環境 DNA 調査・実験マニュアル

Ver. 3.0（2024 年 8 月 9 日発行）

一般社団法人環境 DNA 学会

目次

1. はじめに

本マニュアルは環境 DNA 分析手法の普及と標準化を目的として作成された。ここに記された内容は 2024 年（令和 6）年 8 月現在の最新情報であるが、環境 DNA 分析技術は日進月歩のため、常に最新のマニュアル（本マニュアルのアップデート版）を参照することが重要となる。最新のマニュアルは環境 DNA 学会の web ページ（http://ednasociety.org/）からダウンロードできる。

本マニュアルの改訂は、2019 年 4 月の V2.1、2020 年 4 月の V2.2 に続く 3 回目の改訂となる。この間、環境 DNA はさまざまな場面で使われるようになるとともに、個々の研究者らが使う現場の実情に応じた工夫や改善が行われてきた。今回のマニュアル改定では、マニュアルの初版時に記載した手法をベースに更新するとともに、本文中に書ききれない部分についてはコラム等を用いて紹介している。例えば、ろ過による DNA の濃縮および抽出法の部分では、カートリッジフィルターを用いたろ過方法として、マニュアル初版より掲載しているシリンジとアスピレーターを用いた現場濾過について現在の知見に基づいた更新した。

環境 DNA 分析は一般的に採水、濾過による環境 DNA の濃縮および抽出、分子生物学的な検出実験といった流れで行われる。環境 DNA 検出のための分子生物学的な実験手法としては、リアルタイム PCR を用いた種特異的な「単一種検出法」と、環境 DNA メタバーコーディング手法と呼ばれる特定の分類群（例えば魚類）の次世代シーケンサーを用いた超並列的な「多種同時検出法」がよく用いられる。単一種検出法では特定の対象種を精度良く安価に検出できると考えられる一方で、対象種ごとに検出系を設計する必要がある。多種同時検出法では単一種検出法に比べると手間と費用がかかるものの、多種の情報をまとめて得られるという利点がある。このように、単一種検出法と多種同時検出法は相互補完的に用いられる技術である。本マニュアルでは、単一種検出法に関する一般的な事項を記述するとともに、MiFish プライマーを用いた魚類の網羅的検出法に関する具体的な分析法について詳細に記述している。さらに、今回の改定では、多くの会員から要望が寄せられていた環境 DNA メタバーコーディングデータ解析について、新たな項目を立ち上げ、詳述している。書面の関係上、本文中で紹介仕切れない部分については、付録として紹介している。

なお、本マニュアルには標準的な手法を記載するとともに、新しい技術を紹介しているが、紙面や公開のタイミングの関係で、本マニュアルで取り上げていない技術も多数存在する。本マニュアルは、こうした技術を否定するものではなく、また各分析者による DNA 検出感度の改善や手間の削減などを目的とした工夫を妨げるものではない。

環境 DNA 分析全体の注意事項

環境 DNA 分析は、環境中の極微量な対象 DNA をポリメラーゼ連鎖反応（PCR）で分析可能な量に増幅して検出・定量する技術である。そのため、組織サンプルに由来する DNA や PCR によって得られた増幅産物のような高濃度の DNA によるコンタミネーション（汚染）は結果に取り返しのつかない影響を及ぼすことが多々ある。確度の高い環境 DNA 分析の実施は、コンタミネーションとの戦いであると言ってもよい。そのために、以下のような点に特に注意する必要がある。

1) 実験環境の整備：環境サンプルのような「薄い」DNA を扱う部屋と、PCR 産物のような「濃い」DNA を扱う部屋を物理的に隔離することが重要である。また、実験実施日において作業者は「薄い」DNA を扱う部屋から「濃い」DNA を扱う部屋へと一方通行で作業を行うことを厳守することや、空調設備も含めた実験室間の空気の流れにも気を付けるなど、コンタミネーションの危険性を可能な限り低減するべきである。

2) DNA フリー器具の使用：実験に使う器機は未使用の新品、または残留 DNA を除染したものを用いる。除染には次亜塩素酸ナトリウム溶液（例えば、0.1%濃度）への浸漬が有効であるが、繰り返し使用する中で金属の腐食やプラスチックの劣化などを引き起こす。こうした劣化を引き起こさない DNA 除染試薬が、各種メーカーより販売されており、ウェットティッシュタイプもある。チューブラックのような周辺器具については、紫外線照射による除染も有効であるが、陰になって UV が当たらない場所が生じないよう注意が必要である。

3) 使い捨て手袋の着用：作業時に触れるあらゆるものからコンタミネーションの危険性があるため、清浄な表面を保つために使い捨て手袋（医療用ゴム手袋やビニール製の手袋など）を着用する必要がある。野外サンプルの採取時には、地点間のサンプルのコンタミネーションを防ぐため、採取地点ごとに新品の手袋を使用する。その後の DNA 測定

までの全工程にわたって常に手袋を着用し、自らの DNA あるいは手についた食品等に由来する DNA によるコンタミネーションを防ぐ。いずれの作業においても、作業中に手袋にサンプルや試薬等が付着したときにはこまめに交換する。

4) フィルターチップの使用 : マイクロピペットを介したコンタミネーションを防ぐために、フィルター付きチップの使用が必須である。

5) DNA 低吸着製品の使用 : DNA は通常のプラスチック製品に吸着する性質があるため、可能であれば全工程、特に抽出時の極低濃度環境 DNA 溶液の取り扱いには DNA 低吸着規格のマイクロチューブ（例えば Eppendorf 社の DNA LoBind Tube など）などの製品を使用することを推奨する。

6) 部屋や機器の除染 : マイクロピペットなどの実験器具、遠心機などの機器類を介したコンタミネーションがありうるので、定期的な（できれば実験日ごとに）除染を行うことを推奨する。また、器具類についてはその後汚染されないよう、除染済みの密閉できる清浄な容器に収納することを推奨する。また、空気を介したコンタミネーションもありうるので、実験室全体の定期的な掃除や空気清浄機の設置、作業内容に応じたクリーンベンチの使用も重要である。

本マニュアルに関わる権利と責任の所属について

本マニュアルは一般社団法人環境 DNA 学会の標準化委員会委員および環境 DNA 技術の専門家が参集して作成した。本マニュアルの著作権は一般社団法人環境 DNA 学会に、記載内容に関する責任は、環境 DNA 学会および環境 DNA 技術標準化委員会にある。

環境 DNA 技術標準化委員会（括弧内は担当内容）

委員長	高原　輝彦	島根大学生物資源科学部（全体の編集、および、査読）
委員	近藤　倫生	東北大学大学院生命科学研究科（査読）
（五十音順）	清野　聡子	九州大学大学院工学研究院（2-1 項、2-3 項の執筆）
	土居　秀幸	京都大学大学院情報学研究科（全体の編集、および、査読）
	中村　圭吾	土木研究所水環境研究グループ（査読）
	源　　利文	神戸大学大学院人間発達環境学研究科（全体の編集、1 章、2-2 項、3-1 項、4-2 項、5-1 項の執筆、および、査読）
	宮　　正樹	千葉県立中央博物館（3-1 項、4-1 項、5-2-1～5-2-3 項の執筆）
	村岡　敬子	土木研究所水環境研究グループ（全体の編集、2-1～2-3 項の改訂、および、査読）
	山川　央	公益財団法人かずさ DNA 研究所ゲノム事業推進部（全体の編集、5-2-1～5-2-3 項の改訂、および、査読）
	山中　裕樹	龍谷大学先端理工学部（全体の編集、および、査読）
委員外執筆者	岩崎　渉	東京大学大学院新領域創成科学研究科（5-2-4-1 項の執筆）
（五十音順）	佐土　哲也	千葉県立中央博物館（3-1 項、4-1 項、5-2-1～5-2-3 項の執筆）
	田辺　晶史	東北大学大学院生命科学研究科（5-2-4-2 項の執筆）
	朱　　涛	東京大学大学院新領域創成科学研究科（5-2-4-1 項の執筆）
	山本　哲史	農業・食品産業技術総合研究機構 農業環境研究部門（査読）

なお、本マニュアルは環境 DNA 学会の資金により作成された。本委員会は本文の作成について独立した権限を有する。

2. 調査地点の選定

全般的な注意事項

環境 DNA による生物情報は、採水地点につながる水域に由来する組織片等の DNA を含む物質により得られる。そのため、上流側の環境にも着目しながら、研究目的に応じたサンプルが得られる調査地点を設定する必要がある。一方、環境 DNA のサンプル中には、そこにつながる水域に生息する生物由来の DNA 以外にも様々な DNA が含まれている可能性がある。その発生源は、魚市場や水産加工場、養殖・畜養場のような水産施設、店舗や家庭から排出される汚水、農業で使用される飼料や肥料などさまざまである。これらは、河川や水路から遠い地域からも合流してくる場合がある。一般的に環境 DNA の影響が及ぶ範囲は、河川では数百メートルとされるが、発生源からの混入量（濃度×水量）が多い場合には影響はさらに広範囲に及ぶ可能性がある。人間活動の影響を完全に排除することは難しいが、得られたデータを解釈する上で、周辺にどのような施設があるのかあらかじめ把握しておくとともに、可能であればその影響を受けにくい採水地点を設定することが望ましい。例えば、下水処理施設等を始めとする汚水処理施設や用排水路からの流れ込みがある場合、流れが合流するエリアを極力避けるとともに、合流部よりも上流側に、流路幅が大きい地点では対岸に調査地点を設けることで、これらの影響を小さくすることが期待できる。また、サンプリング時にこれら施設等から流れ込む水を合わせて採取・分析し、混入しうる生物種を把握することも結果を解釈する上で役に立つと考えられる。調査地点の選定の際、商業施設や市街地、住宅地は、予め地図や、国土地理院や民間のウェブサイトなどの空中写真からも判別できることが多い。また現地についてからも目視で判断が可能である。

一方、地図や現地の概観的な目視では検出できない施設も要注意である。排水口は堤防下や護岸壁に開口しているため、作業従事者が立っている岸側から見えないことも多い。採水前に水際を歩きながらその存在の有無を確認する。

また、海面や陸上での養殖や蓄養の施設の付近も避けるべきである。そこで飼育している魚類などのDNAを含んだ排水が水域に直接放出されている場合が多い。こうした施設からは、濃度の高い DNA が連続的に放出されていることもあり、影響が広範囲に及ぶ場合もある。また、養殖、養魚施設で用いられている餌や、釣り人らが用いる撒き餌は地域外で採取された魚類のミンチなどを含む場合も多いため、その水域に生息しない生物の DNA を検出してしまう可能性がある。

調査に際しては地域住民、水域を利活用している人や施設への配慮が必要である。私有地や民有地、空港や発電所等の公共施設を避けて採水地点を設定する。調査地点や作業内容によ

っては、事前の許可申請が必要な区域もある。船舶や水上バイクといった水面を往来する他者との衝突回避や、釣り人や水辺利用者への配慮なども重要である。地点や作業内容によっては許可申請などを要する場合もあるため、事前に管理者（場合によっては所有者）と連絡をとって、各種の許認可について確認する。

コラム１　サンプル中に混入する DNA：環境 DNA のサンプル中には、そこにいた生物以外にも、人間活動に伴う様々な DNA が混入する。本文中にも記載した汚水処理設備からの排水、農地の用排水、養殖・養魚施設、魚市場などの他にも、屋外の焚火跡やゴミ箱、犬・猫、鶏などの糞に含まれる DNA が雨天時等に調査地点に流れ込む可能性もある。自身が調査に用いている漁具や衣類からも混入するかもしれない。人間活動だけでなく、野生動物の糞などに由来する可能性もある。微量な DNA を扱う環境 DNA 分析では、そこにいた生物以外の DNA のサンプルの混入とその影響を完全に防ぐことは困難であるため、分析で得られた生物リストをそのまま使うのではなく、その種がその環境にいることへの妥当性を考え精査することが重要である。その際、異なる時期や近傍のデータも参考になることもある。近年では DNA よりも分解が早いとされる環境 RNA に関する研究も進んでいる。新しい分析技術により、環境 DNA の由来等を評価できるようになることに期待したい。

コラム２　河川下流域・海域における調査前に：港上では、港内における船舶交通の安全等を図ることを目的とした港則法や東京湾等の船舶の交通量が多い海域における船舶交通の安全を図ることを目的とした海上交通安全法等により交通ルールが定められており、採水や採泥の作業を行う際には、許可を受ける必要がある場合がある。港則法では、法第二条で定める港の港内又は港の境界附近で工事又は作業をしようとする者は、海上保安庁（港長又は海上保安部長等）の許可を受けなければならないことが定められており、許可にあたっては船舶交通の安全のための措置を講じる必要がある。海上交通安全法では、航路又はその周辺の海域において工事又は作業をする場合は海上保安庁の許可を受けなければならず、航路及びその周辺の海域以外の海域において工事又は作業をする場合は海上保安庁に届出なければならないと定められており、許可等にあっては、港則法と同様に船舶交通の安全のための措置を講じる必要がある。これらの工事又は作業について、法の対象となる区域では、船舶を用いた採水だけでなく、橋梁や河岸からの採水作業なども対象となる場合があることから、調査計画時に調査地点や作業内容がこれら法令の対象となるか確認し、必要な場合は申請等を行う。なお、港則法及び海上交通安全法の適用区域内における作業であっても、場所や内容によっては、許可や届出までを要しない場合もあることから、事前に作業をしようとする場所にある海上保安部署に相談するとよい。

2-1. 河川における調査地点の選定

河川では環境 DNA が生物分布を反映する距離は、発生源の DNA 量や形態にもよるが数百 m 程度と見積もられている。そのため、調査地において数百 m おきに調査地点を設定することが理想的であるものの、それだけの労力を割くことができない場合も多い。周辺や上流側のハビタット環境などを踏まえながら、予算規模や目的に応じて適宜調整する必要がある。

河川の合流点付近においては、合流点の上流側で採水を行うとそれぞれの支流における分布を理解する助けとなる。

河川での調査地点の設定時の留意点をあげる。環境 DNA の分布や流れによる拡散は、さまざまなスケールの地形に影響されるため、マイクロハビタットというスケールでの留意が必要である。また、調査地点の周辺環境もふくめた写真記録も重要である。

1) 河道地形：ハビタットの重要な構成要素である流れや土砂の堆積状況は、河道地形（形状）の影響を受ける。河川の蛇行部では、カーブの外側では流速が速く、河岸は侵食的であり、淵が形成され、河畔林の木々がオーバーハングする。カーブの内側は流速が遅く、堆砂することで砂州の形成が進み、植生が定着しやすい。その結果、カーブの左右岸で水深や河床材料などが異なる微地形が形成され、それに応じた生態系が存在することとなる。河川の規模等によっては片岸の採水だけではそのエリアの生物相を捉えきれない場合もある。また、調査地点を距離で河口から○○km 地点と設定した場合、直線距離なのか、蛇行を含む流程に沿った距離なのかなども考慮すべきである。国土交通省が管理する河川区間の左右の堤防上には、河川管理のために川の中心を基準に、堤防上に河川距離標が設置されている。

2) 河川の流れ：調査対象とする水域の流れが到達する地点への採水地点の設定を意識する。河川の流速や流向は、同じ断面内であっても一様ではない。中心部を直線的に流れる流心、止水域、渦流発生域とでは、物質のトラップの状態が異なり、それに応じて水質や生物も異なる。ある地点から放出された環境 DNA は、流速に応じて拡散距離が異なるとともに、流れが緩やかな領域では沈降等により十分拡散されない場合もある。河川の合流部付近では、合流部の上流側それぞれで調査することで、それぞれの支流の分布を知る助けとなる。

3) 河岸構造：上述のとおり蛇行部の植生は左右岸でも状況が異なる。例えば葦原などの河岸植生の中は小型の遊泳魚や幼魚の良好なハビタットとなっている。河岸の水際部に護

岸が設置されている場合は、その構造に着目する必要がある。石組や環境配慮型のブロックによる護岸の場合、護岸の隙間などを生物が利用することができる。さらに、ブロックの背後からの透水性が保たれ、地下水や湧水が河川に流れ込むことで、低水温を好む種のマイクロハビタットが形成されている場合もある。

4) 河床の底質：地表を流れる河川の水の一部は、河床の中に浸透して流れ、浸透のしやすさは河床の底質（岩、礫、砂、粘土等の河床材料）により異なる。伏流水と呼ばれるこの流れは、礫間のろ過により地表を流れる河川水と比べて水質が良好で、濁りが少ない。例えば、サケ類は、伏流水が噴出する場所を利用して産卵する。伏流水では、環境 DNA を含む物質も濾過され減少することから、調査地点としては地表を流れる水を捉えることができる地点を選ぶ必要がある。一方、河床材料が粘土など細粒分の多い箇所では採水時に底質の巻き上げが生じやすく、濾過時間や分析結果にも影響を及ぼす可能性がある。採水時の対応が難しい場合（例えば採水器を用いた橋梁上からの採水が必要な地点や水深が浅い場所など）には、採水地点を少しずらすなどの対応が必要である。

5) 物理場の人為的な変化：河道内の物理的な環境は、出水等による自然的な攪乱だけでなく、河道整備、橋梁工事、堰堤の新設や改築、浚渫や砂利採取などさまざまな人為的な影響を受けることがある。また、農業用取水設備下流における灌漑期と非灌漑期、用水発電に伴う夜間と昼間のように、水利用に伴い流況が変化する場合もある。調査目的に応じて、このような影響を受けにくい地点を選ぶことも重要である。また、河道の工事等が行われている期間では、現場への立ち入り制限や、濁りの発生などの影響を受ける可能性もある。計画されている事業については、河川整備計画などで確認することが可能である。

6) 河口域・汽水域・河川感潮域：汽水域では、同じ地点でも、潮汐により河川水と海水の混合の状態や、流向・流速が時々刻々変化し、水中に含まれる環境 DNA の量や組成もまた変化する。気象庁の公表する潮位表を参考に、調査目的に応じた調査時刻を設定する。採水時に、採水地点の位置情報に加え、潮汐の影響を判断するために、採水時間、表層の流向、採水した水深（表層・中層・底層など）も記載することが望ましい。塩水遡上範囲や混合のパターンは、河床勾配や河川流量、河口が面する海域の潮位変化の程度や河川の水温等により変化する。異なるハビタットが面的に分布し、かつ流れが経時的にも変化する水域における採水地点および採水タイミングの設定にあたっては、これらの条件を考慮する必要である。

2-2. 池や湖沼等における調査地点の選定

その水域を代表する水サンプルを取ることに留意すべきである。小規模な定形の池の場合、どこで採水しても検出率に大きな違いはないと考えられる。任意の地点で、アクセスしやすい岸際から表層水を採取する。複雑な形状をした、あるいは規模の大きな池や湖沼の場合の適切な採水数については知見が不足しているが、できるだけ複数地点で採水することが望ましい。岸の構造や底質の影響、人為改変の影響などについては河川の場合と同様の注意が必要である。

ダム湖内では湖岸帯の浅場はもともとの地形がダムの水面付近にある場所に限られ、その周辺の水面下は、急峻な岩盤が形成されることが多い。そのため、水際の植生帯はダム湖内では非連続的に分布し、植生帯を利用する生物で移動範囲が小さい生物の環境 DNA の分布も植生帯の分布域の影響を受ける。さらに、河川に比べ湖内の流速は小さく、水深も大きいため、環境 DNA が拡散しにくい状況がある。ダム湖の湖岸部よりも、上流河川が湖内に流入する付近では, 湖岸部よりも広い浅場が形成されており、魚類では、河川流入部付近は捕獲される種数・個体数ともに湖岸部より多く、環境 DNA でも多くの種が検出される可能性が高い。ダム湖では、出水後もしばらく微細な粒子が浮遊し、これが PCR 阻害要因となる可能性があることにも留意が必要である。

農業用水路で調査を行う場合にはつぎの点に注意する。下流からのポンプアップや他の地域からのパイプラインによる送水などがありうるため、水がどこからきているのかを確認する。また、灌漑期に水があり、非灌漑期に水がなくなるなど、季節によって水量が異なる場合がある。さらにコンクリート水路は滑りやすく、水の流れも速い場合があるので、事故が起きないよう注意する。水路は土地改良区等の団体によって管理されていることから、トラブルを回避するため、調査する場合には了解を得る必要がある。水田や畑からの排水が混ざるので、PCR 阻害要因を含む可能性があることにも留意が必要である。

2-3. 海岸における調査地点の選定

沿岸域の流れは、地形、波浪、風向き、潮位などさまざまな要素の影響を受ける。また、沿岸域のハビタットもさまざまなスケールの地形に影響されるため、環境 DNA の拡散は沿岸域の流動、および、マイクロハビタットの分布に留意が必要である。また、事後の確認のためにも、調査地点の周辺環境もふくめた写真記録が重要である。以下に海岸での調査地点の設定時の留意点をあげる。

1) 海岸地形と底質：海岸地形により汀線付近の波浪条件が異なり、水際での底質の粒径や

波による巻き上がりが異なる。また、バケツなどの採水器が底質に接触し、巻き上がった砂や泥がサンプル中に混入すると濾過作業の効率やサンプルの質に影響するため、水深や河床材料を確認して巻き上げの少ない場所を選ぶことが望ましい。

① 磯や岩場：波による底質の巻き上げが少ないために採水しやすい。波浪が高く、足元が滑りやすいため、落失を防ぐ安全管理がことさら重要になる。

② 砂浜：アクセスは比較的容易だが、汀線（波打際）付近は常に底質を巻き上げているために砂が混入しやすい。

③ 干潟：底質が潮汐により水塊が常時広範囲に移動するために濁水である場合が多い。また、河口や一次生産の高い海域であると、植物プランクトンや懸濁物などが多く含まれているため、採水後の濾過の作業効率が低下し濾過水量が減少することが懸念される。

2) 沿岸流と水質：沿岸流は、沿岸地形により流向流速が一様ではない。波浪に曝される磯や砂浜中心部、岬や構造物の周辺の止水域や渦流発生域とでは、水中に存在する物質のトラップの状態が異なり、それに応じて水質や生物相も異なる。ある地点から放出された環境 DNA は、流速に応じて拡散距離が異なると考えられる。沿岸では、潮汐の影響で水塊が移動、停滞する。河川淡水域のように一方向に流下・拡散するのではないことに注意が必要となる。また出水による淡水の影響、停滞の持続、濁度の上昇などの影響にも注意を払う必要がある。

3) 海岸生態系構造：海岸の調査地点における周辺の生態系の状態の把握が重要である。特に海藻・海草の藻場は水生生物が高密度で生息する。これらの繁茂状況は、潜水調査、衛星画像判読で行うことができる。

① 海岸植生は、背後地の環境が、砂浜、砂丘、崖、人工空間（工業用地、市街地、住宅地）により異なる。調査地点付近の広域的な状態の把握は空中写真判読で行える。

② 護岸や堤防などの人工構造物の場合は、自然のハビタットの改変の度合いに着目する必要がある。特に、コンクリートで隙間なく固めた護岸の場合には、背後地からの地下水の浸出や間隙生物の生息地が失われている。

③ 石やブロックを積み上げた護岸の場合、隙間の透水性も着目すべき点である。コン

クリートなどで隙間を埋めると、透水性や地下水湧出を前提としたマイクロハビタットが破壊される。堤防の場合も、材料が過去から積まれた粘土か、地中に基礎部分を打設したコンクリートかで透水性が異なる。

4) 物理場の人為的な変化：浚渫や港湾開発事業、埋め立て地の造成や護岸工事、消波ブロックや魚種ブロックの設置などにより物理環境が人為的に変化する場合がある。改変の規模、継続性など、影響の時空間スケールの把握が必要である。採水時に周辺の環境の記録や写真撮影を行うことで、事後の確認や考察に役立つ。

① 埋め立て工事では、水域自体が消滅するため、モニタリング地点の変更を余儀なくされる場合もある。また、防波堤、突堤など、海中に突き出す構造物では、周辺の流向流速への影響があるため、予め地図で、また、現地で確認する必要がある。このような構造物は、現地に赴いたときに工事が始まっている場合もある。工事の予定は海岸・港湾・漁港管理者に事前に確認は可能である。

② 航路などの海底掘削では、ハビタットの地形や底質、植生が大きく改変される。特に砂州の除去では、潜砂性魚類のハビタットごと消滅する。

③ 工事の最中には、濁水が発生する。濁度が上昇すると、採水後の濾過作業に影響する。

5) 人工構造物（護岸、堤防、防波堤など）：消波や構造維持のための施設は種々あるが、構造物の材料と、岸との距離により留意する必要がある。岸との距離では、構造物の水中にある根固め、水面付近の消波、沖で波浪を軽減する離岸堤がある。材質としてはコンクリート・ブロックと自然石がある。自然海岸の岩礁と微地形と異なる点は、隙間が多く、時折、透過性が高い点である。打ち寄せた波による水塊がフィルターされる状態となる。離岸堤は沖の小島のような存在である。そのため局所的に岩礁生態系に近い環境が形成される。

3. 採水および濾過

採水の季節

採水の季節について、冬場には環境 DNA の検出率が下がることが報告されているので、採水調査は春～秋に行うと検出率が向上する可能性がある。一方で、季節移動など対象生物種の生態によっては検出しやすい季節や場所があると考えられるので、対象生物の生態情報を把握しておくことは重要である。また、体外受精の生物の場合は繁殖期に環境 DNA 量が著しく増加する。したがって、種特異的検出では対象生物の繁殖期の方が環境 DNA の検出率が高くなることが期待される一方で、網羅的検出では環境 DNA 量が低い他種の検出率を下げるおそれがある。このため、対象生物の繁殖期などに関しては各手法の特徴に応じて検討することが望ましい。また、赤潮やアオコなどの影響で採水サンプル中に高濃度の PCR 阻害物質が混入する場合があるので、このような時期を避けることが望ましい。

安全に採水を行うために

環境 DNA のサンプリング（＝採水）は、季節や場所によってさまざまな環境下で行うことになる。夏には熱中症や日焼け対策が、冬には防寒対策が必要となり、磯や濡れた突堤、貯水池の護岸などでは転倒や落水に注意しなくてはならない。また、水際の作業であるために濡れてもよい撥水性や速乾性の高い衣類を着用することも重要である。フィールドでの調査・作業は不測の事態に備えて原則として複数名で行う。さらに、特に海岸や大規模な河川においては安全を確保するためライフジャケットの着用は必須である。万が一、水難事故が起きてしまった場合は、川や池であれば警察へ 110 番に、海であれば海上保安庁のホットライン 118 番に速やかに通報する。

器材、材料、物資の調達（特に保冷）

調査の器材や物資などの現地調達はできる限り避ける。沿岸部の人口が少ない地域は、コンビニエンスストアやホームセンターがほとんど無く、品揃えが悪い場合も多い。「氷」が必要な場合は、スーパーマーケット、釣具店、鮮魚店、コンビニエンスストアで調達することになる。このような施設は、魚介類を販売しているため、氷の袋などへの付着などコンタミネーションには十分注意する。瞬間保冷剤の準備があると安心である。宿泊を伴う現地調査において「保冷材」を保冷・冷凍するために宿泊施設の冷蔵庫や冷凍庫を利用する際には、保冷材が汚染されないようにビニール袋などで覆う必要がある。冷凍のためにドライアイスを用いることもできる。

濾過手法について

水サンプルの濾過については現場で行う場合と、実験室に持ち帰って行う場合がある。濾過に用いるフィルターには、グラスファイバーフィルターやメンブレンフィルターなどがあり、現地等で使いやすいように密閉する容器や、あらかじめ容器に収められたもの（カートリッジ式フィルター）もある。ここでは、採水後現場でカートリッジ式フィルターを用いて濾過する手法（3-1）と実験室に持ち帰ってからグラスファイバーフィルターで濾過する手法（3-2）について述べる。

3-1．採水とカートリッジ式フィルターを用いた現場濾過

安全に採水を行うために（再掲）

環境 DNA のサンプリング（＝採水）は、季節や場所によってさまざまな環境下で行うことになる。夏には熱中症や日焼け対策が、冬には防寒対策が必要となり、磯や濡れた突堤、貯水池の護岸などでは転倒や落水に注意しなくてはならない。また、水際の作業であるために濡れてもよい撥水性や速乾性の高い衣類を着用することも重要である。フィールドでの調査・作業は不測の事態に備えて原則として複数名で行う。さらに、特に海岸や大規模な河川においては安全を確保するためライフジャケットの着用は必須である。万が一、水難事故が起きてしまった場合は、川や池であれば警察へ 110 番に、海であれば海上保安庁のホットライン 118 番に速やかに通報する。

フィールドデータの記録に必要な道具（例）

- 耐水性野帳（測量野帳レベルブックセ-Y11，コクヨ）
- 耐水加圧ボールペン（BDWR-40F-B，パイロット）あるいは鉛筆
- ハンドヘルド GPS（eTrex20xJ，ガーミン）
- データロガー導電率計（CD-4307SD，マザーツール）
- 防水デジタルカメラ（RICOH WG-30，リコー）

シリンジを用いた現場濾過に必要な道具（例）

- カートリッジ式フィルター（ステリベクス，孔径 0.45μm，SVHV010RS，メルクミリポア）
- 50mL ロックタイプシリンジ（SS-50LZ，テルモ）
- ルアーフィッティング（注入口用, VRMP6，アイシス）
- ルアーフィッティング（排出口用, VRSP6，アイシス）
- バケツ（Soft Bucket 8 型 I-484，ISETO など）
- ロープ（クレモナ金剛打ロープ直径 6mm，ユタカメイク）
- 使い捨て手袋（パウダーフリー）
- 実験用ペーパータオル（キムタオル，日本製紙クレシア）
- 組織用 RNA 安定化溶液（RNAlater，サーモフィッシャー）
- 小型スポイト（E-243，日本メディカルサイエンス）
- 2.0mL チューブ（DNA 低吸着；ザルスタット）
- 医療施設用泡洗浄ハイター1000 400mL（花王）

・ 精製水（精製水 P ワンタッチ式キャップ 500mL，健栄製薬など）
・ チャック付ポリ袋 140mm × 200mm（ユニパック G-8，生産日本社）
・ チャック付ポリ袋 100mm × 140mm（ユニパック E-4，生産日本社）
・ チャック付ポリ袋 17.7cm × 20.3cm（ジップロックイージージッパーM，SC ジョンソン/旭化成ホームプロダクツ）
・ カウンター（数取器）
・ 筆記具（サインペン）（MO-150-MCBK3，ゼブラ）
・ クーラー（ハイパー氷点下クーラーM，ロゴス）
・ 保冷剤（倍速凍結・氷点下パック M，ロゴス）
・ 保冷袋 S サイズ（保冷平袋 S，モロフジ）

アスピレーターを用いた現場濾過に必要な道具（例）

・ カートリッジ式フィルター（ステリベクス，孔径 0.45μm，SVHV010RS，メルクミリポア）
・ ルアーフィッティング（注入口用，VRMP6，アイシス）
・ ルアーフィッティング（排出口用，VRSP6，アイシス）
・ 手提げ平角瓶コック付ポリタンク 10L（1-2169-01，アズワン）
・ epTIPS スタンダード 1～10mL（30000765，エッペンドルフ）
・ ルアーフィッティング オスルアーロック 4.0mm（VPRM406，アイシス）
・ ルアーフィッティング メステーパー5.0mm（VRF506，アイシス）
・ 排気用ゴム管（6-590-01，アズワン）
・ チューブ I 型ジョイント（6-663-02，アズワン）
・ 穴付きシリコン栓（1-7650-07，アズワン）
・ アスピレーター（GAS-1，アズワン）
・ フィルターホルダーマニホルド（2-258-01，アズワン）
・ 使い捨て手袋（パウダーフリー）
・ 液体塩素系漂白剤（病院用ハイター，花王）※1

※1 使用期限（塩素濃度の変化など）に問題がないことを使用前に確認する。

3-1-1. フィールドデータの記録

野帳に記入する主な項目として以下のようなものがあげられる。これらは調査の目的などに応じて加減してよい。耐水性の野帳への記録には耐水性のボールペンや鉛筆、シャーペンで記録するとよい。

・採水者（サンプリングに同行した全員の名前を記録）
・日付（YYYY-MM-DD の形式で記録、必要に応じて時間も記録する方が望ましい）
・測点番号と採水地点の地名（プロジェクト略称＋調査番号＋測点番号）
・緯度経度（35.101252N, 139.293012E のような 10 進法が取り扱いやすい）
・河岸・湖岸・海岸・底質の分類：砂浜・砂利浜・岩礁・サンゴ・護岸（コンクリート・テトラ・捨て石など）
・気象・海象（風向・風力・波高を含む）
・水温（℃）：携帯用の水質計を用いて計測する。
・（海～河川感潮域では）潮汐（大潮・中潮・小潮・若潮・長潮）と干満（満潮・干潮・上げ潮・下げ潮）
・（海～河川感潮域では）塩分濃度（‰）：携帯用の水質計を用いて計測する。
・透明度（透明・ササ濁り・濁り）
・河川で行う場合、わかる場合はダムや発電所の放流量も記録する。
・濾過水量（mL）：必ず記入すること。
・目視の範囲内で魚影やその他の生物：抽出した環境 DNA には魚類以外の生物が含まれているので、クラゲやその他の目立つ生物に関する記録が後々に重要となる。
・写真（撮影の有無）
・その他：環境水に影響を与えそうなものの記録（釣り人の有無；排水や流れ込みの有無；周囲の水田地域の水管理状況など）

3-1-2. 採水およびシリンジを用いた現場濾過

本項では、シリンジにステリベクスを装填して行う現場濾過法について記す。常に使い捨て手袋を着用し、クロスコンタミネーション防止のため採水地点ごとに取り替える。ここではバケツで採水するケースを説明するが、直接ボトルを用いた採水や、シリンジを用いた直接採水を行ってもよい。

1） 濾過キットの作成：例えば 1 採水地点で 2 本のステリベクスを用いて濾過を行う場合（最大 1L x 2 本 ＝ 2L）、2 組を 1 セットとしてキットを作成する。ユニパック G-8 を用意し、その中に、ステリベクス 2 本とシリンジ 2 本を入れる。さらに、RNAlater が入った 2.0mL チューブ 2 本と小型スポイト 2 本を小さなユニパック（E-4）にまとめて入れておく。これに、ステリベクスの注入孔と排出孔を閉じるためのルアーフィッティングを 2 個ずつユニパック E-4 にまとめて入れる。さらに、濾過後のステリベクス 2 本を入れるユニパック E-4 を 1 枚キットに入れる（図 3-1-2-1, 2）。

2） 採水道具の作成：突堤や防波堤、護岸など水面よりも高い所から採水するため、ロープを 15m ほど切り出しバケツにしっかりと結びつける。Soft Bucket 8 型 I-484 を

使用する場合は、取手が抜けることがあるため、本体縁にある穴と取手の2箇所にロープを結びつける（図 3-1-2-3）。

3） バケツの除染：バケツの内部とバケツにくくりつけたロープ先端部に泡洗浄ハイターを吹き付ける（図 3-1-2-4）。数分間放置した後、ハイターを実験用ペーパータオルなどできれいに拭き取る（図 3-1-2-5）。その後、バケツとロープ先端を環境水で2回共洗いする。ハイターによる洗浄が不十分だとクロスコンタミネーションの恐れがあり、共洗いが不十分でハイターが余分に残っているとサンプル中の DNA が分解されるので注意すること。

4） バケツ採水：ロープの末端を岩や橋の欄干などに結びつけバケツの逸失を防ぐ。バケツを投げ（図 3-1-2-6）、ロープを手繰り寄せて環境水の入ったバケツを回収する（図 3-1-2-7）。データのばらつきを防ぐため、1 回のサンプリングで 10 回のバケツ採水を行いその都度シリンジを用いて 100mL の環境水を濾過する。この操作でシリンジ 1 本あたり1L の水を濾過することになる。ただし、環境水の濁度が高い場合は数 100mL で目詰まりが起こり、それ以上濾過できなくなることがある。そのような場合は、それまでの濾過水量を記録しておくことが重要になる。

5） ステリベクスを用いた現場濾過：バケツに汲んだ環境水を 50mL シリンジで吸引する（図 3-1-2-8）。シリンジには 50mL よりも多めに環境水を吸引させ、シリンジを上向きにしてシリンジ内の空気や余分の水を押し出す。環境水の量を 50mL に調整したらステリベクスを装着して加圧濾過を行う（図 3-1-2-9）。ステリベクスとシリンジの着脱を繰り返すので、その際にルアーロックを締め過ぎないように注意する。同じバケツ採水から濾過を2回（50mL x 2 回 ＝ 100mL）繰り返したらバケツの水を捨てる。新たに環境水を汲み上げ、濾過総量が 1L に達するまで、この操作を 10 回繰り返す（シリンジでの濾過作業は合計 20 回となる）。単調な作業のため、カウンター（数取り器）を用いて採水回数を間違えないようにする。

6） ステリベクス内の水分除去：上記の濾過がすべて終了したら、ステリベクスを取り外してシリンジ内に空気を満たす。再度シリンジにステリベクスを取りつけ、カートリッジ内の水分を押し出す（図 3-1-2-10）。この操作を数回繰り返し、水分をできるだけ除去する。

7） ステリベクス排出孔の密閉：ステリベクス内部の水分がほぼなくなったら、ステリベクスをシリンジに取りつけたまま、その排出孔をルアーフィッティングで密閉する（図 3-1-2-11）。

8） RNAlater の充填：ステリベクスをシリンジから取り外し、小型スポイト（図 3-1-2-12）を使って注入孔から RNAlater を 1-2mL 注入する（図 3-1-2-13）。ステリベク

スの注入孔と本体の間に段差があるため、小型スポイトの先端がそれに引っかかるとRNAlater がうまく入らない。段差を避けるように奥まで小型スポイト先端を入れるとスムースに RNAlater を注入できる。なお、Buffer ATL を用いることで収量が上がるとする論文が発表されており（Wu & Minamoto 2023）、そのような手法を用いることもできる。その場合の Bufer ATL の量も 1-2mL 程度で良い。

9） ステリベクス注入孔の密閉：RNAlater をステリベクスに充填したら、注入孔をルアーフィッティングで密閉する（図 3-1-1-14）。ルアーフィッティングを使用する場合は、固く締め過ぎないように注意する。ステリベクス内のフィルター上に集められた DNA の劣化を防ぐために、この作業までを採水現場で行うのが望ましい。

10）必要事項の記入： RNAlater 注入後、ステリベクス表面の水分をキムタオルでよく拭う。水分を取り除いた後、サインペンでステリベクスの本体に日付や測点番号など必要事項を記入する（図 3-1-2-15）。

11）濾過済みステリベクスの保管：必要事項の記入が終わった濾過済みステリベクスをユニパック E-4 に入れる。ステリベクスが入ったユニパックをジップロックに入れ、保冷剤が入ったクーラーボックスに入れて冷暗条件で保管し持ち帰る（図 3-1-2-16）。ラボに持ち帰ったステリベクスは－20℃以下で保存する。

12) ブランクの作成：フィールドブランクは、精製水を用いて上記と同様の作業を行い作成する。フィールドブランクの必要性、頻度については、調査目的などに合わせ各事業主体が慎重に判断する。

3-1-3. アスピレーターを用いた現場濾過

本項では、AC100V の電源がある実験室や船上で大量の水を濾過する場合に有効な方法を記す。濾過には 10L の活栓付きポリタンクを用い、活栓に 10mL のピペットチップを取りつけ、その先端にステリベクスの注入孔をねじ込む。さらに、ステリベクスの排出孔にルアーフィッティングを介してアスピレーターに接続し、吸引濾過により大量の水を濾過する。コンタミ防止のため、常に使い捨て手袋を着用する。

1） ポリタンクの除染： ポリタンクの内部に市販の塩素系漂白剤（ハイター）を入れ、実効塩素濃度 0.1%以上になるように現場海水か水道水を入れて調整する（図 3-1-3-1）。ポリタンクをよく振り、その後に濾過する現場海水で 3 回共洗いして漂白剤を除く。

2） 濾過装置の組み立て：ポリタンクの活栓に 10mL のピペットチップを連結する（図 3-1-3-2）。ステリベクス排出口にルアーフィッティング（オスルアーロック）を装着する（図 3-1-3-3）。ゴム管をチューブ I 型ジョイントとつなぎ、穴付きシリコン栓を取

り付ける（図 3-1-3-4）。フィルターホルダーマニホルドの排出孔とアスピレーターをゴム管でつなぐ（図 3-1-3-5, 6）。フィルターホルダーマニホルドの吸入孔に前述のゴム管を装着する（図 3-1-3-7）。最後にポリタンクとつなげたチップの先端をステリベクス注入孔に強く押し込む（図 3-1-3-8）と大量濾過システムが完成する（図 3-1-3-9, 10）。

3） 濾過：アスピレーターのタンクに水を入れる。除染したバケツなどを使って環境水を採取してポリタンクに入れる。アスピレーターのスイッチを ON にするとポリタンクからアスピレーターに向かって水が流れ、ステリベクスのフィルター上に環境 DNA がトラップされる。事前にポリタンクに 1L ごとにラインを入れていくと、吸引濾過した水の量を確認しやすい。

４） ステリベクス内の水分除去：濾過が終了したら、ステリベクスをピペットチップから取り外し、そのまま吸引濾過を継続すると、ステリベクス内部の水分を除去できる。

5） 濾過後のステリベクスの処理：前項の 7）以降の操作を続けてステリベクスを保管する。

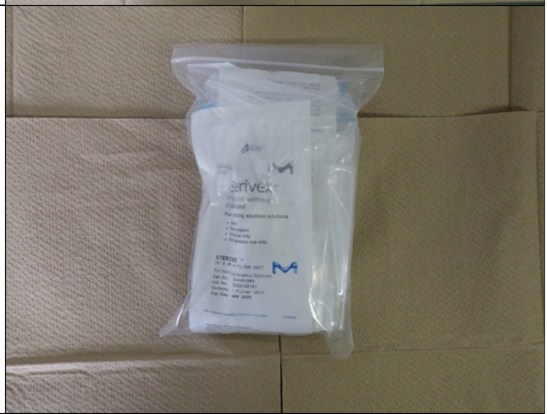
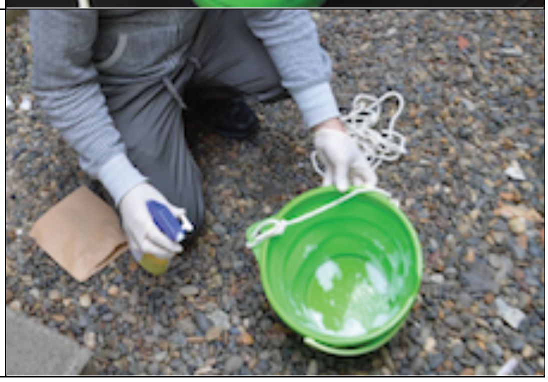
図 3-1-2-1 現場濾過キットの内容：50mL シリンジ 2 本, ステリベクス 2 本, 小型スポイト 2 本, RNAlater が入った 2mL チューブ 2 本, ユニパック（E-4）1 枚, ユニパック（G-8）1 枚。	
図 3-1-2-2 現場濾過キットをユニパック（G-8）に詰めた状態。このように 1 袋にまとめておくと現場での使い勝手がよい。	
図 3-1-2-3 クレモナ金剛打ロープを 15m ほど切り出して折りたたみバケツ（Soft Bucket 8 型 I-484）にしっかりと結びつけたところ。取っ手がとれやすいので、かならずバケツの縁にある小穴にロープの先端をくくりつけておくこと。	
図 3-1-2-4 バケツの内部とバケツにくくりつけたロープ先端部に泡洗浄ハイターを吹き付けて除染する。	

図 3-1-2-5 ハイターを実験用ペーパータオルできれいに拭き取る。きれいに拭き取らないと、採水の際に泡が出て環境水を汚染してしまうので注意すること。	
図 3-1-2-6 バケツを投げたところ。	
図 3-1-2-7 ロープを手繰り寄せて環境水の入ったバケツを回収する。	
図 3-1-2-8 50mL シリンジを用いてバケツで汲んだ環境水を吸引する。	

図 3-1-2-9 ステリベクスを装填して加圧濾過を行う。	
図 3-1-2-10 濾過が終わったら、ステリベクスを取り外してシリンジ内に空気を満たし、シリンジにステリベクスを再装着し、カートリッジ内の水分を押し出す。この操作をカートリッジから水が出なくなるまで数回繰り返す。	
図 3-1-2-11 ステリベクスをシリンジに装着した状態で、排出孔をルアーフィッティングを使って密閉する。	
図 3-1-2-12 小型スポイトをつかい、2.0mL チューブから 2～3 回に分けて RNAlater を吸引する。	

図 3-1-2-13 吸引した RNAlater を注入孔から小型スポイトをつかって注入する。	
図 3-1-2-14 注入孔をルアーフィッティングで密閉する。	
図 3-1-2-15 ステリベクスの表面の水分をキムワイプで拭きとり、サインペンでステリベクスの本体に日付や測点番号など必要事項を記入する。	
図 3-1-2-16 同じ測点から得られた２本のステリベクスをユニパックに入れ、それをさらにジップロックに入れて、保冷剤が入ったクーラーボックスで保管する。	

図 3-1-3-1 ポリタンクの内部に市販の塩素系漂白剤（ハイターなど）を入れ、実効塩素濃度 0.1%以上になるように現場海水か水道水を入れて調整する。その後十分にすすぐ。	
図 3-1-3-2 ポリタンクの活栓の先端に 10mL のピペットチップを押し込む。	
図 3-1-3-3 ステリベクス排出孔にルアーフィッティング（オスルアーロック）を取りつける。	
図 3-1-3-4 ゴム管と穴付きシリコンをチューブ I 型ジョイント（白いジョイント）を介してつなぐ。	

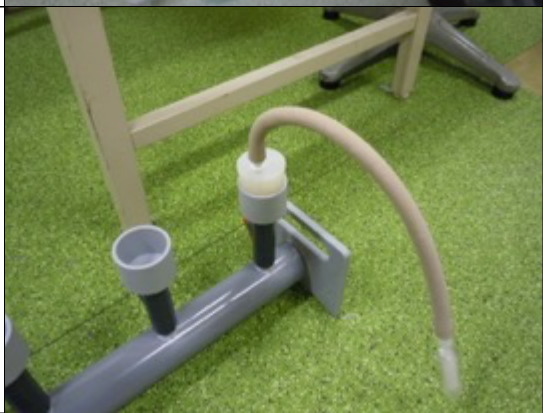
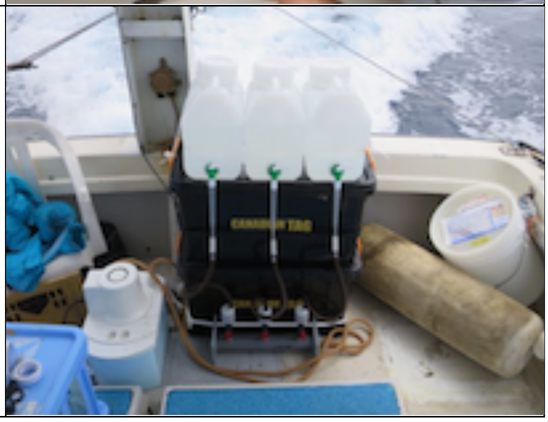
図 3-1-3-5 フィルターホルダーマニホルドの排出孔とゴム管をつなぐ。	
図 3-1-3-6 ゴム管とアスピレーターをつなぐ。	
図 3-1-3-7 フィルターホルダーマニホルドの吸水孔に前述のゴム管を装着する。	
図 3-1-3-8 ポリタンクの活栓に取りつけた 10mL ピペットチップの先端をステリベクス挿入口に強く差し込む。	

図 3-1-3-9 ステリベクスをつかった大量濾過システムの完成。	
図 3-1-3-10 AC100V の電源があれば、写真のように漁船の上でも容易に大量濾過ができる。	

3-2. 採水とグラスファイバーフィルターを用いた実験室での濾過

安全に採水を行うために（再掲）

環境 DNA のサンプリング（＝採水）は、季節や場所によってさまざまな環境下で行うことになる。夏には熱中症や日焼け対策が、冬には防寒対策が必要となり、磯や濡れた突堤、貯水池の護岸などでは転倒や落水に注意しなくてはならない。また、水際の作業であるために濡れてもよい撥水性や速乾性の高い衣類を着用することも重要である。フィールドでの調査・作業は不測の事態に備えて原則として複数名で行う。さらに、特に海岸や大規模な河川においては安全を確保するためライフジャケットの着用は必須である。万が一、水難事故が起きてしまった場合は、川や池であれば警察へ 110 番に、海であれば海上保安庁のホットライン 118 番に速やかに通報する。

フィールドデータの記録に必要な道具（例）

- 耐水性野帳（測量野帳レベルブックセ-Y11，コクヨ）
- 耐水加圧ボールペン（BDWR-40F-B，パイロット）
- ハンドヘルド GPS（eTrex20xJ，ガーミン）
- データロガー導電率計（CD-4307SD，マザーツール）
- 防水デジタルカメラ（RICOH WG-30，リコー）

採水および研究室への輸送に必要な道具（例）

・採水用ボトル（1L 以上：事前に塩素消毒したもの）	サンプル数＋α
・採水用ボトル（1L の純水を入れたもの）	1 日につき 1 本
・10%塩化ベンザルコニウム溶液（1mL ずつに分注したもの）※1	サンプル数＋α
・使い捨て手袋（パウダーフリー）	サンプル数＋α
・採水用バケツおよびロープ	1 式
・スプレー式塩素系漂白剤	1 本
・純水※2	適宜
・ペーパータオル	適宜
・ゴミ袋	適宜
・長靴・胴長等	
・水質計（必要に応じて）	
・マジック、ガムテープ等	

・クーラーボックス
・保冷剤

※1 塩化ベンザルコニウム溶液の使用に関しては特許が取得されており、使用にはロイヤリティが必要になる場合があるため、利用者各自で事前確認が必要である。水サンプルのDNA 分解抑制手法には、塩化ベンザルコニウム溶液の使用のほか、水サンプルを冷蔵・冷凍で保存する方法などがある。
※2 市販の精製水や蒸留水など、PCR 等の検査で DNA 残留が認められない品質の水のことを指す。

グラスファイバーフィルターを用いた実験室での濾過に必要な道具（例）

・フィルターホルダー（事前に塩素消毒したもの[図 3-2-2-1]）	適宜
・アスピレーターまたは真空ポンプ	適宜
・グラスファイバーフィルター（平均孔径 0.7μm）	濾過数の 2 倍
・ピンセット（事前に塩素消毒したもの）	適宜
・アルミホイル	適宜
・チャック袋	適宜
・塩素処理用バケツ	適宜
・塩素系漂白剤	適宜
・純水	適宜
・使い捨て手袋（パウダーフリー）	適宜
・冷凍庫（－20℃以下）	

3-2-1. フィールドデータの記録

野帳に記入する主な項目として以下のようなものがあげられる。耐水性の野帳に耐水性のボールペンあるいは鉛筆、シャープペンシルで記録するとよい。

・採水者（サンプリングに同行した全員の名前を記録）
・日付（YYYY-MM-DD の形式で記録、必要に応じて時間も記録する方が望ましい)
・測点番号と採水地点の地名（プロジェクト略称＋調査番号＋測点番号）
・緯度経度（35.101252N, 139.293012E のような 10 進法が取り扱いやすい）
・河岸・湖岸・海岸・底質の分類：砂浜・砂利浜・岩礁・サンゴ・護岸（コンクリート・テトラ・捨て石など）
・気象・海象（風向・風力・波高を含む）
・水温（℃）：携帯用の水質計を用いて計測する。

・（海では）潮汐（大潮・中潮・小潮・若潮・長潮）と干満（満潮・干潮・上げ潮・下げ潮）
・（海では）塩分濃度（‰）：携帯用の水質計を用いて計測する。
・透明度（透明・ササ濁り・濁り）
・濾過水量（mL）：1000mL 未満の場合には必ず記入すること。
・目視の範囲内で魚影やその他の生物：抽出した環境 DNA には魚類以外の生物が含まれているので、クラゲやその他の目立つ生物に関する記録が後々に重要となる。
・写真（撮影の有無）
・その他：環境水に影響を与えそうなものの記録（釣り人の有無；排水や流れ込みの有無など）

3-2-2. 採水および実験室への輸送

常に使い捨て手袋を着用し、クロスコンタミネーション防止のため採水地点ごとに取り替える。

1) 水辺からの直接採水：直接水辺にアクセスできる場合は、採水ボトル（事前に塩素消毒したものなど, 図 3-2-2-1）を直接水につけて採水を行う。現場の環境水でボトルを 2 回、共洗いした後、サンプルを 1L より少し多めに採取する。コンタミネーション防止のため、共洗いした水は、河川の場合下流側に捨てるなど、共洗いした水がサンプルに混入しないよう注意する（図 3-2-2-2)。作業時には底泥を巻き上げないように注意する。

2) バケツを用いる場合：水辺への直接のアクセスが困難な場合には、バケツを用いて河川水を採取する

   (ア) バケツの除染：バケツの内部とバケツにくくりつけたロープ先端部に泡洗浄ハイターを吹き付ける（図 3-2-2-4）。数分間放置した後、ハイターを実験用ペーパータオルなどできれいに拭き取る（図 3-2-2-5）。その後、バケツとロープ先端を環境水で 2 回共洗いする。ハイターが余分に残っているとサンプル中の DNA が分解されるので注意すること。

   (イ) バケツ採水：バケツを投げ、ロープを手繰り寄せて環境水の入ったバケツを回収する（図 3-2-2-6）。採水した水でバケツを 2 回、共洗いする。その後採水した水でボトルを 2 回、共洗いした後、サンプルを 1L より少し多めに採取する。コンタミネーション防止のため、共洗いした水は、河川の場合下流側に捨てるなど、共洗いした水がサンプルに混入しないよう注意する。

3) フィールドブランク：実験室から運んだ純水が入ったボトルをフィールドで開封し、サンプルと同様に処理する。

4) 実験室への輸送：採水後のサンプルは直射日光および高温をさけて実験室に輸送する。採取した水を保存するためには、いくつか方法がある。1）DNA の分解抑制のために、サンプル 1L に 10%塩化ベンザルコニウム溶液を 1mL 添加し（終濃度 0.01%）、密閉後転倒混和を行ってしっかりと混ぜたものを持ち帰る（図 3-2-2-3）。２）その場でクーラーボックスに入れて冷蔵して持ち帰る。塩化ベンザルコニウムを添加した場合は、常温下でも数日程度は DNA が保存されるが、できるだけ低温での管理が望ましい（ただし、現在のところ、塩化ベンザルコニウムを添加すれば、水サンプルは冷凍させない方がよいと考えられている）。また、紫外線は DNA にダメージを与えるので、直射日光を避けて輸送する。輸送後、速やかに以下の濾過作業を行う。

3-2-3. グラスファイバーフィルターを用いた濾過

実験室に持ち帰ったサンプルはできるだけ早期に（採水後 48 時間以内を推奨）濾過を行う。常に使い捨て手袋を着用する。

1) 塩素処理の準備：塩素処理用バケツに水道水を入れ、市販の塩素系漂白剤を実効塩素濃度 0.1%以上になるように添加する。

2) 道具の塩素処理：フィルターホルダーおよびピンセットは使用前に 5 分以上塩素処理バケツに漬け（図 3-2-3-1）、水道水ですすいだ後、蒸留水ですすいでから使用する。この塩素処理はサンプルが変わるごとに行う必要がある。使用後のボトルはボトル表面も含めて全体を除染する必要があるので、塩素処理バケツに全体を沈めて 5 分以上の塩素除染を行い、次回以降の調査に用いる。

3) 濾過：水サンプルの濾過にはグラスファイバー製のフィルター（平均孔径 0.7μm）を、1L につき 1～2 枚用いて濾過する（図 3-2-3-2 ～ -4）。なお、サンプル水によっては 1L の濾過が困難な場合があるので濾過水量は必ず記録する。濾過水量を減らした場合でもサンプルあたりのフィルター枚数は 2 枚までとすることを推奨する。未使用フィルターにサンプル水がかかることによるコンタミネーションを防ぐため、フィルターの容器を開け放しにしないことやサンプル水より高いところにおいておくことなどの注意が必要である。

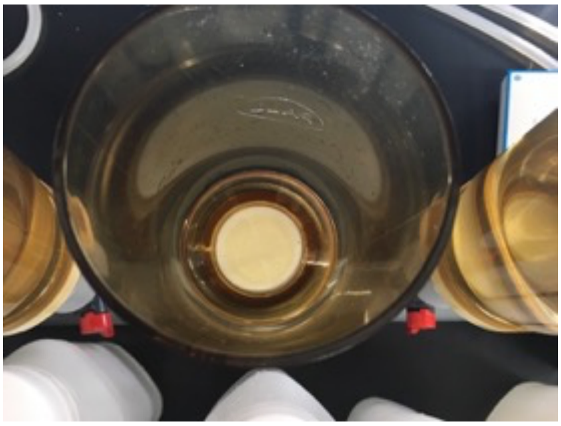
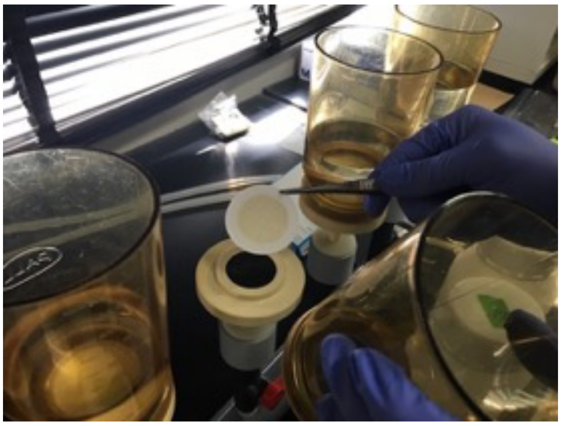
4) フィルターの保存：濾過が終わったフィルターは濾過面を内側にして半分におり、2 枚のフィルターをあわせてアルミホイルで包む（図 3-2-3-5）。アルミホイルにサンプル名などを記入し、ユニパックなどの袋に入れて冷凍庫（-20℃以下）で保存する（図 3-2-3-6）。なお、できるだけ早く次の処理（DNA の抽出）を行うことが望ましい。

5) 濾過ブランク：濾過時以降のコンタミネーションの有無を評価するため、1 日の作業に

つき 1 回、純水 1L を「濾過ブランク」を用意し、サンプルと同様に扱う。ただし、「フィールドブランク」で濾過ブランクの代用としてもよい。輸送の際に、塩化ベンザルコニウム添加している場合は、同様に純水 1L に 10%塩化ベンザルコニウム溶液を 1mL 添加し（終濃度 0.01%）、密閉後転倒混和を行ってしっかりと混ぜたものを「濾過ブランク」として扱う。

図 3-2-2-1 採水ボトルは使用前に塩素系漂白剤などにより除染する。	
図 3-2-2-2 共洗い後の環境水は下流側など、サンプルに影響しないところに捨てる。	
図 3-2-2-3　（保存オプション） 採水後、1 L あたり 10%塩化ベンザルコニウム溶液 1mL を添加する。	
図 3-2-2-4 バケツの内部とバケツにくくりつけたロープ先端部に泡タイプの塩素系漂白剤を吹き付けて除染する。	

図 3-2-2-5 ハイターを実験用ペーパータオルなどできれいに拭き取る。きれいに拭き取らないと、採水の際に泡が出て環境水を汚染してしまうので注意すること。	
図 3-2-2-6 バケツを投げ、ロープを手繰り寄せて環境水の入ったバケツを回収する。	
図 3-2-3-1 濾過に使用する器材は使用前に塩素系漂白剤などにより除染する。	
図 3-2-3-2 濾過の様子。	

図 3-2-3-3 濾過後のグラスファイバーフィルターの状態。	
図 3-2-3-4 濾過後のグラスファイバーフィルターの状態	
図 3-2-3-5 濾過後のグラスファイバーフィルターをアルミホイルで遮光する。	
図 3-2-3-6 アルミホイルにサンプル情報等を書き込み、ユニパックなどの袋で冷凍保存する。	

4. DNA の抽出

サンプル保管上の注意

環境水を濾過したフィルターは冷凍庫に保管する。冷凍庫の温度管理には十分な注意を払い、凍結融解を繰り返すことのないように注意する。

DNA 抽出に共通の注意点

コンタミネーションのリスクを軽減するために、DNA 抽出の作業場所は、PCR 以降の装置やサンプルと物理的に隔離すること、PCR 以降の操作を行った作業者が同じ日に DNA 抽出以前の操作を行うことのないように、1 日の作業内容・順序を事前に確認することが重要である。また、作業開始前と終了後には、作業場所と使用器具、機器類の除染を行うことを推奨する。

以下にカートリッジ式フィルターからの DNA 抽出（4-1）およびグラスファイバーフィルターからの DNA 抽出（4-2）について記す。

4-1. カートリッジ式フィルターからの DNA 抽出

はじめに

本項では、ステリベクスフィルターから DNA を抽出する方法を記す。本手法はビデオジャーナルである Journal of Visualized Science (Miya et al. 2016) に発表した手法を若干改変したもので、一連の技法は動画に収められているので参考にされたい。なお、本プロトコールでは、DNeasy キットに付属の Buffer ATL を使用しないが、Buffer ATL を用いることで収量が上がるとする論文が発表されている（Wu & Minamoto 2023）。また、DNA 抽出の際の試薬量を増やすことで収量が上がるとする論文も発表されており（Wong et al. 2020）、それらの手法を用いることもできる。
ここからが実験室での工程となるので、外来 DNA の混入には十分注意を払わなくてはならない。特に、この段階でコンタミネーションが起こると、以降の実験（リアルタイム PCR 用サンプルや次世代シーケンス用ライブラリーの調製）が台無しになってしまう。そうならないように、DNA 抽出のみの専用の実験室（DNA 抽出室）を設け、PCR 関連の部屋とは空間的に十分隔離しなければならない。さらに、組織からの抽出 DNA や PCR 産物を扱った当日は DNA 抽出室に入らないなどの細心の注意を払う。

DNA 抽出に必要な実験器具と試薬・消耗品（例）

- 恒温器（中にミニローテーターを設置でき、56℃で使用できるもの）
- ミニローテーター（ACR-100，アズワン）と付属の 10mL/15mL チューブホルダー
- QIAvac 24 Plus システム（QIAvac 24 Plus Vacuum Manifold を含む接続アダプター一式（QIAvac 24 Plus），Vacuum トラップと Connecting チューブ、設置トレー一式（QIAvac Connecting System），および Vacuum Pump，いずれもキアゲン）※1
- 遠心分離機（50mL コニカルチューブが回せるもの）
- 微量高速冷却遠心機（2.0mL チューブと DNeasy カラムが回せるもの）
- 卓上小型遠心機（マイクロシックス MS-1，アズワン）
- ボルテックス・ミキサー（VORTEX-GENIE 2 Mixer，エムエス機器）と 3 インチプラットホーム
- ルアーフィッティング（吸引装置接続用，VPRM406，アイシス）
- ルアーフィッティング（注入口用，VRMP6，アイシス）
- ルアーフィッティング（排出口用，VRSP6，アイシス）
- 50mL コニカルチューブ（日本ジェネティクス）
- DNeasy Blood and Tissue kit（キアゲン）
- 96～99.5%エタノール（分子生物学用、富士フィルム和光純薬）

- DNA 低吸着 2.0mL チューブ（ザルスタット）
- DNA 低吸着 1.5mL チューブ（ザルスタット）
- PBS (-)（マグネシウムとカルシウムを含まないリン酸緩衝生理食塩水，細胞科学研究所）※2
- 使い捨て手袋（パウダーフリー）
- マイクロピペット P-1000，P-200，P-100（ピペットマン，ギルソン）
- DNA 低吸着フィルターチップ（マイクロピペットの容量に合わせて各種，使用マイクロピペットに適合したもの）
- 標準型ピンセット（IPT-12，アズワン）
- 1.5mL/2.0mL 用チューブラック

※1 QIAvac 装置を使うかわりに、50mL コニカルチューブと 2.0mL チューブを組み合わせ、遠心分離機で RNAlater を抜き取ってもよい（Miya et al. 2016 が参考になる）。

※2 本プロトコールでは、DNeasy キットに付属の Buffer ATL は使用しないが、Buffer ATL を用いたほうが収量が上がるとする論文も発表されており（Wu & Minamoto, 2023）、そのような手法を用いることもできる。

4-1-1. 実験の準備

常に使い捨て手袋を着用する。作業中に手袋の汚染を感じた場合は速やかに交換する。

1） 乾熱滅菌器を 56℃に設定する（温まるのに時間がかかるので事前に準備しておく；図 4-1-1-1）。

2） RNAlater が充填された濾過済みのステリベクスを準備する。凍結保存されていた場合は、作業前に室温に置いてあらかじめよく解凍しておく（図 4-1-1-2）。

4-1-2. RNAlater の吸引

1） DNeasy Blood and Tissue kit と PBS (-) を使って抽出液（プレミックス）の準備をする（図 4-1-3-1）。1 本のステリベクスあたり 20μL の Proteinase K（600mAU/ml、キット付属）、200μL の Buffer AL、220μL の PBS (-) の割合でプレミックスを調製する。これには、DNA 抽出中のコンタミネーションを検知するための「抽出ブランク」用の 1 本分も含める。

2） ルアーフィッティングを介して QIAvac 24 Plus Vacuum Manifold とステリベクスを接続する（図 4-1-2-1）。

3） QIAvac のポンプのスイッチを入れ、注入孔側から排出孔側に向かって RNAlater を吸

引し除去する。ステリベクスのカートリッジ内には、構造上の問題で若干の RNAlater が残るが、これ以降の DNA 抽出で問題は生じない。

4） ルアーフィッティング（VRSP6）をステリベクスの数だけ用意する。

5） RNAlater を除去したステリベクスをマニホールドから外し、ルアーフィッティング（VRSP6）で排出孔に封をする（図 4-1-2-2）。

4-1-3. DNA の抽出

1) ステリベクスの注入孔を開封し、マイクロピペット（P-1000）と 1000μL 用のフィルターチップを用いて上記のプレミックス（4-1-2-1)）を充填する（注意：注入孔とカートリッジの接合部に段差があるため、チップ先端の挿入具合によって液が溢れ出ることがある ; 図 4-1-3-2）。

2) ルアーフィッティング（VRMP6）でステリベクスの注入孔側に封をする（図 4-1-3-3）。

3) ミニローテーターの 10mL/15mL チューブホルダーにステリベクスを差し込み、ステリベクスが水平になるようにチューブホルダーをローテーター本体に取り付ける。

4) ステリベクスを取り付けたローテーターを恒温器内に置き、10rpm で回転させ 56℃で 20 分間加温する（注意：ミニローテーターの耐久温度は 60℃ ; 図 4-1-3-4）。

5) ステリベクスを加温中に DNA 回収用の 2.0mL チューブ（DNA 低吸着）と 50mL コニカルチューブを用意し（図 4-1-3-5）、2.0mL チューブのキャップを折り曲げて 50mL コニカルチューブ内に入れる（注意：2.0mL のチューブにはあらかじめキャップに番号など必要事項を記入しておく。コニカルチューブの奥まで押し込まない ; 図 4-1-3-6）。

6) ステリベクスの加温が終了後、注入孔側のルアーフィッティングを内部の液が漏れないように注意深く取り外す。

7) ステリベクスの注入孔を、コニカルチューブ内に入れた 2.0mL チューブ内に挿入し、そのまま 50mL コニカルチューブの底まで押し込む (図 4-1-3-7)。きちんと奥まで押し込まれていないと遠心中に 2.0mL チューブが破損することがある。その後しっかりとコニカルチューブのキャップを閉める（図 4 -1-3-8）。

8) ステリベクスを入れたコニカルチューブを 6,000g で 1 分間遠心し（図 4-1-3-9）、抽出 DNA を 2.0mL チューブに回収する（図 4-1-3-10）。

9) 50mL コニカルチューブを遠心機から取り出し、ピンセットを使ってステリベクス（図

4-1-3-11)、2.0mL チューブの順に取り出す(図 4-1-3-12 ; 注意 : 2.0mL チューブはキャップが開いた状態なので注意深く扱うこと)。

10) 使用済みステリベクスを廃棄し、2.0mL チューブのキャップをしっかりと閉じる。

4-1-4. DNeasy Blood and Tissue kit を用いた DNA の精製

1) ステリベクスの本数に抽出ブランク 1 本を加えた本数の DNeasy Blood and Tissue kit(以下 DNeasy)付属のカラムを用意する(図 4-1-4-1)。カラムのキャップに必要事項を記入する。

2) 抽出 DNA が入った 2.0mL チューブに 200µL の 96~99.5%エタノールを入れピペットでよく混和する(図 4-1-4-2)。

3) マイクロピペット(P-1000)の吸引量を 700µL にセットし、カラムに抽出 DNA を入れる(注意 : RNAlater が少量残っているため溶液は 640µL より多くなることがある ; 図 4-1-4-3)。抽出ブランクには、4-1-3 で用意した混合溶液 440µL に 200µL の 96~100%エタノールを加えてピペットで混和したものを用いる。

4) 溶液が入ったカラムを 6,000g で 1 分間遠心する(図 4-1-4-4)。

5) 遠心を終了後、カラムのコレクションチューブを外して新しい 2mL コレクションチューブにカラムに載せ替える(図 4-1-4-5)。使用済みのコレクションチューブは廃棄する(図 4-1-4-6)。

6) カラムに 500µL の Buffer AW1 を入れ(図 4-1-4-7)、6,000g で 1 分間遠心する。

7) 遠心を終了後、カラムを新しい 2mL コレクションチューブに載せ替える(図 4-1-4-8)。使用済みのコレクションチューブは廃棄する。

8) カラムに 500µL の Buffer AW2 を入れ(図 4-1-4-9)、使用している遠心分離機の最大遠心速度で 3 分間遠心する。

9) 新しい DNA 低吸着の 1.5mL チューブを用意し、キャップに必要事項を記入する(図 4-1-4-10)。

10) 遠心を終了後、カラムを 9) で用意した 1.5mL チューブに載せ替える(図 4-1-4-11)。使用済みのコレクションチューブは廃棄する。

11) 100~200µL の Buffer AE(溶出バッファー)をカラムのメンブレン上に注ぎ(図 4-1-4-12)、室温で 1 分間インキュベートした後に 6,000g で 1 分間遠心する(図 4-1-

4-13）。なお、回収 DNA 濃度が希薄となることが予想される場合には、溶出バッファー量を 50µL 程度まで減じることも可能である。溶出に使用したバッファー量を記録しておく。

12）遠心を終了後、カラムを取り外してチューブのキャップをしっかりと閉じる（図 4-1-4-14）。使用済みカラムを廃棄する。

13）この状態で－20℃で安定的に保存可能である（図 4-1-4-15）。

参考文献

Miya, M., Minamoto, T., Yamanaka, H., Oka, S., Sato, K., Yamamoto, S., Sado, T., Doi, H. 2016. Use of a filter cartridge for filtration of water samples and extraction of environmental DNA. *Journal of Visualized Experiments* (117): e54741. doi: 10.3791/54741

Wong, M. K-S., Nakano, M., Hyodo, S. 2020. Field application of an improved protocol for environmental DNA extraction, purification, and measurement using Sterivex filter. *Scientific Reports* 10: 21531. doi: 10.1038/s41598-020-77304-7

Wu, Q., Minamoto, T. 2023. Improvement of recovery yield of macro-organismal environmental DNA from seawater samples. *Analytical Sciences* 39: 713-720. doi: 10.1007/s44211-023-00280-1

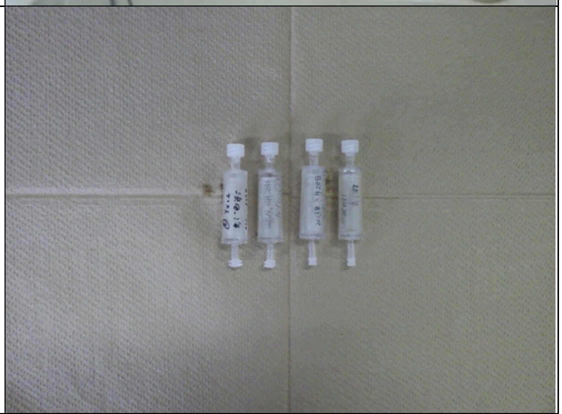
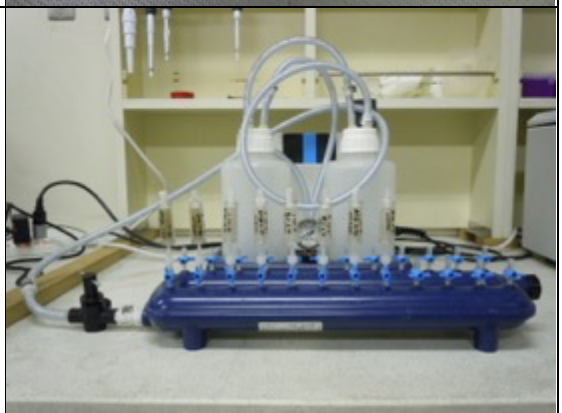
図 4-1-1-1 恒温器を 56℃にセットする。指定の温度に達するまで時間がかかるので、抽出前に余裕をもってセットすること。	
図 4-1-1-2 －20℃に凍結してあったステリベクスを解凍する。冷蔵の場合はそのままでよい（図 4-1-1-2）。	
図 4-1-2-1 ステリベクスの排出孔を開封し、ルアーフィッティングを介して QIAvac と接続し、ステリベクス内に充填した RNAlater を抜き取る。	
図 4-1-2-2 再度、ステリベクスの排出孔を閉じる。	

図 4-1-3-1 抽出に必要な試薬を用いてプレミックスを作成・準備しておく（4-1-2-1）。	
図 4-1-3-2 ステリベクスの注入孔を開封し、マイクロピペット（P-1000）と 1000μL 用のフィルターチップを用いて準備しておいたプレミックスを充填する。	
図 4-1-3-3 ステリベクスの注入孔に封をする。ステリベクスを 56℃に加熱する際、液が膨張するのでしっかり封をすること。	
図 4-1-3-4 ステリベクスを取り付けたローテーターを恒温器内に置き、10rpm で回転させ 56℃で 20 分間加温する。	

図 4-1-3-5 ステリベクスを加温中に DNA 回収用の DNA 低吸着 2.0mL チューブと 50mL コニカルチューブを用意する。	
図 4-1-3-6 2.0mL チューブを 50mL コニカルチューブに挿入したところ。	
図 4-1-3-7 ステリベクスの注入孔を 2.0mL チューブ内に挿入し、そのまま 50mL コニカルチューブの底まで押し込む。	
図 4-1-3-8 ステリベクスと 2.0mL チューブをコニカルチューブの底に押し込んだら、しっかりとコニカルチューブのキャップを閉める。	

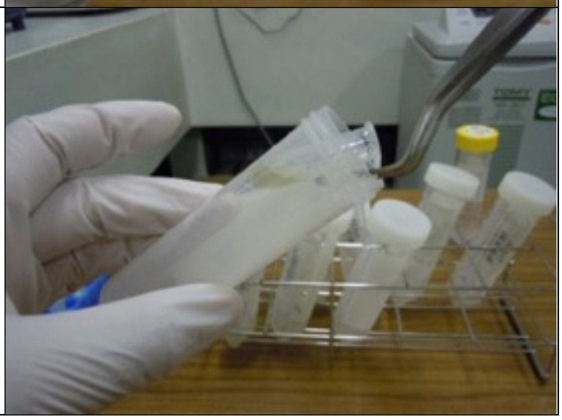
図 4-1-3-9 ステリベクスを入れたコニカルチューブを6,000g で 1 分間遠心する。	
図 4-1-3-10 コニカルチューブ内で 2.0mL チューブに回収された抽出 DNA。	
図 4-1-3-11 ピンセットを使ってコニカルチューブからステリベクスを取り出す。	
図 4-1-3-12 次いでピンセットを使ってコニカルチューブから 2.0mL チューブを取り出す。キャップが開いたままなので注意深く取り出すこと。	

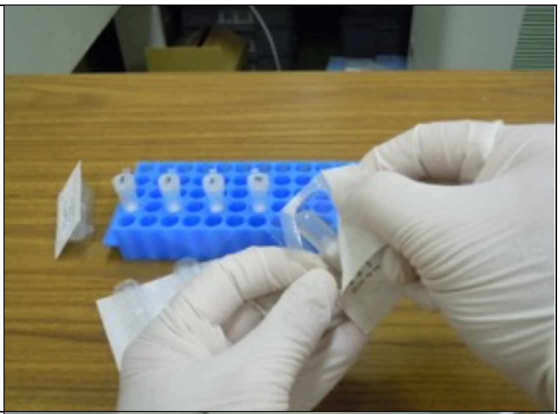
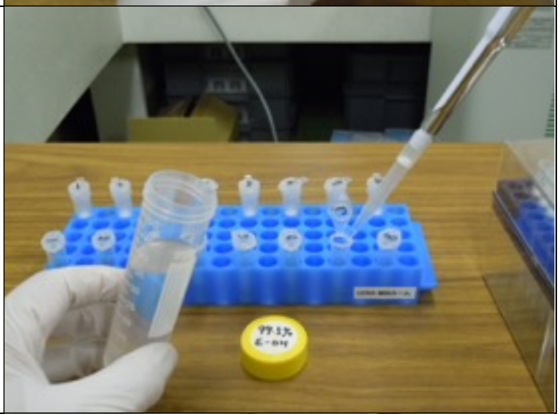
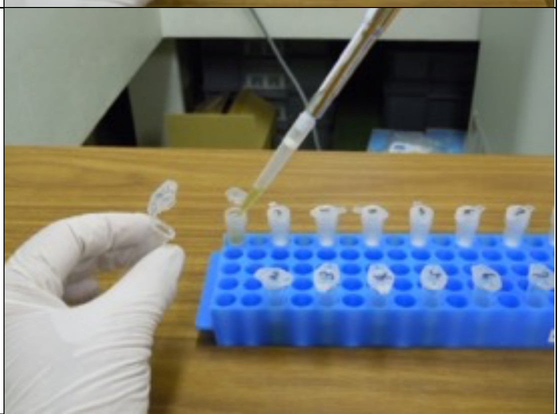
図 4-1-4-1 DNeasy Blood and Tissue kit 付属のカラム（コレクションチューブ付き）を開封してチューブラックに並べる。	
図 4-1-4-2 抽出 DNA が入った 2.0mL チューブに 200μL の 96～100%エタノールを入れピペットでよく混和する。	
図 4-1-4-3 カラムに抽出 DNA を入れる。	
図 4-1-4-4 抽出 DNA が入ったカラムを 6,000g で 1 分間遠心する。	

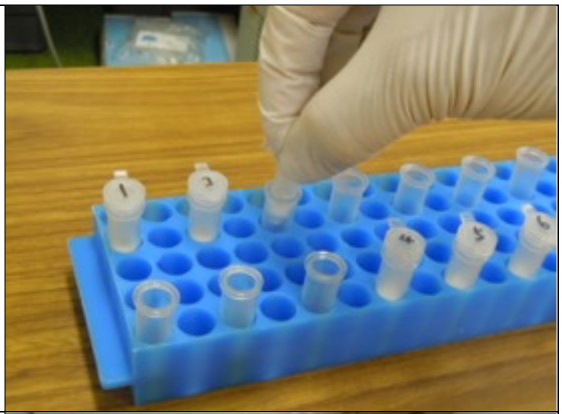
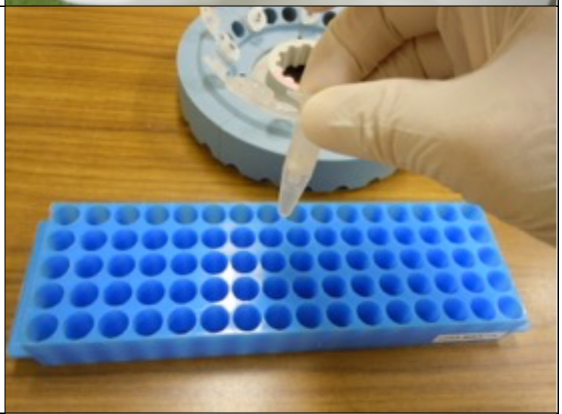
図 4-1-4-5 遠心を終了後、カラムのコレクションチューブを外して新しい 2mL コレクションチューブにカラムに載せ替える。	
図 4-1-4-6 使用済みのコレクションチューブは廃棄する。	
図 4-1-4-7 カラムに 500µL の Buffer AW1 を入れる。	
図 4-1-4-8 遠心を終了後、カラムを新しい 2mL コレクションチューブに載せ替える。	

図 4-1-4-9 カラムに 500μL の Buffer AW2 を入れる。	
図 4-1-4-10 DNA 低吸着の 1.5mL チューブを用意し、キャップに必要事項を記入する。	
図 4-1-4-11 遠心を終了後、カラムを図 4-1-4-10 で用意した DNA 低吸着 1.5mL チューブに載せ替える。	
図 4-1-4-12 100～200μL の Buffer AE（溶出バッファー）をカラムのメンブレン上に注ぐ。	

図 4-1-4-13 室温で 1 分間インキュベートした後に 6,000g で 1 分間遠心する。	
図 4-1-4-14 遠心を終了後、カラムを取り外してチューブのキャップをしっかりと閉じる。チューブ内に集められた溶液が DNA サンプルであるので、間違って捨てないように注意する。	
図 4-1-4-15 この状態で－20℃で安定的に保存可能である。	

4-2. グラスファイバーフィルターからの DNA 抽出

はじめに

本項では、グラスファイバーフィルターから DNA を抽出する方法を記す。なお、本手法は Uchii et al. 2016 に発表した手法を若干改変したものである。

なお、本プロトコールでは、DNeasy キットに付属の Buffer ATL を使用しないが、Buffer ATL を用いることで収量が上がるとする論文が発表されている（Wu & Minamoto 2023）。また、DNA 抽出の際の試薬量を増やすことで収量が上がるとする論文も発表されており（Wong et al. 2020）、それらの手法を援用することもできる。

また、ここからの実験室での工程では外来 DNA の混入には十分注意を払わなくてはならない。特に、この段階でコンタミネーションが起こると、以降の実験（リアルタイム PCR 用サンプルや次世代シーケンス用ライブラリーの調製）が台無しになってしまう。そうならないように、DNA 抽出だけの専用の実験室（DNA 抽出室）を設けるべきである。また、DNA 抽出室は PCR 関連の部屋とは空間的に十分隔離しなければならない。さらに、組織からの抽出 DNA や PCR 産物を扱った当日は DNA 抽出室に入らないなどの細心の注意が必要となる。

DNA 抽出に必要な実験器具と試薬・消耗品（例）

・遠心分離機（サリベットチューブが回せるもの）	
・微量高速冷却遠心機（2.0mL チューブと DNeasy カラムが回せるもの）	
・恒温器（56℃に設定、ヒートブロックでも良い）	
・サリベットチューブ	サンプル数分
・ピンセット	サンプル数分
・DNeasy Blood & Tissue Kit	サンプル数分
・Buffer AL および Proteinase K	
・1.5mL エッペンドルフチューブ（DNA 低吸着）	サンプル数分
・96～99.5%エタノール（分子生物学用）	適宜
・TE バッファ（pH8.0: 分子生物学用）	適宜
・使い捨て手袋（パウダーフリー）	
・マイクロピペット P-1000，P-200，P-100（ピペットマン，ギルソン）	
・フィルターチップ各種	
・1.5mL/2.0mL 用チューブラック	

4-2-1. 実験の準備

常に使い捨て手袋を着用する。作業中に手袋の汚染を感じた場合は速やかに交換する。

1） 56℃の恒温器を準備する（温まるのに時間がかかるので、事前に準備しておく）。

2） 水サンプルを濾過して折りたたんでいたフィルター※1 を、折り目を下にしてサリベットに入れる（図 4-2-1-1、-2）。1 サンプルに 2 枚のフィルターを用いた場合は 2 枚まとめて一つのサリベットに入れる。

3） サリベットの上部および下部に、サンプル番号を振っておく（図 4-2-1-3）。

※1 フィルターに残存する水分が塩化ベンザルコニウムを含む場合に DNA 収量の低下やバラツキが生じる可能性が指摘されており、必要に応じて本処理前に水分除去の手順（5,000g，1 分間遠心など）の追加を検討してもよい。

4-2-2. タンパク質の分解処理

1) サンプルあたり、400μL の Buffer AL、40μL の Proteinase K（600mAU/ml）を添加する (4-2-2-1)。サンプルが n 個であればそれぞれ試薬を n + 1 倍まとめて調製してから分注するとよい。

2) 恒温器で 56℃、30 分間保温処理する（図 4-2-2-2）。加熱するとサリベットのキャップが飛ぶ場合があるため、バスケット部分と下のチューブの部分との間を少し緩め、立てて恒温器に入れる。

3) その後、3,000～5,000g で 3 分間遠心分離する (図 4-2-2-3)。50mL コニカルチューブ内にサリベットチューブを入れて遠心してもよい。この時点でサリベットの下部に濾液が 800～1,000μL となる（図 4-2-2-4）。

4) サリベット内のフィルターにまだ DNA が残っているので、これをさらに回収するため、220μL の TE を添加（図 4-2-2-5）して 1 分間静置する。その後、3,000～5,000g で 3 分間遠心分離する。

4-2-3. DNeasy カラムを用いた DNA の精製

1) フィルターの入ったサリベットの上部を外して捨て、下部の DNA 溶液（図 4-2-3-1）に、400μL の 96～99.5%エタノールを添加する（図 4-2-3-2）。

2) ピペッティング（図 4-2-3-3）で混ぜてから DNeasy のカラム（図 4-2-3-4）へ 650μ

L 程度（半分程度）移し（図 4-2-3-5）、6,000g で 1 分間遠心する（図 4-2-3-6）。

3) 下の 2mL コレクションチューブにたまった濾液を捨て（図 4-2-3-7、-8）、サリベット下部に残っている DNA 溶液を再びカラムに移し（図 4-2-3-9）、6,000g で 1 分間遠心する。この作業を DNA 溶液がなくなるまで繰り返す。

4) カラムを新しい 2mL コレクションチューブに載せ替え（図 4-2-3-10）、500μL の Buffer AW1 を添加後（図 4-2-3-11）、6,000g で 1 分間遠心する。

5) カラムを新しい 2mL コレクションチューブに載せ替え（図 4-2-3-12）、500μL の Buffer AW2 を添加後（図 4-2-3-13）、使用している遠心分離機の最大遠心速度で 2 分間遠心する。

6) 遠心機から取り外すときや移動させるときなどは、揺れなどで下部の液を上部のカラム部分の先に付着させることのないように注意する。

7) DNA 低吸着の 1.5mL チューブを用意し、サンプル名等を記載する（図 4-2-3-14）。

8) カラムを DNA 低吸着の 1.5mL チューブに載せ替える（図 4-2-3-15, -16）。

9) 100～200μL の Buffer AE（溶出バッファー）を添加し（図 4-2-3-17）、1 分間静置する。6,000g で 1 分間遠心分離後（図 4-2-3-18）、カラムの出口部分が抽出溶液に付着しないように気をつけながらカラムを取り外し、 1.5mL チューブの蓋をしっかりとしめる（図 4-2-3-19）。この状態で－20℃で安定的に保存可能である。なお、回収 DNA 濃度が希薄となることが予想される場合には、溶出バッファー量を 50μL 程度まで減じることも可能である。溶出に使用したバッファー量を記録しておく。

補足事項

サリベットを遠心できるサイズの遠心機がない場合は、サリベットの代わりに小型スピンカラムを用いた抽出法を用いることもできる。詳細は Yamanaka et al. 2016 などを参考にするとよい。

参考文献

Uchii, K., Doi, H., Minamoto, T. 2016. A novel environmental DNA approach to quantify the cryptic invasion of non-native genotypes. *Molecular Ecology Resources* 16 (2): 415-422. doi: 10.1111/1755-0998.12460

Wong, M. K-S., Nakano, M., Hyodo, S. 2020. Field application of an improved protocol for environmental DNA extraction, purification, and measurement using Sterivex filter. *Scientific Reports* 10: 21531. doi: 10.1038/s41598-020-77304-7

Wu, Q., Minamoto, T. 2023. Improvement of recovery yield of macro-organismal environmental DNA from seawater samples. *Analytical Sciences* 39: 713-720. doi: 10.1007/s44211-023-00280-1

Yamanaka, H., Motozawa, H., Tsuji, S., Miyazawa, R. C., Takahara, T., Minamoto, T. 2016. On-site filtration of water samples for environmental DNA analysis to avoid DNA degradation during transportation. *Ecological Research* 31 (6): 963-967. doi: 10.1007/s11284-016-1400-9

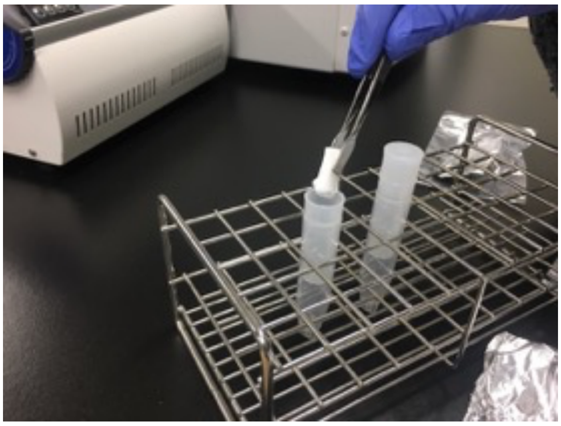
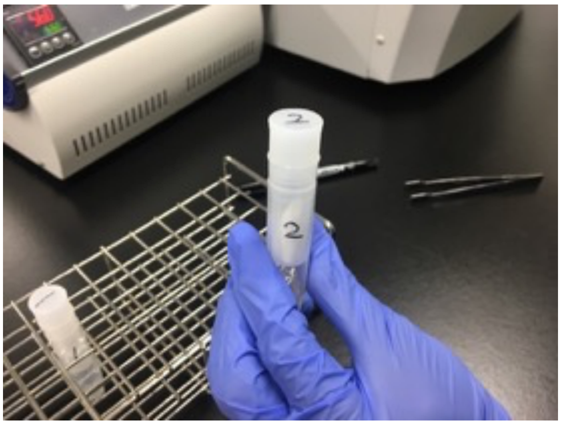
図 4-2-1-1 冷凍庫から取り出したフィルターをサリベットに移し替える。	
図 4-2-1-2 サリベットに入ったフィルター。フィルターは折り目を下にして入れることを推奨。	
図 4-2-1-3 サリベットの上部と下部にサンプル番号を書く。	
図 4-2-2-1 Buffer AL と Proteinase K の混合液をフィルターに添加する。	

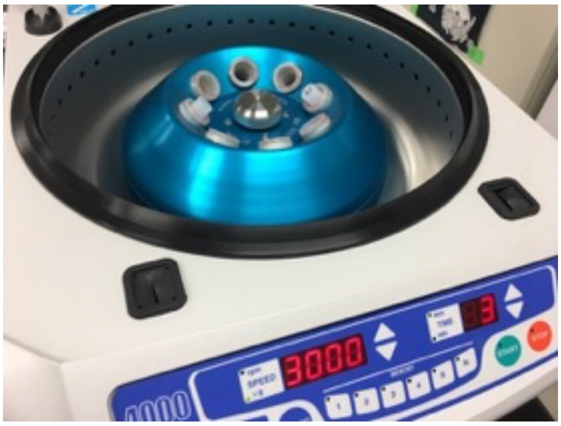
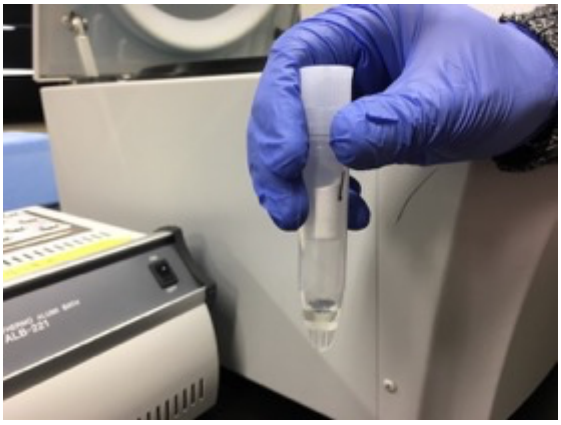
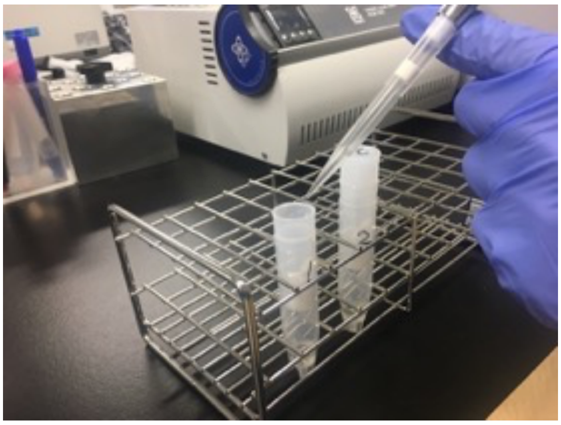
図 4-2-2-2 56℃で 30 分間保温する。	
図 4-2-2-3 遠心機で遠心し、フィルター上の液体をサリベット下部に落とす。	
図 4-2-2-4 遠心後の様子。サリベット下部に DNA 溶液が 800～1,000μL 程度回収される。	
図 4-2-2-5 サリベット内のフィルターに TE バッファを添加する。	

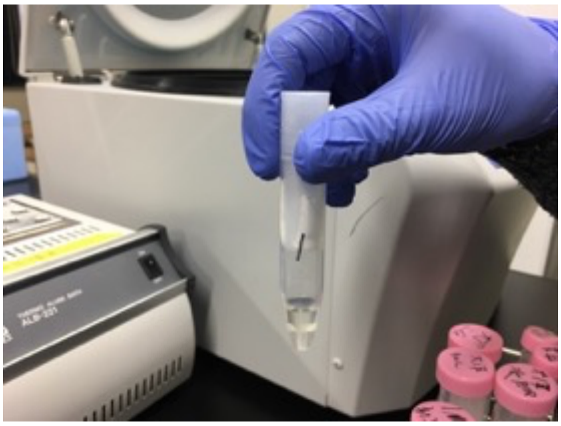
図 4-2-3-1 二度目の遠心後の様子。	
図 4-2-3-2 サリベット上部を取り外し、下部の DNA 溶液にエタノールを添加する。	
図 4-2-3-3 エタノール添加後、ピペッティングでよく混ぜる。	
図 4-2-3-4 DNeasy カラム。	

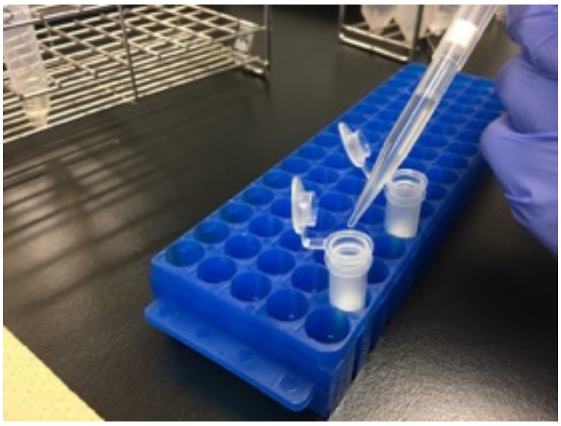
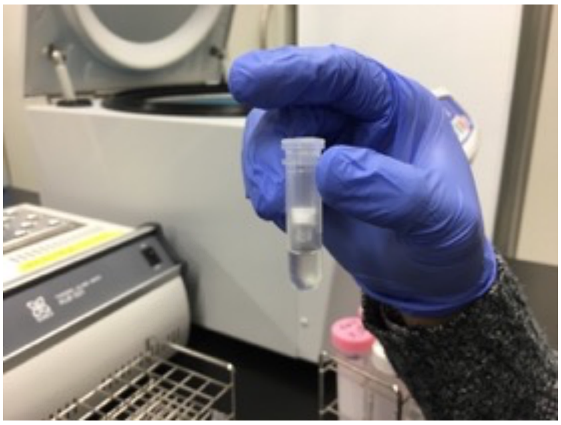
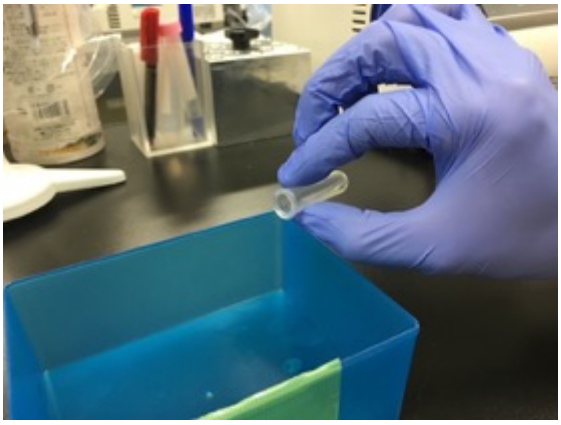
図 4-2-3-5 サリベット下部の DNA 溶液を DNeasy カラムに移す。	
図 4-2-3-6 遠心で、カラムを通過させる。	
図 4-2-3-7 DNA がカラム部分にトラップされるため、下部の液体は廃液である。	
図 4-2-3-8 廃液を捨てる。	

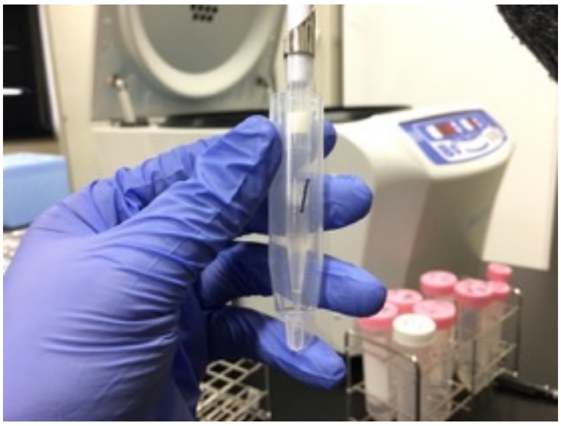
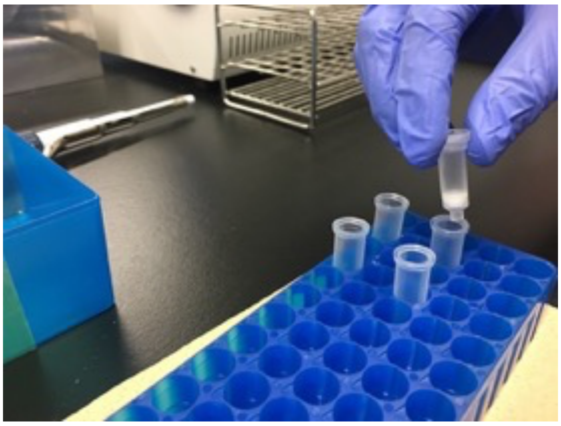
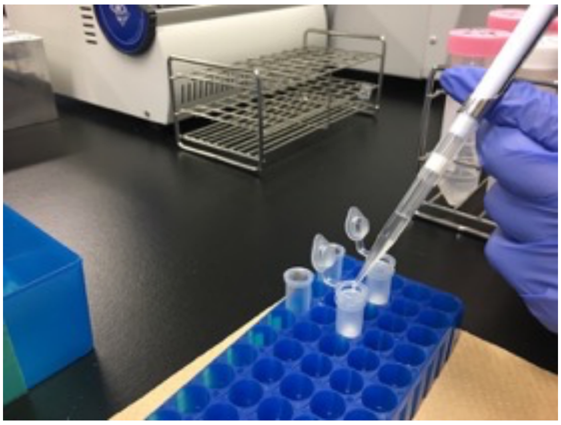
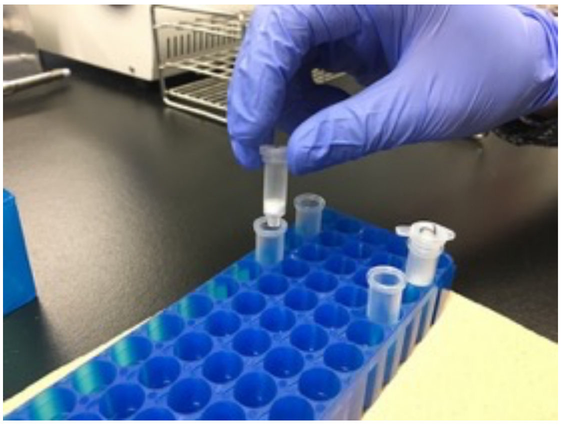
図 4-2-3-9 再びサリベットからカラムに DNA 溶液を移し、遠心する。	
図 4-2-3-10 遠心後、カラムを新しい 2mL コレクションチューブに載せ替える。	
図 4-2-3-11 Buffer AW1 を注ぐ。	
図 4-2-3-12 遠心後、カラムを新しい 2mL コレクションチューブに載せ替える。	

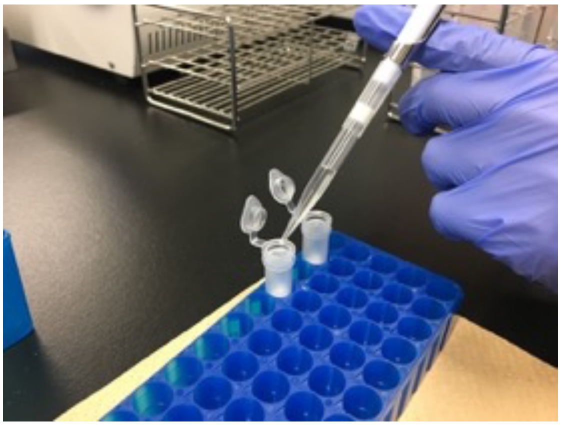
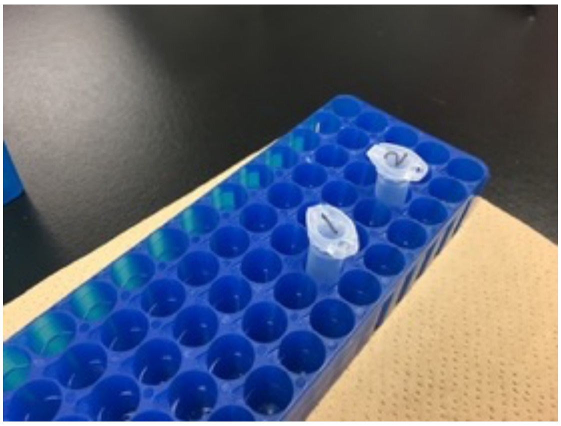
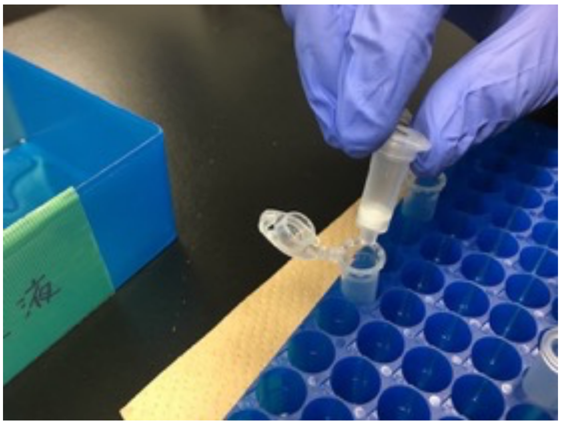
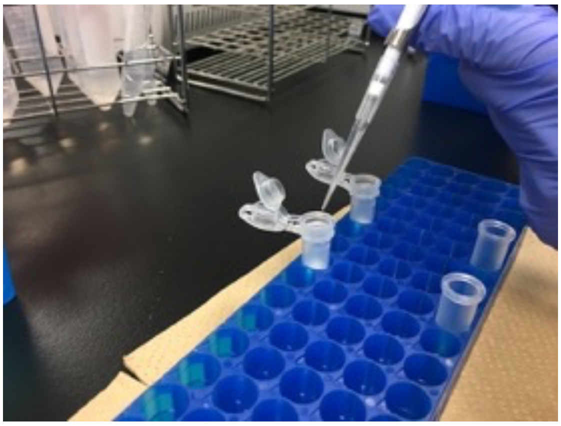
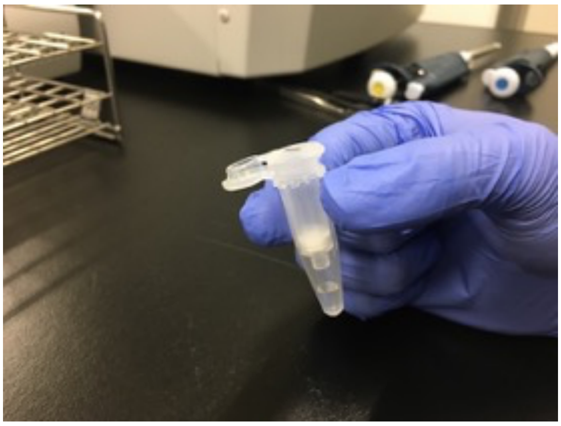
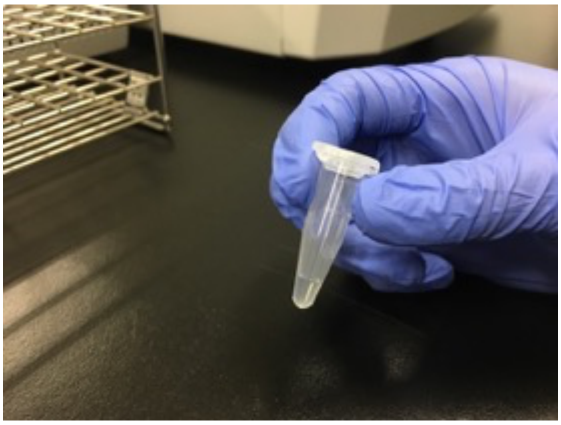
図 4-2-3-13 Buffer AW2 を注ぎ、遠心する。	
図 4-2-3-14 DNA 低吸着の 1.5mL チューブを用意し、サンプル番号を書く。	
図 4-2-3-15 1.5mL チューブに遠心を終えたカラムを載せ替える。	
図 4-2-3-16 1.5mL チューブにカラムを載せ替えた状態。	

図 4-2-3-17 Buffer AE を注ぎ、1 分静置の後、遠心する。	
図 4-2-3-18 遠心後の状態。この時点では下部に落ちた溶液が DNA サンプルであるので、間違って捨てないように注意する。	
図 4-2-3-19 カラムを外し、蓋をしっかりと締め、冷凍保存する。	

5．DNA の分析

5-1．リアルタイム PCR による環境 DNA の種特異的な検出・定量

はじめに

本項では、リアルタイム PCR を用いた環境 DNA の種特異的な検出および DNA 量の定量について記す。種特異的な検出には対象種ごとに検出系を設計する必要があるため、ここで記すのは一例にすぎない。実験条件などについてはそれぞれの系について十分な検討が必要である。

5-1-1．種特異的プライマー（およびプローブ）の設計

種特異的なプライマーに求められる条件は、対象種の DNA を効率よく増幅することと、同所的に生息する近縁種の DNA を誤増幅しないことである。そのためのプライマー設計の手順は以下のとおりである。

1) 塩基配列情報の入手：対象種および同所的近縁種の塩基配列情報をダウンロードする。NCBI（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/）や BOLD（http://www.barcodinglife.org）等のデータベースを適宜利用する。ただし、データベース上の情報には誤りが含まれていることに留意し、複数のシークエンス情報を元に検討することが望ましい。

2) プライマーの設計：対象種と近縁種の間に塩基配列の差異のある領域を探し、プライマーを設計する（図 5-1-1-2）。プライマーの 3'末端付近に対象種に特異的な塩基があるとよい。プライマーの設計に際しては T_m 値が適切な範囲にあるかなど、プライマー設計の一般的な注意点を参考にするとよい。必要に応じて TaqMan プローブも作成する。

3) In silico でのチェック：Primer-BLAST（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/）などを用いて、プライマーの特異性を確認する。同所的に生息する他の生物種が増幅されないことの確認を行う。

4) In vitro でのチェック：対象種および近縁種の組織などから抽出した DNA サンプルを用いて PCR 実験を行い、DNA 増幅の有無をチェックして特異性を確認する（図 5-1-1-4）。

5) 環境 DNA のシーケンスチェック：環境サンプルに由来する DNA 増幅が確認された場

合には、PCR 増幅産物（アンプリコン）をダイレクトシーケンスなどを行い、対象種のDNA が間違いなく増幅していることを確認する。

5-1-2. リアルタイム PCR 実験

以下は一例である。器材や試薬、対象種によってプロトコールの調整が必要である。

リアルタイム PCR 実験に必要な実験器具と試薬・消耗品（例）

・リアルタイム PCR 装置（96 穴）
・PCR 試薬（2×Environmental Master Mix 2.0：サーモフィッシャー）
・UNG 酵素（AmpErase Uracil N-Glycosylase：サーモフィッシャー）
・Assay Mix（各 18μM のプライマー，2.5μM の TaqMan プローブ ※1）
・96 穴 PCR プレートおよびシール
・使い捨て手袋（パウダーフリー）
・マイクロピペット P-1000，P-200，P-100（ピペットマン，ギルソン）
・フィルターチップ （各種）

※1 対象種ごとにプライマーおよびプローブを設計する必要がある。なお、TaqMan プローブを作成する際には、T_m 値（二本鎖 DNA の 50%が一本鎖 DNA に解離するときの温度）をプライマーのものよりも高く設定することで特異性の向上が期待できる。

PCR1 反応あたりの試薬組成（例）

・2×Environmental Master Mix 2.0	10.0μL
・AmpErase Uracil N-Glycosylase（UNG 酵素）	0.1μL
・Assay Mix	1.0μL
・環境 DNA サンプル	2.0～5.0μL
・DNase/RNase フリー水	適量
・合計	20.0μL

全ての PCR 反応（ポジティブコントロール [定量スタンダード]、環境 DNA サンプル、フィールドブランク、濾過ブランク、PCR ブランクを含む）を 3 繰り返し以上で行う。なお、定量を行う際には、定量スタンダードとして、人工合成遺伝子を用意し、4 段階以上の希釈系列を用いて定量する※2。

PCR 反応の条件は様々であるので、ここでは一例として上記の試薬組成でプライマーの T_m 値が 60℃前後、2 ステップ PCR を行う場合について以下に記載する。

50℃で 2 分、95℃で 10 分の初期ステップの後、95℃で 15 秒、60℃で 1 分からなるサイクルを 50-55 回程度繰り返す。

PCR プレートごとにポジティブコントロール（あるいは定量スタンダード）と PCR ブランクを載せるので、すべての PCR 反応を 3 繰り返しで行う場合、一度に解析できるサンプル（フィールドブランク、濾過ブランクを含む）数は 27 サンプル（定量の場合）、または、30 サンプル（在不在検出の場合）である。

環境 DNA サンプルを 3 繰り返しで実施した場合、3 繰り返しのうち 1 つでもポジティブであったサンプルを陽性と判断する（図 5-1-2）。定量測定の場合は定量スタンダードのデータを用いて DNA 量を測定する[※2]。陽性であった環境 DNA サンプルの少なくとも一部は、PCR 増幅産物を用いたダイレクトシーケンスなどを実施して、確かに対象の DNA であることを確認する。特に、リアルタイム PCR 時の Cq 値（Ct 値）が大きいサンプルについてはシーケンスを確認することが望ましい。

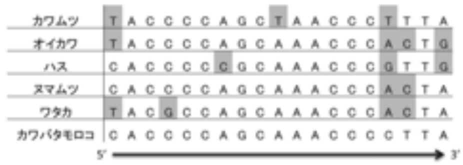
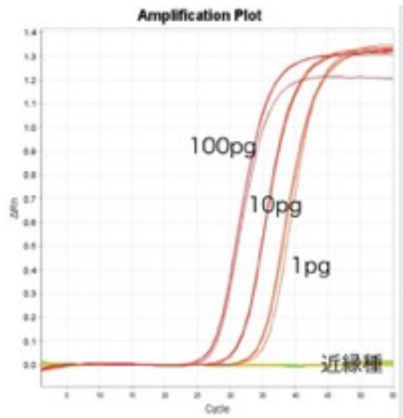
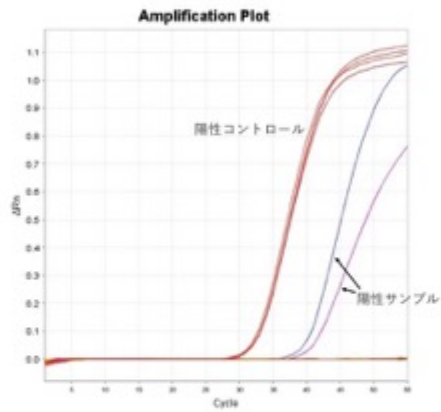
[※2] 定量スタンダードの合成方法として、プラスミド、直鎖 2 本鎖 DNA（IDT 社の gBlooks® Gene Fragments などを購入）、PCR 産物などを用いる方法がある。なお、購入した人工合成遺伝子の収量は目安であり、精製されていないため夾雑物の影響があると考えられる。そのため、精製キットなどを用いて精製を行うことが望ましい。その後、Qubit やデジタル PCR 等を用いて濃度測定してから目的の濃度まで希釈して用いる。

PCR 阻害による陰性に対する対応

環境 DNA サンプルには腐植酸などの PCR 阻害物質が含まれることがある。ここで紹介した PCR の反応系は比較的 PCR 阻害の影響を受けにくいものと考えられているが、時として PCR 阻害による偽陰性の結果が得られることがある。PCR 阻害による偽陰性が疑われる場合、インターナルポジティブコントロール（内部標準）として増幅実績のある DNA をスパイクインするなどの方法で阻害の影響の有無を確認することができる。阻害が確認された場合には DNA 溶液を希釈して PCR を行うと結果が改善する場合がある。また、DNA に含まれる阻害物質を除去するキットも複数展開されている。

参考文献

福岡有紗, 高原輝彦, 松本宗弘, 兵庫県立農業高校生物部, 丑丸敦史, 源利文 2016. 在来希少種カワバタモロコの環境 DNA による検出系の確立. 日本生態学会誌 66 (3): 613-620.

<table>
<tr>
<td>図 5-1-1-2
プライマーの設計。カワバタモロコのプライマー設計の例※3。（福岡ら 2016 より）</td>
<td>
</td>
</tr>
<tr>
<td>図 5-1-1-4
In vitro の増幅チェック。対象種の DNA が増幅し（赤線）、近縁種の DNA が増幅しない（その他の色）ことを確認する。</td>
<td>
</td>
</tr>
<tr>
<td>図 5-1-2
リアルタイム PCR の結果の一例。</td>
<td>
</td>
</tr>
</table>

※3 対象種によっては目的とした DNA 配列に種内多型がみられる場合がある。そのため、作成した（公表されている）プライマー/プローブでは対象種が検出困難な地域個体群など（偽陰性）が存在する可能性にも留意する。ここに記載のプライマー/プローブも地域個体群によっては完全に一致しないことが知られている。

5-2. 環境 DNA メタバーコーディング

5-2-1. ライブラリーの調製ー1：1st PCR

はじめに

環境 DNA メタバーコーディング法では、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を用いてターゲットとなる環境 DNA 群を分析可能な量に増幅すると同時に、PCR 産物の両端に各種のアダプターを付加することによって次世代シークエンサーで分析可能な分子に加工する（ライブラリーの調製）。

PCR は大量の DNA 断片を合成するため、実験の汚染源となりやすい。したがって、PCR の準備（試薬の調合等）を行う実験室（プレ PCR ルーム）と、PCR の実施や PCR 産物そのものを扱う実験室（ポスト PCR ルーム）は空間的に隔離すべきである。また、PCR 産物を扱った当日には DNA 抽出やその他の実験を行わないなど、コンタミのリスクを減らす工夫も必要となる。さらには、二段階 PCR を行うため、最初の PCR（1st PCR）産物を希釈して二回目の PCR（2nd PCR）のテンプレートにする操作が必要となる。そのため、この操作の際に生じるコンタミを防ぐためのクリーンベンチや、クリーンなオープンスペースをつくるテーブルコーチ（KOACH T 500，KOKEN）等を設置する必要がある。また、マイクロピペット、チューブラック、実験机は泡ハイター等を使用してあらかじめ除染し、PCR 反応に用いるチップ、チューブなどの消耗品、および水は、可能な限り信用のおけるメーカーから購入した除染済のものを使用する。

以下、MiFish プライマーを用いたメタバーコーディングサンプル調製の例について記載する。

1st PCR に必要な実験器具と試薬・消耗品（例）

- サーマルサイクラー（96 ウェルプレートが仕掛けられるものがよい）
- KAPA HiFi HS ReadyMix（KK2602，KAPA Biosystems）[※1]
- MiFish プライマー[※2、※3、※4]

板鰓類用（サメ・エイ類に最適化したプライマー）

```
MiFish-E-F-v2 (61 mer):
5’-ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT NNN NNN RGT TGG TAA
ATC TCG TGC CAG C-3’
MiFish-E-R-v2 (68 mer):
```

```
5'-GTG ACT GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC TNN NNN NGC ATA GTG
GGG TAT CTA ATC CTA GTT TG-3'
```

硬骨魚類用 ①（硬骨魚類全般に適用可能なユニバーサルプライマー）

```
MiFish-U-F (60 mer):
5'-ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT NNN NNN GTC GGT AAA
ACT CGT GCC AGC-3'
MiFish-U-R (67 mer):
5'-GTG ACT GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC TNN NNN NCA TAG TGG
GGT ATC TAA TCC CAG TTT G-3'
```

硬骨魚類用 ②（温帯の沿岸域で一般的なアナハゼ類に最適化したプライマー）

```
MiFish-U2-F (60 mer):
5'-ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT NNN NNN GCC GGT AAA
ACT CGT GCC AGC-3'
MiFish-U2-R (67 mer):
5'-GTG ACT GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC TNN NNN NCA TAG GAG
GGT GTC TAA TCC CCG TTT G-3'
```

- DNase/RNase フリー水（分子生物学実験用）
- TE バッファー（分子生物学実験用）
- キャップ一体型 8 連チューブ
- 1.5mL チューブ（DNA 低吸着）
- マイクロピペット P-1000，P-200，P-100，P-20，P-2（ピペットマン，ギルソン）
- フィルターチップ（マイクロピペットの容量に合わせて各種）
- 電動マイクロピペット 0.5～10μL，5～100μL（Xplorer Plus，エッペンドルフ）
- 1.5mL/2.0mL チューブ用チューブラック
- 8 連チューブ用チューブラック
- 使い捨て手袋（パウダーフリー）

※1 陸水のような PCR 阻害物質（たとえば腐植酸）を含むことが多い環境水や泥試料から抽出した DNA では、KAPA HiFi HS で 1st PCR 産物が得られないことがある。このような場合、KOD FX Neo や KOD One（東洋紡）、Platinum SuperFi II DNA Polymerase（サーモフィッシャー）などを用いることで良好な増幅が得られることがある。ただし、酵素によって非特異的増幅の起きやすさや配列毎の増幅効率などの特性が異なるので、使用の際には特性の違いを理解する必要がある。また、比較解析を行うのであれば異なる酵素を用いた結果を混在させない方が安全である。PCR のプロトコールについては、基本的にはメーカーが提供するものをそのまま利用できる。なお、PCR 阻害物質の影響で増幅がうまくいかない場合、サンプルを希釈するとうまく増幅する場合もある。また、DNA に含まれる阻害物質を除去するキットも複数展開されている。

※2 TE バッファーで 100μM に希釈済みのものを注文すると便利である。合成メーカーにより混合塩基の偏りが見られることがある。

※3 アユ、ワカサギ、スナヤツメなど、魚種によっては、プライマー部分に変異があるため

に増幅効率が低下するものがある。これらの魚種が生息する環境で用いる場合、配列を修正したプライマーを少量混合すると検出可能になる。

※4 ここでは先行して研究が進んでいる魚類を対象として分析する場合のプライマーの例を示している。必要な分類学的解像度や利用するシーケンサーが可能な読み取りの長さ等に基づいて適切にプライマーセットを選定する。なお、以降の分析ステップは MiFish プライマーを使用した場合の例を記述している。

1st PCR 産物の精製と濃縮に必要な実験器具と試薬・消耗品（例）

- 卓上小型遠心機（Force Mini　SBC-140，LabNet）
- プレート遠心機（PC-2R，アズワン）
- 1.5mL チューブ（DNA 低吸着）
- 96 ウェルプレート（DNA 低吸着）
- SPRIselect※1（ベックマン・コールター）
- 85%エタノール
- Buffer EB（キアゲン）
- 96 ウェルプレート用マグネットプレート※2 (DynaMag-96 Side, サーモフィッシャー)
- 96 ウェルプレート用遠心機（スピンダウン用）
- マイクロピペット P-1000、P-200、P-100（ピペットマン，ギルソン）
- 8 連マイクロピペット P-200、P-10
- フィルターチップ（マイクロピペットの容量に合わせて各種、使用マイクロピペットに適合したもの）
- 使い捨て手袋（パウダーフリー）

※1 PCR 産物精製用スピンカラム（サイズカットが厳密でない）を用いて精製と濃縮を行うこともできる。ただし、抽出した環境 DNA 溶液中にターゲット断片の含量が少なかった場合、PCR の結果 100bp-150bp あたりに現れるプライマー由来産物の含量が多くなるため、使用するカラムの特性によっては精製の状況が変わってくることがある。また、厳密なサイズ分画可能なスピンカラムも発売されているので、カラム法にこだわるのであればそういったものを使用することもできる。ただし、カラムにしてもビーズにしても、断片回収量や配列内訳などのパフォーマンスがメーカー間で同じとは限らないため、安定したデータを得るためには使用するプライマーセットごとに常にどれか決まった 1 つの製品を使うべきである。

※2 96 ウェルプレート用マグネットプレートは各社からいろいろなものが発売されているが、十分に磁力が強いものを選ぶ。また、今回の目的では、ビーズをウェルの底に集め

るタイプでなく、側面に集めるタイプの方が使い勝手がよい。

精製・濃縮した 1st PCR 産物の定量に必要な実験器具と試薬・消耗品（例）

- TapeStation 4150（アジレント・テクノロジー）
- High Sensitivity D1000 Screen Tape（5067-5584，アジレント・テクノロジー）
- High Sensitivity D1000 Reagents（5067-5585，アジレント・テクノロジー）
- 4150/4200 TapeStation Loading Tips（5067-5598，アジレント・テクノロジー）
- 卓上撹拌器（ボルテックス MS3 ベーシック，イカジャパン）
- 8 連チューブ用卓上遠心機（マイクロ PCR スピナー MS-PCR，アズワン）
- 1.5mL/2.0mL 用卓上遠心機（マイクロシックス MS-1，アズワン）
- 電動マイクロピペット 0.5～10μL（Xplorer plus，エッペンドルフ）
- マイクロピペット P-10 または P-2（ピペットマン，ギルソン）
- フィルターチップ 10μL（ピペットマンに適合したもの）
- 8 連チューブ
- 8 連チューブラック
- 使い捨て手袋（パウダーフリー）
- DNase/RNase フリー水

5-2-1-1. 1st PCR

環境水中から抽出した DNA をテンプレートに PCR を行う場合、抽出 DNA に含まれる魚類由来の DNA 量は事前にわかっていない。したがって、本番実験を行う前に予備実験を行うことで、PCR のサイクル数など至適な実験条件を探索することが重要になる。

常に使い捨て手袋を着用する。作業中に手袋の汚染を感じた場合は速やかに交換する。

1） 実験を始める前にサーマルサイクラーの電源を入れる。

2） プライマーの希釈：市販の TE バッファーを用いて、プライマーの原液（100μM）を 20 倍に希釈する。希釈済みプライマーを以下の比率で混合してプライマーミックスを作る。MiFish-E-F/R-v2 ： MiFish-U-F/R ： MiFish-U2-F/R=1:2:1（淡水魚だけの場合は MiFish-U-F/R のみでよい）

3） 試薬の組成：全容量 12μL（DNA 量 2μL を含む）で PCR を行う場合に、チューブ 1 本あたりのプレミックスの組成は以下のようになる。（注意：試薬は必要量の 1.1～1.2 倍程度の量を調合しないと、電動ピペットで分注する際に不足することがある）。プライマーの終濃度は、フォワードプライマーミックス、リバースプライマーミックスそ

れぞれが 583 nM 程度となる。

KAPA HiFi HS ReadyMix	6.0μL
プライマーミックス	2.8μL
DNase/RNase フリー水	1.2μL

4) PCR の繰り返し数：PCR での取りこぼし（PCR dropouts）を最小限に抑えるために、同一のサンプル（環境 DNA）に対して複数回繰り返し PCR を行うのがよい。例えば、8 連チューブ 1 本を使い、繰り返し数 8 回の PCR を行う。なお、1st PCR を実施する際に生じるコンタミネーションをモニターするために、濾過ブランク、抽出ブランクとは別に、1st PCR の反応セット毎に新たなブランク（1st PCR ブランク）を加えるようにする。1st PCR ブランクは、抽出 DNA の代わりに DNase/RNase フリー水をテンプレートとする（図 5-2-1-1-1）。

5) 上記試薬を必要量の 1.1 倍程度調合してプレミックスを作成し、これを電動ピペットで 8 連チューブに 10μL ずつ分注する。その後、個々のチューブに抽出済みの環境 DNA を 2μL ずつ電動ピペットで分注する。PCR の繰り返し数が 8 回の場合、抽出 DNA を 2μL × 8 = 16μL 使うことになる。

6) サーマルサイクラーの設定は以下のようにする：

95℃の DNA 変性を 3 分間 （初期変性と HotStart 酵素の活性化）
98℃の DNA 変性を 20 秒
65℃のアニーリングを 15 秒　　35 サイクル
72℃の伸長反応を 15 秒
72℃の伸長反応を 5 分間（最終伸長）
4℃

7) 反応終了後はチューブを速やかに取り出して-20℃で凍結保管し、なるべく早く次の精製ステップに進む。

注意 1：アニーリング温度は KAPA HiFi Ready Mix の特性（少なくとも 60℃以上）によりかなり高めに設定してある。これより高いとプライマー配列とのマッチングが低い魚種が検出漏れとなり、逆にこれより低いと非特異的な産物（微生物の 16S rRNA 由来と推定される産物）が多くなる。両者のトレードオフを考えるとこのくらいのアニーリング温度が適正と思われるが、各自の目的に応じて最適化する。

注意 2：サイクル数について、冬期のような魚の活性が低い場合や、PCR 阻害物質の影響

で、35 サイクルだと十分な増幅が見られないことがある。また、PCR 産物が確認できないからといってサイクル数を多くしすぎると、非特異的増幅が起きて解析に支障をきたす場合もある。各自の状況に合わせ、最適なサイクル数を検討する。

5-2-1-2. 1st PCR 産物の精製と濃縮

本稿では、磁性ビーズを用いた 1st PCR 産物の精製・濃縮の例について記す。

常に使い捨て手袋を着用する。作業中に手袋の汚染を感じた場合は速やかに交換する。

1) 繰り返し反応した 1st PCR 産物を 1 本の 1.5mL チューブにまとめる（図 5-2-1-2-1）。1st PCR はチューブ 1 ウェルあたり 12.0µL なので、例えば 8 繰り返しをすべて合わせると 96.0µL になる。

2) SPRIselect のボトルをよく攪拌し、沈殿したビーズをよく分散させる（図 5-2-1-2-2）。1 サンプルあたり 300µL の 85%エタノールを用意する。

3) PCR 産物溶液に対し、等量の SPRIselect を添加し、ピペッティングを 10 回行ってよく攪拌後、全量を 96 ウェルプレートに移し替える（図 5-2-1-2-3）。室温で 1 分間静置する。

4) 96 ウェルプレートを 96 ウェルプレート用マグネットプレートにセットし、液が透明になるまで静置する（図 5-2-1-2-4）。

5) ビーズを吸わないように上清を慎重に除去する（図 5-2-1-2-5）。

6) マグネットプレートにセットしたまま、150µL の 85%エタノールを加え（図 5-2-1-2-6）、室温で 30 秒静置する。ビーズを吸わないように P-200 の 8 連ピペットで上清を慎重に除去する。

7) マグネットプレートにセットしたまま、再度 150µL の 85%エタノールを加え、室温で 30 秒静置する。ビーズを吸わないように P-200 の 8 連ピペットで上清を慎重に除去する（図 5-2-1-2-7）。

8) プレートをスピンダウンして再度マグネットプレートに置き、P-10 の 8 連ピペットとチップを使って残留エタノールを完全に取り除く（図 5-2-1-2-7）。

9) プレートを取り外し、Buffer EB を 25µL 添加してピペッティングを 10 回行ってよく攪拌する。室温で 1 分間静置する（図 5-2-1-2-7）。

10) マグネットプレートにセットし、液が透明になるまで静置する（図 5-2-1-2-8）。

11） ビーズを吸わないよう注意しながら透明な上清を全て回収し、それぞれ新しい 1.5mL チューブ（DNA 低吸着）に移す（図 5-2-1-2-9）。この状態で－20℃で安定的に保存が可能である。

5-2-1-3. 精製・濃縮済み 1st PCR 産物の定量と希釈

精製によってプライマーダイマー等が除かれているかを確認すると同時に PCR 産物の量を測定する。ここでは、アジレント社の TapeStation 4150 を用いたプロトコールを記す。また、用いるキットは High Sensitivity D1000 ScreenTape System になる。ScreenTape には予めゲルが充填されており、一度に最大 16 本の 1st PCR 産物を定量できる。DNA ラダーを使用する場合は 15 本の産物が定量できる。なお、TapeStation 以外に他社の同等の機器でも同様の分析が可能である。

常に使い捨て手袋を着用する。

1） 30 分前に試薬を室温に戻しておく（図 5-2-1-3-1）。

2） TapeStation 4150 付属のコンピューターを起動する。起動完了後に TapeStation 4150 の本体の電源を入れる（図 5-2-1-3-2）。

3） TapeStation とコンピューターの接続が確認できたら、TapeStation 4150 コントローラーを起動し、High Sensitivity D1000 ScreenTape と必要な数の 4150/4200 TapeStation Loading Tips をセットする（図 5-2-1-3-3）。

4） 8 連チューブを用意し、High Sensitivity D1000 Ladder（1 本）とサンプル数を合計した本数の High Sensitivity D1000 Sample Buffer 2μL を分注する（図 5-2-1-3-4）。

5） 分注した 2μL の Buffer に、Ladder もしくは精製濃縮済み 1st PCR 産物を 2μL ずつ入れ（図 5-2-1-3-5, 6）キャップをする。軽く遠心後、ボルテックスを使用し 2000rpm で 1 分間攪拌する（図 5-2-1-3-7）。攪拌後に再度軽く遠心し、溶液をチューブの底に集める。

6） 遠心後、溶液が飛び散らないように注意深くキャップを開け、TapeStation 4150 のカセットにセットする（図 5-2-1-3-8）。

7） TapeStation 4150 コントローラーの指示に従って泳動を開始すると（図 5-2-1-3-9, 10）、20 分ほどでターゲットのバンド（約 310bp）がフェログラムと共に表示される（図 5-2-1-3-11）。マーカーのピークが読み取られない場合がまれにあるが、その時

には適宜マニュアルで補正を行う。

8） ターゲットバンドの濃度を読み取り、DNase/RNase フリー水で 0.1ng/µL に希釈する。High Sensitivity D1000 の測定レンジは 10pg-1000pg なので、バンドの濃度がレンジを超えている場合は適切な希釈率にサンプルを希釈して再度測定を行い、適切なレンジ内に収めて希釈率を決める。ブランクについては原則としてシグナルが得られないため、ポジティブサンプルの平均希釈率を便宜的に用いて希釈する。ただし、例えば非特異的増幅が顕著な場合は 2nd PCR 後に濃度を調整したほうがよい。その際は 5-2-2-1 の 11)のステップでサンプルを 1 つのチューブにまとめず、個別に精製と DNA 濃度の測定を行う。

注意：精製・濃縮済み 1st PCR 産物の希釈にあたっては、PCR 準備室で個々のサンプルの希釈に必要な DNase/RNase フリー水を予め 1.5mL チューブに分注しておき、それを PCR 室に持ち込むとよい。精製・濃縮した 1 st PCR 産物を PCR 準備室に持ち込むと、クロスコンタミの大きな原因となるので注意すること。また、所定の濃度に達しないときは、0.05ng/µL に希釈して 2nd PCR のサイクル数を増やすなど工夫する。

9） 希釈後の 1st PCR 産物は、作製したその日のうちに使用し、冷蔵保管や凍結保管は行わない。希釈前の 1st PCR 産物は－20℃で保存するが、なるべく凍結融解を行わないよう、以降の作業を設計する。

5-2-2. ライブラリーの調製ー2：2nd PCR

実験を始める前に

本項では、定量済みの 1st PCR 産物をテンプレートに用いて 2nd PCR を行う方法について記す。2nd PCR は、シークエンスプライマーが付加したテンプレート（定量済み 1st PCR 産物）に、インデクス（タグ）配列とフローセル結合配列を付加することが主な目的となる。テンプレートを増幅することが目的ではないので、サイクル数は通常 10 回にとどめているが、1st PCR 産物が十分量得られなかった場合（0.1ng/μL 未満にしか調整できない場合）は、濃度に応じて 2nd PCR のサイクル数を増やすなどの工夫が必要になる。また、ラン間のキャリーオーバー（MiSeq 内部の流路に残存する前回ランのライブラリー）の影響を最小限にするために、1 回使ったインデクス配列の組み合わせはその後の数回（2～3 回）のランでは使うべきではない。

2nd PCR に必要な実験器具と試薬・消耗品（例）

- サーマルサイクラー（96 ウェルプレートが仕掛けられるものがよい）
- 定量済み 1st PCR 産物（0.1ng/μL）
- KAPA HiFi HS ReadyMix（KK2602，KAPA Biosystems）
- インデクス付きプライマー（インデクス配列については本項末尾に関連情報を記す）※1，※2

フォワードプライマー（青の部分が 8 塩基からなるインデクス配列）

5’-AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACx xxx xxx xAC ACT CTT TCC CTA CAC GAC GCT CTT CCG ATC T-3’

リバースプライマー（赤の部分が 8 塩基からなるインデクス配列）

5’-CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT xxx xxx xxG TGA CTG GAG TTC AGA CGT GTG CTC TTC CGA TCT-3’

- DNase/RNase フリー水（または分子生物学実験用のハイグレードな滅菌水）
- TE バッファー（分子生物学実験用のハイグレードなもの）
- 8 連チューブ
- 1.5mL チューブ（DNA 低吸着）
- マイクロピペット P-1000，P-200，P-100，P-20，P-2（ピペットマン，ギルソン）
- フィルターチップ（マイクロピペットの容量に合わせて各種）
- 電動マイクロピペット 0.5～10μL，5～100μL（Xplorer Plus，エッペンドルフ）
- 1.5mL/2.0mL チューブ用チューブラック

・ 8 連チューブ用チューブラック
・ 使い捨て手袋（パウダーフリー）

※1 TE バッファーで 100µM に希釈済みのものを注文すると便利である。
※2 1st PCR で使用するプライマーに合わせて配列を変更する必要がある。ここでは本マニュアルで示した MiFish プライマーを 1st PCR に使用した場合の例を示す。

2nd PCR 産物の切り出しに必要な実験器具と試薬・消耗品（例）

・ E-Gel Power Snap Plus Electrophoresis Systems（G9110，サーモフィッシャー）
・ E-gel SizeSelect II 2%（G661012，サーモフィッシャー）
・ 分子サイズマーカー（ターゲットサイズ近辺を判別できるもの）
・ 2nd PCR 産物（1 本あるいはライブラリーごとに複数本のチューブにまとめたもの）
・ DNase/RNase フリー水
・ 1.5mL チューブ（DNA 低吸着）
・ マイクロピペット P-100（ピペットマン，ギルソン）
・ フィルターチップ 100µL
・ 1.5mL/2.0mL チューブ用チューブラック
・ 使い捨て手袋（パウダーフリー）

切り出した 2nd PCR 産物の定量に必要な実験器具と試薬・消耗品（例）

・ Qubit 4.0 Fluorometer（サーモフィッシャー）
・ Qubit dsDNA HS Assay（Q32851［100 サンプル用］，サーモフィッシャー）（Q32854［500 サンプル用］，サーモフィッシャー）
・ Qubit 測定用 500µL 専用チューブ（Q32856，サーモフィッシャー）
・ 500µL チューブ用チューブラック
・ 卓上小型遠心機（マイクロシックス MS-1，アズワン）
・ マイクロピペット P-1000，P-200，P-100，P-20，P-2（ピペットマン，ギルソン）
・ フィルターチップ（マイクロピペットの容量に合わせて各種、ピペットマン適合型）
・ E-Gel で回収した 2nd PCR 産物
・ 使い捨て手袋（パウダーフリー）

5-2-2-1. 2nd PCR

常に実験用の使い捨て手袋を着用する。作業中に手袋の汚染を感じた場合は速やかに交換する。以下に記す方法は、使用する試薬の量を減らすと同時に、2nd PCR で得られる各ライブラリーのリード数ができるだけ均一になるように工夫したものである。

注意：PCR の準備は必ず PCR 準備室（プレ PCR ルーム）で行うこと。また、希釈したとはいえテンプレートは PCR 産物を含む。したがって、テンプレートを PCR 準備室に持ち込んではならない。テンプレートの分注は PCR 室（ポスト PCR ルーム）内のクリーンベンチ内（あるいはそれに相当するスペース）で行うこと。PCR 室でテンプレートを分注する際には、部屋のファンを停めて実験室内のチリが舞い上がらないように注意する。

1） 実験を始める前にサーマルサイクラーの電源を入れる。

2） プライマーの希釈：市販の TE バッファーを用いて、プライマーの原液を 5μM に希釈する。

3） 試薬の組成：全容量 15μL（DNA 量 1.86μL を含む）で PCR を行う場合に、チューブ 1 本当たりの組成は以下のようになる。（注意：試薬は必要量の 1.2 倍程度の量を調合しないと、電動ピペットで分注する際に不足することがある）。プライマーの終濃度は、フォワードプライマー、リバースプライマーそれぞれが 293 nM 程度となる。

KAPA HiFi HS ReadyMix	7.5μL
プライマー	各0.88μL
DNase/RNase フリー水	3.88μL
濃度調整済 1st PCR 産物	1.86μL

注意：2nd PCR では、フォワードプライマーとリバースプライマーに含まれるインデクス配列の組み合わせをサンプルごとに変える。こうすることによって、シークエンス後に異なるサンプルの識別が可能になる。インデクス配列の組み合わせ方にはいろいろな方法があるが、ここでは 8 連チューブをチューブラックに並べたときの「行」と「列」でインデクス配列を変える方法（Combinatorial Dual Index 方式，CDI）を採用する。8 連チューブの場合、行数は 8 に固定されている一方で、列数は使用する 8 連チューブの本数で調整できる。例として、8 種のフォワードプライマー（インデクス配列は D501～508）と 4 種のリバースプライマー（インデクス配列は A701～704）を用いることで、32 ライブラリー（＝サンプル）の並列シークエンスを可能にする組み合わせを示す[※1]。また、冒頭に記したように、ラン間のキャリーオーバー（MiSeq 内部の流路に残存する前回ランのライブラリー）の影響を最小限にするために、1 回使ったインデクス配列の組み合わせはその後の数回（2～3 回）のランでは使用を避けた方がよい。

D501/A701	D501/A702	D501/A703	D501/A704
D502/A701	D502/A702	D502/A703	D502/A704
D503/A701	D503/A702	D503/A703	D503/A704
D504/A701	D504/A702	D504/A703	D504/A704
D505/A701	D505/A702	D505/A703	D505/A704
D506/A701	D506/A702	D506/A703	D506/A704
D507/A701	D507/A702	D507/A703	D507/A704
D508/A701	D508/A702	D508/A703	D508/A704

上記のような組み合わせの場合、行方向（横方向）には標記のフォワードプライマー（D501～508）を含むチューブ 4 本分のプレミックスを 8 種類、列方向（縦方向）には標記のリバースプライマー（A701～704）を含むチューブ 8 本分のプレミックスを 4 種類作成すればよい（図 5-2-2-1-1）。このように（プライマーのみを 1 本 1 本分注するのではなく）プライマーを含むプレミックスを作成することで、PCR 反応の総量が小さくても（ここでは 15μL）正確な反応溶液の調製が可能になる。

4）分注が終了した 8 連チューブのキャップを軽く閉じ、卓上小型遠心機で遠心して溶液をチューブの底に振り落とす。

5）8 連チューブをチューブラックごと PCR 室のクリーンベンチ（あるいはそれに相当する空間）に持って行く。

6）8 連チューブのキャップをプレミックスが飛散しないように注意深く開け、希釈済み 1st PCR 産物を所定のチューブに 1.86μL ずつ入れる。

7）8 連チューブのキャップをしっかりと閉じ、卓上小型遠心機で溶液をチューブの底に落とす。

8）2nd PCR では、アニーリングと伸長反応を合わせたシャトル PCR を行う。サーマルサイクラーを以下のように設定する。

95℃の DNA 変性を 3 分間（初期変性と HotStart 酵素の活性化）
98℃の DNA 変性を 20 秒
72℃のアニーリング+伸長反応を 15 秒
（98℃の変性と 72℃のアニーリング+伸長反応：10 サイクル）
72℃の伸長反応を 5 分間（最終伸長）
4℃

9）8 連チューブをサーマルサイクラーにセットし 2nd PCR を開始する。

10）反応終了後は速やかにサイクラーから取り出し、次の作業まで-20℃で凍結保管する。

11）2nd PCR が終了すると、サンプルごとに固有のインデクスが付加されているので、酵素失活処理もしくはインデクスプライマー除去後に 1 本のチューブにまとめることができる。まとめて分析したいサンプル（たとえば 1 回の調査でとられた 10 サンプル）ごとに 1 本のチューブにまとめる（図 5-2-2-1-2）。 1 st PCR 後に希釈を行っている場合、特に濃度調整などは不要である。ただし、PCR 阻害物質の混入しているサンプルでは希釈しても増幅率に影響が残ることがあり、取得リード数が少なくなる場合がある。

※1 イルミナ社製シークエンサーでは、シーケンシング中に発生するインデックスホッピング（サンプル識別のために付加したタグの入れ替わり）の影響を極力小さくするため、2nd PCR で使用するフォワードプライマーとリバースプライマーを列間もしくは行間で共用せず、1 サンプルごとにまったく別の組み合わせのプライマーを使用することもある（Unique Dual Index 方式）。特に iSeq 等のパターンドフローセルを採用しているシーケンサーではインデックスホッピングの発生率が高いため、メタバーコーディング解析で対象機種を利用する際には UDI の採用は必須と考えてよい。

5-2-2-2. 2nd PCR 産物の精製

2nd PCR 産物には、MiSeq を用いた超並列シークエンスに必要なフローセル結合配列（計 53bp）とインデクス配列（計 16bp）が 1st PCR 産物（約 300bp）の両端に付加されている。1st PCR 産物には、ターゲットとなる魚類由来の産物に加えて 70bp ほど大きな非特異的産物（微生物の 16S rRNA 由来の産物と推定されている）が含まれることが多い。本項では、魚類由来の 2nd PCR 産物（約 370bp）のみを E-Gel を用いたゲル電気泳動で切り出す方法（実際にはピペットで吸いとる方法）を記す。

常に実験用の使い捨て手袋を着用して作業する。

1） E-Gel Power Snap Plus Electrophoresis Systems（以下 Power Snap）のスイッチを ON にする。

2） E-gel SizeSelect II 2%（プラスチックケースに封入されたゲルで以下「ゲル」と呼ぶ）が入ったパッケージを開封し、ゲルのウェルに挿入されたコーム 2 個を注意深く取り外し（図 5-2-2-2-1）、Power Snap に挿入する（図 5-2-2-2-2）。

3） 分子サイズマーカーを適切に調製し、総量 25µL とする。また、2nd PCR 産物 22.5µL と付属の Loading Buffer 2.5µL を混合し、総量 25µL とする。

4) 全てのウェルに水を 50 µL ずつ入れた後、分子サイズマーカーと 2nd PCR 産物 を上段の各ウェルにロードする。分子サイズマーカーはサンプルと別のウェルにロードする。

5) Power Snap のフィルターカバーを閉める（図 5-2-2-2-3）。画面で Category と Type を操作して、E-Gel EX 2％を選択し、泳動時間をとりあえず 14 分にセット後、スタートする。

6) 泳動開始後 10 分程度以降は、View Gel 機能を操作して産物の状態をチェックする。ゲルの回収ウェルに約 370bp のターゲットバンドが近づくまで、泳動時間を調整しつつ泳動する。

7) ターゲットバンドが十分回収ウェルに近づいたところで停止する（図 5-2-2-2-4）。泳動は、停止後も多少惰性で継続されるので、停止のタイミングに注意すること。

8) 回収ウェルに DNase/RNase フリー水を 25µL 補充する。

9) 慎重に泳動を再開する。回収ウェルにバンド全体が入ったところで泳動を停止する。

10) ピペットを用いて回収ウェルからターゲットバンドを吸い出し、ライブラリーごとに 1.5mL チューブにまとめる。回収する際に、ウェルの底にピペット先端で穴を開けないように注意する。

注意：多くの場合、一回の回収で十分量の 2nd PCR 産物を吸い出せるが、定量後に 4nM に調整するには濃度が不足することがある。そのような場合は、回収ウェルに DNase/RNase フリー水を満たして泳動を再開し、一旦バンドを回収ウェルの下流側に出し、泳動モードを Reverse E-Gel にして回収ウェルに戻して再び吸い出すという操作を繰り返すことも可能。この場合、スピンカラムなどをつかって産物を濃縮すると十分な濃度の 2nd PCR 産物が得られる。

5-2-2-3. 切り出した 2nd PCR 産物の定量

本項では、E-Gel を用いて切り出したライブラリーの Qubit による簡易濃度測定法について記す。より正確に濃度を決めるには qPCR による測定がイルミナ社から推奨されているが、経験的には Qubit 測定でも十分であろう。ここでは Qubit 4.0 を使用する場合を例に解説する。

常に実験用の使い捨て手袋を着用して作業する。

1) Qubit dsDNA HS Assay キットを冷蔵庫から取り出し 30 分以上かけて室温に戻す

（図 5-2-2-3-1）。

2） Qubit の濃度測定に必要なチューブの本数は校正用スタンダード#1 と＃2 にライブラリーの数を加えたものになる。

3） キットが室温に戻ったら、 1 測定あたり 199µL の Qubit dsDNA HS Buffer に Qubit dsDNA HS Reagent を 1 µL を加えた計 200µL のプレミックスを必要本数分調製する（図 5-2-2-3-2, 3）。濃度を測定するライブラリーが 1 本の場合、校正用スタンダード 2 本を含めて計 3 本が必要になるので、Qubit Reagent を 3µL に Qubit Buffer を 597µL 加えたプレミックスを調製する。

4） Qubit 測定用 500µL 専用チューブを 2 本取り出し、校正用スタンダード#1 と#2 用にプレミックスを 190µL ずつ分注する。その後、キットに付属するスタンダード#1 と#2 をそれぞれのチューブに 10µL ずつ入れ（図 5-2-2-3-4）、チューブのキャップを閉めてボルテックスで 2～3 秒撹拌し軽く遠心する。

5） 濃度を測定するライブラリーの数だけ 500µL チューブを用意し、それぞれにプレミックスを 198µL ずつ分注する。その後、ライブラリーを 2µL ずつ入れ（図 5-2-2-3-5）、チューブのキャップを閉めてボルテックスで 2～3 秒撹拌し軽く遠心する。2 分間室温で静置する（図 5-2-2-3-6）。

注意：最低でも 2 分間室温で静置しないと測定値が安定しない。

6） Qubit Fluorometer の電源を入れて起動する（図 5-2-2-3-7）。画面から dsDNA を選択し、次いで使用するキット（ここでは dsDNA High Sensitivity）を選択する。校正用スタンダードを用いた校正を選択し、4）で用意したスタンダード#1 と#2 を Qubit の指示に従って順番に測定する（図 5-2-2-3-8）。

7） 次にライブラリーの濃度測定を行う。チューブをセットし、使用するサンプルの量を 2µL に設定して濃度を測定する（図 5-2-2-3-9, 10）。同じサンプルの濃度測定を、計測値が安定するまで複数回行うとよい。

8） Qubit 4.0 ではサンプル濃度（ng/µL）及びそれを 100 倍希釈した測定溶液の計測値（ng/mL）が表示される（図 5-2-2-3-11）。サンプル濃度が 1.0ng/ µL 未満の場合には、複数ウェルから同一ライブラリーを回収し、それをカラムで濃縮するなど工夫が必要になる。

5-2-2-4. インデクス関連情報

インデクス配列は、Hamady et al. (2008) にリストアップされているものから適当なものをピックアップすればよい。ただし、i5 同士、i7 同士では、同時に使用するインデクス配列はカラーバランスに留意し、また、3 塩基以上違うものを選択する必要がある。MiSeq のランで用いるサンプルシートに記入する際には、i7 の配列は逆相補鎖に変換して記入しないとならないが、iSeq100、NextSeq550 など、機種によって記入の仕方が異なるので注意が必要である。ランごとにインデクスを変えることにより、ラン間のクロスコンタミネーション（MiSeq 内部の流路に残存する前回ランのライブラリーに由来するコンタミネーション）を避けることができるので、手持ちのインデクス配列は多めに用意しておくのがよい。

参考文献

Hamady, M., Walker, J. J., Harris, J. K., Gold, N. J., Knight, R. 2008. Error-correcting barcoded primers forpyrosequencing hundreds of samples in multiplex. *Nature Methods* 5: 235–237. doi: 10.1038/nmeth.1184.

5-2-3. MiSeq を用いた超並列シークエンス

シークエンスを始める前に

本項では、イルミナ社の MiSeq を用いた超並列シークエンス法について記す。本手法によるシークエンスを成功に導く最も重要な点は、アダプターダイマーや非特異的産物を含まない、MiFish アンプリコンのみからなる良質のライブラリーを調製することである。このような良質のライブラリーを得ると同時に、ライブラリーごとにほぼ均等なリード数を得るため、本プロトコールでは 1st PCR 産物に対して精製・定量を行い、1st PCR 産物を一定濃度（0.1ng/µL）に調整したテンプレートを用いて 2nd PCR を行うプロトコールを採用した。また、ランを失敗しないためにも MiSeq のメンテナンスが非常に重要になるので、最初にメンテナンスに関連する情報を列記した。なお、MiSeq（ランダムフローセルを採用）の他にイルミナ社の iSeq100（パターンドフローセルを採用）でも、MiFish プライマーを用いた分析で、ほぼ同様の分類学的検出結果を得られることが確認されている（Nakao et al. 2021）。

MiSeq のメンテナンスに必要な試薬・消耗品（例）

- Tween 20 (P7949，Sigma-Aldrich)
- DNase/RNase フリー水
- 50mL 自立式遠沈管
- 500mL 洗浄瓶
- 0.01%次亜塩素酸溶液
- MiSeq Disposable Wash Tubes（MS-102-9999，イルミナ）
- 使い捨て手袋（パウダーフリー）

シークエンスに必要な実験器具と試薬・消耗品（例）

- MiSeq（イルミナ）
- MiSeq Reagent Kit v2（300 サイクル）（MS-102-2002，イルミナ）：総リード数 1500 万本が必要な場合は本品を用いる。それより少なくてよい場合は、必要なリード数に応じて MiSeq Reagent Micro Kit v2（MS-103-1002；総リード数約 400 万本）あるいは MiSeq Reagent Nano Kit v2（MS-103-1001；総リード数約 100 万本）を用いる。
- 濃度測定済みのライブラリー
- 0.2N NaOH（2N などの濃度の高いストックから実験のたびに調製する）

- PhiX Control v3（FC-110-3001，イルミナ）
- 99.5% 分子生物学用グレードエタノール（富士フィルム和光純薬）
- DNase/RNase フリー水
- 脱イオン水
- 1.5mL チューブ （DNA 低吸着）
- ボルテックス・ミキサー（VORTEX-GENIE 2 Mixer，エムエス機器）と 3 インチプラットホーム
- マイクロピペット P-1000，P-200，P-100，P-20，P-2（ピペットマン，ギルソン）
- フィルターチップ（マイクロピペットの容量に合わせて各種）
- チップ 1000μL
- レンズクリーニングティシュ（2105-841，ワットマン）
- 卓上小型遠心機（マイクロシックス MS-1，アズワン）
- 試薬キット解凍用バット（W373×D273×H63 程度の大きさ）（PB-2，アズワン）
- 使い捨て手袋（パウダーフリー）

MiSeq Reagent Kit には、冷凍保存品として 1）HyB Buffer チューブと 2）試薬カートリッジ（図 5-2-3-A）が、冷蔵保存品として 3）PR2 ボトルと 4）フローセル（図 5-2-3-B）の４点が含まれる。冷蔵と冷凍を間違えないように保管する。また、冷凍保存品は解凍したら再凍結させない。

5-2-3-1. MiSeq のメンテナンス

MiSeq では次の 3 通りの洗浄を行う。1）メンテナンスウォッシュ：2 回のウォッシュ液交換を伴う 3 × 20 分のウォッシュで月に 1 回必ず行う（前回のランから 1 ヶ月以上経過すると、MiSeq 側から強制的にメンテナンスウォッシュを行うように要求される）; 2）スタンバイウォッシュ： 1 回のウォッシュ液交換を伴う 2 × 50 分のウォッシュで、1 週間以上 MiSeq をアイドリング状態にすると MiSeq 側からこのウォッシュを行うように要求される；3）ポストランウォッシュ：ウォッシュ液交換のない 1 × 20 分のウォッシュでラン終了後に行う。なお、ポストランウォッシュには、イルミナが提供するアダプターを用いた次亜塩素酸ウォッシュというプロトコールがあるので、通常はこちらを用いて前回ランの持ち越しライブラリーを流路から取り除くようにする。ラン終了後、ポストランウォッシュを行いスイッチオフにした場合、以下のような流れで一連のウォッシュを行い、次のランに進むことになる。なお、前回ウォッシュを行なった日付はウォッシュのトップ画面に日付が表示されるので、それを参考にする。

① MiSeq 本体のスイッチオン（MiSeq コントロールソフトウェアが起動）
↓

② メンテナンスウォッシュ（前回のランから 1 ヶ月以上経過した場合）
↓
③ 次亜塩素酸を用いたポストランウォッシュ（前回ランのライブラリーを除去）
↓
④ MiSeq のラン開始
↓
⑤ 通常のポストランウォッシュ（次亜塩素酸を用いない）
↓
⑥ MiSeq 本体のスイッチオフ

すべてのウォッシュに共通する操作

常に実験用の使い捨て手袋を着用して作業する。

1） 10% Tween 20 ウォッシュ液の作成：Tween 20 原液（図 5-2-3-1-1）を希釈して10%の Tween 20 溶液（ストック可能）をつくり、さらにそれを希釈して実際に用いる 0.5% Tween 20 ウォッシュ液とする。10%に調製済みの Tween 20 を購入して使ってもよい。50mL 遠沈管に 5mL の Tween 20 を注意深く注ぐ（Tween 20 は非常に粘性が高いので入れ過ぎないように注意；図 5-2-3-1-2）。この遠沈管に DNase/RNase フリー水を加えて 50mL にメスアップ。遠沈管をよく撹拌して溶液を混和する。1 回のウォッシュで 10%の Tween 20 溶液を 25mL 使用するので、これが 2 回分のウォッシュ液になる。

2） 0.5% Tween 20 ウォッシュ液の作成：上記の 10%の Tween 20 溶液 25mL を 500mL の洗浄瓶に入れ（図 5-2-3-1-3）、洗浄びんの目盛りで 500mL に達するまで DNase/RNase フリー水を加える。10 回ほど転倒混和する。

3） ウォッシュ液の充填：溶液の入った洗浄瓶を使ってウォッシュカートリッジにウォッシュ液を注入する（図 5-2-3-1-4）。ウォッシュカートリッジのポート（孔）の上から 1cm 程度までウォッシュ液を注ぐと約 6mL 入る。すべて注ぎ終えたら残りのウォッシュ液をウォッシュボトル（350mL 程度）に移し替える（図 5-2-3-1-5）。

4） ウォッシュの準備：MiSeq コントロールソフトウェア（MCS）のトップ画面（図 5-2-3-1-6）の左下にある Perform Wash ボタンを押と 3 通りのウォッシュが表示される（図 5-2-3-1-7）。実施したいウォッシュを選択する。使用済みフローセル（前回のランで使用したフローセル）がフローセルコンパートメントにセットされていることを確認する（図 5-2-3-1-8）。画面右下の Next を押すと、ウォッシュカートリッジとウォッシュボトル、廃液ボトルの取り出し画面に変わる。

5） ウォッシカートリッジのセット：しばらくすると、カートリッジやボトルが取り出さ

れる様子が画面に現れる（図 5-2-3-1-9）。MiSeq 本体の試薬コンパートメントのドアを開け、次に試薬チラーのドアを開ける。試薬チラー内に入っている前回ランのカートリッジ、もしくは前回ウォッシュに用いたウォッシュカートリッジを引き出し、用意したウォッシュカートリッジを奥まできっちり入れ（図 5-2-3-1-10）、試薬チラーのドアを閉める。

6） ウォッシュボトルと廃液ボトルのセット：次に試薬コンパートメントのシッパーハンドルを引き上げる。用意したウォッシュボトルをセットし（図 5-2-3-1-11）、廃液ボトルを空にして所定の位置にセットしたら、シッパーハンドルを引き下げる（図 5-2-3-1-12）。

7） ウォッシュの開始：ウォッシュカートリッジ、ウォッシュボトル、廃液ボトルのセットが完了したら、MiSeq の試薬コンパートメントの扉を閉じ、画面右下の Next を押すとウォッシュが始まる（図 5-2-3-1-13）。

8） ポストランウォッシュの終了：ウォッシュが終了すると右下に Done と表示されるので、それを押すと MiSeq コントロールソフトウェアのトップ画面に戻ってウォッシュの全工程が終了する。メンテナンスウォッシュとスタンバイウォッシュの場合は、以下に記すようにウォッシュ液の交換が必要となるため、ウォッシュ中に先ほど使用した洗浄瓶を水道水でよく洗いミリ Q ですすいだ後、再度 0.5% Tween 20 ウォッシュ液を用意する。使用する分をまとめて調製しておくとよい。

9） ウォッシュ液の交換：メンテナンスウォッシュかスタンバイウォッシの場合、最初のウォッシュが終了するとウォッシュ液を交換するメッセージが表示される。MiSeq の試薬コンパートメントにあるウォッシュカートリッジとウォッシュボトルを取り出し、両者の中に残っている溶液を廃棄する。カートリッジのポートとボトル内部を水道水でよく洗った後に DNase/RNase フリー水でよくすすぐ。新たに作成した 0.5% Tween 20 ウォッシュ液を前述と同様にポートとボトルに満たし、再度 MiSeq の試薬コンパートメントにセットする。廃液はそれほど溜まらないので、廃液ボトルはそのまま使用してもよい。

10）ウォッシュの終了：メンテナンスウォッシュかスタンバイウォッシュの場合、全ての工程が終わると右下に Done と表示される（図 5-2-3-1-14）。Done を押すと MiSeq コントロールソフトウェアのトップ画面に戻ってウォッシュの全工程が終了する。

次亜塩素酸を用いたウォッシュ

1） ウォッシュの準備：ウォッシュカートリッジを用意し、17 番ポートに、0.01%に調整した次亜塩素酸溶液を 1mL 入れた MiSeq Disposable Wash Tubes を差し込む（図

5-2-3-1-15, 16）。17 番ポート以外は通常のポストランウォッシュと同様に 0.5% Tween 20 ウォッシュ液入れ、残りをウォッシュボトルに入れる。

2) 準備が終わったらトップ画面の左下にある Perform Wash ボタンを押す。3 通りのウォッシュが表示されるので Post-Run wash を選択する。画面が切り替わると次亜塩素酸溶液を使用・不使用のチェックボックスが中央やや下に現れるのでチェックを入れる。

3) 右下の Next を押す。これ以降は、前述のウォッシュの実施と同じ。ウォッシュが終了すると右下に Done と表記されるので、それを押すと MiSeq コントロールソフトウェアのトップ画面に戻る。

ラン終了後のポストランウォッシュ

ランが終了すると、右下に Start Wash と表示されるので押す。以降は前述のウォッシュの実施と同じ。

MiSeq 本体の起動法

MiSeq 本体の右側の後ろにあるスイッチを入れる。本体付属の OS である Windows が起動し、起動が完了すると自動的に MiSeq コントロールソフトウェア（MCS）が起動する設定になっている（図 5-2-3-1-17）。起動が完了するには 5 分程度必要になるので、ラン開始の時間を見計らって MiSeq 本体を起動すること。なお、ランの途中停止などのトラブルを避けるために、ラン前のウオッシュがすべて終了したところで MiSeq 本体を再起動することを勧める。

5-2-3-2. シークエンスの下準備

本項では、シークエンスを実際に開始する遅くとも 1 時間前までに終えるべき操作について記す。常に実験用の使い捨て手袋を着用して作業する。

1) 冷凍品の解凍：バットを用意し、冷凍保存してある試薬カートリッジと HyB Buffer のチューブを入れ、カートリッジの側面にある最大水量線まで脱イオン水を静かに注ぐ（図 5-2-3-2-1）。脱イオン水に漬けたまま約 1 時間静置し、キット内部の試薬を十分に解凍する。前日から 4℃に入れて一晩解凍してもよい。4℃では最長 1 週間、試薬を安定に保存できる。

2) 0.2N NaOH 溶液の準備：0.2N NaOH 溶液は、ライブラリーの DNA を一本鎖に変性させるために用いる。ランごとに 2N NaOH 溶液（ストック可）から DNase/RNase

フリー水を用いて希釈し、新鮮な 0.2N NaOH 溶液を調製する。使用する量は微量なので、1.5mL チューブに 1mL 調製すれば、希釈時の誤差も小さく十分量が得られる。調製した 0.2N NaOH 溶液は使用するまで氷上もしくは冷蔵庫に保存し、12 時間以内に使用する。12 時間以内であれば他のランにも使用可能である。残った NaOH 溶液は施設毎の廃棄基準に従って廃棄する。

3） サンプルシートの作成：MiSeq 本体に搭載されているソフトウェア Illumina Experiment Manager（以下 IEM）を起動し、画面の指示に従ってサンプルシートを作成する。サンプルシート作成に必要な試薬カートリッジの番号（例：MS-XXXXXXX-300V2.csv；図 5-2-3-2-2）がカートリッジ側面に記してあるので記録しておく。なお、保存形式が CSV 形式になっていれば、サンプルシートはエクセル等のスプレッドシートとして編集可能である。したがって、ベースとなるファイルを IEM で作成し、それを別途スプレッドシートで編集し直すのが効率的であろう。作成したサンプルシートは、MiSeq 本体の Illumina/Illumina Control Software フォルダー内に保存する。

5-2-3-3. ライブラリー濃度の最終調整

本項では、シークエンス反応が行われるフローセル上において適正な密度でクラスターが形成され、同時にクラスター間の分離がよくなるような実験手法について記す。なお、以下の操作を行うことで得られることが期待されるリード数はキット記載の総リード数からスパイクインした PhiX の割合を除いた数である。

1） 4nM への調整：Qubit で定量した濃度に基づきライブラリーを 4nM に調整する。モル数の計算に用いるのはライブラリー長（平均 372bp）と 1 塩基あたりの分子量（660g/mol）になるが、複数の単位（micro/nano/pico）にまたがって濃度を計算しなくてはならないので、予めスプレッドシートにモル数換算式を入れておくとよい。また、サンプル数が異なる複数のライブラリーを一度にシークエンスする場合は、サンプル数（ブランクを除いたもの）とサンプル毎の取得希望リード数の割り当てから混合比を算出し、それぞれの混合量を決定する。2nd PCR 産物をサイズセレクションしたライブラリは平均 372bp のライブラリー長となる。その溶液の重量濃度がα ng/μL の時、モル濃度は$\alpha*10^6/372*660$ の計算式で求めることができる。

2） DNA の変性：新しい 1.5mL チューブに、4nM に調整したライブラリーを 5μL と 0.2N NaOH を 5μL 入れてピペットで混合する。その後、数秒間ボルテックスし、軽く遠心して溶液をチューブの底に集め、室温で 5 分間静置してライブラリー中の DNA を変性する。この時点での濃度は 2nM である。

3） 20pM への調整：変性した DNA に HyB Buffer を 990μL 加え、20pM に調整する（100 倍希釈）。

4） 最終濃度（12pM）への調整：MiFish アンプリコンの場合、最終濃度を 12pM に調整すると 800～1000K/mm^2 のクラスター密度が得られ、メーカーのスペックにほぼ一致するリード数が得られる。最終濃度を 12pM にするには、360μL のライブラリー溶液に HyB バッファーを 240μL 加える。なお、クラスター密度をより正確にコントロールするには、イルミナライブラリー定量のための qPCR キット（東洋紡の GenNext NGS Library Quantification Kit など）でクラスター形成できる断片のみを濃度評価して　最終濃度を調整する。

5） PhiX のスパイクイン：フローセル上に形成されるクラスター同士のシグナル分離をよくするため、イルミナ社から販売されている PhiX control v3 をスパイクインとして 10-25%入れる。これをサンプル DNA と同様に 0.2N NaOH で変性し、HyB Buffer で 20pM に調整する。10% PhiX とする場合は、例えば上記の 600μL のライブラリーから 60μL を抜き取り、20pM に調整した PhiX を 36μL、HyB Buffer を 24μL 加える。ライブラリーによって適切な PhiX 添加量を決める必要がある。

以上の操作で、12pM に調整されたライブラリー600μL が用意できたので、これを試薬カートリッジに注入し、MiSeq にロードする。

5-2-3-4. シークエンス開始前後の操作

本項では、シークエンス開始前後に必要な操作について記す。既にライブラリーは 12pM に調整されており、機器を正しく設定すればシークエンスできる段階になっている。

常に実験用の使い捨て手袋を着用して作業する。

1） 試薬カートリッジ内の試薬が完全に解凍されたことを確認し、キムタオルでカートリッジ外側についた水滴を十分に拭き取る。試薬カートリッジをおだやかに 10 回程度転倒撹拌し、カートリッジ内の試薬を混和する。試薬内の気泡を取り除くため、キムタオルを敷いた実験台の上にカートリッジを何回か軽く叩きつける（図 5-2-3-4-1）。

2） 1000μL のピペットチップをつかってライブラリー注入ポート（オレンジ色が目印）のホイルに孔を開ける（図 5-2-3-4-2）。使用したチップはそのまま廃棄する。

3） 1200μL または 1000μL の新しいピペットチップを使って、12pM に調整されたライブラリー600μL を試薬カートリッジの注入ポートに入れる（図 5-2-3-4-3）。気泡が入らないようにピペット操作には注意すること。注入口をパラフィルムなどで蓋をし、遮光してランまで 4℃保管する。

4） MiSeq コントロールソフトウェア（MCS）を起動し SEQUENCE ボタンを押してランのセットアップに進む。

5） MiSeq をインターネットに接続していると、SEQUENCE ボタンを押した後に BaseSpace（イルミナ社が提供するクラウド環境）を使用するかどうかの確認ボタンが表示される（図 5-2-3-4-4）。BaseSpace の利用にあたっては、事前に MyIllumina へのユーザー登録が必要となる。

6） BaseSpace を使用する場合には、Use BaseSpace for storage and analysis のボックスにチェックを入れ、表示欄に MyIllumina アカウント登録時に使用した情報を入力する。BaseSpace を使用しない場合はこのボックスを空欄にしておけばよい。選択が終わったら、Next ボタンを押すとフローセルのセッティング画面に切り替わる。

7） 冷蔵保存されていたフローセルを、プラスチック製ピンセットを使って容器から取り出す。フローセルは容器内でバッファーに浸かった状態で保存されているので、MiSeq にセットする前にフローセルのガラス部分とプラスチック部分を DNase/RNase フリー水でよくリンスする。特に、フローセルのプラスチックケース内にバッファーが残りやすいので、その部分はよくリンスすると共にケース内の水分を（注意深く）軽く振り出す。この際、ガスケット（試薬やサンプルへの流路の入り口）部分に強く水流が当たらないように注意する。

8） レンズクリーニングティッシューに 99.5%エタノールを少量滴下し、フローセルのガラス部分についた水分を軽く拭き取る。ガラス部分に汚れや染みがないか目で確認し、きれいになるまでレンズクリーニングティシュで軽く磨く。フローセルのプラスチック部分にある 2 穴のガスケットポートには触れないように注意すること。

9） MiSeq のフローセルコンパートメントのドアを開け、更にフローセルラッチを開けて使用済みのフローセルを取り出す。この時、中のフローセルが飛び出さないように、ラッチの上面に手を当てた状態でラッチを開ける銀色のボタンを押し、急なラッチの跳ね上がりを防ぐとよい。フローセルラッチの台座に埃や析出したバッファーがある場合には、フローセルを磨いたレンズティッシューで拭き取る。

10）フローセルを台座の所定の位置に載せ、カチッと音がするまでラッチを静かに押し下げ固定する。

11）MiSeq コントロールソフトウェア（MCS）の画面左下をチェックし、フローセルに記された ID（RFID）の読み取りがうまくいっていることを確認する。RFID が読まれていたら、フローセルコンパートメントのドアを閉め、Next ボタンを押す。

12）冷蔵保存の PR2 ボトル（シークエンスバッファー）を取り出し、軽く混和してからス

クリューキャップを開ける。

13）MiSeq の試薬コンパートメントのドアを開け、シッパーハンドルを引き上げる。右側の部分に冷蔵保存の PR2 ボトルをセットし、廃液ボトルを空にする。セットが完了したらシッパーハンドルを引き下げる。

注意：シッパーハンドルを引き下げなくてもランが始まってしまうので注意する。引き下げないとバッファーを吸い取ることができないので（おそらくは）ランが停止してしまう。

14）MCS の画面左下をチェックして、RP2 のボトルに記された ID（RFID）が読み込まれていることを確認する。

15）試薬チラーのドアを開け、ウォッシュカートリッジに挿入されているシッパーが完全に引き上げられるまで待つ。シッパーが上がる前にウォッシュカートリッジを引き出そうとすると、シッパーが折れてしまうので注意する。

16）ライブラリーが充填された試薬カートリッジを試薬チラーの奥まで確実に挿入する。

17）試薬チラーのドアを閉める。MCS の画面左下をチェックして、試薬カートリッジに記された ID（RFID）の読み取りがうまくいっているかどうか確認する。

18）画面上に実験名と解析ワークフローが表示されるので確認する。画面左下でサンプルシートのフォルダーの階層を確認して Next を押す。

19）プレランチェックの画面に移行する。チェック項目が表示され、全ての項目にチェックが入ると Start Run ボタンがアクティブになる。ランを開始してよければボタンを押す。

20）Start Run ボタンを押してからしばらくの間はシークエンスの初期トラブルが発生しやすい。試薬がフローセルに流れ込むまではランの再開が可能な場合があるので、5 分間ほどは MiSeq ランの進行を機器の前で見守るとよい。

参考文献

Nakao, R., Inui, R., Akamatsu, Y., Goto, M., Doi., H., Matsuoka, S. 2021. Illumina iSeq 100 and MiSeq exhibit similar performance in freshwater fish environmental DNA metabarcoding. *Scietific Reports* 11: 15763. doi: 10.1038/s41598-021-95360-5

Miya, M., Sato, Y., Fukunaga, T., Sado, T., Poulsen, J. Y., Sato, K., Minamoto, T., Yamamoto, S., Yamanaka, H., Araki, H., Kondoh, M., Iwasaki, W. 2015. MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species. *Royal Society Open Science* 2 (7): 150088. doi: 10.1098/rsos.150088

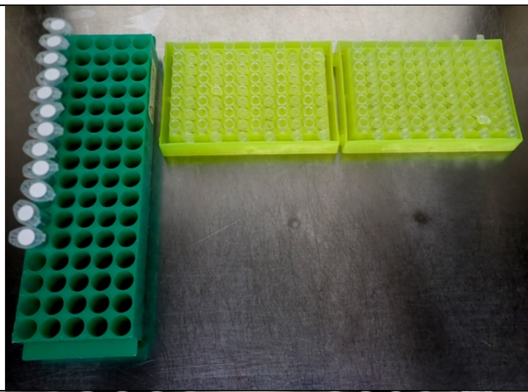
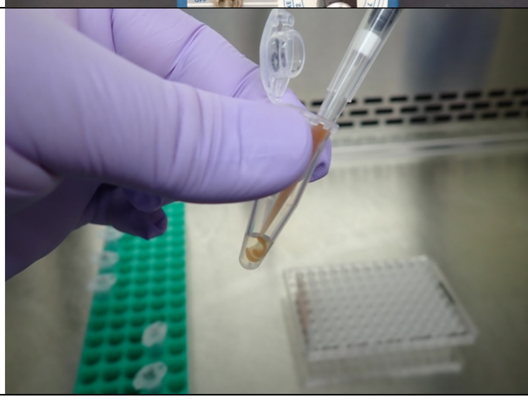
図 5-2-1-1-1 同一サンプルに対して 8 連チューブ 1 本をつかった 8 繰り返しの 1s tPCR をセットアップしたところ。	
図 5-2-1-2-1 繰り返し反応したサンプルをそれぞれ 1 つにまとめる。	
図 5-2-1-2-2 SPRIselect のボトルをよく攪拌して磁性ビーズを分散させる。	
図 5-2-1-2-3 繰り返し分を 1 つにまとめた PCR 産物に等量の SPRIselect を添加してピペッティングで攪拌し、96 ウェルプレート（DNA 低吸着）に移す。	

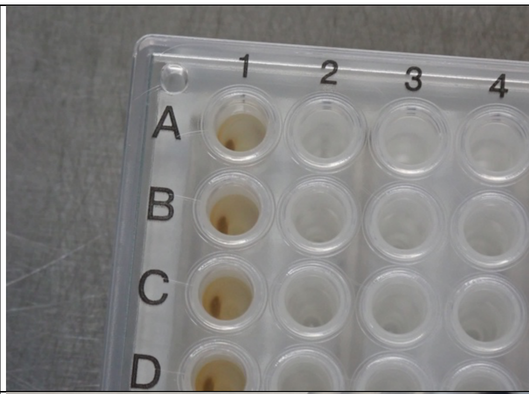
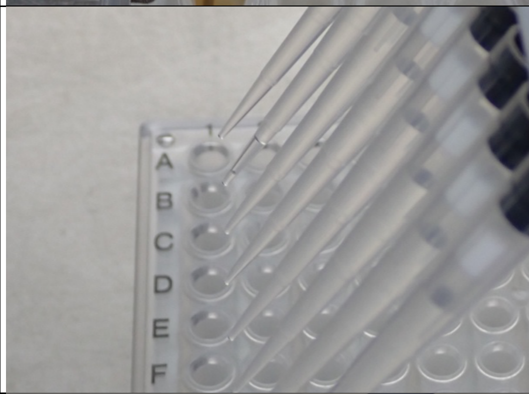
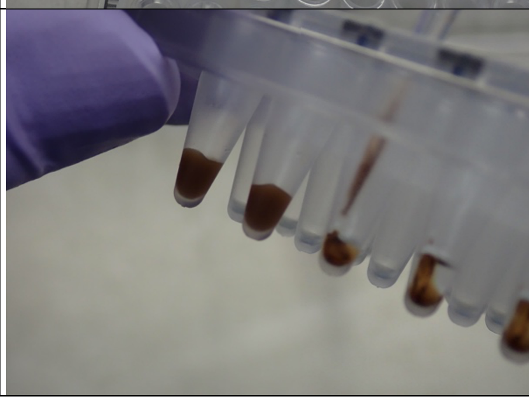
図 5-2-1-2-4 マグネットプレートに設置し、液が透明になるまで静置する。	
図 5-2-1-2-5 上清を慎重に除去する	
図 5-2-1-2-6 マグネットプレートに設置したまま 85%エタノールを加え、30 秒静置し、上清を慎重に除去する。これを 2 回繰り返す。	
図 5-2-1-2-7 遠心で壁面に残った上清を集め、再度マグネットプレートに設置して磁性ビーズから残留エタノールを完全に除去した後、マグネットプレートから取り外し、Buffer EB を 25µL 添加してビーズをよく分散させる。	

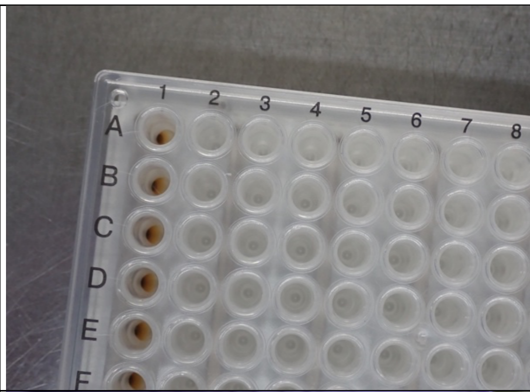
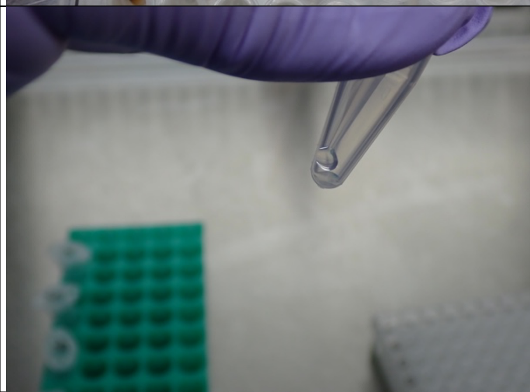
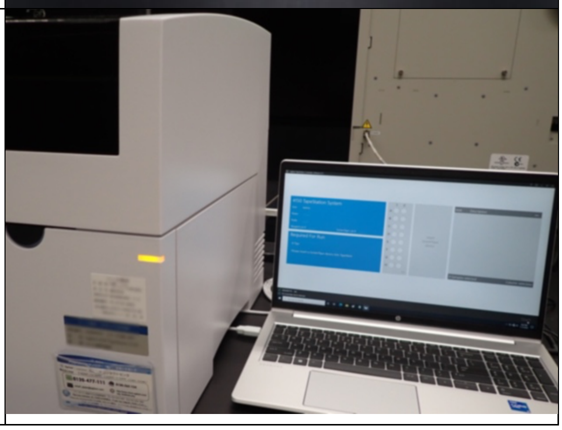
図 5-2-1-2-8 再度マグネットプレートに設置し、液が透明になるまで静置する。	
図 5-2-1-2-9 磁性ビーズを吸わないよう注意しながら上清を全て回収する。	
図 5-2-1-3-1 TapeStation 4150 用のキット。High Sensitivity D1000 Screen Tape（左）と試薬（右）。	
図 5-2-1-3-2 TapeStation 4150 付属のコンピューターを起動する。	

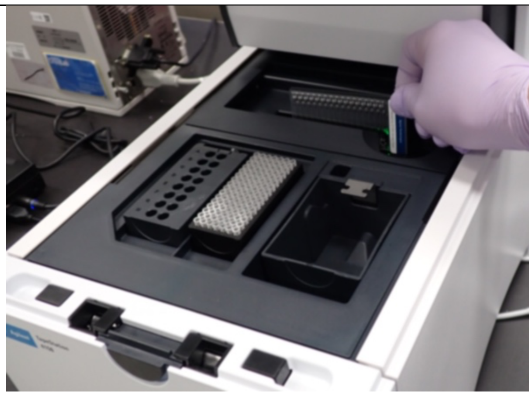
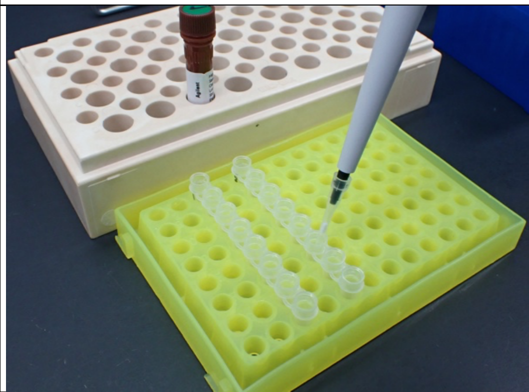
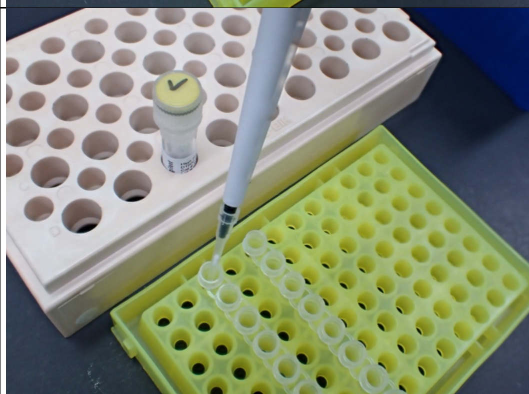
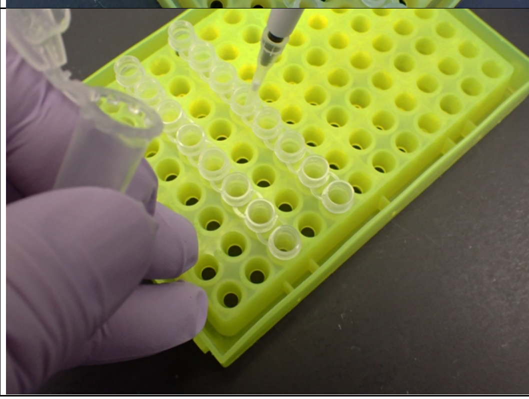
図 5-2-1-3-3 High Sensitivity D1000 Screen TapeScreenTape と必要な数の 4150/4200 TapeStation Loading Tips ピペットチップをセットする。	
図 5-2-1-3-4 High Sensitivity D1000 Sample Buffer を 2μL ずつ分注する。	
図 5-2-1-3-5 High Sensitivity D1000 Ladder ラダー 2μL を 1 本目のチューブに分注する。	
図 5-2-1-3-6 残りのチューブに精製濃縮済み 1st PCR 産物を 2μL ずつ分注する。	

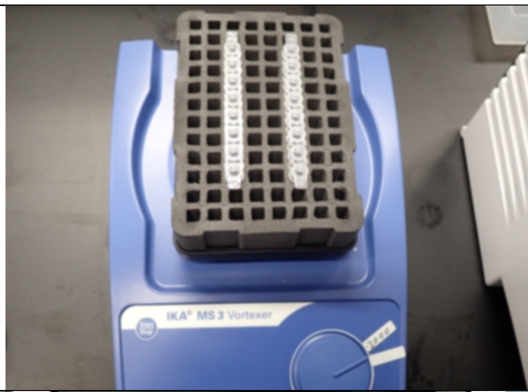
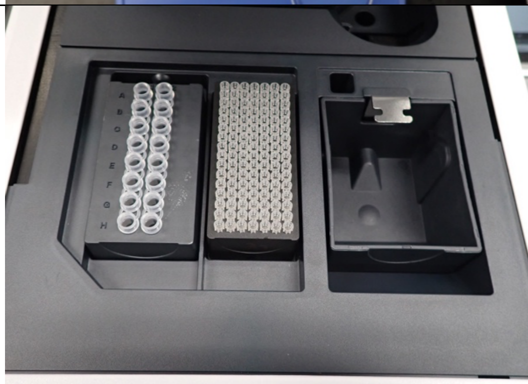
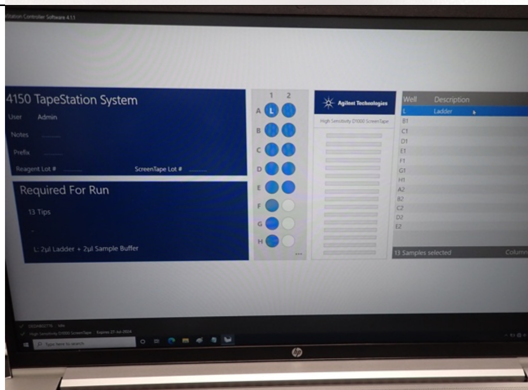
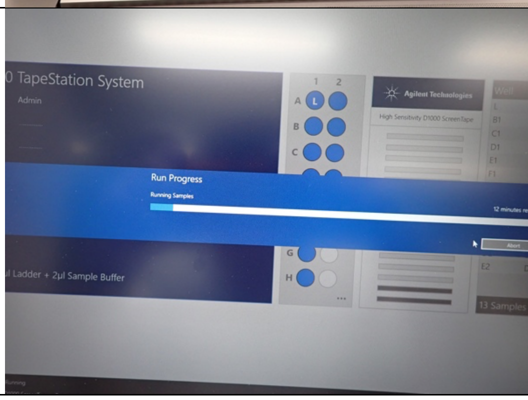
図 5-2-1-3-7 2,000rpm で 1 分間撹拌した後、卓上小型遠心機で液をチューブの底に集める。	
図 5-2-1-3-8 8 連チューブのキャップを中の液が飛び散らないように静かに開け、TapeStation 4150 のカセットにセットする。	
図 5-2-1-3-9 左側の 8 連チューブのイメージ像で、ラダーと測定する PCR 産物のチューブ上での並びを指定する。	
図 5-2-1-3-10 分析を開始すると、自己診断の後に自動で分析を行う。泳動中は残り時間が表示される。	

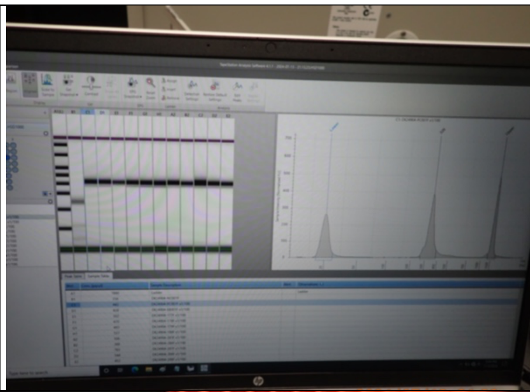
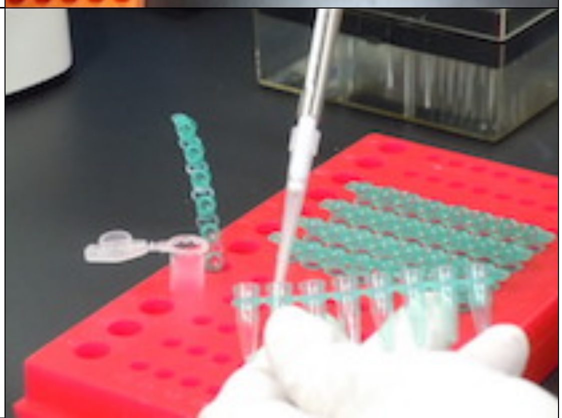
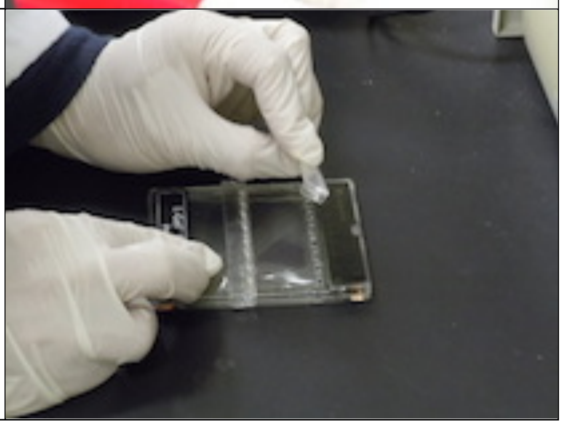
図 5-2-1-3-11 泳動が終了するとターゲットのバンド（約310bp）がフェログラムと共に表示される。	
図 5-2-2-1-1 サンプル数が 40 の場合。	
図 5-2-2-1-2 反応溶液を全量 1 本のチューブにまとめる。	
図 5-2-2-2-1 コームを注意深く取り外す。	

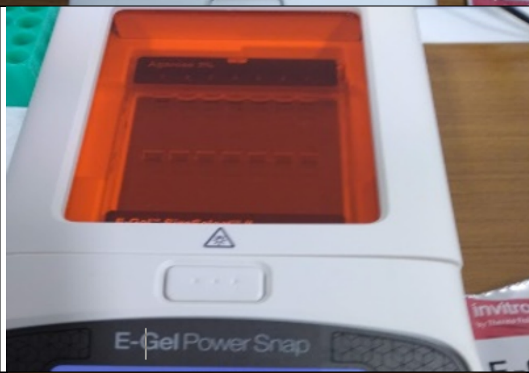
図 5-2-2-2-2 ゲルの右側から iBasePower Snap に挿入する。	
図 5-2-2-2-3 Power Snap のフィルターカバーを閉める。	
図 5-2-2-2-4 基準線回収ウェル直上に到達したターゲット産物（約 370bp）。中央がラダー（サイズマーカー）。回収ウェルのやや上にターゲット産物（370bp）がある。ターゲットバンドの上にスメアと共に時折見られるバンドは非特異的産物なので、回収ウェルに入れないように注意する。	

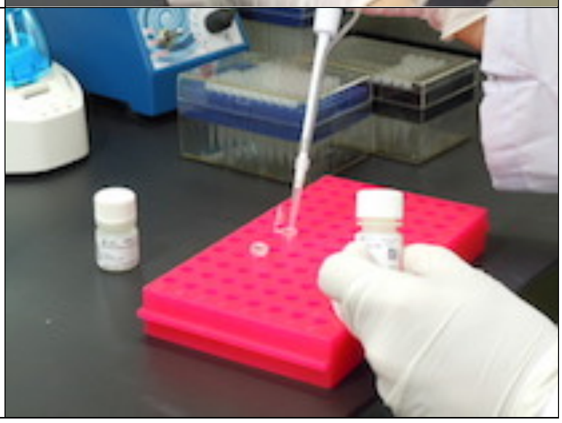
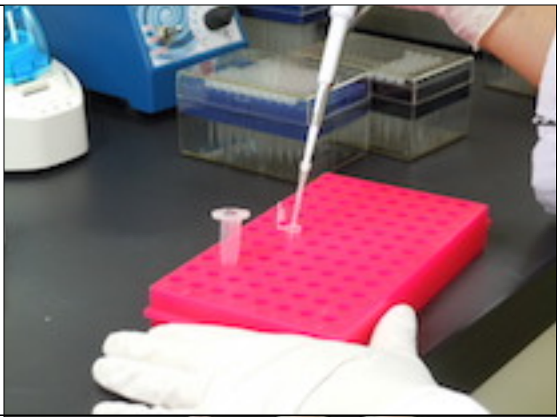
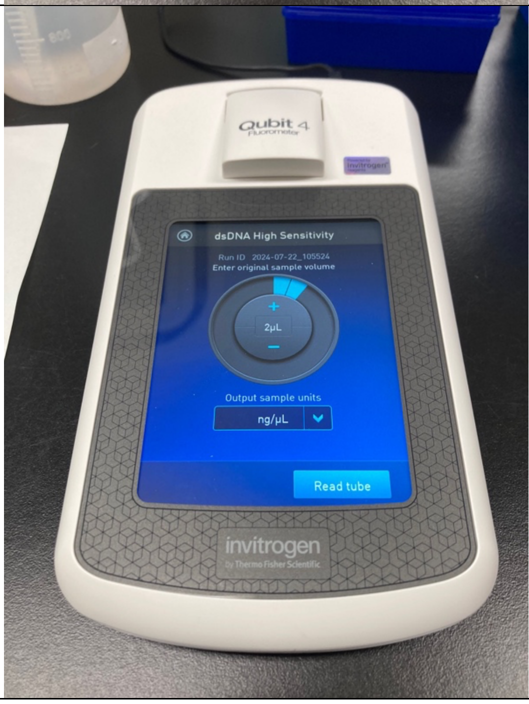
図 5-2-2-3-1 Qubit dsDNA HS Assay キットを冷蔵庫から取り出して 30 分以上かけて室温に戻す。	
図 5-2-2-3-2 新しいチューブに Qubit dsDNA HS Buffer を入れる。	
図 5-2-2-3-3 Qubit dsDNA HS Reagent を入れる。	
図 5-2-2-3-4 スタンダード#1 と#2 をそれぞれのチューブに 10μL ずつ入れる。	

図 5-2-2-3-5 チューブにライブラリーを 2μL 入れる。	
図 5-2-2-3-6 2 分間室温で静置する。この操作を怠ると計測値が安定しない。	
図 5-2-2-3-7 Qubit 4 Fluorometer の電源を入れて起動する。	

<table>
<tr>
<td>図 5-2-2-3-8
スタンダード#1 と#2 を Qubit の指示に従って順番に測定し、検量線を作成する。</td>
<td>
</td>
</tr>
<tr>
<td>図-5-2-2-3-9
Qubit のチューブに加えたサンプルのボリューム、結果の表示単位などを入力する。</td>
<td>
</td>
</tr>
</table>

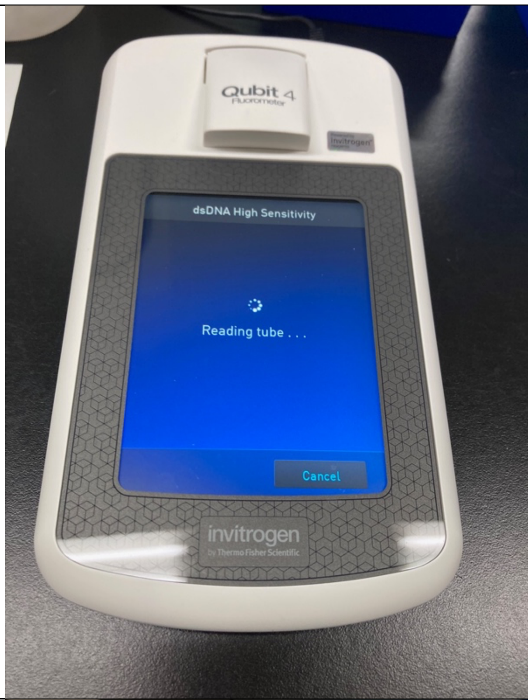
<table>
<tr>
<td>図 5-2-2-3-10
サンプルの濃度を計測しているところ。</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>図 5-2-2-3-11
続けてサンプルの測定を行うと、サンプル DNA の濃度が表示される。上段がサンプルの濃度、下段は測定チューブ内の DNA 濃度。</td>
<td></td>
</tr>
</table>

図 5-2-3-A 冷凍保存品の HyB チューブ（手前右）と試薬カートリッジ（手前左）。	
図 5-2-3-B 冷蔵保存品の PR2 ボトル（中央）とフローセル（右）。	
図 5-2-3-1-1 Tween 20 原液。	
図 5-2-3-1-2 50mL 遠沈管に 5mL の Tween 20 を注意深く注ぐ。Tween 原液は粘性が高いので取り扱いに注意すること。	

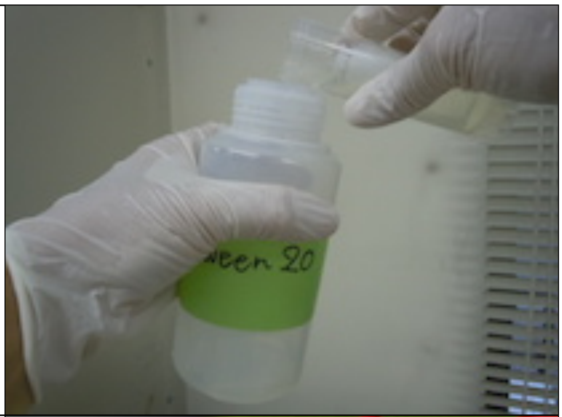
図 5-2-3-1-3 10%の Tween 20 溶液 25mL を 500mL の洗浄瓶に入れる。	
図 5-2-3-1-4 ウォッシュカートリッジにウォッシュ液を注入する。	
図 5-2-3-1-5 すべて注ぎ終えたら残りのウォッシュ液をウォッシュボトル（350mL 程度）に移し替える。	
図 5-2-3-1-6 MiSeq コントロールソフトウェア（MCS）のトップ画面。	

図 5-2-3-1-7 Perform Wash ボタンを押と 3 通りのウォッシュが表示される。	
図 5-2-3-1-8 使用済みフローセルがフローセルコンパートメントにセットされていることを確認する。	
図 5-2-3-1-9 試薬カートリッジやボトルが取り出される様子が画面に現れる。	
図 5-2-3-1-10 用意したウォッシュカートリッジを試薬チラーに入れる。	

図 5-2-3-1-11 用意したウォッシュボトルをセットする。	
図 5-2-3-1-12 セットが完了したらシッパーハンドルを引き下げる。ハンドルを引き下げるのを忘れてもランが始まってしまうので注意すること。	
図 5-2-3-1-13 画面右下の Next を押すとウォッシュが始まる。	
図 5-2-3-1-14 全ての工程が終わると右下に Done と表示される。	

図 5-2-3-1-15 次亜塩素酸溶液用専用チューブ	
図 5-2-3-1-16 17 番ポートに次亜塩素酸溶液が入った専用チューブを入れる。	
図 5-2-3-1-17 MiSeq コントロールソフトウェアが起動してシークエンスの準備が始まる。	
図 5-2-3-2-1 HyB Buffer のチューブを入れ、カートリッジの側面にある最大水量線まで脱イオン水を静かに注ぐ。１時間放置して完全に試薬を解凍する。	

図 5-2-3-2-2 試薬カートリッジの番号はバーコードの真下に書かれている。小さく読みにくいので転記する際に間違えないように注意すること。	
図 5-2-3-4-1 キムタオルを敷いた実験台の上にカートリッジを何回か軽く叩きつけて試薬類をチューブの底に落とす。	
図 5-2-3-4-2 1000µL のピペットチップをつかって注入ポートに大きな孔をまず開ける（オレンジ色の 17 番ポート）。その後、シッパー挿入時にチューブが折れないように各ポートの中心に小さな孔を開けておく（中の試薬にピペットの先が触れないように注意すること）。	
図 5-2-3-4-3 試薬カートリッジの注入ポート（オレンジ色）に 1200µL のピペットチップをつかって調製済みライブラリー600µL を入れる。	

図 5-2-3-4-4 SEQUENCE ボタンを押すと BaseSpace の確認ボタンが表示される。	

5-2-4. 環境 DNA メタバーコーディングデータ解析

はじめに

環境 DNA（eDNA）メタバーコーディングで得られた大量のデータの解析では、いくつかのソフトウェアを組み合わせて実行され、「パイプライン」ともよばれる。それらパイプラインは、複数の種類があり、それぞれ操作性やアルゴリズムの違いなどがある。したがって、どのパイプラインを利用するかは使用者の選択による。ここでは、国内でも利用されることが多い二つのパイプライン、"MiFish パイプライン"の使用手順と"Claident"の概要を例として示す。

5-2-4-1. MiFish パイプライン

FASTQ ファイルの準備

5-2-3.（MiSeq を用いた超並列シークエンス）で述べたワークフローに従ってシーケンスが完了すると、MiSeqOutput/BaseCalls フォルダ（MiSeq を使用した場合）に FASTQ ファイルが作成される。これらの FASTQ ファイルはそれぞれひとつのサンプルのそれぞれのリードに対応し、ファイル名には samplename_S1_L001_R1_001.fastq.gz のようにサンプル名（5-2-3-2 項）が含まれる。ファイル名、FASTQ ファイルの構造、MiSeq を使用した FASTQ ファイル生成のワークフローに関する詳細情報は、次のリンクを参照：https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/software_documentation/miseqreporter/miseq-reporter-generate-fastq-workflow-guide-15042322-01.pdf

単一サンプルデータの解析手順

FASTQ ファイルの解析には、ここではオンラインの MiFish パイプラインの利用について紹介する。なお、GitHub（ソフトウェア開発のプラットフォーム）から、このパイプラインをダウンロードしてローカル PC などにインストールすることでも実施できる。

1) ウェブブラウザで MiFish pipeline web platform（http://mitofish.aori.u-tokyo.ac.jp/mifish/）にアクセスする。

2) 1 サンプルについて read1 および read2 のふたつの FASTQ ファイルをウェブプラットフォームに読み込む（図 5-2-4-1-1）。

3) アップロードしたファイルが正しく認識されたことを確認する（図 5-2-4-1-2）。

4) FASTQ ファイルを MiFish サーバにアップロードする（図 5-2-4-1-3）。

5) パラメータを表示・調整する。ほとんどの場合、デフォルトの設定で問題ない（図 5-2-4-1-4）
 a) MiFish Ref. DB: 参照データベースを選択する。デフォルトでは、最も多くの魚種数を含む最新バージョンになっている。以前の解析結果を再現するために、古いバージョンを選択することもできる。
 b) Filter reads by length: デフォルト値は MiFish プライマーに適している。
 c) BLASTN identity: デフォルトでは、97%以上の同一性がある場合、デノイズされたハプロイド（半数体）配列がターゲット生物に割り当てられる。この値を大きくすると、環境 DNA（eDNA）が各種に由来するかどうかの判定について、網羅性は減るがより正確なものになる。

6) "Run"ボタンをクリックする。ウェブブラウザーはこのタスク専用の別タブ（結果ページ）を起動する。このページは将来の参照用にブックマークとして保存することができる。

注意：結果ページは MiFish サーバーに 1 ヶ月間保存される。すべての表と図を保存しておくことを推奨する。

結果の見方

結果ページでは、生シーケンスリードの統計情報、同定された魚種の全リスト、および下流の解析結果を見ることができる。

1) クオリティコントロールの結果（図 5-2-4-1-5）。この図は右上の≡ボタンをクリックするとエクスポートできる。データファイルは右上の⬇ボタンをクリックするとエクスポートできる。:
 a) 生リード
 b) 高品質リード
 c) マージリード
 d) "N"塩基を含まない非曖昧リード
 e) 長さでフィルタリングされたリード（5-2-4-2 節のステップ 5b）
 f) ユニークリード
 g) デノイズされたハプロイド配列

h) 同定された魚種

注意：長さでフィルタリングされたリードの数が、"N"塩基を含まない非曖昧リードの数よりも著しく少ない場合（図 5-2-4-1-6）、シーケンスデータに重大なオフターゲット（意図していないゲノム領域）増幅やライブラリー構築のミスなどのエラーが存在する可能性がある。

2) 以下の 6 つの列を含む、同定された魚種の完全リスト（図 5-2-4-1-7）：

a) FishBase（https://www.fishbase.se/search.php）による写真。写真がない種はデフォルトのアイコンで表示される。

b) 学名、一般名、およびいくつかの重要な生態学的特徴を表示するタグ。名前は NCBI Taxonomy（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy）から、生態学的特徴のデータは FishBase から取得する。

c) 種同定の信頼度を示す high/moderate/low のラベル。低い信頼度は、同一または類似のバーコード配列を持つ他の魚種が存在するため、同定された魚種が曖昧であることを示す。

d) その種に由来する DNA の読み取り数を示すリード数。

e) 区別できたハプロイドの数。対応する👁ボタンをクリックすると、ハプロイドのリストを表示する新しいボックスがポップアップ表示される（図 5-2-4-1-8）。

f) 代表バーコード配列。対応する🔍ボタンをクリックすると、新しいタブが開き、MitoFish データベースから類似配列を検索できる。

表は 10 行ごとにページ分割される。右上の⬇ボタンをクリックすると、全体の表を Excel 形式でエクスポートできる。

注意：オフターゲット増幅やコンタミネーションにより、表中に魚類以外の種が含まれる場合がある。

3) このサンプルに含まれる全てのハプロイドの系統樹（図 5-2-4-1-9）。環境 DNA リード数（リードアバンダンス）は異なる色と大きさの円で示されます。右上の⬇ボタンをクリックすると、SVG および NEWICK 形式でファイルをエクスポートできる。

4) 異なる分類レベルの相対存在量の積み上げ棒グラフによる表示（図 5-2-4-1-10）。図の上のタブをクリックすることで、異なる分類レベル（綱、目、科、属）を切り替えることができる。この図は、右上の≡ボタンをクリックしてエクスポートすることができる。

複数サンプル（グループ）データの解析手順

MiFish パイプラインは、様々な場所や時点から得られたサンプルや、同一条件下での生物学的レプリケートから得られたサンプルなど、複数のデータセットを解析することもできる（図 5-2-4-1-11）。手順は 5-2-4-2 節で説明した手順とほぼ同じだが、ステップ 3 において、サンプルをグループ分けすることができる（図 5-2-4-1-12）。通常は、異なるサンプリング条件のものは異なるグループとし、同一条件のサンプル（レプリケート）は同じグループとする。

結果の見方

結果ページの構成は、上述の「単一サンプルデータ」で説明したものとほぼ同じになる。異なるサンプルの解析結果は、"Taxonomic Classification"のナビゲーションタブをクリックすることで切り替えることができる（図 5-2-4-1-13）。また、複数のグループについて解析する場合は、グループ間のα多様性とβ多様性に関する結果を、それぞれ散布図とヒートマップで表示する（図 5-2-4-1-14、図 5-2-4-1-15）。外部ファイルへの出力方法は、5-2-4-2 節で示したものと同様になる。

注意 1 : 解析結果で種の識別が困難なとき、サンプリング場所における生息地の観点を加えて種を推定できることがあるが、その場合、結果に注釈を付記するなどの対応が望ましい。

注意 2 : 種の同定結果はデータベースの整備状況に起因する差異が含まれているため、解析に用いた MiFish パイプライン、遺伝子データベースのバージョン情報を明記することが必要である。

Q & A

Q : 参照データベースとは何ですか？

A: メタバーコーディングのための参照データベース（リファレンスデータベース）とは、ターゲットとなる可能性のある生物種（様々な魚種など）のターゲットプライマー（MiFish プライマーなど）領域の塩基配列の網羅的なセットです。DNA 配列と生物種は参照データとの類似性検索によって結びつけられるため、参照データベースはメタバーコーディング解析の鍵となります。MiFish パイプラインに組み込まれた参照データベースは、その完全性を保つために毎月定期的に更新され、その正確性を保証するために専門家によってキュレーションされています。

Q : Run ボタンを押した後はどうなりますか？

A：Run ボタンを押すと、アップロードされた FASTQ ファイルは、一連の前処理ステップを経て、データに含まれる生物種を特定するために参照データベースと比較されます。これらのステップには、品質と長さのフィルタリング、アンプリコン領域への切断、デノイズ、類似性検索、系統解析、生物多様性解析が含まれます。ワークフローの詳細な説明については、次のリンクを参照してください： http://mitofish.aori.u-tokyo.ac.jp/mifish/help/

Q：フィルタリングとは何ですか？（図 5-2-4-1-5）
A：生のイルミナシーケンスリードには、参照データベースと比較する前に除去しなければならないノイズデータが含まれています。例えば、ノイズデータには以下が含まれます。

a) ベースコールの低品質領域として示されるシーケンスエラー
b) アンプリコンに繋がった過剰なプライマーまたはアダプター
c) 異常な長さを持つオフターゲットアンプリコン

MiFish パイプラインは、このようなノイズの多いリードの自動的な除去を行うツールを統合しています。

Q：デノイズ（ノイズ除去）とは何ですか？（図 5-2-4-1-5）
A：環境 DNA メタバーコーディングにおいては、マイナーな生物種（すなわち真の陽性）または人工的なシーケンスエラー（すなわち偽陽性）により、低存在量の DNA 配列が観察されることがあります。デノイズは、そうした低存在量の DNA 配列が偽陽性である場合は、ほとんど同じ配列で存在量の多い配列を伴うという事実に基づいて、真陽性と偽陽性を識別する技術です。MiFish パイプラインはデノイズによって真の陽性配列を得ます。

Q：アルファ多様性とは何ですか？（図 5-2-4-1-14）
A：アルファ多様性とは、特定の場所または 1 つのサンプルに含まれる生物群集がどのくらい多様な種や個体から構成されているかを表す値です。種の数に基づく指標（chao 1 指数）や種の相対量分布に基づく指標（シャノン指数やシンプソン指数）など、様々な指標が用いられます。

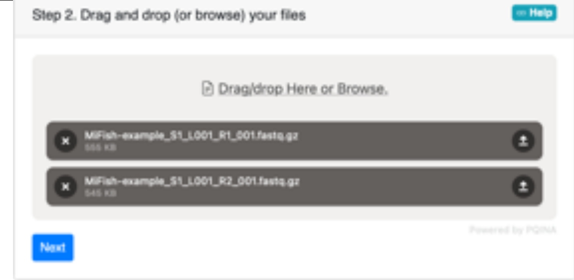
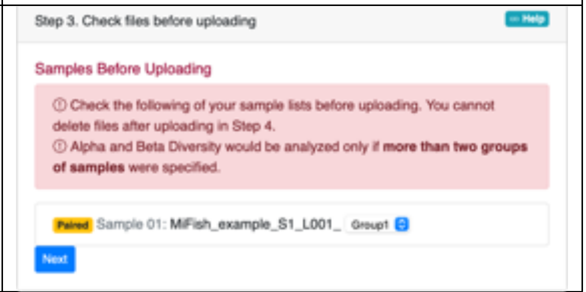
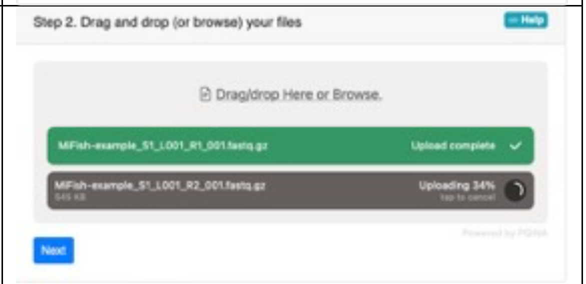
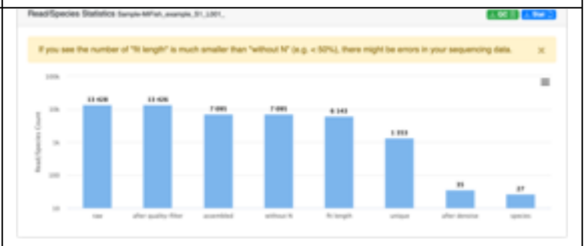
Q：ベータ多様性とは何ですか？(図 5-2-4-1-15）
A：ベータ多様性とは、様々な場所やサンプル間で観察される生物群集のばらつきのことです。ベータ多様性の値が高いほど、サンプル間の種組成の違いが大きいことを意味します。

参考文献

Iwasaki, W., Fukunaga, T., Isagozawa, R., Yamada, K., Maeda, Y., Satoh, TP., Sado, T., Mabuchi, K., Takeshima, H., Miya, M. Nishida, M. 2013. MitoFish and MitoAnnotator: a mitochondrial genome database of fish with an accurate and automatic annotation pipeline. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2531-2540. doi: 10.1093/molbev/mst141

Sato, Y., Miya, M., Fukunaga, T., Sado, T., Iwasaki, W. 2018. MitoFish and MiFish Pipeline: A Mitochondrial Genome Database of Fish with an Analysis Pipeline for Environmental DNA Metabarcoding. *Molecular Biology and Evolution* 35: 1553-1555. doi: 10.1093/molbev/msy074

Zhu, T., Sato, Y., Sado, T., Miya, M., Iwasaki, W. 2023. MitoFish, MitoAnnotator, and MiFish Pipeline: Updates in ten years. *Molecular Biology and Evolution* 40: msad035. doi: 10.1093/molbev/msad035

図 5-2-4-1-1 FASTQ ファイルの読み込み。圧縮ファイル（拡張子.gz、.bz2、.xz）に対応している。読み込んだファイルを削除するには、左側の×ボタンをクリックする。	
図 5-2-4-1-2 アップロードしたファイルが正しく認識されているかの確認。	
図 5-2-4-1-3 FASTQ ファイルの MiFish サーバへのアップロード。右側の↑ボタンをそれぞれクリックし、アップロードする。アップロードに成功したファイルは緑色で表示され、削除することはできない。	
図 5-2-4-1-4 パラメータの表示・調整。デフォルト設定はほとんどの場合に適しており、通常は変更する必要はない。	
図 5-2-4-1-5 生リードのクオリティコントロールの結果、デノイズされたハプロイドの数、同定された生物種の数を示す棒グラフ。	
図 5-2-4-1-6 エラーを含む可能性のあるシークエンシングデータの例。一定の長さの領域から急激にリード数が減少している。	

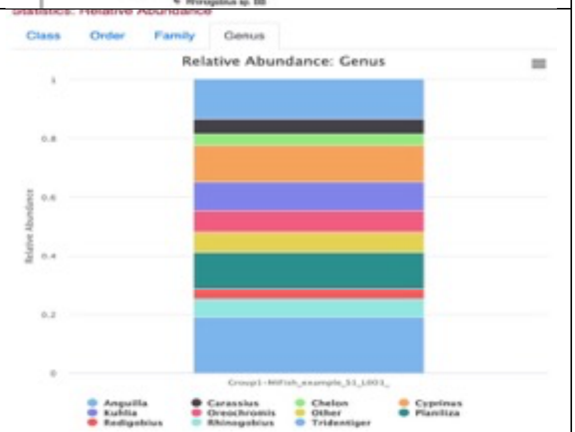
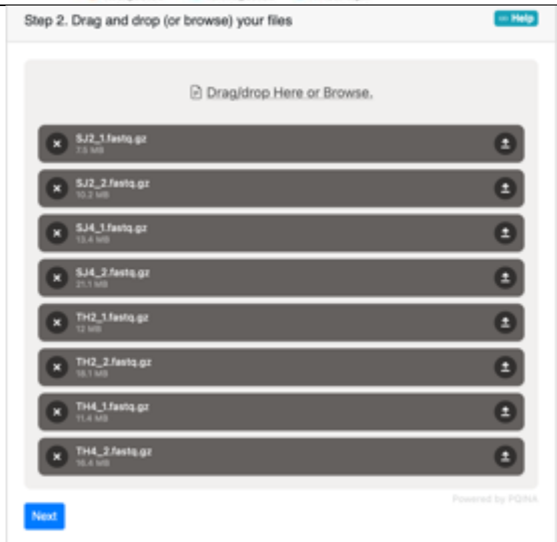
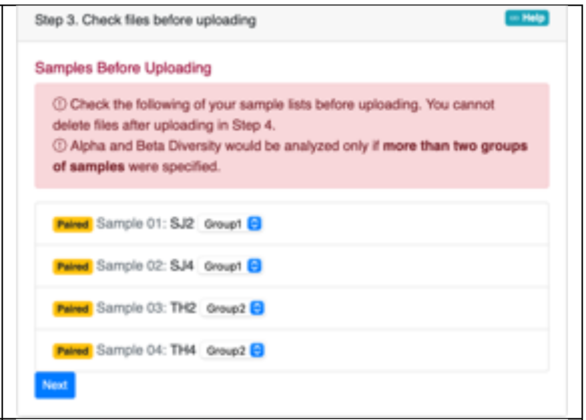
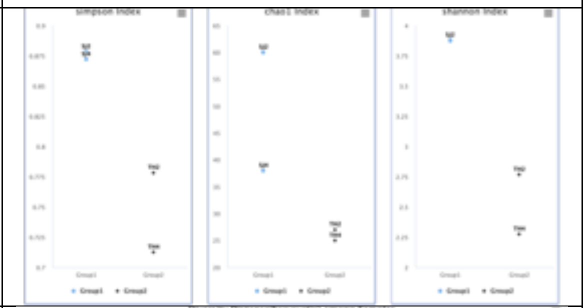
<table>
<tr><td>図 5-2-4-1-7
同定された魚種のリスト。</td><td></td></tr>
<tr><td>図 5-2-4-1-8
同一魚種に属する別個のハプロイド（デノイズ済みの異なるリード配列）のリスト。</td><td></td></tr>
<tr><td>図 5-2-4-1-9
同一サンプル内の全ハプロイドの系統樹。</td><td>
</td></tr>
<tr><td>図 5-2-4-1-10
異なる分類レベルでの相対的存在量の統計量。</td><td>
</td></tr>
<tr><td>図 5-2-4-1-11
MiFish パイプラインを用いた複数サンプルの解析。</td><td>
</td></tr>
</table>

図 5-2-4-1-12 複数のサンプルのグループへの割り当て。最大 3 グループまで割り当てが可能。この図はそれぞれ 2 つの生物学的レプリケートを含む 2 グループの解析を示している。	
図 5-2-4-1-13 異なるサンプルの結果の切り替え。ナビゲーションタブをクリックすることで切り替えられる。	
図 5-2-4-1-14 アルファ多様性の散布図による表示。2 つの生物学的レプリケートを持つ 2 つのサンプルグループを示している（Group 1 は SJ2 と SJ4、Group 2 は TH2 と TH4）。	
図 5-2-4-1-15 ヒートマップで示されたβ多様性。色が濃いほど、2 つのサンプル間の距離が短い（つまり似ている）ことを示す。	

5-2-4-2. Claident

5-2-4-2-1. はじめに

Claident「クライデン」は、メタバーコーディングや DNA バーコーディングのための塩基配列データ解析プログラム集になる。MiFish パイプラインとの違いはおおまかには以下の点になる。

- MiFish プライマーを用いた魚類メタバーコードデータだけでなく、全生物・ウィルスのあらゆる遺伝子座のデータに対応
- 非定量および定量メタバーコーディングをサポート
- より柔軟で詳細な解析に対応
- Web サービスはなく、自前のコンピュータで解析を行う
- 使用のための前提知識・必要な物品は多い

ここでは Claident のインストールから内部標準 DNA を利用した定量メタバーコーディングの方法を解説する。Claident のサポートページを下記 URL に設置しているので、適宜参照いただきたい。

- https://github.com/astanabe/eDNAmanual

また、サンプルデータ、サンプルファイル、本章の原稿ファイル等が置いてある下記 URL を参照すること。

- https://www.claident.org/

なお、5-2-4-2 節のフルバージョンは別紙として下記 URL より閲覧可能である。

https://github.com/astanabe/eDNAmanual/blob/main/metabarcodinganalysiswithClaident.pdf

5-2-4-2-2. 動作環境

Claident は、以下の環境で動作するように作成されている。

- Debian 11 以降（Windows 上の WSL 環境を含む)
- Ubuntu 20.04 以降（Windows 上の WSL 環境を含む)
- Linux Mint 20 以降
- RedHat Enterprise Linux 8 以降

- AlmaLinux 8 以降（Windows 上の WSL 環境を含む）
- Rocky Linux 8 以降
- Homebrew をインストールした macOS
- MacPorts をインストールした macOS

Claindent のインストールの詳細については、下記 URL（別紙フルバージョン）を参照すること。

https://github.com/astanabe/eDNAmanual/blob/main/metabarcodinganalysiswithClaident.pdf

5-2-4-2-3. データ解析全体の流れと前提条件

Claident によるデータ解析は以下の流れになる。

1. デマルチプレックス
2. ペアエンド配列の連結
3. 低品質配列の除去
4. デノイジング
5. 参照配列データベースを用いないキメラ除去
6. 内部標準配列クラスタリング
7. 参照配列データベースを用いたキメラ除去
8. インデックスホッピング除去
9. ネガティブコントロールを利用したデコンタミネーション
10. 分子同定
11. OTU 組成表の作成・加工
12. カバレッジベースレアファクション
13. 内部標準 DNA リード数を利用した DNA 濃度の推定

最終的に得られた OTU 組成表を R やその他の統計解析環境で処理することで、作図や要約、仮説検証を行う。Claident 自体には統計解析機能はない。Claident は大抵のメタバーコードデータの解析に使用可能であるが、ここでは以下のようなデータを仮定して解説を進める。下記を満たしていないデータを解析できないわけではないが、本章では説明の対象としない。

・ 環境水を濾過して濾過フィルターから抽出した環境 DNA サンプルとネガティブコン

トロールとしてのフィールドブランクが含まれる

- 以下の方法でライブラリ調製をする
  - 濃度のわかっている複数の内部標準 DNA を添加して MiFish プライマーを使用して tailed PCR (1st PCR)（5-2-1．ライブラリーの調製ー1：1st PCR, p.67）
  - 1st PCR 産物を鋳型にしてインデックスプライマーを使用して tailed PCR（2nd PCR）（5-2-2．ライブラリーの調製ー2 :2nd PCR, p.75）
  - できあがるライブラリは、両端にインデックスがあるデュアルインデックスライブラリ

- 各サンプルの 2nd PCR 産物を混合してイルミナ社製シーケンサで 1 ランまたは 1 レーン専有で解読する
  - オーバーラップのある、つまり、連結可能なペアエンドシーケンス
  - .bcl を含むランデータまたはインデックスシーケンス分も含めて未デマルチプレックス FASTQ が手元にある

したがって、サンプル・ブランクごとに以下の情報がわかっている必要がある。

- サンプル・ブランクのいずれなのか
- 濾過水量
- 抽出 DNA 溶液量(回収液量ではなく、最後の溶出時に使用した液量)
- 内部標準 DNA 塩基配列
- 内部標準 DNA 濃度
- 1st PCR 時のプライマー配列のうち、シーケンサの読み始めになる部分配列
- 2nd PCR 時のプライマー配列のうち、インデックスとして読まれる部分配列

塩基配列データ処理などの作業の詳しい説明については下記（別紙フルバージョン）を参照すること。

https://github.com/astanabe/eDNAmanual/blob/main/metabarcodinganalysiswithClaident.pdf

付録

田辺晶史 2024. Claident を用いた定量メタバーコーディング解析. https://github.com/astanabe/eDNAmanual/blob/main/metabarcodinganalysiswithClaident.pdf（フルバージョン）

引用について

本マニュアルを引用する場合は以下のような引用方法を推奨します。

マニュアル全体

環境 DNA 学会（2024）環境 DNA 調査・実験マニュアル Ver 3.0.

第 2 章

清野聡子, 源 利文（2024）調査地点の選定. 環境 DNA 学会 環境 DNA 技術標準化委員会（編） 環境 DNA 調査・実験マニュアル Ver 3.0. 8–14 頁.

第 3 章

宮 正樹, 佐土哲也（2024）採水とカートリッジ式フィルターを用いた現場濾過. 環境 DNA 学会 環境 DNA 技術標準化委員会（編） 環境 DNA 調査・実験マニュアル Ver 3.0. 17-29 頁.

源 利文（2024）採水とグラスファイバーフィルターを用いた実験室での濾過. 環境 DNA 学会 環境 DNA 技術標準化委員会（編） 環境 DNA 調査・実験マニュアル Ver 3.0. 30-37 頁.

第 4 章

宮 正樹, 佐土哲也（2024）カートリッジ式フィルターからの DNA 抽出. 環境 DNA 学会 環境 DNA 技術標準化委員会（編） 環境 DNA 調査・実験マニュアル Ver 3.0. 39-51 頁.

源 利文（2024）グラスファイバーフィルターからの DNA 抽出. 環境 DNA 学会 環境 DNA 技術標準化委員会（編） 環境 DNA 調査・実験マニュアル Ver 3.0. 52-62 頁.

第 5 章

源 利文（2024）リアルタイム PCR による環境 DNA の種特異的検出･定量. 環境 DNA 学会 環境 DNA 技術標準化委員会（編） 環境 DNA 調査・実験マニュアル Ver 3.0 63-66 頁.

宮 正樹, 佐土哲也（2024）環境 DNA メタバーコーディング. 環境 DNA 学会 環境 DNA 技術標準化委員会（編） 環境 DNA 調査・実験マニュアル Ver 3.0. 67-110 頁.

朱 涛, 岩崎 渉（2024）環境 DNA メタバーコーディングデータ解析: MiFish パイプライン. 環境 DNA 学会 環境 DNA 技術標準化委員会（編） 環境 DNA 調査・実験マニュアル Ver 3.0. 111-119 頁.

田辺晶史（2024）環境 DNA メタバーコーディングデータ解析: Claident. 環境 DNA 学会 環境 DNA 技術標準化委員会（編） 環境 DNA 調査・実験マニュアル Ver 3.0. 120-122 頁.

環境 DNA 調査・実験マニュアル Ver. 3.0（2024 年 8 月 9 日発行）