

Ver. 2.2（2020年4月3日発行）	変更箇所	Ver. 3.01（2025年6月16日発行）	変更箇所	Ver. 3.1（2026年5月1日発行）
ページ		ページ		ページ
<p align="center"><b>1. はじめに</b></p>	<p align="center"><b>1. はじめに</b></p>	<p align="center"><b>1. はじめに</b></p>	<p align="center"><b>1. はじめに</b></p>	<p align="center"><b>1. はじめに</b></p>
<p>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4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。</p>	<p>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<b>2020,2024</b>年（令和<b>26</b>）年<b>4</b>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。</p>	<p>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。</p>	<p>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。</p>	<p>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。</p>
<p>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の濃縮および抽出法には主として二種類の手法が用いられている。ひとつはカートリッジ式のフィルターを用いた手法、もうひとつはガラスファイバーフィルターを用いた手法である。本マニュアルでは両手法を併記する。また、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手間がかかる。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する。</p>	<p>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。<b>環境DNAの濃縮および抽出法は主として二種類の手法が用いられている。ひとつはカートリッジ式のフィルターを用いた手法、もうひとつはガラスファイバーフィルターを用いた手法である。本マニュアルでは両手法を併記する。また、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<b>手間必要</b>がかかる<b>ある</b>。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<b>する</b>している。さらに、今回の改定では、<b>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。</b></b></p>	<p>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。</p>	<p>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。</p>	<p>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。</p>
<p>なお、本マニュアルには標準的な手法を記載しているが、各分析者による感度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。</p>	<p>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、<b>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。</b></p>	<p>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。</p>	<p>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。</p>	<p>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。</p>
<p><b>環境DNA分析全体の注意事項</b></p>	<p><b>環境DNA分析全体の注意事項</b></p>	<p><b>環境DNA分析全体の注意事項</b></p>	<p><b>環境DNA分析全体の注意事項</b></p>	<p><b>環境DNA分析全体の注意事項</b></p>
<p>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良い。そのために、以下のような点に特に注意する必要がある。</p> <p>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し、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。</p> <p>2) DNAフリー器具の使用：実験に使う器械は未使用の新品、または残留DNAを完全にデオキシタミネーション（除染）したものをを用いる。デオキシタミネーション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。ピペットやチューブブラックなどについては、紫外線照射による除染も有効である。オートクレーブは有効であるが、廃液や廃棄物などと同じ機器を用いることは避けたほうが良い。</p> <p>3) 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医療用ゴム手袋などの手袋を着用する必要がある。野外サンプルの採取からDNA測定までの全工程にわたって手袋を着用し、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。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。</p> <p>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。</p>	<p>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<b>良い</b>。そのために、以下のような点に特に注意する必要がある。</p> <p>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<b>し</b>ることや、空調設備も含めた実験空間の<b>空気の流れにも気を付ける</b>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。</p> <p>2) DNAフリー器具の使用：実験に使う器械は未使用の新品、または残留DNAを<b>完全にデオキシタミネーション（除染）</b>したものをを用いる。<b>デオキシタミネーション</b>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、<b>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。</b></p> <p>3) <b>使い捨て</b>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<b>使い捨て手袋（医療用ゴム手袋などやビニール製の手袋など）</b>を着用する必要がある。野外サンプルの採取<b>から時には、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。</b></p> <p>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。</p>	<p>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。</p> <p>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空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。</p> <p>2) DNAフリー器具の使用：実験に使う器械は未使用の新品、または残留DNAを除染したものをを用いる。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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p>	<p>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。</p> <p>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空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。</p> <p>2) DNAフリー器具の使用：実験に使う器械は未使用の新品、または残留DNAを除染したものをを用いる。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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p>	<p>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。</p> <p>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空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。</p> <p>2) DNAフリー器具の使用：実験に使う器械は未使用の新品、または残留DNAを除染したものをを用いる。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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p>

Ver. 2.2 (2020年4月3日発行)	変更箇所	Ver. 3.01 (2025年6月16日発行)	変更箇所	Ver. 3.1 (2026年5月1日発行)
<p style="text-align: right;">ページ</p> <p>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、特に保存などには低吸着のマイクロチューブ（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。</p> <p>6) 部屋や機器の清浄：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、定期的な洗浄を行うことを推奨する。実験室の掃除も重要である。</p>	<p>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、<u>可能であれば全工程</u>、特に<u>保存など抽出時の極低濃度環境DNA溶液の取り扱い</u>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。</p> <p>6) 部屋や機器の<u>清浄除染</u>：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<u>洗浄を行うこと</u>を推奨する。<u>実験室の掃除</u>（できれば実験日ごとに）<u>除染を行うこと</u>を推奨する。また、<u>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。</u></p>	<p style="text-align: right;">ページ</p> <p>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。</p> <p>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。</p>		<p style="text-align: right;">ページ</p> <p>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。</p> <p>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。</p>

Ver. 2.2（2020年4月3日発行）	変更箇所	Ver. 3.01（2025年6月16日発行）	変更箇所	Ver. 3.1（2026年5月1日発行）
<p style="text-align: right;">ページ</p> <p style="text-align: center;"><b>2.調査地点の選定</b></p> <p><b>全般的な注意事項</b></p> <p>魚市場、店舗、食堂などの産業系の排水には、魚類をはじめとする水生生物のDNAが含まれている可能性が高く、環境DNA分析結果の解釈を困難にする原因となる。住宅からの生活排水も同様である。したがって、用排水路、下水処理場、導水路からの流入の影響を受けにくい地点を選ぶことが重要である。特に、下水処理施設は放流量が大きいため、調査結果への影響が懸念される。処理水の放流口（処理施設と離れていることもある）を確認し、その近傍を避けるようにする。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>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。また、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を検出してしまう可能性がある。</p> <p>釣り人とのトラブルもあり得るので、釣り人から離れて採水を行うと良い。また、釣り人による撒き餌の影響も考えられるため、（河川の場合）釣り人の上流側で採水するなど撒き餌の影響を受けないように注意する必要がある。</p> <p>また、調査に際しては漁業権などの権利関係に配慮し、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べきである。</p>	<p style="text-align: right;">ページ</p> <p style="text-align: center;"><b>2.調査地点の選定</b></p> <p><b>全般的な注意事項</b></p> <p><del>魚市場、店舗、食堂などの産業系の排水には、魚類をはじめとする水生生物のDNAが含まれている可能性が高く、環境DNA分析結果の解釈を困難にする原因となる。住宅からの生活排水も同様である。したがって、用排水路、下水処理場、導水路からの流入の影響を受けにくい地点を選ぶことが重要である。特に、下水処理施設は放流量が大きいため、調査結果への影響が懸念される。処理水の放流口（処理施設と離れていることもある）を確認し、その近傍を避けるようにする。</del></p> <p>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含わせて採取・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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p><del>釣り人とのトラブルもあり得るので、釣り人から離れて採水を行うと良い。また、釣り人による撒き餌の影響も考えられるため、（河川の場合）釣り人の上流側で採水するなど撒き餌の影響を受けないように注意する必要がある。</del></p> <p><del>また、調査に際しては漁業権などの権利関係に配慮し、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べきである。</del></p> <p><b>コラム1 サンプル中に混入するDNA</b>：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。</p>	<p style="text-align: right;">ページ</p> <p style="text-align: center;"><b>2.調査地点の選定</b></p> <p><b>全般的な注意事項</b></p> <p>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含わせて採取・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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p><b>コラム1 サンプル中に混入するDNA</b>：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。</p>	<p style="text-align: right;">ページ</p> <p style="text-align: center;"><b>2.調査地点の選定</b></p> <p><b>全般的な注意事項</b></p> <p>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含わせて採取・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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p><b>コラム1 サンプル中に混入するDNA</b>：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。</p>	

Ver. 2.2（2020年4月3日発行）	変更箇所	Ver. 3.01（2025年6月16日発行）	変更箇所	Ver. 3.1（2026年5月1日発行）
<p style="text-align: right;">ページ</p>	<p><b>コラム2 河川下流域・海域における調査前に</b>：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付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ないと定められており、許可等にあつては、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。</p>	<p style="text-align: right;">ページ</p> <p><b>コラム2 河川下流域・海域における調査前に</b>：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付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ないと定められており、許可等にあつては、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。</p>	<p style="text-align: right;">ページ</p> <p><b>コラム2 河川下流域・海域における調査前に</b>：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付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ないと定められており、許可等にあつては、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。</p>	
<p><b>2-1. 河川における調査地点の選定</b></p> <p>環境DNAが生物分布を反映する距離は、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。しかし、それだけの労力を割くことができない場合も多いので、予算規模や目的に応じて適宜調整する必要がある。</p> <p>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。</p> <p>河川での調査地点の設定時の留意点を挙げる。環境DNAの流れによる拡散は、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。</p> <p>1)河川地形：河道の形状により、河川流の流速や土砂の堆積が異なる。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。また内側では流速が遅く、堆積的で、堆砂により砂州の形成が進み、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ので、調査地点の設定時に地形も判断に入れる。例えば、調査地点を距離で河口から〇〇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。</p> <p>2)河川の流れ：河川の流れは、河道内で一様の流向や流速ではない。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るため、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。</p> <p>3)河岸構造：自然の植生は、上述のとおり蛇行の左右岸の地形の差異により形成や繁茂状況が異なる。河畔林の下や葦原などの河岸植生の中は良好なハビタットとなっている。一方、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られた護岸の場合には、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などの影響がありうる。石やブロックを積み上げた護岸の場合、隙間の透水性が着目点である。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（例 ミミズハゼ）。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。</p>	<p><b>2-1. 河川における調査地点の選定</b></p> <p>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、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。</p> <p>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。</p> <p>河川での調査地点の設定時の留意点を挙げる。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。</p> <p>1) 河川地形：河道の形状により、河川流の流速や土砂の堆積が異なる。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。またカーブの内側では流速が遅く、堆積的で、堆砂により砂州の形成が進み、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〇〇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。</p> <p>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。</p> <p>3) 河岸構造：自然の植生は、上述のとおり蛇行蛇行部の植生は左右岸の地形の差異により形成や繁茂でも状況が異なる。河畔林の下や例えは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。一方、河床の水際部に護岸や堤防などの人工構造物の設置されている場合は、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られた護岸の場合には、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などの影響がありうる。石や石組や環境配慮型のブロックを積み上げたによる護岸の場合、護岸の場合、隙間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に着目点である。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破壊される（例 ミミズハゼ）。堤防の形成されている場合も、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。</p>	<p><b>2-1. 河川における調査地点の選定</b></p> <p>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、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。</p> <p>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。</p> <p>河川での調査地点の設定時の留意点を挙げる。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。</p> <p>1) 河川地形：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〇〇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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p>	<p style="text-align: right;">ページ</p> <p><b>2-1. 河川における調査地点の選定</b></p> <p>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、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。</p> <p>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。</p> <p>河川での調査地点の設定時の留意点を挙げる。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。</p> <p>1) 河川地形：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〇〇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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p>	

Ver. 2.2（2020年4月3日発行）	変更箇所	Ver. 3.01（2025年6月16日発行）	変更箇所	Ver. 3.1（2026年5月1日発行）
<p style="text-align: right;">ページ</p> <p>4)河床の底質：河床の底質（材料）は、岩、礫、砂、粘土により水の透過性が異なる。例えば、サケ類の産卵場では、堆積した礫の下から水が噴出してゐる。採水作業では、河床材料が粘土など細粒分の多い箇所では細心の注意が必要である。バケツなどの採水器が河床に接触すると、底質の巻き上げが発生し、水が濁って濾過が困難となる。また、河床や河岸が岩の場合には、採水器が岩の突起などにひっかかって回収できなくなる可能性がある。そこで作業従事者が採水器を回収するために無理な動作をすると落水する危険性があるので注意する必要がある。</p> <p>5)河川工事などの人為的変更：河川管理者（土木行政）の工事による攪乱には注意が必要である。河川流が流下しやすくするための河道掘削では、ハピ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、潜砂性魚類のハピタットごと消滅する。モニタリング時に周辺の環境の記録写真を撮影しておくのは、これらの攪乱の検知のためもある。工事の最中には、濁水が発生する。河川水の濁度が上昇すると、採水後の濾過作業に影響する。</p> <p>6)河口域・汽水域・河川感潮域：河川水と海水の混合の状態に留意すること。同じ地点でも、潮汐により時々刻々環境条件が変化するため、気象庁の公表する潮位表を参考にして状況に応じた調査時刻を設定する。採水時に、地点の位置に加え、潮汐の影響を判断するために、時間、水深、表層・中層・底層なども記載するのが望ましい。塩水遡上や混合のパターンは、河床勾配や河川流量により異なる。海からの河口に向けての強い外力の影響としては、潮位上昇や強波浪による河川への海水流入量の増加と、それに伴う河川水の海への拡散の抑制がある。</p>	<p>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（材料）は、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、礫間のろ過により水の透過性が異なる。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、サケ類の産卵場では、堆積した礫の下から伏流水が噴出している。採水作業では、一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細心の注意が必要である。バケツなどの採水器が河床に接触すると、採水時に底質の巻き上げが発生し、水が濁って濾過が困難となる。また、河床や河岸が岩の場合には、採水器が岩の突起などにひっかかって回収できなくなる生じやすく、濾過時間や分析結果にも影響を及ぼす可能性がある。そこで作業従事者が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。</p> <p>4) 河川工事などの人為的変更：河川管理者（土木行政）の工事による攪乱には注意が必要である。河川流が流下しやすくするための河道掘削では、ハピ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、潜砂性魚類のハピタットごと消滅する。モニタリング時に周辺の環境の記録写真を撮影しておくのは、これらの攪乱の検知のためもある。工事の最中には、濁水が発生する。河川水の濁度が上昇すると、採水後の濾過作業に影響する。</p> <p>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、揚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。</p> <p>6) 河口域・汽水域・河川感潮域：河川水と海水の混合の状態に留意すること。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）も記載するのが望ましい。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。異なるハピ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がある。</p>	<p style="text-align: right;">ページ</p> <p>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。</p> <p>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、揚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。</p> <p>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。異なるハピ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がある。</p>	<p style="text-align: right;">ページ</p> <p>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。</p> <p>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、揚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。</p> <p>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。異なるハピ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がある。</p>	<p style="text-align: right;">ページ</p> <p>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。</p> <p>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、揚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。</p> <p>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。異なるハピ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がある。</p>

Ver. 2.2（2020年4月3日発行）	変更箇所	Ver. 3.01（2025年6月16日発行）	変更箇所	Ver. 3.1（2026年5月1日発行）
<p style="text-align: right;">ページ</p> <p><b>2-2. 池や湖沼等における調査地点の選定</b></p> <p>流水域である河川に比べると、注意すべきポイントが特段多いわけではないが、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。</p> <p>農業用水路で調査を行う場合には下記の点に注意する。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に注意する。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。</p>	<p><b>2-2. 池や湖沼等における調査地点の選定</b></p> <p><del>流水域である河川に比べると、注意すべきポイントが特段多いわけではないが、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。</del></p> <p>農業用水路で調査を行う場合には<b>下記</b>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に注意する。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。</p>	<p style="text-align: right;">ページ</p> <p><b>2-2. 池や湖沼等における調査地点の選定</b></p> <p>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。</p> <p>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・個体数とともに湖岸部よりも多く、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。</p> <p>農業用水路で調査を行う場合には<b>つぎ</b>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に注意する。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。</p>	<p><b>2-2. 池や湖沼等における調査地点の選定</b></p> <p>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。</p> <p>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・個体数とともに湖岸部よりも多く、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。</p> <p>農業用水路で調査を行う場合には<b>つぎ</b>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に注意する。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。</p>	<p style="text-align: right;">ページ</p> <p><b>2-2. 池や湖沼等における調査地点の選定</b></p> <p>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。</p> <p>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・個体数とともに湖岸部よりも多く、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。</p> <p>農業用水路で調査を行う場合には<b>つぎ</b>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に注意する。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。</p>
<p><b>2-3. 海岸における調査地点の選定</b></p> <p>海岸での調査地点の設定時の留意点を挙げる。環境DNAの流れによる拡散は、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を考慮したスケールでの留意が必要である。調査地点の周辺環境もふくめた写真記録が重要である。</p> <p>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すると、砂や泥を水中に巻き上げる。水サンプルの質や濾過作業の効率に影響するため、巻き上げの少ない環境を選ぶのが望ましい。</p> <p>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。</p> <p>②砂浜：アクセスは比較的良好だが、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する。</p> <p>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。</p> <p>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るため、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ことが考えられる。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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>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。とくに、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。</p> <p>③ 石やブロックを積み上げた護岸の場合、隙間の透水性が着目点である。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、材料が過去から積み残された粘土か、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。</p>	<p><del>海岸での調査地点の設定時の留意点を挙げる。環境DNAの流れによる拡散は、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を考慮したスケールでの留意が必要である。調査地点の周辺環境もふくめた写真記録が重要である。</del></p> <p><b>2-3. 海岸における調査地点の選定</b></p> <p><del>海岸での調査地点の設定時の留意点を挙げる。環境DNAの流れによる拡散は、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を考慮したスケールでの留意が必要である。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。</del></p> <p>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すると、砂や泥を水中に巻き上げる。水サンプルの質や濾過作業の効率に影響するため、巻き上げの少ない環境場所を選ぶことが望ましい。</p> <p>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。</p> <p>② 砂浜：アクセスは比較的良好だが、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<del>い</del>。</p> <p>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。</p> <p>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るため、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ことと<b>と</b>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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>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。とくに、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。</p> <p>③ 石やブロックを積み上げた護岸の場合、隙間の透水性が<b>着目点も着目すべき点</b>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、材料が過去から積み残された粘土か、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。</p>	<p><b>2-3. 海岸における調査地点の選定</b></p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>② 砂浜：アクセスは比較的良好だが、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<del>い</del>。</p> <p>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。</p> <p>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るため、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ことと<b>と</b>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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>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、材料が過去から積み残された粘土か、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。</p>	<p><b>2-3. 海岸における調査地点の選定</b></p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>② 砂浜：アクセスは比較的良好だが、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<del>い</del>。</p> <p>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。</p> <p>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るため、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ことと<b>と</b>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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>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、材料が過去から積み残された粘土か、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。</p>	<p><b>2-3. 海岸における調査地点の選定</b></p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>② 砂浜：アクセスは比較的良好だが、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<del>い</del>。</p> <p>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。</p> <p>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るため、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ことと<b>と</b>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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>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、材料が過去から積み残された粘土か、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。</p>

Ver. 2.2（2020年4月3日発行）	変更箇所	Ver. 3.01（2025年6月16日発行）	変更箇所	Ver. 3.1（2026年5月1日発行）
<p style="text-align: right;">ページ</p> <p>4)底質：底質（材料）は、岩、礫、砂、粘土により水の透過性が異なる。採水作業では、干潟や細砂の砂浜など、海岸材料が粘土など細粒分の多い箇所では細心の注意が必要となる。バケツなどの採水器が底に接触すると、底質の巻き上げが発生し、水が濁り、濾過が困難となる。また、磯の岩場の場合には、採水器が岩の突起などに引っかかると回収できなくなる可能性がある。作業従事者が採水器を回収するために無理な動作をすると落水する危険性があるので、安全管理には注意する必要がある。</p> <p>5)海岸工事など人為的改変：海岸管理者（土木行政）や開発事業者などによる工事による攪乱には注意する必要がある。攪乱の規模、継続性など、影響の時空間スケールの把握が必要である。モニタリング時に周辺の環境の記録写真を撮影するのは、これらの攪乱の検知と記録のためである。</p> <p>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。</p> <p>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。とくに砂州の除去では、潜砂性魚類のハビタットごと消滅する。</p> <p>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。</p> <p>6)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。</p>	<p><del>4)底質：底質（材料）は、岩、礫、砂、粘土により水の透過性が異なる。採水作業では、干潟や細砂の砂浜など、海岸材料が粘土など細粒分の多い箇所では細心の注意が必要となる。バケツなどの採水器が底に接触すると、底質の巻き上げが発生し、水が濁り、濾過が困難となる。また、磯の岩場の場合には、採水器が岩の突起などに引っかかると回収できなくなる可能性がある。作業従事者が採水器を回収するために無理な動作をすると落水する危険性があるので、安全管理には注意する必要がある。</del></p> <p>4) <del>海岸工事など人為的改変：海岸管理者（土木行政）や開発事業者などによる工事による攪乱には注意する必要がある。攪乱物理場的人為的な変化：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可能性がある。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。モニタリング採水時に周辺の環境の記録や写真を撮影するを行うことで、事後のは、これらの攪乱の検知と記録のためである確認や考察に役立つ。</del></p> <p>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。</p> <p>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。とくに砂州の除去では、潜砂性魚類のハビタットごと消滅する。</p> <p>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。</p> <p>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。</p>	<p style="text-align: right;">ページ</p> <p>4)物理場的人為的な変化：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可能性がある。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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p>	<p style="text-align: right;">ページ</p> <p>4)物理場的人為的な変化：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可能性がある。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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p>	<p style="text-align: right;">ページ</p> <p>4)物理場的人為的な変化：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可能性がある。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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p>



Ver. 2.2 (2020年4月3日発行)	変更箇所	Ver. 3.01 (2025年6月16日発行)	変更箇所	Ver. 3.1 (2026年5月1日発行)
<p>ページ</p> <p>バケツ (Soft Bucket 8型 I-484, ISETO社など) ロープ (クレモナ金剛打ロープ直径 6mm, ユタカメイク社など)</p> <p>ゴム手袋 (パウダーフリー) 分子実験用ペーパータオル (61440, 日本製紙クレシア社など)</p> <p>RNAlater Solution (Ambion社)</p> <p>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; ザルスタット社) 医療施設用泡洗浄ハイター1000 400mL (花王) 精製水 (精製水Pフンタッチ式キャップ500mL, 健栄製薬社など) チャック付ポリ袋 140mm × 200mm (ユニバックG-8, 生産日本社) チャック付ポリ袋 100mm × 140mm (ユニバックE-4, 生産日本社) チャック付ポリ袋 17.7cm × 20.3cm (イージージッパーM, ジップロック社)</p> <p>カウンター (数取器, プラス社など) 筆記具 (サインペン) (MO-150-MCBK3, ゼブラなど) クーラー (ハイパー氷点下クーラーM, ロゴス社など) 保冷剤 (倍速凍結・氷点下バックM, ロゴス社など) 保冷袋Sサイズ (保冷平袋S, モロフジなど)</p> <p><b>アスピレーターを用いた現場濾過に必要な道具 (例)</b> カートリッジ式フィルター (ステリベクス, 孔径0.45μm, SVHV010RS, ×ルク・ミリボア社) パラフィルム (エルエムエス社)</p> <p>ルアーフィッシング (VRMP6, 株式会社アイシス, 注入口用)</p> <p>ルアーフィッシング (VRSP6, 株式会社アイシス, 排出口用) 手揚げ平角瓶コック付ポリタンク10L (1-2169-01, アズワン) epTIPPSスタンダード 1~10mL (30000765, エッペンドルフ社)</p> <p>ルアーフィッシング オスルアーロック4.0mm (VPRM406, 株式会社アイシス)</p> <p>ルアーフィッシング メステーバー5.0mm (VRF506, 株式会社アイシス)</p> <p>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ールド (2-258-01, アズワン)</p> <p>液体塩素系漂白剤 (病院用ハイター, 花王)</p>	<p>変更箇所</p> <p>バケツ (Soft Bucket 8型 I-484, ISETO社など) ロープ (クレモナ金剛打ロープ直径 6mm, <del>ユタカメイク社</del> <a href="#">ユタカメイク</a>) <del>ゴム使い捨て手袋 (パウダーフリー)</del> <del>分子実験用ペーパータオル (61440キムタオル, 日本製紙クレシア社などクレシア)</del> <del>組織用RNA安定化溶液 (RNAlater Solution (Ambion社), サモフィッシュヤン)</del></p> <p>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; <del>ザルスタット社</del> <a href="#">ザルスタット</a>) 医療施設用泡洗浄ハイター1000 400mL (花王) 精製水 (精製水Pフンタッチ式キャップ500mL, 健栄製薬社製薬など) チャック付ポリ袋 140mm × 200mm (ユニバックG-8, 生産日本社) チャック付ポリ袋 100mm × 140mm (ユニバックE-4, 生産日本社) チャック付ポリ袋 17.7cm × 20.3cm (<del>イージージッパーM, ジップロック社</del> <a href="#">イージージッパーM, ジップロック</a>)</p> <p>カウンター (数取器 <del>プラス社</del> など) 筆記具 (サインペン) (MO-150-MCBK3, <del>ゼブラ</del> <a href="#">ゼブラ</a>) クーラー (ハイパー氷点下クーラーM, <del>ロゴス社</del> <a href="#">ロゴス</a>) 保冷剤 (倍速凍結・氷点下バックM, <del>ロゴス社</del> <a href="#">ロゴス</a>) 保冷袋Sサイズ (保冷平袋S, <del>モロフジ</del> など)</p> <p>14 <b>アスピレーターを用いた現場濾過に必要な道具 (例)</b> カートリッジ式フィルター (ステリベクス, 孔径0.45μm, SVHV010RS, ×<del>ルク・ミリボア社</del> <a href="#">ルク・ミリボア</a>) <del>パラフィルム (エルエムエス社)</del> ルアーフィッシング (<a href="#">注入口用</a>, VRMP6, <del>株式会社アイシス</del> <a href="#">注入口用</a>)</p> <p>ルアーフィッシング (<a href="#">排出口用</a>, VRSP6, <del>株式会社アイシス</del> <a href="#">排出口用</a>) 手揚げ平角瓶コック付ポリタンク10L (1-2169-01, アズワン) epTIPPSスタンダード 1~10mL (30000765, <del>エッペンドルフ社</del> <a href="#">エッペンドルフ</a>)</p> <p>ルアーフィッシング オスルアーロック4.0mm (VPRM406, <del>株式会社アイシス</del>) ルアーフィッシング メステーバー5.0mm (VRF506, <del>株式会社アイシス</del>)</p> <p>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ールド (2-258-01, アズワン) <del>使い捨て手袋 (パウダーフリー)</del></p> <p>液体塩素系漂白剤 (病院用ハイター, 花王) <sup>*1</sup> <sup>*1</sup> 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。</p>	<p>ページ</p> <p>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)</p> <p>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)</p> <p>組織用RNA安定化溶液 (RNAlater, サモフィッシャー)</p> <p>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フ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 (ユニバックG-8, 生産日本社) チャック付ポリ袋 100mm × 140mm (ユニバック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)</p> <p>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・氷点下バックM, ロゴス) 保冷袋Sサイズ (保冷平袋S, モロフジ)</p> <p>18 <b>アスピレーターを用いた現場濾過に必要な道具 (例)</b> カートリッジ式フィルター (ステリベクス, 孔径0.45μm, SVHV010RS, ×ルク・ミリボア)</p> <p>ルアーフィッシング (注入口用, VRMP6, アイシス)</p> <p>ルアーフィッシング (排出口用, VRSP6, アイシス) 手揚げ平角瓶コック付ポリタンク10L (1-2169-01, アズワン) epTIPPSスタンダード 1~10mL (30000765, エッペンドルフ)</p> <p>ルアーフィッシング オスルアーロック4.0mm (VPRM406, アイシス)</p> <p>ルアーフィッシング メステーバー5.0mm (VRF506, アイシス)</p> <p>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ールド (2-258-01, アズワン) 使い捨て手袋 (パウダーフリー)</p> <p>液体塩素系漂白剤 (病院用ハイター, 花王) <sup>*1</sup> <sup>*1</sup> 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。</p>	<p>変更箇所</p> <p>組織用RNA安定化溶液 (RNAlater, サモフィッシャー)</p> <p>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フ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 (ユニバックG-8, 生産日本社) チャック付ポリ袋 100mm × 140mm (ユニバック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)</p> <p>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・氷点下バックM, ロゴス) 保冷袋Sサイズ (保冷平袋S, モロフジ)</p> <p>19 <b>アスピレーターを用いた現場濾過に必要な道具 (例)</b> カートリッジ式フィルター (ステリベクス, 孔径0.45μm, SVHV010RS, ×ルク・ミリボア)</p> <p>ルアーフィッシング (注入口用, VRMP6, アイシス)</p> <p>ルアーフィッシング (排出口用, VRSP6, アイシス) 手揚げ平角瓶コック付ポリタンク10L (1-2169-01, アズワン) epTIPPSスタンダード 1~10mL (30000765, エッペンドルフ)</p> <p>ルアーフィッシング オスルアーロック4.0mm (VPRM406, アイシス)</p> <p>ルアーフィッシング メステーバー5.0mm (VRF506, アイシス)</p> <p>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ールド (2-258-01, アズワン) 使い捨て手袋 (パウダーフリー)</p> <p>液体塩素系漂白剤 (病院用ハイター, 花王) <sup>*1</sup> <sup>*1</sup> 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。</p>	<p>ページ</p> <p>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)</p> <p>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)</p> <p>組織用RNA安定化溶液 (RNAlater, サモフィッシャー)</p> <p>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フ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 (ユニバックG-8, 生産日本社) チャック付ポリ袋 100mm × 140mm (ユニバック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)</p> <p>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・氷点下バックM, ロゴス) 保冷袋Sサイズ (保冷平袋S, モロフジ)</p> <p>19 <b>アスピレーターを用いた現場濾過に必要な道具 (例)</b> カートリッジ式フィルター (ステリベクス, 孔径0.45μm, SVHV010RS, ×ルク・ミリボア)</p> <p>ルアーフィッシング (注入口用, VRMP6, アイシス)</p> <p>ルアーフィッシング (排出口用, VRSP6, アイシス) 手揚げ平角瓶コック付ポリタンク10L (1-2169-01, アズワン) epTIPPSスタンダード 1~10mL (30000765, エッペンドルフ)</p> <p>ルアーフィッシング オスルアーロック4.0mm (VPRM406, アイシス)</p> <p>ルアーフィッシング メステーバー5.0mm (VRF506, アイシス)</p> <p>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ールド (2-258-01, アズワン) 使い捨て手袋 (パウダーフリー)</p> <p>液体塩素系漂白剤 (病院用ハイター, 花王) <sup>*1</sup> <sup>*1</sup> 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。</p>
<p>3-1-1. フィールドデータの記録</p> <p>15 測量野帳 <a href="#">レベルブック</a> 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良い。耐水性の野帳に耐水性のボールペンで記録するとよい。</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>採水者 (サンプリングに同行した全員の名前を記録)</li> <li>日時 (YYYY-MM-DDの形式で記録)</li> <li>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)</li> <li>緯度経度 (35.101252N, 139.293012Eのような10進法が取り扱いやすい)</li> <li>河岸・湖岸・海岸・底質の種類: 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)</li> <li>気象・海象 (風向・風力・波高を含む)</li> <li>水温 (℃) : 携帯用の水質計を用いて計測する。</li> <li>(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)</li> <li>(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。</li> <li>透明度 (透明・ササ濁り・濁り)</li> <li>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。</li> <li>濾過水量 (mL) : 必ず記入すること。</li> <li>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。</li> <li>写真 (撮影の有無)</li> <li>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)</li> </ul> <p>3-1-2. 採水およびシリンジを用いた現場ろ過</p>	<p>3-1-1. フィールドデータの記録</p> <p>15 測量野帳 <a href="#">レベルブック</a> 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良い。耐水性の野帳への記録には耐水性のボールペンや鉛筆、シャープペンで記録するとよい。</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>採水者 (サンプリングに同行した全員の名前を記録)</li> <li>日時 (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)</li> <li>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)</li> <li>緯度経度 (35.101252N, 139.293012Eのような10進法が取り扱いやすい)</li> <li>河岸・湖岸・海岸・底質の種類: 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)</li> <li>気象・海象 (風向・風力・波高を含む)</li> <li>水温 (℃) : 携帯用の水質計を用いて計測する。</li> <li>(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)</li> <li>(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。</li> <li>透明度 (透明・ササ濁り・濁り)</li> <li>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。</li> <li>濾過水量 (mL) : 必ず記入すること。</li> <li>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。</li> <li>写真 (撮影の有無)</li> <li>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)</li> </ul> <p>3-1-2. 採水およびシリンジを用いた現場ろ過</p>	<p>3-1-1. フィールドデータの記録</p> <p>18 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、シャープペンで記録するとよい。</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>採水者 (サンプリングに同行した全員の名前を記録)</li> <li>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)</li> <li>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)</li> <li>緯度経度 (35.101252N, 139.293012Eのような10進法が取り扱いやすい)</li> <li>河岸・湖岸・海岸・底質の種類: 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)</li> <li>気象・海象 (風向・風力・波高を含む)</li> <li>水温 (℃) : 携帯用の水質計を用いて計測する。</li> <li>(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)</li> <li>(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。</li> <li>透明度 (透明・ササ濁り・濁り)</li> <li>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。</li> <li>濾過水量 (mL) : 必ず記入すること。</li> <li>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。</li> <li>写真 (撮影の有無)</li> <li>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)</li> </ul> <p>3-1-2. 採水およびシリンジを用いた現場濾過</p>	<p>3-1-1. フィールドデータの記録</p> <p>18 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、シャープペンで記録するとよい。</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>採水者 (サンプリングに同行した全員の名前を記録)</li> <li>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)</li> <li>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)</li> <li>緯度経度 (35.101252N, 139.293012Eのような10進法が取り扱いやすい)</li> <li>河岸・湖岸・海岸・底質の種類: 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)</li> <li>気象・海象 (風向・風力・波高を含む)</li> <li>水温 (℃) : 携帯用の水質計を用いて計測する。</li> <li>(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)</li> <li>(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。</li> <li>透明度 (透明・ササ濁り・濁り)</li> <li>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。</li> <li>濾過水量 (mL) : 必ず記入すること。</li> <li>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。</li> <li>写真 (撮影の有無)</li> <li>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)</li> </ul> <p>3-1-2. 採水およびシリンジを用いた現場濾過</p>	<p>3-1-1. フィールドデータの記録</p> <p>19 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、シャープペンで記録するとよい。</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>採水者 (サンプリングに同行した全員の名前を記録)</li> <li>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)</li> <li>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)</li> <li>緯度経度 (35.101252N, 139.293012Eのような10進法が取り扱いやすい)</li> <li>河岸・湖岸・海岸・底質の種類: 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)</li> <li>気象・海象 (風向・風力・波高を含む)</li> <li>水温 (℃) : 携帯用の水質計を用いて計測する。</li> <li>(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)</li> <li>(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。</li> <li>透明度 (透明・ササ濁り・濁り)</li> <li>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。</li> <li>濾過水量 (mL) : 必ず記入すること。</li> <li>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。</li> <li>写真 (撮影の有無)</li> <li>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)</li> </ul> <p>3-1-2. 採水およびシリンジを用いた現場濾過</p>



Ver. 2.2 (2020年4月3日発行)	変更箇所	Ver. 3.01 (2025年6月16日発行)	変更箇所	Ver. 3.1 (2026年5月1日発行)
<p style="text-align: right;">ページ</p> <p>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。以下の作業では、コンタミ防止のため、常に実験用ゴム手袋を着用する。</p> <p>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、実行塩素濃度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、その後ろに濾過する現場海水で3回共洗いして漂白剤を除く。</p> <p>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ー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ー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）。</p> <p>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DNAが吸着・濃縮される。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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p>	<p>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。<del>以下の作業では、</del>コンタミ防止のため、常に<b>実験用ゴムを使い捨て</b>手袋を着用する。</p> <p>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、<b>実行実効</b>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、その後ろに濾過する現場海水で3回共洗いして漂白剤を除く。</p> <p>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ー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ー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）。</p> <p>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<b>環境DNAが吸着→濃縮</b>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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p>	<p style="text-align: right;">ページ</p> <p>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。</p> <p>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、<b>実効</b>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、その後ろに濾過する現場海水で3回共洗いして漂白剤を除く。</p> <p>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ー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ー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）。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p>		<p style="text-align: right;">ページ</p> <p>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。</p> <p>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、<b>実効</b>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、その後ろに濾過する現場海水で3回共洗いして漂白剤を除く。</p> <p>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ー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ー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）。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p>

Ver. 2.2（2020年4月3日発行）	変更箇所	Ver. 3.01（2025年6月16日発行）	変更箇所	Ver. 3.1（2026年5月1日発行）
<p style="text-align: right;">ページ</p> <p><b>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</b></p> <p><b>安全に採水を行うために（再掲）</b>  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良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。  <b>フィールドデータの記録に必要な道具(例)</b>  測量野帳レヘルブック（セ-Y11, コクヨ社など）</p> <p>耐水加圧ボールペン（BDWR-40F-B, パイロットなど）  ハンドヘルドGPS（eTrex20xJ, ガーミン社など）  データロガー-導電率計（CD-4307SD, マザーツール社など）  防水デジタルカメラ（RICOH WG-30, リコー社など）</p> <p><b>採水および研究への輸送に必要な道具</b>  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+a  ・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） サンプル数+a  ・使い捨て手袋 サンプル数+a  ・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</p> <p>・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</p>	<p><b>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</b></p> <p><b>安全に採水を行うために（再掲）</b>  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良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。  <b>フィールドデータの記録に必要な道具(例)</b>  耐水性野帳（測量野帳<del>レヘルブック</del>セ<del>レヘルブック</del>セ-Y11, <del>コクヨ社など</del>コクヨ）  耐水加圧ボールペン（BDWR-40F-B, パイロット<del>など</del>）  ハンドヘルドGPS（eTrex20xJ, <del>ガーミン社など</del>ガーミン）  データロガー-導電率計（CD-4307SD, <del>マザーツール社など</del>マザーツール）  防水デジタルカメラ（RICOH WG-30, <del>リコー社など</del>リコー）</p> <p><b>採水および研究への輸送に必要な道具</b>  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+a  ・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+a  ・使い捨て手袋 <u>（パウダーフリー）</u> サンプル数+a  ・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 適宜</p> <p>・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</p> <p>※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。</p> <p>※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。</p>	<p style="text-align: right;">ページ</p> <p><b>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</b></p> <p><b>安全に採水を行うために（再掲）</b>  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。  <b>フィールドデータの記録に必要な道具（例）</b>  耐水性野帳（測量野帳レヘルブックセ-Y11, コクヨ）</p> <p>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）</p> <p><b>採水および研究室への輸送に必要な道具（例）</b>  ・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+a  ・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+a  ・使い捨て手袋（パウダーフリー） サンプル数+a  ・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</p> <p>・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</p> <p>※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。</p>	<p style="text-align: right;">ページ</p> <p><b>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</b></p> <p><b>安全に採水を行うために（再掲）</b>  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。  <b>フィールドデータの記録に必要な道具（例）</b>  耐水性野帳（測量野帳レヘルブックセ-Y11, コクヨ）</p> <p>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）</p> <p><b>採水および研究室への輸送に必要な道具（例）</b>  ・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+a  ・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+a  ・使い捨て手袋（パウダーフリー） サンプル数+a  ・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</p> <p>・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</p> <p>※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。</p>	
<p><b>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)</b>  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 適宜  ・冷凍庫（-20度以下）</p> <p><b>3-2-1. フィールドデータの記録</b>  測量野帳レヘルブック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で記録するとよい。</p> <p>・採水者（サンプリングに同行した全員の名前を記録）  ・日時（YYYY-MM-DDの形式で記録）</p> <p>・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）</p>	<p><b>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)</b>  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 <u>（パウダーフリー）</u> サンプル数+a  ・冷凍庫（<u>-20度℃</u>以下）</p> <p><b>3-2-1. フィールドデータの記録</b>  測量野帳<del>レヘルブック</del>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。</p> <p>・採水者（サンプリングに同行した全員の名前を記録）  ・日時日付（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）</p>	<p style="text-align: right;">ページ</p> <p><b>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</b></p> <p><b>安全に採水を行うために（再掲）</b>  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。  <b>フィールドデータの記録に必要な道具（例）</b>  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。</p> <p>・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）</p>	<p style="text-align: right;">ページ</p> <p><b>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</b></p> <p><b>安全に採水を行うために（再掲）</b>  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。  <b>フィールドデータの記録に必要な道具（例）</b>  耐水性野帳（測量野帳レヘルブックセ-Y11, コクヨ）</p> <p>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）</p> <p><b>採水および研究室への輸送に必要な道具（例）</b>  ・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+a  ・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+a  ・使い捨て手袋（パウダーフリー） サンプル数+a  ・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</p> <p>・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</p> <p>※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。</p>	
				<p style="text-align: right;">ページ</p> <p><b>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</b></p> <p><b>安全に採水を行うために（再掲）</b>  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。  <b>フィールドデータの記録に必要な道具（例）</b>  耐水性野帳（測量野帳レヘルブックセ-Y11, コクヨ）</p> <p>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）</p> <p><b>採水および研究室への輸送に必要な道具（例）</b>  ・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+a  ・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+a  ・使い捨て手袋（パウダーフリー） サンプル数+a  ・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</p> <p>・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</p> <p>※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。</p>

Ver. 2.2（2020年4月3日発行）	変更箇所	Ver. 3.01（2025年6月16日発行）	変更箇所	Ver. 3.1（2026年5月1日発行）
<p style="text-align: right;">ページ</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・濾過水量（mL）：1000mL未満の場合には必ず記入すること。</li> <li>・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。</li> <li>・写真（撮影の有無）</li> <li>・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）</li> </ul> <p><b>3-2-2. 採水および実験室への輸送</b></p> <p>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1リットル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。採取した水に、DNAの分解抑制のために10%塩化ベンザルコニウム溶液を1mL添加し（終濃度0.01%）、転倒混和を行ってしっかりと混ぜる（図3-2-2-3）。</p> <p>2) パケツを用いる場合：水辺への直接のアクセスが困難な場合には、パケツを用いて河川水を採取する  (ア)パケツの除染：ゴム手袋を着用し、パケツの内部とパ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、ハイターを分子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、パ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。</p> <p>(イ)パケツ採水：パケツを投げ、ロープを手繰り寄せて環境水の入ったパケツを回収する（図3-2-2-6）。採水した水でパケツを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1リットル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。採取した水に、DNAの分解防止のために10%塩化ベンザルコニウム溶液を1mL添加し（終濃度0.01%）、転倒混和を行ってしっかりと混ぜる（図3-2-2-3）。</p> <p>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10%塩化ベンザルコニウム溶液を1mL添加し（終濃度0.01%）、転倒混和を行ってしっかりと混ぜる。</p> <p>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。塩化ベンザルコニウムの添加により、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を分解するので、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。</p> <p><b>3-2-3. グラスファイバーフィルターを用いた濾過</b></p> <p>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。濾過を行う者は作業を通じて手袋を着用する。</p> <p>1) 塩素処理の準備：塩素処理用パケツに水道水を入れ、市販の塩素系漂白剤を実行塩素濃度0.1%以上になるように添加する。</p> <p>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分以上塩素処理パケツに漬け（図3-2-3-1）、水道水ですすいだ後、蒸留水ですすいしてから使用する。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、塩素処理パケツに全体を洗めて5分以上の塩素除染を行い、次回以降の調査に用いる。</p> <p>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、1サンプルにつき2枚用いる。サンプル水を500mLずつ1枚のフィルターで濾過する（図3-2-3-2～-4）。なお、サンプル水によっては500mLの濾過が困難な場合がある。そのようなときには、フィルター1枚あたりの濾過水量を減らし、複数枚に分けて濾過を行い、濾過水量を記録する。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枚とする。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。</p> <p>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）。この状態で数ヶ月程度は安定して保存可能である。</p>	<p style="text-align: right;">ページ</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・濾過水量（mL）：1000mL未満の場合には必ず記入すること。</li> <li>・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。</li> <li>・写真（撮影の有無）</li> <li>・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）</li> </ul> <p><b>3-2-2. 採水および実験室への輸送</b></p> <p><u>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。</u></p> <p>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と、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1リットル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。採取した水に、DNAの分解抑制のために10%塩化ベンザルコニウム溶液を1mL添加し（終濃度0.01%）、転倒混和を行ってしっかりと混ぜる（図3-2-2-3）。</p> <p>2) パケツを用いる場合：水辺への直接のアクセスが困難な場合には、パケツを用いて河川水を採取する  (ア)パケツの除染：<u>ゴム手袋を着用し</u>、パケツの内部とパ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、ハイターを分子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、パ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。</p> <p>(イ)パケツ採水：パケツを投げ、ロープを手繰り寄せて環境水の入ったパケツを回収する（図3-2-2-6）。採水した水でパケツを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1リットル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。採取した水に、DNAの分解防止のために10%塩化ベンザルコニウム溶液を1mL添加し（終濃度0.01%）、転倒混和を行ってしっかりと混ぜる（図3-2-2-3）。</p> <p>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10%塩化ベンザルコニウム溶液を1mL添加し（終濃度0.01%）、転倒混和を行ってしっかりと混ぜる。</p> <p>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。塩化ベンザルコニウムの添加により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。</p> <p><b>3-2-3. グラスファイバーフィルターを用いた濾過</b></p> <p>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。<u>濾過を行う者は作業を通じて常に使い捨て手袋を着用する。</u></p> <p>1) 塩素処理の準備：塩素処理用パケツに水道水を入れ、市販の塩素系漂白剤を<b>実行有効</b>塩素濃度0.1%以上になるように添加する。</p> <p>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分以上塩素処理パケツに漬け（図3-2-3-1）、水道水ですすいだ後、蒸留水ですすいしてから使用する。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、塩素処理パケツに全体を洗めて5分以上の塩素除染を行い、次回以降の調査に用いる。</p> <p>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。</p> <p>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）。<u>この状態で数ヶ月程度は安定して保存可能である</u>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。</p>	<p style="text-align: right;">ページ</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・濾過水量（mL）：1000mL未満の場合には必ず記入すること。</li> <li>・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。</li> <li>・写真（撮影の有無）</li> <li>・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）</li> </ul> <p><b>3-2-2. 採水および実験室への輸送</b></p> <p>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。</p> <p>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と、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。</p> <p>2) パケツを用いる場合：水辺への直接のアクセスが困難な場合には、パケツを用いて河川水を採取する  (ア)パケツの除染：パケツの内部とパ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、パ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。</p> <p>(イ)パケツ採水：パケツを投げ、ロープを手繰り寄せて環境水の入ったパケツを回収する（図3-2-2-6）。採水した水でパケツを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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p><b>3-2-3. グラスファイバーフィルターを用いた濾過</b></p> <p>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。</p> <p>1) 塩素処理の準備：塩素処理用パ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。</p> <p>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分以上塩素処理パケツに漬け（図3-2-3-1）、水道水ですすいだ後、蒸留水ですすいしてから使用する。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、塩素処理パケツに全体を洗めて5分以上の塩素除染を行い、次回以降の調査に用いる。</p> <p>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。</p> <p>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。</p>	<p style="text-align: right;">ページ</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・濾過水量（mL）：1000mL未満の場合には必ず記入すること。</li> <li>・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。</li> <li>・写真（撮影の有無）</li> <li>・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）</li> </ul> <p><b>3-2-2. 採水および実験室への輸送</b></p> <p>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。</p> <p>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と、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。</p> <p>2) パケツを用いる場合：水辺への直接のアクセスが困難な場合には、パケツを用いて河川水を採取する  (ア)パケツの除染：パケツの内部とパ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、パ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。</p> <p>(イ)パケツ採水：パケツを投げ、ロープを手繰り寄せて環境水の入ったパケツを回収する（図3-2-2-6）。採水した水でパケツを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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p><b>3-2-3. グラスファイバーフィルターを用いた濾過</b></p> <p>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。</p> <p>1) 塩素処理の準備：塩素処理用パ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。</p> <p>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分以上塩素処理パケツに漬け（図3-2-3-1）、水道水ですすいだ後、蒸留水ですすいしてから使用する。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、塩素処理パケツに全体を洗めて5分以上の塩素除染を行い、次回以降の調査に用いる。</p> <p>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。</p> <p>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。</p>	

Ver. 2.2 (2020年4月3日発行)	変更箇所	Ver. 3.01 (2025年6月16日発行)	変更箇所	Ver. 3.1 (2026年5月1日発行)
<p style="text-align: right;">ページ</p> <p>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1リットルに10%塩化ベンザルコニウム溶液1mLを添加（終濃度0.01%）した「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良い。</p>	<p>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1リットルに10%塩化ベンザルコニウム溶液1mLを添加（終濃度0.01%）した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良い。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。</p>	<p style="text-align: right;">ページ</p> <p>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。</p>		<p style="text-align: right;">ページ</p> <p>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。</p>

Ver. 2.2（2020年4月3日発行）	変更箇所	Ver. 3.01（2025年6月16日発行）	変更箇所	Ver. 3.1（2026年5月1日発行）
<p style="text-align: right;">ページ</p> <p><b>4. DNAの抽出</b></p> <p><b>サンプル保管上の注意</b></p> <p>カートリッジフィルターまたはガラスファイバーフィルターを用いた濾過の後、サンプルは冷凍庫に保管される。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。</p> <p><b>DNA抽出に共通の注意点</b></p> <p>以下にカートリッジフィルターからのDNA抽出（4-1）およびガ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。コンタミネーションのリスクを軽減するために、どちらの作業も、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。</p> <p><b>4-1. カートリッジ式フィルターからのDNA抽出</b></p> <p><b>DNA抽出を始める前に：コンタミネーションのリスクを減らす方策</b></p> <p>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。なお、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。</p> <p>また、ここからが実験室での工程となるので、コンタミネーション（外来DNAの混入）には十分な注意を払わなくてはならない。とくに、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や次世代シーケンス用ライブラリーの調整）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。</p> <p><b>DNA抽出に必要な実験器具と試薬・消耗品（例）</b></p> <p>乾熱滅菌器（56℃に設定）</p> <p>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</p> <p>QIAVac Connecting System（QIAvac 24 Plus マニホールドとQIAGEN Vacuum Pump, キアゲン社）<sup>1</sup></p> <p>卓上超遠心機（PZ5557-A000, クボタ社）</p> <p>微量高速冷却遠心機（MX-307, TOMY社）</p> <p>微量高速冷却遠心機用ローターラック（AR015-24, TOMY社）</p> <p>卓上小型遠心機（マイクロシックス MS-1, アズワン）</p> <p>ボルテックス・ミキサー（VORTEX-GENIE 2 Mixer, エムエス機器株式会社）と3インチプラットフォーム</p> <p>ルアーフィッティング（VPRM406 オスルアーロック 4mmID用, 株式会社アイシス）</p> <p>50mLコニカルチューブ</p> <p>DNeasy Blood and Tissue kit（キアゲン社）</p> <p>エタノール（分子生物学用）</p> <p>2.0mL チューブ（DNA低吸着；ザルスタット社）</p> <p>1.5mL チューブ（DNA低吸着；ザルスタット社）</p> <p>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）<sup>2</sup></p> <p>パラフィルム</p> <p>ゴム手袋（パウダーフリー）</p> <p>マイクロピペット P-5000, P-1000, P-200, P-100（ピベットマン, ギルソン社）</p>	<p><b>4. DNAの抽出</b></p> <p><b>サンプル保管上の注意</b></p> <p><del>カートリッジフィルターまたはガラスファイバーフィルター環境水を用いた濾過の後、サンプルしたフィルター</del>は冷凍庫に保管される。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。</p> <p><b>DNA抽出に共通の注意点</b></p> <p><del>以下にカートリッジフィルターからのDNA抽出（4-1）およびガ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。</del>コンタミネーションのリスクを軽減するために、<del>どちらDNA抽出の作業も</del>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。<del>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。</del></p> <p><del>以下にカートリッジ式フィルターからのDNA抽出（4-1）およびガ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。</del></p> <p><b>4-1. カートリッジ式フィルターからのDNA抽出</b></p> <p><del><b>DNA抽出を始める前に+コンタミネーションのリスクを減らす方策</b></del>ははじめに</p> <p>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。<del>なお、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 &amp; Minamoto 2023)。</del>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。</p> <p><del>また、ここからが実験室での工程となるので、コンタミネーション</del>（外来DNAの混入）には十分な注意を払わなくてはならない。とくに、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整）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を払う。</p> <p><b>DNA抽出に必要な実験器具と試薬・消耗品（例）</b></p> <p><del>乾熱滅菌器</del>（恒温器（中にミニローテーターを設置でき、56℃に設定で使用できるもの）</p> <p>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</p> <p><del>QIAvac</del>QIAvac 24 Plusシステム（QIAvac 24 Plus Vacuum Manifoldを含む）<del>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）</del><sup>*1</sup></p> <p><del>卓上超遠心機（PZ5557-A000, クボタ社）</del>遠心分離機（50mLコニカルチューブが回せるもの）</p> <p><del>微量高速冷却遠心機（MX-307, TOMY社）</del>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）</p> <p><del>微量高速冷却遠心機用ローターラック（AR015-24, TOMY社）</del>2.0mLチューブとDNeasyカラムが回せるもの）</p> <p>卓上小型遠心機（マイクロシックス MS-1, アズワン）</p> <p>ボルテックス・ミキサー（VORTEX-GENIE 2 Mixer, エムエス機器株式会社）と3インチプラットフォーム</p> <p>ルアーフィッティング（吸引装置接続用、VPRM406 <del>オスルアーロック 4mmID用, 株式会社</del>アイシス）</p> <p>ルアーフィッティング（注入口用, VRMP6, アイシス）</p> <p>ルアーフィッティング（排出口用, VRSP6, アイシス）</p> <p>50mLコニカルチューブ（日本ジェネティクス）</p> <p>DNeasy Blood and Tissue kit（<del>キアゲン社</del>キアゲン）</p> <p><del>96～99.5%</del>エタノール（分子生物学用、<del>富士フィルム和光純薬</del>富士フィルム和光純薬）</p> <p><del>DNA低吸着2.0mL チューブ（DNA低吸着；ザルスタット社）</del>（ザルスタット）</p> <p><del>DNA低吸着1.5mL チューブ（DNA低吸着；ザルスタット社）</del>（ザルスタット）</p> <p>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）<sup>*2</sup></p> <p><del>パラフィルム</del></p> <p><del>ゴム使い捨て手袋（パウダーフリー）</del></p> <p>マイクロピペット P-5000、P-1000, P-200, P-100（ピベットマン, <del>ギルソン社</del>ギルソン）</p>	<p style="text-align: right;">ページ</p> <p><b>4. DNAの抽出</b></p> <p><b>サンプル保管上の注意</b></p> <p>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。</p> <p><b>DNA抽出に共通の注意点</b></p> <p>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。</p> <p>以下にカートリッジ式フィルターからのDNA抽出（4-1）およびガ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。</p> <p><b>4-1. カートリッジ式フィルターからのDNA抽出</b></p> <p>はじめに</p> <p>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 &amp; Minamoto 2023)。</p> <p>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。</p> <p>ここからが実験室での工程となるので、外来DNAの混入には十分な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整）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。</p> <p><b>DNA抽出に必要な実験器具と試薬・消耗品（例）</b></p> <p>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）</p> <p>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</p> <p>QIAvac 24 Plusシステム（QIAvac 24 Plus Vacuum Manifoldを含む）<del>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）</del><sup>*1</sup></p> <p>遠心分離機（50mLコニカルチューブが回せるもの）</p> <p>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）</p> <p>卓上小型遠心機（マイクロシックス MS-1, アズワン）</p> <p>ボルテックス・ミキサー（VORTEX-GENIE 2 Mixer, エムエス機器）と3インチプラットフォーム</p> <p>ルアーフィッティング（吸引装置接続用, VPRM406, アイシス）</p> <p>ルアーフィッティング（注入口用, VRMP6, アイシス）</p> <p>ルアーフィッティング（排出口用, VRSP6, アイシス）</p> <p>50mLコニカルチューブ（日本ジェネティクス）</p> <p>DNeasy Blood and Tissue kit（キアゲン）</p> <p>96～99.5%エタノール（分子生物学用、富士フィルム和光純薬）</p> <p>DNA低吸着2.0mL チューブ（ザルスタット）</p> <p>DNA低吸着1.5mL チューブ（ザルスタット）</p> <p>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）<sup>*2</sup></p> <p><del>パラフィルム</del></p> <p>使い捨て手袋（パウダーフリー）</p> <p>マイクロピペット P-1000, P-200, P-100（ピベットマン, ギルソン）</p>	<p style="text-align: right;">ページ</p> <p><b>4. DNAの抽出</b></p> <p><b>サンプル保管上の注意</b></p> <p>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。</p> <p><b>DNA抽出に共通の注意点</b></p> <p>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。</p> <p>以下にカートリッジ式フィルターからのDNA抽出（4-1）およびガ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。</p> <p><b>4-1. カートリッジ式フィルターからのDNA抽出</b></p> <p>はじめに</p> <p>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 &amp; Minamoto 2023)。</p> <p>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。</p> <p>ここからが実験室での工程となるので、外来DNAの混入には十分な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整）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。</p> <p><b>DNA抽出に必要な実験器具と試薬・消耗品（例）</b></p> <p>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）</p> <p>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</p> <p>QIAvac 24 Plusシステム（QIAvac 24 Plus Vacuum Manifoldを含む）<del>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）</del><sup>*1</sup></p> <p>遠心分離機（50mLコニカルチューブが回せるもの）</p> <p>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）</p> <p>卓上小型遠心機（マイクロシックス MS-1, アズワン）</p> <p>ボルテックス・ミキサー（VORTEX-GENIE 2 Mixer, エムエス機器）と3インチプラットフォーム</p> <p>ルアーフィッティング（吸引装置接続用, VPRM406, アイシス）</p> <p>ルアーフィッティング（注入口用, VRMP6, アイシス）</p> <p>ルアーフィッティング（排出口用, VRSP6, アイシス）</p> <p>50mLコニカルチューブ（日本ジェネティクス）</p> <p>DNeasy Blood and Tissue kit（キアゲン）</p> <p>96～99.5%エタノール（分子生物学用、富士フィルム和光純薬）</p> <p>DNA低吸着2.0mL チューブ（ザルスタット）</p> <p>DNA低吸着1.5mL チューブ（ザルスタット）</p> <p>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）<sup>*2</sup></p> <p><del>パラフィルム</del></p> <p>使い捨て手袋（パウダーフリー）</p> <p>マイクロピペット P-1000, P-200, P-100（ピベットマン, ギルソン）</p>	<p style="text-align: right;">ページ</p> <p><b>4. DNAの抽出</b></p> <p><b>サンプル保管上の注意</b></p> <p>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。</p> <p><b>DNA抽出に共通の注意点</b></p> <p>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。</p> <p>以下にカートリッジ式フィルターからのDNA抽出（4-1）およびガ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。</p> <p><b>4-1. カートリッジ式フィルターからのDNA抽出</b></p> <p>はじめに</p> <p>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 &amp; Minamoto 2023)。</p> <p>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。</p> <p>ここからが実験室での工程となるので、外来DNAの混入には十分な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整）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。</p> <p><b>DNA抽出に必要な実験器具と試薬・消耗品（例）</b></p> <p>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）</p> <p>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</p> <p>QIAvac 24 Plusシステム（QIAvac 24 Plus Vacuum Manifoldを含む）<del>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）</del><sup>*1</sup></p> <p>遠心分離機（50mLコニカルチューブが回せるもの）</p> <p>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）</p> <p>卓上小型遠心機（マイクロシックス MS-1, アズワン）</p> <p>ボルテックス・ミキサー（VORTEX-GENIE 2 Mixer, エムエス機器）と3インチプラットフォーム</p> <p>ルアーフィッティング（吸引装置接続用, VPRM406, アイシス）</p> <p>ルアーフィッティング（注入口用, VRMP6, アイシス）</p> <p>ルアーフィッティング（排出口用, VRSP6, アイシス）</p> <p>50mLコニカルチューブ（日本ジェネティクス）</p> <p>DNeasy Blood and Tissue kit（キアゲン）</p> <p>96～99.5%エタノール（分子生物学用、富士フィルム和光純薬）</p> <p>DNA低吸着2.0mL チューブ（ザルスタット）</p> <p>DNA低吸着1.5mL チューブ（ザルスタット）</p> <p>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）<sup>*2</sup></p> <p><del>パラフィルム</del></p> <p>使い捨て手袋（パウダーフリー）</p> <p>マイクロピペット P-1000, P-200, P-100（ピベットマン, ギルソン）</p>

Ver. 2.2 (2020年4月3日発行)	変更箇所	Ver. 3.01 (2025年6月16日発行)	変更箇所	Ver. 3.1 (2026年5月1日発行)
<p style="text-align: right;">ページ</p> <p>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）</p> <p>ハザミ（パラフィルムを切るためのもの）</p> <p>標準型ピンセット1本（IPT-12, アズワン）</p> <p>1.5mL/2mL用チューブブラック</p> <p><sup>1</sup> QIAVac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、卓上超遠心機でRNAlaterを抜き取ってもよい（Miya et al. 2016が参考になる）。</p> <p><sup>2</sup> 本プロトコールでは、DNeasyキットに付属のバッファァーATLは使用しない。</p> <p><b>4-1-1. 実験の準備</b></p> <p>実験中は必ずゴム手袋を着用する（これ以降作業中に手袋の汚染を感じた場合は速やかに交換する）。</p> <p>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）。</p> <p>2) RNAlaterが充填された濾過済みのステリベクスを準備する（凍結しているRNAlaterは常温で比較的に早く溶解できる；図4-1-1-2）。</p> <p><b>4-1-2. RNAlaterの吸引</b></p> <p>1) ステリベクスの排出孔をふさいでいたキャップもしくはパラフィルムを外し、ルアーフィッティング（VPRM406）を取りつける。</p> <p>2) ルアーフィッティングを介してQIAvac 24 Plus マニホールドとステリベクスを接続する（図4-1-2-1）。</p> <p>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）。</p> <p>4) パラフィルムを1cm × 5cm程度の大きさに切り、ステリベクスの数だけ用意する（ルアーフィッティング [VRSP6] を使用した場合はパラフィルムは不要）。</p> <p>5) RNAlaterを吸引したステリベクスをマニホールドから外し、パラフィルムもしくはルアーフィッティングに封をする（図4-1-2-2；パラフィルムを使用する場合は、乾熱滅菌器で温めた際にステリベクス内の空気が膨張し、パラフィルムが破れて液漏れすることがあるので、排出孔の部分をフィルムで数回重ねて封をすること）。</p> <p><b>4-1-3. DNAの抽出</b></p> <p>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）、200μLのAL、220μLのPBS (-) の割合でプレミックスを調整する。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。</p> <p>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上記のプレミックスを充填する（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）。</p> <p>3) パラフィルムを1cm × 5cm程度の大きさに切り出し、ステリベクスの注入孔側にしっかりと封をする（注意：ルアーフィッティング [VRMP6] を使用の場合はパラフィルムは不要；図4-1-3-3）。</p> <p>4) ミニローターターの10mL/15mLチューブホルダーにステリベクスを差し込み、ステリベクスが地面と平行になるようにチューブホルダーをローターター本体に取り付ける。</p> <p>5) ステリベクスを取り付けたローターターを乾熱滅菌器内に置き、10rpmで回転させ56℃で20分間加温する（注意：ミニローターターの耐久温度は60℃；図4-1-3-4）。</p> <p>6) 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チューブを50mLコニカルチューブに入れる（注意：2.0mLのチューブにはキャップに番号など必要事項を記入、コニカルチューブの奥まで押し込まない；図4-1-3-6）。</p> <p>7) ステリベクスの加温が終了後、注入孔側のパラフィルムもしくは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。</p> <p>8) 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）。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）。</p>	<p>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、<u>使用マイクロピペットに適合したもの</u>）</p> <p><del>ハザミ（パラフィルムを切るためのもの）</del></p> <p>標準型ピンセット1本（IPT-12, アズワン）</p> <p>1.5mL/2mL用チューブブラック</p> <p><sup>*1</sup> 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、<u>卓上超遠心機遠心分離機</u>でRNAlaterを抜き取ってもよい（Miya et al. 2016が参考になる）。</p> <p><sup>*2</sup> 本プロトコールでは、DNeasyキットに付属の<u>バッファァーATLは使用しない</u>が、<u>Buffer ATLは使用しないが、Buffer ATLを用いることで収量が上がるとする論文も発表されており（Wu &amp; Minamoto, 2023, Fukuzawa et al.,）、そのような手法を用いることもできる。</u></p> <p><b>4-1-1. 実験の準備</b></p> <p><del>実験中は必ずゴム常に使い捨て</del>手袋を着用する（<del>これ以降</del>、作業中に手袋の汚染を感じた場合は速やかに交換する）。</p> <p>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）。</p> <p>2) RNAlaterが充填された濾過済みのステリベクスを準備する（<del>凍結しているRNAlater保存されていた場合は常温で比較的に早く、作業前に室温に置いてあらかじめよく溶解できる</del>しておく（図4-1-1-2））。</p> <p><b>4-1-2. RNAlaterの吸引</b></p> <p><del>1) ステリベクスの排出孔をふさいでいたキャップもしくはパラフィルムを外し、ルアーフィッティング（VPRM406）を取りつける。</del></p> <p>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整する。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。</p> <p>2) ルアーフィッティングを介してQIAvac 24 Plus <del>マニホールド</del> Vacuum Manifoldとステリベクスを接続する（図4-1-2-1）。</p> <p>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（<del>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</del>）。</p> <p>4) <del>パラフィルムを1cm × 5cm程度の大きさに切り、ステリベクスの数だけ用意する（ルアーフィッティング [VRSP6] を使用した場合はパラフィルムは不要）</del>をステリベクスの数だけ用意する。</p> <p>5) RNAlaterを吸引除去したステリベクスをマニホールドから外し、<del>パラフィルムもしくは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）</del>パラフィルムを使用する場合は、乾熱滅菌器で温めた際にステリベクス内の空気が膨張し、パラフィルムが破れて液漏れすることがあるので、<del>排出孔の部分をフィルムで数回重ねて封をすること</del>）。</p> <p><b>4-1-3. DNAの抽出</b></p> <p><del>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）、200μLのAL、220μLのPBS (-) の割合でプレミックスを調整する。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。</del></p> <p>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）。</p> <p>2) <del>パラフィルムを1cm × 5cm程度の大きさに切り出し、ステリベクスの注入孔側にしっかりと封をする（注意：ルアーフィッティング [VRMP6] を使用の場合はパラフィルムは不要）</del>でステリベクスの注入孔側に封をする（図4-1-3-3）。</p> <p>3) ミニローターターの10mL/15mLチューブホルダーにステリベクスを差し込み、ステリベクスが地面と平行水平になるようにチューブホルダーをローターター本体に取り付ける。</p> <p>4) ステリベクスを取り付けたローターターを乾熱滅菌器内恒温器内に置き、10rpmで回転させ56℃で20分間加温する（注意：ミニローターターの耐久温度は60℃；図4-1-3-4）。</p> <p>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返して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）。</p> <p>6) ステリベクスの加温が終了後、注入孔側の<del>パラフィルムもしくは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</del>。</p> <p>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）。<del>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。</del>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）。</p>	<p style="text-align: right;">ページ</p> <p>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）</p> <p>標準型ピンセット（IPT-12, アズワン）</p> <p>1.5mL/2.0mL用チューブブラック</p> <p><sup>*1</sup> 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）。</p> <p><sup>*2</sup> 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は使用しないが、Buffer ATLを用いることで収量が上がるとする論文も発表されており（Wu &amp; Minamoto, 2023, Fukuzawa et al.,）、そのような手法を用いることもできる。</p> <p><b>4-1-1. 実験の準備</b></p> <p>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。</p> <p>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）。</p> <p>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溶解しておく（図4-1-1-2）。</p> <p><b>4-1-2. RNAlaterの吸引</b></p> <p>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整する。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。</p> <p>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）。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>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）。</p> <p><b>4-1-3. DNAの抽出</b></p> <p>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）。</p> <p>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）。</p> <p>3) ミニローターターの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ターター本体に取り付ける。</p> <p>4) ステリベクスを取り付けたロータ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：ミニローターターの耐久温度は60℃；図4-1-3-4）。</p> <p>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返して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）。</p> <p>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。</p> <p>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）。</p>	<p style="text-align: right;">ページ</p> <p>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）</p> <p>標準型ピンセット（IPT-12, アズワン）</p> <p>1.5mL/2.0mL用チューブブラック</p> <p><sup>*1</sup> 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）。</p> <p><sup>*2</sup> 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は使用しないが、Buffer ATLを用いることで収量が上がるとする論文も発表されており（Wu &amp; Minamoto, 2023, Fukuzawa et al.,）、そのような手法を用いることもできる。</p> <p><b>4-1-1. 実験の準備</b></p> <p>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。</p> <p>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）。</p> <p>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溶解しておく（図4-1-1-2）。</p> <p><b>4-1-2. RNAlaterの吸引</b></p> <p>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整する。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。</p> <p>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）。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>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）。</p> <p><b>4-1-3. DNAの抽出</b></p> <p>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）。</p> <p>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）。</p> <p>3) ミニローターターの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ターター本体に取り付ける。</p> <p>4) ステリベクスを取り付けたロータ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：ミニローターターの耐久温度は60℃；図4-1-3-4）。</p> <p>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返して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）。</p> <p>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。</p> <p>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）。</p>	

Ver. 2.2 (2020年4月3日発行)	変更箇所	Ver. 3.01 (2025年6月16日発行)	変更箇所	Ver. 3.1 (2026年5月1日発行)
<p style="text-align: right;">ページ</p> <p>9) ステリバッ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2mLチューブに回収する (図4-1-3-10)。</p> <p>10) 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バックス (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)。</p> <p>11) 使用済みステリバックスを廃棄し、2.0mLチューブのキャップをしっかりと閉じる。</p>	<p>8) ステリバッ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2mLチューブに回収する (図4-1-3-10)。</p> <p>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バックス (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)。</p> <p>10) 使用済みステリバックスを廃棄し、2.0mLチューブのキャップをしっかりと閉じる。</p>	<p style="text-align: right;">ページ</p> <p>8) ステリバッ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)。</p> <p>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バックス (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)。</p> <p>10) 使用済みステリバックスを廃棄し、2.0mLチューブのキャップをしっかりと閉じる。</p>	<p style="text-align: right;">ページ</p> <p>8) ステリバッ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)。</p> <p>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バックス (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)。</p> <p>10) 使用済みステリバックスを廃棄し、2.0mLチューブのキャップをしっかりと閉じる。</p>	<p style="text-align: right;">ページ</p> <p>8) ステリバッ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)。</p> <p>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バックス (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)。</p> <p>10) 使用済みステリバックスを廃棄し、2.0mLチューブのキャップをしっかりと閉じる。</p>
<p><b>4-1-4. DNeasy Blood and Tissue kitを用いたDNAの精製</b></p> <p>1) ステリバッ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; 注意: カラムのキャップに必要事項を記入すること)。</p> <p>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4-1-4-2)。</p> <p>3) マイクロピペット (P1000) 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を用いる。</p> <p>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)。</p> <p>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)。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>8) カラムに500μLのBuffer AW2を入れ (図4-1-4-9)、20,000gで3分間遠心する。</p> <p>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)。</p> <p>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。</p> <p>11) 200μLの溶出 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。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。その際は溶出バッファー量を記録しておくこと。</p> <p>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4-1-4-13)。使用済みカラムを廃棄する。</p> <p>13) この状態で-20℃で安定的に保存可能である。</p>	<p style="text-align: right;">37</p> <p><b>4-1-4. DNeasy Blood and Tissue kitを用いたDNAの精製</b></p> <p>1) ステリバッ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+<a href="#">注意</a>)。カラムのキャップに必要事項を記入する (<a href="#">ここ</a>)。</p> <p>2) 抽出DNAが入った2.0mLチューブに200μLの96~<del>100</del><b>99.5</b>%エタノールを入れピペットでよく混和する (図4-1-4-2)。</p> <p>3) マイクロピペット (<del>P1000</del><b>P1000</b>) 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を用いる。</p> <p>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)。</p> <p>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)。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>8) カラムに500μLのBuffer AW2を入れ (図4-1-4-9)、<del>20,000g</del><b>使用している遠心分離機の最大遠心速度</b>で3分間遠心する。</p> <p>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)。</p> <p>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。</p> <p>11) <b>100~200μLの溶出</b> 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 (<a href="#">図4-1-4-13</a>)。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。<b>その際は溶出に使用した</b>バッファー量を記録しておく<b>こと</b>。</p> <p>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-<del>13</del><b>14</b>)。使用済みカラムを廃棄する。</p> <p>13) この状態で-20℃で安定的に保存可能である (<a href="#">図4-1-4-15</a>)。</p>	<p style="text-align: right;">42</p> <p><b>4-1-4. DNeasy Blood and Tissue kitを用いたDNAの精製</b></p> <p>1) ステリバッ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。</p> <p>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)。</p> <p>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を用いる。</p> <p>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)。</p> <p>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)。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>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)。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>13) この状態で-20℃で安定的に保存可能である (図4-1-4-15)。</p>	<p style="text-align: right;">43</p> <p><b>4-1-4. DNeasy Blood and Tissue kitを用いたDNAの精製</b></p> <p>1) ステリバッ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。</p> <p>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)。</p> <p>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を用いる。</p> <p>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)。</p> <p>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)。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>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)。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>13) この状態で-20℃で安定的に保存可能である (図4-1-4-15)。</p>	

Ver. 2.2（2020年4月3日発行）	変更箇所	Ver. 3.01（2025年6月16日発行）	変更箇所	Ver. 3.1（2026年5月1日発行）
ページ		ページ		ページ
4-2.ガラスファイバーフィルターからのDNA抽出	4-2.ガラスファイバーフィルターからのDNA抽出	4-2. ガラスファイバーフィルターからのDNA抽出	52	4-2. ガラスファイバーフィルターからのDNA抽出
DNA抽出を始める前に：コンタミネーションのリスクを減らす方策	DNA抽出を始める前に：コンタミネーションのリスクを減らす方策	はじめに	52	はじめに
<p>本項では、ガ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。</p>	<p>本項では、ガ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。</p>	<p>本項では、ガ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。</p>		<p>本項では、ガ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。</p>
<p>また、ここからが実験室での工程となるので、コンタミネーション（外来DNAの混入）には十分注意を払わなくてはならない。とくに、この段階でコンタミネーションが起こると、以降の実験（ライブラリーの調整）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ぬ。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。</p>	<p>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 &amp; 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。</p> <p>また、ここからが実験室での工程となるので、コンタミネーション（外来DNAの混入）には十分注意を払わなくてはならない。とくに、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整調製）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ぬ。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。</p>	<p>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 &amp; 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。</p> <p>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整）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ぬ。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。</p>		<p>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 &amp; 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。</p> <p>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整）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ぬ。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。</p>
<p>DNA抽出に必要な実験器具と試薬・消耗品（例）</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>遠心分離機（サリベットチューブが回せるもの）</li> <li>遠心分離機（1.5mLチューブが回せるもの）</li> <li>ヒートブロックまたは恒温器（56℃に設定）</li> <li>サリベットチューブ 50本数分</li> <li>ピンセット 50本数分</li> <li>DNeasy Blood &amp; Tissue Kit 50本数分</li> <li>Buffer ALおよびProteinase K *1口</li> <li>1.5mLエッペンドルフチューブ（低吸着） 50本数分</li> <li>エタノール（分子生物学用） 適宜</li> <li>TEバッファ（pH8.0: 分子生物学用） 適宜</li> <li>ゴム手袋（パウダーフリー）</li> <li>マイクロピペット各種</li> <li>フィルターチップ各種</li> <li>1.5mL/2mL用チューブブラック</li> </ul> <p>1 本プロトコールでは、DNeasyキットに付属のバッファATLは使用しない。</p>	<p>DNA抽出に必要な実験器具と試薬・消耗品（例）</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>遠心分離機（サリベットチューブが回せるもの）</li> <li>遠心分離機（+5mL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）</li> <li>ヒートブロックまたは恒温器（56℃に設定、ヒートブロックでも良い）</li> <li>サリベットチューブ サンプル数分</li> <li>ピンセット サンプル数分</li> <li>DNeasy Blood &amp; Tissue Kit サンプル数分</li> <li>Buffer ALおよびProteinase K *1口</li> <li>1.5mLエッペンドルフチューブ（DNA低吸着） サンプル数分</li> <li>96～99.5%エタノール（分子生物学用） 適宜</li> <li>TEバッファ（pH8.0: 分子生物学用） 適宜</li> <li>ゴム使い捨て手袋（パウダーフリー）</li> <li>マイクロピペット各種 P-1000、P-200、P-100（ピペットマン、ギルソン）</li> <li>フィルターチップ各種</li> <li>1.5mL/2mL用チューブブラック</li> </ul> <p>1 本プロトコールでは、DNeasyキットに付属のバッファATLは使用しない。</p>	<p>DNA抽出に必要な実験器具と試薬・消耗品（例）</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>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）</li> <li>恒温器（56℃に設定、ヒートブロックでも良い）</li> <li>サリベットチューブ サンプル数分</li> <li>ピンセット サンプル数分</li> <li>DNeasy Blood &amp; Tissue Kit サンプル数分</li> <li>Buffer ALおよびProteinase K</li> <li>1.5mLエッペンドルフチューブ（DNA低吸着） サンプル数分</li> <li>96～99.5%エタノール（分子生物学用） 適宜</li> <li>TEバッファ（pH8.0: 分子生物学用） 適宜</li> <li>使い捨て手袋（パウダーフリー）</li> <li>マイクロピペット P-1000, P-200, P-100（ピペットマン、ギルソン）</li> <li>フィルターチップ各種</li> <li>1.5mL/2.0mL用チューブブラック</li> </ul>	<p>DNA抽出に必要な実験器具と試薬・消耗品（例）</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>遠心分離機（サリベットチューブが回せるもの）</li> <li>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）</li> <li>恒温器（56℃に設定、ヒートブロックでも良い）</li> <li>サリベットチューブ サンプル数分</li> <li>ピンセット サンプル数分</li> <li>DNeasy Blood &amp; Tissue Kit サンプル数分</li> <li>Buffer ALおよびProteinase K</li> <li>1.5mLエッペンドルフチューブ（DNA低吸着） サンプル数分</li> <li>96～99.5%エタノール（分子生物学用） 適宜</li> <li>TEバッファ（pH8.0: 分子生物学用） 適宜</li> <li>使い捨て手袋（パウダーフリー）</li> <li>マイクロピペット P-1000, P-200, P-100（ピペットマン、ギルソン）</li> <li>フィルターチップ各種</li> <li>1.5mL/2.0mL用チューブブラック</li> </ul>	<p>DNA抽出に必要な実験器具と試薬・消耗品（例）</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>遠心分離機（サリベットチューブが回せるもの）</li> <li>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）</li> <li>恒温器（56℃に設定、ヒートブロックでも良い）</li> <li>サリベットチューブ サンプル数分</li> <li>ピンセット サンプル数分</li> <li>DNeasy Blood &amp; Tissue Kit サンプル数分</li> <li>Buffer ALおよびProteinase K</li> <li>1.5mLエッペンドルフチューブ（DNA低吸着） サンプル数分</li> <li>96～99.5%エタノール（分子生物学用） 適宜</li> <li>TEバッファ（pH8.0: 分子生物学用） 適宜</li> <li>使い捨て手袋（パウダーフリー）</li> <li>マイクロピペット P-1000, P-200, P-100（ピペットマン、ギルソン）</li> <li>フィルターチップ各種</li> <li>1.5mL/2.0mL用チューブブラック</li> </ul>
4-2-1. 実験の準備	4-2-1. 実験の準備	4-2-1. 実験の準備	53	4-2-1. 実験の準備
<p>実験中は必ずゴム手袋を着用する（これ以降の作業中に手袋の汚染を感じた場合は速やかに交換する）。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>56℃の恒温槽を準備する（温まるのに時間がかかるので、事前に準備しておく）。</li> <li>水サンプルを濾過したフィルターを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。</li> <li>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）。</li> </ol>	<p>実験中は必ずゴム手袋を着用する（これ以降の作業中に手袋の汚染を感じた場合は速やかに交換する）。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>56℃の恒温槽恒温器を準備する（温まるのに時間がかかるので、事前に準備しておく）。</li> <li>水サンプルを濾過した折りたたんでいたフィルター<sup>*1</sup>を、折り目を下に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。</li> <li>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）。</li> </ol> <p><sup>*1</sup> 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。</p>	<p>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。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>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）。</li> <li>水サンプルを濾過して折りたたんでいたフィルター<sup>*1</sup>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。</li> <li>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）。</li> </ol> <p><sup>*1</sup> 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。</p>		<p>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。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>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）。</li> <li>水サンプルを濾過して折りたたんでいたフィルター<sup>*1</sup>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。</li> <li>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）。</li> </ol> <p><sup>*1</sup> 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。</p>
4-2-2. タンパク質の分解処理	4-2-2. タンパク質の分解処理	4-2-2. タンパク質の分解処理	53	4-2-2. タンパク質の分解処理
<ol style="list-style-type: none"> <li>サンプルあたり、400 μL の Buffer AL、40 μL 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倍まとめて調整してから分注すると良い。</li> <li>恒温槽で56℃、30分間保温処理する（図4-2-2-2）。恒温槽で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、立てて恒温槽に入れる。</li> <li>その後、3,000gで3分間遠心分離する（図4-2-2-3）。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）。</li> <li>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）、1分間静置する。その後、3,000gで3分間遠心分離する。実験中は必ずゴム手袋を着用する。</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>サンプルあたり、400 μL の Buffer AL、40 μL 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倍まとめて調整調製してから分注すると良い。</li> <li>恒温槽恒温器で56℃、30分間保温処理する（図4-2-2-2）。恒温槽で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、立てて恒温槽恒温器に入れる。</li> <li>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）。</li> <li>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。実験中は必ずゴム手袋を着用する。</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>サンプルあたり、400 μL の Buffer AL、40 μL 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倍まとめて調整してから分注するとよい。</li> <li>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。</li> <li>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）。</li> <li>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。</li> </ol>		<ol style="list-style-type: none"> <li>サンプルあたり、400 μL の Buffer AL、40 μL 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倍まとめて調整してから分注するとよい。</li> <li>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。</li> <li>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）。</li> <li>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。</li> </ol>
4-2-3. DNeasyカラムを用いたDNAの精製	4-2-3. DNeasyカラムを用いたDNAの精製	4-2-3. DNeasyカラムを用いたDNAの精製	53	4-2-3. DNeasyカラムを用いたDNAの精製
<ol style="list-style-type: none"> <li>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のエタノールを添加する（図4-2-3-2）。</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>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）。</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>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）。</li> </ol>		<ol style="list-style-type: none"> <li>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）。</li> </ol>

Ver. 2.2 (2020年4月3日発行)	変更箇所	Ver. 3.01 (2025年6月16日発行)	変更箇所	Ver. 3.1 (2026年5月1日発行)
<p style="text-align: right;">ページ</p> <p>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650μL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)。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>5)カラムを新しい2mL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。</p> <p>6)遠心機から取り外すときや移動させるときなどは、ゆらして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。</p> <p>7)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)。</p> <p>8)カラムを低吸着の1.5mLチューブに載せ替える(図4-2-3-15、-16)。</p> <p>9)100~200μLのBuffer AE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、溶出バッファ量を50μL程度まで減じることが可能である。その際は溶出バッファ量を記録しておくこと。</p>	<p>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650μL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)。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>5) カラムを新しい2mL <del>チューブ</del> <b>コレクションチューブ</b> 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。</p> <p>6) 遠心機から取り外すときや移動させるときなどは、<del>ゆらして</del> <b>揺れなどで</b> 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。</p> <p>7) <b>DNA</b> 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)。</p> <p>8) カラムを <b>DNA</b> 低吸着の1.5mLチューブに載せ替える(図4-2-3-15、-16)。</p> <p>9) 100~<del>200</del> 200μLのBuffer AE (<b>溶出バッファ</b>) 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 <del>-20</del> 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、溶出バッファ量を50μL程度まで減じることが可能である。<b>その際は溶出に使用した</b> バッファ量を記録しておくこと。</p>	<p style="text-align: right;">ページ</p> <p>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650μL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)。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>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)。</p> <p>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)。</p> <p>9) 100~200μLのBuffer AE(溶出バッファ)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、溶出バッファ量を50μL程度まで減じることが可能である。溶出に使用したバッファ量を記録しておく。</p>	<p style="text-align: right;">ページ</p> <p>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650μL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)。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>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)。</p> <p>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)。</p> <p>9) 100~200μLのBuffer AE(溶出バッファ)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、溶出バッファ量を50μL程度まで減じることが可能である。溶出に使用したバッファ量を記録しておく。</p>	<p style="text-align: right;">ページ</p> <p>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650μL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)。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>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)。</p> <p>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)。</p> <p>9) 100~200μLのBuffer AE(溶出バッファ)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、溶出バッファ量を50μL程度まで減じることが可能である。溶出に使用したバッファ量を記録しておく。</p>
<p><b>補足事項</b></p> <p>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を参考にするとよい。</p>	<p>49 <b>補足事項</b></p> <p>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 <b>など</b> を参考にするとよい。</p>	<p>54 <b>補足事項</b></p> <p>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 <b>などを</b> 参考にするとよい。</p>	<p>55 <b>補足事項</b></p> <p>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 <b>などを</b> 参考にするとよい。</p>	

Ver. 2.2 (2020年4月3日発行)	変更箇所	Ver. 3.01 (2025年6月16日発行)	変更箇所	Ver. 3.1 (2026年5月1日発行)
ページ		ページ		ページ
<b>5. DNAの分析</b>	<b>5. DNAの分析</b>	<b>5. DNAの分析</b>	<b>5. DNAの分析</b>	<b>5. DNAの分析</b>
<b>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</b>	<b>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</b>	<b>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</b>	<b>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</b>	<b>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</b>
<p>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。</p>	<p>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。</p>	<p>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。</p>	<p>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。</p>	<p>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。</p>
5-1-1. 種特異的プライマー（およびプローブ）の設計	5-1-1. 種特異的プライマー（およびプローブ）の設計	5-1-1. 種特異的プライマー（およびプローブ）の設計	5-1-1. 種特異的プライマー（およびプローブ）の設計	5-1-1. 種特異的プライマー（およびプローブ）の設計
<p>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。そのためプライマー設計の手順は以下のとおりである。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>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 (<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/</a>) やBOLD (<a href="http://www.barcodinglife.org">http://www.barcodinglife.org</a>) 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。</li> <li>プライマーの設計：対象種と近縁種の間に変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良い。プライマーの設計に際してはT<sub>m</sub>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良い。必要に応じてTaqManプローブも作成する。</li> <li>In silicoでのチェック：Primer-BLAST (<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/</a>) 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。</li> <li>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）。</li> <li>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）をシーケンスし、対象種のDNAが間違いなく増幅していることを確認する。</li> </ol>	<p>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。そのためプライマー設計の手順は以下のとおりである。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>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 (<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/</a>) やBOLD (<a href="http://www.barcodinglife.org">http://www.barcodinglife.org</a>) 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。</li> <li>プライマーの設計：対象種と近縁種の間に変異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良い。プライマーの設計に際してはT<sub>m</sub>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良い。必要に応じてTaqManプローブも作成する。</li> <li>In silicoでのチェック：Primer-BLAST (<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/</a>) 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。</li> <li>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）。</li> <li>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）をシーケンスも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。</li> </ol>	<p>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。そのためプライマー設計の手順は以下のとおりである。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>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 (<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/</a>) やBOLD (<a href="http://www.barcodinglife.org">http://www.barcodinglife.org</a>) 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。</li> <li>プライマーの設計：対象種と近縁種の間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<sub>m</sub>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。</li> <li>In silicoでのチェック：Primer-BLAST (<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/</a>) 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。</li> <li>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）。</li> <li>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。</li> </ol>	<p>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。そのためプライマー設計の手順は以下のとおりである。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>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 (<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/</a>) やBOLD (<a href="http://www.barcodinglife.org">http://www.barcodinglife.org</a>) 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。</li> <li>プライマーの設計：対象種と近縁種の間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<sub>m</sub>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。</li> <li>In silicoでのチェック：Primer-BLAST (<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/</a>) 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。</li> <li>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）。</li> <li>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。</li> </ol>	<p>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。そのためプライマー設計の手順は以下のとおりである。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>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 (<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/</a>) やBOLD (<a href="http://www.barcodinglife.org">http://www.barcodinglife.org</a>) 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。</li> <li>プライマーの設計：対象種と近縁種の間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<sub>m</sub>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。</li> <li>In silicoでのチェック：Primer-BLAST (<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/</a>) 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。</li> <li>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）。</li> <li>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。</li> </ol>
5-1-2. リアルタイムPCR実験	5-1-2. リアルタイムPCR実験	5-1-2. リアルタイムPCR実験	5-1-2. リアルタイムPCR実験	5-1-2. リアルタイムPCR実験
<p>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。</p>	<p>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。</p>	<p>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。</p>	<p>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。</p>	<p>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。</p>
<b>リアルタイムPCR実験に必要な実験器具と試薬・消耗品（例）</b>	<b>リアルタイムPCR実験に必要な実験器具と試薬・消耗品（例）</b>	<b>リアルタイムPCR実験に必要な実験器具と試薬・消耗品（例）</b>	<b>リアルタイムPCR実験に必要な実験器具と試薬・消耗品（例）</b>	<b>リアルタイムPCR実験に必要な実験器具と試薬・消耗品（例）</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>リアルタイムPCR装置（96穴）</li> <li>PCR試薬（2×Environmental Master Mix 2.0；サーモフィッシャー）</li> <li>UNG酵素（AmpErase Uracil N-Glycosylase；サーモフィッシャー）</li> <li>Assay Mix（各18μMのプライマー、2.5μMのTaqManプローブ<sup>*1</sup>）</li> <li>96穴PCRプレートおよびシール</li> <li>ゴム手袋（パウダーフリー）</li> <li>マイクロピペット（各種）</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>リアルタイムPCR装置（96穴）</li> <li>PCR試薬（2×Environmental Master Mix 2.0；サーモフィッシャー）</li> <li>UNG酵素（AmpErase Uracil N-Glycosylase；サーモフィッシャー）</li> <li>Assay Mix（各18μMのプライマー、<del>2.5</del>2.5μMのTaqManプローブ<sup>*1</sup>）</li> <li>96穴PCRプレートおよびシール</li> <li><del>ヨム</del>使い捨て手袋（パウダーフリー）</li> <li>マイクロピペット（<del>各種</del>P-1000, P-200, P-100（ピペットマン、ギルソン））</li> <li>フィルターチップ（各種）</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>リアルタイムPCR装置（96穴）</li> <li>PCR試薬（2×Environmental Master Mix 2.0；サーモフィッシャー）</li> <li>UNG酵素（AmpErase Uracil N-Glycosylase；サーモフィッシャー）</li> <li>Assay Mix（各18μMのプライマー、2.5μMのTaqManプローブ<sup>*1</sup>）</li> <li>96穴PCRプレートおよびシール</li> <li>使い捨て手袋（パウダーフリー）</li> <li>マイクロピペット P-1000, P-200, P-100（ピペットマン、ギルソン）</li> <li>フィルターチップ（各種）</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>リアルタイムPCR装置（96穴）</li> <li>PCR試薬（2×Environmental Master Mix 2.0；サーモフィッシャー）</li> <li>UNG酵素（AmpErase Uracil N-Glycosylase；サーモフィッシャー）</li> <li>Assay Mix（各18μMのプライマー、2.5μMのTaqManプローブ<sup>*1</sup>）</li> <li>96穴PCRプレートおよびシール</li> <li>使い捨て手袋（パウダーフリー）</li> <li>マイクロピペット P-1000, P-200, P-100（ピペットマン、ギルソン）</li> <li>フィルターチップ（各種）</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>リアルタイムPCR装置（96穴）</li> <li>PCR試薬（2×Environmental Master Mix 2.0；サーモフィッシャー）</li> <li>UNG酵素（AmpErase Uracil N-Glycosylase；サーモフィッシャー）</li> <li>Assay Mix（各18μMのプライマー、2.5μMのTaqManプローブ<sup>*1</sup>）</li> <li>96穴PCRプレートおよびシール</li> <li>使い捨て手袋（パウダーフリー）</li> <li>マイクロピペット P-1000, P-200, P-100（ピペットマン、ギルソン）</li> <li>フィルターチップ（各種）</li> </ul>
*1 対象種毎にプライマーおよびプローブを設計する必要がある。	*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 <sub>m</sub> 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。	*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 <sub>m</sub> 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。	*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 <sub>m</sub> 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。	*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 <sub>m</sub> 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）	PCR1反応あたりの試薬組成（例）	PCR1反応あたりの試薬組成（例）	PCR1反応あたりの試薬組成（例）	PCR1反応あたりの試薬組成（例）
<ul style="list-style-type: none"> <li>2×Environmental Master Mix 2.0 10.0μL</li> <li>AmpErase Uracil N-Glycosylase 0.1μL</li> <li>Assay Mix 1.0μL</li> <li>DNA 2.0～5.0μL</li> <li>ミリアQ水（超純水）適量</li> <li>合計 20.0μL</li> </ul> <p>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、遮過ブランク、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。</p> <p>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<sub>m</sub>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。</p> <p>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。</p> <p>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3繰り返しを載せるので、一度に解析できるサンプル（フィールドブランク、遮過ブランクを含む）数は27（定量的場合）または30サンプル（在不在検出の場合）である。</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>2×Environmental Master Mix 2.0 10.0μL</li> <li>AmpErase Uracil N-Glycosylase（UNG酵素） 0.1μL</li> <li>Assay Mix 1.0μL</li> <li>環境DNAサンプル 2.0～5.0μL</li> <li><del>DNase/RNaseフリー水</del> ミリアQ水（超純水） 適量</li> <li>合計 2.0～5.0μL</li> </ul> <p>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、遮過ブランク、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<sup>*2</sup>。</p> <p>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<sub>m</sub>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。</p> <p><del>50</del>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。</p> <p>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3繰り返しを載せるので、<u>すべてのPCR反応を3繰り返しで行う場合</u>、一度に解析できるサンプル（フィールドブランク、遮過ブランクを含む）数は27サンプル（定量的場合）、<u>または、30サンプル</u>（在不在検出の場合）である。</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>2×Environmental Master Mix 2.0 10.0μL</li> <li>AmpErase Uracil N-Glycosylase（UNG酵素） 0.1μL</li> <li>Assay Mix 1.0μL</li> <li>環境DNAサンプル 2.0～5.0μL</li> <li>DNase/RNaseフリー水 適量</li> <li>合計 20.0μL</li> </ul> <p>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、遮過ブランク、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<sup>*2</sup>。</p> <p>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<sub>m</sub>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。</p> <p>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。</p> <p>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、遮過ブランクを含む）数は27サンプル（定量的場合）、または、30サンプル（在不在検出の場合）である。</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>2×Environmental Master Mix 2.0 10.0μL</li> <li>AmpErase Uracil N-Glycosylase（UNG酵素） 0.1μL</li> <li>Assay Mix 1.0μL</li> <li>環境DNAサンプル 2.0～5.0μL</li> <li>DNase/RNaseフリー水 適量</li> <li>合計 20.0μL</li> </ul> <p>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、遮過ブランク、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<sup>*2</sup>。</p> <p>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<sub>m</sub>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。</p> <p>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。</p> <p>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、遮過ブランクを含む）数は27サンプル（定量的場合）、または、30サンプル（在不在検出の場合）である。</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>2×Environmental Master Mix 2.0 10.0μL</li> <li>AmpErase Uracil N-Glycosylase（UNG酵素） 0.1μL</li> <li>Assay Mix 1.0μL</li> <li>環境DNAサンプル 2.0～5.0μL</li> <li>DNase/RNaseフリー水 適量</li> <li>合計 20.0μL</li> </ul> <p>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、遮過ブランク、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<sup>*2</sup>。</p> <p>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<sub>m</sub>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。</p> <p>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。</p> <p>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、遮過ブランクを含む）数は27サンプル（定量的場合）、または、30サンプル（在不在検出の場合）である。</p>

Ver. 2.2（2020年4月3日発行）	変更箇所	Ver. 3.01（2025年6月16日発行）	変更箇所	Ver. 3.1（2026年5月1日発行）
<p style="text-align: right;">ページ</p> <p>3繰り返しのうち、ひとつでもポジティブであったものを陽性と判断する（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。陽性であったサンプルの少なくとも一部はPCR増幅産物をシーケンスして確かに対象の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。</p> <p><b>PCR阻害による陰性に対する対応</b> 環境DNAサンプルには腐植酸などPCR阻害物質が含まれる事がある。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であるが、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として増幅実績のあるDNAをスパイクインする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。</p>	<p>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も<b>めサンプル</b>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<sup>※2</sup>。陽性であった<b>環境DNA</b>サンプルの少なくとも一部は、PCR増幅産物を<b>シーケンス用いたダイレクトシーケンス</b>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。</p> <p><sup>※2</sup> 定量スタンダードの合成方法として、<b>プラスミド、直鎖2本鎖DNA（IDT社のgBlocks<sup>®</sup> Gene Fragments</b>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<b>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。</b></p> <p>59 <b>PCR阻害による陰性に対する対応</b> 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<b>事</b>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<b>でであると</b>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（<b>内部標準</b>）として増幅実績のあるDNAをスパイクインする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。<b>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。</b></p> <p>図5-2-1 補足 <sup>※3</sup> 対象種によっては<b>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。</b></p>	<p style="text-align: right;">ページ</p> <p>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<sup>※2</sup>。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。</p> <p><sup>※2</sup> 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gBlocks<sup>®</sup> 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。</p> <p>65 <b>PCR阻害による陰性に対する対応</b> 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。</p> <p>66 図5-2-1 補足 <sup>※3</sup> 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。</p>	<p style="text-align: right;">ページ</p> <p>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<sup>※2</sup>。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<b>ダイレクトシーケンス</b>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<b>シーケンス</b>シーケンスを確認することが望ましい。</p> <p><sup>※2</sup> 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gBlocks<sup>®</sup> 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。</p> <p><b>PCR阻害による陰性に対する対応</b> 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。</p> <p>66 図5-2-1 補足 <sup>※3</sup> 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。</p>	<p style="text-align: right;">ページ</p> <p>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<sup>※2</sup>。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。</p> <p><sup>※2</sup> 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gBlocks<sup>®</sup> 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。</p> <p><b>PCR阻害による陰性に対する対応</b> 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。</p> <p>66 図5-2-1 補足 <sup>※3</sup> 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。</p>

Ver. 2.2 (2020年4月3日発行)	変更箇所	Ver. 3.01 (2025年6月16日発行)	変更箇所	Ver. 3.1 (2026年5月1日発行)
<p style="text-align: right;">ページ</p> <p style="text-align: center;"><b>5-2. MiFishメタバーコーディング</b></p> <p style="text-align: center;"><b>5-2-1. ライブラリーの調整—1 : 1st PCR</b></p> <p><b>実験を始める前に：コンタミのリスクを減らす方策</b></p> <p>MiFishメタバーコーディングでは、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ケンサーで分析可能な分子に加工する（ライブラリーの調整）。</p> <p>一方、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を行ったり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、MiFishメタバーコーディングでは二段階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、後者の実験室（ポストPCRルーム）には、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ト（KOACH T 500, KOKEN）等を設置する必要がある。また、あらかじめマイクロピペット、チップ、チューブ、チューブブラック、ミリQ水は殺菌灯式電気消毒器（NB-5、日販工業株式会社など）を使って除染を行い（図5-2-1-1）、実験机も泡ハイター等を使用して除染すべきである。</p> <p><b>1st PCRに必要な実験器具と試薬・消耗品（例）</b></p> <p>サーマルサイクラー（GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems など）  殺菌灯式電気消毒器（NB-5、日販工業株式会社など）  KAPA HiFi HS ReadyMix（KK2602, KAPA Biosystems社）<sup>1</sup>  MiFishプライマー 原液（TEバッファーで100μMに希釈済みのものを注文すると便利）  <b>板罫類用（サム・エイ類に最適化したプライマー）</b>  MiFish-E-F-v2（5′-3′；61 mer）：  ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNNNRGTGGTAAATCTCGTGC CAGC</p> <p>MiFish-E-R-v2（5′-3′；68 mer）：  GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTNNNNNNGCATAGTGGGGTATCTA ATCTCAGTTTG</p> <p><b>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）<sup>2</sup></b>  MiFish-U-F（5′-3′；60 mer）：  ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNNNCGGTAAAACTCGTGCC ATC</p> <p>MiFish-U-R（5′-3′；67 mer）：  GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTNNNNNNCATAGTGGGGTATCTAA TCCCCAGTTTG</p> <p><b>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）</b>  MiFish-U2-F（5′-3′；60 mer）：  ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNNNCCGGTAAAACTCGTGCC ATC</p> <p>MiFish-U2-R（5′-3′；67 mer）：  GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTNNNNNNCATAGGAGGGTGTCTAA TCCCCGTTTG</p> <p>ミリQ水（または分子生物学実験用のハイグレードな滅菌水）<sup>3</sup></p> <p>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、ギルソン社など）  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, エッペンドルフ社など）  1.5mL/2.0mLチューブ用チューブブラック  8連チューブ用チューブブラック  ゴム手袋（パウダーフリー）</p>	<p style="text-align: right;">ページ</p> <p style="text-align: center;"><b>5-2. MiFish環境DNAメタバーコーディング</b></p> <p style="text-align: center;"><b>5-2-1. ライブラリーの調整調整—1 : 1st PCR</b></p> <p><del>実験を始める前にコンタミのリスクを減らす方策</del> <b>はじめに</b></p> <p><del>環境DNAメタバーコーディング法</del>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ケンサーで分析可能な分子に加工する（ライブラリーの調整）。</p> <p>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を行ったり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、MiFishメタバーコーディングでは二段階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ト（KOACH T 500, KOKEN）等を設置する必要がある。また、あらかじめマイクロピペット、チップ、チューブ、チューブブラック、ミリQ水は殺菌灯式電気消毒器（NB-5、日販工業株式会社など）を使って除染を行い（図5-2-1-1）、実験机も泡ハイター等を使用してあらかじめ除染すべきであるし、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。</p> <p>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。</p> <p><b>1st PCRに必要な実験器具と試薬・消耗品（例）</b></p> <p>サーマルサイクラー（GeneAmp PCR System 9700、Applied Biosystems など）  <b>96ウェルプレートが仕掛けられるものがよい）</b>  <del>殺菌灯式電気消毒器（NB-5、日販工業株式会社など）</del>  KAPA HiFi HS ReadyMix（KK2602, KAPA Biosystems社）<sup>*1</sup>  MiFishプライマー 原液（TEバッファーで100μMに希釈済みのものを注文すると便利）<sup>*2, *3, *4</sup>  <b>板罫類用（サム・エイ類に最適化したプライマー）</b>  MiFish-E-F-v2（5′-3′→61 mer）：  ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNNNRGTGGTAAATCTCGTGC CAGC</p> <p>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（5′-3′→68 mer）：  GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTNNNNNNGCATAGTGGGGTATCTA ATCTCAGTTTG</p> <p>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′</p> <p><b>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）<sup>2</sup></b>  MiFish-U-F（5′-3′→60 mer）：  ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNNNCTCCGTA AAACTCGTGC CAGC</p> <p>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（5′-3′→67 mer）：  GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTNNNNNNCATAGTGGGGTATCTAA TCCCCAGTTTG</p> <p>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′</p> <p><b>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）</b>  MiFish-U2-F（5′-3′→60 mer）：  ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNNNCCGGGTA AAACTCGTGC CAGC</p> <p>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（5′-3′→67 mer）：  GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTNNNNNNCATAGGAGGGTGTCTAA TCCCCGTTTG</p> <p>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′</p> <p><b>DNase/RNaseフリー水</b> <del>ミリQ水（または分子生物学実験用のハイグレードな滅菌水）<sup>3</sup></del>  <b>滅菌水<sup>3</sup>）</b>  TEバッファー（分子生物学実験用のハイグレードなもの）  <b>キャップ一体型8連チューブ</b>  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、<del>ギルソン社</del> <b>ギルソン</b>社など）  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, <del>エッペンドルフ社</del> <b>エッペンドルフ</b>社など）  1.5mL/2.0mLチューブ用チューブブラック  8連チューブ用チューブブラック  <b>ゴム使い捨て手袋（パウダーフリー）</b></p>	<p style="text-align: right;">ページ</p> <p style="text-align: center;"><b>5-2. 環境DNAメタバーコーディング</b></p> <p style="text-align: center;"><b>5-2-1. ライブラリーの調製—1 : 1st PCR</b></p> <p><b>はじめに</b></p> <p>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ケ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）。</p> <p>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ト（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。</p> <p>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。</p> <p><b>1st PCRに必要な実験器具と試薬・消耗品（例）</b></p> <p>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）</p> <p>KAPA HiFi HS ReadyMix（KK2602, KAPA Biosystems）<sup>*1</sup>  MiFishプライマー<sup>*2, *3, *4</sup></p> <p><b>板罫類用（サム・エイ類に最適化したプライマー）</b>  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′</p> <p><b>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）<sup>2</sup></b>  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′</p> <p><b>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）</b>  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′</p> <p>DNase/RNaseフリー水（分子生物学実験用）</p> <p>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ブラック  8連チューブ用チューブブラック  使い捨て手袋（パウダーフリー）</p>	<p style="text-align: right;">ページ</p> <p style="text-align: center;"><b>5-2. 環境DNAメタバーコーディング</b></p> <p style="text-align: center;"><b>5-2-1. ライブラリーの調製—1 : 1st PCR</b></p> <p><b>はじめに</b></p> <p>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ケ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）。</p> <p>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ト（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。</p> <p>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。</p> <p><b>1st PCRに必要な実験器具と試薬・消耗品（例）</b></p> <p>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）</p> <p>KAPA HiFi HS ReadyMix（KK2602, KAPA Biosystems）<sup>*1</sup>  MiFishプライマー<sup>*2, *3, *4</sup></p> <p><b>板罫類用（サム・エイ類に最適化したプライマー）</b>  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′</p> <p><b>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）<sup>2</sup></b>  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′</p> <p><b>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）</b>  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′</p> <p>DNase/RNaseフリー水（分子生物学実験用）</p> <p>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ブラック  8連チューブ用チューブブラック  使い捨て手袋（パウダーフリー）</p>	<p style="text-align: right;">ページ</p> <p style="text-align: center;"><b>5-2. 環境DNAメタバーコーディング</b></p> <p style="text-align: center;"><b>5-2-1. ライブラリーの調製—1 : 1st PCR</b></p> <p><b>はじめに</b></p> <p>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ケ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）。</p> <p>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ト（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。</p> <p>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。</p> <p><b>1st PCRに必要な実験器具と試薬・消耗品（例）</b></p> <p>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）</p> <p>KAPA HiFi HS ReadyMix（KK2602, KAPA Biosystems）<sup>*1</sup>  MiFishプライマー<sup>*2, *3, *4</sup></p> <p><b>板罫類用（サム・エイ類に最適化したプライマー）</b>  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′</p> <p><b>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）<sup>2</sup></b>  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′</p> <p><b>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）</b>  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′</p> <p>DNase/RNaseフリー水（分子生物学実験用）</p> <p>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ブラック  8連チューブ用チューブブラック  使い捨て手袋（パウダーフリー）</p>

Ver. 2.2 (2020年4月3日発行)	変更箇所	Ver. 3.01 (2025年6月16日発行)	変更箇所	Ver. 3.1 (2026年5月1日発行)
<p style="text-align: right;">ページ</p> <p><sup>1</sup> 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）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。プロトコールについては、メーカーが提供するものをそのまま利用している。PCR阻害物質の影響で増幅がうまくいかない場合には、サンプルを希釈するとうまく増幅する場合もあるが、その場合には1stPCR時のPCRサイクル数を増やすことも検討すると良い。ただし、40サイクル以下とすること（5-2-1-1.参照）。</p> <p><sup>2</sup> アユ、ワカサギ、スナヤツメなど魚種によって、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である。</p> <p><sup>3</sup> 実験室共用でミリQ水を使っているとコンタミの原因となりやすい。ミリQ水を使う場合は殺菌灯で実験のたびに除染するか、そうでない場合は分子生物学実験用の滅菌水を購入した方がよい。</p> <p><b>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）</b>  微量高速冷却遠心機（MX-307, TOMYなど）</p> <p>ホルテックス・ミキサー（VORTEX-GENIE 2, エムエス機器など）  8連チューブ用卓上遠心機（マイクロPCRスピナー MS-PCR, アズワンなど）  1.5mL/2.0mL用卓上遠心機（マイクロシックス MS-1, アズワンなど）  GeneRead Size Selection Kit（180514, キアゲン）<sup>1</sup>  2.0mLコロケーションチューブ（19201, キアゲン；キットの不足分を補うために別途購入）  1.5mLチューブ（DNA低吸着）</p> <p>80%エタノール（適量）</p> <p>マイクロピペットP-1000, P-200, P-100, P-20, P-2（ピペットマン, ギルソン社など）</p> <p>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）</p> <p>ゴム手袋（パウダーフリー）</p> <p><sup>1</sup> DNA精製試薬キットAgencourt AMPure XPやSPRIselect（両者共にベックマン・コールター社）等のビーズで精製しても良好な結果が得られている。この場合、それぞれの試薬はPCR産物と等量もちいて、プロトコールはメーカーが提供するものをそのまま利用している。</p>	<p><sup>2,1</sup> 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には、サンプルを希釈するとうまく増幅する場合もあるが、その場合には1stPCR時のPCRサイクル数を増やすことも検討すると良い。ただし、40サイクル以下とすること（5-2-1-1.参照）。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。</p> <p><sup>2,2</sup> 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。</p> <p><sup>2,3</sup> 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であるになる。</p> <p><sup>3</sup> 実験室共用でミリQ水を使っているとコンタミの原因となりやすい。ミリQ水を使う場合は殺菌灯で実験のたびに除染するか、そうでない場合は分子生物学実験用の滅菌水を購入した方がよい。</p> <p><sup>4</sup> ここでは先行して研究が進んでいる魚種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。</p> <p><b>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）</b>  微量高速冷却卓上小型遠心機（MX-307, TOMYなどForce Mini SBC-140, LabNet）</p> <p>ホルテックス・ミキサー（VORTEX-GENIE 2, エムエス機器など）  8連チューブ用卓上プレート遠心機（マイタロPCRスピナー MS-PCR-PC-2R, アズワンなど）  1.5mL/2.0mL用卓上遠心機（マイタロシックスMS-1, アズワンなど）  GeneRead Size Selection Kit（180514, キアゲン）<sup>1</sup>  2.0mLコロケーションチューブ（19201, キアゲン；キットの不足分を補うために別途購入）  1.5mLチューブ（DNA低吸着）  96ウェルプレート（DNA低吸着）  SPRIselect<sup>2,1</sup>（ベックマン・コールター）  ・ Buffer EB（キアゲン）  85%エタノール（適量）  96ウェルプレート用マグネットプレート<sup>2,2</sup>（DynaMag-96 Side, サーモフィッシャー）  96ウェルプレート用遠心機（スピンドアウ用）  マイクロピペット P-1000, P-200, P-100, P-20, P-2（ピペットマン, ギルソン社などギルソン）  8連マイクロピペット P-200, P-10</p> <p>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）  ゴム使い捨て手袋（パウダーフリー）</p> <p><sup>1</sup> DNA精製試薬キットAgencourt AMPure XPやSPRIselect（両者共にベックマン・コールター社）等のビーズで精製しても良好な結果が得られている。この場合、それぞれの試薬はPCR産物と等量もちいて、プロトコールはメーカーが提供するものをそのまま利用している。</p> <p><sup>2,1</sup> PCR産物精製用スピнка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つた場合、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もある。また、厳密なサイズ分画可能なスピнка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つの製品を使用すべきである。</p> <p><sup>2,2</sup> 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、ビーズをウエ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良い。</p>	<p style="text-align: right;">ページ</p> <p><sup>2,1</sup> 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。</p> <p><sup>2,2</sup> 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。</p> <p><sup>2,3</sup> 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。</p> <p><sup>4</sup> ここでは先行して研究が進んでいる魚種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。</p> <p><b>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）</b>  卓上小型遠心機（Force Mini SBC-140, LabNet）</p> <p>プレート遠心機（PC-2R, アズワン）</p> <p>1.5mLチューブ（DNA低吸着）  96ウェルプレート（DNA低吸着）  SPRIselect<sup>2,1</sup>（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<sup>2,2</sup>（DynaMag-96 Side, サーモフィッシャー）  96ウェルプレート用遠心機（スピンドアウ用）  マイクロピペット P-1000, P-200, P-100（ピペットマン, ギルソン）</p> <p>8連マイクロピペット P-200, P-10</p> <p>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）</p> <p><sup>2,1</sup> PCR産物精製用スピнка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つた場合、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もある。また、厳密なサイズ分画可能なスピнка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つの製品を使用すべきである。</p> <p><sup>2,2</sup> 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、ビーズをウエ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良い。</p>	<p><b>1st PCR産物の精製と濃縮（磁性ビーズ法）に必要な実験器具と試薬・消耗品（例）</b>  プレート遠心機（PC-2R, アズワン）</p> <p>SPRIselect<sup>2,1</sup>（ベックマン・コールター）</p> <p>96ウェルプレート用マグネットプレート<sup>2,1</sup>（DynaMag-96 Side, サーモフィッシャー）</p> <p>96ウェルプレート用マグネットプレート<sup>2,1</sup>（DynaMag-96 Side, サーモフィッシャー）  96ウェルプレート用遠心機（スピンドアウ用）  マイクロピペット P-1000, P-200, P-100（ピペットマン, ギルソン）</p> <p>8連マイクロピペット P-200, P-10</p> <p>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）</p> <p><sup>2,1</sup> PCR産物精製用スピнка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つた場合、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もある。また、厳密なサイズ分画可能なスピнка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つの製品を使用すべきである。</p> <p><sup>2,1</sup> 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、ビーズをウエ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良い。</p> <p><b>1st PCR産物の精製と濃縮（スピнкаラム法）に必要な実験器具と試薬・消耗品（例）</b>  ・ FastqGene Gel / PCR Extraction Kit 100prep/300prep（日本ジェネティクス, FG-91202/FG-91302）  ・ 100%エタノール  ・ 卓上小型遠心機（Force Mini SBC-140, LabNet）  ・ 微量高速冷却遠心機（スピнкаラムを搭載した1.5mLチューブが回せるもの）</p>	<p style="text-align: right;">ページ</p> <p><sup>2,1</sup> 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。</p> <p><sup>2,2</sup> 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。</p> <p><sup>2,3</sup> 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。</p> <p><sup>4</sup> ここでは先行して研究が進んでいる魚種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。</p> <p><b>1st PCR産物の精製と濃縮(磁気ビーズ法)に必要な実験器具と試薬・消耗品（例）</b>  卓上小型遠心機（Force Mini SBC-140, LabNet）</p> <p>1.5mLチューブ（DNA低吸着）  96ウェルプレート（DNA低吸着）  SPRIselect<sup>2,1</sup>（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<sup>2,1</sup>（DynaMag-96 Side, サーモフィッシャー）  96ウェルプレート用遠心機（スピンドアウ用）  マイクロピペット P-1000, P-200, P-100（ピペットマン, ギルソン）</p> <p>8連マイクロピペット P-200, P-10</p> <p>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）</p> <p><sup>2,1</sup> PCR産物精製用スピнка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つた場合、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もある。また、厳密なサイズ分画可能なスピнка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つの製品を使用すべきである。</p> <p><sup>2,1</sup> 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、ビーズをウエ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良い。</p> <p><b>1st PCR産物の精製と濃縮（スピнкаラム法）に必要な実験器具と試薬・消耗品（例）</b>  ・ FastqGene Gel / PCR Extraction Kit 100prep/300prep（日本ジェネティクス, FG-91202/FG-91302）  ・ 100%エタノール  ・ 卓上小型遠心機（Force Mini SBC-140, LabNet）  ・ 微量高速冷却遠心機（スピнкаラムを搭載した1.5mLチューブが回せるもの）</p>

Ver. 2.2 (2020年4月3日発行)	変更箇所	Ver. 3.01 (2025年6月16日発行)	変更箇所	Ver. 3.1 (2026年5月1日発行)																														
<p style="text-align: right;">ページ</p> <p><b>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)</b>  TapeStation 2200 (アジレント・テクノロジー) <sup>1</sup>  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)  TapeStation用ピペットチップ (5067-5153, アジレント・テクノロジー)</p> <p>卓上攪拌器 (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, アズワンなど)  1.5mL/2.0mL用卓上遠心機 (マイクロシックス MS-1, アズワンなど)  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-2 (ピベットマン, ギルソンなど)  フィルターチップ 10μL  8連チューブ  8連チューブブラック  ゴム手袋 (パウダーフリー)  ミリQ水 (超純水)</p> <p><sup>1</sup> 同社が販売するBioAnalyzerでも良好な結果が得られている。この場合、プロトコルはメーカーが提供するものをそのまま利用している。</p> <p><b>5-2-1-1. 1st PCR</b>  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。なお、実験中は必ずゴム手袋を着用すること (これ以降作業中に手袋の汚染を感じた場合は速やかに交換する)。</p> <p>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)</p> <p>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)。</p> <table border="1" data-bbox="124 1304 599 1381"> <tr><td>KAPA HiFi HS ReadyMix</td><td>6.0μL</td></tr> <tr><td>プライマーミックス</td><td>2.8μL</td></tr> <tr><td>ミリQ水</td><td>1.2μL</td></tr> </table> <p>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8連チューブ1本をつかった繰り返し数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、1st PCRに必ず1本以上のブランクを入れること (繰り返し数は1回で抽出DNAの代わりにミリQ水をテンプレートとして入れる)。濾過ブランクと抽出ブランクも同時に実験する場合でも、1st PCRの段階で必ずPCRブランクは含める (図5-2-1-1-1)。</p> <p>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。サーマルサイクラーの設定は以下のようになる：</p> <p>最初に95℃のDNA変性を3分間を挿入</p> <p>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  最後に72℃の伸長反応を5分間を挿入</p>	KAPA HiFi HS ReadyMix	6.0μL	プライマーミックス	2.8μL	ミリQ水	1.2μL	<p><b>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)</b>  TapeStation <del>2200</del>4150 (アジレント・テクノロジー) <sup>*</sup>  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 <del>用ピペットチップ Loading Tips</del> (5067-5153)5598, アジレント・テクノロジー)  卓上攪拌器 (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, アズワンなど)  1.5mL/2.0mL用卓上遠心機 (マイクロシックス MS-1, アズワンなど)  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 (ピベットマン, ギルソンなど)  フィルターチップ 10μL (<u>ピベットマンに適合したものを</u>)  8連チューブ  8連チューブブラック  <del>ゴム使い捨て手袋 (パウダーフリー)</del>  <del>DNase/RNaseフリー水 ミリQ水 (超純水)</del></p> <p><sup>*</sup> 同社が販売するBioAnalyzerでも良好な結果が得られている。この場合、プロトコルはメーカーが提供するものをそのまま利用している。</p> <p><b>5-2-1-1. 1st PCR</b>  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。 <del>なお、実験中は必ずゴム手袋を着用すること (これ以降作業中に手袋の汚染を感じた場合は速やかに交換する)。</del>  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。</p> <p>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)</p> <p>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)。<u>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。</u></p> <table border="1" data-bbox="667 1304 1136 1381"> <tr><td>KAPA HiFi HS ReadyMix</td><td>6.0μL</td></tr> <tr><td>プライマーミックス</td><td>2.8μL</td></tr> <tr><td><del>ミリQ水</del>DNase/RNaseフリー水</td><td>1.2μL</td></tr> </table> <p>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<del>複数回繰り返しPCRを行うのがよい</del>。例えば、8連チューブ1本を<del>つかった使い</del>、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、<del>濾過ブランク、抽出ブランクとは別に</del>、1st PCRに<del>必ず1本以上のブランクを入れること (繰り返し数は1回で抽出DNAの代わりにミリQ水をテンプレートとして入れる)。</del><del>濾過ブランクと抽出ブランクも同時に実験する場合でも、1st PCRの段階で必ずPCRブランクは含めるブランク) 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)。</del></p> <p>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。サーマルサイクラーの設定は以下のようになる：</p> <p><del>最初に</del>95℃のDNA変性を3分間を挿入 (<u>初期変性とHotStart酵素の活性化</u>)</p> <p>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  <del>最後に</del>72℃の伸長反応を5分間 (<u>最終伸長</u>)  4℃</p>	KAPA HiFi HS ReadyMix	6.0μL	プライマーミックス	2.8μL	<del>ミリQ水</del> DNase/RNaseフリー水	1.2μL	<p style="text-align: right;">ページ</p> <p><b>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)</b>  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)  卓上攪拌器 (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 (ピベットマン, ギルソン)  フィルターチップ 10μL (ピベットマンに適合したものを)  8連チューブ  8連チューブブラック  使い捨て手袋 (パウダーフリー)  DNase/RNaseフリー水</p> <p><b>5-2-1-1. 1st PCR</b>  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。</p> <p>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。</p> <p>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)</p> <p>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)。<u>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。</u></p> <table border="1" data-bbox="1136 1304 1682 1381"> <tr><td>KAPA HiFi HS ReadyMix</td><td>6.0μL</td></tr> <tr><td>プライマーミックス</td><td>2.8μL</td></tr> <tr><td>DNase/RNaseフリー水</td><td>1.2μL</td></tr> </table> <p>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)。</p> <p>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。サーマルサイクラーの設定は以下のようになる：</p> <p>95℃のDNA変性を3分間 (初期変性とHotStart酵素の活性化)</p> <p>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℃</p> <p>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。</p>	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	<p><u>・ボルテックスミキサー</u>  <u>・1.5mLチューブ (DNA低吸着)</u>  <u>・コレクションチューブ2mL (キアゲン、19201)</u>  <u>・マイクロピペット P-1000、P-200、P-20 (ピベットマン, ギルソン)</u>  <u>・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)</u>  <u>・使い捨て手袋 (パウダーフリー)</u></p> <p><b>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)</b>  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)  卓上攪拌器 (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 (ピベットマン, ギルソン)  フィルターチップ 10μL (ピベットマンに適合したものを)  8連チューブ  8連チューブブラック  使い捨て手袋 (パウダーフリー)  DNase/RNaseフリー水</p> <p><b>5-2-1-1. 1st PCR</b>  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。</p> <p>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。</p> <p>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)</p> <p>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)。<u>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。</u></p> <table border="1" data-bbox="1754 1304 2169 1381"> <tr><td>KAPA HiFi HS ReadyMix</td><td>6.0μL</td></tr> <tr><td>プライマーミックス</td><td>2.8μL</td></tr> <tr><td>DNase/RNaseフリー水</td><td>1.2μL</td></tr> </table> <p>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、<u>分析サンプルの反応系と同じ試薬の組成とし</u>、抽出DNAの代わりにDNase/RNaseフリー水をテンプレートとする。<u>また、反復数は、分析サンプルの反復数に合わせる</u>ことが推奨される (図5-2-1-1-1)。</p> <p>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。サーマルサイクラーの設定は以下のようになる：</p> <p>95℃のDNA変性を3分間 (初期変性とHotStart酵素の活性化)</p> <p>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℃</p> <p>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。</p>	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	<p style="text-align: right;">ページ</p> <p><b>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)</b>  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)  卓上攪拌器 (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 (ピベットマン, ギルソン)  フィルターチップ 10μL (ピベットマンに適合したものを)  8連チューブ  8連チューブブラック  使い捨て手袋 (パウダーフリー)  DNase/RNaseフリー水</p> <p><b>5-2-1-1. 1st PCR</b>  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。</p> <p>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。</p> <p>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)</p> <p>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)。<u>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。</u></p> <table border="1" data-bbox="2226 1304 2772 1381"> <tr><td>KAPA HiFi HS ReadyMix</td><td>6.0μL</td></tr> <tr><td>プライマーミックス</td><td>2.8μL</td></tr> <tr><td>DNase/RNaseフリー水</td><td>1.2μL</td></tr> </table> <p>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、分析サンプルの反応系と同じ試薬の組成とし、抽出DNAの代わりにDNase/RNaseフリー水をテンプレートとする。また、反復数は、分析サンプルの反復数に合わせる</p> <p>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。サーマルサイクラーの設定は以下のようになる：</p> <p>95℃のDNA変性を3分間 (初期変性とHotStart酵素の活性化)</p> <p>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℃</p> <p>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。</p>	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
KAPA HiFi HS ReadyMix	6.0μL																																	
プライマーミックス	2.8μL																																	
ミリQ水	1.2μL																																	
KAPA HiFi HS ReadyMix	6.0μL																																	
プライマーミックス	2.8μL																																	
<del>ミリQ水</del> DNase/RNaseフリー水	1.2μL																																	
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																																	
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																																	
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																																	

Ver. 2.2 (2020年4月3日発行)	変更箇所	Ver. 3.01 (2025年6月16日発行)	変更箇所	Ver. 3.1 (2026年5月1日発行)
<p style="text-align: right;">ページ</p> <p><b>注意</b>：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、今後さらなる検討が必要である。</p> <p>7) 1st PCRのサイクル数について：冬期のような魚の活性が低いときは35サイクルだと十分な増幅が見られないことがあるため調整が必要となる。そのような時は、40回以下の範囲でサイクル数を増やすことでDNAの回収量を確保する。例えば房総半島沿岸では、冬期以外の暖かい時期では35サイクルで十分量の1st PCR産物（海水1Lを濾過）が得られたが、水温が下がると同じ量の1st PCR産物を得るためには38サイクルが必要となった。また、PCR産物が確認できないからといってサイクル数を40回より多くすると、ブランクにも明瞭なPCR産物ができてしまうなど誤検出の原因となる。このようにサイクル数によってデータの質が変わりうるので、慎重に検討する必要がある。</p> <p><b>5-2-1-2. 1st PCR産物の精製と濃縮</b> 本項ではスピンカラム（GeneRead Size Selection Kit；以下「カラム」と記す；図5-2-1-2-1）を用いた精製・濃縮法について記す。環境DNAメタバーコーディングでは、事前に濃度が不明な微量のDNAを分析可能な量まで増幅させるため、それ以降の実験を阻害するプライマーダイマーやアダプターダイマーが残りやすい。これらを取り除くことが良質のライブラリーを作成するための必須条件となるため、以下のプロトコールでは同じ精製を2回繰り返している。1回の精製でも十分な場合もあるが、精製を2回繰り返すことにより、ゲル上で検出できないレベルまでダイマー類を除去することができる。</p> <p>1) 8繰り返しした1st PCR産物を1本の1.5mLチューブにまとめる（図5-2-1-2-2）。8連チューブ1本あたりの反応系が12.0μLなので、すべて合わせると96.0μLになる。ブランクについては1繰り返しのため12.0μLのまま。</p> <p>2) 各1.5mLチューブに4倍量のSB1溶液（384μL；ブランクのSB1溶液量は48μL）を入れ（図5-2-1-2-3）、よく攪拌してから軽く遠心する。室温で1分間静置。</p> <p>3) GeneRead Size Selection Kitに付属する専用のカラム（コレクションチューブ付き）を必要分用意し、キャップに必要事項を記入する（図5-2-1-2-4）。</p> <p>4) コレクションチューブにセットされたカラムにSB1を混合したPCR産物を入れ（図5-2-1-2-5）、20,000gで1分間遠心する（図5-2-1-2-6）。</p> <p>5) 遠心後、コレクションチューブを外し、新しいコレクションチューブにカラムを載せ替える（図5-2-1-2-7）。使用済みのコレクションチューブは廃棄する（図5-2-1-2-8）。</p> <p>6) カラムに700μLの80%エタノールを添加し（図5-2-1-2-9）20,000gで1分間遠心する（図5-2-1-2-10）。終了後、カラムを新しいコレクションチューブに載せ替える。使用済みのコレクションチューブは廃棄する。この操作（80%エタノールによる精製）を2回繰り返す。</p> <p>7) GeneRead Size Selection Kitに付属する1.5mLのチューブを用意し、キャップに必要事項を記入する。カラムをその1.5mLチューブに載せ替える（図5-2-1-2-11）。</p> <p>8) キットに付属のTEバッファ90μLをカラムに注ぎ（図5-2-1-2-12）、室温で1分間静置する。</p> <p>9) カラムを1分間静置した後、20,000gで1分間遠心する。</p> <p>10) 1.5mLのチューブに回収された産物90μLに対して2回目の精製を行う。TEバッファで溶出した抽出DNA（90μL）の4倍量のSB1溶液（360μL）を1.5mLチューブに入れ（図5-2-1-2-13）、よく攪拌してから軽く遠心する。室温で1分間静置する。</p> <p>11) カラムを新たなコレクションチューブに載せ、4倍量のSB1溶液を加えた1回目の精製済み産物をカラムに注ぐ（図5-2-1-2-14）。20,000gで1分間遠心する。</p> <p>12) 遠心後、コレクションチューブを外し、新しいコレクションチューブにカラムを載せ替える。使用済みのコレクションチューブは廃棄する。</p> <p>13) カラムに700μLの80%エタノールを加えて20,000gで1分間遠心する。終了後、カラムを新しいコレクションチューブに載せ替える。使用済みのコレクションチューブは廃棄する。この操作（80%エタノールによる精製）を2回繰り返す。</p> <p>14) DNA低吸着の1.5mLチューブを用意し、必要事項をキャップに記入する。キャップを開けたままその上にカラムを装着する。</p> <p>15) キットに付属するEBバッファ17μLを、カラムのメンブレンの中心に注意深くピペットで注ぎ入れ（図5-2-1-2-15）、室温で1分間静置。</p> <p>16) 1分間静置したカラムを20,000gで1分間遠心。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5-2-1-2-16）。カラムは廃棄する。この状態で-20℃で安定的に保存が可能（図5-2-1-2-17）。</p>	<p><b>注意1</b>：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、<u>今後さらなる検討が必要である各自の目的に応じて最適化する。</u></p> <p>7) 1st PCRの<b>注意2</b>：サイクル数について+、冬期のような魚の活性が低いときは35サイクルだと十分な増幅が見られないことがあるため調整が必要となる。そのような時は、40回以下の範囲でサイクル数を増やすことでDNAの回収量を確保する。例えば房総半島沿岸では、冬期以外の暖かい時期では35サイクルで十分量の1st PCR産物（海水1Lを濾過）が得られたが、水温が下がると同じ量の1st PCR産物を得るためには38サイクルが必要となった。また、PCR産物が確認できないからといってサイクル数を40回より多くすると、ブランクにも明瞭なPCR産物ができてしまうなど誤検出の原因となる。このようにサイクル数によってデータの質が変わりうるので、慎重に検討する必要がある。</p> <p>65) <b>5-2-1-2. 1st PCR産物の精製と濃縮</b> 本項ではスピンカラム（GeneRead Size Selection Kit）以下「カラム」と記す；図5-2-1-2-1）を用いた精製・濃縮法について記す。環境DNAメタバーコーディングでは、事前に濃度が不明な微量のDNAを分析可能な量まで増幅させるため、それ以降の実験を阻害するプライマーダイマーやアダプターダイマーが残りやすい。これらを取り除くことが良質のライブラリーを作成するための必須条件となるため、以下のプロトコールでは同じ精製を2回繰り返している。1回の精製でも十分な場合もあるが、精製を2回繰り返すことにより、ゲル上で検出できないレベルまでダイマー類を除去することができる。</p> <p>本稿では、<u>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。</u> <u>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。</u></p> <p>1) 8繰り返しした1st PCR産物を1本の1.5mLチューブにまとめる（図5-2-1-2-2）。8連チューブ1本あたりの反応系が12.0μLなので、すべて合わせると96.0μLになる。ブランクについては1繰り返しのため12.0μLのまま。</p> <p>2) 各1.5mLチューブに4倍量のSB1溶液（384μL；ブランクのSB1溶液量は48μL）を入れ（図5-2-1-2-3）、よく攪拌してから軽く遠心する。室温で1分間静置。</p> <p>3) GeneRead Size Selection Kitに付属する専用のカラム（コレクションチューブ付き）を必要分用意し、キャップに必要事項を記入する（図5-2-1-2-4）。</p> <p>4) コレクションチューブにセットされたカラムにSB1を混合したPCR産物を入れ（図5-2-1-2-5）、20,000gで1分間遠心する（図5-2-1-2-6）。</p> <p>5) 遠心後、コレクションチューブを外し、新しいコレクションチューブにカラムを載せ替える（図5-2-1-2-7）。使用済みのコレクションチューブは廃棄する（図5-2-1-2-8）。</p> <p>6) カラムに700μLの80%エタノールを添加し（図5-2-1-2-9）20,000gで1分間遠心する（図5-2-1-2-10）。終了後、カラムを新しいコレクションチューブに載せ替える。使用済みのコレクションチューブは廃棄する。この操作（80%エタノールによる精製）を2回繰り返す。</p> <p>7) GeneRead Size Selection Kitに付属する1.5mLのチューブを用意し、キャップに必要事項を記入する。カラムをその1.5mLチューブに載せ替える（図5-2-1-2-11）。</p> <p>8) キットに付属のTEバッファ90μLをカラムに注ぎ（図5-2-1-2-12）、室温で1分間静置する。</p> <p>9) カラムを1分間静置した後、20,000gで1分間遠心する。</p> <p>10) 1.5mLのチューブに回収された産物90μLに対して2回目の精製を行う。TEバッファで溶出した抽出DNA（90μL）の4倍量のSB1溶液（360μL）を1.5mLチューブに入れ（図5-2-1-2-13）、よく攪拌してから軽く遠心する。室温で1分間静置する。</p> <p>11) カラムを新たなコレクションチューブに載せ、4倍量のSB1溶液を加えた1回目の精製済み産物をカラムに注ぐ（図5-2-1-2-14）。20,000gで1分間遠心する。</p> <p>12) 遠心後、コレクションチューブを外し、新しいコレクションチューブにカラムを載せ替える。使用済みのコレクションチューブは廃棄する。</p> <p>13) カラムに700μLの80%エタノールを加えて20,000gで1分間遠心する。終了後、カラムを新しいコレクションチューブに載せ替える。使用済みのコレクションチューブは廃棄する。この操作（80%エタノールによる精製）を2回繰り返す。</p> <p>14) DNA低吸着の1.5mLチューブを用意し、必要事項をキャップに記入する。キャップを開けたままその上にカラムを装着する。</p> <p>15) キットに付属するEBバッファ17μLを、カラムのメンブレンの中心に注意深くピペットで注ぎ入れ（図5-2-1-2-15）、室温で1分間静置。</p> <p>16) 1分間静置したカラムを20,000gで1分間遠心。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5-2-1-2-16）。カラムは廃棄する。この状態で-20℃で安定的に保存が可能（図5-2-1-2-17）。</p> <p>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。</p>	<p style="text-align: right;">ページ</p> <p><b>注意1</b>：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。</p> <p><b>注意2</b>：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。</p> <p>72) <b>5-2-1-2. 1st PCR産物の精製と濃縮</b> 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。</p> <p>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。</p>	<p style="text-align: right;">ページ</p> <p><b>注意1</b>：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。</p> <p><b>注意2</b>：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。</p> <p>73) <b>5-2-1-2. 1st PCR産物の精製と濃縮（磁性ビーズ法）</b> 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。</p> <p>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。</p>	

Ver. 2.2 (2020年4月3日発行)	変更箇所	Ver. 3.01 (2025年6月16日発行)	変更箇所	Ver. 3.1 (2026年5月1日発行)
<p style="text-align: right;">ページ</p> <p>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。</p> <p>3) PCR産物溶液に対し、等量のSPRIselectを添加し、ピペティングを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。</p> <p>4) 96ウェルプレートを用いた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)。</p> <p>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)。</p> <p>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。</p> <p>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)。</p> <p>8) プレートスピンドア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回収(図5-2-1-2-7)。</p> <p>9) プレートを取り外し、Buffer EBを25μL添加してピペティングを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)。</p> <p>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)。</p> <p>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。</p> <p><b>5-2-1-3. 精製・濃縮済み1st PCR産物の定量と希釈</b></p> <p>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 2200を用いたプロトコルを記す。ちなみに、TapeStation以外にも同社のBioAnalyzer、あるいは他社の同等の機器でも同様の分析が可能である。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。</p> <p>1) 30分前に試薬を室温に戻しておく(図5-2-1-3-1)。</p> <p>2) TapeStation 2200付属のコンピューターを起動する。起動完了後にTapeStation 2200の本体の電源を入れる(図5-2-1-3-2)。</p> <p>3) TapeStationとコンピューターの接続が確認できたら、TapeStation 2200コントローラーを起動し、ScreenTapeと必要な数のチップをセットする(図5-2-1-3-3)。</p> <p>4) 8連チューブを用意し、DNAラダー(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)。</p> <p>5) 分注した2μLのバッファーに、ラダー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。</p>	<p>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。</p> <p>3) PCR産物溶液に対し、等量のSPRIselectを添加し、ピペティングを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。</p> <p>4) 96ウェルプレートを用いた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)。</p> <p>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)。</p> <p>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。</p> <p>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)。</p> <p>8) プレートスピンドア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回収(図5-2-1-2-7)。</p> <p>9) プレートを取り外し、Buffer EBを25μL添加してピペティングを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)。</p> <p>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)。</p> <p>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。</p> <p><b>5-2-1-3. 精製・濃縮済み1st PCR産物の定量と希釈</b></p> <p>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 2200/4150を用いたプロトコルを記す。ちなみに、TapeStation以外にも同社のBioAnalyzer、あるいは他社の同等の機器でも同様の分析が可能である。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。</p> <p>常に使い捨て手袋を着用する。</p> <p>1) 30分前に試薬を室温に戻しておく(図5-2-1-3-1)。</p> <p>2) TapeStation 2200/4150付属のコンピューターを起動する。起動完了後にTapeStation 2200/4150の本体の電源を入れる(図5-2-1-3-2)。</p> <p>3) TapeStationとコンピューターの接続が確認できたら、TapeStation 2200/4150コントローラーを起動し、High Sensitivity D1000 ScreenTapeと必要な数のチップ4150/4200 TapeStation Loading Tipsをセットする(図5-2-1-3-3)。</p> <p>4) 8連チューブを用意し、DNAラダー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)。</p> <p>5) 分注した2μLのバッファーに、ラダー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。</p>	<p style="text-align: right;">ページ</p> <p>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。</p> <p>3) PCR産物溶液に対し、等量のSPRIselectを添加し、ピペティングを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。</p> <p>4) 96ウェルプレートを用いた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)。</p> <p>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)。</p> <p>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。</p> <p>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)。</p> <p>8) プレートスピンドア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回収(図5-2-1-2-7)。</p> <p>9) プレートを取り外し、Buffer EBを25μL添加してピペティングを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)。</p> <p>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)。</p> <p>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。</p> <p><b>5-2-1-3. 1st PCR産物の精製と濃縮(スピнкаラム法)</b></p> <p>本稿では、スピнкаラムを用いた1st PCR産物の精製・濃縮の例について記す。磁性ビーズ精製の代わりにこちらの手法を用いることもできる。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。</p> <p>使用するキット(FastGene Gel/PCR Extraction Kit)に付属の洗浄バッファーGP2には、あらかじめ規定量のエタノールを加えよく攪拌しておく。また、室温保存のスピнкаラムをサンプルの数だけ用意し、付属のコレクションチューブにセットしておく。</p> <p>1) サンプルと同じ数の1.5mLチューブに、あらかじめ1st PCR産物の5倍量の結合バッファーGP1を分取しておく。12μLの反応液 x 8繰り返しの場合、反応液は96μLなので、GP1を480μLずつ分取する。</p> <p>2) 繰り返し反応した1st PCR産物をそれぞれ、1)で用意した1.5mLチューブ1本に集め、ボルテックスミキサーで攪拌、スピンドアウンする(図5-2-1-2-10)。</p> <p>3) 2)の溶液をサンプル毎に1つずつスピнкаラムに乗せ、カラムの蓋を開める(図5-2-1-2-11)。</p> <p>4) 13,000rpmで30秒遠心する。</p> <p>5) カラムを新しいコレクションチューブ(キアゲン)に移す。廃液はコレクションチューブと共に廃棄する(図5-2-1-2-12)。</p> <p>6) 各カラムに、エタノールを加えて調製した洗浄バッファーGP2を600μLずつ加える。チップは都度新しいものに交換する。</p> <p>7) カラムの蓋を開め、13,000rpmで30秒遠心する。</p> <p>8) カラムを新しいコレクションチューブ(キアゲン)に移す。廃液はコレクションチューブと共に廃棄する。</p> <p>9) 13,000rpmで2分遠心し、残留したGP2をよく取り除く。取り除いた残渣はコレクションチューブと共に廃棄する。</p> <p>10) カラムを新しい1.5mLチューブに移し、溶出バッファーGP3を20μLずつメンブレンの中央に乗せる。チップは都度新しいものに交換する(図5-2-1-2-13)。</p> <p>11) 室温に2分放置する。</p> <p>12) 13,000rpmで2分遠心してチューブにDNAを回収する(図5-2-1-2-14)。この状態で-20℃で安定的に保存が可能である。</p> <p><b>5-2-1-3.4. 精製・濃縮済み1st PCR産物の定量と希釈</b></p> <p>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。</p> <p>常に使い捨て手袋を着用する。</p> <p>1) 30分前に試薬を室温に戻しておく(図5-2-1-3-1)。</p> <p>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)。</p> <p>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)。</p> <p>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)。</p> <p>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。</p>	<p style="text-align: right;">ページ</p> <p>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。</p> <p>3) PCR産物溶液に対し、等量のSPRIselectを添加し、ピペティングを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。</p> <p>4) 96ウェルプレートを用いた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)。</p> <p>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)。</p> <p>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。</p> <p>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)。</p> <p>8) プレートスピンドア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回収(図5-2-1-2-7)。</p> <p>9) プレートを取り外し、Buffer EBを25μL添加してピペティングを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)。</p> <p>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)。</p> <p>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。</p> <p><b>5-2-1-3. 1st PCR産物の精製と濃縮(スピнкаラム法)</b></p> <p>本稿では、スピнкаラムを用いた1st PCR産物の精製・濃縮の例について記す。磁性ビーズ精製の代わりにこちらの手法を用いることもできる。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。</p> <p>使用するキット(FastGene Gel/PCR Extraction Kit)に付属の洗浄バッファーGP2には、あらかじめ規定量のエタノールを加えよく攪拌しておく。また、室温保存のスピнкаラムをサンプルの数だけ用意し、付属のコレクションチューブにセットしておく。</p> <p>1) サンプルと同じ数の1.5mLチューブに、あらかじめ1st PCR産物の5倍量の結合バッファーGP1を分取しておく。12μLの反応液 x 8繰り返しの場合、反応液は96μLなので、GP1を480μLずつ分取する。</p> <p>2) 繰り返し反応した1st PCR産物をそれぞれ、1)で用意した1.5mLチューブ1本に集め、ボルテックスミキサーで攪拌、スピンドアウンする(図5-2-1-2-10)。</p> <p>3) 2)の溶液をサンプル毎に1つずつスピнкаラムに乗せ、カラムの蓋を開める(図5-2-1-2-11)。</p> <p>4) 13,000rpmで30秒遠心する。</p> <p>5) カラムを新しいコレクションチューブ(キアゲン)に移す。廃液はコレクションチューブと共に廃棄する(図5-2-1-2-12)。</p> <p>6) 各カラムに、エタノールを加えて調製した洗浄バッファーGP2を600μLずつ加える。チップは都度新しいものに交換する。</p> <p>7) カラムの蓋を開め、13,000rpmで30秒遠心する。</p> <p>8) カラムを新しいコレクションチューブ(キアゲン)に移す。廃液はコレクションチューブと共に廃棄する。</p> <p>9) 13,000rpmで2分遠心し、残留したGP2をよく取り除く。取り除いた残渣はコレクションチューブと共に廃棄する。</p> <p>10) カラムを新しい1.5mLチューブに移し、溶出バッファーGP3を20μLずつメンブレンの中央に乗せる。チップは都度新しいものに交換する(図5-2-1-2-13)。</p> <p>11) 室温に2分放置する。</p> <p>12) 13,000rpmで2分遠心してチューブにDNAを回収する(図5-2-1-2-14)。この状態で-20℃で安定的に保存が可能である。</p> <p><b>5-2-1-4. 精製・濃縮済み1st PCR産物の定量と希釈</b></p> <p>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。</p> <p>常に使い捨て手袋を着用する。</p> <p>1) 30分前に試薬を室温に戻しておく(図5-2-1-3-1)。</p> <p>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)。</p> <p>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)。</p> <p>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)。</p> <p>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。</p>	

Ver. 2.2 (2020年4月3日発行)	変更箇所	Ver. 3.01 (2025年6月16日発行)	変更箇所	Ver. 3.1 (2026年5月1日発行)
<p style="text-align: right;">ページ</p> <p>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 2200のカセットにセットする(図5-2-1-3-8)。 7) TapeStation 2200コントローラーの指示に従って(図5-2-1-3-9, 10)泳動を開始すると、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)。</p> <p>8) ターゲットバンドの濃度を読み取り、ミリQ水で0.1ng/μLに希釈する。ブランクについては、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、非特異的増幅が顕著である場合などは2nd PCR後に濃度を調整したほうが良い場合もある。その場合は5-2-2-1の18)のステップでサンプルを1つのチューブにまとめず、精製とDNA濃度の測定を行う必要がある。</p> <p><b>注意:</b> 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ミリQ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1st 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、希釈に必要なミリQ水の量を計算する際には、精製濃縮済み1st PCR産物の全量ではなくその一部(例えば10.0μL)に対して行うと希釈の精度が上がる。こうすることで、2nd PCR産物の量(リード数)がほぼ一定になる。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。</p> <p>9) 希釈後の1st PCR産物と、残った希釈前の1st PCR産物は-20℃で保存する。</p>	<p>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 <del>2200</del><u>4150</u>のカセットにセットする(図5-2-1-3-8)。 7) TapeStation <del>2200</del><u>4150</u>コントローラーの指示に従って<del>泳動を開始すると</del>(図5-2-1-3-9, 10) <del>泳動を開始すると</del>、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)。<del>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。</del> 8) ターゲットバンドの濃度を読み取り、<u>DNase/RNaseフリー水 ミリQ水</u>で0.1ng/μLに希釈する。<del>ブランクについては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濃度の測定を行う必要</del> <del>が</del><b>注意:</b> 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<u>DNase/RNaseフリー水 ミリQ水</u>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1st 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、<del>希釈に必要なミリQ水の量を計算する際には、精製濃縮済み1st PCR産物の全量ではなくその一部(例えば10.0μL)に対して行うと希釈の精度が上がる。こうすることで、2nd PCR産物の量(リード数)がほぼ一定になる。</del>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。</p> <p>9) 希釈後の1st PCR産物と、<del>残ったは、</del><u>作製したその日のうちに使用し、冷蔵保管や凍結融解は行わない。</u>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。</p>	<p style="text-align: right;">ページ</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p><b>注意:</b> 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1st 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。</p> <p>9) 希釈後の1st PCR産物は、作製したその日のうちに使用し、冷蔵保管や凍結融解は行わない。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。</p>		<p style="text-align: right;">ページ</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p><b>注意:</b> 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1st 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。</p> <p>9) 希釈後の1st PCR産物は、作製したその日のうちに使用し、冷蔵保管や凍結融解は行わない。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。</p>

Ver. 2.2 (2020年4月3日発行)	変更箇所	Ver. 3.01 (2025年6月16日発行)	変更箇所	Ver. 3.1 (2026年5月1日発行)
ページ		ページ		ページ
5-2-2. ライブラリーの調整—2 : 2nd PCR	5-2-2. ライブラリーの調整調製—2 : 2nd PCR	5-2-2. ライブラリーの調製—2 : 2nd PCR	75	77
実験を始める前に	実験を始める前に	実験を始める前に	75	77
<p>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）のランでは使わすべきではない。</p>	<p>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）のランでは使わすべきではない。</p>	<p>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）のランでは使わすべきではない。</p>		<p>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）のランでは使わすべきではない。</p>
2nd PCRに必要な実験器具と試薬・消耗品（例）	2nd PCRに必要な実験器具と試薬・消耗品（例）	2nd PCRに必要な実験器具と試薬・消耗品（例）	75	77
<p>サーマルサイクラー（GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems など） 殺菌灯式電気消毒器（NB-5, 日板工業株式会社など） 定量済み1st PCR産物（0.1ng/μL） KAPA HiFi HS ReadyMix（KK2602, KAPA Biosystems社） インデクス付きプライマー原液（TEバッファで100μMに希釈されたものを注文すると便利；インデクス配列については本項末尾に関連情報を記す）</p>	<p>サーマルサイクラー（GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems など） <del>96ウェルプレートが仕掛けられるものがよい</del> <del>殺菌灯式電気消毒器（NB-5, 日板工業株式会社など）</del> 定量済み1st PCR産物（0.1ng/μL） KAPA HiFi HS ReadyMix（KK2602, KAPA Biosystems社） インデクス付きプライマー原液（TEバッファで100μMに希釈されたものを注文すると便利；インデクス配列については本項末尾に関連情報を記す）<sup>*1, *2</sup></p>	<p>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）<sup>*1, *2</sup></p>		<p>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）<sup>*1, *2</sup></p>
<p>フォワードプライマーの一例（青の部分が8塩基からなるインデクス配列） 2nd PCR F D501 (5'-3'; 70 mer) AATGATACGGCGACACCGAGATCTACACTATAGCCCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT</p>	<p>フォワードプライマーの一例（青の部分が8塩基からなるインデクス配列） <del>2nd PCR F D501 (5'-3'; 70 mer)</del> <del>AATGATACGGCGACACCGAGATCTACACTATAGCCCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT</del></p>	<p>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） 2nd PCR F D501 (5'-3'; 70 mer) AATGATACGGCGACACCGAGATCTACACTATAGCCCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT</p>		<p>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） 2nd PCR F D501 (5'-3'; 70 mer) AATGATACGGCGACACCGAGATCTACACTATAGCCCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT</p>
<p>リバースプライマーの一例（赤の部分が8塩基からなるインデクス配列） 2nd PCR R D701 (5'-3'; 66 mer) CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCGAGTAATGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT</p>	<p>リバースプライマーの一例（赤の部分が8塩基からなるインデクス配列） <del>2nd PCR R D701 (5'-3'; 66 mer)</del> <del>CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCGAGTAATGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT</del></p>	<p>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） 2nd PCR R D701 (5'-3'; 66 mer) CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCGAGTAATGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT</p>		<p>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） 2nd PCR R D701 (5'-3'; 66 mer) CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCGAGTAATGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT</p>
<p>ミリQ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（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, ギルソン社など） 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, エッペンドルフ社) 1.5mL/2.0mLチューブ用チューブブラック 8連チューブ用チューブブラック 実験用ゴム手袋（パウダーフリー）</p>	<p>ミリQ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（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, <del>ギルソン社など</del>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, <del>エッペンドルフ社</del>エッペンドルフ) 1.5mL/2.0mLチューブ用チューブブラック 8連チューブ用チューブブラック <del>実験用ゴム手袋</del>使い捨て手袋（パウダーフリー）</p>	<p>ミリQ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（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ブラック 8連チューブ用チューブブラック 使い捨て手袋（パウダーフリー）</p>		<p>ミリQ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（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ブラック 8連チューブ用チューブブラック 使い捨て手袋（パウダーフリー）</p>
2nd PCR産物の切り出しに必要な実験器具と試薬・消耗品（例）	2nd PCR産物の切り出しに必要な実験器具と試薬・消耗品（例）	2nd PCR産物の切り出しに必要な実験器具と試薬・消耗品（例）	76	78
<p>E-gel iBase Power System (G6400, Invitrogen) E-Gel Safe Imager E-Gel Real-Time Transilluminator ( G6500, Invitrogen) E-gel SizeSelect II 2% (G661012, Invitrogen) 分子サイズマーカー : 50bp DNA Ladder (10416014, Invitrogen) 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） ミリQ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, ギルソン社など） フィルターチップ 100μL 1.5mL/2.0mLチューブ用チューブブラック ゴム手袋（パウダーフリー）</p>	<p>E-Gel <del>iBase</del> Power System <del>(G6400, Invitrogen)</del> Snap Plus Electrophoresis Systems (G9110, サーマフィッシャー) <del>E-Gel Safe Imager E-Gel Real-Time Transilluminator (G6500, Invitrogen)</del> E-gel SizeSelect II 2% (G661012, Invitrogen)サーモフィッシャー) 分子サイズマーカー <del>(50bp DNA Ladder (10416014, Invitrogen) (ターゲットサイズ近辺を判別できるもの)</del> 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 <del>ミリQ水</del> 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, <del>ギルソン社など</del>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ブラック <del>ゴム手袋</del>使い捨て手袋（パウダーフリー）</p>	<p>E-Gel Power Snap Plus Electrophoresis Systems (G9110, サーマフィッシャー) E-gel SizeSelect II 2% (G661012, サーマフィッシャー) 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ブラック 使い捨て手袋（パウダーフリー）</p>		<p>E-Gel Power Snap Plus Electrophoresis Systems (G9110, サーマフィッシャー) E-gel SizeSelect II 2% (G661012, サーマフィッシャー) 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ブラック 使い捨て手袋（パウダーフリー）</p>
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）	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）	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）	76	78
Qubit 2.0 Fluorometer (Life Technologies)	Qubit <del>2.0</del> Fluorometer (Life Technologies)サーモフィッシャー)	Qubit 4.0 Fluorometer (サーモフィッシャー)		Qubit 4.0 Fluorometer (サーモフィッシャー)

Ver. 2.2 (2020年4月3日発行)	変更箇所	Ver. 3.01 (2025年6月16日発行)	変更箇所	Ver. 3.1 (2026年5月1日発行)																																																																																																																															
<p style="text-align: right;">ページ</p> <p>Qubit dsDNA HS Assay (Q32851 [100 サンプル用], Life Technologies) (Q32854 [500サンプル用], Life Technologies)</p> <p>Qubit 測定用500μL専用チューブ (Q32856, Life Technologies)</p> <p>500μLチューブ用チューブラック</p> <p>卓上小型遠心機 (マイクロシックスMS-1, アズワン社など)</p> <p>マイクロピペットP-1000, P-200, P-100, P-20, P-2 (ピペットマン, ギルソン社など)</p> <p>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)</p> <p>E-Gelで回収した2nd PCR産物</p> <p>ゴム手袋 (パウダーフリー)</p> <p><b>5-2-2-1. 2nd PCR</b></p> <p>実験中は必ずゴム手袋を着用する (これ以降作業中に手袋の汚染を感じた場合は速やかに交換する)。事前にピペットやチューブ類は殺菌灯式電気消毒器で20分程度照射して除染しておく (図5-2-1-1)。なお、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。</p> <p><b>注意</b>：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서는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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>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)。</p> <p>KAPA HiFi HS ReadyMix 5μL            プライマー 0.88μL            ミリQ水 3.88μL            定量済み濃度調整済1st PCR産物 86μL</p> <p><b>注意</b>：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。以下に、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。また、冒頭に記したように、ラン間のキャリアオーバー (MiSeq内部の流路に残存する前回のライブラリー) 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) のランに使うべきではない。</p> <table border="1" data-bbox="184 1436 557 1608"> <tr><td>D501/A701</td><td>D501/A702</td><td>D501/A703</td><td>D501/A704</td></tr> <tr><td>D502/A701</td><td>D502/A702</td><td>D502/A703</td><td>D502/A704</td></tr> <tr><td>D503/A701</td><td>D503/A702</td><td>D503/A703</td><td>D503/A704</td></tr> <tr><td>D504/A701</td><td>D504/A702</td><td>D504/A703</td><td>D504/A704</td></tr> <tr><td>D505/A701</td><td>D505/A702</td><td>D505/A703</td><td>D505/A704</td></tr> <tr><td>D506/A701</td><td>D506/A702</td><td>D506/A703</td><td>D506/A704</td></tr> <tr><td>D507/A701</td><td>D507/A702</td><td>D507/A703</td><td>D507/A704</td></tr> <tr><td>D508/A701</td><td>D508/A702</td><td>D508/A703</td><td>D508/A704</td></tr> </table> <p>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5-2-2-1-2)。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整が可能になる。</p> <p>4) 全体に必要なプレミックス (KAPA+ミリQ水) のみのプレミックス) を必要量の1.2倍作成する。上記の32ライブラリーの場合であれば、KAPA 7.5μL x 32 x 1.2 = 288μL にミリQ水3.88μL x 32 x 1.2 = 149μLを加える (総量437μL)。</p> <p>5) フォワードプライマー8種+リバースプライマー4種に用いる計12本の1.5mLチューブを用意してキャップに必要な事項を記入する。</p>	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	<p style="text-align: right;">ページ</p> <p>Qubit dsDNA HS Assay (Q32851 [100サンプル用], <b>Life Technologies</b> <b>サーモフィッシャー</b>) (Q32854 [500サンプル用], <b>Life Technologies</b> <b>サーモフィッシャー</b>)</p> <p>Qubit 測定用500μL専用チューブ (Q32856, <b>Life Technologies</b><b>サーモフィッシャー</b>)</p> <p>500μLチューブ用チューブラック</p> <p>卓上小型遠心機 (マイクロシックスMS-1, <b>アズワン社など</b>)</p> <p>マイクロピペットP-1000, P-200, P-100, P-20, P-2 (ピペットマン, <b>ギルソン社など</b><b>ギルソン</b>)</p> <p>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、<b>ピペットマン適合型</b>)</p> <p>E-Gelで回収した2nd PCR産物</p> <p><b>ゴム使い捨て手袋</b> (パウダーフリー)</p> <p><b>5-2-2-1. 2nd PCR</b></p> <p><b>実験中は必ずゴム常に実験用の使い捨て手袋を着用する (これ以降、作業中に手袋の汚染を感じた場合は速やかに交換する)。</b>事前に<b>ピペットやチューブ類は殺菌灯式電気消毒器で20分程度照射して除染しておく (図5-2-1-1)。</b>なお、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。</p> <p><b>注意</b>：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서는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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>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)。<b>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。</b></p> <p>KAPA HiFi HS ReadyMix 5μL            プライマー 0.88μL            DNase/RNaseフリー水 3.88μL            定量済み濃度調整済1st PCR産物 86μL</p> <p><b>注意</b>：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 (<b>Combinatorial Dual Index方式, CDI</b>) 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。<b>以下に例として</b>、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、ラン間のキャリアオーバー (MiSeq内部の流路に残存する前回のライブラリー) 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) のランに<b>使うべきではない使用を避けた方がよい</b>。</p> <table border="1" data-bbox="747 1436 1121 1608"> <tr><td>D501/A701</td><td>D501/A702</td><td>D501/A703</td><td>D501/A704</td></tr> <tr><td>D502/A701</td><td>D502/A702</td><td>D502/A703</td><td>D502/A704</td></tr> <tr><td>D503/A701</td><td>D503/A702</td><td>D503/A703</td><td>D503/A704</td></tr> <tr><td>D504/A701</td><td>D504/A702</td><td>D504/A703</td><td>D504/A704</td></tr> <tr><td>D505/A701</td><td>D505/A702</td><td>D505/A703</td><td>D505/A704</td></tr> <tr><td>D506/A701</td><td>D506/A702</td><td>D506/A703</td><td>D506/A704</td></tr> <tr><td>D507/A701</td><td>D507/A702</td><td>D507/A703</td><td>D507/A704</td></tr> <tr><td>D508/A701</td><td>D508/A702</td><td>D508/A703</td><td>D508/A704</td></tr> </table> <p>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5-2-2-1-2<sup>1</sup>)。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整が可能になる。</p> <p>4) <b>全体に必要なプレミックス (KAPA+ミリQ水) のみのプレミックス) を必要量の1.2倍作成する。上記の32ライブラリーの場合であれば、KAPA 7.5μL x 32 x 1.2 = 288μL にミリQ水3.88μL x 32 x 1.2 = 149μLを加える (総量437μL)。</b></p> <p>5) <b>フォワードプライマー8種+リバースプライマー4種に用いる計12本の1.5mLチューブを用意してキャップに必要な事項を記入する。</b></p>	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	<p style="text-align: right;">ページ</p> <p>Qubit dsDNA HS Assay (Q32851 [100サンプル用], サーマフィッシャー) (Q32854 [500サンプル用], サーマフィッシャー)</p> <p>Qubit 測定用500μL専用チューブ (Q32856, サーマフィッシャー)</p> <p>500μLチューブ用チューブラック</p> <p>卓上小型遠心機 (マイクロシックスMS-1, アズワン)</p> <p>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)</p> <p>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)</p> <p>E-Gelで回収した2nd PCR産物</p> <p>使い捨て手袋 (パウダーフリー)</p> <p><b>5-2-2-1. 2nd PCR</b></p> <p>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。</p> <p><b>注意</b>：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서는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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>KAPA HiFi HS ReadyMix 5μL            プライマー 0.88μL            DNase/RNaseフリー水 3.88μL            定量済み濃度調整済1st PCR産物 86μL</p> <p><b>注意</b>：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、ラン間のキャリアオーバー (MiSeq内部の流路に残存する前回のライブラリー) 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。</p> <table border="1" data-bbox="1187 1436 1561 1608"> <tr><td>D501/A701</td><td>D501/A702</td><td>D501/A703</td><td>D501/A704</td></tr> <tr><td>D502/A701</td><td>D502/A702</td><td>D502/A703</td><td>D502/A704</td></tr> <tr><td>D503/A701</td><td>D503/A702</td><td>D503/A703</td><td>D503/A704</td></tr> <tr><td>D504/A701</td><td>D504/A702</td><td>D504/A703</td><td>D504/A704</td></tr> <tr><td>D505/A701</td><td>D505/A702</td><td>D505/A703</td><td>D505/A704</td></tr> <tr><td>D506/A701</td><td>D506/A702</td><td>D506/A703</td><td>D506/A704</td></tr> <tr><td>D507/A701</td><td>D507/A702</td><td>D507/A703</td><td>D507/A704</td></tr> <tr><td>D508/A701</td><td>D508/A702</td><td>D508/A703</td><td>D508/A704</td></tr> </table> <p>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整が可能になる。</p>	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	<p style="text-align: right;">ページ</p> <p>Qubit dsDNA HS Assay (Q32851 [100サンプル用], サーマフィッシャー) (Q32854 [500サンプル用], サーマフィッシャー)</p> <p>Qubit 測定用500μL専用チューブ (Q32856, サーマフィッシャー)</p> <p>500μLチューブ用チューブラック</p> <p>卓上小型遠心機 (マイクロシックスMS-1, アズワン)</p> <p>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)</p> <p>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)</p> <p>E-Gelで回収した2nd PCR産物</p> <p>使い捨て手袋 (パウダーフリー)</p> <p><b>5-2-2-1. 2nd PCR</b></p> <p>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。</p> <p><b>注意</b>：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서는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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>KAPA HiFi HS ReadyMix 5μL            プライマー 0.88μL            DNase/RNaseフリー水 3.88μL            定量済み濃度調整済1st PCR産物 86μL</p> <p><b>注意</b>：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、ラン間のキャリアオーバー (MiSeq内部の流路に残存する前回のライブラリー) 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。</p> <table border="1" data-bbox="2255 1436 2629 1608"> <tr><td>D501/A701</td><td>D501/A702</td><td>D501/A703</td><td>D501/A704</td></tr> <tr><td>D502/A701</td><td>D502/A702</td><td>D502/A703</td><td>D502/A704</td></tr> <tr><td>D503/A701</td><td>D503/A702</td><td>D503/A703</td><td>D503/A704</td></tr> <tr><td>D504/A701</td><td>D504/A702</td><td>D504/A703</td><td>D504/A704</td></tr> <tr><td>D505/A701</td><td>D505/A702</td><td>D505/A703</td><td>D505/A704</td></tr> <tr><td>D506/A701</td><td>D506/A702</td><td>D506/A703</td><td>D506/A704</td></tr> <tr><td>D507/A701</td><td>D507/A702</td><td>D507/A703</td><td>D507/A704</td></tr> <tr><td>D508/A701</td><td>D508/A702</td><td>D508/A703</td><td>D508/A704</td></tr> </table> <p>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整が可能になる。</p>	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
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																																																																																																																																
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																																																																																																																																
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																																																																																																																																
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																																																																																																																																

Ver. 2.2 (2020年4月3日発行)	変更箇所	Ver. 3.01 (2025年6月16日発行)	変更箇所	Ver. 3.1 (2026年5月1日発行)
ページ		ページ		ページ
<p>6) 上記のフォワードプライマー8種のチューブに必要なプレミックス (7.5μL + 3.88μL) × 4 × 1.12 / 2 = 25.5μLを8本のチューブに分注する (1.12倍量)。</p> <p>7) 上記のリバースプライマー4種のチューブに必要なプレミックス (7.5μL + 3.88μL) × 8 × 1.12 / 2 = 51μLを4本のチューブに分注する (1.12倍量)。</p> <p>8) 6) の各チューブに必要な8種のフォワードプライマーを 0.88μL × 4 × 1.12 = 3.94μLずつ分注する。</p> <p>9) 7) の各チューブに必要な4種のリバースプライマーを 0.88μL × 8 × 1.12 = 7.88μLずつ分注する。</p> <p>10) 各フォワードプライマーを含むプレミックスを横方向に6.57μLずつ分注する。</p> <p>11) 各リバースプライマーを含むプレミックスを縦方向に6.57μLずつ分注する。</p> <p>12) 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。</p> <p>13) 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。</p> <p>14) 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。</p> <p>15) 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。</p> <p>16) 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。</p>	<p><del>6) 上記のフォワードプライマー8種のチューブに必要なプレミックス (7.5μL + 3.88μL) × 4 × 1.12 / 2 = 25.5μLを8本のチューブに分注する (1.12倍量)。</del></p> <p><del>7) 上記のリバースプライマー4種のチューブに必要なプレミックス (7.5μL + 3.88μL) × 8 × 1.12 / 2 = 51μLを4本のチューブに分注する (1.12倍量)。</del></p> <p><del>8) の各チューブに必要な8種のフォワードプライマーを 0.88μL × 4 × 1.12 = 3.94μLずつ分注する。</del></p> <p><del>9) の各チューブに必要な4種のリバースプライマーを 0.88μL × 8 × 1.12 = 7.88μLずつ分注する。</del></p> <p><del>10) 各フォワードプライマーを含むプレミックスを横方向に6.57μLずつ分注する。</del></p> <p><del>11) 各リバースプライマーを含むプレミックスを縦方向に6.57μLずつ分注する。</del></p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p>	<p>95℃のDNA変性を3分間 (初期変性とHotStart酵素の活性化)</p> <p>98℃のDNA変性を20秒</p> <p>72℃のアニーリング+伸長反応を15秒</p> <p>72℃の伸長反応を5分間 (最終伸長)</p> <p>4℃</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>11) 2nd PCRが終了すると、サンプルごとに固有のインデッ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ッ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) 。1st 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。</p> <p>*<sup>1</sup> イルミナ社製シーケンサーでは、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。</p>	<p>95℃のDNA変性を3分間 (初期変性とHotStart酵素の活性化)</p> <p>98℃のDNA変性を20秒</p> <p>72℃のアニーリング+伸長反応を15秒</p> <p>72℃の伸長反応を5分間 (最終伸長)</p> <p>4℃</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>11) 2nd PCRが終了すると、サンプルごとに固有のインデッ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ッ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) 。1st 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。</p> <p>*<sup>1</sup> イルミナ社製シーケンサーでは、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。</p>	<p>95℃のDNA変性を3分間 (初期変性とHotStart酵素の活性化)</p> <p>98℃のDNA変性を20秒</p> <p>72℃のアニーリング+伸長反応を15秒</p> <p>72℃の伸長反応を5分間 (最終伸長)</p> <p>4℃</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>11) 2nd PCRが終了すると、サンプルごとに固有のインデッ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ッ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) 。1st 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。</p> <p>*<sup>1</sup> イルミナ社製シーケンサーでは、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。</p>
<p>最初に95℃のDNA変性を3分間を挿入</p> <p>98℃のDNA変性を20秒</p> <p>72℃のアニーリング+伸長反応を15秒</p> <p>最後に72℃の伸長反応を5分間を挿入</p> <p>10サイクル</p>	<p>最初に95℃のDNA変性を3分間を挿入 (初期変性とHotStart酵素の活性化)</p> <p>98℃のDNA変性を20秒</p> <p>72℃のアニーリング+伸長反応を15秒</p> <p>最後に72℃の伸長反応を5分間を挿入 (最終伸長)</p> <p>4℃</p> <p>10サイクル</p>	<p>95℃のDNA変性を3分間 (初期変性とHotStart酵素の活性化)</p> <p>98℃のDNA変性を20秒</p> <p>72℃のアニーリング+伸長反応を15秒</p> <p>72℃の伸長反応を5分間 (最終伸長)</p> <p>4℃</p> <p>10サイクル</p>	<p>95℃のDNA変性を3分間 (初期変性とHotStart酵素の活性化)</p> <p>98℃のDNA変性を20秒</p> <p>72℃のアニーリング+伸長反応を15秒</p> <p>72℃の伸長反応を5分間 (最終伸長)</p> <p>4℃</p> <p>10サイクル</p>	<p>95℃のDNA変性を3分間 (初期変性とHotStart酵素の活性化)</p> <p>98℃のDNA変性を20秒</p> <p>72℃のアニーリング+伸長反応を15秒</p> <p>72℃の伸長反応を5分間 (最終伸長)</p> <p>4℃</p> <p>10サイクル</p>
<p>17) 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。</p>	<p>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。</p> <p>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。</p>	<p>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。</p> <p>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。</p>	<p>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。</p> <p>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。</p>	<p>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。</p> <p>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。</p>
<p>18) 2nd PCRが終了すると、サンプルごとに固有のインデックスが付加されているので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) 。1st 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。</p>	<p>11) 2nd PCRが終了すると、サンプルごとに固有のインデッ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ッ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) 。1st 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。</p> <p>*<sup>1</sup> イルミナ社製シーケンサーでは、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。</p>	<p>11) 2nd PCRが終了すると、サンプルごとに固有のインデッ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ッ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) 。1st 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。</p> <p>*<sup>1</sup> イルミナ社製シーケンサーでは、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。</p>	<p>11) 2nd PCRが終了すると、サンプルごとに固有のインデッ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ッ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) 。1st 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。</p> <p>*<sup>1</sup> イルミナ社製シーケンサーでは、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。</p>	<p>11) 2nd PCRが終了すると、サンプルごとに固有のインデッ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ッ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) 。1st 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。</p> <p>*<sup>1</sup> イルミナ社製シーケンサーでは、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。</p>
<p><b>5-2-2-2. 2nd PCR産物の切り出し</b></p>	<p><b>5-2-2-2. 2nd PCR産物の切り出し精製</b></p>	<p><b>5-2-2-2. 2nd PCR産物の精製</b></p>	<p><b>5-2-2-2. 2nd PCR産物の精製</b></p>	<p><b>5-2-2-2. 2nd PCR産物の精製</b></p>
<p>2nd PCR産物には、MiSeqを用いた超並列シーケンシングに必要なフローセル結合配列 (計53bp) とインデックス配列 (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を用いたゲル泳動で切り出す方法 (実際にはピペットで吸い出す方法) を記す。</p>	<p>2nd PCR産物には、MiSeqを用いた超並列シーケンシングに必要なフローセル結合配列 (計53bp) とインデックス配列 (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を用いたゲル泳動電気泳動で切り出す方法 (実際にはピペットで吸い出す方法) を記す。</p> <p>常に実験用の使い捨て手袋を着用して作業する。</p>	<p>2nd PCR産物には、MiSeqを用いた超並列シーケンシングに必要なフローセル結合配列 (計53bp) とインデックス配列 (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出す方法) を記す。</p> <p>常に実験用の使い捨て手袋を着用して作業する。</p>	<p>2nd PCR産物には、MiSeqを用いた超並列シーケンシングに必要なフローセル結合配列 (計53bp) とインデックス配列 (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出す方法) を記す。</p> <p>常に実験用の使い捨て手袋を着用して作業する。</p>	<p>2nd PCR産物には、MiSeqを用いた超並列シーケンシングに必要なフローセル結合配列 (計53bp) とインデックス配列 (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出す方法) を記す。</p> <p>常に実験用の使い捨て手袋を着用して作業する。</p>
<p>1) 分子サイズマーカー (50bp DNA Ladder) 原液80μLにミリQ水920μLを加えて希釈する。</p> <p>2) E-Gel iBase Power System (以下iBase) をE-Gel Safe Imager E-Gel Real-Time Transilluminator (以下Safe Imager) の上にのせ、両者を付属のケーブルで接続してスイッチをONにする。</p> <p>3) 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ム2個を注意深く取り外す (図5-2-2-2-1) 。</p> <p>4) ゲルの右側からiBaseに挿入する (図5-2-2-2-2) 。ゲルが正しく差し込まれるとiBaseのライトが点灯する。</p> <p>5) 2nd PCR産物と付属のLoading Bufferを混合し、上段の各ウェルに20~25μLローディングする。DNAマーカーをサンプルと別のウェルに20~25μLローディングする。未使用のウェルにはミリQ水と同じ分量ローディングする (図5-2-2-2-3) 。</p>	<p>分子サイズマーカー (50bp DNA Ladder) 原液80μLにミリQ水920μLを加えて希釈する。</p> <p>1) E-Gel iBase Power System (以下iBase) をE-Gel Safe Imager E-Gel Real-Time Transilluminator (以下Safe Imager) の上にのせ、両者を付属のケーブルで接続してSnap Plus Electrophoresis Systems (以下Power Snap) のスイッチをONにする。</p> <p>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ム2個を注意深く取り外す (図5-2-2-2-1) 、Power Snapに挿入する (図5-2-2-2-2) 。</p> <p>ゲルの右側からiBaseに挿入する (図5-2-2-2-2) 。ゲルが正しく差し込まれるとiBaseのライトが点灯する。</p> <p>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。</p>	<p>分子サイズマーカー (50bp DNA Ladder) 原液80μLにミリQ水920μLを加えて希釈する。</p> <p>1) E-Gel Power Snap Plus Electrophoresis Systems (以下Power Snap) のスイッチをONにする。</p> <p>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) 。</p> <p>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。</p>	<p>分子サイズマーカー (50bp DNA Ladder) 原液80μLにミリQ水920μLを加えて希釈する。</p> <p>1) E-Gel Power Snap Plus Electrophoresis Systems (以下Power Snap) のスイッチをONにする。</p> <p>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) 。</p> <p>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。</p>	<p>分子サイズマーカー (50bp DNA Ladder) 原液80μLにミリQ水920μLを加えて希釈する。</p> <p>1) E-Gel Power Snap Plus Electrophoresis Systems (以下Power Snap) のスイッチをONにする。</p> <p>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) 。</p> <p>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。</p>

Ver. 2.2 (2020年4月3日発行)	変更箇所	Ver. 3.01 (2025年6月16日発行)	変更箇所	Ver. 3.1 (2026年5月1日発行)
<p>ページ</p> <p>6) 中段のウエル（回収用のウエル）の全てにミリQ水を満たす。回収ウエルにミリQ水を入れ忘れると、泳動が正常に進行しないので注意すること。</p> <p>7) iBaseに観察用プレートユニット（オレンジ色のフィルター付きユニット）をセットし（図5-2-2-2-4）、モードボタンを何回か押ししてRun SizeSelect 2%（No. 9）モードにセットする。泳動時間はとりあえず15分にセットする。</p> <p>8) 慣れないうちは、LED照射ボタンを泳動中に押しして産物の状態をチェックするとよい。本マニュアルで指定した分子サイズマーカーは350bpが他のサイズより明るく光るので、約370bpのターゲットバンドの良い目安となる。</p> <p>9) 15分が経過するとチャイムが鳴って泳動が一時停止する。LED照射ボタンを押ししてターゲットバンドの位置を確認する。回収ウエルの直上に切り込まれたサイズマーカー（基準線）に達していなければ、さらに泳動を数分間追加する。</p> <p>10) 基準線にターゲットバンドが達したら泳動を一時停止する。</p> <p>11) 回収ウエルのミリQ水が泳動中に減少するので、減少した分を補充する。</p> <p>12) 泳動を再開する。回収ウエルにバンド全体が入ったところで泳動を停止する。</p> <p>13) ビベットを用いて回収ウエ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（図5-2-2-2-5）。回収する際に、ウエルの底にビベット先端で穴を開けないように注意する。 <b>注意</b>：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、回収ウエルにミリQ水を満たして泳動を再開し、一旦バンドを回収ウエルの下流側に出し、泳動モードをReverse E-Gelにして回収ウエ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、カラム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。</p>	<p>4) 全てのウエルに水を50 μLずつ入れた後、分子サイズマーカーと2nd PCR産物を上段の各ウエルに20～25μLローディングロードする。<del>DNAマーカーを分子サイズマーカーはサンプルと別のウエルに20～25μLローディングロードする。未使用のウエルにはミリQ水と同じ分量ローディングロードする。</del></p> <p>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。</p> <p>6) <del>中段のウエル（回収用のウエル）の全てにミリQ水を満たす。回収ウエルにミリQ水を入れ忘れると、泳動が正常に進行しないので注意すること。</del></p> <p>7) <del>iBaseに観察用プレートユニット（オレンジ色のフィルター付きユニット）をセットし（図5-2-2-2-4）、モードボタンを何回か押ししてRun SizeSelect 2%（No. 9）モードにセットする。泳動時間はとりあえず15分にセットする。</del></p> <p>8) <del>慣れないうちは、LED照射ボタンを泳動中に押しして開始後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とよい。本マニュアルで指定した分子サイズマーカーは350bpが他のサイズより明るく光るので、ゲルの回収ウエルに約370bpのターゲットバンドの良い目安となる。</del></p> <p>9) <del>15分が経過するとチャイムが鳴って泳動が一時停止する。LED照射ボタンを押ししてターゲットバンドの位置を確認する。回収ウエルの直上に切り込まれたサイズマーカー（基準線）に達していなければ、さらに泳動を数分間追加する。</del></p> <p>10) <del>基準線に7) ターゲットバンドが達したら泳動を一時停止する。</del></p> <p>11) <del>回収ウエルにDNase/RNaseフリー水 ミリQ水が泳動中に減少するので、減少した分を25μL補充する。</del></p> <p>12) <del>慎重に泳動を再開する。回収ウエルにバンド全体が入ったところで泳動を停止する。</del></p> <p>13) <del>ビベットを用いて回収ウエ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（図5-2-2-2-5）。回収する際に、ウエルの底にビベ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、回収ウエルにDNase/RNaseフリー水 ミリQ水を満たして泳動を再開し、一旦バンドを回収ウエルの下流側に出し、泳動モードをReverse E-Gelにして回収ウエ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、カラム 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。</del></p>	<p>ページ</p> <p>4) 全てのウエルに水を50 μLずつ入れた後、分子サイズマーカーと2nd PCR産物を上段の各ウエルにロードする。分子サイズマーカーはサンプルと別のウエルにロードする。</p> <p>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。</p> <p>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。ゲルの回収ウエルに約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。</p> <p>7) ターゲットバンドが十分回収ウエ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。</p> <p>8) 回収ウエルにDNase/RNaseフリー水を25μL補充する。</p> <p>9) 慎重に泳動を再開する。回収ウエルにバンド全体が入ったところで泳動を停止する。</p> <p>10) ビベットを用いて回収ウエ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、ウエルの底にビベット先端で穴を開けないように注意する。 <b>注意</b>：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、回収ウエルに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エルの下流側に出し、泳動モードをReverse E-Gelにして回収ウエ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。</p>	<p>5-2-2-3. 切り出した2nd PCR産物の定量</p> <p>本項では、E-Gelを用いて切り出したライブラリーの濃度測定法について記す。</p> <p>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）。</p> <p>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。</p> <p>3) キットが室温に戻ったら、Qubit Reagentを1 μLにQubit Bufferを199 μL加えた計200 μLのプレミックスを必要本数分調整する（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3 μLにQubit Bufferを597 μL加えたプレミックスを調整する。</p> <p>4) Qubit測定用500 μL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190 μL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10 μLずつ入れ（図5-2-2-3-4）、チューブのキャップを開けてボルテックスで2～3秒攪拌し軽く遠心する。</p> <p>5) 濃度を測定するライブラリーの数だけ500 μLチューブを用意し、それぞれにプレミックスを198 μLずつ分注する。その後、ライブラリーを2 μLずつ入れ（図5-2-2-3-5）、チューブのキャップを開けてボルテックスで2～3秒攪拌し軽く遠心する。2分間室温で静置する（図5-2-2-3-6）。 <b>注意</b>：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。</p> <p>6) Qubit 2.0 Fluorometerの画面をタッチして起動する。画面からDNAを選択し、次いでdsDNA High Sensitivityを選択する。校正用スタンダードを用いた校正をするかどうか聞いてくるので、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, 9）。</p> <p>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、Calculate Stock Concをタッチし、使用するサンプルの量を2 μLに設定して濃度を測定する。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。</p>	<p>ページ</p> <p>4) 全てのウエルに水を50 μLずつ入れた後、分子サイズマーカーと2nd PCR産物を上段の各ウエルにロードする。分子サイズマーカーはサンプルと別のウエルにロードする。</p> <p>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。</p> <p>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。ゲルの回収ウエルに約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。</p> <p>7) ターゲットバンドが十分回収ウエ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。</p> <p>8) 回収ウエルにDNase/RNaseフリー水を25μL補充する。</p> <p>9) 慎重に泳動を再開する。回収ウエルにバンド全体が入ったところで泳動を停止する。</p> <p>10) ビベットを用いて回収ウエ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、ウエルの底にビベット先端で穴を開けないように注意する。 <b>注意</b>：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、回収ウエルに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エルの下流側に出し、泳動モードをReverse E-Gelにして回収ウエ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。</p>
<p>75</p> <p>5-2-2-3. 切り出した2nd PCR産物の定量</p> <p>本項では、E-Gelを用いて切り出したライブラリーの濃度測定法について記す。</p> <p>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）。</p> <p>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。</p> <p>3) キットが室温に戻ったら、1測定あたり199 μLのQubit dsDNA HS BufferにQubit dsDNA HS Reagentを1 μLにQubit Bufferを199 μL加えた計200 μLのプレミックスを必要本数分調整する（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3 μLにQubit Bufferを597 μL加えたプレミックスを調整する。</p> <p>4) Qubit測定用500 μL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190 μL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10 μLずつ入れ（図5-2-2-3-4）、チューブのキャップを開けてボルテックスで2～3秒攪拌し軽く遠心する。</p> <p>5) 濃度を測定するライブラリーの数だけ500 μLチューブを用意し、それぞれにプレミックスを198 μLずつ分注する。その後、ライブラリーを2 μLずつ入れ（図5-2-2-3-5）、チューブのキャップを開けてボルテックスで2～3秒攪拌し軽く遠心する。2分間室温で静置する（図5-2-2-3-6）。 <b>注意</b>：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。</p> <p>6) Qubit Fluorometerの画面電源をタッチして起動する（図5-2-2-3-7）。画面からDNA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するかどうか聞いてくるので選択し、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）。</p> <p>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2 μL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。</p>	<p>75</p> <p>5-2-2-3. 切り出した2nd PCR産物の定量</p> <p>本項では、E-Gelを用いて切り出したライブラリーの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。</p> <p>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）。</p> <p>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。</p> <p>3) キットが室温に戻ったら、1測定あたり199 μLのQubit dsDNA HS BufferにQubit dsDNA HS Reagentを1 μLを加えた計200 μLのプレミックスを必要本数分調整する（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3 μLにQubit Bufferを597 μL加えたプレミックスを調整する。</p> <p>4) Qubit測定用500 μL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190 μL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10 μLずつ入れ（図5-2-2-3-4）、チューブのキャップを開けてボルテックスで2～3秒攪拌し軽く遠心する。</p> <p>5) 濃度を測定するライブラリーの数だけ500 μLチューブを用意し、それぞれにプレミックスを198 μLずつ分注する。その後、ライブラリーを2 μLずつ入れ（図5-2-2-3-5）、チューブのキャップを開けてボルテックスで2～3秒攪拌し軽く遠心する。2分間室温で静置する（図5-2-2-3-6）。 <b>注意</b>：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。</p> <p>6) Qubit Fluorometerの画面電源をタッチして起動する（図5-2-2-3-7）。画面からDNA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するかどうか聞いてくるので選択し、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）。</p> <p>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2 μL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。</p>	<p>80</p> <p>5-2-2-3. 切り出した2nd PCR産物の定量</p> <p>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。</p> <p>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）。</p> <p>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。</p> <p>3) キットが室温に戻ったら、1測定あたり199 μLのQubit dsDNA HS BufferにQubit dsDNA HS Reagentを1 μLを加えた計200 μLのプレミックスを必要本数分調整する（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3 μLにQubit Bufferを597 μL加えたプレミックスを調整する。</p> <p>4) Qubit測定用500 μL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190 μL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10 μLずつ入れ（図5-2-2-3-4）、チューブのキャップを開けてボルテックスで2～3秒攪拌し軽く遠心する。</p> <p>5) 濃度を測定するライブラリーの数だけ500 μLチューブを用意し、それぞれにプレミックスを198 μLずつ分注する。その後、ライブラリーを2 μLずつ入れ（図5-2-2-3-5）、チューブのキャップを開けてボルテックスで2～3秒攪拌し軽く遠心する。2分間室温で静置する（図5-2-2-3-6）。 <b>注意</b>：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。</p> <p>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）。</p> <p>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2 μL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。</p>	<p>82</p> <p>5-2-2-3. 切り出した2nd PCR産物の定量</p> <p>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。</p> <p>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）。</p> <p>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。</p> <p>3) キットが室温に戻ったら、1測定あたり199 μLのQubit dsDNA HS BufferにQubit dsDNA HS Reagentを1 μLを加えた計200 μLのプレミックスを必要本数分調整する（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3 μLにQubit Bufferを597 μL加えたプレミックスを調整する。</p> <p>4) Qubit測定用500 μL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190 μL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10 μLずつ入れ（図5-2-2-3-4）、チューブのキャップを開けてボルテックスで2～3秒攪拌し軽く遠心する。</p> <p>5) 濃度を測定するライブラリーの数だけ500 μLチューブを用意し、それぞれにプレミックスを198 μLずつ分注する。その後、ライブラリーを2 μLずつ入れ（図5-2-2-3-5）、チューブのキャップを開けてボルテックスで2～3秒攪拌し軽く遠心する。2分間室温で静置する（図5-2-2-3-6）。 <b>注意</b>：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。</p> <p>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）。</p> <p>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2 μL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。</p>	

Ver. 2.2 (2020年4月3日発行)	変更箇所	Ver. 3.01 (2025年6月16日発行)	変更箇所	Ver. 3.1 (2026年5月1日発行)
<p style="text-align: right;">ページ</p> <p>8) Qubitではテンプレートを100倍希釈した計測値 (ng/mL) が表示される (図5-2-2-3-10)。この値が10.0ng/mL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。</p> <p><b>5-2-2-4. インデクス関連情報</b></p> <p>以下に示す表は、メタバーコーディングで広く使われているイルミナ社のインデクス配列 (8塩基) である (A501~508/A701~712/D501~508/D701~712)。カスタムプライマーを注文する際には、i5の配列をフォワードプライマーに、i7の配列をリバースプライマーに、それぞれそのまま挿入する。以下の表では8塩基の配列が記載されている。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ので、以下の表でも逆相補鎖に変換して記載している。iSeq100など、機種によっては記入の仕方が異なるので注意が必要である。なお、これ以外のインデクスを使用したい場合は、Hamady et al. (2008) にリストアップされているインデックス配列から適当なものをピックアップすれば良い。手持ちのインデクス配列を増やすと、同時に分析できるライブラリーの数が増えると共に、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 (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) を避けることもできる。また、異なる研究室間で相乗りシーケンスを行えるようになるため、研究経費の節約にもつながる。</p>	<p>8) Qubit 4.0では<del>テンプレート</del> <b>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5-2-2-3-10)。</b><del>この値は11)。</del> <b>サンプル濃度が10.0ng/mL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。</b></p> <p><b>5-2-2-4. インデクス関連情報</b></p> <p><del>以下に示す表は、メタバーコーディングで広く使われているイルミナ社のインデクス配列 (8塩基) である (A501~508/A701~712/D501~508/D701~712)。カスタムプライマーを注文する際には、i5の配列をフォワードプライマーに、i7の配列をリバースプライマーに、それぞれそのまま挿入する。以下の表では8塩基の配列が記載されている。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ので、以下の表でも逆相補鎖に変換して記載している。iSeq100、NextSeq550など、機種によっては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。</del></p> <p><b>5-2-2-4. インデクス関連情報</b></p> <p>以下に示す表は、メタバーコーディングで広く使われているイルミナ社のインデクス配列 (8塩基) である (A501~508/A701~712/D501~508/D701~712)。カスタムプライマーを注文する際には、i5の配列をフォワードプライマーに、i7の配列をリバースプライマーに、それぞれそのまま挿入する。以下の表では8塩基の配列が記載されている。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ので、以下の表でも逆相補鎖に変換して記載している。iSeq100、NextSeq550など、機種によっては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) を避けることもできる。また、異なる研究室間で相乗りシーケンスを行えるようになるため、研究経費の節約にもつながる。留意しておくのがよい。</p>	<p style="text-align: right;">ページ</p> <p>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。</p> <p><b>5-2-2-4. インデクス関連情報</b></p> <p>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。</p>	<p style="text-align: right;">ページ</p> <p>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。</p> <p><b>5-2-2-4. インデクス関連情報</b></p> <p>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。</p>	<p style="text-align: right;">ページ</p> <p>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。</p> <p><b>5-2-2-4. インデクス関連情報</b></p> <p>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。</p>

Ver. 2.2 (2020年4月3日発行)	変更箇所	Ver. 3.01 (2025年6月16日発行)	変更箇所	Ver. 3.1 (2026年5月1日発行)
<p align="right">ページ</p> <p><b>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</b></p> <p>77</p> <p>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整することである。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の他にイルミナ社のiSeq100でもほぼ同様の解析が可能であることが確認されている。</p> <p>Tween 20 (P7949, Sigma-Aldrich) ミリQ水 50mL 自立式遠沈管 500mL洗淨瓶 0.01%次亜塩素酸溶液 次亜塩素酸溶液用専用チューブ（MiSeq Disposable Wash Tubes: PN: MS-102-9999） ゴム手袋（パウダーフリー）</p>	<p><b>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</b></p> <p>77</p> <p>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整することである。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（<a href="#">ランダムフローセルを採用</a>）の他にイルミナ社のiSeq100（<a href="#">パターンドフローセルを採用</a>）でも、<a href="#">MiFishプライマーを用いた分析で、ほぼ同様の解析が可能である</a>。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の他にイルミナ社のiSeq100でもほぼ同様の解析が可能であることが確認されている（<a href="#">Nakao et al. 2021</a>）。</p> <p>Tween 20 (P7949、Sigma-Aldrich) <del>DNase/RNaseフリー水</del> <a href="#">ミリQ水</a> 50mL 自立式遠沈管 500mL洗淨瓶 0.01%次亜塩素酸溶液 <del>次亜塩素酸溶液用専用チューブ</del>（MiSeq Disposable Wash Tubes: <del>PN: MS-102-9999</del>、<a href="#">イルミナ</a>） <del>ゴム</del><a href="#">使い捨て</a>手袋（パウダーフリー）</p>	<p align="right">ページ</p> <p><b>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</b></p> <p>83</p> <p>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整することである。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）。</p> <p><b>MiSeqのメンテナンスに必要な試薬・消耗品（例）</b></p> <p>83</p> <p>Tween 20 (P7949, Sigma-Aldrich) DNase/RNaseフリー水 50mL 自立式遠沈管 500mL洗淨瓶 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）</p>	<p align="right">ページ</p> <p><b>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</b></p> <p>85</p> <p>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整することである。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）。</p> <p><b>MiSeqのメンテナンスに必要な試薬・消耗品（例）</b></p> <p>85</p> <p>Tween 20 (P7949, Sigma-Aldrich) DNase/RNaseフリー水 50mL 自立式遠沈管 500mL洗淨瓶 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）</p>	
<p><b>シークエンスに必要な実験器具と試薬・消耗品（例）</b></p> <p>77</p> <p>MiSeq（イルミナ社） MiSeq Reagent Kit v2 (300サイクル)（MS-102-2002, イルミナ社）：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MiSeq Reagent Micro Kit v2 (MS-103-1002；総リード数約400万本）か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整する） PhiX Control v3 (FC-110-3001, イルミナ社) 99.5% 分子生物学用グレードエタノール（和光純業工業） ミリQ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, エムエス機器株式会社）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, ギルソン社など） 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ッシュ（2105-841, ワットマン） 卓上小型遠心機（マイクロシックスMS-1, アズワン社など） マイクロピペットP-1000, P-200, P-100, P-20, P-2（ピペットマン, ギルソン社など） 試薬キット解凍用バット（W373×D273×H63程度の大きさ）（PB-2,アズワンなど） ゴム手袋（パウダーフリー）</p>	<p><b>シークエンスに必要な実験器具と試薬・消耗品（例）</b></p> <p>77</p> <p>MiSeq（<a href="#">イルミナ社</a> <a href="#">イルミナ</a>） MiSeq Reagent Kit v2 (300サイクル)（MS-102-2002, <a href="#">イルミナ社</a> <a href="#">イルミナ</a>）：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、<a href="#">必要なリード数に応じて</a> MiSeq Reagent Micro Kit v2 (MS-103-1002；総リード数約400万本）<a href="#">あるいは</a> 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整する） PhiX Control v3 (FC-110-3001, <a href="#">イルミナ社</a> <a href="#">イルミナ</a>） 99.5% 分子生物学用グレードエタノール（<a href="#">富士フィルム</a> <a href="#">和光純業工業</a>） <del>DNase/RNaseフリー水</del> <a href="#">ミリQ水</a> 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 <del>株式会社</del>）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, <del>ギルソン社など</del> <a href="#">ギルソン</a>） 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ッシュ（2105-841, ワットマン） 卓上小型遠心機（マイクロシックスMS-1, <del>アズワン社など</del> <a href="#">アズワン</a>） <del>マイタロピペットP-1000, P-200, P-100, P-20, P-2（ピペットマン, ギルソン社など）</del> 試薬キット解凍用バット（W373×D273×H63程度の大きさ）（PB-2、<a href="#">アズワン</a>など） <del>ゴム</del><a href="#">使い捨て</a>手袋（パウダーフリー）</p>	<p><b>シークエンスに必要な実験器具と試薬・消耗品（例）</b></p> <p>83</p> <p>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整する） 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業） 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ッシュ（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）</p>	<p><b>シークエンスに必要な実験器具と試薬・消耗品（例）</b></p> <p>85</p> <p>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整する） 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業） 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ッシュ（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）</p>	
<p><b>5-2-3-1. MiSeqのメンテナンス</b></p> <p>78</p> <p>MiSeq内部には、シークエンス反応が行われるフローセルにライブラリーや試薬を送るチューブが縦横に張り巡らされている。これらチューブの流路を、前回ランの影響が残らないようにきれいに保つことがランを成功に導く大きな要因の一つになる。</p>	<p><b>5-2-3-1. MiSeqのメンテナンス</b></p> <p>78</p> <p>MiSeq内部には、<del>シークエンス反応が行われるフローセルにライブラリーや試薬を送るチューブが縦横に張り巡らされている。</del>これらチューブの流路を、<del>前回ランの影響が残らないようにきれいに保つことがランを成功に導く大きな要因の一つになる。</del></p>	<p><b>5-2-3-1. MiSeqのメンテナンス</b></p> <p>84</p> <p>MiSeq内部には、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。</p>	<p><b>5-2-3-1. MiSeqのメンテナンス</b></p> <p>86</p> <p>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。</p>	



Ver. 2.2（2020年4月3日発行）	変更箇所	Ver. 3.01（2025年6月16日発行）	変更箇所	Ver. 3.1（2026年5月1日発行）
<p style="text-align: right;">ページ</p> <p>9) ウォッシュ液の交換：メンテナンスウォッシュカスタンバイウォッシュの場合、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ミリQ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。</p> <p>10) ウォッシュの終了：メンテナンスウォッシュカ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。</p> <p><b>次亜塩素酸を用いたウォッシュ</b></p> <p>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番ポートに次亜塩素酸溶液用専用チューブ（図5-2-3-1-15；MS-102-9999 MiSeq Disposable Wash Tubes）を入れ（図5-2-3-1-16）、その中に0.01%に調整した次亜塩素酸溶液を1mL注ぐ。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。</p> <p>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右下に現れるのでチェックを入れる。</p> <p>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。</p> <p><b>ラン終了後のポストランウォッシュ</b></p> <p>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。</p> <p><b>MiSeq本体の起動法</b></p> <p>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、ランを開始するたびにMiSeq本体を再起動することを勧める。</p>	<p>9) ウォッシュ液の交換：メンテナンスウォッシュカスタンバイウォッシュの場合、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 ミリQ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。</p> <p>10) ウォッシュの終了：メンテナンスウォッシュカ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。</p> <p><b>次亜塩素酸を用いたウォッシュ</b></p> <p>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<b>次亜塩素酸溶液用専用チューブ（図5-2-3-1-15、MS-102-9999、0.01%に調整した次亜塩素酸溶液を1mL入れたMiSeq Disposable Wash Tubes）を入れ差し込む</b>（図5-2-3-1-15、16）<b>←その中に0.01%に調整した次亜塩素酸溶液を1mL注ぐ</b>。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。</p> <p>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右下に現れるのでチェックを入れる。</p> <p>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。</p> <p><b>ラン終了後のポストランウォッシュ</b></p> <p>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。</p> <p><b>MiSeq本体の起動法</b></p> <p>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、<b>ランを開始するたびにラン前のウォッシュがすべて終了したところで</b>MiSeq本体を再起動することを勧める。</p>	<p style="text-align: right;">ページ</p> <p>9) ウォッシュ液の交換：メンテナンスウォッシュカスタンバイウォッシュの場合、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。</p> <p>10) ウォッシュの終了：メンテナンスウォッシュカ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。</p> <p><b>次亜塩素酸を用いたウォッシュ</b></p> <p>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。</p> <p>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右下に現れるのでチェックを入れる。</p> <p>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。</p> <p><b>ラン終了後のポストランウォッシュ</b></p> <p>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。</p> <p><b>MiSeq本体の起動法</b></p> <p>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、ラン前のウォ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。</p>	<p style="text-align: right;">ページ</p> <p>9) ウォッシュ液の交換：メンテナンスウォッシュカスタンバイウォッシュの場合、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。</p> <p>10) ウォッシュの終了：メンテナンスウォッシュカ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。</p> <p><b>次亜塩素酸を用いたウォッシュ</b></p> <p>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。</p> <p>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右下に現れるのでチェックを入れる。</p> <p>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。</p> <p><b>ラン終了後のポストランウォッシュ</b></p> <p>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。</p> <p><b>MiSeq本体の起動法</b></p> <p>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、ラン前のウォ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。</p>	<p style="text-align: right;">ページ</p> <p>9) ウォッシュ液の交換：メンテナンスウォッシュカスタンバイウォッシュの場合、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。</p> <p>10) ウォッシュの終了：メンテナンスウォッシュカ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。</p> <p><b>次亜塩素酸を用いたウォッシュ</b></p> <p>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。</p> <p>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右下に現れるのでチェックを入れる。</p> <p>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。</p> <p><b>ラン終了後のポストランウォッシュ</b></p> <p>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。</p> <p><b>MiSeq本体の起動法</b></p> <p>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、ラン前のウォ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。</p>
<p><b>5-2-3-2. シークエンスの下準備</b></p> <p>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。他の実験（とくにPCR）とは異なりこの段階でのコンタミの恐れは低いが、実験中は必ずゴム手袋を着用して事前にビベットやチューブ類は殺菌灯式電気消毒器で20分程度照射し除染しておく。</p> <p>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HT1バッファのチューブを入れ、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）。そのまま約1時間脱イオン水を静かに注ぐ（図5-2-3-2-1）。そのまま約1時間脱イオン水に漬けたまま静置し、キット内部の試薬を十分に解凍する。</p> <p>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。毎ランごとに2N NaOH溶液（ストック可）からDNase/RNaseフリー水 ミリQ水を用いて希釈し、新鮮な0.2N NaOH溶液を調整調整すること重要。使用する量は微量なので、1.5mLチューブに1mL調整すれば、希釈時の誤差も小さく十分量が得られる。調整した0.2N NaOH溶液は使用するまで冷蔵庫に保存する。</p> <p>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-XXXXXX-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で編集可能。したがって、ベースとなるファイルは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。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。</p>	<p>81</p> <p><b>5-2-3-2. シークエンスの下準備</b></p> <p>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。<b>他の実験（とくにPCR）とは異なりこの段階でのコンタミの恐れは低いが、実験中は必ずゴム手袋を着用して事前にビベットやチューブ類は殺菌灯式電気消毒器で20分程度照射し除染しておく常に実験用の使い捨て手袋を着用して作業する。</b></p> <p>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HT1バッファ 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）。そのまま約1時間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℃に入れて一晚解凍してもよい。4℃では最長1週間、試薬を安定に保存できる。</p> <p>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 ミリQ水を用いて希釈し、新鮮な0.2N NaOH溶液を調整調整すること重要。使用する量は微量なので、1.5mLチューブに1mL調整すれば、希釈時の誤差も小さく十分量が得られる。調整した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。</p> <p>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-XXXXXX-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は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。</p>	<p>87</p> <p><b>5-2-3-2. シークエンスの下準備</b></p> <p>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。</p> <p>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℃に入れて一晚解凍してもよい。4℃では最長1週間、試薬を安定に保存できる。</p> <p>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溶液を調整する。使用する量は微量なので、1.5mLチューブに1mL調整すれば、希釈時の誤差も小さく十分量が得られる。調整した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。</p> <p>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-XXXXXX-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は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。</p>	<p>89</p> <p><b>5-2-3-2. シークエンスの下準備</b></p> <p>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。</p> <p>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℃に入れて一晚解凍してもよい。4℃では最長1週間、試薬を安定に保存できる。</p> <p>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溶液を調整する。使用する量は微量なので、1.5mLチューブに1mL調整すれば、希釈時の誤差も小さく十分量が得られる。調整した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。</p> <p>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-XXXXXX-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は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。</p>	
<p><b>5-2-3-3. ライブラリー濃度の最終調整</b></p> <p>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が形成され、同時にクラスタ間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。</p>	<p>82</p> <p><b>5-2-3-3. ライブラリー濃度の最終調整</b></p> <p>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が形成され、同時にクラスタ間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。</p>	<p>88</p> <p><b>5-2-3-3. ライブラリー濃度の最終調整</b></p> <p>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が形成され、同時にクラスタ間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。</p>	<p>90</p> <p><b>5-2-3-3. ライブラリー濃度の最終調整</b></p> <p>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が形成され、同時にクラスタ間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。</p>	

Ver. 2.2（2020年4月3日発行）	変更箇所	Ver. 3.01（2025年6月16日発行）	変更箇所	Ver. 3.1（2026年5月1日発行）
<p style="text-align: right;">ページ</p> <p>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ことと良い。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）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ーは平均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α*10<sup>6</sup>/372*660の計算式で求めることができる。</p> <p>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入れてビベットで混合する。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。</p> <p>3) 20pMへの調整：変性したDNAにHT1バッファーを990μLに加え、20pMに調整する（100倍希釈）。</p> <p>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<sup>2</sup>のクラスター密度が得られ、メーカーのスペックには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、ライブラリーを360μLにHT1バッファーを240μL加えればよい。ライブラリーが低品質の場合（本来の長さである370bp付近よりも短いDNAが混ざっている場合）、最終濃度を12pMに調整するとオーバークラスターとなりランを失敗するので注意すること。</p> <p>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、塩基バランスが良いPhiXをスパイクインとして10-25%入れる。イルミナ社から販売されているPhiX control v3は10nMに調整済みのバクテリオファージに由来する既知配列に基づくライブラリーである。これをサンプルDNAと同様に0.2N NaOHで変性し、HT1バッファーで20pMに調整する。その後、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、HT1バッファーを24μL加える。</p> <p>以上の操作で、12pMに調整されたライブラリー600μLができた。後は、調整済みライブラリーを試薬カートリッジに注入し、ランを開始するにあたっての最終操作を行えばよい。</p> <p><b>5-2-3-4. シークエンス開始前後の操作</b></p> <p>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。</p> <p>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10回程度転倒攪拌し、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）。</p> <p>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。</p> <p>3) 1200μLまたは1000μLのピペットチップをつかって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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p>	<p>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ことと良い。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<b>サンプル毎の取得希望リード数の割り当て</b>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ーは平均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α*10<sup>6</sup>/372*660の計算式で求めることができる。</p> <p>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入れてビベットで混合する。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。</p> <p>3) 20pMへの調整：変性したDNAに<b>HT1バッファー</b>に<b>HyB Buffer</b>を990μLに加え、20pMに調整する（100倍希釈）。</p> <p>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<sup>2</sup>のクラスター密度が得られ、メーカーのスペックには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、<b>360μLのライブラリーを360μL溶液にHT1HyB</b>バッファーを240μL<b>加えればよい。ライブラリーが低品質の場合（本来の長さである370bp付近に加える。なお、クラスター密度をより短いDNAが混ざっている場合）、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12pMに調整するとオーバークラスターとなりランを失敗するので注意すること。</b></p> <p>5) hiX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、<b>塩基バランスが良いPhiXをスパイクインとして10-25%入れる</b>。イルミナ社から販売されているPhiX control v3は<b>10nMに調整済みのバクテリオファージに由来する既知配列に基づくライブラリーである。をスパイクインとして10-25%入れる</b>。これをサンプルDNAと同様に0.2N NaOHで変性し、<b>HT1バッファー</b>に<b>HyB Buffer</b>で20pMに調整する。<b>その後、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、HT1バッファー</b>に<b>HyB Buffer</b>を24μL加える。<b>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。</b></p> <p>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。<b>後は調整済みライブラリーので、これを試薬カートリッジに注入し、ランを開始するにあたってその最終操作を行えばよいMiSeqにロードする。</b></p>	<p style="text-align: right;">ページ</p> <p>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こととよい。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ーは平均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α*10<sup>6</sup>/372*660の計算式で求めることができる。</p> <p>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入れてビベットで混合する。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。</p> <p>3) 20pMへの調整：変性したDNAにHyB Bufferを990μLに加え、20pMに調整する（100倍希釈）。</p> <p>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<sup>2</sup>のクラスター密度が得られ、メーカーのスペックには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。</p> <p>4) 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。</p> <p>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。</p> <p><b>5-2-3-4. シークエンス開始前後の操作</b></p> <p>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。</p> <p>常に実験用の使い捨て手袋を着用して作業する。</p> <p>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回程度転倒攪拌し、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）。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p>	<p style="text-align: right;">ページ</p> <p>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こととよい。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ーは平均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α*10<sup>6</sup>/372*660の計算式で求めることができる。</p> <p>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入れてビベットで混合する。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。</p> <p>3) 20pMへの調整：変性したDNAにHyB Bufferを990μLに加え、20pMに調整する（100倍希釈）。</p> <p>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<sup>2</sup>のクラスター密度が得られ、メーカーのスペックには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。</p> <p>4) 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。</p> <p>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。</p>	<p style="text-align: right;">ページ</p> <p>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こととよい。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ーは平均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α*10<sup>6</sup>/372*660の計算式で求めることができる。</p> <p>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入れてビベットで混合する。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。</p> <p>3) 20pMへの調整：変性したDNAにHyB Bufferを990μLに加え、20pMに調整する（100倍希釈）。</p> <p>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<sup>2</sup>のクラスター密度が得られ、メーカーのスペックには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。</p> <p>4) 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。</p> <p>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。</p>
	83		89	91

Ver. 2.2（2020年4月3日発行）	変更箇所	Ver. 3.01（2025年6月16日発行）	変更箇所	Ver. 3.1（2026年5月1日発行）
<p style="text-align: right;">ページ</p> <p>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おり、MiSeqにセットする前にそのバッファーを完全に洗い流す必要がある。この洗浄が十分でない、残存したバッファーがシークエンス中にフローセル上に析出し、データが読み取れなくなる恐れがある。洗浄にあたってはゴム手袋を着用し、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ミリQ水でよくリンスする。とくに、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asket（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。</p> <p>8) レンズクリーニングティッシュに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て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ッシュで軽く磨く。フローセルのプラスチック部分にある2穴のガasketポートには触れないように注意すること。</p> <p>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で拭き取る。</p> <p>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。</p> <p>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開め、Nextボタンを押す。</p> <p>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ウキャップを開ける。</p> <p>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必ず引き下げること。 <b>注意：</b>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いますので注意すること。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ふ。</p> <p>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。</p> <p>15) 試薬チャラーのドアを開け、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こと。</p> <p>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ャラーに挿入する。最後まで押し込まないと試薬チャラーのドアが閉まらないので注意すること。</p> <p>17) 試薬チャラーのドアを開める。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。</p> <p>18) ここまで操作が順調に進むと、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。</p> <p>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。ランを開始しよければボタンを押す。</p> <p>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。</p>		<p style="text-align: right;">ページ</p> <p>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asket（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。</p> <p>8) レンズクリーニングティッシュに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て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ッシュで軽く磨く。フローセルのプラスチック部分にある2穴のガasketポートには触れないように注意すること。</p> <p>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で拭き取る。</p> <p>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。</p> <p>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開め、Nextボタンを押す。</p> <p>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ウキャップを開ける。</p> <p>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必ず引き下げること。 <b>注意：</b>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いますので注意すること。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ふ。</p> <p>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。</p> <p>15) 試薬チャラーのドアを開け、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こと。</p> <p>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ャラーの奥まで確実に挿入する。<b>最後まで押し込まないと試薬チャラーのドアが閉まらないので注意すること。</b></p> <p>17) 試薬チャラーのドアを開める。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。</p> <p>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。</p> <p>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。ランを開始しよければボタンを押す。</p> <p>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。</p>		<p style="text-align: right;">ページ</p> <p>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asket（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。</p> <p>8) レンズクリーニングティッシュに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て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ッシュで軽く磨く。フローセルのプラスチック部分にある2穴のガasketポートには触れないように注意すること。</p> <p>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で拭き取る。</p> <p>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。</p> <p>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開め、Nextボタンを押す。</p> <p>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ウキャップを開ける。</p> <p>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こと。 <b>注意：</b>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いますので注意すること。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ふ。</p> <p>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。</p> <p>15) 試薬チャラーのドアを開け、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こと。</p> <p>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ャラーの奥まで確実に挿入する。</p> <p>17) 試薬チャラーのドアを開める。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。</p> <p>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。</p> <p>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。ランを開始しよければボタンを押す。</p> <p>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。</p>

Ver. 2.2 (2020年4月3日発行)	変更箇所	Ver. 3.01 (2025年6月16日発行)	変更箇所	Ver. 3.1 (2026年5月1日発行)
ページ	新規追加	<p data-bbox="1626 180 1688 201">ページ</p> <p data-bbox="1113 212 1688 260"><b>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</b> 111</p> <p data-bbox="1113 285 1688 422">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。</p> <p data-bbox="1113 422 1688 470"><b>5-2-4-1. MiFishパイプライン</b></p> <p data-bbox="1113 470 1688 506"><b>FASTQファイルの準備</b> 111</p> <p data-bbox="1113 516 1688 758">5-2-3. (MiSeqを用いた超並列シーケンズ) 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</p> <p data-bbox="1113 800 1688 827"><b>単一サンプルデータの解析手順</b> 111</p> <p data-bbox="1113 827 1688 915">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も実施できる。</p> <ol data-bbox="1113 936 1688 1545" style="list-style-type: none"> <li>1) ウェブブラウザでMiFish pipeline web platform (<a href="http://mitofish.aori.u-tokyo.ac.jp/mifish/">http://mitofish.aori.u-tokyo.ac.jp/mifish/</a>) にアクセスする。</li> <li>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)。</li> <li>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)。</li> <li>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)。</li> <li>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)       <ol data-bbox="1172 1251 1688 1356" style="list-style-type: none"> <li>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。</li> <li>b) Filter reads by length: デフォルト値はMiFishプライマーに適している。</li> <li>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。</li> </ol> </li> <li>6) "Run"ボタンをクリックする。ウェブブラウザ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。</li> </ol> <p data-bbox="1113 1566 1688 1614"><b>注意:</b> 結果ページはMiFishサーバに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。</p> <p data-bbox="1113 1635 1688 1663"><b>結果の見方</b> 112</p> <p data-bbox="1113 1663 1688 1711">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。</p> <ol data-bbox="1113 1732 1688 1940" style="list-style-type: none"> <li>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赤ボタンをクリックするとエクスポートできる。:       <ol data-bbox="1172 1795 1688 1940" style="list-style-type: none"> <li>a) 生リード</li> <li>b) 高品質リード</li> <li>c) マージリード</li> <li>d) "N"塩基を含まない非曖昧リード</li> <li>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)</li> <li>f) ユニークリード</li> </ol> </li> </ol>	<p data-bbox="1703 180 2178 201">ページ</p> <p data-bbox="1703 212 2178 260"><b>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</b> 114</p> <p data-bbox="1703 285 2178 422">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。</p> <p data-bbox="1703 422 2178 470"><b>5-2-4-1. MiFishMitoNGSパイプライン</b></p> <p data-bbox="1703 470 2178 506"><b>FASTQファイルの準備</b> 114</p> <p data-bbox="1703 516 2178 758">5-2-3. (MiSeqを用いた超並列シーケンズ) 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</p> <p data-bbox="1703 800 2178 827"><b>単一サンプルデータの解析手順</b> 114</p> <p data-bbox="1703 827 2178 915">FASTQファイルの解析には、ここではオンラインのMiFishMitoNGS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も実施できる。</p> <ol data-bbox="1703 936 2178 1545" style="list-style-type: none"> <li>1) ウェブブラウザでMiFish pipeline web platform (<a href="http://mitofish.aori.u-tokyo.ac.jp/mifish/">http://mitofish.aori.u-tokyo.ac.jp/mifish/</a>) にアクセスする。</li> <li>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)。</li> <li>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)。</li> <li>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)。</li> <li>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)       <ol data-bbox="1762 1251 2178 1356" style="list-style-type: none"> <li>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。</li> <li>b) Filter reads by length: デフォルト値はMiFishプライマーに適している。</li> <li>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。</li> </ol> </li> <li>6) "Run"ボタンをクリックする。ウェブブラウザ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。</li> </ol> <p data-bbox="1703 1566 2178 1614"><b>注意:</b> 結果ページはMiFishサーバに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。</p> <p data-bbox="1703 1635 2178 1663"><b>結果の見方</b> 112</p> <p data-bbox="1703 1663 2178 1711">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。</p> <ol data-bbox="1703 1732 2178 1940" style="list-style-type: none"> <li>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赤ボタンをクリックするとエクスポートできる。:       <ol data-bbox="1762 1795 2178 1940" style="list-style-type: none"> <li>a) 生リード</li> <li>b) 高品質リード</li> <li>c) マージリード</li> <li>d) "N"塩基を含まない非曖昧リード</li> <li>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)</li> <li>f) ユニークリード</li> </ol> </li> </ol>	<p data-bbox="2709 180 2772 201">ページ</p> <p data-bbox="2193 212 2772 260"><b>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</b> 114</p> <p data-bbox="2193 285 2772 422">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。</p> <p data-bbox="2193 422 2772 470"><b>5-2-4-1. MiFishパイプライン</b></p> <p data-bbox="2193 470 2772 506"><b>FASTQファイルの準備</b> 114</p> <p data-bbox="2193 516 2772 758">5-2-3. (MiSeqを用いた超並列シーケンズ) 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</p> <p data-bbox="2193 800 2772 827"><b>単一サンプルデータの解析手順</b> 114</p> <p data-bbox="2193 827 2772 915">FASTQファイルの解析には、ここではオンラインのMitoNGS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も実施できる。</p>

Ver. 2.2 (2020年4月3日発行)	変更箇所	Ver. 3.01 (2025年6月16日発行)	変更箇所	Ver. 3.1 (2026年5月1日発行)
<p>ページ</p>	<p>新規追加</p>	<p>ページ</p> <p>g) デノイズされたハプロイド配列 h) 同定された魚種</p> <p><b>注意</b>：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。</p> <p>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)：</p> <p>a) FishBase (<a href="https://www.fishbase.se/search.php">https://www.fishbase.se/search.php</a>) 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 (<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy</a>) 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。</p> <p>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。</p> <p><b>注意</b>：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。</p> <p>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(リードアブundance)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。</p> <p>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。</p> <p><b>複数サンプル(グループ) データの解析手順</b></p> <p>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。</p> <p><b>結果の見方</b></p> <p>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。</p> <p><b>注意1</b>：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。</p> <p><b>注意2</b>：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。</p>	<p>ページ</p> <p><del>g) デノイズされたハプロイド配列 h) 同定された魚種</del></p> <p><del><b>注意</b>：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。</del></p> <p><del>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)：</del></p> <p><del>a) FishBase (<a href="https://www.fishbase.se/search.php">https://www.fishbase.se/search.php</a>) 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 (<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy</a>) 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。</del></p> <p><del>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。</del></p> <p><del><b>注意</b>：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。</del></p> <p><del>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(リードアブundance)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。</del></p> <p><del>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。</del></p> <p>114 <b>複数サンプル(グループ) データの解析手順</b></p> <p><del>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。</del></p> <p>114 <b>結果の見方</b></p> <p><del>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。</del></p> <p><del><b>注意1</b>：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。</del></p> <p><del><b>注意2</b>：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。</del></p> <p><del>単一サンプルデータの解析手順</del> <del>FASTQファイルの解析には、ここではオンラインのMitoNGS/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も実施できる。</del> <del>1) ウェブブラウザで MitoNGS pipeline web platform (<a href="https://mitofish.aori.u-tokyo.ac.jp/mito-ngs">https://mitofish.aori.u-tokyo.ac.jp/mito-ngs</a>) にアクセスし、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)。圧縮ファイル(拡張子.gz、.bz2)のみに対応している。ファイルサイズ最大500Mbのファイルを最大20個まで登録可能(図5-2-4-1-1)。</del> <del>2) アップロードするファイルが正しく認識されたことを確認し、NEXTボタンを押す(図5-2-4-1-2)。</del></p> <p>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MitoNGS/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も実施できる。 1) ウェブブラウザで MitoNGS pipeline web platform (<a href="https://mitofish.aori.u-tokyo.ac.jp/mito-ngs">https://mitofish.aori.u-tokyo.ac.jp/mito-ngs</a>) にアクセスし、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)。圧縮ファイル(拡張子.gz、.bz2)のみに対応している。ファイルサイズ最大500Mbのファイルを最大20個まで登録可能(図5-2-4-1-1)。 2) アップロードするファイルが正しく認識されたことを確認し、NEXTボタンを押す(図5-2-4-1-2)。</p>	<p>ページ</p>

Ver. 2.2 (2020年4月3日発行)	変更箇所	Ver. 3.01 (2025年6月16日発行)	変更箇所	Ver. 3.1 (2026年5月1日発行)
<p>ページ</p>	<p>新規追加</p>	<p>ページ</p> <p>114</p> <p>Q &amp; A</p> <p>Q：参照データベースとは何ですか？</p> <p>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。</p> <p>Q：Runボタンを押した後はどうなりますか？</p> <p>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：<a href="http://mitofish.aori.u-tokyo.ac.jp/mifish/help/">http://mitofish.aori.u-tokyo.ac.jp/mifish/help/</a></p> <p>Q：フィルタリングとは何ですか？（図5-2-4-1-5）</p> <p>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。</p> <p>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</p> <p>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</p> <p>c) 異常な長さを持つオフターゲットアンプリコン</p> <p>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。</p> <p>Q：デノイズ（ノイズ除去）とは何ですか？（図5-2-4-1-5）</p> <p>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。</p> <p>Q：アルファ多様性とは何ですか？（図5-2-4-1-14）</p> <p>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ブソン指数）など、様々な指標が用いられます。</p> <p>Q：ベータ多様性とは何ですか？（図5-2-4-1-15）</p> <p>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。</p> <p>5-2-4-2. Claident</p> <p>5-2-4-2-1. はじめに</p> <p>120</p> <p>120</p>	<p>3)ベアエンドで解析したいFASTQファイルが正しい組合せで認識されているかを確認する。この段階で、読み込んだファイルの一部もしくは全ての削除が可能。コントロールサンプルの設定も可能（図5-2-4-1-3）。</p> <p>4) パラメータを表示・調整する。プライマーは、FASTQファイル単位で指定が可能。Locationの設定は任意。デフォルト設定はほとんどの場合に適用しており、通常は変更する必要はない。最高の検出感度を求める場合は、ASVのthresholdを0%に設定が可能。登録後、当該分析のID番号が付与される（図5-2-4-1-4）。</p> <p>5) 解析が終了すると、結果へのリンクが表示され、このリンクからこのタスク専用の別タブ（結果ページ）が起動する（図5-2-4-1-5）。</p> <p>注意：結果ページはMitoNGSサーバーに90日間保存される。</p> <p>結果の見方</p> <p>結果ページでは、同定された種的全リストと、それぞれの詳細な情報入手できる。</p> <p>1) ASV配列データおよびASVテーブルのダウンロード（図5-2-4-1-6）。</p> <p>2) MiFishにより同定された種リストと、MiFishにより特定された上位分類群のリスト。ダウンロードボタンによりCSVデータ入手できる（図5-2-4-1-6）。</p> <p>3) 同定された種より詳細な情報、当該配列が報告されている地点情報、アクセッション番号等。種名をクリックすると表示される（図5-2-4-1-8）。</p> <p>4) 他のデータベースで同定された分類群（魚類以外など）および特定されなかった配列情報（図5-2-4-1-9）</p> <p>Q &amp; A</p> <p>Q：参照データベースとは何ですか？</p> <p>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。MiFishMitoNGS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。</p> <p>Q：RunSubmitボタンを押した後はどうなりますか？</p> <p>A：RunSubmit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：<a href="http://mitofish.aori.u-tokyo.ac.jp/mifish/help/">http://mitofish.aori.u-tokyo.ac.jp/mifish/help/</a></p> <p>Q：フィルタリングとは何ですか？（図5-2-4-1-5）</p> <p>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。</p> <p>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</p> <p>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</p> <p>c) 異常な長さを持つオフターゲットアンプリコン</p> <p>MitoNGS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。</p> <p>Q：デノイズ（ノイズ除去）とは何ですか？（図5-2-4-1-5）</p> <p>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。</p> <p>Q：アルファ多様性とは何ですか？（図5-2-4-1-14）</p> <p>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ブソン指数）など、様々な指標が用いられます。</p> <p>Q：ベータ多様性とは何ですか？（図5-2-4-1-15）</p> <p>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。</p> <p>Q：MiFish Pipeline とMitoNGSの違いはですか？</p> <p>A：従来の「MiFish Pipeline」はMiFishプライマー専用設計でしたが、対象をMiFish以外にも拡充したことに合わせて名称を変更したものがMitoNGSとなります。新しい「MitoNGS」パイプラインはより柔軟で、18S rRNA遺伝子や内部転写子や内部転写スベアサー(ITS)のような核DNA配列ではなく、ミトコンドリアDNA配列であれば、あらゆるプライマーやシーケンスデータを扱うよう設計されています。詳しくは、下記URLをご覧ください。<a href="https://mitofish.aori.u-tokyo.ac.jp/mito-ngs/help/">https://mitofish.aori.u-tokyo.ac.jp/mito-ngs/help/</a></p> <p>5-2-4-2. Claident</p> <p>5-2-4-2-1. はじめに</p> <p>121</p> <p>121</p>	<p>ページ</p> <p>3)ベアエンドで解析したいFASTQファイルが正しい組合せで認識されているかを確認する。この段階で、読み込んだファイルの一部もしくは全ての削除が可能。コントロールサンプルの設定も可能（図5-2-4-1-3）。</p> <p>4) パラメータを表示・調整する。プライマーは、FASTQファイル単位で指定が可能。Locationの設定は任意。デフォルト設定はほとんどの場合に適用しており、通常は変更する必要はない。最高の検出感度を求める場合は、ASVのthresholdを0%に設定が可能。登録後、当該分析のID番号が付与される（図5-2-4-1-4）。</p> <p>5) 解析が終了すると、結果へのリンクが表示され、このリンクからこのタスク専用の別タブ（結果ページ）が起動する（図5-2-4-1-5）。</p> <p>注意：結果ページはMitoNGSサーバーに90日間保存される。</p> <p>結果の見方</p> <p>結果ページでは、同定された種的全リストと、それぞれの詳細な情報入手できる。</p> <p>1) ASV配列データおよびASVテーブルのダウンロード（図5-2-4-1-6）。</p> <p>2) MiFishにより同定された種リストと、MiFishにより特定された上位分類群のリスト。ダウンロードボタンによりCSVデータ入手できる（図5-2-4-1-6）。</p> <p>3) 同定された種より詳細な情報、当該配列が報告されている地点情報、アクセッション番号等。種名をクリックすると表示される（図5-2-4-1-8）。</p> <p>4) 他のデータベースで同定された分類群（魚類以外など）および特定されなかった配列情報（図5-2-4-1-9）</p> <p>Q &amp; A</p> <p>Q：参照データベースとは何ですか？</p> <p>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。MitoNGS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。</p> <p>Q：Submitボタンを押した後はどうなりますか？</p> <p>A：Submit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：<a href="https://mitofish.aori.u-tokyo.ac.jp/mito-ngs/help/">https://mitofish.aori.u-tokyo.ac.jp/mito-ngs/help/</a></p> <p>Q：フィルタリングとは何ですか？</p> <p>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。</p> <p>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</p> <p>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</p> <p>c) 異常な長さを持つオフターゲットアンプリコン</p> <p>MitoNGS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。</p> <p>Q：デノイズ（ノイズ除去）とは何ですか？（図5-2-4-1-5）</p> <p>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。</p> <p>Q：MiFish Pipeline とMitoNGSの違いはですか？</p> <p>A：従来の「MiFish Pipeline」はMiFishプライマー専用設計でしたが、対象をMiFish以外にも拡充したことに合わせて名称を変更したものがMitoNGSとなります。新しい「MitoNGS」パイプラインはより柔軟で、18S rRNA遺伝子や内部転写スベアサー(ITS)のような核DNA配列ではなく、ミトコンドリアDNA配列であれば、あらゆるプライマーやシーケンスデータを扱うよう設計されています。詳しくは、下記URLをご覧ください。<a href="https://mitofish.aori.u-tokyo.ac.jp/mito-ngs/help/">https://mitofish.aori.u-tokyo.ac.jp/mito-ngs/help/</a></p> <p>5-2-4-2. Claident</p> <p>5-2-4-2-1. はじめに</p> <p>121</p> <p>121</p>

Ver. 2.2 (2020年4月3日発行)	変更箇所	Ver. 3.01 (2025年6月16日発行)	変更箇所	Ver. 3.1 (2026年5月1日発行)
<p style="text-align: right;">ページ</p>	<p style="text-align: center;"><b>新規追加</b></p>	<p style="text-align: right;">ページ</p> <p>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。</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 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</li> <li>• 非定量および定量メタバーコーディングをサポート</li> <li>• より柔軟で詳細な解析に対応</li> <li>• Webサービスはなく、自前のコンピュータで解析を行う</li> <li>• 使用のための前提知識・必要な物品は多い</li> </ul> <p>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。</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <a href="https://github.com/astanabe/eDNAManual">https://github.com/astanabe/eDNAManual</a></li> </ul> <p>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。</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <a href="https://www.claident.org/">https://www.claident.org/</a></li> </ul> <p>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。</p> <p><a href="https://github.com/astanabe/eDNAManual/blob/main/metabarcodinganalysiswithClaident.pdf">https://github.com/astanabe/eDNAManual/blob/main/metabarcodinganalysiswithClaident.pdf</a></p> <p style="text-align: right;"><b>5-2-4-2-2. 動作環境</b> 120</p> <p>Claidentは、以下の環境で動作するように作成されている。</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Debian 11以降 (Windows上のWSL環境を含む)</li> <li>• Ubuntu 20.04以降 (Windows上のWSL環境を含む)</li> <li>• Linux Mint 20以降</li> <li>• RedHat Enterprise Linux 8以降</li> <li>• AlmaLinux 8以降 (Windows上のWSL環境を含む)</li> <li>• Rocky Linux 8以降</li> <li>• HomebrewをインストールしたmacOS</li> <li>• MacPortsをインストールしたmacOS</li> </ul> <p>Claident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。</p> <p><a href="https://github.com/astanabe/eDNAManual/blob/main/metabarcodinganalysiswithClaident.pdf">https://github.com/astanabe/eDNAManual/blob/main/metabarcodinganalysiswithClaident.pdf</a></p> <p style="text-align: right;"><b>5-2-4-2-3. データ解析全体の流れと前提条件</b> 121</p> <p>Claidentによるデータ解析は以下の流れになる。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. デマルチブレックス</li> <li>2. ペアエンド配列の連結</li> <li>3. 低品質配列の除去</li> <li>4. デノイジング</li> <li>5. 参照配列データベースを用いないキメラ除去</li> <li>6. 内部標準配列クラスタリング</li> <li>7. 参照配列データベースを用いたキメラ除去</li> <li>8. インデックスホッピング除去</li> <li>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</li> <li>10. 分子同定</li> <li>11. OTU組成表の作成・加工</li> <li>12. カバレッジベースレアファクション</li> <li>13. 内部標準DNAリード数を利用したDNA濃度の推定</li> </ol> <p>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。</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 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</li> <li>• 以下の方法でライブラリ調製をする</li> <li>– 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 – 1: 1st PCR, p.67)</li> </ul>	<p style="text-align: right;">ページ</p> <p>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。MiFishMitoNGSパイプラインとの違いはおおまかには以下の点になる。</p> <p><del>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</del></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 非定量および定量メタバーコーディングをサポート</li> <li>• より柔軟で詳細な解析に対応</li> <li>• Webサービスはなく、自前のコンピュータで解析を行う</li> <li>• 使用のための前提知識・必要な物品は多い</li> </ul> <p>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。</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <a href="https://github.com/astanabe/eDNAManual">https://github.com/astanabe/eDNAManual</a></li> </ul> <p>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。</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <a href="https://www.claident.org/">https://www.claident.org/</a></li> </ul> <p>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。</p> <p><a href="https://github.com/astanabe/eDNAManual/blob/main/metabarcodinganalysiswithClaident.pdf">https://github.com/astanabe/eDNAManual/blob/main/metabarcodinganalysiswithClaident.pdf</a></p> <p style="text-align: right;"><b>5-2-4-2-2. 動作環境</b> 121</p> <p>Claidentは、以下の環境で動作するように作成されている。</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Debian 11以降 (Windows上のWSL環境を含む)</li> <li>• Ubuntu 20.04以降 (Windows上のWSL環境を含む)</li> <li>• Linux Mint 20以降</li> <li>• RedHat Enterprise Linux 8以降</li> <li>• AlmaLinux 8以降 (Windows上のWSL環境を含む)</li> <li>• Rocky Linux 8以降</li> <li>• HomebrewをインストールしたmacOS</li> <li>• MacPortsをインストールしたmacOS</li> </ul> <p>Claident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。</p> <p><a href="https://github.com/astanabe/eDNAManual/blob/main/metabarcodinganalysiswithClaident.pdf">https://github.com/astanabe/eDNAManual/blob/main/metabarcodinganalysiswithClaident.pdf</a></p> <p style="text-align: right;"><b>5-2-4-2-3. データ解析全体の流れと前提条件</b> 122</p> <p>Claidentによるデータ解析は以下の流れになる。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. デマルチブレックス</li> <li>2. ペアエンド配列の連結</li> <li>3. 低品質配列の除去</li> <li>4. デノイジング</li> <li>5. 参照配列データベースを用いないキメラ除去</li> <li>6. 内部標準配列クラスタリング</li> <li>7. 参照配列データベースを用いたキメラ除去</li> <li>8. インデックスホッピング除去</li> <li>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</li> <li>10. 分子同定</li> <li>11. OTU組成表の作成・加工</li> <li>12. カバレッジベースレアファクション</li> <li>13. 内部標準DNAリード数を利用したDNA濃度の推定</li> </ol> <p>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。</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 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</li> <li>• 以下の方法でライブラリ調製をする</li> <li>– 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 – 1: 1st PCR, p.67)</li> </ul>	<p style="text-align: right;">ページ</p>

Ver. 2.2 (2020年4月3日発行)	変更箇所	Ver. 3.01 (2025年6月16日発行)	変更箇所	Ver. 3.1 (2026年5月1日発行)
<p style="text-align: right;">ページ</p>		<p style="text-align: right;">ページ</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 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- 2:2nd PCR, p.75)</li> <li>- 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</li> <li>・ 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ーで1ランまたは1レーン専有で解読する</li> <li>- 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</li> <li>- .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</li> </ul> <p>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。</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ サンプル・ブランクのいずれなのか</li> <li>・ 濾過水量</li> <li>・ 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)</li> <li>・ 内部標準DNA塩基配列</li> <li>・ 内部標準DNA濃度</li> <li>・ 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</li> <li>・ 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</li> </ul> <p>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。  <a href="https://github.com/astanabe/eDNAMANual/blob/main/metabarcodinganalysiswithClaident.pdf">https://github.com/astanabe/eDNAMANual/blob/main/metabarcodinganalysiswithClaident.pdf</a></p> <p><b>付録</b></p> <p>田辺 晶史 2024. Claident を用いた定量メタバーコーディング解析。  <a href="https://github.com/astanabe/eDNAMANual/blob/main/metabarcodinganalysiswithClaident.pdf">https://github.com/astanabe/eDNAMANual/blob/main/metabarcodinganalysiswithClaident.pdf</a> (フルバージョン)</p> <p style="text-align: right;">122</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 各サンプルの2nd PCR産物を混合してイルミナ社製<del>シーケンサ</del>シーケンサーで1ランまたは1レーン専有で解読する</li> <li>- オーバーラップのある、つまり、連結可能な<del>ペアエンドシーケンス</del>ペアエンドシーケンス</li> <li>- .bcl を含むランデータまたは<del>インデックスシーケンス分</del>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</li> </ul> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ 1st PCR時のプライマー配列のうち、<del>シーケンサ</del>シーケンスの読み始めになる部分配列</li> </ul>	<p style="text-align: right;">ページ</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 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- 2:2nd PCR, p.75)</li> <li>- 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</li> <li>・ 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ーで1ランまたは1レーン専有で解読する</li> <li>- 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</li> <li>- .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</li> </ul> <p>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。</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ サンプル・ブランクのいずれなのか</li> <li>・ 濾過水量</li> <li>・ 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)</li> <li>・ 内部標準DNA塩基配列</li> <li>・ 内部標準DNA濃度</li> <li>・ 1st PCR時のプライマー配列のうち、シーケンスの読み始めになる部分配列</li> <li>・ 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</li> </ul> <p>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。  <a href="https://github.com/astanabe/eDNAMANual/blob/main/metabarcodinganalysiswithClaident.pdf">https://github.com/astanabe/eDNAMANual/blob/main/metabarcodinganalysiswithClaident.pdf</a></p> <p><b>付録</b></p> <p>田辺 晶史 2024. Claident を用いた定量メタバーコーディング解析。  <a href="https://github.com/astanabe/eDNAMANual/blob/main/metabarcodinganalysiswithClaident.pdf">https://github.com/astanabe/eDNAMANual/blob/main/metabarcodinganalysiswithClaident.pdf</a> (フルバージョン)</p> <p style="text-align: right;">123</p>