

標準作業手順書

バイオレメディエーションにおける生態系影響評価手法

次世代シーケンサーを用いた菌叢解析

(16S rRNA 遺伝子 PCR サンプルの解析)

平成 28 年 3 月版 (Ver.0.9)

独立行政法人 製品評価技術基盤機構

バイオテクノロジーセンター

バイオレメディエーションにおける生態系影響評価手法

次世代シーケンサーを用いた菌叢解析 (16S rRNA 遺伝子 PCR サンプルの解析) 標準作業手順書

目次

序文	1
1. 適用範囲	2
2. 定義	2
3. 解析方法	3
3.1 全体概要	3
3.2 操作手順	4
3.2.1 サンプル採取と保存	4
3.2.2 DNA 抽出	4
3.2.3 アンプリコン調整	4
3.2.4 磁気ビーズ法を用いたサンプル精製	8
3.2.5 Index PCR によるライブラリーの作製	10
3.2.6 ライブラリープールの作製	14
3.2.7 シーケンシング (Illumina 社製 MiSeq シーケンスシステム)	15
3.2.8 リードトリミング	15
3.2.9 リード結合	15
3.2.10 フィルタリング・ラベリング	17
3.2.11 Taxonomy assignment	18
3.2.12 多様性解析	19
4. 評価手順および判断基準	22
5. 付録	24

序文

土壌や地下水等の環境汚染は、人の健康や生活環境への悪影響のみならず、土地のブラウンフィールド化（資産価値よりも浄化費用が上回る土地）による経済的な損失も引き起こしている。このため、浄化対策を積極的に推進するために、比較的低コストで広範囲の汚染に対応し、操業中の事業所でも実施可能な原位置処理浄化技術の一つであるバイオレメディエーションの利用が期待されている。

バイオレメディエーションの中でも、特にバイオオーグメンテーションについては、外部で分離された分解菌を環境中に導入する技術であるため、分解菌の導入が作業区域及びその周辺の生態系へ与える影響について懸念がある。そこで、バイオレメディエーションを実施する際の安全性評価及び管理手法について基本的な考え方を示した「微生物によるバイオレメディエーション利用指針」（平成 17 年 3 月 30 日、経済産業省環境省告示第 4 号）が経済産業省と環境省により合同で策定されている。本指針の解説「微生物によるバイオレメディエーション利用指針の解説」（平成 17 年 7 月、平成 24 年 3 月一部改訂、経済産業省商務情報政策局生物化学産業課、環境省水・大気環境局総務課環境管理技術室）では、バイオオーグメンテーションの利用に際し「周辺生態系への影響評価」を実施することを求めている。しかし、生態系影響評価について、作業手順は明確に記載されておらず、また、事業者にとっても経験の浅い部分でもあるため、生態系影響評価のための具体的なプロトコルの作成や公開等が求められていた。

そこで独立行政法人製品評価技術基盤機構（以下「NITE」という。）では、「土壌汚染対策のための技術開発」（平成 22 年度 NEDO 受託事業、平成 23 年度から平成 26 年度経済産業省受託事業）の一環として、次世代シーケンサーを用いた細菌の菌叢解析による生態系影響評価手法の検討を行い、その手法を作業手順書として取りまとめた。本手順書は、微生物を利用したバイオレメディエーションの普及促進を図ることを目的として、公表を行うものである。

また、本手順書は、バイオレメディエーションだけではなく、様々な分野の菌叢解析の手順書としても用いることができる。本手順書が、これから菌叢解析を始める方、菌叢解析データを利用する方の助けになることを期待する。

1. 適用範囲

本手順書は、バイオレメディエーションを実施した際の生態系への影響を評価するために、次世代シーケンサーを用いた環境中の細菌を網羅的にモニタリングする手法を示したものである。

なお、事業者は、浄化前、浄化中、浄化後における菌叢を比較することで、「微生物によるバイオレメディエーション利用指針」で求められる「作業区域における他の微生物群集への影響」を評価することができる。

2. 定義

本手順書で用いる主な用語の定義は、次による。

2.1 アンプリコン (増幅産物)

PCR で増幅された DNA のことを言い、本手順書においては、バクテリア (古細菌を含む) の 16S rRNA 遺伝子配列の種レベルで配列が異なる領域の配列を含んだ一部の配列 (プライマー部位 341b-805b の間の 約 465bp)

2.2 可変領域 (variable region)

16S rRNA 遺伝子は全ての細菌が保有する遺伝子であることから、系統学的な分類指標として一般的に使用されている。16S rRNA 遺伝子は、保存領域と可変領域が分散した構造を有しており、可変領域は9箇所 (V1~V9領域)が存在している。

2.3 OTU (operational taxonomic unit)

配列同士の類似性が一定以上である配列グループを一つの菌種のように取り扱うための操作上の分類単位のことをいう。16S rRNA 遺伝子の場合、97%以上の類似性を持つグループを一つの OTU として定義することが多い。新型シーケンサーを用いた解析では、各試料あたり数千以上の配列が得られるが、全配列を使用した解析は膨大な時間を要するため、現実的ではない。そこで、あらかじめ OTU に分類し、各 OTU から代表となる配列を一つずつ選び、その後の解析を行うことが一般的である。

2.4 多様性解析 (α 多様性・ β 多様性)

試料中に存在する細菌の種数 (種の豊富さ) を推定する解析のことをいう。1つの試料中における細菌の多様性を α 多様性、複数の試料間における種構成の類似度を β 多様性という。

2.5 UniFrac 解析

比較するサンプルの OTU 代表配列を用いて系統樹解析を行い、試料間で共有される OTU の枝長と各試料で固有な枝長の割合から、菌叢構造の違いを距離 UniFrac distance として計算する解析方法をいう。算出された UniFrac distance を用いて、主座標分析 (PCoA:Principal Coordinate Analysis)やUPGMA法によるクラスタリング解析を行うことで、試料間の相違度を視覚化することができる。また、リード数を考慮し細菌叢の構成を表す Weighted UniFrac 解析と、リード数を考慮せず細菌叢の構成メンバーを表す Unweighted

UniFrac 解析がある。

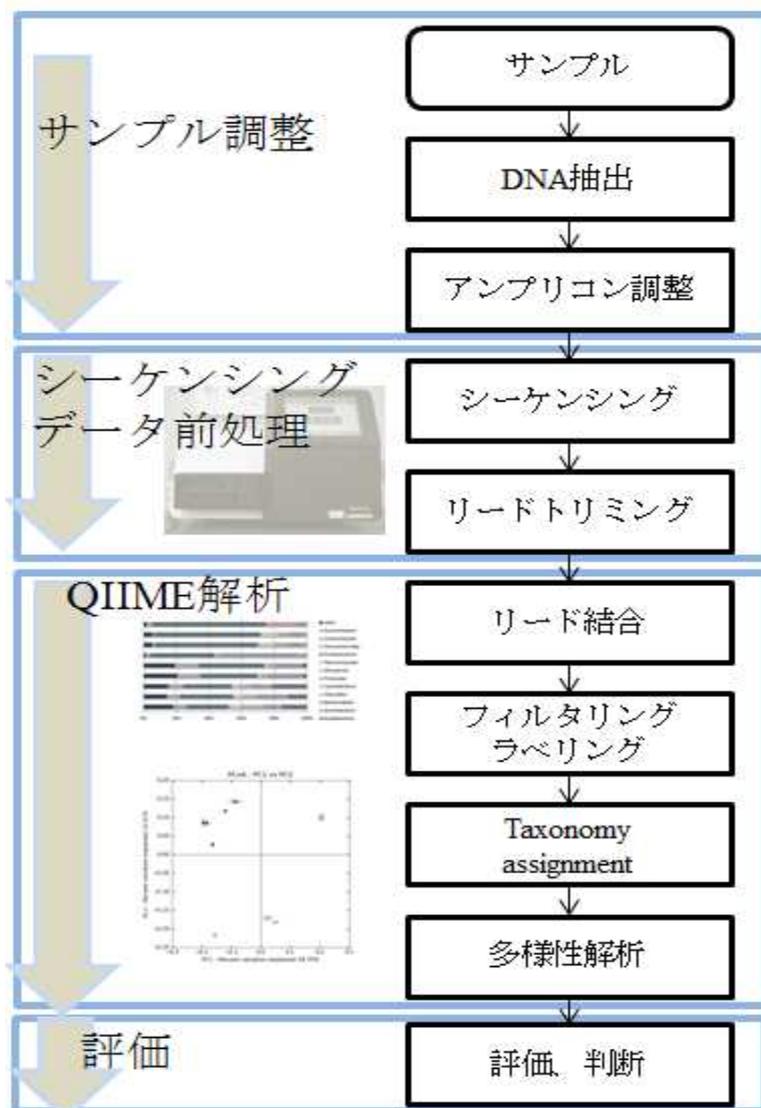
2.6 主座標分析 (PCoA)

主座標分析は、多次元尺度構成法とも呼ばれる統計解析手法の一つで、試料間の相違度を視覚的に分かりやすく付置する方法をいう。算出された UniFrac distance に基づき、試料間の相違度を2次元あるいは3次元空間配置し、菌叢の構造を考察する方法である。類似した試料同士は近く、そうでないものを遠くに配置される。

3. 解析方法

3.1 全体概要

バイオレメディエーションにおける生態系影響評価の手法は、1)サンプル調整、2)シーケンス解析及びデータ前処理、3)QIIME ソフトウェアを用いたデータ解析、4)評価の4工程から構成される。



3.2 操作手順

3.2.1 サンプル採取と保存

サンプル採取後の保存方法により菌叢が変化する可能性があるため、サンプルは採取直後に DNA を抽出するか、直ちに実験が開始できない場合は凍結し、保存する。

3.2.2 DNA 抽出

各社から様々な DNA 抽出キットが販売されており、添付のプロトコール通りの作業を行うことで、土壌や地下水から容易に DNA を抽出することができる。しかし、各キットによって抽出原理が異なるため、抽出 DNA 量や純度、シーケンス解析結果に違いが生じることが報告されている。そこで、試験を開始する前には複数のキットを用いて条件検討をあらかじめ行っておくことが望ましい。

3.2.3 アンプリコン調整

3.2.3.1 PCR 法による 16S rRNA 遺伝子配列の増幅

バクテリアの 16S rRNA 遺伝子 可変領域の V3-V4 領域を対象として設計されたプライマーセットを用いた解析を行う。このプライマーセットには Illumina Index アダプターを使用した、Index PCR に必要なオーバーハング配列を付加している。

プライマーは、オリゴ合成業者に合成依頼をする必要がある。合成時の精製グレードに関しては、脱塩カラム精製以上のグレードを推奨する。

フォワードプライマー MiSeq_Bakt_341F (52mer)

TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-NN-[CCTACGGGNGGCWGCAG]

リバースプライマー MiSeq_Bakt_805R (57mer)

GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG-NN-[GACTACHVGGGTATCTAATCC]

赤字で示しているのがオーバーハング配列、[]内が 16S rRNA 遺伝子特異的配列になる。16S rRNA 遺伝子のアンプリコンシーケンスでは、標的配列の類似性が高いためにクラスターの分離が難しい。そこで、プライマー配列に 2 塩基の N を挟むことでシーケンス時のクラスター分離能の向上を図っている。

このプライマーセットで得られる増幅産物のサイズは約 540 bp である。また、[]内の特異的配列を変更することで、16S rRNA 遺伝子配列の別領域の解析が可能である。

本手順書では、NITE で使用している試薬を一例として示した。

[準備]

試料：

環境サンプルより抽出した DNA

物品：

1.5 ml マイクロチューブ (DNase-free)

PCR8 連チューブ&キャップ (Thin Wall タイプ)
マイクロピペット 1 式
ピペットチップ (低吸着・フィルター付きを推奨)
マイクロチューブ遠心機
PCR チューブ遠心機
ボルテックス・ミキサー
PCR サーマルサイクラー
アイスボックス (氷浴)
サブマリン型電気泳動装置 (e.g. Mupid-2 plus, タカラバイオ, M-2P)
ゲルメーカートレー
ゲル撮影装置 (e.g. プリントグラフ, ATTO)
蛍光検出器 (e.g. Fluoroskan Ascent™, Thermo Scientific™)
電子レンジ
試薬:
PCR キット (e.g. TaKaRa Ex Taq® Hot Start version, タカラバイオ, RR006A)
超純水 (e.g. UltraPure™ Distilled Water, Invitrogen™, 109-77015)
TE Buffer (e.g. TE pH 8.0, ニッポンジーン, 314-90021)
16S rRNA 遺伝子増幅用プライマー
スタンダードアガロース (e.g. Agarose S, ニッポンジーン, 312-01193)
TBE Buffer (e.g. TBE Buffer Powder, タカラバイオ, T9121)
蒸留水 (ラボラトリーグレード)
Loading Dye (e.g. 6x Loading Dye, TOYOBO, RE-DYE)
DNA 分子量マーカー (e.g. Gene Ladder 100, ニッポンジーン, 316-06951)
核酸染色試薬 (e.g. GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain, 和光純薬, 518-24031)
蛍光核酸定量試薬
(e.g. Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit, Invitrogen™, P7589)

[実験手順]

3.2.3.2 サンプルの希釈

濃度測定済みの環境サンプル DNA を、5 ng/μl になるよう TE Buffer で希釈する。

*環境サンプルの DNA 濃度は、蛍光検出器と蛍光核酸定量試薬で測定することを推奨する。

*DNA 濃度が 5ng/μl 以下の場合、「1.2 PCR 条件検討」で PCR サイクルを増やすことで対応し、DNA 濃度の低いものに合わせる。

3.2.3.3 PCR 条件の検討

- (1) 必要本数分の試薬を 1.5 ml マイクロチューブに鋳型 DNA を除き、「表 1 条件検討用 PCR 組成」のとおり調製する。

表 1 条件検討用 PCR 組成

アンプリコンPCR (1st PCR)	Volume(μL)	Final Conc.
10x Ex Taq Buffer	2.5	
dNTP Mixture(2.5mM each)	2.5	250μM each
MiSeq_Bakt_341F プライマー(6μM)	1	240μM
MiSeq_Bakt_805R プライマー(6μM)	1	240μM
超純水	17.8-X[15.8]	
TaKaRa Ex Taq HS	0.2	
template DNA(5 ng/μL)	X[2]	

*16S rRNA 遺伝子の PCR ではネガティブコントロールを毎回用意し、コンタミネーションによる誤増幅がないか確認する。鋳型 DNA の代わりに超純水を用いる。

*PCR 溶液の調製は室温でも可能だが、試薬類は氷上に置いて使用する。

*溶液組成はメーカー添付の取扱説明書より一部改編している。

*1 μl 当たりの DNA 濃度が低い場合、溶液量を変えずに、PCR サイクル数を増やすことで対応する。環境サンプル（特に土壌）から抽出した DNA には PCR 阻害物質が多く存在するため、鋳型 DNA の液量を増やすと PCR 増幅を阻害することがある。

- (2) 転倒混和して溶液を攪拌し、スピンドウンする。
- (3) PCR 溶液を 23 μl ずつ PCR チューブに分注する。
- (4) 鋳型 DNA を 2 μl ずつ加え、チューブキャップをしてスピンドウンする。
- (5) PCR を行う。PCR サイクルは以下のとおり。

①	94°C, 2min	
②	98°C, 10sec	
③	55°C, 30sec	②→④ 18サイクル
④	72°C, 45sec	
⑤	12°C, Hold	

*一連の実験においては、必ず同一機種のカーマルサイクラーを使用する。

(機種が変わると増幅効率が変わることもある。)

*Ramp rate は昇温・降温共に最高値で設定

*Heat Lid は 105°C もしくは最高値に設定 (PCR サイクルの最高温度+5°C 以上に設定する)

*25 μl 系の PCR 溶液中に 10 ng 分の鋳型 DNA があると、約 18 サイクルで目的とする濃度の増幅産物が得られる場合が多い。

- (6) PCR 後、PCR チューブを取出してボルテックスし、スピンドウンする。

3.2.3.4 アガロースゲル電気泳動

(1) TBE Buffer Powder を蒸留水で希釈し、0.5x TBE Buffer を調製する。

*TAE Buffer も使用可能であるが、1000 bp 以下の二本鎖 DNA を泳動する場合、TBE Buffer を用いた方がバンドの分離が良い。

(2) 適切なサイズ（調製量の 3 倍容程度）の耐熱性ビーカーに 0.5x TBE Buffer を入れ、終濃度 2%分のアガロース粉末を加え、ラップで覆う。

(3) ラップに蒸気抜きの穴を開け、電子レンジで加熱して完全に溶解させる。

*2%アガロース溶液は溶けにくいので、時々レンジを止めて攪拌する。また、突沸が起きやすく、危険なので攪拌子を入れるなどした上で、容器を急に動かさないよう注意する。

(4) 溶解終了後、静かに攪拌して溶液を均一にして気泡を取り除く。

(5) ゲルトレーに 60°C程度まで冷ましたアガロース溶液を流し入れ、コームを挿す。

*気泡が入っていた場合には、ピペットチップなどで取り除く。

(6) ゲルが固化するまで室温で静置する。（約 20 分）

(7) 固化した後、ゲル表面に 0.5x TBE Buffer を薄く重層後、コームを外す。

*ゲルを直ぐに使用しない場合、0.5x TBE Buffer で満たした容器に入れ、冷暗所で保存する。

(8) 電極の向きに注意してゲルをセットし、泳動槽に適量の 0.5x TBE Buffer を加える。

*200 μ l のピペット等を使用して TBE Buffer でウェルを洗うと、泳動像がシャープに見える。

(9) Loading Dye は、TE Buffer で希釈をして 2x Loading Dye として調製し、各 PCR 産物 1 μ l を 2x Loading Dye 1 μ l と等量混合し、溶液全量をウェルにアプライする。

(10) ウェルに DNA 分子量マーカを加える。

*DNA Ladder マーカーの 600 bp のフラグメントが 5 ng 前後になるように希釈しておく、サンプルと比較し易い。

(11) 100 V で約 30 分間電気泳動をする。

(12) 泳動後のゲルを核酸染色液に浸す。（染色時間は染色液の濃度に依存する）

*核酸染色剤に関しては変異原性が疑われるものも多いため、取り扱いには注意する。

(13) ゲル撮影装置で泳動像を確認する。

*4 mm 幅のウェルに 1 μ l 分の PCR 産物を泳動した場合の例を「図 1 PCR 条件検討の電気泳動」で示す。

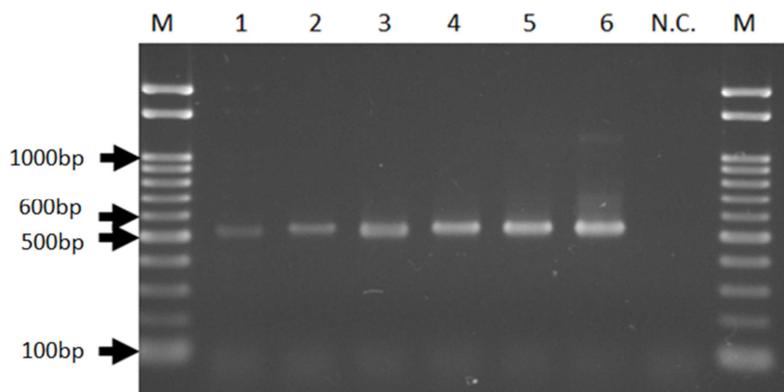


図 1 PCR 条件検討の電気泳動

表 2 PCR サイクル数と濃度

Lane	サイクル数	濃度[ng/ μ l]
Marker	-	-
1	17	3.2
2	18	5
3	19	7.5
4	20	12.4
5	21	17.9
6	22	27.6
Negative Control	22	0.8
Marker	-	-

(14) PCR 条件を決定する。

*増幅産物に非特異的増幅バンドが無く、泳動像がテーリングを起こさない程度の反応サイクル数を決める。

Lane 1 では濃度が低すぎて、精製後の濃度が不足する可能性が有る。

Lane 4 から薄くテーリングが始まり、Lane 6 では非特異的バンドも見えている。

Lane 2, Lane 3 程度のバンド濃度になるようサイクル数を調整すると良い。

3.2.3.5 サンプルの定量 (推奨オプション)

「3.2.3.4 アガロースゲル電気泳動」では、増幅産物の濃度については、数字として出てこないため、蛍光定量法での濃度測定を推奨している。蛍光検出器と試薬の使用方法に関しては各マニュアルを参照 (5. 付録「5.1 サンプルの定量機器と試薬」) する。

蛍光定量後、PCR 産物の濃度が 10 ng/μl を超えると、アガロースゲル電気泳動の結果でバンドがテーリングを起こしやすい。DNA 濃度が 4 ~10 ng/μl 程度になるよう PCR サイクル数を調整する。(「表 2 PCR サイクル数と濃度」参照)

3.2.3.6 アンプリコン PCR

- (1) 全てのサンプルで PCR サイクル条件が決まったら、1 サンプル当たり 3 連で PCR を行う。
- (2) PCR 終了後、サンプル毎に 1.5 ml マイクロチューブ 1 本に集める。
- (3) チューブに集めた後、確認のため「3.2.3.4 アガロースゲル電気泳動」、「3.2.3.5 サンプルの定量 (推奨オプション)」を行い、問題がなければ次の「3.2.4 磁気ビーズ法を用いたサンプル精製」へ進む。

3.2.4 磁気ビーズ法を用いたサンプル精製

ここでは鋳型 DNA やプライマーダイマー等を取り除くため、SPRIselect[®] kit (BECKMAN COULTER) を用いた精製を行う。精製に使用するマグネットスタンドは、強磁性・少容量サンプルに対応したものを推奨する。

[準備]

試料:

増幅後の PCR 産物

物品:

1.5ml マイクロチューブ (DNase-free)

マイクロピペット 1 式

ピペットチップ (低吸着・フィルター付きを推奨)

マイクロチューブ遠心機

ボルテックス・ミキサー

蛍光検出器 (e.g. Fluoroskan Ascent™, Thermo Scientific™)

マグネットスタンド

(e.g. NGS MagnaStand 8ch × 1.5 ml チューブ, Fast Gene, FG-SSMAG1.5)

キャピラリー電気泳動装置 (e.g. Agilent 2100 バイオアナライザ, Agilent Technologies)

試薬:

SPRIselect® kit (BECKMAN COULTER, B23317, B23318)

10 mM Tris-HCl Buffer, pH 8.5 (e.g. Buffer EB, Qiagen, 19086)

蒸留水 (ラボラトリーグレード)

無水エタノール (分子生物学グレード)

蛍光核酸定量試薬

(e.g. Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit, Invitrogen™, P7589)

キャピラリー泳動装置試薬

(e.g. High Sensitivity DNA キット, Agilent Technologies, 5067-4626)

[実験手順]

3.2.4.1 Double Size Selection (0.75x Left - 0.5x Right)

(1) ボルテックスをした後、スピンドウンした PCR 産物 (約 73 µl) に対し 0.5 倍量の SPRIselect® ビーズ (36.5 µl) を加え、完全に懸濁するまでピペッティングする。

*チューブの壁に液滴が飛ばないように注意する。

*SPRIselect ビーズは使用前に完全に懸濁して使用する。

(2) 2 分間室温で静置する。

(3) チューブをマグネットスタンドにセットし、上清が透明になるまで静置する (~5 分間)

(4) 新しい 1.5 ml マイクロチューブに 0.25 倍量の SPRIselect® ビーズ (18.3 µl) を分注しておく。

(5) (3) の上清を、ビーズを吸わないよう注意しながら 4. のチューブに加え、完全に懸濁するまでピペッティングする。上清には低分子 DNA が溶出している。

(6) 2 分間室温で静置する。

(7) チューブをマグネットスタンドにセットし、上清が透明になるまで静置する (~5 分間)

(8) ビーズを吸わないよう注意しながら上清を取り除く。

(9) 180 µl の 85% エタノールを加え 30 秒間静置する。

*ビーズに直接エタノールを掛けてビーズが崩れると、収率が低下することがある。

*ビーズ洗浄用の 85% エタノールを調製する。用時調製とし、必要分だけ作成する。

(10) エタノールを全て取り除く。

*管壁に残ったエタノールは 10 µl のピペット等で念入りに取り除く。

*チップの先端でビーズを直接崩さないよう注意する。

(11) チューブの蓋を開けたまま約3分間自然風乾する。

*ビーズを乾燥させすぎると、収量が低下するので注意する。(ビーズ表面の光沢が無くなる程度)

(12) チューブをマグネットスタンドから外し、30 µl の Tris-HCl Buffer をビーズに掛ける様に加えながら、穏やかにピペッティングで懸濁する。

*チップの先端でビーズを直接崩さないよう注意する。

(13) 2分間室温で静置する。

(14) チューブをマグネットスタンドに置き、上清が透明になるまで静置する(～3分間)

(15) 上清 28 µl を新しいマイクロチューブに移し取る。

*ビーズを吸わないようにするため、溶出液全量は取らないこと。

3.2.4.2 サンプルの定量と希釈

(1) 蛍光定量法を用いてサンプルの濃度を測定する。精製操作に問題がなければ各サンプルの濃度はおおむね 1～10 ng/µl 程度の濃度になる。

(2) 各サンプルを Tris-HCl Buffer で希釈し、1 ng/µl の希釈液を 10 µl 程度調製する。

(次の「3.2.5 Index PCR によるライブラリー作製」で使用する。)

すぐに使用しない場合は、密封して-20℃で保存可能。

3.2.4.3 マイクロキャピラリー電気泳動によるサンプル定性

精製後の PCR 産物はマイクロキャピラリー電気泳動装置で定性を行う。ここでは増幅産物のサイズ確認およびプライマーダイマー等が除去できているか確認を行う。

マイクロキャピラリー電気泳動は、サンプル数などにより機種を使い分ける。装置および試薬の使用法に関しては、各マニュアルを参照(5. 付録「5.2 マイクロキャピラリー電気泳動装置と試薬」参照)する。

*プライマーダイマー等の除去ができていない場合は、「3.2.4 磁気ビーズ法を用いたサンプル精製」または「3.2.3.5 アンプリコン PCR」からやり直す。

増幅産物のサイズに問題がなく、プライマーダイマーのピークが確認されなければ、次の「3.2.5 Index PCR によるライブラリー作製」へ進む。

3.2.5 Index PCR によるライブラリーの作製

定量・定性の終了した増幅産物に対し、Illumina シーケンサー用アダプターおよびサンプル識別用の Index 配列を付加する。

Index 配列は Nextera XT Index kit (Illumina) で 96 通り、Nextera XT Index kit v2 で 384 通りの組み合わせが有り、最大で 384 サンプルを同時にシーケンスすることが可能である。

また、サンプルが少数の場合、Index の組み合わせによってはシーケンスに悪影響を与え

る事が有るので、Illumina 社が配布している Dual Indexing Principle を参考に、使用する Index を決定する。また、Index の組み合わせが有効かどうかは、IEM (Illumina Experiment Manager) ソフトウェア上で確認することができる。

Index PCR には高正確性 PCR 酵素の使用が適している。

一例として KOD -Plus- Ver.2 (TOYOBO) を使用した方法を以下に示した。

*Index PCR 後にも磁気ビーズ法で精製を行う。96 well 対応のマグネットスタンドおよび PCR プレート遠心機があれば、Index PCR を 96 well PCR プレートで行っても良い。

[準備]

試料：

サンプル定性後の PCR 産物

物品：

1.5ml マイクロチューブ (DNase-free)

PCR8 連チューブ&キャップ (Thin Wall タイプ)

マイクロピペット 1 式

ピペットチップ (低吸着・フィルター付きを推奨)

マイクロチューブ遠心機

PCR チューブ遠心機

ボルテックス・ミキサー

PCR サーマルサイクラー

アイスボックス (氷浴)

試薬：

PCR キット (e.g. KOD -Plus- Ver.2, TOYOBO, KOD211)

超純水 (e.g. UltraPure™ Distilled Water, Invitrogen™, 109-77015)

Illumina Nextera XT Index プライマー

[実験手順]

3.2.5.1 Index PCR

- (1) 「3.2.3.2 サンプルの定量と希釈」で調整した 1 ng/μl の鋳型 DNA をボルテックス、スピンドウンする。
- (2) 必要本数分の試薬を 1.5 ml マイクロチューブに Index1 プライマーと鋳型 DNA を除き、「表 3 条件検討用 PCR 組成」のとおり調製する。

表3 条件検討用 PCR 組成

・Index PCR(2nd PCR)	Volume (μL)	final Conc.
10× Buffer for KOD -Plus- Ver.2	5	
dNTPs (2 mM each)	5	200 μM each
25 mM MgSO ₄	3	1.5 mM
Index1 (i7) N7xxプライマー (6 μM)	1.5	180 nM
Index2 (i5) S5xxプライマー (6 μM)	1.5	180 nM
KOD -Plus- (1U/μl)	1	
超純水	28	
template DNA (1 ng/μl)	5	

*PCRを開始するまで試薬の調製は氷浴上で行う。

*Ramp rateは昇温・降温共に最高値で設定*Heat Lidは105℃もしくは最高値に設定 (PCR サイクルの最高温度+5℃以上)に設定する)

- (3) PCR チューブに反応溶液を 43.5 μl ずつ分注する。
- (4) 1.5 μl の Index1 プライマーを加える。
- (5) 5 μl の鋳型 DNA を加える。
- (6) マイクロピペットで穏やかに 10 回懸濁する。
- (7) PCR チューブにキャップをし、スピンドウンする。
- (8) PCR を行う。サイクルは以下のとおり。

①	94℃, 2min	
②	98℃, 10sec	
③	55℃, 30sec	②→④ 8サイクル
④	72℃, 45sec	
⑤	12℃, Hold	

- (9) 終了後、PCR チューブを取り出してボルテックス、スピンドウンする。

3.2.5.2 磁気ビーズ法を用いたライブラリー精製

ここでは Index PCR に使用した塩、プライマーダイマーを取り除くため、磁気ビーズ法を用いた精製を行う。

精製にはマグネットスタンドを用いるが、スタンドは強磁性・少容量サンプルに対応したものを推奨する。1.5 ml マイクロチューブ用でも精製可能であるが、PCR チューブ用か 96well プレート用マグネットスタンドとマルチチャンネルピペットが有ると便利である。

[準備]

試料：

Index PCR 後の増幅産物

物品：

1.5ml マイクロチューブ (DNase-free)

マイクロピペット 1 式

ピペットチップ (低吸着・フィルター付きを推奨)

マイクロチューブ遠心機

PCR チューブ遠心機

ボルテックス・ミキサー

マグネットスタンド

(e.g. NGS MagnaStand 8ch×0.2 ml PCR チューブ, Fast Gene)

(マルチチャンネルピペット)

蛍光検出器 (e.g. Fluoroskan Ascent™, Thermo Scientific™)

キャピラリー電気泳動装置 (e.g. Agilent 2100 バイオアナライザ, Agilent Technologies)

試薬:

SPRIselect® kit (BECKMAN COULTER, B23317, B23318)

超純水 (e.g. UltraPure™ Distilled Water, Invitrogen™, 109-77015)

10 mM Tris-HCl Buffer, pH 8.5 (e.g. Buffer EB, Qiagen, 19086)

無水エタノール (分子生物学グレード)

蛍光核酸定量試薬

(e.g. Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit, Invitrogen™, P7589)

キャピラリー泳動装置試薬

(e.g. High Sensitivity DNA キット, Agilent Technologies, 5067-4626)

[実験手順]

3.2.5.3 Left Side Size Selection (0.70x Left)

ここでは磁性ビーズに目的サイズの DNA を吸着させ、それ以外の低分子部分を取り除く。

- (1) ボルテックスをした後、スピンドウンした PCR 産物 (約 50 µl) に対し 0.70 倍量の SPRIselect® ビーズ (35 µl) を加え、完全に懸濁するまでピペッティングする。

*チューブの壁に液滴が飛ばないように注意する。

*SPRIselect ビーズは使用前に完全に懸濁して使用する。

- (2) 2 分間室温で静置する。
- (3) チューブをマグネットスタンドにセットし、上清が透明になるまで静置する (~5 分間)
- (4) ビーズを吸わないよう注意しながら上清を取り除く。
- (5) 180 µl の 85%エタノールを加え 30 秒間静置する。

*85% エタノールは用時調製する。

*ビーズに直接エタノールを掛けて、ビーズが崩れると収率が低下することがある。

- (6) エタノールを全て取り除く。

*管壁に残ったエタノールは 10 µl のピペット等で念入りに取り除く。

*チップの先端でビーズを直接崩さないよう注意する。

(7) チューブの蓋を開けたまま約3分間自然風乾する。

*ビーズを乾燥させすぎると、収量が低下するので注意する。ビーズ表面の光沢が無くなる程度。

(8) チューブをマグネットスタンドから外し、30 μl の Tris-HCl Buffer をビーズに掛ける様に加えながら、穏やかにピペティングで懸濁する。

*チップの先端でビーズを直接崩さないよう注意する。

(9) 2分間室温で静置する。

(10) チューブをマグネットスタンドに置き、上清が透明になるまで静置する(～3分間)

(11) 上清 28 μl を新しいマイクロチューブに移し取る。

*ビーズを吸わないようにするため、溶出液全量は取らないこと。

3.2.5.4 ライブラリーの定量

蛍光定量法を用いてサンプルの濃度を測定する。

Index PCR、精製操作に問題がなければ各サンプルの濃度はおおむね 5～15 $\text{ng}/\mu\text{l}$ 程度の濃度になる。すぐに使用しない場合は、 -20°C で保存可能である。

3.2.5.5 マイクロキャピラリー電気泳動によるライブラリー定性

ライブラリーをマイクロキャピラリー電気泳動装置で定性する。ここでは増幅産物のサイズ確認およびプライマーダイマーが除去できているか確認を行う。

最終的なライブラリーサイズは約 600 bp～640 bp 程度になる。

*アダプター・Index 配列が付加されると、1回目の定性値から 69 bp 分サイズが大きくなる。

3.2.6 ライブラリープールの作製

定性および定量が終わったライブラリーを個別に 4 nM に希釈した後、等量混合して 4 nM ライブラリープールを作成する。

nM 濃度への換算は、以下の計算式を用いる。

$$\frac{\text{DNA濃度 (ng}/\mu\text{l)}}{660 \text{ g/mol} \times \text{ライブラリー平均長}} \times 10^6 = \text{nM濃度}$$

*660 g/mol は 1 塩基対あたりの平均分子量

なお、本手順書ではライブラリー平均長の値を、大腸菌の 16S rRNA 遺伝子を増幅した場合の理論値である 605 bp で統一し、nM 濃度を算出している。

[準備]

試料：

各ライブラリー

物品：

1.5 ml マイクロチューブ (DNase-free)

マイクロピペット 1 式

ピペットチップ (低吸着・フィルター付きを推奨)

マイクロチューブ遠心機

ボルテックス・ミキサー

試薬：

10 mM Tris-HCl Buffer, pH 8.5 (e.g. Buffer EB, Qiagen, 19086)

[実験手順]

3.2.6.1 4 nM ライブラリープールの作製

- (1) 必要本数の新しいマイクロチューブに、5 μ l の各ライブラリーを分注する。
- (2) 計算式より求めた必要量の Tris-HCl Buffer を加え、4 nM になるよう希釈をする。
- (3) ボルテックスで念入りに懸濁し、スピンドウンする。
- (4) 新しいマイクロチューブを用意し、4 nM のライブラリーを 5 μ l ずつ分取して 1 本にまとめる。

出来上がったライブラリープールは Illumina 社製 MiSeq シーケンスシステムに供す。
直ぐに使用しない場合は、-20°C で保管をする。

3.2.7 シーケンシング (Illumina 社製 MiSeq シーケンスシステム)

本手順書では、Illumina 社製 MiSeq シーケンスシステムと MiSeq Reagent Kit v3(600 cycle) 試薬を使用して、シーケンシングを行う。操作方法については、MiSeq System User Guide に従い作業を行う。

3.2.8 リードトリミング

シーケンシングの結果が良ければ、リードのトリミングを行わなくとも問題は無い。必要であれば、fastx_trimmer や sickle ソフトウェアを利用し、クオリティの低い部分をトリムする。

3.2.9 リード結合

3.2.9.1 リード結合の準備

- ・使用するソフトウェア

ソフトウェアバージョン : QIIME 1.9.1 (2015 年 11 月現在)

MacQIIME を使用する場合、ターミナルアプリケーションを開き、以下のコマンドを入力して QIIME のサブシェルをスタートする必要がある。

```
$ macqiime 
```

・利用するデータ

Illumina 社製 MiSeq シーケンスシステムのシーケンスが終了すると、Sample Sheet に入力した項目に従って、以下の様なファイル名でリードファイルが出力される。

(Sample_Name)_(Sample_ID)_L001_R1_001.fastq.gz

(Sample_Name)_(Sample_ID)_L001_R2_001.fastq.gz

本ガイドでは、Sample Sheet 中の各項目

【Sample_Name】を sample1、sample2、sample3、、、

【Sample_ID】を S1、S2、S3、、、

と入力したことにする。

・作業ディレクトリ

本手順書では、ディレクトリ「QIIME_analysis」をデスクトップ上に作成し、そこへリードファイルをコピーして作業を行うこととする。

ターミナル (Linux では端末アプリケーション) を使用してディレクトリを作成する場合は以下のようなになる。

```
【Linux 環境の場合】 $ mkdir /home/ (ユーザ名) /Desktop/QIIME_analysis 
```

```
【Mac 環境の場合】 $ mkdir /Users/ (ユーザ名) /Desktop/QIIME_analysis 
```

上記ディレクトリにリードファイルをコピーし、ターミナルを使用してディレクトリ内に移動する。

```
【Linux 環境の場合】 $ cd /home/ (ユーザ名) /Desktop/QIIME_analysis 
```

```
【Mac 環境の場合】 $ cd /Users/ (ユーザ名) /Desktop/QIIME_analysis 
```

3.2.9.2 リードの結合

出力されたままのリードファイル (fastq.gz 形式) またはトリミングしたリードファイル (fastq 形式) を用いて、R1 リードと R2 リードを結合する。

```
$ join_paired_ends.py -f sample1_S1_L001_R1_001.fastq.gz -r
sample1_S1_L001_R2_001.fastq.gz -o S1
```

すると、新たなディレクトリ S1 内に、次のファイルが出力される。

```
fastqjoin.join.fastq (結合されたリード)
fastqjoin.un1.fastq (結合されなかった R1 リード)
fastqjoin.un2.fastq (結合されなかった R2 リード)
```

各ファイルに含まれるリード数を確認する場合は以下のコマンドを用いる。

```
$ count_seqs.py -i S1/fastqjoin.join.fastq
$ count_seqs.py -i S1/fastqjoin.un1.fastq
$ count_seqs.py -i S1/fastqjoin.un2.fastq
```

3.2.10 フィルタリング・ラベリング

3.2.10.1 マッピングファイルの作成

QIIME では、各サンプルの日付や備考などのメタデータを指定するファイルを用いることで、サンプルのグループ指定などができる。マッピングファイルは、1つにまとめたファイルが必要となる。それぞれの項目はタブで区切る。

SampleID、BarcodeSequence、LinkerPrimerSequenceの項目は必須であり、他の項目は自由に加えることができる。なお、Illumina社製MiSeqシーケンスシステムから出力されたリードファイルにはバーコード配列は含まれていないので、BarcodeSequenceの項目はTabキーを空打ちしている。

SampleIDには'.'(ピリオド)のみが使用できる。'_'(アンダーバー)などを使用した場合は、それ以降は認識されないので注意が必要である。

これに加え、全てのサンプルの情報をまとめたマッピングファイルを作成する。ここでは、Fasting_map.txtとする。

#SampleID	BarcodeSequence	LinkerPrimerSequence	Date	ReversePrimer	Description	Treatment
sample1		CCTACGGGNGGCWGCAG	20150910	GACTACHVGGGTATCTAATCC	control	no
sample2		CCTACGGGNGGCWGCAG	20150910	GACTACHVGGGTATCTAATCC	control	yes
sample3		CCTACGGGNGGCWGCAG	20150915	GACTACHVGGGTATCTAATCC	target	no
sample4		CCTACGGGNGGCWGCAG	20150915	GACTACHVGGGTATCTAATCC	target	yes

3.2.10.2 フィルタリングとラベリング

結合した各サンプルのリードのフィルタリングとラベリングを行い、ファイルを一つに

まとめる。この場合のフィルタリングは、 $QV \geq 20$ を指定している。

```
$ split_libraries_fastq.py -i S1/fastqjoin.join.fastq,S2/fastqjoin.join.fastq,S3/fastqjoin.join.fastq
--sample_ids sample1,sample2,sample3 -o split_seqs --barcoded_type 'not-barcoded' -q 19
```

すると、新たなディレクトリ `split_seqs` 内に次のファイルが出力される。

- `histograms.txt` (各サンプル中、10bp ごとに何リード含まれているかのファイル)
- `seqs.fna` (リードファイル)
- `split_library_log.txt` (各サンプルのフィルタリング結果のログファイル)

3.2.11 Taxonomy assignment

3.2.11.1 out テーブルの作成

ここでは、リファレンス配列を参考にして 97% の相同性で OTU を作成する方法をとる。OTU 作成と属種同定のアルゴリズムは、デフォルトの UCLUST を用いる。USEARCH など他のアルゴリズムを別途インストールして使用することも可能である。

```
$ pick_closed_reference_otus.py -i split_seqs/seqs.fna -o qiime_analysis -a -O 2
```

* `-a -O 2` は、並列で処理を行うためのオプションで、この場合は CPU を 2 つ使用する。

すると、新たなディレクトリ `qiime_analysis` 内に次のファイルが作成される。

- `uclust_ref_picked_otus` (ディレクトリ)
- `log_(日時).txt` (ログファイル)
- `otu_table.biom` (検出された種などの情報ファイル)
- `97_otus.trout` 各 OTU の系統関係を示したファイル)

3.2.11.2 微生物叢の概要を出力

`otu_table.biom` ファイルから、各サンプルで検出された種を割合で示したタブ区切りファイルを作成する。

```
$ summarize_taxa.py -i qiime_analysis/otu_table.biom -o qiime_analysis/taxonomy_summaries -L
2,3,4,5,6,7
```

すると、新たなディレクトリ `taxonomy_summaries` 内に次のファイルが作成される。

- `otu_table_L2.biom`
- `otu_table_L2.txt` (phylum レベルで分類したタブ区切りテキストファイル)

otu_table_L3.biom
otu_table_L3.txt (class レベルで分類したタブ区切りテキストファイル)
otu_table_L4.biom
otu_table_L4.txt (order レベルで分類したタブ区切りテキストファイル)
otu_table_L5.biom
otu_table_L5.txt (family レベルで分類したタブ区切りテキストファイル)
otu_table_L6.biom
otu_table_L6.txt (genus レベルで分類したタブ区切りテキストファイル)
otu_table_L7.biom
otu_table_L7.txt (species レベルで分類したタブ区切りテキストファイル)

これらのファイルを Microsoft Excel 等の表計算ソフトで開き、グラフを書くことで検出された種を確認できる。

3.2.12 多様性解析

3.2.12.1 サンプルごとの多様性解析 (α 多様性)

otu_table.biom ファイルから、各サンプルの α 多様性を算出する。使用するコマンドでは、以下の多様性指数を算出することができる (`-m` オプション)。一部、OTU 間の系統関係を示したファイルを必要とする多様性指数がある (`-t` オプション)。

'ace', 'berger_parker_d', 'brillouin_d', 'chao1', 'chao1_ci', 'dominance', 'doubles', 'enspie', 'equitability', 'esty_ci', 'fisher_alpha', 'gini_index', 'goods_coverage', 'heip_e', 'kempton_taylor_q', 'margalef', 'mcintosh_d', 'mcintosh_e', 'menhinick', 'michaelis_menten_fit', 'observed_otus', 'observed_species', 'osd', 'simpson_reciprocal', 'robbins', 'shannon', 'simpson', 'simpson_e', 'singles', 'strong', 'PD_whole_tree'

```
$ alpha_diversity.py -i qiime_analysis/otu_table.biom -o qiime_analysis/alpha_diversity.txt -t qiime_analysis/97_otus.tree -m chao1,simpson,observed_species
```

すると、ディレクトリ qiime_analysis 内に次のタブ区切りテキストファイルが作成される。
alpha_diversity.txt

3.2.12.2 サンプル間の多様性解析 (β 多様性)

- β 多様性の算出と 3D プロットの作成

otu_table.biom ファイルからサンプル間の β 多様性を算出し、その結果を主座標解析や系統樹で表す。

```
$ beta_diversity_through_plots.py -i qiime_analysis/otu_table.biom -o
```



```
qiime_analysis/beta_diversity -t qiime_analysis/97_otus.tree -m Fasting_map.txt
```

すると、新たなディレクトリ `beta_diversity` 内に次のディレクトリ及びファイルが作成される。

```
unweighted_UniFrac_emperor_pcoa_plot (ディレクトリ)
weighted_UniFrac_emperor_pcoa_plot (ディレクトリ)
unweighted_UniFrac_dm.txt
unweighted_UniFrac_pc.txt
weighted_UniFrac_dm.txt
weighted_UniFrac_pc.txt
log_(日時).txt (ログファイル)
```

2つのディレクトリ内には `html` ファイルが作成され `Firefox` や `Safari` などのブラウザで開くことができ、`UniFrac` 法で算出された多様度を3つの主成分によりプロットされた図を確認できる。

- ・2Dプロットの作成

3.2.12.1 で作成されたファイルから、2つの主成分によりプロットされた図を作成する。

```
$ make_2d_plot.py -i qiime_analysis/beta_diversity/weighted_UniFrac_pc.txt -o
qiime_analysis/beta_diversity/weighted_2d_plot -m Fasting_map.txt  ⏏
$ make_2d_plot.py -i qiime_analysis/beta_diversity/unweighted_UniFrac_pc.txt -o
qiime_analysis/beta_diversity/unweighted_2d_plot -m Fasting_map.txt  ⏏
```

すると、ディレクトリ `beta_diversity` 内に新たなディレクトリ `weighted_2d_plot` と `unweighted_2d_plot` が作成され、次のディレクトリ及びファイルが作成される。

```
js (ディレクトリ)
英数字による名前 (ディレクトリ)
weighted_UniFrac_pc_2D_PCoA_plots.html
unweighted_UniFrac_pc_2D_PCoA_plots.html
```

上記の `html` ファイルは、`Firefox` や `Safari` などのブラウザで開くことができ、`UniFrac` 法で算出された多様度を2つの主成分によりプロットされた図を確認できる。

- ・UPGMA 法による系統樹の作成

3.2.12.1 で作成されたファイルから、UPGMA 法による系統樹用データを作成する。

```
$ upgma_cluster.py -i qiime_analysis/beta_diversity/weighted_UniFrac_dm.txt -o
qiime_analysis/beta_diversity/weighted_upgma.tre      ↵
$ upgma_cluster.py -i qiime_analysis/beta_diversity/unweighted_UniFrac_dm.txt -o
qiime_analysis/beta_diversity/unweighted_upgma.tre    ↵
```

すると、ディレクトリ `beta_diversity` 内に次のファイルが作成される。

`weighted_upgma.tre`

`unweighted_upgma.tre`

これらのファイルは、MEGA など系統樹を作成できる多くのソフトウェアで開くことができる。

4. 評価手順および判断基準

「バイオレメディエーション利用指針」（「5. 付録「5. 参考文献、Web サイト」参照）によると、バイオレメディエーションを実施する事業者は、同指針第3章第二1(2)「作業区域における他の微生物群集への影響」を評価する必要がある。上述の解析によって得られた菌叢解析に基づき、「バイオレメディエーション利用指針の解説」第3章第二2（生態系への影響評価の実施方法）（「5. 付録「5. 参考文献、Web サイト」参照）で述べられた判断基準（以下に抜粋）を踏まえ、利用微生物の導入による生態系への影響を評価する。

「バイオレメディエーション利用指針の解説」（以下、抜粋）

(1) 他の微生物群集への影響

(1)-1 影響評価の実施方法

他の微生物群集への影響評価にあたっては、まずは、既知の情報を十分に収集し、活用すること。影響評価に資する既知の情報が不足している場合は、必要に応じ、作業区域の土壤等を用いて実験室等での模擬浄化試験を行い、微生物群集の構造変化（プロファイル（菌叢）変化）を把握し、その結果によって生態系等への影響を評価すること。

浄化作業に伴う汚染物質の減少、外来の微生物の導入又は栄養物質の添加等によって、汚染土壤等と修復された土壤等では微生物群の組成は当然ながら変化するため、浄化後にどのような生態系を求めるかを参照する土壤等が必要となる。そこで、まずは、作業区域に類似した土壤等を選定することになる。この土壤等と比較し、修復された土壤について、当該土壤等の物質循環に深く関与している微生物のうち特定の種を選定して評価し、又は適切な手法によって得られた微生物群集の構成変化（プロファイル（菌叢）変化）に基づき評価すること。

微生物の特定の種を選定して評価する場合は、一般細菌、硝化菌、脱窒菌等を選定して当該菌数の増減を測定し、又は土壤の呼吸活性（例えば、二酸化炭素発生量）、硝化活性、脱窒活性等を測定することによって評価する判断情報とする。

微生物群集の構成変化（プロファイル（菌叢）変化）とは、別添4の利用微生物の検出及び識別並びに微生物への影響評価方法の例に示したような分子生物学的手法等により、浄化地域に生息する微生物の種類及び量等の微生物群集構造の変化について経時的に把握したものを指す。具体的には、実際の浄化作業に即した模擬的な試験を実験室レベルで実施し、浄化前、浄化途中、浄化終了後に試料のサンプリングを行い、各サンプルの微生物群集構造を把握する。なお、浄化途中のサンプリングについては、1度ではなく、可能な限り複数回のサンプリングを実施する。微生物群集構造（プロファイル（菌叢））を経時的に比較することによって、浄化開始から浄化終了後において微生物の種類及び量等について、どの程度の変化があるかを調査することとなる。

また、影響評価の対象となる微生物については、一般細菌を広く網羅するようにし、可

能な限りにおいて硝化菌や脱窒菌等の物質循環に係わる菌の増減についても調査すること。

なお、上記のような試験を実施した場合はその試験内容、試験結果（写真やデータなど）を資料として添付すること。

(1)-2 影響評価に当たっての情報の収集方法

影響評価に当たっての情報の収集方法としては、まずは、関係する既知の情報を十分に活用して行うことになる。病原性のない微生物は、近縁の種を含めて、基本的な生理学的特性を収集することが重要となる。

情報が不足している場合は、必要に応じ、実験室等の結果等を収集して行うことになるが、既知の情報収集において不足している事項について、実験室等の結果において補完をすることとなる。

実験等の場合、別添 3 に記載した微生物農薬に関する土壌微生物への影響試験方法や、別添 4 に記載した利用微生物の検出及び識別並びに微生物への影響評価方法を適宜参考にすること。また、評価の根拠となる実験データを添付すること。

(1)-3 影響評価の判断方法

バイオレメディエーションを行うことによって土壌に含まれる有害物質が浄化された結果、一般的には浄化作業以前とは異なる微生物分布となる。また、作業区域の微生物分布が作業区域周辺と同一とはならない場合がある。したがって、評価の実施に際しては、作業に用いた利用微生物の異常な増加がなく、かつ作業区域に類似した土壌等との比較において、他の微生物群集についてマクロの組成において異常な減少等がないことを確認するとともに、作業区域及び土壌の特徴等のその他の情報を活用し、総合的に判断することが重要となる。（別添 4 参照）

5. 付録

5.1 サンプルの定量機器と試薬

(NITE 使用)

装置名称 (メーカー, 製品番号)	試薬名称 (メーカー, 製品番号)	サンプル数/Run	マニュアル
Qubit® 2.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific)	Qubit® dsDNA HS Assay Kit, for use with the Qubit® 2.0 Fluorometer (100 assays) (Thermo Fisher Scientific, Q32851)	1	https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/Qubit_dsDNA_HS_Assay_UG.pdf
Fluoroskan Ascent™ (Thermo Fisher Scientific)	Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, P7589)	96	https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/mp07581.pdf

5.2 マイクロキャピラリー電気泳動装置と試薬

(NITE 使用)

装置名称 (メーカー)	試薬名称 (メーカー, 製品番号)	サンプル数/Run	マニュアル
Agilent 2100 バイオアナライザ (Agilent Technologies)	High Sensitivity DNA キット (Agilent Technologies, 5067-4626)	11	http://www.chem-agilent.com/pdf/High_Sensitivity_DNA_ver_0102_201404.pdf
LabChip GXII システム (PerkinElmer, 124582J)	DNA Extended Range LabChip (760517) HT DNA High Sensitivity Reagent Kit (CLS760672) (PerkinElmer,)	96	http://www.perkinelmer.com/CMResources/Images/44-161585GDE_DNA-1K-Quick-Guide.pdf

5.3 参考文献、Web サイト

ISME J. 2011 Oct;5 (10) :1571-9. doi: 10.1038/ismej.2011.41. Epub 2011 Apr 7.

Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea.

Herlemann DP, Labrenz M, Jürgens K, Bertilsson S, Waniek JJ, Andersson AF.

16S Metagenomic Sequencing Library Preparation

Preparing 16S Ribosomal RNA Gene Amplicons for the Illumina MiSeq System

Illumina, Inc.

http://support.illumina.com/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf

MiSeq System User Guide Illumina, Inc.

http://support.illumina.com/downloads/MiSeq_system_user_guide_15027617.html

アガロースゲルによる核酸電気泳動の基本 電気泳動関連 : Q&A

タカラバイオ株式会社

http://catalog.takara-bio.co.jp/com/tech_info_detail.php?mode=1&masterid=M100003381

http://catalog.takara-bio.co.jp/com/tech_info_detail.php?mode=2&masterid=M100002761

DNA サイズセレクション SPRIselect Kit

ベックマンコールター株式会社

<http://ls.beckmancoulter.co.jp/products/genomics/sprl-select>

微生物によるバイオレメディエーション利用指針

http://www.meti.go.jp/policy/mono_info_service/mono/bio/cartagena/bairemeshishin.pdf

<https://www.env.go.jp/air/tech/bio/an050330.pdf>

微生物によるバイオレメディエーション 利用指針の解説

http://www.meti.go.jp/policy/mono_info_service/mono/bio/cartagena/bairemeshishin.pdf

<https://www.env.go.jp/air/tech/bio/kaisetv.pdf>