

環境 DNA 調査に際しての留意事項（暫定版）

環境 DNA を用いた調査の留意事項は以下のとおりである。以下に示されていない事項や、以下により実施することが困難な場合には、環境 DNA を用いた論文のほか、環境省による「環境 DNA 分析技術を用いた淡水魚類調査手法の手引き」、一般社団法人環境 DNA 学会による「環境 DNA 調査・実験マニュアル Ver 2.2」を参照されたい。

（1）現地調査

1. 採水地点は、調査対象区間と流れの連続性がある下流側の地点のほか、本川との水の関り（連続性）が少ないワンドやクリークを含むように選定する。
2. 採水で使用する採水瓶は、未使用品を用いることを基本とするが、十分な消毒・洗浄処理がされている場合においては再利用品を用いてもよい。
3. 河岸から採水する場合は、河岸から 0.5m 程度離れた個所で採水する。河川内に入り採水する場合は、採水者は川下に立つとともに、サンプル中に巻き上げ等が入らないよう留意する。
4. 採水の際は、以後の採攪拌効率が悪くなるため採水瓶のふた付近まで水を入れてはならない。
5. 採水のために採水器やバケツを用いる場合は、地点ごとに採水機器および付属部品の塩素消毒・洗浄を行う（希釈濃度や時間、洗浄については使用製品の規定を確認されたい）。
6. 採水後のサンプルは、48 時間にろ過を行うことを基本とする。
7. 採水からろ過までの間サンプルは 10℃以下で冷蔵保存する。サンプルが凍結すると分析に支障をきたすため注意する。ろ過後のサンプル（ろ紙・カートリッジフィルタ）は、直ちに冷凍保存する。
8. 現地でろ過を行う場合には、ドライアイス等を用いてサンプルを凍結することが望ましい。また、環境 DNA の論文等において問題がないことが実証されている保存手法を用いてもよい。
9. 上記の作業を行う際に水に触れる部分については、地点ごとに新しい使い捨てゴム手袋を用いる、作業服等への河川水の染み込みやゴミの付着に注意するなど、コンタミネーションに配慮する。

（2）DNA 抽出

1. DNA の抽出に使用する薬品やキット類の選択に当たっては、論文河川・湖沼水の環境 DNA の抽出における実績が確認できる製品を利用する。

2. ろ過サンプルの保管に試料保存試薬を用いた場合は、その後の抽出工程に支障をきたさないよう、環境 DNA の論文等において問題がないことが確認されている処置を施す。
3. ろ過サンプルおよびこれから溶出させた液が触れるものは使い捨てが可能な製品の使用を基本とする。使い捨てができない器具類については、ろ過サンプル（地点・地区別）毎に、DNA の取り扱いにおいて定められる滅菌処理等を施したものを使用する。

（3）分析

分析は、以下の流れで行う。

- ・ DNA 濃度の計測
 - ・ 1 StPCR
 - ・ 1stPCR 産物の精製と濃縮
 - ・ 精製・濃縮済み 1stPCR 産物濃度の定量と混合
 - ・ 2ndPCR 分析
 - ・ MiSeq・iSeq 等の NGS によるシーケンシング

1. 1 stPCR は、以下のプライマーを、指定する比率で混合したものを用いる。

Primer	配列(5'-3')	混合比
MiFish-E-F-v2	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNNNRGTG GTAAATCTCGTGCCAGC	1
MiFish-E-R-v2	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTNNNNNNGCAT AGTGGGGTATCTAATCCTAGTTTG	1
MiFish-U2-F	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNNNGCCGG TAAAACTCGTGCCAGC	1
MiFish-U2-R	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTNNNNNNCATA GGAGGGTGTCTAATCCCGTTTTG	1
MiFish-U-F	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNNNGTCGG TAAAACTCGTGCCAGC	2
MiFish-U-R	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTNNNNNNCATA GTGGGGTATCTAATCCCAGTTTTG	2
MiFish-UL-F	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNNNGCTGG TAAACCTCGTGCCAGC	0.5
MiFish-UL-R	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTNNNNNNCATA GCGGGGTATCTAATCCCGTTTTG	0.5

2. PCR の系は 20 μ L 以上とし、1 サンプル当たり 8 反復を基本とする。
3. メタバーコーディング解析の分析対象は魚類の 12S rRNA 遺伝子領域（MiFish 領域）と

し、得られたペアエンドリードをマージした上で、相同性検索を行う。

4. 分析に当たっては、MiFish 領域のメタバーコーディング分析を行い、様式-5, 6-1, 7, 8にとりまとめる。解析したデータは、各 OTU に対して検出されたリード数と対応する可能性が高い生物種を様式-9, 10にとりまとめる。
5. 解析不調により魚類の配列が得られなかった、もしくはリード数が極端に少ないと判断された場合には、解析不調の原因がサンプルの品質等に起因し受注者の実施した作業には問題がないことなどが発注者に確認・了承された場合に限り、当該サンプルに対して作業報告書を成果物とすることができる。

(4) 精査

1. 分析により得られた読み取り配列に基づき、MiFish pipeline 等の解析と pipeline を用いた精査を行い、生物リストを作成する。精査にあたっては、対象水系や地域における魚種分布情報も踏まえながら、必要に応じて DDBJ 等のデータベースの内容を確認するとともに、配列のリードエラーを含む分析エラーの除外を行う。なお、リストから生物名（配列）を除外する場合は、その理由がわかるように整理を行う。
2. 精査の後、得られた結果は、様式-11にとりまとめる。また、解析生リード配列を含むすべての分析データを電子データとして提出する。