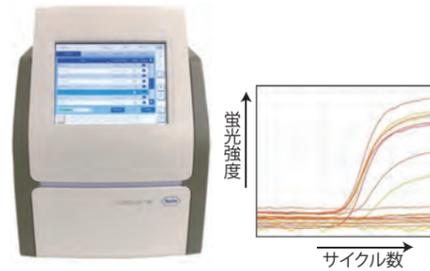


## 種特異的解析の解析具体例①

群馬県と神奈川県におけるブルーギルとオオクチバスの在/不在



上段がブルーギル、下段がオオクチバスの結果で、分母が反復数、分子が検出回数を示しています。ブルーギルはTakahara et al., (2013)、オオクチバスはYamanaka et al., (2016)の方法を参照し、解析を行いました。



LightCycler® 96 システム (Roche) 等を使用し、右上のようなデータから在・不在を判断します。

## 種特異的解析の解析具体例②

アユの定量解析 2つの解析方法の比較結果

サンプル名	抽出DNA 1 ml中のDNAコピー数	
	デジタルPCR	魚類の網羅的解析 + 定量解析 (オプション) 注3
kushikawa-1a	0.56	2.95
kushikawa-1b	0.41	1.72
kushikawa-2a	0.24	0.82
kushikawa-2b	0.67	0.82
osaka-a	2.59	9.34
osaka-b	1.11	5.62

注3) 魚類の網羅的解析のサンプル調製時に内部標準を入れてPCRを行うことで、網羅的解析の結果に定量性の情報も得られる手法です。上記は、その結果の中からアユの数値を抜粋しました。

## 環境DNA用ポータブルチューブポンプの貸出しサービス

解析を弊社にご依頼いただける場合に無償で貸し出ししています。

- ◎現場でろ過するメリット
  - ・水を送付するよりも、DNAの分解が抑えられる。
  - ・輸送費用が安くなる。
  - ・解析費用が、1サンプルあたり27,000円→23,000円(税別)と安くなる。

- ◎費用(税別) ※本体貸出は0円です
  - 発送/返却費用 4,000円(着払い伝票を同梱)
  - 消耗品セット(チューブやステリベクスなど) 2,000円/セット(1サンプル分)
  - 核酸保存液セット\* 500円/セット(1サンプル分)
- \*ろ過後すぐに冷凍できない場合は核酸保存液の添加が必要です。このセットもご購入いただくか、ご自身でそれをご用意ください。

- ◎ご依頼方法
  - メール等で以下の内容をお知らせください。
  - ①本体台数 ②消耗品セットと核酸保存液セットの個数
  - ③使用日程 ④送付先
  - ⑤無償の練習用キット同梱の必要の有無



バッテリーまたはACアダプターで駆動します



使い方など  
詳細は弊社HPで



# 生物技研の 環境DNA解析に デジピ digital PCR 登場!

野生生物の生態調査は捕獲や観察といった直接的手法を中心として行われており、高度な専門知識と経験が必要でした。近年、水に含まれる生物の体液や鱗、糞便由来の「環境DNA」を解析することが可能になり注目を集めています。生物技研では次世代シーケンサー、リアルタイムPCRおよびデジタルPCRを用いて高解像度での解析を行い、環境サンプルに含まれている生物の痕跡を見つけ出します。



### 網羅的解析

次世代シーケンサーを用いた解析です。環境中のDNAを網羅的なプライマーセットでPCR増幅した後、シーケンシングします。得られた塩基配列をデータベースと照らし合わせ、生物相を解析します。

27,000円/サンプル(税別)



### 種特異的解析

環境中のDNAを種特異的なプライマーセットでPCR増幅しながら、特定生物の在・不在やDNAのコピー数を解析します。

リアルタイムPCR解析による在・不在  
3%以上の場合 **15,000円/サンプル(税別)**  
デジタルPCR解析によるDNAコピー数の絶対定量  
3%以上の場合 **15,000円/サンプル(税別)**

2024年9月~  
3サンプル未満の場合、  
割高になります



### 遺伝的多様性解析

次世代シーケンサーを用いた解析です。同じ生物種内で遺伝的に異なる集団(ハプロタイプ)を解析します。

4反復の場合 **42,000円/サンプル(税別)**

こちらは別途ご用意しています。

環境DNA用ポータブルチューブポンプを貸出ししています。  
詳しくは裏表紙をご覧ください。



# 環境DNA 網羅的解析 (メタバーコーディング解析)

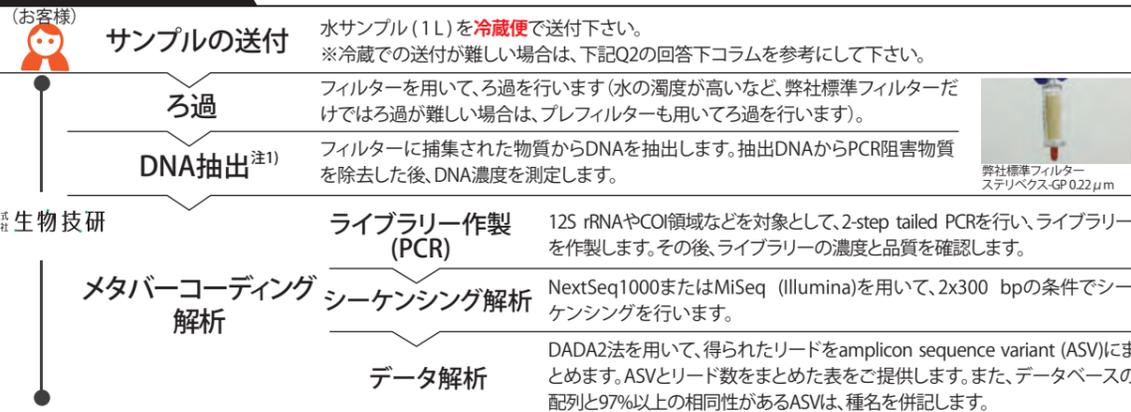
※価格は税別です

価格	27,000円/サンプル 底生動物の解析は 32,000円/サンプル	内訳 ・ろ過 4,000円/サンプル ・DNA抽出 3,000円/サンプル ・メタバーコーディング解析 20,000円/サンプル (底生動物の解析は25,000円/サンプル)
納期	20営業日	※25サンプル以上は+2営業日、57サンプル以上は+3営業日が必要です。 ※ダウンロード形式で納品します。
解析系がある生物種	動物 (COI)、魚類 (cMiFish)*1、哺乳類 (MiMammal)*2、節足動物 (gInsect)*3、鳥類 (gBird)*3-4、二枚貝 (gClam)*3、巻貝 (gSnail)*3、有尾目<イモリ類とサンショウウオ類> (gSalamander)*3、無尾目 (gFrog)*3、環形動物 (gWorm)*3、線虫 (Ecdysozoa)*3、陸上植物 (rbcl)*3、光合成生物 (psbA)*3、褐藻 (gKasso)*3、紅藻 (gKoso)*3、真核生物 (18S rRNA)、底生動物 (gBenthos)*3-5 ( )は使用するプライマーセット名または解析対象領域の名称です。上記以外の生物種についてはご相談ください。	
オプション	プライマー追加 +2,000円/依頼 cMiFishに円口類(スナヤツメやヌタウナギなど)プライマーを追加するオプションです。 MiFish定量解析 +10,000円/サンプル(納期も+5営業日) DNAコピー数を算出するオプションです。	

30%以上で10%引き  
60%以上で20%引き

- \*1 2020年5月よりプライマーセットの名称・混合内容が変わりました。  
旧) 淡水用MiFish→MiFish-U-F/RとMiFish-E-F/R (Miya et al., 2015)を1:1で混合  
海水用MiFish→MiFish-U-F/RとMiFish-E-F/R-v2、MiFish-U2-F/R (unpublished primer)を2:1で混合  
新) cMiFish→MiFish-U-F/RとMiFish-E-F/R-v2、MiFish-U2-F/R、MiFish-Ayu&Wakasagi(unpublished primer)を4:2:2:1で混合
- \*2 弊社でのテスト解析の結果、脊椎動物全般が検出されています。 \*3 自社で開発したプライマーセットでの解析です。
- \*4 鳥類は環境DNAへの移行が少なく、検出が困難な傾向にあります。
- \*5 節足動物、環形動物、貝(二枚貝・巻貝)、十脚甲殻類が解析対象です。プライマー配列やPCR条件は開示していませんので、あらかじめご了承ください。

## 解析の流れ



注1) 抽出されたDNAは、メタバーコーディング解析だけでなく種特異的解析にも使用することが可能です(追加料金: 8,000円/サンプル・生物種)。

## 解析具体例

### 相模川における動物相

OTU名	sample-1	sample-2	sample-3	sample-4	和名
OTU_126	73	0	38	5	5. スジホシムシ属
OTU_03	518	0	54	0	0. ホフムシ
OTU_1171	12	2	0	0	0. キンギキ
OTU_241	21	8	4	1	1. ホウキムシ(ワタシ)
OTU_124	24	30	7	14	14. マミスクラブ
OTU_051	3	13	0	2	2. ボウ
OTU_121	62	30	11	6	6. アユ

各サンプリング地点におけるASVごとのリード数と種名を示しています。動物 (COI) プライマー(Leray et al., 2013)を使用しました。



MiSeqを使用し、左のようなデータ解析結果を納品します。

## よくあるご質問

### Q1. 採水時の注意点は?

<容器>再利用する場合は10倍希釈した漂白剤(ブリーチ)に3時間以上浸漬した後、水道水と純水や超純水でよく流してからお使いください。新品の場合はこの作業は必要ないと考えていますが、慎重を期す場合は行って下さい。

<採水>必ず手袋をして下さい。

<保存>採水後はできる限り早く冷蔵して下さい。

### Q2. サンプル送付時の注意点はありますか?

必ず平日着・冷蔵便で、弊社(右記住所)へ送付して下さい。

※冷凍は推奨しません。凍結融解に伴い細胞が破壊され、解析対象であるDNAが溶液中に放出され、フィルターを通り抜けてしまうためです。

#### 冷蔵での保存・送付が難しい場合

「オスバン消毒液」を、水1Lに対して1ml添加すると10日程度の保存が可能となります。参照論文など詳しくは弊社HPをご覧ください。

### Q3. ろ過量はどのくらい?

送付いただいたサンプル全量をろ過することを基本としていますが、フィルターが目詰まりを起こした時は、その時点でろ過終了となります。複数のフィルターを使用してろ過量を多くしたい場合は、2,500円/フィルター(税別)の追加料金が発生します。

### Q4. フィルターの種類やろ過方法は?

弊社標準は、ステリベクス-GP 0.22 μm(メルクミリポア)で加圧ろ過になります。プレフィルターは、ガラス繊維ろ紙GF/A (Whatman)で減圧ろ過になります。



# 環境DNA 種特異的解析 (リアルタイムPCR解析) (デジタルPCR解析)

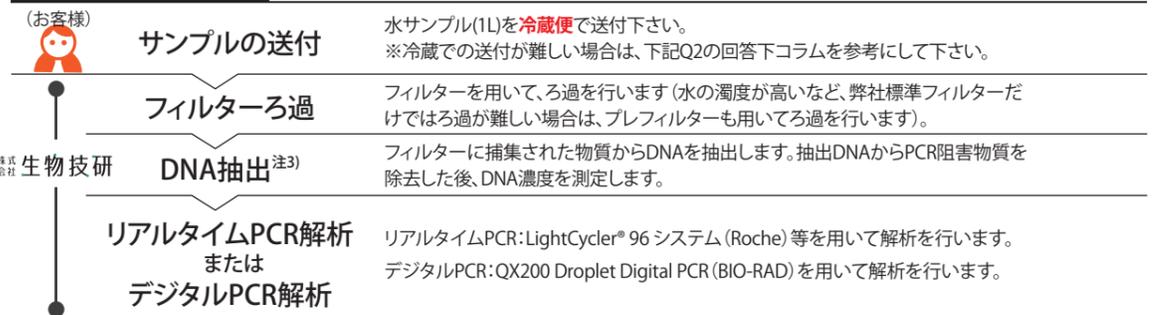
※価格は税別です

		リアルタイムPCR解析	デジタルPCR解析
価格		3サンプル以上の場合 <sup>注2)</sup> <b>15,000円/サンプル</b> 内訳 ・ろ過 4,000円/サンプル ・DNA抽出 3,000円/サンプル ・リアルタイムPCR解析 8,000円/サンプル	3サンプル以上の場合 <sup>注2)</sup> <b>15,000円/サンプル</b> 内訳 ・ろ過 4,000円/サンプル ・DNA抽出 3,000円/サンプル ・デジタルPCR解析 8,000円/サンプル
解析系がある生物種		ブルーギル、オオクチバス、コクチバス、アユ、アユモドキ、オオサンショウウオ、チュウゴクサンショウウオ、ハクバサンショウウオ、ニホンウナギ、イワナ、ヤマメ、イシドジョウ、ゲンジボタル、ヘイケボタル、ニホンザリガニ、ウチダザリガニなど 記載のない生物種についてはご相談ください。  プライマーやプローブは、in silicoで設計するため、対象生物種のみを検出できる保証はできません。対象生物やその近縁種の個体やDNAをお送り頂ければ、特異性の検証を行うことも可能です(3サンプルまで)。	
納期		20サンプルまで 5営業日 ※プライマーの設計・合成が必要な場合は、プライマー合成完了後5営業日です。 ※ダウンロード形式で納品します。	
オプション	定量解析 (DNAコピー数の算出)	20サンプルごと +30,000円/依頼・生物種 ※8反復で解析の場合は、10サンプルごと上記料金必要	デジタルPCRは定量が基本です。
	解析の反復	8反復 +4,000円/サンプル より正確なデータを得るため、標準の4反復から8反復へ増やすオプションです。	4反復 +4,000円/サンプル より正確なデータを得るため、標準の2反復から4反復へ増やすオプションです。

30%以上で15%引き

注2) 1-2サンプルの場合、内訳のリアルタイムPCR解析またはデジタルPCR解析が一律24,000円(3サンプル分)がかかります(下記見積り例2参照)。

## 解析の流れ



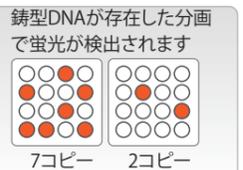
注3) 抽出されたDNAは、別の種の種特異的解析(追加料金: 3サンプル以上で8,000円/サンプル・生物種)やメタバーコーディング解析(追加料金: 20,000円/サンプル)にも使用することが可能です。



### 第3世代のPCR「デジタルPCR」とは?

デジタルPCRは従来のリアルタイムPCRに比べてはるかに高精度、高感度に定量を行う新しい技術です。定性のみの通常のPCR、検量線を用いる絶対定量のリアルタイムPCRに対して、検量線を用意することなく絶対定量が行えるデジタルPCRは、

第3世代のPCRと言われてます。デジタルPCRは、1分画あたり1コピー以下に抽出DNAを希釈してPCR解析をします。希釈の過程で、PCR阻害物質も希釈されるため、阻害を受けにくくなります。その点でも、環境DNAの解析に適した手法と言えます。



## お見積り例

### <網羅的解析>

例1: 1サンプルについて魚類相と動物相を解析  
・ろ過とDNA抽出 7,000円  
・メタバーコーディング解析 20,000円×2=40,000円  
合計 47,000円

### <種特異的解析>

例2: 1サンプルについてアユの在不在を解析  
・ろ過とDNA抽出 7,000円  
・リアルタイム解析 24,000円  
合計 31,000円

### <網羅的解析と種特異的解析の両方を行う>

例3: 3サンプルについて魚類相の網羅的解析とアユの種特異的解析  
・ろ過とDNA抽出 7,000円×3= 21,000円  
・メタバーコーディング解析 20,000円×3=60,000円  
・リアルタイムPCR解析 8,000円×3=24,000円  
合計 105,000円

## お問合せ・見積依頼 サンプル送付先

株式会社生物技研

〒252-0154  
神奈川県相模原市緑区長竹657  
tel: 042-780-8333  
Email: dna@gikenbio.com

