

Application Note

No.31

ライフサイエンス

制限酵素切断パターンの類縁性検索による微生物推定法 － MultiNA の活用 －

Application of Multiple Restriction Enzyme Fragment Length Pattern Analysis for Estimation of Microbial Group – Application of MultiNA –

渡邊 克二^{*1} 曾我部 有司^{*2}



LifeScience

1. はじめに

現在では、特定の遺伝子領域の塩基配列を決定し、既知遺伝子との類縁性から対象遺伝子の性質や機能を推定する類縁性検索方法が遺伝子解析の基本的技術として確立しています。塩基配列決定の高速化・簡便化により塩基配列情報の蓄積が益々進み、これを基本としたメタゲノム解析等の新たな解析技術が確立してくる一方で、蓄積した配列情報を利用することで、事前に塩基配列を決定しなくとも類縁性検索が可能になる環境が生まれています。

今回で紹介する制限酵素断片長による多型解析は、塩基配列決定法が普及する以前、遺伝子同士の類縁関係を簡便に比較できる方法として頻繁に利用されてきました。しかし塩基配列決定の高速化や低価格化が急速に進んだ今となっては予備的に使用されるに過ぎなくなっていました。

この方法の有用な点を文字情報の解析に例えて説明します。塩基配列に基づいた類縁性検索では読み取った膨大な文字情報の中から一字ずつ文字が一致するかどうかを検索するのに対して、制限酵素断片長による検索では文章を句読点で区切った文節数と文字数の数値情報に変換して類似性を調べます。文字情報の塩基配列データは解析対象となる配列が長くなるに従い、データ取得・類縁性検索等のデータ処理に時間・労力がかかってくるのに対し、切断片情報は数値データのため、配列の長さが長くなっても解析に要する時間・労力は増えません。長い配列を対象とする程、解析精度が上昇するため塩基配列決定と比べて優位性が増す場合が生じてきます。著者らはこの点に着目し、実測して得た制限酵素断片長パターンと塩基配列データベースから作成した対照用のデータベースを比

*1 福岡工業大学 工学部 生命環境科学科

*2 株式会社津製作所 分析計測事業部 グローバルアプリケーション開発センター

較し遺伝子の類縁性を検索するシステム“TKS_Ver3.1”を開発しました（図1）^{1,2)}。本法によりこれまでは塩基配列の決定によってしかできなかった遺伝子の類縁性検索が、制限酵素断片長パターンから簡便にできるようになりました³⁾。しかし、断片長パターンのデータを得るためのアガロースゲル電気泳動やポリアクリルアミドゲル電気泳動は、データの取得に時間がかかり操作が煩雑なため、塩基配列決定よりも逆に煩わしくなるという欠点もありました^{3,4)}。これまでに数社から販売されてきた使い捨て型のマイクロチップ型電気泳動装置を

アガロースゲルやポリアクリルアミドゲル電気泳動の代わりに使用しますと、分析時間は短くなりますが操作は相変わらず煩雑で、しかもランニングコストが高額なため、本目的のための普及機器には成り難いという難点がありました⁵⁾。一方でマイクロチップ電気泳動装置 MCE-202 MultiNA はマイクロチップを再利用でき、全自動で試料をアプライできるなどその操作性などから、本方法の普及機器として理想的な機器です。

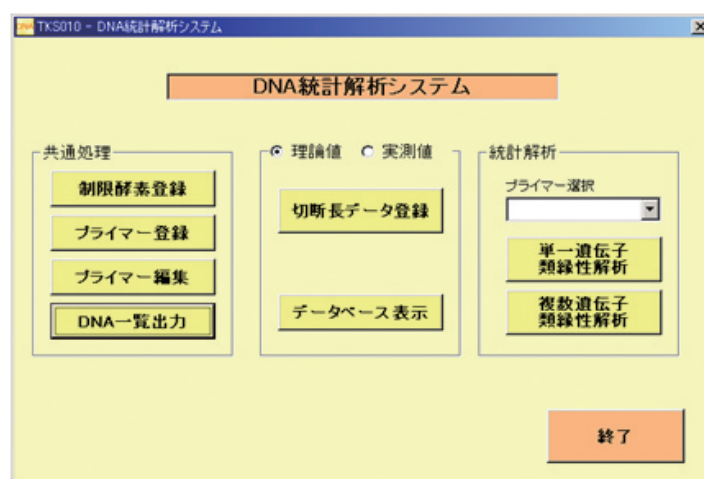


図1 類縁性検索システム“TKS_Ver3.1”

2. 方法の解説

この解析方法の基本原理は“実測値制限酵素切断長データ”と“対照用データ”との類縁性の比較になります。

“実測値制限酵素切断長データ”はユニバーサルプライマーや選択的なプライマーで特定の遺伝子領域を増幅後、その増幅産物を制限酵素で消化し、電気泳動法によって得られたDNAのフラグメントパターンです。一方、“対照用データベース”は公開されている塩基配列データファイルなどからコンピュータ上で理論的増幅長と断片長を計算し編集・作成したものです（図2）。

この類縁性検索システム“TKS_Ver3.1”は様々な解析方法に応用できるよう幅広い汎用性をもたせてあります。

たとえば、様々なPCR^(*)条件に合わせてプライマーセットの登録やパラメータを設定できるようになっています。

さらに、複数種の制限酵素断片長パターンを用いた方が精度が上がります。解析対象の遺伝子によって最適な制限酵素の組み合わせが異なることから、制限酵素やその組み合わせを選択できるようになっています。したがってこの類縁性検索システム“TKS_Ver3.1”は「プライマー」、「制限酵素」、「断片長」の3つのデータベースを連携させて、“対照用データベース”を編集できるようになっています。

2-1. 対照用データベースの作成

まず、公開されている塩基配列データベースからPCRに使用する特定のプライマーで増幅される領域の配列と増幅長をコンピュータ上で算出し、これを「増幅後塩基配列データ」とします。さらに、この「増幅後塩基配列データ」を分析に用いる制限酵素で切断した際に生じる断片長とそのパターンをコンピュータ上で算出し「断片長データ」とし、これが“対照用データベース”となります。

“増幅後塩基配列データ”を編集する際に、PCR条件に合わせてパラメータを設定できるようになっています。例えば、実際にユニバーサルプライマーを用いたPCRによって幅広く細菌の16S rDNA等を増幅したい場合に、鋳型DNAのアニリングサイトとプライマーの配列のミスマッチが4～5塩基あっても増幅する条件を設定することがあります。このような場合でも任意のミスマッチの許容を設定することができるようになっています。

2-2. 類縁性検索方法

Nei, Li らの制限酵素断片長パターン間の遺伝距離 (D_{AB}) を類縁性の指標として用いています⁶⁾。使用する制限酵素の種類を増やした時はそれぞれの制限酵素断片長パターン間の遺伝距離 (D_{AB}) の平均をとるように設定しています。

$$D_{AB} = 1 - 2N_{AB} / (N_A + N_B)$$

D_{AB} ; Nei と Li の遺伝距離 a)

N_A ; A (実測値) の切断片数

N_B ; B (理論値) の切断片数

N_{AB} ; A と B に共通の切断片数

実際に類縁性検索を行う時は、用いたプライマーと制限酵素 (複数) を指定して “対照用データベース” を設定します。これを “実測値制限酵素断片長パターン” に対して解析を行います。その結果、対照用データベースから、実測値に近い理論値を遺伝距離 (D_{AB}) を基に検索し、5 つの配列が候補として挙がってきます。

類縁性検索システム “TKS_Ver3.1” では解析結果を視覚的にとらえやすいように遺伝距離 (D_{AB}) を基に非加重結合法 (UPGMA) によって樹形図を作成し、表示できるようになっています。

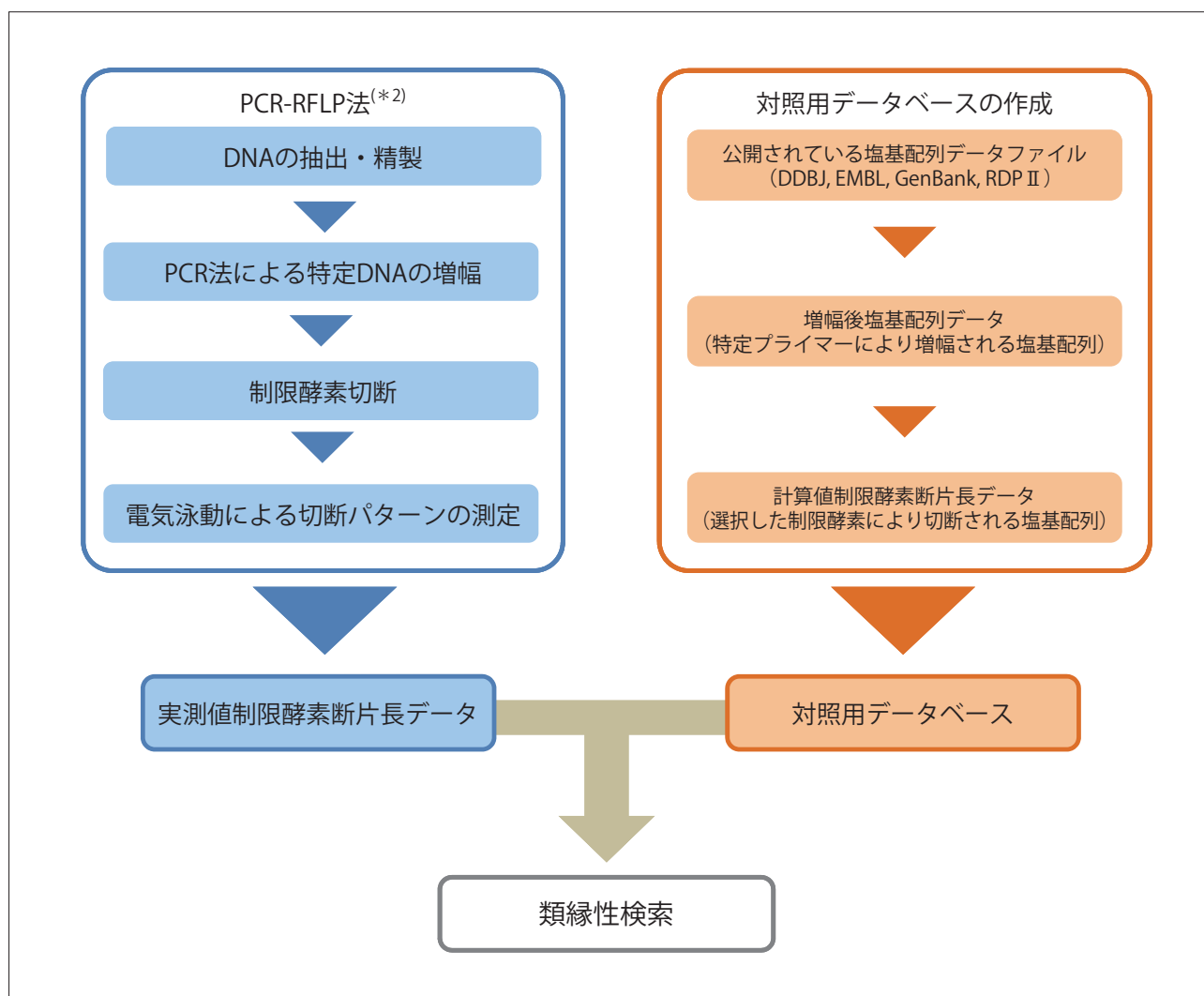


図2 遺伝子の類縁性検索方法及び類縁性検索システムによる解析の流れ

2-3. 使用例

これまでに類縁性検索システム“TKS_Ver3.1”は主に環境中の細菌群や抗生物質耐性菌等の細菌群の解析に有効なことを見出し、報告してきました^{3,4,5)}。

ここでは“TKS_Ver3.1”の糸状菌や酵母（酵母：*Saccharomyces uvarum* NBRC10968, 糸状菌：*Giberella zeae* NBRC7189, *Aspergillus oryzae* NBRC30113, *Penicillium roqueforti* NBRC5459）の類縁性検索への応用を検討した例をご紹介します。

2-3-1. 対照用データベースの作成

もともになるデータベースはリボゾームデータベースプロジェクトⅡ（RDPⅡ）のunaligned SSU（release 6；64,991KB）⁸⁾をダウンロードして使用しました。

今回は18S rDNAのほぼ全領域（1700bp）を増幅するEF4/EF3プライマー⁷⁾（図3）をPCRに用いました。これらのプライマーの塩基配列を用いて“増幅後塩基配列データベース”を

一括編集しました。両プライマーのミスマッチの許容範囲を5塩基に設定し“増幅後塩基配列データベース”を編集したところ2154配列が該当し、データベースが作成されました。このデータベースの中には糸状菌、酵母以外にも多数の動物、植物由来の18S rDNA配列が含まれていました。また、作成されたデータベースの中には、今回、類縁性検索に必要なとなる*Saccharomyces*属は27配列、*Aspergillus*属は24配列しか含まれておらず、*Penicillium*属、*Fusarium*属、*Gibberella*属は含まれていませんでした。従いまして、さらに、GenBankからダウンロードした*Penicillium*属の42配列と*Gibberella*属の2配列をもとのデータベースに加えて再編集をしました。制限酵素は細菌の16S rDNAの分類でも使用した*Hha*Ⅰ、*Alu*Ⅰ、*Rsa*Ⅰ、*Hae*Ⅲを用いました。これらの制限酵素の情報を用いて“計算値制限酵素断片長データ”を一括編集し、これらを対照用データベースとしました。

・ 真核生物用ユニバーサルプライマーの設計

EF4/EF3（1,700bp 18S rDNAのほぼ全域を増幅）→ EF41/EF31

```

EF4  5' G G A A G G G R T G T A T T T A T T T A G
EF41          K           Y   Y

EF3  3' G T T T G A A C C A G T A A A T C C T C C T
EF31          Y   D S       R R
  
```

K：GまたはT
 Y：CまたはT
 D：AまたはGまたはT
 S：CまたはG
 R：AまたはG

アニーリング⁹⁾ 温度48℃(EF4/EF3)→52℃ (EF41/EF31)

・ 真核微生物に由来するDNAの効果的な抽出法

Step1：卓上式破碎装置（Shake Man 2*）による機機械的破碎（3000rpm for 90sec）
 Step2：1% SDS solution (0.1M Tris buffer pH 8.00, 0.1 M NaCl, 60℃ for 30 min)

図3 18S rDNAを増幅するDNAプライマーと真核微生物からのDNAの抽出方法

*Shake Man2はバイオメディカルサイエンスの製品です。

2-3-2. 実測値断片長パターンデータの取得

真核微生物からの簡便な DNA 抽出方法として卓上式破碎装置による機械的破碎と 1% SDS での溶菌処理を行いました。これにより精製した DNA を PCR の鋳型として用いました。PCR で増幅されない基準株がありましたが、混合プライマー (EF31/EF41) を用いることで全て増幅することができました (図 3)。増幅後の PCR 産物を 4 種類の制限酵素 (*Hha* I, *Alu* I, *Rsa* I, *Hae* III) でそれぞれ消化しました。それぞれの消化

断片はマイクロチップ電気泳動装置 MultiNA を用いて分析しました。糸状菌の電気泳動結果を図 4 に示します。

Aspergillus oryzae (NBRC30113) と *Penicillium roqueforti* (NBRC5459) の *Hha* I と *Alu* I 実測値断片長パターンは同じでしたが、*Rsa* I と *Hae* III 断片長パターンには違いがありました。*Giberella zeae* (NBRC7189) は 4 種類すべての実測値断片長パターンで他の糸状菌と異なっていました。

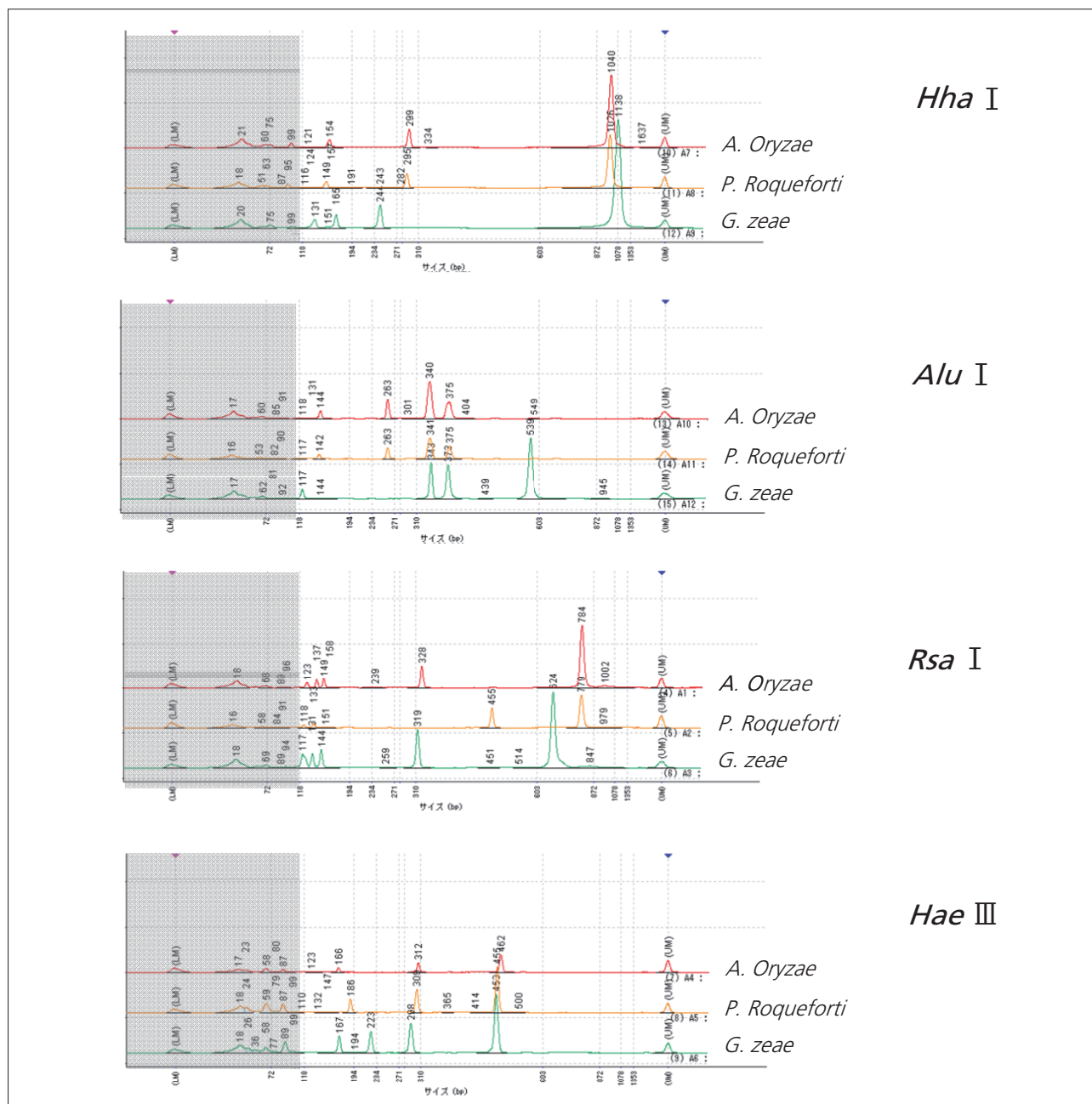


図 4 糸状菌 PCR 増幅産物 (EF41/EF31) の *Hha* I, *Alu* I, *Rsa* I および *Hae* III による断片長パターン

※ノイズとの分離が困難なため 100bp 以下の切断片は実測値、対照用データベースから省略しました (灰色囲み部分)。

2-3-3. 対照データベースとの比較による類縁性検索

酵母 *Saccharomyces uvarum* NBRC10968 の *Hha* I, *Rsa* I, *Alu* I の実測値制限酵素断片長パターンにおいて対照データベース上の *Saccharomyces* sp. (SaySpeci) (表 1), *S.dairenensis* (SayDair8), *Candida colliculosa* (CnoColli), *Torulaspora globosa* (TorDel13) が相違度 “0” となる配列を持つ遺伝子として検索されてきました。しかし *Hae* III で消化した際の実測値制限酵素断片長パターンを加えるとどの配列とも相違度が大きくなりました (図 5)。

糸状菌 *P.roqueforti* (NBRC5459) の *Hha* I, *Rsa* I, *Alu* I,

Hae III の実測値制限酵素断片長パターンにおいては *P.roqueforti* (GQ458035) が相違度 “0” として検索されてきました。(表 2, 図 5)。

A.oryzae (NBRC30113) の *Hha* I, *Rsa* I, *Alu* I, *Hae* III の実測値制限酵素断片長パターンでは *A.oryzae* (Aspe.oryza) が相違度 “0” として検索されました。(表 2, 図 5)。

G.zeae (NBRC7189) については *Gibberella* 属の配列がデータベース上に 2 配列しか登録されていなかったため正確な検索結果を得ることができませんでした。(表 1, 図 5)。

表 1 *Saccharomyces uvarum* NBRC10968 と *Giberella zeae* NBRC7189 の実測値制限酵素断片長データと計算値制限酵素断片長*

<i>Saccharomyces uvarum</i> NBRC10968			<i>Giberella zeae</i> NBRC7189			
<i>Rsa</i> I	<i>Alu</i> I	<i>Hha</i> I	<i>Rsa</i> I	<i>Alu</i> I	<i>Hha</i> I	<i>Hae</i> III
954 (957)	558 (620)	1078 (1029)	624 (695)	539 (621)	1138 (1029)	450 (500)
319 (323)	379 (392)	234 (237)	319 (325)	373 (394)	244 (—)	298 (306)
145 (155)	349 (356)	158 (160)	144 (141)	343 (355)	165 (160)	223 (230)
103 (99)	141 (148)	122 (124)	131 (120)	177 (—)	(151)	167 (176)
			117 (119)	(122)	131 (124)	

* () の数字は *S.uvarum* NBRC10968 と相違度が最も小さい *Saccharom y ces* sp. (SaySpeci) と, *G.zeae* (AB250414) の理論値に対応する切断片長です。

表 2 *Aspergillus oryzae* NBRC30113 と *Penicillium roqueforti* NBRC5459 の実測値制限酵素断片長データと計算値制限酵素断片長*

<i>Aspergillus oryzae</i> NBRC30113				<i>Penicillium roqueforti</i> NBRC5459			
<i>Rsa</i> I	<i>Alu</i> I	<i>Hha</i> I	<i>Hae</i> III	<i>Rsa</i> I	<i>Alu</i> I	<i>Hha</i> I	<i>Hae</i> III
784 (815)	375 (394)	1040 (981)	462 (503)	799 (814)	375 (394)	1026 (980)	455 (501)
328 (325)	340** (356)	299 (286)	312 (315)	455 (481)	341** (356)	295 (286)	309 (315)
149 (156)	340** (354)	154 (151)	166 (174)	133 (143)	341** (353)	149 (151)	186 (195)
137 (143)	263 (268)			118 (119)	263 (268)		
123 (119)	144 (148)				142 (142)		

* () の数字は理論値の *A.oryza* (Aspe.oryza) と, *P.roqueforti* NBRC5459 と相違度が最も小さい *P.roqueforti* (GQ458053) の理論値に対応する切断片長です。

**実測値断片長のピーク面積は大きく相対モル濃度が他の切断長の 2 倍近くあったため、二つの切断片が分離できなかったと判断されました。

図 5 において *A.oryzae* (NBRC30113) との相違度が 0 の検索結果の中に *A.oryzae* 以外にも、*Penicillium* 属細菌 (AF244232 と AF25256) が含まれていました。これは、検索実行時に実測値制限酵素切断長に 10% の測定誤差を許容しているからです。この 10% 誤差は対照用データベースにも適用され、遺伝子配列に基づく相違度よりも低くなる場合があります (9% の測定誤差以下で解析した場合はこの *Penicillium* 属細菌は *Aspergillus* 属とは分離されます)。

許容誤差の設定値を小さくすればする程、理論値間と遺伝子配列間による相違度は近くなり、より正確な遺伝子間距離を表示することができます。しかし一方で、電気泳動による制限酵素断片長の測定では常に測定誤差が生じます。そのため許容誤差の設定値を小さくしすぎると実測値と理論値が一致しなくなります。制限酵素断片長の実測値では配列が長くなるほど解析精度は高くなり、配列が短いほどその精度は減少する傾向があります。従って、今回の分析例におきましても 100bp 以下の制限酵素断片長データは除いています。

許容誤差の設定を一律に設定するのではなく、制限酵素切断片の長さを考慮して、許容誤差の設定を行うことにより、より正確な解析に近づくことができると思われます。

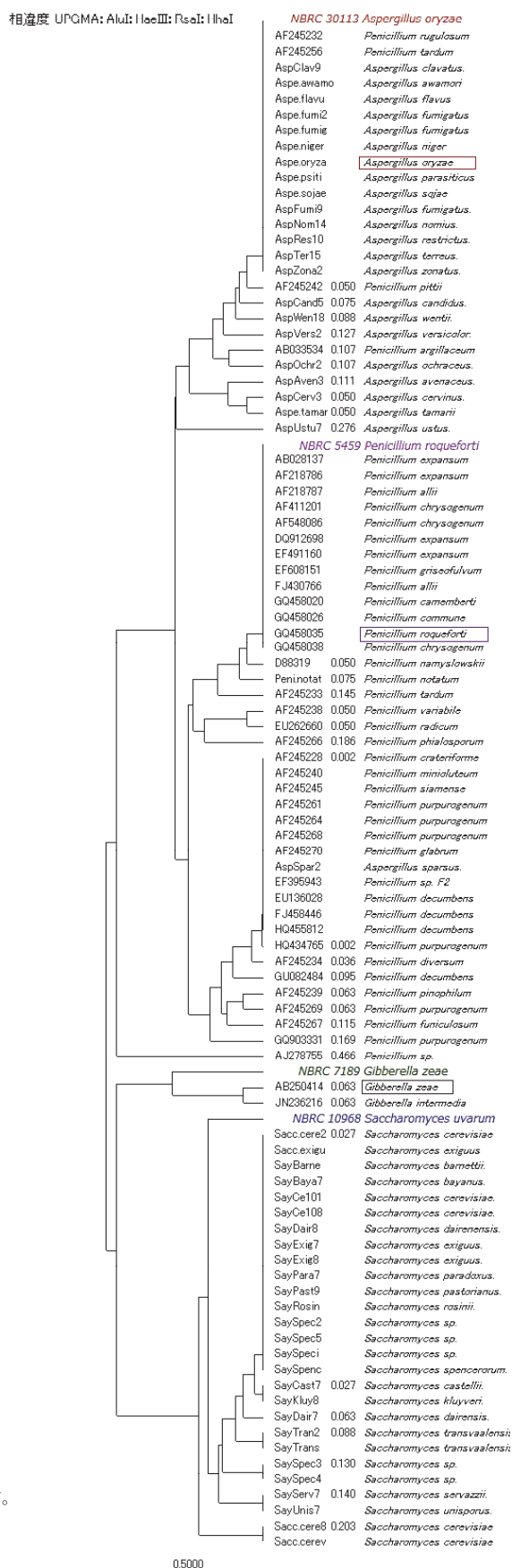


図 5 *Alu I*, *Rsa I*, *Hha I*, *Hae III* の断片長パターンによる類縁性検索結果
断片長の 10% の誤差範囲の断片を一致した断片として類縁性検索しています。

※登録しているすべての *Penicillium* 属, *Gibberella* 属, *Aspergillus* 属の対照用データベースとの類縁性関係を示している。

3. まとめ 今後の展望など

卓上破碎装置による DNA 抽出法と新たに設計した真核生物用ユニバーサルプライマーによって真核生物の 18S rDNA を効果的に増幅でき属レベルの分類が可能であることが分かりました。

今回は分離された基準株を用いましたが、この方法が塩基配列の決定法と比べて優れている点は、“微生物を純粋分離せずに類縁性解析ができる”ことにあります。文字情報は“複数の文章が上書きされた状態”では解読することができません。これと同じように塩基配列決定による類縁性検索では“遺伝子が混在した状態”での類縁性検索は非常に困難で、遺伝子のクローニングや微生物の純粋分離が前提となっています。

方で、複数の微生物由来の制限酵素切断片が混在した状態であっても、電気泳動で分離することにより個々の切断長 (bp) が測定できます。この原理を発展させることにより純粋分離やクローニングすることなく微生物の同定が可能になります。現在、純粋分離やクローニングを行うことなく微生物遺伝子の類縁性検索を実行し、さらには最確数法^(※3)と組み合わせることで微生物相を構成するそれぞれの菌群の種類と数を推定できるシステム (MPN/MERFLP 法) の原型がつくられています⁹⁾。このシステムは微生物の純粋分離なしに同定・定量が可能であることから、これまで安全性評価が困難であった危険性の高い微生物のリスク評価法として期待されています⁹⁾。

(※ 1) PCR (Polymerase Chain Reaction) 法：

試料となる DNA を鋳型として、DNA のある一部分だけを選択的に増幅させる方法。増幅したい領域の両端と配列特異的な短い 1 本鎖 DNA (プライマー) と DNA 合成酵素 (DNA ポリメラーゼ) を用いて、サイクル反応 (DNA 二本鎖の解離→プライマーの結合→DNA 合成反応) を行うことにより任意の DNA 領域を増幅する。原理的には DNA が 1 分子でもあれば反応サイクルの乗数だけ DNA が増えます。プライマーを挟む領域の増幅の有無を利用して目的物の有無が判断できます。

(※ 2) PCR-RFLP 法 (Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism)：

RFLP は制限酵素断片長多型ともいわれ個体あるいは種により DNA 中の制限酵素認識部位の塩基配列には個体差があります。このような性質を利用して、ある DNA を制限酵素によって断片化を行い、その断片長パターンから個体や種を同定する方法。PCR-RFLP は PCR 増幅産物を制限酵素により断片化して、その断片長パターン解析を行う方法。

(※ 3) 最確数法 (Most Probable Number Method ; MPN 法)：

目的の試料から 10 倍ずつ段階的に希釈した接種液を特定の培養液中で一定期間培養し、菌の増殖が確認された陽性試験の割合から最確数表により試料に含まれていた菌数を推定する方法。環境水中の大腸菌群の数値を確率的に算出する方法として衛生指標として用いられています。通常、用いられている最確数法では試験に対し陰性か陽性かを判断 (いわゆる定性試験) した結果を、統計学的手法により定量化しているだけなので、菌の種類を特定することはできません。

[引用文献]

- 1) 渡邊 克二, 奥田 充, 遺伝子の類縁性検索方法及び遺伝子の類縁性検索システム, 国内特許, 平成 15 年 5 月登録 特許第 3431135 号 (2003)
- 2) K.Watanabe, and M.Okuda, Method and system for searching for relationships between base sequences in genes, US patent, No.7,006,924 (2006)
- 3) K.Watanabe, M.Okuda, and N.Koga, Newly developed system based on multiple enzyme restriction fragment length polymorphism- An application to proteolytic bacterial flora analysis, *Soil.Sci.Plant Nutr.* 54, 204-215 (2008) .
- 4) K.Watanabe, Application of multiple enzyme restriction fragment length polymorphism analysis and microchip electrophoresis for estimation of antibiotic-tolerant bacterial group. *J.Pestic.Sci.* 33, 249-260 (2008) .
- 5) K.Watanabe, and N.Koga, Use of microchip electrophoresis system for estimation of bacterial phylogeny and analysis of NO_3^- reducing bacterial flora in field soils. *Biosci.Biotechnol.Biochem.* 73, 479-488 (2009)
- 6) Nei, M., and W.H. Li, Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76: 5269-5273 (1979) .
- 7) E.Smit, P.Leeflang, B.Glandorf, J-D Elsas and K. Wernars. Analysis of Fungal Diversity in the Wheat Rhizosphere by Sequencing of Cloned PCR-Amplified Genes Encoding 18S rRNA and Temperature Gradient Gel Electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2614-2621 (1999)
- 8) J.Cole, B.Chari, T.L.Marsh, R.J.Farris, Q.Wang, S.A Kulam, S.Chandra, D.M.McGarrell, T.M.Schmidt, G.M. Garrity, and J.M.Tiedje, The ribosomal database project (RDP-II) : previewing a new autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy. *Nucleic Acids Res.* 31, 442-443 (2003) .
- 9) K.Watanabe, A.Tanaka, Y.Takagi, K.Suetake, A.Hosoda, and H.Tamura. Populations and Composition of Antibiotic Resistant Bacteria in Composting Process • Proc. ASM 110th General Meeting • 084Q-Q865 (2010)

4. マイクロチップ電気泳動装置 MCE-202 “MultiNA”

アガロースゲル電気泳動法は試薬の調合、ゲルの作成、電気泳動、結果の画像取得、後片付けと一連の作業に多くの時間と手間を要します。さらにデータに関しては感度、分離、再現性、定量性など客観性に乏しいものです。

マイクロチップ電気泳動装置 MCE-202 “MultiNA” はアガロースゲル電気泳動の問題を解決します。



図6 マイクロチップ電気泳動装置 MCE-202 “MultiNA”

MultiNA 特長

• わずか 3 ステップで分析

分析操作は非常にシンプル。分析スケジュールを作成し、あとは試薬とサンプルをセットしてスタートボタンをクリックするだけです。ゲルの作成は不要です。

• 最大 120 分析（108 検体）まで自動分析

最大 4 枚セットすることができるマイクロチップで 120 分析（96+12 検体）を自動分析します。

• 幅広い分野に活用

遺伝子研究用途をはじめ食品分析、ジェノタイピング、微生物分析、感染症分析、RNA 分析など広い分野で活躍します。

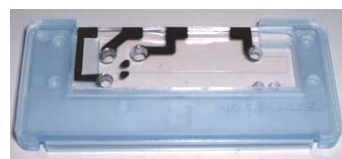
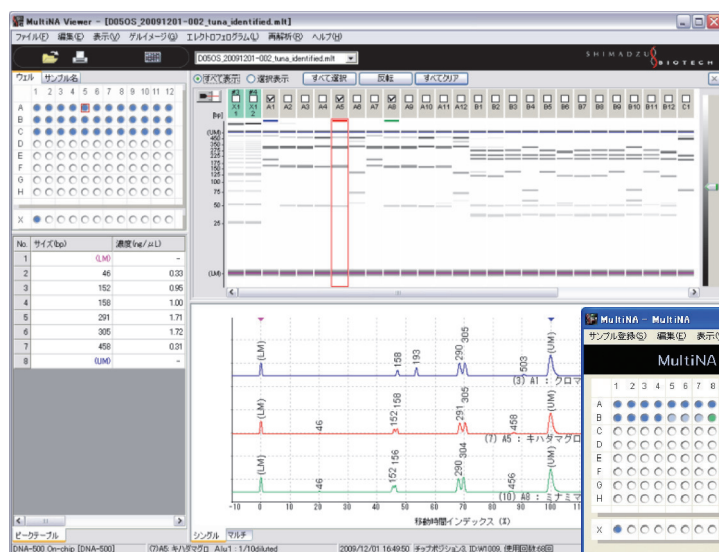


図7 MultiNA 専用マイクロチップ



図8 MultiNA 操作画面

5. MCE-202 “MultiNA” によるカビ・酵母遺伝子の検出例

サンプルは、2種類のカビと1種類の酵母を用いました。

Eurotium 属は、乾物、パン、まんじゅうやジャムなどやや乾燥した食品に発生するカビです。*Penicillium* 属は、アオカビとも呼ばれ、柑橘類、穀物や乳製品などの多くの食品に発生するカビであり、食用としてチーズの製造に用いられるものから、カビ毒を発生する有害なものまで、種類は様々です。*Saccharomyces cerevisiae* は、出芽酵母であり、パン酵母、ワイン酵母、清酒酵母などがあります。

PCR 反応試薬は、弊社の遺伝子増幅用試薬 “Ampdirect® Plus 酵素セット” を使用し、PCR 反応条件は付属の取扱説明書に準じました。

寒天培地に培養したカビ・酵母をマイクロピペットチップに付着させ、それを PCR 反応液に懸濁し、PCR を行いました。PCR は、ITS 領域(※1)を検出するプライマー(日本薬局方(※2)記載の遺伝子解析による微生物の迅速同定法の真菌用 ITS プライマー)を用いました。

PCR 増幅産物を MultiNA で分析した結果を図 12 に示します。カビ・酵母、それぞれに由来する遺伝子特異的増幅産物を明瞭に検出することができました(図中エレクトロフェログラムのサイズ推定値は本実験によるものです)。

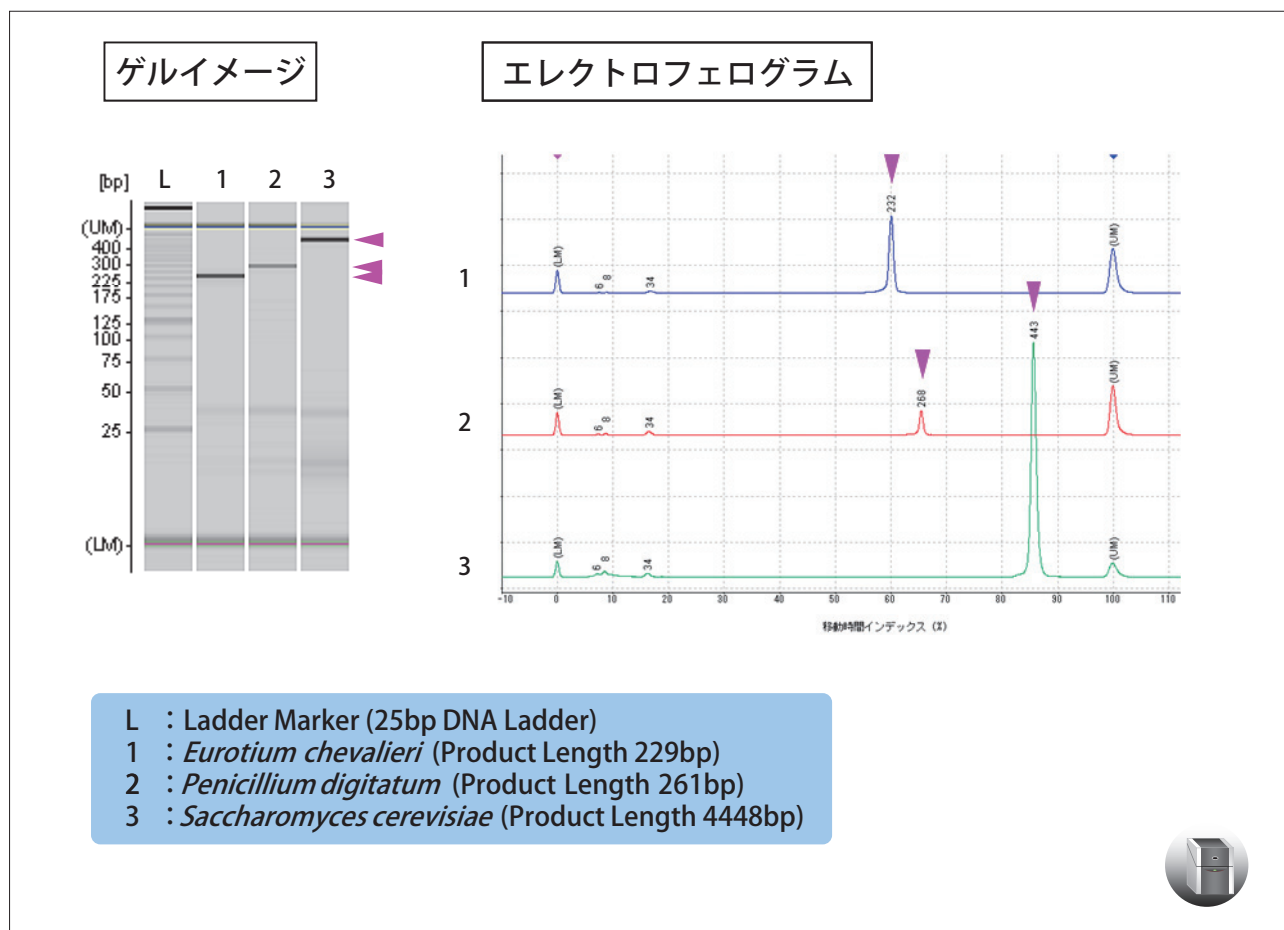


図9 カビ、酵母遺伝子の分析結果

(※1) ITS (Internal Transcribed Spacer) 領域とは、リボソーム RNA 遺伝子 (rDNA) の 18S, 5.8S, 28S, これら3つの間2ヶ所 (18S と 5.8S の間を ITS1, 5.8S と 28S の間を ITS2) にある領域です。菌種間でこの ITS 領域の塩基配列に差があることが知られています。

(※2) 日本薬局方とは、医薬品の性状及び品質の適正を図るために定められた医薬品の規格基準書です。

【参考資料】 島津製作所アプリケーションニュース No.B27 「MCE-202 “MultiNA” によるカビ・酵母遺伝子の検出」

株式会社 島津製作所
分析計測事業部 <http://www.an.shimadzu.co.jp/>

本資料の掲載情報に関する著作権は当社または原著者に帰属しており、権利者の事前の書面による許可なく、本資料を複製、転用、改ざん、販売等することはできません。

掲載情報については十分検討を行っていますが、当社はその正確性や完全性を保証するものではありません。また、本資料の使用により生じたいかなる損害に対しても当社は一切責任を負いません。本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。

初版発行：2012年9月
© Shimadzu Corporation, 2012