

種内・種間の系統関係を学ぶ

目的

遺伝子や遺伝子間の塩基配列の取得と解析を通して、種内・種間の系統関係を学ぶ

日程

- 4 月 18 日（木） 実験実習（PCR 産物の確認、精製）（図 1）
19 日（金） シーケンシング
20 日（土） //
- 21 日（日） //
- 22 日（月） //
- 23 日（火） 解析実習（分子系統解析；図 1）、発表準備
24 日（水） 解析結果の発表
25 日（木） 博物館見学

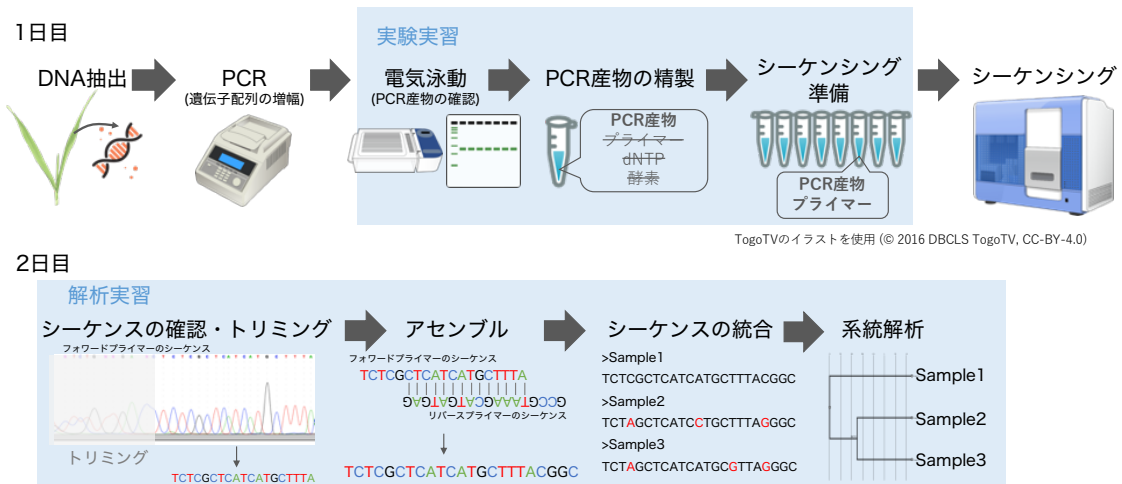


図 1 実習の流れ

テキスト

実験実習: pp. 3-4

解析実習: <https://github.com/CropEvol/lecture>

解析実習でパソコンを使用します。各自ラップトップパソコンを持参してください。
また、データの共有のために Google アカウントが必要です。持っていない方はアカウントを作成してください。

4 月 18 日（木） 実験実習（PCR 産物の確認、精製）のタイムスケジュール

13:00-13:45	全体説明、シーケンシング法や系統解析について
13:45-14:15	実験サンプルの説明、サンプル担当班の決定
14:15-15:00	電気泳動 休憩
15:00-15:15	電気泳動結果の確認
15:15-15:45	PCR 産物の精製
15:45-16:30	シーケンシングサンプルの調整
16:30-17:00	研究発表について

4 月 23 日（火） 解析実習（分子系統解析）のタイムスケジュール

13:00-13:15	全体説明
13:15-13:45	シーケンスの確認とトリミング
13:45-14:00	アセンブル
14:00-14:15	マルチ FASTA ファイルの準備
14:15-14:30	遺伝子系統樹の作成
14:30-14:40	休憩
14:40-15:30	データベースについて、系統樹の見方について
15:30-17:00	残りのサンプルの解析と発表準備

4 月 24 日（水） 発表準備、発表のタイムスケジュール

13:00-15:00	発表準備
15:00-15:45	発表（2 班）
15:45-16:00	休憩
16:00-16:45	発表（2 班）
16:45-17:00	総合討論

実験実習

準備済みの PCR 産物 (別紙 1)

- ・ PCR 産物 (確認用) 約 10 uL (= PCR 産物 約 10 uL; Loading buffer 入り)
- ・ PCR 産物 (精製用) 50 uL (= PCR 産物 15 uL + dH₂O 35 uL)

ステップ 1: PCR 産物の確認

- 1-1) 1.0%アガロースゲルを泳動槽にセットする。
- 1-2) ゲルの各ウェルに「PCR 反応液 (確認用)」を 6 uL を入れる。
- 1-3) 100 bp ラダーマーカー 6 uL をサンプルの隣のウェルに入れる。
- 1-4) 150V で 15 分間程度電気泳動をおこなう。
- 1-5) 電気泳動後、泳動槽からゲルを回収し、トランスイルミネーターで PCR の成否を観察する。

ステップ 2: PCR 産物の精製

※ NucleoSpin Gel and PCR cleanup kit プロトコールに準拠。

- 2-1) PCR 産物 (精製用) に Buffer NTI を 100 uL 加える。
- 2-2) コレクションチューブに黄色のカラムをセットし、3-2 の溶液をカラムに添加する。
※ チューブの蓋にサンプル番号を記入してください。
- 2-3) 11,000×g、1 分間遠心する。
- 2-4) ろ液を捨てた後、カラムを再び同じコレクションチューブにセットする。
- 2-5) Wash Buffer NT3 700 µl をカラムに添加し、11,000×g で 1 分間遠心する。
- 2-6) ろ液を捨てた後、カラムを再び同じコレクションチューブにセットする。
- 2-7) 11,000×g で 2 分間遠心し、カラム内のメンブレンを乾燥させる。
- 2-8) カラムを新しい 1.5 mL チューブにセットし、カラムに Buffer NE 30 µl を加える。
※ チューブの蓋にサンプル番号を記入してください。
- 2-9) 室温で 5 分間インキュベートした後、11,000×g で 1 分間遠心する。
※ 遠心後のろ液に PCR で増幅された DNA が含まれています。
その DNA をステップ 3 で「テンプレート DNA」として使用します。

ステップ 3: シーケンス用プレミックスの準備

※ ユーロフィン DNA シーケンスのサンプル調整方法に準拠。

3-1) チューブ番号リスト（別紙 2）のとおり、テンプレート DNA とフォワードプライマーまたはリバースプライマーを混ぜた溶液を作成する。

表 5 シーケンス用プレミックス(フォワードプライマー)

内容	液量
テンプレート DNA	3 uL
Forward primer (2 pmol/uL)	4.8 uL
dH ₂ O	13.2 uL
Total	21 uL

表 6 シーケンス用プレミックス(リバースプライマー)

内容	液量
テンプレート DNA	3 uL
Reverse primer (2 pmol/uL)	4.8 uL
dH ₂ O	13.2 uL
Total	21 uL

(別紙 1) 準備済みの PCR 産物

表 タルホコムギの準備済み PCR 産物チューブ番号リスト。

白色背景：A 班担当、灰色背景：B 班担当

チューブ	DNA とプライマー	チューブ	DNA とプライマー
1	At01, <i>Vrn1</i> 1F-1R	17	At01, <i>Vrn3</i> 1F-1R
2	At02, <i>Vrn1</i> 1F-1R	18	At02, <i>Vrn3</i> 1F-1R
3	At03, <i>Vrn1</i> 1F-1R	19	At03, <i>Vrn3</i> 1F-1R
4	At04, <i>Vrn1</i> 1F-1R	20	At04, <i>Vrn3</i> 1F-1R
5	At05, <i>Vrn1</i> 1F-1R	21	At05, <i>Vrn3</i> 1F-1R
6	At06, <i>Vrn1</i> 1F-1R	22	At06, <i>Vrn3</i> 1F-1R
7	Negative control※	23	Negative control※
8	(空)	24	(空)
9	At01, <i>Vrn1</i> 3F-3R	25	At01, <i>MYC1</i> 1F-1R
10	At02, <i>Vrn1</i> 3F-3R	26	At02, <i>MYC1</i> 1F-1R
11	At03, <i>Vrn1</i> 3F-3R	27	At03, <i>MYC1</i> 1F-1R
12	At04, <i>Vrn1</i> 3F-3R	28	At04, <i>MYC1</i> 1F-1R
13	At05, <i>Vrn1</i> 3F-3R	29	At05, <i>MYC1</i> 1F-1R
14	At06, <i>Vrn1</i> 3F-3R	30	At06, <i>MYC1</i> 1F-1R
15	Negative control※	31	Negative control※
16	(空)	32	(空)

※ PCR 産物（精製用）には Negative control は含まれていない。

(別紙 1) 準備済みの PCR 産物

泳動用 (C 班)

	a	b	c	d	e	f	g	h
Gene E	Si05	Si06	Sv07	Sv08	Sp11	Sp12	NC	(空)
Gene G	Si05	Si06	Sv07	Sv08	Sp11	Sp12	NC	(空)

精製用 (C 班)

	a	b	c	d	e	f	g	h
Gene E	Si05	Si06	Sv07	Sv08	Sp11	Sp12	(空)	(空)
Gene G	Si05	Si06	Sv07	Sv08	Sp11	Sp12	(空)	(空)

Gene E: *sh1* (*shattering1*) exon2

Gene G: *rps16-trnQ* (UUG) intergenic spacer

NC: Negative control

泳動用 (D 班)

	a	b	c	d	e	f	g	h
Gene H	Si05	Si06	Sv07	Sv08	Sp11	Sp12	NC	(空)
Gene F	Si05	Si06	Sv07	Sv08	Sp11	Sp12	NC	(空)

精製用 (C 班)

	a	b	c	d	e	f	g	h
Gene H	Si05	Si06	Sv07	Sv08	Sp11	Sp12	(空)	(空)
Gene F	Si05	Si06	Sv07	Sv08	Sp11	Sp12	(空)	(空)

Gene H: *kn1* (*knotted1*) exon1-exon3

Gene F: *trnL* (UAA) -*trnF* (GAA) intergenic spacer

NC: Negative control

(別紙2) DNA シーケンスのチューブ番号



図 8 連チューブの側面のチューブ番号

表 チューブ番号リスト(タルホコムギ *Aegilops tauschii*と *Vrn1* 1F, 1R)

チューブ	DNA とプライマー	チューブ	DNA とプライマー
1-1	At01, <i>Vrn1</i> -1F	2-1	At05, <i>Vrn1</i> -1F
1-2	At01, <i>Vrn1</i> -1R	2-2	At05, <i>Vrn1</i> -1R
1-3	At02, <i>Vrn1</i> -1F	2-3	At06, <i>Vrn1</i> -1F
1-4	At02, <i>Vrn1</i> -1R	2-4	At06, <i>Vrn1</i> -1R
1-5	At03, <i>Vrn1</i> -1F		
1-6	At03, <i>Vrn1</i> -1R		
1-7	At04, <i>Vrn1</i> -1F		
1-8	At04, <i>Vrn1</i> -1R		

表 チューブ番号リスト(*Aegilops tauschii*と *MYC1* 1F, 1R)

チューブ	DNA とプライマー	チューブ	DNA とプライマー
3-1	At01, <i>MYC1</i> -1F	4-1	At05, <i>MYC1</i> -1F
3-2	At01, <i>MYC1</i> -1R	4-2	At05, <i>MYC1</i> -1R
3-3	At02, <i>MYC1</i> -1F	4-3	At06, <i>MYC1</i> -1F
3-4	At02, <i>MYC1</i> -1R	4-4	At06, <i>MYC1</i> -1R
3-5	At03, <i>MYC1</i> -1F		
3-6	At03, <i>MYC1</i> -1R		
3-7	At04, <i>MYC1</i> -1F		
3-8	At04, <i>MYC1</i> -1R		

(別紙2) DNA シーケンスのチューブ番号



図 8 連チューブの側面のチューブ番号

表 チューブ番号リスト(*Aegilops tauschii*と *Vrn1* 3F, 3R)

チューブ	DNA とプライマー	チューブ	DNA とプライマー
5-1	At01, <i>Vrn1</i> -3F	6-1	At05, <i>Vrn1</i> -3F
5-2	At01, <i>Vrn1</i> -3R	6-2	At05, <i>Vrn1</i> -3R
5-3	At02, <i>Vrn1</i> -3F	6-3	At06, <i>Vrn1</i> -3F
5-4	At02, <i>Vrn1</i> -3R	6-4	At06, <i>Vrn1</i> -3R
5-5	At03, <i>Vrn1</i> -3F		
5-6	At03, <i>Vrn1</i> -3R		
5-7	At04, <i>Vrn1</i> -3F		
5-8	At04, <i>Vrn1</i> -3R		

表 チューブ番号リスト(*Aegilops tauschii*と *Vrn3* 1F, 1R)

チューブ	DNA とプライマー	チューブ	DNA とプライマー
7-1	At01, <i>Vrn3</i> -1F	8-1	At05, <i>Vrn3</i> -1F
7-2	At01, <i>Vrn3</i> -1R	8-2	At05, <i>Vrn3</i> -1R
7-3	At02, <i>Vrn3</i> -1F	8-3	At06, <i>Vrn3</i> -1F
7-4	At02, <i>Vrn3</i> -1R	8-4	At06, <i>Vrn3</i> -1R
7-5	At03, <i>Vrn3</i> -1F		
7-6	At03, <i>Vrn3</i> -1R		
7-7	At04, <i>Vrn3</i> -1F		
7-8	At04, <i>Vrn3</i> -1R		

(別紙2) DNA シーケンスのチューブ番号



図 8 連チューブの側面のチューブ番号

表 チューブ番号リスト (*Setaria* spp.と Ef, Er E: *sh1* exon2)

チューブ	DNA とプライマー	チューブ	DNA とプライマー
1-1	Si05, Ef	2-1	Sp11, Ef
1-2	Si05, Er	2-2	Sp11, Er
1-3	Si06, Ef	2-3	Sp12, Ef
1-4	Si06, Er	2-4	Sp12, Er
1-5	Sv07, Ef		
1-6	Sv07, Er		
1-7	Sv08, Ef		
1-8	Sv08, Er		

表 チューブ番号リスト (*Setaria* spp.と Gf, Gr G: *rps16-trnQ* (UUG) intergenic spacer)

チューブ	DNA とプライマー	チューブ	DNA とプライマー
3-1	Si05, Gf	4-1	Sp11, Gf
3-2	Si05, Gr	4-2	Sp11, Gr
3-3	Si06, Gf	4-3	Sp12, Gf
3-4	Si06, Gr	4-4	Sp12, Gr
3-5	Sv07, Gf		
3-6	Sv07, Gr		
3-7	Sv08, Gf		
3-8	Sv08, Gr		

(別紙2) DNA シーケンスのチューブ番号



図 8 連チューブの側面のチューブ番号

表 チューブ番号リスト (*Setaria* spp.と Hf, Hr H: *kn1* (*knotted1*) exon1-exon3)

チューブ	DNA とプライマー	チューブ	DNA とプライマー
5-1	Si05, Hf	6-1	Sp11, Hf
5-2	Si05, Hr	6-2	Sp11, Hr
5-3	Si06, Hf	6-3	Sp12, Hf
5-4	Si06, Hr	6-4	Sp12, Hr
5-5	Sv07, Hf		
5-6	Sv07, Hr		
5-7	Sv08, Hf		
5-8	Sv08, Hr		

表 チューブ番号リスト (*Setaria* spp.と Ff, Fr F: *trnL*(UAA)-*trnF*(GAA) intergenic spacer)

チューブ	DNA とプライマー	チューブ	DNA とプライマー
7-1	Si05, Ff	8-1	Sp11, Ff
7-2	Si05, Fr	8-2	Sp11, Fr
7-3	Si06, Ff	8-3	Sp12, Ff
7-4	Si06, Fr	8-4	Sp12, Fr
7-5	Sv07, Ff		
7-6	Sv07, Fr		
7-7	Sv08, Ff		
7-8	Sv08, Fr		