2023年度 先端生物科学コース 学生実験

担当：栽培植物起原学分野

ゲノム解読による植物遺伝子の種間比較

目的

植物のゲノム配列を得て、種間の系統関係や遺伝子と形質の関係をみる

日程

4月20日（木）　実験実習（ナノポアシーケンシングのためのDNA抽出）

4月25日（水）　解析実習（シーケンスデータの解析）

4月26日（木）　解析結果の発表

4月27日（金）　博物館見学

実習サンプル

コムギ近縁野生種

*Aegilops bicornis* BIC-1（イスラエル）、BIC-2（エジプト）

*Aegilops longissima* LON-1（イスラエル）、LON-2（イスラエル）

*Aegilops sharonensis* SHA-1（イスラエル）、SHA-2（イスラエル）

オニドコロ *Dioscorea tokoro*

実験実習（ナノポアシーケンシングのためのDNA抽出）

DNA抽出キット

TaKaRa社販売 NucleoSpin® Plant II

手順

1. 葉（約20 mg）を液体窒素で凍結し、乳鉢・乳棒などで破砕する。破砕後のサンプルは2 mLマイクロチューブに入れる。
2. PL1バッファー 400 uLを破砕後のサンプルに加え、十分に転倒混和する。
3. RNase A溶液 10 uLを加え、軽く転倒混和し、65℃で10分間インキュベートする。

※ 手順16と18で使用するPEバッファーも温めておく。

1. 紫色リングのカラムをコレクションチューブにセットする。コレクションチューブの側面にサンプル名などをサインペンで記入する。
2. 手順3で用意したサンプル溶解液をカラムに加えて、11,000×gで2分間遠心する。
3. 紫色リングのカラムを捨てて、ろ液にPCバッファー 450 uLを添加する。添加時にピペッティングを10回程度おこない、十分に混合する。
4. 緑色リングのカラムを新しいコレクションチューブにセットする。
5. 手順6の溶液 700 uLをカラムに加えて、11,000×gで1分間遠心する。
6. 遠心後、ろ液を捨てて、カラムを同じコレクションチューブにセットする。
7. PW1バッファー 400 uLをカラムに添加し、11,000×gで1分間遠心する。
8. 遠心後、ろ液を捨てて、カラムを同じコレクションチューブにセットする。
9. PW2バッファー 700uLをカラムに添加し、11,000×gで1分間遠心する。
10. 遠心後、ろ液を捨てて、カラムを同じコレクションチューブにセットする。
11. PW2バッファー 200uLをカラムに添加し、11,000×gで2分間遠心する。
12. 遠心後、ろ液を捨てて、カラムを蓋なしマイクロチューブにセットする。
13. 65℃で温めたPEバッファー 50 uLをカラムに添加し、65℃で5分間インキュベートする。
14. 11,000×gで1分間遠心し、ろ液（DNA溶液）を新しい1.5 mLマイクロチューブに移す。
15. 手順16と17の作業を再度おこなう。

※ 蓋なしと1.5 mLマイクロチューブは先ほどと同じものを使う。

解析実習（ナノポアシーケンシングのためのDNA抽出）

解析実習1（実習サンプルの配列決定）

1. シーケンシングリードとそのクオリティを確認する
2. リードのクオリティコントロールをおこなう
3. リードを参照配列にアライメントする
4. マッピング状況を確認する
5. 実習サンプルの変異を検出する
6. 実習サンプルの塩基配列を決定する

解析実習2（系統解析）

1. 遺伝子配列をジーンバンクから探す（NCBIワード検索）
2. 遺伝子相同配列をジーンバンクから探す（NCBI BLAST検索）
3. 遺伝子相同配列を実習サンプルのシーケンスから探す（Local BLAST検索）
4. 集めた相同配列で系統樹を作る