2023年度 生物先端科学コース 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・系統間比較

目的

ゲノムシーケンシングをおこない、遺伝子の塩基配列データから種間や種内系統間の遺伝的関係を調べる

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）

　　21日（金）　ナノポアシーケンシング

　　22日（土） 　〃

　　23日（日） 　〃

　　24日（月） 　〃

　　25日（火）　解析実習（シーケンスデータの解析）

　　26日（水）　解析結果の発表

　　27日（木）　博物館見学

テキスト

実験実習: 3ページ目

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

　解析実習はパソコンを使います。各自ラップトップPCを持参してください。

　解析実習までにGoogleアカウント（無料のアカウントでOK）を取得してください。

実習サンプル ※ DNA抽出担当表は2ページ目、サンプル詳細は別紙

コムギ近縁野生種（4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）

*Aegilops searsii* SEA-1（イスラエル）、SEA-2（シリア）←事前にDNA抽出済み

オニドコロ *Dioscorea tokoro*

東北　雄株（NM）、雌株（NF）

近畿　雄株（CM）、雌株（CF）

九州　雄株（SM）、雌株（SF）

DNA抽出担当表

A班：コムギ近縁野生種「-1」サンプルの担当

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| サンプル番号 | サンプル名 | 担当者 | 濃度 ng/uL | A260/A280 | A260/A230 |
| 1 | LON-1 |  |  |  |  |
| 2 | LON-1 |  |  |  |  |
| 3 | SHA-1 |  |  |  |  |
| 4 | SHA-1 |  |  |  |  |
| 5 | BIC-1 |  |  |  |  |
| 6 | BIC-1 |  |  |  |  |

B班：コムギ近縁野生種「-2」サンプルの担当

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| サンプル番号 | サンプル名 | 担当者 | 濃度 ng/uL | A260/A280 | A260/A230 |
| 7 | LON-2 |  |  |  |  |
| 8 | LON-2 |  |  |  |  |
| 9 | SHA-2 |  |  |  |  |
| 10 | SHA-2 |  |  |  |  |
| 11 | BIC-2 |  |  |  |  |
| 12 | BIC-2 |  |  |  |  |

C班：オニドコロ雄株サンプルの担当

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| サンプル番号 | サンプル名 | 担当者 | 濃度 ng/uL | A260/A280 | A260/A230 |
| 13 | NM |  |  |  |  |
| 14 | NM |  |  |  |  |
| 15 | CM |  |  |  |  |
| 16 | CM |  |  |  |  |
| 17 | SM |  |  |  |  |
| 18 | SM |  |  |  |  |

D班：オニドコロ雄株サンプルの担当

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| サンプル番号 | サンプル名 | 担当者 | 濃度 ng/uL | A260/A280 | A260/A230 |
| 19 | NF |  |  |  |  |
| 20 | NF |  |  |  |  |
| 21 | CF |  |  |  |  |
| 22 | CF |  |  |  |  |
| 23 | SF |  |  |  |  |
| 24 | SF |  |  |  |  |

実験実習（ナノポアシーケンシングのためのDNA抽出）

使用するDNA抽出キット

マッハライナーゲル社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チューブに入れる。

※ 実習では破砕済みサンプルを用意している。

1. 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。
2. 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。このとき、コレクションチューブの側面にサンプル番号を記入する。
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。バッファー添加時に10回程度のピペッティングで十分に混合する。
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。このとき、カラムの蓋にサンプル番号を記入する。
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チューブに移す。このとき、チューブの蓋にサンプル番号を記入する。
15. 抽出DNAの濃度とクオリティをNanoDropで確認する。

学生に配布しないページ

研究室準備品メモ

・DNA抽出キット　分注済み溶液等 各班 1セット（計 4セット）

Lysis Buffer PL1 400 uL x 8（1セット分）

Binding Buffer PC 450 uL x 8（1セット分）

Wash Buffer PW1 400 uL x 8（1セット分）

Wash Buffer PW2 900 uL x 8（1セット分）

Elution Buffer PE 100 uL x 8（1セット分）

RNase A 10 uL x 8（1セット分）

NucleoSpin カラム（紫リング） 8個（1セット分）

NucleoSpin カラム（緑リング） 8個（1セット分）

コレクションチューブ 16個（1セット分）

・DNA抽出マニュアル 人数分（24個）

・ピペットマン 20/200/1000 各班 1セット（計 4セット）

・ピペットチップ yellow/blue 各班 1セット（計 4セット）

・50 mLチューブ（廃液用） 各班1セット（計4セット）

・2.0 mLチューブ 人数分（50個）

・1.5 mLチューブ 人数分（50個）

・蓋なしチューブ 人数分（50個）

・チューブフローター 各班 1個（計 4個）

・50 mL チューブ立て 各班 1個（計 4個）

・産廃用ゴミ袋 各班 1個（計 4個）

・油性マーカー 各班2個（計8個）

・フリーズボックス 2個

・保冷ボックス（保冷剤入り） 1個

・NanoDrop 1台

・恒温槽 2台程度

・ナノポアデバイス