2024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

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）のとおりに、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 |
| dH2O | 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 |
| dH2O | 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斑担当、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, *Vrn1* 1F-1R | 17 | At01, *Vrn3* 1F-1R |
| 2 | At02, *Vrn1* 1F-1R | 18 | At02, *Vrn3* 1F-1R |
| 3 | At03, *Vrn1* 1F-1R | 19 | At03, *Vrn3* 1F-1R |
| 4 | At04, *Vrn1* 1F-1R | 20 | At04, *Vrn3* 1F-1R |
| 5 | At05, *Vrn1* 1F-1R | 21 | At05, *Vrn3* 1F-1R |
| 6 | At06, *Vrn1* 1F-1R | 22 | At06, *Vrn3* 1F-1R |
| 7 | Negative control※ | 23 | Negative control※ |
| 8 | （空） | 24 | （空） |
| 9 | At01, *Vrn1* 3F-3R | 25 | At01, *MYC1* 1F-1R |
| 10 | At02, *Vrn1* 3F-3R | 26 | At02, *MYC1* 1F-1R |
| 11 | At03, *Vrn1* 3F-3R | 27 | At03, *MYC1* 1F-1R |
| 12 | At04, *Vrn1* 3F-3R | 28 | At04, *MYC1* 1F-1R |
| 13 | At05, *Vrn1* 3F-3R | 29 | At05, *MYC1* 1F-1R |
| 14 | At06, *Vrn1* 3F-3R | 30 | At06, *MYC1* 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*Vrn*1 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, *Vrn1*-1F | 2-1 | At05, *Vrn1*-1F |
| 1-2 | At01, *Vrn1*-1R | 2-2 | At05, *Vrn1*-1R |
| 1-3 | At02, *Vrn1*-1F | 2-3 | At06, *Vrn1*-1F |
| 1-4 | At02, *Vrn1*-1R | 2-4 | At06, *Vrn1*-1R |
| 1-5 | At03, *Vrn1*-1F |  |  |
| 1-6 | At03, *Vrn1*-1R |  |  |
| 1-7 | At04, *Vrn1*-1F |  |  |
| 1-8 | At04, *Vrn1*-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, *MYC1*-1F | 4-1 | At05, *MYC1*-1F |
| 3-2 | At01, *MYC1*-1R | 4-2 | At05, *MYC1*-1R |
| 3-3 | At02, *MYC1*-1F | 4-3 | At06, *MYC1*-1F |
| 3-4 | At02, *MYC1*-1R | 4-4 | At06, *MYC1*-1R |
| 3-5 | At03, *MYC1*-1F |  |  |
| 3-6 | At03, *MYC1*-1R |  |  |
| 3-7 | At04, *MYC1*-1F |  |  |
| 3-8 | At04, *MYC1*-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, *Vrn1*-3F | 6-1 | At05, *Vrn1*-3F |
| 5-2 | At01, *Vrn1*-3R | 6-2 | At05, *Vrn1*-3R |
| 5-3 | At02, *Vrn1*-3F | 6-3 | At06, *Vrn1*-3F |
| 5-4 | At02, *Vrn1*-3R | 6-4 | At06, *Vrn1*-3R |
| 5-5 | At03, *Vrn1*-3F |  |  |
| 5-6 | At03, *Vrn1*-3R |  |  |
| 5-7 | At04, *Vrn1*-3F |  |  |
| 5-8 | At04, *Vrn1*-3R |  |  |

表 チューブ番号リスト（*Aegilops tauschii*と*Vrn*3 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, *Vrn3*-1F | 8-1 | At05, *Vrn3*-1F |
| 7-2 | At01, *Vrn3*-1R | 8-2 | At05, *Vrn3*-1R |
| 7-3 | At02, *Vrn3*-1F | 8-3 | At06, *Vrn3*-1F |
| 7-4 | At02, *Vrn3*-1R | 8-4 | At06, *Vrn3*-1R |
| 7-5 | At03, *Vrn3*-1F |  |  |
| 7-6 | At03, *Vrn3*-1R |  |  |
| 7-7 | At04, *Vrn3*-1F |  |  |
| 7-8 | At04, *Vrn3*-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 |  |  |