2025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17日（木）　実験実習（PCR産物の確認、精製）（図1）

　　18日（金）~ 21日（月）　シーケンシング

　　22日（火）　解析実習（分子系統解析; 図1）、発表準備

　　23日（水）　解析結果の発表

　　24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17日（木） 実験実習（PCR産物の確認、精製）のタイムスケジュール

13:15-14:00 全体説明、シーケンシング法や系統解析について

14:00-14:30 実験サンプルの説明、サンプル担当班の決定

14:30-15:15 電気泳動

休憩

15:15-15:30 電気泳動結果の確認

15:30-16:00 PCR産物の精製

16:00-16:45 シーケンシングサンプルの調整

16:45-17:15 研究発表について

4月22日（火） 解析実習（分子系統解析）のタイムスケジュール

13:15-13:30 全体説明

13:30-14:00 シーケンスの確認とトリミング

14:00-14:15 アセンブル

14:15-14:30 マルチFASTAファイルの準備

14:30-14:45 遺伝子系統樹の作成

14:45-14:55 休憩

14:55-15:45 データベースについて、系統樹の見方について

15:45-17:15 残りのサンプルの解析と発表準備

4月23日（水） 発表準備、発表のタイムスケジュール

13:15-15:00 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）

16:45-17:15 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12 uL（= PCR産物 約10 uL+ Loading buffer 2 uL）

・PCR産物（精製用）50 uL（= PCR産物15 uL + Ultrapure water 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8 uLを入れる。

1-3) 100 bpラダーマーカー 8 uLをサンプルの隣のウェルに入れる。

1-4) 150Vで10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、2-1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1.5 mLの蓋なしチューブにセットし、カラムにBuffer NE 30 μlを加える。

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 |
| Ultrapure water | 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 |
| Ultrapure water | 13.2 uL |
| Total | 21 uL |

（別紙1）使用するサンプルと遺伝子領域について

使用サンプル1: イネ *Oryza sativa*（2つの班が担当する）

表1 イネ7系統の情報

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **サンプル名** | **種名** |  | **実験** | **解析** |
| Os1 | *Oryza sativa* |  | ✔️ | ✔️ |
| Os2 | *Oryza sativa* |  | ✔️ | ✔️ |
| Os3 | *Oryza sativa* |  | ✔️ | ✔️ |
| Os4 | *Oryza sativa* |  | ✔️ | ✔️ |
| Os6 | *Oryza sativa* |  | ✔️ | ✔️ |
| Os7 | *Oryza sativa* |  | ✔️ | ✔️ |
| Os8 | *Oryza sativa* |  | ✔️ | ✔️ |

表2 シーケンス解析をおこなう遺伝領域の情報

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **遺伝領域名** | **遺伝子コードするタンパク質** | **PCR増幅長** | **A班** | **B班** |
| *PiaN* 1F-1R | NBS-LRR protein | 509 bp | ✔️ |  |
| *PiaN* 2F-2R | NBS-LRR protein | 563 bp |  | ✔️ |

使用サンプル2: コムギ近縁野生種 *Aegilops tauschii*　（2つの班が担当する）

表3 タルホコムギ *Aegilops tauschii* 18系統の情報

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **サンプル名** | **国** | **緯度** | **経度** | **系統群** | **出穂日数** | **芽生色** | **実験** | **解析** |
| At01 | Dagestan | 42.06 | 48.33 | TauL2 | 148 | Red | - | ✔️ |
| At02 | Pakistan | 30.15 | 66.90 | TauL1 | 156 | Red | - | ✔️ |
| At03 | Pakistan | 30.69 | 66.67 | TauL1 | 170 | Red | - | ✔️ |
| At04 | Afghanistan | 31.83 | 66.21 | TauL1 | 162 | Red | - | ✔️ |
| At05 | Afghanistan | 33.80 | 68.41 | TauL1 | 162 | Red | - | ✔️ |
| At06 | Iran | 36.76 | 45.94 | TauL1 | 148 | Green | - | ✔️ |
| At07 | Iran | 35.85 | 51.04 | TauL2 | 165 | Red | - | ✔️ |
| At08 | Iran | 36.88 | 53.47 | TauL2 | 148 | Red | - | ✔️ |
| At09 | Pakistan | 30.15 | 66.90 | TauL1 | 153 | Red | - | ✔️ |
| At10 | Iran | 37.10 | 55.30 | TauL2 | 165 | Red | - | ✔️ |
| At11 | Iran | 37.67 | 49.40 | TauL2 | 166 | Red | - | ✔️ |
| At12 | Iran | 36.76 | 45.94 | 不明 | - | Green | - | ✔️ |
| At13 | Afghanistan | 35.91 | 68.92 | TauL1 | 162 | Red | ✔️ | ✔️ |
| At14 | Afghanistan | 32.81 | 67.75 | TauL1 | 175 | Red | ✔️ | ✔️ |
| At15 | Turkey | 38.29 | 43.15 | TauL1 | 168 | Red | ✔️ | ✔️ |
| At16 | Turkey | 38.29 | 43.15 | TauL1 | 169 | Red | ✔️ | ✔️ |
| At17 | Armenia | 40.25 | 44.62 | TauL1 | 157 | - | ✔️ | ✔️ |
| At18 | Georgia | 41.82 | 44.82 | TauL3 | 167 | Red | ✔️ | ✔️ |

表4 シーケンス解析をおこなう遺伝領域の情報

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **遺伝領域名** | **遺伝子コードするタンパク質** | **PCR増幅長** | **C班** | **D班** |
| *MYC1* 1F-1R | transcription factor EAT1-like | 923 bp | ✔️ |  |
| *Vrn1* 1F-1R | MADS-box transcription factor 14 | 1225 bp |  | ✔️ |
| *Vrn1* 3F-3R | MADS-box transcription factor 14 | 980 bp | ✔️ |  |
| *Vrn3* 1F-1R | protein HEADING DATE 3A | 660 bp |  | ✔️ |

（別紙2）PCR産物のリスト

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| A班  DNA: イネ  遺伝子領域： *PiaN* 1F-1R | |  | B班  DNA: イネ  遺伝子領域： *PiaN* 2F-2R | |
| チューブNo. | DNA |  | チューブNo. | DNA |
| 1 | Os1 |  | 9 | Os1 |
| 2 | Os2 |  | 10 | Os2 |
| 3 | Os3 |  | 11 | Os3 |
| 4 | Os4 |  | 12 | Os4 |
| 5 | Os6 |  | 13 | Os6 |
| 6 | Os7 |  | 14 | Os7 |
| 7 | Os8 |  | 15 | Os8 |
|  | Negative control※ |  |  | Negative control※ |

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

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| C班  DNA: タルホコムギ  遺伝子領域： *MYC1* 1F-1R | |  | D班  DNA: タルホコムギ  遺伝子領域： *Vrn3* 1F-1R | |
| チューブNo. | 系統名 |  | チューブNo. | 系統名 |
| 17 | At13 |  | 41 | At13 |
| 18 | At14 |  | 42 | At14 |
| 19 | At15 |  | 43 | At15 |
| 20 | At16 |  | 44 | At16 |
| 21 | At17 |  | 45 | At17 |
| 22 | At18 |  | 46 | At18 |
| 23 | Negative control※ |  | 47 | Negative control※ |
|  | （空） |  |  | （空） |

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

（別紙3）シーケンス用サンプルのリスト



図 8連チューブの側面のチューブ番号

表 シーケンス用チューブとサンプルの対応表

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| チューブ | DNA, プライマー | チューブ | DNA, プライマー |
| 1.1 | Os1, *PiaN*-1F | 2.1 | Os1, *PiaN*-1R |
| 1.2 | Os2, *PiaN*-1F | 2.2 | Os2, *PiaN*-1R |
| 1.3 | Os3, *PiaN*-1F | 2.3 | Os3, *PiaN*-1R |
| 1.4 | Os4, *PiaN*-1F | 2.4 | Os4, *PiaN*-1R |
| 1.5 | Os6, *PiaN*-1F | 2.5 | Os6, *PiaN*-1R |
| 1.6 | Os7, *PiaN*-1F | 2.6 | Os7, *PiaN*-1R |
| 1.7 | Os8, *PiaN*-1F | 2.7 | Os8, *PiaN*-1R |
|  |  |  |  |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| チューブ | DNA, プライマー | チューブ | DNA, プライマー |
| 3.1 | Os1, *PiaN*-2F | 4.1 | Os1, *PiaN*-2R |
| 3.2 | Os2, *PiaN*-2F | 4.2 | Os2, *PiaN*-2R |
| 3.3 | Os3, *PiaN*-2F | 4.3 | Os3, *PiaN*-2R |
| 3.4 | Os4, *PiaN*-2F | 4.4 | Os4, *PiaN*-2R |
| 3.5 | Os6, *PiaN*-2F | 4.5 | Os6, *PiaN*-2R |
| 3.6 | Os7, *PiaN*-2F | 4.6 | Os7, *PiaN*-2R |
| 3.7 | Os8, *PiaN*-2F | 4.7 | Os8, *PiaN*-2R |
|  |  |  |  |

（別紙3）シーケンス用サンプルのリスト



図 8連チューブの側面のチューブ番号

表 シーケンス用チューブとサンプルの対応表

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| チューブ | DNA, プライマー | チューブ | DNA, プライマー |
| 5.1 | At13, *MYC1*-1F | 6.1 | At13, *MYC1*-1R |
| 5.2 | At14, *MYC1*-1F | 6.2 | At14, *MYC1*-1R |
| 5.3 | At15, *MYC1*-1F | 6.3 | At15, *MYC1*-1R |
| 5.4 | At16, *MYC1*-1F | 6.4 | At16, *MYC1*-1R |
| 5.5 | At17, *MYC1*-1F | 6.5 | At17, *MYC1*-1R |
| 5.6 | At18, *MYC1*-1F | 6.6 | At18, *MYC1*-1R |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| チューブ | DNA, プライマー | チューブ | DNA, プライマー |
| 7.1 | At13, *Vrn3*-1F | 8.1 | At13, *Vrn3*-1R |
| 7.2 | At14, *Vrn3*-1F | 8.2 | At14, *Vrn3*-1R |
| 7.3 | At15, *Vrn3*-1F | 8.3 | At15, *Vrn3*-1R |
| 7.4 | At16, *Vrn3*-1F | 8.4 | At16, *Vrn3*-1R |
| 7.5 | At17, *Vrn3*-1F | 8.5 | At17, *Vrn3*-1R |
| 7.6 | At18, *Vrn3*-1F | 8.6 | At18, *Vrn3*-1R |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |