

Release date: April 1, 2025

sQuantGenome ver. 2.0:
定量 PCR に基づくゲノムサイズ測定
のためのプロトコル
(遺伝研バージョン)



このプロトコルで紹介する sQuantGenome 法¹は、ゲノムサイズ既知の他生物種や生細胞の調達を要せずにゲノムサイズの測定を可能にする。このプロトコルの前身であるバージョン 1.0 は、Wilhelm *et al.*²によって報告された方法もとに、測定精度の向上のためいくつかのステップを追加している。重要な変更点は 1) 単一コピーのオーソログ遺伝子セットとして確立された CVG 遺伝子セット³から複数（少なくとも3つ以上）のリファレンス遺伝子を選ぶ、2) DNA 定量と PCR に高分子量 gDNA の代わりに断片化した gDNA を使用する、3) サンガーシーケンスと綿密なサイズ分布解析によって DNA コピー数スタンダードを慎重に評価する、4) プラスチック表面への DNA の吸着を防ぐため、吸着性の低いプラスチック製品（チューブやピペットチップ）と界面活性剤（Tween-20）を含む緩衝液を使用する、という点である。

ワークフローは高分子量 (HMW) ゲノム DNA の抽出と断片化、データベースからの単一コピー遺伝子転写産物の同定とプライマーデザイン、PCR による qPCR 用の標準 DNA（コピー数スタンダード）の準備、そして定量 PCR からなる（図 1）。

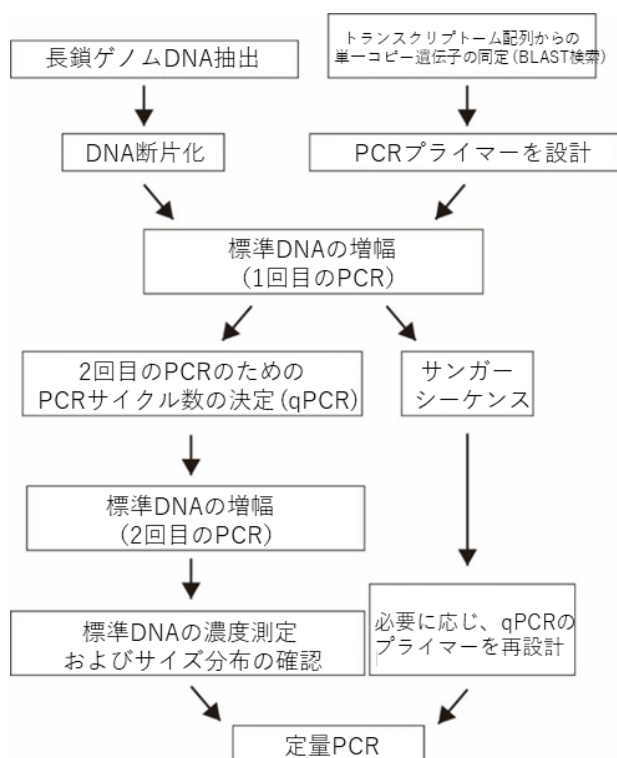


図 1. 定量 PCR に基づくゲノムサイズ測定のワークフロー

**Authorized by Akane Oishi & Shigehiro Kuraku
at National Institute of Genetics
in Squalomix consortium**

試薬および消耗品

- ✓ 低吸着チューブとピペットチップ: DNA LoBind tube (1.5 mL; Eppendorf), Pipet Tip (1000 μ L, 200 μ L, 20 μ L, 10 μ L; Watson)
- ✓ マイクロピペット: Pipetman (P1000, P200, P20, P2; Gilson)
- ✓ 乳鉢と乳棒 (組織からの gDNA 抽出用)
- ✓ 液体窒素 (組織からの gDNA 抽出用)
- ✓ PBS (10 \times PBS solution, Nippon Gene, cat: 314-90185)
- ✓ Shark phosphate-buffered saline solution (板鰐類赤血球からの gDNA 抽出用; shark PBS: 1 \times PBS に 299 mM urea と 68 mM NaCl を添加したもの) for elasmobranch cells/tissue^{4,5}. 蒸留水 200 mL に urea 4.49 g と NaCl 1.0 g を溶かす。25 mL の 10 \times PBS を加える。1N HCl で pH を 7.0 に調整し、水で 250 mL に調整する。ろ過滅菌し 4 $^{\circ}$ C で保存。
- ✓ NucleoBond AXG 100 or AXG 500 with NucleoBond Buffer Set IV (Clontech) or DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen).
- ✓ TE buffer
- ✓ Nuclease-Free Water (Qiagen)
- ✓ g-TUBE (Covaris)
- ✓ TapeStation ScreenTape analysis kit (Genomic DNA, High Sensitivity D1000; Agilent)
- ✓ KAPA HiFi HotStart ReadyMix (KAPA Biosystems)
- ✓ 8-well PCR tube (Nippon Genetics)
- ✓ Agarose S gel (Nippon gene)
- ✓ 10 \times TBE (Tris-borate-EDTA) buffer
- ✓ Atlas DNA stain (BioAtlas)
- ✓ AMPure XP beads (Beckman Coulter)
- ✓ MagnaStand v3.2 (FastGene)
- ✓ Qubit dsDNA HS Assay Kit (ThermoFisher Scientific)
- ✓ BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ThermoFisher Scientific)
- ✓ Luna Universal qPCR Master Mix (NEB)
- ✓ 50 \times dilution buffer (DB) (500 mM Tris-HCl pH 8.0, 2.5% Tween-20)
- ✓ 96-well PCR plates (BioRad)

ゲノム DNA の抽出—下記の手順はあくまでも例

1. 動物組織／胚サンプルの準備

- 1.1 組織を小片（大きさ 1cm 立方まで）に切り離し、液体窒素中で瞬間凍結し、使用するまで -80°C で保存する。
- 1.2 乳鉢と乳棒を用いて、液体窒素中で動物組織／胚を粉末化する。
 - 1.2.1 乳鉢と乳棒を超低温フリーザーで 1 時間以上予冷する。
 - 1.2.2 冷やしておいた乳鉢に液体窒素を注ぐ。
 - 1.2.3 組織（大きさ 1 cm 立方 まで）を乳鉢に移し、乳棒で粉末になるまですりつぶす。

注：ときどき液体窒素を乳鉢に注ぎ、すりつぶしの間乳鉢と乳棒を冷たく保つ。
 - 1.2.4 液体窒素中の組織懸濁液を、液体窒素であらかじめ冷やした 50mL チューブに移す。
 - 1.2.5 スクリューキャップをゆるく閉め、チューブを超低温フリーザーに入れ、液体窒素が完全に蒸発するまで待つ。
 - 1.2.6 すぐにゲノム DNA (gDNA) の抽出に進むか、粉末化した組織を使用するまで -80°C で保存する。

2. 赤血球サンプルの準備

- 2.1 ヘパリンナトリウム塩液 (MOCHIDA, cat: 5,000 units/5 mL; 2-3 mL の血液に 10 μ L 使用) または EDTA (0.5M EDTA, Gibco, cat: 15575-020; 1-2 mL の血液に 10 μ L 使用) を含むシリンジを用いて動物から血液を採取する。
- 2.2 血液を PBS (1 \times PBS または shark PBS) で 1:200 に希釈し、使い捨ての細胞計算盤を用いて細胞数を数える。

注：板鰐類（サメとエイ）には shark PBS を使用する。
- 2.3 $1 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ 細胞を 1.5 mL チューブに取り、500 \times g、5 min、4°C で遠心して細胞をペレット化し、上清を除去、液体窒素中で瞬間凍結し使用するまで -80°C で保存する。

3. NucleoBond AXG 100 または AXG 500 と NucleoBond Buffer Set IV (Clontech) または DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen) を使用して高分子 gDNA を抽出する。

注：前者のキットは、抽出した DNA をロングリードのゲノム配列決定のような高分子量 DNA を特に必要とする目的に使用するときのみ使用した。
4. dsDNA HS Kit を用いて Qubit で gDNA の濃度を定量する。
5. TapeStation (Agilent Technologies) で Genomic DNA ScreenTape 分析キットを用いて抽出した gDNA のサイズ分布を分析し、主要な分子長が 10 kb 以上であることを確認する。

6. gDNA を 1-4 µg 分取、TE バッファーで全量を 150 µL に調整し、g-TUBE カラム (Covaris) にアプライする。AR015-24 ローター (TOMY) を取り付けた MX-300 高速遠心機 (TOMY) にて、25 °C、6,100 rpm 1 分、6,100 rpm 1 分、7,400 rpm 1 分、g-TUBE を反転して 6,100 rpm 1 分、6,100 rpm 1 分、7,400 rpm 1 分で gDNA を 10 kb に裁断する。

注：他のロータータイプの回転速度(rpm)については適宜 Covaris 社に問い合わせる。

7. 断片化した gDNA を 1 µL 分取し、TapeStation で Genomic DNA ScreenTape 分析キットを用いてサイズ分布を調べる。メインバンドのサイズが約 10 kb であることを確認する。
8. 断片化した gDNA を 4°C で保存する。

リファレンス遺伝子の選択とプライマーデザイン

1. 定量化の基準として、研究対象種に単一コピーで存在する遺伝子セットを選ぶことが必須である。脊椎動物を対象にする場合、Core Eukaryotic Genes (CEG)⁶にも含まれる 15 個の Core Vertebrate Genes (CVG)³や、BUSCO (Benchmarking Universal Single-Copy Orthologs)⁷の脊椎動物遺伝子セットがリファレンス遺伝子の有力な候補となる。

HGNC symbol	Human peptide ID
ACAT1	ENSP00000265838
ADCK1	ENSP00000238561
CCT4	ENSP00000377958
COQ5	ENSP00000288532
DLD	ENSP00000205402
GUF1	ENSP00000281543
HACL1	ENSP00000323811
MPI	ENSP00000318318
MTIF2	ENSP00000263629
NAT10	ENSP00000257829
POLR3H	ENSP00000347345
PSMD6	ENSP00000295901
RFC3	ENSP00000369411
RFC4	ENSP00000296273
ZNF622	ENSP00000310042

2. 上記のヒト CVG 遺伝子のアミノ酸配列をクエリーとして用い、対象種のトランスクリプトームアセンブリなどの転写産物の塩基配列に対して BLAST (TBLASTN) 検索を行うことにより、対象種の CVG 転写産物の候補を同定する。トランスクリプトームアセンブリは、例えば板鰐類では Squalomix ページ (<https://github.com/Squalomix/info>)⁸ からリンクされた検索サイトにある。

注：Squalomix に含まれていない種については、その種の転写産物データベースに対して BLAST (TBLASTN) 検索を行う。

3. 最もヒットした転写産物の推定アミノ酸配列を取得し、それをクエリーとして使用して、ヒトタンパク質のアミノ酸配列データベースに対して BLAST (BLASTP) 検索を行う。TBLASTN と BLASTP 検索で互いに最もヒットした標的生物種の転写産物は、選択した CVG のオーソログと考えられる。

注：オーソロジーを分子系統樹の推定により確認することが望ましい。

4. 対象種の転写産物の配列をヒトの相当する部分の最後のエクソンとアライメントすることによって、標的生物種の CVG 転写産物の最後のエクソンを推定する。

注：最後のエクソンを選ぶのは、通常、真核生物ゲノムに含まれる遺伝子を構成するエクソンの中で最も長い傾向があるからである^{9,10}。また、エクソン-イントロンの構造は、例えば板鰐類と哺乳類の間であっても保存されているという仮定に基づいている。選択した遺伝子のある転写産物のイントロンの位置は Ensembl データベース (下図の例) の「Protein」ビューで確認することができる。

5. リファレンス遺伝子の転写産物の最後のエクソンの内側に PCR プライマーをデザインする。例えば Primer3 (<https://bioinfo.ut.ee/primer3/>)¹¹ のような信頼できるプライマー設計プログラムを用いて、アンプリコンの長さが 200-300 nt となるようにする。

注：遺伝子構造が既知の種の場合は、転写産物の最後のエクソンの内側に PCR プライマーと qPCR プライマーをデザインするだけでよい。

- 5でデザインした PCR プライマーの増幅領域の内側に qPCR のプライマーをデザインする。qPCR ではアンプリコンの長さが 60-100 nt となるようにする。

注：いくつかのプライマーが機能しない可能性があるため、少なくとも5つの CVG 遺伝子を選びそれらをリファレンス遺伝子としてプライマーをデザインする。

- OligoCalc プログラム (<https://www.zoology.ubc.ca/~alorch/revcomp.htm>)を用いて前述の PCR プライマーで増幅する DNA スタンダードの分子量(MW)を計算する。

注：オリゴヌクレオチドの組成は「double-stranded DNA」に設定する。

標準 DNA (qPCR コピー数スタンダード)の調製

First-PCR

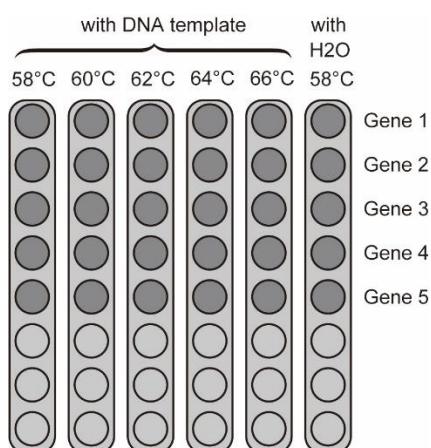
- g-TUBE で断片化した gDNA を H₂O で 5 ng/μL に希釈する。

注：First-PCR に十分な量の DNA を準備する。

- PCR マスターミックスを準備する。

PCR Master Mix (First-PCR-mix)	(×1 reaction)	(# of temperature gradient +NTC)	(10% extra)	
2× KAPA HiFi HotStart Ready Mix	10 μL	×6	×1.1	= 66 μL
Forward primer (10 uM)	0.6 μL	×6	×1.1	= 3.96 μL
Reverse primer (10 uM)	0.6 μL	×6	×1.1	= 3.96 μL
H ₂ O	7.8 μL	×6	×1.1	= 51.48 μL
Total	19 μL	×6	×1.1	= 125.4 μL

- 下図のように First-PCR-mix を 8 連 PCR チューブに 19 μL ずつ分注し、希釈した テンプレート DNA (5 ng/μL)または H₂O を 1 μL 加える。



注：上に示したレイアウトは5つのリファレンス遺伝子で、アニーリング温度の勾配が 58°C - 66°C で 2°C ずつ増加の場合である。リファレンス遺伝子の数や温度勾配が異なる場合はレイアウトを変更する。

注：我々の使用機器では、アニーリング温度の最適温度は理研より 2°Cほど高めに
出るので、62°C、64°C、66°C、68°Cで行っている。

4. PCR を行う。 [98°C for 3 min, 34 cycles of (98°C for 20 sec, 62°C – 68°C in 2°C
increments of temperature gradient for 15 sec, 72°C for 5 sec), 72°C for 1 min, and a hold
at 4°C]

注：アニーリング温度ごとに別々に PCR を行うか温度勾配プロトコルを備えた
PCR マシンを使用する。

5. PCR 産物の一部(4 µL)を分取、0.8 × TBE バッファー中の 2% アガロース(Agarose
S) ゲルで電気泳動を行い、ゲルを Atlas DNA stain で染色し、シングルバンドまた
はそれに近い産物を得られる最適な PCR 条件を決定する。
6. 最適な PCR 条件から PCR 産物を 15 µL 分取、TE を 5 µL 加える。
7. AMPure XP ビーズを用いて PCR 産物のダブルサイズセレクションを次のように行
う。

PCR product size range (bp)	Size selection condition (right side – left side)
100-160	×0.8 vol. (16 µL AMPure XP) – ×1.8 vol. (20 µL AMPure XP)
160-240	×0.8 vol. (16 µL AMPure XP) – ×1.2 vol. (8 µL AMPure XP)
240-300	×0.7 vol. (14 µL AMPure XP) – ×1.0 vol. (6 µL AMPure XP)

右側セレクション

- 7.1 20 µL の PCR 産物に AMPure XP ビーズ（右側セレクション用; 16 µL または
14 µL）を加え、ボルテックスで混ぜ、室温で 5 分間インキュベートする。
- 7.2 チューブを短く遠心し、マグネットスタンドに置いて、上清が透明になるま
で待つ。
- 7.3 上清を新しい PCR チューブに移す。

左側セレクション

- 7.4 AMPure XP ビーズ（左側セレクション用; 20 µL, 8 µL, 6 µL）を右側セレクシ
ョンの上清（ステップ 7.3 から）に加え、ボルテックスで混ぜ、室温で 5 分
間インキュベートする。
- 7.5 短く遠心し、マグネットスタンドに置き、上清が透明になるまで待つ。
- 7.6 サンプルチューブをマグネットに置いたまま、P-200 ピペットで上清を取り
除く。
- 7.7 マグネットに置いたままサンプルチューブに 80% EtOH を 200 µL 加え、30
秒待つ。
- 7.8 サンプルチューブをマグネットに置いたまま、P-200 ピペットで EtOH を取
り除く。
- 7.9 EtOH 洗浄のステップをもう一度くり返す。

- 7.10 短く遠心し、マグネットに置き、残りの EtOH を P-20 か P-10 ピペットで完全に除去する。
- 7.11 蓋を開けたまま、ビーズを 1 分間風乾する。
- 7.12 ビーズに TE を 30 μ L 加え、ボルテックスで混ぜ、室温で 2 分間インキュベートする。
- 7.13 サンプルチューブを短く遠心し、マグネットに置いて、溶出液を新しい 1.5 mL チューブに回収する。
- 7.14 dsDNA HS キットを使い、First-PCR 産物の濃度を Qubit で定量する。
- 7.15 サイズセレクションした First-PCR 産物を 4°C で保存する。
8. サンガーシーケンスを行う。トランスクリプトームアセンブリで予想される配列と一致することを確認する。また、qPCR プライマーがヘテロ接合の多型部位（例 SNP）と重なっていないことを確認する。もしヘテロ接合の多型部位と重なっている場合は、qPCR プライマーを再設計する。
注：サイズセレクションした First-PCR 産物 10 ng を使用し、First-PCR と同じフォワードとリバースプライマーで First-PCR 産物の両端からサンガーシーケンスを行う。

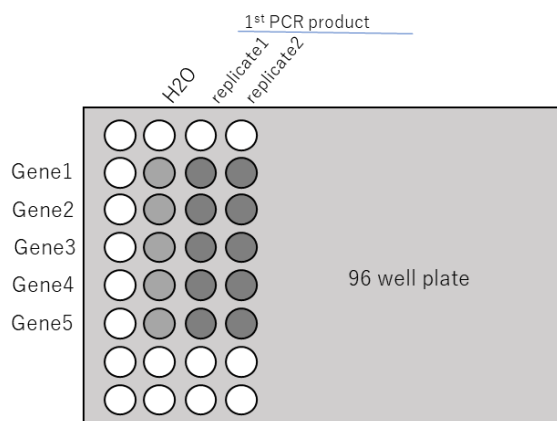
Second-PCR

9. サイズセレクションした First-PCR 産物を H₂O で 5 倍希釈する。
注：PCR サイクル数の決定と Second-PCR に十分な量を準備する。
10. PCR サイクル数決定のための qPCR Master Mix の準備

<u>Cycle-determination-qPCR Master Mix</u>	($\times 1$ reaction)	(# of samples: H ₂ O $\times 1$ and DNA $\times 2$)	(10% extra)		
Luna Universal qPCR Master Mix (2x)	5 μ L	$\times 3$	$\times 1.1$	=	16.5 μ L
Forward primer (10 uM)	0.25 μ L	$\times 3$	$\times 1.1$	=	0.83 μ L
Reverse primer (10 uM)	0.25 μ L	$\times 3$	$\times 1.1$	=	0.83 μ L
H ₂ O	4 μ L	$\times 3$	$\times 1.1$	=	13.2 μ L
Total	9.5 μ L	$\times 3$	$\times 1.1$	=	31.4 μ L

注：プライマーは First-PCR と同じ。

11. サイクル数決定用の qPCR Master Mix 9.5 μ L を 96 穴 qPCR プレートに以下のように分注し、希釈した First-PCR 産物（ステップ 9 から）または H₂O を 0.5 μ L 加える。



注：リファレンス遺伝子の数やテクニカルレプリケーションの数が異なる場合はプレートレイアウトを変更する。

我々の使用している qPCR 機器では、96 穴プレートの外側 1 周のウェルは不安定なため使用しない。

12. BioRad CFX96 C1000 system（または同等のシステム）を用いて[95°C for 1 min, and 40 cycles of (95°C for 15 sec, 60°C for 30 sec) + melt curve]で qPCR を行い、最高蛍光強度の 1/4 に達する Ct (cycle threshold)を決定する。

注：蛍光値は Rn または蛍光強度として設定する。

13. Second-PCR 用の PCR mix を 8 連チューブに準備する。

PCR Mater Mix (Second-PCR-mix)	(×1 reaction)
2× KAPA HiFi HotStart Ready Mix	10 μL
Forward primer (10 uM)	0.6 μL
Reverse primer (10 uM)	0.6 μL
Template DNA	1 μL
H2O	7.8 μL
Total	20 μL

14. 先だって決めたアニーリング温度とサイクル数で PCR を行う。[98°C for 3 min, X cycles of (98°C for 20 sec, Y°C for 15 sec, 72°C for 5 sec), 72°C for 1 min, and a hold at 4°C].
15. Second-PCR 産物を AMPure XP を用いてダブルサイズセレクションし、TE バッファ 30 μL で溶出する。
注：AMPure XP ビーズを用いたサイズセレクションの条件はステップ 7 の「qPCR コピー数スタンダードの調製」の項に従う。
16. dsDNA HS キットを使い、サイズセレクションした Second-PCR 産物の濃度を Qubit で定量する。
17. サイズセレクションした Second-PCR 産物のサイズ分布を High Sensitivity D1000 キットを用いて TapeStation で分析する。シングルバンドであることが確認されたサ

イズセクション Second-PCR 産物のみを次のステップ（定量 PCR）に使用する。

注：TapeStation でサイズ分布の分析のために、サイズセクションした Second-PCR 産物を H₂O で 0.2 ng/μL に希釈する。

18. サイズセクションした Second-PCR 産物は、使用するまで 4°C で保存する。

注：サイズセクション Second-PCR 産物は、次のステップで DNA コピー数スタンダードとして使用する。

定量 PCR

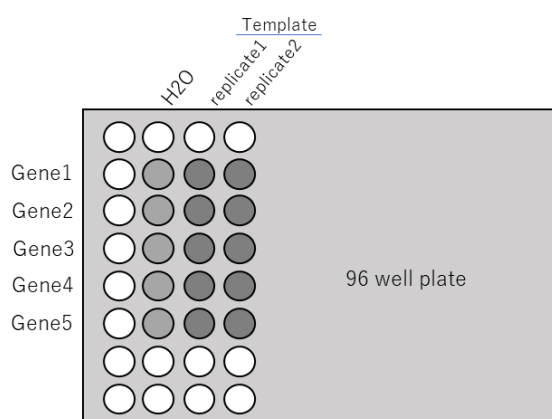
定量 PCR（テスト）

本番では試薬の使用量が多く、増幅が不調な際に不意にコストを払うことになるので、事前に qPCR プライマーを用いてテスト実験を行い、増幅曲線や解離曲線に問題のないことを確認する。

qPCR Master Mix の準備

qPCR Master Mix	(×1 reaction)	(# of samples: H ₂ O x1 and DNA x2)	(10% extra)		
Luna Universal qPCR Master Mix (2x)	5 μL	×3	×1.1	=	16.5 μL
Forward primer (10 uM)	0.25 μL	×3	×1.1	=	0.83 μL
Reverse primer (10 uM)	0.25 μL	×3	×1.1	=	0.83 μL
H ₂ O	4 μL	×3	×1.1	=	13.2 μL
Total	9.5 μL	×3	×1.1	=	31.4 μL

qPCR Master Mix 9.5 μL を 96 穴 qPCR プレートに以下のように分注し、テンプレートまたは H₂O を 0.5 μL 加える。



定量 PCR（本番）

qPCR を 96 穴プレートで行う場合は、全てのリファレンス遺伝子を一度に扱えないので、遺伝子ごとに分けて行う。

1. 断片化した gDNA (「ゲノム DNA 抽出」セクションのステップ 7 から) 5 μ L を新しい 1.5 mL LoBind チューブに分取、TE 19.5 μ L を加えて 5 倍希釈し、50 \times DB ストック溶液を 0.5 μ L 加え、ボルテックスで混ぜる。
注：上記は gDNA の断片化を 4 μ g でスタートした場合。2 μ g でスタートの場合は 2.5 倍希釈にする。
2. DNA スタンダード (「qPCR コピー数スタンダードの調製」のセクションのステップ 18 から) を新しい 1.5 mL LoBind チューブに 24.5 μ L とり、50 \times DB ストック溶液を 0.5 μ L 加えてボルテックスで混ぜる。
3. 断片化した gDNA と 1 \times DB で調製した DNA コピー数スタンダードの濃度を、dsDNA HS キットを用いて Qubit で定量する。
 - 3.1 4 回の測定を行うための総サンプル数を計算する。
注：サンプルは、Qubit dsDNA HS 標準液 1、Qubit dsDNA HS 標準液 2 および DNA コピー数スタンダード (4 レプリケート)、gDNA (4 レプリケート) で構成される。
 - 3.2 Qubit dsDNA HS 試薬を Qubit dsDNA HS buffer で 1:200 に希釈し、Qubit working solution をつくる。
注：Qubit dsDNA HS 標準液と DNA コピー数スタンダードと gDNA を含むサンプルセット全体を測定するのに十分な量の Qubit working solution をつくる。
 - 3.3 gDNA と DNA コピー数スタンダードは 4 レプリケート分をまとめて作製し、4 つの Qubit チューブに分注する。
Qubit working solution を 2-3 回吸引排出することによってピペットチップを予備洗浄する。その後すぐに (gDNA または DNA コピー数スタンダードの場合) $196 \mu\text{L} \times 4.5 = 882 \mu\text{L}$ を 1.5 mL チューブに、(Qubit dsDNA HS 標準液の場合) 190 μ L を 0.5 mL チューブ(Qubit 用)に リバースピペッティングで分注する。Qubit working solution の蒸発を防ぐため蓋は閉めておく。
注：P-1000、P-200 ピペットを使用する。
 - 3.4 ピペットチップを予備洗浄することなく断片化した gDNA とスタンダード DNA を $4 \mu\text{L} \times 4.5 = 18 \mu\text{L}$ 、または Qubit 標準液を 10 μ L 分取し、Qubit working solution に直接入れ、チップを液面下に沈めた状態で上下に 2-3 回ピペッティングする。
注：P-20 ピペットを使用する。
 - 3.5 蓋を閉め、チューブをボルテックスで混ぜ、スピンドウン。gDNA とスタンダード DNA は 4 つの Qubit チューブに 200 μ L ずつ分注する。遠心してチューブの底に液を集め、Qubit を用いて測定する。
注：同じチューブを複数回測定することは避ける。繰り返し測定するとサン

プルの温度が上昇し、DNA の濃度が高い値を示すようになる。

3.6 4本のチューブの測定から平均濃度を求める。

注：4本の測定の変動係数(CV) は1.5%を超えてはならない。値が1.5%を超える場合は、DNA サンプルを再度ボルテックスで混ぜ、Qubit で測定を繰り返す。

4. DNA スタンダード 50,000 コピー/μL (STD1)の調製

4.1 各 DNA スタンダード(1-5 ng/μL in 1×DB)の DNA コピー数を以下の式で計算する。 $1\ \mu\text{L DNA 中の DNA コピー数} = ((\text{DNA 濃度 (ng/}\mu\text{L)}) / (\text{MW (g)} \times 10^9)) \times (6.02214076 \times 10^{23})$.

注：二本鎖の DNA スタンダードの分子量(MW)は OligoCalc program (<https://www.zoology.ubc.ca/~alorch/revcomp.htm>)で計算する。

4.2 DNA スタンダードを 1×DB で 10 倍希釈する (10 倍希釈となる)。

4.2.1 1×DB を 2-3 回吸引排出し、ピペットチップを 1×DB で予備洗浄した後、45μL の 1×DB を 1.5 mL チューブにリバースピペッティングで分注する。

4.2.2 DNA スタンダード (「定量 PCR」セクションのステップ 2 から) をピペットチップの予備洗浄なしで 5μL 分取し、1.5 mL チューブ中の 1×DB 45 μL に直接入れ、ピペットチップを液面化に沈めた状態で上下に 2-3 回ピペッティングし、蓋を閉じてボルテックスで混ぜ、すばやくスピンドウンする。

4.3 さらに DNA スタンダードを 1×DB で 100 倍希釈する (1000 倍希釈となる)。

4.3.1 1×DB を 2-3 回吸引排出し、ピペットチップを 1×DB で予備洗浄した後、495 μL の 1×DB を 1.5 mL チューブにリバースピペッティングで分注する。

4.3.2 10 倍希釈した DNA スタンダード 5 μL をピペットチップの予備洗浄なしで分取し、1.5 mL チューブ中の 1×DB 495 μL に直接入れ、ピペットチップを液面化に沈めた状態で上下に 2-3 回ピペッティングし、蓋を閉じてボルテックスで混ぜ、すばやくスピンドウンする。

4.4 DNA スタンダードをさらに希釈し、50,000 コピーDNA/μL にする。

4.4.1 1×DB を 2-3 回吸引排出し、ピペットチップを 1×DB で予備洗浄した後、100 μL の 1×DB を 1.5 mL チューブにリバースピペッティングで分注する。

4.4.2 5×10^6 コピーDNA に相当する 1000 倍希釈した DNA スタンダードの量(= X μL)を計算する。

4.4.3 1.5 mL チューブ (ステップ 4.4.1) から X μL の 1×DB を取り除く。

4.4.4 1000 倍希釈した DNA スタンダード（ステップ 4.3.2）をピペットチップの予備洗浄なしで X μ L 分取し、直接 1 \times DB（ステップ 4.4.3）に入れ、ピペットチップを液面化に沈めた状態で上下に 2-3 回ピペッティングし、蓋を閉じてボルテックスで混ぜ、すばやくスピンドウンする。

4.4.5 50,000 コピー/ μ L に調製した DNA スタンダードを STD1 とする。

5. DNA スタンダード STD2~STD5 の調製

5.1 10,000 コピー/ μ L の STD2 を調製する。

5.1.1 1 \times DB を 2-3 回吸引排出し、ピペットチップを 1 \times DB で予備洗浄した後、20 μ L の 1 \times DB を 1.5 mL チューブにリバースピペッティングで分注する。

5.1.2 STD1 5 μ L をピペットチップの予備洗浄なしで分取し、1.5 mL チューブ中の 1 \times DB 20 μ L に直接入れ、ピペットチップを液面化に沈めた状態で上下に 2-3 回ピペッティングし、蓋を閉じてボルテックスで混ぜ、すばやくスピンドウンする。

5.1.3 10,000 コピー/ μ L に調製した DNA スタンダードを STD2 とする。

5.2 2,000 コピー-DNA/ μ L、400 コピー-DNA/ μ L、80 コピー-DNA/ μ L の STD3~5 を希釈系列で調製する。

注：STD2 を希釈して STD3 を調製、STD3 を希釈して STD4 を調製、STD4 を希釈して STD5 を調製する。ステップ 5.1.1~5.1.3 のように希釈する。

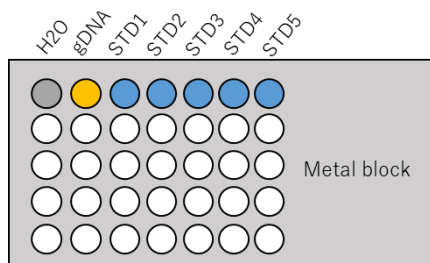
6. ゲノムサイズ推定用の qPCR mix を準備する。

qPCR Master Mix	(\times 1 reaction)	(# of technical replicates +0.5)	(# of samples: gDNA, DNA STDs, H2O +0.5)	
Luna Universal qPCR Master Mix (2x)	5 μ L	\times 4.5	\times 7.5	= 168.75 μ L
Forward primer (10 uM)	0.25 μ L	\times 4.5	\times 7.5	= 8.4uL
Reverse primer (10 uM)	0.25 μ L	\times 4.5	\times 7.5	= 8.4 uL
H2O	3.5 μ L	\times 4.5	\times 7.5	= 118.2 uL
Total	9 μ L	\times 4.5	\times 7.5	= 303.75 uL

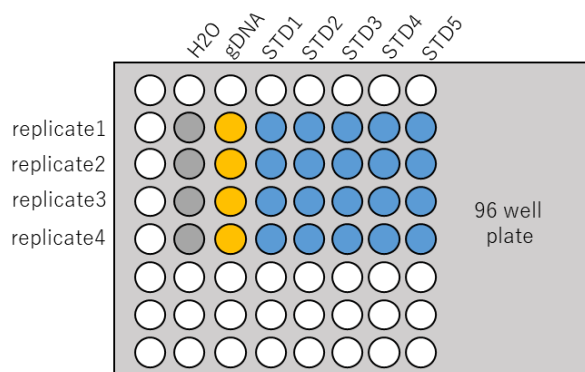
注：テンプレート DNA による汚染を防ぐため、4.と 5.のスタンダードの希釈系列作製より前に、6.の qPCR mix の準備を先に行うのも一案である。

7. 1.5 mL チューブを以下に示すように氷上のメタルブロックの上に置き、9 μ L \times 4.5= 40.5 μ L qPCR Master Mix を分注し、ピペットチップの予備洗浄なしで 4.5 μ L の H2O、gDNA（ステップ 1 から）、または DNA スタンダード（STD1~5 ステッ

プ4と5から)を加える。DNA 溶液を直接 qPCR Master Mix に加え、ピペットチップを液面化に沈めた状態で上下に 2-3 回ピペッティングする。



8. 蓋を閉め、ボルテックスし、1,500 rpm で 10 秒間スピンドウンする。
9. P20 ピペットを 10 μ L にセットし、qPCR Master Mix を 2-3 回吸引排出し、ピペットチップを予備洗浄した後、10 μ L をリバースピペッティングで下図のように 96 穴プレートの 4 つのレプリケートのウェルに分注する。



注：P-20 ピペットを使用する。

我々の使用している qPCR 機器では、96 穴プレートの外側 1 周のウェルは不安定なため使用しない。(⇒1 つのリファレンス遺伝子/96 穴プレートで行う)。

10. BioRad CFX96 C1000 system または類似のリアルタイム PCR 装置を用いて、[95°C for 1 min, and 40 cycles of (95°C for 15 sec, 60°C for 30 sec)] で qPCR を行い、解離解析を行う。

注：検量線の R^2 が 0.98 以上であること、解離曲線がシングルピークを示すこと (PCR 産物が単一なことを示す) を確認する。

11. gDNA サンプルの濃度を DNA コピー数で求め、次の式で C-value を計算する。
ゲノムサイズ (C-value) = (qPCR 反応における DNA の量(ng)) / (qPCR からの DNA コピー数)
12. 少なくとも 3 つのリファレンス遺伝子から平均 C-value を求め、種の C-value を決定する。また、以下の式¹²により塩基対単位のゲノムサイズを計算する。
13. ゲノムサイズ (塩基対) = (C-value) \times 0.978 \times 10⁹

文献

1. Kadota M, Tatsumi K, Yamaguchi K *et al.* Shark and ray genome size estimation: methodological optimization for inclusive and controllable biodiversity genomics. *F1000Research* 2023, **12**:1204
2. Wilhelm, J., Pingoud, A. and Hahn, M. 2003, Real-time PCR-based method for the estimation of genome sizes. *Nucleic Acids Res.*, **31**, e56-e56.
3. Hara, Y., Tatsumi, K., Yoshida, M., Kajikawa, E., Kiyonari, H. and Kuraku, S. 2015, Optimizing and benchmarking de novo transcriptome sequencing: from library preparation to assembly evaluation. *BMC Genomics*, **16**, 977.
4. Uno, Y., Nozu, R., Kiyatake, I., et al. 2020, Cell culture-based karyotyping of orectolobiform sharks for chromosome-scale genome analysis. *Commun. Biol.*, **3**, 652.
5. Maddock, M. B. and Schwartz, F. J. 1996, Elasmobranch Cytogenetics: Methods and Sex Chromosomes. *Bull. Mar. Sci.*, **58**, 147-155.
6. Parra, G., Bradnam, K. and Korf, I. 2007, CEGMA: a pipeline to accurately annotate core genes in eukaryotic genomes. *Bioinformatics*, **23**, 1061-1067.
7. Simão, F. A., Waterhouse, R. M., Ioannidis, P., Kriventseva, E. V. and Zdobnov, E. M. 2015, BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. *Bioinformatics*, **31**, 3210-3212.
8. Nishimura, O., Rozewicki, J., Yamaguchi, K., et al. 2022, Squalomix: shark and ray genome analysis consortium and its data sharing platform. *F1000Research*, **11**.
9. Kalari, K. R., Casavant, M., Bair, T. B., et al. 2006, First exons and introns--a survey of GC content and gene structure in the human genome. *In Silico Biol.*, **6**, 237-242.
10. Zhu, L., Zhang, Y., Zhang, W., Yang, S., Chen, J. Q. and Tian, D. 2009, Patterns of exon-intron architecture variation of genes in eukaryotic genomes. *BMC Genomics*, **10**, 47.
11. Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., et al. 2012, Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.*, **40**, e115.
12. Dolezel, J., Bartos, J., Voglmayr, H. and Greilhuber, J. 2003, Nuclear DNA content and genome size of trout and human. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*, **51**, 127-128.