

# PCR の増幅断片の長さによる種判別

2023/10/3

国立環境研究所 琵琶湖分室

作成者：西田一也

一部改訂（2025/9/11）：馬淵浩司、佐土哲也

## 1. 分析するサンプル

冷凍保存しているエタノール固定の卵群サンプル（国立環境研究所 琵琶湖分室では G 番号で整理）について、各卵群から 8 個ずつの卵を無作為に取り出して、8 連チューブを用いて 1 卵ごとの判別を行う。

## 2. DNA 抽出

カネカ簡易 DNA 抽出キット（カネカ）を用いて DNA 抽出する。

1	8 連チューブに卵を移し、A 液を 40 $\mu$ L ずつ分注して 98 $^{\circ}$ C 16 分インキュベート。
2	B 液を 6 $\mu$ L 分注した後、A 液だけでは溶け切らないので、Protease K（別売り）を 10 $\mu$ L ずつ分注して、56 $^{\circ}$ C で 1 時間から一晩インキュベート。
次にエタノール沈殿により精製。	
3	20,000 G で 5 分間遠心。
4	25 $\mu$ L の上澄みを別の PCR チューブに移す。
5	100%エタノール（44.0 $\mu$ L）+ 3M 酢酸 Na（1.75 $\mu$ L）のミックスを、46 $\mu$ L ずつ入れて転倒混和。
6	20,000 G で 5 分遠心。
7	デカンテーション。チューブを逆さにして溶液を落とす程度。
8	70%エタノール 100 $\mu$ L を分注してリンス。
9	20,000 G で 5 分遠心。
10	デカンテーション。チューブを逆さにして溶液を落とす程度。
11	95 $^{\circ}$ C、6 分を目安にインキュベーションしてアルコールを取り除く。
12	TE 60 $\mu$ L（30～50 $\mu$ L の範囲）を入れ、65 $^{\circ}$ C、60 分インキュベート。

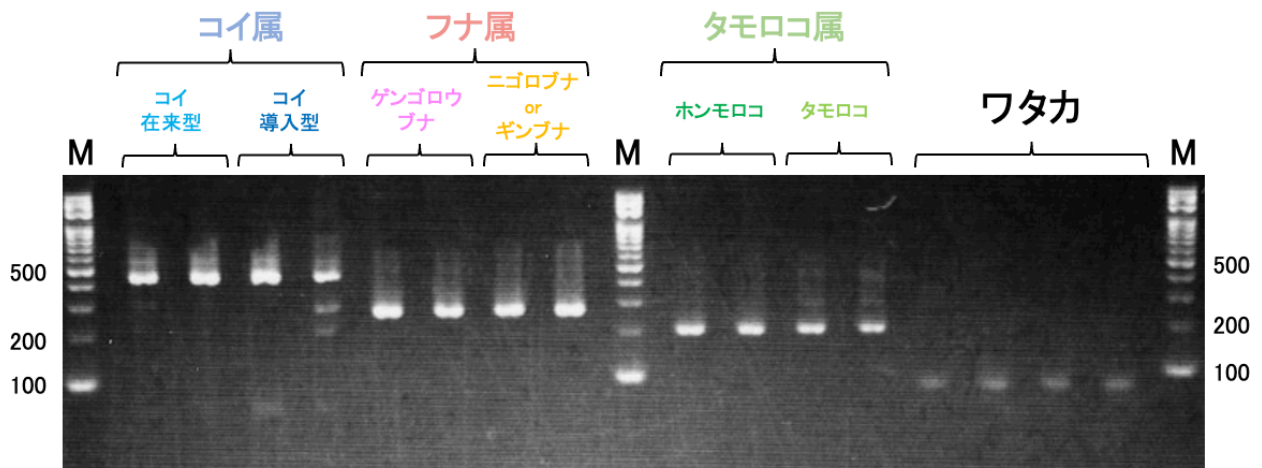
### 3. ミトコンドリア DNA のアレル特異的プライマーを用いたマルチプレックス PCR

#### (1) 属判別

Mabuchi (2016) に従い、以下の組成液を作成し、PCR を行って、コイ、フナ属、タモロコ属、ワタカを判別する。プライマーの塩基配列については (6) の表に記載。

PCR 液の組成			各種類のバンドのサイズ	
	× 1	×		bp
Emerald	2.5		コイ	450
Cytb480Lwata (5 $\mu$ M)	0.2		フナ属	280
Cytb357Lmoro (5 $\mu$ M)	0.2		タモロコ属	200
Cytb279Lfuna (5 $\mu$ M)	0.2		ワタカ	80
Cytb108Lcarp (5 $\mu$ M)	0.2		PCR のプログラム	
Cytb522R (5 $\mu$ M)	0.2		40 サイクル	94 $^{\circ}$ C 5 分
DW	0.5			94 $^{\circ}$ C 15 秒
Template DNA	1.0			52 $^{\circ}$ C 15 秒
				72 $^{\circ}$ C 30 秒
				72 $^{\circ}$ C 3 分
Total	5.0	( $\mu$ L)		

※Mabuchi (2016) と同じ



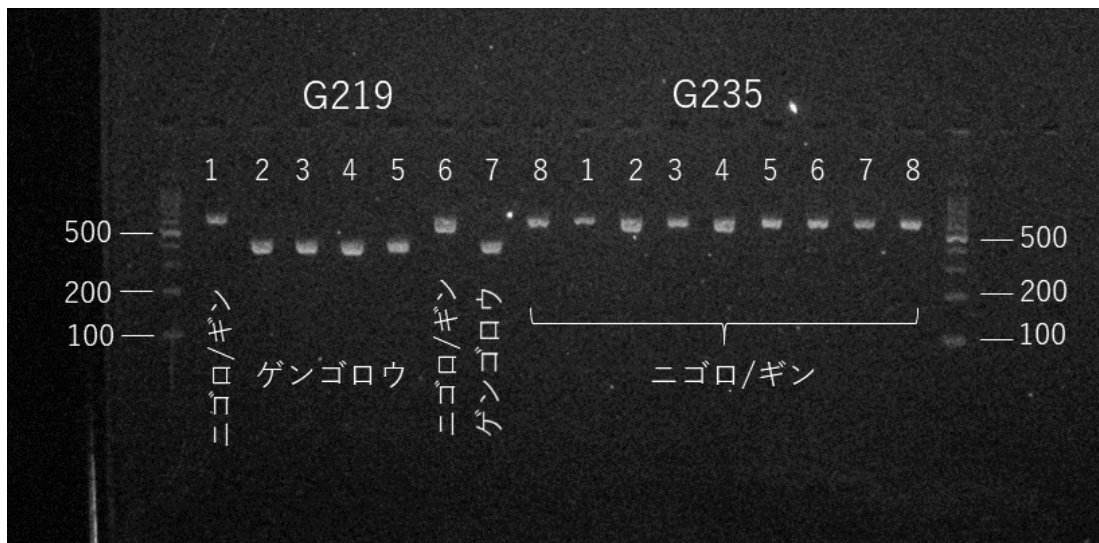
属判別のマルチプレックス PCR 産物の電気泳動像

(2) ゲンゴロウブナとギンブナ/ニゴロブナの判別

Mishina et al. (2014) に従い、以下の組成液を作成し、PCR を行って、ゲンゴロウブナとギンブナ/ニゴロブナを判別する。プライマーの塩基配列については (6) の表に記載。

PCR 液の組成			各種類のバンドのサイズ	
	× 1	×		bp
Emerald	3.0		ギン/ニゴロブナ	630
CytbGengoroL (5μM)	0.1		ゲンゴロウブナ	450
CytbNigoroL (5μM)	0.1		PCR のプログラム	
H15915 (5μM)	0.2		94°C 2分	
DW	0.6		30 サイクル	94°C 15秒 57°C 15秒 72°C 30秒 72°C 7分
Template DNA	1.0			
Total	5.0	(μL)		

※Mishina et al. (2014) と同じ

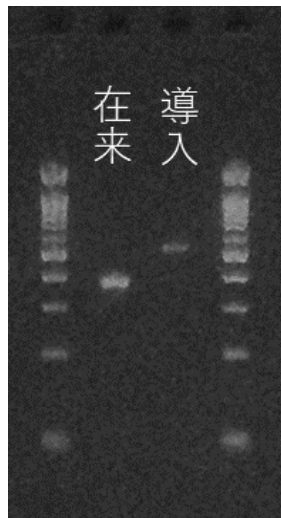


ゲンゴロウとギンブナ/ニゴロブナ判別の PCR 産物の電気泳動像

(3) コイの在来系統と導入系統の判別

馬淵・西田 (2006) に従い、以下の組成液を作成し、PCR を行って、在来系統と導入系統を判別する。プライマーの塩基配列については (6) の表に記載。

PCR 液の組成			各種類のバンドのサイズ	
	× 1	×		bp
Emerald	2.5		導入系統	580
Cytb51LD (5 $\mu$ M)	0.2		在来系統	380
Cyrtb174LW (5 $\mu$ M)	0.2		PCR のプログラム	
Cytb522R (5 $\mu$ M)	0.2		40 サイクル	94°C 5分
DW	1.4			94°C 15秒
Template DNA	1.5			53°C 15秒
Total	6.0	( $\mu$ L)		72°C 30秒
				72°C 3分

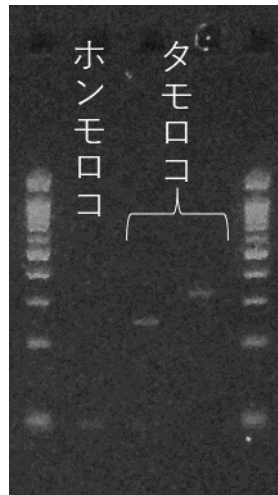


コイの在来系統と導入系統の PCR 産物の電気泳動像

(4) ホンモロコとタモロコの判別

馬淵ほか (2020) に従い、以下の組成液を作成し、PCR を行って、ホンモロコ及びタモロコの 2 系統 (E1, E2) を判別する。プライマーの塩基配列については (6) の表に記載。

PCR 液の組成			各種類のバンドのサイズ	
	× 1	×		bp
Emerald	2.5		タモロコ	230 (E1) 310 (E2)
Cytb465hon_c (5μM)	0.2		ホンモロコ	80
Cytb246tam_e2 (5μM)	0.2		PCR のプログラム	
Cytb315tam_e1 (5μM)	0.2		40 サイクル	94°C 5 分
Cytb522R	0.2			94°C 15 秒
DW	0.7			52.5°C 15 秒
Template DNA	1.0			72°C 30 秒
Total	5.0	(μL)		72°C 3 分



ホンモロコとタモロコの 2 系統 (E1, E2) の PCR 産物の電気泳動像

(5) PCR産物の電気泳動

Nusieve 0.68 g, Agarose L03 0.23 g, 50×TAE 1.2 mL を 250mL ビンに入れ, 蒸留水を加えて約 60 mL にメスアップ. 電子レンジで加熱し完全に溶解させ, 冷ました後 Gel Red を 6 uL 加える. トレイに流し込みゲルを作成.

電気泳動槽の中に 1×バッファ-TAE およびアガロースゲルを入れ, PCR 産物を約 1~2 μL ずつ, 100bpDNA Ladder とともにアプライして, 100V, 20 分程度の条件で泳動する. 泳動後のゲルを UV イルミネーターに載せて泳動像を撮影. 使用したゲルは再利用. 再利用時に GelRed のみ 4uL 程度追加.

(6) ミトコンドリア DNA のアレル特異的プライマーの塩基配列

プライマーの塩基配列

Cytb108Lcarp	GAT GAAACT TTG GAT CCA TC
Cytb279Lfuno	GCA TCM TTC TTC TTC ATC AGT
Cytb357Lmoro	GAAACA TCG GGG TAG TTT TA
Cytb480Lwata	CCT ATA TAG GGG ACA CTA TT
Cytb522R	GCAAAG AAT CGT GTT ART GTT GCA TT
CytbGengoroL	ACC CCA GCT AAT CCT CTG GTC
CytbNigoroL	CCG CTA CTG TTA TCC ACC TAC TG
H15915	ACC TCC GAT CTY CGG ATT ACA AGA
Cytb51LD	TTA AAA TCG CTA ACG ACT CA
Cyrbtb174LW	CCA TAC ACT ACA CCT CAT AT
Cytb465hon_c	ATT ATC AGC AGT TCC ACA T
Cytb315tam_e1	GAG GCC TAT ATT ACT GG
Cytb246tam_e2	CGG ATG ATT TAT CCG AAA TCT G

#### 4. 核 DNA のマイクロサテライト多型解析によるギンブナ（3 倍体）とニゴロブナ（2 倍体）の判別

##### (1) PCR

Mishina et al. (2014) を一部変更し、以下の組成で PCR を行う。判別に有用なプライマーは Cca12, GF1, J01, J12, GF29, J58, GF17 の 7 セット。

	× 1	×
2×Type-it Multiplex PCR Master Mix	3.0	
Cca12F (5μM)	0.24	
Cca12R (5μM)	0.24	
GF1F (5μM)	0.12	
GF1R (5μM)	0.12	
J01F (5μM)	0.12	
J01R (5μM)	0.12	
J12F (5μM)	0.12	
J12R (5μM)	0.12	
GF29F (5μM)	0.12	
GF29R (5μM)	0.12	
J58F (5μM)	0.12	
J58R (5μM)	0.12	
GF17F (5μM)	0.12	
GF17R (5μM)	0.12	
DW	0.08	
Template DNA	1.0	
Total	6.0	(μL)

##### PCR のプログラム

35 サイクル	}	95°C 5分
		94°C 30秒
		50°C 90秒
		72°C 30秒
		60°C 30分

※Mishina et al. (2014) ではアニーリング温度は 53°C, サイクル数は 26.

核 DNA のマイクロサテライト解析用プライマーの配列

Cca12F	<b>NED-</b> ACG CGT CCG GCT GAC ATT AGA GC
Cca12R	ACA ACC CCC GAT CCC CAA CAC A
GF1F	<b>VIC-</b> ATG AAG GGT AGG AAA AGT GTG A
GF1R	CAG GTT AGG GAG AAG AAG GAA T
J01F	<b>VIC-</b> CAT TCC TTT GAG CCT CAG TGT CG
J01R	GGG GAA CAT TTC TGT CGG TCA TT
J12F	<b>6-FAM-</b> TTC TGC ACC ACT AAT GAC AAA CAA
J12R	ACC CGG ATG AAT ATT AAG AAA CAA
GF29F	<b>6-FAM-</b> ATG CTA GGT GAC TGT TTG T
GF29R	CAC CTC CAC TCC TAA TAA T
J58F	<b>PET-</b> GCG GTC CTG CCT CAA AGT A
J58R	GAA CCC TAA AGG CGA CAT CAA
GF17F	<b>PET-</b> GGA ACT AGA GCC CAC TGA CA
GF17R	TGC ATT TGG GAG ACG ATA

※6-FAM, NED, VIC, PET は蛍光ラベル. フォワードプライマーの 5'末端に修飾.

(2) ヒートショック

PCR 産物に下表の組成の液を分注し, サーマルサイクラーで 95°C 3 分ヒートショックした後, 直ちに 5 分急冷し, フラグメント解析に使用する.

溶液の組成		
	× 1	×
Hi-Di Formamide	6.5	
GeneScan500LIZ	0.5	
PCR product	3.0	
Total	10.0	( $\mu$ L)

(3) ジェネティックアナライザー-3130xl の使用手順

1	ポリマーが少ない場合はボトルに充填，またはボトルを交換する。
バッファーを交換する場合は以下 2, 3 の手順で交換.	
2	バッファーを作成 (3.5ml+超純水 up to 35ml). つくり置き可.
3	バッファーリザーバー，ウォーターリザーバーを外して超純水で洗淨→バッファーを陽極リザーバー (丸型) →陰極リザーバー (箱型) の順に入れる. 超純水をラインより少し上まで入れる. セプターを浮きがないように被せる. No.1 : <u>バッファー</u> リザーバー No.2 : ウォーターリザーバー (廃液用) No.3 : ウォーターリザーバー (未使用) No.4 : ウォーターリザーバー (洗淨用)
4	3130 Series 4 を起動させる. (サービスコンソールが表示されていれば, Start All をクリック)
チューブやチャンバー内に気泡が確認される場合は以下 5~7 の手順で取り除く	
5	Wizard→Bubble Remove WizardRemove Bubbles でポンプ内の気泡を除去→ Next→取り除けたか確認し, 取り除けていなければ繰り返し→Finish 通常ここまで.
6	アレイポート付近の気泡を除去 (Yes or No→ネジを反時計回りに緩める→Flush Array Port→締める→Next)
7	キャピラリー内のポリマーを交換する場合は Fillarray でポリマーを交換→Finish
通常はここから開始.	
8	Plate manager→New でプレートレコードを作成. ・ Name : 日付 (例 : 20171214) +名前 ・ Application : GeneMapper-Generic ・ Plate : 96-well ・ Owner name : 名前 ・ Operator : 名前  次に検体番号および以下情報を入力. ・ Size Standard : GS500LIZ ・ Panel : None ・ Analysis Method : Microsatellite Defaults ・ Results Group 1 : GM_Results_Group ・ Instrument Protocol 1 : GM36POP_G5 これらはエクセルで CSV ファイルに入力→インポートすると楽.
9	8 連チューブをプレートベースに A 列からセットし, セプターを被せる. プレートベース

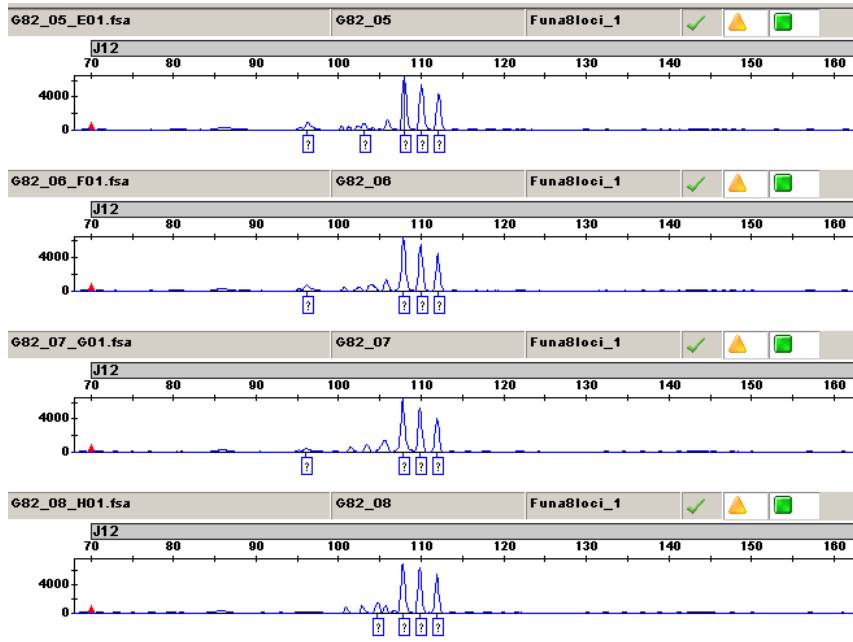
	<p>に入れてプレートリテーナを被せる。</p> <p>オートサンプラーにセットする。切れ込みが奥。A列が奥になる。</p>
10	<p>Run Scheduler でプレートレコードを指定。</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Scan or Type Plate ID にプレート名を入力。</li> <li>• 右側に表示されるプレートをクリック。</li> <li>• Run View でプレートが適切にリンクしているか確認。</li> </ul>
11	<p>▶Start Run ボタンを押してラン開始。</p> <p>Capillary/Array view で波形を表示。</p> <p>1 ラン (16 サンプル) : 35 分程度</p>
12	<p>Run 終了後、サンプルを取り出し、必要であれば遮光して保存。DATA (E) →GM_DATA からデータを USB メモリー等にコピー。</p> <p>終了の場合はサービスコンソールの Stop All をクリック。</p>

#### (4) GeneMapper による倍数性の確認

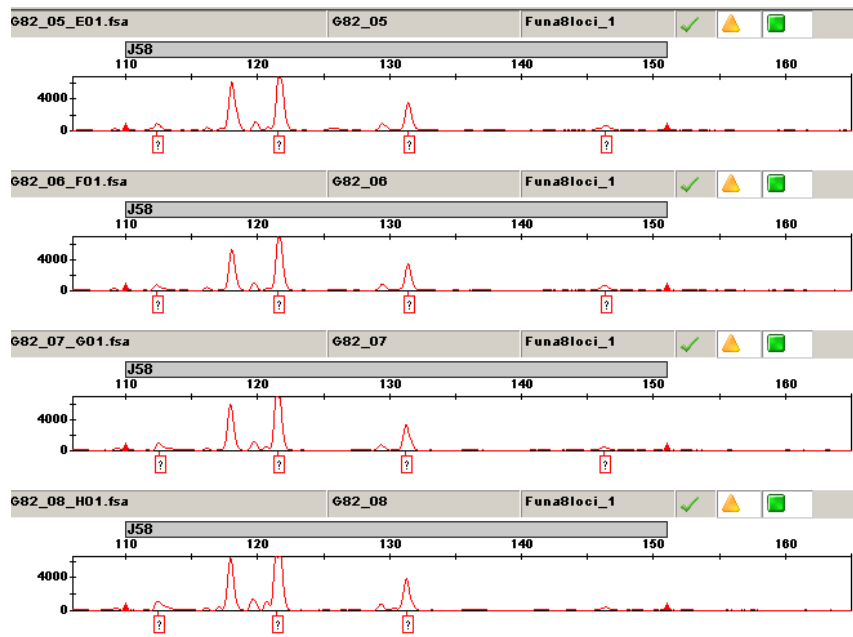
1	File→Add Samples Project でサンプルを追加。
2	Panel を Mabuchi_MS→Funa8loci_1_New, Size Standard→GS500LIZ, Analysis Method →Microsatellite Default に設定し Analyze で分析開始。
3	Size Matching Editor でサイズスタンダードの各フラグメントサイズが正しいか確認。特に 200bp のフラグメントがずれていることが多く、これは結果に影響するので注意する。修正して再度 Analyze。
4	Display Plots でフラグメントの数を確認する。必ずしもきれいなフェノグラム（波形データ）が得られるわけではないが、ギンブナはクローンである場合が多いので、複数のサンプルで同じサイズのフラグメントが現れることに着目すると判別しやすい。逆にニゴロブナの場合はフラグメントのサイズが揃っていないことが多い。

次ページと次々ページに、ギンブナ（3倍体）とニゴロブナ（2倍体）の波形データの例

## プライマーセット J12

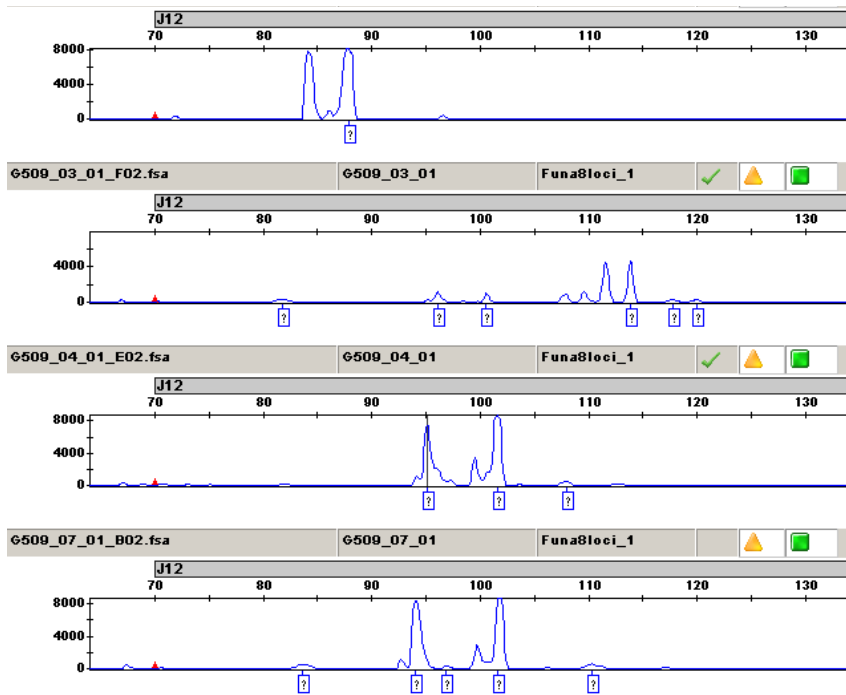


## プライマーセット J58

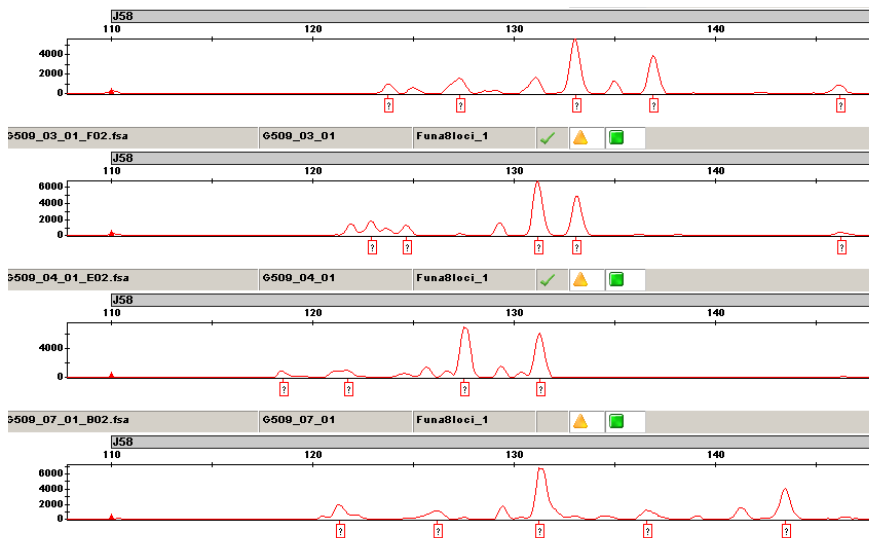


ギンブナ（3倍体）の波形データの例

### プライマーセット J12



### プライマーセット J58



ニゴロブナ（2倍体）の波形データの例