

# 鳥類のDNAバーコーディング 実験操作

鳥の学校 2017.9.18-19

投影資料

杉田典正(国立科学博物館)

# DNAバーコーディング

DNA配列だけで種判別する技術

今回、  
なぞの肉片を  
参加者が種判定

本実習後、受講者は、  
糞中の肉片、落ちている羽、ロードキルの肉片など..  
から鳥の種判定することができます  
基本は一緒です。

# 大まかな流れ

DNA抽出



PCR



Seq反応



配列決定

組織片からタンパク質などを取り除いて、  
きれいなDNA溶液にする

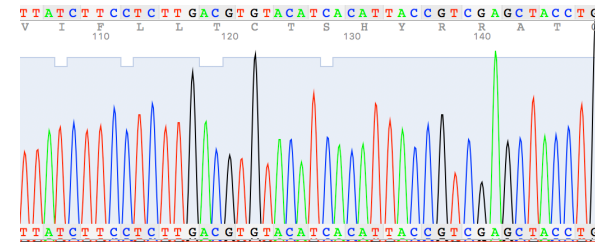
今回は、DNA抽出の途中でPCRに進む

目的のDNA配列を増幅させる

ミトコンドリアDNAチトクロームオキシターゼcサブユニットI  
バーコーディング領域 約650bp

シーケンサーで配列を読むために、蛍光発光する  
ヌクレオチドを付加

パソコン上で作業



# DNA抽出

組織片



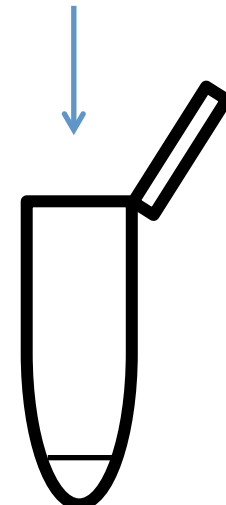
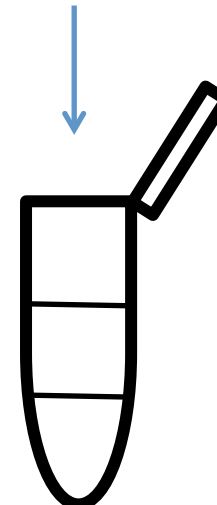
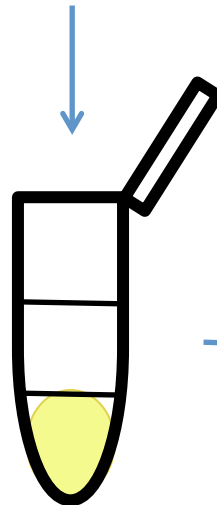
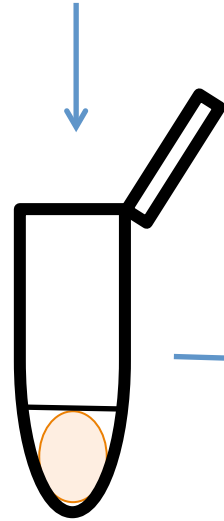
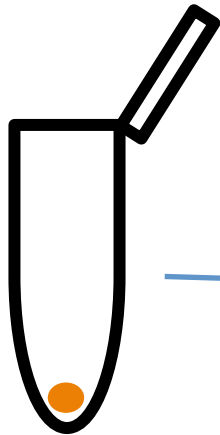
きれいな  
DNA溶液

プロテイナーゼK

PCI

CIA

エタノールと塩



タンパク質  
分解

タンパク質  
変性

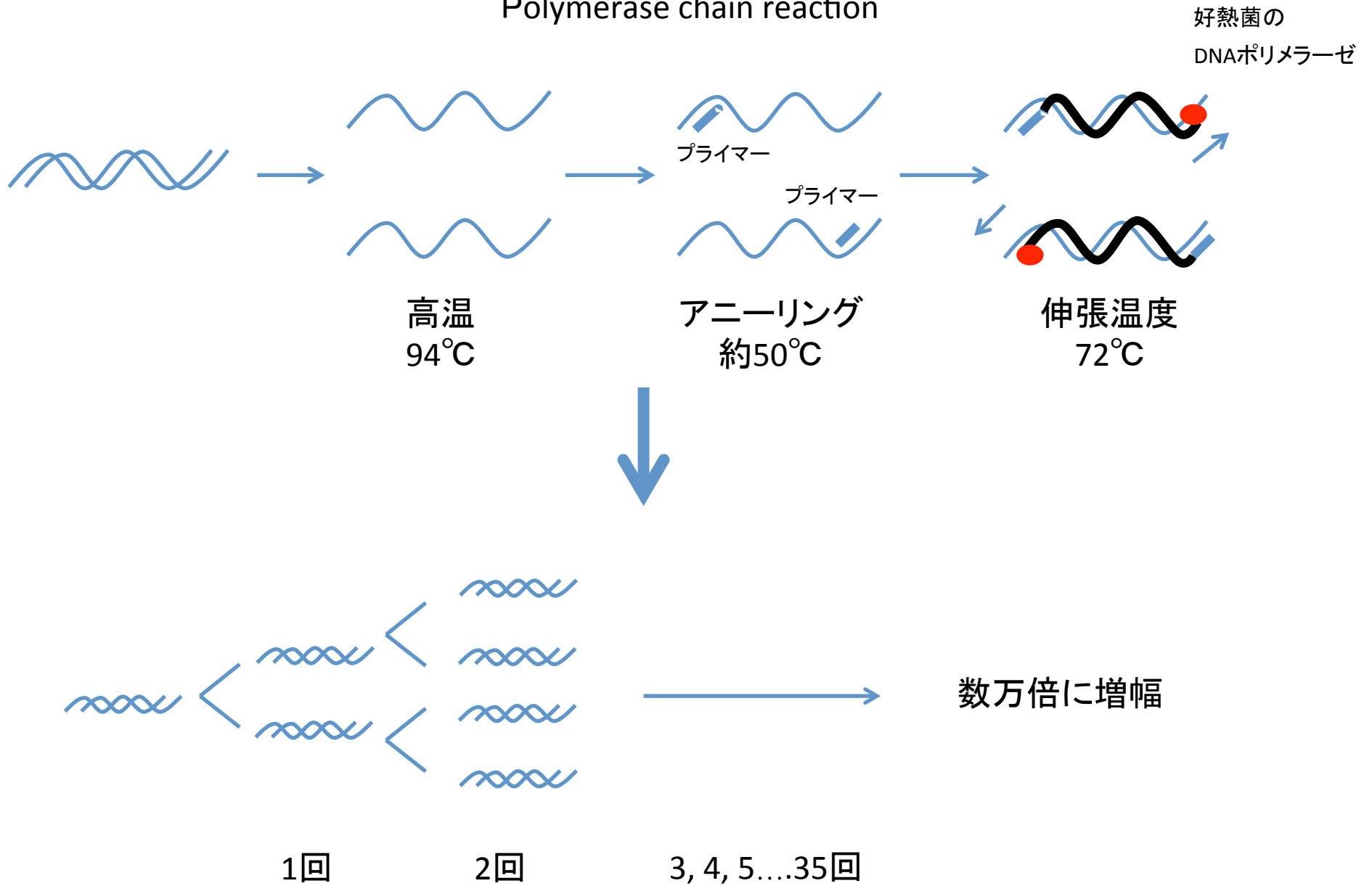
フェノール  
除去

DNA  
可視化

エタノールを取り除き  
TEバッファーに溶かして-80°C保存

# PCR

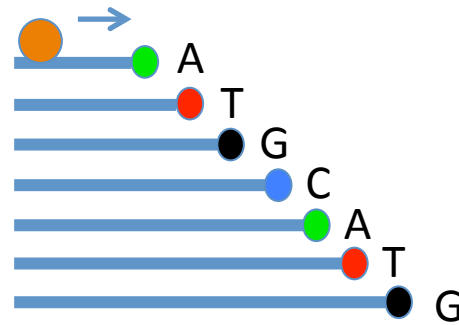
Polymerase chain reaction



# Seq反応

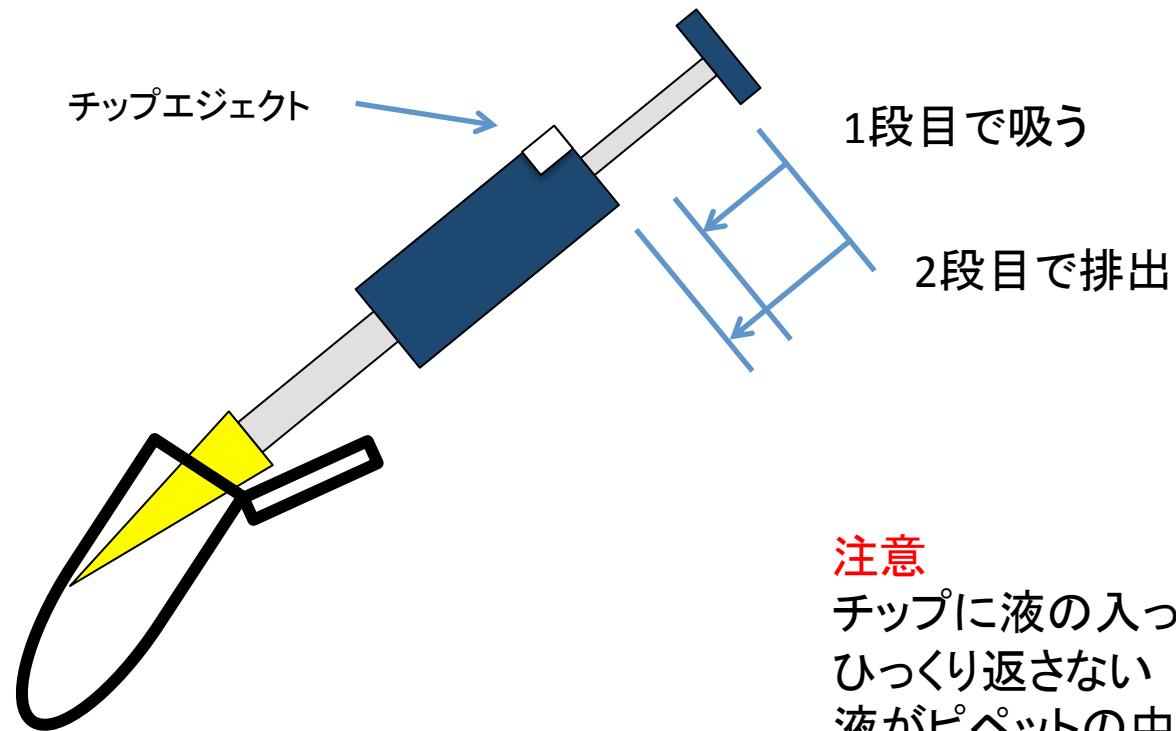
いろいろ種類あるが、最も普及しているダイターミネーター法  
(サンガー法の一つ)

DNAポリメラーゼ

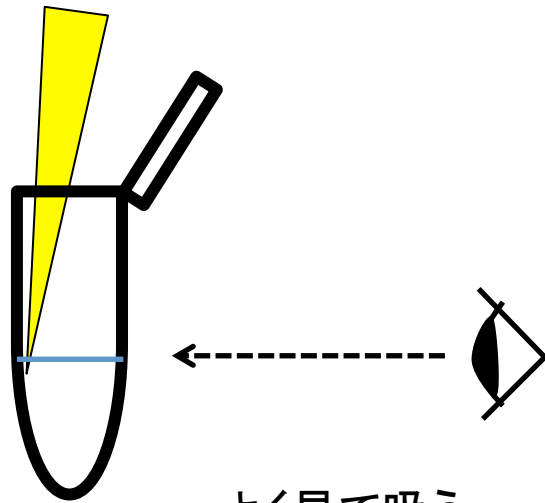


DNAシーケンサー  
ABI Genetic Analyzer 3500へ

# 基本操作 ピペット

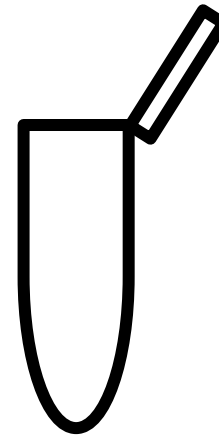


# 基本操作



よく見て吸う  
よく見て入れる  
液量重要

フタの裏触れない  
チューブの内部触れない



別のサンプルを混ぜない  
(クロスコンタミネーション)

**コンタミ注意**

チキンとか

服についてる対象種のフケとか

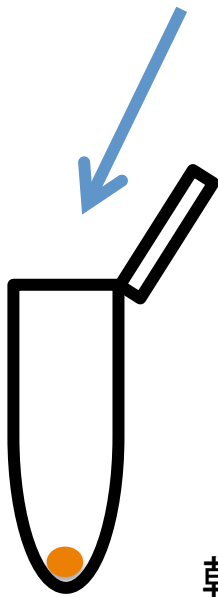


# DNA抽出

Proteinase Kでタンパク質分解

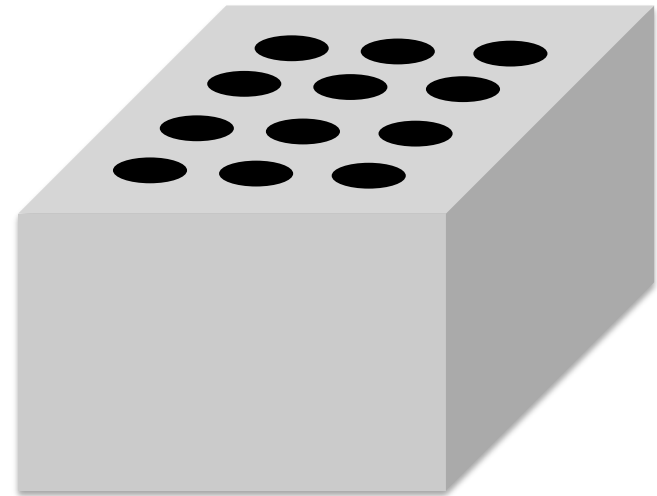
ATL Buffer 180  $\mu$ l

Proteinase K 20  $\mu$ l



乾燥組織片

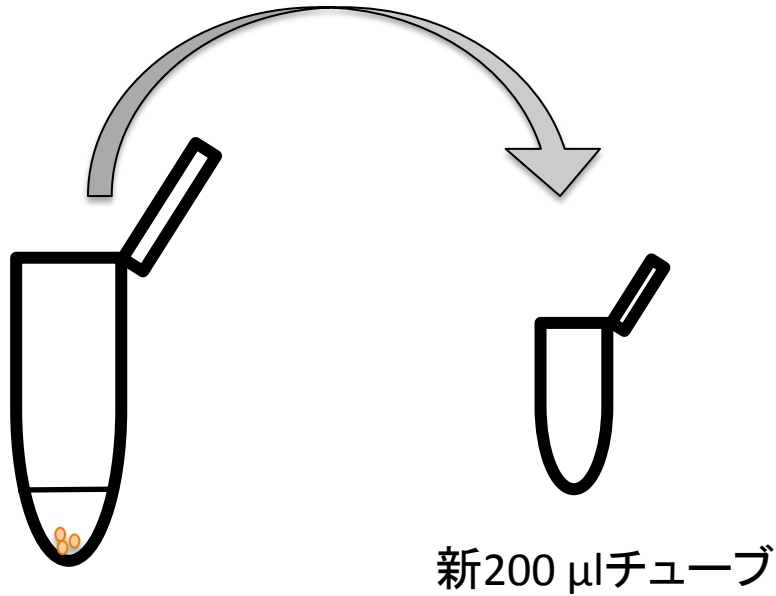
1.5mlチューブ



55 °C 1時間  
15分毎に攪拌

# DNA抽出

スピンドウンして  
上澄み(上部の透き通った部分)  
5  $\mu$ l 移す



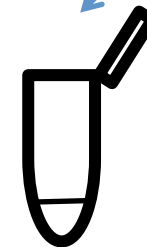
余りは、  
ヒートブロックに戻す

サーマルサイクラーで  
95°C 5分加熱

Proteinase Kを失活させる



滅菌水  
45  $\mu$ l  
で希釈



# PCR

PCR反応液の作製 **重要: 液量注意**

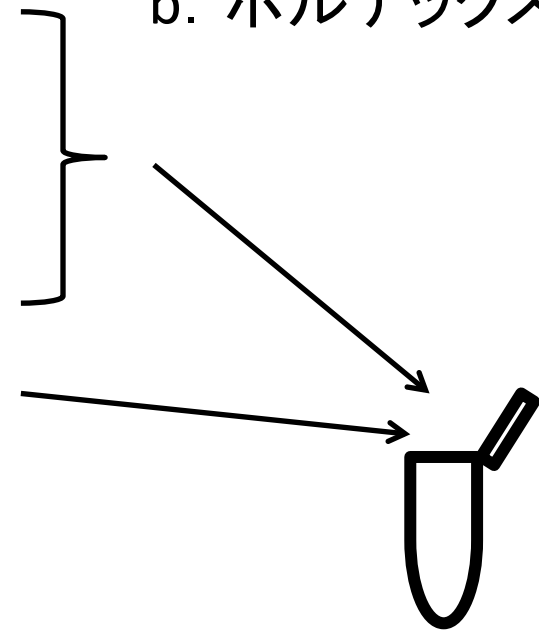
班で(4人組)で作業

5本分(4人+調整分)

滅菌水	48.75 $\mu$ l
Ampdirect	62.5 $\mu$ l
L6697Bird (20 $\mu$ l)	1.5 $\mu$ l
H7390thrush (20 $\mu$ l)	1.5 $\mu$ l
Ex-taq	0.75 $\mu$ l

↑  
高価なので取り扱い注意

- a. 順番に入れる
- b. ボルテックス

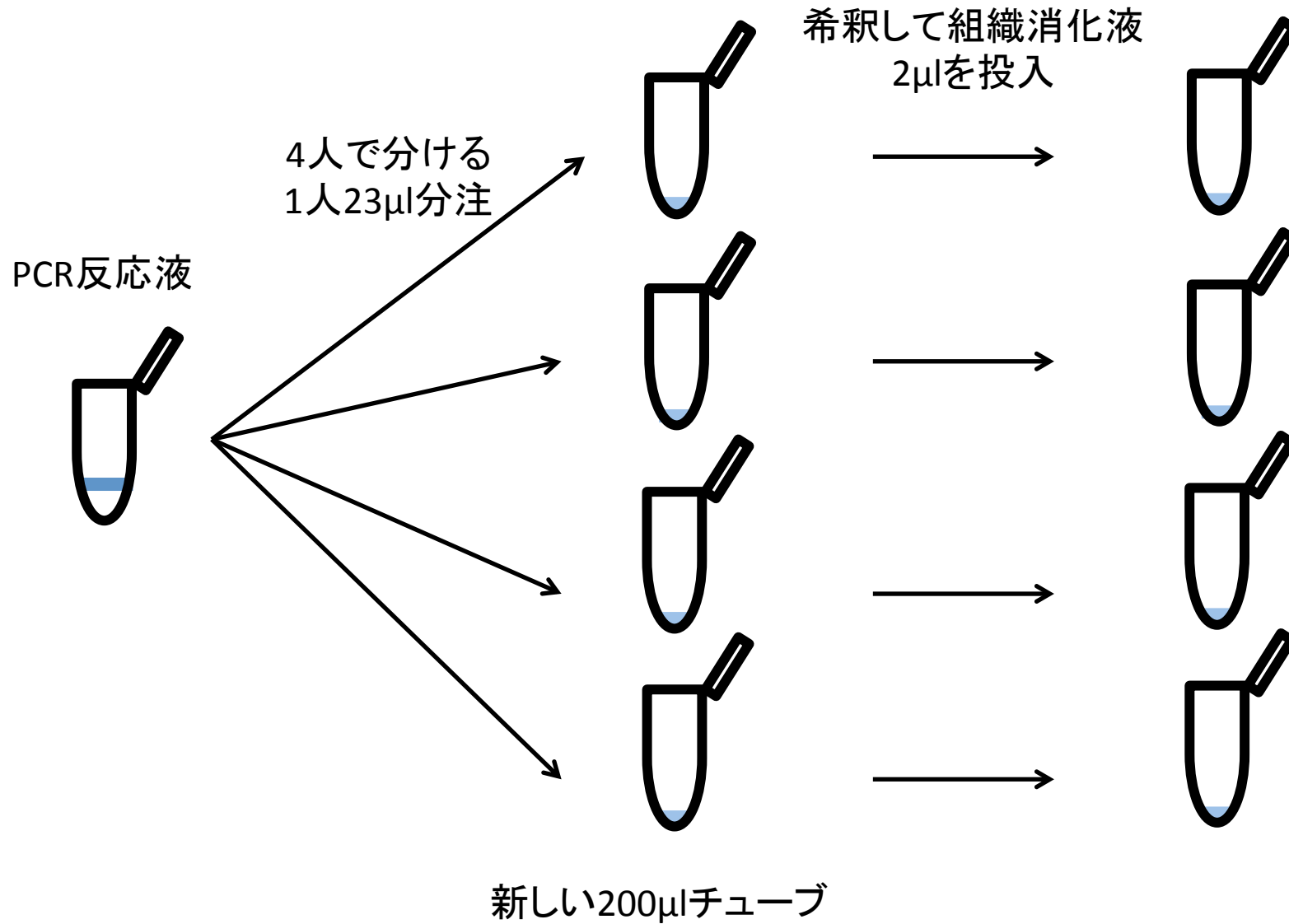


- c. Ex-taq入れたらゆっくりピペッティング

# PCR

PCR反応液の作製


重要: 液量注意



# PCR

サーマルサイクラーの設定・確認

温度	時間	
94 °C	3 min.	
94 °C	30 sec.	] 5 cycles
48 °C	30 sec.	
72 °C	1 min.	
94 °C	30 sec.	
51 °C	30 sec.	] 30 cycles
72 °C	1 min.	
72 °C	5 min.	
4 °C	4 ∞	



# DNA抽出

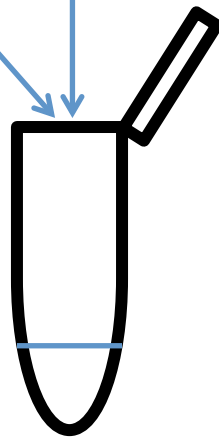
フェノール/クロロホルム抽出

**注意！フェノールとクロロホルムは有毒  
手先に付着させない。すぐ洗い流す**

a. SETバッファ 300 $\mu$ l

b. PCI 500 $\mu$ l

組織消化液



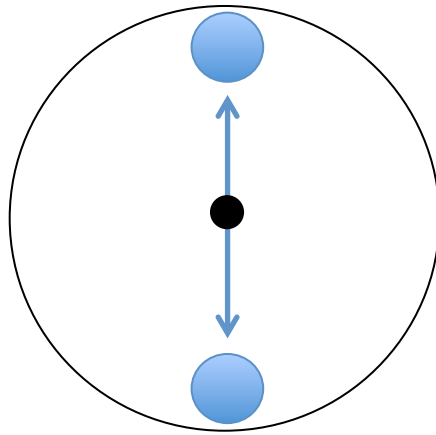
c. 手で3分激しく攪拌

PCI中のフェノールが  
タンパク質を変性させる  
全体が混ざるように

# DNA抽出

フェノール/クロロホルム抽出

d. 遠心分離機  
15000 rpm, 3 min.

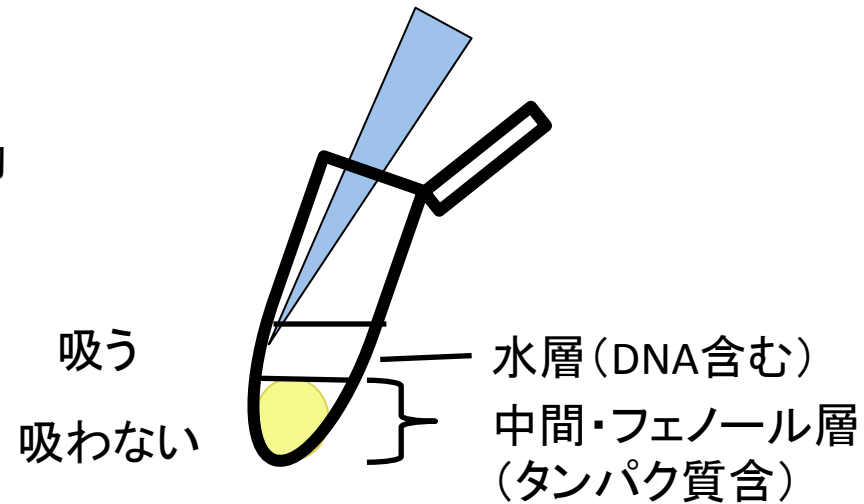


バランス重要

静かに移動



e. 水層を新チューブへ移す

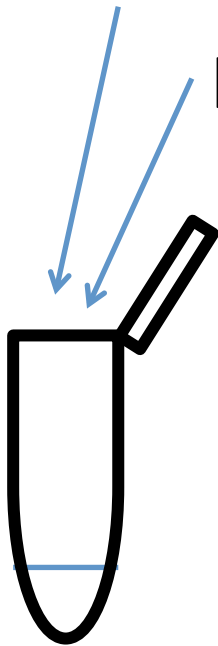


a~eを3回繰り返す

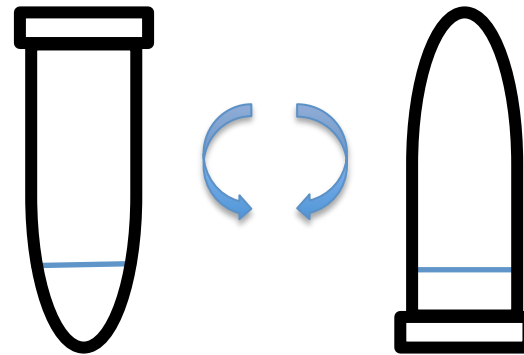
# DNA抽出

a. 100%エタノール 800  $\mu$ l

b. 3M NaAc 40  $\mu$ l



水層



手で回転させて混和

DNAが見える

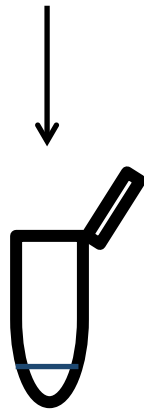
見えない場合は、4°C15000rpm5分遠心  
DNA抽出終了. エタノール蒸発させれば、  
きれいなDNAが得られる



# PCR

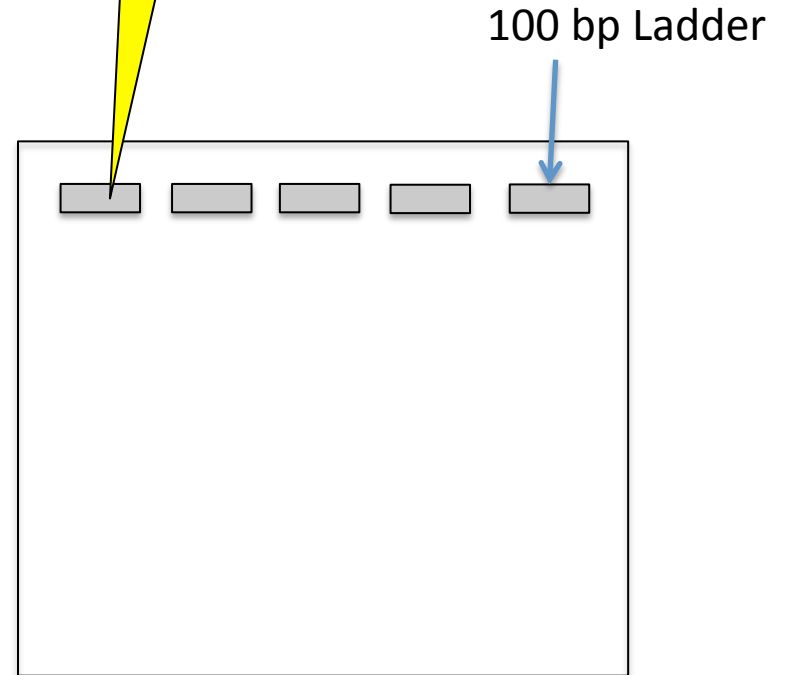
## アガロースゲル電気泳動

	一本分
H <sub>2</sub> O	4 $\mu$ l
6 $\times$ Loading Dye	1 $\mu$ l
PCR産物	2 $\mu$ l
Total	7 $\mu$ l



新200  $\mu$ lチューブ

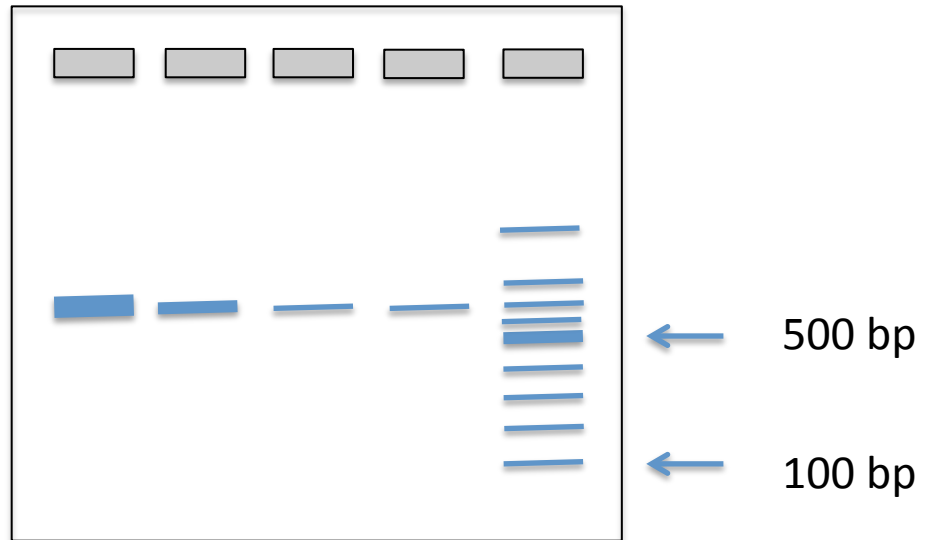
はみ出さないように  
静かに入れる



1.5 % アガロースゲル  
100 V, 20 min.

# PCR

アガロースゲル電気泳動



精製PCR産物を

3倍 2倍

に希釈

# PCR

Exo-sap処理 (プライマーやdNTPの除去)

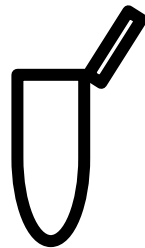
1本分

PCR産物	5 $\mu$ l
Exo-sap IT	0.4 $\mu$ l

サーマルサイクラー



↓ 37 °C 15 min.  
80 °C 15 min.



新200  $\mu$ lチューブ

# Seq反応

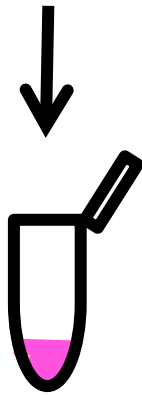
## 反応液の作製

L鎖とH鎖それぞれ伸張するのでチューブは2本に増える

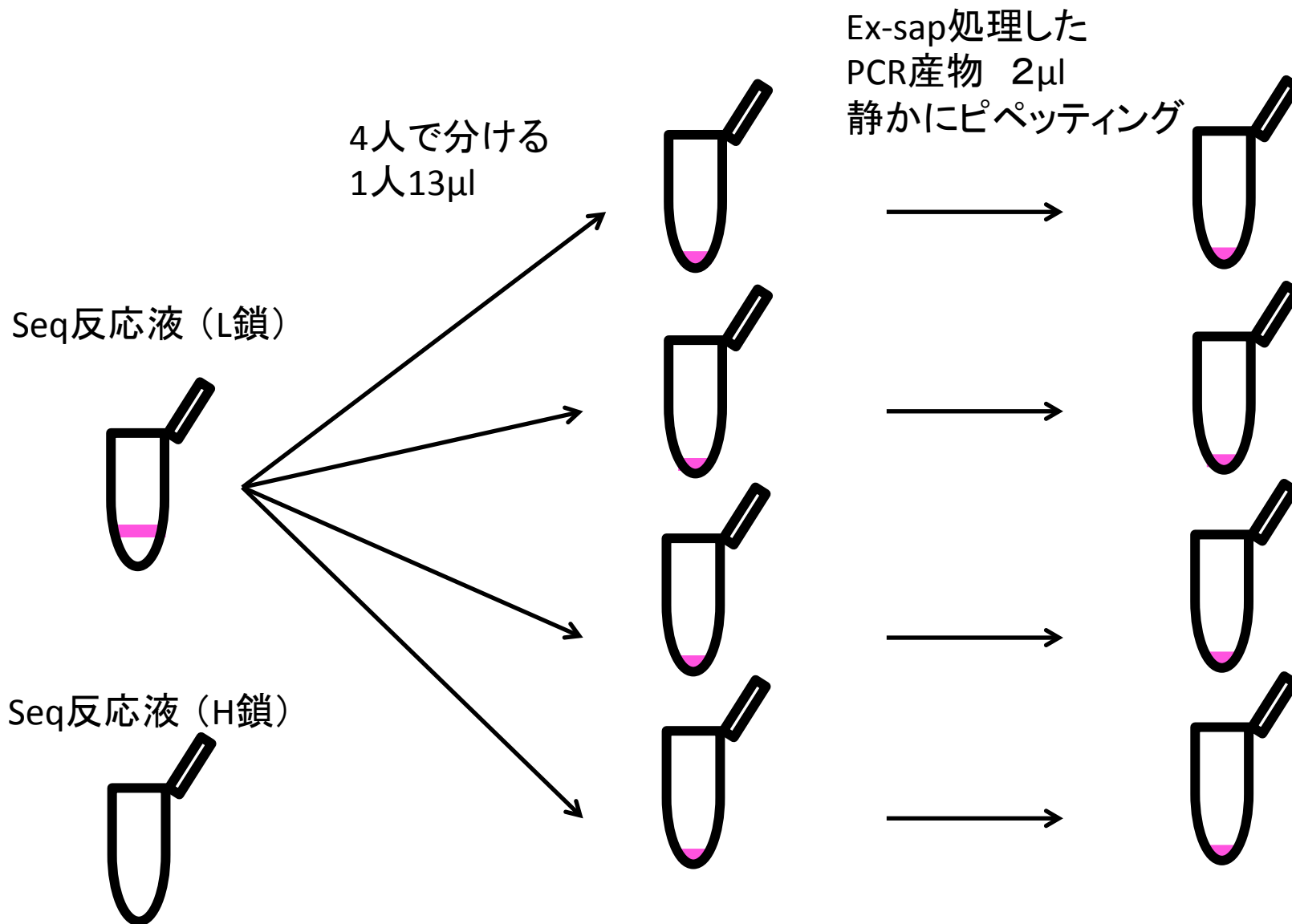
	4本 + 調整
H <sub>2</sub> O	38.5 $\mu$ l
5×Sequence buffer	10.5 $\mu$ l
L6697Bird (2 $\mu$ M)	6 $\mu$ l
BigDye v1.1	10 $\mu$ l
Total	65 $\mu$ l

	4本分 + 調整
H <sub>2</sub> O	38.5 $\mu$ l
5×Sequence buffer	10.5 $\mu$ l
H7390Thrush (2 $\mu$ M)	6 $\mu$ l
BigDye v1.1	10 $\mu$ l
Total	65 $\mu$ l

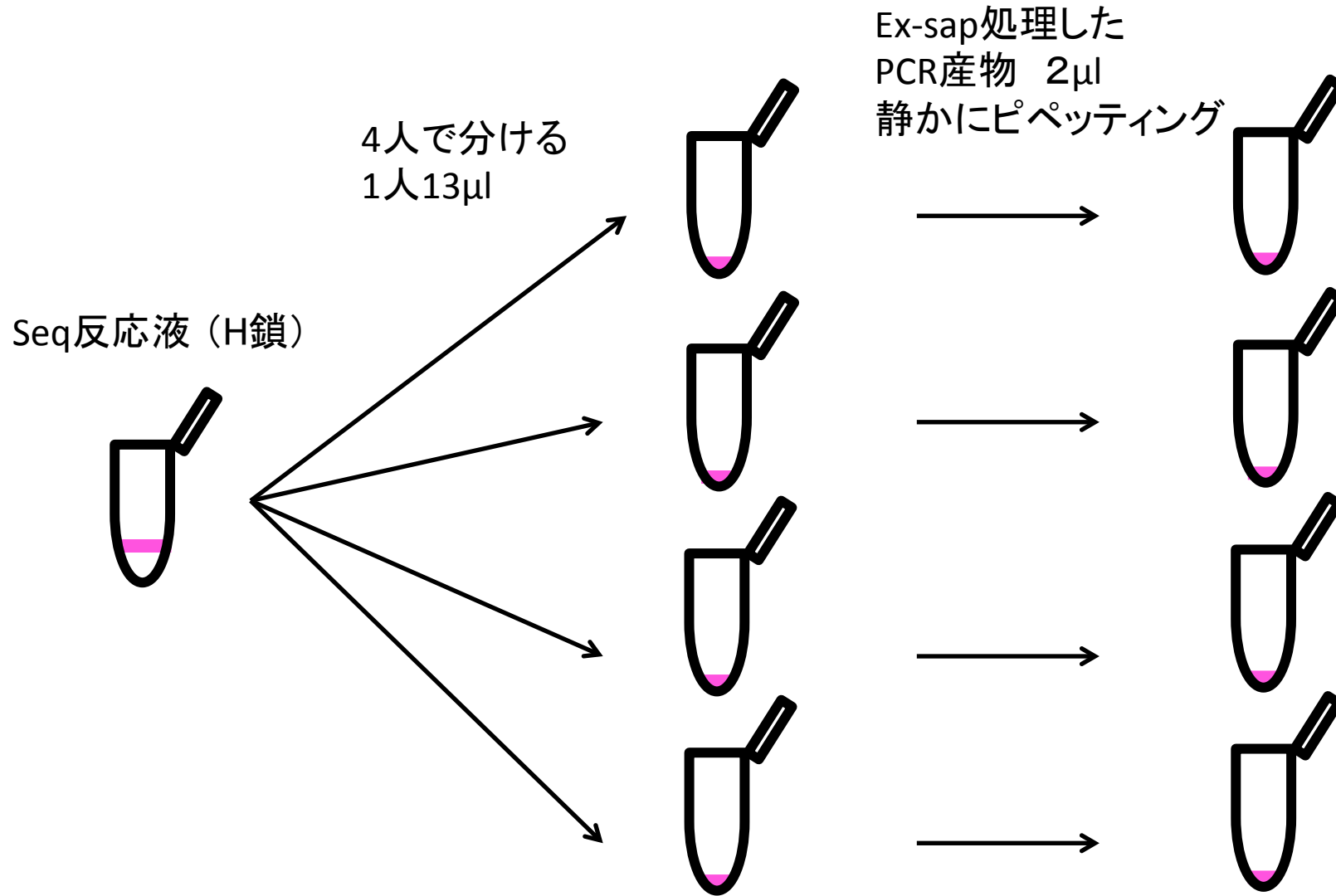
高価なので取り扱い注意



# Seq反応

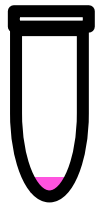


# Seq反応



# Seq反応

サーマルサイクラーの温度・時間条件確認



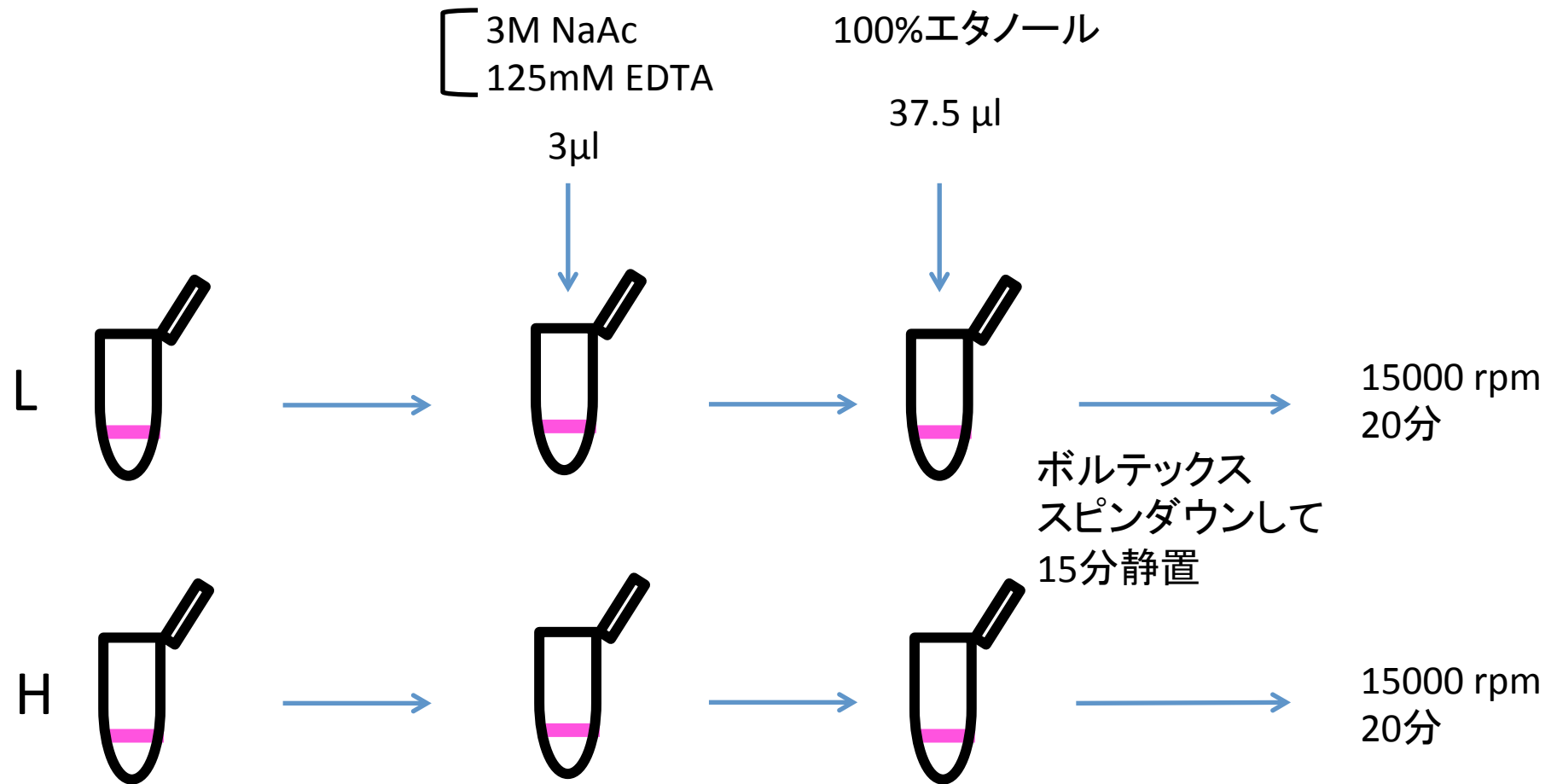
軽くスピンドウン

温度	時間	
96 °C	3 min.	} 25 cycles
96 °C	10 sec.	
50 °C	5 sec.	
60 °C	4 min.	
4 °C	∞	

1日目は、ここまで

# Seq反応

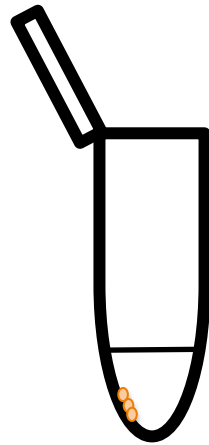
エタノール沈殿



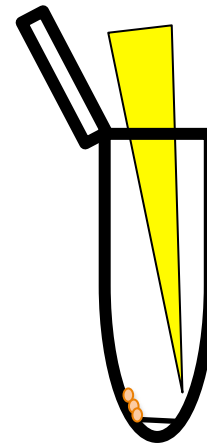


# Seq反応

エタノール沈殿



目には見えないが  
遠心の外側の壁にDNAが  
へばりついてる

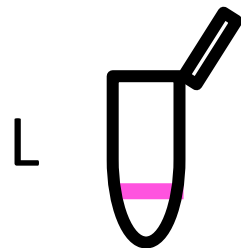


DNAを吸わないように  
内側の壁に沿って  
エタノールを全て吸い出す

# Seq反応

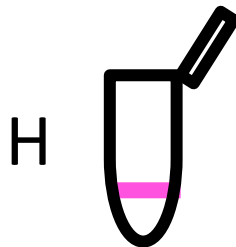
70%エタノール

70  $\mu$ l



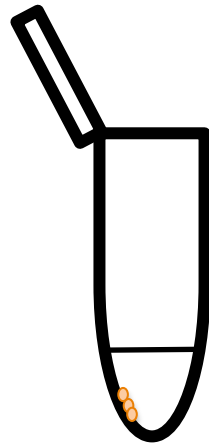
15000 rpm  
5

ボルテックス  
スピンドウンして  
15分静置

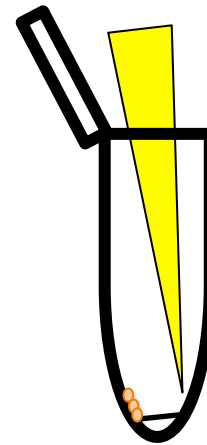


15000 rpm  
5分

# Seq反応

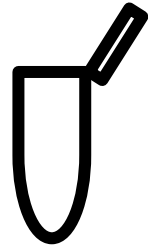


目には見えないが  
遠心の外側の壁にDNAが  
へばりついてる



DNAを吸わないように  
内側の壁に沿って  
エタノールを全て吸い出す

# Seq反応

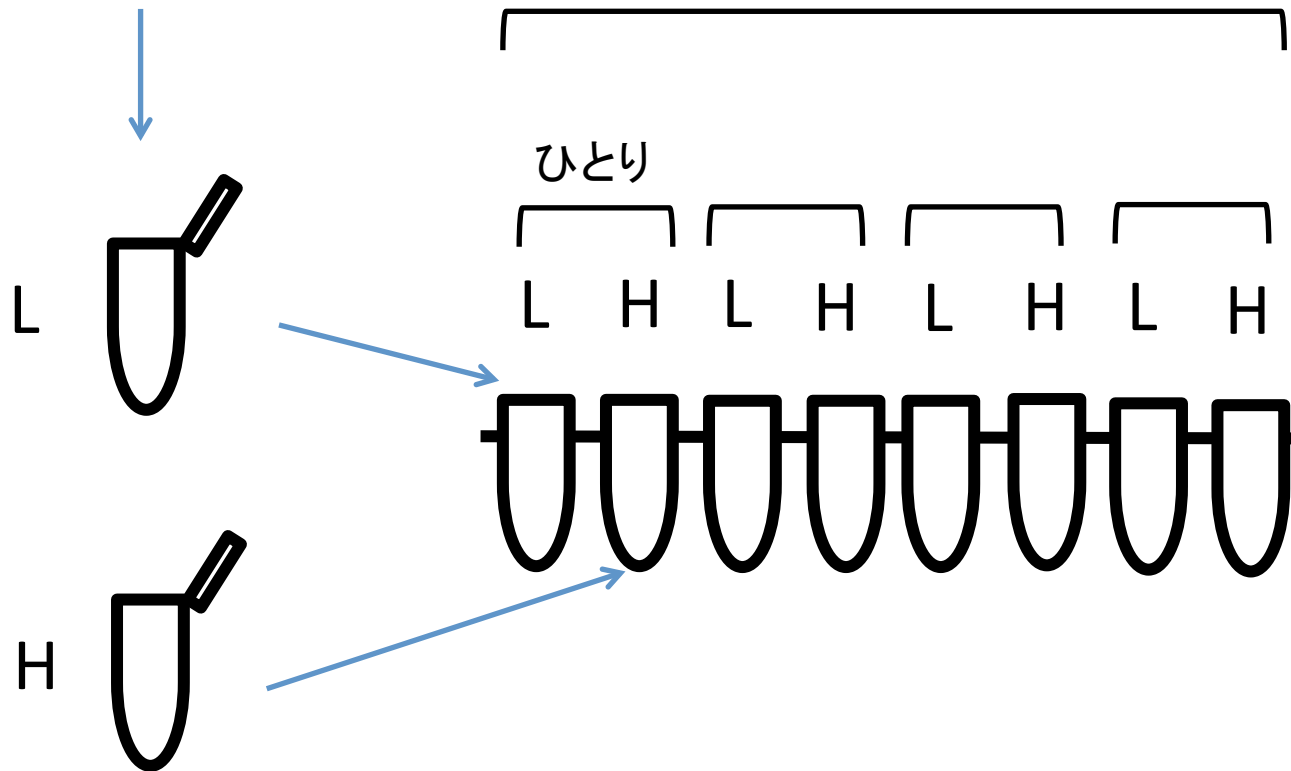


サーマルサイクラーで  
65°C3分

エタノールを蒸発させる

# Seq反応

HiDi ホルミアミド 10  $\mu$ l

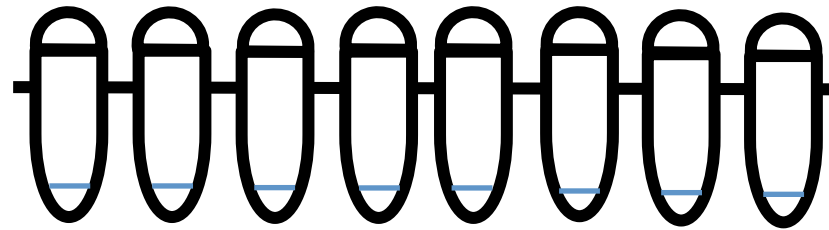


加熱終わったら  
すぐに氷上に移動

加熱終わったら  
すぐに氷上に移動

サーマルサイクラー  
95°C2分

# Seq反応



サーマルサイクラー  
95°C2分



加熱終わったら  
すぐに氷上に移動

# Seq反応

3階へ移動