**PCR（Ampdirect法）によるバーコード領域 (COI 650bp) の増幅**

１．予め用意された組織サンプル（乾燥させた肉片25mg以下）に、

ATL Buffer 180lとProteinase K 20lを加えて、ボルテックスする。

２．ドライブロックを用いて、55℃で1hr温める。

３．消化液を軽くスピンダウンした後、上澄み5lを0.2mlチューブ

に入れる。

４．サーマルサイクラーを用いて、95℃で5min加熱する。

５．消化液にH2O 45lを加えて、10倍に希釈する。

６．1.5mlチューブに下記の組成でPCR反応液を調整する。

　　　　　　　　　　　　　　　　×1　　　　　　 ×5

H2O (9.l) 48.75l

Ampdirect (12.5l) 62.5l

プライマーF (20µM) ( 0.3l ) 1.5l

プライマーR (20µM) ( 0.3l ) 1.5l

Ex Taq (5units/µl)  (0.15l) 0.75l

Total 23l 115l

今回の講習に使う種は、全て以下のプライマーペアを用いる。

F：L6697Bird (5′- TCAACYAACCACAAAGAYATCGGYAC-3′)

R：H7390thrush (5′-ACGTGGGARATRATTCCAAATCCTG-3′)

７．調整した溶液 23lと希釈したDNA 2lを0.2mlチューブに入れ、ピペッティングして混ぜた後に、軽くスピンダウンする。

８．サーマルサイクラーを用いて、PCR反応を行う。

＜サーマルサイクラーの温度設定＞

94℃　　　　　3min

　94℃　　　　　30sec

　48℃　　　　　30sec　　　 5cycles

　72℃　　　　 1min

　94℃　　　　　30sec

　51℃　　　　　30sec　　　 27cycles

　72℃　　　　　1min

72℃　　　　　5min

4℃　　　　　 ∞ Total 32cycle

今回は2人で1sampleを扱う

待ち時間に講習を行う

残った溶液はそのまま温め、

DNA抽出の実験で用いる

以降は4人1グループで実験

各自1本ずつ作る

待ち時間に講習および

DNA抽出の実験を行う

通常は30cyclesする

**DNA抽出（フェノール/クロロホルム抽出）**

ドライブロックで55℃に温めて溶解した組織サンプル約200lに

１．SETバッファーを約300µl加える。

PCI 500 µlを加える。

２．3 min攪拌（キャップを押さえて上下に振る）。

３．遠心分離器で、室温 15,000 rpm 3min 遠心。

４．新しい1.5 mlチューブにCIA 500 µlを用意。

５．P1000を使って、上清をCIAのチューブに入れる。

６．3 min攪拌後、15,000 rpm で3 min遠心。

７．新しい1.5 mlチューブに100 % エタノール 800µl、

3M NaAc 40 µlを用意。

８．上清をエタノールのチューブに入れ（この時約400 µl）、

ゆっくりと混合させる。

沈殿物（もやもや）がDNA（綺麗な場合には白い）。

９．見えない場合は、4 ˚C 15,000 rpm 10min遠心。

沈殿物が見える…はず。

通常は、これを70％エタノールで洗った後、水に溶かして、

DNA分析に使う。

通常はPCIを3回繰り返す

中間層（蛋白質）ができるだけ入らないように慎重に！P1000の先端を切るとよい

**アガロースゲル電気泳動による増幅の確認**

PCRが成功したかどうか、アガロースゲルを用いた電気泳動を行い、PCR産物を確認する。

１．1.5% アガロースゲルを作成する。（※省略）

Ex）ミューピッド用ゲル板3枚分

　　Agalose 4.5g

　　1×TAE 300ml

　　Gelgreen 30l

２．電気泳動装置（ミューピッド）を用いて、予め用意されたゲルと泳動バッファー（1×TAE）で、電気泳動を行う。

1列目のウェルには100bp DNA Ladderを7lアプライし、

　　2列目以降の各ウェルには下記の組成でサンプルをアプライする。

　H2O 4l

　6×Loading Dye 1l

　PCR反応液 2l

Total 7l

100Vの電圧で、20min泳動する。

３．イルミネーターを用いてバンドを確認する。

**Exo SapによるPCR反応液の精製**

１．0.2mlチューブに下記の組成でPCR反応液を作成する。

　　　Exo Sap 0.4l

　PCR反応液 5l

２．サーマルサイクラーを用いて、下記の温度設定で加熱する。

＜サーマルサイクラーの温度設定＞

37℃　　　　　15min

80℃　　　　　15min

３．精製された反応液にH2O 10lを加えて、約3倍に希釈する。

本講習会では省略

予め作成されたものを用いる

加熱する前に軽くスピンダウンする

**シークエンス反応**

１．1.5mlチューブに下記の組成でシーケンス反応液を調整する。

×1 ×5

H2O (7.l) 38.5l

5×seqence buffer (2.1l) 10.5l

L6697Bird (2µM)　　 (1.2l) 6l

プレミックス (BigDye1.1) ( 2l ) 10l

Total 13l 65l

×1 ×5

H2O (7.l) 38.5l

5×seqence buffer (2.1l) 10.5l

H7390thrush (2µM) (1.2l) 6l

プレミックス (BigDye1.1) ( 2l ) 10l

Total 13l 65l

　　調整した溶液13lとPCR反応液 2lを0.2mlチューブに入れる。

２．サーマルサイクラーを用いて、シークエンス反応を行う。

＜サーマルサイクラーの温度設定＞

96℃　　　　　 3min

96℃　　　　　10sec

50℃　　　　　 5sec　　　 25cycle

60℃　　　　　 4min

4℃　　　　　 ∞

**エタノール沈殿によるDNAの回収**

１．反応液に(3M酢酸ナトリウム＋125mM EDTA)溶液 3lと100%エ

タノール 37.5lを加え、ボルテックスした後、15min静置させる。

２．15,000rpmで20min遠心した後、チューブ底に沈殿したDNAを吸

わないように気をつけ、上清のエタノールをピペットで吸い取る。

４．70%エタノールを70l加えた後、2～3回上下逆にして混ぜる。

５．15,000rpmで5min遠心した後、チューブ底に沈殿したDNAを吸

わないように気をつけ、上清のエタノールをピペットで吸い取る。

６．サーマルサイクラーを用いて、フタを開けたまま65℃で3min

温め、吸い取り残したエタノールを完全に乾燥させる。

プライマーFとプライマーRの2種類の反応液を作る

（以降は各自2本になる）

加熱する前に軽くスピンダウンする

　　１日目はここまで

　　２日目はここから

3M酢酸ナトリウム 1.5l

125mM EDTA 1.5l

DNAの位置を一定にするためチューブの向きを揃えるようにして遠心器に入れること

**シークエンサーによる塩基配列の解読**

１．脱イオン化したFormamide 15l（純正品：Hi-Di Formamide）を

加えて、ボルテックスしてDNAをよく溶かす。

２．サンプルを0.2mlチューブから8連チューブに移し替える。

３．サーマルサイクラーを用いて、95℃で2min加熱しdenatureする。

その後すぐに氷上に置き5min以上冷やす。

４．8連チューブをシークエンサーにセットし、ランして配列を解読

する。

**読み取った塩基配列の繋ぎ合わせと配列の完成**

１．読み取った配列のファイルをシークエンサーからUSBに移す。

２．ATGC Ver.6 ( Windows )もしくはATGC Ver.4.2 ( Mac )を用いて、

　　読み取った塩基配列を繋ぎ合わせ、配列を完成させる。

３．ABIファイルをインポートしたあと、 [解析]→[アセンブル]で、

二重鎖の表側と裏側の配列を繋ぎ合わせる。

３．繋ぎ合わせた配列を基に、抜けや余分な塩基を目視で修正する。

また、配列の両端20~30bpを削除してプライマーを取り除く。

[解析]→[コンセンサス配列の再構成]で配列を完成させる。

４．完成した配列のデータをFASTAファイルにエクスポートする。

５．MEGA ver.7でFASTAファイルを読みこみ、配列をコピーする。

６．メモ帳などのテキストエディタにコピーした配列をペーストし、TXTファイルで保存した後、各自のパソコンに移す。

**BOLD Systemsによる完成した配列からの種同定**

１．BOLD Systems（http://www.barcodinglife.org）にアクセスして、

[IDENTIFICATION]→[Enter sequences in fasta format]に

TXTファイルに書かれた塩基配列を書き込み、種を同定する。

1グループで8連チューブ1本

加熱する前に軽くスピンダウンする

待ち時間に昼食休憩を行う

1グループでPC1台

以降は各自のPCで行う