第9回テーマ別講習会：「鳥類研究のためのDNAバーコーディング」

主催：日本鳥学会

共催：国立科学博物館

講師：齋藤武馬（山階鳥類研究所）

　　　杉田典正（国立科学博物館）

　　　坂本大地（九州大学・国立科学博物館 連携大学院）

　　　西海　功（国立科学博物館）

場所：

　　　国立科学博物館筑波研究施設総合研究棟

　　　講習室（メインの講習会場8F）

　　　実験室（シーケンサーがある場所3F）

　　　会議室（食事をする場所用8F）

※基本的に講習室で講義と実験を行う。シーケンスをかける時は、実験室に移動する。食事については、一日目は講習前に済ませておくか、休み時間等に8階会議室でとる。二日目の昼食もその場所を使用可。

行程：

9月18日(月) 1日目

　8F講習室に13時集合。昼食休憩やトイレ休憩などは、実験開始前か反応時間の待ち時間に行う。実験参加者のみ参加費1000円を徴収する。

13: 00-13:25

講習会の趣旨説明（齋藤）と実験全体の説明（杉田）を行う。

13:25-13:45

実験プロトコル（別紙）に沿って実験開始。まずは、DNA抽出の前処理を行う。2人1組で1サンプルずつ担当する。

13:45-14:30

タンパク質の溶解を行う（約45分間）。この間に講習(齋藤)。

14:15-14:30

PCRによるバーコード領域の増幅を行う。PCRのミクスチャーを準備し、PCRにかける。ミックス作成後は、1人1本ずつ実験する。

14:30-17:00

PCRの待ち時間（約2時間）に、実験手順の続きの説明（杉田）と原理の講習（齋藤）を行う。講習後の15:30-16:30の間に、フェノクロ法を用いて、タンパク質の溶解液からDNAを抽出する。

16:45-17:30

電気泳動によるPCR増幅産物の確認を行う。PCR終了前から準備を始める。電気泳動(20分間)をかけて増幅が成功したかを確認する。

17:30-18:10

Exo SapによるPCR産物の精製を行う。 Exo SapをPCRで30分間反応させて、プライマーや余分な小断片の配列を除去する。待ち時間にシーケエンス反応用のミクスチャーを作る。

18:10-18:30

シーケンス反応を行う。シーケンサーで配列が解読できるようにするため、PCRで増幅させた配列に蛍光色素を付着させる。PCR装置にサンプルをセットしてOver night。

18:30-19:00

調整時間。質問対応など、一日を整理する。

19時頃一日目終了

9月19日(火) 2日目

9:30

講習開始

9:30-10:30

エタノール沈殿からドライアップ、Hi-Diホルムアミドに溶かす。この一連の作業は、1日目に作業した反応液をシーケンサーにセットして、配列を解読できるようにするためのもの。

10:30-11:00

3F実験室に移動。シーケンサーにサンプルをセットする前のシートの書き込み方の説明を行う（齋藤）。その後サンプルをシーケンサーにセットし、Run開始。

11:00-13:30

待ち時間に昼食休憩。もし時間に余裕があれば、講習生と講師を交えた昼食会（自由参加）を行う。約2時間半でシーケンサーの解読が終了。

13:30-15:00

解析配列の決定。読み終わったファイルをシーケンサーに接続されているパソコンから取り出し、8F講習室のパソコンに移動させる。配列編集ソフトを用いて、解読したDNA配列を整え、配列を完成させる。完成した配列データを各自のパソコンに移動させる。

15:00-15:30

完成した配列をBOLDのidentificationを用いて種同定を行う。

NJ樹の作成を行い、近縁種との関係について説明する（齋藤）。

15:30-17:00

BOLDの使い方全般の解説。すでに登録・公開されている配列データの閲覧方法や、新たに解析した配列をBOLDに登録するための作業方法を学ぶ（齋藤）。

17:00 講習終了