

添付資料 2

キリンソウの DNA 品種識別マニュアル

SSR マーカー及び STS マーカーによる
常緑キリンソウ品種の DNA 品種識別マニュアル

平成 27 年 10 月 23 日
鳥取大学乾燥地研究センター

キリンソウの DNA 品種識別マニュアルの目次

目次

1. 適用範囲
2. 一般事項
3. 測定の原理
4. 識別方法
 4. 1 方法の要旨
 4. 2 検査試料
 4. 3 購入試薬
 4. 4 機器・プログラム
 4. 5 実験操作
 4. 5. 1 実験操作における注意点
 4. 5. 2 試薬および器具
 4. 5. 3 試験材料の取り出し
 4. 5. 4 DNA 抽出操作
 4. 5. 5 DNA の定量
 4. 5. 6 PCR 増幅操作
 4. 5. 7 SSR マーカー及び STS マーカーの検出方法
 4. 5. 8 データ解析、判定
 4. 5. 9 実験操作フロー図
5. トラブルシューティング
6. 是正処理

付属文書：

表 1 SSR マーカーのプライマー配列

表 2 STS マーカーのプライマー配列

図 2 SSR マーカーの電気泳動写真

図 3 STS マーカーの電気泳動写真

1. 適用範囲

キリンソウ (*Phedimus aizoon*) は、日本、朝鮮、中国、樺太、カムチャッカに分布するベンケイソウ科の多年生の多肉植物である。キリンソウ野生種は日本の山地の岩場に自生し、冬期に落葉し地上部がなくなる性質がある。

常緑キリンソウ品種「トットリフジタ 1 号」はキリンソウの改良品種（品種登録第 15866 号）であり、屋上緑化、壁面緑化などの緑化用植物として広く利用されている。この品種は冬期に地上部に緑を残した状態で越冬するため、一年中緑色を保つことができる。また、温度や乾燥に強く、袋栽培（特許 4911418 号）では、灌漑をせずに屋上緑化することができる。兄弟品種として、「トットリフジタ 2 号」が開発されている（品種登録第 15867 号）。

キリンソウは挿し木による栄養繁殖で簡単に増やすことができる。更に、キリンソウと近縁な種であるタケシマキリンソウ (*Sedum takesimense*) と登録品種であるトットリフジタ 1 号を見た目で識別することが難しいため、品種の保護が難しい状態であった。実際に種苗法違反による侵害が発生し、刑事事件になっている。

そこで、乾燥地研究センターは、株式会社フジタとの共同研究で、キリンソウの品種識別に利用可能な DNA マーカーの開発を行った。SSR マーカー 17 個及び STS マーカー 1 個を用いた DNA 品種識別技術を開発した。

種苗法違反による侵害が発生し品種識別をする必要が生じた際、品種識別の目的は調査する植物が「登録品種なのか、それ以外の野生個体なのか」、「もし登録品種であるなら、どの品種なのか」を決定することである。よって、キリンソウの品種識別を行う際には登録品種と野生個体との比較を行うことになる。本マニュアルで比較対象として用いた野生種個体はタケシマキリンソウ 8 種類、キリンソウ 3 種類である。しかし実際には、野生種には本マニュアルで比較対象とする個体以外にも様々な遺伝子型の個体が存在していると考えられ、その遺伝子型のパターンはきわめて多くの組み合わせがある。偶然に、ある野生種の個体の遺伝子型が、登録品種である「トットリフジタ 1 号」、「トットリフジタ 2 号」または登録予定品種「TF-3」と一致する確率は、それぞれ 1.55×10^{-12} 、 7.77×10^{-12} 、 6.99×10^{-11} であり、これが起こることは考えられない。

本マニュアルでは、調査する植物が「登録品種 3 品種のうちのいずれなのか、野生個体 11 種類のうちのいずれなのか」「もし登録品種であるなら、3 品種のうちのどの品種なのか」を、18 マーカーを用いて決定する方法を記している。実際に常緑キリンソウ品種の品種識別を行う際には、トットリフジタ 1 号、トットリフジタ 2 号、TF-3 の 3 品種の電気泳動パターンとの比較を行うことで判別を行う。その際、本マニュアルで用いているタケシマキリンソウ及びキリンソウ野生個体を比較として用いる必要はない。

品種（種類）：全 14 種類

(1) 登録品種及び登録予定品種：3 品種

トットリフジタ 1 号 (登録品種)

トットリフジタ 2 号 (登録品種)

TF-3 (登録予定品種)

(2) タケシマキリンソウ：8 種類

タケシマキリンソウ 1

タケシマキリンソウ 2

タケシマキリンソウ 3

タケシマキリンソウ 4

タケシマキリンソウ 5

タケシマキリンソウ 6

タケシマキリンソウ 7

タケシマキリンソウ 8

(3) キリンソウ野生系統：3 種類

キリンソウ野生系統 (富山)

キリンソウ野生系統 (柏崎)

キリンソウ野生系統 (佐渡)

被検査物：展開直後の若い葉

キリンソウにおいて登録品種はトットリフジタ 1 号、トットリフジタ 2 号の 2 品種のみ、登録予定品種は TF-3 の 1 品種のみである。上記のタケシマキリンソウ 8 種類はタケシマキリンソウに属する別々の個体 8 種類、キリンソウ野生系統 3 種類は日本の自生地 3 か所から採取した別々の個体 3 種類である。

2. 一般事項

本 DNA 品種識別マニュアルは、鳥取大学乾燥地研究センターで維持・栽培されている品種及び個体の葉から抽出した DNA を用いて、解析・作成されたものである。

3. 測定の原理

SSR とは、Simple Sequence Repeat の略で、マイクロサテライト、STR や VNTR とほぼ同義である。SSR 分析は、2-数塩基の反復配列を利用して、反復配列を挟み込むように

プライマーを設計し、PCR 法で増幅した DNA 断片の長さの差異を検出する方法である。反復配列領域は、その反復回数に突然変異を起こしやすいとされており、DNA 断片の長さを高精度で分析することにより、近縁な品種同士でも判別が可能である。

STS とは、Sequence Tagged Site の略で、本マニュアルで用いた STS マーカーは RAPD-STS マーカーである。RAPD プライマーを用いた PCR の結果得られた品種に特異的なバンドを STS 化したものである。

SSR マーカー及び STS マーカーを用いた測定の手順は、以下のとおりである。

1. キリンソウのサンプルから、ゲノム DNA を抽出する。
2. 特異的な配列を挟み込むように設計したプライマーを用いて、キリンソウサンプルから抽出したゲノム DNA を鋳型にして PCR 増幅を行う。
3. PCR 増幅産物をアガロースゲル電気泳動で分離する。
4. 品種ごとのバンドサイズを比較し、判定を行う。

4. 識別方法

DNA マーカーの一種である SSR マーカー17 種類、及び STS マーカー1 種類を用いた識別方法である。

4. 1 方法の要旨

SSR マーカーは、ゲノム中に豊富に散在している塩基の反復配列を挟み込むように設計したプライマーを用いて、PCR 増幅断片長の差異をアガロースゲル電気泳動で分析することで品種の識別を行う。反復配列領域は、その反復回数に突然変異を起こしやすいと言われている。塩基置換と比較して変異頻度が 1-2 ケタ大きいとされており、近縁な品種同士でも判別が可能である。

本マニュアルで利用する 17 種類の SSR マーカーは、常緑キリンソウ品種トットリフジタ 1 号から、(AC)/(TG) もしくは(AG)/(TC) のモチーフをターゲットとして作製したものである。

また、本マニュアルで利用する 1 種類の STS マーカーは、常緑キリンソウ品種トットリフジタ 1 号のゲノム DNA を鋳型に、RAPD プライマーを用いて得られた特異的なバンドを STS 化したものである。

本マニュアルで利用する 17 種類の SSR マーカー及び 1 種類の STS マーカーは、鳥取大学乾燥地研究センターと株式会社フジタの共同研究で開発したものである。表 1 に SSR マーカーのプライマー配列、表 2 に STS マーカーのプライマー配列を示している。

4. 2 検査試料

展開直後の若い葉を検査試料対象とし、病害、虫害、その他の被害を受けていない健全な組織を用いる。葉は、できるだけ展開直後の若く薄い葉が望ましい。古く厚い葉を用いた場合、経験的に純度や量が劣る DNA が抽出される。

4. 3 購入試薬

1. プライマーセット

プライマーの合成には、MBL ライフサイエンスの DNA 合成もしくはそれに準じるものを用いる。プライマーの精製度は脱塩とし、末端処理は特に行わない。

4. 4 機器・プログラム

1. 推奨機器：GeneAmp PCR SYSTEM 9700 (Applied Biosystems)

2. 高速冷却遠心機 (1.5-2 ml チューブが利用可能なもの)

3. 電気泳動装置 (Mupid など)

4. 紫外線照射装置

5. 写真撮影装置

6. 電子天秤

7. オートクレーブ

8. 熱風循環乾燥機

9. 超純水製造装置

10. ウォーターバス

11. ビーズ式細胞破碎装置 Micro Smash MS-100 (TOMY) もしくはこれに準じる破碎装置

12. ボルテックスミキサー

13. 分光光度計

4. 5 実験操作

4. 5. 1 実験操作における注意点

DNA 抽出から PCR 増幅、アガロースゲル電気泳動による分離までの一連の操作において、供試サンプル以外の DNA が混入しないように十分に注意する。実験台は操作を行う前にエタノールで消毒を行う。操作中は白衣、ゴム手袋、眼鏡、上履きを着用し、コンタミが起きないクリーンな環境で操作する。

4. 5. 2 試薬および器具

(1) 試薬

- ・ MagExtractor -Plant Genome- (東洋紡、NPK-501)

- ・ クロロホルム：イソアミルアルコール 1 l

クロロホルム (Wako、試薬特級、038-02601) とイソアミルアルコール (3-メチル-1-ブタノール、Wako、試薬特級、135-12015) を 24:1 に混合した液を 1 l 作製する。室温で保存する。

- ・ 70%エタノール 250 ml

エタノール (99.5) (Wako、試薬特級、057-00451) を 175 ml 加えた後、滅菌超純水で 250 ml にメスアップを行う。-20℃で保存する。

- ・ 1 M Tris-HCl (pH 8.0) 500 ml

1 M の 2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1, 3-プロパンジオール (Wako、試薬特級、207-06275) 溶液を 500 ml 作製する。6M に調整した塩酸 (Wako、精密分析用、083-03435) で pH 8.0 に調整した後滅菌超純水でメスアップを行い、オートクレーブ滅菌する。保存は 4℃で行う。

- ・ 0.5 M EDTA (pH 8.0) 500 ml

0.5 M の 2NA(EDTA・2Na)、(DOJINDO、純度 99.5%以上、345-01865) 溶液を 500 ml 作製する。粒状の水酸化ナトリウム (Wako、試薬特級、198-13765) 及び 5 M に調整した水酸化ナトリウムで pH 8.0 に調整した後滅菌超純水でメスアップを行い、オートクレーブ滅菌する。保存は 4℃で行う。

- ・ TE (pH8.0) 100 ml

1 M Tris-HCl (pH8.0)、0.5 M EDTA (pH8.0) を、それぞれ 10 mM、1 mM になるように超純水を用いて混合し、100 ml の溶液を作製する。オートクレーブ滅菌を行い、保存は 4℃で行う。

- ・ 10×TBE 1 l

2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1, 3-プロパンジオール、ほう酸 (Wako、試薬特級、021-02195)、0.5 M EDTA を、それぞれ 0.89 M、0.89 M、0.02 M になるように超純水を用いて混合し、1 l の溶液を作製する。オートクレーブ滅菌後、室温で保存する。

- ・ 1×TBE 3 l

10×TBE を 300 ml 量り取り、超純水 2700 ml を加えて 3 l とする。攪拌後、室温で保存する。

- ・ 1-3%アガロースゲル

抽出後のゲノム DNA を泳動する際には 1%、SSR マーカーの PCR 産物を泳動する際には 3%、STS マーカーの PCR 産物を泳動する際には 2%のアガロースを作製し、使用する。Agarose S (ニッポンジーン、For Electrophoresis、312-01193)、1×TBE をフラスコに入れ、電子レンジで加熱し、完全に溶解させる。スターラーで攪拌しながら 60℃程度まで冷ました後、ゲルトレイにそそぐ。ゲルの厚さは 5 mm とする。使用するゲルメーカーセットは Mupid の EXU-HR とする。ゲルトレイは大を使用し、コームは 6mm 幅×13 ウェルのものを、ゲル 1 枚当たり 2 本使用する。流し込んだゲルは 25 分間室温で放置し固めた後 4℃で 30 分間放置し、完全に固める。

- ・ Marker 1 (λ/Hind III digest) (ニッポンジーン、316-00454)

- ・ ローディングダイ

ブロモフェノールブルー (Wako、試薬特級、129-02912)、キシレンシアノール FF (Wako、試薬特級、244-00461)、グリセリン (Wako、試薬特級、075-00616)、0.5 M EDTA (pH 8.0) をそれぞれ最終濃度 0.05% (w/v)、0.05% (w/v)、30% (v/v)、5 mM になるように滅菌超純水を用いて調整する。

- ・ エチジウムブロマイド溶液

1×TBE バッファーに 10 µg/ml の濃度で臭化エチジウム溶液(10mg/ml)(ナカライテスク、核酸電気泳動用、14631-94) を加える。溶液量は染色の際ゲルが十分に浸る程度とする。

- ・ KAPA Taq Extra Hot Start Ready Mix PCR Kit (with loading dye) (KAPA BIO SYSTEMS、KK3606)

- ・ 滅菌超純水

純水は電気伝導率 0.0056 mS/m (25 °C) 以下になるように脱イオン化されたものを用い、さらに精製された超純水を用いるのが望ましい。滅菌超純水は純水を 121℃、15 分以上オートクレーブで処理したものを用いる。

- ・ プライマー溶液

フォワードプライマーとリバースプライマーを各 10 pmol/µl 含む溶液を、滅菌超純水で希釈し調整する。

・ 100 bp DNA Ladder (Dye Plus) (TAKARA、3422A)

(2) 器具など

1.5 ml チューブ (滅菌済み)

2 ml チューブ (滅菌済み)

液体窒素

ビーズ式細胞破碎装置用サンプルチューブ TM-625S (滅菌済み) (TOMY)

破碎用ビーズ (ステンレス、5.0 mm)

磁気スタンド (磁性ビーズ分離用チューブスタンド)

96 穴 PCR プレート (ビーエム機器株式会社)

PCR シーリングテープ (ビーエム機器株式会社)

溶液類は熱に不安定なもの及びキット付属の滅菌不用のものを除いて、オートクレーブ滅菌を行う。

特別の指定がある試薬はそれに従い、その他については JIS 特級試薬 (あるいは同等のグレード) を用いること。

チップやチューブ類は、滅菌済みのものを用い、必ず使い捨てとする。マイクロピペットのチップ類及び 1.5 ml と 2.0 ml 等のチューブは、滅菌缶に入れオートクレーブ滅菌し、その後、乾燥器に入れ、完全に乾燥してから用いる。ガラス製ピペットは、乾熱滅菌を行う。あるいは、滅菌済みの市販品を用いる。

4. 5. 3 試験材料の取り出し

サンプルの取り出し・取り扱い時には、サンプル間で相互に混入しないように、サンプル毎に作業台や電子天秤等の清掃を十分に行うとともに、操作に細心の注意をはらう。生の葉の取り出し・取り扱い時には、組織が乾燥しないように、迅速に操作を行う。

4. 5. 4 DNA 抽出操作

本マニュアルでは、MagExtractor -Plant Genome- (東洋紡) を用いて DNA 抽出を行う。DNA 抽出の基本操作は東洋紡のプロトコールに従っているが、TE バッファーの液量など一部を修正している。以下の抽出操作の中で、キット付属のプロトコールと異なる個所を下線で示した。

(1) サンプルの前処理

- ①展開直後の新鮮な葉を **0.1 g** 採取する。消毒用エタノールで洗浄したピンセットを用いて葉をちぎり取る。採取した葉は破碎用ビーズ **1 個** を入れておいた **2 ml** チューブ（ビーズ式細胞破碎装置用サンプルチューブ）に入れる。
- ②**2 ml** チューブを液体窒素に入れ、チューブごと葉を凍結させる。その後、葉が凍結したままの状態で、ビーズ式細胞破碎装置 **Micro Smash MS-100 (TOMY)** で **2500 rpm**、**30 秒間**の破碎処理を **3 回**、合計 **90 秒間**行う。1 回の破碎処理ごとにチューブを再度液体窒素に入れ冷却し直し、破碎中にサンプルが溶解しないように注意する。破碎後、葉がパウダー状に完全に粉碎されていることを確認する。破碎が不十分の場合は、追加で破碎処理を行う。
- ③溶解液 **300 µl** を加え、溶解液とサンプルをよく混合する。（溶解液が析出していないことを確認してから添加する。）溶解液を加えるまでの間にサンプルが溶解しないように注意する。
- ④ボルテックスミキサーを使用して **10 秒間**激しく攪拌する。（サンプルが完全に溶解液に浸ってから攪拌する。）
- ⑤**65°C**、**10 分間**インキュベートする。（3～4 分おきに計 **2 回**、ボルテックスミキサーで **5 秒間**激しく攪拌する。）
- ⑥クロロホルム：イソアミルアルコール **300 µl** を加える。
- ⑦**3～5 秒間**激しく混合する。（ボルテックスミキサーでは均一に混合されないことがあるので、激しく上下に振って混合する。）
- ⑧**12,000rpm**、**1 分間**遠心分離する。（サンプルによっては沈殿しにくいこともある。その場合、さらに **2～3 分間**遠心分離する。）
- ⑨新たな **1.5ml** チューブに上清 **250 µl** を回収する。（上清が **250 µl** に満たないときは界面の吸い込みに注意しながら可能なだけ上清を回収する。）
- ⑩吸着液 **600 µl** を加える。（上清が **100 µl** に満たないときは吸着液 **750 µl** を加える。）

(2) マニュアル法による Plant DNA の抽出

- ①前項、(1) サンプルの前処理にしたがって調製したサンプルを用意する。
- ②磁性ビーズ **40 µl** を加える。（磁性ビーズは、あらかじめよく混合してから使用する。）
- ③チューブミキサーを使用して、**1 分間**、激しく混合する。・・・[DNA の吸着]
- ④チューブを磁気スタンドにセットして、**30 秒間**程度、放置することによって磁性ビーズを集める。（このとき数回転倒混和し、蓋についたビーズもできるだけ回収する。）
- ⑤上清を除去する。
- ⑥洗浄液 **900 µl** を加える。
- ⑦ボルテックスミキサーを使用して、**5 秒間**程度、激しく混合する。（このとき、ビーズが分散・懸濁されていることを確認する。）

- ⑧チューブを磁気スタンドにセットして、30 秒間程度、放置することによって磁性ビーズを集める。（このとき数回転倒混和し、蓋についたビーズもできるだけ回収する。）
- ⑨上清を除去する。
- ⑩⑥～⑨のステップをもう一度行う。
- ⑪70%エタノール 900 μ l を加える。
- ⑫ボルテックスミキサーを使用して、5 秒間程度、激しく混合する。（このとき、ビーズが分散・懸濁されていることを確認する。）
- ⑬チューブを磁気スタンドにセットして、30 秒間程度、放置することによって磁性ビーズを集める。（このとき数回転倒混和し、蓋についたビーズもできるだけ回収する。）
- ⑭上清を除去する。
- ⑮⑪～⑭のステップをもう一度行う。（エタノールは蓋に付着しているものも含めてできるだけ除去する。）
- ⑯チューブのフタを開けた状態で、55℃の熱風循環乾燥機に 10 分間入れることで、エタノールの除去を行う。
- ⑰TE バッファー50 μ l を加える。
- ⑱チューブミキサーを使用して、1 分間、激しく混合する。・・・[DNA の溶出]
- ⑲チューブを磁気スタンドにセットして、30 秒間程度、放置することによって磁性ビーズを集める。
- ⑳DNA が含まれる上清を新しい 1.5ml マイクロチューブに回収する。

4. 5. 5 DNA の定量

抽出した DNA の定量方法には、アガロースなどの電気泳動による分析や分光光度計による分析がある。前者のアガロース電気泳動では、正確な DNA 量の値は算出されないが、抽出された DNA の量、抽出時の DNA 分解程度（DNA の長さや移動度）や夾雑物の影響の有無を確認することができる。

本マニュアルでは、分光光度計を用いて DNA 量の測定を行い、さらにアガロースゲル電気泳動で DNA の状態を確認する。図 1 に抽出したゲノム DNA の電気泳動写真を示した。

（1）分光光度計による測定

DNA の定量のために吸光度を測定する場合には、必ず回収液を遠心分離（12,000 rpm、1 分間）し、その上清を原液のまま使用する。また、DNA 濃度の算出には、必ず A320 nm 値で補正する。このとき DNA の濃度が 40 ng/ μ l 以上あればよい。40 ng/ μ l 未満の場合は抽出作業をやり直す。

（2）アガロースゲル電気泳動による確認

1. 抽出したゲノム DNA 溶液 3 μ l と、ローディングダイ 1 μ l をよく混合し、1%アガロースゲルにアプライする。ゲノム DNA を電気泳動する際のサイズマーカーとしては Marker 1 (λ /Hind III digest) を用いる。
2. 電気泳動装置で、100 V30 分程度、電気泳動を行う。
3. 電気泳動済みのアガロースゲルを、エチジウムブロマイド溶液中で 10 分間静置して染色する。
5. 紫外線照射装置で紫外線を照射し、写真撮影装置で撮影する。図 1 に電気泳動図を示した。
6. Marker 1 (λ /Hind III digest) のバンドとの比較を行い、DNA の大部分が Marker 1 の最上位のバンド (23.13 kbp) 以上に存在することを確認する。
7. DNA 溶液は-20℃以下で凍結保存する。



図 1 電気泳動図

左：Marker 1 (λ /Hind III digest)

右：抽出した DNA

4. 5. 6 PCR 増幅操作

「4. 5. 1 実験操作における注意点」の項に記載したように、実験操作中のコンタミには十分に注意する。

PCR 増幅操作は以下の通りである。

(1) SSR マーカー

1. PCR 反応液の調製 (1 反応当たり)

①滅菌超純水	6.5 μ l
--------	-------------

②KAPA Taq Extra Hot Start Ready Mix PCR Kit (with loading dye, KAPA BIO SYSTEMS)	12.5 μ l
③SSR プライマー溶液 (フォワードプライマーIP1 とリバースプライマーIP3 を各 10 pmol/ μ l 含む溶液)	1.0 μ l
④ゲノム DNA (10 ng/ μ l になるように滅菌超純水で希釈したもの)	5.0 μ l
全量	25.0 μ l

①、②、③を混合し、マスター液を調整する。マスター液の液量は、サンプル数の 10%増量として調整を行う。マスター液を攪拌し均一にした後、1 反応ごとに分注する。最後に④を加え、最終的な反応液とする。陰性対照の反応液には④のゲノム DNA を加えずに TE バッファーを加える。陽性対照は、トットリフジタ 1 号のゲノム DNA とする。

2. GeneAmp PCR SYSTEM 9700 (Applied Biosystems) を用いて、以下のプログラムで PCR 反応を行う。

- ・ 94°C9 分間熱変性
- ・ [94°C30 秒間→55°C30 秒間→72°C30 秒間]の反応を、40 サイクル
- ・ 72°C5 分間の反応後、4°Cで∞。

3. 反応終了後、-20°Cで保存する。

(2) STS マーカー

1. PCR 反応液の調製 (1 反応当たり)

①滅菌超純水	7.0 μ l
②KAPA Taq Extra Hot Start Ready Mix PCR Kit (with loading dye, KAPA BIO SYSTEMS)	12.5 μ l
③STS プライマー溶液 (フォワードプライマーとリバースプライマーを各 10 pmol/ μ l 含む溶液)	0.5 μ l
④ゲノム DNA(10 ng/ μ l になるように滅菌超純水で希釈したもの)	5.0 μ l
全量	25.0 μ l

①、②、③を混合し、マスター液を調整する。マスター液の液量は、サンプル数の 10%増量として調整を行う。マスター液を攪拌し均一にした後、1 反応ごとに分注する。最後に④を加え、最終的な反応液とする。陰性対照の反応液には④のゲノム DNA を加えずに TE バッファーを加える。陽性対照は、トットリフジタ 1 号のゲノム DNA とする。

2. GeneAmp PCR SYSTEM 9700 (Applied Biosystems) を用いて、以下のプログラムで PCR 反応を行う。

- ・ 94℃ 5 分間熱変性
- ・ [94℃ 30 秒間→60℃ 30 秒間→72℃ 15 秒間]の反応を、35 サイクル
- ・ 72℃ 7 分間の反応後、4℃で∞。

3. 反応終了後、-20℃で保存する。

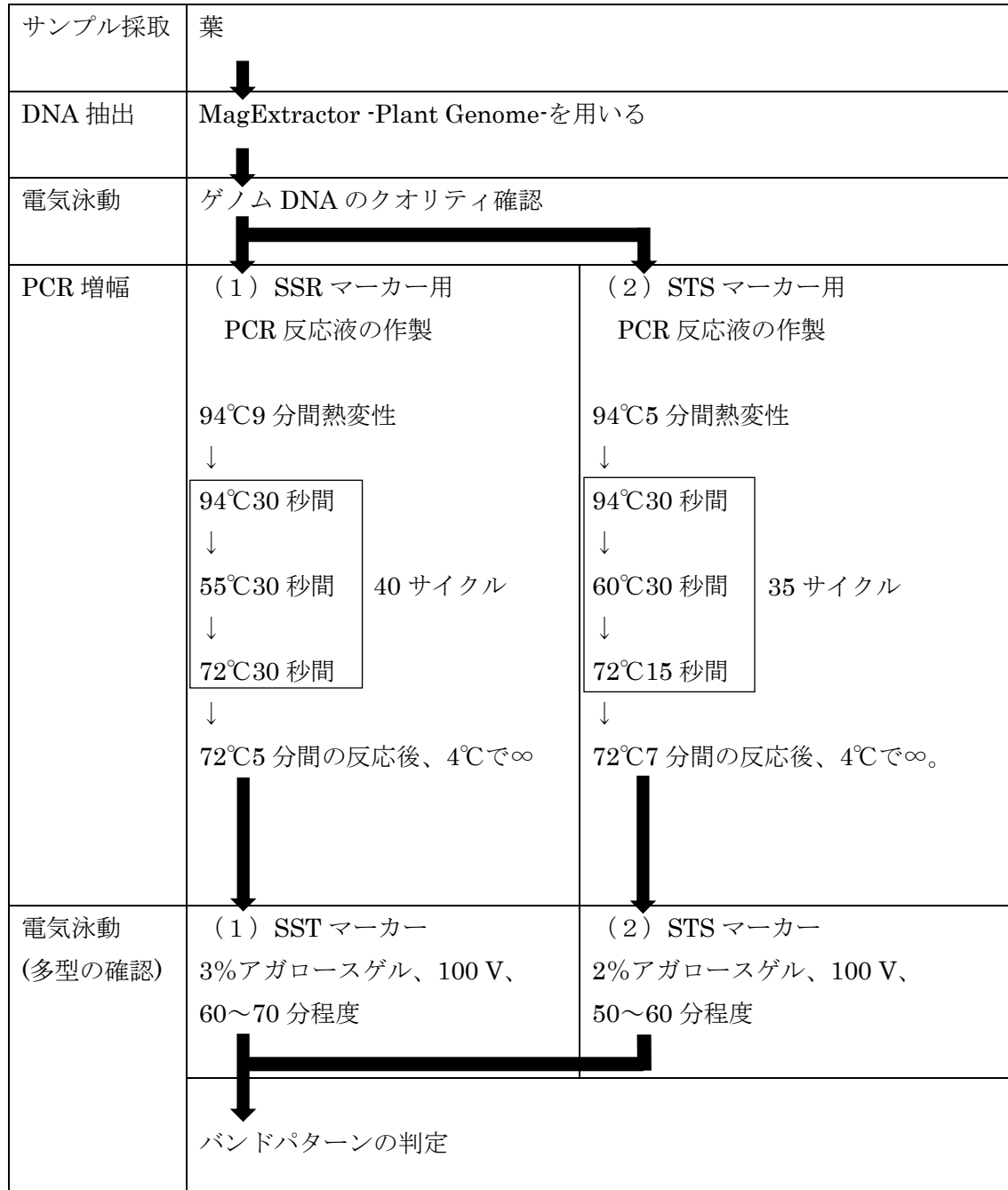
4. 5. 7 SSR マーカー及び STS マーカーの検出方法

バンドの比較のため、サイズマーカーとともに登録品種及び登録予定品種 3 品種を、サンプルと並べて同時に泳動する。SSR マーカーは 3%アガロースゲル、STS マーカーは 2%アガロースゲルで分離を行う。PCR 産物を電気泳動する際のサイズマーカーとしては 100 bp DNA Ladder を用いる。PCR 産物 6 µl、100 bp DNA Ladder 5 µl をウェルにアプライする。泳動は 100 V で行う。SSR マーカーは 60～70 分程度（100 bp DNA Ladder 中のブロモフェノールブルーがゲルの最下流端から 5 mm の位置に来る程度）、STS マーカーは 50～60 分程度（100 bp DNA Ladder 中のブロモフェノールブルーがゲルの最下流端から 1.5 cm の位置に来る程度）泳動を行い、PCR 増幅産物の分離を行う。泳動終了後エチジウムブロマイド溶液に 10 分間浸漬し、染色を行う。染色終了後、紫外線照射下で観察し、写真撮影及び多型の判定を行う。

4. 5. 8 データ解析、判定

バンドのサイズや本数などのバンドパターンの比較を行い、調査する植物が「登録品種 3 品種のうちのいずれかなのか、野生個体 11 種類のうちのいずれかなのか」「もし登録品種であるなら、3 品種のうちどの品種なのか」の判定を行う。用いるマーカーや比較を行う個体によっては、個体間での多型を示さないものや、個体間でのバンドサイズが似ており判定が難しいものがある。全 18 マーカーを用いてバンドパターンの比較を行うことで、調査する植物が同一クローンであるか、異なる遺伝子型を有する別個体であるかの判断を確実に行うことができる。図 2 及び図 3 に、SSR マーカー及び STS マーカーを用いた判定結果の電気泳動写真を示した。バンドパターンの比較を行う際に、DNA 断片が増幅されない系統とマーカーの組み合わせの場合、その結果が PCR の不成功と区別できない。よって、この組み合わせの場合はマーカーとしては評価の対象としない。評価の対象としない組み合わせのものについては、図 2 及び図 3 中に記載した。

4. 5. 9 実験操作フロー図



5. トラブルシューティング

1. 使用組織・部位

完全展開葉はうまく DNA が抽出できない場合があるので、使用しない。

6. 是正処理

本マニュアルの使用者からの情報収集として、改善依頼票を設けて情報交換を行い、必要に応じてマニュアル等の是正措置を行う。

付属文書：

表 1 SSR マーカのプライマー配列

表 2 STS マーカのプライマー配列

図 2 SSR マーカの電気泳動写真

図 3 STS マーカの電気泳動写真

表1 SSRマーカーのプライマー配列

プライマー名	配列	塩基数
251-IP1	CGGGAGCAGCTTAGTCATCAATAT	24
251-IP3	TGTCAAATGCATTAACCATCCAAGT	25
263-IP1	GCGATTAAGCAATTGGATGTCCAAGA	26
263-IP3	CTGGTCCCTTCCACAAAACTTTA	24
274-IP1	TACCTTCGTCATTATCTAGTGTGCAT	26
274-IP3	TTCCACAACGAGTTCGAACATAGA	24
293-IP1	CTATTCCCTCTTTGTGCACGCTCAAC	25
293-IP3	CTCAAGGTCCGCACTCTCTTTT	22
299-IP1	GCAATTGTGCCATTTTCGTAGAGAA	24
299-IP3	ATGGTCGTTTCTCTGCTACTTCTT	24
332-IP1	GTTGCCGTAATTAATCAACAGCTCAT	26
332-IP3	TTGGAAAAATTAGGGATTTGGGGG	24
353-IP1	ACCTACTTACAAGTGACACTAGGTTT	26
353-IP3	AGTTGGAGGGTACATGCGATTTTT	24
257-IP1	AACAAACTGGAATGTTGTGGTGAA	24
257-IP3	GAATTCTTCCTTTGCTGAATACCA	24
260-IP1	CAACTCCGAAACGAAAACAAAACG	24
260-IP3	CATTTTCGCAGCTTTTTCGAG	20
298-IP1	CAAGTAGATAAAGAGTGAAAGGGTAAG	27
298-IP3	CAAATTTGGAGGCATTCTAGTGA	23
366-IP1	TTCAACGAAGAACTGTTCAACCG	24
366-IP3	GAGTGGAGATGGACTGAGTTGAC	23
370-IP1	AAAGAATAAAGAAGTGGCTTCACAG	25
370-IP3	GACTAGTCGTCGTTTCGTTAGTCCT	24
376-IP1	GGGGTTTGGTTCCAAAAATTGAATAC	26
376-IP3	CATTTTCAGGAAAGTGGATTGTC	23
384-IP1	AACGTTAGATACACACTAATCAACGG	26
384-IP3	ATTTTCTGCTGCTTCGACAGAC	22
235-IP1	CTTCAGAAAGCACTAGACTATGCTTG	26
235-IP3	ATGAAATGTTAGACGATGCACCT	23
238-IP1	TGGTAGAGCTCTAGAAGAGGGTAATA	26
238-IP3	CACAAACATATGTCTTCCACAAAC	24
322-IP1	GATCCTTGATCCAGGCTTCAAA	24
322-IP3	TCTACAAGGGATGAGGAAGTATCC	24

IP1はフォワードプライマー、IP3はリバースプライマーである。

表2 STSマーカ－のプライマー配列

マーカ－名	プライマー名 (F, R)	配列	塩基数	トットリフジタ1号を 鋳型DNAとした際の バンドサイズ
A-07	A-07-2,3F	GAAACGGGTGTCACATGACAT	20	449 bp
	A-07-2R	GAAACGGGTGACTTAAGTTA	20	

Fはフォワードプライマー、Rはリバースプライマーである。

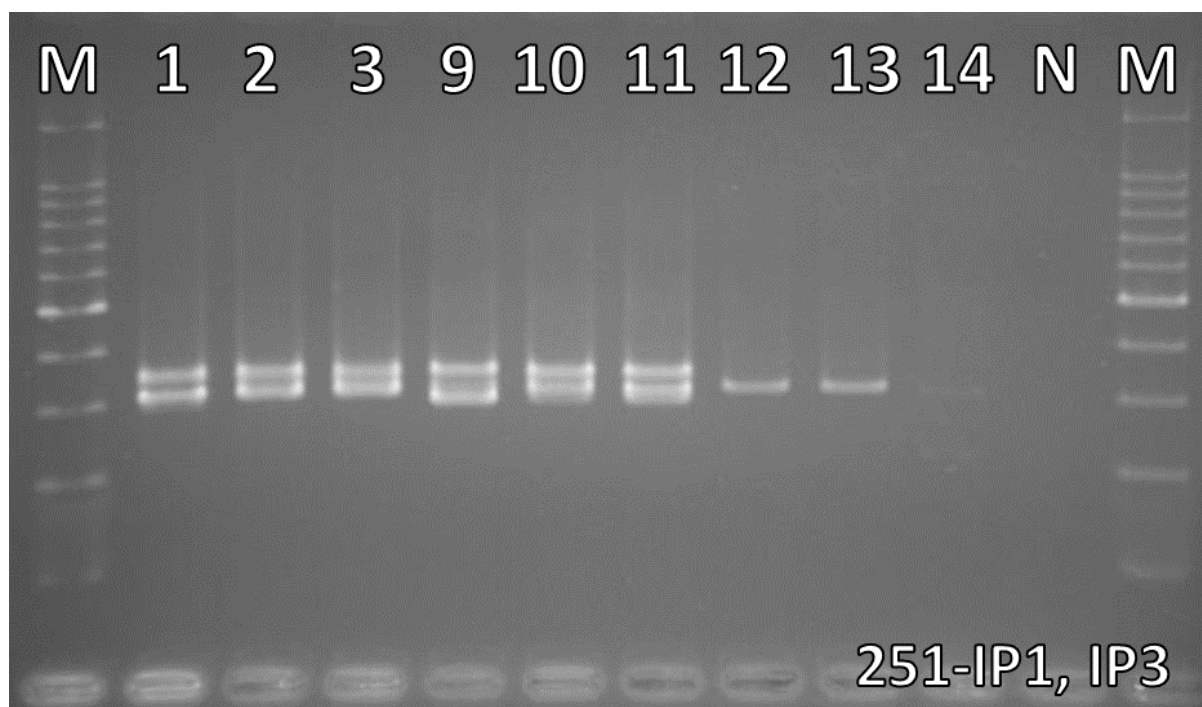
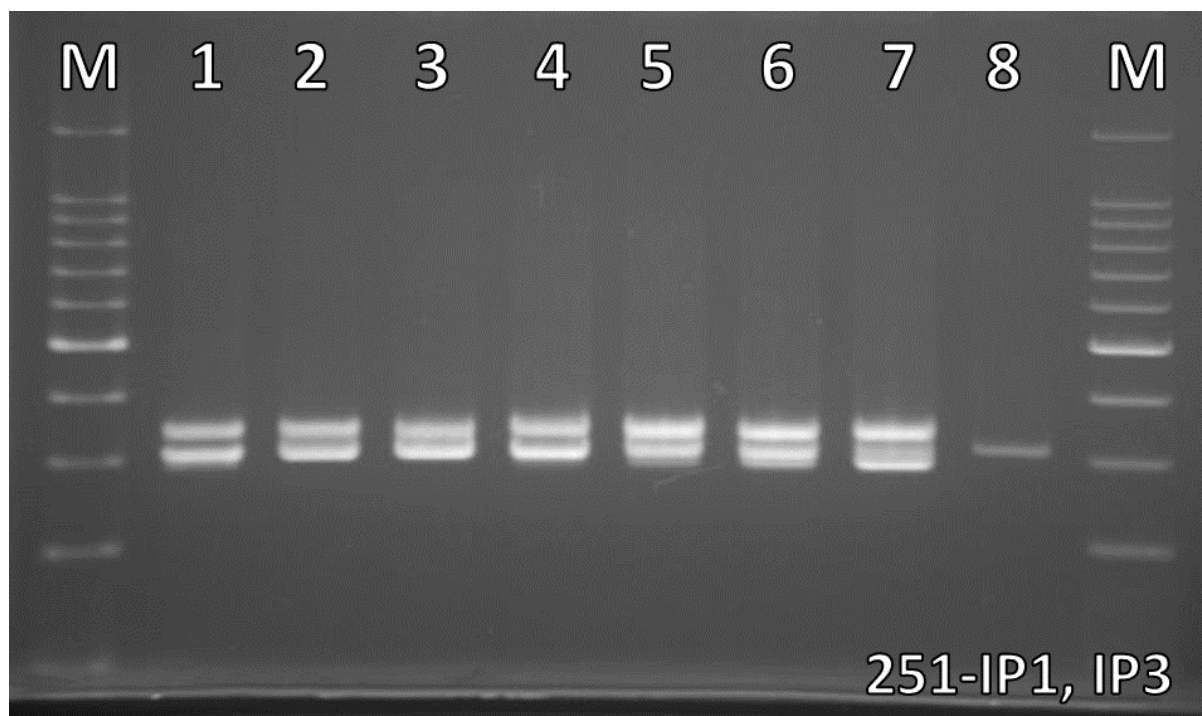


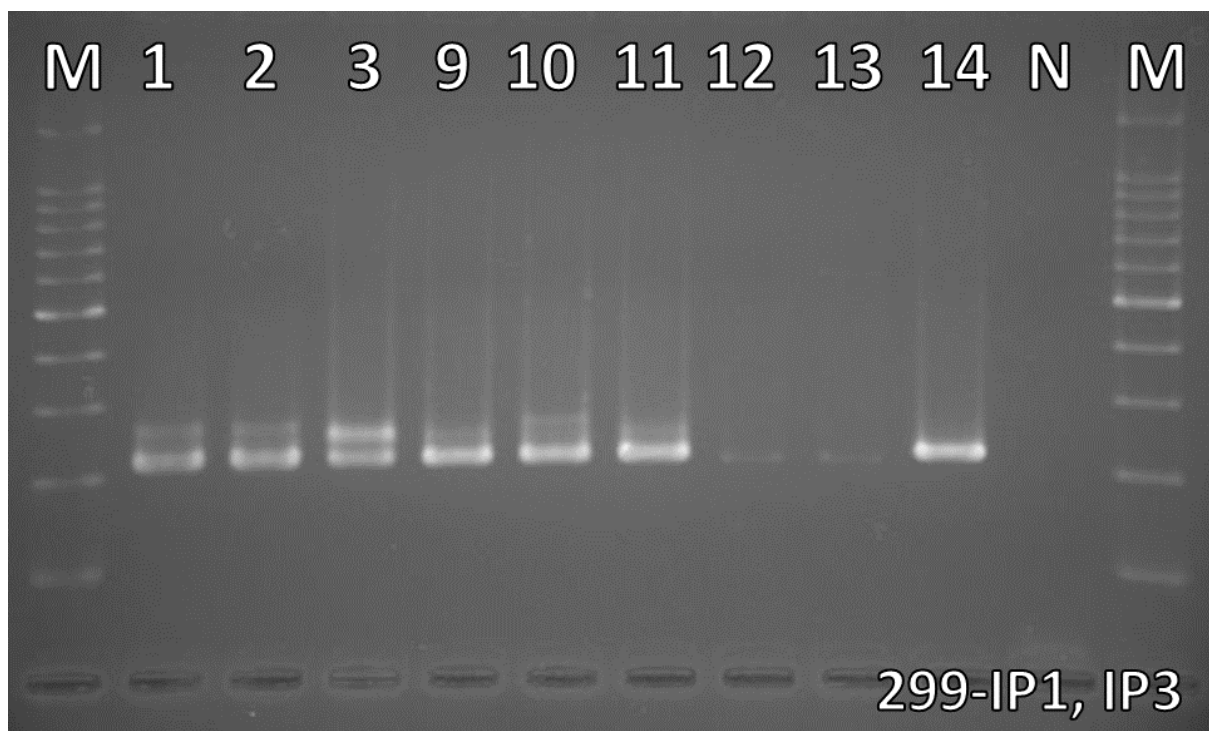
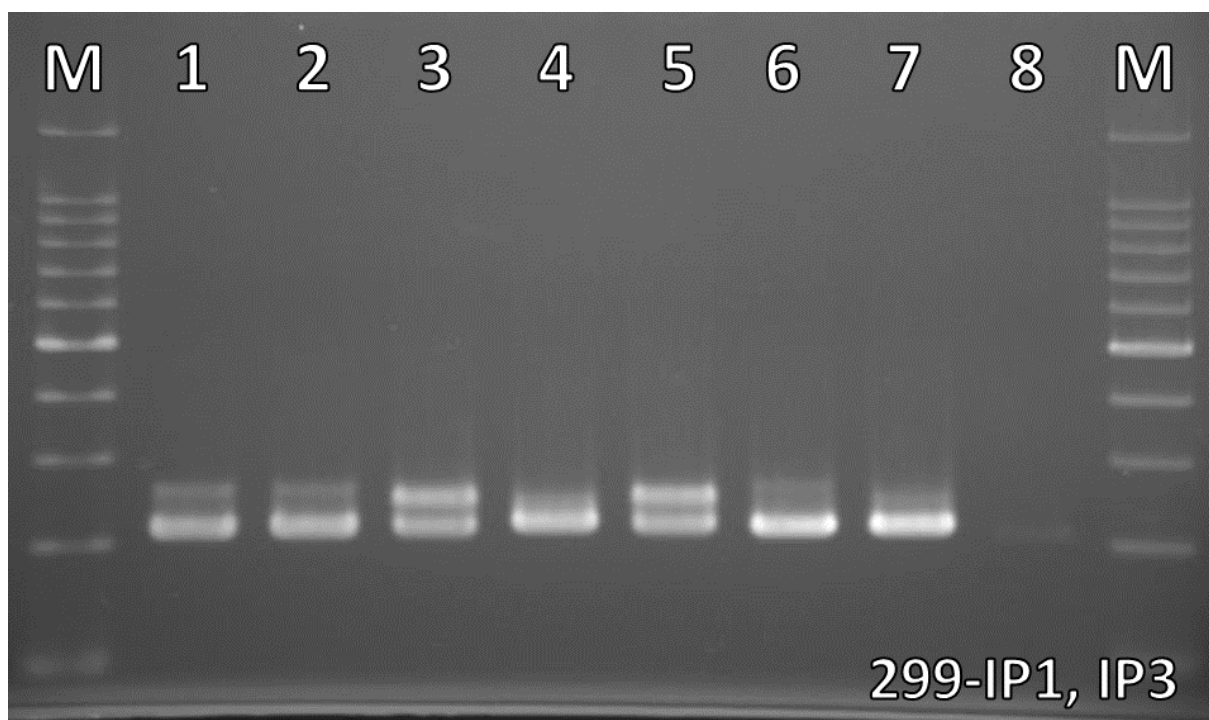
図2 SSRマーカーの電気泳動写真

M: サイズマーカー(100 bp DNA Ladder)、1: トットリフジタ1号、2: トットリフジタ2号、3: TF-3、4: タケシマキリンソウ1、5: タケシマキリンソウ2、6: タケシマキリンソウ3、7: タケシマキリンソウ4、8: タケシマキリンソウ5、9: タケシマキリンソウ6、10: タケシマキリンソウ7、11: タケシマキリンソウ8、12: キリンソウ野生系統(富山)、13: キリンソウ野生系統(柏崎)、14: キリンソウ野生系統(佐渡)、N: ネガティブコントロール

それぞれの電気泳動写真の下部にPCRで用いたプライマーを示した。

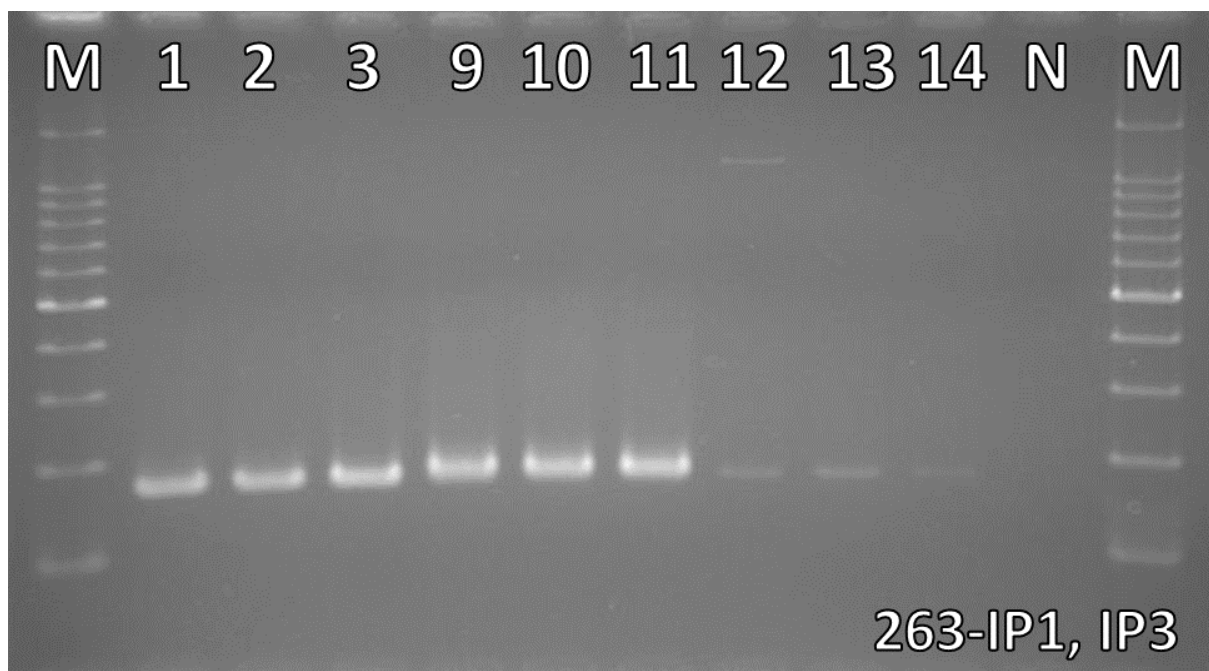
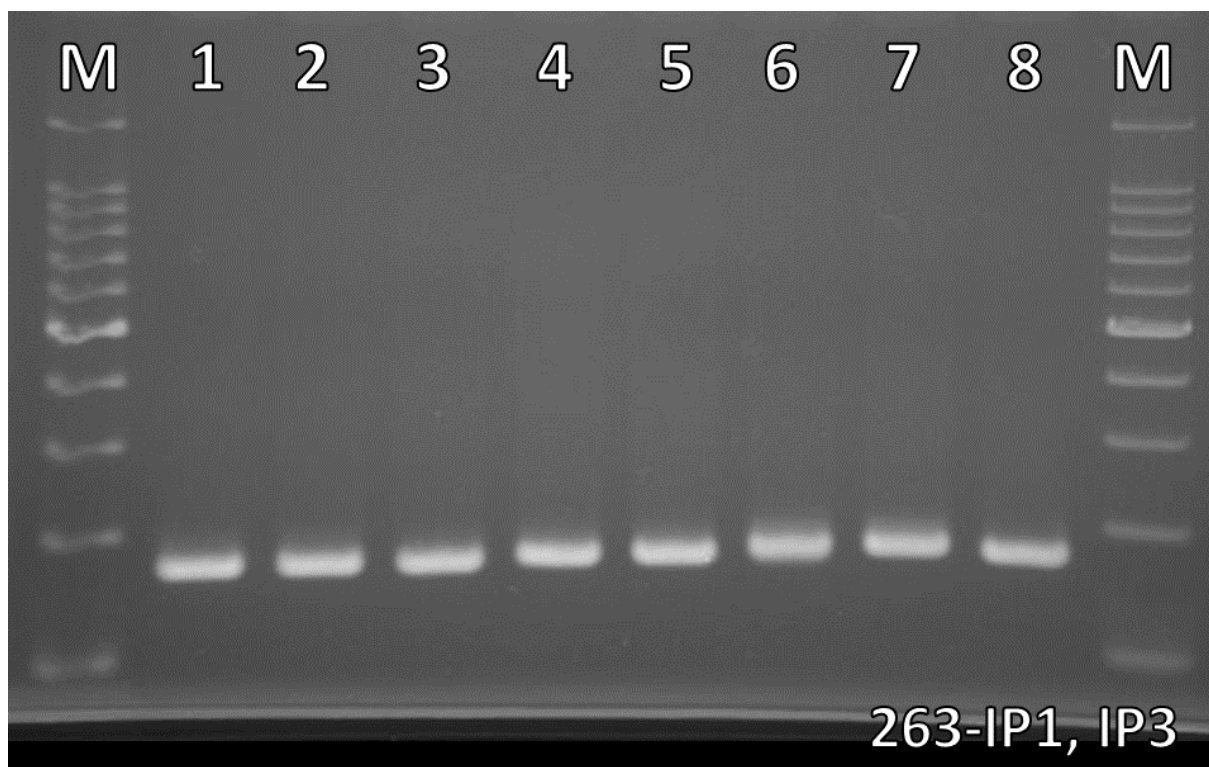
251-IP1, IP3と14の組み合わせの場合はバンドを増幅しないので、マーカーとしては評価の対象としない。

図2 続き



299-IP1, IP3と8, 12, 13の組み合わせの場合はバンドを増幅しないので、マーカーとしては評価の対象としない。

図2 続き



263-IP1, IP3と12, 13, 14の組み合わせの場合はバンドを増幅しないので、マーカーとしては評価の対象としない。

図2 続き

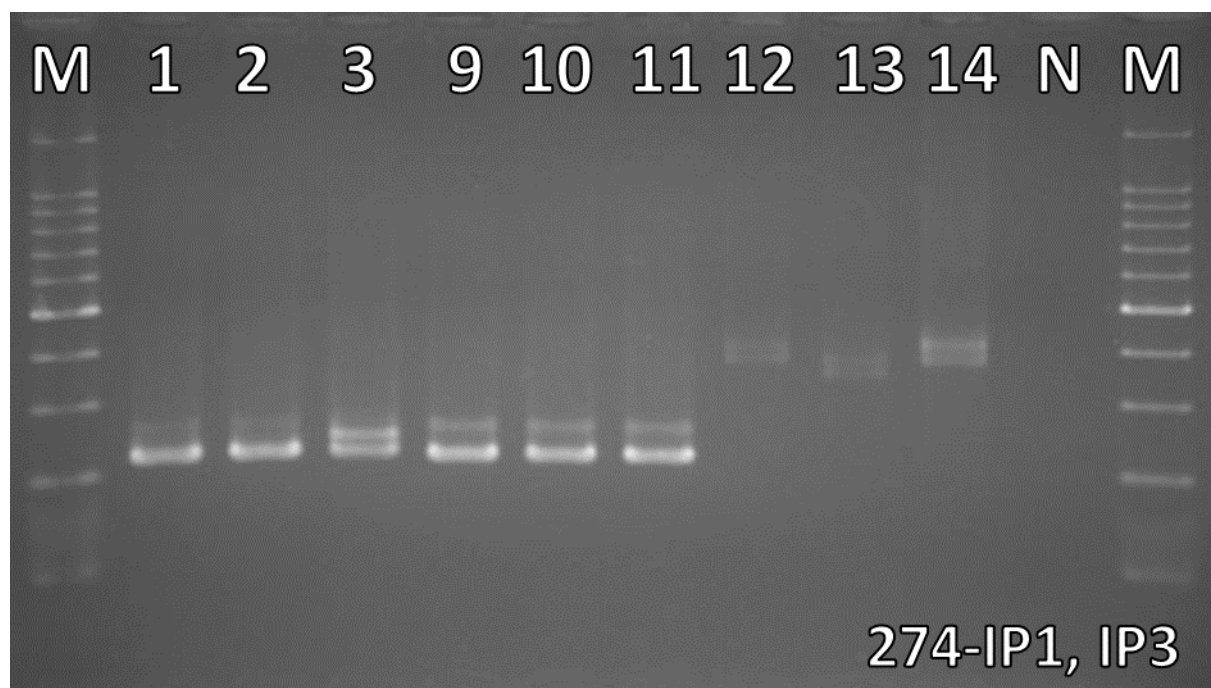
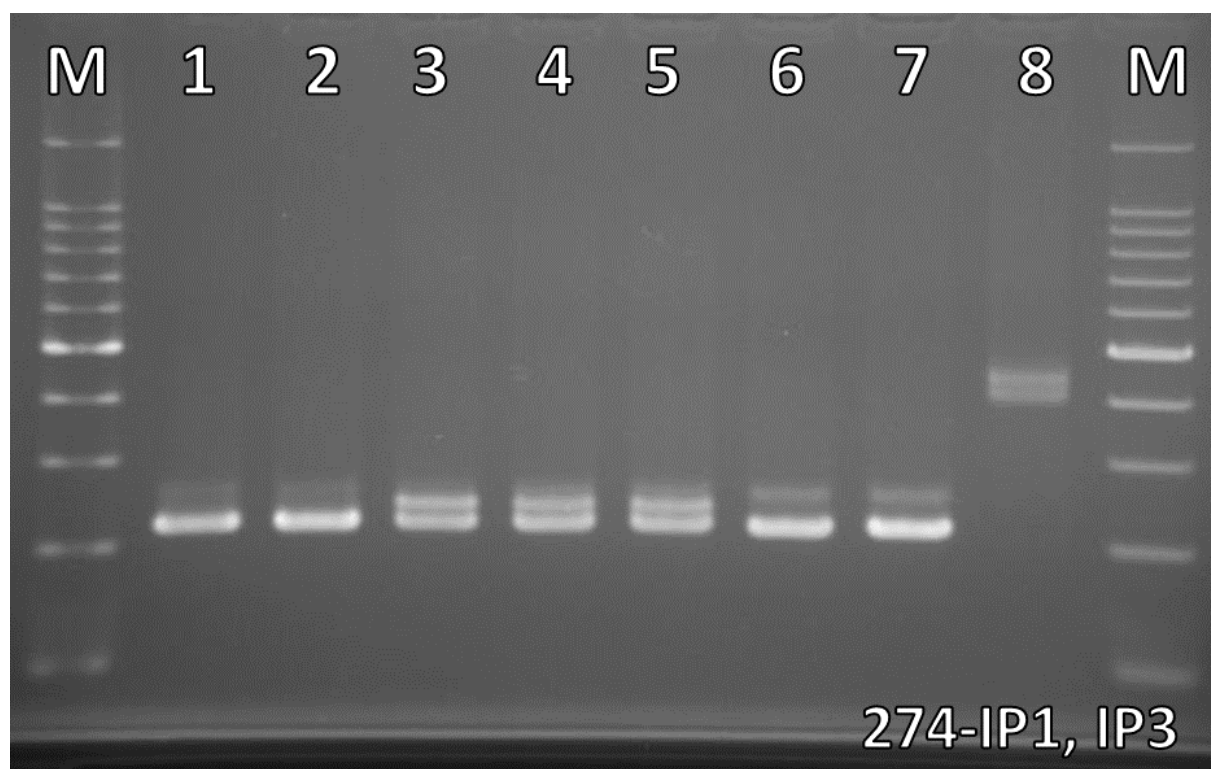


図2 続き

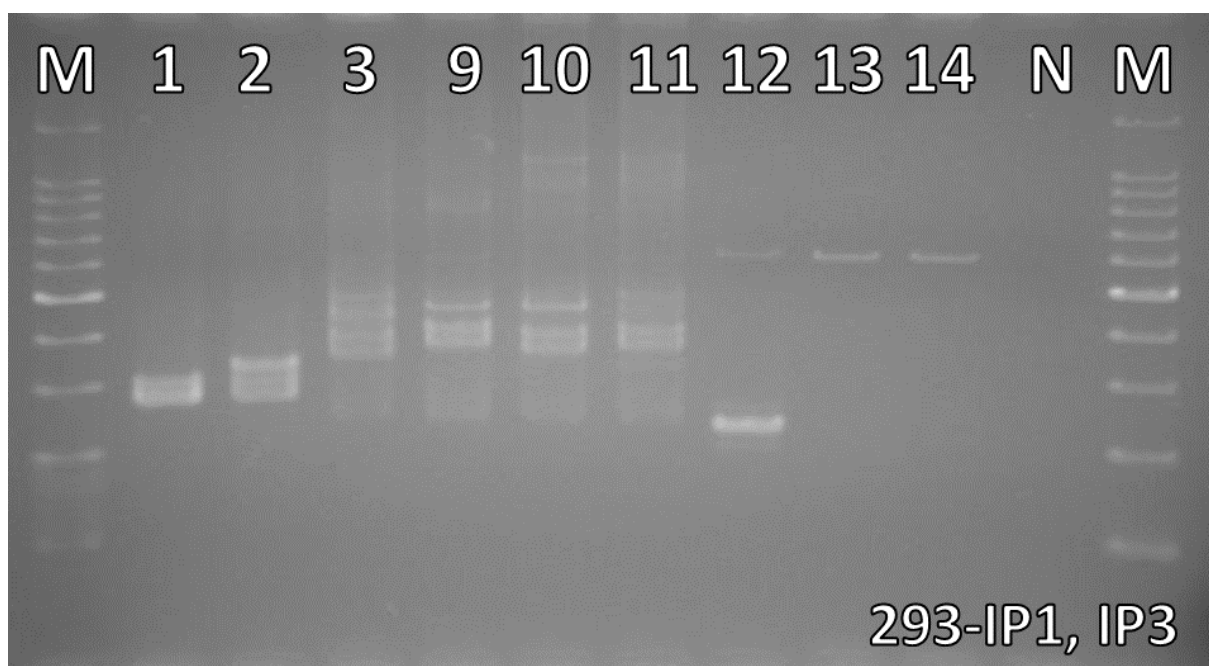
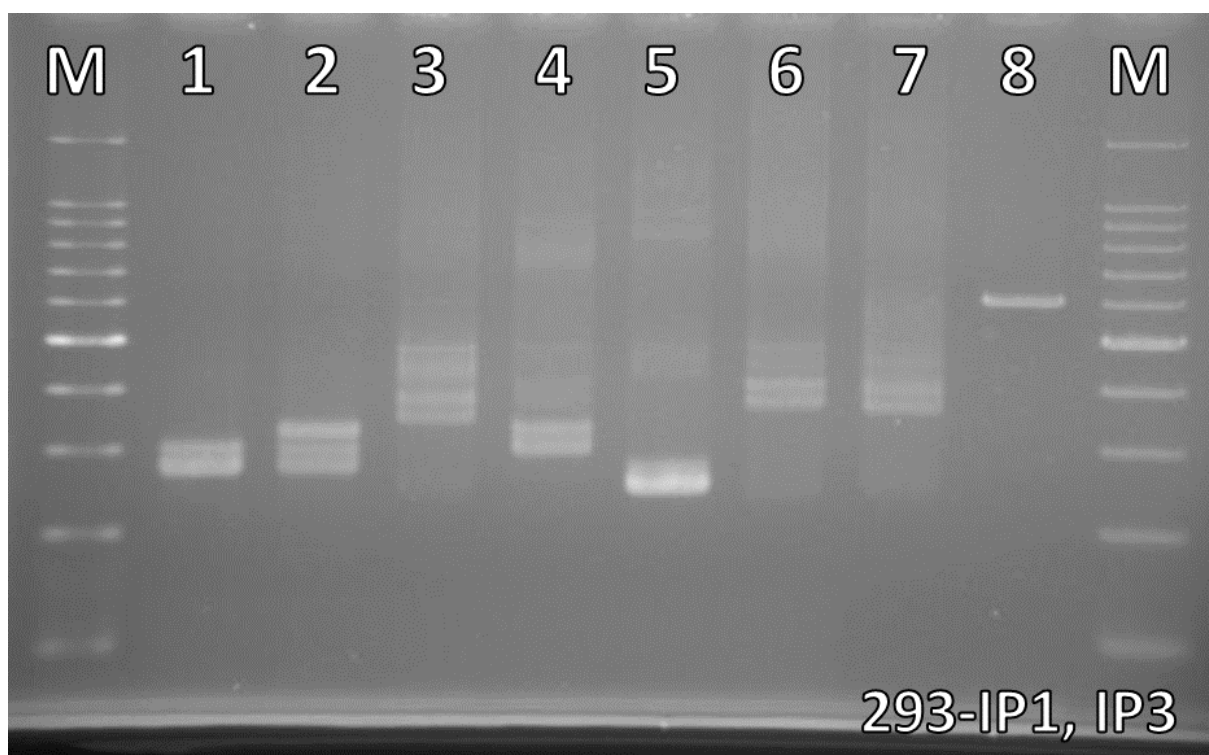


図2 続き

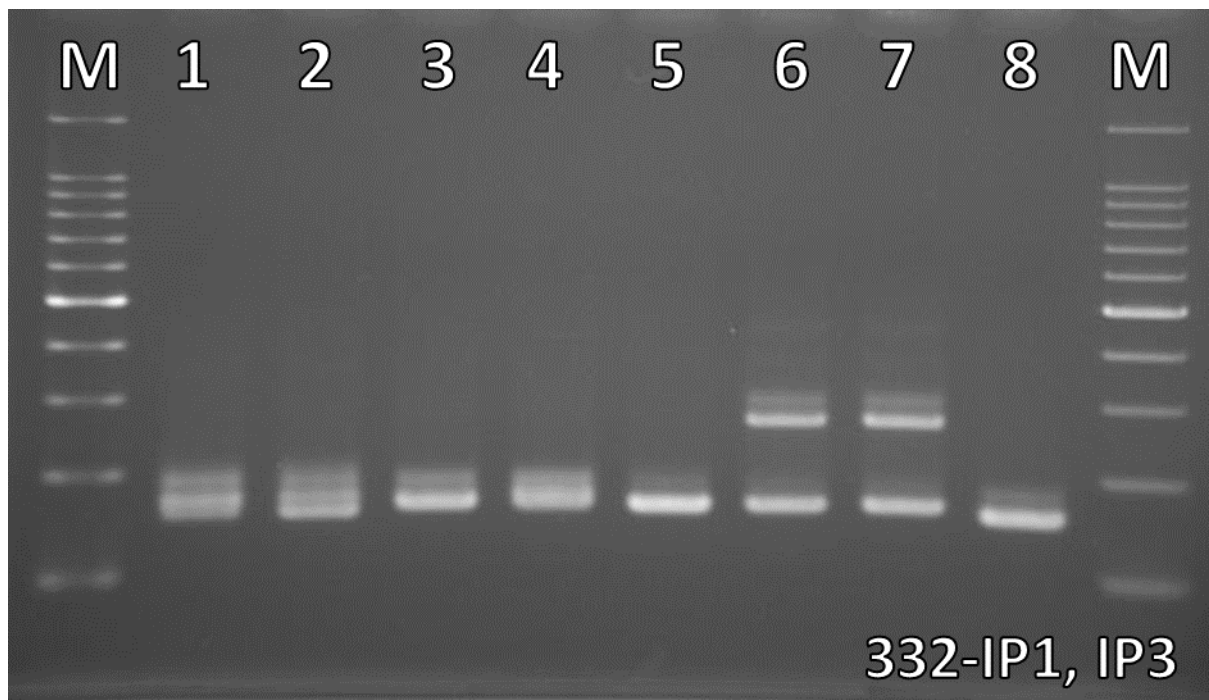
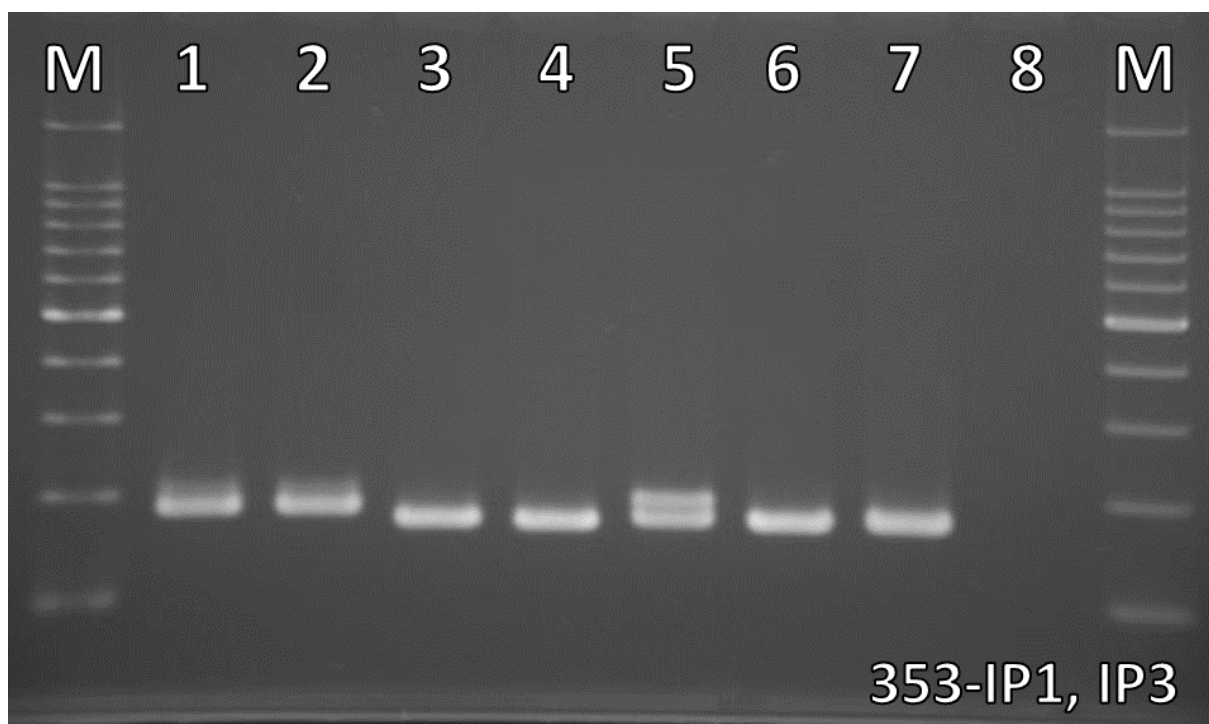


図2 続き



353-IP1, IP3と8, 12, 13, 14の組み合わせの場合はバンドを増幅しないので、マーカーとしては評価の対象としない。

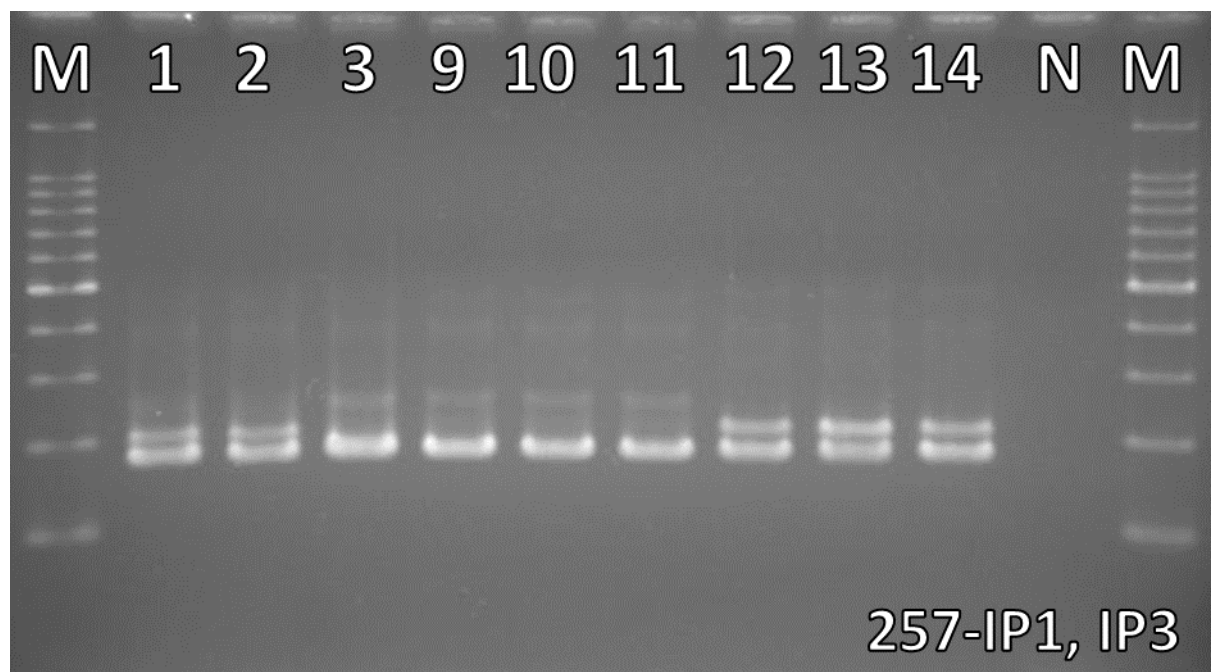
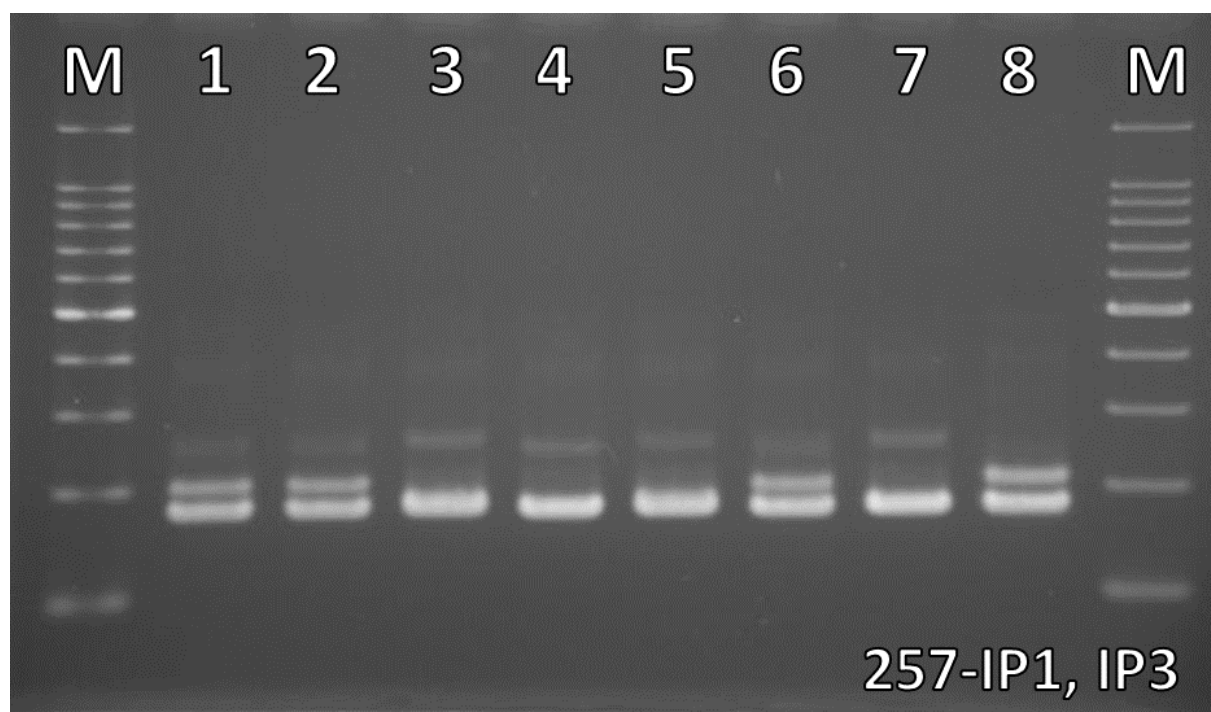


図2 続き

