

## 添付資料 2

### レタスの DNA 品種識別マニュアル



# SSR マーカーによるレタスの DNA 品種識別マニュアル

## レタスの DNA 品種識別マニュアルの目次

### はじめに

1. 適用範囲
2. 一般事項
  2. 1 本マニュアルの成り立ち
  2. 2 レタス各品種の基準系統について
  2. 3 SSR マーカーについて
  2. 4 SSR マーカー遺伝子型の表記について
  2. 5 DNA 品種識別の方法について
  2. 6 品種識別に必要なマーカーについて
  2. 7 補足基準品種について
3. DNA 品種識別の手順
  3. 1 計画・準備
  3. 2 試験操作・判定
4. 試験準備
  4. 1 試験試料
  4. 2 購入品
    4. 2. 1 SSR プライマーセット
    4. 2. 2 試薬・消耗品
  4. 3 調製試薬
  4. 4 機器・プログラム
5. 試験操作・判定
  5. 1 試験操作における一般事項
    5. 1. 1 試験操作を行う環境について
    5. 1. 2 試験操作時の服装
    5. 1. 3 試薬・消耗品の取り扱い
    5. 1. 4 器具の取り扱い
  5. 2 試験試料の採取
    5. 2. 1 試験試料の採取の一般事項
    5. 2. 2 葉からの採取保管
    5. 2. 3 種子の採取保管
  5. 3 DNA 抽出操作 (PureGene 法)
    5. 3. 1 DNA 抽出の一般事項
    5. 3. 2 DNA 抽出の準備
    5. 3. 3 DNA 抽出
    5. 3. 4 DNA 抽出時のトラブルシューティング
  5. 4 DNA の定量・調製・品質確認
    5. 4. 1 DNA の定量の一般事項
    5. 4. 2 DNA の定量
    5. 4. 3 DNA の品質確認

- 5. 4. 4 DNA の定量・調製・品質確認のトラブルシューティング
- 5. 4. 5 DNA の精製
- 5. 5 PCR 増幅操作
  - 5. 5. 1 PCR 増幅操作の一般事項
  - 5. 5. 2 PCR の準備
  - 5. 5. 3 PCR 反応
  - 5. 5. 4 PCR 反応のトラブルシューティング
- 5. 6 SSR マーカーの検出・判定(アクリルアミドゲル電気泳動)
  - 5. 6. 1 アクリルアミドゲル電気泳動の一般事項
  - 5. 6. 2 アクリルアミドゲル電気泳動の準備
  - 5. 6. 3 アクリルアミドゲル電気泳動
  - 5. 6. 4 アクリルアミドゲル電気泳動結果の品質確認
  - 5. 6. 5 遺伝子型の決定
  - 5. 6. 6 アクリルアミドゲル電気泳動のトラブルシューティング
- 5. 7 SSR マーカーの検出方法(QIAxcel)
  - 5. 7. 1 QIAxcel 電気泳動の一般事項
  - 5. 7. 2 準備
  - 5. 7. 3 電気泳動
  - 5. 7. 4 サイズマーカーをもとにしたバンドサイズの計算
  - 5. 7. 5 QIAxcel 電気泳動結果の品質確認
  - 5. 7. 6 QIAxcel 電気泳動結果のデータ整理
  - 5. 7. 7 遺伝子型の決定
  - 5. 7. 8 測定値に基づいた遺伝子型の決定方法
  - 5. 7. 9 QIAxcel 電気泳動結果のトラブルシューティング
- 6. 是正処理

付属文書：

1. レタス SSR マーカーのアクリルアミドゲル電気泳動での検出例
2. レタス SSR マーカーの QIAxcel での検出例
3. 参考文献

\*この目次リストは ISO 規格や JIS 規格の試験方法の様式に準拠したものです。

\*\*項目番号・点の凡例

「①, ②, …」は場合分けを記述する際に使用する

「(1), (2), …」は順序をつける際に使用する。主にプロトコールでの番号となる

「【1】, 【2】 , …」は番号付きで列挙する際に使用する。

「・」は単純に列挙する場合に使用する

はじめに

レタスは主にサラダなど生食に用いられる野菜品目であり、食の洋食化にあわせて、その重要性を増してきた。国内生産においては、2000年以前から高い水準で横ばいを続けており、今後もその重要性に変わりはないと考えられる。

近年、国内消費のみならず輸出においても存在感を増しており、日本産野菜の輸出拡大を図る上で見逃せない品目と言える。

一方で、レタスの品種は、ほぼすべてが固定種であり自殖可能なため特定品種の種子を増殖することは容易である。ひいてはその再生産した種子・あるいはそれを使った育成物を生産・販売されることで育成者の知的財産権が侵害されることが危惧される。

このような状況の下、海外への輸出に向けた地域特産化・ブランド化などの努力と並行して、その知的財産としての価値を保護するため、レタス品種識別法を開発する事は非常に重要である。

現在のレタス品種識別法は、品種登録における特性表が例に挙げられるように、栽培試験を基にした専ら外観・性状を観察する方法であり、生化学的な手法、例えばイチゴのようなDNAマーカーによる品種識別法は確立されていない。

そのため、品種同定のためには、条件を同一にした圃場栽培試験を行う必要があるなど時間・労力・費用が伴う。また、加工品(カットサラダ)である葉片、幼苗、さらに種子といった段階での品種識別は困難な状態である。

このような状況を打開するため、タキイ種苗は文献およびデータベースの情報をもとに選択・開発した14種類のSSR(Simple Sequence Repeatの略、別名マイクロサテライト)マーカーからなる対象12品種に対するレタス品種識別法を開発し、本マニュアルを作成した。

## 1. 適用範囲

本マニュアルの適用範囲は以下のとおりである。

- ・被検査物：レタスの葉(子葉・本葉)および種子
- ・品種：下表の12品種間相互の識別が可能である。これらの内、「サウザー」を基準品種(各DNAマーカーにおける多型の基準となる品種)としている。  
より具体的には、「2.3」記載の事情から、タキイ種苗研究農場で保管されている12品種間の種別を判別するものとなる。適用範囲とした品種はすべて自殖系統であり、栽培形質もそれぞれ異なったものである。

表1.本マニュアル適用範囲の品種

品種登録番号	品種名称	育成/販売者名	備考
635	シナノグリーン	長野県	育成者権消滅
1560	晩抽レッドファイヤー	タキイ種苗	
6147	ダンシング	タキイ種苗	育成者権消滅
9122	サマーサージ	タキイ種苗	
10884	サウザー	タキイ種苗	
12976	ランサー	タキイ種苗	
17203	シナノスター	長野県	
18060	タフオラ0566	タキイ種苗	
18061	タフオラ0567	タキイ種苗	
21502	TLE-452	タキイ種苗	
23484	TLE-487	タキイ種苗	
24335	TLE-496	タキイ種苗	

## 2. 一般事項

### 2. 1 本マニュアルの成り立ち

本 DNA 品種識別マニュアルは、タキイ種苗研究農場で保管されている各品種の市販種子およびその芽生えあるいは栽培した葉より抽出した DNA を用いて SSR 分析を行った結果をもとに解析・作成されたものである。

作製された SSR マーカーは以下のマーカーから成り立っている。(表 2)

- ①文献(Simko 2009)に掲載されたマーカー
- ②文献のマーカー情報からタキイ種苗が改良したマーカー、
- ③公式のデータベース(CGP :

[http://compgenomics.ucdavis.edu/morphodb\\_index.php](http://compgenomics.ucdavis.edu/morphodb_index.php))より、取得した DNA 配列情報を基にタキイ種苗が単独で開発したマーカー

SSR マーカーは適用範囲 12 品種相互を識別するのに十分な種類があり、複数のマーカーを使用することで、信頼度の高い識別が可能となっている。(表 3)

また、マーカーの内、下記の組み合わせで、複数のマーカーを同時に PCR・検出することが可能なマルチプレックス化を図っており、試薬コスト・労力の低減につなげている。マルチプレックス PCR が可能なマーカーの組み合わせは以下の通りである

#### マルチプレックス化 組み合わせ

- ・ SML15 , SML26 , SML22 , SML42 , SML45 : 5 プレックス
- ・ SML60 , SML3 : 2 プレックス
- ・ LS\_WGS\_10 , TK\_39 , LS\_WGS\_15 : 3 プレックス
- ・ TK\_11 , TK\_37 : 2 プレックス
- ・ TK\_20 , TK\_42 : 2 プレックス

DNA 抽出法については市販キットを基本として使用しており、試薬の調整ミス等による人為的ミスが回避可能である。

多型の検出方法についてはアクリルアミド電気泳動あるいはキャピラリー泳動装置の使用が選択できる。

適用範囲にある品種については各 20 個体で本マニュアル掲載の SSR マーカーの拡大確認が行われ、その中では品種内多型がないことが確認されている。

### 2. 2 レタス各品種の基準系統について

レタス各品種の基準系統(品種の真正サンプル。品種を代表するもの)としては、品種登録をされているものについては種苗管理センターに保管されている種子を利用することが理想的であるが、原則として譲渡は受けられない。このため、2. 1 にもある通り、タキイ種苗研究農場で保管されている市販種子を基準として本マニュアルを開発した。このことから、厳密には本マニュアルの DNA 品種識別は、タキイ種苗研究農場で保管されている品種での種別をしたものとなる。

### 2. 3 SSR マーカーについて

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-数塩基の特定配列の反復回数の違いを多型として利用するもので、この反復配列領域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 断片の長さの差異として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 断片の長さの違いを高精度で分析することにより、近縁な品種間も判別が可能である。試験の一般的な手順は、

- (1)調査する試料及び対照となる試料から、ゲノム DNA を抽出する。
- (2)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、各種から抽出したゲノム DNA を鋳型にして PCR 増幅を行う。
- (3)アクリルアミドゲルもしくはキャピラリー泳動装置を使用して、PCR 増幅産物を電気泳動で分離し、多型を検出する。
- (4)検出結果の解析に基づき、調査する試料と対照とする試料の遺伝子型を照合して判定を行う。

といったものとなっている。

### 2. 4 SSR マーカー遺伝子型の表記について

SSR 遺伝子型の表記は、DNA 品種識別技術のガイドライン(平成 20 年 種苗管理センター)の資料 3 記載の方法に従って行った。(表 3)

すなわちレタス品種「サウザー」を基準品種とし、その遺伝子型を「S」とし、さらにこれと別に見つかった対立遺伝子についてはその値から何 bp 離れているかで表示した(表 3)。例えば、SML15 マーカーでは、基準品種「サウザー」の遺伝子型を S、それとは別に見つかったもう一つの遺伝子型は 10bp バンドサイズが小さいので S-10 の表記となる。

同じ表記である場合は同じサイズのバンドが検出されることをあらわす。つまり、同じ遺伝子型であることを示す。

表示の基となるバンドサイズの数値は、QIAxcel DNA High Resolution Kit を利用して、QX Alignment Marker 15 bp/500 bp をアライメントマーカー(PCR サンプル間の泳動距離をそろえる基準)として計測された各種 PCR 産物の泳動距離と、サイズマーカー(QX Size Marker 25-500bp)の泳動距離をもとに比較計算されたものである。実際の塩基数をカウントした数値ではない。

### 2. 5 DNA 品種識別の方法について

DNA 品種識別の最も基本的な方法の一つは、調査する試料(以下、調査試料)と対照となる試料(以下、対照試料)が同じ品種であるか否かを判断する、1 対 1 調査である。より具体的に述べると、調査試料と対照試料より抽出された DNA

を鋳型に PCR を行い、検出された遺伝子型が同一であった場合、同じ品種である可能性が高いと判定し、そうでない場合は違う品種と判定することである。

しかし、適用範囲に示した品種のいずれであるかを判断する場合、対照となりうる品種全部に対して 1 対 1 調査を行うことは非効率である。その場合は、まず基準品種、あるいは同時に電気泳動し検出結果を比較することで遺伝子型の判定基準にできる品種（以下、補足基準品種）に基づいた遺伝子型の判定から品種の推定・絞り込みを行い、最終的に同品種と推定される品種を対照試料とした 1 対 1 調査を行うことが推奨される。

以上のことから本マニュアルでは主に 2 通りの試験に区分している。試験の選択肢と試験例および必要とされるデータ(電気泳動像・解析結果)は以下のとおりである。①あるいは②の場合に合わせて必要な手順を進めることとなる。

①単純に調査試料と対照試料とを 1 対 1 での対応させる場合(1 対 1 試験)

(例)

- ・もちこまれた植物体が品種「サウザー」かどうかを調べる場合。
- ・品種「ランサー」として販売されている種子の品種表記が正しいかを調べる場合。

(必要データ)

- ・対照試料の品種を識別可能な遺伝子型あるいはその組み合わせを、調査試料も持っているかを比較できるデータ

②調査する試料が適用範囲 12 品種の内のどれであるかを判定する場合。

(例)

- ・もちこまれた植物体が適用範囲 12 品種の内のどれであるかを調べる場合。

(必要データ)

- ・調査試料がどの品種に当てはまるかを判定するのに使用できるデータ。(表 3 に記してある遺伝子型と照らし合わせて品種を推定する。)
- ・推定した品種を対照試料として、識別可能な遺伝子型あるいはその組み合わせを調査試料も持っているかを比較できるデータ。(1 対 1 試験と同様となる)

## 2. 6 品種識別に必要なマーカーについて

本マニュアルでは、理想的には表3にあるすべてのマーカーの確認を行うことでもっとも信頼度の高い品種識別とすることができる。

しかし、すべてのマーカーについて試験を行うことが労力・費用の面から問題となる場合、以下の方法を選択できる。

### ①品種特異的な遺伝子型を利用する場合。

表3の中で、12品種中、特定品種にしかない遺伝子型があれば、その品種を特異的に識別可能な遺伝子型として利用することができる。

例えば、ダンシングはSML26での遺伝子型がS-9であり、これは12品種中でダンシングにしかない遺伝子型であるため、この品種を識別可能な遺伝子型となる。

以下、1つのマーカーで12品種中1つの品種を識別できる場合を列挙する。

( )内は各マーカーでの遺伝子型を表す。

- ・ SML26 : ダンシング(S-9)
- ・ SML22 : ランサー(S+24)・TLE-487(S+18)
- ・ SML60 : TLE-452(S+8)
- ・ TK-42 : ダンシング(S-3)

### ②複数マーカーの遺伝子型の組み合わせ（ハプロタイプ）を利用する場合。

表3において、複数マーカーの遺伝子型の組み合わせを利用して品種を識別することが可能である。表3の中で品種が特定できるものであれば、どのマーカーの組み合わせでも可能である。

一例として、図1の様な検査の流れで12品種の識別を行うことができる。例えば、SML45で遺伝子型がSであることを確認したのち、SML22で遺伝子型がSであること、さらにSML42で遺伝子型がSであることが確認できれば、サウザーであることが識別できる。

この場合、最少SML45、SML15、SML22、SML42、TK\_11の5マーカーの遺伝子型の組み合わせの結果で適用範囲12品種の識別が可能となる。

### ③マルチプレックスPCRを行う場合

複数のマーカーを同時に検出するマルチプレックスPCRを利用すれば省力・省コストの検査が可能になる。マルチプレックスPCRが可能な組み合わせとその結果、識別可能な品種の組み合わせは以下のとおりである。

- ・ 5プレックス(SML15, SML26, SML22, SML42, SML45)

12品種から晩抽レッドファイヤとサマーサージ除く計10品種の個別識別が可能である。

この5プレックスのマーカ―運用とTK\_11マーカ―を組み合わせれば、最小2回のPCR・泳動で適用範囲12品種の識別が可能となる。

- ・3プレックス(LD\_WGS\_10, TK\_39, LS\_WGS\_15)  
12品種からダンシング・ランサー・TLE-452・TLE-496の計4品種の個別識別が可能である。
- ・2プレックスのマーカ―組み合わせ、識別に関しては表2、表3参照。

## 2. 7 補足基準品種について

本マーカ―記載の多型はアクリルアミドゲル電気泳動・QIAxcelで検出することとなるが、アリアル間のバンドサイズ差が小さい場合、基準品種やサイズマーカ―との比較だけでは遺伝子型の判定が難しい場合が想定される。その場合には、基準品種に加えて遺伝子型の判定を容易にするため各アリアルを代表する品種：補足基準品種を同じ試験操作に組み込むことが有効となる。

マーカ―SML22、SML45では特に有効である(付属文章1, 2を参照、SML22においてはTLE-487が、またSML45マーカ―ではタフオラ0567が補足基準品種として有効)。

その他、表3にある各マーカ―それぞれの多型に相当する品種であれば、どの品種を各マーカ―の多型のための補足基準品種として使ってもかまわない。

表 2.品種識別マーカーとプライマー配列

マーカー名	出典	プライマー塩基配列		ストック濃度	備考
		Forward	Reverse		
SML15	①	TTGAGGAGGGCATTACGTC	GAGGCGTATCTCCAAGGTGT	10 pmol/μ l	
SML26	①	GGGTTCTCATTGGCTGACAT	TGTCTTCCAACCAAAACATACA	25 pmol/μ l	
SML22	②	TTCGCAGAGCCATTGTA ACTT	TCTTCACATTCATCAGCAAG	10 pmol/μ l	5プレックスセットとして使用可能
SML42	②	CATGAAGTGT TTTGGGGTGA	TGTT CATGTTGATGATGATGGTT	25 pmol/μ l	
SML45	②	CACCACATGACAAGACAATGG	TAATAGCTCCGGTGAGAACGA	10 pmol/μ l	
SML60	①	ATGAGTGCACCCAGAATTT	CTTTCACCAACCAACATCC	10 pmol/μ l	2プレックスセットとして利用可能
SML3	①	CGGGCTGGTTTTGATTTTA	TGTCAAATCGTCACGTGGTT	25 pmol/μ l	
LS_WGS_10	③	AGGGTTTTGGAATGGATGTAT	GACAATTCTTGCAATTTTCTCA	25 pmol/μ l	
TK_39	③	AACAAACACAACACAGTACGAC	CCAAGGTGTACCTATACAGACAT	8 pmol/μ l	3プレックスセットとして使用可能
LS_WGS_15	③	TTCACTTTGAGTTCAATCTTGC	GCTGATGAAAACCAAATCTGT	8 pmol/μ l	
TK_11	③	CAAAGGAAGAAAAGAAAGTGAGA	CCTGTTCAACAACATCTTCCTTC	25 pmol/μ l	2プレックスセットとして利用可能
TK_37	③	ATTGAAGCATTGAAAGCTGAC	CAAACAACATTCATTTAATCTCC	25 pmol/μ l	
TK_20	③	CAATGGAGCAGAAAATACAAAA	ACAACCAACAAGGATCAGC	25 pmol/μ l	2プレックスセットとして利用可能
TK_42	③	TGTCTCTTGCTCCAATACCC	CCCTTTGTGTCATCAATATCA	25 pmol/μ l	

①文献(Simko 2009)に掲載されたマーカー

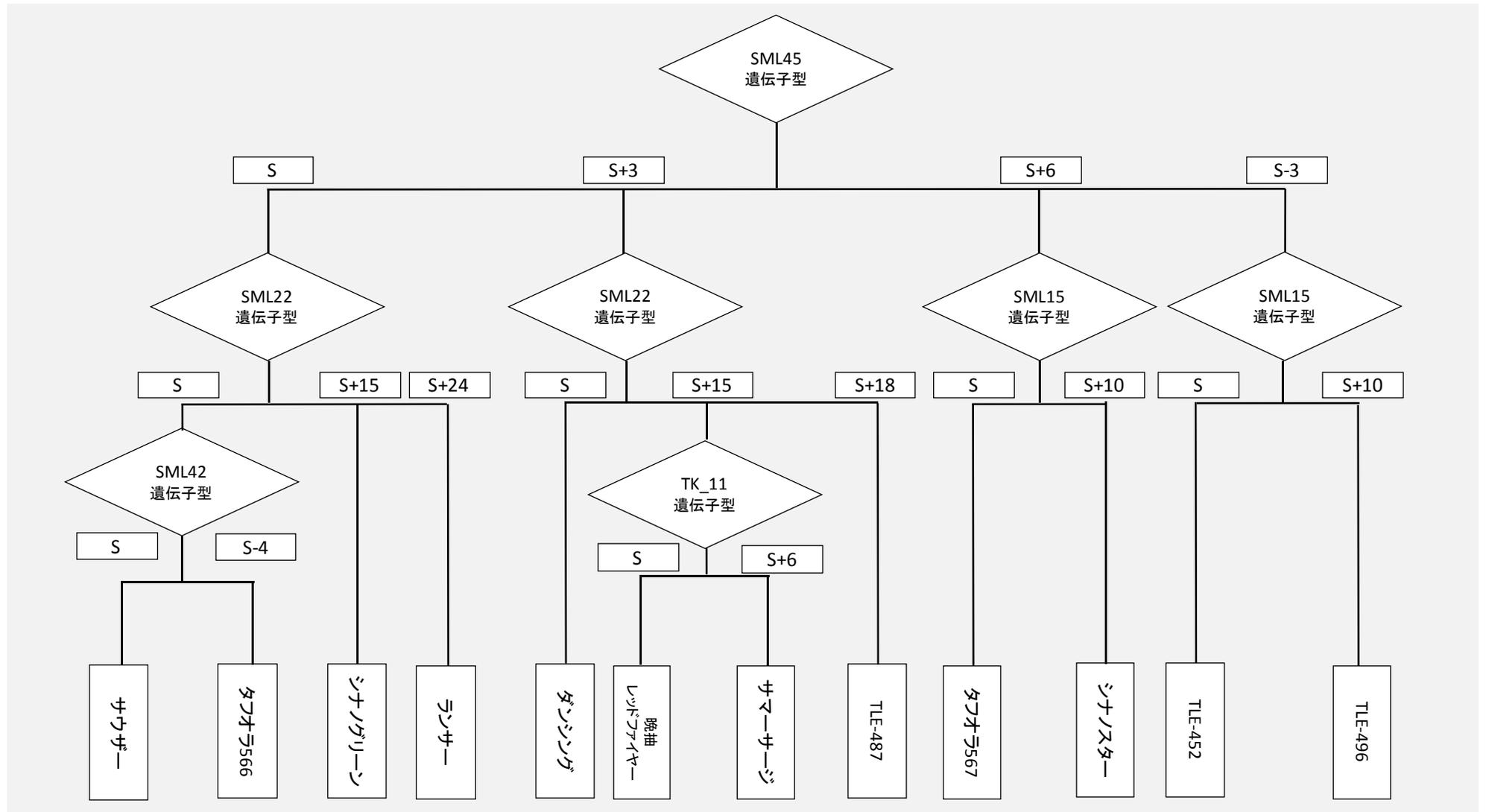
②文献のマーカーをタキイ種苗が改良したマーカー

③公式のデータベース情報を基に、タキイ種苗が開発したもの

表 3. レタス 12 品種 SSR 遺伝子型表

	マーカー名	5プレックス					2プレックス		3プレックス			2プレックス		2プレックス	
		SML15	SML26	SML22	SML42	SML45	SML60	SML3	LS_WGS_10	TK_39	LS_WGS_15	TK_37	TK_11	TK_42	TK_20
	表内多型数	2	3	4	2	4	2	2	2	2	2	2	2	3	2
品種登録番号	品種名														
10884	サウザー	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
635	シナノグリーン	S+10	S	S+15	S	S	S	S	S-15	S+10	S	S	S	S	S+15
1560	晩抽レッドファイヤー	S	S+15	S+15	S-4	S+3	S	S-4	S	S	S-20	S+15	S	S-12	S
6147	ダンシング	S	S-9	S	S	S+3	S	S	S-15	S	S-20	S	S+6	S-3	S
9122	サマーサージ	S	S+15	S+15	S-4	S+3	S	S-4	S	S	S-20	S+15	S+6	S-12	S
12976	ランサー	S+10	S	S+24	S-4	S	S	S	S	S+10	S	S	S+6	S-12	S+15
17203	シナノスター	S+10	S	S+15	S-4	S+6	S	S	S-15	S+10	S	S	S+6	S	S+15
18060	タフオラ0566	S	S	S	S-4	S	S	S	S	S	S	S	S	S-12	S+15
18061	タフオラ0567	S	S	S	S-4	S+6	S	S	S	S	S	S	S	S-12	S+15
21502	TLE-452	S	S	S	S	S-3	S+8	S	S-15	S	S	S	S	S	S+15
23484	TLE-487	S	S+15	S+18	S-4	S+3	S	S-4	S	S	S-20	S+15	S	S	S
24335	TLE-496	S+10	S+15	S+15	S-4	S-3	S	S	S	S+10	S-20	S+15	S+6	S-12	S
備考 Sの参考サイズ(bp)		247	182	130	116	86	171	120	188	145	108	142	120	139	90

図 1.レタス 12 品種識別 マーカー利用のフロー例



### 3. SSR によるレタス DNA 品種識別の手順

3. 2から3. 3の手順に従ってレタスの品種識別を行う。本章記載の流れに従って行われることが望ましいが、試料の採取・保管が優先される場合は、その限りではない。

ここでは大まかな流れについて記載するにとどまり、より詳細な内容については次章以降を参照すること。

#### 3. 1 計画・準備

##### (1)試験内容の確認

「1. 適用範囲」および「2. 一般事項」を参考にして、試験の目的内容が本マニュアルに合致したものであるかを確認する。合致する場合のみ品種識別が可能である。

##### (2)試験方法計画

本章、「2. 一般事項」、「4. 試験準備」「5. 試験操作・判定」を参考にして、必要な試料・試薬・試験操作の把握を行い、試験内容に合わせたより具体的な計画を行う。

例：電気泳動方法の選択。

DNA 抽出操作に必要な試料。

DNA 抽出操作時のサンプルチューブの名称。

PCR 反応における、プレート内での DNA サンプルの配置。

PCR 反応における、PCR マスターミックスで混合する試薬量。 等

##### (4)試料・試薬・器具の準備確認

「4. 試験準備」を参考にして、必要な試料・試薬・器具の確認を行う。手元に無い場合は購入・入手する必要がある。

#### 3. 2 試験操作・判定(図 2,3 のワークフローも参照すること)

##### (1)試料の採取・保管

「5. 2 試験試料の採取」に基づいて試料の採取・保管を行う。

##### (2)DNA 抽出

「5. 3 DNA 抽出操作 (PureGene 法)」に基づいて DNA の抽出を行う。

##### (3)PCR 反応

「5. 5 PCR 反応操作」に基づいて PCR 反応操作を行う。

##### (4)電気泳動・泳動結果の解析

「5. 6 SSR マーカーの検出・判定(アクリルアミドゲル電気泳動)」

あるいは

「5. 7 SSR マーカーの検出方法(QIAxcel)」

に基づいて電気泳動を行う。

電気泳動の手法選択は、各手法の一般事項に基づいて、操作者が選択することができる。

(6)判定に必要なデータがそろうまで必要な試験操作を繰り返す。

必要なデータがそろったら、識別のまとめへ進む。

(7)判定と識別のまとめ

識別可能な遺伝子型あるいはその組み合わせにおいて、調査試料と対照試料が同一であれば、調査試料と対照試料は同じ品種であると判定する。

調査試料の遺伝子型が1つでも対照試料と違うのであれば、対照品種とは異なる品種であると判定する。

元の試料・DNA 試料・品種決定のためのデータに使用された PCR 産物の残りは冷 凍保存する。保存期間の目安は1年とするが、特に必要と考えられるものについては、さらに長期の保存を行う。それ以外の試料や、DNA 抽出時の残液、使用後の PCR プレートは廃棄する。

図 2. 試験操作ワークフロー

(調査試料と対照試料とを 1 対 1 での対応させる場合)

\* 品種推定後の試験である場合、あらかじめ DNA を抽出している試料を改めて抽出しなおす必要はない。

1. サンプル採取	<p style="text-align: center;">葉                      種子</p> <p style="text-align: center;">↓                              ↓</p>														
2. DNA抽出	<p style="text-align: center;">Gentra PureGene Tissue Kit (キアゲン社) を用いる方法</p> <p style="text-align: center;">↓</p>														
3. DNA濃度・純度確認	<p style="text-align: center;">分光光度計 (NanoDro等) やアガロースゲル電気泳動等で、DNAの確認を行い、DNA溶液 (10ng-50ng/μℓ) を調製する</p> <p style="text-align: center;">↓</p>														
4. PCR	<p>PCR反応</p> <p style="margin-left: 40px;">必要DNAサンプル</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・調査試料DNA</li> <li>・対照品種DNA</li> <li>・標準品種 (サウザー) DNA</li> </ul> <table border="1" style="margin-left: 100px; margin-top: 20px;"> <tr> <td style="padding: 5px;">温度</td> <td style="padding: 5px;">94℃</td> <td style="padding: 5px;">94℃</td> <td style="padding: 5px;">57℃</td> <td style="padding: 5px;">72℃</td> <td style="padding: 5px;">72℃</td> <td style="padding: 5px;">10</td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">反応時間</td> <td style="padding: 5px;">5分</td> <td style="padding: 5px;">30秒</td> <td style="padding: 5px;">30秒</td> <td style="padding: 5px;">30秒</td> <td style="padding: 5px;">7分</td> <td style="padding: 5px;">∞</td> </tr> </table> <p style="text-align: center; margin-top: 10px;">┌───────────┴───────────┐ 40サイクル</p> <p style="text-align: center;">↓</p>	温度	94℃	94℃	57℃	72℃	72℃	10	反応時間	5分	30秒	30秒	30秒	7分	∞
温度	94℃	94℃	57℃	72℃	72℃	10									
反応時間	5分	30秒	30秒	30秒	7分	∞									
5. PCR産物の検出	<p style="text-align: center;">PCR産物の電気泳動</p> <p style="text-align: center;">アクリルアミド電気泳動   あるいは  キャピラリー電気泳動 (Qiaxcel等)</p> <p style="text-align: center;">↓</p>														
6. 解析	<p style="text-align: center;">増幅バンド多型の検出</p> <p style="text-align: center;">遺伝子型の確認 (調査品種と対象品種の異同)</p> <p style="text-align: center;">↓</p>														
7. 品種識別	<p style="text-align: center;">必要なマーカーの遺伝子型が同じであれば、調査品種と対象品種は同一であると判断。</p>														

図3. 試験操作ワークフロー

(適用範囲 12 品種の内のどれであるかを判定する場合)

\*この図では主に品種の推定までの流れを示している。

品種推定からの 1 対 1 試験については図 1 を参照すること。

1.サンプル採取	<p style="text-align: center;">葉                      種子</p> <p style="text-align: center;">↓                              ↓</p>														
2.DNA抽出	<p style="text-align: center;">Gentra PureGene Tissue Kit (キアゲン社) を用いる方法</p> <p style="text-align: center;">↓</p>														
3.DNA濃度・純度確認	<p style="text-align: center;">分光高度計(NanoDrop等)やアガロースゲル電気泳動等で、DNAの確認を行い、DNA溶液(10ng-50ng/μl)を調製する</p> <p style="text-align: center;">↓</p>														
4.PCR	<p style="text-align: center;">PCR反応</p> <p style="text-align: center;">必要DNAサンプル</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・調査試料DNA</li> <li>・基準品種(サウザー)DNA</li> <li>・補足基準品種DNA</li> </ul> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin: 10px auto; width: fit-content;"> <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="padding: 2px 10px;">温度</td> <td style="padding: 2px 10px;">94°C</td> <td style="padding: 2px 10px;">94°C</td> <td style="padding: 2px 10px;">57°C</td> <td style="padding: 2px 10px;">72°C</td> <td style="padding: 2px 10px;">72°C</td> <td style="padding: 2px 10px;">10</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px 10px;">反応時間</td> <td style="padding: 2px 10px;">5分</td> <td style="padding: 2px 10px;">30秒</td> <td style="padding: 2px 10px;">30秒</td> <td style="padding: 2px 10px;">30秒</td> <td style="padding: 2px 10px;">7分</td> <td style="padding: 2px 10px;">∞</td> </tr> </table> <p style="text-align: center; margin-top: 5px;">┌───────────┴───────────┐ 40サイクル</p> </div> <p style="text-align: center;">↓</p>	温度	94°C	94°C	57°C	72°C	72°C	10	反応時間	5分	30秒	30秒	30秒	7分	∞
温度	94°C	94°C	57°C	72°C	72°C	10									
反応時間	5分	30秒	30秒	30秒	7分	∞									
5.PCR産物の検出	<p style="text-align: center;">PCR産物の電気泳動</p> <p style="text-align: center;">アクリルアミド電気泳動 あるいは キャピラリー電気泳動(Qiaxcel)</p> <p style="text-align: center;">↓</p>														
6.解析	<p style="text-align: center;">増幅バンド多型の検出 遺伝子型の推定</p> <p style="text-align: center;">↓</p>														
7.品種の推定	<p style="text-align: center;">表3を基に品種の推定</p> <p style="text-align: center;">↓</p>														
8.品種識別	<p style="text-align: center;">推定された品種を対照試料として、1対1試験を行う。</p>														

## 4. 試験準備

### 4. 1 試験試料

本マニュアル想定の実験内容に従って以下の試験試料が必要となる。

#### ①調査試料と対照試料とを1対1での対応させる場合

- ・調査試料
- ・対照試料
- ・基準品種（サウザー）試料

#### ②調査する試料が適用範囲12品種の内どれであるかを判定する場合

- ・調査試料
- ・対照試料  
(品種の推定を行った後に準備することも可能であるが、適用範囲にあるすべての品種の試料があらかじめ手元にあることが望ましい。)
- ・基準品種（サウザー）試料
- ・遺伝子型判定するための補足基準品種  
(付属文章1, 2を参照 TLE-487、タフオラ 567 が有用)

試験実施にあたって上記試料の葉・種子・あるいは保存DNAが必要である。葉・種子からの採取方法の具体的操作は「5. 2」を参照すること。

基本的な検体数は、葉の場合は1品種1個体より2か所。種子の場合は1品種(持ち込まれた袋あたり)2粒とする。より反復を増やすために、検体数を増やすことは可能である。

試験条件をなるべくそろえて試験が行うために、DNA抽出・PCR・PCR産物の検出までを同時に進めることが理想的であり、本マニュアルでも推奨するが、それが不可能となる場合、PCRまでは違う時間・場所で行い、PCR産物の検出のみを同時に行うことが可能である。

もし、別途保存してあったDNAを試験に使用するのであれば、試験本番の前にアガロース電気泳動による品質確認や予備試験としてのPCRを行い、試験に耐える品質であるかを確認しておくのが望ましい。

#### 4. 2 購入品

##### 4. 2. 1 SSR プライマーセット

プライマーの合成には、ファスマック社受託合成サービスのプライマーを利用する。配列は表2を参考にする。グレードは逆相カラム精製以上であること。合計14組(各マーカー2種類)のプライマー溶液を100pmol/μlの濃度指定で購入する。これらのプライマー溶液をプライマー原液とする。購入したプライマー原液は使用までの間、-20℃で保存しておく。同じ品質のものが得られるのであれば、発注先はどこでも良い。

##### 4. 2. 1 試薬・消耗品

試薬・消耗品の購入にあたっては、購入した年月日・ロット番号を別途記録しておき、試験中に異常がおこった際の取り換えや検証に対応できるようにしておく。

試薬・消耗品ともに、添付の説明書に従って、冷凍庫や冷蔵庫などに適切に保管すること。試薬は必要量だけ小分けにしておくことも可能であるが、小分けした大本の試薬瓶やロットを記録しておくこと。

消耗品の内、DNA抽出あるいはPCRに関わるもので滅菌可能なものは、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、完全に乾燥するか、あるいは乾熱滅菌を行っておく。滅菌済みの市販品を用いる場合はその必要はない。

以下に必要な試薬・消耗品を記載する。同等の性能をもつ製品であれば、ここで挙げる以外のものでもよい。

#### 【1】DNA抽出用の試薬・消耗品

- ・1.5ml チューブ (グライナー code:616201)
- ・チューブラック(マルチウルトララック code:15191)
- ・Gentra Pure Gene Cell Kit (キアゲン社 code:158381)
  - \* 付属試薬 : Cell lysis solution
  - Protein Precipitation Solution
  - DNA Hydration Solution(TE バッファーとして使用可能)
  - \*\* Pure Gene Kit は多くのシリーズがあるが、上記の付属試薬が同梱されているならば、どのキットを購入しても差し支えない
- ・RNaseA (キアゲン社 code:19101)
- ・2-プロパノール 500ml (ナカライテスク code: 03065-35)
- ・99.5% エタノール 500ml (ナカライテスク code:08948-25)
- ・3-メルカプト-1,2-プロパンジオール 25ml (和光純薬 code:139-16452)
- ・ポリビニルピロリドン 25 25g(ナカライテスク code:28316-62)
- ・消泡剤 KM-72(信越工業)
- ・3M 酢酸アンモニウム溶液(ニッポンジーン code: 316-90081)

- ・ 50 ml 遠沈管 (ポリプロピレン製、滅菌済み)
- ・ ホモジナイザー用のペッスル
- ・ ビーズ式細胞破壊装置に使用するビーズ  
(キアゲン タングステンビーズ code:69997)

## 【2】 PCR 用の試薬・消耗品

- ・ PCR Tube 0.5ml (エッペンドルフ code:95261)  
\*PCR マスターミックス調製時に使用する。
- ・ *Ex Taq* DNA polymerase(TaKaRa Bio)  
250U(Code:RR001A)  
1000U(Code:RR001B)  
3000U(Code:RR001C)  
\*PCR 酵素のほか、*Ex Taq* buffer、dNTP Mix が同梱されている
- ・ 96well PCR プレート ノンスカート(日本ジェネティクス code:FG-1742)  
\*サンプル数が少ない時は切って使用可能
- ・ MicroAmp Base(ABI 社 code: N8010531)  
\*PCR プレートを固定する台
- ・ PCR 用シリコンマット (日本ジェネティクス社 code:SM-96EXP)  
\*サンプル数が多い場合有用。
- ・ ABI MicroAmp 12-cap strips (ABI 社 code:N8010534)  
\*サンプル数が少ない場合有用。
- ・ 滅菌水(超純水をオートクレーブ 121°C20 分したものか、  
市販の DNase/RNase フリー水を使用)

## 【3】 PCR 産物検出用の試薬・消耗品

アクリルアミド電気泳動用

- ・ アクリルアミドプレキャストゲル 5%  
プレートサイズ(mm) 幅 160×高 100  
(バイオクラフト code : MTG-807 )

\*以下の試薬・消耗品で自作可能

- 40%アクリルアミド・ビス混合液(19:1) (ナカライテスク code:00857-55)  
N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン  
(ナカライテスク code:33401-72)

過硫酸アンモニウム(ナカライテスク codo:02627-34)

泳動用プレート 160mm×100mm

切れ込みあり(バイオクラフト code:No.1060)

1t スペーサー付(バイオクラフト code:No.1061)

サンプルコウム 1t 28W(バイオクラフト code:No.WC281)  
スラブプレートパッキン(バイオクラフト code:No-1004)

- ・ 5×TBE 1000ml(ニッポンジーン code:318-90041)
- ・ 10bp Ladder(ライフテクノロジー code:10821-015)
- ・ 核酸泳動用色素マーカー
  - 6×Loading Buffer Triple Dye(ニッポンジーン code:314-90261)等
  - \* ブロモフェノールブルーを含むもの
- ・ エチジウムブロマイド溶液 10mg/ml  
10ml (ニッポンジーン code:315-90051)
- ・ ダミープレート(code:No.dp-28)
- ・ マルチミニフレックスチップ(ソレンソン code:15101)
  - \* ゲルにサンプルをロードする際に有用
- ・ スパチュラ
  - \* ゲルをガラス板から剥がすのに使用する。調理用のヘラでも良い
- ・ フライ返し
  - \* エチジウムブロマイド溶液浸漬で使用。
- ・ ゲルトレイ(東洋紡 FAS-2530)
  - \* 写真撮影の際にゲルを乗せるトレイ

#### キャピラリー電気泳動用

- ・ QIAxcel DNA High Resolution Kit (キアゲン code:929002)
  - \* QIAxcel1 で使用する試薬およびカートリッジ(アクリルアミドゲル電気泳動での泳動プレートに相当する)が同梱されている。
- ・ QX Size Marker 25-500bp (キアゲン code:929560)
- ・ QX Alignment Marker 15 bp/500 bp (1.5 ml) (キアゲン code:929520)

#### 【4】 その他一般的に必要な器具・消耗品

- ・ マイクロピペット用チップ
  - \* フィルターチップが望ましい
- ・ マイクロピペット各種容量
  - \* PCR 反応用と電気泳動用を分ける
- ・ ピンセット
- ・ ゴム手袋
- ・ 白衣
- ・ 上履き
- ・ ホワイトボードマーカー
- ・ テープ類

- ・キムワイブ
- ・キムタオル

#### 4. 3 調製試薬

以下、調製が必要な試薬について記載する。

- 【1】キアゲン社の **Gentra Puregene** を使用して DNA 抽出を行うが、**Cell lysis Solution** のみ試薬を添加する必要がある。調製方法は抽出方法に記載している。
- 【2】DNA 抽出時に 70%エタノールが必要であるが、これはエタノール 700ml に滅菌水を 10mlまでメスアップしたものを使用する。
- 【3】PCR で使用するプライマーについては、「5. 5. 2 【2】」に記載している通り、表 2 にあるストックの濃度に調製しておく。
- 【4】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。
- 【5】電気泳動用のバッファーは 5×TBE バッファーを 10 倍希釈したもの(0.5×TBE バッファー)使用する
- 【6】電気泳動後のゲル染色液は蒸留水 1000mlあたり 100  $\mu$  lのエチジウムブロマイド溶液(10mg/ml)を添加したものを使用する。ゲル染色のため、20. cm四方以上の大きさのタッパーに入れておくこと。複数のゲルを同時に泳動する場合は、ゲルの間違いを防ぐために、複数のタッパーを用意することや、ゲルを浸漬する位置をあらかじめ設定しておく必要がある。

#### 4. 4 機器・プログラム

以下に必要な機器・プログラムを記載する

同等の性能をもつ製品であれば、ここで挙げる以外のものでもよい。

##### 【1】DNA 抽出用の機器

- ・ホモジナイザー(池田理化社 S-305-N)
- ・ビーズ式細胞破壊装置 (安井器械 マルチビーズショッカー)
- ・定温乾燥器(ヤマト科学 DS600)  
\*65°Cでサンプルを静置できるものであればインキュベータでも良い。
- ・高速冷却遠心機(トミー MX-200)  
\*1.5ml チューブが利用可能なもの
- ・真空遠心乾燥機(トミー CC-105)
- ・チューブミキサー(和研薬 MODEL-2280)
- ・NanoDrop

## 【2】 PCR 用の機器

- ・ PCR プレート用遠心機(クボタ PlateSpin II)
- ・ PCR システム GeneAmp PCR System 9700  
(アプライドバイオシステムズ社)

## 【3】 PCR 産物検出用の機器

アクリルアミド電気泳動用

- ・ アクリルアミド電気泳動装置 (バイオクラフト社 BE-260)
- ・ 電気泳動用パワーサプライ(アトー AE8270)  
\*クロスオーバー方式の電源装置であること。
- ・ 紫外線照射装置並びに写真撮影装置 (TOYOBO 社 FAS-II)

キャピラリー電気泳動用の機器

- ・ QIAxcel(キアゲン社)  
\*QIAxcel 用プログラムも含む

## 【4】 その他一般的に必要な機器

- ・ 電子天秤
- ・ オートクレーブ
- ・ 超純水製造装置
- ・ 冷蔵庫
- ・ 冷凍庫  
\* 試薬・DNA サンプル用に-20℃,  
植物体長期保存用に-80℃のもの(ディープフリーザー)が必要。
- ・ ポリシーラー

## 5. 試験操作・判定

### 5. 1 試験操作における一般事項

#### 5. 1. 1 試験操作を行う環境について

一般的な分子生物学試験を行うことができる試験室の環境が必要である。

室温は極端な低温・高温を避け、平均 25℃程度が望ましい。各種設備、器具を整理整頓し、別の試験との混同を避けるようにする。

試薬による汚染、供試サンプル以外の DNA を防ぐために、DNA 抽出から PCR 増幅、泳動分析までをそれぞれ別の場所で行われることが望ましい。また試験操作ごとに実験台を 70%エタノール溶液でふき掃除を行うなど、クリーンな環境を維持することに努める。

アクリルアミド・エチジウムブロマイドは危険な試薬にあたるため、DNA 抽出や PCR 反応を行う試験台や、一般的な作業スペースなどから隔離された場所で使用されるべきである。

#### 5. 1. 2 試験操作時の服装

試験操作時は、白衣、ゴム手袋、保護眼鏡、マスク、上履きを着用する。試料のコンタミネーションを防ぐために、ゴム手袋はこまめに交換する。交換の目安については各操作の項目に記載してある。

アクリルアミド・エチジウムブロマイドは危険な試薬にあたるため、それぞれの試薬操作に使った手袋が他の場所に触れることで、汚染が拡大しないように注意を払うべきである。

#### 5. 1. 3 試薬・消耗品・DNA 溶液の取り扱い

PCR 酵素等冷蔵・冷凍が必要となる試薬については必要量をあらかじめ明確にしておき、保管場所から取り出し、必要量を測り取ったあとは、素早く元の場所に戻すこと。

PCR 試薬・プライマー・DNA 溶液を使用する際は、チューブのふたに液体が残らないように、フラッシュ遠心をしてから使用すること。

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。

本マニュアル記載内容の他、試薬に添付の注意書があればそれに従うこと。試験で出た各種廃液・廃棄物は、定められた方法に従って廃棄すること。

#### 5. 1. 4 器具の取り扱い

ピペットは操作者個人専用で割り当てられ、かつ DNA 抽出用、PCR 用、電気泳動用でそれぞれ分けて使用されることが望ましい。ピペットの数が足りない場合、PCR 用と電気泳動用を分けることが優先される。

使用したピペットなどの器具は、実験操作を終えたのち、清掃・洗浄をしてから保管場に戻すこと。

本マニュアル記載内容のほか、添付の説明書があればそれに従うこと。

## 5. 2 試験試料の採取

### 5. 2. 1 試験試料の採取の一般事項

葉・種子いずれの場合においても病害、虫害、その他の被害を受けていない健全なものを用いる。試料の取り出し・取り扱い時には、試料間で相互に混入しないように以下の点に注意すること。

- ・ 試料毎に作業台や電子天秤等の清掃を十分に行う。
- ・ ピンセットは一つの試料の処理が終わったあと、新しいものに取り換えるか、70%エタノールで十分に拭き、組織片が残っていないことを確認の上、次の試料に移ること。
- ・ ゴム手袋に組織片がつく場合は取り換える

### 5. 2. 2 葉からの採取保管

葉が持ち込まれる際の形態として、レタスの株そのもの、葉、カットサラダ形態、幼苗が考えられる。

もっとも望ましい状態は、生の葉(冷凍・乾燥状態ではない葉)であり、試験室に持ち込まれるまでの間は冷蔵状態に保たれており、輸送の間に損傷をうけていないものである。

取り扱い時には、組織が乾燥・損傷しないように、迅速に操作を行うこと。

以下①～④までは生の場合、⑤についてはそれ以外の場合について、採取方法を記載する。

#### ①レタスの株そのものの場合

レタスの葉一枚を DNA 試験のために採取する。採取する葉は古い葉であることを避ける。古い葉とは株(球)の外側にある葉である。採取する大きさは 10 cm<sup>2</sup>以上のものであれば十分であるが、実際の DNA 抽出に供する分量はそれよりも少ないので、やむを得ない場合はそれ以下でも構わない。

採取した葉は次に記載する②葉の採取方法に従って DNA 抽出のための準備をする。株の残りは試料名を記入したビニール袋に入れて試験終了まで、冷蔵庫保管する。

なお、圃場で株から葉を採取する場合も、前述通り古い葉を避けて、必要な葉を冷蔵状態で試験室に持ち込むこと。

#### ②葉

レタスの維管束部分に含まれる乳液にはポリフェノール類が多く含まれ DNA の抽出時に褐変が生じその後の PCR が阻害されることがある。そのため、葉柄(肋とされる白い部分)・葉脈は DNA 抽出には適しない。適する部分は葉の緑色(品種によっては赤等に着色)の柔らかい部分である。

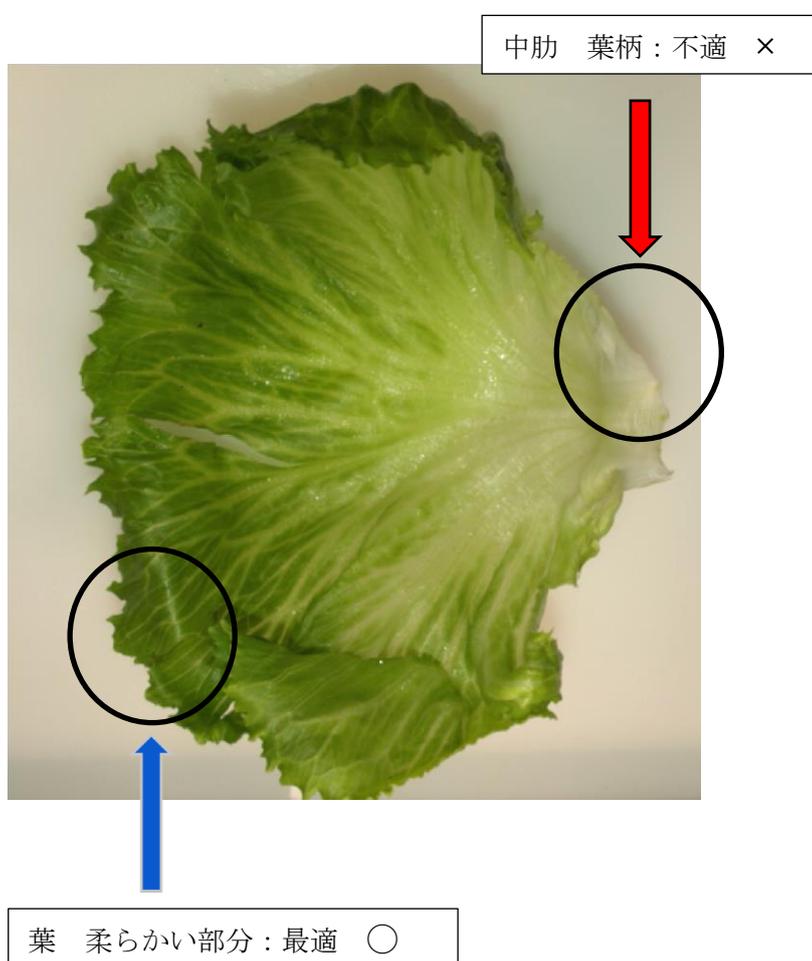
DNA 抽出に適した量の目安は、1.5ml チューブの口の半分～1/4 の大きさ。より具体的には、面積にして約 0.8 cm<sup>2</sup>～0.4 cm<sup>2</sup>。重さの場合は約 0.50 mg～0.25 mg である。この範囲であればよい。可能であれば、1.5ml チューブの口の半分を目安に採取する。

DNA 抽出操作前に必要量をピンセットちぎり取り、DNA 抽出用の 1.5ml チューブ(チューブには名称を記入しておくこと)に入れておく。すぐに DNA 抽出操作に移るのが望ましいが、DNA 抽出作業が行われるまでが数日以内である場合は冷蔵庫で保管しておくことも可能である。長期的に保管する場合は-80℃のディープフリーザーで保存するのが望ましい。

葉の残りは試料名を記入したビニール袋に入れて試験終了まで、冷蔵庫保管するか、長期保存する場合は-80℃のディープフリーザーで保存する。

PCR に適した DNA が得られずやり直す際は、以前に採取した場合の半分の量を DNA 抽出試料とすること。

#### 参考 採取部位



### ③カットサラダ形態

DNA 抽出に適した部分・量・採取操作は②葉に記載の内容に従う。

色や形態が明らかに異なる切片が混合してある場合は、分類できる分でそれぞれ必要検体数分を採取すること。

### ④幼苗

幼苗の場合、子葉を DNA 抽出のための試料とすることが可能である。

DNA 抽出に適した部分・量・採取操作は②葉に記載の内容に従う。

### ⑤その他の場合

凍結保存した葉を試料とする場合は DNA 抽出に適した部分・量は②葉に記載の内容に従うが、取り出し・取り扱い時に、室温で長時間放置すると劣化が起こるので、迅速に操作を行う。また DNA 抽出操作にすぐ移ることが必要。

本マニュアルの試験においては、PCR に適した DNA 溶液が得られることがもっとも重要なことである。従って、前述の内容に当てはまらない場合であっても DNA 抽出を試みることは可能である。

## 5. 2. 3 種子の採取保管

種子は持ち込むのに使用された袋やチューブごとに、識別可能な記号・番号を振り分け記入しておき、テープやポリシーラーを用いて十分に口を留めてから、冷蔵庫あるいは冷暗所、可能であればデシケーターに保存する。長期間保存状態にあったものからでも抽出は可能である。

種子の採取は 1 袋(チューブ)ごとに行い、採取が終わったら、袋の口を閉じておくこと。ある袋が開いている状況で、別の袋を開けて採取するというのをしない。

販売されるレタス種子には種子そのものの場合と、種子の周囲を天然素材の粉体で包んだペレット加工種子である場合がある。以下①は種子そのものの場合、②にペレット加工種子の採取の方法について記載する。

### ①種子そのものの場合

種皮を除去する必要はなく、そのまま DNA 抽出作業を行えるが、十分捻実した種子を使用する必要がある。指で触ってみて容易に変化する種子は、捻実していない種皮のみの種子(しいな)である可能性が高いので、使用しない。

DNA 抽出作業前に、DNA 抽出作業にあたる分を一粒ずつピンセットで DNA 抽出用の 1.5ml チューブ(チューブには名称を記入しておくこと)に入れておく。DNA 抽出作業が行われるまでが数日以内である場合はそのまま保管しておくことも可能である。

②ペレット加工種子の場合

DNA 抽出作業を行う前にペレットを割り、中身の種子を取り出す必要がある。ペレットの割り方は、紙等に挟んで上から押すつぶす方法や、ピンセットの先を使ってペレットを割る方法がある。ペレット片が除去できていれば、種子を完全に洗浄する必要はない。ペレット除去後の扱いは、①の場合に準ずる。

### 5. 3 DNA 抽出操作 (PureGene 法)

#### 5. 3. 1 DNA 抽出の一般事項

本マニュアルでは、キアゲン社の Gentra PureGene Cell Kit を DNA 抽出の基本となる試薬とした。従って、Gentra PureGene Cell Kit のマニュアルを参考に操作を行うこと。

但しレタスの場合、レタスの持つポリフェノール類が酸化重合し PCR 反応を阻害する可能性があると考えたため、抽出時のバッファーにそれらをする防ぐための試薬 (酸化防止剤・フェノール物質吸着剤)、また作業上の扱いを良くするための消泡剤を添加するなど一部内容を修正した。

#### 5. 3. 2 DNA 抽出の準備

- 【1】試料毎に「5. 2」に従って採取された試料が入った 1.5ml チューブと DNA 沈殿に使用する同じく 1.5ml チューブの計 2 本が必要(DNA 抽出操作(2) および(7)参照)。DNA 沈殿に使用するチューブにも上清を入れる予定の試料名称をあらかじめ記入し、チューブラックに並べておく。
- 【2】使用するゴム手袋は新しいものを用意する。また、操作中ゴム手袋が汚れた場合はその場で交換すること。
- 【3】定温乾燥機等の温度調整が必要な機器類が使用温度に達しているかを確認しておき、スムーズな操作が可能な状態にしておく。
- 【4】デカンテーション用のピペーター、キムタオルが必要である。

### 5. 3. 3 DNA 抽出

以下の(1)から(16)の順に従って DNA 抽出を行う。

(1)50ml 遠沈管(ポリプロピレン製)に抽出キットの PureGene Cell lysis solution 40ml、酸化防止剤として 200 $\mu$ l のメルカプトプロパンジオール、フェノールの物質の吸着材として 0.4g のポリビニルピロリドン 25、作業の効率化のため 500 $\mu$ l の消泡剤、12 $\mu$ l の RNaseA を入れ混合する。  
混合する試薬の比率が同じであれば、試料数に合わせて全体量を増減させることは可能である。

(2)試料の入っている 1.5ml チューブに (1) で作成した抽出液 300 $\mu$ l 加える。

(3)抽出サンプルを葉・種子ともに原型が残らない様に磨砕する。

①ホモジナイザーを使用する場合

試料間でのコンタミネーションを防ぐために 1 サンプルごとに先端のペッスルを交換する。

②ビーズ式細胞破壊装置で粉砕する場合

ビーズを 3 つ以上使用し、たとえばマルチビーズショッカーの場合は 1800rpm 10 秒の条件設定で粉砕する。十分な粉砕が確認できない場合は、粉砕処理を繰り返す。

粉砕を確認後、チューブのふたにサンプルがついた場合サンプルを遠心機のフラッシュ機能で落とす。

(4)定温乾燥器で 65°C/1 時間インキュベートする。

(5)100 $\mu$ l の Protein Precipitation Solution を加え、攪拌する。

①ボルテックスの場合 2500rpm 5 秒間が望ましい。

②チューブミキサーの場合、MIXING SPEED を最大設定にし、5 秒間行うのが望ましい。

溶液が全体的に懸濁しているかを確認すること。

(6)10°C、15,000rpm で 6 分間遠心を行う。

チューブのヒンジ部を外側にする。 (各遠心操作共通)

(7)残渣の混入を極力避ける様に上清 200 $\mu$ l を新しい 1.5ml チューブに移す。  
使用するチップは試料ごとに交換すること。

- (8)200 $\mu$ l(移した上清と同量)の 2-プロパノールを加え 50 回転倒混和する。チューブラックにチューブを固定できるなら、ラックごとに全チューブを一度に転倒混和できる。  
転倒混和の後、10 $^{\circ}$ C、15,000rpm で 2 分間遠心する。
- (9)チューブの底に DNA の沈殿が見えているか確認する。葉の場合の方が沈殿を確認しやすい。種子の場合、初期の組織量が微細であるため沈殿が見えない場合もあるが、仮に沈殿が見えなくても以降の抽出操作を進める。
- (10)上清をデカンテーションで捨てる。前段階で沈殿が確認できていたなら、廃液とともに流れないように注意すること。キムタオルを作業台にしいておき、デカンテーションで逆さにしたチューブの口をキムタオルに押し付けることで、残った廃液も十分に取り除く。  
キムタオル同じ個所に押し付けることでコンタミネーションを起こさないために、キムタオルの別箇所に押し付けるか、切り分けたキムタオルを使うこと。  
DNA の沈殿が浮いてしまい、うまくデカンテーションができない場合は、ピペットを使って廃液を取り除く。
- (11)300 $\mu$ l の 70%エタノールを加え、3 回転倒混和したのち、10 $^{\circ}$ C、15,000rpm で 2 分間遠心する。
- (12)上清をデカンテーションで捨てる。(10)の方法と共通である。
- (13)チューブのふたを開けた状態で真空遠心乾燥機を用いて室温で 5 分間乾燥する。
- (14)種子からの抽出の場合 50 $\mu$ l、葉からの抽出の場合 100 $\mu$ l の TE バッファー(キットに付属)を加え、定温乾燥器で 65 $^{\circ}$ C/1 時間インキュベートする。
- (15)溶液を攪拌したのち、フラッシュ遠心を行う。
- ①ボルテックスの場合 2500rpm 3 秒間が望ましい。
  - ②チューブミキサーの場合、MIXING SPEED を最大設定にし、10 秒間行うのが望ましい。
- (16)得られた溶液は DNA の定量 (5. 4 に記載) を行うか、すぐに定量を行わない場合は-20 $^{\circ}$ C で保存する。

#### 5. 3. 4 DNA 抽出時のトラブルシューティング

**【1】** DNA 抽出操作の(8)以降で何らかの失敗があり、必要な溶液が失われた。

(7)の操作において、残液が 200  $\mu$ l 残っているので、それを使って(8)以降の操作を実施する。その際、破碎残渣が混入しないように、新たに遠心操作を行ってから上清を移すこと。移す上清の液量は 100~150  $\mu$ l 程度にしておく。上清の量に合わせて等量の 2-プロパノールを加える。それ以降はプロトコールに従い、(14)で使用する TE バッファアの量を 50  $\mu$ l にする。  
必要な残液が無い場合はすべての工程をやり直す。

**【2】** (10)(12)で DNA の沈殿が流れおちてしまった。

チューブ外に出てしまった沈殿は回収せず、前項の残液の再利用を行う。必要な残液が無い場合はすべての工程をやり直す。

**【3】** (14)で沈殿が溶けない。

DNA の定量や PCR を行い、DNA 量が許容範囲以下である場合または、PCR の結果が検出できない場合は DNA 抽出をやり直す。

## 5. 4 DNA の定量・調製・品質確認

### 5. 4. 1 DNA の定量の一般事項

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、濃度の分かったコントロールサンプルとの比較で抽出された DNA の概量、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。一方、後者では迅速な測定が可能であると同時に、DNA の量・夾雑物の存在が値で算出される。本マニュアルでは、分光光度計 NanoDrop による定量方法について記す。もし、検査機関に NanoDrop が無い場合、他の方法を用いてもよい。

本マニュアルでは NanoDrop1000 にしたがって記載しているが、別機種を使用する際は、別機種のマニュアルに従って、DNA 濃度を測定すること。

### 5. 4. 2 DNA の定量

- (1) NanoDrop のソフトウェアを起動する。測定部表面が汚れていないことを確かめて、測定部に最大容量 2 $\mu$ l ピペットを使って 1 $\mu$ l の滅菌水を乗せたのち、サンプリングアームをおろし、「OK」をクリックする。
- (2) 「Initializing Spectrometer-Please wait」表示が消えたのちサンプリングアームを上げ、滅菌水をふき取り、続けて DNA を溶解した際に使ったバッファ (本マニュアルでは TE バッファ。DNA を溶かした試薬のストックが推奨される) 1 $\mu$ l を測定部に乗せたのち、サンプリングアームをおろし、「Blank」をクリックする。
- (3) サンプリングアームを上げ、測定部をふき取り、測定するサンプルを 1 $\mu$ l 測定部に乗せる。Sample ID にサンプル名を入力しておく。「Measure」をクリックする。1 サンプル分の計測が終了するまで待つ。
- (4) サンプルの DNA 濃度, があらわされる。
- (5) 測定対象の DNA 試料すべてについて、(3)(4)を繰り返す。
- (6) すべての DNA 試料の測定終了後、データをパソコンの記録媒体に保存する。記録媒体はハードディスク・USB 等どれでもよい。画面内「Show report」をクリックし、メニューにある Reports で Save Report を選択しあと、Export Report Table Only を選ぶ。テキスト形式で記録することができ、エクセルでの編集・計算も可能である。

(7)分析のための DNA 濃度の許容範囲の目安は 10ng-50ng/ $\mu$  である。この範囲であれば、どのような濃度でも良い。もしこの範囲内に無い場合は、測定した DNA 濃度に基づき、許容範囲内に調製する。

(8)すぐに使用しない場合、DNA 溶液は-20℃以下で凍結保存する。

5 日以内で使用する場合は冷蔵庫でも保存可能である。

#### 5. 4. 3 DNA の品質確認

DNA の最終的な品質は PCR 反応ができるか否かがもっとも重要であるため、PCR 反応操作本番に入る以前に、あらかじめ PCR 予備試験を行うことが推奨される。

その場合、「5. 5 PCR 増幅操作」以降に記載されている内容に従い、15 組のプライマーのいずれかを用いて PCR 反応および PCR 増幅物の検出を行う。すでに PCR で増幅することが確認済みである DNA 試料をコントロールとして用いることが望ましい。

#### 5. 4. 4 DNA の定量・調製・品質確認のトラブルシューティング

**【1】 DNA 濃度が 10ng/ $\mu$  l 以下である。**

①DNA 濃度が 5ng/ $\mu$  l 以上である場合は、「5. 4. 5 DNA の精製」に従って DNA の濃縮を行う。あるいは DNA の抽出をやり直す。

②DNA 濃度が 5ng/ $\mu$  l 未満である場合は、DNA の抽出をやり直す。

**【2】 PCR 予備試験でバンドが確認できない。**

①抽出したすべての試料でバンドが確認できない場合で、さらに増幅することが確認済みである DNA 試料をコントロールとしておりそのバンドも確認できない場合は、PCR 反応の不良である可能性が高い。PCR 用試薬を更新して PCR 反応操作をやり直す、あるいは複数のサーマルサイクラーを保有しているなら、サーマルサイクラーを変更して PCR を行う。いずれの場合でも再現しない場合は DNA の抽出をやり直す。

②抽出したすべての試料でバンドが確認できないが、コントロールのバンドは確認できる場合は、DNA 抽出溶液の不良である可能性が高い。よって DNA 抽出試薬を更新して DNA 抽出操作をやり直す

③同時に抽出した試料のバンドは確認できる場合は、そのバンドの出ない場合試料のみが何らかの原因で不良となっている可能性が高い。DNA の抽出をやり直すか、「5. 4. 5 DNA の精製」に従って DNA の再精製を行う。

④以下の状態が観察されていた場合。

A260/A280 が 1.8 未満、あるいは A260/A230 が 1.0 以上である。または抽出中に確認した DNA の沈殿が白くなく着色していた、といったことが見られた場合は、DNA 抽出液にある夾雑物が PCR を阻害している可能性がある。10ng/ $\mu$ l までの範囲で DNA 溶液を希釈することで PCR 阻害物質の影響を軽減する可能性がある。

希釈で改善しない場合は「5. 4. 5 DNA の精製」に従って DNA の再精製を行う。再精製で改善しない場合は、DNA 抽出をやり直す。なお、葉からの DNA 抽出物で、夾雑物の影響が疑われる場合、DNA 抽出のやり直しにあたっては、採取する量を当初の半分程度にすると良い。

#### 5. 4. 5 DNA の精製

DNA の精製は以下の(1)から(10)の順に行う。細かい点については 「5. 3. DNA 抽出」と同様である。

- (1)DNA 溶液の 1/10 量の 3M 酢酸ナトリウムを入れる  
\* 定量直後(99  $\mu$ l)である場合は 10  $\mu$ lにして構わない。
- (2) (1)の液と等量の 2-プロパノールを加えて 50 回転倒混和する。
- (3) 10°C、15,000rpm で 10 分間遠心する。
- (4) 上清をデカンテーションで捨てる。
- (5)300 $\mu$ l の 70%エタノールを加え、10°C、5,000rpm で 2 分間遠心する
- (6)上清をデカンテーションで捨てる。
- (7)ふたを開けた状態で真空遠心乾燥機を用いて室温で 5 分間乾燥する。
- (8)30 $\mu$ l の TE バッファー(キットに付属)加え、定温乾燥器で 65°C/1 時間インキュベートする。
- (9)溶液を攪拌したのち、フラッシュ遠心を行う。
- (10)得られた溶液は DNA の定量・品質確認を行う。

この方法で PCR 可能な DNA 試料が得られない場合は、新たに抽出をし直す。

## 5. 5 PCR 反応操作

### 5. 5. 1 PCR 反応操作の一般事項

#### 【1】PCR プレートでの配置について

本マニュアルで挙げた PCR 反応装置 GeneAmp PCR System 9700 は 96 ウェル分(96 サンプル分)の PCR 反応を行うことができるため、複数の DNA サンプルとマーカーの組み合わせを 1 度の PCR 反応操作に供することができる。本マニュアルでは PCR プレートの配置の仕方について以下を基本とする。

- ・ 96 ウェルの PCR プレートは横の並びとして A,B...H 行の 8 行と、縦の並びとして 1,2...12 列の 12 列から構成されており、本マニュアルで購入品に挙げた PCR プレート上には、それぞれの行列表記がなされている。  
その表記に従い、サンプルの配置順序は左端上の「A1」のウェルから始まり、右に向かい、一番右端まで来たら、1 行下がった「B1」より再び右進む形にする。
- ・ PCR 反応に続く電気泳動との関連から、1 行 12 ウェルを 1 単位として考え、マーカー毎に行を構成する形で PCR 反応を行う。

さらに詳しいプレート上での配置の設定については「5. 5. 2 【2】」を参考にすること。

#### 【2】コンタミネーションの防止

PCR 増幅操作では、微量の鋳型 DNA であっても増幅される。特に別の操作で得られた PCR 産物が混入すると、増幅効率が良いため、識別に必要な結果が得られない場合があるので注意すること。

また試料の酵素的分解を防ぐため、人間の皮膚表面から分泌されている DNase の混入を防止しなければならない。以上のことから「5. 1 試験操作における一般事項」にある服装・試薬・器具の取り扱い方法に準じてこれらの PCR 試験の阻害要素を取り除くように努めるとともに以下の点に注意すること。

- ・ DNA 溶液・プライマー溶液・試薬・準備中の PCR プレミックスのふたは、使用する度に開閉を行う。PCR 操作の近くでふたを開けたまま放置しないこと。
- ・ チップに DNA サンプル・試薬が入った状態で PCR プレート上を通る場合は最短経路で通すこと。
- ・ PCR の準備は 1 プレートごとに行い、別の PCR プレートを準備する場合はゴム手袋を交換すること。

## 5. 5. 2 PCR の準備

### 【1】プライマーの準備

購入したプライマー原液を TE バッファーで表 2 にあるそれぞれのプライマー指定の濃度に希釈しておき、ストック溶液とする。プライマー原液と同様に、ストック溶液も使用するまでの間は $-20^{\circ}\text{C}$ 冷凍保存する。

### 【2】PCR に供するサンプルの用意と配置設定

以下の通りに設定することを基本とする。

- ・「4. 1」にもある通り、本マニュアルでは調査試料と対照試料およびコントロールとして基準品種サウザーが必要である。また、マーカによっては(主に SML22,SML45 において)アリアル間の細かな差を区別するため、補足基準品種が必要な場合がある。これらのサンプルは条件をそろえるために、同時に PCR 反応に供する
- ・調査試料葉、対照試料は、1 個体につき 2 か所分、種子であれば、それを保存している袋・チューブ 1 つにつき 2 粒分の DNA 溶液が同時に PCR に供されること。
- ・1 つの DNA 溶液につき、同時に 2 反復以上 PCR 行うことが望ましい。
- ・試験操作を円滑に行うために、後に続く電気泳動の配置において並びが反映される様に考慮することが望ましい。

以上のことから PCR プレートにおける 1 マーカーあたりの各 DNA サンプルの配置例としては次 2 ページの通りとなる。

次 2 ページの配置は一例であって、一度の PCR 反応を行うマーカやサンプルに応じて、プレート上に任意でサンプルを配置することが可能である。必要なサンプルが無い場合は、別途 DNA 抽出を行う必要がある。

配置の設計に従って、プレート上にマジックで記入をしておく、のちの操作でサンプル・試薬の入れ間違いを防ぐことができる。文字の色を変える、簡単な数字を使うなど、便宜的な表記でもよい。





### 【3】 シングル・マルチプレックス PCR の選択

選択の基準は以下の 4 点である。（「2. 6」も参照すること）

- ・ 1 マーカーで識別可能な品種については、シングル PCR で十分である。
- ・ 識別を行う上で複数のマーカーが必要である場合は、マルチプレックス PCR で試験するほうが、労力・費用の軽減となる。
- ・ 基準品種・補足基準品種と照らし合わせて品種の推定を行う場合はシングル PCR で行うほうが、バンドの照合がしやすい。
- ・ マルチプレックスでの検出がうまくいかない場合は、識別に必要なマーカーのみをシングル PCR すれば、判定可能となる可能性がある。

以上を考慮の上、選択を行う。

### 【4】 PCR プレミックス調製の計算

表 4 にある組成を参考に検体数にあわせて調整する試薬量の計算を行う。その際、「実際の検体数+1 検体(検体数奇数)あるいは 2 検体(検体数偶数)」で設定すると分注などで生じる溶液のロスに対応できる。

マルチプレックス PCR を行う場合は、必要なマーカー分のプライマーセットを入れること。

表 4. PCR の組成表 \*プライマーは各マーカーあたり Forward, Reverse1 組を入れること

シングルマーカー	(検体数)	2	14(PCRプレート1行分)	26(PCRプレート2行分)
滅菌水		13.8 $\mu$ l	96.6 $\mu$ l	179.4 $\mu$ l
10 $\times$ ExTaq reaction Buffer		2.0 $\mu$ l	14.0 $\mu$ l	26.0 $\mu$ l
2.5mM dNTP Mix		1.8 $\mu$ l	12.6 $\mu$ l	23.4 $\mu$ l
Primer (Forward)		0.2 $\mu$ l	1.4 $\mu$ l	2.6 $\mu$ l
Primer (Reverse)		0.2 $\mu$ l	1.4 $\mu$ l	2.6 $\mu$ l
ExTaq DNA Polymerase		0.1 $\mu$ l	0.7 $\mu$ l	1.3 $\mu$ l
<hr/>				
2マーカーマルチプレックス	(検体数)	2	14(PCRプレート1行分)	26(PCRプレート2行分)
滅菌水		13.4 $\mu$ l	93.8 $\mu$ l	174.2 $\mu$ l
10 $\times$ ExTaq reaction Buffer		2.0 $\mu$ l	14.0 $\mu$ l	26.0 $\mu$ l
2.5mM dNTP Mix		1.8 $\mu$ l	12.6 $\mu$ l	23.4 $\mu$ l
Primer (Forward)		0.2 $\mu$ l	1.4 $\mu$ l	2.6 $\mu$ l
Primer (Reverse)		0.2 $\mu$ l	1.4 $\mu$ l	2.6 $\mu$ l
ExTaq DNA Polymerase		0.1 $\mu$ l	0.7 $\mu$ l	1.3 $\mu$ l
		$\times$ 2マーカー分	$\times$ 2マーカー分	$\times$ 2マーカー分
<hr/>				
3マーカーマルチプレックス	(検体数)	2	14(PCRプレート1行分)	26(PCRプレート2行分)
滅菌水		13.0 $\mu$ l	91.0 $\mu$ l	169.0 $\mu$ l
10 $\times$ ExTaq reaction Buffer		2.0 $\mu$ l	14.0 $\mu$ l	26.0 $\mu$ l
2.5mM dNTP Mix		1.8 $\mu$ l	12.6 $\mu$ l	23.4 $\mu$ l
Primer (Forward)		0.2 $\mu$ l	1.4 $\mu$ l	2.6 $\mu$ l
Primer (Reverse)		0.2 $\mu$ l	1.4 $\mu$ l	2.6 $\mu$ l
ExTaq DNA Polymerase		0.1 $\mu$ l	0.7 $\mu$ l	1.3 $\mu$ l
		$\times$ 3マーカー分	$\times$ 3マーカー分	$\times$ 3マーカー分
<hr/>				
5マーカーマルチプレックス	(検体数)	2	14(PCRプレート1行分)	26(PCRプレート2行分)
滅菌水		12.2 $\mu$ l	85.4 $\mu$ l	158.6 $\mu$ l
10 $\times$ ExTaq reaction Buffer		2.0 $\mu$ l	14.0 $\mu$ l	26.0 $\mu$ l
2.5mM dNTP Mix		1.8 $\mu$ l	12.6 $\mu$ l	23.4 $\mu$ l
Primer (Forward)		0.2 $\mu$ l	1.4 $\mu$ l	2.6 $\mu$ l
Primer (Reverse)		0.2 $\mu$ l	1.4 $\mu$ l	2.6 $\mu$ l
ExTaq DNA Polymerase		0.1 $\mu$ l	0.7 $\mu$ l	1.3 $\mu$ l
		$\times$ 5マーカー分	$\times$ 5マーカー分	$\times$ 5マーカー分

### 5. 5. 3 PCR 反応

- (1)氷上に 0.5ml チューブを用意し、PCR 酵素を除いた試薬をあらかじめ計算しておいた量で混合し PCR プレミックスの作成を行う。複数のマーカを 1 度の PCR 反応にかける場合は、マーカ毎あるいはマルチプレックスのセット毎にチューブを用意すること。
  - (2)氷上で PCR プレートに、あらかじめ設定した配置に従って、DNA 溶液(10ng-50ng/ $\mu$ l に調整したもの)を 1.0  $\mu$ l 分注する。DNA 試料ごとにピペットチップを交換すること。
  - (3)PCR プレミックスに PCR 用酵素を入れ、混合する。  
複数のプレミックスが用意されている場合、チューブごとにチップを交換すること。
  - (4)調製した PCR マスターミックスを 9.0  $\mu$ l 加える。PCR マスターミックスを分注するピペットチップは 1 サンプルずつ新しいものに取り換えること。
  - (5)分注の終了後、PCR プレート用遠心機のフラッシング機能で溶液をウェルの底に集め、サーマルサイクラーにかけるまで氷上に保存する。
- (3)PCR システム GeneAmp PCR System 9700 を用いて、以下のプログラムで、PCR 反応を行う。

温度	94°C	94°C	57°C	72°C	72°C	10
反応時間	5 分	30 秒	30 秒	30 秒	7 分	$\infty$
		┌───────────┐		└───────────┘		
		40 サイクル				

- (4)反応終了後、すぐに泳動操作を行うか、-20°C で保存する。

#### 5. 5. 4 PCR 反応のトラブルシューティング

PCR 反応の成否については、電気泳動での結果を見て行うことになる。ここでは電気泳動の結果バンドに異常がある場合についてトラブルシューティングを記載する。DNA の抽出に原因が可能性もあるため、「5. 4. 3」「5. 4. 4」記載の内容も参考にすること。

##### 【1】電気泳動で PCR 反応物のバンドが確認できない。あるいは増幅が不十分

###### ①すべてのサンプルの増幅が確認できない。

- ・試薬を入れ替える

DNA の品質に問題が無いのであれば、PCR 試薬・プライマーのいずれかに問題がある可能性がある。PCR 試薬・プライマーをすべて更新して、操作をやり直す。

- ・サーマルサイクラーを確認する。

サーマルサイクラーに異常が発生していないか。あるいは設定プログラムにミスが無いかを確認する。2 台以上サーマルサイクラーを保有しているなら、サーマルサイクラーを変えて PCR を行う。

###### ②同じ DNA 溶液由来の PCR 反応物で 2 反復あるうちの片方が増幅しない。

- ・DNA 溶液の分注ミスの可能性がある。再 PCR 反応を行う際、確実に分注できているか、PCR マスターミックスを分注する前に確認をする。

###### ③同じ DNA 溶液由来の PCR 反応物で 2 反復あるうちの両方が増幅しない。

- ・DNA 溶液の品質に問題がある可能性がある。DNA の品質確認及び、精製・再抽出を実施する。

###### ④サーマルサイクラーの機種が違う場合

- ・このマニュアルでは GeneAmp PCR System 9700（アプライドバイオシステムズ社）を使用した試験方法・を記載している。この機種と違う場合では増幅がうまく行われないう可能性がある。アニーリング温度を 1~2°C 減らす、あるいはサイクル数を 1~3 回ぐらい増やし、増幅が確認できた条件で試験を行う。

##### 【2】付属文書の写真と比べて非特異的なバンドが多数出る

- DNA 溶液の濃度を 10ng に希釈して再度 PCR を行う。
- サーマルサイクラーの機種が違う場合には、アニーリング温度を 2-5°C 上げる。

## 5. 6 SSR マーカーの検出・判定(アクリルアミドゲル電気泳動)

### 5. 6. 1 アクリルアミドゲル電気泳動の一般事項

#### 【1】アクリルアミド電気泳動の特徴

キャピラリー式電気泳動に比べ、安価な機器を使用するとともに、PCR 産物の泳動のほか、タンパク質の試験でも利用されるなど、広く利用されていることから、試験の導入が容易である。

また、サンプルが個別に泳動される形になるキャピラリー式電気泳動やシーケンサーを利用したフラグメント解析と比べ、条件をそろえた形で複数のサンプルを泳動することができ、そのため泳動バンドの視覚的に比較することで遺伝子型の判定が容易にできる。

欠点として、泳動時間や準備が煩雑なため、キャピラリー式電気泳動に比べ解析に時間がかかること。危険な試薬であるアクリルアミド・エチジウムブロマイドを使用する必要があることが挙げられる。

#### 【2】ゲルについて

使用するゲルのサイズは幅 160mm×高 100mm とする。事前に作成された市販品(プレキャストゲル)を用いる方が望ましいが、本マニュアルに従って自作したゲルでも識別は可能である。

#### 【3】泳動時間について

電気泳動の必要時間は、周辺環境や機器の違いにより、変化する場合がある。「5. 6. 3」で記載した通りに本マニュアルでは電気泳動の時間を 25 分に設定し、微調整を行うようにしているが、円滑な試験の妨げになる可能性がある。従って、最初の泳動で実際にかかった合計泳動時間を目安に設定を修正して、以降の試験を行うことは可能である。

## 5. 6. 2 アクリルアミドゲル電気泳動の準備

### 【1】アクリルアミドゲルの自作

(1)~(4)の手順でアクリルアミドの泳動プレートを作成する。

泳動プレート 4 セット分(PCR プレート 1 枚分)の作成方法となるため、必要に応じて試薬量・準備枚数を増減させること。

(1)泳動用プレート(160mm×100mm)のスペーサー付のガラス板に、スラブプレートパッキンをスペーサーの外側に添わせる形で置き、切れ込み付の泳動用プレートで挟み込みクリップで留める。

(2)以下に示す試薬上から下の順に混合する。

N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミンを加えると反応が始まるので、必要なプレートが組みあがっているかを確認すること。

滅菌水	49.5ml
5×TBE	3.0ml
40%アクリルアミド・ビス混合液(19:1)	7.5ml
過硫酸アンモニウム	105.0mg
N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン	60 $\mu$ l

(3)(2)の混合液を泡立てないようにまぜ、固まらないうちに(1)で作成したプレートセットに流し込む。溢れ出さない程度入れること。

(4)ゲルを流し込み次第、サンプルコウムを差し込み、30分放置する。  
これを泳動プレートとする

空気中に長時間放置すると、乾燥するため、1時間以内に使用しない場合は、ビニール袋に入れ、口を密封したうえで冷蔵庫に保管すること。

### 【2】泳動の配置設定

以下の通りに設定することを基本とする。

- ・サンプルの配置の仕方は左のレーンから始まり、右に向かう形を基本とする。
- ・PCR プレートでの配置がそのまま反映される形に 12 サンプル分をひとまとまりとして配置し、それをサイズマーカーではさみ込む形を基本とする。  
(合計 14 レーン使用する)

- ・隣り合うバンドの高さを見ることが最も確実な判定となるため、調査試料と対照試料など、比較させたいサンプルが隣り合うほうがよい。
- ・1枚で12サンプル分を泳動する際は、中央部に寄せた形にする。  
従って、1マーカーあたりのゲルの各レーンにおける各泳動サンプルの配置例としては次2ページの通りとなる。示す配置は一例であって、試験者の判断でレーン上に任意で泳動サンプルを配置することが可能である。

①調査試料と対照試料の1対1調査の場合。

泳動プレートを切れ込みの無い側から見ての配置となる。1プレートに1マーカ・12サンプル分を配置した例。

レーン	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
	空き							サイズ マーカ	サウザー DNA 1試料目 PCR 1反復目	サウザー DNA 1試料目 PCR 2反復目	調査試料 DNA 1試料目 PCR 1反復目	調査試料 DNA 1試料目 PCR 2反復目	調査試料 DNA 2試料目 PCR 1反復目	調査試料 DNA 2試料目 PCR 2反復目	対照試料 DNA 1試料目 PCR 1反復目	対照試料 DNA 1試料目 PCR 2反復目	対照試料 DNA 2試料目 PCR 1反復目	対照試料 DNA 2試料目 PCR 2反復目	サウザー DNA 2試料目 PCR 1反復目	サウザー DNA 2試料目 PCR 2反復目	サイズ マーカ	空き						

②調査する試料がレタス12品種の内どれであるかを判定するのにあたって、品種を推定する場合。

泳動プレートを切れ込みの無い側から見ての配置となる。1プレートに1マーカ・12サンプル分を配置した例。

レーン	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
	空き							サイズ マーカ	サウザー DNA 1試料目 PCR 1反復目	サウザー DNA 1試料目 PCR 2反復目	調査試料 DNA 1試料目 PCR 1反復目	調査試料 DNA 1試料目 PCR 2反復目	調査試料 DNA 2試料目 PCR 1反復目	調査試料 DNA 2試料目 PCR 2反復目	基準品種A DNA 1試料目 PCR 1反復目	基準品種A DNA 1試料目 PCR 2反復目	基準品種B DNA 2試料目 PCR 1反復目	基準品種B DNA 2試料目 PCR 2反復目	サウザー DNA 2試料目 PCR 1反復目	サウザー DNA 2試料目 PCR 2反復目	サイズ マーカ	空き						

③PCR プレート 2 行分(24 サンプル分)を同時に泳動する場合は、以下のように配置する。

泳動プレートを切れ込みの無い側から見ての配置となる。1 マーカーあたり 12 サンプル分を 2 マーカー分配置した場合を示す。サンプルの区分けは①,②と同様のため省略する。

レーン	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
	マーカー: SML15												マーカー: SML26															
	サイズマーカー	サウザー	サウザー	調査試料	調査試料	調査試料	調査試料	対照試料	対照試料	対照試料	対照試料	サウザー	サウザー	サイズマーカー	サウザー	サウザー	調査試料	調査試料	調査試料	調査試料	対照試料	対照試料	対照試料	対照試料	サウザー	サウザー	サイズマーカー	空き

### 【3】電気泳動用サンプルの作成

10  $\mu\text{l}$  の PCR 反応液に対して 2  $\mu\text{l}$  のローディングバッファーを添加したものを、電気泳動用のサンプルとする。具体的操作としてはサンプルの入っているウェルの内側にローディングバッファーを 2  $\mu\text{l}$  分ピペットでつけ、プレート遠心機でフラッシュ遠心をする。

### 【4】10bp ラダーマーカの準備

10bp ラダーマーカ泳動の設定に従って必要分作成する

1 レーン分あたりの試薬量は以下の通りである。

10bp ラダーマーカ溶液 1.0  $\mu$

ローディングバッファー 1.0  $\mu\text{l}$

滅菌水 1.5  $\mu\text{l}$

---

0.5ml チューブか、PCR プレートの空のウェルを必要な試薬を混合したものの用意しておく。

## 5. 6. 3 アクリルアミドゲル電気泳動

(1)泳動プレートにクリップ、プレートパッキンがついている場合は取り除く。

(2)泳動槽の上部バッファー槽にクリップを使って泳動プレートをセットする。  
泳動プレート切れ込みがある側が内側となる。

泳動プレート 2 つが使用可能であるが、泳動プレート 1 枚を使用する際はダミープレートを使用する

(3)下部バッファー槽に 0.5×TBE バッファーを注ぐ。

(4)上部バッファー槽を下部バッファー槽に設置し、上部バッファー槽に 1×TBE バッファーを注ぐ。ゲルの上部がバッファーより出ないことに注意すること。

(5)ゲルの下部に気泡が無いこと確認、ある場合は針を曲げた注射器を使い、バッファーで押し流す。

(6)レーン間をゆがませないようにコームをゆっくり抜き取る

(7)注射器を使いバッファーで押し流すことでレーンを洗浄する。

レーンを仕切るゲル部分がゆがんでしまっている場合は、針の側面で押すことで修正することができる。

(8)5 $\mu$ lの設定したピペットと使用する。サンプルを5回ピペッティングし、ローディングバッファーとPCR反応液が十分に混ざるようにする。

(9)5 $\mu$ lのサンプルをレーンに入れる。チップの先端はレーンの底より5mm程度の位置にし、ゆっくりとサンプルを押し出すこと。

(10)チップを交換し、次のサンプルへの操作に向かう。基本的には左から右の順で入れていく。

すべてのサンプルが設定したレーン入るまで終わるまで

(8)~(10)を繰り返す。

(11)サイズマーカーに設定したレーンに3.5 $\mu$ l入れる

(12)電源に接続し、泳動を開始する。電源装置がアトー社製 AE8270(クロスオーバー方式採用機種)である場合は電流・電圧の設定は200mA・200Vに設定する。アトー社製 AE8270 に相当する機器でない場合は定電圧200Vが望ましい。電源の正極・負極が逆にならないように注意すること。細かい泡が発生することを確認する。発生していなければ、電流が白金線に通っていないことになる。

ブロモフェノールブルーの色素バンドの中心が、ゲルの下端より1cmに来るまで泳動を行う。そのため、最初は泳動時間を25分で行い。色素バン

ドの様子を見て、2分単位で追加を行う。(色素バンドの存在はあくまでも目安であるので、仮に色素バンドがゲルより流れきってしまった場合、ゲルの染色、および写真撮影を行うのが良い。)

(13)泳動停止後、泳動槽上部から泳動バッファーをすて、泳動槽から泳動プレートを取り外す。

(14)取り外した泳動プレートの切れ込みがある側をこちら向きにし、柄の先が平らなスパチュラをプレートの角にある間に入れてプレートの間を開け、切れ込みプレートを取り外す。ゲルが切れ込みの無いプレートに残っているようにすること

(15)レーンの仕切り部分のゲルを下5mm程度残して取り除く。

またゲルの、向かって右上1cm角部分を切り取り、裏表左右の目印とする。

(16)ゲルの左右に切れ込みを入れ、エチジウムブロマイド溶液より15cm程度上のところでゲル部分を下にする。

(17)ゲルの1辺を剥がすとゲル全体もはがれ、溶液内に落ちる。

溶液内でゲルが広がった形になるようにフライ返しで広げる。

(18)エチジウムブロマイド溶液に15分間浸漬することで染色を行う。

振盪する必要はない

(19)ゲルをエチジウムブロマイド溶液から引き揚げ、ゲルトレイに乗せる

この時、ゲルのガラス面についていた側が撮影側に向くように注意する。

ゲルの、向かって左上に切り取った跡があることで確認可能である。

余分な染色液が残らないようにキムワイプでゲルの周辺をふき取るなどして取り除く。

(20)紫外線照射装置で写真撮影を行う。

CCDカメラ等によるゲル撮影装置も使用可能である。

露光時間、絞りを調節し、DNAの増幅バンドあるいはDNAサイズマーカーが明瞭となるように撮影する。遺伝子型判定の際に書き込むことができる1枚と予備のもう1枚の計2枚以上の写真を印刷すること。撮影後得られた写真の余白に日付、撮影者、PCRのマーカー、試験番号を記入しておく。

写真の設定は以下の通り

- ・写真は白黒を反転して(ネガ)印刷をする
- ・写真にしてゲルが縦7cm以上の大きさであればバンドの判定は可能である。
- ・拡大、縮尺が可能な場合は、写真で印刷する範囲内でサイズマーカーが両端にくるように設定する。
- ・「【2】泳動の配置設定」の③でしめした様にゲル1枚で2マーカー以上を泳動している場合、サイズマーカーで挟んだ1マーカー分毎に印刷する。

#### 5. 6. 4 アクリルアミドゲル電気泳動結果の品質確認

遺伝子型の決定を行う前に、泳動結果の品質確認を行う。マーカー毎に付属文書の泳動像が参考になる。

遺伝子型の決定に関わるバンドの見方については以下の通りとなる。

- ・バンド上下の中心をバンドサイズの基準とする。それに続いて、バンドの下部、上部が補助的な判断材料となる。
- ・シングル検出の場合、もっとも太くはっきり見えるバンドである。(付属文書1を参照)  
30bp以下の小さいサイズで確認できるバンドはプライマーダイマーであるので、意味のあるバンドとはしない。
- ・マルチプレックス検出の場合、遺伝子型の決定に関わるバンドは、付属文章で指定した範囲にあるバンドである。

また解析を行う間の泳動結果の品質確認は以下の点に着目すること

- ・解析するのに必要なバンドが確認できるか。
- ・解析するのに必要なバンドに極端な歪みがないか。
- ・サンプル間で同じマーカーのバンドの検出度合が同等か。  
(検出度合=バンド上下の幅=太さが2倍以上の違いを見せていないか)
- ・同じ個体・同じ品種由来のサンプル同士でバンドサイズに違いがないか。

列挙した点で異常が見られた場合は、やり直しを行うこと。

詳しくはトラブルシューティングを参照すること。

## 5. 6. 5 遺伝子型の決定

各マーカーの遺伝子型の決定方法は以下の通りである。

### ① 1対1調査の場合。

調査品種のバンドサイズが対照品種のものと同じであるならば、  
遺伝子型が同じであると判定する。

バンドサイズが違う場合は違う遺伝子型であると判定する。

### ②品種の推定を行う場合。

詳細に関しては付属文章1のそれぞれのマーカーの説明部分を参照して  
行う。概ね以下方法のいずれか、あるいは組み合わせて遺伝子型の判定  
を行うこととなる。

- ・ サウザーを基準に遺伝子型を判定する。
- ・ サイズマーカーを基準に遺伝子型の判定を行う
- ・ 補足基準品種のバンドとの異同を見る。

また、得られた遺伝子型のデータを表3と照らしあわせて、品種の推定  
を行う。

判定が困難である場合は、判定したいサンプルと比較したい PCR サンプル  
同士あるいはサイズマーカーを隣り合う形に設定した再泳動を行う。

## 5. 6. 6 アクリルアミドゲル電気泳動のトラブルシューティング

### 【1】解析するのに必要なバンドが確認できない。

- ・ DNA 抽出や PCR に問題がある可能性が高い。  
「5. 4. 4」や「5. 5. 4」を参考に DNA 抽出、PCR をやり直す
- ・ サイズマーカーも検出されていないのであれば、エチジウムブロマイド染色が不十分であることが考えられる。染色液を作り直し、再染色を行う。

### 【2】解析するのに必要なバンドに極端な歪みがある。

#### ①両端部分がゆがむ(スマイリング)

- ・ 両端部分の泳動を避け、12 サンプル以内(サイズマーカーを含め 14 サンプル以内)をゲルの中央部に配置して泳動を行う。
- ・ 低電圧(100V,50V)での泳動を試みる。この場合、ブロモフェノールブルーの色素バンドを目安に、予備試験で泳動時間の設定をあらかじめ行ってから。本試験を行うこと。

#### ②一部のサンプルのバンドがゆがむ

- ・ 自作のゲルを使用している場合、ゲル作成試薬の混合が不十分である可能性がある。プレキャストゲルの使用を試みる。
- ・ 泳動プレートのゲルの下部に気泡が存在していた可能性も考えられる。泳動の準備中に気泡を確認した場合は針を曲げた注射器を使い、バッファーで押し流す操作を行うこと。泳動中に発生した気泡がゲル下にたまっている場合は、一旦泳動を中止(通電を中止)して、気泡を取り除いた後再開すること。

### 【3】サンプル間で検出度合が大きく違う

- ・ 極端に細いバンドのものは、DNA 抽出や PCR に問題がある可能性がある。「5. 4. 4」「5. 5. 4」を参考に DNA 抽出、PCR をやり直す。

- ・泳動に供する PCR 増幅産物量を調節することで改善がみられる場合がある。

検出が大き過ぎるものについては、再泳動の際、 $3.5\sim 2.5\mu\ell$ の範囲で泳動をやり直す。

**【4】** 同じ個体・同じ品種由来のサンプル同士でバンドサイズに違いがある。

- ・ **【2】** の①と共通の問題である可能性がある。泳動を残りのサンプルでやり直す。再泳動で改善がみられない場合、DNA 抽出からやり直す。特に種子の場合、同品種内での多型(品種内多型)や混種(別品種の紛れ込み)可能性も考慮して複数個体(20 個体程度)DNA 抽出と PCR を行い、最初にバンドサイズに違いのみられたマーカーで再びバンドサイズの違いが発生するかを確認する。

## 5. 7 SSR マーカーの検出方法(QIAxcel)

### 5. 7. 1 QIAxcel 電気泳動の一般事項

#### 【1】QIAxcel 電気泳動の特徴

アクリルアミド電気泳動と比較すると、泳動速度が速いため、結果データを早期に得ることができる。また危険試薬に触れる機会が少ない。試験前後の組み立て作業や後片付け、洗浄等の負担が少ないことも利点である。一方で試験コストはアクリルアミドゲルの場合よりも高価である。

プログラムによる処理により、ゲル泳動像のようなバンドパターンが表示されるため、アクリルアミドゲルの場合と同様の視覚的な判別も可能である。

さらにバンドサイズを具体的な数値としても得られるため、泳動像以外に判定の根拠を得ることが可能である。

ただし、泳動自体は個別のキャピラリー内で行っており、得られるデータ(移動距離、バンドサイズ)は、サンプル間の泳動距離をそろえるアライメントマーカーを基準として修正されたものであることから、例え隣り合うレーンに配置された同じバンドサイズのサンプルであっても、**2bp** 以内でのずれが生じる場合があるため、判定にあたっては注意が必要である。

#### 【2】QIAxcel の泳動単位

QIAxcel の泳動プログラムを1度動作させる毎に、1泳動12レーン分を8泳動分連続で泳動可能である。これはPCRプレートの横12ウェルずつ8行分に相当する。1回プログラムを動作するごとにデータの整理および解析を行うことが望ましい。

#### 【3】QIAxcel の操作方法について

このマニュアルでは、レタスの品種識別に必要な設定や、流れを説明するのにとどまり、より詳細なQIAxcelの操作方法については付属の説明書を参照すること

## 5. 7. 2 準備

**【1】** QIAxcel のマニュアルに従い、準備を行う。

QIAxcel に付属の Solution Tray に所定の試薬をいれ、本体に設置しておくことを確認する。

新しいカートリッジを使用する場合、QIAxcel の説明書に従ってインテンシティキャリブレーションを行い、各キャピラリーのシグナルの強さをそろえておくこと。

**【2】** 泳動の配置設定

QIAxcel ではあらかじめ測定したサイズマーカーのデータを記録しておき、それに基づいてバンドサイズを測定することができるが同時に泳動したサイズマーカーの値に基づいた場合が最も信頼できる。従ってキャピラリーの内 1 つには必ずサイズマーカーを入れる必要がある。

また一度の泳動で 12 サンプルが限度であるため、PCR で基本とした 12 ウェル分そのままを反映させることはできない。この場合、調査試料、対照試料、サウザーの各 2 サンプル分を優先的に泳動し、別途泳動するようにする。

従って、1 泳動あたりの各レーンにおける各泳動サンプルの配置例としては次ページの通りとなる。示す配置は一例であって、試験者の判断で各キャピラリーに任意で泳動サンプルを配置することが可能である。

①調査試料と対照試料の1対1調査の場合。

キャピラリー位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
サイズ マーカー		サウザー DNA 1試料目 PCR 1反復目	サウザー DNA 1試料目 PCR 2反復目	調査試料 DNA 1試料目 PCR 1反復目	調査試料 DNA 1試料目 PCR 2反復目	調査試料 DNA 2試料目 PCR 1反復目	調査試料 DNA 2試料目 PCR 2反復目	対照試料 DNA 1試料目 PCR 1反復目	対照試料 DNA 1試料目 PCR 2反復目	対照試料 DNA 2試料目 PCR 1反復目	対照試料 DNA 2試料目 PCR 2反復目	サウザー DNA 2試料目 PCR 1反復目

②調査する試料がレタス12品種の内どれであるかを判定するのにあたって、品種を推定する場合。

キャピラリー位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
サイズ マーカー		サウザー DNA 1試料目 PCR 1反復目	サウザー DNA 1試料目 PCR 2反復目	調査試料 DNA 1試料目 PCR 1反復目	調査試料 DNA 1試料目 PCR 2反復目	調査試料 DNA 2試料目 PCR 1反復目	調査試料 DNA 2試料目 PCR 2反復目	基準品種A DNA 1試料目 PCR 1反復目	基準品種A DNA 1試料目 PCR 2反復目	基準品種B DNA 2試料目 PCR 1反復目	基準品種B DNA 2試料目 PCR 2反復目	サウザー DNA 2試料目 PCR 1反復目

### 【3】 アライメントマーカの準備

QXAlignment Marker 15 bp/500 bp をアライメントマーカーク試薬とする。  
これを QIAxcel DNA High Resolution Kit 【以下キット】 に付属している 0.2ml 12-tube Strip 2 の各ウェルに 15 $\mu$ l 入れ、キット付属のミネラルオイルを 15 $\mu$ l 重層する。

### 【4】 電気泳動用サンプルの作成

泳動に供する PCR 産物 1 $\mu$ l を、事前に設定した配置に従って、新しい PCR プレートにいれる。滅菌水を 100 $\mu$ l 加えふたをし、ボルテックス 【2500rpm 3 秒間】 を行った後、プレート用遠心機でフラッシュ遠心を行う。

PCR 産物を入れないウェルがある場合でも滅菌水のみは入れておくこと。

サイズスタンダードは滅菌水で 800 倍に薄めたものを用意しておき、そのうち 30 $\mu$ l をあらかじめ設定したウェルに入れる。

いずれのサンプルも底に気泡が残らないように注意すること。残っている場合は、フラッシュ遠心で取り除く。

### 【5】 データの記録箇所の用意

QIAxcel ではデータの記録を自動で行うことが可能である。あらかじめ接続しているパソコン内に品種識別用のフォルダを作成しておき、データの保存先指定先とする。

### 【6】 データの処理パラメーターの設定

Analysis メニューから Parameters を選択し Parameter setup 画面を起動し、以下の設定を行う

- Pos.Threshold は 0.2 に設定する
- Minimum Distance は 0.25 に設定する
- Data smoothing filter は 5 に設定する
- Filter peak と Last peak は有効にしておく
- Use as default は有効にしておく

すべての設定が終わったら、「OK」をクリックする。

### 5. 7. 3 電気泳動

- (1) QIAxcel 本体とプログラム QIAxcel BioCalculator を起動する。
- (2) File メニューから Instrument Control をクリックする。  
Instrument Control 画面が起動する。
- (3) QIAxcel カートリッジを QIAxcel 本体に挿入し、「Cart Latch」をクリックする。カートリッジが接続される。
- (4) 「Change Buffer」をクリックすると、Sample Tray Holder(PCR プレート  
を乗せる部分)が手前に移動する。PCR プレートを Sample Tray Holder に設  
置し、アライメントマーカーク試薬を調製した 0.2ml 12-tube Strip 2 を Solution  
Tray に設置する。「Park」をクリックする。Sample Tray Holder が奥に移  
動する。
- (5) Sample Tray Holder は左側奥を A1 とした PCR プレートのウェル配置を反  
映させている。設置する PCR プレートの向きに注意すること。  
この操作はカートリッジ先端を乾かさないように Sample Tray Holder が手  
前に来た時点から 5 分以内に終了すること。
- (6) Instrument Control 画面で泳動の条件を設定する。  
条件設定は以下の通り
  - Pos 欄で設置した PCR プレート上で泳動する行の位置を指定する。  
例えば A 行を泳動する場合は A を指定しておく。  
泳動するすべての行をそれぞれの欄に設定する。  
96 ウェルプレートすべてにサンプルがある場合は、A~H まで設定しておく
  - Method は 0M700 に設定する。
  - Sample の欄にはその行を示す名前を入れる。  
一例として「日付\_泳動番号\_マーカ名」がある。
  - Runs は 1 に設定する。
  - Method directory はあらかじめ QIAxcel の泳動プログラムがあるファイル  
を選択しておく(QIAxcel のマニュアルに準ずる)
  - Time は空欄にする。

- Inc は空欄にする。
- Data directory では付属パソコン内でデータを記録する場所を指定する。  
事前に作成したフォルダを設定することも可能
- User ID では空欄にしておく
- Plate ID は5. 1.6を参考に設定した泳動泳動操作の番号を入れておくと、  
整理がしやすい。
- Create Gel Image at Start of Acquisition は有効にしておく
- Automatically analyze After Data Acquisition は有効にしておく
- Autoscale Time Axis During Acquisition は有効にしておく
- include Reference Marker Table は無効にしておく

条件設定が終了したら、**Run** ボタンをクリックして泳動をスタートさせる。

#### 5. 7. 4 サイズマーカーをもとにしたバンドサイズの計算

泳動結果の解析を前に、泳動で得られたバンドのサイズを、サイズマーカーに基づいて計算を行う。

(1)プログラム **QIAxcel BioCalculator** を起動する。

泳動直後である場合は、**Instrument Control** の画面を閉じておく

(2)**Folder** メニューの **Open** を選び、**Data directory** で指定した記録箇所を開く

(3)5. 7. 3 で **Plate ID** に設定した名前のフォルダをクリックする。

(4)拡張子が **hff** であるファイル1つが1ランごとの結果を示しているファイルである。ファイル名は5. 7. 3 で **Sample** の欄に設定した名前である。目的のファイルを開く。

(5)**12** レーンの中の1つ、サイズマーカーを泳動した結果を基にレファレンスマーカーを作成し、現在開いているすべてのレーンに適用させる。詳しい操作方法は **QIAxcel** のマニュアルを参照すること。バンドサイズが計算され、ゲルイメージ画面の端にサイズマーカーのバンドサイズが表記される。また、バンドにカーソルを合わせると、左上に赤字でバンドサイズが表示されるようになる。詳しい解析は「5. 7. 6」以降に記載する

(6)**Window** メニューの **close all** を選ぶ、選択肢の **Yes to all** のボタンをクリックする。

(7)別の **hff** ファイルがあれば、同様にバンドサイズの計測を行う。

### 5. 7. 5 QIAxcel 電気泳動結果の品質確認

遺伝子型の決定を行う前に、泳動結果の品質確認を行う。マーカー毎に付属文書の泳動像が参考になる。

遺伝子型の決定に関わるバンドの見方については以下の通りとなる。

- ・ レーンごとにアライメントマーカーのバンド(500bp,15bp)と PCR 産物のバンドが表示される。
- ・ バンドの強さは個別のレーンのデータファイル上で、ピーク(RFU 値:Relative Fluorescent Unit)の高さとして確認することができる。
- ・ バンド上下の中心がバンドサイズの基準でありピークの頂点と相当する。
- ・ シングル検出の場合、遺伝子型の決定に関わるバンドは、アライメントマーカーのバンド以外でもっとも太くはっきり見える。(もっともピークが高い)バンドである。(付属文書 2 を参照)
- ・ 30bp 以下の小さいサイズで確認できるバンドはプライマーダイマーであるので、意味のあるバンドとはしない。
- ・ マルチプレックス検出の場合、遺伝子型の決定に関わるバンドは、付属文章で指定した範囲にあるバンドである。
- ・ 5. 7. 1 でも記載した通り、得られたデータは個別のキャピラリーで計測されたものであるため、同じサンプルでも微妙な差が出てしまう場合がある。2bp 未満は許容範囲である。

泳動結果の品質確認は以下の点に着目すること

- ・ 解析するのに必要なバンドが確認できるか。
- ・ 解析するのに必要なバンドの RFU 値が 1000 を超えているか
- ・ 同じマーカーのバンドが各サンプル同程度に検出されているか。  
(各レーンで同じマーカーのピークに 2 倍以上の違いが無いか。)
- ・ 同じ個体・同じ品種由来のサンプル同士でバンドサイズに違いがないか。
- ・ サイズマーカーのすべてのピークの RFU 値が 500 以上 4000 以内であるか。

列挙した点で異常が見られた場合は、やり直しを行うこと。詳しくはトラブルシューティングを参照すること。

## 5. 7. 6 QIAxcel 電気泳動結果のデータ整理

泳動結果の解析のために、泳動像の印刷とバンドサイズの計測が必要である。

### 【1】泳動像の印刷

泳動像の解析自体はパソコンの画面上で行うことも可能であるが、記録用紙用に泳動像の印刷をしておき、添付しておく。

(1)hff ファイルを開き、泳動像がある画面(フォルダービュー画面)を最大化しておく。

(2)目的となるバンドの上下を1回ずつクリックすると、アライメントマーカのバンド(500bp,15bp)を上下の端にした泳動像となる。

(3)①か②の方法で泳動像の印刷を行う。

①パソコンの PrintScreen 機能を使う。

パソコンの PrintScreen で画面を直接記録し、Paint アプリケーションに貼り付け、JPEG 形式で記録しておく。これを印刷する。他のアプリケーション(パワーポイント等)に添付してから印刷してもよい。

②BioCalculator の Gel View 機能を使う

BioCalculator の Folder メニューの Export、選択肢 Gel View を選ぶ  
Resolution の設定は X:100 Y:1000、JPEG 形式で記録する。

①の場合と同様に印刷を行う。

### 【2】バンドサイズの計測

バンドサイズの計測は①か②の方法で行う。

①フォルダービュー画面から確認する

バンドにカーソルを合わせると、左上に赤字でバンドサイズ(bp)が表示される。各レーンの遺伝子型を示すバンドにカーソルを合わせ、バンドサイズを確認し、記録していく。

②Export 機能を使う(シングルマーカの場合のみ)

すべてのデータファイルを閉じた状態で、**File** メニューから **Export** を選択する。**Plate Image & Result File Creator** 画面が開くので以下通り設定を行う。

- **Plate Directory** で目的のデータがある **Plate ID** のファイルを選択する。
- **Image/Result File name** にはデータ名前を設定しておく。
- **Files to Process** 画面で、1 泳動 12 サンプル分のデータを指定する。
- **Use these integration parameters** は有効にする
- **Use the Reference Marker table** は有効にする。
- **Property** の欄で **Name**、**Height**、**Size** を指定する。

設定が終了すると **Process** ボタンをクリックする。

CSV ファイルのデータが指定の場所に出力される。**Name** でサンプル名を確認でき、**Height** でピークの高さを確認できる。アライメントマーカのピークは最初と最後のピークとなる。アライメントマーカピーク以外で最も大きいピークにあたるサイズが遺伝子型を示すバンドのサイズ(bp)となる。

## 5. 7. 7 遺伝子型の決定

マーカーの遺伝子型の決定方法は以下の通りである。

### ① 1対1調査の場合。

調査品種のバンドサイズが対照品種のものと同じであるならば、遺伝子型が同じであると判定する。

バンドサイズが違う場合は違う遺伝子型であると判定する。

### ② 品種の推定を行う場合。

詳細に関しては付属文章2にあるそれぞれのマーカーの説明部分を参照して行う。概ね以下方法のいずれか、あるいは組み合わせて遺伝子型の推定を行うことになる。

- ・ サウザーを基準に遺伝子型を判定する。
- ・ バンドサイズを基準に遺伝子型を判定する。  
(詳細は5. 7. 8を参照する)
- ・ 補足基準品種のバンドとの異同を見る。  
ただし、データ上の2bp未満のずれは許容範囲である。

得られた各マーカーの遺伝子型データを表3と照らしあわせて、品種の推定を行う。

決定、あるいは推定された遺伝子型は記録用紙の所定の場所に記録しておく。

## 5. 7. 8 測定値に基づいた遺伝子型の決定方法

5. 6. 5にある「サイズマーカーを基準に遺伝子型を計測する」にあたっては、同時の泳動で得られた標準品種サウザーのバンドサイズの計測値(bp)と、比較するサンプルの計測値、および各マーカーの特定配列（モチーフ）の塩基数(次ページ表 5)を基に以下のような計算を行う。

- (1)標準品種サウザーの泳動サンプルで得られたバンドサイズの計測値を **S** と置く。例えばマーカー**SML15** において、サウザーの計測値が **247.5** であった場合はその値を **S** と表記する。
- (2)同じ泳動で比較する泳動サンプルの値とサウザーの差を計算し小数点以下を四捨五入したのち、**S** に差を付加した形にする。四捨五入の結果差が **0** の場合は **S** の表記のままとなる。例えば比較サンプルの計測値が **237.4** であれば、 $237.4 - 247.5 = -10.1$  となり **S-10** となる。
- (3)**SSR** の遺伝子型は特定配列の反復回数と関係する。**SML15** マーカーは特定配列塩基数 **5** である。従って、**S** との差は **5** の倍数での増減となる。計算結果 **-10**（特定配列塩基数：**5**×**2** 反復）と矛盾しないため、上記の場合、遺伝子型は **S-10** と判定・表記する。
- (4)仮に倍数に丁度当てはまらない結果となった場合は、**0** と特定配列塩基数の倍数を比較、もっとも近いものを遺伝子型とする。例えば、**SML15** において計算上 **S-11** となった場合は **S-10** と判定・表記する。あるいは **S+1** となった場合は **S** と判定する。

表 5. 各マーカー特定配列（モチーフ）塩基数

マーカー名	モチーフ塩基数
SML15	5
SML26	3
SML22	3
SML42	4
SML45	3
SML60	3
SML3	5
LS_WGS_10	4
TK_39	5
LS_WGS_15	3
TK_11	5
TK_37	3
TK_20	3
TK_42	3

## 5. 7. 9 QIAxcel 電気泳動結果のトラブルシューティング

### 【1】解析するのに必要なバンドが確認できない

- ・DNA 抽出や PCR に問題がある可能性が高い。

「5. 4. 4」や「5. 5. 4」を参考に DNA 抽出、PCR をやり直す。

### 【2】解析するのに必要なバンドの RFU 値が 1000 を超えていない、あるいはサンプル間で検出度合が大きく違う

- ・どちらの場合も、希釈倍率を変更することで改善する場合がある。

たとえば検出度合が 2 倍以上の違いがある場合、検出度を半分に抑える場合は PCR 産物 0.5  $\mu$ l に対して滅菌水 100  $\mu$ l を加えるようにし、検出度を 2 倍にする場合 PCR 産物 2  $\mu$ l に対して滅菌水 100  $\mu$ l を加えるようにする。ただし、希釈の変化は塩濃度による泳動の影響を考慮して 3 倍～1/3 以内にする。

また希釈率を変更したあと、12 サンプルすべての RFU 値が 1000 以上であることに注意すること。これで改善しない場合は DNA 抽出、PCR、泳動をやり直す。

- ・最初の泳動で極端に検出が低い(RFU 値が 500 以下)のものは、DNA 抽出や PCR に問題がある可能性がある。

「5. 4. 4」や「5. 5. 4」を参考に DNA 抽出、PCR、泳動をやり直す。

### 【3】サイズマーカーのピークのうち 1 つ以上で RFU 値が適正值(500 以上 4000 以内)にない。

- ・希釈倍率を変化させることで改善する。RFU 値が低い場合、希釈倍率を上げる。RFU 値が高い場合、希釈倍率を下げる。

### 【4】同じ個体・同じ品種由来のサンプル同士でバンドサイズに 2bp 以上違いがある。

- ・泳動を残りのサンプルでやり直す。

バンドサイズの違いがサンプルに由来するかを確認するため、サンプルの位置を入れ替えて再測定を行う。入れ替えた後もバンドサイズの違いが同位置のキャピラリーで現れた場合は、キャピラリーの異常を考える。この場合、キャピラリーの初期補正(キャリブレーション)をしてもう一度泳動を行う。

バンドサイズの違いがサンプル由来であることが確認できた場合は、DNA 抽出からやり直す。特に種子の場合、同品種内での多型(品種内多型)や混種(別品種の紛れ込み)の可能性も考慮して複数個体(20 個体程度)の DNA 抽出と PCR を行い、最初にバンドサイズに違いの見られたマーカーでバンドサイズの違いが発生するかを確認する。

## 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。

また、本マニュアルに掲載した 14 の SSR マーカーではさらに多くの品種を識別することが可能である。追って、識別できる品種を増やした形に本マニュアルを改良する予定である。

