

添付資料 1

DNA 鑑定提供までの
ジョブフローと規則

DNA鑑定提供までのジョブフローと規則

- DNA鑑定提供までのジョブフロー
- マーカー開発規則
- 認証規則
- DNA鑑定の検査規則
- ライセンス規則と責任
- DNA鑑定の品質確保
- 品種識別マニュアルの書き方

特定非営利法人 DNA鑑定学会
妥当性委員会



(H25.6.7)

更新経歴表

更新月日	内容
2009/6/16	添付資料1に「品種識別マニュアルの目次」を追加した。
2009/6/22	「3. 1. 2 妥当性実施機関の条件」を追加した。 それに伴い、「3. 1委員会」を「3. 1. 1」に変更し、3. 1には「3. 1妥当性の確保」を設けた。
	「図1 DNA鑑定サービスまでのジョブフロー」にstep5として「DNA鑑定の品質確保」を追加した。
	「6. DNA鑑定の品質確保」を追加した。
2009/7/8	「2. 2 権利関係」の文章表現を分かり易くした。内容に変更なし。
	「3. 認証規則」の序論に「同一内容の検証を複数機関へ依頼し、複数機関の検証データを総合的に分析して認証の妥当性を求める」を追加した。
	「2. 4 自己検証」 (1) 以下の株で品種判別を実施すること。 基準株：分譲元 生産者：分譲先生産者の産物 市販品：種苗会社などの流通品 を追加した。
2010/11/2	「4. 2. 4 2 検体の比較検査」を追加
	「4. 2. 5 基準値マーカーの扱い方」を追加
	添付資料1に「品種識別マニュアルの目次」を削除し、 「7. 品種識別マニュアルの書き方」を追加
	タイトルを「DNA鑑定サービスまでのジョブフローと規則」から 「DNA鑑定提供までのジョブフローと規則」
2011/7/5	「2. 3. 1 マーカーの開発」の「(3) 2bp 以上の SSR マーカー」と「(4) 誰でも活用できる検査技術」を追加

目次

1.	DNA鑑定提供までのジョブフロー	2
2.	マーカー開発規則	3
3.	認証規則	5
4.	DNA鑑定の検査規則	10
5.	ライセンス規則と責任	13
6.	DNA鑑定の品質確保	18
7.	品種識別マニュアルの書き方	19

1. DNA鑑定提供までのジョブフロー

本ジョブフローは、研究開発の成果を産学官の協力で実社会に提供することを目的とし、提供までに必要な事柄とそのガイドラインをジョブフローとして図1に現します。

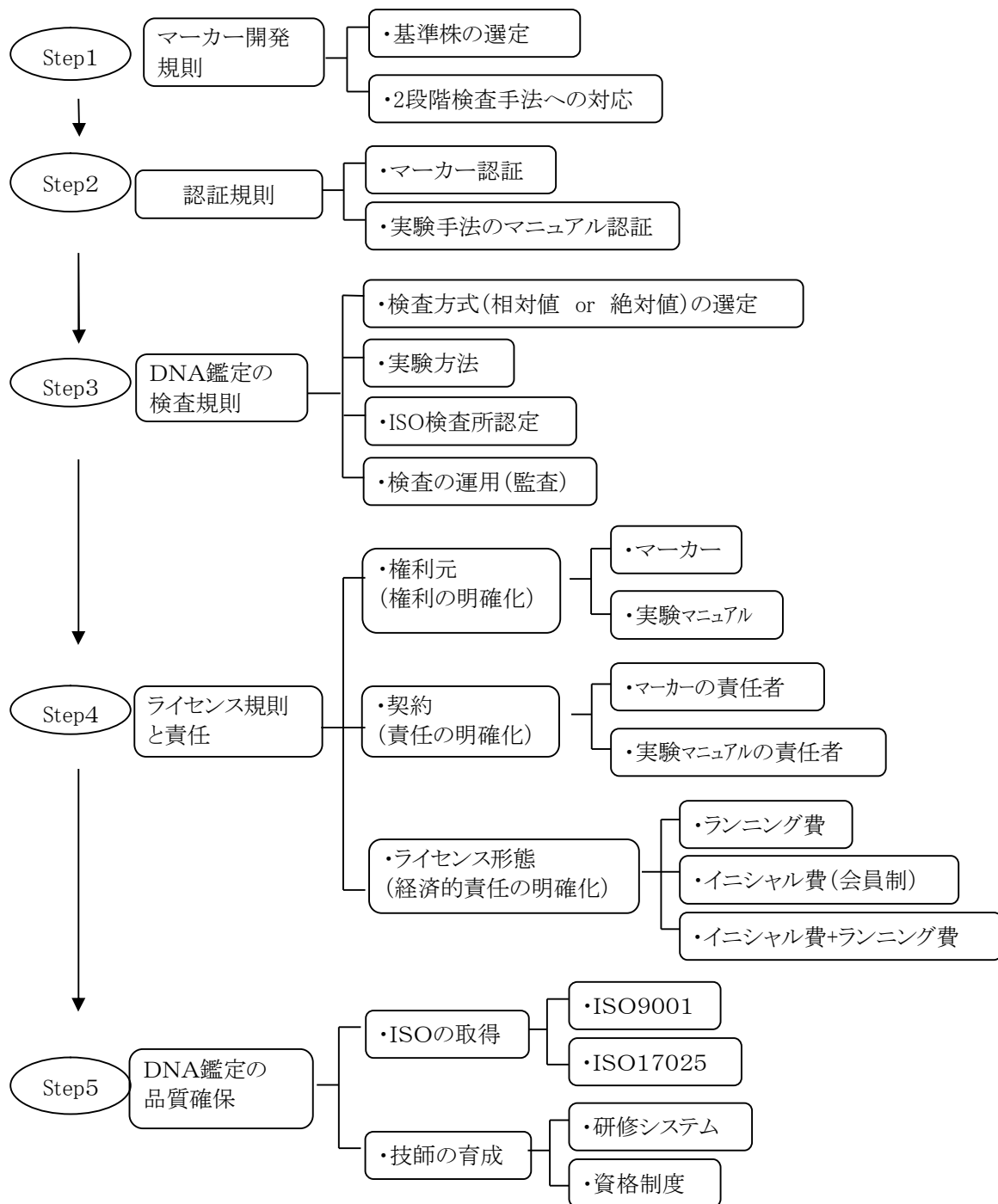


図1 DNA鑑定サービスまでのジョブフロー

2. マーカー開発の規則

2. 1 基本的な考え方

DNA鑑定に必要な要素を、識別するための「マーカー」と、マーカーを検出するための「実験方法」とに区別して定義する。また、権利も各々で異なり、規則も権利に従って設定する。

2. 2 権利関係

識別の開発で発生する知的所有権は、品種などを識別する「識別マーカー」と、識別マーカーを用いて判別する実験手段を記載した品種識別マニュアルとがある。

「品種識別マーカー」は、特許権としての権利となり、識別するための実験手段を書いた手順書の「識別マニュアル」は著作権としての権利となる。

2. 3 開発

2. 3. 1 マーカーの開発

品種識別などのマーカー開発をするにあたって、基本的に以下の事項を考慮して開発しなくてはならない。

(1) 基準株を明確に定めて開発

マーカーを開発するにあり、分譲している基準株を用いて開発をおこなうこと。

(2) 2段階検査に対応したマーカーの開発

簡易検査と精密検査との2段階で検査を可能としたマーカーであること。
簡易検査とは断片長などの簡易的な手法で判別がおこなえること。精密検査とは現在の技術でベストと思われる判別手法の塩基配列で判別できること。

(3) 2bp以上のSSRマーカー

電気泳動の誤差が2bp程度生じるため、4bp以上のSSRマーカーが好ましい。

(4) 誰でも活用できる検査技術

エチプロなど健康面で問題とされている物を使用しない方式とする。

2. 3. 2 品種識別マニュアルの開発

品種識別マニュアルとは、識別マーカーを使って識別する実験方法を記載するもので、学会で指定する目次に従って記載すること。内容は、第三者が使用して品種識別が出来る内容でなくてはならない。ただし、新たな技術が開発され、マニュアルに記載されている内容で実験することが出来ないようなときは、新たに

マニュアルを作成し、定義して実施すること。このとき、マーカーの変更をしてはならない。

2. 4 自己検証

信頼性を確認するため、品種識別の開発終了時、以下の条件で最終確認をおこなうこと。

- (1) マーカー開発した人物と異なる人物で最終確認を実施することが好ましい。
- (2) 品種識別マニュアルで検証作業を実施すること。
- (3) 以下の株で品種判別を実施すること。
 - 基準株：分譲元
 - 生産者：分譲先生産者の産物
 - 市販品：種苗会社などの流通品
- (4) 実験の繰返し回数を複数回おこなうこと。
- (5) 品種確認は同一品種別個体で5個体以上の個体検査をおこない、検証結果を提示できる状況にしておくこと。

3. 認証規則

認証業務とは、依頼元から提供されたマニュアルに記載している「DNAマーカーと検査手順」について、同一内容の検証を複数機関へ依頼し、複数機関の検証データを総合的に分析して認証の妥当性を求めるものである。

検証業務とは、マニュアルに従って検査を実施し、手順の再現性確認と識別の認証率を求めるものである。

認証率とは、サンプル採取した複数の生物検体を、マニュアルに従って検査をおこない、DNAマーカーによる判別の結果をデータ評価したもので、DNAマーカーでの品種一致率を求めたものである。

3. 1 妥当性の確保

妥当性を確保するために、委員会を設け、妥当性に相応しい機関で実施しなくてはならない。

3. 1. 1 妥当性委員会の設置

認証業務は複数人の第三者委員会（中立委員を委員長として、大学、独立法人研究機関、民間等の専門家から構成）で構成させ、検証機関の選定、サンプルの採取および認証率を合議の上で決定し、図2の認証業務フローに従って遂行すること。

3. 1. 2 妥当性実施機関の条件

妥当性とは、品種基準株の選定、品種識別マーカーの開発方法、マーカーの認証率およびDNA鑑定検査方法を検証して評価し、その妥当性を判別することである。そのため、妥当性には中立性と公平性が要求されるため、以下の業務に係わっている機関が妥当性業務を実施してはならない。

(1) 品種識別マーカーの開発業務

(2) DNA鑑定による検査業務

(3) 種苗の管理業務

3. 2 認証基準

委託された認証業務において、帳票にて申請を受付け、以下の条件をクリアした申請のみを受け入れるものとする。検査手順のマニュアルがあること。

(1) 検査手法の中にコントロールマーカーが定義されていること。

(2) マーカー判別手法において、最終的に塩基配列を読み取ることで正確な判別できる方式であること。

(3) マーカーの探索において、以下の条件を実施して決めること。

・同一DNAで繰返し実験をし、再現性の確認をおこなう。

- ・同一品種の複数個体との比較を実施する。
- ・異なる品種に対しても、1品種複数個体で比較を実施する。

3. 3 検証機関の選定基準

検証機関の選定基準とは、検証業務を実施する機関を選定するための基準について定義したものである。(基本的にはISO17025の試験所認定機関のレベルに準拠した検証機関であることが望ましい)

1) 機関選定の手法

学会の法人会員に対して公募をおこない、応募機関の中から選定することを原則とする。ただし、応募の中に認証を取得している機関が無い、あるいは何らかの都合で公募がおこなえないときは、委員会で協議して検証先を決定する。

2) 検証機関の選定基準

認証資格として、ISO17025, ISO15189 または ISO9001 を取得している機関を優先することを原則とする。但し、何らかの事情により、認証を取得していない機関を選定対象とするときは、以下に述べるチェック項目に従い当該機関のチェックを委員会でおこなう。

- (1) 検証機関に試験所品質管理マニュアル相当のマニュアルがあること。
- (2) 検証機関は検証業務に関する権限と責任を明確にした組織表が作成されていること。(機密保持体制、職員への内圧外圧の排除を含む)
- (3) 品質マニュアルには品質管理者、技術管理者の権限と責任が明確に記載されていること。
- (4) 検証機関の品質マニュアルには品質目標、品質方針の記載があること。
- (5) 検証機関は文書管理体制(品質マニュアル等の配布管理、文書ファイル、文書改定、文書保管管理、文書取扱責任者など)が整っていること。
- (6) 検証機関では依頼内容の確認、記録が取られていること。
- (7) 検証業務に使用する検査機器、試薬などの購買、受入検査の記録を保持していること。
- (8) 検証業務に関する不適合試験業務の管理(不適合処理、是正処置、予防処置)が行われていること。
- (9) 検証業務の見直しのための内部監査及びマネジメントレビューが行われていること。
- (10) 検証業務に関与する職員の教育訓練、資格認定を実施していること。
- (11) 検証業務に関する施設の適合性の記録(温度、湿度、環境制御など)を取っていること。
- (12) 検証業務に関する試験方法及び妥当性確認(検査手順書の適合性、検査

手順書の改定、対応規格の有無、対応試験方法の有無、不確かさレベルの確認など)

- (13) 検証業務に関する検査機器の保全計画及び実績、検査機器の設備管理台帳、ソフトウェアの管理記録を整備していること。
- (14) 検証業務、測定トレーサビリティの確保がおこなわれていること。(認証標準物質又は標準物質、検査機器、試薬など)
- (15) 検証業務に関する試験試料の識別管理、保管管理を行っていること。
- (16) 検証業務に関する品質の保証(精度管理:正確さ、再現精度の管理)を行っていること。
- (17) 検証業務に関する鑑定の報告実績があること。

以上のチェック項目に関して70%以上の適合性があることが望ましい。

認証機関の選定確認用のチェックリストは別添の「ISO17025試験所またはISO17025試験所相当レベルに該当するかどうかを確認するための監査チェックリスト」を使用する。

3.4 サンプルの採取基準

マニュアルに記載されているDNAマーカで判別を実施するためのサンプル採取基準を定義する。サンプルは以下の観点で採取する。

1) 標準株

標準株を管理している機関から、同一株を複数個採取する。これは、DNAマーカが標準株に対して、どの程度の妥当性があるか判別するためである。

2) 市販品

市販されている株を複数個所から購入し、DNAマーカで判別する。これは、DNAマーカと市販品株とにどの程度の差異が生じているか判別するためのものである。

3) 多品種との妥当性

上記、1)、2)は同一品種株に対する妥当性評価のためであるが、異なる品種に対しても同様の判別を実施すること。

3.5 認証率

妥当性を確保するために、検証機関を複数機関選定し、各機関に同一のサンプルを与えて検証業務を実施させる。認証率は、依頼されたDNAマーカと標準株および市販品との一致率をまとめて求める。

3.6 是正処置及び予防処置

学会での認証活動において発生した問題点とその対策を記録し、是正処置を講じる

ことで、その後の予防処置をおこなう。

学会での認証活動は、認証委員会での討議内容を議事録として残し、是正処置が発生した場合は是正処置内容を対象の検証機関に報告して、1ヶ月以内に是正処置報告書を検証機関に提出してもらいその内容を再度認証委員会にて審議して最終的な検証機関の選定を行う。

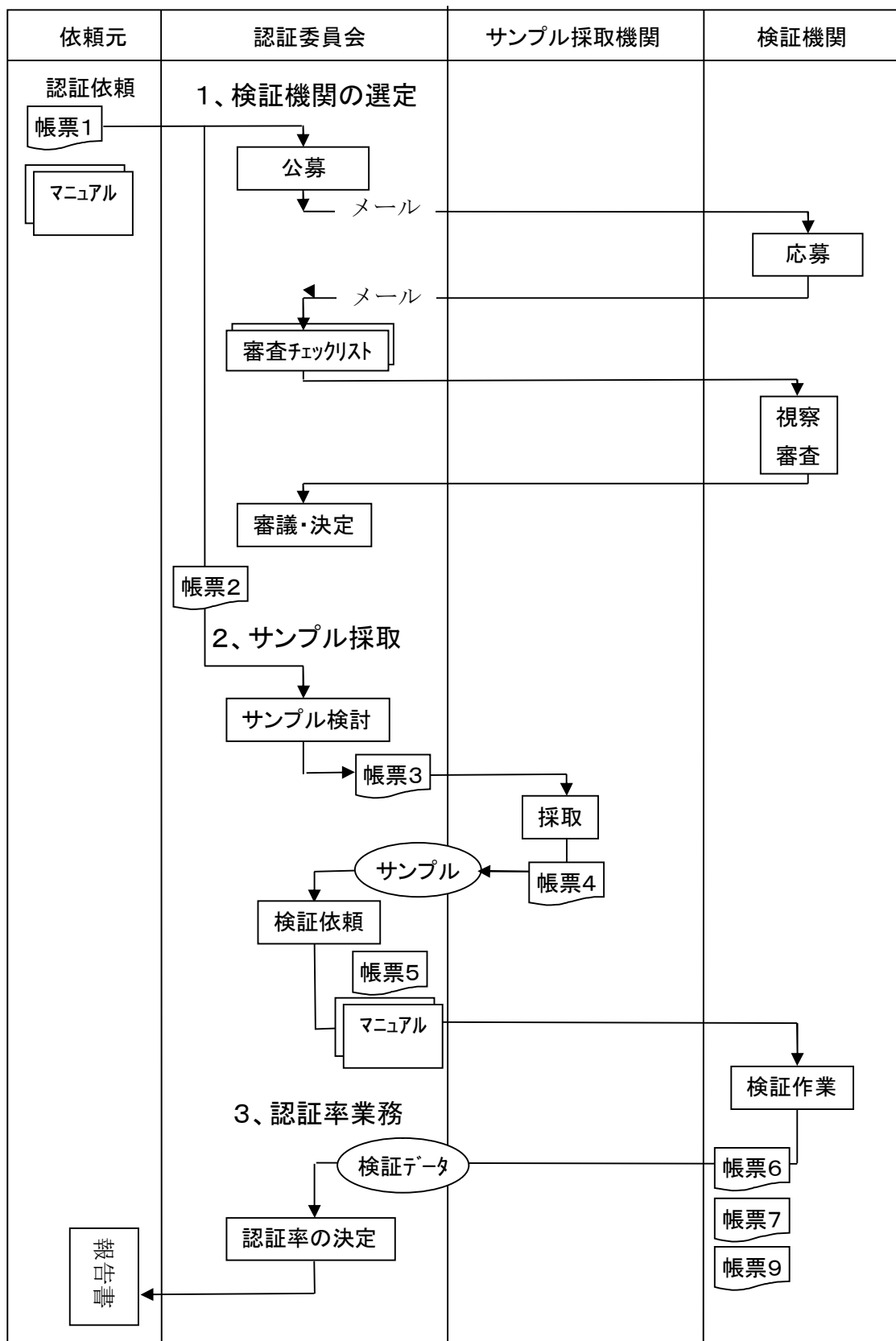


図2 認証の業務フロー

4. DNA鑑定の検査規則

4. 1 基本的な考え方

DNA鑑定において、品種識別マニュアルで識別の実験方法などを記載しているが、全機関がマニュアルに記載されている同一の環境で実験することは現実的でない。そのため、以下の指針を設けることで、DNA鑑定の品質を確保する。

(1) 検査の手法

基準品種と被検査物のマーカーを一緒に、あるいは平行に測定し、基準品種マーカーと被検体のマーカーを相対比較する。

(2) 基準品種の設定

検査の前に基準品種を設定して検査をおこなう。

(3) 2段階検査

簡易検査と精密検査の2段階検査方式とし、精密検査では塩基配列で判別する。

4. 2 DNA鑑定の検査

4. 2. 1 検査の手法

DNA鑑定の検査は大きく分けて、基準品種のマーカー値を基準値として定義して置き、被検体のマーカー測定値と基準値とを比較して判別する方法の絶対値方式と、基準品種のDNAと被検体のDNAとを一緒に、あるいは平行に測定する相対値方式とに区別することが出来る。絶対値方式では、検査に使用する機器など、各検査機関の環境が異なると、測定値にバラツキが生じる。そのため、判別の信頼性を確保するためには、各検査機関の環境が異なっても、同じ測定結果を得ることができる相対値方式を用いるものとする。

4. 2. 2 基準品種の設定

前記の相対値方式によるDNA鑑定方法は、基準品種のDNAを保存して置き、そのDNAを使用する方法と、基準品種の固体を保存して置き、検査に時にDNAを抽出して使用する方法がある。相対値方式ではどちらの手段を用いてもよい。基準品種のDNAを抽出して使用する方法は、品種の基準株を複数個体用意し、個々のマーカーを測定して同一の測定値が多く存在したDNAを基準DNAとして使用する。

4. 2. 3 2段階検査

現在のバイオテクノロジーにおいて、十分な証拠能力を有する検査結果を出すためには、最終的にマーカー部位の塩基配列で判別を行なうことが最善の手法である。しかし、常に塩基配列を読取って判別することはコスト面から現実的でない。そこで、まず簡易検査によって基準品種と異なる品種の疑いがあるかどうかのスクリーニングを行い、その結果、基準品種と異なる品種の疑いがあるものについては、精密検査としての塩基配列決定を行なうという2段階の検査システムを採用する。

この2段階検査の方式は、以下のような利点を持つ。

- (1) 簡易検査の結果により精密検査の必要性を判断できるため、手間と費用のかかる精密検査を行なう件数を減らすことができる。
- (2) 簡易検査のみでは証拠として不十分とされる危険性を、精密検査の結果によって払拭することが可能となり、十分な証拠能力を有する検査を行なうことができる。

従って、簡易検査は、後に精密検査を行なうことを考慮して、精密検査を行うに十分な量と質の検体または検体から抽出したDNAを保存できるような簡易検査でなくてはならない。

4. 2. 4 2検体の比較検査

2検体を電気泳動の分離で比較するときは、検体ごとに異なる蛍光色素を標識して、一緒に電気泳動させる。これは、検体を別々に電気泳動すると電気泳動の環境が毎回異なるため、誤差が生じることを防ぐためである。

4. 2. 5 基準値マーカーの扱い方

検体が多くて一緒に電気泳動できない様なときは、基準マーカー&サイズマーカーを用いてマーカーと一緒に検体と電気泳動させる。基準マーカー&サイズマーカーの測定値を基準として、検体の測定値を正規化し、比較する。このとき、電気泳動が異なると基準マーカーやサイズマーカーの測定値にも誤差が生じることを考慮する必要がある。

4. 3 検査機関の認定

検査機関の認定は、以下に示す検査方法に準じて作を実施できる機関を認定する方式とし、DNA鑑定の品質監査を定期的におこない品質を維持させることを目的とする。

- (1) 識別マーカーは学会で指定するものを使用すること。
- (2) 基準品種株は学会が指定したものを使用すること。
- (3) 測定は相対値方式でおこなうこと。
- (4) 自機関における実験用マニュアルの作成をおこない、当該マニュアルの更新経歴管理など品質を維持するためのシステムを向けていること。

- (5) マニュアルは学会で指定する目次に従って記載すること。
- (6) 実験マニュアルの妥当性として、一定量の品種識別を実施したデータを学会に提示すること。
- (7) 各実験過程において記録を取り、ドキュメント管理をおこなうこと。
- (8) 学会は、認定機関に対してのクレーム窓口を用意すること。

5. ライセンス規則と責任

5. 1 目的

DNA鑑定サービスをビジネス社会に組み入れるためには、トラブル発生時の対処ができるよう責任の所在や関連する知的財産などの権利を明確にしておかなくてはならない。そのためには、関係する機関との権利関係を明確にし、契約書を結んで鑑定サービスを実施しなくてはならない。

特許登録済のマーカ－：実施権のライセンス契約（ライセンス費）を結ぶ。

特許未登録のマーカ－：技術コンサル（技術指導費）という形で契約を結ぶ。

責任の所在や権利を明確にし、技術漏洩および無断使用の状況にならないようにする。特に営利企業へ技術供与する場合には特に注意する必要がある。

5. 2 権利内容

DNA鑑定の技術に関連して発生する権利には、識別をするための「識別マーカ－」と実験手法を記載した「検査マニュアル」の二種類の知的所有権があり、各々の権利は表1に表すように権利の種類が異なる。

識別マーカ－を権利化するためには特許を取得することによって権利を主張することができる。検査マニュアルについては刊行物と同様、著作物として権利化することができる。ただし、検査マニュアルに記載している内容を権利化するときは、新規性のある内容について特許を取得する必要がある。

表1 知的所有権

種類	知的所有権		実施権
識別マーカ－	特許権	発明者	出願人であるが、一般的に委託開発費で開発した場合は、全ての権利（研究成果）が委託開発の依頼元に所有する旨の契約条項が記載されている。
識別マニュアル	著作権	作成者	著作物であり、多方面へ配布するなどの場合には、作成者の了解が必要であるが、一般的に委託開発費で開発した場合は、委託契約書（または研究成果の納入）で依頼元に権利が帰属される。

5. 3 権利の帰属

権利の帰属先は開発の条件によって異なるが、一般的には図3に示すような構成に

なっている。権利は発明者が権利化し、出願人が実施権を持つために発明者との間で取り決めを交わす。例えば、特許ロイヤリティまたは製品化などで得た利益をどのように分配するかを決めておくなどの方法で、利益を発明者に還元するためである。

基本的には実施権は出願人に帰属するが、委託研究によって生まれた発明については、委託契約書で依頼元に帰属する契約となっていることが一般的である。ただし、国の委託研究などでは、依頼先が大学などの非営利団体のときは申請すれば依頼先へ帰属させることができる場合もある。そのため、権利を実施したい者は権利の帰属している機関を探して、そことライセンス契約を結ぶ必要がある。

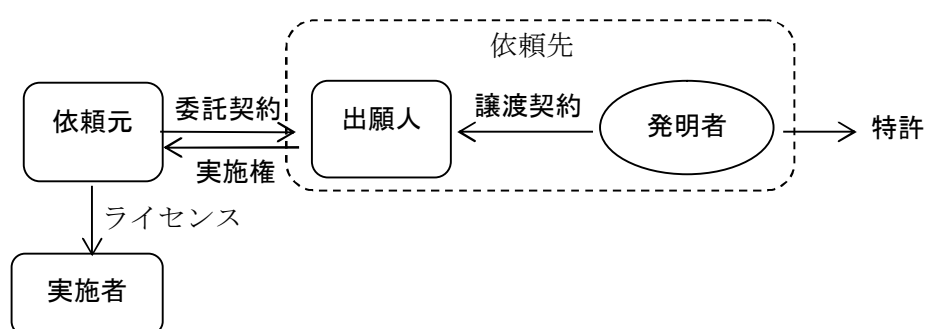


図3 権利関係

5. 4 実施時の責任関係

DNA鑑定の実施形態における責任の所在は、知的所有権を権利化した場合と権利化しなかった場合とで異なる。開発と権利関係を図4にDNA鑑定と責任の所在を表2に表して説明する。

5. 4. 1 開発と権利関係

DNA鑑定の開発に関係する機関としては下記の機関が存在し、その役割と権利関係を下記のように定義する。

開発依頼元：識別マーカーの開発を依頼する。

開発機関：開発依頼元から依頼された識別マーカーの開発をおこなう。

認証機関：開発された識別マーカーの妥当性として、基準株や品種識別の認証率などの評価をおこなう。

検査機関：開発された識別マーカーでDNA鑑定サービスをおこなう。

一般的に、識別マーカーの開発をおこなう場合、全ての権利が開発依頼元に所属するよう委託契約書に記載されているため、ライセンスの契約は開発依頼元と契約することになる。しかし、国の委託研究では、開発機関が大学などの非営利のときは、権利の譲渡を申請することにより、開発機関に帰属させることができる。このようなと

きのライセンス契約は開発機関と結ぶことになる。

そのため、企業がDNA鑑定サービスを実施するときは、権利の帰属先を明確にして、ライセンス契約を結ぶ必要がある。

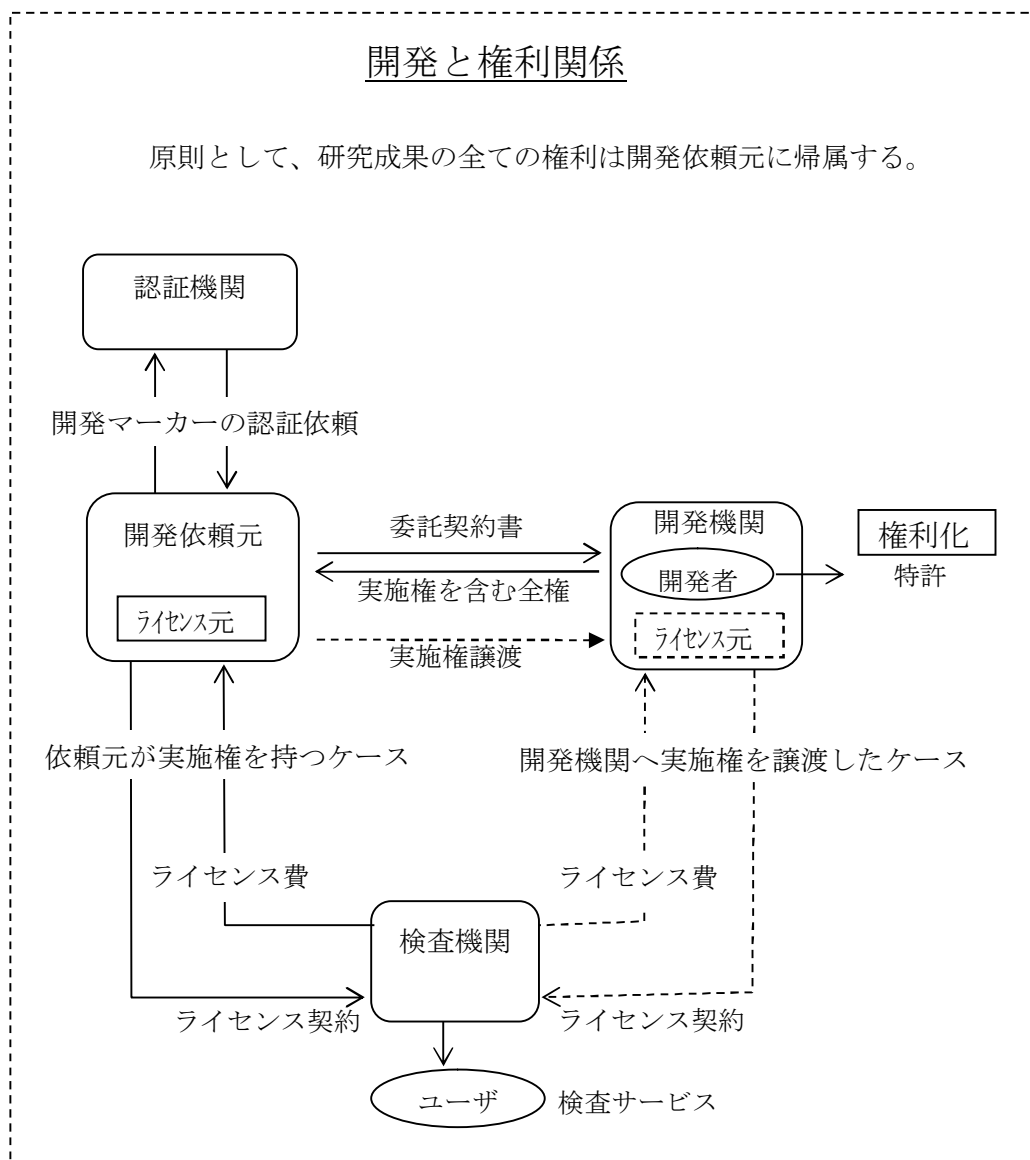


図4 権利化した場合

5. 4. 2 DNA鑑定と責任の所在

DNA鑑定における責任の所在として、ライセンス元、検査機関および認証機関の3機関が存在し、知的所有権を権利化した場合としなかった場合で責任の所在も異なる。

DNA鑑定結果で生じる問題としては以下の事象が予想され、そのときの責任の所在を表2に示す。

(1) 検査作業における瑕疵義務

検査時の作業ミスで結果が正確にでなかった。

検査機関の問題であり、権利関係の責任とは関係ない。

(2) 検査マニュアルの不備

検査マニュアル通りに実施したが検査結果が正確にでなかった。

一般的に検査機関では検査マニュアル採用時に不備を確認するため、通常では起こりえないが、起こった場合は契約条項に従う。

(3) 識別マーカの認証率

定義されている認識率の精度で識別できない。

認証における責任の所在は、権利化の形態に関係なく、妥当性評価を実施した場合、評価した認証機関の責任となる。妥当性評価を実施していない場合は、ライセンス契約の有無で異なり、契約しているときは、ライセンス元の責任となり、未契約のときは検査機関の責任となる。

表2 DNA鑑定と責任の所在

形態	ライセンス 契約		妥当性 の実施	検査結果の責任(検査の瑕疵は除く)		
				ライセンス元	検査機関	認証機関
知的所有権を権利化した場合	必要	有	実施			○
			未	○		
		無	実施			○
			未		○	
知的所有権を権利化しなかった場合	不要	有	実施			○
			未	○		
		無	実施			○
			未		○	

5. 5 ライセンス費

ライセンス契約を結んでDNA鑑定サービスを実施するときは、知的所有権者に対してロイヤリティの費用を支払う必要がある。一般的にロイヤリティの支払い方法には、「イニシャル費」、「ランニング費」および「イニシャル費+ランニング費」の3タイプがあり、契約時に明確にしておく必要がある。

イニシャル費： ライセンス費として、最初に一度だけロイヤリティ費を支払う。

ランニング費： 1回ごとの検査に対してロイヤリティを支払うもので、検査費用の%で支払う。

イニシャル費+ランニング費： 初期にロイヤリティを支払い、且つ、検査時にも1回ごとのロイヤリティを支払う。

6. DNA鑑定の品質確保

DNA鑑定の実施にあたってISOの取得、また、検査を実施する検査技術者の技術水準を維持するなど、品質を確保することが必要である。

6. 1 ISOの取得

DNA鑑定を実施する機関は、国際水準の品質保証を確保するため、ISOを取得することが望ましい。

ISO 9001：品質保証の認証

ISO 17025：検査所の認定

6. 2 技師の育成

DNA鑑定の検査を実施する技師の水準を確保するため、資格制度を設け、検査する技師の技術水準を基準化する。さらに、技術を維持するための仕掛けを設け、変化するDNA鑑定技術に対応できるようにする。

7. 品種識別マニュアルの書き方

【基本的な書き方】

- 1) 表現は大きいや暖かいなどの曖昧な表現ではなく、 $XXX \pm YY$ や $XX^{\circ}\text{C} \sim XX^{\circ}\text{C}$ の様に数値で表す。色が必要なときは、写真などで貼り付けることが望ましい。
- 2) マニュアル使用の対象者は、当該種を扱った経験の無い検査技師であることを前提に記載する。

【目次】

1. 適用範囲（具体的な適用の範囲や目的を述べる）

このマニュアルで検査できる対象範囲を記載する。

例：北海道立十勝農業試験場で保存している小豆が対象である。対象試料は粒であり、加工品は対象としていない。

2. 一般事項（識別に必要とされる一般的な規格、指針、ガイドなどがあれば記載する） 一般的に注意しておく事項について記載する。

例：

- ・ 本技術については、技術開発元の〇〇が特許出願中（出願番号 XXXX）であるため、業務利用については出願者の許諾が必要である。
- ・ 品種DNAと被検体DNAとの相対値での検査でおこなうこと。
- ・ JAS 分析試験ハンドブック 遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル 改訂第2版
（平成14年6月20日 （独）農林数遺産消費技術センター）を参照。

3. 測定の方法（測定の方法を簡潔に述べる。識別能力にも言及する）

DNAマーカー及び識別方法の原理について記載する。

例：

- ・ 〇〇を利用した品種特異的マーカーの測定法。××種類の品種識別が可能。
（以下、具体的な品種名を列挙）

4. 識別方法（具体的な識別方法名を記載する）

識別方法の手段について記載する。

例：

- ・ 本技術は、作物の進化過程において発生した、ゲノム上の品種特異的な short sequence repeat (SSR) マーカーの反復回数の違いを、SSRを含んだゲノム領域の増幅鎖長の違いにより識別する、SSR法である。

4. 1 方法の要旨

この方法を用いた趣旨を記載する。

例：

- ・ 近年増加しつつある海外からの〇〇の輸入に際し、国内生産者の育成者権保護のために、類似品種の識別の必要性が増大している。輸入品の場合、輸送・保存のための加工処理により DNA が断片化する場合が多い。SSR 法はゲノム DNA の非常に短い領域のみを検査対象とするため、断片化した DNA でも、高感度かつ高精度に品種識別が可能である。また、本法において利用する××種類の SSR マーカーは品種ごとの多型性が高く、多型間のマーカーサイズの違いも大きいいため、相互に明確な識別が可能である。

4. 2 検査試料

検査試料の種類および量や、入手先の選定理由について記載する。

例：

- ・ 〇〇の葉、子実、葉柄を検査試料対象とし、病害や虫害等の損傷のない健全な組織を用いる。1 サンプルは1 葉、1 子実、または1 本の葉柄（各××グラム程度）とし、複数の検査試料を複数回検査する。検査試料は、依頼元より提供された。基準とする〇〇は、△△研究所より、凍結葉を入手する。入手した検査試料は、-20℃以下に冷凍保存する。

4. 3 購入試薬

購入する試薬を記載する。

例：

- ・ エタノール（96-100%）（和光純薬、Cat No：057-00451）
- ・ マーカーA 特異的プライマーペア（受託会社に合成を発注）
A-F：GACTCGATAGTTACGATC
A-R：TCAGTTACGATCGAGCTA

4. 4 調製試薬

調整・保存方法を記載する。

例：

- ・ マーカー特異的プライマー
滅菌蒸留水を用いて各 10pmol/ μ l に調製。1.5ml チューブに 100 μ l ずつ分注し、-20℃以下で凍結保存。一度検査に用いたチューブに残った溶液は破棄。

4. 5 機器・プログラム

使用する機材を記載する。

例：

- ・ 粉砕器：本法では、水分含量の高い試料に適したものを用いる。分解洗浄、滅菌が出来るものが望ましい。△△は DNA を分解するため使用してはならない。
- ・ DNA 溶液濃縮装置：（品名）遠心濃縮機 （メーカー・型番）TOMY CC-105

4. 6 実験操作

色々な方式があると思われるが、下記の趣旨に従って記載すること。また、各工程において、実験時の注意事項を記載すること。（例えば、泡を取り除いてから処理するなど）

4. 6. 1 操作準備作業

基準を設けて実施する。

例：

- ・ 安全確保：検査者は、白衣、防護用眼鏡、ゴム手袋を着用する。
- ・ 実験準備：恒温槽を〇〇℃に調整しておく。

4. 6. 2 操作場所

実験する場所を記載する。

例：

- ・ 有機溶媒の分注操作はドラフト内で行う。
- ・ DNA 抽出と PCR 増幅反応は別室で行う。

4. 6. 3 試薬及び器具

使用する試薬や機器の種類を記載する。検査の各過程に必要なものをすべて列挙する。

例：

購入試薬

- ・ DNA 合成酵素 品名：KOD FX メーカー・型番：TOYOBO KFX-101

調整試薬

- ・ 電気泳動溶液
 - 1) 2000ml プラスチック体積計で超純水 1960ml を計量し、2000ml プラスチックびんに入れる。
 - 2) 50ml ピペットで 50X TAE 40ml を計量し、超純水に加える。
 - 3) 2000ml プラスチックびんの蓋をしっかりと閉め、20 回転倒混和し、電気泳動溶液とする。
(室温で 1 カ月保存可能)

4. 6. 4 試験材料の取り出し

マーカー開発に使用した株や自己検証に用いた株とその調達先を記載する。

4. 6. 5 DNAの抽出操作

操作手順を記載する。

「試料の 2～3 倍程度」、「〇〇の一部を別に取り」などの曖昧な表現を避け、「試料重量の 2.5 倍」、「〇〇の $\times \times \mu$ l を微量分注器で別の 1.5ml チューブに取り分け」など、全ての操作について、具体的な操作が迷いなくできる表現にする。

4. 6. 6 PCR増幅操作

DNAの増幅方法を記載する。(コントロールを入れて確認する)

コントロールは何をどれだけどのように用意するか、なども具体的に記載する。

4. 6. 7 DNAマーカーの検出方法について説明する。

電気泳動によるDNAの分離での検出や、塩基配列読み取りなどの方法の種類、コントロールには何をどれだけどのように用いるか、なども、数量的な表現で明確に記載する。

検出の有無を判断する場合には、たとえば、「〇〇機の $\times \times$ の条件における読み取り結果のピーク値が $\Delta \Delta$ 以上」など、その根拠を明確にする。

4. 6. 8 データ解析、判定

複数回の実験を実施してデータを解析する。

判定基準を明確に記載する。基準値との比較をする場合には、基準値の定義と不確かさおよび検査値とその不確かさを明確に記載する。基準値を複数設定する場合には、それらの利用法とその根拠を記載する。「実験によっては」のでは、正確な判定はできない。

複数の基準値を解析や判定に用いる場合には、その必要性の根拠、用い方などを具体的に明確に記載する。

4. 6. 9 実験操作フロー図

実験手順のジョブフローを記載する。

サンプルから DNA 抽出、識別用反応、識別操作、判定までの全体の流れを、方法の名称（PCR、DNA シーケンサーによる鎖長解析など）とともに 1 枚の図にする。上から下へ、矢印で各作業をつなぐ。

5、トラブルシューティング

実験時のトラブル対策についての Q & A を、上記本文中の記載に対応して記述する。

例：

- DNA 濃度が $○○\text{ng}/\mu\text{l}$ に満たない場合

エタノール沈殿で濃縮を行う。

具体的には、 $××\mu\text{l}$ の $\Delta\Delta$ を加え、・・・

(本文の手順中では「DNA 濃度が $○○\text{ng}/\mu\text{l}$ 以上であることを確認後」などと記載があり、脚注などで、「DNA 濃度が $○○\text{ng}/\mu\text{l}$ に満たない場合についてはトラブルシューティング参照のこと」と書いておくことが前提)

6、是正処置

是正依頼票など是正が必要と思われる事項についての情報収集をおこなう仕組みを記載する。

例：

- ・ 実験操作内容改善、プロトコールの不明箇所改善、手法改善等に役立てるため、マニュアル使用者に「問題票（別紙 001）」を配布し、記入してもらって回収する。記載された事項について、是正処置担当者は、原因を究明し、適切な是正処置を選択して、是正依頼票を作成する。文書発行責任者の承認後、是正依頼票をマニュアル作成者へ渡し、マニュアル作成者はマニュアルの是正を行う。マニュアル作成者が是正処置を行った場合、審査、承認を経て本プロトコールの「変更改訂履歴」へ内容を記載し、マニュアル使用者へ報告する。是正処置担当者は、是正されたマニュアルの使用者に聞き取りを行い、是正処置が効果的に行われて問題が解決されたかどうかを監視する。問題が解決されない場合は再度、是正処置を行う。

実験操作については操作の順番に従った操作フロー図（作業ブロック図）を付けることが推奨される。

付属文書：（本文規定以外に参考になる文書や文献があればそれらを付属文書として番号をつけて記述する。）

参考文献：（本文での引用文献名、参考文献名とそれらの引用番号を本文に1）、2）のようにつけてその文献名称を順番にリストアップする）

添付資料 2

SSR マーカーによる
長野県育成りんご品種の
DNA 品種識別マニュアル

**SSR マーカーによる長野県育成りんご品種の
DNA 品種識別マニュアル**

長野県農業試験場 知的財産管理部

Ver.1.1
2018/12/28

SSR マーカーによる長野県育成りんご品種の DNA 品種識別マニュアル

目次

- 0. はじめに
- 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 操作準備作業
 - 4. 5. 2 操作場所
 - 4. 5. 3 試薬および器具
 - 4. 5. 4 試験材料の取り出し
 - 4. 5. 5 DNA 抽出操作
 - 4. 5. 6 DNA の定量
 - 4. 5. 7 PCR 増幅操作
 - 4. 5. 8 PCR 増幅産物の増幅確認試験
 - 4. 5. 9 SSR マーカーの検出方法
 - 4. 5. 10 データ解析
 - 4. 5. 11 解析結果に基づく品種判定
 - 4. 5. 12 実験操作フロー図
- 5. トラブルシューティング
- 6. 是正処置

付属文書：

1. 14 種類の SSR マーカーによる長野県職務育成りんご品種の品種識別の詳細

2. 供試品種の特徴

＊この目次リストは DNA 鑑定学会の様式に準拠したものです。

0. はじめに

果樹品種は一般的に穂木による増殖が容易であり、農林水産省に品種登録されているものであっても国内外の第三者による不法な増殖や流出といった危険性がある。このような現状から、侵害が疑われた案件を速やかに立証し、県オリジナル品種の権利を保護するため、DNA マーカーを用いた品種識別の対策が急務と考えられる。

そこで、本場では県オリジナル品種の育成者権を保護することを目的として、平成 14 年より既に論文等で報告されているりんご品種識別用 SSR マーカーのうち、品種識別に適用可能な SSR マーカーを選抜し、県オリジナルりんご品種の品種識別技術の開発を進めてきた。

最終的に 14 種類の SSR マーカーを選抜し、全ての遺伝子型の一致を確認することで識別を行う技術を開発した。これらの手法をまとめ、本マニュアルを作成する。

<参考文献>

1) Guilford, P., S. Prakash, J. M. Zhu, E. Rikkerink, S. Gardiner, H. Bassett and R. Forster (1997) Microsatellites in *Malus X domestica* (apple): abundance, polymorphism and cultivar identification. *Theor Appl Genet* 94: 249-254

2) Moriya, S., H. Iwanami, K. Okada, T. Yamamoto and K. Abe (2011) A practical method for apple cultivar identification and parent-offspring analysis using simple repeat markers. *Euphytica* 177:135-150

1. 適用範囲

識別可能な品種：長野県職務育成品種 4 品種を含むりんご 12 品種

(付属文書 2. 供試品種の特徴を参照)

被検査物：葉片（果実組織及び加工品は対象としていない）

2. 一般事項

① 本マニュアルの基本方針は次の資料に準拠している。

- ・ DNA 品種識別技術討論会（2003）植物の DNA 品種識別についての基本的留意事項

ー技術開発と利用のガイドラインー

http://www.hinshu2.maff.go.jp/pvr/dna_manual/guideline.pdf

- ・（別添資料）植物品種識別における品種同定理論

http://www.hinshu2.maff.go.jp/pvr/dna_manual/betten.pdf

- ・ 独立行政法人種苗管理センター（2008）DNA 品種識別技術の妥当性確認のためのガイドラインーSSR を中心としてー

http://www.hinshu2.maff.go.jp/pvr/dna_meeting/H20_2nd/guideline.pdf#search=%27%E7%8B%AC%E7%AB%8B%E8%A1%8C%E6%94%BF%E6%B3%95%E4%BA%BA%E7%A8%AE%E8%8B%97%E7%AE%A1%E7%90%86%E3%82%BB%E3%83%B3%E3%82%BF%E3%83%BC%EF%BC%882008%EF%BC%89DNA+%E5%93%81%E7%A8%AE%E8%AD%98%E5%88%A5%E6%8A%80%E8%A1%93%E3%81%AE%E5%A6%A5%E5%BD%93%E6%80%A7%E7%A2%BA%E8%AA%8D%E3%81%AE%E3%81%9F%E3%82%81%E3%81%AE%E3%82%AC%E3%82%A4%E3%83%89%E3%83%A9%E3%82%A4%E3%83%B3%EF%BC%8DSSR+%E3%82%92%E4%B8%AD%E5%BF%83%E3%81%A8%E3%81%97%E3%81%A6%EF%BC%8D%27

- ・ DNA 鑑定学会（2013）添付資料 1 DNA 鑑定提供までのジョブフローと規則

http://www.maff.go.jp/j/kanbo/tizai/brand/b_syokubut/attach/pdf/index-2.pdf#search=%27DNA%E9%91%91%E5%AE%9A%E6%8F%90%E4%BE%9B%E3%81%BE%E3%81%A7%E3%81%AE%E3%82%B8%E3%83%A7%E3%83%96%E3%83%95%E3%83%AD%E3%83%BC%E3%81%A8%E8%A6%8F%E5%89%87%27

② 本マニュアルは、長野県果樹試験場（長野県須坂市大字小河原 492）に植栽されている既存栽培品種の 12 品種（各品種の詳細は付属文書 2 を参照）を用いて、解析・作成されたものである。

これら 12 品種は、本マニュアルに記載されている 14 種類の SSR マーカーによって全て識別可能である。

3. 測定の方法

SSR とは、Simple Sequence Repeat の略称であり、Short Tandem Repeat（略称 STR）とも呼ばれている。SSR 法は、数塩基単位の反復配列からなる SSR 領域を特異的に増幅するプライマー対を設計し、PCR 反応により SSR 領域の DNA 断片を得て、その断片長をシーケンサーによるフラグメント解析等で調べることによって、個体間の DNA 断片長の差異（遺伝子型）を検出する方法である。

SSR 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、ゲノム中に多数存在することが明らかになっている。また、共優性で多型性に富み、再現性も高いことから、SSR 法は近縁な品種間においても遺伝子型の多型が検出しやすく、複数領域の解析により品種識別や親子鑑定を高精度で行うことができる。特に栄養繁殖性作物である果樹類の品種識別においては、この方法がスタンダードとなっている。

その一般的手順を以下に記す。

- ①調査対象及び基準品種の試料から、DNA 抽出キット等を用いてゲノム DNA を抽出する。
- ②SSR 領域を特異的に増幅するプライマーを用いて、①で得たゲノム DNA を鋳型にして PCR 反応による SSR 領域の増幅を行う。このとき、一方のプライマーの 5' 末端に蛍光色素を標識したものをを用いる。
- ③DNA シーケンサーを用いたフラグメント解析により、PCR 増幅産物の DNA 断片長を解析する。
- ④フラグメント解析用ソフトウェアを用いて、フラグメント長の実測値に基づき遺伝子型を決定する。
- ⑤調査対象と基準品種の遺伝子型を照合し、複数の SSR 領域で遺伝子型の一致を確認して調査対象試料が基準品種と同一品種であるか否かを判定する。

4. 識別方法

DNA マーカーの一種である SSR マーカーを 14 種類用いた識別方法である。

4. 1. 方法の要旨

りんごの品種を識別する方法として、基本的には樹体や果実、花器等の他品種と区別可能な栽培・生態的特性の比較が用いられてきた。しかし、栽培

地の環境要因に影響を受けるだけでなく、識別に多くの時間と労力がかかるため、速やかな対処が求められる権利侵害時における侵害立証目的の活用には問題があった。

近年では結果が客観的で安定性が高く、試料の採取時期や部位を問わずに速やかに品種識別可能な方法として DNA マーカーの活用が期待されており、多くの果樹品目で識別技術の開発が進められている。中でも、本マニュアルで採用している SSR 法は、共優性で多型性に富み、再現性も高いことから、果樹においてスタンダードな DNA による品種識別の手法として利用されている。

SSR マーカーによる DNA 断片の増幅を確認するだけならば、アガロースゲル電気泳動を行って PCR 増幅産物の有無を確認すればよいが、2～4 塩基対の違いを区別する精度の高い解析はこの方法では困難である。そのため、本マニュアルでは、ゲル電気泳動の工程は SSR 領域の PCR 増幅を確認することに留め、増幅された DNA 断片長を高い精度で解析できる DNA シーケンサーによるフラグメント解析により識別するものとする。

本マニュアルで利用する 14 種類の SSR マーカーは、国内外で論文等によりプライマー配列が公表されているものについて予備的な識別試験を行って実用的な品種識別が可能なものを選抜したものである。「表 1. 14SSR マーカーの詳細情報」と「付属文書 1. 長野県職務育成品種の識別に用いる 14 種類の SSR マーカーの詳細」にデータを記している。

表 1 14SSRマーカーの詳細情報

マーカー名 ^Z	プライマー配列 (5' → 3') ^Y		染色体 ^V
	Forward ^W	Reverse ^V	
CH02b12	Beckman Dye4 -GGCAGGCTTTACGATTATGC	gtttcttCCCCTAAAAGTTCACAGGC	5
CH01e01	Beckman Dye3 -GGTTGGAGGGACCAATCATT	gtttcttCCCCTCTCTGTGCCAGATC	14
CH02b03b	Beckman Dye2 -ATAAGGATACAAAAACCTACACAG	gtttGACATGTTTGGTTGAAAACTTG	10
CH02b10	Beckman Dye4 -CAAGGAAATCATCAAAGATTCAAG	gtttcttCAAGTGGCTTCGGATAGTTG	2
CH02d11	Beckman Dye3 -AGCGTCCAGAGCAACAGC	gtttAACAAAAGCAGATCCGTTGC	15
CH02f06	Beckman Dye2 -CCCTCTCAGACCTGCATATG	gtttcttACTGTTTCCAAGCGATCAGG	2
CH01d08	Beckman Dye4 -CTCCGCCGTATAACACTTC	gtttTACTCTGGAGGGTATGTCAAAG	15
CH02b07	Beckman Dye3 -CCAGACAAGTCATCACAACACTC	gtttcttATGTCGATGTCGCTCTGTTG	10
CH02g09	Beckman Dye2 -TCAGACAGAAGAGGAAGTGTATTG	gtttCAAACAAACAGTACCGCAA	8
CH02h11a	Beckman Dye4 -CGTGGCATGCCTATCATTTG	gtttcttCTGTTTGAACCGCTTCCTTC	4
CH04d02	Beckman Dye2 -CGTACGCTGCTTCTTTTGCT	gtttcttCTATCCACCACCCGTCAACT	12
CH05c07	Beckman Dye4 -TGATGCATTAGGGCTTGACTT	gtttcttGGGATGCATTGCTAAATAGGAT	9
CH05g03	Beckman Dye3 -GCTTTGAATGGATACAGGAACC	gtttcttCCTGTCTCATGGCATTGTTG	17
CH04d10	Beckman Dye2 -GAGGGATCTGTAGCTCCGAC	gtttcttTGGTGAGTATCTGCTCGCTG	11

Z: マーカーは、Moriya et al. (2011) Euphytica 177:135-150 をもとに選出した。

Y: 各マーカーのプライマー配列、およびマーカーが座乗する染色体番号については、Liebhard et al. (2002) Molecular Breeding 10:217-241 による。

W: ボールドイタリック体は蛍光色素 (Beckman Dye2[黒]、Beckman Dye3[緑]、Beckman Dye4[青])を示し、Forwardプライマーの5' 末端に修飾した。

V: 全てのマーカーのReverseプライマーに波形を安定させるためのPIG-tailing配列 (gtttまたはgtttctt) を付加した。

4. 2 検査試料

本マニュアルの検査試料としては、DNA 抽出量の多い生育期の新梢の先端より採取した展開前～展開直後の若葉を用いることが望ましい。なお、若葉の採取が困難な場合は、成葉を用いても分析に必要な量の DNA を抽出できる。

リンゴ果実の果皮、果柄及び新梢の樹皮、休眠芽から抽出した DNA から品種識別も可能であるが、DNA 抽出及び解析方法は若葉を試料とした手法と同様のため、このマニュアルでは記載を省略した。

4. 3 購入試薬

<一般試薬>

- ・ 99.5%エタノール（消毒用エタノール）（米山薬品工業株式会社）

<DNA 抽出関係>

- ・ 液体窒素
- ・ DNA 抽出キット（DNeasy Plant Mini Kit）（Qiagen 社）
- ・ エタノール（99.5%）（米山薬品工業株式会社）

<PCR 関係>

- ・ SSR プライマーセット

表 1 に記した 14 種類の SSR マーカーを増幅するプライマーセットを使用する。当场では Beckman Coulter 社のシーケンサー（Ge-XP、本体は CEQ-8800 同等品）を使用しているため、フォワードプライマーの 5'末端に Beckman Dye を修飾する。この合成には、シグマアルドリッジジャパン社または、IDT（Integrated DNA Technologies）株式会社の受託合成サービスを利用する。

シグマアルドリッジジャパン社（現在メルク社の傘下）へ合成を依頼する場合は、2018 年 10 月から合成依頼に関する web ページが更新されたため、下記の手順により依頼する。

- ① メルク社のホームページにアクセスし、

<https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/custom-dna-oligos-modifications.html>

- ② 登録してログイン。

<https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/custom-dna-oligos-wellred-primers.html>

- ③ 表 1 を参照して、WellRED Primers[®]のオーダーシートにより合成を依頼する。

<https://www.sigmaaldrich.com/pc/ui/tube-home?product=wellred>

※WellRED は Beckman Dye と同じもの。web ページの更新により、下記のように呼称が変わった。

Beckman Dye2 = WellRED (D2) -PA

Beckman Dye3 = WellRED (D3) -PA

Beckman Dye4 = WellRED (D4) -PA

一方、リバープライマーの合成には蛍光色素を修飾しない。ただし、1bp 違いの隣接した 2 本のピークが観測されるスプリットピーク (split peak) やスタッターによる偽のピークの発生を抑制するため、各リバープライマーの 5' 末端に GTTT または GTTTCTT 配列 (PIG-tail 配列) を付加する。リバープライマーは非蛍光プライマーのため、受託合成先は限定されない。当場ではつくばオリゴサービスに合成**を依頼している。精製グレードは脱塩でよい。

**<http://www.tos-bio.com/oligo.htm>

合成依頼先より届いた蛍光及び非蛍光プライマーは、添付されている合成 DNA データシートに示された DNA 収量に応じて TE バッファーで 100 μ M 濃度になるように希釈する。凍結・融解によるプライマーの劣化が全体に及ばないようにするため、マスター溶液は、50~100 μ l に小分けして -20 $^{\circ}$ C で冷凍保存し、順次使用する。同時に、TE バッファーでマスター溶液を 20 倍希釈したディリュション溶液を直近の分析に必要な 50 μ l 程度の量を作成し、-20 $^{\circ}$ C で冷凍保存する。

- ・滅菌蒸留水 (DDW) : Millipore のボトル詰めの分子生物学用水を使用
- ・TE Buffer : 市販の TE バッファー (Promega V6231) を使用。
- ・DNA Polymerase : AmpliTaq Gold DNA Polymerase (Thermo Fisher 社)、または Taq DNA Polymerase with Standard Taq Buffer (New England Biolabs 社) のいずれかを 1 試料当たり 0.25U の濃度で使用。
- ・PCR Buffer、dNTPs : 酵素に添付のものを付属のプロトコル濃度 (PCR バッファー : 10 倍、dNTPs : 200 μ M each) で使用。

<電気泳動関係>

- ・ゲルローディングバッファー (株式会社ニッポンジーン)
- ・DNA マーカー (100bp DNA Ladder) (日本ジェネティクス社)
- ・TAE バッファー (TAE 50x) (株式会社ニッポンジーン)

- ・アガロース（アガロース S）（株式会社ニッポンジーン）
 - ・GelRed™ 核酸ゲル染色液（×10000 水溶液で後染め染色）（Biotium, Inc.）
- ※電気泳動関係の試薬類は、上記のものと同等の性能を有するものであれば代替品として使用が可能である。

＜フラグメント解析関係＞

- ・SLS（Sample Loading Solution）（AB Sciex 608082）
- ・DNA サイズスタンダード 400（AB Sciex 608098）
- ・ミネラルオイル（サイズスタンダード 400 に付属）
- ・セパレーションバッファー（AB Sciex 608012）
- ・セパレーションゲル（AB Sciex 391438）

4. 4 機器・プログラム

- ・フリーザー（-20℃以下）
- ・冷蔵庫
- ・ボルテックスミキサー
- ・スピンドウン用卓上遠心機
- ・プレート遠心機
- ・高速冷却遠心機（1.5–2.0 ml チューブが利用可能なもの）
- ・クールブロックバス
- ・核酸定量装置（ThermoFisher Scientific 社、Qubit 3.0 Fluorometer）
- ・PCR サーマルサイクラー（MJ Research 社、PTC-100）
- ・電気泳動装置（Mupid 社、Mupid-2X）
- ・紫外線照射装置、ゲル撮影装置
- ・電子天秤
- ・オートクレーブ
- ・純水製造装置
- ・乾熱滅菌機
- ・ガスバーナーまたはガス焔炉
- ・シークエンサー（Beckman Coulter 社 Ge-XP、本体は CEQ-8800 Genetic Analysis System と同等品）
- ・DNA Separation Capillary Array 33-75B（Eight capillaries, 75 µm i.d., 33 cm long）
- ・解析用ソフトウェア（CEQ8800 解析ソフト）

4. 5 実験操作

4. 5. 1 操作準備作業

DNA 実験操作は、実験開始前に実験台上を 70%エタノールを噴霧して消毒する。実験操作時は、白衣、ゴム手袋、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、ゴム手袋は各操作項目に示したタイミングでこまめに交換する。

4. 5. 2 操作場所

DNA 抽出から PCR 増幅、DNA シークエンサー分析まで、供試試料以外の DNA が混入しないクリーンな環境で操作する。

4. 5. 3 試薬及び器具

- ・滅菌蒸留水 (DDW) : Millipore のボトル詰めの分子生物学用水
- ・氷
- ・ラップ
- ・アルミホイル (オートクレーブ滅菌済)
- ・メス : 試料数分
- ・ピンセット
- ・1.5 ml エッペンドルフチューブ (Bio-BiK 社) (乾熱滅菌済) : 1 試料あたり 3 本
- ・500 μ l チューブ
- ・1.5ml チューブ用ラック 2 個
- ・乳鉢、乳棒 (オートクレーブ滅菌済) : 試料数分
- ・薬匙 (オートクレーブ滅菌済) : 試料数分
- ・マイクロピペット各種容量
- ・フィルター付きマイクロピペット用チップ (Bio-BiK 社) (乾熱滅菌済)
- ・96 穴 PCR プレート (Bio-BiK 社) または 200 μ l チューブ
- ・96 穴用シリコンラバーマット
- ・液体窒素容器 10L
- ・キムタオルまたは、キッチンペーパー
- ・アルミブロック
- ・発泡スチロール容器
- ・マーカーペン

・廃液用ビーカー

※滅菌蒸留水は、PCR 反応液の希釈等へ用いる量が少量のため、市販の分子生物学用水（Water for Molecular Biology , Millpore など）を購入して使用。

※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。

※チップは滅菌済みのもの、チューブ類はオートクレーブ滅菌（121℃、20 分間）済みのものを用い、必ず使い捨てとすること。

4. 5. 4 試験材料の取り出し

試料の取り出し・取り扱い時には、試料毎に 70%エタノールを作業台に噴射してキムタオルまたはキッチンペーパーでの拭き取りや電子天秤等の清掃を十分に行う。着用するゴム手袋は試料毎に交換する必要は無いが、ゴム手袋着用のまま手洗いしてゴム手袋の洗浄を十分に行った後、70%エタノールを噴射し、キムタオルまたはキッチンペーパーで水分を拭ってから次の試料に移るなど、試料間のコンタミネーションに細心の注意をはらいながら操作する。試料を切除するメス、試料を載せたり、包むアルミホイル片は使用前にオートクレーブ滅菌（121℃、20 分間）し、試料毎に交換する。試料を掴むピンセットは試料毎にガスバーナーまたはガス焔炉で火炎消毒を行う。

若い葉片を検査試料対象とする場合、枝先端の展開直後の汚れていない葉片を 1 枚をポリ袋またはエッペンドルフチューブに入れて採取し、実験室に搬入後、速やかに試料の調整、秤量を行う。

なお、晩秋の褐変・落葉する前までの成葉 0.1g から、解析に十分な量（200 分析程度）DNA を抽出することが可能であるが、同じ抽出操作で成葉の 4～10 倍の DNA 収量がある若葉を試料として用いた方が効率的である。

※採取当日に調整、秤量できない場合は、試料を-20℃冷凍保存する。

※冷凍保存したりんごの葉片を供試する場合、解凍すると褐変が急速に進むので、室温に移した後の調整・破碎作業は速やかに進める。

以下の手順に従って試料を取り出す。

① 滅菌したアルミホイルの上でメスとピンセットを用いて若い葉片の葉柄と主脈を除き、葉身を 10mm 角程の大きさに切り分ける。

※試料の不用意な混入を防ぐため、メスの刃は試料毎に新しい替刃にする。

② 電子天秤で生重 0.1g を秤量し、採取日と試料名を記した滅菌アルミホイルに

包む。

- ③ DNA 抽出時まで-20℃以下のフリーザーで凍結保存する。
- ④ 試料リストを作成する。

4. 5. 5 DNA 抽出操作

様々な DNA 抽出キットが市販されているが、ここでは DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen 社) を抽出に用いた場合について説明する。基本操作はこの添付プロトコルに従っている。コンタミ防止のため、マスク及びゴム手袋を着用して各操作を行うこと。以下に手順を示す。

- ① ⑥で使うクールブロックバスのスイッチを入れ、65℃に設定して暖めておく。⑦で使う氷と水を入れた発泡スチロール容器にアルミブロックを置いて冷やしておく。
- ② 乾熱滅菌済の 1.5ml チューブに試料リストを参照して番号または試料名称をマーカーペンで記入する。これを 1 試料あたり 3 本用意する。
- ③ オートクレーブ滅菌済の乳鉢、乳棒、薬匙、乾熱滅菌の 1.5ml チューブのセットを試料点数分用意し、試料毎に交換する。実験台にキムタオルまたはキッチンペーパーを敷いてその上に 1 セット置く。
- ④ 4. 5. 4 で準備した調整済の試料を、乳鉢へ入れて液体窒素を注ぎ、乳棒で粉末にすり潰す。
- ⑤ 薬匙で粉碎粉末をかき集めて、1 試料あたり予め Buffer AP1 を 400 μ l と RNase A (100mg/ml) を 4 μ l 入れて室温に置いた 1.5ml チューブへ移す。
※1.5ml チューブは、チューブの蓋をして 2~3 回転倒混和する。
※②で用意した 3 本のチューブのうちの 1 本目を用いる。
- ⑥ チューブに入れた混合液を①の予め 65℃に設定したクールブロックバスで 10 分間インキュベートする。
※インキュベーション中にチューブを 3~4 分毎に 2~3 回転倒混和する。
※転倒混和しても試料がチューブの底に沈殿したままで混合できない状態ならば、ボルテックスにより混合する。
- ⑦ 130 μ l の Buffer P3 を加え、蓋をして 2~3 回転倒混和し、①で用意したラックにチューブを移して 5 分間氷温でインキュベートする。
- ⑧ 14,000 rpm で 5 分間、室温で遠心操作し、上清に透明な細胞溶解液を得る。
- ⑨ QIAshredder Mini スピンカラム<紫色>へ、上清の透明な細胞溶解液をピペティングによりロードし、14,000 rpm で 2 分間室温で遠心操作を行う。夾雑物の沈殿のみ残った 1.5ml チューブは捨てる。

※約 400 μ l の上清がロードできる。

※沈殿した夾雑物をできるだけ吸い込まないようにロードする。

- ⑩ QIAshredder Mini スピんカラム<紫色>を通過した濾液を新しい 1.5ml チューブ (②で用意した 3 本のチューブのうちの 2 本目) にピペットで移す。

※ピペッティングの際に濾液の底に薄く張り付いた細胞破片が剥がれて濾液に混じらないようにする。

- ⑪ 濾液に 1.5 倍容量の Buffer AW1 を添加する (濾液が 400 μ l 回収できた場合、600 μ l の Buffer AW1 を添加する)。

※ピペットで 2~3 回ゆっくりとポンピングして、穏やかに混和する。

- ⑫ DNeasy Mini スピんカラム<無色>に⑪の混合液を 2 回に分けてマイクロピペットでロードする。

※DNeasy Mini スピんカラム<無色>に約 600 μ l の混合液が一度に入りきれないため、1 回目に 400 μ l、2 回目に残り全部をロードする。

- ⑬ 8,000 rpm 以上で 1 分間、室温で遠心操作する。スピんカラムよりコレクションチューブを外し、底に溜まった濾液を廃液用ビーカーに捨てる (1 回目)。

このコレクションチューブは⑫のスピんカラムを差し込んで再利用する。

※この操作によりスピんカラムのメンブレンに DNA が吸着される。

※濾液を捨てた後にコレクションチューブの底に残った濾液は、実験台に敷いたキッチンペーパーに開口部を下にして 5 回ほど押し付けて拭うことにより完全に排出する。試料毎にキッチンペーパーの新しい部分を使う。

- ⑭ ⑫で残った混合液を DNeasy Plant スピんカラムにマイクロピペットでロードする (2 回目)。

- ⑮ 8,000 rpm 以上で 1 分間、室温で遠心操作し、コレクションチューブを外して濾液ごと捨てる。

- ⑯ DNeasy Mini スピんカラムを新しい 2 ml コレクションチューブ (キット付属) に差し込む。

- ⑰ DNeasy Mini スピんカラムに Buffer AW2 を 500 μ l を加え、8,000 rpm で 1 分間、室温で遠心操作し、コレクションチューブに溜まった濾液を廃液用ビーカーに捨てる (1 回目)。このコレクションチューブは再使用する。

※DNeasy Mini スピんカラムのメンブレンに吸着された DNA の洗浄が行われる。この操作は 2 回行う。

※⑬と同様にキッチンペーパーにコレクションチューブの開口部を押し付けて拭い、濾液が底に残らないようにする。

- ⑱ 再度、DNeasy Mini スピんカラムに Buffer AW2 を 500 μ l (2 回目) を加

え、8,000 rpm で 1 分間、室温で遠心操作し、濾液を捨てる。

コレクションチューブは再使用する。

※⑬と同様にキッチンペーパーにコレクションチューブの開口部を押し付けて拭い、濾液が底に残らないようにする。

- ⑲ 14,000 rpm で 2 分間、室温で遠心操作してメンブレンを乾燥させる。コレクションチューブを外して濾液ごと捨てる。

- ⑳ DNeasy Mini スピнкаラムを②で用意した 3 本の 1.5 ml チューブのうちの 3 本目に差し込み、Buffer AE を 100 μ l、DNeasy Mini スピнкаラムのメンブレン上に直接ピペットで添加して静置し、室温（15～25℃）で 5 分間インキュベートする。

※DNeasy Mini スピнкаラムのメンブレンに吸着された DNA の溶出が行われる。この操作は 2 回行う。

- ㉑ 8,000 rpm 以上で 1 分間、室温で遠心操作し、濾液（溶出した DNA）を 1.5 ml チューブに回収する。

※濃い濃度の DNA を得たい場合は、ここで終了し、100 μ l の抽出液を得る。

- ㉒ ㉑～㉑の操作をもう一度繰り返す。

（DNeasy Mini スピнкаラムのメンブレン上に Buffer AE を 100 μ l 添加して静置し、室温（15～25℃）で 5 分間インキュベートした後、8,000 rpm 以上で 1 分間、室温で遠心操作し、濾液を 1.5 ml チューブに回収する。）

- ㉓ 合計 200 μ l の DNA 抽出液が得られる。チューブに蓋をして、DNeasy Mini スピнкаラムを捨てる。

- ㉔ 1 週間以内に使用する場合は、4℃で冷蔵保存、長期保存する場合には-20℃で冷凍保存する。

4. 5. 6 DNA の定量

4. 5. 7 の PCR 反応を同一のプロトコルで行うためには、全ての試料をその PCR 反応に最適な DNA 濃度に揃える必要がある。

そのためには 4. 5. 5 で抽出した DNA の定量を行い、その数値を基にして PCR 反応に最適な DNA 濃度（1～2.5ng/ μ l）に揃えるための希釈倍率を算出し、単位量（40 μ l）の抽出 DNA 原液を 1.5ml チューブに採って希釈倍率に応じた量の TE バッファーを加えて濃度を揃える。

DNA の定量方法には、(1)濃度が既知の DNA と同時に DNA 試料のアガロース電気泳動を行い、蛍光の強さを比較することによって、DNA 試料のおよその濃度を把握する方法、(2)分光光度計による分析、(3)核酸用の濃度測定器

(NanoDrop、Qubit など) がある。

本マニュアルでは、(3)の核酸用の濃度測定器 Qubit 3.0 フルオロメーター (Thermo Fisher) による定量方法について機器付属のプロトコルに準じて述べる。

- ① DNA 標準液を入れる 0.5ml チューブを 2 本及び、試料毎に 1 本ずつの 0.5ml チューブを準備する。
- ② まず、反応溶液を調整する。Qubit reagent と Qubit dsDNA HS Buffer を 1:200 になるように、1.5ml チューブに必要量分 $\{(標準液\ 2\ 本 + 試料数 + 1) \times 200\mu l\}$ 混合して作成する。
- ③ 次に標準液を作成する。付属の DNA 濃度 $1ng/\mu l$ 標準液及び DNA を含まない標準液より各 $1\mu l$ を、②で作成の 0.5ml チューブに入れた反応溶液 $199\mu l$ に混合し、2～3 秒間ボルテックスを行う。
- ④ 抽出した各 DNA 溶液原液各 $5\mu l$ を②で作成した反応溶液 $195\mu l$ に混合し、2～3 秒間ボルテックスを行う。
- ⑤ 標準溶液及び試料の入った 0.5ml チューブをラックに入れて静置し、室温で 2 分間インキュベーションする。
- ⑥ Qubit 3.0 フルオロメーターの電源を入れるとホーム画面が表示されるので、その中の「Choose an assay」で「dsDNA」を画面にタッチして選択する。次の画面で「dsDNA:High sensitivity」と「dsDNA:Broad range」の 2 種類が選択できるが、「dsDNA:High sensitivity」の方を選択する。
- ⑦ 次の画面で「run samples」が表示されるので選択し、標準溶液 2 本のチューブを表示画面の指示に従って Qubit 3.0 フルオロメーターのサンプルチャンバーにセットして測定すると、検量線が作成される。
- ⑧ 画面下の「Run samples」をタッチすると、「Sample volume screen」が表示されるので、④で用いた DNA 溶液原液の量（ここでは $5\mu l$ ）を入力し、画面下の「Read tube」をタッチして試料の濃度測定を開始する。
- ⑨ 各試料を入れた $0.5\mu l$ チューブを Qubit 3.0 フルオロメーターのサンプルチャンバーにセットして測定する。各試料毎にこの操作を繰り返し、DNA 濃度を記録する。
- ⑩ DNA 抽出原液より抽出した DNA のうち、当面の分析に用いる量 ($40\mu l$) を別の 1.5ml チューブに移し、DNA 濃度測定値を基にして、 $2.5ng/\mu l$ 濃度に希釈するために加える TE バッファーの量を試料別に算出し、希釈する。 $2.5ng/\mu l$ 濃度の DNA が用意できた場合は、「4. 5. 7 PCR 増幅操作」に進む。

抽出した DNA 濃度が 2.5ng/μl 濃度を下回る場合、1～2.5ng/μl 濃度ならば TE による希釈を行わないで抽出した原液をそのまま PCR 増幅操作に用いる。濃度が 1 ng/μl に満たない場合は、エタノール沈殿を行って抽出原液を濃縮して 1 ng/μl 以上の濃度を確保するか、葉片試料から DNA 抽出をやり直す。

4. 5. 7 PCR 増幅操作

PCR 実験では、微量の鋳型 DNA であっても増幅されてしまうので、目的以外の DNA の混入を防ぐとともに、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。コンタミネーション防止のため、実験の際は白衣、帽子、マスク、新しい手袋を必ず着用する。また、PCR 反応液の調製はすべて氷上で行う。

①保冷の準備

発泡スチロールのケースにアルミブロックを置き、空隙に保冷剤と氷を詰め、アルミブロックの上面から 5mm 程度下の高さまで水を浸す。(できれば、確実に温度を下げるため、発泡スチロールのケースに蓋をしてしばらく放置する)。水やアルミブロックは、実験時に速やかに温度を下げるため、予め冷蔵庫で保冷しておく。

※常温操作も可能だが、プライマーダイマーの発生や非特異的な増幅を抑えるため、氷温操作を徹底する。

②PCR 用プロトコルペーパーの作成

PCR に使う試薬の量を作業中確認するためや、後々どのような PCR を行ったかを振り返れるようにしておくために、PCR のプロトコルを記した紙を準備しておく。内容はプレートまたはチューブへの試料配置図、プレミックスのプロトコル、サーマルサイクラーのプログラムから成り、実験の度に雛形を修正、追記して用いる。

プレミックス用の試薬の量は余目を考慮して試料数+1 (例えば 9 試料であれば 10 試料分の試薬量) で設計する。

③プレートまたはチューブの準備

PCR を行う試料数に応じて、容器を選ぶ。

試料数	1～6 程度	200μl チューブ
-----	--------	------------

- 〃 6～48 程度 96 穴 PCR プレートのカットして使用
- 〃 48～96 96 穴 PCR プレートをそのまま使用
- ※他に 8 連チューブの利用も有効

④ PCR 反応液の調整と分注

- ・ マスター液を作成するための 500 μ l チューブを用意する。マスター液を複数本作成するときは、チューブの蓋にマーカー名等を記入して区別する。チューブは事前にアルミブロック上で予冷しておく。
- ・ 必要な試薬を冷蔵庫から出し、ボルテックス及びスピンドアウンしてから、アルミブロック内に置く。

※Taq DNA polymerase だけは、混和の直前に冷凍庫から取り出して分注し、使用後すぐに戻す。

※冷凍から解凍した試薬は、成分が不均一になっているため、必ずボルテックスとスピンドアウンを実施する。

- ・ 表 2 の(1)～(6)を混合し、マスター液を調整する。マスター液の液量は、(試料数 + 1)とする。マスター液をボルテックスにより攪拌して均一にした後、プレートの指定した位置または 200 μ l チューブに 1 反応ごとに分注する。
- ・ 最後に表 2 の(7)テンプレート DNA を加え、最終的な反応液とする。

表 2 PCR 反応液の調整 (1反応あたり)

試薬名等	1 分析あたり使用量
(1) 滅菌蒸留水 ^Z	4.9 μ l
(2) 10x Buffer ^Y	1 μ l
(3) dNTPs ^X	1 μ l
(4) F-primer	1 μ l
(5) R-primer	1 μ l
(6) Taq DNA Polymerase ^Y	0.1 μ l
(7) テンプレート DNA ^W	1 μ l
全量	10 μ l

Z Water for Molecular Biology (Millipore)

Y Taq DNA Polymerase with Standard Taq Buffer (New England Biolabs #M0273L)

付属の10x BufferおよびTaq DNA Polymerase

X GeneAmp dNTP Mix (Applied Biosystems #N8080260) (2.0mM each・最終濃度0.2mM each)

W りんご葉片よりDNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を用いて抽出したDNAをTEバッファーまたは

滅菌蒸留水で2.5ng/ μ l濃度に希釈したもの。抽出DNA濃度が薄く、2.5ng/ μ l濃度が得られない場合、抽出濃度1～2.5ng/ μ lでは抽出したDNA原液を希釈せずにそのまま使用。

抽出濃度1ng/ μ lではエタノール沈殿により1ng/ μ l以上に濃縮するか、DNA抽出をやり直す。

- ※同じマーカーのマスター液を分注する際にはチップを変えないでよい。
- ※先に試料を分注すべきか、マスター液を分注すべきか判断が分かれるところだが、操作の確実性、品種間のコンタミ・リスクの軽減を考えると、先にマスター液を分注するのがよい。
- ※テンプレート DNA の分注に際しては、分注量が 1 μ l と、ごく僅かなので、マイクロチップで確実に吸入および排出ができたことを目視で確認する。
- ※テンプレート DNA を先に分注する場合は、チューブの一番底に確実に分注するよう心掛け、ウェルの底に液滴が存在しているかどうか目視で確認する。
- ※分注後にチューブまたはプレートを上遠心機またはプレート遠心機によりスピンドウンし、チューブ底に一定量の液が泡なしに揃って存在していることを確認する。
- ※コンタミ回避のため、チップが目的外の部分に触れないように注意する。
- ※プレート使用の場合、試料数が多くなると、分注する位置を間違えやすくなるため、プレート上にサインペンで線や目印を付けるなどして、操作ミスを防ぐ工夫をする。

⑥蓋をする。

アプライが終わったら、200 μ l チューブの場合は蓋を閉める。プレートの場合は、シリコンキャップ、シール、8 連チューブ用のキャップ等で蓋をする。この際にキャップの PCR 溶液側の面を触らないように気をつける。

⑦サーマルサイクラーを用いて、以下に示すプログラムで PCR 反応を行う。

表 3 PCR プログラム

ステップ	温度	時間	反復
初期変性	95℃	5分	1
変性	94℃	1分	} 35
アニーリング	55℃	1分	
伸長	72℃	2分	
最終伸長	72℃	10分	1
保存	10℃	∞	

⑧反応終了後に試料を保存する場合は、プライマーの蛍光標識を失活させないようにするためアルミホイルで遮光し、4℃以下で保存する。

4. 5. 8 PCR 増幅産物の増幅確認

「4. 5. 7 DNA 抽出操作」で作成した PCR 増幅産物の増幅を確認するために、アガロースゲル電気泳動を行う。この操作を省略して、「4. 5. 9 SSR マーカーの検出」に記載したフラグメント解析に直接移行することも可能であるが、アガロースゲル電気泳動によりバンドが確認できない PCR 産物が生じた場合には、フラグメント解析を行ってもシグナルが認められないためデータを取得できずに分析費用のロスにつながることで、PCR 産物のバンドの濃淡により、PCR 産物希釈程度を判断できる等の理由から、ひと手間かけても確認試験を行うことが確実なフラグメント解析のデータ取得のために有効である。増幅が確認された場合は「4. 5. 9 SSR マーカーの検出」へ、増幅がみられなかった場合にはトラブルシューティング (p.34) を参照し、再度「4. 5. 7 PCR 増幅操作」に戻って PCR 増幅操作を行って、PCR 増幅産物を得るようにする。得られた産物は今後の試験に使用する可能性が高いため、コンタミネーションや酵素的分解を防ぐために白衣、マスク、新しいゴム手袋を必ず着用して扱う。以下に手順を示す。

① 電気泳動用 2%アガロースゲルの作製

2 g のアガロース粉末を量り取り、300ml 程度の三角フラスコに入れ、100mL の 1×TAE バッファーを加え、口部分をラップで半分程覆った後、500W の電子レンジで溶解させる。突沸が起きないようにするため、内部を確認しながら、泡が立ってきたら電子レンジの電源をオン／オフしながらアガロースを融解させるようにゆっくりとフラスコを回すように混ぜる。火傷を防ぐため、三角フラスコに触れる際は必ず厚手の軍手を着用する。内部にアガロースの粒が見えなくなったら 60～70℃程度まで常温下で冷まし、ゲル板に溶液を流し込んでコームを差し込み、ゲルが完全に固まるまで静置する。

② PCR 産物の電気泳動槽へのアプライと電気泳動

電気泳動ゲルが作製できたら、1×TAE バッファーの入った電気泳動槽装置に設置し、ゲルが完全に浸ることを確認してから試料のアプライを行う。10μl の PCR 産物の一部 (4μl) をパラフィルムに滴下し、そこにローディングバッファー溶液を 1μl 加えてピペットで混和して計 5μl とする。一番左に 100bp のラダーマーカーを 3μl アプライし、次いで試料も 5μl ずつアプライしていく。アプライが完了したら、100V、25 分間で電気泳動を行う。この条件でローディングバッファーの Dye が well から 2cm 程度移動した状態であれば増幅

バンドの有無を判断できる。

③ 増幅産物の確認

電気泳動が完了したら、電気泳動槽からゲルを枠ごと取り出し、GelRed™ 核酸ゲル染色液 (Biotium, Inc.) 10000 倍水溶液で後染め染色を 15 分間行う。その後、手袋をした手でゲルを紫外線照射装置にのせて紫外線を照射し、泳動像を撮影する（増幅状況の証拠画像となるため、画像を印刷し、プロトコルシートに貼り付けて増幅状況を後から参照できるようにする）。

増幅バンドが期待されるおよその位置に確認された試料の残りの PCR 産物は、次項「4. 5. 9 SSR マーカーの検出」においてフラグメント解析に用いる。

バンドが確認できない試料は、テンプレート DNA の量を倍量に増やすなどして PCR 反応をやり直す。供試したほとんどの試料にバンドが確認できない場合は、PCR 反応液の各要素の劣化を疑い、プライマーも含めて新しい試薬類に交換するか、別のサーマルサイクラーを使用する。

4. 5. 9 SSR マーカーの検出

前項で得た PCR 増幅産物を蛍光 DNA シーケンサーで分析し、フラグメント解析を行う。フラグメント値(各 SSR マーカーにおける増幅断片の塩基対長)は解析実施日の気温やバッファー等の影響を受けることがあるため、同じマーカー由来の試料は同じ日に解析する。基本的分析操作は、Beckman Coulter 社 CEQ8800^{※1}のフラグメント解析プロトコルに従って行う。以下に手順を示す。

(用意するもの)

- ・ SLS (Sample Loading Solution) (AB Sciex 608082)
- ・ セパレーションゲル (AB Sciex 391438)
- ・ DNA サイズスタンダード 400 (以下 ss400 と略す) (AB Sciex 608098)
- ・ ミネラルオイル (サイズスタンダード 400 に付属)
- ・ セパレーションバッファー (AB Sciex 608012)
- ・ サンプルプレート (BioBik PCR プレート 3400-00)
- ・ バッファープレート
- ・ 試料の PCR 産物
- ・ 滅菌蒸留水 (Water for Molecular Biology , Millpore)

(1) フラグメント解析のための試料の調整

SLS (sample loading solution) とサイズスタンダードを含む溶液に PCR 産物を溶解し、調整する。

①フラグメント解析用プロトコルペーパーの作成

フラグメント解析に使う試薬の量を計算したり、フラグメント解析用サンプルプレート上の解析試料の位置を記載したプロトコルペーパーを予め用意しておくとし便利である。

②PCR 産物の希釈

- ・「4. 5. 7 PCR 増幅操作」で得た PCR 増幅産物を、滅菌蒸留水で希釈する。
- ・「4. 5. 8 PCR 増幅産物の増幅確認試験」後のプレートまたはチューブに残った PCR 増幅産物に、直接滅菌蒸留水をマイクロピペットで加え、ポンピングで混和する。希釈倍率は、増幅バンドの濃さにより加減し、バンドが薄い場合は 5~10 倍、濃い場合は 20 倍に希釈する (図 1)。

※PCR 産物原液を使用すると、シグナルの解析上限を超え、シグナルの位置が移動して正確な測定値を示さないために 5 倍以上に希釈する。

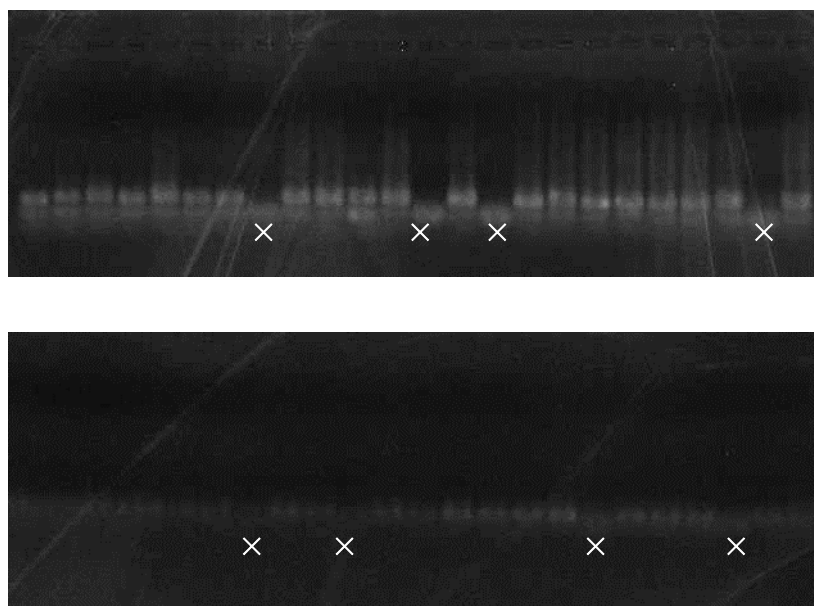


図 1 PCR 産物電気泳動時の増幅バンド濃淡による希釈倍率の目安

上段：20 倍希釈が望ましい

下段：5~10 倍希釈が望ましい

×：増幅が起らなかった試料

③調整液の作成

- ・解凍した SLS と、サイズスタンダード 400 を表 4 の組成に従い、(サンプル数+1) 分量のプレミックス溶液を 1.5ml チューブに作成する。

※サイズスタンダード 400 が均一になるようにボルテックスで十分に混合する。

※SLS は、納品後はすぐ冷凍保管し、初めて解凍したときに、必要な量を小分けにして冷凍しておく、凍結融解の影響を極力少なくすることができる。

※サイズスタンダードはゲル電気泳動におけるラダーマーカーと同様の役割を持ち、Beckman Coulter 社のシーケンサーでは、DNA サイズスタンダード 400 と同 600 の 2 種類のサイズスタンダードを用いることができる。このマニュアルで供試している SSR マーカーの断片長は、ほぼ 350bp 以下であるため、DNA サイズスタンダード 400 を使用している。

表 4 遺伝子解析のための調整液の組成 (1 試料当たり)

試薬およびPCR産物	使用量
SLS (サンプルローディングソリューション)	37.5 μ l
DNAサイズスタンダード 400	0.5 μ l
PCR産物 (滅菌蒸留水により5~20倍希釈したもの)	2.0 μ l
ミネラルオイル (DNAサイズスタンダード 400に付属)	1 滴 (15 μ l程度)

④フラグメント解析用サンプルプレートへのアプライ

- ・別に用意した、フラグメント解析用 96 ウェルタイタープレートの指定したウェルの底にチップを変えながら、希釈した PCR 産物を 2 μ l ずつ分注する。

- ・調整液を 38 μ l ずつチップを変えながら分注する。この際に 5 回程度のポンピングにより、PCR 産物と調整液を十分に混和する。

※プレートの底や液面に泡が残らないようにポンピングする。

※先に調整液を試料数分注し、次に PCR 産物の分注という順番でも可。

この際、PCR 産物を分注したチップを別の 30 μ l に調整したマイクロピペットに装着し直してポンピングするなどして、十分に混和する。

- ・ミネラルオイルを 1 ウェルあたり一滴 (約 15 μ l) 滴下する。

※ミネラルオイル (サイズスタンダード 400 に付属) は、調整液の蒸散を防ぐために用いる。

※この方法での混和はポンピングのみであり、プレートのボルテックスと

スピンドダウンは行わない。

⑤バッファープレートへのセパレーションバッファの分注

- ・バッファープレートを用意し、サンプルプレートの試料と同じ位置に、セパレーションバッファをウェルの 8 割程度になるように滴下する。

※Beckman Coulter 社のシーケンサーでは、試料用のプレートとは別に、バッファープレータを用意し、セパレーションバッファを満たしてセットする仕組みになっている。セパレーションバッファは、キャピラリー電気泳動中にキャピラリーの先端を浸して通電させるための伝導性の液体であり、バッファープレートは、泳動後のポリアクリルアミド・ゲルの排出先としても使われる。

(2) シーケンサーの起動とプレート装着

- ①CEQ8800 と付属 PC を起動させる。
- ②付属ソフトの Run control を起動し、ゲルカートリッジ（中身はポリアクリルアミド・ゲル）を装着する。
- ③キャピラリーを冷蔵保存中の場合は、キャピラリーを装着する。
- ④サンプルプレート、バッファープレートの向きを間違えずに装着し、ウェッティングトレイに蒸留水を満たす。
- ⑤キャピラリーを予め 50℃に加温する。50℃に達して安定した後、マニホールドパージ（manifold purge＝ゲルの流路の洗浄）、キャピラリーゲルフィル（capillary gel fill＝キャピラリー内のゲルの更新）の操作を行う。

(3) 試料の登録

- ①付属ソフトの試料登録画面を起動し、新規に立ち上げたプレート登録画面で試料（PCR 産物＋調整液）を分注した位置のとおり試料名を登録する。

※この際に、前項で述べたフラグメント解析用プロトコルペーパーのファイルが Excel 等で作成されていれば、コピー＆ペーストで速やかに登録できる。

- ②各試料の analysis method を「Frag-3」に指定する。
- ③登録ファイルを保存する。

※Run Sample ボタンがアクティブになり、分析準備が整う。

(4) 分析開始～終了

- ①アクティブになった **Run Sample** ボタンをクリックし、表示されるプレートビューで試料の位置に間違いが無いか確認した後、分析が開始される。

※ゲル・カートリッジのゲル残量が 2ml 以下になると、新しいゲルカートリッジの装着が求められるので、新しいものに交換する。

※キャピラリー温度が 50℃になるまでは泳動は開始されない。

- ②データのモニタリング

※泳動開始 15 分後にサイズスタンダードのピークが出始め、45～50 分で終了し、解析データが付属 PC に転送される。

- ③分析終了操作

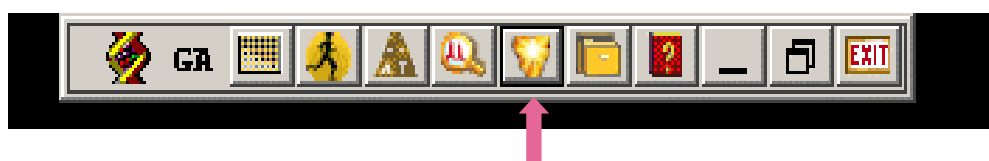
- ・サンプルプレート、バッファープレートを外し、ウェッティングトレイの水を廃棄、洗浄して新しい滅菌蒸留水を満たして装着する。翌日以降分析予定が無い場合はキャピラリーを外して冷蔵する。最後にゲルカートリッジを取り外して冷蔵し、シーケンサーの電源を切る。

4. 5. 10 データ解析

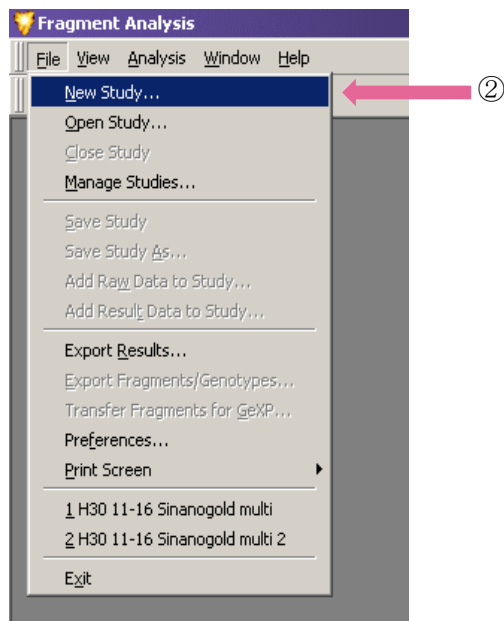
「4. 5. 9 SSR マーカーの検出」で得られたデータを、解析用ソフトウェア (CEQ8800 解析ソフト) を用いて結果の解析を行う。

(1) データの解析： 波形図の確認～アリルのアノテーション～印刷

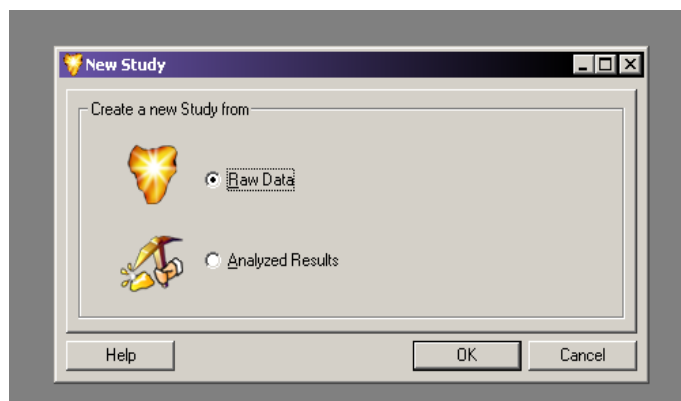
- ・泳動が終わったら、右上のメニューバーの“金色の逆三角形” …①のアイコンをクリックする。



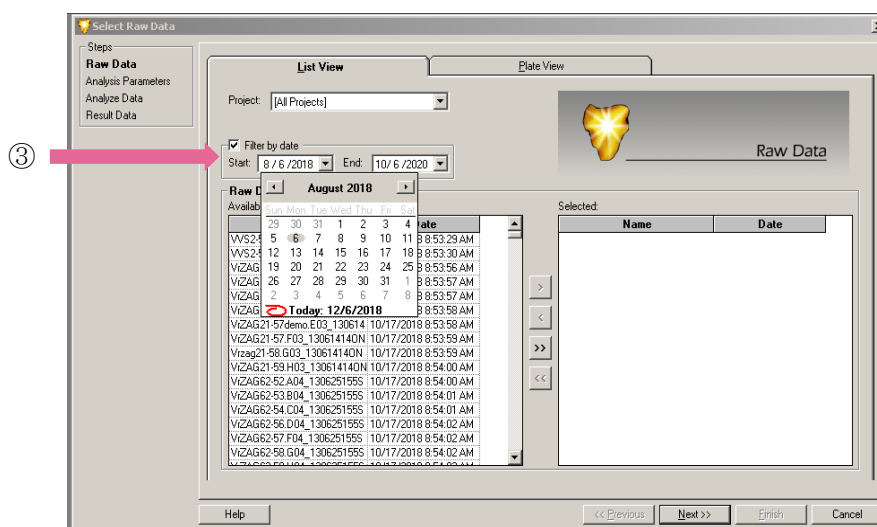
- ・「Fragment Analysis」のトップ画面が開く。
- ・左上の「File」をクリックし、「New Study」…②を選択する（既存の分析データを見たい時は「Open Study」を選択する。）



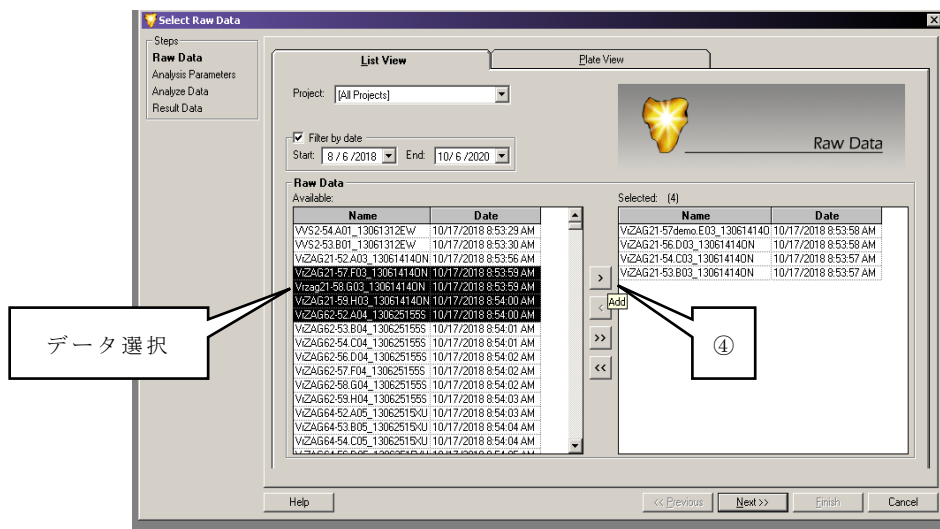
- ・「New Study」ウィンドウが出るので「Raw Data」を選択し、「OK」をクリックする。



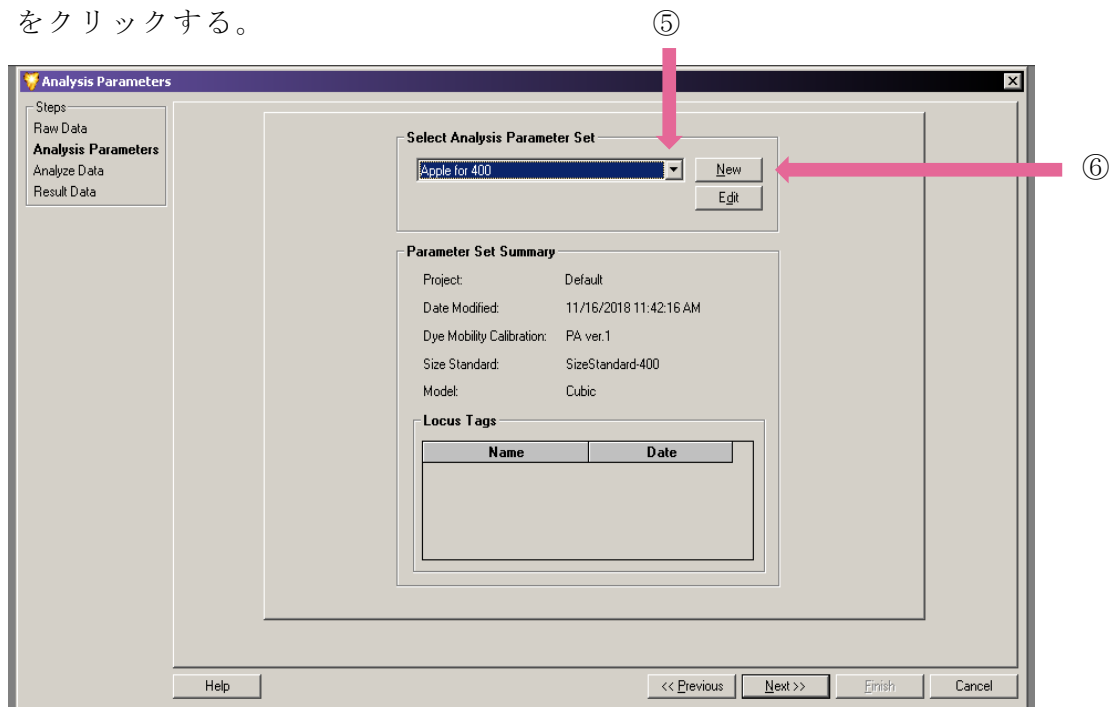
- ・「Select Raw Data」ウィンドウ「Filter by date」・・・③にチェックを入れ、日付でデータを絞り込む。



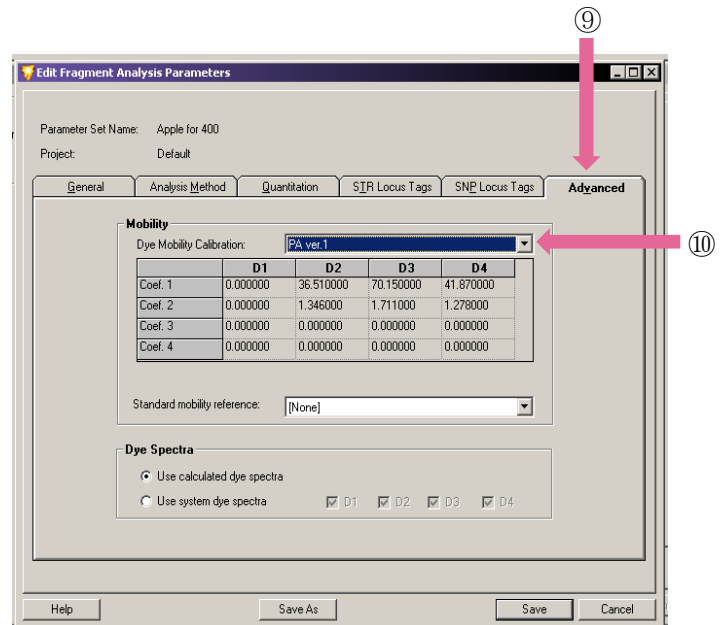
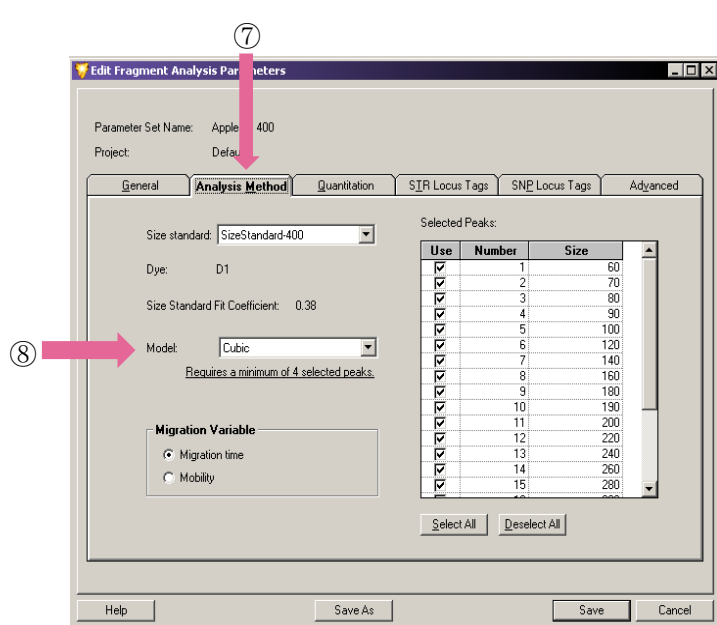
- ・分析にかけるデータを一括で選択して「>」・・・④をクリックすると選択したデータが右の欄に移るので、確認後、「Next」をクリックする。



- ・「Analysis Parameters」ウィンドウ「Select Analysis Parameter Set」で予め設定して保存した「Analysis Parameter Set」を▼・・・⑤で選択し、「Next」をクリックする。



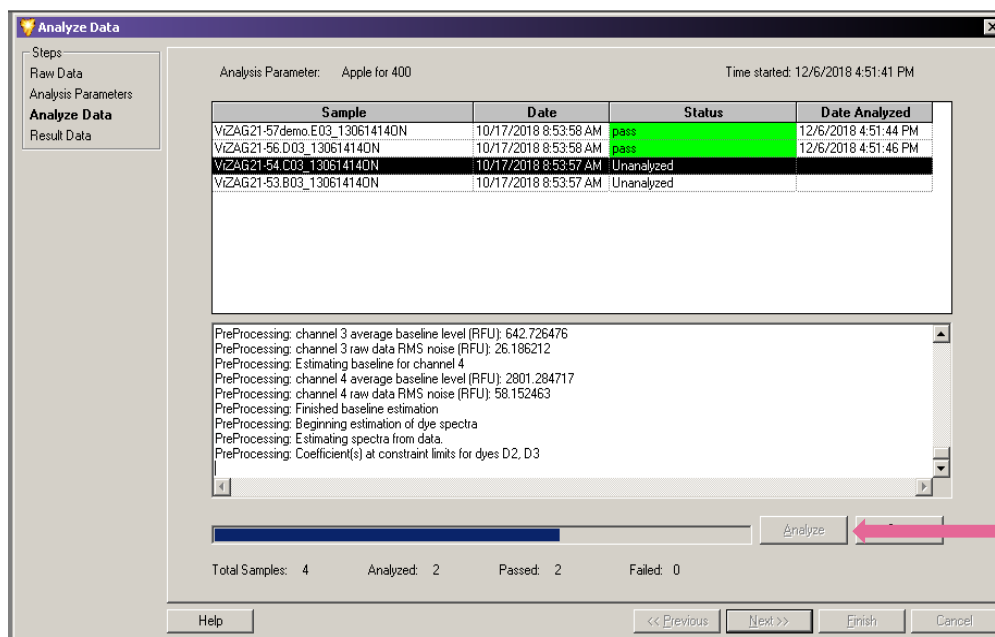
※設定方法は、「New」・・・⑥をクリックし、「Analysis Method」・・・⑦タブを開き、「SizeStandard」で使用したサイズスタンダードの種類（ここでは「SizeStandard400」を選択）・・・⑦を▼で指定し、「Model」の▼で「Cubic」・・・⑧を選択する。さらに「Advanced」タブ・・・⑨を開き、「Dye Mobility Calibration」で「PA ver.1」・・・⑩を▼で選択する。以上の設定が終わったらこの「Analysis Parameter Set」を「Save as」で名前を付けて保存する。



保存

・「Analyze Data」ウィンドウ「Analyze」をクリックすると分析が始まる。

・解析が終わったら「Next」をクリックする。

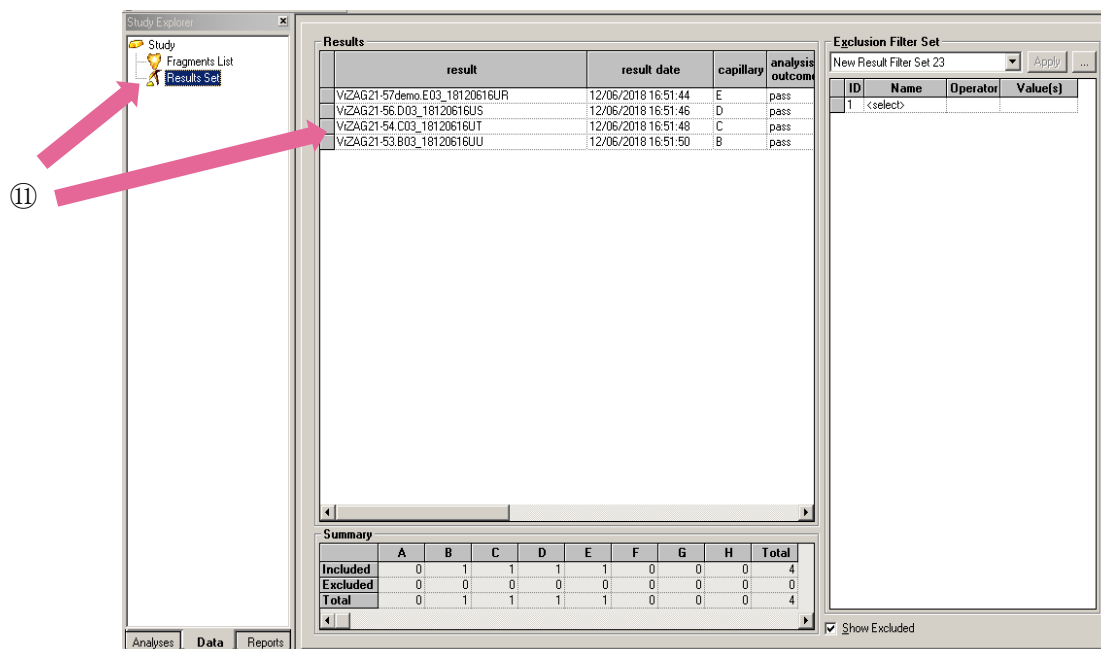


分析開始

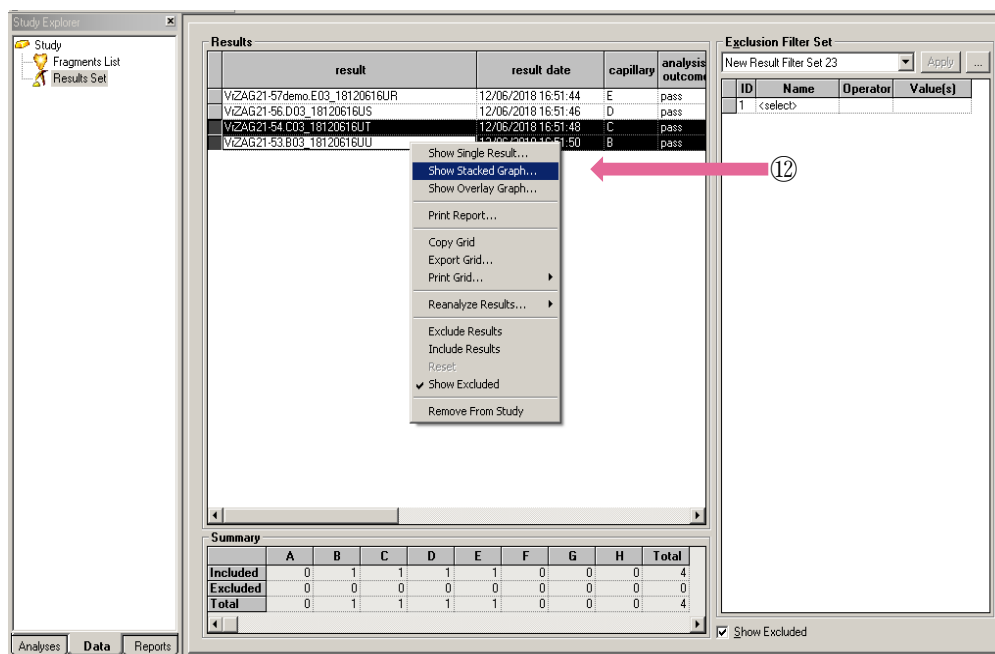
分析終了でクリック

・「Select Result Data」ウィンドウの「Next」をクリックする。

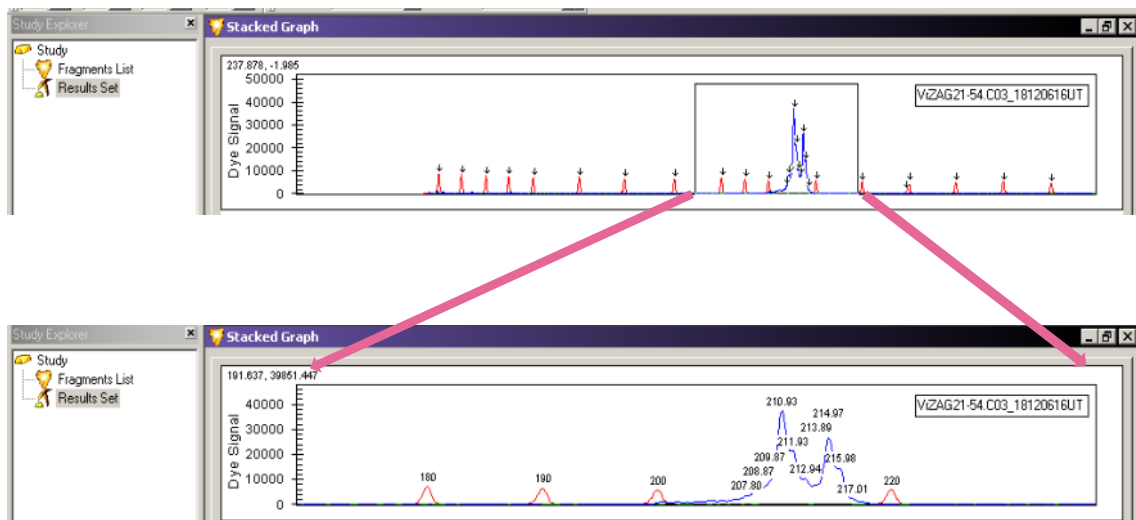
- ・「Fragment Analysis」ウィンドウに戻り、“Result Set” …⑪が表示される。



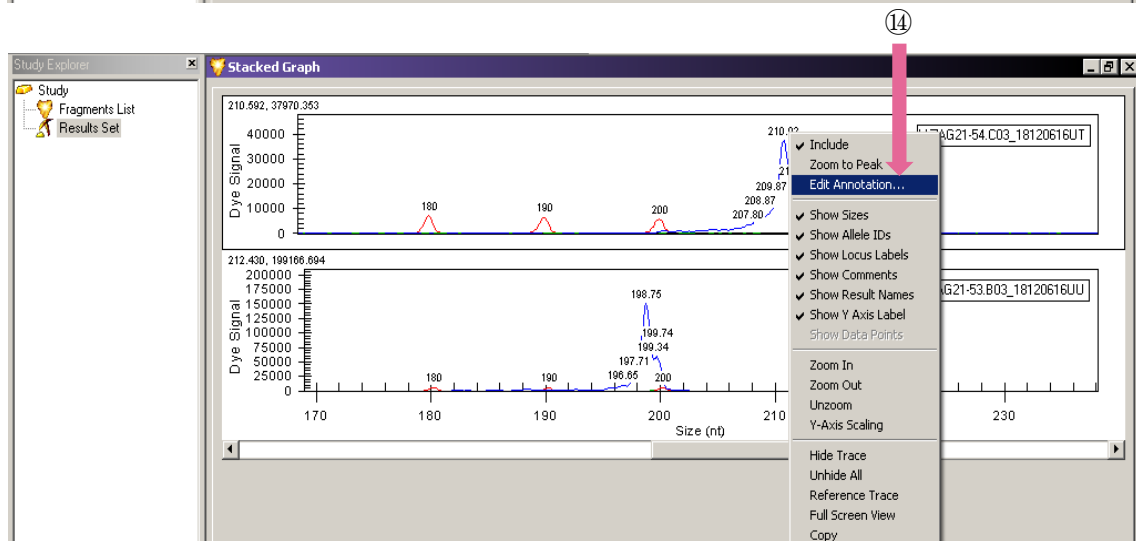
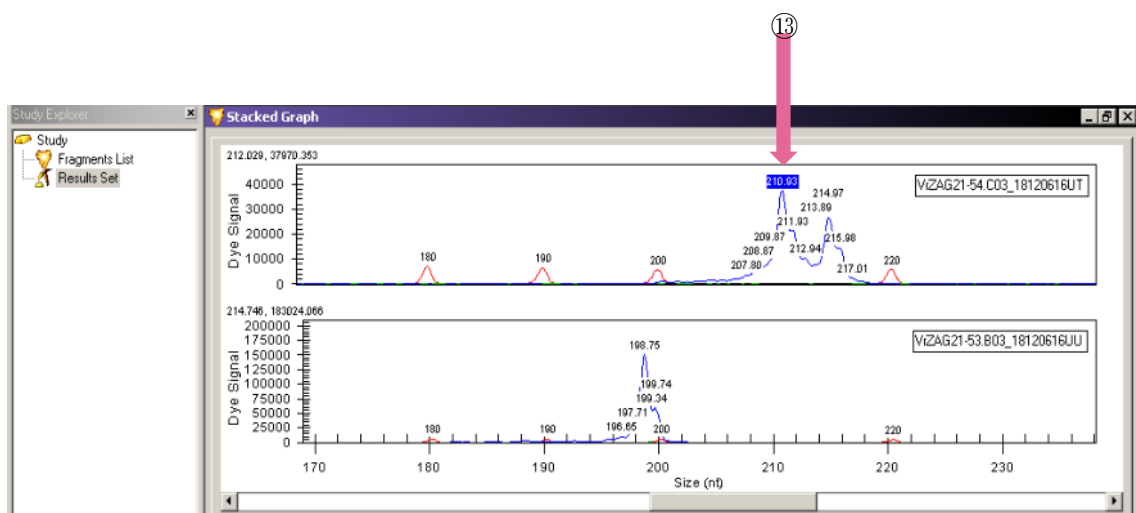
- ・試料名を選択すると白黒反転するので、最後の試料名の上で右クリックし、「Show Stacked Graph」…⑫をクリックする。



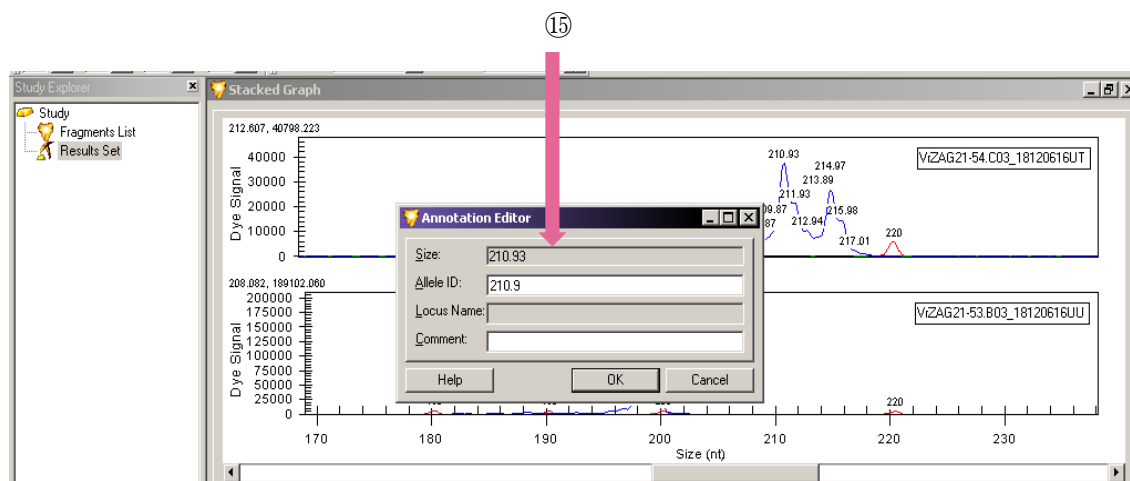
- ・波形図が表示される。拡大したい部分をマウスでドラッグし、指を離すと拡大表示される。



- ・目的のピークの上にカーソルを合わせ・・・⑬、右クリックすると一覧が表示されるので、「Edit Annotation」・・・⑭をクリックする。



- ・「Annotation Editor」ウィンドウが表示されるので、Allele ID・・・⑮に小数点以下1桁に四捨五入した Size の値を入力し、「OK」をクリックする。これらを全てのアリルについて行う。



マーカーの色素だけを選択する。

- ・キーボードの **PrintScreen** キーを押し、フラグメント解析画像を得て、Excel 等に張り付けて活用する。

(2) Fragment Analysis Parameter について

泳動結果を解析する際、デフォルト設定で行うと、長いアリルの断片長を正確に解析することができないため、品目に関係なく、必ず「Analysis Method」タブの「Advanced」で「PA ver.1」を選択したパラメーター・セットを用いる。

(3) その他

解析結果は、シーケンサー付属のソフトウェアで解析し、波形図として見ることができる。横軸が DNA 断片長、縦軸が DNA 断片の蛍光シグナルの検出強度を示している。

赤い色で示された波形が、サイズスタンダード (size standard) のものである。サイズスタンダードは、100bp、200bp、300bp など決まった長さの DNA 断片の混合物である (ラダーマーカのようなもの)。解析ソフトは、検出されたサイズスタンダードの波形のピークを基準に、泳動時間から DNA 断片長を推量している (図 1)。

青、緑、黒の波形は、試料のものである (フォワードプライマーに修飾した蛍光色素により、マーカごとに色は異なる)。SSR マーカによって得られる波形は複雑で、1つのアリルにつき複数のピークを持つ。これは、DNA ポリ

メラゼによるアデニル化と、スタッターによるものである。通常は最も高いピークの断片長を読み取り、アレルサイズ (allele size) とする (図 2)。

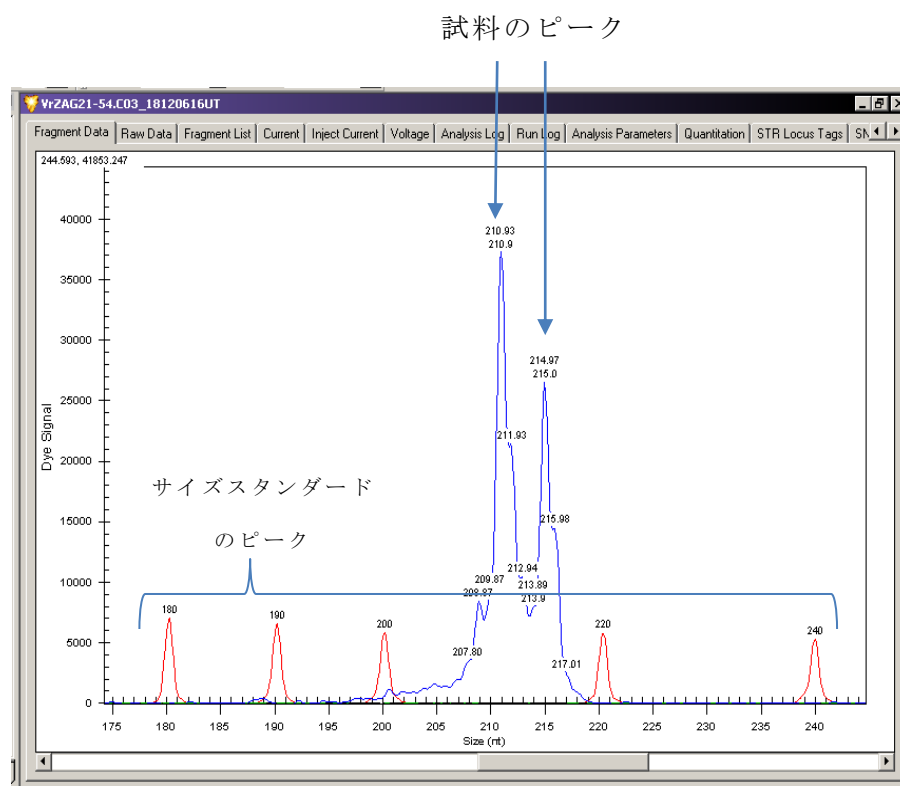
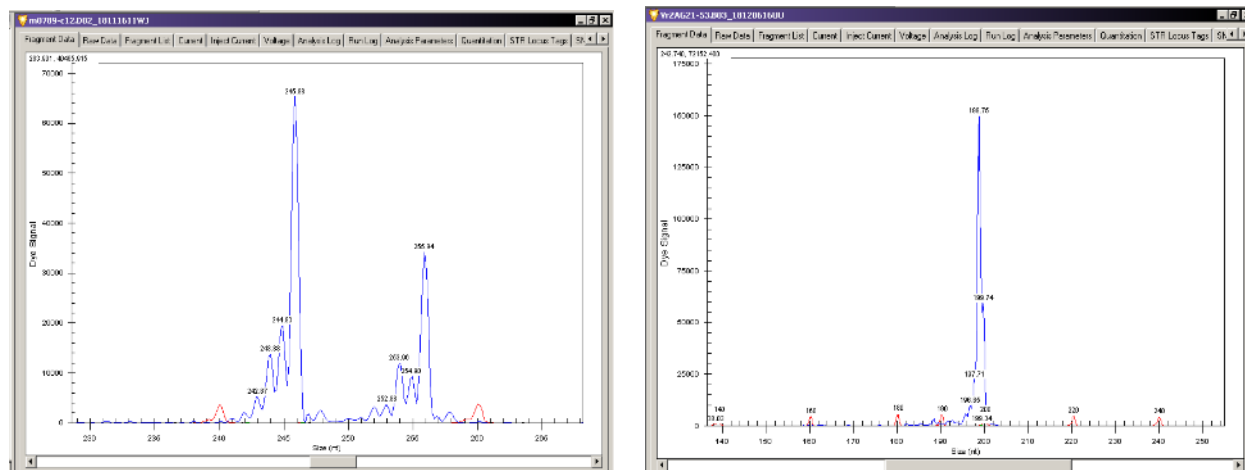


図 2 SSR マーカーによるフラグメント解析結果の波形図の一例

本試験の解析対象となるリンゴの品種はすべて二倍体であるため、ヘテロ接合であれば、2 つのアレルが観測される。二倍体でホモ接合であれば、2 つのアレルが重なって 1 つのアレルがあるように観測される (図 3)。

なお、三倍体品種であれば最大 3 つのアレル、四倍体品種であれば最大 4 つのアレルが観測される。ただし、倍数性を正確に判定するためには、フローサイトメーターなどの機器を用いて分析する必要がある。

SSR マーカーの場合、読み取ったアレルサイズの組合せが、その品種の、そのマーカーにおける遺伝子型である。品種間で、複数のマーカーの遺伝子型を比較することにより、品種識別を行う。



ヘテロ接合

ホモ接合

図3 二倍体の SSR マーカーを用いたフラグメント解析における波形図の比較

4. 5. 1. 1 解析結果に基づく品種判定

1 試料につき、最低 2 回の解析を行って得られた断片長が同じ値であることを確認する。既知の親子関係が明らかな品種も一緒に解析してアリの遺伝矛盾の有無を解析する親子鑑定を行うこともデータの信憑性を高めるのに有効である。

「付属文書 2 供試品種の特徴」に示した基準品種及び比較品種の合計 12 品種の各品種において、今回供試の SSR マーカー 14 種類の増幅断片長を用いて解析し、その数値が表 5 に示した品種のうち、14 種類の SSR 遺伝子型の全てにおいて同じ値の品種があった場合、その品種である可能性が非常に高いと判定される。

これに対して、どれか 1 種類あるいは 1 種類以上の SSR マーカーにおいて表 5 に示した SSR 遺伝子型と一致しない場合は、残りの種類の SSR マーカー遺伝子型が一致していてもその品種である可能性は非常に低いと判定される。

表5 りんご12品種、14SSRマーカーの増幅断片長 (bp) による遺伝子型

品種名 \ マーカー	CH02b12	CH01e01	CH02b03b	CH02b10	CH02d11
シナノゴールド	144 / 148	119 / 119	84 / 84	130 / 134	121 / 135
シナノスイート	148 / 148	115 / 119	84 / 84	134 / 142	121 / 135
シナノドルチェ	148 / 148	115 / 119	84 / 84	134 / 142	121 / 135
シナノリップ	148 / 148	119 / 127	84 / 84	142 / 142	121 / 135
秋映	134 / 144	115 / 119	84 / 101	130 / 134	121 / 135
王林	148 / 148	119 / 119	103 / 105	134 / 152	121 / 151
ぐんま名月	132 / 148	115 / 119	84 / 84	140 / 142	121 / 135
紅玉	132 / 134	115 / 117	101 / 103	134 / 142	123 / 135
ゴールデンデリシャス	148 / 148	115 / 119	84 / 105	130 / 134	121 / 135
千秋	144 / 148	119 / 119	84 / 84	130 / 142	121 / 135
つがる	134 / 148	115 / 117	84 / 101	134 / 134	121 / 135
ふじ	148 / 148	115 / 119	84 / 113	140 / 142	135 / 135
品種名 \ マーカー	CH02f06	CH01d08	CH02b07	CH02g09	CH02h11a
シナノゴールド	146 / 151	246 / 256	115 / 117	124 / 143	134 / 136
シナノスイート	146 / 157	256 / 260	115 / 117	116 / 124	134 / 136
シナノドルチェ	146 / 151	256 / 256	115 / 117	112 / 124	134 / 136
シナノリップ	151 / 157	246 / 256	115 / 117	112 / 124	128 / 134
秋映	151 / 166	246 / 246	115 / 117	112 / 124	134 / 136
王林	151 / 166	256 / 260	115 / 115	116 / 124	134 / 136
ぐんま名月	146 / 151	260 / 277	117 / 137	116 / 124	134 / 136
紅玉	157 / 166	246 / 277	117 / 137	116 / 141	110 / 126
ゴールデンデリシャス	151 / 166	256 / 277	115 / 123	124 / 143	134 / 136
千秋	146 / 151	246 / 256	115 / 117	112 / 124	134 / 136
つがる	157 / 166	246 / 256	115 / 117	116 / 124	110 / 136
ふじ	146 / 166	246 / 260	117 / 117	112 / 116	134 / 134
品種名 \ マーカー	CH04d02	CH05c07	CH05g03	CH04d10	
シナノゴールド	127 / 139	147 / 157	142 / 173	157 / 193	
シナノスイート	125 / 127	143 / 157	142 / 169	171 / 211	
シナノドルチェ	139 / 154	120 / 147	142 / 173	167 / 193	
シナノリップ	127 / 127	120 / 147	167 / 169	157 / 171	
秋映	127 / 154	120 / 157	169 / 173	157 / 193	
王林	139 / 154	157 / 157	142 / 169	157 / 193	
ぐんま名月	125 / 154	120 / 157	142 / 173	167 / 193	
紅玉	127 / 154	149 / 157	169 / 200	171 / 211	
ゴールデンデリシャス	127 / 139	147 / 157	142 / 173	193 / 193	
千秋	127 / 154	120 / 157	142 / 169	157 / 167	
つがる	127 / 154	157 / 157	169 / 173	171 / 193	
ふじ	125 / 127	120 / 143	142 / 169	167 / 211	

注 長野県職務育成りんご品種は「シナノゴールド」、「シナノスイート」、「シナノドルチェ」、「シナノリップ」である。

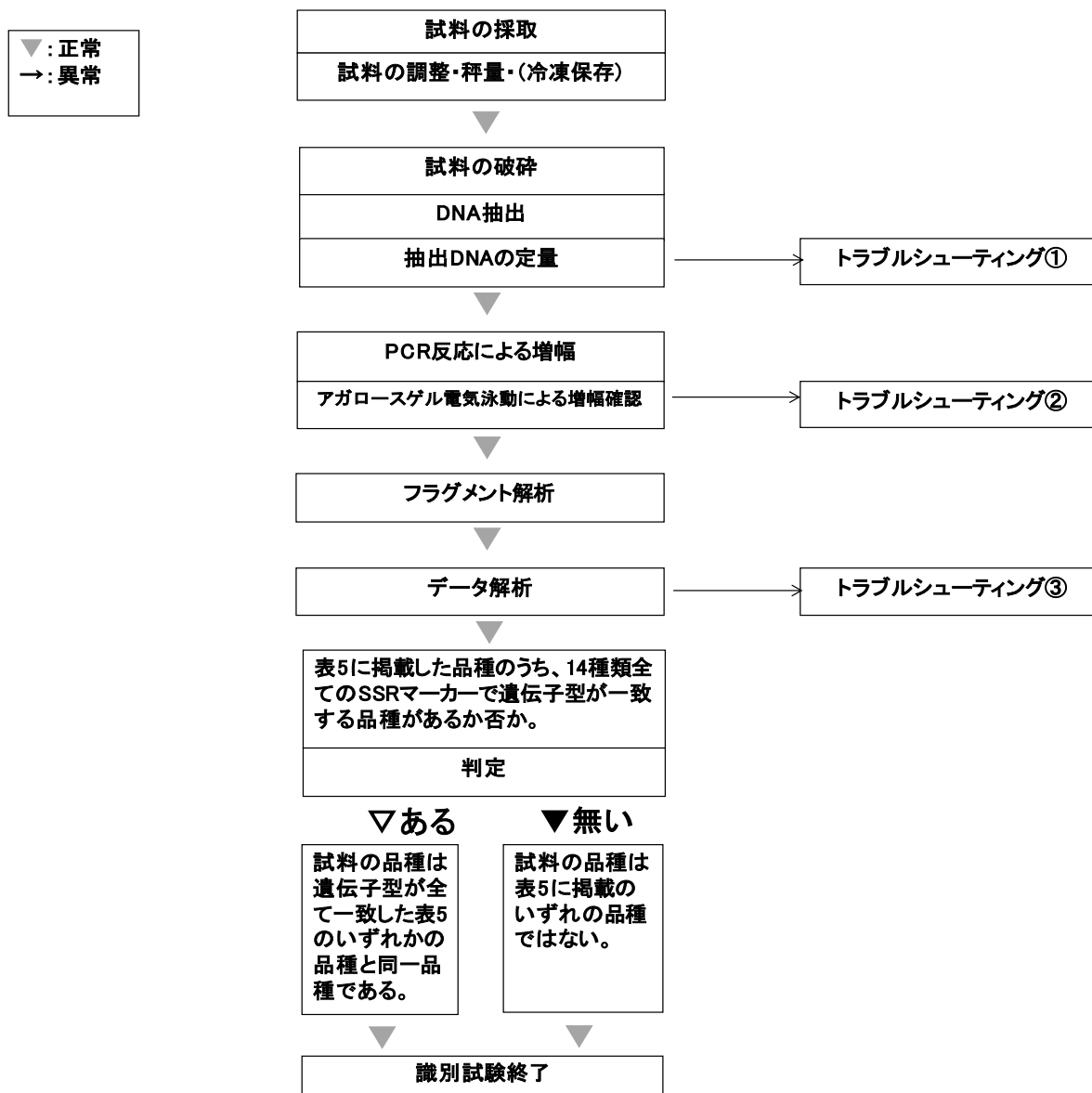
表6 りんご12品種^Z、14SSRマーカーの増幅断片長 (bp) による遺伝子型^Y

品種名 \ マーカー	CH02b12	CH01e01	CH02b03b	CH02b10	CH02d11
シナノゴールド	A/A+4	B/B	C/C	D/D+4	E/E+14
シナノスイート	A+4/A+4	B-4/B	C/C	D+4/D+12	E/E+14
シナノドルチェ	A+4/A+4	B-4/B	C/C	D+4/D+12	E/E+14
シナノリップ	A+4/A+4	B/B+8	C/C	D+12/D+12	E/E+14
秋映	A-10/A	B-4/B	C/C+17	D/D+4	E/E+14
王林	A+4/A+4	B/B	C+19/C+21	D+4/D+22	E/E+30
ぐんま名月	A-12/A+4	B-4/B	C/C	D+10/D+12	E/E+14
紅玉	A-12/A-10	B-4/B-2	C+17/C+19	D+4/D+12	E+2/E+14
ゴールデンデデリシャス	A+4/A+4	B-4/B	C/C+21	D/D+4	E/E+14
千秋	A/A+4	B/B	C/C	D/D+12	E/E+14
つがる	A-10/A+4	B-4/B-2	C/C+17	D+4/D+4	E/E+14
ふじ	A+4/A+4	B-4/B	C/C+29	D+10/D+12	E+14/E+14
アレル数	4	4	5	5	4
遺伝子型数	6	4	6	7	4
備考 (基準フラグメント値)	A=144	B=119	C=84	D=130	E=121
品種名 \ マーカー	CH02f06	CH01d08	CH02b07	CH02g09	CH02h11a
シナノゴールド	F/F+5	G/G+10	H/H+2	I/I+19	J/J+2
シナノスイート	F/F+11	G+10/G+14	H/H+2	I-8/I	J/J+2
シナノドルチェ	F/F+5	G+10/G+10	H/H+2	I-12/I	J/J+2
シナノリップ	F+5/F+11	G/G+10	H/H+2	I-12/I	J-6/J
秋映	F+5/F+20	G/G	H/H+2	I-12/I	J/J+2
王林	F+5/F+20	G+10/G+14	H/H	I-8/I	J/J+2
ぐんま名月	F/F+5	G+14/G+31	H+2/H+22	I-8/I	J/J+2
紅玉	F+11/F+20	G/G+31	H+2/H+22	I-8/I+17	J-24/J-8
ゴールデンデデリシャス	F+5/F+20	G+10/G+31	H/H+8	I/I+19	J/J+2
千秋	F/F+5	G/G+10	H/H+2	I-12/I	J/J+2
つがる	F+11/F+20	G/G+10	H/H+2	I-8/I	J-24/J+2
ふじ	F/F+20	G/G+14	H+2/H+2	I-12/I-8	J/J
アレル数	4	4	4	5	5
遺伝子型数	6	8	5	5	5
備考 (基準フラグメント値)	F=146	G=246	H=115	I=124	J=134
品種名 \ マーカー	CH04d02	CH05c07	CH05g03	CH04d10	
シナノゴールド	K/K+12	L/L+10	M/M+31	N/N+36	
シナノスイート	K-2/K	L-4/L+10	M/M+27	N+14/N+54	
シナノドルチェ	K+12/K+27	L-27/L	M/M+31	N+10/N+36	
シナノリップ	K/K	L-27/L	M+25/M+27	N/N+14	
秋映	K/K+27	L-27/L+10	M+27/M+31	N/N+36	
王林	K+12/K+27	L+10/L+10	M/M+27	N/N+36	
ぐんま名月	K-2/K+27	L-27/L+10	M/M+31	N+10/N+36	
紅玉	K/K+27	L+2/L+10	M+27/M+58	N+14/N+54	
ゴールデンデデリシャス	K/K+12	L/L+10	M/M+31	N+36/N+36	
千秋	K/K+27	L-27/L+10	M/M+27	N/N+10	
つがる	K/K+27	L+10/L+10	M+27/M+31	N+14/N+36	
ふじ	K-2/K	L-27/L-4	M/M+27	N+10/N+54	
アレル数	4	5	5	5	
遺伝子型数	6	7	5	8	
備考 (基準フラグメント値)	K=127	L=147	M=142	N=157	

Z: 長野県職務育成りんご品種は「シナノゴールド」、「シナノスイート」、「シナノドルチェ」、「シナノリップ」である。

Y: 表5の各SSRマーカーのフラグメント値について、基準品種「シナノゴールド」の持つフラグメント値のうち、小さな値のアレルをアルファベットで表記し、もう片方のアレル及び他の品種のアレルをアルファベットと整数の増減で表記したものを遺伝子型とした。

4. 5. 1 2 実験操作フロー



5. トラブルシューティング

問題点	考えられる原因	対応
①抽出 DNA 濃度が 2.5ng/μl 未満である。	試料葉片の採取時期、採取部位が適切ではない。	• DNA を再抽出する。 「4. 5. 5 DNA の抽出操作」の⑱での溶出操作を 1 回に止め、濃度の高い抽出液とする。 新梢先端にある展葉直後の若い葉片を採取する。成葉の場合は、緑色の試料を採取する。 • 抽出 DNA 原液をエタノール沈殿等で濃縮する。
②PCR 増幅産物（バンド）がほとんど、または全く検出されない。	プライマーの変性または分解が進んでいる。	• 原液よりワーキングソリューションを作成し直して供試するか、新しく合成したものを供試する。蛍光標識されたプライマーおよび PCR 増幅産物は遮光し、繰り返しの凍結・融解を避けて保存する。
	Taq ポリメラーゼ酵素が失活している。	• 別在庫の同様の酵素、あるいは新しく購入した酵素を供試する。
	使用したサーマルサイクラーのメーカーまたは機種が異なる。 考えられる原因	• 「4. 5. 7 PCR 増幅操作」に戻る。本マニュアルには PTC-100 (MJ Research.製) を使用したため、それと同等あるいはそれ以上の性能を有する機器を使用する。 • バンドが検出されない場合は、サイクル数を 5 回程度上げるか、アニーリング温度を 1.0～3.0℃下げる。 • 非特異的なバンドが検出される場合は、アニーリング温度を 1.0～3.0℃上げる。

③-1 試料のアリルの観測値が各反復で異なる場合のうち、100bp 以下にプライマーに由来する太く大きなピークが検出される。 サイズスタンダードのシグナル強度が不均衡である。	試料の PCR 産物濃度が高すぎるため、過剰なプライマーの影響により試料のキャピラリーへの取り込みが抑制され、結果的に試料のシグナルの強さが抑制され、正確な断片長が測定できない。	• PCR 産物を希釈してインジェクション量を減らし、RAW データで試料のピークが振り切らないように調整する。 • PCR 産物を通常の 10 倍希釈から 20 倍希釈に変えるなどして、PCR 産物を薄くして供試する。 • 詳細はベックマンコールター社の web ページ「フラグメント解析におけるシグナル強度のバランス」 https://ls.beckmancoulter.co.jp/files/appli_note/APC006.pdf
③-2 フラグメント解析時の RAW Data 表示で試料のピークの頂上がフラットになって表示され、解析結果は 1 本のピークではなく 2 本のピークとして解析される。	フラグメント解析時の RAW Data 表示でプライマーダイマーまたはアリのシグナルが検出上限を超えている。	に解説されているので参照されたい。
④ 反復解析したすべての結果において理論的に予測していない位置に顕著なアリのピークが出現する。	実験操作による試料間のコンタミネーション	別に抽出した同じ品種の DNA がある場合は、その試料を使って「4. 5. 7 PCR 増幅操作」に戻ってやり直す。無い場合は「4. 4. 5 DNA 抽出操作」からやり直し、同様な結果が出ることを確認する。いずれも、PCR 反応の際に新しい PCR 試薬や滅菌蒸留水、別ロットのチューブ類を用いる。

6. 是正処置

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処置を行う。

付属文書 1. 「シナノゴールド」の識別に用いる 14 種類の SSR マーカーの詳細

SSR マーカー名 : CH02b12

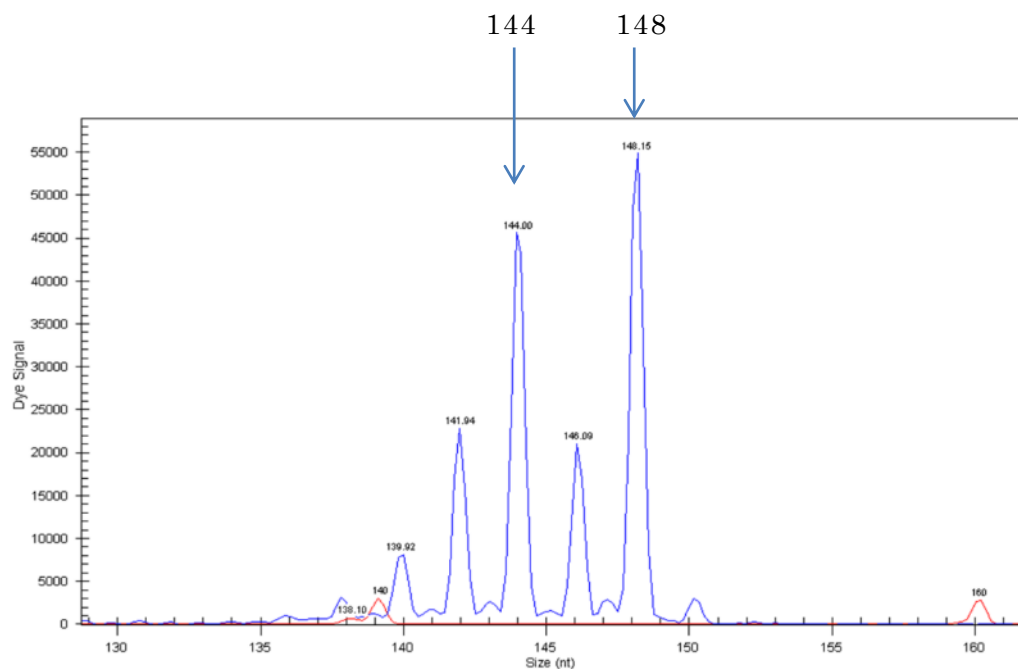
フォワードプライマー配列 : Beckman Dye4-GGCAGGCTTTACGATTATGC

リバースプライマー配列 : gttttcttCCCACTAAAAGTTCACAGGC

モチーフ : (TC)₂₁

座上染色体番号 : 5

基準品種「シナノゴールド」のフラグメントピーク :



* 検出されるピークは 2 本。

SSR マーカー名 : CH01e01

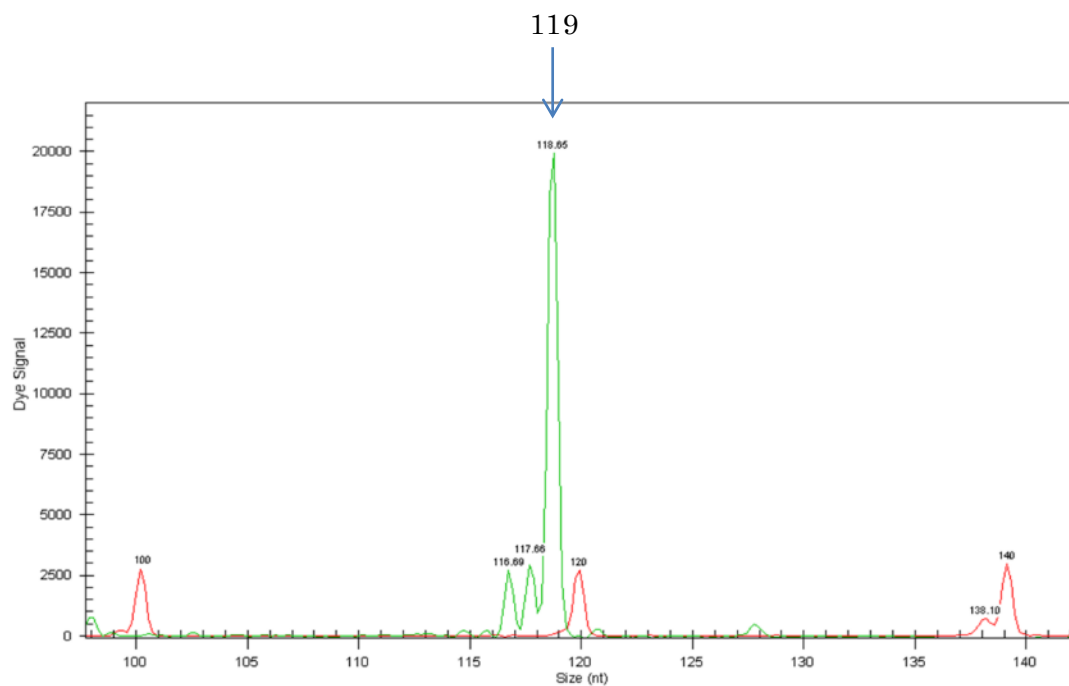
フォワードプライマー配列 : Beckman Dye3-GGTTGGAGGGACCAATCATT

リバースプライマー配列 : gttttcttCCCACTCTCTGTGCCAGATC

モチーフ : (AG)₃₂

座上染色体番号 : 14

基準品種「シナノゴールド」のフラグメントピーク :



* 検出されるピークは 1 本

SSR マーカー名 : CH02b03b

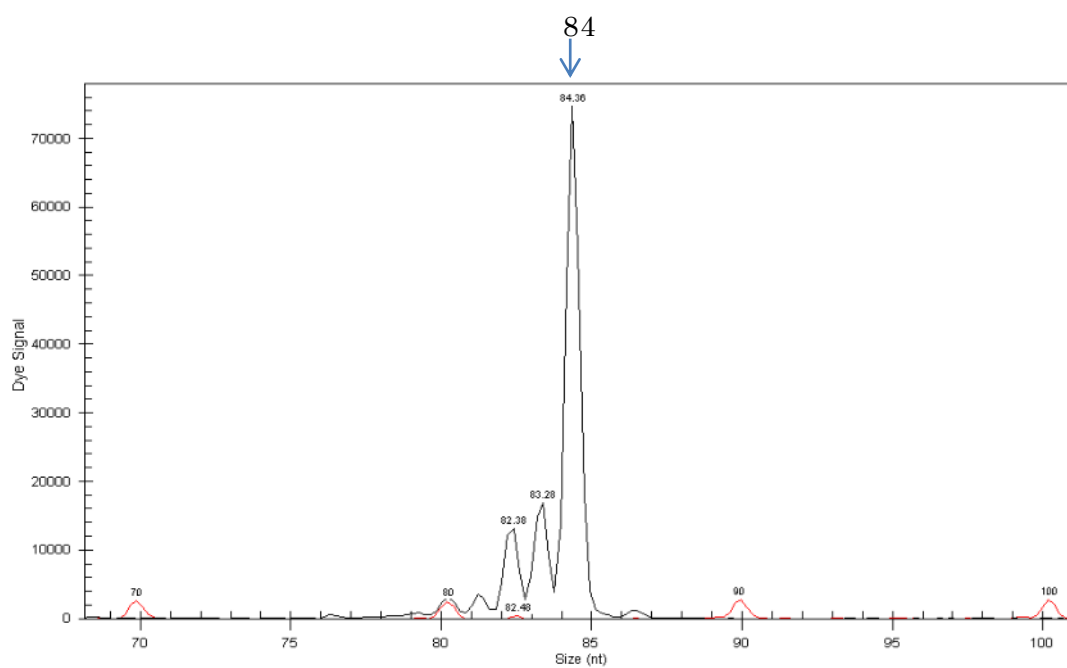
フォワードプライマー配列 : Beckman Dye2-ATAAGGATACAAAAACCCTACACAG

リバースプライマー配列 : gtttGACATGTTTGTTGAAAACCTTG

モチーフ : (C T)₂₂

座上染色体番号 : 10

基準品種「シナノゴールド」のフラグメントピーク :



* 検出されるピークは 1 本

SSR マーカー名 : CH02b10

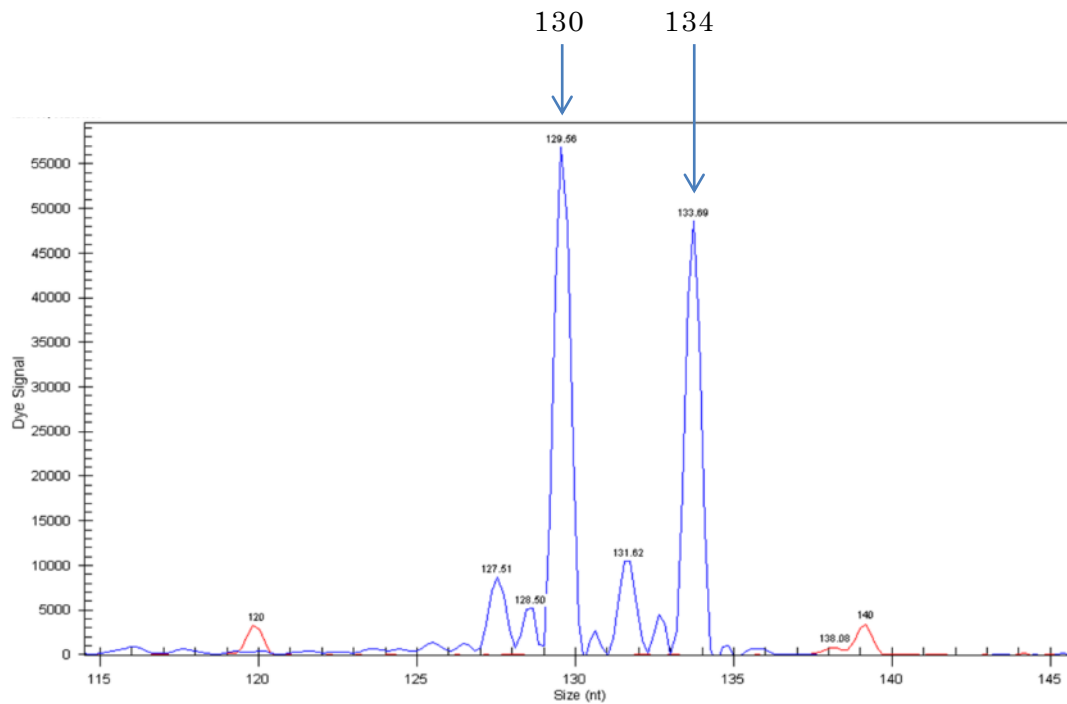
フォワードプライマー配列 : Beckman Dye4-CAAGGAAATCATCAAAGATTCAAG

リバースプライマー配列 : gtttcttCAAGTGGCTTCGGATAGTTG

モチーフ : (C T)₁₉

座上染色体番号 : 2

基準品種「シナノゴールド」のフラグメントピーク :



* 検出されるピークは 2 本

SSR マーカー名 : CH02d11

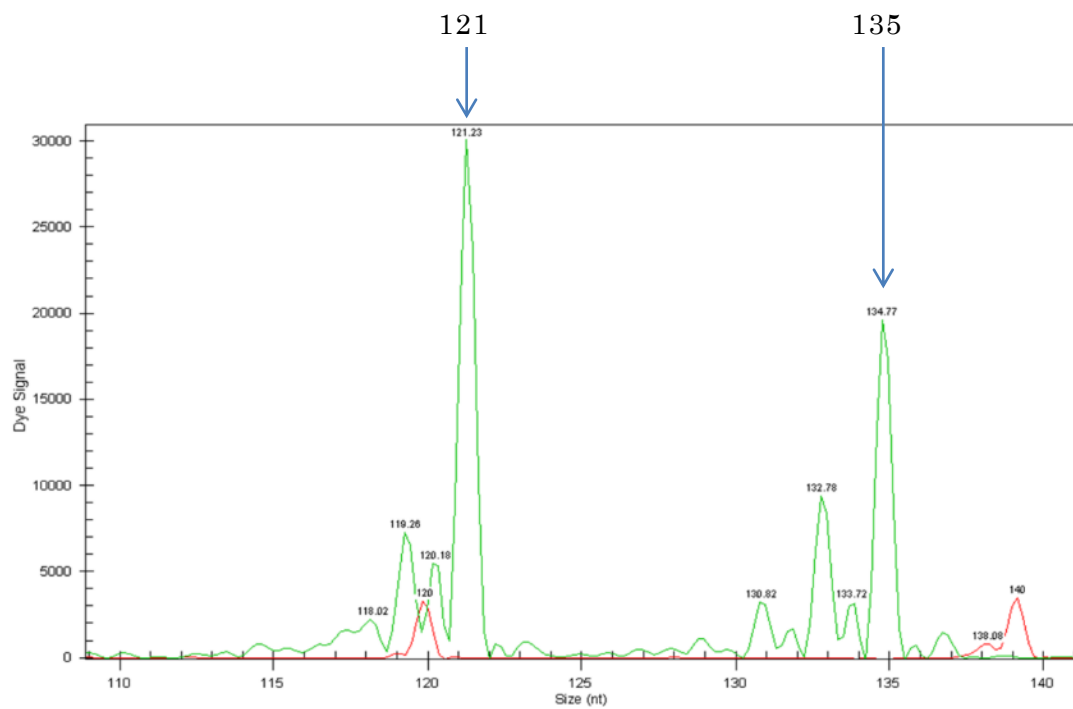
フォワードプライマー配列 : Beckman Dye3-AGCGTCCAGAGCAACAGC

リバースプライマー配列 : gtttAACAAAAGCAGATCCGTTGC

モチーフ : (A G)₁₂

座上染色体番号 : 15

基準品種「シナノゴールド」のフラグメントピーク :



* 検出されるピークは 2 本

SSR マーカー名 : CH02f06

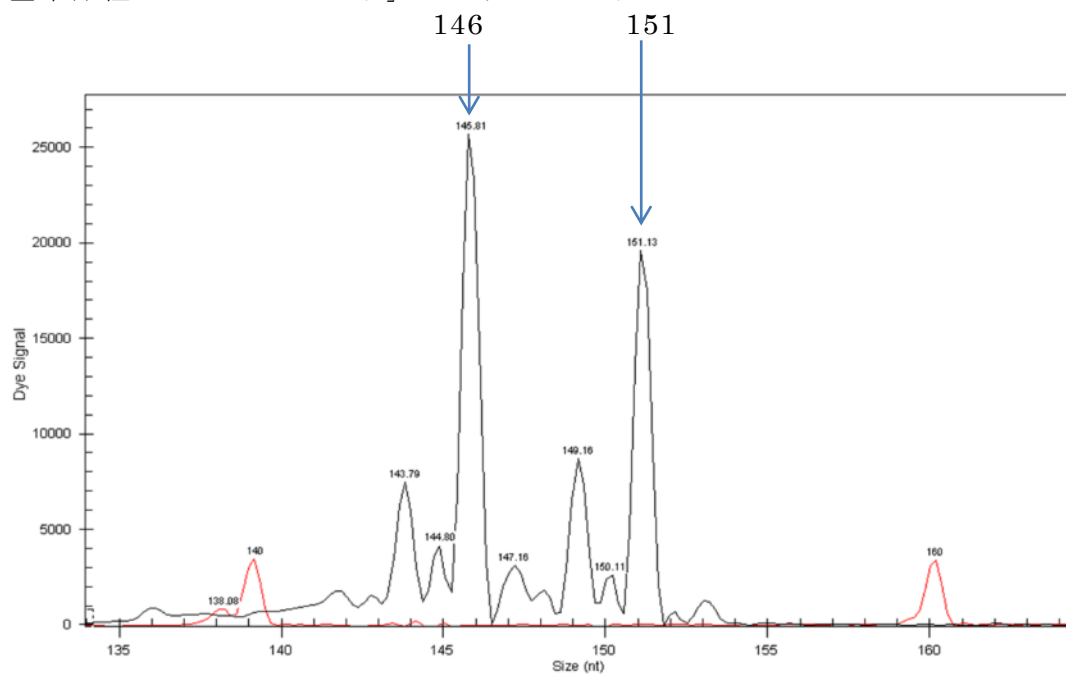
フォワードプライマー配列 : Beckman Dye2-CCCTCTTCAGACCTGCATATG

リバースプライマー配列 : gttttcttACTGTTTCCAAGCGATCAGG

モチーフ : (G A)₁₉

座上染色体番号 : 2

基準品種「シナノゴールド」のフラグメントピーク :



* 検出されるピークは 2 本

SSR マーカー名 : CH01d08

フォワードプライマー配列 : Beckman Dye4-CTCCGCCGCTATAA CACTTC

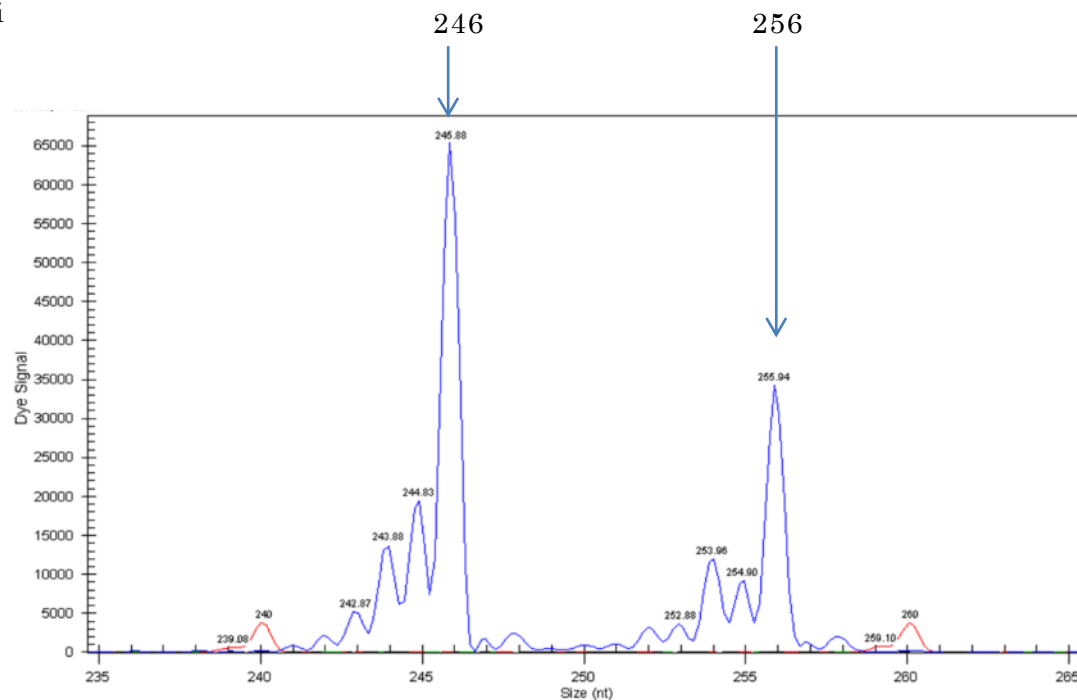
リバースプライマー配列 : gttttTACTCTGGAGGGTATGTCAAAG

モチーフ : (A G)₁₁

座上染色体番号 : 15

基準品種「シナノゴールド」のフラグメントピーク :

i



* 検出されるピークは 2 本

SSR マーカー名 : CH02b07

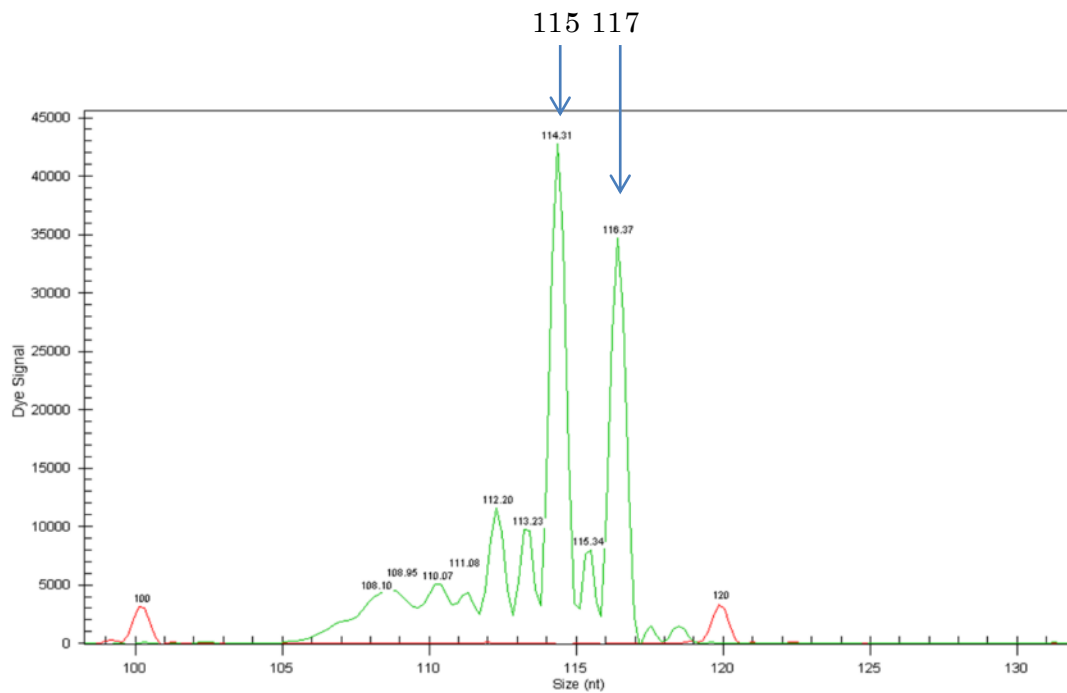
フォワードプライマー配列 : Beckman Dye3-CCAGACAAGTCATCACAACACTC

リバースプライマー配列 : gttttcttATGTCGATGTCGCTCTGTTG

モチーフ : (C T)₁₇

座上染色体番号 : 10

基準品種「シナノゴールド」のフラグメントピーク



* 検出されるピークは 2 本

SSR マーカー名 : CH02g09

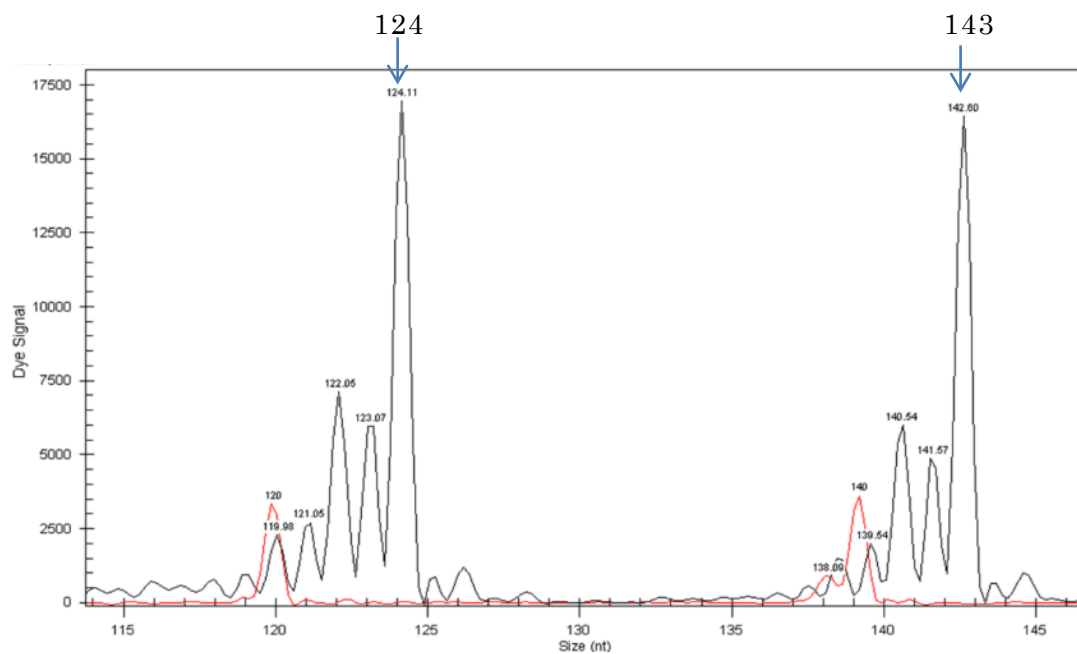
フォワードプライマー配列 : Beckman Dye2-TCAGACAGAAGAGGAAGTGTATTTG

リバースプライマー配列 : gttttCAAACAAACCAGTACCGCAA

モチーフ : (TC)₁₇

座上染色体番号 : 8

基準品種「シナノゴールド」のフラグメントピーク :



* 検出されるピークは 2 本

SSR マーカー名 : CH02h11a

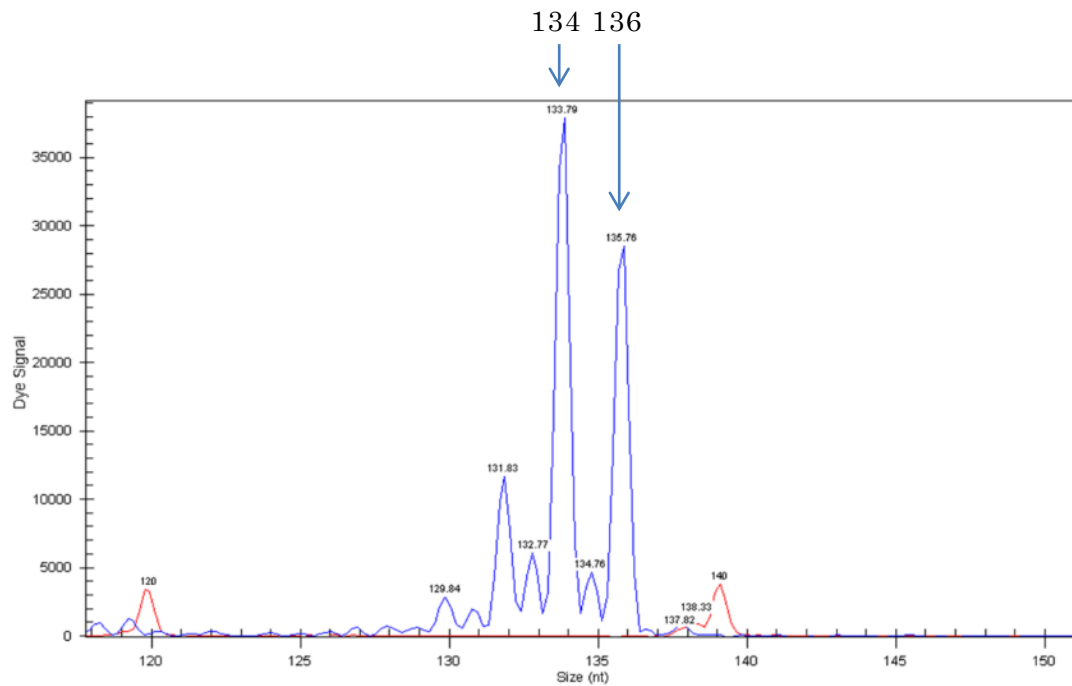
フォワードプライマー配列 : Beckman Dye4-CGTGGCATGCCTATCATTTG

リバースプライマー配列 : gttttcttCTGTTTGAACCGCTTCCTTC

モチーフ : (G A)₁₄

座上染色体番号 : 4

基準品種「シナノゴールド」のフラグメントピーク :



* 検出されるピークは 2 本

SSR マーカー名 : CH04d02

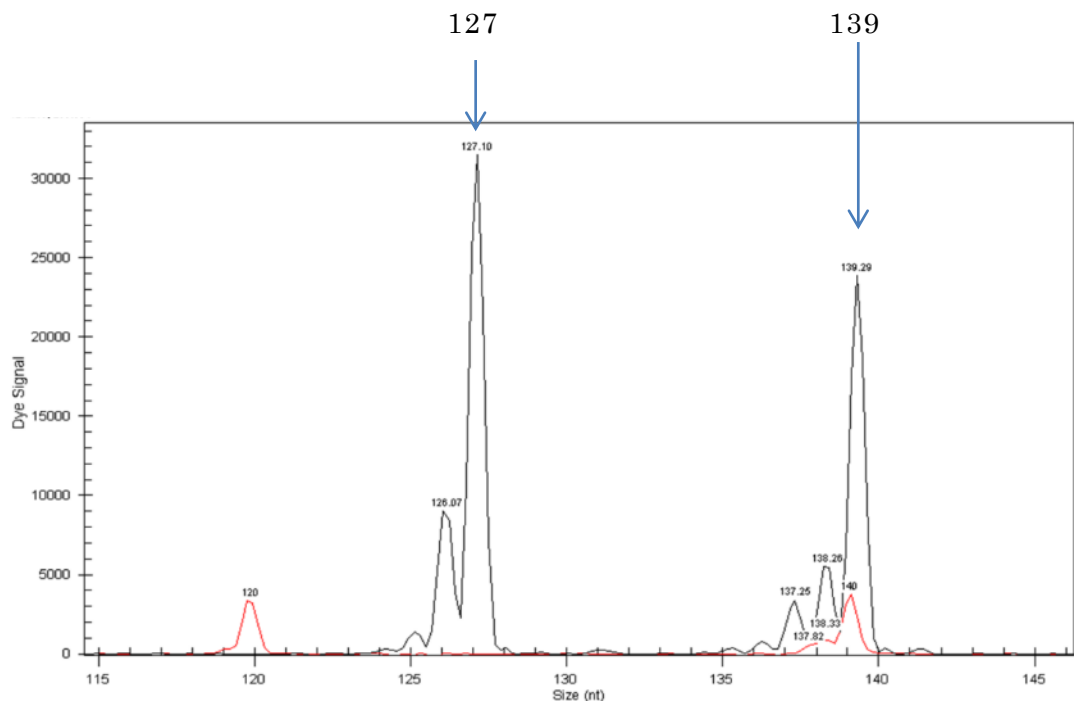
フォワードプライマー配列 : Beckman Dye2-CGTACGCTGCTTCTTTTGCT

リバースプライマー配列 : gttttcttCTATCCACCACCCGTCAACT

モチーフ : (T C)₁₉

座上染色体番号 : 12

基準品種「シナノゴールド」のフラグメントピーク



* 検出されるピークは 2 本

SSR マーカー名 : CH05c07

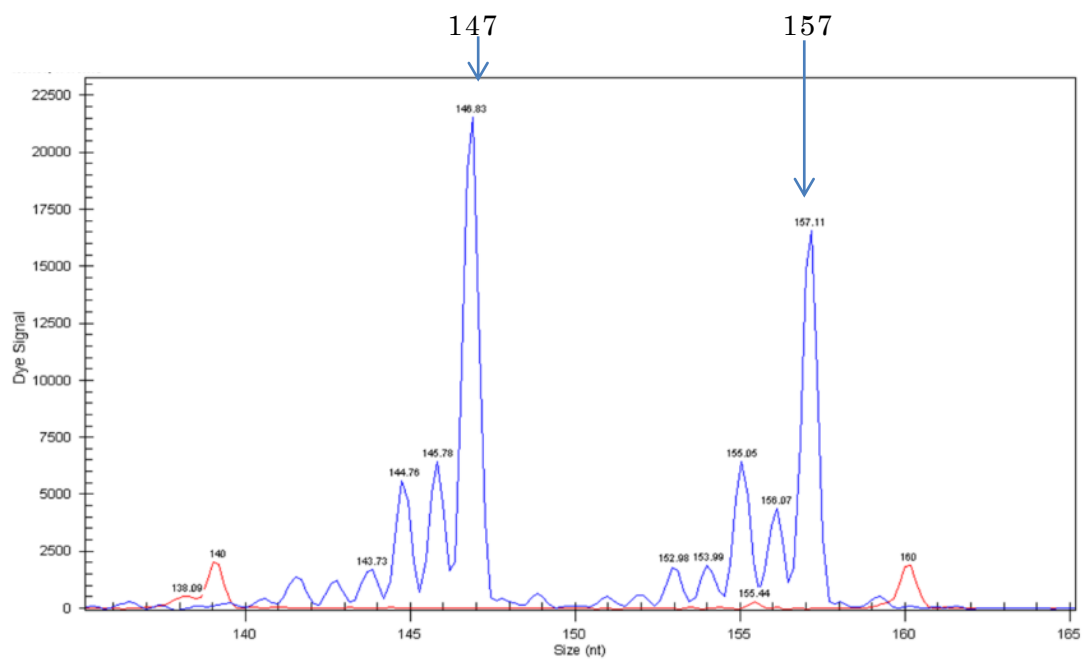
フォワードプライマー配列 : Beckman Dye4-TGATGCATTAGGGCTTGTACTT

リバースプライマー配列 : gttttcttGGGATGCATTGCTAAATAGGAT

モチーフ : (TC)₂₁

座上染色体番号 : 9

基準品種「シナノゴールド」のフラグメントピーク :



* 検出されるピークは 2 本

SSR マーカー名 : CH05g03

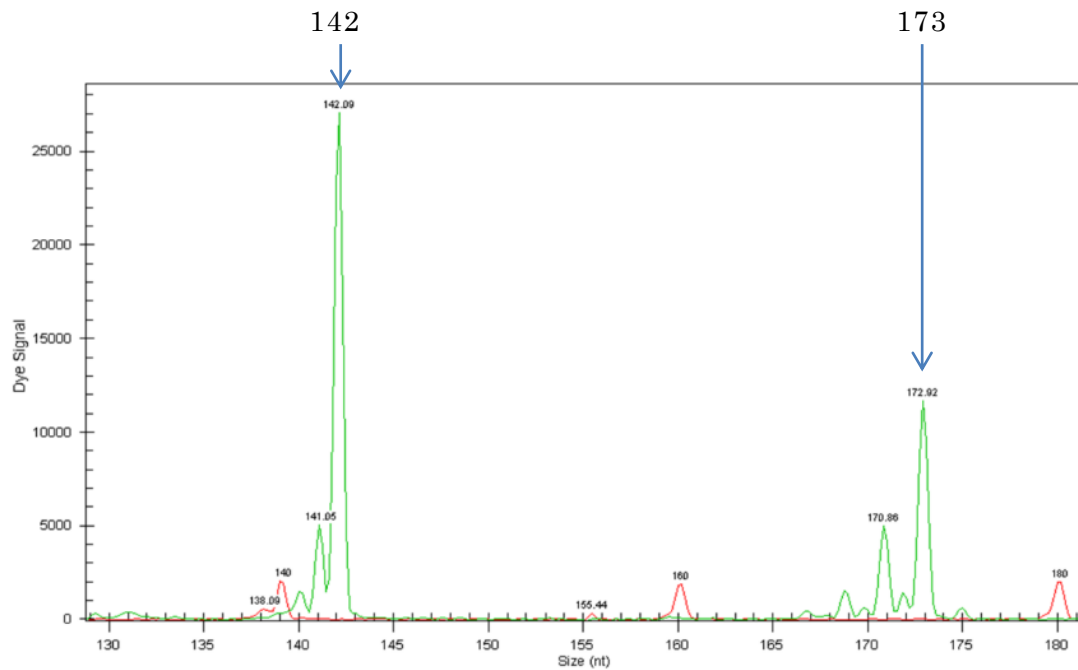
フォワードプライマー配列 : Beckman Dye3-GCTTTGAATGGATACAGGAACC

リバースプライマー配列 : gttttcttCCTGTCTCATGGCATTGTTG

モチーフ : (TC)₂₁

座上染色体番号 : 17

基準品種「シナノゴールド」のフラグメントピーク



* 検出されるピークは 2 本

SSR マーカー名 : CH04d10

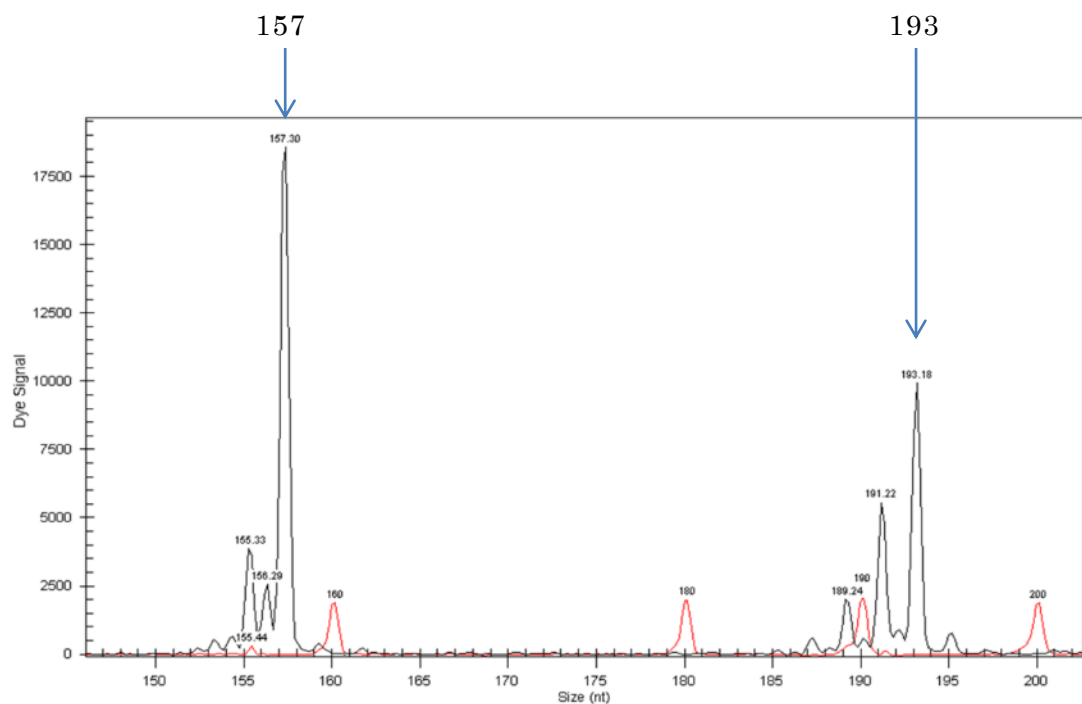
フォワードプライマー配列 : Beckman Dye2-GAGGGATCTGTAGCTCCGAC

リバースプライマー配列 : gttttcttTGGTGAGTATCTGCTCGCTG

モチーフ : (GA)₁₁GG(GA)₁₇

座上染色体番号 : 11

基準品種「シナノゴールド」のフラグメントピーク :



* 検出されるピークは 2 本

付属文書 2. 供試品種の特徴

品種名称	登録番号	出願番号	農林水産物の種類	育成者権者名/備考
シナノゴールド	7328	8710	Malus Mill. (和名：リンゴ属)	長野県
シナノスイート	5139	6771		長野県/期間満了により育成者権消滅
シナノドルチェ	12732	14586		長野県
シナノリップ	26584	30170		長野県
秋映	3411	4095		小田切健男氏（長野県中野市）/育成者権消滅
玉林	—	—		—
ぐんま名月	2816	3539		群馬県/期間満了により育成者権消滅
紅玉	—	—		—
ゴールデンデリシャス	—	—		—
千秋	42	91235		秋田県/育成権消滅
つがる	—	—		—
ふじ	—	—		—

※ゴールデンデリシャスと千秋は、シナノゴールドの親品種である。