

(参考資料 1)

DNA マーカー (CAPS 法) によるイチゴ品種識別マニュアル

2007 年 8 月

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構

野菜茶業研究所 野菜ゲノム研究チーム

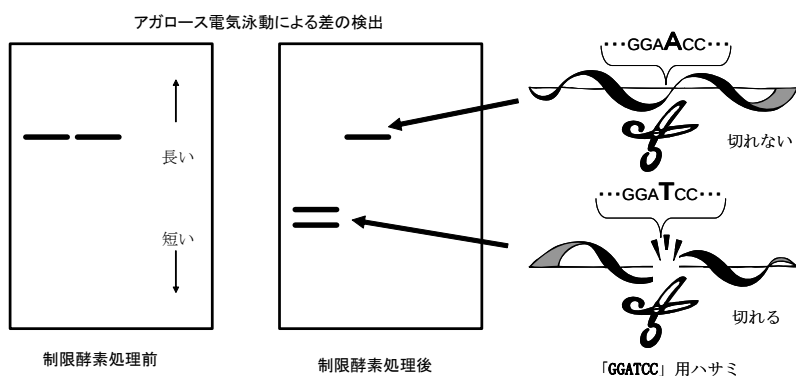
目次

1. DNA マーカーと CAPS について	・ ・ ・ ・ ・ 3
2. イチゴ葉からの DNA 抽出	・ ・ ・ ・ ・ 4
3. PCR 法による目的 DNA 断片の増幅	・ ・ ・ ・ ・ 6
4. 制限酵素処理による増幅断片の消化	・ ・ ・ ・ ・ 8
5. アガロースゲル電気泳動による多型の検出	・ ・ ・ ・ ・ 9
6. トラブルシューティング	・ ・ ・ ・ ・ 10
7. 使用マーカー一覧表	・ ・ ・ ・ ・ 11
8. イチゴ品種のマーカー遺伝子型	・ ・ ・ ・ ・ 37
9. 問合せ先	・ ・ ・ ・ ・ 40

1. DNA マーカーと CAPS について

ヒトがひとり一人違う DNA 配列をもっているように、イチゴの品種もそれぞれ異なる DNA 配列をもっています。このような配列の違いを手軽に検出する手段が DNA マーカーです。DNA マーカーには、ハイブリダイゼーションを行う RFLP、ランダム配列のプライマーを用いる RAPD、また生物に内在する短い塩基の繰り返し配列（マイクロサテライト）を検出する SSR 等様々な手法のものがあるが、本マニュアルでは制限酵素処理により配列差を検出する Cleaved Amplified Polymorphic Sequence (CAPS)を用いた品種識別法の実践法を紹介します。CAPS マーカーの利点は、安定な結果が得られやすく、検査をする人やサンプルの状態、DNA 抽出方法などによって結果が左右されにくいことです。また、手法も比較的シンプルで、DNA シーケンサなど高価な解析装置や高度な技術が必要ないことから、様々な検査機関で容易に取り組めることも挙げられます。

CAPS 法では、あらかじめ品種間で塩基配列に差があると分かっている遺伝子を標的として検出します。イチゴのゲノムの中から、該当遺伝子のみを PCR 法により選別し増幅しま



CAPSマーカーの仕組み

素)を選抜して処理を行います。その結果、制限酵素で切断される DNA を保有する品種と、切断されない DNA を持つ品種とでは、処理後に残る DNA 断片の長さが異なります (図参照)。この長さの違いはアガロースゲル電気泳動法により容易に検出できます。

実際に分析に必要な手順についても図に示しました。所要時間は、ある程度技術に熟練した分析者が 16 サンプルについて 5 つのマーカーで分析する場合の概算です。

す。この段階では大部分のマーカーにおいて増幅された遺伝子の長さに品種間の差はありません。しかし、遺伝子内部の配列は異なっているため、この配列の違いを認識する制限酵素 (特定の塩基配列だけを認識しその部分で DNA を切断する酵

実際の分析作業の流れ

1.DNA抽出(ガク片または果実20-50mg使用)

所要時間: 2時間

2.DNAの増幅(PCR法)

所要時間: 2時間

3.増幅産物の制限酵素処理

所要時間: 1~2時間

4.電気泳動による分離と検出

所要時間: 1時間

所要時間: 約8時間

2. イチゴ葉からの DNA 抽出

(QIAGEN DNeasy Plant Mini kit／添付の説明書にほぼ従う)

- 1) イチゴサンプル（葉またはガク片）50～100mg を破碎する。

ー細胞破碎装置（QIAGEN MM-300 等）を使用する場合

専用チューブにサンプル及びジルコニアボール等の錘を入れ、付属の AP1 Buffer 400μL、消泡剤（食品添加物：例ー信越化学工業 KM-72）一滴、及び付属の RNase A 4μL を加えて破碎する。

ーコンテスを用いる場合

1.5ml あるいは 2ml チューブにサンプル及び海砂を入れ、付属の AP1 Buffer 400μL と付属の RNase A 4μL を加えてコンテスで懸濁液様になるまで破碎する。

ー液体窒素を用いる場合

乳鉢にサンプル及び海砂を入れ、液体窒素を加えて乳棒で粉末状に破碎する。サンプルが溶解しないよう手早く行うこと。続けて付属の AP1 Buffer 400μL と付属の RNase A 4μL を加え、混合して、ピペットマンで 1.5ml あるいは 2ml チューブに移す。

（注！！AP1 Buffer：室温が低い場合には沈殿することがあるので使用前に沈殿の有無を確認する。沈殿がある場合は保温し完全に沈殿がなくなった状態で使用する。）

- 2) 破碎液の入ったチューブを 65℃で 10 分間インキュベートする。その間、2～3 回チューブを振って懸濁液が沈殿しないよう混合する。
- 3) 2)に付属の AP2 Buffer 130μL を加え、混合した後氷上で 5 分間インキュベートする。
- 4) 常温、15,000rpm で 5 分間遠心し、植物残滓や蛋白質、海砂を沈殿させる。
- 5) QIAshredder spin column（紫）を 2ml の collection tube（付属）の上にセッティングした状態で、4)の上清を column に移す。
- 6) 常温、15,000rpm で 2 分間遠心し、collection tube に溶液を集める。
- 7) 6)の上清（約 400μL）を、沈殿を吸わないように注意しながら新しいエッペンドルフチューブに移す。（※ここで沈殿が出ない場合も多い。）
- 8) 7)に付属の AP3/E Buffer を 1.5 倍量（約 600μL）加え、ピペッティングでしっかりと混合する。ここで沈殿が生じることもある。

（注！！AP3/E Buffer：使用前に AP3 Buffer に指定量のエタノールを加える必要がある。）

- 9) DNeasy mini spin column（白）を 2ml の collection tube（付属）の上にセッティングした状態で、8)の溶液 650μL を沈殿ごと column に移す。
- 10) 常温、10,000rpm で 1 分間遠心し、collection tube に集まった溶液は廃棄し、column を同じ tube に再びセッティングする。（※この状態で DNA は column のメンブレンに吸着している。）
- 11) 9)で残った溶液を同じ column に移し、同様の操作を繰り返す。

12) column を新しい collection tube (付属) の上に移し、付属の AW Buffer 500 μ L を加えて常温、10,000rpm で 1 分間遠心する。

(注！！AW Buffer：使用前に指定量のエタノールを加える必要がある。)

13) collection tube の中身は廃棄し、これを同じ column に再セッティングする。

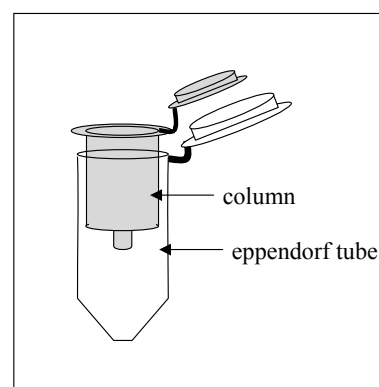
14) 12) の操作を繰り返す。ただし、遠心は常温、15,000rpm で 2 分間行い、メンブレンを完全に乾燥させる。(ここで溶液が残ると、後の PCR 反応に悪影響を及ぼす。)

15) column を新しい 1.5~2.0mL チューブに移し、65℃に温めた付属の AE Buffer 100 μ L を加え、5 分間放置する (右図)。

16) 常温、10,000rpm で 1 分間遠心する。

17) 15)、16) の操作を繰り返す。最終的に全量 200 μ L の DNA 溶液が得られる。

18) 200 μ L 中 10 μ L を 2% アガロースゲルにアプライして、抽出 DNA を確認する (※電気泳動方法は、10 ページ参照)。ここで、薄くても目に見える量の DNA が得られていれば、PCR のテンプレートとして使用可能。得られていなければ、再度抽出を行う。



19) PCR テンプレート用 DNA 溶液を作成するため新しいエッペンドルフチューブ (または 1.5~2.0mL チューブ) に滅菌水 180 μ L と DNA 抽出溶液 20 μ L を加えピペッティングによりゆっくり混合する。

(注！！PCR テンプレートには、抽出 DNA を滅菌水で 10 倍希釈したものを用いる。)

3. PCR 法による目的 DNA 断片の増幅

1) プライマー溶液の取扱

- ・ 使用時以外は常時冷凍で保存する。
- ・ 本マニュアルでは、プライマーの濃度を 5 pmol/μL に調整した例について記載する。

2) PCR 反応溶液の組成 (1 反応分)

dH ₂ O (滅菌水)	6.2 μL
10×PCR buffer (AmpliTaqGold 付属)	2.0 μL
dNTP mix (AmpliTaqGold 付属)	1.6 μL
Forward(Fw) primer (5 pmol/μL)	4.0 μL
Reverse(Rv) primer (5 pmol/μL)	4.0 μL
AmpliTaq Gold (5 unit/μL, Applied Biosystems 社製)	0.2 μL
DNA 溶液 (前項 19) に従い、DNA 溶液を dH ₂ O で 10 倍希釈したもの	2.0 μL (最適 DNA 量 2-20 ng)
合計	20.0 μL

注意！！

※DNA の 10 倍希釈には滅菌水の代わりに TE buffer を使用しないこと。

※Primer はマーカーごとに異なるため、「7. 品種識別用マーカー情報」を参照して適切なものを選択すること。 Primer 「F3H-Fw(N)」および「APX2-Rv」は、複数のマーカーで併用するので、注意する。

※Polymerase (AmpliTaq Gold) は常に氷上で取扱うこと。他の試薬は、常温で溶解後直ちに氷上に移すこと。

※(ポイント！！) 反応溶液の作成は、以下の順序で行うこと。

- ① dH₂O、PCR buffer、dNTP mix (順不同) を混合し、氷上でよく冷やす。
- ② 十分に冷えた①に、氷上で Primer 溶液を加える。以下の操作は全て氷上で行う。
- ③ AmpliTaq Gold を加える。
- ④ DNA 溶液を加える。

実際には数サンプル分の同時分析を行うことが多い。その場合、CAPS マーカーごとにまとめてプレミックス溶液を作成すると省力できる。以下に、6 サンプルを同時に分析する際のプレミックス組成と手順を例として記す。

－6 サンプル分プレミックス（余裕分含め7サンプル分）－

dH ₂ O（滅菌水）	43.4 μL
10×PCR buffer（AmpliTaqGold 付属）	14.0 μL
dNTP mix（AmpliTaqGold 付属）	11.2 μL
Forward(Fw) primer（5 pmol/μL）	28.0 μL
Reverse(Rv) primer（5 pmol/μL）	28.0 μL
AmpliTaq Gold（5 unit/μL）	1.4 μL
合計	126.0 μL

注意！！

※操作の注意点は前々ページに記載されたものに従う。

※Polymerase は最後に加え、溶液全体を絶対に泡が立たないようにゆっくりと混合する。

各サンプルの DNA 希釈溶液 2 μL を、それぞれの PCR 反应用チューブ（0.2 ml チューブ、96 サンプル用プレート等）に入れておく。

↓

プレミックスを必要サンプル数＋余裕分作成し、氷上で18 μLずつDNAの入ったチューブに分注する。このとき、DNA溶液との混合操作をする必要はない。

↓

軽く遠心して溶液をチューブの底に集める。その後サーマルサイクラーにかけるまで、氷上に保存する。

3) PCR 反応の条件

94℃	10 分	
94℃	30 秒	
55℃	30 秒	
72℃	30 秒	
72℃	7 分間	
4℃	∞	

×35 回繰り返す

PCR 反応終了後、DNA の増幅を確認する。20 μL 中 5 μL を 2%アガロースゲルにアプライして、増幅の有無を確認する。（※電気泳動方法は、10 ページ参照）

4. 制限酵素処理による増幅断片の消化

(1 サンプル分の溶液組成)

PCR 増幅溶液	5.0 μ L
10×制限酵素用バッファー	1.0 μ L
滅菌水	3.6 μ L
制限酵素 4 Unit※	0.4 μ L
合計	10 μ L



軽く遠心

※37℃、2 時間インキュベート

この溶液についても PCR 反応溶液と同様、マーカーごとに必要サンプル分のプレミックス溶液を調整することで省力化できる。あらかじめ PCR 増幅溶液 5.0 μ L をチューブに入れておき、プレミックス溶液を 5.0 μ L ずつ分注する。

どの PCR 増幅産物に対してどの制限酵素で処理するかは、7. 品種識別用マーカー情報を参照すること。6 サンプルを同時に分析する際のプレミックス組成を例として記している。

注意！！

※制限酵素処理温度の基本は 37℃であるが、中には 55℃ (*Bse*G I)、60℃ (*Bsa*B I) や 65℃ (*Taq* I) のものがあるので注意するとともに、「7. 品種識別用マーカー情報」の留意点を参考にする。

※制限酵素は氷上で取り扱い、プレミックスには最後に加えて泡が立たないようにゆっくり混合すること。

5. アガロースゲル電気泳動による多型の検出

9 ページで処理した反応溶液全量（～10 μ L）を 2.0%アガロースゲルにアプライし、電気泳動により以下の方法で多型を確認する。

1) アガロースゲル (2.0%) の作成 (ミューピッド大ゲル使用の場合)

- ・ 0.8 g のアガロースを計量し、100ml 三角フラスコに入れる。1×TAE (TBE でも可) 40ml を加えてよく混ぜる。



- ・ 電子レンジ内で温めてアガロースを溶解させる。この時、完全に溶解していることを確認する。



- ・ 10mg/mlのエチジウムブロマイド溶液 2.0 μ Lを加えて、良く混ぜる。コームを立てたゲル作成用ユニットの中に、泡立たないように流し込み、固まるまで放置する。

※エチジウムブロマイドは変異源であるので取り扱いには注意する。

2) 電気泳動

- ・ 指定量の DNA 溶液をパラフィルム上にとり、約 1/6 量の 6×ローディングバッファ（DNA 溶液 10 μ L なら 2 μ L）を添加し、よく混ぜる。



- ・ 全量を泳動槽にセットした 2.0%アガロースゲルにアプライし、1×TAE (ゲルが TBE の場合 TBE) 中で、ローディングバッファの色素がゲルの 3/4 程度に来るまで電気泳動を行う。鮮明な像を出すためには電圧は 100V 以下が望ましい。



ゲルを紫外線照射下に置き、多型を確認・撮影する。第 9 章の電気泳動写真と比較し、多型のタイピングを行う。

※抽出 DNA の有無や、PCR 増幅の有無を確認する場合は、泳動距離は上記の 1/5 程度で十分です。

アガロース濃度が 2.0%であれば、ゲルのサイズやエチジウムブロマイドの量・電気泳動の方法等は基本的に実施されている研究機関の常用法で問題ありません。

6. トラブルシューティング

(症状 1) PCR 反応を行っても、目的のバンドが増幅しない。下の方にぼやけたもの（プライマーダイマー）が大量に出る。

※ダイマーが大量に出ても、目的のバンドが多型検出に十分量増幅されていれば問題ありません。

- ・ プライマーのデザイン上、PCRに反応前にダイマーを作ってしまった可能性があります。

対策 1) 氷上操作を徹底してください。プライマーを含む溶液を 4℃以上にしないください。

対策 2) 毎回使用前にプライマーの熱変成を行ってみてください。

使用する量の Forward 及び Reverse プライマー溶液を、同一の 0.2ml PCR 用チューブに入れる。

↓

サーマルサイクラーにセットして 95℃で 15 分熱変成し、その後直ちに氷上に移し、3-5 分急冷する。

↓

全量をよく冷えたプレミックス溶液に加える。

- ・ DNA溶液を原液のまま使用すると、増幅しないことがあります。必ず 10 倍に希釈して使用してください。

(症状 2) PCR 反応でそれらしいバンドは増幅するが、制限酵素処理後に明確な品種間多型が出ない。

- ・ Ampli Taq Gold以外のpolymeraseを使用すると、このようなことが起こる場合があります。

(症状 3) 制限酵素処理後、はっきりした品種間多型は見られるが、酵素切断の切れ残りのようなバンドが現れるため、正しい多型の判断が難しい。

対策 1) 毎回使用前にプライマーの熱変成を行ってみてください（方法は上記）。

対策 2) アニーリング温度が適切でない（低い）可能性があります。サーマルサイクラーの機種によって温度が微妙に違いますので、予備試験で 0.5～1.0℃ずつ上げながらお使いの機種の適温条件を設定してください。但し、上げすぎる（約 60℃以上）と DNA が増幅されなくなります。

対策 3) 制限酵素処理にエアーインキュベーターを用いている場合、酵素処理が不十分な可能性があります。ウォーターバスかサーマルサイクラーを用いてインキュベートを行ってください。

7. 使用マーカー一覧表

イチゴ品種識別に使用するマーカーについての、必要なプライマー配列情報、およびそれに組み合わせる制限酵素等の情報を下記に記載しました。

ーマーカー名は対象遺伝子の略称と使用する制限酵素名を併記したものです。

ー写真は 23 品種・系統（レーン 6 と 14 は同じ品種で再現性を示している）においてマーカーで解析した場合得られる電気泳動後の像です。

番号	品 種 名	番号	品 種 名	番号	品 種 名
1	とよのか	9	サンチーゴ	17	純ベリー
2	女峰	10	ピーストロ	18	リンダモール
3	とちおとめ	11	アイストロ	19	栃の峰
4	章姫	12	紅ほっぺ	20	とちひめ
5	さちのか	13	けいきわせ	21	さがほのか
6	アイベリー	14	アイベリー	22	久留米 9323 号
7	レッドパール	15	さつまおとめ	23	福岡 S6（あまおう）
8	濃姫	16	ひのみね	24	宝交早生

ー 2 つのプライマー配列はプライマー名に続けて記載しています。プライマー名は遺伝子の略称と Fw(forward) もしくは Rv(reverse) を併記しており、これまでの発表論文（下記）と配列等が異なるものには(N)を添加しています。F3H-Fw(N) 、APX2-Rv は、複数の PCR に併用するプライマーであるので注意して下さい。

Kunihisa, M., N. Fukino and S. Matsumoto. 2003. Development of cleavage amplified polymorphic sequence (CAPS) markers for identification of strawberry cultivars. *Euphytica* 134: 209-215

Kunihisa, M., N. Fukino and S. Matsumoto. 2005. CAPS markers improved by cluster-specific amplification for octoploid strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.) cultivar identification, and their disomic inheritance. *Theor. Appl. Genet.* 110: 1410-1418

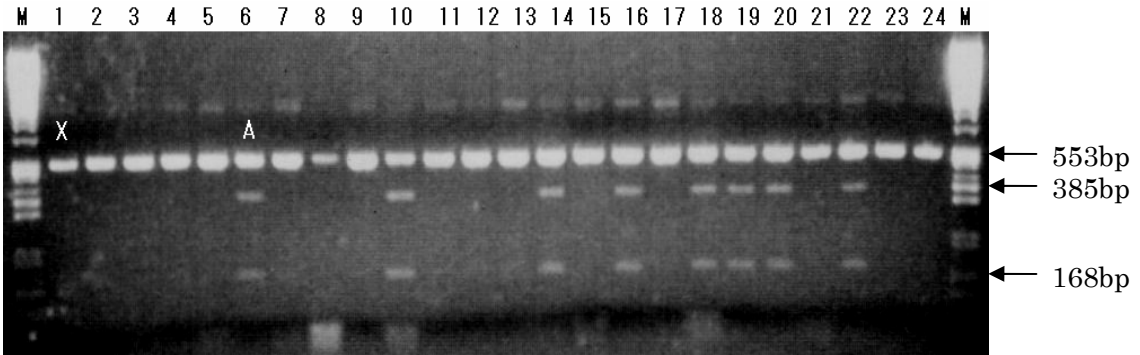
ーコメント・留意点は、必ず参考にして下さい。基本の制限酵素処理温度(37℃)とは異なるマーカーについてはここに記載しています。

ーバンドサイズの欄は、PCR で増幅されるバンドおよび制限酵素処理後に現れる多型バンドのおおよそのサイズを示しています。

ー制限酵素溶液プレミックス欄に 6 サンプル分の基本的なプレミックス組成を記しました。

DFR-Hin6 I (DFR-HhaI)

電気泳動像の例 (M は分子量マーカー λ H/H、番号に該当する品種名を 12 ページの表に記載)



多型タイプ : A、X

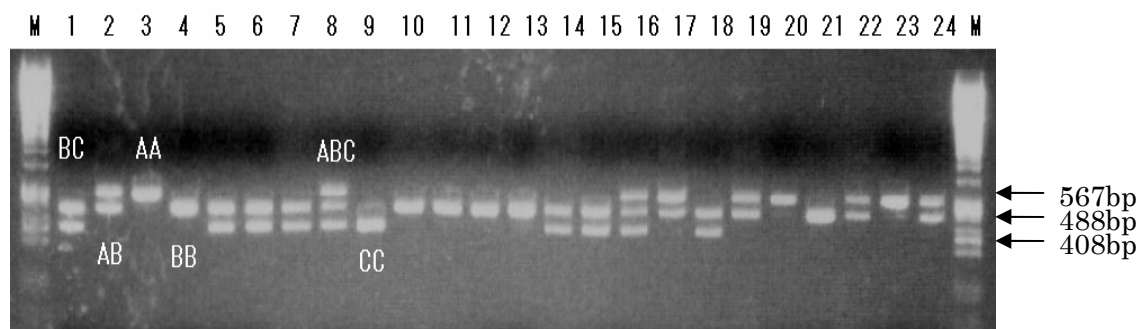
補足 : 多型バンドが最も薄いマーカーで検出に注意を要する (電気泳動距離を短めにする)。

プライマー	Sequence	Base	制限酵素	処理温度
DFR-Fw	GAGACCCTGGTCCGTCG	17	Hin6 I	37℃
DFR-Rv	CCTCCGAAGTGTCTTTGCTTTGAG	24		

多型バンドサイズ (下線の有無で判断)	制限酵素反応液分量
PCR 増幅産物 : 553 bp 多型A : 553 bp, <u>385 & 168 bp</u> 多型 X : 553 bp	6+1 サンプル分 <u>Fermentas Hin6 I (10U/μL)</u> Hin6 I 2.8 μL Buffer Tango 7.0 μL H ₂ O 25.2 μL

APX-Mlu I

電気泳動像の例 (M は分子量マーカー λ H/H、番号に該当する品種名を 12 ページの表に記載)



多型タイプ： AA、BB、CC 、AB、BC、ABC

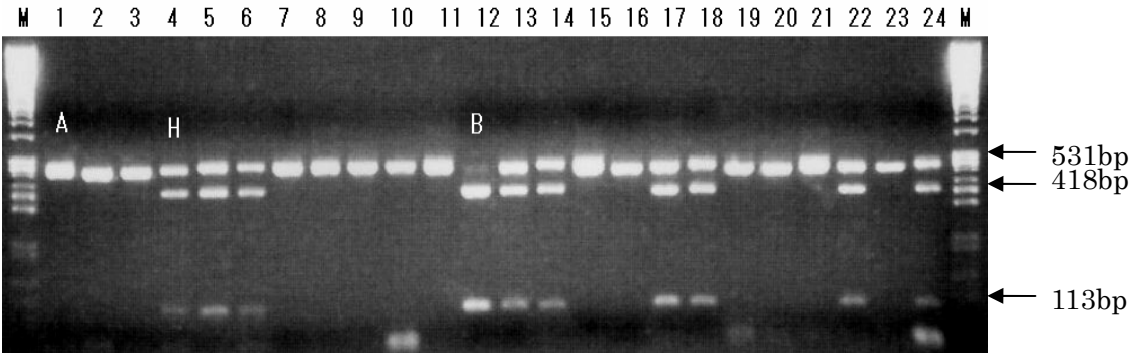
補足：PCR 増幅の段階で 2 通りのバンドが増幅される。制限酵素処理後さらにもう一通りのバンドが検出できる。

プライマー	Sequence	Base	制限酵素	処理温度
APX-Fw	GTGGTCACACCTTGGTGC	18	<i>Mlu</i> I	37℃
APX-Rv	AGTATAATATTTAAGCAGAATGCAGACTTC	30		

多型バンドサイズ (下線の有無で判断)	制限酵素反応液分量
PCR 増幅産物：567 bp or/and 488 bp 多型ABC： <u>567 bp</u> , <u>488 bp</u> , <u>408 bp</u> 多型AB： <u>567 bp</u> , <u>488 bp</u> 多型BC： <u>488 bp</u> , <u>408 bp</u> 多型AA： <u>567 bp</u> 多型BB： <u>488 bp</u> 多型CC： <u>408 bp</u>	6+ 1 サンプル分 <u>Fermentas <i>Mlu</i> I (10U/μL)</u> <i>Mlu</i> I 2.8 μL BufferR 7.0 μL H ₂ O 25.2 μL

CHI-PvuⅡ

電気泳動像の例 (M は分子量マーカー λ H/H、番号に該当する品種名を 12 ページの表に記載)



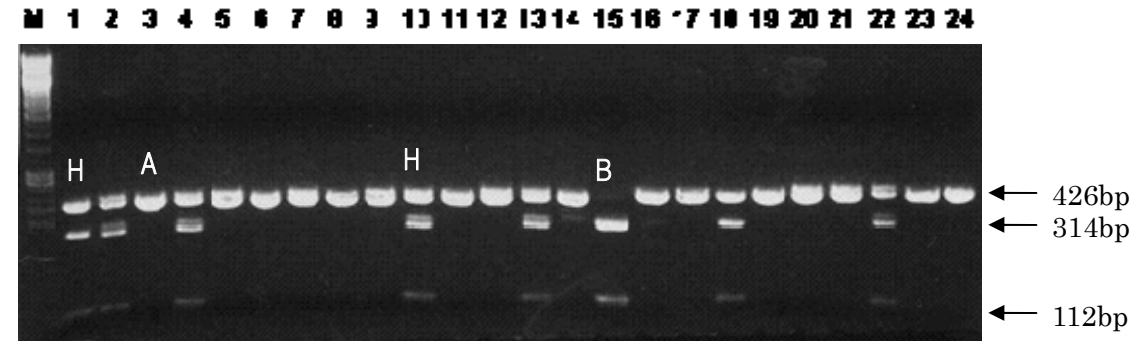
多型タイプ : A、B、H

プライマー	Sequence	Base	制限酵素	処理温度
CHI-Fw	AGGAGTTGACAGAGTCGGTTG	21	PvuⅡ	37℃
CHI-Rv	GACTTGTGAGTATGATAGTCTGCTG	25		

多型バンドサイズ (下線の有無で判断)	制限酵素反応液分量
PCR 増幅産物 : 531 bp	6+1 サンプル分
多型A : <u>531 bp</u>	<u>Fermentas PvuⅡ (10U/μL)</u>
多型H : <u>531 bp</u> , <u>418 bp</u> , 113bp	PvuⅡ 2.8 μL
多型B : <u>418 bp</u> , 113bp	BufferG 7.0 μL
	H ₂ O 25.2 μL

F3H-NcoI (N)

電気泳動像の例 (M は分子量マーカー λ H/H、番号に該当する品種名を 12 ページの表に記載)



多型タイプ： A、H、B

補足 1：314bp バンドの上部に薄いバンドが出る場合があるが(レーン 2/4/10 等)、タイピング上は無視する。

補足 2：フォワードプライマーが他のマーカー (F3H2-Dde I) と共通

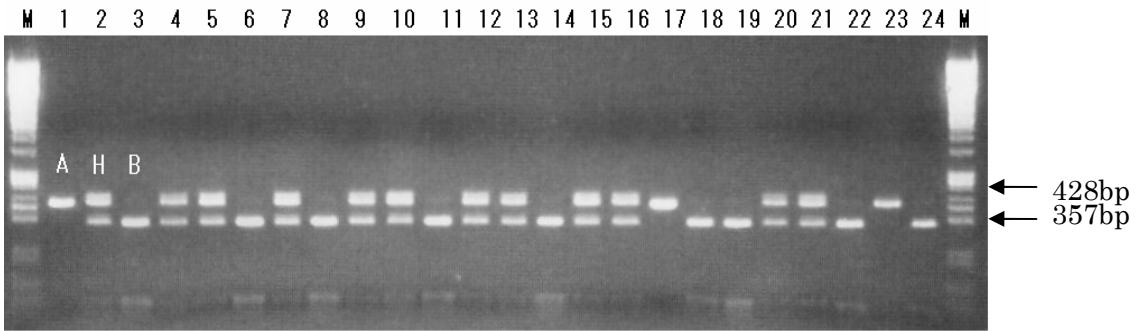
補足 3：プライマーペアが他のマーカー (F3H-Eam1104 I) と共通

プライマー	Sequence	Base	制限酵素	処理温度
F3H-Fw(N)	ACCATGGACATGTGAGTATACTTT	24	Nco I	37°C
F3H-Rv(N)	ACTAAGGAACTCATACTCAACCA	23		

多型バンドサイズ	制限酵素反応液分量
PCR 増幅産物：426 bp	<u>6+1 サンプル分</u> NEB Nco I (10U/μL) 2.8 μL Buffer 4 7.0 μL H ₂ O 25.2 μL
多型 A：426 bp	
多型 H：426 bp, 314 & 112 bp	
多型 B：314 & 112 bp	

F3H-Eam1104 I (EarI) (N)

電気泳動像の例 (M は分子量マーカー λ H/H、番号に該当する品種名を 12 ページの表に記載)



多型タイプ : A、B、H

補足 1 : フォワードプライマーが他のマーカー (F3H2-Hpa II) と共通

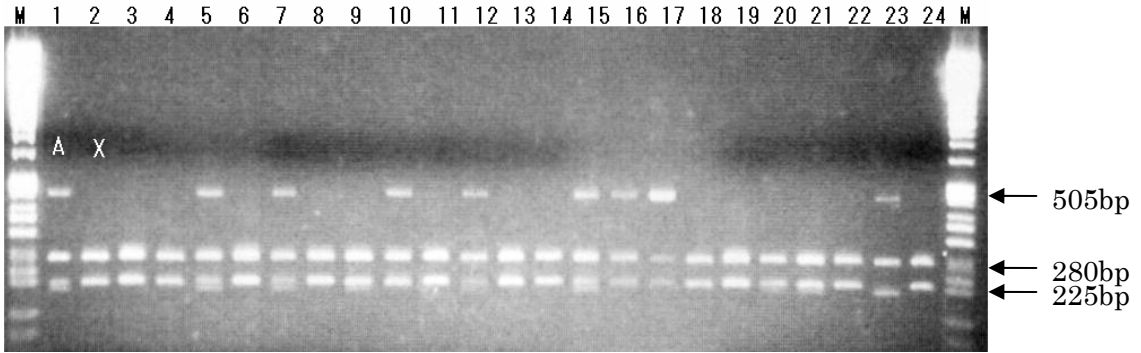
補足 2 : プライマーペアが他のマーカー (F3H-Nco I) と共通

プライマー	Sequence	Base	制限酵素	処理温度
F3H-Fw (N)	ACCATGGACATGTGAGTATACTTT	24	<i>Eam</i> 1104 I	37°C
F3H-Rv (N)	ACTAAGGAACTCATACTCAACCA	23		

多型バンドサイズ (下線の有無で判断)	制限酵素反応液分量
PCR 増幅産物 : 428 bp 多型A : <u>428 bp</u> 多型H : <u>428 bp</u> , <u>357 bp</u> 多型B : <u>357 bp</u>	6+1 サンプル分 <u>Fermentas <i>Eam</i>1104 I (10U/μL)</u> <i>Eam</i> 1104 I 2.8 μL Buffer Tango 7.0 μL H ₂ O 25.2 μL

F3H2-Hpa II (N)

電気泳動像の例 (M は分子量マーカー λ H/H、番号に該当する品種名を 12 ページの表に記載)



多型タイプ : A、X

補足 1 : フォワードプライマーが他のマーカー (F3H-Eam1104 I (N)) と共通

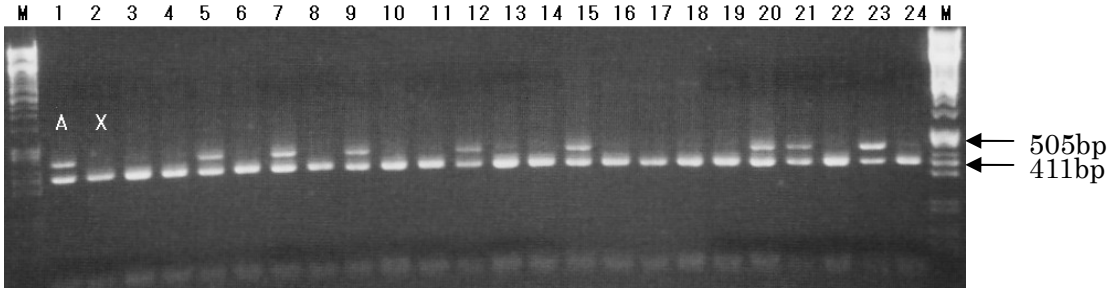
補足 2 : プライマーペアが他のマーカー (F3H2-Dde I) と共通

プライマー	Sequence	Base	制限酵素	処理温度
F3H-Fw (N)	ACCATGGACATGTGAGTATACTTT	24	<i>Hpa</i> II	37℃
F3H2-Rv (N)	CCCAAATAATGTGTCAATACATATACGAT	29		

多型バンドサイズ (下線の有無で判断)	制限酵素反応液分量
PCR 増幅産物 : 505 bp 多型A : <u>505 bp</u> , 280 & 225 bp 多型 X : 280 & 225 bp	6+1 サンプル分 <u>Fermentas <i>Hpa</i> II (10U/μL)</u> <i>Hpa</i> II 2.8 μL Buffer Tango 7.0 μL H ₂ O 25.2 μL

F3H2-DdeI (N)

電気泳動像の例 (M は分子量マーカー λ H/H、番号に該当する品種名を 12 ページの表に記載)



多型タイプ： A、X

補足 1：505bp バンドはやや薄く見にくいため、泳動を長めにするなど分離を徹底する。

補足 2：フォワードプライマーが他のマーカー (F3H-Nco I) と共通

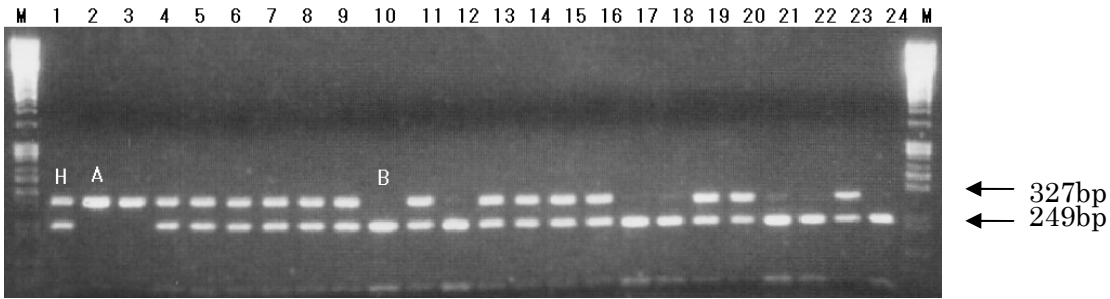
補足 3：プライマーペアが他のマーカー (F3H2-HpaII) と共通

プライマー	Sequence	Base	制限酵素	処理温度
F3H-Fw(N)	ACCATGGACATGTGAGTATACTTT	24	Dde I	37℃
F3H2-Rv(N)	CCCAAATAATGTGTCAATACATATACGAT	29		

多型バンドサイズ	制限酵素反応液分量 (予備試験用プレミックス)
PCR 増幅産物：505 bp	6+ 1 サンプル分
多型 A：505 bp, 411 bp	NEB Dde I (10U/ μ L) 2.8 μ L
多型 X：411 bp	Buffer 3 7.0 μ L
	H ₂ O 25.2 μ L

F3H3-AccI (N)

電気泳動像の例 (M は分子量マーカー λ H/H、番号に該当する品種名を 12 ページの表に記載)



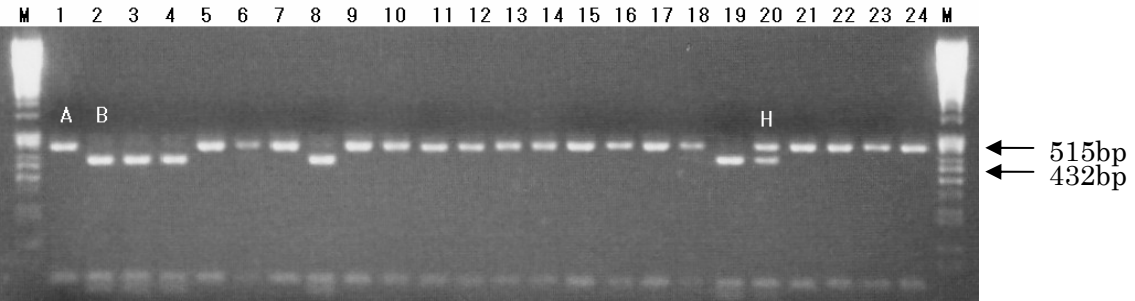
多型タイプ : A、H、B

プライマー	Sequence	Base	制限酵素	処理温度
F3H3-Fw	TAATAGGGTCTAGGTGCGTGG	21	Acc I	37℃
F3H3-Rv(N)	ACCCAAATAATGTGTCAATACATATAAGAC	30		

多型バンドサイズ	制限酵素反応液分量
PCR 増幅産物 : 327 bp	<u>6+1 サンプル分</u>
多型 A : 327 bp	NEB Acc I (10U/μL) 2.8 μL
多型 H : 327 bp, 249 bp	Buffer 4 7.0 μL
多型 B : 249 bp	H ₂ O 25.2 μL

CTI1-HinfI

電気泳動像の例 (M は分子量マーカー λ H/H、番号に該当する品種名を 12 ページの表に記載)



多型タイプ : A、H、B

プライマー	Sequence	Base	制限酵素	処理温度
CTI1-Fw	TTCTAATGATCAACACCTACTTTCCC	26	Hinf I	37℃
CTI1-Rv	GTAGCCCAACCGCCTG	16		

多型バンドサイズ	制限酵素反応液分量
PCR 増幅産物 : 593 bp	<u>6+1 サンプル分</u>
多型 A : 515 bp	Fermentas Hinf I (10U/μL) 2.8 μL
多型 H : 515 bp, 432 bp	Buffer R 7.0 μL
多型 B : 432 bp	H ₂ O 25.2 μL

MSR-Alu I

電気泳動像の例 (M は分子量マーカー λ H/H、番号に該当する品種名を 12 ページの表に記載)



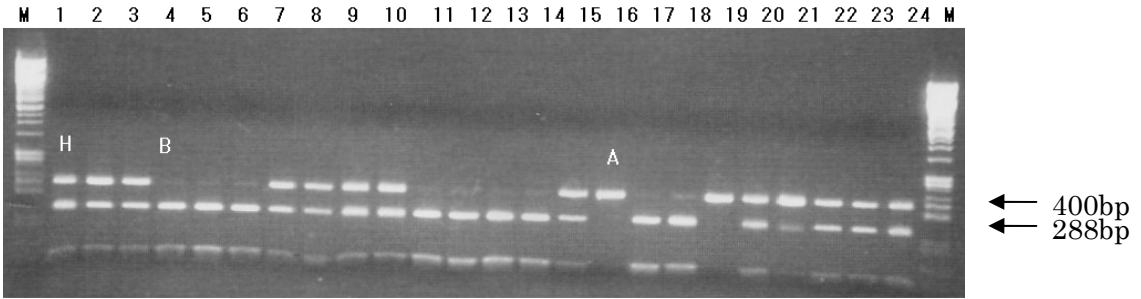
多型タイプ : A、B、H

プライマー	Sequence	Base	制限酵素	処理温度
MSR-Fw	AGCACTTTCACCATAGGCATAATC	24	Alu I	37℃
MSR-Rv	CCTTGAGCATAAATGAACTGGCA	23		

多型バンドサイズ (下線の有無で判断)	制限酵素反応液分量
PCR 増幅産物 : 525 bp 多型A : <u>525 bp</u> 多型H : <u>525 bp</u> , <u>276 & 249 bp</u> 多型B : <u>276 & 249 bp</u>	6+1 サンプル分 <u>NEB Alu I (10U/μL)</u> Alu I 2.8 μL Buffer2 7.0 μL H ₂ O 25.2 μL

PGPA-AccI (N)

電気泳動像の例 (M は分子量マーカー λ H/H、番号に該当する品種名を 12 ページの表に記載)



多型タイプ : A、H、B

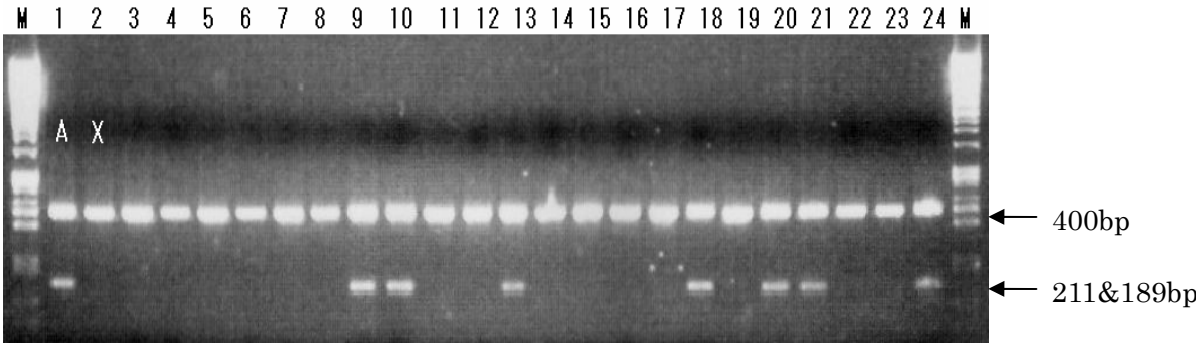
補足 : プライマーペアが他のマーカー (PGPA-RsaI) と共通

プライマー	Sequence	Base	制限酵素	処理温度
PGP-FwA	CCTCACCTTCCTCGAGCTC	19	Acc I	37℃
PGP-RvA(N)	AAGTCTATCCGATCAAAGTTCATG	24		

多型バンドサイズ	制限酵素反応液分量
PCR 増幅産物 : 400 bp	<u>6+1 サンプル分</u>
多型 A : 400 bp	NEB Acc I (10U/μL) 2.8 μL
多型 H : 400 bp, 288 bp	Buffer 4 7.0 μL
多型 B : 288 bp	H ₂ O 25.2 μL

PGPA-Rsa I (N)

電気泳動像の例 (M は分子量マーカー λ H/H、番号に該当する品種名を 12 ページの表に記載)



多型タイプ : A、X

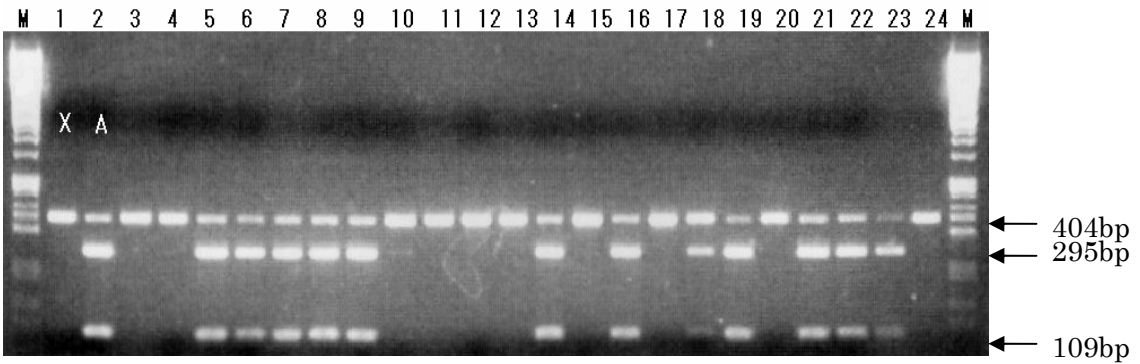
補足 : プライマーペアが他のマーカー (PGPA-AccI) と共通

プライマー	Sequence	Base	制限酵素	処理温度
PGP-FwA	CCTCACCTTCCTCGAGCTC	19	Rsa I	37℃
PGP-RvA (N)	AAGTCTATCCGATCAAAGTTCATG	24		

多型バンドサイズ (下線の有無で判断)	制限酵素反応液分量
PCR 増幅産物 : 400 bp 多型A : 400 bp, <u>211 & 189 bp</u> 多型 X : 400 bp	6+1 サンプル分 NEB Rsa I (10U/μL) _____ 2.8 μL Buffer1 7.0 μL H ₂ O 25.2 μL

PGPB-Rsa I

電気泳動像の例 (M は分子量マーカー λ H/H、番号に該当する品種名を 12 ページの表に記載)



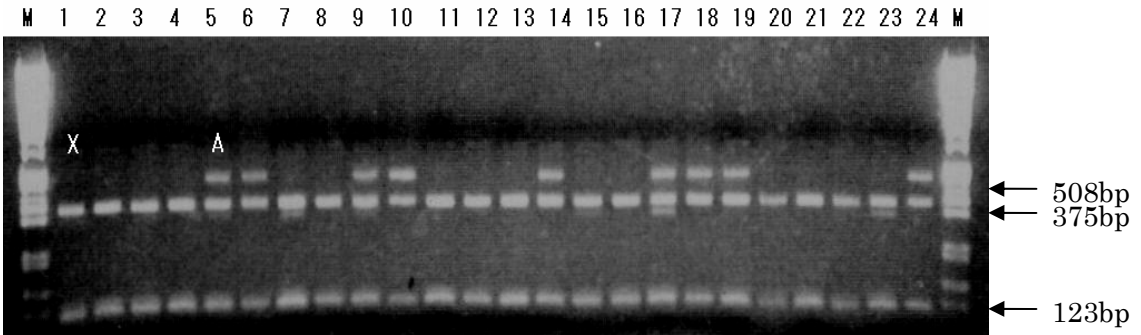
多型タイプ : A、X

プライマー	Sequence	Base	制限酵素	処理温度
PGP-FwB	ACCTCACCTTCCTTGAGCTT	20	Rsa I	37℃
PGP-RvB	GACAAGTCTATCCGATCAAAGTTCATA	27		

多型バンドサイズ (下線の有無で判断)	制限酵素反応液分量
PCR 増幅産物 : 404 bp 多型A : 404 bp, <u>295 bp</u> , 109 bp 多型 X : 404 bp	6+1 サンプル分 <u>NEB Rsa I (10U/μL)</u> 2.8 μL Buffer1 7.0 μL H ₂ O 25.2 μL

APX2-Dra I

電気泳動像の例 (M は分子量マーカー λ H/H、番号に該当する品種名を 12 ページの表に記載)



多型タイプ : A、X

補足 : リバースプライマーが他のマーカー (APX3-Dra I、APX4-Taq I) と共通

プライマー	Sequence	Base	制限酵素	処理温度
APX2-FwA	CAGAGGCCTCATCGCCG	17	Dra I	37℃
APX2-Rv	TCAGGTCCACCGGTGACC	18		

多型バンドサイズ (下線の有無で判断)	制限酵素反応液分量
PCR 増幅産物 : 508 bp 多型A : <u>508bp</u> , 375bp, 123bp 多型 X : 375bp, 123bp	6+1 サンプル分 <u>Fermentas Dra I (10U/μL)</u> 2.8 μL Buffer Tango 7.0 μL H ₂ O 25.2 μL