

ヨーロッパザラボヤ判定 DNA 検査方法マニュアル Ver.5

作成日：2013年4月30日

ヨーロッパザラボヤ *Asciidiella aspersa* と形態で判定されたホヤについて、これの DNA の Specific PCR や塩基配列を分析することによっても、ヨーロッパザラボヤ *Asciidiella aspersa* と判定することができる。また形態で種査定できなかったホヤについても、DNA の Specific PCR や塩基配列を分析することによって、日本在来のザラボヤ *Ascidia zara* か、ヨーロッパザラボヤ *Asciidiella aspersa* か、またはその近縁種の *Asciidiella scabra* または *Asciidiella sp. aff. Scabra* (*A. scabra* の隠蔽種) かを判定できる。

DNA の分析は、ミトコンドリア DNA の CO1 遺伝子を利用した Specific PCR (Polymerase Chain Reaction) または PCR-ダイレクトシーケンシング法で行う。得られた Specific PCR や DNA 塩基配列のパターンから、日本在来のザラボヤ *Ascidia zara* であるか、ヨーロッパザラボヤ *Asciidiella aspersa* であるか、またはその近縁種の *Asciidiella scabra* または *Asciidiella sp. aff. scabra* であるかを判定する。

*PCR では、鋳型 DNA が微量存在しても増幅される。したがって、目的外の DNA (特に PCR 増幅産物) の混入に注意を払う必要がある。また、DNA は人間の皮膚表面から分泌されている DNA 分解酵素 (DNase) により分解されるので、本酵素の混入を防止しなければならない。これらの点を考慮し、使い捨てのチューブ、チップ等を使用し、DNA や DNase 等が混入しないよう注意して用いる。

1. 試料の準備

検査に用いるホヤの成体は、生きている個体を -20°C 以下で冷凍する。試料は、 -20°C 以下に冷却して絶命させた後、そのまま冷凍保存する。または 100%エタノールで固定した後、 -20°C で保存する。

*水

逆浸透膜精製した RO 水又は蒸留水を Milli-Q 等で 17 M Ω /cm まで精製した超純水をオートクレーブで 121 $^{\circ}\text{C}$ 、15 分以上で滅菌したものなど、DNA、DNase 等が混在していないもの。本 Specific PCR および PCR-ダイレクトシーケンシングによる検査では、特に断り書きがない限りこのような水を使用すること。

2. DNA 抽出精製

DNA 抽出にはいくつかの方法があるが、TNES (10 mM Tris-HCl, pH 7.5; 125 mM NaCl ;

10 mM EDTA ; 1% sodium dodecyl sulfate (SDS) - 6 M Urea 緩衝液とフェノール・クロロホルムを用いた抽出法は、応用範囲が広く、魚介類の DNA 抽出で実績がある。そこで、本抽出法について以下に記す。なお、市販の DNA 抽出キットでも DNA が良好に抽出できる物もあるため、そのようなキットを用いて DNA を抽出してもよい。

2. 1 TNES - 6 M Urea 緩衝液とフェノール・クロロホルムを用いた抽出法

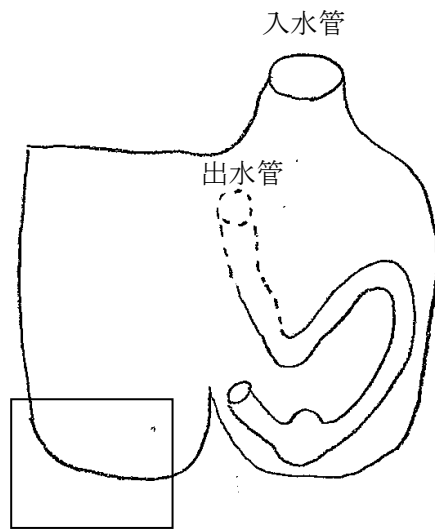


図1 ホヤの解剖図。被囊を取り去り、腹正中で切り開いたところ。

図1の四角部分の筋肉組織をハサミとピンセットで50 mgほど摘出する。摘出後の残りの検体は-20℃以下で保存する。摘出した筋肉組織を500 μLのTNES-6 M Urea 緩衝液^{*1}の入った1.5 mL マイクロチューブに投入後、20 mg/mLのProteinase K^{*2}を10 μL加えて軽く攪拌して混和し、37℃で1晩静置する。攪拌する際は、チューブの蓋に緩衝液が付かないよう注意する。次に、500 μLのフェノール・クロロホルム^{*3}を加え、転倒混和後ミキサーで軽く攪拌し、ローテーターにマイクロチューブを設置する。これを10 rpmで10分間回転させて攪拌した後、15,000 rpm (>7,500 ×g)で10分間室温遠心する。水層(上層)を新しい1.5 mL マイクロチューブに移す。この時、中間層とフェノール・クロロホルム層(下層)を混入しないように注意する。再度、500 μLのフェノール・クロロホルムを加え、上記と同様に攪拌、遠心する。水層(上層)を新しい1.5 mL マイクロチューブに移す。この時、中間層とフェノール・クロロホルム層(下層)を混入しないように注意する。4℃に冷却した500 μLのジエチルエーテル^{*4}を加え、約30秒転倒混和する。なお、ジエチルエーテルを加えた直後は、ジエチルエーテルが白濁するが、これが元の透明色に戻るまで転倒混和する。15,000 rpm (>7,500 ×g)で30秒室温遠心する。ジエチルエーテル層(上層)を取り除き、専用の廃液瓶中に入れる。この時、なるべく水層(下層)を混入しないように注意する。再度、4℃に冷却した500 μLのジエチルエーテルを加え、上記と同様に転倒混和、遠心する。ジエチルエーテル層(上層)を取り除き、専用の廃液瓶中に入れる。次に、

-20℃に冷却した 1 mL の 100%エタノールを加え、-80℃で 15 分以上、-20℃で 1 時間以上静置する。15,000 rpm (> 7,500 ×g) で 15 分間冷却遠心 (4℃) する。マイクロチューブをゆっくりと傾けて上澄み液を捨てる。-20℃に冷却した 1 mL の 70%エタノールを加え、15,000 rpm (> 7,500 ×g) で 15 分間冷却遠心 (4℃) する。上記と同様に上澄み液を捨て、再度-20℃に冷却した 1 mL の 70%エタノールを加え、遠心する。上記と同様に上澄み液を捨て、2~3 分間真空乾燥、あるいは約 1 時間風乾する。この時、完全に乾燥しないように注意する。300 µL の 0.1×TE 緩衝液*5または TE 緩衝液を加えて軽く混和後、4℃で一晩静置して完全に溶解する。その後、しばらく検査に使用しない場合や長期保存する場合は、-20℃以下で保存する。本抽出法により抽出した DNA 試料は RNA も含むが、PCR 等への利用において特に問題はない。RNA を分解する場合は、DNA を完全に溶解した後、100 µg/mL の RNase A*6 を 10 µL 加えて、37℃で 1 時間静置する。

***1 TNES (10 mM Tris-HCl, pH7.5; 125 mM NaCl; 10 mM EDTA; 1% sodium dodecyl sulfate (SDS)) - 6 M Urea 緩衝液**

360g の Urea、10 mL の 1 M Tris (pH 7.5)、20 mL の 0.5 M EDTA、7.3 g の NaCl をビーカーに入れ、水 (滅菌してなくて良い) を約 900 mL 加え、加温しながらスターラーで攪拌する。Urea は溶解すると吸熱反応するため、Urea が完全に溶解するまで加温する。10 g の SDS を少量ずつ加えて溶解する。全量が 1,000 mL となるよう水 (滅菌してなくて良い) を加えた後、オートクレーブで滅菌する。室温で長期間保存できる。なお、市販の ISOHAIR (株) ニッポンジーン) を使用しても良い。

***2 20 mg/mL の Proteinase K**

20 mg/mL となるように水に溶解し、分注して-20℃で凍結保存する。使用する毎に溶解し、使用後は凍結保存する。

***3 フェノール・クロロホルム**

0.1% 8-hydroxyquinoline で着色した 1 M Tris-HCl (pH 8.0)飽和フェノールとクロロホルムを 1 : 1 (v/v)で混合する。4℃で遮光保存する。有害であるので、手袋を着用する、揮発物を吸い込まない等して、取り扱いの際は注意する。

***4 ジエチルエーテル**

有害な有機溶媒であるので、揮発物を吸い込まない等取り扱いの際は注意する。

***5 TE 緩衝液**

各最終濃度が 10 mM Tris-HCl (pH8.0)、1 mM EDTA (pH8.0)となるように水 (滅菌してなくて良い) で調整し、オートクレーブで滅菌する。室温で保存できる。

***6 100 µg/mL の RNase A**

100 µg/mL となるように水に溶解し、分注して-20℃で凍結保存する。使用する毎に溶解し、

使用後は凍結保存する。RNase は不活化しにくい酵素であり、除染が難しい。そのため、実験室内に拡散しないように注意する。

3 DNA 試料原液中の DNA 純度の確認並びに DNA 試料液の調整と保存

上記抽出法で抽出した DNA は、特に問題なくそのまま PCR に使用できるが、抽出した DNA の純度と濃度を、紫外外部吸収スペクトルを測定して算出する。また、抽出した DNA が PCR の鋳型として利用できる長さであるか、アガロースゲル電気泳動で確認する。

3. 1 紫外外部吸収スペクトルの測定

DNA 試料の適当量を取り、原液もしくは必要に応じて DNA 溶液と同じ溶液で 10~100 倍希釈した希釈液について 200~300 nm の範囲で紫外外部吸収スペクトルを測定し、230 nm、260 nm 及び 280 nm の吸光度(O.D. 230、O.D. 260、O.D. 280)を記録する。次いで O.D. 260 が 1 のときの DNA 濃度を 50 ng/μL DNA として、DNA 試料原液の DNA 濃度を算出する。また、O.D. 260 / O.D. 280 を計算する。この比が 1.7~2.0 になれば、DNA が十分に精製されていることを示す。得られた DNA 濃度から、DNA 試料原液を以後の PCR に必要な濃度に水で希釈して DNA 試料液とし、-20℃以下で冷凍保存する。冷凍保存した DNA 試料液は、融解後直ちに使用する。なお、DNA 試料原液の濃度が PCR で規定された濃度 (5 ng/μL~10 ng/μL) に達しないときは、そのまま DNA 試料液として用いる。

3. 2 アガロースゲル電気泳動

DNA 試料原液をアガロースゲル電気泳動により分離し、抽出した DNA のバンドを確認する。

3. 2. 1 アガロースゲルの作成

必要量のアガロースを秤量し、TAE 緩衝液*を加え電子レンジ等で加熱して、目視でアガロースの粒子が全く確認できなくなるまで溶解する。次に、ゲルを 50℃前後まで冷やした後、ゲルメーカーにゲルを流し込み、室温で十分に冷やし固めてゲルを作成する。ゲルはすぐに使用するのが望ましいが、緩衝液に浸して 4℃で数日間保存することもできる。ゲルの濃度は 500~10 kbp の DNA を明瞭に分離する濃度とする。

* TAE 緩衝液

各最終濃度が 40 mM Tris-酢酸、1 mM EDTA となるように、水 (滅菌してなくて良い) を用いて調整したもの。

3. 2. 2 電気泳動

TAE 緩衝液を満たした電気泳動槽にゲルをセットする。DNA 試料原液(1~5 μL)と適当量のゲルローディング緩衝液を混ぜ合わせた後、ゲルのウェルに注入する。また、DNA 分子量マーカー (λHind III digestion 等)を、DNA 試料原液を入れたウェルの両隣のウェルに注入する (2~9 番目のウェルに DNA 試料原液を入れた場合、1 及び 10 番目のウェルに DNA 分子量マーカーを入

れる)。ゲルへの試料注入に時間がかかりすぎると、DNA が拡散し鮮明な結果が得られにくくなるので注意する。次に、100 V 定電圧で電気泳動を行い、ゲルローディング緩衝液に含まれる BPB がゲルの 1/3～2/3 まで進んだところで電気泳動を終了する。

3. 2. 3 ゲルの染色

ゲルが浸かる量の TAE 緩衝液が入った容器に、泳動後のゲルを移し入れる。次に、緩衝液 100 mL あたり、5 μ L のエチジウムブロミド*溶液(10 mg/mL)を加え、容器を振とう器に乗せて軽く振とうしながら 30 分程度染色する。

* エチジウムブロミド

2 本鎖の DNA 鎖の間に入り込む蛍光試薬であり、強力な発ガン作用と毒性がある。取り扱いには必ず手袋をはめ、マスクを着用する。

3. 2. 4 ゲルイメージ解析

ゲルイメージ解析装置内のステージあるいはトランスイルミネーターのステージ上に、電気泳動と染色が終了したゲルをのせて紫外線(312 nm)を照射する。ゲルイメージ解析装置の画面あるいは操作パソコンの画面で電気泳動パターンを確認する。泳動結果は画像データとして保存しておく。DNA 分子量マーカーと比較して、DNA のバンドが約 20 kbp 以上のところにあるのが望ましい。

4 Specific PCR

この手法は、種特異的プライマー (Species Specific Primer、SSP) を用いて PCR を行い (SSP-PCR)、種を PCR 産物の長さの違いとして見分ける手法である。

第 1 の Specific PCR で、日本在来のザラボヤ *Ascidia zara* であれば 226 bp、ヨーロッパザラボヤ *Asciidiella aspersa* であれば 122 bp、その近縁種の *Asciidiella scabra* または *Asciidiella sp. aff. scabra* であれば 305 bp の PCR 産物が得られる。

また第 1 の Specific PCR で *Asciidiella scabra* または *Asciidiella sp. aff. scabra* と判定された場合、第 2 の Specific PCR で *Asciidiella scabra* であれば 113 bp、*Asciidiella sp. aff. scabra* であれば 305 bp の PCR 産物が得られる。

第 1 の Specific PCR

Specific PCR 反応液は、14.2 μ L の水、2 μ L の 10 \times 緩衝液*¹及び 2.5 mM dNTP*¹、各 0.1 μ L の 100 μ M プライマー*²計 7 種類、0.1 μ L (0.5units (U))の Taq DNA ポリメラーゼ*³(5 U/ μ L)の順に加え、これに 1 μ L の DNA 溶液(20～50 ng/ μ L)を加えて総量を 20 μ L にする。DNA 溶液以外の緩衝液等を 1 本のマイクロチューブ等で必要量調整した後、0.2 mL PCR 反応チューブ等に 19 μ L ずつ分注しても良い。なお、PCR 反応液の調整は、反応液の温度が上がらないように、氷上で行う。次に、PCR 反応チューブ等を PCR 増幅装置*⁴に設置する。PCR 反応は、先ず 94 $^{\circ}$ C で 5 分間加熱し、次に 94 $^{\circ}$ C で 30 秒、55 $^{\circ}$ C で 30 秒、72 $^{\circ}$ C で 1 分間のサイクルを 40 回行い、最後

に 72°C で 7 分間の伸長反応を行った後、4°C で保存する。得られた反応液を PCR 増幅反応液とする。

***1 10×緩衝液及び 2.5 mM dNTP**

DNA ポリメラーゼに添付されているもの又は同等の結果が得られる物を用いる。

***2 100 µM プライマー**

100 µM になるよう 1/10 TE または TE に溶解したもの。各プライマーの塩基配列は以下の通りである。なお、合成したプライマーは salt free 以上に精製されていることが望ましい。

第 1 の Specific PCR のためのプライマー

scabra-F	: 5'-GGC TTC TTC CYC CTG CAT TC-3' (20 mer)
ASW-FL	: 5'-GGT TAC TCC CTC CGG CAT TT-3' (20 mer)
zara-F	: 5'-TCC TCC CCT TTC AAG AGG TG-3' (20 mer)
aspersa-F2	: 5'-TTA ATT TCT TAG TGA CAA TGA TAG GT-3' (26 mer)
Ascidrella-R	: 5'-TGC AGC CAA CAC MGG AAG AG-3' (20 mer)
zara-R	: 5'-GGC AGC TAG CAC TGG CAA TG-3' (20 mer)
ASW-R	: 5'-CGC AGC CAA TAC GGG AAG AG-3' (20 mer)

***3 Taq DNA ポリメラーゼ**

TaKaRa EX Taq DNA ポリメラーゼ (タカラバイオ社製) 又は同等の結果が得られるものを用いる。

***4 PCR 増幅装置**

Gene Amp PCR System 9700 (アプライドバイオシステムズ社製)、iCycler サーマルサイクラー(バイオ・ラッドラボラトリーズ社製)又は同等の結果が得られるものを用いる。

4. 1 電気泳動

PCR 増幅反応液をアガロースゲル電気泳動により分離し、PCR 増幅した DNA 断片のバンドを確認する。

4. 1. 1 アガロースゲルの作成

「3. 2. 1 アガロースゲルの作成」と同様に行う。

4. 1. 2 電気泳動

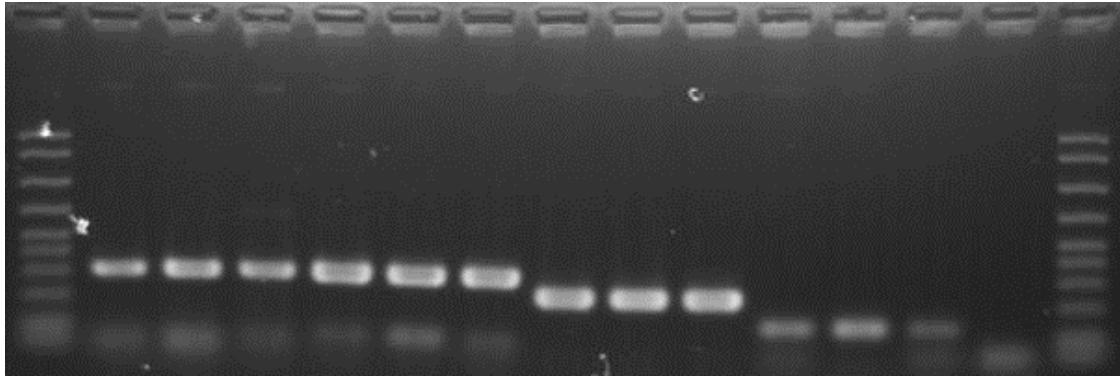
「3. 2. 2 電気泳動」と同様に行う。なお、PCR 増幅反応液は適当量(1~3 µL)使用し、DNA 分子量マーカーは、100bp DNA Step Ladder 等を用いる。

4. 1. 3 ゲルの染色

「3. 2. 3 ゲルの染色」と同様に行う。

4. 1. 4 ゲルイメージ解析

「3. 2. 4 ゲルイメージ解析」と同様に行う。



M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 M

図2 第1の Specific PCR の電気泳動図

M:DNA 分子量マーカー、上から 2,000 bp、1,500 bp、1,000 bp、700 bp、500 bp、400 bp、300 bp、200 bp、(100 bp、50 bp、よく分離されていない)。

1~3 : *Ascidella* sp. aff. *scabra*

4~6 : *Ascidella scabra*

7~9 : *Ascidia zara*

10~12 : *Ascidella aspersa*

13 : DNA 無し (陰性対照区)

第1の Specific PCR で、*Ascidia zara* であれば 226 bp、ヨーロッパザラボヤ *Ascidella aspersa* であれば 122 bp、その近縁種の *Ascidella scabra* または *Ascidella* sp. aff. *scabra* であれば 305 bp の PCR 産物が得られる。

第2の Specific PCR

第1の Specific PCR で *Ascidella scabra* または *Ascidella* sp. aff. *scabra* と判定された場合、第2の Specific PCR で *Ascidella scabra* であれば 113 bp、*Ascidella* sp. aff. *scabra* であれば 305 bp の PCR 産物が得られる。

Specific PCR 反応液は、14.4 μ L の水、2 μ L の 10 \times 緩衝液及び 2.5 mM dNTP、各 0.1 μ L の 100 μ M プライマー*1計 5 種類、0.1 μ L (0.5 units (U))の Taq DNA ポリメラーゼ(5 U/ μ L)の順に加え、これに 1 μ L の DNA 溶液(20~50 ng/ μ L)を加えて総量を 20 μ L にする。DNA 溶液以外の緩衝液等を 1 本のマイクロチューブ等で必要量調整した後、0.2 mL PCR 反応チューブ等に 19 μ L ずつ分注しても良い。なお、PCR 反応液の調整は、反応液の温度が上がらないように、氷上で行う。次に、PCR 反応チューブ等を PCR 増幅装置に設置する。PCR 反応は、先ず 94 $^{\circ}$ C で 5 分

間加熱し、次に 94℃で 30 秒、55℃で 30 秒、72℃で 1 分間のサイクルを 40 回行い、最後に 72℃で 7 分間の伸長反応を行った後、4℃で保存する。得られた反応液を PCR 増幅反応液とする。

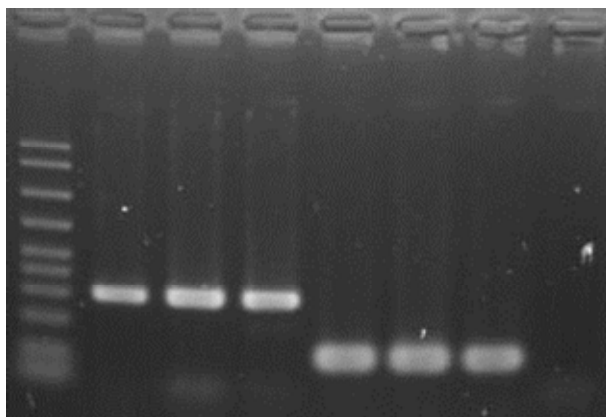
*1 100 μM プライマー

100 μM になるよう 1/10TE または TE に溶解したもの。各プライマーの塩基配列は以下の通りである。なお、合成したプライマーは salt free 以上に精製されていることが望ましい。

第 2 の Specific PCR のためのプライマー

scabra-F	: 5'-GGC TTC TTC CYC CTG CAT TC-3' (20 mer)
ASW-FS	: 5'-CCA TAA TAG GCA TGA AGG CC-3' (20 mer)
ASW-FS2	: 5'-CCA TAA TAG GCA TGA AGG CT-3' (20 mer)
Ascidrella-R	: 5'-TGC AGC CAA CAC MGG AAG AG-3' (20 mer)
ASW-R	: 5'-CGC AGC CAA TAC GGG AAG AG-3' (20 mer)

電気泳動については、第 1 の Specific PCR と同様に行う。



M 1 2 3 4 5 6 7

図 3 第 2 の Specific PCR の電気泳動図

M:DNA 分子量マーカー、上から 2,000 bp、1,500 bp、1,000 bp、700 bp、500 bp、400 bp、300 bp、200 bp、(100 bp、50 bp、よく分離されていない)。

1~3 : *Ascidrella* sp. aff. *scabra*

4~6 : *Ascidrella scabra*

7 : DNA 無し (陰性対照区)

第 2 の Specific PCR で *Ascidrella scabra* であれば 113 bp、*Ascidrella* sp. aff. *scabra* であれば 305 bp の PCR 産物が得られる。

5 PCR-ダイレクトシーケンシング

Specific PCR の判定では不十分と考えられる場合や、Specific PCR では判定が出来なかった場合には、直接シーケンシングして Blast 検索等を行い、自分の求めた塩基配列がデータベース上

のどの配列と最も相同性が高いかを調べることが出来る。

5. 1 CO1 の PCR

PCR 反応液は、14.7 μL の水、2 μL の 10 \times 緩衝液*1及び 2.5 mM dNTP*1、各 0.1 μL の 100 μM プライマー*2計 2 種類、0.1 μL (0.5 units (U))の Taq DNA ポリメラーゼ*3(5 U/ μL)の順に加え、これに 1 μL の DNA 溶液(20~50 ng/ μL)を加えて総量を 20 μL にする。DNA 溶液以外の緩衝液等を 1 本のマイクロチューブ等で必要量調整した後、0.2 mL PCR 反応チューブ等に 19 μL ずつ分注しても良い。なお、PCR 反応液の調整は、反応液の温度が上がらないように、氷上で行う。次に、PCR 反応チューブ等を PCR 増幅装置*4に設置する。PCR 反応は、先ず 94 $^{\circ}\text{C}$ で 5 分間加熱し、次に 94 $^{\circ}\text{C}$ で 30 秒、55 $^{\circ}\text{C}$ で 30 秒、72 $^{\circ}\text{C}$ で 1 分間のサイクルを 40 回行い、最後に 72 $^{\circ}\text{C}$ で 7 分間の伸長反応を行った後、4 $^{\circ}\text{C}$ で保存する。得られた反応液を PCR 増幅反応液とする。

*1 10 \times 緩衝液及び 2.5 mM dNTP

DNA ポリメラーゼに添付されているもの又は同等の結果が得られる物を用いる。

*2 100 μM プライマー

100 μM になるよう 1/10TE または TE に溶解したもの。各プライマーの塩基配列は以下の通りである。なお、合成したプライマーは salt free 以上に精製されていることが望ましい。

CO1 の PCR 増幅のためのプライマー対

Asc,CO1-ForA 5' TTA TTC GSS TYG AGT TAT CTC A 3' (22mer)

Asc,CO1-RevA 5' TCA AAY AGA AGC ATW GTR ATA GC 3' (23mer)

484 bpのPCR産物 (プライマーを除く) が得られる場合がある。

または

Asc,CO1-ForC 5' TTA TTC GGG TTG AGT TAT CTC A 3' (22mer)

Asc.CO1-RevC 5' TCA AAA AGA AGC ATA GTA ATA GC 3' (23mer)

484 bpのPCR産物 (プライマーを除く) が得られる。

(*Ascidella scabra*はこのプライマー対でのみPCR増幅される)

または

LC01490Asc 5' TGT CMA CWA AYC ATA ARG ATA TTG G 3' (25mer)

HCO2198Asc 5' TAS ACC TCS GGR TGS CYA AAA AAC CA 3' (26mer)

657 bp (*Ascidella aspersa*, *Ascidella* sp. aff. *scabra*) の PCR 産物 (プライマーを除く) が得られる場合がある。

または

LC01490 5' GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G 3' (25mer)

HCO2198 5' TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA 3' (26mer)

657 bp の PCR 産物 (プライマーを除く) が得られる。

(*Ascidia zara*はこのプライマー対でのみ PCR 増幅される)

プライマーの配置図

C01 遺伝子→

```
+++++
LC01490Asc->                                     <-HC02198Asc
LC01490  ->                                     <-HC02198
      Asc. C01-ForA->                           <-Asc. C01-RevA
      Asc. C01-ForC->                           <-Asc. C01-RevC
```

*3 Taq DNA ポリメラーゼ

TaKaRa EX *Taq* DNA ポリメラーゼ（タカラバイオ社製）又は同等の結果が得られるものを用いる。

*4 PCR 増幅装置

Gene Amp PCR System 9700（アプライドバイオシステムズ社製）、iCycler サーマルサイクラー（バイオ・ラッドラボラトリーズ社製）又は同等の結果が得られるものを用いる。

PCR 反応後の電気泳動については、4. Specific PCR に記載した通りに行う。

5. 2 ExoSAP-IT*を用いた PCR 産物の精製

PCR による増幅を確認できたら、PCR の増幅産物 1 サンプルあたり 0.1 μ L の ExoSAP-IT が入るようにミリ Q 水で希釈調整した溶液を PCR 産物に加える。

<例>96 サンプルで 96 穴プレートを使用の場合（少し多めに調整）

9.6 μ L の ExoSAP-IT を 288 μ L のよく冷やしたミリ Q 水に加え、泡立てないようによくピペッティングした後、各サンプルの壁面に 3 μ L ずつ 8 連ピペットで加える。

シリコンマットを乗せて蓋をした後、プレートの壁面についた滴を完全に落とすため、遠心機で軽く回す。

サーマルサイクラーを用いて 37°C(30 min) → 80°C(15 min)で処理する。

増幅した PCR 産物の濃度が濃い場合は ExoSAP-IT で処理した PCR 産物にミリ Q を 10~30 μ L 程加えて希釈する場合もある。

*極めて熱に弱いデリケートな酵素を用いるため、扱いには特に注意する。常温に放置したり、チューブの下の方を直に手で持ったりしない。

5. 3 シーケンス反応の反応系

シーケンス反応にはいくつかの企業がキットを販売しているが、ここでは BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit（アプライドバイオシステムズ社）を例に述べる。

反応液は以下の通り調整する。

	1 サンプルあたり	96 サンプルの場合
Template* ¹	0.5 μ L	
Bdmix* ³	0.3 μ L	28.8 μ L
5 \times Buffer* ⁴	2 μ L	192 μ L
DW	7.2 μ L	\times サンプル数(96) 691.2 μ L
5 μ M Primer* ²	0.5 μ L	48 μ L
Total	10.5 μ L	1,008 μ L

*1 Template...ExoSAP-IT で精製した PCR 産物

*2 Primer は 5 μ M にミリ Q で希釈。濃度はその都度必ず確認する。

*3 Bdmix は BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit の Reaction Mixture

*4 5 \times Buffer は BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit に付属している。

5. 4 サーマルサイクラーの設定

上記サーマルサイクラーを用いてシーケンス反応を以下の通り行う。

{96 $^{\circ}$ C(10sec) \rightarrow 50 $^{\circ}$ C(5sec) \rightarrow 60 $^{\circ}$ C(4min)} \times 30 サイクル \rightarrow 4 $^{\circ}$ Cforever

5. 5 シーケンス反応産物の精製 (エタノール沈殿)

10 μ L の反応産物が入ったウェルへ 125 mM EDTA 5 μ L を 8 連ピペットで加える。

リザーバーと 8 連ピペットを用いて、冷凍庫のよく冷えた 100 %エタノールを 50 μ L 加え白いシリコンマットをセットする。

プレート攪拌機で 5 秒間ほどプレートごとよく攪拌させる。

プレート遠心機用のプレート台にセットして 2,150 \times g 45 min で遠心かける。

遠心済みのプレートを取り出し、流しで上清液を捨てる。

(一回で一気に上清液を捨てる、絶対にプレートを裏返してはならない)

プレートを下に向けてキムタオルに乗せ、軽めに遠心をかけて (50 \times g で 1 分)、壁面の残ったエタノールをキムタオルへ完全に吸わせる。

リザーバーと 8 連ピペットを用いて、冷凍庫のよく冷えた 70%エタノールを 50 μ L 加え白いシリコンマットをセットする。

プレート遠心機用のプレート台にセットして 1,700 \times g 15 min で遠心かける。

遠心済みのプレートを取り出し、流しで上清液を捨てる。

プレートを下に向けてキムタオルに乗せ、軽めの遠心で (50 \times g で 1 分) 壁面のエタノールをキムタオルへ完全に吸わせる。

白いシリコンマットをセットして、アルミホイルで遮光して冷凍庫で保存。

5. 6 シーケンサーへセット (ABI3100、ABI3130xl genetic analyzer の場合)

エタ沈済みサンプルプレートの各ウェルに HiDi-ホルムアミドを 10 μ L ずつ加える。

プレートごと 10 秒間 VORTEX をかける。

遠心して壁面についている液を落とす。
サーマルサイクラーで 92°C 2 分のヒートショック。
すぐにアルミホイル等で遮光して氷冷。
シーケンサーにセット。

ABI3100、ABI3130xl genetic analyzer のマニュアルに従ってシーケンス取得。
波形データと塩基配列データが得られる。

5. 7 結果の判定 1-分子系統樹の作成

分子系統樹作成ソフトウェア MEGA5 を install する。

次の配列を国際 DNA データベースからダウンロードしたり、コピー&ペーストして、マルチファスタ形式に並べる。

- *Ascidella aspersa* cytochrome oxidase subunit I mitochondrial pseudogene, partial sequence. (AY116600)

- *Ascidia zara* cytochrome oxidase subunit I mitochondrial gene, partial sequence
AACAGGTATGGTTATTGGAGATGGTCATACTTACAATGTTATTGTTACTGCCCATGCGTT
TGTTATAAATTTTTTTTTTTGTTATAACCCACAATGATTGGGGGTTTTAGGAATTGGCTCTT
GCCTATGATAGTTAGAGCTCCGGATATAGCCTTTCCTCGATTAATAATATGAGCTTCTG
GCTTTTGCTCCAGCATTTTTTTTTTATAGTTATCTCTACCTTAATGGGTAGGGGTGCAAG
AACGGGATGAACTGTTTATCCTCCCCTTCAAGAGGTGTGGCCACAGCGGTCTGCAGT
GGATTTTGCTATTTTTTCCCTCCATCTTGCTGGTATTTTCGAGCATTCTAGGATCTATTAA
TTTTCTTGTTACTATGTGGAATATGAAGGCTAAGGGTATAGAGGCCTATCATATTAGTTT
GTTCTGTTGGTCAGTTATCTTTACTACCATCCTTCTAGTGCTGTCATTGCCAGTGCTAGC
TGCC

- *Ascidella scabra* cytochrome oxidase subunit I mitochondrial gene, partial sequence
GCCGGGTCAGGTGATTAGGGATGGTCAGGTCTATAACGTGGTCGTGACTGCTCATGCTTT
TGTTATGATTTTTTTCTTTGTTATGCCATTATGATTGGTGGGTTTGTTAATTGGTTGTT
ACCTATGATAGTAGGGGCTCCGGATATGGCTTTCCTCGTATGAATAATATGAGTTTTTG
GTTACTCCCTCCGGCATTTTTTTATGTTGATTATTTCTTCTGTTATTGGGAGTGAGCAGG
TACGGGGTGGACAGTATATCCACCGCTTCTAGCAATCTAGCCACGCGGGCCCTGCTGT
TGATTGTGCTATTTTTTCTTTACACCTAGCCAGAGTTTCAAGTATTCTTGGGTCTATTAA
TTTTTTAGTAACCATAATAGGCATGAAGGCTAAGGGTTCAGTTACTTGAATTTGAGTTT
ATTTTGTGTTGGTCTGTTATTTTTACTACTATTTTGTGTTGGTGCTTCTCTTCCCGTATTGGC
TGCG

- *Ascidella* sp. aff. *scabra* cytochrome oxidase subunit I mitochondrial gene, partial sequence

ACCTGGGCAGGTTATTGGTGACGGTCAAGTATATAATGTGGTGGTGACGG

```
CCCATGCCTTTGTTATGATCTTTTTTTTTTTGTTATGCCATTATAATTGGT
GGGTTTGGGAATTGGTTATTACCTATGATAGTTGGGGCTCCGGATATGGC
TTTTCTCGTATAAATAATATGAGTTTTTTGGCTTCTTCCCCCTGCATTCT
TTATGTTGATTATTTCTTCTGTGATTAGGACCGGGGCTGGGACGGGGTGG
ACAGTATATCCCCCTGTGTGAGCAACTTAGCCCACGCTGGCCCTGCTGT
TGATTGTGCAATTTTTTCTTTACACTTGGCGGGTGTCTTAGCATTCTCG
GGTCTATTAATTTCTTAGTGACGATAATGGGAATAAAAGCACGGGGTTTT
AGTTATTTAAATTTAAGTTTATTTTGTGGTCTGTAATTTTTACTACTAT
TTTGTGGTGCTTTCTTCTCCTGTGTTGGCTGCA
```

- ・ (自分の決めた CO1 の配列 1)
- ・ (自分の決めた CO1 の配列 2)
- ・

MEGA5 →Align →Edit/Build Alignment → Create a new alignment →OK を選択。
Are you building a DNA or Protein sequence alignment? で DNA を選択。

Alignment explorer が表示されるので、マルチファスタ形式に並べた配列をコピー、ペーストする。

Alignment → Align by CLUSTAL W を選択、パラメータが表示されるので OK を押すと自動的に Alignment を行う。Alignment が終わったら、名前を付けてデータを保存する。具体的には、

Data → Exit AlnExplorer → Closing Alignment Explorer. Would you like to save the current alignment session to file? と表示されるので「はい」を選択し、ファイル名を入力して保存する (MAS ファイル)。

Data → Open A File/Session を選択し、保存してある MAS ファイルを選択して開く。

How would you like to open this MAS file? と聞いて来るので Analyse を選択。

MEGA5 のウィンドウの Phylogeny を選び、表示されるタブから Construct/Test Minimum-EvolutionTree...を選ぶ。

Would you like to use the currently active data? と聞いて来るので Yes を選択。

選択肢が表示されるので→ Model/Method から Kimura 2 parameter model を選択する。

Compute を押すと系統樹が計算される。

自分の決定した CO1 の配列が *Asciidiella aspersa*, *Asciidiella scabra*, *Asciidiella* sp. aff. *scabra*, *Ascidia zara* に近縁であるか、系統樹から判断する。

5. 8 結果の判定 2-Blast 検索

結果の判定 1 で、自分の決定した CO1 の配列が、*Asciidiella aspersa*, *Asciidiella scabra*, *Asciidiella* sp. aff. *scabra*, *Ascidia zara* のいずれにも該当しないことが判明した場合、国際 DNA データベースに自分の決定した配列を投入して Blast 検索し、最も相同性の高い配列がどの種の配列であるかを調べる事が出来る。

DNA データベースにアクセスする。<http://www.ddbj.nig.ac.jp> 左横の「検索」欄の BLAST をクリック。

自分の配列を検索配列データのところにコピー&ペーストする。

検索結果を WWW で見るか E-mail で見るか選択する。

検索対象 DIVISION で、Standard divisions の「無脊椎動物」以外のチェックを全て消す。

「より詳細な設定」を適当にセットする。

検索開始（「入力内容の送信」をクリックする）。

〈例〉自分の配列が以下のような 100 bp であるとき、

```
tttgggttttttggccaccctgaagtttatatcctcatcttacctaggtttggtataatcagccatgtggta  
gttttctattcaagaaagcctaataatttt
```

Blast 検索の結果は、

	Score	E
	(bits)	Value
Sequences producing significant alignments:		
U21670 U21670.1 <i>Ascidia mentula</i> cytochrome oxidase subunit I (CO...	198	3e-49
EF057731 EF057731.1 <i>Pseudachorutinae</i> sp. RCG-2004 haplotype 18 c...	84	1e-14
GU937470 GU937470.1 <i>Scutovertex</i> sp. 'ianus' isolate SianSch6 cyt...	70	2e-10
GU937466 GU937466.1 <i>Scutovertex</i> sp. 'ianus' isolate SianSt1 cyto...	70	2e-10
AB608870 AB608870.1 <i>Neomicropteryx bifurca</i> mitochondrial COI gen...	68	6e-10
GQ488184 GQ488184.1 <i>Stylocellus</i> sp. Peninsula 5 voucher MCZ DNA1...	68	6e-10
FJ913762 FJ913762.1 <i>Neoconocephalus triops</i> isolate NtTT5 cytochr...	68	6e-10
FJ913761 FJ913761.1 <i>Neoconocephalus triops</i> isolate NtTT4 cytochr...	68	6e-10
FJ913760 FJ913760.1 <i>Neoconocephalus triops</i> isolate NETrioPR3 cyt...	68	6e-10
FJ913759 FJ913759.1 <i>Neoconocephalus triops</i> isolate NETrioPR1 cyt...	68	6e-10

となり、U21670 が最も高い Score と圧倒的に小さい E-value を持つことがわかる。先頭の U21670 のリンクをクリックすると

```
LOCUS      AMU21670                205 bp    DNA     linear   INV 03-SEP-2002
DEFINITION Ascidia mentula cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial
            cds; mitochondrial gene for mitochondrial product.
ACCESSION  U21670 . . . . .
```

と表示されることから、自分の塩基配列は *Ascidia mentula* の COI との相同性が高いことがわかる。

スコアの 198 (bits) をクリックすれば、

```
>U21670|U21670.1 Ascidia mentula cytochrome oxidase subunit I (COI)
            gene, partial cds; mitochondrial gene for mitochondrial
            product.
            Length = 205
```

```
Score = 198 bits (100), Expect = 3e-49
```

Identities = 100/100 (100%)

Strand = Plus / Plus

```
Query: 1   tttgggttttttggccaccctgaagtttatatcctcatcttacctaggtttgggtataatca 60
          |||
Sbjct: 21   tttgggttttttggccaccctgaagtttatatcctcatcttacctaggtttgggtataatca 80
```

```
Query: 61   gccatgtggtagttttctattcaagaaagcctaataatattt 100
          |||
Sbjct: 81   gccatgtggtagttttctattcaagaaagcctaataatattt 120
```

のように、相同性検索の結果が示される。このケースでは、相同性 (Identities) は 100%であった。

【執筆者】 独立行政法人水産総合研究センター中央水産研究所
水産遺伝子解析センター 大原一郎

【問い合わせ】 独立行政法人水産総合研究センター中央水産研究所業務推進課
〒236-8648 神奈川県横浜市金沢区福浦 2-12-4 TEL : 045-788-7615 (代表) FAX : 045-788-5001