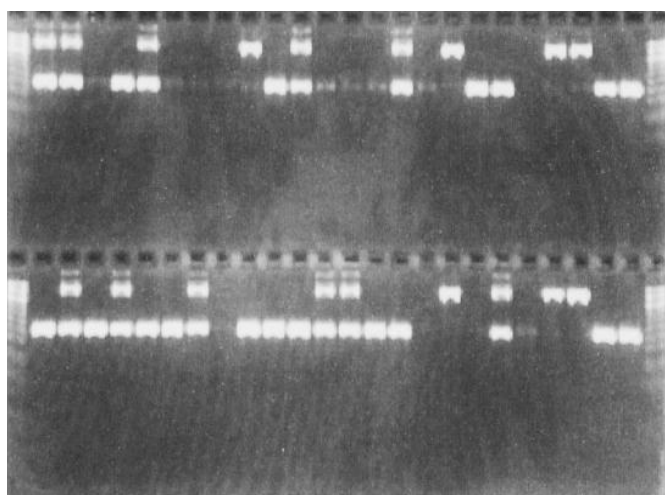


「コシヒカリ環1号」の判別マーカ-による
ハイスループットなDNAマーカ-選抜
実験プロトコル ver1.0

- DNA抽出から電気泳動まで -



農業環境技術研究所
土壤環境研究領域

2015年3月

はじめに

本マニュアルは、カドミウム吸収が抑制された「コシヒカリ環1号」¹⁾と他の品種をDNAマーカーを使って判別する方法を記したものです。さらに本DNAマーカーは、「コシヒカリ環1号」が持つカドミウム吸収抑制遺伝子 (*OsNRAMP5*²⁾ の一塩基欠損型) を様々な品種に導入し、新たな低カドミウム水稻品種を作出する目的で、活用することができます。多数の個体をマーカー選抜し、カドミウム吸収抑制遺伝子の有無を効率的に調査できるように、ハイスループットな方法を載せました。本マニュアルを参考に、利用者の施設や実験計画に合わせた方法に改良し、効率的な低カドミウム水稻品種の育成に役立てて頂ければ幸いです。

なお、本変異体の育種利用に関しては、農業環境技術研究所との共同研究契約が必要です。詳細については、最後のページにある問い合わせ先にご連絡下さい。

コシヒカリ環1号¹⁾：イオンビーム照射によって作出した、低カドミウムのコシヒカリ変異体。2013年に品種登録出願。
*OsNRAMP5*²⁾：重金属（カドミウム、マンガン）を輸送する膜タンパク質をコードする遺伝子。

目次

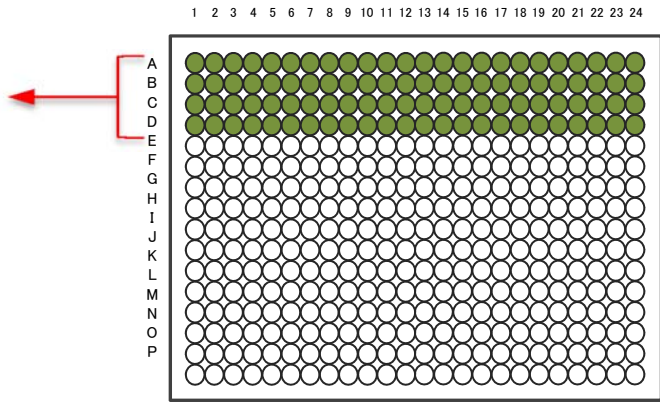
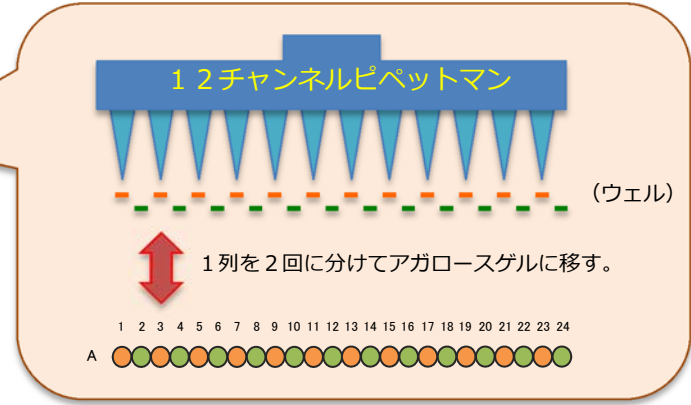
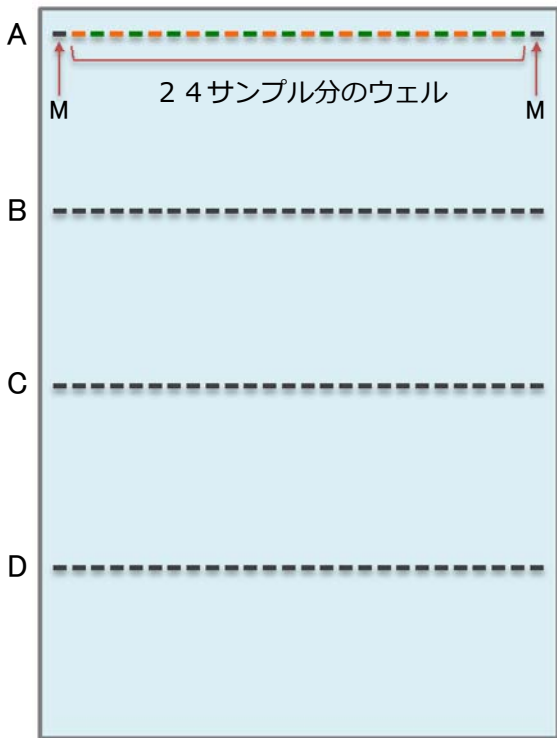
	ページ
1. 育苗計画	3
2. DNA抽出	5
3. PCR	9
4. 電気泳動	13
5. PCR・電気泳動での代替品	16
参考文献／問い合わせ先	19

1. 育苗計画

電気泳動 → PCR → DNA抽出 → サンプルングのように逆算して、電気泳動後の遺伝子型確認とデータ管理を容易にするため、それを見越したセルトレイでの育苗計画を立てる。

① 電気泳動

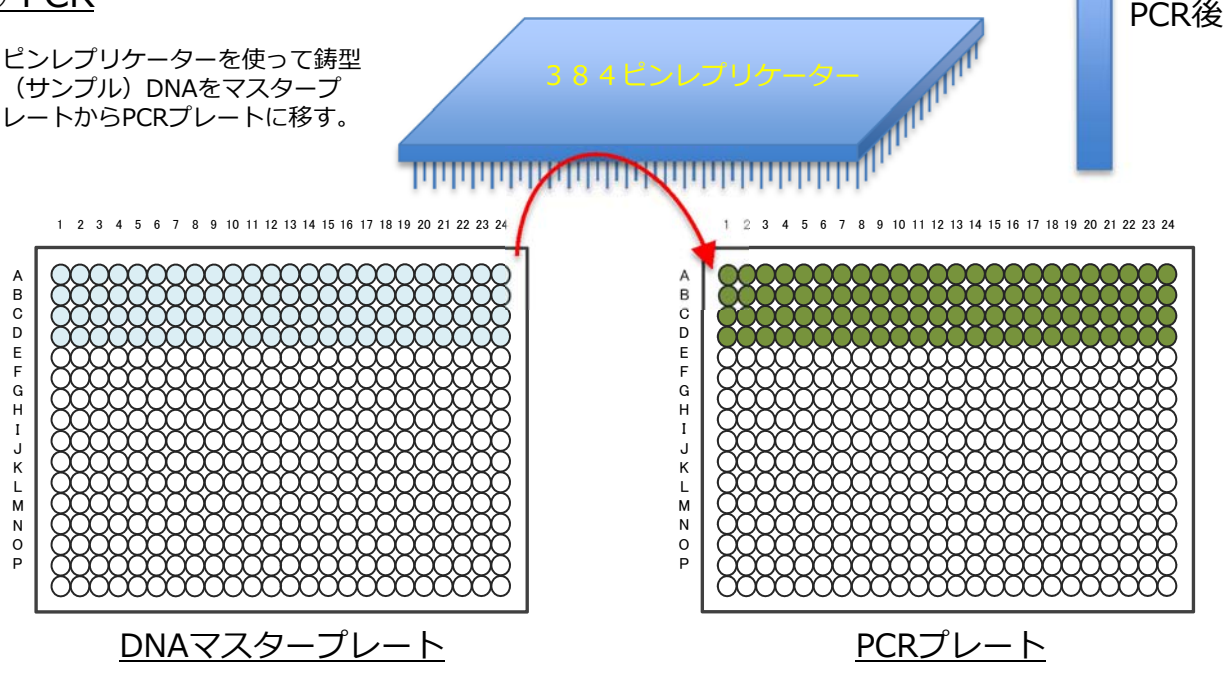
1レーンに乗せられるサンプル数は24サンプル



384-ウェル PCRプレート 1枚分の電気泳動にはアガロースゲルが4枚必要

② PCR

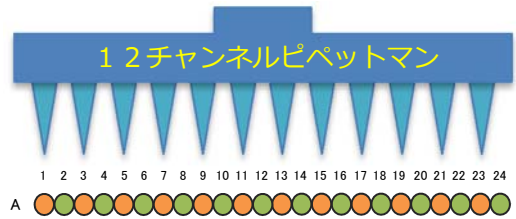
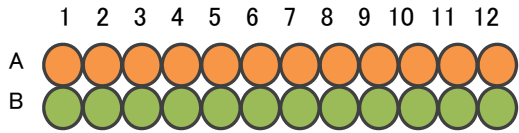
ピンリプレクターを使って鋳型 (サンプル) DNAをマスタープレートからPCRプレートに移す。



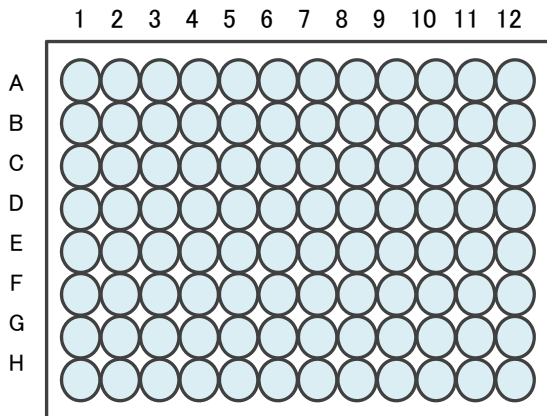
1. 育苗計画 (つづき)

③ サンプルDNAマスタープレートの作成

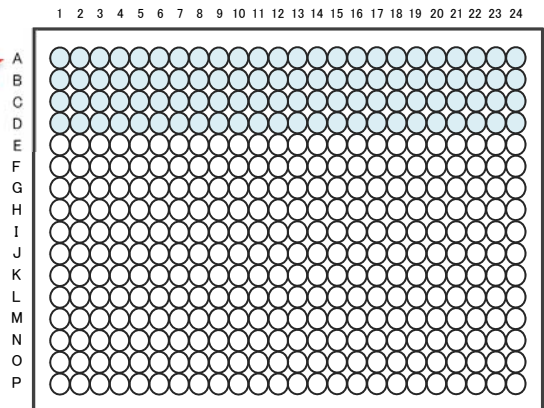
9 6ウェルプレートの2列が3 8 4ウェルプレートの1列に移る。



例えば、9 6プレートで列Aにサンプルの奇数番、列Bに偶数番を配置しておくと、3 8 4プレートで列Aには1～最大24サンプルまで順に配置される。



DNAストックプレート



DNAマスタープレート

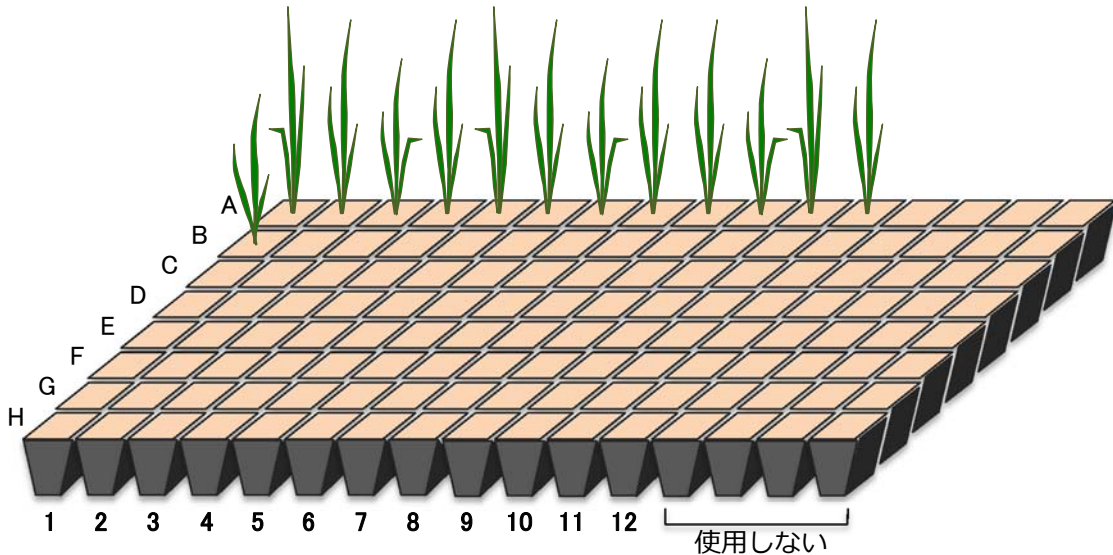
9 6-ウェル PCRプレート (DNA抽出用) 1枚分のサンプルは、3 8 4-ウェルプレートの4列分にまとめられる。



DNA抽出後

④ 育苗とサンプリング

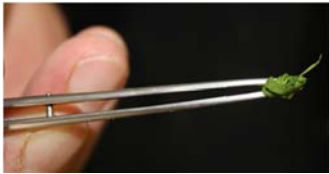
8 x 12列 (96ウェル) の範囲で播種・育苗し、マス目の配置通りに最新葉の先端約2cmをサンプリングする。



2. DNA抽出

1) サンプルング

第3葉身展開期以降の新展開葉を先端から1~3cm切り取り、できるだけ葉を折りたたみ深型96ウェルプレートに奥に入れる（破碎用鉄球が効率よく当たるように）。温室でサンプルングを行うときには葉身を入れたプレート coolerボックス内で一時的に氷冷。



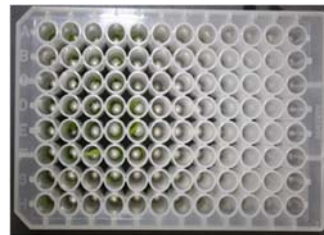
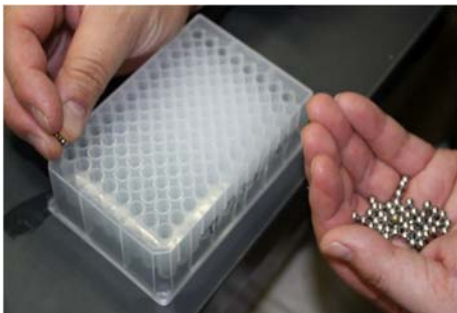
折り畳んだ葉身をピンセットで摘み、ウェルの奥に入れる。



育苗トレイでの幼苗の配置と同じにする。

2) 破碎と抽出

折り畳んで入れた葉身の上に鉄球が来るように、5mmのステンレス球を各ウェルに1つずつ入れる。



破碎機や遠心機でのバランスをとるためにサンプルの有り無しにかかわらず、全てのウェルに鉄球を入れる。

（折り畳んだ葉身がウェルの中で開いて伸びてしまうと、葉がウェル壁面に張り付き、鉄球による破碎効率が著しく悪くなる。そのため、鉄球を入れる時点で葉身が開いた場合は、一度取り出して畳み直して入れることが望ましい。）

DNA簡易抽出用バッファー（TPEバッファー）を各ウェルに400 μ Lずつ加え、シリコンマットでフタをする。シリコンマットがしっかりシールしているかを十分に確認をする。破碎後、抽出バッファーが緑色になり組織がある程度破碎されていることを確認する。



破碎前



破碎後

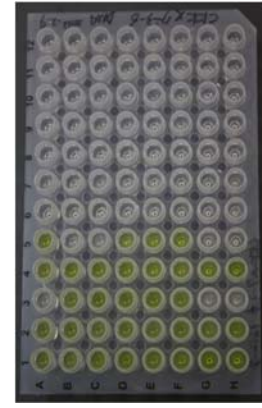
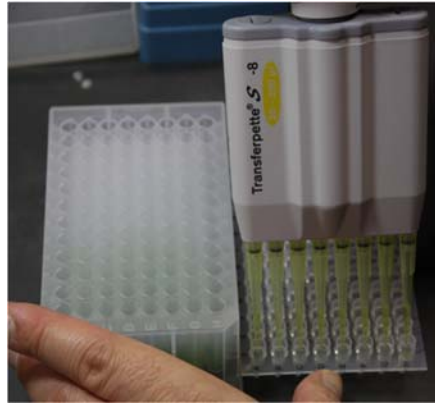
サンプルの有り無しにかかわらず、全てのウェルに抽出バッファーを入れる。

一様に破碎されていることを確認できたら、深型プレート対応の遠心分離器（4 $^{\circ}$ C, 1870x g, 10min）で残渣、不溶物を沈殿させる。

2. DNA抽出 (つづき)

3) エタノール沈殿

Chimney TopのPCRプレートにイソプロパノールを100 μ Lずつ分注したところに、破碎液上清を100 μ L (50 μ Lを2回) を移し、ピペティングで混合する。



サンプルの有りに無しかかわらず、全てのウェルにイソプロパノールを入れ、すべてのウェルの抽出バッファーを移す。

フタをしないまま96-wellチューブスタンドに乗せて、遠心分離器のラックにセットする。4 $^{\circ}$ C, 1870 x gで30min遠心分離をかける。(96-well PCRチューブスタンドは個体間の重量差が大きいので事前調整が必要)



キムタオルの上に上清を捨て、新しいキムタオルをプレートの上に置きそのまま逆さにして、上清を除く。



二つ折りにしたキムタオルを被せる



ひっくり返す

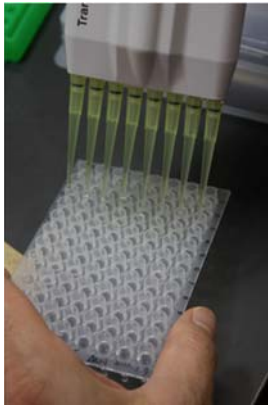


キムタオルに上清を吸わせる。

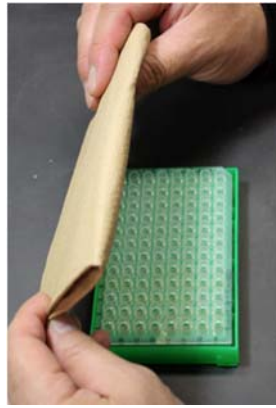
2. DNA抽出 (つづき)

↓

キムタオルの上に上清を捨て、新しいキムタオルをプレートの上に置きそのまま逆さにして、さらに余分な上清を除く。150 μ Lの70%エタノールをプレート各ウェルの側面から静かに注ぎ沈殿物を洗う。エタノールを分注した後、プレートの上にキムタオルを当てて上下をひっくり返して上清を捨てる。



70%エタノールを分注する



二つ折りのキムタオルを被せる

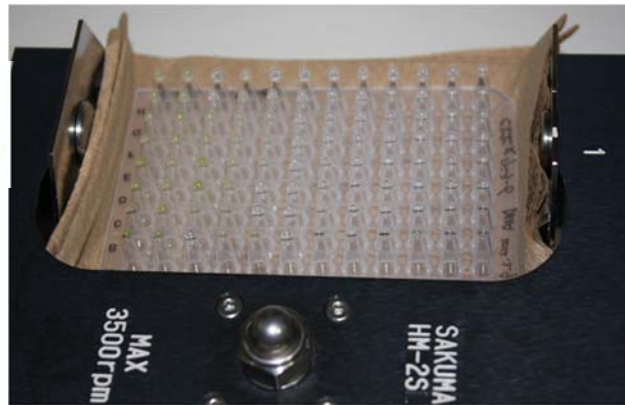
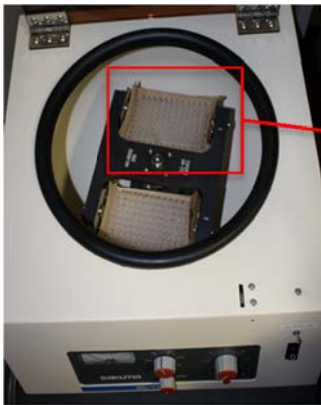


ひっくり返す



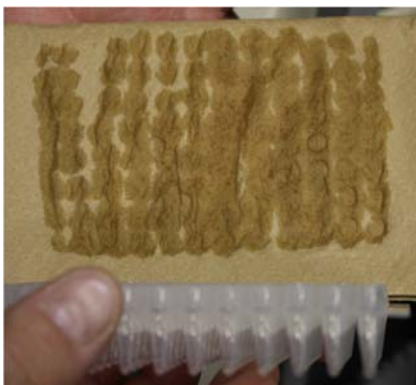
キムタオルに上清を吸わせる

新しいキムタオルの上にプレートを逆さに置き、スイング式の低速遠心分離器でフラッシュスピン（300 rpmに達したらストップ）をかけて余分な70%エタノールを除く。



デカントでは落ちきらなかった70%エタノールを遠心力で飛ばす。
(遠心力が強い、もしくは遠心時間が長いと沈殿させたDNAも外側に飛ばされるので注意が必要)

プレートを上向きに置き風乾させる。TEを100 μ L加え、沈殿したDNAを溶解させる。PCRプレートシールを貼り、サンプル名を記載後、4 $^{\circ}$ C（短期保存）もしくは-20 $^{\circ}$ C（長期保存）で保存する。



遠心力で飛ばされた70%エタノール



風乾後にTEを分注する。



液漏れの無いようにしっかりと貼り付ける。

2. DNA抽出 (つづき)

・設備/装置

フレークアイス製氷機
多検体破砕機 シェークマスター (深型96穴プレート対応) (BMS)
Hi-MAC CR20E スイングローターR3S MPバケット使用 (HITACHI)
4℃保冷庫、-20℃冷凍庫

・ハンドリング

精密ステンレスハサミ
ピンセット
深型96-wellプレート (※1)
e.g. Matrix™ 1.0 mL Deepwell Storage Blocks (Thermo Scientific) : 推奨
96-well PCRプレート用シリコンラバーマット (※1)
e.g. BM6012対応マット (ビーエム機器) : 推奨
200~1000μL用の8または12チャンネルのピペットマン
Chimney Top 96-well PCRプレート
PCRプレートシール
96-well PCRチューブスタンド
キムタオル
リザーバー

(※1) プレーートのウェル形状とシリコンマットの適合性に注意。(下記の推奨品は適合確認済み)

・試薬類 (※2)

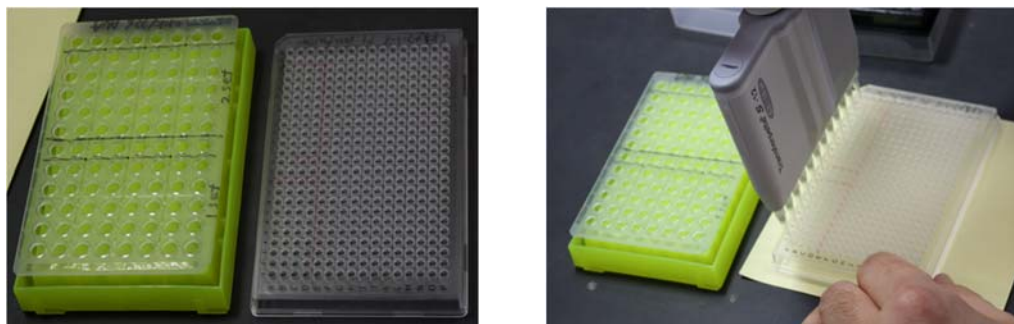
DNA簡易抽出バッファー(TPE バッファー) : 1M KCl、0.1M Tris-HCl (pH8.0)、
10mM EDTA
イソプロパノール
99.5%エタノール
滅菌したMilli-Q水または脱イオン水
TE : 10mM Tris-HCl (pH8.0)、1mM EDTA

(※2) グレードは特級試薬で良い。(分子生物学用のグレードである必要は無い。)

3. PCR

1) マスタープレートの作製

96-well プレートで調製したDNAサンプルを384-well プレートに10 μ Lずつ移しマスタープレートを作成する。マスタープレートは4 $^{\circ}$ C（短期保存）もしくは-20 $^{\circ}$ C（長期保存）で保存する。

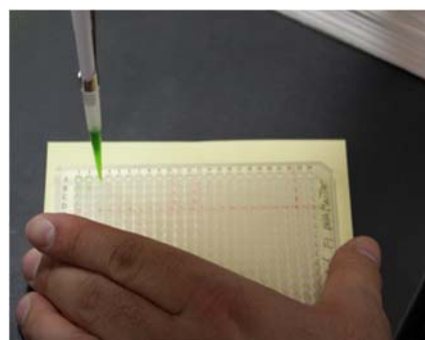


2) 反応液を調製

氷上でDye入りプレミックスPCR試薬とマーカー用PCRプライマーを混合し、PCRマスターミックスを調製する。1サンプルあたりの反応液は5 μ L。分注する際に多少のロスがあるためマスターミックスを多めに調製しておく。
例) 384サンプルの場合は400サンプル分、96プレート系では100サンプル分を調製

PCRマスターミックス組成／サンプル	384 $^{\circ}$ プレート系	96 $^{\circ}$ プレート系 ※
x2 Dye入りプレミックスPCR試薬	2.5 μ L	5.0 μ L
10 μ M Fwd primer	0.15 μ L	0.3 μ L
10 μ M Rev primer	0.15 μ L	0.3 μ L
Milli-Q 水(滅菌済)	2.2 μ L	4.4 μ L
Total	5.0 μ L	10.0 μ L

※ウェルの口径が大きくなり、水分の蒸発量が384 $^{\circ}$ プレートの場合より多くなるので、最低でも10 μ Lの液量でPCRを行う。



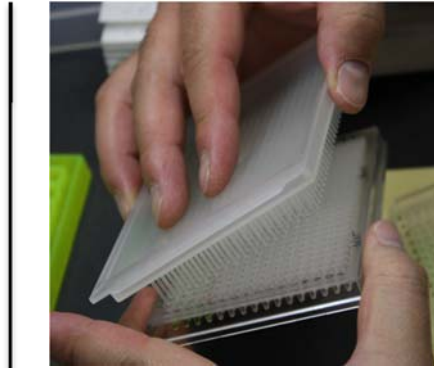
マスタープレートにあるサンプルの分だけ対応するウェルに分注する。

	プライマー名	配列(5' → 3')
コシヒカリ環1号用 プライマーセット	F3189 (Fwd primer)	ATGGAAAGAAACCGAACAAAGATCCAGG
	R3612 (Rev primer)	CGGAGAAATCGTGTAGACTAATTCGGT

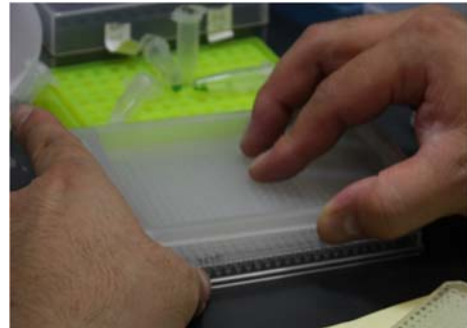
3. PCR (つづき)

3) 鋳型 (サンプル) DNAを混和

384 ピンレプリケーターでマスタープレートのサンプルDNAをPCRプレートに移し、よく混ぜる。

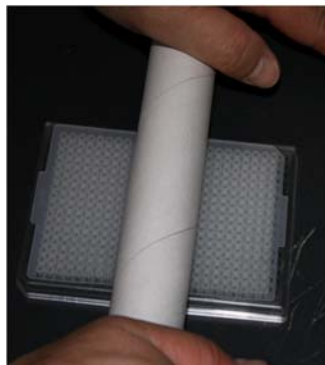


鋳型DNAはピン先に少しだけ付着する量で十分



レプリケーターを小刻みに上下に動かし鋳型DNAと反応液を良く混ぜる。

卓上のプレート用小型遠心分離器によるフラッシュスピンで反応液をプレートの底に落とし、シリコンマットのふたをする。



指圧である程度シール (仮止め) した後、サランラップの芯、麺棒などでマット全体を押し付ける。
(指圧だけでは、シーリングにムラでき、PCR中に反応液が乾燥してしまうことがある。)

4) PCR

サーマルサイ클ラーのヒーティングブロックが70℃以上になってからサンプルプレートをセットする。

PCR条件				
		サイクル数	温度	時間 (※1)
Step 1	初期熱変性・PCR酵素活性化	1	95 °C	2 min
Step 2	熱変性	35	98 °C	10 sec
	アニーリング		60 °C	30 sec
	伸長反応		72 °C	5 sec
Step 3	最終伸長反応	1	72 °C	5 sec
	保冷		15 °C	∞

※1) 高速PCR試薬、KAPA2G Fast ReadyMix w/ dye (KAPA BIOSYSTEMS) を用いたときの時間設定である。他社のPCR試薬を用いるときはその製品プロトコルを参照。

反応後のPCR産物は冷蔵庫で1週間保存可能 (サンプルの水分蒸発を防ぐためにプレートをラップで包む) 。

3. PCR (つづき)

5) 制限酵素処理

本マーカーはPCRで増幅させたDNA断片を制限酵素で切断するCAPSマーカーである。「コシヒカリ環1号」はFastDigest FspI (制限酵素) による消化でPCR産物は切断されるが、コシヒカリの場合は切断されず、DNA断片長に明らかな違いが表れるため、両品種の識別は可能となる。

FastDigest FspI (制限酵素) のx1反応液 (付属または別売のGreen Buffer使用) を氷上で調製し、PCR後のプレートに5 または10 μ Lずつ加え新しいピンレプリケーターで攪拌する。再度シリコンマットでフタをして37 $^{\circ}$ Cで60分間サーマルサイクラーでインキュベーションする。

制限酵素反応液/サンプル	384プレート系	96プレート系
x10 FastDigest [®] Green Buffer	0.5 μ L	1.0 μ L
FspI (制限酵素)	0.2 μ L	0.4 μ L
Milli-Q 水 (滅菌済)	4.3 μ L	8.6 μ L
Total	5.0 μ L	10.0 μ L

この制限酵素処理ではPCR反応液と酵素反応液を1:1で混合するため実際には酵素反応液が希釈される。そのため制限酵素のメーカーが保証する酵素活性が得られない可能性がある^(※1)。したがって、上記の反応系でPCR産物の切断が不十分な場合は反応時間を延長する、もしくは酵素反応液、酵素自体の割合を増やすといった方法で対処可能である^(※2)。

※1) x2 制限酵素反応液を調製しPCR反応液と混合後にx1になるようにしても全体の塩濃度が上昇するため、酵素活性への悪影響は避けられない。試薬の節約という点も含めてPCR反応液と酵素反応液を1:1で混合する反応系で制限酵素の活性 (目的の範囲内) を確認済み。

※2) サーマルサイクラーの機種やPCRプレート、シリコンマットの微細な形状の違いによってPCR反応液の蒸発量も多少異なるため、制限酵素反応液量もしくは反応時間の再調整が必要となる場合がある。制限酵素反応液の増量が最も効果的であるが、PCR産物の濃度もさらに希釈されるため電気泳動後のバンドが薄くなる可能性があり注意が必要。

3. PCR (つづき)

・ 設備/装置

フレークアイス製氷機

卓上遠心機ミニプレートスピナー (日本ジェネティクス)

ABI GeneAmp 9700 Dual 384 Blocks Thermal Cycler (Applied BioSystems)

4℃保冷库

-20℃冷凍庫

・ ハンドリング

10~20 μ L用の8または12チャンネルのピペットマン

10~1000 μ Lまでの各種シングルチャンネルのピペットマン

連続分注機能付き電動ピペットマン

eg. Finnpipette Novus シングル、ギルソンピペットマン Concept シングル

1.5mLマイクロチューブ

384-well PCRプレート用アルミブロック

384ピンレプリケーター (ビーエム機器)

384-well PCRプレート

384-well PCRプレート用シリコンラバーマット またはPCRプレートシール

サランラップの芯または麺棒など

・ 試薬類

Dye入りプレミックスPCR試薬

e.g. KAPA2G Fast ReadyMix w/ dye (KAPA BIOSYSTEMS)

GoTaq Green Master Mix (Promega)、等

カスタムプライマー (脱塩のみの精製グレードで可)

滅菌した超純水もしくは脱イオン水

FastDigest® FspI (制限酵素) (Thermo Scientific)

4. 電気泳動

1) 3%アガロースゲルの調製

30g (ゲル10枚分) の電気泳動用アガロースを電気泳動バッファー※1 1Lに懸濁させ、120℃, 20分のオートクレーブをかける。メジウム瓶の中には予め高粘度用スターラーを入れておく。

※1) 泳動バッファーはTBEでも代替可

↓
オートクレーブ終了後、ゲル溶液には濃度むらがあるので高温の内にスターラーでアガロースを念入りに攪拌する※2。高温で溶液の粘性が低い内にゲル作製台に約100mLずつ分注する。

※2) 攪拌が強く、空気をゲル溶液内に巻き込むとゲルから気泡が抜けず電気泳動像が乱れるので要注意

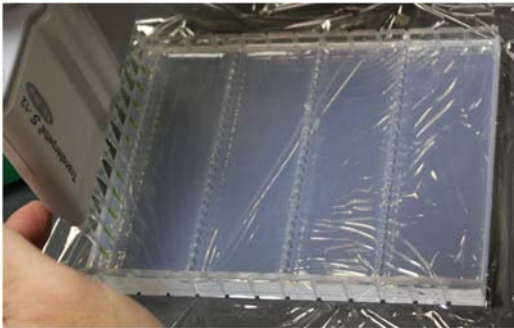
↓
ゲル表面に気泡が混入することがあるので、キムワイブなどを使って取り除く。
(ゲルが熱いうちにしか行えないので注意)

室温でゲルを冷まし固化させた後、コームを抜いてゲルを作製台から取り出し、使用しないゲルについては電気泳動バッファーに浸漬させた状態で保存する。(常温で3カ月程度の長期保存可)

2) 電気泳動

PCR産物をアガロースゲルにロードする際にゲルのサンプルウェルにバッファーを満たしておく。実験台にサランラップを敷きゲルを並べる。

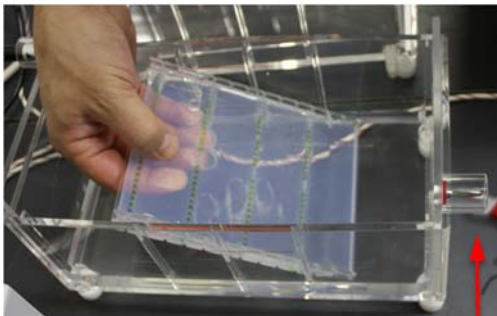
12チャンネルのピペットマンで384穴プレートからPCR産物を全量取り、ゲルのサンプルウェルにロードする。両端のウェルにはDNAサイズマーカー200ng (100ng/μL溶液を2μL)をロードする。



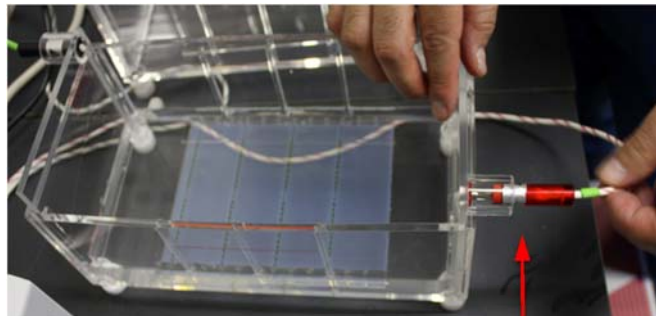
↓
電気泳動バッファーを満たした泳動槽にゲルを静かに沈める。電気泳動用パワーサプライをセットし、定電圧200Vで80分間(対象多型: 500bs以下)、泳動槽に通電する。通電すると、陰電極から細かい泡がたくさん出る。

(重要)

DNAは、陰電極(-)から陽電極(+)に向かって流れるので、電極に対するゲルの向きを間違えないようにする。



万が一の感電を防ぐため片側電極のプラグを外しておく。



ゲルを泳動層に沈めた後、通電直前にプラグをつなげる。

4. 電気泳動 (つづき)

3) ゲルの染色と多型の検出

電気泳動終了後、ゲルを適当濃度のエチジウムブロマイド (EtBr) 溶液に20~30分間浸漬する。

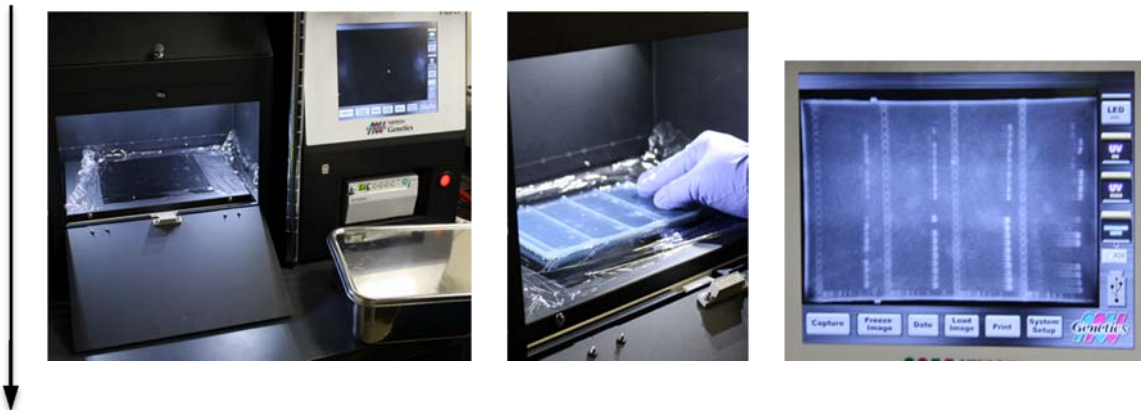


溶液は蒸留水で良く、泳動バッファーを用いる必要は無い。
EtBrは光で退色するため、ゲルの出し入れ以外の時は容器にフタをして遮光しておく。

染色後、ゲルを1枚ずつサランラップに移し、撮影装置で泳動像の写真を撮影。

(不要になった染色液については活性炭処理などによるEtBr除去後、適切に廃棄する。

また、撮影後の不要なゲルをビニール袋に入れ、口を固く縛り可燃ゴミとして廃棄する。)



増幅断片の大きさをもとに遺伝子型をA親型、B親型、H型とし、エクセルでデータ管理を行う。

4. 電気泳動 (つづき)

・ 装置/設備

高粘度液専用スターラー

電子天秤

オートクレーブ

フォーラック24サブマリンUVラック12ch用 (日本エイドー)

フォーラック24サブマリンゲル作製台 (日本エイドー)

フォーラック24サブマリンコウム (1.5mm厚) 24検体+マーカー2本用 (日本エイドー)

フォーラックサブマリンゲル電気泳動装置 (日本エイドー)

パワーバック HV (バイオラッド)

・ ハンドリング

1L広口メジューム瓶

高粘度用スターラーバー

シリコンミトン (軍手は不適)

100mLビーカー

タッパーウェア (アガロースゲル保存用)

サランラップ

10 μ L用12チャンネルピペットマン

10 μ Lショートチップ

蓋付きステンレスバット (エチジウムブロマイド染色用)

ビニール手袋

・ 試薬類

電気泳動用アガロース

蒸留水 (滅菌不要)

x1 SB バッファー : 10 mM NaOH adjusted to pH 8.5 with Boric acid

x20 SB バッファーストック (1 L) : NaOH 8g, Boric acid 45g (pH8.0^{*})

^{*}希釈すると自動的にpH8.5まで上昇

(SBの代替バッファー)

x1 TBE バッファー : 45 mM Tris base, 45 mM Boric acid, 1 mM EDTA (pH 8.0)

x5 TBEバッファーストック (1 L) : Tris(hydroxymethyl)aminomethane 54g,
Boric acid 27.5g, EDTA \cdot 2Na 3.7g

DNA Ladder Marker

エチジウムブロマイド (染色液の最終濃度は 1 μ g/mL)

エチジウムブロマイド処理剤

e.g. Ethidium Bromide Green Bag Kit (Q-Biogene) 、

エチブロDESTロイヤール (Wako) 、等

5. PCR・電気泳動での代替品

(96ウェルのサーマルサイクラーを用いる場合)

・ PCR関係

96-well PCRプレート用アルミブロック

96ピンレプリケーター

96-well PCRプレート、8または12連PCRチューブ

96-well PCRプレート用シリコンラバーマット、PCRプレートシール（プレートの場合）

Dye入りプレミックス高速PCR試薬

KAPA2G Fast ReadyMix w/ dye (KAPA BIOSYSTEMS) : 推奨

SapphireAmp Fast PCR Master Mix (TAKARA)、等

連続分注機能付き電動ピペットマンが無い場合、シングルのピペットマンで8または12連PCRチューブに数サンプル分の反応液を分注しておき、8、12チャンネルピペットマンで10 μ Lずつ各ウェルに分注することで省力化できる。

・ 電気泳動装置

8～12連ピペット対応サブマリン式小型電気泳動装置

TAITECまる楽泳動 Pico-96

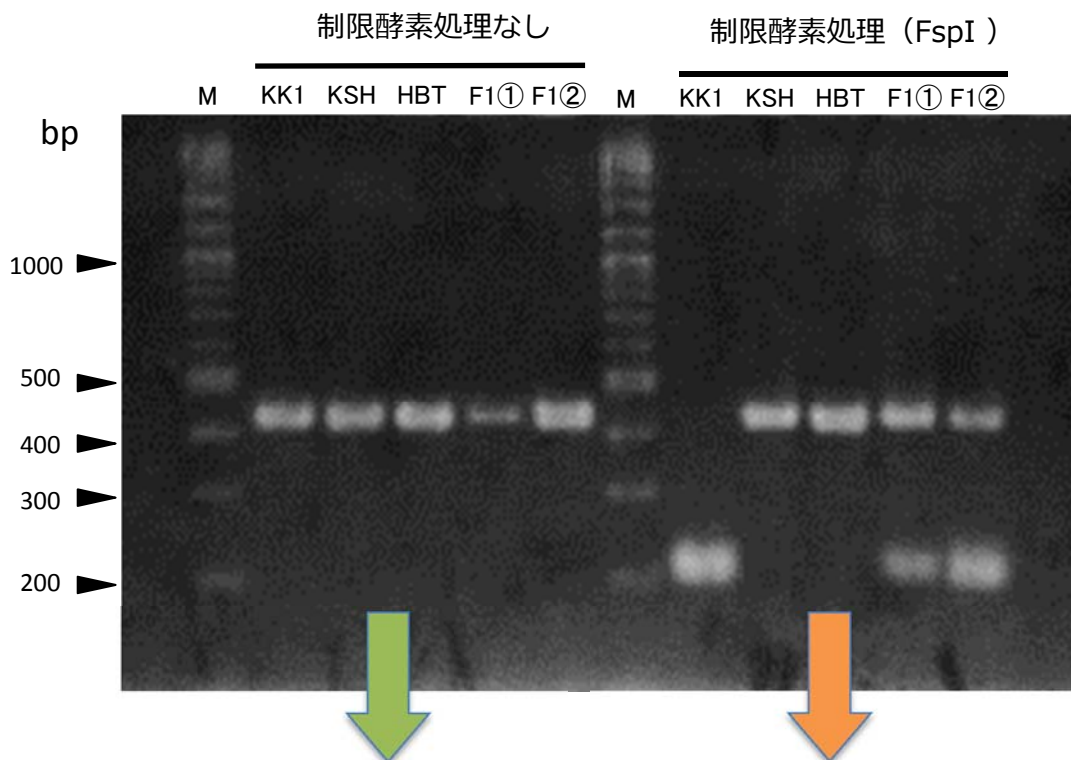
Mupid-exU、等

注1) 小型の泳動装置ではゲルおよびウェルサイズが小さい場合があるので泳動距離とサンプル処理数、ウェルにロードする時の8、12チャンネルピペットの操作性とロードできるサンプル液量に注意、装置購入前に要確認。

注2) 製品によってはゲル作成台の材質が高温に対応していない場合がある。3%のアガロースゲルの成型には作成台に高温の溶けたゲルを流し込むので、ゲル作成台の耐熱性も事前確認が必要。

電気泳動像

M : サイズマーカー
 KK1 : コシヒカリ環1号
 KSH : コシヒカリ
 HBT : ハバタキ
 F1① : KK1 x KSH
 F2② : KK1 x HBT



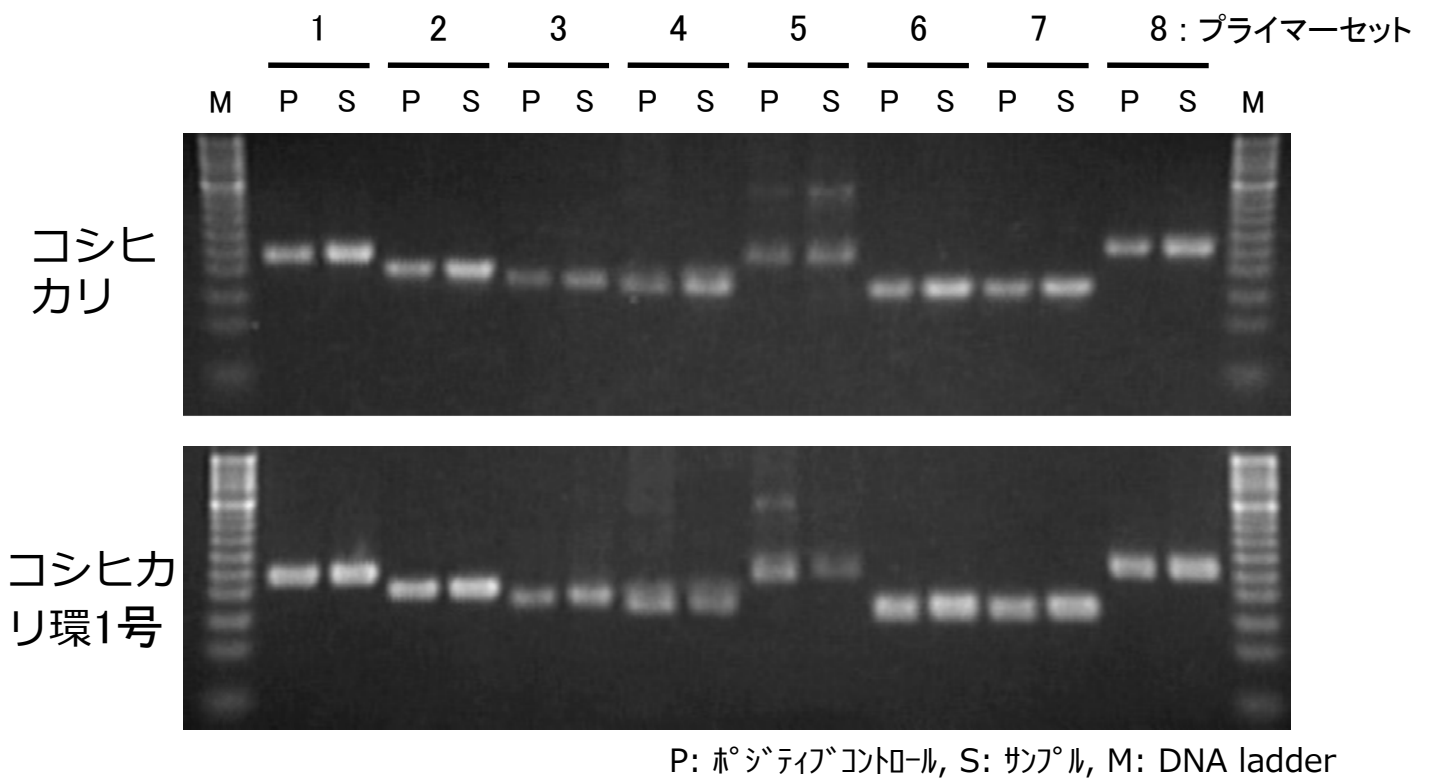
制限酵素処理をしていないの場合
 主な日本型品種（コシヒカリ等）の増幅断片 : 425 bp
 主なインド型品種（ハバタキ等）の増幅断片 : 423 bp
 コシヒカリ環1号の増幅断片 : 424 bp

FspIによる digestion（消化）の場合
 主な日本型品種（コシヒカリ等）の増幅断片 : 425 bp
 主なインド型品種（ハバタキ等）の増幅断片 : 423 bp
 コシヒカリ環1号の増幅断片 : 207bp + 217 bp

酵素処理後バンドが重なるため、1本に見える

(参考) 市販の品種判別キットを用いた場合

(株) ビジョンバイオ お米鑑定団® ver.4
農林水産省モニタリング検査対応キット



市販の品種判別キットでは、コシヒカリ
とコシヒカリ環1号の区別はできません。

(参考文献)

Ishikawa S, Ishimaru Y, Igura M, Kuramata M, Abe T, Senoura T, Hase Y, Arao T, Nishizawa NK, Nakanishi H (2012): Ion-beam irradiation, gene identification, and marker-assisted breeding in the development of low-cadmium rice. Proc Natl Acad Sci U S A, 109(47):19166-19171.

問い合わせ先:

〒305-8604

茨城県つくば市観音台3-1-3

農業環境技術研究所 土壤環境研究領域

主任研究員 石川 覚

Tel: 029-838-8270

E-mail: isatoru@affrc.go.jp

(マニュアル作成者：倉俣正人、安部匡、石川覚)