植物防疫基礎講座:

昆虫類やダニ類の DNA シーケンス法と 簡単な解析方法の紹介

近畿中国四国農業研究センター 三 浦 一 芸

はじめに

2010年の植物防疫9月号(三浦,2010)に引き続き, 今回は PCR で得られた DNA 産物を直接シーケンスす る方法と得られたシーケンス結果の簡単な解析方法を紹 介する。

I PCR 産物の調整

PCR 産物をシーケンスする場合,まず PCR で使った 過剰のプライマーや塩基等を取り除かなければいけな い。そこで、ミリポア社製マイクロコン-100カラムを 利用する方法を紹介する。DNAのテンプレートは本誌 第64巻9月号(三浦,2010)で紹介した PCR 産物33 µ1であるとする。

- (1) マイクロコン-100のカラムを組み立てる(図-1)。
- (2) PCR 産物をカラムに入れる。
- (3) 遠心機で 500g で 15 分間遠心する (室温)。
- (4) 廃液が出たチューブを捨てる。
- (5) 新しいチューブを用意する。

(6) カラムを倒置し,遠心機で1,000gで3分間遠 心する (室温)。

(7) シーケンスのためのテンプレートとして使える 濃度にする。PCR が終わり電気泳動をした際に DNA の濃度によってバンドの太さは変わる。例えば図-2 の6のような太いバンドが得られたら $10 \mu l$ 以上の滅 菌水を入れる。また、図-2の3とか4のような若干 薄いバンドの場合5~6 μl の滅菌水を入れる。その 後、ボルテックスして軽くチビタンで回す。これはあ くまで経験に基づくものである。これから $1 \mu l$ 取り 出しシーケンス用のテンプレートとする。

 (8) 正確にするならば、サンプルの量を分光光度計 を利用して測定し必要な濃度に調整する。次の工程で 必要な DNA 量は 200 ~ 500 ng である。この場合は 減菌水の量が変わる。

Introduction of Methods of DNA Sequence Analysis for Insects and Mites. By Kazuki Miura

Ⅱ シーケンスのための蛍光標識(Dye Terminator 法)

(1) 試薬やプライマーの量を調整する(表-1)。このときプライマーは片方だけである。また、PCR用のプライマーの濃度ではない。ここで必要なプライマーは PCR 用プライマーから 320 µl 取り出し、滅菌水を680 µl 入れたものである。

(2) PCR 産物の調整を行ったものを 1µl入れる。

 (3) サーマルサイクラーで 96℃ 10 秒後,96℃ 10
 秒,50℃ 5 秒(注意:ここはプライマーの Tm 値で変 える。ただし,経験上どのプライマーでも50℃で問



図-1 マイクロコン100 左:正立状態,右:倒立状態.



図-2 PCR 産物の電気泳動 左からマーカー, 6 つの PCR 産物.

⁽キーワード:DNA, シーケンス, アセンブル, アライメント, 系統樹)

表-1 試薬1本文の分量 (BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit)

試薬など	量 (µl)
Premix	4
5 imes Sewuencing Buffer	2
プライマー	1
テンプレート DNA(PCR 産物) (200 ~ 500 ng)	1
滅菌水	12



図-3 CentriSep スピンカラム 滅菌水を入れて放置している状態.

題はない)および 60℃ 4 分を 25 サイクルする。その 後は 4℃で保つか,アルミ箔などで包み- 20℃で保存 する。

Ⅲ精 製

1 CentriSep スピンカラムを利用した方法

 PCR を行っている間にサンプル精製用の CentriSep スピンカラムを用意する(図-3)。

(2) CentriSep スピンカラム内へ 800 µl の精製水を入れる。

- (3) ボルテックスを行い,水和する。
- (4) カラムに気泡がないことを確認する。
- (5) 室温で2時間以上放置する(注意:CentriSep スピンカラムの説明書には30分以上と書かれている)。
- (6) ウオッシャーチューブに上のキャップ,下のキャップの順で取り外したカラムをセットする。
- (7) カラム内の滅菌水がゲル表面まで自然落下するのを待つ。
- (8) 出てきた水を一度捨てる。再度、カラムをセットする。
- (9) 遠心機で730g,2分間遠心する。



 図-4 ドライアップするための真空ポンプ内蔵の卓上型 微量濃縮遠心機(WKN-PV-1200 DNA プチ Vac 和研薬株式会社)

- (10) 新しいサンプルチューブにカラムをセットする。
- (11) シーケンスのための蛍光標識を行ったサンプル を全量入れる。
- (12) 遠心機で730g,2分間遠心する。

(13) 図-4のような機械 (DNA プチ Vac など)を利用して乾燥させる (ドライアップ)。

 エタノール沈殿(CentriSep スピンカラムを使用 しない場合)

(1) シーケンスのための蛍光標識を行ったサンプル
 を 1.5 ml または 2 ml のチューブに入れる。

(2) その中に95%エタノール64µlと滅菌水16µl 入れる。

- (3) 室温で15分間放置する。
- (4) 遠心機で 15,000 rpm 15 分間遠心する。
- (5) 上澄みを残さないように注意深く分注器 (ピペ ットマンなど) で吸い取る。

(6) 70%のエタノール 250 µl を入れ, ボルテック

- ス後,軽くチビタンで回す。
- (7) 遠心機で15,000 rpm 10 分間遠心する。
- (8) 上澄みを残さないように注意深く分注器 (ピペ ットマンなど) で吸い取る。

(9) 図-4のような機械を利用して乾燥させる(ド ライアップ)。

エタノール沈殿は非常に安価であるが、初心者の方に は CentriSep スピンカラムをお薦めする。ほかに現在で は BigDyeXTerminator という試薬を用いる方法もある。

3 シーケンサー用サンプル

(1) ドライアップしたチューブに 20 µ*l* の Hi-Di
 Formamide を入れる。

(2) ボルテックス後,軽くチビタンで回す。

(3) サーマルサイクラーを95℃に保ち、サンプルチューブを2分間置き加熱する(図-5)。

(4) 加熱後,直ちにサンプルを氷の中に置き急冷する。

(5) シーケンス用サンプルが完成する。すぐにシーケンサーにかけない場合はアルミ箔などに包んで遮光して-20℃で保管する。

この後,シーケンスサーにかけるか,または外注に出 すことになる。シーケンサーの取り扱い方は同じ会社で も異なるのでここでは省略することにする。



図-5 サーマルサイクラーの利用 95℃∞に設定.

Ⅳ 塩基配列の決定

配列の連結(アセンブル assemble)(図-6)

シーケンサーから取り出した DNA データーはフォワ ード側のプライマーから伸びた配列とリバース側のプラ イマーから伸びた配列が1つずつになっている。これを 一つに合わせなくてはいけない。ここでは市販の CLC

DNA Workbench5.7 を利用した方法を紹介する。

- (1) CLC DNA Workbench5.7 を立ち上げる(図-7)。
 (2) 「Import」をクリックしフォワード側とリバー
- ス側のファイルを選択する。
- (3) 「Toolbox」をクリックしタブを開く。

(4) 「Sequencing Data Analysis」→「Assemble Sequence...」と進む (図-8)。

- (5) ファイルを選択 (図-9)。
- (6) 「Next」を3回クリックし「Finish」をクリックする。
- (7) 指摘があるところは波形を見ながら正しいと考

フォワードのプライマーでのDNAシーケンス結果 リバースのプライマーでのDNAシーケンス結果 図-6 アセンブルのイメージ

CLC DNA Workbench 5.7 (Current work	kspace: Defaut)	
File Edit Search View Toolbox Worksp		
Show New Save Import Proof Graphics P		With 100% Page Storing Zoom In Zoom Dut
Navigation Area	with OpakaM-10-285S O with OpakaM-10-285A O with Kochilf-SCOIR O	
		Sequence Settings
-205 KochiF-5001R	20 40 60 80 I I I I	Sequence layout
E Recycle bin (177)	KochiF-5COIR NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN	AT Spacine
	Trace data	No spacing •
		Auto wrap
	100 120 140 <u>Bg</u> ll	Fixed wraps
	KachiF-5COIR AAAAAAAAAAAAAAATCCAATTCTTCAAAGGGTAGAGATTTTTAGGTTTGTTT	every 10000 residues
	Trace are an and an and and an and an and an and an and an and and	Double stranded
		Relative to 1
	190 200 220 240	V Numbers on plus strand
		TG
	TADAAAAAA AAAAAA AAAAAAA AAAAAAAAAAAAAA	A A
Or Kenter succession 10		Sequence label
Trainov		Name •
Alignments and Trees	260 280 300 320 I I I I	Annotation types
B A General Sequence Analyses	Kochi-SCOIR TGATGAGCTCAAACAATAAATCCCAAAAATCCAATCGCTATTATTGCGTAAATTATTCCTAAAAGTCCAAAAGTTCTTTCT	FG • Restriction sites
i⊛-taa Protein Analyses ⊛-taa Sequencing Data Analyses	Trace data MAMMANAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	Residue coloring
Borning and Probes Coning and Restriction Sites		Find
BLAST Search	340 360 380 400	420 • Text format
	KochiF-5COIR TTACTTTCTTGAGTAATAATATGAGAAATTAGTCCAAATCCTGGTAAAAATTAAAAATGTAAACTTCTGGGTGACCAAAAAATC	AG
	Trace data and MANAAAA and	
	440 460 480 500	
	KochiF-5COIR AAAAGGTGTTGGTATAAGACAGGGTCTCCCCCCCCCCCC	тт
	And A.A. A. A. And anterna a marine A. A.	A .
		(V) -
Processes Toolbox		

図-7 CLC DNA Workbench5.7の外観

-62 -



図-8 配列の連結の手順



図-9 ファイルの選択

えられる塩基に修正する。

- (8) 塩基配列をコピーする (図-10)。
- (9) コピーした配列は「メモ帳」などのテキストエ ディターに貼り付ける。

ここから先は目的によって手順が異なってくる。

V 相 同 検 索

上記の手順で決めた配列がどのようなものに似ている のかを調べたくなる。調べることを相同性(homology) 検索と呼ぶ。GenBank などに登録されているデータベ ースから相同性の高い配列を探す。その結果,分子の機 能や構造,分子進化を考えることが可能となる。この相 同性検索のためのツールが BLAST(Basic Local Alignment Search Tool)である。

(1) http://blast.ddbj.nig.ac.jp/top-j.html を開く。

(2) アセンブルで連結した配列を or COPY & PASTE:
 と書かれている下の空欄にペーストする (図-11)。
 (3) 「入力内容の送信」をクリックする。

- (4) 「View Result」をクリックする。
- (5) よく似ているデータが表示される(図-12)。

VI 系統樹作成(NJ法)

ここまでできたら系統樹を描いて見たくなるものであ る。そのためにはまず系統的に見て同じ塩基配列を比較 する必要がある。この計算をアライメントと呼ぶ(図-13)。 ここでは引き続き CLC DNA Workbench5.7 を利用する。

(1) アセンブルにより連結した塩基配列や GenBank
 から取り出した配列を FASTA フォーマットで記述する(図-14)。

(2)「Import」で FASTA フォーマットのファイルを 読み込む。

(3)「Toolbox」→「Alignments and Trees」→ 「Create Alignment」で読み込んだ FASTA フォーマッ トファイルを開く。

(4) 「Next」を2回クリックし「Finish」をクリックする。

(5) アライメントされた結果が出る (図-13)。

(6) 「File」→「Save as..」でファイルの名前をつけ 保存する。

(7)「Toolbox」→「Alignments and Trees」→ 「Create Trees..」で先ほどのアライメントしたファイ ルを指定する。

(8)「Next」を2回クリックして「Finish」をクリ ックする。

(9) 系統樹が表示される (図-15)。

もちろん,アライメントや系統樹は他の無料のソフト やweb上でできる。例えば,DDBJ (http://clustalw. ddbj.nig.ac.jp/topj.html) にFASTAフォーマットで書か れた配列を入れる (図-16) と,図-17 のようなアライ



図-10 配列の連結結果と配列のコピー



図-11 BLAST に配列を挿入 or COPY & PASTE の下の空欄に描かれている塩基配列.

Sequences producing significant alignments:								Score E (bits) Value			
	AB262428 AB554258 AB262436 AB262435 AB262435 AB262434 AB262433 AB262431 AB262430	AB262428.1 AB554258.1 AB262436.1 AB262435.1 AB262435.1 AB262433.1 AB262433.1 AB262433.1 AB262433.1	Thrips Thrips Thrips Thrips Thrips Thrips Thrips Thrips Thrips	tabaci tabaci tabaci tabaci tabaci tabaci tabaci tabaci	mitochondrial mitochondrial mitochondrial mitochondrial mitochondrial mitochondrial mitochondrial mitochondrial	COI COI COI COI COI COI COI COI	gene gene gene gene gene gene gene	for for for for for for for	CyC CyC CyC CyC CyC CyC CyC CyC	595 587 587 587 587 587 587 587 587 587	e-167 e-164 e-164 e-164 e-164 e-164 e-164 e-164
	AB262441 AB262440 AB262438 AB262437	AB262440.1 AB262438.1 AB262438.1 AB262437.1	Thrips Thrips Thrips Thrips	tabaci tabaci tabaci tabaci	mitochondrial mitochondrial mitochondrial mitochondrial	COI COI COI COI	gene gene gene gene	for for for	сус сус сус	<u>579</u> <u>579</u> <u>579</u> <u>579</u>	e-162 e-162 e-162 e-162

図-12 BLAST による検索結果

メント結果が得られる。

NJ 法については http://www.appliedbiosystems.jp/ website/jp/biobeat/contents.jsp?TYPE=C&BIOCATEGO RYCD=6&COLUMNCD=3308 で斎藤成也氏による非常 に簡単でわかりやすい説明が掲載されている。是非,一 読されたい。

CLC DNA Workbench 5.7 (Current work	kspace: Default)			Sector State	And I Address of the Owner, where the			
File Edit Search View Toolbox Workspi	ace Help							
Show New Save Import Export Graphics Pr	int Undo Redo Cut Copy Paste Del	ete Workspace Plug-ins	Search				Fit Width	100% Pan Sele
Navigation Area	IEI * AR+THCOLalia	-€: * AR+THCOLal -€: * COLalier	gOII≣AR+T nmentOI	HCOI O REP Koo IEII COI_alignment	chiF-5COIR O i	II AR+THCOLalig	AR+THCOI	
- 306 KochiF-5COIR	4E:* ARYTHOOLAIIB	P NOBI Search O	Ø + Bearch ♥	P NODI search	HEP KUCHIF-UCOIK	P NOBI search		1 0 111
705 KochiF-5COIU			20		40			Alignmer
AR+THCOLalignment	I partial cds haplotype: 14	TETETGGGAT	TATTAATTAT	AGGACTTTAT	AAAGAAGGAG	GGGGAAGGGG	50	E
En Alteriation	I partial cds haplotype: 12	TCTCTGGGAT	TATTAATTAT	AGGACTTTAT	AAAGAAGGAG	GGGGAACGGG	50	Sequence
the up necycle bin (162)	_I_partial_cds_haplotype:_10	TCTCTGGGAT	TATTAATTAT	AGGACTTTAT	AAAGAAGGAG	GGGGAACGGG	50	Spacing
	_I_partial_cds_haplotype:_11	TCTCTGGGAT	TATTAATTAT	AGGACTTTAT	AAAGAAGGAG	GGGGAACGGG	50	Every 10 re
	_I_partial_cds_haplotype:_17	TETETGGGAT	TATTAATTAT	AGGACTTTAT	AAAGAAGGAG	CGGGAACGGG	50	No wrap
	_I_partial_cds_haplotype:_16	TETETGGGAT	TATTAATTAT	AGGACTTTAT	AAAGAAGGGG	CGGGAACGGG	50	Auto wr
	_I_partial_cds_haplotype:_15	TETETGGGAT	TATTAATTAT	AGGACTTTAT	AAAGAAGGAG	GGGGAACAGG	50	C Fixed w
	MatsuyamaF-17	TET GGGAT	TATTAATTAT	AGGACTITAT	AAAGAAGGAG	GGGGAAGGGG	48	
	Matsuyamar-9	AI		AGGACITIAT	AAAGAAGGAG	GGGGAALAGG	42	every
	KagawaF-20			AGGAETTTAT	AAAGAAGGGGG	GGGGAAGGGG	30	Double
	KagawaF-19			AGGAGTTTAT	AAAGAAGGAG	GGGAAGGGG	31	III Mumhan
	KagawaF-22		AT	AGGACTTTAT	AAAGAAGGAG	GGGGAACGGG	32	Trainiber
	KochiM-8			AT	AAAGAAGGAG	GGGGAACGGG	22	Relative to
	MatsuyamaF-12				AG	GGGGAACGGG	12	V Number
	e_l_partial_cds_haplotype:_8	TCTCTGGGAT	TATTAATTAT	AGGACTTTAT	AAAGAAGGAG	GGGGAACAGG	50	☑ Lock nu
	e_l_partial_cds_haplotype:_6	TETETGGGAT	TATTAATTAT	AGGACTTTAT	AAAGAAGGAG	CGGGAACAGG	50	E Hide Ial
0-6-6-6-6	e_l_partial_cds_haplotype:_7	TETETGGGAT	TATTAATTAT	AGGACTTTAT	AAAGAAGGGG	CGGGAACAGG	50	
Center search termiz	e_l_partial_cds_haplotype:_4	TETETAGGAT	TATTAATTAT	AGGACTTTAT	AAAGAAGGAG	GGGGAACAGG	50	V LOCK Id
Too box 🗶	e_l_partial_cds_haplotype:_9	TETETGGGGAT	TATTAATTAT	AGGACITIAT	AAAGAAGGAG	GGGGAACAGG	50	Sequence la
Alignments and Trees	e_i_partial_cds_napiotype:_5	TETETCCCAT	TATTAATTAT	AGGACTITAT	AAAGAAGGAG	CCCAACAGG	50	IName
Create Pairwise Comparison	e partial_cds_haplotype3	TETETCCCAT	TATTAATTAT	AGGAGTTTAT	AAAGAAGGAG	GGGGGAGAGG	50	Show s
	e partial_cds_haplotype: 1	TETETGGGAT	TATTAATTAT	AGGACTTTAT	AAAGAAGGAG	GGGAAGAGG	50	🔄 Identica
Create Alignment	OsakaF-34		AT	AGGACTTTAT	AAAGAAGGAG	GGGAACAGG	32	Annotation
Join Alignments	KochiF-5				GAAGGAG	GGGGAACAGG	17	Annotation
General Sequence Analyses	KochiM-2			· · · · · TTTAT	AAAGAAGGAG	CGGGAACAGG	25	. Desidered
Convert DNA to RNA	KochiF-6			TTTAT	AAAGAAGGAG	GGGGAACAGG	25	 Hesidue co
Convert RNA to DNA	UsakaF-33	TETETOCOTT	TATTAATTAT	AGGACITIAT	AAAGAAGGAG	GGGGAAGAGG	32	 Alignment
- xte Reverse Complement Sequence	_i_partial_cds_haplotype:_20	TETETCCCAT	TATTAATTAT	ACCAPTTAT	AAAGAAGGAG	CCCCACACG	50	Nucleotide
Reverse Sequence	I partial cds haplotype: 18	TETETGGGAT	TATTAATTAT	AGGAGTTTAT	AAAGAAGGAG	GGGAAGAGG	50	Find
Translate to Protein	OsakaM-37	IN STOCOM	1011001101	ACCASILIAI	AAAGAAGGAG	COCAREACO	50	. Total former
Protein Analyses	KagawaF-24				- AAGAAGGGG	GGGGAAGGGG	19	 Text forma
E Mit Sequencing Data Analyses	OsakaM-38						-	
Trim Sequences	Consensus	TCTCTGGGAT	TATTAATTAT	AGGACTTTAT	AAAGAAGGAG	CGGGAACAGG		
	100%	and an an and an and a second						
Add Sequences to Contin	Conservation							
Reassemble Contig	2.0bits			ACCHOTTTIT	AAAAAAAAAAA	000-10 00		
	Sequence logo	TATAT-OOLT	T . T T T T A .	ALTERT	nnni-nni-l-ti-	I isisis A AI - isis		*
		ত্থি – 19	マライメ	ント結里				

□ COI - ×王城 . ファイル(F) 編集(E) 書式(O) 表示(V) ヘルプ(H) Kochi F=5 jAAQBAGGGGAACAGGATGAACAGTGTATCCACCTTTATCAACATTTTATCATTCAGGACCTTCAGTAGACTTAACAATTTTTTC Koch IF=b ITTATAAAGAAGGAGCGGGAACAGGATGAACAGTGTATCCACCTTTATCAACATTTTATCATTCAGGACCTTCAGTAGACTTAACA Koch i M~2 TTATAAAGAAGGAGCGGGAACAGGATGAACAGTGTATCCACCTTTATCAACATTTTATCATTCAGGACCTTCAGTAGACTTAACA SOCDIM-8 IAAAGAAGAAGGAGCGGGAACGGGATGAACAGTATATCCACCTTTATCAACGTTTTATCATTCAGGACCTTCAGTAGACTTAACAATT sakar-33 AGGACTTTATAAAGAAGGAGCGGGAACAGGATGAACAGTGTATCCACCTTTATCAACATTTTATCATTCAGGACCTTCAGTAGA >Usaka--34 ATAGGACTITATAAAGAAGGAGCGGGAACAGGATGAACAGTGTATCCACCTITATCAACATTITATCATTCAGGACCTTCAGTAGA >UsakaM=37 ATTCAGGACCTTCAGTAGACTTAACAATTTTTTCTTTACACCTTGCAGGAATTTCTTCAATTTTGGGTGCCTTAAATTTTATTTCT OsakaM-38 ACCTICAGIAGACTTAACAATTTTTTCTTTACNCCTTGCAGGAATTTCTTCAATTTTGGGTGCCTTAAATTTTATTTCTACAATT >KagawaF-19 TAGGACTITATAAAGAAGGAGGGGGAACGGGATGAACAGTATATCCACCTTTATCAACGTTTTATCATTCAGGACCTTCAGTAGAC XKagawaF-20 AGGACTTIATAAAGAAGGGGGGGGGAACGGGATGAACAGTATATCCACCTTTATCAACGTTTTATCATTCAGGACCTTCAGTAGACT >KagawaH=22 ATAGGACTTTATAAAGAAGGAGCGGGAACGGGATGAACAGTATATCCACCTTTATCAACGTTTTATCATTCAGGACCTTCAGTAGA XKagawat-24 AAGAAGGGGGGGGAACGGGATGAACAGTATATCCACCTTTATCAACGTTTTATCATTCAGGACCTTCAGTAGACTTAACAATTTTT XKagamat-26 ATAGGACTTTATAAAGAAGGAGCGGGAACGGGATGAACAGTATATCCAOCTTTATCAACGTTTTATCATTCAGGACCTTCAGTAGA utsuyamar-12 gagaacaggatgaacagtatatccacctttatcaacgttttatcatcaggaccttcagtagacttaacaattttttctttac АССЭВЗААЛЭЭЭА ГЫААЧАЯТАТАТОЧЧОГТ ТАТОЧЧОГТ Матьриальт ТСТЭЭЗАТТАТТАТТАТААСАСТТТАТАААДААДЗАДСООЗДААСДЭДАТДААСАДТАТАТССАССТТТАТСААСДТТТАТСАТ ТСТЭЭЗАТТАТТАТТАТААДЭАСТТТАТАААДААДЗАДСООЗДААСДЭДАТДААСАДТАТАТССАССТТТАТСААСДТТТАТСА ™Matsuvamar-ə ATTATTAATTATAGGACTTTATAAAGAAQGAQCGQGAACAQGATQAACAGTATATCCACCTTTATCAACGTTTTATCATTCAQGAC

おわりに

ここで紹介した方法は現在我々の研究室で使用してい るものである。より安価な方法はたくさんある。以下の サイトを紹介する。

アセンブルの無料のやり方が http://www.kyotobe.ne.jp/kumiyama-hs/sqreport/webmanual/phred phrap/usephredphrap.htm および http://cse.fra.affrc.go. jp/ksaitoh/using_consed.html に説明されている。アラ イメントなどの塩基配列の編集は無料ソフト BioEdit (http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html) があ る。また, アライメントや系統樹は無料ソフト MEGA (http://evolgen.biol.metro-u.ac.jp/MEGA/) がある。田 邊晶史氏による http://www.fifthdimension.jp/docu ments/molphytextbook/は参考になる。

ここで記述した方法は PCR 産物を直接 DNA シーケ ンスするものである。図-18 の右のような重複した波形 が得られた場合(例えば,核とか重複寄生している微生 物)は,複数の種類の PCR 産物が混在している場合が 多い。このような場合には,各々のシーケンスを得るた めに,PCR 産物をクローニングし,テンプレートとし て用いなければいけない。クローニングについては第 65巻(2011年)3月号で紹介する予定である。

ここで紹介した方法の必要な器具などとその価格を 表-2に書き出した。参考になれば幸いである。わかり にくいことがあればメール(miurak@affrc.go.jp)など をお送りくだされば幸いである。

引用文献

1) 三浦一芸 (2010): 植物防疫 64:620~625.

-65-

CLC DNA Workbench 5.7 (Current work	space: Default)	
File Edit Search View Toolbox Workspa		
Show New Save Import Export Graphics Pri	R Undo Redo Cue Copy Parte Delete Workspace Plug-lins Search Re Wath 10	0% Pan Selection
Navigation Area	IEI * AR*THOOLaile. O EI * AR*THOOLaile. O IF AR*THOOLAIL. O IF AR*THOOLAILE. O IF AR*THO	O -TEI * AF
CLC_Data	P NCBI search O P * Search O P NCBI search O #EP KochiF-SCOIR O P NCBI search O IEF AR*THCOI O IEE * AR*THCOI_alig_	C 4E: * AR+
- 206 KochiF-5COIU - III AR+THCOI alignment	rs gi 139001385 dbj AB262438.1 _Thrips_tabaci_mitochondrial_COI_gene_for_cycytochrome_oxidase_l_partial_cds_haplotype:_11 ها gi 139001383 dbj AB262437.1 _Thrips_tabaci_mitochondrial_COI_gene_for_cycytochrome_oxidase_l_partial_cds_haplotype:_10	1 1 1
E Recycle bin (182)	38 gi 139001392 dbj AB262439.1 _Thrips_tabaci_mitochondrial_COl_gene_for_cycytochrome_oxidase_l_partial_cds_haplotype:_12 53 gi 139001407 dbj AB262443.1 _Thrips_tabaci_mitochondrial_COl_gene_for_cycytochrome_oxidase_l_partial_cds_haplotype:_16	 Tree Layout Node symbol
	eg gi[139001413]dbi]AB262444.1]_Thrips_tabaci_mitochondrial_COI_gene_for_cycytochrome_oxidase_l_partial_cds_haplotype:_17 gi[139001405]dbi]AB262442.1]_Thrips_tabaci_mitochondrial_COI_gene_for_cycytochrome_oxidase_l_partial_cds_haplotype:_15	Layout
	gij139001403jdbijAB262441.1]_Thrips_tabaci_mitochondrial_COI_gene_tor_cycytochrome_oxidase_I_partial_cds_haplotype:_14	Label col
	o KochiM-2 o <u>100</u> OsakaM-38	Branch la Node coli
	71U • OsakaM-37	 Line color Labels
	99 51 sof gil295841412[dbj]AB554259.1[_Thrips_tabaci_mitochondrial_COI_gene_for_cycytochrome_oxidase_l_partial_cds_haplot	Nodes Branches
	 merg gl/25041410[db]AB554200.1_inrips_tabad_mitochondrial_COl_gene_tor_cycytochrome_oxidase_l_partial_cds_haplot; gl/25841410[db]AB554258.1[Thrips_tabaci_mitochondrial_COl_gene_for_cycytochrome_oxidase_l_partial_cds_haplot; gl/2.0extrd 23 	Text format
	94 KagawaF-24	
Qr (enter search term)	so KagawaF-36 84 Sa KagawaF-26	
Toolbox X	¹ 4 KagawaF-20	
Create Pairwise Comparison	est 664 KochiM-8	
- TE: Maximum Likelihood Phylogeny	MatsuyamaF-17 weight with the standard	
General Sequence Analyses	gi 139001345 db] AB262429.1 _Thrips_tabaci_mitochondrial_COI_gene_for_cycytochrome_oxidase_i_partial_cds_haplotype:_2 de_gi 139001350 db AB262430.1 _Thrips_tabaci_mitochondrial_COI_gene_for_cycytochrome_oxidase_i_partial_cds_haplotype:_3	
Convert DNA to RNA	gi 139001356 dbj AB262431.1 Thrips_tabaci_mitochondrial_COI_gene_for_cycytochrome_oxidase_l_partial_cds_haplotype:_4 gi 139001366 dbj AB262434.1 Thrips_tabaci_mitochondrial_COI_gene_for_cycytochrome_oxidase_l_partial_cds_haplotype:_7	
Reverse Complement Sequence	gi[139001360]dbj]AB262433.1]_Thrips_tabaci_mitochondrial_COI_gene_for_cycytochrome_oxidase_I_partial_cds_haplotype:_6 tsj_gi]139001358]dbj]AB262432.1]_Thrips_tabaci_mitochondrial_COI_gene_for_cycytochrome_oxidase_I_partial_cds_haplotype:_5	
Translate to Protein	gi[139001373]dbj]AB262435.1 _Thrips_tabaci_mitochondrial_COl_gene_for_cycytochrome_oxidase_I_partial_cds_haplotype:_8 gi]139001379]dbj]AB262436.1 _Thrips_tabaci_mitochondrial_COl_gene_for_cycytochrome_oxidase_I_partial_cds_haplotype:_9	
Sequencing Data Analyses	0.500	
11 1 4	· 図-15 系統樹 (NI 注)	
CLUSTALW WWW Sys	×	Sec. 1
← → C ☆ http://	/clustalw.ddbj.nig.ac.jp/top-j.html	
@ Web スライスギャ @	おすすめサイト	
0		
ODDB J		
DNA Data Bank of Japan	・ DOTSINOUTPUT(アラインメントの一致	文字をドッ
<u>Japanese</u> <u>English</u>	version 1.83 • DISTANCE(系統樹作成時の塩基置換)	数推定法)
Search	<u>脾やれてクリナーマン</u> ※SEQNO <u>RANGEオプション</u> を使用する場合は、配列名に「/」を付かしないで下さい。	
BLAST Help	※後数の配列治可時に検索することかできます。後数検索の例 ただし、配列数などによっては、検索時間がかかりタイムアウトなどで結果が取得出来ないケースがございますので	ご注意下さ
Analysis	そのような場合は、配列数を小さくする等して再度お試し下さい。 File Unload	
	ファイルを選択 選択されていません	
Hept	Copy & Paste	
Utility		
Traffic Depute Viewer		
Result Mewer	ACAGCTATTCTCCTTCTTTTATCTCTACCAGTGTTAGCAGGGGCAGGAGCTATCACAATACTTTAACTGACCGAA	
Others	TTTTGGTCACCCAGAAGTITACATITTACTTTACCAGGATTTGGACTAATTTCTCATATTATTACTCAA	
What's New	GATTTATTGTTTGAGCTCATCACATATTTACAATTGGAATAGACGTTGATACACGAGCATACTTACATC	
 <u>Statistics</u> <u>Documents</u> 		
• <u>Q and A</u> • <u>References</u>	解析結果 ※系統樹描画ツールTreeViewダウンロードページへのリンク	
	● WWW © E-Mail	
DDBJ lop Page	〔入力内容の送信〕 入力項目の中止	

図-16 DDBJ の CLUSTAL W によるアライメント Copy & Paste 欄に FASTA フォーマットで書かれた配列を入れている.



図-17 アライメント結果

表-2 DNA シーケンスでの主な物品リスト

品名	販売メーカー名	品番	単位	価格 (円)
マイクロコン-100	日本ミリポア	42413	100 個	41,000
BigDye ® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	アプライドバイオシステムズ	4337455	100 反応	125,000
CentriSep TM スピンカラム	アプライドバイオシステムズ	401762	100 個	38,000
DNA プチ Vac	和研薬	WKN-PV-1200	1台	328,000
BigDye [®] XTerminator TM	アプライドバイオシステムズ	4376486	100 反応	25,000
Hi-Di [™] Formamide	アプライドバイオシステムズ	4311320	25 m <i>l</i>	5,000
CLC DNA Workbench5.7	フィルジェン	Cat.#F-CLC-DW	1固定永久ライセンス	52,500
			(アカディミック版)	
CLC DNA Workbench5.7	フィルジェン	Cat.#F-CLC-DW	1固定永久ライセンス	262,500
			(コマーシャル版)	

農林水産省プレスリリース (22.9.16~22.10.15)

農林水産省プレスリリースから,病害虫関連の情報を紹介します。 http://www.maff.go.jp/j/press/syouanの後にそれぞれ該当のアドレスを追加してご覧下さい。

◆「ウメ輪紋ウイルスに関する対策検討会」の開催について

◆ 平成 22 年度病害虫発生予報第8号の発表について (10/7) /syokubo/101007.html

/syokubo/101004.html

(10/4)

773