



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	パラタクソノミスト養成講座 DNA（初級）編
Author(s)	小林, 憲生; 舘, 卓司
Citation	パラタクソノミスト養成講座・ガイドブックシリーズ, 3
Issue Date	2009-12-31
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/45191
Type	book
File Information	ara03.pdf



パラタクソノミスト養成講座

DNA(初級) 編



小林憲生・館 卓司 (北海道大学総合博物館)

北海道大学 教育GP
「博物館を舞台とした体験型全人教育の推進」

北海道大学総合博物館

序 文

パラタクソノミスト (Parataxonomist) とは、1980 年代にアメリカの生物学者ジャンセン (D. Janzen) らが熱帯コスタリカの生物多様性調査を行った際に考えだした調査プロジェクトの役割の一つです。熱帯ジャングルで生物調査をすると、膨大な生物が採集されます。とくに昆虫は一晚の灯火採集で数万の個体が採集されることもあり、その膨大な標本を整理するには、人手が必要です。そこで考えだされたのが、パラタクソノミスト。名称は、パラ (Para: 準) とタクソノミスト (Taxonomist: 分類学者) という 2 つの言葉を合わせ、研究者である分類学者のサポートをするという「準分類学者」の意味をもちます。

コスタリカでは、焼畑農業をしていた現地の人たちがパラタクソノミストとして採用されました。現地の人にとっては安定した雇用と収入を得ることができ、自分たちの住む地域は地球上の貴重な遺伝子資源としての自然環境であるという意識の改革につながりました。焼畑で消失しつつあった熱帯林も自発的に保護がなされ、地球環境保全への貢献にもなりました。このパラタクソノミストのシステムは、コスタリカ以外の熱帯域へも広がり、パプアニューギニアやグアテマラでも行われました。しかし、2000 年代に入り先進国からの熱帯生物多様性保全や研究への支出が減り、幾つかのパラタクソノミスト事業は中断を余儀なくされています。

さて、日本でのパラタクソノミスト事業は、熱帯域とは違ったかたちで進められています。2003 年から 21 世紀 COE「新・自然史科学創成」の教育プログラムの一部として、北海道大学を中心に「パラタクソノミスト養成講座」が始められました。日本では、パラタクソノミストとして生計をたてることはほとんど不可能なことから、おのずと対象となる人も事業内容も変わってきます。

日本でのパラタクソノミスト事業の目的は以下のとおりです。

- (1) 生物多様性保護と研究を促進させる生物分類学ファシリティー構築のための人材育成
- (2) 博物館を基盤とした、分類学、学術標本研究、フィールド科学の振興と普及

パラタクソノミスト養成講座は、大学生・大学院生の教養教育として、博物館ボランティアや環境調査会社職員のスキルアップとして、学芸員、教員、自然観察指導員のリカレント教育として、現在まで利用されてきています。パラタクソノミスト事業は、生物学から始まりましたが、2 番目の目的を掲げることで、現在は鉱床学、岩石・鉱物学、考古学、古生物学など、標本を取り扱う学問分野へも広がり始めました。2008 年からは、北海道大学教育 GP「博物館を舞台とした体験型全人教育の推進」の助成を得て、養成講座を行っています。

パラタクソノミスト養成講座には、(1)「もの」である標本を作成し、観察し、じかに触れる体験型教育、(2) 幼児から高齢者まで、幅広い年齢対象をもつ生涯教育としての位置づけ、(3) ヴァーチャル時代の情報源の再確認 (情報は「もの」である実物から取り出されます)、(4)「理科離れ」からの脱却の手がかり、という特徴があります。このように、パラタクソノミスト事業をとおして、「もの」を見る目を養ない、より豊かな知性、感性が得られるような養成講座を企画できればと願っています。

このガイドブックシリーズは、北海道大学総合博物館を中心として行われてきた「パラタクソノミスト養成講座」の内容をまとめたものです。ガイドブックを使って、独自にパラタクソノミスト養成講座が開催できるように作られています。多くの博物館や大学が、そして関心を持つ分類学者や学芸員、社会教育主事、学校教員の方々が、それぞれの地域で普及事業として「パラタクソノミスト養成講座」を開催していただくことになれば、このうえない喜びです。

北海道大学総合博物館
大原 昌宏

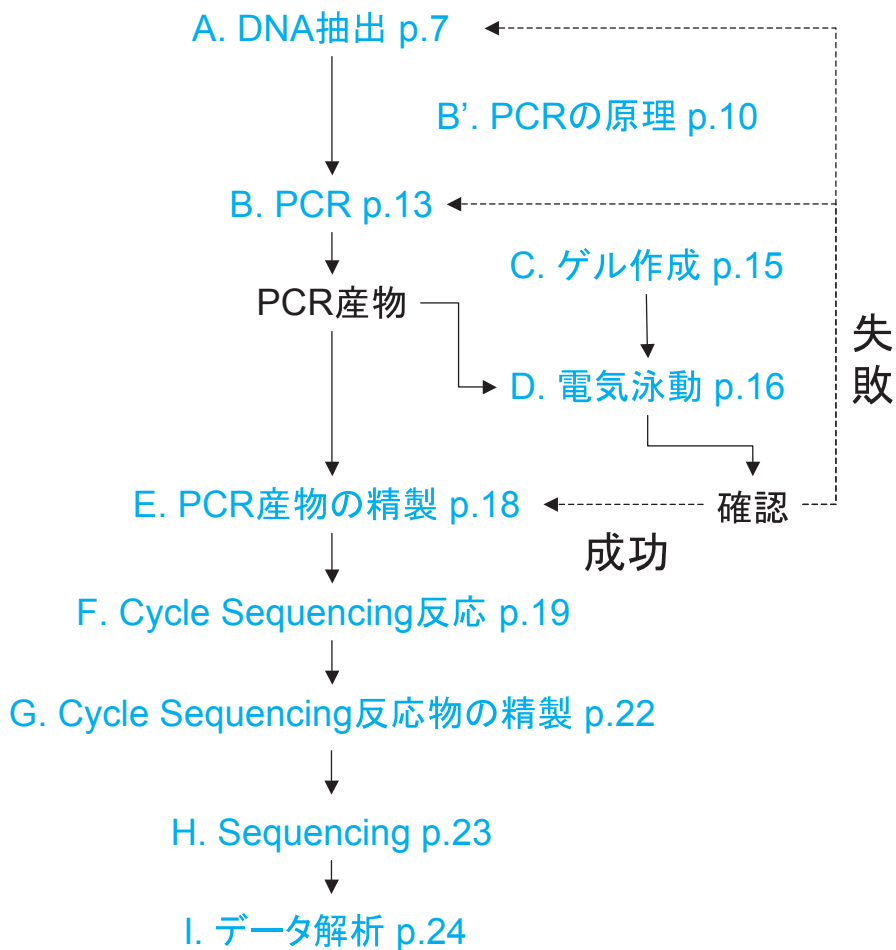
我々人間は、おおよそ 60 兆個の細胞からできています。その中の細胞一つ一つには約 32 億もの DNA の塩基対が入っています。この DNA が遺伝子の本体であり、我々の体の設計図です。これほど“膨大”で“身近?” なのではあるはずの DNA ですが、普段はお目に掛かることも無く、多くの人々にとってはあまり馴染みのない存在かもしれません。この DNA を身近な存在にするきっかけの一つが、1980 年代にキャリー・マリスによって開発されたポリメラーゼ・チェーン・リアクション (PCR) という技術です。この PCR 法は、彼がガールフレンドとドライブをしている最中に思いついたアイディアだそうです。このちょっとした思いつきが、その後の生物学を大きく変えました。PCR 法は、短時間に目的の DNA を大量に増幅する技術です。彼は 1993 年にノーベル化学賞を受賞しましたが、今では生物・医学に関連する様々な分野で用いられるようになりました。最近では、医療現場での遺伝子診断や犯罪捜査などにも DNA の知識・技術が応用されており、まさに“他人事”では無くなってきました。一見関係が希薄に思える生物多様性分野の研究においても、生物の同定や系統推定を行う際に DNA の情報を用いる場合も多くあり、今後のパラタクソノミストにも必要な知識となってくるでしょう。

このガイドブックは、昆虫を材料に、DNA の抽出から塩基配列の決定までの作業を行うための小冊子です。DNA 実験に必要なサンプルの保存、機器の使い方や系統推定のソフトウェアなども紹介します。本書は、原理から実際の作業までの全体を理解することを目的としており、これを機会に多くの人が DNA を身近に感じ、利用してくれることを願っています。

北海道大学総合博物館

小林憲生
館 卓司

作業の流れ





実験をはじめる前に

DNA の実験をはじめる前に、実験作業中の注意、実験に用いる機器、道具、薬品などを解説します。

●実験に必要な心構え、注意点

実験には、取扱に注意を必要とする機器や試薬などがあります。また、不用意な操作によってコンタミネーション(実験汚染: 目的以外の DNA が混入すること)を引き起こし、結果に影響を与える場合もあります。細心の注意を払って実験しましょう。

●実験に必要な機器、器具、試薬

実験には、様々な機器、器具、試薬が必要です。以下にそれぞれの名称と使い方を記します。

シークエンサー：塩基配列を決定する機械

サーマルサイクラー：PCR や Cycle sequencing を行う機械

遠心分離機：遠心力を掛けることによって、サンプルの成分を分離・分画する機械

攪拌機：サンプルを混ぜる機械

電気泳動槽：DNA の分子量を測定するために用いる機械

トランスイルミネーター：紫外線をあてて、DNA の増幅等を確認するための機械

遠心乾燥機：減圧し、水分を除去するために用いる機械

ゲル作成器：電気泳動用のゲルを作るための道具

マイクロピペッター：少量の液体を測り取る道具

ホモゲナイズ棒：サンプルを磨り潰すための棒

パソコン：データ処理に用いる

ピンセット：サンプルを扱うときに用いる

チューブ：DNA 抽出や PCR など様々なところで用いる

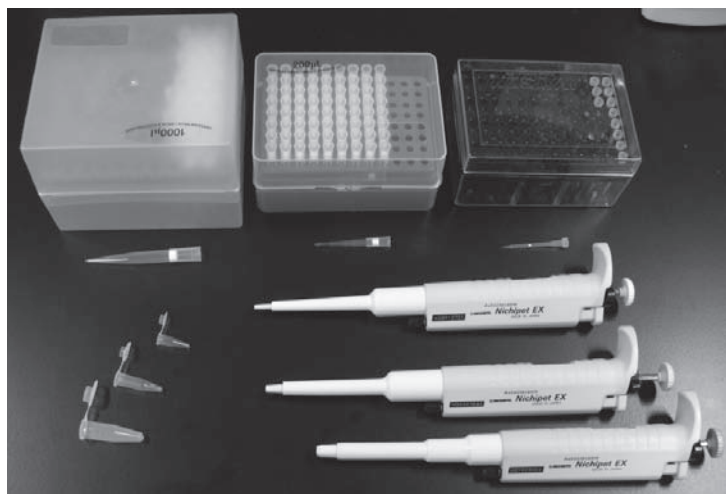
チップ：マイクロピペッターの先端部分、ピペッターの種類によって使い分ける

手袋：コンタミネーションを防止するために用いる

各種試薬：DNA 抽出や PCR など様々なところで用いる(詳細は別紙参照)

系統樹作成用ソフトウェア：様々なソフトが存在する(詳細は別紙参照)

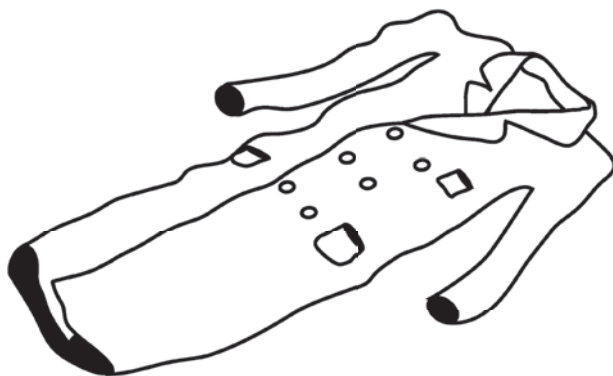
チップ(上)、チューブ(下左)、
ピペット(下右)



左から、手袋、ホモゲナイズ棒、
ピンセット



白衣



A

DNA 抽出

標本から DNA を取り出す作業です。

DNA 抽出に関しては、これまでに様々な方法が知られています。外骨格を残したまま DNA を抽出する方法、市販のキットを用いて精製度が高い DNA を抽出する方法、植物等に含まれる PCR 阻害作用を持つ成分を除去しつつ DNA を抽出する方法などです。

ここでは Boom et al. (1990) の方法を用いて DNA 抽出を行います。DNA が pH7.0 以下でシリカゲルに吸着し、pH8.0 以上でシリカゲルから離れる性質を利用して、DNA を精製する方法です。この方法の利点として、短時間に抽出が可能であること、比較的安価であることが挙げられます。

作業を行うときは、コンタミネーションを防止するために、使い捨てのゴム手袋を着用して実験しましょう。

● DNA 抽出に使う試薬

Binding Buffer (pH7.0)¹⁾

シリカゲル混合液²⁾

Wash Buffer (pH7.5)³⁾

TE (pH8.0)⁴⁾

Distilled Water 蒸留水 (D.W.)

● 標本

キイロショウジョウバエ

Drosophila melanogaster

クロショウジョウバエ

D. virilis



卓上遠心分離器

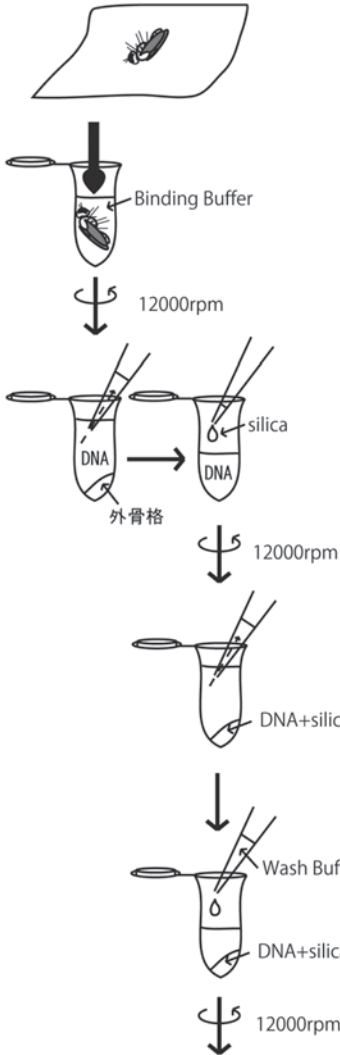


攪拌器

1) などの肩文字のついた薬品は、組成と作成方法が p. 26-27 に記されています。

【作業】

01. エタノール固定標本を濾紙などの上に置き、エタノールを蒸発させます。



02. 500 μ l 用チューブに 100 μ l の Binding Buffer と標本を入れ (体が大きいときは、脚一本や、胸の筋肉部分などでも可)、ホモゲネイズ棒で標本をすり潰します。
03. 12000 回転で 2 分間遠心します。
04. 上清を別のチューブに移し替え、シリカゲル混合液を 5 μ l を加え、よく撹拌します。
05. 12000 回転で 2 分間遠心します。
06. 上清をピペットで捨てます。
- *沈殿が汚い場合は、再度 Binding Buffer を加え、撹拌・遠心してください。
07. Wash Buffer 200 μ l を加え、よく撹拌します。
08. 12000 回転で 30 秒間遠心します。

09. 上清をピペットで捨てます。
10. 07-09 の作業を再度行ないます。

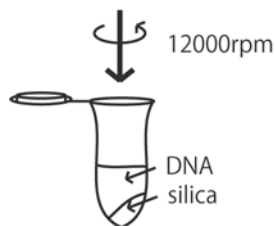
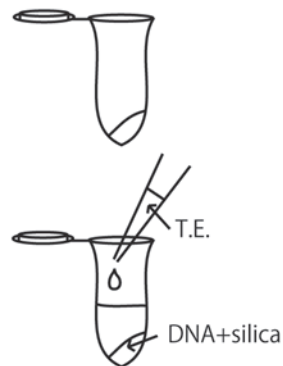
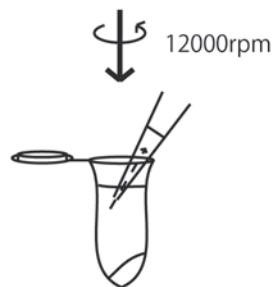
11. キャップを開けたままにして (5-10 分程度)、シリカゲルを乾燥させます。

*乾燥しすぎないように注意してください。シリカゲルが白くなったら OK です。

12. TE 30 μ l (D.W. でも可) を加え、よく攪拌します。

13. 12000 回転で 30 秒間遠心します。

14. 上清を新しいチューブに移します。長期間保存するときは、冷凍庫 (- 20℃以下) で保存しましょう。



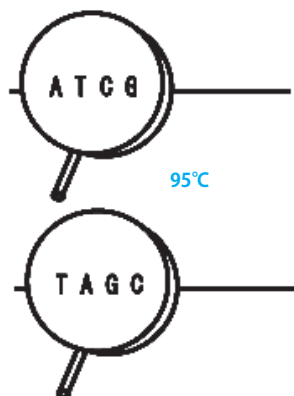
Polymerase Chain Reaction (PCR) の原理

短時間に目的の DNA を増幅させる原理を紹介します。

【特徴 1】 DNA は相補的なペアを形成しています。



【特徴 2】ところが、高温になるとこのペアが離れます。



【特徴 3】そして今度は下がると、同じペア同士、元に戻ろうとします。



【原理】

PCR は、DNA 合成酵素 *Taq* polymerase^{注1)}、Primer 2 種類^{注2)}、そして dNTP^{注3)} を用いて、短時間に DNA を増幅させる方法です。PCR は、以下の 3 つの特徴をもちます。

特徴 1. DNA は通常相補的な塩基が対になった 2 本鎖 (A-T、C-G がペア) を形成しています。

特徴 2. 95°C 前後の高温条件下では 1 本鎖に解離します (denature)。

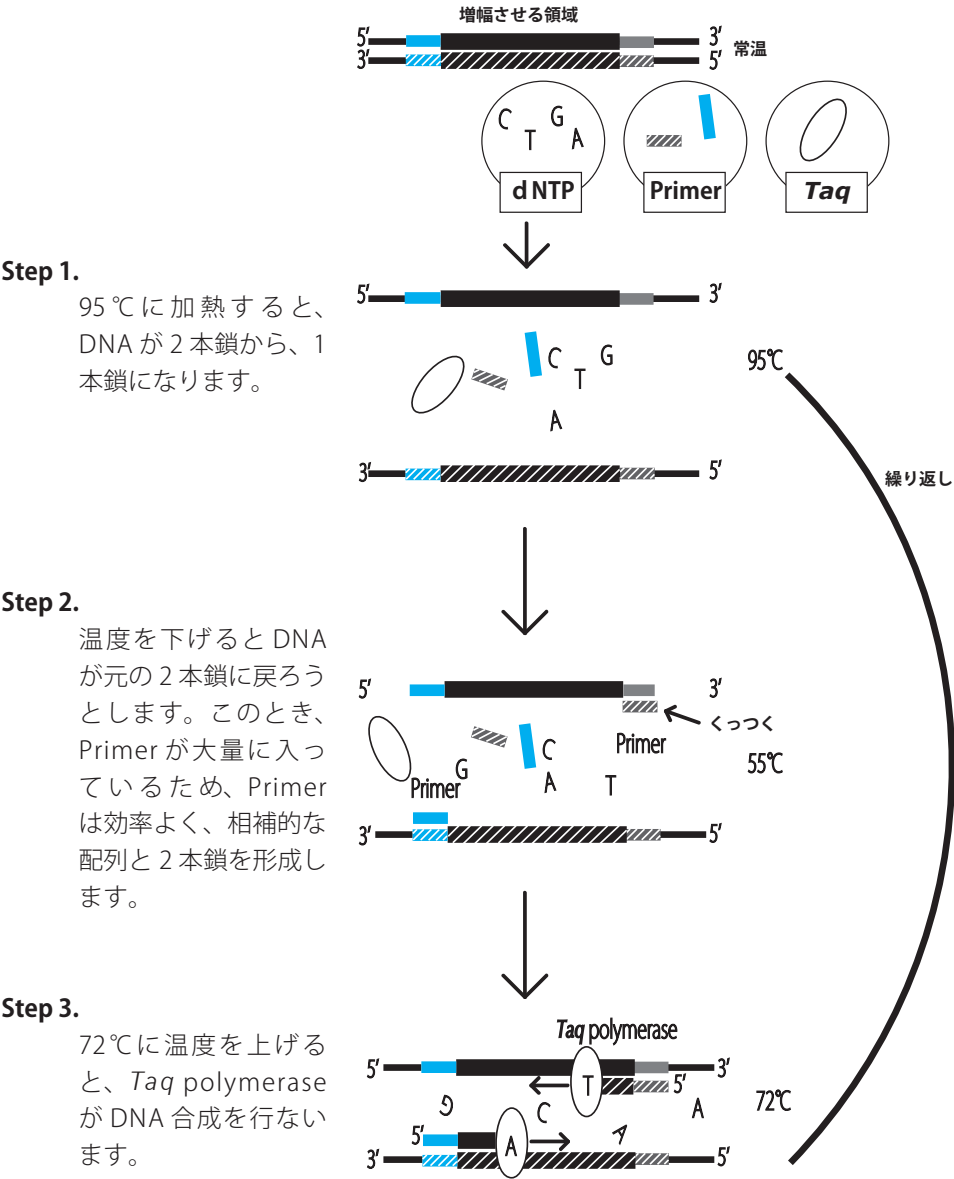
特徴 3. 温度が下がると、また元のペア同士の 2 本鎖に戻ろうとします (annealing)。

注 1) 海底の噴出口など高温条件下で棲息する高熱細菌の DNA 合成酵素を人工的に合成・抽出したもので、95°C の高温でも 30 分程度は失活しません。また、60–75°C で 5' 末端側から 3' 末端側への DNA の合成 (extension) を行います。

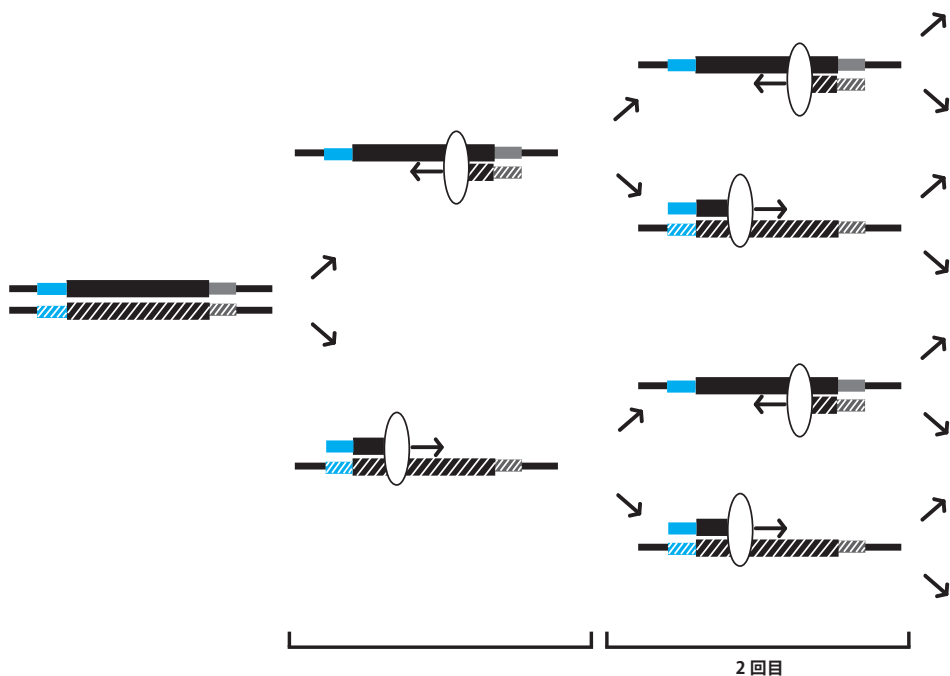
注 2) 増幅させる DNA 領域の両端の配列と同じ配列であり、予め合成した 20–25 塩基程度の 1 本鎖の DNA 配列です。

注 3) 合成される A, T, G, C の塩基の混合物です。

合成の仕組み



前ページの Step 1-3 を繰り返します。このサイクルを n 回繰り返す事によって、DNA が 2^n 倍に増幅されます。



PCR 産物が指数関数的に増えていく様子

B

PCR

DNA 増幅を行うための試薬の調整、サーマルサイクラーのプログラムの設定について紹介します。

1. PCR

PCR 反応を行うためには、市販の薬品等を用いた試薬調整が必要になります。コンタミネーションを防ぐために、試薬を混合する順番にも注意が必要です。

※ここで用いる 2 種類の Primer (Folmer et al., 1994) は、ミトコンドリア DNA チトクローム C オキシダーゼサブユニット I 遺伝子の一部の領域 (約 650 base pair: bp) の増幅を行うためのもので、多くの昆虫に対して適用可能で、DNA バーコーディング等で世界的に広く用いられています。

【作業】

01. 以下に 4+α サンプル分のやり方を示します。下記の液体 a-e を順番に 500 μ l チューブに入れ、撹拌します。

- a. D.W. 79 μ l
- b. 10 $\times$ PCR Buffer 10 μ l
- c. dNTP mixture 8 μ l
- d. Primer LCO1490 (10pmol/ μ l) 1 μ l
- e. Primer HCO2198 (10pmol/ μ l) 1 μ l

02. Taq polymerase 0.5 μ l を加え、軽く撹拌します。

03. 4 つの 200 μ l 用チューブ (A-D) に各 19 μ l 入れます。



チューブをセットするところ



プログラムがスタートしたところ

04. チューブ A 及び B には、抽出した DNA を各 $1\mu\text{l}$ 入れます。チューブ C には、positive control として、増幅する事が事前に明らかとなっている DNA $1\mu\text{l}$ を入れます。チューブ D には、negative control として D.W. $1\mu\text{l}$ を入れます。
05. 卓上遠心機等でサンプルをチューブの下の部分に集めます。
06. サーマルサイクラーにセットします。

2. サーマルサイクラー

【サーマルサイクラーのプログラム】

01. 95°C 30sec.
02. 95°C 30sec., 55°C 30sec., 72°C 45sec. を 30 cycle
03. 72°C 7min..
04. 4°C で保存

※ annealing の温度を下げると、非特異的に primer が結合します。従って増幅が困難である場合、温度を下げることにより結果が改善される場合があります。一方で、目的としていない DNA が増えやすくなるため、注意が必要です。

※ extension の時間設定は、目的とする領域の長さによって異なります。一般的に *Taq* polymerase は 1 分間で約 1000 bp 合成が可能です。今回の primer では 600-700 bp 程度の DNA を増幅する事を目的としているため、上記の時間設定になっています。

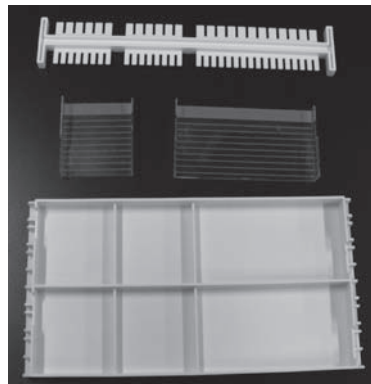
C

ゲル作成

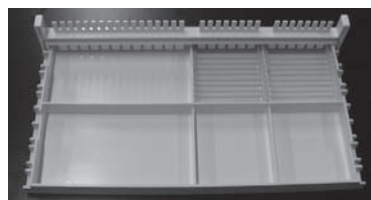
「D. 電気泳動」を行うために、ゲル (Gel) を作成します。

【作業】

01. 耐熱性のガラス瓶に、0.35g のアガロースの粉末と、50ml の TAE Buffer⁵⁾ を入れます。
02. 電子レンジで加熱・溶解させた後、水洗して 60℃程度まで冷します。
03. 冷えたゲルをゲル作成器に流し込みます (今回の場合、0.7%の濃度の小さいゲルが 2 枚できます)。
04. サンプルを流し込むための櫛を差し込み、固まるまで待ちます (約 30 分)。



ゲルメーカー式



ゲルを流し込んだところ

D

電気泳動

電気泳動は、分子篩効果を利用し、分子量の異なる DNA を分離・識別する方法です。

【原理】

電気泳動は分子篩効果によって、DNA の分子量に応じて移動距離が異なる性質を利用し、特定の DNA の分子量を測定する手段です。分子量が小さければ小さいほど移動距離が大きくなります。Loading Buffer[®] に含まれている SYBR[®] green (染色液) が 2 本鎖の間に入り込み、紫外線条件下で発色することにより、DNA 増幅の有無を調べると共に、Size Marker (ここでは λ Styl digest を用いています) との比較により、分子量を推定します。



電気泳動セット



ーから + (←の方向にサンプルが泳動される)

【作業】

01. Loading Buffer $2\mu\text{l}$ をパラフィルム上に置きます (今回は 6 個)。
02. ゲルを電気泳動層に入れ (サンプル溝がある方が陰極)、ゲルが浸る高さまで TAE Buffer を入れます。

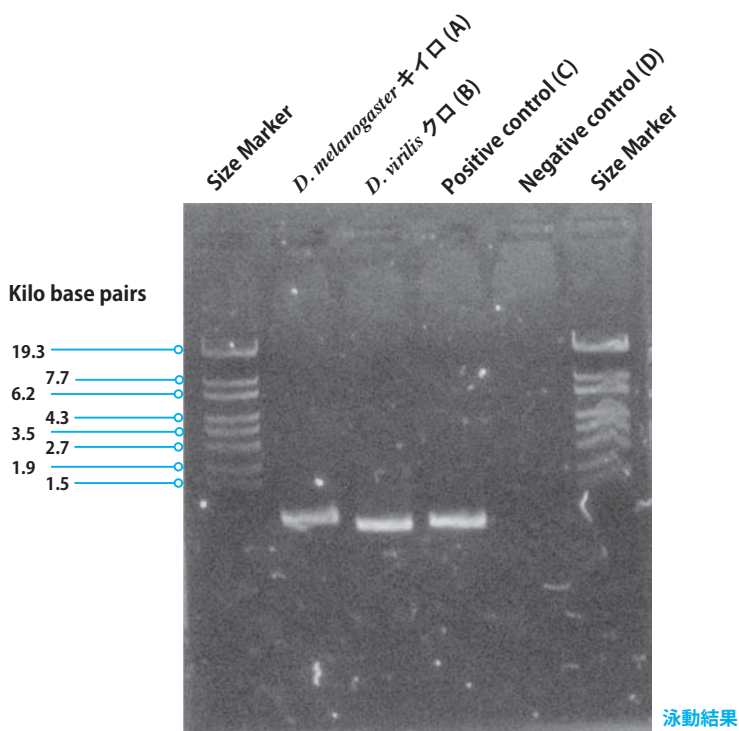


03. PCR 反応が終了したサンプル $5\mu\text{l}$ と Size Marker (分子量を測定する基準試料) $5\mu\text{l}$ をパラフィルムの上に置き、Loading Buffer と混合させます。

04. 混合液をサンプル溝に入れ、100V で約 30 分間、電気泳動を行ないます。

※泳動時間は、目的とする DNA の長さによって異なります。今回は、Loading Buffer の Bromo Phenol Blue が全体の 2/3 程度まで移動したら終了です。

05. トランスイルミネーターを用いて紫外線下で DNA の増幅を確認します。



PCR 産物の精製

得られた PCR 産物を精製し、その次の操作に用いるための作業です。

この PCR 産物の精製は、次の「F. Cycle sequencing 反応」を行う上で、Primer 等の好ましくない成分を排除するために行います。基本的に「A. DNA 抽出」と同じ原理・同じ作業です。

【作業】

01. PCR 産物が入ったチューブに、100 μ l の Binding Buffer とシリカゲル混合液 5 μ l を加えます。
02. 良く攪拌し、12000 回転で 2 分間遠心します。
03. 上清をピペットで捨てます。
04. Wash Buffer 200 μ l を加え、よく攪拌し、12000 回転で 30 秒間遠心します。
05. 上清をピペットで捨てます。
06. 作業 04-05 を再度行います。
07. シリカゲルを乾燥させます。
08. D.W. 20 μ l を加え良く攪拌し、12000 回転で 30 秒間遠心します。
09. 上清を新しいチューブに移します。長期間保存するときは、冷凍庫（－20℃以下）で保存しましょう。

F

Cycle sequencing 反応

様々な長さの一本鎖 DNA を作成する作業です。

【原理】

この Cycle sequencing 反応は、PCR 産物を鋳型にして、「色々な長さ」の一本鎖の PCR 産物の断片を作成する行程です。前述の PCR と異なる点は、Primer を 1 種類しか用いないこと、dNTP(通常の PCR と同様に合成反応が継続する)の他に、ddNTP(合成反応が停止する)も同時に用いること、ddNTP には蛍光色素が付加されていること等が挙げられます。

Step 1.

95℃に加熱すると、DNA が 2 本鎖から、1 本鎖に離れます(このステップは通常の PCR と同じです)。

Step 2.

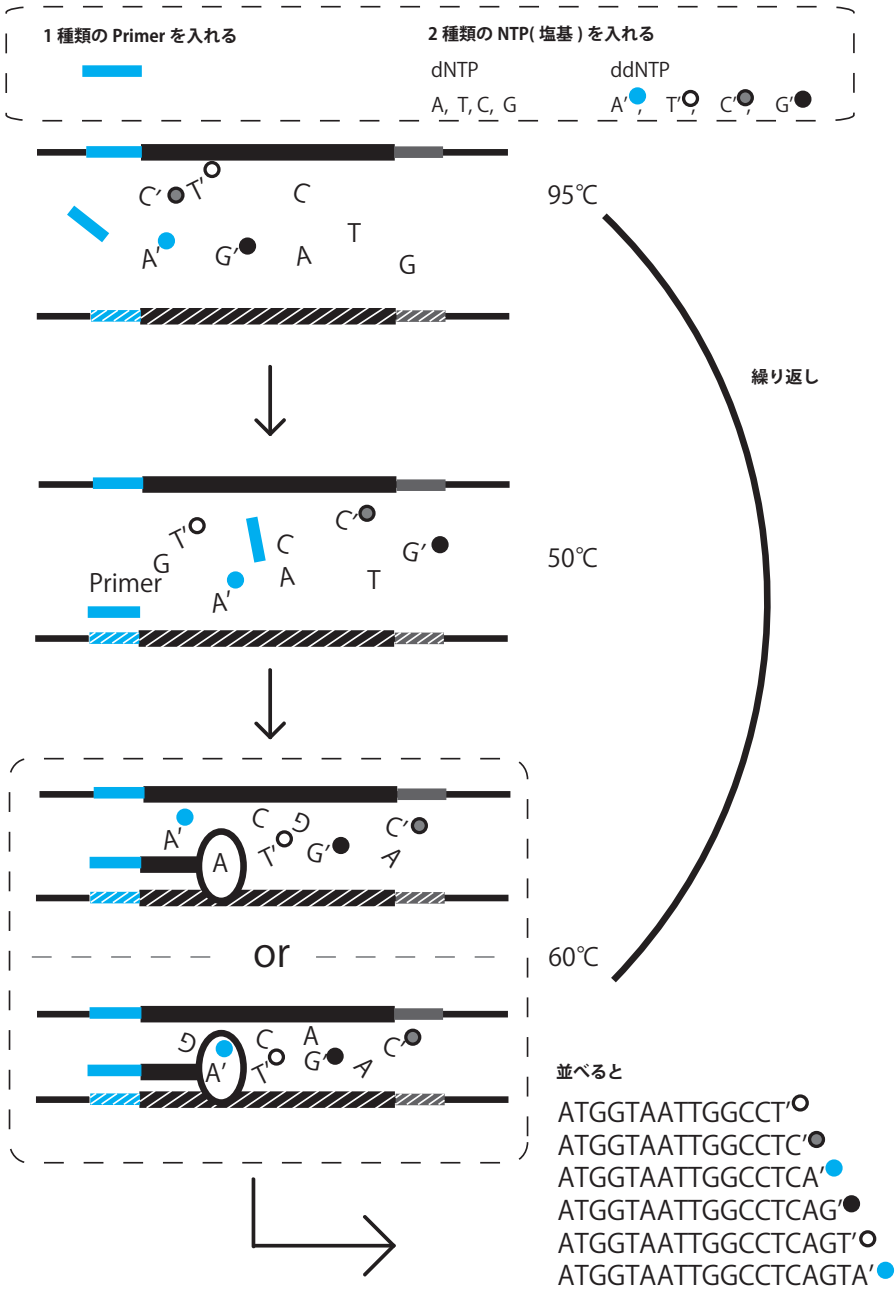
50℃程度にすると DNA が元の 2 本鎖に戻ろうとします。このとき、Primer が大量に入っているため、Primer は効率よく、相補的な配列と 2 本鎖を形成します(このステップも通常の PCR と同じです)。

Step 3.

60℃に温度を上げると、*Taq* polymerase が DNA 合成を行ないます(温度は異なりますが、ここも通常の PCR と同じ原理です)。ここで、*Taq* polymerase が dNTP を取り込んだ場合、合成が継続し、次の塩基が取り込まれます。一方、*Taq* polymerase が ddNTP を取り込んだ場合、合成反応がそこで停止します。

上記の Step 1-3 を繰り返します。どちらを取り込むかは「運次第」なので、大量に PCR 産物があれば、様々な所で合成が停止した産物が出来上がるハズです。

サイクルシーケンシング反応： 通常の PCR との違い



【作業】

01. ここでは Applied BioSystems 社の反応液 Cycle Sequencing Kit, Big Dyeterminator ver. 3.1 を用いた作業を紹介します。
下記の液体を順番に 200 μ l チューブに入れます。

- a. D.W. 4 μ l
- b. Cycle sequencing 反応用 Pre-Mix ^{注 4)} 8 μ l
- c. Primer LCO1490 (0.8 μ mol/ μ l) 4 μ l
- d. 精製後の DNA ^{注 5)} 4 μ l

02. 卓上遠心機で液体をチューブの下に集めます。
03. サーマルサイクラーにセットし、プログラムをスタートさせます。

注 4) Pre-Mix には *Taq* polymerase, Buffer, dNTP, ddNTP が含まれています。

注 5) 一般的に必要なとされる DNA 量は 100ng 程度です。今回の場合は、DNA 量を計測していないため、反応に十分な DNA 量として 4 μ l としています。

※上記の分量はメーカー推奨の量になります。実際に行う場合は、サンプルに適した濃度で行ってください (1/5 以下でも多くの場合問題ありません。メーカー推奨の希釈液があります)。

【サーマルサイクラーのプログラム】

- 01. 96°C 30sec.
- 02. 50°C 15sec.
- 03. 60°C 4min.
- 04. 01-03 を 25 cycle
- 05. 4°Cで保存

Cycle sequencing 反応物の精製

Cycle sequencing 反応で得られた産物を精製する作業です。

この Cycle sequencing 反応物の精製は、高分子コロイドである DNA をエタノールと塩で凝集させて沈殿を得る方法で、一般的にエタノール沈殿と呼ばれています。

【作業】

01. 反応物に $3\mu\text{l}$ の 3M Na Acetate と 75% エタノール $100\mu\text{l}$ を入れて攪拌し、15 分間室温で放置します。
02. 12000 回転で 12–15 分間遠心し 上清をピペットで捨てます。
03. 再度 75% エタノール $100\mu\text{l}$ を入れて軽く攪拌し、12000 回転で 3 分間遠心後、上清を同様に捨てます。
04. 素早く乾燥させるために、遠心乾燥機で遠心します (3–5min)。

※時間に余裕があるときは、冷蔵庫等で蓋をあけて保存すれば、遠心乾燥作業は必要ありません。

H

Sequencing (シーケンシング)

Auto Sequencer を用いて、塩基配列を決定します。

【原理】

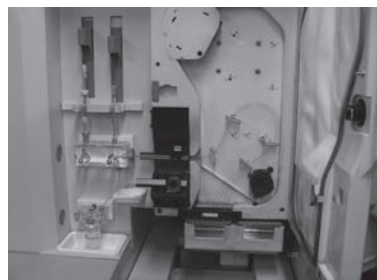
前述「F. Cycle sequencing 反応」によって、様々な長さの一本鎖 DNA が生成されています。この一本鎖 DNA が電気泳動によってキャピラリー内部を移動します。分子量が小さければ小さいほど短時間にキャピラリーを移動します。このキャピラリーの先端近くにはレーザーがあり、レーザーが照射されることによって、ddNTP に付加されている蛍光色素が光ります。その光の種類を機械が読みとることによって、塩基の種類を特定します。



Auto Sequencer

【作業】

01. 乾燥させた試料に脱イオンホルムアミドを $15\mu\text{l}$ 入れ、攪拌します。
02. 溶かした試料を専用プレートに移し、Auto Sequencer にセットします。
03. パソコンにサンプルや用いた試薬等のデータを入力し、Auto Sequencer をスタートさせます。

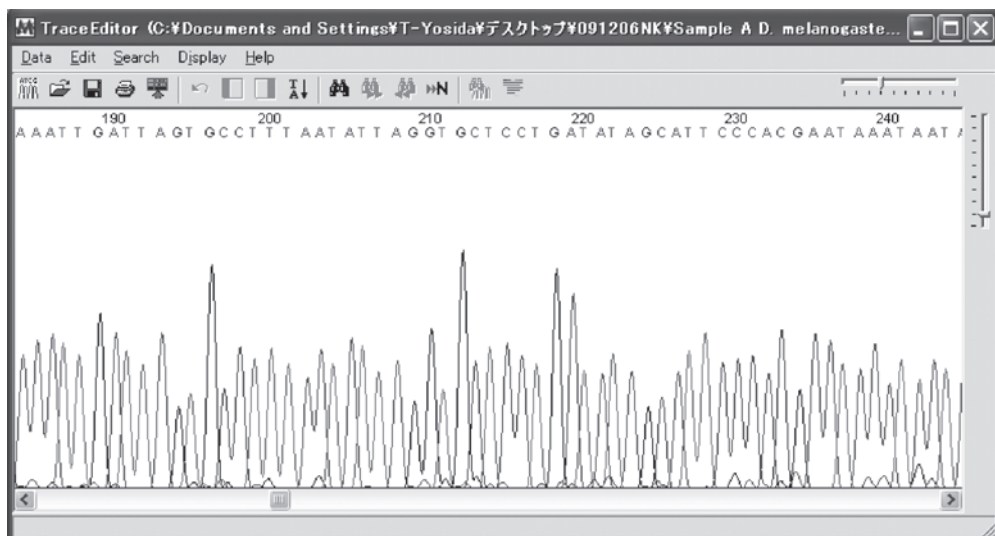


内部

データ解析

得られた塩基配列データを比較し、解析します。

得られた DNA の波形データを比較します。これ以降の作業にはコンピュータを用い、有料・無料の software(ソフトウェア)が必要になります。決定した複数の塩基配列を比較するための多重整列を行う(相同な DNA 領域を揃える)作業は、**CLUSTAL X** (Thompson et al., 1997) や **4peaks** (<http://mekentosj.com/science/4peaks/>) 等の software で行うことが可能です。また、**PAUP***(Swofford, 2002: 有料) や **MEGA 4.0** (Tamura et al., 2007) では、系統樹を作成することが可能です。残念ながら、現在のところ日本語で操作が可能な software は有りません。この他にも様々な software が開発されており、それらは Felsenstein の Homepage (<http://evolution.genetics.washington.edu/>)

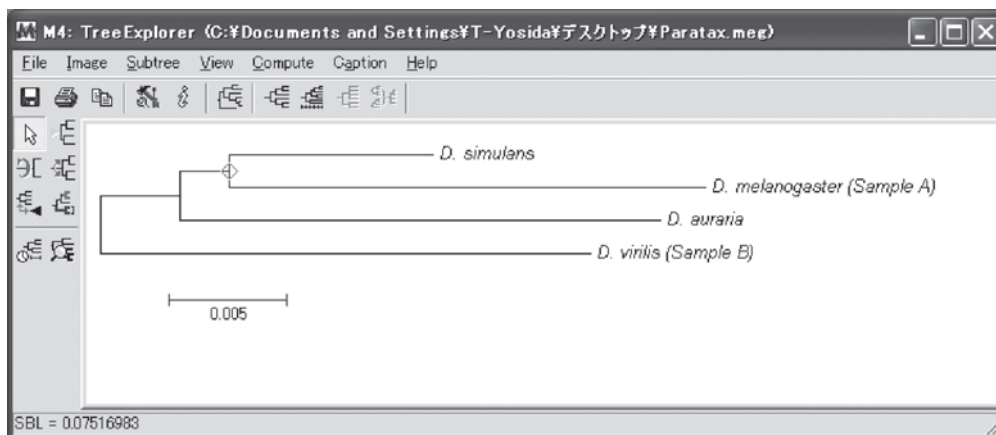


MEGA 上で見る塩基配列データ

phylip/software.html) から検索可能です。

系統樹の作成法には、距離行列法、最節約法、最尤法、及びベイズ法が知られており、それらを紹介した日本語の本も出版されています (長谷川・岸野, 1996; 根井・クマー, 2006)。上記の software の使用方法、及び系統樹作成法の原理及び利点・欠点については、これらの教科書を参考にしてください。

また、自らが決定した塩基配列データに、既に国立遺伝学研究所に登録されているデータ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) をダウンロードして、解析に加えることも可能です。ここでは、配列を決定したキロショウジョウバエとクロショウジョウバエにオナジショウジョウバエ (*D. simulans*) とカオジロショウジョウバエ (*D. auraria*) のミトコンドリア DNA チトクローム C オキシダーゼ サブユニット I 遺伝子のデータをダウンロードして作成した系統樹を示します。



Maximum Composite Likelihood distance model (Tamura et al., 2004) を用いて近隣結合法 (Neighbor-joining method, Saitou & Nei, 1987) で作成した遺伝子系統樹

引用文献

- Boom R, Sol CJA, Salimans MMM, Jansen CL, Wertheim-Van Dillen PME, Van Der Noordaa J (1990) Rapid and simple method for purification of nucleic acids. J. Clin. Micro. 28: 495-503.
- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Mol. Mar. Biol. Biotechnol. 3: 294-299.
- 長谷川政美・岸野洋久 (1996) 分子系統学 岩波書店
- 根井正利・クマー S (2006) 分子進化と分子系統学 培風館
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. 4: 406-425.
- Swofford DL (2002) Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods), version 4.0b. Sunderland (MA): Sinauer Associates.
- Tamura K, Nei M, Kumar S (2004) Prospects for inferring very large phylogenies using the Neighbor-Joining Method. Proc. Nat. Acad. Sci., USA 101: 11030-11035.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol. Biol. Evol. 24: 1596-1599.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucle. Acid. Res. 25: 4876-4882.

本実験で用いている Primer の配列

LCO1490 5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3'
HCO2198 5'-TAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'

試薬の組成

- 1) Biding Buffer: 5M Guanidine Thiocyanate; 100mM Tris-HCl (pH<7.0). [作成方法] Guanidine Thiocyanate 60g +1M Tris-HCL (pH<7.0) ⁷⁾ 10m^l+D. W. 適量 = 100m^l. *吸熱反応が生じるため、湯煎しながら行なう。
- 2) シリカゲル混合液: Silica beads, diameter 5 μ m : 0.01N HCl = 1 : 1.
- 3) Wash Buffer: 10mM Tris-HCl (pH 7.5); 100mM NaCl: EtOH= 1 : 4. [作成方法] 100mM Tris-HCL (pH7.5) ⁸⁾ 20m^l +1M NaCl ⁹⁾ 20 m^l + D. W. 160 m^l + 99.5% EtOH 800m^l = 1000m^l.

- 4) TE (pH 8.0): 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA. [作成方法] 1M Tris-HCl (pH8.0)⁸⁾ 10mL + 0.5M EDTA (pH8.0) 2mL + D. W. 適量 = 1000mL.
- 5) TAE Buffer: 40mM Tris-HCl (pH 8.0); 40mM Acetic Acid; 1mM EDTA (pH8.0). [作成方法] Tris [hydroxymethyl] aminomethane 4.84g + Acetic Acid 1.142μL + 0.5M EDTA (pH8.0) 2mL + D. W. 適量 = 1000mL.
- 6) Loading Buffer. [作成方法] Bromo Phenol Blue, 0.25mL + Xylene Cyanol, 0.25mL + 500mM EDTA, 0.002mL + sucrose, 0.4g + Sybr Green I, 1μL + D.W. 適量 = 1mL.
- 7) 1M Tris-HCl (pH<7.0). [作成方法] Tris [hydroxymethyl] aminomethane 121.1g + D. W. 800mL + HCl 適量 (pH<7.0) + D. W. 適量 = 1000mL.
- 8) 7) と同様の方法で作成。
- 9) 1M NaCl. [作成方法] NaCl 58.5g + D. W. 適量 = 1000mL.

謝辞

ガイドブックの作成にあたり、以下の方々にお世話になりました。厚くお礼を申し上げます。太田有理、大原昌宏、角井敬知、柁原宏、片倉晴雄、加藤徹、木村正人、甲山哲生、齋藤貴之、高橋英樹、多田泰紘、舘亜古、田中眞理、蛭田眞平、持田誠（敬称略）。また、パラタクソノミスト養成講座運営にあたり、以下の助成金を受けました。

北海道大学教育 GP「博物館を舞台とした体験型全人教育の推進」。

■執筆者

小林憲生（コバヤシ ノリオ）

北海道大学 総合博物館 資料部研究員

舘 卓司（タチ タクジ）

北海道大学 総合博物館 資料部研究員

■編集

大原昌宏（オオハラ マサヒロ）

北海道大学 総合博物館 准教授

■図・写真

小林憲生（コバヤシ ノリオ）

北海道大学 総合博物館 資料部研究員



パラタクソノミスト養成講座・ガイドブックシリーズ 3



パラタクソノミスト養成講座
DNA (初級) 編

著：小林憲生・館 卓司
図・写真：小林憲生

2009 年 12 月 31 日発行

北海道大学 教育 G P
「博物館を舞台とした体験型全人教育の推進」

北海道大学総合博物館、札幌

