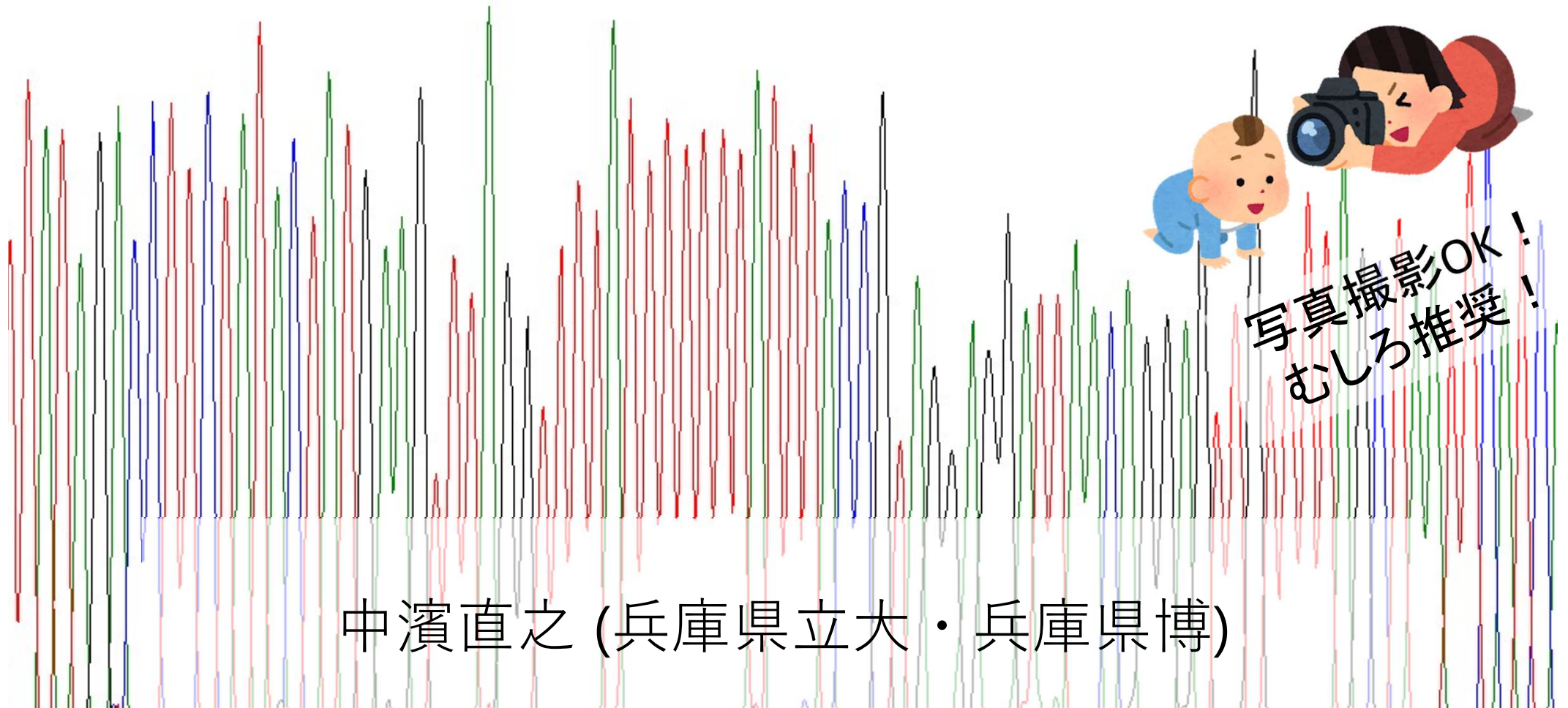


DNAバーコードデータ構築のための手法紹介 ～基礎から最先端まで～ (一部抜粋)



中濱直之 (兵庫県立大・兵庫県博)

手法紹介

- サンガーシーケンシングによる方法
- ハイスループットシーケンサーによる方法

サンプリングと標本作製

1. 採集後、脚1本を切り取ってすぐに無水エタノール（もしくはプロピレングリコール）入りのチューブへ保管（体全体でもよい）
2. チューブは冷凍、冷蔵もしくは常温保存。エタノールの量と比較してサンプル量が多い場合、一旦エタノールを置換しておく
3. 脚以外の体は通常通り標本作製。**写真撮影や証拠標本として必要なので、必ず標本作製すること**
4. 標本は将来的に博物館へ寄贈

サンプリングと標本作製

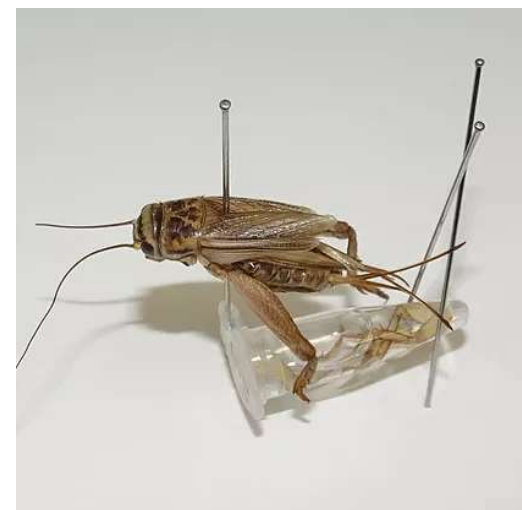
※DNAサンプルと標本を一緒に保管する方法

(Nakahama et al. 2019)

1. 殺虫を確認後、昆虫から筋肉組織（脚部や胸筋など）を切り取る。
2. 切り取った筋肉組織を、99%プロピレングリコールとともに0.2mlチューブに保管する。
3. チューブの蝶番に昆虫針を刺し、昆虫の乾燥標本とともに保管。ドイツ箱で常温保管でよい。



くわしくはこちら



DNA抽出

基本的には、市販の抽出キットに沿ったプロトコルでOK
(中濱は、費用と手軽さからWizard® Genomic DNA Purification Kit - プロメガを使用)



JBOLIに記載された抽出プロトコル

※外骨格を破砕せずに抽出する方法

サンプルを破砕せずに (穴や亀裂をあけておくとよい)
プロテナーゼKの入った抽出バッファーに半日～1日浸し、
バッファーをその後の抽出に使用

サンプルはエタノールで置換した後に乾燥させ、乾燥標本
にボンドで糊付けもしくはゲニタリアチューブに保管

PCR

Folmer (1994)で開発されたプライマーが基本

LCO1490 5' -GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3'

HCO2198 5' -TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'



PCR反応条件や反応液の組成はこちら

ゲル電気泳動で、1本バンドが出ているかどうかを確認

バンドが出ないとき: サイクル数を増やす、アニーリング温度を下げる

バンドが複数出るとき: サイクル数を減らす、アニーリング温度を上げる

どうしてもうまくいかない場合、プライマーの変更が必要かも

シーケンシング

シーケンスエラーを除去するため、フォワード、リバーズ両方から読むのが無難
サンガーシーケンサーを持っているラボではシーケンシングが可能
ない場合はユーロフィンジェノミクス、FASMAC、マクロジェンなどに外注でよい

データの確認

FASTA形式で納品

>Tamamushi

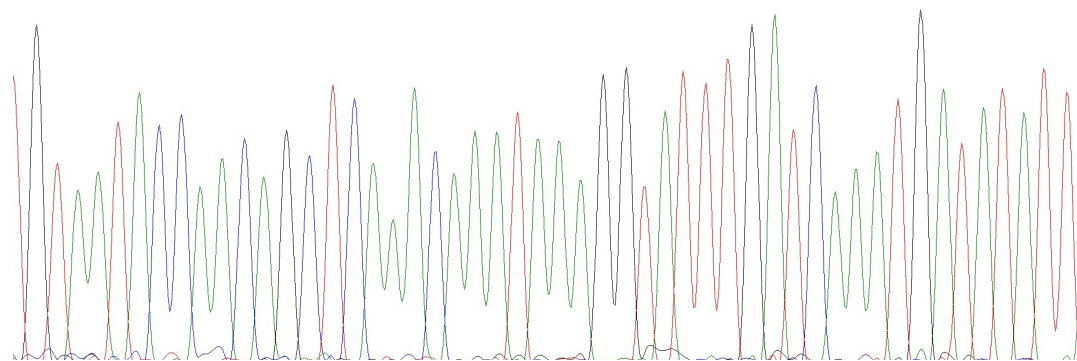
AGTGGGCCGATCGATTTGCC

>Hamushi

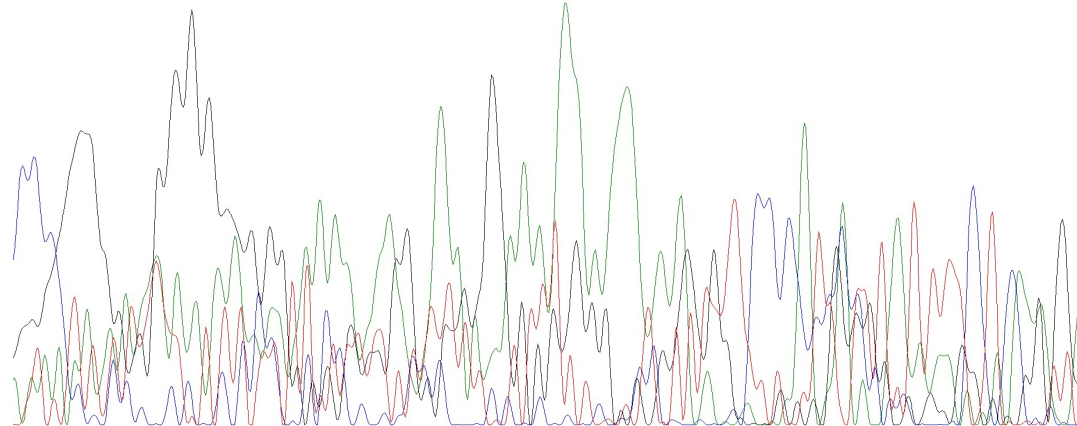
GATCCNCTATGGGCCATATTA

ソフトウェアFinchTVやBioEditで波形を確認可能

良い例



ダメな例



アライメント、データ整備

波形が問題なければ、MEGAなどでフォワードとリバースの結合、アライメントを実施

汚い波形は容赦なく捨てる

BLAST検索による確認 (※開始位置に注意)

MX: Alignment Explorer (IsochibiCompleted38.fas)

Data Edit Search Alignment Web Sequencer Display Help

DNA Sequences Translated Protein Sequences

Species/Abbrv

1. Tm01_F-PRMIX_Len
2. Tm02_F-PRMIX_Len
3. Tm03_F-PRMIX_Len
4. Tm04_F-PRMIX_Len
5. Tm05_F-PRMIX_Len
6. Tm06_F-PRMIX_Len
7. Tm07_F-PRMIX_Len
8. Tm08_F-PRMIX_Len
9. Tm09_F-PRMIX_Len
10. Tm10_F-PRMIX_Len
11. Tm11_F-PRMIX_Len
12. Tm12_F-PRMIX_Len
13. Tm13_F-PRMIX_Len
14. Tm14_F-PRMIX_Len
15. Tm15_F-PRMIX_Len
16. Tm16_F-PRMIX_Len
17. Tm17_F-PRMIX_Len
18. Tm18_F-PRMIX_Len
19. Tm19_F-PRMIX_Len
20. Tm20_F-PRMIX_Len
21. Tm21_F-PRMIX_Len
22. Tm22_F-PRMIX_Len
23. Tm24_F-PRMIX_Len
24. Tm25_F-PRMIX_Len
25. Tm26_F-PRMIX_Len
26. Tm27_F-PRMIX_Len
27. Tm28_F-PRMIX_Len
28. Tm29_F-PRMIX_Len
29. Tm30_F-PRMIX_Len
30. Tm31_F-PRMIX_Len
31. Tm32_F-PRMIX_Len
32. Tm33_F-PRMIX_Len
33. Tm34_F-PRMIX_Len
34. Tm35_F-PRMIX_Len
35. Tm37_F-PRMIX_Len
36. Tm41_F-PRMIX_Len
37. Tm42_F-PRMIX_Len
38. Tm43_F-PRMIX_Len

Download GenBank Graphics Next

Anax parthenope voucher Odon200 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
Sequence ID: MW490451.1 Length: 658 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 658 GenBank Graphics Next Match Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1216 bits(658)	0.0	658/658(100%)	0/658(0%)	Plus/Plus
Query 1	AAACACTTATTTTTATTCGGAGCATGATCAGGAATGGTAGGAACCTCTAAGAGTTTT	80		
Sbjct 1	AAACACTTATTTTTATTCGGAGCATGATCAGGAATGGTAGGAACCTCTAAGAGTTTT	80		
Query 61	AATTGGAATGAATTAGGACACCCAGGATCATAATTGGAGATGATCAAAATTTAATGT	120		
Sbjct 61	AATTGGAATGAATTAGGACACCCAGGATCATAATTGGAGATGATCAAAATTTAATGT	120		
Query 121	AATTGTAACAGCTCATGCTTTTGTATAATTTCTTTATAGTAATACCTATTATAATGG	180		
Sbjct 121	AATTGTAACAGCTCATGCTTTTGTATAATTTCTTTATAGTAATACCTATTATAATGG	180		
Query 181	AGGATTTGGAATTTGATTTAGTGCCCAATAATTAGGACACCCGATATAGCTTTCCACG	240		
Sbjct 181	AGGATTTGGAATTTGATTTAGTGCCCAATAATTAGGACACCCGATATAGCTTTCCACG	240		
Query 241	ATTAATAACATAAAGATTTTACTACTACCACTCTCTAACCCCTTTATAGGAGGAAG	300		
Sbjct 241	ATTAATAACATAAAGATTTTACTACTACCACTCTCTAACCCCTTTATAGGAGGAAG	300		
Query 301	TATAGTTGAAAGAGGTGCAGGAACAGGATGAACGTTTATCCTCCTCTGCTGGTCAAT	360		
Sbjct 301	TATAGTTGAAAGAGGTGCAGGAACAGGATGAACGTTTATCCTCCTCTGCTGGTCAAT	360		
Query 361	TGCCCATGCAGGAGCATCTGTAGATTTAACTATTTTTCTCTTCATTGGCTGGAGATC	420		
Sbjct 361	TGCCCATGCAGGAGCATCTGTAGATTTAACTATTTTTCTCTTCATTGGCTGGAGATC	420		
Query 421	TTCAATTCAGGTGCTATTAATTTTACTACAACAATTAATAAAGTCAACAGGAAT	480		
Sbjct 421	TTCAATTCAGGTGCTATTAATTTTACTACAACAATTAATAAAGTCAACAGGAAT	480		
Query 481	AAAGATAGATCAAAATACCCTATTGATGAGCTGTAGTAATACAGCCGACTACTATT	540		
Sbjct 481	AAAGATAGATCAAAATACCCTATTGATGAGCTGTAGTAATACAGCCGACTACTATT	540		
Query 541	ATTAATCTCTCCTGCTCTGCTGGTCAATTAACAATGCTATTAACAGATCGAAATATA	600		
Sbjct 541	ATTAATCTCTCCTGCTCTGCTGGTCAATTAACAATGCTATTAACAGATCGAAATATA	600		
Query 601	TACATGATTTTTGATCCTGCAGGAGGAGGATCCAATTCCTTATCAACACTCTGTT	658		
Sbjct 601	TACATGATTTTTGATCCTGCAGGAGGAGGATCCAATTCCTTATCAACACTCTGTT	658		

データベース登録

波形が問題なければ、MEGAなどでフォワードとリバースの結合、アライメントを実施

汚い波形は容赦なく捨てる

開始位置に注意 (NCBIやBOLDを参考にするのが無難)

DDBJやBOLDへの登録は、以下のQRコードが参考に



DDBJへの登録マニュアル



BOLDへの登録マニュアル

ハイスループットシーケンサー

ハイスループットシーケンサー(次世代シーケンサー)
による手法もどんどん開発されている

(Hausmann et al. 2016; Sonet et al. 2018; Sire et al. 2019)

ハイスループットシーケンサーの概要

全体の流れ

1. サンプリング、標本作製
2. DNA抽出
3. PCR (多くは複数のプライマーを使用)
4. ライブラリー作成、シーケンサーのラン
5. リードの選別、結合から配列決定
6. BOLDやDDBJへのデータ登録

1、2、3の一部、6はサンガーシーケンシングによる方法と同様

ハイスループットシーケンサーの概要

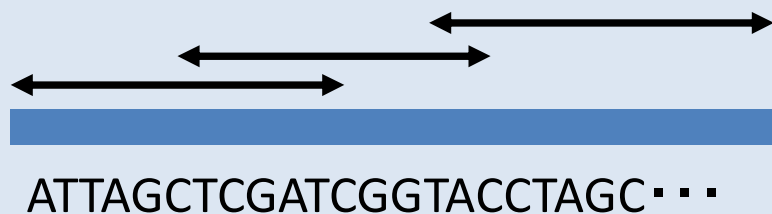
3. 全体をカバーする複数領域を独立にPCR



4. PCR産物にタグ付け、混合してからシーケンサーのラン



5. リードの選別、結合を経て全体の領域の配列決定 (Trimmomatic、Geneiousなど)



MiseqによるDNAバーコード配列決定
(昆虫標本を使用) (Sire et al. 2019)

本手法のメリット

プライマーによっては乾燥標本でも可能

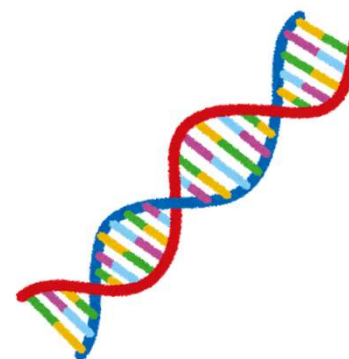
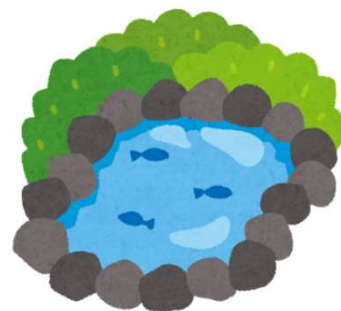
(Hernández-Triana et al. 2014; Mitchell et al. 2015; Hausmann et al. 2016)



60年以上前の標本からできた例も
(Hausmann et al. 2016)

サンガーシーケンシングではほぼ無理

シーケンサー1ランごとの値段は変わらないため、
複数領域を同時に決定してコスト節約が可能
環境DNAでは16SrRNAなども用いるので複数領域を決定
する意義は大きい



今後の検討事項

COIの配列決定には300bp以下のプライマーセットが必要
すでにいくつかプライマーセットが開発されている
ただし特定の分類群でのみ使用できるものが多い

(Mitchell et al. 2015; Elbrecht and Leese 2017)

どこまで汎用性があるのか？（目、科、属による違い）

続きは伊藤先生の講演へ