

研究成果の証明に役立つ研究記録ノート

RESEARCH LAB NOTEBOOK

ノコギリクワガタは 幸屋火砕流 も生き延びたか
～大隅諸島産 ノコギリクワガタの多様性の秘密と亜種分類の妥当性～

ノートNo.

氏 名

国分高校 サイエンス部 昆虫班

所属名

使用期間

年 月 日 ～ 年 月 日

DNAの抽出

参加者:

計4名

小あごヒゲを本分だけ
プロテアーゼ20μlを加
足りなくなるため。

♂5匹, ♀2匹 計7匹

1. コギリワワガタ [徳之島] の小あごヒゲをとり、エッペンドリフチューブに入れる。
(エッペンドリフチューブには エタール 分子生物学用 99.5% を入れておく。)

マイクロピペット

- ほしい量を設定する
- 液体をほしい量だけ押し出す。

○ 押し出すスイッチは
2段階で(3段階も
ある)
強くおすと、ピペット
の下の液体を
押し出せる。

* ピペットを洗う

エッペンドリフチューブのハリに
当たったら、
ピペットはすぐに
捨てる。
ハリに当たっている
かもしれないため。

ちびみ。

→
小数

2. 新しいエッペンドリフチューブに ATL Buffer を入れ、そこに小あごヒゲを1本入れる。
(マイクロピペットで 180μl 加える。)
3. 2のエッペンドリフチューブに マイクロピペットで プロテアーゼ を20μl 加えて入れる。
4. ボルテックス (VORTEX-2 GENIE) に30秒かける
5. インキュベーター (ドライサムユニット) で 55℃ くらいの適度な温度に設定する。一晩かける。
6. 1時間後
1.5ml インキュベーターから サンプルをとり出し、もう1度 ボルテックスにかける。

	1チューブ分	2チューブ (3チューブ分)
D.W. [蒸留水] Distillation Water.	13μl	39μl
10X Buffer	2.0μl	6.0μl
dntp	2.0μl	6.0μl
tag	0.3μl	0.9μl
プライマー (x, y)	0.4μl ずつ	1.2μl ずつ
DNA	2.0μl ずつ	2.0μl ずつ

2チューブ分を、かりに2と
ハリに引っ張りして
足りなくなると、完璧なPCRが
できなくなるため、余分に準備する。
↳ 30サンプル分やるときは、1チューブ余分に
用意。

合計

冷凍されていた場合、
常温で解凍しなければならない。

⇒ 熱を加えて解凍すると変性
してしまうから。

参加者：

計 3 名

1. 2014年7月19日から一晩 インキュベーターにかけたサンプルをとり出し、200 μ lの AL buffer を加えて、10秒間 ボルテックス(vortex-2)した後、70°Cで10分間培養。
2. 210 μ lの99.5% EtOHを加え、30秒間ボルテックスする。
3. spin column (スピナラム) を ^{2mlの} collection tube (コレクションチューブ) に立て、溶液を移す。
(2あごはみは残しておく)
4. 8000rpmで1分間遠心する。(微量用冷却高速遠心機を使用)
5. collection tubeを交換し、spin column に 500 μ lの AW 1 bufferを加え、8000rpmで1分間遠心する。
6. collection tubeを交換し、spin column に 500 μ lの AW 2 bufferを加え、15000rpmで3分間遠心する。
7. spin columnを1.5mlのエッペンドルフチューブに立て、AE bufferを30 μ l加え、8000rpmで1分間遠心し、DNAを溶出する。

8. 試薬の調合 (今回は、29サンプルのため
30サンプル分余用意)

9. それぞれのチューブに1チューブ分の試薬を
加え、サーマルサイクラーでPCR
94°Cで30秒 47°Cで30秒
72°Cで1分 X 35

	1チューブ分	30チューブ分
D.W. (蒸留水)	13 μ l	390 μ l
10x Buffer	2.0 μ l	60 μ l
dNTP	2.0 μ l	60 μ l
rTaq	0.3 μ l	9 μ l
プライマー	0.4 μ lずつ	12 μ lずつ
DNAテンプレート	2.0 μ lずつ	2.0 μ lずつ

forward LCO 1490F GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G
reverse HCO 2198R TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA

続き

10. ゲル作り (50cc 1% の濃度のゲルを作る)

1) アガロース 0.5g,

TAE x50 Buffer 1000 μ l

D.W. (蒸留水) 48ml

三角フラスコで混ぜる

2) ラップで軽くふたをし、電子レンジで1分10秒

3) 電子レンジから取り出し、混ぜてから電子レンジで20秒 (沸騰するまで)

4) 荒熱をとる (3~5分待つ), 荒熱がとれたら、容器に入れ、固める。(15~30分)

電気泳動機 ← 装置 (エレクトロフォリシス)

11. TAE X1 の溶液を入れ、ゲルを入れる。

発がん性あり

12. 6xローディング Buffer 1 μ l と PCR をした DNA 3 μ l を混ぜ、4 μ l にし、ゲルの穴に入れる。

13. 20分間 電気泳動 (100V)

染めやすくするため

14. エチジウムブロマイドに電気泳動をしたゲルを入れ、エチジウムブロマイドの原液を1滴入れる。

電気泳動ゲル撮影機

15. 機械で15分混ぜる。

Mild Mixer

16. DNA が

増幅幅

しているか

確認。

※

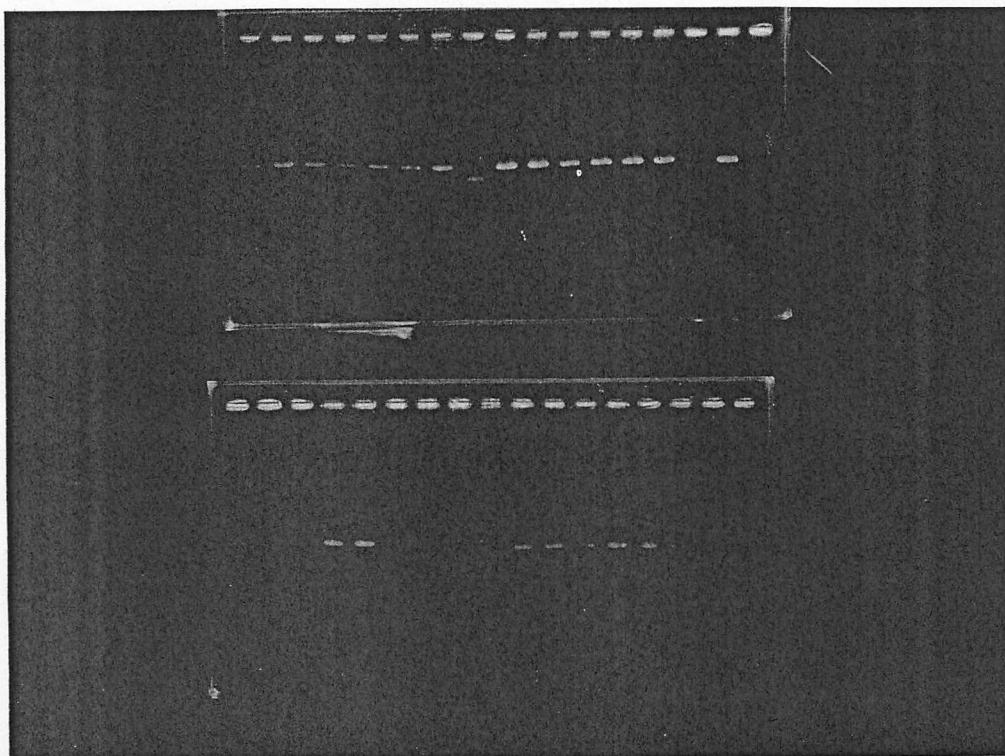
※

電気泳動

ゲル撮影機

で撮影
↑
影

IOKI, TNKI
が確認不可



シーケンス用PCR

参加者:

計4名

1. PCR clean up (DNAをキレイにする作業)

① 必要なDNAを採取するためにゴミを取り除くための溶液をつくる。

<材料>

・NT1 225 μ l
 ・D.W 1575 μ l) 1800 μ l

② 新しいエプンドルフチューブにPCR産物を15 μ l, ①の溶液を285 μ l入れる。それを150 μ lを2回に分けてスピニングに入れる。

(もしも残ったら最後まで吸う)

③ ②を11000 $\times$ gで30秒遠心分離機(微量用冷却高速遠心機)にかける。④ 次にNT3(洗うためのBuffer)を入れ(700 μ l)もう一度11000 $\times$ gの30秒で遠心分離機にかける。この作業を2回行う。⑤ 11000 $\times$ gで1分間遠心分離機で乾かす。(塩基性の溶液を吸ってなくすため。)⑥ 15 μ lのNEを入れ、1分間放置する。(その間にNEがシリカメンブレンからDNAを取ってくれる)その後11000 $\times$ gで1分間遠心分離機にかける。

2. DNAの分子量を測る

① 分光光度計を使い、ナイドロップという方法で行う。(1 μ lのサンプルにおいてDNAの量を調べる)Big Dye Terminator v.1 2 μ l, Buffer② エプンドルフチューブにTaqを4 μ l入れ、冷やしておく。(forward側とreverse側に分けておく)③ 1 μ lあたりDNAが50ng入っているようにするため、それぞれ決まった量のDNAを②のエプンドルフチューブに移す。

A	B	C	D	E	F	G	H
① AM 1 17.82	② AM 3 6.406	③ AM 5 139.6	④ KR 2 121.7	⑤ KR 6 44.06	⑥ KR 4 108.7	⑦ TN 2 97.65	⑧ TN 4 78.20
⑨ TN 6 95.77	⑩ TN 8 161.7	⑪ TK 1 19.26	⑫ TK 3 51.52	⑬ TK 4 27.74	⑭ TK 6 26.80	⑮ AM 2 21.65	⑯ AM 4 93.62
⑰ KR 1 103.5	⑱ KR 3 66.42	⑲ KR 5 89.24	⑳ TN 1 112.5	㉑ TN 3 53.84	㉒ TN 5 80.65	㉓ TN 7 18.69	㉔ TN 9 21.25
㉕ TK 2 57.67	㉖ TK 5 44.23	㉗ TK 7 57.51					

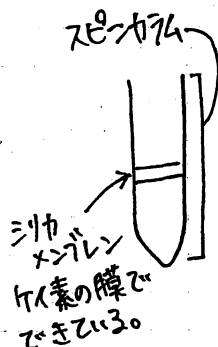
①: 3 μ l ⑩: 1 μ l ⑲: 1 μ l
 ②: 8 μ l ⑪: 3 μ l ㉑: 1 μ l
 ③: 1 μ l ⑫: 1 μ l ㉒: 1 μ l
 ④: 1 μ l ⑬: 2 μ l ㉓: 1 μ l
 ⑤: 1 μ l ⑭: 2 μ l ㉔: 3 μ l
 ⑥: 1 μ l ⑮: 2 μ l ㉕: 2 μ l
 ⑦: 1 μ l ⑯: 1 μ l ㉖: 1 μ l
 ⑧: 1 μ l ㉗: 1 μ l ㉘: 1 μ l
 ⑨: 1 μ l ㉙: 1 μ l ㉚: 1 μ l

<エプンドルフチューブに入るDNAの量>

<それぞれのDNAの分子量>

④ サーマルサイクラーで(96℃)塩基配列を調べる。
最終

・NT1は、5'のり
 のような役割で、
 必要DNA
 をくっつける。
 D.W: 蒸留水



参加者:

計5名

DNA抽出は、鹿児島大学の坂巻先生に
してもらいました。

1. インキュベーターにかけたサンプルを取り出し、AL buffer を 200 μ l 加えて 10 秒間ボルテックスした後 70℃ で 10 分間培養。

2. 210 μ l の E+OH (99.5% のエタノール) を加えて 30 秒間ボルテックスする。

3. スピノカラムを 2 ml のコレクションチューブに立て、溶液を移す。(ニギムゲは残しておく)

4. 8000rpm で 1 分間遠心分離機にかける。

5. コレクションチューブを交換し、スピノカラムに 500 μ l の AW1 buffer を加えて、8000rpm で 1 分間遠心分離機にかける。

6. コレクションチューブを交換し、スピノカラムに 500 μ l の AW2 buffer を加えて、15000rpm で 3 分間遠心分離機にかける。

7. スピノカラムを 1.5 ml のエプンディルチューブに立て、AE buffer を 30 μ l 加えて、8000rpm で 1 分間遠心分離機にかけ、DNA を溶出する。

8. 試薬の調合 (30 サンプルですが 33 サンプル分作った)
<材料>

D.W. (蒸留水) ・ 1チューブ分 12.9 μ l 33チューブ分 425.7 μ l

10x buffer ・ 2.0 μ l 66 μ l

rTaq ・ 0.3 μ l 9.9 μ l

プライマー (F&R) ・ 0.4 μ l づ 13.2 μ l づ

DNA テンプレート ・ 2.0 μ l づ

<今回抽出した DNA>
のサンプル名

産地記号	DNA通番号
MR	31
UM	32
YS1	33
YS2	34
YS3	35
YS4	36
YS5	37
SM1	38
FM1	39
FM2	40
FM3	41
FM4	42
FM5	43

産地記号	DNA通番号
SK1	44
SK2	45
SK3	46
YK1	47
YK2	48
YK3	49
YK4	50
YK5	51
KE1	52
KE2	53
KE3	54
KE4	55
KE5	56
TNN1	57
TNN2	58
TNN3	59
TNN4	60

9. これらを調合して試薬をそれぞれのチューブに、1チューブ分の試薬を加えてサマルサイクルで PCR する。
94℃ で 30 秒、47℃ で 30 秒、72℃ で 1 分
これを 35 サイクル

10. ゲル作り (50 cc 1% の濃度のゲル)
<材料>

アガロース 0.5g

TAEx 50 buffer 1000 μ l

D.W 49 μ l

(1) 材料を三角フラスコに入れ混ぜる。

(2) ラップで軽くフタをし電子レンジで 1 分 25 秒 温める。(沸騰するまで。)

(3) 粗熱をとる。(3~5 分待つ) 粗熱 がとれたら型に流し込み固める。(15~30 分)

11. 電気泳動機の中に ~~TAEx~~ 50xTAE 6 ml, D.W 294 μ l の溶液とゲルを入れる。

12. 6xローディング Buffer 1 μ l と PCR 済みの DNA 3 μ l を混ぜ 4 μ l にし、ゲルの穴の中に入れる。

13. 20 分間電気泳動 (100V)

14. イチジウムブロマイドに電気泳動済みのゲルを入れ、イチジウムブロマイドの原液を入れマイルドミキサーで 約 10 分 混ぜる。

シーケンス用PCR

参加者:

計3名

指導: 坂巻先生

TA: さん
さん

1. PCR産物の精製 (DNA通番号31, 32は、PCRによるDNAの増幅が"できなかった"ので、シーケンス用PCRの作業は行わなかった。)

(1) 必要なDNAを採取するために、ゴミを取り除くための溶液をつくる。()

<材料>

・ NT1 175 μ l
・ D.W 1225 μ l) 1400 μ l

300 μ l $\times$ 28個体
= 8400 μ l

(2) 新しいエッペンドルフチューブにPCR産物を15 μ l, (1)の溶液を285 μ l入れる。
それを150 μ lずつ2回に分けてスピニングカラムに入れる。()

(3) (2)を11000 $\times$ gで30秒遠心分離機(微量用冷却高速遠心機)にかける。

(4) 次にNT3(洗うためのBuffer)を入れ、(700 μ l) もう一度11000 $\times$ gの30秒で遠心分離機にかける。()

(5) 11000 $\times$ gで1分間遠心分離機で乾かす。

(6) 15 μ lのNEを入れ、1分間放置する。その後、11000 $\times$ gで1分間遠心分離機にかける。()

2. DNAの分子量を測る

(1) 分光光度計を使い、ナイドロップという方法で行う。(1度に8個のサンプルをスเปクトラム解析でき、解析に用する時間は20秒)()

3. シーケンス用PCR

プライマー

forward LCO 1490F GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G
reverse HCO 2148R TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA

(1) エッペンドルフチューブに Big Dye Terminator v.1 を4 μ l, Buffer を4 μ l, プライマーを3.2 μ l, D.W を入れ、冷やしておく。このとき、forward と reverse で分け、各28個体ずつ作る。()

(D.Wは(2)の作業時に、1 μ l DNAを移したら7.8 μ l, 2 μ l DNAを移したら6.8 μ l 入れる。)

(2) 1 μ l あたりにつき DNAが50ng 入っているようにするため、それぞれ決まった量のDNAを(1)のエッペンドルフチューブに移す。()

<それぞれのDNAの分子量>

	1	2	3	4
A	33 82.44 ⁶⁹	40 154.9	47 201.7	54 241.6
B	37 71.01	44 41.04	48 57.98	58 46.25
C	35 109.8	43 115.7	49 68.75	56 44.07
D	36 28.82	45 152.9	50 94.96	57 27.32
E	37 21.73	46 46.56	51 44.24	58 59.10
F	38 94.82	47 99.96	52 74.99	59 46.33
G	39 49.83	48 27.62	53 125.3	60 84.29

<エッペンドルフチューブに入れるDNAの量>

33 1 μ l	40 1 μ l	47 1 μ l	54 1 μ l
34 1 μ l	41 1 μ l	48 1 μ l	55 1 μ l
35 1 μ l	42 1 μ l	49 1 μ l	56 1 μ l
36 2 μ l	43 1 μ l	50 1 μ l	57 2 μ l
37 2 μ l	44 1 μ l	51 1 μ l	58 1 μ l
38 1 μ l	45 1 μ l	52 1 μ l	59 1 μ l
39 1 μ l	46 2 μ l	53 1 μ l	60 1 μ l

(4) サーマルサイクラーで塩基配列を調べる。

(39, 54)は、2倍に薄めてから1 μ l 入れる。

2014. 8. 29

指導者

DNA 解析

参加者

計3名

先輩

1. 1個体 1個体の DNA のデータを 1つにまとめる

- ①. BioEdit を起動
 - ②. 左上の file を開く
 - ③. 全データを 1回開き、1つのデータにまとめていく。(カットしてペースト)
 - ④. 保存
- ※ file の種類を Fasta にする。

fileの種類

- fas ... 塩基配列
- mas ... アライメント後のデータ
- meg ... 解析用データ
- mts ... 系統樹

保存するときは、
③ 前の後に .fas
と書く!!



使用ソフト

- ・ Bio Edit
- ・ Mega

- Ctrl + X → カット
- Ctrl + C → コピー
- Ctrl + V → ペースト
- Ctrl + Z → 戻る (1回前)

Ctrl + A → 全部選択

Ctrl + Y → 進む

Ctrl + S → セーブ

2. リバースをフォワードにあわせる

- ①. リバースのデータを選択
- ②. シーケンス (shift + ~~Ctrl~~ + r)

4. mas → meg を作る

- ①. mas を開く
- ②. データ data Export Alignment
↑ MEGA Format で保存

3. アライメント

- ①. Mega を開く
- ②. file から Open
- ③. まとめたデータを開く
- ④. Align を選択 (Alignment)
- ⑤. Align By Muscle を選択
- ⑥. Compute してから保存(セーブ)

5. 系統樹

- ①. meg file を開く
- ②. Phylogeny の一番上 Construct
- ③. Test → Bootstrap method

以上の作業を ①、② の 2つのデータで行った。

測定者:

記録者:

DNA解析

指導者

参加者

計3名

1、1個体 1個体のデータを1つにまとめる 鹿児島大学から

~~2014.8.29の作業~~

使用ソフト
・BloEdit

①、2014.8.29のデータと2014.9.1に届いたデータを1つにまとめる。
(①、②のエピ-のfile)

②、BloEditを起動

③、左上のfileを開く

④、全データを1回開き、1つのデータにまとめていく。(カットしてペースト)

⑤、保存 名前を変更

⑥、2014.8.29のデータと2014.9.1のデータにかぶっているデータがあったため、それを削除

⑦、保存

(TK 4本の塩基配列は読み取
られていたが、不備があった。
YS1R, SK3Rの塩基配列が
読み取られなかった。)

データ入力

DNA解析

参加者:

計3名

昨日の続きから。
(手順2から)

2. リバースをフォワードに合わせる。

① リバースのデータを選択

② シーケンス (shift + ctrl + r)

3. アライメント

① Megaを開く。

② file から open。

③ まとめたデータを開く。

④ Alignを選択。

⑤ Align By Muscleを選択。

⑥ Computeしてから保存。

※今回アライメントをしたところ、どこかミスをしていてうまくいかかったため、明日また確認してから、系統樹を作成する。

グラフ作成

参加者:

計4名

- ・ 本工産(南九州)と黒島産の体長、大アゴ長を、
近似的に表す。
(横軸) (縦軸)
- ・ 1つのグラフに2本の近似的な曲線を表し、
2つの産地を比較する。