

CAPS マーカーによるカンキツ 24 品種の果実の DNA
品種識別技術

国立研究開発法人

農業・食品産業技術総合研究機構

CAPS マーカーによるカンキツ 24 品種の果実の DNA 品種識別技術

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構
果樹茶業研究部門、種苗管理センター

1. はじめに

カンキツは、ミカン科ミカン亜科のミカン属(*Citrus*)、キンカン属(*Fortunella*)およびカラタチ属 (*Poncirus*) 等に属する植物の総称である。このうち、常緑果樹として食用に用いられるのはミカン属とキンカン属の一部とされている。日本では、生食、ジュース用として「ウンシュウミカン」(*Citrus unshiu*)や「オレンジ」(*Citrus sinensis*)、香酸カンキツとして、香味や食酢用として「レモン」(*Citrus limon*)や「ユズ」(*Citrus junos*)などが利用されている。

日本でのカンキツの総栽培面積は、60,318.3ha である (図 1、大臣官房統計部生産流通消費統計課「平成 30 年耕地及び作付面積統計」(令和元年 11 月 8 日公開) および農林水産省生産局園芸作物課「平成 30 年産 特産果樹生産動態等調査」(令和 3 年 2 月 26 日公開) から作成)。平成 30 年産の品種およびグループ別栽培面積では、「ウンシュウミカン」が 65.7%、「不知火」が 4.5%、「ユズ」が 3.7%、「イヨ」が 3.5%、「ポンカン」が 2.7%と続いている。特に、「ウンシュウミカン」はその他のカンキツ類より品種数が非常に多く、枝変わり等により幅広い収穫時期や優良な着色系が確立された品種によって構成されている。一方、「ウンシュウミカン」以外のカンキツはそれぞれの種内では品種数は多くないものの、上記農林水産省でデータ収集されている種は在来種や種間交雑等により 148 種類に及んでいる。

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構果樹茶業研究部門(以下、果樹茶部門)が育成した「不知火」は、育成品種としては 40 年ほど前に開発されたものの、平成 30 年度の栽培面積が 2,690.0ha と現在においても多くの生産地で広いシェアを誇る。近年では、糖度が高く、「ウンシュウミカン」と同等の β -クリプトキサンチン含有量を特性とする「あすみ」などの品種が育成され(登録年月日:平成 26 年 9 月 30 日)、農林水産省の補助事業を利用して海外出願もされている。これらの優良な登録品種の国内外での種苗の管理、侵害物品への権利行使のためには、侵害か否かを迅速に判定する技術が必要である。DNA 品種識別は、簡易で迅速に品種識別が可能であり、登録品種の偽装表示、税関による侵害物品の水際取締りなどの利用も考えられる。また、消費者に対する食の安全・安心の確保や国内のカンキツ生産を侵害物品から守るためにも有用である。農研機構はこれまでに制限酵素処理により配列差を検出する Cleaved Amplified Polymorphic Sequence (CAPS)マーカー (Shimada ら、2014¹) を用いて、主要なカ

ンキツ品種・系統を識別する技術を報告している（二宮ら、2015²、Nonaka ら、2017³、Fujii ら、2019⁴）。また、カンキツの品種識別に利用する DNA マーカーの開発を支援するミカンゲノムデータベース（Kawahara ら、2020⁵）を作成し、Web サイト (<https://mikan.dna.affrc.go.jp/>) で公開している。これまでに開発した CAPS マーカーの中から正確な遺伝子型の判定が可能等の条件でマーカーを絞り込み、12 種類の CAPS マーカーによるカンキツ 22 品種の DNA 品種識別技術を開発し、「CAPS マーカーによるカンキツ 22 品種の DNA 品種識別技術マニュアル」⁶として公開している。

近年、「あすみ」などの優良品種の穂木が海外へ不当に流出し、隣国で無断栽培された果実が日本へ逆輸入される懸念が生じている。開発した優良品種の育成者権の権利侵害を未然に防ぐために、海外で無断栽培された優良品種の果実が国内へ逆輸入されることのないよう輸入果実の検査体制を強化する取り組みが必要である。そこで、「CAPS マーカーによるカンキツ 22 品種の DNA 品種識別技術マニュアル」⁶の一部を改訂し、国内で流通するカンキツ 24 品種の果実から抽出した DNA を用いた品種識別技術を作成した。

¹ Shimada, T., H. Fujii, T. Endo, T. Ueda, A. Sugiyama, M. Nakano, M. Kita, T. Yoshioka, T. Shimizu, H. Nesumi, Y. Ikoma, T. Moriguchi and M. Omura (2014) Construction of a citrus framework genetic map anchored by 708 gene-based markers.

Tree Genetics & Genomes 10: 1001-1013. DOI 10.1007/s11295-014-0738-9.

² 二宮 泰造、島田 武彦、遠藤 朋子、野中 圭介、大村 三男、藤井 浩 (2015) CAPS マーカーによるカンキツの品種識別法の開発と親子鑑定. *園学研* 14(2):127-133.

³ Nonaka, K., H. Fujii, M. Kita, T. Shimada, T. Endo, T. Yoshioka and M. Omura. (2017) Identification and parentage analysis of citrus cultivars developed in Japan by CAPS markers. *The Horticulture Journal* 86 (2): 208-221. DOI: <https://doi.org/10.2503/hortj.OKD-026>.

⁴ Fujii, H., T. Narita, H. Oshino, T. Endo, T. Kawakami, H. Goto, T. Yoshioka, M. Omura and T. Shimada (2019) CAPS markers with stability and reproducibility for discriminating major citrus cultivars in Japan. *DNA Polymorphism* 27 :71-79.

⁵ Kawahara, Y., T. Endo, M. Omura, Y. Teramoto, T. Itoh, H. Fujii and T. Shimada (2020) Mikan genome database (MiGD): integrated database of genome annotation, genomic diversity, and CAPS marker information for mandarin molecular breeding. *Breeding Science* 70(2): 200-211. DOI: <https://doi.org/10.1270/jsbbs.19097>.

⁶ 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 (2019) CAPS マーカーによるカンキツ 22 品種の DNA 品種識別技術マニュアル.

https://www.naro.affrc.go.jp/publicity_report/publication/pamphlet/tech-pamph/130601.html.

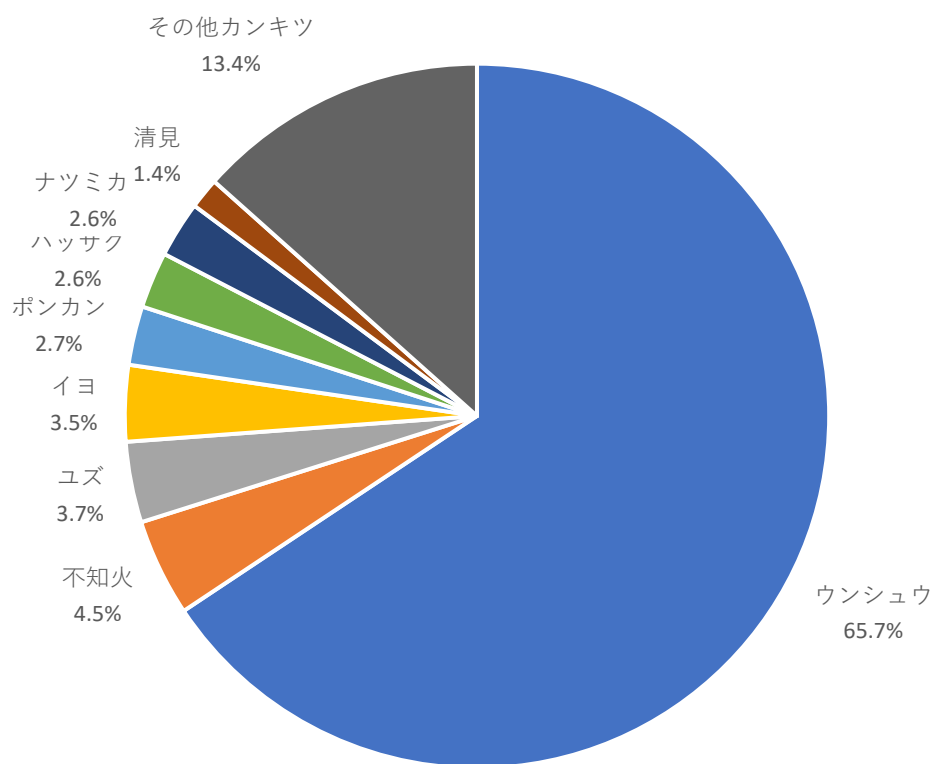


図1 カンキツの品種別栽培面積（平成30年産）
総栽培面積 60,318.3 ha

2. 一般的注意事項及びDNA抽出法について

DNA 品種識別分析における一般的注意事項及び実験、サンプルからの DNA 抽出方法については、＜植物の DNA 品種識別についての基本的留意事項 — 技術開発と利用のガイドライン— (http://www.hinshu2.maff.go.jp/pvr/dna_manual/guideline.pdf)＞及び＜DNA 品種識別技術の妥当性確認のためのガイドライン (http://www.hinshu2.maff.go.jp/pvr/dna_meeting/H20_2nd/guideline.pdf)＞を参照のこと。カンキツの果肉や果皮から抽出した DNA には PCR 反応を阻害する多糖類やポリフェノールなどが混入することから、本マニュアルでは DNeasy® Plant Mini Kit (キアゲン社) を用いて DNA 抽出をおこなっている。本マニュアルでは、サンプルの粉碎に多検体細胞破碎装置シェイクマスターオート (BMS 社) を使用している。他のメーカーのビーズ式多検体粉碎装置を使用する場合、付属の取扱い説明書に従い、サンプルを粉碎する。

＜準備するもの＞

多検体細胞破碎装置シェイクマスターオート (BMS 社)、オート用 2ml アルミブロック (BMS 社)、ステンレスビーズ 6.0mm (BMS 社)、2.0ml マスターハードチューブ (BMS 社)、1.5ml チューブ (滅菌済み)、乳鉢・乳棒 (滅菌済み、180℃で 2 時間乾熱滅菌したもの)、薬さじ (滅菌済み、180℃で 2 時間乾熱滅菌したもの)、液体窒素、QIAshredder Mini Spin Column (キアゲン社)、DNeasy Mini Spin Column (キアゲン社)、コレクションチューブ(2ml) (キアゲン社)、Buffer AP1 (キアゲン社)、Buffer P3 (キアゲン社)、Buffer AW1 (エタノール添加、キアゲン社)、Buffer AW2 (エタノール添加、キアゲン社)、Buffer AE (キアゲン社)、RNase A ストック溶液 (100 mg/ml) (キアゲン社)、滅菌超純水、高速遠心機 1 台 (1.5~2.0ml チューブが利用可能なもの) など。Buffer AP1 の溶液中に析出がみられた場合は使用前に 65℃で保温する。

＜実験操作＞

基本操作は、キアゲン社のプロトコールに従っている。

- (1) 新鮮な果実からフラベド (外果皮、図 2) を切り出し、約 30mg を計量し、2 個の破碎用のステンレスビーズ 6.0mm と共に 2.0ml マスターハードチューブに挿入する。凍結した果実を用いる場合、計量中に解凍しないよう迅速に行う。サンプルを挿入した 2.0ml マスターハードチューブをオート用 2ml アルミブロックに装填し、液体窒素で冷却する。
- (2) 多検体細胞破碎装置シェイクマスターオートに冷却したオート用 2ml アルミブロックを装着し、800rpm で 2 分間、サンプルを粉碎する。(粉碎装置

- が利用できない場合は、計測したサンプルを液体窒素で乳鉢・乳棒などを利用して、サンプルを凍結状態で粉砕し、1.5ml チューブに入れる)
- (3) 2.0ml マスターハードチューブ内のサンプルが粉末状に粉砕していることを確認し、400 μ l の AP1 と 4 μ l の RNase A ストック溶液 (100 mg/ml) を加える。サンプル挿入後に激しくボルテックスする。
 - (4) 混合液を 65°C で 10 分間インキュベートする。インキュベーション中にチューブを 2~3 回転倒混和する。
 - (5) 130 μ l の Buffer P3 を混合液に添加後、混和し、5 分間氷上でインキュベートする。
 - (6) ステンレスビーズ 6.0mm を取り除いた混合液を 1.5ml チューブに移し、20,000 \times g、5 分間、室温で遠心する。
 - (7) 2 ml コレクションチューブ中にセットした QIAshredder Mini Spin Column (薄紫色) に(6)の上澄み液 をピペットで入れ、20,000 \times g、2 分間、室温で遠心する。
 - (8) (7) のろ液画分を新しい 1.5ml チューブに移す。
 - (9) 清澄済み混合液に 1.5 倍容量の Buffer AW1 を添加し、ピペットで混和する。
 - (10) (9)の混合液 (形成した沈殿物を含む) 650 μ l を、2 ml のコレクションチューブに装着した DNeasy Mini Spin Column (透明) にピペットで移す。
 - (11) 6,000 \times g 以上、1 分間、室温で遠心し、ろ液を棄てる。
 - (12) (9) の残った混合液は(10)と(11)を繰り返す。
 - (13) DNeasy Mini Spin Column を新しい 2 ml のコレクションチューブに装着し 500 μ l の Buffer AW2 を添加する。6,000 \times g 以上、1 分間、室温で遠心し、ろ液を棄てる。
 - (14) 500 μ l の Buffer AW2 を DNeasy Mini Spin Column に添加し、20,000 \times g、2 分間、室温で遠心してメンブレンを乾燥させる。
 - (15) DNeasy Mini Spin Column を新しい 1.5 ml チューブに移し、50 μ l の Buffer AE を DNeasy メンブレン上に直接ピペットで添加する。室温 (15 ~ 25°C) で 5 分間インキュベートした後、6,000 \times g 以上、1 分間、室温で遠心し、ろ液を回収する。

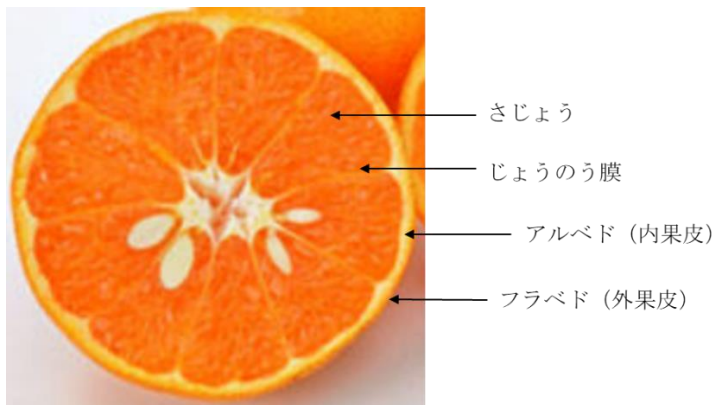


図2 カンキツの果実組織の名称

カンキツ果実は、フラベド、アルベド、じょうのう膜（さじょうを包む膜）、さじょうなどで構成されている。

3. DNA 溶液の品質の確認

1) 分光光度計によるサンプル DNA 溶液の品質の確認

上記2項で得たサンプル DNA 溶液の 260nm 吸光度と 230nm 吸光度を分光光度計で測定し、判定基準（DNA の濃度が 3ng/μl、260nm 吸光度と 230nm 吸光度の比率（A260/230 比）の値が 1.4）以上をクリアしていることを確認する。

<準備するもの>

NanoDrop1000 (サーモフィッシャー社)、滅菌超純水、Buffer AE (キアゲン社)、キムワイプ (日本製紙クレシア社)、サンプル DNA 溶液など。

<基本操作>

- (1) PC の電源を入れ、ND-1000 ソフトウェアを起動する。
- (2) メインメニューが表示されるので“Nucleic Acid”をクリックする。
- (3) “Initialize instrument” のメッセージが表示されるので、アームを開き、測定部をきれいにし、3μl の滅菌水をのせる。
- (4) アームを閉じ、“OK” をクリックする。
- (5) 表示された測定画面の“Sample type”の中から“2 重鎖 DNA...DNA-50”を選択する。
- (6) 測定部の滅菌水をキムワイプで拭き取り、測定部にブランク用の 3μl の Buffer AE (ブランク溶液) をのせる。
- (7) 測定画面の“Blank” をクリックする。
- (8) 測定部のブランク溶液をキムワイプで拭き取り、3μl のサンプル DNA 溶液をのせ、“Measure” をクリックする。

- (9) サンプル DNA 溶液の 260nm 吸光度の値、260nm 吸光度と 230nm 吸光度の比率 (A260/230 比) の値を記録する。
- (10) 測定終了後は、サンプル DNA 溶液をキムワイプで拭き取り、3 μ l の滅菌水をのせてキムワイプで滅菌水を拭き取り、測定部をきれいにする。
- (11) ソフトを終了し、PC をシャットダウンする。
- (12) DNA 濃度が 3ng/ μ l 未満、または、A260/230 比の値が 1.4 未満の場合は、PCR 反応や制限酵素反応を阻害する多糖類やポリフェノールなどの夾雑物の混入が考えられるため、DNA 抽出からやり直す。

4. CAPS マーカーを用いた PCR 反応

果実サンプルで増幅バンドの安定した検出や遺伝子型の判定が容易となるようにプライマー配列を再設計した 14 種類の CAPS マーカーを用い 24 品種について PCR 反応を行う。PCR 反応は、鋳型 DNA、プライマー、滅菌水を加えるだけで PCR 反応液が調整できるオールインワンタイプの GoTaq® DNA Polymerase (プロメガ社) を用いたプロトコールである。改変した CAPS マーカーは、既報の CAPS マーカーが標的とする制限酵素認識部位を含み、PCR の増幅サイズが 400bp 以下となるようにプライマー配列が再設計されている。既報の CAPS マーカーで使用する制限酵素を用いて PCR 増幅断片を消化すると、同じ遺伝子型が検出できる。

<準備するもの>

1.5ml 又は 2.0ml チューブ (滅菌済み)、96 穴 PCR プレート又は 8 連チューブ (サーモフィッシャー社)、キャップまたはフルプレートカバー (サーモフィッシャー社)、サンプル DNA 溶液 (2.5ng/ μ l に調製したもの)、GoTaq® DNA Polymerase (プロメガ社)、1/10TE バッファー、滅菌超純水、CAPS プライマー溶液 (フォワードプライマーとリバースプライマーを各 5pmol/ μ l 含む溶液、1/10TE バッファーで希釈)、PCR システム ProFlex PCR System (サーモフィッシャー社) など。

<用いた CAPS マーカー>

それぞれの CAPS マーカーについて、マーカー名、フォワードプライマーとリバースプライマーの塩基配列、ターゲットサイズ、座乗染色体番号を、表 1 に掲載した。

<本マニュアルで識別可能なカンキツ 24 品種>

「ウンシュウミカン (宮川早生 (みやがわわせ))」、「グレープフルーツ (ダン

カン)、「スイートオレンジ (トロビタ)」、「レモン (リスボン)」、「不知火 (しらぬひ)」、「イヨ (宮内伊予柑 (みやうちいよかん))」、「ナツミカン (川野夏橙 (かわのなつだいだい))」、「ハッサク」、「ポンカン (太田ポンカン (おおたぼんかん))」、「璃の香 (りのか)」、「みはや」、「あすみ」、「あすき」、「麗紅 (れいこう)」、「津之輝 (つのかがやき)」、「西南のひかり (せいなんのひかり)」、「津之望 (つなのぞみ)」、「はるひ」、「清見 (きよみ)」、「せとか」、「はるみ」、「はれひめ」、「甘平 (かんぺい)」、「愛媛果試第 28 号 (えひめかしだい 28 号) (紅まどんな (べにまどんな))」。

表 1. 本マニュアルで使用した CAPS マーカー

マーカー名*	フォワードプライマー (5' - 3') リバースプライマー (5' - 3')	染色 色 体	増幅 サイ ズ(bp)	制限酵素	Buffer	反応温度
Bf0158-3	AAAAGCATTACAGAGGAGTTCGAC GGAAATTCATTAACCGTATCCGCA	3	352	<i>Pvu</i> II	M	37°C
Bf0036-3	CAGAATTTTGCGAAGGCCCTACTG GCACACTGAGATGCAAAAAGGTTGA	1	399	<i>Msp</i> I	M	37°C
Tf0150-2	TGATCCATCAAGAGCCCTAGGT TTCAGCTAAAAGCGTCACAAAAGG	8	385	<i>Hinf</i> I	H	37°C
Tf0271-2	ATCTTGTTTCTACCAGCTTCTTCAG CACTGATTGAATACATCGAATTGCATC	6	400	<i>Rsa</i> I	M	37°C
Tf0300-3	AGATTTCTCAGGAGTCTAAGAGCA ACTGGAACATATTTTCCAAGGCA	3	393	<i>Dra</i> I	M	37°C
Tf0419-2	TTGTTCCATCACTGAAAGAAGTGGT AGCTGGATTTGTGAACAGATTAGGA	3	389	<i>Pvu</i> II	M	37°C
Tf0420-2	TGGAGGCCATTTCTTATTAGACATT AGGGTTCTGGTAATCCCAGTT	3	388	<i>Hae</i> III	M	37°C
Tf0318-2	TTAGAGCAAGGAGGGGTCAA TTCATCCAACATGAAGGCCTTAC	4	400	<i>Hinc</i> II	M	37°C
Tf0293-4	CCAATATCTGGTACCACATTCTGTT GTGTAAGTTCCATTGCTTGCATT	3	394	<i>Hind</i> III	B	37°C
A10302-2	TCCATTATGCAGGAGATCTCTCA CATGAAAGTCCTTAGACTTGGATCT	9	383	<i>Hind</i> III	B	37°C
Mf0097-2	GATGATGGCAAATTCAGAACTGGA TGCCACAAAAGACAGTAATATGG	4	369	<i>Dra</i> I	M	37°C

Mf0090-2	GTTCCAGCCATCTCTCATCGGAA ATCATACTCGCCCTTTGAGATCCA	7	400	<i>Msp</i> I	M	37°C
Gn0073-2	TGCTCGGGGTCATCTACTCTG ACCATCTTTTCAGCAAAAAGCCATT	2	394	<i>Sty</i> I	H	37°C
Gn0048-2	TTGAGAAGAAGCTTTGAATTGGGTAACA AGGACATGATTTCCAACCTTATTCTACA	4	380	<i>Pvu</i> II	M	37°C

* 改変した CAPS マーカーは、既報の CAPS マーカーと同じ遺伝子座の特定の制限酵素認識部位を標的としている。マーカー名の右側の枝番は、PCR 増幅断片の長さが異なるマーカーであることを示している。再設計したプライマーを用いて分析した場合においても、既報の CAPS マーカーと同じ遺伝子型が検出できる。

<基本操作>

(1) 以下のように PCR 反応液を調製する。

試薬名	分量
GoTaq® Colorless Master Mix	5.0 μl
プライマー溶液	1.0 μl
滅菌超純水	3.0 μl
サンプル DNA 溶液	1.0 μl
計	10.0 μl

(2) PCRシステムProFlex PCR System（サーモフィッシャー社）などを用いて、以下のプログラムでPCR反応を行う。

95°C 2分

95°C 30秒	} 32 サイクル
57°C 30秒	
72°C 60秒	

72°C 5分

4°C ∞

5. アガロースゲル電気泳動による増幅断片の確認

上記4項で得た反応溶液を2.0%アガロースゲルにアプライし、電気泳動によ

り以下の方法で PCR 増幅産物の有無を確認する。

<準備するもの>

アガロース (ニッポンジーン社)、50×TAE (ニッポンジーン社)、100bp DNA ラダーマーカー (バイオメディカルサイエンス社)、6×Loading buffer (GM バイオラボ社)、EtBr 溶液(10 mg/ml)、ゲルメーカー (ミューピッド社)、サブマリオン型電気泳動装置 (ミューピッド社)、ゲル撮影システム (アトー社) など。

<基本操作>

- (1) アガロースゲル(2.0%)を作製する。2.0g のアガロースを計量し、300 ml 三角フラスコに入れる。スターラー及び1×TAE 100 ml を加えてよく混ぜる。電子レンジ内で温めてアガロースを溶解させる。この時、完全に溶解していることを確認する。コームを立てたゲル作製用ユニットの中に、泡立たないように流し込み、固まるまで放置する。
- (2) 1.0 µl の 6×Loading Dye を 4 µl の PCR 産物を添加した混合液 5µl と 6µl の 100bp DNA ラダーマーカーを泳動槽にセットした 2.0%アガロースゲルにアプライし、1×TAE 中に、青色の色素がゲルの 2/3 程度に来るまで 100 ボルトの定電圧で電気泳動を行う。
- (3) 電気泳動終了後、ゲルを約 0.5 µg/ml の EtBr 溶液中で 20 分間程度染色し、紫外線照射下で、PCR 増幅産物の多型を確認・撮影する。
※EtBr は変異源であるので取り扱いには注意すること。

6. 制限酵素処理による増幅断片の消化

上記 4 項で得た PCR 産物を、それぞれのマーカーに対応した制限酵素で処理し、後述の 7 項で遺伝子型を判定するための準備を行う。マーカーに対応した制限酵素は表 1 のプライマー情報を参照する。

<準備するもの>

1.5ml 又は 2.0ml チューブ (滅菌済み)、96 穴 PCR プレート又は 8 連チューブ (サーモフィッシャー社)、キャップまたはフルプレートカバー (サーモフィッシャー社)、PCR 増幅溶液、各種制限酵素 (ニッポンジーン社)、各種制限酵素付属の 10× buffer、滅菌超純水、PCR システム ProFlex PCR System (サーモフィッシャー社)

<基本操作>

- (1) 以下のように制限酵素反応液を調製する。

試薬名	分量
PCR 増幅溶液	4.0 μ l
10×buffer	1.5 μ l
滅菌超純水	9.3 μ l
制限酵素	0.2 μ l
計	15.0 μ l

(2) PCR システム ProFlex PCR System (サーモフィッシャー社) などを用いて、37°C 3 時間でインキュベーションを行う。

6. アガロースゲル電気泳動による多型の検出

上記 5 項で得た反応溶液を 2.0%アガロースゲルにアプライし、電気泳動により以下の方法で多型を確認する。

<準備するもの>

5. と同様。

<基本操作>

5. と同様。

7. 遺伝子型判定とトラブルシューティング

1) 遺伝子型判定

各マーカーを用いた遺伝子型は、表 2 のとおりである。また、それぞれのマーカーにおける電気泳動像については、参考資料を参照のこと。

2) トラブルシューティング

(1) PCR 反応を行っても、目的のバンドが見られない。下の方にぼやけた像（プライマーダイマー）が出る。

ア PCR 増幅が失敗している可能性があるため、氷上操作を確実に行う。

プライマーを含む溶液を 4°C 以上にしない。

イ プライマーの劣化の可能性があるので、凍融解を繰り返したプライマーは廃棄し、新たに調製し直すこと。

ウ 1.0%アガロースゲルを用いた電気泳動により、分解が少なく、単一のバンドとして検出できる高分子の DNA が抽出できていることを確認する。エ 上記ア、イの対策を実施しても目的のバンドが見られない場合は、試薬を取り替える。

(2) PCR 反応でバンドは見られるが、制限酵素処理後に明確な品種間多型が出ない。

ア 長期保存で制限酵素の活性が低下している場合、新規に購入した制限酵素を使用すること

イ 制限酵素の使用や多糖類やポリフェノールなどの夾雑物の多い DNA を鋳型に PCR すると、制限酵素処理が不安定になる恐れがあるため、A260/230 比の値が 1.6 未満の DNA サンプルは使用しないこと。

(3) 制限酵素処理後、はっきりした品種間多型は見られるが、酵素切断の切れ残りによるバンドが現れるため、正しい多型の判断が難しい。

ア サーマルサイクラーの機種によって温度が微妙に異なる可能性があるため、適切なアニーリング温度でない場合がある。予備試験でアニーリング温度を調整し、使用する機器の最適条件を設定すること。

イ 制限酵素処理にエアーインキュベーターを用いている場合、酵素処理が不十分な可能性があるため、ウォーターバスまたはサーマルサイクラーを用いてインキュベートを行う。

ウ DNA 溶液の夾雑物の影響により制限酵素の活性が阻害され、酵素処理が不十分な可能性がある場合は、3~5 倍量の制限酵素を使用する。

エ 葉から抽出した DNA サンプルなどのポジティブコントロールを同時分析して遺伝子型を確認すること。

(4) 制限酵素処理後、低分子 (200bp 以下) のバンドが見られない。

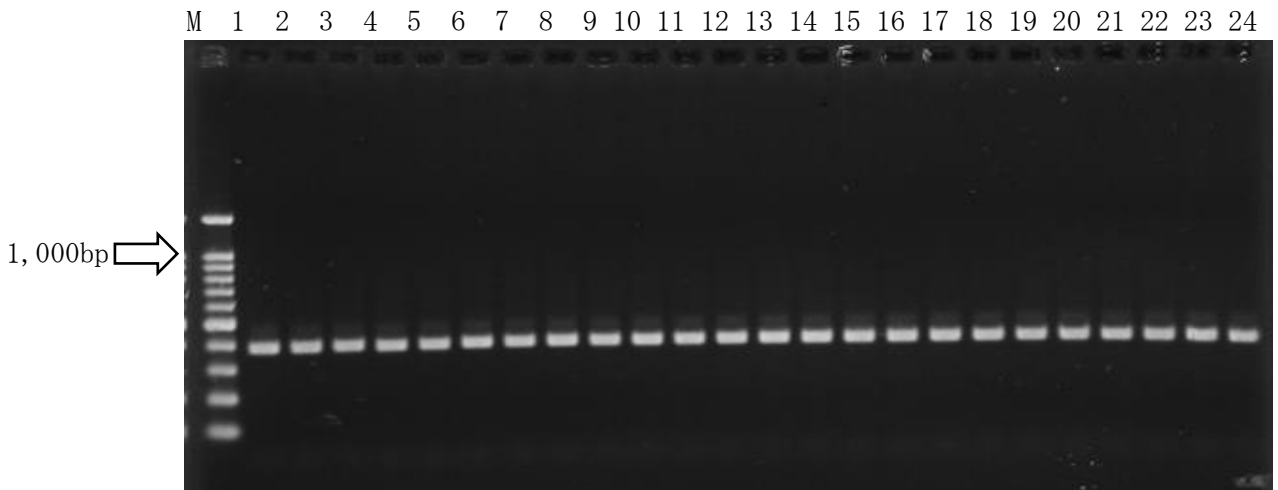
ア 泳動時間が長すぎる場合、200bp 以下のバンドが像として認識できなくなる (ぼやけるまたは消失する) 場合がある。サブマリン型電気泳動装置 (ミューピッド社) 使用の場合は約 30 分間を泳動時間の目安とする。

イ アガロースゲルの濃度が 2.0% より低い場合、200bp 以下のバンドが像として認識できなくなる (ぼやけるまたは消失する) 場合がある。2.0% 以上の濃度で泳動することが望ましい。

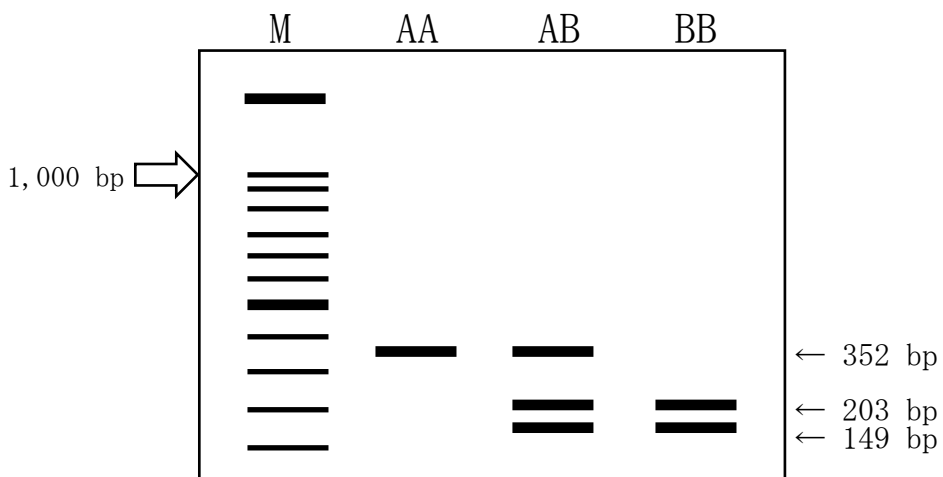
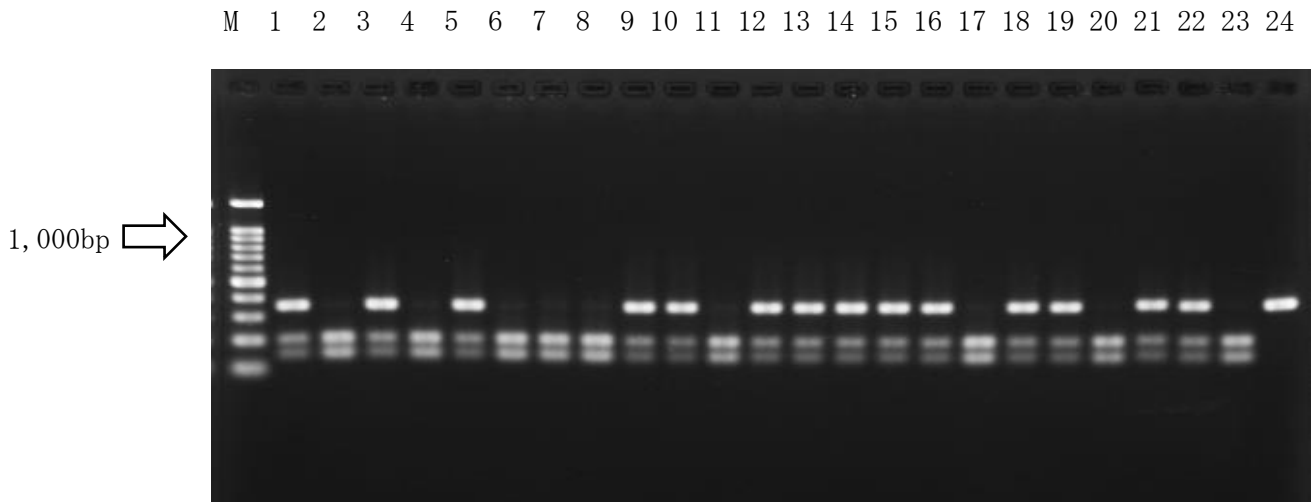
表2 各マーカーの遺伝子型

品名	マーカー名		Bf0158-3 Pvu II	Bf0036-3 Msp I	Tf0150-2 Hinf I	Tf0271-2 Rsa I	Tf0300-3 Dra I	Tf0419-2 Pvu II	Tf0420-2 Hae III	Tf0318-2 Hinc II	Tf0293-4 Hind III	Al0302-2 Hind III	MF0097-2 Dra I	MF0090-2 Msp I	Gn0073-2 Sty I	Gn0048-2 Pvu II
	マーカー名	品名														
1	ウシジケウミカン(宮川早生)	AB	BB	AB	BB	AB	AB	BB	AB	BB	AA	AB	BB	AA	BB	AA
2	グレープフルーツ(ダンカン)	BB	BB	BB	AA	AA	AB	AB	AA	AB	AA	AA	AA	AB	AA	AB
3	スイートオレンジ(トロビタ)	AB	AB	BB	AA	AA	AB	AB	AA	AB	AB	AA	AB	AB	AA	AB
4	レモン(リスボン)	BB	AA	AB	AA	AA	AB	BB	AA	AA	AA	AB	AA	AA	AB	AA
5	不知火	AB	AA	BB	AA	AA	AB	AB	AA	BB	AB	BB	AB	AB	AA	AA
6	イヨ(普通)	BB	AB	AB	AA	AA	BB	AB	BB	BB	AA	AB	BB	AB	AB	AB
7	ナツミカン(川野ナツダイダイ)	BB	BB	AB	AB	AB	AB	BB	AB	AB	AA	AA	AB	AA	AB	AB
8	ハッサク	BB	BB	AB	AB	AB	AB	BB	AB	AB	AA	AB	AB	AA	AA	AB
9	ボンカン(太田)	AB	AB	BB	AA	AA	BB	AB	AB	BB	AA	AB	BB	AB	AA	AA
10	隣の香	AB	AB	AA	AB	AB	AB	BB	AA	AA	AA	AA	AB	AA	BB	AA
11	みはや	BB	AB	BB	AA	AA	AB	AB	AA	BB	AA	AB	BB	BB	AA	AA
12	あずみ	AB	AB	AB	AA	AA	AB	BB	AA	AB	AA	AB	AB	BB	AA	AA
13	あずき	AB	AB	AB	AB	AB	AB	BB	AA	AB	BB	AB	AB	AB	AA	AA
14	麗紅	AB	AB	BB	AA	AA	AB	BB	AA	AB	AA	AB	BB	AB	AB	AA
15	津之輝	AB	AB	AA	AA	AA	AB	BB	AB	BB	AA	AB	BB	BB	AB	BB
16	西南のひかり	AB	AB	AB	AB	AB	AB	BB	AB	BB	AA	BB	BB	BB	AB	AA
17	津之望	BB	AA	AB	AA	AA	AB	BB	AA	BB	AA	AA	BB	BB	AA	AA
18	はるひ	AB	AB	AB	AA	AA	AA	AB	AA	AB	AA	AA	AB	AA	AB	AA
19	清見	AB	AB	AB	AA	AA	AB	BB	AA	BB	AB	AB	AB	AB	AB	AB
20	せとか	BB	AB	BB	AA	AA	AB	BB	AA	BB	AA	BB	BB	BB	AA	AB
21	はるみ	AB	AB	BB	AA	AA	AB	BB	AA	BB	AB	AB	BB	BB	AB	AA
22	はれひめ	AB	AB	AB	AB	AB	BB	BB	AA	BB	AA	AB	AB	AB	AB	AA
23	甘平	BB	AB	AB	AA	AA	AB	BB	AB	AB	AA	BB	AB	AB	AA	AA
24	愛媛県試第28号(紅まどんな)	AA	AA	BB	AB	AB	AB	AB	AA	BB	AA	AA	AB	AB	AA	AB

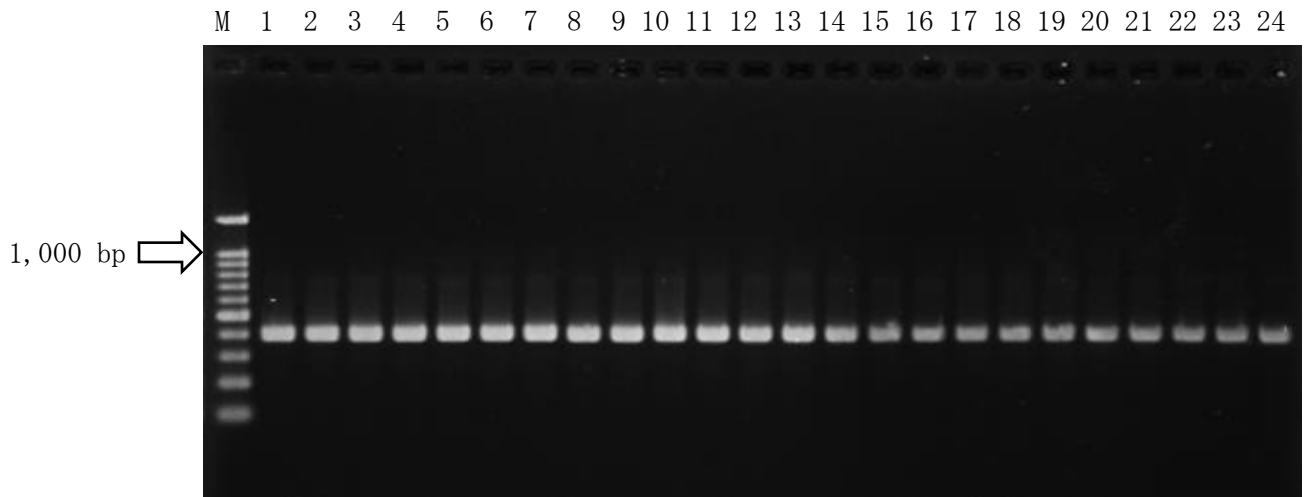
PCR 增幅



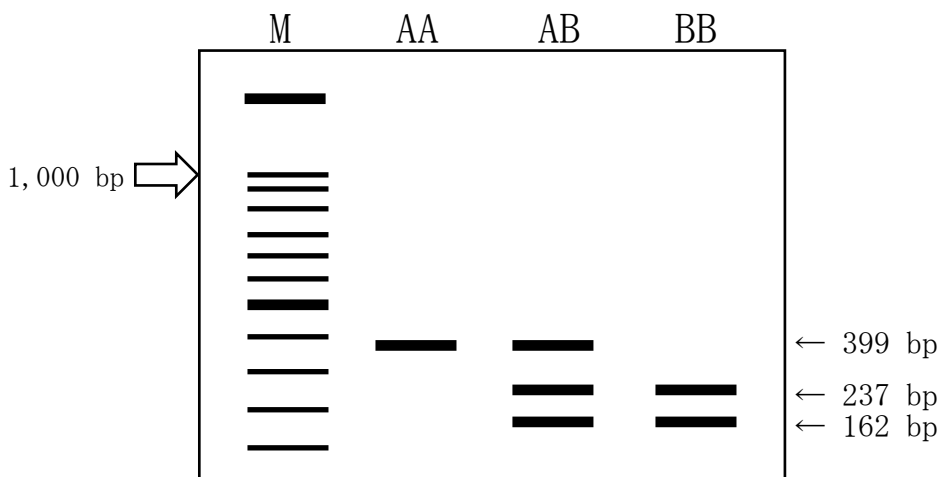
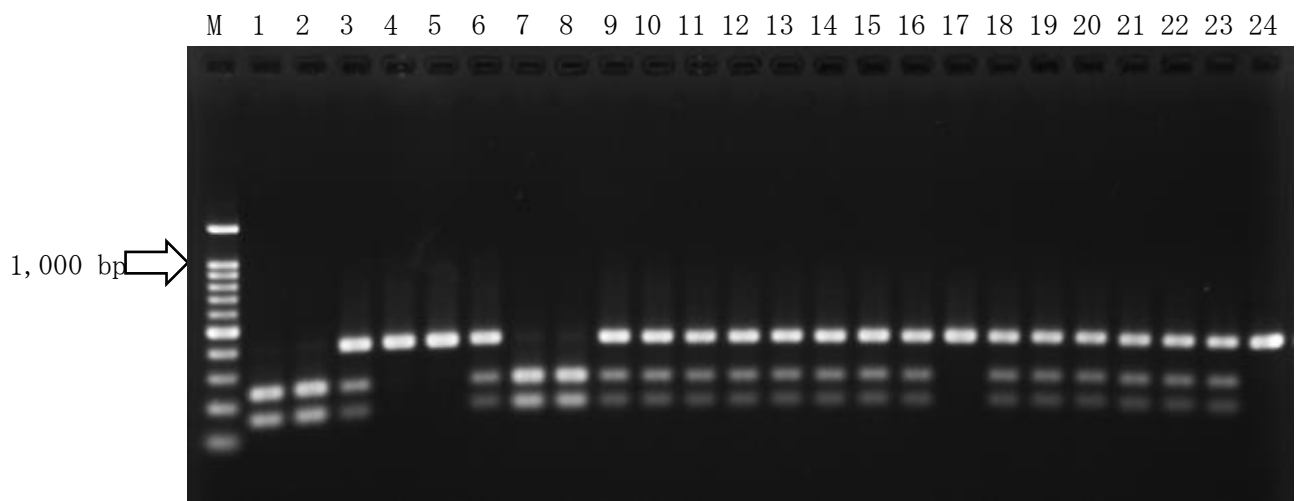
制限酵素処理後



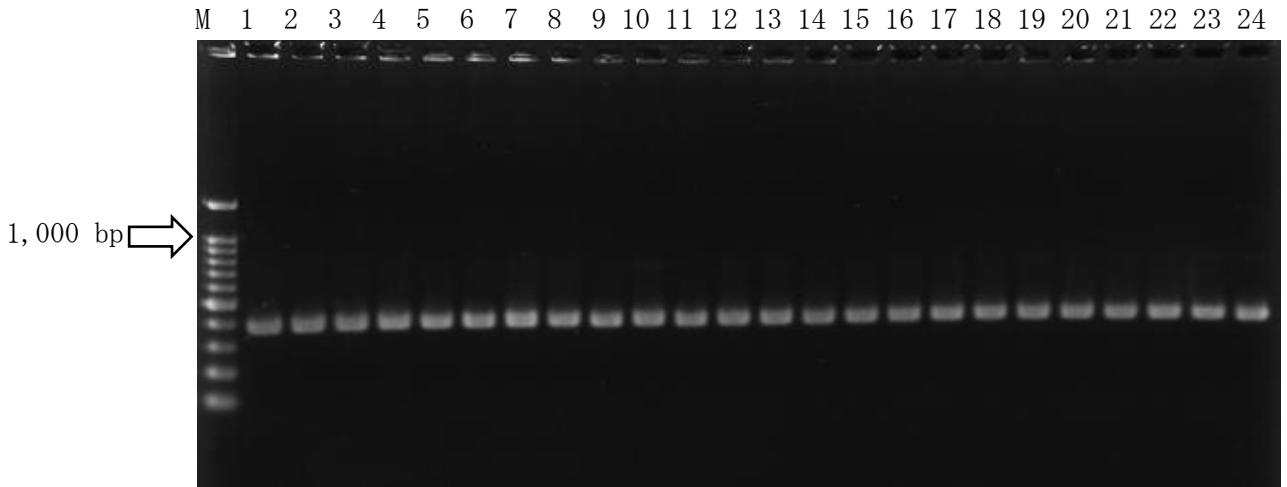
PCR 增幅



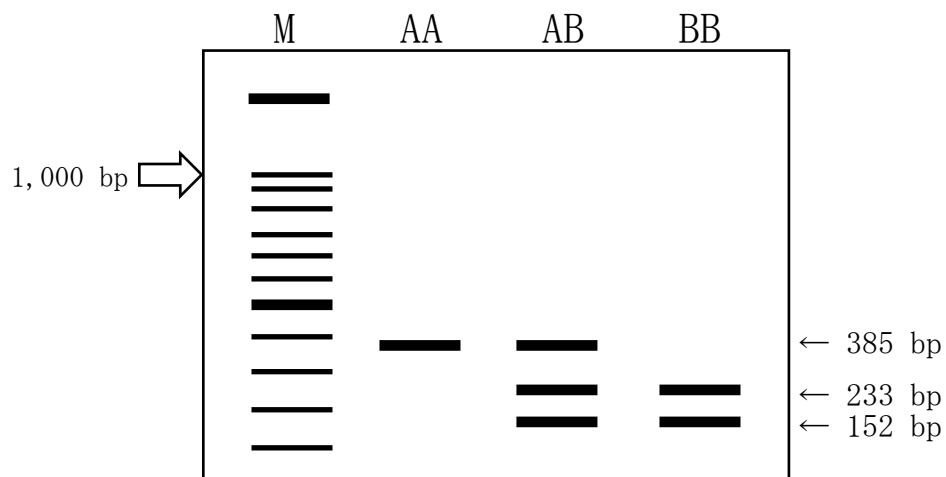
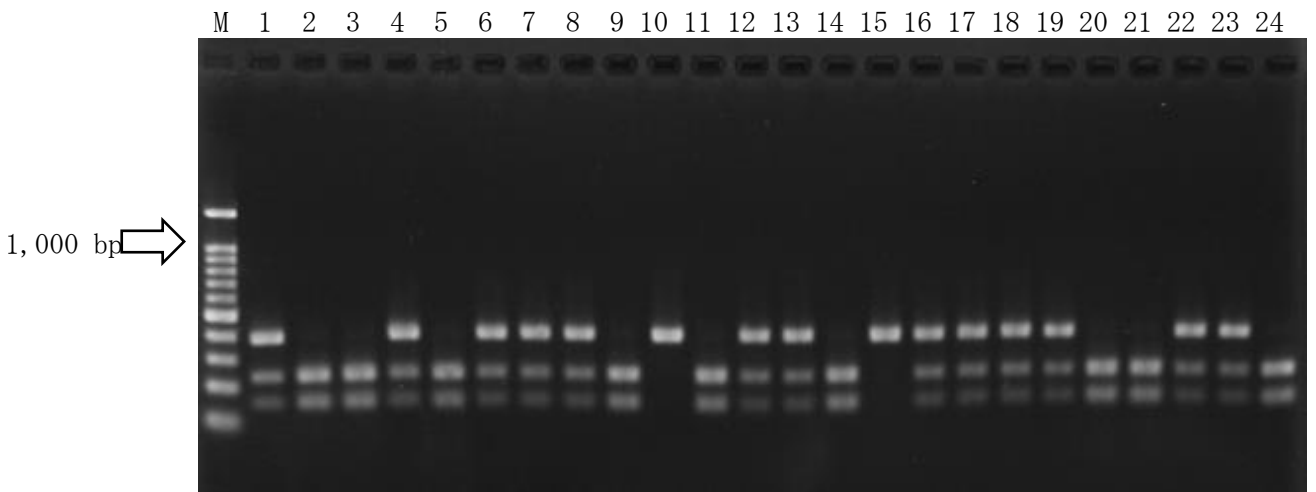
制限酵素処理後



PCR 增幅

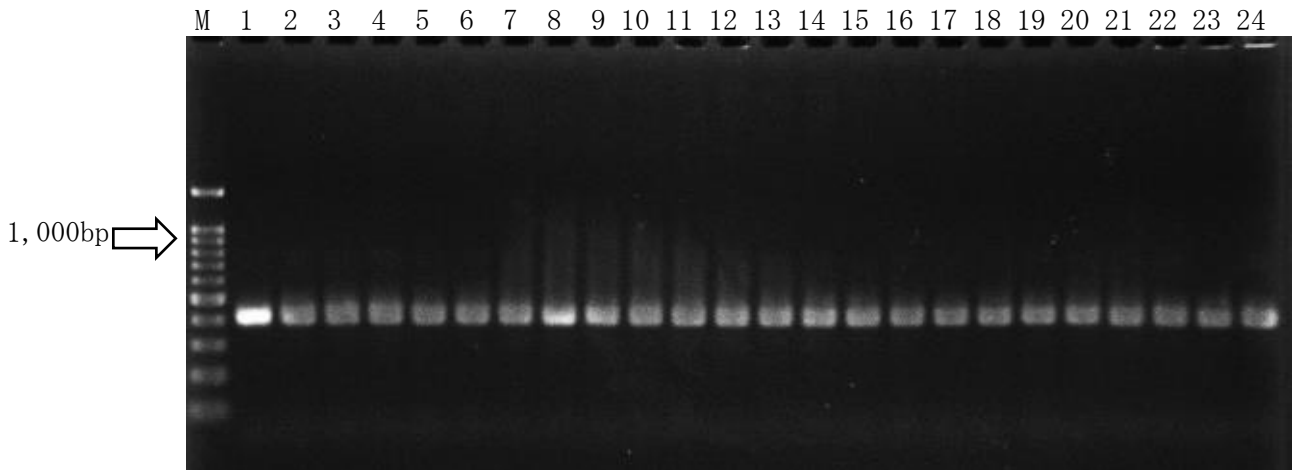


制限酵素处理後

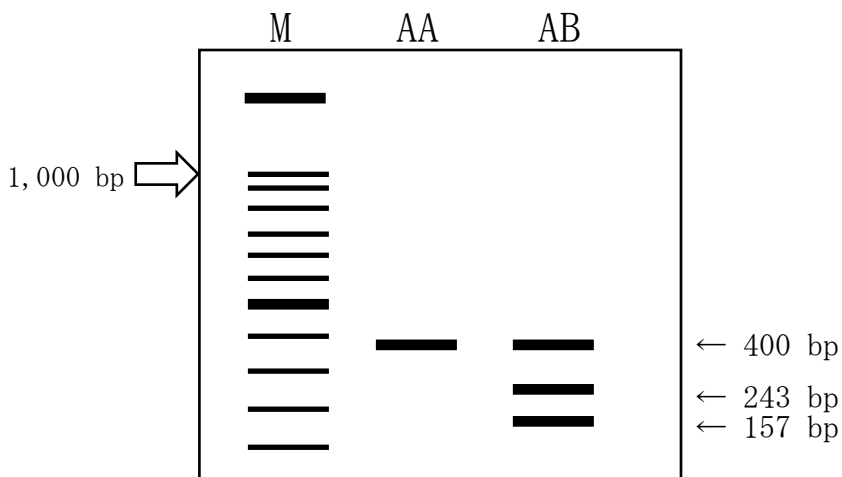
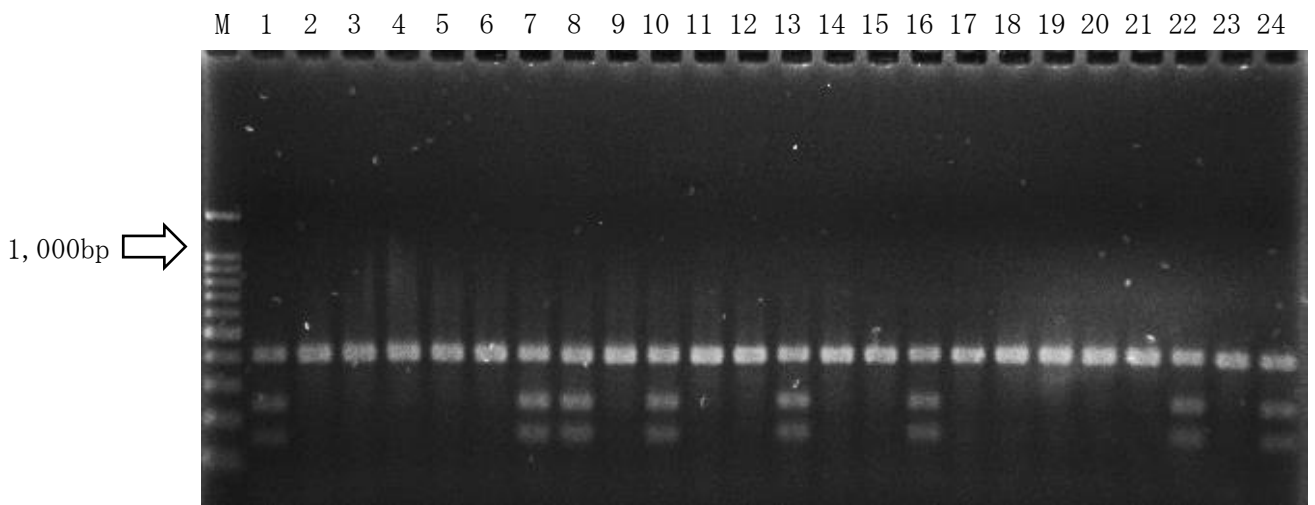


Tf0271-2/ *Rsa* I

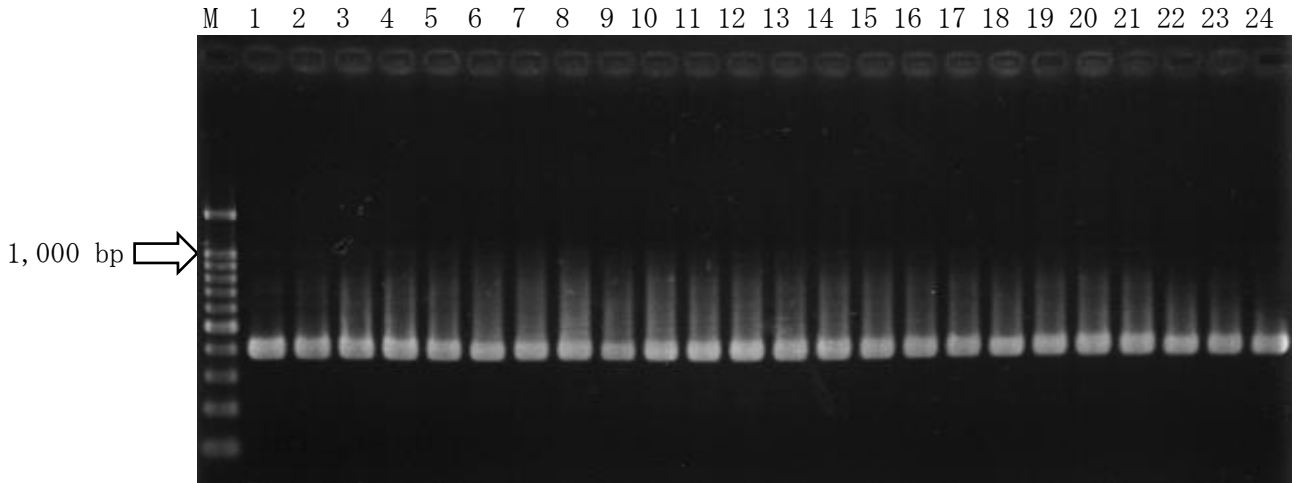
PCR 增幅



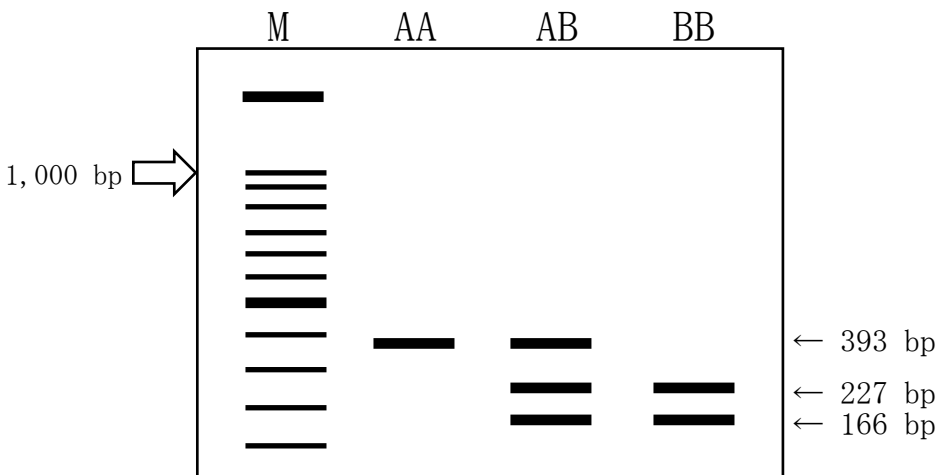
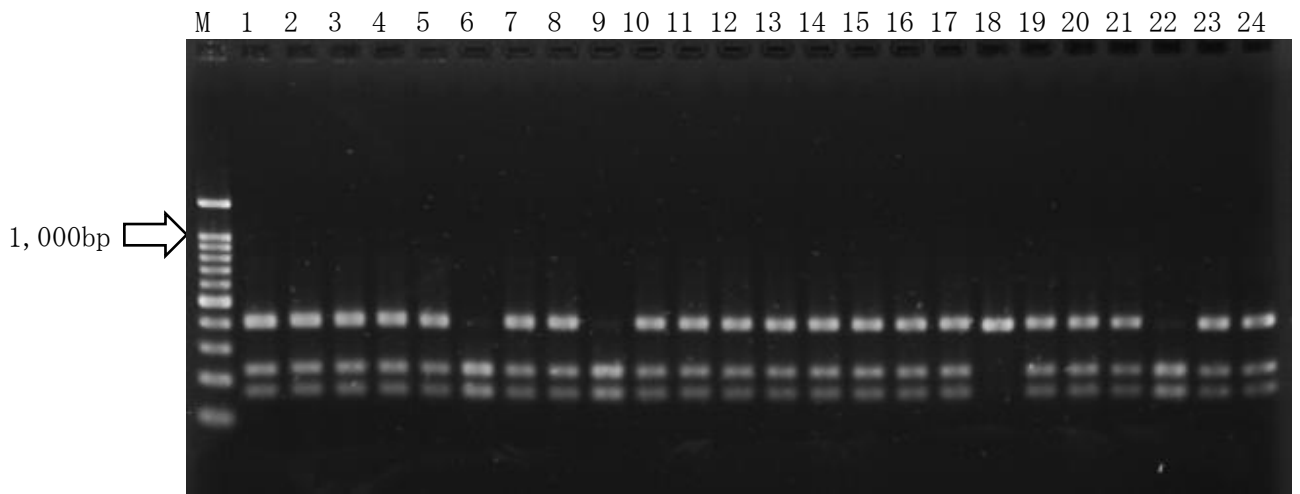
制限酵素处理後



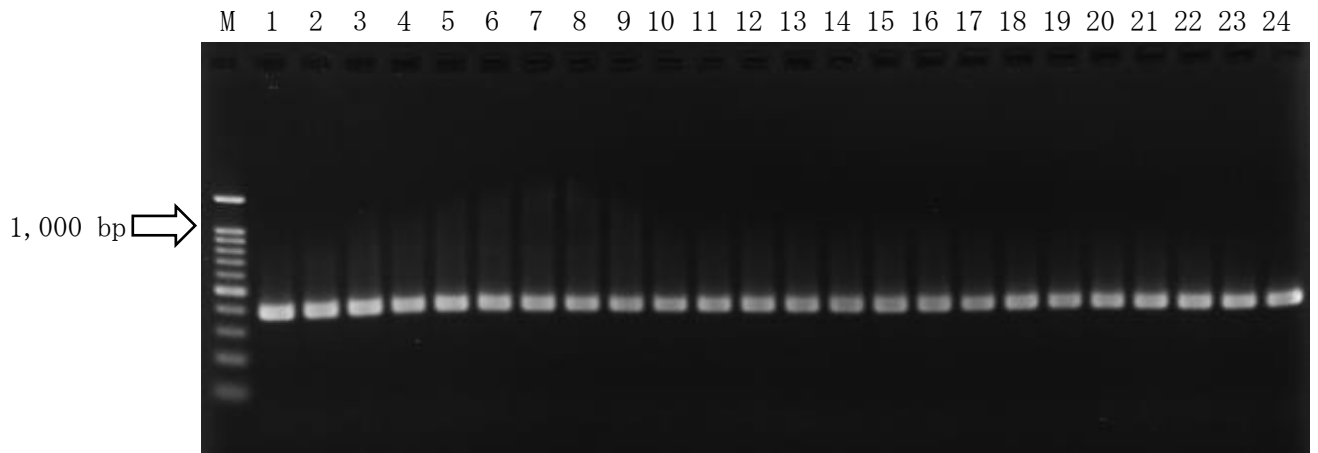
PCR 增幅



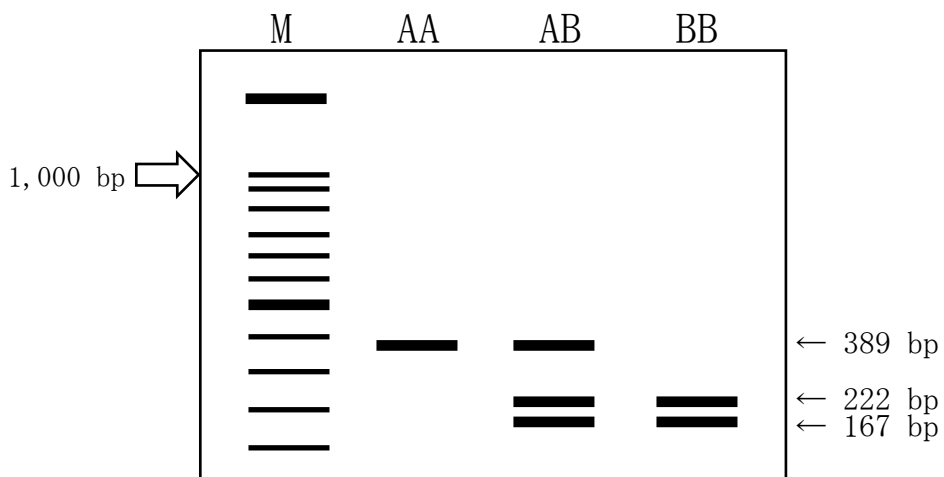
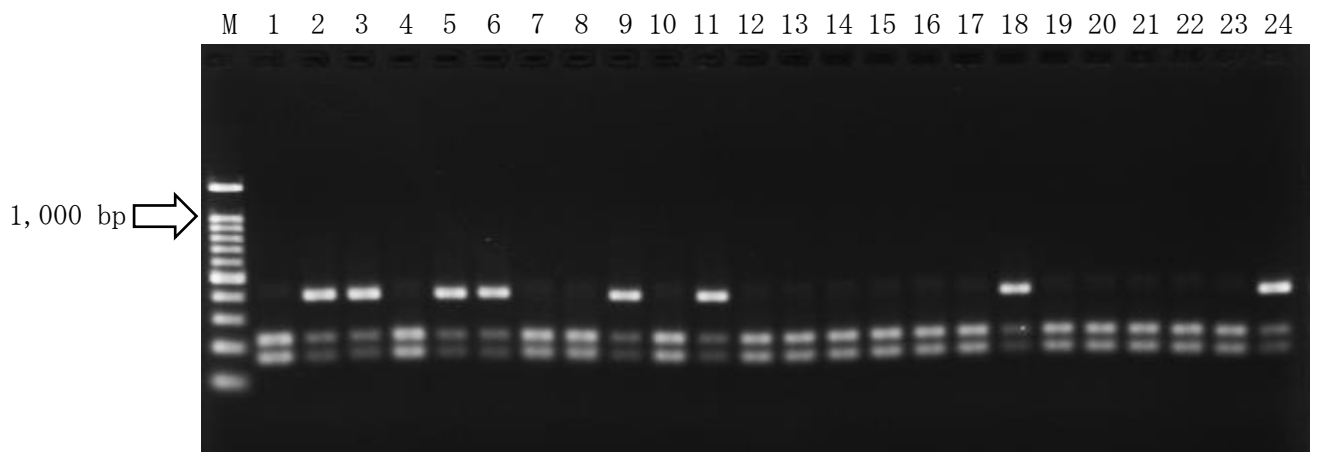
制限酵素处理後



PCR 增幅



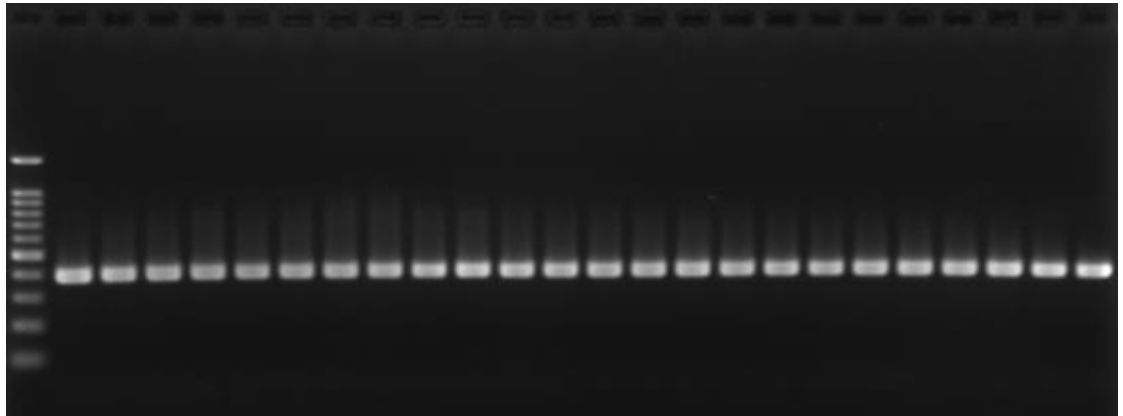
制限酵素処理後



PCR 增幅

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24

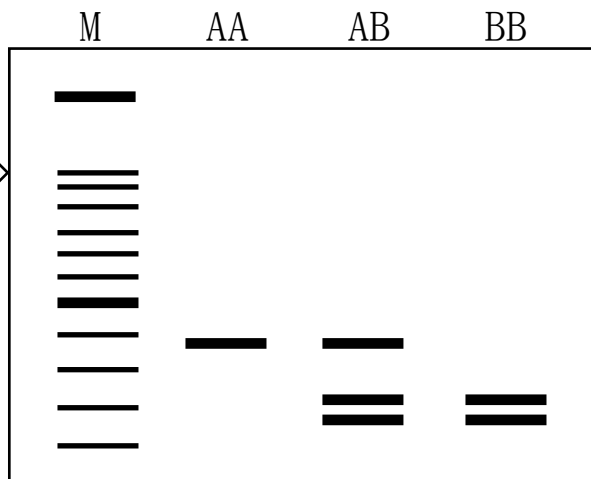
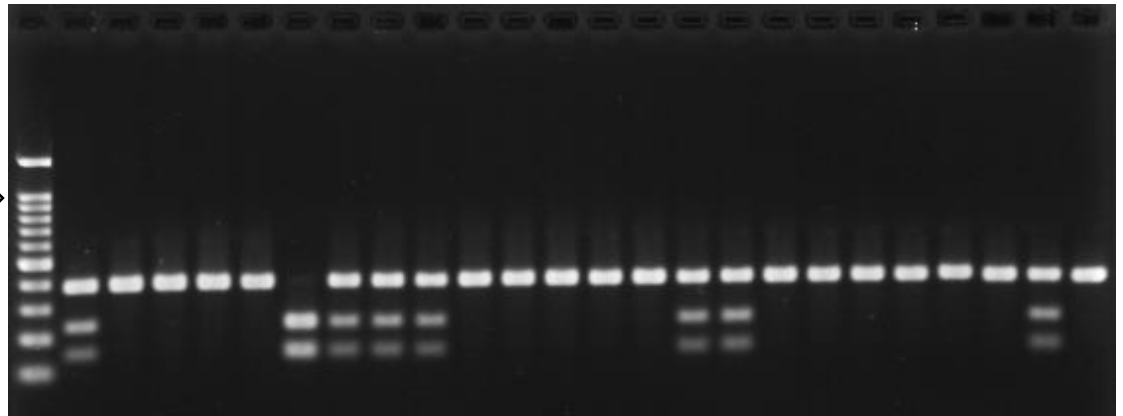
1,000 bp



制限酵素処理後

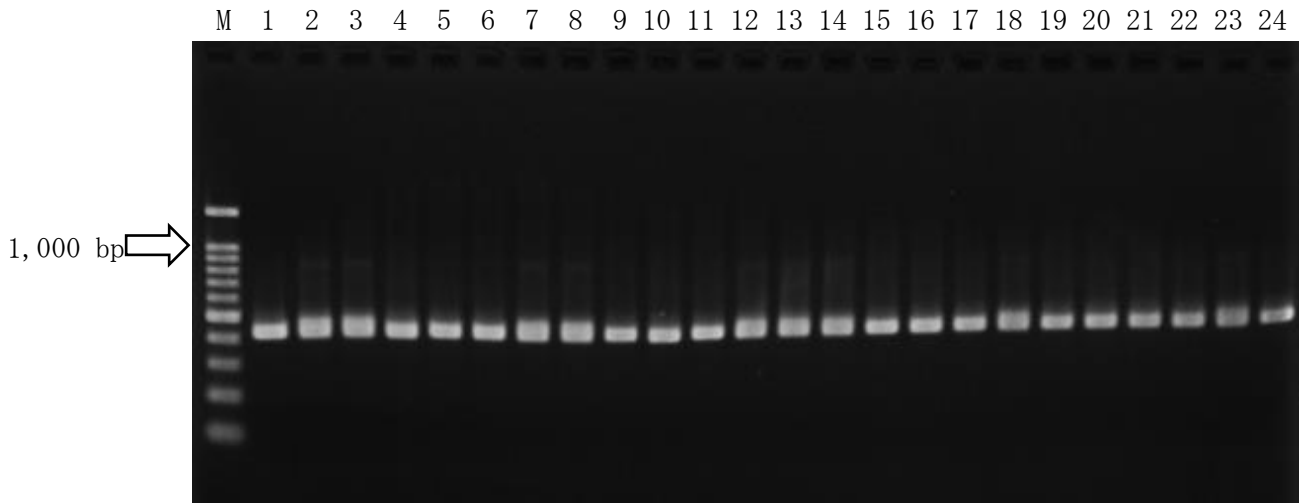
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24

1,000 bp

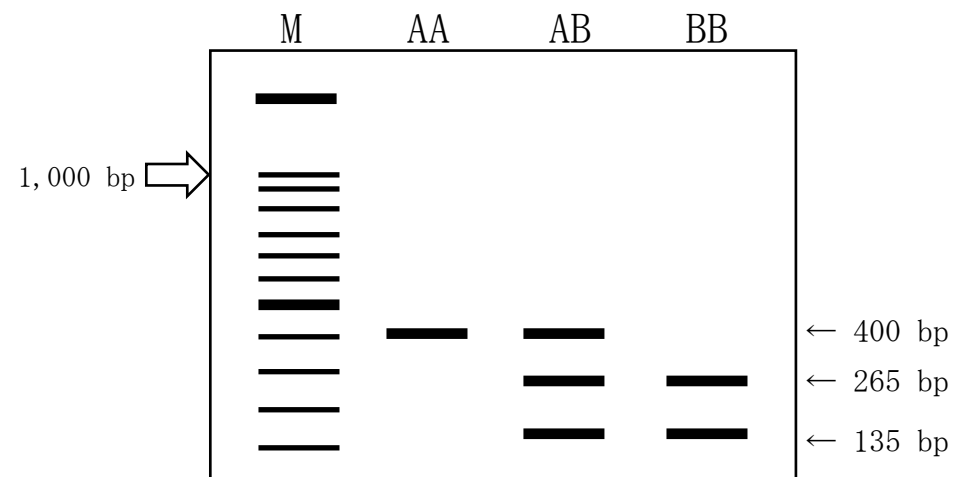
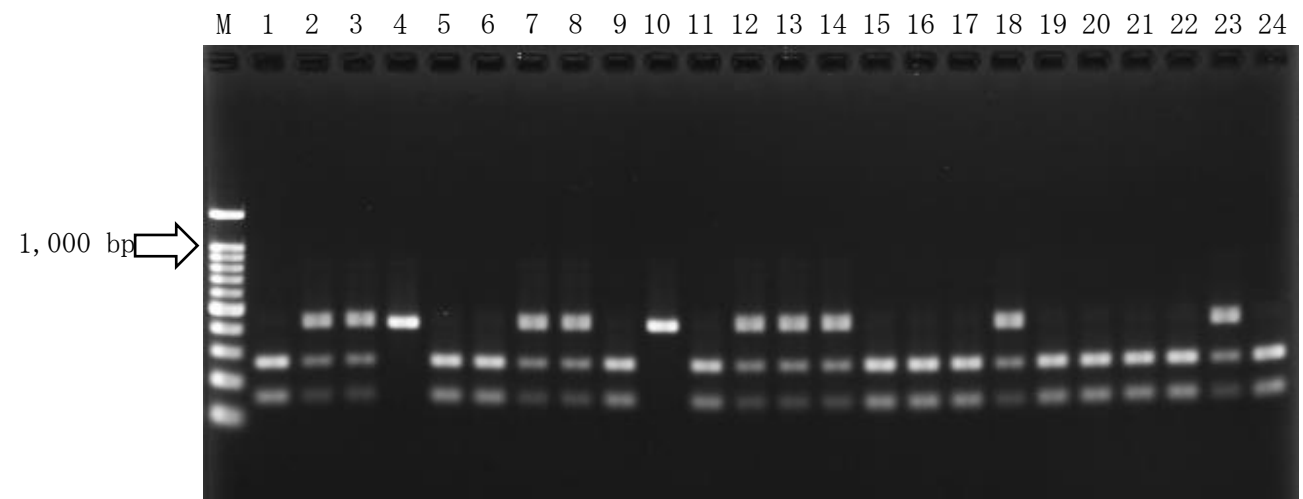


← 388 bp
← 226 bp
← 162 bp

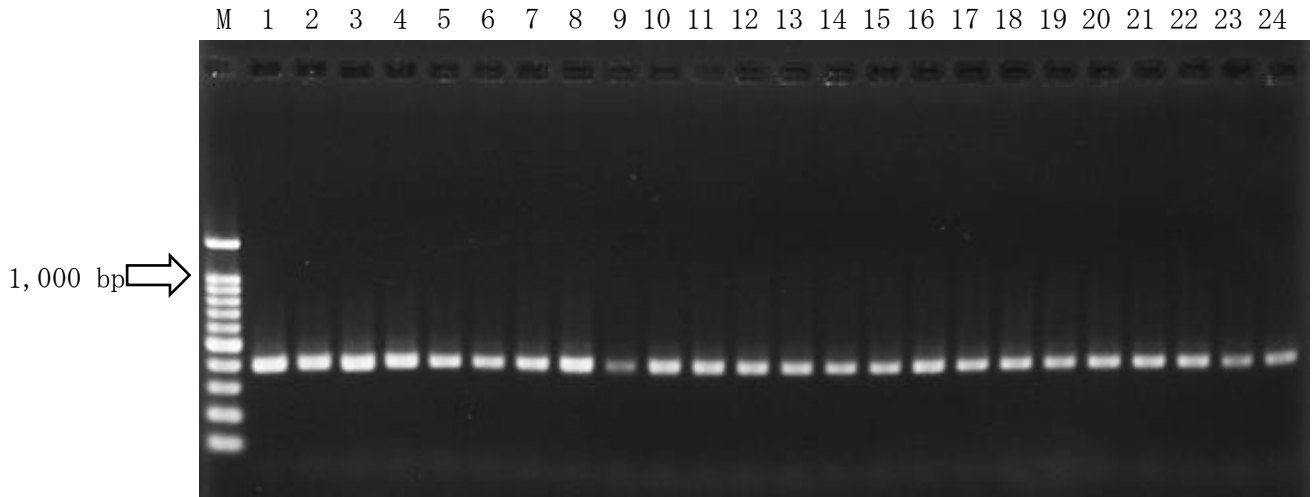
PCR 增幅



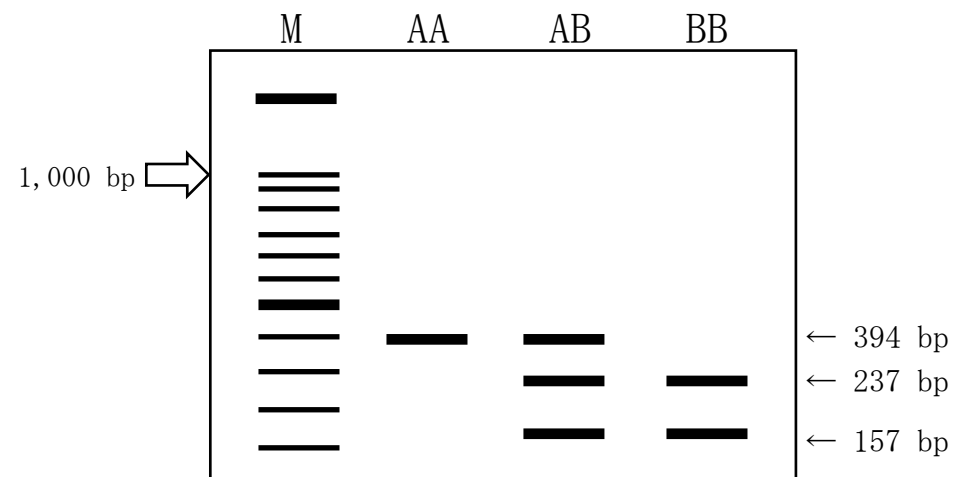
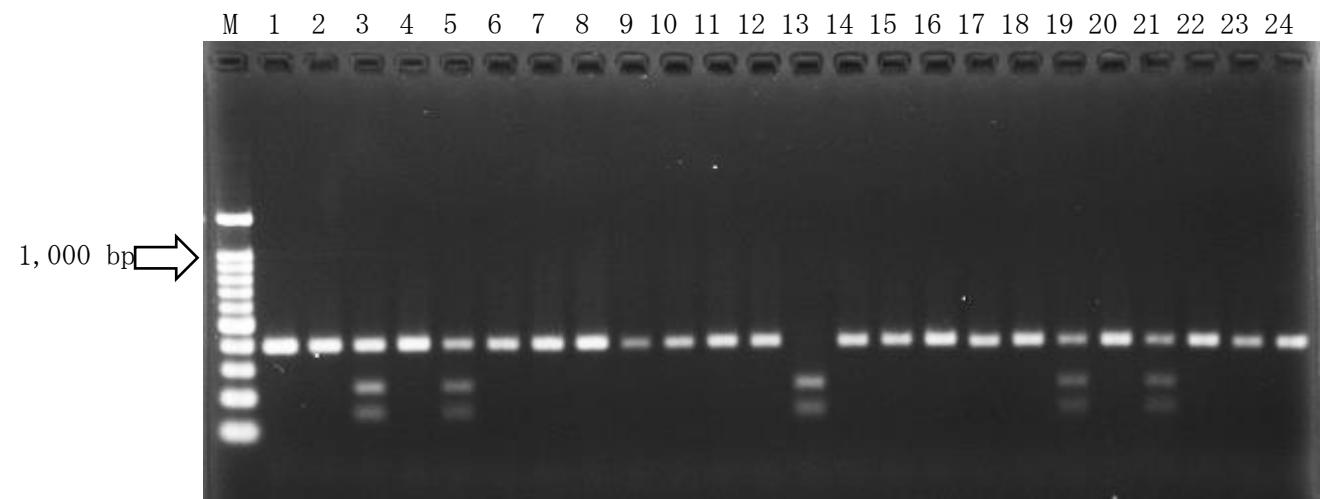
制限酵素处理後



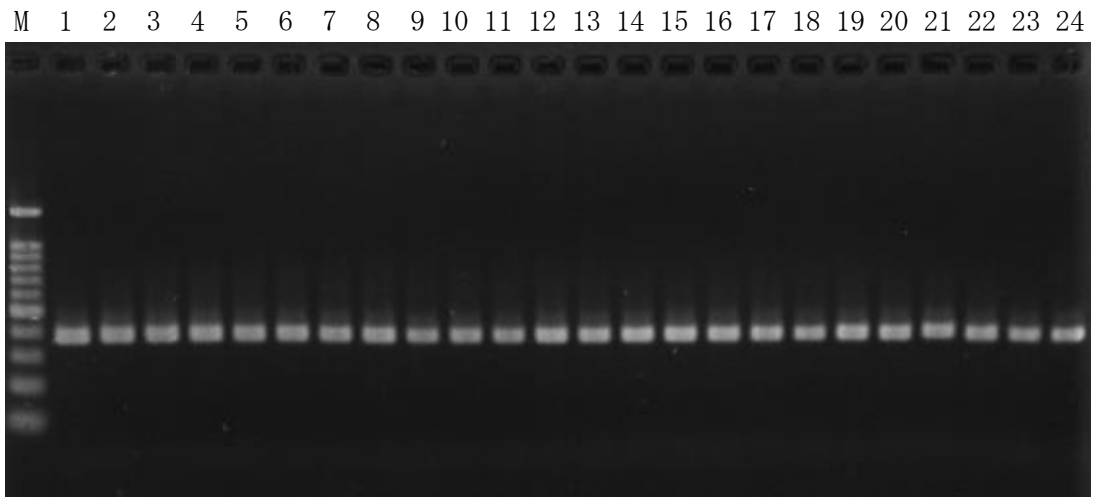
PCR 增幅



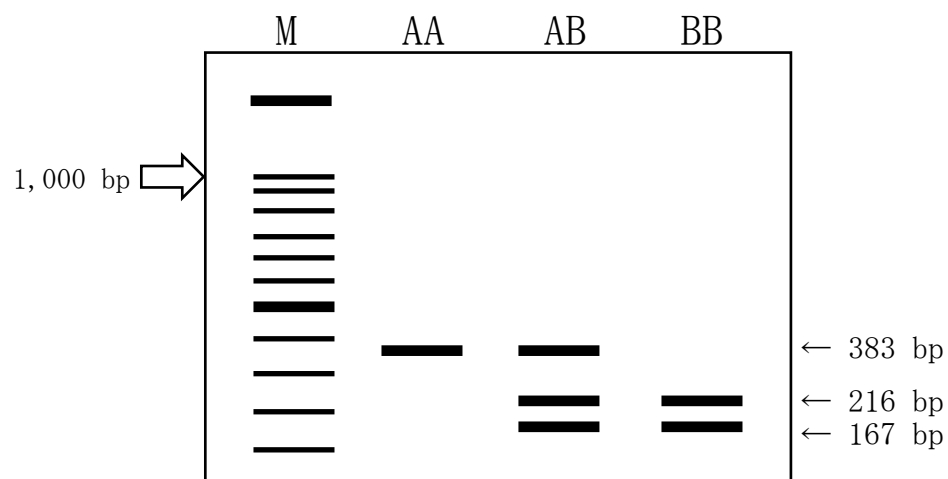
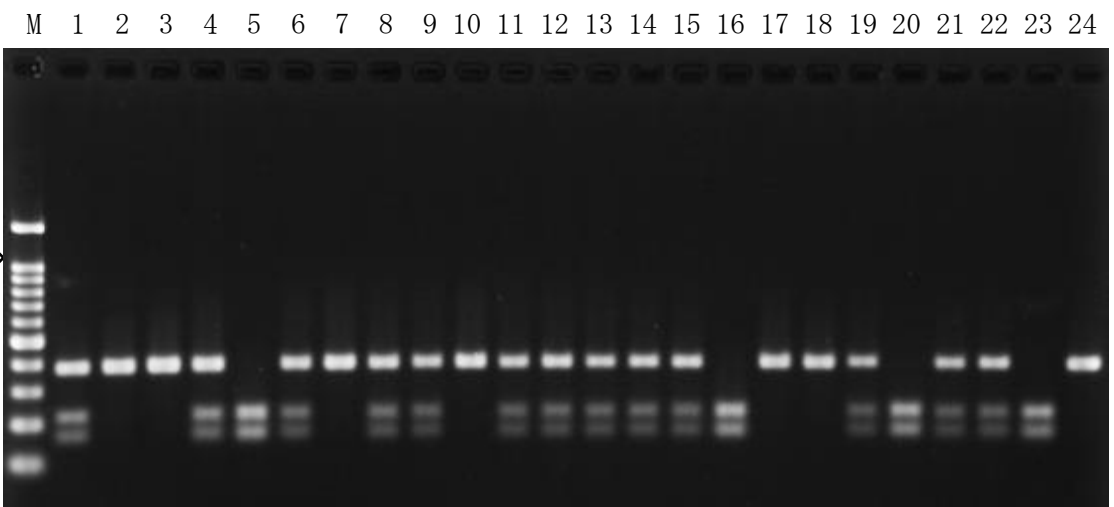
制限酵素处理後



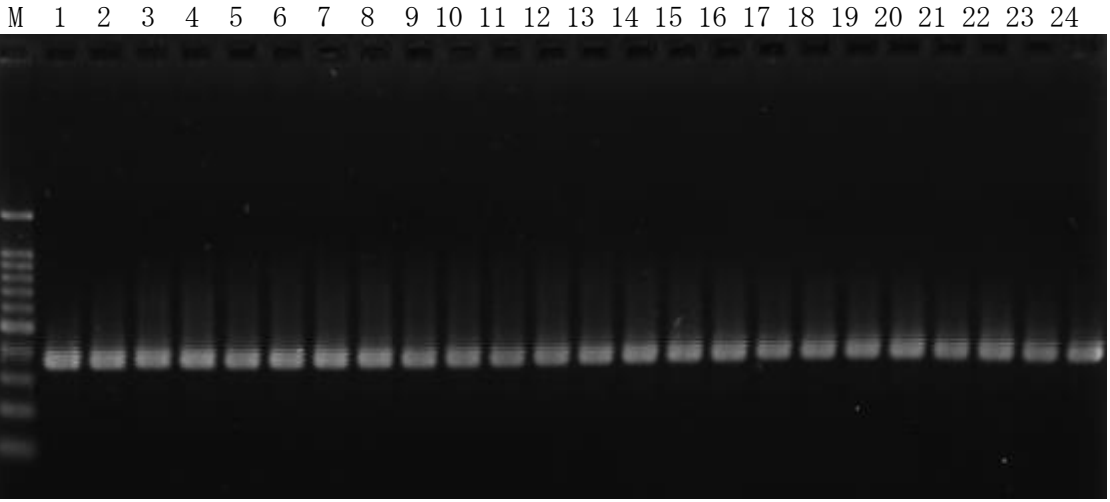
PCR 增幅



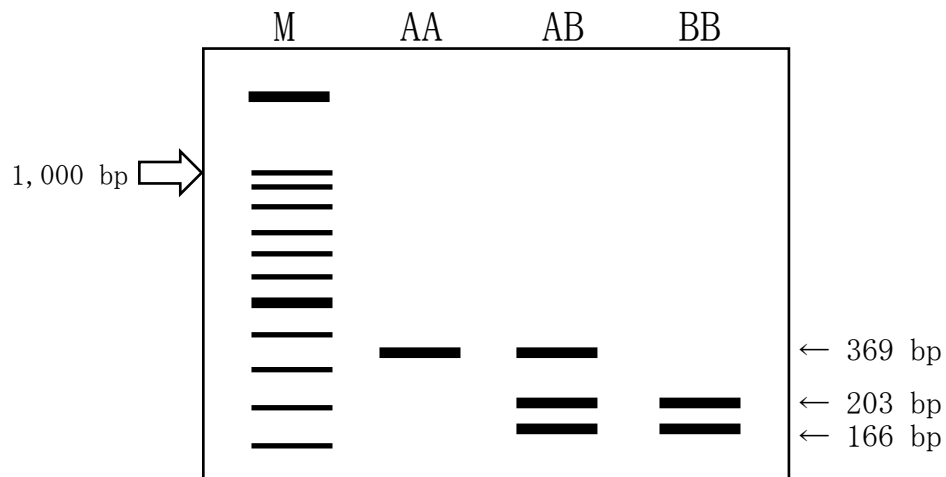
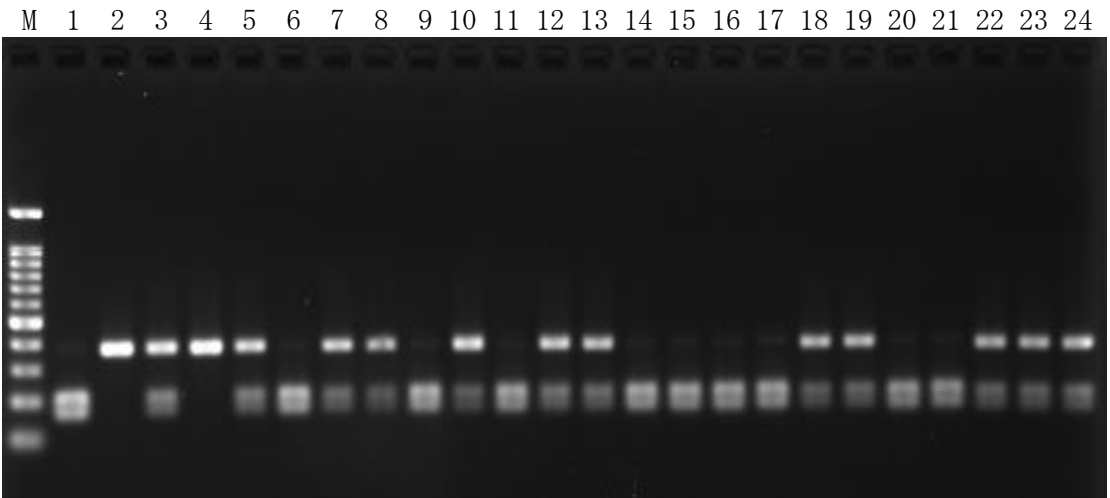
制限酵素处理後



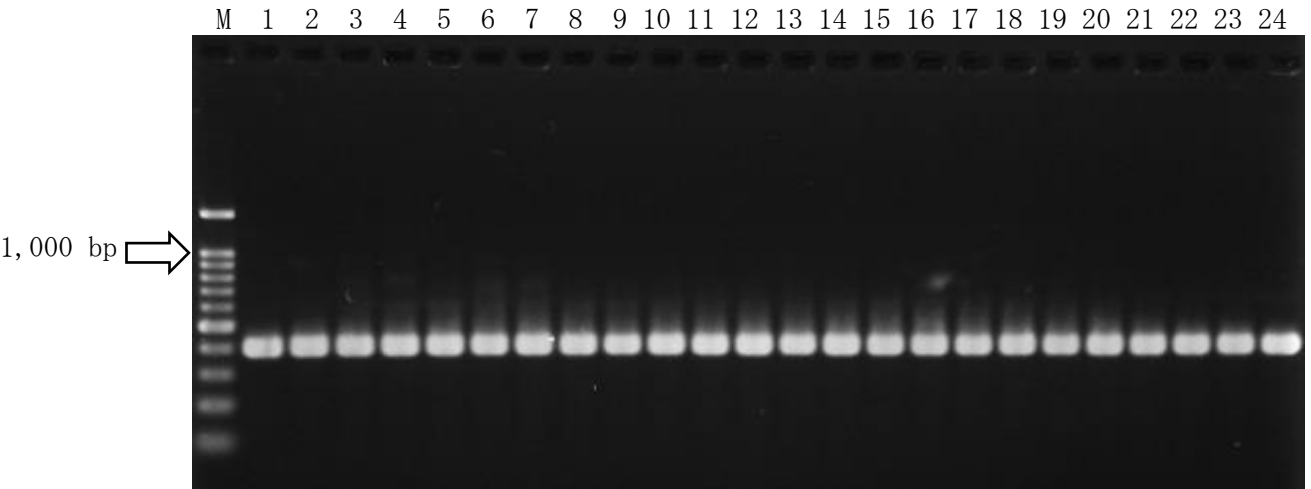
PCR 增幅



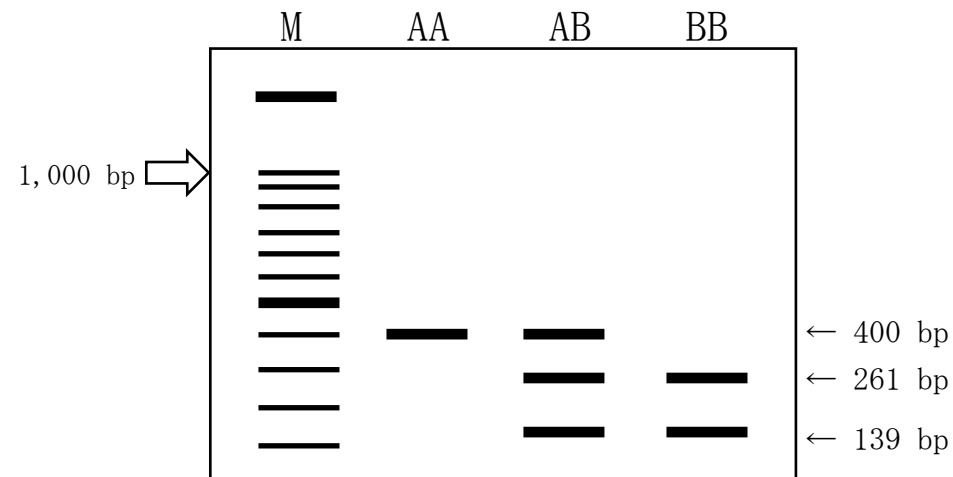
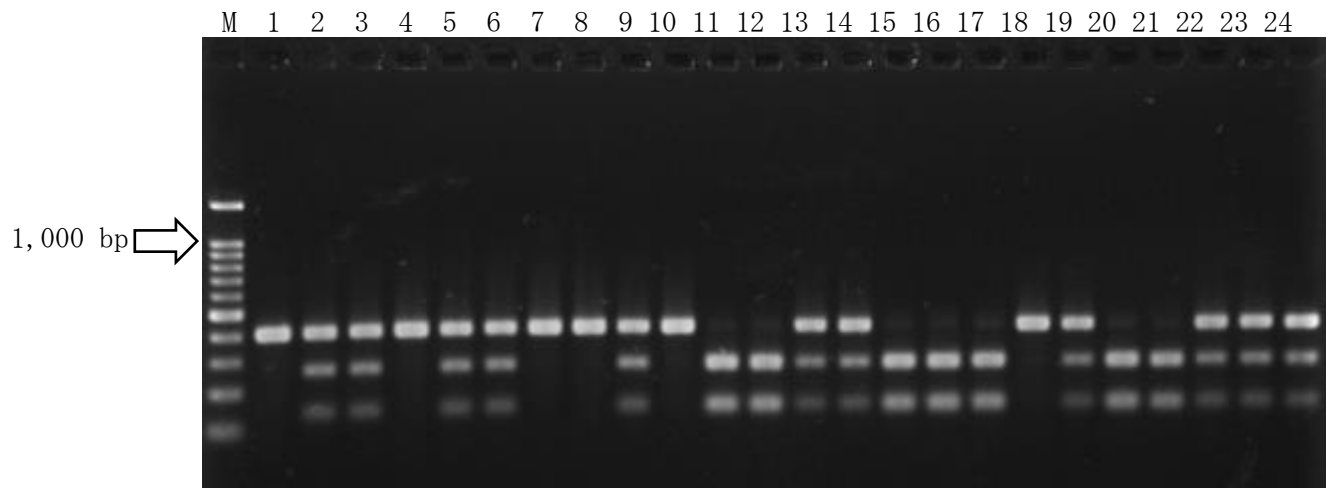
制限酵素处理後



PCR 增幅

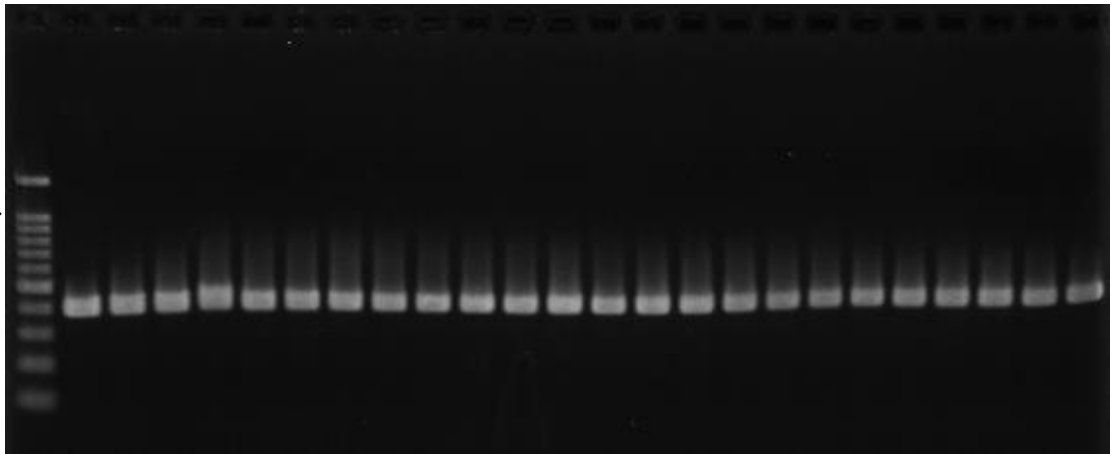


制限酵素处理後



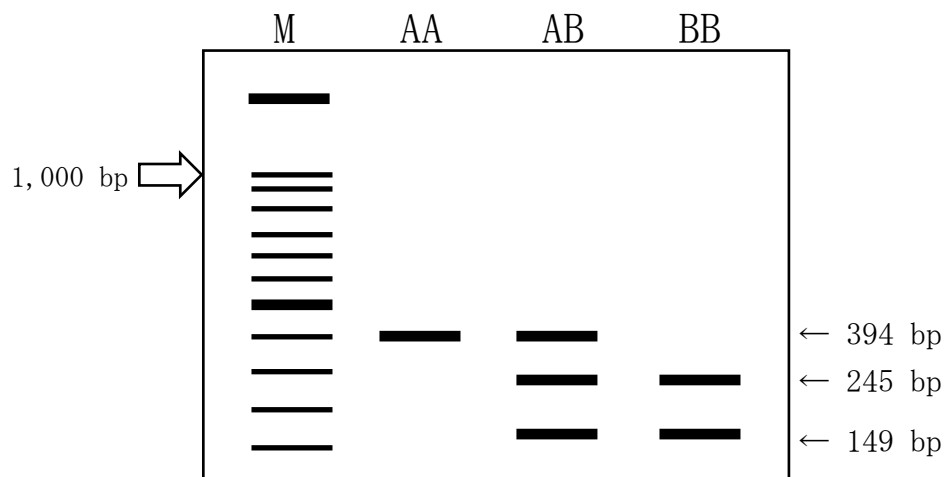
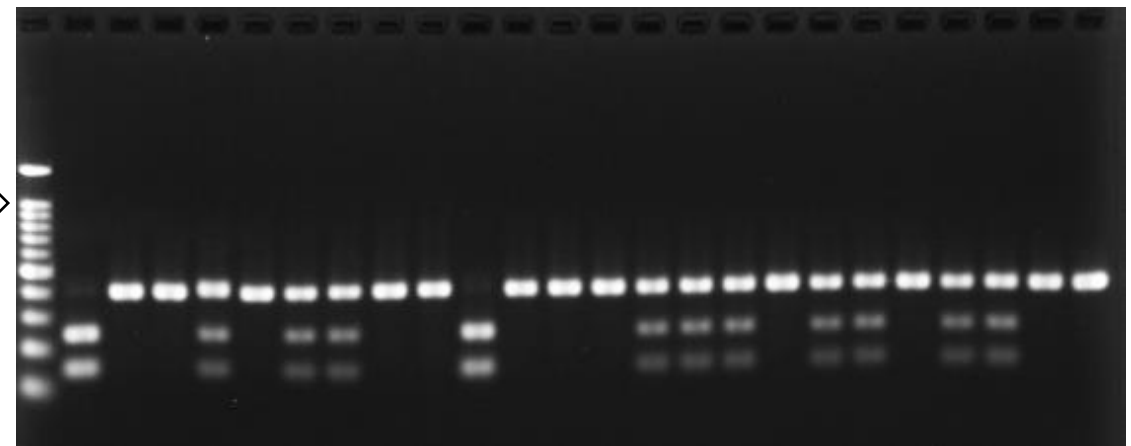
PCR 增幅

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24

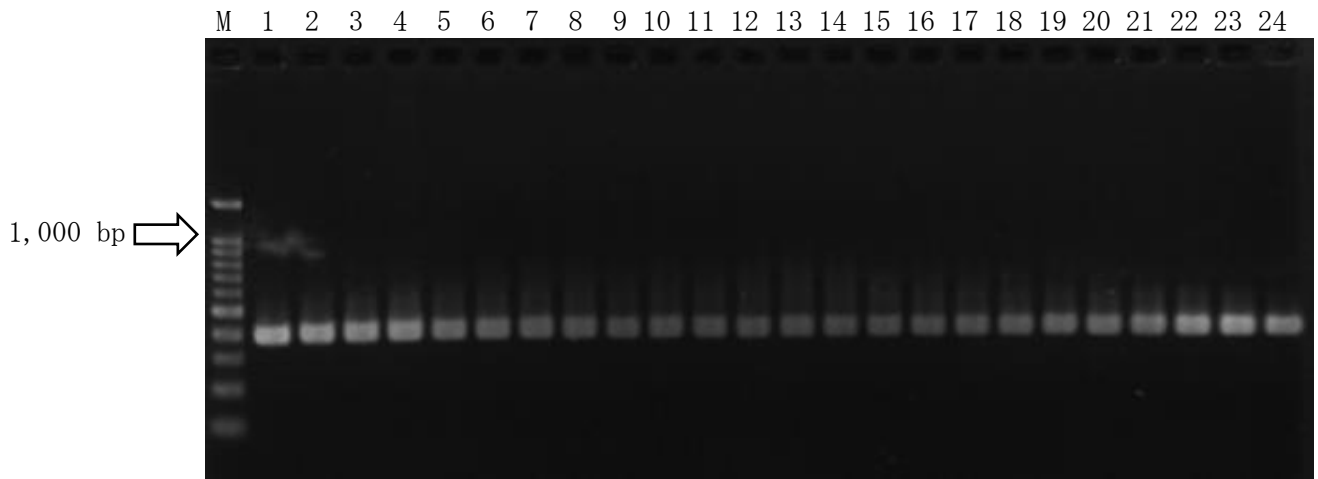


制限酵素処理後

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24



PCR 增幅



制限酵素処理後

