令和８年度ガザミマイクロサテライトDNA分析業務委託仕様書

1 分析内容

ガザミのDNA抽出、マイクロサテライトDNAの分析、遺伝子型の決定

2 分析予定検体等

（１）分析予定検体数：1,000～2,000検体（漁獲状況により増減有）

（２）分析検体：県が送付するガザミ検体（エタノール保存）並びにDNA抽出液。ガザミ検体は、漁獲物、種苗（約5～10㎜）、種苗生産に用いた親ガニ。

（３）検体発送時期：検体は、契約締結後、3回程度に分け送付する。検体等の送付に係る費用は、受託者が負担する。

3 分析方法

（１）DNA抽出

① エタノールで保存したガザミ検体から、1検体ごとにDNAの抽出を行う。抽出後は、RNase処理によりRNAの除去を確実に実施すること。

② DNA抽出液は、（２）で使用するほか、1.5mlマイクロチューブに濃度10ng／μl以上の溶液を、少なくとも20μl以上入れて納品するものとする。

（２）マイクロサテライトDNAについて、以下のプライマー（Applied Biosystems社が提供する7塩基のテール配列は付加しない）を用いてPCR反応で目的領域を増幅した後、DNAシークエンサーApplied Biosystems 3730 xl DNA Analyzer を用いて増幅産物のサイズを測定する。その際、サイズスタンダードにはGeneScan™ 600 LIZ Size Standard(Applied Biosystems社製)を使用する。また、キャピラリー長及びランモジュールについては、委託者の指示に従う。

＜プライマー配列＞

PT69（色素VIC）
Forward: 5’-TTATAATGTAGGCGCTCGCTGGAC-3’
Reverse: 5’-CCTTCCTCTGCTGCGTCTCGTC-3’

PT720（色素NED）
Forward: 5’-CAGGGAGGCTGAGACAAGGTGTGT-3’
Reverse: 5’-TCAGTGCGTGGTGTAATCATGTCA-3’

PT322（色素PET）
Forward: 5’-GCCAGTCCACTAGTCGTACGGTCA-3’
Reverse: 5’-ATGGAGACGTGACCGAGATTGCAT-3’

PT659（色素PET）
Forward: 5’-TCACGGAAGGACTGAATAGAGACG-3’
Reverse: 5’-TTTCTGGCAGTCCTTTCCTTTCAA-3’

C5（色素VIC）
Forward: 5’-TGTAGGTAGATAGGTAGGAAGG-3’
Reverse: 5’-ATGAACTGAGCACAGGAG-3’

C6（色素FAM）
Forward: 5’-CGCTACCTCTACTCATCC-3’
Reverse: 5’-GTGTCTAGTGCGTCCAAC-3’
C13（色素FAM）
Forward: 5’-CTGTCTGATGAGTGAGGCTAC-3’
Reverse: 5’-TGACCACGAGGAAAGGAG-3’
H11（色素NED）
Forward: 5’-GCCCTGATACTCGGTGAA-3’
Reverse: 5’-GGAGCAGAGGCAGCAATA-3’

- 遺伝子型の決定については、解析ソフト（株式会社 Applied Biosystems社製 GeneMapper）を用い、検体ごとに行う。
- 別途送付するサイズスタンダードのチェック表、もしくは任意の様式にてサイズスタンダードの波形が良好であるかどうか、サイズの設定が正しいかどうかを確認し、確認した結果を成果品として納品すること。
- 分析値（アリル値）は少数点第２位まで記載すること。
- その他、疑問がある場合や詳細は委託者の指示に従うこと。

４ 成 果 品

（１）DNA抽出液　　１検体につき１本
（10/100検体の割合でDNAの濃度を分光光度計で測定し、その結果を添付すること）
但し、納品するマイクロチューブには読み返しが可能な方法で指定されたサンプル番号を付すこと。

（２）シークエンス波形データ（電子ファイルのみで可）　１式

（３）泳動結果生データ（拡張子が「.fsa」の電子ファイル）　１式

（４）遺伝子型決定結果（電子ファイルのみで可）　１式

（５）サイズスタンダードチェック表（電子ファイルのみで可）　１式

なお、（２）シークエンス波形データについては、委託者が指定した様式でファイルごとのサンプル内訳を示すこと。（３）遺伝子型決定結果については、マーカーの順番を、C5、C13、H11、PT659、C6、PT322、PT69、PT720の順で結果に示すこと。

５　納入期限

令和９年３月12日（金）

６　納入場所

佐賀県有明水産振興センター
（〒849-0313　佐賀県小城市芦刈町永田2753-2）

参考資料

＜反応液＞

10×Buffer	1μl
dNTPs	1μl
25mM MgSO4	0.6μl
プライマー Crab12S-4	0.1μl
D-DR	0.1μl
KOD-Plus-Ver.2	0.1μl
DW	6.1μl
サンプル(1～10ng/μl)	1μl
合計	10μl

＜PCRサイクル＞

94℃	1分	
94℃	30秒	
48℃	1分	30サイクル
72℃	3分	
72℃	7分	
4 ℃	∞	