

ニワトリ・ウズラのDNA検定方法と手順の改善

○高間瑠佳^{A)}

^{A)} 生物・生体技術支援室 生物機能解析・実験実習技術グループ

概要

ニワトリとウズラは鳥類を代表するモデル動物であり、ライフサイエンス研究において不可欠な生物資源である。生命農学研究科の附属施設である鳥類バイオサイエンス研究センターは、研究用のニワトリ・ウズラの系統を保存し、また学内の研究室だけでなく外部の研究機関にも生体・種卵・血液・臓器等のリソースを提供することを目的として運営されている。現在、飼育・維持しているニワトリは約30系統・約1200羽、ウズラは22系統・約2000羽である。

今年度はニワトリ・ウズラのうちDNA検定の必要な系統について、採血及び検定の業務を受け持つことになったので、この手順を紹介し、またスムーズに行うための手順の改善をおこなったことを発表する。

1 DNA 検定とは

生物の個体に特定の遺伝子が入っているかを、PCR法などを用いて判定する作業のことである。主な手順を以下に載せる。

- ① 有核細胞の採取
- ② タンパク質分解をして核膜内のDNAを精製する
- ③ DNAのうちの必要な部分だけを増やす（PCR）
- ④ 電気泳動でDNAを分子量毎に分離する
- ⑤ DNAを染色し、撮影する
- ⑥ 対象のDNAの有無を判定する

PCR法について説明する。PCRとはPolymerase Chain Reaction（ポリメラーゼ連鎖反応）の略で、DNAを複製させ増やす方法である。DNAは2本鎖の形状をしているが、およそ95℃にすると2本が離れ、冷やすと相補的な配列同士が結合する特性がある。DNAは4種類の塩基「アデニン」「チミン」「シトシン」「グアニン」が材料として必要である。また増やしたいDNAの配列を調べ、その部分に結合するように「プライマー」という合成DNAを準備しておく。さらに、DNAを複製させるための酵素「DNAポリメラーゼ」が必要である。これら塩基とプライマーとサンプルのDNAとDNAポリメラーゼを混ぜ合わせ、温度コントロールができる「サーマルサイクラー」に入れることで、目的のDNAを大幅に増やすことが可能になる。

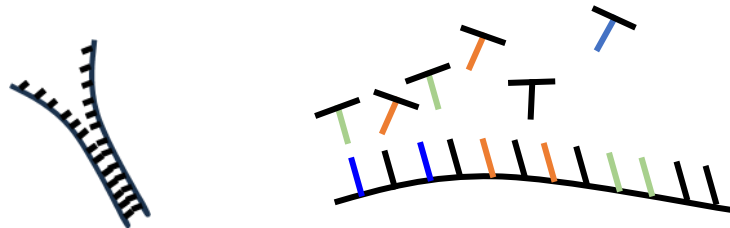


図1 DNAの増やし方イメージ

人間の赤血球は無核細胞なので、簡便にDNAを調べる場合は口腔内の粘膜を採取することが多い。しかし

鳥類の赤血球は有核細胞のため、血液を少量採取するだけで簡便に DNA 検定が行える。

2 ニワトリの DNA 検定

2.1 ニワトリの採血

ニワトリの採血は、通常の DNA 検定では中雛～大雛（3～6 ヶ月）に行う。ニワトリは生後すぐに個体識別タグを取り付けるので、採血では個体識別番号とサンプル番号を記録しながら行う。一人が雛を保定し、左翼の静脈から注射器（注射針 23G×1" R・B に 1ml のシリンジ）を使用して約 500 μ l を採血する。注射器にはあらかじめ血液が凝固しないように 10 μ l ほどのヘパリンを入れておく。採血後は冷蔵保存をする。

2.2 ニワトリの検定作業

最初にタンパク質分解を行う。8 連チューブをサンプルの本数分用意し、番号を付ける。タンパク質分解液を調液する。ニワトリでは分解酵素に Proteinase K を使用する。サンプル 1 本あたり Proteinase K を 0.5 μ l、Lysis Buffer を 30 μ l で調液し、8 連チューブに分注する。作業机にラップを敷き、注射器から血液を 1 滴（約 40 μ l）出し、そこから 2 μ l を採取して 8 連チューブに添加する。8 連チューブの蓋をし、サーマルサイクラーで 50°C 30 分加熱して分解、さらに 95°C 5 分加熱して Proteinase K を失活させる。常温に戻して遠心分離を行う。13300rpm で 3 分間遠心分離をし、固形物を沈殿させる。新しい 8 連チューブを用意する。これにサンプル番号を付け、MilliQ 水を 30 μ l ずつ入れる。ここに遠心分離で得られた上澄みを 1 μ l 採取し希釈する。

- ① 8 連チューブを用意
- ② Proteinase K 分解液を 1.5 μ l チューブか 15ml チューブで調液、8 連チューブに分注
- ③ 血液を 2 μ l 採取し 8 連チューブに添加
- ④ サーマルサイクラーで加熱・分解・失活
- ⑤ 遠心分離
- ⑥ 新しい 8 連チューブに MilliQ 水を 30 μ l 分注、サンプル上澄み液を 1 μ l 添加し希釈

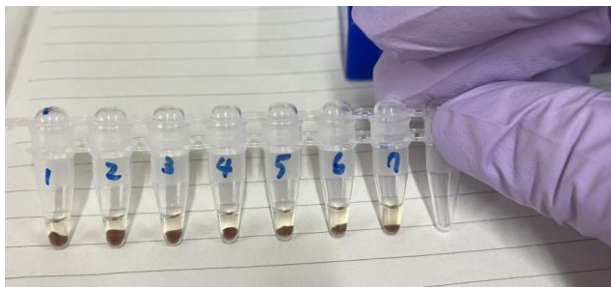


図2 8 連チューブ（タンパク質分解後遠心分離した状態）

次に、PCR を行う。当センターでは、ニワトリでは 3 種類の検定があり、プライマーやサーマルサイクラーでの温度操作は異なるが、最初に KOD Fx Neo Buffer（バッファー）・dNTPs（デオキシヌクレオシド三リン酸：4 塩基を含む）・プライマー・KOD Fx Neo（DNA ポリメラーゼ）を混ぜ合わせ、1 本あたり 9 μ l になるように MilliQ 水を加えた反応液「PCR Mix」を、サンプル本数+予備 2 本分+コントロール 2 本分を調液する。これを 8 連チューブに分注してからサンプル DNA 希釈液を 1 μ l 添加し、サーマルサイクラーにセットして DNA を増幅させる。

- ① 1.5ml チューブに Mix 調液
- ② 8 連チューブに分注
- ③ サンプル希釈液を添加

④ サーマルサイクラーで増やす

増やした DNA に制限酵素を使って「特定の DNA 配列が入っていれば切れる／入ってなければ切れない」という追加作業を行う検定もある。この場合 PCR を行った後に、制限酵素を含む第2反応液を調液し、8連チューブにさらに添加し、恒温槽で一晩反応させる。

全ての反応を終えたサンプルを電気泳動で分離する。電気泳動に必要なのはアガロースゲルである。アガロースゲルはアガロースを電気泳動で使用する緩衝液で溶かし固めて作成するゲルのことである。鳥センターでは TAE（トリスヒドロキシメチルアミノメタン・酢酸・EDTA からなる緩衝液）を使用する。ニワトリの3検定では1.5%のアガロースゲルを作成するが、作成には40分程度かかるので、PCRをかけている間に行うと時間の無駄がない。また、アガロースゲルにサンプルを添加する際、目視で添加がうまくできているか／泳動が問題なく行えたかを確認するために、サンプルに色素「ローディングダイ」を添加しておく。ローディングダイはサンプル液が緩衝液内に自然拡散せずゲル内に均等に沈むように比重添加剤も入っており、目的の DNA のサイズを考慮した色素を選ぶ。ここでは青色のブロモフェノールブルーを使用している。

- ① アガロースを TAE で溶解
- ② ゲルケースに流し入れ、コームを挿して固定・放熱
- ③ PCR 済サンプル液にローディングダイを添加
- ④ ゲルを電気泳動槽に入れサンプルを注入
- ⑤ 泳動スタート

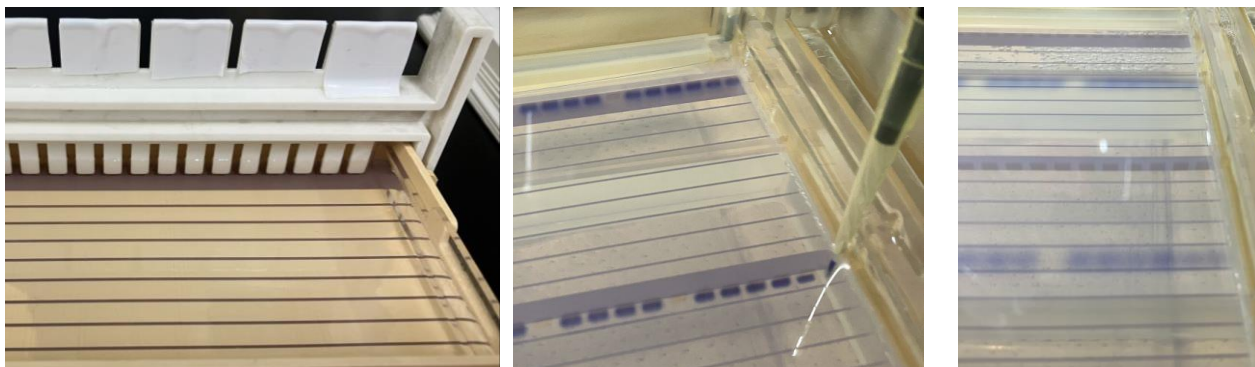


図3 検定作業の器具 左：アガロースゲル②,中央：ゲルにサンプル注入④,右：泳動後⑤

アガロースゲル内で DNA のサイズごとに分離した DNA は、このままではまだ視覚的に確認できないので、DNA を染色する。Gel Red という染色液に20分ほど漬け込み、シアン色（ピーク 505nm）に対して蛍光発光させる。これを撮影する。サンプルと一緒に比較対照（陽性（Positive）・陰性（Negative））をサンプルと同時に PCR にかけると判定しやすい。

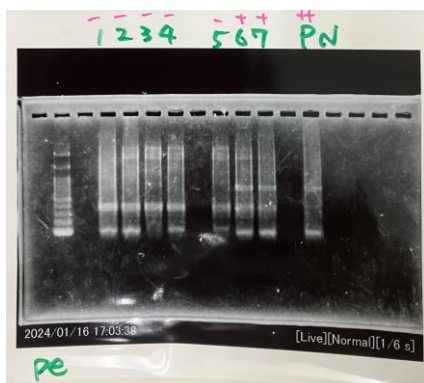


図4 アガロースゲル撮影例

3 ウズラの DNA 検定

3.1 ウズラの採血

ウズラの採血は、生後 1~2 週で行う。生後 1 週未満では、体が弱く多少の傷で死んでしまう恐れがある。またウズラは飛翔能力が高いので逃亡する危険があり、また頭部をコンテナ天井にぶつけて怪我をする恐れがある。ウズラはニワトリに比べると成長スピードが速いので、雛の時点で個体識別のタグをつけると成長に支障をきたすため、成鶏になるまで金属タグ無しで育成する。採血は飛翔逃亡の危険度が低いヒナのうちに、個体識別用のビニルテープで仮付けをして行う。ウズラで通常行う DNA 検定は、ある 2 系統について系統造成のため 3 週間ごとに孵化を行っており、早めに目的 DNA の有無を特定し選抜する「スクリーニング」をする必要がある。少量の血液を採取して手早く結果を出している。

また、ウズラの採血は一人で行う。ヒナの保定と採血はそれぞれ片手で行えるからである。

- ① ヒナをケージからコンテナに移す
- ② ヒナに個体識別テープを付ける
- ③ 血液保存用 1.5ml サンプルチューブを用意する
- ④ 左手で雛を持ち、右翼の内側が表に出るように保定する
- ⑤ 右翼の内側の静脈に傷をつけ、少量の血液が出るようにする
- ⑥ 右手でサンプルチューブの蓋を開け、血液を掬い取る（5~20 μ l 程度）
- ⑦ ヒナをケージに戻す
- ⑧ ②に戻り繰り返す



図5 ウズラの採血作業 左：個体識別テープ装着②,右：保定④

3.2 ウズラの検定作業

ウズラの検定作業は、ニワトリとあまり変わらない。ただし採血方法が異なりヘパリンを使用していないため、採血後できるだけ速やかにタンパク質分解を行う必要がある。

タンパク質分解を行う前に、サンプルチューブの壁面に付着した血液を底にまとめる必要がある。遠心分離を 15000rpm で 1 分間行う。タンパク質分解液には、サンプル数が 30 本程度なら KANEKA Easy Extraction Kit を使う。

- ① 遠心分離
 - ② チューブに直接 Kit の A 液を 100 μ l 添加
 - ③ チューブをサーモブロックで加熱 98°C 8 分
 - ④ 放熱し常温になったら Kit の B 液を 14 μ l 添加
- 40 本以上ならばニワトリと同じ Proteinase K を使用する。

- ① 遠心分離
- ② 8連チューブに Proteinase K 分解液を分注する
- ③ 遠沈後の上澄み液を 2 μ l 採取し、8連チューブに添加
- ④ Proteinase K の加熱方法で分解

4 ウズラの作業手順見直し

4.1 採血の手順の見直し

ウズラは元々小型なので、雛の段階に注射器で採血することができない。またニワトリと比べると成長スピードが著しく早く、孵化直後の雛に個体識別タグをつけると致命傷をつける恐れがあるため、金属タグを付けられない。このため雛の時点で採血する際の個体識別や採血後の検定作業は、ニワトリと違って手間がかかる。そこで手間・時間を少しでも減らす取り組みを行った。

最初に、個体識別仮タグ（ビニルテープ）の作成について、採血日の前日までに前倒しで行うことにした。採血日の当日にこれらの作業も行くと、検定作業を定時時間内に終えることはおよそ不可能である。私の担当業務は鶏舎での飼育管理もあり、検定作業だけに日数を割くことはできない。当初は週に1日だけを検定作業に充てていたが、個体識別テープは2週間ほどで自然に剥がれ落ちてしまうので、時間との勝負でもある。できるだけ識別テープを付けて1週間ほどで結果を出す必要がある。このため、検定作業の時間を週に1日半に増やしたうえで、雛への識別テープの装着の作業を前日の1時間弱を使って前倒しで行うことにした。

採血作業はケージから雛を出しコンテナに移し替えてから、コンテナから一羽ずつ取り出し採血が終わった後にケージに戻すため、コンテナから取り出す前に番号を付与しても取り出すときは順不同になる。改善案の第1案は「テープは番号無しにして付与し、サンプルチューブのみに番号を書いておく。テープの番号は取り出したときに記入」としていた。採血手順の原案の「取り出した順番に番号を付ける」を踏襲したものであった。また、順不同で取り出すとチューブの取り間違えや、識別テープの剥がれ落ちで番号の抜けが発生する恐れを排除するためだった。しかし実際にやってみると、採血直前にテープに番号を記入する方が手間であることが分かった。なぜなら、テープに雛の糞が付着していることが多いため、記入前にテープの汚れを拭き取る作業が必要になったからである。

そこで改善案第2案は「テープにあらかじめ番号を記入、サンプルチューブをチューブスタンドに入れて使用状況を把握」にした。採血前日の時点で、識別テープの番号を記入しておくことはできる。そしてすべての雛に識別テープを付けた後、サンプルチューブを用意し番号を書いておく。またチューブスタンドに番号順に並べることで、チューブの取り違いを防止し番号の抜けがあっても把握しやすくなった。前日の準備に多少時間がとられるが、採血日の作業時間は短縮できる。テープの剥がれ落ち対策に、当日の作業では予備の無記入テープとペンを用意している。

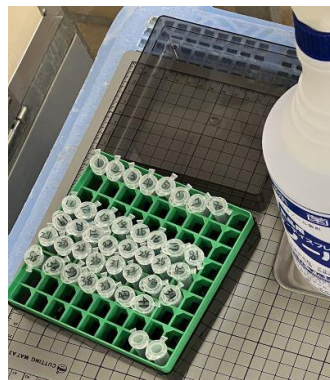
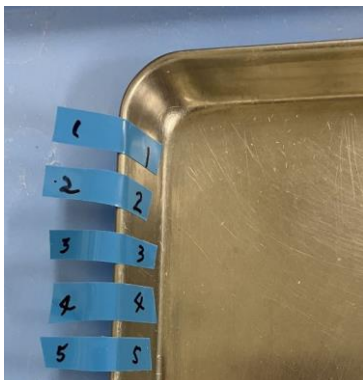


図6 採血作業道具 左：個体識別テープ,右：サンプルチューブスタンド

表1 採血作業手順の改善案の比較

	原案	変更1案	変更2案
時間	× 一日で検定が終わらない	▲ 当日の番号記入は 時間がかかる	○ 前日の準備がやや長い が当日は早く終わる
個体識別	▲ 移しながら装着するのは 逃亡リスクあり	○ 前日確認 (ナンバリングは当日)	○ 前日装着 (当日番号抜けの恐れ)
採血順番	○	○	○ ランダムだが問題ない

4.2 ラボ作業の手順の見直し

作業で時間が足りない場合は、どこか区切りの良いところで切り上げ、後日に回す必要がある。この検定作業で区切りの良いところは、電気泳動の手前である。サーマルサイクラーでDNAを増やしている間にアガロースゲルを作成する同時作業はできる。しかし電気泳動から先の作業は、ゲルという乾きやすい物質を扱っているため①ゲルにサンプルを注入する作業、②泳動、③DNA染色、④撮影までは途中で止めて後日に回すことができない。またこの一連の作業は1時間弱の時間を要する。そのため、16時の時点でPCRが終わっていない場合、またはゲルの作成が終了していない場合は、検定作業を後日に回さなければいけない。PCRの時間中に作成したアガロースゲルが使用できずに浮いてしまう。

そこでアガロースゲルを乾燥しないように溶媒に浸して冷蔵保存しておく、一週間ほどは使用可能であることを教員よりアドバイスを受けた。タッパーにゲルと溶媒・緩衝液のTAEを被る程度に入れ4℃の冷蔵保存をする。これによって、採血日に検定作業を全て終了できなくても予備日の半日を使えば、採血日の一週間以内に結果を出すことが可能になった。

また、PCR Mixの調液内容については原案の配合量を変更した。変更点は、①KOD Fx Neo（DNAポリメラーゼ）の効きが弱いため、原案では1本あたり0.1μlだったのを0.15μlに増量、②試料の添付量を扱いやすくするため、タンパク質分解後に3倍希釈をしたうえで原案0.5μlから2.4μlに増量、の2点である。

更にPCRでのサーマルサイクラーの温度設定も何回か変更して、明瞭でDNAの分離ができたゲルの写真を撮影できるようになった。

5 もう一つの改善点

もう一つ大きな改善をしたことがある。それは老眼鏡の導入であった。この一年で手元の視野について鮮明に見ることが難しくなっていることを自覚した。これはDNA検定作業においても、例えば採血の際にウズラの血管の位置が鮮明に見えないことによって、ウズラに余計な傷を負わせてしまう恐れがあり、保定時間が長くなることも、動物福祉の点からも懸念される事項である。老眼鏡を今期初めて作り使用したところ、血管の位置を格段に把握しやすくなった。動物福祉の点からも改善でき、また採血の作業時間の短縮につながった。その分検定作業の時間を長く確保しやすくなり、判定も早く出せる。

また老眼鏡の導入は、検定の作業を行う上でも改善につながっている。初期の頃はサンプルを1μl添加するときにピペットできちんと吸い取ることができているか、添加することができているのかを、何度も目視

して確認していた。老眼鏡の導入によって、1回の目視確認で済むようになった。これにより作業時間の短縮化につながっており、結果として判定が1週間以内に出すことがほぼ可能になった（サンプル量・精密判定を要しない場合）。

参考文献

- [1] 名古屋大学大学院生命農学研究科附属鳥類バイオサイエンス研究センター(ABRC)ホームページ
(<https://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~abrc/>)
- [2] 中山広樹，“細胞工学 別冊 目で見える実験ノートシリーズ バイオ実験イラストレイテッド③新版 本当にふえるPCR” 秀潤社
- [3] ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社「PCR ってなんですか」
(<https://www.roche-diagnostics.jp/solutions/diagnostic-solutions/pcr#de4d03d9-7009-4ed3-872a-364735172493>)
- [4] アトー株式会社「アガロースゲル電気泳動 基本操作」
https://atto.co.jp/content/download/8675/97802/file/Application+Note+AgaroseEP+basic_210129.pdf
- [5] コスモ・バイオ株式会社「アガロースの調整の仕方」
<https://www.cosmobio.co.jp/support/technology/agarose-gel-electrophoresis/agarose-preparation-recommendations-cda.asp>