

ウズラのナンバリング方法の改善

およびニワトリ DNA 検定における PCR プロトコルの検討

○高間瑠佳

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。

今年度はウズラの DNA 検定におけるサンプルのナンバリング方法の改善、および、新規に導入した遺伝子改変ニワトリのスクリーニング検査に必要な PCR のプロトコルを検討したので、この手順を紹介する。

1 ウズラのナンバリング方法の改善

昨年報告したウズラの個体識別方法の脚に取り付ける番号仮タグ（ビニルテープ）について、再検討を行った。

1.1 採血方法と個体識別用ビニルテープについて

ウズラの採血は、生後1～2週程度で行う。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ケージから出した後の取り扱いが難しく、また頭部をコンテナ天井にぶつけて怪我をする恐れもある。ウズラはニワトリに比べると成長スピードが速く、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。採血は飛翔能力の低いヒナのうちに、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、トランスジェニック系統の樹のために後輩を進めており、3週間ごとに孵化する個体について、早めに目的 DNA の有無を検定し選抜する「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。

- 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（5～20μl 程度）
- ⑦ ヒナをケージに戻す
- ⑧ ②に戻り繰り返す

1.2 仮タグテープの改善

昨年度までは、個体識別用のビニルテープをそのまま脚に巻き、テープの粘着力のみで固定していた。これは作業の前任者であった奥崎助教から指導を受けた方法である。しかしこのビニルテープの粘着力のみで固定する方法は、2週間保持するのは難しいという話であった（2週間で1〜2割が脱落）。この方法は、学生や教員がニワトリの雛でスクリーニングを行う際の方法である。スクリーニング作業を2日連続で行うことが可能なので、数日間テープが外れなければ検査に支障が出ない。

一方鶏舎の作業（飼育や清掃など）を週に3日（週明け＋水曜日＋週末）以上行う私は、スクリーニング検査に連続2日間確保することは不可能である。最速で4日間、長くて3週間（祝日などで検査作業の日が確保できないこともある）かかる検定が終了するまではテープが外れないように改善する必要がある。結果が出る前にテープが外れてしまうと検査を出しても個体の識別ができなくなる。

そこで、ビニルテープの両端を貼り合わせた部分にホチキスを打つことにした。



図1 ウズラの個体識別仮テープのホチキス止め

ホチキス止めをしたテープは、針が安全に付いたまますっぽり抜け落ちることはあるがその頻度は低く、3週間での脱落率は1〜5%程度であった。一度に30羽を扱う場合だと0〜2羽程度で済む。1羽のみが脱落した場合ならば脱落した個体の識別番号は特定できる。2羽以上のテープが脱落した場合は再検定が必要になるが、ホチキス無しの場合よりも損失を低く抑えることができた。

なお、脱落したテープは針が外れずにそのまま抜け落ちるため、針でウズラが傷つくことはない。またテープのサイズは、ウズラの口には容易に入らない大きさのため、誤食も発生していない。

2 ニワトリのPCRプロトコルの検討

2.1 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

このうち、新たな系統のニワトリやウズラを飼育し系統保存を行うために新たな遺伝子を対象として DNA 検定を行うには、③の PCR の手順を一部変更する必要がある。

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、特異の DNA を効率よく複製させ増やす方法である。DNA は 4 種類の塩基「アデニン」「チミン」「シトシン」「グアニン」の配列情報を遺伝情報として保有し、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。増やしたい DNA の配列の特徴に結合するように「プライマー」という短い合成 DNA を準備しておく。DNA を複製させる酵素「DNA ポリメラーゼ」が結合したプライマー末端に 1 つずつ特定の塩基を含むヌクレオチドを伸長していくことで相補的な DNA が合成される温度変化により DNA を 1 本鎖→プライマー結合→合成と制御することが可能で、温度サイクルを繰り返すことで指数関数的に目的 DNA を増幅させることができる。このため、これら塩基（正確にはヌクレオチド）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。

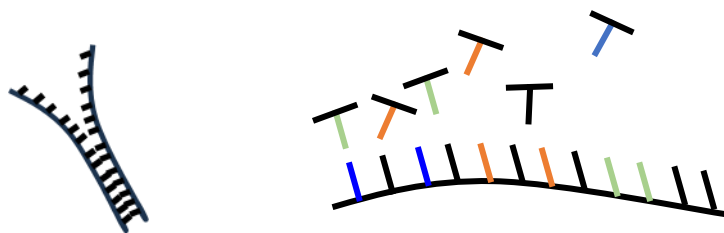


図1 DNA の増やし方イメージ

人類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 抽出が行える。

2.2 新たに導入した遺伝子組換えニワトリの PCR プロトコルの検討

今年度、新しく導入した遺伝子組換えニワトリ（他大学にて開発された系統）において、導入遺伝子の有無を検定（スクリーニング検査）するための PCR について、増幅条件の検討を行った。

検討する項目は①PCR に使用する成分の濃度と使用量、②DNA を増幅させるための温度設定（プロトコル）である。

PCR 用調整液は 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）の 4 要素で構成される。検討する要素は、プライマーの濃度とサンプル量である。プライマーやサンプルの濃度が高過ぎると、必要なバンド以外のバンド（非特異バンド）が増えてしまい、電気泳動をかけても判別が難しい。逆に濃度が低過ぎると PCR であまり増えないので、判別できない。プライマーの濃度は原液で 100 μ M だが、10 μ M に希釈分注し、PCR 反応液では従来の標準は 0.5～1.2 μ M であるが、1 μ M になるようにした。サンプルの濃度、使用量については、これまで他のニワトリでの PCR を行う際と同じ 450 倍希釈 1 μ L にした。

次に PCR プロトコルを検討した。プロトコルとはサーマルサイクラーでの温度サイクル設定のことで、DNA 2 本鎖を解離させ、ポリメラーゼが dNTPs を材料に特定 DNA の部分を増やしていくために、温度を上

げたり下げたりを繰り返す条件である。この仕組みを以下に記す。

① 熱変性

（高温に上げると、二本鎖 DNA は一本鎖 DNA に分離する）

② アニーリング

（温度を下げると、一本鎖 DNA にプライマーが付着する）

③ 伸長反応

（温度を DNA ポリメラーゼの至適温度まで上げると、DNA ポリメラーゼによりプライマーに隣接する DNA が合成され二本鎖になる）

① に戻って 25～35 回繰り返す

このうちアニーリング・伸長反応の温度設定を変えることによって PCR 反応の増幅効率が変わる。

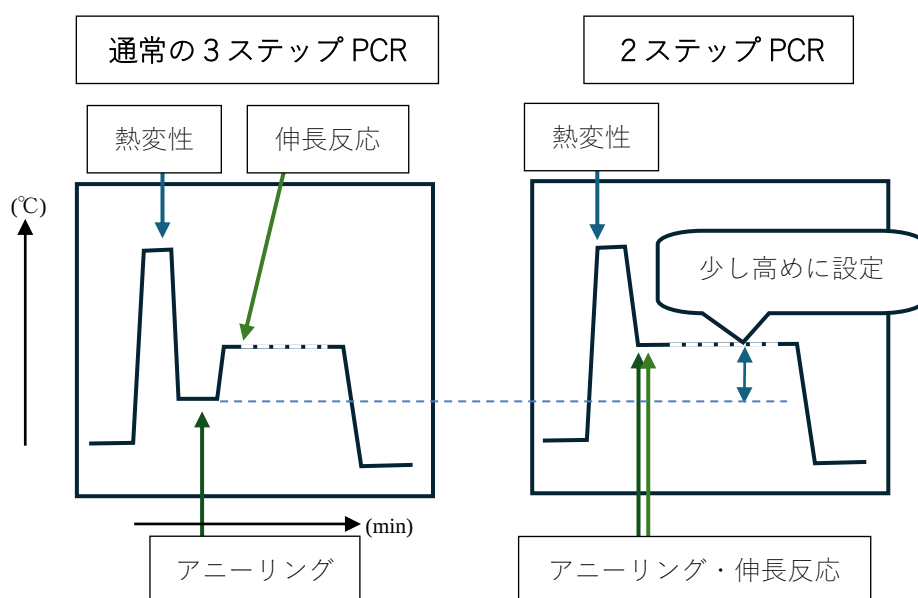


図2 PCR プロトコルの基本パターン

アニーリングの温度を考える上で必要なパラメータに「 T_m 」がある。 T_m とは、Melting Temperature、融解温度のことである。プライマーがターゲット配列と50%の割合で2本鎖を形成する温度である。そのため温度が低い方が2本鎖を形成している比率が高くなると言える。 T_m はDNA・プライマーの長さと配列を元に、「最近接塩基対法」などの計算方法から出すことができる。そして、アニーリング・伸長反応の温度を検討する上で基本ルールは以下の4つがある

- ・ アニーリング温度は $T_m^{\circ}\text{C} + 5$ 位で試し、増えなかったら下げる/エキストラバンドが多ければ上げる
- ・ 3ステップは沢山増やせるがエキストラバンドも増える
- ・ 2ステップは増えにくいエキストラバンドは減らせる
- ・ プライマーの T_m が $60\sim 68^{\circ}\text{C}$ の場合は2ステップを試す

今回のプライマーの T_m は $52\sim 58^{\circ}\text{C}$ であることから第1案では 56°C とした。各プロトコルの結果を図3・4・5に示す。

第1案（時間は分：秒）（図3）

94℃	2:00	
98℃	0:10（熱変性）	} ×36 回繰り返す
56℃	0:30（アニーリング）	
68℃	0:30（伸長反応）	
68℃	7:00	
10℃	∞	

ポジティブコントロール（種卵の親世代で陽性が確定している成鶏の DNA を含有する試料。赤い三角▼）を上段下段で2つずつ入れたのは、提供された2本のポジティブコントロールのバンドがちゃんと見えることを最優先の確認事項としたためである。その結果は達成したが、目的以外のバンド（エキストラバンド）が数本あり、また全体的に白くなるスミアが発生した。そこで第2案では、アニーリングの温度を上げ60℃にした。

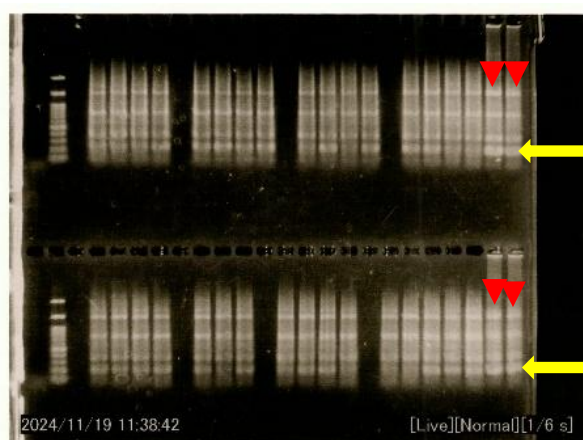


図3 温度設定第1案の結果（赤三角がポジティブコントロール・黄矢印が目的のバンド）

第2案（図4）

94℃	2:00	
98℃	0:10（熱変性）	} ×36 回繰り返す
60℃	0:30（アニーリング）	
68℃	0:30（伸長反応）	
68℃	7:00	
10℃	∞	

（アニーリング温度を56℃→60℃に変更）

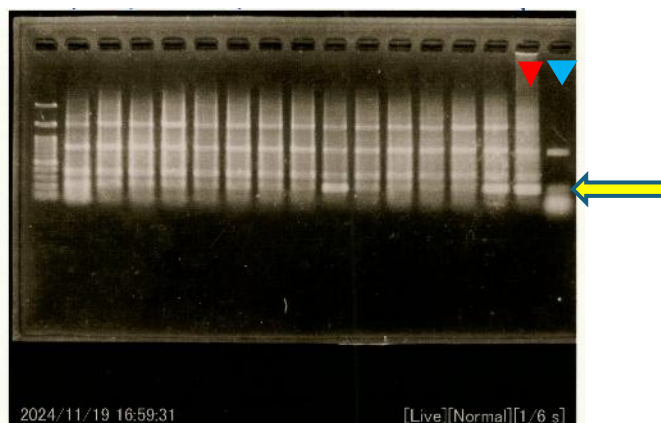


図4 温度設定第2案の結果（青三角はネガティブコントロール（MilliQ 水））

アニーリング温度を上げたが、非特異バンドは減少しなかった。そこで第3案は3ステップ法でなく2ステップ法を試すことになった。アニーリングと伸長反応を68℃で同時に行うことにした。

また、ネガティブコントロール（DNA 試料の代わりに MilliQ を入れたもの。MilliQ は PCR 調液にも使っているため、調液にコンタミがない証明になる）にバンドが認められた。MilliQ はディスポチューブに取り置いた後何回か使い続けていたが、これがコンタミにつながる恐れがあると考え、この後からは作業毎に新しく MilliQ を取り替えることにした。

第3案からは電気泳動の設定も変更することにした。泳動の時間は第1案・2案では17分だったが、ゲルにまだ余裕があったため、20分まで延長することにした。これにより、バンドの分離に時間をかけることになるのでバンドの間隔が広がり見やすくなることが期待できる。

第3案（図3の右）

94℃	2:00	
98℃	0:10（熱変性）	
68℃	0:30（アニーリング・伸長反応）	
68℃	7:00	
10℃	∞	

（アニーリングと伸長反応を68℃に統一し2ステップに変更）

全体的に白くなるスメア状態がなくなり、エクストラバンドの濃度が下がって薄くなり、目的のバンドがはっきりと確認できるようになった。ネガティブコントロールの非特異バンドがほぼ出なくなったので成功したと言って良い。

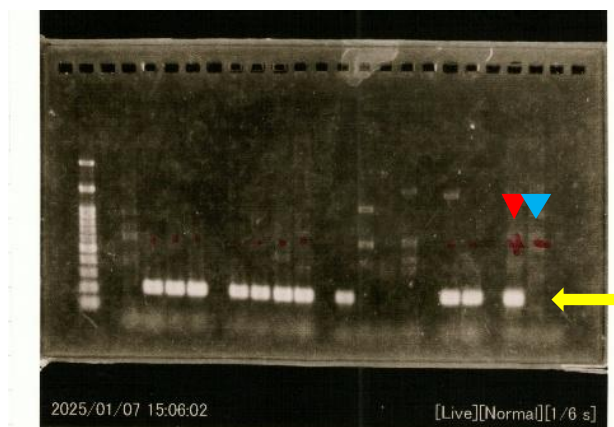


図5 温度設定第3案の結果

3 まとめ

今回の検討作業を通じて、PCR の原理やプロトコルの仕組み・意味の理解が深まった。3ステップ法は目的のバンドが少ない（1コピー程度）場合は増やしやすいう方法であるが、目的以外のバンド（エクストラバンド）も増えて判別しにくいこともある。むしろ2ステップ法から試しても良いようである。

次年度以降は自分で新しいプロトコルの検討作業ができるようになると思う。

最後に、この技術発表会におけるポスター及び報告書について、鳥類バイオサイエンス研究センターのセンター長西島謙一教授、奥崎奥寄雄也助教、植村武夫技術員、全学技術センターの厚味智子主任技師、伊藤

麻里子主任技師の皆様から添削とご指導を頂いた。厚く御礼申し上げます。

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] ニワトリ・ウズラのDNA検定方法と手順の改善，高間瑠佳，第3回東海国立大学機構技術発表会
- [3] PCR条件の最適化ってどうやるの？PCRが初めての人に教えてあげたいちょっとしたコツその2
<https://www.thermofisher.com/blog/learning-at-the-bench/pcr-basic2/>
- [4] 実験医学別冊 目的別で選べるPCR実験プロトコルー失敗しないための実験操作と条件設定のコツ，佐々木博己編著，青柳一彦・河府和義著，羊土社