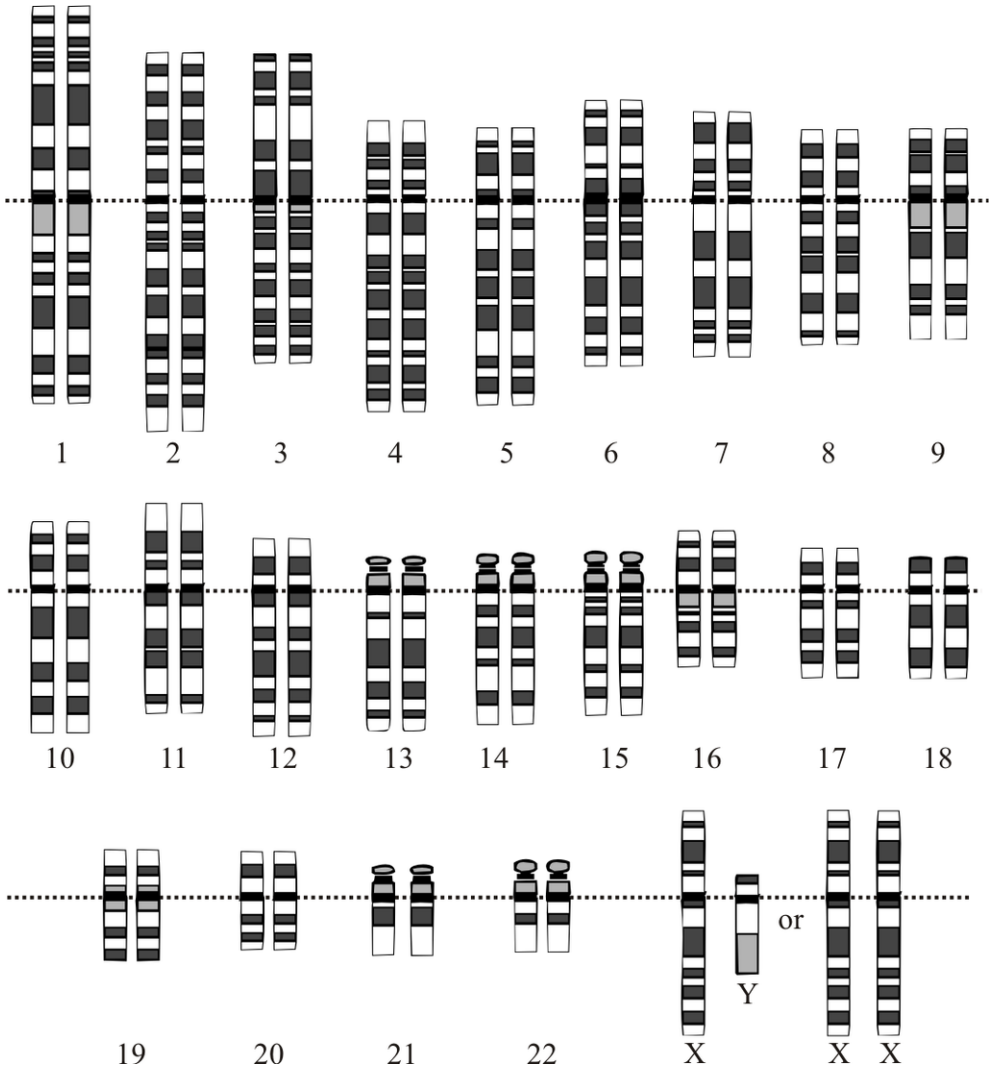
動物生命機能学実験

PCR による genotyping: 鳥類の雌雄鑑別

高谷 智英
t-takaya.net

Oct 19, 2018

性決定：常染色体と性染色体



ヒトの細胞は、
22対44本の常染色体と、
1対2本の性染色体を持つ。
(合計46本の染色体)

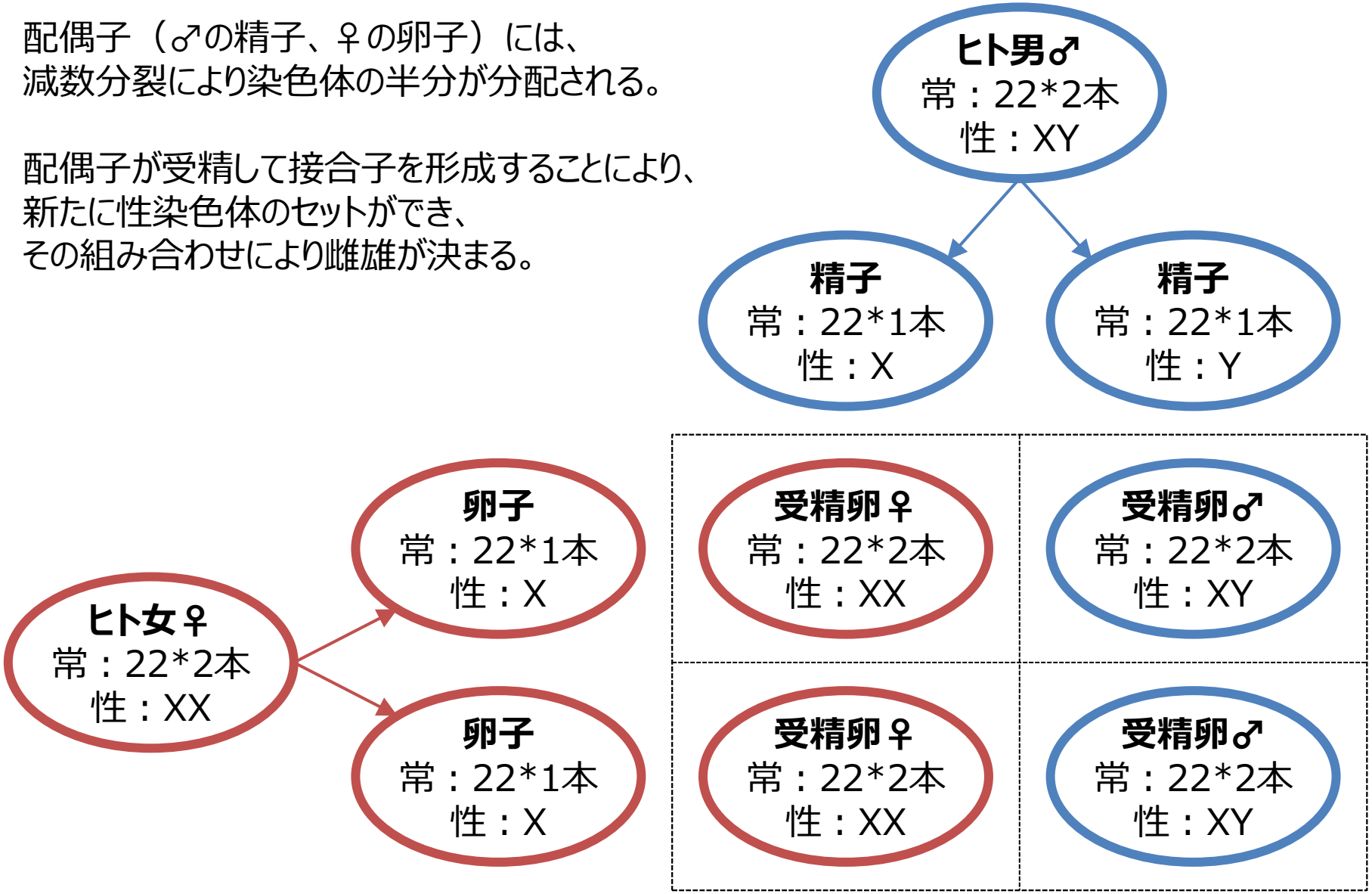
男性の性染色体は、
X染色体1本とY染色体1本

女性の性染色体は、
X染色体2本である。

性決定：減数分裂による配偶子の形成と、受精した接合子

配偶子（♂の精子、♀の卵子）には、
減数分裂により染色体の半分が分配される。

配偶子が受精して接合子を形成することにより、
新たに性染色体のセットができ、
その組み合わせにより雌雄が決まる。



性染色体による性決定は動物種で異なる

Giemsa-stained karyotype of the Japanese quail (*Coturnix japonica*) (2n=78)

G-banded macrochromosome of the Japanese quail

(provided by Chizuko Nishida, Hokkaido University)

ウズラの性染色体はZW型であり、 **ZZが雄♂、ZWが雌♀** である。

Genotyping (遺伝子型判定) とは

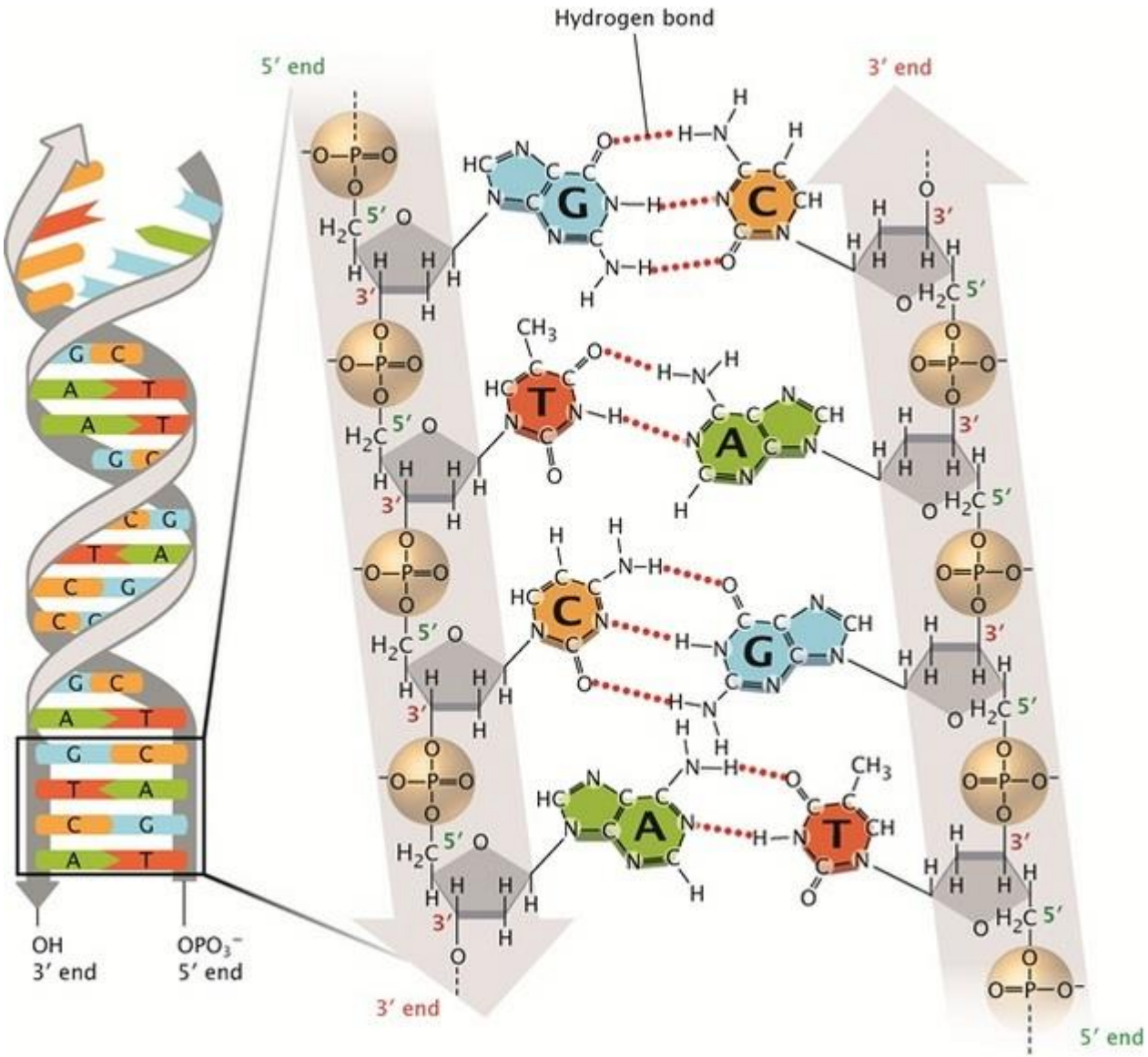
目的：
PCR による genotyping によって、ウズラの雌雄を鑑別する。

Genotyping (遺伝子型判定) とは、ゲノムDNAの配列を識別し、ある個体と別の個体の遺伝子型の違いを検出することである。

方法：
- DNAシーケンス（ゲノムDNAの配列を直接読む）
- **PCR**（ゲノムDNAのある領域の長さの違いを識別する）
- 制限酵素（ゲノムDNAの制限酵素サイトの違いを識別する）

PCR: polymerase chain reaction (ポリメラーゼ連鎖反応)

DNA の方向性



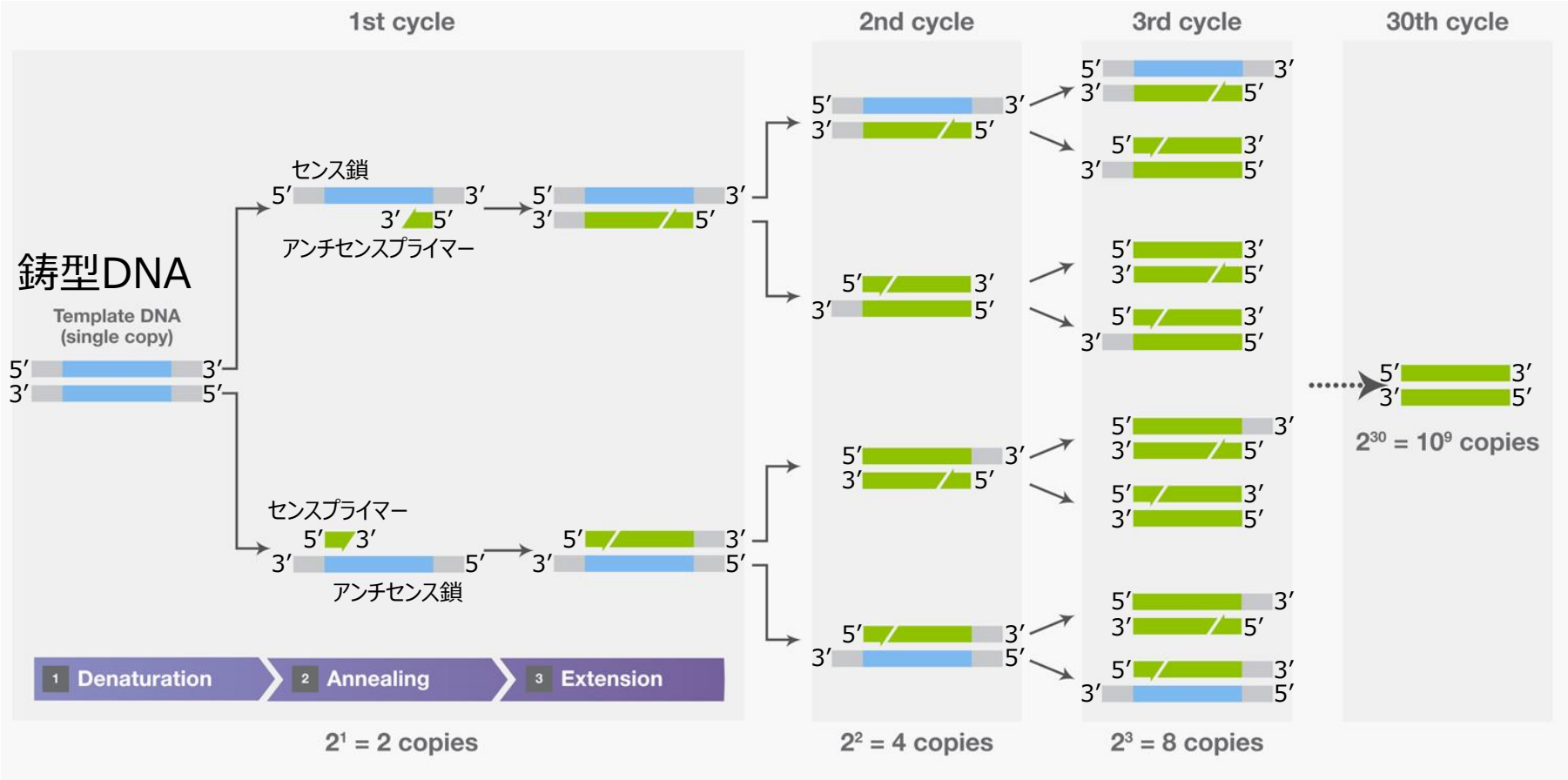
ヌクレオチドの
デオキシリボースは
5′ の位置で
リン酸と結合している。

また、3′ の位置で
隣のヌクレオチドと
リン酸結合している。

G と C は3つの水素結合で
対合している。

A と T は2つの水素結合で
対合している。

PCR: polymerase chain reaction

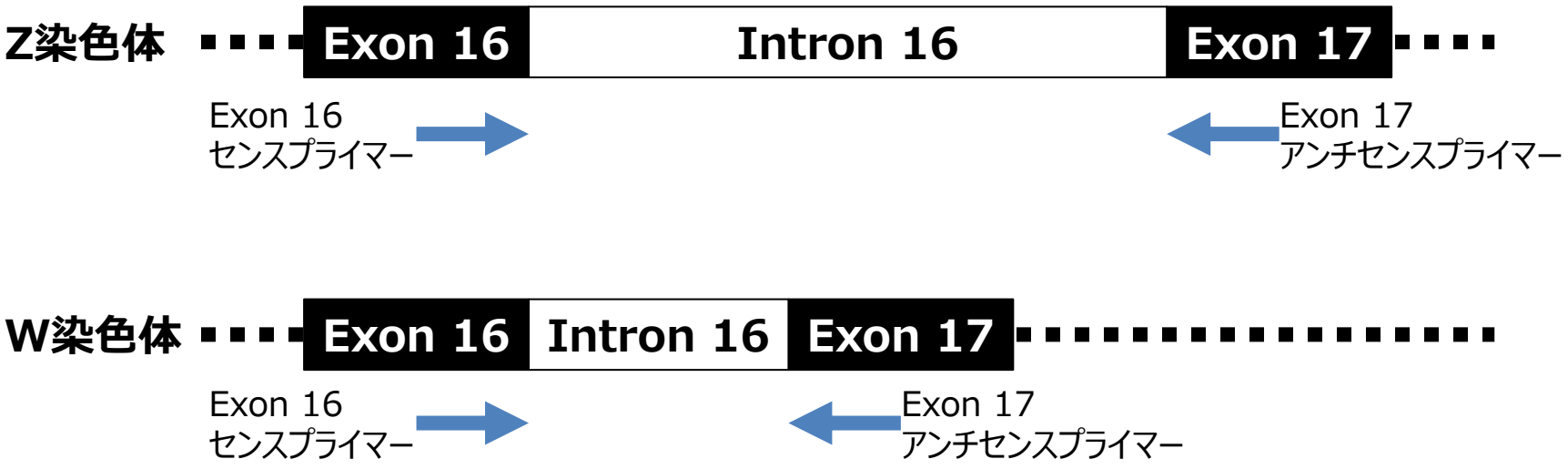


プライマー (primer): 鋳型DNAと相補的に結合する短い1本鎖DNA
DNA (RNAも) は常に 5′ から 3′ に向かって合成される。
センスプライマーとアンチセンスプライマーで挟まれた領域が複製される。

PCR: polymerase chain reaction

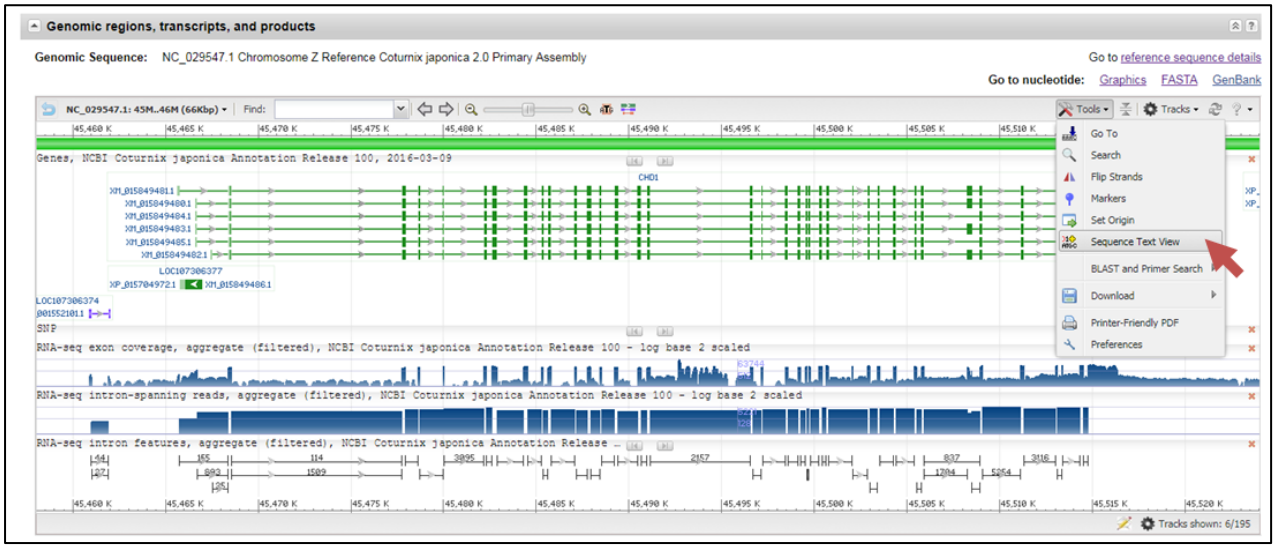
センスプライマーとアンチセンスプライマーで挟まれた領域の長さが雌雄で異なれば、
PCR によって（PCR産物の長さを調べることで）雌雄を鑑別することができる。

ウズラの性染色体にある
CHD1 (chromodomain helicase DNA binding protein 1)
遺伝子の第16イントロンの長さは、Z染色体とW染色体で異なる。



CHD1 遺伝子配列の取得

1. **NCBI** (National Center for Biothechnology Information) のホームページにアクセスする。
   https://www.ncbi.nlm.nih.gov/
2. 検索ボックスに**「CHD1 Quail」**と入力する。
3. 検索ボックス横のプルダウンメニューから**「Gene」**を選択し、「Search」をクリックする。
4. 検索結果が出てくる。**「Tools」**から**「Sequence Text View」**を選ぶ。



5. 配列中の exon がピンクに表示され、対応するアミノ酸が青字で表示されている。Intron は緑で表示される。

6. ウィンドウ左上の**「Prev Page」**を押して配列を上流にさかのぼり、開始コドン（ATG; M）を見つける。

7. 開始コドンから始まるのが「exon 1」である。Exon 1 の次が intron 1 で、その次の exon は「exon 2」である。
8. **「exon 16」**（CATTTGATA…）と、その近くにある短い**「exon 17」**（AGACTTGAT…）を見つける。
9. Word ファイルに、exon 16 と exon 17 の配列をペーストし、適当な名前を付けて保存する。

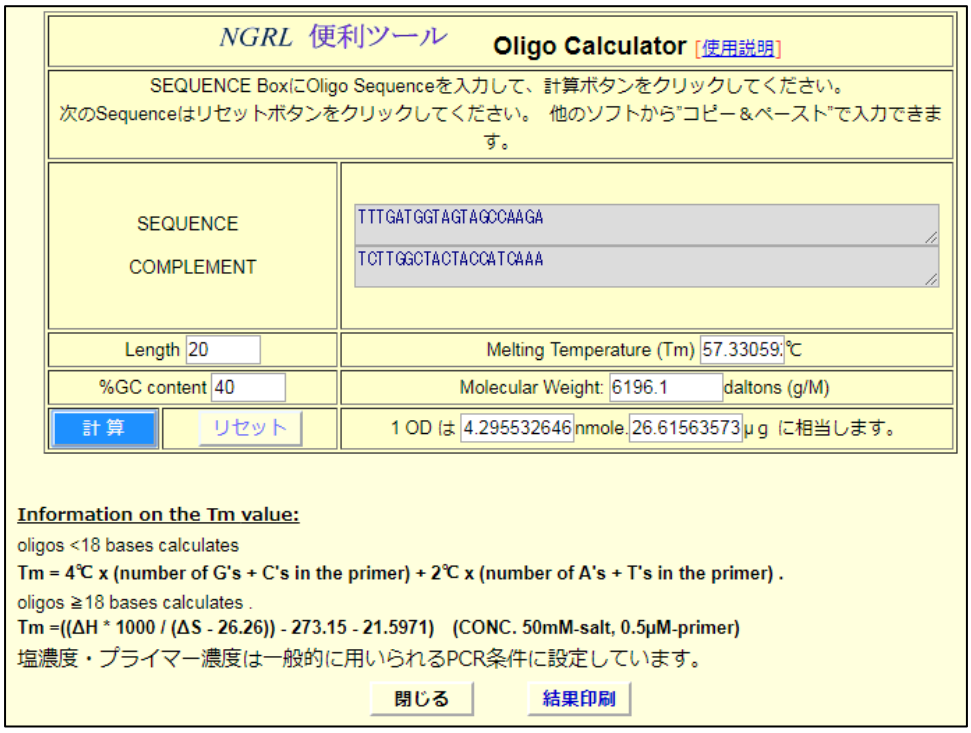
Exon 16:（5′-3′）
CATTTGATACGTAGCAGCGGGAAACTGATCCTTCTTGACAAGTTACTGATTCGTCTGCGAGAACGT
GGCAACAGAGTTCTGATTTTCTCTCAGATGGTGAGGATGCTGGACATCCTAGCAGAATATCTAAAG
TATCGCCAGTTTCCCTTCCAG

Exon 17:（5′-3′）
AGACTTGATGGATCAATAAAAGGGGAACTGAGGAAACAAGCACTGGATCATTTCAATGCAGAAGG
ATCAGAG

10. 取得した Exon 17 の配列はセンス鎖（5′-3′）である。
Exon 17 のアンチセンス鎖（5′-3′）の配列を Word ファイル、および最後のページに記入しなさい。

CHD1 プライマーの設計

1. **Oligo Calculator** のページにアクセスする。
   http://www.ngrl.co.jp/tools/0217oligocalc.htm
2. Exon 16 から 20 塩基前後の適当な配列をコピーし、Oligo Calculator の**「SEQUENCE」**に入力する。
3. **「計算」**をクリックすると、入力した配列の情報が出力される。



- COMPLEMENT: 入力した配列に対して相補的な配列。
- Length: 配列の長さ。
- %GC content: GC 含有量。配列中の G または C の割合。
- Melting Temperature: **Tm 値**ともいう。二本鎖 DNA の 50%が解離して一本鎖 DNA になる温度のこと。

4. 以下の条件を満たすプライマー配列を、Exon 16 のセンス鎖、および Exon 17 のアンチセンス鎖から見つけなさい。
   - Length: 20～24
   - %GC content: 40～60%（できれば 45～55%）
   - Melting Temperature: 55～65ºC（可能な限り、2 つのプライマー配列で同じにする）

5. 設計したプライマーによって増幅される PCR 産物の長さを計算しなさい。
   なお、Z 染色体の intron 16 の長さは 445 base、W 染色体の intron 16 の長さは 277 base である。

6. 次のページに、設計したプライマーの情報を記入して提出すること（全員）。
   設計したプライマーは実際に合成します。グループの中で、誰のプライマーを合成するか決めなさい。

学籍番号：＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿　　氏名：＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿

Exon 17 のアンチセンス鎖の配列（5′-3′）

＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿

Exon 16 センス鎖のプライマー配列（5′-3′):

＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿

Exon 17 アンチセンス鎖のプライマー配列（5′-3′):

＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿

	Exon 16 sense	**Exon 17 antisense**
プライマーの長さ		
GC 含有量（%）		
Tm 値（ºC）		
Z 染色体の PCR 産物の長さ（base）		
W 染色体の PCR 産物の長さ（base）		

このプライマーを：（○で囲む）

合成する　　合成しない