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 26, 2018

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：

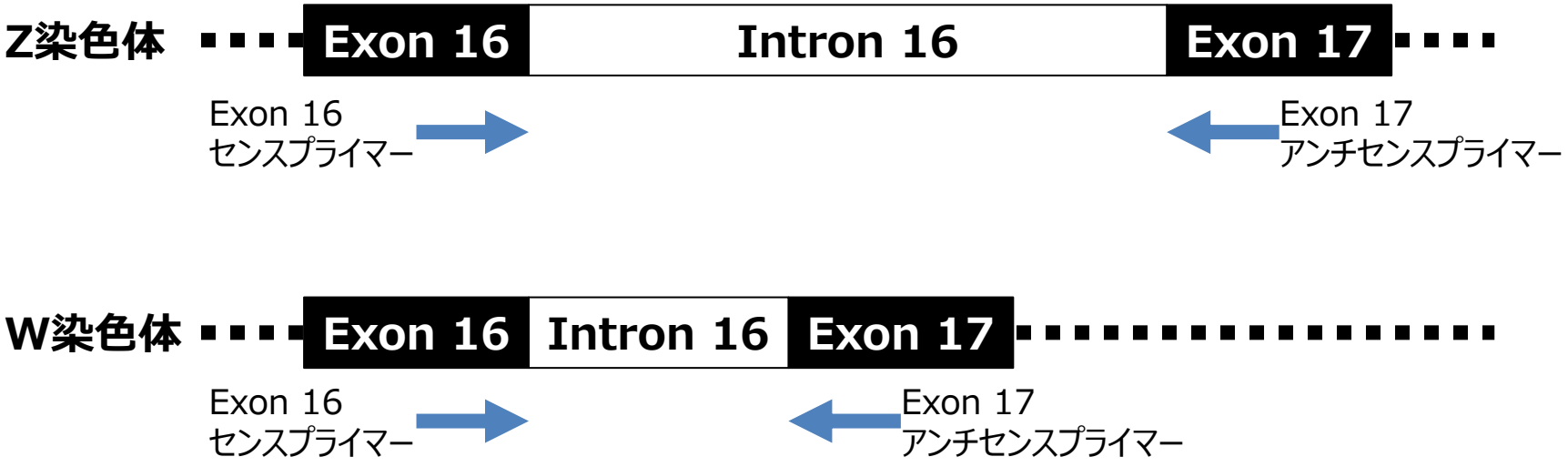
- **PCR**（ゲノムDNAのある領域の長さの違いを識別する）

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

PCR: polymerase chain reaction

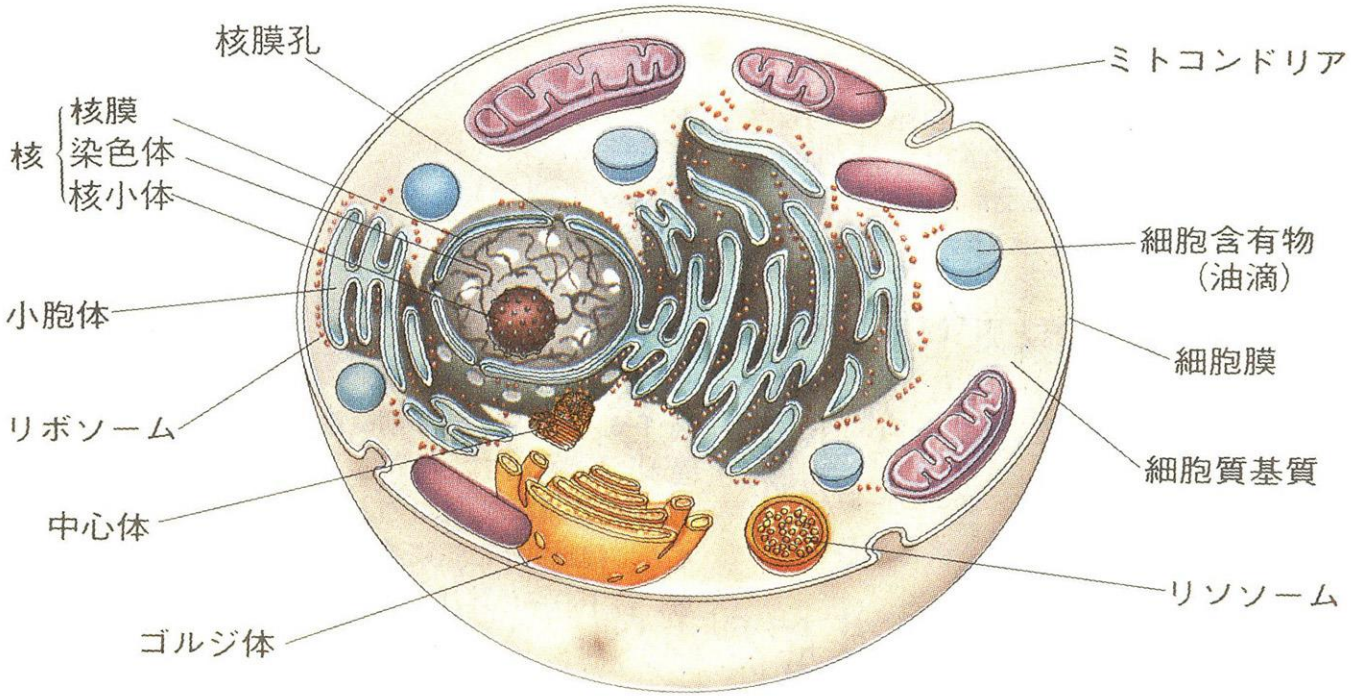
センスプライマーとアンチセンスプライマーで挟まれた領域の長さが雌雄で異なれば、
PCR によって（PCR産物の長さを調べることで）雌雄を鑑別することができる。

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。

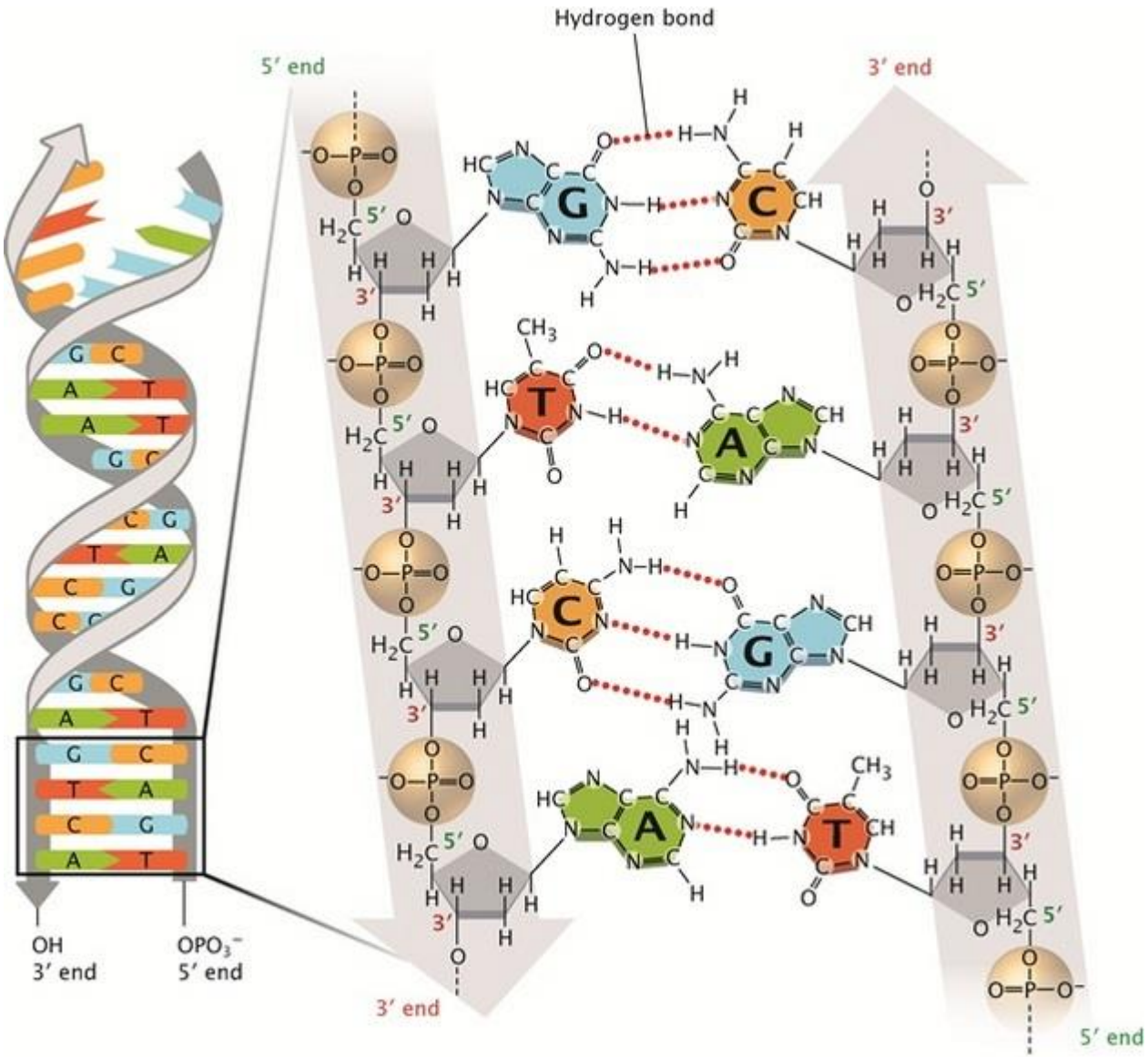


NaOH (強アルカリ塩) による細胞破壊

NaOH などの強アルカリ塩は強力な脱脂作用やタンパク質変性作用を示す。
これらは、**NaOH による炭化水素の加水分解反応**である。



DNA の方向性



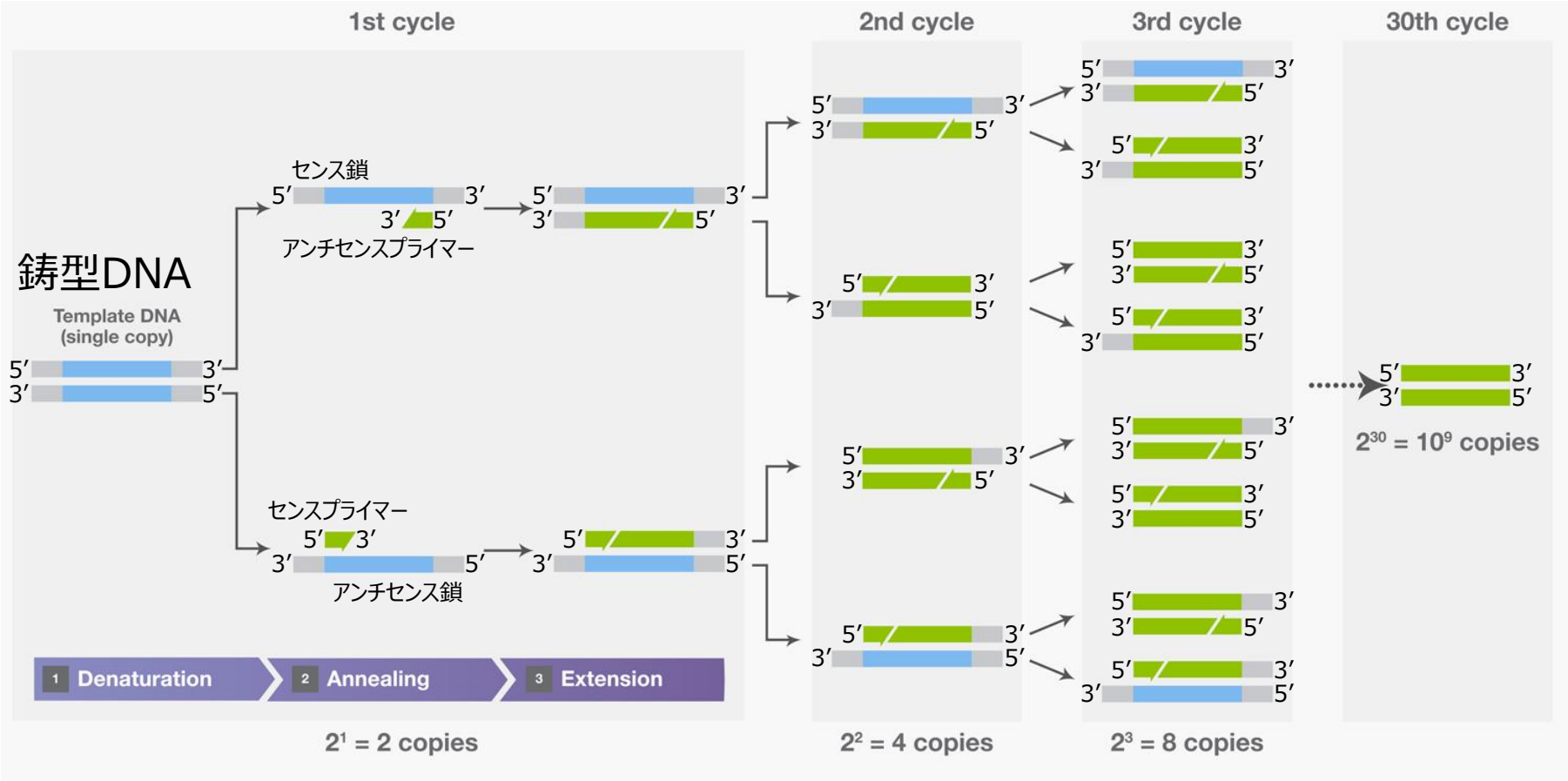
ヌクレオチドの
デオキシリボースは
5′ の位置で
リン酸と結合している。

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。

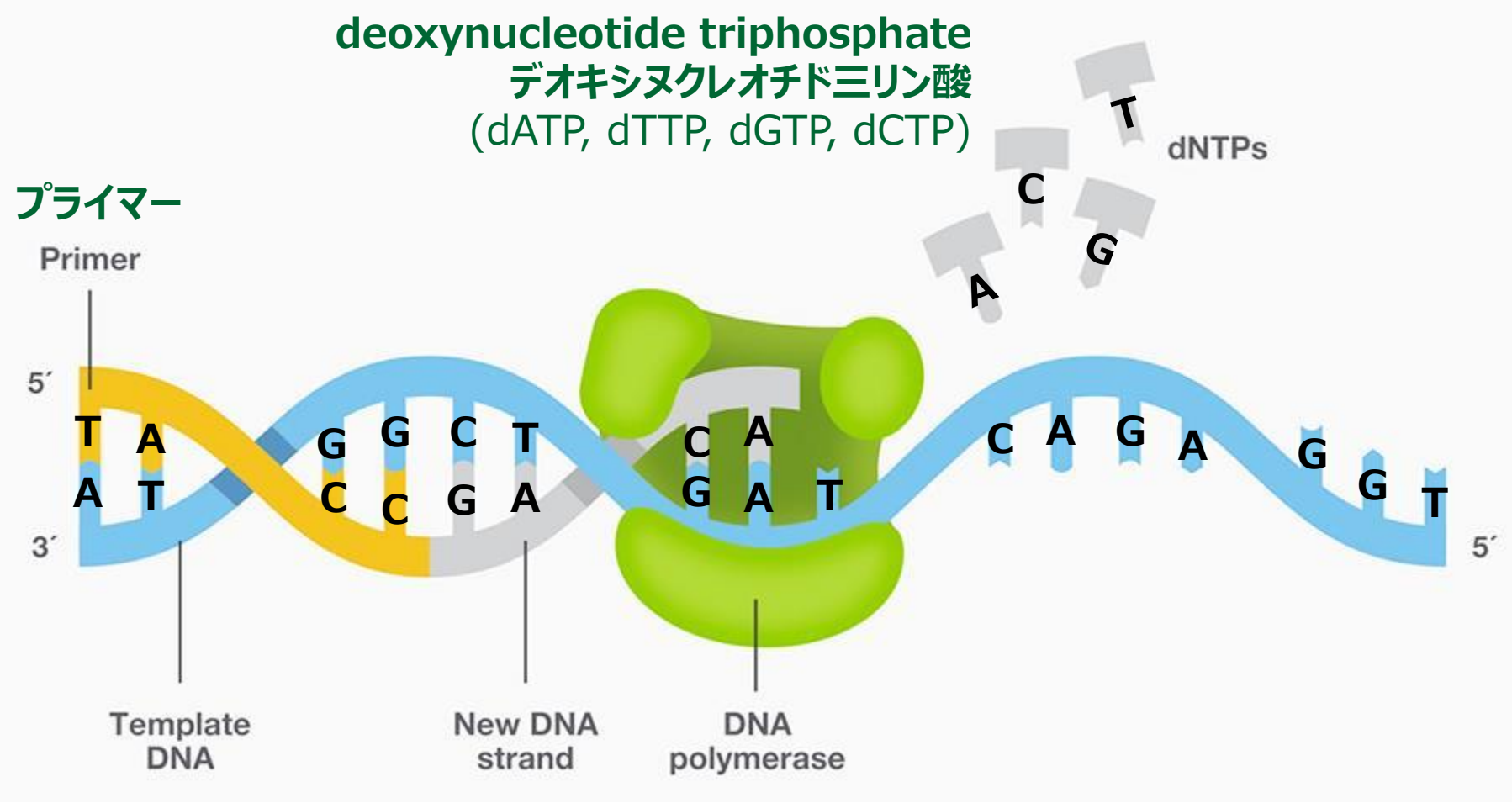
A と T は2つの水素結合で
対合している。

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。

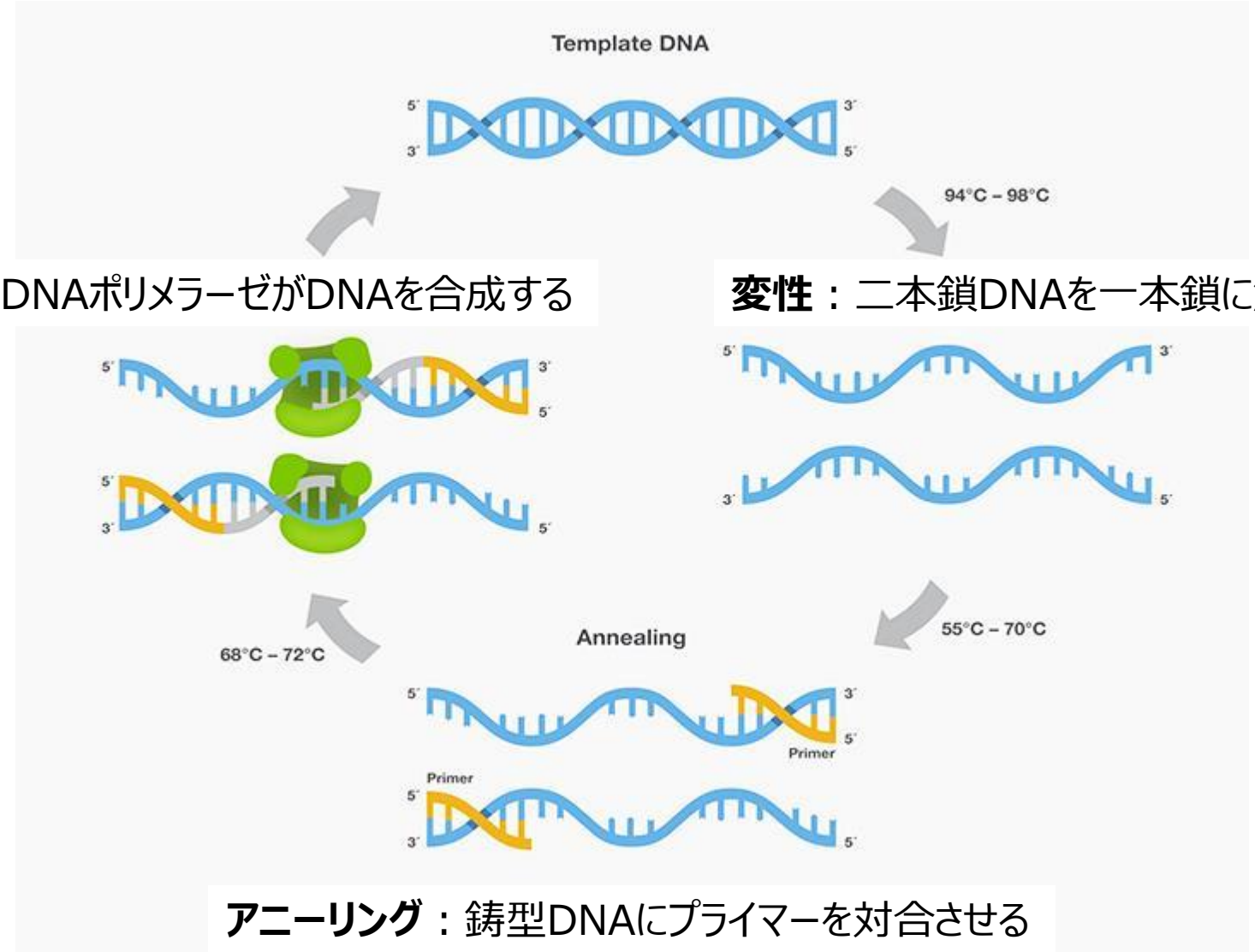
PCR: polymerase chain reaction



鋳型DNA

DNA合成酵素

PCR: polymerase chain reaction



伸長：DNAポリメラーゼがDNAを合成する

変性：二本鎖DNAを一本鎖に解離する

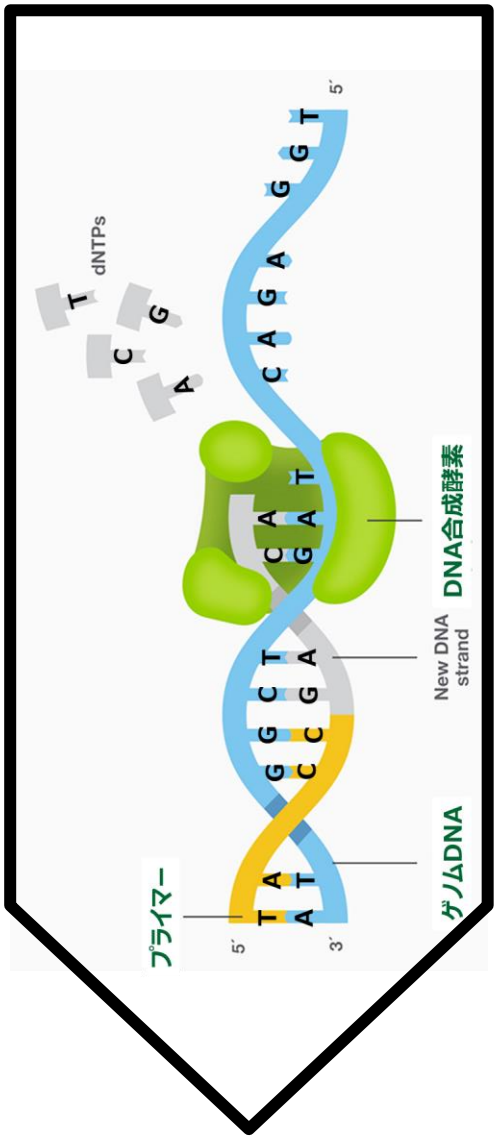
アニーリング：鋳型DNAにプライマーを対合させる

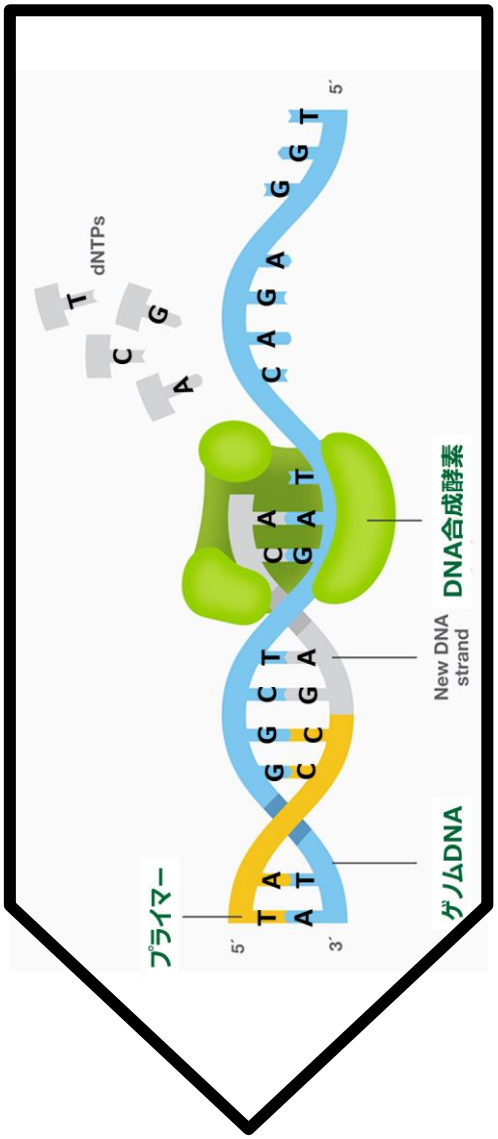
Taq DNA ポリメラーゼ

好熱菌 *Thermus aquaticus* が
産生するDNAポリメラーゼ。
90℃以上の高温でも比較的安定。

90℃以上で変性を繰り返すPCRでも
使える！

PCR反応液の組成





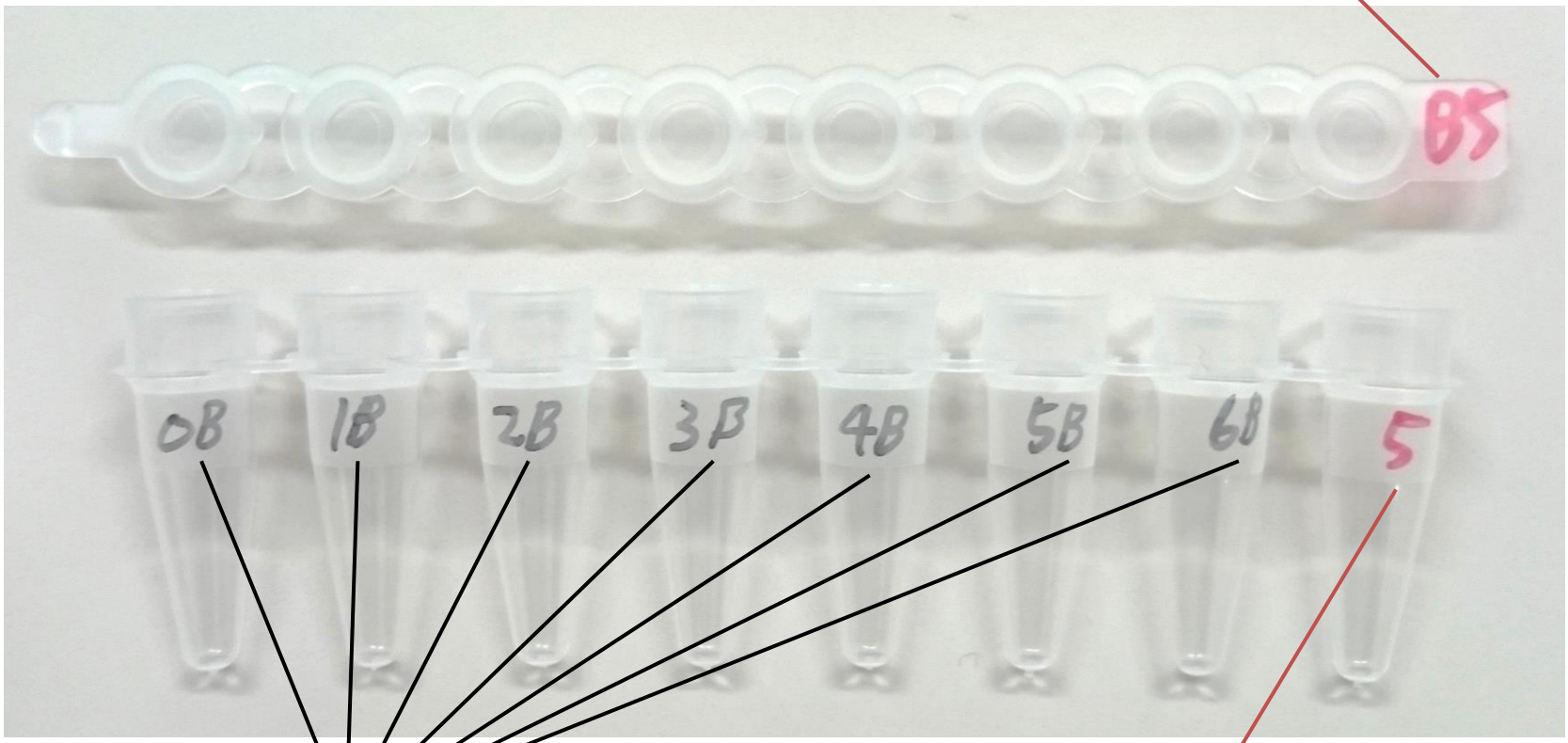
ゲノムDNA:
AとBの2種類

プライマーペア：
F0/R0~F6/R6
の7種類

2 x 7 = 14本の
チューブが必要

8連PCRチューブ

ウズラゲノムDNA+グループ番号

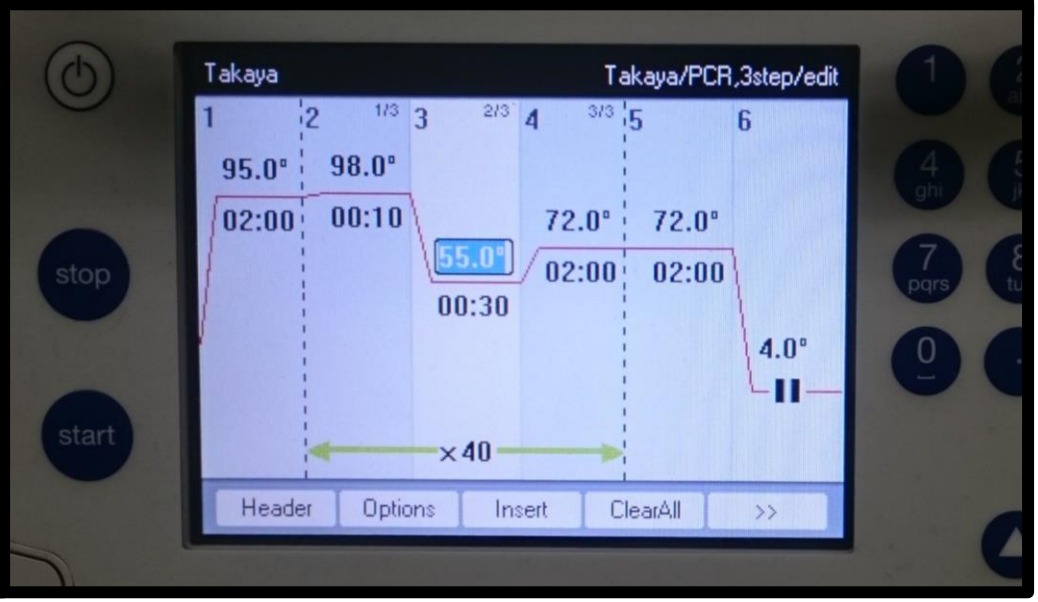


プライマー番号+ウズラゲノムDNA

グループ番号（サンプルは入れない）

サーマルサイクラー

eppendorf
flexlid
Takaya
User Level
Eppendorf
Takaya
Recently Used
16C
37C
PCR,2step
PCR,3step
RT
Other Users
MC nexus gradient
New
NewFolder
stop
start
enter
del
next
Mastercycler
nexus gradient


Takaya
Takaya/PCR,3step/edit
1
2
1/3
3
2/3
4
3/3
5
6
95.0°
02:00
98.0°
00:10
55.0°
00:30
72.0°
02:00
72.0°
02:00
4.0°
×40
stop
start
Header
Options
Insert
ClearAll
>>

0. マイクロピペッターの操作

0.1. 目的

マイクロピペッターの機構を理解し、正しく操作することで、正確な容量の溶液を計量できるようにする。

1. ウズラゲノム DNA の調整

1.1. 目的

アルカリ抽出法により、ウズラの血液サンプル（**A と B の二種類**）から、ゲノム DNA を調整する。強アルカリ性の溶液で血球細胞を破壊し、細胞核内のゲノム DNA を溶出させ、PCR に用いることが可能なゲノム DNA 溶液を調整する。

1.2. 材料

- ウズラ血液サンプル（「A」と「B」の 2 種類）
- 1.5 ml サンプルチューブ（「A」と「B」の 2 種類）
- 0.2 N NaOH
- 0.04 M Tris-HCl 緩衝液（pH 8.0）

1.3. 方法

1. 1.5 ml サンプルチューブに、80 ul の 0.2 N NaOH を入れる。
2. 上のチューブに、2 ul のウズラ血液サンプルを加える。
3. チューブをタッピングしてよく混ぜる。
4. チューブを遠心機でスピンダウンする。
5. 75℃で 20 分間、チューブを反応させる。
6. 上のチューブに、720 ul の 0.04 M Tris-HCl (pH8.0) を加えて中和する。
7. チューブをタッピングしてよく混ぜる。
8. これを**「ウズラゲノム DNA 溶液」**とする。

1.4. 課題（最終レポートに、以下の設問に対する解答を盛り込むこと）

- NaOH で溶出したゲノム DNA の溶液を Tris-HCl で中和するのはなぜか？

2. PCR 反応液の調整

2.1. 目的

ウズラゲノム DNA 溶液を鋳型とし、前回の実習で設計したプライマーで CHD1 遺伝子の、exon 16~intron 16~exon 17 の領域を増幅する。PCR の原理を理解し、PCR 反応液を正しく調整する。

2.2. 材料

- 1.5 ml サンプルチューブ（「Mix」）
- 8 連 PCR チューブ 2 セット（「AX」と「BX」。X はグループ番号）
- 滅菌蒸留水（「H_2O」）
- 10×PCR 緩衝液（「10×buf」）
- 2.5 mM dNTP 混合液
- DNA ポリメラーゼ（「ExTaq」）
- ウズラゲノム DNA 溶液（「A」と「B」の 2 種類）
- 10 uM プライマー（F0~F6, R0~R6 の 14 種類）別紙参照

誰がどのプライマーを担当するか決める。 自分の担当プライマー：＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿

2.3. PCR 反応液の組成

	1 サンプル分	**15 サンプル分（Mix）**
滅菌蒸留水（H_2O）	12.3 ul	＿＿＿＿＿＿ul
10×PCR 緩衝液（10×buf）	2.0 ul	＿＿＿＿＿＿ul
2.5 mM dNTP 混合液	1.6 ul	＿＿＿＿＿＿ul
DNA ポリメラーゼ（ExTaq）	0.1 ul	＿＿＿＿＿＿ul
ウズラゲノム DNA 溶液**（A or B）**	2.0 ul	
10 uM プライマー**（F）**	1.0 ul	
10 uM プライマー**（R）**	1.0 ul	
合計	20.0 ul	

2.4. PCR 反応液 Mix の作成

1. 1.5 ml サンプルチューブに、蒸留水、10×buf、2.5 mM dNTP、ExTaq を、**この順番で**加える。
2. チューブをタッピングしてよく混ぜる。
3. チューブを遠心機でスピンダウンする。
4. チューブを氷上に置く。

2.5. PCR 反応液の調整

8 連 A_____	**0A**	**1A**	**2A**	**3A**	**4A**	**5A**	**6A**	
Mix（_____ul）	+	+	+	+	+	+	+	
ゲノム DNA 2 ul	A	A	A	A	A	A	A	
プライマーF 1 ul	F0	F1	F2	F3	F4	F5	F6	
プライマーR 1 ul	R0	R1	R2	R3	R4	R5	R6	

8 連 B_____	**0B**	**1B**	**2B**	**3B**	**4B**	**5B**	**6B**	
Mix（_____ ul）	+	+	+	+	+	+	+	
ゲノム DNA 2 ul	B	B	B	B	B	B	B	
プライマーF 1 ul	F0	F1	F2	F3	F4	F5	F6	
プライマーR 1 ul	R0	R1	R2	R3	R4	R5	R6	

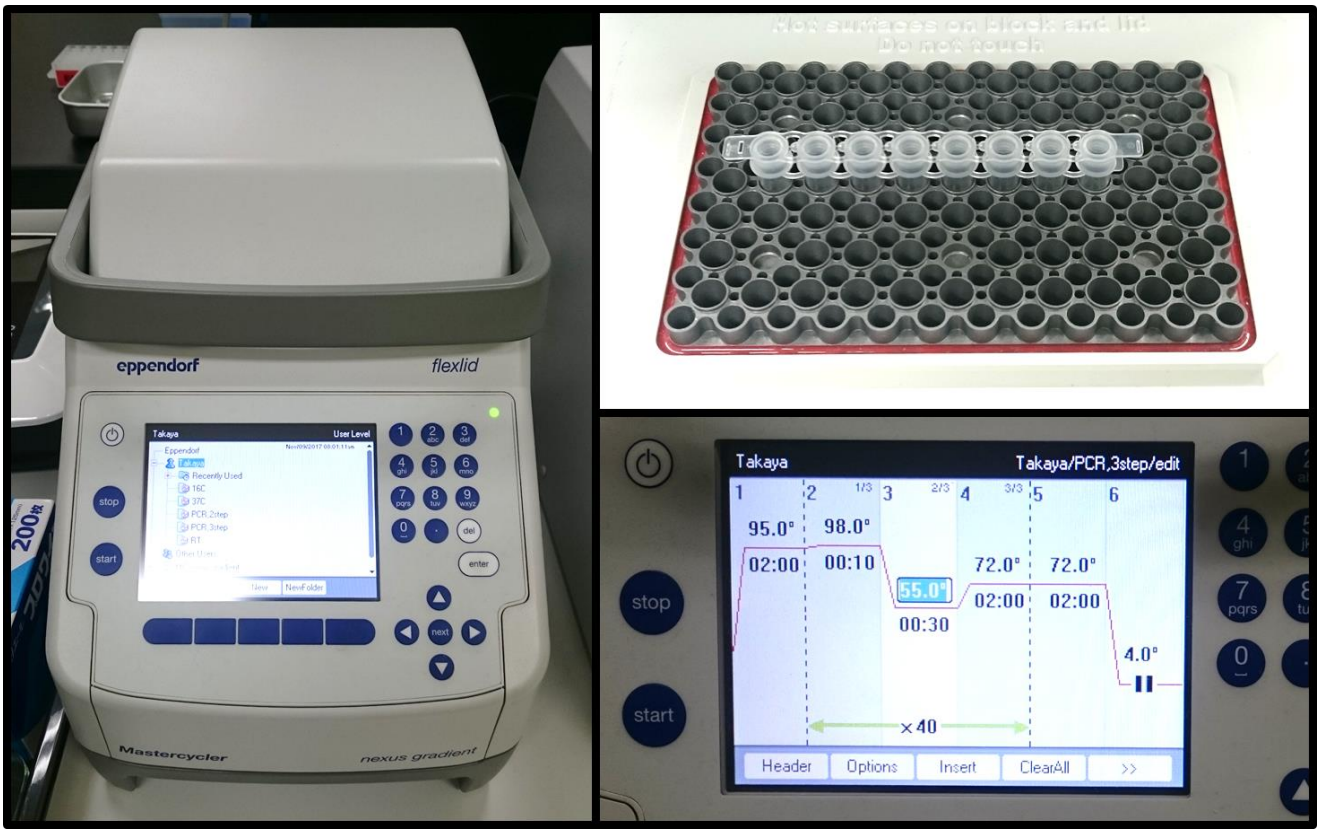
1. 8 連 PCR チューブに、_____ul の PCR 反応液 Mix を入れる。
2. 上のチューブに、2 ul のウズラゲノム DNA 溶液を入れる。
   ＊チップの先を PCR 反応液 Mix の中に差し込み、ウズラゲノム DNA 溶液を確実に PCR 反応液 Mix に加える。
3. 上のチューブに、1 ul のプライマーCHD-F__を入れる。
   ＊ウズラゲノム DNA 溶液と同様に、確実にプライマーを加える。
4. 上のチューブに、1 ul のプライマーCHD-R__を入れる。
5. 全てのチューブに全ての溶液を加え終わったら、チューブキャップを取り付ける。
6. チューブをタッピングしてよく混ぜる。
7. チューブを遠心機でスピンダウンする。
8. 8 連チューブを氷上に置く。

2.6. 課題（最終レポートに、以下の設問に対する解答を盛り込むこと）

- PCR 反応液 Mix を作成するとき、蒸留水、10×buf、2.5 mM dNTP、ExTaq の順番で加えるのはなぜか？
- Taq が入っているチューブを氷上に置くのはなぜか？

3. PCR 反応

サーマルサイクラーを用い、以下の条件で PCR 反応を行う。



予備変性	95℃, 2 分	ゲノム DNA を完全に解離する
変性	98℃, 10 秒	x15 サイクル
アニーリング（for F1-6/R1-6））	**55℃**, 30 秒	
伸長（1 kb/min）	72℃, 30 秒	
変性	98℃, 10 秒	x15 サイクル
アニーリング（for F0/R0）	**50℃**, 30 秒	
伸長（1 kb/min）	72℃, 30 秒	
最終伸長	72℃, 2 分	
冷却	4℃	

PCR 反応が終了したら、チューブを-20℃で保存する。

プライマー名	配列 (5'-3')	長さ (base)	GC含有量 (%)	Tm (℃)	PCR産物の長さ (bp)	
					Z染色体	W染色体
CHD1-F0	GTTACTGATTCGTCTACGAGA	21	42.9	51.2	614	446
CHD1-R0	ATTGAAATGATCCAGTGCTTG	21	38.1	51.3		
CHD1-F1	CATTTGATACGTAGCAGCGG	20	50.0	63.1	645	477
CHD1-R1	TCCAGTGCTTGTTTCCTCAG	20	50.0	63.0		
CHD1-F2	GAGGATGCTGGACATCCTAG	20	55.0	61.2	543	375
CHD1-R2	GTGCTTGTTTCCTCAGTTCC	20	50.0	61.3		
CHD1-F3	AGTTTCCCGCTGCTACGTATC	21	52.0	64.1	643	475
CHD1-R3	GAGGAAACAAGCACTGGATCA	21	48.0	64.1		
CHD1-F4	AGAACGTGGCAACAGAGTTC	20	50.0	61.9	611	443
CHD1-R4	CTCTGATCCTTCTGCATTGA	20	45.0	60.5		
CHD1-F5	GAACGTGGCAACAGAGTTCT	20	50.0	61.9	578	410
CHD1-R5	CTTGTTTCCTCAGTTCCCCT	20	50.0	62.0		
CHD1-F6	ATTGATACGTAGCAGCGGG	19	53.0	62.6	656	486
CHD1-R6	GCATTGAAATGATCCAGTGC	20	45.0	63.0		

PCR

1. PCR の原理

PCR とは、Polymerase Chain Reaction の略である。文字通り DNA ポリメラーゼを用いて連鎖反応的に DNA を増幅する方法である。PCR 法の開発は、分子生物学のみならず、さまざまな分野に影響を与えた。

PCR の原理は、増幅したい DNA とその両端の配列に相補的な一対の DNA プライマーおよび耐熱性 DNA ポリメラーゼを用いて、3 段階の温度変化を n サイクル繰り返すことによって標的 DNA を 2^n 倍に増幅することにある。温度変化の第 1 段階（94 ～ 96℃）で、標的二本鎖 DNA を熱変性して一本鎖とし、第 2 段階（55 ～ 60℃）でプライマーを一本鎖 DNA にアニーリングさせ、第 3 段階（72 ～ 74℃）で伸長反応を進める。1 サイクルで標的 DNA は 2 倍になる。従って理論的には n サイクルの反応で標的 DNA は 2^n 倍に増幅されるので 20 サイクルでは約 100 万倍に増幅されることになる。実際には数 100 万倍まで増幅することができる。

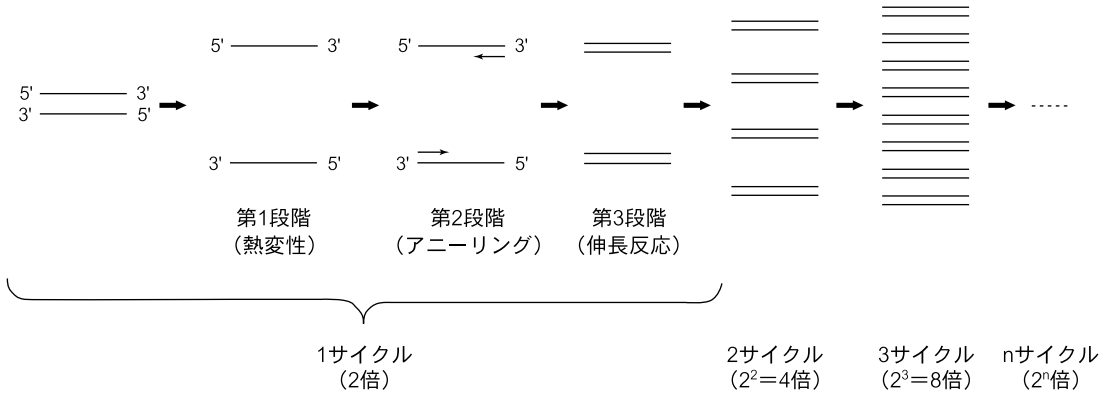


図　PCR 法による DNA 増幅の原理

2. PCR に影響を与える因子

このように PCR は非常に簡単に DNA を増幅できるわけであるが、さまざまな反応条件によって影響を受けるので、行う実験によって反応条件の最適化を行った方がよい。*Taq* DNA ポリメラーゼを用いた PCR に影響を与える因子について以下に簡単に解説する。

酵素濃度

Taq DNA ポリメラーゼは、通常 1 ～ 2.5 units/100 μl 反応液で使用される。一般に濃度が高すぎると非特異的産物が出現することがあり、逆に濃度が低すぎると増幅が不十分になる。

dNTP 濃度

dNTP 濃度は通常それぞれ 20 ～ 200 μmol/l である。各 dNTP の濃度は同一でないと誤った取り込みによるエラーが生じる原因になる。特異性と忠実度は、dNTP 濃度が低いほど高くなる。理論的には、100 μl 反応液で 20 μmol/l の各 dNTP が存在すれば、2.6 μg の DNA が合成できる。

Mg^{2+}濃度

通常、総 dNTP 濃度より 0.5 ～ 2.5 mmol/l 高い濃度が採用される。鋳型 DNA やプライマーから持ち込まれる EDTA などのキレート剤の濃度に注意しなければならない。

プライマー

プライマーは、通常 18 ～ 28 ヌクレオチド長で、G+C 含量が 50 ～ 60% で、Tm 値が 55 ～ 80℃となるように設計する。2 つのプライマーはそれぞれ 0.1 ～ 0.5 μmol/l で使用する。

温度

変性温度は高いほど特異性や増幅度が高くなるが、逆に *Taq* DNA ポリメラーゼの活性低下を早めるので、普通は 94 ～ 96℃で 15 ～ 30 秒間である。

プライマーのアニーリング温度は、Tm 値より 5℃程低い温度がよく、通常 55 ～ 60℃である。アニーリング温度が高いほど特異性は高くなる。0.2 μmol/l のプライマーは数秒間でアニーリングする。

伸長反応の温度は、72℃が多く用いられる。合成速度は、他の反応条件にもよるが、1 秒間で 35 ～ 100 ヌクレオチドである。

サイクル数

サイクル数は多いほど増幅度は高くなるが、同時に非特異的産物が増加する。40 サイクルを越えないことが望ましい。理論的には指数関数的に増幅するが、実際にはプラトーになる。プラトーになる条件は、反応条件により異なる。

その他

pH も PCR に影響をおよぼす。通常 10 ～ 50 mmol/l Tris-HCl（pH 8.3 ～ 8.8 at 20℃）が用いられる。また、塩濃度、ゼラチンや非イオン性界面活性剤の存在によっても影響を受ける。

PCR は非常に高温で反応を行うため、反応液中の水分が蒸発し、組成が変わってしまう。反応液にミネラルオイルを重層することにより水分の蒸発を防ぐことができる（サーマルサイクラーの種類によってはミネラルオイルが必要ないものもある）。

3. PCR の実際

プライマーの設計

プライマーの設計上のポイントは以下の通りである。

① 両プライマーの Tm 値が同程度であること。
② プライマーの 3′ 末端側の塩基配列が正確であること。
③ プライマーの 3′ 末端どうしが相補的でないこと。
④ G+C 含量があまり高くないこと（50 ～ 60%がよい）。特にプライマーの 3′ 末端側に G+C リッチな領域がないようにする。
⑤ プライマー自身がヘアピンのような高次構造をとらないこと。

Wako http://www.wako-chem.co.jp　ニッポン・ジーン http://www.nippongene.com

マイクロピペッターの使い方

■はじめに

マイクロピペッターは、1ml以下の微量の液体を測り採る器具である。ピストンを上下することにより空気を出し入れすることができる構造で、ピストンの上下する距離をダイヤルで細かく調整し、出し入れする空気の量を細かく調節できるため、計量する液体の量を正確に調節できる。種類によって、使うチップと計量可能な範囲が異なるので、ともに適したサイズのものを使用する。デリケートな器具であるので、取り扱いに注意する。

■手順

①計量する容量にあわせてマイクロピペッターとチップを選ぶ(図１)[注1]。

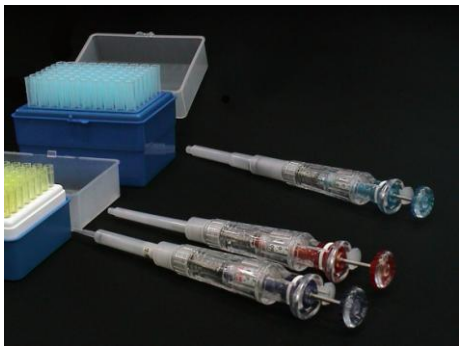


図１．マイクロピペッターとチップ
この機種の場合、奥の P1000 はブルーのチップを手前の p20 と p200 では、イエローチップを使用する。

②ダイヤルを回して、いったん、計量する容量より多めの数字に合わせ、ゆっくりとダイヤルを戻して、計量する量にあわせる(図２)。[注2]

P20　P200　P1000

図２．メモリ調整ダイヤル（右）とマイクロピペッターの目盛り(左)
ここで表示されている目盛で、P20 の場合は、10μl
P200 の場合は、100μl
P1000 の場合は、1000μl 測りとることになる。

③マイクロピペッターは、図３のように片手でしっかり握りこむように持ち、親指でプッシュロッドを操作する。[注3]

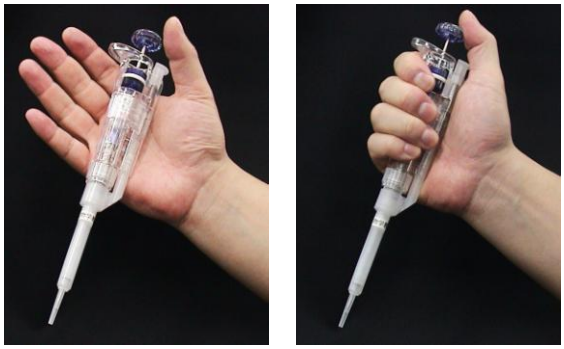


図３．マイクロピペッターの持ち方

④チップラックに入ったチップにマイクロピペッターを差し込み、軽くトントンと叩くようにして装着する（図４）。

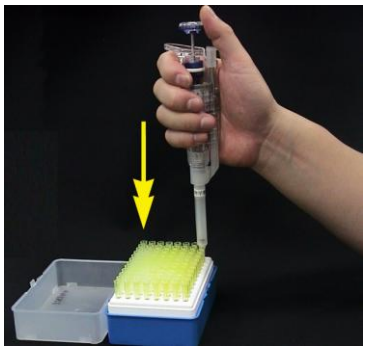


図４．チップの装着

⑤プッシュロッドを第１ストップまで押した状態で、チップの先端を液面につける。（図５参照）
⑥ゆっくりプッシュロッドを押さえていた指を離し、液体を吸い上げる。
⑦測りとる容器に移動し、ゆっくりと第１ストップまで押し、液を排出し、さらに第２ストップまでプッシュロッドを押し下げて、チップ内の液を完全に排出する。（図５参照）
⑧プッシュロッドを押さえていた指をゆっくりと離し、プッシュロッドを元の位置にもどす。
⑨チップ回収ボックスの中で、チップイジェクターボタンを押して、チップをはずす。（図５参照）

図５．プッシュロッドの位置