

ウズラ無精卵中のDNA分布とPCR分析による性決定因子分布の検証

バイサイエンス科バイオ研究部3年竹中紗也香

〈目的〉農業畜産分野における繁殖早期における性判別は生産性の向上に必須な技術である。牛などの哺乳類の性決定はXY型であり、その因子は雄の生殖細胞にある。一方、鶏やウズラなど家禽はZW型であり雌の生殖細胞に性決定因子がある。そこで、家禽であるウズラの無精卵におけるDNAの分布と性決定因子の分離の有無、すなわちその起源が体細胞なのか減数分裂後の生殖細胞起源なのかについて検証実験を試みた。

〈材料〉2023年12月、有精卵から孵化させ飼育中の並ウズラ1羽・姫ウズラ2羽(計メス3羽)から得られる無精卵を使用した。

写真(左)並ウズラのカラメルちゃん
(右)姫ウズラのチョコちゃん



〈方法〉

1). ウズラ卵からのDNA抽出

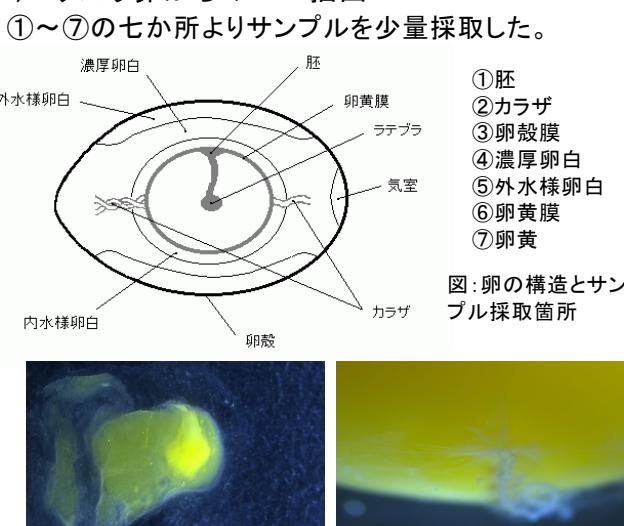


写真:デジタル顕微鏡で観察したウズラ卵の胚(左)カラザ(右)

1)DNA抽出テスト

Quick Extract DNA Quick Extraction Solution(エアブラウン サイエンティフィック社)を用い、プロトコルに従い抽出操作を行なった。その後、DNAを精製し、紫外可視分光光度計によるDNA濃度測定を行った。

2)ゲノムDNA増幅

得られたDNA量が少ない箇所があったのでPCRテンプレートとする前に、ゲノム増幅キットGenomiPhi V2 DNA Amplification Kit(Cytiva社)を用いてゲノムDNA増幅をおこなった。

3)PCR

高谷(2019)による鳥類雌雄識別用プライマーから増幅DNA長がZ染色体とW染色体で明らかに異なるCHD1-F1,CHD1-R1、CHD1-F6,CHD1-R6をオリゴヌクレオチドとしてLife Technologies Japan社に発注し、PCRを行った。

表. 高谷による鳥類雌雄識別用プライマー

プライマーナンバー	配列(5'-3')	長さ (base)	GC含有量 (%)	Tm (°C)	PCR産物の長さ (bp)	Z染色体	W染色体
CHD1-F0	GTTACTGATTCTGTACAGAGA	21	42.9	51.2	614	446	
CHD1-R0	ATTGAATAATGATCCAGTCCTTG	21	38.1	51.3			
CHD1-F1	GAACCTGGCAACAGAGTTCT	20	50.0	61.9	578	410	
CHD1-R1	CTTGTTCCTCAGTCCCCCT	20	50.0	62.0			
CHD1-F2	CATTGATACGTAGCAGCGG	20	50.0	63.1	657	489	
CHD1-R2	GCATTGAAATGATCCAGTGC	20	45.0	63.0			
CHD1-F3	CATTGATACGTAGCAGCGG	20	50.0	63.1	640	472	
CHD1-R3	TGCTTGTGTTCCCTCAGTCCC	20	50.0	64.1			
CHD1-F4	CATTGATACGTAGCAGCGG	20	50.0	63.1	644	476	
CHD1-R4	GAACTGAGGAAACAAGCACTGG	22	50.0	64.9			
CHD1-F5	CATTGATACGTAGCAGCGG	20	50.0	63.1	644	476	
CHD1-R5	CCAGTGCCTGTTCTCAGTGT	21	48.0	63.1			
CHD1-F6	CATTGATACGTAGCAGCGG	20	50.0	63.1	670	502	
CHD1-R6	CTCTGATCCTCTGATTGA	20	45.0	60.5			

4)電気泳動

調整後のSLB (sample loading buffer)2μLと、PCR反応液5μLを混和後、サンプルとしてDNA染色材を含むX1TAEバッファーを用いた2%アガロースゲルに入れ、100Vで20分間電気泳動をした。泳動後、紫外線を照射しゲルを撮影した。

結果:抽出DNAの濃度

・DNA抽出テスト

どの採取箇所からも微量ではあるが、DNAを得られた。特に発生の中核である胚の50倍のDNAがほぼ等量の卵黄膜からえることができた。

サンプル	濃度 μ g/ml
①胚	1.0
②カラザ	0.4
③卵殻膜	1.6
④濃厚卵白	1.4
⑤外水様卵白	2.3
⑥卵黄膜	46.4
⑦卵黄	4.8

・PCR

プライマーセットCHD1-F1/CHD1-R1とCHD1-F6/CHD1-R6を使用したPCRで増幅バンドを得ることができた。

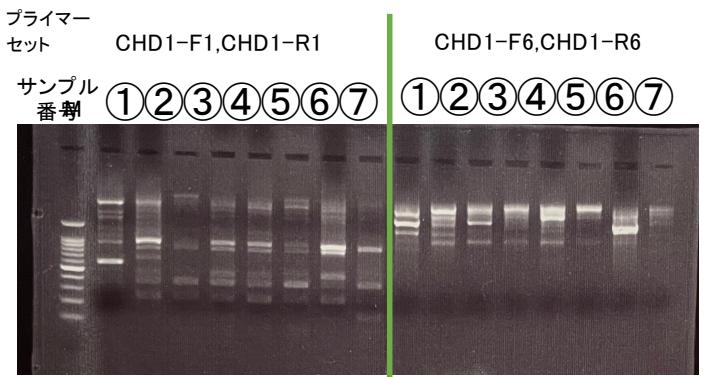


図. 電気泳動で得られたDNA増幅バンド

プライマーセットCHD1-F1/CHD1-R1を用いたPCRにおいて将来の個体であるサンプル①がZ染色体の存在をしめす614bp付近の明瞭なバンドが認められた。しかし他の組織からそのバンドについて検出できていない。現時点では、胚以外の箇所からその卵の雌雄判別は困難であるといえる。

参考文献：2019/10/25 動物生命機能学実験 高谷 智英
web資料 (<http://t-takaya.net/lecture/file/20191025.pdf>)