

家畜・家禽のゲノム DNA 抽出におけるガラスろ紙法の検討

工藤美雪¹・河邊弘太郎²・大久津昌治³・岡本 新¹・山口 浩⁴・
安江 博⁵・前田芳實¹・下桐 猛^{1*}

¹鹿児島大学農学部家畜育種学研究室 890-0065 鹿児島市郡元

²鹿児島大学フロンティアサイエンス研究推進センター 890-0065 鹿児島市郡元

³鹿児島大学農学部家畜繁殖学研究室 890-0065 鹿児島市郡元

⁴鹿児島大学農学部附属農場入来牧場 895-1402 薩摩川内市入来町

⁵農業生物資源研究所ゲノム研究ユニット 305-0901 つくば市池の台

Examination of the Method of Glass Filter Paper in the Genomic DNA Extraction of Domestic Animal / Poultry

Miyuki Kudo¹, Kotaro Kawabe², Shoji Ookutsu³, Shin Okamoto¹, Hiroshi Yamakuchi⁴,
Hiroshi Yasue⁵, Yoshizane Maeda¹, Takeshi Shimogiri^{1*}

¹ *Laboratory of Animal Breeding and Genetics, Faculty of Agriculture, Kagoshima University, Korimoto, Kagoshima 890-0065*

² *Fronotier Science Research Center, Kagoshima University, Korimoto, Kagoshima 890-0065*

³ *Laboratory of Animal Reproduction, Faculty of Agriculture, Kagoshima University, Korimoto, Kagoshima 890-0065*

⁴ *Iriki Livestock Farm, Experimental Farm, Faculty of Agriculture, Kagoshima University, Iriki, Satsumasendai 895-1402*

⁵ *Animal Genome Research Unit, National Institute of Agrobiological Sciences, Ikenodai, Tsukuba 305-0901*

Summary

In this study, to develop a cost-effective and rapid genomic DNA purification method in animals and birds, we examined the DNA purification method using glass fiber filter proven in plant genomics. Four or eight blood cell samples from each of cattle and chickens were used for the purification. The purification method was basically the same as that described previously (Muramoto et al. 2005). Several points were tested in this method for recovering DNA efficiently, revealing the following: 1) One μg of genomic DNA was purified from the chicken blood cell samples diluted 50-200 times. It could be used for $\sim 5\text{kb}$ PCR amplification. Genomic DNA from the chicken blood cell samples diluted 1-10 times could not be used for PCR amplification. In cattle, genomic DNA was purified from the blood cell samples diluted 1-200 times. It could be used for 0.8kb PCR amplification. 2) Concerning concentration of sodium sulfite in sample storage, 10% was acceptable. 3) Drying the filter with the blood cells before purifying improved DNA yield. 4) Conversion from sodium sulfite to vitamin C failed to obtain the genomic DNA from the samples. 5) When the filter with the blood cells was stored for four weeks at room temperature, genomic DNA was purified. We purified the genomic DNAs using this method for 10 yen/sample and from 16 samples at 1 hour. These results suggest that this method is a cost-effective and rapid genomic DNA purification method in animals and birds.

Key Words: blood cells, cost-effective, genomic DNA purification, glass fiber filter

キーワード：安価，ガラス繊維ろ紙，ゲノム DNA 抽出，血球

緒 言

近年，家畜や家禽においてもゲノム解析が進展し，マイクロサテライトや一塩基多型 (SNPs) などの DNA 多型マーカー情報が集積され，個体識別や品種識別などが実用化されている³⁾。また，家畜や家禽の経済的に重要

2009年11月30日 受付日

2009年12月24日 受理日

* Corresponding author. E-mail: simogiri@agri.kagoshima-u.ac.jp

な形質と関連する DNA 多型マーカーが単離され、育種選抜において実用化されつつある¹⁾。これらの実験を高精度に行うためには、多検体からのゲノム DNA 抽出が必須である。それゆえ、ゲノム DNA の抽出法には安価・迅速・高純度に精製できる手法がよいと考えられる。植物で確立されたガラス繊維ろ紙法²⁾は、DNA が二酸化ケイ素 (SiO₂) を主成分とする担体に結合しやすいという性質を利用したゲノム DNA 抽出法である。この方法では、3段階の処理によってポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) に用いるに充分量のゲノム DNA を30分間以内で単離することができる。また、1サンプルあたりに用いる遠心チューブも1本でよいいため、試薬等も合わせたコストは1サンプルあたり10円未満である。さらに、抽出した DNA は10 kbp 以上の LA-PCR にも用いることができ、ガラス繊維ろ紙に組織液を吸着させ、室温乾燥状態で1ヶ月放置した後、DNA 抽出操作を行ったサンプルでも同領域を増幅できることが報告されている²⁾。

そこで、本研究では、ガラスろ紙法を家畜や家禽のゲノム DNA 抽出に応用するために、いくつかの条件検討を試みたので報告する。

材料および方法

1. 供試材料

材料には、ニワトリとウシの血球を各4または8サンプル供試した。血球は原液と生理食塩水で10倍・50倍・100倍・150倍・200倍に希釈し、ゲノム DNA の抽出を行った。

2. ガラス繊維ろ紙によるゲノム DNA の抽出

ガラス繊維ろ紙には、ワットマン社製の Glass Microfibre Filters GF/C を用いた。まず、抗酸化物質を含む抗酸化溶液 (基本組成: 20 mM トリス塩酸 (pH8.0)・2mM EDTA・1~20%抗酸化物質) にガラス繊維ろ紙を浸潤し、乾燥させた後、5 mm 角に裁断した。裁断したろ紙に血球サンプルを吸着させ、エッペンドルフチューブに移した。サンプル吸着後のろ紙はゲノム抽出に使用した。なお、ここでろ紙を乾燥させ保存した。

サンプル吸着後のろ紙に以下の3段階の処理、すなわち (1) カオトロピック塩 (蛋白質などの分子構造を不安定化する性質を持つ) を含む固定液による処理、(2) アルコールを含む高塩濃度の洗浄液による処理、(3) TE 緩衝液によるゲノム DNA の溶出処理を行った。各処理液の基本組成は、固定液: 100 mM トリス塩酸 (pH 8.0)・10 mM EDTA-2Na・7M グアニジン塩酸、洗浄液: 50 mM トリス塩酸 (pH8.0)・5 mM EDTA-2Na・200 mM 塩化ナトリウム・60%エタノール、TE 緩衝液: 10 mM トリス塩酸 (pH8.0)・1 mM EDTA-2Na であった。

具体的には、サンプル吸着後のろ紙の入ったチューブに固定液を200 μ l 加えて軽く混和し、室温で5分間静置した。その後、15,000 rpm で10秒間遠心し、上清を捨てた。チューブに洗浄液を200 μ l 加えて軽く混和後、

15,000 rpm で10秒間遠心し、上清を捨て、ろ紙を洗浄した。洗浄処理はもう一度繰り返した。さらに、70%エタノールを200 μ l 加えて軽く混和し、15,000 rpm で10秒間遠心し、上清を捨て、ろ紙を洗浄した。また、ろ紙に不純物が付着していれば、洗浄処理をもう一度繰り返した。洗浄処理後、ろ紙を室温で乾燥させ、TE 緩衝液100 μ l でゲノム DNA を溶出させた。最後に、15,000 rpm で5分間遠心し、得られる溶液を PCR 反応の鋳型 DNA 溶液として用いた。なお、すべての処理は室温にて行い、調整された DNA サンプルを4℃で保存した。

3. 検討項目

今回のガラス繊維ろ紙法について検討した項目は以下のとおりである。① 吸着させる血球サンプルの希釈倍率、② 抗酸化物質である亜硫酸 Na の濃度、③ サンプル吸着後のろ紙の乾燥処理の有無、④ 抗酸化物質として、亜硫酸 Na とビタミン C の検討、⑤ サンプル吸着後のろ紙の保存期間、の5項目であった。

4. ゲノム抽出の確認

抽出されたゲノム DNA は、PCR 増幅により性能確認を行った。

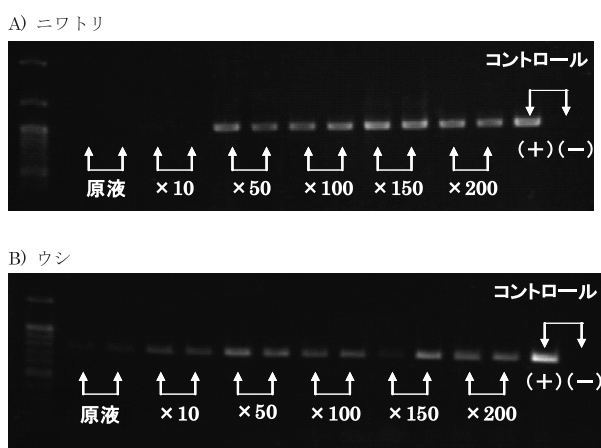
PCR には、AmpliQ Gold[®] PCR Master Mix (Applied Biosystems) を用い、定法に従って行った。用いたプライマーは、ニワトリでは第1染色体の SNP (rs15975079) を含む1,030 bp 領域を増幅する M26_F (5'-GTGCAATCAGTGTGGGTTTG-3') と M26_R (5'-TCATGAAGGGGCTTCTCATT-3') を用いた。他方、ウシは、チロシナーゼ関連遺伝子である *TYRP2* 遺伝子の795 bp 領域を増幅する bTYR_F (5'-GCTCCATTAACCAGCTCAGG-3') と bTYR_R (5'-TCATCTGTGCAAACGTCACA-3') を用いた。

さらに、ニワトリから抽出されたゲノム DNA では、LA-PCR も試みた。LA-PCR には、Ex Taq (TAKARA BIO INC) を用い、定法に従って行った。用いたプライマーは、*CPS1* 遺伝子内の4,474 bp 領域を増幅する CPS1-P13F (5'-GAAGCCTTGACAGACCCCAGCTACAAAG-3') と CPS1-P18R (5'-ACCCACAGTCAACTGCTACAAC TTTAAC-3')、および *OTC* 遺伝子内の5,370 bp 領域を増幅する OTC3F (5'-GCCATGATTT TTGAGAAGAG AAGCACAAGA AC-3') と OTC3R (5'-AATGTCTTGT TTT GTAAGGA AGGAAGAATG TC-3') を用いた。PCR 反応後の溶液はアガロースゲル電気泳動で解析し、増幅産物の有無を確認した。

結果および考察

1. 吸着させる血球の希釈倍率

ニワトリとウシの血球を原液と生理食塩水で10倍・50倍・100倍・150倍・200倍に希釈し、ゲノム DNA の抽出を行った。なお、各区4サンプルで実施した。抽出した DNA の濃度を測定した結果、すべての希釈倍率でゲ



第1図 血球の希釈倍率による PCR 増幅の影響 (A: ニワトリ, B: ウシ)

各希釈倍率で抽出したゲノム DNA から PCR 増幅し, A) ニワトリで1030 bp の, B) ウシでは795 bp の PCR 産物を2%アガロースゲル電気泳動により確認した. なお, コントロールとして, フェノール法で抽出したゲノム DNA (+)と滅菌蒸留水(-)を用いた. A) ニワトリでは50~200倍希釈で PCR 産物を確認できたが, 原液と10倍希釈では確認できなかった. B) ウシではすべての希釈倍率で PCR 産物を確認できた.

第1表 血球サンプルの希釈倍率によるゲノム DNA 抽出量

希釈倍率	DNA 量 (μg) ¹	
	ニワトリ	ウシ
×1	7.58 ± 1.42	7.79 ± 1.99
×10	2.50 ± 0.77	1.50 ± 0.05
×50	1.51 ± 0.14	0.75 ± 0.03
×100	0.98 ± 0.10	0.73 ± 0.06
×150	0.91 ± 0.02	0.83 ± 0.07
×200	1.28 ± 0.17	0.88 ± 0.33

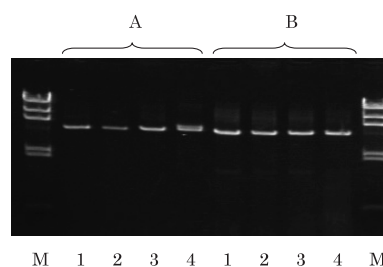
¹平均 ± 標準偏差

ノム DNA が得られ, その量は原液が最も多く, 50~200倍希釈で1 μg 程の DNA が抽出可能であった (表1).

得られたゲノム DNA を鋳型として用いて PCR を行なった結果, ニワトリでは50~200倍希釈で1 kb の PCR 産物が確認され, 原液・10倍希釈では PCR 産物が確認できなかった (図1A). これは, タンパク質などの不純物が PCR 反応を阻害したのではないかと考えられた. 他方, ウシではすべての希釈倍率で PCR 産物を確認することができた (図1B). また, ニワトリ血球100倍希釈から得られたゲノム DNA を用いて LA-PCR を行ない, 4,474 bp 領域および5,370 bp 領域を増幅することができた (図2). 以上の結果から, ろ紙を利用したゲノム DNA 抽出法が家畜・家禽の血球においても有効であり, その希釈倍率が, ニワトリで50~200倍, ウシで1~200倍で利用可能であることが示された.

2. 抗酸化物質としての亜硫酸 Na の濃度

血球を吸着させたろ紙を長期保存するために加える抗酸化物質である亜硫酸 Na の濃度を1・5・10・20%の4区用意し, 抽出 DNA 量の変化と PCR 増幅産物の有無を確認した. サンプルはニワトリ血球の100倍希釈液を



第2図 ガラスろ紙法により抽出したニワトリゲノム DNA を用いた LA-PCR 増幅の結果 (A: 5,370 bp 領域, B: 4,474 bp 領域)

ニワトリ血球100倍希釈を吸着させたろ紙から抽出したゲノム DNA (4サンプル: 1~4) を LA-PCR により増幅し, A) OTC 遺伝子内の5,370 bp 領域, B) CPS1遺伝子内の4,474 bp 領域の PCR 産物を1%アガロースゲル電気泳動により確認した. M は分子量マーカーである. その結果, A) B) とともに PCR 産物を確認できた.

第2表 亜硫酸 Na 濃度によるゲノム DNA 抽出量の変化

亜硫酸 Na 濃度	DNA 量 (μg) ¹
1%	0.93 ± 0.14
5%	1.00 ± 0.14
10%	1.03 ± 0.10
20%	1.46 ± 0.40

¹平均 ± 標準偏差

供試し, 各区8サンプルで実施した. その結果, すべての濃度でゲノム DNA を得ることができ, PCR 増幅も確認できた (表2). したがって, 亜硫酸 Na の使用量と保存, DNA 抽出量を考慮すると, すでに植物で報告されている10%で問題ないことが示唆された.

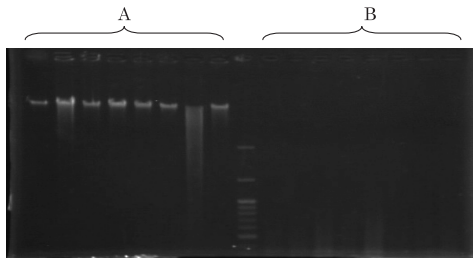
3. サンプル吸着後のろ紙の乾燥処理

血球サンプル吸着後のろ紙を, 乾燥せずすぐに DNA 抽出した場合 (未乾燥区) と, 乾燥後, DNA 抽出した場合 (乾燥区) との間で DNA 抽出量の変化と PCR 増幅産物の有無を比較した. サンプルにはニワトリ血球の50・100・150・200倍希釈したものを各8サンプル用いた. その結果, 全ての区で乾燥区が未乾燥区よりも DNA 量が多く, PCR 増幅も確認できた (表3とデータ示さず). 以上の結果から, サンプル吸着ろ紙は未乾燥よりも乾燥した方が効率的に DNA 抽出できることが示唆された. これは, ろ紙を乾燥したことで固定液が染込みやすくなり, サンプルとの反応が改善されたのではないかと推察した.

第3表 血球吸着後のろ紙の乾燥とゲノム DNA 抽出量の変化

希釈倍率	DNA 量 (μg) ¹	
	未乾燥	乾燥
×50	1.51 ± 0.14	2.03 ± 0.39
×100	1.49 ± 0.71	4.13 ± 0.42
×150	1.13 ± 0.21	2.84 ± 1.32
×200	1.34 ± 0.69	3.08 ± 0.71

¹平均 ± 標準偏差



第3図 サンプル吸着ろ紙の保存剤としてのビタミンCの検討

ビタミンC 20%区で抽出したゲノムDNAを1%アガロースゲル電気泳動により観察した。A) サンプル吸着後のろ紙を乾燥せず、すぐにゲノム抽出に利用した(未乾燥区)。B) サンプル吸着後のろ紙を乾燥後、ゲノム抽出に利用した(乾燥区)。その結果、AではゲノムDNAを確認できたが、Bでは確認できなかった。

4. 抗酸化物質の検討

抗酸化物質である亜硫酸Naを強い抗酸化作用があり有害性のないビタミンC(アスコルビン酸Na)に代替し、抽出DNA量の変化とPCR産物の有無を確認した。サンプルはニワトリ血球の100倍希釈液を供試し、各区8サンプルで実施した。その結果、血球吸着後のろ紙をすぐにゲノム抽出に利用すると、全ての区でPCR増幅可能なゲノムDNAを得ることができた(図3A)が、乾燥させるとゲノムDNAが得られなかった(図3B)。以上の結果は、ビタミンCがサンプル吸着後のろ紙の保存には利用できないことを示唆し、本法には不適であることが示された。

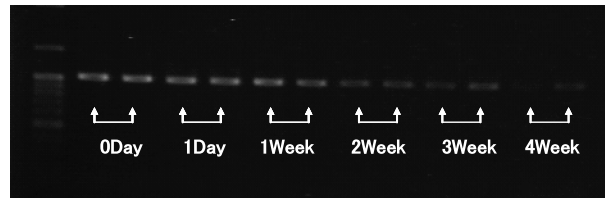
5. サンプル吸着後のろ紙の保存期間

血球を吸着させたるろ紙を乾燥後、一定期間室温で保存したものからゲノムDNAを抽出し、得られるDNA量の変化とPCR産物の有無を確認した。サンプルはニワトリ血球100・150・200倍希釈を供試し、各区8サンプルで実施した。その結果、乾燥後4週間までDNAの抽出が可能であることが確認できた(表4)。また、一部に薄いバンドがあるものの、PCR産物についても確認することができた(図4)。同様のろ紙を半年間保存して、同実験を行なった結果、DNAが分解され、PCR産物を得ることができなかった(データ示さず)。これは、室温乾燥状態で放置している間にろ紙が空気中の細菌等に汚染され、DNAが分解されたと推察された。そこで、現在、酸素を通さない袋に脱酸素剤とともにサンプルろ紙

第4表 保存期間によるゲノムDNA抽出量の変化

保存期間	DNA量 (μg) ¹		
	$\times 100$	$\times 150$	$\times 200$
0Day	1.49 \pm 0.71	1.13 \pm 0.21	1.34 \pm 0.70
1Day	4.13 \pm 0.42	2.84 \pm 1.32	3.08 \pm 0.71
1Week	1.90 \pm 0.32	1.99 \pm 0.22	1.69 \pm 0.33
2Week	3.27 \pm 0.54	2.58 \pm 0.53	2.33 \pm 0.40
3Week	2.52 \pm 0.86	1.87 \pm 0.26	2.07 \pm 0.66
4Week	5.83 \pm 1.24	4.10 \pm 0.73	4.54 \pm 0.64

¹平均 \pm 標準偏差



第4図 サンプルろ紙の保存期間ごとのPCR増幅の結果(血球100倍希釈)

一定期間室温で保存したサンプルろ紙からゲノムDNAを抽出した後、PCR増幅を行ない、2%アガロースゲル電気泳動により解析した。0Dayは未乾燥を表し、1Day以降は乾燥後の経過期間を表している。その結果、PCR産物が4週間(4Week)まで確認できた。

を密封し、どの程度保存可能かを検討中である。

以上の検討結果から、ガラス繊維ろ紙を用いたゲノムDNA抽出法は家畜・家禽のゲノムDNA抽出にも有効であることが示された。また、本法を効果的に利用するためには、家禽では血球の希釈倍率を50倍以上にすること、抗酸化剤としては10%亜硫酸Naが適当であること、ろ紙はサンプル吸着後に乾燥させることが重要であることが示唆された。本研究ではサンプル吸着後のろ紙を4週間まで保存可能であることを確認した。得られるDNAは通常のPCRやLA-PCRのみならず、96か所のSNPsをマルチプレックスPCRにより遺伝子型判定するDigiTag2法にも利用可能であることが示されている⁴⁾。

現在、前述のように、保存方法の改善による保存期間の延長を検討中である。また、血球以外のサンプル(肉・唾液・糞便)についても利用可能かについて検討している。本法は、コスト面で優れているが、16個体の血球から1時間でゲノムDNAを抽出できることから、時間面においても優れた方法であり、家畜や家禽においても多検体の遺伝子型判定に有用な技術であることが示された。

要約

【目的】家畜や家禽における安価で迅速なゲノムDNA抽出法の確立を目的として、本研究では、植物で実績のあるガラス繊維ろ紙を用いたDNA抽出法を検討したので報告する。

【材料及び方法】材料には、ニワトリ血球とウシ血球を各4または8検体供試した。方法は基本的に村元ら(2005)²⁾を参照し、以下の5項目(①血球の希釈倍率、②抗酸化物質の濃度、③サンプル吸着ろ紙の乾燥処理、④抗酸化物質の種類、⑤サンプル吸着後の保存期間)について、DNA抽出とPCR増幅の可否を検討した。

【結果及び考察】1. 血球の希釈倍率は、ニワトリでは50倍~200倍で1 μg 程度のゲノムDNAが得られ、1kbのPCR産物が確認できた。また、LA-PCRによって約5kbの産物も確認できた。他方、原液と10倍希釈ではゲノムDNAが抽出されたが、PCR増幅できなかった。ウシでは原液で7.8 μg 程度・10倍で1.5 μg 程度・50倍~200倍で1 μg 程度のゲノムDNAを得ることができた。また、

PCRにより800 bpの増幅産物を確認できた。2. 抗酸化物質である亜硫酸 Na の濃度は、植物と同様10%でよいことが確認できた。3. 血球を吸着させたろ紙を乾燥させると、乾燥せずすぐに抽出する場合に比べて DNA 量が増加した。4. 抗酸化剤の亜硫酸 Na をビタミン C に変更した結果、ゲノム抽出できないことが示された。5. サンプル吸着後の保存は、室温で4週間まで DNA 抽出が可能であることを確認した。本法は、1サンプル当たりの費用が10円程度で、コスト面で優れ、16個体の血球からおよそ1時間でゲノム DNA が抽出できた。以上から、ガラス繊維ろ紙を用いたゲノム DNA 抽出法は家畜・家禽のゲノム DNA 抽出にも安価にかつ短時間で利用できることが示された。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、ご協力いただいた附属農場入来牧場と家畜育種学研究室の皆様には深甚の謝意を表します。また、本研究の一部は、文部科学省 科学研究費補助金と農業生物資源ゲノムバンク事業の研究助成を受けて実施した。ここに感謝の意を表します。

文 献

- 1) Meuwissen, T.H., B.J. Hayes, M.E. Goddard. 2001. Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. *Genetics*. 157: 1819-29.
- 2) 村元靖典・沢野定憲. 2005. ガラス繊維濾紙を利用した植物からの迅速・簡便・低コストな DNA 抽出法. 平成16年度関東東海北陸農業研究成果情報. Available: http://narc.naro.affrc.go.jp/chousei/shiryou/kankou/seika/kanto16/08/16_08_06.html
- 3) Rikimaru, K., H. Takahashi. 2007. A method for discriminating a Japanese brand of chicken, the Hinai-jidori, using microsatellite markers. *Poult. Sci.* 86: 1881-6.
- 4) 下桐 猛・西田奈央・丹羽孝介・西堀正英・工藤美雪・平岩秀樹・岡本 新・前田芳實・徳永勝士・安江 博. 2008. わが国で開発された DigiTag2 法によるニワトリ SNPs の同時検出. *動物遺伝育種研究*. 36: 221.