

生きているゼブラフィッシュ胚のジェノタイピング法の改良

1240181 相原陽介

Refining the genotyping method for live zebrafish embryos

Yosuke Aihara

ゼブラフィッシュを用いて遺伝学的な研究を行う場合は、生きたままの状態ではジェノタイピングを行う必要がある。汎用されているのは成体の尾びれを切断して DNA を調製するフィンクリップ法だが、この方法では成体まで育成する時間とコストが必要になる。またフィンクリップを3日胚で行う方法もあるが、尾びれを顕微鏡下で採取する必要があるため多数のサンプルを扱うことは難しい。そのため、生きた胚の表面組織からプロテアーゼを用いて細胞を剥離させる方法が報告されているが、胚の生存率と DNA の回収率・検出率に問題があった。そこで、この方法を改良することにより、これらの問題点を解決することを試みた。本研究では、プロテアーゼとしてプロテイナーゼ K とトリプシンを複数の濃度で比較するとともに、操作時に用いるウェルの容量が胚の生存へ与える影響を調べるため 96 と 48 ウェルプレートと比較した。また、なるべく短時間でジェノタイピングを行うことが可能なように qPCR 法を採用した。その結果、トリプシンを適切な濃度で使用すると胚への影響を最小限に留めながら、qPCR 検出が可能な量の DNA を抽出できることがわかった。次に、*sox3* 遺伝子にタグをノックインした胚の遺伝型が判別できるかを調べるため、ノックインアレルの検出用のプローブを設計した。wt とノックインアレル特異的な 2 種のプローブを用いてマルチプレックス qPCR を行ったところ、ノックインアレルのホモ接合型、ヘテロ接合型、野生型の 3 つの遺伝型をほとんどのサンプルでは区別することが出来たが、一部のサンプルで qPCR の検出に問題が見られたため、現在その改善を図っている。