



DNA 染色試薬で小型動物表面の微細構造を観察する

東京理科大学 創域理工学部 生命生物科学科 教授

助教

和田
さかした
坂下

なおゆき
直之
みさき
美咲

1. 実験のねらい

筆者らの専門である発生生物学分野の研究では、胚の全体や器官・組織の形態を詳細に観察することが求められる。この時、詳細に観察する手法として、固定した個体を、蛍光を発する DNA 結合色素で染色して、励起光下で観察する手法が報告されている（文献 1）。このように書くと難しい技術のようにみえるが、実は、高校生物の DNA 実験ができる装置や試薬があれば同様な像を観察することが出来る。ここでは、それらの装置や試薬を使って、入手しやすいニワトリ胚や小型魚類の表面を観察する方法を紹介したい。

用いるのは、高校生物教科書にも記載されている「DNA 電気泳動法」で用いる試薬や器具類である。電気泳動法では、DNA を泳動したゲルを「DNA 染色液」に浸して、染色された DNA の位置を検出する。DNA 染色液にはいくつかの種類があるが、昨今は蛍光色素を用いるのが専らで、高校生物の教科書でも、DNA バンドパターンの蛍光像が掲載されているものもある。一般に、DNA 検出用蛍光色素は DNA に結合する性質を示すことを利用し、今回の実験では、生物試料を染色液に浸し、試料表面を構成する細胞の DNA を染色して蛍光観察する。

2. 準備

(1) 生物材料：ここでは例として、私たちの研究室で使っているニワトリ胚（受精卵の入手や孵卵法は文献 2 を参考）、および小型魚類（ゼブラフィッシュ）を挙げる【図 1】。小型魚類は、飼育中に死んでしまった個体で良く（ただし死後の早いうちに固定する）、鮮度が高ければ、スーパーで売っている生シラスなどの小型魚でも可。

(2) 蛍光装置：電気泳動で用いる UV 照明装置、または青色 LED 照明装置（懐中電灯型の青色光照明でもよい）。UV 照明は古くから DNA 検出時に用いられているが、安全面から最近では青色 LED 照明が増えている（こちらの方が安価でもある）。いずれの場合も、光源から目を

守る安全ゴーグルやフィルター（橙～黄色）を用意すること。

(3) 試薬類：① DNA 結合試薬：蛍光装置が UV 照明の場合は臭化エチジウム（EtBr、各社から市販されている 10 mg/mL のもの）を、青色 LED の場合は非 EtBr 核酸染色液を用いる。後者の例としてミドリグリーン（日本ジェネティクス、NE-MG03）、Atlas Sight DNA Stain（フナコシ、BH40401）などがある。いずれも実験者の皮膚に付着すると、DNA に結合して細胞に影響する可能性があるため、安全面から手袋を使用して実験すること（高校教科書にも注意が書かれている）。② 固定液（ホルマリン液）：ホルムアルデヒド液を生理食塩水で 1/10 に希釈したもの。③ 生理食塩水（未滅菌で可）、④ 界面活性剤：食器用洗剤を生理食塩水で 0.5 % に希釈する。

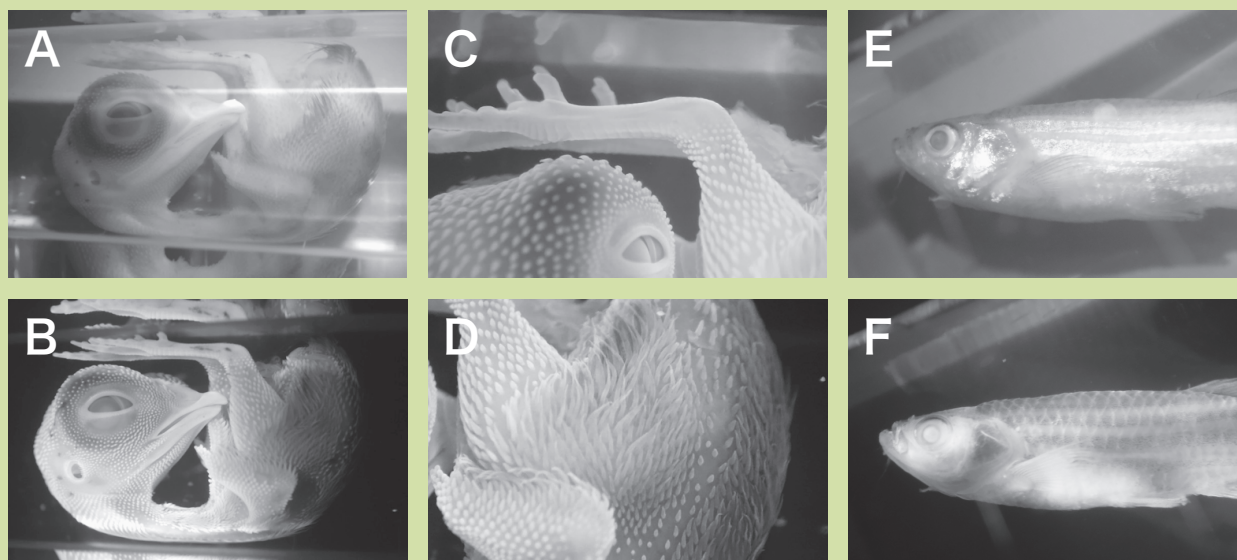
(4) その他：実験用手袋（実験時には安全面から手袋を使用する。手に密着するニトリルゴムタイプがお勧め）、小型試料ビン（用いる動物を出し入れできる口径で、密栓できるもの。今回用いたものは 25mL のプラスチック製品）、ピンセット、虫メガネ（大きいレンズ面で、高い倍率のものがよい）観察用プラスチックトレイ（透明なもの）など。

3. 実際の操作と観察

(1) 試料の固定：サンプルを試料ビンに入れ、ホルマリン液を満たして一晩固定する。一晩経過したら、ホルマリン液から生理食塩水に置換し、さらに 2-3 回洗浄して残留ホルマリンを除去する。ホルマリン廃液は回収して、指定された方法で処分する。

(2) 表面処理：魚類など表面が硬い場合、染色液の浸透性を上げるために、0.5% 界面活性剤を加えた生理食塩水に浸し、30-60 分処理する。処理後は生理食塩水で 2-3 回すすぐ。

(3) 染色：核酸染色試薬を生理食塩水で希釈する。EtBr なら 1/5000-1/10000、非 EtBr 核酸染色液な



【図 1】蛍光染色での表面観察 A、B：通常光で観察したニワトリ 12 日胚 (A) と、DNA 染色色素処理の後、青色光による蛍光像を黄色フィルター越しに観察した胚 (B)。蛍光像 (B) では、胚表面の羽毛芽の凹凸 (いわゆる鳥肌) が明瞭になる。C、D：胚の一部を拡大したもの。虫メガネとデジカメのズーム機能の併用で、ここまで拡大して詳細に観察できる。E、F：ゼブラフィッシュ成魚の蛍光観察。通常光 (E) でも大雑把な構造は観察出来るが、蛍光像 (F) ではウロコの詳細な形やその並びなど、より微細な構造・形態を観察できる。写真ではわかりづらいが、ヒレを構成する骨 (鰭条) も 1 本 1 本が見える。

ら 1/1000-1/2000 に希釈し、試料ビンに試料全体が浸るように添加する。これ以降の操作は試料ビンを遮光して行う (アルミ箔で覆うなどする)。同じく、これ以降の操作は手袋を使用し、こぼした場合は十分に拭き取ること。1 時間から一晩浸した後、生理食塩水に置換して 2-3 回洗う。EtBr を用いた場合は、回収して指定された方法で処分する。

(4) 観察：サンプルをビンのまま、あるいはピンセットでトレイ上に出し、照明装置の上に載せ、黄色～橙色のフィルターを介して観察する。照明装置が小型の場合、装置を立てて、サンプルの横から照明光をあてても良い。サンプルは小さいので、虫メガネを介して観察する。フィルターと虫メガネを介しての長時間の観察は難しいので、写真を撮影した方がじっくり観察できる。デジカメやスマホのレンズ部前面に虫メガネをあてて、さらにフィルターを介して写真を撮る。

我々がこの操作でニワトリ胚や魚類 (成魚) を観察した結果を【図 1】に載せる。低倍率観察した走査型電子顕微鏡像のように組織全体の膨らみや窪み、通常の照明をあてただけでは見えない皮膚の細かな突起、さらに作業時に生じた組織の傷まで明瞭に観察できる。

4. 指導のポイント

通常光に比べて生物表面のコントラストが高くなるため、形態の微小な変化が観察しやすくなる。写真を撮って、微細構造の形態やその並び方、場所による構造の違い、などを観察する。例えば【図 1C】の写真から、足の先端半分は羽毛ではなくウロコ状構造になっていることがわかる。照明の向きによって微細構造の見え方が異なるので、装置や試料の方向を変えて、目的構造が最も明瞭に見える条件を探すと良い。

併せて、仮に試薬を素手で扱った場合、手指の皮膚細胞の DNA も同様に蛍光色素染色されることが予想されるため、「DNA 染色試薬の操作時には手袋使用が必要である」ことの理解につながればと思う。

今回の執筆にあたり、予備実験として植物の葉を用いて、いくつかの条件で検討したが、残念ながら同様の像は観察出来なかった。原因としては、植物の表面が撥水性を示すため DNA 染色液の浸透が悪いことと、植物自体が持つ色素が励起光照射で蛍光を発することが挙げられる。過去の「科学フォーラム」誌では、植物の自家蛍光を指標にした形態観察の方法が紹介されている (文献 3)。今回紹介した DNA 染色試薬とは原理が異なるが、類似した道具で形態観察できる点に注目したい。

参考文献

- 1) Sandell LL, Kurosaka H, Trainor PA. Genesis. 50, 844-850 (2012).
- 2) 和田直之、科学フォーラム、431、56-57 (2022).
- 3) 橋本研志、朽津和幸、科学フォーラム、436、60-61 (2023).