# 成績概要書(2003年1月作成)

課題分類:

研究課題:LAMP 法による牛受精卵性判別キットの開発

(牛受精卵の迅速、低コスト性判別キットの開発)

担当部署: 道立畜試 畜産工学部 遺伝子工学科・受精卵移植科

家畜生産部 育種科

栄研化学㈱・北大・酪農大・ジェネティクス北海道・北海道農業開発公社

担当者名:協力分担:

予算区分:道費(重点領域特研)

研究期間:2001~2002 年度(平成 13~14 年度)

## 1. 目的

現在、PCR 法により性判別した牛受精卵を受胚牛に移植することにより、雌雄の子牛を産み分けることが可能になっている。しかし、PCR 法は DNA の増幅と判定に時間がかかり、操作も煩雑であるという問題点があった。近年、迅速かつ簡易に DNA の増幅と検出が可能な新遺伝子増幅去(Loop-mediated Isothermal Amplification ; LAMP) 法が開発された。そこで、この LAMP 法と当場が特許取得した牛雄特異的 DNA 配列(S4)を組み合わせて、簡易で迅速に牛受精卵の性判別ができる技術を開発するとともに試薬のキット化を図る。

#### 2. 方法

- 1) LAMP 法による牛受精卵性判別技術の開発
  - (1) LAMP 用プライマーの設計
  - (2) 反応条件の検討
  - (3) DNA 抽出方法の検討
- 2) LAMP 法による牛受精卵性判別キットの判別精度と保存安定性
- 3) 性判別受精卵の移植による実証試験

### 3. 成果の概要

- 1) (1) 雄特異的 DNA 配列 (S4) および公開されている雌雄共通 DNA 配列から、LAMP 用プライマーをそれぞれ 3 および 15 セット設計した。それらの中から、特異性、反応速度および検出感度の優れたプライマー (Primer M1 および Primer C1) を選定した。
- 1) (2) 反応条件として、温度、時間および検出感度について検討した。反応温度は 63 が最適で、35 分で濁度による検出が可能であった。また、その条件で雄特異的 DNA は 0.5pg まで、雌雄共通 DNA は 0.01pg まで安定して検出できた(図 1)。
- 1) (3) DNA 抽出法としては、NaOH 法が判定率および一致率が高く、操作も簡便であることから最適と判断した(表 1)。試料として 5 細胞を採取すれば、DNA 抽出後に 20 で約 1 ヶ月の保存が可能であった。
- 2) (1) 上記 1)において決定されたプライマー、反応温度および抽出方法により、キットを作製した(図2および3)。牛受精卵から採取した 1 細胞から 5 細胞を用いてキットの判定精度を検定した。5 細胞を用いると、95%以上を正しく判定することができた(表2)。
- 2) (2) LAMP 牛受精卵性判別キットは、 20 で凍結保存することにより、すくなくとも 9 ヶ月間は検出感度の低下がみられなかった(図4)。
- 3) 性判別を行った 61 個の受精卵を受胚牛に移植した。35 頭が受胎し、出生した 33 頭の子牛の性はすべて判定結果と一致した (表 3)。

LAMP 法による牛受精卵の性判別技術を開発してキットを作成し、その有効性を実証した。本キットでは 63 35 分で DNA が増幅され、さらに濁度による簡易な検出が可能であった。また、その判別に要する時間は、従来の約3時間から約1時間に短縮された。

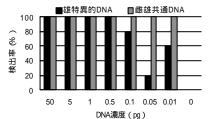


図 1 LAMP 法による白血球由来 DNA の検出率



抽出方法	実験数ª	判定可能数(%)	一致数(%)
Tris	20	16 (80)	13 ( 81 )
NaOH	20	19 (95)	19 ( 100 )
PK-TW	20	18 (90)	17 ( 94)

- 。PCR 法により雄と判定された受精卵から採取した1細胞を試料とした b雌雄共通反応が陽性であり細胞を確実にサンブリングしたことが確認さ
- c雄特異的反応が陽性であり雄と判定された検体



図 2 LAMP 法牛受精卵性判別試薬キット



図3 白濁による LAMP 反応の検出

表 2 受精卵由来細胞を用いた LAMP 牛受精卵性判別キットの検出感度評価

細胞数 実験	実験数	判定可能a	LAMP による判定結果			
神心致 关键数		(%)		一致数 b ( % )		一致数 b (%)
1	48	38 ( 79)	12	12 (100)	26	17 (65)
2	44	42 (95)	16	16 (100)	26	22 (85)
3	47	45 (96)	19	19 (100)	26	22 (85)
4	46	46 (100)	20	20 (100)	26	22 (85)
5	44	44 (100)	22	22 (100)	22	21 (95)

 $^{\mathrm{a}}$  雌雄共通反応が陽性であり細胞を確実にサンプリングしたことが確認された検体  $^{\mathrm{b}}$  PCR による性判別結果との比較

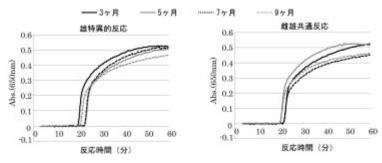


表 3 LAMP 法による性判別受精卵の

移植実証試験						
移植数	受胎数	分娩数	一致数			
	(%)	(%)	(%)			
61	35 (57)	33 (94)	33(100)a			

a雄;12,雌;21

図 4 LAMP 牛受精卵性判別キットの凍結保存安定性試験(試料:5細胞)

#### 4. 成果の活用面と留意点

- 1) 正確かつ効率的に性判別を行うために、増幅および増幅の判定は専用測定装置を使用して行うことが望ましい。
- 2) 確実に性判別を行うために、試料とする細胞は胚盤胞の栄養外胚葉の 10%以上を用い、変性 した細胞は用いない。また、桑実胚など細胞数の少ない受精卵を用いる場合も 10 細胞以上を 採取する。
- 3) 細胞から DNA を抽出した後は、直ちに性判別を実施することが望ましい。やむを得ず DNA 抽出後に凍結保存(-20 )する場合は1ヶ月以内に判定を行う。
- 4) LAMP 牛受精卵性判別キットは 2002 年度末より正式販売を行う。
- 5) 本方法は「牛胚の性判別用プライマーおよびそれを用いた牛の性判別方法(特願 2002-085025)」として特許申請中である。

### 5. 残された問題とその対応

1) 性判別受精卵の凍結保存技術を改善する。