

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胎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法（Loop-mediated Isothermal Amplification；LAMP）法が開発された。そこで、このLAMP法と現場が特許取得した牛雄特異的DNA配列（S4）を組み合わせ、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個の受精卵を受胎牛に移植した。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。

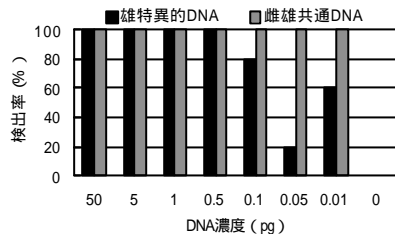


図1 LAMP法による白血球由来 DNA の検出率

表1 DNA抽出方法の検討

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

^a 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プリングしたことが確認された検体
^c 雄特異的の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	実験数	判定可能 ^a (%)	LAMPによる判定結果			
			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)

^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 ^b PCRによる性別判定結果との比較

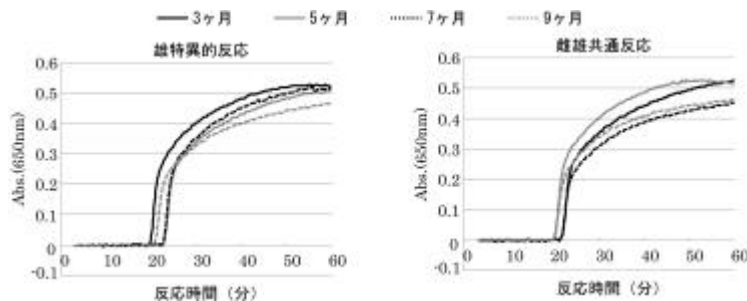


図4 LAMP牛受精卵性判別キットの凍結保存安定性試験(試料:5細胞)

表3 LAMP法による性別判定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

4. 成果の活用面と留意点

- 1) 正確かつ効率的に性別判定を行うために、増幅および増幅の判定は専用測定装置を使用することが望ましい。
- 2) 確実に性別判定を行うために、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、直ちに性別判定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「牛胚の性別判定用プライマーおよびそれを用いた牛の性別判定方法(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) 性別判定受精卵の凍結保存技術を改善する。