

6) 簡単で速い牛受精卵の性別判定キット

(LAMP法による牛受精卵性別判定キットの開発)

北海道立畜産試験場 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

1. 試験のねらい

子牛を生産する場合、乳用牛では乳生産のための雌、肉用牛では発育のよい雄の子牛が望まれる場合が多い。現在、子牛の雌雄産み分けは、あらかじめ性別判定した受精卵を受胎牛に移植することで行われている。しかし、DNAを増幅するためのPCR法は時間がかかるうえ、操作も煩雑であるという問題点がある。そこで、簡易で迅速に牛受精卵の性別判定を行うために、新たに開発された遺伝子増幅法(Loop-mediated Isothermal Amplification; LAMP)と当場が特許取得した牛雄特異的DNA配列(S4)を組み合わせた性別判定技術を開発するとともに試薬のキット化を図る。

2. 試験の方法

1) LAMP法による性別判定技術の開発

雄特異的および雌雄共通DNA配列を増幅するためのLAMP用プライマーを設計し、反応条件(反応温度、反応時間および検出感度)の検討を行った。

2) DNA抽出方法の検討

受精卵の細胞から効率的にDNA抽出を行うために、加熱法、アルカリ法および蛋白分解酵素法を比較した。

3) LAMP法牛受精卵性別判定キットの性能評価

1)および2)の検討結果をもとにキットを作成し、受精卵から採取した細胞(1~5細胞)を用いて検出感度を評価した。また、キットの保存安定性を評価した。

4) 性別判定受精卵の移植による実証試験

LAMP法により性別判定した受精卵を移植し、生まれた子牛の性を確認した。

3. 試験の結果

1) LAMP法による性別判定技術の開発

LAMP法により、63°Cの一定温度で、35分以内に雄特異的および雌雄共通DNA配列を増幅することができた。増幅されたDNAは、反応液の濁度を測定することにより、簡易に検出することができた(図1)。

2) DNA抽出方法の検討

DNA抽出法としては、アルカリ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)。

3) LAMP法牛受精卵性別判定キットの性能評価

作成したキット(図2)は、試料として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)。また、本キットは、-20°C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。

4) 性別判定受精卵の移植による実証試験

性別判定を行った受精卵を受胎牛に移植し、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)。

《本キットの特徴》

本キットは、迅速かつ簡易な牛受精卵の性別判定を可能にし、所要時間を従来の約3時間から約1時間に短縮した。DNAの増幅は、反応液の白濁により簡易に検出できることから、電気泳動を必要としない。さらに、少数の細胞を用いて正確に性別判定を行うことができる。これらのことから、本キットは、牛受精卵の性別判定技術の普及に大きく貢献するものと思われる。

本キットは、現在試験販売を実施しており、本年度末より本格発売を行う予定である。

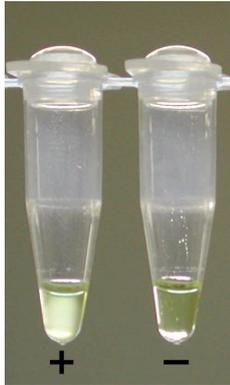


図1 反応液の白濁による増幅の検出



図2 LAMP法牛受精卵性判別試薬キット

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 (%)
加熱法	20	16 (80)	13 (81)
アルカリ法	20	19 (95)	19 (100)
酵素法	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

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

【用語解説】

LAMP法：PCR法に代わる新遺伝子増幅法。一定温度で迅速かつ特異的なDNAの増幅が可能であり、反応液の白濁により増幅産物を検出することができる。

性判別方法の比較

	LAMP	PCR
プライマー	6箇所の領域に対して4種類のプライマーを設定するため特異性が高い	2箇所の領域に対して2種類のプライマーを設定する
所要時間	約1時間で判定が可能	約3時間
DNA合成酵素	鎖置換型DNA合成酵素	TaqDNAポリメラーゼなど
温度制御	63の一定温度	50~95程度の複雑な温度制御が必要
検出方法	反応液の白濁により容易に検出できる	増幅産物の電気泳動あるいはUV照射
必要な機器	エンドポイント濁度測定装置	PCR装置・電気泳動装置・UV照射装置