

2. 牛胚の性判別法に関する研究(短報)

— 2点PCR法の性判別への応用 —

酪農科：井上哲郎

農林水産省畜産試験場：渡邊伸也

要 約

牛胚の性判別を2点PCR法で行なうための条件(25 μ l反応系)

1) 酵素量…1.5unit/react

2) 雌雄共通塩基配列に対応するプライマー…SV

SV1: 5' -GGCCATGGATGCAATCCAGCCTTTGAAACC-3'

SV2: 5' -TTGATTGGATCCACGCATAGGGGGAACATG-3'

3) 雄特異的塩基配列に対応するプライマー…MR

MR1: 5' -AGCCTTGTGCCCTGGCAACTGGGGAAACGG-3'

MR2: 5' -CCAACCGGTTCCACAGTCTCTAGGAAACAG-3'

4) Mg²⁺濃度…4.5mM

5) サイクル…93℃ 60秒→(93℃ 25秒→72℃ 45秒)×50回

緒 言

家畜の雌雄産み分け技術は、育種改良及び生産性の効率を向上させることを目的とする技術である。これにはいくつかの方法が試みられているが、中には、再現性やコストに問題のあるものもあり、現在、牛においてはPCR(Polymerase Chain Reaction)法が主に用いられている。これは、発達中の胚(桑実期胚～胚盤胞期胚)の一部を顕微鏡下で切り取り、その細胞からDNAを抽出し、Y染色体上のDNAに特異的に存在する塩基配列をPCRによって増幅し、検出する方法である。残りの胚は数時間培養し、切断面を修復させて凍結保存しておき、雌雄が判明した後融解して移植することにより、あらかじめ性の判った牛を生産することができる。

通常、PCRは「熱変性→アニーリング→伸長反応」の3点からなる。しかし最近、アニーリングと伸長反応を同一温度で行う方法(2点PCR法)を推奨する酵素が市販されはじめている。そこで、本研究では、この2点PCR法を用いて牛胚の性判別を行うための諸条件について検討した。

試験方法

1. 試験期間

供試胚の作出：平成9年4月～7月

研究期間：平成9年7月28日～11月27日

2. 試験の概要

まず、牛白血球を検体として、「熱変性」と「アニーリング・伸長反応」の2点よりなるPCR法を行うための諸条件を検討した。

プライマーには、雌雄共通塩基配列に対応するSV(seminal vesicle protein)、雄特異的塩基配列に対応するMR(male-specific repetitive)を使用した。

DNAポリメラーゼには、経時的活性化酵素を供することにより、ホットスタート操作の省略も試みた。

最終的に2分割胚を検体とし、牛白血球で決定された条件で胚の性判別が可能かどうか調べた。

結 果

牛胚の性判別を2点PCR法で行なうための条件(25 μ l反応系)

1) 雌雄共通塩基配列に対応するプライマー…SV

2) 雄特異的塩基配列に対応するプライマー…MR

- 3) 酵素…1.5 unit / react
- 4) Mg^{2+} …4.5 mM
- 5) サイクル…93℃ 600秒 → (93℃ 25秒 → 72℃ 45秒) × 50回

ま と め

結果に示した条件を用いることにより、2点PCR法によって牛胚の性別判別が可能であることが確認された。この方法を用いることで、煩雑なホットスタートを行うことなく非特異的産物の生成を抑えることができる。

PCR法による性別判別技術自体はすでに実用化の域に達している。しかし、バイオプシー胚の凍結融解後の受胎率は依然低く、凍結技術の早急な改善が望まれる。

謝 辞

農林水産省畜産試験場繁殖部の皆様の御指導に感謝いたします。

参 考 文 献

- 1) 石田美保・渡邊伸也・榊田博司：PCR法を用いたウシ胚の性別判別におけるシグナル検出の改善，日本胚移植研究会誌
- 2) 佐藤義政・渡邊伸也・榊田博司：キャピラリーPCR法を用いたウシ胚の性別判定の検討，東日本家畜受精卵移植技術研究会誌