

成績概要書（平成 19 年 1 月作成）

研究課題： 牛胚性判別キットを用いたフリーマーチンの迅速診断
（等温 DNA 増幅法(LAMP 法)を活用した微量 DNA 迅速検出技術の開発）
担当部署： 道立畜試 基盤研究部 受精卵移植科
予算区分： 外部資金
研究期間： 完 2005 年度（平成 17 年度）

1. 目的

ウシ異性双子由来の雌子牛の多くは血中性染色体キメラによるフリーマーチンとして肉用に処理されるが、なかには正常な繁殖性を持つ個体もあり、雌牛の価値の高いホルスタインでは経済的な損失が大きい。そこで、本実験では、フリーマーチン判定法の簡易化を目的として、先に我々が開発し市販されている LAMP 法によるウシ胚性判別試薬キットを活用した血中性染色体キメラの検出技術を開発する。

2. 方法

1) 血液試料の簡易処理方法の検討

血液希釈倍率の設定

雄特異的 DNA 検出感度の検討

2) LAMP 法による血液キメラ検査

3. 結果の概要

1)- 血液最終希釈倍率が 10～500 倍希釈では、加温後に濁度が上昇し、0.2 を越えた（図 1）。1000 倍希釈では、加温前後ともに濁度の上昇は認められなかった。以降の試験では血液最終希釈倍率を 1000 倍とし、濁度が 0.2 を越えた場合に DNA が増幅された陽性反応と判定した。

1)- 10～0.01%の XY 白血球を含むすべての血液で雄特異的 DNA が検出された（図 2）。血液は、NaOH による簡易 DNA 抽出後に試料として用いることができた。判定に要する時間は血液の処理を含め約 1 時間であり、従来の染色体検査（3-4 日）あるいは PCR 法（4-5 時間）に比較して短縮された（フロー 1）。

2) 異性双子由来の雌子牛から採取した血液のキメラ検査を実施した。LAMP 法の結果は、すべて染色体検査および PCR 検査の結果と一致した（表 1）。LAMP 法で正常と判定された 4 例中 3 例は、後日受胎あるいは分娩が確認された。残りの 1 例も発情を確認し、人工授精が実施された。

本実験では、LAMP 法によるウシ胚性判別試薬キットを活用して血中性染色体キメラを検出する方法を示した。本方法により、血液を試料として約 1 時間で性染色体キメラに基づくフリーマーチンの判定が可能であった。

フロー 1 LAMP 法による血液キメラ検査手順

採血

血液 50 μ l を蒸留水 4.95ml で希釈

希釈血液 0.5ml に 0.05N NaOH 0.5ml を添加

室温で 5 分以上静置 (DNA 抽出)

DNA 試料 5 μ l を LAMP 反応液に添加

63、35 分間保温

濁度測定

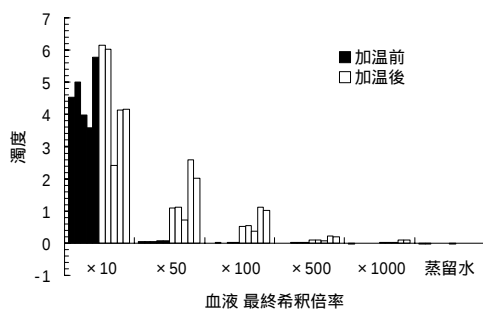


図 1 血液による濁度測定への影響

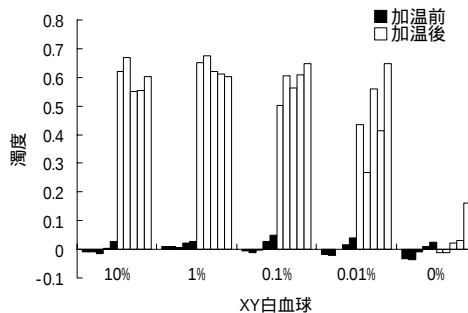


図 2 雄特異的 DNA の検出感度

表 1 異性双子由来雌子牛における染色体検査および DNA 分析の比較

個体番号	週齢	染色体検査			DNA 分析	
		60 XX	60 XY	(XY %)	PCR	LAMP
1	1	10	8	(44)	キメラ	キメラ
2	1	12	13	(52)	キメラ	キメラ
3	1	147	53	(27)	キメラ	キメラ
4	5	167	33	(17)	キメラ	キメラ
5	2	154	46	(23)	キメラ	キメラ
6	1	74	186	(72)	キメラ	キメラ
7	3	37	10	(21)	キメラ	キメラ
8	2	171	29	(15)	キメラ	キメラ
9	10	161	39	(20)	キメラ	キメラ
10	1	153	32	(17)	キメラ	キメラ
11	1	200	0	(0)	正常	正常
12	3	200	0	(0)	正常	正常
13	3	200	0	(0)	正常	正常
14	2	200	0	(0)	正常	正常

-; 未計測

4. 成果の活用面と留意点

- 1) 血液キメラ検査に基づく簡易フリーマーチン判定法として利用する。
- 2) 陰性対照として DNA 合成酵素を含まない反応を実施し、血液添加による非特異的な濁度の上昇がないことを確認する。
- 3) 血液添加による非特異的な濁度の上昇がある場合は、DNA の精製処理を行なった後、検査を実施する。

5. 残された問題とその対応

なし