6)牛胚の性判別と新プライマーの開発

新得畜産試験場　生産技術部　生物工学科

1.試験のねらい

牛では生まれた子牛が雄か雌かによって経済価値が大きく異なる。例えば、乳牛では搾乳用の後継牛、肉牛では肥育用雄牛というように、目的に応じて雌雄を産み分けることができれば、コスト低減など経営合理年に大きく貢献すると期待されている。

家畜の性判別については、これまでにも遠心分離によるX・Y精子の分離、胚の染色体検査など様々な方法が試みられてきたが、遠心分離では再現性が低く、染色体検査では判定結果は正確であるが、技術に熟練を要し標本作成率が50%程度であるなど実用に耐えるものはなかった。しかし、最近になり遺伝子工学が発達し、中でも目的とするDNA断片のみを大量に増やすことができるPCR(Polymerase chain reaction)法は、胚の性判別を可能にするものと期待されている。

本試験では、中胚(受精卵)の性判別にPCR法が適用できるかどうかを検討した。また、新たに牛の雄に特異的なDNAを探索・解析し、それをもとにプライマーを設計して、PCRによる牛胚の性判別技術の開発をめざした。

2.試験の方法

1)中胚の性判別におけるPCRの適用性の検討

胚の一部を試料としたPCRによる性判別の可能性および切断した胚の受胎性について既製のプライマー2種類を用いて検討した。

2)牛Y染色体特異的DNAの分離・同定および新プライマーの設計

牛の雌雄のDNAを分析して違いの見られる部分を検索し、塩基配列を解析した。それを基にプライマーを設計し、PCRによる胚の性判別法について検討した。

3.試験の結果

1)PCRにより中胚の一部を試料として、雄特異的なDNAを増幅・検出することができ、この技術が性判別に適用可能であることを確認した。また、性判別した胚の移植試験により、胚を傷つけることによる耐凍性低下の問題が明かとなった(表1)。性判別成績では、初期の段階でコンタミネーション(不純物や不要なDNAの混入)に起因すると思われる誤判別が見られた(表2)。これらの問題点を解決してこの方法を広く普及するために、現在実証試験を実施中である。

2)雄に特異的な反応を示したDNA断片について、塩基配列の解析を行った。得られた塩基配列を基にプライマーを3組(A,B,C)設

計しPCRを行った結果、プライマーAとCでは雄にのみDNA断片が1本検出され、プライマーBでは雄のDNA断片に加え雌雄共通のDNA断片が検出された。

プライマーBについて胚の一部を試料としてPCRを行い(図1)、染色体検査による雌雄判定の結果と比較したところ全て一致した(表3)。この結果から、プライマーBを用いたPCRにより試料採取ミス(操作中における胚細胞の消失)のチェックと雌雄の判別が同時に行えることが示された。

以上の結果から、PCR法が中胚の性判別に適用できることが確認された。また、独自に設計した新プライマーを用いれば、従来2組必要であった試料採取ミスのチェックと雌雄の判別を1組のプライマーで行うことができ、より効率的であることが示された。

表1　　性判別胚の移植成績

移植方法	移植頭数	受胎頭数(%)	分娩頭数
新鮮胚移植	13	6(46.1)	6
凍結胚移植	43	12(27.9)	8[1)]
合計	56	18(32.1)	14

1)2頭流産、2頭は妊娠継続中

参考：平成5年度北海道における移植成績　新鮮胚59.8%、凍結胚48.3%

表2　　性判別成績

実施年度	性判別結果[1)]
平成3年	1/1
平成4年	5/8
平成6年	5/5
合計	11/14(78.6%)

1)一致頭数/分娩頭数

表3　　独自に開発したプライマーBを用いたPCRと染色体検査の結果

検査胚数	PCRによる判定結果	染色体検査結果	判定一致率(%)
36	♂　26	♂　26	100
	♀　10	♀　10	100

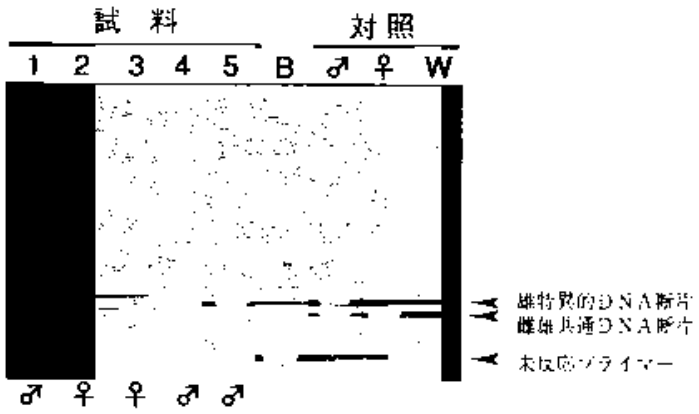

図1.PCRの電気泳動像

PCRで増幅したDNA断片が2本あれば雄、1本なら雌と断定

B:洗浄用バッファー

　採取したサンプルを洗浄する際に用いた本液にコンタミネーションが無いことを確認。

対照：

　試料として既知の性別の(♂,♀)と蒸留水(W)でPCRを行い、反応が性状であることを確認。

《用語解説》

DNA

　Deoxyribo Nucleic Acid　デオキシリボ核酸の略称。

　生物の遺伝情報を担っている化学物質。

プライマー

　最初のもの、きっかけを作るものという意味。PCRでDNAを増やすときに、目的のDNA断片のみを増やすきっかけとなる20～30塩基の短いDNA断片。

目次へ戻る