

唾液を用いた初生豚のphosphohexose isomerase (PHI) 遺伝子型の判定

誌名	畜産試験場研究報告 = Bulletin of the National Institute of Animal Industry
ISSN	0077488X
著者	三上, 仁志 大西, 彰 阿部, 恒夫
巻/号	44号
掲載ページ	p. 93-96
発行年月	1986年3月

短 報

唾液を用いた初生豚の phosphohexose isomerase (PHI) 遺伝子型の判定

三上仁志・大西 彰・阿部恒夫

緒 言

1971年に豚の phosphohexose isomerase (EC. 5.3.1.9, glucosephosphate isomerase) の遺伝的変異が報告された^{1,2)}。近年、この酵素多型を支配する遺伝子座, PHI がハロセン感受性遺伝子座, HAL と密接に連鎖していることが知られ^{3,4)}、同じく HAL と密接に連鎖している血液型遺伝子座 H, 血液型 A-O システムの抑制遺伝子座, S とともにハロセン感受性遺伝子除去に役立つものと期待されている⁵⁻⁸⁾。

従来、豚の PHI 分析は、赤血球を試料としてでん粉ゲル電気泳動による方法が広く用いられているが、この方法では試料の採取、調整、ゲルの作製、泳動にかなりの労力、時間そして経験を必要とする。PHI 分析を実際の育種に応用するためには、多頭数の豚について調査する必要があり、より簡便な方法の開発が望まれている。

本研究では、補助者なしで採取できる初生豚の唾液を検体として、セルロースアセテート膜電気泳動により簡易に分析する方法を工夫した。

材 料 と 方 法

1. 試 料

當場産の生後5日以内の子豚を供試した。唾液の採取は、約10×10 cm のガーゼを人さし指にまきつけ、子豚の口腔内を拭い、唾液の付着した部位をハサミで切り取る。小試験管内で切り取ったガーゼから唾液を約0.2 ml の蒸留水で洗い出し、そのまま泳動用の試料とした。

対照用の赤血球は、同じ個体の豚の耳静脈に注射針を刺し、ヘパリン処理ヘマトクリット用毛細管で採取した血液をヘマトクリット用遠心器で分離し、血球量の5~10倍に蒸留水で希釈して試料とした。

2. 電気泳動

泳動はヘレナ研究所製の泳動装置キットを用い、基本的な操作は同メーカーにより指示されている方法に従っ

た。

1) セルロースアセテート膜

9.4×7.6 cm のTitan III ZZ と Titan III Iso Vis の2種類の膜を用いた。

2) 緩衝液

トリス・グリシン緩衝液 (25 m M トリス, 192 m M グリシン), pH 8.5 を用いた。

3) 膜のバッファライズ

泳動用と“サンドウィッチ染色”用の一対の膜を専用のトレイを用いて緩衝液に20分間浸す。このトレイで同時に12枚の膜を浸すことができるが、上記の緩衝液を用いた場合、浸す時間が数時間に及ぶと泳動像が乱れることがあった。

4) 試料の塗布

試料の塗布には、12検体用のサンプルウェルプレート、アプリケータを用いた。試料を5 μ l ずつサンプルウェルに取り、緩衝液から取り出した膜へアプリケータで1回塗布した。1回の塗布で自動的に0.3 μ l の試料が付着し、本試験での唾液試料では1回の塗布量が適当であった。もし染色濃度が薄い場合には塗布回数を増せば良い。

多数の試料を同時に泳動するため、1枚の膜に3列に塗布し、合計36検体を同時に泳動する試みも行った。

5) 泳動と泳動条件

専用の泳動槽を用い、泳動槽の上に置いたアイスノンで冷却しながら、200 V で25分泳動した。

6) 発 色

あらかじめ緩衝液に浸してあった別の膜に酵素反応発色液を1 ml 注いで染みこませ、泳動の終了した膜と重ね合わせる“サンドウィッチ法”により染色した。発色液は5 ml の0.1 M Tris-HCl 溶液 (pH 8.0) に8 mg の MgCl₂, 8 mg の Fructose-6-phosphate, 4 mg の NADP, 4 mg の MTT, 2 mg の PMS, 0.1 ml の glucose-6-phosphate dehydrogenase (100 unit/ml) を加えて用いた。サンドウィッチした後、5分以内に発色するので適当な

濃度となった時点で水道水で洗い反応を停止させた。

結果と考察

初生子豚からの唾液採取は、補助者なしでも1頭1分間も必要とせず、採血に比較してきわめて能率が良い。付着する唾液量はガーゼが軽く湿める程度で充分である。泳動のための試料調整も蒸留水で洗い出すだけで、遠心分離を必要としないことがわかった。

Titan III Iso Vis セルロースアセテート膜は分離能は良いが高価であり、Titan III ZZでも十分に目的は達することができる。唾液の泳動パターンは図1に示すように、赤血球のパターンと全く同様であり、明確に3遺伝子型を区別できる。

1枚の膜に試料を3列に塗布することにより、同時に36検体を泳動することも可能であった。

この PHI と HAL の間には、ピエトレン、ベルギーランドレース⁹⁾、フランスピエトレン⁶⁾、デンマークランドレース¹⁰⁾、日本のランドレース^{11,12)}、などで強い連鎖不平衡が認められ、PHI-BBがハロセン感受性遺伝子と連鎖している。この PHI-BBを持つ豚で PSE 筋が多発することがわが国でも確かめられている¹³⁾。

ハロセン感受性遺伝子 *HALⁿ* は、正常な遺伝子 *HAL^N* に対し劣性遺伝をするため、HAL-Nn の個体は HAL-

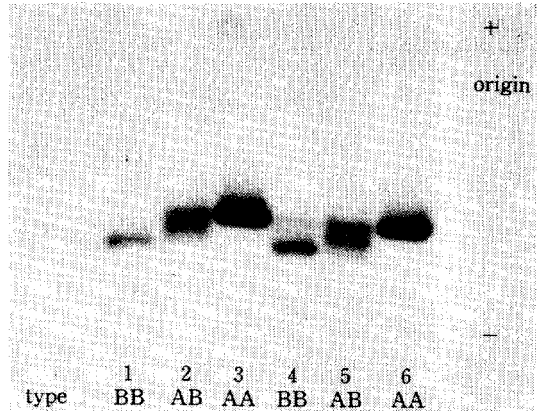


Fig. 1. Electrophoretic patterns of saliva (1, 2 and 3) and red cell (4, 5 and 6) PHI.

NN と区別できない。一方、PHI は明確にヘテロ型の区別ができる。従って、その集団での PHI と HAL の連鎖不平衡の程度にもよるが、PHI の判定と HAL 判定とを組み合わせることにより *HALⁿ* の淘汰速度を早めることが期待できる。初生豚の唾液を用い、PHI 遺伝子型を簡易に判定できる本方法の利用価値は高いものと考えられる。

引用文献

- 1) KÚBEK, A. and H. DINKLAGE : Phosphohexose isomerase polymorphism of pigs. *Anim. Blood Grps biochem. Genet.*, **2**, 35—38, 1971
- 2) SAISON, R. and M. O'REILLY, Phosphohexose isomerase variants in pigs. *Vox Sang.*, **20**, 274—276, 1971
- 3) Jørgensen, P. F., J. HYLDGAARD-JENSEN, J. MOUSTGAARD and G. EIKELNBOOM : Phosphohexose (PHI) and porcine halothane sensitivity. *Acta vet. Scand.*, **17**, 370—372, 1976
- 4) ANDRESEN, E. and P. JENSEN : Close linkage established between the HAL locus for halothane sensitivity and PHI (phosphohexose isomerase) locus in pigs of the Danish Landrace breed. *Nord. Vet.-Med.*, **29**, 502—504, 1977
- 5) RASMUSEN, B. A. and L. L. CHRISTIAN : H-blood type in pigs as predictors of stress susceptibility. *Science*, **191**, 947—948, 1976
- 6) GUÉRIN, G., L. OLLIVIER and P. SELLIER : Déséquilibres de linkage entre les locus Hal (Hyperthermie maligne) PHI et 6-PGD dans deux lignées Piétrain. *Ann. Génét. Sél. anim.*, **10**, 125—129, 1978
- 7) IMLAH, P.: Linkage studies between the halothane (Hal), phosphohexose isomerase (Phi) and H red blood cell loci of Pietrain/Hampshire and Landrace pigs. *Anim. Blood Grps biochem. Genet.*, **13**, 245—262, 1982
- 8) WEBB, A. J.: The halothane test: A practical method of eliminating porcine stress syndrome. *Vet. Res.*, **106**, 410—412, 1980
- 9) ANSAY, M., L. OLLIVIER : Créatinine plasmatique et sensibilité du porc au syndrome d'hyperthermie

- maligne. Relations avec deux enzymes du globule rouge (PHI et 6-PGD). *Ann. Génét. Sél. anim.*, **10**, 9—16, 1978
- 10) ANDRESEN, E.: Association between susceptibility to the malignant hyperthermia syndrome (MHS) and H blood types in Danish Landrace pigs explained by linkage disequilibrium. *Livest. Prod. Sci.*, **7**, 155—162, 1980
 - 11) WATANABE, S., A. AKITA, T. KOISHIKAWA, M. NAITO and K. HIMENO : Association between Halothane Reactivity and PHI phenotype, and its significance for predicting meat quality in Japanese Landrace pigs. *Jpn. J. Zootech. Sci.*, **50**, 574—581, 1979
 - 12) OISHI, T., H. NISHOJI, A. HORIUCHO and I. HYODO : Practical Values of the Halothane, H, PHI and 6PGD loci for exclusion of PSE pork in Japanese Landrace pigs. *Jpn. J. Zootech. Sci.*, **52**, 586—594, 1981

Determining Phosphohexose Isomerase (PHI) Genotypes of Newborn Piglets from their Saliva

Hitoshi MIKAMI, Akira ONISHI and Tsuneo ABE

Summary

Simple technique for determining PHI genotypes of newborn piglets from their saliva was developed. Samples of saliva were obtained by wiping mouth cavities with a piece of gauze. The phenotypes for allelic variants of saliva PHI, determined by electrophoresis on Titan III cellulose acetate plates, was the same as those of erythrocyte PHI.