

## PCR法によるブタ雄特異的DNAの検出

誌名	日本養豚学会誌 = The Japanese journal of swine science
ISSN	0913882X
巻/号	311
掲載ページ	p. 27-32
発行年月	1994年3月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター  
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council  
Secretariat



# PCR法によるブタ雄特異的DNAの検出： 検体細胞数および増幅条件の検討

河原崎達雄・高坂哲也\*・知久幹夫・曾根 勝・吉田光敏\*\*

静岡県中小家畜試験場, 静岡県菊川町 439

\* 茨城大農学部, 茨城県阿見町 300-3

\*\* 静岡大農学部, 静岡市 422

(1993年8月24日受付)

**要 約** PCR (Polymerase Chain Reaction) 法によるブタ雄特異的 DNA 増幅に及ぼす検体細胞数および増幅条件の影響についてブタ白血球を用いて検討した。McGraw ら (1988) が報告したブタ雄特異的 DNA 反復配列 491 bp を増幅するプライマーセット (Male-specific, M ; 5'-TCATGGACCAGG-TAGGGAAT-3', 5'-GAAAGACACGTCCTTGGAGA-3', 関口ら, 1992) およびプライマーセット M の内側領域 236 bp を増幅する Nested プライマーセット (Nested, N ; 5'-AAGTGGTCA-GCGTGTCCATA-3', 5'-TTTCTCCTGTATCCTCCTGC-3') を用いて PCR を 30 サイクル行ったところ, ブタ雄特異的 DNA のシグナル検出は検体白血球の細胞数に影響され, プライマーセット M では検体白血球数が 50 個以上, プライマーセット N では 10 個以上で雄特異的 DNA の検出が可能であった。PCR サイクル数の増加 (40 サイクルおよび 60 サイクル) および反応産物 (30 サイクル) を鋳型 DNA とした同一プライマーセットでの再度の増幅 (30 サイクル) は, 検出感度の著しい上昇に結び付かなかった。一方, プライマーセット M の反応産物 (30 サイクル) を鋳型 DNA とし, プライマーセット N により PCR (30 サイクル) を行ったところ, 検出感度は上昇し, 非常に少数 (推定数 1 個) の白血球からブタ雄特異的 DNA の検出が可能となった。

## 緒 言

Polymerase Chain Reaction (PCR) 法により雄特異的 DNA 配列を増幅し, 胚の雌雄を判別する試みがヒト<sup>1)</sup>, ウシ<sup>2-6)</sup>, ウサギ<sup>7)</sup>, マウス<sup>8)</sup>などで報告されている。ブタにおいては, 関口および川倉<sup>9)</sup>が McGraw ら<sup>10)</sup>の報告したブタ雄特異的 DNA 反復配列の検出を, 齊藤および戸津川<sup>11)</sup>が Sinklar ら<sup>12)</sup>の報告した Y 染色体特異的 DNA 領域 (SRY : Sex-determining region Y) の検出を試みている。しかしながら, PCR 法による胚の性別判別およびその移植では, 胚からバイオプシーして得た数個の割球を PCR 検体とすることから, 極めて鋭敏な検

出感度を示す PCR 法の確立の必要性が指摘される。そこで本研究では, McGraw ら<sup>10)</sup>が報告したブタ雄特異的 DNA 反復配列から作成した 2 組のプライマーセットのブタ雄特異的 DNA 検出に対する有効性を確認した後, これらのプライマーセットを用いて PCR 法によるブタ雄特異的 DNA 増幅における検体細胞数および増幅条件を検討した。

## 材料および方法

PCR 法のための検体細胞の処理 : ブタ (大ヨークシャー種 : W, デュロック種 : D, ランドレース種 : L およびキンカ種 : J), ウシ (ホルスタイン種) それぞれの

Detection of porcine male-specific DNA sequence using polymerase chain reaction : effect of template cell number and amplification conditions

T. KAWARASAKI, T. KOHSAKA\*, M. CHIKYU, M. SONE and M. YOSHIDA\*\*

Shizuoka Swine and Poultry Experiment Station, Kikugawa-cho, Shizuoka-ken, 439

\* Faculty of Agriculture, Ibaraki University, Ami-cho, Ibaraki 300-03

\*\* Faculty of Agriculture, Shizuoka University, Shizuoka 422

雌雄およびヒトの男女から末梢血液を採取し、Ficoll-Paque (Pharmacia) で 1,500 rpm (408×g), 30 分間遠心分離し、白血球のみを分画採取した。白血球はリン酸緩衝塩類溶液 (pH 7.4) で 2 回洗浄した後、細胞数を計測し、それぞれの細胞数となるように K 緩衝液 (50 mM KCl, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5% Tween 20, 100 μg/ml プロテイナーゼ K 添加 Tris-HCl 緩衝液: 10 mM, pH 8.8)<sup>13)</sup> で希釈した。DNA の抽出は 56°C の K 緩衝液中で 45 分間インキュベーション後、94°C, 10 分間加熱することにより行った。抽出後の DNA サンプルの濃度は 1 mM EDTA 添加 Tris-HCl 緩衝液 (10 mM, pH 8) で調製した。

PCR 増幅: PCR 法に用いるプライマーは, McGRAW ら<sup>10)</sup> が報告したブタ雄特異的 DNA 反復配列をもとに設計された 491 bp を増幅するプライマーセット (Male-specific, M: 5'-TCATGGACCAGGTAGGGAAT-3', 5'-GAAAGACACGTCCTTGGAGA-3')<sup>9)</sup> およびプライマーセット M の内側領域 236 bp を増幅する Nested プライマーセット (Nested, N; 5'-AAGTGGTCA-GCGTGTCCATA-3', 5'-TTTCTCCTGTATCCTCC-TGC-3') を用いた。PCR の反応条件は, 鑄型 DNA 液 10 μl, Taq-DNA ポリメラーゼ 2.3 単位, プライマー 20 pmol, 200 μM dNTP, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1% Triton X-100 となるように 50 μl の PCR 緩衝液を調製し, 94°C, 55°C, 72°C 各 1 分の反応を 30~60 サイクル行った。反応終了後, 反応産物 10 μl を

2% アガロースゲルを用いて電気泳動し, エチジウムブロマイドで染色した後, UV イルミネーターで増幅 DNA を確認した。

## 結 果

図 1 にプライマーセット M を用いたブタ, ウシおよびヒト白血球からのブタ雄特異的 DNA 配列の検出結果を示した。検体細胞数 50,000 個で, PCR を 30 サイクル行った結果, ブタの雄においてはいずれの品種 (L, W, D および J) とともに 491 bp の位置に明瞭な DNA バンドが検出された。ブタの雌の一部 (ライン 2: L 種およびライン 4: W 種) において 491 bp 付近に薄いバンドが検出されたが, 高濃度の雌ブタ白血球 (ライン 13: 1,000,000 個~ライン 17: 50,000 個) を検体として増幅してもそれらのバンドは強くならなかった。また, ウシの雌雄, ヒトの男女では 491 bp 付近に DNA バンドは検出されなかった。

図 2 にプライマーセット N を用いたブタ, ウシおよびヒト白血球からのブタ雄特異的 DNA 配列の検出結果を示した。検体細胞数 50,000 個で, PCR を 30 サイクル行った結果, ブタの雄においてはいずれの品種 (L, W, D および J) とともに 236 bp の位置に明瞭な DNA バンドが検出された。しかし, ブタの雌, ウシの雌雄, ヒトの男女ではその位置に DNA バンドが検出されなかった。また, 高濃度の雌ブタ白血球を検体とした場合にも 236 bp 付近に DNA バンドは検出されなかった。

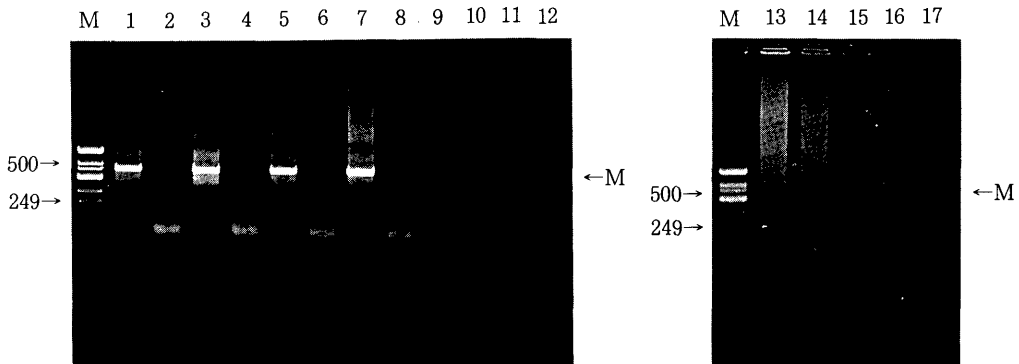


図 1. プライマーセット M を用いた増幅によるブタ, ウシおよびヒト白血球からのブタ雄特異的 DNA 配列の検出

M: Marker ( $\phi$  X174/Hinf I digest), ライン 1~12 は検体白血球数 50,000 個での増幅, 1: L ♂, 2: L ♀, 3: W ♂, 4: W ♀, 5: D ♂, 6: D ♀, 7: J ♂, 8: J ♀, 9: ウシ ♂, 10: ウシ ♀, 11: ヒト ♂, 12: ヒト ♀, ライン 13~17 は高濃度雌ブタ白血球を検体とした増幅, 検体白血球数は 13: 1,000,000 個, 14: 500,000 個, 15: 250,000 個, 16: 100,000 個, 17: 50,000 個, ←M: プライマーセット M による増幅 DNA バンド (491 bp) の出現位置, PCR はいずれも 30 サイクル

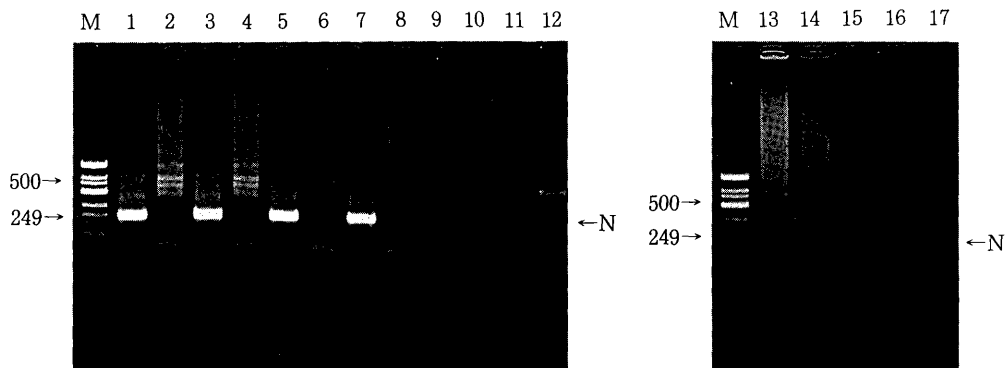


図 2. プライマーセット N を用いた増幅によるブタ、ウシおよびヒト白血球からのブタ雄特異的 DNA 配列の検出

M: Marker ( $\phi$  X174/Hinf I digest), ライン 1~12 は検体白血球数 50,000 個での増幅, 1: L♂, 2: L♀, 3: W♂, 4: W♀, 5: D♂, 6: D♀, 7: J♂, 8: J♀, 9: ウシ♂, 10: ウシ♀, 11: ヒト♂, 12: ヒト♀, ライン 13~17 は高濃度雌ブタ白血球を検体とした増幅, 検体白血球数は 13: 1,000,000 個, 14: 500,000 個, 15: 250,000 個, 16: 100,000 個, 17: 50,000 個, ←N: プライマーセット N による増幅 DNA バンド (236 bp) の出現位置, PCR はいずれも 30 サイクル

表 1. PCR 法によるブタ白血球からのブタ雄特異的 DNA 増幅に及ぼす細胞数および増幅条件の影響

検体	プライマー-M <sup>a)</sup> による増幅				プライマー-N <sup>b)</sup> による増幅				プライマー-M-Nによる反復増幅 <sup>c)</sup>
	増幅回数				増幅回数				
	30	40	60	30+30 <sup>e)</sup>	30	40	60	30+30 <sup>d)</sup>	
A	50 <sup>f)</sup>	50	50	50	5	5	5	5	1
B	50	50	50	10	5	2.5	2.5	2.5	1
C	50	50	50	10	10	5	5	5	1

<sup>a)</sup> プライマー-M: 5'-TCATGGACCAGGTAGGGAAT-3', 5'-GAAAGACACGTCCTTGGAGA-3', <sup>b)</sup> プライマー-N: 5'-AAGTGGTCAGCGTGTCCATA-3', 5'-TTTCTCCTGTATCCTCCTGC-3', <sup>c)</sup> プライマー-M で30回増幅した反応産物10 $\mu$ l を鋳型としてプライマー-Mを用いて30回増幅, <sup>d)</sup> プライマー-Nで30回増幅した反応産物10 $\mu$ l を鋳型としてプライマー-Nを用いて30回増幅, <sup>e)</sup> プライマー-Mで30回増幅した反応産物10 $\mu$ l を鋳型としてプライマー-Nを用いて30回増幅, <sup>f)</sup> 数字は特異的 DNA バンドの検出可能な細胞 (白血球) 数

表 1 に PCR 法によるブタ雄特異的 DNA 増幅に及ぼす検体細胞数および増幅条件の影響について示した。プライマーセット M を用いた場合, 30 サイクル増幅 [30 (M)] での検出限界細胞数は, いずれの検体とも 50 個であった。増幅サイクル数を 40 サイクルおよび 60 サイクルと増加しても検出限界細胞数はいずれの検体も 50 個であった。さらに, 30 (M) の反応産物 10 $\mu$ l を鋳型 DNA とし, 新しい PCR 反応液を調製し, プライマーセット M で 30 サイクル増幅した場合での検出限界細胞数は 2 検体で 10 個に減少したが, 1 検体では 50 個のままであった。プライマーセット N を用いた場合, 30 サイクル増幅 [30 (M)] での検出限界細胞数は, 5 個 (2 検体) ~10 個 (1 検体) とプライマーセット M の場合と比

較して若干少なかった。増幅サイクル数を 40 サイクルと増加した場合の検出限界細胞数は, 2.5 個 (1 検体) ~5 個 (2 検体) と若干減少したが, 60 サイクルと増加した場合および 30 (N) の反応産物 10 $\mu$ l を鋳型 DNA とし, 新しい PCR 反応液を調製し, プライマーセット N で 30 サイクル増幅した場合の検出限界細胞数は, それぞれ 2.5 個 (1 検体) ~5 個 (2 検体) のままであった。一方, 30 (M) の反応産物 10 $\mu$ l を鋳型 DNA とし, 新しい PCR 反応液を調製し, プライマーセット N で再度 30 サイクル増幅 (以下 Nested PCR 法と呼ぶ) したところ, 検出感度は著しく高まり, 推定細胞数 1 個においても明瞭な雄特異的 DNA バンドを確認することが可能であった (図 3)。なお, 検出感度が最も高かった増幅方法,

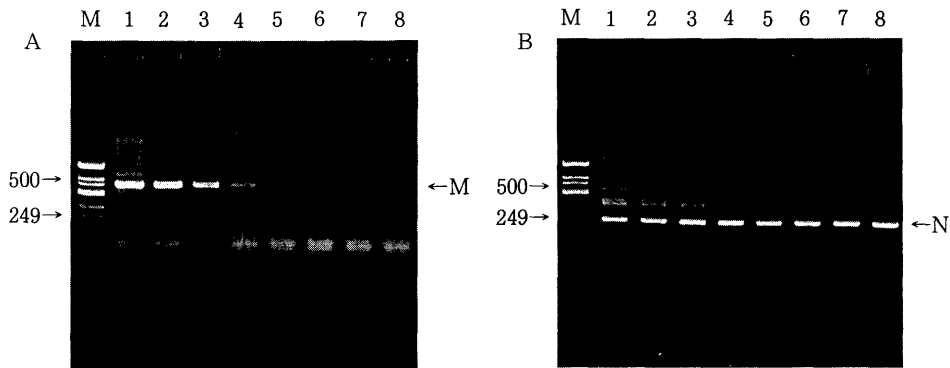


図 3. ブタ白血球の希釈系列の Nested PCR 法 (プライマーセット M により 30 サイクル増幅した PCR 反応産物 10  $\mu$ l を鋳型としてプライマーセット N で 30 サイクル増幅) によるブタ雄特異的 DNA 配列の検出

A: プライマーセット M を用いた 1 回目の増幅 (30 サイクル), B: プライマーセット N を用いた 2 回目の増幅 (30 サイクル), M: Marker ( $\phi$  X174/Hinf I digest), 検体白血球数は 1: 50,000 個, 2: 5,000 個, 3: 500 個, 4: 50 個, 5: 10 個, 6: 5 個, 7: 2.5 個, 8: 1 個, ←M: プライマーセット M を用いた 1 回目の増幅 DNA バンド (491 bp) の出現位置, ←N: プライマーセット N を用いた 2 回目の増幅 DNA バンド (236 bp) の出現位置

すなわち Nested PCR 法で雌検体を増幅してもプライマーセットに対応する DNA の増幅は確認されなかった。

### 考 察

ヒトの Y 染色体長腕に存在する反復配列 DYZ1 はヒトの性判別に利用されているが, 非常に少数であるが常染色体上にも類似配列が存在することが知られている<sup>14)</sup>。今回の実験においてもプライマーセット M を用いた増幅時に一部の雌ブタ検体から目的とする DNA と同じくらいの大きさの非常に薄い DNA バンドが検出されたことから, 常染色体あるいは X 染色体上に類似配列の存在が疑われた。しかし, 高濃度の雌ブタ検体を用いた増幅および雌検体の Nested PCR 法による増幅でも目的とする DNA バンドは検出されなかった。また, プライマーセット M あるいは N を用いて PCR 法によりピオチンあるいはジゴキシゲニン標識 DNA プローブを作成すると, これらの DNA プローブは Y 染色体長腕と特異的にハイブリダイズすることが確認されている<sup>9,15)</sup>。これらのことから, 本配列は常染色体や X 染色体上には存在せず, 今回用いたプライマーセットによる増幅においても雌検体からの標的 DNA 増幅は無いものと思われた。

SR Y 領域は多くのほ乳動物において保存されており,

ブタにおいても性判別に利用できることが確認されている<sup>11)</sup>。多くの家畜に共通性があることは同一のプライマーセットを多くの動物に利用できる可能性があるなどの利点を有しているが, 他の動物の遺伝子が混入した場合に判定を誤る危険性もある。特に, 胚などの培養液には牛血清や牛血清アルブミンが添加される場合が多く, ウシ由来遺伝子が混入する危険性がある。また, 検出操作時にヒト由来 DNA が混入する危険性もある。しかし, 今回我々が利用した 2 組のプライマーセットによる DNA の増幅ではウシやヒトの検体細胞から目的の DNA が検出されないことから, ブタ由来以外の DNA が混入しても判定を誤る危険性はなく, ブタの性判別のために利用し易いものと考えられた。

一部の胚細胞をバイオプシし, 胚の雌雄判別を行った後, 残りの胚をレシピエント豚に移植するためには, 胚の生存性を高めるためにもできるだけ少数の検体細胞から雄特異的 DNA を増幅し, 正確に雌雄判別を行うことが要求される。目的 DNA の検出性を左右する要因の一つに検出しようとする DNA 配列のコピー数がある。McGraw の報告したブタ雄特異的 DNA のコピー数は明らかにされていないが, MILEHAM ら<sup>16)</sup> は本配列と同一ファミリーに属すると思われる配列を検索し, これらがおおよそ 200 コピー存在することを報告している。したがって, 本配列も同程度のコピー数が存在するものと推

察され、SRY領域のような単一配列に比べて検出し易いものと思われる。しかし、実際の増幅においてはいずれのプライマーを用いた場合も一般的なPCR条件である30サイクル程度の増幅では期待されるほどの高い検出性は得られなかった。そこで検出条件について検討したところ、PCR回数の増加や1回目の増幅産物を鋳型DNAとした同一プライマーを用いた増幅では、dNTP、プライマーなどの基質を新しく調製しても著しい検出性の上昇は認められず、Nested PCR法により検出性が向上した。FROHMAN<sup>17)</sup>らは、Nested PCR法では、1回目の増幅で生じた非特異的反応産物が2回目の増幅時に鋳型となることを排除できるため、標的DNA増幅の特異性を高めると推測している。本研究においても標的DNAの検出性を阻害していた要因は酵素の不活化やdNTP、プライマーなどの基質の消費よりも非特異的反応産物の増加ではないかと推察された。また、HANDYSIDE<sup>ら</sup><sup>1)</sup>は、Nested PCR法によりヒト胚1割球からDYZ1領域を検出し、雌雄判定を行い、洗美<sup>ら</sup><sup>8)</sup>はNested PCR法により10個以下の細胞に相当するDNA量からマウスの単一配列の検出を行っている。これらのことから、Nested PCR法はDNAの検出性を向上するために大変有効な手法と思われた。なお、検体により検出限界細胞数に若干の差が認められたが、これは細胞数測定時あるいはDNA抽出時の誤差によるものと考えられた。しかし、これらの差はいずれも1希釈段階以内のものであり、検出性の傾向を確認するにあたって問題とならなかった。また、Nested PCR法による検出では検出性が非常に高いためにこれらの誤差の影響を受けなかったものと思われた。

以上のことから、本研究で用いた2組のプライマーセットはブタ雄特異的DNA増幅に有効性が高く、Nested PCR法を用いることにより非常に少数(推定数1個)の白血球からブタの雄特異的DNAを検出できることが明らかになった。

## 謝 辞

本研究の遂行にあたり、ご指導御助言頂いた静岡大学農学部番場公雄教授、農林水産省畜産試験場川倉一彦先生、静岡県西部食肉衛生検査所川森文彦先生、研究器材

を提供して頂いた静岡県西部食肉衛生検査所の皆様に感謝します。

## 文 献

- 1) HANDYSIDE, A.H., E.H. KONTOGIANNI, K. HARDY and R.M.L. WINSTON : *Nature*, **344**, 768-770, 1990.
- 2) PEURA, T., J.M. HYTTINEN, M. TURUNEN and J. JANNE : *Theriogenology*, **35**, 545-553, 1991.
- 3) WATANABE, S., T. AWATA, H. TAKAHASHI, H. MASUDA, and H. YASUE : *Animal. Sci. Technol. (Jpn.)*, **62**, 1149-1152, 1991.
- 4) UTSUMI, K., T. KAWAMOTO, J.H. KIM, A. IRITANI, A. SAKAI and T. KOMANO : *J. Reprod. Dev.*, **38**, 35-43, 1992.
- 5) 渡辺伸也・高橋清也・小西秀彦・今井 裕・栗田嵩・高橋秀彰・榊田博司・安江 博 : *日畜会報*, **63**, 715-720, 1992.
- 6) ITAGAKI Y., S. SATOU, Y. SHITANAKA, T. KUDO, Y. YAMAGUCHI and S. SUTOU : *J. Reprod. Dev.*, **39**, 65-72, 1993.
- 7) 中島達彦・関口総一郎・川倉一彦・榊田博司 : *日本畜産学会第84大会講演要旨*, 68, 1991.
- 8) 洗美 微・国枝哲夫・小林栄治・東 貞宏・豊田裕 : *哺乳卵学誌*, **8**, 87-88, 1991.
- 9) 関口総一郎・川倉一彦 : *日本畜産学会第85回大会講演要旨*, 235, 1992.
- 10) MCGRAW R.A., R.J. JACOBSON and M. AKAMATU : *Nucleic Acids Research*, **16**, 10389, 1988.
- 11) 齊藤英文・戸津川 清 : *日豚会誌*, **30**, 125-127, 1993.
- 12) SINCLAIR, A.H., P. BERTA, M.S. PALMER, J.R. HAWKINS, B.L. GRIFFITHS, M.J. SMITH, J.W. FOSTER, A.-M. FRISCHAUF, R. LOUELL-BADGE and P.N. GOODFELLOW : *Nature*, **346**, 240-244, 1990.
- 13) KAWASAKI, E.S. : *PCR 実験マニュアル*, 129-134, HBJ 出版局, 東京, 1991.
- 14) 中込弥男・中堀 豊・永渕成夫・関 智子 : *実験医学*, **8**, 1201-1205, 1990.
- 15) 河原崎達雄・高坂哲也・曾根 勝・番場公雄 : *第84回家畜繁殖学会講演要旨*, 143, 1993.
- 16) MILEHAM A.J, K.W. SIGGENS and G.S. PLASTOW : *Nucleic Acids Research*, **16**, 11842, 1988.
- 17) FROHMAN, M.A. and G.R. MARTIN : *Technique*, **1**, 165-170, 1989.

**Detection of Porcine Male-specific DNA Sequence using  
Polymerase Chain Reaction : Effect of Template Cell  
Number and Amplification Conditions**

Tatsuo KAWARASAKI, Tetsuya KOHSAKA\*, Mikio CHIKYU,  
Masaru SONE and Mitsutoshi YOSHIDA\*\*

Shizuoka Swine and Poultry Experiment Station,  
Kikugawa-cho, Shizuoka-ken, 439

\* Faculty of Agriculture, Ibaraki University, Ami-cho, Ibaraki 300-03

\*\* Faculty of Agriculture, Shizuoka University, Shizuoka 422

Present study was carried out to investigate some conditions of PCR for detection of porcine male-specific repeated DNA sequence in white blood cells. Two sets of oligonucleotide primers designed on the basis of porcine male-specific repeated DNA sequence data (McGRAW *et al.*, 1988) were used. The first primer set (Male-specific, M; 5'-TCATGGACCAGGTAGGGAAT-3' and 5'-GAAAGACACGTCCTTGGAGA-3', SEKIGUCHI *et al.*, 1992) amplified 491 base pairs (bp). The second primer set (Nested, N; 5'-AAGTGGTCAGCGTGTCATA-3' and 5'-TTTCTCCTGTATCCTCCTGC-3'), which located in inner region to be amplified by the first primer set, amplified 236 bp. The PCR was performed using either primer sets for 30-60 cycles of amplification (denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 55°C for 1 min, and extension at 72°C for 1 min) with template cells. When the template cells were  $5 \times 10^4$  cells from both males and females in the pig, cattle or human, the male-specific DNA could only detect in the boar with 30 cycles of PCR. Detection of the fragment in porcine cells diluted serially revealed that the more than 50 and 10 template cells were required for M and N primer set, respectively. Increase in cycles of PCR or amplification (30 cycles) of PCR product with the same primers were not effective for reducing the template cell number, either. Meanwhile, the amplification of PCR product, which obtained with M primer set, with N primer set were effective for reducing the template cell number, and allowed to detect male-specific DNA from a single cell.

*Jpn. J. Swine Science*, **31**, 1 : 27-32

**Key words** : male-specific DNA, PCR, porcine, white blood cell