

## ウシ受精卵の性判別のための迅速FISH法

誌名	Journal of mammalian ova research = 日本哺乳動物卵子学会誌
ISSN	13417738
巻/号	162
掲載ページ	p. 77-81
発行年月	1999年4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



一技術ノート一

## ウシ受精卵の性判別のための迅速 FISH 法

小林 仁<sup>1</sup>・佐々田比呂志<sup>2</sup>・佐藤 英明<sup>2</sup>

<sup>1</sup>宮城県農業短期大学附属農場 仙台市太白区 〒982-0231

<sup>2</sup>東北大学大学院農学研究科 仙台市青葉区 〒981-8555

**要旨:** 迅速 FISH 法によるウシ受精卵の性判別を紹介した。標本はウシ胚盤胞からバイオプシーした約 10 個の割球から作製した。PCR 法により作製した Dig- 標識プローブ (ウシ雄特異的塩基配列 BC1.2) を含むハイブリダイゼーションミックスを標本に滴下し、72°C のアルミブロック上で 8 分間変性した。ただちに、38.5°C で 5 分間ハイブリダイズした後、72°C に保温した SSPE に 5 分間静置して高速洗浄を行った。プローブの発光は抗 Dig-FITC を用いて行い、蛍光顕微鏡で観察した。FISH の操作が 1 時間以内に完了し、雄胚と雌胚とが明瞭に判別できることから、迅速 FISH 法はウシ受精卵の性判別に有効と考えられた。キーワード: ウシ, 性判別, 胚盤胞, FISH

Fluorescence in situ hybridization (FISH) 法は、あらかじめデオキシリボ核酸やジゴキシゲニンなどのハプテンで標識した相補的な配列を有する DNA プローブを、分裂期または間期細胞の核内 DNA との間で安定なハイブリットを形成させた後、プローブに結合した標識物質を免疫学的手法を用いて蛍光色素で可視化する方法である。染色体分析法のように染色体標本の作製を必要とせず、間期の細胞でも生体内の本来の位置 (*in situ*) にある特定の塩基配列を検出できる点で優れており、ヒトでは遺伝子のマッピング、染色体異常の検査および性判別にも利用されている [4]。

家畜における受精卵の性判別は、従来行われていた染色体分析法に代わり Y 染色体特異的配列を用いた PCR (Polymerase chain reaction) 法が広く用いられるようになった。一方、FISH 法による性判別は、操作が PCR 法より煩雑であることと、判定までに約 2 日以上を要するためほとんど行われていなかった [2]。最近、筆者らは従来の FISH 法の操作を簡易化し、性判別が 1 時間以内で行える迅速 FISH を開発した [3]。本稿では、迅速 FISH 法によるウシ胚盤胞の性判別法を紹介する。

### I. PCR 法による標識プローブの作成

#### 準備

器具, 消耗品:

サーマルサイクラー

(受付 1999 年 2 月 15 日 / 受理 1999 年 3 月 5 日)

別刷請求先: 〒982-0231 仙台市太白区坪沼字沼山 35-3

宮城県農業短期大学附属農場 小林 仁

遠心分離乾燥機または減圧デシケーター

微量冷却遠心分離機

電気泳動槽

マイクロピペット (10  $\mu$ l 用, 200  $\mu$ l 用, 1000  $\mu$ l 用)

試薬:

ウシ雄特異的 DNA BC1.2 [1] プライマーペア

プライマー 1: 5'-ATCAGTGCAGGGACCGAGATG-3'

プライマー 2: 5'-AAGCAGCCGATAAACACTCCTT-3'

ウシ鑄型 DNA

10  $\times$  PCR buffer

デオキシヌクレオシド三リン酸 (ミックスしていないもの)

20 mM dATP

20 mM dCTP

20 mM dGTP

20 mM dTTP

ジゴキシゲニン 11-dUTP (ペーリンガーマンハイム)

Taq ポリメラーゼ

ミネラルオイル

3M 酢酸ナトリウム

100% エタノール

70% エタノール

TE (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA (pH 8.0))

2% アガロースゲル

#### 方法 1

- 1) PCR チューブに以下の組成で反応液 (総量 100  $\mu$ l) を作る (表 1)。
- 2) ミネラルオイルを 50  $\mu$ l 重層する。
- 3) 最初に熱変性を 2 分行い、後は PCR を 40 サイクル行う。

熱変性: 97°C  $\times$  2 分

↓

熱変性: 94°C  $\times$  1 分

アニーリング: 56°C  $\times$  1.5 分

伸長反応: 72°C  $\times$  1.5 分

40 サイクル

↓

伸長反応: 72°C  $\times$  10 分

↓

保存: 4°C

表1. PCR反応液の組成

ウシDNA (50 ng/μl)	1 μl
10×PCR buffer	10 μl
20 mM dATP	1 μl
20 mM dCTP	1 μl
20 mM dGTP	1 μl
20 mM dTTP	0.65 μl
1 mM Dig-11-dUTP	7 μl
プライマー-1 (50 μM)	1 μl
プライマー-2 (50 μM)	1 μl
Taq polymerase (5 U/μl)	0.5 μl
滅菌蒸留水	75.85 μl
計	100 μl

- 4) PCR生成物のうち5 μlを2%アガロースゲルで電気泳動する。BC1.2プライマーが標的とする配列の長さは250bpであるが、ジゴキシゲニン標識されたPCR生成物は分子量が大きくなるため、標識していないものに比べやや遅く泳動される。この泳動距離の差により、標識の確認が簡単にできる(図1)。
- 5) PCR生成物の1/10量の3M酢酸ナトリウムを加える。
- 6) 総容量の2.5倍量の100%エタノールを加え、よく転倒混和する。
- 7) 室温で10分間静置する。
- 8) マイクロチューブを4℃で15,000 rpm, 10分間遠心分離する。
- 9) 核酸の沈殿を確認しながら上清を、ピペティング、あるいはデカンテーションで捨てる。
- 10) 70%エタノールを800 μl入れ、よく転倒混和する。
- 11) マイクロチューブを4℃で15,000 rpm, 10分間遠心分離する。
- 12) 核酸の沈殿を確認しながら上清を、ピペティングで捨てる。
- 13) 遠心乾燥機または減圧デシケーターでペレットを乾燥させる。
- 14) 100 μlのTEに溶解し、ジゴキシゲニン標識プローブとする。
- 15) 小分けして-20℃で保存する。

## II. 標本の作製

### 準備

#### 器具, 消耗品:

マイクロマニピレーター  
 ドライヤーまたは小型扇風機  
 シリコナイズした時計皿またはホローグラス  
 洗浄したスライドグラス  
 マイクロピペット (10 μl用, 200 μl用, 1000 μl用)

#### 試薬:

PBS (-)

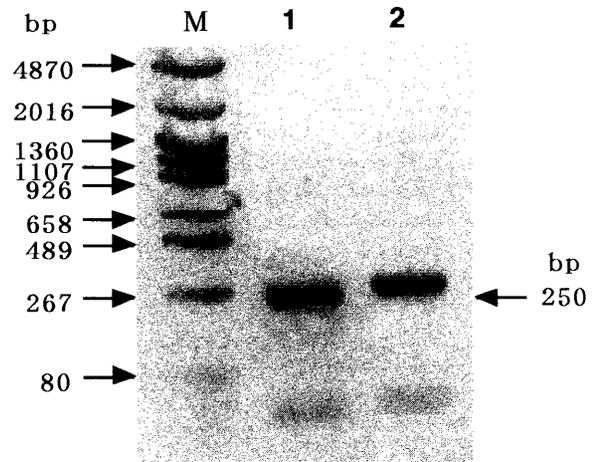


図1. PCR法によるジゴキシゲニン標識ウシY染色体特異的(BC1.2)プローブ作製。M; マーカー(pHY), レーン1; ジゴキシゲニンで標識していないPCR生成物, レーン2; ジゴキシゲニン標識PCR生成物, これは標識していないPCR生成物に比べやや遅く泳動される。

固定液(酢酸:エタノール=1:3)

### 方法2(図2)

- 1) マイクロマニピレーターにより胚盤胞から10個程度の割球を採取する。
- 2) 時計皿内のPBS(-)に等量の固定液を加え、細胞塊をその中に静かに移す。
- 3) 細胞質が透明になり割球が分散する直前にスライドグラスに滴下する。
- 4) 標本に固定液を滴下し、再固定と脱脂を行う。
- 5) 標本を室温で十分に乾燥させる。

## III. 迅速FISH法による性別別

### 準備

#### 器具, 消耗品:

蛍光顕微鏡  
 バンドパスフィルター(オリンパス光学工業:U-MWIBA)  
 恒温水槽(72℃)  
 インキュベーター(37℃)  
 ヒーティングブロック(72℃)  
 マイクロピペット(10 μl用, 200 μl用, 1000 μl用)  
 コプリングジャー  
 カバーグラス

#### 試薬:

Formamide  
 Dextran sulfate  
 Anti-Dig FITC(ペーリンガーマンハイム)  
 Propidium Iodide (PI)

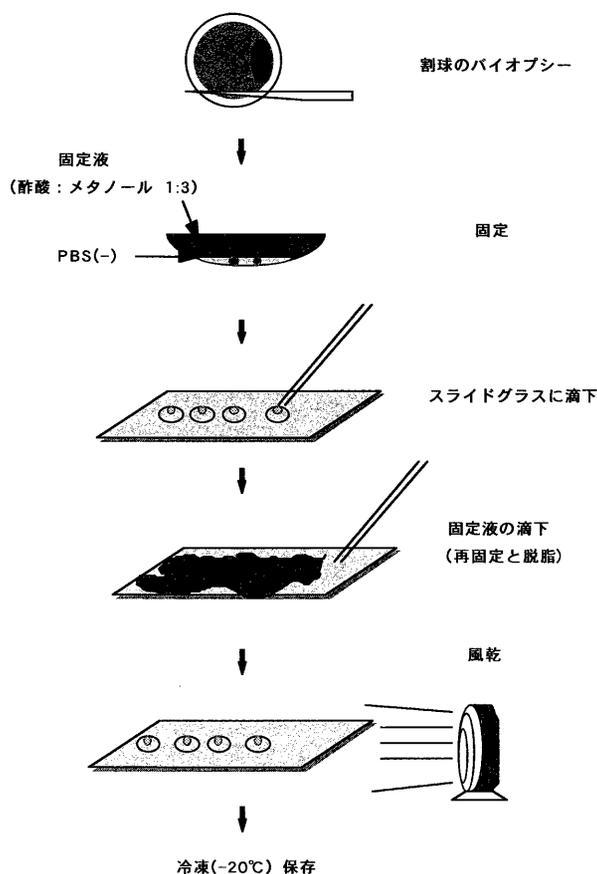


図2. バイオプシーした割球の標本作製法

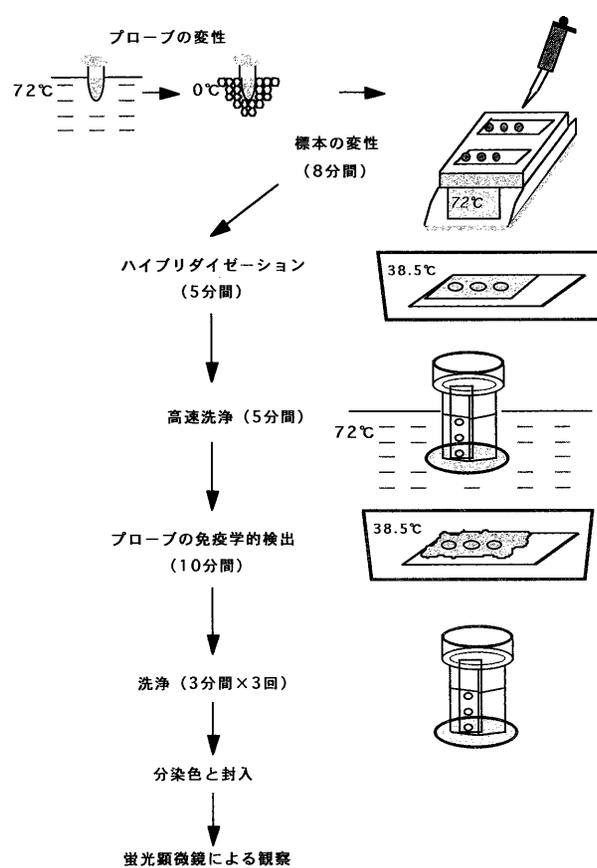


図3. 迅速FISH法の操作手順

$\text{NaH}_2\text{PO}_4$   
 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$   
 BSA (ベーリンガー・マンハイム: 711454)  
 ブロックエース (大日本製薬株)  
 Nonidet P-40  
 Diazabicyclooctane (DABCO; シグマ)  
 PBS (-)  
 glycerol  
**調製試薬:**  
 0.5×SSPE (75 mM NaCl, 4.4 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0.625 mM, pH 7.4)  
 20×SSC (NaCl 3 M, Sodium citrate 0.3 M)  
 マスターミックス (Formamide 5.5 ml, Dextran sulfate 1.0 g, 20×SSC 0.5 ml)  
 PN buffer (0.1 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0.1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.1% Nonidet P-40)  
 PNB buffer (1% ブロックエース in PN buffer)  
 PI (0.1 μg/ml) 添加退色防止液 (1.25 g DABCO in 10 ml PBS + 90 ml glycerol)  
 Anti-Dig buffer (1.0 μg/ml Anti-Dig FITC in PNB buffer)

### 方法3 (図3)

- 1) 標本を 72°C のヒーティングブロック上で数分間加熱する (エージング)。
- 2) マスターミックス 7.0 μl, Dig 標識プローブ 1.5 μl および BSA 1.5 μl を混合し, ハイブリダイゼーションミックスを調製する。
- 3) ハイブリダイゼーションミックスを 72°C で 5 分間熱処理を行った後, クラッシュアイス中で冷却する (プローブ DNA の変性)。
- 4) 72°C に保温してあるアルミブロック上のスライドグラスに, ハイブリダイゼーションミックス 10 μl を滴下する。
- 5) カバーガラスで封入し, 8 分間加熱する (標本 DNA の変性)。
- 6) 直ちに, 38.5°C のインキュベーターに移し, 5 分間ハイブリダイゼーションを行う。
- 7) スライドから慎重にカバーガラスを取り除き, 予め 72°C に加熱しておいた 0.5×SSPE に 5 分間浸し, 余分なプローブを取り除く。
- 8) PN Buffer に 2 分間浸す (室温)。



雄胚

雌胚

図4. 迅速 FISH 法により性別判別したウシ胚

9) 標本に PNB buffer を 100  $\mu$ l 滴下し、パラフィルムをかぶせ、室温で5分間静置する。

以下の操作は、遮光または退色防止用蛍光灯下で行う。

10) スライドガラス上の PN buffer を紙タオル上に落とし、素早く Anti-Dig buffer 100  $\mu$ l を標本にかけ、パラフィルムで覆い 38.5°C で 10 分間保温する。

11) 標本を PN Buffer の入ったコプリンジャーに入れ、3分間緩やかに振盪させ、この操作を3回繰り返す。

12) PI 添加退色防止液 20  $\mu$ l を標本に滴下し、カバーガラスで覆う。

13) 封入後約 10 分で蛍光顕微鏡観察が可能である。

### おわりに

迅速 FISH 法により性別判別を行ったウシ胚盤胞を図4に示した。雄と推定された胚には、割球中に明瞭な緑黄色のシグナルが観察され、シグナルのみられない胚(雌)と明確に判別できた。

これまでウシの in situ hybridization による性別判別は、精子 [5] では用いられていたが胚では操作が煩雑なためほとんど行われていなかった [2]。筆者らが開発した迅速 FISH 法を用いることにより、PCR 法と同様に簡便でかつ短時間にウシ胚の性別判別が行えるようになった。FISH 法による性別判別は判定が明確であり、PCR 法で指摘されているキャリアオーバーによるクロスコンタミネーションによる誤診はない。いまのところ、ウシの X 染色体および常染色体につ

いての特異的な反復配列は知られていないため、用いることのできるプローブは限られているが、今後プローブとなりうる特異的な配列が明らかになることにより、性別判別だけでなく、染色体異常の検査への応用が期待される。

### 参考文献

- 1) Cotinot, C., Kirszenbaum, M., Leonard, M., Gianquinto, L. and Vaiman, M. (1991): Isolation of bovine Y-derived sequence: potential use in embryo sexing. *Genomics*, 10, 646-653.
- 2) Kirszenbaum, M., Cotinot, C., Leonard, M., Vaiman, M. and Fellous, M. (1990): Diagnosis of the sex of bovine embryos using molecular biology. *Reprod. Nutr. Dev. Suppl.*, 1, 125S-132S.
- 3) Kobayashi, J., Sekimoto, A., Uchida, H., Wada, T., Sasaki, K., Sasada, H., Umezumi, M. and Sato, E. (1998): Rapid detection of male-specific DNA Sequence in bovine embryos using fluorescence in situ hybridization. *Mol. Reprod. Dev.*, 51, 390-394.
- 4) Munne, S., Weier, H.U., Stein, J., Grifo, J. and Cohen, J. (1993): A fast and efficient method for simultaneous X and Y in situ hybridization of human blastomeres. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 10, 82-90.
- 5) Schwerin, M., Blottner, S., Thomsen, P.D., Roschlau D. and Brockmann, G. (1991): Quantification of Y chromosome bearing spermatozoa of cattle using in situ hybridization. *Mol. Reprod. Dev.*, 30, 39-43.

## ***A Rapid Fluorescence In Situ Hybridization Method For Sexing Bovine Embryos***

*Jin Kobayashi<sup>1</sup>, Hiroshi Sasada<sup>2</sup> and Eimei Sato<sup>2</sup>*

*<sup>1</sup>Research farm, Miyagi Agricultural College, Taihaku-ku, Sendai 982-0231, and*

*<sup>2</sup>Laboratory of Animal Reproduction, Faculty of Agriculture, Tohoku University, Aoba-ku, Sendai, 981-8555, Japan*

In this paper, we show a protocol of a refined and useful application of rapid fluorescence in situ hybridization (FISH) for sexing bovine blastocysts. About ten blastomeres per bovine blastocyst are fixed in an equal volume of PBS(-) and fixative freshly made of acetic acid and methanol (1:3, v/v), and mounted onto a clean glass slide, on which the fixative is dropped. The PCR primer pair is designed from a bovine male-specific DNA sequence termed as BC1.2. The following sequences of the oligonucleotide primers are used: upstream 5'-ATCAGTGCAGGGACCGAGATG-3' and downstream 5'-AAGCAGCCGATAAACACTCCTT-3'. A Dig-labeled probe produced by PCR is added to the hybridization mixture (as a final concentration, 50% formamide, 10% dextran sulfate, 30 ng/ $\mu$ l BSA and 2  $\times$  SSC, pH 7.0). The hybridization mixture adjusted is dropped on each glass

slide, and denatured at 72°C for 8 min on an aluminum block. Immediately after denaturation, they are hybridized at 38.5°C for 5 min, washed in 0.5  $\times$  SSPE at 72°C for 5 min and followed by washing in PN buffer (0.1% sodium phosphate, pH 8.0, 0.1% NP-40) for 2 min. The Dig is detected by incubation with anti-Dig-fluorescein (1.0  $\mu$ g/ml) in PN buffer plus 1% Block Ace at 38.5°C for 5 min. After washing with PN buffer, the blastomeres are counterstained with propidium iodide (0.3  $\mu$ g/ml) in an anti-fade solution. The observation is carried out under an epifluorescence microscope. The whole process of FISH can be carried out within almost 1 hr. This protocol with a male-specific DNA probe is a powerful tool for sexing bovine embryos.

**Key words:** Blastocyst, Sexing, FISH, Bovine