

# 鉴别牛早期胚胎性别的多重 PCR 技术研究

王学清<sup>1</sup>,裴翠娟<sup>1</sup>,李魁英<sup>1</sup>,王银钱<sup>2</sup>,王 昆<sup>1</sup>,张 峰<sup>1</sup>,吴占军<sup>1</sup>

(1. 河北省农林科学院 粮油作物研究所,河北 石家庄 050031;2. 河北省畜牧站,河北 石家庄 050031)

**摘要:**根据牛 Y 染色体特异重复序列设计合成 5 对牛 Y 染色体特异引物,依据牛微卫星基因设计合成 3 对牛染色体内标引物。每对引物分别扩增牛基因组 DNA,筛选出 2 对牛 Y 染色体特异引物和 1 对牛 DNA 特异内标引物。通过对多重 PCR 扩增条件进行优化组合,建立 1 个可用于牛早期胚胎性别鉴别的多重 PCR 方法及引物组合:BY1/A1。

**关键词:**牛;性别鉴别;多重 PCR;胚胎

中图分类号:S823.03 文献标识码:A 文章编号:1000-7091(2011)06-0089-05

## A Study on Sex Determination of Bovine Pre-implantation Embryos by Multi-PCR

WANG Xue-qing<sup>1</sup>,PEI Cui-juan<sup>1</sup>,LI Kui-ying<sup>1</sup>,WANG Yin-qian<sup>2</sup>,WANG Kun<sup>1</sup>,  
ZHANG Feng<sup>1</sup>,WU Zhan-jun<sup>1</sup>

(1. Institute of Cereal and Oil Crops, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Shijiazhuang 050031, China; 2. Dairy Cattle Research Center of Hebei, Shijiazhuang 050031, China)

**Abstract:** Basing on the sequence of bovine Y-specific repeat sequence, 5 pairs of bovine male-specific PCR primers were designed, meanwhile basing on the microsatellite genes, 3 pairs of bovine-specific PCR primers were designed as internal control primers. Two pairs primers of Y-specific and 1 pairs of bovine-specific were selected basing on the single PCR amplification of bovine DNA, one pairs of primer combinations BY1/A1 was established for sex identification by Multi-PCR amplification of bovine genomic DNA and embryos.

**Key words:** Bovine; Sex identification; Multi-PCR; Embryos

奶源是奶业发展的基础,目前我国良种奶牛数量少,单产水平低是制约奶业健康发展的关键问题。据统计,我国 1 000 多万头存栏奶牛中,真正属于优良品种的中国荷斯坦奶牛不足 1/3,其余全是改良奶牛。目前我国奶业正处在由传统的依靠数量增长向现代质量效益型转变的阶段,因此迫切需要增加高产奶牛的数量,提高奶牛单产水平。19 世纪 70 年代中期胚胎移植技术广泛应用以来,奶牛胚胎性别的早期鉴定成为研究的热点,很多方法被用于牛的胚胎性别鉴定中。而 PCR 技术因其高效、快速的特点得到快速的发展<sup>[1-9]</sup>,但目前还不能满足生产的需要。

本研究根据 GenBank 中收录的牛 Y 染色体特异序列和牛基因组序列分别设计公牛特异引物和内

标引物,通过对引物浓度组合、dNTP 浓度、Mg<sup>2+</sup> 浓度、退火温度的筛选优化 PCR 反应体系,扩增牛基因组 DNA 和胚胎细胞 DNA,建立稳定、灵敏、高效的牛早期胚胎性别鉴定的多重 PCR 反应体系,以期利用该方法实现奶牛良种的快速扩繁。

## 1 材料和方法

### 1.1 样品采集

血液样品(公、母各 2 头)采自藁城市绿发工贸有限公司奶牛场,颈静脉采血 10 mL,ACD 抗凝,-20℃保存。已知性别的胚胎样品由北京安伯胚胎生物技术中心提供。

### 1.2 模板制备

牛血液基因组 DNA 的提取:采用常规的酚-氯

收稿日期:2011-09-15

基金项目:2010 年省财政专项(2010055008);河北省自然科学基金项目(C2009001308)

作者简介:王学清(1981-),男,河北平山人,助理研究员,硕士,主要从事动物遗传育种研究。

通讯作者:王 昆(1974-),女,河北河间人,研究员,博士,主要从事动物遗传育种研究。

仿抽提法<sup>[10]</sup>提取基因组 DNA ,ddH<sub>2</sub>O 溶解。0.7% 琼脂糖凝胶电泳检测基因组 DNA ,紫外分光光度计测定其纯度和浓度。将 DNA 样品分别稀释至约 10 ng/ $\mu$ L 20 ng/ $\mu$ L 50 pg/ $\mu$ L ,分装成小份 , $-20^{\circ}\text{C}$  保存备用。

胚胎样品的制备:将胚胎解冻后 ,用倒置显微镜和分割刀切取中、晚期囊胚内细胞团对面的滋养层

细胞 5~10 个 ,置于灭菌的 PCR 管中 ,瞬时离心后备用。用于检测 PCR 体系的扩增效率与灵敏性。

1.3 引物的设计与合成

依据 GenBank 中牛 Y-染色体特异序列和牛染色体特异序列 ,分别设计 6 对 Y-染色体特异引物和 3 对牛染色体内标引物。所有引物均由上海生工生物技术有限公司合成。引物详细信息见表 1。

表 1 引物及相关信息

Tab. 1 Information of primers

引物 Primer	引物序列 Primer sequence	T <sub>m</sub> / $^{\circ}\text{C}$	产物大小/bp Product size	序列来源 Sequence source
BY1	CTGTCATTCTACTCTACTGTTTTCCCC	60.90	344	AY374307.1
	GATGTTATTATCTCTTTTCAGGTTTT	52.86		GI: 34604116
BY2	TTGGAGCACGCCTCTGGAGTTGAT	60.40	694	AY374307.1
	TTGGAGCACGCCTCTGGAGTTGAT	62.11		GI: 34604116
BY3	ACAGACTGGGTGTCAGTGGATGGA	62.11	699	AY374307.1
	TGTTGGCTGGACTTACTGGCTCAT	60.40		GI: 34604116
BY4	GTCTCGGGTTGTGGTCGTGCTTGTGC	67.05	224	Z31587.1
	ATGAGTTATGTATTTCTGGAGTTTTTC	54.44		GI: 587091
BY5	CTGTTCAAAATGTTAGAAATGACTGGC	57.86	307	Z31587.1
	AGAAGTGACACCTGAGATCAGACGGGA	63.94		GI: 587091
A1	TCGTCAGAAACCGCACACTG	59.85	216	Bovine 1.715
	TGGAAGCAAAGAACCCCGCT	59.85		Satellite ,GI: 701
A2	CCAGACGAGCTTTGCTTCCTTATA	58.69	180	AF158242.1
	ACAGACTCAACCCGAGACCTTACT	60.40		GI: 5690365
A3	TTAGCCTCATCTCTTCGGCACCA	60.20	269	X60511.1
	GACCAGGAACACCCAGCACAGA	61.85		GI: 539

1.4 多重 PCR 引物及反应条件筛选

1.4.1 多重 PCR 引物的筛选 首先采用单重 PCR 扩增牛染色体 DNA ,以获取各个引物最适退火温度 ,反应采用 20  $\mu$ L 体系 ,其中各组成成分浓度为: *Taq* 酶 1.4 U ,dNTP 200  $\mu$ mol/L , $\text{Mg}^{2+}$  1.5 mmol/L ,引物浓度 50 pmol/L 。

单重反应循环条件为:  $95^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min; 然后进行循环条件:  $95^{\circ}\text{C}$  变性 30 s ,退火 30 s ,  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s ,30 个循环; 最后  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 5 min。

1.4.2 多重 PCR 反应体系的建立与优化 将筛选出的较理想的牛 Y 染色体特异引物和内标引物组合 ,通过对引物浓度、dNTP 浓度、 $\text{Mg}^{2+}$  浓度、退火温度的筛选和优化 ,确定多重 PCR 的最佳反应条件。反应体系总体积 20  $\mu$ L ,其中 *Taq* 酶 1.4 U ,内标引物浓度 50 pmol/L ,Y 染色体引物浓度分别为 120 ,150 pmol/L ,dNTP 浓度分别为 150 ,180 ,200 ,220  $\mu$ mol/L ;  $\text{Mg}^{2+}$  浓度分别为 1.5 2.0 2.5 mmol/L ,退火温度分别为 51 53 55  $57^{\circ}\text{C}$  。多重 PCR 反应条件为:  $95^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min; 然后进行循环条件:  $95^{\circ}\text{C}$  变性 30 s ,退火 30 s ,  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s ,30 个循环; 最后  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 5 min。

1.5 PCR 扩增产物的检测

取 5  $\mu$ L PCR 产物 ,溴化乙啶染色 ,1.5% 琼脂糖凝胶电泳 ,凝胶成像系统检测 PCR 扩增结果。

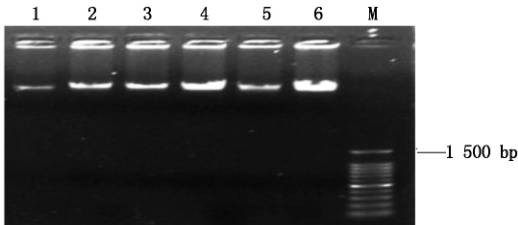
1.6 多重 PCR 反应体系扩增效率检测

以微量牛基因组 DNA 和少量胚胎细胞为模板 ,验证建立的多重 PCR 反应体系的检测效率。基因组 DNA 模板浓度梯度 10 ,20 ,50 pg; 胚胎细胞为 5~10 个滋养层细胞。

2 结果与分析

2.1 牛血液基因组 DNA 检测结果

取 1  $\mu$ L 基因组 DNA ,用 0.7% 琼脂糖凝胶电泳检测 ,结果见图 1。



1~6. 基因组 DNA; M. 分子量 Marker.  
1~6. Genomic DNA; M. Molecular Marker.

图 1 基因组 DNA 电泳图  
Fig. 1 Electrophoresis of genomic DNA

## 2.2 多重 PCR 引物及反应条件筛选结果

2.2.1 各引物退火温度筛选结果 5 对 Y 染色体特异性引物 PCR 扩增产物电泳检测结果表明: BY1 的 PCR 产物大小约为 344 bp。随着退火温度的升

高, PCR 扩增产物逐渐变弱, 在 51 ~ 56℃ 温度区间内 PCR 产物整齐、清晰; BY2 在整个温度区间内都获得了相应的 PCR 产物, 大小约 694 bp, 但均较弱 (图 2)。

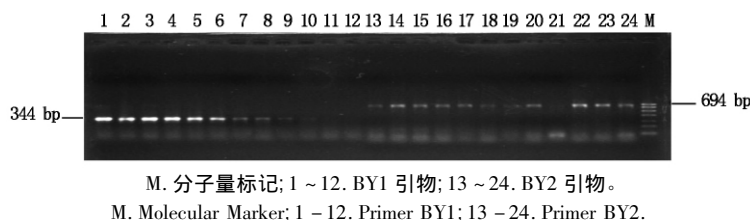


图 2 BY1、BY2 基因组 DNA PCR 扩增结果

Fig. 2 Bovine DNA samples amplified results by PCR with BY1 and BY2 primers

引物 BY3 的扩增产物大小约 699 bp。随着退火温度的升高, 亮度逐渐增强, 但均比较弱。引物

BY4 的扩增产物大小约 224 bp, 在整个温度区间内均整齐、清晰 (图 3)。

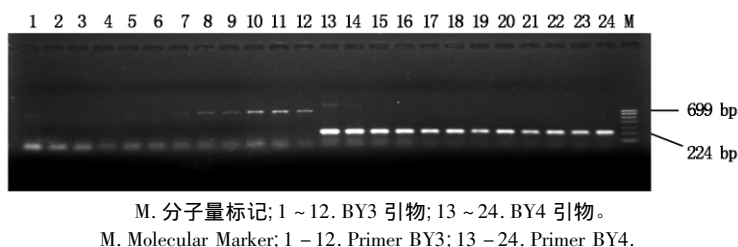


图 3 BY3、BY4 基因组 DNA PCR 扩增结果

Fig. 3 Bovine DNA samples amplified results by PCR with BY3 and BY4 primers

引物 BY5 的 PCR 扩增产物大小约 307 bp, 在整个温度区间内均整齐、清晰 (图 4)。

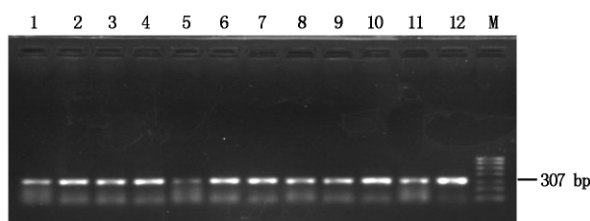


图 4 BY5 基因组 DNA PCR 扩增结果

Fig. 4 Bovine DNA samples amplified results by PCR with BY5 primer

内标引物中只有 A1 得到了 PCR 产物, 大小约 216 bp, 与预期大小一致, 扩增产物条带整齐、清晰 (图 5)。

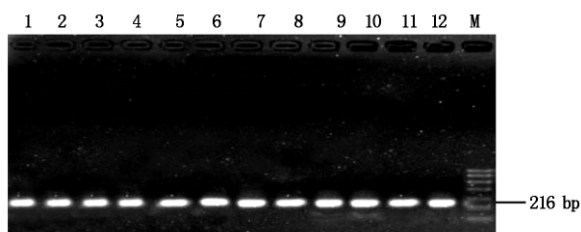


图 5 A1 基因组 DNA PCR 扩增结果

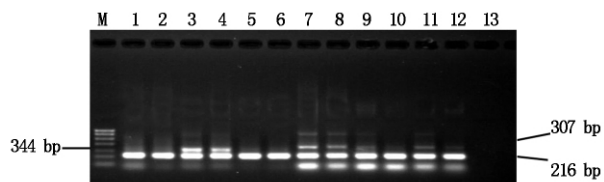
Fig. 5 Bovine DNA samples amplified results by PCR with A1 primer

由于 BY4 产物大小约为 224 bp, 与内标引物产物大小相当, 不适用于建立多重 PCR 反应体系, 因此, 最终选择 Y 染色体特异引物扩增效果较好的 BY1、BY5 和内标引物 A1 进行多重 PCR 筛选。

2.2.2 不同引物组合多重 PCR 筛选结果 通过对 2 组引物组合不同的反应条件: 引物浓度组合、dNTP 浓度、 $Mg^{2+}$  浓度和退火温度进行筛选, 筛选结果如下。

2.2.2.1 不同引物浓度组合筛选结果 对 BY1/A1、BY5/A1 组合进行了 50/120、50/150 pmol/L 2 个引物浓度梯度的筛选, 结果显示: BY1/A1 在 50/150 pmol/L 浓度时 2 对引物均获得清晰的特异性产物; 而 BY5/A1 在 50/120 pmol/L 出现杂带, 50/150 pmol/L 浓度下未获得 Y 染色体特异性产物, 以母牛血液 DNA 为模板时出现非特异条带, 弃用 (图 6)。因此, 确定 BY1/A1 引物浓度组合为 50/150 pmol/L。

2.2.2.2 dNTP 浓度筛选结果 在确定引物浓度组合的基础上, 筛选最适 dNTP 浓度。电泳结果见图 7。结果表明: 4 个浓度梯度下, 扩增效果良好, 且各浓度梯度间无明显差异。由于通常 PCR 反应体系的 dNTP 浓度多为 200  $\mu$ mol/L, 所以本研究确定适宜 dNTP 浓度为 200  $\mu$ mol/L。

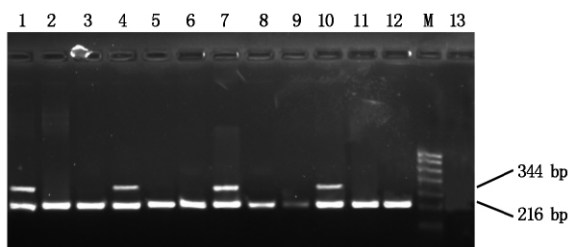


M. 分子量标记; 1~4、7~10. 公牛; 5、6、11、12. 母牛; 1~6. BY1/A1 引物组合; 7~12. BY5/A1 引物组合; 1、2、7、8. 引物浓度为 50/120 pmol/L; 3、4、9、10. 引物浓度为 50/150 pmol/L; 5、6、11、12. 阴性对照; 13. 空白对照。

M. Molecular Marker; 1~4、7~10. Male; 5、6、11、12. Female; 1~6. BY1/A1; 7~12. BY5/A1; 1、2、7、8. Combinations of primers were 50/120 pmol/L; 3、4、9、10. Combinations of primers were 50/150 pmol/L; 5、6、11、12. Negative control; 13. Blank control.

图 6 BY1/A1、BY5/A1 引物浓度组合筛选

Fig. 6 Amplification results of different concentration combinations of the primers BY1/A1、BY5/A1



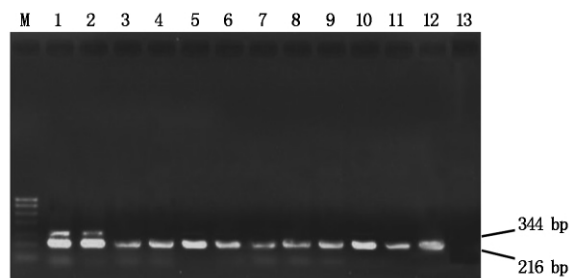
M. 分子量标记; 1~3. 150  $\mu\text{mol/L}$ ; 4~6. 180  $\mu\text{mol/L}$ ; 7~9. 200  $\mu\text{mol/L}$ ; 10~12. 220  $\mu\text{mol/L}$ ; 13. 空白对照; 1、4、7、10. 公牛; 2、3、5、6、8、9、11、12. 母牛。

M. Molecular Marker; 1~3. 150  $\mu\text{mol/L}$ ; 4~6. 180  $\mu\text{mol/L}$ ; 7~9. 200  $\mu\text{mol/L}$ ; 10~12. 220  $\mu\text{mol/L}$ ; 13. Blank control; 1、4、7、10. Male; 2、3、5、6、8、9、11、12. Female.

图 7 BY1/A1 dNTP 浓度筛选

Fig. 7 Amplification results of different dNTP concentrations

2.2.2.3  $\text{Mg}^{2+}$  浓度筛选结果 在以上筛选、优化的基础上, 进行  $\text{Mg}^{2+}$  浓度的筛选, 扩增结果表明: 3 种  $\text{Mg}^{2+}$  浓度下, 仅在  $\text{Mg}^{2+}$  浓度为 1.5 mmol/L 时, Y 染色体和微卫星标记引物都能获得清晰地特异性产物, 其他  $\text{Mg}^{2+}$  浓度下均只获得了微卫星特异性产物 (图 8)。



M. 分子量标记; 1~4. 1.5 mmol/L; 5~8. 2.0 mmol/L; 9~12. 2.5 mmol/L; 13. 空白对照; 1、2、5、6、9、10. 公牛; 3、4、7、8、11、12. 母牛。

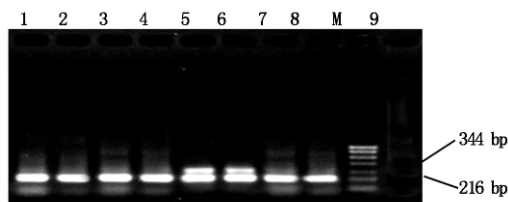
M. Molecular Marker; 1~4. 1.5 mmol/L; 5~8. 2.0 mmol/L; 9~12. 2.5 mmol/L; 13. Blank control; 1、2、5、6、9、10. Male; 3、4、7、8、11、12. Female.

图 8 不同  $\text{Mg}^{2+}$  浓度的 PCR 扩增结果

Fig. 8 Amplification results of different  $\text{Mg}^{2+}$  concentrations

2.2.2.4 退火温度筛选结果 依据前面筛选的最

适引物浓度组合、dNTP 浓度、 $\text{Mg}^{2+}$  浓度, 再进行退火温度筛选。扩增结果表明: 仅在 55 $^{\circ}\text{C}$  获得 2 种引物的特异性条带, 其他退火温度条件下没有扩增出 Y 染色体特异产物 (图 9)。



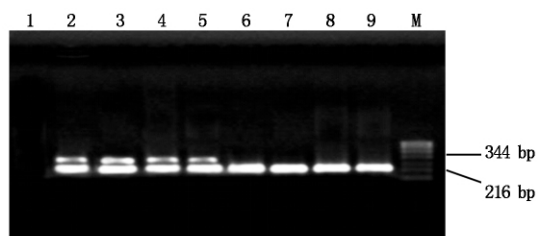
M. 分子量标记; 1、2. 51 $^{\circ}\text{C}$ ; 3、4. 53 $^{\circ}\text{C}$ ; 5、6. 55 $^{\circ}\text{C}$ ; 7、8. 57 $^{\circ}\text{C}$ ; 9. 空白对照。

M. Molecular Marker; 1、2. 51 $^{\circ}\text{C}$ ; 3、4. 53 $^{\circ}\text{C}$ ; 5、6. 55 $^{\circ}\text{C}$ ; 7、8. 57 $^{\circ}\text{C}$ ; 9. Blank control.

图 9 退火温度筛选结果

Fig. 9 Amplification results of different annealing temperature

2.2.2.5 多重 PCR 反应体系建立 通过对 2 组引物组合不同的反应条件进行筛选: dNTP 浓度对 PCR 结果影响不明显, BY1/A1 组合在引物浓度 50/150 pmol/L 组合下、 $\text{Mg}^{2+}$  浓度为 1.5 mmol/L、退火温度为 55 $^{\circ}\text{C}$  时, 2 种引物均能获得较好的特异性产物; BY5/A1 引物组合进行多重 PCR 筛选时出现杂带, 弃用。因此本试验筛选出 BY1/A1 多重 PCR 反应体系, 进行牛胚胎早期性别鉴定。

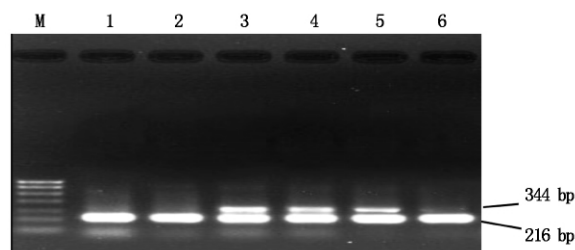


M. 分子量标记; 1. 空白对照; 2、6. 50 pg; 3、7. 20 pg; 4、8. 10 pg; 5. 雌性; 9. 雄性。

M. Molecular marker; 1. Blank control; 2、6. 50 pg; 3、7. 20 pg; 4、8. 10 pg; 5. Female; 9. Male.

图 10 不同浓度基因组 DNA 模版扩增结果

Fig. 10 Amplified results of different concentration of Bovine DNA templates



M. 分子量标记; 1、2. 雄性胚胎; 3~5. 雌性胚胎。

M. Molecular Marker; 1、2. Female embryos; 3~5. Male embryos.

图 11 胚胎鉴定结果

Fig. 11 Amplified results of bovine embryo

2.3 多重 PCR 反应体系扩增效率检测结果

通过对不同含量的基因组 DNA 模板以及胚胎

样品进行 PCR 检测扩增效率。结果表明: BY1/A1 组合均可得到清晰的特异性扩增产物, 且雌性胚胎对应单一的内标引物扩增产物条带, 而雄性胚胎对应内标引物扩增产物条带和 Y 染色体特异性产物条带, 与胚胎的已知性别完全一致(图 10, 11)。因此, 利用本体系实现对牛早期胚胎的性别鉴定是可行的。

### 3 讨论

用于早期胚胎性别鉴定的技术有很多, 如免疫学方法<sup>[11]</sup>、遗传学方法<sup>[12]</sup>及生化方法等。但是都受到灵敏度、准确性低或所需时间长等因素的限制。随着 PCR 技术的出现使高效、准确的性别鉴定成为可能。目前, 多种基于 PCR 技术的家畜早期胚胎性别鉴定方法已经建立<sup>[2-4, 13-15]</sup>, 主要有巢式 PCR 法、单重 PCR 法、LAMP 法、多重 PCR 法等。但是巢式 PCR 法需要富集模板后再进行胚胎性别鉴别, 增加了鉴别的工作量, 所需时间长; 单重 PCR 法仅扩增 Y 染色体特异片段, 没有内部标记, 假阴性几率高; LAMP 法虽然具有简单、快速、特异性高、准确的特点, 但是由于其成本较高使其推广应用受到了限制。多重 PCR 法, 只需一次 PCR 反应即可完成性别鉴定, 所需时间较短, 而且通过引进内标引物, 提高反应的准确率。因此本研究选择多重 PCR 法进行胚胎性别鉴定研究。

较常规 PCR 来说, 多重 PCR 的影响因素增加, 对反应体系的要求更高<sup>[16]</sup>, 其中最主要的是反应的退火温度、体系的  $Mg^{2+}$  浓度和引物之间的相互作用及浓度组合。因此一个灵敏、稳定、高效的 PCR 反应体系的建立都要针对退火温度和  $Mg^{2+}$  浓度来进行筛选和调整, 以优化整个 PCR 反应体系。PCR 反应的  $Mg^{2+}$  浓度大多以 1.5 mmol/L 为标准, 而且认为随着  $Mg^{2+}$  浓度的提高, 反应的特异性会降低。本研究中  $Mg^{2+}$  浓度为 2.0 mmol/L 时, BY1/A1 组合扩增效果良好。其次退火温度是影响多重 PCR 的另外一个重要因素。一般, 引物的  $T_m$  值就是其 PCR 反应的适宜退火温度, 并在其附近有一定的波动。多重 PCR 反应中同时存在两对引物, 而且往往两对引物的退火温度不同, 这样对退火温度的优化就极为重要。本研究以两对引物的  $T_m$  值为参考, 通过对 2 种组合进行温度梯度筛选, 选出 2 个引物均适宜的退火温度。另外在设计引物时也应注意引物的  $T_m$  值不应相差太大。本试验设计合成的牛 Y 染色体特异引物和内标引物, 在单重 PCR 条件下, Y 染色体特异引物和内标引物扩增条带较好。多重

PCR 扩增时, 考虑到引物之间的相互作用<sup>[17]</sup>及引物浓度<sup>[18]</sup>会对扩增反应造成影响, 本试验对 2 组引物组合进行了引物浓度梯度的筛选, 从而获得每组引物的最佳浓度组合。

通过反应条件优化, 本研究建立了稳定、灵敏的多重 PCR 反应体系, 可以用于牛胚胎的早期性别鉴定。另外, 本研究未对 PCR 反应程序中的循环参数进行研究, 而这方面的研究将有助于缩短 PCR 反应时间提高 PCR 反应体系的效率。因此, 在今后的工作中将进一步展开。

### 参考文献:

- [1] Veerhuis R, Hendriksen P J, Hengst A M *et al.* The production of anti-H-Y monoclonal antibodies: their potential use in a sex test for bovine embryos [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 1994, 42(3-4): 317-330.
- [2] 陈从英, 黄路生, 陈静波, 等. 牛早期胚胎性别鉴定 PCR 反应体系的优化研究 [J]. *畜牧兽医学报*, 2003, 34(3): 209-212.
- [3] Schroder A, Miller J, Thomsen P *et al.* Sex determination of bovine embryos using the polymerase chain reaction [J]. *Animal biotechnol*, 1991, 1: 121-133.
- [4] 王宗礼, 王栋, 程金华等. 鉴别牛早期胚胎性别 PCR 方法引物的设计与筛选 [J]. *畜牧兽医学报*, 2005, 36(2): 1116-120.
- [5] 任克良, 梁全忠, 毛杨毅. PCR 法鉴别牛胚性别技术研究 [J]. *山西农业科学*, 2000, 28(2): 3-6.
- [6] 唐克礼. 家畜性别控制的方法和前景 [J]. *山西农业科学*, 1987(10): 38-39.
- [7] 淮亚红, 辛晓玲, 簪林森, 等. LAMP 法在牛早期胚胎性别鉴定中的应用 [J]. *河南农业科学*, 2005(8): 91-94.
- [8] 魏红芳, 秦粉菊, 徐照学, 等. 家畜性别控制与胚胎性别鉴定技术在畜牧业中的应用 [J]. *河南农业科学*, 2001(1): 27-28.
- [9] 向前, 刘玉婵. 性别控制在牛繁殖中的实践 [J]. *河南农业科学*, 1996(1): 30-31.
- [10] J 萨姆布鲁克 D W 拉塞尔. 分子克隆实验指南 [M]. 第 3 版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [11] Utsumi K, Hayashi M, Takakura R *et al.* Embryo sex selection by a rat male specific antibody and the cytogenetic and developmental confirmation in cattle embryos [J]. *Mol Reprod Dev*, 1993, 34(1): 25-32.
- [12] Hare W C D, Mitchell D, Betteridge K J *et al.* Sexing 2-week old bovine embryos by chromosomal analysis prior to surgical transfer: preliminary methods and results [J]. *Theriogenology*, 1976, 5(5): 243-253.
- [13] Hasler J F, Cardey E, Stokes J E *et al.* Nonelectrophoretic PCR-sexing of bovine embryos in a commercial environment [J]. *Theriogenology*, 2002, 58(8): 1457-1469.
- [14] 朱化彬. PCR 法鉴别哺乳动物胚胎性别的研究 [J]. *国外畜牧科技*, 1995, 22(5): 26-28.
- [15] Park J H, Lee J H, Choi K M *et al.* Rapid sexing of pre-implantation bovine embryo using consecutive and multiplex polymerase chain reaction (PCR) with biopsied blastomere [J]. *Theriogenology*, 2001, 55(9): 1843-1853.
- [16] 黄银花, 胡晓湘, 徐慰倬, 等. 影响多重 PCR 扩增效果的因素 [J]. *遗传*, 2003, 25(1): 65-68.
- [17] Bej A K, Mahbubani M H, Miller R *et al.* Multiplex PCR amplification and immobilized capture probes for detection of bacterial pathogens and indicators in water [J]. *Mol Cell Probe*, 1990, 4(5): 353-365.
- [18] Sunzeri F J, Lee T H, Brownle R G *et al.* Rapid simultaneous detection of multiple retroviral DNA sequence using the polymerase chain reaction and capillary DNA chromatography [J]. *Blood*, 1991, 77(4): 879-886.