

牛早期胚胎性别鉴定快速 PCR 方法的研究

张 莉, 史爱华, 李桂萍, 余文莉

(北京市农林科学院 畜牧兽医研究所, 北京 100097)

摘要: 根据公牛 Y-染色体特异重复序列和公母牛共有的 DNA 序列, 设计并合成 PCR 引物用于牛或牛胚胎性别鉴定, 通过 PCR 反应对公母牛静脉血及牛胚胎进行性别鉴定, 结果表明, 母牛只能扩增出 250 bp 的内标基因片段, 而公牛能同时扩增出 131 bp 的 Y-染色体特异性基因片段和 250 bp 的内标基因片段。静脉血样与实际性别的符合率为 100%; 4~10 个胚胎细胞的扩增也出现和静脉血相同的特异条带。这表明该检测方法准确、简便, 具有较高的灵敏性和稳定性。

关键词: 牛胚胎; 性别鉴定; PCR

中图分类号: S823 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2009)01-0212-03

Sex Identification of Bovine Embryo with PCR Methods

ZHANG Li, SHI Ai-hua, LI Gui-ping, YU Wen-li

(Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097, China)

Abstract: Two pairs of specific primes were designed on the special sequences of Y chromosome and sharing DNA sequence of bull and cow, a set of polymerize china reaction were used for identify the bull and cow blood samples and embryo. Results showed cow only demonstrated a band of 250 bp and bull demonstrated two band of 131 bp by and 250 bp, results of blood identification is completely in accordance with the actual sex type, 4 to 10 embryo cell also demonstrated same specific band model of blood sample, which showed that this method of sex identification were effective and sensitive.

Key words: Bovine embryo; Sex identification; Polymerize chain reaction

性别控制的方法基本分为两个方面: 一是 X、Y 精子的分离技术, 结合人工受精, 来控制后代性别, 到目前为止, 一直没有得到令人满意的结果; 二是通过胚胎性别鉴定, 结合胚胎移植来进行性别控制^[1,2]。家畜胚胎的性别鉴定已成为家畜胚胎移植技术的一项重要内容。用分子生物学方法鉴定家畜胚胎性别是 20 世纪 80 年代后期才开始的。目前, 已被国内外研究人员广泛应用于家畜, 尤其是牛胚胎的性别鉴定。其主要方法有: 雄性特异性 DNA 探针检测法, PCR 扩增 DNA 片段检测法, PCR 扩增 SRY 法等^[3,4]。Herr C M 等^[5]首先应用了 PCR 技术进行了牛羊早期胚胎性别鉴定。虽然已经建立起了许多 PCR 性别鉴定技术体系, 但尚不能满足生产实践的需要。巢式 PCR 鉴别技术^[6], 预先需进行一次 PCR 模板的富集, 然后再进行第二次 PCR 扩增, 增

加了工作量, 延长了性别鉴别时间, 增加了成本; 两步 PCR 法, 首先对 Y 染色体特异引物进行 10 个循环的预扩增, 然后再加入常染色体引物进行二重 PCR 扩增, 这种方法一次就可完成早期胚胎性别鉴别, 同巢式 PCR 技术相比操作过程相对简单了, 准确率也很高, 但也增加了鉴定所用的时间及污染的机会; 只对 Y 染色体特异引物进行扩增的单重 PCR 法是最简单的方法, 但没有分子内标, 往往把没有发生 PCR 扩增反应的个体也误判为雌性个体, 增加了假阴性的几率; 近年来, 报道的 LAMP 法采用特殊的引物^[7], 把传统 PCR 技术中的变性、复性、延伸过程都在 63.5℃或 65℃下统一进行, 缩短了检测时间, 但该方法在检测时引入了化学显色反应体系, 该体系对检测过程的反应条件特别敏感, 稍有污染就可能影响到检测结果的准确性, 同时高昂的检测费用

收稿日期: 2008-12-05

基金项目: 北京市优秀人才资助项目

作者简介: 张 莉(1973-), 女, 新疆伊犁人, 副研究员, 博士, 主要从事畜禽生物技术工作。

和专门的检测仪器限制了其在生产实践中的应用。因此, 本研究针对目前传统 PCR 技术进行改进, 旨在研究出一种可在奶牛生产实践中推广应用的快速、简便的鉴别方法, 为促进奶业的发展提供技术理论基础。

1 材料和方法

1.1 牛血液和胚胎样品的采集

颈静脉采集牛抗凝血样品 5 mL, -20℃冻存备用。移植的胚胎为冷冻解冻的奶牛胚胎。应用显微操作技术从每枚胚胎中切取 4~6 个细胞, 分别置于 PCR 管中-20℃下短时保存, 或作为模板立即进行 PCR 检测。

1.2 牛外周血基因组 DNA 的制备

先分别采集雄性和雌性奶牛外周血 5 mL, 取 1 mL 全血用试剂盒提取基因组 DNA, 溶于 200 μL 灭菌超纯水中, 取 2 ng 进行多重 PCR 扩增。

1.3 微量牛胚胎细胞的提取

用胚胎分割仪, 从桑椹胚或囊胚切取 4~10 个细胞, 然后把胚胎细胞样品放入 200 μL 离心管中, 加入 8 μL 灭菌超纯水备用。

1.4 引物的设计和合成

引物 1: 5'-TGATAGTTGATCCACAGAAGG-3'
5'-TGAAGTTACAAGCAGCTGAGG-3'
引物 2: 5'-TGAGGCATGGAAGTCCGCTTG-3'
5'-GGTGGTTCACATTCCGTAGG-3'

由英俊公司合成。

1.5 PCR 反应体系及琼脂糖凝胶电泳检测

PCR 扩增的反应体系总体积为 20 μL, 其中 10 × PCR Buffer 2 μL, 4dNTP 的浓度均为 200 pmol/L, 引物浓度为 5~20 pmol/L, Taq 酶 2.5 U, 模板 DNA 10~100 ng/μL。PCR 循环参数为: 94℃预变性 5 min; 94℃变性 30 s; 53℃退火 25 s; 72℃延伸 30 s, 共进行 30 个循环; 最后在 72℃延伸 5 min。PCR 反应在 PCR 仪上进行。

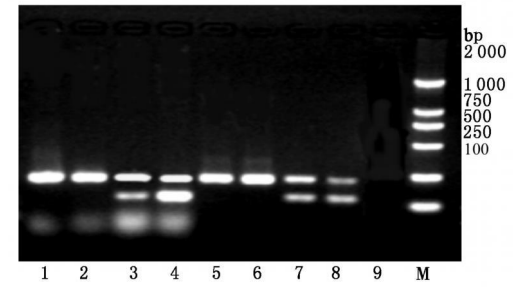
取 5 μL PCR 扩增产物加入 1 μL 上样缓冲液, 在 2% 的琼脂糖凝胶上电泳, DNA 分子量标记同时上样电泳^[8]。用凝胶成像系统观察 PCR 结果。

2 结果与分析

2.1 多重 PCR 对牛基因组 DNA 扩增结果

试验结果表明用 Y-染色体特异性序列 P1, P2 引物和一对常染色体 DNA 内标引物对牛全血进行性别鉴定时, 公牛能同时扩增出 131 bp 的 Y-染色体特异性基因片段和 250 bp 的内标基因片段, 而母牛

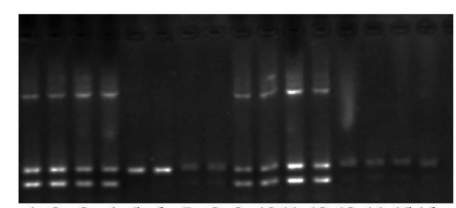
只能扩增出 250 bp 的内标基因片段, 用超纯水作对照则没有任何扩增条带(图 1)。共检测了 8 份公牛和 8 份母牛全血 DNA 样品, 检测结果和实际性别完全符合(图 2)。



M. DL2000; 1, 2, 5, 6, 为雌性; 3, 4, 7, 8, 为雄性; 9, 空白对照。
M. DL2000; Female sample. 1, 2, 5, 6; Male sample. 3, 4, 7, 8; 9. Control.

图 1 牛基因组 DNA PCR 扩增产物电泳结果

Fig. 1 Electrophoresis of PCR products of cattle genomic DNA



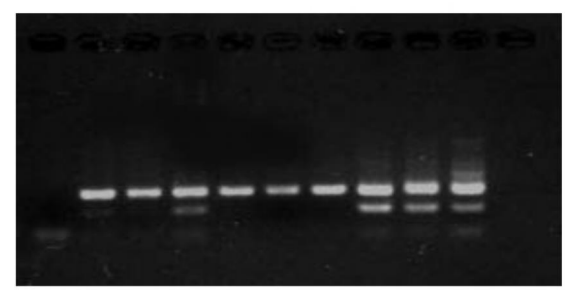
1, 2, 3, 4, 9, 10, 11, 12. 为公牛; 5, 6, 7, 8, 13, 14, 15, 16. 为母牛。
Female sample. 5, 6, 7, 8, 13, 14, 15, 16;
Male sample. 1, 2, 3, 4, 9, 10, 11, 12.

图 2 牛全血基因组 DNA PCR 扩增产物电泳结果

Fig. 2 Electrophoresis of PCR products of cattle blood genomic DNA

2.2 多重 PCR 对奶牛胚胎检测结果

多重 PCR 对奶牛胚胎检测结果(图 3)。4, 8, 9, 10 泳道同时扩增出 131 bp 的 Y-染色体特异性基因片段和 250 bp 的内标常染色体基因片段, 因此性别鉴定为雄性胚胎; 2, 3, 5, 6, 7 泳道只扩增出 250 bp 的内标基因片段, 因此判定为雌性胚胎。共检测了 10 枚胚胎的性别, 性别鉴定胚胎移植后产出 3 头犊牛和 2 头流产犊牛, 性别和检测结果完全一致。



1. 空白对照; 4, 8, 9, 10. 为雄性; 2, 3, 5, 6, 7. 为雌性。
1. Control; Female sample. 2, 3, 5, 6, 7; Male sample. 4, 8, 9, 10.

图 3 奶牛胚胎 PCR 扩增产物电泳结果

Fig. 3 Electrophoresis of PCR products of cattle embryos

2.3 对牛、人、羊和猪的外周血 DNA 进行 PCR 扩增结果

采集牛、人、羊和猪的外周血,提取 DNA 进行 PCR 扩增,结果表明(图 4):所有的人、羊和猪的外周血 DNA 都没有任何扩增产物。说明本研究的试剂盒对牛严格特异,男性操作和其他动物的 DNA 不会对牛胚胎性别鉴定结果产生污染。

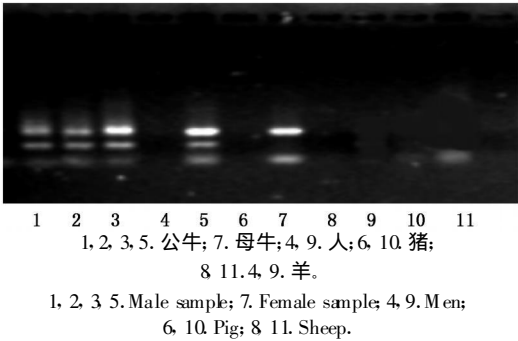


图 4 不同样品外周血 DNA PCR 扩增产物电泳结果

Fig. 4 Electrophoresis of PCR products of blood of samples

3 讨论

根据美国基因库(Genbank)所提供的 Y-染色体重复序列,设计合成了一对特异性引物 P1、P2,用于奶牛胚胎 Y-染色体重复序列的多重 PCR 技术检测。此对引物对奶牛胚胎细胞 DNA 进行扩增,出现 131 bp 扩增条带的样本,即代表为雄性奶牛,由此可鉴定牛早期胚胎的性别。

在实际的生产应用中如果只使用一对 Y-染色体特异性引物序列,在进行牛早期胚胎鉴定过程中容易产生假阴性,因此,为了避免 PCR 假阴性结果,本研究根据牛的常染色体 DNA 序列设计合成了一对引物,在 PCR 扩增的同时作为内对照。即使用 Y-染色体特异性序列引物和常染色体 DNA 序列引物对牛或牛胚胎进行性别鉴定时,母牛只能扩增出 250 bp 的内标基因-常染色体基因片段,而公牛能同时扩增出 131 bp 的 Y-染色体特异性基因片段和 250 bp 的内标常染色体基因片段,如果胚胎细胞丢失则没有任何扩增条带。这样通过对奶牛或胚胎进行 PCR 扩增和扩增产物分析,就能对奶牛或胚胎性

别进行鉴定。

对牛早期胚胎的性别鉴定的基本步骤包括,分割胚胎细胞样品,不用提取细胞 DNA,直接用多重 PCR 方法对胚胎进行性别鉴定来检测牛性别。用特异性引物及内标引物进行 PCR 反应时,公牛样品可以扩增出 131 bp 和 250 bp 的片段,而母牛样品只能扩增出 250 bp 片段,从而可以鉴定牛胚胎性别。

本研究提供了一对牛 Y-染色体重复序列的特异性引物,该引物特异性强和其他哺乳动物的同源性低,避免了其他动物 DNA 给牛胚胎性别鉴定带来的污染问题。用该特异性引物及内标引物建立了奶牛胚胎性别鉴定的多重 PCR 检测方法,该 PCR 检测采用一步法,具有简单、快速、准确、灵敏的特点,可在生产现场应用;由于设置了内标引物对照,可排除 PCR 假阴性错误,保证鉴定结果的可靠。

参考文献:

- [1] 田万强,魏红芳,曾林森,等.家畜早期胚胎性别鉴定方法在畜牧业中的应用[J].黄牛杂志,2001,27(5):43—46.
- [2] Virta J, Markola J, Peippo J, *et al.* Sex determination of bovine embryo blastomeres by fluorogenic probes[J]. Theriogenology, 2002, 57(9): 2229—2236.
- [3] Meunier P G, Pastout L, Chevalier G, *et al.* Rapid determination of sex in myocastor copus embryos in the first stage of gestation[J]. C R Acad Sci III, 2001, 324(4): 321—325.
- [4] Manna L, Neglia G, Marino M, *et al.* Sex determination of buffalo embryos(*bubalus bubalis*) by polymerase chain reaction[J]. Zygote, 2003, 11(1): 17—22.
- [5] Herr C M, Reed K C. Micromanipulation of bovine embryos for sex determination[J]. Theriogenology, 1991, 35(1): 45—54.
- [6] 陈从英,黄路生,陈静波,等.牛胚胎性别鉴定体系的建立和优化[J].农业生物技术学报,2003,11(4):399—402.
- [7] 淮亚红,辛晓玲,曾林森,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] 卢圣栋.现代分子生物学实验技术[M].北京:高等教育出版社,1993:315—317.