

应用巢式 PCR 法鉴定牛早期胚胎性别

罗光彬¹, 孙明亮¹, 纪英卓¹, 曹 丹²

(1.沈阳农业大学 畜牧兽医学院, 沈阳 110161; 2.沈阳市畜牧兽医研究所, 沈阳 110034)

摘要: 为获得一种高效的牛胚胎性别鉴定方法, 采用高特异性和灵敏度的巢式 PCR 进行扩增。结果表明: 公牛可以扩增出 187bp 的 SRY 基因片段和 255bp 的 β 珠蛋白基因片段, 母牛只能扩增出 255bp 的 β 珠蛋白基因片段。巢式 PCR 只需 3-8 个细胞就可以观察到扩增结果, 而常规 PCR 则需要较多的细胞, 所以牛胚胎性别鉴定时使用巢式 PCR 效果更好。

关键词: 巢式 PCR; 牛; 早期胚胎; 性别鉴定

中图分类号: S852.1; S823

文献标识码: A

文章编号: 1000- 1700(2007)01- 0080- 05

Using Nested PCR for Sex Determination of Bovine Early Embryos

LUO Guang-bin¹, SUN Ming-liang¹, JI Ying-zhuo¹, CAO Dan²

(1.College of Animal Husbandry and Veterinary, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China;

2.Institute of Animal Science and Veterinary Medicine of Shenyang, Shenyang 110034, China)

Abstract: In this experiment, in order to obtain a high efficiency sex determination method, we used nested PCR to amplify purpose fragments. The result showed that 187 bp and 255 bp bands could be visible on the gel in ultraviolet transilluminator for male, but for female, only 255 bp band could be visible. It needed only 3 to 8 cells for obtaining amplification result by nested PCR, but more cells were needed by normal PCR. So we could obtain better results of sex determination of bovine preimplantation embryos by nested PCR.

Key words: nested PCR; bovine; early embryo; sex determination

随着科学技术的不断发展,我国畜牧业生产发生了巨大的变化,性别鉴定技术在畜牧业中的作用也日益明显。因为家畜的很多生产性状与性别有关,如:在乳制品生产中需要较多的母畜,而在肉畜生产中则优先选择公畜;并且在消灭不理想的隐性性状^[1],防止性连锁疾病^[2],加快遗传进展及畜群的更新等方面也起重要作用。因此,如果能够有效地控制家畜的性别,就能更好地利用自然资源,从而服务于人类自身。20世纪80年代以后,这方面的研究取得了很大的进展,特别是PCR技术和性别鉴定基因(SRY)的发现,使家畜早期胚胎性别鉴定的研究成为人们关注的课题之一^[3,4]。Herr等(1990)^[5]首先成功应用PCR技术鉴定牛羊胚胎性别。我国在胚胎性别鉴定方面的研究起步较晚,但发展很快,取得了长足的进步。1991年,曾溢涛等^[6]应用PCR技术扩增SRY序列首次进行牛胚胎性别鉴定获得成功。之后罗应荣等(1994),胡明信等(1995),柏学进等(1997),吕碧文等(1998),陈从英等(2003)^[7-11]都应用PCR技术鉴定牛胚胎性别获得成功。在使用常规PCR法进行性别鉴定时由于灵敏度有限、取样细胞数较少,所以其效率受到一定影响,但是取样细胞数过多将影响胚胎活力进而导致低妊娠率。因此,为了获得一种在胚胎性别鉴定过程中既少量取样,又有较高效率的方法,进行了本试验。

1 材料与方 法

本试验于2005年3月至2006年1月在沈阳农业大学畜牧兽医学院动物胚胎工程实验室和中心实验室进行。

1.1 试验样品

血液样品采自沈阳市于洪区金氏牛羊屠宰场,胚胎样品来自于沈阳农业大学畜牧兽医学院动物胚胎工程实验室体外受精、体外培养的胚胎。

1.2 试剂与仪器

主要试剂为Taq酶、dNTP、10×PCR Buffer、Mg²⁺ 购于天根生化科技(北京)有限公司,引物合成于宝生物工

收稿日期: 2006- 03- 09

基金项目: 沈阳市科技局资助项目(1053097- 3- 03; 1041044- 3- 03)

作者简介: 罗光彬(1959-),男,沈阳农业大学教授,博士,从事动物胚胎生物工程研究。

程(大连)有限公司, 100bp Ladder 购于上海生工生物工程技术有限公司。主要仪器为 PCR 仪(TGRADIENT, 德国 Biometra 公司)、凝胶成像系统(VerSa Doc, 美国 Bio-Rad 公司)、台式高速离心机(Microfuge48, 美国 Beckman 公司)、紫外分光光度计(Cary 50 Probe, 美国 Varian 公司)等。

1.3 引物合成

根据文献^[12,13]合成了 2 对巢式 PCR 引物,同时根据牛 β -珠蛋白基因序列^[14]设计合成一对内标引物。

1.4 模板 DNA 的提取

血样采用酚/氯仿反复抽提来获取 DNA。胚胎细胞 DNA 的提取通常有两种方法:一是煮沸法,将胚胎细胞置于 PCR 管中沸水煮 10min 后放于冰上冷却, $14000\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10min 取其上清作为反应模板。二是反复冻融法,将胚胎细胞置于 PCR 管中用液氮反复冻融几次后 $14000\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10min, 取其上清作为反应模板。

1.5 试验设计

本试验采用高特异性和灵敏度的巢式 PCR 法对牛胚胎进行性别鉴定。首先用 SRY 基因和内标基因的外引物进行约 20 个循环的扩增,然后取第一轮扩增产物再加入 SRY 基因内引物和内标引物进行第二轮 25 个循环的扩增。

1.6 PCR 体系的优化试验

1.6.1 Mg^{2+} 浓度的确定 将所选定 PCR 反应体系其他条件保持不变 ($30\mu\text{L}$ 反应体系), 使 Mg^{2+} 浓度分别为 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, $3.0\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 进行扩增, 根据扩增结果来确定最佳 Mg^{2+} 浓度。

1.6.2 Taq DNA 聚合酶用量的确定 将所选定 PCR 反应体系其他条件保持不变 ($30\mu\text{L}$ 反应体系), 使 Taq DNA 聚合酶的用量分别为 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0U 进行扩增, 根据扩增结果来确定 Taq DNA 聚合酶的最佳用量。

1.6.3 引物浓度的确定 将所选定 PCR 反应体系其他条件保持不变 ($30\mu\text{L}$ 反应体系), 使引物浓度分别为 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, $0.5\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 进行扩增, 根据扩增结果来确定最佳引物浓度。

1.6.4 退火温度的确定 将所选定 PCR 反应体系其他条件保持不变 ($30\mu\text{L}$ 反应体系), 使退火温度分别为 53, 54, 55, 56, 57, 58 进行扩增, 根据扩增结果来确定最佳退火温度。

1.7 优化后 PCR 体系的应用试验

1.7.1 准确率的测定 以已知性别的基因组 DNA 为模板, 应用优化后的 PCR 反应体系进行扩增来确定准确率。

1.7.2 精子细胞的扩增 直接以微量精子细胞(5 个)为模板, 应用优化后的 PCR 反应体系进行扩增以确定该 PCR 反应体系的灵敏度。

1.7.3 胚胎扩增 将一枚桑椹胚切割成 6 份, 取其中一份切割胚的 DNA 为模板, 应用优化后的 PCR 反应体系进行扩增来鉴定胚胎的性别。

1.8 PCR 扩增产物的电泳检测

PCR 反应结束后取 $6\mu\text{L}$ PCR 扩增产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳, 电压 100V, 电泳时间 45min, EB 染色后紫外灯下观察扩增结果。

2 结果与分析

2.1 牛基因组 DNA 的提取及鉴定

通过分光光度计测出牛基因组 DNA 的浓度为 $1\sim 2\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 接近 1.8, 电泳结果(图 1)说明该 DNA 提取纯度较高符合扩增要求。

2.2 基因组 DNA 性别鉴定的结果

2.2.1 第一轮扩增结果 以基因组 DNA 为模板经过第一轮扩增后无论是雄性或雌性都只在 467bp 处形成一条外引物的扩增带(图 2), 不能鉴定出性别。

2.2.2 第二轮扩增结果 基因组 DNA 在经过第二轮扩增后雄性在 255bp 和 187bp 两处形成两条扩增带, 而雌性只在 255bp 处形成一条扩增带(图 3), 可以鉴定出性别。其中 255bp 是二者的内标引物扩增带, 187bp 是雄性特异引物的扩增带。

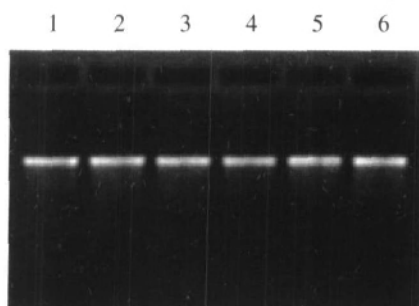


图 1 牛基因组 DNA
Figure 1 Bovine genomic DNA

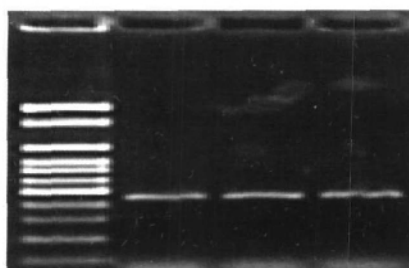


图 2 第一轮扩增结果
泳道 1.100bp Ladder;2.4.基因组 DNA(♂);3.基因组 DNA(♀)
Figure 2 The first amplification
Lane 1. 100bp Ladder; Lane 2,4. products of male bovine genomic DNA amplification; Lane 3. products of female bovine

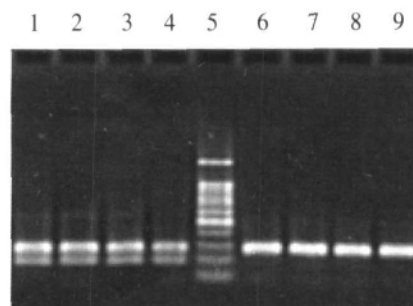


图 3 第二轮扩增结果
泳道 1~4.基因组 DNA(♂);5.100bp Ladder;6~9.基因组 DNA(♀)
Figure 3 The second amplification
Lane 1~4. products of male bovine genomic DNA amplification; Lane 5. 100bp Ladder; Lane 6~9. products of female bovine

2.3 PCR 优化的结果

2.3.1 不同 Mg^{2+} 浓度的影响 在本试验中, Mg^{2+} 浓度在 $2.0mmol \cdot L^{-1}$ 时扩增效果较好(图 4)。分析其原因,可能是由于 SRY 基因含量较少,在雄性特异性 DNA 片段的扩增反应中,能与雄性特异引物结合的位点就比较少,对产物的特异性程度也要求较高,故需要相对较高的 Mg^{2+} 浓度。

2.3.2 不同 Taq DNA 聚合酶用量的影响 在应用 Taq DNA 聚合酶进行 PCR 反应时,酶量偏少则 PCR 产物相应减少影响对结果的判定,而酶量过高则会增加产物的非特异性扩增。本试验中在 $30 \mu L$ 的扩增体系下 $1.0U$ 的 Taq DNA 聚合酶用量就足够扩增所用(图 5)。

2.3.3 不同引物浓度的影响 标准 PCR 反应每条引物的典型浓度是 $0.2 \sim 0.5 \mu mol \cdot L^{-1}$ 。引物浓度过低将减少扩增产物的量,过高可能会引发错配,导致非特异性扩增,特别是在巢式 PCR 的第一轮扩增中如果外引物的浓度过高,到最后电泳时可能会同时看到内引物和外引物所扩增的 2 条 SRY 基因带。本试验中引物浓度为 $0.2 \mu mol \cdot L^{-1}$ 时扩增结果较好(图 6)。

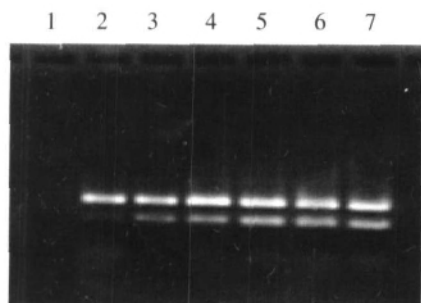


图 4 不同 Mg^{2+} 浓度的影响
泳道 1.阴性对照;2~7 的 Mg^{2+} 浓度分别为:0.5,1.0,1.5,2.0,2.5,3.0mmol·L⁻¹
Figure 4 Effect by different Mg^{2+} concentration

Lane 1.negative control; Lane 2~7. Mg^{2+} concentration 0.5,1.0,1.5,2.0,2.5,3.0mmol·L⁻¹

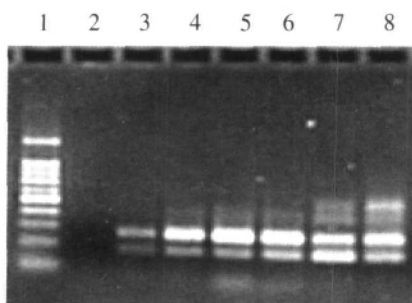


图 5 不同 Taq DNA 聚合酶的影响
泳道 1.100bp Ladder;2.阴性对照;3~8 的酶用量分别为:0.5,1.0,1.5,2.0,2.5,3.0U
Figure 5 Effect by different DNA polymerase concentration

Lane 1. 100bp Ladder; Lane 2.negative control; Lane 3~8.unit of polymerase 0.5,1.0,1.5,2.0,2.5,3.0U

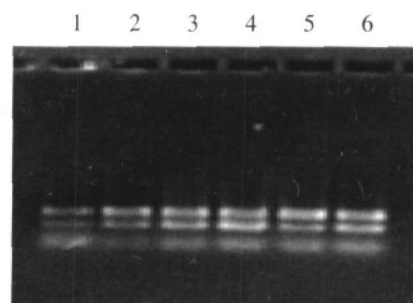


图 6 不同浓度引物的影响
泳道 1~6 的引物浓度分别为:0.05,0.1,0.2,0.3,0.4,0.5μmol·L⁻¹
Figure 6 Effect by different primer concentration

Lane 1~6. primer concentration 0.05,0.1,0.2,0.3,0.4,0.5μmol·L⁻¹

2.3.4 不同退火温度的影响 本试验所采用的退火温度是 $57^\circ C$, 提高退火温度至 $58^\circ C$ 有利于提高 PCR 反应的特异性。退火时间一般为 $1 \sim 1.5min$, 在此时间内引物和模板可以充分结合。本试验由于要扩增的目的序列均不超过 $500bp$, 因此, 只需要 $30s$ 就足够了(图 7)。

优化后的 PCR 反应体系为:第一轮 PCR 反应的体积为 $30 \mu L$, 其中含各引物 $0.2 \mu mol \cdot L^{-1}$, Mg^{2+} $2.0mmol \cdot L^{-1}$, Taq 酶 $1.0U$, 共 20 个循环。然后取第一轮 PCR 反应物 $1 \mu L$ 作为第二轮 PCR 反应的模板, 同时加入 SRY 基因内引物和内标引物各 $0.2 \mu mol \cdot L^{-1}$, Mg^{2+} $2.0 mmol \cdot L^{-1}$, Taq 酶 $1.0U$, 反应体积 $30 \mu L$, 共进行 25 个循环。循环参数同为:预变性 $95^\circ C, 5min$; 变性 $94^\circ C, 30s$; 退火 $57^\circ C, 30s$; 延伸 $72^\circ C, 1min$; 最后在 $72^\circ C$ 延伸 $8min$ 。

2.4 PCR 体系的应用

2.4.1 准确率 87 个血液样品鉴定结果与实际性别完全符合。即 87 个样品中已知性别为雄性的均为两条扩增条带 187bp 和 255bp, 所有已知性别为雌性的均为一条扩增条带 255bp, 准确率 100%。

2.4.2 精子细胞的扩增 直接以微量精子细胞(5 个)为模板进行 PCR 扩增, 可以获得正确的清晰的扩增带(图 8), 说明该 PCR 体系具有较高灵敏度可以对少量胚胎细胞进行性别鉴定。

2.4.3 胚胎扩增 切割胚的扩增结果表明(图 9), 虽然洗卵液有污染, 但却没有影响到性别鉴定的结果判定, 然后再将其中另一份切割胚进行巢式 PCR 扩增, 结果一致。本试验共鉴定 32 枚桑椹胚和囊胚, 前后两次鉴定结果均一致, 其效率明显高于 Peura 等四分胚的 90%~95% 和罗应荣等^[7]半胚的 81.8%。

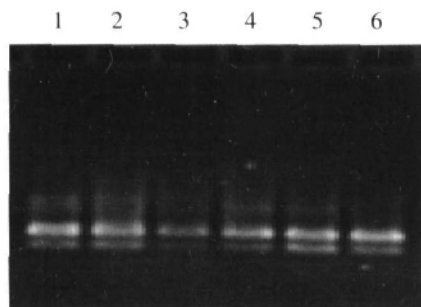


图 7 不同退火温度的影响
泳道 1~6 的退火温度分别为:
53, 54, 55, 56, 57, 58℃

Figure 7 Effect by different anneal temperature

Lane 1~6, anneal at 53, 54, 55, 56, 57, 58℃

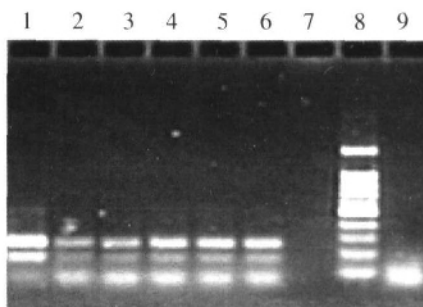


图 8 精子细胞的扩增

泳道 1. 阳性对照(♂); 2~6. 精子细胞; 7. 空白对照;
8. 100bp Ladder; 9. 阴性对照

Figure 8 Amplification of sperm cell

Lane 1, positive control (♂); Lane 2~6, sperm cell;
Lane 7, 9, negative control; Lane 8, 100bp Ladder

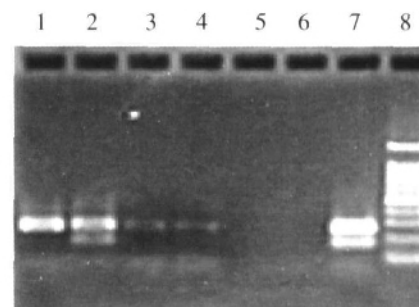


图 9 切割胚的扩增

泳道 1. 阳性对照(♀); 2. 切割胚胎; 3, 4. 洗卵液;
5. 空白对照; 6. 阴性对照; 7. 阳性对照(♂);
8. 100bp Ladder

Figure 9 Amplification of embryos

Lane 1, positive control (♀); Lane 2, biopsy;
Lane 3, 4, wash embryo liquid; Lane 5, 6,
negative control; Lane 7, positive control (♂);
Lane 8, 100bp Ladder

3 结论与讨论

本试验选用 2 对巢式 PCR 引物经实验证明完全公牛特异。但在操作过程中, 特别是胚胎分割取样或吸取胚胎细胞的过程中很容易丢失样品, 如果只使用一对公牛特异引物, 很容易造成假阴性从而影响准确率, 根据牛 β -珠蛋白基因序列设计了一对内标引物, 避免了假阴性的发生, 提高了准确率。在取样细胞数量上, Tomi-naga 研究表明取样细胞的数量影响性别鉴定的准确率, 取样细胞 2~10 个就足够用于 PCR 性别鉴定^[15]。而有报道当取样细胞小于 5 个时, PCR 性别鉴定的效率显著降低, 而较大的样品量(8~10 个细胞)鉴定结果较成功^[16], 但是取样细胞数过多将影响胚胎活力而导致妊娠率降低。在本试验中, 当取样细胞小于 5 个时, PCR 性别鉴定效率显著降低, 大于 5 个时则鉴定结果较成功, 与余文莉等^[15]和金方等^[17]所报道的相似。本试验中对血液样品扩增的准确率达 100%, 高于使用常规 PCR 法扩增的准确率。对切割胚胎的扩增经过多次重复试验结果也均前后一致, 并且准确率高于 Herr 等^[18]的 91.6% 和 Peura 等的 90%~95%, 罗应荣等^[7]的 81.8%, 吕碧文等^[10]的 84.1%, 与曾溢涛等^[9], 胡明信等^[9], 柏学进等^[9], 陈从英等^[11]所报道的一致, 均达到 100%, 说明本试验所选用的引物和优化的巢式 PCR 体系是可以应用于牛早期胚胎的性别鉴定。

尽管应用巢式 PCR 进行牛早期胚胎性别鉴定已获得成功, 但还有许多问题需要注意和解决。首先, 大部分胚胎培养液中含有犊牛血清, 如果血清不纯, 将很容易造成污染; 其次, 在胚胎切割过程中给胚胎造成的损伤, 将影响其受胎率, 再加上性别鉴定胚胎冷冻后存活率过低等问题, 如果能很好地解决这些问题, 该技术必将进入实用化和生产阶段, 给畜牧业生产带来更大的经济效益。

参考文献:

- [1] 乌达巴拉, 赖双英, 石 泉. 家畜早期胚胎性别鉴定技术的应用[J]. 畜牧与饲料科学, 2005, (2): 40-41.
- [2] 禹学礼, 栗颖华. PCR 在动物胚胎性别鉴定中的应用[J]. 洛阳农业高等专科学校学报, 2002, 22(1): 27-28.
- [3] MACHATY Z, PALDI A, CSAKI T, et al. Biopsy and sex determination by PCR of IVF bovine embryos [J]. Journal of Reproduction and Fertility, 1993, 98: 467-470.

- [4] CHRENEK P, BOULANGER L, HEYMAN Y, et al. Sexing and multiple genotype analysis from a single cell of bovine embryo [J]. *Theriogenology*, 2001, 55:1071- 1081.
- [5] HERR C M, REED K C. Micromanipulation of bovine embryos for sex determination[J]. *Theriogenology*, 1991, 35(1):45- 54.
- [6] 曾溢滔, 任兆瑞, 胡明信, 等. 应用 PCR 扩增牛 SRY 序列进行奶牛胚胎性别鉴定[J]. *中国科学(B)*, 1993, 23(4):371- 375.
- [7] 朱裕鼎, 王大可, 许罕华, 等. 利用 PCR 技术鉴定奶牛早期胚胎性别的研究[J]. *高技术通讯*, 1992, 12:12- 14.
- [8] 胡明信, 吴学清, 高建明, 等. 牛胚胎性别鉴定与取样胚胎移植应用技术的研究[J]. *畜牧兽医学报*, 1995, 4(6):487- 495.
- [9] 柏学进, 薛建华, 董雅娟, 等. 牛胚胎移植技术开发与应用研究课题鉴定材料[R]. 哈尔滨: 黑龙江省畜牧研究所, 1997.
- [10] 温利华, 王风武. 性别控制与在畜牧业中的应用[J]. *内蒙古畜牧科学*, 2000, 7:20- 21.
- [11] 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
- [12] YUKO K, SEIJSATO, XIAO C, et al. Cloning and Characterization of bovine SRY gene [J]. *Animal Science Technology*, 1995, 66(12):994- 1001.
- [13] KIRKPATRICK B W, MONSON R L. Sensitive sex determination assay applicable to bovine embryos derived from IVM and IVF[J]. *Journal of Reproduction and Fertility*, 1993, 98:335- 340.
- [14] AASEN E, MEDBANO J F. Amplification of the ZFY and ZFX genes for sex identification in humans, cattle, sheep and goats [J]. *Biotechnology*, 1990, 8:1279- 1281.
- [15] 余文莉, 崔利艳, 李树静, 等. 影响牛 PCR 胚胎性别鉴定雌性准确率的因素分析[A]. 中国畜牧兽医学会动物繁殖学会第十三届学术研讨会论文集[C]. 保定: 中国高级兽医学会动物繁殖学会, 2006:35- 38.
- [16] KEIICHIRO, TOMINAGA. Cryopreservation and sexing of in vivo- and in vitro- produced bovine embryos for their practical use [J]. *Journal of Reproduction and Development*, 2004, 50:29- 38.
- [17] 金 方, 房 义, 余文莉, 等. 影响牛 PCR 胚胎性别鉴定反应率的因素分析[A]. 中国畜牧兽医学会动物繁殖学会第十三届学术研讨会论文集[C]. 保定: 中国高级兽医学会动物繁殖学会, 2006: 3942.
- [18] HERR C M, MATTHAEI K L, PETRZAK U, et al. A rapid Y- chromosome- detecting bovine embryo sexing assay[J]. *Theriogenology*, 1990, 33(1):245- 247.

[责任编辑: 王 娟]