

两温度梯度多重 PCR 鉴别牛早期胚胎性别的技术

王 栋,程金华,朱化彬,郝海生,王宗礼,杨 波,王振玲,杜卫华,刘永华,张营霞

(中国农业科学院畜牧研究所,北京 100094)

摘要:稳定、可靠和快速的牛胚胎性别鉴定方法在生产应用中具有重要意义。通过两温度梯度 PCR 方法对牛基因组、克隆胚胎、胚胎样品进行性别鉴别实验研究,建立了稳定、简便、快速的牛早期胚胎性别鉴别两温度梯度 PCR 方法,鉴定时间仅为 57 分钟。采用两温度梯度 PCR 方法对 30 枚奶牛胚胎进行了早期性别鉴别,并将鉴别的 15 枚胚胎(11 枚为雌性,4 枚为雄性)移植到同期处理的 15 头受体母牛体内。60 天后妊娠检查,有 7 个受体成功受孕,5 头受体怀孕晚期流产,流产犊牛全部为母犊。结果产下 1 公 1 母两头犊牛,流产个体与出生个体的性别与 PCR 鉴别结果完全相符。

关键词:性别鉴别;两温度梯度 PCR;胚胎

中图分类号:S823.2 文献标识码:A

文章编号:0253-9772(2006)03-0334-05

The Technique of Sexing Bovine Pre-implantation Embryos with Two-temperature Gradient Multiplex PCR

WANG Dong, CHENG Jin-Hua, ZHU Hua-Bin, HAO Hai-Sheng,

WANG Zong-Li, YANG Bo, WANG Zhen-Ling, DU Wei-Hua, LIU Yong-Hua, ZHANG Ying-Xia

(Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094, China)

Abstract: For the stable, reliable, fast method of sexing bovine pre-implantation embryos is still play very important role in husbandry production, the amplification experiment under the condition of the two-temperature gradient PCR was done with bovine samples such as genome, cloning embryos, embryos respectively. As a result, the stable, simple, fast method of two-temperature gradient PCR for sexing bovine pre-implantation embryos was obtained, which only took 57 minutes to identify the embryo sex. A total of 30 dairy embryos were sexed with the two-temperature gradient PCR method in the study. 15 identified embryos (11 female, 4 male) were transferred into 15 recipient cows, among them 7 were pregnant after 60 days. In the end, 5 female calves were aborted in late pregnancy, and 1 female and 1 male dairy calf were born. The sexes of aborted and born calves were fully in accordance with the embryo sex pre-determination with PCR method.

Key words: sexing; two-temperature gradient PCR; embryos

由于家畜性别对畜牧生产有重要影响,而奶牛性控精液远不能满足当前生产实践的大量需求,早期胚胎性别的快速鉴别在我国奶业发展中仍具有重要的理论和实际意义。现在科研人员已经建立起了

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^[1~3],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;

收稿日期:2005-06-13;修回日期:2005-12-20

基金项目:国家高技术研究发展专项经费(编号:2004AA243011)[Supported by National High Technology Research and Development Program of China (No. 2004AA243011)]

作者简介:王 栋(1968—),男,内蒙古赤峰人,博士。研究方向:遗传育种与繁殖技术。Tel:010-62815892;E-mail:dongwang@iascaas.net.cn

通讯作者:朱化彬(1965—),男,副研究员,研究方向:动物遗传育种与繁殖技术。Tel:010-62815892;E-mail:huabinzhu@yahoo.com.cn

两步 PCR 法^[4],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^[5~7],增加了假阴性的几率;近来,LAMP 法采用特殊的引物设计,把传统 PCR 技术中的变性、复性、延伸过程都统一在 63.5℃ 或 65℃ 下进行^[8],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多对公牛特异引物和内标引物,研究了传统 PCR 技术的循环参数,并对本研究室以前的工作进行了改进^[9],旨在摸索出一种可在奶牛生产实践中推广应用的实用技术手段。

1 材料和方法

1.1 牛血液、细胞和胚胎样品的采集

颈静脉采集牛(2 公,2 母)血液样品 4 mL,ACD

抗凝,-20℃ 冻存储备用。克隆胚胎为体外培养 7 d 的克隆牛胚胎,移植的胚胎为冷冻解冻的 A 级奶牛体内胚胎。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 4℃ 下短时保存,或作为模板立即进行 PCR 检测。

1.2 牛血液 PCR 模板的制备

取 100~120 μL 抗凝血于 1.5 mL 离心管中,加双蒸水至 1.5 mL,充分混匀,冰浴 5 min 后 12 000 r/min 离心 1 min,弃上清,加入 100 μL 双蒸水悬浮沉淀,煮沸 5~10 min,立即冰浴 5 min,以 12 000 r/min 离心 5 min,取上清于另一离心管中即可用于 PCR 检测,或-20℃ 保存备用。

1.3 引物的设计与合成

依据 GenBank 中收录的 Y 染色体特异重复序列(gi:587091,序列报道长度为 489 bp),设计引物 B34;根据 Y 染色体特异 DNA 文库序列设计引物 B78。依据牛微卫星 DNA (Bovine 1.715 satellite, gi:701)序列设计了内标引物 A12。引物序列及相关的信息见表 1。

1.4 PCR 循环参数

两温度梯度 PCR 反应的温度循环程序:95℃ 预变性 3 min,94℃ 1 s,55℃ 1 s,30 个循环,循环结束后 72℃ 延伸 3 min,最后 4℃ 保存,或立即琼脂糖凝胶电泳检测。

表 1 胚胎性别鉴别所用引物序列及相关信息

Table 1 the primers sequence for sexing embryos and related information

引物代号 Code of primers	引物序列(5'→3') Sequence of primers(5'→3')	引物长度 Length of primers	T _M 值 T _M value	产物长度 Length of products(bp)
B34	TCTTTGTCTCGGGTTGTGGT	20	55.4	268
	GAATCCTACTCCTCAGAATG	20	53.4	
B78	GATCACTATACATACACCACT	20	51.7	141
	GCTATGCTAACACAAATTCTG	21	51.7	
A12	TCGTCAGAAACCGCACACTG	20	57.5	216
	TGGAAGCAAAGAACCCCGCT	20	57.5	

1.5 琼脂糖凝胶电泳检测

取 5 μL PCR 扩增产物加入 2 μL 上样缓冲液,在 2% 的琼脂糖凝胶上电泳,SYBR[®] Green I 荧光染料染色,紫外透射仪检测 PCR 扩增结果。只有内标引物扩增产物带的确定为雌性,同时出现内标引物

和 Y 染色体特异引物扩增产物条带的确定为雄性,无任何扩增条带出现的确定检验无效。分子量标记(鼎国 B003-2)同时上样电泳,分子量标记中最亮的条带为 3 kb,次亮的条带为 600 bp。

1.6 胚胎移植

将鉴别后的胚胎移植于同期发情处理的黄牛受体母牛,所用受体牛全为安徽省当地黄牛。移植时对每枚胚胎和每一受体牛都进行统一编号,跟踪观察受体牛的受孕情况,并记录流产个体和出生个体的性别。

2 结果与分析

2.1 两温度梯度多重 PCR 的基因组 DNA 扩增结果

将 Y 染色体特异引物 B34、B78 和内标引物 A12 组合,对基因组 DNA 进行两温度梯度多重 PCR 扩增,琼脂糖凝胶检测结果见图 1。两对引物组合都获得了较为理想的扩增效果。

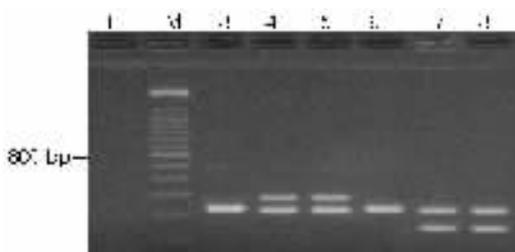


图 1 基因组 DNA 的两温度梯度多重 PCR 扩增结果

1: 阴性对照; M: 分子量标记; 3~5: B34 与 A12 的产物; 6~8: B78 与 A12 的产物; 3, 6: 雌性个体; 4, 5, 7, 8: 雄性个体。

Fig.1 The amplification results of genomic DNA in two-temperature gradient multiplex PCR

1: Negative control; M: Molecular Marker; 3~5: Primers B34 and A12; 6~8: Primers and B78 and A12; 3, 6: Female; 4, 5, 7, 8: Male.

2.2 两温度梯度多重 PCR 的克隆胚胎检测结果

以牛基因组 DNA 为阳性对照,对已知性别克隆胚胎样品进行两温度梯度多重 PCR 扩增,产物电泳结果如图 2。检测时对同一胚胎样品分别采用两对引物组合进行鉴定,结果 4 枚克隆胚胎样品性别鉴定结果为 2 雌 2 雄,与已知性别相符,两对引物的鉴定结果完全一致。

2.3 两温度梯度多重 PCR 的胚胎检测结果

本研究共对 30 枚奶牛胚胎进行了早期性别鉴定,鉴定结果除一枚胚胎没有扩增出条带外,其他 29 枚胚胎都得到了较为清晰的扩增结果,其中 13 枚为雌性胚胎,16 枚为雄性胚胎。图 3 为采用引物 A12 和 B78 组合对其中 9 枚胚胎的检测结果。图 3



图 2 克隆胚胎的性别鉴定结果

1~6: A12/B34 扩增结果; 8~13: A12/B78 扩增结果; 1, 2, 8, 9: 牛基因组 DNA 扩增结果; 3~6, 10~13: 克隆胚胎切割样的扩增结果; M: 分子量标记; 14: 阴性对照。

Fig.2 The sexing results of clone embryos

1, 2, 8, 9: PCR products of genomic DNA; 3~6, 10~13: PCR products of clone embryos; M: DNA Marker; 14: Negative control.

表明,所有样品都获得了理想的检测结果,9 枚胚胎样品中 5 枚为雄性胚胎,4 枚为雌性胚胎,而鉴定时间仅为 57 min。

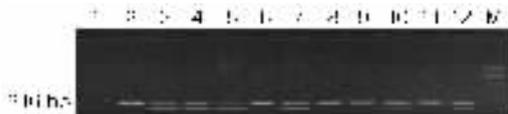


图 3 胚胎的两温度梯度多重 PCR 检测结果

1: 阴性对照; 2: 雌性 DNA 样品; 3: 雄性 DNA 样品; 4~12: 胚胎样品; 4, 5, 7, 10, 12: 雄性胚胎; 6, 8, 9, 11: 雌性胚胎; M: 分子量标记。

Fig.3 The amplification results of two-temperature gradient multiplex PCR for bovine embryos

1: Negative control; 2: Female DNA; 3: Male DNA; 4~12: Embryos samples; 4, 5, 7, 10, 12: Male embryos; 6, 8, 9, 11: Female embryos; M: Molecular Marker.

2.4 胚胎移植结果

将 15 枚经鉴定的奶牛胚胎(11 枚为雌性,4 枚为雄性)移植给 15 头同期发情处理的安徽当地黄牛,移植后 60 d 进行妊娠检查,7 个受体成功妊娠,但妊娠的 5 头受体于怀孕晚期流产,流产犊牛全部为母犊,2 头受体分别产下 1 公、1 母两头犊牛,流产犊牛和出生犊牛的性别与应用 PCR 法进行的早期胚胎性别鉴别结果完全相符。

3 讨论与结论

常规 PCR 反应每个循环包括 3 个温度梯度: (1)94℃ 变性,双链 DNA 解链成单链 DNA; (2)复性,引物与模板特异结合; (3)72℃ 延伸, DNA 聚合酶在 4 种 dNTP 的参与下扩增模板。常规 PCR 反应一般

表 2 牛胚胎的性别鉴定结果

Table 2 Sex identification of the bovine embryos

受胚牛编号 Recipient No.	胚胎编号 Embryos No.	PCR 结果 PCR results	犊牛性别 Calf sex	妊娠 Pregnancy	流产 Abortion	性别验证结果是否一致 Identity
57	02081-1	♀		+	♀	符合 Being identical
043	02081-2	♀		-		
017	02081-3	♀		+	♀	符合 Being identical
031	02081-4	♀		+	♀	符合 Being identical
053	02081-5	♀		-		
023	98024-1	♀		-		
075	98024-2	♂		-		
003	98024-3	♀		-		
018	98024-4	♂	♂	+		符合 Being identical
009	02041-1	♂		+	♂	符合 Being identical
039	02041-2	♀	♀	+		符合 Being identical
041	02090-1	♀		-		
069	02091-2	♀		-		
57	02041-1	♀		-		
73	02041-2	♂		+	♂	符合 Being identical

需要 30~35 个循环约 2 个 h 左右。如果扩增的 DNA 片段较小时(小于 200 bp),从 55℃ 左右复性到 94℃ 左右变性过程中,引物在与底物模板结合后,继而 DNA 聚合酶就可以在升温过程中很快完成 DNA 链的催化合成^[10]。Wittwer 等^[11]的实验证明了这一点,他们采用毛细管作为 PCR 反应容器,以空气作为热传导介质,使用快速循环仪在 15 min 内完成了三温度循环 PCR 的 35 个循环。快速 PCR 每一个循环包括 94℃ 变性不超过 1 s → 45℃ 复性不超过 1 s → 72℃ 延伸 10 s 3 步,该方法除了缩短了扩增时间外,还得到了较为理想的扩增产物。Chars 等^[12]进一步简化了传统的 PCR 程序,取消了延伸这一温度梯度,他们采用这种两温梯度 PCR 扩增方法研究大鼠 C-Ha-ras 基因的突变,实验中使用了至少 4 套不同的引物,采用的 PCR 反应程序为,变性 1 min,复性/延伸 1 min,均获得了理想的扩增结果。据报道, *Taq* 酶的最佳催化合成温度为 75~80℃,在此温度下的延伸速度为 150~300 个核苷酸/秒·酶分子,温度下降合成速度也随之降低,到 70℃ 时合成速度为 60 个核苷酸/秒·酶分子,而在温度高于 80℃ 时,则几乎没有延伸反应发生^[13]。本

研究使用的是德国 EPPENDORF 公司的 PCR 仪,其升温速度为 4℃/s,在升温时经 75~80℃ 的时间约为 1.2 s,可合成长度约为 180~360 个核苷酸的长链,所以本研究根据扩增片段的长度取消了延伸这一温度梯度,表明扩增反应仍能照常发生。同时本实验还做了两温度梯度扩增能力的检测研究,研究结果表明两温度梯度 PCR 能够成功地实现对 500 bp 片段的扩增(未发表资料)。说明 DNA 聚合酶的合成能力及 PCR 反应的潜力还值得进一步探索研究。

本实验还发现两温度梯度 PCR 方法提高了扩增的特异性,减少了很多在常规 PCR 反应中存在的非特异条带。Wittwer 等^[11]的实验也证明,缩短各个温度梯度的反应时间,不但缩短了扩增时间,还得到了比传统 PCR 法更特异的扩增产物。故推断, DNA 聚合酶的特异性与其在各个温度梯度的停留时间有关,在保证合成过程能够成功发生的前提下,在各个温度梯度停留的时间越长则越容易引起非特异产物的形成,所以除了引物、反应体系等因素外,尽可能缩短 PCR 反应各个温度梯度的反应时间也可提高反应特异性。

本研究将 PCR 扩增时间缩短到 38 min, 并且得到的 PCR 产物较小, 两条带相差较大, 电泳检测时可以在较短的时间内得到明显的区分, 由于产物片段较小和扩增时间的缩短, 同传统 PCR 检测方法相比检测时间大大缩短, 可以使整个性别鉴别时间缩短到 57 min 左右。本研究的胚胎移植结果表明, 本方法是较为简捷、可靠的奶牛胚胎性别鉴别方法, 基本满足胚胎性别鉴定实践中所需要的快速、高效的鉴定要求。

参 考 文 献 (References):

- [1] Appa Rao K B, Totey S M. Cloning and sequencing of buffalo male-specific repetitive DNA: sexing of *in-vitro* developed buffalo embryos using multiplex and nested polymerase chain reaction. *Theriogenology*, 1999, 51(4):785~797.
- [2] CHEN Cong - Ying, HUANG Lu - Sheng, CHEN Jing - Bo, DING Neng-Shui, ZHOU Li-Hua, XIAO Hai-Xia. Establishing and optimizing the system for sex determination of bovine preimplantation embryos. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2003, 11(4): 399~402.
陈从英, 黄路生, 陈静波, 丁能水, 周利华, 肖海霞. 牛早期胚胎性别鉴定体系的建立和优化. *农业生物技术学报*, 2003, 11(4):399~402.
- [3] HUANG Shu-Zhen, CHEN Mei-Jue, HUANG Ying, SUN Qiong, LU Jian-Ying, REN Zhao-Rui, ZENG Yi-Tao. Sexing the IVF bovine and goat embryos. *Hereditas* (Beijing), 2000, 22(2): 65~68.
黄淑帧, 陈美珏, 黄英, 孙琼, 陆建英, 任兆瑞, 曾溢滔. 试管牛和试管羊胚胎性别的鉴定. *遗传*, 2000, 22(2): 65~68.
- [4] Park J H, Lee J H, Choi K M, Joung S Y, Kim J Y, Chung G M, Jin D I, Im K S. Rapid sexing of preimplantation bovine embryo using consecutive and multiplex polymerase chain reaction (PCR) with biopsied blastomere. *Theriogenology*, 2001, 55: 1843~1853.
- [5] Hasler J F, Cardey E, Stokes J E, Bredbacka P. Nonelectrophoretic PCR-sexing of bovine embryos in a commercial environment. *Theriogenology*, 2002, 58: 1457~1469.
- [6] ZHU Hua-Bin, PAN Xi-Yan. The study on mammalian embryo sex determination with PCR method. *Foreign Husbandry Science and Technology*, 1995, 22(5): 26~28.
朱化彬, 潘锡岩. PCR 法鉴别哺乳动物胚胎性别的研究. *国外畜牧科技*, 1995, 22(5):26~28.
- [7] YANG Jian-Min, ZHU Su-Ling, WU Li-Hong, JIANG Yao-Qing, TAN Li-Ling, GONG Yun-Hao, SUN Shu-Fang, LIAO He-Mo, YAN Zhong-Quan. Sexing bovine embryos using polymerase chain redction. *Hereditas* (Beijing), 1995, 17(2): 14~16.
杨建民, 朱苏玲, 武立红, 蒋耀青, 谭丽玲, 宫云浩, 孙淑芳, 廖和模, 严忠全. PCR 方法用于奶牛早期胚胎的性别鉴定. *遗传*, 1995, 17(2): 14~16.
- [8] Hirayama H, Kageyama S, Moriyasu S, Takahashi Y, Katagiri S, Toen K, Watanabe K, Yamashina H, Onoe S, Minamihashi A. Rapid Sexing of Preimplantation Bovine Embryos Using Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Proceedings of the Annual Conference of the International Embryo Transfer Society*, 2003, 59:508.
- [9] WANG Zong-Li, WANG Dong, CHENG Jin-Hua, YANG Bo, ZHU Hua-Bin, HAO Hai-Sheng, GUO Yi. Designing and screening of PCR primers for sexing bovine pre-implantation embryos. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2005, 36(2): 1116~1120.
王宗礼, 王栋, 程金华, 杨波, 朱化彬, 郝海生, 郭仪. 鉴别牛早期胚胎性别 PCR 方法引物的设计与筛选. *畜牧兽医学报*, 2005, 36(2): 1116~120.
- [10] Joseph Sambrook, David W Russell. *Molecular Cloning Third Edition, Volume 2*. Cold Spring Harbor, New York: CSHL Press, 2001, 8. 14~8. 16.
- [11] Wittwer C T, Garling D J. Rapid cycle DNA amplification: time and temperature optimization. *Biotechniques*, 1991, 10(1):76~83.
- [12] Cha R S, Zarbl H, Keohavong P, Thilly W G. Mismatch amplification mutation assay (MAMA): application to the c-H-ras gene. *PCR Methods Appl*, 1992, 2(1):14~20.
- [13] ZHANG Wei-Ming. *Modern Molecular Biology Laboratory Protocol, First Edition*. Beijing: Science Press, 2003, 244~270.
张维铭. *现代分子生物学实验手册, 第一版*. 北京: 科学出版社, 2003, 244~270.