

牛早期胚胎性别鉴定 PCR 反应体系的优化研究

陈从英¹, 黄路生¹, 陈静波², 任 军¹, 肖海霞²

(1. 江西农业大学江西省动物生物技术重点实验室, 南昌 330045; 2. 新疆畜牧科学院畜牧所繁殖室, 乌鲁木齐 830000)

摘 要: 根据牛 SRY 基因序列设计合成 2 对巢式 PCR 引物作为性别鉴定引物, 根据牛酪蛋白基因序列设计了一对引物作为内标引物建立了牛胚胎性别鉴定的 PCR 反应体系。同时对常规 PCR 和巢式 PCR 在牛早期胚胎性别鉴定中的实用性进行比较。15 头公牛、13 头母牛的 DNA 样品检测结果表明: 使用巢式 PCR 公牛可以扩增出 205 bp 的 SRY 基因片段和 403 bp 的酪蛋白基因片段, 母牛只能扩增出 403 bp 的酪蛋白基因片段; 而使用常规 PCR 时公牛扩增出 255 bp 的 SRY 基因片段和 403 bp 的酪蛋白基因片段, 母牛只能扩增出 403 bp 的酪蛋白基因片段, 其性别鉴定结果和实际完全一致。由于巢式 PCR 只需 10 个细胞就可以在紫外透射分析仪下看到扩增结果, 而常规 PCR 则需要 20~30 个细胞, 所以胚胎性别鉴定时使用巢式 PCR 效果更好。试验采用巢式 PCR 鉴定了 10 个奶牛胚胎的性别, 同时还对血清是否会对试验结果产生影响进行了研究。

关键词: SRY 基因; 常规 PCR; 巢式 PCR; 牛胚胎; 性别鉴定

中图分类号: S813.3; S814.7

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2003)03-0209-04

家畜性别的人为控制一直是人们追求的目标。实现家畜性别的人为控制主要有两条途径: 一是 X 精子和 Y 精子的分离; 二是早期胚胎的性别鉴定。从目前 X、Y 精子分离技术的发展来看, 虽然使用流式细胞分类仪已成功分离了 X、Y 精子, 但其成本高, 分离效率低, 一时还很难在实际应用中推广。随着胚胎移植技术的产业化推广, 早期胚胎的性别鉴定技术日益发展成熟, 成为目前最有实用价值的一项性别控制技术。

牛早期胚胎的性别鉴定已有十几年的发展历史, 从早期的免疫学方法到胚胎细胞的染色体核型分析, 取得了巨大的发展, 但真正进入实用化阶段是 PCR 技术在牛早期胚胎性别鉴定中的应用。Herr 等(1990) 首先成功应用 PCR 技术鉴定牛羊胚胎性别^[1]。曾溢滔等(1993) 通过对牛 SRY 基因片段的直接测序, 设计了牛 SRY 基因引物, 对牛早期胚胎进行了性别鉴定研究^[2]。

目前常用的牛胚胎性别鉴定的 PCR 方法主要有两种: 一种为常规 PCR, 即用一对 Y-染色体特异性引物或同时使用一对公、母牛共有基因引物作为内标引物对胚胎样品进行一次 PCR 扩增来鉴定胚胎性别^[3~6]。另一种为巢式 PCR^[7], 即先用 Y-染

色体特异基因的外引物和内标引物进行第一次 PCR 扩增, 然后取第一次扩增产物再加入内引物和内标引物进行第二次扩增。本试验中, 我们根据牛 SRY 基因序列自行设计了 2 对 SRY 基因引物(嵌套式引物) 作为性别鉴定引物, 同时根据牛酪蛋白基因序列设计一对引物作为内标引物, 建立了牛胚胎性别鉴定的 PCR 反应体系, 对比分析了常规 PCR 和巢式 PCR 方法在牛胚胎性别鉴定中的实用性, 还对微量胚胎细胞样品 DNA 的提取方法, 所用的犊牛血清是否会对鉴定结果产生污染等进行了研究和检测, 以期找到最佳的牛胚胎性别鉴定方法。

1 材料与方法

1.1 模板 DNA 的提取 牛耳组织 DNA 提取: 提取牛耳组织 DNA, 检验所设计引物的特异性。从牛场或屠宰场采集牛耳组织, 70% 乙醇保存, 回实验室后剪碎, 用蛋白酶 K、组织裂解液消化过夜, 然后用酚-氯仿反复抽提, 无水乙醇沉淀, 70% 乙醇洗涤后干燥, TE 溶解至终浓度 100 ng/μl。

微量细胞 DNA 的提取: 使用微量血细胞或颗粒细胞模拟胚胎细胞样品, 寻求最佳的胚胎细胞 DNA 提取方法, 使用相同数量的颗粒细胞对比两种 PCR 方法的灵敏度。提取方法分两种: 一是取少量血液或在高倍实体显微镜下取 10 个颗粒细胞在沸水中煮 10 min, 离心后取其上清作为反应模板; 二

收稿日期: 2002-02-04

基金项目: 江西省科技厅重点科技计划项目资助

作者简介: 陈从英(1975-), 男, 江西石城人, 硕士, 从事动物遗传育种与繁殖的研究。

是将颗粒细胞样品用液氮反复冻融几次后离心,取上清作为反应模板。

胚胎样品 DNA 提取:选择 A 级或 B 级的致密桑椹胚和早期囊胚,采用日本产 NALISHIGE MN-151 型简易胚胎分割仪对胚胎进行分割取样,取样细胞数为整个胚胎的 1/5~1/3。取样细胞用热处理或液氮处理,离心取上清。

1.2 PCR 引物的设计和合成 根据参考文献[8]报道的牛 SRY 基因序列设计合成了 2 对巢式 PCR 引物,同时根据牛酪蛋白基因序列设计合成一对内标引物,引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.3 PCR 检测 常规 PCR 扩增的反应体系总体积为 20 μ l,其中 10 \times PCR Buffer 2 μ l, Mg^{2+} 2.5 mmol/l, dNTP (上海生工) 0.4 μ l, Taq 酶(上海生工) 2.5 U,各引物浓度为 0.3 μ mol/l。循环参数为:预变性 94 $^{\circ}C$, 5 min;变性 94 $^{\circ}C$, 30 s;退火 63 $^{\circ}C$, 30 s;延伸 72 $^{\circ}C$, 1 min;共进行 38 个循环,最后在 72 $^{\circ}C$, 5 min。巢式 PCR 的反应体系为:第一次 PCR 反应体积为 10 μ l,其中含各引物 0.1 μ mol/l, Taq 酶 2.0 U,共 20 个循环。取第一次 PCR 反应物 4 μ l 作为第二次 PCR 反应模板,同时加入 SRY 基因内引物和内标引物各 0.25 μ mol/l, Taq 酶 2.0 U 共进行 30 个循环,循环参数和常规 PCR 一样。PCR 反应在 PTC-100(MJ Research)上进行。

1.4 PCR 扩增产物的电泳分析 取 8 μ l PCR 扩增产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳,电压 90 V,电泳时间 30 min,紫外透射分析仪观察扩增结果。

1.5 血清对试验结果的影响 在 PBS 中加入 10%、20% 的犊牛血清,再分别取 10 μ l 含血清的 PBS 经煮沸 10 min 后离心取上清作为反应模板,通过鉴定扩增产物的有无来判定所用血清是否会对胚胎性别鉴定结果产生污染。

1.6 受体牛同期发情处理及性别鉴定后胚胎移植 在供体牛注射 PG 前一天对受体牛注射 PG 进行同期发情处理。性别鉴定后的胚胎,移植到同期发情牛的子宫角。

2 结果

2.1 引物特异性检测结果 采集 15 头公牛,13 头母牛的耳组织样品,用抽提的 DNA 进行 PCR 扩增。结果常规 PCR 扩增后琼脂糖凝胶电泳,在紫外灯下公牛可观察到 255 bp 的 SRY 基因扩增带和 403 bp 的酪蛋白基因扩增带,而母牛只能看到 403 bp 的酪

蛋白基因扩增带(图 2)。而采用巢式 PCR 时,公牛可看到 205 bp 的 SRY 基因扩增带和 403 bp 的酪蛋白基因扩增带,母牛只能看到 403 bp 的酪蛋白基因扩增带(图 1),其性别鉴定结果和实际性别完全一致。

2.2 常规 PCR 和巢式 PCR 在牛胚胎性别鉴定中的灵敏度 在同样取 0.5 μ l 新鲜血液加入 30 μ l 水处理后取其中 6 μ l 作为反应模板的情况下,用常规 PCR 扩增 38 个循环时,在紫外灯下看到的扩增带较模糊,易产生误判,而使用巢式 PCR 时扩增带比较清晰。相同数量颗粒细胞(10~20 个)提取 DNA 后作为反应模板的情况下,使用一次 PCR 扩增 38 个循环,在紫外灯下有时因为扩增产物少而看不到明显的扩增带,采用巢式 PCR 时,则可以清晰地看到 403 bp 的一条扩增带。减少细胞量的试验结果表明,使用巢式 PCR 只需 10 个细胞即可看清楚扩增产物的电泳带,因此在胚胎性别鉴定时,由于从胚胎上切取的细胞数量少,所以最好使用巢式 PCR。

2.3 微量细胞样品 DNA 的提取方法 使用热处理法和使用液氮处理法提取的微量细胞样品 DNA 的扩增效率相同,所以在胚胎性别鉴定时可以使用任意一种处理方法。

2.4 血清纯度对试验结果的影响 含 10%、20% 血清的 PBS 试验结果表明,所用的犊牛血清比较纯不会对 PCR 鉴定结果产生污染。

2.5 胚胎性别鉴定 对 12 枚黑白花奶牛胚胎进行了性别鉴定,其中第 2 号和第 9 号胚胎由于操作过程中胚胎细胞丢失而无法判定其性别,其余 10 枚胚胎的性别鉴定结果如下表,受体牛不够所以每头受体移植双胚。由于性别鉴定和胚胎移植都是在牛场进行,当时气温很高(8 月初),因此鉴定性别的 10 枚胚胎中只有 2 枚胚胎移植成功,次年 5 月已产下两头牛犊,其实际性别和鉴定结果完全一致。今后将进一步扩大性别鉴定和移植胚胎的规模。

3 讨论

使用 PCR 鉴定牛早期胚胎性别是目前牛性别控制中最实用、最有推广价值的一项技术。目前人们已报道了多种用 PCR 鉴定牛早期胚胎性别的方法和引物序列。根据牛 SRY 基因序列设计的 2 对巢式 PCR 引物经实验表明完全公牛特异。在牛胚胎性别鉴定过程中,特别是分割取样过程中容易丢



图 1 巢式 PCR 扩增结果

Fig.1 Amplification result of nested PCR

图 1 1、3、4、6、8 只有 403bp 的酪蛋白基因扩增片段,其性别鉴定为母牛;2、5、7 同时有 403bp 的酪蛋白基因扩增片段和 205bp 的 SRY 基因扩增片段,其性别鉴定为公牛;9 为单独使用内标引物扩增结果;10 为单独使用 SRY 基因外引物扩增结果,片段长 255bp,11 为内标引物和 SRY 基因外引物扩增结果;12 为单独使用 SRY 基因内引物扩增的 205bp 片段。

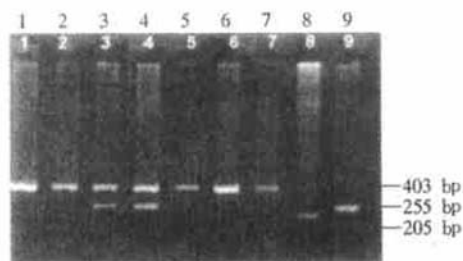


图 2 常规 PCR 扩增结果

Fig.2 Amplification result of normal PCR

图 2 3、4 同时具有 255bp 的 SRY 基因扩增片段和 403bp 的酪蛋白基因扩增片段,其性别鉴定为公牛;1、2、5、6 只有 403bp 的酪蛋白基因扩增片段,性别鉴定为母牛;7 为单独使用内标引物扩增结果;8 为单独使用 SRY 基因内引物扩增的 205bp 片段;9 为单独使用 SRY 基因外引物扩增的 255bp 片段。

Fig.1 Lane 1, 3, 4, 6, 8 female bovine, only having 403bp of casein protein gene fragment; Lane 2, 5, 7 male bovine, having both 205bp of amplified SRY DNA and 403 bp of casein DNA; Lane 9 amplified casein DNA; Lane 10 male bovine, 255bp of amplified SRY DNA only using external primer; Lane 11 male bovine, both having 255bp of amplified SRY DNA using external primer and 403bp of casein DNA; Lane 12 male bovine, 205bp of amplified SRY DNA only using internal primer.

Fig.2 Lane 3, 4 male bovine, having both 255bp of amplified SRY DNA and 403bp of casein DNA; Lane 1, 2, 5, 6 female bovine, only having 403bp of casein protein gene fragment; Lane 7 amplified casein DNA; Lane 8 male bovine, 255bp of amplified SRY DNA using external primer; Lane 9 male bovine, 205 bp of amplified SRY DNA using internal primer.

表 牛胚胎性别鉴定结果

Table The results of sex determination of bovine embryos

供体牛号 Donor bovine No.	胚胎号 Embryo No.	胚胎发育期 Embryo stage	胚胎级别 Embryo rank	性别鉴定结果 Results of sex determination	受体牛号 Recipient bovine No.
787	1	CM	A	母(Female)	0037 左(Left)
787	2	CM	B	公(Male)	0007 右(Right)
787	3	CM	B	公(Male)	0032 左(Left)
787	4	CM	B	公(Male)	0048 左(Left)
44	5	EB	B	母(Female)	0038 左(Left)
44	6	CM	A	公(Male)	0032 右(Right)
44	7	CM	A	公(Male)	0007 左(Left)
44	8	CM	A	样品丢失(Sample lost)	0037 右(Right)
44	9	CM	B	母(Female)	0038 右(Right)
104	10	EB	A	母(Female)	9800 左(Left)
104	11	CM	B	样品丢失(Sample lost)	9800 右(Right)
104	12	CM	A	公(Male)	9715

CM: 致密桑椹胚(Compacting morulae)

EB: 早期囊胚(Early blastocyst)

失样品,所以如果只用一对公牛特异的引物,就会把已丢失样品的个体误判为母牛而影响准确率,我们根据牛酪蛋白基因序列设计了一对内标引物,因此如果样品丢失,那么酪蛋白基因扩增带也没有,避免了假阴性的产生。

在胚胎性别鉴定所用的 PCR 方法中,常规 PCR

虽然可以减少性别鉴定所需要的时间,但由于胚胎性别鉴定时切割取样的细胞数少,一次扩增灵敏度有限,所以容易产生在紫外灯下看不到扩增带或扩增带亮度不够而对鉴定结果产生误判的现象,如果采用巢式 PCR,由于经过两次扩增,扩增产物的量增加,结果更容易判断,而且巢式引物的使用增加了

扩增产物的特异性,提高了准确度。

除引物的特异性之外,微量胚胎细胞 DNA 的提取是另一个关键,它关系到 PCR 反应的成败。试验所使用的煮沸法和冻融法都可用于胚胎细胞样品 DNA 的提取,这两种方法和传统的 DNA 提取方法相比操作简便、用时短,适合在牛胚胎性别鉴定中使用。

在胚胎性别鉴定中,由于胚胎培养液中含有犊牛血清,如果血清不纯,再加上 PCR 极为灵敏,所以有可能对试验结果产生影响。根据 Herr C·M 等^[2]报道,胚胎培养用的牛血清和 BSA 等都会对试验结果产生影响。我们试验中所使用的血清都经过 0.22 μm 的滤菌器过滤,含 10%、20% 血清的 PBS 经热处理后作为反应模板没有扩增产物,说明所用的血清纯度比较高,不会对性别鉴定结果产生影响。另外在胚胎切割取样过程中,为了防止样品间的交叉污染,在每切割完一个胚胎后,都分别用 70% 酒精、双蒸水和 PBS 涮洗切割针,而且每个胚胎用不同的吸管吸取切割下的细胞,尽可能的避免了污染。

参考文献:

- [1] Herr C M, Reed K C. Micromanipulation of bovine embryos for sex determination [J]. *Theriogenology*, 1991, 35 (1): 45~ 54.
- [2] 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.
- [3] 杨建明,朱苏玲,武立红,等.PCR 方法用于奶牛早期胚胎的性别鉴定[J]. *遗传*, 1995, 17(2): 14~ 16.
- [4] 欧阳红生.用 PCR 鉴别牛胚胎性别的研究[J]. *中国兽医学报*, 1995, 15(2): 112~ 155.
- [5] Machaty Z, Paldi A, Csaki T, Varga Z, Kiss I, Barandi Z, Vajta G. Biopsy and sex determination by PCR of IVF bovine embryos[J]. *Journal of Reproduction and Fertility*, 1993, 98: 467~ 470.
- [6] Chrenek P, Boulanger L, Heyman Y, Uhrin P, Laurincik J, Renard J P. Sexing and multiple genotype analysis from a single cell of bovine embryo[J]. *Theriogenology*, 2001, 55: 1071~ 1981.
- [7] 黄淑帧,陈美珏,黄瑛,等.试管牛和试管羊胚胎性别的鉴定[J]. *遗传*, 2000, 22(2): 65~ 68.
- [8] Yuko K, Seijisato, Xiao C, et al. Cloning and Characterization of bovine SRY gene[J]. *Animal Science Technology*, 1995, 66(12): 994~ 1001.

The Study on Optimizing the System of PCR for Sex Determination of Bovine Preimplantation Embryos

CHEN Cong-ying¹, HUANG Lu-sheng¹, CHEN Jing-bo², Ren Jun¹, Xiao Hair-xia²

(1. Jiangxi Provincial Key Laboratory for Animal Biotechnology, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China; 2. Institute of Animal Science, Xinjiang Academy of Animal Science, Urumqi 830000, China)

Abstract: We designed 2 pairs of SRY gene nested primers for sex determination and a pair of casein protein gene primer as an internal standard in this study and established the system of PCR. At the same time, we compared the efficiency of nested PCR in sex determination of bovine embryos with that of normal PCR. DNA from 15 male and 13 female embryos were used as template in the PCR. As a result, 205bp and 403bp bands could be visible on the gel in ultraviolet transilluminator by nested PCR for male, but for female, only 403bp band could be visible. By normal PCR, if DNA was from the male embryos, it could be amplified 255bp and 403bp products. From the female, it had only 403bp product. In every case the results were as expected for both female and male. It needed only 10 cells for obtaining amplification result by nested PCR, but 20 to 30 cells were needed by normal PCR. So we could obtain better results of sex determination of bovine preimplantation embryos by nested PCR. In this experiment, the sex of 10 bovine embryos was determined by nested PCR. We also researched whether the fetal calf serum could contaminate the embryo samples or not.

Key words: SRY gene; Normal PCR; Nested PCR; Bovine embryos; Sex determination