

鉴别牛早期胚胎性别 PCR 方法引物的设计与筛选

王宗礼^{1,4}, 王 栋², 程金华², 杨 波², 朱化彬^{2*}, 郝海生², 郭 炎炎³

(1. 甘肃农业大学动物科技学院, 兰州 730070; 2. 中国农业科学院畜牧研究所, 北京 100094;

3. 中国科学院动物研究所, 北京 161006; 4. 中国农业科学院草原研究所, 呼和浩特 010010)

摘 要: 根据牛 Y-染色体特异重复序列、睾丸特异蛋白基因以及性别决定基因序列设计合成 5 对公牛 Y-染色体特异引物, 依据牛骨骼肌 α 肌动蛋白前体基因和微卫星 DNA 序列设计合成 4 对牛 DNA 特异引物(内标引物)。单重 PCR 扩增牛基因组 DNA, 筛选出 4 对牛 Y-染色体特异引物和 1 对牛 DNA 特异内标引物。将不同的 Y-染色体特异引物与内标引物组合, 多重 PCR 扩增牛基因组 DNA、已知性别的牛成纤维细胞和克隆胚胎, 筛选出 2 个可用于牛早期胚胎性别鉴别的 PCR 引物组合: B34/A12 和 B78/A12。

关键词: 引物设计; 牛; 胚胎性别鉴别; 多重 PCR

中图分类号: S823.2

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2005)02-0116-05

随着家畜 Y-染色体特异序列研究进展和 PCR 技术的不断完善, 建立了多种应用 PCR 技术鉴别家畜早期胚胎性别的方法^[1-3]。但是有些鉴别牛胚胎性别的方法如巢式 PCR 技术(nested-PCR), 需要预先进行一次 PCR 模板的富集后进行胚胎性别鉴别, 增加了鉴别的工作量和所需时间^[1]。2 步 PCR 方法首先需要用 Y-染色体特异引物进行 10 个左右循环的 PCR 预扩增, 然后加入内标引物进行多重 PCR 扩增, 不仅增加了反应的循环数和鉴定所用的时间, 同时增加了反应污染的几率^[3]。单重 PCR 法仅利用 Y-染色体特异引物扩增 Y-染色体特异片段, 避免了多重 PCR 中常染色体引物对 Y-染色体特异引物扩增的影响, 但由于没有内部标记, 就可能将没有发生反应的样品误判定为雌性, 从而增加试验假阴性的几率^[2]。

本研究根据已发表的牛 Y-染色体特异序列和牛基因组序列分别设计了公牛 Y-染色体特异引物和牛基因组内标引物, 并分别组成不同引物组合 PCR 扩增牛基因组 DNA、体外培养的成纤维细胞和克隆胚胎, 旨在获得可用于鉴别牛早期胚胎性别的 PCR 最佳引物组合, 建立稳定的 PCR 反应体系。

1 材料与方法

1.1 牛血液、细胞和胚胎样品的采集

中国农业科学院畜牧研究所试验牛场荷斯坦奶牛(2♀)和鲁西黄牛(2♂)颈静脉采集血液样品 4 mL, ACD 抗凝, -20℃冻存备用。将体外培养的鲁西黄牛耳组织成纤维细胞, 用低浓度的 TE 溶液洗涤 2 次, 在体视显微镜下分别分离出 1.5、10 个细胞置于 PCR 管备用。体视显微镜下徒手持玻璃切割针将体外培养的第 7 天克隆奶牛胚胎切成 4~6 份, 分别置于 PCR 管备用。

1.2 PCR 扩增模板的制备

1.2.1 牛血液 PCR 模板的制备 取 100 μ L 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 10 min, 12 000 r/min 离心 1 min, 弃上清, 加入 100 μ L 双蒸水悬浮下层沉淀, 煮沸 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用于 PCR 反应, 或 -20℃保存备用。

1.2.2 牛成纤维细胞和胚胎样品 PCR 模板的制备

在体视显微镜下将所需数目的已知性别的鲁西黄牛成纤维细胞和切割取得的胚胎细胞置于灭菌的 PCR 管中, 瞬时离心后进行 PCR 扩增, 或置于 4℃保存。

1.3 引物设计与合成

依据 GenBank 中牛 Y-染色体特异序列和牛染色体特异序列, 分别设计了 5 对 Y-染色体特异引物: B90、B12、B34、B56 和 B78; 和 4 对牛染色体特

收稿日期: 2004-03-17

基金项目: “948”引进项目(2001-362); 农业科技成果转化资金项目(02EFN216900732); “863”项目(2001AA243013)资助

作者简介: 王宗礼(1962-), 男, 研究员, 博士生, 现在工作单位: 中国农业科学院草原研究所

* 通讯作者: 朱化彬, E-mail: zhuhuabin@iascaas.net.cn.

异内标引物: A12、A34、A56 和 A78(见表 1)。

所有引物均由上海博亚生物技术有限公司合成。

表 1 引物及相关信息
Table 1 Bovine primers

引物 Primer	引物序列 The sequence of primer	T _m
B90	AGTCGTATGCTTCTGCTATG	53.4
	TTGTGAGTATGTGGTCTTGG	53.4
B12	ATCCAGTCCCTTTGAAGTGT	53.4
	GTTGTCTACGGTTATGAATG	51.3
B34	TCTTTGTCTCGGGTTGTGGT	55.4
	GAATCCTACTCCTCAGAATG	53.4
B56	GTTCCGACAGACAGATATTGGTG	55.6
	AGGGCTTCTTGGGTATGT	52.6
B78	GATCACTATACATACACCACT	51.7
	GCTATGCTAACACAAATTCTG	51.7
A12	TCCTCAGAAACCGCACACTC	57.5
	TGGAAGCAAAGAACCCCGCT	57.5
A34	TTGCCATTTCTCCTCCAAT	53.4
	CTTCTTCTCTCTCCCTTT	53.4
A56	TGAAGTCACTCAGTTGTGTC	53.4
	TATACCCTGGCTTCTTCTCT	53.4
A78	AGCAGAACCAAAGGACAGTAG	55.6
	AGGACACACAGACCCGAGAG	59.5

1.4 PCR 扩增的反应体系及循环参数

采用 20 μL 的 PCR 反应体系, 其中 *Taq* 酶 1U (鼎国生物), dNTP(华美) 浓度为 200 μmol/L, Y-染色体特异引物浓度为 120 pmol/L, 内标引物浓度为 50 pmol/L。反应体系中各种离子的浓度分别为 20 mmol/L Tris-HCl、10 mmol/L (NH₄)₂SO₄、10

mmol/L KCl、0.1% Triton X-100 和 2 mmol/L MgCl₂。PCR 程序: 95 °C 预变性 6 min; 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 30 个循环; 72 °C 延伸 5 min。

首先采用单对引物 PCR 扩增(单重 PCR)牛染色体 DNA(1 ♂, 1 ♀), 将扩增较理想的牛 Y-染色体特异引物和内标引物组合, 分别进行 PCR 扩增(多重 PCR)牛染色体 DNA(2 ♂, 1 ♀), 应用多重 PCR 扩增筛选的引物组合 PCR 扩增已知性别的成纤维细胞(公牛细胞数分别 1、5、10 细胞, 母牛细胞数为 5 个)和已知性别的牛克隆胚胎样本(2 ♂, 2 ♀)。扩增时根据情况分别采用超纯水、细胞培养液、胚胎切割液作为阴性对照。

1.5 琼脂糖凝胶电泳检测

PCR 扩增产物用 2% 的琼脂糖凝胶电泳, SYBR-GreenI 荧光染色, 紫外透射仪检测 PCR 扩增结果, DNA 分子量标准为鼎国 B003-2。

2 结果与分析

2.1 Y-染色体特异引物和内标引物 PCR 扩增

分别利用 Y-染色体特异引物和内标引物对牛基因组 DNA 进行单重 PCR 扩增, 扩增产物琼脂糖凝胶电泳结果见图 1。结果表明, 牛 Y-染色体特异引物 B90、B12、B34、B56 和 B78 都获得了相应的扩增产物电泳带, 但是引物 B90 的扩增产物带较弱。牛染色体 DNA 特异引物(内标引物) A12 和 A78 获得相应的产物带, A78 扩增产物片段大小(252 bp)与引物 B34 产物片段大小(248bp)相似, 而引物 A34 和 A56 未扩增出相应的产物带。

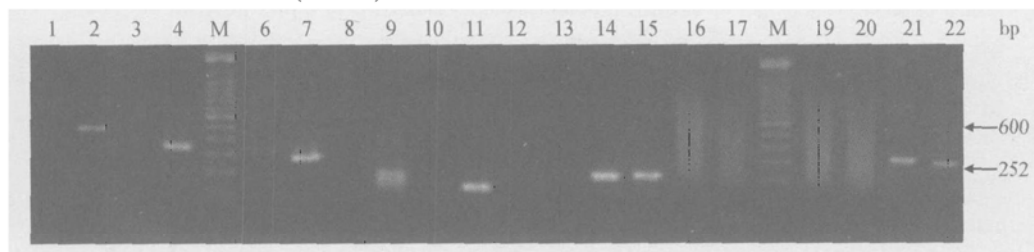


图 1 不同 Y-染色体特异引物和内标引物 PCR 扩增牛基因组 DNA 产物

Fig. 1 Gel electrophoresis of bovine DAN samples amplified by PCR with different Y-specific primers and internal control primers

1、2. B90 产物; 3、4. B12 产物; M. 分子量标准; 6、7. B34 产物; 8、9. B56 产物; 10、11. B78 产物; 12、13. 空白对照(超纯水); 14、15. A12 产物; 16、17. A34 产物; 19、20. A56 产物; 21、22. A78 产物
1, 2. B90; 3, 4. B12; M. DNA molecular marker; 6, 7. B34; 8, 9. B56; 10, 11. B78;
12, 13. negative control; 14, 15. A12; 16, 17. A34; 19, 20. A56; 21, 22. A78.

因此,在本试验条件下,通过单重 PCR 扩增筛选出 Y-染色体特异引物 B90、B12、B34 和 B78 及内标引物 A12。将筛选的 Y-染色体特异引物分别与内标引物组合进行多重 PCR 反应。

2.2 不同 Y-染色体特异引物和内标引物组合多重 PCR 扩增

2.2.1 多重 PCR 扩增牛基因组 DNA

筛选出的不同 Y-染色体特异引物与内标引物组合多重 PCR 扩增牛染色体 DNA 产物电泳结果。表明(见图 2), Y-染色体特异引物 B12、B34、B78 与内标引物 A12 组合,不仅获得内标引物 A12 的特异扩增条带(216bp),而且公牛样品都得到了相应的扩增条带,但引物 B90 与 A12 组合多重 PCR 扩增效果较差,且稳定性不好。

因此,本试验筛选出 Y-染色体特异引物 B12、B34 和 B78 与内标引物 A12 组合。

2.2.2 多重 PCR 扩增牛成纤维细胞

不同 Y-染色体特异引物与内标引物 A12 组合多重 PCR 扩增体外培养的鲁西黄牛皮肤成纤维细胞 DNA 产物的电泳结果。表明(见图 3), B34 和 B78 与 A12 引物组合,雌性细胞仅扩增出内标引物的特异带,雄性细胞除扩增到内标引物特异产物条带外,还扩增到 Y-

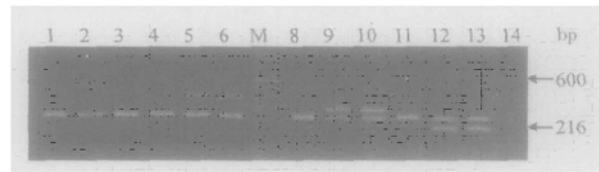


图 2 不同引物组合多重 PCR 扩增牛基因组 DNA
Fig. 2 Gel electrophoresis of bovine DAN samples amplified by Diplex PCR with different sets of Y-specific primers and internal control primers combination
1~ 3. B90 与 A12 组合; 4~ 6. B12 与 A12 组合;
M. 分子量标记; 8~ 10. B34 与 A12 组合;
11~ 13. B78 与 A12 组合; 14. 空白对照(超纯水)
1~ 3. primers B90 and A12; 4~ 6. primers B12 and A12; M. DNA molecular marker;
8~ 10. primers B34 and A12; 11~ 13. primers B78 and A12; 14. negative control.

染色体特异引物条带。不同细胞数(1、5 和 10 个细胞)模板扩增时也都得到理想的扩增结果。B12 与 A12 引物组合,内标引物获得应有的扩增条带, Y-染色体特异引物扩增公牛染色体 DNA 及 5 和 10 个雄性细胞获得特异的扩增带,但是扩增产物较弱,而且扩增 1 个雄性细胞时未获特异的扩增条带。

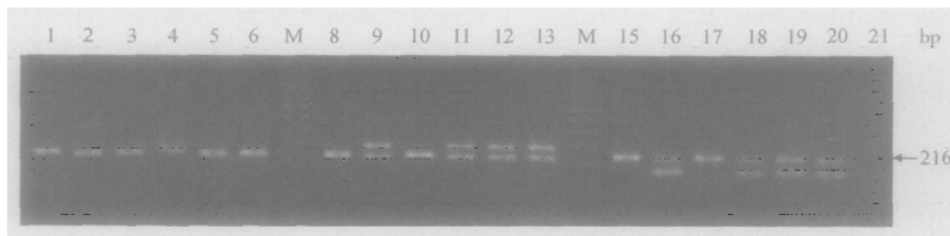


图 3 不同引物组合多重 PCR 扩增牛成纤维细胞

Fig. 3 Gel electrophoresis of bovine fibroblasts samples amplified by diplex PCR with different sets of Y-specific primers and internal control primers combinations

1~ 6. B12 与 A12 的产物, 1、2 为牛染色体 DNA, 3~ 6 为细胞; 8~ 13. B34 与 A12, 8、9 为牛染色体 DNA, 10~ 13 为细胞;
15~ 20. B78 与 A12, 15、16 为基因组 DNA, 17~ 20 为细胞; M. DNA 分子量标记; 21. 空白对照(培养液)
1~ 6. B12 and A12, 1, 2 for genome and 3~ 6 for cells; 8~ 13. primers B34 and A12, 8, 9 for genome and 10~ 13 for cells; 15~ 20. B78 and A12, 15, 16. genomic and 17~ 20 for cells; M. Molecular marker; 21. Negative control

本试验选筛选出 2 个 Y-染色体特异引物 B34 和 B78 与内标引物 A12 组合。

2.2.3 多重 PCR 扩增胚胎的结果

引物 B34 和 B78 与内标引物 A12 组合分别扩增奶牛克隆胚胎产物的电泳结果。表明(见图 4), 引物 B34 和 B78 分别与内标引物 A12 组合扩增体外培养 7 d 的牛克隆胚胎, 雄性胚胎都获得 Y-染色体特异的扩

增带和内标引物条带, 而且 2 个引物组合扩增结果相同。

3 讨论

PCR 反应是鉴别牛早期胚胎性别的有效方法之一, 灵敏度和准确率较高^[5]。多重 PCR 由于采用了内标引物作为分子内标, 使鉴定结果更可靠, 但是

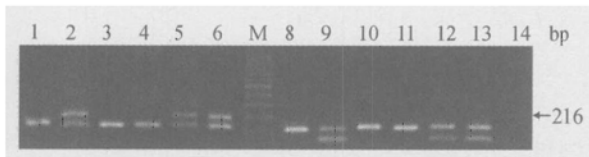


图 4 不同引物组合多重 PCR 扩增牛克隆胚胎
Fig. 4 Gel electrophoresis of bovine cloned embryo samples amplified by duplex PCR with different sets of Y-specific primers and internal control primers combination

1~ 6. B34 与 A12 组合, 1 2 为基因组 DNA, 3~ 6 为胚胎; 8~ 13. B78 与 A12 组合, 8 9 为牛基因组 DNA, 10~ 13. 胚胎的扩增产物; M. 分子量标记; 14. 空白对照(切割液)
1~ 6. primers B34 and A12, 1, 2 are for genome and 3~ 6 for embryos; 8~ 13. B78 and A12, 8, 9 for genome and 10~ 13 for embryos; M. The molecular marker; 14. Negative control(splitting medium)

影响 PCR 扩增结果的因素增加^[6]。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, 5 对 Y-染色体特异引物和 2 对内标引物都获得了特异的扩增条带。单重 PCR 扩增效果较好的引物 B90、B12 与 A12 组合多重 PCR 扩增时, Y-染色体特异引物的扩增效果比单重 PCR 差, 这可能是不同组合引物序列间的相互作用, 或者引物间存在着一种竞争抑制作用^[9], 调整不同引物的浓度, 有可能减小或者消除这种竞争和抑制作用^[10]。

有些引物组合的扩增效果与底物模板有关。引物组合 B12 和 A12 多重 PCR 扩增牛染色体 DNA 效果很好(图 2), 而扩增细胞、胚胎时, 虽然能检测到较强的内标引物产物, 但是 Y-染色体特异条带很弱(图 3), Ponce^[11] 等也有类似的报道。可能不同来源的(血样、细胞和胚胎)模板浓度, 即扩增底物的起始浓度(靶序列的拷贝数)不同影响了多重 PCR 扩增结果。

退火温度是影响多重 PCR 扩增的另一重要因素。一般情况下, 引物的 T_m 通常就是 PCR 反应的适宜退火温度, 但退火温度也可能在 T_m 值附近有一个波动范围。本试验单重 PCR 扩增表明(图 1), 55℃退火时, T_m 为 51.5℃的 B78 扩增效果很理想, 而 T_m 为 53.4℃的 B90 扩增效果却很差, T_m 为 53.4℃的 A34、A56 也没有扩增产物出现, 当退火温度调整到 53.5℃时, A34、A56、B90 都得到了理想的扩增效果。

因此, 本试验设计多对 Y-染色体特异引物与内标引物以供筛选是必要, 试验中首先应用单重 PCR 反应筛选引物, 然后应用多重 PCR 筛选不同的引物组合, 获得了 2 个可以鉴别牛早期胚胎性的最佳引物组合: B34/A12 和 B78/A12。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] Hasler J F, Cardey E, Stokes J E, et al. Nonelectrophoretic PCR-sexing of bovine embryos in a commercial environment[J]. Theriogenology, 2002, 58: 1457~ 1469.
- [3] Park J H, Lee J H, Choi K M, et al. Rapid sexing of preimplantation bovine embryo using consecutive and multiplex polymerase chain reaction (PCR) with biopsied blastomere[J]. Theriogenology, 2001, 55: 1843~ 1853.
- [4] Hirayama H, Kageyama S, Moriyasu S, et al. Rapid sexing of preimplantation bovine embryos using Loop mediated Isothermal Amplification[A]. Proceedings of the annual conference of the international embryo transfer society[C]. 2003, 59: 508.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] Antoniou E, Oulmouden A, Skidmore C J, et al. Isolation of a Y-specific bovine DNA fragment using minisatellite-related PCR primers[J]. Anim Genet, 1996, 27(3): 214~ 215.
- [8] Cheng H, Shi H, Zhou R, et al. Characterization of Bovidae sex-determining gene SRY [J]. Genet Sel Evol, 2001, 33(6): 687~ 694.
- [9] 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: 353~ 365.
- [10] 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.

- [11] Ponce M R, Robles P, Micol J L. High-throughput genetic mapping in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Mol Genet*, 1999, 261: 408~ 415.

Designing and Screening of PCR Primers for Sexing Bovine Pre-implantation Embryos

WANG Zong-li^{1,2}, WANG Dong², CHENG Jir-hua², YANG Bo²,
ZHU Hua-bin^{2*}, HAO Ha-sheng², GUO Yi³

(1. *College of Animal Science and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China;*

2. *Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094, China;*

3. *Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 161006, China;*

4. *Grassland Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Hohhot 010010, China)*

Abstract: 5 pairs of bovine male-specific PCR primers were designed based on the sequences of bovine Y-specific repeat sequence, testis-specific protein gene on Y chromosome and sex determining region Y gene (SRY), meanwhile, based on skeletal alpha action precursor gene and bovine 1.715 satellite DNA, 4 pairs of bovine-specific PCR primers were designed as internal control primers. After PCR amplification of bovine genomic DNA with different primers, 4 pairs of bovine male-specific primers and 1 pair of bovine-specific primers could work very well. Two primer combinations of bovine male-specific PCR primers and internal control primers, B34/A12 and B78/A12, were obtained for sexing bovine pre-implantation embryo after multiplex PCR amplifications of bovine genomic DNA, fibroblasts, and clone embryos.

Key words: primer; bovine; embryo sexing; multiplex PCR

* Corresponding author