

早期胚胎性别鉴定技术 PCR 法及其应用现状

李建柱¹, 韩芬霞², 唐雪峰¹ (1. 信阳农业高等专科学校动物科学系, 河南信阳 464000; 2. 河南科技学院动物科学学院, 河南新乡 453003)

摘要 对 PCR 法的原理、特点及 PCR 法早期胚胎性别鉴定的几个关键环节的研究和应用进行了综述, 并对其存在的问题及发展前景作了展望。

关键词 PCR; 早期胚胎; 性别鉴定

中图分类号 Q954.4 **文献标识码** A **文章编号** 0517-661X(2006)14-3257-01

PCR 法具有准确、快速、灵敏等优点, 是目前比较理想的胚胎性别鉴定方法。因此, 笔者对早期胚胎性别鉴定技术 PCR 法及其应用现状进行了综述。

1 PCR 法概述

1.1 原理 PCR(聚合酶链式反应)即通过引物延伸核酸的某个区域而进行的重复双向 DNA 合成。首先是双链 DNA 在高温作用下变性, 解链成单链, 随后降低温度(退火), 这时 2 条引物分别与各自互补 DNA 杂交。在 DNA 聚合酶作用下, 利用反应体系中 4 种 dNTP 底物将引物链沿 5'-3' 方向延伸, 并与模板互补形成新链。新合成的链又可作为模板参与下一轮循环, 使靶 DNA 的拷贝数呈指数级增加^[1]。其中, 设计的引物必须能扩增出具有 Y 染色体特异性的序列, 如 SRY 基因片段, 雌性 DNA 没有扩增产物或产物与雄性产物不同, 对 6~7 d 牛的早期胚胎进行电泳法或非电泳法分析, 即可判定胚胎性别, 然后进行选择移植。

1.2 特征 与其他早期胚胎性别鉴定技术相比较, PCR 性别鉴定法主要有以下几个特征: ①灵敏高效。这是由 PCR 的特性决定的, Chrenek 等使用 1 个胚胎细胞进行性别鉴定及多重遗传型分析, 结果表明, 扩增有效率达 91%, 显著高于核型分析(5%左右)等方法^[2]。②准确率高。很多研究报道 PCR 法具有 100% 的准确率^[3]。③所用时间短。PCR 方法目前所需的时间一般是 2~4 h, 比核型分析(8h 以上)大大缩短了。缩短鉴定时间可减少胚胎受外界影响的机会, 保证胚胎活检后不需冷冻等待即可鉴定结果, 同时也使 1 次超数排卵采集到的大批胚胎在 6~8 h 内完成性别鉴定, 活检后胚胎在此期间可以在保存液中保存, 不需冷冻即可直接移植。④易受 DNA 的污染。由于单拷贝的 DNA 也能扩增出产物, 因此, 胚胎操作液中的血清物质(特别是在畜场)、储存不当的 PCR 反应体系及前次扩增的产物都可能造成污染, 从而造成假阴性或假阳性的判断。这就要求在活检、扩增的每一步都要考虑到这些因素, 严格规范操作以避免污染^[4]。

1.3 主要种类 目前, 常用的牛胚胎性别鉴定的 PCR 方法主要有以下几种: 常规多重 PCR, 巢氏 PCR 和 PEP-PCR 等。常规多重 PCR 鉴定牛胚胎性别的基本原理是用 1 对 Y 染色体特异性引物或同时用 1 对公、母牛共有基因引物作为内标引物对胚胎样品进行 1 次扩增来鉴定胚胎性别。该方法一般在 Y 染色体的特异性高的拷贝重复序列上设计公牛特异性引物, 扩增 30~38 个循环。巢氏 PCR 则是利用 SRY 基因是单拷贝基因且其基因保守性很强的特点在 SRY

基因上设计引物。其引物设计方法是在 SRY 扩增片段上及内标扩增片段上各设计 1 对外引物和 1 对或 1 条内引物。即先用 SRY 基因和内标基因的外引物进行约 20 个循环的扩增, 然后将第 1 次扩增的产物再加入 SRY 基因和内标基因的内引物进行第 2 次扩增, 第 2 次扩增大概为 30 个循环。PEP-PCR 的主要过程是首先采用显微操作从胚胎中吸取单个卵裂球, 细胞经过处理提取 DNA 后, 用 15 bp 的随机寡核苷酸引物进行多轮的引物扩展预扩增(PEP), 然后取 5 μl PEP 反应产物进行 Y 染色体特异基因引物及内标引物的双重 PCR 扩增, 进行性别鉴定。

1.4 主要环节 Herr 等首先成功建立了牛、羊胚胎性别鉴定的 PCR 法^[5]。PCR 法实质就是 Y 染色体特异性片段或 Y 染色体上的性别决定基因的检测技术。即通过合成 SRY 基因或锌指结构基因(ZFY)或其他 Y 染色体上特异性片段的部分序列作为引物, 在一定条件下进行 PCR 扩增反应。能扩增出目标片段的胚胎即为雄性胚胎, 否则即为雌性胚胎。PCR 用于牛胚胎性别鉴定的主要过程一般包括: ①胚胎获取。冷冻胚胎、刚从供体牛回收的鲜胚或体外受精培养的胚胎都可以用来鉴定性别。②引物设计。根据 Y 染色体上特异基因或 DNA 片段的碱基序列设计引物序列。③胚胎细胞取样及处理。用显微操作或徒手从胚胎中取出 6~8 只细胞煮沸 10 min 后进行 PCR 扩增。④PCR 检测。反应总体积和反应条件因所用 PCR 种类的不同而不同。⑤电泳分析。取 8~12 μl 的 PCR 扩增产物在琼脂糖凝胶上进行电泳, 紫外透射分析仪观察扩增结果, 根据是否有 Y 染色体特异性基因或片段的扩增产物来判定胚胎性别。

2 PCR 技术在动物胚胎性别鉴定中的应用

1989 年澳大利亚首先成功地采用 PCR 技术, 在体外扩增牛 Y 染色体特异 DNA 片段鉴别奶牛胚胎性别, 准确率达 90% 以上^[6]。1991 年 Herr 等利用 PCR 扩增牛胚胎的 SRY 基因鉴定胚胎性别, 产犊结果表明准确率达 92%^[5]。1991 年, 上海市儿童医院医学遗传研究所和北京农学院合作, 首先应用 DNA 直接测序法制定了牛 SRY 基因的核心序列。测序结果表明, 在 SRY 核心序列中, 牛与鼠有 75% 相同。在此基础上, 设计合成了牛 SRY 序列 PCR 扩增引物, 鉴定了 17 枚奶牛胚胎, 并移植了 5 枚分割鉴定的胚胎。结果表明, 凡是有特异扩增带的均出现阳性杂交结果(雄性后代), 无特异扩增的 PCR 产物为阴性杂交结果(雌性后代), 这证明扩增的为 SRY 特异产下的牛亦与鉴定结果完全一致^[7]。1992 年, Tetsuo Kunieta 等用双步 PCR 法制备了针对 Y 染色体特异序列的 SRY 基因引物对和针对 X 染色体 DXNDS 序列

作者简介 李建柱(1978-), 男, 甘肃会宁人, 在读硕士, 助教, 从事动物繁殖技术研究。

收稿日期 2006-04-26

(下转第 3261 页)

(上接第 3257 页)

中 ZFY 基因的引物对,以后者为对照,其中 1 个分裂球用于检型分析,另 1 个的 1 半用于扩增,结果用 10 h 准确测出了 Y 染色体的存在,识别了性别,这表明有足够时间将已知性别的另一半胚胎作为供体植入小鼠体内,从而省去了冷冻保存的过程^[8]。1998 年,浙江省农科院畜牧兽医所吕碧文等人利用 PCR 技术扩增牛外周血淋巴细胞 DNA 中的 SRY 基因片段,对 17 枚早期胚胎进行性别鉴定,结果除 1 枚难以判断外,其他 16 枚判断正确,准确率达 94.1%^[9]。2000 年,黄淑桢等利用 PCR 技术鉴定试管羊胚胎性别,将 124 枚鉴定胚胎移植给 44 只受体母羊,结果分娩 14 只羔羊,流产 2 只,羔羊性别与胚胎性别的准确率达 100%^[10]。2003 年,陈从英等根据牛 SRY 基因 5 调控区序列设计合成了 2 对巢式 PCR 引物作为公牛特异的性别鉴定引物,并根据牛酪蛋白基因序列设计合成了 1 对引物作为内标基因引物,建立了牛早期胚胎性别鉴定的 PCR 反应体系,鉴定了 10 枚奶牛胚胎的性别,结果表明,产下的犊牛其实际性别和鉴定结果一致^[11]。

3 前景展望

目前,用 PCR 技术鉴定早期胚胎性别还没有在实际生产中广泛应用,其主要原因是 PCR 性别鉴定体系还不够完善,主要表现在:①如果从胚胎取样的细胞数少,PCR 灵敏度不够,扩增产物少,鉴定结果不好判断;而如果从胚胎取样的细胞数过多,对胚胎的伤害大,影响其妊娠率。②PCR 反应体系特别容易受污染,从而造成假阳性或假阴性,影响胚胎性别鉴定的准确率。所以在 PCR 实际操作过程中,为

避免污染,保存液中的犊牛血清纯度要高;另外胚胎切割取样过程中,为了防止样品的交错污染,在每切割完 1 个胚胎后,都要分别用浓度为 70% 的酒精、双蒸水和 PBS 洗刷切割针,并且要用不同的吸管吸取切割下的细胞,且胚胎切割室要与 PCR 操作室分开。

随着 PCR 鉴定胚胎性别的研究成功,胚胎的性别鉴定进入了一个崭新的发展阶段。但是要达到推广应用阶段,还要进一步研究简易快速的胚胎切割取样技术、胚胎性别鉴定的 PCR 试剂盒以及取样胚胎的冷冻保存技术。

参考文献

- [1] ZHU P. Handbuolc of Gene Amplification by PCR [M]. Beijing: China Science and Technology press, 1992: 15-23.
- [2] 李青旺, 胡建宏, 王立强, 等. 哺乳动物胚胎性别鉴定技术的研究进展[J]. 家畜生态, 2004, 25(1): 45-48.
- [3] 李馨, 杨隽. 家畜性别控制研究现状与展望[J]. 黑龙江八一农垦大学动物科技学院, 1997, 18(2): 15-18.
- [4] 吕碧文, 俞颂东, 金水仙. 牛早期胚胎性别鉴定的方法研究[J]. 武汉大学学报, 1999(4): 211-214.
- [5] HERR C M, REED K C. Micromanipulation of bo bovine embryos for sex determination[J]. Theriogenology, 1991, 35(1): 45-54.
- [6] CUUSINS D V. Rapid identifying mycobacterium bovis by DNA amplification[J]. Veterinary Microbiology, 1991(2): 187-195.
- [7] 黄国清, 潘珂. 聚合酶链式反应及其在动物胚性别鉴定中的应用[J]. 当代畜牧, 1998, 72(4): 1-3.
- [8] 段子渊. 动物性别决定的分子机理及性别鉴定与控制机理[J]. 黄牛杂志, 1998, 24(3): 52-55.
- [9] 吕碧文, 俞颂东, 金水仙. 应用 PCR 技术鉴定牛早期胚胎性别的研究[J]. 黄牛杂志, 1998, 24(3): 23-24.
- [10] 黄淑桢, 陈美珏, 黄瑛, 等. 试管牛和试管羊胚胎性别鉴定[J]. 遗传, 2000, 22(2): 65-68.
- [11] 陈从英, 黄路生, 陈静波, 等. 牛早期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.