

牦牛胚胎性别鉴定 PCR 反应体系的建立

张大伟, 字向东*, 黄磊, 马力, 陈达文, 徐华伟, 梁冠男

(西南民族大学 高原动物遗传育种与繁殖教育部重点实验室, 成都 610041)

摘要: 研究旨在建立牦牛胚胎性别鉴定准确、可靠的 PCR 反应体系及研究切割取样对胚胎发育能力的影响。根据牦牛 *SRY* 和 *HSL* 基因序列分别设计合成 2 对巢式 PCR 引物作为性别鉴定引物和 2 对引物作为内标引物, 通过优化 PCR 反应条件, 对已知性别牦牛血液基因组 DNA 和牦牛杂种胚胎 DNA 采用巢式 PCR 进行性别鉴定。结果表明, 血液样本性别鉴定与实际性别完全相符, 准确率 100%。从早期胚胎取 8 个细胞进行性别鉴定, 结果雄性为 45.8% (11/24), 雌性为 54.2% (13/24), 取样后胚胎发育率为 56.7%。结果说明已成功建立牦牛胚胎性别鉴定的 PCR 体系。

关键词: 牦牛; 体外受精; 胚胎; 巢式 PCR; 性别鉴定

中图分类号: S823.85; S814.8

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2011)01-0141-04

Sexing of *in vitro*-produced Yak Embryos by Nested-PCR

ZHANG Da-wei, ZI Xiang-dong*, HUANG Lei, MA Li, CHEN Da-wen,

XU Hua-wei, LIANG Guan-nan

(The Key Laboratory of Plateau Animal Genetics, Breeding and Reproduction, Ministry of Education, Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041, China)

Abstract: The objective of this study was to obtain an accurate and reliable method for determining the sex of yak embryos through amplification of *SRY* gene of the yaks, and evaluate embryonic development after biopsies. Two pairs of *SRY* gene nested primers for sex determination and two pairs of *HSL* gene primers as internal standard and optimized PCR reaction conditions were designed. The accuracy of PCR amplification for sex determination was verified by 24 blood samples. The result showed that in every case, the results were as expected for both female and male, i. e., accuracy was 100%. Using this optimized procedure, clear signals following PCR amplification were obtained from all samples of IVF-derived yak embryos, eight cells were sampled from each embryo, 45.8% (11/24) embryos for males and 54.2% (13/24) for females. 56.7% (17/30) of biopsied embryos could further develop. It was concluded that this PCR system was highly reliable for sex determination of yak embryos.

Key words: yak; *in vitro* fertilization; embryo; nested-PCR; sex determination

牦牛 (*Bos grunniens*) 是分布在青藏高原及其毗邻高山地区不可替代的重要畜种, 是青藏高原人们赖以生存的主要生活资料和生产资料, 但牦牛的生产性能低下, 产奶量低, 生长速度慢。用良种奶牛 (*Bos taurus*) 与牦牛种间杂交可以有效提高其杂种

一代 (F_1) 的泌乳性能, 但是由于 F_1 代雄性不育, F_1 代母牛只能与奶牛或牦牛回交繁殖后代以提供产奶性能, 然而回交后代因生产性能极为低下而被早期淘汰^[1]。近年来, 奶牛和牦牛异种体外受精 (*In vitro* fertilization, IVF) 已经取得了成功^[2-3], 为通过

收稿日期: 2010-01-28

基金项目: 四川省科技厅应用基础项目 (07JY029-128); 四川省学术带头人培养基金资助

作者简介: 张大伟 (1982-), 男, 蒙古族, 河北围场人, 硕士, 主要从事动物遗传育种与繁殖学研究, E-mail: 24217664@qq.com

* 通讯作者: 字向东, 教授, Tel: 028-85528868, E-mail: zixd@sina.com

胚胎移植繁殖 F₁ 代以及实现 F₁ 代“繁殖”具有高经济价值的后代提供了技术保障。如果能建立胚胎性别鉴定体系以控制后代性别,则繁殖的后代更具经济价值。

自哺乳动物性别决定基因 SRY 发现以来^[4],以少量胚胎细胞 DNA 为模板进行 PCR 扩增开展早期胚胎性别鉴定已在多种哺乳动物获得成功^[5-12]。牦牛与普通牛 SRY 基因的核酸同源率为 99.08%^[13],但目前尚未利用该基因建立牦牛胚胎性别鉴定体系。因此,本研究旨在建立用于牦牛及其杂种胚胎性别鉴定准确、可靠的 PCR 反应体系,并研究显微操作取样对胚胎发育能力的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

牦牛精液为青海省大通牦牛场的牦牛细管冷冻精液,牦牛血液样品及黄牛卵巢采自成都郊区屠宰场。血液用 ACD 抗凝, -20 °C 保存。

胎牛血清(FCS)购自 Gibco 公司;引物由大连宝生物公司合成;Taq 酶、Marker、dNTPs、Mg²⁺ 购自 Tiagen 公司;其余体外胚胎生产试剂均为 Sigma

表 1 牦牛杂种胚胎性别鉴定的引物序列及 PCR 产物大小

Table 1 Primer sequences and PCR product sizes for sex determination of yak embryos

基因 Gene	引物序列 Primer sequence	PCR 产物大小/bp Size of products
SRY	外:F1 CGCCATTCTTTGAGGAG,R1 CCGGCTTAATTGGCTTTC	225
	内:F2 CCCATTCTTTGAGGAGGCAC,R2 TTTCTGTGGCCTCTTGGCTC	
HSL	外:F1 CGCACAATGACACAGTCACTGGT,R1 CAGGCAGCGCCGTAGAAGCA	498
	内:F2 CACAGTCACTGGTGACCCTG,R2 GTCTCTGTGTCCAGGTCAAAGA	

1.5 巢式 PCR 反应体系的建立

PCR 反应体系总体积为 25 μL: 10 × ExTaq Buffer (Mg²⁺ Free) 2.0 μL, MgCl₂ (25 mmol · L⁻¹) 2.0 μL, dNTPs (2.5 mmol · L⁻¹) 2.0 μL, SRY 和 HSL 的引物(10 pmol · L⁻¹) 各 1.0 μL, 模板 DNA 2.0 μL, Ex Taq 酶(1 U · μL⁻¹) 0.5 μL, 超纯水 8.5 μL。优化 PCR 条件:(1) Mg²⁺ 浓度: 1.5、2.0 和 2.5 mmol · L⁻¹ 3 个浓度梯度;(2) PCR 循环数: 30、35、40 三个梯度,在每组进行 11 个循环后加入内引物;(3) 退火温度: 55、57、59 和 61 °C 4 个梯度。取 5 μL PCR 产物,1% 的琼脂糖凝胶电泳,紫外透射仪检测 PCR 扩增结果。

公司产品。

1.2 模板 DNA 的提取

牦牛血液 DNA 的提取:采用常规的酚-氯仿抽提法^[7,14]提取基因组 DNA,TE 溶解。0.7% 琼脂糖凝胶电泳检测基因组 DNA, -20 °C 保存。

胚胎样品 DNA 的提取:根据本实验室建立的牦牛体外受精技术^[2-3],利用牦牛精子与黄牛卵母细胞生产牦牛杂种胚胎。用 DPBS 液(无 Ca²⁺ 和 Mg²⁺)清洗胚胎 4 次后,移入 60 mm 的平皿(100 μL 液滴,覆盖石蜡油)。用显微操作仪(Leica DMIRE2, Germany)从早期囊胚(IVF 第 7 天)中吸出 5 或 8 个卵裂球,用煮沸法提取 DNA^[10]。

1.3 切割后胚胎的培养

将取样后的胚胎继续培养,IVF 第 10 天观察其发育情况。

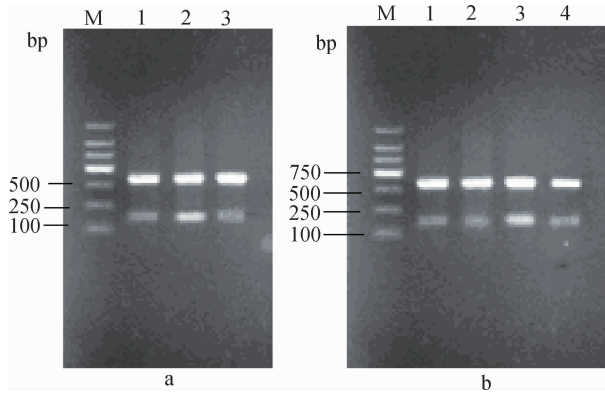
1.4 PCR 引物的设计和合成

根据 NCBI 中 SRY 基因序列(Accession No. : EU294189.1)设计合成牦牛 Y-染色体特异基因 SRY 内外引物各 1 对,参考文献[15]合成公母牦牛共有的常染色体 HSL 基因内外引物各 1 对(表 1)。

2 结果

2.1 PCR 反应条件的优化

以牦牛血液 DNA 为模板进行 PCR 条件优化,结果表明,在 25 μL 的 PCR 扩增体系中,Mg²⁺ 浓度为 2.0 mmol · L⁻¹ 时,特异性扩增产物带清晰、整齐,无非特异性产物产生,扩增效果理想(图 1a);退火温度为 59 °C 的 SRY 和 HSL 基因扩增条带亮度都高(图 1b);35 个循环足以得到准确的结果,进一步增加循环数对扩增效果无明显改善(图略)。



a. Mg^{2+} 浓度的优化: 1. $1.5 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$; 2. $2.0 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$; 3. $2.5 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ 。b. 退火温度的优化: 1. $55 \text{ }^{\circ}C$; 2. $57 \text{ }^{\circ}C$; 3. $59 \text{ }^{\circ}C$; 4. $61 \text{ }^{\circ}C$

a. PCR products amplified with various concentrations of Mg^{2+} : 1. $1.5 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$; 2. $2.0 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$; 3. $2.5 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ 。

b. PCR products amplified with various annealing temperature: 1. $55 \text{ }^{\circ}C$; 2. $57 \text{ }^{\circ}C$; 3. $59 \text{ }^{\circ}C$; 4. $61 \text{ }^{\circ}C$

图 1 牦牛胚胎性别鉴定 PCR 反应体系的优化

Fig. 1 Optimization of PCR protocol for sex determination of yak embryos

2.2 巢式 PCR 在牦牛胚胎性别鉴定中的准确性和可靠性

用牦牛血液提取基因组 DNA 对优化后 PCR 体系的准确性进行检测, 12 头母牦牛均只能看到 498 bp 的 *HSL* 基因扩增带, 而 12 头公牦牛均能看到 498 bp 的 *HSL* 基因扩增带和 225 bp 的 *SRY* 基因扩增带, 其性别鉴定结果与实际性别完全一致(图 2)。从每枚牦牛杂种胚胎中吸取 8 个卵裂球进行性别鉴定时, 24 枚胚胎均得到稳定的扩增结果, 其中 11 枚为雄性, 13 枚为雌性(图 3)。从每枚胚胎中吸取 5 个卵裂球进行性别鉴定时, 27 枚胚胎中 6 枚为雄性, 18 枚为雌性, 3 枚未出结果。

2.3 切割后胚胎的发育能力

将吸出 8 个卵裂球的早期囊胚在原 IVC 体系中进一步培养, IVF 第 10 天, 取样后的胚胎发育率为 56.7% (17/30), 对照组为 70.0% (21/30), 2 组间差异不显著 ($P > 0.05$)。

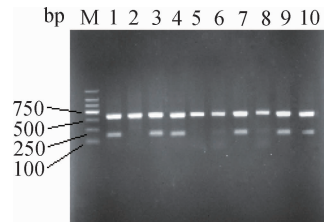


M. 250 bp ladder DNA 相对分子质量标准; 1~12 为雌性; 13~24 为雄性

M. 250 bp ladder; 1-12 were females; 13-24 were males

图 2 已知性别的牦牛血液 DNA PCR 扩增结果

Fig. 2 Sex identification of yak blood DNA by PCR



M. DL2000 DNA 相对分子质量标准; 1, 3, 4, 7, 9, 10. 为雄性, 其余为雌性

M. DL2000 DNA marker; 1, 3, 4, 7, 9, 10 were males, others were females

图 3 牦牛杂种胚胎的性别鉴定结果

Fig. 3 Sex determination of yak hybrid embryos

3 讨论

目前建立的胚胎性别鉴定方法主要有核型分析法^[16]、X-链接酶检测法^[17]、H-Y 抗原检测法^[18]、*SRY* 片段的 PCR 扩增法^[6]。采用巢式 PCR 可以有效提高性别鉴定的灵敏度和特异性, 是最有效的胚胎性别鉴定方法。用于哺乳动物性别鉴定的基因主要有 *SRY*^[5-12] 和 *ZFY/ZFX* 基因^[19]。本研究根据牦牛 *SRY* 基因序列设计的 2 对巢式 PCR 引物作为性别鉴定引物, 同时, 考虑到在胚胎性别鉴定的分割取样过程中由于样品小而容易丢失, 如果只用 1 对雄性特异的引物, 就会把已丢失样品或扩增失误的个体误判为雌性而影响准确率^[8,10], 因此, 我们根据 *HSL* 序列设计了 1 对内标引物, 避免了假阴性的产生。

与 Fu 等^[10] 在水牛的研究结果相似, 本研究也发现 Mg^{2+} 浓度、循环数及退火温度对 PCR 扩增效

果有明显影响。采用优化的 PCR 反应体系对已知性别的牦牛 DNA 样品进行性别鉴定,鉴定结果与实际性别完全一致,准确率 100%,说明引物特异性高。在开展胚胎性别鉴定时,取样少对胚胎发育能力影响小,但操作难度大,一般在胚胎中吸取 4~5 个胚胎细胞就足以开展早期胚胎性别鉴定^[10-12,19]。本研究表明,从每枚牦牛杂种胚胎取出 8-细胞提取的 DNA 进行 PCR 扩增,所有胚胎都得到稳定的扩增结果,虽然取样后胚胎的发育能力有所降低,但未达到显著水平。但是,吸取 5 个胚胎细胞进行 PCR 扩增时,部分胚胎没有得到扩增结果,说明微量胚胎细胞 DNA 的提取技术及 PCR 技术有待进一步改进。

4 结 论

本研究建立了牦牛及其杂种胚胎早期性别鉴定的准确、可靠的 PCR 反应体系;在牦牛早期囊胚吸取 8 个卵裂球足以进行胚胎性别鉴定,且对胚胎的发育能力没有显著影响。

参考文献:

- [1] WIENER G, HAN J L, LONG R J. The Yak [M]. Bangkok: The Regional Office for Asia and the Pacific of the Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2003.
- [2] ZI X D, LU H, YIN R H, et al. Development of embryos after *in vitro* fertilization of bovine oocytes with sperm from either yaks or cattle [J]. *Anim Reprod Sci*, 2008, 108(1): 208-215.
- [3] ZI X D, YIN R H, CHEN S W, et al. Developmental competence of embryos derived from reciprocal *in vitro* fertilization between yak and cattle [J]. *J Reprod Dev*, 2009, 55(5):480-483.
- [4] SINCLAIR A H, BERTA P, PALMER M S, et al. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif [J]. *Nature*, 1990, 346(6281): 240-244.
- [5] UTSUMI K, IRITANI A. Embryo sexing by male-specific antibody and by PCR using male-specific (SRY) primer [J]. *Mol Reprod Dev*, 1993, 36(2): 238-241.
- [6] ZENG Y T, ZHANG M L, CHEN M J, et al. Sexing bovine embryos using PCR amplification of bovine SRY sequence [J]. *Sci China B*, 1994, 37(2): 170-176.
- [7] SATHASIVAM K, KAGEYAMA S, CHIKUNI K, et al. Sex determination in the domestic pig by DNA amplification using the HMG-box sequence [J]. *Anim Reprod Sci*, 1995, 38(4): 321-326.
- [8] 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.
- [9] MARA L, PILICHI S, SANNA A, et al. Sexing of *in vitro*-produced ovine embryos by duplex PCR [J]. *Mol Reprod Dev*, 2004, 69(1): 35-42.
- [10] FU Q, ZHANG M, QIN W S, et al. Cloning the swamp buffalo SRY gene for embryo sexing with multiplex-nested PCR [J]. *Theriogenology*, 2007, 68(9): 1211-1218.
- [11] LU W F, RAWLINGS N, ZHAO J, et al. Amplification and application of the HMG box of bovine SRY gene for sex determination [J]. *Anim Reprod Sci*, 2007, 100(1): 186-191.
- [12] SHI L, YUE W B, REN Y S, et al. Sex determination in goat by amplification of the HMG box using duplex PCR [J]. *Anim Reprod Sci*, 2008, 105(3): 398-403.
- [13] 杨其沅,字向东,马吉云,等.牦牛 SRY 和 TRO 基因部分序列克隆与测序分析 [J].生物信息学,2008, 6(2): 59-61.
- [14] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. Molecular cloning: a laboratory manual 2 [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
- [15] 马志杰,钟金城,字向东,等.三个牦牛群体激素敏感脂肪酶(HSL)基因外显子 I 的多态性 [J].中国农业科学,2009, 42(1): 370-376.
- [16] KING W A. Sexing embryos by cytological methods [J]. *Theriogenology*, 1984, 21(1): 7-17.
- [17] WILLIAMS T J. A technique for sexing mouse embryos by a visual colorimetric assay of the X-linked enzyme, glucose 6-phosphate dehydrogenase [J]. *Theriogenology*, 1986, 25(5): 733-739.
- [18] ANDERSON G B. Identification of embryonic sex by detection of H-Y antigen [J]. *Theriogenology*, 1987, 27(1): 87-97.
- [19] AASEN E, MEDRANO J F. Amplification of the Zfy and Zfx genes for sex identification in humans, cattle, sheep and goats [J]. *Biotechnology*, 1990, 8(12):1279-1281.