

SRY/ZFX 引子進行乳牛性別鑑定之聚合酶連鎖反應⁽¹⁾

蕭振文⁽²⁾ 蔡麗卿⁽²⁾ 陳裕信⁽²⁾ 曲鳳翔⁽²⁾ 楊鎮榮⁽²⁾
陳立人⁽²⁾⁽³⁾

收件日期：93 年 8 月 16 日；接受日期：93 年 12 月 16 日

摘 要

本研究旨在利用聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR)，測試 SRY/ZFX 引子進行乳牛性別鑑定的最適條件。探討之 PCR 條件包括粘合溫度、反應體積、循環數、MgCl₂ 濃度、聚合酶濃度與 dNTP 濃度等，藉以推薦適合的 PCR 條件，改善細胞或胚性別鑑定的效率與敏感性。試驗利用體外培養 (*in vitro culture*) 之荷蘭母牛卵丘細胞或公牛之耳朵成纖維細胞做為性別鑑定之樣品，每組細胞數至少 10 個，先經蛋白酶 K (proteinase K) 前處理，再測試各種影響 PCR 反應之重要條件。試驗結果顯示，利用 SRY/ZFX 引子進行細胞樣品之性別鑑定，PCR 之粘合 (annealing) 溫度在 55~56°C 間、40 次循環、反應體積 20 μ l、2.5 mM 之 MgCl₂、2~3u 的 *Taq* DNA 聚合酶、200~300 μ M 之 dNTP，可獲得最佳的 PCR 性別鑑定結果，此最適的 PCR 條件將可供體細胞或田間進行牛胚性別鑑定之參考。

關鍵詞：乳牛、性別鑑定、引子、聚合酶連鎖反應。

緒 言

家畜之性別控制為大多數畜牧業者所期望，酪農需要母牛來生產牛乳，而供應冷凍精液的種畜公司期望生產種公牛供應精液，人類胚之早期鑑定，更能預防性聯遺傳疾病的發生 (Thornhill and Monk, 1996)，故性別鑑定技術不論在人類或動物均具重要之價值。近年來，畜產生技之蓬勃發展，使畜牧業者能分享科技進步的好處，進而增進動物之生產，提升產業競爭力 (Lopes *et al.*, 2001)。乳牛的生殖科技中，性別鑑定及胚移置技術之應用，使性能優異的乳牛在短時間內獲得較多之後代，提高牛群之泌乳量，加速遺傳改進。

著床前動物胚的性別鑑定方法中，有性染色體核型分析、存在於雄性動物胚表面 H-Y 抗體的

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 1263 號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所生理組。

(3) 通訊作者，E-mail: jwshiau@mail.tlri.gov.tw。

測定 (White *et al.*, 1987)、X-染色體酵素量的測定及利用 Y-染色體特異探針 (probe) 進行雜交反應 (hybridization) (Bondioli, 1992) 等, 這些方法在實際應用時, 面臨了檢測操作步驟煩瑣、準確性及敏感性不足、需要特殊技術及儀器設備等因素而不易實際應用。近年來, 因為分子生物技術的快速進展, 加上聚合酶連鎖反應技術的發明, 使原本極微量之 DNA 樣品, 在數小時的反應後即能大量複製標的序列; 因此, 配合顯微操作技術抽取胚內之少許的胚葉細胞進行 PCR, 可快速準確地分析胚的性別, 達到性別選殖之目的 (Aasen and Medrano, 1990; Bredbacka, 2001)。

牛胚之性別鑑定因其具有其經濟價值, 在先進國家已納入牛胚商業生產之重要技術, 透過酪農協會與生技公司合作, 大規模進行牛胚之性別鑑定, 提升酪農經營效益與競爭力。而牛胚性別鑑定之各種方法, 以 PCR 之應用最為準確可行 (Peura *et al.*, 1991)。Bondioli (1992) 曾顯微抽取桑椹期牛胚之 2 個胚葉細胞進行胚性別鑑定後移置, 由分娩仔牛之性別確認鑑定之準確率達 90% 以上。Machaty *et al.* (1993) 則使用單一胚葉細胞進行性別鑑定並獲得高準確率 (95.4%), 且經顯微操作後之牛胚移置後, 其懷孕率與未經顯微操作之對照組無差異 (54.1% 與 52.6%)。進行性別鑑定時, 選用的引子及進行 PCR 時的條件皆影響性別鑑定的結果, 故本研究之主要目的乃探討 SRY/ZFX 引子進行 PCR 性別鑑定時的條件, 探討 PCR 反應溫度、反應體積、循環數、MgCl₂ 濃度、聚合酶濃度與 dNTP 濃度等條件, 測試適合之 PCR 條件, 以提供未來牛胚性別鑑定技術應用之參考。

材料與方法

I. 性別鑑定用樣品之製備

本試驗使用之化學藥品除特別註明, 均使用 Sigma (Sigma Chemical Co., USA) 所製造者。

(i) 乳牛血液樣品之收集與 DNA 純化萃取: 自不同性別乳牛之頸靜脈採集全血, 置入已添加抗凝血劑之離心管後, 利用乳牛基因組 DNA 純化套組 (Quiagen, GmbH) 並依其步驟萃取基因組 DNA 後定量, 作為 PCR 之公母陽性對照樣本。

(ii) 乳牛體細胞樣品

1. 荷蘭母牛卵丘細胞 (cumulus cells) 之取得與培養: 自屠宰場取得牛卵巢, 先以裝於 1 ml 針筒之 18 號針頭抽取卵巢表面直徑 2-6 mm 濾泡內之卵丘-卵母細胞複合體 (cumulus-oocyte complexes, COCs), 再分離收集乳牛卵母細胞外圍之卵丘細胞, 並予以體外培養於 38.5°C、2% CO₂ 及相對濕度 95% 之環境條件, 並定期更換培養液, 以做為性別鑑定之雌性細胞樣品來源。卵丘細胞樣品進行性別鑑定時先經過三次磷酸緩衝液 (phosphate-buffered saline, PBS) 清洗後, 將細胞樣品置於無鈣鎂 PBS 小滴中, 以微量玻璃針吸取一定數目之卵丘細胞置入無鈣鎂 PBS 小滴中清洗, 再置入含 PCR 反應混合物之微量離心管中, 供性別鑑定之用。
2. 公牛耳朵成纖維細胞 (fibroblast) 之取得與培養: 將荷蘭公牛之耳朵經消毒後剪取其組織, 取得之耳朵組織先予細切後再以胰蛋白酶 (trypsin) 處理, 以分離耳朵成纖維細胞。取得之耳朵成纖維細胞經初代培養後, 冷凍備用。後續之培養條件及細胞樣品進行性別鑑定時之前處理均與卵丘細胞者相同。

II. 聚合酶連鎖反應

(i) 性別鑑定引子之製備: 應用於牛胚性別鑑定之引子是 SRY/ZFX 引子共四條引子, 分別複製出的 SRY 與 ZFX 基因產物, 其序列分別為

SRY + : 5'-TGTTTCAGAGTATTGAACGACGA-3'

SRY — : 5'-AATAAGCACAAAGAAAGTCCAGG-3'
 ZFX + : 5'-ATAATCACATGGAGAGCCACAAGCT-3'
 ZFX — : 5'-GCACTTCTTTGGTATCTGAGAAAG-T-3'

引子之合成係委託 Gibco 公司進行。

- (ii) PCR 及電泳：使用體外培養之荷蘭母牛卵丘細胞或公牛耳朵成纖維細胞做為性別鑑定之樣品。乳牛體細胞樣品以無鈣鎂 PBS 清洗 3 次，旋即置入內含 8 μ l 細胞溶解液〔不含 $MgCl_2$ 的 1 \times PCR 緩衝液、含蛋白酶 K 0.15 μ g/ μ l (Roche Boehringer-Mannheim, Germany)〕之 0.25 ml 微量離心管，進行細胞溶解反應，反應條件設定為先以 56°C 作用 30 分鐘，再以 94°C 繼續作用 15 分鐘，最後將樣品維持在 4°C。細胞樣品經過細胞溶解液處理後，即測試各種 PCR 反應之條件。PCR 反應液中含有細胞溶解後提供之模板及 100 pM 的引子、10 \times PCR buffer，進行 PCR 的條件為 *Taq* DNA 聚合酶最初之變性 (denaturation) 為 94°C 3 分鐘。後續則分別測試不同之 PCR 條件，包括 PCR 之粘合溫度 52~58°C、*Taq* DNA 聚合酶 0.5~3 u (Promega, USA)、50~400 μ M dNTP、1~4.5 mM $MgCl_2$ 、20~50 μ l PCR 反應體積、30~50 次 PCR 循環等。最後之 extension 為 72°C 8 分鐘；反應完成後維持於 4°C。PCR 程式之設定與進行乃採用 iCycler 之 PCR 儀器 (Bio-Rad, USA)，該 PCR 儀器可在同一反應程式中設定不同溫度梯度，以探討適合的 PCR 反應條件。PCR 之後，取 10 μ l 之 PCR 產物加入 2 μ l 的 6 \times Loading buffer，置入 2% 瓊脂糖膠片 (agarose gel) 內，於 0.5 \times TAE 液中進行電泳，條件為 100 volt 30 分鐘。電泳後將膠片置入染液〔0.5 \times 的 TAE 內含 0.1 μ g/ml 的溴化乙錠 (ethidium bromide)〕中染色，並於紫外燈箱上觀察並記錄結果。本試驗中所有個別的 PCR 條件均重複至少 3 次，以確認實驗結果之正確性與重複性。

結果與討論

本研究乃使用 SRY/ZFX 引子，進行乳牛體細胞之 PCR 性別鑑定時，測定適合之 PCR 性別鑑定條件，供未來牛胚性別鑑定之參考。供試之體外培養之荷蘭母牛卵丘細胞或公牛之耳朵成纖維細胞做為性別鑑定之樣品，先經過蛋白酶 K 處理後做為 PCR 之模板，以探討各項影響因子。利用 SRY/ZFX 引子進行 PCR 後得到之產物片段，公牛有 450 bp 及 680 bp 兩條 PCR 產物，母牛則僅有 450 bp 一條 PCR 產物。試驗所測試之各項 PCR 條件包括 PCR 之粘合溫度 52~58°C、*Taq* DNA 聚合酶 0.5~3 u、50~400 μ M dNTP、1~4.5 mM $MgCl_2$ 、20~50 μ l PCR 反應體積、30~50 次 PCR 循環等。結果顯示使用 SRY/ZFX 為引子，較適合之 PCR 條件分別粘合溫度 55~56°C (圖 1)、20 μ l 反應體

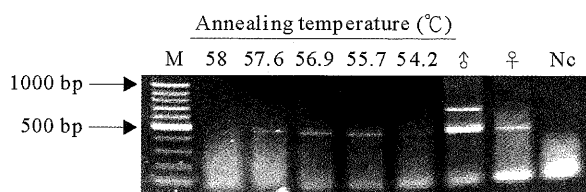


圖 1. 以 PCR 進行荷蘭母牛卵丘細胞性別鑑定時不同粘合溫度 (54~58°C) 對 SRY/ZFX 引子的影響。♂ ♀ 為乳牛基因組 DNA 陽性對照。Nc 為陰性對照。M 為 100 bp 標記。

Fig. 1. The effect of annealing temperature (54~58°C) during PCR on sexing of bovine cumulus cells using SRY/ZFX primer. Lanes ♂ and ♀ are genomic DNA (positive control) from male and female cattle, respectively. Nc: negative control. M: 100 bp ladder marker.

積 (圖 2)、40 次 PCR 循環數 (圖 3)、2~3 u *Taq* DNA 聚合酶 (圖 4)、200~300 μ M dNTP 濃度 (圖 5)、2.5 mM $MgCl_2$ (圖 6)。測試最適當之 PCR 條件後，分析不同性別荷蘭乳牛之體細胞樣品，可獲得清晰且再現性良好的 PCR 產物 (圖 7)。

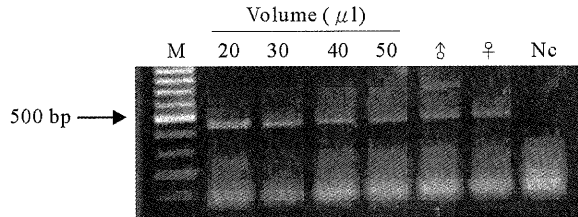


圖 2. 以 PCR 進行荷蘭母牛卵丘細胞性別鑑定時不同反應體積 (20~50 μ l) 對 SRY/ZFX 引子的影響。♂ ♀ 為乳牛基因組 DNA 陽性對照。M 為 100 bp 標記。Nc 為陰性對照。

Fig. 2. The effect of reaction volume (20~50 μ l) during PCR on sexing of bovine cumulus cells using SRY/ZFX primer. Lanes ♂ and ♀ are genomic DNA (positive control) from male and female cattle, respectively. Nc: negative control. M: 100 bp ladder marker.

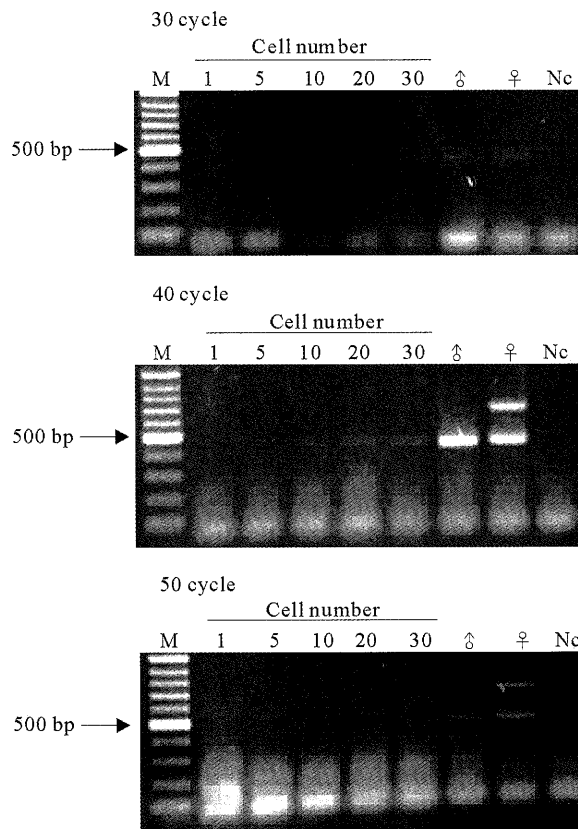


圖 3. 以 PCR 進行荷蘭母牛卵丘細胞性別鑑定時不同循環次數 (30~50 cycle) 對 SRY/ZFX 引子的影響。♂ ♀ 為乳牛基因組 DNA 陽性對照。M 為 100 bp 標記。Nc 為陰性對照。

Fig. 3. The effect of PCR cycle number (30~50 cycle) during PCR on sexing of bovine somatic cells using SRY/ZFX primer. Lanes ♂ and ♀ are genomic DNA (positive control) from male and female cattle, respectively. Nc: negative control. M: 100 bp ladder marker.

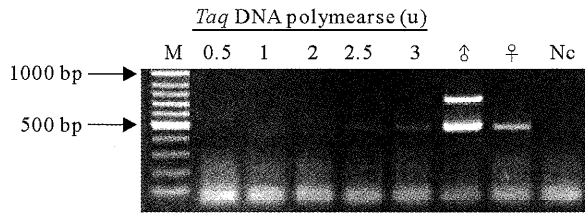


圖 4. 以 PCR 進行荷蘭母牛卵丘細胞性別鑑定時不同 *Taq* DNA 聚合酶濃度 (0.5~3 u) 對 SRY/ZFX 引子的影響。♂ ♀ 為乳牛基因組 DNA 陽性對照。M 為 100 bp 為分子標記。Nc 為陰性對照。
 Fig. 4. The effect of *Taq* DNA polymerase concentration (0.5~3 u) during PCR on sexing of bovine somatic cells using SRY/ZFX primer. Lanes ♂ and ♀ are genomic DNA (positive control) from male and female cattle, respectively. Nc: negative control. M: 100 bp ladder marker.

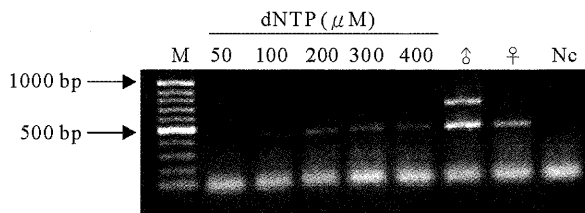


圖 5. 以 PCR 進行荷蘭母牛卵丘細胞性別鑑定時不同 dNTP 濃度 (50~400 μ M) 對 SRY/ZFX 引子的影響。♂ ♀ 為乳牛基因組 DNA 陽性對照。M 為 100 bp 為分子標記。Nc 為陰性對照。
 Fig. 5. The effect of dNTP concentration (50~400 μ M) during PCR on sexing of bovine somatic cells using SRY/ZFX primer. Lanes ♂ and ♀ are genomic DNA (positive control) from male and female cattle, respectively. Nc: negative control. M: 100 bp ladder marker.

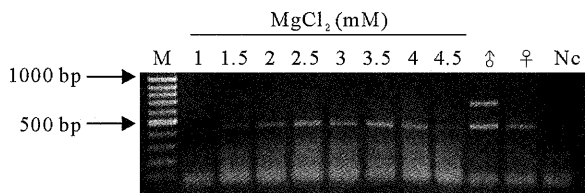


圖 6. 以 PCR 進行荷蘭母牛卵丘細胞性別鑑定時不同 $MgCl_2$ 濃度 (1~4.5 mM) 對 SRY/ZFX 引子的影響。♂ ♀ 為乳牛基因組 DNA 陽性對照。M 為 100 bp 為分子標記。Nc 為陰性對照。
 Fig. 6. The effect of $MgCl_2$ concentration (1~4.5 mM) during PCR on sexing of bovine somatic cells using SRY/ZFX primer. Lanes ♂ and ♀ are genomic DNA (positive control) from male and female cattle, respectively. Nc: negative control. M: 100 bp ladder marker.

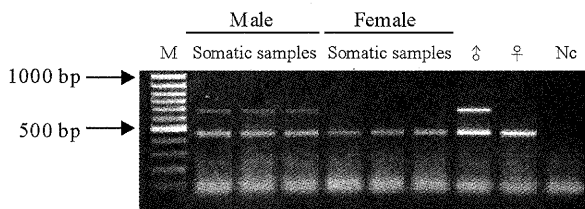


圖 7. 應用適當之 PCR 條件分析不同性別荷蘭牛體細胞。♂ ♀ 為乳牛基因組 DNA 陽性對照。M 為 100 bp 為分子標記。Nc 為陰性對照。
 Fig. 7. Sexing of somatic cells from male and female Holstein dairy cattle by suitable PCR conditions. Lanes ♂ and ♀ are genomic DNA (positive control) from male and female cattle, respectively. Nc: negative control. M: 100 bp ladder marker.

在進行性別鑑定時，分析之敏感性及準確性為重要關鍵與考量因素。一般在進行 PCR 時應用經過純化的 DNA 做為模板，均能獲得清晰的分析結果，而相同的條件進行細胞樣品的分析，PCR 後進行膠體電泳分析往往容易發生模糊 (smear) 現象，無法明確的鑑定細胞之性別。因此，在先前的研究中 (資料未顯示)，應用蛋白酶 K 前處理細胞樣品後進行 PCR，可以有效改善此模糊現象。

在進行性別鑑定時，起始的模板亦為影響鑑定結果之關鍵因素，故在先前研究中亦發現進行分析時之細胞樣品至少 10 個，可以有效的鑑定細胞之性別。而提升性別鑑定之敏感性與成功率，為該技術能否實際田間推廣應用的關鍵。若乳牛之體細胞樣品能獲得清楚且穩定之分析結果，則性別鑑定技術始能實際應用於田間珍貴的牛胚樣品。

Chrenek *et al.* (2001) 曾利用顯微操作抽取單一牛胚之胚葉細胞進行性別鑑定時，配合蛋白酶 K 的 PCR 反應液進行樣品前處理再進行 PCR，可以有效的鑑定牛胚之性別。蛋白酶 K 進行細胞樣品前處理可以使微量細胞中的基因組 DNA 裸露做為模板，使特異性引子粘上，以便擴增性染色體特異之序列。

進行性別鑑定時了解適合的反應條件後，將來配合顯微操作方法，以顯微刀半切或僅抽取少量胚葉細胞進行取得待測胚葉細胞 (Shea, 1999) 及選用的引子均有重要的影響。

進行性別鑑定時，選用之性染色體特異引子將顯著影響性別鑑定的結果。性別鑑定用引子皆選用僅存在於 Y 染色體上的雄性特異序列做為陽性引子，複製出雄性特有之 PCR 產物。因此，理論上具有 Y 染色體特異片段的樣品即判定為雄性，不含 PCR 產物的樣品，因欠缺可供引子結合的模板序列，故無此 PCR 產物者判定為雌性。然而進行 PCR 時，有可能因人為操作之疏忽，例如未將細胞樣品確實放入 PCR 反應試管中而造成偽陰性。為避免此種失誤，均在性別鑑定時加入一組存在於 X 染色體或體染色體上的對照引子，以提高操作之正確性 (Zeleny and Schimmel, 2002)。

本研究使用的性別鑑定引子為 SRY/ZFX，是以複製雄性特有的 SRY 基因而判定細胞樣品之性別，同時加入在公、母均可以複製出 PCR 產物的 ZFX 基因做為對照引子。因此分析結果有 450 bp 及 680 bp 兩條 PCR 產物則為雄性，若僅有 450 bp 一條者則判定為雌性。SRY 基因已知是存在於 Y 一染色體上的睪丸決定因子 (Sultan *et al.*, 1991)，SRY 基因序列已應用在牛胚之性別鑑定上 (Utsumi and Iritani, 1993; Zeng *et al.*, 1994)。SRY 除了已應用在哺乳動物胚之性別鑑定之外，也供畜產品之原料性別檢測之用。而做為對照的 ZFX 則是 Zinc finger protein 基因，ZFX 已廣泛應用在牛胚或基因轉殖牛胚之 PCR 性別鑑定 (Horvat *et al.*, 1993)。而利用 ZFY/ZFX 基因座之性別特異性限制片段長度多態性 (restriction fragment length polymorphism, RFLP)，將 PCR 產物經限制酶切割，藉由限制酶切割位置之存在與否所造成的片段數經過電泳分析而確認樣品性別。ZFY/ZFX 亦可在第一次 PCR 之後，添加內部引子進行第二次巢式 PCR (nested PCR) 而解決性別鑑定後面臨的人為錯誤 (Aasen and Medrano, 1990)。此外，應用 PCR 產生的 DIG (digoxigenin) 一標定探針，也可供檢測 ZFX/ZFY 進行 PCR 之後的電泳片段。

利用 PCR 進行基因分析或相關實驗，因反應極為敏感，故 PCR 之重要條件如反應之粘合溫度、Taq DNA 聚合酶、dNTP、MgCl₂、PCR 反應體積與 PCR 循環數等，為實驗能否成功之關鍵。而本研究結果所獲得之適當 PCR 條件，可作為應用 SRY/ZFX 引子進行牛胚胚葉細胞性別鑑定之基礎。

參考文獻

- Aasen, E. and J. F. Medrano. 1990. Amplification of the ZFY and ZFX genes for sex identification in human, cattle, sheep and goats. *Biotechnology* 8 : 127~129.
- Bondioli, K. R. 1992. Embryo Sexing: a review of current techniques and their potential for commercial application in livestock production. *J. Anim. Sci.* 70 (Suppl) : 19~29.
- Bredbacka, P. 2001. Progress on methods of gene detection in preimplantation embryos. *Theriogenology* 55 : 23~34.
- Chrenek, P., L. Boulanger, Y. Heyman, P. Uhrin, J. Laurincik, J. Bulla and J. P. Renard. 2001. Sexing and multiple genotype analysis from a single cell of bovine embryo. *Theriogenology* 55 : 1071~1081.
- Horvat, S., J. F. Medrano, E. Behboodi, G. B. Anderson and J. D. Murray. 1993. Sexing and detection of gene construct in microinjected bovine blastocysts using the polymerase chain reaction. *Transgenic Res.* 2 : 134~140.
- Lopes, R. F. F., F. Forell, A. T. D. Oliveira and J. L. Rodrigues. 2001. Splitting and biopsy for bovine embryo sexing under field conditions. *Theriogenology* 56 : 1383~1392.
- Machaty, Z., A. Paldi, T. Csaki, Z. Varga, I. Kiss, Z. Barandi and G. Vajta. 1993. Biopsy and sex determination by PCR of IVF bovine embryos. *J. Reprod. Fertil.* 98 : 467~470.
- Peura, T., J. M. Hyttinen, M. Turunen and J. Janne. 1991. A reliable sex determination assay for bovine preimplantation embryos using the polymerase chain reaction. *Theriogenology* 35 : 547~555.
- Shea, B. F. 1999. Determinating the sex of bovine embryos using polymerase chain reaction results: a six year retrospective study. *Theriogenology* 51 : 841~845.
- Sultan, C., J. M. Lobaccaro, R. Medlej, F. Poulat and P. Berta. 1991. SRY and male sex determination. *Hormone Res.* 36 : 1~3.
- Thornhill, A. R. and M. Monk. 1996. Cell recycling of a single human cell for preimplantation diagnosis of X-linked disease and dual sex determination. *Mol. Hum. Reprod.* 2 : 285~289.
- Utsumi, K. and A. Iritani. 1993. Embryo sexing by male specific antibody and by PCR using male specific (SRY) primer. *Mol. Reprod. Dev.* 36 : 238~241.
- White, K. L., G. B. Anderson and R. H. Bondurant. 1987. Expression of a male-specific factor on various stages of preimplantation bovine embryos. *Biol. Reprod.* 37 : 867~873.
- Zeleny, R. and H. Schimmel. 2002. Sexing of beef - a survey of possible methods. *Meat Sci.* 60 : 69~75.
- Zeng, Y. T., M. L. Zhang, M. J. Chen, X. D. Zhou, Y. Huang, Z. R. Ren, S. Z. Huang, M. X. Hu, X. Q. Wu, J. M. Gao, B. Zhang and H. R. Xu. 1994. Sexing bovine embryos using PCR amplification of bovine SRY sequences. *Sci. China B.* 37 : 170~176.

Optimization of PCR parameters for dairy cattle sexing using SRY/ZFX primers⁽¹⁾

Jen-Wen Shiau⁽²⁾, Lee-Ching Tsai⁽²⁾, Yu-Hsin Chen⁽²⁾,
Feng-Hsiang Chu⁽²⁾, Jenn-Rong Yang⁽²⁾ and Lih-Ren Chen⁽²⁾⁽³⁾

Received : Aug. 16, 2004 ; Accepted : Dec. 16, 2004

Abstract

The purpose of this study was to determine the suitable conditions of polymerase chain reaction (PCR) for sex determination with SRY/ZFX primers. The effects of annealing temperature, reaction volume, cycle number, the concentration of Taq DNA polymerase, dNTP, and MgCl₂ on the sensitivity and specificity of PCR sexing were determined. Samples of *in vitro* culture somatic cells from male and female dairy cattle were used for sex determination. The results showed that the PCR conditions consisted of annealing temperature between 55~56°C, 40 cycle number, 20 μ l reaction volume, 2.5 mM MgCl₂, 200~300 μ M dNTP, and 2.5~3 u Taq DNA polymerase were most suitable for sex determination of bovine somatic cells with SRY/ZFX primers.

Key words : Dairy cattle, Sex determination, Primer, PCR.

(1) Contribution No.1263 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

(2) Physiology Division, COA-LRI, Hsinhua, Tainan 712, Taiwan, R.O.C.

(3) Corresponding author. E-mail: jwshiau@mail.tlri.gov.tw