

# 利用同步聚合酶連鎖反應進行乳牛之性別鑑定<sup>(1)</sup>

蕭振文<sup>(2)</sup> 蔡麗卿<sup>(2)</sup> 劉瑞珍<sup>(2)</sup> 陳立人<sup>(2) (3)</sup>

收件日期：93 年 12 月 10 日；接受日期：94 年 3 月 9 日

## 摘 要

本研究旨在利用同步聚合酶連鎖反應 (real-time polymerase chain reaction, real-time PCR)，配合 SyberGreen (SYBR) 與螢光標定的探針 (probe) 進行乳牛的性別鑑定，以探討 real-time PCR 應用之可行性。利用純化之不同性別乳牛基因組 DNA 與體外培養 (*in vitro culture*) 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，先經蛋白酶 K (proteinase K) 前處理後利用 ZFX/ ZFY (X/Y-linked zinc finger protein) 引子進行傳統 PCR 預先擴增 (pre-amplification)，獲得 PCR 產物後設計 nested PCR 引子並應用 SYBR 進行 real-time PCR。結果顯示隨著起始模板 DNA 濃度之增加，PCR 出現擴增曲線的循環較早。雖然如此，但在不同 PCR 循環所獲得的產物均具有專一性且重疊的 DNA 解離曲線 (dissociation curve)，顯示 PCR 擴增產物之高度特異性。

預先擴增的初次 PCR 產物配合 nested PCR 引子及性別特異性的 TaqMan 螢光探針進行雜合反應 (hybridization)，由反應產生的不同螢光將不同性別樣品分群而判定其性別。試驗結果顯示，待測之基因組 DNA 或 1 到 20 個不同數量的體細胞樣品在雜合反應後因釋放螢光之不同而分群，有效完成性別鑑定。本研究顯示，應用 real-time PCR 進行乳牛的性別鑑定，可直接判定樣品之性別而不需進行傳統之電泳分析，且有較高的敏感性與重覆性，為具應用潛力的乳牛性別鑑定方法。

關鍵詞：性別鑑定、乳牛、探針、同步聚合酶連鎖反應。

## 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 抗原的測

---

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 1271 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：lrchen@mail.tlri.gov.tw

定 (White *et al.*, 1987)、X-染色體酵素量的測定及利用 Y-染色體特異探針進行雜合反應 (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 (polymerase chain reaction, PCR) 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，達到選性繁殖之目的 (Aasen and Medrano, 1990; Bredbacka, 2001)。

牛胚之性別鑑定因具有經濟價值，先進國家已將之納入牛胚商業生產之重要技術，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 之應用較為準確可行 (Peura *et al.*, 1991)。傳統的 PCR 反應完成後必需進行電泳分析以判定結果。目前同步聚合酶連鎖反應 (real-time PCR) 已廣泛應用在基因轉殖動物的外源基因偵測、親子鑑定 (Ballester *et al.*, 2004) 或性別鑑定上 (Alonso and Martin, 2004)，短時間即可完成定性或定量的敏感分析，大為改善傳統 PCR 不足的敏感性及降低膠體電泳的時間與成本。本研究之主要目的乃探討 real-time PCR 應用於乳牛性別鑑定之可行性，以提供乳牛性別鑑定之應用。

## 材料與方法

### I. 性別鑑定用樣品之製備：

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

#### (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% CO<sub>2</sub> 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 (fibroblasts) 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) 預先擴增反應與性別鑑定引子 (primer)：應用於預先增殖反應之性別鑑定引子序列分別為 ZFX-Sense：5'-ATAATCACATGGAGAGCCACAAGC-3' 與 ZFX-Antisense：5'-GAGCCTCTTTGGTATCTGAGAAAGT-3'。PCR 利用基因組 DNA 或體外培養之荷蘭母牛或公牛體細胞做為樣品。體細胞以無鈣鎂 PBS 清洗後旋即置入內含 8  $\mu$ l 細胞溶解液 [不含 MgCl<sub>2</sub> 的 1  $\times$  PCR 緩衝液、含 proteinase K 0.15  $\mu$ g/ $\mu$ l (Roche Boehringer-Mannheim, Germany)] 之 0.25 ml 微量離心管進行細胞溶解，條件為 56°C 30 min、94°C 15 min，最後維持在 4°C。PCR 儀器使用 iCycler (Bio-Rad, U.S.A.)。PCR 反應液中含有不同濃度的模板 (基因組 DNA 分別為 0.1、1.0 與 10 ng/ $\mu$ l；體細胞樣

品則為 1 個、5 個、10 個與 20 個)、 $0.4 \mu\text{M}$  引子、 $10 \times \text{PCR buffer}$ 、*Taq* DNA 聚合酶等, PCR 條件為 denaturation  $94^\circ\text{C}$  3 min。PCR 反應體積  $25 \mu\text{l}$ , 反應條件為 10 次  $94^\circ\text{C}$  1 min、 $54^\circ\text{C}$  50 sec、 $72^\circ\text{C}$  30 sec 循環。接著為 20 次  $94^\circ\text{C}$  1 min、 $54^\circ\text{C}$  50 sec、 $72^\circ\text{C}$  45 sec 循環, 而後為 10 次  $94^\circ\text{C}$  1 min、 $54^\circ\text{C}$  50 sec、 $72^\circ\text{C}$  1 min 循環, 最後為  $72^\circ\text{C}$  5 min extension; 反應完成後維持於  $4^\circ\text{C}$ 。預先擴增之 PCR 產物長度約 450 bp。

(ii) Real-time PCR :

1. 利用初次之 PCR 產物 (amplicons) 進行 real-time PCR。合成分析 ZFX/ ZFY 之 nested PCR 引子序列為 Forward primer :  $5'\text{-AAAGCACATGCGAATCCATACTG-}3'$ , Reverse primer :  $5'\text{-TTGGTATCTGAGAAAGTCAGAAGACAAAT-}3'$ 。使用 SYBR 為螢光染劑。Real-time PCR 使用 ABI PRISM 7900HT 序列偵測系統 (Applied Biosystems, U.S.A.) 進行序列之擴增與偵測。PCR 反應液使用  $25 \mu\text{l}$  之  $1 \times \text{TaqMan Universal PCR Master Mix}$  (Applied Biosystems, U.S.A.) 進行。探針之反應量為 100 nM, 而 nested 引子用量為 700 nM。反應以  $1 \mu\text{l}$  之第一次 PCR 產物做為模板。進行 real-time PCR 之條件為 10 次  $50^\circ\text{C}$  2 min、 $95^\circ\text{C}$  10 min 循環, 而後為 40 次  $94^\circ\text{C}$  15 sec、 $62^\circ\text{C}$  1 min 循環。Nested PCR 與探針雜合均使用相同的反應條件。
2. 螢光探針雜合反應: 使用合成之 TaqMan 螢光探針 (Applied Biosystems, U.S.A.), 探針之序列與標定方式為 ZFY : FAM-AAAACCTAAGCATAGTAAAGAAATGTCTTTCAAG-TAMRA、ZFX : VIC-AGCATAGTAAAGAGATGCCATTCAAGTGTGA- TAMRA。合成之探針分別利用不同螢光標定 ZFX/ZFY 基因 3' 的 3 個核苷酸差異位置, 進行雜合反應以鑑定樣品性別。

(iii) 性別鑑定結果判定: 探針雜合反應後, 由 ABI PRISM 7900HT 序列偵測系統內之 SDS 分析軟體, 將單獨產生 VICTM 螢光的樣品判定為純合子對偶基因 X; 單獨產生 FAMTM 螢光的樣品判定為純合子對偶基因 Y, 若樣品同時產生兩種螢光則判定為雜合子。Real-time PCR 在反應後將自動搜集波長 550 至 660 nm 的螢光後經過運算而自動區分樣品為不同對偶基因而分辨 ZFX/ZFY 之序列差異, 判定樣品之性別。

## 結果與討論

本研究乃分析不同性別乳牛基因組 DNA 與體外培養的乳牛體細胞的 ZFY/ZFX 基因。配合 SYBR 與螢光標定探針, 探討 real-time PCR 應用於性別鑑定之可行性。先應用 ZFX/ZFY 引子進行傳統 PCR 預先增殖, PCR 產物在不同濃度、不同性別之乳牛基因組 DNA 模板均獲得長度約 450 bp 的第一次 PCR 產物 (圖 1)。進行 real-time PCR 時, 設計 nested 引子進行反應, 使用 SyberGreen 螢光染劑, 結果隨著第一次 PCR 原始模板 DNA 之起始濃度不同, 分別在不同循環 (20-30 循環) 出現 PCR 產物之擴增曲線 (圖 2)。不同性別乳牛之反應起始 DNA 濃度為 0.1、1.0 與  $10 \text{ ng}/\mu\text{l}$  時, 母牛分別在第 24 次、第 27 次與第 30 次循環 (圖 2A), 公牛分別在第 19 次、第 24 次與第 30 次循環出現 PCR 產物之擴增曲線 (圖 2B)。在不同循環所獲得的不同性別樣品 PCR 產物均具專一性 DNA 解離曲線 (圖 3)。母牛與公牛反應之  $T_m$  值相近, 分別為  $78^\circ\text{C}$  與  $76^\circ\text{C}$  (圖 3A, 3B), 顯示 real-time PCR 擴增產物之高度特異性。利用不同性別乳牛的體細胞樣品, 數目分別為 1、5、10 與 20 個, 進行第一次 PCR 後的產物與 TaqMan 螢光探針進行雜合反應, 分別將 ZFY 以 FAMTM 標定, ZFX 以 VICTM 標定, 雜合反應後呈現不同螢光而將不同性別樣品加以區集如圖 4 所示。各別公牛之體細胞樣品在雜合反應後集中在圖 4 左上之藍點區集, 而各別母牛之體細胞樣品在雜合反應後集中在圖 4 之右下紅點區集。如此即能有效的判定不同性別乳牛的不同對偶基因為純合子或雜合子, 分辨 ZFX/ZFY 之序列差異。

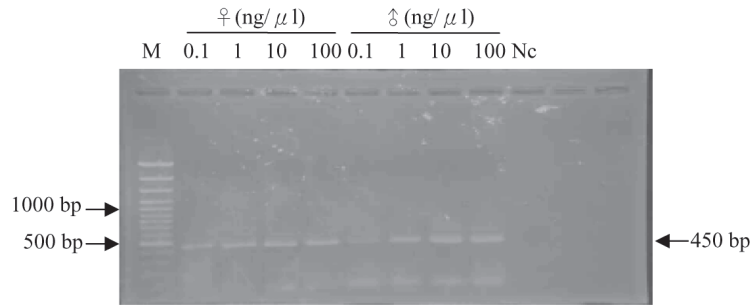


圖 1. 不同性別與不同濃度之乳牛基因組 DNA 使用 ZFX/ZFY 引子進行第一次 PCR 後之產物電泳圖。Nc 為負對照。M 為 100 bp 標記。

Fig. 1. The electrophotogram of PCR products amplified from different concentrations of purified male and female bovine genomic DNA with ZFX/ZFY primers. Lane Nc : Negative control. Lane M : 100 bp ladder marker.

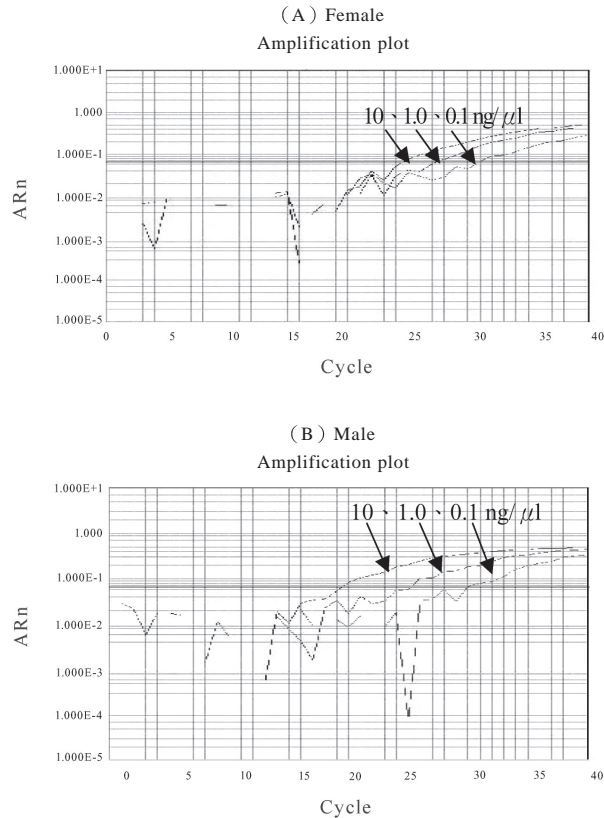


圖 2. 不同濃度與不同性別之乳牛基因組 DNA 其 PCR 產物進行 nested real-time PCR 擴增曲線。由左至右之擴增曲線分別代表 10、1.0 與 0.1 ng/μl 之第一次 PCR 反應之模板濃度。

Fig. 2. The nested real-time PCR amplification plots of specific PCR products amplified from first PCR products obtained from different concentrations of male and female bovine genomic DNA. From left to right, template concentrations at first PCR reaction are 10, 1.0, and 0.1 ng/μl, respectively.

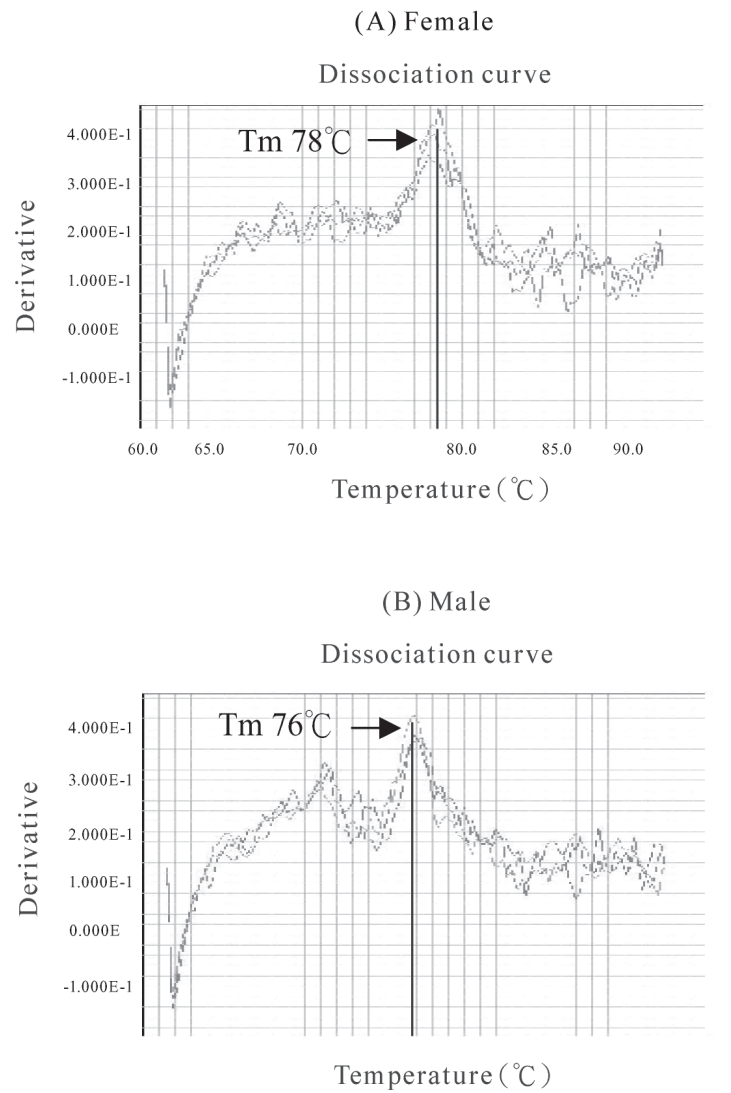


圖 3. 不同濃度與不同性別乳牛基因組 DNA 之第一次 PCR 產物進行 nested real- time PCR 產物之解離曲線。

Fig. 3. The dissociation curves of real-time PCR products amplified from first PCR products obtained from different concentrations of male and female bovine genomic DNA.

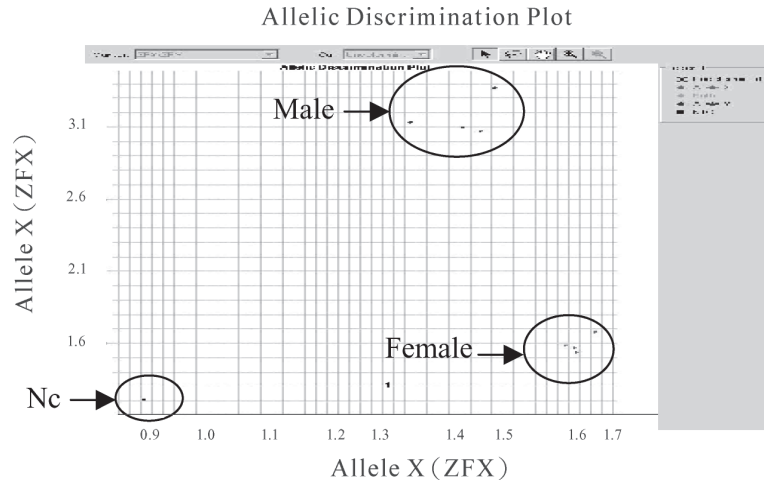


圖 4. 不同性別與不同體細胞數（1、5、10 與 20 個）之第一次 PCR 產物與 TaqMan 螢光標定探針進行雜合反應後之區集圖。上面之點區集為公的體細胞樣品，右下之點區集為母的體細胞樣品，左下點 Nc 為負對照。

Fig. 4. First PCR product from male and female dairy cattle with different somatic cells numbers (1, 5, 10, and 20 cells) are hybridized with TaqMan fluorescent probes. The samples show up in two clusters. Allele 1 shows the male (ZFY) samples (in blue) in the upper corner, and allele 2 indicates the female (ZFX) samples (in red) in the right lower corner. Nc: negative control.

進行性別鑑定之分析有別於例行之 PCR，在進行性別鑑定時，分析方法之敏感性與成功率為其關鍵因素。一般的 PCR 大都使用純化的 DNA 樣品來進行，成功率與敏感度均非問題。若利用體細胞樣品進行分析，結果之重複率與再現性相當不穩定，往往會呈現無法判定的模糊（smear）現象，導致不明確的鑑定結果。因此，提升性別鑑定之敏感性與成功率成為該技術能否實際應用及田間推廣的關鍵，尤其是應用在珍貴的牛胚樣品更是如此。傳統的 PCR 結束後，產物約需進行約 30 min 的電泳分析，瓊脂糖（agarose）之價格昂貴且利用溴化乙錠（ethidium bromide）進行染色，敏感度不及 SYBR 或高度專一的螢光探針，且因溴化乙錠有致癌危險而對人類健康有負面的影響。如何有效改善乳牛的性別鑑定成為重要的研究主題。近年來，real-time PCR 的發展，已成為分子生物學及基因體研究的重要工具，目前已廣泛應用在人類或基因轉殖動物的外源基因偵測、親子鑑定（Ballester *et al.*, 2004; Shitara *et al.*, 2004; Tesson *et al.*, 2002）或性別鑑定上（Alonso and Martin, 2004; Andreasson and Allen, 2003），短時間即可完成定性或定量的敏感分析，改善傳統 PCR 敏感性不足的問題並降低膠體電泳的時間與成本，甚至取代傳統基因定量的北方吸漬法（Northern blotting），分析更為敏感，並可精確定性與定量。本研究因此探討應用 real-time PCR 技術進行乳牛之性別鑑定，以提供乳牛性別鑑定之應用參考。結果顯示 real-time PCR 技術應用於乳牛之性別鑑定具有可行性。

影響性別鑑定的因子除了 PCR 之外，選用的引子會顯著影響性別鑑定的結果。性別鑑定用的引子皆選用僅存在於 Y 染色體上的雄性特有序列做為陽性引子，複製出雄性特有的 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，無 PCR 產物的樣品，則因為沒有可供引子結合的模板序列，故無 PCR 之增殖產物而判定為雌性。然而在進行分析時也有可能因為人為的操作因素，而造成偽陰性的結果。通常可加入一組存在於 X 染色體或體染色體上均有的對照用引子作為內在對照組（internal control），以提高性別鑑定之正確性（Zeleny and Schimmel, 2002）。Zinc



finger protein 基因 ZFX/ZFY，在公、母均可以複製出 450 bp 的 PCR 產物，故可作為傳統 PCR 時的陽性對照引子，已被廣泛應用在牛胚或基因轉殖牛胚之性別鑑定 (Horvat *et al.*, 1993)。而利用 ZFY/ZFX 基因之性別特異性片段長度之多態性 (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之性別。ZFY/ZFX 亦可在第一次 PCR 之後，添加內部引子進行第二次 nested PCR 而改善性別鑑定所面臨的人為錯誤 (Aasen and Medrano, 1990)。Aasen and Medrano (1990) 以 PCR 進行性別鑑定，ZFX 與 ZFY 分別產生 445 與 447 bp 產物。而公、母樣品產生的 PCR 片段，再利用 *Pst*I 限制酶切割後，公的樣品將產生 103 及 344 bp 二條片段，而母性之 PCR 產物因欠缺限制酶之切位，所以只有一條產物，電泳後即可由膠片上片段數與長度而判定結果。此外，應用 PCR 產生的 DIG (digoxigenin) - 標定探針，也可供檢測 ZFX/ZFY 進行 PCR 之後的電泳片段。本研究使用的引子為 ZFY/ZFX，在完成第一次 PCR 後在公、母均可以複製出 450 bp 的 PCR 產物供進行 real-time PCR 之 SYBR 染色與螢光標定探針雜合反應，以鑑定不同乳牛樣品的性別。其原理在於 ZFY/ZFX 基因 3' 有 3 個位置核苷酸不同，進行雜合反應以鑑定樣品性別。

近年來，調控動物重要經濟性狀的基因座 (quantitative trait loci, QTL) 已逐漸被解析，例如與乳牛產乳量有關的基因 (Georges *et al.*, 1995; Velmala *et al.*, 1999)。在乳牛的核心育種計畫中，應結合牛胚生產、性別鑑定與遺傳標記輔助選拔 (marker assisted selection, MAS) 才能達到最大之遺傳改進率。牛胚性別鑑定具有極高之經濟價值。進行著床前牛胚之性別鑑定與遺傳標記分析時需採取極少的體細胞或牛胚胚葉細胞以便分析多個基因座。若能自發育早期之牛胚取得細胞樣品，牛胚在移置前即有充足時間可完成性別鑑定與遺傳分析。為了利用極少的細胞進行多基因分析，進行基因組的預先增殖 (primer extension preamplification, PEP) 是重要的步驟 (Chrenek *et al.*, 2001; Sermon *et al.*, 1996)。特定基因的擴增可利用 nested PCR 進行 (Lien *et al.*, 1999)。利用第一次引子增殖之產物，設計出二次 PCR 的引子進行二次擴增，可有效改善 PCR 之特異性。

利用螢光探針進行對偶基因判定主要是利用螢光報導染劑或 quencher 染劑所標定之特異性寡核苷酸探針序列進行 (Morin *et al.*, 1999)，若探針特異性序列經過複製，將造成探針的分解而使報導螢光的強度增強。使用不同的螢光報導染劑，進行單次 PCR 即可測定對偶基因特異探針的分解情形。此法已成功應用在測定對偶基因單一核苷酸多態性的研究 (Morin *et al.*, 1999)。此法之優點，為分析迅速且不需進行電泳分析，而 PCR 後數分鐘即完成眾多樣品之判讀，達到高產出量 (high throughputs) 分析效率。與傳統方法比較，將螢光探針併入 PCR 反應，可以有效改善分析之敏感性與特異性 (Virta *et al.*, 2002)。

本研究應用 real-time PCR 進行乳牛的性別鑑定，可直接判定樣品性別而不需進行傳統膠體電泳分析，提供了比傳統 PCR 敏感且重覆性高，並具應用潛力的乳牛性別鑑定方法。

## 參考文獻

- Aasen, E. and J. F. Medrano. 1990. Amplification of the ZFY and ZFX genes for sex identification in humans, cattle, sheep and goats. *Biotechnology* 8 : 1279-1281.
- Alonso, A. and P. Martin. 2004. A real-time PCR protocol to determine the number of amelogenin (x-y) gene copies from forensic DNA samples. *Methods Mol. Biol.* 297 : 31-44.
- Andreasson, H. and M. Allen. 2003. Rapid quantification and sex determination of forensic evidence materials. *J. Forensic Sci.* 48 : 1280-1287.

- Ballester, M., A. Castello, E. Ibanez, A. Sanchez and J. M. Folch. 2004. Real-time quantitative PCR-based system for determining transgene copy number in transgenic animals. *Biotechniques* 37 : 610-613.
- 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.
- Georges, M., D. Nielsen, M. Mackinnon, A. Mishra, R. Okimoto, A. T. Pasquino, L. S. Sargeant, A. Sorensen, M. R. Steele and X. Zhao. 1995. Mapping quantitative trait loci controlling milk production in dairy cattle by exploiting progeny testing. *Genetics* 139 : 907-915.
- 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.
- Lien, S., N. E. Cockett, H. Klungland, N. Ambeim, M. Georges and L. Gomez-Raya. 1999. High-resolution genetic map of the sheep callipyge region: linkage heterogeneity among rams detected by sperm typing. *Anim. Genet.* 30 : 42-46.
- 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.
- Morin, P. A., R. Saiz and A. Monjazeib. 1999. High-throughput single nucleotide polymorphism genotyping by fluorescent 5' - exonuclease assay. *Biotechniques* 27 : 538-552.
- 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.
- Sermon, K., W. Lissens, H. Joris, A. Van Stirtegehem and I. Liebaers. 1996. Adaptation of the primer extension preamplification (PEP) reaction for preimplantation diagnosis: single blastomere analysis using short PEP protocols. *Mol. Hum. Reprod.* 2 : 209-212.
- Shitara, H., A. Sato, J. Hayashi, N. Mizushima, H. Yonekawa and C. Taya. 2004. Simple method of zygosity identification in transgenic mice by real-time quantitative PCR. *Transgenic Res.* 13 : 191-194.
- Tesson, L., J. M. Heslan, S. Menoret and I. Anegon. 2002. Rapid and accurate determination of zygosity in transgenic animals by real-time quantitative PCR. *Transgenic Res.* 11 : 43-48.
- 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.
- Velmalä, R. J., H. J. Vilkkilä, K. T. Elo, D.-J. de Koning and A. V. Mäki-Tanila. 1999. A search for quantitative trait loci for milk production traits on chromosome 6 in Finnish Ayrshire cattle. *Anim. Genet.* 30 : 136-143.
- Virta, J., J. Markola, J. Peippo, M. Markkula and J. Vilkkilä. 2002. Sex determination of bovine embryo blastomeres by fluorogenic probes. *Theriogenology* 57 : 2229-2236.
- 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.



## Sex determination of dairy cattle by real- time PCR <sup>(1)</sup>

Jen-Wen Shiau<sup>(2)</sup>, Lee-Ching Tsai<sup>(2)</sup>, Jui-Jane Liu Tai<sup>(2)</sup>, and Lih-Ren  
Chen<sup>(2) (3)</sup>

Received : Dec. 10, 2004 ; Accepted : March. 9, 2005

### Abstract

The purpose of this study was to develop a fast real-time polymerase chain reaction (PCR) method for sexing dairy cattle. DNA samples prepared from peripheral blood and *in vitro* cultured somatic cells were pre-amplified by traditional PCR with ZFX/ZFY primers. Resulted products were used as a template in the followed real-time PCR assay, with nested primers and SYBR, and then determined with sex specific fluorogenic probes for ZFX and ZFY. The results showed that the higher the concentration of initiation template was, the earlier the amplification plots appeared. The dissociation curve of real-time PCR products showed high specificity. By using SYBR analysis and sex specific fluorogenic probes, the accuracy, efficiency, and reproducibility of sex determination for bovine genomic DNA and somatic cells were significantly improved. In addition, the time-consuming electrophoresis was eliminated by using fluorogenic probes for sexing dairy cattle.

Key words : Sexing, Dairy cattle, Probe, Real-time PCR, ZFX (X-linked zinc finger protein ).

---

(1) Contribution No. 1271 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

(2) Physiology Division, COA-LRI, Hsinhua, Tainan 71246, Taiwan, R.O.C.

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