

# 利用即時聚合酶連鎖反應進行乳羊之性別鑑定<sup>(1)</sup>

蕭振文<sup>(2)</sup> 蔡麗卿<sup>(2)</sup> 劉瑞珍<sup>(2)</sup> 戴謙<sup>(3)</sup> 陳立人<sup>(2)(4)</sup>

收件日期：94 年 9 月 6 日；接受日期：94 年 10 月 24 日

## 摘 要

本研究旨在利用即時聚合酶連鎖反應 (real-time polymerase chain reaction, real-time PCR)，配合 SyberGreen (SYBR) 與螢光標定探針 (probe) 進行乳羊的性別鑑定。試驗應用純化之乳羊基因組 DNA 與體外培養 (*in vitro* culture) 之阿爾拜因乳羊耳朵成纖維細胞做為性別鑑定之樣品。體細胞樣品先經蛋白酶 K (proteinase K) 處理後，利用 ZFX/ZFY (ZFX/ZFY-linked zinc finger protein) 引子進行 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，隨著起始的模板 DNA 增加，在較早的循環出現 PCR 擴增曲線，PCR 產物具有高度專一性之解離曲線 (dissociation curve)，顯示 PCR 產物之高度特異性。預先擴增後之初次 PCR 產物配合 nested PCR 引子及性別特異 TaqMan 螢光探針進行雜合反應 (hybridization)，因樣品產生不同螢光而判定性別。試驗結果顯示，待測之乳羊基因組 DNA 或少至 1 個體細胞，進行雜合反應後均能準確鑑定性別。本研究顯示應用 real-time PCR 可直接鑑定乳羊樣品之性別而不需進行電泳分析，且具較高之敏感性與重覆性，具有田間乳羊性別鑑定之應用潛力。

關鍵詞：乳羊、性別鑑定、即時聚合酶連鎖反應、ZFX。

## 前 言

家畜之性別控制為大多數畜牧業者所期望，酪農需要母羊來生產羊乳，而種畜公司則希望生產優良種公羊以供應精液。人胚之早期鑑定更能預防遺傳疾病的發生 (Thornhill and Monk, 1996)。故性別鑑定技術在人或動物均具有重要之價值。近年來，畜產生技蓬勃發展，使畜牧業者能應用生殖科技增進動物之生產，提升產業競爭力 (Lopes *et al.*, 2001)。乳羊的生殖科技中，胚體外培養 (*in vitro* production, IVP)、性別鑑定及胚移置技術之應用，提供了控制家畜性比率的機會，使性能優異的乳羊在短時間內可獲得較多後代，提高羊群泌乳量並加速遺傳改進速率。

---

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 1300 號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所生理組。

(3) 國科會南部科學園區管理局。

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

著床前動物胚的性別鑑定方法，早期有細胞學的方法檢測性染色體核型、存在於公胚表面的 H-Y 抗原測定 (White *et al.*, 1987) 及利用 Y- 染色體特異探針進行原位雜合 (*in situ hybridization*) (Bondioli, 1992) 或螢光原位雜合 (fluorescent *in situ hybridization*, FISH) 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提供了家畜基因改良的有用工具，加上聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 的發明，使原本極微量之 DNA 樣品，在經過數小時的反應後大量複製；配合顯微操作抽取胚內少許胚葉細胞，進行 PCR 後即可快速準確地鑑定胚的性別，達到選性繁殖之目的 (Aasen and Medrano, 1990; Bredbacka, 2001)。PCR 性別鑑定技術已成功應用在人 (Handyside *et al.*, 1989)、牛 (Collins *et al.*, 1995)、馬 (Peippo *et al.*, 1995)、綿羊 (Bredbacka and Peippo, 1992)、豬 (Ford and Conley, 1994) 與小鼠 (Kunieda *et al.*, 1992)。傳統的 PCR 完成後必需進行電泳分析以判定結果。目前即時聚合酶連鎖反應 (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。本研究主要目的乃探討 real-time PCR 應用於乳羊細胞或組織的性別鑑定可行性，提供進一步羊胚性別鑑定之應用。

## 材料與方法

### I. 性別鑑定用樣品之製備

- (i) 乳羊血液之收集與 DNA 萃取：自不同性別阿爾拜因 (Alpine) 乳羊之頸靜脈採集全血，置入已添加抗凝劑之離心管，利用基因組 DNA 純化套組 (Qiagen, GmbH) 並依其步驟萃取 DNA，經過定量後作為 PCR 之公與母陽性對照樣品。
- (ii) 乳羊體細胞樣本：阿爾拜因乳羊耳朵組織成纖維細胞 (fibroblast) 之分離與培養，是將不同性別阿爾拜因乳羊之耳朵消毒後剪取組織，細切後再以胰蛋白酶處理分離細胞。耳朵成纖維細胞經初代培養後冷凍備用。

### II. 聚合酶連鎖反應

- (i) 預先擴增與性別鑑定引子 (primer)：應用於預先增殖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 或體外培養之乳羊體細胞做為樣本。體細胞以不含鈣鎂的磷酸緩衝液 (phosphate-buffered saline, PBS) 清洗後旋即置入內含 8  $\mu$ l 細胞溶解液 [不含  $MgCl_2$  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 1 至 50 ng/ $\mu$ l；體細胞樣品則為 1 個、5 個、10 個與 20 個)、0.4  $\mu$ M 引子、10  $\times$  PCR buffer 與 Taq DNA 聚合酶等。PCR 條件為 denaturation 94°C 3 min。PCR 反應體積 25  $\mu$ l，反應條件為 10 循環之 94°C 1 min、54°C 50 sec、72°C 30 sec。接著為 20 循環之 94°C 1 min、54°C 50 sec、72°C 45 sec，而後為 10 循環之 94°C 1 min、54°C 50 sec、72°C 1 min，最後為 72°C 5 min extension；反應後維持於 4°C。

## (ii) 即時聚合酶連鎖反應

1. 利用初次 PCR 產物 (amplicons) 進行 real-time PCR。合成 nested PCR 之引子，序列分別為 Forward primer : 5'-AAAGCACATGCGAATCCATACTG-3'，Reverse primer : 5'-TTGGTATCTGAGAAAGTCAGAAGACAAAT-3'。使用 SYBR 為螢光染劑。real-time PCR 儀器為 ABI PRISM 7900HT 序列偵測系統 (Applied Biosystems, U.S.A.)。PCR 反應液使用 25  $\mu$ l 之 1  $\times$  TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, U.S.A.)。探針濃度為 100 nM，而 nested 引子濃度為 700 nM。反應以 1  $\mu$ l 初次 PCR 產物為模板。real-time PCR 條件為 10 循環之 50°C 2 min、95°C 10 min，而後為 40 循環之 94°C 15 sec、62°C 1 min。
2. 螢光探針雜合反應：TaqMan 螢光探針 (Applied Biosystems, U.S.A.) 之序列為 ZFY : FAM-AAAACTAAGCATAGTAAAGAAATGTCTTTCAAG-TAMRA、ZFX : VIC-AGCATAGTAAAGAGATGCCATTCAAGTGTGA-TAMRA。探針分別利用 VIC™ 與 FAM™ 兩種不同螢光所標定的探針，偵測 ZFX/ZFY 基因的核苷酸差異位置，進行雜合反應以判定樣品的性別。

## (iii) 性別鑑定結果判定

雜合反應後，由 ABI PRISM 7900HT 序列偵測系統內 Sequence Detection System (SDS) 分析軟體將產生 VIC™ 螢光的樣品判定為雌性，產生 FAM™ 螢光的樣品判定為雄性。real-time PCR 後儀器自動掃描波長 550 至 660 nm 的螢光，運算後自動區集而判定樣品之性別。本試驗中不同數目的乳羊體細胞樣品 (1、10 與 20 個細胞) 進行 PCR 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

羊胚之性別鑑定具有經濟價值，先進國家已將之納入羊胚生產的重要生物技術，藉以提升酪農之經營效益。本研究應用 real-time PCR 分析不同性別阿爾拜因乳羊的基因組 DNA 與經體外培養乳羊體細胞的 ZFY/ZFX 基因。配合 SYBR 與螢光探針，探討 real-time PCR 應用於乳羊性別鑑定之可行性。試驗先應用純化的乳羊基因組 DNA 為樣品，配合 ZFX/ZFY 引子進行傳統 PCR 的預先擴增，結果在不同濃度與不同性別的 DNA 樣品均獲得 450 bp 的初次 PCR 產物 (圖 1)。之後取初次 PCR

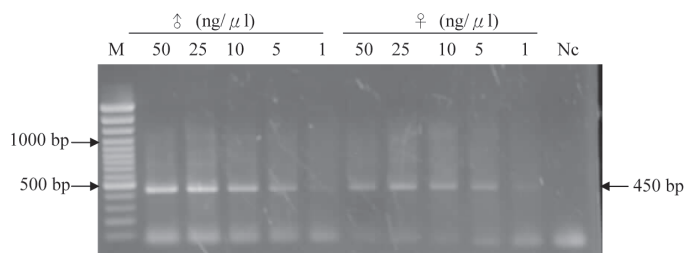
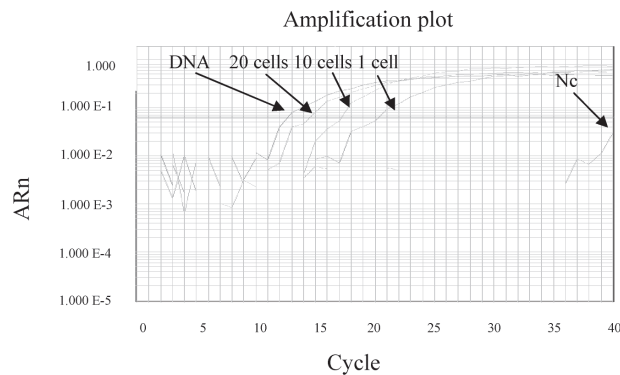


圖 1. 不同性別與不同濃度 (1-50 ng/  $\mu$ l) 之乳羊基因組 DNA 使用 ZFX/ZFY 引子進行初次 PCR 之產物电泳圖。Nc 為負對照，M 為 100 bp 標記。

Fig. 1. The electrophotogram of PCR products amplified from different concentrations (1-50 ng/  $\mu$ l) of purified male and female dairy goat genomic DNA with ZFX/ZFY primers. Lane Nc: negative control. Lane M: 100 bp ladder marker.

產物做為模板進行 real-time PCR 以建立性別鑑定的分析法（資料未顯示）。由基因組 DNA 樣品所獲得的分析法進一步利用體外培養的不同性別乳羊體細胞進行性別鑑定之敏感性測定。細胞數目分別為 1、10 與 20 個的體細胞先經 PCR 預先擴增後，取初次 PCR 產物做為模板，使用 SyberGreen 進行 real-time PCR，結果隨著初次 PCR 原始模板之細胞數不同，分別在不同循環（10-20 循環）出現 PCR 產物之擴增曲線（圖 2）。不同性別乳羊之起始細胞數為 1、10 與 20 個，母羊分別在第 20 次、第 18 次與第 15 次循環（圖 2A），公羊分別在第 18 次、第 16 次與第 15 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、不同起始體細胞樣品之 PCR 產物均具有專一性的 DNA 解

(A) Female



(B) Male

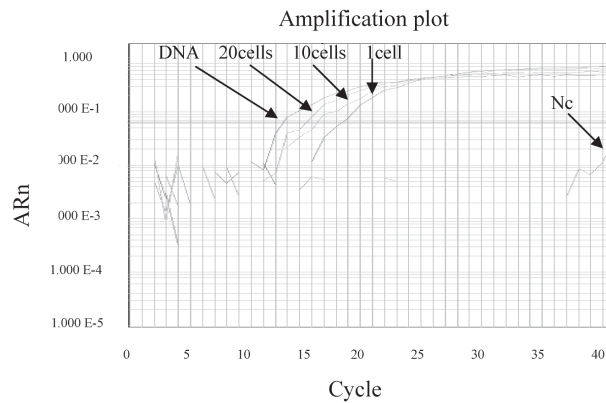
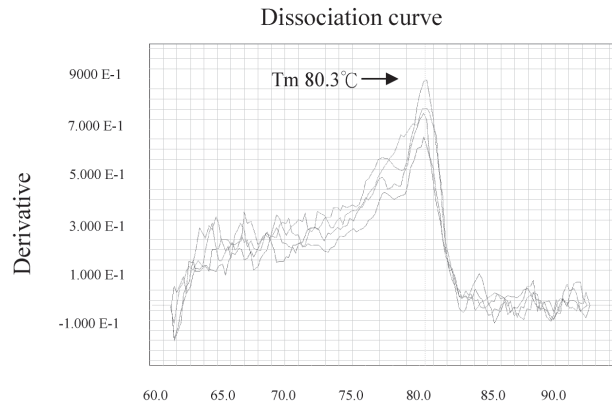


圖 2. 不同數目之乳羊體細胞之初次 PCR 產物進行 real-time PCR 之擴增曲線。左至右之擴增曲線分別代表基因組 DNA（25 ng/  $\mu$  l）、20 個、10 個、與 1 個細胞之初次 PCR 之模板濃度。Nc 為負對照。

Fig. 2. The nested real-time PCR amplification plots of specific PCR products amplified from first PCR products obtained from different number of somatic cells for the (A) female and (B) male dairy goat. From left to right, template concentrations at first PCR reaction are genomic DNA (25 ng/  $\mu$  l), 20-, 10- and 1-cell, respectively. Nc: negative control.

離曲線（圖3）。母羊與公羊real-time PCR反應之 $T_m$ 值相近，分別為 $80.3^{\circ}\text{C}$ 與 $80.8^{\circ}\text{C}$ （圖 3A，3B），顯示 real-time PCR 之擴增產物具有高度特異性。不同性別、不同數目的乳羊體細胞之初次 PCR 產物與 TaqMan 螢光探針進行雜合反應後，分別以 FAM<sup>TM</sup> 標定 ZFY，VIC<sup>TM</sup> 標定 ZFX，雜合後呈現不同螢光而將不同性別樣品加以區集（圖 4）。公羊之體細胞樣品在雜合反應後集中在圖 4 左上之區集；母羊之體細胞樣品在雜合反應後集中在圖 4 右下之區集，明確地判定乳羊細胞的性別。

(A) Female



(B) Male

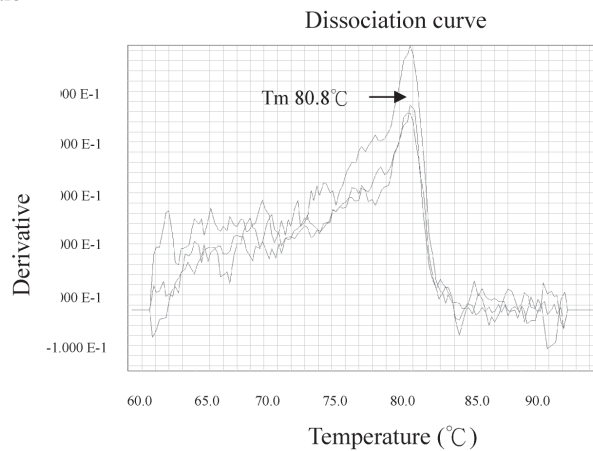


圖 3. 不同數目之乳羊體細胞經初次 PCR 後的產物做為模板進行 real-time PCR 之解離曲線。

Fig. 3. The dissociation curves of real-time PCR products amplified from first PCR products obtained from different number of somatic cells of the (A) female and (B) male dairy goats.

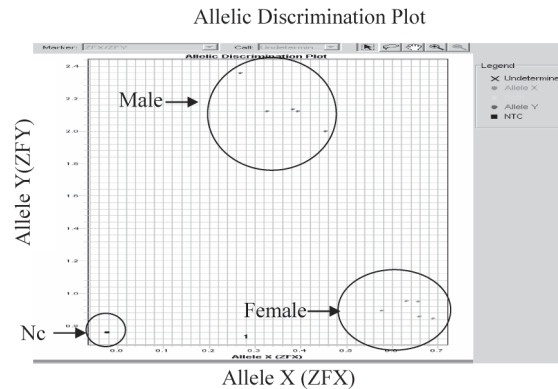


圖 4. 不同性別之乳羊基因組DNA與體細胞（1、5、10與20個）經初次PCR產物做為模板與TaqMan螢光探針雜合後之區集圖。上面之點區集為公的體細胞樣品，右下之點區集為母的體細胞樣品，左下點 Nc 為負對照。

Fig. 4. First PCR product from male and female dairy goats 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 the upper left corner, and allele 2 indicates the female (ZFX) samples in the lower right corner. Nc: negative control.

動物胚的性別鑑定法，目前以 PCR 較為準確可行 (Mara *et al.*, 2004)。傳統的 PCR 在反應後必需進行膠體電泳分析來判定結果。進行性別鑑定時，使用之引子對大多為 Y-染色體特異性與體染色體對照序列。由於牛與羊之基因組 DNA 間具有高度相似性 (Moore *et al.*, 1991)，所以牛的 Y-染色體或體染色體序列經過測試後或可做為羊的性別鑑定引子使用。羊胚性別鑑定已應用 ZFY/ZFX 與 SRY 基因等 Y-染色體特異性序列 (Gutierrez-Adan *et al.*, 1997; Ng *et al.*, 1996)。Mara *et al.* (2004) 為了測試體外生產羊胚性別鑑定之敏感性，先以綿羊輸卵管細胞及公仔羊體細胞 30、5 與 2 個體細胞作為樣品。分別使用公牛 Y-染色體特異性序列 SRY 及公母牛均會出現產物的引子 1.715 (SAT) (Peura *et al.*, 1991)，結果準確率達 91.2%。而後分析 21 個 IVP 生產的囊胚期綿羊胚，分析後的胚可立即移置入受胚動物，減少胚冷凍的傷害損失。進行胚的性別鑑定，必需具備敏感、快速、有效且準確的特點 (Peura *et al.*, 1991; Rao *et al.*, 1993; Macha'ty *et al.*, 1993; Park *et al.*, 2001; Manna *et al.*, 2003)。羊的繁殖具有季節性，而體內發育胚的取得不易，往往需藉助於外科手術，故應用體細胞做為樣品，應用一定數目的體細胞測試敏感性後，再提供羊胚性別鑑定之應用。在進行傳統 PCR 性別鑑定時，細胞數減少時可能因 DNA 的損失而影響分析效率 (Bredbacka, 1998)。細胞數太多時，也可能因模板 DNA 太多，在 PCR 產物電泳時呈現模糊現象。而起始的模板 DNA 濃度高，PCR 產物在進行膠體電泳的條帶也愈明顯，而作為陰性對照的樣本則完全沒有 PCR 產物 (Greenlee *et al.*, 1998; Le Bourhis *et al.*, 1998)。Ng *et al.* (1996) 研發綿羊的性別鑑定法，使用公羊 Y-染色體上 SRY 基因內的 HMG box 序列設計引子，此高度保留序列經 PCR 後複製一條 161 bp 公羊特有產物，輔以微衛星對照序列，準確的鑑定綿羊或公母性腺嵌合羊 (intersex chimeras) 的性別。進行 PCR 最佳的基因組 DNA 濃度為 100 ng。若模板濃度低於 10 ng 則必需增加 PCR 循環數，才能產生足夠的產物量供分析之用。以傳統 PCR 進行性別鑑定，常因為解析度不佳或產物濃度太高而影響結果的判定。



動物胚的性別鑑定有別於例行的 PCR，分析法之敏感性及成功率為最重要關鍵因素。傳統的 PCR 使用已經純化之 DNA 樣品作為模板，成功率與敏感度均高。若直接利用細胞樣品進行 PCR 性別鑑定，結果之重複性與再現性相當不穩定，往往在電泳膠體上呈現模糊 (smear) 現象而無法判定結果。因此，提升性別鑑定之敏感性與成功率成為實際應用與田間推廣的關鍵。傳統 PCR 結束後，產物進行約 30 min 的電泳分析。由於瓊脂糖 (agarose) 價格昂貴且在電泳後以溴化乙錠 (ethidium bromide) 進行膠體染色，敏感度遠低於 real-time PCR 使用的 SYBR 或專一性螢光探針，且溴化乙錠有致癌危險而有損人類健康。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，廣泛應用在人或基因轉殖動物的外源基因偵測、親子鑑定或性別鑑定 (Alonso and Martin, 2004; Andreasson and Allen, 2003)，短時間即可完成定性或定量分析，改善傳統 PCR 敏感度不足的問題，同時降低膠體電泳的時間與成本，甚至取代傳統上用於基因定量的北方吸漬法 (Northern blotting) (Ballester *et al.*, 2004; Shitara *et al.*, 2004; Tesson *et al.*, 2002)。因此本研究探討應用 real-time PCR 進行乳羊性別鑑定之可行性，結果顯示該技術應用於乳羊之性別鑑定具有高度應用之潛力。

影響性別鑑定的因素除了 PCR 反應條件之外，選用的引子也相當重要。性別鑑定用引子皆選用僅存在於 Y-染色體上的雄性特有序列作為陽性引子，複製出雄性特有的 PCR 產物。理論上具有 Y-染色體特異片段的樣品即為雄性。無 PCR 產物的樣品因為缺乏引子的結合序列，故欠缺 PCR 產物而判定為雌性。然而進行分析時，常因人為操作而造成偽陰性。因此在實際分析時會添加一組存在於 X-染色體或體染色體上的引子作為內部對照 (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 PCR 後，公與母羊均可複製出單一條 450 bp 產物。ZFX/ZFY 已廣泛應用在牛胚或基因轉殖牛胚之性別鑑定 (Horvat *et al.*, 1993)。或配合特異性片段長度多態性 (restriction fragment length polymorphism, RFLP)，將 ZFY/ZFX 的 PCR 產物以特定的限制酶切割，藉由限制酶切割位置與否及切割後進行電泳分析後的片段數目區別樣品性別。亦可應用 ZFY/ZFX 引子進行 nested PCR，改善性別鑑定面臨的人為錯誤 (Aasen and Medrano, 1990)。Aasen and Medrano (1990) 應用 ZFX 與 ZFY 引子進行 PCR 性別鑑定，分別獲得 445 與 447 bp 產物。公與母羊之 PCR 片段經過 *Pst*I 限制酶切割後，公的樣品將產生 103 及 344 bp 二條片段，而母的 PCR 產物因欠缺 *Pst*I 之切位，只有一條產物，電泳後由片段數與長度而判定結果。此外，亦可應用非放射性 DIG (digoxigenin) — 標定探針，檢測 ZFX/ZFY 在 PCR 後的電泳片段。

本研究使用牛的 ZFY/ZFX 引子序列，在 PCR 預先擴增後於公與母羊的基因組 DNA 或體細胞均複製出一條 450 bp 的產物。此產物做為模板進行 real-time PCR 之探針雜合反應而鑑定樣品的性別。其原理在於 ZFY/ZFX 基因的部份核苷酸差異，經由探針進行雜合反應即可高度敏感地鑑定樣品之性別。在進行動物胚的性別鑑定時，取得的胚葉細胞數目愈少對胚的損傷愈少。因此，性別鑑定時以極少的細胞做為樣品，配合預先擴增 (primer extension preamplification, PEP) (Chrenek *et al.*, 2001; Sermon *et al.*, 1996)。之後再利用 nested PCR 擴增特定基因 (Lien *et al.*, 1999)，可有效改善 PCR 之特異性。應用 real-time PCR 配合螢光探針進行乳羊的性別鑑定，利用螢光染劑或探針 (Morin *et al.*, 1999)，探針能辨識特異序列，經過 PCR 擴增後造成探針分解而激發強烈的螢光為判定依據，分析迅速且不需電泳分析，PCR 後數分鐘即可判讀數目眾多的樣品，提高檢測數量與分析效率，有效改善傳統方法分析之低敏感性與特異性 (Virta *et al.*, 2002)。本研究應用 real-time PCR 進行乳羊的性別鑑定，結果顯示，待測樣品數目為 10 體細胞以上，性別鑑定之準確率可達到 100%。取單一體細胞進行性別鑑定時之準確率可以達到至少 80%。因此，本試驗由極少的乳羊體細胞即可直接判定樣品之性別而不需進行電泳分析，提供較傳統 PCR 更敏感而準確的分析結果，具有應用於羊胚性別鑑定之商業潛力。

## 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 : 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. 1998. Recent developments in embryo sexing and its field application. *Reprod. Nutr. Dev.* 38 : 605-613.
- Bredbacka, P. 2001. Progress on methods of gene detection in preimplantation embryos. *Theriogenology* 55 : 23-34.
- Bredbacka, P. and J. Peippo. 1992. Sex diagnosis of ovine and bovine embryos by enzymatic amplification and digestion of the DNA from the ZFY/ZFX locus. *Agric. Sci. Finl.* 2 : 233-238.
- Chrenek, P., L. Boulanger, Y. Heyman, P. Uhrin, J. Laurincik, J. Brlla and J. P. Renard. 2001. Sexing and multiple genotype analysis from a single cell of bovine embryo. *Theriogenology* 55 : 1071-1081.
- Collins, M. E., D. A. Stevens, L. J. Jenner and J. Brownlie. 1995. A rapid method for rRNA detection in single cell biopsies from preimplantation-stage bovine embryos. *Theriogenology* 43 : 1227-1238.
- Ford, S. P. and A. J. Conley. 1994. Effect of sex and recipient breed of porcine embryonic development. *Biol. Reprod. Dev.* 50 : 88. (Abstr.)
- Greenlee, A. R., R. L. Krisher, E. D. Plotka. 1998. Rapid sexing of murine preimplantation embryos using a nested, multiplex polymerase chain reaction (PCR). *Mol. Reprod. Dev.* 49 : 261-267.
- Gutierrez-Adan, A., W. T. Cushwa, G. B. Anderson and J. F. Medrano. 1997. Ovine-specific Y-chromosome RAPD-SCAR marker for embryo sexing. *Anim. Genet.* 28 : 135-138.
- Handyside, A. H., J. K. Pattinson, R. J. Penketh, J. D. Delhanty, R. M. Winston and E. G. Tuddenham. 1989. Biopsy of human preimplantation embryos and sexing by DNA amplification. *Lancet* 1 : 347-349.
- 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.
- Kunieda, T., M. Xian, E. Kobayashi, T. Imamichi, K. Moriwaki and Y. Toyoda. 1992. Sexing of mouse preimplantation embryos by detection of Y chromosome-specific sequences using polymerase chain reaction. *Biol. Reprod.* 46 : 692-697.
- Le Bourhis, D., P. Chesne, M. Nibart, J. Marchal, P. Humblot, J. P. Renard and Y. Heyman. 1998. Nuclear



- transfer from sexed parent embryos in cattle: efficiency and birth of offspring. *J. Reprod. Fertil.* 113 : 343-348.
- 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.
- 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.
- Manna, L., G. Neglia, M. Marino, B. Gasparrini, R. Di Pala and L. Zicarelli. 2003. Sex determination of buffalo embryos (*Bubalus bubalis*) by polymerase chain reaction. *Zygote* 11 : 17-22.
- Mara, L., S. Pilichi, A. Sanna, C. Accardo, B. Chessa, F. Chessa, M. Dattena. 2004. Sexing of *in vitro* produced ovine embryos by duplex PCR. *Mol. Reprod. Dev.* 69 : 35-42.
- Moore, S. S., L. L. Sargeant, T. J. King, J. S. Mattick, M. Georges and D. J. Hetzel. 1991. The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species. *Genomics* 10 : 654-660.
- Morin, P. A., R. Saiz and A. Monjazeb. 1999. High-throughput single nucleotide polymorphism genotyping by fluorescent 5'-exonuclease assay. *Biotechniques* 27 : 538-552.
- Ng, A., K. Sathasivam, S. Laurie and E. Notarianni. 1996. Determination of sex and chimaerism in the domestic sheep by DNA amplification using HMG-box and microsatellite sequences. *Anim. Reprod. Sci.* 41 : 131-139.
- Park, J. H., J. H. Lee, K. M. Choi, S. Y. Joung, J. Y. Kim, J. M. Chung, D. I. Jin and K. S. Im. 2001. Rapid sexing of preimplantation bovine embryos using consecutive and multiplex polymerase chain reaction (PCR) with biopsied single blastomeres. *Theriogenology* 55 : 1843-1853.
- Peippo, J., M. Huhtinen and T. Kotilainen. 1995. Sex diagnosis of equine preimplantation embryos using the polymerase chain reaction. *Theriogenology* 44 : 619-627.
- 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.
- Rao, K. B., C. H. Pawshe and S. M. Totey. 1993. Sex determination of *in vitro* developed buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos by DNA amplification. *Mol. Reprod. Dev.* 36 : 291-296.
- 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.
- Virta, J., J. Markola, J. Peippo, M. Markkula and J. Vilkki. 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.

## Sexing dairy goat 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>, Chein Tai<sup>(3)</sup> and  
Lih-Ren Chen<sup>(2)(4)</sup>

Received : Sept. 6, 2005 ; Accepted : Oct. 24, 2005

### Abstract

The purpose of this study was to develop a fast method for sexing dairy goats by real-time polymerase chain reaction (PCR). DNA samples prepared from peripheral blood and in vitro cultured somatic cells were pre-amplified by traditional PCR with ZFX/ZFY primers. The resultant products were used as a template in the following real-time PCR assay, with nested primers and SYBR, and then determined with sex specific fluorogenic probes for ZFX and ZFY. Results showed that the higher the concentration of initiation template was, the earlier the amplification plot 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 caprine genomic DNA and somatic cells were significantly improved. In addition, the time-consuming electrophoresis for traditional PCR procedure was eliminated by using fluorogenic probes for dairy goat sexing.

Key words : Dairy goat, Sexing, Real-time PCR, ZFX.

---

(1) Contribution No.1300 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

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

(3) Southern Taiwan Science Park Administration, National Science Council, Sinshih, Tainan 741, Taiwan, R.O.C.

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