

# 牛冷冻试管胚胎性别鉴定的应用\*

张锁链 布赫 仓明 旭日干

(内蒙古大学实验动物研究中心 呼和浩特 010021)

**摘要:** 利用双引物 PCR 技术对优质良种牛体外受精的冷冻胚胎进行性别鉴定,并对分割后的半胚分别进行 PCR 扩增和染色体分析,两种方法的判定结果相吻合。在本实验条件下,利用减少 PCR 体系中细胞的数量来确立最低的模板 DNA 的检出量,2-细胞不能检测,4-细胞检出率为 62.5%,8-细胞为 90%,16-细胞以上为 100%。对 23 枚经过性别鉴定后的胚胎进行移植,获得 5 头纯种试管牛,产犊率为 21.7%,与正常的胚胎移植结果 27.3%(3/11)无显著差异,预测性比为 100%符合。

**关键词:** 牛体外受精; PCR; 胚胎性别鉴定

**中图分类号:** Q492 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2002)02-42-04

## Sexing of Frozen IVF Bovine Embryos by PCR during Embryo Transfer

ZHANG Suo-Lian BU He CANG Ming B Shorgan

(The Research Center for Laboratory Animal Science, Inner Mongolia University Huhhot 010021, China)

**Abstract:** Sex of early embryos was determined by PCR using double primers (Y-specific DNA primer BOV-97, 157 bp; Bovine  $\alpha$ -lactalbumin primer in male and female, 109 bp). The sex determination accuracy of biopsied half embryos by PCR with BOV97 primer was 100% in accordance with chromosome analysis. Under our conditions, detection rate of embryonic DNA were zero with 2 cells, 62.5% with 4 cells, 90% with 8 cells and 100% with 16 cells. A total of 23 embryos that had been biopsied and sexed were transferred into the donors, and 5 calves were born. The success rate is 21.7%, with no significant difference from the normal IVF-ET (27.3%, 3/11).

**Key words:** Bovine IVF-ET; Sex identification; PCR

家畜早期胚胎的性别鉴定是胚胎工程中的一项重要内容,自从商业化的胚胎移植出现以来,尤其象牛这样妊娠期较长的家畜,养殖业主渴望能够在胚胎移植前对其进行性别鉴定,以期获得更高的经济效益。以前的许多方法如:细胞遗传学分析、雄性特异抗原测定、X-染色体连锁酶活性的测定等,虽然可以进行性别鉴定,但是由于方法繁琐难以应用于生产实际。90年代初雄性特异基因(SRY)的发现和 PCR 技术的广泛应用,使性别控制转向生产应用成为可能<sup>[1]</sup>。我国在 90 年代中期,利用 PCR 技术鉴定

牛胚胎性别已取得成功<sup>[2]</sup>,但是在如何使该项技术走向产业化应用等方面作得还很不够,90年代以来,家畜体外受精技术(IVF)在我国得到飞速发展。目前,我国在利用牛的体外受精技术实现工厂化生产良种冷冻试管胚胎方面已逐步迈向产业化<sup>[3]</sup>,每年全国牛胚胎移植中所用

\* 内蒙古自然科学基金资助(No.971304-2);

第一作者简介 张锁链,男,50岁,研究员,硕士生导师;研究方向:生殖生物学。

收稿日期:2001-04-04,修回日期:2001-09-11

的 IVF 胚胎的比例在逐步扩大,但目前对于 IVF 冷冻胚胎的性别鉴定在实际生产中应用的可能性尚未见报道。本试验对牛冷冻解冻试管胚胎的切割取样,性别检测和胚胎移植进行研究,探讨这项技术在生产实际中应用的可行性。

## 1 材料与方 法

### 1.1 牛的体外受精及胚胎冷冻

实验所用胚胎均为在国外用 IVF 方法生产的,其具体方法如下。体外成熟培养以及体外受精的处理过程均采用旭日干等的方法并略加改进<sup>[4]</sup>,其主要过程为:将采自屠宰场的卵巢置于 30~35℃ 的生理盐水中带回实验室,用装有 18 号针头的注射器从卵泡中抽取卵母细胞,采卵液为 PBS + 3 mg/ml BSA; 将采集到的卵母细胞培养在 TCM199 + 10 mmol/L HEPES + 0.1 mg/ml FSH + 10% ECS(发情第 6 d 的母牛血清)的培养液小滴中,上覆石蜡油,培养在 38.5℃,5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中 22~24 h;将冷冻精液(购自澳大利亚 Genetic Australia 公司)在 35℃ 左右的水浴中解冻,利用 Percoll 梯度离心,将活精子分离,用含有 10 mmol/L Caffeine 的 BO 液离心洗涤两次,3000 r/min,5 min;用 BO + 20 mg/ml BSA + 2 μl 肝素稀释 1 倍,使精子浓度达到 2 × 10<sup>6</sup> 个/ml,经过成熟培养的卵母细胞移入调整好的精子液滴中,受精 6~8 h 之后,将受精的卵母细胞洗涤,移至 SOF + 8 mg/ml BSA 的发育培养液中,3d 后换入 SOF + 5% D<sub>2</sub>OCS 液滴中;发育至囊胚阶段;选择 A 或 B 级胚胎利用乙二醇作保护剂程序化冷冻,保存于 -196℃ 的液氮中。根据不同的实验内容可以选择不同发育时期的体外受精胚胎,从 2-细胞到 32-细胞不等。

### 1.2 胚胎取样

将由国外生产的优质良种牛冷冻试管胚胎,按照常规的解冻方法解冻,选取 A 或 B 级胚胎用于切割。将单个胚胎移入含有 0.25% 链酶蛋白酶的 PBS 小滴中处理 2~3 min,随后移入底部划有浅道的直径 35 mm 的塑料培养皿上切割液小滴(3 mg/ml BSA, PBS)中。用显微操作仪上的微型刀片将透明带切开,如果发现解冻后游离出来的细胞碎块,将其吸

出作为样品;如果没有,则需要将胚胎滋养层切下 1/5~1/10 作为样品。将取得的样品用蒸馏水冲洗 3 次,移入放有 10 μl 蒸馏水的 Eppendorf 管中。利用冻融法使细胞内的 DNA 释放出来,供 PCR 扩增。切割后的胚胎待移植。

### 1.3 用 PCR 进行性别鉴定

利用双引物 PCR 扩增体系是本试验的一个特色,它可以提高检测的准确性,两对引物分别根据 Y-染色体特异片断(157 bp)<sup>[5]</sup>和 Bovine α-Lactalbumin 基因部分片断(109 bp)设计<sup>[6]</sup>,序列如下:

5'-GATCACTATACATACACCCTCTCATCCTA-3',  
3'-GATCTTGTGATAAAAAGGCTATGCTACACA-5', 157bp;  
5'-CTAGTAGGCATCCTATTCCATGCCA-3',  
3'-ATTCAGGCAAAGTACACCTCCGTA-5', 109bp  
引物合成由上海生物工程公司完成。

在 PCR 反应体系中,两对引物各 2 μl, 2.5 mmol/L dNTP 4 μl, 10 × Taq E Buffer 5 μl, Taq DNA 聚合酶 1 μl (5 u), 补充蒸馏水到 32 μl, 总体积为 50 μl。引物反应浓度为 1 μmol/L。循环程序:92℃ 60 s, 56℃ 60 s, 72℃ 60 s, 循环 30 次。电泳条件:取 10 μl PCR 扩增产物,加 2 μl 加样缓冲液(溴酚兰),2% 琼脂糖凝胶(加溴化乙锭),电压 80V,1 h。电泳结果中,出现双带为雄性样品,单带(109 bp)为雌性。PCR 试剂盒购自北京华美公司。

### 1.4 胚胎移植

挑选形态较好的经过性别鉴定的胚胎,利用非手术移植法将其移植到同期发情的受体母牛体内,观察怀孕情况及所产犊牛的性比。

## 2 结果与分析

### 2.1 IVF 胚胎 PCR 法与染色体检查法的性别鉴定

将体外受精获得的第 7 日龄囊胚平均切割,一分为二,一半用于染色体检查,方法见 Iwasaki<sup>[7]</sup>,另一半用于 PCR 检测。结果见表 1。

### 2.2 细胞数量不同对 DNA 扩增效果的影响

增加 PCR 反应体系中胚胎细胞的数量,根据雌雄共有基因 Bα-Lactalbumin 片断的扩增结果,确立反应中所需最低模板 DNA 的量。胚胎细胞

均取自早期囊胚的滋养层细胞。结果见表 2。

表 1 PCR 法与染色体检查法鉴定胚胎性别的比较 (单位:个/视野)

胚胎形态	性别鉴定方法	供试胚胎	平均卵裂球数	性别鉴定结果(%)	
				雌	雄
1/2 胚	染色体检查法	10	28	3(30.0)	7(70.0)
1/2 胚	PCR 法	10	—	3(30.0)	7(70.0)

表 2 细胞数量不同对 DNA 扩增效果的影响

胚胎细胞数量	供试胚胎数	DNA 扩增结果(%)	
		BOV 97M	$\alpha$ -Lactalbumin
2	5	0	0
4	8	1(12.5)	5(62.5)
8	10	4(40.0)	9(90.0)
16	10	6(60.0)	10(100.0)

**2.3 性别鉴定胚的移植** 将 23 枚经过切割取样的冷冻解冻胚胎移植到受体母牛的体内,结果产犊 5 头。其中有 2 头为同卵双犊。产犊率为 21.7%。性别鉴定结果与所产犊牛的性别完全相符。将没有经过切割的冷冻解冻胚胎 11 枚直接移植给受体母牛,结果产犊 3 头,产犊率为 27.3%,与性控胚胎移植结果没有显著差异。结果见表 3。

表 3 牛 IVF 性别鉴定胚胎移植后的产犊结果

组别	胚胎	产犊数(%)	胚胎性别/犊牛性别
性别鉴定	23	5(21.7)	5♂/5♂(100.0)
对照组	11	3(27.3)	---

### 3 讨论

本实验首先将牛 IVF 胚胎平等分割后分别用 PCR 法和染色体检查法对胚胎进行性别鉴定,结果 PCR 法与染色体检查法的胚胎的雌雄比完全相同,PCR 法的准确率为 100%。表明本实验所用的 PCR 法是可行的。

利用 PCR 技术进行性别判定的关键是要提高检测的灵敏度和扩增的特异性。使用不同的引物,其检测的灵敏度是不同的,由最低模板 DNA 量为 50 pg 推测,其样品细胞数为 5~10

个。从本实验结果可以看出,样品细胞数量的多少对胚胎细胞的性别鉴定有一定的影响。当细胞数量在 2 个细胞时检测不到结果,当细胞数量在 4 个细胞时则双重引物法只能检测到 60%,但当细胞数量增加到 8 个细胞时检测率可以上升到 90%以上,在 16 个细胞时则可达到 100%。说明在本实验的条件下,以双重引物法鉴定胚胎性别时细胞数量应在 8 个细胞以上。在实验中确信将样品细胞放入 Eppendorf 管中至关重要,由于本实验运用双重引物,可以有效的防止错误的判断。

性别鉴定的胚胎移植后的产犊率为 21.7%,与正常胚胎的移植产犊率无显著差异。表明胚胎经过性别鉴定以后虽有一定的损伤,但对产犊率无明显影响。已知胚胎的性别与产犊牛的性别完全吻合,证明本实验采用的 PCR 方法鉴定胚胎的性别是可靠的。

本实验通过 PCR 技术方法,对牛 IVF 冷冻胚胎的性别进行鉴定,然后移植给受体母牛,获得了性别鉴定的 5 头犊牛。表明本试验在国外生产的牛 IVF 冻胚胎经过空运回国并在经过性别鉴定等一系列过程和短途运输至实验场进行胚胎移植,胚胎的质量和产犊率不会受到影响。通过用 PCR 法对牛 IVF 冷冻胚胎进行性别鉴定的技术在实际生产中可以应用。

### 参 考 文 献

- [1] Sinclair A H, Berta P, Hawians J R *et al.* A gene from the human sex determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature*, 1990, 346: 240~246.
- [2] Zeng Y T, Zhang M L, Chen M Y *et al.* Amplify SRY sequence by PCR to identify the cow's sex. *China Science(B)*, 1993, 23(4):371~376.

- [ 3 ] 张锁链, 仓明, 旭日干. 牛体外受精胚胎移植的应用研究. 内蒙古大学学报(自然科学版), 2000, 31(4): 410 ~ 413.
- [ 4 ] 旭日干, 张锁链, 薛晓先等. 屠宰母牛卵巢卵母细胞的体外受精和胚胎早期发生研究. 内蒙古大学学报(自然科学版), 1989, 20(4), 407 ~ 414.
- [ 5 ] Miller J R, Kooperman M. Isolation and characterization of two male-specific DNA fragments from the bovine gene. *Anim Genet*, 1990, 21: 77 ~ 82.
- [ 6 ] Vilotte J L, Soulier S, Mercier J C. Complete nucleotide sequence of bovine-Lactalbumin gene: compare with its rat counterpart. *Biochimie*, 1987, 69: 609 ~ 620.
- [ 7 ] Iwasaki S, Shioya Y, Masuda H *et al*. Incidence of chromosomal abnormalities in early bovine embryo derived from *in vitro* and *in vivo*. *Gemate Research*, 1989, 22: 83 ~ 91.