

細胞數、蛋白酶處理與聚合酶對於 SRY/ZFX 與 BE5 引子進行性別鑑定的影響⁽¹⁾

蕭振文⁽²⁾ 陳裕信⁽²⁾ 蔡麗卿⁽²⁾ 楊鎮榮⁽²⁾ 李善男⁽³⁾
鄭登貴⁽⁴⁾ 薛佑玲⁽⁵⁾ 陳立人⁽²⁾⁽⁶⁾

收件日期：93 年 6 月 30 日；接受日期：93 年 8 月 19 日

摘 要

本研究之主要目的乃探討應用 SRY/ZFX 及 BE5 引子進行聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 性別鑑定時，細胞數、PCR 之前蛋白酶 K (proteinase K) 處理與否，以及聚合酶種類對於性別鑑定敏感性與特異性之影響，藉以提昇性別鑑定之準確性。試驗分別利用經過純化不同性別乳牛基因組 DNA 及體外培養之乳牛體細胞 (卵丘細胞) 做為性別鑑定之材料。結果顯示，經過純化之不同性別乳牛基因組 DNA 樣品，SRY/ZFX 及 BE5 二組引子之性別鑑定敏感性可達到 5 ng，且不論一般 *Taq* 聚合酶或於高溫條件始啟動聚合作用的 Hot Start 聚合酶均可獲得專一性的 PCR 產物；而利用體外培養的乳牛體細胞進行分析時，細胞樣品至少需 10 個以上，並於 PCR 之前先經蛋白酶 K 前處理，配合使用一般 *Taq* 或 Hot Start DNA 聚合酶進行 PCR，是適合的細胞樣品性別鑑定條件。

關鍵詞：牛胚、性別鑑定、引子、聚合酶連鎖反應。

緒 言

著床前動物胚的性別鑑定方法，有性染色體核型分析、存在於雄性動物胚表面 H-Y 抗體的測定 (White *et al.*, 1987)、X-染色體酵素量的測定及利用 Y-染色體特異探針進行雜交反應 (hybridization) (Bondioli, 1992) 等，這些方法在實際應用時，卻面臨了試驗步驟煩瑣、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 (PCR) 技術的發明，使原本極微量之 DNA 樣品，在數小時的反應之後即能大量複製標的序列。因此，應用顯微操作技術抽取少許的胚葉細胞進行 PCR，即可快速準確地分析胚

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 1244 號

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所生理組

(3) 行政院農業委員會畜產試驗所副所長室

(4) 國立臺灣大學農學院畜產學系

(5) 國立中山大學生物醫學研究所

(6) 通訊作者

的性別，達到控制家畜後代性別的目的 (Aasen and Medrano, 1990; Bredbacka, 2001)。

牛胚之性別鑑定因具高度經濟價值，在先進國家已成為牛胚商業生產之重要技術。在法國，性別鑑定透過酪農人工授精協會與生技公司，提供酪農大規模的田間牛胚性別鑑定，明顯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。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，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%)。

本研究之主要目的，乃探討 SRY/ZFX 及選殖自牛齒釉蛋白基因的 BE5 兩引子對進行 PCR 性別鑑定時，細胞數、蛋白酶 K 前處理及聚合酶種類對乳牛體細胞性別鑑定之影響，藉以改善利用 SRY/ZFX 與 BE5 兩引子進行性別鑑定之效率與敏感性，供牛胚性別鑑定應用之參考。

材料與方法

I. 性別鑑定用樣品之製備

本試驗所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) 並依照其操作步驟進行基因組 DNA 之萃取與定量。
- (ii) 卵丘細胞之取得與培養：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)，取得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，供性別鑑定之細胞樣品來源。卵丘細胞樣品進行性別鑑定時先經過三次磷酸緩衝液 (phosphate buffer solution, 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。

II. 聚合酶連鎖反應

- (i) 性別鑑定引子之製備：應用於性別鑑定之引子有二組，第一組是國立台灣大學畜產學系開發之 BE-5 引子，其三條引子之核酸序列共用之 BE-5：分別為

5'-AGCAACAGACAAGACCAAG-3'

X-498：5'-TCAAATATCTGCATCCCCTCA-3'

Y-368：5'-ACTGATACTTCCTTCTCCTCA-3'。

第二組引子是 SRY/ ZFX 引子對，共有四條引子以分別複製出 SRY 及 ZFX，其序列分別為

SRY+：5'-TGTTTCAGAGTATTGAACGACGA-3'

SRY-：5'-AATAAGCACAAGAAAGTCCAGG-3'

ZFX+：5'-ATAATCACATGGAGAGCCACAAGCT-3'

ZFX-：5'-GCACTTCTTTGGTATCTGAGAAAG-T-3'。

引子之合成與純化係委託 Gibco 公司進行。

- (ii) PCR 反應及電泳：分別使用經過純化之不同性別乳牛基因組 DNA 樣品、體外培養之乳牛卵丘細胞及體外培養之牛胚樣品做為性別鑑定之樣品。純化之乳牛基因組 DNA 樣品可直接進行 PCR；而體細胞樣品或胚葉細胞樣品則以無鈣鎂 PBS 清洗 3 次，旋即置入內含 10 μ l 細胞溶解液〔不含 $MgCl_2$ 的 1 \times PCR 緩衝液、含 proteinase 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 56 $^{\circ}C$ 30 分鐘、94 $^{\circ}C$ 15 分鐘，最後將樣品維持在 4 $^{\circ}C$ 。細胞樣品經過細胞溶解液處理後，便於進行 PCR 反應之擴增。完成前處理之細胞樣品，隨即加入 40 μ l 的 PCR 反應液中。PCR 反應液中含有 100 pM 的引子 1 μ l、*Taq* DNA 聚合酶 (Promega, USA) 或具 Hot Start 功能之 DNA 聚合酶〔Roche Boehringer-Mannheim, Germany) 0.5 μ l (5 U/ μ l)、10 \times PCR buffer 5 μ l、2.5 mM dNTP 1 μ l 及 25 mM $MgCl_2$ 5 μ l，PCR 反應總體積為 50 μ l。進行 PCR 的條件：*Taq* DNA 聚合酶最初之 denaturation 為 94 $^{\circ}C$ 3 分鐘；而具 Hot Start 功能之 DNA 聚合酶則經 95 $^{\circ}C$ 5 分鐘 denaturation。後續 PCR 條件則均為 40 次循環的 94 $^{\circ}C$ 30 秒、56 $^{\circ}C$ 30 秒、72 $^{\circ}C$ 30 秒；最後之 extension 為 72 $^{\circ}C$ 8 分鐘；反應完成後維持於 4 $^{\circ}C$ 。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。

結果與討論

近年來，由於分子生物技術的快速發展，使哺乳動物之性染色體特異 DNA 序列的研究增加，輔以 PCR 快速增殖微量 DNA 的技術，使動物著床前胚之性別鑑定可行性大為提升 (Thibier and Nibart, 1995)。整個性別鑑定分析可以在 5-6 小時內完成，因為分析所需時間短且操作較傳統方法簡單，尤其適合田間胚移置操作時性別鑑定之用 (Peura *et al.*, 1991)。

本試驗分別利用純化過之不同性別荷蘭種乳牛之基因組 DNA、體外培養之乳牛卵丘細胞做為性別鑑定分析之樣品。試驗結果顯示，利用 SRY/ZFX 引子分析不同性別之乳牛基因組 DNA 樣品，經過 PCR 反應後得到之產物片段，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。利用 BE5 引子分析，公牛有 489 bp 及 368 bp 兩條 PCR 產物，母牛則僅有 498bp 一條 PCR 產物 (圖 1)。為了探討兩種引子鑑定基因組 DNA 之敏感性，亦進行系列稀釋以進行 PCR，結果性別鑑定敏感度可達到 5 ng。當模板之基因組 DNA 量增加時，PCR 產物量亦隨之增加 (圖 2)。

本試驗亦比較不同的聚合酶種類對性別鑑定效率的影響，使用之聚合酶有兩種，分別為 *Taq* DNA 聚合酶或用於提高 PCR 之特異性與敏感性，於高溫才能啓始聚合作用的 Hot Start DNA 聚合酶，結果發現二種聚合酶在基因組 DNA 樣品皆可獲得專一性且清楚的 PCR 產物，而在相同的模板 DNA 量條件下，使用 Hot Start DNA 聚合酶所獲得之 PCR 主要產物量又較一般 *Taq* DNA 聚合酶者更為清楚 (圖 3)。顯示 Hot Start DNA 聚合酶進行 PCR 時其特異性及敏感性較一般 *Taq* DNA 聚合酶為佳。故 Hot Start DNA 聚合酶常用於改善 PCR 的反應，尤其是應用在待分析樣品模板 DNA 量少或基因套數極少時，效果更為顯著 (Okayama *et al.*, 2004)。

本試驗利用取自母牛卵丘-卵母細胞複合體所培養的卵丘細胞進行測試時，先將卵丘細胞以蛋白酶 K 進行前處理，再分別利用 *Taq* 或 Hot Start 兩種 DNA 聚合酶進行 PCR，結果無論是否經過蛋白酶 K 前處理者均可以獲得 PCR 產物 (圖 4)。惟經過蛋白酶 K 處理者，PCR 產物明顯較未處理者清楚可見，顯示蛋白酶 K 前處理之重要性 (圖 4)，此為利用體細胞樣品進行性別鑑定，提高性別鑑定之敏感度與鑑定率之關鍵步驟。

試驗更進一步利用基因組 DNA 所建立的條件，以 SRY/ZFX 與 BE5 引子測定母牛卵丘細胞之

細胞數對於性別鑑定敏感度及特異性之影響。結果當體細胞樣品數達到 10 個細胞以上，並利用蛋白酶 K 前處理者，可以清楚呈現性別鑑定之 PCR 結果 (圖 5)。在實驗中，待測之卵丘細胞數低於 10 個以下亦可獲得 PCR 結果，然而再現性與鑑定之成功率均低於細胞數較多者 (圖 6)。

在進行性別鑑定時，分析之敏感性及成功率為重要關鍵與考量因素。性別鑑定之進行有別於例行之 PCR 分析，一般的 PCR 大都使用經過純化的 DNA 樣品來進行，成功率與敏感度均高。若直接利用體細胞樣品進行分析，往往會出現模糊 (smear) 現象，導致鑑定結果不理想。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。

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，配合含有蛋白酶的 PCR 反應液進行細胞樣品前處理，反應時間為 56°C 1 小時，而後加溫至 96°C 維持 10 分鐘去除蛋白酶 K 活性，再進行 PCR 反應。結果可以有效的鑑定牛胚之性別。利用蛋白酶 K 進行細胞樣品前處理以便下一步的 PCR 反應，可以使細胞的蛋白質被有效分解而使極微量的基因組 DNA 裸露，做為 PCR 之模板以便進行 Y- 染色體特異序列之擴增。本實驗中利用蛋白酶 K 處理與否雖然都可以獲得性別鑑定的結果，然而有經過蛋白酶 K 處理者，其 PCR 產物之判定是顯而易見的清楚，因此細胞樣品經過蛋白酶 K 處理將可以有效改善牛胚性別鑑定之敏感性。

影響性別鑑定的因子除了 PCR 之外，取得待測胚葉細胞之顯微操作方法 (Shea, 1999) 及選用的引子均有重要的影響。部分研究指出，經過顯微操作或半切後之牛胚，經進行性別鑑定後移置之懷孕率與正常胚相近 (分別為 60%與 61%) (Lopes *et al.*, 2001)。牛胚經過分切或顯微操作並不會影響胚移置後之存活率及懷孕率 (Williams *et al.*, 1984)。使用單一胚葉細胞進行性別鑑定亦獲得高度之準確率，經顯微操作後的牛胚移置後懷孕率與未經顯微操作之對照組沒有差異 (54.1% 與 52.6%) (Gray *et al.*, 1991; Kippax *et al.*, 1991)。

在進行性別鑑定時選用之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，理論上是有 Y 染色體特異片段的樣品即判定為雄性，未有 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 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，例如未將細胞樣品放入分析的 PCR 反應試管中而造成偽陰性的結果。為了減少並避免此種人為失誤，均會加入一組存在於 X 染色體或體染色體上均有的對照用引子，以提高性別鑑定之操作正確 (Zeleny and Schimmel, 2002)。本研究使用的引子共有兩種，SRY/ZFX 組是以複製雄性特有的 SRY/ZFX 基因而判定樣品或細胞之性別，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。另一組引子對為 BE5，該引子對有 3 條引子，其中的 BE5 為公、母均有的共用引子，加上在雄性具有特異性的 Y- 368 引子及雌性特異性 X- 498 引子，若 PCR 分析結果有 489 bp 及 368 bp 兩條 PCR 產物則為雄性，若僅有 498 bp 一條者則判定為雌性。

SRY 基因已知是存在於 Y- 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。在歐盟國家牛肉的進出口貿易額，每年高達數十億歐元之多，而生產高品質的公牛肉可以獲得補貼，為了預防牛肉的摻雜造假並保障消費者的權益與食品安全，亦利用聚合酶連鎖反應進行牛肉的性別鑑定 (Zeleny and Schimmel, 2002)。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 PCR (nested PCR) 而解決性別鑑定後面臨的人為錯誤 (Aasen and Medrano, 1990)。Aasen and Medrano (1990) 進行 PCR 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，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 (probe)，也可供檢測 ZFX/ZFY 進行 PCR 之後的電泳片段。

在 X 與 Y 染色體上基因為純合子的齒釉蛋白 (amelogenin)，是一種參與牙齒琺瑯質發育的蛋白質，也提供不同哺乳動物胚或細胞之性別鑑定之用 (Akane, 1998; Manucci *et al.*, 1994)。人類齒釉蛋白基因亦應用在人類刑事法醫學之鑑定 (Michael and Brauner, 2004)，甚至自經過高溫焚燒過的牙齒中成功鑑定受害者的性別身分 (Williams *et al.*, 2004)。

牛的齒釉蛋白基因存在著第一型與第二型轉錄本 (transcript)，二種轉錄本分別存在於 X 與 Y 染色體上。牛的第二型齒釉蛋白基因的其中一段區域因為刪除之故，所以產生的片段產物較第一型為短。因此，以此做為性別鑑定之引子，獲得之 PCR 產物片段會有差異。Zeleny and Schimmel (2002) 曾利用牛的齒釉蛋白基因進行胚之性別鑑定，在雄性與可得到 280 及 217 bp 之第一與第二型產物，而利用此引子進行性別鑑定時無需另外添加體染色體對照引子。本試驗所應用之 BE5 引子係選殖自牛基因組的齒釉蛋白基因 (Chen *et al.*, 1999)。在 X 與 Y 染色體中的第五個介入子 (intron) 具有 45.1% 的相似性且具多個刪除位置。可提供荷蘭牛之性別鑑定之用而複製出存在於 X 與 Y 染色體上的齒釉蛋白基因，已成功應用在單一牛胚葉細胞之性別鑑定之用，同時其分析步驟亦可供人類或其他家畜偵測遺傳缺陷分析之用。

本試驗結果，利用 SRY/ZFX 或 BE5 引子進行基因組 DNA 及乳牛體細胞之性別鑑定時，當體細胞樣品高於 10 個，必先經過蛋白酶 K 的前處理，在 PCR 時使用 *Taq* 或 Hot Start DNA 聚合酶，可獲得清楚的 PCR 主要產物，是為合適的乳牛體細胞性別鑑定條件。

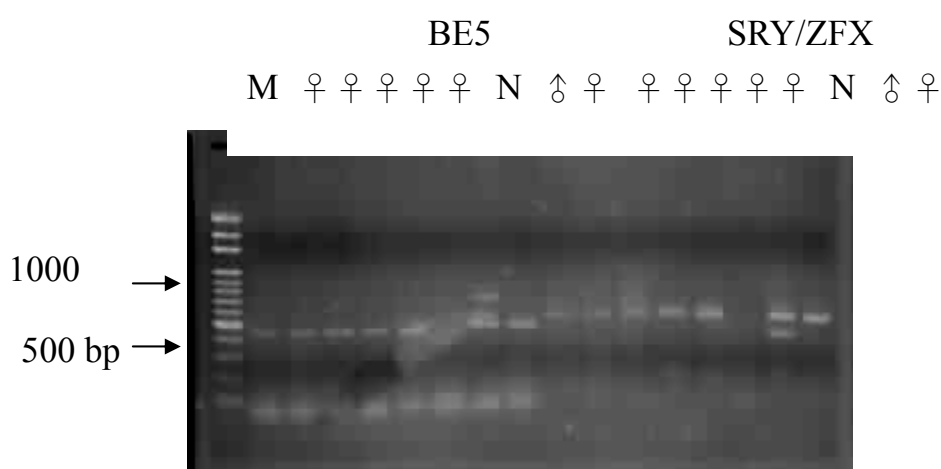


圖 1. 不同性別乳牛基因組 DNA 使用 SRY/ZFX 及 BE5 兩組引子進行 PCR 性別鑑定後之電泳圖。N 為陰性對照。M 為 100 bp 標記。

Fig. 1. The electrophotogram of PCR products amplified from purified bovine genomic DNA with SRY/ZFX and BE5 primers. Lane N: Negative control. Lane M: 100 bp ladder marker.

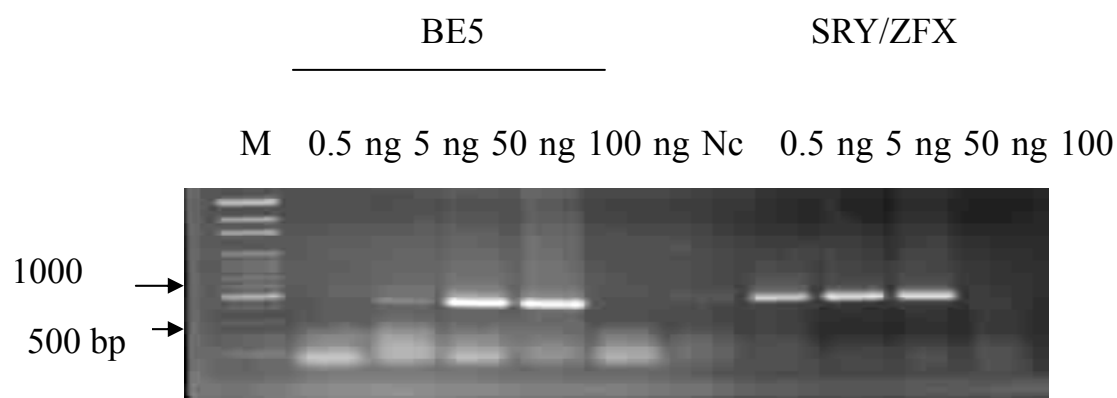


圖 2. 不同濃度之乳牛基因組 DNA 樣品使用 SRY/ZFX 及 BE5 兩組引子進行 PCR 性別鑑定後之電泳圖。乳牛基因組 DNA 模板量為 0.5 ng 至 100 ng。N 為陰性對照。M 為 100 bp 標記。

Fig. 2. The electrophotogram of PCR products amplified from purified bovine genomic DNA of 0.5 ng to 100 ng with SRY/ZFX and BE5 primers. Lane N : Negative control. Lane M : 100 bp ladder marker.

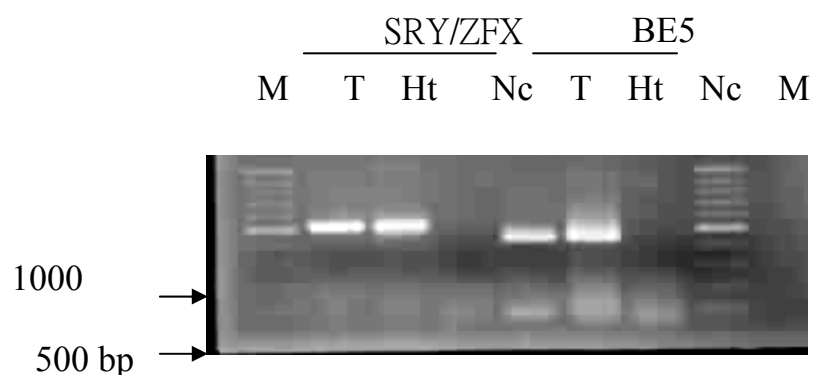


圖 3. 乳牛基因組 DNA 樣品使用 SRY/ZFX 及 BE5 兩組引子並配合 *Taq* 或 Hot start 不同聚合酶進行 PCR 性別鑑定後之電泳圖。T 與 Ht 分別為 *Taq* 或 Hot start 聚合酶。M 為 100 bp 標記。N 為陰性對照。

Fig. 3. The electrophotogram of PCR products amplified from bovine genomic DNA with SRY/ZFX and BE5 primers and using *Taq* and Hot start polymerase, respectively. Lane T : *Taq* polymerase. Lane Ht : Hot start *Taq* polymerase. Lane N : Negative control. Lane M : 100 bp ladder marker.

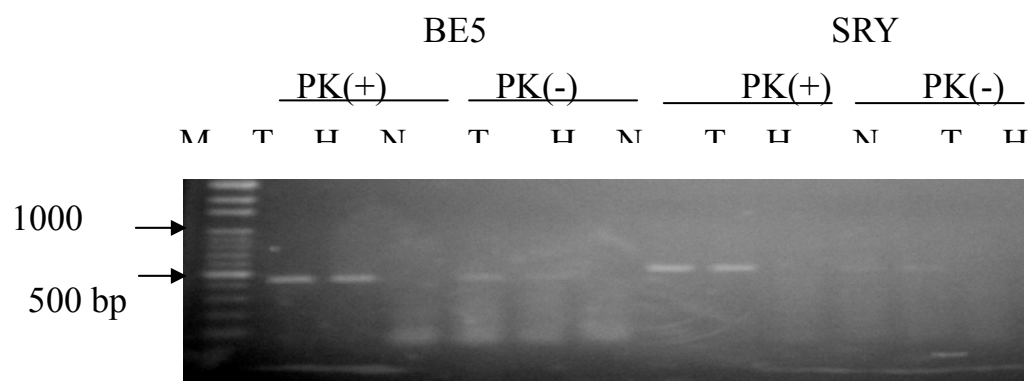


圖 4. 乳牛卵丘細胞經過蛋白酶 K 處理與否進行 PCR 性別鑑定後之電泳圖。PK + 與 PK - 分別為蛋白酶 K 處理與否後進行 PCR 反應。M 為 100 bp 為分子標記。N 為陰性對照。

Fig. 4. The electrophotogram of PCR products of bovine cumulus cells with (PK+) or without (PK-) proteinase K pretreatment and PCR-amplified for 50 cycles using the Hot Start polymerase. Lane T : *Taq* polymerase. Lane Ht : Hot start polymerase. Lane N : Negative control. Lane M : 100 bp ladder marker.

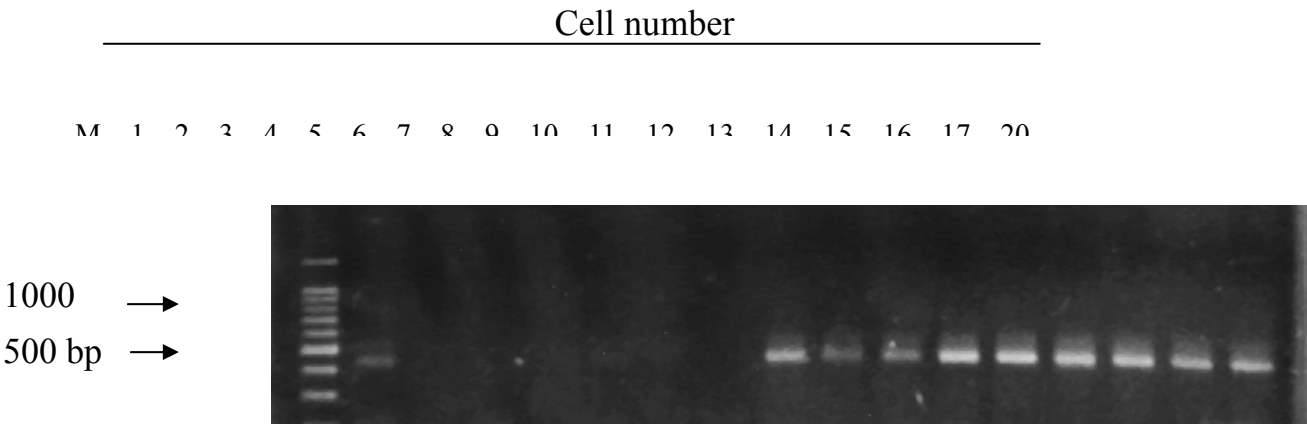


圖 5. 利用 SRY/ZFX 引子測定不同數目的乳牛卵丘細胞進行 PCR 性別鑑定之電泳圖。

Fig. 5. The electrophotogram of PCR products amplified from various number of bovine cumulu cells to test the sensitivity of PCR analysis. M: 100 bp molecular marker. The number above each lane is the number of cells used for amplification.

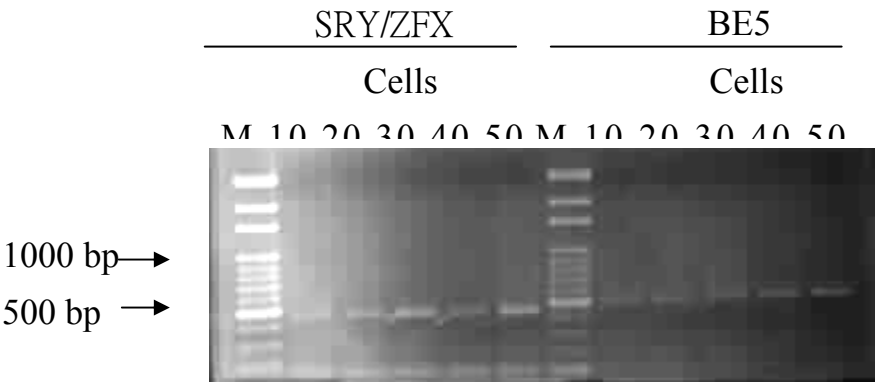


圖 6. 以 SRY/ZFX 與 BE5 引子分析不同數目的乳牛卵丘細胞進行 PCR 性別鑑定之電泳圖。M 為 100 bp 為分子標記。

Fig. 6. The electrophotogram of PCR products amplified from various numbers of bovine cumulus cells with SRY/ZFX or BE5 as primers. M: 100 bp molecular marker.

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.

Akane, A. 1998. Sex determination by PCR analysis of the X-Y amelogenin gene. *Methods in Mol. Cell. Biol.* 98 : 245~249.

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.

Chen, C. M., C. L. Hu, C. H. Wang, C. M. Hung, H. K. Wu, K. B. Choo and W. T. K. Cheng. 1999. Gender determination in single bovine blastomeres by polymerase chain reaction amplification of sex-specific polymorphic fragments in the amelogenin gene. *Mol. Reprod. Dev.* 54 : 209~214.

- 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.
- Gray, K. R., K. R. Bondioli and C. L. Betts. 1991. The commercial application of embryo splitting in beef cattle. *Theriogenology* 35 : 37~44.
- 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.
- Kippax, I. S., W. B. Christie and T. G. Rowan. 1991. Effects of method of splitting, stage of development and presence or absence of zona pellucida on foetal survival in commercial bovine embryo transfer of bisected embryos. *Theriogenology* 35 : 25~35.
- 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. Fert.* 98 : 467~470.
- Manucci, A., K. M. Sullivan, P. L. Ivanov and P. Gill. 1994. Identification of the X-Y homologous gene amelogenin. *Intl. J. Legal Med.* 106 : 190~193.
- Michael, A. and P. Brauner. 2004. Erroneous gender identification by the amelogenin sex test. *J. Forensic Sci.* 49 : 258~259.
- Okayama, N., K. Fujimura, J. Nakamura, Y. Suehiro, Y. Hamanaka and Y. Hinoda. 2004. Evaluation of a new efficient procedure for single-nucleotide polymorphism genotyping: tetra-primer amplification refractory mutation system-polymerase chain reaction. *Clin. Chem. Lab. Med.* 42 : 13~16.
- 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.
- Thibier, M. and M. Nibart. 1995. The sexing of bovine embryos in the field. *Theriogenology* 43 : 71~80.
- 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.
- Williams, D., M. Lewis, T. Franzen, V. Lissett, C. Adams, D. Whittaker, C. Tysoe and R. Butler. 2004. Sex determination by PCR analysis of DNA extracted from incinerated, deciduous teeth. *Sci. Justice* 44 : 89~94.
- Williams, T. J., R. P. Elsdon and G. E. Seidel. 1984. Pregnancy rates with bisected bovine embryos. *Theriogenology* 22 : 521~531.
- 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.

Effects of cell numbers, proteinase K treatment and polymerase on sex determination with SRY/ZFX and BE5 primers ⁽¹⁾

Jen-Wen Shiau⁽²⁾, Yu-Hsin Chen⁽²⁾, Lee-Ching Tsai⁽²⁾, Jenn-Rong Yang⁽²⁾, San-Nan Lee⁽³⁾, Winston Teng-Kuei Cheng⁽⁴⁾, Yow-Ling Shiue⁽⁵⁾ and Lih-Ren Chen^{(2) (6)}

Received : June 30, 2004 ; Accepted : Aug. 19, 2004

Abstract

The purpose of this study was to determine the effects of cell numbers, proteinase K treatment prior to polymerase chain reaction (PCR), and polymerase on the sensitivity and specificity of sex determination by using SRY/ZFX or BE5 as primer. Purified genomic DNA from male and female dairy cattle and in-vitro-cultured cumulus cells were used for the sex determination. The results showed that the sensitivity of sex determination of genomic DNA was 5 ng when Taq or Hot Start polymerase was used in amplification with either SRY/ZFX or BES primers. When the somatic cells were used as samples for determination, treatment with proteinase K and then PCR running with Hot Start DNA polymerase, sexing efficiency would be effectively improved. Ten cells were the minimal numbers required for the successful sexing.

Key words : Bovine embryo, Sex determination, Primer, PCR.

-
- (1) Contribution No. 1244 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.
 - (2) Physiology Division, COA-LRI, Hsinhua, Tainan 712, Taiwan, R.O.C.
 - (3) Deputy Director Office, COA-LRI, Hsinhua, Tainan 712, Taiwan, R.O.C.
 - (4) Department of Animal Sciences, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, R.O.C.
 - (5) Institute of Biomedical Sciences, National Sun Yet-Sen University, Kaohsiung, Taiwan, R.O.C.
 - (6) Corresponding author.