

简报

奶牛 ZFX, ZFY 基因片段的克隆、测序 及 PCR 对奶牛性别鉴定灵敏度研究

徐亚欧 龚荣慈

(西南民族学院畜牧兽医系 成都 610041)

唐榕 毛裕民

(复旦大学遗传所 上海 200433)

奶牛胚胎的性别鉴定是多年来奶牛业研究和探索的问题。尤其在体外授精、胚胎分割冷冻、保存及胚胎移植一系列生物科学高技术发展和应用的今天,这一问题的解决显得更加重要和迫切。用分子杂交的方法也可对胚胎进行早期性别鉴定,但这一方法必须要有大量的样品 DNA,而且所需时间长,并受到实验条件的限制,很难在基层和生产中推广应用。PCR 方法除了有前述特点外,还同时具有所需设备简单,操作方便,易于在生产中推广应用。为此,我们对奶牛的 ZFX 及 ZFY 基因片段进行了克隆、测序,并以此设计出分别对 ZFX 及 ZFY 具特异的引物,以奶牛血液 DNA 为模板进行 PCR 扩增对奶牛性别鉴定灵敏度试验。

1. 引物和方法

1.1 材料和模板 DNA

利用 p₁-5EZ 及 p₂-3EZ 引物^[1]并作部分改变增加了 BamHI 和 XbaI 两个酶切位点构成 ZF₁ 和 ZF₂ 两个引物:

ZF₁: 3'-CCCTCTAGATTACATAATCACATGGAGAGCCACAAG-3'

ZF₂: 5'-CGGGATCCTGCACTTCTTTGGTATCTGAGAAAGT-3'

模板 DNA 用常规方法从黑白花奶牛血液及小牛胸腺中制备。

1.2 载体、菌株及试剂盒

pUC118 作为克隆载体,宿主菌株为 *E. coli* MV1184, 辅助噬菌体 M13K07, FD-DNA 聚合酶、限制酶 BamHI、XbaI、PstI 购自 Promega 公司, 测序试剂盒购自 Pharmacia 公司, DIG 杂交试剂盒购自 Boehringer-Mannheim 公司

1.3 PCR 扩增^[2]

PCR 反应体系总体积 50 μ l, 其中 25mmol/L Tris-HCl, pH8.2; 25mmol/L (NH₄)₂SO₄; 2.0mmol/L MgCl₂; 100 μ g/ml Gelatin; 5% 甲酰胺, 引物 ZF₁ 0.2 μ mol/L, ZF₂ 0.2 μ mol/L, dNTP 200 μ mol/L; 模板 DNA 根据灵敏度而不同。93 $^{\circ}$ C 变性 7 分钟后加入 2u/ml FD-DNA 聚合酶, 液体石蜡约 20 μ l, 反应条件 93 $^{\circ}$ C 变性 45 秒, 60 $^{\circ}$ C 退火 45 秒, 72 $^{\circ}$ C 延伸 60 秒, 共 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 保温 5 分钟。取扩增产物 3 μ l 在 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳, 在透射式紫外检测仪上观察鉴定。余下的产物提纯酶切鉴定。

1.4 扩增产物的克隆

复旦大学遗传工程国家重点实验室资助课题。

本文于 1993 年 3 月 5 日收到。

将公牛及母牛的 PCR 扩增产物提纯后分别定向连接在 pUC118 上。转化至 *E. coli* MV1184, 在含有 Xgel 的 SOB/Amp 平板上培养后随机挑出若干白色单菌落, 再在 LB 液体培养液过夜, 抽出重组质粒, 用 PstI, BamHI 及 XbaI 酶切鉴定重组子, 获得随机来源的 ZFX, ZFY 转化子各两个。

1.5 测序

采用双脱氧顺序测定法^[9]。

1.6 特异性引物的设计

根据测序结果分别在 ZFX 和 ZFY 上找两处差异较大的序列设计引物。

1.7 Nest PCR 扩增体系及条件

反应条件同前, 仅引物改用 ZF₁, ZF₂ 为第一轮扩增引物。ZF₂、ZF₃; ZF₂, ZF₄ 分别为第二轮实验组和内参照组的两对引物。

1.8 转移及杂交

采用常规的 Southern 转移, 利用 DIG 杂交试剂盒进行杂交。

2 结果与讨论

2.1 PCR 扩增产物鉴定

图 1 可见以 ZF₁ 和 ZF₂ 扩增奶牛 DNA 的 PCR 产物雌, 雄牛都无差异均为 468bp, 母牛的 PCR 产物经 PstI 酶切后无变化, 说明扩增段内无 PstI 酶切位点。公牛的 PCR 产物经酶切后则产生 468bp, 356bp 和 112bp 三个片段, 说明公牛的扩增片段内有两个 PstI 酶切位点^[9]。

2.2 重组子鉴定

用 BamHI, XbaI, PstI, 对已克隆的 ZFX 及 ZFY 进行酶切鉴定。凡用 PstI 酶切产生 3294bp 和 356bp 两个片段的为 ZFY。而 PstI 酶切后只有一个 3662bp 片段的为 ZFX。

```

ZFX TTGCATGCC T GCAGGTCGAC TCTAGATTAC ATAATCACAT GGAGAGCCAC -50
ZFY T----- GCAGGTCGAC TCTAGATTAC ATAATCACAT GGAGAGCCAC -40
ZFX AAGCTTACCA GCAAGGCCGA GAAGGCCATT GAATGCGATG ACTGCGGTAA -100
ZFY AAGCTTACCA GCAAGTCAGA GAAGGCCATC GAATGTGATG ACTGTGGCAA _81
ZFX GCATTICTCT CATGCTGGGG CTTTGTTTAC TCATAAAAATG GTGATAAAGG -150
ZFY GCATTICTCC CATGCTGGGG CTTTGTTTAC TCACAAAATG GTGATAAAGG -141
ZFX AAAAAGGAGC TAACAAAATG CACAAAATGA AATTCTGTGA ATACGAGACA -200
ZFY AAAAAGGAGC CAGCAAAAATG CATAAAATGA AATTCTGTGA AT--GAGACA-189
ZFX GCTGAACAAG GGTACTAGAA TCGCCACCTT TTGGCGGTCC ATAGCAAGAA -250
ZFY GCTGAACAAG GGTATTAAA TCGCCACCTT TTGGCAGTCC ACAGCAAGAA -239
ZFX CTTTCCTCAT ATATGCGTGG AGTGTGGTAA --GGTT -284
ZFY CTTTNCCTAT ATATGTGTAG AGTGTGGTAA AGGTTTNCGT CACCNAICAG -289

ZFY AGCTCAAAAA GCACATGCCA GTCAT -313

```

图 2 ZFX 和 ZFY 克隆片段的总 DNA 序列

2.3 克隆片段的序列分析及引物设计

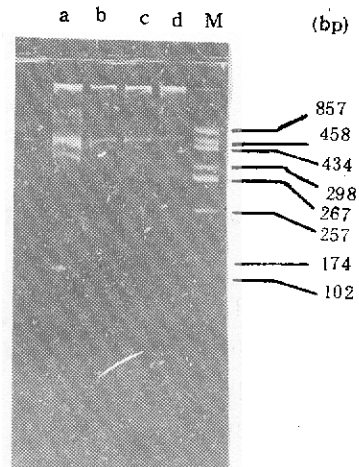


图 1 以 ZF₁ 和 ZF₂ 为引物 PCR 产物限制酶酶切结果
a 和 c 分别为公牛和母牛 PCR 产物用 PstI 酶切片段
b 和 d 分别为公牛和母牛 PCR 产物片段
M 是 pUC19 用 HaeIII 酶切作为对照

利用双脱氧顺序测定法测出 ZFX 281bp 的一个片段和 ZFY 上的一个 313bp 片段。(见图 2)。并分别在该两个片段内设计两条引物 ZF₁ 和 ZF₂。其序列如下：

ZF₁5'-ATCGAATGTGACTGTGGC-3'

ZF₂5'-GAGCTAACAAAATGCACAAATG-3'

2.4 Nest PCR 扩增对奶牛性别鉴定的灵敏度

ZF₁ 和 ZF₂ 作为第一轮扩增公牛和母牛血液 DNA，其模板浓度为 8ng, 800pg, 80pg 和 8pg 四个梯度。第一轮仅有 8ng 和 800pg 的浓度可扩增出一条 468bp 的条带，且公母牛都无差异。用第一轮 PCR 产物各梯度 2μl 作模板，用 ZF₂ 和 ZF₃ 为第一组雄性特异的引物进行第二轮扩增，结果在四个梯度的公牛血液 DNA 扩增中都出现一条 406bp 的条带，见图 3 (a)。用 ZF₂ 和 ZF₁ 为第二组内参照的引物进行第二轮扩增，结果四个梯度不论公母牛均出现一条 326bp 的扩增带，因雌、雄都有一条 ZFX 片段，见图 3 (b)。空白管未出现任何条带，这与我们预期相符。

2.5 杂交检验引物的特异性

用克隆后带有 ZFX 及 ZFY 未经酶切的 pUC118 重组子 (命名为 pUC118X1 和 pUC118Y1) 作 Southern 转移，再用标记过的 ZF₃ 和 ZF₄ 对两张转移膜进行杂交。结果 ZF₃ 只能与 pUC118Y1 杂交形成一特异条带，不能用 pUC118X1 杂交。而 ZF₄ 则只能与 pUC118X1 杂交形成一特异条带。这说明 ZF₃ 特异于 ZFY，而 ZF₄ 特异于 ZFX，见图 4 (图中 C 为重组子开环，d 为环状结构)。

目前用 SRY⁽⁵⁾ 对奶牛胚胎早期性别鉴定已有报道。就其利用 ZFX 及 ZFY 对奶牛进行性别鉴定，其优点在于这两者有较大的同源性。可利用共同的引物先同时对两者扩增。然后利用 ZFX 特异的引物 ZF₁ 作为参照，利用 ZFY 特异的引物 ZF₂ 为雄性特异，从而达到高特异和高灵敏度。而利用 SRY 进行性别鉴定则需要另外的 DNA 片段上设计内参照引物。

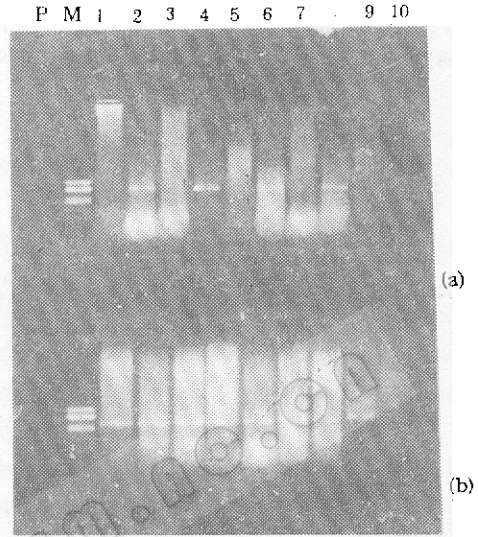


图 3 Nest PCR 扩增结果
a. 以 ZF₂ 和 ZF₃ 为引物作第二轮扩增；b. 以 ZF₂ 和 ZF₁ 作第二轮扩增
1, 3, 5, 7, 9 分别母牛对应于 8ng、800pg、80pg 和 8pg 以及 0.8pg 奶牛 DNA
2, 4, 6, 8, 10 分别为公牛对应于 8ng、800pg、80pg、8pg 以及 0.8pg 奶牛 DNA

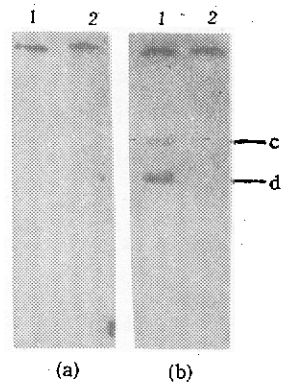


图 4 pUC118X1 和 pUC118Y1 的杂交结果
a. 以 ZF₄ 对 ZFX 及 ZFY 重组子杂交
b. 以 ZF₃ 对 ZFX 及 ZFY 重组子杂交

参 考 文 献

- (1) Eric A and Juan F M. *Bio/Technology*, 1990, 8: 1279—1281.
- (2) Saiki R K *et al.* *Science*. 1985, 230: 1350—1354.
- (3) Sambrook J, Fritsch E F and Manitis T. *Molecular cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbar Laboratory, Cold Spring Harbar. NY 1989.
- (4) Marks P P B *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1990, 87: 1681—1685.
- (5) Terrence R, Tiersch Michael J *et al.* *Hum. Genet.* 1991, 87: 571—573.

The Cloning Sequencing of the ZFY and ZFX Genes Fragments and Sensitivity Studies of Amplification of These Fragments for Sex Identification in Cow by PCR

Xu Yaou Gong Rongci

(*Department of Animal Science, Southwestern Nationalities
College, Chendu 610041*)

Tang Rong Mao Yumin

(*Institute of Genetic, Fudan University, Shanghai 200433*)

Abstract According to the ZFY and ZFX genes in human, a set of primer ZF₁ and ZF₂ was designed. ZFY and ZFX fragments were amplified from cow DNA by PCR. Then ZFX and ZFY fragments were cloned to the pUC118 and sequenced from PCR fragments. According to these sequences, the oligonucleotide primer ZF₃ in specific ZFY and the ZF₄ in specific ZFX were designed. One set of ZFX-specific primers was formed by ZF₂ and ZF₄. Other set of ZFY-specific primers was formed by ZF₁ and ZF₃. Nevertheless, the ZF₃ and ZF₄ can be used for allele-specific oligonucleotide probes (ASO). We used the two set specific primers or ASO to identify the sex of cow and the sensitivity reached 8pg DNA levels (correspond to the DNA of one cell).

Key words Cow, sex identification