

# PCR 技术在胚胎性别鉴定中的应用<sup>\*</sup>

袁 野<sup>1</sup>, 丁 鏊<sup>1</sup>, 刘 娣<sup>2</sup>

(1. 东北农业大学动物科技学院, 哈尔滨 150030; 2. 黑龙江省农科院, 哈尔滨 150086)

**摘要:** 家畜早期胚胎性别鉴定对畜牧业生产具有重要的现实意义。本文扼要介绍了胚胎分割技术和采用 PCR 技术鉴别牛、羊等家畜胚胎性别的操作程序, 对影响该技术雌雄判定率的因素进行了综合分析。对这种方法的研究现状、各种技术细节的主要优缺点和发展前景进行了系统介绍。

**关键词:** 性别鉴定; 胚胎; PCR

中图分类号: S 814.7 文献标识码: A 文章编号: 1002-2767(2005)02-0035-04

## The principle, Progress and Application of PCR Method on Embryos Sex Identification

YUAN Ye<sup>1</sup>, DING Juan<sup>1</sup>, LIU Di<sup>2</sup>

(1. College of Animal Science and Technology of Northeast Agricultural University, Harbin 150030; 2. Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086)

**Abstract:** Identification of livestock embryo sex is a significant factor to livestock production. This article summarized the technology of dividing embryos and the operation specification of PCR method for sex identification of cattle, sheep and other livestock embryos. It analyzed the factors which affect sex identification rate. It also introduced the method progress, technic details, advantage and disadvantage.

**Key words:** sex identification; embryos; PCR

人为控制家畜性别一直是人们追求的目标, 特别是对于有经济价值的家畜, 如牛、山羊等。对早期胚胎尤其是附植前胚胎进行性别鉴定, 再进行移植, 在畜牧生产中具有重要的科学研究价值和商业价值。鉴定胚胎性别的方法主要有: 细胞遗传学分析、X 染色体关联酶活性的测定、胚胎发育率差异性分析、雄性特异性抗原的探测以及 Y 染色体特异性 DNA 探针的应用。虽然使用流式细胞分类仪已成功分离了 X、Y 精子, 但成本高, 分离效率低, 一时还很难在实际生产中推广。胚胎移植技术的广泛应用为控制家畜子代性别创造了另一条新途径。如果一个胚胎在移植之前能够确定性别, 移植那些理想性别的胚胎, 就可以达到控制目的。随着胚胎移植技术的产业化推广, 早期胚胎的性别鉴定技术日益发展成熟, 成为目前最有实用价值的一项性别控制技

术。80 年代后期, PCR 技术应用于胚胎性别鉴定, 为控制家畜性别提供了一条实用价值较高的技术手段。

### 1 牛羊胚胎性别鉴定的发展史

牛早期胚胎的性别鉴定已有十几年的发展历史, 从早期的免疫学方法到胚胎细胞的染色体核型分析, 取得了巨大的发展, 但真正进入实用化阶段是 PCR 技术在牛早期胚胎性别鉴定中的应用。Herr 等<sup>[1]</sup>首先成功应用 PCR 技术鉴定牛羊胚胎性别。曾溢滔等<sup>[2]</sup>通过对牛 *SRY* 基因片段的直接测序, 设计了牛 *SRY* 基因引物, 对牛早期胚胎进行了性别鉴定研究。

由于奶牛和山羊的 *SRY* 基因核心序列的同源性高达 98%<sup>[2, 3]</sup>, 所以 20 世纪 90 年代初, 在阐明奶牛

\* 收稿日期: 2005-01-10

基金项目: 黑龙江省农业委员会农业新技术推广资助项目

第一作者简介: 袁野(1980-), 男, 哈尔滨市人, 现东北农业大学动物遗传育种与繁殖专业硕士研究生, 从事分子遗传学研究。刘娣为通讯作者, Tel: 0451-86677458

和山羊性别决定基因 *SRY* 核心序列的基础上,首次提出并应用 PCR 扩增奶牛和山羊胚胎的 *SRY* 基因序列来鉴定胚胎性别获得成功,随后进一步开展了对冷冻胚胎的性别鉴定和移植的研究<sup>[4]</sup>。

黄淑娟等<sup>[5]</sup>通过奶牛和山羊的卵母细胞体外成熟和体外受精技术,可在实验室容易地获得质量较高的胚胎,然后通过显微操作技术,采集少许细胞进行 PCR 扩增性别决定基因 *SRY* 的特异序列,便能快速灵敏地鉴定胚胎的性别。特别要指出的是,用于性别鉴定的胚胎是含有外源基因的转基因胚胎,因此,试管牛和试管羊胚胎性别鉴定技术为转基因家畜的研究和发展提供了一种可行的技术手段。

用 PCR 方法鉴定家畜胚胎的性别其主要程序为:①胚胎的获取:冷冻胚胎、刚从供体家畜回收的鲜胚或体外受精培养的胚胎都可以用来鉴定性别;②引物的设计:根据 Y 染色体上的性别决定基因或特异性片段设计引物,同时设计一对公母畜共有基因引物作为内对照,避免假阴性的发生;③用显微操作仪或徒手从胚胎中取出几个细胞处理后进行 PCR 扩增;④电泳检测:能同时扩增出 Y-染色体上相应片段和公母畜共有基因片段的胚胎即为雄性胚胎,而只能扩增出公母畜共有基因片段的胚胎即为雌性胚胎。

## 2 胚胎细胞取样技术

胚胎性别鉴定是否能成功不只取决于鉴定方法,更重要的是如何获得用于鉴定的胚胎样品,只有熟练地进行胚胎分割,才有可能使切割后的胚胎成活并用于胚胎移植,否则一切鉴定都失去了意义。

### 2.1 分割胚胎

为了获取胚胎细胞进行 PCR 鉴定,需要进行胚胎分割。当然也可以不进行胚胎分割,用针吸出胚胎细胞,例如下文中的第五种方法。但是使用分割方法获取胚胎比较简便常用。常见的胚胎分割方法有以下几种<sup>[6]</sup>,具体的选择要根据试验要求和不同实验室的技术背景。

2.1.1 毛细管吹吸法 这种方法主要适用于分离 2~8 个细胞期卵裂球。在显微操作仪的帮助下,在无钙、镁离子的培养液中,用固定针吸住胚胎,用另一玻璃针挑开胚胎的透明带,细胞团自透明带中脱出。再用仅能通过胚胎的毛细管吹吸胚胎,得到单个卵裂球,再将卵裂球装入空的透明带中,体外培养至一定时期,移植入受体中。

2.1.2 显微手术法 这种方法主要适用于分割桑椹胚和囊胚。在显微操作仪的帮助下,以固定针吸

住胚胎,用玻璃针或显微手术刀将胚胎对称切割。在切割桑椹胚时,需要在不含钙、镁离子的培养液中,以降低细胞间的连接,降低由于切割造成的损伤。对胚胎的分割要注意对称,尤其是囊胚,要注意将内细胞团对称地一分为二。

2.1.3 徒手分割法 徒手分割法主要适用于分割体积较大的胚胎,其优势在于可以不用显微操作仪。在实体显微镜下,用止血钳夹住切割刀片,将透明带切开一部分,再用直径略小于胚胎的毛细管吹吸几次,胚胎从透明带中脱出。手持玻璃针自上而下对称切割裸胚。这种方法多用于分割桑椹胚和囊胚。也可使用玻璃针直接将透明带连同细胞一起切开。

2.1.4 免疫手术法 免疫手术法是利用处于囊胚期的胚胎其滋养层细胞之间已形成紧密连接,能阻挡外部抗体分子进入囊胚腔。其方法是:将胚胎置于抗血清中,使滋养层细胞与抗体分子充分结合,然后在补体的协助下,利用免疫反应,溶解外层的滋养层细胞,而未结合抗体分子的内细胞团则保持完整。这样分离的内细胞团可以用来进行 PCR 鉴定。

2.1.5 酸性溶液溶解透明带法 这是李晓红等人<sup>[7]</sup>在实验中使用的方法。胚胎在受精后第 3 天(4~8 个细胞期)进行性别鉴定。准备好显微操作的培养皿后,将接受鉴定的卵裂期胚胎加入微滴中,然后将显微操作皿转送 37℃ 恒温的显微操作仪平台上,用显微固定针固定胚胎,用酸性的 Tyrodes 液在透明带上烧灼形成大小约 25  $\mu\text{m}$  裂孔,然后以内径约 20  $\mu\text{m}$  的微穿刺针吸出单个卵裂球,将吸出的卵裂球移到 Ep 管中,置 -20℃ 冷藏待用。这种方法可以保留比较完整的透明带。

### 2.2 胚胎的分割时期与取样细胞数

在实际生产过程中一般都使用晚期桑椹胚或囊胚。牛胚胎发育到 16 个细胞期逐渐致密化,细胞间由点状接触变为紧密镶嵌,接触面过大,产生了紧密连接和间隙连接,彼此之间的界限不清晰,不易分开。大量试验证明,随着取样细胞数目增多,移植成功率降低。细胞数量少一些理论上是可行的,但却需要增加扩增周期,延长测定时间。另外,取样细胞数量过少还会产生污染问题,采胚细胞时如采到粘在胚胎上的精子,空气中的污染、培养液中的 BSA 及操作污染都可能成为污染源,导致错判。所以取样细胞数一般不应少于 5 个。如果是囊胚,取样时尽量不要切割到胚胎的内细胞团,否则会使细胞发育能力降低。

为了不影响结果判定的准确率,而且不至于使

分割成功率和发育率过低。用 5~10 个细胞胚胎进行分割效果比较好。

### 2.3 胚胎切割液

根据 Herr C. M 等<sup>[1]</sup>报道, 胚胎切割液用的牛血清和 BSA 等都会对试验结果产生影响。在胚胎性别鉴定中, 如果胚胎切割液中含有外源犊牛血清, 由于 PCR 极为灵敏, 有可能将血清中的 DNA 也作为模板扩增, 所以会对试验结果产生影响。为了避免错误扩增而产生假阳性, 影响结果判定, 切割液中不需要添加犊牛血清, 只用加有 12.5% 蔗糖的 PBS 即可。用含有蔗糖的 PBS 是为了加大摩擦, 减少胚胎在分割进程中的滑动性, 而且由于外界渗透压增大, 可以使细胞中的液体减少, 防止细胞破裂。

另外在胚胎切割取样过程中为了尽可能的避免样品间的交叉污染, 在每切割完一个胚胎后, 都用 PBS 涮洗切割针, 而且用口吸管吸取切割下的细胞后都需要反复清洗。

### 2.4 透明带的有无

哺乳动物卵透明带(Zona pellucid, ZP)是包绕生长卵母细胞、排除卵子和分裂胚胎的一层半透明丝状酸性糖蛋白基质。所有哺乳动物卵母细胞的外围都为透明带所包裹, 直到囊胚后期才消失。透明带是胚胎的重要组成部分, 在精卵识别、结合和穿透的过程中以及阻止多精入卵和保护着床前胚胎方面都起着至关重要的作用, 是微生物和病毒的屏障, 透明带作为卵膜结构保持了胚胎的完整性。有可能还参与了滋养层细胞的物质转运。

而哺乳动物早期胚胎显微切割一般在晚期桑椹胚或囊胚期进行, 此时透明带还未溶解消失, 这就使原本具有保护作用的透明带成为显微操作的障碍。另外由于牛的胚胎透明带非常厚而且有韧性, 不利于切割, 所以, 是否需要保留透明带和在胚胎分割过程中如何选择切割方法就有了很大联系。

透明带是否需要保留的问题, 一直引起人们的注意。一些试验证明, 桑椹胚和囊胚移植时, 牛胚有无透明带对妊娠率没有影响。高建明等<sup>[9]</sup>的试验数据显示, 透明带的存留和脱失对胚胎发育能力的影响是不明显的, 也就是说透明带不是胚胎取样后影响发育能力的主要因素, 而主要因素是取样细胞的多少和胚胎在体外操作中停留时间长短的影响。但 Sotomaru 等<sup>[10]</sup>曾发现, 有透明带的分割胚比无透明带的分割胚对冻-融有更高的抵抗力。

综上所述, 如果切割后需要冷冻保存就需要保留透明带, 切割方法要使用对透明带损伤较小的, 如

毛细管吹吸法和酸性溶液溶解透明带法。鲜胚直接移植就不需要保留透明带, 切割方法可以使用显微手术法和徒手分割法。

## 3 PCR 鉴定技术的探讨

### 3.1 胚胎细胞 DNA 的提取

除引物的特异性之外, 微量胚胎细胞 DNA 的提取是另一个关键, 它关系到 DNA 反应的成败。试验所使用的煮沸法和冻融法都可用于胚胎细胞样品 DNA 的提取。(1)煮沸法: 在体视显微镜下, 取适当数量的胚胎放入离心管中加入 10  $\mu$ L 无菌超纯水, 在 100  $^{\circ}$ C 煮沸 10~15 min, 然后立即置于冰上, 冷却后离心 10 min, 取上清液用于 PCR; (2)反复冻融法: 在体视显微镜下, 取适当数量的胚胎放入离心管中加入 6~7  $\mu$ L 无菌超纯水, 在液氮中冷冻后, 取出立即解冻, 反复冻融几次, 然后直接用于 PCR 扩增。这两种方法和传统的 DNA 提取方法相比操作简便、用时短, 适合在牛羊胚胎性别鉴定中使用<sup>[8]</sup>。

还有另一种方法, 每次鉴定时取胚胎细胞放入 DNA 提取液中, 室温下放置 5 min。

### 3.2 常规 PCR 与巢式 PCR

目前常用的牛胚胎性别鉴定的 PCR 方法主要有两种: 一种为常规 PCR, 即用一对 Y 染色体特异性引物或同时使用一对公、母牛共有基因引物作为内标引物对胚胎样品进行一次 PCR 扩增来鉴定胚胎性别<sup>[13~14]</sup>。另一种为巢式 PCR<sup>[5]</sup>, 即先用 Y 染色体特异基因的外引物和内参照引物进行第一次扩增, 然后取第一次扩增产物再加入内引物和内参照引物进行第二次扩增。巢式 PCR 的使用降低了扩增多个靶位点的可能性, 因为同两套引物都互补的靶序列很少。而使用同样的引物对进行总数相同的循环(30~40 次)会扩增非特异性靶位点。

在胚胎性别鉴定所用的 PCR 方法中, 虽然可以减少性别鉴定所需要的时间, 但由于胚胎性别鉴定时切割取样的细胞数少, 一次扩增灵敏度有限, 所以容易产生在紫外灯下看不到扩增带或扩增带亮度不够而对鉴定结果产生误判的现象, 如果采用巢式 PCR, 由于经过两次扩增, 扩增产物的量增加, 结果更容易判断, 而且巢式引物的使用增加了扩增产物的特异性, 提高了准确度。肖海霞等<sup>[15]</sup>通过常规双重 PCR 法和巢式 PCR 法的比较研究, 结果表明巢式 PCR 法大大提高了鉴定牛早期胚胎性别的灵敏度。

### 3.3 扩增引物的选择

目前报道的应用于牛胚胎性别鉴定的引物主要有 Y 染色体重复序列引物<sup>[13]</sup>, ZFY/ZFX 基因引

物<sup>[16]</sup>和 *SRY* 基因核心序列 HMG 保守区引物<sup>[17]</sup>。

由于扩增效率以及诸多因素影响,在检测中使用参照物十分重要,采用内参照技术可以有效避免假阴性,因此,原先用于定量检测的内参照技术同样有必要运用于定性检测中。所以除了在 Y 染色体设计引物外,很多人还在常染色体上设计引物作为内参照,大多是一些容易设计及检测的管家基因。

本人分别用羊 Y 染色体上的 *SRY* 基因及位于常染色体上的 *GAPDH* 基因设计引物,取得了较好的效果。

### 3.4 缓冲液与循环次数

缓冲液中  $Mg^{2+}$  对 PCR 性别鉴定结果的影响:不同的  $Mg^{2+}$  浓度对扩增牛常染色体特异的 DNA 片段的影响不是太大,而对于扩增雄性特异的 *SRY* 片段则有较明显的影响,在较低浓度时均无产物形成,只有在较高浓度时才有扩增。但是浓度太高又会产生杂带,经反复摸索,  $Mg^{2+}$  终浓度为 1.2 mM 效果较好。循环次数对结果的影响:分别以 25、35、50 次 3 种不同的循环次数进行 PCR 扩增,结果基本一致,但 50 次时,凝胶电泳时背景不太清晰,虽不影响结果判定,但时间长,故认为选择 35 次左右较合适<sup>[18]</sup>。但本人经过试验证明,经过 30 次循环即可取得较好的效果,更加节省时间。

## 4 PCR 性别鉴定前景与展望

胚胎性别鉴定程序仍很复杂,使养牛生产者和胚胎操作者一筹莫展。当发展的技术有效时,最现实的问题就是成本分析。人们之所以重视胚胎性别鉴定,主要是从经济角度去考虑,由于移植理想性别的胚胎时,可以节约受体母畜,减少维持费用,并且理想性别的每个子代都有很高的价值,所以此技术发展前景非常广阔。虽然此技术理论上可以应用于所有哺乳动物,但实际生产中为了追求最大的经济效益,研究者们通常把目光放在经济价值高、繁殖周期长的大家畜上,其它小动物一般不考虑。

利用 PCR 扩增牛的 *SRY* 基因进行胚胎的性别鉴定,其准确率达到 98% 以上,是目前为止最为理想的胚胎性别鉴定方法。但是由于胚胎切割给胚胎造成了损伤,必然影响其受胎率。目前采用 PCR 法在实践中生产理想性别牛存在的关键问题是受胎率低。据 1996 年度日本全国实施的 732 例新鲜胚性别判定试验,除 150 例未行妊娠鉴别外,胚胎鉴别后雌、雄牛受胎率分别为 32.8% 和 29.2%。冷冻胚受胎率更低<sup>[19]</sup>。我国切割鲜胚的移植受胎率平均在 25% 左右,切割冻胚移植受胎率的实验室数据为

21% ~ 25%<sup>[20]</sup>。

现在日本荣研化学株式会社已经研制出 Loopamp 牛胚胎性别鉴定试剂盒,运用新的基因扩增技术 LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification) 法,分别使用不同的引物,对牛胚细胞中的雄性特异性核酸序列和雌雄共有核酸序列进行扩增反应,通过检测有无扩增反应来鉴定牛胚胎细胞的性别。有无扩增反应是通过检测反应过程中获得的副产品焦磷酸镁所形成的白色沉淀的混浊度来判定。它的特点是有很高的特异性,它采用雄性特异性以及雌雄共有引物,因此可以最大限度地排除误判。只需一台 Loopamp 终点浊度仪,就能完成扩增、检出、判定整个过程,不需要操作繁琐的电泳仪。但是据了解,一台浊度仪需要 7 ~ 8 万元,每个试剂盒能作 24 次,每次需要 230 元左右,一个试剂盒价格在 5 000 元以上。所以此试剂盒虽然鉴定速度快,但是由于价格昂贵,在我国并不能很好的普及。

芬兰农业研究所的 P. Bredbacka 等<sup>[21]</sup>发明了一种技术,利用该技术可以免去电泳步骤,将扩增后的微量离心管置于紫外光下直接观察就可以鉴定出牛胚胎的性别,并可降低残留物对扩增结果的影响。该鉴定方法所用的胚胎样可以在无显微操作仪的条件下,徒手切取胚胎获得。利用该方法可以较快地清洗显微工具,并进一步减少鉴别所需时间。

作为一种理想的胚胎性别鉴定方法,最好是鉴定的准确率达到 100%,胚胎移植的成功率有所提高。目前,应进一步重点研究两个关键技术环节,即简易、快速、对胚胎损伤较小的切割取样技术和成本低廉、易于推广、便于在现场操作的胚胎性别鉴定试剂盒。该技术必将进入实用化和生产化阶段,给畜牧业生产带来巨大的经济效益。

### 参考文献:

- [1] Herr C M, Reed K C. Micromanipulation of bovine embryos for sex determination [J]. Theriogenology, 1991, 35(1): 45-54.
- [2] 曾溢滔, 任兆瑞, 胡明信, 等. 应用 PCR 扩增牛 *SRY* 序列进行奶牛胚胎性别鉴定[J]. 中国科学(B), 1993, 23(4): 371-375.
- [3] 陈美珏, 黄英, 叶进培, 等. 应用 PCR 扩增 Y 染色体性别决定区序列鉴定山羊胚胎性别[J]. 上海实验动物科学, 1996, 16(1): 5-7.
- [4] 胡明信, 吴学清, 曾溢滔, 等. 牛胚胎性别鉴定与取样胚胎移植应用技术研究[J]. 畜牧兽医学报, 1995, 26(6): 487-495.
- [5] 黄淑帆, 陈美珏, 黄瑛, 等. 试管牛和试管羊胚胎性别的鉴定[J]. 遗传, 2000, 22(2): 65-68.
- [6] 毕春明, 陈大元. 哺乳动物胚胎分割研究进展及应用前景[J]. 生理科学进展, 2002, 33(3): 205-208.
- [7] 李晓红, 庄广伦, 李满. 单细胞 PCR 对种植前胚胎的性别鉴定

# 农业生态系统中害虫与天敌群落 多样性与稳定性研究<sup>\*</sup>

宋新元, 张广学

(沈阳师范大学, 沈阳 110034)

**摘要:** 随着害虫防治策略的不断改进, 群落生态学中的许多基本概念被越来越多的应用到农业害虫防治系统中。本文简明、准确的阐述了群落生态学在进行有害生物综合治理中的重要作用以及群落物种多样性和群落复杂性与稳定性之间的关系等问题。

**关键词:** 群落生态学; 群落物种多样性; 群落稳定性

中图分类号: S 181 文献标识码: A 文章编号: 1002 - 2767(2005)02 - 0039 - 02

## The Community Ecology of Insect Pests and Their Natural Enemies in Agricultural Ecosystem

SONG Xin yuan, ZHANG Guang xue

(Shenyang Normal University, Shenyang 110034)

**Abstract:** With the development of pest control strategies, more and more concepts from community ecology are applied to the system of preventing agricultural pests. The essay through the simple and accuracy words state that community ecology has played an important role in the integrated pest management. Furthermore, there is hot topic, that is the problems about community diversity and the relationship between the community complexity and stability.

**Key words:** community ecology; community diversity; community stability

\* 收稿日期: 2004 - 09 - 21

第一作者简介: 宋新元(1980 - ), 男, 辽宁兴城人, 硕士, 从事农业病虫害综合防治研究。张广学为通讯作者, Tel: 024 - 86574969; E-mail: tianshui1999@sohu.com.

- [J]. 中山医科大学学报, 1998, 19(1): 11-13.
- [8] 陈从英, 黄路生, 陈静波, 等. 牛早期胚胎性别鉴定 PCR 反应体系的优化研究[J]. 畜牧兽医学报, 2003, 34(3): 209-212.
- [9] 高建明, 吴学清. 小鼠胚胎切割取样后体外培养发育能力的研究[J]. 北京农学院学报, 1994, 9(2): 98-104.
- [10] Sotomaru Y, Kato Y, Tsunoda Y. Production of monozygotic twins after freezing and thawing of bisected mouse embryos[J]. Cryobiology, 1998, 37: 139-145.
- [11] 杨建明, 朱苏玲, 武立红, 等. PCR 方法用于奶牛早期胚胎的性别鉴定[J]. 遗传, 1995, 17(2): 14-16.
- [12] 欧阳红生. 用 PCR 鉴别牛胚胎性别的研究[J]. 中国兽医学报, 1995, 15(2): 112-155.
- [13] Machaty Z, Paldi A, Csaki T, et al. Biopsy and sex determination by PCR of IVF bovine embryos[J]. Journal of Reproduction and Fertility, 1993, 98: 467-470.
- [14] Chrenck B, Boulanger L, Heyman Y, et al. Sexing and multiple genotype analysis from a single cell of bovine embryo[J]. Theriogenology, 2001, 55: 1071-1081.
- [15] 肖海霞, 陈从英, 陈静波, 等. 应用 PCR 技术鉴定牛早期胚胎性别方法优化的研究[J]. 云南畜牧兽医, 2002, (4): 1-2.
- [16] Appa Rao K B C, Totey S M. Cloning and sequencing of buffalo male-specific repetitive DNA: sexing of in vitro developed buffalo embryos using multiplex and nested polymerase chain reaction[J]. Theriogenology, 1999, 51: 785-797.
- [17] Aasen E, Medrano J F. Amplification of the ZFY and ZFX genes for sex identification in humans, cattle, sheep and goats[J]. Biotechnology, 1990, 8: 1279-1281.
- [18] 吕碧文, 俞颂东, 金水仙. 牛胚胎性别鉴定的 PCR 方法研究[J]. 武汉大学学报(自然科学版), 1999, 45(2): 211-214.
- [19] 任克良, 梁全忠, 毛杨毅. PCR 法鉴别牛胚胎性别技术研究[J]. 山西农业科学, 2000, 28(2): 3-6.
- [20] 魏雅萍. 家畜胚胎早期性别鉴定的方法[J]. 青海畜牧兽医杂志, 2003, 33(1): 41-42.
- [21] 李建栋. 牛胚胎性别简易鉴别方法[J]. 黑龙江畜牧科技, 1998, (2): 46-47.