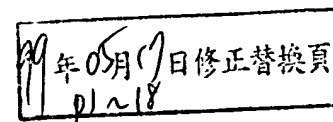


發明專利說明書



(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：96135735

※ 申請日期：96.09.26

※IPC 分類：C12Q 1/68 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

鑑定鷹類性別的方法與用於鑑別鷹類性別的序列

Method for eagles gender identification and sequence for eagles gender identification

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

高雄醫學大學/KAOHSIUNG MEDICAL UNIVERSITY

代表人：(中文/英文) 余幸司/Yu, Hsin-Su

住居所或營業所地址：(中文/英文)

高雄市三民區十全一路 100 號

Kaohsiung Medical University, 100 Shih-Chuan 1st Road, San Ming District, Kaohsiung City 807, Taiwan

國 籍：(中文/英文) 中華民國/TW

三、發明人：(共 5 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 張學偉/Hsueh-Wei CHANG

2. 程建中/Chien-Chung CHENG

3. 谷德倫/De-Luen GU

4. 鄭淳安/Chun-An CHENG

5. 溫政浩/Cheng-Hao WEN

國 籍：(中文/英文)

中華民國/TW

四、聲明事項：

- ☒ 主張專利法第二十二條第二項 ☒ 第一款或 ☐ 第二款規定之事實，其事實發生日期為：96 年 8 月 31 日。

相關網址：

序列辨識號 1 DQ885238 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nuccore&id=118566367>

序列辨識號 2 DQ885237 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nuccore&id=118566365>

- ☐ 申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

- ☐ 有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

- ☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

- ☐ 主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

- ☐ 主張專利法第三十條生物材料：

- ☐ 須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

- ☐ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

五、中文發明摘要：

一種鑑定鷹類性別的方法，包括：在序列辨識號：3 之序列範圍內設計一第一引子；在序列辨識號：4 之序列範圍內設計一第二引子；提供一鷹類之一 DNA；將該 DNA 以該第一引子與 P2 引子之引子對以及該第二引子與 P2 引子之引子對進行聚合酶鏈反應；以及對該聚合酶鏈反應進行電泳結果判定，出現兩個條帶者為雌性，只出現一個條帶者為雄性。

六、英文發明摘要：

A Method for eagles gender identification includes designing a first primer within the region of SEQ ID NO: 3, designing a second primer within the region of SEQ ID NO: 4, providing a DNA of an eagle, performing a polymerase chain reaction with the DNA and the first primer/P2 primer and the second primer/P2 primer; and determining gender by electrophoresis, with the result showing two bands being female while one band being male.

七、指定代表圖：

- (一)本案指定代表圖為：第 4a 圖。
- (二)本代表圖之元件符號簡單說明：無。

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：無。

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於鳥類之性別鑑定，且特別關於鷹類之分子性別鑑定技術。

【先前技術】

全世界約有 60% 的鳥類為性別單型性 (sexually monomorphic)，而此種鳥類無明顯之外部性徵，不易由其外觀來分辨其性別。

目前以性別專一聚合酶鏈反應 (polymerase chain reaction, PCR) 來鑑別性別單型性鳥類之性別。一般性別專一聚合酶鏈反應是根據性染色體上之染色體解旋酶 DNA 鍵結蛋白 *CHD* (Chromo-Helicase-DNA binding protein) 基因長度的不同，利用通用的 *CHD* 引子對 P2/P8 引子 (Griffiths, et al, 1998) 進行聚合酶鏈反應，並進行電泳，將 *CHD-W* 與 *CHD-Z* 基因的聚合酶鏈反應產物分離。*CHD-W* 基因位於 W 染色體上，因此專一於雌性，而 *CHD-Z* 基因位於 Z 染色體上因此為雌雄共有 (雌性之性染色體對為 ZW；雄性之性染色體對為 ZZ)。

然而鷹類之性別鑑定不適用於此方法，因為以此方法所得之 *CHD-W* 與 *CHD-Z* 基因的聚合酶鏈反應產物兩者長度太相近，長度差太小 (約 2~13-b.p.)，無法分離，所以必須將聚合酶鏈反應產物進行核酸定序或者其他後續步驟，造成無法快速性別鑑定的問題，且大量進行性別鑑定篩選時也不易進行，因此本發明提供一種鷹類專用之高通量與快速分子性別鑑定之方法。

【發明內容】

本發明提供一種鑑定鷹類性別的方法，包括：在序列辨識號：3 之序列範圍內設計一第一引子；在序列辨識號：4 之序列範圍內設計一第二引子；提供一鷹類之一 DNA；將該 DNA 以該第一引子與 P2 引子之引子對以及該第二引子與 P2 引子之引子對進行聚合酶鏈反應；以及對該聚合酶鏈反應進行電泳結果判定，出現兩個條帶者為雌性，只出現一個條帶者為雄性。

本發明另提供一種鑑定鷹類性別的方法，包括：在序列辨識號：3 之序列範圍內設計一第一引子；在序列辨識號：4 之序列範圍內設計一第二引子；提供一鷹類之一 DNA；將該 DNA 以該第一引子與 P2 引子之引子對以及該第二引子與 P2 引子之引子對進行聚合酶鏈反應；以及對該聚合酶鏈反應進行產物熔點曲線分析，出現兩個波峰者為雌性，只出現一個波峰者為雄性。

本發明又提供一種用於鑑別鷹類性別的序列，包括序列辨識號：3 與序列辨識號：4。

本發明還提供一種台灣大冠鷲(*Spilornis cheela hoya*)之 Z 染色體上之染色體解旋酶 DNA 鍵結蛋白基因序列，其包括序列辨識號：1 之序列。

本發明也提供一種台灣大冠鷲之 W 染色體上之染色體解旋酶 DNA 鍵結蛋白基因序列，其包括序列辨識號：2 之序列。

為了讓本發明之上述和其他目的、特徵、和優點能更明顯易懂，下文特舉較佳實施例，並配合所附圖示，作詳

細說明如下：

【實施方式】

本發明先以 P2(5'-TCTGCATCGCTAAATCCTTT-3') (序列辨識號：7) /P8(5'-CTCCCAAGGATGAGRAAYTG-3') (序列辨識號：8) 引子(Griffiths, *et al*, 1998)對台灣大冠鷲(*Spilornis cheela hoya*)的 DNA 進行聚合酶鏈反應，並將聚合酶鏈反應產物經電泳純化與 DNA 定序，得到較低分子量之序列辨識號：1 與較高分子量之序列辨識號：2，藉由 BLAST 分析後確認，序列辨識號：1 與其他鳥類之 *CHD-Z* 基因非常相似，而序列辨識號：2 則與其他鳥類之 *CHD-W* 非常相似，因此確認序列辨識號：1 為台灣大冠鷲之 *CHD-Z* 的基因序列，而序列辨識號：2 則為台灣大冠鷲之 *CHD-W* 的基因序列。

上述之聚合酶鏈反應之條件可視不同情況而做調整，較佳為：94°C，4 分鐘；94 °C，30 秒，5 次循環；47 °C，30 秒；72 °C，30 秒；94 °C，30 秒，49 次循環；46 °C，30 秒；72 °C，20 秒以及 72°C，5 分鐘。

將不同種類之鷹類的 *CHD-Z* 基因與 *CHD-W* 基因進行 BLAST 比對，得到不同種鷹類之 *CHD-ZW* 序列共同區以及 *CHD-W* 序列專一區。上述之不同種鷹類可包括蒼鷹(*Accipiter gentilis*)、黑鳶(*Milvus migrans*)、短趾鵟(*Circaetus gallicus*)、熊鷹(*Spizaetus nipalensis*)、長嘴兀鷲(*Gyps indicus*)、東方白背禿鷹(*Gyps bengalensis*)、北雀鷹(*Accipiter nisus*)、白腹鵟(*Circus*

spilonotus)、金雕(*Aquila chrysaetos*)與台灣大冠鷲。而 *CHD-ZW* 序列共同區較佳為序列辨識號：3，而 *CHD-W* 序列專一區較佳為序列辨識號：4（其第 36 個核苷酸為 r，代表可為腺嘌呤或鳥嘌呤）。

接著本發明依此 *CHD-ZW* 序列共同區與 *CHD-W* 序列專一區提供一種鑑定鷹類性別的方法。在一實施例中，於序列辨識號：3 之序列範圍內設計一第一引子（順向），其中第一引子可包括序列辨識號：3，並於序列辨識號：4 之序列範圍內設計一第二引子（順向），其中第二引子可包括序列辨識號：4，接著提供一鷹類之一 DNA，將該 DNA 以該第一引子與 P2 引子（反向）之引子對以及該第二引子（順向）與 P2 引子（反向）之引子對進行聚合酶鏈反應，之後對該聚合酶鏈反應進行電泳結果判定，出現兩個條帶者為雌性，只出現一個條帶者為雄性。

因雌性同時具有 *CHD-Z* 與 *CHD-W* 基因，故當樣本為雌性時同時會與第一引子（*CHD-ZW* 序列共同區）/P2 引子對與第二引子（*CHD-W* 序列專一區）/P2 引子對產生作用，而產生兩段聚合酶鏈反應產物；而雄性只具有 *CHD-Z*，所以當樣本為雄性時只會與第一引子（*CHD-ZW* 序列共同區）/P2 引子對進行聚合酶鏈反應，故只具有一段產物。而第一引子/P2 與第二引子/P2 之產物的長度差依照引子與所鑑定之鷹類的不同，約為 103-107 b.p.。所以能於電泳膠上清楚地分離。

所有鷹類皆可適用於此方法來鑑定性別，而較佳適合之鷹類包括鷹亞科，或者包括蒼鷹、黑鳶、熊鷹、長嘴兀鷲、東方白背禿鷹、北雀鷹、白腹鵠、金雕或台灣大冠鷲，

又更佳者包括台灣大冠鷲。

聚合酶鏈反應可視情況需要而做調整，並無一定之限制，在一實施例中第一引子為序列辨識號：5 而第二引子為序列辨識號：6（其第 18 個核苷酸為 r，代表可為腺嘌呤或鳥嘌呤）較佳。

在另一實施例中，於序列辨識號：3 之序列範圍內設計一第一引子（順向），其中第一引子可包括序列辨識號：3，並於序列辨識號：4 之序列範圍內設計一第二引子（順向），其中第二引子可包括序列辨識號：4，接著提供一鷹類之一 DNA，將該 DNA 以該第一引子（順向）與 P2 引子（反向）之引子對以及該第二引子（順向）與 P2 引子（反向）之引子對進行聚合酶鏈反應，之後對該聚合酶鏈反應進行熔點曲線分析，出現兩個波峰者為雌性，只出現一個波峰者為雄性。

因雌性同時具有 *CHD-Z* 與 *CHD-W* 基因，故當樣本為雌性時同時會與第一引子（*CHD-ZW* 序列共同區）/P2 引子對與第二引子（*CHD-W* 序列專一區）/P2 引子對產生作用，而產生兩段聚合酶鏈反應產物，所以兩個產物各有一個熔點曲線，故具兩個波峰；而雄性只具有 *CHD-Z*，所以當樣本為雄性時只會與第一引子（*CHD-ZW* 序列共同區）/P2 引子對進行聚合酶鏈反應，故只具有一段產物，只有一個熔點曲線。而第一引子/P2 與第二引子/P2 之產物的長度差依照引子與所鑑定之鷹類的不同，約為 103-107 b.p.。所以兩個波峰間能清楚分離。第一引子/P2 之聚合酶鏈反應之產物的熔點溫度（波峰）為約 79-80°C；第二引子/P2 之聚合酶鏈反應之產物的熔點溫度（波峰）

為約 80-81°C。

所有鷹類皆可適用於此方法來鑑定性別，而較佳適合之鷹類包括鷹亞科，或者包括蒼鷹、黑鳶、熊鷹、長嘴兀鷲、東方白背禿鷹、北雀鷹、白腹鷗、金雕或台灣大冠鷲，又更佳者包括台灣大冠鷲。

聚合酶鏈反應可視情況需要而做調整，並無一定之限制，在一實施例中第一引子為序列辨識號：5 而第二引子為序列辨識號：6（其第 18 個核苷酸為 r，代表可為腺嘌呤或鳥嘌呤）較佳，而兩波峰之熔點溫度差為約 0.5-1°C，較佳為 0.5°C。

又上述之聚合酶鏈反應可為一般聚合酶鏈反應或即時聚合酶鏈反應。若為一般聚合酶鏈反應則可在聚合酶鏈反應完後再進行熔點曲線分析之所需步驟；若為即時聚合酶鏈反應則可在聚合酶鏈反應完成後在同一儀器上立即進行熔點曲線分析。

【實施例】

台灣大冠鷲之 CHD-Z 與 CHD-W 基因序列之取得

於台灣墾丁國家公園的准許下，收集 24 隻台灣大冠鷲的血液樣本，分別編碼為 Bd1~Bd24。根據孵卵與餵食行為，將 Bd1 與 Bd15 台灣大冠鷲作為雌性控制組。藉由 Qiagen blood kit 來萃取血液 DNA。

之後將 Bd1~Bd24 之血液 DNA 以通用引子 P2 與 P8 來進行聚合酶鏈反應。經調整之 PCR reaction 混合物 (10 μ l) 包含 1 μ l 的 10X PCR buffer、0.3 μ l 的 50 mM MgCl₂、0.2 μ l 的 10 mM dNTPs、0.6 μ l 的 DMSO、0.14 μ l

的 5U Taq enzyme、0.12 μ l 的 350 μ g/ml 混合引子(1:1) 以及 7.64 μ l 的 DNA 於水中。

聚合酶鏈反應之條件為：94°C，4 分鐘；94 °C，30 秒，5 次循環；47 °C，30 秒；72 °C，30 秒；94 °C，30 秒，49 次循環；46 °C，30 秒；72 °C，20 秒以及 72°C，5 分鐘。

接著將產物以 4% 洋菜電泳膠進行電泳，之後以進行染色，得到結果如第 1 圖所示。結果顯示 Bd1~Bd10 中不論性別，皆只顯示一個條帶，因此藉由電泳並無法直接辨別 10 隻台灣大冠鷲之性別。在仔細觀察後，發現其具有不同分子量之兩種形式的條帶：一為較低分子量條帶出現在 Bd3、Bd4、Bd5、Bd7、Bd9 與 Bd10；較高分子量之條帶則出現在 Bd1、Bd2、Bd6 與 Bd8。

經膠體 DNA 萃取與純化後，進行定序，得到較低分子量者為序列辨識號：1，較高分子量者為序列辨識號：2。在與其他鳥類之 *CHD-Z* 與 *CHD-W* 進行 BLAST 後（以下顯示），發現序列辨識號：1 與其他鳥類之 *CHD-Z* 基因非常相似，而序列辨識號：2 與與其他鳥類之 *CHD-W* 基因非常相似，因此確認序列辨識號：1 為台灣大冠鷲之 *CHD-Z* 的序列，而序列辨識號：2 則為台灣大冠鷲之 *CHD-W* 的序列。

台灣大冠鷲與相關鷹類之 *CHD-Z* 與 *CHD-W* 基因進行 BLAST

將台灣大冠鷲與其他 7 種鷹類之 *CHD-Z* 與 *CHD-W* 基因(由 P2/P8 引子對所得)以：*CHD-Z* 與 *CHD-W* 的 GenBank

accession nos.以及（兩基因間的長度差）來表示。黑鳶 *Milvus migrans* AB096142, AB096141 (2-b.p.)、熊鷹 *Spizaetus nipalensis* AB096150, AB096149 (8-b.p.)、長嘴兀鷲 *Gyps indicus* DQ156155, DQ156156 (6-b.p.)、東方白背禿鷹 *Gyps bengalensis* DQ156153, DQ156154 (5-b.p.)、北雀鷹 *Accipiter nisus* AB096152, AB096151, (4-b.p.)、白腹鵟 *Circus spilonotus* AB096146, AB096145, (4-b.p.)、金雕 *Aquila chrysaetos* AB096148, AB096147, (3-b.p.)與台灣大冠鷲 *Spilornis cheela hoya* 序列辨識號：1，序列辨識號：2 (13-b.p.)。上述之鷹類皆屬於鷲鷹目 (*Falconiformes*)、鷲鷹科 (*Accipitridae*) 鷹亞科 (*Accipitrinae*)，但分屬於不同屬。

將上述各基因序列比較後得知，使用 P2/P8 引子對之 *CHD-Z* 與 *CHD-W* 基因 PCR 產物，其長度差只在約 2-13 b.p.，這代表 P2/P8 引子並不適合用來鑑定鷹類之性別。BLAST 結果顯示於表 1。表 1 之 A 部分為序列辨識號：1 之序列（台灣大冠鷲 *CHD-Z*），C 部分為序列辨識號：2 之序列（台灣大冠鷲 *CHD-W*）；B 與 D 部分分別為序列辨識號：1 與其他鷹類之 *CHD-Z* 以及序列辨識號：2 與其他鷹類之 *CHD-W* 比較結果。結果顯示序列辨識號：1 與其他鷹類之 *CHD-Z* 基因之 BLAST 分數以及 E 值非常相近，代表在鷹亞科中，*CHD-Z* 基因非常相近；而 *CHD-W* 基因也有相似之結果。

表 1、台灣大冠鷲與其他 7 之鷹類之 *CHD-Z* 與 *CHD-W* 基因序列的 BLAST 結果

A	TCTCCCAAGGATGAGGAATTGTGCAAAACAGGTGTCTTTTGGTTTTGACTGACTTGTGCT TTTATATTGCTATTGGTTTAGTTTCTTTGTTGGGGGGTGTGTTGGGTTTTGGTTTTTAA GTTGGTTTTTTTTTTTCCTTTTCTGAACACATATTTTGGACAGGCTAGGTAAACTTTACT TATGGTTGTTAATCACATAGCTTTGAACTACCTATTCTGAAATTCCAGATCAGCTTTAAT GGAAGTGAAGGGAGACGCAGTAGGAGCAGAAGATACTCTGGATCTGATAGTGACTCCATC TCAGAAAGAAAACGGCCTAAAAAACGTG																																			
B	<table><tr><th colspan="2">Sequences producing significant alignments:</th><th>Score (Bits)</th><th>E Value</th></tr><tr><td>gi 75272662 gb DQ156155.1 </td><td>Gyps indicus chromosome Z chromo-h...</td><td><u>351</u></td><td>9e-94</td></tr><tr><td>gi 75272605 gb DQ156153.1 </td><td>Gyps bengalensis chromosome Z chro...</td><td><u>351</u></td><td>9e-94</td></tr><tr><td>gi 31338945 dbj AB096150.1 </td><td>Spizaetus nipalensis CHD1Z gene f...</td><td><u>349</u></td><td>3e-93</td></tr><tr><td>gi 31338949 dbj AB096152.1 </td><td>Accipiter nisus CHD1Z gene for ch...</td><td><u>343</u></td><td>2e-91</td></tr><tr><td>gi 31338937 dbj AB096146.1 </td><td>Circus spilonotus CHD1Z gene for ...</td><td><u>343</u></td><td>2e-91</td></tr><tr><td>gi 31338929 dbj AB096142.1 </td><td>Milvus migrans CHD1Z gene for chr...</td><td><u>343</u></td><td>2e-91</td></tr><tr><td>gi 31338941 dbj AB096148.1 </td><td>Aquila chrysaetos CHD1Z gene for ...</td><td><u>341</u></td><td>8e-91</td></tr></table>				Sequences producing significant alignments:		Score (Bits)	E Value	gi 75272662 gb DQ156155.1 	Gyps indicus chromosome Z chromo-h...	<u>351</u>	9e-94	gi 75272605 gb DQ156153.1 	Gyps bengalensis chromosome Z chro...	<u>351</u>	9e-94	gi 31338945 dbj AB096150.1 	Spizaetus nipalensis CHD1Z gene f...	<u>349</u>	3e-93	gi 31338949 dbj AB096152.1 	Accipiter nisus CHD1Z gene for ch...	<u>343</u>	2e-91	gi 31338937 dbj AB096146.1 	Circus spilonotus CHD1Z gene for ...	<u>343</u>	2e-91	gi 31338929 dbj AB096142.1 	Milvus migrans CHD1Z gene for chr...	<u>343</u>	2e-91	gi 31338941 dbj AB096148.1 	Aquila chrysaetos CHD1Z gene for ...	<u>341</u>	8e-91
Sequences producing significant alignments:		Score (Bits)	E Value																																	
gi 75272662 gb DQ156155.1 	Gyps indicus chromosome Z chromo-h...	<u>351</u>	9e-94																																	
gi 75272605 gb DQ156153.1 	Gyps bengalensis chromosome Z chro...	<u>351</u>	9e-94																																	
gi 31338945 dbj AB096150.1 	Spizaetus nipalensis CHD1Z gene f...	<u>349</u>	3e-93																																	
gi 31338949 dbj AB096152.1 	Accipiter nisus CHD1Z gene for ch...	<u>343</u>	2e-91																																	
gi 31338937 dbj AB096146.1 	Circus spilonotus CHD1Z gene for ...	<u>343</u>	2e-91																																	
gi 31338929 dbj AB096142.1 	Milvus migrans CHD1Z gene for chr...	<u>343</u>	2e-91																																	
gi 31338941 dbj AB096148.1 	Aquila chrysaetos CHD1Z gene for ...	<u>341</u>	8e-91																																	
C	TCTCCCAAGGATGAGGAATTGTGCAAAACAGGTATCTCTGGGTTTTGACCAACTAACTTT GATTTTTTTTGTGTTGTTGTTTTTTGTTTGTGTTTTTTCATTGCTGTTGTCTTGTCTTGTACTTT TGGGTTGGGTGGTTTTTCACACATGGCACACCCCCCATTCCCCCATTTTTGACAGGCTAG ATAACACATTAATAAAATGTTTTAGTCACGTAGCTTTGAACTACTTAATCTGAAATTCCA GATCAGCTTTAATGGAAGTGAAGGGAAACGCAGTAGGAGCAGAAGATATTCTGGATCTGA TAGTGACTCCATCTCGGAAAGAAAACGACCAAAAAAACGTG																																			
D	<table><tr><th colspan="2">Sequences producing significant alignments:</th><th>Score (Bits)</th><th>E Value</th></tr><tr><td>gi 31338927 dbj AB096141.1 </td><td>Milvus migrans CHD1W gene for chr...</td><td><u>337</u></td><td>1e-89</td></tr><tr><td>gi 31338943 dbj AB096149.1 </td><td>Spizaetus nipalensis CHD1W gene f...</td><td><u>327</u></td><td>1e-86</td></tr><tr><td>gi 31338939 dbj AB096147.1 </td><td>Aquila chrysaetos CHD1W gene for ...</td><td><u>327</u></td><td>1e-86</td></tr><tr><td>gi 31338947 dbj AB096151.1 </td><td>Accipiter nisus CHD1W gene for ch...</td><td><u>321</u></td><td>8e-85</td></tr><tr><td>gi 75272676 gb DQ156156.1 </td><td>Gyps indicus chromosome W chromo-h...</td><td><u>315</u></td><td>5e-83</td></tr><tr><td>gi 75272634 gb DQ156154.1 </td><td>Gyps bengalensis chromosome W chro...</td><td><u>315</u></td><td>5e-83</td></tr><tr><td>gi 31338935 dbj AB096145.1 </td><td>Circus spilonotus CHD1W gene for ...</td><td><u>313</u></td><td>2e-82</td></tr></table>				Sequences producing significant alignments:		Score (Bits)	E Value	gi 31338927 dbj AB096141.1 	Milvus migrans CHD1W gene for chr...	<u>337</u>	1e-89	gi 31338943 dbj AB096149.1 	Spizaetus nipalensis CHD1W gene f...	<u>327</u>	1e-86	gi 31338939 dbj AB096147.1 	Aquila chrysaetos CHD1W gene for ...	<u>327</u>	1e-86	gi 31338947 dbj AB096151.1 	Accipiter nisus CHD1W gene for ch...	<u>321</u>	8e-85	gi 75272676 gb DQ156156.1 	Gyps indicus chromosome W chromo-h...	<u>315</u>	5e-83	gi 75272634 gb DQ156154.1 	Gyps bengalensis chromosome W chro...	<u>315</u>	5e-83	gi 31338935 dbj AB096145.1 	Circus spilonotus CHD1W gene for ...	<u>313</u>	2e-82
Sequences producing significant alignments:		Score (Bits)	E Value																																	
gi 31338927 dbj AB096141.1 	Milvus migrans CHD1W gene for chr...	<u>337</u>	1e-89																																	
gi 31338943 dbj AB096149.1 	Spizaetus nipalensis CHD1W gene f...	<u>327</u>	1e-86																																	
gi 31338939 dbj AB096147.1 	Aquila chrysaetos CHD1W gene for ...	<u>327</u>	1e-86																																	
gi 31338947 dbj AB096151.1 	Accipiter nisus CHD1W gene for ch...	<u>321</u>	8e-85																																	
gi 75272676 gb DQ156156.1 	Gyps indicus chromosome W chromo-h...	<u>315</u>	5e-83																																	
gi 75272634 gb DQ156154.1 	Gyps bengalensis chromosome W chro...	<u>315</u>	5e-83																																	
gi 31338935 dbj AB096145.1 	Circus spilonotus CHD1W gene for ...	<u>313</u>	2e-82																																	

CHD-ZW 共同區與 CHD-W 專一區之確定

台灣大冠鷲與其他種鷹類之 *CHD-Z* 與 *CHD-W* 基因序列比較圖顯示於第 2a-c 圖，第 2a-c 圖連續序列之圖式。經序列比對後，發現於第 2b 圖之黑框區 1 為 *CHD-Z* 與 *CHD-W* 共同所具有之序列區，稱做 *CHD-ZW* 序列共同

區，為序列辨識號：3；而於第 2 a 與 b 圖之黑框區 2 為 *CHD-W* 所專有之序列，稱做 *CHD-W* 序列專一區，為序列辨識號：4（其第 36 個核苷酸為 r，代表可為腺嘌呤或鳥嘌呤）。

其中序列辨識號：3 位於台灣大冠鷲 *Spilornis cheela hoya* 序列辨識號：1(*CHD-Z*)的第 216-253 個核苷酸，序列辨識號：2 (*CHD-W*)的第 229-266 個核苷酸；位於黑鳶 *Milvus migrans* **AB096142** (*CHD-IZ*)的第 198-235 個核苷酸，**AB096141** (*CHD-IW*)的第 200-237 個核苷酸；位於熊鷹 *Spizaetus nipalensis* **AB096150** (*CHD-IZ*)的第 199-236 個核苷酸，**AB096149** (*CHD-IW*)的第 207-244 個核苷酸；位於長嘴兀鷲 *Gyps indicus* **DQ156155** (*CHD-Z*)的第 226-263 個核苷酸，**DQ156156** (*CHD-W*)的第 228-265 個核苷酸；位於東方白背禿鷹 *Gyps bengalensis* **DQ156153** (*CHD-Z*)的第 227-264 個核苷酸，**DQ156154** (*CHD-W*)的第 227-264 個核苷酸；位於北雀鷹 *Accipiter nisus* **AB096152** (*CHD-IZ*)的第 203-240 個核苷酸，位於 **AB096151** (*CHD-IW*)第 199-236 個核苷酸；位於白腹鵟 *Circus spilonotus* **AB096146** (*CHD-IZ*)的第 203-240 個核苷酸，**AB096145** (*CHD-IW*)的第 199-236 個核苷酸；位於金雕 *Aquila chrysaetos* **AB096148** (*CHD-IZ*)的第 200-237 個核苷酸，**AB096147** (*CHD-IW*)的第 203-240 個核苷酸。

而序列辨識號：4 位於台灣大冠鷲 *Spilornis cheela hoya* 序列辨識號：2 的第 107-150 個核苷酸；位於黑鳶 *Milvus migrans* **AB096141** 的第 78-121 個核苷酸；位於熊鷹 *Spizaetus nipalensis* **AB096149** 的第 81-124 個核苷酸；

位於長嘴兀鷲 *Gyps indicus* **DQ156156** 的第 106-149 個核苷酸；位於東方白背禿鷹 *Gyps bengalensis* **DQ156154** 的第 105-148 個核苷酸；位於北雀鷹 *Accipiter nisus* **AB096151** 的第 77-120 個核苷酸；位於白腹鵟 *Circus spilonotus* **AB096145** 的第 77-120 個核苷酸；位於金雕 *Aquila chrysaetos* **AB096147** 的第 81-124 個核苷酸。

在序列辨識號：3 之列範圍內設計一引子搭配 P2 引子，以及在序列辨識號：4 之序列範圍內設計一引子搭配 P2 引子，可對鷹類 DNA 進行聚合酶鏈反應或即時聚合酶鏈反應。而兩對引子對產物的長度差夠長，足以產生分別。在序列辨識號 3 之列範圍內設計一第一引子（序列辨識號：5）；在序列辨識號：4 之列範圍內設計一第二引子（序列辨識號：6）。

聚合酶鏈反應與電泳結果鑑別鷹類性別

將台灣大冠鷲 Bd19~Bd24 以及 Bd12、Bd14、Bd15 與 Bd17 的血液 DNA 樣本，對序列辨識號：5/P2 引子對以及序列辨識號：6/P2 引子對於不同試管中進行聚合酶鏈反應（雙重覆），其中序列辨識號：5/P2 引子對與序列辨識號：6/P2 引子對為分開置於兩試管中分別與血液 DNA 樣本進行反應，而聚合酶鏈反應的條件為 95°C，3 分鐘；95 °C，30 秒，45 次循環；56 °C，30 秒；72 °C，20 秒。

接著將產物以 1.5% 洋菜電泳膠進行電泳，之後以進行染色，得到結果如第 3 圖所示。

雌性控制組 Bd15 與 Bd19、Bd20、Bd23、Bd12、Bd14 與 Bd17 出現兩個條帶（約 269 b.p.與 163 b.p.），顯示為

其雌性；而 Bd21、Bd22 與 Bd24 只出現一個條帶（約 163 b.p.），顯示其為雄性。

即時聚合酶鏈反應與產物熔點曲線分析鑑別鷹類性別

將台灣大冠鷲 Bd19~Bd24 以及 Bd12、Bd14、Bd15 與 Bd17 的血液 DNA 樣本，對序列辨識號：5/P2 引子對以及序列辨識號：6/P2 引子對在不同試管中以 MyiQ instrument (BioRad, Corp.)儀器進行即時聚合酶鏈反應（螢光染劑為 SYBR Green I），其中序列辨識號：5/P2 引子對與序列辨識號：6/P2 引子對為分開置於兩試管中分別與血液 DNA 樣本進行反應，而聚合酶鏈反應的條件為 95°C，3 分鐘；95 °C，30 秒，45 次循環；56 °C，30 秒；72 °C，20 秒。

在聚合酶鏈反應結束後藉由儀器之預設系統值維持 95°C，1 分鐘；降溫至 55 °C，1 分鐘，以及之後以 0.5°C /秒的速度下緩慢升溫至 95°C 來記錄熔點曲線。在溫度緩慢升溫至 SYBR Green I 在 DNA 股的螢光解離的期間，以 80 個重複持續偵測螢光。自動紀錄不同溫度(T)的即時相對螢光量(RFU)，以產生熔點曲線，而藉由繪示 (-d(RFU)/dT)對溫度(T)的關係圖，自動轉換為熔點波峰。RFU 為相對螢光強度單位。結果顯示於第 4a-i 圖。

第 4a-i 圖顯示聚合酶鏈反應之熔點曲線分析結果，雌性控制組 Bd15（第 4a 圖）Bd14（第 4b 圖）與 Bd17（第 4c 圖）Bd19（第 4d 圖）、Bd20（第 4e 圖）、Bd23（第 4f 圖）出現兩個波峰，（序列辨識號：5/P2 引子之產物

為 79.5°C 及序列辨識號：6/P2 引子之產物為 80°C），顯示為其雌性；而 Bd13（第 4g 圖）、Bd21（第 4h 圖）、Bd22（第 4i 圖）與 Bd24（第 4j 圖）只出現一個波峰（序列辨識號：5/P2 引子之產物為 79.5°C），顯示其為雄性。而此與前述之結果完全相符。

雖然本發明已以較佳實施例揭露如上，然其並非用以限定本發明，任何熟習此技藝者，在不脫離本發明之精神和範圍內，當可作些許之更動與潤飾，因此本發明之保護範圍當視後附之申請專利範圍所界定者為準。

【圖式簡單說明】

第 1 圖顯示以 P2/P8 引子對台灣大冠鷲血液 DNA 進行聚合酶鏈反應後所得之產物進行電泳之結果。

第 2a-c 圖顯示台灣大冠鷲與其他 7 種鷹類之 *CHD-Z* 與 *CHD-W* 基因序列比較圖。

第 3 圖顯示以本發明一實施例鑑別鷹類之方法的電泳結果圖。

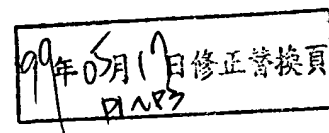
第 4a-j 圖顯示以本發明一實施例鑑別鷹類之方法的熔點曲線分析圖。

【主要元件符號說明】

1、2～黑框區

序列表

【序列編號】



<110> 高學醫學大學

<120> 鑑定鷹類性別的方法與用於鑑別鷹類性別的序列

<160> 8

<210> 1

<211> 328

<212> DNA

<213> *Spilornis cheela hoya*

<400> 1

tctcccaagg atgaggaatt gtgcaaaaca ggtgtctttt ggttttgact gacttgtgct	60
tttatattgc tattggttta gtttctttgt tggggggtgt tggtgggttt tggtttttaa	120
gttgggttttt tttttccttt tctgaacaca tatttttgac aggctaggta aaactttact	180
tatggttggt aatcacatag ctttgaacta cctattctga aattccagat cagctttaat	240
ggaagtgaag ggagacgcag taggagcaga agatactctg gatctgatag tgactccatc	300
tcagaaaagaa aacggcctaa aaaacgtg	328

<210> 2

<211> 341

<212> DNA

<213> *Spilornis cheela hoya*

<400> 2

tctcccaagg atgaggaatt gtgcaaaaca ggtatctctg ggttttgacc aactaacttt	60
gatttttttg ttggtgtttt ttgtttgttt ttccattgct gttgtcttgt cttgtacttt	120
tgggttgggt ggttttcaca catggcacac ccccccattc ccccatcttt gacaggctag	180

ataacacatt aataaaatgt tttagtcacg tagctttgaa ctacttaatc tgaaattcca 240
gatcagcttt aatggaagtg aagggaacg cagtaggagc agaagatatt ctggatctga 300
tagtgactcc atctcggaaa gaaaacgacc aaaaaaacgt g 341

<210> 3
<211> 44
<212> DNA
<213> *Accipitrinae*
<400> 3

tctgaaattc cagatcagct ttaatggaag tgaaggga 38

<210> 4
<211> 44
<212> DNA
<213> *Accipitrinae*
<400> 4

ttgtcttgta cttttgggtt gggtggtttt cacacrtggc acac 44

<210> 5
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 5

gatcagcttt aatggaagtg aag 23

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 6

ttgggtgggtt ttcacacrtg 20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 7

tctgcatcgc taaatccttt 20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 8

ctcccaagga tgagraaytg 20

十、申請專利範圍：

99年05月17日修正替換頁
21~27

1.一種鑑定鷹類性別的方法，包括：

在序列辨識號：3 之序列範圍內設計一第一引子；

在序列辨識號：4 之序列範圍內設計一第二引子；

提供一鷹類之一 DNA；

將該 DNA 以該第一引子與序列辨識號：7 之引子的引子對以及該第二引子與序列辨識號：7 之引子的引子對進行聚合酶鏈反應，其中該第一引子與序列辨識號：7 之引子的引子對以染色體解螺旋酶鍵結蛋白 Z 與 W 基因為標的基因，而該第二引子與序列辨識號：7 之引子的引子對以染色體解螺旋酶鍵結蛋白 W 基因為標的基因；以及

對該聚合酶鏈反應進行電泳結果判定，出現兩個條帶者為雌性，只出現一個條帶者為雄性。

2.如申請專利範圍第 1 項所述之鑑定鷹類性別的方法，其中該鷹類包括鷹亞科。

3.如申請專利範圍第 1 項所述之鑑定鷹類性別的方法，其中該鷹類包括蒼鷹、黑鳶、熊鷹、長嘴兀鷲、東方白背禿鷹、北雀鷹、白腹鵠、金雕或台灣大冠鷲。

4.如申請專利範圍第 1 項所述之鑑定鷹類性別的方法，其中該鷹類包括台灣大冠鷲。

5.如申請專利範圍第 1 項所述之鑑定鷹類性別的方法，其中該第一引子包括序列辨識號：3 或序列辨識號：5。

6.如申請專利範圍第 1 項所述之鑑定鷹類性別的方法，其中該第二引子包括序列辨識號：4 或序列辨識號：6。

7.一種鑑定鷹類性別的方法，包括：

在序列辨識號：3 之序列範圍內設計一第一引子；

在序列辨識號：4 之序列範圍內設計一第二引子；

提供一鷹類之一 DNA；

將該 DNA 以該第一引子與序列辨識號：7 之引子的引子對以及該第二引子與序列辨識號：7 之引子的引子對進行聚合酶鏈反應，其中該第一引子與序列辨識號：7 之引子的引子對以染色體解螺旋酶鏈結蛋白 Z 與 W 基因為標的基因，而該第二引子與序列辨識號：7 之引子的引子對以染色體解螺旋酶鏈結蛋白 W 基因為標的基因；以及

對該聚合酶鏈反應進行產物熔點曲線分析，出現兩個波峰者為雌性，只出現一個波峰者為雄性。

8.如申請專利範圍第 7 項所述之鑑定鷹類性別的方法，其中該聚合酶鏈反應為即時聚合酶鏈反應。

9.如申請專利範圍第 7 項所述之鑑定鷹類性別的方法，其中該鷹類包括鷹亞科。

10.如申請專利範圍第 7 項所述之鑑定鷹類性別的方法，其中該鷹類包括蒼鷹、黑鳶、熊鷹、長嘴兀鷲、東方白背禿鷹、北雀鷹、白腹鷄、金雕或台灣大冠鷲。

11.如申請專利範圍第 7 項所述之鑑定鷹類性別的方法，其中該鷹類包括台灣大冠鷲。

12.如申請專利範圍第 7 項所述之鑑定鷹類性別的方法，其中該第一引子包括序列辨識號：3 或序列辨識號：5。

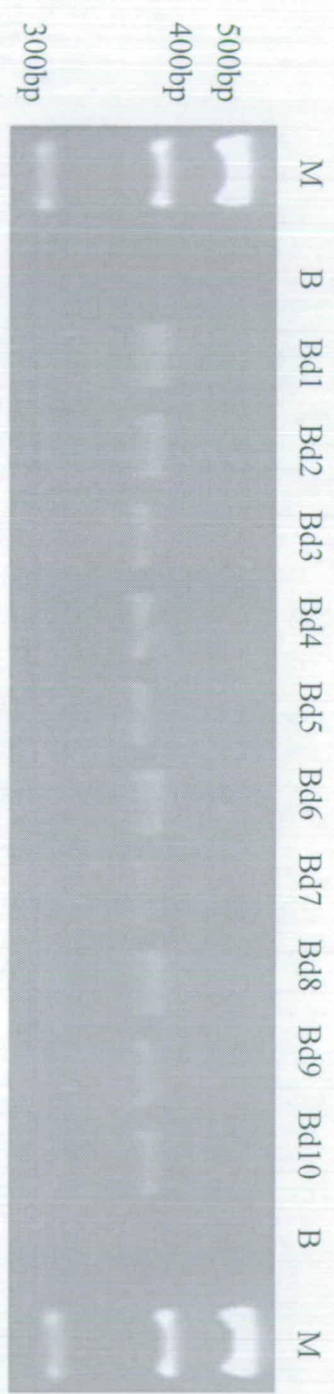
13.如申請專利範圍第 7 項所述之鑑定鷹類性別的方法，其中該第二引子包括序列辨識號：4 或序列辨識號：

6。

14.如申請專利範圍第 7 項所述之鑑定鷹類性別的方法，其中該兩個波峰之熔點溫度差為約 $0.5-1^{\circ}\text{C}$ 。

15.如申請專利範圍第 7 項所述之鑑定鷹類性別的方法，其中該兩個波峰之熔點溫度差為約 0.5°C 。

16.一種用於鑑別鷹類性別的序列，包括序列辨識號：3 與序列辨識號：4。



第 1 圖

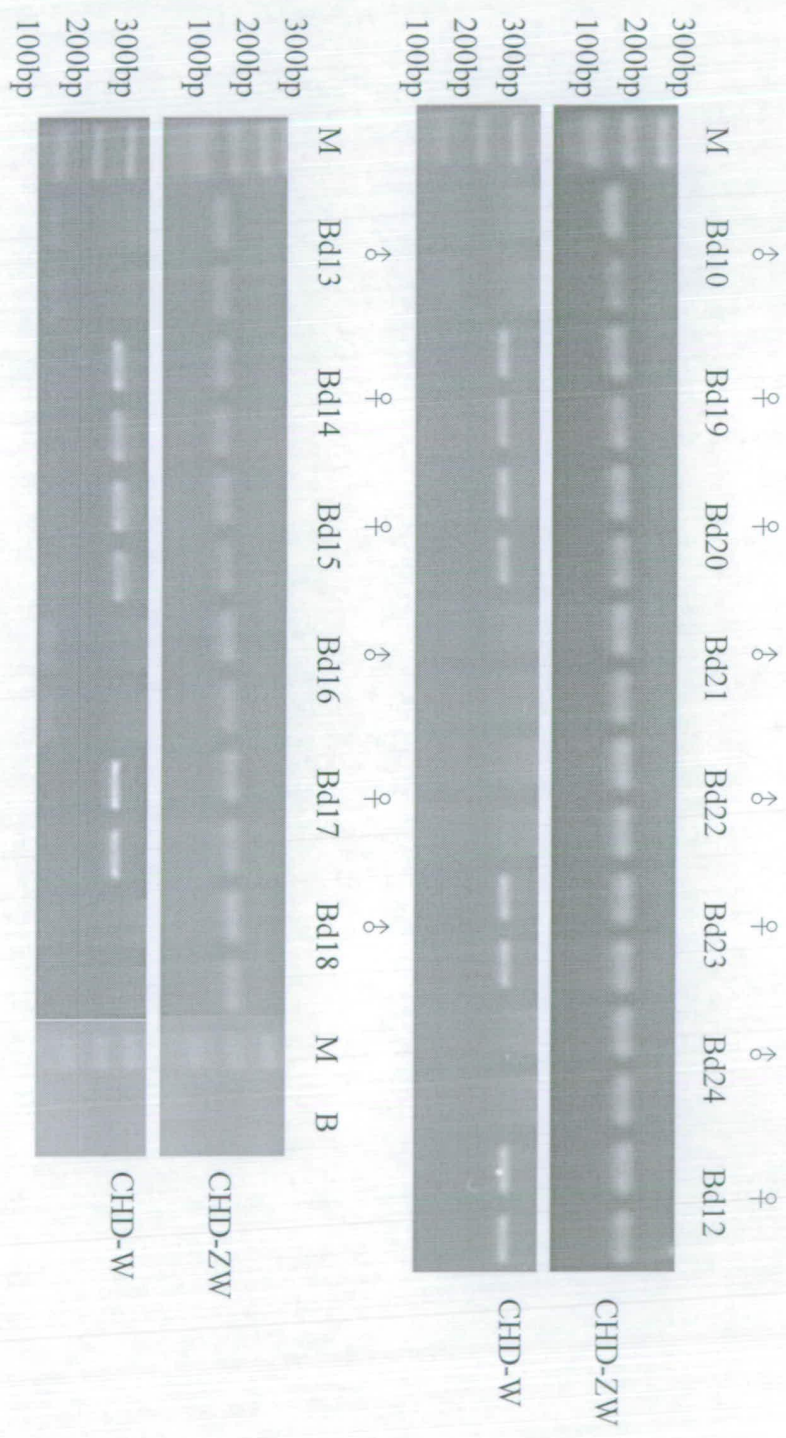
第 2a 圖

[illegible]

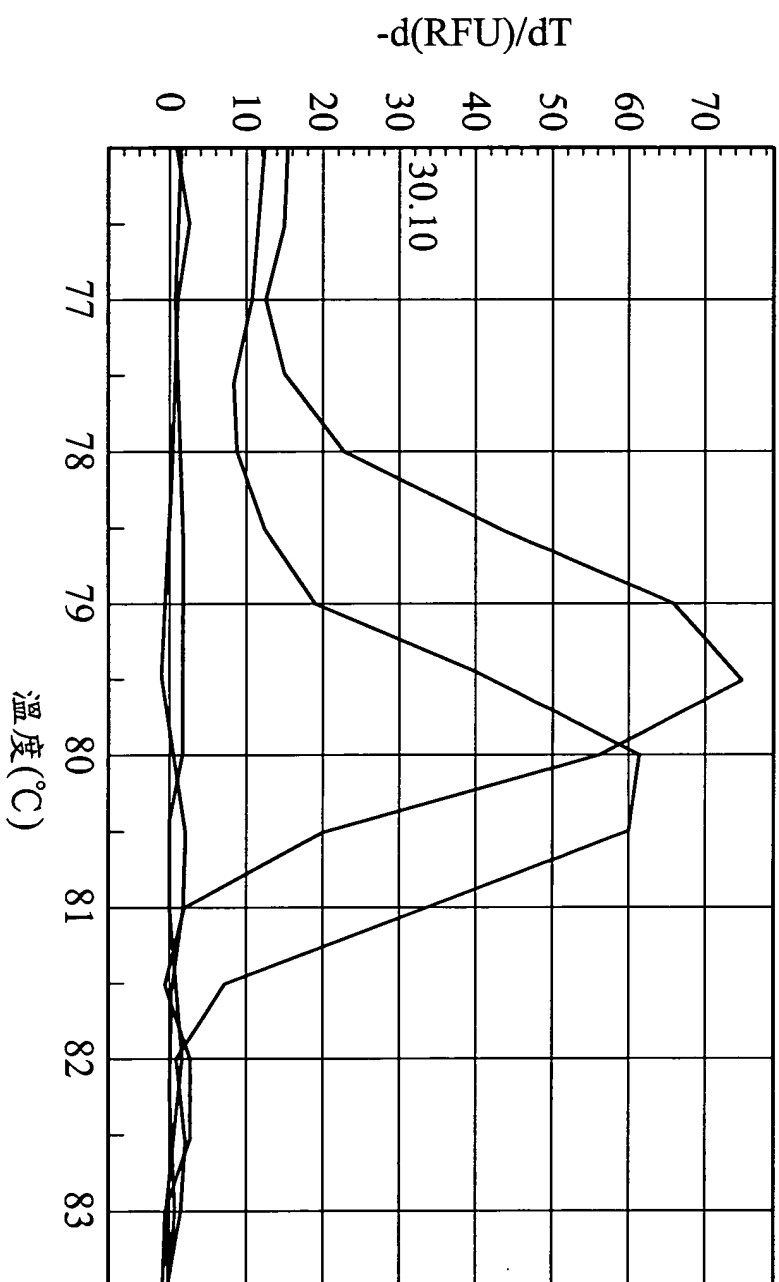
第 2b 圖

[illegible]

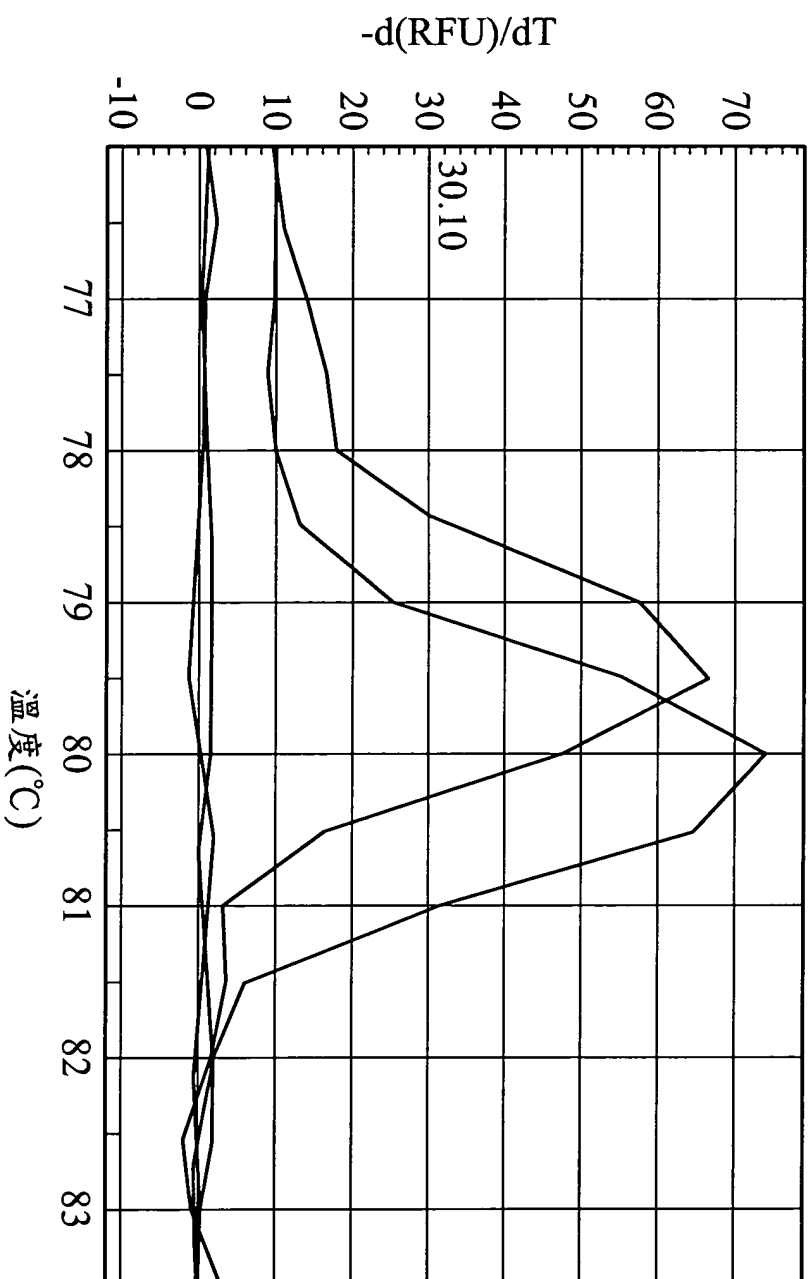
第 2c 圖



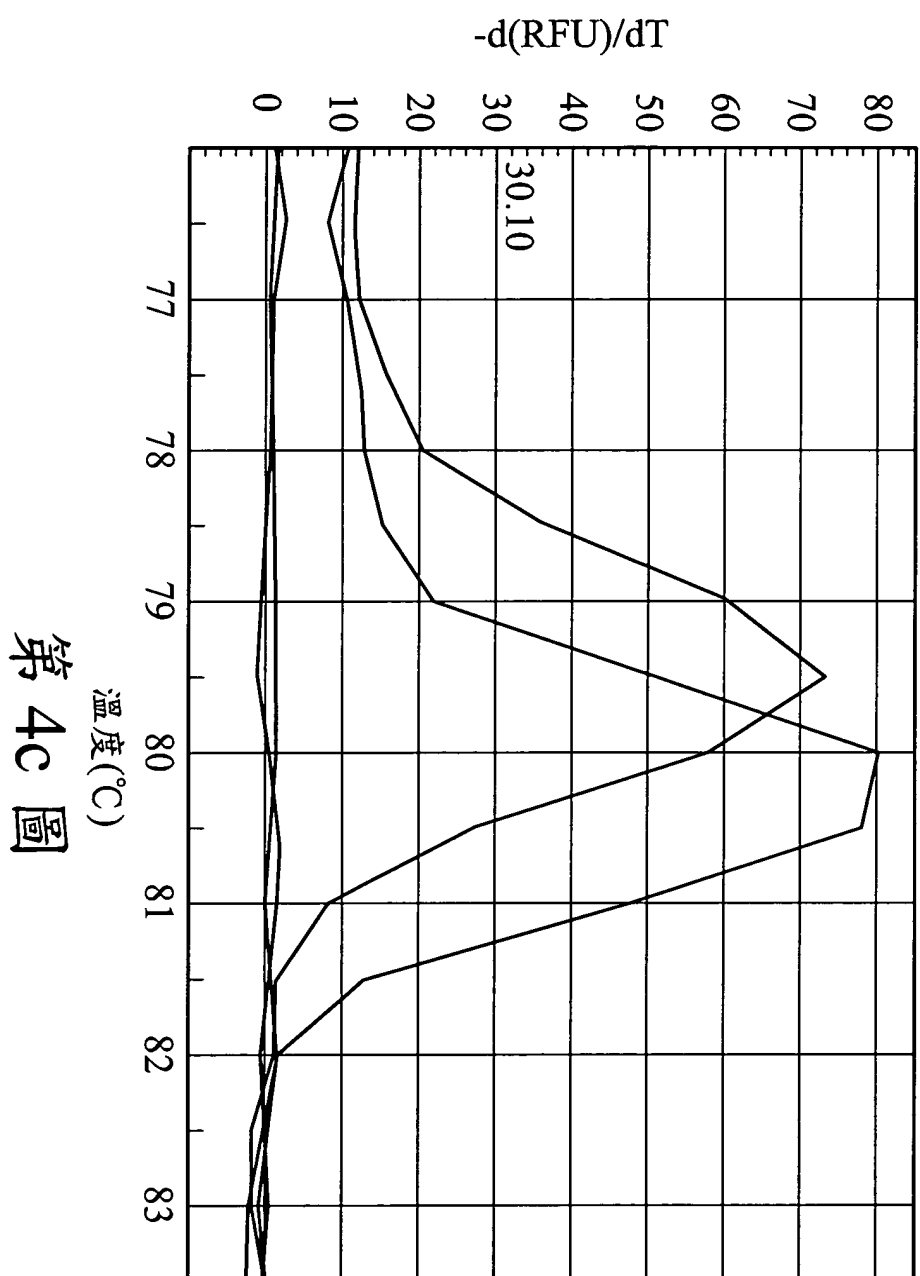
第 3 圖



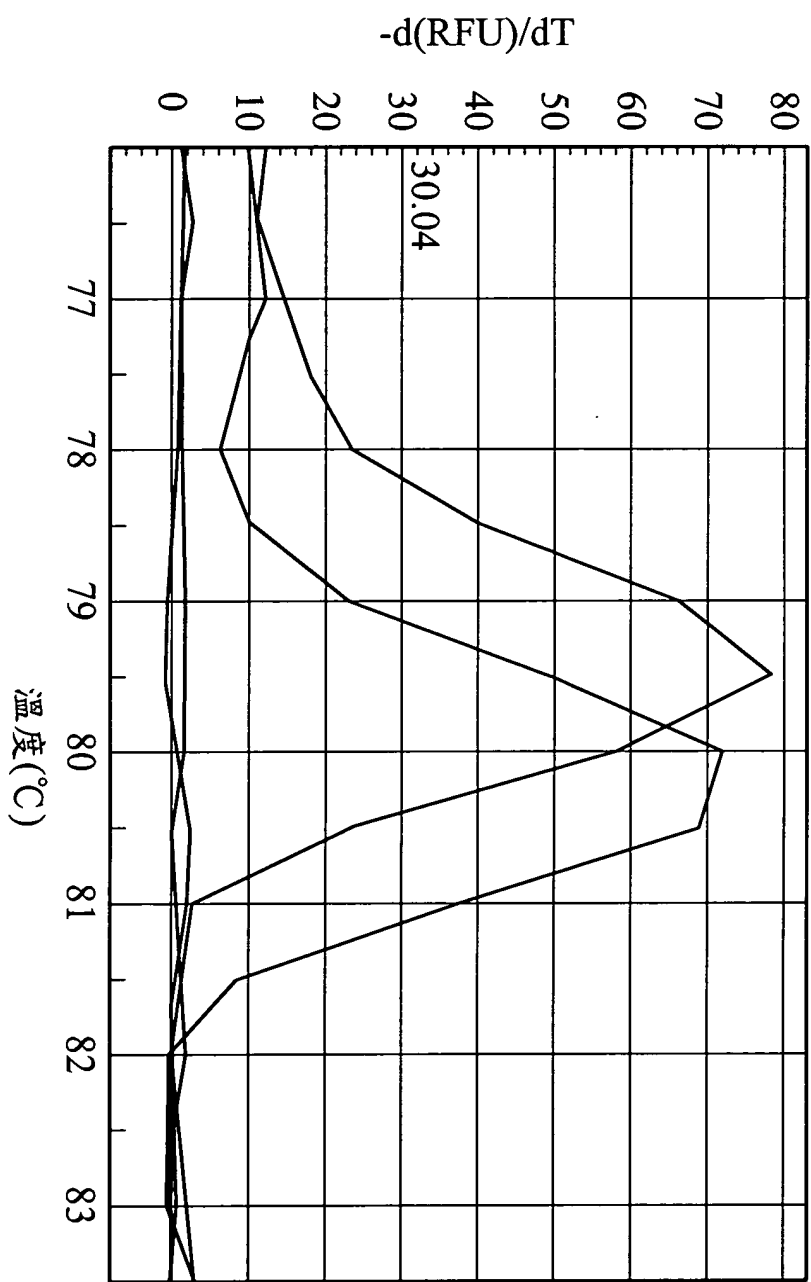
第4a圖



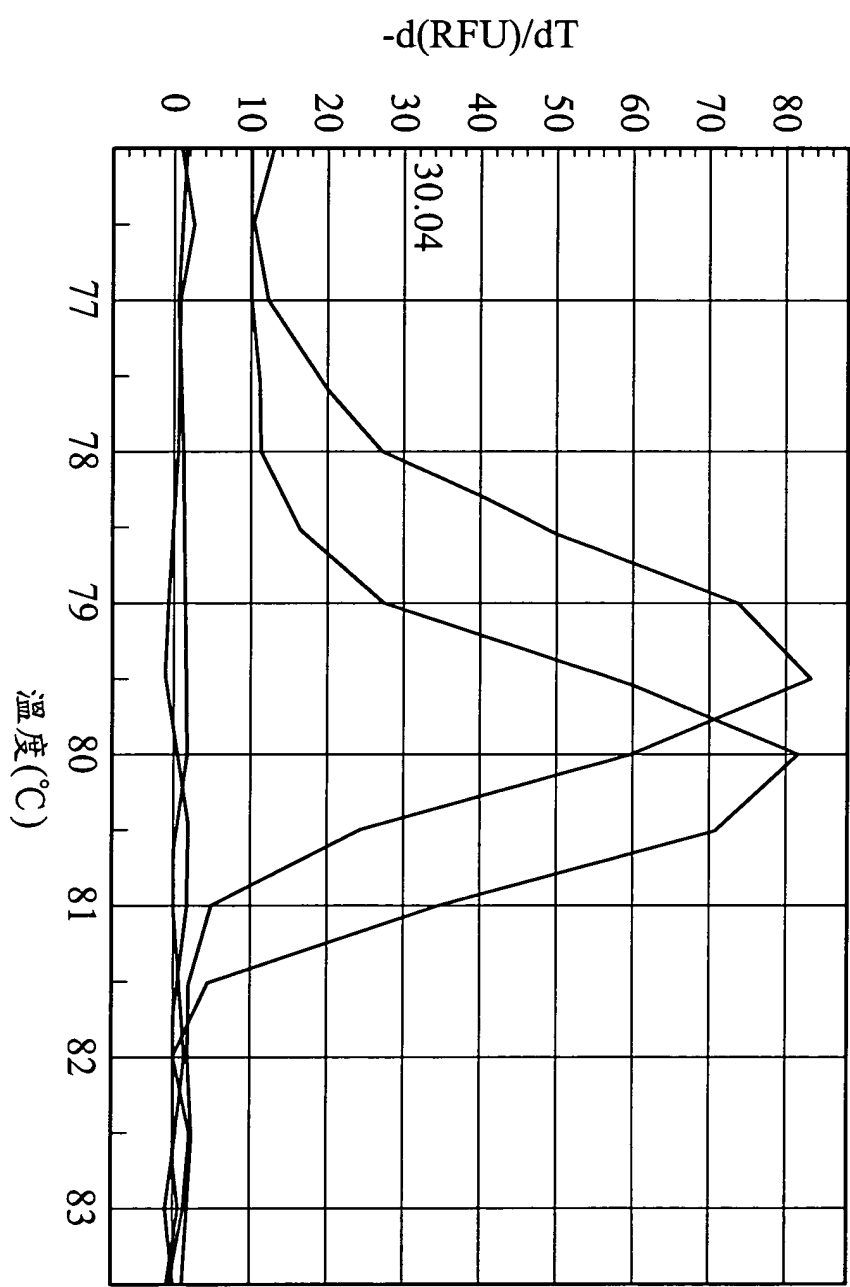
第 4b 圖



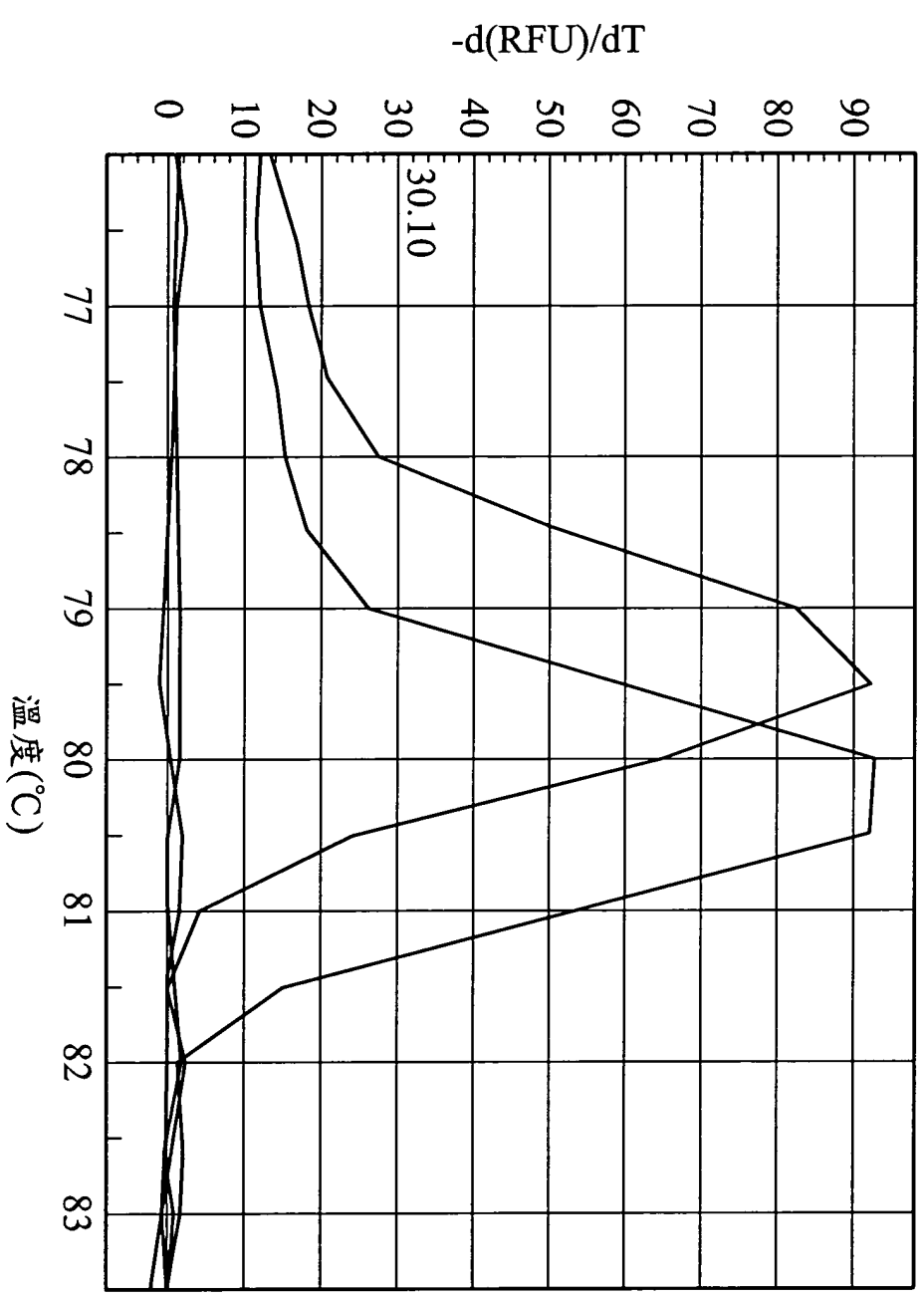
第4c圖



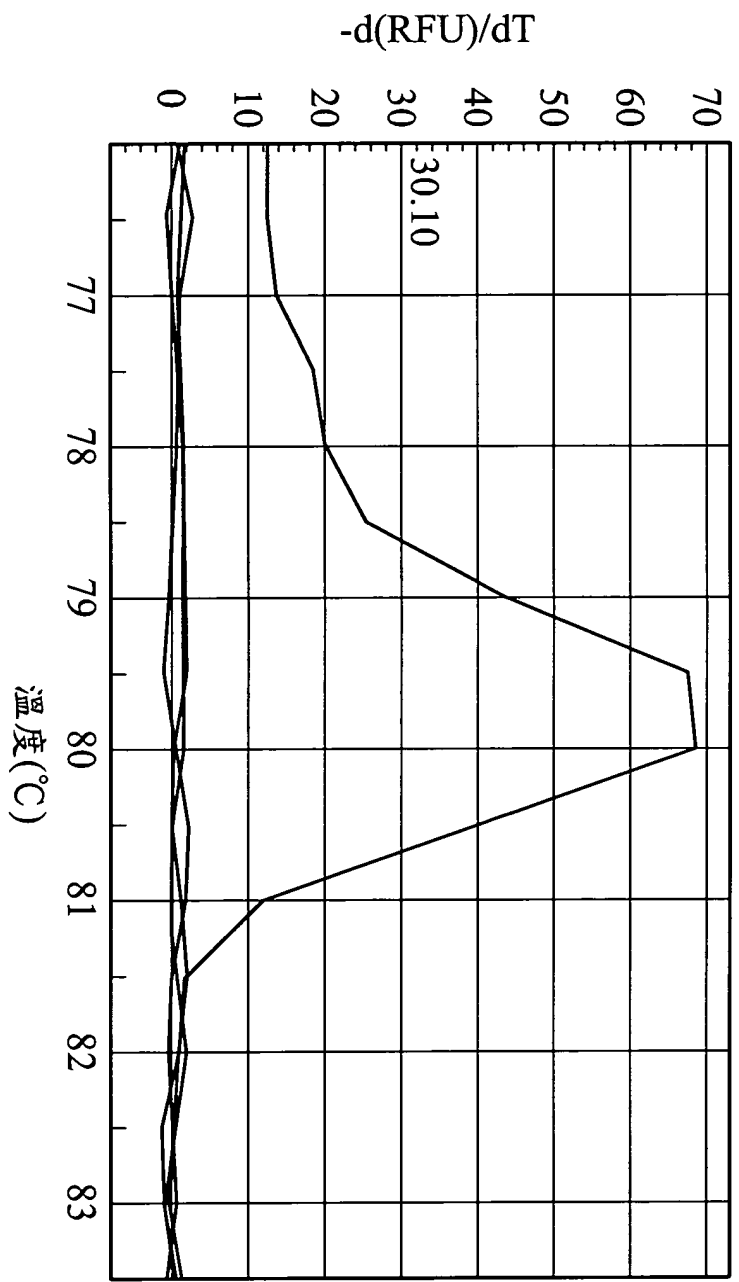
第 4d 圖



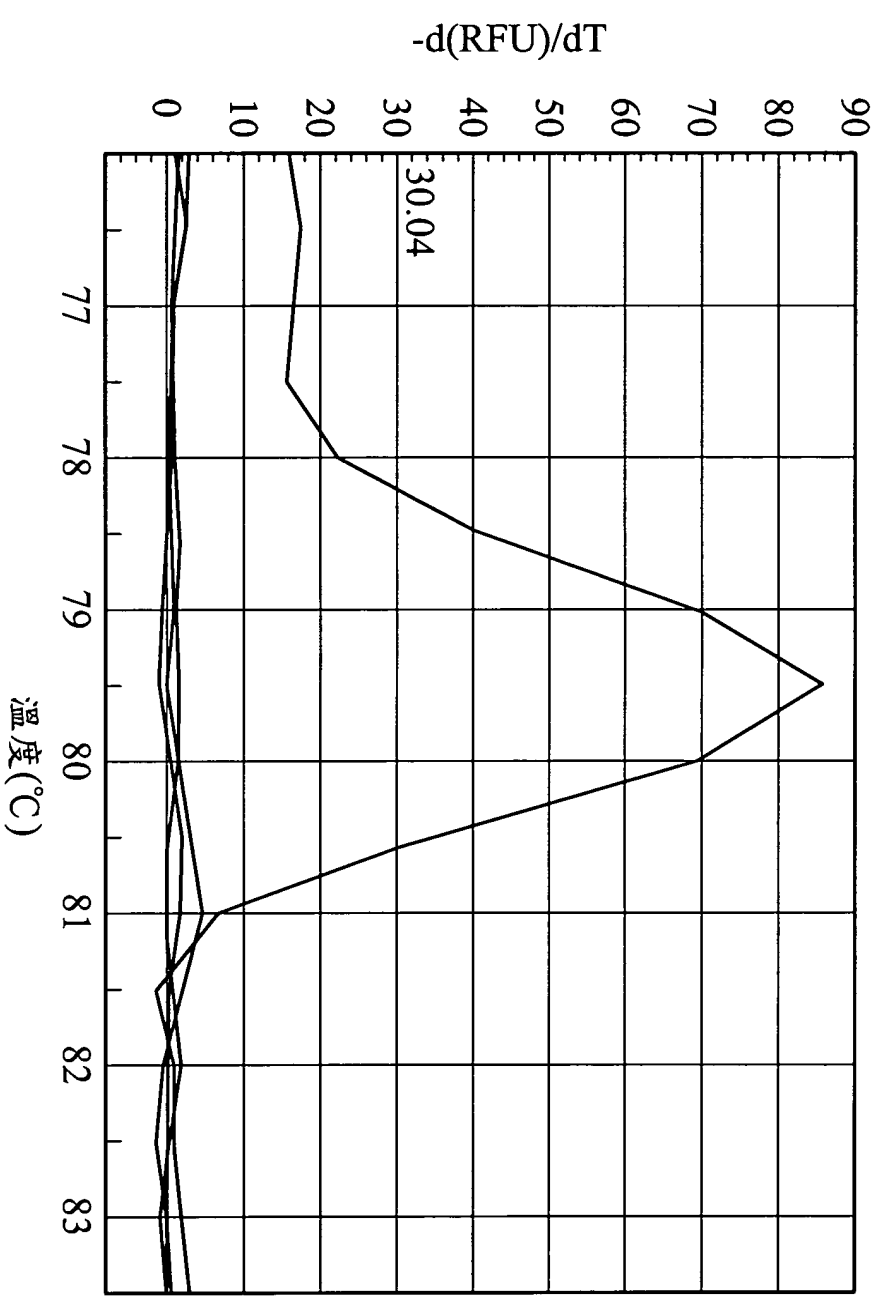
第 4e 圖



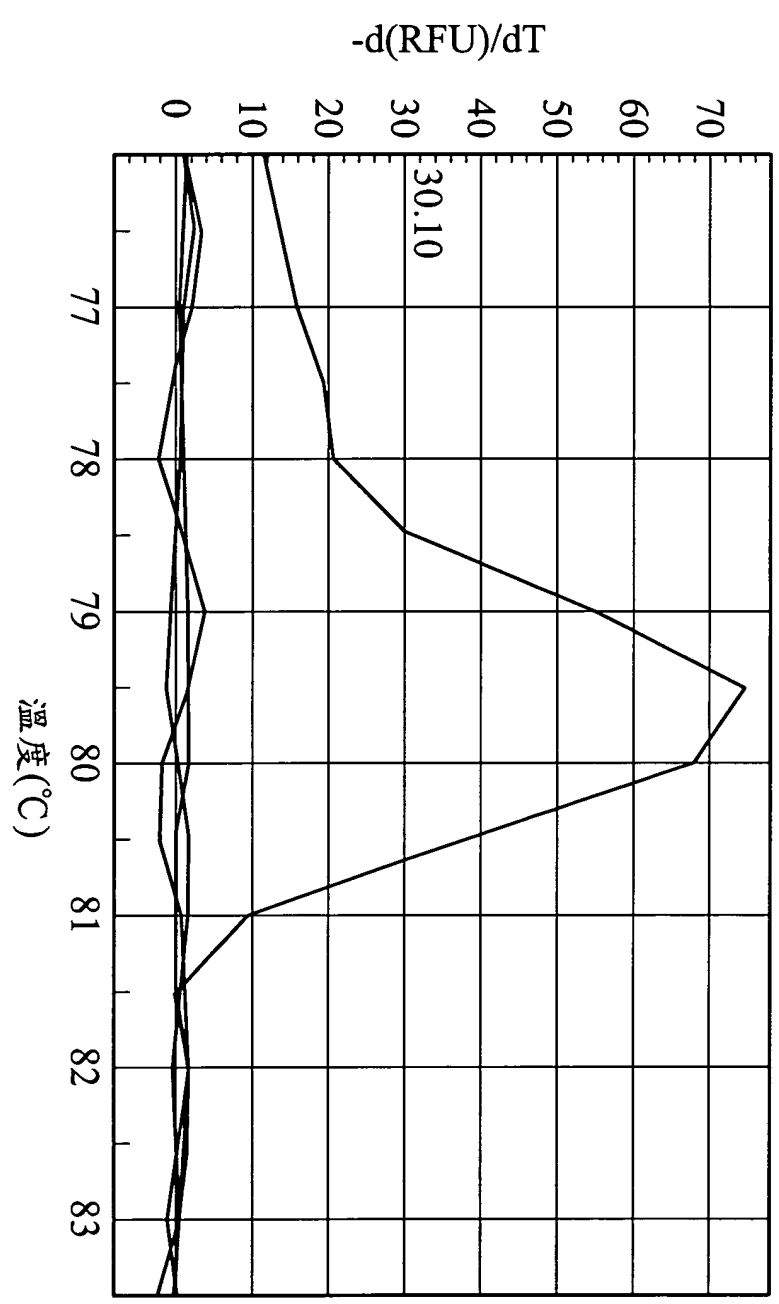
第4f圖



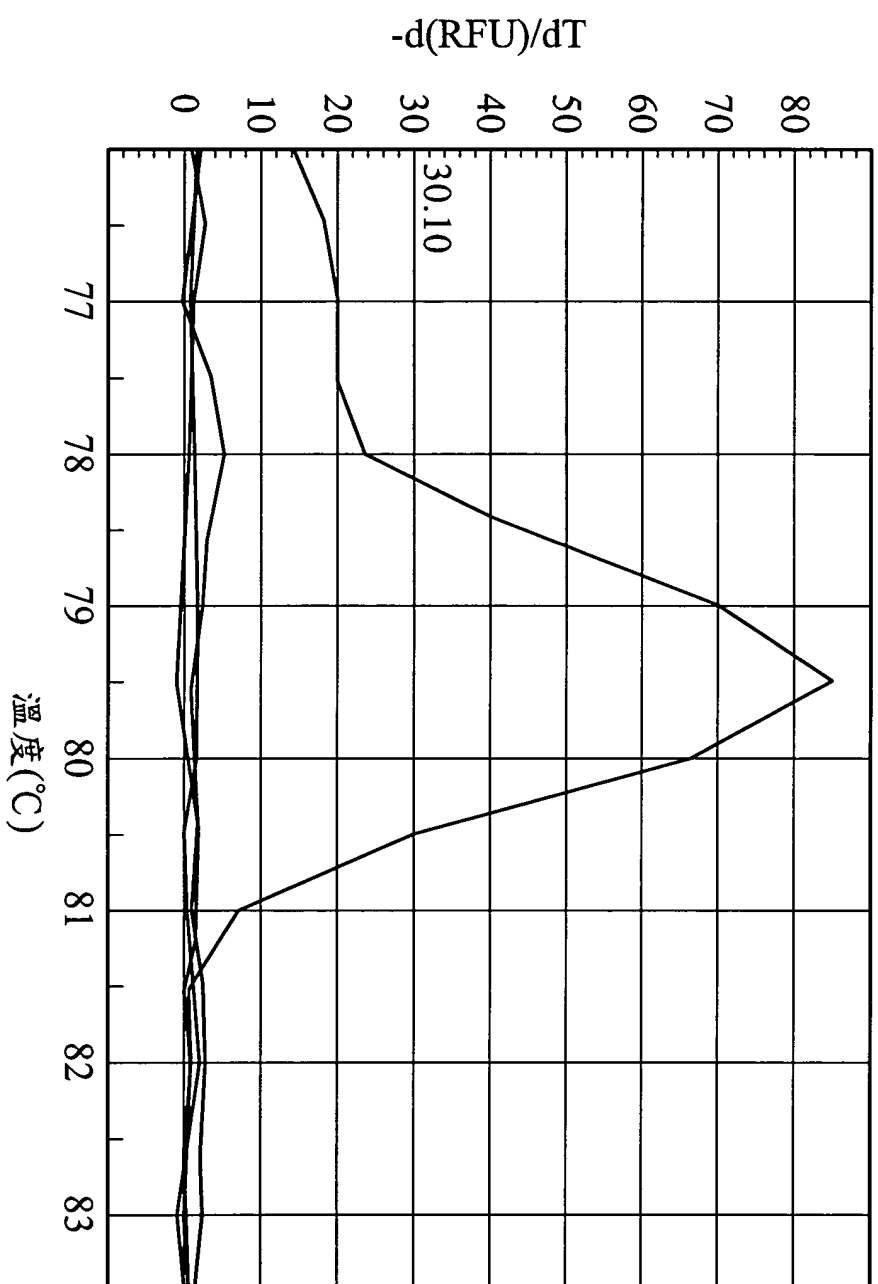
第 4g 圖



第4h圖



第 4i 圖



第4j圖