

【11】證書號數：I534269

【45】公告日：中華民國 105 (2016) 年 05 月 21 日

【51】Int. Cl.： C12Q1/68 (2006.01) C40B40/08 (2006.01)

發明

全 11 頁

【54】名稱：鑑定鶉屬鳥類、雞屬鳥類與馬雞屬鳥類性別的方法以及鑑別鶉屬鳥類、雞屬鳥類與馬雞屬鳥類性別之核苷酸引子對  
METHOD FOR COTURNIX, GALLUS AND CROSSOPTILON GENDER IDENTIFICATION AND NUCLEOTIDE PRIMER PAIR FOR COTURNIX, GALLUS AND GROSSOPTILON GENDER

【21】申請案號：100139058 【22】申請日：中華民國 100 (2011) 年 10 月 27 日

【11】公開編號：201317357 【43】公開日期：中華民國 102 (2013) 年 05 月 01 日

【72】發明人：張學偉 (TW) CHANG, HSUEH WEI；曾昭能 (TW) TSENG, CHAO NENG；  
劉于瑄 (TW) LIU, YU SHUAN【71】申請人：高雄醫學大學 KAOHSIUNG MEDICAL UNIVERSITY  
高雄市三民區十全一路 100 號

【74】代理人：洪澄文；顏錦順

【56】參考文獻：

TW I326712B

TW 201132764A1

NCBI GenBank：AF006660，2006 年 11 月 29 日

審查人員：莊智惠

## [57]申請專利範圍

1. 一種鑑定鶉屬鳥類、雞屬鳥類與馬雞屬鳥類性別的方法，包括：提供一鶉屬鳥類、雞屬鳥類或馬雞屬鳥類之 DNA 樣本；將該 DNA 樣本以於序列辨識號：9 或其互補股之序列範圍內設計之一第一引子與 P2 引子(序列辨識號：1)或其互補股之一第一引子對以及於序列辨識號：10 或其互補股之序列範圍內設計之一第二引子與 P2 引子(序列辨識號：1)或其互補股之一第二引子對進行聚合酶鏈鎖反應；以及對該聚合酶鏈鎖反應之產物進行熔點曲線分析，出現兩個波峰者為雌性，只出現一個波峰者為雄性。
2. 如申請專利範圍第 1 項所述之鑑定鶉屬鳥類、雞屬鳥類與馬雞屬鳥類性別的方法，其中該鶉屬鳥類包括藍胸鶉(*Coturnix chinensis*)，該雞屬鳥類包括雞(*Gallus gallus*)，而該馬雞屬鳥類包括褐馬雞(*Crossoptilon mantchuricum*)。
3. 如申請專利範圍第 1 項所述之鑑定鶉屬鳥類、雞屬鳥類與馬雞屬鳥類性別的方法，其中該第一引子對包括序列辨識號：11 與 P2 引子(序列辨識號：1)或序列辨識號：11 之互補股與 P2 引子(序列辨識號：1)之互補股。
4. 如申請專利範圍第 1 項所述之鑑定鶉屬鳥類、雞屬鳥類與馬雞屬鳥類性別的方法，其中該第二引子對包括序列辨識號：12 與 P2 引子(序列辨識號：1)或序列辨識號：12 之互補股與 P2 引子(序列辨識號：1)之互補股。
5. 如申請專利範圍第 1 項所述之鑑定鶉屬鳥類、雞屬鳥類與馬雞屬鳥類性別的方法，其中該聚合酶鏈鎖反應為即時聚合酶鏈鎖反應。
6. 如申請專利範圍第 1 項所述之鑑定鶉屬鳥類、雞屬鳥類與馬雞屬鳥類性別的方法，其中該兩個波峰之熔點溫度相差約 0.5-1.5 。

(2)

7. 如申請專利範圍第 1 項所述之鑑定鶉屬鳥類、雞屬鳥類與馬雞屬鳥類性別的方法，其中該兩個波峰之熔點溫度相差約 0.5。
8. 一種鑑定鶉屬鳥類、雞屬鳥類與馬雞屬鳥類性別的方法，包括：提供一鶉屬鳥類、雞屬鳥類或馬雞屬鳥類之 DNA 樣本；將該 DNA 樣本以於序列辨識號：9 或其互補股之序列範圍內設計之一第一引子與 P2 引子(序列辨識號：1)或其互補股之一第一引子對以及於序列辨識號：10 或其互補股之序列範圍內設計之一第二引子與 P2 引子(序列辨識號：1)或其互補股之一第二引子對進行聚合酶鏈鎖反應；以及對該聚合酶鏈鎖反應之產物進行電泳結果判定，出現兩個條帶者為雌性，只出現一個條帶者為雄性。
9. 如申請專利範圍第 8 項所述之鑑定鶉屬鳥類、雞屬鳥類與馬雞屬鳥類性別的方法，其中該鶉屬鳥類包括藍胸鶉，該雞屬鳥類包括雞，而該馬雞屬鳥類包括褐馬雞。
10. 如申請專利範圍第 8 項所述之鑑定鶉屬鳥類、雞屬鳥類與馬雞屬鳥類性別的方法，其中該第一引子對包括序列辨識號：11 與 P2 引子(序列辨識號：1)或序列辨識號：11 之互補股與 P2 引子(序列辨識號：1)之互補股。
11. 如申請專利範圍第 8 項所述之鑑定鶉屬鳥類、雞屬鳥類與馬雞屬鳥類性別的方法，其中該第二引子對包括序列辨識號：12 與 P2 引子(序列辨識號：1)或序列辨識號：12 之互補股與 P2 引子(序列辨識號：1)之互補股。
12. 如申請專利範圍第 8 項所述之鑑定鶉屬鳥類、雞屬鳥類與馬雞屬鳥類性別的方法，其中該兩個條帶所代表之核苷酸的長度差異為約 150-244-b.p。
13. 一種鑑別鶉屬鳥類、雞屬鳥類與馬雞屬鳥類性別之核苷酸引子對，包括於序列辨識號：9 或其互補股之序列範圍內設計之一第一引子與 P2 引子(序列辨識號：1)或其互補股之一第一引子對。
14. 如申請專利範圍第 13 項所述之鑑別鶉屬鳥類、雞屬鳥類與馬雞屬鳥類性別之核苷酸引子對，更包括於序列辨識號：10 或其互補股之序列範圍內設計之一第二引子與 P2 引子(序列辨識號：1)或其互補股之一第二引子對。
15. 如申請專利範圍第 13 項所述之鑑別鶉屬鳥類、雞屬鳥類與馬雞屬鳥類性別之核苷酸引子對，其中該第一引子對包括序列辨識號：11 與 P2 引子(序列辨識號：1)或序列辨識號：11 之互補股與 P2 引子(序列辨識號：1)之互補股。
16. 如申請專利範圍第 14 項所述之鑑別鶉屬鳥類、雞屬鳥類與馬雞屬鳥類性別之核苷酸引子對，其中該第二引子對包括序列辨識號：12 與 P2 引子(序列辨識號：1)或序列辨識號：12 之互補股與 P2 引子(序列辨識號：1)之互補股。

#### 圖式簡單說明

第 1A-1B 圖顯示以 P2/P8 引子分別對藍胸鶉與雞 DNA 進行聚合酶鏈反應後所得之產物之 3% 膠體電泳圖。M 與 B 分別指以 100-b.p. 為倍數的標準 DNA 分子量標誌與 P2/P8 聚合酶鏈反應空白組。藍胸鶉與雞分別藉由 C 與 G 所指出。三角形、箭號與附有星號之箭號指出 P2/P8 擴增子的位置。

第 1C 圖顯示以 P2/P8 引子分別對藍胸鶉 DNA 進行聚合酶鏈反應後所得之產物之熔點曲線分析。

第 1D 圖顯示以 P2/P8 引子分別對雞 DNA 進行聚合酶鏈反應後所得之產物之熔點曲線分析。

第 2A-2B 圖顯示藍胸鶉(*Coturnix chinensis*)、雞(*Gallus gallus*)與褐馬雞(*Crossoptilon mantchuricum*)之 CHD-Z 與 CHD-W 基因序列比較圖。

第 3A-3B 圖顯示以本發明重新設計之引子分別對藍胸鶉與雞 DNA 進行聚合酶鏈反應後所得之產物之 1.5% 膠體電泳圖。M 與 B 分別指以 100-b.p. 為倍數的標準 DNA 分子量標誌與聚

(3)

合酶鏈反應空白組。三角形分別指出 ZW-cot-F1/P2(114-b.p.)與 W-cot-F1/P2(315-318-b.p.)之擴增子的位置。

第 3C 圖顯示以本發明重新設計之引子分別對雄性藍胸鶉 C1 之 DNA 進行聚合酶鏈反應後所得之熔點曲線分析。

第 3D 圖顯示以本發明重新設計之引子分別對雄性藍胸鶉 C2 之 DNA 進行聚合酶鏈反應後所得之熔點曲線分析。

第 3E 圖顯示以本發明重新設計之引子分別對雌性藍胸鶉 C3 之 DNA 進行聚合酶鏈反應後所得之熔點曲線分析。

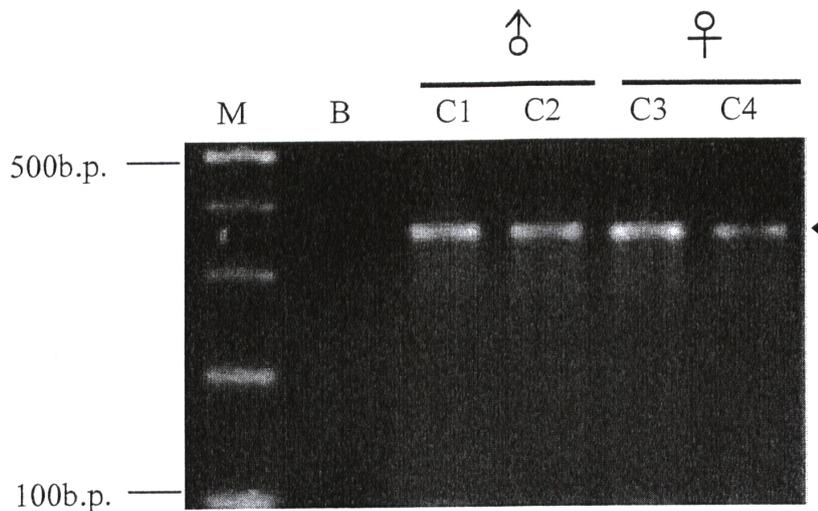
第 3F 圖顯示以本發明重新設計之引子分別對雌性藍胸鶉 C4 之 DNA 進行聚合酶鏈反應後所得之熔點曲線分析。

第 3G 圖顯示以本發明重新設計之引子分別對雄性雞 G1 之 DNA 進行聚合酶鏈反應後所得之熔點曲線分析。

第 3H 圖顯示以本發明重新設計之引子分別對雄性雞 G2 之 DNA 進行聚合酶鏈反應後所得之熔點曲線分析。

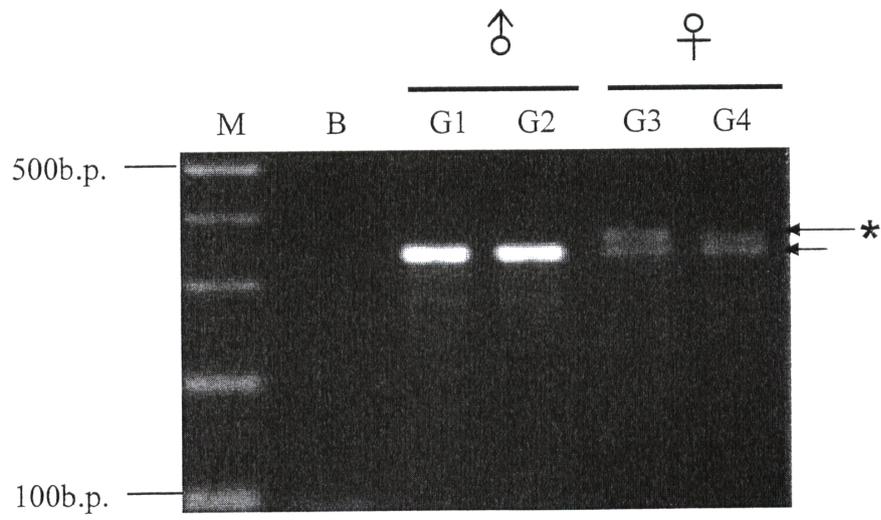
第 3I 圖顯示以本發明重新設計之引子分別對雌性雞 G3 之 DNA 進行聚合酶鏈反應後所得之熔點曲線分析。

第 3J 圖顯示以本發明重新設計之引子分別對雌性雞 G4 之 DNA 進行聚合酶鏈反應後所得之熔點曲線分析。

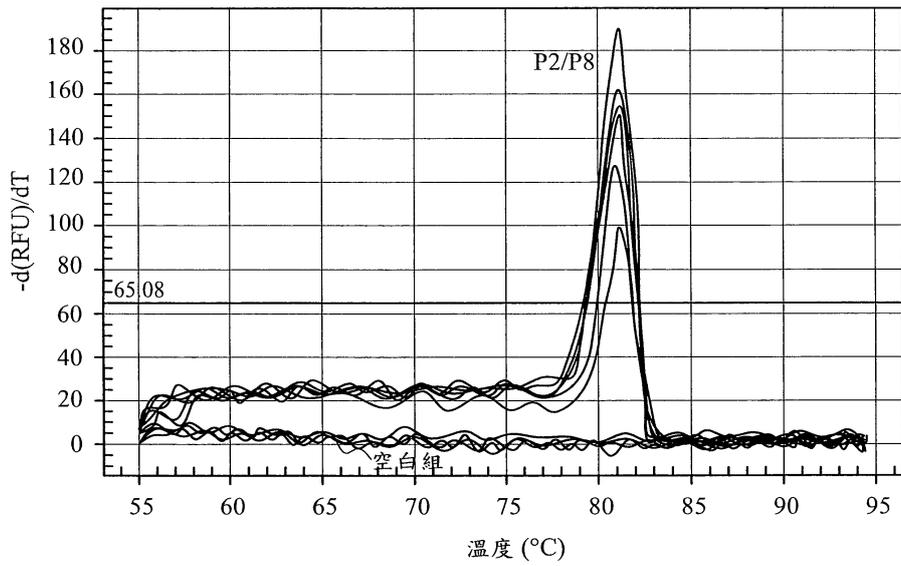


第 1A 圖

(4)



第 1B 圖



第 1C 圖



(6)

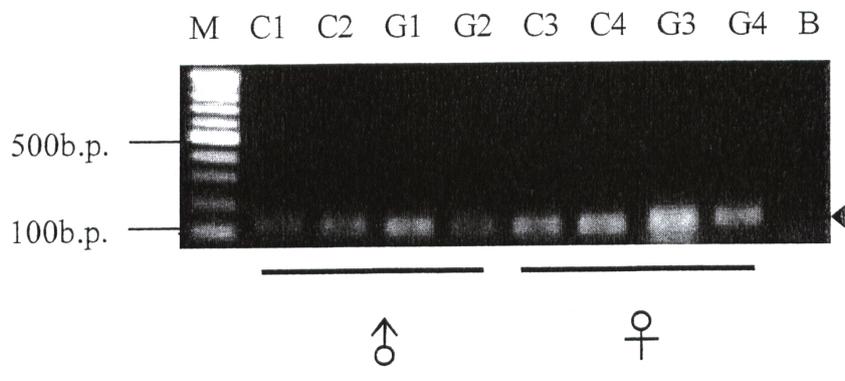
```

      1
TT- -GATACTTCCATTGCTGATGTTTTGTCTTGTACTTTTGTGTGTTGTGTT- -GGTTTTCGT
TT- -GATACTTCTATTGCTGATGTTTTGTCTTGTACTTTTGTGTGTTGTGTT- -GGTTTTCGT
TT- -GATACTTACATTGCTGATGTTTTGTCTTGTACTTTTGTGTGTTGTGTT- -GGTTTTCGT
TTATGTTGATATTTTTGTTTTGGTTATTGCCTGTGGTTTTTTTTTGTTTTTTTTT
TTATGTTGATATTTTCATTTGAGTTTTTGCCT-----TTTT
TTATGTTGATATTTTCATTTTGGTTTTTGCCT-----TTTTTAT
** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
AGTCATGTAGCTTTGAACTAGTTACTCTGAACTTCCAGATCAGCTTTAATGGAAATGAAG
AGTCATGTAGCTTTGAACTAGTTACTCTGAACTTCCAGATCAGCTTTAATGGAAATGAAG
AGTCACATAGCTTTGAACTAGTTACTCTGAACTTCCAGATCAGCTTTAATGGAAATGAAG
AATCATGTAGCTTTGAACTTTC - TTATTCTGACATTGCAGATCAGCTTTAATGGAAATGAAG
AATCATGTGGCTTTGAACTTTC - TCATGCTGAAATCCAGATCAGCTTTAATGGGAGTGAAG
ACTCATGTAGCTTTGAACTTTC - TTGTTCTGAAATCCAGATCAGCTTTAATGGAAATGAAG
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
      2
AACGACCAAAAAAACGTTGGACGACCACGAACATAACCCCGAGAAAAACATTAAGGATTTA
AACGACCAAAAAAACGTTGGACGACCACGAACATAACCCCGTGA AAAACATTAAGGATTTA
AACGACCAAAAAAACGTTGGACGACCACGAACATAACCCCGTGA AATCATTAAAGGATTTA
AACGACCAAAAAAACGTTGGGAGACCTCGAACTATTCTCGAGAAAAATTAAGGATTTA
AACGACCAAAAAAACGTTGGAAGACCTCGAACTATTCTCGAGAAAAATTAAGGATTTA
AACGACCAAAAAAACGTTGGGAGACCTCGAACTATTCTCGAGAAAAATTAAGGATTTA
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

第 2B 圖

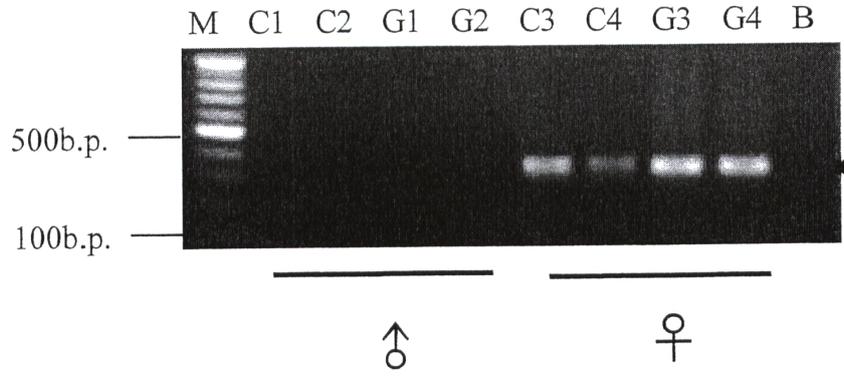
ZW/P2 引子



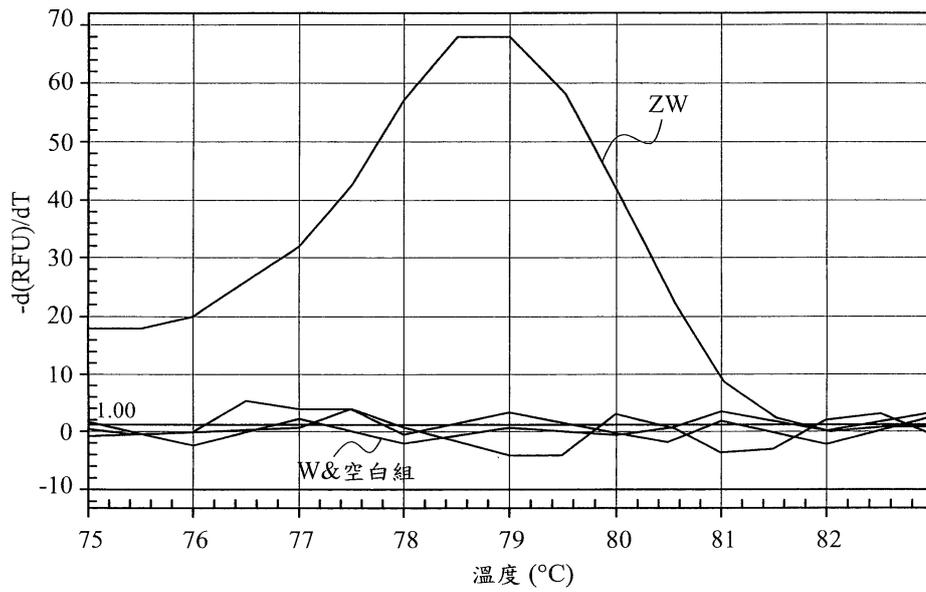
第 3A 圖

(7)

W/P2 引子

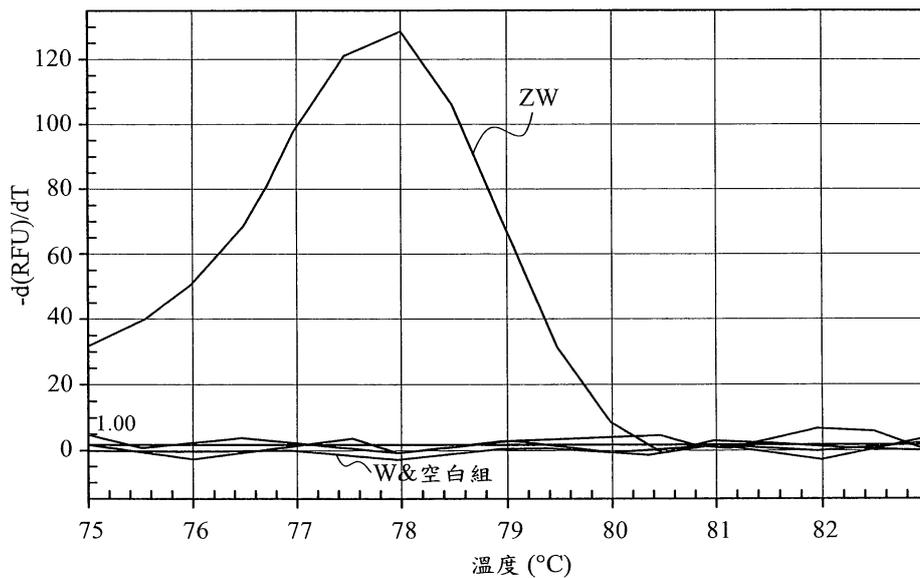


第 3B 圖

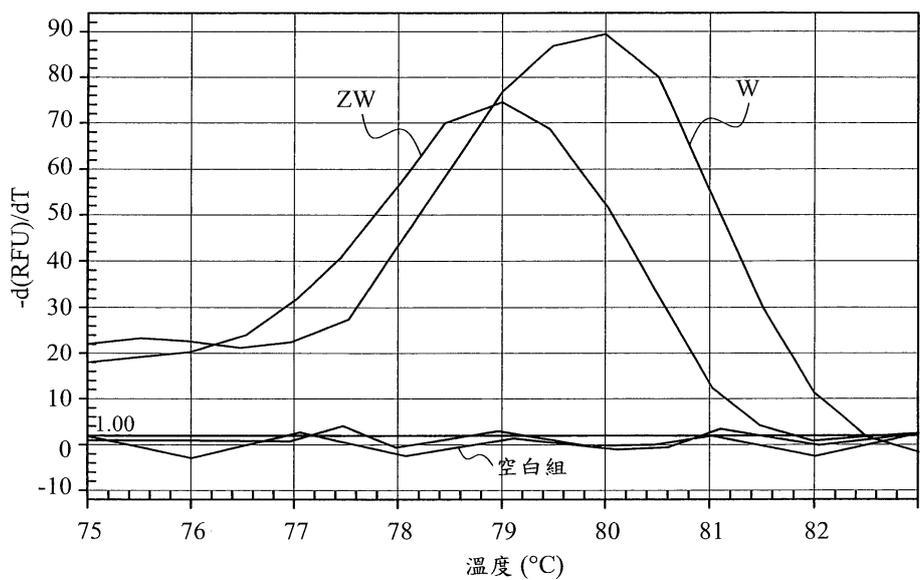


第 3C 圖

(8)

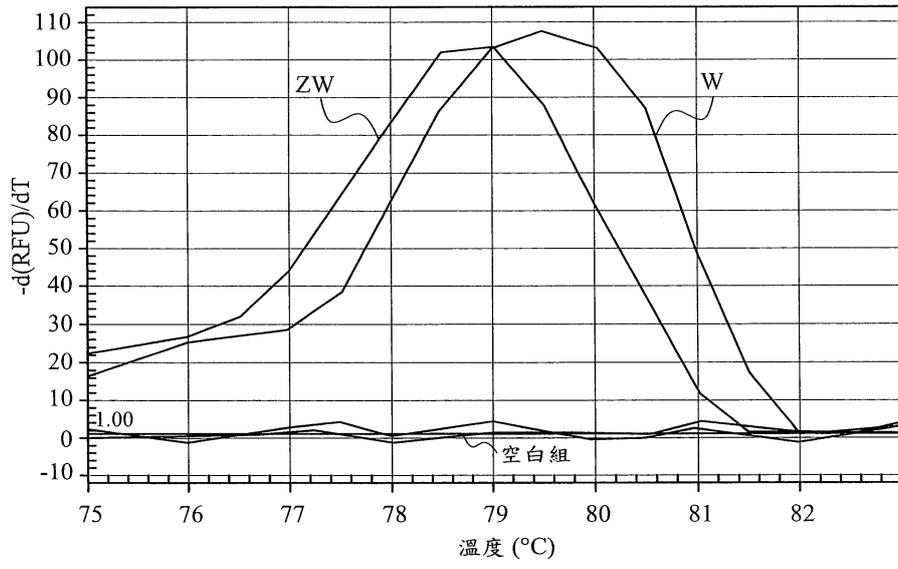


第 3D 圖

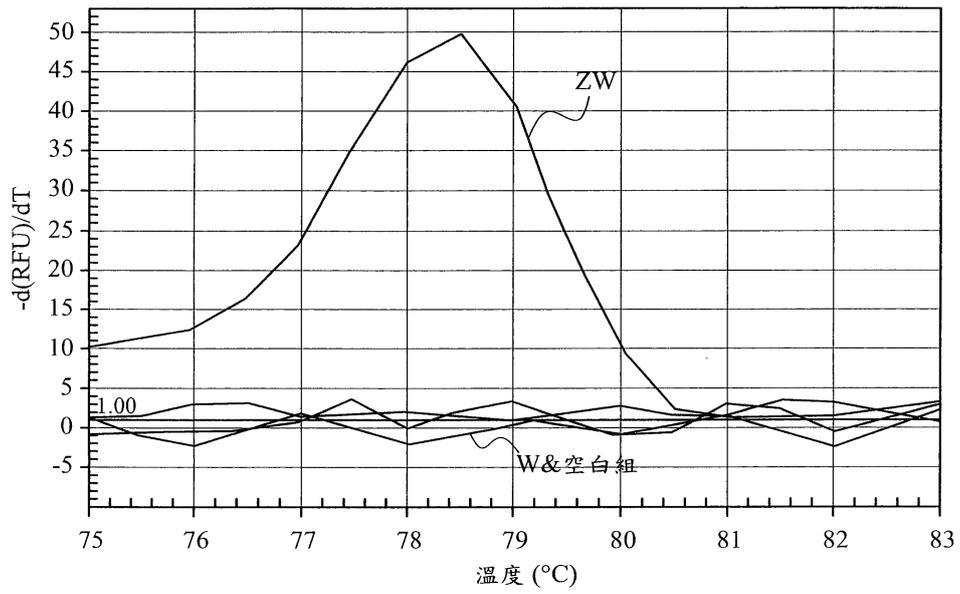


第 3E 圖

(9)

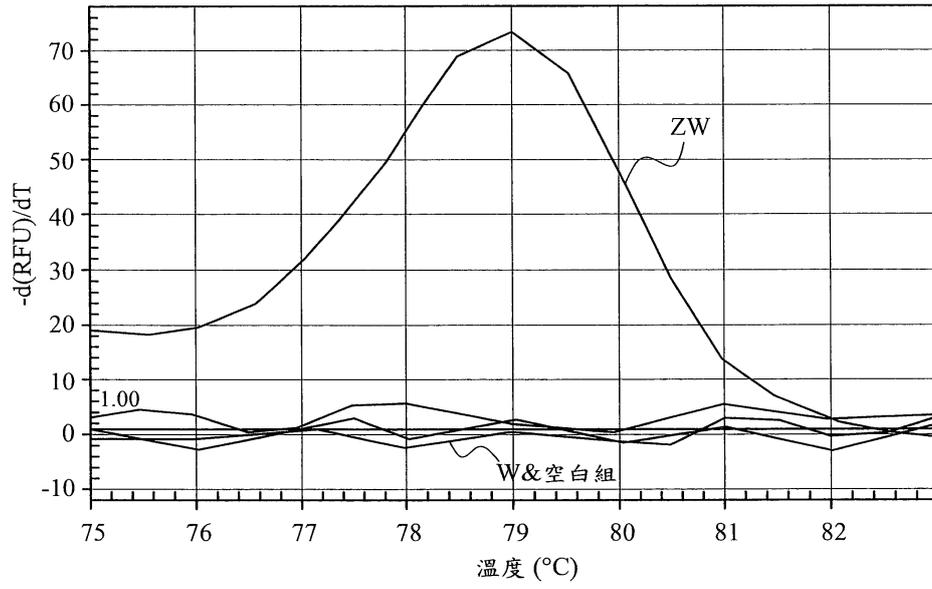


第 3F 圖

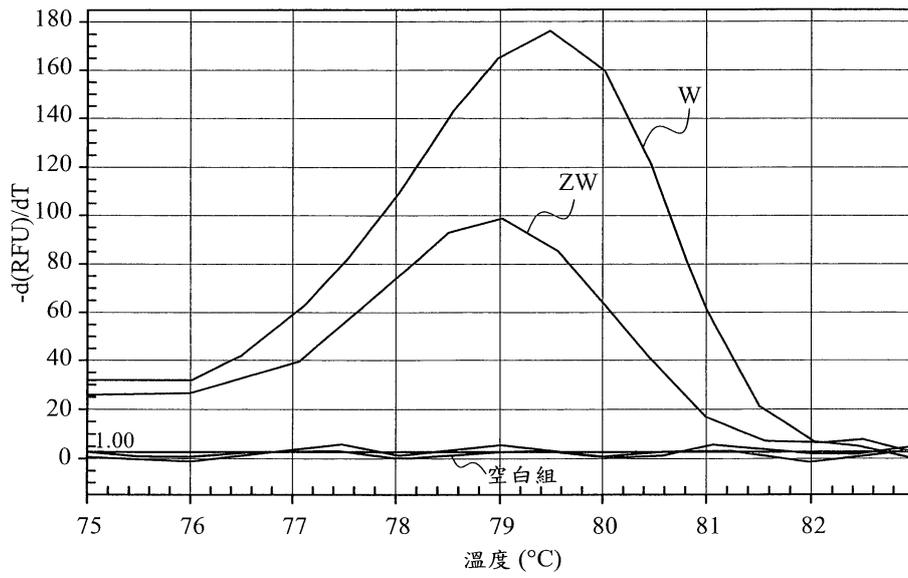


第 3G 圖

(10)

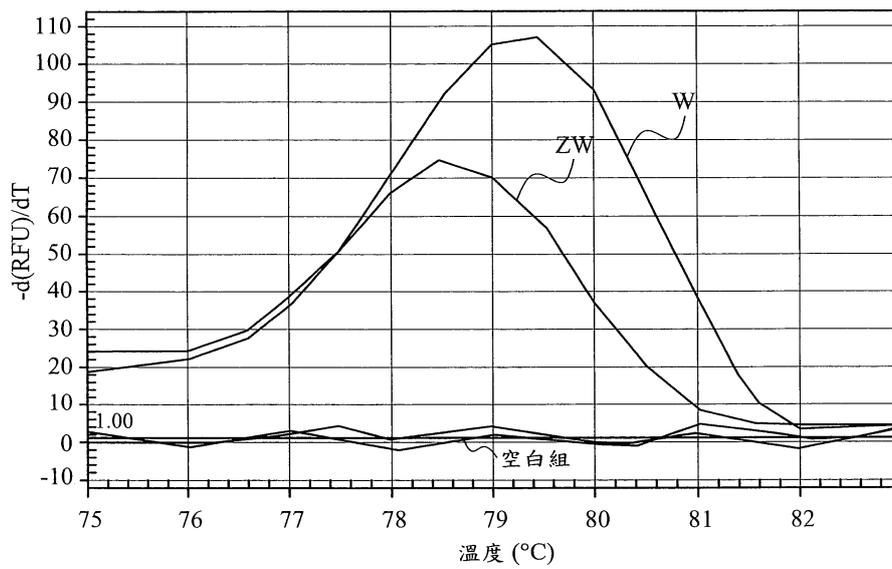


第 3H 圖



第 3I 圖

(11)



第 3J 圖