



- (21)申請案號：099109810 (22)申請日：中華民國 99 (2010) 年 03 月 31 日
- (51)Int. Cl. : *C12Q1/68 (2006.01)* *G01N33/48 (2006.01)*
- (71)申請人：高雄醫學大學(中華民國) KAOHSIUNG MEDICAL UNIVERSITY (TW)
 高雄市三民區十全一路 100 號
- (72)發明人：張學偉 CHANG, HSUEH WEI (TW)；程建中 CHENG, CHIEN CHUNG (TW)；蘇盈方 SU, YING FANG (TW)；洪瑜謙 HUNG, YU CHEN (TW)
- (74)代理人：洪澄文；顏錦順
- (56)參考文獻：
- TW 200914622
- Wu CP et al., A novel sex-specific DNA marker in Columbidae birds. *Theriogenology*. 2007 Jan 15;67(2):328-33. Epub 2006 Sep 11.
- Griffiths R et al., A DNA test to sex most birds. *Mol Ecol*. 1998 Aug;7(8):1071-5.
- 審查人員：莊智惠
- 申請專利範圍項數：18 項 圖式數：3 共 45 頁

(54)名稱

鑑定鳩鴿科鳥類性別的方法、鑑別鳩鴿科鳥類性別之核苷酸序列與鑑別鳩鴿科鳥類性別之核苷酸引子對

METHOD FOR COLUMBIDAE GENDER IDENTIFICATION, NUCLEOTIDE SEQUENCE FOR COLUMBIDAE GENDER AND NUCLEOTIDE PRIMER PAIR FOR COLUMBIDAE GENDER

(57)摘要

本發明提供一種鑑定鳩鴿科鳥類性別的方法，包括：提供一鳩鴿科鳥類之 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。

The invention providing a method for Columbidae gender identification including: providing a DNA of a Columbidae; performing a polymerase chain reaction to the DNA with the first primer designed within the region of SEQ ID NO: 9 or the complementary sequence thereof/P2 primer or the complementary sequence thereof of a first primer pair and the second primer designed within the region of SEQ ID NO: 10 or the complementary sequence thereof/P2 or the complementary sequence thereof primer of a second primer pair; and determining gender by performing a melting curve analysis to the polymerase chain reaction product, with the result showing two peaks being female while one peak being male.

1、2... 黑框區

P2引子

TCTGCATCGCTAAATCCTTT

C. livia-Z TCTGCATCGCTAAATCCTTTAATATTTTCTCGAGGAATGGTTCGTGGTCTCCACGTTTT
 C. pulchricollis-Z TCTGCATCGCTAAATCCTTTAATATTTTCTCGAGGAATGGTTCGTGGTCTCCACGTTTT
 S. tranquebarica-Z TCTGCATCGCTAAATCCTTTAATATTTTCTCGAGGAATGGTTCGTGGTCTCCACGTTTT
 C. livia-W TCTGCATCGCTAAATCCTTTAATATTTTCTCGAGGAATAGTTCGTGGTCTCCACGTTTT
 C. pulchricollis-W TCTGCATCGCTAAATCCTTTAATATTTTCTCGAGGAATAGTTCGTGGTCTCCACGTTTT
 S. tranquebarica-W TCTGCATCGCTAAATCCTTTATGCATTCTCGAGGAATAGTTCGTGGTCTCCACGTTTT

ZW-序列共同區 ~2

C. livia-Z TTTGGCGGTTTTCTTTCTGATATGGAGTCACTATCAGATCCAGAGGTATCTTCTGCTCCTA
 C. pulchricollis-Z TTTGGCGGTTTTCTTTCTGATATGGAGTCACTATCAGATCCAGAGGTATCTTCTGCTCCTA
 S. tranquebarica-Z TTTGGCGGTTTTCTTTCTGATATGGAGTCACTATCAGATCCAGAGGTATCTTCTGCTCCTA
 C. livia-W TTTGGTGGTTTTCTTTCTGACATGGAGTCACTATCAGATCCAGAAGTATCTTCTGCTTCTA
 C. pulchricollis-W TTTGGTGGTTTTCTTTCTGAGATGGAGTCACTATCAGATCCAGAAGTATCTTCTGCTTCTA
 S. tranquebarica-W TTTGGTGGTTTTCTTTCTGAGATGGAGTCACTATCAGATCCAGAAGTATCTTCTGCTTCTA

第2A圖
 第2B圖
 第2C圖

第2A圖

發明專利說明書

公告本

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：99109810

C12Q 1/68 (2006.0)

※申請日：99.3.31

※IPC 分類：

G01N 33/48 (2006.0)

一、發明名稱：(中文/英文)

鑑定鳩鴿科鳥類性別的方法、鑑別鳩鴿科鳥類性別之核苷酸序列
與鑑別鳩鴿科鳥類性別之核苷酸引子對

Method for *Columbidae* gender identification, nucleotide sequence for
Columbidae gender and nucleotide primer pair for *Columbidae* gender

二、中文發明摘要：

本發明提供一種鑑定鳩鴿科鳥類性別的方法，包括：
提供一鳩鴿科鳥類之 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）或其互補股的一第一引子對以
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）或其互補股的一第二
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。

三、英文發明摘要：

The invention providing a method for *Columbidae* gender
identification including: providing a DNA of a *Columbidae*;
performing a polymerase chain reaction to the DNA with the first
primer designed within the region of SEQ ID NO: 9 or the
complementary sequence thereof/P2 primer or the complementary
sequence thereof of a first primer pair and the second primer designed

within the region of SEQ ID NO: 10 or the complementary sequence thereof /P2 or the complementary sequence thereof primer of a second primer pair; and determining gender by performing a melting curve analysis to the polymerase chain reaction product, with the result showing two peaks being female while one peak being male.

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(2A-2C)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

1、2～黑框區

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：
無。

六、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，且特別關於鳩鴿科 (*Columbidae*) 鳥類之分子性別鑑定技術。

【先前技術】

性別鑑定對於監測於顯示族群降低趨勢之區域中的族群大小而言為重要的。性別比率對於幫助鳥類繁殖、監測族群穩定度與偵測全球變遷關係而言為重要因子。然而，由於外表無法區分性別，所以大多數的鳩鴿科鳥類屬於單一性徵。因此鳩鴿科鳥類之性別鑑定為困難的。

傳統上，鳥類之分子性別鑑定是根據由 Griffiths P2/P8 引子 (Griffiths, et al, 1998) 所擴大之染色體解旋酶 DNA 鍵結蛋白 (Chromo-Helicase-DNA binding protein, *CHD*)-Z 與染色體解旋酶 DNA 鍵結蛋白-W 兩者之間的內隱子 (intron) 長度差異，即，在電泳分析後，雄性包含一單一的 *CHD*-Z (ZZ) 條帶 (band)，而雌性包含兩個條帶 (*CHD*-Z 與 *CHD*-W；ZW)。目前已發展用於鳥類性別鑑定之其他方法，例如用於聚合酶鏈鎖反應之重新設計的非 P2/P8 引子 (Fridolfsson, A. and Ellegren, H. (1999) A simple and universal method for molecular sexing of non-ratite birds. *Journal of Avian Biology*, 30, 116-121.; Chang, H.W., Chou, T.C., Gu, D.L., Cheng, C.A., Chang, C.C., Yao, C.T., Chuang, L.Y., Wen, C.H., Chou, Y.C., Tan, K.Y. et al. (2008) An improved PCR method for gender identification of eagles. *Molecular and*

cellular probes, 22, 184-188.)、聚合酶鏈鎖反應-限制性片段長度多型性(PCR-RFLP)(Sacchi, P., Soglia, D., Maione, S., Meneguz, G., Campora, M. and Rasero, R. (2004) A non-invasive test for sex identification in short-toed Eagle (*Circaetus gallicus*). *Molecular and cellular probes*, 18, 193-196.; Reddy, A., Prakash, V. and Shivaji, S. (2007) A rapid, non-invasive, PCR-based method for identification of sex of the endangered Old World vultures (white-backed and long-billed vultures) - Implications for captive breeding programmes. *Current Science*, 92, 659-662.)、隨機複製多型性 DNA-聚合酶鏈鎖反應(RAPD-PCR)(Wu, C.P., Horng, Y.M., Wang, R.T., Yang, K.T. and Huang, M.C. (2007) A novel sex-specific DNA marker in Columbidae birds. *Theriogenology*, 67, 328-333.)與擴增片段長度多形性-聚合酶鏈鎖反應(AFLP-PCR)(Huang, C.W., Cheng, Y.S., Rouvier, R., Yang, K.T., Wu, C.P. and Huang, M.C. (2007) AFLP fingerprinting for paternity testing in ducks. *Br Poult Sci*, 48, 323-330.)。

或者，使用熔點曲線分析(melting curve analysis, MCA)可以同時測量許多許多聚合酶鏈鎖反應複製子(amplicon)的熔點溫度值。熔點曲線分析可排除電泳步驟以節省時間且成為高通量(high-throughput)。熔點曲線分析廣泛應用於許多領域，例如甲基化、SNP 基因型分類、突變的偵測、微生物之屬的鑑定、染色體構形捕捉(chromosome conformation capture)之定量；然而，很少將其應用於鳥類

的性別鑑定。

對於熔點曲線分析而言，特定聚合酶鏈鎖反應複製子之不同熔點溫度值與相對應電泳條帶有不同位移遷移率而言是類似的。不同長度的複製子有不同的熔點溫度值(T_m ; melting temperature)，即長度越長，其 T_m 值越大；長度越短，其 T_m 值越小。因此，基於其 *CHD-Z* 與 *CHD-W* 之不同熔點溫度值，使用熔點曲線分析來鑑定一些鳩鴿科鳥類的性別為可能的。雖然熔點曲線分析可用來確認 *CHD-Z* 與 *CHD-W* 複製子之不同熔點溫度值，然而在不同種鳥類之間其長度差異為多變的。短小之 *CHD-Z* 與 *CHD-W* 複製子的內隱子(intron)長度差異，常常導致其之間有微小的熔點溫度值差異，且由於即時聚合酶鏈鎖反應機器(real-time PCR machine)之解析度限制，在熔點曲線分析中可能為無法區分。

近來，自隨機複製多型性 DNA 方法產生之雌性專一引子已被報導於三種鳩鴿科鳥類之性別鑑定(Wu, C.P., Horng, Y.M., Wang, R.T., Yang, K.T. and Huang, M.C. (2007) A novel sex-specific DNA marker in Columbidae birds. *Theriogenology*, 67, 328-333.)，例如金背鳩(*Streptopelia orientalis*)、斑頸鳩(*Streptopelia chinensis*)與家鴿(*Columba livia*)，其產生之聚合酶鏈鎖反應之長度分別為 777-b.p.、778-b.p.與 770-b.p.。16S rRNA (256 b.p.)作為對於使用此雌性專一引子之性別鑑定的聚合酶鏈鎖反應控制組。然而。此雌性專一引子需放大長度長之聚合酶鏈鎖反應產物，而可能遭受樣本 DNA 本質不佳的問題，特別是收集於田野研

究之樣本，由於其 DNA 可能降解。所以，一些降解或縮短之雌性樣本可能無法用此雌性專一引子進行正確檢測。由於一個細胞的多數細胞核基因只有一套時，粒腺體的數目可能有 1000 個，使得粒腺體基因的複製數目 (copy number) 約為細胞核基因的 1000 倍。因此，一些降解或縮短之雌性樣本，只要 1000 個粒線體其中有一個完整的，其 16S rRNA 仍可被放大。即，因為 16S rRNA 為正反應，而雌性專一聚合酶鏈鎖反應為負反應，在此情況下，雌性可能被誤認為是雄性。

因此，目前亟需一高通量、高準確度之鳩鴿科鳥類性別方法。

【發明內容】

本發明提供一種鑑定鳩鴿科鳥類性別的方法，包括：提供一鳩鴿科鳥類之 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）或其互補股的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）或其互補股的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。

本發明另提供一種鑑定鳩鴿科鳥類性別的方法，包括：提供一鳩鴿科鳥類之 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）或其互補股的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）或其互補股的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。

本發明還提供一種鑑別鳩鴿科鳥類性別之核苷酸序列，包括序列辨識號：9 或其互補股之序列。

本發明更提供一種鑑別鳩鴿科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）或其互補股的一第一引子對。

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：1) (順向) / P8 (5'-CTCCCAAGGATGAGRAAYTG-3') (序列辨識號：2) 引子 (逆向) (Griffiths, *et al*, 1998) 分別對家鴿 (*Columba livia*)、灰林鴿 (*Columba pulchricollis*) 與紅鴿 (*Streptopelia tranquebarica*) 的 DNA 進行聚合酶鏈鎖反應，並將聚合酶鏈鎖反應產物經電泳純化與 DNA 定序。

在對家鴿 DNA 的聚合酶鏈鎖反應中得到較高分子量

之序列辨識號：3 與較低分子量之序列辨識號：4；在對灰林鴿 DNA 的聚合酶鏈鎖反應中得到較高分子量之序列辨識號：5 與較低分子量之序列辨識號：6；在對紅鳩 DNA 的聚合酶鏈鎖反應中得到較高分子量之序列辨識號：7 與較低分子量之序列辨識號：8。藉由 BLAST 分析後，確認序列辨識號：3、5 及 7 與其他鳥類之 *CHD-Z* 基因非常相似，而序列辨識號：4、6 及 8 則與其他鳥類之 *CHD-W* 非常相似，因此確認序列辨識號：3、5 及 7 分別為家鴿、灰林鴿與紅鳩之 *CHD-Z* 的基因序列，而序列辨識號：4、6 及 8 則為分別為家鴿、灰林鴿與紅鳩之 *CHD-W* 的基因序列。

上述之聚合酶鏈鎖反應之條件可視不同情況而做調整，較佳為：95°C，4 分鐘；95 °C，30 秒，5 次循環；47 °C，30 秒；72 °C，30 秒；95 °C，30 秒，49 次循環；46 °C，20 秒；72 °C，20 秒以及 72°C，5 分鐘。

將不同種類之鳩鴿科鳥類的 *CHD-Z* 基因與 *CHD-W* 基因以生物資訊工具 SDSC-Biology Workbench (<http://workbench.sdsc.edu/>) 進行序列排列比對(sequence alignment)，可得到不同種鳩鴿科鳥類之 *CHD-ZW* 序列共同區以及 *CHD-W* 序列專一區。在一實施例中，上述之不同種之鳩鴿科鳥類可包括家鴿、灰林鴿與紅鳩。在一實施例中，*CHD-W* 序列專一區較佳為序列辨識號：9 或其互補股，而 *CHD-ZW* 序列共同區較佳為序列辨識號：10 或其互補股。

接著本發明依此 *CHD-W* 序列專一區，或此 *CHD-W* 序列專一區以及 *CHD-ZW* 序列共同區提供一種鑑定鳩鴿科鳥類性別的方法。

在本發明一實施態樣中，係藉由以聚合酶鏈鎖反應為基礎之熔點曲線分析方法來進行鳩鴿科鳥類之性別鑑定。

在一實施例中，首先可提供一鳩鴿科鳥類的 DNA，將此 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進行聚合酶鏈鎖反應。然後，對此聚合酶鏈鎖反應之產物進行熔點曲線分析，出現一個波峰者為雌性，而沒有出現波峰者為雄性或者是 DNA 品質不良無法判定。此時，要確認為雄性時，可採用以下另一實施例。

在另一實施例中，首先可提供一鳩鴿科鳥類的 DNA，將此 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。然後，對此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。

第一引子對的例子可包括序列辨識號：9 之互補股（逆向）與 P2 引子（序列辨識號：1）（順向）或序列辨識號：9（順向）與 P2 引子（序列辨識號：1）之互補股（逆向）。又，第一引子對的例子也可包括序列辨識號：11 之互補股（逆向）與 P2 引子（序列辨識號：1）（順向）或序列辨識號：11（順向）與 P2 引子（序列辨識號：1）之互補股（逆向）。此外，第二引子對的例子可包括序列辨識號：10 之互補股（逆向）與 P2 引子（序列辨識號：1）（順向）

或序列辨識號：10（順向）與 P2 引子（序列辨識號：1）之互補股（逆向）。又，第二引子對的例子也可包括序列辨識號：12 之互補股（逆向）與 P2 引子（序列辨識號：1）（順向）或序列辨識號：12（順向）與 P2 引子（序列辨識號：1）之互補股（逆向）。

由於雌性同時具有 *CHD-Z* 與 *CHD-W* 基因，故當樣本為雌性，且僅使用第一引子（於 *CHD-W* 序列專一區）/P2 引子或其互補股之第一引子對進行聚合酶鏈鎖反應時，雌性 DNA 樣本會產生一段聚合酶鏈鎖反應產物，為第一引子（於 *CHD-W* 序列專一區）/P2 引子或其互補股之第一引子對所產生之產物。因此，將此聚合酶鏈鎖反應產物進行熔點分析時，會產生一個熔點曲線，且具一個波峰。此外，當樣本為雌性，且同時使用第一引子（於 *CHD-W* 序列專一區）/P2 引子或其互補股之第一引子對與第二引子（於 *CHD-ZW* 序列共同區）/P2 引子或其互補股之第二引子對進行聚合酶鏈鎖反應時，雌性 DNA 樣本會產生兩個聚合酶鏈鎖反應產物，分別為第一引子（於 *CHD-W* 序列專一區）/P2 引子或其互補股之第一引子對所產生之產物與第二引子（於 *CHD-ZW* 序列共同區）/P2 引子或其互補股之第二引子對所產生之產物。因此將聚合酶鏈鎖反應產物進行熔點分析時，兩個產物各會產生一熔點曲線（兩條熔點曲線），且具兩個波峰。在一實施例中，第一引子（序列辨識號：11 之互補股，於 *CHD-W* 序列專一區）（逆向）/P2 引子之第一引子對所產生之產物為約 252 -b.p.，而第二引子（序列辨識號：12 之互補股，於 *CHD-ZW* 序列共同區）/P2 引

子之第二引子對所產生之產物為約 104-b.p.。

而雄性僅具有 *CHD-Z*，故當樣本為雄性，且僅使用第一引子（於 *CHD-W* 序列專一區）/P2 引子或其互補股之第一引子對進行聚合酶鏈鎖反應時，雄性 DNA 樣本並無法產生聚合酶鏈鎖反應產物。因此，進行熔點分析時，不會出現熔點曲線，不具波峰。此外，當樣本為雄性，且同時使用第一引子（於 *CHD-W* 序列專一區）/P2 引子或其互補股之第一引子對與第二引子（於 *CHD-ZW* 序列共同區）/P2 引子或其互補股之第二引子對進行聚合酶鏈鎖反應時，雄性 DNA 樣本僅會產生一個聚合酶鏈鎖反應產物，為第二引子（於 *CHD-ZW* 序列共同區）/P2 引子或其互補股之第二引子對所產生之產物。因此將聚合酶鏈鎖反應產物進行熔點分析時，只會產生一個熔點曲線，且只具一個波峰。在一實施例中，第二引子（序列辨識號：12 之互補股，於 *CHD-ZW* 序列共同區）/P2 引子之第二引子對所產生之產物為約 104-b.p.。

另一方面，因為不論雌性或雄性之 DNA 皆可以第二引子（於 *CHD-ZW* 序列共同區）/P2 引子或其互補股之第二引子對進行聚合酶鏈鎖反應而產生產物，因此可將第二引子（於 *CHD-ZW* 序列共同區）/P2 引子或其互補股之第二引子對所進行之聚合酶鏈鎖反應當作一正控制組。

而第一引子/P 或其互補股 2 及第二引子/P2 或其互補股之產物的長度差依照引子與所鑑定之鳩鴿科鳥類的不同，為至少大於約 100- b.p.。所以在同時使用兩對引子對的進行聚合酶鏈鎖反應即熔點曲線分析時，兩個波峰間能清楚

分離。在一實施例中，第一引子/P2 或其互補股之產物 (252-b.p.)與第二引子/P2 或其互補股之產物(104-b.p.)的長度差為約 148-b.p.。又在一實施例中，第一引子/P2 或其互補股之聚合酶鏈鎖反應之產物的熔點溫度（波峰）為約 78.5-79.5°C；第二引子/P2 或其互補股之聚合酶鏈鎖反應之產物的熔點溫度（波峰）為約 77-78°C。兩波峰之熔點溫度差可為約 0.5-2.5°C，在一實施例中為約 1.5°C。

所有鳩鴿科鳥類皆可適用於此方法來鑑定性別，在一實施例中鳩鴿科鳥類包括家鴿(*Columba livia*)、灰林鴿(*Columba pulchricollis*)與紅鳩(*Streptopelia tranquebarica*)。

聚合酶鏈鎖反應可視情況需要而做調整，並無一定之限制。又上述之聚合酶鏈鎖反應可為一般聚合酶鏈鎖反應或即時聚合酶鏈鎖反應。若為一般聚合酶鏈鎖反應則可在聚合酶鏈鎖反應完後再進行熔點曲線分析之所需步驟；若為即時聚合酶鏈鎖反應則可在聚合酶鏈鎖反應完成後在同一儀器上立即進行熔點曲線分析。聚合酶鏈鎖反應為基礎之熔點曲線分析方法與傳統聚合酶鏈鎖反應相較，其僅需於聚合酶鏈鎖反應中額外加入一螢光試劑，例如 SYBR green I。

於使用熔點曲線分析之本發明方法中，無須使用電泳分析，並具有高通量（可以選擇 96-或 384-孔洞之聚合酶鏈鎖反應）與節省時間等優點。

在於本發明另一實施態樣中，係藉由以聚合酶鏈鎖反應為基礎之電泳分析方法來進行鳩鴿科鳥類之性別鑑定。

在一實施例中，首先提供一鳩鴿科鳥類的 DNA，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及 P2 引子（序列辨識號：1）或其互補股之一第一引子對進行聚合酶鏈鎖反應。然後，對此聚合酶鏈鎖反應之產物進行電泳分析，出現一個條帶者為雌性，而沒有出現條帶者為雄性或者是 DNA 品質不良無法判定。此時，要確認為雄性時，應採用以下另一實施例。

在另一實施例中，首先提供一鳩鴿科鳥類的 DNA，接著將該 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。然後，對此聚合酶鏈鎖反應之產物進行電泳分析，出現兩個條帶者為雌性，只出現一個條帶者為雄性。

第一引子對的例子可包括序列辨識號：9 之互補股（逆向）與 P2 引子（序列辨識號：1）（順向）或序列辨識號：9（順向）與 P2 引子（序列辨識號：1）之互補股（逆向）。又，第一引子對的例子也可包括序列辨識號：11 之互補股（逆向）與 P2 引子（序列辨識號：1）（順向）或序列辨識號：11（順向）與 P2 引子（序列辨識號：1）之互補股（逆向）。此外，第二引子對的例子可包括序列辨識號：10 之互補股（逆向）與 P2 引子（序列辨識號：1）（順向）或序列辨識號：10（順向）與 P2 引子（序列辨識號：1）之互補股（逆向）。又，第二引子對的例子也可包括序列辨識號：12 之互補股（逆向）與 P2 引子（序列辨識號：1）

(順向)或序列辨識號：12(順向)與 P2 引子(序列辨識號：1)之互補股(逆向)。

由於雌性同時具有 *CHD-Z* 與 *CHD-W* 基因，故當樣本為雌性，且僅使用第一引子(於 *CHD-W* 序列專一區)/P2 引子或其互補股之第一引子對進行聚合酶鏈鎖反應時，雌性 DNA 樣本會產生一段聚合酶鏈鎖反應產物，為第一引子(於 *CHD-W* 序列專一區)/P2 引子或其互補股之第一引子對所產生之產物。因此，將此聚合酶鏈鎖反應產物進行電泳分析時，會產生一個產物，且具一個條帶。此外，當樣本為雌性，且同時使用第一引子(於 *CHD-W* 序列專一區)/P2 引子或其互補股之第一引子對與第二引子(於 *CHD-ZW* 序列共同區)/P2 引子或其互補股之第二引子對進行聚合酶鏈鎖反應時，雌性 DNA 樣本會產生兩個聚合酶鏈鎖反應產物，分別為第一引子(於 *CHD-W* 序列專一區)/P2 引子或其互補股之第一引子對所產生之產物與第二引子(於 *CHD-ZW* 序列共同區)/P2 引子或其互補股之第二引子對所產生之產物。因此將聚合酶鏈鎖反應產物進行電泳分析時具兩個條帶。在一實施例中，第一引子(序列辨識號：11之互補股，於 *CHD-W* 序列專一區)(逆向)/P2 引子之第一引子對所產生之產物為約 252 -b.p.，而第二引子(序列辨識號：12之互補股，於 *CHD-ZW* 序列共同區)/P2 引子之第二引子對所產生之產物為約 104-b.p.。

而雄性僅具有 *CHD-Z*，故當樣本為雄性，且僅使用第一引子(於 *CHD-W* 序列專一區)/P2 引子或其互補股之第一引子對進行聚合酶鏈鎖反應時，雄性 DNA 樣本並無法產

生聚合酶鏈鎖反應產物。因此，進行電泳分析時，不會出現條帶。此外，當樣本為雄性，且同時使用第一引子（於 *CHD-W* 序列專一區）/P2 引子或其互補股之第一引子對與第二引子（於 *CHD-ZW* 序列共同區）/P2 引子或其互補股之第二引子對進行聚合酶鏈鎖反應時，雄性 DNA 樣本僅會產生一個聚合酶鏈鎖反應產物，為第二引子（於 *CHD-ZW* 序列共同區）/P2 引子或其互補股之第二引子對所產生之產物。因此將聚合酶鏈鎖反應產物進行電泳分析時，只會產生一個條帶。在一實施例中，第二引子（序列辨識號：12 之互補股，於 *CHD-ZW* 序列共同區）/P2 引子之第二引子對所產生之產物為約 104-b.p.。

另一方面，因為不論雌性或雄性之 DNA 皆可以第二引子（於 *CHD-ZW* 序列共同區）/P2 引子或其互補股之第二引子對進行聚合酶鏈鎖反應而產生產物，因此可將第二引子（於 *CHD-ZW* 序列共同區）/P2 引子或其互補股之第二引子對所進行之聚合酶鏈鎖反應當作一正控制組。

而第一引子/P2 或其互補股與第二引子/P2 或其互補股之產物的長度差依照引子與所鑑定之鳩鴿科鳥類的不同，為至少大於約 100- b.p.。所以在同時使用兩對引子對的進行聚合酶鏈鎖反應即電泳分析時，兩個條帶間能清楚分離。在一實施例中，第一引子/P2 或其互補股之產物 (252-b.p.) 與第二引子/P2 或其互補股之產物 (104-b.p.) 的長度差為約 148-b.p.。

所有鳩鴿科鳥類皆可適用於此方法來鑑定性別，在一實施例中鳩鴿科鳥類包括家鴿、灰林鴿與紅鳩。

聚合酶鏈鎖反應可視情況需要而做調整，並無一定之限制。

根據前述可知，可藉由使用本發明 *CHD-W* 序列專一區，或此 *CHD-W* 序列專一區以及 *CHD-ZW* 序列共同區來鑑定鳩鴿科鳥類性別。因此本發明還可提供一種鑑別鳩鴿科鳥類性別之核苷酸序列，其可包括 *CHD-W* 序列專一區，或此 *CHD-W* 序列專一區以及 *CHD-ZW* 序列共同區。在一實施例中，本發明提供之鑑別鳩鴿科鳥類性別之核苷酸序列，可包括序列辨識號：9 或其互補股之序列，或可更包括序列辨識號：10 或其互補股之序列。

又由上述可知，本發明更可提供一種鑑別鳩鴿科鳥類性別之核苷酸引子對，其可包括於序列辨識號：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）或其互補股的一第一引子對，或可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）或其互補股的一第二引子對。

第一引子對的例子可包括序列辨識號：9 之互補股（逆向）與 P2 引子（序列辨識號：1）（順向）或序列辨識號：9（順向）與 P2 引子（序列辨識號：1）之互補股（逆向）。又，第一引子對的例子也可包括序列辨識號：11 之互補股（逆向）與 P2 引子（序列辨識號：1）（順向）或序列辨識號：11（順向）與 P2 引子（序列辨識號：1）之互補股（逆向）。此外，第二引子對的例子可包括序列辨識號：10 之互補股（逆向）與 P2 引子（序列辨識號：1）（順向）或序列辨識號：10（順向）與 P2 引子（序列辨識號：1）

之互補股（逆向）。又，第二引子對的例子也可包括序列辨識號：12 之互補股（逆向）與 P2 引子（序列辨識號：1）（順向）或序列辨識號：12（順向）與 P2 引子（序列辨識號：1）之互補股（逆向）。

【實施例】

1. 樣本來源與 DNA 萃取

於台灣特有生物保育中心收集由於碰撞造成死亡之雄性與雌性家鴿（雌性（Bd 90 與 Bd 91）與雄性（Bd 92 與 Bd 93））、灰林鴿（雌性（Bd 5137）與雄性（Bd 3314、Bd 4970 與 Bd 5417））與紅鳩（雌性（Bd 101）與雄性（Bd 102 與 Bd 103））的肌肉樣本。這些已知的性別係藉由解剖檢查得知。以 DNeasy 組織套組(Qiagen, Valencia, CA, USA)，根據操作指南，來萃取組織 DNA。

2. 藉由 Griffiths 之 P2/P8 引子對之初級（傳統）的分子性別鑑定

聚合酶鏈鎖反應

對於上述三種鳩鴿科鳥類使用用於鳥類之性別定的 P2（序列辨識號：1）（順向）/P8（序列辨識號：2）（逆向）引子(Griffiths)。聚合酶鏈鎖反應混合物包括 1X PCR 緩衝溶液、0.16 μ M 引子、0.2 mM dNTPs、0.7U Platinum-Taq 酵素 (Invitrogen)、1.5 mM $MgCl_2$ 、SYBGreen I (1:2000; Invitrogen)與 10-20 ng DNA 於總體積 10 μ l 中。聚合酶鏈

鎖反應之如下所述：95°C，4分鐘；95°C，30秒，5次循環；47°C，30秒；72°C，30秒；95°C，30秒，49次循環；46°C，20秒；72°C，20秒以及72°C，5分鐘。

(1) 電泳分析

將聚合酶鏈鎖反應之產物 (*CHD-Z* 與 *CHD-W* 複製子) 進行電泳分析，結果如第 1A 至 1C 圖所示。於第 1A 至 1C 圖中，三種鳩鴿科鳥類 (家鴿、灰林鴿與紅鳩) 於 3% 之膠體電泳中顯示雌鳥有代表 *CHD-Z* (上方) 與 *CHD-W* (下方) 的兩個特定條帶；而雄鳥只有 *CHD-Z* 的一個特定條帶。

(2) 熔點曲線分析：以傳統引子對 P2/P8 為例

在聚合酶鏈鎖反應結束後，以 iQ™5 即時聚合酶鏈鎖反應機器 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) 之系統預設值，即 55°C-95°C，以 0.5°C/秒之加熱率，80 總數重複，來進行熔點曲線分析。熔點曲線以 (-dRFU/dT) 對溫度 (T) 顯示。各聚合酶鏈鎖反應產物的熔點溫度 (T_m) (對應於 -dRFU/dT 之波峰的溫度) 藉由 Bio-Rad iQ™5 系統預設軟體來測定。RFU 為相對螢光單位 (relative fluorescence unit)。

這些鳩鴿科鳥類之 P2/P8 複製子 (*CHD-Z* 及/或 *CHD-W* 基因) 的熔點曲線分析僅出現一個熔點波峰於 80°C，其無法區分雌性與雄性彼此，結果顯示於第 1D 至 1F 圖。第 1D 至 1F 圖分別為家鴿、灰林鴿與紅鳩的結果，顯示家鴿、灰林鴿與紅鳩之雌性 (Bds 91、5137 與 101) 與雄性 (Bds 93、5417 與 103) 的 P2/P8 複製子的熔點值相似 (80.0 至 80.5)。因此當測試家鴿、灰林鴿與紅鳩之性別時，無法藉由使用

P2/P8 引子對來執行熔點曲線分析。

3. *CHD-Z* 與 *CHD-W* 複製子之定序

之後為了定序，將上述於膠體中之 DNA 以萃取套組 (Qiagen) 進行萃取。然後進行定序，分別得到家鴿之較高分子量產物為序列辨識號：3，較低分子量產物為序列辨識號：4；灰林鴿之較高分子量產物為序列辨識號：5，較低分子量產物為序列辨識號：6；紅鳩之較高分子量產物為序列辨識號：7，較低分子量產物為序列辨識號：8。

4. 計算於 *CHD-Z* 與 *CHD-W* 複製子間之內隱子的長度差異

將上述序列以生物資訊工具 SDSC-Biology Workbench (<http://workbench.sdsc.edu/>) 進行比對，結果顯示於第 2A-2C 圖中。如 Chang, H.W., Gu, D.L., Su, S.H., Chang, C.C., Cheng, C.A., Huang, H.W., Yao, C.T., Chou, T.C., Chuang, L.Y. and Cheng, C.C. (2008) High-throughput gender identification of Accipitridae eagles with real-time PCR using TaqMan probes. *Theriogenology*, 70, 83-90 中所述，計算對於各種類而言使用 Griffiths 之 P2/P8 引子對之 *CHD-Z* 與 *CHD-W* 複製子間之內隱子的長度差異。簡單而言，自相同種類之先行排列比對 (pre-aligned) 序列計算出在 *CHD-Z* 與 *CHD-W* 複製子之序列中的刪除區域 (於第 2A-2C 圖中以虛線指出)。

將家鴿、灰林鴿與紅鳩之 *CHD-Z* 與 *CHD-W* 基因 (由

P2/P8 引子對所得) 以：*CHD-Z/CHD-W* (兩基因間的長度差) 來表示。家鴿：序列辨識號：3/序列辨識號：4 (20-b.p.)、灰林鴿：序列辨識號：5/序列辨識號：6 (21-b.p.)與紅鳩：序列辨識號：7/序列辨識號：8 (18-b.p.)。

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 18-21 b.p.，這代表 P2/P8 引子並不適合用來鑑定鳩鴿科鳥類之性別。

又由上述之序列比對可得 *CHD-W* 所專有之序列，稱做 *CHD-W* 序列專一區，為序列辨識號：9，如第 2B 圖之黑框區 1 所示；與 *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：10，如第 2A 圖之黑框區 2 所示。

5. 藉由重新設計之引子對之進階的分子性別鑑定

為了解決於熔點曲線分析於性別鑑定中使用 P2/P8 因子之內在問題，分別在 *CHD-W* 序列專一區 (序列辨識號：9) *CHD-ZW* 序列共同區 (序列辨識號：10) 重新設計對於三種鳩鴿科鳥類之 *CHD-W* 序列專一區與 *CHD-ZW* 序列共同區之聚合酶鏈鎖反應的逆向引子，以增加聚合酶鏈鎖反應產物間的長度差異。對於 *CHD-W* 序列專一區之逆向引子為序列辨識號：11；對於 *CHD-ZW* 序列專一區之逆向引子為序列辨識號：12。而此兩逆向引子分別搭配一相同的順向引子 P2 (序列辨識號：1)。於 *CHD-W* 序列專一區中所設計之引子/P2 引子設計為專一於雌性，而 *CHD-ZW* 序列

共同區/P2 引子設計為專一於雌性與雄性兩者之正控制組。由序列辨識號：11（於 *CHD-W* 序列專一區）引子（逆向）/P2 引子（順向）所產生之聚合酶鏈鎖反應產物為 252-b.p.，而由序列辨識號：12（於 *CHD-ZW* 序列共同區）（逆向）引子/P2 引子（順向）所產生之聚合酶鏈鎖反應產物為 104-b.p.。

聚合酶鏈鎖反應

與初級(傳統)的分子性別鑑定相較，些微修飾聚合酶鏈鎖反應的條件，如下所示：變性(denaturation) (95°C，3 分鐘)，50 循環之變性 (95°C，30 分鐘)、黏附(annealing) (58°C，30 秒) 與延伸(extension) (72°C，15 秒)。

(1) 電泳分析

為了測試重新設計之性別專一引子，藉由 *CHD-W* 序列專一區中所設計之引子/P2 引子以及 *CHD-ZW* 序列共同區/P2 引子將聚合酶鏈鎖反應放大於不同聚合酶鏈鎖反應管中，且將聚合酶鏈鎖反應複製子實施於 1.5% 之膠體電泳，結果如分別第 3A 與 3B 圖所示。雌性鳥類 (*CHD-Z/CHD-W* 形式)，例如 Bds 90、91、5137 正確放大以 *CHD-W* 序列專一區中所設計之引子/P2 引子以及 *CHD-ZW* 序列共同區中所設計之引子/P2 引子的兩個聚合酶鏈鎖反應（分別為 252-b.p. 與 104-b.p.）。然而，雄性鳥類 (*CHD-Z/CHD-Z* 形式)，僅正確放大以 *CHD-ZW* 序列共同區中所設計之引子/P2 引子的聚合酶鏈鎖反應，而無 *CHD-W* 序列專一區中所

設計之引子/P2 引子的聚合酶鏈鎖反應。雖然一些雄性(Bds 4970 與 5417) *CHD-W* 序列專一區中所設計之引子/P2 引子顯示出一些具有不正確大小之非專一條帶(第 3B 圖, 星號指出), 然而, 將這些非專一聚合酶鏈鎖反應產物進行定序與執行 BLAST 後發現, 其與 *CHD* 基因的序列相似性很低(non-homologous) (資料未顯示)。

(2) 三種鳩鴿科鳥類之高通量分子性別鑑定-熔點曲線分析

在聚合酶鏈鎖反應結束後, 以 *iQ*TM5 即時聚合酶鏈鎖反應機器(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)之系統預設值, 即 55°C-95°C, 以 0.5°C/秒之加熱率, 80 總數重複, 來進行熔點曲線分析。熔點曲線以 (-dRFU/dT) 對溫度(T)顯示。各聚合酶鏈鎖反應產物的熔點溫度(T_m) (對應於 -dRFU/dT 之波峰的溫度) 藉由 Bio-Rad *iQ*TM5 系統預設軟體來測定。RFU 為相對螢光單位(relative fluorescence unit)。熔點曲線分析資料以二重複實驗。結果顯示於第 3C 與 3D 圖中。

於第 3C 與 3D 圖中, 執行相同之聚合酶鏈鎖反應(第 3A 與 3B 圖)的熔點曲線分析。於第 3C 圖中, 將四個雌性(Bds 90、91、5137 與 101)進行熔點曲線分析, 結果顯示三種鳩鴿科鳥類之不同個體被確認為雌性, 由於其顯示出對於 *CHD-W* 序列專一區中所設計之引子/P2 引子與於 *CHD-ZW* 序列共同區中所設計之引子/P2 引子的兩個波峰(W: 79.0-79.5°C; ZW: 77.5°C)。於第 3D 圖中, 將七個

雄性 (Bds 92、93、3314、4970、5417、102 與 103) 進行熔點曲線分析，結果顯示三種鳩鴿科鳥類之其他個體被確認為雄性，由於其僅具有 *CHD-ZW* 序列共同區/P2 引子的一個波峰 (ZW: 77.5°C)。

在特定雄性 (Bds 4970 與 5417) 中，發現使用 *CHD-W* 序列專一區中所設計之引子/P2 引子之非專一聚合酶鏈鎖反應放大，然其可與 *CHD-W* 序列專一區中所設計之引子/P2 引子產物與 *CHD-ZW* 序列共同區/P2 引子產物區分，藉由其不同之熔點值 (79.0-79.5°C 與 77.5°C 比上 82.0°C)。

由上述可知，藉由使用本發明重新設計之性別專一引子，於 *CHD-W* 序列專一區中所設計之引子/P2 引子以及於 *CHD-ZW* 序列共同區中所設計之引子/P2 引子，鳩鴿科鳥類之兩個聚合酶鏈鎖反應複製子間的長度差異可擴大至 148-b.p. (參見第 2A-2C 圖) 以分辨於熔點曲線分析中之曲線 (參見第 3 圖)。

雖然於一些雄性樣本在使用 *CHD-W* 序列專一區中所設計之引子/P2 引子中觀察到之非專一聚合酶鏈鎖反應放大，然其非常容易與目標產物區分，基於其不同之熔點值。

因此本發明重新設計之性別專一引子，可用來執行使用熔點曲線分析之高通量鳩鴿科鳥類性別鑑定方法。

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 1A-1C 圖顯示以 P2/P8 引子分別對家鴿、灰林鴿與紅鳩 DNA 進行聚合酶鏈反應後所得之產物之 3%膠體電泳圖。

第 1D-1F 圖顯示以 P2/P8 引子分別對家鴿、灰林鴿與紅鳩 DNA 進行聚合酶鏈反應後所得之產物之熔點曲線分析。

第 2A-2C 圖顯示家鴿、灰林鴿與紅鳩之 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家鴿、灰林鴿與紅鳩 DNA 進行聚合酶鏈反應後所得之產物之 1.5%膠體電泳圖。

第 3C-3D 圖顯示以本發明重新設計之引子分別對家鴿、灰林鴿與紅鳩 DNA 進行聚合酶鏈反應後所得之熔點曲線分析。

【主要元件符號說明】

1~黑框區

2~黑框區

序列表

【序列編號】

<110> 高雄醫學大學

<120> 鑑定鳩鴿科鳥類性別的方法、鑑別鳩鴿科鳥類性別之核苷酸序列與鑑別鳩鴿科鳥類性別之核苷酸引子對

<160> 12

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 1

tctgcatcgc taaatccttt

20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 2

ctcccaagga tgagraaytg

20

<210> 3

<211> 370

<212> DNA

<213> 家鴿(*Columba livia*)

<400> 3

tctgcatcgc taaatccttt aatattttct cgaggaatgg ttcgtggtct tccacgtttt 60
 tttggccggt ttctttctga tatggagtca ctatcagatc cagagtatct tctgctccta 120
 ctgcgcttcc cttcacttcc attaaagctg atctggaatt tcagaataag tagttcaaag 180
 ctatgcgatt gacaaacaca ggtcaagttt tgcctaacct gtcaaaaata cgtgttcaga 240
 aaacggaaaa aaccctaaaa aaacaaaacc caacaacaat cccaacaaa ctaaaccaac 300
 agcaacacaa aagcacaagt caatcagaac caagacacac ctgttttgca cagttcctca 360
 tccttgggag 370

<210> 4

<211> 350

<212> DNA

<213> 家鸽(*Columba livia*)

<400> 4

tctgcatcgc taaatccttt aatattttct cgaggaatag ttcgtggtcg tccacgtttt 60
 tttggtogtt ttctttctga catggagtca ctatcagatc cagaatatct tctgcttcta 120
 ctgcatttcc cttcacttcc attaaagctg atctggaatt tcagattaag tagttcaaag 180
 ctatgtgact aaaacatttt aataatgtgc tatctagcct gtcaaaaatg gggggtgaaa 240
 agtacaagcc aaaaacaaca gtaatgaaaa acaaagaaa cacaacaaca agaagttagt 300
 tgggtcaaac ccagagatac ctgttttgca cagttcctca tccttgggag 350

<210> 5

<211> 370

<212> DNA

<213> 灰林鴿 (*Columba pulchricollis*)

<400> 5

```
tctgcatcgc taaatccttt aatattttct cgaggaatgg ttcgtggtct tccacgtttt    60
tttggccggt ttctttctga tatggagtca ctatcagatc cagagtatct tctgctccta    120
ctg'gccttc cttcacttcc attaaagctg atctggaatt tcagaataag tagttcaaag    180
ctacgcgatt gacaaacaca ggtcaagttt tgcctaacct gtcaaaaata cgtgttcaga    240
aaacggaaaa aaccctaaaa aacccaaaacc caacaacaat cccaacaaa ttaaaccaac    300
agcaacacaa aagcacaagt caatcagaac caagagacac ctgttttgca cagttcctca    360
tccttgggag                                     370
```

<210> 6

<211> 349

<212> DNA

<213> 灰林鴿 (*Columba pulchricollis*)

<400> 6

```
tctgcatcgc taaatccttt aatattttct cgaggaatag ttcgtggtcg tccacgtttt    60
tttggtcggt ttctttctga gatggagtca ctatcagatc cagaatatct tctgcttcta    120
ctgcatttcc cttcgcttcc attaaagctg atctggaatt tcagattaag tagttcaaag    180
atatgtgact aaaacatttt aataatgtgc tatctagcct gtcaaaaatg gggggtgaaa    240
agtacaagcc aaaacaacag taatgaaaaa acaacaacac acaacaacaa gaagttagtt    300
ggtcaaaacc cagagatacc tgttttgcac aatttctcat ccttgggag                                     349
```

<210> 7

<211> 367

<212> DNA

<213> 紅鳩(*Streptopelia tranquebarica*)

<400> 7

```
tctgcatcgc taaatccttt aatattttct cgaggaatgg ttcgtggtct tccacgtttt    60
tttgcccggt ttctttctga tatggagtca ctatcagatc cagagtatct tctgctccta    120
ctgcgcttcc cttcacttcc attaaagctg atctggaatt tcagaataag tagttcaaag    180
ctacgcgatt gacaaacaca ggtcaagttt tgcctaacct gtcaaaaata tgtgttcaga    240
aaacggaaaa aaaactaaaa aaacaaaacc caacaacccc caacaaacta aaccaacagc    300
aacacaaaag cacaagtcaa tcagaaccaa gagacacctg ttttgcacag ttttctcatcc    360
ttgggag                                           367
```

<210> 8

<211> 349

<212> DNA

<213> 紅鳩(*Streptopelia tranquebarica*)

<400> 8

```
tctgcatcgc taaatccttt atgcatttct cgaggaatag ttcgtggtcg tccacgtttt    60
tttggtcggt ttctttctga gatggagtca ctatcagatc cagaatatct tctgcttcta    120
ctgcatttcc cttcgcttcc attaaagctg atctggaatt tcagattaag tagttcaaag    180
ctatgtgact aaaacatttt aataatgtgc tatctagcct gtcaaaaatg gggggtgaaa    240
agtacaagcc aaaacaacag taatgaaaaa acaacaacac acaacaacaa gaagttagtt    300
ggcaaaacc caagatacc tgttttgcac agttcctcat ccttgggag                       349
```

<210> 9

<211> 38

<212> DNA

<213> 家鴿 (*Columba livia*)、灰林鴿 (*Columba pulchricollis*)、紅鳩 (*Streptopelia tranquebarica*)

<400> 9

tggggggtga aaagtacaag ccaaaaacaa cagtaatg

38

<210> 10

<211> 51

<212> DNA

<213> 家鴿 (*Columba livia*)、灰林鴿 (*Columba pulchricollis*)、紅鳩 (*Streptopelia tranquebarica*)

<400> 10

cgttttcttt ctgabatgga gtcactatca gatccagarg tatcttctgc t

51

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> 家鴿 (*Columba livia*)、灰林鴿 (*Columba pulchricollis*)、紅鳩 (*Streptopelia tranquebarica*)

<400> 11

gggtgaaaag tacaagccaa

20

<210> 12

<211> 23

<212> DNA

<213> 家鴿 (*Columba livia*)、灰林鴿 (*Columba pulchricollis*)、紅鳩 (*Streptopelia tranquebarica*)

<400> 12

atggagtcac tatcagatcc aga

23

第 99109810 號申請專利範圍修正本

正日期：103 年 11 月 25 日

七、申請專利範圍：

1. 一種鑑定鳩鴿科鳥類性別的方法，包括：

提供一鳩鴿科鳥類之 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）或其互補股的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）或其互補股的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 項所述之鑑定鳩鴿科鳥類性別的方法，其中該鳩鴿科鳥類包括家鴿(*Columba livia*)、灰林鴿 (*Columba pulchricollis*) 與 紅 鳩 (*Streptopelia tranquebarica*)。

3. 如申請專利範圍第 1 項所述之鑑定鳩鴿科鳥類性別的方法，其中該第一引子對包括序列辨識號：11 之互補股與 P2 引子（序列辨識號：1）或序列辨識號：11 與 P2 引子（序列辨識號：1）之互補股。

4. 如申請專利範圍第 1 項所述之鑑定鳩鴿科鳥類性別的方法，其中該第二引子對包括序列辨識號：12 之互補股與 P2 引子（序列辨識號：1）或序列辨識號：12 與 P2 引子（序列辨識號：1）之互補股。

5. 如申請專利範圍第 1 項所述之鑑定鳩鴿科鳥類性別的方法，其中該聚合酶鏈鎖反應為即時聚合酶鏈鎖反應。

第 99109810 號申請專利範圍修正本

修正日期：103 年 11 月 25 日

6.如申請專利範圍第 1 項所述之鑑定鳩鴿科鳥類性別的方法，其中該兩個波峰之熔點溫度相差約 0.5-2.5°C。

7.如申請專利範圍第 1 項所述之鑑定鳩鴿科鳥類性別的方法，其中該兩個波峰之熔點溫度相差約 1.5°C。

8.一種鑑定鳩鴿科鳥類性別的方法，包括：

提供一鳩鴿科鳥類之 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）或其互補股的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）或其互補股的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 項所述之鑑定鳩鴿科鳥類性別的方法，其中該鳩鴿科鳥類包括家鴿、灰林鴿與紅鳩。

10.如申請專利範圍第 8 項所述之鑑定鳩鴿科鳥類性別的方法，其中該第一引子對包括序列辨識號：11 之互補股與 P2 引子（序列辨識號：1）或序列辨識號：11 與 P2 引子（序列辨識號：1）之互補股。

11.如申請專利範圍第 8 項所述之鑑定鳩鴿科鳥類性別的方法，其中該第二引子對包括序列辨識號：12 之互補股與 P2 引子（序列辨識號：1）或序列辨識號：12 與 P2 引子（序列辨識號：1）之互補股。

12.如申請專利範圍第 8 項所述之鑑定鳩鴿科鳥類性別

第 99109810 號申請專利範圍修正本

修正日期：103 年 11 月 25 日

的方法，其中該兩個條帶所代表之核苷酸的長度差異為約 148-b.p.。

13.一種鑑別鳩鴿科鳥類性別之核苷酸序列，其係被用來設計出用以鑑別鳩鴿科鳥類性別的引子，包括序列辨識號：9 或其互補股之序列。

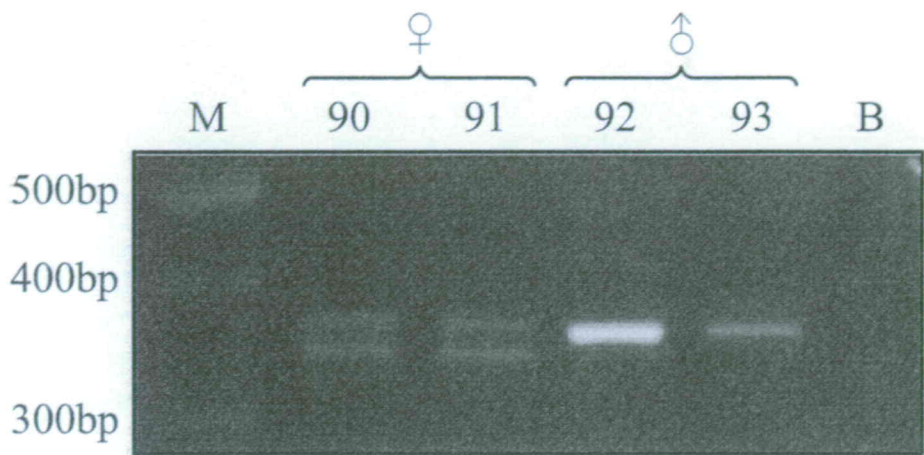
14.一種鑑別鳩鴿科鳥類性別之核苷酸序列，其係被用來設計出用以鑑別鳩鴿科鳥類性別的引子，包括序列辨識號：10 或其互補股之序列。

15.一種鑑別鳩鴿科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引子與 P2 引子（序列辨識號：1）或其互補股的一引子對。

16.如申請專利範圍第 15 項所述之鑑別鳩鴿科鳥類性別之核苷酸引子對，其中該引子對包括序列辨識號：11 之互補股與 P2 引子（序列辨識號：1）或序列辨識號：11 與 P2 引子（序列辨識號：1）之互補股。

17.一種鑑別鳩鴿科鳥類性別之核苷酸引子對，包括於序列辨識號：10 或其互補股之序列範圍內設計之一引子與 P2 引子（序列辨識號：1）或其互補股的一引子對。

18.如申請專利範圍第 17 項所述之鑑別鳩鴿科鳥類性別之核苷酸引子對，其中該引子對包括序列辨識號：12 之互補股與 P2 引子（序列辨識號：1）或序列辨識號：12 與 P2 引子（序列辨識號：1）之互補股。



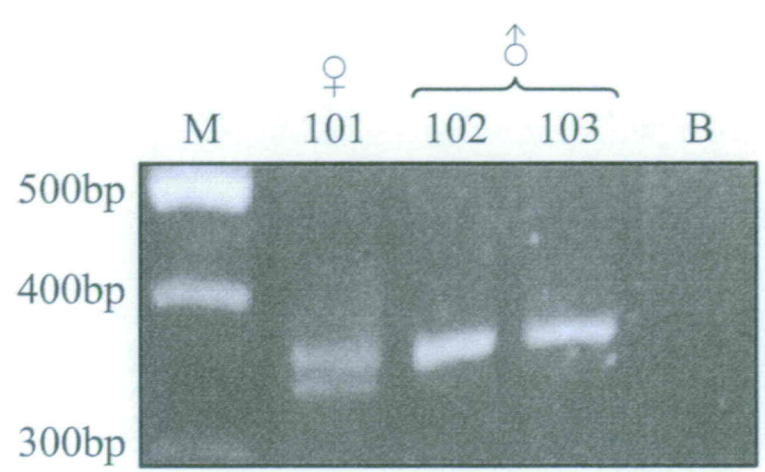
家鴿

第1A圖



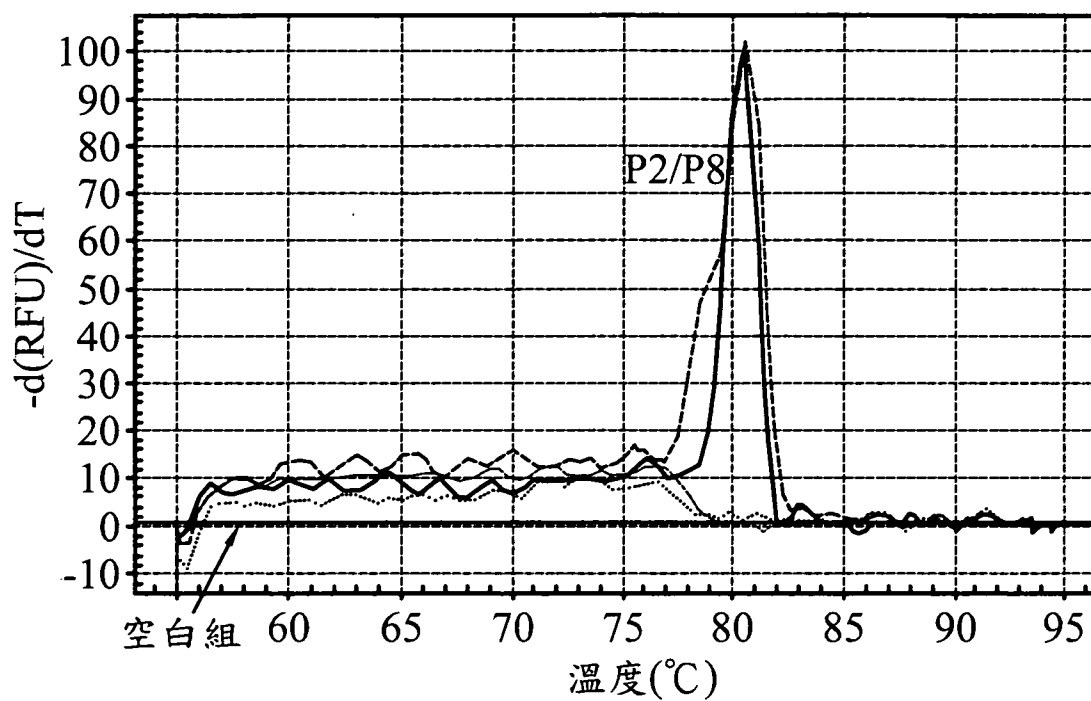
灰林鴿

第1B圖

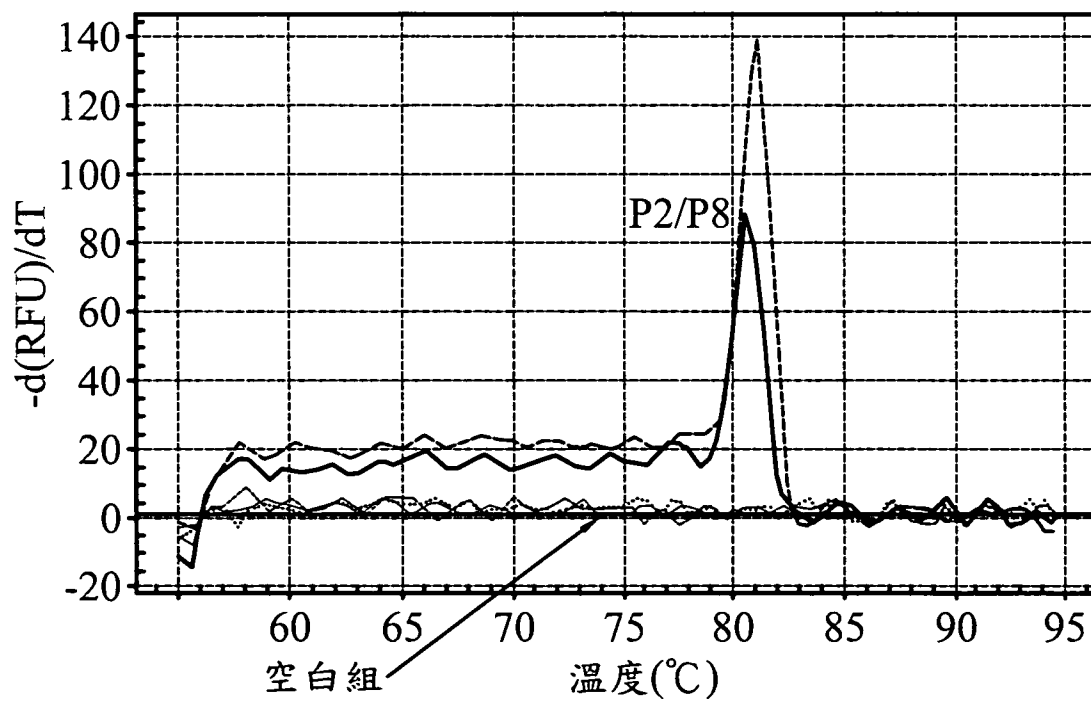


紅鳩

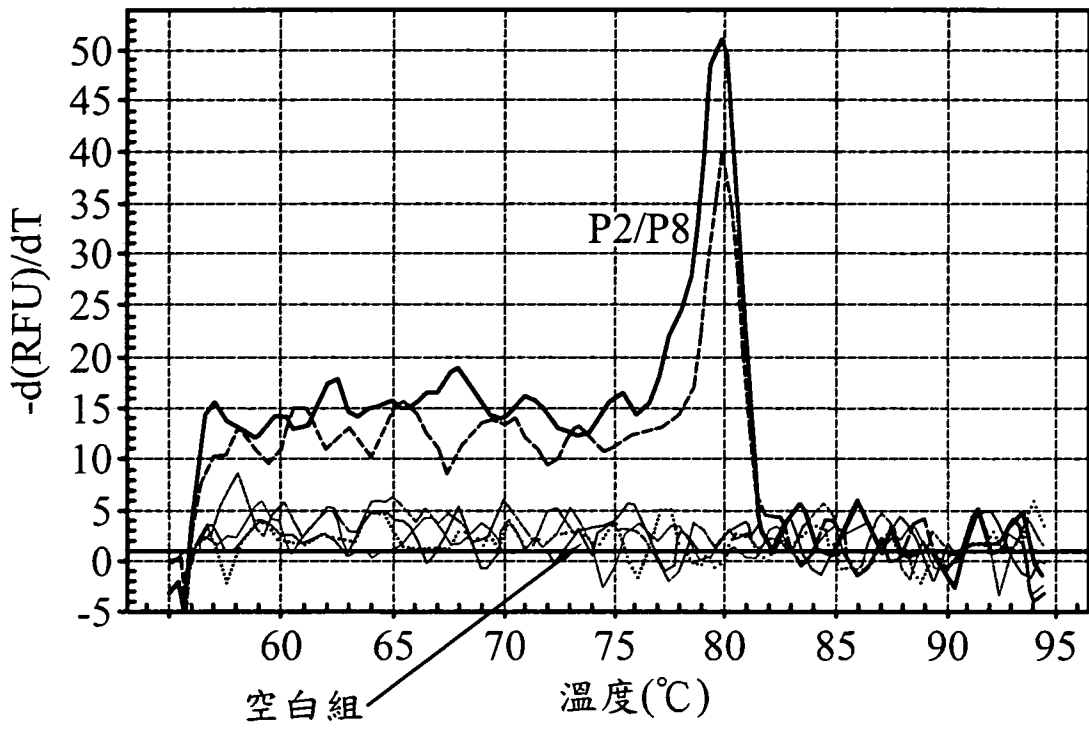
第1C圖



第1D圖



第1E圖



第 1F 圖

P2引子

C. livia-Z
TCTGCATCGCTAAATCCCTT
 TCTGCATCGCTAAATCCCTTAAATAATTTCTCGAGGAAATGGTTCCGTGCTCTCCACCGTTTT
 C. pulchricollis-Z
 TCTGCATCGCTAAATCCCTTAAATAATTTCTCGAGGAAATGGTTCCGTGCTCTCCACCGTTTT
 S. tranquebarica-Z
 TCTGCATCGCTAAATCCCTTAAATAATTTCTCGAGGAAATGGTTCCGTGCTCTCCACCGTTTT
 C. livia-W
 TCTGCATCGCTAAATCCCTTAAATAATTTCTCGAGGAAATGGTTCCGTGCTCTCCACCGTTTT
 C. pulchricollis-W
 TCTGCATCGCTAAATCCCTTAAATAATTTCTCGAGGAAATGGTTCCGTGCTCTCCACCGTTTT
 S. tranquebarica-W
 TCTGCATCGCTAAATCCCTTAAATAATTTCTCGAGGAAATGGTTCCGTGCTCTCCACCGTTTT

 ***** ZW-序列共同區 *****

2

C. livia-Z
 TTTGGCCGTTTCTTTCTGATATGGAGTCACTATCAGATCCAGAGGTAATCTTCTGCTCCTA
 C. pulchricollis-Z
 TTTGGCCGTTTCTTTCTGATATGGAGTCACTATCAGATCCAGAGGTAATCTTCTGCTCCTA
 S. tranquebarica-Z
 TTTGGCCGTTTCTTTCTGATATGGAGTCACTATCAGATCCAGAGGTAATCTTCTGCTCCTA
 C. livia-W
 TTTGGTCGTTTCTTTCTGACATGGAGTCACTATCAGATCCAGAGTAATCTTCTGCTTCTA
 C. pulchricollis-W
 TTTGGTCGTTTCTTTCTGAGATGGAGTCACTATCAGATCCAGAGTAATCTTCTGCTTCTA
 S. tranquebarica-W
 TTTGGTCGTTTCTTTCTGAGATGGAGTCACTATCAGATCCAGAGTAATCTTCTGCTTCTA

第2A圖

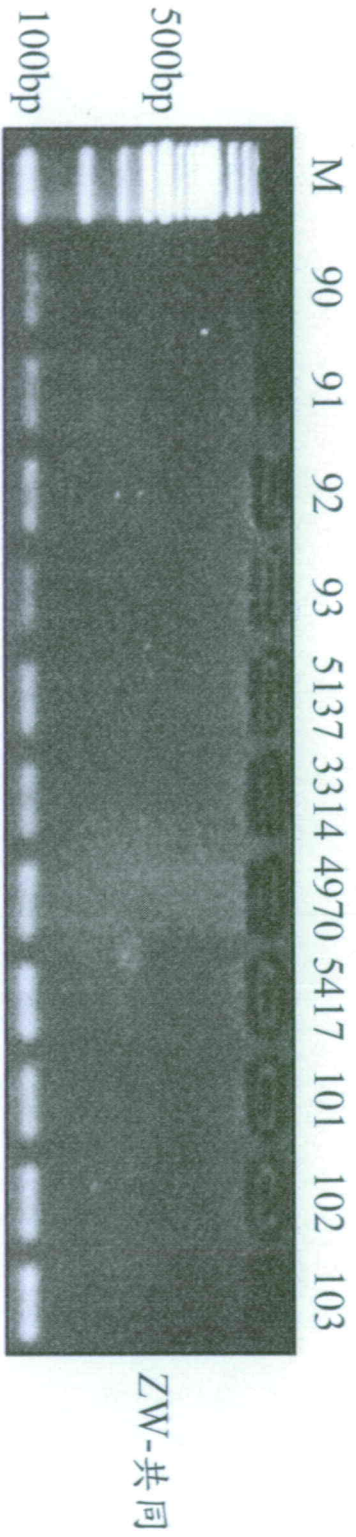
第2B圖

第2C圖

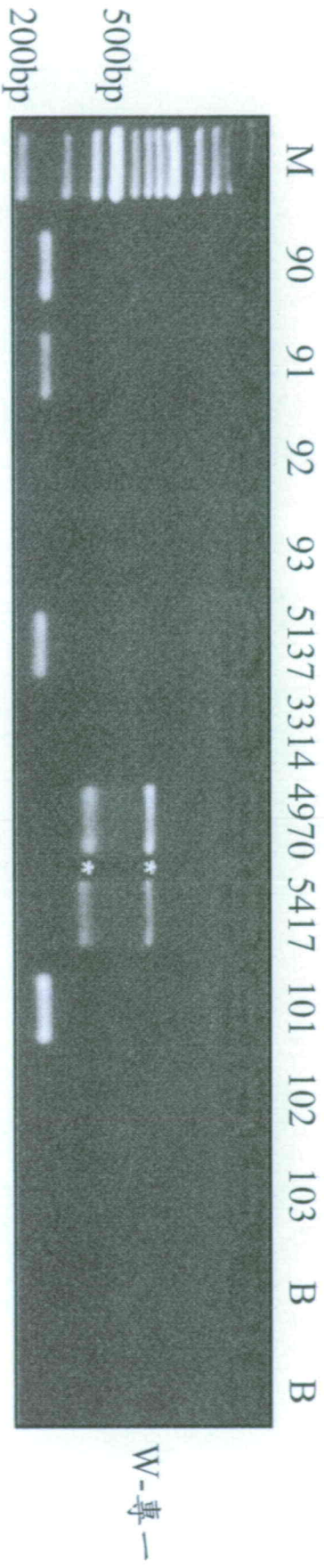
第2A圖

C. livia-Z CTGGCCCTTCCTTCACCTCCATTAAAGCTGATCTGGAATTCAGAATTAAGTACTTCAAAG
C. pulchricollis-Z CTGGCCCTTCCTTCACCTCCATTAAAGCTGATCTGGAATTCAGAATTAAGTACTTCAAAG
S. tranquebarica-Z CTGGCCCTTCCTTCACCTCCATTAAAGCTGATCTGGAATTCAGAATTAAGTACTTCAAAG
C. livia-W CTGCATTTCCCTTCACCTCCATTAAAGCTGATCTGGAATTCAGAATTAAGTACTTCAAAG
C. pulchricollis-W CTGCATTTCCCTTCACCTCCATTAAAGCTGATCTGGAATTCAGAATTAAGTACTTCAAAG
S. tranquebarica-W CTGCATTTCCCTTCACCTCCATTAAAGCTGATCTGGAATTCAGAATTAAGTACTTCAAAG
**** * **** * **** * **** * **** * **** * **** * **** * **** *
C. livia-Z CTATGGCATTGACAACACACAGGTC AAGTTTTGCCCTAACCTGTCAAAAATACGTGTTCAGA
C. pulchricollis-Z CTACCGGATTGACAACACACAGGTC AAGTTTTGCCCTAACCTGTCAAAAATACGTGTTCAGA
S. tranquebarica-Z CTACCGGATTGACAACACACAGGTC AAGTTTTGCCCTAACCTGTCAAAAATATGTTTCAGA
C. livia-W CTATGTGACTAAACATTTTAATAATGTGCTATCTAGCCTGTCAAAAATG-----GG
C. pulchricollis-W ATATGTGACTAAACATTTTAATAATGTGCTATCTAGCCTGTCAAAAATG-----GG
S. tranquebarica-W CTATGTGACTAAACATTTTAATAATGTGCTATCTAGCCTGTCAAAAATG-----GG
** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
C. livia-Z AAACGGAAAAAACCCCTAAAAAAAACAAAAACCAACAACAATCCCCAAACAACCTAAACCAAC
C. pulchricollis-Z AAACGGAAAAAACCCCTAAAAAAAACAAAAACCAACAACAATCCCCAAACAATTAACCAAC
S. tranquebarica-Z AAACGGAAAAAAAACCTAAAAAAAACAAAAACCAACAACAAC-----CCCAACAACAACCTAAACCAAC
C. livia-W GGGTGAAAAAGTAC-----AAGCCAAAA-CAACAGTAA-----TGAAAAAACAAGAAGAAC
C. pulchricollis-W GGGTGAAAAAGTAC-----AAGCCAAAA-CAACAGTAA-----TGAAAAAACAAGAAGAAC
S. tranquebarica-W GGGTGAAAAAGTAC-----AAGCCAAAA-CAACAGTAA-----TGAAAAAACAAGAAGAAC
* ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
1 } W-序列專一區

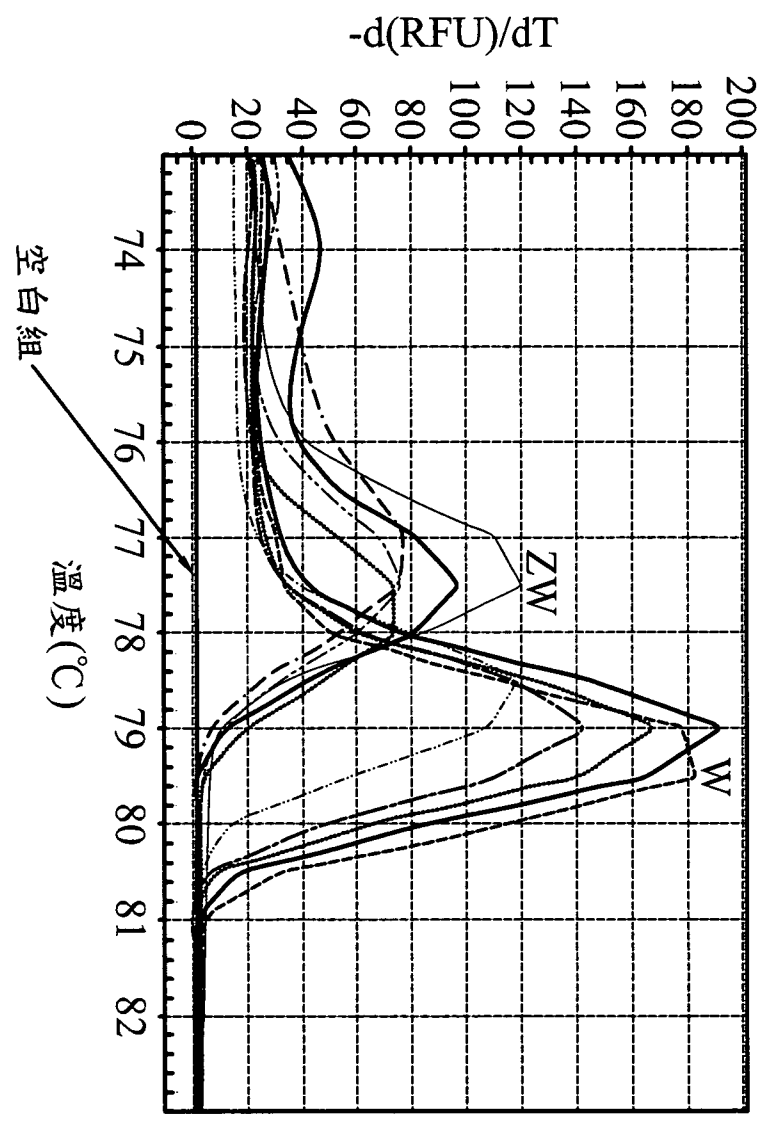
第2B圖



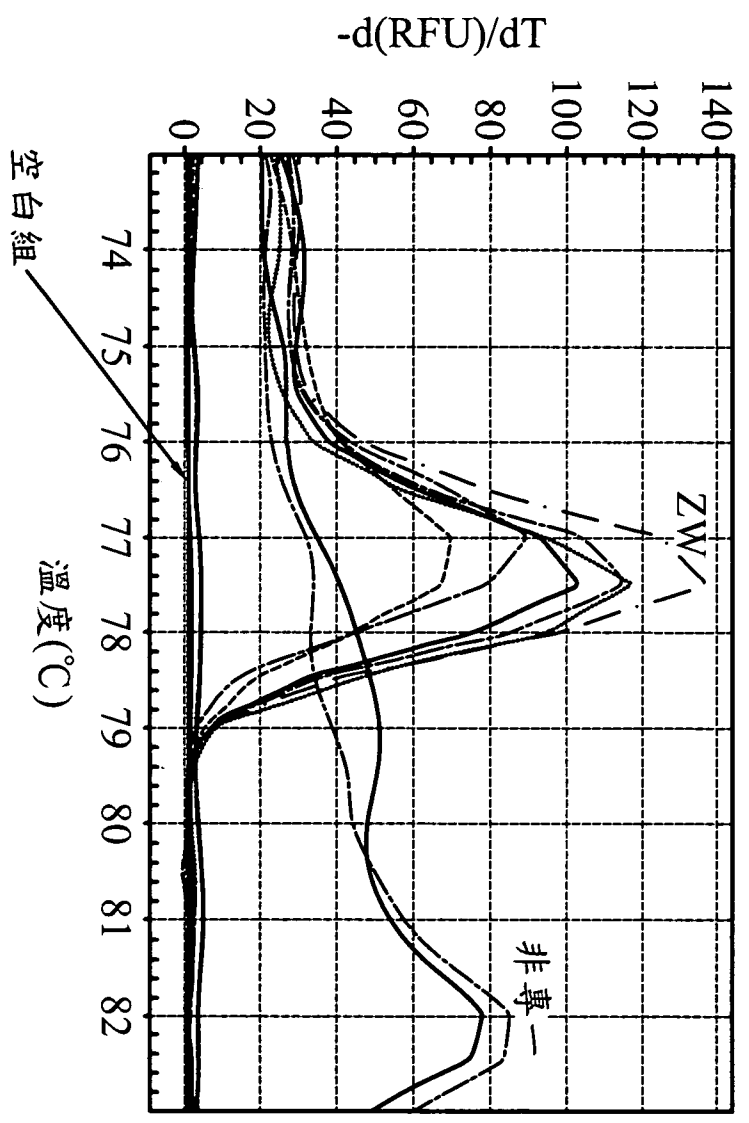
第3A圖



第3B圖



第3C圖



第3D圖