



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I524067 B

(45)公告日：中華民國 105 (2016) 年 03 月 01 日

(21)申請案號：100140656 (22)申請日：中華民國 100 (2011) 年 11 月 08 日

(51)Int. Cl. : G01N33/50 (2006.01) C12Q1/68 (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)；張詠婷 CHANG, YUNG TING (TW)；邱慧慈 CHIU, HUI TZU (TW)

(74)代理人：洪澄文；顏錦順

(56)參考文獻：

TW 200914622A

Costantini V et al., "DNA sexing in Humboldt Penguins (*Spheniscus humboldti*) from feather samples", *Animal Reproduction Science*, vol.106, p.162-167, 2008/11/03

Zhang P et al., "Spheniscus magellanicus isolate MP4 CHD1W gene, partial sequence", NCBI GenBank accession no.GU451239, 2010/03/02

審查人員：顏逸瑜

申請專利範圍項數：22 項 圖式數：4 共 71 頁

(54)名稱

鑑定企鵝科鳥類性別的方法、鑑別企鵝科鳥類性別之核苷酸序列與鑑別企鵝科鳥類性別之核苷酸引子對

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

(57)摘要

本發明提供一種鑑定企鵝科鳥類性別的方法，包括：提供一企鵝科鳥類之 DNA 樣本；將該 DNA 樣本以於序列辨識號：11 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，或於序列辨識號：12 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，以及於序列辨識號：13 或其互補股之序列範圍內設計之一第三引子與 P2 引子(序列辨識號：1)或其互補股之一第三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。

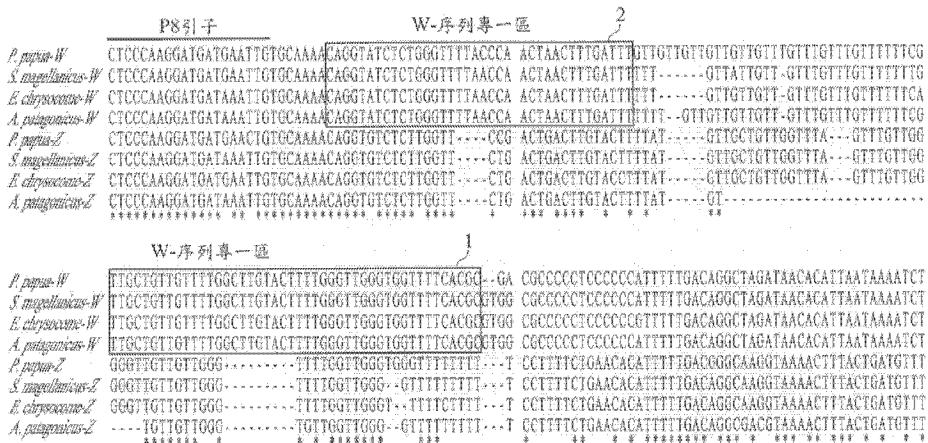
The invention providing a method for Spheniscidae gender identification including: providing a DNA of a Spheniscidae; performing a polymerase chain reaction to the DNA with a first primer pair of a first primer designed within the region of SEQ ID NO: 11 or the complementary sequence thereof/P2 primer or the complementary sequence thereof, or a second primer pair of a second primer designed within the region of SEQ ID NO: 12 or the complementary sequence thereof/P2 primer or the complementary sequence thereof and a third primer pair of a third primer designed within the region of SEQ ID NO: 13 or the complementary sequence thereof/P2 primer or the complementary sequence thereof; 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.

指定代表圖：

符號簡單說明：

1、2、3...黑框區



第2A圖
第2B圖

第 2A 圖



第 2B 圖

公告本

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫) Go/N33/50 2006.01

※申請案號：100140656

※申請日：2005.11.08

※IPC 分類：

C12Q/68

2006.6

一、發明名稱：(中文/英文)

鑑定企鵝科鳥類性別的方法、鑑別企鵝科鳥類性別之核苷酸序列與鑑別企鵝科鳥類性別之核苷酸引子對 /
Method for Spheniscidae gender identification, nucleotide sequence for Spheniscidae gender and nucleotide primer pair for Spheniscidae gender

二、中文發明摘要：

本發明提供一種鑑定企鵝科鳥類性別的方法，包括：提供一企鵝科鳥類之 DNA 樣本；將該 DNA 樣本以於序列辨識號：11 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，或於序列辨識號：12 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，以及於序列辨識號：13 或其互補股之序列範圍內設計之一第三引子與 P2 引子（序列辨識號：1）或其互補股的一第三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 Spheniscidae gender identification including: providing a DNA of a Spheniscidae; performing a polymerase chain reaction to the DNA with a first primer pair of a first primer designed within the region of SEQ ID NO: 11 or the complementary sequence thereof/P2 primer or the complementary sequence thereof, or a second primer pair of a second primer designed within the region of SEQ ID NO: 12 or the complementary sequence thereof/P2 primer or the complementary sequence thereof and a third primer pair of a third primer designed within the region of SEQ ID NO: 13 or the complementary sequence thereof/P2 primer or the complementary sequence thereof; 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(2)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

1、2、3～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，且特別關於企鵝科(Spheniscidae)鳥類之分子性別鑑定技術。

【先前技術】

全球暖化已對企鵝族群帶來增加之威脅。在海洋生態系統中之氣候誘導的改變，由於減少海冰範圍(Jenouvrier S, Caswell H, Barbraud C, Holland M, Stroeve J, Weimerskirch H. Proc Natl Acad Sci U S A 2009;106:1844-7)與獵物之可得性(Le Bohec C, Durant JM, Gauthier-Clerc M, Stenseth NC, Park YH, Pradel R, Gremillet D, Gendner JP, Le Maho Y. Proc Natl Acad Sci U S A 2008;105:2493-7.)，而可能對於企鵝族群具有重大影響。因此，對於企鵝族群之監測與保護變為一重要的議題。

企鵝（企鵝科(Spheniscidae)）為高度特化之海鳥，且牠們主要居住於南極與次南極區域之冷水中。除了冠企鵝屬(Eudyptes)外(Martínez I, Order Sphenisciformes. in: J. Del Hoyo, Elliott, A. & Sagatal, J., (Ed.), Handbook of the birds of the world, Lynx Edicions, Barcelona, 1992, pp. 140-60.)，多數企鵝科種類，例如紳士企鵝(Gentoo penguins)（巴布亞企鵝(*Pygoscelis papua*)）(Davis RW, Croxallt JP, O'conn MJ. Journal of Animal Ecology 1989;58:59-74)、麥哲倫企鵝 (Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*))(Bertellotti M, Tella JL, Godoy JA, Blanco G,

Forero MG, Donázar JA, Ceballos O. The International Journal of Waterbird Biology 2002;25:479-84)、與國王企鵝 (King penguins (*Aptenodytes patagonicus*))(Nicolaus M, Bohec C, Nolan PM, Gauthier-Clerc M, Maho Y, Komdeur j, Jouventin P. Polar Biology 2007;31:53-61.)顯示很少之性別差異。雖然雄性通常比雌性具有較大之體型，然而，在年紀非常小時，藉由直接觀察所進行之企鵝性別鑑定是難以確定的(Bertellotti M, Tella JL, Godoy JA, Blanco G, Forero MG, Donázar JA, Ceballos O. The International Journal of Waterbird Biology 2002;25:479-84)。因此，測量族群之準確之性別比例是困難的，而性別比例為監測企鵝族群之穩定度的一重要指標。

目前許多鳥類之分子性別測定技術係主要屬於聚合酶鏈鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)的策略。在企鵝性別鑑定中，其大部分藉由使用引子 P2/P8 (Bertellotti M, Tella JL, Godoy JA, Blanco G, Forero MG, Donázar JA, Ceballos O. The International Journal of Waterbird Biology 2002;25:479-84; Sacchi P, Soglia D, Maione S, Meneguz G, Campora M, Rasero R. Mol Cell Probes 2004;18:193-6.)與引子 2917F/3088R(Ellegren H. Proc Biol Sci 1996;263:1635-41.)來測定。這些方法之大部分為通常根據雌性專一 *CHD-W* 基因與於兩性別中共同之 *CHD-Z* 基因，即雌性為 *ZW*，而雄性為 *ZZ*。根據介於 *CHD-Z* 與 *CHD-W* 之聚合酶鏈鎖反應擴增產物之間的長度差異，以聚合酶鏈鎖反應為基礎之方法使用單一之引子對，例如 Griffiths's

引子 P2 與 P8 (Griffiths R, Double MC, Orr K, Dawson RJ. Mol Ecol 1998;7:1071-5.)可測定鳥類之性別。然而，在 3% 瓊脂膠電泳分析中，洪氏環企鵝 (*Spheniscus humboldti*)之 CHD-Z 與 CHD-W 之聚合酶鏈鎖反應擴增產物是難以解析的。近來，已引入限制性片段長度多態性 (restriction fragment of length polymorphism, RFLP)(Costantini V, Guaricci AC, Laricchiuta P, Rausa F, Lacalandra GM. Anim Reprod Sci 2008;106:162-7; Boutette JB, Ramsay EC, Potgieter LND, Kania SA. Journal of Avian Medicine and Surgery 2002;16:198-202.)來測定洪氏環企鵝之性別，且其電泳分析也變得比使用 P2 與 P8 引子之聚合酶鏈鎖反應結果清楚。但是，限制性片段長度多態性方法之缺點為需要額外之時間以及限制酵素切割之成本。所以，發展快速且可靠之用於企鵝性別鑑定的方法仍然為一挑戰。

因此，目前亟需一高通量、高準確度之企鵝科鳥類性別方法。

【發明內容】

本發明提供一種鑑定企鵝科鳥類性別的方法，包括：提供一企鵝科鳥類之 DNA 樣本；將該 DNA 樣本以於序列辨識號：11 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，或於序列辨識號：12 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，以及於序列辨識號：13 或其互補股之序列範圍內設計之一第三引子與 P2 引子（序列辨識號：1）或其互補股的一第三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。

本發明提供另一種鑑定企鵝科鳥類性別的方法，包括：提供一企鵝科鳥類之 DNA 樣本；將該 DNA 樣本以於序列辨識號：11 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，或於序列辨識號：12 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，以及於序列辨識號：13 或其互補股之序列範圍內設計之一第三引子與 P2 引子（序列辨識號：1）或其互補股的一第三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企鵝科鳥類性別之核苷酸序列，包括序列辨識號：11 或其互補股之序列，或序列辨識號：12 或其互補股之序列。

本發明更提供一種鑑別企鵝科鳥類性別之核苷酸引子對，包括於序列辨識號：11 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，或於序列辨識號：12 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。

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】

首先，可由資料庫中取得藉由以(傳統 P2/P8 引子) (Griffiths R, Double MC, Orr K, Dawson RJ., Mol Ecol 1998;7: 1071-1075.)所獲得之不同之企鵝科鳥類的 *CHD-Z* 與 *CHD-W* 基因序列的資訊。在一實施例中，資料庫可為 GenBank。又 P2 引子之序列為 5'-TCTGCATCGCTAAATCCTTT-3' (序列辨識號：1) (逆向) (AGACG TAG CGA TTTAGGAAA)，P8 引子之序列為 5'-CTCCCAAGGATGAGRAAYTG-3' (序列辨識號：2) (GAGGGTTCC TACTC TT AC) 引子 (順向) (Griffiths, et al, 1998)。

將不同種類之企鵝科鳥類的 *CHD-Z* 基因與 *CHD-W* 基因以生物資訊工具，進行序列排列比對 (sequence alignment)，可得到不同種企鵝科鳥類之 *CHD-ZW* 序列共同區以及 *CHD-W* 序列專一區。而上述生物資訊工具可包括 Biology Workbench 3.2 (<http://workbench.sdsc.edu/>)，但不限於此。在一實施例中，上述之不同種之企鵝科鳥類可包括阿德利企鵝屬 (*Pygoscelis*) 企鵝、小藍企鵝屬 (*Spheniscus*) 企鵝、冠企鵝屬 (*Eudyptes*) 企鵝與王企鵝屬 (*Aptenodytes*) 企鵝等，但不限於此。在一實施例中，上述之不同種之企鵝科鳥類可包括巴布亞企鵝 (*Pygoscelis papua*)、麥哲倫企鵝 (*Spheniscus magellanicus*)、南跳岩企鵝 (*Eudyptes*

chrysocome)與國王企鵝(*Aptenodytes patagonicus*)等。

在一實施例中，可在序列排列比對之前執行一同源序列搜尋。在一實施例中，同源序列搜尋可藉由 NCBI (National Center for Biotechnology Information)中之 BLAST 工具來執行。此外，可根據 GenBank 得知巴布亞企鵝之 *CHD-Z* 的基因序列與 *CHD-W* 的基因序列分別為序列辨識號：3 與序列辨識號：4，麥哲倫企鵝之 *CHD-Z* 的基因序列與 *CHD-W* 的基因序列分別為序列辨識號：5 與序列辨識號：6，南跳岩企鵝之 *CHD-Z* 的基因序列與 *CHD-W* 的基因序列分別為序列辨識號：7 與序列辨識號：8，而國王企鵝之 *CHD-Z* 的基因序列與 *CHD-W* 的基因序列則分別為序列辨識號：9 與序列辨識號：10。

在一實施例中，*CHD-W* 序列專一區較佳為序列辨識號：11 或其互補股，而 *CHD-ZW* 序列共同區較佳為序列辨識號：13 或其互補股。在另一實施例中，*CHD-W* 序列專一區較佳為序列辨識號：12 或其互補股，而 *CHD-ZW* 序列共同區較佳為序列辨識號：13 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企鵝科鳥類性別的方法。

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(melting curve analysis)方法來進行企鵝科鳥類之性別鑑定。

在一實施例中，首先可提供一企鵝科鳥類的 DNA，將此 DNA 樣本以於序列辨識號：11 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，或是，將此 DNA 樣本以於序列辨識號：12 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，首先可提供一企鵝科鳥類的 DNA，將此 DNA 樣本以於序列辨識號：11 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：13 或其互補股之序列範圍內設計之一第三引子與 P2 引子（序列辨識號：1）或其互補股之一第三引子對進行聚合酶鏈鎖反應，或者是將此 DNA 樣本以於序列辨識號：12 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以及於序列辨識號：13 或其互補股之序列範圍內設計之一第三引子與 P2 引子（序列辨識號：1）或其互補股之一第三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。在一實施例中，上述兩個波峰之熔點溫度相差約 0.5-2.0°C。

第一引子對的例子可包括序列辨識號：11（順向）與 P2 引子（序列辨識號：1）（逆向）或序列辨識號：11 之互補股（逆向）與 P2 引子（序列辨識號：1）之互補股（順

向)。又，第一引子對的例子也可包括序列辨識號：14（順向）與 P2 引子（序列辨識號：1）（逆向）或序列辨識號：14 之互補股（逆向）與 P2 引子（序列辨識號：1）之互補股（順向）。

第二引子對的例子可包括序列辨識號：12（順向）與 P2 引子（序列辨識號：1）（逆向）或序列辨識號：12 之互補股（逆向）與 P2 引子（序列辨識號：1）之互補股（順向）。又，第二引子對的例子也可包括序列辨識號：15（順向）與 P2 引子（序列辨識號：1）（逆向）或序列辨識號：15 之互補股（逆向）與 P2 引子（序列辨識號：1）之互補股（順向）。

第三引子對的例子可包括序列辨識號：13（順向）與 P2 引子（序列辨識號：1）（逆向）或序列辨識號：13 之互補股（逆向）與 P2 引子（序列辨識號：1）之互補股（順向）。又，第三引子對的例子也可包括序列辨識號：16（順向）與 P2 引子（序列辨識號：1）（逆向）或序列辨識號：16 之互補股（逆向）與 P2 引子（序列辨識號：1）之互補股（順向）。此外，第三引子對的例子也可包括序列辨識號：17（順向）與 P2 引子（序列辨識號：1）（逆向）或序列辨識號：17 之互補股（逆向）與 P2 引子（序列辨識號：1）之互補股（順向）。

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，或僅使用第二引子（於 *CHD-W* 序列專一區）/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，或是第二引子（於 *CHD-W* 序列專一區）/P2 引子或其互補股之第二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三引子（於 *CHD-ZW* 序列共同區）/P2 引子或其互補股之第三引子對進行聚合酶鏈鎖反應，或同時使用第二引子（於 *CHD-W* 序列專一區）/P2 引子或其互補股之第二引子對與第三引子（於 *CHD-ZW* 序列共同區）/P2 引子或其互補股之第三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三引子（於 *CHD-ZW* 序列共同區）/P2 引子或其互補股之第三引子對所產生之產物，或分別為第二引子（於 *CHD-W* 序列專一區）/P2 引子或其互補股之第二引子對所產生之產物與第三引子（於 *CHD-ZW* 序列共同區）/P2 引子或其互補股之第三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（共兩條熔點曲線），且具兩個波峰。

當使用第一引子對與第三引子對來對雌性 DNA 樣本進行聚合酶鏈鎖反應時，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為約 263-291-b.p.，而第三引子（於 *CHD-ZW* 序列共同區）/P2 引子或其互補股之第三引子對所產生之產物為約 122-151-b.p.。在一實施例中，在使用第一引子對與第三引子對來對雌性 DNA 樣本進行聚合酶鏈鎖反應，且第一引子對係包括序列為序列辨識號：14 之第一引子（於 *CHD-W* 序列專一區）（順向）與 P2 引子（序列辨識號：1）（逆向），而第三引子係對包括序列為序列辨識號：16 之第三引子（於 *CHD-ZW* 序列共同區）（順向）與 P2 引子（序列辨識號：1）（逆向）的情況下，第一引子對所產生之產物為約 287-289-b.p.，而第三引子對所產生之產物為約 124-148-b.p.。

當使用第二引子對與第三引子對來對雌性 DNA 樣本進行聚合酶鏈鎖反應時，第二引子（於 *CHD-W* 序列專一區）/P2 引子或其互補股之第二引子對所產生之產物為約 340-362-b.p.，而第三引子（於 *CHD-ZW* 序列共同區）/P2 引子或其互補股之第三引子對所產生之產物為約 122-151-b.p.。在一實施例中，在使用第二引子對與第三引子對來對雌性 DNA 樣本進行聚合酶鏈鎖反應，且第二引子對係包括序列為序列辨識號：15 之第二引子（於 *CHD-W* 序列專一區）（順向）與 P2 引子（序列辨識號：1）（逆向），而第三引子係對包括序列為序列辨識號：17 之第三引子（於 *CHD-ZW* 序列共同區）（順向）與 P2 引子（序列辨識號：1）（逆向）的情況下，第二引子對所產生之產物為約 351-356-b.p.，而第三引子對所產生之產物為約

124-148-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，或僅使用第二引子（於 *CHD-W* 序列專一區）/P2 引子或其互補股之第二引子對進行聚合酶鏈鎖反應，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三引子（於 *CHD-ZW* 序列共同區）/P2 引子或其互補股之第三引子對進行聚合酶鏈鎖反應，或同時使用第二引子（於 *CHD-W* 序列專一區）/P2 引子或其互補股之第二引子對與第三引子（於 *CHD-ZW* 序列共同區）/P2 引子或其互補股之第三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，為第三引子（於 *CHD-ZW* 序列共同區）/P2 引子或其互補股之第三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。

當使用第一引子對與第三引子對來對雄性 DNA 樣本進行聚合酶鏈鎖反應時，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不會產生產物，而第三引子（於 *CHD-ZW* 序列共同區）/P2 引子或其互補股之第三引子對所產生之產物為約 122-151-b.p.。在一實施例中，在使用第一引子對與第三引子對來對雄性 DNA 樣本進行聚合酶鏈鎖反應，且第一引子對係包括序列為序列辨識號：

14 之第一引子（於 *CHD-W* 序列專一區）（順向）與 P2 引子（序列辨識號：1）（逆向），而第三引子係對包括序列為序列辨識號：16 之第三引子（於 *CHD-ZW* 序列共同區）（順向）與 P2 引子（序列辨識號：1）（逆向）的情況下，第一引子對不會產生產物，而第三引子對所產生之產物為約 124-148-b.p.。

當使用第二引子對與第三引子對來對雄性 DNA 樣本進行聚合酶鏈鎖反應時，第二引子（於 *CHD-W* 序列專一區）/P2 引子或其互補股之第二引子對不會產生產物，而第三引子（於 *CHD-ZW* 序列共同區）/P2 引子或其互補股之第三引子對所產生之產物為約 122-151-b.p.。在一實施例中，在使用第二引子對與第三引子對來對雄性 DNA 樣本進行聚合酶鏈鎖反應，且第二引子對係包括序列為序列辨識號：15 之第二引子（於 *CHD-W* 序列專一區）（順向）與 P2 引子（序列辨識號：1）（逆向），而第三引子係對包括序列為序列辨識號：17 之第三引子（於 *CHD-ZW* 序列共同區）（順向）與 P2 引子（序列辨識號：1）（逆向）的情況下，第二引子對不會產生產物，而第三引子對所產生之產物為約 124-148-b.p.。

另一方面，因為不論雌性或雄性之 DNA 皆可以第三引子（於 *CHD-ZW* 序列共同區）/P2 引子或其互補股之第三引子對進行聚合酶鏈鎖反應而產生產物，因此可將第三引子（於 *CHD-ZW* 序列共同區）/P2 引子或其互補股之第三引子對所進行之聚合酶鏈鎖反應當作一正控制組。

依照引子與所鑑定之企鵝科鳥類的不同，第一引子/P2

或其互補股及第三引子/P2 或其互補股之產物的長度差為至少大於約 112-169-b.p.，而第二引子/P2 或其互補股及第三引子/P2 或其互補股之產物的長度差為至少大於約 189-240-b.p.。所以在同時使用第一引子對與第三引子對進行聚合酶鏈鎖反應及熔點曲線分析，或同時使用第二引子對與第三引子對進行聚合酶鏈鎖反應及熔點曲線分析時，兩個波峰間能清楚分離。

在一實施例中，第一引子/P2 或其互補股之產物與第三引子/P2 或其互補股之產物的長度差為約 139-163-b.p.。在另一實施例中，第二引子/P2 或其互補股之產物與第三引子/P2 或其互補股之產物的長度差為約 203-230-b.p.。

在熔點曲線分析中，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）可為約 79.5-80.5°C，而第三引子/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 81.0-81.5°C，因此兩波峰之熔點溫度差可為約 0.5-2.0°C。在一實施例中，第一引子之序列為序列辨識號：14，第三引子之序列為序列辨識號：16，而第一引子/P2 或其互補股之聚合酶鏈鎖反應之產物的熔點溫度（波峰）可為約 79.5-80.0°C，而第三引子/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 81.5°C，因此兩波峰之熔點溫度差可為約 1.5-2.0°C。又相似地，在熔點曲線分析中，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）可為約 79.5-80.5°C，而第三引子/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 81.0-81.5°C，因此兩波峰之熔點溫度

差可為約 0.5-2.0°C。在一實施例中，第二引子之序列為序列辨識號：15，第三引子之序列為序列辨識號：17，而第二引子/P2 或其互補股之聚合酶鏈鎖反應之產物的熔點溫度（波峰）可為約 79.5-80.5°C，而第三引子/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 81.0-81.5°C。因此兩波峰之熔點溫度差可為約 0.5-2.0°C。所有企鵝科鳥類皆可適用於此方法來鑑定性別，在一實施例中企鵝科鳥類可包括阿德利企鵝屬企鵝（例如，巴布亞企鵝）、小藍企鵝屬之企鵝（例如，麥哲倫企鵝）、冠企鵝屬(Eudyptes)（例如，南跳岩企鵝）企鵝與王企鵝屬企鵝（例如，國王企鵝）等，但不限於此。

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 更多-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企鵝科鳥類之性別鑑定。

在一實施例中，首先可提供一企鵝科鳥類的 DNA，將此 DNA 樣本以於序列辨識號：11 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，或是，將此 DNA 樣本以於序列辨識號：12 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，首先可提供一企鵝科鳥類的 DNA，將此 DNA 樣本以於序列辨識號：11 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：13 或其互補股之序列範圍內設計之一第三引子與 P2 引子（序列辨識號：1）或其互補股之一第三引子對進行聚合酶鏈鎖反應，或者是將此 DNA 樣本以於序列辨識號：12 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以及於序列辨識號：13 或其互補股之序列範圍內設計之一第三引子與 P2 引子（序列辨識號：1）或其互補股之一第三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。在一實施例中，兩個條帶所代表之核苷酸的長度差異為約

112-240-b.p.。

第一引子對的例子可包括序列辨識號：11（順向）與 P2 引子（序列辨識號：1）（逆向）或序列辨識號：11 之互補股（逆向）與 P2 引子（序列辨識號：1）之互補股（順向）。又，第一引子對的例子也可包括序列辨識號：14（順向）與 P2 引子（序列辨識號：1）（逆向）或序列辨識號：14 之互補股（逆向）與 P2 引子（序列辨識號：1）之互補股（順向）。

第二引子對的例子可包括序列辨識號：12（順向）與 P2 引子（序列辨識號：1）（逆向）或序列辨識號：12 之互補股（逆向）與 P2 引子（序列辨識號：1）之互補股（順向）。又，第二引子對的例子也可包括序列辨識號：15（順向）與 P2 引子（序列辨識號：1）（逆向）或序列辨識號：15 之互補股（逆向）與 P2 引子（序列辨識號：1）之互補股（順向）。

第三引子對的例子可包括序列辨識號：13（順向）與 P2 引子（序列辨識號：1）（逆向）或序列辨識號：13 之互補股（逆向）與 P2 引子（序列辨識號：1）之互補股（順向）。又，第三引子對的例子也可包括序列辨識號：16（順向）與 P2 引子（序列辨識號：1）（逆向）或序列辨識號：16 之互補股（逆向）與 P2 引子（序列辨識號：1）之互補股（順向）。此外，第三引子對的例子也可包括序列辨識號：17（順向）與 P2 引子（序列辨識號：1）（逆向）或序列辨識號：17 之互補股（逆向）與 P2 引子（序列辨識號：1）之互補股（順向）。

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，或僅使用第二引子（於 *CHD-W* 序列專一區）/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，或是第二引子（於 *CHD-W* 序列專一區）/P2 引子或其互補股之第二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三引子（於 *CHD-ZW* 序列共同區）/P2 引子或其互補股之第三引子對進行聚合酶鏈鎖反應，或同時使用第二引子（於 *CHD-W* 序列專一區）/P2 引子或其互補股之第二引子對與第三引子（於 *CHD-ZW* 序列共同區）/P2 引子或其互補股之第三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三引子（於 *CHD-ZW* 序列共同區）/P2 引子或其互補股之第三引子對所產生之產物，或分別為第二引子（於 *CHD-W* 序列專一區）/P2 引子或其互補股之第二引子對所產生之產物與第三引子（於 *CHD-ZW* 序列共同區）/P2 引子或其互補股之第三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。

當使用第一引子對與第三引子對來對雌性 DNA 樣本進行聚合酶鏈鎖反應時，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為約 263-291-b.p.，而第三引子(於 *CHD-ZW* 序列共同區) /P2 引子或其互補股之第三引子對所產生之產物為約 122-151-b.p.。在一實施例中，在使用第一引子對與第三引子對來對雌性 DNA 樣本進行聚合酶鏈鎖反應，且第一引子對係包括序列為序列辨識號：14 之第一引子(於 *CHD-W* 序列專一區)(順向)與 P2 引子(序列辨識號：1)(逆向)，而第三引子係對包括序列為序列辨識號：16 之第三引子(於 *CHD-ZW* 序列共同區)(順向)與 P2 引子(序列辨識號：1)(逆向)的情況下，第一引子對所產生之產物為約 287-289-b.p.，而第三引子對所產生之產物為約 124-148-b.p.。

當使用第二引子對與第三引子對來對雌性 DNA 樣本進行聚合酶鏈鎖反應時，第二引子(於 *CHD-W* 序列專一區) /P2 引子或其互補股之第二引子對所產生之產物為約 340-362-b.p.，而第三引子(於 *CHD-ZW* 序列共同區) /P2 引子或其互補股之第三引子對所產生之產物為約 122-151-b.p.。在一實施例中，在使用第二引子對與第三引子對來對雌性 DNA 樣本進行聚合酶鏈鎖反應，且第二引子對係包括序列為序列辨識號：15 之第二引子(於 *CHD-W* 序列專一區)(順向)與 P2 引子(序列辨識號：1)(逆向)，而第三引子係對包括序列為序列辨識號：17 之第三引子(於 *CHD-ZW* 序列共同區)(順向)與 P2 引子(序

列辨識號：1) (逆向) 的情況下，第二引子對所產生之產物為約 351-356-b.p.，而第三引子對所產生之產物為約 124-148-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，或僅使用第二引子 (於 *CHD-W* 序列專一區) /P2 引子或其互補股之第二引子對進行聚合酶鏈鎖反應，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三引子 (於 *CHD-ZW* 序列共同區) /P2 引子或其互補股之第三引子對進行聚合酶鏈鎖反應，或同時使用第二引子 (於 *CHD-W* 序列專一區) /P2 引子或其互補股之第二引子對與第三引子 (於 *CHD-ZW* 序列共同區) /P2 引子或其互補股之第三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，為第三引子 (於 *CHD-ZW* 序列共同區) /P2 引子或其互補股之第三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。

當使用第一引子對與第三引子對來對雄性 DNA 樣本進行聚合酶鏈鎖反應時，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不會產生產物，而第三引子 (於 *CHD-ZW* 序列共同區) /P2 引子或其互補股之第三引子對所產生之產物為約 122-151-b.p.。在一實施例中，在使用第一引子對與第三引子對來對雄性 DNA 樣本進行聚

合酶鏈鎖反應，且第一引子對係包括序列為序列辨識號：14 之第一引子（於 *CHD-W* 序列專一區）（順向）與 P2 引子（序列辨識號：1）（逆向），而第三引子對係包括序列為序列辨識號：16 之第三引子（於 *CHD-ZW* 序列共同區）（順向）與 P2 引子（序列辨識號：1）（逆向）的情況下，第一引子對不會產生產物，而第三引子對所產生之產物為約 124-148-b.p.。

當使用第二引子對與第三引子對來對雄性 DNA 樣本進行聚合酶鏈鎖反應時，第二引子（於 *CHD-W* 序列專一區）/P2 引子或其互補股之第二引子對不會產生產物，而第三引子（於 *CHD-ZW* 序列共同區）/P2 引子或其互補股之第三引子對所產生之產物為約 122-151-b.p.。在一實施例中，在使用第二引子對與第三引子對來對雄性 DNA 樣本進行聚合酶鏈鎖反應，且第二引子對係包括序列為序列辨識號：15 之第二引子（於 *CHD-W* 序列專一區）（順向）與 P2 引子（序列辨識號：1）（逆向），而第三引子對係包括序列為序列辨識號：17 之第三引子（於 *CHD-ZW* 序列共同區）（順向）與 P2 引子（序列辨識號：1）（逆向）的情況下，第二引子對不會產生產物，而第三引子對所產生之產物為約 124-148-b.p.。

另一方面，因為不論雌性或雄性之 DNA 皆可以第三引子（於 *CHD-ZW* 序列共同區）/P2 引子或其互補股之第三引子對進行聚合酶鏈鎖反應而產生產物，因此可將第三引子（於 *CHD-ZW* 序列共同區）/P2 引子或其互補股之第三引子對所進行之聚合酶鏈鎖反應當作一正控制組。

依照引子與所鑑定之企鵝科鳥類的不同，第一引子/P2 或其互補股及第三引子/P2 或其互補股之產物的長度差為至少大於約 112-169-b.p.，而第二引子/P2 或其互補股及第三引子/P2 或其互補股之產物的長度差為至少大於約 189-240-b.p.。所以在同時使用第一引子對與第三引子對進行聚合酶鏈鎖反應並進行電泳分析，或同時使用第二引子對與第三引子對進行聚合酶鏈鎖反應並進行電泳分析時，兩個條帶間能清楚分離。

在聚合酶鏈鎖反應中，第一引子/P2 或其互補股之產物與第三引子/P2 或其互補股之產物的長度差為約 112-169-b.p.。在一實施例中，第一引子之序列為序列辨識號：14，第三引子之序列為序列辨識號：16，而第一引子/P2 或其互補股之聚合酶鏈鎖反應之產物與第三引子/P2 或其互補股之聚合酶鏈鎖反應之產物的長度差為約 139-163-b.p.。相似地，在聚合酶鏈鎖反應中，第二引子/P2 或其互補股之產物與第三引子/P2 或其互補股之產物的長度差為約 189-240-b.p.。在一實施例中，第二引子之序列為序列辨識號：15，第三引子之序列為序列辨識號：17，而第二引子/P2 或其互補股之聚合酶鏈鎖反應之產物與第三引子/P2 或其互補股之聚合酶鏈鎖反應之產物的長度差為約 203-230-b.p.。

所有企鵝科鳥類皆可適用於此方法來鑑定性別，在一實施例中企鵝科鳥類可包括阿德利企鵝屬企鵝（例如，巴布亞企鵝）、小藍企鵝屬企鵝（例如，麥哲倫企鵝）、冠企鵝屬（例如，南跳岩企鵝）之企鵝與王企鵝屬企鵝（例

如，國王企鵝)等，但不限於此。

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* 序列共同區來鑑定企鵝科鳥類性別。因此本發明還可提供一種鑑別企鵝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，本發明提供之鑑別企鵝科鳥類性別之核苷酸序列，可包括序列辨識號：11 或其互補股之序列，或可更包括序列辨識號：13 或其互補股之序列。在另一實施例中，本發明提供之鑑別企鵝科鳥類性別之核苷酸序列，可包括序列辨識號：12 或其互補股之序列，或可更包括序列辨識號：13 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企鵝科鳥類性別之核苷酸引子對，其可包括於序列辨識號：11 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，或其可包括於序列辨識號：12 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。又在一實施例中上述本發明之鑑別企鵝科鳥類性別之核苷酸引子對還可更包括於序列辨識號：13 或其互補股之序列範圍內設計之一第三引子與 P2 引子(序列辨識號：1) 或其互補股的一第三引子對。

第一引子對的例子可包括序列辨識號：11 (順向) 與

P2 引子（序列辨識號：1）（逆向）或序列辨識號：11 之互補股（逆向）與 P2 引子（序列辨識號：1）之互補股（順向）。又，第一引子對的例子也可包括序列辨識號：14（順向）與 P2 引子（序列辨識號：1）（逆向）或序列辨識號：14 之互補股（逆向）與 P2 引子（序列辨識號：1）之互補股（順向）。

第二引子對的例子可包括序列辨識號：12（順向）與 P2 引子（序列辨識號：1）（逆向）或序列辨識號：12 之互補股（逆向）與 P2 引子（序列辨識號：1）之互補股（順向）。又，第二引子對的例子也可包括序列辨識號：15（順向）與 P2 引子（序列辨識號：1）（逆向）或序列辨識號：15 之互補股（逆向）與 P2 引子（序列辨識號：1）之互補股（順向）。

第三引子對的例子可包括序列辨識號：13（順向）與 P2 引子（序列辨識號：1）（逆向）或序列辨識號：13 之互補股（逆向）與 P2 引子（序列辨識號：1）之互補股（順向）。又，第三引子對的例子也可包括序列辨識號：16（順向）與 P2 引子（序列辨識號：1）（逆向）或序列辨識號：16 之互補股（逆向）與 P2 引子（序列辨識號：1）之互補股（順向）。此外，第三引子對的例子也可包括序列辨識號：17（順向）與 P2 引子（序列辨識號：1）（逆向）或序列辨識號：17 之互補股（逆向）與 P2 引子（序列辨識號：1）之互補股（順向）。

1. 樣本收集與血液 DNA 萃取

來自已知性別之巴布亞企鵝 (*Pygoscelis papua*) (雌性：G304、G404 與 G508；雄性：AD7564) 的四個血液樣本由海景世界企業股份有限公司 (Hi-Scene World Enterprise Co. LTD., Taiwan) 所提供。如 Chang HW, Gu DL, Su SH, Chang CC, Cheng CA, Huang HW, Yao CT, Chou TC, Chuang LY, Cheng CC. *Theriogenology* 2008;70:83-90. 所述藉由 Qiagen 血液套組萃取血液 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

先前已報導了用於鳥類性別鑑定的通用引子，即引子 P2 與 P8 (Griffiths R, Double MC, Orr K, Dawson RJ., *Mol Ecol* 1998;7: 1071-1075.)。在企鵝之分子性別鑑定中使用此 P2 (序列辨識號：1) (逆向) / P8 (序列辨識號：2) (順向) 引子。將上述 DNA 樣本分別添加至經修飾之聚合酶鏈鎖反應混合物 (10 μ l)。經修飾之聚合酶鏈鎖反應混合物包括 1 μ l 之 10X PCR 緩衝溶液、0.3 μ l 之 50 mM $MgCl_2$ 、0.2 μ l 之 10 mM dNTPs、0.6 μ l 之 DMSO、0.14 μ l 之 5U Taq enzyme、0.12 μ l 之 350 μ g/ml 引子混合 (1:1) 與 7.64 μ l 之在水中的 DNA。聚合酶鏈鎖反應之條件經修飾如下：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，50 次循環；47°C，20 秒；72°C，20 秒；

78°C，10 秒；72°C，5 分鐘，25°C，10 分鐘；以及 55°C，10 秒，80 次循環。

(1) 電泳分析

將聚合酶鏈鎖反應之產物 (*CHD-Z* 與 *CHD-W* 擴增子 (amplicon)) 藉由 3% 瓊脂膠進行電泳分析且隨後以溴化乙錠 (ethidium bromide)，結果如第 1A 圖所示。

藉由 P2/P8 擴增後，雌性與雄性企鵝應分別具有兩條條帶 (band) 與一條條帶 (Griffiths R, Double MC, Orr K, Dawson RJ. Mol Ecol 1998;7:1071-5.)。在第 1A 圖中，將由 P2/P8 引子所擴增之聚合酶鏈鎖反應產物進行 3% 瓊脂膠電泳分析，然而，其所顯示出之條帶仍然太相近以致無法清楚區分性別。在小心地觀察膠體後，發現其顯示了聚合酶鏈鎖反應產物之具有不同分子量的兩條條帶。較低條帶為在所有測試樣本中所共有，而較高之條帶僅於 G304、G404 與 G508 中被發現。由於這些樣本是以已知性別之方式來收集，因此推測較低分子量條帶與較高分子量條帶分別對應至 *CHD-Z* 與 *CHD-W* 之部分。

(2) 熔點曲線分析

在聚合酶鏈鎖反應完成後，以 iQTM5 即時聚合酶鏈鎖反應機器 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) 之預設程式，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 $(-d(\text{RFU})/dT)$ 對溫度 (T) 顯示 (其中 RFU 與 T 分別為相對螢光單位 (relative

fluorescence unit)與溫度)。各聚合酶鏈鎖反應產物的熔點溫度(T_m)(對應於 $-d(RFU)/dT$ 之波峰的溫度)藉由 Bio-Rad iQ™5 系統預設軟體來測定。其中聚合酶鏈鎖反應擴增子的存在與純度可藉由 1.5% 瓊脂膠電泳分析來確認。

對於 *CHD-Z* 及/或 *CHD-W* 基因之 P2/P8 聚合酶鏈鎖反應擴增子的熔點曲線分析而言，僅出現一個波峰於大約 82 °C (第 1B 圖)。因此使用 P2/P8 引子之熔點曲線分析無法對巴布亞企鵝執行性別鑑定。

3. *CHD-Z* 與 *CHD-W* 基因之 TA 選殖(cloning)與核苷酸定序

在以電泳分析之後，以 MiniElute 膠體純化套組(Qiagen)對來自使用 P2 與 P8 引子之聚合酶鏈鎖反應擴增的 DNA 條帶進行膠體純化。由於 *CHD-Z* 與 *CHD-W* 聚合酶鏈鎖反應產物在一般瓊脂膠中可能不易解析，因此選擇雄性與雌性企鵝 (AD7564 與 G508) 為 *CHD-Z* 與 *CHD-W* 選殖的主要來源。藉由使用 pGEM-T Easy TA Cloning kit (Promega) 個別選殖 *CHD-Z* 與 *CHD-W* 聚合酶鏈鎖反應產物，如 Chang HW, Cheng CA, Gu DL, Chang CC, Su SH, Wen CH, Chou YC, Yao CT, Tsai CL, Chou TC, Cheng CC. BMC Biotechnology 2008;8:12.所述，且之後將其進行定序。

所獲得之巴布亞企鵝的 *CHD-Z* 與 *CHD-W* 基因序列顯示於第 2A 與 2B 圖中。

4. BLAST 分析

執行於 NCBI (National Center for Biotechnology Information)中之 BLAST 工具以發現具有同源序列之許多鳥類種類(Wu CP, Horng YM, Wang RT, Yang KT, Huang MC., Theriogenology 2007;67: 328-333.)。參數設定如下所示：選擇搜尋設定為“others (其他)”與“nr/nt”與程式篩選為“最佳化稍微相似之序列(optimize for somewhat similar sequences)(blastn)”。

5. 序列比對分析

將上述所產生之序列藉由使用 Biology Workbench 3.2 (<http://workbench.sdsc.edu/>)進行比對。

根據 BLAST 分析，巴布亞企鵝的 P2/P8 聚合酶鏈鎖反應擴增子的序列為完全符合 GenBank 編號為 GU451234 之 *CHD-Z* 序列與 GenBank 編號為 GU451238 之 *CHD-W* 序列，除了於 GU451238 序列之位置 141 的單一核苷酸多型性(Y = T/C)之外 (資料未顯示)。

此外，許多企鵝種類，例如麥哲倫企鵝、南跳岩企鵝與國王企鵝具有與巴布亞企鵝相似之 *CHD-Z* 與 *CHD-W* 序列。於 GenBank 中發現其 *CHD-Z* 與 *CHD-W* 序列如下所示：巴布亞企鵝為 GU451234 與 GU451238；麥哲倫企鵝為 GU451235 與 GU451239；南跳岩企鵝為 GU451233 與 GU451237；以及國王企鵝為 GU451232 與 GU451236。

此四種企鵝之 *CHD-Z* 與 *CHD-W* 基因之序列比對顯示於第 2A 與 2B 圖中。

而由上述之序列比對可得 *CHD-W* 所專有之序列(所選

擇不同鳥類之個別 *CHD-W* 基因所共同具有之 *CHD-W* 基因專有序列)，稱做 *CHD-W* 序列專一區，為序列辨識號：11 與序列辨識號：12，分別如第 2A 與 2B 圖之黑框區 1 與黑框區 2 所示；與 *CHD-Z* 與 *CHD-W* 共同所具有之序列區（所選擇不同鳥類之個別 *CHD-Z* 與 *CHD-W* 基因所共同具有之 *CHD-Z* 與 *CHD-W* 基因共同序列），稱做 *CHD-ZW* 序列共同區，為序列辨識號：13，如第 2A 與 2B 圖之黑框區 3 所示。

CHD-Z 與 *CHD-W* 之序列相似度，在這些種類之企鵝中給予了設計出用於性別鑑定之新穎引子的可能性。

6. 使用重新設計之引子對之進階的分子性別鑑定

分別在 *CHD-W* 序列專一區（序列辨識號：11）與 *CHD-ZW* 序列共同區（序列辨識號 13）中，重新設計對於 *CHD-W* 序列專一區與 *CHD-ZW* 序列共同區之聚合酶鏈鎖反應的順向引子。對於 *CHD-W* 序列專一區（序列辨識號：11）之順向引子為 PGU-W1：5'-GCTGTTGTTTTGGCTTGTACT-3'（序列辨識號：14）；對於 *CHD-ZW* 序列共同區之順向引子為 PGU-ZW1：5'-RCGCAGTAGGAGCAGAAGATA-3'（序列辨識號：16）。

此外，分別在 *CHD-W* 序列專一區（序列辨識號：12）與 *CHD-ZW* 序列共同區（序列辨識號 13）中，重新設計對於 *CHD-W* 序列專一區與 *CHD-ZW* 序列共同區之聚合酶鏈鎖反應的順向引子。對於 *CHD-W* 序列專一區（序列辨識號：12）之順向引子為 PGU-W2：5'-

TCTCTGGGTTTTAMCCAACTAAC-3' (序列辨識號：15)；
對於 CHD-ZW 序列共同區之順向引子為 PGU-ZW2：
5'-GCTTTAATGGAAGTGAAGGGA-3' (序列辨識號：17)。

使用相同之逆向引子 P2 (序列辨識號：1) (Griffiths R, Double MC, Orr K, Dawson RJ, Mol Ecol 1998;7: 1071-1075.)，對於巴布亞企鵝而言，PGU-W1/P2 引子對與 PGU-ZW1/P2 引子對之聚合酶鏈鎖反應擴增長度分別為 287-b.p. 與 126-b.p.。又，使用相同之逆向引子 P2 (序列辨識號：1)，對於巴布亞企鵝而言，PGU-W2/P2 引子對與 PGU-ZW2/P2 引子對之聚合酶鏈鎖反應擴增長度分別為 356-b.p. 與 148-b.p.。

如第 2A 與 2B 圖中所示，*CHD-W* 基因之藉由 PGU-W1/P2 引子對與 PGU-ZW1/P2 引子對所擴增之聚合酶鏈鎖反應產物的長度，對於巴布亞企鵝而言，分別為 287-b.p. 與 126-b.p.，而對於麥哲倫企鵝、南跳岩企鵝與國王企鵝而言，則分別為 289-b.p. 與 126-b.p.。又，*CHD-Z* 基因之藉由 PGU-ZW1/P2 引子對所擴增之聚合酶鏈鎖反應產物的長度，對於巴布亞企鵝、麥哲倫企鵝、南跳岩企鵝而言，為 126-b.p.，而對於國王企鵝而言，則為 124-b.p.。

同樣如第 2A 與 2B 圖中所示，*CHD-W* 基因之藉由 PGU-W2/P2 引子對與 PGU-ZW2/P2 引子對所擴增之聚合酶鏈鎖反應產物的長度，對於巴布亞企鵝而言，分別為 356-b.p. 與 148-b.p.，對於麥哲倫企鵝與南跳岩企鵝，則分別為 351-b.p. 與 148-b.p.，而對於國王企鵝而言，則分別為 355-b.p. 與 148-b.p.。又，*CHD-Z* 基因之藉由 PGU-ZW2/P2

引子對所擴增之聚合酶鏈鎖反應產物的長度，對於巴布亞企鵝、麥哲倫企鵝、南跳岩企鵝而言，為 148-b.p.，而對於國王企鵝而言，則為 146-b.p.。

聚合酶鏈鎖反應

於此執行之聚合酶鏈鎖反應條件如下所示：變性（95°C，3 分鐘）；50 個循環之變性（95°C，30 秒）；黏附（61°C，30 秒）與擴增（72°C，7 秒）。

(1) 電泳分析

將 PGU-W1/P2 引子對與 PGU-ZW1/P2 引子對於不同孔洞中對巴布亞企鵝之 DNA 樣本執行聚合酶鏈鎖反應，且之後將聚合酶鏈鎖反應之產物（*CHD-Z* 與 *CHD-W* 擴增子）藉由 1.5% 瓊脂膠進行電泳分析，結果如第 3A 圖所示。將 PGU-W2/P2 引子對與 PGU-ZW2/P2 引子對於不同孔洞中對巴布亞企鵝之 DNA 樣本執行聚合酶鏈鎖反應，且之後將聚合酶鏈鎖反應之產物（*CHD-Z* 與 *CHD-W* 擴增子）藉由 1.5% 瓊脂膠進行電泳分析，結果如第 4A 圖所示。

如於第 3A 圖與第 4A 圖中所示，包含 126-b.p. 之單一條帶（第 3A 圖之右側區塊）與 148-b.p. 之單一條帶（第 4A 圖之右側區塊）的所有測試個體，被視為對於 *CHD-Z* 基因與 *CHD-W* 基因兩者的聚合酶鏈鎖反應正控制組，其代表在雄性與雌性巴布亞企鵝兩者中皆發現 *CHD-ZW* 共同序列。

另一方面，具有 287-b.p. 條帶與 356-b.p. 條帶之企鵝代表雌性，且在雄性中缺乏上述這些條帶。因此，可確定樣

本 G304G404 與 G508 之性別為雌性，而 AD7564 為雄性。

儘管其他企鵝，例如麥哲倫企鵝、南跳岩企鵝與國王企鵝之 DNA 樣本為無法獲得，藉由本發明之方法，其性別仍可被鑑定，由於藉由本發明所重新設計之引子，牠們共享幾乎相同之聚合酶鏈鎖反應產物的長度。

(2) 熔點曲線分析：

在聚合酶鏈鎖反應完成後，以 iQ™5 即時聚合酶鏈鎖反應機器(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)之預設程式，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(-d(RFU)/dT)對溫度(T)顯示（其中 RFU 與 T 分別為相對螢光單位(relative fluorescence unit)與溫度）。各聚合酶鏈鎖反應產物的熔點溫度(T_m)(對應於-d(RFU)/dT 之波峰的溫度)藉由 Bio-Rad iQ™5 系統預設軟體來測定。聚合酶鏈鎖反應擴增子的存在與純度藉由 1.5% 瓊脂膠電泳分析來確認。

執行使用 PGU-W1/P2 引子對與 PGU-ZW1/P2 引子對之與第 3A 圖相同之聚合酶鏈鎖反應產物的熔點曲線分析，結果顯示於第 3B 至 3E 圖。三個巴布亞企鵝的個體被測定為雌性，由於牠們具有對於 PGU-W1 專一引子之波峰(81.5°C; W)與對於 PGU-ZW1 共同引子之波峰(79.5-80.0 °C; ZW)兩者（第 3B 圖：G304；第 3C 圖：G404；第 3D 圖：G508）。相對地，其他企鵝被測定為雄性，由於其具有一單一之 PGU-ZW1 共同的 T_m 波峰(79.5-80.0 °C; ZW)（第 3E 圖：AD7546）。

相似地，執行使用 PGU-W2/P2 引子對與 PGU-ZW2/P2 引子對之與第 4A 圖相同之聚合酶鏈鎖反應產物的熔點曲線分析，結果顯示於第 4B 至 4E 圖。三個巴布亞企鵝的個體被測定為雌性，由於牠們具有對於 PGU-W2 專一引子之波峰(81.0-81.5°C; W)與對於 PGU-ZW2 共同引子之波峰(79.5-80.5°C; ZW)兩者(第 4B 圖：G304；第 4C 圖：G404；第 4D 圖：G508)。相對地，其他企鵝被測定為雄性，由於其具有一單一之 PGU-ZW2 共同的 T_m 波峰(79.5-80.5°C; ZW)(第 4E 圖：AD7546)。

7. 討論

多數種類之企鵝為僅具非常小程度之雌雄異形，特別是對於未成熟之企鵝而言。藉由性別比例監測企鵝族群之穩定度應避免雄性傾向測定(male-biased determination)。目前已發展出一些方法來克服介於兩種 *CHD* 基因之間之內隱子(intron)長度差異短的問題；然而，僅有報導將 PCR-RFLP 方法(Costantini V, Guaricci AC, Laricchiuta P, Rausa F, Lacalandra GM. Anim Reprod Sci 2008;106:162-7.) 實施於企鵝之性別鑑定，例如漢波德企鵝(*Spheniscus humboldti*)。聚合酶鏈鎖反應-限制性片段長度多態性(restriction fragment of length polymorphism, RFLP)為一方法，其執行聚合酶鏈鎖反應，以限制酵素切割並執行於電泳分析(Huang HW, Su YF, Yao CT, Hung YC, Chen CC, Cheng CC, Chang HW. Theriogenology 2010;75:73-9.)。

為了節省時間與成本，在本發明中發展重新設計之引

子，藉由使用即時聚合酶鏈鎖反應結合熔點曲線分析來測定企鵝性別。使用重新設計之 ZW 共同的引子 (PGU-ZW1 與 PGU-ZW2) 與 W 專一引子 (PGU-W1 與 PGU-W2) 結合 P2 引子，對於這些企鵝種類而言，介於兩個 PCR 擴增子之長度差異擴大至，PGU-ZW1/P2 與 PGU-W1/P2 擴增子之差異為 161-b.p. (= 287-126)，而 PGU-ZW2/P2 與 PGU-W2/P2 擴增子之差異為 208-b.p. (= 356-148) (第 2A 與 2B 圖)，而此使得根據熔點曲線分析中之不同曲線的性別偵測為可實施 (參見第 3B-E 圖與第 4B-E 圖)。因此本發明重新設計之共同引子對可藉由使用熔點曲線分析來對於企鵝科鳥類執行高通量之性別鑑定。

對於性別鑑定而言，本發明之熔點曲線分析方法，係根據波峰數目，即一個波峰為雄性，兩個波峰為雌性，並根據在即時機器中之內建軟體所自動測定之 T_m 值的正確範圍。相對地，電泳分析方法為藉由人工檢查根據條帶數目與正確大小，其較為勞動密集。因此由上述可知，熔點曲線分析方法較為便利。

8. 結論

於本發明中，重新設計之性別鑑定引子為限於企鵝科鳥類，且對於鑑定企鵝科鳥類而言，即時聚合酶鏈鎖反應結合熔點溫度測定為一簡單有效且健全的方法。因此藉由本發明之方法可對於企鵝科鳥類執行高通量之性別鑑定，並達到節省時間與成本之功效。

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 圖顯示以 P2/P8 引子分別對巴布亞企鵝 DNA 進行聚合酶鏈反應後所得之產物之 3% 膠體電泳圖。

第 1B 圖顯示以 P2/P8 引子分別對巴布亞企鵝 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 圖顯示巴布亞企鵝 (*Pygoscelis papua*)、麥哲倫企鵝 (*Spheniscus magellanicus*)、南跳岩企鵝 (*Eudyptes chrysocome*) 與國王企鵝 (*Aptenodytes patagonicus*) 之 CHD-Z 與 CHD-W 基因序列比較圖。

第 3A 圖顯示以本發明重新設計之 PGU-W1/P2 引子對與 PGU-ZW1/P2 引子對分別對巴布亞企鵝 DNA 進行聚合酶鏈反應後所得之產物之 1.5% 膠體電泳圖。三角形分別指出 PGU-W1/P2 (287-b.p.) 與 PGU-ZW1/P2 (126-b.p.) 之擴增子的位置。

第 3B 圖顯示以本發明重新設計之 PGU-W1/P2 引子對與 PGU-ZW1/P2 引子對分別對雌性巴布亞企鵝 G304 之 DNA 進行聚合酶鏈反應後所得之熔點曲線分析。

第 3C 圖顯示以本發明重新設計之 PGU-W1/P2 引子對與 PGU-ZW1/P2 引子對分別對雌性巴布亞企鵝 G404 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 PGU-W1/P2 引子對與 PGU-ZW1/P2 引子對分別對雌性巴布亞企鵝 G508 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 PGU-W1/P2 引子對與 PGU-ZW1/P2 引子對分別對雄性巴布亞企鵝 AD7564 之

DNA 進行聚合酶鏈反應後所得之熔點曲線分析。

第 4A 圖顯示以本發明重新設計之引子對與 PGU-ZW2/P2 引子對分別對巴布亞企鵝 DNA 進行聚合酶鏈反應後所得之產物之 1.5% 膠體電泳圖。三角形分別指出 PGU-W2/P2 (3567-b.p.) 與 PGU-ZW2/P2 (148-b.p.) 之擴增子的位置。

第 4B 圖顯示以本發明重新設計之 PGU-W2/P2 引子對與 PGU-ZW2/P2 引子對分別對雌性巴布亞企鵝 G304 之 DNA 進行聚合酶鏈反應後所得之熔點曲線分析。

第 4C 圖顯示以本發明重新設計之 PGU-W2/P2 引子對與 PGU-ZW2/P2 引子對分別對雌性巴布亞企鵝 G404 之 DNA 進行聚合酶鏈反應後所得之熔點曲線分析。

第 4D 圖顯示以本發明重新設計之 PGU-W2/P2 引子對與 PGU-ZW2/P2 引子對分別對雌性巴布亞企鵝 G508 之 DNA 進行聚合酶鏈反應後所得之熔點曲線分析。

第 4E 圖顯示以本發明重新設計之 PGU-W2/P2 引子對與 PGU-ZW2/P2 引子對分別對雄性巴布亞企鵝 AD7564 之 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、2、3～黑框區

序列表

【序列編號】

<110> 高雄醫學大學

<120> 鑑定企鵝科鳥類性別的方法、鑑別企鵝科鳥類性別之核苷酸序列與鑑別企鵝科鳥類性別之核苷酸引子對

<160> 17

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> P2 引子

<400> 1

tctgcatcgc taaatccttt

20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> P8 引子

<400> 2

ctcccaagga tgagraaytg 20

<210> 3

<211> 369

<212> DNA

<213> 巴布亞企鵝

<400> 3

ctcccaagga tgatgaactg tgcaaaacag gtgtctcttg gttccgactg acttgtactt 60

ttatgttgct gttggttag tttgttggg gttgttggg gggttgggtt ggggtgggtt 120

ttttttcctt ttctgaacac atttttgacg ggcaaggtaa aactttactg atgtttgtca 180

atcacgtagc ttggaactac ttattctgaa attccagatc agctttaatg gaagtgaagg 240

gaggcgcagt aggagcagaa gatactcggg atctgatagt gactccatct cagaaagaaa 300

aaggcaaaa aaacgtggaa gaccacgaac tattcctcga gaaaatatta aaggatttag 360

cgatgcaga 369

<210> 4

<211> 389

<212> DNA

<213> 巴布亞企鵝

<400> 4

ctcccaagga tgatgaattg tgcaaaacag gtatctctgg gttttaccca actaactttg 60

atgtgtgtt gttgtgttg tttgtttgtt tgttttttcg ttgctgttgt tttggcttgt 120

acttttgggt tgggtggttt tcaogcgacg cccctcccc ccatttttga caggctagat 180

aacacattaa taaaatcttt gtcacatagc ttggaactac ttaatctgaa attccagatc 240

agctttaatg gaagtgaagg gaaacgcagt aggagcagaa gatattctgg atctgatagt 300

gactccatct cagaaagaaa acgaccaaaa aaacgtggac gaccacgaac tattcctoga 360

gaaaatatta aaggatttag cgaigcaga 389

<210> 5

<211> 367

<212> DNA

<213> 麥哲倫企鵝

<400> 5

ctcccaagga tgataaattg tgcaaaacag gtgtctcttg gttctgactg acttgactt 60

ttatgttgct gttggtttag tttgttggg gttgttggtg ggttttggtt ggggtttttt 120

ttttcctttt ctgaacacat ttttgacagg caaggtaaaa ctttactgat gtttgcagt 180

cgcgtagctt tgaactactt attctgaaat tccagatcag ctttaatgga agtgaaggga 240

ggcgcagtag gagcagaaga tactctggat ctgatagtga ctccatttca gaaagaaaaa 300

ggccaaaaaa acgtggaaga ccacgaacta ttcctcgaga aaatattaataa ggatttagcg 360

atgcaga 367

<210> 6

<211> 384

<212> DNA

<213> 麥哲倫企鵝

<400> 6

ctcccaagga tgatgaattg tgcaaaacag gtaictctgg gttttaacca actaactttg 60

atTTTTgtt attgTtgtt gttTgtttt ttgtTgctgt tgtttTggct tgtactttt 120
ggTtgggtg tttTcacgcg tggcgcccc tccccatt tttgacaggc tagataacac 180
attaataaaa tctttgtcac atagctttga actacttaat ctgaaattcc agatcagctt 240
taatggaagt gaaggaaac gcagtaggag cagaagatat tctggatctg atagtgactc 300
catctcagaa agaaaacgac caaaaaacg tggacgacca cgaactattc ctgagaaaa 360
tattaaagga tttagcgatg caga 384

<210> 7

<211> 367

<212> DNA

<213> 南跳岩企鵝

<400> 7

ctccaagga tgatgaattg tgcaaacag gtgtctcttg gttctgactg acttgtaacct 60
ttatgttgct gttggtttag tttgttgggg gttgttgttg ggttttggtt gggtttttct 120
ttttctttt ctgaacacat tttgacagg caaggtaaaa ctttactgat gtttgtcagt 180
cacgtagctt tgaactactt attctgaaat tccagatcag ctttaattga agtgaaggga 240

ggcgcagtag gagcagaaga tactctggat ctgatagtga ctccatttca gaaagaaaac 300

gaccaaaaaa acgtggacga ccacgaacta ttctctgaga aaatattaa ggatttagcg 360

atgcaga 367

<210> 8

<211> 384

<212> DNA

<213> 南跳岩企鵝

<400> 8

ctcccaagga tgataaattg tgcaaaacag gtatctctgg gttttaacca actaactttg 60

atTTTTggt gttgTTgTTt gTTTgTTTTt tCattgctgt tGTTTTggct tGtactTTTg 120

ggtTgggtgg ttttCacgcg tggcgcCccc tcccccgTt tttgacaggc tagataacac 180

attaataaaa tctttgtcac atagctttga actacttaat ctgaaattcc agatcagctt 240

taatggaagt gaagggaaac gcagtaggag cagaagatat tctggatctg atagtgactc 300

catctcagaa agaaaacgac caaaaaaacg tggacgacca cgaactattc ctcgagaaaa 360

tatttaaagga tttagcgatg caga

384

<210> 9

<211> 339

<212> DNA

<213> 國王企鵝

<400> 9

ctcccaagga tgataaattg tgcaaaacag gtgtctcttg gttctgactg acttgtactt 60

ttatgttggt gttgggtggt ggttggggtt tttttttcc ttttctgaac acatttttga 120

caggcgacgt aaaactttac tgatgtttgt caatcacata gctttgaact acttattctg 180

aaattccaga (tcagctttaa tggaagtgaa gggaggcgca gtaggagcag aagatactct 240

ggatctgata gtgactccat ctcagaaaga aaggcaaaa aaacgtggaa gaccacgaac 300

tattcctcga gaaaatatta aaggatttag cgatgcaga

339

<210> 10

<211> 388

<212> DNA

<213> 國王企鵝

<400> 10

ctcccaagga tgataaattg tgcaaaacag gtatctctgg gttttaacca actaactttg 60

atTTTTTTgt tGttGttgtt gtttGtttgt tttttcgttg ctgttgTTTT ggcttgTact 120

tttgggttgg gtggttttca cgcgtggcgc cccctcccc catttttgac aggctagata 180

acacattaat aaaatctttg tcacgtagct ttgaactact taatctgaaa ttccagatca 240

gctttaatgg aagtgaaggg aaacgcagta ggagcagaag atattctgga tctgatagtg 300

actccatctc agaaagaaaa cgaccaaaaa aacgtggacg accacgaact attcctcgag 360

aaaatattaa aggatttagc gatgcaga 388

<210> 11

<211> 46

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> CHD-W 序列專一區域

<400> 11

ttgctgttgt tttggcttgt acttttgggt tgggtggttt tcacgc

46

<210> 12

<211> 37

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> CHD-W 序列專一區域

<400> 12

caggatctc tgggttttam ccaactaact ttgattt

37

<210> 13

<211> 56

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> CHD-ZW 序列共同區域

<400> 13

ttcagctttaa tgggaagtgaa gggaaarcgca gtaggagcag aagataytc

49

<210> 14

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> *CHD-W* 專一引子

<400> 14

gctgttgttt tggcttgtac t

21

<210> 15

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> *CHD-W* 專一引子

<400> 15

tctctgggtt ttamccaact aac

23

<210> 16

<211> 21

<212> DNA

<213> aa

<213> 人工序列

<220>

<223> CHD-ZW 共同引子

rcgcagtagg agcagaagat a

21

<210> 17

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> CHD-ZW 共同引子

<400> 17

gctttaatgg aagtgaaggg a

21

七、申請專利範圍：

1. 一種鑑定企鵝科鳥類性別的方法，包括：

提供一企鵝科鳥類之 DNA 樣本；

將該 DNA 樣本以於序列辨識號：11 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，或於序列辨識號：12 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，以及於序列辨識號：13 或其互補股之序列範圍內設計之一第三引子與 P2 引子（序列辨識號：1）或其互補股的一第三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 項所述之鑑定企鵝科鳥類性別的方法，其中該企鵝科鳥類包括阿德利企鵝屬 (*Pygoscelis*) 企鵝、小藍企鵝屬 (*Spheniscus*) 企鵝、冠企鵝屬 (*Eudyptes*) 企鵝與王企鵝屬 (*Aptenodytes*) 企鵝。

3. 如申請專利範圍第 1 項所述之鑑定企鵝科鳥類性別的方法，其中該企鵝科鳥類包括巴布亞企鵝 (*Pygoscelis papua*)、麥哲倫企鵝 (*Spheniscus magellanicus*)、南跳岩企鵝 (*Eudyptes chrysocome*) 與國王企鵝 (*Aptenodytes patagonicus*)。

4. 如申請專利範圍第 1 項所述之鑑定企鵝科鳥類性別的方法，其中該第一引子對包括序列辨識號：14 與 P2 引子（序列辨識號：1）或序列辨識號：14 之互補股與 P2 引子（序列辨識號：1）之互補股，而該第三引子對包括序列

辨識號：16 與 P2 引子（序列辨識號：1）或序列辨識號：16 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 項所述之鑑定企鵝科鳥類性別的方法，其中該第二引子對包括序列辨識號：15 與 P2 引子（序列辨識號：1）或序列辨識號：15 之互補股與 P2 引子（序列辨識號：1）之互補股，該第三引子對包括序列辨識號：17 與 P2 引子（序列辨識號：1）或序列辨識號：17 之互補股與 P2 引子（序列辨識號：1）之互補股。

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

7.如申請專利範圍第 1 項所述之鑑定企鵝科鳥類性別的方法，其中該兩個波峰之熔點溫度相差約 0.5-2.0°C。

8.如申請專利範圍第 4 項所述之鑑定企鵝科鳥類性別的方法，其中該兩個波峰之熔點溫度相差約 1.5-2.0°C。

9.如申請專利範圍第 5 項所述之鑑定企鵝科鳥類性別的方法，其中該兩個波峰之熔點溫度相差約 0.5-2.0°C。

10.一種鑑定企鵝科鳥類性別的方法，包括：

提供一企鵝科鳥類之 DNA 樣本；

將該 DNA 樣本以於序列辨識號：11 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，或於序列辨識號：12 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，以及於序列辨識號：13 或其互補股之序列範圍內設計之一第三引子與 P2 引子（序列辨識號：1）或其互補股的一第三引子對進行聚合酶

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。

11.如申請專利範圍第 10 項所述之鑑定企鵝科鳥類性別的方法，其中該企鵝科鳥類包括阿德利企鵝屬企鵝、小藍企鵝屬企鵝、冠企鵝屬企鵝與王企鵝屬企鵝。

12.如申請專利範圍第 10 項所述之鑑定企鵝科鳥類性別的方法，其中該企鵝科鳥類包括巴布亞企鵝、麥哲倫企鵝、南跳岩企鵝與國王企鵝。

13.如申請專利範圍第 10 項所述之鑑定企鵝科鳥類性別的方法，其中該第一引子對包括序列辨識號：14 與 P2 引子（序列辨識號：1）或序列辨識號：14 之互補股與 P2 引子（序列辨識號：1）之互補股，而該第三引子對包括序列辨識號：16 與 P2 引子（序列辨識號：1）或序列辨識號：16 之互補股與 P2 引子（序列辨識號：1）之互補股。

14.如申請專利範圍第 10 項所述之鑑定企鵝科鳥類性別的方法，其中該第二引子對包括序列辨識號：15 與 P2 引子（序列辨識號：1）或序列辨識號：15 之互補股與 P2 引子（序列辨識號：1）之互補股，而該第三引子對包括序列辨識號：17 與 P2 引子（序列辨識號：1）或序列辨識號：17 之互補股與 P2 引子（序列辨識號：1）之互補股。

15.如申請專利範圍第 10 項所述之鑑定企鵝科鳥類性別的方法，其中該兩個條帶所代表之核苷酸的長度差異為約 112-240-b.p.。

16.如申請專利範圍第 13 項所述之鑑定企鵝科鳥類性

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 139-163-b.p.。

17.如申請專利範圍第 14 項所述之鑑定企鵝科鳥類性別的方法，其中該兩個條帶所代表之核苷酸的長度差異為約 203-230-b.p.。

18.一種鑑別企鵝科鳥類性別之核苷酸序列，其係被用來設計出用以鑑別企鵝科鳥類性別的引子，係由一 *CHD-W* 基因序列專一區之序列所構成，或者係由一 *CHD-W* 基因序列專一區之序列與一 *CHD-Z* 基因與 *CHD-W* 基因序列共同區之序列所構成，其中該 *CHD-W* 基因序列專一區之序列為序列辨識號：11 或其互補股之序列，或為序列辨識號：12 或其互補股之序列，而該 *CHD-Z* 基因與 *CHD-W* 基因序列共同區之序列為序列辨識號：13 或其互補股之序列。

19.一種鑑別企鵝科鳥類性別之核苷酸引子對，包括於序列辨識號：11 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，或於序列辨識號：12 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。

20.如申請專利範圍第 19 項所述之鑑別企鵝科鳥類性別之核苷酸引子對，更包括於序列辨識號：13 或其互補股之序列範圍內設計之一第三引子與 P2 引子（序列辨識號：1）或其互補股的一第三引子對。

21.如申請專利範圍第 20 項所述之鑑別企鵝科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：

14 與 P2 引子（序列辨識號：1）或序列辨識號：14 之互補股與 P2 引子（序列辨識號：1）之互補股，而該第三引子對包括序列辨識號：16 與 P2 引子（序列辨識號：1）或序列辨識號：16 之互補股與 P2 引子（序列辨識號：1）之互補股。

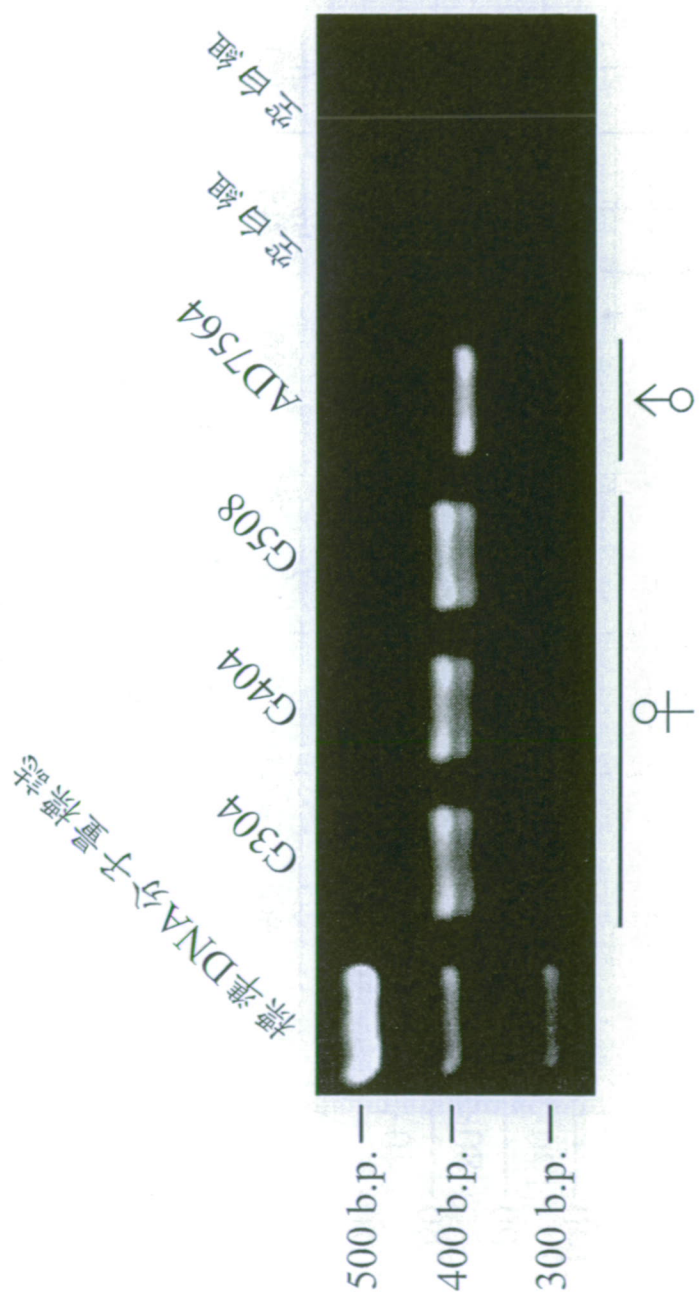
22. 如申請專利範圍第 20 項所述之鑑別企鵝科鳥類性別之核苷酸引子對，其中該第二引子對包括序列辨識號：15 與 P2 引子（序列辨識號：1）或序列辨識號：15 之互補股與 P2 引子（序列辨識號：1）之互補股，而該第三引子對包括序列辨識號：17 與 P2 引子（序列辨識號：1）或序列辨識號：17 之互補股與 P2 引子（序列辨識號：1）之互補股。

八、圖式：(如後所示)

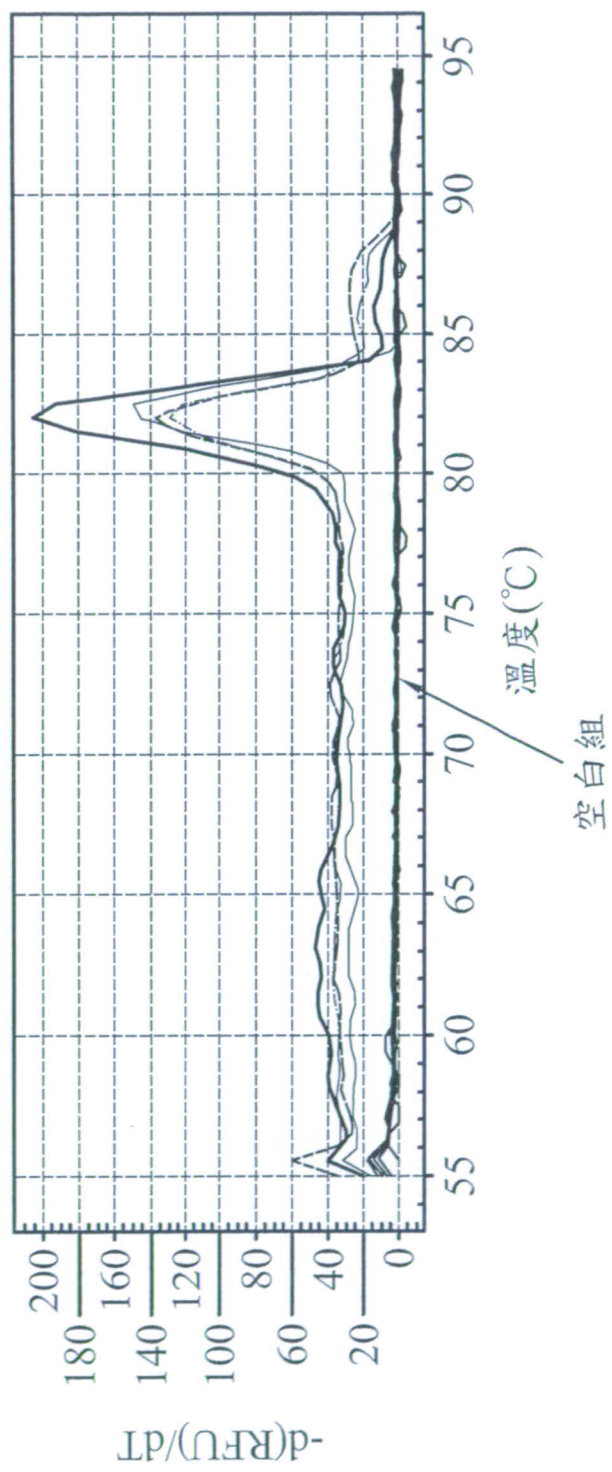
103年4月10日修(更)正本

(本)

公告本



第1A圖



第1B圖

W-序列專一區

P8引子

2

P. papua-W
S. magellanicus-W
E. chrysocome-W
A. patagonicus-W
P. papua-Z
S. magellanicus-Z
E. chrysocome-Z
A. patagonicus-Z

W-序列專一區

1

P. papua-W
S. magellanicus-W
E. chrysocome-W
A. patagonicus-W
P. papua-Z
S. magellanicus-Z
E. chrysocome-Z
A. patagonicus-Z

第2A圖
 第2B圖

第2A圖

ZW-序列共同區

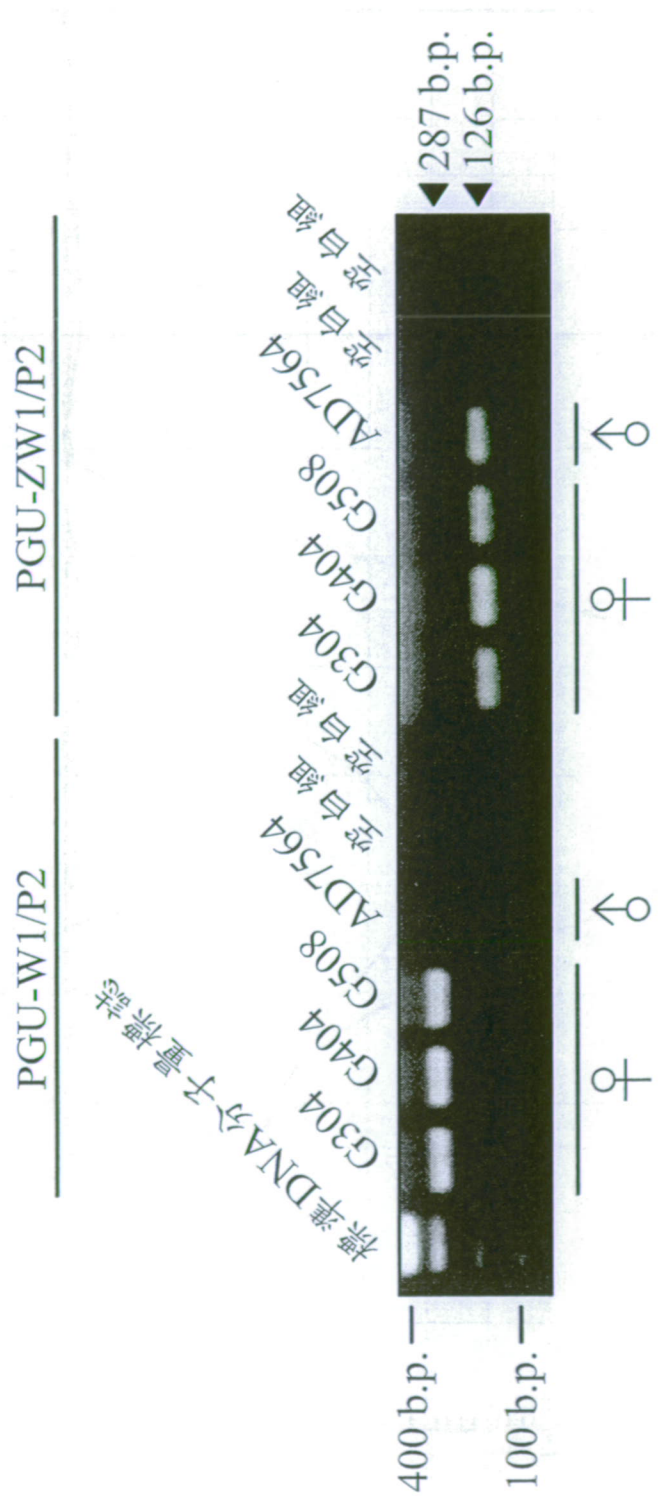
3

P. papua-W TT - -GTCACATAGCTTTGAACTACTTAATCTGAAATTCAGATCAGCTTT AATGGAAGTGAAGGAAACCGCAGTAGGACGAGAAGATATTCTGGATCTGA
S. magellanicus-W TT - -GTCACATAGCTTTGAACTACTTAATCTGAAATTCAGATCAGCTTT AATGGAAGTGAAGGAAACCGCAGTAGGACGAGAAGATATTCTGGATCTGA
E. chrysocome-W TT - -GTCACATAGCTTTGAACTACTTAATCTGAAATTCAGATCAGCTTT AATGGAAGTGAAGGAAACCGCAGTAGGACGAGAAGATATTCTGGATCTGA
A. patagonicus-W TT - -GTCACGTAGCTTTGAACTACTTAATCTGAAATTCAGATCAGCTTT AATGGAAGTGAAGGAAACCGCAGTAGGACGAGAAGATATTCTGGATCTGA
P. papua-Z GTCAAATCAGGTAGCTTTGAACTACTTAATCTGAAATTCAGATCAGCTTT AATGGAAGTGAAGGAGGGCCGAGTAGGACGAGAAGATACTCGGGATCTGA
S. magellanicus-Z GTCAGTCGGTAGCTTTGAACTACTTAATCTGAAATTCAGATCAGCTTT AATGGAAGTGAAGGAGGGCCGAGTAGGACGAGAAGATACTCTGGATCTGA
E. chrysocome-Z GTCAGTCAGGTAGCTTTGAACTACTTAATCTGAAATTCAGATCAGCTTT AATGGAAGTGAAGGAGGGCCGAGTAGGACGAGAAGATACTCTGGATCTGA
A. patagonicus-Z GTCAAATCACATAGCTTTGAACTACTTAATCTGAAATTCAGATCAGCTTT AATGGAAGTGAAGGAGGGCCGAGTAGGACGAGAAGATACTCTGGATCTGA
* * * * *

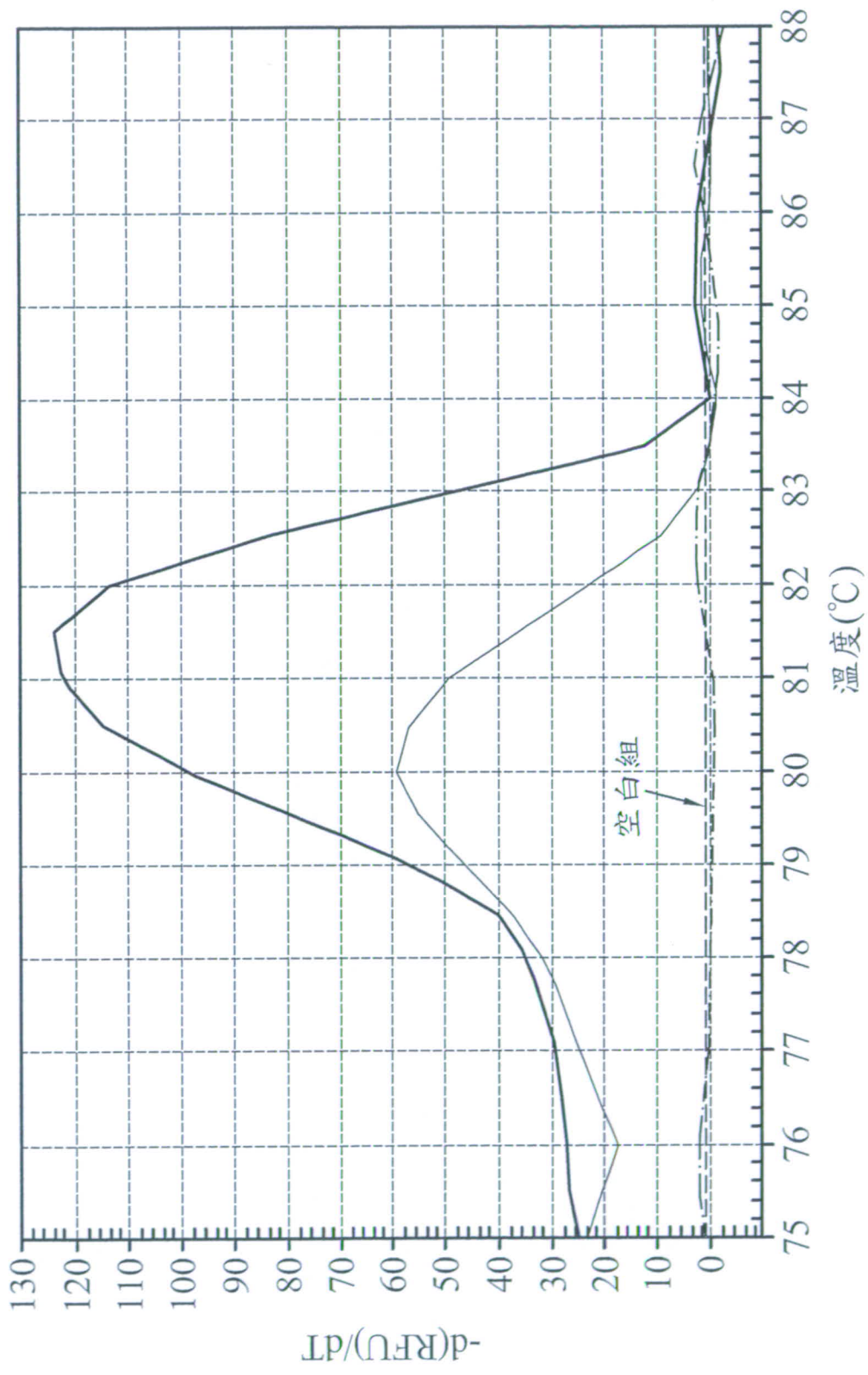
P. papua-W TAGTGACTCCATCTCAGAAAGAAAACGACCCAAAAAACGTGGACGACCAC GAACTATTCCTCGAGAAAAATTTAAAGGATTTAGCGATGCAGA
S. magellanicus-W TAGTGACTCCATCTCAGAAAGAAAACGACCCAAAAAACGTGGACGACCAC GAACTATTCCTCGAGAAAAATTTAAAGGATTTAGCGATGCAGA
E. chrysocome-W TAGTGACTCCATCTCAGAAAGAAAACGACCCAAAAAACGTGGACGACCAC GAACTATTCCTCGAGAAAAATTTAAAGGATTTAGCGATGCAGA
A. patagonicus-W TAGTGACTCCATCTCAGAAAGAAAACGACCCAAAAAACGTGGACGACCAC GAACTATTCCTCGAGAAAAATTTAAAGGATTTAGCGATGCAGA
P. papua-Z TAGTGACTCCATCTCAGAAAGAAAAGGCCAAAAAACGTGGAAGACCAC GAACTATTCCTCGAGAAAAATTTAAAGGATTTAGCGATGCAGA
S. magellanicus-Z TAGTGACTCCATTTTCAGAAAGAAAAGGCCAAAAAACGTGGAAGACCAC GAACTATTCCTCGAGAAAAATTTAAAGGATTTAGCGATGCAGA
E. chrysocome-Z TAGTGACTCCATTTTCAGAAAGAAAACGACCCAAAAAACGTGGACGACCAC GAACTATTCCTCGAGAAAAATTTAAAGGATTTAGCGATGCAGA
A. patagonicus-Z TAGTGACTCCATCTCAGAAAGAAA - -GGCCAAAAAACGTGGAAGACCAC GAACTATTCCTCGAGAAAAATTTAAAGGATTTAGCGATGCAGA
***** * * * * *

P23|子

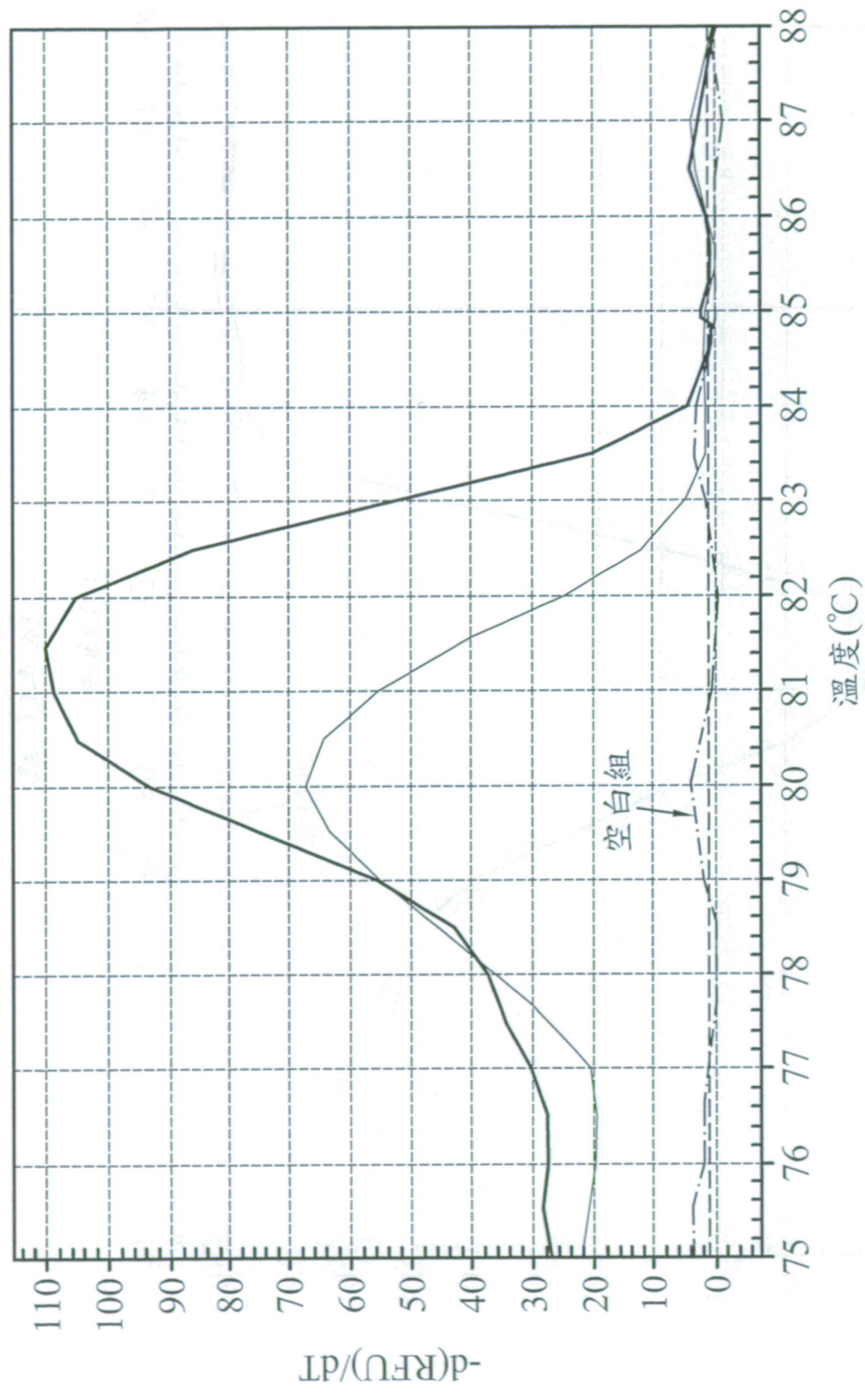
第2B圖



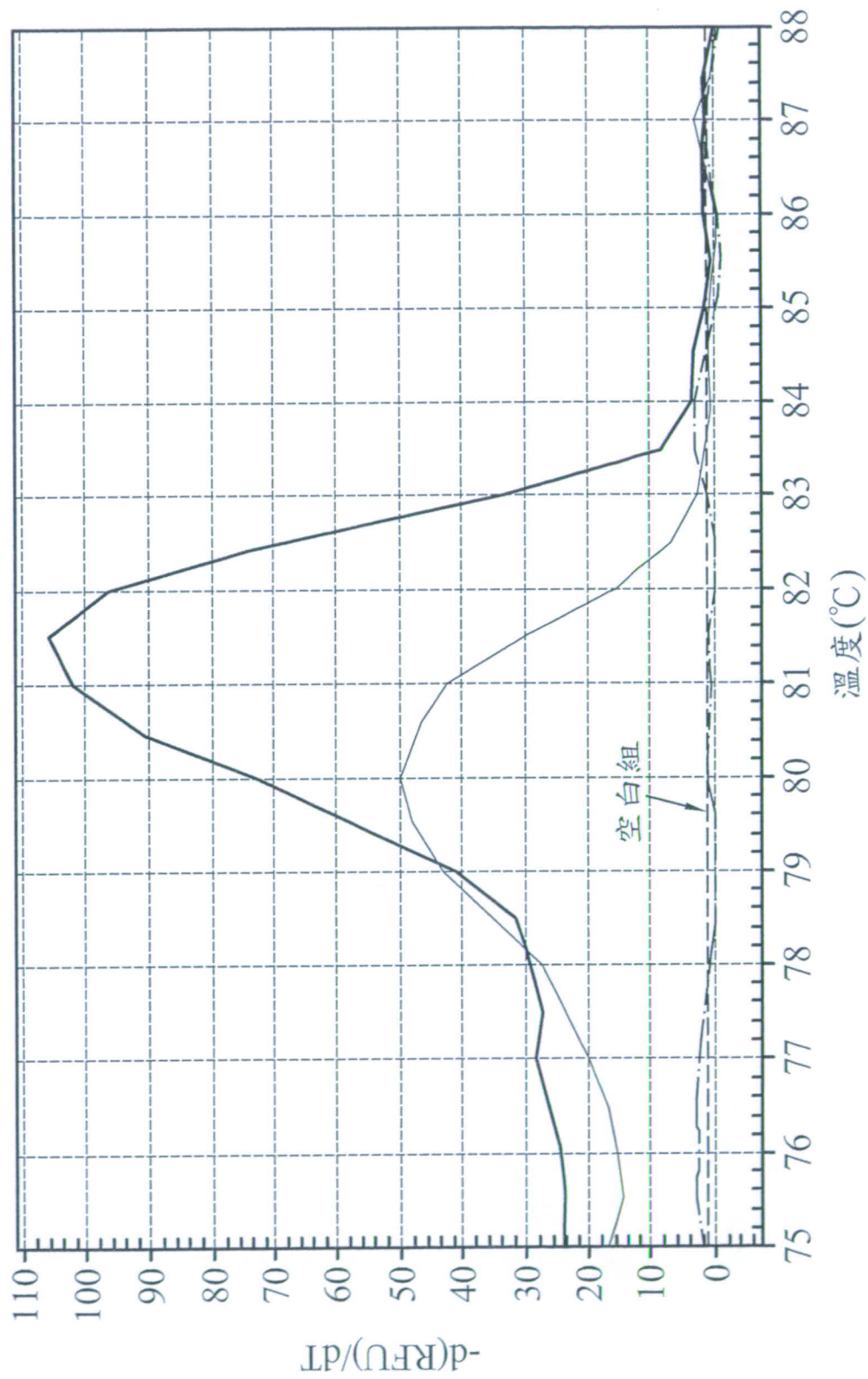
第3A圖



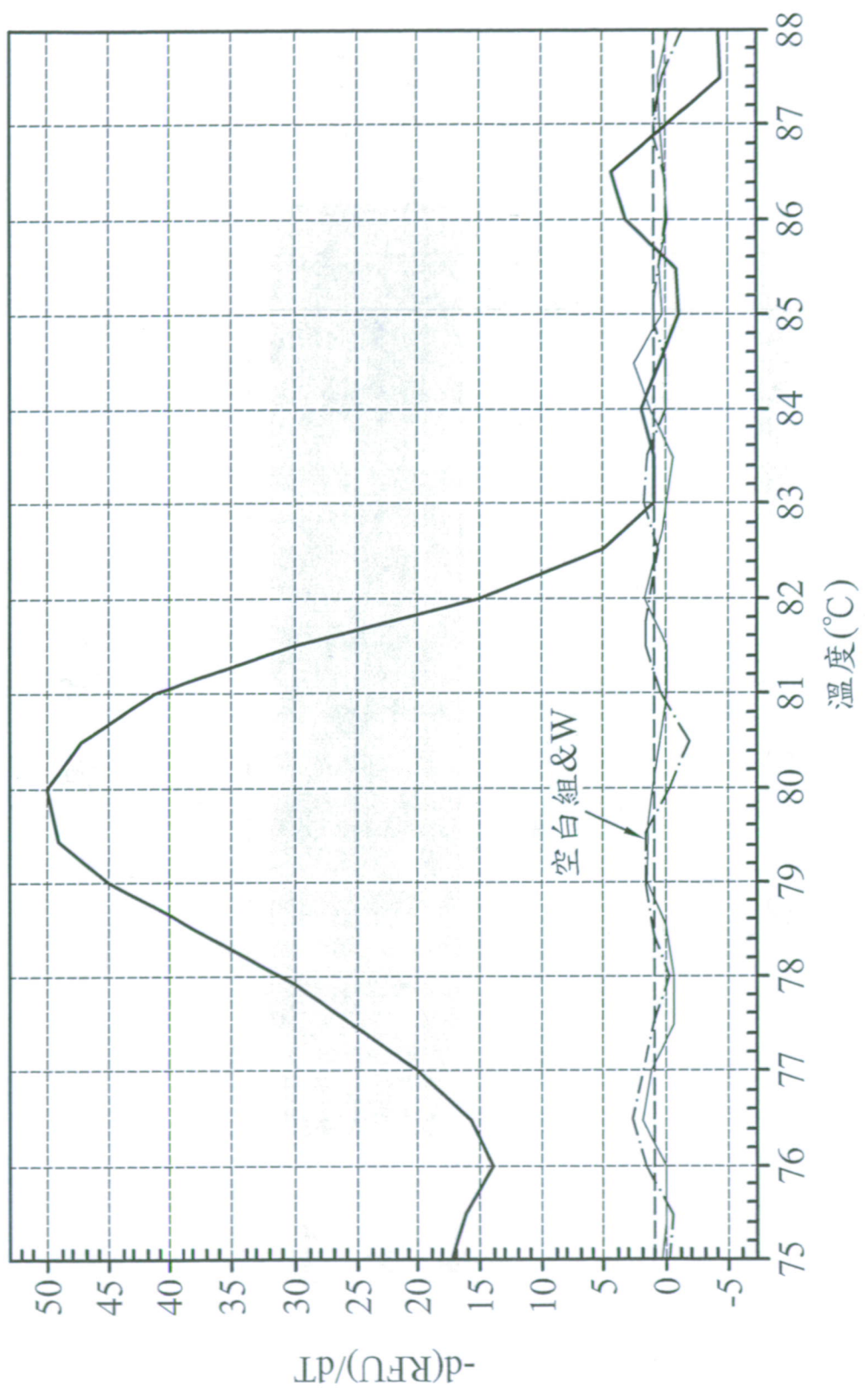
第3B圖



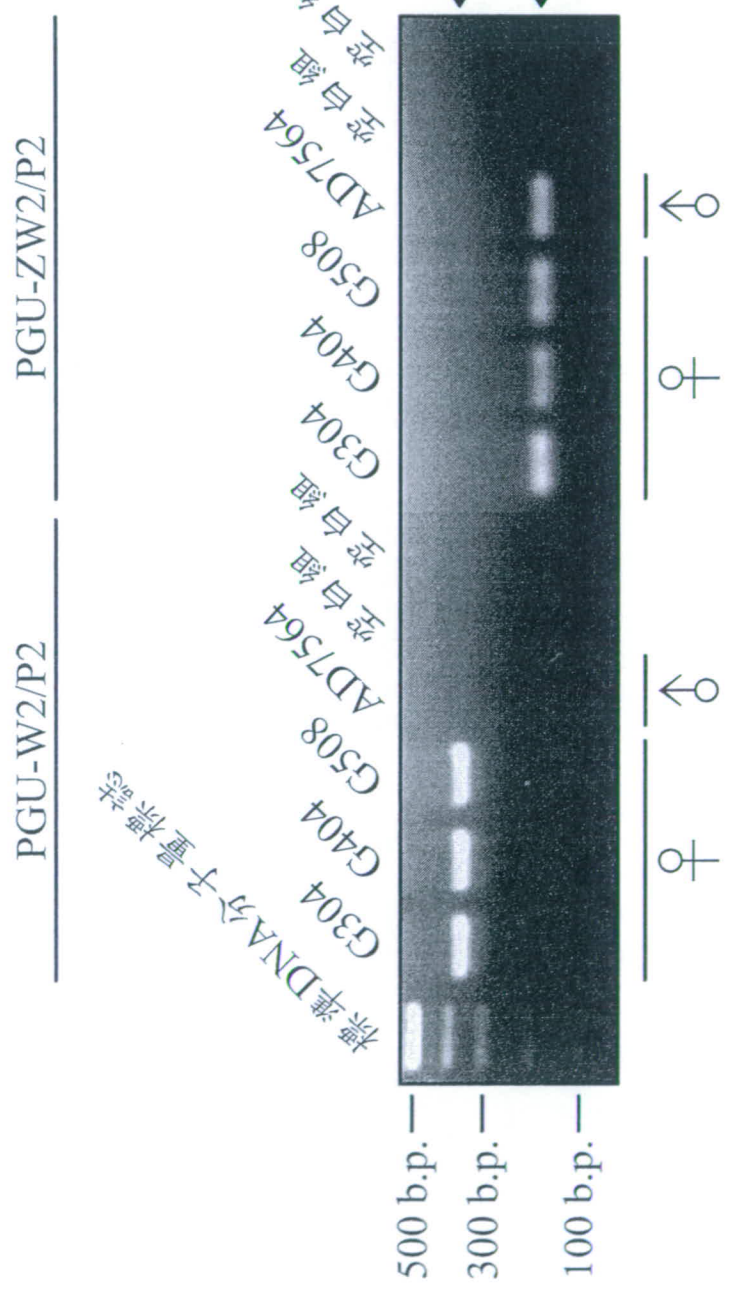
第3C圖



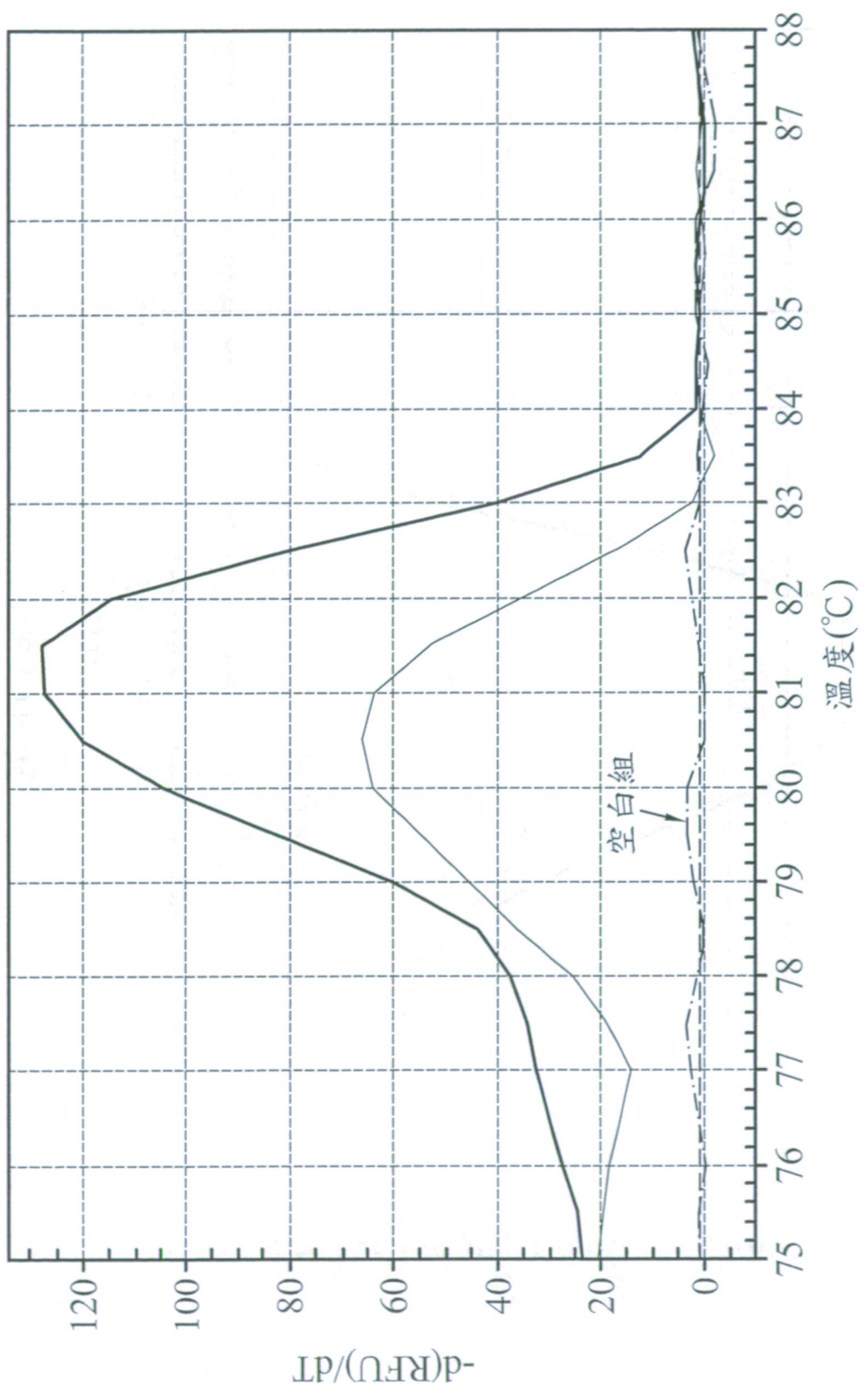
第3D圖



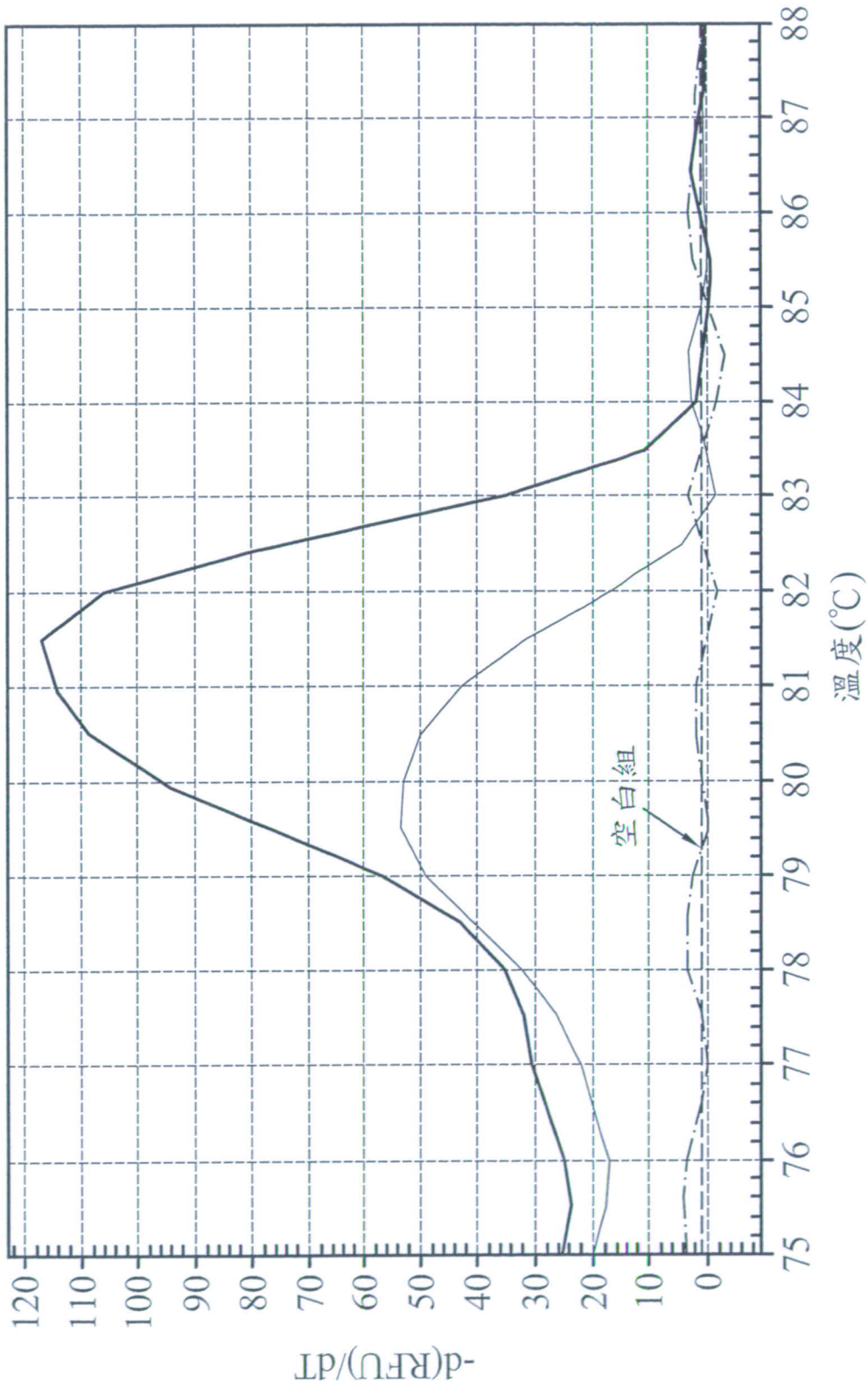
第3E圖



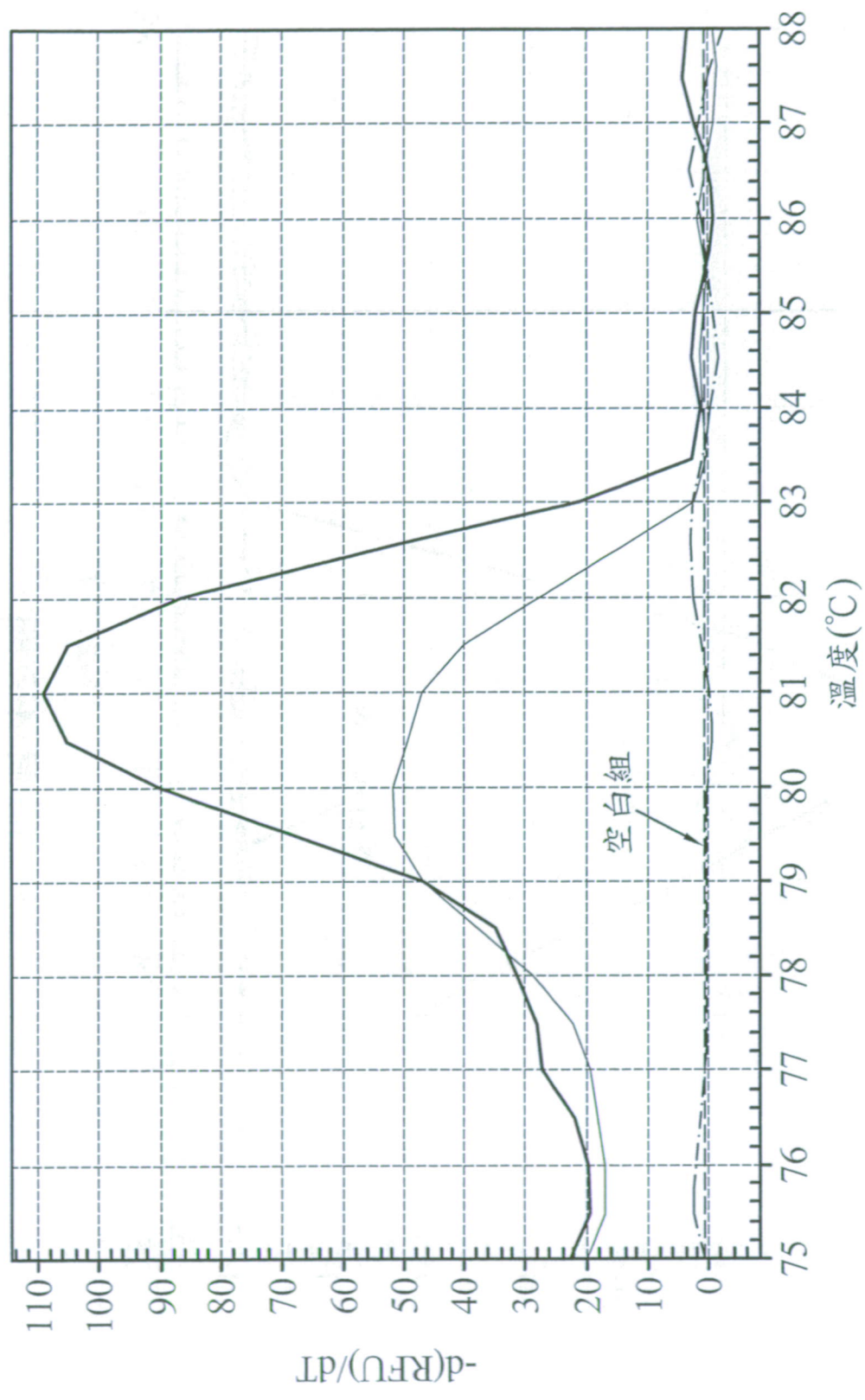
第4A圖



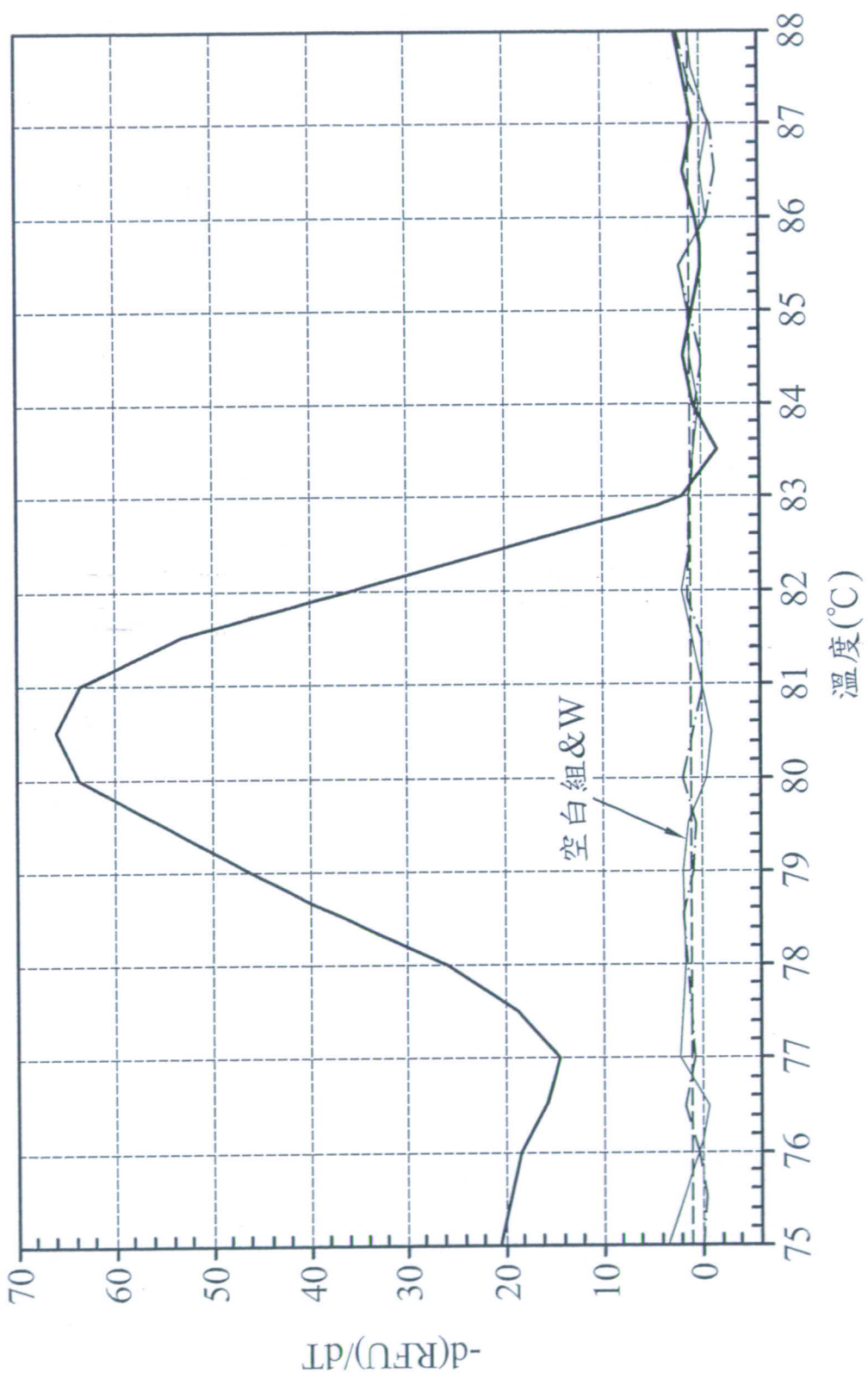
第4B圖



第4C圖



第4D圖



第4E圖