

鸟类性别鉴定技术研究进展*

李刚^① 杨水云^① 周航^① 任建设^② 马清义^② 王万云^③

(①西安交通大学生命科学学院 西安 710049; ②陕西省珍稀野生动物抢救饲养研究中心 陕西周至 710400;

③陕西省林业厅动物保护管理站 西安 710082)

摘要: 鸟类性别鉴定曾经通过外科手术对生殖腺直接进行检测,此法不仅繁琐而且有时会导致鸟的不育;细胞学水平上鉴定性别是通过直接观察 W、Z 性染色体而进行,但由于染色体数目大、分散难度高,很容易引起人为的主观因素导致结果错误。近年来利用鸟类 W 染色体上的性连锁基因或 DNA 序列,通过 PCR、原位杂交等技术建立起来的 DNA 分子水平性别鉴定方法,发展迅猛,准确度高,操作简便。此技术一旦形成体系,对鸟类研究、濒危物种保存等都将具有非常重要的意义。

关键词: 性别鉴定;CHD;ATP5A1;EEO.6

中图分类号: Q812 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2003)05-106-03

Development of Techniques for Sexing Birds

LI Gang^① YANG Shui-Yun^① ZHOU Hang^① REN Jian-She^②

MA Qing-Yi^② WANG Wan-Yun^③

(① School of Life Science and Technology, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049;

② Louguantai Wild Animal Protection and Breeding Center, Zhouzhi Shaanxi 710400;

③ Department of Forestry of Shaanxi, Xi'an 710082, China)

Abstract: There are two traditional methods of sexing birds: surgical and cytological. The former examines the gonads directly and carries the risk of causing sterility. The latter examines chromosomes in the cell nucleus assigning sex based on the size difference between W and Z chromosomes, but is prone to subjective error. At present, the molecular method of sexing birds, which is based on sex-linked genes or DNA, employs the most advanced analytical methods such as PCR and Southern Blot Hybridization. This method is simple, cheap and effective. It plays an important role in both the conservation of rare and endangered birds and scientific research.

Key words: Sex identification; CHD; ATP5A1; EEO.6

有一些成鸟的性别很容易判定,比如可以通过羽毛的颜色或个体大小来区分。但几乎一半以上的鸟类不能通过外部特征进行性别判定,特别是对于幼鸟,作为性别标记的成年鸟类羽色特征还未出现,这就给人工育雏、尤其是珍稀动物的人工培育带来很大困难。同样,性别问题也给从事鸟类研究的科研人员带来了麻烦,在对鸟类性别划分理论以及鸟类进化理论等的研究中,由于雌雄个体在行为和生理上是有差别的,性别不能准确判定,就会得出错误的研究结论。无论是为了人工繁育^[1]、保存物种还是科研,尤其是随着一些

野生珍稀鸟类的不断灭绝,鸟类的性别鉴定技术的研究和建立都迫在眉睫。本文在总结鸟类性别鉴定现有技术的基础上,对现行的较为先进可行的技术进行了介绍,试图通过这些技术的比较,指出一条简单快捷、准确可靠的鸟类性别鉴定的途径。

* 陕西省科学技术研究发展计划项目(No. 99K13-G9-2), 西安交通大学 2000 年自然科学基金;

第一作者介绍 李刚,男,23 岁,西安交通大学生命学院学生;从事野生动物保护分子生物学研究。

收稿日期:2002-09-20,修回日期:2003-03-12

1 通过外科手术的性别鉴定技术

通过外科手术的方法(剖腹和镜检)可以对鸟类性别进行判定,其目的是直接观察生殖腺。首先,鸟被麻醉固定后,在腹部最后两根肋骨间切一个小口,对于剖腹来说这个开口要大到可以放入一个金属探针,用来将肠胃移位,之后对生殖腺进行检测,其中雄性有一对睾丸,雌性有一个卵巢。随着科技的发展,镜检技术越来越普遍,它可用一根光学纤维线深入体内进行生殖腺检测,甚至只需在腹部开一个小孔就行了。

外科技术存在着几个问题:首先,这种方法在一些体积较小的鸟类中应用非常困难;其次,麻醉和手术也存在一定的危险,术后刀口处容易感染,严重的可导致鸟的死亡;更重要的是操作不当会导致鸟类不育。尽管已经有很多成功鉴定的记录,但是科学家并不提倡用这种方法,尤其反对将其用于一些濒危鸟类的性别鉴定。

2 细胞学水平上的性别鉴定技术

虽然我们不能用外部特征对鸟类进行性别鉴定,但是微观性别标记仍是可以利用的,方法之一就是检测细胞的染色体。和哺乳动物一样,鸟类也有一套染色体组,其体细胞为二倍体,在人类中雄性为异配性别(XY),雌性为同配性别(XX)。而鸟类则正好相反,异配性别为雌性(ZW),同配性别为雄性(ZZ)。这说明雌性有一条特异的W染色体。细胞学技术主要就是W染色体进行观察,雌性的性染色体一条大(Z),一条小(W),而雄性个体两条均较大(ZZ)。大体过程^[2]是:对骨髓或血液等样品用胶原酶处理后,加入培养基对细胞进行培养、离心、低渗、制片、染色、镜检。镜检时要选择染色体分散,形态良好的中期细胞进行。

理论上用镜检技术进行性别鉴定很容易,但是在实际当中存在一些问题。例如,鸟类的染色体数量大(40~126不等),分为大染色体和小染色体,Z染色体为大染色体,W染色体为小染色体。在检测中,想把染色体分散检测比较困难,而且大与小的划分很容易造成人为的主观差错。

3 DNA分子水平性别鉴定技术

既然染色体的本质是DNA,那么DNA就成为进行鸟类性别鉴定的可靠物质基础。前已述及鸟类的性别决定系统为ZW型(其中雄性为ZZ,雌性为ZW),所以凡是W染色体上的特异序列或基因便成为人们寻找的主要目标。但不巧的是,寻找一个适合性别连锁的标

记物并非易事。因为决定性别的W染色体与人类Y染色体类似,非常短小且含有不定量的无功能DNA^[2],而且这些无功能的序列进化很快,甚至在近缘物种间也存在很大差异,因此很难依此作为鉴定依据;但在W染色体上,也有一些基因或假基因是非常保守的,可以依此进行性别鉴定。截至目前,已发现了几个这样的基因(CHD基因^[3,4]和ATP5A1-W基因^[5])和一个假基因序列(EEO.6序列^[5]),它们的进化速率很慢,对于鸟类是非常保守的。

3.1 CHD-W基因鉴定 CHD-W基因,全称为染色体螺旋蛋白基因,是一个功能性基因。在非平胸鸟类有两个同源拷贝CHD-W和CHD-Z,其中CHD-W为W连锁,CHD-Z为Z连锁^[6,7],可以利用PCR方法对CHD-W进行扩增,但由于CHD-W和CHD-Z具有一定的同源性,所以引物设计尤其重要。Griffiths等人在1996^[4]年用P2(5'-TCTGCATCGCTAAATCCTTT-3')和P3(5'-AGATATCCGGATCTGATAGTGA-3')引物对扩增了CHD-W和CHD-Z的部分片段,结果显示扩增产物大小是相同的,但他们发现CHD-W扩增片断有一个Hae III酶切位点,而CHD-Z却没有,于是,在PCR之后先用Hae III处理,这样,雄性仍为一条带,而雌性为45 bp和65 bp两条带,而且成功地对珍稀鸟类金刚鹦鹉^[3]进行了性别鉴定。

但这一引物对对于平胸鸟类性别鉴定并不适用。此外由于P2,P3引物对每次需要对扩增产物进行酶切,使得试验耗时,且成本高,于是Griffiths等人于1998年在对两个CHD基因进行比较后,对引物进一步改良,将P3换为P8(5'-CTCCCAAGGATGATRAAYTG-3'),P2和P8与CHD基因中的外显子严格匹配,这两个引物间含有一段内含子序列,而这段序列是进化很快的,且在2条性染色体上的大小不同^[8,9],所以用此引物进行扩增,雌性会产生两条带,而雄性只有一条,这一方法快捷、简便、成本低,无论雌雄,总会有条带产生,不仅可以区分性别,同时也可作为PCR体系的阳性对照,一举两得,是值得推广的一条性别鉴定途径。

3.2 ATP5A1基因 ATP5A1基因^[5]是1994年由Halberson和Dwrak两个人首次应用于鸟类性别鉴定中的。由于此基因在W,Z染色体上以不同形式的序列出现,所以将染色体进行酶切并电泳后,通过基因中被称作PMgl的序列作为探针进行原位杂交,会产生不同条带,进而区分性别。但此基因的保守性不是很好。在不同种鸟中基因的序列有差异,所以在不同物种中需要不同的ATP5A1序列进行鉴定,这就给性别鉴定工作增加了很大的工作量。

3.3 EEO.6 序列 该序列从鸡的 W 染色体克隆而来, 长度 0.6 kb, 含有 *EcoR* I 片段, 是一段单一序列, 包含了一段类似于外显子的序列——ET15, 很可能是一个假基因, 它在目前已被检测过的鸟类中都是保守的, 虽然在 W、Z 上有一段同源序列, 但它们在大部分序列上却存在差异, 可以通过选择合适的引物对 W 染色体上的特异性片断进行扩增, 结果雄性不被扩增, 而雌性会产生一条扩增带, 因此得以区别。但是该方法可能会

在 PCR 反应中由于 PCR 扩增条件或加样错误等人为操作因素导致无条带产生故而认为是雄性, 从而导致假性结果, 还需要另外设计阳性对照条带来作为参照才能进行准确鉴定。

表 1 对近年来常见的分子水平性别鉴定方法及适用范围进行了总结, 希望对从事鸟类性别鉴定的研究人员有所帮助。

表 1 DNA 分子水平性别鉴定方法及其使用范围

性别标记	方法	优缺点比较	使用范围
CHD 基因	PCR + 酶切	不同性别, 扩增产物的酶切位点不同, 引物扩增条带较小, 成本较高 ^[3]	适用于雁形目、鸡形目、雀形目、鹤形目、鸮形目、鹤形目, 不适合平胸鸟类
	PCR 扩增	不同性别染色体上的内含子大小不同, 扩增后分别得到 1 条和 2 条带, 但电泳分辨率要求较高(区分 20 bp 以上为佳), 成本低, 简便, 快捷 ^[8,9]	适用于雁形目、鸡形目、雀形目、鹤形目, 不适合于平胸鸟类
ATP5A1 基因	原位杂交	不同种鸟类所需探针有微小差异, 需用 ATP5A1 的相似序列进一步杂交, 实验速度慢, 成本高	适合于多数平胸鸟类和非平胸鸟类
EEO.6 序列	PCR 扩增	不同种鸟类引物不同, 需要设计阳性对照引物, 扩增条带大小可以预测, 琼脂糖电泳即可满足要求 ^[5]	鸡形目、雁形目、雀形目、鸮形目、鹤形目、鹤形目、隼形目, 不适合平胸鸟类

除以上介绍的几种方法外, 利用随机引物扩增来鉴别雌雄的方法在国外也有报道^[10,11], RAPD 和 AFLP 是两种最常见的方法^[11], 但此类方法工作量大, 数据处理繁琐, 成本也很高。此种方法可以作为发现新遗传标记的基础方法, CHD 基因^[12]就是通过该方法分离得到的, 所以可以通过随机扩增找出适合于广泛鸟类^[10]性别鉴定的通用序列进行新引物和新方法的研究。

参 考 文 献

- [1] 燕海峰, 肖兵南, Pavel Trefil 等. 家禽的性别鉴定方法. 动物学杂志, 2001, 36(6): 58 ~ 61.
- [2] 刘凌云等. 朱鹮的染色体性别鉴定及核型分析. 北京师范大学报, 1992, 28(4): 554 ~ 557.
- [3] Griffiths R, Tiwari B. Identification of the sex of the last wild Spix's Macaw. *Nature*, 1995, 375: 454.
- [4] Griffiths R, Daan S, Dijkstra C. Sex identification in birds using two CHD genes. *Proc R Soc Lond B*, 1996, 263: 1249.
- [5] Itoh Y, Ogawa A. Identification of the sex of a wide range of carinatae birds by PCR using primer sets selected from chicken EEO.6 and its related sequences. *The American Genetic Association*, 2001, 9: 2315 ~ 2321.
- [6] Kate L, Christa M. Molecular sexing of birds. *Nature*, 1996, 383: 761 ~ 762.
- [7] Griffiths R, Korn R. A CHD1 gene is Z chromosome linked in the chicken gallus domesticus. *Gene*, 1997, 197: 225.
- [8] Kahn N, John St. Chromosome-specific intron size differences in the avian CHD Gene provide an efficient method for sex identification in birds. *The Auk*, 1998, 115(4): 1074 ~ 1078.
- [9] Griffiths R, Double M, Kate L. A DNA test to sex most birds. *Molecular Ecology*, 1998, 7: 1071 ~ 1075.
- [10] Bello N, Sanchez A. The identification of a sex-specific DNA marker in the ostrich using a random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay. *Molecular Ecology*, 1999, 8: 667 ~ 669.
- [11] Lessells C, Mateman A. Sexing birds using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Molecular Ecology*, 1998, 7: 187 ~ 195.
- [12] Griffiths R, Tiwari B. The isolation of molecular genetic markers for the identification of sex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90: 8324 ~ 8326.