

一种血液 PCR 快速鉴定中华鳖性别方法的优化

胡鉴^① 武志亿^① 方瑜^① 余姚辉^① 李彩燕^① 宋伟^{①②*}

① 浙江万里学院生物与环境学院 宁波 315100; ② 新疆农业大学动物科学学院 乌鲁木齐 830000

摘要: 目前判断中华鳖 (*Pelodiscus sinensis*) 性别的方法主要有外形观察、生殖器官解剖观察和 DNA 分子鉴定, 但这些方法各有局限, 不能完全满足生产上的需求, 因此急需建立一种快速、损伤小且可准确鉴定中华鳖性别的方法。本研究以中华鳖成鳖为对象, 裙边静脉采血, 血液经碱煮沸法快速处理后, 取上清液作为 DNA 模板用 PTPN11 引物进行 PCR 反应与琼脂糖凝胶电泳, 雌性 (ZW 型) 呈现分子量大小为 860 bp 和 1 500 bp 左右的清晰双带, 雄性 (ZZ 型) 呈现分子量大小为 860 bp 左右的清晰单带。通过外部形态观察和解剖后生殖器官观察对比表明该方法可行, 性别鉴定准确率为 100%。因此, 基于碱煮沸法快速处理的血液直接 PCR 可以作为一种快速、经济检测中华鳖性别的方法。

关键词: 中华鳖; 血液; 非损害性取样; PCR; 遗传性别鉴定

中图分类号: Q955 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2025) 01-136-09

A Rapid Method for Sex Identification in the Chinese Soft-Shelled Turtle *Pelodiscus sinensis* Based on Direct Blood PCR

HU Jian^① WU Zhi-Yi^① FANG Yu^① YU Yao-Hui^① LI Cai-Yan^① SONG Wei^{①②*}

① College of Biological & Environmental Sciences, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100;

② College of Animal Sciences, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830000, China

Abstract: [Objectives] Currently, the primary methods for determining the sex of Chinese Soft-shelled Turtle *Pelodiscus sinensis* include visual inspection of external features, examination of reproductive organs after dissection, and DNA PCR analysis. However, each of these methods has its limitations and cannot fully meet the requirements for sex determination in the huge production of Chinese Soft-shelled Turtle. Therefore, there is an urgent need to develop a rapid, minimally invasive and accurate method for determining the genetic sex of Chinese Soft-shelled Turtles. **[Methods]** In this study, blood was collected from veins of the calipash in adult Chinese Soft-shelled Turtles. The blood supernatant was used as a DNA template for PCR reaction and identification following rapid pretreatment. The feasibility of the genetic method was assessed by optimizing

基金项目 浙江省农业 (水产) 新品种选育重大科技专项 (No. 2021c02069-8-3), 宁波市科技创新 2025 重大专项 (No. 2021Z009);

* 通讯作者, E-mail: sw2014wl@163.com;

第一作者简介 胡鉴, 男, 硕士研究生; 研究方向: 水产动物品质调控; E-mail: 1336588571@qq.com.

收稿日期: 2024-03-08, 修回日期: 2024-10-12 DOI: 10.13859/j.cjz.202524053 CSTR: 32109.14.cjz.24053

the pretreatment method, blood volume and PCR system (including primer concentration, template concentration, DNA polymerase mix volume and annealing temperature, among other factors), as well as by comparative blood DNA PCR tests, external morphological observations, and dissection of reproductive organs. **[Results]** The results demonstrated that after rapid pretreatment of 5 μl fresh turtle blood using an alkaline boiling method, a 20 μl PCR system was prepared by adding 2 μl of supernatant DNA template, 10 μl of DNA polymerase mixture, 0.8 μl each of upstream and downstream primers, and 6.4 μl of ddH₂O. PCR amplification was then performed at an annealing temperature of 58 °C, followed by detection using 1% agarose gel electrophoresis. The results revealed that female turtles (ZW type) exhibited distinct double bands with molecular sizes approximately 860 bp and 1 500 bp, while male turtles (ZZ type) exhibited a clear single band with molecular sizes around 860 bp (Fig. 1). The accuracy of sex identification in Chinese Soft-shelled Turtles reached 100%, which was confirmed by the blood DNA PCR validation test, external morphological observations and examinations of reproductive organ (Figs. 8 - 10). **[Conclusion]** The direct blood PCR method based on alkaline boiling pretreatment is considered a rapid and cost-effective approach for sex determination in Chinese Soft-shelled Turtles.

Key words: Chinese Soft-shelled Turtle, *Pelodiscus sinensis*; Blood; Non-damaging sampling; PCR; Genetic characterization

中华鳖 (*Pelodiscus sinensis*) 是我国重要的水产特种经济动物。近几年, 中华鳖的年产量稳定在 30 余万吨, 产值高达 200 亿元以上, 市场需求旺盛 (王丹等 2022)。中华鳖具有典型的雌雄异速生长二态性, 雄性个体生长速度更快, 且其雄性裙边更加宽厚, 市场价格高于雌性 (罗志嘉等 2017, 曾丹等 2017, 陈嘉倩等 2020)。因此, 饲养繁育过程中, 根据不同的生产需求, 需要对中华鳖的性别进行区分。目前鉴定中华鳖性别主要通过外观形态观察 (李为 2000), 虽然该方法快速简便, 但对于中华鳖外部形态特征不明显的个体 (假雌) 或发育不成熟的稚鳖和幼鳖难以判断其雌雄, 因此主要应用于正常成鳖, 局限性较大。另外, 通过解剖观察性腺确定鳖性别也是一种常用的方法 (朱道玉 2008, 朱道玉等 2009), 该方法准确率可达到 100%, 但是操作过程必须宰杀样本, 不适应生产的需求。而基于性别特异或连锁的分子标记可快速准确地鉴定遗传性别, 省时省力 (鲁翠云等 2019)。中华鳖具有微小性染色体 (ZZ/ZW), 科研中常用肌肉组织 DNA PCR 法鉴定中华鳖遗传性别 (Liang

et al. 2019, Zuo et al. 2020, 葛健辉等 2023), 该方法准确率高, 但采集样品过程中需要对中华鳖进行机械性损伤取组织, 甚至宰杀, 易造成其伤口感染或死亡, 而且获得组织样本后还要进行前处理 (粉碎) 和利用 DNA 提取试剂盒提取 DNA 样本, 步骤繁琐、耗时较长、成本高, 不适合大规模性别鉴定。因此, 亟需建立一种准确、快捷且非损害性的方法来鉴定中华鳖的遗传性别。

获得有效的动物基因组 DNA 是后续众多分子生物学研究的前提, 血液是非损害性遗传性别快速鉴定的理想材料 (李少斌等 2021)。采集少量血液是一种对动物伤害性较小的取样方法 (Lefort et al. 2022, 王金秀等 2022)。使用血液 DNA 或全血结合普通 PCR 检测, 可对大量样本同时进行检测, 既适用于生产上性别鉴定的需求, 也可满足科研对鉴定准确率的要求。目前该方法已在家禽 (孙嘉等 2016, 王美青 2018)、家畜 (程凯宁 2009, 陶维昆等 2022) 和人类 (龙登凯等 2016) 性别鉴定中广泛应用, 但利用中华鳖血液直接 PCR 鉴定其遗传性别的方法尚未有研究报道。因此, 本实验通过优

微量全血鉴定中华鳖性别方法体系, 借助血液基因组 DNA 进行 PCR 鉴定, 并通过外观形态观察和性腺器官观察方法进行验证, 保证实验结果的可靠性和鉴定结果的准确性, 以期为中华鳖性别鉴定提供简便、快捷且经济的方法。

1 材料与方法

本研究是根据浙江万里学院动物护理与使用委员会制定的《实验动物护理与利用指南》中爬行动物伦理和福利标准进行的。本实验所用中华鳖于 2022 年 11 月采自湖州德清县清溪花鳖专业合作社, 遗传背景相同, 共 30 只, 雌雄各 15 只, 外部性别特征明显, 个体体重均在 500 g 左右, 个体健康、无损伤。

1.1 血液采集

用酒精棉球对中华鳖靠近大腿根部一侧的裙边(该位置静脉血管丰富)进行消毒, 用已灭菌处理的采血针快速扎破血管, 待新鲜血液流出, 用移液枪快速吸取适量新鲜血液, 并迅速转移至 1.5 ml 离心管中, 进行后续实验。血液采集完毕后用碘伏和红霉素软膏对裙边伤口进行消毒处理。

1.2 血液 DNA 敏感性分析

分别采集雌性和雄性中华鳖新鲜血液 10.0 μl , 按照 Magen 血液 DNA 提取试剂盒 (IVD3018, 广州美基生物科技有限公司) 说明书的操作步骤提取血液基因组 DNA。将获得的血液基因组 DNA 按照 40.0、20.0、10.0、5.0、2.5 mg/L 的浓度梯度进行稀释, 每个梯度设置 3 个重复。以梯度稀释的 DNA 作为模板, 进行 PCR 反应。PCR 反应总体系为 20.0 μl : 2 \times Phanta Max Mster Mix (P525, 诺唯赞生物科技有限公司) 10.0 μl , 10.0 mmol/L 的 PTPN11 上、下游引物[序列参考 Literman 等 (2017), 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成]各 0.4 μl , 无菌去离子水 8.2 μl , DNA 模板 1.0 μl 。PCR 反应程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 最终延伸 5 min。PCR 产物经

1%琼脂糖凝胶电泳检测, 通过凝胶成像系统 (Gel Doc XR⁺, BIO-RAD) 拍照观察。

1.3 血液前处理方法优化

碱煮沸法 (Meeker et al. 2007): 将采集的新鲜血液 3.0 μl 加入装有 200.0 μl 50.0 mmol/L NaOH 溶液的 1.5 ml 离心管中煮沸 10 min, 后加入 20.0 μl 1.0 mol/L 的 Tris-HCl 混匀, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液 2.0 μl 为模板进行 PCR 反应。

酶解法 (刘敏等 2023): 取 3.0 μl 血液加入 100.0 μl 裂解液 (20.0 mmol/L Tris-HCl, 100.0 mmol/L EDTA, 0.1% SDS, pH 8.0) 和蛋白酶 K (终浓度为 200.0 mg/L) 溶液中, 充分混匀后在 60 $^{\circ}\text{C}$ 下水浴 10 min、后 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min 终止酶解反应, 室温离心取上清液 2.0 μl 作为模板进行 PCR 反应。

1.4 血液添加量优化

分别取雌性和雄性中华鳖新鲜血液, 血液添加量分别为 2.0、3.5、5.0、6.5 和 8.0 μl , 通过碱煮沸法对其进行前处理, 取上清液作为模板进行 PCR 反应, 其中模板添加量根据上清液 DNA 浓度调整, 控制 DNA 含量至 50.0 ng。

1.5 PCR 反应体系因素优化

分别取雌性和雄性中华鳖新鲜血液, 通过碱煮沸法对其进行前处理, 取上清液作为 DNA 模板, 进行 PCR 反应, PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳, 利用凝胶成像系统拍照观察。基础反应体系和反应程序分别参照实验方法 1.2 相关内容进行操作, 在此基础上优化模板添加量 (1.0、2.0、3.0、4.0 和 5.0 μl)、引物添加量 (0.2、0.4、0.6 和 0.8 μl)、2 \times Phanta Max Mster Mix 添加量 (8.0、10.0 和 12.0 μl) 和退火温度 (52、54、56、58 和 60 $^{\circ}\text{C}$) 4 种因素, 进行 PCR 反应和电泳检测, 根据条带的特异性及其清晰程度, 来确定最佳因素条件。

1.6 验证实验

采集 30 只中华鳖 (雌、雄各 15 只) 新鲜血液。血液直接 PCR 鉴定: 以碱煮沸法快速处理血液, 取上清液进行 PCR 反应和凝胶成像分

析。血液基因组 DNA PCR 鉴定 (Litterman et al. 2017)：按照试剂盒说明书步骤提取血液基因组 DNA，进行 PCR 反应和凝胶成像分析。观察生殖器官外部形态 (李为 2000) 与解剖性腺器官 (朱道玉 2008, 朱道玉等 2009)：根据雌、雄中华鳖生殖器官外部形态差异判断性别，雄鳖的尾细长且自然伸出裙边外，雌鳖的尾粗短且不露出裙边外；中华鳖宰杀解剖后，观察其性腺器官形态，有睾丸者为雄鳖，有卵巢者为雌鳖。

2 结果

2.1 血液基因组 DNA 敏感性

10.0 μL 中华鳖新鲜血液经试剂盒提取获得血液基因组 DNA，其 DNA 浓度为 $(83.4 \pm 7.8) \text{ mg/L}$ 。中华鳖性别鉴定 PCR 血液 DNA 的敏感性分析结果见图 1，PCR 体系中 DNA 总含量在 20.0 ng 及以上时条带清晰。雌性鳖血液 DNA PCR 扩增电泳图有两条带，大小分别为 860 bp 和 1 500 bp 左右；雄性鳖血液 DNA PCR 扩增电泳图只有一条带，大小为 860 bp 左右。DNA 总含量 10.0 ng 时，PCR 产物电泳条带暗

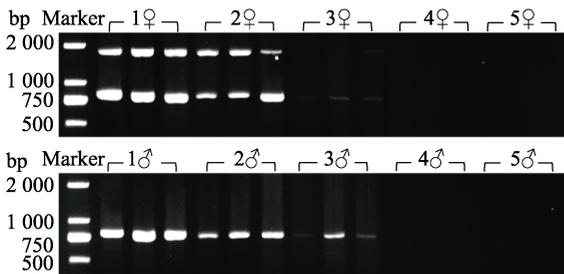


图 1 中华鳖性别鉴定 PCR 血液 DNA 的敏感性分析

Fig. 1 Sensitivity analysis of blood DNA by PCR for sex identification of *Pelodiscus sinensis*

Marker. DL2000 DNA 分子量标准；1~5 分别代表不同 DNA 浓度：40 mg/L、20 mg/L、10 mg/L、5 mg/L 和 2.5 mg/L；♀ 为雌性，♂ 为雄性。

Marker. DL2000 DNA marker; 1 - 5 respectively represent different DNA concentrations: 40 mg/L, 20 mg/L, 10 mg/L, 5 mg/L, 2.5 mg/L; ♀. Female, ♂. Male.

淡不清晰，甚至有部分条带缺失；DNA 总含量低于 10 ng 时 PCR 产物电泳未出现条带，该现象可能是由于 DNA 浓度过低，达不到 PCR 反应的最低模板浓度，致使条带不能有效扩增出来。综上所述，血液 DNA 浓度达到 20.0 mg/L 及以上才可满足该性别标记引物检测的要求。因而，全血 PCR 中血液添加量要在 3.0 μL 及以上。

2.2 血液前处理方法

血液前处理方法筛选结果见图 2。血液酶解法前处理，雌、雄鳖血液 PCR 产物均未出现电泳条带 (重复多次验证)，可能是酶解时间太短，DNA 释放量不够；血液经碱煮沸法前处理后，雌、雄鳖血液 PCR 产物均出现电泳条带，其中雌性鳖出现了约 860 bp 和 1 500 bp 两条带，雄性鳖出现约 860 bp 一条带，鉴定结果与中华鳖血液基因组 DNA 性别鉴定 PCR 结果一致。因此，血液前处理选择碱煮沸法。血液碱煮沸法前处理 PCR 产物电泳图条带拖尾较严重、部分目的条带亮度较弱，可能是因为模板中含有多种抑制物影响 PCR 的有效反应以及 DNA 含量少等因素造成的。因而，需要在碱煮

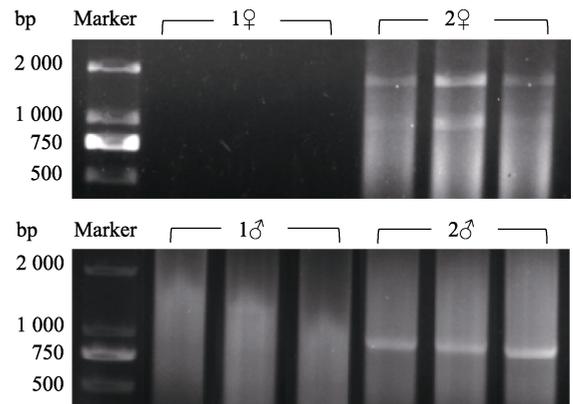


图 2 血液前处理方法对中华鳖性别 PCR 鉴定的影响

Fig. 2 Effect of blood pretreatment on sex identification of *Pelodiscus sinensis* by PCR

Marker. DL2000 DNA 分子量标准；1. 酶解法；2. 碱煮沸法。
Marker. DL2000 DNA marker; 1. Enzymatic hydrolysis method; 2. Alkali boiling method.

沸法前处理的基础上进行血液添加量、模板添加量以及引物添加量等方面的优化。

2.3 血液添加量优化

不同添加量的中华鳖血液经碱煮沸法处理后，上清液中 DNA 质量见表 1。DNA 含量随着血液添加量的增加逐渐增大，含量范围 (111.7 ± 10.8) mg/L 至 (321.2 ± 13.3) mg/L，上清液中 DNA 含量均满足 PCR 体系中 DNA 含量不低于 20.0 mg/L 的需求。吸光度 $A_{260/280}$ 的数值在 (1.35 ± 0.06) ~ (1.41 ± 0.18) 范围内，均明显低于 DNA $A_{260/280}$ 标准值 1.80，可能是由于上清液中含有较多蛋白质，如血红蛋白、乳铁蛋白和免疫球蛋白等； $A_{260/230}$ 的数值在 (0.2 ± 0.01) ~ (0.29 ± 0.02) 范围内，均明显低于 DNA $A_{260/230}$ 标准值 2.0，可能是由于上清液中含有胆红素、胆盐、血色素等血红蛋白代谢物以及肝素和碱性溶液等因素对其影响。另外，上清液颜色随着血液添加量的增加逐渐加深。

血液添加量对中华鳖性别 PCR 鉴定结果的影响比较大，随着血液添加量的增加，PCR 条带越来越亮 (图 3)，在血液添加量为 5.0 μl 时，条带数和条带亮度达到最佳效果。在血液

添加量为 2.0 μl 时，条带亮度暗、条带数不完整 (尤其雌性)，可能是因为血液低添加量时上清液 DNA 含量低，模板添加量增加，致使 PCR 体系 pH 变化较大，影响聚合酶活性，减弱扩增效率；在血液添加量为 8.0 μl 时，条带亮度变弱 (尤其雌性)，可能是因为血液高添加量时上清液中蛋白质和血红蛋白代谢物等杂质含量较高，抑制 DNA 聚合酶活性，进而抑制 PCR 反应。综上，选择 5.0 μl 作为血液最佳添加量。

2.4 PCR 反应体系因素优化

2.4.1 模板添加量

模板添加量筛选结果如图 4 所示，当模板添加量为 2.0 μl 时，PCR 产物电泳条带亮度和清晰度均高，且条带数量完整。模板添加量低于 2.0 μl 时，PCR 产物电泳条带亮度暗淡、背景有拖尾，且条带数量不完整，可能是因为 PCR 体系中 DNA 含量低，影响 PCR 反应效率。随着模板添加量增加 (超过 2.0 μl)，PCR 产物电泳条带亮度逐渐变弱、背景拖尾现象加重，且条带数量出现部分缺失 (雌性)，可能是由于模板添加量增加致使体系中血红蛋白、血色素、肝素和碱溶液等杂质增加，进而抑制 PCR 反应。因此，在保证 PCR 体系中 DNA 含量达到反应要求的基础上，尽量减

表 1 碱煮沸法处理不同添加量中华鳖血液的上清液 DNA 质量信息表

Table 1 DNA quality information of blood supernatant of *Pelodiscus sinensis* by alkaline boiling method with different supplemental levels

| | 血液添加量 The amount of blood (μl) | | | | |
|---------------------------------|---|---|---|--|---|
| | 2.0 | 3.5 | 5.0 | 6.5 | 8.0 |
| DNA 浓度 DNA concentration (mg/L) | 111.7 ± 10.8 | 146.5 ± 14.8 | 245.9 ± 15.2 | 270.1 ± 13.7 | 321.2 ± 13.3 |
| $A_{260/280}$ | 1.35 ± 0.06 | 1.37 ± 0.02 | 1.41 ± 0.18 | 1.40 ± 0.03 | 1.40 ± 0.06 |
| $A_{260/230}$ | 0.20 ± 0.01 | 0.20 ± 0.00 | 0.24 ± 0.02 | 0.26 ± 0.01 | 0.29 ± 0.02 |
| 样品颜色 Sample color |  |  |  |  |  |

A_{260} 、 A_{280} 和 A_{230} 分别是在 260、280 和 230 nm 处测定的 DNA 的吸光度值， $A_{260/280}$ 和 $A_{260/230}$ 是核酸纯度的指示值。

A_{260} , A_{280} and A_{230} refers to the determination of DNA absorbance at 260, 280 and 230 nm, respectively, and $A_{260/280}$ and $A_{260/230}$ are indicators of nucleic acid purity.

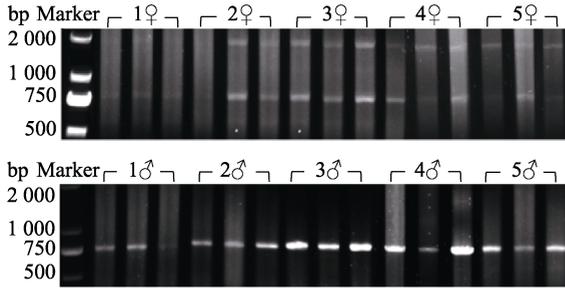


图3 血液添加量对中华鳖性别 PCR 鉴定的影响

Fig. 3 Effect of blood supplemental level on sex identification of *Pelodiscus sinensis* by PCR

Marker. DL2000 DNA 分子量标准；1~5 分别代表血液添加量：2.0 μl 、3.5 μl 、5.0 μl 、6.5 μl 和 8.0 μl 。

Marker. DL2000 DNA marker; 1-5 represent the amount of blood: 2.0 μl , 3.5 μl , 5.0 μl , 6.5 μl , 8.0 μl .

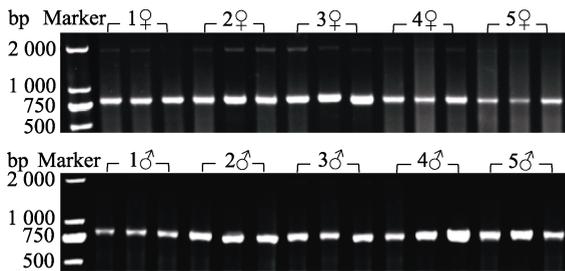


图4 模板添加量对中华鳖性别 PCR 鉴定的影响

Fig. 4 Effect of template addition amount on sex identification of *Pelodiscus sinensis* by PCR

Marker. DL2000 DNA 分子量标准；1~5 分别代表模板添加量：1.0 μl 、2.0 μl 、3.0 μl 、4.0 μl 和 5.0 μl 。

Marker. DL2000 DNA marker; 1-5 respectively represent the template addition amount: 1.0 μl , 2.0 μl , 3.0 μl , 4.0 μl , 5.0 μl .

少 DNA 模板的添加量，因而模板添加量选择 2.0 μl 。

2.4.2 引物添加量 引物添加量对中华鳖性别 PCR 鉴定的影响如图 5 所示，随着上、下游引物添加量的增加，PCR 产物条带清晰度更明亮且条带更完整。当上、下游引物添加量分别为 0.8 μl (10 $\mu\text{mol/L}$) 时，PCR 产物条带清晰明亮且条带完整。PCR 体系中引物添加量需增

加可能是因为 DNA 模板中的杂质抑制或竞争引物与模板的结合导致的。因此，将 0.8 μl (10 $\mu\text{mol/L}$) 作为上、下游引物最佳添加量。

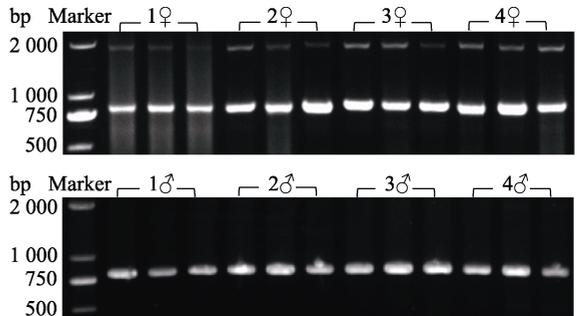


图5 引物添加量对中华鳖性别 PCR 鉴定的影响

Fig. 5 Effect of primer addition amount on sex identification of *Pelodiscus sinensis* by PCR

Marker. DL2000 DNA 分子量标准；1~4 分别代表引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 添加量：0.2 μl 、0.4 μl 、0.6 μl 和 0.8 μl 。

Marker. DL2000 DNA marker; 1-4 respectively represent the amount of primer (10 $\mu\text{mol/L}$) addition: 0.2 μl , 0.4 μl , 0.6 μl , 0.8 μl .

2.4.3 DNA 聚合酶混合液添加量 DNA 聚合酶混合液添加量对中华鳖性别 PCR 鉴定的影响如图 6 所示，随着 2 \times Phanta Max Master Mix 溶液添加量的增加，PCR 产物电泳条带亮度增加，可能由于 DNA 模板中的杂质与 Mg^{2+} 结合，降低 Mg^{2+} 活性或阻碍其与聚合酶结合而抑制，需要增加混合液的量进而补充体系中被抑制成份的量。从图中观察，添加量 10.0 μl 和 12.0 μl 的条带亮度差异不大，从经济成本考虑，选择 10.0 μl 为最佳 DNA 聚合酶混合液添加量。

2.4.4 退火温度 PCR 扩增退火温度 (T_m) 对鉴定结果的影响如图 7 所示， T_m 在 52~60 $^{\circ}\text{C}$ 范围内，PCR 产物没有杂带，引物特异性好；随着退火温度的增高，PCR 产物条带亮度逐渐增加。结合雌、雄中华鳖 PCR 扩增结果，选择 58 $^{\circ}\text{C}$ 作为最佳退火温度。

2.5 验证实验

血液基因组 DNA PCR 产物凝胶电泳结果

如图 8 所示, 15 只雄性中华鳖电泳条带为单一条带, 大小均在 860 bp, 条带清晰明亮; 15 只雌性中华鳖电泳条带均为双条带, 大小均在 860 bp 和 1 500 bp 左右, 条带清晰明亮可准确辨别。

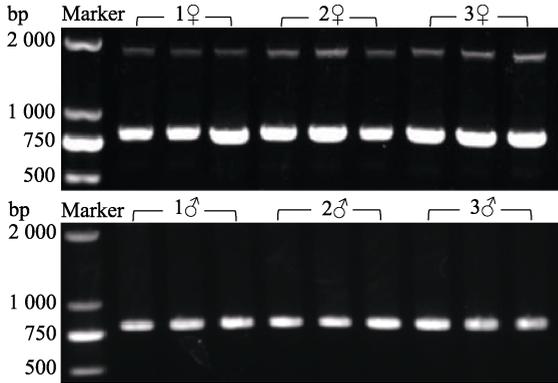


图 6 DNA 聚合酶混合液添加量对中华鳖性别 PCR 鉴定的影响

Fig. 6 Effect of DNA polymerase concentration on sex identification of *Pelodiscus sinensis* by PCR

Marker. DL2000 DNA 分子量标准; 1~3 分别代表 DNA 聚合酶混合液添加量: 8.0 μ l、10.0 μ l 和 12.0 μ l。

Marker. DL2000 DNA marker; 1 - 3 represent the addition amount of DNA polymerase mixture: 8.0 μ l, 10.0 μ l, 12.0 μ l.

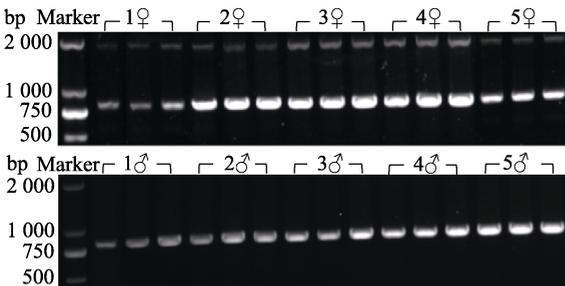


图 7 退火温度对中华鳖性别 PCR 鉴定的影响

Fig. 7 Effect of annealing temperature on sex identification of *Pelodiscus sinensis* by PCR

Marker. DL2000 DNA 分子量标准; 1~5 分别代表不同退火温度: 52 $^{\circ}$ C、54 $^{\circ}$ C、56 $^{\circ}$ C、58 $^{\circ}$ C 和 60 $^{\circ}$ C。

Marker. DL2000 DNA marker; 1 - 5 respectively represent different annealing temperatures: 52 $^{\circ}$ C, 54 $^{\circ}$ C, 56 $^{\circ}$ C, 58 $^{\circ}$ C, 60 $^{\circ}$ C.

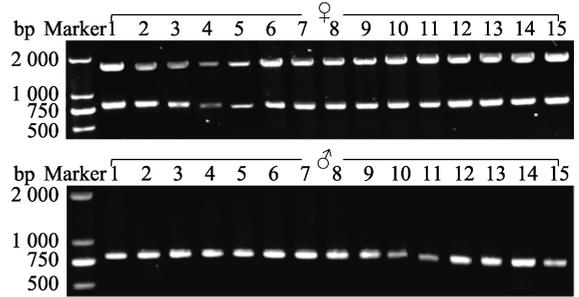


图 8 中华鳖血液基因组 DNA PCR 性别鉴定

Fig. 8 Sex identification of *Pelodiscus sinensis* by PCR with blood genome DNA

Marker. DL2000 DNA 分子量标准; 1~15 分别代表 15 只雌性中华鳖编号和 15 只雄性中华鳖编号。

Marker. DL2000 DNA marker; 1 - 15 represent the numbers of 15 females and 15 males of *P. sinensis* respectively.

血液直接 PCR 凝胶电泳结果如图 9 所示, 15 只雄性中华鳖 PCR 产物电泳均为单一条带, 大小均在 860 bp 左右, 条带清晰; 15 只雌性中华鳖 PCR 产物电泳均为两条带, 条带大小均在 860 bp 和 1 500 bp 左右, 条带清晰可准确辨别。

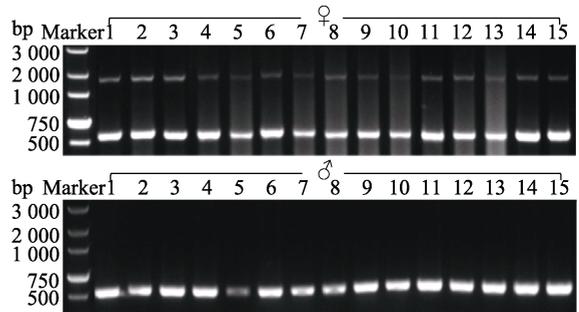


图 9 中华鳖微量血液直接 PCR 性别鉴定

Fig. 9 Sex identification of *Pelodiscus sinensis* by direct PCR in trace blood

Marker. DL5000 DNA 分子量标准; 1~15 分别代表 15 只雌性中华鳖编号和 15 只雄性中华鳖编号。

Marker. DL5000 DNA marker; 1 - 15 represent the numbers of 15 females and 15 males of *P. sinensis* respectively.

中华鳖尾部及解剖后性腺器官观察结果如图 10 所示, 15 只中华鳖符合雄性外部观察特

征，尾细长能自然伸出裙边外，且结合解剖观察雄性性腺器官为睾丸，明确该 15 只中华鳖为雄鳖；另外 15 只中华鳖尾粗短不露出裙边，符合雌性尾部描述特征，且性腺器官为卵巢（已有卵黄生成），明确该 15 只中华鳖为雌鳖。

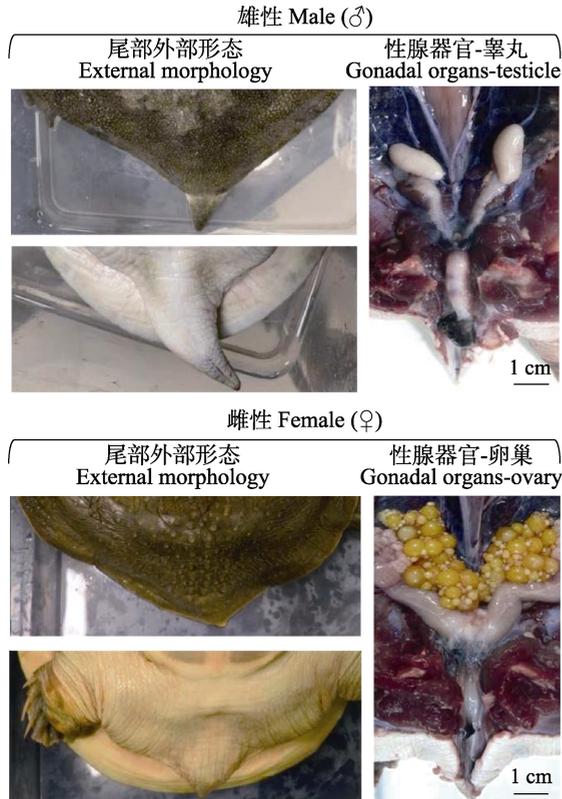


图 10 中华鳖尾部外部形态和性腺器官观察结果

Fig. 10 External morphology and gonadal organs of *Pelodiscus sinensis*

结合以上验证结果，基于碱煮沸法快速处理的血液直接 PCR 法是一种快速、非损害性检测中华鳖性别的可行方法。血液 PCR 检测流程为：5 μl 新鲜血液加入到 200.0 μl NaOH 溶液（50.0 mmol/L）中煮沸 10 min，后加入 20.0 μl Tris-HCl（1.0 mol/L）混匀、离心，取 2.0 μl 上清液，后分别加入 PTPN11 引物各 0.8 μl （10 $\mu\text{mol/L}$ ）、2 \times Phanta Max Mster Mix 10.0 μl 、无菌去离子水 6.4 μl 至 PCR 总体系 20.0 μl ；在退火温度（ T_m 值）为 58 $^{\circ}\text{C}$ 条件下

进行 PCR 扩增，PCR 产物通过凝胶成像系统拍照观察，雌性鳖电泳条带为两条清晰带，雄性鳖电泳条带为单一清晰条带。

3 讨论

中华鳖是我国养殖的重要名特优水产品之一，其雌雄个体之间在生长方面存在着明显差异。据报道，雄性生长速度是雌性的 1.55 倍，说明雄鳖的饲料转化率高（周洵等 2011）。此外，雄性成鳖个体体型大，肌肉脂肪少，裙边宽厚，市场价格高于雌性。王志忠等（2006）研究发现，在中华鳖池塘养殖过程中，将雌性鳖和雄性鳖分池饲养，能够大大降低中华鳖疾病的发生率，显著提高经济效益。然而，中华鳖养殖周期长，生态养殖模式下需要 1 冬龄才可能通过外观进行性别鉴别。因此，开发中华鳖早期性别分子鉴定技术，对促进中华鳖养殖业的发展具有重要的应用价值。近几年，鉴定中华鳖遗传性别的 SNP 标记已有开发（梁宏伟等 2019，李伟等 2020，葛健辉等 2023，曾丹等 2023），但 SNP 标记信息公开发表的较少，并且利用 PCR 鉴定的模板都是从组织中提取的高质量 DNA。Literman 等（2017）从雌、雄鳖肌肉组织中提取 DNA，通过 PTPN11 引物扩增出性别特异片段，可精确区分雌鳖和雄鳖。类似地，本实验采用 PTPN11 引物通过前处理和反应条件优化对中华鳖血液直接 PCR，结果发现雌鳖可以扩增出 2 个片段，而雄鳖只能扩增出其中 1 个片段，我们通过外观形态、性腺器官观察以及血液基因组 DNA PCR 方法验证了血液直接 PCR 鉴定性别的准确率为 100%。与传统的组织（如肌肉、皮肤或裙边和指甲等）DNA PCR 方法相比，本研究提出的血液直接 PCR 方法省去了组织样本 DNA 提取步骤，大大缩短了时间并降低了成本，同时采用了对动物体造成极小创伤的血液采集，采集方便且大大降低了检测样本的死亡率，更适用于大规模养殖现场的快速鉴定，是一种准确、快捷、经济的检测方法。张晋强等（2015）开发了一种

检测猪嗜血支原体的血液直接 PCR 方法,但需使用专用的血液直接 PCR 试剂盒。而本研究建立的血液直接 PCR 方法仅需对血液进行短时处理和常规的 PCR 反应,在原有血液(原血)直接 PCR 方法的基础上(结果不稳定,准确率在 75%左右),进一步优化操作步骤,提高正确率、降低成本,为中华鳖遗传性别的快速鉴定提供了新技术方法。

参 考 文 献

- Lefort M C, Cruickshank R H, Descovich K, et al. 2022. Blood, sweat and tears: a review of non-invasive DNA sampling. *Peer Community Journal*, 2(16): 1–19.
- Liang H, Wang L, Sha H, et al. 2019. Development and validation of sex-specific markers in *Pelodiscus sinensis* using restriction site-associated DNA sequencing. *Genes*, 10(4): 302–313.
- Literman R, Radhakrishnan S, Tamplin J, et al. 2017. Development of sexing primers in *Glyptemys insculpta* and *Apalone spinifera* turtles uncovers an XX/XY sex-determining system in the critically-endangered bog turtle *Glyptemys muhlenbergii*. *Conservation Genetics Resources*, 9: 651–658.
- Meeker N D, Hutchinson S A, Ho L, et al. 2007. Method for isolation of PCR-ready genomic DNA from zebrafish tissues. *Biotechniques*, 43(5): 610–614.
- Zuo F, Shen Y, Wang W. 2020. A minimally-invasive protocol for molecular sex identification of the Chinese soft-shelled turtle *Pelodiscus sinensis*. *Freshwater Science*, 39(1): 147–155.
- 陈嘉倩, 方鑫园, 卜伟绍, 等. 2020. 浙江云和地区繁殖后中华鳖形态特征的两性异形. *丽水学院学报*, 42(2): 39–44.
- 程凯宁. 2009. 利用母牛外周血进行早期胚胎性别鉴定与牛白细胞黏附缺陷症的检测. 南京: 南京农业大学硕士学位论文.
- 葛健辉, 任晋东, 关文志, 等. 2023. 中华鳖性别分子鉴定方法开发与验证. *浙江农业学报*, 35(11): 2594–2599.
- 李少斌, 赵芳芳, 张瑞国, 等. 2021. 不同抗凝剂处理绵羊血液对 DNA 提取效果的影响. *中国草食动物科学*, 41(1): 79–81.
- 李为. 2000. 特种水产动物的雌雄鉴别方法. *内江科技*, (6): 42–42.
- 李伟, 朱新平, 徐红艳, 等. 2020. 一种快速鉴定中华鳖遗传性别的 PCR 扩增引物、方法及试剂盒. 广东省: CN201810685968.0, 2020-05-05.
- 梁宏伟, 王利华, 沙航, 等. 2019. 一种中华鳖雌性别特异性分子标记及遗传性别鉴定方法. 湖北省: CN201910069349.3, 2019-10-01.
- 刘敏, 申蓉, 王树梅, 等. 2023. 快速提取鸭血基因组 DNA 方法的研究. *食品安全导刊*, (17): 103–105, 109.
- 龙登凯, 赵丹, 周涛, 等. 2016. 基于 SRY 基因的人血迹性别快速鉴定的方法学研究. *贵阳中医学院学报*, 38(3): 32–36.
- 鲁翠云, 匡友谊, 郑先虎, 等. 2019. 水产动物分子标记辅助育种研究进展. *水产学报*, 43(1): 36–53.
- 罗志嘉, 王佩, 彭娜, 等. 2017. 水产动物生长性别差异研究进展. *水产学杂志*, 30(6): 56–60.
- 孙嘉, 杨树青, 孙珂, 等. 2016. 采用血液、羽毛等材料鉴别鸡性别 PCR 方法的应用研究. *家禽科学*, (7): 11–15.
- 陶维昆, 黄飞, 刘波, 等. 2022. 超微量 DNA 模板扩增鉴定绵羊早期胚胎性别体系优化. *中国畜牧杂志*, 58(2): 97–101.
- 王丹, 吴反修, 宋丹丹, 等. 2022. 2022 年中国渔业统计年鉴. 北京: 中国农业出版社, 24–27.
- 王金秀, 兰香英, 罗庆华, 等. 2022. 中国大鲵非损害性 DNA 取样及提取方法的比较研究. *动物学杂志*, 57(5): 641–652.
- 王美青. 2018. 鸭胚早期性别鉴定及性别决定候选基因表达的研究. 扬州: 扬州大学硕士学位论文.
- 王志忠, 刘鹏章. 2006. 中华鳖雌雄分塘高效养殖新模式. *农业知识*, (2): 16–17.
- 曾丹, 陈梦莹, 周淑云, 等. 2023. 一种快速鉴定中华鳖遗传性别的 SNP 标记及其引物和应用. 湖南省: CN202310958622.4, 2023-09-19.
- 曾丹, 王晓清. 2017. 中华鳖遗传育种研究现状及进展. *湖南师范大学自然科学学报*, 40(4): 40–44.
- 张晋强, 薛翼鹏, 李晓云, 等. 2015. 血液直接 PCR 方法在猪嗜血支原体检测中的应用. *中国兽医学报*, 35(8): 1244–1247.
- 周洵, 朱园贞. 2011. 中华鳖雌、雄生长速度差异性研究. *水产养殖*, 32(5): 11–13.
- 朱道玉. 2008. 中华鳖卵巢的发育. *西南大学学报: 自然科学版*, 30(4): 169–173.
- 朱道玉, 吴红松. 2009. 中华鳖精巢发育的组织学观察. *安徽农业科学*, 37(22): 10522–10524.