

朱鹮性别相关基因及其性别鉴定

李 明 丁长青 魏辅文 * 蒙世杰 席咏梅 路宝忠

(中国科学院动物研究所, 北京 100080; 西北大学生物系, 西安 710069; 陕西朱鹮保护观察站, 洋县 723300. * 联系人)

摘要 朱鹮是世界极危鸟类, 由于其野生和饲养种群的近亲繁殖现象日渐严重, 再引入建立异地野生种群已是当务之急. 然而, 由于朱鹮雌雄同色, 从形态学特征区分性别的难度较大. 为了在选择再引入的释放个体时能够准确地进行性别鉴定, 利用 PCR 方法对雌性个体 W 性染色体上的性别相关基因进行扩增, 成功地对 3 只朱鹮的性别进行了正确鉴定. 同时, 还得到了其性别相关基因 362 bp 的 DNA 序列, 与近缘种东方白鹮相比有 13 个碱基差异, 其中转换和颠换之比为 2.25. 该基因序列的获得为进一步设计更为专一的朱鹮性别相关基因引物提供了基础理论依据.

关键词 朱鹮 性别相关基因 性别鉴定

朱鹮(*Nipponia nippon*)是世界极危鸟类, 曾广泛分布于日本、朝鲜、中国和俄罗斯等地. 由于人为捕杀和栖息地的不断丧失, 其野生种群到 20 世纪中叶已基本绝灭^[1]. 1981 年, 朱鹮野生种群在洋县境内重新发现, 引起了我国政府和国内外学者的极大关注^[2]. 经过近 20 年的努力, 朱鹮的保护与拯救工作取得显著成就, 野生种群已从发现时的 7 只增长到 120 余只, 饲养种群已达 128 只. 为合理保护这一珍稀鸟类, 除了加强其栖地的保护外, 再引入建立异地种群被认为是保护其遗传多样性的有效途径^[3, 4]. 然而, 在建立异地种群进行引种配对时, 由于朱鹮为雌雄同色鸟类, 其性别从外部形态学特征上难于确定, 这给引种配对造成极大的困难. 因此, 寻找一种行之有效的性别鉴定方法极其重要.

对于雌雄同色鸟类的性别鉴定, 以前是利用染色体和性激素等分析方法进行确定^[5, 6]. 近年来, 利用 PCR 技术扩增性别相关基因进行动物性别鉴定已在哺乳类和鸟类中得到了成功的应用^[7~9]. 性别相关基因是指位于某一性染色体上, 且只能在雄性或雌性中扩增出的一个基因片段, 如哺乳动物雄性 Y 染色体上的 SRY 基因^[7], 鸟类雌性 W 染色体上的 *EE0.6*^[10], *CHD-W* 和 *CHD-NW* 基因^[11]等. 如能建立一个得到 Y 或 W 性染色体上的某一个性别相关基因的 PCR 扩增体系, 就能达到性别鉴定的目的. 本研究利用朱鹮的近缘种东方白鹮 (*Ciconia boyciana*) W 性染色体上的性别相关基因 PCR 引物, 成功地扩增了朱鹮相应的性别相关基因, 达到了性别鉴定的目的, 同时还对该基因进行序列测定, 为进一步设计更为专一的朱鹮性别相关基因引物提供了理论依据. 现将结果报道如下:

1 材料和方法

() 2 只朱鹮的血液样品(ZH1 雌性, ZH2 未知)和 1 只朱鹮的肌肉样品(ZH3 雄性)均来自陕西省洋县朱鹮饲养繁殖中心.

() DNA 提取按照 Tamate 等人^[12]的方法进行.

() 性别相关基因的 PCR 扩增. 利用扩增东方白鹮 W 性染色体的性别相关基因的引物^[13]进行扩增反应. 引物序列为 5' CACCCTGGATTGGACAACCTATTTC 3' (正向)和 5' CACTCTTTCCAGGAAATCAA3' (反向). 反应体积为 20 μ L, 其中含有 0.2 mmol/L dNTPs, 1 mmol/L 引物, 1/10 体积的 10 $\times$ PCR buffer, 1.5 mmol/L MgCl₂, 1.75 U Taq 酶, 以及 10 ng 左右的 DNA. 反应条件为 95 $^{\circ}$ C, 80 s, 59 $^{\circ}$ C, 90 s, 72 $^{\circ}$ C, 60 s, 共进行 35 个循环, PCR 反应在 TaKaRa TP240 型热循环仪上进行. 取 4 μ L 反应液在 2% 的琼脂糖凝胶上进行电泳检测.

() PCR 产物的克隆. 利用 2% 低熔点琼脂糖凝胶分离和纯化 PCR 产物. PCR 产物克隆利用 Epicurian Coli[®] Ultracompetent and Supercompetent Cells 试剂盒(STRATAGENE)进行. 首先将 PCR 产物插入到 pT7Blue (R) 载体上, 然后按照试剂盒的操作步骤进行.

() 序列测定. 克隆的序列测定利用 DyEnamic[™] ET terminator 测序试剂盒 (Amersham Pharmacia Biotech)进行, 测序引物为 BcaBEST[™] RV-M(GAGCGGATAACAATTTCACACAGG) 和 M13-47(CGCCAGGGTTTCCAGTCACGAC)(TaKaRa). 测序反应在自动测序仪 ABI PRISM[™] 310 Genetic Anal-

lyzer 上进行.

(vi) 排序及序列比较. 利用 Clustal W 排序软件进行排序^[13], 并与东方白鹳的性别相关基因进行同源比较.

2 结果和讨论

2.1 朱鸮性别相关基因的扩增和性别鉴定

利用东方白鹳性别相关基因引物从 3 只朱鸮个体的 DNA 中扩增出相应的性别相关基因片段(图 1).

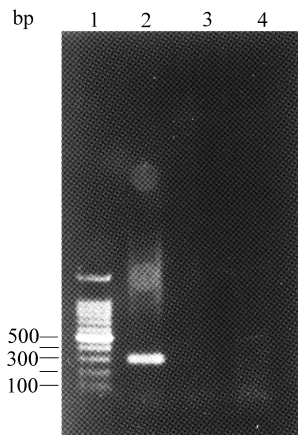


图 1 朱鸮 W 染色体上的性别相关基因扩增图谱
1, 2, 3 和 4 分别示 DNA 分子量(100 bp)以及朱鸮个体 ZH1, ZH2 和 ZH3 的性别相关基因的扩增结果

从扩增结果来看, 3 只朱鸮个体中只有 ZH1 得到了扩增片段, 其大小在 300 bp 左右. 因为该引物是用来扩增位于雌性个体 W 性染色体上的相应基因片段, 因此也只能在雌性个体中才能扩增出来. 根据实验结果, 我们可以确认出这 3 只朱鸮个体的性别, 即 ZH1 为雌性, ZH2 和 ZH3 为雄性, 与 ZH1 和 ZH3 在取样时确认的性别相吻合. 虽然 ZH2 的性别不详, 但通过该实验可以判断为雄性.

利用通用引物扩增性别相关基因并进行性别鉴定, 在一些哺乳动物中是完全可行的^[12]. 在鸟类中, 虽然也有相关的报道^[11, 14], 但 Murata 等人^[7]认为这些通用引物具有一定的缺陷, 并不一定适用于鹳形目鸟类. 本研究所采用的 PCR 引物不仅对于东方白鹳具有很高的专一性^[8, 9], 而且在其近缘种朱鸮中也得到了成功地应用. 根据 Itoh 等人^[8]和 Murata 等人^[9]的实验结果, 该对引物扩增的片段大约在 300 bp 左右, 与本研所得到的扩增片段大小相似. 因此, 我们认为东方白鹳的性别相关基因的扩增引物也适用于朱鸮的性别鉴定.

2.2 朱鸮性别相关基因的 DNA 序列分析

通过将朱鸮性别相关基因的 PCR 产物克隆到 pT7Blue (R) 载体上, 利用自动测序仪进行序列测定,

朱鸮	ATTGACAATTTGTCTGTCTCTGGGAAAAGATGTATGCAAGCAAGGAACAAAATCAATGC
东方白鹳	ATTGACAGTTTGTCTGTCTCCGGGAAAAGATGTATGCAAGCAAGGAACAAAATCAACGC
	* * *
朱鸮	CAACAACAAATGTTTAGAATCATTTCAAGTGTCCAACCTCAATTTTAACTGAAATCCAG
东方白鹳	CAACAACAAATGTTTAGAATCATTTAAAGTGTCCAACCTCAATTTTAACTGAAATCCAG
	* *
朱鸮	TTCAGGTCAGATTCTTTCTCAAATGAACCTGAACCTATACTATTATTCAGAAGATGCAC
东方白鹳	TTGAGGTCAGATTCTTTCTCAAATGAACCTGAAGCTATACTATTATTCAGAAGATGCAC
	* *
朱鸮	CGAAATCCAGCTGAAGCACTTAAAAGACATTTAAAGTGAAGTGAAGTAGTTCCTAAATAAA
东方白鹳	TGAAATCCAGCTGAAGCGCTTAAAAGACAGTTAAAGTGAAGTGAAGTAGTTCCTAAGTGAA
	* * * *
朱鸮	ACTCATTCAAAGAAGTATTAGA
东方白鹳	ACTCATTCAAAGGAGTATTAGA
	*

图 2 朱鸮和东方白鹳性别相关基因的 DNA 序列比较
* 示变异的核苷酸位点

得到 262 bp 的朱鸮性别相关基因序列(该基因序列已存放于基因序列库 DDBJ 中, 序列号: AB045309). 利用 Clustal W 排序软件, 将该基因序列与东方白鹳性别相关基因序列进行比较(图 2), 发现朱鸮性别相关基因和东方白鹳性别相关基因之间有 13 个碱基的序列差异(4.96%), 其中转换 (Ts) 和颠换 (Tv) 的比例

为 2.25 ($Ts/Tv = 2.25$), 其颠换发生的比例远远高于其他编码基因, 如细胞色素 b($77/56 = 1.38$), 这是因为该性别相关基因是非编码基因, 且目前对其具体功能仍不清楚^[8].

致谢 实验所用的引物和分子克隆试剂盒分别由石卷专修大学玉手英利教授和柴田清孝博士提供, 在此一并表示

感谢.本工作为中国科学院知识创新工程项目(批准号:KSCX2-1-03)、中国科学院“青年科学家创新小组”专项基金和国家自然科学基金(批准号:39870098)资助项目.

参 考 文 献

1 Yamashina Y, Nakanishi G. *Nipponia nippon*. Tokyo: Newton Books, 1983

2 刘荫增. 朱鹮在秦岭的重新发现. 动物学报, 1981, 27(3): 273

3 Leberg P L. Strategies of population reintroduction: effects of genetic variability on population growth and size. *Conserv Biol*, 1993, 7: 194 ~ 199

4 Wolf C M, Griffith B, Reed C, et al. Avian and mammalian translocations: update and reanalysis of 1987 survey data. *Conserv Biol*, 1996, 10: 1142 ~ 1154

5 Bush M, Kennedy S, Wildt D E, et al. Sexing birds by laparoscopy. *Int Zoo Yb*, 1978, 18: 197 ~ 198

6 Hildebrandt T, Pitra C, Sommer P, et al. Sex identification in birds of prey by ultrasonography. *J Zoo Wildl Med*, 1995, 26: 367 ~ 376

7 Murata K, Masuda R. Gender determination of the Linne's two-toed sloth (*Choloepus didactylus*) using *SRY* amplified from hair. *J Vet Med Sci*, 1996, 58: 1157 ~ 1159

8 Itoh Y, Ogawa A, Murata K, et al. Identification of the sex of oriental white stork, *Ciconia boyciana*, by the polymerase chain reaction based on its sex chromosome-specific DNA sequences. *Genes Genet Syst*, 1997, 72: 51 ~ 56

9 Murata K, Itoh Y, Ogawa A, et al. Sexing the oriental white stork *Ciconia boyciana* by PCR using a single plucked feather as a source of DNA. *Jpn J Ornithol*, 1998, 46: 157 ~ 162

10 Orgawa A, Solovei I, Hutchison N, et al. Molecular characterization and cytological mapping of a non-repetitive DNA sequence region from the W chromosome of chicken and its use as a universal probe for sexing *Carinatae* birds. *Chromosome Res*, 1997, 5: 93 ~ 101

11 Griffiths R, Daan S, Dijkstra C. Sex identification in birds using two CHD genes. *Proc R Soc Lond B*, 1996, 263: 1251 ~ 1256

12 Tamate H B, Tatsuzawa S, Suda S, et al. Mitochondrial DNA variations in local populations of the Japanese sika deer, *Cervus nippon*. *J Mamm*, 1998, 79: 1396 ~ 1403

13 Thompson J D, Higgins D G, Gibson T J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Res*, 1994, 22: 4673 ~ 4680

14 Ellegren H. First gene on the avian W chromosome (CHD) provides a tag for universal sexing of non-ratite birds. *Proc R Soc Lond B*, 1996, 263: 1635 ~ 1641

(2000-08-01 收稿, 2000-10-10 收修改稿)

www.scichina.com

131