

家禽的性别鉴定方法^{*}

燕海峰^① 肖兵南^① Pavel Trefil^② 吴晓林^①

(^①湖南省畜牧兽医研究所 长沙 410131; ^②捷克生物医药研究所 布拉格 25449)

摘要:现代家禽生产,祖代鸡通过翻肛鉴定性别,父母代鸡以羽速(快慢羽)判定公母,而商品代鸡则以羽色自别雌雄。常规性别鉴定方法耗资费力,且慢羽基因(K)与内源病毒基因(ev-21)紧密连锁,导致慢羽鸡群免疫反应降低,成活率和产蛋性能下降。以鉴定W染色体上性连锁DNA序列或基因为基础,从分子水平上鉴定家禽性别的研究有望填补家禽性别鉴定空白。

关键词:家禽;雌雄鉴别;W染色体;性连锁基因

中图分类号:S831 **文献标识码:**A **文章编号:**0250-3263(2001)06-58-04

Identification of Sex in Domestic Fowls

YAN Hai-Feng^① XIAO Bing-Nan^① Pavel Trefil^② WU Xiao-Lin^①

(^①Hunan Institute of Animal and Veterinary Sciences Changsha 410131, China;

^②Research Institute of Biopharmacy and Veterinary Drugs Prague 25449, Czech Republic)

Abstract: In present schemes of commercial bird industry, newly-hatched birds are usually sexed by vent identification, or by sex-linked genes for plumage color or feathering alleles. Traditional methods of sexing, however, are not desirable ones, due to various limitations in sexing efficiency and application. Moreover, the slow-feather gene K is linked closely to the endogenous virus (ev-21) gene, which would result in high death rate and low reproductive rate of layers. The molecular sexing method in poultry, which is based on the essence of life—the gene and DNA sequence, utilizes the most advanced analytical method of nucleic acid, will facilitates the study of poultry in the fields such as the sex allocation theory, the evolution of the sex chromosome, the libraries of sex chromosome and transgenic chickens.

Key words: Domestic fowl; Sexual discrimination; W chromosome; Sex-linked gene

雌雄鉴别在家禽养殖业有重要作用,通过鉴定1日龄雏鸡的雌雄,可淘汰非目的性别,降低饲养成本,提高经济效益。随着人们生活习惯和地域的差别,对两种性别肉鸡的需求有明显的不平衡性,而且雌雄对于环境、营养条件的要求和反应也不同。实现雌雄分群饲养,便于科学管理、提高生产性能和屠体品质^[1]。同时,性别鉴定在基础研究领域更具有重要意义。通过研究鸡W染色体上性连锁基因或特异的DNA序列,获得了一些从分子水平上鉴定鸟类性别的方法^[2,3]。很多鸟类的幼年雄性和雌性个体,在躯体大小、羽毛等方面没有区别,尤其是刚出壳的雏鸡,根本无法从外形上区分^[4]。利用性染色体特异遗传标记对早期家禽胚胎

进行性别鉴定,有利于研究在性别分化过程中性激素的合成和表达^[5],有利于研究鸟类性别划分理论和鸟类的进化史^[6],有利于在家禽胚胎发育早期构建雄性和雌性染色体cDNA文库,从而通过合适的底物和扩增程序来鉴定性连锁的特异克隆,而且通过该途径还可获得新的性连锁基因或DNA序列^[7]。此外,家禽分子水平上的性别判定,是研究相反性别家鸡嵌合体的前

^{*}中捷政府间科技合作项目(编号35-10),湖南省自然科学基金项目(编号00JJY2019);

第一作者介绍 燕海峰,男,32岁,助理研究员;研究方向:分子生物学;E-mail: hfklaugh@public.cs.hn.cn

收稿日期:2000-03-26;修回日期:2000-12-25

提^[8-10]。

目前禽类的性别判定方法有光谱荧光法、超声波扫描法、骨盆判定法、泄殖腔法和分子生物学法等。家禽养殖业,主要利用翻肛鉴别法和羽毛伴性遗传方法来鉴定 1 日龄的雏鸡。分子水平上的性别鉴定暂时主要用于实验研究或一些专门从事鸟类性别鉴定的商业公司。

1 常规雌雄鉴别方法

翻肛鉴别法是鉴定出壳后祖代雏鸡的常用方法,利用不同性别家禽泄殖腔形态差异进行鉴定。鸟类生殖器官在体内,不易从外表辨别,因此对刚出壳雏鸡的性别鉴定,比其它动物要困难得多。尽管通过性器官外形能区别家禽的雌雄,但至少必须考虑 15 种不同形状,只有经过专业训练的技术人员才能成功地运用。此外,翻肛性别鉴定的主观性强。

羽速伴性遗传法是鉴定父母代雏鸡性别的主要方法。初生雏羽速差异由性染色体上的一对等位基因决定,其中野生型的快羽基因(k^+)为隐性,而突变型慢羽基因(K)为显性。羽速伴性遗传规律在发现之初只有理论上的意义,因为雏鸡要到 10 日龄才能根据尾羽的长出与否区别快慢羽,而当时商品生产只饲养纯种鸡,无需杂交配套。后来人们认识到借助适宜的配套组合,可依据初生雏在主翼羽(primary feathers)和覆主翼羽的相对长度区分公母雏,同时也由于杂交鸡在商品生产中占主要地位,羽速伴性遗传生产自别雌雄的杂种鸡才引起人们的高度重视^[1,11]。目前,几乎所有大型种鸡公司都培育了自己的快慢羽品系。但携带慢羽基因(K)的母鸡产蛋量低而死亡率高,进一步研究发现慢羽基因(K)与内源性病毒(endogenous virus)基因(ev-21)是紧密连锁的^[11],因而导致慢羽鸡对外源病毒的耐性、免疫反应降低^[11]。有一些基于主翼羽生长速度的性别“检测器”,通过羽毛边缘自动检测雏鸡性别,但准确率不高(50%~89%)。

羽色伴性遗传法根据雌雄个体不同的羽毛颜色鉴定性别,是国内商品代鸡舍常用的性别鉴定方法。判定很容易,但必须有羽色性连锁基因存在于待选择的禽种系。这种方法鉴定家禽,首先应设计一系列杂交程序,选择出具有羽色性连锁基因的纯合系,虽然准确率较高,但获得羽色性连锁纯合家禽种系很困难。

2 分子水平上的家禽性别鉴定

非平胸鸟类的雌性具有一对异源染色体(ZW),雄性具有一对同源染色体(ZZ)。家禽中 W 染色体在细胞

核 DNA 中占 1.4%,而 Z 染色体约占 10%^[12]。由于 W 染色体很小,且仅存在于雌性中,它是被研究得最多的染色体^[13]。

Tone 等用 *Xho* I 限制性内切酶消化从白菜航母鸡中提取的 DNA,获得了 0.7 kb(重复 14 000 次)与 1.1 kb(重复 6 000 次)的两个重复序列片段,它们均位于 W 染色体上^[14]。随后用相似的方法,经 *Eco*R I 内切酶消化,发现了第三个长为 1.2 kb(重复 700~4 000 次)的重复片段。*Eco*R I 家族与两个 *Xho* I 家族的重复序列占整个 W 染色体总 DNA 的 70%~90%^[15],这些大重复片段又由许多串联的结构相似的 21 bp 亚单位构成。这些重复序列构成了 W 染色体的异染色质区域,是鉴定 W 染色体的基础^[13]。目前,在禽类已研究出了一些基于每个细胞的 DNA 含量、性连锁基因以及性连锁序列为遗传标记的性别鉴定方法。

2.1 以每个分子 DNA 含量为基础的性别鉴定 由于 W 染色体比 Z 染色体小得多,因此每个雄性细胞的 DNA 含量比雌性的多,这已被用来作为一种禽类性别鉴定方法,即用碘化丙锭对雌性和雄性细胞核进行染色,再用流体细胞计进行检测^[16]。雄性和雌性 DNA 总量的差别随禽种的不同,在 0.6%~3.5% 之间变化^[13]。

2.2 利用性连锁 DNA 序列 利用性连锁序列进行家禽性别鉴定,是通过 DNA 印迹杂交(southern blot hybridization)、细胞原位杂交(*in situ* hybridization, ISH)或聚合酶链式反应(PCR),鉴定 W 染色体来实现的。所以家禽分子生物学性别鉴定方法的发展,包括发现新的性连锁序列和改进检测这些特异遗传标记的方法。

Mizuno 等以克隆的 0.7 kb *Xho* I 片段作探针,进行低强度核酸杂交,发现了另外两个与 *Xho* I 家族相关的序列,即火鸡中的 *Pst* I(重复 10 000 次)和野鸡中的 *Taq* I(重复 4 000 次)^[7]。这些雌性基因组特异的 *Xho* I、*Eco*R I 与 *Pst* I 家族的高度重复,使它们都能作为 DNA 印迹杂交或细胞原位杂交的特异探针进行雌性性别的鉴定。

Uryu 等对鸡 W 染色体上 *Xho* I 家族的重复序列进行克隆和测序,以携带有用生物素标记的 0.7 kb 重复片段的重组质粒为探针,利用两种杂交技术,对白菜航母鸡进行了性别鉴定^[17]。利用原位杂交技术,检测核苷酸序列较方便,无论是用提纯的 DNA 还是细胞,甚至血液进行原位杂交,雌性和雄性都能清楚地鉴定^[17]。利用以 W 染色体为特异探针的血液原位杂交,通过检测出壳后表现为雄性的嵌合体鸡中的 W 染色体,可研究雌性供体胚盘细胞在雄性嵌合体鸡中的命运^[8]。当时还无法在转移前对供体细胞与受体胚进行性别鉴定,

混合性别的嵌合体是通过混合多个供体胚盘,随机产生的。后来,胚盘细胞和精子也能利用原位杂交进行性别鉴定,促进了混合性别嵌合体的研究^{9,101},但似乎不适合鉴定供体胚盘细胞或受体胚的性别。

如果 DNA 已用凝胶分离,或很易从样品中分离,则采用 DNA 印迹杂交较方便。利用细胞原位杂交不必提纯 DNA,但玻片准备工作既费时又费力,好在已有一些商业产品和试剂盒简化了其中很多步骤,使其应用领域在不断扩大。最近,高分辨率同位素分析仪(如 Bio-Image 公司的 MicroImager)的产生,已大幅度地提高了同位素检测的空间分辨率和灵敏度。但只有在能获得相对高产的荧光染料,同时定量记录原位杂交结果的成像系统简化了的时候,荧光原位杂交(fluorescence *in situ* hybridization, FISH)才能成为常规技术。FISH 简单、安全,更适合于亚细胞标记,即检测染色体上的核酸序列。目前,这些新检测方法的应用,因费用高昂而受到限制,很多实验室仍以同位素探针为主。

PCR 性别鉴定技术,在鸟类应用较早¹⁸,家禽中最早用于鉴定 5~7 d 鸡胚。其基本程序为:① 根据选定 W 染色体上的一段特异序列,构建一对特异引物,如 447 bp *EcoR* I 序列;② 从鸡细胞样品中提取 DNA,在合适的条件下进行 PCR 反应;③ 利用琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,同时设定阴性和阳性对照。如果在预定的位置有一条带,且阴性与阳性对照正常,则意味着样品中存在 W 染色体,故为雌性。利用 PCR 技术鉴定性别,灵敏准确,只需微量样品,甚至可鉴定单个精子⁵,同样可鉴定从羽毛、血液和胚盘细胞中提取的 DNA¹⁹。嵌合体鸡研究中,利用它能鉴定供体胚盘细胞和受体胚的性别。去除几百个 X 期的胚盘细胞,对胚的发育无影响²⁰,但去掉 700 个 X 期胚盘中央透明区的细胞,会严重影响种系细胞的发育,而如果是受体胚,则因有供体细胞的补充,反而会增加嵌合率。Ogawa 等还阐述了鸡 W 染色体上一个非重复序列的分子特性和细胞学图谱,以及利用它,通过 PCR 广泛鉴定非平胸鸟类性别的方法³。因此,家禽染色体水平上的性别鉴定,PCR 是最简单、快速的方法,但需要专业公司生产特异引物,同时需要 PCR 仪。

2.3 以性连锁基因为基础的方法 性连锁基因主要是指羽毛性连锁基因,但通过低强度 PCR 筛选能扩增特异位点的随机引物,或低强度杂交⁷,已发现了一些新性连锁基因。最有影响力的是从鸡中分离的染色体解旋酶 DNA 结合(chromo-helicase-DNA, CHD)基因,它编码一个有关调节整个染色体水平上转录活性的蛋白,在鼠类只有一个同源拷贝,而在非平胸鸟类有两个拷

贝²¹。利用 PCR,从 7~8 d 鸡胚脊髓组织的 cDNA 文库中分离了鸡 CHD-W 基因²¹。禽类 CHD 基因具有高度保守性,可作为一个广泛的遗传标记鉴定所有非平胸鸟类。平胸鸟类没有异源的染色体对,W 染色体上主要是常染色质,与 Z 染色体具有相当高的同源性。在鸵鸟中没有 CHD-W 基因,表明最原始血统鸟类的存在²,这很好地吻合了性染色体是由常染色体进化而来的理论。CHD 基因的另一个同源基因连锁在 Z 染色体上(CHD-Z)。

因此,可利用以上任何一种方法鉴定家禽的性别,CHD-W 基因可作为一种广泛的探针鉴定鸟类性别,尤其适合还没有特定遗传标记的种类。家鸡中,利用 W 染色体上 447 bp 的 *EcoR* I 重复特异序列作为遗传标记,进行特异引物的 PCR 扩增,可相对较容易地进行性别鉴定¹⁹。

3 分子生物学性别鉴定方法展望

雌性鸟类具有一对异源染色体,与哺乳动物完全不同。外部因子(如温度)决定低等脊椎动物的性别,不同种类动物之间没有一个共同的性别决定基因。作为常染色体起源的性别决定基因和性激素,除了在性别分化方面的作用外,还有没有体细胞方面的功能?显然这方面还缺乏研究。家禽分子生物学性别鉴定方法,以生命的本质——基因和 DNA 序列为基础,利用最先进的核酸分析方法,以与人们生活息息相关的家禽为研究对象,将会更进一步促进禽类性别划分理论、性染色体进化、性染色体文库以及转基因鸡的研究。

参 考 文 献

- [1] 吴晓林,项可宁. 优质三黄鸡育种之羽速基因利用(I)羽毛生长速度规律、分型与羽速自别配套体系. 见:郑诚主编. 第四届优质肉鸡的改良生产及发展研讨会论文集(香港). 广州:华南理工大学出版社,1997. 47~57.
- [2] Ellergren, H. First gene on the avian W chromosome (CHD) provides a tag for universal sexing of non-ratite birds. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 1996, **263**:1 635~1 641.
- [3] Ogawa, A., I. Solovei, N. Hutchison *et al.* Molecular characterization and cytological mapping of a non-repetitive DNA sequence region from the W chromosome of chicken and its use as an universal probe for sexing carinatae birds. *Chromosome Res.*, 1997, **5**(2): 93~101.
- [4] Lessells, K., K. Mateman. Molecular sexing of birds. *Nature*, 1996, **383**:761~762.
- [5] Abinawanto, K. Shimada, K. Yoshida *et al.* Effects of aro-

- matase inhibitor on sex differentiation and levels of P450 (17-alpha) and P450 arom messenger ribonucleic acid of gonads in chicken embryos. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 1996, **102**(2): 241 ~ 246.
- [6] Fridolfsson, A. K., H. Cheng, N. G. Copeland *et al.* Evolution of the avian sex chromosomes from an ancestral pair autosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, **95**(14): 8 147 ~ 8 152.
- [7] Mizuno, S., Y. Saitoh, O. Nomura *et al.* Sex-specific DNA sequences in galiformes and their application to the study of sex differentiation. In: *Manipulation of the Avian Genome*. New York: CRC Press LLC, 1993. 257 ~ 274.
- [8] Shaw, D. L., R. S. Carscience, R. J. Etches *et al.* The fate of female donor blastodermal cells in male chimeric chickens. *Biochem. Cell Biol.*, 1992, **70**(10 ~ 11): 1 218 ~ 1 229.
- [9] Kagami, H., M. E. Clark, A. M. Verrinder Ginnins *et al.* Sexual differentiation of chimeric chickens containing ZZ and ZW cells in the germline. *Mol. Reprod. Dev.*, 1995, **42**: 379 ~ 387.
- [10] Tagami, T., Y. Matsubara, H. Hanada *et al.* Differentiation of female chicken primordial germ cells into spermatozoa in male gonads. *Dev. Growth. Differ.*, 1997, **39**(3): 267 ~ 271.
- [11] 谢后清, 周铁茅等. 成都白鸡快慢羽纯系的选育及羽型研究. *四川农业大学学报*, 1985, **3**(1): 9 ~ 14.
- [12] Tone, M., N. Nakano, E. Takao *et al.* Demonstration of W chromosome-specific repetitive DNA sequences in the domestic fowl, *Gallus domesticus*. *Chromosoma*, 1982, **86**: 551 ~ 569.
- [13] Steven, L. *Avian Biochemistry and Molecular Biology*. Published by the Press Syndicate of the University of Cambridge, 1996. 129 ~ 130.
- [14] Tone, M., Y. Sakaki, T. Hashiguchi *et al.* Genus specificity and extensive methylation of the W chromosome-specific repetitive DNA sequences from the domestic fowl, *Gallus domesticus*. *Chromosoma*, 1984, **89**: 228 ~ 237.
- [15] Saitoh, Y., H. Saitoh, K. Ohtomo *et al.* Occupancy of the majority of DNA in the chicken W chromosome by bent-repetitive sequences. *Chromosoma*, 1991, **101**: 32 ~ 40.
- [16] Nakamura, D., T. R. Tiersch, M. Douglass *et al.* Rapid identification of sex in birds by flow cytometry. *Cytogenet Cell Genet.*, 1990, **53**(4): 201 ~ 205.
- [17] Uryu, N., Y. Nagata, K. Ito *et al.* Determination of the sex of chickens by a biotin-labeled deoxyribonucleic acid probe. *Poult. Sci.*, 1989, **68**(6): 850 ~ 853.
- [18] Griffiths, R., B. Tiwari. The identification of sex in the Starling *Sturnus Vulgaris* using a molecular DNA technique. *Mol. Ecol.*, 1992, **1**(3): 191 ~ 194.
- [19] Trefil, P., M. M. Bruno, T. Micus *et al.* Sexing of chicken feather follicle cells, blood and blastodermal cells. *Folia Biologica*, 1999, **45**: 253 ~ 256.
- [20] Klein, S., F. Ellendorff. Analysis of chicken embryonic development after removal of blastodermal cells for sexing. *Br. Poult. Sci.*, 1998, **39**(4): 482 ~ 487.