

鸵鸟性别鉴定的分子标记方法

付晶 白秀娟*

(东北农业大学动物科技学院 哈尔滨 150030)

摘要: 鸵鸟 (*Struthio camelus*) 属于平胸总目鸟类,雌雄鸵鸟在性成熟前外部形态相同,很难通过外观和形态来鉴定性别,给早期分群饲养造成了很大的困难。实验利用鸵鸟羽毛提取基因组 DNA,之后利用 *EEO.6* 和 *CHD* 基因中 2 个引物组合对 3 对已知性别和 9 只未知性别鸵鸟的性别基因片段进行特异性扩增。结果显示,这对引物组合在雄性鸵鸟的 DNA 中未扩增出片段,在雌性鸵鸟 DNA 中扩增出 1 条片段,可以对鸵鸟的性别作出准确鉴定,从而解决幼雏期鸵鸟难以从外貌上区分其性别的问题。

关键词: 平胸鸟类;鸵鸟;性别鉴定;*EEO.6*; *CHD*

中图分类号:Q953 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2010)02-82-06

A Molecular Method for Sex Identification in the Ostrich (*Struthio camelus*)

FU Jing BAI Xiu-Juan*

(College of Animal Science and Technology, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: It is difficult to identify the sex of Ostrich (*Struthio camelus*) with morphological method before reaching sexual maturity, and this situation challenged the early feeding of Ostrich. In this study, genome DNA was extracted from feathers by using nondestructive sampling method and a combination of primer from one of *EEO.6* and the other of *CHD*. Sex gene sequences were amplified and compared among three pairs of sex-known birds and 9 sex-unknown birds. The results showed that male birds displayed no distinct amplification band, whereas one band was amplified for female ones. Thus the method could be used for sexing Ostrich before sexual maturity.

Key words: Ratite bird; Ostrich (*Struthio camelus*); Sex identification; *EEO.6*; *CHD*

鸵鸟 (*Struthio camelus*) 产于非洲,属鸵鸟目 (Struthioniformes) 鸵鸟科 (Struthionidae),是现存体形最大且不能飞行的鸟类。鸵鸟属于平胸总目鸟类之一,两性幼雏长得非常相像,甚至年轻的鸵鸟也相差很少,到目前为止在鸵鸟幼雏期仍无法从外貌分辨雌雄,这给早期分群饲养造成了极大的困难。

传统的性别鉴定方法^[1-3]都存在一定的局限性,例如致死性、主观影响大、过程繁琐、需要专门的技术设备等,不适合对大量的鸵鸟进行性别鉴定。目前非平胸总目鸟类的性别鉴定的分子生物学方法已见报道^[4-6],但平胸鸟类鸵

鸟性别鉴定的分子生物学方法只见 Huynen 等^[7]和 Bello 等^[8]的报道。Huynen 等^[7]采用 RAPD 标记,利用随机引物 K1 和 K7 对现存的平胸鸟类鸵鸟和鸬鹚 (*Dromaius novaehollandiae*) 进行了性别鉴定,雌性个体得到大约 350 bp 左右的条带。Bello 等^[8]也是用此种标记,先构建两个 DNA 池一个池是雄性鸵鸟混合基因组,另一个池是雌性鸵鸟混合基因组,然后用

* 通讯作者, E-mail: bxj630306@163.com;

第一作者介绍 付晶,女,博士研究生;研究方向:特种经济动物饲养;E-mail: fujing1999@163.com。

收稿日期:2009-08-05,修回日期:2009-12-23

随机引物对两个 DNA 池进行随机扩增多态性 DNA 检测,雌性鸵鸟得到特异性扩增片段,对该片段进行克隆测序,并根据得到的序列重新设计引物来验证鉴定结果的准确性。这种方法虽然能够区分鸵鸟的性别,但该标记需要筛选大量引物,工作量较大,且该标记要求的退火温度较低,实验重复性差,因此不适合用于大量鸵鸟的性别鉴定,并且不明确特异片段的序列组成,对进一步探讨平胸总目鸵鸟的性别分化没有明确的意义。到目前为止,通过扩增性别基因特异片段来鉴定平胸总目鸵鸟性别的文献还尚未见报道。因此,建立一种准确、简便和对鸵鸟伤害较小的性别鉴定方法非常必要。本实验采用非伤害取样方法,从鸵鸟羽毛中提取基因组 DNA 并从国内外目前用于鸟类性别分子鉴定的众多相关引物中,确定 1 对最佳引物组合,对鸵鸟性别基因的部分序列进行扩增,从而成功地对鸵鸟的性别作出鉴定,其结果与已知性别相吻合。

1 材料与方法

1.1 材料 样本取自哈尔滨市向前鸵鸟养殖基地,已知性别鸵鸟 6 只(3 雌 3 雄),未知性别鸵鸟 9 只。实验所用的样本均为被鉴定鸵鸟的羽毛。

1.2 试剂 PCR 试剂和 *rTaq* 酶,购自北京天根生物工程公司;胶回收(小量)试剂盒和质粒 DNA(小量)抽提试剂盒,购自哈尔滨海基生物公司;克隆载体 pMD18-T vector,购自 Promega 公司;转化宿主大肠杆菌株 JM109,由盖宁生物科技(北京)有限公司提供;氨苄青霉素,购自哈尔滨宝泰克公司;限制性内切酶 *EcoR* I、*Hind* III,购自大连宝生物工程有限公司。

1.3 引物 利用文献^[4,9-10]报道的鸟类性别鉴定的通用引物进行 18 种组合,引物组合、引物序列以及扩增结果见表 1。最终从 *EE0.6*^[9](0.6-EcoRI-fragment) 和 *CHD*^[10] 基因(chromohelicase-DNA-binding gene)中各筛选出 1 条引物来组合进行扩增,从而鉴定鸵鸟的性别,将这对引物称作有效引物,即表 1 中的引物组合 5

EE0.6f/1272H。在扩增每种引物组合时,2550F/2718R^[11]这对引物可以对雌性和雄性鸵鸟均扩增出相同的片段,因此将 2550F/2718R 这对引物称作验证引物,来鉴定雌性和雄性鸵鸟基因组的有效性,即表 1 中的引物组合 18。

1.4 方法

1.4.1 基因组 DNA 的提取 按照陈小麟^[11]提供的方法从鸵鸟的羽毛中提取基因组 DNA,检测纯度和浓度后,稀释成工作液(50 ng/ μ l),4℃保存备用。

1.4.2 PCR 扩增 PCR 扩增总体积为 25 μ l,其中灭菌水 14.2 μ l、10 \times buffer 2.5 μ l、dNTP (10 mmol/L) 2.0 μ l、镁离子 1 μ l,上下游引物 (10 pmol/L) 各 1 μ l、*rTaq* 聚合酶 0.3 μ l (2.5 U/ μ l)、DNA 模板 3 μ l。阴性对照的 PCR 体系中不加模板,除灭菌水以外的其他物质均按上述量添加,最终用灭菌水将总体积补充至 25 μ l。扩增反应在 PTC-200 型 PCR 仪上进行。

有效引物 *EE0.6f/1272H* 扩增程序:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 30 s,46.4℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 1 min,循环 33 次;72℃ 延伸 10 min。

验证引物 2550F/2718R 扩增程序:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 30 s,59.5℃ 退火 40 s,72℃ 延伸 40 s,循环 30 次;72℃ 延伸 8 min。

扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.4.3 验证实验 由于有效引物的扩增结果中雄性鸵鸟没有扩增出条带,一方面原因可能是该引物组合对 W 染色体上的特异性片段进行扩增,雄性不扩增,因此雌性会产生 1 条扩增带;另一方面如果有其他因素(如模板降解)导致 PCR 反应失败,则很可能造成性别误判。因此,为了证明雄性鸵鸟的基因组质量合格,可以用于 PCR 扩增,本实验增加了验证引物(该引物对雌性和雄性鸵鸟均能扩增出条带)对已知性别鸵鸟的基因组进行扩增的实验。

1.4.4 特异引物扩增产物的克隆测序 参考林宁^[12]的方法对特异性引物扩增产物进行克隆,提取的质粒经酶切鉴定确认后由北京华大生物技术有限公司测序。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequence

组合编号 Number	引物名称 Primer name	引物来源 Primer source	引物序列 Primer sequence	扩增结果 Results of PCR amplification
1	P8	<i>CHD</i>	5'-CTCCCAAGGATGAGGAATTG-3'	雌雄均为 1 条带
	1272H	<i>CHD</i>	5'-TCCAGAATATCTTCTGCTCC-3'2	
2	P3	<i>CHD</i>	5'-AGATATTCTGGATCTGATACTGA-3'	雌雄均为 1 条带
	P9	<i>CHD</i>	5'-TAAGGTCTGTCTCAGAYTTRTCNAC-3'3	
3	P3	<i>CHD</i>	5'-AGATATTCTGGATCTGATACTGA-3'	无扩增条带, 只有二聚体
	P14	<i>CHD</i>	5'-ACTTTTCCAATATGGATGAAGA-3'4	
4	P3	<i>CHD</i>	5'-AGATATTCTGGATCTGATACTGA-3'	雌雄均有多条带, 条带不明显
	1272H	<i>CHD</i>	5'-TCCAGAATATCTTCTGCTCC-3'5	
5	EE0. 6f	<i>EE0. 6</i>	5'CACCCTGGATTGGACAACCTATTTTC3'	雄性无扩增条带, 雌性扩增出 1 条带
	1272H	<i>CHD</i>	5'-TCCAGAATATCTTCTGCTCC-3'6	
6	P3	<i>CHD</i>	5'-AGATATTCTGGATCTGATACTGA-3'	雌雄均有多条带, 且带很弱
	1237L	<i>CHD</i>	5'-GAGAACTGTGCAAAACAG-3'7	
7	P3	<i>CHD</i>	5'-AGATATTCTGGATCTGATACTGA-3'	雌雄均有多条带, 且带很弱
	EE0. 6f	<i>EE0. 6</i>	5'CACCCTGGATTGGACAACCTATTTTC3'8	
8	P3	<i>CHD</i>	5'-AGATATTCTGGATCTGATACTGA-3'	雌雄均有多条带, 且带很弱
	EE0. 6r	<i>EE0. 6</i>	5'CACTCTTCCAGGAAATCAA3'9	
9	P3	<i>CHD</i>	5'-AGATATTCTGGATCTGATACTGA-3'	雌雄有相同的扩增带
	2550F	<i>CHD</i>	5'-GTTACTGATTCTGCTACGAGA-3'10	
10	P3	<i>CHD</i>	5'-AGATATTCTGGATCTGATACTGA-3'	无扩增条带
	2718R	<i>CHD</i>	5'-ATTGAAATGATCCAGTGCTTG-3'11	
11	P2	<i>CHD</i>	5'-TCTGCATCGCTAAATCCTTT-3'	无扩增条带
	1272H	<i>CHD</i>	5'-TCCAGAATATCTTCTGCTCC-3'12	
12	P9	<i>CHD</i>	5'-TAAGGTCTGTCTCAGAYTTRTCNAC-3'	雌雄均扩增 1 条带
	P14	<i>CHD</i>	5'-ACTTTTCCAATATGGATGAAGA-3'13	
13	P9	<i>CHD</i>	5'-TAAGGTCTGTCTCAGAYTTRTCNAC-3'	雌雄均扩增 2 条带
	1272H	<i>CHD</i>	5'-TCCAGAATATCTTCTGCTCC-3'14	
14	P9	<i>CHD</i>	5'-TAAGGTCTGTCTCAGAYTTRTCNAC-3'	雌雄均扩增出 1 条亮带及 2 条弱带
	1237L	<i>CHD</i>	5'-GAGAACTGTGCAAAACAG-3'15	
15	P9	<i>CHD</i>	5'-TAAGGTCTGTCTCAGAYTTRTCNAC-3'	无扩增条带
	EE0. 6f	<i>CHD</i>	5'CACCCTGGATTGGACAACCTATTTTC3'16	
16	P9	<i>CHD</i>	5'-TAAGGTCTGTCTCAGAYTTRTCNAC-3'	无扩增条带
	EE0. 6r	<i>EE0. 6</i>	5'CACTCTTCCAGGAAATCAA3'17	
17	P9	<i>CHD</i>	5'-TAAGGTCTGTCTCAGAYTTRTCNAC-3'	无扩增条带
	2550F	<i>CHD</i>	5'-GTTACTGATTCTGCTACGAGA-3'18	
18	2550F	<i>CHD</i>	5'-GTTACTGATTCTGCTACGAGA-3'	雌雄均扩增 1 条带
	2718R	<i>CHD</i>	5'-ATTGAAATGATCCAGTGCTTG-3'	

2 结 果

2.1 有效引物 PCR 产物电泳结果

2.1.1 有效引物对已知性别鸵鸟的鉴定 利用有效引物 EE0.6f/1272H 扩增已知性别的鸵鸟基因组 DNA 样本的结果见图 1。1~3 号是雄性个体,均未扩增出条带;4~6 号是雌性个体,扩增出 1 条带,片段大小是 750 bp 左右。此结果证明,这对有效引物能鉴别鸵鸟的性别,可用于鸵鸟的性别鉴定。

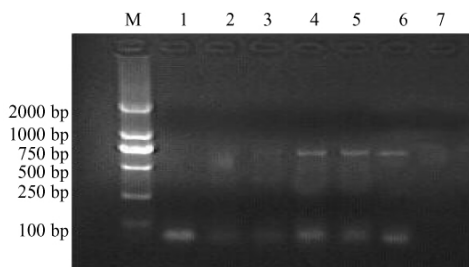


图 1 有效引物 EE0.6f/1272H 对已知性别鸵鸟 DNA 的 PCR 扩增结果

Fig.1 Results of PCR of effective primer EE0.6f/1272H in sex-known Ostrich

M: DL 2000 DNA 分子量标准; 1~3: 雄性;

4~6: 雌性; 7: 阴性对照。

M: DL 2000 DNA marker; 1-3: Male;

4-6: Female; 7: Control.

2.1.2 有效引物对未知性别鸵鸟的鉴定 利用有效引物 EE0.6f/1272H 对 9 只 5 月龄未知性别鸵鸟的基因组 DNA 样本进行 PCR 扩增,结果见图 2。个体 3、7、9 的扩增产物无条带,可以将其判定为雄性。2、4、5、6、8、10 的扩增产物为 1 条带,片段大小为 750 bp,可以将其判定为雌性。该鉴定结果与鸵鸟养殖基地 2 名技术人员在鸵鸟 9 月龄时利用翻肛鉴定的结果一致,进而说明了该鉴定结果的真实可靠性。

2.2 验证引物 PCR 产物电泳结果 利用引物 2550F/2718R 组合来扩增 2.1.1 中已知性别鸵鸟(雌、雄各 3 只)的 DNA(图 3)。雌雄鸵鸟均扩增出条带,说明雄性和雌性鸵鸟的基因组均是有效的。阴性对照没有出现条带,证明扩增产物真实可靠。

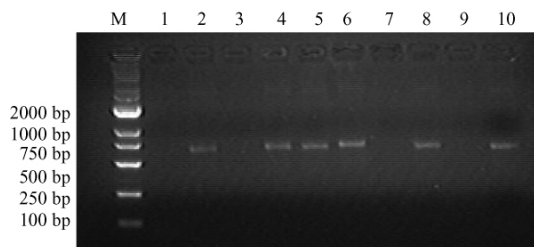


图 2 有效引物 EE0.6f/1272H 对未知性别鸵鸟 DNA 的 PCR 扩增结果

Fig.2 Results of PCR of effective primer EE0.6f/1272H in sex-unknown Ostrich

M: DL 2000 分子量标准; 1: 阴性对照;

3,7,9: 雄性; 2,4,5,6,8,10: 雌性。

M: DL 2000 marker; 1: Control; 3,7,9: Male;

2,4,5,6,8,10: Female.

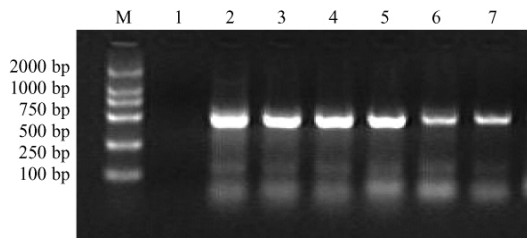


图 3 引物 2550F/2718R PCR 扩增结果

Fig.3 Results of PCR of primer 2550F/2718R

M: DL 2000 DNA 分子量标准; 1: 阴性对照;

2~4: 雄性; 5~7: 雌性。

M: DL 2000 DNA marker; 1: Control;

2-4: Male; Lane 5-7: Female.

2.3 重组质粒酶切鉴定 将 2.1.1 中 PCR 产物进行克隆并提取质粒。为了验证回收质粒确为插入目的片段的重组质粒,采用双酶切法鉴定。将质粒 DNA 经 *Eco*R I 和 *Hind* III 双酶切后电泳分析,得到两条带(图 4)。一条 2 kb 左右的条带与 pMD18-T 大小一致,另一条 710 bp 左右的条带与预期的目的片段大小相符,证实得到插入有目的片段的 pMD18-T 阳性克隆,可以对重组质粒进行测序。

2.4 序列测定结果 重组质粒经北京华大公司测定,鸵鸟性别基因部分序列的长度为 713 bp,序列见图 5。现已将该序列提交到 GenBank (Accession No: GQ148555)。

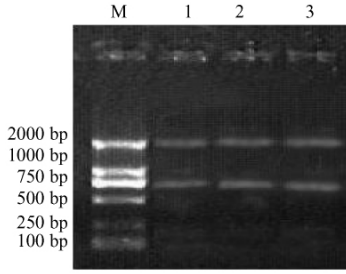


图 4 质粒酶切结果

Fig. 4 Results of plasmid enzyme digestion

M: DL 2000 DNA 分子量标准; 1~3: 酶切结果。

M: DL 2000 marker; 1-3: Result of enzyme digestion.

```
TCCAGAATATCTTCTGCTCCTGGGAACAGGCCAAGACAAGCTGTTATTTACTCAAGACAAGATTATAAAGTTGC
AGCTAAGCCACAGTGACAGGTTATCTCCATTCTACCTGAGAAGTCTCTGGGGATAGTTACCGTAAACTTTGATG
AGCCACTAGAGATGAGGATTTTCTGTCACCTGAAGGACAGCAGCTATCCCTCAGTTCCTCTTTTATGACATTG
GCTTAAATGAAGACGTCCTGCAAACATATGTCCTTTGTGTAGCCCCGGGGCCTTCATATCTTTTGCCAAAAGGCA
AGTATTTTCCAAATGAGACATGCAAACACTGCGGAGTGTACTGAGAGTCTAAGTATTATTGCTGAAAAAAA
GGAGAATGCCAGAAAGAAATCAAACAACATTGATTTATGCAGCATGATATTTGTCAATAAAATATTTTATTGGA
GGAAAGAAATACAAAGCTGTTATTCCACTCACAGAAGTAGTAAATGCAAAATTAAGAAATCGCTCCTGCAAG
ACAGTGGATAACTTGATTTCTATCAATATTCCTGTTAAATTAATTGTTGGATATAATCTCACAAAGCTGCAAGAA
TACTTAGAAAAAATGAAAGTGGTCTGTTTTAAATAAAAGCTATTGCTGCACTGGACTAACAAAATTCTAGAC
TTTTTGTAGAGAACTGAGAAATAGGTTGTCCAATCCAGGGT
```

图 5 鸵鸟性别基因部分序列

Fig. 5 Part sequences of sex gene in the Ostrich

(*Crossoptilon mantchuricum*) *CHD-2* 基因部分序列 (Accession No: EU515130) 同源性为 100%。据此可以推论, 所测得的 DNA 序列可能与鸵鸟的性别决定相关。

3 讨论

鸟类的基因型为 ZW 型 (雌性为 ZW, 雄性为 ZZ)。目前用于性别鉴定的性别连锁基因主要有 *CHD* 和 *EEO. 6*。

1995 年 Griffiths 和 Tiwari 首次发现了与 W 染色体连锁的 *CHD-W* 基因, 全称为染色体螺旋蛋白基因 (chromobox-helicase-DNA binding gene) [13]。随着研究的不断深入, 发现鸟类的 *CHD* 基因位于性染色体上, 非常保守, 是一个功能性基因。它编码一个有关调节整个染色体水平上转录活性的蛋白, 在非平胸鸟类中有两个同源拷贝 *CHD-W* 和 *CHD-Z*, 其中 *CHD-W* 为

2.5 鸵鸟性别基因部分核苷酸序列的同源比较

将所测序列通过 GenBank 中的 Blast 比较分析, 表明鸵鸟性别基因的部分序列与鹧鸪的 W 染色体上相应部分基因片段 (Accession No: FJ807675) 的同源性为 100%; 与丹顶鹤 (*Grus japonensis*) 的 *SRY* 基因部分序列 (Accession No: AY114731) 的同源性为 100%; 与东方白鹳 (*Ciconia boyciana*) W 染色体部分序列 (Accession No: D85617) 同源性为 100%; 与野鸽 (*Columba livia*) W 染色体部分序列 (Accession No: FJ598049) 同源性为 100%; 与褐马鸡

W 连锁, *CHD-Z* 为 Z 连锁。两者的外显子序列和大小相似, 内含子大小却有很大差别 [14]。根据在 *CHD-Z*、*CHD-W* 基因中内含子大小的不同, 雌性为 ZW 型, 雄性为 ZZ 型, 因此在 PCR 扩增产物电泳检测时, 雌性为 2 条带, 雄性为 1 条带。Griffiths 利用 *CHD* 基因的引物 P₂ 和 P₈ 对鸡形目等 18 个目的 28 种鸟类进行了性别鉴定, 其中只有平胸鸟类中的鸵鸟不能作出正确的判断, 从而断定此方法对非平胸鸟类具有广适性 [15]。田秀华等运用 *DHD* 基因中 2550F 和 2718R 这对引物成功对 7 种鹤形目鸟类的性别进行了分子鉴定 [10]。

EEO. 6 是从鸡的 W 染色体克隆而来, 长度大约为 0.6 kb, 在 Z 染色体上也有一段同源序列, 但序列差异较大 [16], 因此, 设计相应的引物进行 PCR 扩增, 雌性的扩增电泳图将产生一条带, 而雄性则不产生条带。1997 年 Itoh 等人利

用 *EEO.6* 序列成功地鉴别了东方白鹳的性别^[17], 结果为雌性的扩增电泳图将产生一条 300 bp 左右的条带, 而雄性则不产生条带。这一方法简单易行, 但存在无法克服假阴性的问题, 使得鉴别的准确率降低。2006 年咎树婷等人改进了这一方法, 通过增加了一对引物扩增 *EEO.6* 在 Z 染色体上的同源序列^[18], 克服了假阴性的问题, 但这一方法目前也只应用于东方白鹳, 是否具有较高的通用性还待进一步的研究。扩增 *EEO.6* 基因片段的性别鉴定方法适用于许多鸟类。

鸵鸟是平胸总目鸟类, 单独用 *EEO.6* 基因的引物或 *CHD* 基因的引物对其性别基因进行扩增均不能鉴别鸵鸟的性别。本实验利用非伤害性取样方法, 从鸵鸟羽毛中提取了基因组 DNA, 利用 *EEO.6* 基因引物和 *CHD* 基因的引物进行 18 种组合, 最终通过扩增引物 *EE0.6f* 和 *1272H* 的组合, 成功地鉴定了鸵鸟的性别, 得到的结果是雌性鸵鸟扩增出一条带, 而雄性鸵鸟无扩增条带。这与 Itoh^[17] 等人用 *EEO.6* 序列鉴定东方白鹳的结果相似, 可能是因为本实验的引物中有一条来自于 *EEO.6* 序列。但是, 这种方法也存在着缺陷, 在操作过程中可能会因为加样、点样等问题或由于环境方面的原因, 导致电泳图不出现条带而错误地将样本判断为雄性。因此, 必须验证雄性和雌性鸵鸟基因组 DNA 的有效性, 以增加检测的准确性。对有效引物 PCR 扩增得到的条带进行克隆测序, 得到了一条 713 bp 的片段。该序列与一些鸟类的性别决定基因的部分序列同源性很高, 说明该序列在物种进化过程中保守性很高。但单独用 *EEO.6* 基因引物或 *CHD* 基因的引物又鉴定不出鸵鸟的性别, 这说明鸵鸟是比较特殊的一种鸟类, 它的进化路线是否不同于其他鸟类, 这还有待于进一步研究。

参 考 文 献

[1] 燕海峰, 肖兵南, Pavel T, 等. 家禽的性别鉴定方法. 动物学杂志, 2001, 36(6): 58-61.
[2] 李刚, 杨水云, 周航, 等. 鸟类性别鉴定技术研究进展.

动物学杂志, 2003, 38(5): 106-108.

- [3] 刘忠诚, 冯新畅. 鸵鸟性别的鉴定方法. 黑龙江畜牧兽医, 1998, 9: 32.
[4] 刘铸, 白素英, 田秀华. *CHD* 基因与非平胸鸟类性别鉴定. 生物技术通报, 2006, (增刊): 147-150.
[5] 江杉, 陈小麟. 扩增性别基因片段的鹭类性别鉴定方法的研究. 厦门大学学报: 自然科学版, 2006, 45(5): 152-155.
[6] 周鑫, 杨楠, 岳碧松, 等. 利用 PCR 鉴定四川雉鹑性别. 四川动物, 2008, 27(4): 645-647.
[7] Huynen L, Millar C D, Lambert D M. A DNA test to sex ratite birds. Mol Ecol, 2002, 11(4): 851-856.
[8] Bello N, Sanchez A. The identification of a sex-specific DNA marker in the ostrich using a random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay. Mol Ecol, 1999, 8(4): 667-669.
[9] 江杉. 鹭科鸟类性别鉴定方法及白鹭和黄嘴白鹭雏鸟种群性别比例的研究. 厦门: 厦门大学硕士学位论文, 2007.
[10] 田秀华, 刘铸, 何相宝, 等. 七种鹤形目鸟类性别的分子鉴定. 动物学杂志, 2006, 41(5): 62-67.
[11] 陈小麟, 麻常听, 李琪. 鸟类陈旧标本 DNA 提取方法的研究. 厦门大学学报: 自然科学版, 2008, 12(增刊 2): 1-5.
[12] 林宁, 白秀娟. 水貂多巴胺受体 D2 基因的克隆测序及外显子区多态性检测. 经济动物学报, 2008, 12(1): 13-17.
[13] Griffiths R, Tiwari B. Sex of the last wild Spix's macaw. Nature, 1995, 375: 454.
[14] Griffiths R, Daan S, Dijkstra C. Sex identification in birds using two *CHD* genes. Proc R Soc Lond B Biol Sci, 1996, 263(1374): 1251-1256.
[15] Griffiths R, Tiwari B. The isolation of molecular genetic markers for the identification of sex. PNAS, 1993, 90(18): 8324-8326.
[16] Ogawa A, Irina S. Molecular characterization and cytological mapping of non-repetitive DNA sequence region from the W chromosome of chicken and its use as a universal probe for sexing Carinatae birds. Chromosome Research, 1997, 5: 93-101.
[17] 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.
[18] 咎树婷, 周立志, 江浩, 等. 东方白鹳 *EE0.6* 基因及性别鉴定. 华东地区 2006 年动物学术研讨会论文集, 2006, 254-259.