

家畜早期胚胎性别鉴定技术的研究进展

曾玉峰 阎萍 郎侠 (中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所, 甘肃兰州 730050)

摘要 从家畜性别控制的主要途径、早期胚胎性别鉴定主要方法以及在畜牧生产中的应用等方面, 详细论述了各技术的基本原理、研究概况及存在问题, 并对发展前景提出设想。

关键词 胚胎; 性别鉴定; 研究进展

中图分类号 S852 .1 文献标识码 A 文章编号 0517 - 6611(2008) 22 - 09552 - 02

Research Advance on Sex Identification for Early Embryos in Domestic Animals

ZENG Yu feng et al (Lanzhou Institute of Animal & Veterinary Pharmaceuticals Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou, Gansu 730050)

Abstract Basic principle, studying status and problems existed in sex controlling in domestic animals were discussed particularly in respect of main approach, method of identification for early embryos in domestic animals and application in animal husbandry. In addition, the tentative plan for developmental prospect was put forward.

Key words Embryo; Sex identification; Research advance

性别控制是指通过人为干预使雌性动物按人们的意愿繁殖所需性别后代, 建立优化商品畜群, 以提高生产性能和经济效益的一整套技术。采用这一技术, 可以充分发挥母畜的繁殖潜力和公畜的生长优势, 进而提高畜牧业的经济效益; 可以排除畜群中有害基因或基因型, 防止性连锁疾病; 可以提高优良畜群的繁殖速度, 加快畜群的更新换代, 促进新品种选育。随着科学技术的发展, 性别决定和性别控制的研究已成为当今生物技术的一项重要内容。

1 家畜性别控制的主要途径

目前, 哺乳动物性别控制技术有3种: 人工授精前主要通过免疫学方法或流式细胞分类法分离X精子和Y精子, 以控制性别; 通过控制精子的受精环境来控制性别; 在胚胎移植前对早期胚胎的性别进行鉴定, 以控制性别。目前, 在前2种尚未取得完全成功的情况下, 胚胎的性别鉴定成为性别控制的主要途径。家畜胚胎的性别鉴定技术是家畜胚胎移植技术的一项重要内容, 是新的更高的目标之一。

2 家畜早期胚胎性别鉴定方法及研究进展

2.1 胚胎性别鉴定方法

2.1.1 细胞遗传学方法。细胞遗传学方法主要是指通过核型分析对胚胎进行性别鉴定, 即通过查明胚胎细胞的性染色体类型(XX型或XY型)来鉴定胚胎性别。这是在经典的胚胎性别鉴定的基础上发展起来的一种性别鉴定方法。其鉴别程序一般是取少量胚胎细胞进行活体细胞分析, 利用乙酰氨基秋水仙碱阻止有丝分裂, 经固定染色, 得到处于分裂中期的染色体分布相。该法的优点是准确率可达100%, 但采集细胞会伤害胚胎, 而且获得高质量的中期染色体相当困难, 不适用于实际生产, 目前主要用来验证其他性别鉴定方法的准确率^[1]。

2.1.2 免疫学方法。免疫学方法是利用HY抗血清或HY单克隆抗体检测胚胎上是否存在雄性特异性HY抗原, 从而进行胚胎性别鉴定的一种方法。胚胎的HY抗原检测方法

有细胞毒性分析法、间接荧光免疫法和囊胚形成抑制法3种^[2]。该方法操作相对简便, 可应用于商业生产, 胚胎可鉴别比率很高, 但其准确率一直是一个人们难以逾越的障碍。另外, 由于HY抗原是弱抗原, 在操作过程中观察人员的主观影响很大, 因而结果误差大, 在实际生产中目前还难以实行。

2.1.3 生物化学方法。生物化学方法是指通过测定早期胚胎X染色体相关的酶活性来鉴定胚胎性别的一种方法。在哺乳动物中, 同型配子组成的胚胎有2条X染色体, 其中一条染色体会在胚胎早期失活。研究显示, X染色体的失活与胚胎基因组启动之间存在明显的间隙。因此, 在一个细胞中, 与X染色体相联系的酶的活性、浓度在雌性胚胎中是雄性胚胎的2倍。据此, 将X连锁酶的底物、辅酶和指示剂与早期胚胎一起孵育, 根据胚胎着色的深浅进行分类, 从而鉴定胚胎的性别。

2.1.4 分子生物学方法。分子生物学方法是新发展起来的一种利用雄性特异性基因探针和PCR扩增技术来鉴别家畜性别的方法。其实质是检测Y染色体上的SRY基因有无来判断雌雄, 有则判为雄性, 无则判为雌性。采用分子生物学方法鉴定家畜胚胎性别是20世纪80年代后期才开始的, 目前已被国内外研究人员广泛应用于家畜, 尤其是牛胚胎的性别鉴定。其主要方法有雄性特异性DNA探针检测法、PCR扩增DNA片段检测法、PCR扩增SRY法等。PCR法具有灵敏度高(单个细胞即可检测)、准确率高(达95%以上)、快速、操作简便等优点, 但灵敏度高又是该技术的缺点。PCR过程极易遭到污染而造成假阳性(或假阴性), 影响鉴定的准确性。尽管如此, PCR法仍是目前最理想的性别鉴定方法。

2.2 性别鉴定技术研究进展 早在1902年, M Curg在研究蝗虫精细胞时, 首先提出性别决定的染色体理论。1910年Guyer首先发现哺乳动物性染色体以及人们认识到以精子染色体内含物为基础测定哺乳动物性别以来, 人们对精子的处理产生了极大的兴趣。Lush是最早研究性别控制的科学家之一^[3]。1923年Painter证实了人类X和Y染色体的存在^[4]。1944年Avery等发现DNA是遗传信息的携带者^[5]。1959年Welshons等提出Y染色体决定雄性的理论^[6-7]。20世纪60年代后期流动细胞仪问世, 使人们更有兴趣致力于新的、快

基金项目 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目 (BRF060101)。

作者简介 曾玉峰(1979-), 男, 甘肃兰州人, 硕士, 助理研究员, 从事动物遗传育种与繁殖方面的研究。

收稿日期 2008-05-19

速的单一细胞测定技术的研究。1976年, Gedhill 等首先利用流动细胞仪测定X精子和Y精子的DNA, 以确定可能由于各种环境因素导致基因损害而引起的改变^[8]。1979年, Mruzi 提出以DNA为性别选择的一种潜在标志, 通过对多种动物精子染色体长度的测定, 发现X精子和Y精子中的DNA含量都存在差异^[9]。1986年, Johnson 等改良了普通的流动细胞仪, 使其专门适用于分离活精子。所有这些研究为今后最终利用改良的流动细胞检索仪分离X精子和Y精子打下了基础^[10]。1989年, Johnson 等首先报道用流动细胞仪成功地分离兔子活的X精子和Y精子, 并用分离的精子受精产下后代以后, 这一技术的研究取得了突破性和实质性的进展^[11]。随后, 在牛^[12]、猪^[13]、羊^[14]和人^[15]方面的研究都相继取得成功, 至今已产下了数以千计的预选性别的后代。Leonard 取牛胚胎滋养层细胞与牛Y染色体特异性DNA探针进行原位杂交处理, 采用免疫细胞学技术检测, 性别鉴定的准确率达95%以上^[16]。

1966年, Jacobs 等发现雄性决定因子位于Y染色体短臂上。Jost 等对兔胚胎阉割后的试验表明, 胚胎中睾丸组织的存在是促使雄性性状发育或阻止雌性性状发育的必需物质, 同时Y染色体同源区存在性别决定的主导信息, 具有编码睾丸形成诱导物的特异序列, 因此将这一区域的基因定名为睾丸决定因子(TDF)^[17]。于是, 人们集中在Y染色体上寻找决定雄性性别的负责睾丸分化的睾丸决定因子。1990年, Page 等对一个有Y染色体但与22号染色体易位表现为女性患者的研究发现, 这是由Y染色体上1A区缺失所致。因此, 将TDF定位于Y染色体的1A亚区的第一小区。同年, Sndair 等发现在哺乳动物Y染色体上存在SRY基因, 编码79个氨基酸。它所编码的这个氨基酸序列高度保守。在转基因小鼠的研究中, 成功地将包含有SRY基因的14 kb Y染色体片段通过显微注射导入XX雌性受精卵, 使这种整合了SRY基因的转基因小鼠实现了性反转, 其大小、体重、交配行为与正常XY雄性无异, 由此证明了SRY基因为哺乳动物的性别主宰基因。SRY序列的发现是哺乳动物性别控制理论的重大突破^[18]。Herr 首先采用PCR技术扩增Y染色体特异多重序列鉴定了牛、羊等家畜胚胎性别, 准确率分别达到91.6%和96.5%^[19]。1991年曾溢涛等首先应用DNA测序法直接测序得到牛SRY基因的核心序列, 同时设计合成了仅特异于牛SRY基因的2对PCR寡核苷酸引物, 用17枚(4枚全胚、11枚切割胚样、2枚三分胚) 奶牛胚胎进行性别鉴定, 性别符合率达100%, 产下的牛犊性别也与鉴定结果一致^[20]。1994年罗应荣等采用PCR扩增牛羊Y染色体, 检测牛羊性别, 准确率达80%^[21]。1995年, 欧阳红生等用PCR技术对牛胚胎性别进行鉴定, 准确率均达到100%^[22]。近年来国内外许多研究人员致力于PCR技术的研究和应用, 为不断提高检测的准确性和灵敏度, 对PCR技术进行了调整和改进。

3 家畜早期胚胎性别鉴定技术在畜牧生产中的应用

家畜早期胚胎的性别鉴定已有几十年的发展历史。从早期的免疫学方法到胚胎细胞的染色体核型分析, 已取得了巨大的发展, 但真正进入实用化阶段是PCR技术在牛早期胚胎性别鉴定中的应用^[23]。1999年在中国工程院院士旭日干

教授领导下, 我国研究人员将国外生产的良种肉牛试管冷冻胚胎通过PCR性别控制技术进行性别鉴定, 然后将已确定性别的胚胎移植给受体母牛, 性别鉴定的准确率达100%^[24]。2000年上海市医学遗传研究所曾溢滔院士和黄淑祯教授首次应用PCR技术检测奶牛胚胎的SRY基因, 成功进行了奶牛和山羊冷冻胚胎的SRY基因检测和选择移植, 从而大大提高胚胎性别鉴定的实用性。为了提高动物胚胎鉴定技术的实用性, 促进其产业化, 课题组进一步建立了试管牛和试管羊胚胎性别鉴定和胚胎移植的新技术。以27枚试管牛胚胎和207枚试管羊胚胎进行性别鉴定, 然后选10枚经性别鉴定的牛胚胎移植于8头受体母牛以及用124枚已鉴定好的羊胚胎移植于44头受体母羊, 移植后妊娠率分别达37.5%和64.1%, 分娩、流产后的牛犊、羊羔的性别与胚胎性别鉴定的结果完全一致^[25]。2003年陈从英等用巢式PCR和常规多重PCR对奶牛胚胎进行性别鉴定, 发现巢式PCR更灵敏, 特异性更好^[23]。2003年曹越等建立了全套式PCR对牛胚胎性别鉴定的方法, 用于检测牛早期胚胎性别, 采用2对引物双扩增, 增大了检测反应的唯一性和准确性, 方法全程2h左右, 使胚胎离体时间缩短, 对提高移植成功率极为重要^[26]。

从目前的性别决定理论分析, 流式细胞器分类法和SRY-PCR扩增法是准确而且发展前景广阔的2种性别控制方法。但是, 前者由于分离速度太慢而影响其在生产中的应用。运用SRY-PCR技术鉴定胚胎性别, 关键在于提高灵敏度, 减少细胞取样对胚胎的损伤, 同时需要加快研制各种家畜的SRY-PCR试剂盒, 使该方法的操作简单而且实用。但是, PCR技术在灵敏度高的同时, 易污染, 易扩增异源物质。所以, 通过寻找新的胚胎特异性的抗原, 制备高效价的抗体, 有可能提供一种简单、准确、低成本的方法, 以促进性别控制技术在畜牧业的广泛应用^[27]。

4 结语

哺乳动物特别是家畜性别的人为控制一直是人们梦寐以求的愿望。性别控制与人工授精、胚胎移植和胚胎切割及冷冻保存技术的联合使用, 可以使各饲养管理单位按生产所需进行畜种繁殖, 减少因自然出生性别比率问题而导致影响生产问题的出现, 加快生产规模、生产效益的增长, 还可以加速濒危动物、珍稀动物的繁殖和保种进程。与此同时, 可以使分子生物技术作为有效的辅助手段走上商业化、产业化的道路。因此, 家畜性别控制技术是一项值得探索的生物繁殖技术, 具有巨大的利用价值^[28]。

参考文献

- [1] 梁子安, 杨玉霞. 论哺乳动物性别控制[J]. 高等函授学报: 自然科学版, 2000, 13(5): 58-60.
- [2] 田万强, 魏红芳, 咎林森. 家畜早期胚胎性别鉴定方法在畜牧业中的应用[J]. 黄牛杂志, 2001, 27(5): 43-46.
- [3] GUYER MF. Accessory chromosomes in man[J]. *Bd Bull Marine Bd Lab*, 1910, 19: 219.
- [4] PAINTER T S. Studies in mammalian spermatogenesis[J]. *J Exp Zool*, 1923, 37: 291.
- [5] 卢克焕. 哺乳动物性别控制研究进展[J]. 中国兽医学报, 2002(22) 4: 411-414.
- [6] WELSHONS WJ. They chromosome as the bearer of the male determining factors in the mouse[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1959, 5: 560-566.
- [7] JACOBS P A. A case of human intersexuality having a possible XY sex determining mechanism[J]. *Nature*, 1959, 183: 302-303.

品测5次,根据计算公式,求出每100g干珍珠花中所含粗脂肪的含量。由表3可见,每100g珍珠花中粗脂肪含量仅为1.95g,是一种低脂佳蔬。

表2 珍珠花中可溶性糖含量

Table 2 Soluble sugar content in *S. bumalda*

编号 Code	样重 g Sample weight	吸光度 Absorbency	糖含量 g/100g Sugar content	相对标准偏差 % Relative standard deviation
1	2.000 0	0.431	9.27	
2	2.000 0	0.432	9.29	
3	2.000 0	0.428	9.20	0.357
4	2.000 0	0.429	9.23	
5	2.000 0	0.430	9.25	

表3 珍珠花中粗脂肪含量

Table 3 Crude fat content in *S. bumalda*

编号 Code	样重 g Sample weight	M ₁ g	M ₂ g	脂肪含量 g/100g Fat content	相对标准偏差 % Relative standard deviation
1	2.000 0	3.308 1	3.269 1	1.95	
2	2.000 0	3.302 3	3.263 3	1.95	
3	2.000 0	3.316 0	3.267 2	1.94	0.628
4	2.000 0	3.342 1	3.302 7	1.97	
5	2.000 0	3.341 6	3.302 8	1.94	

2.4 总灰分含量 利用高温灼烧法测定总灰分含量,空坩埚质量为 M₀,样品加空坩埚质量为 M₁,残灰加空坩埚质量

为 M₂。样品测5次,根据计算公式,求出每100g干珍珠花中所含总灰分的含量。由表4可见,每100g珍珠花中总灰分含量为4.22g,分析可知矿质元素的含量较高。

表4 珍珠花中总灰分含量

Table 4 Total ash content in *S. bumalda*

编号 Code	M ₀ g	M ₁ g	M ₂ g	灰分含量 g/100g Ash content	相对标准偏差 % Relative standard deviation
1	31.100 1	36.100 1	31.311 6	4.23	
2	30.960 1	35.960 1	31.171 5	4.23	
3	38.014 6	43.014 6	38.224 5	4.20	0.379
4	32.613 5	37.613 5	32.825 4	4.24	
5	31.378 9	36.378 9	31.589 4	4.21	

3 结论

珍珠花营养成分的测定结果为每100g干珍珠花中粗蛋白质含量为34.94g,可溶性糖含量为9.25g,粗脂肪含量为1.95g,总灰分含量为4.22g。由此可见,珍珠花是一种粗脂肪含量低,可溶性糖含量适当,蛋白质和总灰分含量高的蔬菜。目前人们都讲究食用低脂肪、高蛋白质和富含矿质元素的天然食品。因此,珍珠花可以开发成为一种优良的野生蔬菜和健美食品。

参考文献

(上接第9553页)

- [8] GLEDHILL B L, LAKES S, STEINMEIZ L L, et al. Flow microfluorometric analysis of sperm DNA content: effect of cell shape on the fluorescence distribution [J]. *J Cellular Physiol*, 1976, 87: 167 - 176.
- [9] MORUZZI J F. Selecting a mammalian species for the separation of X and Y chromosome-bearing spermatozoa [J]. *J Reprod Steril*, 1979, 57: 319 - 323.
- [10] JOHNSON L A, HINKEL D. Modification of a laser-based flow cytometer for high resolution DNA analysis of mammalian spermatozoa [J]. *Cytometry*, 1986, 7: 268 - 273.
- [11] JOHNSON L A, FLOOK J P, HAWK H W. Sex predilection in rabbits: Live birth from X and Y sperm separated by DNA and cell sorting [J]. *Biol Reprod*, 1989, 41: 199 - 203.
- [12] CRAN D G, JOHNSON L A, POLGE C. Sex selection in cattle: A field trial [J]. *Vet Rec*, 1995, 136: 495 - 496.
- [13] JOHNSON L A. Sex selection in swine: Altered sex ratio in offspring following surgical insemination of flow sorted X and Y bearing spermatozoa [J]. *Reprod Domestic Anim*, 1991, 26: 309 - 314.
- [14] CRAN D G, MCKELVEY W A C, KING M E, et al. Production of lambs by low dose intrauterine insemination with flow cytometrically sorted and unsorted sperm [J]. *Theriogenology*, 1997, 47: 267.
- [15] FUGGER E F. Clinical experience with flow cytometric separation of human X and Y chromosome bearing sperm [J]. *Theriogenology*, 1999, 52: 1435 - 1440.
- [16] LEONARD M, KIRSZENBAUM M, COHENOT C, et al. Sexing bovine embryos using Y chromosome specific DNA probe [J]. *Theriogenology*, 1987, 27(1): 248 - 249.
- [17] 乌达巴拉. 哺乳动物性别鉴定方法的比较研究 [D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2005.
- [18] SINCLAIR A H, BERTA P, PALMER M S, et al. A gene from the human sex determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA binding motif [J]. *Nature*, 1990, 346: 240 - 246.
- [19] HERR C M, REED K C. Micromanipulation of bovine embryos for sex determination [J]. *Theriogenology*, 1991, 35(1): 45 - 54.
- [20] 曾溢滔, 胡明信. 应用聚合酶反应(PCR)扩增牛Y染色体的性别决定区(SRY)进行奶牛胚胎性别鉴定 [J]. *科学通报*, 1992, 37(5): 479 - 480.
- [21] 罗应荣, 刘云海, 朱化彬, 等. 应用聚合酶链式反应鉴定奶牛胚胎性别和移植试验 [J]. *中国畜牧杂志*, 1994, 30(2): 32 - 37.
- [22] 欧阳红生. 用PCR鉴别牛胚胎性别的研究 [J]. *中国兽医学报*, 1995, 15(2): 112 - 155.
- [23] 陈从英, 黄路生, 陈静波, 等. 牛早期胚胎性别鉴定PCR反应体系的优化研究 [J]. *畜牧兽医学报*, 2003, 34(3): 209 - 212.
- [24] 张锁链, 仓明, 旭日干. 牛体外受精胚胎移植的应用研究 [J]. *内蒙古大学学报: 自然科学版*, 2000, 31(4): 410 - 413.
- [25] 黄淑桢, 陈美珏, 黄英, 等. 试管牛和试管羊胚胎性别的鉴定 [J]. *遗传*, 2000, 22(2): 65 - 68.
- [26] 曹越, 杨应忠, 魏亚萍, 等. 建立全套式PCR对牛胚胎性别鉴定的方法 [J]. *黄牛杂志*, 2003, 29(4): 8 - 10.
- [27] 马峻, 裴轶劲, 季维智. 哺乳类性别控制的实践与进展 [J]. *动物学研究*, 2002, 23(2): 161 - 165.
- [28] 张明, 卢克焕. 用分离精子进行性别控制研究的现状 [J]. *中国生物工程杂志*, 2003, 23(7): 57 - 61.