

# PCR 扩增 Sry 基因进行鲸类动物性别的鉴定

王加连<sup>1</sup> 杨光<sup>1\*</sup> 周开亚<sup>1</sup> 魏辅文<sup>2</sup> 严洁<sup>1</sup>

(1 南京师范大学生命科学学院遗传资源研究所, 南京, 210097) (2 中国科学院动物研究所, 北京, 100080)

**摘要:** 哺乳动物 Y 染色体短臂上的 Sry 基因决定雄性发育方向。本研究参照哺乳动物 Sry 基因保守区序列设计引物, 以非性别特异性的线粒体 DNA 细胞色素 *b* 基因作为阳性对照, 用 PCR 扩增江豚、长喙真海豚等鲸类动物的 Sry 基因片段并对其进行凝胶电泳分析来鉴定鲸类动物的性别。通过此方法对 87 个已知性别鲸类动物标本的检验, 结果完全正确, 并进一步应用此方法成功地完成了另外 33 个未知性别鲸类标本的性别鉴定。由此建立了一套简单、快速、可靠的鲸类动物的性别鉴定方法。

**关键词:** PCR; Sry 基因; 性别鉴定; 鲸类动物

中图分类号: Q74

文献标识码: A

文章编号: 1000 - 1050 (2005) 01 - 0020 - 04

## Sex Identification of Cetaceans by PCR with Sry-Specific Primers

WANG Jialian<sup>1</sup> YANG Guang<sup>1\*</sup> ZHOU Kaiya<sup>1</sup> WEI Fuwen<sup>2</sup> YAN Jie<sup>1</sup>

(1 Institute of Genetic Resources, College of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing, 210097, China)

(2 Institute of Zoology, the Chinese Academy of Science, Beijing, 100080, China)

**Abstract:** Sex-determining region Y (Sry) gene located in the short arm of the mammalian Y chromosome directs the sexual development of male. In this study, a 221-bp fragment of cetacean Sry genes was amplified by polymerase chain reaction (PCR) through a pair of primers designed based on the conserved region of other mammalian Sry genes. Eighty seven sex-known cetacean specimens in Nanjing Normal University were accurately determined sex with the simultaneous amplification of mitochondrial DNA cytochrome *b* (*cyt b*) gene fragments as positive control, which proved the efficiency of the present molecular technique. The established molecular method was applied to sex eighteen finless porpoises *Neophocaena phocaenoides*, two bottlenose dolphins *Tursiops truncatus*, three indo-pacific bottlenose dolphins *T. aduncus*, three baiji *Lipotes vexillifer*, five striped dolphins *Stenella coeruleoalba*, and two pantropical spotted dolphin *S. attenuata*. This study provided a simple, rapid, and accurate approach for cetacean sex identification.

**Key words:** PCR; Sry gene; Sex identification; Cetacean

传统的性别鉴定是依靠动物的行为和外部形态特征, 如雌性动物的育幼行为、雌雄动物的体型和毛色差异、有无角等 (徐艳春等, 2000), 方法虽然简便、直观, 但对于雌雄个体差异不明显的动物或者动物胚胎, 以及一些不完整的或外部性别鉴别特征缺失标本, 则难以鉴别。

近年来, 随着细胞生物学和分子生物学技术的发展以及性别决定机理研究的深化, 人们开始在细胞水平上和分子水平上探索动物性别鉴定的方法。

哺乳动物在发育期的性腺分化主要依赖于雄性特有的 Y 染色体 (Cooke, 1990), 所以探查 Y 染色体的存在与否可作为哺乳动物性别鉴定的一种手段。人们通过荧光标志法用特定染色剂盐酸阿的平对哺乳动物的细胞进行染色, 雄性动物细胞核内的 Y 染色体能与染色剂结合, 从而形成一个明亮的荧光点, 因而可根据细胞荧光点的有无获知 Y 染色体是否存在, 进而判别动物性别 (孙言文, 1994)。然而, 直接对 Y 染色体进行检查的细胞遗传学方

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30270212 和 20070116); 国家自然科学基金杰出青年基金资助项目 (30125006); 江苏省“青蓝工程”中青年学术带头人科研基金和国家“211”工程“十五”建设资助项目

作者简介: 王加连 (1965 - ), 男, 硕士, 主要从事动物分子生物学研究。现在盐城师范学院生物系工作。

收稿日期: 2004 - 04 - 06; 修回日期: 2004 - 07 - 23

\* 通讯作者, correspondence author, E-mail: gyang@njnu.edu.cn

法程序较复杂, 材料要求严格, 准确率不高, 于是人们逐渐将目光转移到 Y 染色体的结构——特异的核酸序列上来。通过 PCR 技术扩增 Y 染色体特异核酸序列, 并对其进行凝胶电泳分析, 在雄性个体的扩增产物中能得到特异性条带, 而在雌性个体中则无相应扩增产物, 从而达到性别鉴定的目的, 准确率较高 (Bradbury *et al.*, 1990; 杨晓娟等, 1999; 张传生和杜立新, 2001)。

Sry (Sex-determining region Y) 基因是位于 Y 染色体 Tdy (Testis-determining Y chromosome) 区段内高度保守的单拷贝基因 (Sinclair *et al.*, 1990)。徐艳春等 (2000) 以东北虎 (*Panthera tigris*) 等 8 种哺乳动物的新鲜毛发和在冷冻条件下保存 4 个月的毛发作为材料, 从毛囊中提取 DNA, 应用 PCR 方法扩增 Sry 基因片断, 探讨了哺乳动物性别鉴定的分子方法。杨晓娟等 (1999) 根据已知动物的性别决定基因序列设计引物, 以血液样品为材料, 以非性别特异性的脑源性神经营养因子基因片断 (BDNF) 作为正对照, 用于扩增 Sry 基因片断, 通过凝胶电泳分析进行大熊猫 (*Ailuropoda melanoleuca*)、浣熊 (*Procyon lotor*)、天山棕熊 (*Ursus actors*) 和马来熊 (*Helarctos malayanus*) 性别的分子鉴定。

在鲸类动物性别的分子鉴定研究中, Palsbøll 等 (1992) 通过扩增 ZFX/ZFY (X, Y linked Zinc-finger containing protein) 基因 1 149 bp 的片断首次探讨了鲸类性别鉴定的分子生物学途径。Béubé 和 Palsb (1996) 认为在材料不新鲜, DNA 部分降解的情况下, PCR 扩增难以扩增出如此长的片断, 因此他们设计了 2 组引物分别对 ZFX 和 ZFY 基因中约 540 bp 的片断进行特异性扩增, 经 214 个已知性别个体的验证, 成功地对 3 570 个未知性别的鲸类标本进行性别鉴定。在国内, 通过分子生物学技术进行鲸类性别鉴定研究, 还未见任何报道。本研究通过 PCR 技术扩增 Sry 基因, 目的在于探索对鲸类动物快速、高效和简捷的性别鉴定方法。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

共分析了鲸类动物陈旧骨骼标本或 -20℃ 保存的肌肉标本 120 号, 其中已知性别标本 87 号、未知性别标本 33 号。包括江豚 (*Neophocaena phocaenoides*) 70 号 (雄性 20、雌性 32、未知性别 18)、

长喙真海豚 (*Delphinus capensis*) 11 号 (雄性 6、雌性 5)、瓶鼻海豚 (*Tursiops truncatus*) 10 号 (雄性 2、雌性 6、未知性别 2)、南瓶鼻海豚 (*T. aduncus*) 5 号 (雄性 1、雌性 1、未知性别 3)、白髯豚 (*Lipotes vexillifer*) 7 号 (雌性 4、未知性别 3)、条纹原海豚 (*Stenella coeruleoalba*) 13 号 (雌性 8、未知性别 5)、热带点斑原海豚 (*S. attenuata*) 4 号 (雄性 1、雌性 1、未知性别 2)。这些标本全部来自中国沿岸和长江中下游被误捕误伤致死的个体。标本收藏于南京师范大学生命科学学院, 保存时间 2~28 年。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 总 DNA 提取

肌肉样品用标准的蛋白酶 K 消化和酚/氯仿抽提的方法 (Sambrook *et al.*, 1989) 抽提总 DNA。对骨骼样品, 先用 2% 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 去除表面污物, 烘干并在紫外灯下照射 15 min 以交联表面可能带有的外源 DNA, 捣碎后用 0.5 mol/L 的 EDTA (pH 8.0) 脱钙 72 h。以后的处理同肌肉样品。

#### 1.2.2 PCR 扩增

参照王毅等 (2001) 的文献设计扩增鲸类 Sry 基因的引物 1 对, 其中上游引物为 5' - TGAAGC-GACCCATGAACG - 3', 下游引物为 5' - TCGAC-GAGGTCGATACTT - 3', 可扩增 Sry 基因保守区内 221 bp 的片断。引物由上海生工生物工程公司合成。

为避免使用上述引物扩增时可能出现的假阴性, 以及由此带来的性别误判, 又根据鲸类线粒体 DNA (Mitochondrial DNA, mtDNA) 细胞色素 *b* (Cytochrome *b*, *cyt b*) 基因保守区序列设计了一对阳性对照引物: 5' - ACGACGCATTCATTGATCT - 3' 和 5' - GTGCTCAGGGTATGGACGTA - 3', 用于扩增鲸类 *cyt b* 基因保守区 336 bp 的片断。

PCR 反应在 MJ Research 200 型 PCR 仪上进行。反应体系为: 浓度为 10 μM 的 Sry 基因和 *cyt b* 基因两组 4 条引物各 1 μl, 2 mM 的 dNTP 2 μl, 25 mM 的 Mg<sup>2+</sup> 2 μl, 1 mg/ml 牛血清白蛋白 (BSA) 2 μl, PCR 缓冲液 3 μl, 5 U/μl 的 Taq 酶 0.2 μl, DNA 模板 100 ng, 加 ddH<sub>2</sub>O 补足到 30 μl。空白对照与上述反应体系基本相同, 只是用等量的 ddH<sub>2</sub>O 代替模板。循环参数为: 94℃ 预变性 5 min, 进入如下循环, 94℃ 变性 1 min、55℃ 复性 1 min、72℃ 延伸 1

min, 循环次数为 35, 最后 72 延伸 10 min。

### 1.2.3 电泳检测

取 4  $\mu$ l PCR 扩增产物加 1.5  $\mu$ l 溴酚蓝混匀后, 经 1% 琼脂糖凝胶 (含溴化乙啶 0.05  $\mu$ g/ml) 电泳, 通过 UVP GDS 8000 凝胶分析及照相系统观察并记录结果。

## 2 结果

在同一反应体系中, 对上述已知性别的 87 个鲸类标本的总 DNA 进行 Sry 基因和 cyt b 基因片段的 PCR 扩增 (图 1)。雄性个体均同时出现 221 bp 和 336 bp 的 2 条特异性扩增带, 而雌性个体则只出现 336 bp 的 1 条扩增带。扩增产物的特征及性别鉴定结果与实际性别吻合率为 100%。

依照上述方法, 对另外 33 个未知性别的鲸类标本进行性别鉴定。结果显示, 这 33 个标本包括 20 个雄性和 13 个雌性 (表 1)。

## 3 讨论

Sry 基因是区分性别差异的遗传标记之一。通过扩增 Sry 基因进行性别鉴定最早应用于人类, 并广泛应用于法医检测 (匡金枝等, 2002; 郭秀改

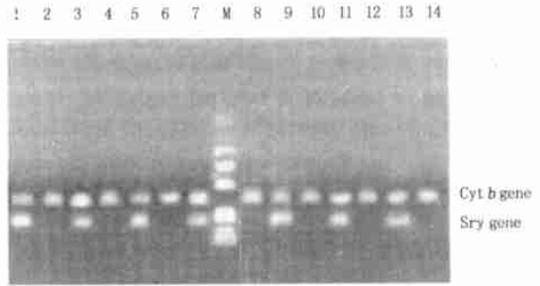


图 1 鲸类 Sry 和 cyt b 基因的 PCR 扩增产物电泳结果

泳道 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 分别是雄性的江豚 NJNU0282, NJNU 0305 和 NJNU0339, 长喙真海豚 NJNU0060, 瓶鼻海豚 NJNU0045, 南瓶鼻海豚 NJNU0391 和点斑原海豚 NJNU0217。

泳道 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 分别是雌性的江豚 NJNU0283, 白髻豚 NJNU0378, 条纹原海豚 NJNU0400, 长喙真海豚 NJNU0238, 瓶鼻海豚 NJNU0051, 南瓶鼻海豚 NJNU0392 和点斑原海豚 NJNU0393。

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of PCR products of Sry and cyt b genes in cetaceans

Lanes 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13: Males of finless porpoises NJNU 0282, NJNU0305, and NJNU0339, long-beaked common dolphin NJNU0060, bottlenose dolphin NJNU0045, Indo-Pacific bottlenose dolphin NJNU0391, and pantropical spotted dolphin NJNU0217.

Lanes 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14: Females of finless porpoise NJNU0283, baiji NJNU0378, striped dolphin NJNU0400, long-beaked common dolphin NJNU0238, bottlenose dolphin NJNU0051, Indo-Pacific bottlenose dolphin NJNU0392, and pantropical spotted dolphin NJNU0393

表 1 未知性别的鲸类样品性别鉴定结果

Table 1 Identification of sex unknown cetacean specimens

物种 Species	编号 No.	性别 Sex	物种 Species	编号 No.	性别 Sex
<i>N. phocaenoides</i>	NJNU0394	Male	江豚	NJNU0443	Female
	NJNU0395	Male	瓶鼻海豚	NJNU0037	Female
	NJNU0413	Female	<i>T. truncatus</i>	DI	Female
	NJNU0414	Male	南瓶鼻海豚	NJNU0396	Male
	NJNU0415	Male	<i>T. aduncus</i>	NJNU0398	Male
	NJNU0416	Male		NJNU0399	Male
	NJNU0417	Female	白髻豚	NJNU0024	Male
	NJNU0418	Male	<i>L. vexillifer</i>	NJNU0381	Male
	NJNU0419	Female		NJNU0388	Female
	NJNU0420	Female	条纹原海豚	NJNU0429	Male
	NJNU0422	Male	<i>S. coeruleoalba</i>	NJNU0430	Female
	NJNU0423	Female		NJNU0431	Male
	NJNU0424	Female		NJNU0432	Female
	NJNU0425	Female		NJNU0433	Male
	NJNU0426	Male	热观点斑原海豚	NJNU0389	Male
	NJNU0427	Male	<i>S. attenuata</i>	NJNU0390	Male
	NJNU0439	Male			

等, 1996)。医学上可以对性别发育异常的人进行诊断 (Yu *et al.*, 2001)。目前, 国际奥委会已经

认可通过 Sry 基因检测来确定运动员的性别。在我国, 应用 PCR 扩增 Sry 基因进行家畜性别的早期判

断也取得了理想效果,但运用该方法对野生动物的性别进行鉴别仅见于徐艳春等(2000)和杨晓娟等(1999)的少量报道,在鲸类动物中则尚未开展。

本研究选取了本实验室收藏的7种鲸类动物(江豚、长喙真海豚、瓶鼻海豚、南瓶鼻海豚、白暨豚、条纹原海豚和热带点斑原海豚)共87个已知性别的个体,通过PCR扩增Sry基因进行性别鉴定。为了防止PCR扩增Sry基因失败而造成的假阴性导致误判,我们在PCR反应体系中加入与性别无关的cyt b基因扩增引物作为阳性对照,即扩增Sry基因的同时扩增cyt b基因。当仅扩增出cyt b基因时,说明基因组中不存在Sry基因,其性别为雌性。当同时扩增出cyt b基因和Sry基因时,说明动物的性别为雄性。如果没有任何扩增产物,就说明PCR失败,其结果不能用于判定性别。同时,为防止假阳性的出现对性别判别准确率的影响,研究中还用了空白对照(阴性对照)。通过对87个已知性别鲸类标本的检验,鉴定结果与实际性别完全一致,证明了该方法的有效性。同时应用此方法确定了其它33个未知性别鲸类标本的性别。

值得注意的是,PCR反应具有高倍的扩增能力,这一方面增加了反应的敏感性,即使微量的样品也能用来进行性别鉴定,但另一方面外源DNA的污染可能又成为一大干扰因素。因此所用材料、器具、试剂必须严格防止污染,操作应力求规范、严谨。此外还要根据样品性质和取样量的大小,适当调整PCR的反应体系和循环参数,避免因产物较少导致电泳条带太弱而无法判断的情况。尽管如此,通过扩增Sry基因片段进行鲸类动物的性别鉴定,仍是一种简便、快速和高效的方法,具有较高的可靠性和广泛的适用性,特别是对非损伤性采样所得的样品,以及一些不完整的或外部性别鉴别特征缺失的样品来说,本研究提供了可行的性别鉴定途径。

## 参考文献:

- Bradbury M W, Isola L W, Gordon J W. 1990. Enzymatic amplification of a Y chromosome repeat in a single blastomere allows identification of the sex of preimplantation mouse embryos. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **87**: 4053 - 4057.
- Béubé M, Palsbøll P. 1996. Identification of sex in cetaceans by multiplexing with three ZFX and ZFY specific primers. *Molecular Ecology*, **5**: 283 - 287.
- Cooke H. 1990. The continuing search for the mammalian sex-determining gene. *Tig September*, **6** (9): 273 - 275.
- Palsbøll P J, Vøder A, Bakke I, Høe Cewely M R. 1992. Determination of gender in cetaceans by the polymerase chain reaction. *Canadian Journal of Zoology*, **70**: 2166 - 2170.
- Sambrook J, Fitch E, Maniatis T. 1989. *Molecular cloning, a laboratory manual*. Second edition. USA: Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Sinclair A H, Berta P, Palmer M S, Hawkins J R, Godfellow P N. 1990. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to conserved DNA-binding motif. *Nature*, **346**: 240 - 245.
- Yu Q, Huang S Z, Ye L Z, Feng L, He F F, Ye J, Gu C X, Ge Q S. 2001. The role of sexual related Y gene detection in the diagnosis of patients with gonadal dysgenesis. *Chinese Medical Journal*, **114** (2): 128 - 131.
- 王毅, 单祥年, 张悦, 刘宁生, 鲁晓萱, 佺文惠, 王金焕, 陈玉泽, 杨凤堂, 胡均, 张文兴, 徐春茂. 2001. 黑鹿 Y 染色体的鉴别和 Sry 基因的克隆及定位. *遗传*, **23** (2): 114 - 118.
- 匡金枝, 黎方, 朱巍. 2002. 3 个基因座的复合扩增及其在法医学性别鉴定中的应用. *中国法医学杂志*, **17** (2): 104 - 105.
- 杨晓娟, 杨玉华, 张义正, 陈卫红, 费立松, 宋云芳, 何光昕. 1999. 大熊猫与熊类动物性别的分子鉴定. *应用与环境生物学报*, **5** (3): 288 - 290.
- 孙言文. 1994. *生物物证技术*. 北京: 中国人民大学出版社.
- 张传生, 杜立新. 2001. 哺乳动物性别决定机理及性别鉴定方法研究进展. *黄牛杂志*, **3**: 38 - 42.
- 徐艳春, 马立新, 白素英, 金煜, 景松岩. 2000. 应用 PCR 方法通过毛发进行哺乳动物性别鉴定. *东北林业大学学报*, **6**: 73 - 77.
- 郭秀改, 刘军, 曹侠, 魏玉芝. 1996. 运用 PCR 技术对人骨组织和牙齿进行性别鉴定的应用研究. *法医学杂志*, **12** (4): 209 - 210.