

CHD 基因与非平胸鸟类性别鉴定

刘铸^{1,2} 白素英^{1,3} 田秀华^{1*}¹东北林业大学野生动物资源学院, 哈尔滨 150040 ²牡丹江师范学院, 牡丹江 150040³国家林业局野生动植物检测中心, 哈尔滨 150040

摘要: 自 1995 年 CHD 基因被应用于鸟类性别的分子鉴定以来, 非平胸类鸟类性别鉴定问题正逐步被解决, CHD 基因已经成为非平胸鸟类性别鉴定最重要的分子标记。阐述和分析了 CHD 基因在扩增目标及引物设计、取样范围及辅助技术和所涉足的科研领域等方面的发展及现状。期望随着 CHD 基因研究的深入, 建立起完善的基于 CHD 基因的鸟类性别鉴定体系, 通过更广泛的应用, 促使涉及鸟类性别鉴定的科学研究向着更深、更广的方向发展。

关键词: 非平胸鸟类 性别鉴定 CHD 基因

CHD Gene and the Sex Identification of Non-Ratite Birds

Liu Zhu^{1,2} Bai Suying^{1,3} Tian Xiuhua^{1*}¹ College of Wild life Resources, Northeast Forestry University, Harbin 150040² Mudanjiang teachers college, Mudanjiang 150040³ Detecting Center of Wild Fauna and Flora, The State Forestry Administration, Harbin 150040

Abstract Since the application of CHD gene in molecular sexing identification of unratite birds in 1995, the sex identification of non-ratite birds has been studied step by step. CHD gene has turned into the most important molecular marker in the sex identification of non-ratite birds. This paper expatiated and analyzed the progress and status in amplification target and design of primer, range of sampling and assistant technique and the relative research fields of CHD gene. Looking forward to using more broad application, laboratories can build up perfect system of sex identification of non-ratite birds using CHD gene and promote the relative researches of sex identification of non-ratite birds more deep and extensive.

Key words Non-ratite birds Sex identification CHD gene

鸟类的 CHD 基因位于性染色体上, 鸟类的性染色体为 ZW 型, 雄性为 ZZ, 雌性为 ZW。CHD 基因在非平胸鸟类中有两个同源拷贝 CHD-W 和 CHD-Z, 其中 CHD-W 为 W 连锁, CHD-Z 为 Z 连锁^[1,2]。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)^[3], 随后发现这个基因非常保守, 并且几乎所有非平胸类鸟类都具有 CHD-W 基因^[4], 从此这个基因开始用于鸟类性别的分子鉴定。起初有人认为 CHD 基因是鸟类性别决定基因, 但是随后的研究发现, 在鸟类中,

也存在对 Z 染色体上的 CHD-Z 基因进行数量补偿, 尽管研究发现不是通过抑制 Z 染色体基因进行数量补偿的, 但可能是通过转录和翻译水平来调控的^[5,6], 所以 CHD-Z 基因可能不是鸟类性别决定基因, 并且近期研究发现 CHD-W 基因也不是性别决定基因。尽管 CHD 基因不是鸟类性别决定基因, 但是 CHD 基因在鸟类性别分子鉴定中却发挥着巨大的作用。

全世界的鸟类中有 60% 是单态性鸟 (monomorphic birds)。在对单态性鸟类进行科学研究和人工饲养繁殖中, 尤其对珍稀濒危鸟类来说, 要安全、准

作者简介: 刘铸 (1979-), 男, 硕士, 研究方向: 动物学及分子生物学

通讯作者: 田秀华, 电话: 0451-82190623 E-mail: tianxiuhua@163.com

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

确的进行性别鉴定非常困难。对所有单态性鸟和部分双态性鸟的雏鸟进行安全和准确的性别鉴定就更加困难了。随着 *CHD* 基因研究的深入,为解决非平胸类鸟类性别鉴定带来了无限的希望。*CHD* 基因进行性别鉴定主要通过两个途径:第一个途径是通过特异性引物对 *Z*和 *W* 两个染色体的特异序列进行 PCR 扩增,然后用限制性内切酶检测对 PCR 扩增产物进行酶切,由于 *CHD-W* 基因上有特异性酶切位点,因此对酶切产物电泳时,雌性为三条带,雄性为一条带;第二个途径是直接通过特异性引物对 *Z*和 *W* 两个染色体上不同大小的特异序列进行 PCR 扩增,检测结果将表现为:雌性为两条带;雄性为一条带。自 *CHD* 基因被发现以来,这 10年中,对 *CHD* 基因的研究迅速发展,已经成为非平胸类鸟类性别鉴定最重要的分子标记。以下将对 *CHD* 基因各方面的发展进行阐述和分析。

1 扩增目标及引物设计的发展

1995年 Griffiths 等人设计了一对引物 P2/P3^[3],开始了应用 *CHD* 基因对鸟类性别进行分子鉴定的研究,P2位于 *CHD* 基因内一个内含子下游 132bp处,P3位于这个内含子下游 22 bp处,扩增产物 110 bp。Griffiths和 Tiwari利用这对引物对金刚鹦鹉 (*Cyanopsitta cyanea*) 样本进行 PCR 扩增,运用第一个途径,用限制性内切酶 *Hae*Ⅲ对 PCR 扩增产物进行酶切,酶切后,雌性为 110bp、45 bp和 65 bp三条带,雄性为一条 110 bp带,成功对金刚鹦鹉的性别进行了鉴定。2002年 Luis 等人对引物 P2/P3在原有限制性内切酶 *Hae*Ⅲ的基础上又增加了两个限制性内切酶 *Dde*Ⅰ和 *Xho*Ⅰ,并利用这个体系成功的对 5种濒危单态性鸟类进行了性别鉴定^[7]。2002年 Bemudez-Humaran 等人在研究角冠雉 (*Oreophaps derbianus*) 时发现,引物 P2/P3扩增的 *W* 染色体产物缺少 *Dde*Ⅰ的酶切位点,但有限制性内切酶 *Nla*Ⅲ的位点,并将引物 P2/P3的 *W* 染色体扩增产物切成为 80bp和 30bp两段,成功的对这种濒危鸟类进行了性别鉴定^[8]。

1998年 Griffiths 等人通过对鼠的 *CHD1* 基因和鸡的 *CHD-Z* 基因的研究^[2,9],设计了一个新的上游引物 P8^[10],P2/P8构成一对引物成功扩增了 P2前端的内含子,并且设计了分别位于 P2/P8外侧的一

对引物 P14/P9对 P2/P8的目标带进行了检测。由于这个内含子在 *Z*和 *W* 两个染色体上有大小不同的 PCR 扩增产物,因此运用第二条途径进行鸟类性别鉴定。随后 Griffiths 等人运用这对引物对大量鸟类进行了性别鉴定^[10]。从此,引物对 P2/P8成为用 *CHD* 基因进行鸟类性别鉴定运用最普遍的引物。

CHD-Z 基因不像 *CHD-W* 基因那样保守,*CHD-Z* 基因的进化速度很快,甚至有的科学家利用 *CHD-Z* 基因对大鸨 (*Otus tarla*) 的种群结构进行研究^[12]。正因为 *CHD-Z* 基因有这个特点,所以 P2/P8在推广应用过程中遇到了一些问题:第一,在一些物种中应用 P2/P8扩增 *CHD-Z* 基因和 *CHD-W* 基因的产物大小十分相似,琼脂糖凝胶电泳很难区分。面对这种情况一般改用变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,也有的采用限制性内切酶对 P2/P8的 PCR 扩增产物进行酶切,然后再用琼脂糖凝胶电泳检测。如,2004年 Sacchi 等人利用限制性内切酶 *Asp*700Ⅰ对 P2/P8的 PCR 扩增产物进行酶切,成功地对短尾雕 (*Circus gallicus*) 进行了性别鉴定^[13]。第二,在一些物种中 *CHD-Z* 基因自身出现多态性,导致 P2/P8对 *CHD-Z* 基因的 PCR 扩增产物出现 2个或多个等位基因。如, Dawson 等人对 4种海鸥性别鉴定时,四个物种中都发现了 2个 *CHD-Z* 基因等位基因,这种情况类似的情况在大山雀 (*Parus major*) 和蓝孔雀 (*Pavo cristatus*) 等一些种类也有发生^[14]。遇到这种情况必须采用变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,这样有时雄性的电泳结果会出现两条带,需要认真分型,然后再进行性别鉴定,但是在某些特殊情况下,*CHD-W* 基因和某个 *CHD-Z* 等位基因只差 1~2bp,分型判读起来就非常困难了,对这样的物种只能寻求其它策略。第三,就是被扩增出的 *CHD-W* 基因大于 *CHD-Z* 基因,由于在 PCR 反应中小片段占有优势,特别在 PCR 反应很弱的情况下,*CHD-W* 基因的扩增产物电泳结果会很弱或根本看不见,很容易产生性别误判。

1998年 Kahn 等人设计了一对引物 1237L/1272H^[11],这对引物的结果判定与 P2/P8类似,它们扩增的是 *CHD-Z* 基因的同一个内含子,但这对引物应用较少。1999年 Fridolfsson 和 Ellegren 设计了一对引物 2550F/2718R^[15],这对引物也是对 *CHD*

基因的一个内含子进行了扩增,但是与 P2/P8扩增的不是同一个内含子。现有研究显示,还没有出现 *CHD-Z* 基因和 *CHD-W* 基因扩增的产物大小相似的情况,也没有出现 *CHD-Z* 基因扩增产物具有多态性的情况,并且这样,PCR产物可以直接利用琼脂糖凝胶电泳就能进行性别鉴定,十分方便^[14]。另外,引物 2550F/2718R 扩增出的 *CHD-Z* 基因通常大于 *CHD-W* 基因,也不存在性别误判的问题。因此,此对引物值得推广引用。表 1 列出了以 *CHD* 基因为目标用于非平胸鸟类性别分子鉴定的引物序列。

表 1 *CHD* 基因用于非平胸鸟类性别分子鉴定的引物序列

引物名称	引物序列
P2	5'-TCTGCAATCGCTAAATCCITP-3'
P3	5'-AGATATTCTGGATCTGATAGTGA-3'
P8	5'-CTCCCAAGGATGAGRAAYTG-3'
P14	5'-ACTTTTCCAATA TGGATGAAGA-3'
P9	5'-TAAGTCTGTCTCAGAYTTRTCNAG-3'
1237L	5'-GAGAAA CTGTG CAAAA CAG-3'
127H	5'-TCCAGAA TATCTTCTGCTCC-3'
2550F	5'-GTTACTGATTCTCTACGAGA-3'
2718R	5'-ATTGAAATGATCCA GTGCTTG-3'

2 取样范围及辅助技术的发展

为了将 *CHD* 基因应用于更多鸟类的性别鉴定,尤其是应用于濒危鸟类,许多学者针对取样范围及辅助技术做出了很多努力。为了达到快速并且非损伤的对鸟类进行性别鉴定的目的,1999年 Robertson 等人首次利用鸟粪作为一种 DNA 取样来源,通过 *CHD* 基因成功地对一种食草鸟类鸮鸮鹑 (*Strigops habroptilus*) 的性别进行了鉴定^[16];同年 Nota 和 Takenaka 首次利用鸟类的排泄物白色部分的尿,作为一种 DNA 取样来源,通过 *CHD* 基因成功的对白色来亨鸡的性别进行了鉴定^[17];1999年 Trefil 等人 and 2001年 Bello 等人证实了可以利用鸟类羽毛提取 DNA,通过 *CHD* 基因进行鸟类的性别鉴定^[18,19];2003年 Jensen 等人利用卵壳膜,提取 DNA,成功扩增 *CHD* 基因进行了鸟类的性别鉴定^[20]。以上这些研究以保护为宗旨并且拓宽了利用 *CHD* 基因进行

研究的取样范围,便于通过对鸟类野外的活动领域或巢穴收集排泄物(粪便和尿)、羽毛和卵壳膜,利用 *CHD* 基因进行性别鉴定。这些取样方法与快速、微量的 Chelex DNA 提取法结合,建立了快速和有效的鸟类性别分子鉴定体系。2003年 Jensen 等人证明了用这个体系 5个小时可以对鸟类做出性别鉴定^[20,21]。当然,通过捕捉鸟类采集血液仍然是一种重要的取样方式,但新鲜血液不易保存。FTA 卡可以在常温下长期保存血液样本,2002年 Gutierrez-corcheio 等人利用 FTA 卡对来自多个国家的灰伯劳 (*Lanius excubitor*) 样本进行了性别鉴定^[21]。电泳技术的迅速发展同时也促进了 *CHD* 基因在鸟类性别鉴定中的进一步应用。2000年 Lesaicherre 等人首次把毛细管电泳用于 *CHD* 基因的鸟类性别鉴定,对极其微量的样本可以做出准确的鉴定,0.1ng/μl 的样本的 RSD (The relative standard deviations) 在雄性小于 0.6%,在雌性小于 0.4%。这项技术的应用无疑解决了 P2/P8 对于 *CHD-Z* 基因和 *CHD-W* 基因的产物大小十分相似而导致的分型、判读非常困难的问题^[23]。

3 所涉足的科研领域的发展

在鸟类 *CHD* 基因至今短暂的十年里,随着引物设计、限制性内切酶、取样范围及辅助技术的发展,*CHD* 基因性别鉴定已经十分广泛的应用于非平胸类鸟类,包括:雁形目、鸡形目、雀形目、行鸟形目、鸥形目、隼形目、鸮形目、鸛形目和鹤形目等,并且已经涉足于多项研究领域。从最初的对不同个体或不同种类的鸟类进行性别鉴定,已经向着更加深入、更加细微的方向发展。

有很多学者对不同鸟类或同种鸟类的不同种群的性比进行研究,例如:2004年 Catry 等人利用 *CHD* 基因对鸥亚鸮 (*Eriothacus rubecula*) 的一个越冬群体的性比进行了研究^[24]。

由于鸟类后代(雏鸟)的性比是此种鸟的性比最重要的决定因素,因此近些年,通过 *CHD* 基因对鸟类后代的性比进行研究已经炙手可热,许多学者围绕着各种可能影响鸟类后代的性比及分化因素进行了大量研究。2000年 Oddie 认为雌雄雏鸟体形的大小差异产生的竞争影响着大山雀后代的性别分配^[25];通过 *CHD* 基因对鸟类的后代的性别鉴定发

现蛋的质量和大小与后代的性别存在着共变^[26-27], 也有一些科学家发现一些鸟类孵化顺序影响着后代的性别, 有个十分有趣的例子, 黑头矿鸟 (*Manorina melanoccephala*) 由于雄性后代能帮助母体照顾后代, 所以通常第一个孵化出的是雄性鸟^[28-29]; 通过 *CHD* 基因对鸟类后代的性别鉴定发现, 一些鸟类雌雄亲鸟的身体状况以及栖息地条件是后代性比的影响因素^[30-32]; 有的学者还认为一些鸟类后代的性比与一窝繁殖个体的多少和死亡率有关^[33]。

随着 *CHD* 基因的不断应用, 一些科学家利用 *CHD* 基因对鸟卵进行了性别鉴定, 虽然一些学者认为对新生卵进行性别鉴定存在一定误差, 但已有科学家成功研究了卵的性别与母体抗体系统产生共变以及未成功孵化卵的性别影响着后代的性比^[34-36]。利用 *CHD* 基因对不同生理阶段的鸟类进行性别鉴定, 对涉及鸟类性别的问题进行科学研究已经成为一个热点。

综上所述, 10年间, *CHD* 基因各方面的研究以其惊人的速度在发展。目前已经发展了多引物和较完备的鉴定体系, 这将为涉及鸟类性别鉴定的科学研究提供可靠的研究途径。当然, 目前 *CHD* 基因性别鉴定体系还不够完善, 有很多方面有待于进一步发展, 如还需另外开发一些目标片段、设计一些新的引物以适用于一些特殊物种等。期望随着 *CHD* 基因研究的深入, 建立起完善的基于 *CHD* 基因的鸟类性别鉴定体系, 通过更广泛的应用, 推动涉及鸟类性别鉴定的科学研究向着更深、更广的方向发展。

参 考 文 献

- 1 Lessells K, Mateman C. *Nature* 1996 383 761~762
- 2 Griffiths R, Kom R. *Gallus domesticus* *Gene* 1997 197 225~229.
- 3 Griffiths R, Tiwari B. *Nature* 1995 375 454.
- 4 Griffiths R, Daan S, Dijkstra C. *Proceedings of the Royal Society of London series B*, 1996, 263 1251~1256
- 5 Ellegren H. *Dosage Trends Gene*, 2002 18 (1): 25~28
- 6 Kuroiwa A, Yokomine T, Sasaki H, et al. *Cytogenet Genome Research*, 2002, 99: 310~314.
- 7 Luis G B, A racey G, Carbo H L, et al. *Journal of Experimental Zoology*, 2002 292: 677~680
- 8 Bermudez-Humaran L G, Chavez-Zamarrin P, Guzman-Velasco A,

- et al *Reproduction in Domestic Animals* 2002, 37 321~323.
- 9 Delmas V, Stokes D G, Perry R P. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 1993 90 2414~2418
- 10 Griffiths R, Double M C, Orr K, et al. *Molecular Ecology*, 1998 7 1071~1075
- 11 Kahn N W, John J, Quinn T W. *The Auk* 1998 115: 1074~1078
- 12 Pita C, Lieckfeldt D, Abnso J C. *Molecular Ecology* 2000, 9 1165~1170
- 13 Sacchi P, Soglia D, Maione S, et al. *Molecular and Cellular Probes* 2004 18: 193~196
- 14 Dawson D A, Darby S, Hunter F M, et al. *Molecular Ecology Notes* 2001, 1: 201~204.
- 15 Friolfsson A K, Ellegren H. *Journal of Avian Biology*, 1999 30 116~121.
- 16 Robertson B C, Minot E O, Lambert D M. *Molecular Ecology*, 1999 8 1349~1350
- 17 Nota Y, Takenaka O. *Molecular Ecology*, 1999 8 1235~1238.
- 18 Trefil P, Bruno M M, Matus T, et al. *Folia Biologica-Prague* 1999 45: 253~256
- 19 Bello N, Francino O, Sanchez A. *J Vet Diagnost Invest* 2001 13 162~164.
- 20 Jensen T, Pemasetti F M, Durrant B. *Zoo Biology*, 2003, 22: 561~571
- 21 Russello M A, Amato G. *Zoo Biology*, 2001, 20: 41~45
- 22 Gutierrez-corcheron F, Amuga M V, Sanz L, et al. *Molecular Ecology Notes* 2002, 2 75~77.
- 23 Lesaidre M L, Li S F Y, Lee H K. *Electrophoresis* 2000 21 1336~1340
- 24 Caty P, Campos A, Almada V, et al. *Journal of Avian Biology*, 2004 35: 204~209.
- 25 Oddie K R. *Journal of Animal Ecology*, 2000 69: 903~912
- 26 Rutkowska J, Cichon. *Journal of Avian Biology*, 2005 36 12~17
- 27 Muller W, Groothuis T G G, Eising C M, et al. *European Society for Evolutionary Biology*, 2005 18: 661~668.
- 28 Amokh K E, Griffiths S C, Gokhzen A W. *Journal of Avian Biology*, 2001, 32 219~223.
- 29 Cichon M, Dubiec A, Stoczek M. *Journal of Avian Biology*, 2003 34 355~359
- 30 Magrath M J L, Green D J, Kamdeur J. *Journal of Avian Biology*, 2002 33 260~268.
- 31 Alonso-Alvarez C, Velando A. *British Ornithologists' Union Ibis* 2003 145: 220~226.
- 32 Stauss M, Segebacher G, Tomiak J, et al. *Oikos* 2005, 109 367~373

(参考文献 33~36略)