

棕背鼯性别的快速鉴定

马 芹¹, 王元智¹, 陆涛峰¹, 李智昊², 杨春文², 陈洪岩^{1*}

(1. 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所, 黑龙江省实验动物与比较医学重点实验室, 哈尔滨 150009;

2. 牡丹江师范学院, 黑龙江 牡丹江 157011)

【摘要】 目的 野生棕背鼯因其活动敏捷、性情凶猛、不易抓取, 很难从外表对其性别做出准确判断, 影响分笼及后期的实验室繁育, 拟建立一种快速、准确、简便的性别鉴定方法。**方法** 以棕背鼯的新鲜被毛为材料, Chelex-100 提取毛囊 DNA, 利用 PCR 技术分别扩增锌指结构基因 (*ZFY/ZFX*) 片段和 Y 染色体性别决定区基因 (*SRY*) 片段, 并建立双重 PCR 扩增方法。**结果** 雄性棕背鼯扩增出 *ZFY/ZFX* 和 *SRY* 两个基因片段, 而雌性棕背鼯只扩增出 *ZFY/ZFX* 基因片段。利用这种方法对 23 只棕背鼯、10 只 Wistar 大鼠和 8 只 BALB/c 小鼠进行性别鉴定, 扩增结果与表型判断和解剖结果一致。**结论** 以被毛为实验材料, 减少了对棕背鼯的惊吓和损伤; 建立的双重 PCR 扩增方法准确、快速, 可应用于鼠的性别鉴定。

【关键词】 棕背鼯; *SRY* 基因; *ZFY/ZFX* 基因; PCR 扩增; 性别鉴定

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 01-0096-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.01.017

A rapid and useful method for gender identification of grey red-backed voles

MA Qin¹, WANG Yuanzhi¹, LU Taofeng¹, LI Zhihao², YANG Chunwen², CHEN Hongyan^{1*}

(1. Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences; Heilongjiang Provincial Key Laboratory of Laboratory Animal and Comparative Medicine, Harbin 150009, China; 2. Mudanjiang Normal College, Mudanjiang 157011)

【Abstract】 Objective Grey red-backed voles (*Myodes rufocanus*) are agile, fierce and hard to catch, thus, it is difficult to judge their gender by external appearance, especially for the juvenile voles. Therefore, it may cause difficulties to their allocation and later breeding in laboratories. The aim of this paper is to establish a rapid, simple and accurate method for gender identification of grey red-backed voles. **Methods** Fresh hair follicles were taken from 6 adult male voles, 3 adult females and 14 4-week-old juvenile voles, 5 male and 5 female 9-week-old Wistar rats, and 5 male and 3 female 6-week-old BALB/c mice. The genomic DNA was extracted using Chelex-100 resin and the zinc-finger Y/X gene (*ZFY/ZFX*) and the gene of sex-determining region of the Y (*SRY*) chromosome were amplified by PCR, and a double PCR amplification method was established. **Results** The *ZFY/ZFX* gene and *SRY* gene were simultaneously amplified from the male voles, while only the *ZFY/ZFX* gene was amplified from the females. The gender of all 23 voles, 10 Wistar rats and 8 BALB/c mice were correctly identified with this method, and the PCR results were consistent with the phenotypic and autopsy results. **Conclusions** Using fresh hair follicles as experimental materials for gender identification of grey red-

[基金项目] 国家科技支撑计划(编号:2015BAI07B02-02)。

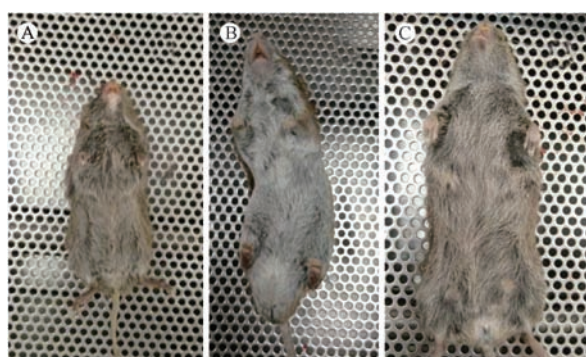
[作者简介] 马芹(1990 —), 女, 硕士研究生, 专业: 预防兽医学。E-mail: 542446515@qq.com

[通信作者] 陈洪岩(1963 —), 男, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 兽医微生物及其分子生物学。E-mail: chenhongyan@caas.cn

backed voles can alleviate shock and damage to the animals. The established double PCR amplification method is accurate, simple, rapid, and deserves to be used for gender identification of grey red-backed voles.

【Key words】 grey red-backed voles; *SRY* gene; *ZFY/ZFX* gene; PCR amplification; gender identification

在野生啮齿类动物棕背鼯 (*Myodes rufocanus*) 的生态学研究中,对其进行性别鉴别是分析其种群动态的一项基本工作^[1]。因棕背鼯是流行性出血热病毒、森林脑炎病毒及普马拉病毒等人兽共患病原体的天然宿主^[2-3],本实验室已开展棕背鼯的实验室繁育^[4],拟将其培育成实验动物,以便构建人兽共患病感染动物模型,同时丰富实验动物资源。但在其实验室繁育过程中,因其性别不易判断,严重影响着分笼与繁殖。目前对棕背鼯的性别鉴定多依据肛门到尿生殖孔的距离及被毛、性情、乳头及外部生殖器官等指标^[5-6]进行判断(图 1),但棕背鼯活动敏捷、性情不温顺,不易抓取;幼龄时期的棕背鼯外部生殖器官又未显现,不能从外表准确区分雌雄;从肛门到尿生殖孔的距离及被毛进行观察,主观性较强,很难做到正确的性别分离。



注:A:4 周龄;B:成年雄性;C:成年雌性。

图 1 棕背鼯性别的表型判断

Note. A: A 4-week-old grey red-backed vole; B: An adult male grey red-backed vole; C: An adult female grey red-backed vole.

Fig. 1 Phenotypic identification of the gender of grey red-backed voles

随着对性别决定理论的深度研究,用于动物性别鉴定的方法也在同步发展,尤其在分子生物学领域取得了较大进展。Page 等^[7]发现在 Y 染色体上存在一种可编码锌指蛋白的高度保守的基因序列,即锌指结构基因 (zinc-finger Y, *ZFY*),该序列可能与性别决定有关;Schneider-Gädicke^[8]在哺乳动物 X 染色体上也发现了与 *ZFY* 高度同源的基因,即 *ZFX* 基因,在无 *ZFY* 表达的小鼠上,睾丸的分化不受影响,因此, *ZFY/ZFX* 基因不能决定性别。Sinclair 等^[9]发现在 Y 染色体短臂靠近常染色体的 35 kb 区

域存在性别决定区 (sex-determining region of the Y chromosome),即 *SRY* 基因。Koopman 等^[10]将 *SRY* 基因注入到雌性小鼠胚胎中,后期小鼠发育成雄性,证明了 *SRY* 基因为哺乳动物的性别决定基因。目前已在东北虎、黑熊、猫、牛等动物^[1, 11-13]上用 *SRY* 基因进行了性别鉴定,正确率 100%。本实验在棕背鼯实验室繁育研究^[4]的基础上,利用 PCR 技术,以棕背鼯的新鲜毛囊为实验材料,从毛囊中提取 DNA,利用 *SRY* 基因和 *ZFY/ZFX* 基因的双重 PCR 扩增对棕背鼯的性别进行鉴定,建立一种快速、准确、简便的性别鉴定方法。

1 材料和方法

1.1 实验动物

于黑龙江省牡丹江地区牡丹峰林地捕获的野生棕背鼯若干只,经隔离检疫后,饲养在中国农业科学院哈尔滨兽医研究所负压隔离环境感染动物实验设施内 [SYXK (黑) 2017-009],选取 6 只雄性成年、3 只雌性成年及 14 只 4 周龄左右棕背鼯用于 PCR 方法鉴定棕背鼯性别;10 只 SPF 级 Wistar 大鼠 (5 只雄性,体重 310 ~ 320 g;5 只雌性,体重 230 ~ 240 g;9 周龄) 和 8 只 SPF 级 BALB/c 小鼠 (5 只雌性和 3 只雄性,体重 21 ~ 23 g,6 周龄),购自北京维通利华实验动物技术有限公司 [SCXK (京) 2016-0011],饲养在中国农业科学院哈尔滨兽医研究所负压隔离环境感染动物实验设施内。实验过程中按实验动物使用的 3R 原则给予人道主义关怀。

1.2 主要试剂与仪器

Chelex-100 resin 购于 Sigma 公司,蛋白酶 K 和 2 × EasyTaq SuperMix 购于全式金生物技术有限公司,PCR 仪购于杭州博日科技有限公司,DK-8D 型电热恒温水槽购于上海精宏实验有限公司,凝胶成像分析系统购于北京赛智创业科技有限公司,其他常规试剂为分析纯。

1.3 实验方法

1.3.1 棕背鼯基因组 DNA 的提取

用镊子夹取棕背鼯被毛,挑选带有毛囊的 5 根,保留被毛根部,剪去其余部分,放入 0.5 mL EP 管中,加入 0.3 mL ddH₂O 洗一次,然后加入 30 μL 5%

的 Chelex-100 和 5 μ L 5 mg/mL 的蛋白酶 K, 置于 56 $^{\circ}$ C 恒温水浴保温 6 h。取出后振荡, 100 $^{\circ}$ C 保温 8 min, 充分振荡, 13 000 r/min 离心 3 min, DNA 存在于上清中, -20 $^{\circ}$ C 保存上清备用。

1.3.2 引物合成

参考文献^[14]设计并合成扩增 *ZFY/ZFX* 基因片段的引物: P1: 5'-ATAATCACATGGAGAGCCACAA GCT-3', P2: 5'-GCACTTCTTTGGTATCTGAGAAA GT-3'; 针对鼠的 *SRY* 基因设计并合成用于性别鉴定的引物: P3: 5'-TGTGGTCTCGTGGTCAGAGG-3', P4: 5'-CGGCTTCTGTAAGGCGTTTC-3'。引物均由哈尔滨博仕生物技术有限公司合成。

1.3.3 PCR 扩增

以提取的毛囊 DNA 为模板, 分别构建 *ZFY/ZFX* 基因和 *SRY* 基因 PCR 扩增体系 50 μ L: 2 $\times$ EasyTaq PCR SuperMix 25 μ L, DNA 模板 1 μ g, P1 (P3) 引物 1 μ L, P2 (P4) 引物 1 μ L, ddH₂O 22 μ L。反应程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测, 扩增条带大小与目的条带一致时进行测序分析。

1.3.4 双重 PCR 扩增

将扩增 *ZFY/ZFX* 基因和 *SRY* 基因的引物同时加入到一个 PCR 反应体系内, 建立双重 PCR 扩增方法。扩增体系为: 2 $\times$ EasyTaq PCR SuperMix 25 μ L, DNA 模板 1 μ g, P1 引物 1 μ L, P2 引物 1 μ L, P3 引物 0.6 μ L, P4 引物 0.6 μ L, ddH₂O 20.6 μ L。反应程序同 PCR 扩增。同时优化退火温度、引物浓度及琼脂糖凝胶浓度, 确定最佳的双重 PCR 扩增条件。当扩增片段仅有一个 (*ZFY/ZFX* 445/447 bp) 时, 说明该棕背鼯不存在 *SRY* 基因位点, 性别为雌性; 当扩增片段有两个 (*ZFY/ZFX* 445/447 bp 和 *SRY* 108 bp) 时, 说明该棕背鼯的性别为雄性; 当没有扩增片段时, 说明 PCR 扩增体系构建失败, 不能对棕背鼯的性别进行鉴定。

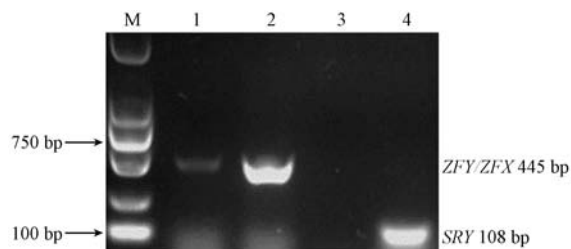
1.3.5 性别鉴定

选取 23 只棕背鼯 (表型判断为 6 只雄性, 3 只雌性, 其余鼠性别经解剖结果进行判断)、10 只 Wistar 大鼠 (5 只雄性, 5 只雌性) 和 8 只 BALB/c 小鼠 (3 只雄性, 5 只雌性), 获取其带有毛囊的新鲜被毛, Chelex-100 提取基因组 DNA。利用上述建立的双重 PCR 扩增方法进行性别鉴定。

2 结果

2.1 PCR 扩增

选取雄性、雌性棕背鼯各一只, 利用 Chelex-100 提取毛囊中 DNA, 分别以雄、雌 DNA 为模板, P1 和 P2 为引物建立 PCR 反应体系, 扩增 *ZFY/ZFX* 基因片段, 产物经琼脂糖凝胶电泳显示, 雌、雄性棕背鼯均有扩增条带 (图 2), 片段大小与 *ZFY/ZFX* 目的片段一致, 经测序后分析为 *ZFX* 基因。同时, 以 P3 和 P4 为引物, 扩增 *SRY* 基因片段, 结果显示雄性有与 *SRY* 基因目的片段大小一致的条带, 测序分析为鼠的 *SRY* 基因, 而雌性未扩增出条带 (图 2)。



注: M: DL 2000 DNA Marker; 泳道 1 和 2: *ZFY/ZFX* 基因扩增; 泳道 3 和 4: *SRY* 基因扩增。泳道 1 和 3: 雌性棕背鼯; 泳道 2 和 4: 雄性棕背鼯。

图 2 棕背鼯 *SRY* 基因和 *ZFY/ZFX* 基因的 PCR 扩增结果

Note. M: DL 2000 DNA Marker; Lane 1 and 2: PCR products of the *ZFY/ZFX* gene; Lane 3 and 4: PCR products of the *SRY* gene. Lane 1 and 3: Female voles; Lane 2 and 4: Male voles.

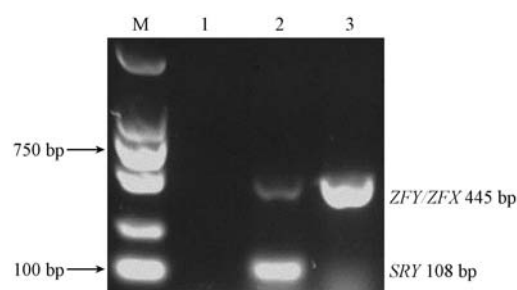
Fig. 2 PCR amplification products of the *SRY* and *ZFY/ZFX* genes in grey red-backed voles

2.2 双重 PCR 扩增

分别以雄性、雌性棕背鼯毛囊 DNA 为模板, 构建 *ZFY/ZFX* 基因和 *SRY* 基因双重 PCR 扩增体系, 结果显示雄性可扩增出两条片段 (*ZFX* 445 bp 和 *SRY* 108 bp); 而雌性只扩增出一条片段 (*ZFX* 445 bp), 未扩增出 *SRY* 基因片段; 阴性对照无条带 (图 3)。实验重复操作 3 次, 扩增结果一致, 稳定性较好, 双重 PCR 扩增体系构建成功。通过对扩增条件的优化, 退火温度为 55 $^{\circ}$ C 时扩增的 PCR 产物在 3% 琼脂糖凝胶电泳下观察效果最佳。

2.3 性别鉴定

获取 23 只棕背鼯、10 只 Wistar 大鼠及 8 只 BALB/c 小鼠的新鲜毛囊, 提取基因组 DNA, 利用本实验建立的 *ZFY/ZFX* 基因和 *SRY* 基因双重 PCR 扩增方法, 对 23 只棕背鼯进行性别鉴定, 结果 (图 4) 显示前 9 只已知性别的棕背鼯检测结果与表型判断

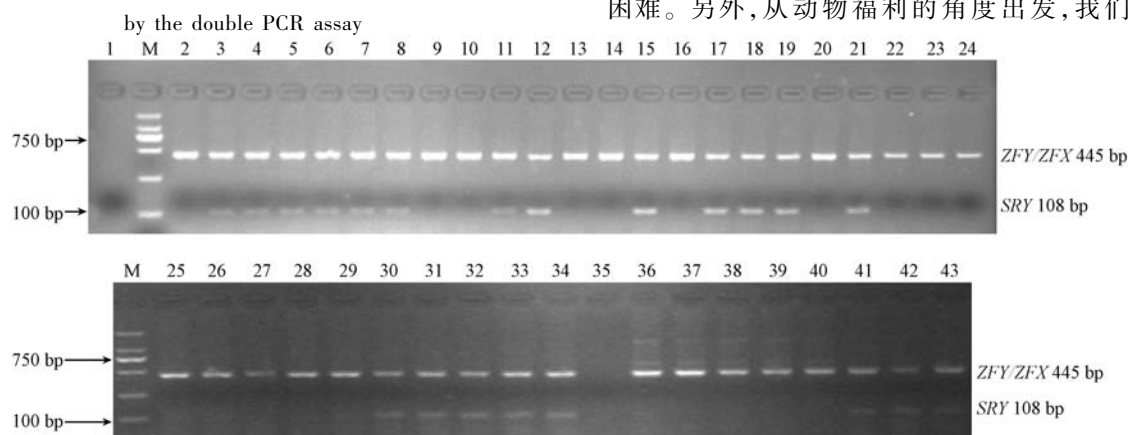


注: M: DL 2000 DNA Marker; 泳道 1~3: 分别为阴性对照、雄性棕背鼯、雌性棕背鼯。

图 3 雌、雄性棕背鼯 *SRY* 基因和 *ZFY/ZFX* 基因的双重 PCR 扩增结果

Note. M: DL 2000 DNA Marker; Lane 1~3: Negative control, male and female grey red-backed voles, respectively.

Fig. 3 Amplification products of the *SRY* and *ZFY/ZFX* genes in male and female grey red-backed voles

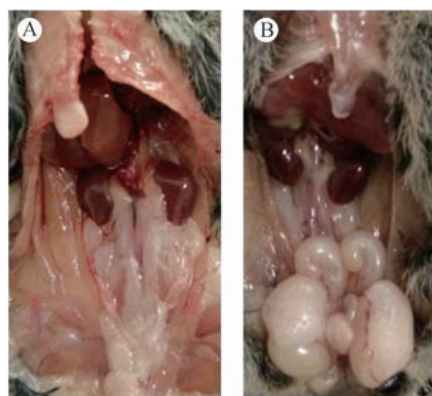


注: M: DL 2000 DNA Marker; 泳道 1 和 35: 阴性对照; 泳道 2~24: 分别为棕背鼯样品 1~23; 泳道 25~34: 分别为 Wistar 大鼠样品 1~10; 泳道 36~43: 分别为 BALB/c 小鼠样品 1~8。

图 4 棕背鼯、Wistar 大鼠和 BALB/c 小鼠的性别鉴定

Note. M: DL 2000 DNA Marker; Lane 1 and 35: Negative control; Lane 2~24: Samples 1~23 taken from grey red-backed voles, respectively; Lane 25~34: Samples 1~10 taken from Wistar rats, respectively; Lane 36~43: Samples 1~8 taken from BALB/c mice, respectively.

Fig. 4 Gender identification of the grey red-backed voles, Wistar rats and BALB/c mice



注: A: 雌性; B: 雄性。

图 5 棕背鼯性别的解剖结果

Note. A: Female; B: Male.

Fig. 5 Autopsy results demonstrating the gender identification of grey red-backed voles

一致,其中 6 只同时扩增出 *ZFY/ZFX* 基因和 *SRY* 基因片段,为雄性;3 只仅扩增出 *ZFY/ZFX* 基因片段,没有扩增出 *SRY* 基因片段,为雌性;其余未知性别的 14 只棕背鼯,鉴定为结果显示 7 只为雄性,7 只为雌性,与解剖结果一致(图 5)。PCR 扩增结果显示 10 只 Wistar 大鼠中 5 只为雄性,5 只为雌性;8 只 BALB/c 小鼠中 5 只为雌性,3 只为雄性,与解剖结果一致,说明建立的双重 PCR 扩增方法同样适用于大鼠和小鼠的性别鉴定。

3 讨论

对动物进行性别鉴定时,大多数 PCR 方法以动物的组织为实验材料,对于一些性情凶猛、活动敏捷、不易抓取和固定的动物,获取其组织材料比较困难。另外,从动物福利的角度出发,我们应尽量

减少对动物的伤害。已有文献证实以动物被毛为材料进行性别鉴定是完全可靠的,正确率 100%^[1]。本实验以棕背鼯的被毛为实验材料,利用 Chelex-100 提取毛囊中的 DNA,并以提取的 DNA 作为 PCR 扩增的模板,该方法不仅不损害研究对象,采样和 DNA 的提取也更加快捷,实验结果准确可靠,还可以降低实验成本。

与常规 PCR 方法(只针对雄性特异性基因进行一次扩增)不同,本实验构建了 *ZFY/ZFX* 基因和 *SRY* 基因的双重 PCR 扩增,以 *ZFY/ZFX* 基因作为 PCR 扩增的内参照,防止因 PCR 扩增 *SRY* 基因失败造成假阴性,该方法提高了准确率,同时也增加了 (下转第 107 页)

因素判断受试物对呼吸指标的影响,而不是简单地参照统计学意义的结果进行判断。总而言之,在应用无创遥测系统进行安全药理学研究时,应当在正式实验之前,尽量考虑到所有对猴的各种应激因素^[4],获取完善的基线(baseline)数据,并对应正式实验操作的特点,在记录动物 baseline 数据的时候安排合适的应激因素(可以人工模拟),包括喂食、巡视、清扫、短时间固定、给药等,为该批次动物进行的实验提供正确的参考依据。

本文应用植入遥测技术观察到的恒河猴呼吸、血压、心电、体温等生理指标基本上均有明显的昼夜节律变化,呼吸、血压、心电、体温等指标白昼均高于夜晚,符合正常恒河猴的生理周期特性。经过驯养的恒河猴在饥饿状态下对工作人员的喂食清扫活动的应激影响比较强烈。应用植入遥测技术可以对清醒无束缚状态下恒河猴心电、血压、呼吸、体温等进行连续监测,能真实地反映恒河猴 24 h 内上述生理指标的变化规律,为恒河猴在药理毒理学

研究中的应用提供参考。同时应用植入遥测技术,有助于提高药物安全药理学研究的效率,减少动物的使用数量,符合 3R 原则。

参考文献:

- [1] 国家食品药品监督管理总局 [EB/OL]. <http://www.sda.gov.cn/WS01/CL1616/101015.html>, 2014-05-13.
- [2] ICH. ICH Guidance for Industry ICH S7A: Safety Pharmacology Studies for Human Pharmaceuticals [S]. ICS 2001.
- [3] 齐卫红,李伟,李继红,等.健康恒河猴心电图研究[J].实验动物科学,2011,28(3):47-50.
- [4] 仇怀林,吕锡太.太行山猕猴动脉血压的研究[J].河南师范大学学报(自然科学版),1989,30(2):116-119.
- [5] Kaiser R, Tichenor S, Regalia D, et al. Evaluation of jacketed external telemetry in multiple social housing paradigms for cynomolgus monkey [J]. J Pharmacol Toxicol, 2015, 75: 180.
- [6] 梁春南. Beagle 犬安全药理遥测系统埋植手术术位开裂处治失败 1 例报告 [J]. 实验动物科学, 2012, 29(4): 52-54.

[收稿日期]2017-07-05

(上接第 99 页)

模板的利用率。本实验针对 *ZFY/ZFX* 基因和 *SRY* 基因建立的双重 PCR 方法,能够对棕背䟽的性别做出正确判断,具有快速、准确、简便等优点,可广泛应用于野生动物研究领域以及实验室繁育中的性别鉴定。该方法也可能存在一些局限性,对一些性别与正常情况不同,如 Y 染色体 *SRY* 基因缺失个体、染色体组型为 *XXY*、*XXX* 等个体,该方法不能做出正确鉴定,但这种情况在自然状态下发生的几率非常小^[1],可以忽略。通过利用针对 *ZFY/ZFX* 基因和 *SRY* 基因建立的双重 PCR 扩增方法,可以对棕背䟽的性别做出正确判断,合理安排分笼和繁殖,将对棕背䟽的实验室繁育有重要影响。

参考文献:

- [1] 徐艳春,马立新,白素英,等.应用 PCR 方法通过毛发进行哺乳动物性别鉴定[J].东北林业大学学报,2000,28(6):72-77.
- [2] 魏仰华,王凤臣,何亦祥,等.大林姬鼠棕背䟽引起流行性出血热爆发流行调查报告[J].人民军医,1983,34(11):26-29.
- [3] 姚李四.中朝长白山毗邻口岸区域鼠类和体表寄生虫及其携带病原初步研究[D].中国人民解放军军事医学科学院,2012.
- [4] 王元智,马芹,陆涛峰,等.棕背䟽的实验室繁育[J].中国实验动物学报,2017,25(2):169-173.
- [5] 牛永东,程詠,石刚刚.新生仔鼠早期性别的快速鉴定[J].

汕头大学医学院学报,2014,21(1):22-23.

- [6] 王淑香,闫明伟,王远东,等.麝鼠的性别鉴定[J].黑龙江畜牧科技,2000,28(1):40.
- [7] Page DC, Mosher R, Simpson EM, et al. The sex-determining region of the human Y chromosome encodes a finger protein [J]. Cell, 1987, 51(6): 1091-1104.
- [8] Schneider-Gädick A, Beer-Romero P, Brown LG, et al. ZFX has a gene structure similar to ZFY, the putative human sex determinant, and escapes X inactivation [J]. Cell, 1989, 57(7): 1247-1258.
- [9] Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, 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(6281): 240-244.
- [10] Koopman P, Gubbay J, Vivian N, et al. Male development of chromosomally female transgenic for Sry [J]. Nature, 1991, 351(6322): 117-121.
- [11] 王晗. PCR 法进行小鼠和牛的性别鉴定 [D]. 西北农林科技大学, 2005.
- [12] 武建中,田青.聚合酶链式反应在小鼠雄性胚胎性别鉴定中的优化研究[J].黑龙江畜牧兽医,2015,58(9):92-94.
- [13] 潘求真,冯国兴,郑晓亮,等.利用多重 PCR 技术快速鉴定小鼠的性别[J].黑龙江畜牧兽医,2010,53(19):125-126.
- [14] Chen Y, Dong Y, Xiang X, et al. Sex determination of *Microtus mandarinus mandarinus* is independent of Sry gene [J]. Mamm Genome, 2008, 19(1): 61-68.

[收稿日期]2017-08-03