

# 性别控制技术及其在家畜生产中的应用

郭海燕, 张昊, 李拥军\*, 程国虎 (扬州大学动物科学与技术学院, 江苏省动物遗传繁育与分子设计重点实验室, 江苏扬州 225009)

**摘要** 繁殖力是畜牧生产中重要的经济指标, 繁殖新技术对畜禽生产与繁殖起着巨大的推动作用。性别控制技术是繁殖新技术发展史上的一个重要里程碑。对性别控制技术及其在家畜生产中的应用进行了综述。

**关键词** 繁殖力; 性别控制; 家畜生产

中图分类号 S814 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2016)25-116-03

## Sex Control Technology and Its Application in Livestock Production

GUO Hai-yan, ZHANG Hao, LI Yong-jun\* et al (College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Key Laboratory for Animal Genetic, Breeding, Reproduction and Molecular Design of Jiangsu Province, Yangzhou, Jiangsu 225009)

**Abstract** Fertility is an important economic indicator in animal production. Breeding new technology plays a huge role in promoting the production and breeding of livestock. And sex control technology is an important milestone in the history of the development of new technology of reproduction. Based on these, we reviewed the sex control technology and its application in livestock production.

**Key words** Fertility; Sex control; Livestock production

繁殖力是评价家畜经济效益的重要指标, 对种畜而言繁殖力就是生产力。因此, 提高家畜的繁殖性能对于提高我国畜牧业的经济效益具有重要意义。随着科学技术的发展, 繁殖新技术在畜牧生产中的应用越来越广泛, 并取得了一定的成果。动物繁殖新技术包括性别控制、动物克隆、转基因技术、胚胎嵌合以及体外受精等。性别控制技术是繁殖新技术发展史上的一个重要里程碑。笔者对性别控制技术及其在家畜生产中的应用进行了综述。

## 1 性别控制技术

性别控制(Sex control)是指通过人为干预并按照人们的愿望使雌性动物繁殖出所需性别后代的一种繁殖新技术。性别控制技术在畜牧生产实践中有着重要的意义。性别控制技术可使受性别限制的生产性状(如泌乳性状)和受性别影响的生产性状(如生长速度、肉质等)获得更大的经济效益; 同时, 还能增强良种选种中的强度和提高了育种效率, 以获得最大的遗传进展。此外, 通过控制性别还能克服牛胚胎移植中出现的异性孪生不育现象, 排除伴性有害基因的危害等<sup>[1]</sup>。

**1.1 性别控制技术的发展基础** 公元前400年, 古希腊哲学家德谟克利特就提出通过抑制一侧睾丸从而控制后代性别的设想, 虽然这设想在现在看来十分荒谬, 但也反映出当时人们对性别控制技术的渴望。1923年, Painter首次证实了人类X和Y染色体的存在, 并指出卵子与Y精子结合时发育为雄性, 与X精子结合时发育为雌性。1959年, Welshons和Jacobs等提出Y染色体决定雄性的理论。1990年, Sinclair等<sup>[2]</sup>从人体中克隆到Y染色体上1个名称为SRY的基因。此后, SRY基因在其他动物中相继被克隆出来, 并证实其长度约为35 kb, 编码79个氨基酸(HMG盒), 这是SRY基因主要的功能区。研究发现, 人与哺乳动物的HMG区域的

同源性高达70%, 而在其他区域如此高的同源性<sup>[3-8]</sup>。Y染色体上SRY基因的发现是哺乳动物性别决定理论的重大突破, 也为性别控制技术奠定了理论基础。

**1.2 性别控制的方法** 目前, 性别控制的方法主要分为受精前的控制(X精子与Y精子的分离); 与受精后的控制(早期胚胎的性别鉴定)。受精前的控制是指通过在体外对精子进行干预, 使在受精之前便决定后代的性别; 受精后的控制指通过对胚胎进行性别鉴定, 从而获得所需性别的后代。在家畜生产实践中, 较为理想的方法是先分离X、Y精子, 然后再根据需求进行人工授精, 从而得到所需性别的后代。

**1.2.1 X与Y精子分离的方法。**从20世纪50年代开始, 人们就开始了X与Y精子的大小、带电荷数、密度及活力等方面的研究。研究表明, X、Y精子的差异主要表现在X精子的DNA含量大于Y精子以及Y染色体上的性别决定序列SRY<sup>[2,9]</sup>。此外, 二者在其他方面无明显差异。X与Y精子DNA含量的差异就是X、Y精子分离的理论基础<sup>[10]</sup>。

X与Y精子的分离方法有很多种, 包括物理分离法, 沉积分离法、梯度离心法、电泳法、白蛋白沉淀法、免疫学分离法以及流式细胞仪分离法等。其中, 流式细胞仪分离法具有效率高、准确率高等优点, 是目前畜牧生产中较为高效、可靠且使用范围广泛的一种方法<sup>[11-12]</sup>。

**1.2.1.1 流式细胞仪分离法。**目前, 在生产中使用最多、技术最为成熟的就是流式细胞仪分离法。此方法的理论依据就是X、Y精子头部DNA含量的差异。在家畜中X精子的DNA含量比Y精子高3%~4%<sup>[10]</sup>。根据这一差异, 用DNA特异性染料(常用Hoechst33342)对精子进行染色, 染料着色量与DNA含量成正比<sup>[13]</sup>。经过染色的精子会连同少量的稀释液逐个通过激光束, 然后精子上的荧光染料就会被激发形成光学信号, 探测器根据发光强度的强弱将信息传递给计算机, 计算机的信息处理系统会使发光强度高的带正电, 弱的带负电, 然后带电液滴通过高压电场被分开, 进入2个不同的收集管, 正电荷收集管为X精子, 负电荷收集管为Y精子<sup>[1,12]</sup>。经过多年的改进, 流式细胞仪分离的准确率可达

**作者简介** 郭海燕(1992-), 女, 河南洛阳人, 硕士研究生, 研究方向: 动物遗传育种与繁殖。\*通讯作者, 教授, 博士, 硕士生导师, 从事动物繁殖学和羊生产学的教学和科研工作。

**收稿日期** 2016-07-13

90%以上,此方法已经用于商业化,特别是在奶牛的生产中较为常用。

**1.2.1.2 免疫学分离法。**免疫学分离法是根据利用 H-Y 抗体检测 Y 精子质膜上存在的 H-Y 抗原,以此来分离 X 精子和 Y 精子<sup>[14]</sup>。Zavos<sup>[15]</sup> 和 Jones 等<sup>[16]</sup> 利用此方法都成功分离出 Y 精子。但是, Hendriksen P J M<sup>[17]</sup> 研究表明 X 和 Y 精子会共享抗原,它们都能够结合抗 H-Y 抗原抗体。此外,免疫学分离法处理精子的时间较长,会降低精子活力,从而导致受胎率的降低,因此此方法在生产实践中难以推广<sup>[18]</sup>。

**1.2.1.3 其他常见的分离方法。**

(1)密度梯度离心技术在 20 世纪 70 年代就已经出现。此方法的原理是 X、Y 精子的密度和比重不同,但由于其差异并不大,X、Y 精子的比重会随精子成熟情况的不同而变化,因此该方法的分离效果并不是十分理想,在生产实践中也并不常用<sup>[19-20]</sup>。

(2)电泳法的原理是 X、Y 精子表面携带的电荷不同,因此在电泳时会分别向两极移动并形成 2 条泳带,从而使精子分离<sup>[21]</sup>。但是,此方法的分离结果的准确性和重复性都不理想,且精子在电泳液中不易存活,因此此方法在生产中也不常用<sup>[22]</sup>。

(3)白蛋白柱分离法的技术基础是 Y 精子在白蛋白溶液中的泳动速度比 X 精子快。很多科研人员用此方法分离人或动物的 X、Y 精子,但结果却差别很大<sup>[23-24]</sup>。Ericsson 等<sup>[25]</sup> 首次用此方法分离到 85% 的人类精子。Evans 等<sup>[26]</sup> 认为白蛋白柱法不能有效分离人类的 X、Y 精子。由于此方法的效果存在较大的争议,所以此方法也不太常用。

**1.2.2 早期胚胎的性别鉴定。**通过对早期胚胎进行性别鉴定,移植已知性别的胚胎,也可以控制后代的性别比例。对胚胎进行性别鉴定有许多方法,如核型分析法、SRY-PCR 法、免疫学法和 X-相关酶法等。目前,在生产实践中最有效、最常用的早期胚胎的性别鉴定方法就是 SRY-PCR 法。

**1.2.2.1 核型分析法。**不同物种的染色体都有各自特定的形态结构,包括染色体的长度、着丝点位置、臂比、随体大小等特征,且这些形态特征是相对稳定的。胚胎的性别鉴定就是分析胚胎细胞的染色体组,具有 XX 染色体的是雌性胚胎,具有 XY 染色体的是雄性胚胎。核型分析一般采用切割胚(晚期桑葚胚、囊胚或扩张囊胚),检测时一半用于鉴定性别,另一半用于移植或冷冻<sup>[27]</sup>。如果想要扩张囊胚,切割时可切成含内细胞团的半胚和含滋养层细胞的半胚,前者用于冷冻和移植,后者用于核型分析<sup>[27]</sup>。

核型分析法的主要步骤如下:先取部分胚胎细胞,用秋水仙素处理使细胞处于有丝分裂的中期,然后制成染色体标本,通过显微摄影分析染色体组成并确定胚胎性别<sup>[1]</sup>。此方法的准确率可达 100%,但此方法对胚胎损伤较大,且操作有一定难度,因此在生产实践中难以推广。

**1.2.2.2 X-相关酶法。**X-相关酶法是通过测定早期胚胎中与 X 染色体连锁相关酶的活性来鉴定胚胎性别的一种方

法。此方法通过观察相关酶与底物着色反应的颜色来鉴别胚胎性别。此方法的准确性较低,且不能检测桑葚胚以后的胚胎性别,因此在生产中并不常用<sup>[28]</sup>。

**1.2.2.3 免疫学法。**胚胎的免疫学法与 X、Y 精子分离的免疫学法很相似,都是根据雄性的 H-Y 抗原去鉴别性别,就是利用 H-Y 单克隆抗体或血清检测胚胎是否存在 H-Y 抗原,从而达到对胚胎进行性别鉴定的一种方法。利用此方法鉴定小鼠和奶牛的胚胎性别,其雄性与雌性鉴别的准确率均能达到 80% 以上<sup>[29-30]</sup>。由于此方法在操作中会破坏胚胎,且 H-Y 抗原是弱抗原,观察人员的主观因素对结果的影响很大,从而会导致结果存在较大误差,因此在生产实践中也难以推广。

**1.2.2.4 SRY-PCR 法。**SRY-PCR 法就是指利用雄性特异性 DNA 探针和 PCR 扩增技术对哺乳动物早期胚胎进行性别鉴定的一种方法。首先提取胚胎的 DNA,以此为模板,用 SRY 基因的一段碱基作为引物进行 PCR 扩增,再用 SRY 特异性探针扩增引物进行检测,若检测结果为阳性即为雄性胚胎;若检测结果为阴性,则为雌性胚胎。此外,也可对 PCR 产物进行电泳检测,出现特异性条带的为雄性,不出现特异性条带的为雌性<sup>[28]</sup>。此方法对胚胎损伤小,准确率高,可达 95% 以上<sup>[31]</sup>。此方法在生产中较为常用,运用此方法时应注意避免污染,防止出现假阳性<sup>[32]</sup>。

## 2 性别控制在家畜生产中的应用

性别控制技术对于家畜生产具有重大意义,在生产中能够增加所需性别的动物,提高家畜生产的经济效益,特别是对奶牛产业起着重要的推动作用。此技术还可以通过控制后代的性别,从而避免异性胚胎移植导致的孪生不育现象;同时对预防伴性遗传疾病也起着举足轻重的作用<sup>[28]</sup>。

**2.1 流式细胞仪在家畜生产中的应用** 由于对胚胎进行性别检测时,会对胚胎造成一定程度的损害,从而会导致妊娠率的降低;鉴定时对样本有一定的要求,对劣质胚胎的鉴定效果较差,因此在家畜生产上使用最多的是流式细胞仪分离法<sup>[12]</sup>。

在奶牛行业中,流式细胞仪得到了广泛应用。截至 2012 年,全国拥有 36 台流式细胞仪,分布在洛阳白马寺种公牛站、河南鼎元种牛有限公司、北京奶牛中心种公牛站、赛克星股份有限公司以及其他一些生物公司和种公牛站<sup>[33]</sup>。

2006 年宝鸡市在陕西省率先使用了性控冻精技术,累计已配种上万头,母犊率达 92% 以上<sup>[34]</sup>。“十一五”期间,在全国 2 700 多个奶牛场累计使用奶牛性控冻精 150 多万支,生产奶牛母犊 50 余万头,总产值达 25 亿元<sup>[35]</sup>。陕西省千阳县 2008 年开始使用此技术,截至 2015 年底累计产犊母犊单项增加经济收入 836.42 万元<sup>[36]</sup>。

**2.2 SRY-PCR 技术在家畜生产中的应用** 对于性染色体差异较小的物种而言,使用 X、Y 精子分离法较为困难,且后代有一定的畸形率<sup>[37]</sup>。因此,SRY-PCR 在家畜生产中也是一种常见的方法。PCR 具有快速、简便、特异性强等特点,此方法在养牛业中已经广泛应用<sup>[38]</sup>。在试验中,PCR 分为常

规 PCR、多重 PCR 和巢式 PCR。早期试验大多采用常规 PCR 法,后来为避免扩增失败而导致的判断结果的错误,一般采用多重 PCR 法,在扩增性别特异引物的同时扩增常染色体序列作为阳性对照<sup>[39]</sup>。巢式 PCR 法就是同时根据 1 个性别特异基因设计 1 对外引物,获得被测基因较长的扩增产物,再根据扩增产物序列设计第 2 对引物(内引物)对产物进行第 2 次扩增<sup>[37]</sup>。研究表明,与其他 PCR 法相比,巢式 PCR 法胚胎性别鉴定的灵敏度得到大大提升<sup>[40-41]</sup>。在实际生产中,将多重 PCR 与巢式 PCR 结合起来可以提高结果的可靠性<sup>[37]</sup>。在奶牛产业中,为了多生母犊,可以对 *SRY* 基因进行定点突变,使之不再表达,从而控制牛犊性别<sup>[42]</sup>。

### 3 小结

性别控制的各种技术都有各自的优点与缺点。随着科学技术的进步,性别控制技术的准确度与灵敏度一定会得到更大提升。相信在不久的将来,性别控制技术就会走上商业化与生产化的规模,同时也一定会为家畜产业带来更大的经济效益。

### 参考文献

- [1] 朱士恩. 家畜繁殖学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2009.
- [2] 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(6281): 240-244.
- [3] GUBBAY J, COLLIGNON J, KOOPMAN P, et al. A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes[J]. *Nature*, 1990, 346(346): 245-250.
- [4] JUST W, RAU W, VOGEL W, et al. Absence of Sry in species of the vole *Ellobius*[J]. *Nature genetics*, 1995, 11(2): 117-118.
- [5] KOOPMAN P. The molecular biology of SRY and its role in sex determination in mammals[J]. *Reproduction fertility & development*, 1995, 7(4): 713-722.
- [6] NAGAI K. Molecular evolution of Sry and Sox gene[J]. *Gene*, 2001, 270(1/2): 161-169.
- [7] FOSTER J W, BRENNAN F E, HAMPIKIAN G K, et al. Evolution of sex determination and the Y chromosome: SRY-related sequences in marsupials[J]. *Nature*, 1992, 359(6395): 531-533.
- [8] 邵长伟, 陈松林. 脊椎动物性别决定基因与性染色体演化机制[J]. *农业生物技术学报*, 2012, 20(12): 1463-1474.
- [9] JOHNSON L A, WELCH G R, RENS W. The Beltsville sperm sexing technology: High-speed sperm sorting gives improved sperm output for in vitro fertilization and AI[J]. *Journal of animal science*, 1999, 77(S2): 213-220.
- [10] JOHNSON L A. Method to preselect the sex of offspring: US, US5135759[P]. 1992.
- [11] GARNER D L, EVANS K M, SEIDEL G E. Sex-sorting sperm using flow cytometry/cell sorting[M]. *Spermatogenesis: Methods and Protocols*, 2013: 279-295.
- [12] 张华林, 刘光磊, 潘斌, 等. 奶牛性控冻精技术应用研究进展[J]. *中国奶牛*, 2015(23): 15-20.
- [13] 张莹霞. 流式细胞仪分离哺乳动物精子的研究进展[J]. *畜牧与饲料科学*, 2010, 31(2): 141-142.
- [14] KAWARASAKI T, WELCH G R, LONG C R, et al. Verification of flow cytometrically-sorted X-and Y-bearing porcine spermatozoa and reanalysis of spermatozoa for DNA content using the fluorescence in situ hybridization(FISH) technique[J]. *Theriogenology*, 1998, 50(4): 625-635.
- [15] ZAVOS P M. Preconception sex determination via intra-vaginal administration of HY antisera in rabbits[J]. *Theriogenology*, 1983, 20(2): 235-240.
- [16] JONES P P, 蔡正华. 用免疫磁珠法分离 X 精子与 Y 精子[J]. *中国畜牧兽医*, 1993(2): 4.
- [17] HENDRIKSEN P J M. Do X and Y spermatozoa differ in proteins? [J]. *Theriogenology*, 1999, 52(8): 1295-1307.
- [18] 田从岩, 田从生, 张大义. 奶牛繁殖性别控制新技术的推广研究[J]. *兽医导刊*, 2015(24): 65.
- [19] 杨阳. 安徽省奶牛性控冻精应用效果调查及评估[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2013.
- [20] 曹世祯, 韩建林. 用 Percoll 不连续密度梯度分离奶牛精液对控制性别比率的研究[J]. *中国奶牛*, 2000(1): 19-20.
- [21] BLECHER S R, HOWE R, LI S, et al. A new approach to immunological sexing of sperm[J]. *Theriogenology*, 1999, 52(8): 1309-1321.
- [22] 张淑娟. 哺乳动物性别控制研究进展[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2005(2): 63-64.
- [23] WHITE K L, BRADBURY M W, ANDERSON G B, et al. Immunofluorescent detection of a male-specific factor on preimplantation bovine embryos[J]. *Theriogenology*, 1984, 21(1): 275.
- [24] ROSE G A, WONG A. Experiences in Hong Kong with the theory and practice of the albumin column method of sperm separation for sex selection[J]. *Human reproduction*, 1998, 13(1): 146-149.
- [25] ERICSSON R J, LANGEVIN C N, NISHINO M. Isolation of fractions rich in human Y sperm[J]. *Nature*, 1973, 246(5433): 421-424.
- [26] EVANS J M, DOUGLAS T A, RENTON J P. An attempt to separate fractions rich in human Y sperm[J]. *Nature*, 1975, 253(5490): 352-354.
- [27] 王士勇. 应用核型分析法鉴定家畜胚胎性别[J]. *黑龙江动物繁殖*, 2016(2): 85.
- [28] 赵雪. 奶牛性别控制技术研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2012.
- [29] 王达珍, 郭继彤, 李煜, 等. 免疫学方法鉴定小鼠早期胚胎性别的研究[J]. *内蒙古大学学报(自然科学版)*, 1994(5): 561-565.
- [30] RAMALHO M F P D T, GARCIA J M, ESPER C R, et al. Sexing of murine and bovine embryos by developmental high-titer arrest induced by H-Y antisera[J]. *Theriogenology*, 2004, 62(9): 1569-1576.
- [31] 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.
- [32] 魏红芳, 秦粉菊, 徐照学, 等. 家畜性别控制与胚胎性别鉴定技术在畜牧业中的应用[J]. *河南农业科学*, 2001(1): 27-29.
- [33] 朱化彬, 朱化彬, 王皓宇, 等. 胚胎生物技术进展及其在良种肉牛扩繁中的应用[C]//第二届中国肉牛选育改良与产业发展国际研讨会暨中国畜牧兽医学学会养牛分会第八届二次学术研讨会. 杨凌: 中国畜牧兽医学学会, 西北农林科技大学, 2013.
- [34] 马国际, 程助国, 朱大年. 陕西牛人工授精技术应用现状分析[J]. *家畜生态学报*, 2015(12): 80-84.
- [35] 李喜和. 家畜繁育生物技术研究与产业化推广应用[J]. *中国农业科技导报*, 2013(3): 64-71.
- [36] 常小彦, 倪同堂. 奶牛性控繁育技术在奶牛生产中的推广与应用[J]. *兽医导刊*, 2016, (4): 48.
- [37] 林博. 快速 PCR 方法的建立及其在牛精子和胚胎性别鉴定中的应用[D]. 北京: 中国农业科学院, 2010.
- [38] 杨建民, 谭丽玲. PCR 方法用于奶牛早期胚胎的性别鉴定[J]. *遗传*, 1995(2): 14-16.
- [39] 吴阳升, 刘明军, 郭志勤. 连续多重 PCR 牛胚胎性别鉴定[J]. *新疆农业大学学报*, 2004, 27(2): 29-32.
- [40] 肖海霞, 陈从英, 陈静波, 等. 应用 PCR 技术鉴定牛早期胚胎性别方法优化的研究[J]. *云南畜牧兽医*, 2002(4): 1-2.
- [41] 王晗, 窦忠英. 应用巢式及复合 PCR 对小鼠早期胚胎进行性别鉴定[J]. *西北农业学报*, 2005, 14(4): 158-161.
- [42] 孙伟丽, 李光玉, 钟伟, 等. SRY 基因研究进展及其在动物性别鉴定中的应用[J]. *黑龙江动物繁殖*, 2008, 16(3): 1-3.