

席继锋, 王香祖, 张永生, 等. 哺乳动物性别决定与性别控制研究进展 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56 (7): 140-148.

XI J F, WANG X Z, ZHANG Y S, et al. Advances in sex determination and sex control in mammals [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56 (7): 140-148.

哺乳动物性别决定与性别控制研究进展

席继锋^{1,2}, 王香祖^{1,2*}, 张永生², 刘颖³, 杨楠⁴

(1. 新疆农业职业技术学院, 新疆 昌吉 831100;

2. 石河子大学动物科技学院, 新疆 石河子 832003;

3. 昌吉市六工镇农业发展研究中心, 新疆 昌吉 831100;

4. 新疆天山畜牧生物育种有限公司, 新疆 昌吉 831100)

摘要: 哺乳动物性别决定是一个由许多基因参与的级联调控过程。研究发现, 参与哺乳动物性别决定的基因很多, 比如 *Sry*、*Sox9*、*MIS*、*SF-1*、*Zfy* 等。通过研究哺乳动物的性别决定相关基因, 结合现代分子生物学技术, 如 RNA 干扰技术和基因工程技术等, 有望从基因层面实现人为控制动物后代性别的目标。本文主要对哺乳动物性别决定相关基因和性别控制技术进行了综述, 以期为畜牧生产中家畜的性别控制提供参考。

关键词: 哺乳动物; 性别决定; 性别控制

中图分类号: S814

文献标志码: A

文章编号: 0529-5130(2024)07-0140-09

Advances in sex determination and sex control in mammals

XI Jifeng^{1,2}, WANG Xiangzu^{1,2*}, ZHANG Yongsheng², LIU Ying³, YANG Nan⁴

(1. Xinjiang Agricultural Vocational Technical College, Changji 831100, China;

2. College of Animal Science and Technology, Shihezi University, Shihezi 832003, China;

3. Agricultural Development Research Center of Liugong Town, Changji 831100, China;

4. Xinjiang Tianshan Animal Husbandry and Biological Breeding Co., Ltd., Changji 831100, China)

Abstract: Sex determination in mammals is a delicate and complex process involving many genes. Studies find that there are many genes involved in mammalian sex determination, such as *Sry*, *Sox9*, *MIS*, *SF-1*, *Zfy* and so on. Studying the genes related to sex determination in mammals, in combination with modern molecular biology techniques, such as RNA interference, and genetic engineering techniques, such as transgenic technology, is expected to achieve the ideal goal of artificially controlling the sex of animal offspring at the gene level. In this paper, the genes related to mammalian sex determination and sex control techniques are reviewed in order to provide references for sex control in livestock production.

Keywords: mammal; sex determination; sex control

家畜的性别控制对于优质遗传资源的利用及保护、养殖场经济效益的提高等方面均具有重要的现实意义。然而, 家畜的性别控制因家畜体内复杂的基因调控网络和调节机制而成为功能基因组学、分子生物学、基因工程、胚胎工程等领域的研究热点之一。生产实践中, 家畜的性别控制主要有 2 条途径: 第一是在母畜受精前将 X、Y 精子分离开, 然后用分离后的只含 X 精子或 Y 精子的精液配种繁殖以控制家畜后

代的性别。比如流式细胞仪分离精子法, 分离的准确率高 (>95%), 操作简便, 重复性好, 是目前最有效、最直接的分离方法。然而该方法所使用的仪器设备昂贵、成本高、分离速率慢、分离后的精子活力低, 因而限制了其在生产中的推广应用。第二是在胚胎移植前对胚胎的雌雄性别进行鉴别, 然后将单一性别的胚胎移植到受体母畜子宫内以控制家畜后代的性别。该方法准确率高, 遗传稳定性好, 可以快速扩大优质母畜群体数量, 市场应用前景广阔。但是该方法会对胚胎造成一定的损伤, 导致母畜的受胎率降低, 胚胎移植的成本较高, 因此也难以在生产中推广普及。近年来, 基因编辑技术 (CRISPR/Cas9)、RNA 干扰技术 (RNAi) 的快速发展使得探索从基因层面控制家畜的性别变成了可能。目前, 这些技术被广泛

收稿日期: 2023-09-07; 修回日期: 2024-06-11

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金面上项目 (2021D01A110, 2021D01A111)

第一作者: 席继锋, 男, 博士, 副教授

* 通信作者: 王香祖, 博士, 副教授, 主要从事动物遗传育种方面的研究, E-mail: 568444591@qq.com。

应用于探索细胞基因功能、传染病检测及肿瘤诊断与治疗等基因工程和生物医学领域，具有很高的应用价值和广阔的市场前景。

1 哺乳动物性别决定与基本机制

大多数哺乳动物都存在两性的发育，即雌雄异性，雄性为XY型，雌性为XX型，这对它们的生存和进化至关重要。研究发现，人类染色体性别决定基因（sex-determining region Y, SRY, 人类以外的物种表示为 *Sry*）是与性别决定相关的非常重要的基因。小鼠Y染色体上 *Sry* 的存在与该基因具有性别决定的功能一致。通过引入 *Sry* 将XX小鼠转化为雄性的试验证明，*Sry* 是哺乳动物性别决定的开关基因。与其他在进化中得到很好保护的发育系统不同，性别决定在动物界是高度可变的。事实上，*Sry* 只在哺乳动物中发现，尽管不是在所有哺乳动物中都存在（单孔目动物缺乏 *Sry*）。

关于真兽类哺乳动物性别决定的遗传基础有2个特征。首先，胚胎发育为雄性或雌性取决于双向潜能胚胎性腺是否分化为睾丸或卵巢，属于初级性别决定，一旦选择了睾丸或卵巢的发育途径，所有随后的次级性别决定特征都是性腺分泌激素的结果；其次，Y染色体是雄性哺乳动物的性染色体，在正常情况下，决定个体性别的是Y染色体存在与否，而不是X染色体的数量。这2个中心原则使遗传学家能够根据性染色体Y上的基因来构建哺乳动物性别决定的遗传基础问题。人类的睾丸决定因子（testis determining factor, *TDF*）及小鼠的睾丸决定基因（testis-determining Y gene, *Tdy*）的分离是全球科学家研究的热点。1990年科学家成功鉴定出人类的睾丸决定基因 *SRY*。通过对人类Y染色体上35 kb区域（男性性别确定所需的最小已知区域）的搜索，鉴定出了1个显示 *TDF* 所有预测特性的蛋白在哺乳动物上高度保守，在雄性睾丸分化前的发育性腺中表达，并编码具有明显调节潜能的DNA结合蛋白。1991年，雌性转基因小鼠的 *Sry* 证明：尽管存在2条X染色体和缺少精子发生所需的Y染色体基因而不育，但这只小鼠发育为正常雄性^[1]。因此，*Sry* 被证明是哺乳动物睾丸测定所需的唯一与Y染色体相关的基因。

目前，最详细的哺乳动物性别决定研究是以小鼠为模型进行的。小鼠的生殖嵴一般是在雌雄鼠交配后（days post coitum, dpc）的10.0 d出现^[2]。此时的两性生殖嵴没有任何差异，它们都具有分化成为支持细胞（支持睾丸中的生殖细胞）或颗粒细胞（在卵巢中具有同源作用）的前体细胞的功能。在小鼠胚胎

发育过程中，双潜能性腺从生殖嵴上升10.5 dpc。在XY生殖嵴的体细胞中，*Sry* 表达在10.5 dpc开始，在11.5 dpc达到峰值，然后在12.5 dpc减弱^[3-5]。几个小时后，*SOX9* 过表达，支持细胞被诱导分化。在11.5~12.5 dpc时 *SOX9* 的表达量最高，出生后表达量下降，出现环状（*FGF9*、*PGD2* 和 *SOX9* 本身）支持，*SOX9* 随后激活许多雄性特异性基因，包括 *Amh*。在12.5 dpc时，睾丸索已经形成，睾丸和卵巢之间的形态学差异显著。无 *Sry* 时，*FOXL2*、*WNT4* 和 *RSPO1* 表现出雌性特异性。在10.0~10.5 dpc时，特异性性腺发育由XY生殖嵴的性腺细胞中的 *Sry* 表达启动^[4-5]。

在11.0 dpc时，*SRY* 蛋白最初在生殖嵴中心的一组体细胞中表达。11.5 dpc时表达 *SRY* 蛋白的细胞域随后扩张，占据整个生殖嵴，这些细胞被称为支持细胞前体。到12.0 dpc时，*SOX9* 的表达在这些相同的细胞中被激活，这些细胞现在被称为前支持细胞。表达 *SOX9* 的细胞通过12.5 dpc组装成睾丸索，称为支持细胞。*SOX9* 在13.5 dpc及以上的支持细胞中继续表达^[6]。

1.1 *Sry* 与性别决定

Sry 的活性导致双向潜能胚胎性腺发育成睾丸。在小鼠中，性腺起源于生殖嵴，这种结构出现在交配后约10.5 d中肾的增厚。中肾和生殖嵴一起被称为泌尿生殖嵴。发育中的性腺包括2个共同的已知细胞谱系的雄性和雌性：生殖细胞和至少3种体细胞类型即类固醇细胞、支持细胞和结缔组织细胞。原始生殖细胞从原始裂隙的起点沿着背侧肠系膜迁移，并在10.5~12.0 dpc之间到达生殖嵴。生殖嵴的体细胞部分来自间叶和上覆的体腔上皮，以及来自相邻中肾的细胞^[7]。支持细胞系是第一个表现出性别特异性分化的细胞。在雄性中，产生支持细胞约在12.5 dpc，而在雌性中却分化为卵巢卵泡细胞。支持细胞的排列导致特征性睾丸索的形成。第一种支持细胞的产物是苗勒氏抑制物，这是一种导致雌性生殖道胶原退化的糖蛋白，还有睾酮和二氢睾酮等睾丸激素，由类固醇前体细胞（睾丸间质细胞）的雄性衍生物产生。这些促进了沃尔夫氏管系统进入附睾、输精管和精囊的发育。目前还没有发现与这些雌性生殖器发育所必需的相对应的雌性激素。如果要预测在睾丸决定和分化过程中 *Sry* 活性的时间和位置，应该是在发育中的雄性性腺的10~12 dpc之间。此外，预测 *Sry* 的精确功能，它很可能决定了上述一个或多个性腺细胞谱系的发生，包括直接激活编码基因或调节睾丸激素的生产。

Sry 序列的排列方式表明，其保守性主要局限于

高迁移群组 (high mobility group, HMG)^[8-9]。N 末端在非灵长类群中表现出长度的异质性, 而 C 末端非盒区即使在灵长类中也表现出长度的异质性, 其广泛存在于小鼠 *Sry* 中, 有 314 个氨基酸残基, 而在人类 *SRY* 中只有 70 个氨基酸残基。通过对小鼠生殖嵴 *Sry* 转录本结构的测定, 表明该区域存在于性别决定 *Sry* 蛋白中。事实上, 对于不同物种的非框 *Sry* 开放阅读框中所观察到的高度序列差异和高频率的非同义突变, 会在 2 种不同的解释中进行选择: 非盒区要么是功能上不受限制的, 要么是发生了物种特有的适应性差异^[10]。小鼠和人类 *SRY* 在影响转录调控的方式上功能不同的可能性, 支持了 *SRY* 蛋白的适应性差异的观点。人类 *SRY* 先前被证明可以在体外激活报告基因的转录^[11], 但是关于功能可分离的 DNA 结合和转录激活域的证据仅存在于小鼠 *Sry*。如果小鼠与人类之间转录调控机制存在差异的话, 可以预测, 当在小鼠基因组背景上激活时, 人类 *SRY* 可能会丧失功能。这种情况与人类和灵长类形成的相对同质的 *SRY* HMG 盒形成对比^[12]。在小鼠和人类植入前胚胎中都检测到了 *Sry/SRY* 转录本。虽然有人提出这一表达可能与雄性植入前胚胎相对于雌性生长更快有关^[13], 但目前还不知道这是否有任何生物学意义。可以肯定的是支持细胞发育成睾丸索并刺激生殖细胞、间质细胞、睾丸血管细胞和其他类型细胞的性别发育。

缺乏 *Sry* 的 XX 性腺, *Wnt4* 和 *FOXL2* 在 11.5 ~ 12.5 dpc 时表达雌性特异性, 并上调卵泡抑制素等下游基因。雌性特异性基因的表达引起卵泡膜细胞和颗粒细胞的分化以及卵母细胞的产生和卵泡的形成。SOX 蛋白一般充当细胞分化开关的作用^[14]。*SRY* 具有 HMG-DNA 结合的结构域, 与 DNA 双螺旋结构中的小沟 (A/T) ACAA (T/A) 结合, 形成 60° ~ 85° 弯曲^[15]。另外, 在小鼠的 *Sry* 基因序列的 C 末端还存在一个富含谷氨酰胺 (Q) 的结构域, 该结构域具有转录激活功能。缺少该结构域的 *Sry* 转基因模型不能引起雄性发育^[16]。将人的 *SRY* 转入小鼠, 最终小鼠发育为雄性^[17-18], 提示存在于 *SRY* 上的非 HMG 结构域同样保守。

在小鼠中, *Sry* 在性腺中的表达在空间和时间上都受到严格的调节。在小鼠胚胎中, *Sry* 的表达在 XY 生殖嵴的体细胞中从 10.5 dpc 开始, 在 11.5 dpc 达到峰值, 然后在 12.5 dpc 减少^[19-23]。*Sry* 在人类胎儿期和沙袋鼠性腺及多个组织中表达。小鼠 *Sry* 表达起始于生殖嵴的中心, 然后在几个小时内延伸到性腺的整个过程^[23]。因此, 并非生殖嵴的所有部分都同时暴露于 *Sry* 转录物或蛋白质中。*Sry* 在小鼠中的瞬

时动态表达突出了 *Sry* 在发育性腺的个体体细胞中的关键时间窗内发挥作用的概念。启动 *Sry* 表达的时间因物种的不同而不同。如人类和山羊的 *Sry* 基因在出生后也有表达^[24]。在通过组合 XX 和 XY 早期小鼠胚胎产生嵌合体的试验中, 结果产生了含有不同比例 XY 细胞的性腺。当 35% ~ 40% 的体细胞是 XY 时形成睾丸, 少于 10% 的体细胞是 XY 时形成卵巢^[25], 表明中等比例的 XY 细胞产生睾丸。

1.2 SOX9 与性别决定

在 XY 小鼠性腺中, *SOX9* 表达在 *Sry* 表达开始后立即在支持细胞前体中上调, 并模拟 *Sry* 表达的波浪式模式^[26]。使用 *SOX9* 和 *Sry* 抗体对正常小鼠睾丸发育的研究揭示了支持细胞前体的存在, 这些细胞表达 *SOX9*, 但没有首先表达 *Sry*。此外, 在一个性别逆转的嵌合体 XX 个体中发现了 *SOX9* 的重复。这些观察表明, *SOX9* 对于睾丸的确定是充分和必要的, XY *SOX9* 无效的性别逆转表型证实了这一结论^[27], 而 XX *SOX9* 在小鼠性别决定过程中却是过表达^[28-29]。与 *SOX9* 作为睾丸决定因子的作用一致, *Amh* 和 *PGDs* 已被确定为 *SOX9* 的直接靶标^[30]。与 *Sry* 不同, *SOX9* 在非哺乳动物和脊椎动物中是保守的。因此, *SOX9* 在性别决定中的作用被认为是脊椎动物的起源和关键。此外, 由于小鼠 XX 性腺中 *SOX9* 过表达的表型与 *Sry* 过表达的表型相似, *SOX9* 被认为是 *Sry* 下游激活睾丸决定程序剩余部分所需的唯一基因。

1.3 苗勒氏抑制物转录本 (MIS) 与性别决定

在小鼠中, *MIS* (müllerian inhibitory substance) 首次在睾丸 12.5 dpc 处被检测到^[31]。在雄性小鼠胎儿中, *MIS* 的功能、时间和表达位点使其成为 *Sry* 激活的明显靶点。*Sry* 在激活 *MIS* 表达中的作用有两方面的证据: 首先, 纯化的 *Sry* 蛋白在体外被证明与 *MIS* 启动子的上游元件结合; 其次, 用 *Sry* 表达质粒和错误启动子报告基因构建物共转染性腺嵴细胞系, 导致报告基因激活^[32]。过度表达 *MIS* 的转基因雌性小鼠表现出苗勒管衍生结构的缺失、生殖细胞的丧失以及含有支持细胞的精原小管的最终外观。这一表型类似于牛不孕不育, 即在发育过程中暴露在一对雄性双胞胎血液中的雌性胎儿, 并表现出性腺反转。

1.4 类固醇生成因子 1 (SF-1) 与性腺发育

SF-1 (steroidogenic factor 1) 是肾上腺皮质激素的关键调节因子^[33], 对性腺发育和性别分化至关重要。*SF-1* 无效等位基因纯合子小鼠缺乏肾上腺, 并表现出完全的性腺发育不全^[34]。到 12 dpc 时, 雄性和雌性小鼠的性腺组织都因凋亡而消失, 到 12.5 dpc 时, 性腺消失。有数据表明, *SF-1* 可以调节 *MIS* 基因的表达。此外, 在胚胎发育过程中, *SF-1* 和 *MIS*

在支持细胞中的空间和时间表达一致。在发育中的小鼠性腺中早在 9.5 dpc 就检测到 *SF-1* 转录本, 以及 *SF-1* 缺陷小鼠性腺发育的早期阻滞表明它必须调节性腺发育所需的其他基因^[35]。在发育中的性腺中观察到的 *SF-1* 表达的性别二态模式可能是 *Sry* 直接激活 *SF-1* 的证据。

1.5 piRNA/PIWI 与精子发生

Argonaute 蛋白家族包括 AGO 亚家族及 PIWI 亚家族, AGO 亚家族在多种组织中表达, 而 PIWI 亚家族在动物生殖腺中特异性表达^[36]。piRNAs (PIWI interacting RNAs) 是一类可与 PIWI 相互作用、小的非编码 RNAs (small noncoding RNAs, sncRNAs), 长度为 24~32 nt, 一般在动物生殖腺细胞中特异性地表达。小鼠基因组编码 3 个 PIWI 亚家族蛋白的基因, 分别为 MIWI2、MILI、MIWI, 它们所编码的蛋白质在进化过程中均具有保守的结构域: PAZ (piwi-argonaute-zwille)、PIWI 和 MID (middle domains)^[37]。这 3 个蛋白的表达模式呈现出一定的发育进程和空间特异性, 暗示可能通过一种相互协调的模式调控生殖细胞的发育。MIWI 表达于妊娠后 12.5 d 的原始生殖细胞 (PGC) 到产后 20 d 的圆形精子细胞阶段, 产前 MILI 定位于细胞质斑点状颗粒中, 产后 MILI 定位于细胞质的拟染色体颗粒中, 而且 MILI 是唯一在雌性生殖细胞中表达的 PIWI 蛋白^[38]。MIWI2 表达于妊娠后 14.5~15.5 d 的生殖细胞至分娩阶段, MIWI2 在产后的表达快速下降, 产后 4 d 不表达。MIWI2 定位于细胞核又定位于细胞质。MIWI 的表达从产后精母细胞持续到后期的精子细胞, 但在成熟的精子中不表达^[39-40]。敲除 MIWI 的雄性小鼠出现不育现象, 原因是精子发生在第一次减数分裂的前期被阻断^[41], 然而雄性小鼠的 PGC 的发育及雌性小鼠生殖细胞的发生不受影响。敲除 MIWI2 的雄性小鼠具有类似的表型^[42]。研究发现, 敲除 MILI 和 MIWI2 后, 均导致胚胎期小鼠生殖细胞逆转座子的转录活性增加及 DNA 甲基化程度的降低^[43]。提示在精子发生过程中 MILI 和 MIWI2 可以不同程度地结合 piRNAs, 且 MILI 结合的 piRNAs 呈现发育进程动态变化。

综上, 尽管人们在哺乳动物的性别决定领域有了一定的研究积累, 对性别决定的机制有了一定的认识, 初步揭示性别决定关键基因 *Sry* 的功能, 但是关于性别决定的多基因信号传导通路的作用机制还不清楚, 需要今后作进一步深入研究和探讨。

2 哺乳动物的性别控制方法

动物的性别控制一直都是基因工程和胚胎工程技

术研究的热点领域, 对动物的生命活动规律等问题的认识具有重要的指导意义。动物的性别是从胚胎发育早期开始到动物性成熟以至其繁殖后代的连续性过程, 伴随着动物体生命活动的全过程。目前, 哺乳动物主要通过分离精子和胚胎性别鉴定进行性别控制。

2.1 分离精子

大多数哺乳动物都存在两性的发育, 雄性为 XY 型, 雌性为 XX 型。在受精前将精液中的 X、Y 精子加以分离, 然后用分离后的只含 X 精子或 Y 精子的精液配种繁殖以控制家畜后代的性别。

2.1.1 电泳分离法

根据 X、Y 精子表面膜电荷的不同, 电泳时 X、Y 精子就会在电场中向不同的电极移动而将其分离。吴伟等^[44]运用该方法分离牛的精子, 最终的母犊率比正常 (约 1:1) 提高了 14.27%。电泳分离精子法因分离过程不稳定, 从而影响到结果的准确性和重复性, 故应用较少。

2.1.2 离心沉降法

由于 Y 精子比 X 精子的 DNA 含量低, 所以 X 精子的密度及重量大于 Y 精子, 在离心时 X 精子比 Y 精子的沉降速度快, 下层液体中 X 精子的含量较多。离心沉降法的优点是分离时间比沉降分离法短, 对精子的活力影响较小。但是 X 精子之间沉降速度的差异可能会大于 X 与 Y 精子间的差异, 因此, 分离结果很不稳定, 重复性低, 目前很少在生产中应用。

2.1.3 H-Y 抗原分离法

H-Y 抗原分离法也叫免疫学分离法, 依据是利用 H-Y 抗体检测精子质膜上存在的 H-Y 抗原, 通过分离可以获得 2 种不同类型的精子。免疫法分离精子的优点是高效, 缺点是处理精子耗时较长, 精子的数目少, 处理后的精子活力较低, 故推广应用较少。

2.1.4 流式细胞仪分离法

首先将稀释后的精液与 Hoechst 33342 染料混合培养, 使精子的 DNA 与染料结合, 然后通过激光束的激发, X 精子会发出强荧光, 它们在经过电场时会向 2 个不同的方向偏转, 据此可以将其分离。1989 年, 美国 XY 公司首次应用流式细胞仪将 XY 精子分离。岳文斌^[45]应用该方法分离精子的平均受胎率达到 52%。Seidel 等^[46]利用分离后的牛精子人工授精配种的母犊率为 83%。王建国等^[47]用分离后的精液配种, 雌性比例高达 93.3%。阚远征等^[48]用分离精液配种, 获得 92.6% (529/571) 的母犊率。据统计, 流式细胞仪分离的速率为 6×10^6 个/h。孙树春等^[49]用分离后的 X 精子配种, 母犊率高达 97.14% (34/35)。孙国庆等^[50]用分离后的精液配种母牛, 母犊比例达 95.45%。冯登侦等^[51]用流式细胞仪分离后

的精液人工授精配种,母犊率高达 77.5%。赵国琳等^[52]采用分离得到的精液配种繁殖犊牛,母犊比例为 92.31%。邰发红等^[53]将分离获得的 X 精液进行冷配,得到的母犊率为 94.9%。流式细胞术是目前获得优良品种母牛后代的最先进最直接的生物技术,可以充分发挥良繁母牛的繁殖潜力,加快繁育速度,调整奶牛品种结构。然而,该方法因分离速率低、成本高等原因而导致在生产中的推广应用受到了限制。

2.2 胚胎性别鉴定

胚胎性别鉴定是在给受体移植前对动物的早期胚胎进行性别鉴定以实现后代性别控制的目的。

2.2.1 X 染色体相关酶法

通过测定早期胚胎中 X 染色体相关的活性酶与底物反应的颜色以鉴定胚胎的性别。X 染色体相关酶主要有腺嘌呤磷酸转移酶 (adenine phosphoribosyl transferase, APRT), 次黄嘌呤核酸转移酶 (hypoxanthine nucleotransferase) 和 6-磷酸葡萄糖脱氢酶 (6-phosphate glucose dehydrogenase)。然而该方法因较高的假阳性和胚胎的高死亡率而很少在生产中应用。

2.2.2 荧光原位杂交技术 (FISH 法)

FISH (fluorescence in situ hybridization) 法是一项新的分子生物学技术。Kawarasaki 等^[54]利用该技术以 Y 染色体上的探针结合胚胎切割技术检测猪的早期胚胎性别,准确率达 91%。Lee 等^[55]应用 FISH 法对牛的体外受精胚胎进行鉴定,效果良好。该技术的优点是快速、高效,且准确率高。然而, FISH 法在使用过程中需要用到放射性物质,对人畜的身体损害较大,故在实际生产中的应用有限。

2.2.3 聚合酶链式反应技术 (PCR 法)

PCR 法特点是灵敏、高效、操作简便,耗时短。采用哺乳动物 SRY 基因引物扩增技术鉴别早期胚胎性别,准确率较高,应用前景广阔。陈从英等^[56]采用 PCR 方法鉴定奶牛早期胚胎的性别,准确率高达 100%。Mara 等^[57]用 PCR 法扩增羊 Sry 基因进行早期胚胎的性别鉴定,获得的准确率为 87.5%。付强等^[58]利用优化后的多重巢氏 PCR 方法鉴定早期胚胎的性别,准确率与出生性别完全一致。然而,由于鉴定过程中采集胚胎较多,导致胚胎的活力下降,移植后母牛的受胎率降低等原因,限制了其在生产中的应用和推广。

2.2.4 环-酶恒温扩增法 (LAMP 法)

LAMP (loop-mediate isothermal amplification) 法,即设计目标基因的雌雄通用引物和雄性特异性引物,在 65 °C 恒温 PCR 扩增反应,根据反应产物中白色沉淀的浑浊度而对早期胚胎性别进行鉴定。肖海霞等^[59]分别利用 PCR 法和 LAMP 法对牛早期胚胎性别

进行鉴定,准确率分别为 87% (PCR) 和 95% (LAMP), LAMP 法鉴定胚胎性别的灵敏度较高。Zohair 等^[60]利用该方法鉴定水牛的早期胚胎性别,准确率高达 100%。LAMP 法的优点是灵敏度高、特异性好、准确率高、耗时短,然而因胚胎切割后损伤较多,故生产中的应用较少。

3 RNA 干扰技术与性别控制

RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 是一种精确而有效的基因沉默方法,1998 年由 Fire 等人在秀丽隐杆线虫中首次进行了试验性记录,并获得了 2006 年诺贝尔生理学/医学奖。随后的 RNAi 研究证明了合成小干扰核糖核酸 (siRNAs) 或短发夹核糖核酸 (shRNAs) 在牙科疾病、眼病、癌症、代谢疾病、神经退行性疾病和其他疾病中的临床潜力。siRNAs 通常长度为 21~25 bp,具有序列同源性驱动的基因敲除能力。RNAi 通过选择性沉默基因,为研究人员研究生物系统提供了一个轻松的工具。在 RNAi 成为成功的治疗策略之前,需要研究几个关键的技术,如选择性、稳定性、体内给药、疗效和安全性的优化。RNAi 已被用于生成模型系统,识别新的分子靶标,以全基因组方式研究基因功能,并为临床治疗创造新的途径和方法。RNAi 可以特异性和选择性地敲除或沉默靶基因表达的自然过程,为从基因层面控制家畜的性别提供了宝贵的工具。

小序列的外在 dsRNA 或内在 microRNA 分别抑制互补的转录后 mRNA (siRNA) 或抑制翻译 (miRNA),激发了人们对自然基因沉默过程是特异性和健康性的强烈希望。沉默过程发生在 RNA 效应前体与 RNA 酶 III Droscha (用于 miRNA) 和 Dicer (用于 miRNA 和 siRNA) 相互作用后,随后形成 RNA 干扰沉默复合物 (RISC)。靶 mRNA 的内核裂解发生在从导入 (反义) siRNA 序列的 5' 端到 10 个核苷酸的单位点上^[61-62]。RNA 干扰可通过化学合成的双链小干扰 RNA (siRNA) 或短发夹 RNA (shRNA) 来介导。通过 T7 RNA 聚合酶在体外产生的 siRNA 被发现是有活性的,并且很快证明由发夹结构组成的活性 siRNA 可以从质粒构造上的 RNA 聚合酶 III 启动子转录到细胞中。荧光标记的 siRNA 已经被用来追踪传递的 siRNA 的命运。siRNA 在细胞内的积累在平台期前稳定增加 4 h。注射 48 h 后,大部分 siRNA 似乎已经降解,细胞中只剩下 1% 的荧光。siRNA 在细胞内的时空分布与观察到的 siRNA 介导的 RNA 干扰活性动力学是一致的,该活性在传递后 24 h 左右达到高峰,48 h 后减弱^[63]。

与 siRNA 不同,shRNA 在细胞核中合成,进一

步加工并运输到细胞质中,然后并入 RISC 并发挥活性。shRNA 处理过程与 microRNA 成熟途径相似。因此,研究 miRNA 的合成与成熟为基于 miR-30 的 shRNA 的合成奠定了基础。RNA 诱导沉默复合体 (RISC) 的主要组成部分是 Argonaute 蛋白家族。在 Argonaute 蛋白家族 Ago1、Ago2、Ago3、Ago4 中,只有 Ago2 具有内切酶活性,也被组装成 RISC,推测是通过不分裂的方式发挥作用。Argonaute 蛋白家族中的 sinRISC 不仅涉及 siRNA 或 miRNA 的装载,而且还涉及转录(靶向异染色质)和转录后基因沉默。Ago 蛋白复合物在 mRNA 中寻找互补的靶位点,在这些位点内核溶解活性的 Ago2 对 mRNA 进行切割,从而启动 mRNA 降解。其他含有无髓核溶解活性的 Ago 蛋白复合物主要通过加工体(p 体)的 mRNA 隔离与位于 3'UTR 的部分互补靶点结合,以抑制翻译。一旦目标 mRNA 被识别,目标 mRNA 要么被切割,要么发生构象变化,随后 2 种类型的结构被指定到 p 体进行分离或降解。激活的 siRNA 或 miRNA 装载的复合物然后被释放,以进行更多轮的基因沉默活动。

但是,正在开发中的第三种独特的 RNAi 选项称为双功能 RNA (biRNA)。从概念上讲,靶向设计 shRNA 以便有效地将 shRNA 加载到 2 个依赖切割和不依赖切割的 RISC。双功能 shRNA 通过加载到多种类型的 RISC 上,可以同时诱导靶 mRNA 降解,并通过 mRNA 隔离抑制翻译。试验表明,在果蝇中,Ago1 优先与从不完美配对发夹前体中切除的 miRNA 结合,而那些具有近乎完美配对发夹前体的 miRNA 则被 Ago2 结合。在转染了 Ago 蛋白的 HEK293 细胞中,免疫共沉淀发现了大约 600 组类似的转录本与 Ago1、Ago2、Ago3 或 Ago4 结合,提示所有 4 种含 RISC 的哺乳动物 Ago 蛋白都参与了 RNAi 的功能。由于大多数 mRNA 在其 3'UTR 上有多个 miRNA 靶点(有距离限制),miRNA 介导的 RNAi 系统对于靶向 mRNA 似乎是多余的,允许协同下调以确保靶 mRNA 敲除。双功能 shRNA 方法模拟了自然过程,通过多种 RNAi 途径和复合物介导靶 mRNA 敲低。

因转染效率高,整合外源性 DNA 有效的病毒类载体成为递送 shRNA 的流行载体,但近年来由于安全性和免疫原性的担忧而失去了支持。非病毒聚合物传递系统,特别是含有生物降解组分的系统,虽然其转染效率通常较低,但比病毒传递系统具有更好的安全性。非病毒载体通常是阳离子制剂,容易与带负电荷的核酸结合,也可与带负电荷的外细胞膜多糖结合,促进细胞内吞作用。脂质纳米颗粒具有递送 shRNA 和 siRNA 的潜力。Alnaylam 已经开发了由脂质聚乙二醇复合物组成的纳米颗粒,能够包裹和保护

核酸,以达到系统输送的目的。这些稳定的核酸脂质颗粒首次成功应用于非人类灵长类动物的 siRNA 治疗^[64-65]。研究发现,siRNA 活体传递相关的细胞因子诱导程度因载体不同而有很大差异。在阳离子非病毒核酸转染中,一个公认的难题是转染效率通常与毒性相关^[66-67]。RNAi 结构与其靶转录本之间的单双碱基不匹配通常是可以耐受的,而不会降低抑制的效力。尽管载体驱动的 shRNA 方法不允许对沉默结构进行特定的化学修饰,但 siRNA 低聚物可以通过化学修饰来减少直接的脱靶效应。这些修改必须谨慎应用,因为脱靶效应的减少有时伴随着抑制的总效力的降低。

4 RNA 干扰锌指蛋白 (Zfy) 及其研究进展

Zfy [Cys (2) His (2) (C₂H₂)] 是哺乳动物细胞中最常见的蛋白基模,在人类中预测有超过 800 个相关蛋白。在人类和其他一些哺乳动物中,X-连锁的 Zfx 和 Y-连锁的 Zfy C₂H₂ 型基因位于性染色体非重组区最末端^[68]。目前为止,在所有的脊椎动物中都发现了同源基因,包括鱼类,甚至在昆虫中也发现了同源基因,所有脊椎动物 Zfx 和 Zfy 蛋白的氨基末端被认为是一种转录激活因子,有一个假定的核定位信号,由外显子 10 编码。已经发现 Zfy 家族:非常相似的 Y 关联的 Zfy1 和 Zfy2,常染色体 Zfa、Zfx 的逆转录拷贝。小鼠的 Zfx 普遍转录,而 Zfy1、Zfy2 和 Zfa 的转录仅局限于睾丸。人类 Zfx 和鼠的 Zfx 蛋白有 94% 的相同,这反映了维持 X-连锁基因的进化压力,表明它们的功能相当。人类的 Zfx 和 Zfy 蛋白具有 98% 的序列同源性和相同的结构完整性,而小鼠 Zfx 和 Zfy 蛋白的序列同源性只有 60%。因此,虽然人类 Zfx 和 Zfy 的功能可能相似,但小鼠 Zfx 和 Zfy 的功能不同。

人类 ZFY (GenBank: M30607) 和小鼠 Zfy1 (GenBank: X14382),以及人类 ZFX (GenBank: m30608) 和小鼠 Zfx (GenBank: M32308) 具有高度的序列一致性。因此,牛和人 ZFY 的编码区大小相同。然而,牛的 Zfx 比人的短 15 bp。牛 Zfx 和 Zfy 显示 93% 的同源性,而人 ZFX 和 ZFY 显示 90% 的同源性。牛 Zfx 与人 ZFX 的符合率为 93%,而牛与人 Zfy 的符合率为 90%。这些关于牛 Zfx (GenBank: AF032866) 和 Zfy (GenBank: AF032867) 的数据,以及其他地方报道的牛 Zfx 的序列,代表了牛 Zfx 基因的第一个完整编码区。每个编码区域(开放阅读框)被确定为 2 个重叠的 cDNA 片段的延伸,每个片段用一对引物扩增^[69]。

对人和牛的 ZFY/Zfy 和 ZFX/Zfx 进行蛋白序列

比对。与人 *ZFX* 相比,牛 *Zfx* 在第 6 外显子上短 6 个氨基酸(位置 155-160 非人类 *ZFX*, GenBank: AAA61309),在第 5 外显子上长 1 个氨基酸(位置 10 牛 *Zfx*, GenBank: AAL18260)。然而,牛和人的 *ZFY/Zfy* 都有 801 个氨基酸,牛的第 9 外显子比人的 *ZFY* 长 1 个氨基酸(位于 GenBank: AAL18261 的 338 位),牛的第 6 外显子比人的 *ZFY* 短 1 个氨基酸(位于 GenBank: AAA61310 的 76 位)。牛 *Zfx* 和 *Zfy* 羧基端与相应的人类蛋白序列几乎相同,也包含 13 个锌指基序。与人类一样,牛的 *Zfx* 和 *Zfy* 有 98% 是相同的。由于该聚丙氨酸基序似乎是保守的,因此该聚丙氨酸基序可能具有功能意义。有几种间接证据支持这种可能性。例如,小鼠睾丸决定因子 *Sry* 中富含谷氨酰胺的结构域已被证明负责该蛋白氨基末端一半的转录激活功能。试验表明,小鼠 *Zfx* 序列编码的缺失,特别是多丙氨酸通路的缺失,会导致这些动物的身体缩小及其他异常^[70]。除了人类和老鼠之外,牛的 *Zfx* 和 *Zfy* 基因的完整编码区已经确定。在 *Zfx* 或 *Zfy* 蛋白中,保守的聚丙氨酸基序已被确认。这些数据将有助于性染色体的进化研究以及对哺乳动物 *Zfx* 和 *Zfy* 基因的功能和结构的理解。

5 展望

近年来,哺乳动物的性别控制技术对畜牧生产的影响深远。目前,建立在 DNA 含量差异的流式细胞仪的应用能精准地分离 X、Y 精子,在牛羊猪繁育过程中的应用前景广阔,但是由于精子分离后的损伤,分离成本高及分离效率低而在其他动物上的应用较少。随着分子生物技术和基因工程技术的不断发展,新发现的 TLR7/8 受体调控方法促使 X、Y 精子运动能力呈现差异而进行分离, H-Y 抗体制备等靶向凝集 Y 精子在试验中都显示出较好的性别控制效果,新的研究成果的应用将为动物遗传改良、优良品系的获得、伴性遗传疾病的检测等带来新的发展前景。总之,生物新技术的快速发展使得从基因层面控制家畜的性别变成了可能。目前,这些技术被广泛应用于探索基因功能、传染病检测及肿瘤诊断与治疗等基因工程和生物医学领域,具有很高的应用价值和广阔的市场前景,为进一步研究基因特定功能提供了新的思路和方法。

参考文献:

- [1] KOOPMAN P, GUBBAY J, VIVIAN N, et al. Male development of chromosomally female mice transgenic for *Sry* [J]. *Nature*, 1991, 351: 117-121.
- [2] GREENFIELD A, KOOPMAN P. *SRY* and mammalian sex determination [J]. *Current Topics in Developmental Biology*, 1996, 34: 1-23.
- [3] KOOPMAN P, MUNSTERBERG A, CAPEL B, et al. Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation [J]. *Nature*, 1990, 348: 450-452.
- [4] HACKER A, CAPEL B, GOODFELLOW P, et al. Expression of *Sry*, the mouse sex determining gene [J]. *Development*, 1995, 121: 1603-1614.
- [5] JESKE Y W, BOWLES J, GREENFIELD A, et al. Expression of a linear *Sry* transcript in the mouse genital ridge [J]. *Nat Genet*, 1995, 10: 480-482.
- [6] BOWLES J, SCHEPERS G, KOOPMAN P. Phylogeny of the SOX-family of developmental transcription factors based on sequence and structural indicators [J]. *Dev Biol*, 2000, 227: 239-255.
- [8] BUEHR M, GU S, MCLAREN A. Mesonephric contribution to testis differentiation in the fetal mouse [J]. *Development*. 1993, 117: 273-281.
- [9] TUCKER P K, LUNDRIGAN B L. Rapid evolution of the sex determining locus in Old World mice and rats [J]. *Nature*, 1993, 364: 715-717.
- [10] WHIFFIELD L S, LOVELL-BADGE R, GOODFELLOW P N. Rapid sequence evolution of the mammalian sex-determining gene *SRY* [J]. *Nature*, 1993, 364 (6439): 713-715.
- [11] COHEN D R, SINCLAIR A H, MCGOVEM J D. *Sry* protein enhances transcription of *Fos*-related antigen I promoter constructs [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994, 91: 4372-4376.
- [12] PONTIGGIA A, WHITFIELD S, GOODFELLOW P N, et al. Evolutionary conservation in the DNA-binding and -bending properties of HMG-boxes from the *SRY* proteins of primates [J]. *Gene*, 1995, 154: 277-280.
- [13] ZWINGMAN T, ERICKSON R P, BOYER T, et al. Transcription of the sex-determining region genes *Sry* and *Zfy* in the mouse preimplantation embryo [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993, 90: 814-817.
- [14] BOWLES J, SCHEPERS G, KOOPMAN P. Phylogeny of the SOX family of developmental transcription factors based on sequence and structural indicators [J]. *Dev Biol*, 2000, 227: 239-255.
- [15] HARLEY V R, GOODFELLOW P N. The biochemical role of *SRY* in sex determination [J]. *Mol Reprod Dev*, 1994, 39: 184-193.
- [16] BOWLES J, COOPER L, BERKMAN J, et al. *Sry* requires a CAG repeat domain for male sex determination in *Mus musculus* [J]. *Nat Genet*, 1999, 22: 405-408.
- [17] LOVELL-BADGE R, CANNING C, SEKIDO R. Sex-determining genes in mice: building pathways [J]. *Novartis Found Symp*, 2002, 244: 4-18.
- [18] PANNETIER M, TILLY G, KOCER A, et al. Goat *SRY* induces testis development in XX transgenic mice [J]. *FEBS Lett*, 2006, 580: 3715-3720.
- [19] KOOPMAN P, MIINSTERBERG A, CAPEL B, et al. Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation [J]. *Nature*, 1990, 348: 450-452.
- [20] HACKER A, CAPEL B, GOODFELLOW P, et al. Expression of *Sry*, the mouse sex determining gene [J]. *Development*, 1995, 121: 1603-1614.

- [21] JESKE Y W A, BOWLES J, GREENFIELD A, et al. Expression of a linear Sry transcript in the mouse genital ridge [J]. *Nature Genet*, 1995, 10: 480-482.
- [22] BULLEJOS M, KOOPMAN P. Spatially dynamic expression of Sry in mouse genital ridges [J]. *Dev Dyn*, 2001, 221: 201-205.
- [23] WILHELM D, MARTINSON F, BRADFORD S, et al. Sertoli cell differentiation is induced both cell- autonomously and through prostaglandin signaling during mammalian sex determination [J]. *Dev Biol*, 2005, 287: 111-124.
- [24] HANLEY N A, HAGAN D M, CLEMENT-JONES M, et al. SRY, SOX9, and DAX1 expression patterns during human sex determination and gonadal development [J]. *Mech Dev*, 2000, 91: 403-407.
- [25] BURGOYNE P S, BUEHR M, KOOPMAN P, et al. Cell-autonomous action of the testis-determining gene: Sertoli cells are exclusively XY in XX↔XY chimaeric mouse testes [J]. *Development*, 1988, 102 (2): 443-450.
- [26] WAGNER T, WIRTH J, MEYER J, et al. Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9 [J]. *Cell*, 1994, 79: 1111-1120.
- [27] BARRIONUEVO F, BAGHERI-FAM S, KLATTIG J, et al. Homozygous inactivation of Sox9 causes complete XY sex reversal in mice [J]. *Biol Reprod*, 2006, 74: 195-201.
- [28] BISHOP C E, WHITWORTH D J, QIN Y, et al. A transgenic insertion upstream of Sox9 is associated with dominant XX sex reversal in the mouse [J]. *Nat Genet*, 2000, 26: 490-494.
- [29] VIDAL V P, CHABOISSIER M C, DE ROOIJ D G, et al. Sox9 induces testis development in XX transgenic mice [J]. *Nat Genet*, 2001, 28: 216-217.
- [30] DE SANTA BARBARA P, BONNEAUD N, BOIZET B, et al. Direct interaction of SRY-related protein SOX9 and steroidogenic factor1 regulates transcription of the human anti-Mullerian hormone gene [J]. *Mol Cell Biol*, 1998, 18: 6653-6665.
- [31] MUNSTERBERG A, LOVELL-BADGE R. Expression of the mouse anti-Mullerian hormone gene suggests a role in both female and male sexual differentiation [J]. *Development*, 1991, 113: 613-624.
- [32] HAQQ C M, KING C-Y, UKIYAMA E, et al. Molecular basis of mammalian sex determination: activation of Mullerian inhibiting substance gene expression by SRY [J]. *Science*, 1994, 266: 1494-1500.
- [33] LALA D S, RICE D A, PARKER K L. Steroidogenic factor 1, a key regulator of steroidogenic enzyme expression, is the mouse homolog of fushi tarazu factor 1 [J]. *Mol Endocrinol*, 1992, 6: 1249-1258.
- [34] LUO X, IKEDA Y, PARKER K L. A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation [J]. *Cell*, 1994, 77: 481-490.
- [35] SHEN W-H, MOORE C C D, IKEDA Y, et al. Nuclear receptor steroidogenic factor 1 regulates the Mullerian inhibiting substance gene: a link to the sex determination cascade [J]. *Cell*, 1994, 77: 651-661.
- [36] JULIANO C, WANG J Q, LIN H F. Uniting germline and stem cells; the function of Piwi proteins and the piRNA pathway in diverse organisms [J]. *Annu Rev Genet*, 2011, 45: 447-469.
- [37] JINEK M, DOUDNA J A. A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference [J]. *Nature*, 2009, 457 (7228): 405-412.
- [38] ARAVIN A A, SACHIDANANDAM R, BOURC'HIS D, et al. A piRNA pathway primed by individual transposons is linked to de novo DNA methylation in mice [J]. *Mol Cell*, 2008, 31 (6): 785-799.
- [39] DENG W, LIN H F. *miwi*, a murine homolog of *piwi*, encodes a cytoplasmic protein essential for spermatogenesis [J]. *Dev Cell*, 2002, 2 (6): 819-830.
- [40] GRIVNA S T, PYHTILA B, LIN H F. MIWI associates with translational machinery and PIWI-interacting RNAs (piRNAs) in regulating spermatogenesis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103 (36): 13415-13420.
- [41] KURAMOCHI-MIYAGAWA S, KIMURA T, IJIRI T W, et al. *Mili*, a mammalian member of *piwi* family gene, is essential for spermatogenesis [J]. *Development*, 2004, 131 (4): 839-849.
- [42] CARMELL M A, GIRARD A, VAN DE KANT H J, et al. MIWI2 is essential for spermatogenesis and repression of transposons in the mouse male germline [J]. *Dev Cell*, 2007, 12 (4): 503-514.
- [43] KURAMOCHI-MIYAGAWA S, WATANABE T, GOTOH K, et al. DNA methylation of retrotransposon genes is regulated by Piwi family members MILI and MIWI2 in murine fetal testes [J]. *Genes Dev*, 2008, 22 (7): 908-917.
- [44] 吴伟, 陈元明, 刘润铮, 等. 奶牛的精液分离及性控试验 [J]. 内蒙古农牧学院学报, 1998, 19 (3): 62-64.
- [45] 岳文斌. 动物繁殖新技术 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2003: 156-182.
- [46] SEIDEL G E, 谭世俭. 精子性别分离及其应用 [J]. 广西畜牧兽医, 2000, 16 (5): 38-39.
- [47] 王建国, 周文忠, 钱松晋, 等. 奶牛 X 性控冻精应用研究 [J]. 广西农业生物科学, 2006 (25), 191-192.
- [48] 阚远征, 张振山. 奶牛性控精液应用效果简析 [J]. 中国奶牛, 2007 (05), 23-24.
- [49] 孙树春, 桑润滋, 孙国庆. 性控精液对奶牛人工授精情期受胎率及性比例的影响 [J]. 黑龙江动物繁殖, 2007 (1): 6-8.
- [50] 孙国庆, 孙树春, 赵驻军, 等. 性控精液对奶牛情期受胎率的影响 [J]. 畜牧与兽医, 2008 (11): 59-60.
- [51] 冯登侦, 马建宁, 宁晓波, 等. 荷斯坦奶牛性控精液配种效果分析 [J]. 农业科学研究, 2008 (2): 22-24.
- [52] 赵国琳, 魏立明, 胡刚, 等. 奶牛性控冻精应用效果研究 [J]. 中国牛业科学, 2009, 35 (1): 17-18.
- [53] 邵发红, 许国军, 王新华. 奶牛 X 性控冻精应用效果试验 [J]. 中国奶牛, 2009 (5): 35-36.
- [54] KAWARASAKI T, MATSUMOTO K, MUROFUSHI J, et al. Sexing of porcine embryo by in situ hybridization using chromosome Y- and 1-specific DNA probes [J]. *Theriogenology*, 2000, 53 (7): 1501-1509.
- [55] LEE J H, PARK J H, LEE S H, et al. Sexing using single blastomere derived from IVF bovine embryos by fluorescence in situ hybridization (FISH) [J]. *Theriogenology*, 2004, 62: 1452-1458.
- [56] 陈丛英, 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.
- [57] MARA L, PILICHI S, SANNA A, et al. Sexing of *in vitro* produced ovine embryos by duplex PCR [J]. *Molecular reproduction and de-*

- velopment, 2004, 69: 35-42.
- [58] 付强, 张明, 郑海英, 等. 水牛胚胎性别鉴定的 PCR 方法 [J]. 中国兽医学报, 2008, 28 (9): 1096-1100.
- [59] 肖海霞, 陈静波, 海丽且木, 等. 应用 PCR 法和 LAMP 法鉴定牛早期胚胎性别的研究 [J]. 新疆农业大学学报, 2006, 29 (4): 85-88.
- [60] ZOHEIR K M A, ALLAM A A. A rapid improved method for sexing embryo of water buffalo [J]. Theriogenology, 2011, 76: 83-87.
- [61] ELBASHIR S M, HARBORTH J, LENDECKEL W, et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells [J]. Nature, 2001, 411 (6836): 494-498.
- [62] LIU J, CARMELL M A, RIVAS F V, et al. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi [J]. Science, 2004, 305 (5689): 1437-1441.
- [63] GRUNWELLER A, GILLEN C, ERDMANN V A, et al. Cellular uptake and localization of a Cy3-labeled siRNA specific for the serine/threonine kinase Pim-1 [J]. Oligonucleotides, 2003, 13: 345-352.
- [64] BLOW N. Small RNAs: delivering the future [J]. Nature, 2007, 450: 1117-1120.
- [65] ZIMMERMANN T S, LEE A C, AKINC A, et al. RNAi-mediated gene silencing in non-human primates [J]. Nature, 2006, 441 (7089): 111-114.
- [66] LV H, ZHANG S, WANG B, et al. Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery [J]. J Control Release, 2006, 114 (1): 100-109.
- [67] PARK T G, JEONG J H, KIM S W. Current status of polymeric gene delivery systems [J], Adv Drug Deliv Rev, 2006, 58: 467-486.
- [68] IWASE M, SATTA Y, HIRAI Y, et al. The amelogenin loci span ancient pseudo autosomal boundary in diverse mammalian species [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100: 5258-5263.
- [69] XIAO C, TSUCHIYA K, SUTOU S. Cloning and mapping of bovine *ZFX* gene to the long arm of the X-chromosome (Xq34) and homologous mapping of *ZFY* gene to the distal region of the short arm of the bovine (Yp13), ovine (Yp12), and caprine (Yp12) Y [J]. Mamm Genome, 1998, 9: 125-130.
- [70] LUOH S W, BAIN P, POLAKIEWICZ R D, et al. *Zfx* mutation results in small animal size and reduced germ cell number in male and female mice [J]. Development, 1997, 124: 2275-2284.