

雞隻性別鑑定的RAPD標記⁽¹⁾

林德育⁽²⁾⁽⁵⁾ 劉瑞珍⁽³⁾ 陳若菁⁽²⁾ 鍾秀枝⁽²⁾
黃祥吉⁽⁴⁾ 黃鈺嘉⁽²⁾ 張秀鑾⁽²⁾

收件日期：91 年 9 月 09 日；接受日期：91 年 10 月 15 日

摘 要

為尋求雞隻性別遺傳標記，本研究利用 248 組寡核苷酸 RAPD 引子以行政院農業委員會畜產試驗所（畜試所）4 個畜試土雞近親品系各 2 公 10 母之個體 DNA 作為模板，進行隨機複製多態性 DNA (RAPD) 分析。第一階段分析結果顯示 248 組寡核苷酸引子中，引子 AI05 (5'-GTCGTAGCGG-3') 所產出的 PCR 產物之 850 bp DNA 片段為母雞特有的片段，可作為區分公母性別的標記。第二階段，再以引子 AI05 分析畜試所飼養之 4 個畜試土雞近親品系、來亨雞、絲羽烏骨雞、黑羽烏骨雞、北京油雞、無鱗雞、紐漢西雞、黑色蘆花雞及民間黑母雞等 12 種不同品種（系）雞隻公母雞各 10 隻之血樣 DNA，檢測結果準確率為 100% (240/240) 與實際性別吻合，在母雞的 PCR 產物 DNA 片段中，皆有 850 bp DNA 片段之母雞特有片段，在公雞樣品中皆無此 850 bp DNA 片段，證實 RAPD 引子 AI05 可作為區分性別之遺傳標記。同時，由於本方法不需再藉由巢式 PCR (nested PCR) 或限制酶分切來確認，因此，為一較經濟且簡易的檢測方法。

關鍵詞：雞、隨機複製多態性 DNA、性別鑑定。

緒 言

造成脊椎動物表現不同性別變異的決定機制可分為遺傳與環境兩種，在鳥類與哺乳動物是藉由遺傳來決定性別的，雄性哺乳動物為異型配子 (heterogametic) 型 (XY)，由 Y 染色體上睪丸決定因子 (SRY) 職司性別的決定，而雌性鳥類為異型配子型 (ZW)，性別的決定是由 W 染色體帶有卵巢決定基因或是由 Z 染色體數目來決定性別，目前尚無定論 (Griffiths and Tiwari, 1993; O'Neill *et al.*, 2000; Ellegren, 2001)。鑑別物種的性別並非易事，尤其是野生動物，約有一半鳥類在成鳥時仍無法從外觀上分辨出性別，幼鳥的比率更高 (Griffiths *et al.*, 1998)。因此，尋求一種快速且準確的性別鑑定方法為鳥類研究的重要課題。應用聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 來鑑別鳥類

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 1142 號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所遺傳育種組。

(3) 行政院農業委員會畜產試驗所生理組。

(4) 行政院農業委員會畜產試驗所產業組。

(5) 通訊作者。

性別為一理想的方法，Itoh *et al.* (2001) 藉由微量的血樣或羽毛萃取出的 DNA，即可準確地鑑別許多鳥類品種的雄雌。應用 PCR 鑑定鳥類性別的方法已陸續被開發，D'Costa and Petite (1998) 發展出鑑別已知性別的成年火雞與火雞早期胚 (5 日至孵化) 性別的方法；Duan and Fuerst (2001) 以 CSL 引子成功地鑑定鶴的性別；Clinton *et al.* (2001) 也成功地建立了早期雞胚性別鑑定的檢測方法。

逢機複製 DNA 片段之多態性 (random amplified polymorphic DNA, RAPD) 分析方法係利用單一寡核苷酸 (10bp) 為引子，以少量 DNA 為模板，在較為不嚴苛的條件下 (relaxed stringency) 進行 PCR 複製反應，逢機複製出多態性的 DNA 片段作為 DNA 指印 (fingerprint)。由於此一逢機寡核苷酸引子可以與模板 DNA 上許多區域產生接合，如果有二個引子接合點的方向性正確，而且其間的距離大小 (核酸長度) 恰當，就可以複製出該片段來。不同個體間的遺傳組成不同，逢機引子可以接合處不盡相同，因此複製出來的 DNA 片段也就不同，形成多態性遺傳標記 (劉等，1999)。RAPD 已被應用於分析遺傳變異 (Welsh and McClelland, 1990; Williams *et al.*, 1990)。這些遺傳標記進行基因遺傳分離試驗也證明符合簡單的孟德爾遺傳定律，且是以顯性標記遺傳 (dominant markers) (Waugh and Powell, 1992)。Levin *et al.* (1993) 曾利用此法對雞之性染色體作基因定位。應用 RAPD 方法進行禽類性別鑑定已有許多報告被發表，蕭等 (1996) 發現 RAPD 引子 AA16 可產生褐色菜鴨與北京鴨母禽特異性 DNA 片段，而引子 AA14 則可產生中國鵝母禽特異性 DNA 片段；Bello and Sanchez (1999) 利用 RAPD 引子 D10 鑑別駝鳥性別；林等 (2001) 應用 RAPD 引子 AB14 可產生白羅曼鵝母禽特異性 DNA 片段。本試驗應用 RAPD 的方法分析畜試所選育成功之畜試土雞近親品系與其他 8 種不同雞種公雞與母雞個體 DNA，以建立雞隻性別鑑定的遺傳標記。

材料與方法

I. 試驗動物

本試驗共分為兩個階段探討雞隻性別鑑定的 RAPD 遺傳標記，雞隻樣品皆取自十六週齡後的雞隻。

(i) 階段一：尋找雞隻性別鑑定的 RAPD 遺傳標記。

行政院農業委員會畜產試驗所四個畜試土雞近親品系 (L7、L9、L11、L12) 各 2 公 10 母，共 48 隻。

(ii) 階段二：確認雞隻性別鑑定的 RAPD 遺傳標記。

四個畜試土雞近親品系 (L7、L9、L11、L12)、蘆花雞、絲羽烏骨雞、絲羽烏骨雞、北京油雞、來亨雞、紐漢西、民間黑母雞及無鱗雞共 12 種不同品種(系)雞隻公、母雞各 10 隻，共 240 隻。

II. 採血及 DNA 之萃取

(i) 由供試雞隻翼下靜脈採集血液約 0.5~1.0 ml，置入含抗凝血劑之採血管中混合後供 DNA 之萃取用。

(ii) 以快速 DNA 萃取套組 (IsoQuick, Microprobe, USA) 萃取 DNA 後，經乾燥並加入適量 TE 緩衝液溶解，再利用光電比色計 (Pharmacia LKB, England) 測定 DNA 濃度並將之調整至最後濃度為 20~30 ng/μl 供 PCR 反應之模板 (template)。

III. PCR 反應

- (i) 階段一：利用 248 種長度為 10bp 的合成寡核苷酸隨機引子 (Operon Technologies, Inc., USA)，以 4 個畜試土雞近親品系 (L7, L9, L11, L12)，每個品系 2 隻公雞與 10 隻母雞之雞隻個體 DNA 做為模板，利用 *Taq* 聚合酶進行 PCR，反應溶液之總體積為 25 μ l，反應溶液中含下列成分：10 mM Tris-HCl (pH 8.3)、50 mM KCl、2 mM $MgCl_2$ 、0.001% gelatin、100 μ M each of dATP, dCTP, dGTP, and dTTP、5 pM primer、200~300 ng of genomic DNA 及 0.5 units of *Taq* DNA polymerase (Boehringer Mannheim, Germany, BM)。PCR 反應是以自動控溫儀 (Parkin Elmer Cetus, Thermal Cycler, USA) 進行，RAPD-PCR 反應之條件依序為變性 (denature)：94°C 1 分鐘、煉合(annealing)：36°C 1 分鐘及延長 (extension)：72°C 2 分鐘，連續進行 45 個循環反應，最後將溫度保持在 4°C。
- (ii) 階段二：利用長度為 10 bp 的合成寡核苷酸 AI05 隨機引子 (Operon, USA)，AI05 隨機引子序列為 5'-GTCGTAGCGG-3'，除了 4 個畜試土雞近親品系 (L7、L9、L11、L12)外，並取得蘆花雞、絲羽烏骨雞、絲羽烏骨雞、北京油雞、來亨雞、紐漢西、民間黑母雞及無鱗雞等共 12 種不同品種(系)雞隻，以每品種 (系) 公、母雞各 10 隻之雞隻個體 DNA 做為模板，依上述方法進行 PCR 反應。

IV. 電泳分析

PCR 的產物進行 1.5%瓊脂糖膠體電泳分析，使用 0.5X 之 TBE (Tris-boric acid-EDTA) buffer 為電泳緩衝液，電泳條件為 150 伏特，電泳時間為 3.5~4.0 小時。電泳完成之膠體經 ethidium bromide 染色後，利用紫外燈 (Spectroline, USA) 觀察 RAPD 指印，並照相 (Spectroline, USA) 記錄結果供資料分析之用。

結果與討論

利用 RAPD 方法分析四個畜試土雞近親品系 (L7、L9、L11、L12) 各 2 公 10 母的 DNA 樣品，在 248 種 Operon 10 bp 寡核苷酸引子所得之指印中，有 96% (239/248) 種引子可獲得複製 DNA 片段產物 (表 1)，其中可複製出具多態性 DNA 片段的引子有 74% (183/248) 種 (表 2)。又在所作出之 RAPD 指印，平均約可產生 8.7 (2075/239) 條產物，而 DNA 片段之長度變異範圍為 0.2-3.2 kb。分析 239 種引子所產生的 RAPD 指印，其中有一些引子對畜試土雞 DNA 所產生之 DNA 片段為相同型態(圖 1)，另一類則可使不同個體間產生多態性 (圖 2)。

而以引子 AI05 檢測所有供試之母雞 DNA 可複製出一條 850 bp 性別特異性 DNA 片段，在供試公雞 DNA 中則無此片段。因此，再以引子 AI05 檢測四個近親品系畜試土雞 (L7、L9、L11、L12)、蘆花雞、絲羽烏骨雞、絲羽烏骨雞、北京油雞、來亨雞、紐漢西、民間黑母雞及無鱗雞共 12 種不同品種 (系) 雞隻公、母雞各 10 隻，共 240 隻雞隻個體 DNA，結果顯示在此 12 種不同品種(系)的所有供試之母雞 DNA 皆可複製出 850 bp 性別特異性 DNA 片段，而所有供試之公雞 DNA 皆無此 850 bp DNA 片段 (圖 3)，顯示引子 AI05 可為雞隻性別鑑定之遺傳標記。

表 1. 不同引子對畜試土雞 DNA 所複製出之 PCR 產物

Table 1. PCR product information in TLRI native chickens amplified with different random primers

Operon primer kits ¹	Number of amplifiable primers	Number of DNA fragments	Length of DNA fragment (kb)	Unamplifiable primers
AA01~AA20	16	3~13	0.30~2.60	AA05, AA06, AA09, AA13
AB01~AB20	20	1~24	0.40~3.20	
AC01~AC20	18	3~18	0.20~2.80	AC16, AC18
AD01~AD20	19	2~13	0.30~2.60	AD07
AE01~AE20	20	3~15	0.30~2.60	
AF01~AF20	20	3~11	0.30~2.60	
AG01~AG20	20	4~21	0.30~2.60	
AH01~AH20	19	2~16	0.30~2.60	AH07
AI01~AI20	20	6~21	0.30~3.00	
AJ01~AJ20	20	2~17	0.30~2.60	
AK01~AK20	20	2~14	0.30~2.60	
AL01~AL20	19	4~19	0.30~3.00	AL02
AM01~AM08	8	5~17	0.30~3.00	

TLRI denotes Taiwan livestock Research Institute.

¹. Primer kits (10 bp) from Operon Technologies, Inc., USA.

表 2. 在畜試土雞雞隻 DNA 中可以複製多態性 RAPD 片段之引子

Table 2. Primers yielding polymorphic bands in TLRI native chickens

Operon primer kits ¹	Primers yielding polymorphic bands
AA01~AA20	AA-01, 02, 07, 10, 11, 12, 16, 17, 18, 20
AB01~AB20	AB-01, 03, 04, 05, 06, 07, 09, 10, 11, 12, 14, 16, 18, 19
AC01~AC20	AC-02, 07, 08, 13, 14, 15, 17, 19
AD01~AD20	AD-01, 02, 03, 04, 05, 06, 11, 12, 13, 16, 18, 19, 20
AE01~AE20	AE-01, 03, 04, 05, 06, 07, 09, 10, 11, 12, 13, 15, 17, 18, 19, 20
AF01~AF20	AF-01, 02, 03, 05, 06, 07, 08, 09, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18
AG01~AG20	AG-01, 02, 03, 04, 05, 07, 08, 09, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 20
AH01~AH20	AH-01, 02, 04, 06, 08, 09, 10, 11, 12, 14, 15, 18
AI01~AI20	AI-01, 02, 03, 05, 06, 08, 09, 10, 11, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20
AJ01~AJ20	AJ-01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 08, 09, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 19, 20
AK01~AK20	AK-01, 02, 03, 04, 06, 08, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20
AL01~AL20	AL-01, 03, 04, 05, 06, 07, 08, 09, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 19, 20
AM01~AM20	AM-01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 08

¹. Primer kits (10 bp) from Operon Technologies, Inc., USA.

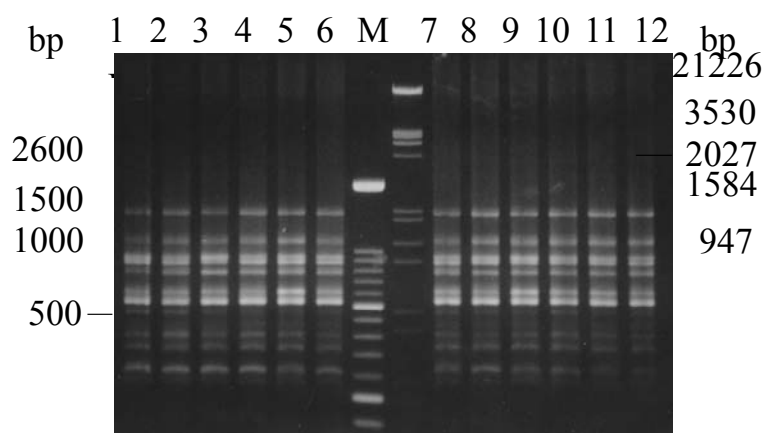


圖 1. 以引子 AE16 (5'- TCCgTgCTgA -3') 在畜試土雞複製出相同型態之 RAPD 指印。1~10 為近親品系 7 的母雞，11~12 為公雞。M：DNA 梯度標誌。

Fig. 1. The RAPD fingerprint polymorphisms of TLRI native chicken amplified with Operon primer AE16 (5'- TCCgTgC TgA -3'). Lanes 1~10 were female and lanes 11~12 were male of inbred line 7. M represented molecular size markers.

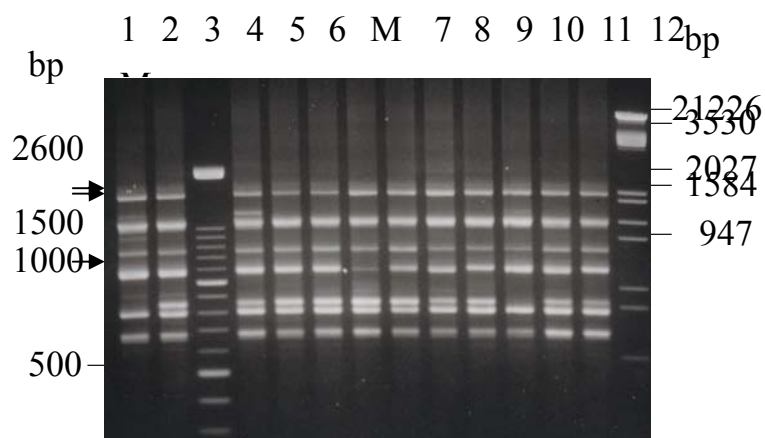


圖 2. 以引子 AD06 (5'- AAgTgCACgg -3') 在畜試土雞複製出多態性之 RAPD 指印。1~10 為近親品系 7 的母雞，11~12 為公雞，M：DNA 梯度標誌，黑色箭頭所指為具變異性的 DNA 片段。

Fig. 2. The polymorphic RAPD fingerprint of TLRI native chickens amplified with Operon primer AD06 (5'- AAgTgCACgg -3'). Lanes 1~10 were females and lanes 11~12 were males of inbred line 7. M represented molecular size markers. The band variation among chickens were indicated by black arrows.

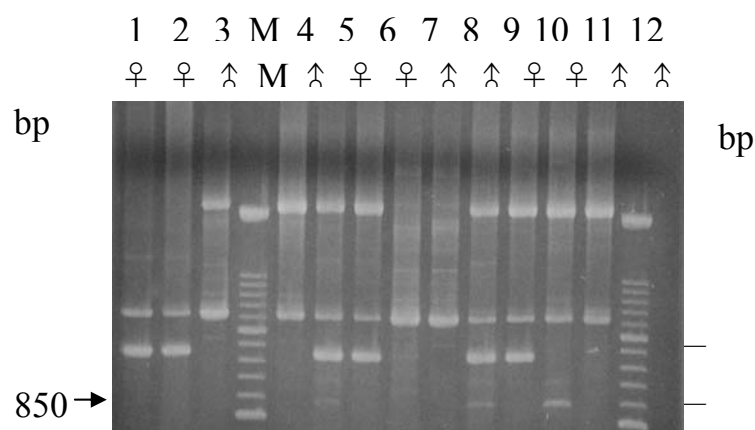


圖 3. 不同性別的畜試土雞 (1~4)、來亨雞 (5~8) 及絲羽烏骨雞 (9~12) 以引子 AI05 檢測所得之 RAPD 指印。其中 1、2、5、6、9、10 為母雞，3、4、7、8、11、12 為公雞。M 為 100bp DNA 梯度標誌。黑色箭頭所指的 DNA 片段為母雞性別特異性 DNA 片段。

Fig. 3. RAPD products amplified by AI05 in different gender of TLRI Native Chicken (lanes 1~4), Leghorn (lanes 5~8) and White Silkies (lanes 9~12). Lanes 1, 2, 5, 6, 9, 10 were females and lanes 3, 4, 7, 8, 11, 12 were males. M represented molecular size markers. The female-specific DNA fragments were indicated by black arrows.

由於公雞與母雞生長速度不同與單一性別生產模式的需求，早期性別鑑定對大規模養雞產業非常重要的。羽毛性別區分法 (feather sexing) 是最早被應用於商業生產的雛雞性別鑑定的方法，乃藉由特殊雜交組合個體的羽毛特徵區分性別。然而，羽毛特徵的性別鑑定並無法普及所有雞隻生產體系，後來肛門性別鑑定法 (vent sexing) 隨即被普遍地應用。大多數動物雄性個體具外生殖器可輕易地區分出性別。雞隻與鳥類雄性個體無明顯的外生殖器可供識別，雄性個體生殖器皆在體內，因此在孵化後至數週齡內不易區分出性別。肛門性別鑑定法乃以肉眼觀察生殖器型狀些微的差異來區分出雛雞的性別。這種雛雞性別鑑定方法已行之多年，其準確率亦可高達 95% 以上。然而，合格的性別鑑別師必須受過專業的訓練，且並非大多數受過訓練者都能勝任。雖然肛門性別鑑定法提供一種有效的區分性別的方法，但是由於需要培養許多專業的性別鑑別師來進行雛雞性別的鑑定，且考量到疾病的傳染等問題，近年來部份業者以應用羽毛性別鑑別法來取代肛門性別鑑定法。不過應用羽毛性別鑑別法又受限於保留羽毛基因與經濟性狀選拔間的問題。因此，肛門性別鑑定法仍被應用於養雞產業。

雖然雞隻性別鑑定的檢測方法已陸續被發表，由於應用 RAPD 的方法不需再藉由對照反應 (control reactions) 引子的添加 (Clinton, 1994; Clinton *et al.*, 2001)，巢式 PCR (nested PCR) 或限制酶分切來確認，因此，為一簡易方便且準確的檢測方法。

誌 謝

本研究承台灣省政府農林廳 88 及 89 年度公務預算經濟性能遺傳標記之研究：II. 近親土雞品系經費補助，試驗期間蒙家畜育種系實驗室與畜牧場同仁協助血樣處理與雞隻飼養管理工作，謹此一併誌謝。

參考文獻

- 林德育、劉瑞珍、陳若菁、葉力子、張秀鑾、戴謙。2001。白羅曼鵝逢機複製多態性 DNA 片段指印之分析。畜產研究 34(1)：79~87。
- 蕭振文、劉瑞珍、陳若菁、黃祥吉、戴謙。1996。家禽逢機複製多態性 DNA 之分析。畜產研究 29(4)：317~330。
- 劉瑞珍、陳若菁、黃祥吉、林德育、戴謙。1999。利用逢機複製 DNA 片段多態性分析近親台灣土雞之遺傳相似性。中華農學會報 186：89~98。
- Bello, N. and A. Sanchez. 1999. The identification of a sex-specific DNA marker in the ostrich using a random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay. *Mol. Ecol.* 8(4)：667~669.
- Clinton, M. 1994. A rapid protocol for sexing chick embryos (*Gallus g. domesticus*). *Anim. Genet.* 25(5)：361~362.
- Clinton, M., L. Haines, B. Belloir and D. McBride. 2001. Sexing chick embryos: a rapid and simple protocol. *Br. Poult. Sci.* 42(1)：134~138.
- D'Costa, S. and J. N. Petite. 1998. Sex identification of turkey embryos using a multiplex polymerase chain reaction. *Poult. Sci.* 77(5)：718~721.
- Duan, W. and P. A. Fuerst. 2001. Isolation of a sex-linked DNA sequence in cranes. *J Hered.* 92(5)：392~397.
- Ellegren, H. 2001. Hen, cocks and avian sex determination: A quest for genes on Z or W ? *EMBO reports* 2(3)：192~196.
- Griffiths, R., M. C. Double, K. Orr and R. J. Dawson. 1998. A DNA test to sex most birds. *Mol. Ecol.* 7(8)：1071~1075.
- Griffiths, R. and B. Tiwari. 1993. The isolation of molecular genetic markers for the identification of sex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90：8324~8326.
- Itoh, Y., M. Suzuki, A. Ogawa, I. Munechika, K. Murata K and S. Mizuno. 2001. Identification of the sex of a wide range of Carinatae birds by PCR using primer sets selected from chicken EE0.6 and its related sequences. *J. Hered.* 92(4)：315~321.
- Levin, I., L. B. Crittenden and J. B. Dodson. 1993. Genetic map of the chicken Z chromosome using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Genomics* 16：224~230.
- O'Neill, M., M. Binder, C. Smith, J. Andrews, K. Reed, M. Smith, C. Millar, D. Lambert and A. Sinclair. 2000. ASW: a gene with conserved avian W-linkage and female specific expression in chick embryonic gonad. *Dev. Genes Evol.* 210(5)：243~249.
- Waugh, R. and W. Powell. 1992. Using RAPD markers for crop improvement. *Trends in Biotech.* 10：186~191.
- Welsh, J. and M. McClelland. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 18：7213~7218.
- Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski and S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18：6531~6535.

RAPD marker for sex identification in chickens⁽¹⁾

Der-Yuh Lin⁽²⁾⁽⁵⁾, Jui-Jane Liu Tai⁽³⁾, Jo-Chin Chen⁽²⁾,
Hsiu-Chih. Chung⁽²⁾, Hsiang-Chi Huang⁽⁴⁾, Yu-Chia Huang⁽²⁾
and Hsiu-Luan Chang⁽²⁾

Received : Sep. 9 , 2002 ; Accepted : Oct. 15, 2002

Abstract

To search for chicken sex identification candidate markers, 248 different 10-mer primers of arbitrary sequence were used to screen four chicken inbred lines at the Taiwan livestock Research Institute (TLRI) (two males and ten females each line). In phase I, a random amplified polymorphic DNA (RAPD) marker (AI05, 5'-GTCGTAGCGG-3') demonstrated high sensitivity and accuracy in gender diagnosis. The PCR polymorphism results indicated a specific DNA fragment (850 bp) amplified with primer AI05 could distinguish females from males. The proof stage, phase II, AI05 was used to test 240 birds, 10 males and 10 females each, from 12 different lines/breeds, including eight exotic lines/breeds (Leghorn, White Silkies, Black Silkies, Beijing Fatty Chicken, Scaleless Chicken, New Hampshire Red and Black Plymouth Rock and Folk Black Chicken). Results showed 100% (240/240) accuracy. The RAPD sex determination method can reduce labor costs, compared with nested PCR or restriction endonuclease digestion of PCR products.

Key words : Chicken, Random amplified polymorphic DNA (RAPD), Sex identification.

-
- (1) Contribution No.1142 from Taiwan Livestock Research Institute (TLRI), Council of Agriculture(COA), Executive Yuan.
 - (2) Department of Breeding and Genetics, COA-TLRI, Hsinhua, Tainan 712, Taiwan, R.O.C.
 - (3) Department of Animal Physiology, COA-TLRI, Hsinhua, Tainan 712, Taiwan, R.O.C.
 - (4) Department of Animal Industry, COA-TLRI, Hsinhua, Tainan 712, Taiwan, R.O.C.
 - (5) Corresponding author.