

动物性别控制技术的研究进展

李桂钊 动科 1071

[摘要] 目前在畜牧业生产中的性别控制主要是通过 XY 精子分离和早期胚胎性别鉴定来实现的,人为控制出生家畜的性别可以降低生产成本,提高经济效益。随着科技的进步和研究的不断深入,家畜性别控制技术也在不断的完善。作者综述了 X、Y 精子的分离和胚胎性别鉴定这两项家畜性控技术的发展历程和研究状,并对其今后的研究方向及应用前景进行了展望。

关键词: 性别控制; 精子分离; 胚胎性别鉴定

性别控制(Sex control)是指通过人为地干预或操作,按照人们的愿望繁殖所需性别后代的生物技术。由于畜牧生产中许多重要的经济性状都与性别有关,如肉、蛋、乳等的生产都需要特定性别的动物进行生产,所以对畜牧业生产有着重要意义。

1 性别决定的机理

1.1 性别决定基因—SRF 基因

自从 Jacobs 等 1959 年^[1]发现 Y 染色体是性别决定因子,认为 Y 染色体有决定睾丸分化的基因(Testis determining factor,TDF),以后人们先后研究了 Y 染色体的短臂、H—Y 抗原和 ZFY 基因,Palmer 等(1989)^[2]发现,决定动物性别的基因是 Y 染色体上一个核心区基因,并将其命名为 SRY(Sex Determining Region of Y-Chromosome)。1991 年,Koopman 等将含有 SRY 基因的 DNA 片段(14kb)作为外源基因导入雌性鼠胚中,结果引起部分性反转,从而证明了 SRY 为哺乳动物的性别决定主宰基因。

哺乳动物胚胎发育的早期阶段为性别未分化期,性腺原基分化的类型决定了机体将来性别的发育^[3]。当性腺原基被某中信息诱导发育为睾丸,支持细胞分泌抗苗勒氏管因子()抑制苗勒氏管发育,吴尔夫氏管发育成附睾和输精管,而睾丸分泌的雄性激素刺激阴茎、阴囊和雄性解剖学的其他部分的发育。如果性腺原基发育为卵巢,由卵巢分泌的雌激素则使苗勒氏管发育为阴道、子宫和输卵管等^[4]。

然而诱导性腺原基的信息究竟是什么?起初,人们认为是 Y 染色体编码性别决定因子,这种因子特异的决定睾丸的发育。这种性别决定因子又称为睾丸决定因子^[5-6](人体中为 testis determining factor,简称 TDF;鼠体中为 testis determining Y,简称 Tdy)。但是 Y 染色体上的基因众多,究竟何为 TDF?几十年来,研究者分别研究了 Y 染色体短臂、H-Y 抗原和 ZFY 基因,认为就是 TDF,但是都被后来的研究所否定。直到 1990 年,Sinclair^[7]将此基因定位于自拟常染色体相邻的 35 kb 的片段,并将其命名为 SRY(sex determining region of Y gene)。Koopman (1991)^[8]将含有 SRY 的 14kbDNA 作为转基因导入 XX 雌性胎鼠中,结果部分小鼠产生了性反转,从而证实了 SRY 基因就是 TDF 基因。

2 性别控制的途径

性别控制是一项历史悠久而又朝气蓬勃的生物技术。最早可追溯到 2500 年前古希腊德谟克利特,在 20 世纪,随着孟德尔遗传理论的重新确立,人们提出性别由染色体决定的理论。1923 年 Painter 证实人类 X 和 Y 染色体的存在。1959 年 Welshons 和 Jacobs 等提出 Y 染色体决定雄性的理论,后来 Jacobs 等在 1966 年发现雄性决定因子位于 Y 染色体短臂上,1990 年英国学者 Sinclair 和 Gubbay 发现了 Y 染色体的性别决定区(sex determining region of the Y,SRY)^[9]。同时伴随着人工授精和胚胎移植技术的发展和运用,性别控制的研究出现了高潮。就目前的研究内容看最主要的有两条途径,其一是精子的性别控制,其二是胚胎的性别鉴定。

2.1 精子的性别控制

人们已确认动物的性别是由 X 和 Y 染色体决定的。从 20 世纪 50 年代开始,人们就对 X 和 Y 精子的大小、带电荷数、密度和活力等作了较深入的研究。人们试图根据 X 与 Y 精子之间的生物学差异识别带有不同染色体的精子,并将其分开,进行人工授精从而控制家畜的性别。但由于除了 X 精子的染色体含量高于 Y 精子和 Y 染色体上有特异的 SRY 序列外,两种精子在其他方面没有明显差异,故在这方面的研究还没有取得较理想的结果。

2.2 胚胎的性别鉴定

正常的受精卵从卵子获得一条 X 染色体,从精子获得一条 X 或 Y 染色体,以此决定胚胎的性别。人们开始运用细胞学、分子生物学或免疫学方法对哺乳动物附植前的胚胎进行性别鉴定,通过移植已知性别的胚胎可控制后代性别比例。但当 Y 染色体上 SRY 基因被发现后,人们就开始对早期胚胎利用特异性 DNA 探针或 PCR 技术进行鉴定,然后按要求选择胚胎进行移植,从而达到控制后代性别的目的。

3 性别控制的方法

3.1 X、Y 精子的分离

Lush(1925)利用精子分离的方法进行性别控制研究,首次报道了用离心法分离兔 X、Y 精子,而授精结果发现后代性别比例无显著改变。在此后的半个多世纪里,人们就开始寻找分离 X、Y 精子的有效方法。人们先后采用了多种技术,包括:过滤法、密度梯度离心法、电泳技术、免疫法和流式细胞分离技术等,对 X、Y 精子进行分离,但绝大多数技术因分选速度慢、纯度过低或对精子损害性过大等缺陷而不再应用,只有流式细胞分离技术进展较快,成为目前唯一有效的精子分离手段^[10]。

3.1.1 根据精子的理化性质分离法

从上世纪 70 年代开始,由于 X、Y 精子存在物理化学和生物学上的差异,人们一直试图依据这些微小的差异将 X、Y 精子分离。人们分别采用了沉降法、电泳法、密度梯度离心法和凝胶过滤法等各种技术分离精子并进行临床实验。但许多研究表明,以上几种方法分离的精子数少、准确率低且可重复性差,所以现在很少应用。

3.1.2 以长臂 Y 染色体为标记分离法

Barlow 在 1970 年以长臂 Y 染色体为标记对 X、Y 精子进行分离,其原理为根据 Y 精

子具有长臂 Y 染色体的特征,利用盐酸奎纳克林荧光监测技术来分离精子^[11]。由于精液准备程度的变化性和连续观察与识别荧光信号的难度性,许多人对此法的效率和重复性持怀疑态度,在实际生产中更是很少应用。

3.1.3 免疫分离精子法

该方法是利用 H-Y 抗体检测精子质膜上存在的 H-Y 抗原,以此来分离 X 精子和 Y 精子。只有 Y 精子才能表达 H-Y 抗原,因而,利用 H-Y 抗体精子质膜上存在的 H-Y 抗原,再通过一定的程序,就能将 H-Y+(Y 精子)和 H-Y-(X 精子)精子分离。将所需性别的精子进行人工授精,即可获得预期性别的后代。这种分离精子的方法依赖于 H-Y 抗血清的制备,尤其是抗血清的质量。这种方法目前主要采用免疫亲和柱层析法、H-Y 抗血清直接输入法和免疫磁珠技术来分离精子。Bryant 等(1980)^[12]应用 H-Y 抗体免疫学亲和柱层析,首次成功地分离了人和小鼠的 H-Y 阳性和阴性精子。Zavos 等(1982)^[13]用兔子生产抗血清进行实验,把 H-Y 抗血清注入母兔阴道 15 min 后输精,产出的雌性兔为 74.2%;1987 年他又采用免疫过滤法对兔子和牛进行试验,结果后代中雌兔为 78.9%、母犊为 74.4%。Bradley(1989)^[12]用免疫亲和柱层析法分离绵羊的 H-Y 阳性和 H-Y 阴性精子,发现未结合到层析柱的精子有 70%~80%为阴性,结合到层析柱上而后被洗脱下来的精子 75%~78%为阳性;而对照组的 H-Y 阳性和 H-Y 阴性精子分别为 43%~44%和 56%~57%。王光亚等(1994)^[14]用兔 H-Y 抗血清进行试验,将效价为 1:32 的兔 H-Y 抗血清输入发情母兔阴道内 10~15 min 后自然交配,所生 2 只小兔均为雌兔。罗承浩等(2004)^[15]应用此法对奶牛进行实验,结果表明比自然产母犊性比率理论值提高 10.7 个百分点。但由于 H.Y 抗原是一种弱抗原,所以其准确性比较低。

参考文献

3.1.4 流式细胞分离仪分离精子法

流式细胞光度法是目前分离 X 精子和 Y 精子比较理想的方法,借助流式细胞光度计进行测定,其理论依据是 X 与 Y 精子 DNA 的含量不同。DNA 含量高,当用专用荧光染料染色时,其吸收的染料就多,发出的荧光也强,反之发出的荧光就弱。这种分离方法开创了精子分离的新局面。Joh-son 等^[16](1989)用分离的兔 Y 精子在子宫内输精后,预测雄性兔比例为 81%,实际亦为 81%;X 精子输精后预测雄兔的比例为 14%,实际产雄兔的比例为 6%。1991 年他用经使用该法分离的猪 X 精子输精后,获得 74%的雌性仔猪,Y 精子输精后获得 68%的雄性仔猪。Gran 等^[17](1993)使用该法分离牛精子用于体外授精,将胚胎移植给 9 头受体牛,其中 4 头妊娠产牛犊 6 头,3 头雌性,3 头雄性,均与预测性别相符。Abeydeera 等^[18](1998)报道,利用该法分离的猪 X 精子授精,产雌性 23 头,雄性 1 头,准确率为 97%;利用分离的 Y 精子授精,产雄性仔猪率为 100%。Seidel 等^[19](1999)报道了使用牛分离精子冷冻保存后的授精效果,后代性别准确率在 90%以上。但是用一般流式细胞分类器分离精子时,需要精子一个个通过,这样就必须稀释精液,造成精子的运动能力下降,加之分离效率太低,目前还无法应用于实际生产。但是,据 Johson(2000)^[22]报道,同时分离收集 X 和 Y 精子,分离速度以达到每小时 6,000,000 精子;若只

分离和收集 X 精子,则分离速度可达到每小时 18,000,000 精子,看来,用于生产实践为期已不远。如果结合显微注射技术,该方法将是一种有效的分离 X、Y 精子的技术。

3.2 胚胎性别鉴定

动物性别控制除了通过对 X、Y 精子进行分离以外,还可以通过对其胚胎进行性别鉴定,胚胎的性别鉴定已成为实现人为控制出生家畜性别的主要途径之一。现在能够实现胚胎性别鉴定的技术很多,而且已经达到成熟。但是这些方法存在准确率不高、费时或试验费用昂贵等不足。随着研究的深入和现代分子新技术的出现,细胞遗传学方法、分子生物学方法、免疫学方法和生物化学微量分析法等方法对胚胎性别鉴定较为有效、准确和快速的并且具有一定发展和推广前景。

3.2.1 细胞遗传学方法

通过核型分析对胚胎进行性别鉴定,即通过 Y 染色体的核型鉴定来达到鉴定胚胎性别的方法。此方法是取一小部分滋养层细胞,将被鉴定胚胎用含有丝分裂阻滞剂(如秋水仙素)的培养液培养,然后诱使细胞及染色体扩展并加以固定,以永久性 DNA 染料如姬姆萨液染色,用显微镜检查,其性别鉴定准确率可达 100%^[21],但采集细胞鉴定时对胚胎具有很大损伤,同时由于 Y 染色体的核型鉴定只有在细胞分裂中期才能观察到,所以难度极大且费时多,对于技术水平也要求比较高,所以不适用于生产实际。

3.2.2 分子生物学方法

分子生物学方法是近十几年发展起来的一种利用雄性特异性基因探针和 PCR 扩增技术鉴别家畜胚胎性别的崭新方法。它具有灵敏、准确、特异、快速等特点,因此它成为胚胎性别鉴定中最具研究价值和发展潜力的技术方法,其实质就是检测 Y 染色体上的 SRY 基因的有无,有则判为雄性,无则判为雌性。

3.2.2.1 雄性特异 DNA 探针检测法

主要是从胚胎取下少量细胞,将其 DNA 与 Y 染色体特异标记的 DNA 序列(控针)杂交,结果如果为阳性,则为雄性胚胎,否则为雌性胚胎。Leonard 等(1987)^[22]首次鉴定牛囊胚获得成功,其准确率为 95%(81/85)。但由于 DNA 杂交需要大量的胚细胞(15 个或更多)和需时较长以及鉴定胚胎数少,并且此法技术要求较高,所以该法在广泛应用上受到一定限制,生产实践中也就很少应用。

3.2.2.2 荧光原位杂交法(FISH)

FISH 其主要有荧光素探针制备、探针和靶 DNA 的变性与杂交、观察鉴定三部分组成。由于 FISH 技术制备了特异性序列片段探针,而且杂交在细胞内进行,并能使用试剂而发光、显色,既能在细胞分裂间期杂交,也能在分裂中期杂交,所以具高效性和底的错误率^[23],因此具有广泛的应用性。Santiaqomunne 等(1993)^[24]用绿色荧光素标记 Y 染色体特异序列探针,红色荧光素标记 X 染色体重复序列探针,对处于 4 天前 8 细胞期的人胚胎进行了共 6 个分裂球双探针 FISH 检测,仅使用 6h 就完成了从显微操作到显微观察的整个过程,准确检测了胚胎性

别,其有效率达 95.5%(65/68)。Kawarasaki T^[25]等用 FISH 技术以染色体 Y-探针和切割胚胎进行杂交检测猪胚胎性别,鉴定率为 91%(85/97),而 92%(60/65)的切割胚体外发育 48h 后有明显的囊胚腔和内细胞团,在移植的 12 头受体中产出 12 头与鉴定结果一致的仔猪。此方法具有高效、快速、准确的特点。其不足之处 DNA 探针特异性不强、荧光素分辨率低且对胚胎毒性较大。

3.2.2.3 PCR 扩增法

PCR 技术原理^[26]主要是利用 DNA 聚合酶依赖于 DNA 的特性,模仿体内的复制过程,在人工引物的作用下诱发聚合酶反应。其全过程包括 DNA 模板变性、退火、延伸 3 个步骤的若干次循环。然后将扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳并用 EB 染色后再进行紫外激光检测,出现特异带的是雄胚,否则为雌胚。Herr 等(1990)^[27]首先成功应用 PCR 技术鉴定牛羊胚胎性别。国内外的专家学者相继用此技术,通过扩增胚胎的性别决定基因(SRY)鉴定胚胎性别,由于 SRY 基因的核心序列在哺乳动物高度保守,设计相同的引物也可以鉴别不同哺乳动物的性别,产犊结果表明准确率达到 95%~100%。陈从英等(2003)^[28]利用此技术对牛胚胎进行鉴定,其结果达到 100%(10/10)。张建新等(2004)^[29]通过试验研究证明以打孔法对早期桑葚胚进行采样并进行性别鉴定是比较可行的方法,其准确率达到 100%(20/20)。该技术灵敏度高,可重复性好,该技术建立后很快被用于胚胎的性别鉴定。但是该技术容易造成污染,同时耗时长所以还需进一步的改进。

3.2.2.4 LAMP 法

与 PCR 技术同属于基因扩增技术的 LAMP^[30]法是一种全新的基因扩增法。由于双链 DNA 在 65℃左右处于动态平衡状态,任何一条引物对双链 DNA 的互补部位进行碱基配对时,一条链就会脱落变成单链。LAMP 法就是利用这一特点,对目标基因的 6 个区段设定雄性特异性以及雌雄共同引物(4 种),利用特殊的链置换型 DNA 聚合酶,在 65℃的恒温条件下对胚细胞中的雄性特异性核酸序列和雌雄共有核酸序列进行扩增反应,最后通过反应过程中获得的副产物焦磷酸镁形成的白色沉淀的浑浊度来进行早期胚胎性别的鉴定。从反应开始到性别判定完成约 40 min。王海浪利用此法对牛早期胚胎进行检测,其性别符合率达到 100%,与 H.Hirayama,S.等鉴定 113 头奶牛胚胎性别符合率 58 枚雄性,55 枚雌性结果相符^[31]。LAMP 反应是相当灵敏的反应。只要混入及其少量的目标基因以外的基因 DNA 或其他检品的扩增产物,也可能造成误判。所以 LAMP 技术具有 PCR 技术相似的缺点,就是极高的灵敏度而容易受到污染的干扰。

比较胚胎性别鉴定的各种方法,应用 PCR 技术、LAMP 法进行胚胎性别鉴定,具有灵敏、快捷、简便、实用等特点,但灵敏度高本身又是该技术的缺点,由于操作过程极易遭到污染,因此在操作过程中,一定要严格遵守操作规则,以防止外源污染。

综上所述,哺乳动物性别控制技术近年来已取得了很大的进展,精子分离技术虽然不直接伤害胚胎,但其准确率不高,到目前为止只有流式细胞仪可将 X、Y 精子高效地分开,但其价格昂

贵,所以不适用于大规模的生产实际。从胚胎性别鉴定的整个历史进程来看,用分子体生物学方法进行准确高效的胚胎性别鉴定是可行的,但从胚胎上切取部分细胞,而后经冷冻,解冻会对胚胎造成一定的损害,所以,今后应该在对性别决定更深的研究,着重对那些快速、准确、经济的性别鉴定方法,以便更好地应用。

4 前景展望

综上所述,关于 X、Y 精子分离技术和胚胎性别鉴定技术的研究,虽然已开展了一些工作并取得了一些进展,但很多问题有待解决,如流式细胞仪分离速度慢、仪器昂贵和部分精子类型不能被识别而影响其在生产中的应用,按照目前的分离速度,要获得一次输精剂量的牛精子,需花费近 20 h 的时间,如此长的分离时间直接影响精子的活率,导致受孕率下降;再如 PCR 扩增法胚胎取样受实验员试验技术的影响、胚胎冷冻和解冻处理后对胚胎移植成功率的影响等。笔者相信,随着研究的不断深入,技术的不断发展,流式细胞仪也在不断更新换代,分离精子的速度必将逐渐提高,从流式细胞仪的发展速度看推广前景良好,同时结合体外受精和显微授精技术的研究,来提高精子的利用率,可以增加流式细胞仪的实际应用价值;PCR 扩增法的整个操作可在几分钟内完成,在生产中应用非常方便,而且胚胎性别鉴定的 PCR 试剂盒已经出现,但在实际应用中成本问题是必须要考虑的,所以首先在大家畜和珍贵动物上应用的可能性较大。需要提出的是在完善和改进上述两种性控技术的过程中,可以寻找其他的方法回避技术中复杂的步骤。如日本荣研化学株式会社研制出 Loopamp 牛胚胎性别鉴定试剂盒,运用了新的基因扩增技术 LAMP(loop-mediated isothermal amplification)法,这种方法通过检测反应过程中获得的副产物焦磷酸镁所形成的白色沉淀的混浊度来判定结果,简化了 PCR 扩增结果的检测方法。

家畜性别控制的研究是家畜繁育的一项重要课题,具有很大的理论意义和实际应用价值。通过 X、Y 精子的分离和胚胎性别鉴定可以有效地进行家畜性别的控制。家畜性别控制技术将成为家畜繁育的一项常规技术,对各项育种技术的发展和应用都具有重要的促进作用,对优良家畜的繁殖和增加畜产品的产量,均具有巨大的经济意义。因此,需要我们研究者的继续努力和政府的大力支持,加快家畜性控技术的研究和推广步伐,这也是家畜生产者所期望的。

参考文献

- [1] Goodfellow, P.N., Darling, S.M. Genetics of sex - determining in man and mouse. (J) *Development*, 1988, 102:251—258.
- [2] 葛宝生,李善如,陈永福等.性别决定及 SRY 基因在胚胎发生中的表达[J].*国外畜牧科技*, 1998,25(3):29—32
- [3] 张红卫, 王子仁, 张士瑾, 等.发育生物学[M].北京: 高等教育出版社, 2001, 334—340.
- [4] 朱必才, 高建国, 张子峰,等.哺乳动物性别决定及其机制的研究[J].*细胞生物学杂志*, 2002, 2 (45): 282—286.
- [5] Sinclair A H et al.A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif[J].*Nature*,1990,346:240—244.
- [6] Goodfellow P.N and Darling S M.Genetics of sex-determining in man and mouse[J].*Development*, 1988, 102:251—258.
- [7] BROCK K V,RIBLET S M.Nucleotide sequencing of 5 and 3 terminal of bovine viral diarrhea virus by RNA ligation and PCR[J].*Journal of virological methods*,1992,38—39.
- [8] Koopman P et al.Male development of chromosomally female mice transgenic for sry[J].*Nature*,1991,351:117—121.
- [9] 李馨,杨隽,郭志光.家畜性别控制研究现状与展望[J].*内蒙古畜牧科学*,1997,(2):15~18.
- [10] Maxwell.W.M.C,Evans.G,Hollinshead.F.K,et al.Integration of sperm sexing technology into the ART toolbox[J].*Animal Reproduction Science*,2004,82-83(2004):79-95.
- [11] Barlow P,Vosa C G.The chromosome in human spermato-zoa[J].*Nature*,1970.226:961.
- [12] 郭志勤等.家畜胚胎工程. (M) 中国科学技术出版社,1998 年第一版
- [13] Zavos,PM .Preconception sex determination via intravaginal administration of H-Y antigen in rabbits[J].*Theft—oae nofoav*,1982,20:23-24.
- [14] 王光亚,段恩奎.山羊胚胎工程[M].陕西:陕西天则出版社,1994.149-179.
- [15] 罗承浩,贾德福,马骏洪,等.应用生殖免疫方法制作性别化冷冻精液对奶牛性别控制的研究[J].*中国生物工程杂志*,2004,24(2):84-87.
- [16] John, L.A., Flook, J.P., HAWK, H.W. Sex preselection in rabbits: live birth from X- and Y- sperm separated by DNA and cell sorting. (J) *Biol. Reprod*,41, 199~203
- [17] Cran, D. G., Johnson, L.A., Polge, C. Production of bovine calves following separation of X- and Y-chromosome-bearing sperm and in vitro fertilization. (J) *Vet.Rec.*,1993, 132: 40~41
- [18] Abeydeera, L.r., Johnson, L.A., Welch, G.D., et al.Birth of piglets preselected for gender following in vitro fertilization of in vitro matured pig oocytes by X-and Y-chromosome-bearing spermatozoa sorted by high speed flow cytometry. (J) *Theriogenology*,1998, 50,981~988
- [19] Seidel, G. E, Jr., Schenk, J.L., Herickoff, L.A., et al.Insemination of heifers with sexed sperm. (J) *Theriogenology*,1999, 52, 1407~1420

- [20] Johnson, P.A. Sexing mammalian sperm for production of offspring: the state- of- the- art. (J) Anim. Reprod.Sci., 2000, 61~66: 93~107
- [21] 华进联, 郑玥茂, 窦忠英.家畜早期胚胎性别鉴定[J].黑龙江畜牧兽医, 1999, 8: 9—11.
- [22] 梁明振, 卢克焕.动物性别控制研究现状[J].上海畜牧兽医通讯, 2002, 4: 6—9.
- [23] 李青旺, 胡建荣, 王力强,等.哺乳动物胚胎性别鉴定技术的研究进展[J].家畜生态,2004,2 (51): 45—48.
- [24] CuiX.etal. J Anim SciTenhnol(Jnh)[J].1996.67:333—337.
- [25] Kawarasaki T,Matsumoto K,Murofushi J,et al .Sexing of porcine embryo by in setuhybridization using chromosome Y-and I-specific DNA probes[J].Theriol,2000,53:1501-150.
- [26] 王建辰, 章孝荣, 王光亚,等.动物生殖调控[M].安徽:安徽科学技术出版社, 1998, 316—323.
- [27] Herr C M. Reed K C.Micromanipulation of bovine embryos for sex determination[J]. Theriogenology, 1991,35(1):45—54.
- [28] 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.
- [29] 张建新, 岳文斌, 赵宇军.山羊体外受精胚胎性别鉴定不同取样方法的研究[J].激光生物学报, 2004 13(2), 120—123.
- [30] 肖海霞, 辛宇云, 陈静波,等.LAMP 法在牛早期胚胎性别鉴定中的应用与研究[c].草食家畜第二届全国动物胚胎生物技术暨第九届兽医产科学研讨会论文集 2003(增刊).
- [31] 王海浪, 薛建华, 孙凤俊.简便快速的胚胎性别鉴定方法--LAMP 法[J].黑龙江动物殖,2003,11(4):38—39.