

网络出版时间:2013-03-27 15:46

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20130327.1546.002.html>

奶山羊间性个体的遗传鉴定及 AFLP 指纹图谱分析

石恒波, 罗 军, 王 维, 许会芬, 朱江江, 李 君

(西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西省农业分子生物学重点实验室, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] **【目的】**分析奶山羊间性个体的遗传背景,探讨间性个体发生的遗传机制,为山羊性别调控以及性别决定的研究提供参考。**【方法】**通过核型分析、特异性性别调控基因(Sex-determining region of Y chromosome, SRY)的 PCR 扩增以及 AFLP(Amplified fragment length polymorphism)指纹图谱分析等方法,研究西农萨能羊间性个体的遗传本质。**【结果】**间性山羊与正常母山羊的核型一致,为 58+XX;间性个体基因组中未能扩增出 SRY 基因;AFLP 指纹图谱分析发现,有 9 对引物扩增出清晰的条带,共 1 833 条,片段长度为 70~500 bp,9 对引物的扩增结果差异明显,表现出丰富的多态性,共获得 611 个多态位点,占总扩增条带数的 33.3%,但在基因组水平上间性山羊与正常母山羊个体并没有大的差异。**【结论】**根据试验结果推测,间性山羊的出现并非是由个体基因组发生突变造成的,可能是在性别决定过程中某个因子的调控出现差错,从而导致胚胎在发育过程中偏离雌性轨道而产生间性山羊个体,其具体机制有待进一步研究。

[关键词] 间性山羊;核型分析;SRY 基因;AFLP 指纹图谱

[中图分类号] S827.9⁺43

[文献标志码] A

[文章编号] 1671-9387(2013)04-0001-06

Genetic determination and AFLP fingerprinting analysis of intersex dairy goats

SHI Heng-bo, LUO Jun, WANG Wei, XU Hui-fen, ZHU Jiang-jiang, LI Jun

(College of Animal Science and Technology, Shaanxi Provincial Key Laboratory
of Agricultural Molecular Biology, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: **【Objective】** The research was conducted to investigate the development mechanism of intersex goat by analyzing its genetic background. **【Method】** The paper studied the genetic characteristics of intersex goats through karyotype analysis, amplification of SRY (Sex-determining region of Y chromosome) gene and AFLP (Amplified fragment length polymorphism) fingerprinting. **【Result】** The results showed that the karyotype of intersex goats was 58+XX, same as that of normal goats. SRY gene was not found in genome of intersex goats. AFLP fingerprinting found that there were nine pairs of primers amplified clear bands and the total number was 1 833 with the size of 70—500 bp. The differences between the nine pairs of primers were distinct, showing various polymorphisms. A total of 611 polymorphic loci were obtained, accounting for 33.3% of the whole amplified bands. However, there was no large difference between intersex and normal dairy goats in genome. **【Conclusion】** According to the results, it was predicted that the occurrence of intersexuality was not resulted from mutations in individual genome. Instead, it may be caused by failing regulation of some factors in the process of sex determination, which leads the deviation of indi-

[收稿日期] 2012-07-11

[基金项目] 公益性行业(农业)科研专项(201103038);陕西省重大科技创新项目(2009ZKC07-01)

[作者简介] 石恒波(1985—),男,河南项城人,在读博士,主要从事动物遗传学研究。E-mail: shihengbo@nwsuaf.edu.cn

[通信作者] 罗 军(1965—),男,陕西扶风人,教授,博士,博士生导师,主要从事生物技术与家畜育种研究。

E-mail: luojun@nwsuaf.edu.cn

vidual embryo from the female track during the development. Further work should be done to clarify the mechanism in.

Key words: intersex goats; analysis of karyotype; SRY gene; AFLP fingerprinting

间性山羊是指遗传上为雌性而性腺或外生殖器却发育为雌雄相兼或者完全雄性的山羊个体。间性个体的出现,影响了山羊种群的繁殖力,给养羊业发展造成了危害^[1]。山羊间性在 20 世纪初就引起科学界的关注,许多国家对这一问题进行了广泛的研究,取得了一定的进展。Vallenzasca 等^[2]对 2 例有雄性生殖器官且尿道下裂的无角间性山羊进行了细胞遗传学分析,结果发现,1 例为 60XX,另一例为 60XX/XY 嵌合体,60XY 个体中有 5% 为淋巴细胞。常洪等^[3]提出间性和无角连锁的理论。Pailhoux 等^[4]对 3 只无角间性山羊的外部形态、生产性能、组织学、染色体组成及 Y 染色体筛选进行分析,使用 Southern blot 和 PCR 扩增技术,对 Y 染色体特异序列包括 SRY 和 ZFY (zinc finger protein, Y-linked) 基因进行检测,在 3 只 60XX 的间性羊中未检测到 Y 来源的 DNA,排除了 Y 染色体易位和 XX/XY 嵌合现象。1994 年,詹铁生等^[5]利用传统遗传学方法研究了西农萨能羊间性出现的机制,结果发现,间性和无角性状是由不同基因控制的,但这些结果缺少试验验证。2001 年, Pailhoux 等^[6]研究发现,阿尔卑斯山羊间性个体基因组缺失 PIS (Polled Intersex Syndrome) 区域,造成了性别调控基因 *FOXL2* 的下调,个体在胚胎发育初期开始出现性反转趋势。目前,研究间性个体与正常个体在基因组水平上差异的文献较少,山羊间性发生的机制仍无定论。本研究通过核型分析、特异性性别调控基因 SRY 的 PCR 扩增以及 AFLP 指纹图谱等方法分析间性山羊个体,试图从基因组水平上找到间性山羊与正常山羊的差异,并探讨间性个体的遗传发生机制,为以后奶山羊性别调控以及动物性别决定等研究提供试验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

RPMI-1640 培养基购自 Gbico 公司,胎牛血清购自 Hyclone 公司,肝素、植物血细胞凝集素 PHA 和秋水仙素均购自 Sigma 公司,血液基因组提取试剂盒、吉姆萨 (Giemsa) 原液购自北京天根生物技术有限公司,pMD-19T 试剂盒购自大连宝生物工程有限公司,AFLP 试剂盒购自北京鼎国生物技术有限

公司,其他分析纯购自天津博迪化工。间性奶山羊来自陕西省白水林皋奶山羊场(4 只)和西农萨能羊原种场(3 只),正常奶山羊均来自西北农林科技大学西农萨能羊原种场(其中健康 2 周龄公羊 7 只、母羊 11 只),本研究中山羊品种均为西农萨能羊。

1.2 方法

1.2.1 全血细胞培养及核型分析 对 7 只间性山羊和 11 只正常母羊,用 2 g/L 的肝素液润湿注射器后颈静脉采血,在无菌条件下,将全血接种至培养瓶中,摇匀,于 37 °C 培养箱中培养 72 h,每天轻摇 3 次。培养基为 RPMI1640 (包含体积分数 20% 胎牛血清、20 g/L 植物血凝素和 20 万 IU/L 的青、链霉素混合溶液)。每个个体血样重复 3 次。在终止培养前 6 h,加入终质量浓度为 0.2 μg/mL 的秋水仙素,培养结束后,1 000 r/min 离心收集细胞,加入预温的 0.075 mol/L KCl 低渗液 5 mL 悬浮细胞,低渗处理 20 min。低渗处理后,加入 2 mL 固定液预固定 5 min,1 000 r/min 离心收集细胞,再加入 5 mL 固定液固定 30 min。重复固定 3 次,第 3 次固定后在 4 °C 冰箱静置过夜。第 2 天除去部分上清液,用剩余多细胞悬液进行滴片,在体积分数为 10% 的 Giemsa 染液中染色 20 min,清洁水冲洗浮色,晾干。在光镜下选择 20 个染色体分散适度、周缘清晰的中期分裂相细胞观察性染色体。

1.2.2 基因组的提取 采用颈静脉采血法随机采集正常公羊(样本数 $n=7$)、正常母羊(样本数 $n=11$)以及全部间性山羊(样本数 $n=7$)的血样,利用血液基因组提取试剂盒提取血样 DNA 用于 AFLP 试验,同时取等量的公羊 DNA 混合用于 SRY 基因检测,随机选择 7 只正常母羊的 DNA 样本混合用于 SRY 扩增。

1.2.3 引物设计 根据 GenBank 中已经公布的山羊 SRY 基因的序列 (GenBank 登录号: Z30646),利用生物信息学软件 primer 5.0 设计扩增引物,上游引物 SF: 5'-TGAACGAAGACGAAAGGTGGCT-3',下游引物 SR: 5'-CCTGGGTATTTGTCTCGG-TGT-3',扩增片段长度为 162 bp。

1.2.4 SRY 基因的 PCR 扩增 以 1.2.2 中提取的血样 DNA 为模板,进行山羊 SRY 基因保守区域的 PCR 扩增。PCR 反应体系为: 2 μL 10 × LA Buffer II (含 Mg^{2+}), 2 μL dNTPs (2.5 μmol/L), 1

μL SF ($10\ \mu\text{mol/L}$), $1\ \mu\text{L}$ SR ($10\ \mu\text{mol/L}$), $0.2\ \mu\text{L}$ LA Taq DNA 聚合酶($5\ \text{U}/\mu\text{L}$), $10\ \text{ng}$ DNA 模板, 加 ddH₂O 至 $20\ \mu\text{L}$ 。PCR 反应条件为: $95\ ^\circ\text{C}$ 预变性 $3\ \text{min}$; $94\ ^\circ\text{C}$ 变性 $30\ \text{s}$, $60\ ^\circ\text{C}$ 退火 $30\ \text{s}$, $72\ ^\circ\text{C}$ 延伸 $30\ \text{s}$, 34 个循环; $72\ ^\circ\text{C}$ 延伸 $5\ \text{min}$, $4\ ^\circ\text{C}$ 保温。用 $2\ \text{g/L}$ 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 用 DNA 快速回收试剂盒回收目的条带。根据 pMD-19T 试剂盒说明书, 将回收片段与 pMD-19T 载体连接后送上海 Invitrogen 公司测序。

1.2.5 AFLP 分析 采用一步法进行酶切与连接: 用内切酶 *EcoR* I / *Mse* I 双酶切基因组 DNA, 同时加入连接酶、*EcoR* I 与 *Mse* I 接头, 混匀, $37\ ^\circ\text{C}$ $5\ \text{h}$, $8\ ^\circ\text{C}$ $4\ \text{h}$, $4\ ^\circ\text{C}$ 过夜。adapter 的序列为: *EcoR* I 接头 1: $5'\text{-CTC GTA GAC TGC GTA CC-3'}$, *EcoR* I 接头 2: $5'\text{-AAT TGG TAC GCA GTC TAC-3'}$; *Mse* I 接头 1: $5'\text{-GAC GAT GAG TCC TGA G-3'}$, *Mse* I 接头 2: $5'\text{-TAC TCA GGA CTC AT-3'}$ 。预扩增反应体系为: 不含选择性碱基的预扩增上、下游引物各 $1\ \mu\text{L}$, 连接产物 $2\ \mu\text{L}$, dNTP $2\ \mu\text{L}$, $10\times$ LA Buffer $2.5\ \mu\text{L}$, LA Taq DNA 聚合酶 $0.2\ \mu\text{L}$, 加三蒸水 $16.3\ \mu\text{L}$ 至 $25\ \mu\text{L}$ 。反应条件为: $94\ ^\circ\text{C}$ 预变性 $3\ \text{min}$; $94\ ^\circ\text{C}$ 变性 $30\ \text{s}$, $56\ ^\circ\text{C}$ 退火 $1\ \text{min}$, $72\ ^\circ\text{C}$ 延伸 $90\ \text{s}$, 20 个循环; $72\ ^\circ\text{C}$ 延伸 $10\ \text{min}$, $4\ ^\circ\text{C}$ 保存。扩增产物按 $1:20$ 稀释, 作为选择性扩增模板。选择性扩增反应体系为 $25\ \mu\text{L}$, 反应底物除引物用选择性碱基的引物组合外, 其他步骤同预扩增。反应条件: 一轮扩增条件为 $94\ ^\circ\text{C}$ $30\ \text{s}$, $65\ ^\circ\text{C}$ $30\ \text{s}$, $72\ ^\circ\text{C}$ $80\ \text{s}$, 此后每轮循环温度递减 $0.7\ ^\circ\text{C}$, 扩增 12 个循环; 随

后 $94\ ^\circ\text{C}$ $30\ \text{s}$, $55\ ^\circ\text{C}$ $30\ \text{s}$, $72\ ^\circ\text{C}$ $80\ \text{s}$, 23 个循环, $4\ ^\circ\text{C}$ 保存。本试验选用的 7 只间性羊和 11 只正常母羊血液基因组, 利用 AFLP 的 64 对引物进行选择性的扩增。对选择性引物参考 AFLP 试剂盒说明书。扩增产物变性后, 用 $40\ \text{g/L}$ 的变性胶进行电泳, 电压 $1200\ \text{V}$, 电泳约 $1\ \text{h}$, 小片段处于胶的底部, 用测序仪激光管收集条带。电泳结束后, 胶图由测序仪软件自动生成, 用于分析结果。用 GENESCAN 3.1 软件打开胶图, 分析、整理数据, 通过 Binthere 软件提取样品各大小片段的的结果, 生成原始矩阵, 以此记录扩增产物的多态性。用 NTSYSpc-2.11F 软件进行数据分析。对原始矩阵用 SimQual 程序求 DICE 相似系数矩阵, 并获得相似系数矩阵。用 SHAN 程序中的 UPGMA 方法进行聚类分析, 并通过 Tree plot 模块生成聚类图。

2 结果与分析

2.1 间性山羊的核型鉴定

Y 染色体为中着丝粒, 与其他染色体(亚端型或者端着丝粒型)差异明显; Y 染色体的另一个特点是体积小, 只有最小非 Y 染色体的 $1/2$, 可以根据这 2 个特点准确识别 Y 染色体。分析(图 1)发现, 间性山羊具有 60 条染色体, 核型未发现异常, 常染色体全部为端部着丝点染色体, X 染色体为第 2 对最大的端着丝点染色体, 但没有发现最小且是惟一中着丝点染色体的 Y 染色体, 说明间性山羊与正常母山羊的核型一致, 为 $58+XX$ 。

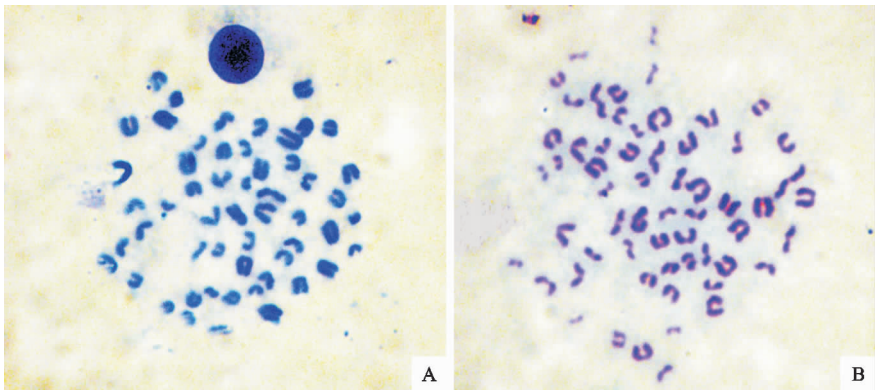


图 1 间性和正常母山羊的染色体核型分析($400\times$)

A. 间性山羊; B. 正常母山羊

Fig. 1 Analysis of chromosome karyotypes of intersexual and normal female goats ($400\times$)

A. Intersex goats; B. Normal female goats

2.2 性别特异性基因 SRY 的扩增

以从间性山羊和正常山羊血样中提取的基因组

DNA 为模板, 扩增雄性动物特异性基因 SRY。PCR 产物电泳检测结果显示, 该引物在正常公山羊

基因组序列中扩增出了 162 bp 的特异性条带,在间性山羊和正常母山羊基因组中没有扩增出特异性条带(图 2)。将扩增出的特异性条带回收,送上海 In-vitrogen 公司测序,结果显示,扩增出的特异性条带为山羊 *SRY* 基因。

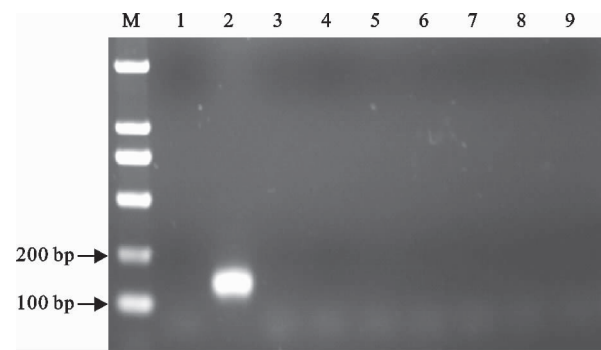


图 2 正常山羊和间性山羊基因组 *SRY* 基因扩增产物的凝胶电泳结果

M. DNA Marker DL2000;1. 正常母山羊;
2. 正常公山羊;3~9. 间性山羊

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of *SRY* gene amplification by different genomic DNAs

M. DNA Marker DL2000;1. Normal female goat;
2. Normal male goat;3-9. Intersex goats

2.3 间性山羊基因组的 AFLP 分析

选择性扩增结果表明,扩增引物中有 9 对扩增出了清晰的条带,共 1 833 条,片段长度为 70~500 bp,9 对引物的扩增结果差异明显,表现出不同程度的多态性。共得到多态位点 611 个,占总扩增条带的 33.3%。由于间性山羊和正常母山羊属于同一品种,因此在 AFLP 技术得到的 DNA 指纹图谱中,

虽然个体间遗传多样性丰富并且出现了较多的个体差异条带(图 3),但未发现间性山羊的特异性条带。

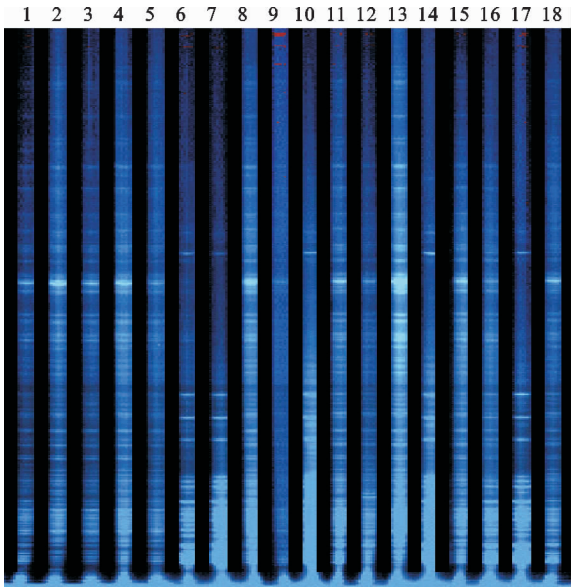


图 3 7 只间性山羊和 11 只正常母山羊个体基因组的 AFLP 指纹图谱分析
1~7. 间性山羊;8~18. 正常母山羊

Fig. 3 AFLP fingerprints of genomic DNAs of intersex goats and normal female goats
1-7. Intersex goats;8-18. Normal female goats

以 AFLP 图谱上 DNA 条带的统计结果为依据,用 UPGMA 聚类法对供试的 18 份材料进行聚类分析,得到树状分支图(图 4)。图 4 显示,间性山羊与正常母山羊的遗传距离为 0.81~0.96,遗传背景接近,为 AFLP 指纹图谱中间性山羊样本没有出现特异性条带的现象提供了验证依据。

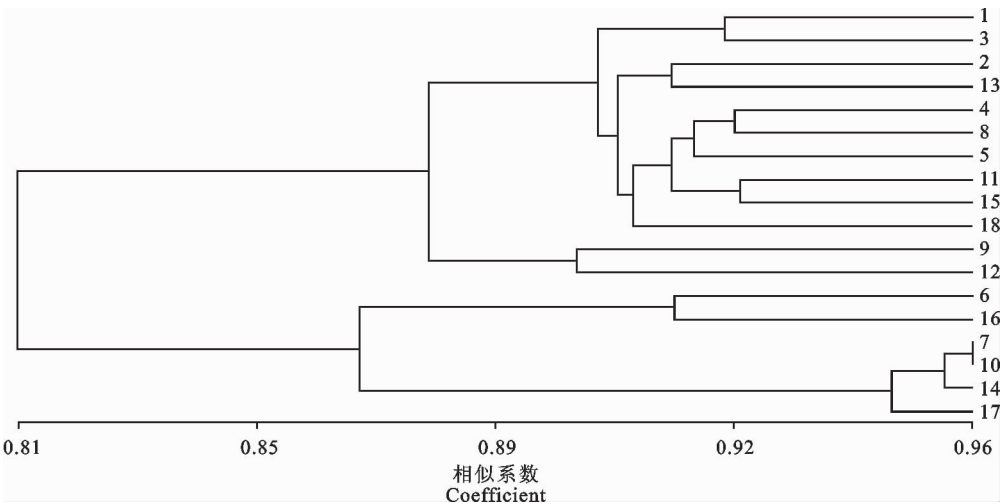


图 4 间性山羊和正常母山羊个体的 UPGMA 聚类图
1~7. 间性山羊;8~18. 正常母山羊

Fig. 4 UPGMA dendrogram for intersex goats and normal female goats
1-7. Intersex goats;8-18. Normal female goats

3 讨 论

3.1 奶山羊的间性与性别决定

哺乳动物的性别决定指生殖腺发育为睾丸或卵巢的选择过程,这个复杂的生物学过程一直是生物界关注的热点^[7-8]。在不同类型胚胎中有不同的信号通路引导双性脊发展成为睾丸或者卵巢^[9-15],一旦这些信号通路发生改变,就会造成个体性别决定出现紊乱,导致间性个体出现^[16]。研究表明,哺乳动物的性别决定不仅与性染色体上的性别决定基因 *SRY*、*DAX1* 相关,还与常染色体上的 *SOX9* (*SRY*-related HMG box 9)、*MIS* (Mullerian inhibiting substance)、*WT1* (Wilm's tumor gene 1)、*AMH* (Anti-Mullerian Hormone)、*SF1* (Steroidogenic factor 1)、*FOXL2* (Forkhead box L2)、*PISRT1* (Polled intersex syndrome regulated transcript 1) 等基因有着密切的联系^[13,17-18],任何因子的突变或者沉默,都能造成性别决定的紊乱。性别决定出错的间性个体在其他哺乳动物上比较罕见,但在山羊中却有一定的普遍性,间性山羊一般可占到整个羊群的 4%~6%,甚至高达 10%。

间性山羊从形态解剖学上分为偏雌性和偏雄性 2 大类,从细胞遗传学上可以分为以下 5 种类型:(1)60XX/XY 嵌合体型;(2)PIS 区域缺失型;(3)Y 染色体易位;(4)60XY/61XXY 嵌合型;(5)59XO/60XX/61XXX 嵌合间性^[1,2,4,19]。为了鉴定本试验选用的 7 只间性山羊的遗传背景,探讨西农萨能羊的间性遗传机制,首先对其进行了核型分析,结果发现,7 只间性山羊均具有正常的染色体核型:60XX,未发现 Y 染色体或者染色体个数的变异。为进一步研究这些间性山羊的产生是否是由 Y 染色体的移位造成的变异引起的,本研究设计了雄性性别标记基因 *SRY* 的引物,PCR 扩增结果显示,引物仅在正常公山羊的基因组中扩增出特异性的条带,而在正常母山羊和间性山羊个体中并没有扩增出相应的条带。这表明 7 只间性山羊的遗传基础是雌性,与常洪^[8]、詹铁生等^[20]的研究结果一致。个体性别决定过程发生紊乱,从而造成性别由雌性向雄性反转,这种遗传发生机制仍有待进一步探讨。PCR 扩增 *SRY* 基因在牛胚胎性别鉴定中应用较为成功,本研究结果为隐性间性山羊的分子鉴定提供了可靠的分析方法。

3.2 奶山羊间性个体的 AFLP 分析

扩增片段长度多态性(AFLP)是一种选择性扩

增限制性片段的方法,具有 RFLP 技术的重复性好、可靠性强和 PCR 技术的高效性、方便性和安全性等优点^[21-22],已广泛应用于动植物及微生物的遗传多样性研究、品系分析、高密度遗传图谱的构建等方面^[23-24]。Griffiths 等^[25]利用 AFLP 技术成功分离出性别特异性的分子标签;Griffiths 等^[26]利用 AFLP 分离出牛性别特异性片段。基于间性山羊的遗传基础方面的研究,本研究选择 7 只间性山羊样本以及随机选择的 11 只正常母山羊个体,提取其血样基因组,进行 AFLP 指纹分析,用筛选的 9 对引物扩增后,虽然得到了较多的多态性条带,但并未出现预期的与性别调控相关的特异性条带。2001 年, Pailhoux 等^[6]研究发现,阿尔卑斯山羊间性出现的原因极有可能是由 PIS 区域的缺失造成的,但这与本研究的结果并不一致。同时,在 AFLP 试验之前,笔者通过预试验扩增得到了 PIS 区域,说明西农萨能羊间性的机制与阿尔卑斯山羊并不一致。本试验 AFLP 结果说明,间性个体和正常母山羊个体在基因组水平上是一致的,其发育成间性个体可能并非是由基因片段的缺失或者突变而造成的。间性的出现可能是性别决定过程中某些因子的调控出现了差错,导致个体胚胎在发育过程中偏离雌性轨道而朝向雄性发育。本研究初步探讨了山羊间性的遗传机制,但限于获得的样本数较小等原因,未能明确其机制,有待扩大样本量以及在候选因子的检测等方面做进一步研究。同时本研究显示,AFLP 标记应用于山羊遗传多样性的检测具有很高的效率,为以后山羊种属分类及其遗传多样性的研究提供了一种有效的方法。

[参考文献]

- [1] 张丽娟,武会娟. 间性山羊的研究进展 [J]. 大连大学学报, 2006,27(2):6-9.
Zhang L J, Wu H J. Research on intersexual goats [J]. Journal of Dalian University, 2006, 27(2): 6-9. (in Chinese)
- [2] Vallenzasca C, Galli A. Cytogenetical and histopathologic study of two cases of polled goats [J]. Andrologia, 1990, 22(3): 289-290.
- [3] 常 洪. 关于山羊间性的遗传学分析 [J]. 畜牧兽医学报, 1980, 11(4): 245-250.
Chang H. Genetic analysis on intersex goats [J]. Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences, 1980, 11(4): 245-250. (in Chinese)
- [4] Pailhoux E, Cribiu E P, Chaffaux S, et al. Molecular analysis of 60, XX pseudohermaphrodite polled goats for the presence of *SRY* and *ZFY* genes [J]. J Reprod Fertil, 1994, 100(2): 491-

- 496.
- [5] 詹铁生,田玉山,雒鸣峰,等. 西农莎能山羊间性遗传机制研究[J]. 遗传学报,1994,21(5):356-361.
Zhan T S,Tian Y S,Luo M F,et al. The genetic mechanism of intersexuality in milk goats of saanen breed of Xinong [J]. Acta Genetica Sinica,1994,21(5):356-361. (in Chinese)
- [6] Pailhoux E,Vigier B,Chaffaux S,et al. 7 kb deletion triggers intersexuality and polledness in goats [J]. Nat Genet,2001,29(4):453-458.
- [7] Giovanna C,Pietro P,Orietta R,et al. Sex determination and sex reversal [J]. Current Opinion in Genetics&Development,2006,16(3):289-292.
- [8] Jennifer B,Blanche C. One tissue,two fates;Molecular genetic events that underlie testis versus ovary development [J]. Nat Rev Genet,2004,5(7):509-521.
- [9] Ross A J,Capel B. Signaling at the crossroads of gonad development [J]. Trends Endocrinol Metab,2005,16(1):19-25.
- [10] Sekido R,Bar I,Narváez V,et al. *SOX9* is up-regulated by the transient expression of *SRY* specifically in Sertoli cell precursors [J]. Dev Biol,2004,274(2):271-279.
- [11] Manuylov N L,Fujiwara Y,Adameyko I I,et al. The regulation of *Sox9* gene expression by the *GATA4/FOG2* transcriptional complex in dominant XX sex reversal mouse models [J]. Developmental Biology,2007,307(2):356-367.
- [12] Pannetier M,Tilly G,Kocer A,et al. Goat *SRY* induces testis development in XX transgenic mice [J]. FEBS Letter,2006,580(15):3715-3720.
- [13] Zenteno-Ruiz J C,Kofman-Alfaro S,Méndez J P. 46,XX sex reversal [J]. Archives of Medical Research,2001,32(6):559-566.
- [14] Pailhoux E,Vigier B,Schibler L,et al. Positional cloning of the PIS mutation in goats and its impact on understanding mammalian sex differentiation [J]. Genet Sel Evol,2005,37:S55-64.
- [15] Pannetier M,Renault L,Jolivet G,et al. Ovarian specific expression of a new gene regulated by the goat PIS region and transcribed by a *FOXL2* bidirectional promoter [J]. Genomics,2005,85(6):715-726.
- [16] Pannetier M,Servel N,Cocquet J,et al. Expression studies of the PIS regulated genes suggest different mechanisms of sex determination within mammals [J]. Cytogenet Genome Res,2003,101(3/4):199-205.
- [17] Lim H N,Freestone S H,Romero D,et al. Candidate genes in complete and partial XY sex reversal: Mutationanalysis of *SRY*,*SRY*-related genes and *FTZ-F1* [J]. Molecular and Cellular Endocrinology,1998,140(1/2):51-58.
- [18] Small C L,Shima J E,Uzumcu M,et al. Profiling gene expression during the differentiation and development of the murine embryonic gonad [J]. Biol Reprod,2005,72(2):492-501.
- [19] 陆建英,陈雪银,黄英,等. 核型异常的两性畸形山羊 2 例报告 [J]. 遗传,2003,25(2):160-162.
Lu J Y,Chen X Y,Huang Y,et al. Chromosomal abnormalities in two cases of goats with sexual deformity [J]. Hereditas,2003,25(2):160-162. (in Chinese)
- [20] 詹铁生,田玉山,贾维珍,等. 西农萨能山羊间性个体遗传性别研究 [J]. 西北农业大学学报,1992,20(2):27-32.
Zhan T S,Tian Y S,Jia W Z,et al. Research on genetic sex of the intersex body of Xinong saanen goat [J]. Acta Univ Agric Boreali-Occidentalis,1992,20(2):27-32. (in Chinese)
- [21] Zabeau M,Vos P. Selective restriction fragment amplication: A general method for DNA fingerprinting; Europen, Ep053 4858 [P]. 2005-04-27.
- [22] Vos P,Hogers R,Bleeker M,et al. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting [J]. Nucleic Acids Research,1995,23(21):4407-4414.
- [23] Vaneechoutte M. DNA fingerprinting techniques for microorganisms: A proposal for classification and nomenclature [J]. Mol Biotechnol,1996,6(2):115-142.
- [24] 李纪委,江玲霞,徐银学. AFLP 在动物遗传育种中的应用 [J]. 安徽农业科学,2008,36(21):8936-8939.
Li J W,Jiang L X,Xu Y X. Application of AFLP technique in genetics and animal breeding [J]. Journal of Anhui Agri Sci,2008,36(21):8936-8939. (in Chinese)
- [25] Griffiths R,Orr K. The use of amplified fragment length polymorphism (AFLP) in the isolation of sex-specific markers [J]. Molecular Ecology,1999,8(4):671-674.
- [26] Griffiths R,Orr1 K,Adam A,et al. DNA sex identification in the three-spined stickleback [J]. Journal of Fish Biology,2000,57(5):1331-1334.