

# 中国荷斯坦牛SR<sub>Y</sub>基因编码区的克隆与原核表达<sup>\*</sup>

裴杰<sup>1,2</sup>, 刘小林<sup>1</sup>, 杜卫华<sup>2</sup>, 林秀坤<sup>2</sup>

(1 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100;

2 中国农业科学院 畜牧研究所 基因与细胞研究室, 北京 100094)

**[摘要]** 利用PCR技术从雄性中国荷斯坦牛的基因组DNA中克隆了Y染色体性别决定基因(Sex-determining Region on the Y Chromosome, SR<sub>Y</sub>)的编码区全长序列, 构建了表达载体pET-28a/SR<sub>Y</sub>, 并将其在大肠杆菌(*E. coli*)中进行了诱导表达, 对表达产物进行了检测。结果表明, SR<sub>Y</sub>基因编码区长687 bp, 编码229个氨基酸; 表达载体pET-28a/SR<sub>Y</sub>构建成功; 表达产物中含有相对分子质量为33 ku的SR<sub>Y</sub>蛋白。

**[关键词]** 奶牛; Y染色体; SR<sub>Y</sub>基因; SR<sub>Y</sub>蛋白; 诱导表达

**[中图分类号]** S829.9<sup>+</sup>1; Q785

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-9387(2006)07-0017-05

1990年, 位于哺乳动物Y染色体上与性别发生直接相关的Y染色体性别决定基因(Sex-determining Region on the Y Chromosome, SR<sub>Y</sub>)从人的Y染色体上被分离<sup>[1]</sup>, 之后该基因被确认为人们长期寻找的睾丸决定因子(Testis Determining Factor, TDF)。该基因的有无和突变与否直接决定了哺乳动物的性别表型。基因型为XX且带有SR<sub>Y</sub>/S<sub>ry</sub>基因的哺乳动物会以雄性或间性表型存在<sup>[2-3]</sup>; SR<sub>Y</sub>基因的突变同样会在一定程度上引起性反转或性别异常<sup>[4-5]</sup>。

SR<sub>Y</sub>蛋白属于含有高迁移率族蛋白(High-Mobility Group Box, HMG), 并且可以特异结合于DNA序列蛋白的一个亚类, 该亚类包括多种转录因子, 如各种与性别决定有关的高迁移率族蛋白(SR<sub>Y</sub>-Related High-Mobility Group Box, SOX)<sup>[6]</sup>。SR<sub>Y</sub>蛋白对其他与性别相关基因的调控作用是通过结合其启动子, 调节其表达水平来实现的, 如雄性激素受体(Androgen Receptor, AR)<sup>[7]</sup>和缪勒氏管抑制因子(Mullerian Inhibiting Substance, MIS)。体外试验显示, SR<sub>Y</sub>蛋白的HMG可特异地结合于DNA小沟的一致性序列AACAAAT上<sup>[8-9]</sup>; SR<sub>Y</sub>蛋白是核蛋白<sup>[10]</sup>, 能诱导目的DNA的强烈弯曲<sup>[11]</sup>。SR<sub>Y</sub>蛋白的这些特征与其调节转录的功能密切相关。杜晓娟等<sup>[12]</sup>的研究表明, 通过原核表达的人SR<sub>Y</sub>蛋白能特异性结合位于19号染色体的MIS基因启动子区。Desclozeaux等<sup>[13]</sup>认为, 磷酸化N末

端SR<sub>Y</sub>蛋白的DNA结合能力得到加强。目前, 对人和小鼠的SR<sub>Y</sub>基因及SR<sub>Y</sub>蛋白的研究较多, 而对牛SR<sub>Y</sub>基因的研究报道则还较少, 其在胚胎性别发育过程中的作用尚不清楚。

为此, 本研究克隆了中国荷斯坦牛的SR<sub>Y</sub>基因, 并将其在大肠杆菌中进行了表达, 对表达产物进行了鉴定, 为进一步研究SR<sub>Y</sub>基因与其上、下游基因的相互作用机理, 阐明牛SR<sub>Y</sub>基因在性别决定过程中的重要作用及从分子水平上控制奶牛的性别奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 血样、细菌菌株及载体 雄性中国荷斯坦牛的血样取自河北省大厂回族自治县屠宰场; 大肠杆菌*E. coli* DH5 $\alpha$ 及*E. coli* BL21(DE3)均购自天为时代公司; pGEM-T克隆载体为Promega公司产品; pET-28a(+ )表达载体购自Novagen公司。

1.1.2 试剂 LA Taq聚合酶, 限制性内切酶EcoRI, SalI和dNTP均为TaKaRa公司产品; 琼脂糖由上海YITO公司生产; XGal, IPTG和琼脂粉均购自Sigma公司; T4DNA连接酶为Promega公司产品; DNA凝胶回收纯化试剂盒、质粒提取试剂盒均购自天为时代公司; 胰蛋白胨和酵母浸出粉均由OXOID公司生产。

1.1.3 引物的设计与合成 根据GenBank收录的

<sup>\*</sup> [收稿日期] 2005-12-02

[作者简介] 裴杰(1979-), 男, 内蒙古牙克石人, 在读硕士, 主要从事分子遗传学研究。

[通讯作者] 林秀坤(1957-), 男, 山东临沂人, 研究员, 博士生导师, 主要从事分子生物学研究。E-mail: linxiukun@yahoo.com

荷斯坦奶牛 *SRY* 基因(登录号为AB039748)设计一对引物 P1 和 P2。

P1 序列为: 5' AGT AGG TTG ATG GGT TT-3';

P2 序列为: 5' TGA TTA ACA GAG GAC CAG-3'。

根据 *SRY* 基因序列和载体 pET-28a(+) 的多克隆位点设计引物 *SRY*-E 和 *SRY*-S。

*SRY*-E 序列为: 5' GCG GAA TTC ATG TTC AGA GTA TTG AAC G-3';

*SRY*-S 序列为: 5' GCG GTC GAC TCA ATA TTG AAA ATA AGC AC-3' (下划线示酶切位点)。引物均由英骏生物公司合成。

## 1.2 方法

1.2.1 雄性中国荷斯坦牛基因组DNA的提取 以成年雄性中国荷斯坦牛的血液组织为材料,用酚-氯仿方法<sup>[14]</sup>提取基因组DNA。

1.2.2 *SRY* 基因编码区的PCR扩增 以雄性中国荷斯坦牛基因组DNA作为模板,P1,P2作为引物,进行*SRY*基因编码区的扩增。PCR反应体系为:10×扩增缓冲液 10 μL,200 mmol/L 的 dNTP 20 μL,1 mmol/L 引物各 2.5 μL,模板DNA 1 μg,LA Taq DNA 聚合酶 2.5 U,加三蒸水至 100 μL。PCR反应条件为:94 5 min;94 30 s,54 30 s,72 1 min,30个循环;72 10 min。PCR产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测后,用DNA凝胶回收纯化试剂盒回收PCR产物,采用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳对回收产物检测。

1.2.3 重组质粒 pGEM-T/*SRY* 的构建与鉴定 回收的PCR产物和pGEM-T载体在T<sub>4</sub>连接酶的作用下,于16℃连接1 h后,4℃连接过夜,构建重组质粒pGEM-T/*SRY*。将重组质粒转化至感受态*E. coli* DH5α菌中,转化产物于37℃、225 r/min培养90 min后,涂布于含有Amp,X-gal,IPTG的LB固体培养基上,于37℃条件下培养14 h。挑取LB培养基上阳性菌落,接种于含有Amp的LB液体培养基中,于225 r/min培养过夜。对菌液进行PCR鉴定,同时提取大肠杆菌的质粒进行*Bst*I酶切鉴定。将PCR和酶切鉴定均为阳性的菌落送奥科生物公司测序。

1.2.4 *SRY* 基因编码区酶切位点的加入 以质粒pGEM-T/*SRY*为模板,*SRY*-E和*SRY*-S为引物进行扩增。PCR反应体系为:10×扩增缓冲液 10 μL,

200 mmol/L 的 dNTP 20 μL,1 mmol/L 引物各 2.5 μL,模板DNA 0.5 μg,LA Taq DNA 聚合酶 2.5 U,加三蒸水至 100 μL。PCR反应条件为:94 5 min;94 30 s,51 30 s,72 1 min,30个循环;72 延伸 10 min。PCR产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测后,回收并纯化PCR产物。

1.2.5 表达载体的构建与鉴定 分别将回收的加酶切位点的产物和pET-28a(+)载体用*Eco*R I和*Sal* I双酶切,产物分别进行 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳,回收目的片段,将目的片段在T<sub>4</sub>DNA连接酶作用下,于16℃条件下连接1 h后,4℃连接过夜。将连接产物转化至感受态*E. coli* BL21(DE3)中,构建pET-28a/*SRY*重组子,将转化产物涂布于含50 mg/L卡那霉素的LB琼脂平板中。对阳性pET-28a/*SRY*重组子进行PCR和*Eco*R I,*Sal* I双酶切鉴定,选取阳性克隆送奥科生物公司测序。

1.2.6 *SRY* 蛋白的诱导表达 将原核表达阳性克隆接种于5 mL含50 mg/L卡那霉素的LB液体培养基中,于30℃、200 r/min培养至A<sub>600</sub>为0.6,然后加入IPTG使其终浓度为0.4 mmol/L,对*SRY*基因进行诱导表达,分别于0,0.5,1,2,3,4,5 h收获菌液,共取7次。以相同的方法分别诱导*E. coli* BL21(DE3)和含转化质粒pET-28a(+)的*E. coli* BL21(DE3) 5 h,以其表达产物作为对照。

1.2.7 表达产物的SDS-PAGE检测 将1.2.6中不同诱导时间收获菌液的A<sub>600</sub>均调至0.68,然后分别取菌液1.5 mL,于4℃离心(10 000 r/min,1 min),弃上清液,收集各种菌体。再加入上样缓冲液,混匀,煮沸5 min,于15 000 r/min离心10 min,取上清液15 μL进行体积分数10% SDS-PAGE电泳,考马斯亮蓝R250染色并脱色<sup>[14]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 *SRY* 基因编码区的PCR扩增

*SRY* 基因编码区的PCR扩增产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳分析,可见1条长度为1 041 bp的片段,与预期片段大小一致(图1)。

### 2.2 重组质粒的鉴定

pGEM-T/*SRY*质粒经*Bst*I酶切,分别得到1条约3 000 bp的片段和1条约1 000 bp的插入片段(图2),与预期结果一致。序列分析结果(图3)显示,黑白花奶牛*SRY*基因编码区长度为687 bp,编码229个氨基酸。

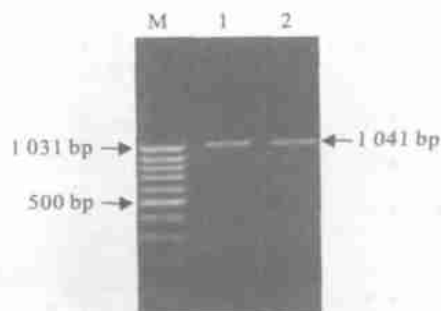


图1 中国荷斯坦牛 *SRY* 基因编码区 PCR 扩增产物的电泳图谱

M. DNA 分子质量标准; 1, 2 PCR 扩增产物

Fig 1 PCR-amplification of Holstein cow

*SRY* gene open reading frame

M. DNA marker; 1, 2 PCR products

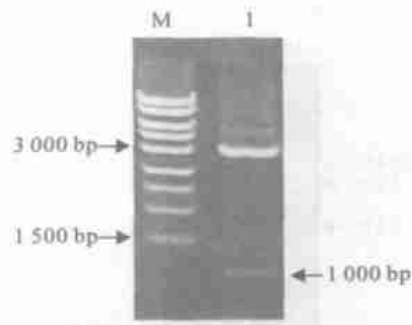


图2 重组质粒 pGEM-T/*SRY* 酶切产物电泳图谱

M. DNA 分子质量标准; 1 pGEM-T/*SRY*

质粒的 *Bst* I 酶切片段

Fig 2 Restriction identification

of plasmid pGEM-T/*SRY*

M. DNA marker; 1 Plasmid pGEM-T/*SRY* digested by *Bst* I

```

AGTAGGTTGATGGGTTTGGGCTGACTGCCAGGACGTATTGAGGGGAGGTATTGGGGGCGGAGAAATAA
ATATTTCACGTGTATATATTGCACTAAGTCAGTCTGTGGTAAGAACAACCTATGAATAGCACCATAATTTT
AGAACGCTTACACCGCATATTACTTCTCCCTTTTAAACACTGCGTATGCTTCTGCTAAACAGTGCAGT
1      CGTATGCTTCTGCTATGTTAGA GTT AAC GAC GAT GTT TAC AGT CCA
1      M F R V L N D D V Y S P
37 GCT GTG GTA CAG CAA CAA ACT ACT CTC GCT TTT AGG AAA GAC TCT TCC TTG TGC ACA GAC
13 A V V Q Q Q T T L A F R K D S S L C T D
97 AGT CAT AGC GCA AAT GAT CAG TCT GAA AGG GGA GAA CAT GTT AGG GAG AGC AGC CAG GAC
33 S H S A N D Q C E R G E H V R E S S Q D
157 CAC GTC AAG CGA CCC ATG AAC GCC TTC ATT GTG TGG TCT CGT GAA CGA AGA CGA AAG GTG
53 H V K R P M N A F I V W S R E R R R K V
217 GCT CTA GAG AAT CCC AAA ATG AAA AAC TCA GAC ATC AGC AAG CAG CTG GGA TAT GAG TGG
73 A L E N P K M K N S D I S K Q L G Y E W
277 AAA AGG CTT ACA GAT GCT GAA AAG CGC CCA TTC TTT GAG GAG GCA CAG AGA CTA CTA GCC
93 K R L T D A E K R P F F E E A Q R L L A
337 ATA CAC CGA GAC AAA TAC CCG GGC TAT AAA TAT CGA CCT CGT CGG AGA GCC AAG AGG CCA
113 I H R D K Y P G Y K Y R P R R R A K R P
397 CAG AAA TCG CTT CCT GCA GAC TCT TCA ATA CTA TGC AAC CCG ATG CAT GTA GAG ACA TTG
133 Q K S L P A D S S I L C N P M H V E T L
457 CAC CCC TTC ACA TAC AGG GAT GGT TGT GCC AAG ACC ACA TAC TCA CAA ATG GAA AGC CAA
153 H P F T Y R D G C A K T T Y S Q M E S Q
517 TTA AGC CGC TCA CAG TCC GTG ATC ATA ACC AAT TCA CTC CTG CAA AAG GAG CAT CAC AGC
173 L S R S Q Q S V I I T N S L L Q K E H H S
577 AGC TGG ACA AGC CTG GGC CAC AAT AAG GTA ACA TTG GCT ACA CGG ATT TCG GCG GAC TTT
193 S W T S L G H N K V T L A T R I S A D F
637 CCC TGT AAC AAA AGC TTA GAG CCT GGA CTT TCT TGT GCT TAT TTT CAA TAT TGA CTTCCTTAC
213 P C N K S L E P G L S C A Y F Q Y
CTTCCTTACTCTCGCTAACAAAGGCGCTCTTTATCTCAATTTTACTACAGTTTACCTGCGACTTAATTTTATAA
GAAGCCCAATAAGTAAGTACATTTAATCATGTAAGAATTCAGACTTTCCTCAATATACTGGTCTCTGTTAATCA

```

图3 重组质粒 pGEM-T/*SRY* 测序结果

□ .*SRY*基因的起始密码子; ▲.HMG盒; \_ .终止密码子

Fig.3 Sequencing of recombinant plasmid pGEM-T/*SRY* Vector

□ .The start codon ATG in *SRY* gene; ▲.The HMG box; \_ .The TGA stop codon

### 2.3 表达质粒的构建及重组子鉴定

表达载体 pET-28a/*SRY* 的酶切产物电泳图谱见图4。从图4可以看出, 重组表达质粒 pET-28a/*SRY* 经 *Eco*RI, *Sal*I 双酶切得到大于5 kb 的线性 pET-28a(+) 片段和约700 bp 的 *SRY* 插入片段。

### 2.4 表达产物的 SDS-PAGE 检测

由图5可知, *SRY* 基因获得了表达, 诱导4 h 表达量达到高峰, *SRY* 蛋白质相对分子质量约为33 ku, 与预期结果一致; 对照组 *E. coli* BL 21(DE3) 和含空质粒 pET-28a(+) 的 *E. coli* BL 21(DE3) 均未

见 SR Y 蛋白表达。

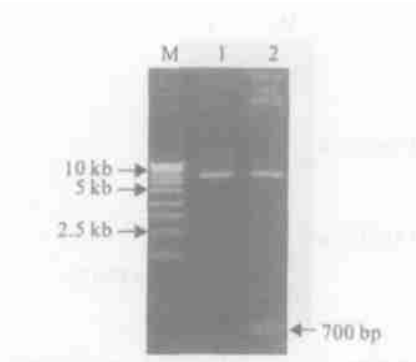


图 4 表达载体 pET-28a/SRY 的酶切产物电泳图谱

M. DNA 分子质量标准; 1 pET-28a(+) 质粒的 *EcoR* I 和 *Sal* I 酶切片段; 2 pET-28a/SRY 重组表达质粒的 *EcoR* I 和 *Sal* I 酶切片段

Fig 4 Restriction identification of expression vector pET-28a/SRY

M. DNA marker; 1 Plasmid pET-28a(+) digested by *EcoR* I and *Sal* I; 2 Recombinant plasmid pET-28a/SRY digested by *EcoR* I and *Sal* I

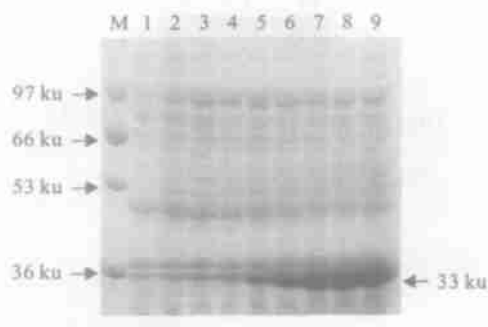


图 5 中国荷斯坦牛 SRY 基因表达产物的 SDS-PAGE 检测结果

M. 蛋白质分子质量标准; 1. *E. coli* BL 21(DE3) 菌株诱导表达产物; 2 带有 pET-28a(+) 质粒的 *E. coli* BL 21(DE3) 菌株诱导表达产物; 3~ 9 分别为转化 pET-28a/SRY 质粒的 *E. coli* BL 21(DE3) 菌株在 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 h 内诱导表达产物

Fig 5 Soluble expression of Holstein cow SRY protein by SDS-PAGE

M. Protein marker; 1. Protein of *E. coli* BL 21(DE3) induced by IPTG; 2 Protein of *E. coli* BL 21(DE3) containing pET-28a(+) induced by IPTG; 3- 9 Protein of *E. coli* BL 21(DE3) containing pET-28a/SRY induced in 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 h by IPTG

### 3 讨 论

哺乳动物的性别决定是一个多层次调控过程, 在该过程中 SR Y 蛋白是众多性别决定基因发挥作用的枢纽。SR Y 蛋白几乎存在于所有的哺乳动物中, 该蛋白含有一个 HM G 盒。HM G 盒是 SR Y 蛋白的保守区<sup>[15]</sup>, 由约 80 个氨基酸组成, 存在于许多 DNA 结合蛋白中。在促成胚胎雄性化过程中, SR Y 蛋白行使一个结构转录因子的功能。人类 SR Y 基因开放读码框存在于一个单外显子中, 编码 204 个氨基酸。小鼠 Sry 蛋白 C-末端包含一个占整个 Sry 蛋白一半的谷氨酸重复区域, 失去该区域的 Sry 蛋白能使 XX 转基因鼠发生性反转, 这揭示了该区域在性别决定中的功能<sup>[16]</sup>。牛的 SR Y 蛋白由 229 个氨基酸组成, 并带有一个由 79 个氨基酸组成的 HM G 盒。

奶牛是经济价值较高的动物, 实现对奶牛的性别控制, 可以在相当大的程度上节约生产成本, 提高经济效益。中国荷斯坦牛是我国的地方品种, 将其作为研究对象更具有现实意义。

当前, 对人和鼠性别控制机理的研究较多, 而在

牛上研究的较少。杜晓娟等<sup>[12]</sup>的研究表明, 人 SR Y 蛋白对人 *MIS* 基因的启动子有结合功能, 这表明 SR Y 蛋白作为转录因子对 *MIS* 基因的表达有调控功能, 从而间接地控制性别分化。但这种调控模式在牛上是否存在, 仍然不清楚。Bergstrom 等<sup>[17]</sup>、Giese 等<sup>[18]</sup>和 Ng 等<sup>[19]</sup>的研究表明, 在人和鼠中, SR Y/Sry 蛋白与 DNA 的结合功能来自于 SR Y/Sry 的 HM G 盒。在众多有关 SR Y 基因的研究中, 对于牛 SR Y 蛋白全序列在原核生物中表达的研究未见报道。本试验对奶牛的 SR Y 基因进行表达, 为研究 SR Y 基因与其他性别相关基因之间的相互作用以及在基因水平对奶牛进行性别控制奠定了基础。

基于牛 SR Y 基因为单外显子基因, 其编码区可通过以基因组为模板扩增获得, 本研究对其进行了克隆和原核表达。采用原核表达能获得大量的目的蛋白, 有利于进一步对蛋白质功能进行研究。本研究结果表明, 通过表达获得了 256 个氨基酸的融合蛋白, 其中含有由 229 个氨基酸组成的 SR Y 蛋白和 27 个非目的氨基酸残基。该融合蛋白是可溶性的, 这保证了目的蛋白的活性基本不受影响。融合蛋白带有 His 标签, 可进行进一步纯化, 用于 SR Y 蛋白对其下游基因调控方面的研究。

## [参考文献]

- [1] Sinclair A H, Berta P, Palmer M S, et al A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to conserved DNA-binding motif[J]. Nature, 1990, 346: 240-245
- [2] Koopman P, Gubbay J, Vivian N, et al Male development of chromosomally female mice transgenic for *Sry* [J]. Nature, 1991, 351: 117-122
- [3] Kusz K, Kotecki M, Wojda A, et al Incomplete masculinisation of XX subjects carrying the *SRY* gene on an inactive X chromosome[J]. F Med Genet, 1999, 36: 452-456
- [4] Canto P, Galicia N, Soderlund D, et al Screening for mutations in the *SRY* gene in patients with mixed gonadal dysgenesis or with Turner syndrome and Y mosaicism [J]. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology, 2004, 115: 55-58
- [5] Iliopoulos D, Volakakis N, Tsiga A, et al Description and molecular analysis of *SRY* and *AR* genes in a patient with 46, XY pure gonadal dysgenesis (Swyer syndrome) [J]. Annales de genetique, 2004, 47: 185-190
- [6] Pevny L H, Sockanathan S, Placzek M, et al A role for *SOX1* in neural determination [J]. Development, 1998, 125: 1967-1978
- [7] Xin Y, Michael L L, Tong L, et al *SRY* interacts with and negatively regulates androgen receptor transcriptional activity [J]. Biological Chemistry, 2001, 276(49): 46647-46654
- [8] Harley V R, Lovell-Badge R, Goodfellow P N. Definition of a consensus DNA binding site for *SRY* [J]. Nucleic Acids Res, 1994, 22: 1500-1501
- [9] Van de Wetering M, Clevers H. Sequence-specific interaction of the HMG box proteins TCF-1 and *SRY* occurs within the minor groove of a Watson-Crick double helix [J]. EMBO J, 1992, 11: 3039-3044
- [10] Poulat F, Girard F, Chevrone M, et al Nuclear localization of the testis determining gene product *SRY* [J]. Cell Biol, 1995, 128: 737-748
- [11] Ferrari S, Harley V R, Pontiggia A, et al *SRY*, like HMG1, recognizes sharp angles in DNA [J]. EMBO J, 1992, 11: 4497-4506
- [12] 杜晓娟, 伏瑾, 蔡玲玲, 等. 人 *SRY* 基因表达及表达蛋白的结合功能研究 [J]. 中华医学遗传学杂志, 1998, 15(5): 290-292
- [13] Desclozeaux M, Poulat F P, De Santa B, et al Phosphorylation of an N-terminal motif enhances DNA-binding activity of the human *SRY* protein [J]. Biological Chemistry, 1998, 273(14): 7988-7995
- [14] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南 [M]. 3 版. 黄培堂, 王嘉玺, 朱厚础, 等, 译. 北京: 科学出版社, 2002
- [15] Whitfield L S, Lovell-Badge R, Goodfellow P N. Rapid sequence evolution of the mammalian sex-determining gene *SRY* [J]. Nature, 1993, 364: 713-715
- [16] Bowles J, Cooper L, Berkman J, et al *Sry* requires a CAG repeat domain for male sex determination in *Mus musculus* [J]. Nature Genet, 1999, 22: 405-408
- [17] Bergstrom D E, Young M, Albrecht K H, et al Related function of mouse *SOX3*, *SOX9* and *SRY* HMG domains assayed by male sex determination [J]. Genesis, 2000, 28: 111-124
- [18] Giese K, Pagel J, Grosschedl R. Distinct DNA-binding properties of the high mobility group domain of murine and human *SRY* sex-determining factors [J]. Proc natl Acad Sci, 1994, 91: 3368-3372
- [19] Ng K W, Ridgway P, Cohen D R, et al The binding of a Fos/Jun heterodimer can completely disrupt the structure of a nucleosome [J]. EMBO J, 1997, 16: 2072-2085

Cloning of Holstein cow's *SRY* ORF and its expression in *E. coli*PEI Jie<sup>1,2</sup>, LIU Xiao-lin<sup>1</sup>, DU Wei-hua<sup>2</sup>, LIN Xiu-kun<sup>2</sup>

(1 College of Animal Science and Technology, Northwest A &amp; F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094, China)

**Abstract** The gene of *SRY* ORF was cloned using Holstein cow genome. The total coding region is 687 bp, encoding a peptide with 229 amino acid residues. The Holstein cow's *SRY* ORF was cloned to *EcoR* I and *Sal* I sites of pET-28a(+) to construct an expression plasmid pET-28a/*SRY*. The expression plasmid was transformed to *E. Coli* BL 21 (DE3), induced by IPTG. SDS-PAGE analysis confirmed that the Holstein cow's *SRY* peptide was highly expressed at 4 h induction at 37 °C. The *SRY* protein was expressed from total protein of *E. Coli* BL 21 (DE3).

**Key words:** cow; Y chromosome; *SRY* gene; *SRY* protein; induced expression