

牛 SRY 基因的克隆与测序

赵 雪^{1a}, 王保莉^{1b}, 安志兴^{1a}, 赛务加甫^{1a,2}, 蒲 鹏^{1b}, 张 涌^{1a}

(1 西北农林科技大学 a 生物工程研究所, b 生命科学学院, 陕西 杨凌 712100;
2 新疆石河子大学 动物科技学院, 新疆 石河子 832003)

[摘 要] 以牛基因组 DNA 为模板, 在一对特异性引物的引导下, 利用 PCR 技术成功地扩增了牛 SRY 基因。纯化回收目的片段, 克隆到 pMD 18-T 载体上, 筛选阳性克隆测序, 得到 SRY 基因两端的序列(5 端 641 bp, 3 端 786 bp)。与网上公布的牛 SRY 基因序列进行同源性比较, 结果显示, 牛 SRY 基因长度为 2 713 bp, 克隆的 5 和 3 端 2 个片段与网上公布的牛 SRY 基因序列对应片段的同源性分别为 98.7% 和 98.1%。

[关键词] SRY 基因; 牛; PCR

[中图分类号] Q785

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)07-0019-04

Cloning and sequencing of SRY gene of bovine

ZHAO Xue^{1a}, WANG Bao-li^{1b}, AN Zhi-xing^{1a}, SAI Wu-jiafu^{1a,2},
PU Peng^{1b}, ZHANG Yong^{1a}

(1a Biology Engineer Research Center, 1b College of life Science, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;
2 College of Animal Science and Technology, Xinjiang Shihezi University, Xinjiang, Shihezi 832003, China)

Abstract: The SRY gene was amplified by the polymerase chain reaction (PCR) with a pair of specific primers, then a 2 713 bp bovine SRY gene fragment with genomic DNA as the template was gained. The gene was purified and recovered and cloned into the pMD18-T vector, and the identified positive clone was sequenced to obtain 5 and 3 sequence (5 end was 641 bp and 3 end was 786 bp). Compared with the SRY gene sequence on web, the result indicated that the SRY gene was 2 713 bp. The homologs of the two sequenced results and the bulletin result of bovine SRY gene are 98.7% and 98.1%, respectively.

Key words: SRY gene; bovine; PCR

哺乳动物的性别决定与分化, 是多基因有序协调表达的过程。其中 SRY 基因是人和动物性别的决定基因, 其在哺乳动物胚胎发育过程中诱导睾丸分化, 是一个十分重要的发育开关。人类 Y 染色体上具有决定睾丸分化的基因称睾丸决定 (testis determining factor, TDF) 因子。1990 年, Sinclair 等^[1] 在人类 Y 染色体的短臂近似常染色体区域分离和克隆了一个单拷贝基因, 与性别决定相关, 命名为 SRY 基因。同年, Gubbay 等^[2] 也克隆到小鼠的相

关基因, 命名为 Sry 基因, 认为其就是小鼠的睾丸决定基因 (testis-determining y, Tdy), 即性别决定区基因 (sex determining region, SRY)。SRY 基因的 DNA 序列在所有已检测的哺乳动物中是高度保守的, 该基因的发现, 使 Y 染色体上性别决定基因的研究取得重大突破。1991 年, Koopman 等^[3] 将含有 Sry 的 14 kb DNA 片段导入 XX 雌性胎鼠中, 结果部分小鼠产生了性反转, 成功诱导出雄性转基因小鼠, 从而确定小鼠 Sry 基因就是 Tdy, 也使 SRY 基

* [收稿日期] 2006-01-16

[基金项目] 国家“863”高技术研究与发展计划项目(2001AA213081)

[作者简介] 赵 雪(1974-), 女, 陕西礼泉人, 在读博士, 主要从事动物胚胎工程与分子生物学研究。E-mail: ylzxx @163.com

[通讯作者] 张 涌(1956-), 男, 内蒙古和林格尔人, 教授, 博士生导师, 主要从事胚胎学和胚胎工程研究。

因成为 TDF 的最佳候选基因。Liu 等^[4]用 FISH 和 RH 技术研究了牛 *SRY* 基因的图谱,发现牛 *SRY* 基因位于 BTA Yq 的末梢。Parma 等^[5]扩增了水牛 *SRY* 全序列,确定在家牛和水牛之间,*SRY* 基因于一千万年前已出现了变异。Daneau 等^[6]认为,牛和人 *SRY* 基因 5 侧翼序列保守而小鼠的不保守。本试验以牛基因组 DNA 为模板,设计一对特异性引物,采用 PCR 方法扩增牛 *SRY* 基因,并对其进行了克隆和测序,以期为进一步研究牛 *SRY* 基因的作用机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

dNTPS、*Taq* DNA 聚合酶和 pMD18-T Vector 为 TaKaRa 公司产品,UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒和 UNIQ-10 柱式质粒小剂量提取试剂盒为上海生物工程公司产品,琼脂糖、DNA marker 和 *Hind*、*EcoR* 限制性内切酶为 MBI 公司产品,X-gal 和 IPTG 为 BBI 公司产品。PE-2400 PCR 仪为 PERKIN ELMER 产品,电泳电源为 LKB Multiphor 2197,DYY-31A 型水平电泳槽为北京六一仪器厂产品,GDS-8000 凝胶成像系统为 UVP 产品。

1.2 牛血样

牛血样采自陕西杨凌某牛场的荷斯坦公牛。

1.3 引物设计与合成

查询 Genbank 中发表的牛 *SRY* 基因序列,用 Clustal W 程序软件对猪、牛、羊、小鼠等几种动物的 *SRY* 基因序列进行分析,结果发现哺乳动物的 *SRY* 基因核酸序列有很高的同源性和保守性。按引物设计的一般原则,用 primer 软件设计一对引物用于牛 *SRY* 基因的克隆,碱基序列如下:

P1 5-引物: 5-GTT TGC CTT ATG GAT TTA TT-3 ;

P2 3-引物: 5-TCT ACT TTA GCC TAT TTG-3 。

引物由上海生工生物工程技术有限公司合成,预期扩增片段长度为 2 713 bp。

1.4 牛基因组 DNA 的提取

牛全血基因组 DNA 用蛋白酶 K 和苯酚从荷斯坦公牛全血中提取,按照 Blin 和 Stanford 的方法改进后进行操作^[7]。

1.5 牛 *SRY* 基因的 PCR 扩增

PCR 反应体系为 50 μ L :25 mmol/L MgCl₂ 3 μ L ,

10 mmol/L dNTP 1 μ L ,10 \times PCR buffer 5 μ L ,引物 P1 1 μ L ,引物 P2 1 μ L ,*Taq* DNA 聚合酶 0.5 μ L ,模板 DNA 1 μ L ,加 ddH₂O 至 50 μ L。PCR 反应程序为:95 预变性 5 min;95 变性 30 s,55 退火 1.3 min,72 延伸 2 min,30 个循环;72 继续延伸 10 min。反应完毕后,取 10 μ L 扩增产物在含 10 g/L 溴化乙锭的琼脂糖凝胶上进行电泳,然后在紫外透射仪下观察。观察到目的条带后,使用 UNIQ-10 柱式 DNA 回收试剂盒对其进行纯化回收。

1.6 牛 *SRY* 基因的测序

在一支 PCR 管内制备连接反应液,全量为 10 μ L :50 ng/ μ L pMD 18-T Vector 1 μ L ,PCR 产物 4 μ L ,连接液 5 μ L。4 反应过夜。用 CaCl₂ 制备感受态大肠杆菌,按照文献[7]的方法并略作改进后进行。在无菌条件下将培养好的大肠杆菌菌液转移到一个高压灭菌、用冰预冷的 50 mL 聚丙烯管中,在冰上放置 10 min,使培养物冷却至 0 ,于 4 、4 000 r/min 离心 10 min,回收细胞,倒出培养液,将管倒置 1 min,以使最后残留的痕量培养液流尽。以 10 mL 用冰预冷的 0.1 mol/L CaCl₂ 重悬每份沉淀,冰浴放置 15 min,4 、4 000 r/min 离心 10 min,回收细胞,倒出培养液,将管倒置 1 min,以使最后残留的痕量培养液流尽。每 50 mL 初始培养物用 2 mL 预冷的 0.1 mol/L CaCl₂ 重悬每份细胞沉淀,即成感受态细胞,将其分装成 200 μ L 小份。将连接液转化到制备好的感受态细胞中,然后将加有连接液的感受态细胞加入 LB 培养液中,37 摇床温育过夜。培养好的菌液使用 UNIQ-10 柱式质粒小量抽提试剂盒,将连有 *SRY* 的质粒用 *EcoR* I 和 *Hind* 进行双酶切。37 水浴温育 1.5 h,10 g/L 琼脂糖凝胶电泳。将培养好的菌液涂布于加有 14 μ L 20 g/L X-gal 和 7 μ L 200 g/L IPTG 的琼脂平板上,37 培养箱内培养 24 h 进行蓝白斑筛选。在 1.5 mL 灭菌的 Ep 管中加入含有 Amp 的琼脂培养基。将经过酶切鉴定的阳性菌体用灭菌牙签穿刺于琼脂培养基中,37 培养过夜,离心管用封口膜包裹好,交由上海华大公司进行测序。将测序结果与网上公布的牛 *SRY* 基因序列进行同源性分析。

2 结果与分析

2.1 牛 *SRY* 基因的 PCR 扩增

从图 1 可以看出,靠近 3 000 bp 处有强的特异性条带,与预期结果(2 713 bp)相符。

2.2 牛 *SRY* 基因的回收

为确保后续工作的进行,必须对从凝胶中回收的牛 *SRY* 基因片段进行检测。本试验用回收产物

进行琼脂糖凝胶电泳,结果得到了清晰可见的条带(图 2),条带大小为 2 713 bp。

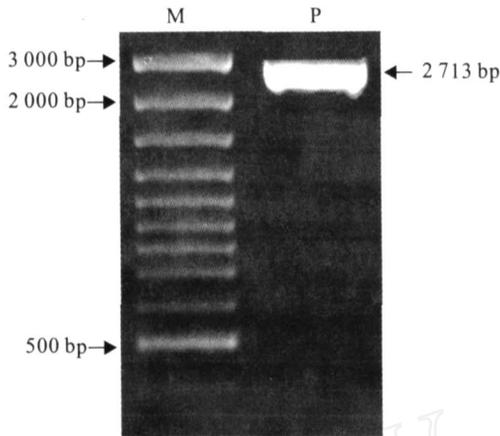


图 1 牛 *SRY* 基因的 PCR 产物电泳结果
P. PCR 产物;M. DNA 分子标样

Fig. 1 Electrophoresis of bovine *SRY* PCR product
P. PCR product;M. DNA marker

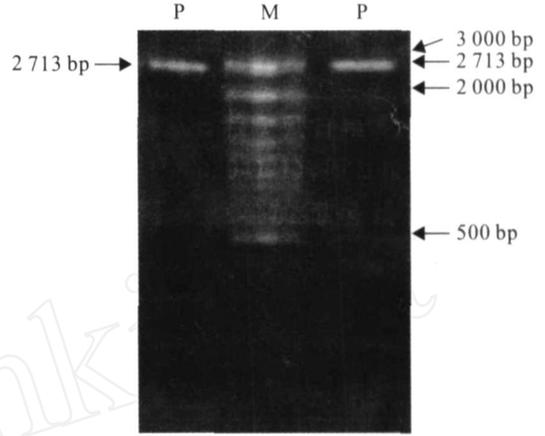


图 2 牛 *SRY* 基因 PCR 纯化产物的电泳结果
P. 凝胶纯化产物;M. DNA 分子标样

Fig. 2 Electrophoresis of bovine *SRY* PCR product purified from agarose gels

P. PCR product purified from agarose gels;M. DNA marker

2.3 重组质粒 pMD18- T/ *SRY* 的提取结果

采用 UNIQ-10 柱式质粒小量抽提试剂盒提取质粒 DNA 后,进行琼脂糖凝胶电泳,结果见图 3。由图 3 可见,获得了一条明亮的条带,该条带长度为 T 载体(2 692 bp)与 *SRY* 基因(2 713 bp)片段之和,即约 5 384 bp。

2.4 重组质粒 pMD18- T/ *SRY* 的酶切鉴定结果

用内切酶 *EcoR* I 和 *Hind* 对重组质粒 pMD18- T/ *SRY* 进行双酶切,应切出 2 713 和 2 627 bp 两部分。由于二者核苷酸数接近,电泳结果(图 4)表明,两条带的位置非常靠近,不能完全分开。由此判断,所需目的片段克隆成功,可以进行测序。

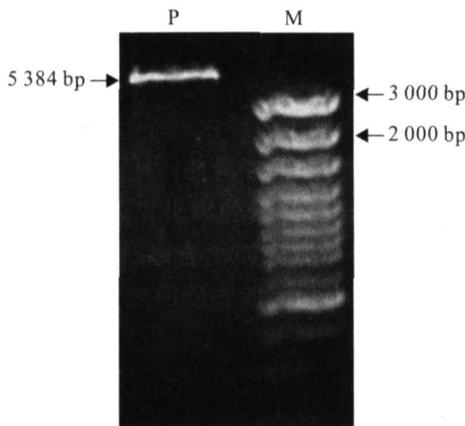


图 3 重组质粒 pMD18- T/ *SRY* 电泳结果
P. 质粒 DNA;M. DNA 分子标样

Fig. 3 Electrophoresis of pMD18- T/ *SRY* recombination plasmids
P. plasmids DNA;M. DNA marker

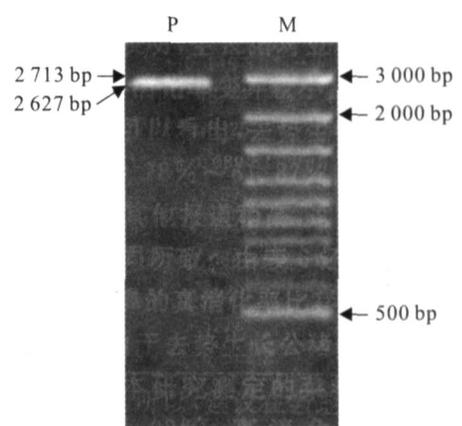


图 4 重组质粒 pMD18- T/ *SRY* 双酶切产物电泳结果
P. *EcoR* V *Hind* 双酶切产物;M. DNA 分子标样

Fig. 4 Endonuclease digestion of recombination plasmids pMD18- T/ *SRY*
P. *EcoR* V *Hind* endonuclease digestion;M. DNA marker

2.5 牛 *SRY* 基因测序结果与同源性比较

对得到的牛 *SRY* 基因两端进行测序,其 5 端为

641 bp,3 端为 786 bp。

将所得测序结果在 NCBI 网站上进行 BLAST

比较,结果显示这两个片段与牛的 *SRY* 基因对应片段的同源性分别为 98.7% 和 98.1%。

3 讨 论

SRY 基因作为性别的决定基因,已在人类及哺乳动物中得到证实;此外,在鱼类(泥鳅)、爬行类(鳖)、鸟类和果蝇中也都检测到 *SRY* 的同源基因,说明该基因在进化上是高度保守的。Gutierrez 等^[8]用 RT-PCR 检测体外生产的黑白花牛胚胎,表明从 4-8 细胞到囊胚期,*SRY* 基因都有表达,显示了体外培养的牛雄性胚胎比雌性胚胎发育快,性腺分化前性别已经开始分化,说明移植前胚胎具有性别二态性。Daneau 等^[9]从猪基因组 DNA 克隆出长 1 664 bp 的 *SRY* 基因片段,发现猪 *SRY* 基因在结构上与人和牛 *SRY* 基因的相似度比与小鼠的更高;他们还用牛基因组 DNA 克隆出长 1 800 bp 的 *SRY* 基因片段,发现人 *SRY* 启动子序列的结合位点也出现在牛 *SRY* 基因的启动子区,CAAT 和 TATA 盒出现在牛 *SRY* 序列内部^[10]。鲁晓瑄等^[11]对小鹿 *Sry* 基因进行了克隆和测序,表明小鹿 *Sry* 基因保守序列与人的 *SRY* 基因保守区相同碱基的比值为 152/184,达到 82.6%,提示小鹿 *Sry* 基因与人的 *SRY* 基因存在着较高的同源性,说明 *SRY* 基因在进化过程中高度保守。洪桂云等^[12]用设计的引物和最适条件扩增了 20 头牛的 DNA 样品,结果表明,公牛样品均出现预期的 *SRY* 特异性扩增带,大小为 163 bp,而母牛样品不能扩增出特异带,因此所扩增的序列为公牛特异的 *SRY* 序列,且片段大小与设计的序列完全一致。本试验以牛基因组 DNA 为材料,应用设计的特异引物成功地扩增出牛 *SRY* 基因全序列,片段大小与设计的完全一致。为了进一步确证试验结果,本试验将牛 *SRY* 扩增产物克隆到质粒 pMD18-T 载体上,筛选阳性克隆进行基因测序,并将测序结果在 NCBI 网站上进行 BLAST 比较,结果显示,所测得的牛 *SRY* 基因 5 端和 3 端两

个片段,与网上公布的牛 *SRY* 基因对应片段的同源性分别为 98.7% 和 98.1%,说明 *SRY* 基因的进化与哺乳动物进化的方向一致,同时也再次证实 *SRY* 基因存在着高度的保守性。

[参考文献]

- [1] Sinclair A H, Berta P, Hawian J R, et al. A gene from the human sex determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif [J]. *Nature*, 1990, 364: 240-246.
- [2] Gubbay J, Collignon J, Koopman R, et al. A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes [J]. *Nature*, 1990, 346: 245-250.
- [3] Koopman P, Gubbay J, Vivan N, et al. Male development of chromosomally female mice transgenic for *Sry* [J]. *Nature*, 1991, 351: 117-121.
- [4] Liu W S, De L F A. Assignment of *SRY*, *ANT3*, and *CSF2RA* to the bovine Y chromosome by FISH and RH mapping [J]. *Anim Biotechnol*, 2004, 15: 103-109.
- [5] Parma P, Feligini M, Greppi G, et al. The complete coding region sequence of river buffalo (*Bubalus bubalis*) *SRY* gene [J]. *DNA Seq*, 2004, 15: 77-80.
- [6] Daneau I, Pilon N, Boyer A. The porcine *SRY* promoter is transactivated within a male genital ridge environment [J]. *Genesis*, 2002, 33: 170-180.
- [7] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南 [M]. 金冬雁, 黎孟枫, 译. 北京: 科学出版社, 1999.
- [8] Gutierrez Adan A, Behboodi E, Murray J D, et al. Early transcription of the *SRY* gene by bovine preimplantation embryos [J]. *Mol Reprod Dev*, 1997, 48: 246-250.
- [9] Daneau I, Ethier J F, Lussier J G, et al. Porcine *SRY* gene locus and genital ridge expression [J]. *Biol Reprod*, 1996, 55: 47-53.
- [10] Daneau I, Houde A, Ethier J F, et al. Bovine *SRY* gene locus: cloning and testicular expression [J]. *Biol Reprod*, 1995, 52: 591-599.
- [11] 鲁晓瑄, 张悦, 单祥年. 小鹿 *Sry* 基因的克隆和测序 [J]. *遗传*, 2003, 25(3): 299-301.
- [12] 洪桂云, 陈宏权. 牛 *SRY* 序列的体外扩增 [J]. *安徽农业大学学报*, 2004, 31: 421-423.