

雄牛特异的SRY同源序列的扩增和分析

翟文学 陈秀兰 吴德国 徐吉臣 高英堂 朱立煌

(中国科学院遗传研究所, 北京 100101)

利用人、兔、鼠SRY序列设计引物, 应用PCR扩增牛的SRY序列, 获得200bp的雄牛特异的扩增片段。克隆该扩增片段, 获得重组质粒pCH21, 进行序列分析, 并与人、兔和鼠SRY的对应区域比较, 具有高度同源性。用pCH21 DNA作探针与牛的基因组DNA酶切图谱杂交, 显示了雄牛特异的1.7kb的杂交带。分析200bp的PCR扩增片段是牛的SRY基因片段。用同一对引物扩增人和山羊的DNA样品, 也获得雄性特异的200bp的扩增片段。

关键词 奶牛; SRY基因; PCR扩增

哺乳动物的性别决定是一个有重要理论意义和应用前景的课题。1990年Andrew H. Sinclair等^[1]首次将人的性别决定区定位在Y染色体上, 从着丝粒到端粒方向与拟常染色体区相邻的35 kb的范围内, 并进一步确定了一个称为SRY sex-determining region Y)的编码序列, 推测是人们正在寻找的人的睾丸决定因子TDF(testis-determining factor)。人的SRY在兔、鼠、猪、牛、马和老虎等哺乳动物Y染色体上有相应的同源序列, 分析比较兔、鼠和人的Y染色体SRY同源序列, 证明SRY序列是高度保守的^[1,2]。越来越多的研究正在证实SRY基因是性别决定因子即TDF^[3-6]。

同其他哺乳动物一样, 牛的性别决定的分子生物学研究刚刚开始^[7-10], 牛的性别决定因子也尚未分离。本实验利用已知的人、兔、鼠SRY序列设计引物, 应用PCR方法, 扩增并克隆了雄牛特异的SRY部分序列, 推测是牛的SRY同源基因片段。本研究为鉴定牛胚胎性别和分离牛的SRY同源基因打下了基础。

材料与方 法

(一) 样品来源

本实验所用的实验动物是北京北郊农场和西郊农场的黑白花奶牛, 采用静脉抽血, 加抗凝剂溶液ACD^[11], 或取肝脏组织提取DNA。

(二) 牛基因组DNA的提取

采用Maniatis^[11]提取哺乳类基因组DNA的方法进行。将DNA溶于TE或无菌水中, 测定浓度, 用于PCR扩增或限制酶酶切。

(三) 引物的设计与合成

根据已知人、兔、鼠SRY基因保守区序列设计引物, 其位置和序列见图1。引物在ABI自动DNA合成仪上合成, 并脱盐纯化。

(四) PCR反应

实验中所用的PCR试剂均为PE-Cetus产品。扩增条件按试剂盒说明书并

本文于1992年4月15日收到。

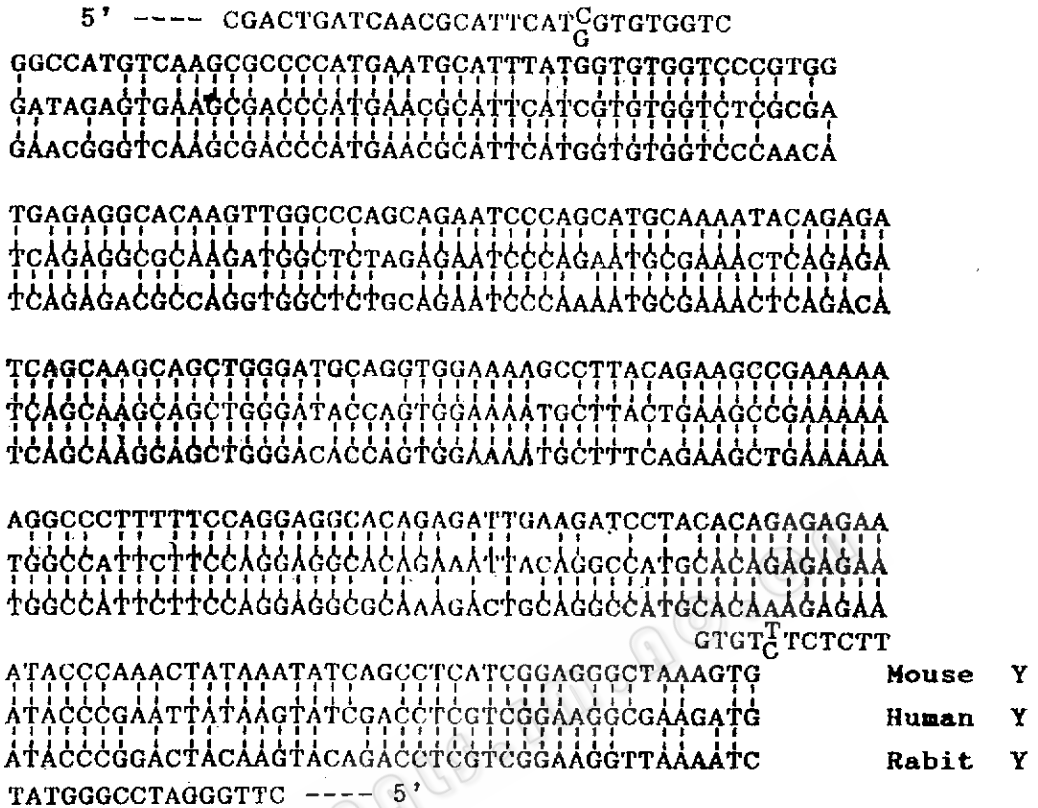


图 1 人、兔和鼠SRY基因高度保守区的比较和设计的引物序列

Fig.1 Comparison of the highly conserved region of human, rabbit and mouse SRY genes as well as the designed primer sequences

略加改进的方法进行。总反应体积50 μ l, 含模板DNA 0.5 μ g, 每个引物 25pmol, Taq聚合酶1.25单位。反应缓冲液和dNTP浓度均按说明书加入, Mg²⁺浓度 1.5 mmol/L, 反应体系在95 $^{\circ}$ C预变性10 min后, 加Taq酶, 混匀, 再加40 μ l 石蜡油封液面。以72 $^{\circ}$ C 60s, 94 $^{\circ}$ C 60s, 55 $^{\circ}$ C 30s进行29个循环。最后于72 $^{\circ}$ C保温7 min。整个过程均在自动热循环仪上进行。

(五) PCR样品的电泳

PCR扩增结果用琼脂糖凝胶电泳鉴定。取上述扩增反应液 15 μ l 加入到2.0%的琼脂糖凝胶平板样品孔中, 以 TAE 或 TBE为电泳缓冲液, 100伏电泳约4h, EB染色后, 在紫外灯下观察。

(六) 扩增片段的克隆

将 PCR 产物按 J. Fenton Williams^[12]方法处理, 直接平端连接到质粒 pUC18的Hind II位点, 或经设定的限制酶酶切后粘端连接, 转化大肠杆菌 JM83或JM103。连接反应和转化按Boehringer公司pUC克隆试剂盒说明书进行。用碱法^[11]提取质粒DNA, 用限制酶酶切和特异引物PCR扩增筛选获得特异重组体克隆。

(七) 特异扩增片段的序列分析

提取带有扩增片段的重组体质粒DNA, 用双脱氧链终止法进行序列分析。具体操作按照Promega T7测序试剂盒说明书pUC双链测序方法进行。

(八) 牛 DNA 的酶解, 电泳和 Southern 吸印

实验中所用的限制酶是西德 Boehringer 公司的产品, 酶解反应溶液均用公司提供的 Iox 缓冲液配制。为使酶解完全, 在反应溶液中还补充亚精胺, 反应时间均在 8 h 以上, 并加两次酶, 所加酶的总量每微克 DNA 大于 10 单位。电泳使用 TBE 缓冲液, 凝胶浓度为 0.7%, 每个电泳样品的 DNA 含量为 10 μg, 电泳电压为 40 伏, 电泳时间为 16 h 或过夜。Southern 吸印用 Hybond N⁺ 滤膜 (Amersham 公司产品), 吸印按照产品说明书进行。吸印用溶液是 0.4 mol/L NaOH, 吸印时间在 3 h 以上, 吸印后将滤膜在 2 × SSC 溶液中漂洗 10 min 后, 可立即用于杂交或用保鲜膜包裹后在 4 °C 保存。

(九) 探针标记和分子杂交

用随机寡核苷酸引物标记质粒 DNA [11,13]。在标记反应中, DNA 底物的含量为 300 ng, 并加本实验特异引物 25 pmol, 使用的同位素是 ³²P-α-dCTP (NEN 公司产品), 标记反应的时间在 2 h 以上。分子杂交按 McCouch 等 [14] 的方法。杂交在带盖的盒中进行, 杂交液的体积为 25 ml, 杂交后用 1 × SSC (含 0.1% 的 SDS) 溶液, 在室温洗 10 min 然后将滤膜用保鲜膜包裹, 加 X 光片和增感屏在暗盒中曝光, 一般曝光时间为 1—5 天。

实 验 结 果

(一) 扩增雄性特异的 DNA 片段

根据人、兔和鼠 SRY 基因序列的高度保守区 (见图 1) 设计了两对引物。用两对引物分别扩增牛 DNA, 用图 1 中的一对引物扩增得到 200 bp 的雄性特异的片段, 与设计的大小相同。雌性个体和纯水

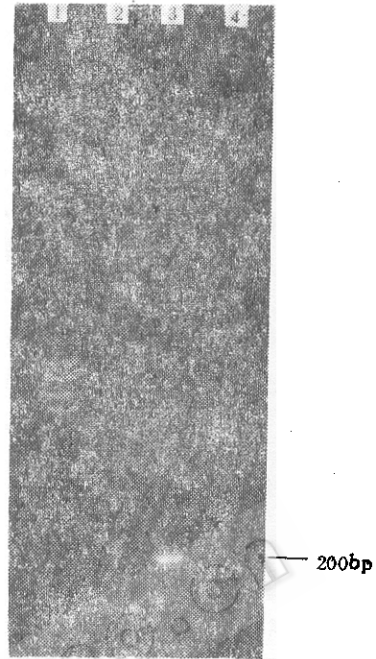


图 2 奶牛基因组 DNA PCR 扩增产物的电泳比较

Fig. 2 Electrophoresis of PCR products of cattle genomic DNA

1. Molecular weight marker (pBR322/Hae I)
2. Female sample, 3. Male sample
4. Water as control

对照均没显示出该扩增带 (图 2)。可以推测, 该扩增片段来自 Y 染色体。

(二) 特异扩增片段的克隆和序列分析

将扩增产物用 Klenow 酶修复补平后, 钝端连接到 pUC18 的 Hind II 位点。转化 JM83 和 JM103, 在含 Ap、IPTG 和 X-Gal 的培养基上获得白色阳性克隆。提取重组体质粒 DNA 并用限制酶酶切, 插入片段为 200 bp, 与扩增片段大小相同 (图 3)。又用特异引物扩增该重组质粒 DNA, 可获得 200 bp 的扩增带, 证明插入片段为 PCR 扩增片段。将含有 200 bp 扩增片段的重组质粒命名为 pCH21。提取 pCH21 的 DNA, 直接用双链 DNA 作模板测序 (图 4)。与人、兔和鼠 SRY 序列对应区域比较 (表 1), 4 种哺乳动物在此区域

头。用此引物还扩增了人和山羊的DNA样品,也获得雄性特异的大小与牛相同的扩增片段。分析人样品的扩增产物确为SRY序列,可以初步证明牛的扩增片段是牛的SRY同源基因序列。

讨 论

利用SRY同源引物扩增出雄牛特有的与设计一致的片段,序列分析显示了与人、兔和鼠SRY序列的高度同源性,分子杂交也显示了雄牛特异的杂交带。根据这些结果可以得出,该扩增片段不仅是雄牛特异的SRY同源片段,而且很可能就是牛的SRY同源基因片段。这是国内外首次获得牛雄性特异的SRY同源序列。利用该扩增片段来分离牛的完整SRY基因,可

以从两个方面考虑:一是建立雄牛基因库或Y染色体库,利用扩增片段作探针或利用特异引物扩增从基因库中筛选牛SRY基因。二是从该扩增片段序列入手,设计引物,利用反转PCR方法直接从基因组DNA中扩增完整SRY基因。目前工作正在进行之中。

SRY基因是唯一一个Y连锁的引起雄性发育所必需的基因,在性别决定中起到开关作用。我们设想利用SRY基因控制性别。通过改造该基因,利用转基因方法,试图获得只产生一种精子的雄牛,从而人为地控制后代性别。进一步研究SRY基因的结构、表达以及在性别决定过程中与其它基因的相互作用,一定能找到一种可行的性别控制的途径。

参 考 文 献

- [1] Sinclair, A.H. et al.: *Nature*, 346:240, 1990.
- [2] Gubbay, J. et al.: *Nature*, 346:245, 1990.
- [3] Berta, P. et al.: *Nature*, 348:448, 1990.
- [4] Koopman, P. et al.: *Nature*, 348:450, 1990.
- [5] Jager, R.J. et al.: *Nature*, 348:452, 1990.
- [6] Koopman, P. et al.: *Nature*, 351:117, 1991.
- [7] Bondioli, K.R. et al.: *Theriogenology*, 31:95, 1989.
- [8] Aasen, E. and Medrano, J.F.: *Biotechnology*, 8:1279, 1990.
- [9] Matthews, M.E. and Reed, K.C.: *Cytogenet. Cell Genet.*, 56:40, 1991.
- [10] Schroder, A. et al.: *Animal Biotechnology*, 1(2):121-133, 1990.
- [11] Maniatis, T. et al.: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989.
- [12] Williams, J.F.: *Amplifications*, Issue 3, 1989.
- [13] Martin, B. et al.: *Science*, 243:1725, 1989.
- [14] McCouch, S.R. et al.: *Theor. Appl. Genet.*, 76:8:5, 1988.
- [15] Sardelli, A.D.: *Amplifications*, Issue 6, 1991.

Amplification and Analysis of a Male-specific SRY Homologous Sequence of Cattle

Zhai Wenxue Chen Xiulan Wu Deguo Xu Jichen

Gao Yingtang Zhu Lihuang

(Institute of Genetics, Academia Sinica, Beijing 100101)

Based on the highly conserved region of human, rabbit, mouse SRY (sex-determining region Y) sequences, the primers were designed for the amplification of the unknown homologous sequence of cattle by polymerase chain reaction (PCR). A 200bp male-specific amplifying fragment was obtained. The fragment shares high homology with the known SRY sequences and has been proposed to be a sequence of bovine SRY gene. By using the cloned fragment as a probe to hybridize to the Southern blot of HindIII-digested cattle genomic DNA, a 1.7kb male-specific fragment was detected, and which is considered to contain the 200bp fragment. When the same pair of primers was used in amplification of human and goat DNA samples, the 200bp male-specific fragment was also obtained.

Key words Cattle; SRY gene; PCR amplification