

PCR 扩增黄鳝和刺鳅 SRY 盒基因*

周荣家 余其兴 程汉华 郭一清

(武汉大学生命科学学院, 武汉 430072)

关键词 SRY 盒基因 鱼类 PCR 扩增

性别是从酵母到人类几乎所有真核生物所共有的性状, 性别决定机制的探索一直是生物学研究的热点之一, 其研究工作涉及遗传、发育和进化等领域, 它不仅具有重要的理论意义, 而且对实现动物性别的人为控制, 对认识人类性分化异常等多种与性别有关的疾病, 准确地进行产前性别诊断和预防性连锁疾病等都有重大的现实意义, 同时, 对性别这一在进化上保守性状进行深入研究, 将会为生物的进化分析提供新的线索. 近年来, 在人和哺乳动物性别决定机制的研究方面, 已取得突破性进展. 位于 Y 染色体上的 SRY 基因被认为是性别决定的关键基因^[1]. 在胚胎发育过程中, 它决定着睾丸的形成, 由此决定着个体向男(雄)性方向发育. 最近的研究表明, 在其他染色体上以及在进化程度明显不同的物种中, 也广泛存在 SRY 的同源基因. 这些拟 SRY 基因现已被命名为 SRY 盒(SRY-box)或者 SOX 基因^[2]. 鱼类约占脊椎动物种数的一半, 作为较低等的脊椎动物, 是从水生到陆生进化上的一个重要环节. 在鱼类存在从雌雄同体到雌雄异体的各种性别类型. 性反转在鱼类也是较为常见的现象, 因此在鱼类开展 SRY 盒基因的研究将会大大促进性别决定机制的深入研究. 为此, 我们选择了具有性逆转特性的鱼类黄鳝和具有异型性染色体的鱼类刺鳅作为研究对象. 采用 PCR 扩增技术, 以探讨 SRY 盒基因在鱼类中的进化保守性.

1 材料与方法

1.1 材料

探针 BS-SRY 为含人 SRY 基因保守区的重组质粒, 由法国 Berta 博士惠赠. PCR 扩增引物为本文参照已知人 SRY 基因序列合成, 其 DNA 序列为, 引物对 A: 引物 1, 5' CCCGA-ATTCGACAATGCAATCATATGCTTCTGC 3', 引物 2, 5' CTGTAGCGGTCCCGTTGCT-GCGGTG3'; 引物对 B: 引物 1, 5' TGAAGCGACCCATGAACG3', 引物 2, 5' CGACG-AGGTCGATACTTA3'. 实验用鱼, 黄鳝购自武汉市集贸市场, 刺鳅购自湖南张家界集贸市场. Dig 试剂盒购自 Boehringer Mannheim 公司, Taq DNA 聚合酶和 dNTP 等购自华美生物工程公司.

1.2 方法

PCR 扩增: 分别提取动物血液 DNA, 取基因组 DNA 约 100 ng, 200 μ mol/L dNTP 和引物各

1995-06-25 收稿, 1995-10-28 收修改稿

*国家自然科学基金, 中国博士后科学基金和武汉市晨光计划资助项目

0.4 $\mu\text{mol/L}$, 1 单位 Taq DNA 聚合酶, 在 25 μL 反应体系中进行 PCR 扩增. 引物对 A 的扩增条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min 30 s, 循环次数为 35 次. 引物对 B 的扩增条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 42 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 循环次数为 35 次. Southern 印迹杂交: PCR 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后, 经 Southern 转移于 Hybond-N 膜上, 与 Dig 标记的人 SRY 探针(包括 HMG 盒在内 800 bp DNA 片段)进行杂交, 实验条件参照 Boehringer Mannheim 公司手册进行.

2 结果与讨论

当以黄鳝基因组 DNA 为模板, 采用引物对 A 进行 PCR 扩增时, 在雄性和雌性个体均可见一致的三条扩增带, 其 DNA 片段大小分别约为 600, 550 和 250 bp, 另外还有数条扩增带在不同个体间呈现多态现象, 见图 1(a).

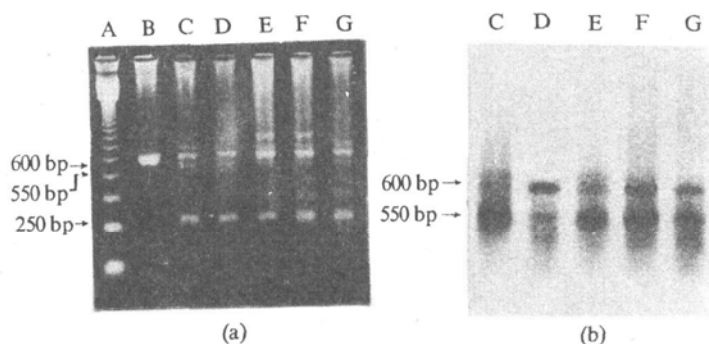


图1 PCR 扩增黄鳝基因组 DNA SRY 盒基因

(a) PCR 扩增产物电泳图: A, 123 bp DNA 大小标识; B, 扩增人 SRY 基因; C 和 D, 雄性黄鳝; E, F 和 G, 雌性黄鳝; (b) PCR 扩增产物的 Southern 印迹杂交

引物对 A 特异扩增出正常男性 SRY 基因含保守区在内约 600 bp DNA 片段, 见图 1(a) (B). 为了确定这对引物在黄鳝中扩增出的 DNA 片段与人 SRY 基因的同源性, 我们又将扩增产物电泳后, 经 Southern 转移于 Hybond-N 膜上, 与经随机引物法以 Dig 标记的人 SRY 基因探针进行 Southern 印迹杂交. 结果显示, 在雄性和雌性黄鳝个体中, 均出现了两条杂交带, 经计算其大小分别约为 600 bp 和 550 bp, 即 PCR 扩增产物后两条扩增带, 而另一条 250 bp 扩增带无杂交信号, 见图 1(b). 该研究初步说明黄鳝基因组存在人 SRY 的同源基因.

为了进一步证实黄鳝基因组中存在 SRY 盒基因, 我们又合成了另一对引物 B. 该引物扩增人 SRY 基因保守区 200 bp DNA 片段, 该对引物在牛, 绵羊和山羊中也扩增出了各自 SRY 基因保守区 DNA 片段^[4]. 采用这对引物以黄鳝基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 其结果见图 2(a), 结果显示, 在雄性和雌性个体均可见约 200 bp 扩增带. 说明黄鳝中存在 SRY 盒基因保守区同源片段. 采用该对引物, 以刺鲀基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 在雄性和雌性个体中也可见约 200 bp 扩增带, 见图 2(b).

该实验结果说明刺鲀基因组中也存在 SRY 同源基因. SRY 盒基因在这两种鱼中的发现, 进一步说明 SRY 盒基因在水生脊椎动物鱼类具有进化保守性. 研究已经发现, 在果蝇、

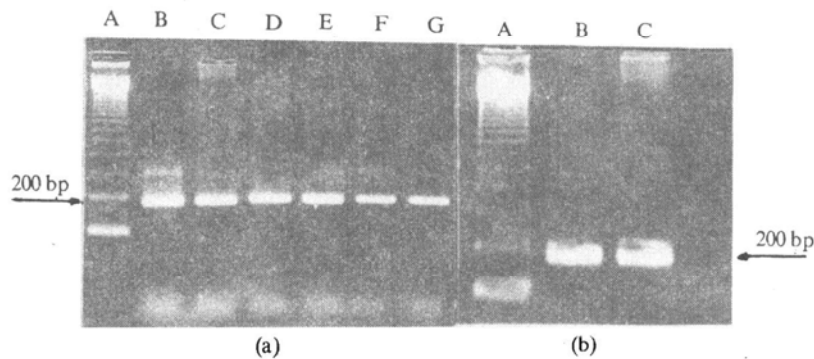


图 2 PCR 扩增黄鳝(a)和刺鳅(b)SRY 盒基因保守区

(a) A, 123 bp DNA 大小标识; B, C 和 D, ♂; E, F 和 G, ♀. (b) A, 123 bp DNA 大小标识; B, ♀; C, ♂

两栖类、鸟类和北美鱼等广泛物种中存在 SRY 盒基因^[2]. 本文在鱼类初步发现了 SRY 盒基因的存在, 为探索鱼类性别决定机制及其该机制从水生到陆生, 从低等动物到人类的进化模式提供了新线索. 在进化明显分化的物种中存在 SRY 盒基因, 提示该类基因在进化上很原始, 在这些物种分化之前它可能就以一种原型存在, 即该类基因的共同祖先. 作者曾于 1993 年提出这个观点^[3], 后来 Su 等发现 SRY 基因是一个没有内含子的转座基因, 也指出其祖先基因的存在^[6]. 然而, SRY 基因是何时发生转座的, 其祖先基因是谁等正是尚待研究的新课题. 鱼类 SRY 盒基因的发现和进一步分析将有助于这些问题的深入研究.

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 a conserved DNA-binding motif. *Nature*, 1990, 346: 240~244
- 2 Denny P, Swift S, Brand N *et al.* A conserved family of genes related to the testis determining gene SRY. *Nucleic Acids Research*. 1992, 20: 2 887~2 888
- 3 Berta P, Hawkins J R, Sinclair A H *et al.* Genetic evidence equating SRY and testis determining factor. *Nature*, 1990, 348: 448~450
- 4 Payen E J, Cotinot C Y. Comparative HMG-box sequences of the SRY gene between sheep, cattle and goats. *Nucleic Acids Research*, 1993, 11: 2 772
- 5 周荣家, 毛 勇, 余其兴等. 见: 中国博士后首届学术大会论文集(下). 北京: 国防工业出版社, 1993, 1 774
- 6 Su H, Lau Y F C. Identification of the transcriptional unit, structural organization and promoter sequence of the human sex-determining region Y (SRY) gene, using a reverse genetic approach. *Am J Hum Genet*, 1993, 52: 240~244