

赤麂 Sry 基因的定位及 Y 染色体的鉴别*

张悦 单祥年** 刘宁生 鲁晓萱

东南大学医学院医学遗传学研究中心, 南京 210009

聂文惠 杨凤堂 王金焕 陈玉泽

中国科学院昆明动物研究所, 昆明 650223

摘要 应用流式细胞仪分离赤麂的 1, Y₁, Y₂ 染色体, 通过简并寡核苷酸引物聚合酶链式反应(DOP-PCR) 增加模板数量. 用人的性别决定基因 HMG 框内设计 1 对引物进行 PCR 扩增. 在雄性赤麂 Y₂ 染色体 DOP-PCR 产物中扩增出与人 SRY 基因同源的 Sry 基因片段, 经克隆测序后, 初步证明赤麂 Y₂ 染色体是真正的 Y 染色体, 同时对赤麂 Sry 基因进行了初步定位.

关键词 赤麂 Sry 基因 DOP-PCR 性染色体

赤麂(*Muntjak muntiacus vaginalis*)是目前已知的哺乳动物中染色体最少的动物, 其核型为 $2n = 6\text{♀}, 7\text{♂}$ ^[1]. 雄性赤麂具有两条 Y 染色体, 究竟是哪一条 Y 染色体在性别决定机制中起作用还是两条 Y 染色体均起作用? 这是一个令人迷惑的问题.

20 世纪 50 年代末, 人们才知道哺乳动物的性别决定依赖于 Y 染色体, 推测 Y 染色体上应有一种睾丸决定因子(testis determining factor, TDF)决定性腺发育为睾丸. 直到 1990 年, Sinclair^[2]等才克隆到人 Y 染色体上的性别决定区基因(sex determining region of the Chromosome Y, SRY), 在人类称为 SRY, 其他动物称为 Sry. 该基因在所有已检测的哺乳动物中是高度保守的. 1991 年, Koopman^[3]等将含有 Sry 基因的 14 kb DNA 片段导入雌鼠体内地诱导出雄性转基因小鼠, 从而确定小鼠 Sry 基因就是 Tdy(testis-determining y), 也使 SRY 基因成为人类 TDF 的最佳候选基因.

我们应用流式细胞仪染色体分离技术、DOP-PCR 和在 SRY 基因 HMG-box 内设计引物进行特异性扩增赤麂的 SRY 基因的方法, 成功地将赤麂的 Sry 基因进行了克隆和测序, 从而在分子水平上确定了 Y₂ 在赤麂的性别决定中起真正的作用.

1 材料与方方法

1.1 材料

赤麂雄性细胞株来自胚胎肺组织, 引自中国科学院昆明动物研究所细胞库.

2000-09-12 收稿, 2000-11-17 收修改稿

* 国家自然科学基金资助项目(批准号:39670393)

** 联系人. Email: shanxn@jlonline.com

1.2 方法

1.2.1 染色体的制备及分离

细胞按常规培养,加秋水仙素,低渗、离心,沉淀悬浮在 500 μL PAB 缓冲液,用 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 色霉素 A3, 2 mmol/L MgSO_4 , 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Hoechst33258 固定染色体至少 2 h. 染色体分离前 10 min,加入亚硫酸钠和柠檬酸钠(终浓度分别为 10 mmol/L, 25mmol/L). 染色体置于 FACStar 正向分离器(Becton Dickinson)中,分离出赤鹿的 1号, Y_1 及 Y_2 染色体^[4].

1.2.2 DOP-PCR

引物序列:5-CCGACTCGAGNNNNNATGTGG-3. 100 μL 反应物如下: Taq 酶 2.5U, dNTP 0.2 mmol/L,引物 50 pmol,模板 50~100 ng. 反应参数为:94 $^{\circ}\text{C}$, 9 min,1 个循环;94 $^{\circ}\text{C}$, 1 min, 30 $^{\circ}\text{C}$,1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$,3 min, 9 个循环;94 $^{\circ}\text{C}$, 1 min, 62 $^{\circ}\text{C}$,1 min,72 $^{\circ}\text{C}$,3 min,30 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min. 在 1%琼脂糖凝胶电泳 10~15 min 检查扩增产物.

1.2.3 Sry 基因特异性扩增、克隆及鉴定

SRY 引物参照文献 [5] 设计,序列为 5'-TGAAGCGACCCATGAACG-3' 和 5'-CGACGAGGACGATACTTA3'. 反应体系如下: Taq 酶 2.5 U, dNTP 0.2 mmol/L,引物 0.5 $\mu\text{mol}/\text{L}$, 分别取 1号、 Y_1 和 Y_2 染色体的 DOP-PCR 产物各 4 μL 作为模板,加无菌水至终体积 100 μL . 条件如下:94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 1 个循环;94 $^{\circ}\text{C}$, 1 min, 58 $^{\circ}\text{C}$,1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$, 1 min, 35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 20 min. 5 μL 反应产物进行琼脂糖电泳. 只有 Y_2 的 DOP-PCR 产物扩增出 200 bp 的片段. 从低熔点胶纯化回收的 PCR 产物(25 ng/ μL),用 T-A 互补克隆法^[6]将赤鹿 Sry 基因的扩增产物克隆到 pGEM-T 载体中,转化 DH5 α 菌,通过 α 互补筛选和菌落 PCR 验证,挑选出一个阳性克隆,进行测序.

2 结果与讨论

2.1 DOP-PCR 的扩增

DOP-PCR 扩增赤鹿 1号, Y_1 , Y_2 染色体的产物约为 100 bp~2000 bp 的片段,其浓度约为 50~100 ng/ μL (图 1).

2.2 Sry 基因 HMG-box 的 PCR 结果

用 Sry 基因 HMG-box 序列设计的引物在雄性赤鹿 Y_2 染色体 DOP-PCR 产物中扩增 Sry 基因片段,在 1号及 Y_1 染色体 DOP-PCR 产物未见特异扩增带(图 2). 赤鹿 Sry 基因 HMG-box PCR 产物的克隆测序的结果见图 3.

2.3 讨论

DOP-PCR 是一种通用引物扩增方法,可以扩增未知序列. DOP-PCR 的原理是在足够低的复性温度下,只有引物 3'端的 6 个特异性碱基与模板 DNA 结合(理论上模板 DNA 上每 4⁶ 个碱基中就有一个结合位点),因此任何 6 个特异性序列都可以按这样的频率与模板 DNA 结合,进行高密度的扩增,所以它的扩增产物可以完整地代表原始 DNA 样品^[7]. 这种方法特别适用于 DNA 模板量较少时(如单个分离的染色体),具有简便、高效的特点.

施立明等^[8]对鹿属动物曾在细胞水平上作过大量研究,对染色体及核型的研究表明在鹿

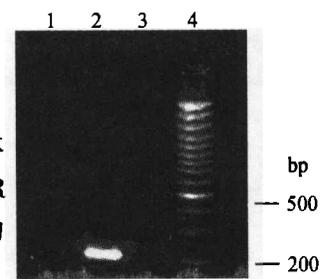


图 1 雄性赤鹿 1号, Y_1 , Y_2 染色体 DOP-PCR 扩增结果, 1, Y_1 ; 2, Y_2 ; 3, 1号染色体; 4, 100 bp DNA 标记

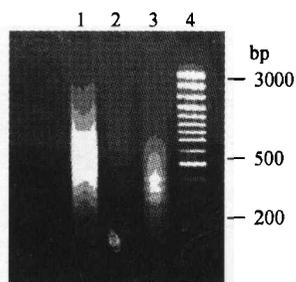


图 2 雄性赤鹿 Sry HMG box 扩增结果. 1, Y₁; 2, Y₂; 3, 1 号染色体; 4, 100 bp DNA 标记.

属动物中广泛地存在着染色体多态性. 赤鹿雄性和雌性之间存在着数目上的差异, 雄性要比雌性多 1 条性染色体. 马昆等^[9]对赤鹿的精母细胞联会复合体研究中认为性别决定模式为 XAXA/XAY.

我们通过流式细胞仪染色体分离技术、DOP-PCR 和 PCR 技术, 以赤鹿的 Y 染色体 DOP-PCR 产物为模板, 用人的性别决定基因 (Sex-determining Region of the Chromosome Y, SRY) 中 HMG 框内的 1 对引物进行 PCR 扩增 Sry 基因片段, 进行克隆、测序结果表明赤鹿 Sry 基因的保守区序列与人 SRY 基因保守区序列的同源性高达 82.6%, 将赤鹿 Sry 基因定位于赤鹿的 Y₂ 染色体上, 证实 Y₂ 是真正意义上的性染色体.

| | | | | |
|------------|-------------|------------|------------|------------|
| CCTTCATTGT | GTGGTCTCGT | GAACGAAGAC | GAAAGGTAAC | TATAGAGAAT |
| CCCAAAATGC | AAAACCTCAGA | GATCAGCAAG | CAGCTGGGGT | ATGAGTGGAA |
| AAGGCTTACA | GATGCTGAAA | AGCGCCATT | CTTTGAGGAG | GCACAGAGAC |
| TACTAGCCAT | ACACCGAGAC | AAATACCCGG | GCTAT | |

图 3 赤鹿 Sry 基因 HMG-box 序列

参 考 文 献

- 1 施立明. 赤鹿的核型. 动物学报, 1976, 22(1): 116.
- 2 Sinclair AH, et al. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. Nature, 1990, 346(6281): 240
- 3 Koopman P, et al. Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. Nature, 1991, 351(6322): 117
- 4 Carter, N. P, et al. Study of X chromosome abnormality in XX males using bivariate flowkaryotype analysis and flow sorted dot blots. Cytometry, 1990, 11: 202
- 5 张思仲, 等. 大熊猫 Sry 基因的 PCR 扩增和克隆. 遗传学报, 1994, 21(4): 281
- 6 Sambrook J, et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- 7 Telenius H, et al. Cytogenetic analysis by chromosome painting using amplified flow sorted chromosomes. Genes Chromosomes & Cancer, 1992, 4: 257
- 8 Shi L M, et al. Comparative cytogenetic studies on the red muntjac, Chinese muntjac and their F1 hybrids. Cytogenet Cell Genet, 1980, 26: 22
- 9 马 昆, 等. 小鹿、黑鹿、赤鹿精母细胞联会复合体的比较研究. 遗传学报, 1988, 15(4): 282