

牛 SRY 蛋白表达纯化与体外功能鉴定*

裴杰¹ 杜卫华² 刘小林¹ 柳向军¹ 朱化彬² 赵金红³ 林秀坤^{2**}

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, 北京 100094

3. 内蒙古农业大学动物科学与医学学院, 呼和浩特 010018

摘要 利用 PCR 技术从北京黑白花奶牛 (*Bos taurus*) 的基因组 DNA 中克隆了 SRY (Sex-determining region on the Y chromosome) 基因编码区全长序列。序列分析表明牛 SRY 基因的 HMG 区 (High mobility group) 呈现高度的保守性, 与人、小鼠、猪等的相似性达到 70%。将 SRY 基因与 pET-28a (+) 载体相连, 构建表达载体 pET-28a/SRY; 将该表达载体转入大肠杆菌 BL21 (DE3), 以 IPTG 诱导 30℃ 诱导 4 h, SRY 蛋白可高效表达, 表达产物占总蛋白量的 26%。对表达产物进行了 Western-blotting 检测, 并采用亲和层析技术获得了高纯度的牛 SRY 蛋白。通过 PCR 技术分别获得牛、人、鼠的苗勒氏管抑制物 (Mullerian Inhibiting substances, MIS) 启动子, 凝胶阻滞试验证明, 牛 SRY 蛋白可与人及牛 MIS 启动子结合, 但与鼠的 Mis 启动子不发生相互作用 [动物学报 52 (6): 1082-1087, 2006]。

关键词 SRY 基因 表达纯化 奶牛 Mis 启动子

Expression and purification of bovine SRY protein and its functional characterization *in vitro* *

PEI Jie¹, DU Wei-Hua², LIU Xiao-Lin¹, LIU Xiang-Jun¹, ZHU Hua-Bin², ZHAO Jin-Hong³, LIN Xiu-Kun^{2**}

1. Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100, China

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

3. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010018, China

Abstract The SRY gene was cloned from the bovine *Bos taurus* genome. The total coding region is 687 bp, encoding a peptide with 229 amino acid residues. Compared with the SRY genes from other species, including human, mouse and pig, the amino acid sequence at the HMG region is highly conserved with 70% similarity. The bovine SRY gene 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* BL21 (DE3), and induced by IPTG. SDS-PAGE analysis confirmed that the bovine SRY peptide was highly expressed after 4h induction at 30℃. The product of expression was identified by Western-blotting and the SRY protein was purified to homogeneity. Functional analysis using gel-shift experiments confirmed that bovine SRY protein could bind with the promoter of Mullerian Inhibiting Substances (MIS) from bovine and human. In contrast, no interaction was found between bovine SRY protein and the promoter region of MIS from mice [Acta Zoologica Sinica 52 (6): 1082-1087, 2006].

Key words SRY gene, Expression and purification, Cow, Mis promoter

牛、羊等家畜的性别控制具有重大的应用价值, 目前应用于性别控制的技术主要有胚胎的性别

鉴定与精子分离等手段, 但在胚胎形成后控制性别必将导致大量胚胎的损失, 而采用流式细胞技术分

2006-05-15 收稿, 2006-08-23 接受

* 本项研究得到中国农业科学院人才基金资助 (This research is funded by the talent foundation from Chinese Academy of Agricultural Sciences)

** 通讯作者 (Corresponding author). E-mail: linxiukun@yahoo.com

© 2006 动物学报 Acta Zoologica Sinica

离精子又存在造价高、分离速度慢以及受精率低等缺点。采用分子生物学手段阐明 SRY 及其相关基因在性别发育过程中的作用, 有希望在分子水平上控制哺乳动物的性别发育。SRY 基因并非决定性别的惟一基因, 哺乳动物性别决定是一个多层次调控过程, 性别决定是以 SRY 基因为主导的多基因参与的有序协调过程。迄今为止已发现包括 SRY 基因在内的 6 种基因 (SRY, SOX9, MIS, WT-1, SF-1, DAX-1) 参与了胚胎性别决定中从未分化原始生殖嵴到两性内生殖器官形成的过程 (刘铁铮等, 2003)。SRY 蛋白是这些基因在性别决定中发挥作用的枢纽, 对性别形成的具体作用机制的了解直接决定于对 SRY 基因及 SRY 蛋白的深入研究。

SRY (Sex-determining region on the Y chromosome) 基因是位于哺乳动物 Y 染色体上与性别发生直接相关的基因, 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 的带有 SRY 基因的个体会以雄性或间性表型存在 (Koopman et al., 1991; Kamila et al., 1999); SRY 基因的突变也会在一定程度上引起性反转或性别异常 (Patricia et al., 2004; Mohammad et al., 2004)。1990 年, SRY 基因从人的 Y 染色体上得到分离 (Sinclair et al., 1990), 之后该基因被确认为人们长期寻找的睾丸决定因子 TDF (Testis determining factor)。SRY 蛋白属于含有 HMG 盒 (High mobility group) 并特异结合于 DNA 序列蛋白的一个亚类, 该亚类包括多种转录因子, 如各种 SOX (SRY-related high-mobility group box) 蛋白 (Pevny et al., 1998)。目前对人和小鼠的 SRY 基因及其蛋白的研究相对较成熟, 而对牛 SRY 基因的功能研究报道不多, 尚不清楚牛 SRY 蛋白是否具有转录因子的活性, 在性别形成过程中牛 SRY 基因是否具有控制性别发育的作用。

本研究首次将牛的 SRY 基因在大肠杆菌中表达, 并采用 His-tag 吸附层析技术分离纯化获得了高均一性的牛 SRY 蛋白, 并首次证实牛 SRY 蛋白可与牛及人的 MIS 启动子序列特异性结合, 但不能与鼠的 Mis 启动子发生相互作用。这一研究结果对进一步阐明牛 SRY 基因在性别发育中的作用及人为的控制奶牛的性别具有重大意义。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物组织、细菌菌株及载体 雄性北京黑

白花奶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 α 及 *E. coli* BL21 (DE3) 购于天为时代公司; pGEM-T 克隆载体为 Promega 公司产品; pET-28a (+) 表达载体购于 Novagen 公司。

1.1.2 分子生物学试剂 EX Taq 聚合酶, 限制性内切酶 *EcoR* I、*Sal* I 和 dNTPs 均为 TaKaRa 公司产品; 琼脂糖由上海 YITO 公司生产; XGal、IPTG、琼脂粉购于 Sigma 公司; T₄ DNA 连接酶为 Promega 公司产品; DNA 凝胶回收纯化试剂盒、质粒提取试剂盒购于天为时代公司, 蛋白质纯化试剂盒购于 QIAGEN 公司; 胰蛋白胨、酵母浸出粉由 OXOID 公司生产; His 多克隆抗体购自北京博尔迈的 MBL 产品, 二抗 (羊抗兔) 为 Santa cruz 公司产品, NC 膜为 Amersham 公司产品, Western Blot 显色试剂盒为 Pierce 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 SRY 基因的扩增、回收 用酚-氯仿方法提取雄性北京黑白花奶牛的基因组 DNA。设计一对包含 SRY 基因编码序列的引物 P1: 5'-AGTAG-GTTGATGGGTTT-3', P2: 5'-TGATTAACA-GAGGACCAG-3'。以牛基因组 DNA 为模板, P1、P2 为引物, 扩增 SRY 基因, PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 54 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min; 共 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 回收 PCR 产物, 对回收产物以 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.2 目的基因 SRY 的克隆 回收的 PCR 产物和 pGEM-T 载体在 T₄ 连接酶的作用下, 16 $^{\circ}$ C 连接 1 h 后, 4 $^{\circ}$ C 过夜连接, 构建重组质粒 pGEM-T-SRY。将重组质粒转化至感受态 *E. coli* DH5 α 菌中。在固体 LB 培养基上挑取阳性菌落, 接种于含有 Amp 的 LB 液体培养基中过夜培养。通过菌液 PCR 对所获得的大肠杆菌进行鉴定; 同时提取质粒, 用 *Bst*z I 酶切鉴定。将 PCR 和酶切鉴定均为阳性的菌落送至生物公司测序。

1.2.3 表达载体的构建 根据 SRY 基因序列和载体 pET-28a (+) 的多克隆位点设计引物, SRY-E: 5'-GCGGAATTCATGTTTCAGAGTATTG-AACG-3', SRY-S: 5'-GCGGTCGACTCAATATTGAAAATAAGCAC-3' (划线部分为酶切位点)。以质粒 pGEM-T-SRY 为模板, SRY-E 和 SRY-S 为引物进行扩增, PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 51 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min; 共 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C

10 min。纯化 PCR 产物，对加酶切位点的扩增纯化产物和 pET-28a (+) 载体分别以 *EcoR* I、*Sal* I 双酶切，1% 的琼脂糖凝胶电泳回收后，以 T_4 DNA 连接酶 16℃ 连接 1 h 后，4℃ 过夜连接。将连接产物转化至感受态 *E. coli* BL21 (DE3) 中，转化产物涂布于 LB (含 50 mg/L 卡那霉素) 琼脂平板中。经 PCR 和 *EcoR* I、*Sal* I 双酶切鉴定，选取阳性克隆送至生物公司进行序列分析。

1.2.4 SRY 蛋白的诱导表达

将原核表达阳性克隆接种于 50 ml 含卡那霉素的 LB 液体培养基中，37℃ 培养至 A_{600} 为 0.6。加 IPTG 至 0.4 mmol/L 诱导表达，于 30℃ 培养，每隔 1 h 取菌液，取至 5 h。以同样的方法诱导 *E. coli* BL21 (DE3) 和含质粒 pET-28a (+) 的 *E. coli* BL21 (DE3) 5 h 作对照。将诱导各时间收获的菌液 A_{600} 均调至 0.68，取菌液 1.5 ml，4℃ 离心收集各种菌。加上样缓冲液，混匀，煮沸 5 min，12 000 r/min 离心 2 min，取上清 15 μ l 进行 10% SDS-PAGE 电泳，考马斯亮蓝 R250 染色并脱色。

1.2.5 SRY 蛋白的 Western blot 检测 将诱导表达的产物先进行 SDS-PAGE 电泳，然后以半干法电转移至硝酸纤维素膜 (NC)，膜短暂漂洗后用丽春红染膜，待蛋白 Marker 条带显色后用滤纸将膜轻轻吸干，用记号笔标记蛋白 Marker 各条带，继而经漂洗去除丽春红，然后依次经 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h，与抗-His 单抗温育 1 h，与 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 温育 1 h，每步完成后均严格洗膜，最后加 DAB 避光显色。

1.2.6 SRY 蛋白的纯化 30℃ 大量诱导含有 pET-28a/SRY 的 BL21 (DE3) 菌，离心收集，溶于裂解液中，冰上放置 30 min，超声波碎菌直至菌液变的澄清，离心沉淀包涵体。用裂解液平衡 Ni-NTA 亲和层析柱，上样离心后的上清液，用漂洗液洗两次，再用洗脱缓冲液洗脱，纯化产物及菌体总蛋白用 12% SDS-PAGE 电泳检测。

1.2.7 MIS 基因启动子的扩增与序列分析 用酚-氯仿方法自北京黑白花奶牛、人以及小鼠的血样中提取基因组 DNA。分别设计三对包含 MIS 基因启动子的引物，序列如下：

MIS-Bovine-sense: 5'-CAGGCACGTTGGAAC-AGAAGG-3'

MIS-bovine-antisens: 5'-CACTGCGAAGGT-GGTCAAGTCA-3'

Mis-human-sense: 5'-CACATCAGGCCAGC-

TCT-3'

Mis-human-antisense: 5'-CCAGTCCAAGTC-TTCTCGG-3'

Mis-mouse-sense: 5'-AGGGAGATGGGAGCT-ACTCA-3'

Mis-mouse-antisense: 5'-CAGGCACAAAGG-TTCAGG-3'

分别以牛、人、鼠的基因组 DNA 为模板，上述序列为引物，扩增 MIS 基因的启动子，Mis 启动子的长度分别为：牛 162 bp、人 201 bp、小鼠 217 bp。PCR 反应条件：94℃ 5 min；94℃ 30 s，58℃ 30 s，72℃ 45 s；共 30 个循环；72℃ 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后，回收 PCR 产物，进行序列测定。

1.2.8 牛 SRY 蛋白与 MIS 基因的相互作用 采用上述 MIS (Mis) DNA 为模板，利用 PCR 反应制备 32 P 标记的双链 DNA 探针。凝胶阻滞试验按 Haqq et al. (1993) 的方法进行，双链探针与牛 SRY 蛋白在下列缓冲液中温育：10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4；50 mmol/L NaCl；2 mmol/L MgCl₂；0.5 mmol/L 二硫基苏糖醇；4% 的甘油。反应液中加入 poly (dI-dC) 40 μ g/ml 去除非特异性相互作用。温育反应在 4℃ 条件下进行。

2 结 果

2.1 牛 SRY 基因的克隆与序列分析

以奶牛基因组 DNA 为模板，以 SRY 基因的 P1、P2 为引物进行 PCR 扩增。PCR 扩增产物与 pGEM-T Vector 连接，构建重组质粒。以 *Bst*z I 酶切 pGEM-T-SRY 质粒，得到一条约 1 000 bp 的插入片段。将酶切鉴定为阳性的重组子进行测序分析。结果表明所获得的 SRY 基因序列包含完整的编码框架，编码区由 687 个碱基组成，编码 229 个氨基酸，HMG 区含有 79 个氨基酸 (图 1)，与报道的序列完全一致 (Kato et al., 1995)。牛的 SRY 基因 HMG 序列与人、小鼠、猪、猫的有大于 70% 的同源性，此外牛和猪在 HMG 序列以外还有一定的同源性。

2.2 表达质粒的构建及重组子鉴定

以引物 SRY-E、SRY-S 扩增的含有 SRY 基因的 DNA 片段与 pET-28a (+) 均以 *EcoR* I、*Sal* I 双酶切，在 T_4 DNA 连接酶作用下连接，构建重组质粒 pET-28a/SRY。该质粒经 *EcoR* I、*Sal* I 双酶切得到约 700 bp 的 SRY 插入片段 (图 2)。

```

AGTAGGTTGATGGGTTTGGGCTGACTGCCAGGACGTATTGAGGGGAGGTATTGGGGCGGAGAAATAA
ATATTTCACTGTATATATTGCACTAAGTCAGTCTGTGGTAAGAACAACCTTATGAATAGCACCATAATTTTT
AGAACGCTTACACCGCATATTACTTCTCCCTTTTAAACAGTGCCTATGCTTCTGCTAAACAGTGCAGT
1.....CGTATGCTTCTGCT ATG TTC AGA GTA TTG 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 TGT 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...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 CGG TCA CAG TCC GTG ATC ATA ACC AAT TCA CTC CTG CAA AAG GAG CAT CAC AGC
173...L...S...R...S...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...CCCTGT AAC AAA AGC TTA GAG CCT GGA CTT TCT TGT GCT TAT TTT CAA TAT TGA CTTCCITTAC
213...P...C...N...K...S...L...E...P...G...L...S...C...A...Y...F...Q...Y

```

图 1 牛 SRY 基因的序列分析

起始密码子的第一个碱基编号为 1, 在编码区下面是其编码的氨基酸序列, 划线部分为 HMG 盒, 终止密码子由下划线标出。

Fig.1 Sequence analysis of bovine SRY gene

The first nucleotide of translational start codon is numbered 1 for the nucleotide sequence. The translated amino acid sequence is indicated under the nucleotide sequence of the open reading frame. The HMG box is underlined, while the TGA stop codon is underlined.

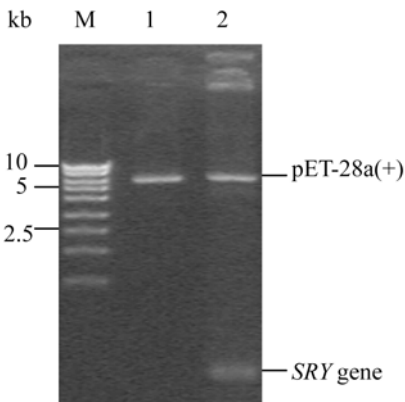


图 2 质粒 pET-28a-SRY 的酶切鉴定

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.2 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.

2.3 SDS-PAGE 分析

将含有 pET-28a (+) /SRY 的工程菌 *E. coli* BL21 (DE3) 在 30℃ 培养, 加入 IPTG 至 0.4 mmol /L 诱导表达, 于不同时间取样, 以 SDS-PAGE 测定菌体中牛 SRY 蛋白的表达量。结果表明 IPTG 诱导 1 h 即可见到 SRY 基因的表达 (图 3, 条带 5), 诱导 4 h 表达量达到高峰 (图 3, 条带 8), 定量分析表明 SRY 蛋白可占总蛋白量的 26%。蛋白质分子量约为 33 kD, 与预期 SRY 蛋白一致, 对照组 *E. coli* BL21 (DE3) (图 3, 条带 1) 和含空质粒 pET-28a (+) 的 *E. coli* BL21 (DE3) (图 3, 条带 2) 均未见该蛋白表达。

2.4 SRY 蛋白 Western-blotting 分析结果

以 His 标签肽为标志的 Western 印迹分析显示, 经 IPTG 诱导的含重组表达载体 pET-28a/SRY 的菌体裂解物能与抗-His 单抗特异性反应, 在约 33 kD 处呈现单一条带 (图 4, 条带 2), 而经同样诱导的只含载体 pET-28a (+) 的菌体裂解物则无此反应 (图 4, 条带 1), 说明所表达的融合蛋

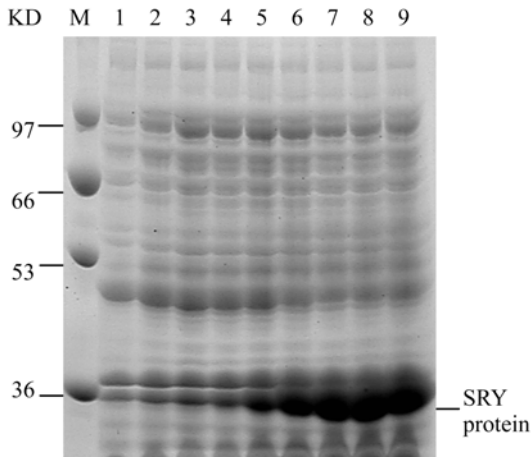


图3 可溶性 SRY 蛋白 DS-PAGE 分析

M: 蛋白质分子质量标准; 1: 诱导 BL21 (DE3) 菌株所得可溶性总蛋白; 2: 诱导带有 pET-28a (+) 质粒的 BL21 (DE3) 菌株所得可溶性总蛋白; 3-9: 为带有 pET-28a/SRY 质粒的 BL21 (DE3) 菌株分别诱导 0、0.5、1、2、3、4、5 h 所得可溶性总蛋白。

Fig.3 Expression of bovine SRY in *E. coli*

M: Protein marker. 1: Total proteins of *E. coli* BL21 (DE3). 2: Total proteins of *E. coli* BL21 (DE3) containing plasmid pET-28a (+). 3-9: Total proteins of *E. coli* BL21 (DE3) containing plasmid pET-28a/SRY induced at 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, and 5 h respectively.

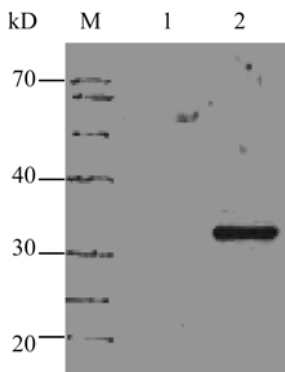


图4 重组 SRY 的 Western blot 分析

M: 蛋白质分子质量标准; 1: 含质粒 pET-28a (+) 的大肠杆菌 BL21 (DE3); 2: 含质粒 pET-28a/SRY 的大肠杆菌 BL21 (DE3)。

Fig.4 Western blot analysis of recombinant SRY

M: Protein marker. 1: *E. coli* BL21 (DE3) containing plasmid pET-28a(+). 2: *E. coli* BL21 (DE3) containing plasmid pET-28a-SRY.

白的确是目的蛋白。

2.5 SRY 蛋白纯化结果

为了研究表达蛋白的生物学功能, 我们采用亲和层析技术纯化了牛 SRY 重组蛋白, 利用 Ni-

NTA 亲和层析柱吸附, 咪唑缓冲液洗脱, 聚丙烯酰胺电泳检测纯化产物, 可以看到一条清晰的 SRY 蛋白纯化条带, 分子量为 33 kD (图 5, 条带 1)。这说明通过亲和层析纯化获得了高均一性牛 SRY 蛋白。

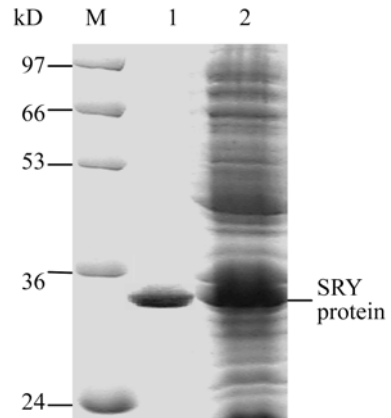


图5 重组牛 SRY 蛋白的纯化

M: 蛋白质分子质量标准; 1: 纯化的 SRY 蛋白; 2: 诱导后菌体总蛋白。

Fig.5 Identification of purified bovine recombinant SRY protein

M: Protein marker. 1: SRY protein purified. 2: Total proteins of *E. coli* BL21 (DE3) transformed with pET-28a/SRY.

2.6 牛 SRY 蛋白与 MIS 基因启动子的相互作用

采用凝胶阻滞试验测定了牛 SRY 蛋白与 MIS 启动子的相互作用, 发现将牛的 SRY 蛋白与牛或人的 MIS 启动子温育, 电泳后可见明显的结合条带 (图 6, 条带 2, 3), 但以鼠的启动子与牛的 SRY 蛋白作用时, 未见到两者的结合条带 (图 6, 条带 4)。这一研究结果说明牛 SRY 蛋白可与牛及人的 MIS 启动子在体外特异性结合。但不能与鼠的 Mis 启动子发生相互作用。

3 讨论

SRY 基因调控机制目前尚不十分清楚, 与性别决定相关的 SF1 (Steroidogenic factor 1, Nicolas et al., 2003) 和 WT1 (Wilm's tumor gene 1, Anwar and Grady, 2001) 可以与 SRY 基因的启动子结合, 此外 SRY 对其它与性别相关的基因也具有类似调控作用, 如 AR (Androgen receptor) (Xin et al., 2001) 和 MIS (Haqq et al., 1993)。MIS 是蛋白质激素转化生长因子家族的一员, 是生长的 Sertoli 细胞产生的旁分泌蛋白激素, 引发苗勒氏管 (Mullerian duct) 的退化。苗勒氏管由上皮及周围

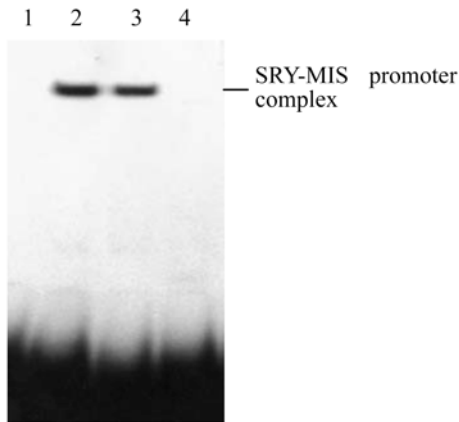


图 6 牛 SRY 蛋白与 MIS (Mis) 的结合

1: 对照组; 2: 牛 MIS 启动子; 3: 人 MIS 启动子; 4: 鼠 MIS 启动子。

Fig. 6 Bovine SRY protein binds with Mis promoter regions

Gel-retardation experiment was performed with bovine SRY protein and Mis promoters from bovine (lane 2), human (lane 3) and mice (lane 4). Lane 1 represents the bovine Mis probe only as a negative control.

的间充质组成,主要是产生雌性动物的内生殖结构,包括输卵管、子宫、子宫颈及阴道前部。在哺乳动物中, MIS (或者叫做 AMH “Anti-mullerian hormone”) 由胎儿睾丸分泌,与睾酮协同引发苗勒氏管的退化而阻止雌性生殖器官的分化 (Josso, 1995)。前期的研究证实 MIS 基因的表达与雄性性状的形成具有密切关系, Mis 基因敲除的雄性小鼠胚胎可发育形成雌性小鼠的性器官 (苗勒氏管), SRY 通过调节 MIS 基因的表达影响性别的发育。已有的研究揭示 SRY 基因表达之后, SOX9 开始表达,此后多种与睾丸发育相关的激素包括 MIS 开始分泌。但在体内 SRY 是否直接作用于 Mis 基因需要更多的实验证实。

我们的实验克隆了奶牛 SRY 基因蛋白的编码序列,并在大肠杆菌中获得高效表达,采用亲和层析技术获得了高均一性的 SRY 蛋白,并证实牛 SRY 蛋白可以与牛或人的 MIS 基因的启动子进行体外结合,但不能与鼠的 Mis 基因作用,这说明牛的 SRY 基因与人的具有更高的相似性。序列分析也表明,牛 SRY 蛋白与人的具有高度的同源性,同时发现人、牛、鼠、兔、羊和沙袋鼠的 HMG 盒有 70% 的一致性,而在 HMG 以外则没有序列保守性,小鼠的 Sry 蛋白还含特有的富含谷胱氨酸序列域。SRY 基因迅速的进化 (Whitfield et al., 1993),在 HMG 区域之外缺少同源性可能反映了

SRY 在性别决定之外的其他功能的进化,如在精子发生和脑中的功能。牛 SRY 蛋白与人 MIS 基因的结合提示二者在调控性腺发育中可能具有类似的调控模式。小鼠的 Mis 基因启动子不能与牛的 SRY 蛋白结合,说明 HMG 序列以外的部分与结合性能有一定的关系,我们实验室正在比较不同生物中 SRY 蛋白与 DNA 分子的结合特性,以确定 SRY 蛋白的结合域。我们的研究结果表明牛 SRY 蛋白可与牛或人的 MIS 启动子相互作用,这种结合特性是否可在体内影响 MIS 基因的表达,并进而影响性别发育需要进一步的实验证实。我们的实验也表明在原核生物大肠杆菌中表达的 SRY 蛋白有其生物活性,这为我们进一步研究其体内外的生物学功能提供了基础。

参考文献 (References)

- Liu TZ, Xing GD, Zhou DX, 2003. Resent progress in sex gene based regulation and sex control. Agricultural Science of Jiangsu Province 19 (4): 246-252.
- Anwar H, Grady FS, 2001. The human sex-determining gene SRY is a direct target of WT1. Biol. Chem. 276 (20): 16 817-16 823.
- Haqq CM, King CY, Dnahoe PK, Weiss MA, 1993. SRY recognizes conserved DNA sites in sex-specific promoters. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 1 097-1 101.
- Josso N, 1995. Paediatric applications of anti-mullerian hormone research. Horm. Res. 43 (6): 24-38.
- Kamila K, Maciej K, Alina W, 1999. Incomplete masculinisation of XX subjects carrying the SRY gene on an inactive X chromosome. F. Med. Genet. 36: 452-456.
- Kato Y, Sato S, Cui X, Itagaki Y, Sutou S, 1995. Cloning and characterization of bovine SRY gene. Animal Sci. Technol. 66: 994-1 000.
- Koopman P, Gubbay J, Vivian N, 1991. Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. Nature 351: 117-122.
- Mohammad S, Varinderpal SD, Neeraj J, 2004. Two new novel point mutations localized upstream and downstream of the HMG box region of the SRY gene in three Indian 46, XY females with sex reversal and gonadal tumour formation. Molec. Human Reprod. 10: 521-526.
- Nicolas P, Isabelle D, Veronique P, 2003. Porcine SRY promoter is a target for steroidogenic factor 1. Biol. Reprod. 68: 1 098-1 106.
- Patricia C, Norma G, Daniela S, 2004. Screening for mutations in the SRY gene in patients with mixed gonadal dysgenesis or with Turner syndrome and Y mosaicism. Europ. J. Obstetr. Gynecol. Reprod. Biol. 115: 55-58.
- Pevny LH, Sockanathan S, Placzek M, 1998. A role for SOX1 in neural determination. Develop. 125: 1 967-1 978.
- Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, 1990. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to conserved DNA-binding motif. Nature 346: 240-245.
- Whitfield LS, Lovell-Badge R, Goodfellow PN, 1993. Rapid sequence evolution of the mammalian sex-determining gene SRY. Nature 364: 713-715.
- Xin Y, Michael LL, Tong L, 2001. SRY interacts with and negatively regulates androgen receptor transcriptional activity. Biol. Chem. 276 (49): 46 647-46 654.
- 刘铁铮, 邢光东, 周东蕊, 2003. 性别基因调控与性别控制研究进展. 江苏农业学报 19 (4): 246-252.