

# 赤麂 SRY 基因的测序及其与部分偶蹄目 动物 SRY 基因序列的比较\*

郭金虎 单祥年 常青 余多慰

武景阳

(南京师范大学生物学系, 南京 210097)

(南京铁道医学院生物学教研室, 南京 210009)

**摘要** 采用人 SRY 基因的一段保守序列的引物, 通过 PCR 在雄性赤麂中扩增出了赤麂 SRY 基因的特异片段, 通过 DNA 斑点杂交证实其扩增产物与人 SRY 基因有着较高的同源性。将 PCR 产物克隆到载体 pGEM<sup>®</sup> T Vector 中, 转化 DH5 $\alpha$  菌, 经与人 SRY 基因探针进行菌落杂交筛选出赤麂 SRY 基因的阳性克隆, 并对其进行了测序。将其序列与基因库中录入的所有偶蹄目动物的 SRY 基因序列进行同源性比较, 用 UPGMA 法构建了其系统进化树, 从分类和进化上对赤麂 SRY 基因进行分析。

**关键词** 赤麂 SRY 基因 性别决定 偶蹄目 DNA 序列 系统进化

性别决定一直是遗传学研究的一个热点。SRY 基因是哺乳动物染色体上的性别决定基因的最佳候选基因, 是 1990 年 Sinclair 等人在人类 Y 染色体上克隆的一个单拷贝基因 (Sinclair *et al.*, 1990), 研究表明其在性别分化中起着重要作用。该基因在哺乳动物中具有高度的保守性, 人们曾在兔、猩猩、牛、马、猪、虎、大熊猫甚至鱼类中都找到了 SRY 基因的同源基因 (张思仲等, 1994; 黄晓等, 1998)。现在将具有编码 DNA 结合蛋白的 HMG 框的基因称作 SRY-box 基因家族, 即 SOX 基因 (徐晋麟等, 1998)。目前基因库中已录入的各种哺乳动物的 SOX 基因序列约有 200 多种, 因此将新发现的动物的 SRY 基因与基因库 (GenBank) 中的各种资料进行比较, 可以从进化和分类地位上对 SRY 基因进行研究 (周荣家等, 1997)。

近来人们又发现和提出了一些新的性别决定的相关基因, 如副中肾抑制基因 MIS、SRY 相关基因 SOX9、编码甾类因子的基因 SF1、X-连锁的 DAX 基因、Wilm's 肿瘤抑制基因 WT1 等。此外人们还提出了 Z-基因模型, DSS-基因模型等几种哺乳动物性别决定的模型 (徐晋麟等, 1998), 因此选用一些有价值的模式动物继续深入进行性别决定机制的研究具有重要的意义。

赤麂 (*Muntiacus muntjak vaginalis*) 仅分布于印度和我国云南地区, 是迄今为止发现的染色体数目

最少的脊椎动物, 其染色体特别大 (施立明, 1976)。国内自 70 年代以来有众多实验室用赤麂细胞株研究细胞周期、染色体生物学行为及遗传毒理, 是公认的一种模式动物 (马昆等, 1988)。另外赤麂在性别决定方面也与一般动物不同, 它具有 2 条 Y 染色体, 细胞学研究提示其可能是由小麂通过串联易位而形成的, 但无分子水平证据, 所以赤麂是研究哺乳动物 SRY 基因结构及性别决定机制的一种很有价值的动物。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

雌性和雄性赤麂细胞株引自中科院昆明动物研究所, 正常男性和女性血液取自南京妇幼保健医院。

PCR 产物克隆载体为 Promega 公司的 pGEM T Vector, 宿主菌为 DH5 $\alpha$ 。DIG 标记及检测试剂盒 (AP 显色) 和 PCR 产物纯化试剂盒购自 Boeringer Mannheim 公司, 杂交用尼龙膜为 QIAGEN 公司的 QIabrane 尼龙膜。Taq 酶和 dNTP 购自上海生工生物工程公司, PCR 所用引物由上海生工生物工程公司合成, 引物 1: 5' TGAAGCGACCCATGAACG3', 引物 2: 5' TCGACGAGGTCGATACTT3', 可扩增人 SRY 基因保守区内 221 bp 的片段。

### 1.2 方法

1998-12-18 收稿, 2000-07-28 修回

\* 国家自然科学基金资助项目 (No. 39670393)

第一作者简介 郭金虎, 男, 24 岁, 硕士研究生。研究方向: 细胞和分子遗传学。E-mail: golden-tiger@990.net

**1.2.1 DNA 的提取** 赤麂雌性和雄性培养细胞的基因组 DNA 及正常男性和女性血细胞基因组 DNA 的提取分别按照我们实验室的常规操作进行。

**1.2.2 PCR 扩增** 反应总体积为 25  $\mu$ l, 反应液中含模板 DNA 约 200 ng, 50 mmol 的 KCl, 10 mmol 的 Tris-HCl (pH 8.0), 200  $\mu$ mol/L dNTP, 两种引物各为 0.5  $\mu$ mol/L。反应在 MJ Research 200 型 PCR 仪上进行, 先 94 $^{\circ}$ C 变性 8 分钟, 再加入 1U 的 Taq 酶。扩增人 SRY 基因的条件为: 94 $^{\circ}$ C 40 s, 58 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 1 分钟。扩增赤麂 SRY 基因的条件为 94 $^{\circ}$ C 40 s, 52.5 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 1 分钟。反应共 35 个循环, 最后延伸为 72 $^{\circ}$ C 7 分钟。

**1.2.3 探针的制备** 以正常男性基因组 DNA 作为模板, 用引物 1 和引物 2 进行 PCR 反应, 掺入 DIG 标记的 dUTP, 然后用公司 PCR 产物纯化试剂盒 (Boeringer Mannheim 公司) 进行纯化, 溶于适量 TE 待用。探针的灵敏度按照 Boeringer Mannheim 公司提供的方法进行测试。

**1.2.4 赤麂 SRY 基因扩增产物的斑点杂交** 将赤麂 SOX 基因扩增产物按照 10 ng, 1 ng, 0.1 ng 在 Qiabrane 尼龙膜上点样, 与人 SRY 基因探针进行斑点杂交, 杂交条件为 52.5 $^{\circ}$ C 过夜。洗膜条件为 2  $\times$  SSC/0.1% SDS, 0.5  $\times$  SSC/0.1% SDS, 52.5 $^{\circ}$ C。

**1.2.5 赤麂 SRY 基因扩增产物的克隆** 按方法 1.2.2 进行 PCR, 但将最后延伸时间延长为 15 分钟 (王瑛, 1996)。然后按照 Promega 公司提供的方法进行 T-A 互补克隆, 转化到宿主菌 DH5 $\alpha$  中。

**1.2.6 菌落杂交** 转化菌用含 X-gal 平板培养, 从中挑选 42 个白色菌落列于平板上继续培养, 过夜后印到 Qiabrane 尼龙膜上与人的 SRY 基因探针进行菌落杂交, 杂交及洗膜条件同斑点杂交。

**1.2.7 赤麂 SRY 基因克隆的测序** 测序由大连宝生物公司进行, 测序仪为 ABI PRISMTM377DNA 自动测序仪, 反应试剂为 Dye Terminator Cycle Sequencing Kit with AmpliTaq DNA Polymerase, FS (PERKIN ELMER) 及 BigDyeTM Terminator cycle Sequence Ready Research Kit (PERKIN ELMER)。

**1.2.8 偶蹄目部分动物 SRY 基因的同源性比较及系统进化分析** 根据赤麂 SRY 基因的部分序列, 运用 BLAST 分析软件与基因库 (GenBank) 中登录的所有偶蹄目动物的 SRY 基因序列进行同源性分析。赤麂及基因库中偶蹄目部分种类共 24 个个体 SRY 基因的核苷酸序列, 利用 MEGA 分析软件包中 Kimura 二参数模型估计彼此间的遗传距离, 并根据

遗传距离利用 UPGMA 法构建了 SRY 基因的系统发生树 (Altschul *et al.*, 1997)。

## 2 结 果

### 2.1 用人 SRY 基因的保守引物扩增赤麂同源的 SRY 基因

采用人 SRY 基因的这对引物可在男性中扩增出 221 bp 的 SRY 基因片段, 同样的引物在雄性赤麂中扩增出与人 SRY 基因同源的 221 bp 的片段, 在雌性赤麂中未见特异扩增带 (图 1)。

### 2.2 人 SRY 基因探针的灵敏度、特异性及斑点杂交

用 PCR-DIG 法制备的探针灵敏度达 0.01 pg (图 2), 说明用该方法制备的探针具有很高的标记效率, 并在与男性和女性 DNA 同时进行斑点杂交时显示了较好的特异性 (图 3)。

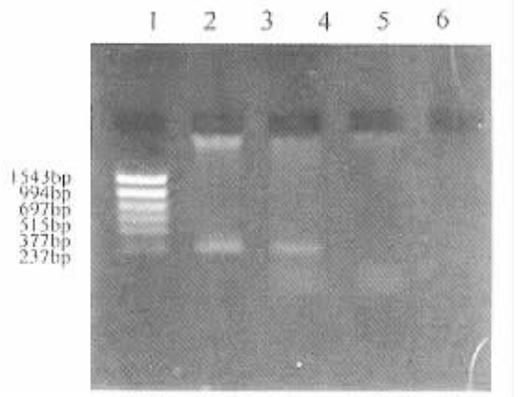


图 1 赤麂 SRY 基因片段 PCR 结果

#### 1.1 Amplification of *M. m. vaginalis* SRY gene by PCR

1: 分子量标记 (Marker) 2: 正常男性 [Human (male)] 3: 雄性赤麂 (Male *M. m. vaginalis*) 4: 雌性赤麂 (Female *M. m. vaginalis*) 5: 空白对照 (Blank control)

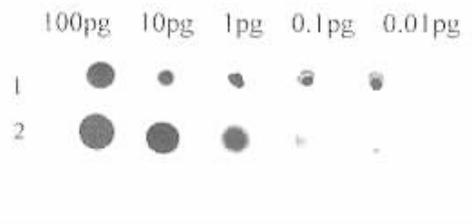


图 2 人 SRY 基因探针标记灵敏度

fig.2 Labeling sensitivity of human SRY gene probe  
对照 (Control) 2: 人 SRY 基因探针 (Human SRY gene probe)

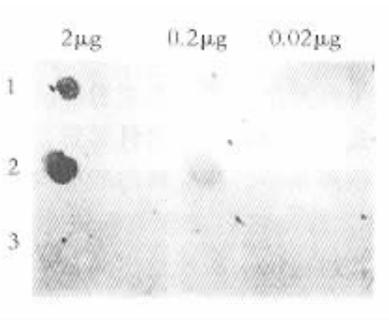


图 3 人 SRY 基因探针的特异性

.3 Specification of human SRY gene Probe

1, 2 : 正常男性 [ Human male ] 3 : 正常女性 [ Human female ]

雄性赤麂 SRY 基因扩增产物与人 SRY 基因探针斑点杂交结果, 显示扩增产物与人 SRY 基因有着高度的同源性 (图 5)。

2.3 菌落杂交筛选阳性克隆及序列测定

选取 42 个白色菌落, 印在尼龙膜上用制备的人 SRY 基因探针进行菌落杂交 (图 4), 取其中一个阳性克隆 2F 进行序列测定, 结果如下:

CCTTCATTGT GTGGTCTCGT GAACGAAGAC GAAAGGTG-  
GC TCTAGAGAAT CCCAAAATGC AAAACTCAGA GATCAGCAAG  
CAGCTGGGGT ATGAGTGAA AAGGCTTACA GATGCTGAAA  
AGCGCCCAT CTTTGAGGAG GCACAGAGAC TACTAGCCAT A-  
CACCGAGAC AAATACCCGG GCTAT

2.4 偶蹄目部分动物 SRY 基因的同源性比较结果 (表 1)



4 以人 SRY 基因探针菌落杂交筛选阳性克隆  
Fig.4 Identification of positive colony by colony hybridization with human SRY gene probe



5 赤麂 SRY 基因 PCR 产物的斑点杂交  
5 DNA dot hybridization of PCR product of *M. m. vaginalis* SRY gene

表 1 赤麂 SRY 基因部分序列与偶蹄目部分种类动物 SRY 基因同源性分析结果

Table 1 Result of homological analysis of *M. m. vaginalis* 's SRY gene fragment with some animal 's SRY gene of Artiodactyla

| 物种<br>Species                 | 基因序列号<br>Assession No. | 比数<br>Score ( bits ) | 期望值<br>Expect value | 同源性<br>Identities |
|-------------------------------|------------------------|----------------------|---------------------|-------------------|
| 牛 <i>Bos taurus</i>           | L36821                 | 343                  | 6e ~ 93             | 98%               |
| 欧洲牛 <i>European bison</i>     | Z30321                 | 343                  | 6e ~ 93             | 98%               |
| 日本梅花鹿 <i>Cervus nippon</i>    | AB004667               | 305                  | 1e ~ 81             | 98%               |
| 山羊 <i>Capra hircus</i>        | Z18757                 | 323                  | 5e ~ 87             | 97%               |
| 绵羊 <i>Ovis aries</i>          | Z18807                 | 331                  | 2e ~ 89             | 97%               |
| 小鹿瞪羚 <i>Gazella dorcas</i>    | AJ003127               | 125                  | 2e ~ 27             | 94%               |
| 小麂鹿 <i>Tragulus Javanicus</i> | D13463                 | 210                  | 5e ~ 53             | 93%               |
| 原驼 <i>Lama guanicoe</i>       | U66068                 | 172                  | 1e ~ 41             | 87%               |
| 猪 <i>Sus scrofa</i>           | Z26909                 | 137                  | 7e ~ 31             | 86%               |
| 野猪 <i>Swine</i>               | S79625                 | 149                  | 2e ~ 34             | 87%               |

## 2.5 赤麂 SRY 基因部分序列与偶蹄目部分种类 SRY 基因的系统进化分析结果

基于偶蹄目 24 个动物个体 SRY 基因部分序列差异, 对其彼此间的距离进行分析, 构建的 UPGMA 系统进化树见图 6。

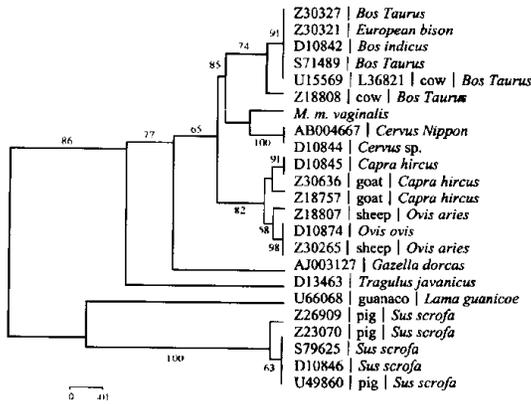


图 6 UPGMA 法构建的偶蹄目部分动物 SRY 基因系统发生树

Fig.6 Phylogenetic tree of the SRY gene sequence of some animals of Ord. Artiodactyla constructed by the UPGMA method  
0.01 表示序列差异 (The bar scale of 0.01 indicated sequence diversity)

## 3 讨论

3.1 我们采用人 SRY 基因的保守区的引物, 通过 PCR 在雄性赤麂中特异扩增出了与人 SRY 基因有着高度同源性的 SRY 基因片段, 再次证实了 SRY 基因在哺乳动物中的保守性, 并暗示这一基因在赤麂中可能对性别决定也起着关键作用。

3.2 通过将赤麂与从基因库中获得的所有偶蹄目动物 SRY 基因序列的同源性进行比较, 发现 SRY 基因在整个偶蹄目动物中也是非常保守的, 其中赤麂与梅花鹿 SRY 基因同源性高达 98%, 与原驼的同源性也达 87% (表 1)。从对偶蹄目部分动物

SRY 基因的聚类结果可以看出, 赤麂和梅花鹿同属鹿科, 鹿亚科的赤麂在进化地位上与鹿亚科的日本梅花鹿的亲缘关系最近, 与牛总科羊亚科的山羊、绵羊及牛科羚羊亚科的小鹿瞪羚的关系也比较近, 而与麋鹿科的小麋鹿、猪科的猪、牛总科中牛科的家牛、欧洲牛、骆驼科的原驼的亲缘关系比较远 (图 6), 这与它们在分类和进化上的不同地位基本上是相对应的。需要指出的是小鹿瞪羚的聚类结果似乎有些意外, 这应该是由于小鹿瞪羚在基因库中收录的基因片段与赤麂等动物 SRY 基因重叠部分太短而造成的误差。

本文所获得的赤麂 SRY 基因序列已被 GenBank 收录, 编码为 AF196477。

3.3 在赤麂 SRY 基因的扩增中, 只在雄性赤麂中有特异的扩增产物, 暗示在赤麂的两条 Y 染色体上可能只有一条 Y 染色体上存在 SRY 基因, 或者两条都有至少是保守区序列相同的 SRY 基因。如果是前一种可能的话, 那么从基因水平上讲, 在赤麂性别分化过程中真正起着性别决定作用的只有一个 Y 染色体, 而如果是后一种可能的话, 则说明赤麂的性别决定方式与一般哺乳动物有着明显的不同之处, 两条 Y 染色体上 SRY 基因在保守区序列相同的情况下, 其两翼序列可能相同也可能存在差异。

南美仓鼠 *Akodon* 中也有两种 Y 染色体, 其中一种 Y 染色体传给子代后诱导睾丸发育, 长成雄鼠, 而另一种 Y 染色体却不能诱导子鼠性腺分化, 产生可育雌鼠 (Bianchi *et al.*, 1993)。研究表明这种雌鼠性反转的原因并非由于 SRY 基因缺失或突变引起, 而是因为性分化阶段 SRY 基因未能表达, 因此研究 Y 染色体上 SRY 基因可能不同的结构和功能对于进一步深入研究哺乳动物性别决定机制将有非常重要的价值。赤麂的性别决定方式与此是否相似还有待探讨, 为了弄清这个问题, 就要对赤麂 SRY 基因进行染色体定位, 目前本实验室正在进行这一工作。

## 参 考 文 献 (References)

- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller and D. J. Lipman 1997 Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389~3402.
- Bianchi, N. O., M. S. Bianchi, G. Baillier, A. de la Chapelle 1993 Characterization and sequenceing of the sex determining region Y gene (SRY) in *Akodon* (Cricetidae) species with sex reversed females. *Chromosoma* (102) 389~395.
- Huang, X., R. J. Zhou, H. H. Cheng and Y. Q. Guo 1998 The SOX gene in two species of fresh-water fishes. *Acta. Zool. Sin.* **44**(2) 239~240. [黄晓, 周荣家, 程汉华, 郭一清 1998 两种淡水鱼 SOX 基因的扩增和测序. *动物学报* **44**(2) 239~240.]

- Ma, K. and L. M. Shi 1988 Comparative studies on synaptonemal complexes in matocytes of Chinese *Muntiacus reevesi*, Black muntjac *M. crinifrons* and Indian muntjac *M. muntjak*. *Acta Genetica Sinica* **15**(4):282~289. [马 昆, 施立明 1988 小鹿、黑鹿、赤鹿精母细胞联合会复合体的比较研究. 遗传学报 **15**(4):282~289.]
- Sinclair, A. H., P. Berta, M. S. Palmer, J. R. Hawkins, B. L. Giriffiths, M. J. Smith, J. W. Foster, A. M. Frischauf and P. N. Goodfellow 1990 A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* **346**:240~244.
- Shi, L. M. 1976 The karyotype of *M. m. vaginalis*. *Acta. Zool. Sin.* **22**(1):116. [施立明 1976 赤鹿的核型. 动物学报 **22**(1):116.]
- Wang, Y. 1996 Comparison of methods of direct cloning of PCR product. *Prog. Bioengineering.* **16**(5):55~57. [王 瑛 1996 PCR产物直接克隆的几种方法. 生物工程进展 **16**(5):55~57.]
- Xu, J. L. and M. Xu 1998 Sex determination and sex reversal of mammal. *Prog. Biochem. Biophys.* **25**(1):30~35. [徐晋麟, 徐 沫 1998 哺乳动物性别决定和性反转. 生物化学和生物物理进展 **25**(1):30~35.]
- Zhang, S. Z. and R. J. Zhou 1994 PCR and cloning of the Giant Panda SRY gene. *Acta genetica Sinica* **21**(4):281~286. [张思仲, 周荣家 1994 大熊猫 SRY 基因的 PCR 扩增和克隆. 遗传学报 **21**(4):281~286.]
- Zhou, R. J., Y. Q. Guo and H. H. Cheng 1997 The phylogenetic comparative tree of SRY and SOX gene. *Acta Zool. Sin.* **43**(2):192~196. [周荣家, 郭一清, 程汉华 1997 SRY 和 SOX 基因比较树. 动物学报 **43**(2):192~196.]

### 外 文 摘 要 (Abstract)

## SEQUENCING SRY GENE OF *MUNTIACUS MUNTIAC VAGINALIS* AND A PHYLOGENETIC COMPARISON WITH SOME OF ARTIODACTYLA \*

GUO Jin-Hu SHAN Xiang-Nian CHANG Qing YU Duo-Wei

( Department of Biology , Nanjing Normal University , Nanjing 210097 , China )

WU Jing-Yang

( Departmnet of Biology , Nanjing Railway Medical College , Nanjing 210009 , China )

With human SRY gene primers of the conserved region, the SRY gene fragment of *M. m. vaginalis* homologous to human SRY was amplified by PCR. In male *M. m. vaginalis*, a gene fragment of 221 bp homologous to human SRY was identified by DNA dot hybridization. By ligating pGEM<sup>®</sup> T Vector with the PCR products of SRY gene of *M. m. vaginalis* and transforming the bacteria DH5 $\alpha$  and clony hybridization with human SRY probe, the positive clony with *M. m. vaginalis* Sry gene fragment was identified gene, the SRY fragment of this clony was sequenced. The sequences identities of SRY gene fragments of all animals of Artiodactyla available from GenBank were compared with the *M. m. vaginalis* SRY gene fragment. The phylogenetic tree was constructed and analyzed by UPGMA method and it was studied at the level of taxonomics and evolution.

**Key words** *M. m. vaginalis*, SRY gene, Sex determination, Artiodactyla, DNA sequence, Phylogeny

\* This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.39670393)