

# 利用 SRY 基因鉴定山羊胎儿成纤维细胞的性别

王怡<sup>1,2</sup>, 管鹏飞<sup>2</sup>, 薛整风<sup>1,2</sup>, 成勇<sup>2</sup> (1. 扬州大学比较医学中心, 江苏扬州 225009; 2. 扬州大学兽医学院, 江苏扬州 225009)

**摘要** 根据 GenBank 中已发表的山羊 SRY 基因和  $\beta$ -乳球蛋白基因序列设计 2 对 PCR 引物, 对来自 3 个 1 月龄山羊胎儿成纤维细胞的基因组 DNA 进行 PCR 扩增, 分别以公羊、母羊的基因组 DNA 为阳性和阴性对照, 同时对 PCR 产物进行序列测定和同源性分析。结果表明, 阳性对照和 GFF1 细胞系有 2 条扩增带, 阴性对照、GFF2 和 GFF3 细胞系只有 1 条扩增带; 序列测定结果表明, PCR 扩增产物为 SRY 基因, 利用该方法准确鉴定出 1 个雄性细胞系和 2 个雌性细胞系。

**关键词** SRY 基因; 山羊胎儿成纤维细胞; 性别鉴定

**中图分类号** S827 **文献标识码** A **文章编号** 0517 - 6611 (2009) 16 - 07359 - 02

## Determination on Sex of Goat Fibroblast Cell with SRY Gene

WANG Yi et al (Center of Comparative Medicine, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009)

**Abstract** According to the sequences of SRY gene and  $\beta$ -lactoglobulin gene of goat published in GenBank, 2 pairs of PCR primers were designed, and the genome DNA from fibroblast cell of 3 one-month old goats were amplified by PCR. With genome DNA from male and female goats as the positive and negative CK resp., the sequence of PCR product was determined and its homology was analyzed. The results showed that positive CK and GFF1 cell line had 2 amplified bands, negative CK, GFF2 and GFF3 cell lines only had 1 amplified band. The results of sequence determination showed that the PCR product was SRY gene, and with it 1 male cell line and 2 female cell lines were accurately identified.

**Key words** SRY gene; Goat fibroblast cell; Sex determination

将转染外源 DNA 的体细胞作为核供体用于核移植是生产转基因动物的一种新方法<sup>[1-2]</sup>。胎儿成纤维细胞具有易分离、体外培养生长迅速、传代次数多、染色体倍性稳定等特点, 是供核的首选细胞。生产动物乳腺生物反应器对转基因动物的性别有特殊要求, 因此对分离培养的胎儿成纤维细胞进行快速准确的性别鉴定是获得所需性别核移植动物的必需环节。胎儿性别早期鉴定曾是动物胚胎工程领域研究的重要内容。随着性别决定理论研究的深入, 多种性别鉴定方法已被建立起来, 主要包括染色体核型分析法、X-连接酶分析法、H-Y 抗原分析法、SRY-PCR 法等。SRY 是位于雄性 Y 染色体性别决定区 (Sex-determination region) 的基因, 在不同动物中高度保守, 其表达决定胚胎向雄性方向分化<sup>[3-5]</sup>。通过传统的 PCR 法特异性扩增 SRY 基因的核心序列可以对动物细胞或胚胎进行性别鉴定。

目前, 牛、绵羊、兔早期胚胎及胎儿成纤维细胞系的 SRY-PCR 性别鉴定方法已被成功建立起来<sup>[6-8]</sup>, 但有关山羊胎儿成纤维细胞的性别鉴定方法报道甚少。笔者根据山羊 SRY 基因和  $\beta$ -乳球蛋白基因序列设计 2 对引物对山羊胎儿成纤维细胞 (Goat fetal fibroblast cell lines, GFF) 总 DNA 进行扩增, 根据扩增产物的电泳条带对胎儿成纤维细胞进行性别鉴定, 以期快速、准确的选取所需性别的细胞系用于生产转基因和克隆山羊提供理论依据。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 1 月龄山羊胎儿取自扬州大学大联环药业基因工程有限公司羊场。DMEM 购自 Sigma 公司, FBS 购自 Gibco 公司, 基因组提取试剂盒 Easy-DNA Kit、PGEM-T easy vector 购自 Invitrogen 公司, Taq 酶购自大连宝生物公司, QIAEX II Gel Extraction DNA 回收试剂盒购自 QIAGEN 公司,

其余试剂购自上海生工公司。引物由上海博亚生物技术有限公司合成。

## 1.2 方法

**1.2.1 山羊胎儿成纤维细胞系的建立。** 经外科手术取出山羊胎儿, 立即用无  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  的 PBS 洗涤 3 次, 去除头、四肢及内脏, 剩余组织剪碎成  $1 \text{ mm}^3$  的小块。向剪碎的组织中加入消化液 (0.25% 胰蛋白酶、0.02% EDTA) 消化 5 min, 用含 10% FBS 的 DMEM 液终止消化。静置 10 min, 取上清,  $1500 \text{ r/min}$  离心 10 min, 弃上清, 加入新鲜的含 10% FBS 的 DMEM 液重悬细胞并稀释至浓度为  $1 \times 10^6$  个/ml。吸取 10 ml 细胞悬液接种于 6 孔板, 置  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 、100% 相对湿度的培养箱中培养, 细胞生长汇合至 80% 时, 冻存部分细胞, 其他细胞按 1:2 的稀释比例传代培养<sup>[9]</sup>。

**1.2.2 山羊胎儿成纤维细胞总 DNA 的提取。** 参照 Easy-DNA Kit 操作说明书, 取部分山羊胎儿成纤维细胞提取基因组 DNA。采用传统的苯酚-氯仿抽提法提取公羊、母羊基因组 DNA 作为对照。

**1.2.3 PCR 扩增 SRY 基因。** 根据 GenBank 已发表的山羊 SRY 基因和  $\beta$ -乳球蛋白序列设计 2 对引物, SRY 基因上游引物: 5'-GAACGAAGACGAAAGGTGGC-3', 下游引物: 5'-GG-GACTGTGAGCGGCATAA-3';  $\beta$ -乳球蛋白上游引物: 5'-CG-GAATCTCCCAATGACCA-3', 下游引物: 5'-CAGAACCCAA-CACCTAACCCCT-3'。PCR 反应体系: 待测 DNA 样品 2  $\mu\text{l}$ 、引物各 1  $\mu\text{l}$ 、Taq 酶 0.5  $\mu\text{l}$ 、DMSO 4  $\mu\text{l}$ 、dNTP 2  $\mu\text{l}$ 、 $10 \times$  Buffer 5  $\mu\text{l}$ 、ddH<sub>2</sub>O 32.5  $\mu\text{l}$ , 总体积 50  $\mu\text{l}$ 。PCR 反应条件:  $94^\circ\text{C}$  变性 45 s,  $59^\circ\text{C}$  退火 30 s,  $72^\circ\text{C}$  延伸 30 s, 30 个循环, 再  $72^\circ\text{C}$  延伸 10 min,  $4^\circ\text{C}$  保存备用。

**1.2.4 SRY 基因 PCR 产物的克隆、测序及同源性分析。** 用 QIAEX II Gel Extraction DNA 回收试剂盒回收 PCR 产物, 将回收产物与 PGEM-T easy vector 于  $4^\circ\text{C}$  连接过夜, 具体方法参照试剂盒使用说明。转化、重组克隆筛选及酶切鉴定均按照常规方法进行<sup>[10]</sup>。阳性重组质粒送大连宝生物公司测

**基金项目** 扬州大学生命科学学科群资助项目

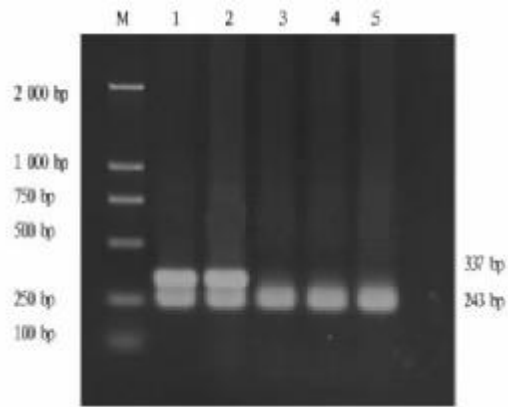
**作者简介** 王怡 (1979 - ), 女, 江苏扬州人, 博士, 助教, 从事转基因与实验动物研究。

**收稿日期** 2009-03-05

序。利用 BLAST 软件对测序结果进行同源性分析。

## 2 结果与分析

**2.1 PCR 扩增结果** 分别以公羊、母羊基因组 DNA 为阳性、阴性对照,采用 PCR 方法扩增 SRY 基因,共检测出了 GFF1、GFF2、GFF3 3 个细胞系的性别。由图 1 可知,阳性对照和 GFF1 均扩增出 337、243 bp 2 条带,阴性对照、GFF2、GFF3 只扩增出 243 bp 1 条带。



注:M 为 DL2000 Marker;1 为公羊阳性对照;2 为母羊阴性对照;3~5 分别为 GFF1、GFF2、GFF3 的扩增产物。

Note:M. DL2000 Marker; 1. Ram positive control; 2. Ewe negative control; 3-5. Amplified products of GFF1, GFF2 and GFF3, respectively.

图 1 山羊胎儿成纤维细胞系 SRY-PCR 扩增结果

Fig.1 Amplified results of goat fetal fibroblast lines by SRY-PCR

**2.2 山羊 SRY 基因序列及同源性分析结果** 将 PCR 产物回收与 PGEM-T easy 载体连接、转化、筛选,阳性克隆送大连宝生物公司进行测序。BLAST 分析结果显示,扩增的 SRY 基因与 GenBank 中已发表的山羊 SRY 基因的序列同源性为 100%,与绵羊 SRY 基因的序列同源性为 97%,与牛 SRY 基因的序列同源性为 99%。

## 3 讨论

SRY 是位于雄性 Y 染色体性别决定区的基因,在不同动物中高度保守<sup>[3]</sup>。SRY 基因的表达决定了胚胎向雄性方向分化,因此可通过特异性扩增 SRY 基因的核心序列对动物胚胎或细胞进行性别鉴定。Here 等首次采用 PCR 技术成功扩增了牛染色体特异 DNA 片段用于鉴定奶牛胚胎的性别,鉴定正确率达 90% 以上<sup>[4-5]</sup>。曾溢滔等<sup>[6]</sup>也利用 PCR 技术成功地鉴定了奶牛胚胎的性别,由于早期胚胎细胞的

DNA 提取量较少且极易污染,他们设计了 2 对 PCR 引物,采用巢式 PCR 法(即 2 次扩增法),以第 1 次 PCR 反应的产物作为第 2 次 PCR 反应的模板进行扩增,有效地鉴定了胚胎的性别。

该试验根据山羊 SRY 基因序列设计的引物可有效从公羊基因组 DNA 中扩增出 337 bp 的特异性片段,而从母羊基因组 DNA 中未扩增出该条带,这一结果表明含有该特异性片段的 GFF1 为雄性细胞系,而不含该特异性条带的 GFF2、GFF3 为雌性细胞系。序列测定及同源性分析进一步证明扩增产物为 SRY 基因片段,说明该试验设计的引物可用于 PCR 扩增鉴定山羊胎儿成纤维细胞的性别。

PCR 技术因特异性强、操作简便、快速高效而被广泛应用于生命科学的各个领域。为了避免基因组提取或 PCR 操作过程中的失误造成的假阴性,该试验根据山羊  $\beta$ -乳球蛋白基因设计了 1 对内标引物,同时进行 PCR 反应。

以往的研究对胚胎细胞进行早期性别鉴定时一般采用多重 PCR 法,需要几对引物和多次扩增反应。而该试验采用 2 对引物,1 次扩增即可准确鉴定出细胞系的性别,为转基因克隆动物研究中外源基因的转染、保存和扩增提供了可靠的依据,同时也证实 SRY 基因不仅可用于早期胚胎性别鉴定,还可用于细胞系性别鉴定。

## 参考文献

- [1] MCCREATH K J, HOWCROFT J, CAMPBELL K H, et al. Production of gene targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells [J]. Nature, 2000, 405: 1066-1069.
- [2] SCHNLEKE A S, KIND A J, RITCHIE W A, et al. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts [J]. Science, 1997, 278: 2130-2133.
- [3] GUBBY J, COLLIGNON J, KOOPMAN R, et al. A gene mapping to the sex-determining region Y gene chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes [J]. Nature, 1990, 346 (6281): 245-250.
- [4] KOOPMAN P, GUBBAY J, VIVIAN N, et al. Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry [J]. Nature, 1991, 351 (6322): 117-121.
- [5] 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 [J]. Nature, 1990, 346 (6281): 240-244.
- [6] 曾溢滔, 张美兰, 陈美珏, 等. 应用 PCR 扩增 SRY 序列进行奶牛胚胎性别的鉴定 [J]. 中国科学 (B 辑), 1993, 23 (4): 371-374.
- [7] 李湘萍, 潘求真, 石德顺, 等. 应用 PCR 技术鉴定绵羊胎儿成纤维细胞系性别 [J]. 广西农业生物科学, 2002, 21 (4): 219-222.
- [8] 侯健, 安晓荣, 苟克勉, 等. SRY-PCR 法快速鉴定体外培养兔胎儿成纤维细胞系的性别 [J]. 农业生物技术学报, 2001, 9 (2): 191-193.
- [9] 薛庆善. 体外培养的原理与技术 [M]. 北京: 科学出版社, 2001: 88-135.
- [10] SAM BROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. Molecular cloning: A laboratory manual [M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 464-467.

(上接第 7358 页)

and Evolution, 2007, 24 (8): 1596-1599.

- [6] THOMPSON J D, HIGGINS D G, GIBSON T J, et al. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice [J]. Nucleic Acids Res, 1994, 22 (22): 4673-4680.
- [7] XIA X, XIE Z. DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution [J]. Heredity, 2001, 92: 371-373.
- [8] ZARDOYA R, MEYER A. Phylogenetic performance of mitochondrial pro-

tein-coding genes in resolving relationships among vertebrates [J]. Mol Biol Evol, 1996, 13 (7): 933-942.

- [9] MIYA M, NISHIDA M. Use of mitogenomic information in teleostean molecular phylogenetics: a tree-based exploration under the maximum-parsimony optimality criterion [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2000, 17 (3): 437-455.
- [10] 陈殊君, 赫崇波, 木云雷, 等. 硬骨鱼类线粒体基因系统发育信息效率分析 [J]. 中国水产科学, 2008 (1): 12-21.