

两种蛇 Sox 基因的 PCR-SSCP 分析*

杨超^① 杨传秀^② 聂刘旺^①

(^①安徽师范大学生命科学学院 芜湖 241000; ^②皖南医学院生理学教研室 芜湖 241001)

摘要: 采用 PCR 技术,以特异扩增人 SRY 基因 HMG-box 保守区的一对引物,扩增了乌梢蛇和赤链蛇的 Sox 基因。结果两种蛇雌雄个体与人一样,均能扩增出大小为 220 bp 左右的基因片段。对扩增产物进行的 SSCP 分析发现两种蛇之间以及种内雌雄个体间单链迁移率略有差异,而与人有较大差异。本文为研究蛇类的性别决定机制及 Sox 基因的演化提供了分子生物学资料。

关键词: Sox 基因; PCR-SSCP; 乌梢蛇; 赤链蛇

中图分类号: Q812 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2003)01-08-05

PCR Amplification and SSCP Analysis of the Sox Gene in Snakes *Zaocys dhumnades* and *Dinodon rufozonatum*

YANG Chao^① YANG Chuan-Xiu^② NIE Liu-Wang^①

(^① College of Life Science, Anhui Normal University, Wuhu 241000;

^② Department of Physiology, Wannan Medical College, Wuhu 241001, China)

Abstract: PCR was used to amplify the Sox gene of *Zaocys dhumnades* and *Dinodon rufozonatum* with a pair of primers, which can also amplify the conservative sequence of the human SRY gene. The results suggest that both male and female snakes have the Sox gene, which has a length about 220 bp, equal to that of human SRY gene. The result of SSCP analysis showed that there were many differences in the Sox gene sequence between snakes and humans, but few difference between males and females of the same species or between the two species of snakes. These results are relevant to the study of sex-determination in snakes and the evolution of the Sox gene.

Key words: Sox gene; PCR-SSCP; Snake

SRY 基因 (sex-determining region Y gene, SRY) 在哺乳动物胚胎发育过程中诱导睾丸分化,是一个十分重要的发育开关基因。现已在众多的哺乳动物以及进化程度明显不同的物种中检测到 SRY 的同源序列,统称为 SRY 盒基因 (SRY-box) 或 Sox 基因 (人类用 SOX 表示)。Sox 基因结构的典型特征是具保守的 HMG 盒^[1,2], 编码的蛋白可以和 DNA 进行序列特异性结合且具有空间结构特异性,其突变将会失去与 DNA 结合的能力从而导致性反转^[1], 系统分析显示, Sox 基因在性别决定、神经发育、器官形成中有重要功能^[3-6]。因而以 Sox 这一保守基

因为线索,研究其性别分化,将会为性别决定机制研究提供新的思路。

爬行动物在系统进化上是极其古老而又特殊的一类,哺乳动物和鸟类由此进化而来。爬行动物的性别决定机制极其复杂,存在有 GSD (genetic sex determination)^[7] 和 ESD (environmental

* 安徽省自然科学基金项目 (No. 01043202), 2001 校青年基金项目 (No. 125032);

第一作者介绍 杨超,男,31岁,硕士,讲师;研究方向:细胞及分子生物学。

收稿日期:2002-06-26,修回日期:2002-09-10

sex determination)^[8,9]等多种类型。乌梢蛇(*Zaocys dhumnades*)和赤链蛇(*Dinodon rufozonatum*)隶属爬行纲蛇亚目游蛇科,是两种分布广泛的无毒蛇,有关其染色体的研究已有报道^[10,11],但其性别决定分子机制的研究,国内外尚未见报道。PCR-SSCP技术是一种基于PCR的单链构象多态性(single strand conformation polymorphism)的分析技术,由Orita^[12]等于1989年建立,后经不断改进和完善,该技术现已成为DNA已知突变检测或未知变异分析中十分常用和实用方法之一。本文对两种蛇Sox基因进行PCR扩增,并进行了SSCP分析,以期对其性别决定机制的类型进行探讨。

1 材料与方法

1.1 实验动物和DNA的提取 乌梢蛇1♀、1♂,赤链蛇1♀、1♂,购自安徽芜湖市吉和水产市场,性别按活体解剖检查确定,均为性成熟个体。DNA的提取,各取新鲜肌肉组织1g左右,经蛋白酶K和SDS消化4~5h后,酚/酚/酚-氯仿/氯仿抽提,无水乙醇沉淀,70%乙醇洗涤,TE溶解,4℃保存备用。

1.2 PCR扩增 PCR扩增用引物参照人SRY基因HMG-box保守区序列及有关文献设计^[13,14],由上海生工生物工程公司合成,PAGE纯化,序列为R1:5'-TGAAGCGACCCATGAACG-3',R2:5'-TCGACGAGGTCGATACTT-3',该对引物可特异扩增人SRY基因HMG-box保守区序列,扩增片段长度为221bp。PCR扩增条件为:基因组DNA 100 ng,每引物0.5 μmol/L,2.0 mmol/L MgCl₂,0.2 μmol/L dNTP,1U *Taq* DNA聚合酶,加双蒸水至25 μl。循环条件为:97℃预变性5 min,94℃ 50 s,55.5℃ 50 s,72℃ 50 s,35个循环,72℃延伸10 min,4℃保存。2%琼脂糖凝胶电泳检测,并拍照。

1.3 SSCP分析 采用非变性6%聚丙烯酰胺凝胶,TBE缓冲系统。5 μl PCR产物和6 μl变性液(98%甲酰胺,0.5 g/L溴酚兰,0.5 g/L二甲苯蓝)混匀,98℃变性10 min后,立即置于冰浴中10 min,将变性混合物点入加样孔,10 V/cm

电泳3 h,70%乙醇(含0.5% HAC)固定,1% AgNO₃染色,1.5% NaOH(含0.4% HCHO)显色,拍照分析。

1.4 测序及Sox基因的分析 对经菌落PCR和SSCP分析筛选出的不同阳性克隆,委托上海基康生物技术公司进行全自动测序;采用Blast方法,联机与GenBank进行DNA序列相似性检索。由此命名乌梢蛇Sox基因(Sox of *Zaocys dhumnades*,简称为ZDSox),赤链蛇Sox基因(Sox of *Dinodon rufozonatum*,简称为DRSox)。

2 结果与分析

2.1 PCR扩增结果 PCR扩增产物经2%琼脂糖凝胶电泳后显示,发现所研究的两种蛇雌雄个体均扩增出一条带,且带型一致,大小约为220 bp左右,与阳性对照(人的男性)扩增带一

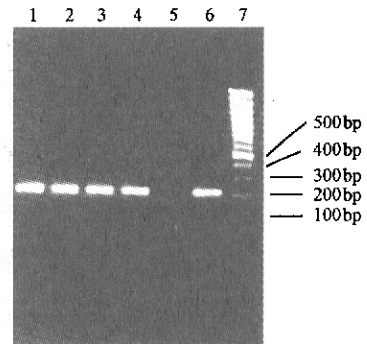


图1 两种蛇Sox基因PCR扩增结果

1,2. 乌梢蛇♀、♂; 3,4. 赤链蛇♀、♂; 5. 女; 6. 男;
7. 100 bp ladder

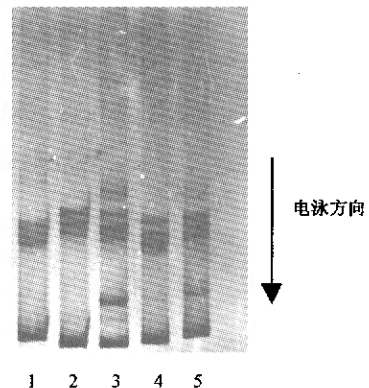


图2 两种蛇Sox基因SSCP分析结果

1. 男; 2,3. 乌梢蛇♀、♂; 4,5. 赤链蛇♀、♂

致,而阴性对照(人的女性)未扩增出带(图1)。此结果初步说明在这检测的两种蛇中存在有与人 SRY 同源的基因。

2.2 SSCP 分析的结果 SSCP 分析结果显示,尽管两种蛇类 Sox 基因的 PCR 扩增片段大小与人的相同,但该基因片段的单链迁移率有较大差异。此外,这两种蛇种间的迁移率有一定差异,种内雌雄个体间也略有差异(图2),SSCP 结果进一步说明了蛇类基因组中存在有人的 SRY 基因的同源基因,且该基因序列在雌雄个体中可能有性别差异性。

2.3 乌梢蛇和赤链蛇的 Sox 基因 经菌落 PCR 和 SSCP 分析,从乌梢蛇和赤链蛇的雄性个体中分别筛选到与人 SOX 基因单链泳动速率不同的阳性克隆。测序后,采用 Blast 方法,联机与 GenBank 进行 DNA 序列相似性检索,根据其与人 SOX 基因的相似性分别命名为 ZDSox3, DRSox3(两种蛇 Sox3 序列完全一样,其雌性个体未发现 Sox3 基因)。其 DNA 序列与 SOX3 的同源性比较(图3),与 SRY 的同源性比较(图4)。

```

SOX3      AAACGGCCCATGAACGCCTTCATGGTATGGTCCC GCGGGCAGCGGCGCAAATGGCCCTG
ZDSox3    AAGCGACCCATGAATGCGTTCATCGTGTGGTCCC GGGGCCAGCGTCGCAAGATGGCCCAA
DRSox3    AAGCGACCCATGAATGCGTTCATCGTGTGGTCCC GGGGCCAGCGTCGCAAGATGGCCCAA
          **#**#*****#**#**+*****+*#*****+**+*****+*****#*****+##
SOX3      GAGAACCCCAAGATGCACAATTCTGAGATCAGCAAGCGCTTGGGCGCCGACTGGAAACTG
ZDSox3    GAGAACCCCAAAATGCATAACTCGGAGATCTCCAAGCGCCTGGGCGCCGACTGGAAACTG
DRSox3    GAGAACCCCAAAATGCATAACTCGGAGATCTCCAAGCGCCTGGGCGCCGACTGGAAACTG
          *****#*****#**#**+*****+*****#*****#*****#*****
SOX3      CTGACCGACGCCGAGAAGCGAACATTCATCGACGAGGCCAAGCGACTTCGCGCCGTGCAC
ZDSox3    CTGAGCGACGCCGAGAAAAGGCCCTTCATCGACGAGGCCAAACGCTTGC GCGCCGTCCAC
DRSox3    CTGAGCGACGCCGAGAAAAGGCCCTTCATCGACGAGGCCAAACGCTTGC GCGCCGTCCAC
          ****+*****#**#**+*****+*****#**#**+*****+*****
SOX3      ATGAAGGAGTATCCGGACTACAAGTACCGACCGCGC
ZDSox3    ATGAAGGAATATCCGGACTACAAGTATCGACCTCGT
DRSox3    ATGAAGGAATATCCGGACTACAAGTATCGACCTCGT
          *****#*****#*****#*****+**#

```

图3 ZDSox3、DRSox3 与 SOX3 的同源性比较
* 表示相同; # 表示转换; + 表示颠换

3 讨论

3.1 Sox3 及其与 SRY 基因的关系 Sox3 基因位于哺乳动物的 X 染色体上, SRY 基因位于 Y 染色体上;在 Sox 基因家族中没有哪一个基因

比 Sox3 更接近于 SRY,现已推断 Sox3 和 SRY 可能原本是一对等位基因,SRY 是从 Sox3 进化而来^[15]。关于 Sox3 的作用,现在较为广泛接受的观点是 SRY 与 Sox3 相互作用调节 Sox9,Sox9 是与性别决定直接相关的基因,它的表达与否直

```

SRY      AAGCGACCCATGAACGCATTCATCGTGTGGTCTCGCGATCAGAGGGCGAAGATGGCTCTA
ZDSox3   AAGCGACCCATGAATGCGTTCATCGTGTGGTCCCAGGGCCAGCGTCGCAAGATGGCCAA
DRSox3   AAGCGACCCATGAATGCGTTCATCGTGTGGTCCCAGGGCCAGCGTCGCAAGATGGCCAA
*****#*****#*****#**+*##**+*+*****#**+*
SRY      GAGAATCCCAGAATGCGAAACTCAGAGATCAGCAAGCAGCTGGGATACCAGTGGAAAATG
ZDSox3   GAGAACCCAAAATGCATAACTCGGAGATCTCCAAGCGCCTGGGCGCCGACTGGAAACTG
DRSox3   GAGAACCCAAAATGCATAACTCGGAGATCTCCAAGCGCCTGGGCGCCGACTGGAAACTG
*****#*****#*****#*****#*****#*****#*****#*****#*****#
SRY      CTTACTGAAGCCGAAAAATGGCCATTCTTCCAGGAGGCACAGAAATTACAGGCCATGCAC
ZDSox3   CTGAGCGACGCCGAGAAAAGGCCCTTCATCGACGAGGCCAAACGCTTGCAGCGCCGTCAC
DRSox3   CTGAGCGACGCCGAGAAAAGGCCCTTCATCGACGAGGCCAAACGCTTGCAGCGCCGTCAC
**+*+##**+*****#**+*****+*****+*****+*****+##+##+**###+**#**+****
SRY      AGAGAGAAATACCCGAATTATAAGTATCGACCTCGT
ZDSox3   ATGAAGGAATATCCGGACTACAAGTATCGACCTCGT
DRSox3   ATGAAGGAATATCCGGACTACAAGTATCGACCTCGT
*+##**#*****#**#**#*****#*****#*****#*****#*****#*****#*****#

```

图 4 ZDSox3、DRSox3 与 SRY 基因的同源性比较

* 表示相同; # 表示转换; + 表示颠换

接决定睾丸发育与否;在雄性中,SRY 抑制 Sox3, Sox9 没有 Sox3 的抑制得以发挥作用,诱导睾丸发育;在雌性中,无 SRY, Sox3 产物抑制 Sox9,因而无睾丸发育^[16,17]。SOX3 在人的不同组织中广泛表达,SRY 基因只在睾丸组织中表达;Sox3 基因在进化过程中是高度保守的,而 SRY/Sry 基因即便是在亲缘关系很近的物种间也有较大差异,这两个方面提示 Sox3 是 SRY 的祖先基因^[16]。SRY 基因作为 Sox3 基因的变异形式出现并获得在睾丸发育过程雄性特异的作用^[16]。在乌梢蛇和赤链蛇的雄性个体中存在 Sox3,从侧面暗示了 Sox3 可能是 SRY 的祖先基因。从图 3 可以得到 ZDSox3 和 DRSox3 与 SOX3 有 34 个碱基不同,其中 17 个发生了转换(A 与 G,C 与 T 互换),17 个发生了颠换。从图 4 可以得到 ZDSox3 和 DRSox3 与 SRY 基因有 54

个碱基不同,其中 25 个发生了转换(A 与 G,C 与 T 互换),29 个发生了颠换。

3.2 两种蛇类性别决定机制探讨 爬行动物性别决定机制极其复杂,存在有基因型性别决定(GSD)和环境型性别决定(ESD)等多种类型,ESD 中又以 TSD(temperature dependent sex determination)为普遍,这在龟鳖目^[8,9]、鳄目^[19]以及蜥蜴^[7]中均有报道。据不完全统计^[20],在现存的 6551 种爬行动物中,已有一千多种做过核型分析,在这些核型中,有 27% 的种类属于基因型性别决定机制,其中 338 种有异型性染色体组成,另外 47 种为同型性染色体。爬行动物中进行 ESD 检测的种类仅有 115 种,已证实有 94 种为 ESD 类型的物种,均无异型性染色体的分化。一般认为,没有性别染色体的分化,可能是 TSD 机制的共同特征,也就是说,具 TSD 机制的

种类,雌雄间具遗传上的同质性。乌梢蛇和赤链蛇染色体的研究资料显示^[10,11],两种蛇雌雄个体均有异型性染色体的分化。迄今,有关游蛇科其它种类核型的分析结果,大多认为雌雄间具有性别染色体的分化。孵化实验也表明,赤链蛇孵化温、湿度对孵化成功率和幼体性别无显著影响^[21]。故多数学者认为,蛇应属 GSD 机制。本文 SSCP 及序列分析的结果发现蛇雌雄个体 Sox 基因的确有差异,从分子水平上证实了两种蛇的性别决定属 GSD 机制。

参 考 文 献

- [1] Sinclair A H, Betra 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 Res*, 1992, **120**: 2 887.
- [3] Pevny L H, Lovel L. Sox genes find their feet. *Curr Opin Genet Dev*, 1997, **7**(3): 338 ~ 344.
- [4] Capel B. Sex in the 90s: SRY and the switch to the male pathway. *Annu Rev Physiol*, 1998, **60**: 497 ~ 523.
- [5] Schilham M W, Moerer P, Cumano A, *et al.* Sox4 facilitates thymocyte differentiation. *European Journal of Immunology*, 1997, **27**(5): 1 292 ~ 1 295.
- [6] Ahn S G, Cho G H, Jedng S Y, *et al.* Identification of cDNAs for Sox4, an HMG-BOX protein and a novel human homology of yeast splicing factor SSF-1 differentially regulated during apoptosis induced by prostaglandin A2/delta 12-OGJ2 in Hep3B cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1999, **260**(1): 216 ~ 221.
- [7] Viets B E. Sex determining mechanism in squamate reptiles. *Expe Zool*, 1994, **270**: 45 ~ 46.
- [8] 聂刘旺,单祥年,郭超文等.平胸龟 Sox 基因的克隆和序列分析. *激光生物学报*, 2000, **9**(2): 106 ~ 109.
- [9] 聂刘旺,单祥年,汪鸣等.中华鳖 4 个 Sox 基因保守区的序列分析. *水生生物学报*, 2001, **25**(3): 245 ~ 250.
- [10] 杨友金,黄美华,曲韵芳.游蛇亚科四种蛇类核型的比较. *两栖爬行动物学报*, 1986, **5**(1): 30 ~ 33.
- [11] 郭超文.安徽沿江地区 4 种蛇的染色体组型、C 带和 Ag-NORs 研究. *应用与环境生物学报*, 1999, **5**(1): 50 ~ 54.
- [12] Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, *et al.* Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single strand conformation polymorphism. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989a, **86**: 2 766 ~ 2 770.
- [13] Spotila L D, Kaufer N F, Theriot E, *et al.* Sequence analysis of the ZFY and sox genes in the turtle, *Chelydra serpentina*. *Molecular Phylogenetic and Evolution*, 1994, **3**(1): 1 ~ 9.
- [14] 聂刘旺,单祥年,郭超文等.两种龟类 Sox 基因的 PCR 扩增及 SSCP 分析的研究. *应用与环境生物学报*, 1999, **5**(4): 378 ~ 381.
- [15] 周荣家.参与发育的基因家族. *遗传*, 2001, **23**(1): 86 ~ 88.
- [16] Jennifer A, Marshell G. Evolution of the mammalian Y chromosome and sex-determining genes. *Exp Zool*, 1998, **281**: 472 ~ 481.
- [17] 张悦,鲁晓晔,单祥年.性别决定基因的研究进展. *遗传*, 2000, **22**(5): 328 ~ 330.
- [18] Foster J W, Graves J A M. An SRY-related sequence on the Marsupial X chromosome: implications for the evolution of the mammalian testis-determining gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91**: 1 927 ~ 1 931.
- [19] Coriat A, Valleley M E, Mark W J, *et al.* Chromosomal and temperature-dependent sex determination: the search for a conserved mechanism. *J Exp Zool*, 1994, **270**: 112 ~ 116.
- [20] Janzen J F. Environmental sex determination in reptiles: ecology, evolution, and experimental design. *Quar Rev Biol*, 1991, **66**(2): 149 ~ 179.
- [21] 张永普,计翔.火赤链游蛇卵孵化的进一步研究兼孵化水环境的影响. *动物学报*, 2002, **48**(1): 35 ~ 43.