

PCR 扩增泥鳅和大鳞副泥鳅 SRY 盒基因*

常重杰 周荣家 余其兴

(武汉大学生命科学学院 武昌 430072)

摘 要 以特异扩增人 SRY 基因保守区的一对引物,研究了泥鳅和大鳞副泥鳅基因组中 SRY 盒基因的扩增。结果表明,该引物可以在泥鳅中扩增出四条带,其长度分别为 200,550,940 和 1 000bp。在大鳞副泥鳅中扩增出三条带,大小为 200,550 和 900bp。经 Southern 杂交显示出二者的阳性带为 200 和 550bp。阳性带在雌雄个体间和两个物种间无差异。

关键词 SRY 盒基因 泥鳅 大鳞副泥鳅

世界上现存鱼类多达 20 000 种,是脊椎动物中分布最广,种类最多的类群。在脊椎动物的系统进化中,鱼类处于承前启后的关键地位。与高等脊椎动物相比,其性别决定具有原始性和可塑性。深入研究其性别决定机制,对于水

产养殖来说,具有重要的实用价值。因为许多鱼类雌雄之间的经济性状如生长率等存在差

* 本研究由霍英东基金资助;

第一作者介绍:常重杰,男,32 岁,副教授,遗传学博士;

收稿日期:1996-01-02,修回日期:1997-06-03

异,因此通过控制性别的方法专门生产全雌或全雄鱼苗进行单性养殖可以提高经济效益。同时,鱼类的性染色体分化处于萌芽状态,在目前已进行过核型及带型考察的鱼类中,仅有少数种类具有异于探讨脊椎动物中性别相关基因及性染色体进化的机制。

1990年 Sincliar 等人分离出了人的睾丸决定基因(Sex-related Region of Y, SRY),是性别决定及分化机制研究领域的一个重大突破,使人们对于性别决定机制的认识有了较大进展^[1]。SRY 基因具有高度的进化保守性,在为数众多的动物物种中都已发现了 SRY 的同源基因,把同 SRY 保守区 HMG 基序具有 60% 以上相似性的基因统称为 SRY 盒基因即 SOX 基因(SRY-box gene)^[2]。SRY 盒基因的发现及其在进化中的保守性为性别决定机制及其在个体发育过程中的作用提出了新的研究课题。

泥鳅(*Misgurnus auguilicaudatus*)和大鳞副泥鳅(*Paramisgurnus dabryanus*)是我国常见的鲤形目鳅科鱼类,具有较近的亲缘关系,曾被列为同一属。我们在进行银染和 C 带研究时发现大鳞副泥鳅为 ZZ/ZW 性别决定,而泥鳅中未发现异形性染色体。为了检测近缘种在 SRY 盒基因方面是否存在差异,我们考察了这两个物种中 SRY 盒基因的分布状况。

1 材料和方法

1.1 材料 泥鳅和大鳞副泥鳅购自武汉市集贸市场。扩增引物为本实验室参照已知人 SRY 基因序列合成,其 DNA 序列为:引物 1: 5' TGAAGCGACCCATGAACG3'; 引物 2: 5' CGACGAGGTCGATACTTA3'。探针为由 Dig-dUTP 标记的含人 SRY 基因保守区的重组质粒 BS-SRY,由法国 Berta 博士惠赠。Dig 标记和检测试剂盒购自 Boehringer Mannheim 公司, TaqDNA 聚合酶和 dNTP 等购自华美生物工程公司。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取和纯化

抽取实验鱼血液, ACD 抗凝,离心收集细胞;经 SDS 裂解和蛋白酶 K 在 50℃ 消化过夜,酚/酚-氯仿/氯仿纯化,乙醇沉淀,干燥, TE 溶解后,用 RNaseA 消化 RNA,再经酚-氯仿/氯仿纯化,乙醇沉淀和干燥后溶解于 TE 中, 4℃ 存放备用。

1.2.2 PCR 扩增

取基因组 DNA 约 100ng, 200μmol/L dNTP, 引物各 0.4μmol/L, IU 单位 Taq DNA 聚合酶,在 20μl 反应体系中进行 PCR 扩增。扩增条件为: 94℃ 30 秒, 48℃ 40 秒, 72℃ 80 秒,循环次数为 35 次。最后一个循环延伸时间为 7 分钟,扩增产物置于 4℃ 保存备用。

1.2.3 Southern 印迹杂交

PCR 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离后转移于 Hybond-N 尼龙膜上,与 Dig 标记的人 SRY 探针进行杂交,实验条件参照 Boehringer Mannheim 公司操做手册进行。

2 结果

我们使用的这一对引物特异扩增人的 SRY 基因保守区约 200bp 的片段。以泥鳅的基因组 DNA 为模板在雌性及雄性个体中可见一致的四条扩增带,其大小分别为 200, 550, 940 和 10 000bp。扩增大鳞副泥鳅基因组 DNA 时,在雌性及雄性个体可见大小一致的三条带,其大小分别为 200, 550, 和 900bp(见图版 I A)。为了确定这对引物在二者中扩增出的 DNA 片段与人 SRY 基因的同源性,我们又将扩增产物电泳后,经 Southern 转移于 Hybond-N 膜上,与经随机引物法以 Dig-dUTP 标记的人 SRY 基因探针进行 Southern 印迹杂交。结果显示:在二个物种的雌性及雄性个体中,均出现了二条带,即 200 和 550bp 这两条带。而泥鳅中的另外二条带和大鳞副泥鳅中的另外一条带无杂交信号(见图版 I B)。该研究初步说明在泥鳅和大鳞副泥鳅中存在人的 SRY 基因的同源基因,而且这些基因在雌雄个体间及二个物种间差异不大。

3 讨论

目前已鉴定出了两类具有 HMG-box 的基因;一类含有多个 HMG-box,即高迁移率级(High Mobility Group, HMG)蛋白质基因,其产物以非序列特异性的方式与 DNA 结合;另一类仅含有一个 HMG-box,即 SRY 盒基因,其产物以序列特异方式与 DNA 结合,在发育过程中起转录调控作用^[3]。我们扩增出的约 200bp 的片段与阳性对照中的片段是一致的,这可能是泥鳅和大鳞副泥鳅中人 SRY 盒基因的同源基因。另一条阳性带,其分子量约为 550bp,这可能是另一类具有 HMG 盒的基因。周荣家等人在扩增黄鳍基因组 DNA 时也扩增出了一条约 550bp 的阳性片段,可能也属于此类^[4]。

大鳞副泥鳅原订种名为大鳞泥鳅(*Misgurnus mizolepis*),与泥鳅同归入泥鳅属,后来根据陈景星(1979)研究结果,原订种名大鳞泥鳅较泥鳅属鱼类在形态解剖上已有明显差异,其基枕骨的咽突已在背大动脉下愈合,下咽骨发达变短,中央部分变宽,咽齿呈扁白状,因此将其划归副泥鳅属。泥鳅属和副泥鳅属为进化上亲缘关系十分近的两个属,后者占有更高的分类地位^[5]。从 PCR 扩增产物看,泥鳅中为四条带,其中 940 和 1 000bp 两条带不存在于大鳞副泥鳅中。大鳞副泥鳅中为三条带,其中 900bp 为其所特有,说明两种泥鳅在分子水平上也存在明显差异。但就 Southern 印迹结果分析,这 3 条带是非特异扩增产物,二者在 SRY 盒基因方面未见差异。

目前已在哺乳动物、鸟类、爬行类、两栖类及昆虫中已鉴定出了至少 40 个不同的 Sox 基因,其中只有少数进行了详细的研究^[6]。但性别专一的 SRY 基因只见于哺乳类雄性中。因此 Spotila 提出,在性染色体进化的早期, SRY 盒基因散布于常染色体上,以后经过染色体重排逐步集中于某一特定染色体上,最后形成了与性别决定直接相关的性染色体。由于 SRY 基因存在于原兽亚纲及真兽亚纲中说明 SRY 盒基因演化为 SRY 是发生于哺乳类形成之

前^[7]。我们曾对几种鱼进行过 Sox 基因分析,它们或是具有异形的性染色体(刺鳅)或具有自然性转变(黄鳍),或是不具有异形性染色体(斑马鱼、胡子鲶),都未发现性别特异的扩增带^[4,8]。这种现象意味着 SRY 盒基因也广泛存在于鱼类中,但由于其进化地位较低,其 SRY 盒基因尚未集中于一特定染色体上,因而,大部分鱼类中无异形性染色体。在进化过程中个别种类开始进化出性染色体,这表现在鱼类性染色体类型的多样性。现在一般认为, X 和 Y 染色体的进化可能来源于同一对祖先染色体。X 和 Y 染色体的共同祖先染色体,经历多次由常染色体到性染色体的转座、重排及 Y 染色体上基因的剪切和染色体上相应部分的失活, Y 染色体上异染色质的积聚等步骤,才逐步形成了现在的 X 和 Y 染色体。从进化上分析,原始的 SRY 基因与某一 Sox 基因(人类中可能为 Sox3)为等位基因,编码一种 DNA 结合蛋白质,可以在雌性及雄性胚胎发育过程中起作用,该基因位于尚未分化或部分分化的原始 X 和原始 Y 染色体上,尔后伴随着 Y 染色体的形成过程而获得雄性性别决定的关键功能,从而在 Y 染色体上保留下来^[2],而在其它较低等的脊椎动物中由于尚未完成上述 Y 染色体的分化,所以其雌雄个体基因组中的 Sox 基因基本一致,缺少性别特异的调控功能。

参 考 文 献

- 1 Sinclair, A. H., P. Berta, P. Palmer, 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 Jamie, W., J. A. Foster, G. Marshall. An SRY-related sequence on the marsupial X chromosome: implication for evolution of mammalian testis-determining gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, 91: 1927~1931.
- 3 Van-Houte, L. P. A., V. P. Chupina, M. Van-Der-Wetering. Solution of structures of the sequence specific HMG-box of the lymphocyte transcriptional activator Sox-4. *J. of Biological Chemistry*, 1995, 270(51): 30516~30524.
- 4 周荣家, 余其兴, 程汉华等. PCR 扩增黄鳍和刺鳅 SRY 盒基因. *科学通报*, 1996, 41(7): 640~642.
- 5 李康, 李渝成, 周敏. 两种泥鳅染色体组型的比较研究. 动

- 物学研究, 1983, 4(1): 75~82.
- 6 Connor, F., E. Wright, P. Denny: The sry-related HMG box-containing gene Sox6 is expressed in the adult testis and developing nervous system of the mouse. *Nucleic Acids Research*, 1995, 23(7): 3365~3372.
- 7 Spotila , D. Kaufer, E. Theriot. Sequence analysis of the ZFY and Sox genes in the turtle, *Chelydra serpentina*. *Molec. Phylogenet. Evol.* 1994, 3: 1~9.
- 8 周荣家, 余其兴, 程汉华. SRY 盒基因在斑马鱼和胡子鲇中的保守性分析. 遗传, 1996, 18(1): 1~3.

THE AMPLIFICATION OF SRY-BOX GENES IN THE GENOMIC DNA OF *MISGURNUS AUGUILLICAUDATUS* AND *PARAMISGURNUS DABRYANUS* BY PCR

CHANG Zhongjie Zhuo Rongjia YU Qixing

(College of Life Sciences, Wuhan University Wuchang 430072)

ABSTRACT Using the primers which specially amplify the conservative motif of Human SRY gene, we studied the PCR amplification of SRY-box (Sox) genes in genomic DNA of *Misgurnus auguillicaudatus* and *Paramisgurnus dabryanus*. The results showed that 4 bands present in the PCR products of *Misgurnus auguillicaudatus*, their length was 200, 550, 940 and 1 000bp. 3 bands present in *Paramisgurnus dabryanus*, they were 200, 500 and 900bp, respectively. Southern blotting indicated that the 200 and 550bp bands were specially positive. There was no difference between male and females, no differences were found between these two species.

KEY WORDS Sox gene *Misgurnus auguillicaudatus* *Paramisgurnus dabryanus*

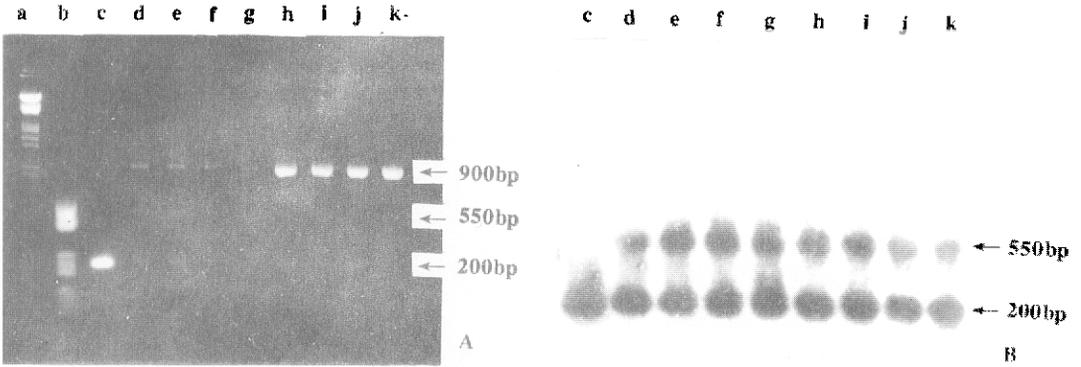
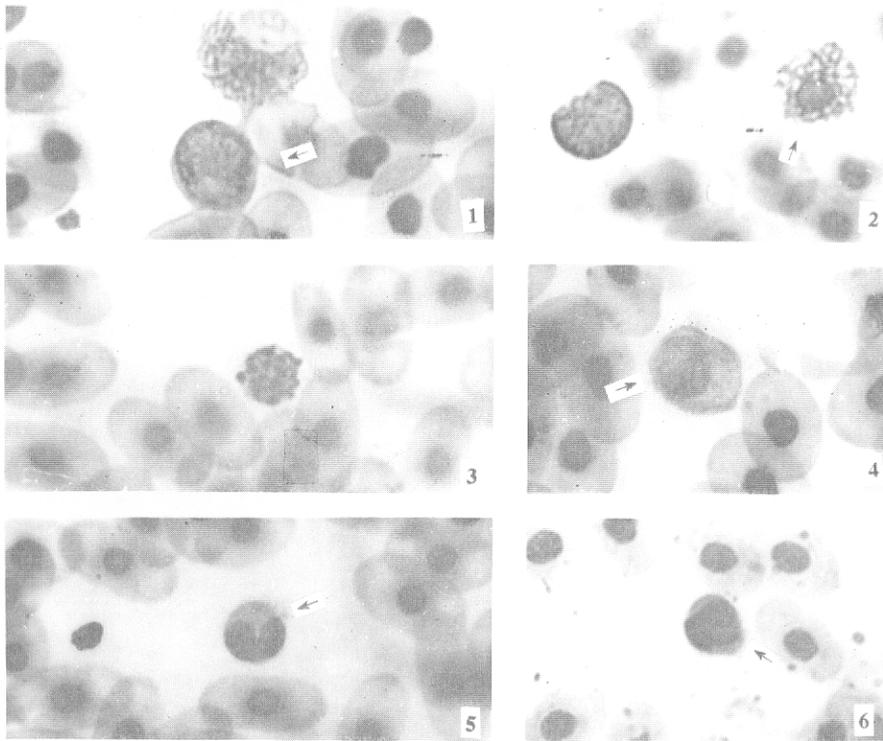


图 A 为基因组扩增结果;图 B 为 Southern 印迹杂交结果

Fig. A PCR amplification result Fig. B Southern blotting result

a 为 λ /HindIII + EcoRI ; b 为 pBR322/HaeIII ; c 为阳性对照; d, e 为雌性泥鳅; f, g 为雄性泥鳅; h, i 为雌性大鳞副泥鳅; j, k 为雄性大鳞副泥鳅 a. λ /HindIII + EcoRI ; b. pBR322/HaeIII ; c. positive control; d, e. female *Misgurnus anguillicaudatus*; f, g. male *Misgurnus anguillicaudatus*; h, i. female *Paramisgurnus dabryanus*; j, k. male *Paramisgurnus dabryanus*



图版说明见文后 (Explanation at the end of the text)

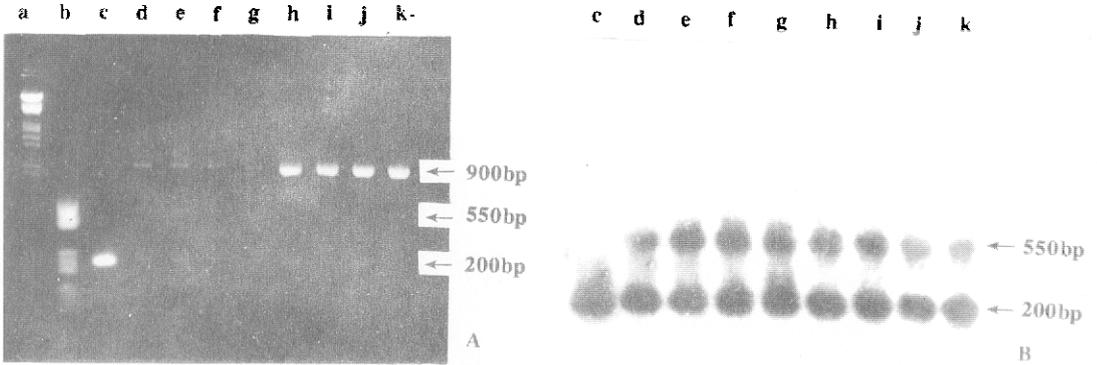
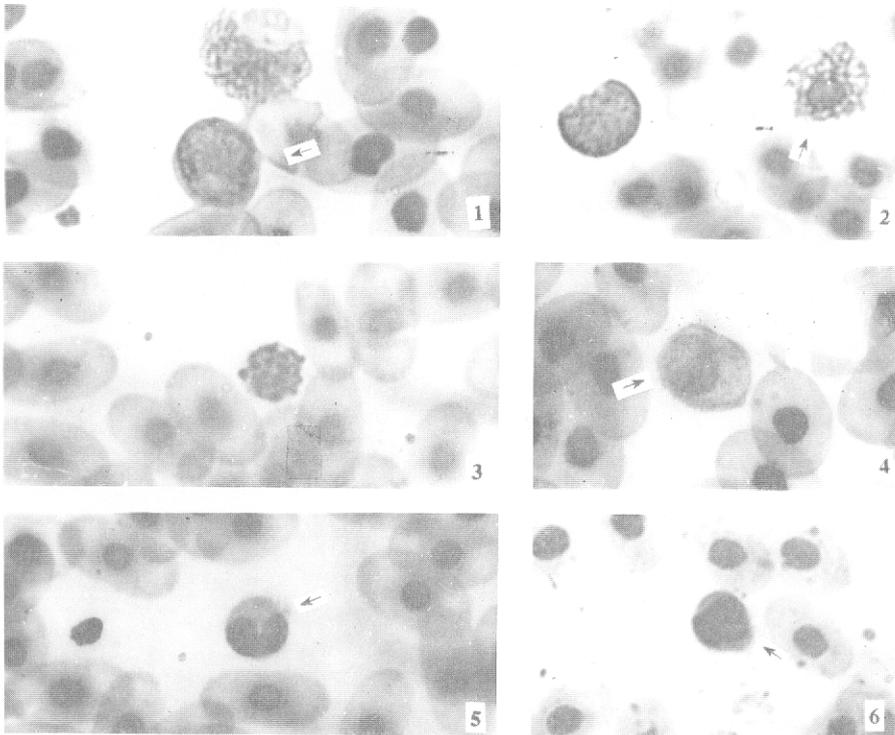


图 A 为基因组扩增结果;图 B 为 Southern 印迹杂交结果

Fig. A PCR amplification result Fig. B Southern blotting result

a 为 λ /HindIII + EcoRI ; b 为 pBR322/HaeIII ; c 为阳性对照; d, e 为雌性泥鳅; f, g 为雄性泥鳅; h, i 为雌性大鳞副泥鳅; j, k 为雄性大鳞副泥鳅 a. λ /HindIII + EcoRI ; b. pBR322/HaeIII ; c. positive control; d, e. female *Misgurnus anguillicaudatus*; f, g. male *Misgurnus anguillicaudatus*; h, i. female *Paramisgurnus dabryanus*; j, k. male *Paramisgurnus dabryanus*



图版说明见文后 (Explanation at the end of the text)