

中华鳖 7 种组织 SOX 基因表达的 RT-PCR 分析*

聂刘旺 单祥年 汪 鸣 郭超文 鲁晓萱

(安徽师范大学生命科学学院, 安徽芜湖 241000)
(南京师范大学生命科学学院, 南京 210097)

关键词 中华鳖 RT-PCR 序列分析 基因表达

SOX 家族是由一类 SRY (sex determination region of Y chromosome) 相关基因构成的基因家族, 所有成员的共同特点是编码的蛋白质有一 HMG box DNA 结合域 (Donald *et al.*, 1997)。人和小鼠的不同细胞以及不同组织中的 SOX/SOX 表达研究显示该基因有充分的时、空表达特异性 (Gubbay *et al.*, 1990; Koopman *et al.*, 1990); 其突变分析和胚胎发育不同时期的表达研究还表明该基因在神经系统发育以及胚胎发育的多个过程中起关键作用 (Koopman *et al.*, 1991)。因此, SOX 基因的研究对于揭示动物性别决定的分子机制、胚胎发育的基因调控等都有十分重要的意义。

作者通过对中华鳖 (*Pelodiscus sinensis*) 卵的人工孵化研究, 认为中华鳖的性别决定属于温度依赖型性别决定 (temperature-dependent sex determination, TSD) 机制, 采用特异 SRY 基因的引物进行 PCR 扩增, 显示其雌、雄个体中均存在 SRY 的同源基因 SOX (聂刘旺等, 2001)。迄今, 在爬行动物中, 进行过不同组织 SOX 基因表达研究的仅见密西西比鳄 (*Alligator mississippiensis*) (Coriat *et al.*, 1994), 而中华鳖的有关研究则未见有报道。本文通过 RT-PCR 技术, 研究了中华鳖七种组织 SOX 基因的表达, 并克隆分析了睾丸、脑、脾、心和肾五种组织中表达的基因序列。本研究将为揭示中华鳖 SOX 基因表达的时、空特异性及其作用提供线索。

1 材料和方法

1.1 实验材料

实验动物中华鳖 3 , 3 均为性成熟个体。活体解剖鉴定性别后, 迅速取肝脏、肌肉、脑、睾丸、

卵巢、脾脏和心脏等组织, 置液氮罐中冻存备用。

1.2 mRNA 提取和 RT-PCR 反应

mRNA 的提取采用 Boehringer mannheim 公司的 mRNA 提取试剂盒进行。RT-PCR 反应采用 Boehringer Mannheim 试剂盒 (One tube RT-PCR System,) , PCR 扩增 SOX 基因和测序用引物序列为: Rg-3: 5'-GGTCAA GCGACCCATGA A (C/T) GC (AGCT) TT-3 , Rg-4: 5'-AGGTG GTACTT (AG) TA (AG) T (CT) (AGCT) GG (AG) TA-3 。该引物可特异扩增人 HMG box 内的保守序列, 扩增片段长为 217 bp。RT-PCR 反应在 PE2400 型扩增仪上进行, 扩增体系为 50 μl, 含 25 pmol/L 每引物, 2.0 mol/L MgCl₂, AMV 反转录酶和 Tth polymerase 各 2 U。反转录条件为: 50 热循环 40 min 进行第一链的合成, 接着 94 2 min 使杂交双链解开。PCR 循环条件为: 94 40 s, 45 1 min, 68 1 min, 5 个循环, 接着 94 40 s, 52 1 min, 68 1 min, 35 个循环, 再 72 延伸 15 min, 4 保存。

PCR 结束后, 取 5 μl 产物用 2% 凝胶进行检测, 拍照。余下产物用纯化试剂盒纯化, 纯化方法参照产品手册进行。

1.3 SOX 基因的克隆和序列分析

选用来自睾丸、脑、脾、心和肾五种组织中的 PCR 产物进行克隆分析。克隆用载体为 pEGM-T, T4 DNA 连接酶, 采用菌落 PCR 方法筛选阳性克隆。细菌的转化参照《分子克隆》方法。阳性克隆选出后, 再分别挑取一环接种到 5 ml LB 液体培养基中, 37 摆床 (250 r/min) 培养 12 h。培养产物用小制备法提取质粒。

SOX 基因片段的测序采用 PE 公司的测序试剂盒, 在 ABI 自动测序仪 (373 型) 上进行测序。

1999-12-05 收稿, 2001-06-25 修回

* 安徽省和江苏省自然科学基金资助课题 (No. 97412002, No. 97506112)

第一作者简介 聂刘旺, 男, 37 岁, 博士, 教授。研究方向: 动物分子遗传学。E-mail: lwnie@mial.ahwhptt.net.cn

2 结 果

2.1 中华鳖不同组织 RT-PCR 扩增结果

中华鳖雌雄个体七种组织的 RT-PCR 扩增结果见图 1。七种组织中，睾丸、脑、肾、心和脾 5 种组织中均有 SOX 基因的表达。其中，睾丸、脑和脾三种组织中表达量最高，而心和肾组织中表达稍弱。肌肉、肝脏组织和雌性个体的卵巢中未见有 SOX 基因的表达。

试验中，雌雄个体各重复 3 次，均可见较一致的结果。

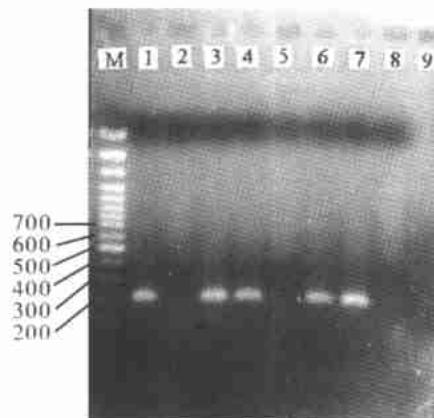


图 1 中华鳖 7 种组织 RT-PCR 扩增结果

Fig. 1 RT PCR pattern in difference tissues of Chinese soft-shelled turtle

M: 100 bp 梯带标记核酸 (Ladder) 1: 睾丸 (Testicle)
2: 卵巢 (Ovary) 3: 脑 (Brain) 4: 心脏 (Heart)
5: 肝 (Liver) 6: 肾 (Kidney) 7: 脾 (Spleen)
8: 肌肉 (Muscle) 9: 阴性对照 (Contrast)

2.2 阳性克隆的测序结果

对筛选出阳性克隆进行了测序，结果表明，在睾丸组织中表达的是 TSSOX1、TSSOX4、TSSOX5 和 TSSOX9 基因，而在脑组织中表达的是 TSSOX2 和 TSSOX4 基因，脾组织和心脏组织中表达的是 TSSOX4 基因，肾组织中表达的是 TSSOX2 和

TSSOX3 (见图 2)。

3 讨 论

3.1 中华鳖不同组织 SOX 基因表达的特异性

本项研究结果表明，在中华鳖的成体中，SOX 基因在脑、心肌、肾脏、脾脏和雄性个体的睾丸组织中均有不同程度的表达，而在肌肉、肝脏和雌性个体的卵巢中则无表达，显示该基因具有一定的组织表达特异性。Coriat 等 (1994) (Western *et al.*, 1999) 研究了美国密西西比鳄 (*Alligator mississippiensis*) 不同组织中 SOX 基因的表达，该种类为 TSD 型性别决定机制，他们从发育胚胎不同组织中提取总 mRNA，然后采用 Northern 杂交技术进行分析，结果显示，SOX 基因在脑、肾和睾丸等组织中有表达，而肝脏组织中则无表达，也显示有一定的组织特异性。在人和高等哺乳动物中，SR Y/Sry 基因仅在睾丸组织中表达，而在其它组织中则无表达。爬行动物和哺乳动物 SR Y 相关基因表达的差异性，暗示了 SOX 基因在性别决定和胚胎发育的作用中可能担负有多种不同的功能。

3.2 关于 SOX 基因的功能

SOX 基因家族是一类以 SR Y 基因为代表的一个新的控制发育的基因家族。这类基因的功能依赖于一个 DNA 的结合基序称为 HMG box 编码的产物，可能是一类转录调控因子，推测与性腺的功能有关或是具有多项促进发育的功能 (Pevny *et al.*, 1997)。如大鼠的 SOX3 基因显示在精细胞减数分裂的后期有大量的表达，且同 Sry 基因一样可识别 (AACAA T) 特异序列，因而被认为其与精子的形成有关。人类 SOX4 基因可在脑、心和睾丸组织中大量表达，推测其功能不仅与性腺功能有关，而且可能在神经系统功能中有重要作用。最近的一项研究表明，小鼠的 SOX9 基因可以在两方面起到至关重要的作用，其一是具有性别决定的作用，另一功能则显示在骨骼发育过程中 (Osaki *et al.*, 1999)。已知 SOX9 的突变会产生人类的成骨发育

```

TSSOX1: MVWSHQRRKLAL EYPSMRNSEICKQLGKQWKLTTDAEKL PFFQEAQQLQQMHIEN
TSSOX2: MVWSQIERRKIHRSPPRTCTTPRSKRLGKRWKLKDSDKI PFIREAERLRLKHIAN
TSSOX3: MVWSQIERRKIMEQSPDMHNSEISKRLGKRWKLKDSDKI PFIREAERLRLKHMED
TSSOX4: MVWSQIERRKIMEQSPDMHNAEISKRLGKRWKLKDSDKIPFIREAERLRLKHMAD
TSSOX5: MVWSQHERRKIMDQWPDMHNAEISKRLGRRWQLLQDSEKIPFVKEAERLRLKHMAD
TSSOX9: MVWSQNERRKIMDQWPDMHNSEISKRLGRRWQLLQDSEKIPFVKDGNAEAQAHGED

```

图 2 中华鳖 SOX 基因 HMG box 编码的氨基酸序列

Fig. 2 The HMG box coding amino acid sequence of SOX gene of Chinese soft-shelled turtle

不全病 (campomelic dysplasia, CD)。而在这类病人中，通常发生 XY型性反转，暗示其同时具有性别决定的作用。本研究所分离得到的 6 条 SOX 基因中，TSSOX4 与人类 SOX4 基因相近，编码的氨基酸序列相似性达到 98%；TSSOX1 和 TSSOX9 与人类 SOX9 基因相近，编码的氨基酸序列相似性达 75% 以上，与人类 SRY 基因的相似性也很高。

这种较高的同源性可能反映了它们在功能上的相似性，推测 TSSOX-1 和 TSSOX9 基因可能与中华鳖精细胞的发育和成熟有关；而 TSSOX4 在 3 种组织中均有表达，推测可能与细胞的生长和分化有关（如神经细胞和免疫细胞的分化）；TSSOX2 和 TSSOX3 的功能尚待进一步研究。

参 考 文 献 (References)

- Coriat, A. M., E. Valleley and W. J. Mark 1994 Chromosomal and Temperature Dependent sex determination: the search for a conserved mechanism. *J. Exp. Zool.* **270**: 112~116.
- Donald, M. B and K. K. H. Loung 1997 Sox9 directly regulates to the type^c collagen gene. *Nature Genetics* **16**: 174~178.
- Gubbay, J., J. Collignon and P. Koopman 1990 A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed gene. *Nature* **346**: 245~250.
- Koopman, P., A. Munsterberg and B. Capel 1990 Expression of a candidate sex determining gene cloning mouse testis differentiation. *Nature* **348**: 140~152.
- Koopman, P., J. Gubbay and N. Vivian 1991 Male development of chromosomal female mice transgenic for Sry. *Nature* **351**: 117.
- Nie, L. W., X. N. Shan, C. W. Guo and M. Wang 2001 The conservative region sequence analysis of four Sox genes in the *Trionyx sinensis*. *Acta Hydrobiologica Sinica* **25** (3): 23~28. [聂刘旺, 单祥年, 郭超文, 汪鸣 2001 中华鳖 4 个 Sox 基因保守区的序列分析. *水生生物学报* **25** (3): 23~28.]
- Osaki, E., Y. Nishina, J. Inazawa and N. G. Copeland 1999 Identification of a novel Sry-related gene and its germ cell-specific expression. *Nucleic Acids Res.* **27** (12): 2503.
- Pevny, L. H. and B. R. Lovell 1997 Sox gene find their feet. *Curr. Opin. Gene. Dev.* **7** (3): 338.
- Western, P. S., J. L. Harry, J. A. Graves and A. H. Sinclair 1999 Temperature-dependent sex determination: up regulation of SOX9 expression after commitment to male development. *Development Dynamics* **214** (3): 171.

外 文 摘 要 (Abstract)

RT-PCR ANALYSIS ON SOX GENE OF SEVEN TISSUES FROM THE CHINESE SOFT-SHELL ED TURTLE (*Pelodiscus sinensis*) *

NIE Liu-Wang SHAN Xiang-Nian WANG Ming GUO Chao-Wen LU Xiao-Xuan

(Life Science College, Anhui Normal University, Wuhu 241000, Anhui, China)

(Life Science College, Nanjing Normal University, Nanjing 210009, China)

In this paper, RT-PCR analysis on SOX gene of seven tissues from the Chinese soft-shelled turtle (*Pelodiscus sinensis*) was studied, and SOX gene fragments of expression from the testicle, brain, heart, kidney and spleen were cloned using RT-PCR products. The results show that SOX genes has specific expression in the testicle, brain, spleen, cardiac muscle and kidney and isn't expression in muscle, liver and ovary of female. The results of sequence reveal that the SOX genes of expression in the testicle are TSSOX1、TSSOX4 TSSOX5 and TSSOX9, and those are TSSOX2 and TSSOX4 in the brain, and this is TSSOX4 in the spleen and heart tissue, and those are TSSOX2 and TSSOX3 in the kidney tissue. This suggests that the SOX gene act important role not only on the sex determination, but also on the development of neural system, immunocyte system and the differentiation of male germ cell.

Key words Chinese soft-shelled turtle (*Pelodiscus sinensis*), RT-PCR, Sequence analysis, Gene expression

* This work was supported by Natural Science Foundation of Anhui and Jiangsu Science and Technology Committee Granted (No. 97412002, No. 97506112)