

文章编号: 1000-0615(2005)04-0478-04

斑节对虾 *Sox* 基因 HMG 盒的 PCR 扩增及 SSCP 分析

汪桂玲, 朱 琴, 李家乐

(上海水产大学生命科学与技术学院, 上海 200090)

摘要: *SRY* 基因是人类及哺乳动物睾丸决定因子的最佳候选基因, HMG 盒是 *SRY* 基因编码蛋白质的唯一功能区, 在性别决定中极其重要且高度保守, 许多进化程度上明显不同的物种中都能检测出 *SRY* 基因的 HMG 盒, 即 *Sox* 基因。斑节对虾是一种重要经济虾类, 其性别决定机制研究薄弱, 至今未找到性染色体。本研究根据人的 *SRY* 基因的 HMG 盒保守区的核苷酸序列, 设计了 1 对兼并引物, 通过 PCR 扩增出斑节对虾的 *Sox* 基因, 并对扩增产物进行 SSCP 分析。结果表明, 斑节对虾雌雄个体均存在 *Sox* 基因, 从雌雄个体中均扩增出约 350 bp 和 220 bp 两条基因片段, 推测其中 350 bp 片段含内含子, SSCP 结果显示斑节对虾内存在 *Sox* 基因家族的不同成员, 且雌雄存在差异。最后我们讨论了对虾性别决定可能的机制。

关键词: 斑节对虾; *Sox* 基因; HMG 盒; SSCP 分析; 性别决定

中图分类号: S917 文献标识码: A

PCR amplification and SSCP analysis of *Sox* gene HMG-box in *Penaeus monodom*

WANG Gui-ling, ZHU Qin, LI Jia-le

(College of Aquaculture Science and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: *SRY* (sex-determining region of the Y chromosome) gene plays a key role in sex determination in the mammal and some evidences suggest that *SRY* encodes the TDF (testis determining factor) that is required for male sex determination. *Sox* genes are closely related to the *SRY* and code for proteins with a characteristic DNA-binding motif known as *SRY*-type HMG (high mobility group) box. A large number of *Sox* genes have been found in a wide variety of species throughout the animal kingdom, from human to *Drosophila*. *Penaeus monodom* is an important economical species and its heteromorphic sex chromosomes have not been found. So far, little information is known about *P. monodom*'s molecular genetics of sex determination. In this paper, the technique of PCR is used to amplify the *Sox* genes of *P. monodom* with a pair of primers which specially amplify the conservation sequences of man HMG-box gene. In addition, the technique of SSCP (single strand conformation polymorphism) is used to analyze the amplification products. The results of PCR and SSCP analysis suggest: 1) The lengths of the fragments of PCR products are about 350 bp and 220 bp in both female and male shrimps. 2) There are *Sox* genes in these shrimps. 3) Introns are also found in *Sox* genes which is 350 bp. 4) There are different *Sox* genes in female and male shrimps. And the sex-determining mechanism of prawn is also discussed.

Key words: *Penaeus monodom*; *Sox* gene; high mobility group (HMG) box; single strand conformation polymorphism (SSCP) analysis; sex determination

动物的性别控制是生物技术的热点之一, 对虾的性别控制更是水产养殖高新技术研究中引入

注目的课题, 在斑节对虾 (*Penaeus monodom*) 中人为地改变其性别比率, 大大提高雌性对虾的比例,

收稿日期: 2004-09-21

资助项目: 上海市教委青年科研基金(03-127); 上海高校水产养殖 E-研究院资助(03E009); 上海市教委水产养殖重点学科基金和校级水产养殖重点学科基金(03-40)资助

作者简介: 汪桂玲(1974-), 女, 陕西蓝田人, 博士研究生, 从事水产动物种质资源与遗传育种的研究。E-mail: glwang@shfu.edu.cn

通讯作者: 李家乐, E-mail: jlli@shfu.edu.cn

这无疑是提高对虾养殖产量的一条非常有效的途径。但是到目前为止,对于斑节对虾性别分化和决定的机理尚不清楚。由于大多数虾蟹类染色体数目多且体积小(呈点状),核型分析困难,鉴定其性染色体并非易事,影响了虾蟹类性别决定方面的研究。目前,虾蟹类性别决定方面的研究多见于激素注射及促雄腺移植对其性别分化及性别控制的影响方面的基础研究^[1,2],性别相关基因的克隆少见报道,国内只有锯缘青蟹(*Scylla serata*) *Sox* 基因的初步报道^[3]。本文首次对斑节对虾的 *Sox* 基因 HMG 盒进行了研究,旨在为对虾类性别决定的分子机制、胚胎发育及 *Sox* 基因的进化等研究提供分子资料。同时为虾蟹类性别分化和决定的机理的研究提供新的思路,为加快虾蟹类单性化养殖奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

斑节对虾于2003年3月购自上海市杨浦区图门路农贸市场,性别按活体解剖检查确定,雌、雄各3只,均为性成熟个体。

1.2 实验试剂

蛋白酶K、平衡酚等购自北京鼎国生物技术有限公司, *Taq* 酶购自宝生物工程有限公司,引物由上海生工生物工程公司合成, *Sox* 基因引物序列为: P1: 5' - AAG CGA CCC ATG AA (CT) GC (AGCT) TT (CT) AT (AGCT) G - 3'; P2: 5' - ACG AGG TCG GTA (CT) TT (AG) TA (AG) T (CT) (AGCT) GG - 3'。

1.3 DNA 提取

取用无水乙醇固定的斑节对虾的肌肉,双蒸水冲洗,用经典酚-氯仿提取DNA,核酸蛋白仪检测DNA OD值,确定DNA的纯度、浓度。1%琼脂糖凝胶电泳分析DNA的质量。

1.4 PCR 反应体系

总体积为25 μL 含 2 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Mg}^{2+}$, 0.2 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTP, 0.4 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 引物, 100 ng 模板DNA, 0.4U *Taq* 酶。PCR反应程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 50 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 60 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 60 s, 35个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.5 SSCP 分析

采用6%非变性PAGE, TBE缓冲系统。取

PCR扩增产物5 μL 加入甲酰胺4 μL , 溴酚蓝指示剂2 μL , 混匀后95 $^{\circ}\text{C}$ 热变性8 min, 冰浴5 min, 每孔上样10 μL , 500 V 恒压电泳4 h, 0.2%硝酸银染色, 拍照分析。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增结果

用正常男性基因组DNA的扩增产物作阳性对照,并用标准Marker pUC19 DNA/*Msp*I 计算斑节对虾 *Sox* 基因长度,获得PCR产物的长度分别为350 bp、220 bp,雌雄均为2条带,且带型一致(图1),其中220 bp大小的片段与阳性对照扩增带一致,此结果初步说明了斑节对虾基因组中存在与人的SRY基因同源的基因。

2.2 SSCP 分析的结果

将PCR产物纯化后经T-A连接克隆,蓝白斑筛选重组转化子。随机挑选白斑,用小量制备法抽提质粒DNA,进行PCR-SSCP分析。结果350 bp片段的PCR产物获得了两种不一致的SSCP分型,来自雌性斑节对虾PCR产物SSCP分型有两种,一种2条带,另一种3条带,分别命名为S1基因、S2基因,来自雄性斑节对虾PCR产物SSCP分型一致,均有迁移率一致的2条带,和雌性斑节对虾的2条带型的迁移率一致,为S1基因。而220 bp片段的PCR产物在获得了三种不一致的SSCP分型,来自雌性斑节对虾PCR产物SSCP分型一致,均有迁移率一致的2条带,命名为S3基因,来自雄性斑节对虾PCR产物SSCP分型不一致,分别有3条带和4条带,分别命名为S4基因、S5基因。这些结果提示在斑节对虾内存在 *Sox* 基因家族的不同成员,且雌雄存在差异, S2基因、S3基因为雌性斑节对虾所特有, S4基因、S5基因为雄性斑节对虾所特有, S1基因没有性别特异性。

3 讨论

3.1 斑节对虾 *Sox* 基因的PCR 扩增结果分析

SRY基因是人类及哺乳动物睾丸决定因子TDF的最佳候选基因。SRY蛋白含有204个氨基酸,其中1个约79个氨基酸区域即HMG盒是SRY基因编码蛋白的唯一功能区^[4]。由于SRY的发现,人们进而发现了一个庞大的与性别决定

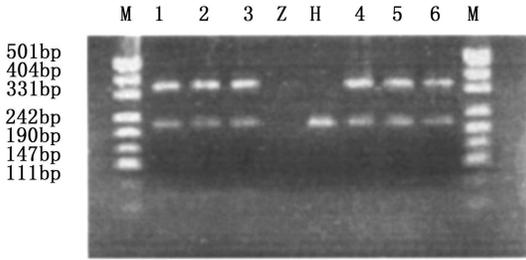


图1 斑节对虾 *Sox* 基因片段 PCR 结果

Fig. 1 PCR products of *Sox* gene of *P. monodora*

M: pUC19DNA/ *Msp*I 标准分子量; Z: 阴性对照; H: 阳性对照 (男性DNA); 1- 3: 雄虾 4- 6: 雌虾

M: pUC19DNA/ *Msp*I maker; Z: negative reaction; H: positive reaction (male DNA)

1- 3: male shrimp; 4- 6: female shrimp

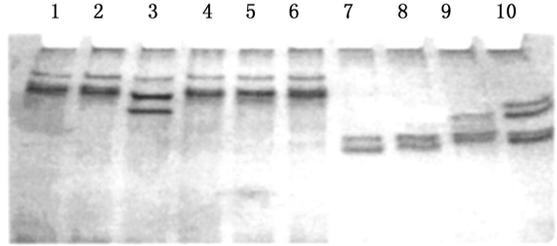


图2 斑节对虾 *Sox* 基因 SSCP 电泳图谱

Fig. 2 SSCP electrophoretic patterns of *Sox* gene of *P. monodora*

1- 3: 雌虾 (350 bp); 4- 6: 雄虾 (350 bp); 7- 8: 雌虾 (220 bp); 9- 10: 雄虾 (220 bp)

1- 3: female shrimp (350 bp); 4- 6: male shrimp (350 bp); 7- 8: female shrimp (220 bp); 9- 10: male shrimp (220 bp)

1- 3: female shrimp (350 bp); 4- 6: male shrimp (350 bp);

7- 8: female shrimp (220 bp); 9- 10: male shrimp (220 bp)

有关的 *SRY* 盒- *Sox* 基因家族。 *Sox* 基因广泛存在于动物界, 在进化地位明显不同的物种中, 从哺乳动物到鸟类、爬行类、两栖类、鱼类, 甚至昆虫、酵母中, 都含有 *Sox* 家族的不同成员^[5-9]。研究发现, *SRY* 基因是一个没有内含子的基因^[10], 在较高等的脊椎动物中(如爬行类、鸟类和哺乳类) *Sox* 基因也无内含子, 而较低等物种鱼类和两栖类部分物种中的 *Sox* 基因却含有内含子^[11,12], 且不同物种同一基因内含子大小不同。这些研究结果显示内含子和外显子不同位点的重组在 *Sox* 基因的进化中扮演了重要的角色。本研究中斑节对虾 *Sox* 基因的 PCR 扩增产物有两条特异性扩增带, 大小分别为 220 bp 和 350 bp, 其中 220 bp 片段与人的 *SRY* 基因扩增带长度相吻合, 不含内含子, 而 357 bp 片段长度扩增带, 推测该 *Sox* 基因中可能含有内含子。

3.2 斑节对虾 *Sox* 基因 SSCP 分析

SSCP 是一种基于 PCR 的单链构象多态性的分析技术, 其原理是相同长度的 DNA 片段(即使仅相差 1 个碱基)变性后解链为单链, 达到一种序列特异的亚稳定构象, 不同构象在非变性聚丙烯酰胺凝胶中决定了特定的迁移率。Orita 等^[13]认为 SSCP 分析能检测出 200~ 300 bp 序列中的 1 个碱基变异, Hayashi 等^[14]认为 SSCP 分析对于小于 400 bp 的 PCR 产物最有效, 现已成为 DNA 已知或未知突变检测、家族基因成员的辨别最常用且较实用的方法之一。目前, *Sox* 基因家族成员已达到 40 多个, 本实验中斑节对虾 *Sox* 基因大小约

350 bp 和 220 bp, 非常适用 SSCP 分析。从 350 bp 片段的 PCR-SSCP 结果获得了两种不一致的 SSCP 分型, 推断此片段至少含有 2 个不同 *Sox* 基因, 且均含有内含子。雌性有 2 个 350 bp 的不同的 *Sox* 基因, 雄性有 1 个 350 bp 的 *Sox* 基因, 且与雌性的一个 *Sox* 基因相同。而从 220 bp 片段的 PCR-SSCP 结果获得了 3 种不一致的 SSCP 分型, 推断此片段至少含有 3 个不同 *Sox* 基因。雌性有 1 个 220 bp 的 *Sox* 基因, 雄性有 2 个 220 bp 的 *Sox* 基因, 与雌性的 *Sox* 基因完全不同。

3.3 斑节对虾性别决定机制的探讨

甲壳动物的性别决定问题非常复杂, 在已报道的虾蟹类性别决定机制中, 有遗传决定型、环境决定型及遗传与环境共同决定型。这些都说明甲壳动物的性染色体或性别决定机制仍处于进化的早期阶段^[15]。目前, 在已进行核型分析的虾蟹类中, 绝大多数未发现异型性染色体^[16], 由于大多数虾蟹类染色体数目多且体积小(呈点状), 核型分析困难, 鉴定其性染色体并非易事。不过即使没有找到性染色体也可以用其他方法证明存在性染色体遗传机制, 如罗氏沼虾虽然至今没有找到异型性染色体, 但它按 ZW-ZZ 的雌性异配的遗传机制遗传^[17]。中国对虾虽然也未发现性染色体, 但刘萍等^[18]利用 RAPD 技术对中国对虾亲本及子一代分析中, 发现父本及某些子代个体中有 1 条 1 200 bp 特征带, 由此认为, 中国对虾的性别并不是由性染色体所决定, 而可能是由座落在某条染色体上的控制性别的基因所决定, 该特征

带是雄性个体所具有的特异性片段。王兵等^[19]采用 mRNA 双随机引物差示技术分离中国对虾性别相关片段,然后利用这些引物组合对中国对虾的基因组进行了 PCR 检测,发现其中两对引物组合可以扩增出具有性别相关性的片段。并以此推测,中国对虾的性别决定机制符合 XX-XY 雄性异配。这一发现与 Naylor^[20]的报道极为相似,认为对虾性别基因存在是决定其性别的基础,对虾性别决定机制属于基因决定型。SSCP 分析结果显示, S2 基因、S3 基因、S4 基因、S5 基因具有性别特异性, S2 基因、S3 基因为雌性斑节对虾所特有, S4 基因、S5 基因为雄性斑节对虾所特有。在 *Sox* 基因家族中直接与性别决定有关的基因是 *SRY*、*Sox 3*、*Sox 9*, 其中 *Sox 3* 是 *Sox 9* 在睾丸形成过程中的负调控因子, 在没有 *SRY* 的 XX 雌性中, *Sox 3* 抑制 *Sox 9*, 导致不形成睾丸。至于 S2 基因、S3 基因、S4 基因、S5 基因这些基因是否与性别决定有直接的关系, 还需要进一步的研究。

上海水产大学生命科学与技术学院楼允东教授、王丽卿副教授、陈立婧老师及 2000 级本科生高巍、郭丽娟两位同学对本工作给予大力支持与帮助, 谨致谢忱!

参考文献:

- [1] Nagabhushanam R, Kulkarni G K. Effect of exogenous testosterone on the androgenic gland and test of a marine penaeid prawn, *Parapenaeopsis ardwikii* [J]. *Aquac*, 1981, 23: 19-27.
- [2] 汪桂玲, 韦荣编, 邱高峰. 17- β 雌二醇对中华绒螯蟹促雄腺组织结构和超微结构的影响 [J]. *上海水产大学学报*, 2004, 13(1): 10-15.
- [3] 刘艳红, 楼允东, 邱高峰. 锯缘青蟹 *Sox* 基因的 PCR 扩增 (英) [J]. *上海水产大学学报*, 2003, 12(增刊): 24-27.
- [4] Sinclair A H, Berun P, Palmer M, *et al.* A gene from human sex-determination region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif [J]. *Nature*, 1990, 346: 240-244.
- [5] Soullier S, Jay P, Poulat F, *et al.* Diversification pattern of gene related to the testis determining genes *SRY* [J]. *Nucl Acid Res*, 1992, 48: 517-527.
- [6] Jennifer A, Marshall G. Evolution of the mammalian Y chromosome and sex-determining genes [J]. *J Exp Zool*, 1998, 281: 472-481.
- [7] Coughlan T, Scharl M, Homung U, *et al.* PCR-based sex test for *Xiphophorus maculatus* [J]. *J Fish Biol*, 1998, 54: 218-222.
- [8] Vriz S, Lovell B R. The zebrafish Zf-sox 19 protein: a novel member of the sox family which reveals highly conserved motifs outside of the DNA-binding domain Zool [J]. *Gene*, 1995, 153(10): 175-179.
- [9] Spotila L D, Kaufer N F, Theriot E. Sequence analysis of the ZFY and SOX genes in the turtle *Chelydra serpentina* [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 1994, 3(1): 1-9.
- [10] Su H, Lau Y F. Identification of the transcriptional unit, structural organization and promoter sequence of the human sex-determining region Y (*SRY*) gene, using a reverse genetic approach [J]. *Am J Hum Genet*, 1993, 52: 240-244.
- [11] Chang Z J, Du Q Y, Zhou R J, *et al.* The *Sox8* with intron in *Paranisgurmus dabryanus* [J]. *Dev Reprod Biol Soc*, 2000, 9(2): 15-22.
- [12] 黄引久, 梁玉华, 胡明洁. 黑斑蛙 *Sox* 基因 PCR 扩增产物研究 [J]. *蚌埠医学院学报*, 2003, 28(4): 286-288.
- [13] Orita M, Iwahana H K. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single strand conformation polymorphism [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 86: 2766-2770.
- [14] Hayashi K, Yandell D W. How sensitive is PCR-SSCP [J]. *Hum Mut*, 1993, 2: 238-246.
- [15] 楼允东, 刘艳红, 邱高峰. 虾蟹类性别决定研究进展 [J]. *上海水产大学学报*, 2004, 13(2): 158-162.
- [16] Katakura Y. Hormonal control of sex differentiation in the terrestrial isopod, *Armadillidium vulgare*, gunma sympos [J]. *Endocrinology*, 1967, 4: 49-64.
- [17] Melecha S R, Nevin P A, Phyllis H, *et al.* Sex-ratio and sex-determination in progeny from crosses of surgically sex-reversed freshwater prawns, *Macrobrachium rosenbergii* [J]. *Aquac*, 1992, 105: 201-218.
- [18] 刘萍, 孔杰, 石拓, 等. 中国对虾黄渤海沿岸群体亲本及子一代 RAPD 分析 [J]. *海洋水产研究*, 2000, 21(1): 13-21.
- [19] 王兵, 樊拥军, 张晓军, 等. 中国对虾性别相关片段的初步研究 [J]. *高技术通讯*, 2003, 5: 82-87.
- [20] Naylor C. Variation in sex determination in natural population of a shrimp [J]. *J Ecol Biol*, 1988: 355-368.