

春曲

——中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所
第二届中青年科技论文暨盛彤笙杯演讲比赛论文集

杨志强 张继瑜 王学智 主编

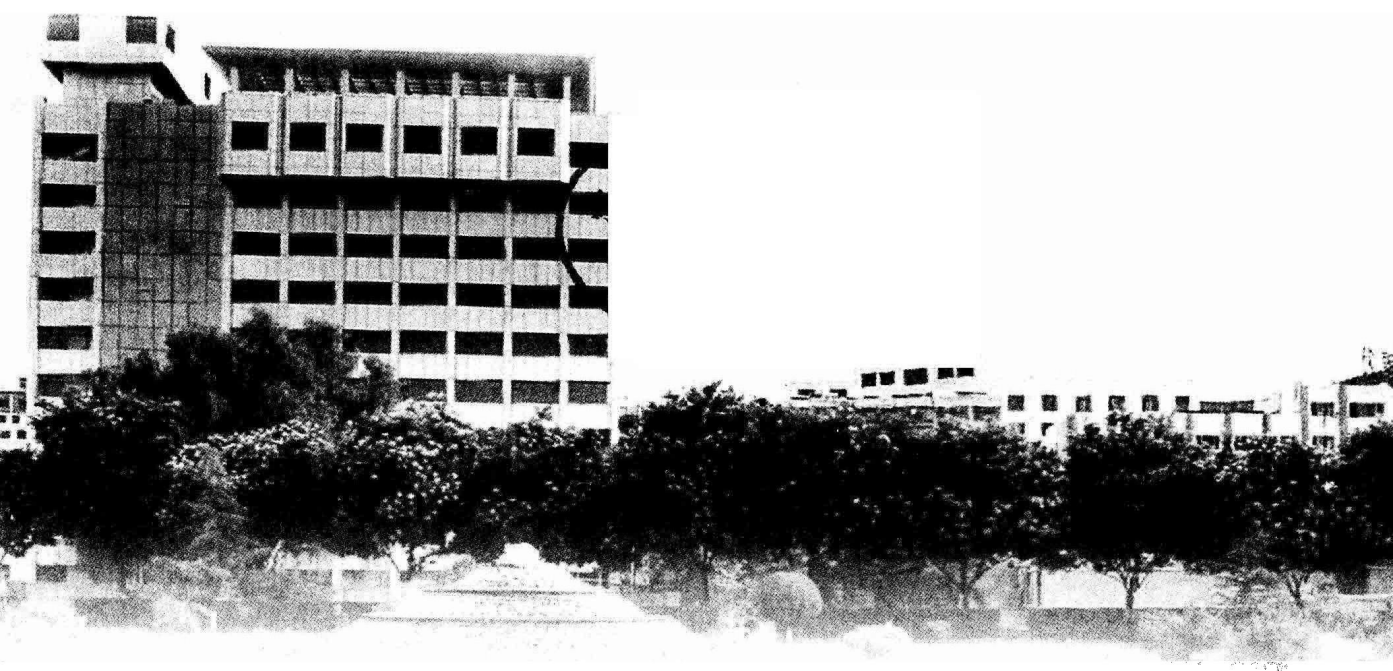


中国农业科学技术出版社

春曲

——中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所
第二届中青年科技论文暨盛彤笙杯演讲比赛论文集

杨志强 张继瑜 王学智 主编



中国农业科学技术出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

春曲: 中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所第二届中青年科技论文暨盛彤笙杯演讲比赛论文集/杨志强等主编. —北京: 中国农业科学技术出版社, 2009. 7

ISBN 978-7-80233-947-7

I. 春… II. 杨… III. ①畜牧学-文集②兽医学: 药理学-文集 IV. S8-53 S859-53

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2009) 第 112527 号

责任编辑 梅 红

责任校对 贾晓红

出版者 中国农业科学技术出版社

北京市中关村南大街 12 号 邮编: 100081

电 话 (010) 82106630 (编辑室) (010) 82109704 (发行部)

(010) 82109703 (读者服务部)

传 真 (010) 82106636

网 址 <http://www.castp.cn>

经销者 新华书店北京发行所

印刷者 北京华正印刷有限公司

开 本 787 mm × 1092 mm 1/16

印 张 15.875

字 数 400 千字

版 次 2009 年 7 月第 1 版 2009 年 7 月第 1 次印刷

定 价 45.00 元

序

同志们、年轻的朋友们：

经过认真酝酿和紧张筹备，中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所第二届中青年科技论文暨盛彤笙杯演讲比赛如愿如期拉开了帷幕。对此，我深感亲切、备受鼓舞。因为十年前，我们研究所举办了第一届中青年科技论文演讲比赛。今天，全所31位青年科技工作者欢聚一堂，共同交流学术心得和科研体会。在这里，请允许我代表研究所党委班子对演讲比赛的顺利举行表示最热烈的祝贺！对参与演讲的每位青年学者表示最热烈的欢迎！对关心和支持这次演讲会的各位同志表示最衷心的感谢！

今年，是我们研究所建所五十周年。半个世纪前，我们的先辈们在兰州西郊的荒原上创建了我国第一个从事中国传统兽医学研究的国家级机构，同时也设立了畜牧科学的研究部门。一代又一代科技工作者，从祖国的四面八方，从海外的著名学府，云集这里扎根创业，励精图治。研究所由小到大，由弱到强，由单一学科发展到多学科综合，取得了一批又一批科技成果，为我国畜牧业的发展做出了重要贡献。进入二十一世纪以来，研究所又成为国家非营利性科研机构，得到了国家有关部委的大力支持，科研项目明显增加，科研经费明显增长，科研条件明显改善，科研水平明显上升，研究所呈现出前所未有的好形势、新局面。今天，我们作为研究所五十周年光辉时刻的见证者而自豪。与此同时，我们亦永远铭记那些曾经为研究所建立、发展呕心沥血的先辈们，向他们表示崇高的敬意！在这里，特别值得我们纪念和敬仰的是我国著名的兽医学专家、微生物学家、教育家，我们研究所的创立者盛彤笙先生。他是我国首批中国科学院生物学学部委员，也是我国第一座国立兽医学院的创办者和首任院长。他首译的《兽医微生物学》等已成为我国预防兽医学的经典著作。他是医学博士，又是兽医学博士，生前获得了诸多的荣誉，担任了不少的重要职务。鉴于他的学识、人格和威望，在我们庆祝建所五十周年的时候为深切缅怀这位研究所的

开创者——盛彤笙先生，并以他的姓名冠名这次演讲比赛，具有十分重要的纪念意义。

同志们，年轻的朋友们，现代化畜牧业离不开畜牧科学、兽医科学、草业科学和药物科学，它们对畜牧业的可持续发展提供了强劲的动力，发挥着重要的保障作用。党和政府做出增强自主创新能力，建设创新型国家的战略部署，这是我们畜牧科技工作又一次难得的机遇。畜牧兽医学科的创立、成长和发展，是农业科学技术创新发展的科学基础，是科学知识体系化的象征，是创新型国家建设的重要方面，是国家科技实力的标志。在我所的学科繁荣、发展过程中，传统学科不断深入发展，新兴学科不断出现，学科间相互渗透，交叉学科不断产生，及时总结、报告畜牧兽医学科最新研究进展，对于广大科技工作者跟踪、了解、把握学科的发展动态，深入开展科学研究，推动多学科协调发展，促进原始创新能力的提升，建设创新型国家意义重大。因此，我所开展这次演讲比赛，既是所庆活动的一部分，又是研究所开展学术交流，活跃学术思想，促进学科发展，增强自主创新的重要举措之一。其目的在于贯彻科技兴国战略，落实科学发展观，弘扬科学精神，繁荣学术思想，展示科学风貌，拓展交流渠道，更好地推动研究所的科研工作。通过这样的活动，也是为年轻科技工作者提供展示才华的舞台，提供锻炼和提高的机会。机会我们创造，条件我们提供，舞台我们搭建，以人为本，以研为本，创新为本，是我们不变的信念。年轻的朋友们，奋发努力吧！让我们一心钻研业务，勤奋工作，奉献科学。在智慧的创造性劳动中，我们失去的只是汗水和心血，收获的将是我们的事业。让我们以饱满的热情全身心地投入到比赛活动中，在比赛的过程中寻找快乐，追求成功，享受幸福，感悟收获。愿年轻的朋友们比出真实力，赛出好成绩。

预祝中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所第二届中青年科技论文暨盛彤笙杯演讲比赛取得圆满成功！

(此序为中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所杨志强所长在盛彤笙杯演讲比赛上的祝辞)

目 录

| | |
|---|----------|
| 中国荷斯坦牛 SRY 蛋白表达与功能鉴定 | 裴 杰等/1 |
| 串联抑制素基因疫苗的构建与鉴定 | 郭 宪等/15 |
| 消化方式和胎龄对昆明系小鼠 EGCs 无血清培养的影响 | 董书伟等/22 |
| 从细胞色素 b 基因全序列探讨鼯鼠凸颅亚属的分子系统发育 | 杨红善/29 |
| 人参总皂苷及其衍生物对小鼠主要免疫细胞和细胞因子的影响 | 郭志廷等/38 |
| 绵羊早期生长性状 BLUP 模型筛选试验研究 | 程胜利等/45 |
| 草地早熟禾引种适应性研究及坪用性状评价 | 路 远/51 |
| 硅肥对紫花苜蓿水分含量的影响 | 田福平/59 |
| 瓜州县大风沙尘天气变化规律及成因分析 | 张怀山/66 |
| 不同预处理对羊毛纤维平均直径的影响及其相关性研究 | 郭天芬等/73 |
| 8 种动物纤维显微结构的观察 | 李维红/80 |
| INH α 三维结构与其他 TGF- β 配体的比较分析 | 岳耀敬等/85 |
| 脂蛋白脂肪酶基因的研究进展 | 邢成锋/94 |
| 中国五个绵羊群体 mtDNA D-环遗传多样性研究 | 包鹏甲等/101 |
| 羊品种对其成革物理机械性能影响的研究 | 王宏博等/108 |
| 4 个牦牛品种的 AFLP 分析及其遗传多样性研究 | 肖玉萍/112 |
| 宫康对奶牛子宫内膜炎的药效试验 | 苗小楼等/120 |
| 中草药复方对人工诱发鸡大肠杆菌病的防治试验 | 李世宏/125 |
| 奶牛隐性乳房炎诊断方法的研究进展 | 罗金印/129 |
| 奶牛乳房炎研究进展 | 田海燕等/137 |
| 益生酵母改善断乳仔猪肠道健康及免疫功能的作用初探 | 王 玲等/143 |
| 兽药单克隆抗体的制备及其应用研究进展 | 张 艳等/150 |

| | |
|---|----------|
| 锌对小鼠机体抗氧化酶活性及 NO、MDA 含量的影响 | 荔 霞等/157 |
| 喹乙醇检测技术的研究进展 | 张景艳等/163 |
| 福氏志贺菌外输调节蛋白基因 <i>MarA</i> 的原核表达载体构建及其鉴定 | 魏小娟等/169 |
| 黄花补血草的化学成分研究 | 刘 宇/174 |
| 抗蜂螨中草药的初步筛选与药效研究 | 王东升等/177 |
| 载药纳米乳的研究进展及其在药剂学中的应用 | 胡宏伟等/185 |
| 中药散剂“禽瘟王”的组方辨证浅析 | 李锦宇等/193 |
| 中药质量标准研究进展与展望 | 关宇强/197 |
| 多重 PCR 技术用于奶牛乳房炎 3 种主要病原菌快速检测的研究 | 李宏胜等/206 |
| 奶牛乳房炎多联苗抗原配比及抗人工感染试验研究 | 李宏胜等/213 |
| 我国西北地区农户生活能源利用现状与发展对策 | 杜天庆等/220 |
| 喹烯酮代谢物的合成 | 李剑勇等/223 |
| 肠道内容物中氨态氮含量检测方法研究 | 蒲万霞等/230 |
| 我国毛皮业存在的问题及应对措施 | 席 斌等/237 |
| 中草药抗病毒作用的研究现状 | 张林林等/241 |

中国荷斯坦牛 SRY 蛋白表达与功能鉴定

裴 杰², 韩凤桐¹, 林秀坤^{1*}

(1. 中国农业科学院 北京畜牧兽医研究所, 北京 100094;

2. 中国农业科学院 兰州畜牧与兽药研究所, 甘肃兰州 730050)

摘要: 以研究牛 *SRY* (Sex-determining Region on the Y Chromosome) 基因对其下游基因的表达调控作用为目的, 从中国荷斯坦牛的基因组 DNA 中克隆 *SRY* 基因编码区全长序列; 将 *SRY* 基因编码区与 pET-28a (+) 载体相连, 构建表达载体 pET-28a/*SRY*; 将该表达载体转入大肠杆菌 BL21 (DE3) 中, 在合适的条件下诱导表达, 对表达产物进行了 Western-blotting 检测, 并采用亲和层析技术纯化 *SRY* 蛋白; 扩增牛、人、鼠的 *MIS* (Mullerian Inhibiting Substances) 启动子, 与 *SRY* 蛋白共同进行凝胶阻滞试验。同时, 构建 pcDNA3.1/*SRY* 表达载体和 pEGFP-N1/*SRY* 亚细胞定位表达载体, 在生殖嵴细胞和卵巢颗粒细胞中进行了 *SRY* 基因过表达, 对性别控制相关基因在 *SRY* 基因过表达前后的表达水平变化进行检测, 包括 *MIS*、*SF1* (Steroidogenic Factor-1)、*GATA4* (GATA binding protein 4)、*WT1* (Wilms' Tumor gene)、*SOX9* (Sry-related HMG box-9) 和 *DAX1* (Dosage sensitive sex reversal locus-1) 基因, 并在两种细胞中进行了 *SRY* 蛋白亚细胞定位研究。研究结果表明: *SRY* 蛋白获得高效表达, 纯化得到了高纯度的牛 *SRY* 蛋白; 牛 *SRY* 蛋白可与人及牛的 *MIS* 启动子结合, 但与鼠的 *Mis* 启动子不发生相互作用; *SRY* 基因在两种细胞中过表达后, 在生殖嵴细胞中 *SOX9* 基因的表达水平被显著上调, 但在卵巢颗粒细胞中未观察到 *SOX9* 基因被上调现象, 而其他几个基因的表达水平未受 *SRY* 基因过表达影响; 亚细胞定位结果表明牛 *SRY* 蛋白主要分布在细胞核内。因此, 牛 *SRY* 基因在性别调控中起转录因子的作用。

关键词: 牛 *SRY* 基因; 表达; 启动子; 亚细胞定位

Expression of Bovine SRY Protein and its Functional Characterization

PEI Jie², HAN Fengtong¹, LIN Xiukun^{1*}

(1. Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094, China;

2. Lanzhou Institute of Animal Science and Veterinary Pharmaceutics,
Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730050, China)

Abstract: Aiming at researching expression and regulation of bovine *SRY* gene; the gene of *SRY* was cloned from bovine genome; the bovine *SRY* gene was cloned to *EcoR* I and *Sal* I sites of pET-28a (+) to construct an expression plasmid pET-28a/*SRY*; the expression plasmid was transformed to *E. Coli* BL21 (DE3), and induced by IPTG, SDS-PAGE analysis confirmed that the bovine *SRY* peptide was highly expressed after 4h induction at 30°C; the product of expression was identified by Western-blotting and pu-

基金项目: 国家自然科学基金项目资助 (编号: 30671501)。

* 通讯作者: 林秀坤 (1957—), 男, 山东人, 研究员, 研究方向: 动物生物技术。

Tel: 010-62813339; E-mail: Linxiukun@yahoo.com。

rified; the promoters of MIS genes of human, cow and mouse were cloned, SRY functional analysis of protein using gel-shift experiments was confirmed; with the pcDNA3.1/SRY and pEGFP-N1/SRY vector constructed, expression levels of MIS, SF1, GATA4, WT1, SOX9 and DAX1 gene were detected, while SRY gene was over-expressing in genital ridge cell and ovary granular cell; subcellular localization of SRY was researched. SRY protein was expressed and purified by homogeneity; bovine SRY protein could bind with the promoter of MIS from bovine and human, in contrast, no interaction was found between bovine SRY protein and the promoter region of MIS from mice; the expression of SOX9 gene was up-regulated in genital ridge cell and the other genes were not affected by SRY; subcellular localization showed SRY protein was mainly distributed in nucleolus. The SRY gene plays a role of transcriptional factor in process of sex determination.

Key words: Bovine SRY gene; Expression; Promoter; Subcellular localization

SRY (sex-determining region of the Y chromosome) 基因主导哺乳动物雄性性别决定和睾丸的起始发育 (Gubbay *et al.*, 1990; Koopman *et al.*, 1991; Sinclair *et al.*, 1990)。转 SRY 基因的 XX 型小鼠向雄性发育 (Koopman *et al.*, 1991)。SRY 蛋白含有一段可以结合 DNA 的区域被称为 HMG 盒 (Nasrin *et al.*, 1991; Nelson *et al.*, 2006)。HMG 盒在哺乳动物不同物种间相对保守, 人 SRY 基因 HMG 盒区域相应位置的点突变可以引起性别反转 (Berta *et al.*, 1990; Harley *et al.*, 1992; Jager *et al.*, 1990; Pontiggia *et al.*, 1994)。对人 SRY 蛋白的亚细胞定位研究结果表明 SRY 蛋白分布在 Sertoli 细胞的细胞核内, 推测其发挥转录因子作用。鼠 SRY 基因在 XY 型胚胎生殖嵴 Sertoli 前体细胞中表达, 并受到严格的时空限制 (Albrecht and Eicher, 2001; Nils *et al.*, 2007)。

虽然已证明 SRY 基因具有诱导睾丸发育的功能 (Koopman *et al.*, 1991), 但它的下游目的基因仍然无法确定。SOX9 基因是 SRY 可能的下游基因之一。在 Sertoli 细胞中, SRY 基因开始表达后不久 SOX9 基因开始表达, 并在以后生命中持续表达, 而在鼠卵巢中没有发现 SOX9 基因表达 (Kent *et al.*, 1996; Morais da Silva *et al.*, 1996), 这种表达模式表明 SOX9 有可能是 SRY 下游的直接目的基因, SOX9 基因存在缺陷的人 XY 型个体经常出现骨骼畸形综合征、躯干发育异常, 同时伴随出现男性到女性的性反转 (Wagner *et al.*, 1994)。研究表明 SOX9 基因可以代替 SRY 基因的作用诱导睾丸发育 (Bishop *et al.*, 2000; Vidal *et al.*, 2001; Panagiota *et al.*, 2006)。这些结果表明 SOX9 基因有足够的的能力诱导睾丸发育。SF1, WT1 (Kreidberg *et al.*, 1993), GATA4, MIS (Jeske *et al.*, 1996; Munsterberg and Lovell-Badge, 1991) 和 DAX1 也被证明在性别决定过程中有重要作用。目前关于哺乳动物 SRY 基因的大量研究主要集中在人和鼠上, 在其他动物上的研究较少。牛作为重要的经济动物, 其性别控制具有十分重要的价值, 本试验以牛作为试验动物研究 SRY 基因的表达和定位。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物组织、细菌菌株及载体

雄性中国荷斯坦牛的血样取自河北省大厂回族自治县屠宰场; 大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 及

E. coli BL21 (DE3) 购于天为时代公司; pGEM-T 克隆载体为 Promega 公司产品; pET-28a (+) 表达载体购于 Novagen 公司。

1.1.2 分子生物学试剂

EX *Taq* 聚合酶, 限制性内切酶 *EcoR* I、*Sal* I 和 dNTPs 均为 TaKaRa 公司产品; 琼脂糖由上海 YITO 公司生产; XGal、IPTG、琼脂粉购于 Sigma 公司; T_4 DNA 连接酶为 Promega 公司产品; DNA 凝胶回收纯化试剂盒、质粒提取试剂盒购于天为时代公司, 蛋白质纯化试剂盒购于 QIAGEN 公司; 胰蛋白酶、酵母浸出粉由 OXOID 公司生产; His 多克隆抗体购自北京博尔迈的 MBL 产品, 二抗 (羊抗兔) 为 Santa cruz 公司产品, NC 膜为 Amersham 公司产品, Western Blot 显色试剂盒为 Pierce 公司产品; 引物由上海生工生物公司合成 (表 1)。

表 1 引物序列

| 名称 | 引物序列 (s: 上游引物, a: 下游引物) 和酶切位点 (加粗) | 长度 | 酶切位点 |
|-------|--|---------|--------|
| SRY1s | s. 5'-AGTAGGTTGATGGGTTT-3' | 1 040bp | |
| SRY1a | a. 5'-TGATTAACAGAGGACCAG-3' | | |
| SRY2s | s. 5'-GCGGAATTCATGTTTCAGAGTATTGAACG-3' | 690bp | EcoR I |
| SRY3a | a. 5'-GCGCTCGAGTCAATATTGAAAATAAGCAC-3' | | |
| SRY2s | s. 5'-GCGGAATTCATGTTTCAGAGTATTGAACG-3' | 686bp | EcoR I |
| SRY4a | a. 5'-GCGGTCGACTATTGAAAATAAGCACAAG-3' | | |
| GAPDH | s. 5'-GCAAGTTCAACGGCACAG-3' | 249bp | |
| | a. 5'-GGTTCACGCCCATCACAA-3' | | |
| SF1 | s. 5'-GTGTCGGGCTACCACTA-3' | 165bp | |
| | a. 5'-CACCGTCAGGCACTTCT-3' | | |
| GATA4 | s. 5'-GCCAACTGCCAGACCAC-3' | 352bp | |
| | a. 5'-TCGCACTGACCGAGAAC-3' | | |
| WT1 | s. 5'-CAAGGACTGTGAACGAAG-3' | 235bp | |
| | a. 5'-GTGCATGTTGTGATGGC-3' | | |
| SOX9 | s. 5'-CGGCTTCTCGCCTTTCCC-3' | 459bp | |
| | a. 5'-CTTGCTGAGCTCGGCGTTG-3' | | |
| MIS | s. 5'-ATCCCCGAGACATACCA-3' | 111bp | |
| | a. 5'-GGCCTGCATCTTTAGC-3' | | |
| DAX1 | s. 5'-AGGACCGCTTGAACTTTGA-3' | 189bp | |
| | a. 5'-AGCCCTTGATGCTTTGGAC-3' | | |
| MIS b | s. 5'-CAGGCACGTTGGAACAGAAGG-3' | | |
| | a. 5'-CACTGCCAAGGTGGTCAAGTCA-3' | | |
| MIS h | s. 5'-CACATCAGGCCAGCTCT-3' | | |
| | a. 5'-CCAGTCCAAGTCTTCTCGG-3' | | |
| Mis m | s. 5'-AGGGAGATCGGAGCTACTCA-3' | | |
| | a. 5'-CAGGCACAAAGGTTTCAGG-3' | | |

1.2 方法

1.2.1 目的基因 *SRY* 的克隆

用酚-氯仿方法提取雄性中国荷斯坦牛的基因组 DNA。设计一对包含 *SRY* 基因编码序列的引物 SRY1s、SRY1a (表 1)。以牛基因组 DNA 为模板, SRY1s、SRY1a 为引物, 扩增

SRY 基因, PCR 反应条件: 94℃ 5min; 94℃ 30s, 54℃ 30s, 72℃ 1min; 共 30 个循环; 72℃ 10min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 回收 PCR 产物, 对回收产物以 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

回收的 PCR 产物和 pGEM-T 载体在 T_4 连接酶的作用下, 16℃ 连接 1h 后, 4℃ 过夜连接, 构建重组质粒 pGEM-T-SRY。将重组质粒转化至感受态 *E. coli* DH5 α 菌中。在固体 LB 培养基上挑取阳性菌落, 接种于含有 Amp 的 LB 液体培养基中过夜培养。通过菌液 PCR 对所获得的大肠杆菌进行鉴定; 同时提取质粒, 用 *Bstz* I 酶切鉴定。将 PCR 和酶切鉴定均为阳性的菌落送至生物公司测序。

1.2.2 构建原核表达载体

根据 SRY 基因序列和载体 pET-28a (+) 的多克隆位点设计引物, SRY2s、SRY4a (表 1)。以质粒 pGEM-T-SRY 为模板, SRY-E 和 SRY-S 为引物进行扩增, PCR 反应条件: 94℃ 5min; 94℃ 30s, 51℃ 30s, 72℃ 1min; 共 30 个循环; 72℃ 10min。纯化 PCR 产物, 对加酶切位点的扩增纯化产物和 pET-28a (+) 载体分别以 *EcoR* I、*Sal* I 双酶切, 1% 的琼脂糖凝胶电泳回收后, 以 T_4 DNA 连接酶 16℃ 连接 1h 后, 4℃ 过夜连接。将连接产物转化至感受态 *E. coli* BL21 (DE3) 中, 转化产物涂布于 LB (含 50mg/L 卡那霉素) 琼脂平板中。经 PCR 和 *EcoR* I、*Sal* I 双酶切鉴定, 选取阳性克隆送至生物公司进行序列分析。

1.2.3 SRY 蛋白的诱导表达

将原核表达阳性克隆接种于 50ml 含卡那霉素的 LB 液体培养基中, 37℃ 培养至 A_{600} 为 0.6。加 IPTG 至 0.4mmol/L 诱导表达, 于 30℃ 培养, 每隔 1h 取菌液, 取至 5h。以同样的方法诱导 *E. coli* BL21 (DE3) 和含质粒 pET-28a (+) 的 *E. coli* BL21 (DE3) 5h 作对照。将诱导各时间收获的菌液 A_{600} 均调至 0.68, 取菌液 1.5ml, 4℃ 离心收集各种菌。加上样缓冲液, 混匀, 煮沸 5min, 12 000r/min 离心 2min, 取上清 15 μ l 进行 10% SDS-PAGE 电泳, 考马斯亮蓝 R250 染色并脱色。

将诱导表达的产物先进行 SDS-PAGE 电泳, 然后以半干法电转移至硝酸纤维膜 (NC), 膜短暂漂洗后用丽春红染膜, 待蛋白 Marker 条带显色后用滤纸将膜轻轻吸干, 用记号笔标记蛋白 Marker 各条带, 继而经漂洗去除丽春红, 然后依次经 5% 脱脂奶粉室温封闭 1h, 与抗-His 单抗温育 1h, 与 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 温育 1h, 每步完成后均严格洗膜, 最后加 DAB 避光显色。

1.2.4 SRY 蛋白的纯化

30℃ 大量诱导含有 pET-28a/SRY 的 BL21 (DE3) 菌, 离心收集, 溶于裂解液中, 冰上放置 30min, 超声波碎菌直至菌液变得澄清, 离心沉淀包涵体。用裂解液平衡 Ni-NTA 亲和层析柱, 上样离心后的上清液, 用漂洗液洗两次, 再用洗脱缓冲液洗脱, 纯化产物及菌体总蛋白用 12% SDS-PAGE 电泳检测。

1.2.5 牛 SRY 蛋白与 MIS 基因的相互作用

用酚-氯仿方法自中国荷斯坦牛、人以及小鼠的血样中提取基因组 DNA。分别设计 3 对包含 MIS 基因启动子的引物 (表 1)。分别以牛、人、鼠的基因组 DNA 为模板, 上述序列为引物, 扩增 MIS 基因的启动子, PCR 反应条件: 94℃ 5min; 94℃ 30s, 58℃ 30s,

72℃ 45s; 共 30 个循环; 72℃ 10min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 回收 PCR 产物, 进行序列测定。

采用上述 MIS (Mis) DNA 为模板, 利用 PCR 反应制备³²P 标记的双链 DNA 探针。凝胶阻滞试验按 Haqq 等的方法进行, 双链探针与牛 SRY 蛋白在下列缓冲液中温育: 10mM Tris-HCl, pH 值为 7.4; 50mM NaCl; 2mM MgCl₂; 0.5mM 二硫基苏糖醇; 4% 的甘油。反应液中加入 poly (dI-dC) 40μg/ml 去除非特异性相互作用。温育反应在 4℃ 条件下进行。

1.2.6 构建真核表达载体

以 pGEM-T-Sry 为模版用上游引物 Sry2s (加入 EcoR I 酶切位点) 和下游引物 Sry3a (加入 Xho I 酶切位点) 扩增 Sry 基因编码区, PCR 产物和载体经过 EcoR I 和 Xho I 双切后, 在 T₄ 连接酶的作用下连接, 构建表达载体 pcDNA3.1-Sry。以 pGEM-T-Sry 为模版用上游引物 Sry2s (加入 EcoR I 酶切位点) 和下游引物 Sry4a (加入 Sal I 酶切位点) 扩增 Sry 基因编码区, PCR 产物和载体经过 EcoR I 和 Sal I 双切后, 在 T₄ 连接酶的作用下连接, 构建亚细胞定位载体 pEGFP-N1-Sry。引物序列见表 1。

1.2.7 牛生殖嵴细胞培养及性别鉴定

取交配后 45 ~ 60d 的母牛子宫, 取出胚胎。在无菌条件下将生殖嵴取出并切碎, 在无血清的含 50U/ml 胶原酶 IV (Gibco, Germany) Dulbecco modified Eagle medium/Ham's F12 (DMEM/F12) (Gibco, Germany) 中 37℃ 消化, 间隔 20min 震荡 1 次, 共 3 次 (Pilon *et al.* 2003)。每次震荡后把消化液取出 1500rpm 离心 10min 收集细胞, 然后细胞被重新悬浮并立即放入 25cm 细胞培养瓶 (BD, Becton Dickinson, USA)。培养条件为含 10% 胎牛血清 (Biochrom AG, Germany) 的 DMEM/F12 培养液, 37℃、5% CO₂ 培养箱。

取胎牛的剩余组织提取 DNA, 经过 PCR 扩增 SRY 基因序列来鉴定胚胎性别。上游引物为 SRY1s, 下游引物为 SRY1a, 用 GAPDH 基因作阳性对照来检测扩增条件正确性。通过性别鉴定来确认建立的细胞系为雄性胚胎的生殖嵴细胞系。

1.2.8 牛卵巢颗粒细胞培养

在屠宰厂收集屠宰后 20min 以内的青年母牛的卵巢。把有优势卵泡发育的卵巢放入含有 50U/ml 青霉素 (Sigma, Germany) 和 50pg/ml 链霉素 (Sigma, Germany) 的 PBS (Gibco, Germany) 中, 保存在 25℃ 下, 在 45min 内运回实验室。在无菌室用注射器将卵巢上的优势卵泡刺破并将卵泡液吸出, 卵泡的鉴定标准见文献, 健康的排卵前卵泡直径约为 10mm, 卵泡液内没有碎片。将卵丘卵母细胞复合体用含有 15U/ml 肝素 (Sigma, Germany) 的 PBS 洗 5 ~ 7 次。将复合体切成两半, 用细胞帚轻轻刮下颗粒细胞。将颗粒细胞转移到 PBS 中, 50X g 离心 2min, 去上清液, 用含 10% 胎牛血清的细胞培养液悬浮细胞。用血球计数板进行细胞计数。用台盼蓝染色方法检测细胞活率。细胞被培养在含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 中, 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。

1.2.9 SRY 在生殖嵴细胞和卵巢颗粒细胞中过表达

转染质粒用无内素质粒提取试剂盒提取 (Galen, China)。质粒转染程序参考 lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 说明书。转染前 24h 将细胞以 (4 ~ 8) × 10⁵ cells/well 的密度铺于 6 孔板内。每孔 4μg pcDNA3.1-SRY 转染细胞, DNA : Lipo2000 比例 2 : 3。pcDNA3.1 (+) 载体以同样的条件作为对照组转染细胞。编码绿色荧光蛋白

的 pIRES-EGFP 空载体同步转染细胞来评价转染效率。细胞和转染复合物在培养箱中孵育 4~6h 后,用 PBS 洗涤 3 次,加入含血清的细胞培养基继续培养至 24h。转染效率约为 35%~40%。pcDNA3.1-SRY 被分别导入生殖嵴细胞和卵巢颗粒细胞,上述实验独立重复 3 次。

1.2.10 Sfl、Gata4、Wtl、Sox9、Amh 和 Dax1 表达水平检测

本实验利用半定量 RT-PCR 检测 SRY 基因在两种细胞中过表达处理后 *Sfl*、*Gata4*、*Wtl*、*SOX9*、*MIS* 和 *DAX1* 表达水平变化。cDNA 由两步法反转录反应制备。逆转录酶为 M-MuLV (Fermentas MBL Lithuania)。PCR 试剂为 2 × Easy Taq PCR SuperMix (TransGen Biotech Co. Beijing)。以牛 *GAPDH* 作为内参基因。引物序列见表 1。PCR 条件: 94℃/5min, 94℃/30s, 56~61℃/1min, 和 72℃/1min 26~32 循环, 72℃ 终产物延长 8min。10μl PCR 产物用含有 EB 的 1.3% 的琼脂糖凝胶电泳检测。用 NIH Image1.62 软件 (<http://rsb.info.nih.gov/nih-image/download.html>) 测量目的条带光密度值。用 *GAPDH* 内参基因对目的条带的光密度值进行标准化处理。上述实验独立重复 3 次。所得数据用 T 检验统计分析。

1.2.11 SRY 蛋白亚细胞定位分析

为研究牛 SRY 蛋白在细胞中分布区域,利用 pEGFP-N1-SRY 载体,其表达的蛋白为 SRY 蛋白和 GFP 蛋白的融合蛋白 (SRY-GFP)。在细胞内 SRY 蛋白上的核定位信号可以引导融合蛋白迁移到 SRY 蛋白的工作区域,所以在共聚焦显微镜下观察细胞内绿色荧光蛋白的分布就可以了解到 SRY 蛋白的在细胞内的哪个区域发挥作用,以此推测基因的功能。细胞转染方法及培养条件同上。用 pEGFP-N1 空载体在同样的条件下转染细胞作为对照组。线粒体染色:转染 24h 后的细胞和 1μM MitoTracker Red (Molecular Probes) 孵育在 37℃ 下 30min,用 PBS 将细胞洗两遍,用含有 3.7% 多聚甲醛的 DMEM 在 37℃ 下固定 15min。细胞核染色:固定后的细胞用 PBS 洗涤 3 次,将细胞和 10μM Hoechst 33342 37℃ 下孵育 15min。激光共聚焦显微镜 (Bio-Rad Inc., Hercules, USA) 照相。

2 结果与分析

2.1 牛 SRY 基因的克隆与序列分析

以奶牛基因组 DNA 为模板,以 SRY 基因的 P1、P2 为引物进行 PCR 扩增。PCR 扩增产物与 pGEM-T Vector 连接,构建重组质粒。以 *Bstz* I 酶切 pGEM-T-SRY 质粒,得到一条约 1 000bp 的插入片段。将酶切鉴定为阳性的重组子进行测序分析。结果表明所获得的 SRY 基因序列包含完整的编码框架,编码区由 687 个碱基组成,编码 229 个氨基酸,HMG 区含有 79 个氨基酸 (图 1),与报道的序列完全一致。牛的 SRY 基因 HMG 序列与人、小鼠、猪、猫的有大于 70% 的同源性,此外,牛和猪在 HMG 序列以外还有一定的同源性。

2.2 表达质粒的构建及重组子鉴定

以引物 SRY-E、SRY-S 扩增的含有 SRY 基因的 DNA 片段与 pET-28a (+) 均以 *EcoR* I、*Sal* I 双酶切,在 T₄ DNA 连接酶作用下连接,构建重组质粒 pET-28a/SRY。该质粒经 *EcoR* I、*Sal* I 双酶切得到约 700bp 的 SRY 插入片段 (图 2)。

```

GAAATAAATATTTCACTGTATATATTGCACTAAGTCACTCTGTGTAAGAACAACCTTATGAATAGCACCA
TAATTTTTAGAACGCTTACACCCGATATTACTTCTCCCCCTTTTAAACAGTGCAGTCCT ATGCTTCTGCT.
1  AAACACTGCACTCGTATGCTTCTGCT ATG TTC AGA GTA TTG AAC GAC GAT GTT TAC AGT CCA.
1  M F R V L N D D V Y S P
37 GCT CTG GTA CAG CAA CAAACT ACT CTC GCT TTT AGG AAA GAC TCT TCC TTG TGC ACA GAC.
13 A V V Q Q Q I I L A F R K D S S L C T D
97 AGT CAT AGC GCAAAT CAT CAG TGT GAA AGG GGA GAA CAT GTT AGG CAG ACC ACC CAG GAC.
33 S H S A N D Q C E R G E H V R E S S Q D
157 CAC GTC AAG CGACCC ATG AAC GCC TTC ATT CTG TGG TCT CGT GAA CGA AGACGA AAG GTG.
53 H V K R P M N A F I V W S R E R R R K V
217 GCT CTA GAG AAT CCC AAAATG AAA AAC TCA GAC ATC AGC AAG CAG CTG CGA TAT GAG TGG.
73 A L E N P K M K N S D I S K Q L G Y E W
277 AAA AGG CTT ACA GAT GCT GAA AAG CGC CCA TTC TTT GAG CAG GCA CAG ACA CTA CTA GCC.
93 K R L T D A E K R P F F E E A Q R L L A
337 ATA CAC CGA GAC AAA TAC CCG GGC TAT AAA TAT CGA CCT CGT CGGAGA GCC AAG AGC CCA.
113 I H R D K Y P G Y K Y R P R R R A K R P
397 CAG AAA TCG CTT CCT GCA GAC TCT TCA ATA CTA TGC AAC CCG ATG CAT GTA GAG ACA ITG.
133 Q K S L P A D S S I L C N P M H V E T L
457 CAC CCC TTC ACA TAC AGG GAT GGT TGT GCC AAG ACC ACA TAC TCA CAA ATG GAA AGC CAA.
153 H P F T Y R D G C A K T I Y S Q M E S Q
517 TTA AGC CGG TCA CAG TCC GTG ATC ATA ACC AAT TCA CTC CTG CAAAAG GAG CAT CAC AGC.
173 L S R S Q S V I I T N S L L Q K E H S
577 AGC TGG ACA AGC CTG GGC CACAAT AAG GTA ACA TTG GCT ACACGG ATT TCG CCG GAC TTT.
193 S W T S L G H N K V T L A T R I S A D F
637 CCC TGT AAC AAA AGC TTA GAG CCT GGA CTT TCT TGT GCT TAT TTT CAA TAT TGA CTCCTTAC.
213 P C N K S L E P G L S C A Y F Q Y *
CTTCTTACTCTCGCTAACAAAGCGCCTCTTATCTCAATTTACTACAGTTTCACCTGCGACTTAATTTTA.
TAAGAAGCCCAATAAGTAAGTACATTTAACATGTAAAGAATTCAGACTTTCCAATATAACTGCTCCTCTGT.
TAATCA.
    
```

图1 牛 SRY 基因的序列分析

起始密码子的第一个碱基编号为1，在编码区下面是其编码的氨基酸序列，划线部分为 HMG 盒，终止密码子由 * 标出。

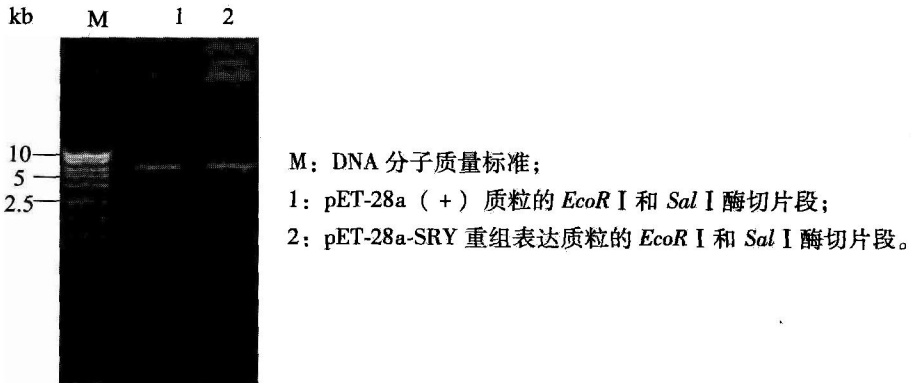


图2 质粒 pET-28a-SRY 的酶切鉴定

2.3 表达产物 SDS-PAGE 分析

将含有 pET-28a (+) /SRY 的工程菌 *E. coli* BL21 (DE3) 在 30℃ 培养，加入 IPTG 至 0.4mmol/L 诱导表达，于不同时间取样，以 SDS-PAGE 测定菌体中牛 SRY 蛋白的表达量。结果表明 IPTG 诱导 1h 即可见到 SRY 基因的表达 (图 3，条带 5)，诱导 4h 表达量达到高峰

(图3, 条带8), 定量分析表明 SRY 蛋白可占总蛋白量的 26%。蛋白质分子量约为 33KD, 与预期 SRY 蛋白一致, 对照组 *E. coli* BL21 (DE3) (图3, 条带1) 和含空质粒 pET-28a (+) 的 *E. coli* BL21 (DE3) (图3, 条带2) 均未见该蛋白表达。

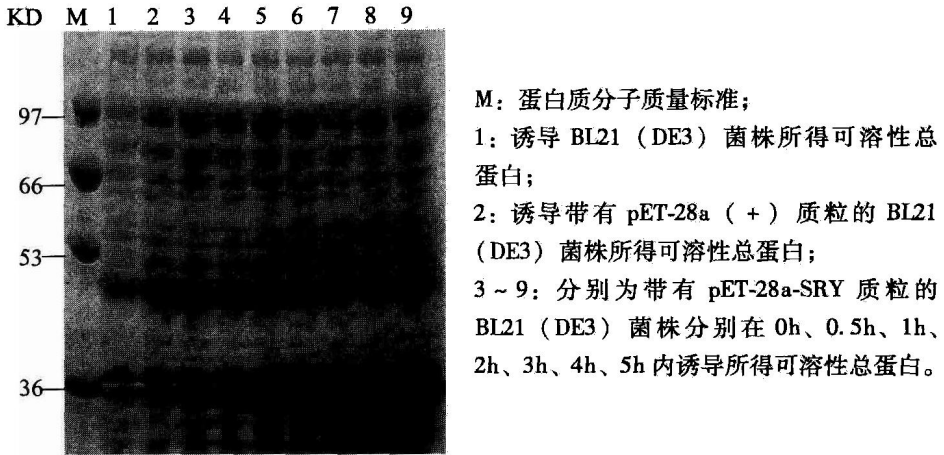


图3 可溶性 SRY 蛋白 DS-PAGE 分析

2.4 SRY 蛋白 Western-blotting 分析结果

以 His 标签肽为标志的 Western 印迹分析显示, 经 IPTG 诱导的含重组表达载体 pET-28a/SRY 的菌体裂解物能与抗-His 单抗特异性反应, 在约 33KD 处呈现单一条带 (图4, 条带2), 而经同样诱导的只含载体 pET-28a (+) 的菌体裂解物则无此反应 (图4, 条带1), 说明所表达的融合蛋白的确是目的蛋白。

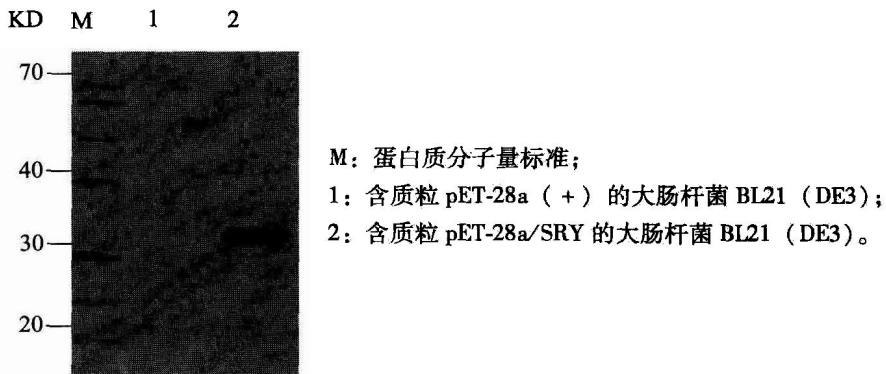


图4 重组 SRY 的 Western Blot 分析

2.5 SRY 蛋白纯化结果

为了研究表达蛋白的生物学功能, 我们采用亲和层析技术纯化了牛 SRY 重组蛋白, 利用 Ni-NTA 亲和层析柱吸附, 咪唑缓冲液洗脱, 聚丙烯凝胶电泳检测纯化产物, 可以看到一条清晰的 SRY 蛋白纯化条带, 分子量为 33KDa (图5, 条带1)。这说明通过亲和层析纯化获得了高均一性牛 SRY 蛋白。

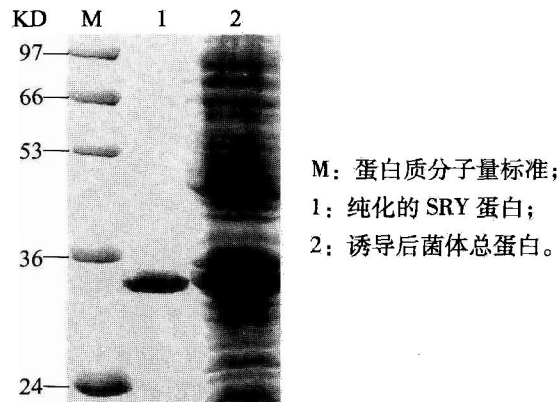


图5 SRY 蛋白的纯化

2.6 牛 SRY 蛋白与 MIS 基因启动子的相互作用

采用凝胶阻滞试验测定了牛 SRY 蛋白与 MIS 启动子的相互作用,发现将牛的 SRY 蛋白与牛或人的 MIS 启动子温育,电泳后可见明显的结合条带(图6,条带2、3),但以鼠的启动子与牛的 SRY 蛋白作用时,未见到两者的结合条带(图6,条带4)。这一研究结果说明牛 SRY 蛋白可与牛或人的 MIS 启动子在体外特异性结合。但不能与鼠的 MIS 启动子发生相互作用。

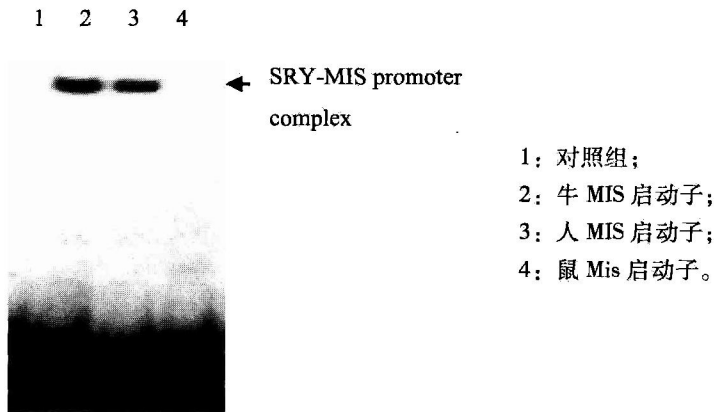
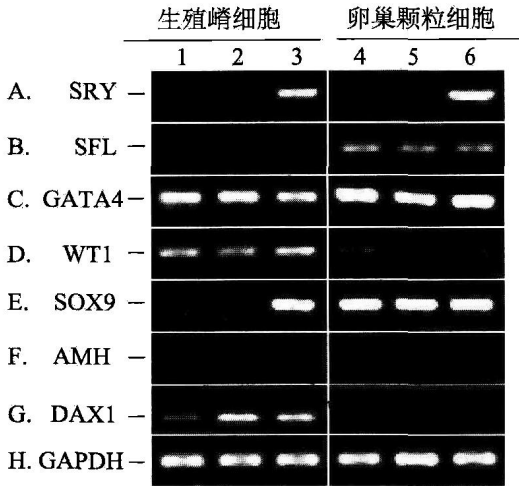


图6 牛 SRY 蛋白与 MIS (Mis) 的结合

2.7 SF1、GATA4、WT1、SOX9、MIS 和 DAX1 基因表达水平

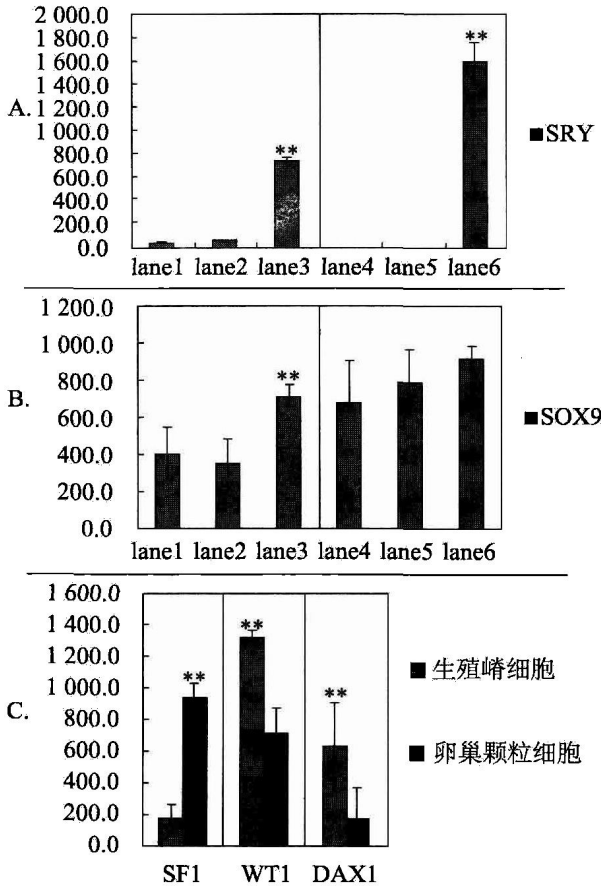
通过半定量 RT-PCR 检测两种细胞中 SF1、GATA4、WT1、SOX9、MIS 和 DAX1 基因经过 SRY 基因过表达处理后 mRNA 转录水平变化。RT-PCR 检测结果在两种细胞中进行比较。在两种细胞中导入带有 SRY 基因插入片段载体的实验组可以检测到显著的 SRY 表达(图1A,条带3、6)。在生殖嵴细胞中经过 SRY 基因过表达处理后,发现 SOX9 基因的表达显著升高($P < 0.01$),但在卵巢颗粒细胞实验组没有观察到这一现象(图7E,图8B)。SF1、GATA4、WT1、MIS 和 DAX1 在两种细胞中的检测结果表明 SRY 的过表达处理对其各自的表达水平没有影响(图7)。比较两种细胞中各基因内源表达水平发现, SF1 基因在卵巢颗粒细胞中的表达水平显著高于在生殖嵴细胞中的表达水平($P < 0.01$)。WT1 和 DAX1 基因在

生殖嵴细胞中的表达水平显著高于在卵巢颗粒细胞中的表达水平 ($P < 0.01$) (图 7B、7D、7G, 图 8C)。



1. 4 对照组为未转染质粒细胞的基因表达水平;
2. 5 对照组为转染空载体质粒 pcDNA3.1 (+) 细胞的基因表达水平;
3. 6 为转染带有 SRY 基因插入片段 pcDNA3.1-SRY 细胞的基因表达水平。

图 7 SRY 基因过表达对其他性控相关基因表达水平的影响



柱高度代表经过内参 (GAPDH) 标准化处理的光密度值。A 和 B 中 1、2、3 道代表基因在生殖嵴细胞中的表达水平; 4、5、6 道代表基因在卵巢颗粒细胞中的表达水平; 1、4 道对照组为未转染质粒细胞的基因表达水平; 2、5 道对照组为转染空载体质粒 pcDNA3.1 (+) 细胞的基因表达水平; 3、6 道为转染带有 SRY 基因插入片段载体 pcDNA3.1-SRY 细胞的基因表达水平。A 和 B 中 * * 代表和对照组相比差异极显著 ($P < 0.01$); C 中 * * 代表在两种细胞内相比差异极显著 ($P < 0.01$)。

图 8 RT-PCR 电泳图像光密度分析结果