

奶牛 ZFY、ZFX 基因片段的克隆及测序*

唐 榕 马匆匆 毛裕民

(复旦大学遗传学研究所, 上海 200433)

徐亚欧 龚荣慈

(西南民族学院牧医系, 成都 610041)

摘要 奶牛的早期胚胎性别鉴定是奶牛胚胎分割及移植技术产生较大经济效益的前提, 用 PCR 技术进行早期胚胎性别鉴定具有准确、快速、灵敏度高的特点, 利用人和鼠的性别分化相关的 DNA 序列 ZFY、ZFX 基因序列设计的引物对公牛和母牛的染色体 DNA 进行 PCR 扩增, 将扩增产物定向克隆到 pUC118 上, 获得 ZFY、ZFX 转化子, 并测定了 ZFY、ZFX 基因的序列, 发现两者同源性达 88.2%, 以此为基础可设计引物和探针, 以 PCR 方法进行高灵敏度的奶牛性别鉴定。

关键词 ZFY, ZFX, 克隆, 测序

奶牛的体外受精、胚胎分割及胚胎移植技术的应用, 迫切需要解决分割胚胎移植前的性别鉴定。若能解决这一技术, 就能使胚胎分割及移植产生较大的经济价值。过去对动物性别鉴定多采用细胞遗传学的方法即培养羊水细胞, 检查是否有 Y 染色体的存在, 而这一方法不适合对早期胚胎的鉴定。也有人采用荧光抗体技术, 但这种方法可靠性和准确性都差。近年发展起来的聚合酶链式反应^[1] (polymerase chain reaction, PCR) 技术具有准确、快速、灵敏度高的特点, 所以迅速发展的 PCR 技术很快被运用到早期胚胎性别鉴定上。国内外利用 PCR 对人胚胎的性别鉴定已成功地应用于科研和临床中, 但这一方法要应用于奶牛的胚胎性别鉴定关键在于要找到某一与奶牛性别分化相关的 DNA 序列。本文报道了对奶牛 ZFY、ZFX 基因片段的 PCR 扩增, 克隆和测序。

1 材料与方法

1.1 引物设计

为了扩增并克隆奶牛的 ZFY、ZFX 基因片段, 我们利用了已报道的 P₁-5EZ 及 P₂-3EZ 引物^[2] 并作了部分修改及增加了 BamHI 和 XbaI 两个酶切位点构成 ZF1 和 ZF2 两个引物。ZF1: 5' -CC TC TA GA TT AC AT AA TC

AC AT GG AG AG CC AC AA G-3'

ZF2: 5' -CG GG AT CC TG CA CT TC TT TG GT AT CT GA GA AA GT -3'

1.2 模板制备

模板 DNA 根据文献 [3] 的方法并略加改变而制备。自奶牛颈静脉采 15ml 血液, 肝素抗凝, 低渗处理去除红血球, 蛋白酶 K 消化, 酚、酚-氯仿、氯仿抽提, 乙醇沉淀 DNA。TE 缓冲液 (Tris-HCl 10mmol/L, EDTA 1mmol/L pH8.0) 溶解后用紫外分光光度计测定其浓度与质量。小牛胸腺组织则先洗净, 剪碎, 蛋白酶 K 消化, 酚、酚-氯仿、氯仿抽提, 乙醇沉淀 DNA。TE 溶解后用紫外分光光度计测定其浓度与质量。

1.3 PCR 扩增

在 50μl 反应体系中含 25mmol/L Tris-Cl pH8.2; 25mmol/L (NH₄)₂SO₄; 2.0mmol/L MgCl₂; 100μg/ml 明胶; 5% 甲酰胺; 引物 ZF1 与 ZF2 各 0.2μmol/L, dNTP 各 200μmol/L; 模板 (男人、女人、公牛、母牛) DNA 各 500ng。93℃ 变性 7min 后加入 2 单位 FD 耐热 DNA 聚合酶, 液体石蜡约 20μl。然后以 93℃ 变性 45s, 60℃ 退火 45s, 72℃ 延伸 60s 的条件共循环 30

* 复旦大学遗传工程国家重点实验室资助课题。

收稿日期: 1994-01-04, 修回日期: 1994-06-10

次, 最后再 72℃ 保温 5min.

1.4 扩增产物的鉴定及纯化

取 3μl 扩增产物通过 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 余下的 PCR 产物以酚、氯仿抽提, 乙醇沉淀. TE 溶解后, 人 DNA 的扩增产物利用 Hae III (美国 Promega 公司) 进行酶切, 奶牛 DNA 的扩增产物用 Pst I (美国 Promega 公司) 酶切, 再以 7.5% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳对酶切产物进行检测鉴定.

1.5 克隆

按文献 [3] 的方法进行. 将公牛及母牛的扩增产物纯化后, 分别用 BamH I 和 Xba I 双酶切, 再用这两种酶双酶切 pUC118 质粒, 将酶切的产物与质粒连接后, 转化至 *E. coli* MV1184. 在含有 Xgal 的 SOB/Amp 的平板上培养, 随机挑取若干白色菌落. 将挑出的白色菌落分别划线以挑取单菌落和消除可能存在的异源双链质粒, 然后接种于 5ml 含 Amp 的 LB 液体培养基内发酵过夜, 分别抽取质粒, 用 Xba I 和 BamH I (美国 New England Biolabs 公司) 及 Pst I 进行酶切鉴定重组子. 最后获得随机来源的 ZFY, ZFX 转化子各两个.

1.6 测序

随机来源的 ZFY、ZFX 转化子分别制备单链 DNA, 采用双脱氧链终止测定法测序^[4,5] (测序试剂盒购自瑞典 Pharmacia LKB 公司的 ³²P Sequencing Kit.).

2 结 果

2.1 PCR 产物的鉴定

从图 1 中可见未经酶切的 PCR 产物的长度无论人的还是牛的其雌雄都无差异, 约为 468bp. 人的 PCR 产物用 Hae III 酶切, 女性的产生 409bp 和 57bp 两个片段, 而男性的产生 409bp、326bp、84bp 和 57bp 四条片段. 因为 ZFX 没有 Pst I 酶切位点, 所以奶牛 DNA 的 PCR 产物用 Pst I 酶切, 母牛只有 468bp 一个片段, 而公牛则产生 468bp、356bp 和 112bp 三个片段. 这些结果表明本实验所设计的引物是合适的.

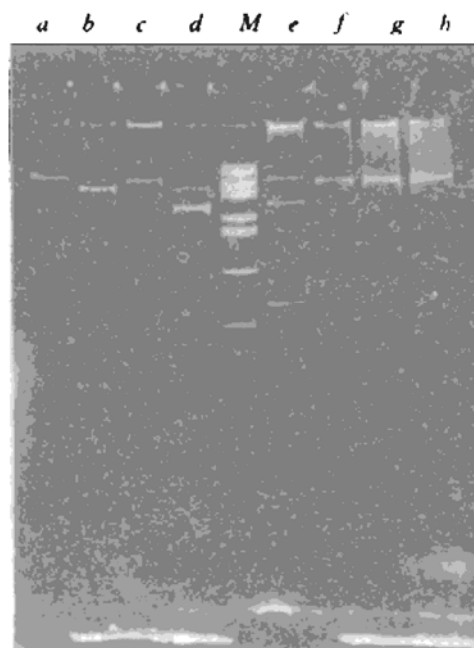


图 1 PCR 产物鉴定结果

a: 女人扩增产物; b: 女人扩增产物 HaeIII 酶切; c: 男人扩增产物; d: 男人扩增产物 HaeIII 酶切; e: 公牛扩增产物 Pst I 酶切; f: 公牛扩增产物; g: 母牛扩增产物 Pst I 酶切; h: 母牛扩增产物; M: pUC19 Hae III 酶切.

2.2 重组子的鉴定

用 BamH I, Xba I 和 Pst I 对已克隆的重组子进行酶切鉴定. 公牛的 PCR 产物经 BamH I 和 Xba I 双酶切后, 凡含有 ZFY 片段的重组子可以切出 3194bp 和 468bp 两个片段, 用 Pst I 酶切时可切出 3306bp 和 356bp 两个片段; 而含有 ZFX 片段的重组子用 BamH I 和 Xba I 酶切时切出 3194bp 和 468bp 两个片段, 而用 Pst I 酶切时则只有一个 3662bp 的片段. 由此可以区分含有 ZFX 和 ZFY 片段的克隆.

2.3 测序结果

采用双脱氧末端终止法分别测得 284 个碱基的 ZFX 序列和 313bp 的 ZFY 序列 (含引物部分). 在两个随机来源的 ZFX 克隆之间和在两个随机来源的 ZFY 克隆之间未发现有序列的差异. 已测序的 ZFX 和 ZFY 片段其同源性达 88.7%, 仅在少数位点有差异 (见图 2). 在这些地方设计引物和探针, 不需酶切就可高灵敏度地进行奶牛的性别鉴定.

```

ZFX - TTGCATGCCGTCAGGTCGACTCTAGATTACATAATCACATGGAGAGCCAC -50
      |||
ZFY -      TGCAGGTCGACTCTAGATTACATAATCACATGGAGAGCCAC -41
      |||

ZFX - AAGCTTACCAGCAAGGCGGAGAAGGOCATGAAATGCGATGAGTGGGAAA -100
      |||
ZFY - AAGCTTACCAGCAAGTCAGAGAAGGOCATGAAATGTGATGAC TGTGGGAA -91
      |||

ZFX - GCATTCTCTCATGCTGGGGCTTTGTTTACTCATAAAATGGTGCATAAAGG -150
      |||
ZFY - GCATTCTTCCATGCTGGGGCTTTGTTTACTCATAAAATGGTGCATAAAGG -141
      |||

ZFX - AAAAAGGAGCTAACAAAATGCACAAATGTAAATTC TGTGAATACGAGACA -200
      |||
ZFY - AAAAAGGAGCCAGCAAAAATGCATAAATGTAAATTC TGTGAAT--GAGACA -189
      |||

ZFX - GC TGAACAAGGGTTACTGAATCGCCACCTTTTGGCGGTCCATAGCAAGAA -250
      |||
ZFY - GC TGAACAAGGGTTATTAAATCGCCACCTTTTGGCAGTCCACAGCAAGAA -239
      |||

ZFX - CTTTCTCATATATGCGTGGAGTGTGGTAA-GGTT -284
      |||
ZFY - CTTTCCCATATATGTGTAGAGTGTGGTAAAGG TTTTCGTC ACCNATCAG -289
      |||

ZFY - AGCTCAAAAAGCACATGCCGAGTCA -313

```

图2 ZFX及ZFY片段测序结果及同源性比较

3 讨 论

利用人和鼠的ZFX和ZFY基因序列设计的引物对公牛和母牛的染色体DNA PCR扩增,其产物不能直接观察差异,必须经过酶切、电泳等步骤后才能鉴别雌雄,但作为胚胎的性别鉴定仍达不到所需要的灵敏度,所以只有测出奶牛本身的ZFX、ZFY序列并以此设计引物或探针才能达到目的。就此而言目前国内外仍未见此类报道。本实验对奶牛的ZFX及ZFY的片段进行了测序。测序的结果表明不仅奶牛的ZFX与ZFY之间有很大的同源性,而且奶牛与人、鼠的ZFX及ZFY之间也具有很高的同源性,这说明各种动物的ZFX、ZFY可能都具有较大的同源性,就差异而言各种动物的ZFX与ZFY之间的差异仅存在于不同的区域,所以根据一种动物所设计的特异性引物不一定对其他动物具有同样的特异性。要想获得奶牛性别特异的引物只有根据奶牛的ZFX及ZFY序列来设计(另文发表)。

采用ZFX及ZFY来对奶牛胚胎进行早期性别鉴定,其优点在于ZFX与ZFY有较大的同源性,可利用共同的引物先同时扩增两者,然后再利用ZFX设计内参照引物或探针,以

ZFY设计雄性特异的引物或探针,从而达到高灵敏度和高特异性。这方面的研究已获成功,我们将另文报道。而利用SRY进行性别鉴定则需要在另外的基因片段上设计内参照引物或探针。ZFY、ZFX与SRY在性别决定的过程中都是影响因素之一,也可能SRY是更早期的决定基因^[6],但从目前文献来看未见ZFY、ZFX缺失仍可完成性别分化的报道,所以ZFY和ZFX在性别分化中也可能是不可缺少的。无论SRY在性别分化中的影响是否更重要,用ZFY和ZFX的检出来进行奶牛的性别鉴定应是非常可靠的。从结果的重要性的方法的简便性来看,用ZFX和ZFY可能会比用SRY更好些。

参 考 文 献

- 1 Saiki R K, Scharf S, Faloona F *et al.* Science, 1985; **230**: 1350
- 2 Aasen E, Medrano J F. Bio/Technology, 1990; **8**: 1279
- 3 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 464
- 4 Sanger F, Nicklen S, Coulson A R. Proc Natl Acad Sci USA, 1977; **74**: 5463
- 5 Vieira J, Messing J. Methods Enzymol, 1987; **153**: 3
- 6 Tiersch T R, Mitchell M J, Wachtel S S. Human

Genetics, 1991, 87: 571

Cloning and Sequencing of ZFY and ZFX Gene From Cow. Tang Rong, Ma Congcong, Mao Yumin (*Institute of Genetics of Fudan University, Shanghai 200433, China*); Xu Yaou, Gong Rongci (*Southwest Nationalities College, Chengdu 610041, China*).

Abstract Sex identification of cow embryo in its early stage is very important. It is the premise of the possibility that the technology of separating and transplanting cow embryo can bring about great economic efficacy. PCR technology is an accurate, speedy and sensi-

tive method in sex identification of cow embryo. Using the human sex differentiation relevant DNA sequences ZFY and ZFX, two primers are designed and a fragment is amplified from the male or female cow genomic DNA. Then the fragments are cloned into the vector pUC118 and are sequenced. It is found that the fragments from ZFY gene and ZFX gene have 88.2% homologous regions. Upon this, primers and probes can be designed to identify the cow sex sensitively by means of PCR.

Key words ZFY, ZFX, clone, sequence

巢-PCR 分型检测人乳头状瘤病毒同源序列*

陈 嵩 吕懿娟

(重庆医科大学生物化学教研室, 重庆 630046)

摘要 采用 L_1 通用引物 MY 11/9 介导聚合酶链反应 (PCR), 从人生殖道疣、癌组织中扩增人乳头状瘤病毒 (HPV) 同源序列得 394—552bp DNA 片段, 再以内引物 GP 5/6 介导第二次扩增得 139—154bp 片段. 然后根据 Rsa I 酶切扩增片段的电泳图谱来分出 HPV 型别, 无需特异型别的探针进行分子杂交. 35 例宫颈癌和 30 例生殖器疣 HPV 同源序列检出率分别为 85.75% 和 96%; 12 例卵巢腺癌检出 HPV 同源序列者 7 例. 本法简便、灵敏、可靠, 并适合于临床应用.

关键词 人乳头状瘤病毒 (HPV), 聚合酶链反应 (PCR), 宫颈癌, 限制性内切酶图谱, 生殖器疣

人乳头状瘤病毒 (HPV) 感染可引起生殖器疣. 近年来细胞学^[1]、免疫组化^[2]及核酸分子杂交证实特异型别 HPV 感染与宫颈癌关系密切^[3]. 因此 HPV 分型检测具有重要理论和实践意义. 随着 PCR 技术的广泛应用, 国外学者已采用通用引物介导 PCR 和特异性寡核苷酸探针分子杂交来检测不同型别 HPV 同源序列^[4]. 本文采用 Manos 等^[5]设计的一对 L_1 通用引物 MY 11/9 扩增生殖道疣、宫颈癌和卵巢腺癌组织中 HPV 相关序列, 又以 Snijders 等^[6]设计的 L_1 通用引物 GP5/6 为内引物作第

二次扩增, 根据不同型别的 Rsa I 酶切扩增片段的特征性电泳图谱即可分型, 无需分子杂交. 本法简便、可靠、灵敏、无论活检组织、脱落细胞以及石蜡包埋组织均适用.

1 材料与方法

1.1 标本来源

女性生殖器疣活检组织 30 例. 宫颈高、中及低分化鳞癌 35 例, 其中 30 例为石蜡包埋组

* 四川省卫生厅资助项目.

收稿日期: 1994-01-17, 修回日期: 1994-04-25