

大鲵 2 个 Sox 基因 HMG-box 的克隆及分析

许宝红^{1a}, 肖调义^{1a*}, 肖真明^{1a}, 苏建明^{1b}, 刘巧林^{1a}, 陈开健^{1a}, 王冬武², 徐永福²

(1.湖南农业大学 a.动物科学技术学院; b.动物医学院, 湖南 长沙 410128; 2. 湖南省水产科学研究所, 湖南长沙 410153)

摘 要: 为探明 Sox 基因在物种进化中的保守性及其性别分型, 以大鲵雌、雄个体为材料, 参照 Sox 基因 HMG-box 保守区的序列, 设计简并引物扩增, 两因子均在雌、雄个体内得到 217 bp PCR 扩增产物, 不存在性别差异。将二者编码的氨基酸序列与 NCBI 中其他物种 Sox 基因编码的氨基酸序列进行比对, 其中一个基因与人、斑马鱼、家鼠、鸡、热带爪蟾、扬子鳄 *Sox11* 基因的同源性均为 90%, 另一个基因与罗非鱼、鸭嘴兽、家鼠、红鳍东方鲀、斑马鱼、鸡、人、非洲爪蟾和大鲵 *Sox14* 基因的同源性均为 90%, 故根据大鲵的学名, 将这 2 个基因分别命名为 *adSox11* 和 *adSox14c*。 *adSox11* 和 *adSox14c* 在大鲵精巢、卵巢、肾脏和心脏中均有不同程度表达, 而在胃和肝脏中几乎不表达。

关 键 词: 大鲵; Sox 基因; 高迁移率族蛋白盒

中图分类号: S931.9 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2012)01-0073-05

Cloning and sequence analysis of HMG-box of two Sox genes in *Andrias davidianus*

XU Bao-hong^{1a}, XIAO Tiao-yi^{1a*}, XIAO Zhen-ming^{1a}, SU Jian-ming^{1b},

LIU Qiao-lin^{1a}, CHEN Kai-jian^{1a}, WANG Dong-wu², XU Yong-fu²

(1. a. College of Animal Science and Technology; b. College of Animal Medical, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2. Institute of Fisheries Science of Hunan Province, Changsha 410153, China)

Abstract: Using a pair of degenerate primers designed based on HMG-box, a conserved region in Sox gene, two 217 bp-fragments were amplified and cloned from the male and the female *Andrias davidianus* which exhibited no sexual difference by PCR-SSCP analysis. Amino acid sequence analysis showed one of the 217 bp-fragments showed 90% homology to *Sox11* gene of human, zebrafish, mouse, chicken, *Xenopus tropicalis* and *Alligator sinensis* respectively and the other showed 90% homology to *Sox14* gene of Tilapia, *Ornithorhynchus anatinus*, mouse, *Fugu rubripes*, zebrafish, chicken, human and *Xenopus Laeuis* respectively, thereafter the two fragments were termed as *adSox11* and *adSox14c* respectively. Sox gene transcripts were found in spermary, ovary, heart and kidney by RT-PCR but not stomach and liver of *Andrias davidianus*. These results collectively suggested that Sox gene was highly conserved across species Sox gene and was selectively expressed among tissues and organs to accommodate the need of development.

Key words: *Andrias davidianus*; Sox genes; high mobility group box(HMG-box)

Sox 基因家族是参与发育的基因家族之一, 在性别决定、早期胚胎发育、神经发育等方面发挥重要作用。在哺乳类、鸟类、爬行类、两栖类、鱼类等进化地位不同的动物中均已发现 Sox 基因^[1-4],

收稿日期: 2011-10-22

基金项目: 国家自然科学基金项目(31040083); 湖南省科技计划项目(2009NK3104)

作者简介: 许宝红(1979—), 女, 湖南隆回人, 硕士, 讲师, 主要从事水产动物遗传育种研究, xbht568@126.com; *通信作者, tyx1128@yahoo.com.cn

且 Sox 基因家族的成员具有高度保守性^[5-9]。目前,有关 Sox 基因的研究^[10-11]已深入到低等多孔动物到高等哺乳类动物等进化地位不同的各物种。

大鲵(*Andrias davidianus*)是水生动物到陆生动物的过渡类型,是现存两栖动物中最大的一种^[12],是中国特有的两栖动物,有着特殊的进化意义。肖调义等^[13]已克隆大鲵 *Dmrt* 基因的 DM 结构域,发现不同进化地位物种的 *Dmrt* 基因 DM 结构域存在高度的同源性,且在系统进化上高度保守。闫楠等^[14]首次发现在大鲵体内存在 Sox 基因(成功克隆了大鲵3个 Sox 基因),且比对分析出与人 Sox 基因在分子进化上具有高度的保守性。笔者将大鲵 Sox 基因与水生类、爬行类、鸟类等不同进化地位物种的同源基因进行比较,以期为研究 Sox 基因家族在不同进化地位脊椎动物中的进化保守性提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材 料

大鲵雌、雄个体各2尾,采自湖南省张家界大鲵保护中心。成熟雄体平均体质量10.5 kg,平均体长80 cm。成熟雌体平均体质量6 kg,平均体长45 cm。解剖后取肾脏、精巢、卵巢等内脏组织,-80℃冻存储备用。

宿主菌为大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 α ,由湖南农业大学水生生物实验室保存。

1.2 方 法

1.2.1 大鲵肌肉组织 DNA 和总 RNA 的提取

采用 TaKaRa 公司的 Universal Genomic DNA Extraction Kit Ver.3.0 试剂盒提取大鲵肌肉组织 DNA。用 Trizol 法提取总 RNA,并将其溶于焦碳酸二乙酯(DEPC)处理过的无菌水中,-80℃保存。

1.2.2 PCR 产物的克隆及 SSCP 分析

以大鲵基因组 DNA 为模板,采用简并 PCR 技术扩增大鲵 Sox 基因 HMG 盒。参照文献^[15-16],设计如下简并引物,用于扩增 Sox11 基因 HMG-box。P1:5'-AAGCGACCCATGAA(C/T)GC(A/G/C/T)TT(C/T)AT(G/A/C/T)G-3';P2:5'-ACGAGGTCGGTA

(C/T)TT(A/G)TA(A/G)T(C/T)(G/A/T/C)GG-3'。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

克隆后,挑取30个阳性单菌落,分别加到1 mL 含有氨苄的 LB 培养基中培养。对菌落 PCR 产物进行 PCR-SSCP 分析。PCR 反应条件:94℃预变性5 min;94℃变性40 s,54℃退火50 s,72℃延伸50 s,5个循环;94℃变性40 s,57℃退火50 s,72℃延伸50 s,30个循环;72℃再延伸10 min。扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测。

用10%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳对插入片段进行分析。将5 μ L 纯化产物与6 μ L 变性液(98%甲酰胺,0.5 g/L 溴酚兰,0.5 g/L 二甲苯蓝)混匀,98℃变性8 min 后冰浴10 min,点样,20 V/cm 电泳2 h,10%冰乙酸固定,0.1% AgNO₃染色,3% Na₂CO₃显色,拍照,最后筛选出有差异的阳性克隆,并委托 Invitrogen 公司进行测序。

测序结果经 DNAMAN 软件去除两端引物序列后进行 BLAST 分析。

1.2.3 不同组织表达的 RT-PCR 检测

应用 RT-PCR 对大鲵 Sox11 基因在卵巢、心脏、精巢、肾脏、胃、肝脏等6个不同组织的表达进行检测,以管家基因 β -actin 作为阳性对照。根据已测出的大鲵 Sox11 基因保守区序列设计特异引物,用以检测其组织表达情况。

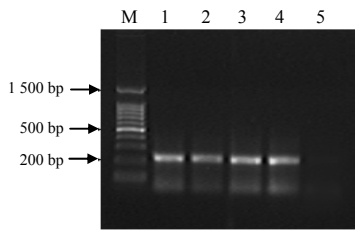
PCR 反应体系:2.5 μ L 10 \times Buffer, 2 μ L dNTP (2.5 mmol/L dNTPs), 1 μ L 引物(10 μ mol/L), 1 μ L cDNA, 0.5 μ L ExTaqDNA 聚合酶(5 U/ μ L),加灭菌 ddH₂O 补足至25 μ L。

PCR 循环条件:97℃预变性5 min;94℃变性30 s,63℃退火30 s,72℃延伸30 s,40个循环;72℃延伸10 min。4℃保存。10%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物。用凝胶成像仪拍照。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增结果

利用设计的简并引物,采用常规 PCR 扩增大鲵 sox 基因的 HMG-box,经普通琼脂糖凝胶电泳,在雌、雄大鲵个体中各扩增出1条长度约220 bp 的带(图1)。



M Marker; 1-2 雌; 3-4 雄; 5 阴性对照。
图 1 大鲵 Sox 基因的 PCR 扩增结果

Fig.1 Result of PCR for Sox gene in *Andrias davidianus*

2.2 PCR-SSCP 筛选结果

PCR-SSCP 技术是一种基于 PCR 的 DNA 单链构象多态性分析技术,相同长度的 DNA 片段,其碱基的差异可通过迁移率的差异来体现。雌、雄大鲵的 2 条均约为 220 bp 的片段,经 PCR-SSCP 筛选和聚丙烯酰胺垂直电泳后迁移率不一致(图 2),说明这 2 条片段尽管长度一致,但是分属于 2 个不同的基因,且两基因为雌、雄大鲵所共有。

2.3 大鲵 Sox 基因的 HMG-box 氨基酸序列比对结果

将筛选到的阳性克隆进行测序,其编码的氨基酸序列经 GenBank 同源性检索,得到 2 个 Sox 基因

HMG-box 保守序列。采用 DNAMAN 软件对大鲵 Sox 基因 HMG-box 氨基酸序列进行比对的结果见图 3、图 4。所用序列登录号见表 1。本试验结果与 NCBI 中已经登录的大鲵 4 个 Sox 基因的相似性达到 89.01%。与 NCBI 中已登录的大鲵 *Sox14a* 和 *Sox14b* 的 HMG-box 氨基酸序列相比,大鲵 *Sox14c* 只在第 46 位由丝氨酸(S)代替了 *Sox14a* 的脯氨酸(P),在第 64 位到第 69 位分别由赖氨酸(K)、亮氨酸(L)、谷氨酰胺(Q)、异亮氨酸(I)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)代替了 *Sox14a* 和 *Sox14b* 的天冬氨酸(D)、酪氨酸(Y)、赖氨酸(K)、酪氨酸(Y)、精氨酸(R)、脯氨酸(P)。

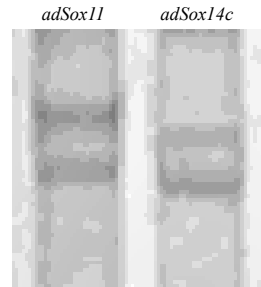


图 2 PCR-SSCP 分析筛选结果

Fig.2 Selected by PCR-SSCP

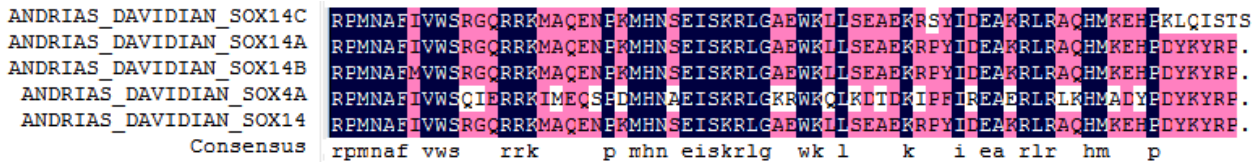


图 3 大鲵 Sox 基因的 HMG-box 氨基酸序列比对结果

Fig.3 Alignment of the nucleic acid sequences of Sox gene HMG-box in *Andrias davidianus*

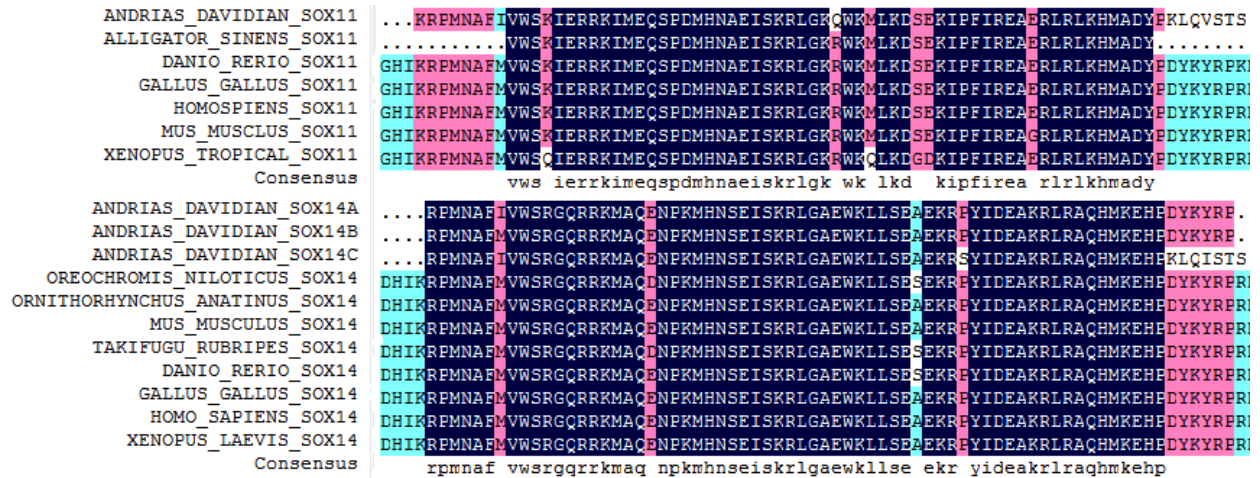


图 4 大鲵 Sox 基因与其他物种 Sox 基因氨基酸序列同源性的比较结果

Fig.4 Homology of amino acid sequence of Sox genes between *Andrias davidianus* and other species

表 1 用于比对的各物种 *Sox11* 和 *Sox14* 基因及其 GenBank 登录号

Table 1 GenBank accession numbers of *Sox11* and *Sox14* used for blast

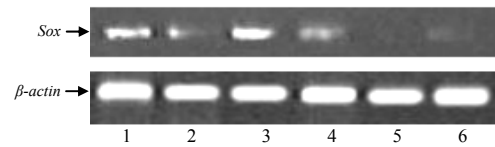
物种名称	基因名称	登录号
人(<i>Homo sapiens</i>)	<i>Sox11</i>	NM_003108
家鼠(<i>Mus musculus</i>)	<i>Sox11</i>	NM_009234
鸡(<i>Gallus gallus</i>)	<i>Sox11</i>	NM_205187
非洲爪蟾(<i>Xenopus laevis</i>)	<i>Sox11</i>	NM_001008052
斑马鱼(<i>Danio rerio</i>)	<i>Sox11</i>	AJ237813
扬子鳄(<i>Alligator</i>)	<i>Sox11</i>	AY375184
罗非鱼(<i>Oreochromis niloticus</i>)	<i>Sox14</i>	ABO26873.1
鸭嘴兽(<i>Ornithorhynchus anatinus</i>)	<i>Sox14</i>	AAM51629.1
家鼠(<i>Mus musculus</i>)	<i>Sox14</i>	AAI00556.1
红鳍东方鲀(<i>Takifugu rubripes</i>)	<i>Sox14a</i>	AAQ18498.1
斑马鱼(<i>Danio rerio</i>)	<i>Sox14</i>	NP_001032769.1
鸡(<i>Gallus gallus</i>)	<i>Sox14</i>	NP_990092.1
人(<i>Homo sapiens</i>)	<i>Sox14</i>	NP_004180.1
非洲爪蟾(<i>Xenopus laevis</i>)	<i>Sox14</i>	NP_001165685.1
大鲵(<i>Andrias davidianus</i>)	<i>Sox14a</i>	ADN52691.1
大鲵(<i>Andrias davidianus</i>)	<i>Sox14b</i>	ADN52692.1

在 GenBank 数据库 BLAST 搜索与这2个 Sox 基因片段同源性最高的序列,用 DNAMAN 软件进行序列分析。结果显示,其中一个基因的氨基酸序列与人、斑马鱼、家鼠、鸡、热带爪蟾、扬子鳄 *Sox11* 基因的同源性均为90%;另一个基因的氨基酸序列与罗非鱼、鸭嘴兽、家鼠、红鳍东方鲀、斑马鱼、鸡、人、非洲爪蟾、大鲵 *Sox14*基因的同源性也均为90%。

习惯上,与 *SRY* 的 HMG 保守区有着50%以上相似性的蛋白都归为 Sox 基因蛋白。经序列搜索及比对后发现,本研究中克隆出的2个基因 DNA 序列与人 *SRY* HMG-box 区 DNA 序列的相似性都为99%,氨基酸序列一致性都为90%,所以,可以确定这2个序列都属于 Sox 基因家族中的成员。根据大鲵的学名,将与 NCBI 数据库中 *Sox11*相似性为90%的大鲵 Sox 片段命名为 *adsSox11*。在 NCBI 中已经登录的大鲵 *Sox14*已经有3条,经比对后发现,本研究中得到的基因与其他3条的同源性为89.01%,故按先后把该基因命名为 *adSox14c*。更准确的命名还需得到基因 cDNA 全长序列,并了解其相关功能后才能确定。

2.4 在组织中的表达结果

由图5可见,RT-PCR 结果表明,两基因在精巢和卵巢中都有较强的表达,在肾脏和心脏中表达较弱,而在胃、肝脏中没有表达。



1 卵巢; 2 心脏; 3 精巢; 4 肾脏; 5 胃; 6 肝脏。

图 5 大鲵 Sox 基因在不同组织中的表达

Fig.5 Sox gene expression in different tissues of *Andrias davidianus*

3 讨论与结论

*Sox11*基因属于 C 亚族,常表达于发育中的中枢神经系统和外周神经系统,主要功能是指导神经分化和神经决定^[17]。*Sox14*基因属于 B 亚族,是转录抑制因子,参与胚胎发育和细胞调控^[18]。人类 *SRY/Sry* 基因的表达有一定的组织特异性,仅在睾丸和脑中表达,而在其他组织中无表达^[19]。根据本试验结果,在大鲵成体体内,Sox 基因在卵巢、心脏、精巢、肾脏组织中均有不同程度的表达,而在胃和肝脏中无表达,显示该基因具有一定的组织表达特异性,而不是集中表达于某个组织中,而且主要表达于卵巢等与性腺相关的组织中。由此可推测,*adSox11*基因可能参与大鲵性腺组织器官的功能执行,其具体功能需进一步研究。

本试验从大鲵体内克隆出了 *adSox11* 和 *adSox14c* 基因的 HMG-box 保守序列。*adSox14c* 基因与 NCBI 中已经登录的大鲵3个 Sox 基因的 HMG-box 氨基酸序列相似性达到89.01%,只在第46位由 *adSox14c* 的丝氨酸(S)代替了 *Sox14a* 的脯氨酸(P); *adSox14c* 与罗非鱼、鸭嘴兽、家鼠、红鳍东方鲀、斑马鱼、鸡、人、非洲爪蟾、大鲵的 *Sox14*基因的同源性均达90%,大鲵 *Sox14c* 基因的第7位由异亮氨酸(I)代替了其他物种的蛋氨酸(M),第46位由丝氨酸(S)代替了其他物种的脯氨酸(P)。*Sox14*的高度保守区域为 RPMNAF, VWSRGQRRKMAQ, NPKMHNSEISKRLGAEWKLLSE, EKR, YIDEAK RLRAQHMKEHP。*adSox11*第36位由谷氨酰胺(Q)代替了精氨酸(R),其保守序列为 VWS, IERRKIM

EQSPDMHNAEISKRLGK、KIPFIREA 在 RLRLKH MADY 区域高度保守。尽管大鲵在物种进化中介于水生到陆生的过渡阶段,但其 Sox 基因是高度保守的(产生个别氨基酸的突变)。

利用 SSCP 可以把仅相差1个碱基的片段区别开来。黄建安等^[20]、吴添文等^[21]分别利用 SSCP 技术分析了茶树 *PPO* 基因分型和家兔 *KAP6.1* 基因分型,汪桂玲等^[16]利用 SSCP 技术分析得到斑节对虾雌雄个体3种相异带型。杨超等^[22]发现蛇的 Sox 基因 SSCP 带型在雌雄个体间有差异。亓海燕等^[2]对中华绒螯蟹性腺中特异表达的 Sox 基因经序列测定后发现其片段无性别差异性。本试验中通过 SSCP 筛选得到的 *adSox11* 和 *adSox14* 基因,在雌、雄大鲵体内同时存在,无性别差异,与汪桂玲、杨超等的结论相悖。大鲵 Sox 基因是否存在雌核相异性,还需在测定其基因全长 cDNA 序列和探明其生物学功能后才能确定。

参考文献:

- [1] 程双怀,陈冬生,聂刘旺.中华绒螯蟹2个Sox基因HMG-box的克隆及测序[J].发育与生殖生物学报,2003(11):205-210.
- [2] 亓海燕,邱高峰.一个在中华绒螯蟹性腺中特异表达的Sox基因HMG盒区的克隆与鉴定[J].自然科学进展,2009,19(3):279-285.
- [3] 刘艳红,楼允东,邱高峰.锯缘青蟹Sox基因的PCR扩增[J].上海水产大学学报,2003,12(增刊):24-27.
- [4] 陈启龙,唐鑫生.大绿蛙Sox基因和Dmrt基因的PCR-SSCP分析[J].四川动物,2007,26(2):319-322.
- [5] 郭宝成,李俊兵,童超波,等.一种四倍体鲤科鱼Sox基因的克隆和序列分析[J].科学通报,2008,53(12):1395-1402.
- [6] 葛永斌,曹承和,聂刘旺.饰纹姬蛙7个Sox基因的克隆及序列分析[J].生物学杂志,2008,25(3):36-40.
- [7] 张小艳,赵刚,刘江,等.东稀有鮡鲫(*Rare gudgeon*) Sox基因的克隆及序列分析[J].武汉大学学报:理学版,2006,52(2):213-219.
- [8] Chardard D, Chesnel A, Goze C, et al. Pw Sox1: The first member of the Sox gene family in Urodeles[J]. Nucleic Acids Research, 1993, 21: 3576.
- [9] Goze G, Poulat F, Berta P, et al. Partial cloning of Sox11 and Sox12 two new human Sox genes[J]. Nucleic Acids Research, 1993, 21(12): 2943.
- [10] Wright E M, Snopek B, Koopman P, et al. Seven new members of the Sox gene family expressed during mouse development [J]. Nucleic Acids Research, 1993, 21(3): 744.
- [11] Jager M, Quéinnec E, Houliston E, et al. Expansion of the Sox gene family predated the emergence of the Bilateria[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2006, 39(2): 468-477.
- [12] 费梁.中国两栖动物图鉴[M].郑州:河南科学技术出版社,1999:38-40.
- [13] 肖调义,吴宝林,葛熹凯,等.中国大鲵*Dmrt*基因DM结构域的克隆及序列分析[J].水生生物学报,2009,33(1):89-94.
- [14] 闫楠,朱必才,相学军,等.野生中国大鲵Sox基因的克隆与序列分析[J].生物学杂志,2010,27(6):5-10.
- [15] Koopman P, Gubbay J, Vivian N, et al. Male development of chromosomally female mice transgenic for *Sry*[J]. Nature, 1991, 351(6322): 117-121.
- [16] 汪桂玲,朱琴,李家乐.斑节对虾Sox基因HMG盒的PCR扩增及SSCP分析[J].水产学报,2005,29(4):478-481.
- [17] 沈建明,朱冬发,吴琼.三疣梭子蟹Sox基因HMG盒的克隆分析[J].水产科学,2008,27(2):59-64.
- [18] 袁虎,王秋菊,韩东一.Sox家族基因的功能及其研究进展[J].国外医学遗传学分册,2005,28(6):332-335.
- [19] 朱必才,高建国,张子峰,等.哺乳动物性别决定及其机制的研究[J].细胞生物学杂志,2002,24(5):282-286.
- [20] 黄建安,黄意欢,罗军武,等.茶树多酚氧化酶基因的SNP分析[J].湖南农业大学学报:自然科学版,2007,33(4):454-460.
- [21] 吴添文,冯凯,何孟颖,等.6个家兔群体*KAP6.1*基因的遗传多样性分析[J].湖南农业大学学报:自然科学版,2010,36(6):666-672.
- [22] 杨超,杨传秀,聂刘旺.2种蛇Sox基因的PCR-SSCP分析[J].动物学杂志,2003,38(1):8-12.

责任编辑:王赛群