

SRY 基因检测在医学遗传学实验教学中的开展^①

宫磊¹,朱晓蕾¹,卜文婕¹,林爱琴¹,武其文²

(1. 皖南医学院医学微生物学教研室/医学遗传学研究室,安徽 芜湖 241002

E-mail:leigong03@126.com;

2. 皖南医学院附属弋矶山医院检验科,安徽 芜湖 241001)

摘要: **目的** 基于转化医学的思想,我们在医学遗传学实验教学中开展案例式教学——性别决定区 Y(SRY) 基因的检测,以在培养实践性人才的同时,为临床提供可借鉴的实验方法。**方法** 从 14 例发育正常的人体外周血标本中提取基因组 DNA,将学生分组,每组分别采用 PCR 法扩增 SRY 基因和 β -Actin 基因,琼脂糖凝胶电泳检测。随机挑选 2 例 SRY 基因扩增产物进行测序分析。**结果** 14 例标本中 8 例男性标本 SRY 基因检测结果为阳性,6 例女性标本为阴性,检测结果与标本实际性别相符。2 例 SRY 基因扩增产物经测序分析为目标序列。**结论** 案例式的 SRY 基因检测实验教学使学生在掌握 PCR、琼脂糖凝胶电泳技术的同时,更了解到这些技术在基因诊断中的应用。实验所建立的检测方法具有一定的临床参考价值,体现了基础医学教育服务于临床,并向临床转化的思想。

关键词: SRY 基因;转化医学;案例式教学;医学遗传学;实验教学

中图分类号: G642 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-5817(2017)02-0155-03

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2017.02.026

医学遗传学是一门医学与遗传学相结合的桥梁学科,主要讲述遗传学的一般规律以及遗传病的分类、发病的遗传机制、遗传方式、临床表现、诊断和预防等^[1-2]。随着分子医学的飞速发展,遗传病的范畴逐渐扩大,由发病率较低的单基因病、染色体病扩展到包括先天缺陷、精神分裂症、心脑血管疾病、肿瘤等常见病在内的多种疾病^[3-5]。对这些疾病发病机制的进一步探索、早期诊断、预防和根本治疗,需要大量具有扎实的医学遗传学背景知识和相关技术的专门人才^[6]。为了更好地满足临床需求,以培养实践性人才为出发点,我们在医学遗传学本科实验教学中开展案例式教学——性别决定区 Y (sex determining region Y, SRY) 基因的检测实验。

1 对象与方法

1.1 对象 授课对象为皖南医学院 2013 级医学检验专业四年制三年级学生 ($n=60$)。

1.2 方法

1.2.1 实验材料 肝素锂抗凝剂;血液基因组 DNA 提取试剂盒(购自天根生化科技有限公司);Taq DNA 聚合酶(购自美国 Thermo 公司);dNTPs(购自美国 Promega 公司);GelRedTM 核酸凝胶染色剂(购自美国 Biotium 公司);引物由上海生工生物工程公司合成。

1.2.2 实验方法 人体外周血标本 14 例,来自皖南

医学院附属弋矶山医院检验科,标本采集对象均为发育正常的体检者。将采集的 14 例肝素锂抗凝全血标本置于 -20°C 下冰柜冻存。将全血室温解冻后,取 $300\ \mu\text{l}$,采用天根血液基因组 DNA 提取试剂盒提取 DNA,最后加 $200\ \mu\text{l}$ 洗脱缓冲液溶解 DNA。

引物设计和合成:NCBI 网站在线设计目标基因 (SRY 基因) 和内参基因 (β -Actin 基因) 的引物。引物序列及扩增片段大小见表 1。

表 1 PCR 扩增 SRY 基因和 β -Actin 基因的引物

基因	引物序列(5'-3')	目标片段大小(bp)
SRY	ACGCATTCATCGTGTGGTCT	237
	AACTGCAATTCTTCGGCAGC	
β -Actin	AAGTCCTGCCCTCATTGCC	299
	CAGTGAGGACCCTGGATGTG	

聚合酶链反应及琼脂糖凝胶电泳:对 14 例标本所提取的基因组 DNA 分别扩增 SRY 基因编码序列和 β -Actin 基因部分序列。PCR 总反应体积为 $50\ \mu\text{l}$:模板 DNA $2\ \mu\text{l}$,Taq 酶 $2.5\ \text{U}$, $10\times$ buffer $5\ \mu\text{l}$, MgCl_2 $1.5\ \text{mmol/L}$, dNTPs $0.2\ \text{mmol/L}$, 上游及下游引物各 $0.5\ \mu\text{mol/L}$, 加超纯水至总体积 $50\ \mu\text{l}$ 。PCR 循环条件为: 95°C 预变性 $3\ \text{min}$, 95°C 变性 $30\ \text{s}$, 57°C 退火 $30\ \text{s}$, 72

① 基金项目:皖南医学院教学研究项目(2012jyxm18)

℃延伸 1 min,共 35 个循环,最后 72 ℃延伸 5 min。取 10 μl PCR 扩增产物加样,同一例标本的 SRY 基因和 β-Actin 基因 PCR 产物加入同一个加样孔中,1.2%琼脂糖凝胶电泳 50 min(电压 100 V),GelRed™ 染液染色,凝胶成像系统中观察结果,摄片保存。

DNA 测序:随机挑选 2 例男性标本 SRY 基因的 PCR 产物送上海生工生物工程公司行 DNA 测序,测序结果在 NCBI 网站 BLAST 比对验证。

1.2.3 教学实施过程 课前准备:要求学生课前查阅资料,了解 PCR 和琼脂糖凝胶电泳的相关原理、操作步骤;通过 OMIM 网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>)了解 SRY 基因相关信息。教师事先提取出 14 例标本的基因组 DNA。课堂教学过程:首先教师通过 PPT 简要介绍聚合酶链反应的原理、应用领域;SRY 基因的结构、功能和临床检测意义;阐明引物和扩增片段的大小、位置以及 PCR 反应的体系和循环条件;介绍实验所用的仪器、材料。接着教师示教微量加样器的使用方法及 PCR 反应体系的配制。然后按 3~4 人一组将学生分组,每组领用待检 DNA 模板(作为待检标本,不告知标本的实际性别)、引物以及反应体系中其他试剂的混合物;分别配制目标基因和内参基因的反应体系,标记后置于冰上。待 8 组配制完毕,统一置于 PCR 仪中扩增。学生在教师的指导下完成琼脂糖凝胶制备过程,待 PCR 反应结束后每组依次加样,电泳检测结果,凝胶成像系统观察、摄片。实验结果的讨论分析:先由学生分析实验结果,进行基因诊断、判断标本性别,讨论实验方法,并分组汇报。然后

教师公布每组 DNA 样本的实际性别,与学生实验结果进行对比分析并答疑,学生课后撰写实验报告。随机挑选 2 例男性标本 SRY 基因的 PCR 产物进行测序分析。

2 结果

2.1 PCR 结果 14 例标本中 8 例男性标本均扩增出 SRY 基因和 β-Actin 基因目标片段,SRY 检测结果为阳性;6 例女性标本均扩增出 β-Actin 基因目标片段,未见 SRY 基因片段,SRY 基因检测结果为阴性(见图 1),检测结果与标本实际性别相符。

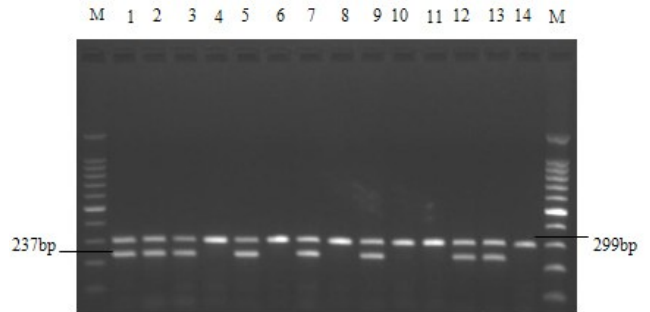


图 1 14 例外周血标本的 SRY 基因和 β-Actin 基因扩增结果注:M 为 100 bp DNA Ladder Marker;1、2、3、5、7、9、12、13 为男性标本,SRY 基因检测结果为阳性;4、6、8、10、11、14 为女性标本,SRY 基因检测结果为阴性

2.2 DNA 测序结果 2 例男性标本 SRY 基因扩增产物的测序结果,经 NCBI 网站 BLAST 比对验证为 SRY 基因目标序列,其中 1 例测序图见图 2。

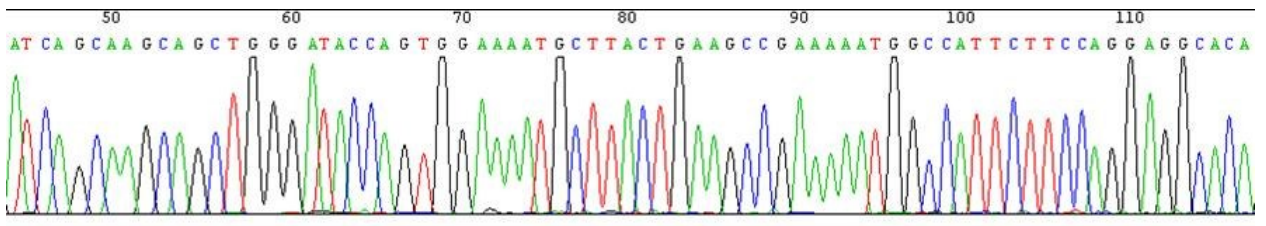


图 2 1 例男性标本 SRY 基因的测序结果

3 讨论

SRY 基因是 Y 染色体上的性别决定序列,定位于 Yp11.31,全长 1108 bp,只含有一个外显子,是胚胎发育早期促使未分化性腺向睾丸分化的关键基因。SRY 基因的缺失、突变或易位可导致性发育异常,引起 46,XY 女性性反转综合征或 46,XX 男性性反转综合征,临床常表现为不育^[7-10]。因此开展 SRY 基因的检测

对于性发育异常疾病或不育症的病因研究、诊断和鉴别诊断都具有重要的临床意义。受转化医学思想的启发,我们欲在医学遗传学实验教学中开展既适合教学,又可应用于临床且取材上不受病例标本限制的基因诊断实验,鉴于 SRY 基因检测的临床意义和男性特有而女性缺如的特点,我们选择其作为基因诊断的靶基因,以男性和女性两种 DNA 标本为模板,使检测结果既

有阳性又有阴性,符合临床实际检测情况。实验方法上设置内参照,以鉴别实验结果中可能存在的假阴性,使学生意识到实验方法的严谨性在临床检测中的重要性。在实验教学开始之前,要求学生查阅相关资料,明确实验目的,增强实验的主动性。整个实验教学过程模拟临床基因诊断过程,使学生在检测、分析、判断、思考中掌握了PCR和琼脂糖凝胶电泳技术,更了解了这些技术在疾病诊断中的应用。这种案例式情景式的实验教学模式提高了学生的学习兴趣,加深了他们对实验方法的理解,增强了他们运用知识,技术解决实际问题的信心。此外,由于PCR反应时间较长,我们在PCR反应的实验间隙还穿插了“正常人类G显带染色体识别”教学,解决了课时有限的矛盾,也避免了单一实验的单调、枯燥,提高了教学效率。在前期的预实验中,我们设计了多对引物,避开目标基因和内参基因的多态位点,并使内参基因上下游引物分处于两个内含子中以排除DNA标本中可能残留的RNA的干扰,经过多次PCR,筛选出灵敏度高、特异性强、重复性好、可在同一循环条件下扩增的SRY和 β -Actin基因引物。对14例外周血标本的检测结果与样本实际性别相符,PCR产物经测序验证为目标序列,表明所建立的SRY基因检测方法具有一定的临床参考价值,体现了基础医学教育服务于临床并向临床转化的思想。

参考文献:

- [1] 杨保胜,李刚. 医学遗传学[M]. 北京:高等教育出版社, 2014:3-6.
- [2] 左俊. 医学遗传学[M]. 6版. 北京:人民卫生出版社, 2013:1-6.
- [3] 陆国辉,徐湘民. 临床遗传咨询[M]. 北京:北京大学医学出版社, 2007: 181-515.
- [4] 吕震,俞渊,唐乾利,等. ABCB11基因在胆石病中的作用及其研究进展[J]. 右江民族医学院学报, 2015, 37(3): 493-495.
- [5] 梁莉. α -地中海贫血的筛查与产前诊断的研究进展[J]. 右江民族医学院学报, 2015, 37(1):143-145.
- [6] 罗会元. 从历史的观点谈我国医学遗传学的出路[J]. 基础医学与临床, 2008, 28(5):417-418.
- [7] Larney C, Bailey TL, Koopman P. Switching on sex: transcriptional regulation of the testis-determining gene Sry[J]. Development, 2014, 141(11): 2195-2205.
- [8] Graves JA. In retrospect: Twenty-five years of the sex-determining gene[J]. Nature, 2015, 528(7582): 343-344.
- [9] McClelland K, Bowles J, Koopman P. Male sex determination: insights into molecular mechanisms[J]. Asian J Androl, 2012, 14(1):164-171.
- [10] 邢娅,季星,肖冰,等. 六例Y染色体短臂片段易位所致46,XX男性综合征患者的细胞和分子遗传学研究[J]. 中华医学遗传学杂志, 2012, 29(4):408-412.

收稿日期:2016-08-20;修回日期:2016-09-28

(上接第154页)

参考文献:

- [1] 黄川锋,张冬. 高职医学检验技术专业生物化学检验教学改革探索[J]. 继续医学教育, 2016, 30(3):10-11.
- [2] 何平. 医学检验本科专业临床生物化学检验实验教学改革探索[J]. 右江民族医学院学报, 2013, 35(6):865-866.
- [3] 曾方银,李强,包杰,等. 医学检验本科生临床生化实验教学探讨[J]. 山西医科大学学报:基础医学教育版, 2010, 12(3):288-291.
- [4] 岑叶平,费红军,汪文娟. 高职医学检验技术专业实验教

学改革与创新探析[J]. 安徽卫生职业技术学院学报, 2010, 9(4):92-93.

- [5] 李玉芹,刘蕊. 与临床紧密对接的临床生物化学检验技术教学改革与创新[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(24): 3455-3456.
- [6] 周江,唐植昭,王龙武. 临床生物化学检验实验教学改革探讨[J]. 右江民族医学院学报, 2014, 36(6):937-938.
- [7] 刘建强. 高职医学检验专业《生物化学检验》教学方法探讨[J]. 中国医学教育技术, 2010, 24(1):99-101.

收稿日期:2016-07-13;修回日期:2016-08-02