

SRY 基因的检测

【教学对象与学时】

教学对象：临床医学七年制及五年制本科生

学时：4 学时

【预习要求】

PCR 反应的基本原理。

性别检测的基本原理。

性别检测的基本应用。

【目的要求】

掌握 PCR 反应的基本原理。

掌握性别决定的分子机制。

掌握用 PCR 扩增检测性别的方法。

掌握用 PCR 扩增检测性别方法的应用。

【重点和难点】

重点：如何判断性别结果

难点：性别判断方法的应用理论

【教学过程设计】

课前提问；

讲解原理及步骤

注意事项；

学生分组实验；

讨论和总结；

【课前提问】

如何用 PCR 技术鉴定性反转综合征 46, XX 的患者？

SRY 基因片段检测为阳性结果。

如何用 PCR 技术鉴定性反转综合征 46, XY 的患者？

SRY 基因片段检测为阴性结果。

人类个体的表型性别是由哪种基因决定的？

SRY 基因。

SRY 基因片段检测性别具有广泛的实际应用价值？

确认 SRY 所在区域的缺失或易位，诊断 46, XY 女性或 46, XX 男性性反转综合征的患者；预防甲型血友病、G6PD 缺乏症等 X 连锁隐性遗传病患儿的出生判断异性别的骨髓移植程度；法医学上尸块或血斑的性别确定；大量标本的运动员体检。

【课前讲解】

PCR 反应的基本原理。

性别决定的

SRY 分子机制。

PCR 扩增检测性别方法的应用。

【实验讲解】

一、实验目的：

掌握 PCR 反应的基本原理

掌握性别决定的分子机制

掌握用 PCR 扩增检测性别的方法

掌握用 PCR 扩增检测性别方法的应用

二、实验器材与试剂：

器材：加样器、紫外投射仪、电泳仪、PCR 扩增仪

试剂：由微量外周血标本制备模板、DNA 细胞裂解缓冲液、(SDS 蛋白酶 K)、酚：氯仿：异戊醇(25: 24: 1 体积比)、3mol 醋酸钠(pH5.2)、无水乙醇，-20℃保存、70%乙醇，-20℃保存、TE 缓冲液

PCR 检测性别试剂与材料：

上、下游引物(各 5μmol/L)

模板

DNA 溶液

10×PCR 缓冲液：(高压灭菌)

dNTPs 溶液(2.5mmol/L 原液)

Taq DNA 聚合酶(5U/μl)

琼脂糖凝胶电泳分离

DNA 片段

电泳级琼脂糖

电泳缓冲液: 5×TBE 贮存液

5mg/ml 的溴化乙锭溶液, 4°C 暗存。

上样缓冲液: 0.25% 溴酚蓝, 0.25% 二甲苯青, 30% 甘油于水中。4°C 贮存。

三、实验过程与步骤

(一) SRY 基因引物设计

Y1.5 5' -CTA GAC CGC AGA GGC GCC AT-3'

Y1.6 5' -TAG TAC CCA CGC CTG CTC CGG-3'

扩增 DNA 片段长度 239bp

(二) PCR 反应

1、在 0.5ml Eppendorf 管中依次加入 H ₂ O	60.5μl
10×PCR 缓冲液	10μl
dNTPs 溶液(2.5mmol/L 原液)	8μl(0.2mmol/L)
上游引物(5μmol/L)	10μl (0.5μmol/L)
下游引物(5μmol/L)	10μl(0.5μmol/L)
模板 DNA 溶液(基因组 DNA 溶液)	1μl
Taq DNA 聚合酶(5U/μl)	0.5μl(2.5U/100μl)
总量	100μl

2、混匀, 短暂离心。

3、PCR 条件 Y1.5/ Y1.6 PCR 扩增条件:

变性 95°C 5 分钟

变性 94°C 75 秒

复性 55°C 90 秒

延伸 72°C 150 秒

循环 30 次。

扩增产物冷却至室温可于 4°C 保存。

四、实验结果与观察

紫外灯下观察结果、判断性别

五、实验设计方案

样品采集、制备模板

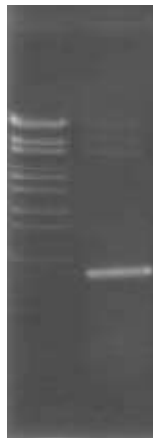
DNA、PCR 扩增、电泳分离及检测。

【典型结果】

如图所示

男性样品可以见到一 239bp 的阳性扩增片段。

女性样品为阴性扩增片段。



【分析讨论】

实验成功的经验或失败的教训

【实验报告要点】

实验原理、操作步骤、实验结果、分析讨论。

【参考文献】

Principles of Medical Genetics, 2nd Edition by Thomas D. Gelehrter, Francis S. Collins, and David Ginsburg. Genetics, 3rd Edition by Daniel L. Hartl, Jones and Bartlett Publishers, Boston