

GEN MÃ HÓA VÙNG XÁC ĐỊNH GIỚI TÍNH TRÊN NHIỄM SẮC THỂ Y (SRY - SEX DETERMINING REGION Y) Ở MỘT SỐ CÁ THỂ NGƯỜI VIỆT NAM

Nguyễn Đăng Tôn, Định Thị Kim Hương, Nông Văn Hải

Viện Công nghệ Sinh học

TÓM TẮT

Gen đặc hiệu nhiễm sắc thể Y, SRY, là một trong những gen quan trọng tham gia vào sự xác định giới tính ở người. SRY mã hóa cho nhân tố phiên mã tinh hoàn, nhân tố này đóng vai trò quan trọng trong quá trình phát triển và biệt hóa giới tính ở đàn ông. Gen này có vị trí ở vùng đầu mút trên cánh tay ngắn của nhiễm sắc thể Y (Yp11.3). Các đột biến trên gen này thường dẫn đến kiểu hình nữ mang cặp nhiễm sắc thể giới tính là XY, không phát triển tuyến sinh dục nam. DNA tổng số được tách chiết từ máu của 4 cá thể (ADT3, MT70, MT87 và MT95) thuộc 2 dân tộc Kinh/Việt và Mường. Sử dụng cặp mồi SRYF và SRYR chúng tôi đã nhân được đoạn gen mã hóa SRY có kích thước 0,85 kb, bao gồm toàn bộ vùng mang mã và một phần vùng không mang mã ở đầu 5' và 3' của vùng mang mã. Sản phẩm PCR sau đó được gắn vào vector pCR2.1, biến nạp vào chủng vi khuẩn *E. coli*. Các dòng plasmid tái tổ hợp được tiến hành đọc trình tự cả 2 chiều. Phân tích trình tự đoạn gen mã hóa SRY chúng tôi tìm được 4 điểm thay đổi nucleotide. Ba trong số 4 điểm thay đổi này đều dẫn đến thay đổi amino acid tương ứng là T34C (F12L) ở mẫu ADT3, G256A (R86Q) ở mẫu MT87 và C236T (A79V) ở mẫu MT70. Đây là 4 trình tự gen SRY đầu tiên của người Việt Nam, các trình tự này đã được công bố trên ngân hàng gen quốc tế GenBank/EMBL với mã số tương ứng là AM884751, AM8847450, AM884748 và AM884746.

Từ khóa: HMG, người Việt Nam, nhiễm sắc thể Y, SRY

ĐẶT VẤN ĐỀ

SRY mã hóa cho nhân tố phiên mã là thành viên của họ protein gắn DNA - HMG-box (High Mobility Group - box). SRY được phát hiện ra nhờ sự phân tích các đoạn nhỏ của nhiễm sắc thể Y đã được chuyển cho nhiễm sắc thể X trong genome của các cá thể nam giới mang cặp nhiễm sắc thể giới tính XX và những người bị mắc bệnh ái nam ái nữ thực sự. Năm 1993, Su và Lau đã xác định được SRY là gen không có intron có kích thước 3,8 kb nằm ở vị trí Yp11.3 trên nhiễm sắc thể Y. Vùng mang mã của gen này mã hóa cho phân tử protein bao gồm 204 amino acid với khối lượng phân tử là 24 kDa. Về mặt cấu trúc, phân tử protein SRY có 3 domain, domain đầu N, domain trung tâm và domain đầu C. Domain trung tâm bắt đầu từ vị trí amino acid 58 đến 137, chứa một motif HMG, có chức năng gắn và làm uốn cong DNA, là domain quan trọng nhất của phân tử protein SRY.

Ở người, các đột biến trên gen SRY được xác định ở những bệnh nhân nữ mang cặp nhiễm sắc thể giới tính XY, không có khả năng sinh sản (Cameron *et al.*, 1997; Canto *et al.*, 2000; Harley *et al.*, 1992, 2003; Nasrin *et al.*, 1991; Shahid *et al.*, 2005). Trong

khí đó, đột biến nhiễm sắc thể dẫn đến chuyển đoạn một phần nhiễm sắc thể Y có chứa gen này cho nhiễm sắc thể X tạo thành kiểu hình nam mang cặp nhiễm sắc thể giới tính XX (Zenteno *et al.*, 1997). Cho đến nay, người ta đã xác định được 51 đột biến trên vùng mang mã của gen mã hóa SRY. Các đột biến này chủ yếu nằm trên domain HMG-box (Assumpcao *et al.*, 2002; Fernandez *et al.*, 2002; Shahid *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2003), cho thấy vai trò quan trọng của domain này. Chỉ có 10 đột biến nằm trên 2 domain còn lại, 8 trong số đó nằm ở domain đầu N và 2 đột biến còn lại nằm ở domain đầu C.

Trong bài báo này, chúng tôi tiến hành phân lập và xác định trình tự gen mã hóa SRY ở một số cá thể người Việt Nam để tìm hiểu tính đa hình của gen này trên các đối tượng người Việt.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Mẫu máu của 4 cá thể người Việt Nam: MT70, MT87, MT95 và ADT3, thuộc 2 dân tộc Kinh/Việt và Mường.

Cặp mồi sử dụng để nhân đoạn gen mã hóa SRY, ký hiệu SRYF và SRYR, được đặt tổng hợp tại Hãng IDT có trình tự như sau:

SRYF 5'-GGT GTT GAG GGC GGA GAA ATG -3';
SRYR 5'-ATA AGA AAG TGA GGG CTG TAA GTT -3'.

TA Cloning® Kit, vector pCR®2.1 và tế bào khả biến chủng TOF10F được mua của Hãng Invitrogen.

Phương pháp

Các kỹ thuật sinh học phân tử cơ bản như tách chiết và tinh sạch DNA tổng số, điện di kiểm tra và tách dòng được tiến hành theo Sambrook và Russell (2001) với một vài cải tiến nhỏ cho phù hợp với đặc trưng của mẫu nghiên cứu.

Gen mã hóa SRY được khuếch đại bằng kỹ thuật PCR. Hỗn hợp phản ứng bao gồm 0,625 đơn vị *Taq* DNA polymerase, 1× đệm PCR, 250 µM dNTP mỗi loại, 10 pM mỗi loại mồi và 500 ng DNA tổng số. Kỹ thuật PCR được tiến hành trên máy luân nhiệt (MJ Research) với chu trình nhiệt như sau: 94°C trong 3 phút, 94°C trong 1 phút, 56°C trong 1 phút, 72°C trong 1 phút, lặp lại 30 lần từ bước 2, 72°C trong 8 phút, giữ ở 4°C. Sản phẩm PCR được làm lạnh đến 4°C và giữ ở -20°C đến khi sử dụng.

Sản phẩm PCR được gắn vào vector pCR®2.1 TA và biến nạp vào tế bào *E. coli* chủng TOF10F theo quy trình của hãng sản xuất Invitrogen.

Phản ứng xác định trình tự được thực hiện trên máy ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer với bộ kit BigDye Terminator v3.1. Các thông số trình tự nucleotide và chất lượng định được thu thập và kiểm

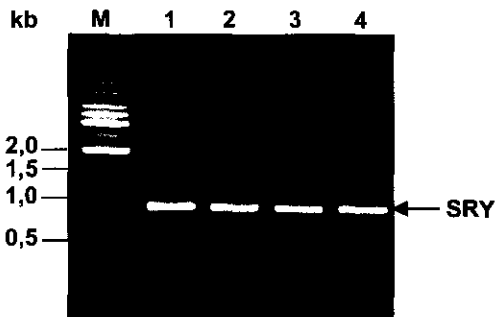
định bằng các phần mềm ABI Data Collection v.2.0. Trình tự đoạn gen mã hóa SRY của các cá thể người Việt Nam được so sánh với một số trình tự công bố trên các Ngân hàng trình tự gen Quốc tế EMBL (EBI)/Genbank/DBJ với mã số L10101 thông qua sử dụng các phần mềm phân tích như Seqscape, BioEdit...

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

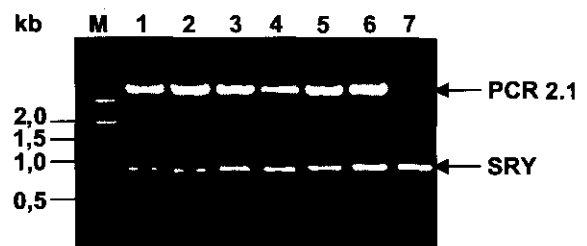
Nhân gen mã hóa SRY bằng kỹ thuật PCR

Gen mã hóa cho SRY có kích thước 3,8 kb, không chứa intron. Vùng mang mã có vị trí từ 2076 (vị trí 91 trên cDNA) đến 2690 (vị trí 711 trên cDNA), mã hóa cho phân tử protein có kích thước 204 amino acid (Su, Lau, 1993). Để phân tích mức độ đa hình gen mã hóa SRY ở một số cá thể người Việt Nam, chúng tôi tiến hành thiết kế cặp mồi SRYF và SRYR để nhân đoạn gen mã hóa SRY trên cơ sở trình tự cDNA của gen này công bố trên ngân hàng gen (Genbank) có mã số L10101 có vị trí từ nucleotide thứ 9 đến nucleotide 841, có chứa toàn bộ vùng mang mã của gen này. Theo tính toán lý thuyết, sử dụng cặp mồi này chúng tôi sẽ nhân được đoạn có kích thước khoảng 0,85 kb. PCR được thực hiện trên khuôn là DNA tổng số tách từ mẫu máu của các cá thể nghiên cứu. Kết quả được thể hiện trên hình 1.

Trên điện di đồ cho thấy (Hình 1), ở cả 4 mẫu nghiên cứu đều xuất hiện một băng duy nhất đậm nét với kích thước khoảng 0,85 kb, hoàn toàn phù hợp với kích thước đoạn gen mã hóa SRY theo tính toán lý thuyết. Như vậy, sản phẩm PCR đã được khuếch đại đặc hiệu và có số lượng đủ lớn để sử dụng trong các nghiên cứu tách dòng và đọc trình tự.



Hình 1. Điện di đồ sản phẩm PCR gen mã hóa SRY từ các mẫu nghiên cứu trên gel agarose 0,8%. M: Marker 1 kb; 1-4: Sản phẩm PCR của gen mã hóa SRY từ 4 mẫu tương ứng là mt70, mt87, mt95 và ADT3.



Hình 2. Điện di kiểm tra plasmid tái tổ hợp. M: Thang DNA chuẩn 1 kb; 1-6: Sản phẩm cắt DNA plasmid bằng enzyme hạn chế *EcoRI* tương ứng với các dòng mt70P1, mt70P9, mt87P1, mt87P3, mt95P3, ADT3P10; 7: Sản phẩm PCR gen mã hóa SRY từ khuôn DNA plasmid pha loãng 40 lần.

L10101	ATGCAATCAT	ATGCTTCTGC	TATGTTAAGC	GTATTCAACA	GCGATGATTA	CAGTCCAGCT	GTGCAAGAGA	70
MT70								
MT87								
MT95								
ADT3			C.....					
L10101	ATATTCCCGC	TCTCCGGAGA	AGCTCTTCCT	TCCTTTGCAC	TGAAAGCTGT	AACTCTAAGT	ATCAGTGTGA	140
MT70								
MT87								
MT95								
ADT3								
L10101	AACGGGAGAA	AACAGTAAAG	GCAACGTCCA	GGATAGAGTG	AAGCGACCCA	TGAACGCATT	CATCGTGTGG	210
MT70								
MT87			A.....					
MT95								
ADT3								
L10101	TCTCGCGATC	AGAGGCGCAA	GATGGCTCTA	GAGAATCCCA	GAATGCGAAA	CTCAGAGATC	AGCAAGCAGC	280
MT70			T.....					
MT87					A.....			
MT95								
ADT3								
L10101	TGGGATACCA	GTGGAAAATG	CTTACTGAAG	CCGAAAAATG	GCCATTCTTC	CAGGAGGCAC	AGAAATTACA	350
MT70								
MT87								
MT95								
ADT3								
L10101	GGCCATGCAC	AGAGAGAAAT	ACCCGAATTA	TAAGTATCGA	CCTCGTCGGA	AGGCGAAGAT	GCTGCCGAAG	420
MT70								
MT87								
MT95								
ADT3								
L10101	AATTGCAGTT	TGCTTCCCGC	AGATCCCGCT	TCGGTACTCT	GCAGCGAAGT	GCAACTGGAC	AACAGGTTGT	490
MT70								
MT87								
MT95								
ADT3								
L10101	ACAGGGATGA	CTGTACGAAA	GCCACACACT	CAAGAATGGA	GCACCAGCTA	GGCCACTTAC	CGCCCATCAA	560
MT70								
MT87								
MT95								
ADT3								
L10101	CGCAGCCAGC	TCACCGCAGC	AACGGGACCG	CTACAGCCAC	TGGACAAAGC	TGTAG		615
MT70								
MT87								
MT95								
ADT3								

Hình 3. So sánh trình tự nucleotide của gen mã hóa SRY của 4 cá thể MT70, MT87, MT95 và ADT3 với trình tự chuẩn trên ngân hàng GenBank có mã số L10101.

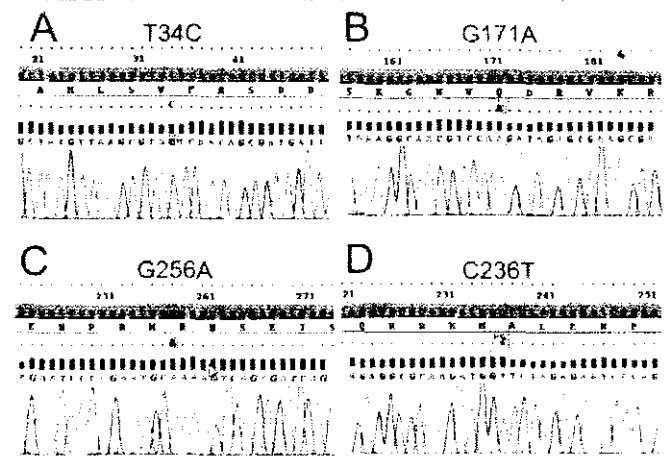
Chọn dòng gen mã hóa SRY trong vector pCR®2.1 TA

Để tạo cơ sở cho việc xác định trình tự gen mã hóa SRY, chúng tôi đã tiến hành tách dòng phân tử đoạn gen này trong vector tách dòng pCR®2.1

TA. Sản phẩm của phản ứng ghép nối được biến nạp vào tế bào *E. coli* chủng TOF10F'. Các thể tái tổ hợp được kiểm tra bằng enzyme hạn chế *EcoRI*. Theo tính toán lý thuyết, các DNA plasmid mang gen quan tâm khi được cắt bằng *EcoRI* sẽ cho 2 băng với các kích thước khoảng 3,9 kb (tương ứng

với kích thước của vector) và khoảng 0,85 kb (tương ứng với kích thước đoạn gen được chèn vào). Song song với việc cắt kiểm tra bằng enzyme hạn chế, chúng tôi cũng đã tiến hành PCR để kiểm tra với khuôn là DNA plasmid được pha loãng 40 lần. Kết quả được thể hiện trên hình 2.

Từ điện di đồ có thể thấy các kết quả thực nghiệm thu được hoàn toàn phù hợp với tính toán lý thuyết. Như vậy, gen mã hóa SRY đã được tách dòng thành công. Các plasmid tái tổ hợp được tách chiết với lượng lớn và được tinh sạch để sử dụng cho phản ứng xác định trình tự.



Hình 4. Các điểm thay đổi nucleotide hiển thị trên đỉnh tín hiệu trình tự ở các mẫu nghiên cứu. A: Mẫu ADT3 với điểm thay đổi T34C. B, C: Mẫu MT87 với 2 điểm thay đổi G171A và G256A. D: Mẫu MT70 với điểm thay đổi C236T

Xác định và phân tích trình tự gen mã hóa SRY

Phản ứng xác định trình tự được tiến hành theo cả hai chiều xuôi và ngược. Sau khi xử lý số liệu bằng các phần mềm chuyên dụng, chúng tôi thu được trình tự bao gồm toàn bộ vùng mang mã (từ mã khởi đầu ATG đến mã kết thúc TAG) mã hóa SRY có chiều dài 615 bp. Kết quả so sánh trình tự của các mẫu nghiên cứu với trình tự trên GenBank có mã số L10101 được trình bày trên hình 3, cho thấy có sự thay đổi nucleotide ở 3 trong 4 mẫu nghiên cứu, T34C ở mẫu ADT3; G171A, G256A ở mẫu MT87 và C236T ở mẫu MT70 (Hình 3, 4).

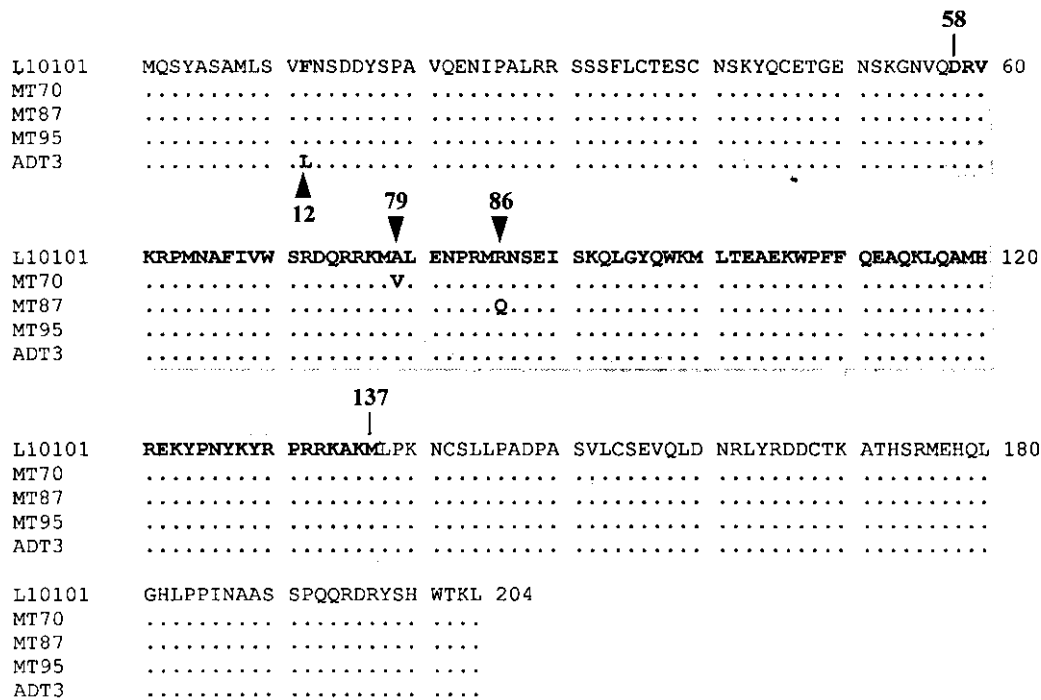
Trong đó, 3 thay đổi nucleotide dẫn đến thay đổi amino acid, bao gồm T34C dẫn đến thay đổi F12L ở mẫu ADT3, C236T dẫn đến thay đổi A79V ở mẫu MT70 và G256A dẫn đến sự thay đổi R86Q ở mẫu MT87 (Hình 5).

Protein SRY được chia thành 3 domain, bao gồm domain trung tâm, gồm có 80 amino acid từ vị trí amino acid 58 đến vị trí 137, domain đầu C và domain đầu N. Domain trung tâm có chức năng bám và uốn cong DNA, gọi là domain HMG,

domain này rất bảo thủ giữa các loài. Độ tương đồng ở domain này giữa người và chuột là 89% (Coward *et al.*, 1994). Các đột biến trên domain này làm thay đổi chức năng của SRY, có thể làm giảm hoặc làm mất khả năng sinh tinh hoặc gây ra các bất thường về giới tính (nữ mang cặp nhiễm sắc thể giới tính XY), hay cũng có thể dẫn đến biểu hiện kiểu hình ái nam ái nữ (Shahid *et al.*, 2005). Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành phân tích gen mã hóa SRY trên các đối tượng là nam giới khỏe mạnh thuộc 2 dân tộc khác nhau (Kinh/Việt và Mường) ở độ tuổi từ 18 đến 20, có biểu hiện giới tính bình thường. Kết quả phân tích trình tự nucleotide và trình tự amino acid suy diễn cho thấy có 2 điểm thay đổi amino acid thuộc domain HMG đó là A79V và R86Q (Hình 5). Tuy nhiên, các thay đổi amino acid này không trùng với các thay đổi đã được công bố trước đây làm thay đổi chức năng của gen dẫn đến bất thường giới tính (Brown *et al.*, 1998; Domenice *et al.*, 1998; Jordan *et al.*, 2002; Maier *et al.*, 2003; Schaffler *et al.*, 2000; Shahid *et al.*, 2004; Veitia *et al.*, 1997). Ngoài ra, chúng tôi còn tìm thấy một vị trí thay đổi amino acid tại domain đầu N trên trình tự amino acid đó là V12L, điểm đa

hình/đột biến này cũng chưa được tác giả nào nhắc tới. Do số mẫu cá thể còn rất hạn chế, những điểm thay đổi này có thể được xem là các đa hình giữa

các cá thể trong quần thể hoặc là đa hình giữa các tộc người Việt Nam, chứ chưa thể phân biệt được đa hình theo dân tộc Kinh/Việt, Mường.



Hình 5. So sánh trình tự amino acid suy diễn từ trình tự DNA SRY của 4 cá thể MT70, MT87, MT95 và ADT3 với trình tự suy diễn từ trình tự chuẩn trên ngân hàng Genbank có mã số L10101. Có 3 điểm thay đổi amino acid trên 3 mẫu là F12L, A79V và R86Q trên các mẫu tương ứng là ADT3, MT70 và MT87, 2 trong số đó (A79V, R86Q) nằm trong domain bám DNA. Trình đặt trong hộp đồng khung là trình tự domain bám DNA - HMG box.

KẾT LUẬN

Chúng tôi đã nhân thành công đoạn gen mã hóa SRY trên 4 đối tượng người Việt Nam thuộc các dân tộc Kinh/Việt (2 mẫu) và Mường (2 mẫu), với kích thước đoạn nhân là 0,85 kb, bao gồm một phần không mang mã đầu 5' và 3' và toàn bộ vùng mang mã của gen mã hóa SRY.

Đã đọc và phân tích trình tự vùng mang mã của gen mã hóa SRY, có kích thước 615 bp tính từ mã khởi đầu đến mã kết thúc, ở cả 4 mẫu nghiên cứu. Trong các trình tự đọc được chúng tôi đã phát hiện thấy 4 điểm thay đổi nucleotide, 3 trong số đó dẫn đến thay đổi amino acid (F12L, A79V và R86Q). Các thay đổi amino acid này chưa được công bố trong bất cứ một tài liệu nào, chúng có thể là những điểm đa hình của người Việt Nam so với các dân tộc khác trên thế giới. Đây là 4 trình tự gen mã hóa SRY đầu tiên của người Việt Nam, 4 trình tự này đã được

đăng ký trên ngân hàng gen quốc tế Genbank/EMBL với mã số tương ứng là AM884751, AM8847450, AM884748 và AM884746.

Lời cảm ơn: Công trình này được thực hiện bằng kinh phí của đề tài "Ứng dụng công nghệ DNA để nghiên cứu một số đặc điểm cấu trúc nhiễm sắc thể Y của người Việt Nam" thuộc Chương trình "Nghiên cứu Cơ bản trong Khoa học Tự nhiên" giai đoạn 2006 - 2008.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Assumpcao JG, Benedetti CE, Maciel-Guerra AT, Guerra G, Jr Baptista MTM, Scolfaro MR, Mello MP, (2002) Novel mutations affecting SRY DNA-binding activity: the HMG box N65H associated with 46, XY pure gonadal dysgenesis and the familial non-HMG

- box R30I associated with variable phenotype. *J Mol Med* 80: 782-790.
- Brown S, Yu CC, Lanzano P, Heller D, Thomas L, Warburton D, Kitajewski J, Stadtmauer L (1998) A de novo mutation (gln2stop) at the 5-prime end of the SRY gene leads to sex reversal with partial ovarian function. *Am J Hum Genet* 62: 189-192.
- Cameron FJ, Sinclair AH (1997) Mutations in SRY and SOX9: testis-determining genes. *Hum Mut* 9: 388-395.
- Canto P, de la Chesnaye E, Lopez M, Cervantes A, Chavez B, Vilchis F, Reyes E, Ulloa-Aguirre A, Kofman-Alfaro S, Mendez JP (2000) A mutation in the 5-prime non-high mobility group box region of the SRY gene in patients with Turner syndrome and Y mosaicism. *J Clin Endocr Metab* 85: 1908-1911.
- Domenice S, Nishi MY, Billerbeck AEC, Latronico AC, Medeiros MA, Russell AJ, Vass K, Carvalho FM, Frade EMC, Arnhold IJP, Mendonca BB (1998) A novel missense mutation (S18N) in the 5-prime non-HMG box region of the SRY gene in a patient with partial gonadal dysgenesis and his normal male relatives. *Hum Genet* 102: 213-215.
- Dork T, Stuhmann M, Miller K, Schmidtke J (1998) Independent observation of SRY mutation I90M in a patient with complete gonadal dysgenesis. *Hum Mut* 11: 90-91.
- Fernandez R, Marchal JA, Sanchez A, Pasaro E (2002) A point mutation, R59G, within HMG-box in a female 45, X/46, X, psu dic(Y)(pter → q11:q11 → pter). *Hum Genet* 111: 242-246.
- Fuqua JS, McLaughlin J, Perlman EJ, Berkowitz GD (1997) Analysis of the SRY gene in gonadal tissue of subjects with 46,XY gonadal dysgenesis. *J Clin Endocr Metab* 82: 701-702.
- Harley VR, Jackson DI, Hextall PJ, Hawkins JR, Berkovitz GD, Sockanathan S, Lovell-Badge R, Goodfellow PN (1992) DNA binding activity of recombinant SRY from normal males and XY females. *Science* 255: 453-456.
- Harley VR, Layfield S, Mitchell CL, Forwood JK, John AP, Briggs LJ, McDowall SG, Jans DA (2003) Defective importin beta recognition and nuclear import of the sex-determining factor SRY are associated with XY sex-reversing mutations. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 7045-7050.
- Jordan BK, Jain M, Natarajan S, Frasier SD, Vilain E (2002) Familial mutation in the testis-determining gene SRY shared by an XY female and her normal father. *Clin Endocr Metab* 87: 3428-3432.
- Li B, Zhang W, Chan G, Jancso-Radek A, Liu S, Weiss MA (2001) Human sex reversal due to impaired nuclear localization of SRY: a clinical correlation. *J Biol Chem* 276: 46480-46484.
- Maier EM, Leitner C, Lohrs U, Kuhnle U (2003) True hermaphroditism in an XY individual due to a familial point mutation of the SRY gene. *J Pediatr Endocr Metab* 16: 575-580.
- Margarit E, Coll MD, Oliva R, Gomez D, Soler A, Ballesta F (2000) SRY gene transferred to the long arm of the X chromosome in a Y-positive XX true hermaphrodite. *Am J Med Genet* 90: 25-28.
- Nef S, Verma-Kurvari S, Merenmies J, Vassalli JD, Efstratiadis A, Accili D, Parada LF (2003) Testis determination requires insulin receptor family function in mice. *Nature* 426: 291-295.
- Nasrin N, Buggs C, Kong XF, Carnazza J, Goebel M, Alexander-Bridges M (1991) DNA-binding properties of the product of the testis-determining gene and a related protein. *Nature* 354: 317-320.
- Schaffler A, Barth N, Winkler K, Zietz B, Rummele P, Knuchel R, Scholmerich J, Palitzsch KD (2000) Identification of a new missense mutation (gly95glu) in a highly conserved codon within the high-mobility group box of the sex-determining region Y gene: report on a 46XY female with gonadal dysgenesis and yolk-sac tumor. *J Clin Endocr Metab* 85: 2287-2292.
- Shahid M, Dhillon VS, Aslam M, Husain SA (2005) Three new novel point mutations localized within and downstream of high-mobility group-box region in SRY gene in three Indian females with Turner syndrome. *J Clin Endocr Metab* 90: 2429-2435.
- Sharp A, Kusz K, Jaruzelska J, Tapper W, Szarras-Czapnik M, Wolski J, Jacobs P (2005) Variability of sexual phenotype in 46, XX(SRY+) patients: the influence of spreading X inactivation versus position effects. *J Med Genet* 42: 420-427.
- Su H, Lau YFC (1993) Identification of the transcriptional unit structural organization and promoter sequence of the human sex-determining region Y (SRY) gene using a reverse genetic approach. *Am J Hum Genet* 52: 24-38.
- Uehara S, Funato T, Yaegashi N, Suzuki H, Sato J, Sasaki T, Yajima A (2002) SRY mutation and tumor formation on the gonads of XY pure gonadal dysgenesis patients. *Cancer Genet Cytogenet* 113: 78-84.
- Uehara S, Hashiyada M, Sato K, Nata M, Funato T, Okamura K (1999) Complete XY gonadal dysgenesis and aspects of the SRY genotype and gonadal tumor

formation. *J Hum Genet* 47: 279-284.

Veitia R, Ion A, Barbaux S, Jobling MA, Souleyreau N, Ennis K, Ostrer H, Tosi M, Meo T, Chibani J, Fellous M, McElreavey K (1997) Mutations and sequence variants in the testis-determining region of the Y

chromosome in individuals with a 46,XY female phenotype. *Hum Genet* 99: 648-652.

Zenteno JC, Lopez M, Vera C, Mendez JP, Kofman-Alfaro S (1997) Two SRY-negative XX male brothers without genital ambiguity. *Hum Genet* 100: 606-610.

THE GENE ENCODING SEX DETERMINING REGION Y (SRY) IN FOUR VIETNAMESE INDIVIDUALS

Nguyen Dang Ton, Dich Thi Kim Huong, Nong Van Hai*

Institute of Biotechnology

SUMMARY

The Y chromosome - specific gene SRY is one of the key genes involved in human sex determination. The SRY gene encodes a testis-specific transcription factor that plays a key role in sexual differentiation and development in males and is located on distal region of short arm of the Y chromosome (Yp11.3). Mutations in SRY gene result in XY sex reversal and pure gonadal dysgenesis. Total genomic DNA was extracted and purified from four blood samples (ADT3, MT70, MT87, and MT95) belonging to Kinh/Viet, and Muong Ethnic minorities. The CDS region of the SRY gene was amplified using specific primers SRYF and SRYR. The PCR products of about 0.85 kb, including the fragment of 3' and 5' flanking sequence, were ligated to the pCR 2.1 TA vector, and then transformed into *E. coli* cells. The purified recombinant plasmids were used for sequencing of the inserts. Four polymorphisms in the coding region of the SRY gene were detected in 3 samples, ADT3, MT70 and MT87, which are base substitution polymorphisms (T34C in ADT3, G171A and G256A in MT87, and C236T in MT70, respectively). Three of these polymorphisms (T34C, G171A, and G256A) lead to the replacement of the amino acid residues (F12L, A79V, and R86Q, respectively). These are the first sequences of the SRY gene of Vietnamese individuals from Vietnam. The sequences have been deposited in EMBL/GenBank with the Accession Numbers AM884751, AM8847450, AM884748, and AM884746, respectively.

Keywords: HMG, Vietnamese individuals, SRY, Y chromosome

* Author for correspondence: Tel: 84-4-7562934/8363222; Fax: 84-4-8363144; E-mail: vhnong@ibt.ac.vn