

半滑舌鳎含 *sox9* 基因 BAC 克隆的筛选及 BAC-FISH 定位

孙 建^{1,2} 陈松林^{2*} 谢明树² 邵长伟²

(¹ 大连海洋大学水产与生命学院, 116023)

(² 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

摘 要 以本实验室构建的半滑舌鳎 BAC 文库为基础, 通过对其进行有序混合, 构建了两步 PCR 筛选体系; 对性别决定相关的 *sox9* 基因的序列设计特异性引物, 筛选获得阳性单一 BAC 克隆。利用 BAC-FISH 技术将包含 *sox9* 基因的 BAC 克隆定位在半滑舌鳎染色体上。结果显示, *sox9* 基因在雌、雄半滑舌鳎的一对常染色体的长臂上分别存在两个杂交信号位点, 信号稳定且特异。研究证实了该文库筛选体系的有效性; 首次实现了对性别相关的 *sox9* 基因在半滑舌鳎染色体上的定位, 其结果为揭示 *sox9* 基因参与鱼类性别控制的机制提供了重要基础。

关键词 半滑舌鳎; *sox9* 基因; BAC 文库; 荧光原位杂交; 染色体

中图分类号 Q959.486 文献标志码 A 文章编号 1000-7075(2014)01-0034-07

Screening and BAC-FISH locating of the *sox9* gene BAC clone of half-smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis*

SUN Jian^{1,2} CHEN Song-lin^{2*} XIE Ming-shu² SHAO Chang-wei²

(¹ College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, 116023)

(² Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture,

Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

ABSTRACT A two-step PCR screening system of the half-smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis* BAC library was constructed by an orderly mixing of the BAC clones. Using the specific primers designed to *sox9* gene sequence, one positive single BAC clone was screened out from the BAC library. In this study, the *sox9*-containing BAC clone, P17P21, was mapped to the long arms of a pair of homologous chromosomes of *C. semilaevis* using the technology of BAC-FISH. The result showed that there are two hybridization signal sites in a pair of autosomes of the female and male *C. semilaevis*, and the signals are stable and specific. This study confirmed the effectiveness of the two-step PCR screening system and achieved the positioning of *sox9* gene on chromosomes of *C. semilaevis*. The results will facilitate further studies on the *sox9* gene of *C. semilaevis* and will provide an important basis for chromosomal identification of this species.

国家自然科学基金重点项目(31130057)和国家自然科学基金项目(41006107)共同资助

* 通讯作者。E-mail: chensl@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2013-03-10; 接受日期: 2013-04-09

作者简介: 孙 建(1987-), 男, 硕士研究生, 主要从事鱼类遗传育种研究。E-mail: sunjian@126.com

KEY WORDS *Cynoglossus semilaevis*; *sox9* gene; BAC library; Fluorescence *in situ* hybridization (FISH); Chromosome

半滑舌鳎 *Cynoglossus semilaevis* 属鲽形目 Pleuronectiformes、舌鳎科 Cynoglossidae、舌鳎属 *Cynoglossus*, 主要分布于我国黄、渤海, 属暖水性底层鱼类, 因其营养丰富、经济价值高等特点, 已成为我国北方重要的海水鱼类养殖品种(柳学周等 2005)。在自然条件下, 半滑舌鳎具有雌、雄个体差异大的特性, 雌性个体生长速度比雄性快, 成熟雌鱼体重和全长可达雄鱼的 2~4 倍。因此, 通过对半滑舌鳎性别决定和性腺分化等进行研究, 提高雌鱼比例, 可以极大地提高半滑舌鳎的养殖效益(姜言伟等 1988)。目前, 关于半滑舌鳎性别决定的研究取得了一定进展: 马学坤等(2006)对半滑舌鳎的性腺分化进行了组织学观察; 周丽青等(2005)通过染色体核型分析, 确定半滑舌鳎性染色体类型为 ZW/ZZ 型, 且 W 型性染色体与其他染色体相对长度相差较大, 可明显区分。

sox9 基因参与动物多种生理活动的调控, 而其最主要的功能还是性别决定。在哺乳动物和鸟类中已确认 *sox9* 基因参与性别决定和分化(Morais *et al.* 1996; Bagheri-Fam *et al.* 2012; Smith *et al.* 2004)。由于鱼类所处特殊的进化地位, 是最原始的脊椎动物, *sox9* 基因在鱼类中的作用机制更为多样、复杂, 其中黄鳍(刘 利等 2001)、斑马鱼(Adriana *et al.* 2005)和鲤鱼(华慧颖等 2011)*sox9* 基因在精巢中的表达明显高于卵巢, 证明其与雄性性腺分化有关; 在史氏鲟(陈金平等 2004)中发现, *sox9* 基因在精巢和卵巢中表达无明显差别, 因而与其性腺分化无关, 却发现与软骨分化过程有某些关联; 在青鳉(Yokoi *et al.* 2002)和黄颡鱼(俞菊华等 2005)中, *sox9* 基因只在卵巢中表达, 说明与雌性性腺分化相关。Dong 等(2011)对半滑舌鳎 *sox9* 基因进行了克隆、表达的研究, 半滑舌鳎 *sox9* 基因在雄性的性腺中表达显著高于雌性, 显示 *sox9* 基因与半滑舌鳎雄性性腺分化的相关性。而对其进行染色体上定位将有助于促进该基因功能的深入研究。而荧光原位杂交技术(Fluorescence *in situ* hybridization, FISH)是进行基因在染色体上定位的最有效、快捷的方法(权洁霞等 1999)。

对于半滑舌鳎, 通过 FISH 技术已经成功定位了一些基因(谢明树等 2012; 王旭波 2008; 翟 腾等 2011)。然而对于包括 *sox9* 在内的大部分单、低拷贝的功能基因, 通常无法获得足够长度的探针, 其杂交信号很难在常规 FISH 技术下被检出。Shao 等(2009)构建了高质量的半滑舌鳎 BAC 文库, 使以 BAC 质粒为探针的 FISH 技术(BAC-FISH)的应用成为可能, 为单、低拷贝功能基因的染色体定位提供了可靠的探针来源。BAC 文库筛选系统是获取单一阳性 BAC 克隆的必备工具, 通过对文库进行有序混合, 构建文库两步 PCR 筛选系统(程 华等 2012), 可以实现单一阳性 BAC 克隆在文库中准确、高效的筛选, 这不仅可为染色体定位提供探针, 同时对于物理作图、图位克隆、分子标记发掘等工作有重要的作用。本研究在半滑舌鳎 BAC 文库中筛选出含有 *sox9* 基因序列的单一阳性克隆, 并通过 BAC-FISH 技术成功将此单一克隆定位到半滑舌鳎有丝分裂中期分裂相上, 为 *sox9* 基因的后续深入研究奠定了基础, 同时对半滑舌鳎染色体鉴别工作起到了推动作用。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

实验用半滑舌鳎, 体长为(25~45)cm, 体重为(200~500)g, 于 2012 年 10 月中旬取自山东省海阳市黄海水产有限公司, 运回实验室暂养 2 d 后使用, 雌、雄各 6 尾。半滑舌鳎基因组 BAC 文库, 由中国水产科学研究院黄海水产研究所水产基因组与细胞工程研究室构建(Shao *et al.* 2009), 该文库由两个高质量的半滑舌鳎 BAC 文库, 共计克隆 55 296 个, 排列在 144 块 384-well 冻存板中。平均插入片段 156.4 kb, 覆盖半滑舌鳎基因组 13.8 倍。

1.2 含有 *sox9* 基因的 BAC 克隆的筛选

1.2.1 构建一级混合池(384 盘池)

一块 384-well 冻存板中全部克隆的 DNA 混合为一个一级池,即 384 盘池。具体构建方法如下:用 $8 \times 10 \mu\text{l}$ 移液器,将 384 盘的每 4 个孔接种到加有 $870 \mu\text{l}$ LB 培养基(含 $12.5 \mu\text{g/ml}$ 氯霉素)96 孔培养盘的 1 孔中,每孔接种菌液 $5 \mu\text{l}$ 。封口膜将培养盘封好, 37°C 振荡培养 24 h。将整个 96 孔培养盘用 $12 \times 300 \mu\text{l}$ 移液器每孔吸取 $800 \mu\text{l}$ 菌液混合起来,分装于两个 50 ml 离心管中。 $5\ 000 \text{ r/min}$ 离心 7min,弃上清液(保留少许培养基)后转移至 1.5 ml 离心管中,离心、弃上清液,超净台上晾干, -80°C 保存。后续 143 块 384-well 冻存同样方法建立一级池。

144 个一级池混合完成,取其中一份。每管加入无菌水至 1 ml 混匀,吸取 $100 \mu\text{l}$ 转移至新的 1.5 ml 离心管中, $5\ 000 \text{ r/min}$ 离心 7min,弃上清液。用高纯度质粒小量快速提取试剂盒(博迈德生物公司)提取 BAC 质粒 DNA。加入 $50 \mu\text{l}$ 洗脱液,保存于两块 96 孔板中, -20°C 保存备用。

以一级池混合 BAC DNA 为模板,本实验室已有的 *sox9* 基因序列设计特异性引物 *sox9*-S (5'-GAGAAACGGTCTGCGTATGA-3')和 *sox9*-A (5'-TCTCTTGACGTGAGGCTTG-3'), PCR 扩增。PCR 反应体系:模板 $1.0 \mu\text{l}$,正向和反向引物(10mmol/L)各 $0.5 \mu\text{l}$, *Taq* DNA 聚合酶($5\text{U}/\mu\text{l}$) $0.2 \mu\text{l}$, $10 \times$ PCR Buffer $1.5 \mu\text{l}$, dNTP(各 2.5 mmol/L) $1.5 \mu\text{l}$,加去离子水至 $15 \mu\text{l}$ 。PCR 程序: 95°C 预变性 5min,然后按(95°C 30 s; 56°C 30 s; 72°C 40 s)进行 35 个循环,最后 72°C 延伸 7 min。 1% 琼脂糖电泳检测,筛选出阳性 384 盘池。

1.2.2 二维交叉筛选

用 $8 \times 10 \mu\text{l}$ 移液器,将筛选得到的阳性 384 盘接种到 4 个加有 $870 \mu\text{l}$ LB 培养基(含 $12.5 \mu\text{g/ml}$ 氯霉素)96 孔培养盘中,每孔接种菌液 $5 \mu\text{l}$ 。封口膜将培养盘封好, 37°C 振荡培养 24 h。用 $12 \times 300 \mu\text{l}$ 移液器吸取与 384 盘中对应的 96 孔盘中 A 行的菌液,每孔 $400 \mu\text{l}$,进行混合,记为 R-A,第 B 行至第 P 行分别记为 R-B 至 R-P,共 16 个行二级池,分别装于 15 ml 离心管中。同理,吸取与 384 盘中对应的 96 孔盘中 1 列的菌液,每孔 $400 \mu\text{l}$,进行混合,记为 L-1,第 2~24 列分别记为 L-2~L-24,共 24 个列二级池,分别装于 15 ml 离心管中。以上行、列共 40 个二级池, $5\ 000 \text{ r/min}$ 离心 7min,弃上清液(保留少许培养基)后转移至 1.5 ml 离心管中,离心、弃上清液,提取 BAC 质粒 DNA。

经 PCR(反应体系与程序同一级池 PCR 条件)扩增和琼脂糖电泳检测,行和列二级池分别呈现阳性。通过十字交叉即可断定该阳性 BAC 单克隆在 384 盘中的位置。

1.3 阳性 BAC 克隆的验证

为了进一步验证筛选到的克隆含有 *sox9* 基因,以阳性 BAC 单克隆提取的质粒 DNA 为模板,*sox9*-S 和 *sox9*-A 为引物组合进行 PCR 反应。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后按照胶回收试剂盒(Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit™, Tiangen)回收,纯化后的片段连接到 pMD18-T 载体,转化到 *E. coli* 菌株上。利用 M13 通用引物进行 PCR 扩增检测,取阳性克隆测序。

1.4 半滑舌鲷染色体制备

参照沙珍霞等(2007)的方法,略有改动。取 1 龄左右半滑舌鲷个体作为实验用鱼,先按剂量 $11 \mu\text{g/g}$ 鱼体质量腹腔注射 PHA,注射后将鱼放入 25°C 海水中暂养 24h,再按剂量 $1.2 \mu\text{g/g}$ 鱼体质量注射秋水仙素,(2~3)h 后静脉抽血、杀鱼取头肾并置于 0.75% 生理盐水中撕碎,四层纱布过滤,离心收集细胞($1\ 800 \text{ r/min}$ 、5 min),用生理盐水洗涤细胞两次,再用 75 mmol/L KCl 溶液在 37°C 低渗处理 30 min,最后用 -20°C 预冷的新鲜配制的卡诺氏液(甲醇:冰醋酸 = 3:1, 体积比)固定两次,每次 30 min,采用冷片法滴片,空气干燥后于 -20°C 保存备用。

1.5 探针标记

用高纯度质粒小量快速提取试剂盒(博迈德生物公司)提取阳性克隆的高纯度 BAC 质粒 DNA,并测定浓度。取 1 μg 质粒,加入 4 μl DIG-Nick Translation Mix 15 $^{\circ}\text{C}$ 反应 80 min 以标记探针,电泳检测标记后片段大小。

加入 1 μl 0.5 mol/L DETA 65 $^{\circ}\text{C}$ 处理 10 min 以终止反应,再加入 1/10 体积 3 mol/L NaAc,2.5 倍体积冷乙醇,于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 沉淀过夜。4 $^{\circ}\text{C}$ 13 000 r/min 离心 20 min,弃上清液,加入 70% 乙醇静置 1 min 后离心、弃上清液,超净台上晾干,加入 40 μl 空白杂交液(50% 去离子甲酰胺,2 \times SSC,10% 硫酸葡聚糖,50 mmol/L 磷酸缓冲液,pH 7.0)溶解探针。

用于杂交的 BAC 探针需封阻其中可能存在的重复序列,故加入 10 倍探针量的半滑舌鳎 Cot-1 DNA 和 50 倍量的鲑精 DNA。杂交液中探针终浓度为 16.67 ng/ μl 。

1.6 荧光原位杂交

用 0.1% 胃蛋白酶在 37 $^{\circ}\text{C}$ 处理染色体片 20 min,以去除多余的蛋白成分,2 \times SSC 中过一下终止反应,转移至 10% 多聚甲醛中固定 10 min,70%、90%、100% 梯度乙醇中脱水各 5 min,自然干燥后,70% 的甲酰胺中 70 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min 15 s,之后立即转入预冷的梯度乙醇中脱水以防止 DNA 复性,脱水后自然干燥。开始杂交前,将杂交液 75 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 min,冰上放置 10 min,37 $^{\circ}\text{C}$ 预退火 1 h,以封堵探针中的重复序列。之后,将杂交液滴加到染色体片上,覆以盖玻片,指甲油封片,置黑暗湿盒中 37 $^{\circ}\text{C}$ 杂交(24~36)h。

杂交完成后,小心去除盖玻片,依次将染色体片置于 42 $^{\circ}\text{C}$ 下的 50% 甲酰胺、2 \times SSC 和 60 $^{\circ}\text{C}$ 下的 1 \times SSC 中摇动洗脱两次,每次 6 min,以洗去非特异杂交的探针。洗脱完成后,依次使用 Sheep-anti-digoxigenin 和 FITC-donkey-anti-sheep 进行信号扩增。抗体孵育完成后,将染色体片于 Washing-buffer(4 \times SSC,0.1% TWEEN 20)中 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇动洗涤两次,每次 6 min。取出后尽力甩去染色体片表面多余的液体,加 PI 复染,Nikon 80i 观察,冷 CCD 照相,所得照片用 NIS-element(Nikon) 和 Photoshop(Adobe)进行合成及对比度调整。

2 结果

2.1 BAC 文库中 *sox9* 基因的筛选定位

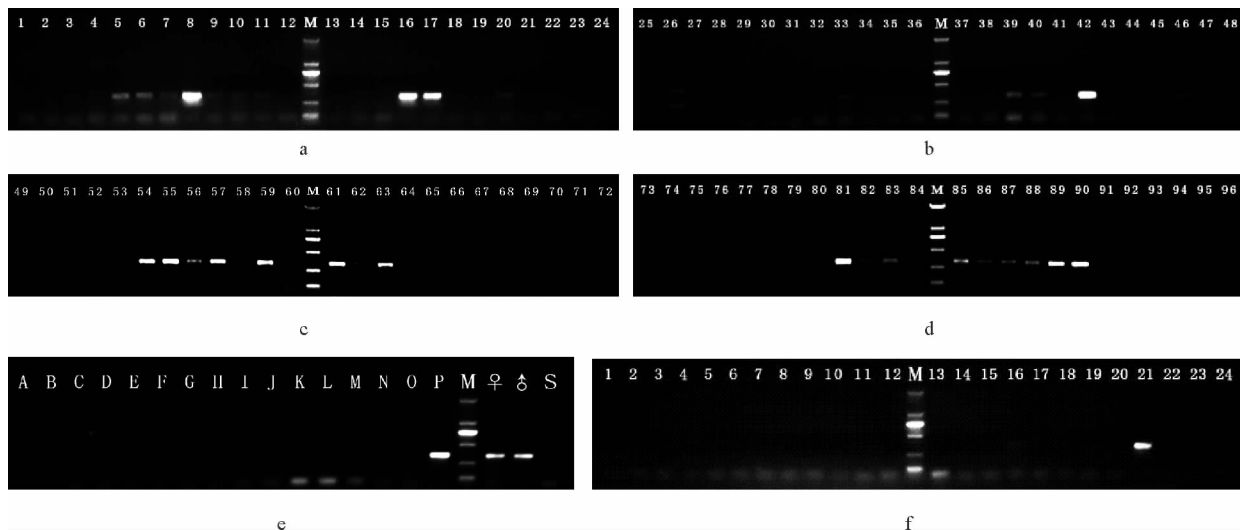
半滑舌鳎 13 : 8 倍的基因组文库 55 296 个克隆构建盘混合池(一级池)144 个,本次筛选含 *sox9* 基因的阳性盘只对前 96 个一级池做 PCR 扩增,选取 1 个阳性 384 盘构建二级池 40 个,其中行池 16、列池 24。使用特异性引物 *sox9*-S 和 *sox9*-A,筛选 96 个一级池,结果发现,盘池 8、16、17、42、54、55、57、59、61、63、81、89、90 出现预期的 340 bp 左右条带(图 1-a、图 1-b、图 1-c、图 1-d),选取条带较亮的一级池 P17,PCR 筛选二级池,行 R-P、列 C-21 出现预期的 340 bp 左右条带(图 1-e、图 1-f)。因此,单一克隆 P17P21 是筛选到包含 *sox9* 基因的阳性克隆。

2.2 筛选出的 BAC 克隆中 *sox9* 基因的验证

由引物组合 *sox9*-S 和 *sox9*-A 从 BAC 克隆 P17P21 得到特异性扩增产物。测序分析显示,该片段长约 340bp,经过 Blast 比对,属于半滑舌鳎 *sox9* 基因,进一步证实了 BAC 克隆 P17P21 中包含半滑舌鳎 *sox9* 基因。*sox9* 基因序列验证结果见图 2。

2.3 染色体制备

显微镜下观察半滑舌鳎头肾细胞制备的染色体,随机统计雌、雄中期分裂相各 100 个,察看染色体数目、形态,80% 左右中期分裂相染色体数目齐全(半滑舌鳎二倍体染色体数为 42 条),均为端着丝粒染色体、可清晰分辨出两臂。



a~d. 一级池筛选结果; e, f. 二级池筛选结果; M. 分子质量标准; ♀、♂. 半滑舌鲷雌、雄基因组 DNA 为模板的阳性对照; S. 水为模板的阴性对照
a-d. The first-step PCR screening result; e, f. The second-step PCR screening result; M. Molecular weight marker; ♀、♂. Positive control; S. Negative control

图 1 两步 PCR 从 BAC 文库混合池中筛选出含 *sox9* 基因的单一阳性克隆

Fig. 1 Identifying positive clone containing *sox9* by two-step PCR screening of BAC library pools

2.4 *sox9* 基因 BAC-FISH 探针的制备

以高纯度 P17P21 的 BAC 质粒 DNA 为模板, 缺口平移法制备地高辛标记的探针, 琼脂糖电泳检测片段集中在(150~450)bp 之间(图 3), 证实标记成功。

2.5 *sox9* 基因所在的 BAC 克隆在染色体组中的定位

在半滑舌鲷前肾细胞制备的分散良好的染色体中期分裂相上, 用 BAC 克隆 P17P21 进行染色体定位研究。结果证实, P17P21 克隆定位于两条常染色体长臂的中部(图 4), 实验重复 3 次, 每次统计 100 个中期分裂相, 杂交信号明亮, 信噪比高, 没有发现信号数量和位置的变异, 杂交结果可信。

3 讨论

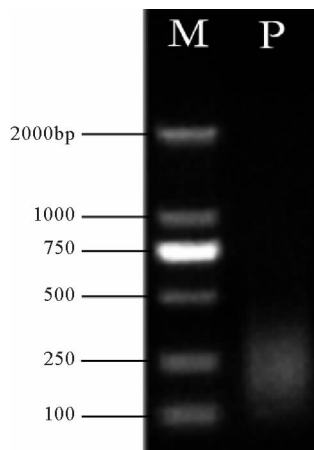
对于 BAC 文库的筛选方法, 主要分为两种: 杂交筛选法(王文生等 2006; 张洋等 2008)和基于 PCR 的池化筛选法(吴新东等 2008; Ling *et al.* 2009)。本研究中采取的方法是针对制备 BAC-FISH 探针所需的阳性单克隆而进行优化的筛选方法。前期构建的一级池时, 仅进行盘池构建, 而不进行高度浓缩的一级行、列池构建, 此法既可以节省建池所需时间和成本, 更重要的是可以减少因浓缩程度过高而造成阳性克隆的丢失。在筛选得到阳性盘后

```

GAGAAACGGTCTGCGTATGAATCTCCTCGACCCATACCTGAAGATGACGG 50
AGGAACAGGACAAGTGTCTCTCTGACGCCCCGAGCCCTAGCATGTCCGAG 100
GACTCCGCGGGCTCCCGTGCCTCCGGTCAAGGCTCCGACACCGAAAA 150
CACCCGGCCGTCGAGAACGGAATCTGAGGGCGGACGGAACCCGTGATCG 200
ACTTCAAGAAAGACGAGGACGATAAGTTTCCCGTTTGTATCCGGGATGCT 250
GTGTCGCGGTGCTCAAGGGCTACGACTGGACTCTGGTCCCATGCCGGT 300
ACGCGTGAACGGATCTACGAAGAACAAGCCCTACGTC AAGAGA 343
    
```

图 2 *sox9* 基因在 BAC 克隆中 PCR 验证的测序结果

Fig. 2 The sequence of PCR product of *sox9* gene BAC

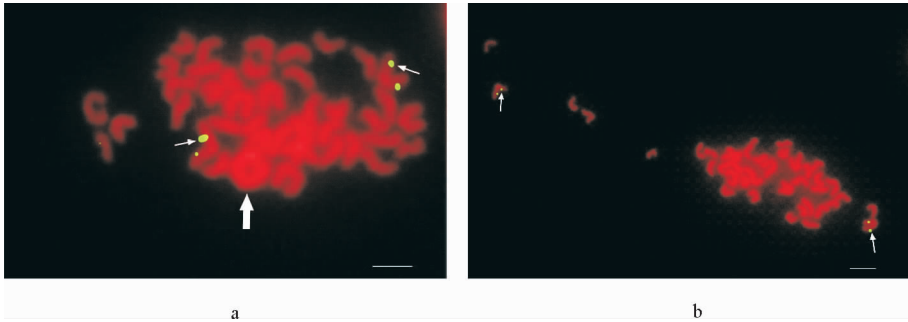


P. 地高辛标记的探针; M. 分子质量标准
P. DIG-labeled probe; M. Molecular weight marker

图 3 以 BAC 质粒 DNA 为模板制备的地高辛标记的探针

Fig. 3 Preparation of DIG-labeled probe using BAC DNA as the template

再构建二级行、列池进行 PCR 筛选,可迅速确定单一阳性克隆,且最大程度避免出现假阳性的可能性。在对一、二级池进行筛选过程中均是以提取的 BAC 质粒 DNA 为模板进行扩增的,这样做可以避免菌液 PCR 因含有较多的杂蛋白对 PCR 准确性的影响。本研究通过此筛选体系筛选出的单一阳性克隆 P17P21 与 Shao 等(2009)采用杂交筛选法筛选到阳性结果相符合,然而,Shao 等(2009)筛选到的阳性克隆有多个与本研究中的一级池阳性结果不符,经 PCR 扩增验证发现与本方法筛选到一级池不符的阳性克隆均为假阳性。



a. P17P21 克隆在半滑舌鳎雌鱼染色体上的定位;b. P17P21 克隆在半滑舌鳎雄鱼染色体上的定位;

小箭头所示为杂交信号;大箭头所示为 W 染色体。标尺=5 μ m

a. BAC clone P17P21 location result in chromosome of female *C. semilaevis*;

b. BAC clone P17P21 location result in chromosome of male *C. semilaevis*;

Little arrows indicated signals in the chromosomes; big arrows indicated the W chromosome. Bar=5 μ m

图 4 P17P21 克隆在半滑舌鳎染色体上的定位

Fig. 4 BAC clone P17P21 location result in chromosome of *C. semilaevis*

sox9 基因是继 SRY 基因后发现的又一与性别决定相关的 *sox* 家族成员,人的 *sox9* 基因是在 1994 年被首次分离和克隆(Wagner *et al.* 1994),并在同一年,通过荧光原位杂交等方法将人的 *sox9* 基因定位在 17q24.3~25.1 区段内(Foster *et al.* 1994)。研究已表明,在一些鱼类中也存在 *sox9* 基因。目前,对于鱼类 *sox9* 基因的研究主要集中在结构、表达、功能等方面,而在染色体定位方面的报道较少。Huang 等(1999)在黄鳝性别相关基因的研究中将 *sox9* 基因定位在其 6 号常染色体上,而本研究首次将 *sox9* 基因在半滑舌鳎染色体上进行了定位,由定位结果可以推断出半滑舌鳎的 *sox9* 基因同样是定位在一对常染色体上,而不是性染色体 Z/W 上。这表明与性别决定相关的 *sox9* 基因在鱼类和人类的染色体定位中,均位于常染色体上,由此可以推测,鱼类 *sox9* 基因同样是参与性别调控的常染色体上基因,其作用机制可能与人类 *sox9* 基因参与性别决定和分化的机制有某些相似之处。

2000 年以来,随着 FISH 技术逐渐在半滑舌鳎染色体研究上得到应用,半滑舌鳎染色体研究进入到分子细胞遗传学阶段。利用 FISH 定位技术开发染色体特异性探针是一种很有前途的染色体鉴别方法,在半滑舌鳎研究中,已经利用大片段克隆作为探针开发了一些染色体特异性探针,成功鉴别了一些染色体。王旭波(2008)利用 5 个 Fosmid 克隆鉴别了半滑舌鳎的 5 对染色体,翟 腾等(2011)获得 1 个雌鱼特异性 Fosmid 克隆并定位到 W 染色体上。本研究中将具有明确功能基因标签(*sox9* 基因)的 BAC 克隆,成功定位在半滑舌鳎的一对同源染色体上,这使其成为一个理想的染色体特异性探针,同时起到了鉴别染色体和定位基因的作用。

sox9 基因由于在性别分化方面的重要作用而受到研究者的重视。本研究通过建立半滑舌鳎 BAC 文库的两步 PCR 筛选体系,筛选到含有 *sox9* 基因的唯一 BAC 克隆,证明了此筛选体系的有效性;并率先通过 BAC-FISH 技术将其定位到半滑舌鳎的一对同源常染色体上。若能在今后的研究中开发出与 *sox9* 基因连锁的分子标记,并将其定位到遗传连锁图上,同时以 BAC 文库为基础构建高密度物理图谱,则有望实现该基因在遗传连锁图谱、物理图谱和染色体上的同时定位,必将为 *sox9* 基因的更加细致深入的研究和应用打下坚实的基础。

参 考 文 献

- 马学坤, 柳学周, 温海深, 徐永江, 张立敬. 2006. 半滑舌鳎性腺分化的组织学观察. 海洋水产研究, 27(2):55-61
- 王文生, 王省芬, 马峙英, 张桂寅. 2006. 棉花抗黄萎病相关基因筛选与亚克隆文库构建. 华北农学报, 21(z1): 147-150
- 王旭波. 2008. 半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)雌鱼分子细胞遗传学分析. 青岛:中国海洋大学博士研究生学位论文
- 华慧颖, 王芳, 常重杰, 杜启艳. 2011. 鲤鱼 *sox9* 基因 HMG 保守区的克隆及序列分析. 河南农业科学, 2011, 40(7):147-151
- 刘利, 郭一清, 周荣家. 2001. 黄鳝 *sox9* 基因的克隆及其鉴定分析. 遗传学报, 28(6):535-539
- 权洁霞, 戴继勋. 1999. 荧光原位杂交技术(FISH)在鱼类遗传学研究中的应用及前景. 动物学研究, 20(3):225-229
- 吴新东, 陈芳, 李鑫, 邹毅辉, 邱巍, 高剑峰. 2008. 中国美利奴细毛羊 BAC 文库的三维 PCR 筛选. 生物工程学报, 24(10):1828-1831
- 沙珍霞, 陈松林, 田永胜. 2007. 圆斑星鲷染色体核型分析. 中国水产科学, 14(3): 478-481
- 张洋, 张晓军, 刘斌, 李富花, 相建海. 2008. 基因组研究的关键平台——大片段文库. 海洋科学, 32(4): 74-81
- 陈金平, 袁红梅, 王斌, 梁冰, 张树义. 2004. 史氏鲟 *sox9* 基因 cDNA 的克隆及在早期发育过程不同组织中的表达. 动物学研究, 25(6): 527-533
- 周丽青, 杨爱国, 柳学周, 杜伟, 庄志猛. 2005. 半滑舌鳎染色体核型分析. 水产学报, 29(3):417-420
- 柳学周, 庄志猛, 马爱军, 陈四清, 孙中之, 梁友, 徐永江. 2005. 半滑舌鳎繁殖生物学及繁育技术研究. 海洋水产研究, 26(5):7-14
- 俞菊华, 李建林, 曹丽萍, 吴婷婷, 杨弘. 2005. 黄颡鱼 *sox9* 基因的分离及分析. 农业生物技术学报, 13(5): 620-623
- 姜言伟, 万瑞景. 1988. 渤海半滑舌鳎的生殖习性及其产卵生态的研究. 海洋水产研究, 9:185-192
- 程华, 彭仁海, 张香娣, 刘方, 王春英, 王坤波. 2012. 棉花 BAC 文库快速筛选法. 生物技术, 22(3):55-58
- 谢明树, 孙冰, 张博, 邵长伟, 王启龙, 王磊, 陈松林. 2012. 牙鲆和半滑舌鳎 5S rDNA 基因的染色体定位及鲽形目 5 种鱼类的分子系统学分析. 水产学报, 36(8):1160-1166
- 翟腾, 王旭波, 王晶, 高金宁, 翟介明, 张全启. 2011. 半滑舌鳎雌性特异 Fosmid 克隆的筛选及 FISH 定位. 中国海洋大学学报, 41(11):57-60
- Adriana R, Yi-Lin Y, Ruth AB and 4 others. 2005. Characterization and expression pattern of zebrafish anti-Müllerian hormone (amh) relative to *sox9a*, *sox9b*, and *cyp19a1a*, during gonad development. Gene Expr Patterns 5(5):655-667
- Bagheri-Fam S, Sreenivasan R, Bernard P and 5 others. 2012. *Sox9* gene regulation and the loss of the XY/XX sex-determining mechanism in the mole vole *Ellobius lutescens*. Chromosome Res 20(1):191-199
- Dong XL, Chen SL, Ji XS, Shao CW. 2011. Molecular cloning, characterization and expression analysis of *sox9a* and *foxl2* genes in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). Acta Oceanologica Sinica 30(1):68-77
- Foster JW, Dominguez-steglich MA, Guioli S and 8 others. 1994. Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. Nature 372(6406):525-530
- Hayato Y, Tohru K, Minoru T and 6 others. 2002. *Sox9* in a teleost fish, medaka (*Oryzias latipes*): Evidence for diversified function of *sox9* in gonad differentiation. Mol Reprod Dev 63(1):5-16
- Huang X, Zhou R, Liu L and 3 others. 1999. Chromosome assignments of the rice field eel *sox9* and *sox17* genes. Aquaculture Int 7: 393-397
- Ling F, Wang LL, Du HL. 2009. Study on cloning and polymorphism of porcine adiponectin promoter. Agr Sci Technol 10(6):53-56
- Morais S, Hacker A, Harley V and 3 others. 1996. *Sox9* expression during gonadal development implies a conserved role for the gene in testis differentiation in mammals and birds. Nat Genet 14(1):62-68
- Shao CW, Chen SL, Scheuring CF and 4 others. 2009. Construction of two BAC libraries from half-smooth tongue (*Cynoglossus semilaevis*) and identification of clones containing candidate sex-determination genes. Mar Biotechnol 12(5):558-568
- Smith CA, Sinclair AH. 2004. Sex determination: insights from the chicken. Bioessays 26(2):120-132
- Wagner T, Wirth J, Meyer J and 11 others. 1994. Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene *sox9*. Cell 79(6):1111-1120