

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20171010001

http://www.yykxjz.cn/

张乐乐, 边力, 常青, 侯吉伦, 陈四清, 赵庆, 刘琨, 葛建龙, 刘长琳. 圆斑星鲈 *sox9* 基因的克隆与表达. 渔业科学进展, 2018, 39(6): 72-80

Zhang LL, Bian L, Chang Q, Hou JL, Chen SQ, Zhao Q, Liu K, Ge JL, Liu CL. Cloning and expression of the *sox9* gene in spotted halibut (*Verasper variegatus*). Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(6): 72-80

圆斑星鲈 *sox9* 基因的克隆与表达*

张乐乐^{1,2} 边力² 常青² 侯吉伦³ 陈四清^{2①}
赵庆^{1,2} 刘琨^{1,2} 葛建龙² 刘长琳²

(1. 水产科学国家级实验教学示范中心 上海海洋大学 上海 201306; 2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 3. 中国水产科学研究院北戴河中心实验站 秦皇岛 066100)

摘要 本研究筛选到圆斑星鲈(*Verasper variegatus*)的性别相关基因 *sox9*, 并通过 RACE 技术获得了全长序列, 基因全长为 3287 bp, 包括 1431 bp 的 ORF, 编码 477 个氨基酸, 368 bp 的 5' UTR 和 1488 bp 的 3' UTR。在 3' UTR 中有多聚腺苷酸尾和加尾信号 AATAAA。通过荧光定量 PCR 测定了 *sox9* 基因在圆斑星鲈成鱼不同组织中的表达水平, 发现 *sox9* 基因在圆斑星鲈的脑、眼、鳃、心、肝、胆、肠、精巢、卵巢、肾和肌肉等各个组织中都有不同程度的表达。在鳃、脑和精巢组织中检测到较高水平的 *sox9* 转录, 其中精巢中的转录水平显著高于其他组织, *sox9* 基因在性腺中的表达显示出性别两相性差异。其在精巢中的表达水平要显著高于卵巢, 说明 *sox9* 基因与雄性性腺发育相关。通过测定 *sox9* 基因在圆斑星鲈幼鱼不同发育时期(20、30、40、50、60、70 和 80 日龄)的表达水平, 发现其在 20~50 日龄表达量逐渐下降, 在 60 日龄时表达量上升, 推测表达量上升可能与幼鱼性腺分化相关。

关键词 圆斑星鲈; *sox9*; 性别基因; mRNA 表达

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)06-0072-09

基因 *sox*(SRY-related HMG-box)是与哺乳动物睾丸决定基因 *SRY*(Sex determination Region of Y chromosome)的保守区 HMG 基序有 60%以上同源性的一类基因的统称, 而 *sox9*(Sex determining region Y-box 9)是 *sox* 基因家族中重要的一员(Foster *et al.*, 1994)。东天等(2015)研究表明, *sox9* 基因是目前发现的大多数脊椎动物睾丸发育的主要基因之一, 被认为与性逆转、性别分化胚胎期的细胞分化以及精原细胞的形成有关。哺乳类 *sox9* 下调 *wnt4* (Wingless-type

MMTV integration site family, member 4)的表达, 性腺将发育成睾丸(侯林等, 2007); *sox9* 参与激活 *amh* (Anti-mullerian hormone), 可以使哺乳动物性腺向精巢方向发育(文爱韵等, 2011)。目前, 在尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)、青鳉(*Oryzias latipes*)、高身丽脂鲤(*Astyanax altiparanae*)、西伯利亚鲟鱼(*Acipenser baerii*)和牙汉鱼(*Odontesthes bonariensis*)等多种鱼类中获得了 *sox9* 基因(Kobayashi *et al.*, 2008; Nakamura *et al.*, 2012; Fernandino *et al.*, 2003; Adolfini *et al.*, 2015;

* 中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费(20603022016005)和天津市农业科技成果转化与推广项目(201604100)共同资助[This work was supported by Special Scientific Research Funds for Central Non-Profit Institutes, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences (20603022016005), and Agriculture Science and Technology Achievement Transformation and Generalization Project in Tianjin (201604100)]. 张乐乐, E-mail: 2459823080@qq.com

① 通讯作者: 陈四清, 研究员, E-mail: chensq@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2017-10-10, 收修改稿日期: 2017-10-30

Berbejillo *et al.*, 2013)。证实了 *sox9* 基因在鱼类性别分化和性腺发育过程中发挥着重要的作用。李永婧等 (2017) 研究发现, *sox9* 的突变会导致雌性个体出现雄性表型, 这可能与生殖细胞数目的减少相关, 表明在硬骨鱼类中 *sox9* 基因可能具有新的功能, 即在生殖细胞系维持和存活方面发挥了重要作用。

圆斑星鲈 (*Verasper variegatus*) 是一种具有广阔养殖前景的新兴养殖对象, 雌性在生长速度与体型上明显比雄性大, 5~8 cm 的圆斑星鲈经养殖 4 年, 雌、雄鱼的体重分别达 4.3 kg 和 1.2 kg (叶建生等, 2006)。通过进行性别控制, 培育单一雌性苗种, 可以有效提高其养殖效益。性别决定机制与性别分化特征的研究对实现单性化繁殖十分重要。迄今圆斑星鲈性别相关基因的研究还未见报道。作者克隆了圆斑星鲈 *sox9* 基因的全长序列, 并分析其在圆斑星鲈成鱼不同组织及在幼鱼不同发育阶段的表达差异, 为圆斑星鲈的性别决定及性腺发育机制提供了基础资料和理论依据。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

1.1.1 成鱼各组织样品的制备 圆斑星鲈成鱼取自蓬莱天源水产有限公司, 解剖鱼体, 观察其性腺, 确定性别, 然后取成体雄鱼和雌鱼各 3 尾, 体长为 (23.5±0.5) cm、体重为 (340±20) g, 取其组织 (全脑、眼、鳃、心、肝、胆、肠、精巢、卵巢、肾和肌肉), 置于有 RNA later 试剂的离心管中, 液氮速冻后, 将样品保存于 -80℃ 超低温冰箱, 待用。

1.1.2 仔鱼各发育时期样品的制备 不同发育时期的仔鱼取自于山东省威海市乳山市的山东科合海

洋高技术有限公司。选取 20、30、40、50、60、70 和 80 日龄仔鱼, 其全长分别为 (10.5±0.7)、(13.5±0.6)、(19.6±1.8)、(29.6±2.4)、(36.2±2.5)、(45.1±2.3) 和 (57.7±2.8) cm, 每个日龄取 10 尾鱼, 去头去尾保留腹部, 处理后装入冻存管中, 液氮速冻, 于 -80℃ 超低温冰箱中保存备用。

1.2 RNA 提取及反转录

本研究采用 Trizol 法提取成鱼不同组织以及仔鱼各发育时期性腺组织的 RNA。用分光光度计和琼脂糖凝胶电泳检验 RNA 质量。用 DEPC 处理水将 RNA 稀释成浓度为 1 μg/μl 的溶液, 并使用反转录试剂盒 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (TaKaRa), 以稀释后的 RNA 为模板, 将 RNA 反转录成 cDNA。具体实验步骤为: 在冰上, 向 0.2 ml 的 PCR 管中依次加入 5×gDNA Eraser Buffer 2.0 μl, gDNA Eraser 1.0 μl, Total RNA 1 ng, RNase Free dH₂O 补至 10 μl; 42℃ 水浴 2 min, 置于冰上; 再加入 PrimeScript RT Enzyme Mix I 1.0 μl, RT Primer Mix 1.0 μl, 5×PrimeScript Buffer 2 4.0 μl, RNase Free dH₂O 4.0 μl; 然后, 37℃ 水浴 15 min, 85℃ 水浴 5 s, 置于冰上。产物 cDNA 转移至 -20℃ 保存备用。

1.3 *sox9* 基因核心片段的克隆

基于本课题组前期获得的圆斑星鲈转录组数据 (Ge *et al.*, 2017), 使用软件 Oligo7 设计特性引物 *sox9*-S1 和 *sox9*-A1 (表 1), 以成鱼性腺组织的 cDNA 为模板, PCR 扩增 *sox9* 核心序列。

PCR 反应体系 (50 μl): 在 0.2 ml PCR 管中依次加入 2×TSINGKE Master Mix 25 μl, *sox9*-S1 (10 μmol/L)

表 1 本实验所用引物
Tab.1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'~3')	用途 Purpose
<i>sox9</i> -S1	TGCTCGCCTCCTCCACCCAA	克隆 <i>sox9</i> 基因
<i>sox9</i> -A1	TCGCAACTCGCCTTCTCGTCT	To amplify the <i>sox9</i> gene
β-actin-S	TTCTGGTGATGGTGTGAC	
β-actin-A	GTGGTGGTGAAGGAGTAG	荧光定量
<i>sox9</i> -S2	GACCAGTACCCGCATCTGCAC	Real-time PCR
<i>sox9</i> -A2	TCAGACGCTCCGCTTCCCTCCA	
5'GSP-1	ATCGGCACCAGCGTCCAGTCGTA	5' RACE 第一轮 First round
5'GSP-2	AGCCCTTCAGCACCTGGGACA	5' RACE 第二轮 Second round
3'GSP-1	TCCCAGGTGCTGAAGGGCTACGA	3' RACE 第一轮 First round
3'GSP-2	CAGAACTCAGCAAGACCCTGGGCAA	3' RACE 第二轮 Second round
M13-S1	CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC	PCR
M13-A1	GAGCGGATAACAATTTACACAGG	PCR

1 μl , *sox9*-A1(10 $\mu\text{mol/L}$) 1 μl , cDNA 1 μl , 加双蒸水补至 50 μl ; PCR 反应条件为 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 7 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。扩增产物保存于-20 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.2%的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物中的目的条带。UV2 下切胶, 使用 SanPrep 柱式 DNA 凝胶回收试剂盒(生工)和 PMDTM 18-T 载体(TaKaRa)对目的 DNA 片段进行回收、连接和转化培养。具体步骤参考试剂盒使用说明书。菌液 PCR 进行阳性克隆筛选。

菌液 PCR 反应体系(10 μl)如下, 在 0.2 ml PCR 管中依次加入 2 \times TSINGKE Master Mix 5 μl , M13-S1 (10 $\mu\text{mol/L}$) 0.4 μl , M13-A1 (10 $\mu\text{mol/L}$) 0.4 μl , 菌液 2 μl , 加双蒸水补至 10 μl 。PCR 反应条件为 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。扩增产物保存于-20 $^{\circ}\text{C}$ 。

扩增产物经 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测目的条带(原目的条带加 150~200 bp 为阳性克隆)。有目的条带的菌液送测。测序结果与 NCBI 数据库进行对比, 确定序列为 *sox9* 基因的核心序列。

1.4 *sox9* 基因 5' UTR 和 3' UTR 的扩增

使用 SMARTTM RACE cDNA Amplification RACE (TaKaRa)反转录试剂盒, 以性腺组织 RNA 为模板制备 5'和 3'cDNA 的第一条链。根据前面所得的核心序列设计特异性引物 3' GSP-1 和 3' GSP-2 扩增 *sox9* 基因的 3' UTR。设计特异性引物 5' GSP-1 和 5' GSP-2 扩增 *sox9* 基因的 5' UTR(表 2)。5' UTR 和 3' UTR 扩增都采用巢式 PCR 方法, 共 2 轮 PCR 反应, 第一轮以 5'和 3' cDNA 的第一条链为模板及外侧特异引物 GSP-1 进行扩增, 第二轮以第一轮 PCR 产物为模板及内侧特异引物 GSP-2 进行扩增。

反应体系 25 μl : 10 \times Buffer 2.5 μl , dNTP (2.5 mmol/L) 0.5 μl , UPM 2.5 μl , 5'或 3'特异引物 0.5 μl , 5'或 3' RACE 模板 1.25 μl , Taq DNA 聚合酶 0.5 μl , ddH₂O 补足至 25 μl 。PCR 反应条件为 94 $^{\circ}\text{C}$, 30 s; 68 $^{\circ}\text{C}$, 30 s; 72 $^{\circ}\text{C}$, 2 min。

将 PCR 所得的 5'和 3'端产物进行电泳检测, UV2 下切胶回收 DNA 片段, 并连接转化, 挑取阳性克隆测序。测序结果与 NCBI 数据库进行比对, 确定为 *sox9* 基因的片段。

1.5 序列和系统发育分析

使用软件 Gene Tool 对 *sox9* 基因进行序列分析, 使用软件 DNAMAN 对其进行蛋白序列多重比对分析, 使用软件 MEGA 5 进行系统进化分析。

1.6 荧光定量 PCR

根据 *sox9* 基因的核心序列, 运用软件 Oligo7 设计多对特异性引物, 以圆斑星鲃成鱼不同组织和幼鱼不同发育阶段性腺组织的 cDNA 为模板, 荧光定量 PCR(qRT-PCR)测定 *sox9* 基因在圆斑星鲃不同组织和幼鱼不同发育阶段的表达水平。特异性引物要进行引物试扩增, 检测其条带的特异性及扩增效率, 找出最佳的特异引物。通过预实验筛选出最佳引物 *sox9*-S2 和 *sox9*-A2(表 1), 目的基因 *sox9* 与内参基因 β -actin 的扩增效率都接近 100%, 扩增效率一致, 采用 2^{- $\Delta\Delta\text{Ct}$} 法分析基因相对表达量。

qRT-PCR 反应体系(20 μl)为 2 \times SYBR Premix Ex TaqTM II (TaKaRa) 10 μl , cDNA 模板 2 μl , 正反向引物各 0.8 μl , ROX Reference Dye II 0.4 μl , ddH₂O 补齐至 20 μl 。扩增反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s (1 个循环); 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 34 s (40 个循环); 95 $^{\circ}\text{C}$ 15s (1 个循环); 60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min (1 个循环); 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s (1 个循环)。每一实验样品重复扩增 3 次, 用于后续实验数据。运用 SPSS 19.0 软件进行 One-way ANOVA 差异显著性分析。

2 结果

2.1 序列和系统发育分析

通过对 *sox9* 基因核心片段的克隆以及对其 5' UTR 和 3' UTR 的扩增, 得到了 *sox9* 基因的全长序列。基因全长为 3287 bp, 经软件预测 *sox9* 基因包括 1431 bp 的 ORF, 可编码 477 个氨基酸, 368 bp 的 5' UTR 和 1488 bp 的 3' UTR(图 1)。在 3' UTR 中有多聚腺苷酸尾和加尾信号 AATAAA。

如图 2 所示, 将圆斑星鲃 Sox9 蛋白序列与其他物种的 Sox9 蛋白序列进行比对分析, 比对所用的物种包括: 人(*Homo sapiens*, CAA86598.1)、原鸡(*Gallus gallus*, AAB09663.1)、鼠(*Mus musculus*, NP_035578.3)、非洲爪蟾(*Xenopus laevis*, NP_001084276.1)、红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*, Sox9a: AAQ18507.1, Sox9b: AAQ18508.1)、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*, ART89197.1)、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*, ACO40490.1)、赤点石斑鱼(*Epinephelus akaara*, AAT77677.1)和青鳉(*Oryzias latipes*, Sox9a: NP_001098556.1, Sox9b: AAX62151.1)。比对结果显示, 包括圆斑星鲃在内的鱼类 Sox9 蛋白均含有高度保守的 HMG 结构域。*sox9* 基因编码的 477 个氨基酸, 其中 103~173 aa 为 HMG 结构域。

根据已发表的各个物种的 Sox9 蛋白序列, 采用 MEGA 软件的邻接法(Neighbor-joining, NJ), 自举次

```

1 tctaatacga ctcaatag ggcaagcagt ggtatcaacg cagagtacat ggggactcct tcagccatcc tccaagagcg cgtctctcct
91 cacagttctc ttcaaaagta cactttcaga gtaaacgacg ggagcgacat cactcgaac tcgcccctctc gctctgctaa aagtcaaagg
181 agcgtccaga agtttttttc tgtttggctt ttttggttct gccttgcact caaggattca ggtttgccag tcgagctgtg cgccctcaca
271 gactgtcact gcagtccttg ggcaagcagc ttggatttta gaaagaagga tttttcctcc tttttatctg tgatacggcg ttcctcaatt
      M N L L D P Y L K M T E E Q E K C H S D A P S P S M S E
361 tttttcgcAT GAATTCCTC GACCCTTACC TGAAGATGAC AGAAGAACAG GAGAAGTGTC ACTCCGACGC TCCAGCCCC AGCATGTCTG
      D S A G S P C P S G S G S D T E N T R P I D N H L L L G P D
451 AGGACTCCGC GGGCTCTCCG TGCCCGTCCG GCTCCGGCTC GGACACCGAG AACACCCGTC CGATCGACAA CCACCTCCTC CTGGGCCCCAG
      Y K K E G E E E K F P V C I R D A V S Q V L K G Y D W T L V
541 ACTACAAGAA GGAGGGCGAG GAAGAGAAGT TCCCCGTGTG CATCAGGGAT CCGGTGTCCC AGGTGTGAA GGGCTACGAC TGGACGCTGG
      P M P V R V N G S S K N K P H V K R P M N A F M V W A Q A A
631 TGCCGATGCC AGTGCCTGTC AACGGCTCAA GCAAAAACAA ACCTCACGTC AAAAGACCCA TGAACGCATT CATGGTGTGG GCACAAGCCG
      R R K L A D Q Y P H L H N A E L S K T L G K L W R L L N E V
721 CGCGGAGGAA GGTGGCCGAC CAGTACCCGC ATCTGCACAA CGCAAGACTC AGCAAGACCC TGGGCAAACT TTGGAGATTG CTC AACGAAG
      E K R P F V E E A E R L R V Q H K K D H P D Y K Y Q P R R R
811 TCGAGAAGCG CCGCTTTGTG GAGGAAGCGG AGCGTCTGAG AGTGCAGCAC AAGAAGGATC ATCCCGACTA CAAATATCAG CCGAGGCCGA
      K S V K N G Q N E T E D G E Q T H I S P N A I F K A L Q Q A
901 GAAAGTCTGT GAAGAACGGA CAAAACGAAA CCGAGGACGG CGAGCAACG CACATATCTC CCAATGCGAT CTTCAAGCGC CTGCAGCAGG
      G A P A S S M G E A H S P G E H S G Q S Q G P P T P P T P
991 CCGATTCGCC GCGCTCGAGC ATGGGCGAGG CGCACTCTCC AGGAGAACAT TCAGGTCAAT CCCAGGCCCC ACCAACACCC CCAACACCC
      K T D L P T T K V D L K R E G R P I Q E G T S R Q L N I D F
1081 CCAAGACAGA CCTGCCACC ACCAAGGTTG ACCTGAAGCG TGAGGGGCGC CCCATTCAGG AGGGCACCCAG TCCGACGCTC AACATCGACT
      G A V D I G E L S S E V I S N M G S F D V D E F D Y L P L
1171 TTGAGGCGGT GGACATTGGC GAGCTGAGCA GCGAAGTCAT CTCCAACATG GGGAGCTTTG ACGTCGATGA GTTTGACCAG TACCTGCCGC
      H S H A G V A G A A Q A G Y T G S Y G I S S S S V G Q A A N
1261 TTCACAGCCA CGTGGGGGTG GCCGGCGCAG CCCAGGCCGG CTACACTGGC AGCTACGGCA TCAGCAGCTC CTCAGTCGGC CAGGCAGCQA
      V G A H A W M S K Q Q Q H S L T T L G G G G E Y F D Q Q
1351 ATGTCGGGGC CCACGCTTGG ATGTCCAAGC AGCAGCAGCA CTCTCTGACC ACCTTGGGTG GAGGAGGCGA CAGGGCCCAA CAGGGTCAAC
      R T T Q I K T E Q L S P S H Y S E Q Q G S P Q H V T Y G S F
1441 AAAGAACCAC CCAGATCAAG ACGGAGCAGC TGAGCCCCAG TCACTACAGC GAGCAGCAAG GCTCCCCACA GCACGTACC TACGGGTCTC
      N L Q H Y S A S S Y P S I T R A Q Y D Y S E H Q G G A N S Y
1531 TCAACCTGCA GCACTACAGC GCCTCTCTT ACCCTCTAT CACAAGAGCA CAGTATGACT ATTCTGAACA CCAAGGTGGT GCCAATCTCT
      Y S H A A G Q G S G L Y S T F S Y M S P S Q R P M Y T P I A
1621 ACTACAGCCA TGCACTGGC CAGGGCTCCG GCCTGTACTC CACTTTCAGC TACATGAGCC CAGCCAGAG GCCGATGTAC ACCCCGATCG
      D T T G V P Q T H S P Q H W E Q Q P I Y T Q L S R P
1711 CAGACACCAC CGGAGTGCCC TCTGTACCCC AGACCCACAG TCCGACAGCAG TGGGAGCAGC AGCCCATTTA CACACAGCTG TCCAGGCCGt
1801 gaagaggcag cctcagcact gactgtataca cactcgcacc cagcagataga cttctctctg cccgggtggcc ttcgcccgc cactccacca
1891 ccccccccc cccccccc gcattgccaa cagaaaaaca tgacaaggac tttttatag tactgaaata tatctttgga ttggctcaca
1981 acagtgcctt tttgtattgg ttggaattgt gattatattt ttttagatat aatgtttaa aaagttaaat cctctgtgag gacatactgg
2071 ttataaataat tttagtagtg actgtgtatg tttctgtctc ttgtcatcct catcttggtg atcagtgatc ttagaatcct catcgtcaag
2161 atttgaaggt ctcacacggt ttaaaaggagc cggagtgccg agtaaatca cccctcagtg ccttacttct cactaatgta tttttgtac
2251 aggaagtaag aaacgtttac tgacactgcc atcttataat agccttcatt ctgctttgaa cttttgtact gtacatatgt tattgtaatt
2341 cccgtgagat gcaaggtttg agcaatgcac gttagaaata gatttgaatt ttttggccat gatatgactg tgcatacagt gaattagtca
2431 aatattctac ttctcgttct ttgctttagc tcaaacgatt gtgtttgaaa cgctatagca ggtgccatgt aactctacta ggggcccctac
2521 cgtgttgcta gacgtaactg agcaatgctt gcttttctct ggttactgct ttgataccat tgggtcctct gtagccacat tagagcgct
2611 cagtcactg gcaatgcagt gtcaaaaacca cagcgtagtt ctgacttctt gttttaggga gaatacagga agtgaccatt tacctgactt
2701 tccctcagcag ccagcaggtt tgagtcgggc gtacttctgt catccccaca gccttttctc aaccttttta tttcttaat ttattcttta
2791 gcataaattt tatttgaaaa taactatttg caattatctt ttaattcag cagcagctta caaccgctga catatgtggt acaaatgtgt
2881 ttattttatca ttttgaattg tttccgtatt aaagtctctt ttaattcag ttagttatg tacagattac tataaattac tagaagagc
2971 ttttttttaa aaaaagaaaa actggaagtt tttctgtctt tctttttaa aaaagaatta atgtatatgg aagccgtggc cgttttgtaa
3061 agaatttgct ggaatcccca ggatactttt ttttttgaa aaaaaaaaa aggttgtgtt cctcatttta tattctgtat cattagttct
3151 tcttttgta tcttttttaa tgcagtttcc ctataggtaa acatgccatt gttttaaag cttatctttt gttttttatt gtttgaata
3241 aaaaacaaa actgagaat aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaa

```

图 1 圆斑星鲈 *sox9* 基因核苷酸序列

Fig.1 The nucleotide sequence of the *sox9* gene in spotted halibut

大写字母: 编码区; 小写字母: 非编码区

Uppercase letters: Coding regions; Lowercase letters: Untranslated regions (UTR)

数(bootstrap)1000次,构建NJ分子系统进化树(图3)。进化树构建所用的 Sox9 蛋白的其他物种包括: 人(*H. sapiens*, CAA86598.1)、原鸡(*G. gallus*, AAB09663.1)、鼠(*M. musculus*, NP_035578.3)、沼泽鳄(*Crocodylus palustris*, ACU12296.1)、红鳍东方鲀(*T. rubripes*, Sox9a: AAQ18507.1, Sox9b: AAQ18508.1)、大菱鲆(*S. maximus*, ART89197.1)、牙鲆(*P. olivaceus*,

ACO40490.1)、斑马鱼(*Barchydanio rerio*, Sox9a: AAG09814.1, Sox9b: AAG09815.1)、赤点石斑鱼(*E. akaara*, AAT77677.1)和青鲈(*O. latipes*, Sox9a: NP_001098556.1, Sox9b: AAX62151.1)。从图3可以看出,哺乳类(如人)、鸟类(如原鸡)和爬行类(如沼泽鳄)的 Sox9 聚在了一起,圆斑星鲈 Sox9 与牙鲆、青鲈等其他硬骨鱼类的 Sox9 聚在了一起。

<i>E.akaara</i>	Sox9	MNLLDPYLKMTTEGQKCHSDAPSPNSLSDSAGSPCPSGSGSDTENTRPSDNHLLLGCDYKKEGEEEFKFPVCI	RDAVSCVLKGYDWTLV	88
<i>G.gallus</i>	Sox9	MNLLDPFNMKTEEDQKGLS GAPSPITNSLSDSAGSPCPSGSGSDTENTRPPCENTFPKGDPELKKESDEEDKFPVCI	REAVSCVLKGYDWTLV	90
<i>H.sapiens</i>	Sox9	MNLLDPFNMKTEEDQKGLS GAPSPITNSLSDSAGSPCPSGSGSDTENTRPPCENTFPKGDPELKKESDEEDKFPVCI	REAVSCVLKGYDWTLV	89
<i>M.musculus</i>	Sox9	MNLLDPFNMKTEEDQKGLS GAPSPITNSLSDSAGSPCPSGSGSDTENTRPPCENTFPKGDPELKKESDEEDKFPVCI	REAVSCVLKGYDWTLV	89
<i>O.latipes</i>	Sox9a	MNLLDPYLKMTTEGQKCHSDAPSPNSLSDSAGSPCPSGSGSDTENTRPSDNHLLI RGDYKKEGEEEFKFPVCI	RDAVSCVLKGYDWTLV	88
<i>O.latipes</i>	Sox9b	MNLLDPYLKMTTEGQKCHSDAPSPNSLSDSAGSPCPSGSGSDTENTRPSDNHLLI RGDYKKEGEEEFKFPVCI	RDAVSCVLKGYDWTLV	88
<i>P.olivaceus</i>	Sox9	MNLLDPYLKMTTEGQKCHSDAPSPNSLSDSAGSPCPSGSGSDTENTRPSDNHLLGCDYKKEGEEEFKFPVCI	RDAVSCVLKGYDWTLV	88
<i>S.maximus</i>	Sox9	MNLLDPYLKMTTEGQKCHSDAPSPNSLSDSAGSPCPSGSGSDTENTRPSDNHLLGCDYKKEGEEEFKFPVCI	RDAVSCVLKGYDWTLV	88
<i>T.rubripes</i>	Sox9a	MNLLDPYLKMTTEGQKCHSDAPSPNSLSDSAGSPCPSGSGSDTENTRPSDNHLLGCDYKKEGEEEFKFPVCI	RDAVSCVLKGYDWTLV	88
<i>T.rubripes</i>	Sox9b	MNLLDPYLKMTTEGQKCHSDAPSPNSLSDSAGSPCPSGSGSDTENTRPSDNHLLGCDYKKEGEEEFKFPVCI	RDAVSCVLKGYDWTLV	88
<i>V.variegatus</i>	Sox9	MNLLDPYLKMTTEGQKCHSDAPSPNSLSDSAGSPCPSGSGSDTENTRPI DNHLLGCDYKKEGEEEFKFPVCI	RDAVSCVLKGYDWTLV	88
<i>X.laevis</i>	Sox9a	MNLLDPFNMKTEEDQKCHSDAPSPITNSLSDSAGSPCPSGSGSDTENTRPPCENTFPKGCCELKKETEEDKFPVCI	REAVSCVLKGYDWTLV	89
<i>E.akaara</i>	Sox9	PNPVVRVNGSSKSPHVKRPNNAFMVWA AARRKLA DCPYPLHNAELSKTLGKLVRL LNEVEKRPFVEEAERLRVCHKKDHPDYKYCPRRR	178	
<i>G.gallus</i>	Sox9	PNPVVRVNGSSKSPHVKRPNNAFMVWA AARRKLA DCPYPLHNAELSKTLGKLVRL LNEVEKRPFVEEAERLRVCHKKDHPDYKYCPRRR	180	
<i>H.sapiens</i>	Sox9	PNPVVRVNGSSKSPHVKRPNNAFMVWA AARRKLA DCPYPLHNAELSKTLGKLVRL LNEVEKRPFVEEAERLRVCHKKDHPDYKYCPRRR	179	
<i>M.musculus</i>	Sox9	PNPVVRVNGSSKSPHVKRPNNAFMVWA AARRKLA DCPYPLHNAELSKTLGKLVRL LNEVEKRPFVEEAERLRVCHKKDHPDYKYCPRRR	179	
<i>O.latipes</i>	Sox9a	PNPVVRVNGSSKSPHVKRPNNAFMVWA AARRKLA DCPYPLHNAELSKTLGKLVRL LNEVEKRPFVEEAERLRVCHKKDHPDYKYCPRRR	178	
<i>O.latipes</i>	Sox9b	PNPVVRVNGSSKSPHVKRPNNAFMVWA AARRKLA DCPYPLHNAELSKTLGKLVRL LNEVEKRPFVEEAERLRVCHKKDHPDYKYCPRRR	178	
<i>P.olivaceus</i>	Sox9	PNPVVRVNGSSKSPHVKRPNNAFMVWA AARRKLA DCPYPLHNAELSKTLGKLVRL LNEVEKRPFVEEAERLRVCHKKDHPDYKYCPRRR	178	
<i>S.maximus</i>	Sox9	PNPVVRVNGSSKSPHVKRPNNAFMVWA AARRKLA DCPYPLHNAELSKTLGKLVRL LNEVEKRPFVEEAERLRVCHKKDHPDYKYCPRRR	178	
<i>T.rubripes</i>	Sox9a	PNPVVRVNGSSKSPHVKRPNNAFMVWA AARRKLA DCPYPLHNAELSKTLGKLVRL LNEVEKRPFVEEAERLRVCHKKDHPDYKYCPRRR	178	
<i>T.rubripes</i>	Sox9b	PNPVVRVNGSSKSPHVKRPNNAFMVWA AARRKLA DCPYPLHNAELSKTLGKLVRL LNEVEKRPFVEEAERLRVCHKKDHPDYKYCPRRR	178	
<i>V.variegatus</i>	Sox9	PNPVVRVNGSSKSPHVKRPNNAFMVWA AARRKLA DCPYPLHNAELSKTLGKLVRL LNEVEKRPFVEEAERLRVCHKKDHPDYKYCPRRR	178	
<i>X.laevis</i>	Sox9a	PNPVVRVNGSSKSPHVKRPNNAFMVWA AARRKLA DCPYPLHNAELSKTLGKLVRL LNEVEKRPFVEEAERLRVCHKKDHPDYKYCPRRR	179	
<i>E.akaara</i>	Sox9	KSVKNGCNPEDEG ECTHISPNAI FKALCOADSP... ASSNGEAVHSPGEHSGSGCPPTTPTTKTDLIP.SSKADLKREG... RPNCEGTS.	261	
<i>G.gallus</i>	Sox9	KTVKNGCSECEEGSECTHISPNAI FKALC ADSPCSSSI SEVHSPGEHSGSGCPPTTPTTKTACCPCGKDLKREG... PLAEGGR.	265	
<i>H.sapiens</i>	Sox9	KSVKNGCAEAEATECTHISPNAI FKALC ADSPHSSGAVSEVHSPGEHSGSGCPPTTPTTKTDC. PGKADLKREG... PLPEGGR.	264	
<i>M.musculus</i>	Sox9	KSVKNGCAEAEATECTHISPNAI FKALC ADSPHSSGAVSEVHSPGEHSGSGCPPTTPTTKTDC. PGKADLKREG... PLPEGGR.	264	
<i>O.latipes</i>	Sox9a	KSVKNGSEAEEDSECTHISPNAI FKALCOADSP... ASSNGEAHSPGEHSGSGCPPTTPTTKTDLIP.SSKADLKREG... RPNCEGTS.	261	
<i>O.latipes</i>	Sox9b	KSVKNGSEAEEDSECTHISPNAI FKALCOADSP... ASSNGEAHSPGEHSGSGCPPTTPTTKTDLIP.SSKADLKREG... RPNCEGTS.	261	
<i>P.olivaceus</i>	Sox9	KSVKNGCNPEDEG ECTHISPNAI FKALCOADSP... ASSNGEAHSPGEHSGSGCPPTTPTTKTDLIP.SSKADLKREG... RPNCEGTS.	261	
<i>S.maximus</i>	Sox9	KSVKNGCNDAEDN ECTHISPNAI FKALCOADSP... ASSLGEVHSPGEHSGSGCPPTTPTTKTDLIP.SSKADLKREG... RPNCEGTS.	261	
<i>T.rubripes</i>	Sox9a	KSVKNGCNPEDEG ECTHISPNAI FKALCOADSP... ASSLGEVHSPGEHSGSGCPPTTPTTKTDLIP.SSKADLKREG... RPNCEGTS.	261	
<i>T.rubripes</i>	Sox9b	KSVKNGCNESDCSECTHISPNAI FKALCOADSP... ASSNGEAHSPGEHSGSGCPPTTPTTKTDLIP.SSKADLKREG... RPNCEGTS.	261	
<i>V.variegatus</i>	Sox9	KSVKNGCNTEDEG ECTHISPNAI FKALCOADSP... ASSNGEAHSPGEHSGSGCPPTTPTTKTDLIP.SSKADLKREG... RPNCEGTS.	264	
<i>X.laevis</i>	Sox9a	KSVKNGQTECEDGA ECTHISPNAI FKALC ADSPHSSNSSEVHSPGEHSGSGCPPTTPTTKTDLIP.SSKADLKREG... PLCENGR.	264	
<i>E.akaara</i>	Sox9	RCLNIDFGAVCI NELSSSEVI SINISGSDVDFDFCYLP HPHSHAGVTGAA. CAG. YTGSYG. SSSSVSCAANVGAHVMS. KCCCCC.....	342	
<i>G.gallus</i>	Sox9	CPPHIDFRDVEI GELSSDVI SINISGSDVDFDFCYLP HPHSHAGVTGAA. CAG. YTGSYG. SSSASPPAGAC. HAVMAKCCPCPP... CPP	350	
<i>H.sapiens</i>	Sox9	CPPIDFRDVEI GELSSDVI SINISGSDVDFDFCYLP HPHSHAGVTGAA. CAG. YTGSYG. SSSAATPASAC. HVMSKCCAPPPCCPP	350	
<i>M.musculus</i>	Sox9	CPPIDFRDVEI GELSSDVI SINISGSDVDFDFCYLP HPHSHAGVTGAA. CAG. YTGSYG. SSSAATPASAC. HVMSKCCAPPPCCPP	350	
<i>O.latipes</i>	Sox9a	RCLNIDFGAVCI GELSSDVI SINISGSDVDFDFCYLP HPHSHAGVTGAA. CTS. YSNMVM. NSSAVGCTANVGAHVMSKCCCH.....	340	
<i>O.latipes</i>	Sox9b	RCLNIDFGAVCI GELSSDVI SINISGSDVDFDFCYLP HPHSHAGVTGAA. CTS. YSNMVM. NSSAVGCTANVGAHVMSKCCCH.....	340	
<i>P.olivaceus</i>	Sox9	RCLNIDFGAVCI GELSSSEVI SINISGSDVDFDFCYLP HPHSHAGVTGAA. CAG. YTGSYG. SSSSVSCAANVGAHVMS. KCCCCC.....	341	
<i>S.maximus</i>	Sox9	RCLNIDFGAVCI GELSSSEVI SINISGSDVDFDFCYLP HPHSHAGVTGAA. CAG. YTGSYG. GSSVSCAANVGAHVMS. KCCCCC.....	342	
<i>T.rubripes</i>	Sox9a	RCLNIDFGAVCI GELSSSEVI SINISGSDVDFDFCYLP HPHSHAGVTGAA. CAG. YTGSYG. SSSSVSCAANVGAHVMS. KCCCCC.....	342	
<i>T.rubripes</i>	Sox9b	RCLNIDFRDVEI GELSSDVI SHIETFDVNEFDCYLP HPHSHAGVAT. PVA. YS GTYSI. SSSGVPSPCTGVAAVLT. PNCNCC..... G	344	
<i>V.variegatus</i>	Sox9	RCLNIDFGAVCI GELSSSEVI SINISGSDVDFDFCYLP HPHSHAGVAT. CAG. YTGSYG. SSSVSCAANVGAHVMS. KCCC.....	340	
<i>X.laevis</i>	Sox9a	CPPRIDFRDVEI GELSSSEVI STIETFDVNEFDCYLP HPHSHAGVAT. CAS. YTGSYG. SSSATTPATGAC. PACMSKCCCCP.....	343	
<i>E.akaara</i>	Sox9	... HSLTTLGGG... CEPVCCG... CCRRTI	KTECLSPSHYSECCCHS... CHATYGSFNLCHYSTSS. Y	400
<i>G.gallus</i>	Sox9	ACPPACHTLP... TERECGP... ACCRPH	KTECLSPSHYSECCCHPECCCCC... CCLGYGSFNLCHYGFSS. Y	416
<i>H.sapiens</i>	Sox9	CAPPAPCAAPPCCAAAPPCCPAHTLTLSSSEPCCSCRTH	KTECLSPSHYSECCCHS... PCCIAYSFPNLPHYSPSY. Y	432
<i>M.musculus</i>	Sox9	CAPCAPCAPP. CCAPPCCPAP. CCCCASHLTLSSSEPCCSCRTH	KTECLSPSHYSECCCHS... PCCIAYSFPNLPHYSPSY. Y	430
<i>O.latipes</i>	Sox9a	... SLATLGGG... GDCSCCG... CCRRTI	KTECLSPSHYSECCCHS... CHVSYGSFNLCHYSTSS. Y	397
<i>O.latipes</i>	Sox9b	... SLATLGGG... GDCSCCG... CCRRTI	KTECLSPSHYSECCCHS... CHVSYGSFNLCHYSTSS. Y	397
<i>P.olivaceus</i>	Sox9	... HSLTTLGGG... GECGCCG... CCRRTI	KTECLSPSHYSECCCHS... CHVTYGSFNLCHYSTSS. Y	399
<i>S.maximus</i>	Sox9	... PSLTTLGGG... GECGCCG... CCRRTI	KTECLSPSHYSECCCHS... CHVTYGSFNLCHYSTSS. Y	400
<i>T.rubripes</i>	Sox9a	CCCHSLTALSGG... GECSCCG... CCRPAQ	KTECLSPSHYSECCCHS... CHVTYGSFNLCHYSTSS. Y	405
<i>T.rubripes</i>	Sox9b	C... HTLTLVGG... SSTEA... CHR... TCI	KTECLSPSHYNDCCSSP... CHVTYGSFNLCHYSTSPSY	403
<i>V.variegatus</i>	Sox9	... HSLTTLGGG... GECGCCG... CCRRTI	KTECLSPSHYSECCCHS... CHVTYGSFNLCHYSTSS. Y	398
<i>X.laevis</i>	Sox9a	... CCHSLTTLNS... ECSC... SCRTH	KTECLSPSHYSDCCCHS... PCLNYSFNLCHYSTSS. Y	400
<i>E.akaara</i>	Sox9	PSITRAC. YDYSDFCCGAN. ... SYSHAGCGSSGLYSTFSYMS. PSCRPMYTPIDITTGVPSPCTHSP. CHWECPIYTCLSR	478	
<i>G.gallus</i>	Sox9	PPITRSE. YDYTEFCNSGS. ... YYSHA. AGCGSGLYSTFTYNN. PTCRPMYTPIDITSGVPTI PCTHSP. CHWECPIYTCLTR	493	
<i>H.sapiens</i>	Sox9	PPITRSC. YDYTEFCNSGS. ... YYSHA. AGCGGLYSTFTYNN. PACRPMYTPIDITSGVPSI PCTHSP. CHWECPIYTCLTR	508	
<i>M.musculus</i>	Sox9	PPITRSC. YDYADFCNSGS. ... YYSHA. AGCGSGLYSTFTYNN. PACRPMYTPIDITSGVPSI PCTHSP. CHWECPIYTCLTR	506	
<i>O.latipes</i>	Sox9a	PSITRAC. YDYSDFCCGAN. ... SYSHAGCGSNMYSTFSYMS. PSCRPMYTPIDITTGVPSPCTHSP. CHWECPIYTCLSR	475	
<i>O.latipes</i>	Sox9b	PSITRAC. YDYSDFCCGAN. ... SYSHAGCGSNMYSTFSYMS. PSCRPMYTPIDITTGVPSPCTHSP. CHWECPIYTCLSR	475	
<i>P.olivaceus</i>	Sox9	PSITRAC. YDYSDFCCGAN. ... SYSHAGCGSGLYSTFSYMS. PSCRPMYTPIDITTGVPSPCTHSP. CHWECPIYTCLSR	477	
<i>S.maximus</i>	Sox9	PSITRAC. YDYSDFCCGAN. ... SYSHAGCGSGLYSTFSYMS. PSCRPMYTPIDITTGVPSPCTHSP. CHWECPIYTCLSR	478	
<i>T.rubripes</i>	Sox9a	PSMTRAC. YDYSDFCCGAN. ... SYSHAGCGSGLYSTFSYMS. PSCRPMYTPIDITTGVPSPCTHSP. CHWECPIYTCLSR	483	
<i>T.rubripes</i>	Sox9b	PSITRAC. YDYSEFCNSGS. ... YYSHAGCGSGLYSTFSYMS. PSCRPMYTPIDITSGVPTI PCS. SP. CHWECPIYTCLTR	488	
<i>V.variegatus</i>	Sox9	PSITRAC. YDYSEFCNSGS. ... SYSHAGCGSGLYSTFSYMS. PSCRPMYTPIDITTGVPSPCTHSP. CHWECPIYTCLSR	476	
<i>X.laevis</i>	Sox9a	PTITRAC. YDYTEFCGSS. ... YYSHA. SGNGLYSTFSYMS. PSCRPMYTPIDITTGVPSPCTHSP. CHWECPIYTCLTR	476	

图 2 鱼类 Sox9 蛋白序列比对分析

Fig.2 Alignment analysis of Sox9 protein sequences of fishes

人(*H. sapiens*, CAA86598.1)、原鸡(*G. gallus*, AAB09663.1)、鼠(*M. musculus*, NP_035578.3)、非洲爪蟾(*X. laevis*, NP_001084276.1)、
 红鳍东方鲀(*T. rubripes*, Sox9a: AAQ18507.1, Sox9b: AAQ18508.1)、大菱鲆(*S. maximus*, ART89197.1)、牙鲆(*P. olivaceus*,
 ACO40490.1)、赤点石斑鱼(*E. akaara*, AAT77677.1)和青鲈(*O. latipes*, Sox9a: NP_001098556.1, Sox9b: AAX62151.1)

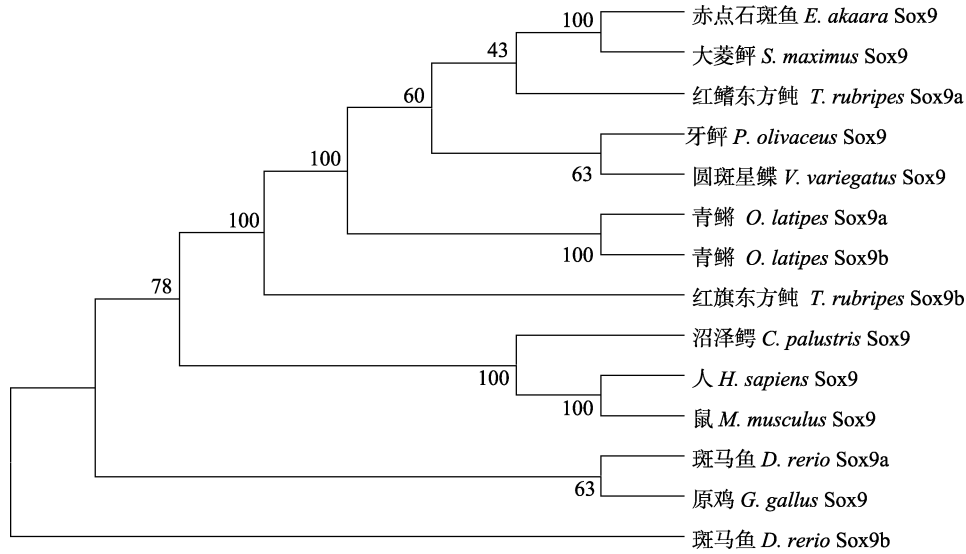


图 3 多个物种 Sox9 蛋白序列的系统进化分析

Fig.3 A neighbor-joining tree based on multiple Sox9 protein sequences

人(*H. sapiens*, CAA86598.1); 原鸡(*G. gallus*, AAB09663.1); 鼠(*M. musculus*, NP_035578.3); 沼泽鳄(*C. palustris*, ACU12296.1); 红鳍东方鲀(*T. rubripes*, Sox9a: AAQ18507.1, Sox9b: AAQ18508.1); 大菱鲆(*S. maximus*, ART89197.1); 牙鲆(*P. olivaceus*, ACO40490.1); 斑马鱼(*B. rerio*, Sox9a: AAG09814.1, Sox9b: AAG09815.1); 赤点石斑鱼(*E. akaara*, AAT77677.1); 青鲷(*O. latipes*, Sox9a: NP_001098556.1, Sox9b: AAX62151.1)

2.2 *sox9* 基因在成体各组织中的表达分析

荧光定量 PCR 测定圆斑星鲷 *sox9* 基因在成体各组织中的表达水平, 结果显示, 圆斑星鲷 *sox9* mRNA 普遍存在于成体各组织中(脑、眼、鳃、心、肝、肠、胆、精巢、卵巢、肾和肌肉)(图 4)。比较雌雄个体相同组织的表达水平, 可以发现 *sox9* 基因在鳃和性腺组织中的表达显示出性别两相性差异($P < 0.05$), 雄鱼的表达水平要显著高于雌鱼; 比较不同组织的表达水平, 可以发现 *sox9* 基因在雌鱼鳃、脑和肠组织中表达水平较高, 在卵巢、肌肉、心和肾脏组织中表达水平较低, 在雄鱼鳃、脑和精巢组织中表达水平较高, 在肌肉、心和肾脏中表达水平较低。

2.3 *sox9* 基因在仔鱼发育时期的表达分析

荧光定量 PCR 测定圆斑星鲷 *sox9* mRNA 在仔鱼各发育时期的表达水平。结果显示, *sox9* 基因在仔鱼 20~50 日龄表达量逐渐下降, 在 60 日龄表达量上升, 在 70 日龄之后表达量下降(图 5)。

3 讨论

本研究克隆了圆斑星鲷 *sox9* 基因, 并通过 RACE 技术得到了 *sox9* 基因的全长。 *sox9* mRNA 全长为 3287 bp, 编码 477 个氨基酸。将其蛋白序列与其他

物种 Sox9 蛋白序列进行比对, 发现其 103~173 aa 为高度保守的 HMG 结构域。利用已知物种的 Sox9 蛋

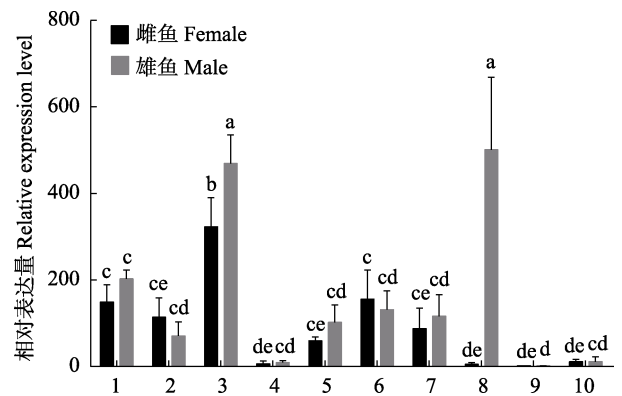


图 4 *sox9* 基因在圆斑星鲷成鱼不同组织中表达的定量分析
Fig.4 Quantitative analysis of the expression of *sox9* gene in different tissues of adult spotted halibut

1: 脑; 2: 眼; 3: 鳃; 4: 心; 5: 肝; 6: 肠; 7: 胆; 8: 性腺; 9: 肾; 10: 肌肉

a, b, c, d 表示组间具有显著性差异($P < 0.05$), ce, cd, de 含相同字母表示组间差异不显著

1: Brain; 2: Eye; 3: Gill; 4: Heart; 5: Liver; 6: Intestine; 7: Gallbladder; 8: Gonad; 9: Kidney; 10: Muscle
a, b, c, and d indicated the expression levels are significantly different among tissues ($P < 0.05$), ce, cd and de which have one identical letter indicated the expression levels are not significantly different among tissues

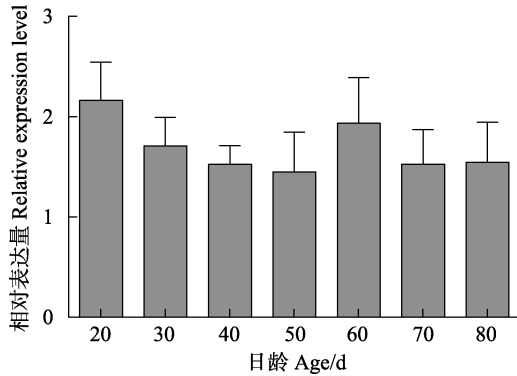


图5 *sox9* 基因在仔鱼发育时期表达的定量分析

Fig.5 Quantitative analysis of the expression of *sox9* gene in the larval developmental stages of spotted halibut

白序列构建分子系统进化树,发现圆斑星鲽 *Sox9* 与牙鲆等硬骨鱼类的 *Sox9* 聚在一起,说明 *sox9* 基因在鱼类中是比较保守的。而且其与牙鲆 *Sox9* 在同一分支,则说明二者亲缘关系最近。同时,通过系统进化树可发现,在人、鼠和原鸡等较高等的脊椎动物中只出现一种 *sox9* 基因,而在斑马鱼、青鳉和红鳍东方鲀等鱼类中出现 2 种类型的 *sox9* 基因,即 *sox9a* 和 *sox9b*。斑马鱼的 *Sox9a* 和原鸡在同一分枝上,而斑马鱼 *Sox9b* 却在另一分支,这说明斑马鱼 *Sox9a* 与鸟类等较高等脊椎动物 *Sox9* 亲缘关系较近,功能也会更相似,这一点与 Rodríguez-Marí 等(2005)的研究发现相吻合。Rodríguez-Marí 等(2005)研究发现,斑马鱼 *sox9a* 基因在精巢组织的 Sertoli 细胞中表达,而 *sox9b* 基因则在卵巢的卵母细胞中表达。我们在研究中发现,圆斑星鲽也存在 2 种类型的 *sox9* 基因,但只成功克隆出 1 种类型的 *sox9* 基因,因 *sox9* 亚型的划分没有公认的标准,暂时将其命名为 *sox9* 基因。

通过荧光定量 PCR 分析圆斑星鲽 *sox9* 基因在成体各组织中的表达,发现其在圆斑星鲽成体的各组织中都有不同程度的表达,这与牙鲆和许氏平鲈 (*Sebastes schlegelii*) *sox9* 基因的研究结果一致(文爱韵等, 2011; 马丽曼, 2014)。*sox9* 在精巢中的表达量要显著高于卵巢,显示出性别两相性差异,与裸盖鱼 (*Anoplopoma fimbria*)、点带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*)、尼罗罗非鱼和斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*) *sox9* 基因的表达情况一致(Smith *et al*, 2013; Luo *et al*, 2010; Kobayashi *et al*, 2008; Xia *et al*, 2007),说明 *sox9* 基因与雄性性别相关,推测 *sox9* 基因可能参与了圆斑星鲽精巢发育过程。*sox9* 基因除在精巢中表达最高,在鳃和脑组织中也有较高表达,说明 *sox9* 在其他组织的发育过程中也发挥了作用。如 Dong 等(2011)发现,半滑舌鳎(*Cynoglossus semaluevas*)

sox9a 基因在雄性的脑、垂体和性腺中的表达都显著高于雌性,且 9 月龄的半滑舌鳎精巢中的表达量达到峰值,在原肠胚期的表达量高于其他时期,说明 *sox9a* 基因对半滑舌鳎的脑-垂体-性腺轴及精原细胞的形成起重要作用。青鳉 *sox9b* 基因的突变会导致雌性个体出现雄性表型,可能与生殖细胞数目的减少相关,表明在硬骨鱼类中可能具有新的功能,在生殖细胞系维持和存活方面发挥了重要作用(李永婧等, 2017)。此外,在斑马鱼、黄鳝 (*Monopterus albus*) 和黄颡鱼 (*Pelteobagrus fulvidraco*) 等鱼类中发现了 2 个 *sox9* 基因(Rodríguez-Marí *et al*, 2005; Zhou *et al*, 2003; 俞菊华等, 2005)。Rodríguez-Marí 等(2015)在斑马鱼中筛选到 *sox9a* 和 *sox9b* 两个 *sox9* 基因。*sox9a* 在精巢和脑等多个组织中表达,在卵巢中不表达;*sox9b* 仅在卵巢中表达,在其他组织中不表达。而 Zhou 等(2003)在黄鳝中发现 *sox9a₁* 和 *sox9a* 两个基因,其在精巢、卵巢和间性性腺(精卵巢)中都表达。这说明 *sox9* 基因的 2 个分型的功能是不同的。Volf 等(2005)指出,在硬骨鱼类中存在 2 种类型的 *sox9* 基因,也许是由鱼类特有的基因组复制导致的。

荧光定量 PCR 测定了圆斑星鲽 *sox9* 基因在仔鱼各发育时期的表达水平,结果显示, *sox9* 基因在仔鱼 20~50 日龄表达量逐渐下降,而在 60 日龄时表达量上升,这与许氏平鲈 *sox9* 基因在其仔鱼不同发育阶段的表达模式相同,即在孵化后 5 d 和 10 d 表达量有降低的趋势,15 d 和 25 d 的表达量逐渐上升,许氏平鲈在孵化后约 25~35 d 性腺开始分化,因此,许氏平鲈 *sox9* 基因在 25 日龄表达量达到较高的水平可能与性腺的分化有关(马丽曼等, 2014)。圆斑星鲽性腺分化的研究未见报道,而条斑星鲽 (*Verasper moseri*) 在 60~70 日龄性腺开始分化(李忠红, 2009),这与圆斑星鲽 *sox9* 基因表达量上升的时间接近,因此,推测表达量上升可能与幼鱼性腺分化有关。

参 考 文 献

- Adolfi MC, Carreira AC, Jesus LW, *et al*. Molecular cloning and expression analysis of *dmrt1* and *sox9* during gonad development and male reproductive cycle in the lambari fish, *Astyanax altiparanae*. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2015, 13: 2
- Berbejillo J, Martinez-Bengochea A, Bedó G, *et al*. Expression of *dmrt1* and *sox9* during gonadal development in the Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 2013, 39(1): 91-94
- Dong T, Liu FJ, Hu HX, *et al*. Research progress on sex differentiation related genes on sturgeon. *Biotechnology*

- Bulletin, 2015, 31(10): 62–70 [东天, 刘凤娇, 胡红霞, 等. 鲟鱼性别分化相关基因研究进展. 生物技术通报, 2015, 31(10): 62–70]
- Dong XL, Chen SL, Ji XS, *et al.* Molecular cloning, characterization and expression analysis of *Sox9a* and *Foxl2* genes in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Acta Oceanologica Sinica*, 2011, 30(1): 68–77
- Fernandino JL, Guilgur LG, Strobl-Mazzulla PH, *et al.* Molecular cloning of SOX9, DMRT1 and SF1 cDNA partial sequences in the pejerrey fish *Odontesthes bonariensis* (Atheriniformes). *Fish Physiology and Biochemistry*, 2003, 28(1–4): 145–146
- Foster JW, Dominguez-Steglich MA, Guioli S, *et al.* Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. *Nature*, 1994, 372(6506): 525–530
- Ge J, Chen S, Liu C, *et al.* Characterization of the global transcriptome and microsatellite marker information for spotted halibut *Verasper variegatus*. *Genes and Genomics*, 2017, 39(3): 307–316
- Hou L, Cui YX, Yao B. Progress in sexual determination related SOX9. *Chinese Journal of Birth Health and Heredity*, 2007, 15(8): 1–2, 9 [侯林, 崔英霞, 姚兵. 性别决定相关基因 SOX9 研究进展. 中国优生与遗传杂志, 2007, 15(8): 1–2, 9]
- Kobayashi T, Kajirua- Kobayashi H, Guan G, *et al.* Sexual dimorphic expression of *DMRT1* and *Sox9a* during gonadal differentiation and hormone-induced sex reversal in the teleost fish Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Developmental Dynamics*, 2008, 237(1): 297–306
- Li YJ, Wu LM, Li XJ. A review on the genes related with sex determination and differentiation in teleosts. *Journal of Henan Normal University (Natural Science Edition)*, 2017, 45(4): 72–78 [李永婧, 吴利敏, 李学军. 硬骨鱼类性别决定与分化相关基因研究进展. 河南师范大学学报(自然科学版), 2017, 45(4): 72–78]
- Li ZH. Gynogenesis induced and histological observation on gonadal sex differentiation in barfin flounder (*Verasper moseri*). Master's Thesis of Northeast Agricultural University, 2009, 28–34 [李忠红. 条斑星鲈 *Verasper moseri* 雌核发育诱导及性别分化过程的初步研究. 东北农业大学硕士研究生学位论文, 2009, 28–34]
- Luo YS, Hu W, Liu XC, *et al.* Molecular cloning and mRNA expression pattern of *Sox9* during sex reversal in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *Aquaculture*, 2010, 306(1–4): 322–328
- Ma LM. Study on sex related genes *Sox3*, *Sox9* and *Dmrt1* in black rockfish, *Sebastes Schlegeli*. Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2014, 79–91 [马丽曼. 许氏平鲈性别相关基因 *Sox3*、*Sox9* 和 *Dmrt1* 的研究. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2014, 79–91]
- Nakamura S, Watakabe I, Nishimura T, *et al.* Analysis of medaka *sox9* orthologue reveals a conserved role in germ cell maintenance. *PLoS One*, 2012, 7(1): e29982
- Rodríguez-Mari A, Yan YL, BreMiller RA, *et al.* Characterization and expression pattern of zebrafish *anti-Müllerian hormone (amh)* relative to *sox9a*, *sox9b*, and *cyp19ala*, during gonad development. *Gene Expression Patterns*, 2005, 5: 655–667
- Smith EK, Guzmán JM, Luckenbach JA. Molecular cloning, characterization, and sexually dimorphic expression of five major sex differentiation-related genes in a Scorpaeniform fish, sablefish (*Anoplopoma fimbria*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2013, 165(2): 125–137
- Volff JN. Genome evolution and biodiversity in teleost fish. *Heredity*, 2005, 94(3): 280–294
- Wen AY, You F, Sun P, *et al.* Study on cloning and expression of gene *sox9* in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Advances in Marine Science*, 2011, 29(1): 97–104 [文爱韵, 尤锋, 孙鹏, 等. 牙鲆 *sox9* 基因的克隆与表达研究. 海洋科学进展, 2011, 29(1): 97–104]
- Xia W, Zhou L, Yao B, *et al.* Differential and spermatogenic cell-specific expression of *DMRT1* during sex reversal in protogynous hermaphroditic groupers. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2007, 263(1–2): 156–172
- Ye JS, Wang XQ, Ma S, *et al.* Studies on biological and advances of *Verasper variegates*. *Fisheries Economy Research*, 2006(6): 5–7 [叶建生, 王兴强, 马甦, 等. 圆斑星鲈的生物学特性及其研究进展. 渔业经济研究, 2006(6): 5–7]
- Yu JH, Li JL, Cao LP, *et al.* Isolation and analysis of *Sox9* derived from yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2005, 13(5): 620–623 [俞菊华, 李建林, 曹丽萍, 等. 黄颡鱼 *Sox9* 基因的分离及分析. 农业生物技术学报, 2005, 13(5): 620–623]
- Zhou R, Liu L, Guo Y, *et al.* Similar gene structure of two *Sox9a* genes and their expression patterns during gonadal differentiation in a teleost fish, rice field eel (*Monopterus albus*). *Molecular Reproduction and Development*, 2003, 66(3): 211–217

(编辑 马瑾艳)

Cloning and Expression of the *sox9* Gene in Spotted Halibut (*Verasper variegatus*)

ZHANG Lele^{1,2}, BIAN Li², CHANG Qing², HOU Jilun³, CHEN Siqing^{2①},
ZHAO Qing^{1,2}, LIU Kun^{1,2}, GE Jianlong², LIU Changlin²

(1. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306;
2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 3. Beidaihe Central
Experiment Station, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qinhuangdao 066100)

Abstract Significant differences exist in the growth rate and body size of male and female spotted halibut (*Verasper variegatus*), with the females being significantly larger than the males. All-female cultivation can improve breeding efficiency. Studies investigating the mechanism of sex determination and features of sex differentiation may provide valuable information for all-female cultivation. In this study, we successfully identified the *sox9* gene of spotted halibut. The total length is 3287 bp, including a 1431 bp ORF, encoding 477 amino acids; the 5' UTR is 368 bp and the 3' UTR is 1488 bp. Polyadenylic acid tails and AATAAA caudal signals were identified in the 3' UTR. The expression of the *sox9* gene differed in the brain, eye, gills, heart, liver, gallbladder, intestine, testis, ovary, kidney, and muscle in spotted halibut. Transcript levels were high in the gill, brain, and testis, and were significantly higher in the testis than in the other tissues. A two-phase gender difference was observed in the gonads; *sox9* expression was significantly higher in the testis than in the ovary, indicating that *sox9* might be associated with male gonad development. The dynamic expression patterns of the *sox9* gene in spotted halibut larvae gradually declined from 20 to 50 d after hatching, with a sudden rise observed after 60 d. This increased expression might be associated with differentiation of larval gonad.

Key words *Verasper variegatus*; *sox9*; Sex genes; mRNA expression

① Corresponding author: CHEN Siqing, E-mail: chensq@ysfri.ac.cn