

金钱鱼 *Sox9* cDNA 克隆及其表达分析

陈建华^{①②③} 何毛贤^② 牟幸江^① 阎斌伦^③
张俊彬^{①*} 金司晨^③

① 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; ② 中国科学院南海海洋研究所 海洋生物资源可持续利用重点实验室 广州 510301; ③ 淮海工学院 江苏省海洋生物技术重点实验室 连云港 222005

摘要: 为了解 *Sox9* 基因在金钱鱼 (*Scatophagus argus*) 性腺分化中的作用, 本研究利用 cDNA 末端快速扩增法 (RACE) 克隆了金钱鱼 *Sox9* 基因 cDNA 全长序列, 同时研究了投喂芳香化酶抑制剂来曲唑 (LE) (50 mg/kg) 后该基因的表达及其性腺的组织学变化。金钱鱼 *Sox9* cDNA 全长 2 759 bp, 包括 5' 非翻译区 (5'-UTR) 31 bp、3' 非翻译区 (3'-UTR) 1 288 bp 和开放阅读框 (ORF) 1 440 bp, 编码 479 个氨基酸。该氨基酸序列 104 ~ 172 位为 HMG 保守盒, 在该盒内存在一个特征性基序, 两个核定位信号 NLS 及一个富含亮氨酸的核输出信号 NES。该序列与赤点石斑鱼 (*Epinephelus akaara*) 的相似性最高, 为 96.0%, 与非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*)、人 (*Homo sapiens*)、原鸡 (*Gallus gallus*)、小家鼠 (*Mus musculus*) 等物种的相似性为 61.5% ~ 76.1%。Real-time PCR 显示, 金钱鱼 *Sox9* 基因在脑、鳍、精巢中表达量较高。组织学研究表明, 芳香化酶抑制剂来曲唑能有效诱导金钱鱼发生不同程度的性逆转, 性腺中卵母细胞退化, 精原细胞增殖。Real-time PCR 结果显示, 金钱鱼 *Sox9* 基因在来曲唑处理 20 d 后开始不断上升, 于处理后第 40 天时达到最高值, 在第 60 天时表达量迅速下降。上述结果表明, 金钱鱼 *Sox9* 基因高度保守, 可能在金钱鱼性腺雄性化过程中起重要作用。

关键词: 金钱鱼; *Sox9*; cDNA 克隆; 芳香化酶抑制; 基因表达

中图分类号: S917.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2015) 01-93-10

cDNA Cloning and mRNA Expression Analysis of *Sox9* in *Scatophagus argus*

CHEN Jian-Hua^{①②③} HE Mao-Xian^② MU Xing-Jiang^① YAN Bin-Lun^③
ZHANG Jun-Bin^{①*} JIN Si-Chen^③

① *College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306;* ② *Key Laboratory of Marine Bio-resources Sustainable Utilization, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301;* ③ *Jiangsu Key Laboratory of Marine Biotechnology, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China*

基金项目 国家科技部“十二五”科技支撑计划 (No. 2011BAD13B01), 中国科学院海洋生物资源可持续利用重点实验室开放基金项目 (No.LMB121007);

*通讯作者, E-mail: Jbzhang30@163.com;

第一作者介绍 陈建华, 男, 博士研究生; 研究方向: 海洋生物学; E-mail: chenjianhuazsu@163.com.

收稿日期: 2014-03-22, 修回日期: 2014-08-26 DOI: 10.13859/j.cjz.201501012

Abstract: In order to elucidate the role of *Sox9* in gonadal differentiation of *Scatophagus argus*, the full length cDNA of *Sox9* was cloned from testis of *S. argus* using RT-PCR and rapid amplification of cDNA ends (RACE). To investigate effect of aromatase inhibitor letrozole (LE) on *Sox9* gene expression and gonadal development, juveniles were fed with diets containing LE 50 mg/kg, and gonadal development was observed histologically and the expression of *Sox9* was measured with quantitative real-time PCR. RACE results (Fig. 1) showed that full length cDNA of 2 759 bp contained a 31 bp 5'-untranslated region (5'-UTR), a 1 288 bp 3'-untranslated region (3'-UTR) and a 1 440 bp open reading frame (ORF) encoding 479 amino acids. A HMG (high mobility group) box containing a specific motif, two nuclear localization signal (NLS) sequences and a nuclear export signal (NES) was found in the deduced amino acid sequence of SOX9 (Fig. 1). The amino acid sequence had a high similarity to SOX9 of other species, and the percent identity compared with *Epinephelus akaara*, *Xenopus laevis*, *Homo sapiens*, *Gallus gallus*, and *Mus musculus* was 61.5% - 96.0%. The expression levels of *Sox9* mRNA in different tissues were analyzed by quantitative real-time PCR. The highest expression level was detected in the brain, intestine and fin (Fig. 3). Histological results showed that sex reversal could be induced by LE, and the degenerating oocytes and proliferation of spermatogonia were observed in gonad from LE-treated *S. argus* (Fig.4). The expression level of *Sox9* mRNA was up-regulated significantly at 20 d, reached its peak at 40 d of treatment with LE but was down-regulated markedly at 60 d (Fig. 5). These results suggest that *Sox9* is highly conserved. Masculinization can be induced by LE treatment and *Sox9* may be one of the important factors initiating the masculinization of *S. argus* during sex reversal.

Key words: *Scatophagus argus*; *Sox9*; Clone; Aromatase inhibitor; Gene expression

Sox (Sry-related high mobility group box) 是一个基因家族的统称, 是指含有一个高度保守的 SRY 样 HMG (high mobility group) 盒且其氨基酸序列同 *Sry* 基因 HMG 盒的同源性高于 50% (Foster et al. 1994)。HMG 结构域能够识别特异的 DNA 位点, 并在其他转录因子的相互作用下与目标 DNA 结合。迄今为止, 已超过 30 个 SOX 家族成员被鉴定并根据其结构及功能的不同分为不同的亚族 (Luo et al. 2010)。

Sox9 属于 SOXE 亚族中的一个基因, *Sox9* 基因不但含有 SOX 家族共有的 HMG 结构域, 在其蛋白 C 端约 1/3 处还存在一段富含脯氨酸、谷氨酰胺和丙氨酸的区域, 这一非酸性区域在进化上也非常保守 (Barrionuevo et al. 2010)。*Sox9* 基因在脊椎动物的性别决定与分化 (Wada et al. 2009, Lecointre et al. 2010)、软骨发生、神经系统发育及胰腺的发育等过程中发挥重要

作用 (Seymour et al. 2008)。据文献报道, 在哺乳动物睾丸支持细胞的分化途径中, *Sox9* 基因是 *Sry* 最佳的下游调控基因, 是除 *Sry* 之外一个非常重要的雄性性别决定基因, 在雄性性别决定过程中具有非常重要作用 (Kent et al. 1996)。近年来, 多种鱼类的 *Sox9* 基因已相继被克隆, 如斑马鱼 (*Danio rerio*) (Chiang et al. 2001)、鳊鱼 (*Monopterus albus*) (Zhou et al. 2003)、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) (Takamatsu et al. 1997)、青鳉 (*Oryzias latipes*) (Yokoi et al. 2002)、点带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*) (Luo et al. 2010) 等, 这些研究促进了人们对鱼类 *Sox9* 基因的认识。

金钱鱼 (*Scatophagus argus*) 隶属鲈形目 (Perciformes) 金钱鱼科 (Scatophagidae) 金钱鱼属, 其适应性极强。金钱鱼生长速度较快是水产增养殖的优良品种, 也是一种名贵的水族观赏鱼类之一。在养殖过程中, 发现雌性个

体比雄性个体大(蔡泽平等 2010)。金钱鱼雌雄个体性腺发育不同步, 雄性个体先成熟, 雌性个体成熟较晚(兰国宝等 2005), 给人工繁育带来极大的困难。迄今, 已有多位学者对金钱鱼的染色体核型进行过报道, Khuda-Bukhsh 等(1974)首先报道了金钱鱼染色体为 $2n = 48$, 其中雌鱼为 48 条近端着丝粒染色体, 雄鱼含 47 条近端着丝粒染色体和 1 条中部着丝粒异型染色体并确定为 Y 染色体。Khuda-Bukhsh 等(1999)用银染法再次证实了金钱鱼存在性染色体且其决定类型为 XY 型。但目前国内外对金钱鱼的研究还不够深入, 主要集中在寄生虫种类调查(李海燕 2007)、温度对卵巢发育的影响(张敏智等 2013)、雌雄个体的形态差异分析(吴波等 2014)及性腺组织结构观察(崔丹等 2013)等方面的研究。但有关金钱鱼性腺分化与发育的分子机制还未阐明, 开展其分子机理的研究具有重要意义。

本研究采用 RACE 技术克隆得到金钱鱼 *Sox9* 基因 cDNA 序列, 应用荧光定量 RT-PCR 技术分析了该基因在不同组织中的表达, 以及投喂芳香化酶抑制剂来曲唑(letrozole, LE)后 *Sox9* 基因的表达情况, 并结合组织学方法分析来曲唑对金钱鱼性腺发育的影响。研究旨在为开展金钱鱼 *Sox9* 基因的生物学功能研究提供依据。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

实验用金钱鱼幼鱼(30 日龄, 30 dph: days after hatching)及成鱼取自广东阳江养殖基地。于实验室暂养一周无异常后使用。

1.2 总 RNA 的提取与 cDNA 第一链的合成

使用 Trizol Reagent (Invitrogen) 按试剂说明书提取性腺总 RNA。用琼脂糖电泳检测 RNA 的完整性, 核酸蛋白定量仪(GE, USA)测定 RNA 浓度, 然后 -80°C 保存备用。以总 RNA 为模板, 以 OligodT₁₈ 为引物, 按照逆转录 M-MLV (TaKaRa) 说明书合成 cDNA 第一链。

1.3 *Sox9* 基因片段的获得

根据 GenBank 中点带石斑鱼 (GenBank: GU143809)、奥利亚罗非鱼 (*Oreochromis aureus*, GenBank: EU373500s)、斑马鱼 (GenBank: AF277096)、虹鳟 (GenBank: AF209872) *Sox9* 基因保守区域设计 1 对引物 *Sox9*-F 和 *Sox9*-R (表 1), 以上述第一链 cDNA 为模板, PCR 扩增 *Sox9* 基因中间片段。PCR 反应体系为 25 μl , 含 2.5 μl 10 \times PCR Buffer、2.5 μl MgCl_2 (25 mmol/L)、1 μl dNTP (2.5 mmol/L)、上游和下游引物各 0.5 μl (10 $\mu\text{mol/L}$)、0.3 μl *Taq* 酶 (5 U/ μl) 和 1 μl 模板, 以 ddH₂O 补充至 25 μl 。扩增条件为: 94°C 预变性 3 min; 94°C 45 s, 58°C 45 s, 72°C 1 min, 35 个循环; 72°C 延伸 10 min, 4°C 保存。PCR 产物切胶纯化回收后, 连接到 pMD18-T (TaKaRa) 载体, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 经鉴定后将阳性克隆送上海美吉生物公司测序。

1.4 3'RACE 和 5'RACE

根据已得到中间片段序列设计 3' RACE 引物 S-3-F1、S-3-F2 (表 1)。3' RACE 的操作参照 3'-Full RACE Core Set 试剂盒 (TaKaRa) 推荐方法进行。首先以试剂盒提供的 3' RACE Adaptor 为引物进行反转录, 然后以试剂盒提供的 3' RACE Outer Primer 和按要求设计的 S-3-F1 进行第 1 轮 PCR 扩增。反应条件为: 94°C 预变性 3 min; 94°C 45 s, 50°C 45 s, 72°C 2 min, 30 个循环; 72°C 延伸 10 min。用第 1 轮 PCR 产物为模板, 3' RACE Inner Primer 和 S-3-F2 为引物进行第 2 轮 PCR 扩增。反应条件为: 94°C 预变性 3 min; 94°C 45 s, 60°C 45 s, 72°C 2 min, 35 个循环; 72°C 延伸 10 min。将获得的扩增产物连接到 pMD18-T 载体, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 经鉴定后将阳性克隆送上海美吉生物公司测序。

5' RACE 参照程汉良等(2011)方法。5' RACE 所用引物见表 1。首先以 S-5-R 为引物进

表 1 本研究所用引物序列

Table 1 Sequences of primers

引物 Primer	序列 Sequence (5' - 3')	扩增片段大小 Fragment size (bp)	用途 Usage
Sox9-F	AAGAGAAGTTCCTCCGTGTG	1 017	扩增中间片段
Sox9-R	GAGGGGTAAGCAGAGGTGCT		扩增中间片段
S-3-F1	GGGAGCTTTGATGTCGATGAGTTT	1 876	3'RACE 第 1 轮
S-3-F2	CGTTGGGGCTCACGCTTGGATGT	1 745	3' RACE 第 2 轮
S-5-R	CTTGACAGATTTTCTCCGCTTGG		5' RACE 反转录形成第 1 链
S-5-R1	CGTTGTGCAGATGCGGGTATTGAT	584	5' RACE 下游引物 1
S-5-R2	AGCATCTCTGATACACACGGGGAAGCTT	415	5' RACE 下游引物 2
Oligo (dT) ₁₆ AP	CTGATCTAGAGGTACCGGATCC(T) ₁₆ AP		5' RACE 上游引物 1
AP	CTGATCTAGAGGTACCGGATCC		5' RACE 上游引物 2
18S-F	GGACACGGAAAGGATTGACAGA	112	扩增内参基因 18S rRNA
18S-R	CGTTCGTTATCGGAATTAACCAGAC		
Q-Sox-F	GCAGGGTCAACAGAGAACCA	146	用于组织表达研究
Q-Sox-R	TTGTGATGGAGGGTAAGCA		

行反转录得到 cDNA 第 1 链, 用 RNaseH (Fermmentas, Canada) 消化 cDNA, 然后用末端脱氧核苷转移酶 (Fermmentas, Canada) 进行 5'端加 poly A 尾得到 5' RACE 模板。以 Oligo (dT)₁₆ AP 和 S-5-R1 为引物进行第 1 轮 PCR, 然后以第 1 轮 PCR 产物为模板, S-5-R2 和 AP 为引物进行第 2 轮 PCR, 反应条件同 3' RACE。PCR 产物切胶纯化回收、连接、测序。

1.5 序列分析

用 DNASTar 软件包中的 SeqMan 将中间片段、3' RACE 和 5' RACE 测序所得序列进行拼接得到 Sox9 的全长 cDNA 序列。运用 BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) 进行同源性分析。运用 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/orf.cgi>) 寻找开放阅读框 (open reading frame, ORF)。用 ProtParam (<http://www.cn.expasy.org/tolls/ProtParam>) 对所推测的蛋白质基本物理化学参数进行分析, 利用 ScanProsite (<http://prosite.expasy.org/scanprosite/>) 和 SWISS-MODEL (<http://www.swissmodel.expasy.org/SWISS-MODEL.html>) 对蛋白质的功能区及结构进行分析。将金钱鱼 SOX9 的氨基酸与其他物种 SOX9 氨基酸进行

ClustalW 比对, 利用 MEGA4.0 软件中的邻接 (neighbor-joining, NJ) 法构建 SOX9 分子系统发育树, 并进行 1 000 次的 bootstraps 值验证。

1.6 金钱鱼幼鱼的来曲唑处理

实验所用芳香化酶抑制剂来曲唑 (LE) 为瑞士 Novartis 产品。将来曲唑溶解于无水酒精中, 然后加入到一定量的饲料中, 混匀后放入通风橱内让酒精挥发备用。对照组鱼所投喂饲料用同样比例的酒精进行处理。实验分为 2 组, 每组设置 3 个重复, 每个重复 30 尾幼鱼。实验组 (LE 组) 每天投喂 2 次含 50 mg/kg 来曲唑的饲料, 对照组投喂不含来曲唑的饲料。于开始投喂饲料后第 20、40、60 天分别从实验组和对照组各取 15 尾鱼测量体重、体长, 取出部分性腺组织置于液氮中用于提取 RNA, 同时取部分性腺组织用 Bouin's 液固定, 用于组织切片鉴定鱼的雌雄。

1.7 Sox9 基因表达分析

利用 Real-time PCR 法检测 Sox9 基因在金钱鱼心、脑、鳃、肠、鳍、肝、肾、脾、肌肉、精巢、卵巢组织的表达情况, 同时检测 Sox9 基因在投喂含芳香化酶抑制剂来曲唑饲料后金钱鱼性腺的表达情况。各组织总 RNA 提取后,

用 DNase I 处理以去除基因组 DNA 污染, 以 OligodT₁₈ 反转录合成 cDNA 第 1 链, 以 Q-*Sox*-F 和 Q-*Sox*-R 为引物进行 PCR 扩增。同时, 以 18S rRNA 为内参基因, 用 18S-F 和 18S-R 为引物进行 PCR。反应程序为: 95°C 30 s; 95°C 5 s, 60°C 1 min, 40 个循环; 95°C 15 s, 60°C 1 min, 95°C 15 s。采用 2^{-ΔΔCt} 法计算 *Sox9* 基因的表达量, 用 SPSS19.0 软件包中单因素方差分析 (One-Way ANOVA) 及 Duncan's 检验法对数据进行统计学分析。结果以平均值±标准差 (Mean ± SD) 表示。

2 结果

2.1 *Sox9* 基因全长 cDNA 克隆与序列分析

利用 DNASTar 软件去除载体序列并将其进行拼接, 得到了金钱鱼 *Sox9* 完整的 cDNA 序列, GenBank 登录号为 JQ740598。该基因全长 2 759 bp, 包括 5' 非翻译区 (5'-UTR) 31 bp, 3' 非翻译区 (3'-UTR) 1 288 bp, 开放阅读框 (ORF) 1 440 bp, 编码 479 个氨基酸。3' 端含有多聚腺苷酸加尾信号 (AATAAA) 和 PolyA 尾 (图 1)。该氨基酸序列的 104~172 位为 HMG 保守盒, 在该盒内存在一个特征性基序 AQAARRKL, 两个核定位信号 NLS (NLS1: KRPMNAFMVWAQAARRK; NLS2: RRRK), 同时还含有一个富含亮氨酸的核输出信号 NES (LSKTLGKLWRL)。用 ProtParam 软件预测金钱鱼 SOX9 蛋白分子量为 52.884 ku, 理论等电点为 6.26。

2.2 *Sox9* 基因同源性分析

利用 DNASTar 软件对金钱鱼 SOX9 氨基酸序列与已经报道的序列进行同源性分析, 金钱鱼 SOX9 与赤点石斑鱼 (*Epinephelus akaara*, GenBank: AAT77677)、红鳍东方鲀 (*Takifugu rubripes*, GenBank: AAL32172)、牙汉鱼 (*Odontesthes bonariensis*, GenBank: AAP84605)、虹鳟 (GenBank: AF209872)、斑马鱼 (GenBank: AF277096)、非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*, GenBank: AAI70060)、人 (*Homo*

sapiens, GenBank: CAA86598)、原鸡 (*Gallus gallus*, GenBank: BAA25296)、小家鼠 (*Mus musculus*, GenBank: AAL16093) 等物种的同源性分别为 96.0%、95.6%、94.4%、83.3%、77.7%、76.1%、75.8%、74.5%、61.5%。

利用 MEGA 4.0 软件对金钱鱼 SOX9 氨基酸序列与其他物种的 SOX9 氨基酸序列进行邻接 (neighbor-joining) 聚类分析 (图 2)。在分子系统树中, 所有鱼类聚为一支, 与其他较高等脊椎动物分开, 该基因的系统进化关系与传统的物种进化地位基本一致。

2.3 *Sox9* 基因组织表达分析

通过 Real-time PCR 方法检测金钱鱼 *Sox9* 基因在不同组织中的表达水平, *Sox9* 基因在脑、鳍、精巢组织中表达量较高, 其次为肠、鳃、卵巢, 在肝、脾、肾、心、肌肉组织中的表达量最少 (图 3)。由此可见, *Sox9* 基因在金钱鱼各组织中的表达既具有组织普遍性, 同时也表现出明显的组织特异性。

2.4 来曲唑 (LE) 处理对金钱鱼性腺发育及其 *Sox9* 基因表达的影响

投喂含 LE 饲料后, 金钱鱼在第 20、40、60 天的体重分别为 (7.02 ± 0.92) g、(9.12 ± 1.34) g 和 (11.56 ± 1.78) g, 体长分别为 (4.89 ± 0.32) cm、(5.51 ± 0.29) cm 和 (6.1 ± 0.38) cm ($n = 15$)。LE 处理 40 d 后, 对照组雌鱼 (图 4a) 性腺表现为卵母细胞呈圆形或卵圆形, 对照组雄鱼 (图 4b) 性腺充满精原细胞。LE 处理组金钱鱼性腺出现不同程度的性逆转, 即间性体的存在 (图 4c, d), 表现为卵母细胞退化, 精原细胞出现, 即发生由雌性向雄性的性逆转现象。Real-time PCR 检测金钱鱼幼鱼在 LE 处理不同时间后 *Sox9* 基因在性腺的表达情况见图 5。LE 处理后, 金钱鱼 *Sox9* 基因表达量均高于对照组, *Sox9* 基因表达量在处理第 20 天开始不断上升 ($P < 0.05$), 于第 40 天时达到最高值 ($P < 0.01$), 在处理第 60 天表达量迅速下降, 此时 *Sox9* 表达量略高于对

```

1
32 ATGAATCTCCTCGACCCCTTACATAAAGATGACAGAAGAACAGGAGAAGTGTCACTCTGACGCTCCCAGCCCCAGCATGTCTGAGGACTCC
1 MNL LDPYIKMTEE EQEKCHSDAPSPSMS EDS
122 GCAGGCTCGCCGTGCCGTCCGGTCCGGTTCGGACTGAGAACACCCGGCCGTCGACAAACCACCTCCACCTGGGTGCAGACTACAAG
31 AGSPCPSPSGSGSDTENTRPSDNHLHLGLADYK
212 AAAGAGAACGAAGAGGAAAAGTCCCCGTGTGTATCAGAGATGCTGTGTCTCAGGTGCTGAAGGGCTACGACTGGACGCTGGTGCCGATG
61 KENEE EKFPVCI RDAVSQV LKGYDWT LVP M
302 CCGTGCCGGTCAACGGCTCAAGTAAAAATAAACCTCAGCTCAAAAGACCCATGAACGCATTCATGGTGTGGGCTCAAGCTGCGCGGAGG
91 PVRVNGSSSKNKPHV KRPMNAFMVWAQAARR
392 AAGCTGGCCGATCAATACCCGCATCTGCACAACCGGAAGCTCAGCAAAACCTGGGCAAACCTTTGGAGATTACTCAACGAAGTAGAGAAG
121 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 E K
482 CGCCCGTTTGTGGAAGAAGCTGAGCGTTTGGGGTGCAGCATAAGAAGGACCACCCGACTACAAATATCAGCCAAGGCGGAGAAAATCT
151 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 K S
572 GTCAGAACCAGGCAAAACGATCCCGAGGACGGCAGCAAAACCACATCTCTCCAAATGCGATCTTCAAGGCGCTGCAGCAGGCGATTCT
181 V K N G Q N D P E D G E Q T H I S P N A I F K A L Q Q A D S
662 CCAGCGTCGAGTTTGGGCGAGGTGCATTTCCAGGAGAGCATTCAGGTGAGTCCAGGGCCACCAACACCCCAACCACCCCAAGACA
211 P A S S L G E V H S P G E H S G Q S Q G P P T P P T T P K T
752 GACCTGCCCTCCAGCAAACTGACCTGAAGCGCGAGGGCCGCCCATGCAGGAGGGCACCAGTCGCCAGCTCAACATCGACTTTGGAGCT
241 D L P S S K T D L K R E G R P M Q E G T S R Q L N I D F G A
842 GTGGACATTGGCGAGCTGAGCAGCGAAGTCATCTCCAACATGGGGAGCTTTGATGTCGATGAGTTTGATCAGTACCTGCCACCTCACAGC
271 V D I G E L S S E V I S N M G S F D V D E F D Q Y L P P H S
932 CACGCCGGGTGACCGGAGCAGCCAGGCTGGCTACACGGCAGTTACGGCATCAACAGCTCCTCAGTCAGCAAGCAGCAACGTTGGG
301 H A G V T G A A Q A G Y T G S Y G I N S S S V S Q A A N V G
1022 GCTCACGCTTGGATGTCCAAGCAGCAGCAGCAACATTTCTAACCACCCCTGGGTGGAGGAGGTGAGCAAGGCCAGCAGGGTCAACAG
331 A H A W M S K Q Q Q Q H S L T T L G G G E Q Q G Q Q G Q Q
1112 AGAACCCAGATCAAGACAGAGCAGCTGAGCCCGAGCCACTACAGTGAGCAGCAGGGCTCCCCACAGCAGCTCACCTCCAGGCTCCTC
361 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
1202 AACCTGCAGCACTACAGCACCTCTGCTTACCCTCCATCAAGAGCGCAGTATGACTATTCAGACCACCAAGGTGGTGCCTCCTAC
391 N L Q H Y S T S A Y P S I T R A Q Y D Y S D H Q G G A N S Y
1292 TATAGCCATGCGAGCTGGCCAAGGCTCTGGCTGTACTCCACTTCAGTACATGAGCCCCAGCCAGGCGGATGACACCCCAATTGCT
421 Y S H A A G Q G S G G L Y S T F S Y M S P S Q R P M Y T P I A
1382 GACAACACCGGGTGCCTCAGTGCCCGACCCAGTCCAGCAGTGGGAGCAGCAGCCATTTACACACAGCTGTCCAGGCCATGA
451 D N T G V P S V P Q T H S P Q H W E Q Q P I Y T Q L S R P *
1472 GGAGATAGACTTAGCACTGACTGTATGACACCCATCCCATGATAGACTCTTTCTGCCAAGGGGCTTTGTATCACCATGCCACATGC
1562 CCTTCATGTCAACAGAAAAACGCAACAGGACTTTTTATAGTACTGAAAATTTATCTTTGGATTGGCTCACACAGTGCCTTTTGTA
1652 TTGGTTGGAATTGTGATTATATTTTTAGATATAATGTTAAAAAGTTAAGTCCTCTGTGAGGATATACAGGTTATAAATATTTAGTAT
1742 GTACTGTGTATGTCTGCTCTGTGCATCATCATCACCGTAATCAGTGTGCATCAGCATCCTCATCATCATCATTGAAAGGTTTAA
1832 CACATCTAAAGGAGCAGCAATGCCGGTAAAAACACCCCTCAGTGGCCCTACTTCTCACTAATGTTTTTTTTTTGATGTTTTTTGTACAG
1922 AAGTAAGAAACGCTTTTTTACTGACACTGCCATCTGTAATAGCCTATTCTGCTTTGGATTTTTGTACTGTACATATTTATTATAATT
2012 CCCATGAAATGCAAGAACTGAGCAATGCAGGTTCAAATGGATTTTTGGCCATGGTATGACCGTGTGCATCAGAGAATTAGTCAAATATTC
2102 CACTTTTTATTTTTGCTTTAGCTCAAATATTTGTTGGAAATGCTATAGCAGGTGCCATGTAACCTACTAGGGCCCTTACTGTGTTG
2192 GTAGATGTAATGAGCAACGCTTGCTTCTATCTGGTACTGCCTTGATACCTTTGGTGCCTTGGAGCCACAGTAGGGAGGCTCCTTCCA
2282 CTGGCATTGCAGTGTCAAACCACAGCATAATTCTGACTTCTGCTTGGAGGATACAGGAAGCGACCTTTGACCTGTATCTCCTCTGCA
2372 GCCAGCAGGTCTGAGTCTTGCCTACTGCAGCCCGCTTTTTCTAACTTTTTCTTAATTTATCTTTGGCATTAAATTTATTTGAAA
2462 ATAACTATTTGCAATATCTTTTTAATTTCAGCAGCAGCTAAGTATGAGTAAAAAGTTTTTCAGTGAAGAGTTTGTGTGCATATGTGGTAC
2552 AAAATTGTTTATTTATCTTTGTAATGTTCCGTATAAAAGTTTCTGTTATTCATAATCTAGTTATGTACAGATTACTTCTAATTACAA
2642 AATGAGTCTTCTTAAAAATAAAAAAGAAAACTGGAAGTTTTCTTTTTCTGCTAACAATAAATTAATGATATGGAAGCTG
2732 TGCTGTTTTTGTAAACAAAAA

```

图1 金钱鱼 Sox9 cDNA 序列及其推导的氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of Sox9 cDNA

双下划线碱基为 poly (A) 加尾信号, 灰底色氨基酸为 HMG 保守盒, 单下划线氨基酸为特征性基序, * 为终止密码子。

Plus tail signal (AATAAA) is marked with double underlines; HMG box is marked with grey; Characteristic sequence is marked with single underline; Termination condon is marked with “*”.

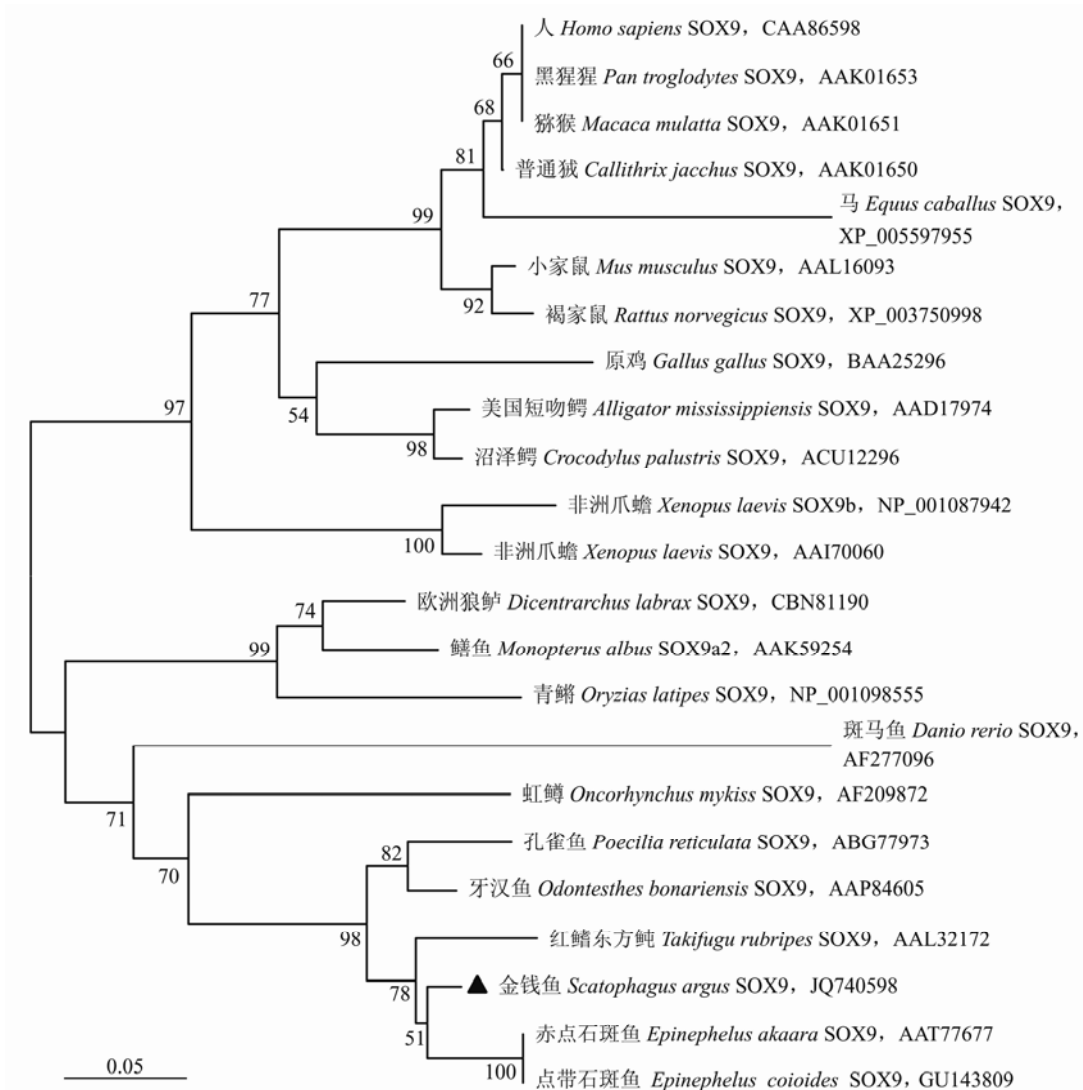


图 2 采用 MEGA 4.0 软件构建的基于 SOX9 氨基酸序列的邻接系统进化树

Fig. 2 Neighbor-joining phylogenetic tree based on SOX9 amino sequences by MEGA 4.0

图中枝上的数据代表置信度, 标尺表示进化距离; 黑三角形是本研究得到的序列。

Numbers on nodes indicate bootstrap values and scale plate indicates genetic distance. *Scatophagus argus* SOX9 is marked with a black triangle indicates.

照组 ($P > 0.05$)。

3 讨论

3.1 金钱鱼 SOX9 序列结构及同源性分析

本研究通过 RACE 技术从金钱鱼性腺中克隆了 *Sox9* 基因, 其推导的氨基酸序列中含有高度保守的 HMG 盒, 且在该盒内存在一个特征

性基序 AQAARRKL, 两个核定位信号 NLS1 和 NLS2, 及一个富含亮氨酸的核输出信号 NES, 与 NCBI 数据库中绝大多数物种 *Sox9* 基因氨基酸序列一致。说明 HMG 盒在进化地位不同的脊椎动物中均非常保守。序列分析及同源性分析显示, 金钱鱼 SOX9 与其他动物的 SOX9 具有较高同源性, 特别是与大多数鱼类

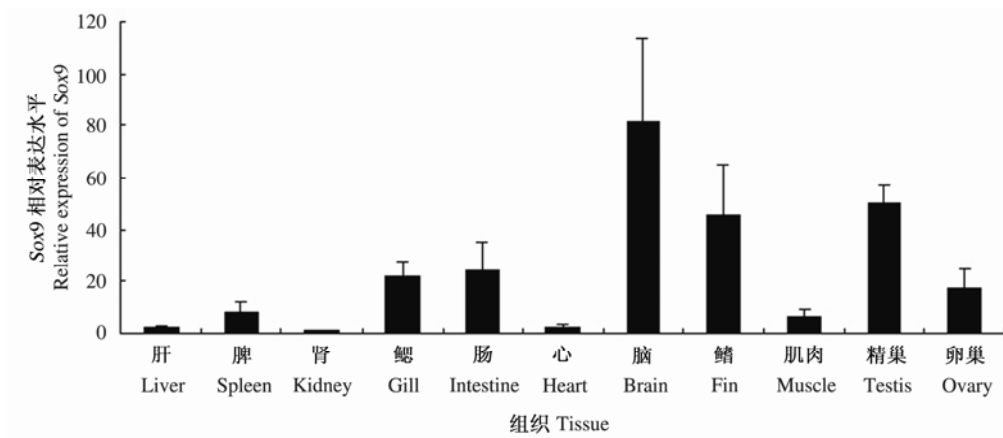


图 3 金钱鱼 *Sox9* 基因在不同组织中的表达分布

Fig. 3 Distribution of *Sox9* gene expression in different tissues of *Scatophagus argus*

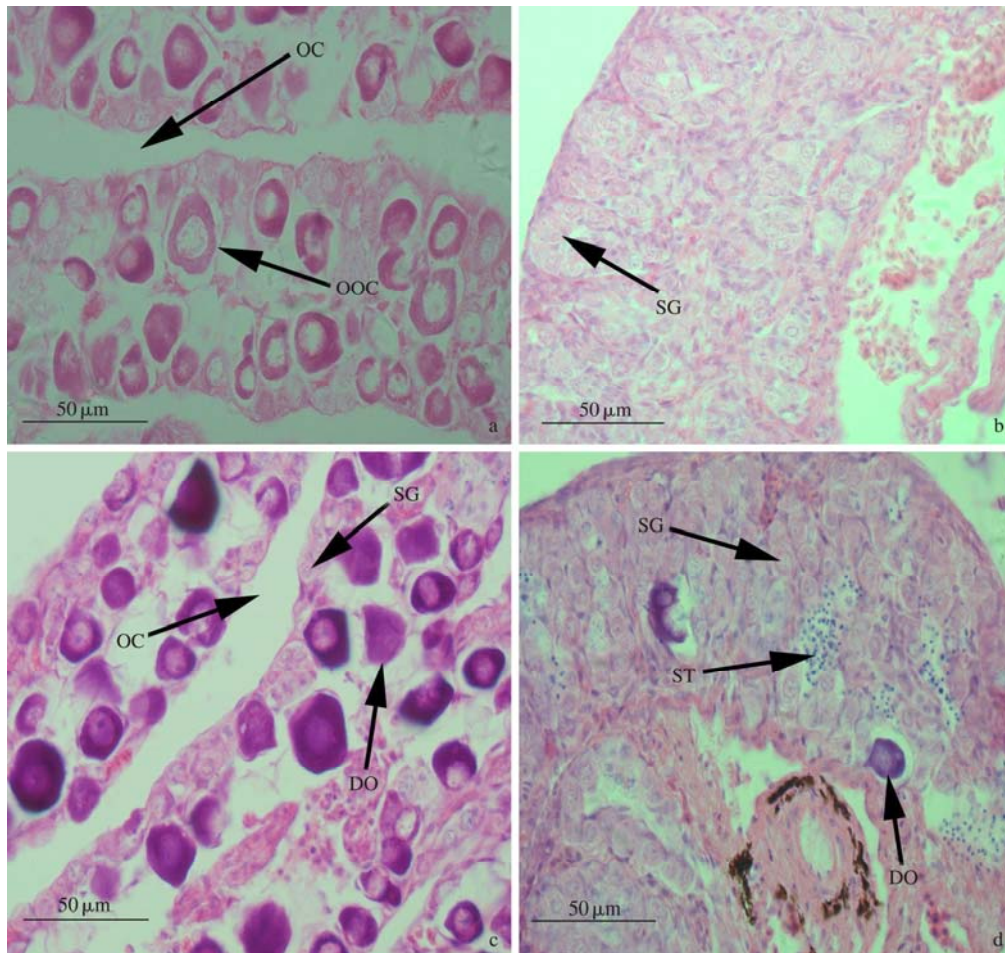


图 4 来曲唑处理对金钱鱼性腺发育的影响

Fig. 4 The effect of letrozole on gonadal development of *Scatophagus argus*

a. 对照组卵巢; b. 对照组精巢; c. d. 间性性腺。a. Control group ovary; b. Control group testis; c and d. Intersex gonad.
 OC. 卵巢腔; OOC. 卵母细胞; DO. 退化卵母细胞; SG. 精原细胞; ST. 精子细胞。
 OC. Ovarian cavity; OOC. Oocyte; DO. Degenerating oocyte; SG. Spermatogonia; ST. Spermatid.

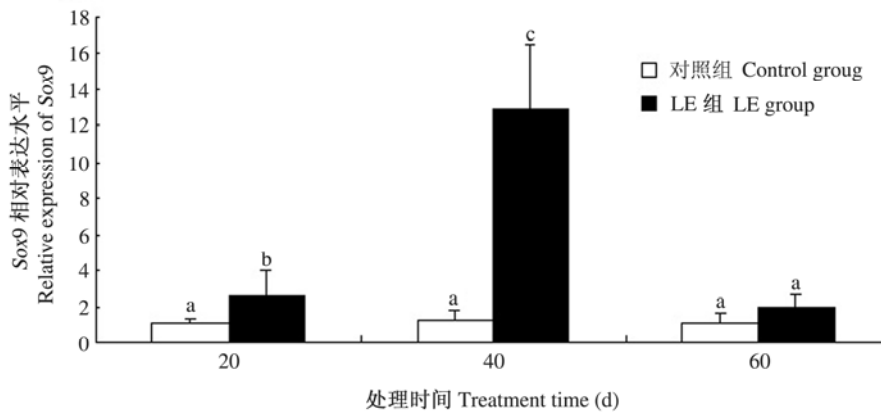


图5 来曲唑处理后金钱鱼性腺 *Sox9* 基因的表达情况

Fig. 5 Expression level of *Sox9* gene in gonad of *Scatophagus argus* after letrozole treatment

LE. 来曲唑。同一处理时间, 不同字母表示组间差异显著 ($P < 0.05$), 相同字母表示组间差异不显著 ($P > 0.05$)。

LE. Letrozole. Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$) and same letters indicate no significant differences ($P > 0.05$).

的同源性均超过 75%, 说明该基因高度保守, 也表明该基因在脊椎动物生命活动过程中起重要作用。

3.2 金钱鱼 *Sox9* 组织表达特征

Sox9 基因在金钱鱼各组织中存在普遍表达, 但也表现出明显的组织特异性。Real-time PCR 结果显示, *Sox9* 基因在金钱鱼脑组织中具有最高的表达量, 与 *Sox9* 基因在虹鳟 (Takamatsu et al. 1997)、西伯利亚鲟 (*Acipenser baerii*) (施志仪等 2010) 中的表达情况相似。这可能是与 *Sox9* 基因在调控神经分化和发育中起重要作用有关。本研究中, *Sox9* 基因在金钱鱼精巢中的表达高于卵巢, 与 *Sox9* 基因在鲤鱼 (*Cyprinus carpio*) (杜启艳等 2005) 中的组织表达相似, 说明 *Sox9* 基因可能在金钱鱼精巢发育过程中起重要作用, 但 *Sox9* 基因在不同鱼类性腺中的表达存在不同的情况, 如在史氏鲟 (*A. schrenckii*) 中, *Sox9* 基因在精巢和卵巢中的表达差异不明显 (陈金平等 2004), 而在青鳞中 *Sox9* 基因在卵巢中表达量高于精巢 (Yokoi et al. 2002)。这说明 *Sox9* 基因的功能是复杂的, 有待于进一步研究。

3.3 来曲唑对金钱鱼 *Sox9* 表达影响的分析

芳香化酶抑制剂通过抑制或降低芳香化酶活性, 影响雄激素向雌激素转化, 从而影响脊椎动物性腺分化。通过芳香化酶抑制剂来曲唑处理赤点石斑鱼, 能够降低内源性雌二醇水平, 同时提高 11-酮基睾酮 (11-ketotestosterone, 11-KT) 浓度, 促使卵母细胞退化和雄性生殖细胞增殖 (李广丽等 2005)。在暗纹东方鲀 (*Takifugu obscurus*) 研究中发现芳香化酶抑制剂来曲唑可抑制内源性雌激素合成, 使 *CYP19A* 基因表达下调, 同时上调 *DMRT1* 基因表达, 并发生雄性化逆转 (汪奇等 2012)。本研究中, LE 也能促使卵母细胞退化, 精原细胞大量增殖, 诱导金钱鱼由雌性向雄性逆转。同时 LE 处理后, 金钱鱼 *Sox9* 基因表达量在处理第 20 和 40 天时显著上调。这可能是由于芳香化酶抑制剂阻碍金钱鱼体内的雄性激素向雌激素转化, 降低内源性雌二醇水平, 促使雄性生殖细胞增殖。而 *Sox9* 被认为是支持细胞的标记基因 (Hemendinger et al. 2002)。支持细胞能产生缪勒氏管抑制物、抑制素、活化素、雄激素结合蛋白, 并在精子发生中起重要作用 (Boukari et al. 2009)。因此, 金钱鱼 *Sox9* 基因表达量的上升可能是由于支持细胞的重新分化和增殖。

参 考 文 献

- Barrionuevo F, Scherer G. 2010. *SOX E* genes: *SOX9* and *SOX8* in mammalian testis development. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 42(3): 433–436.
- Boukari K, Meduri G, Brailly-Tabard S, et al. 2009. Lack of androgen receptor expression in Sertoli cells accounts for the absence of anti-Mullerian hormone repression during early human testis development. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 94(5): 1818–1825.
- Chiang E F L, Pai C I, Wyatt M, et al. 2001. Two *Sox9* genes on duplicated zebrafish chromosomes: expression of similar transcription activators in distinct sites. *Developmental Biology*, 231(1): 149–163.
- Foster J W, Dominguez-Steglich M A, Guioli S, et al. 1994. Campomelic dysplasia and autosomal sex reversed caused by mutations in an *SRY*-related gene. *Nature*, 372(6506): 525–530.
- Hemendinger R A, Gores P, Blacksten L, et al. 2002. Identification of a specific Sertoli cell marker, *Sox9*, for use in transplantation. *Cell Transplantation*, 11(6): 499–505.
- Kent J, Whealey S C, Andrews J E, et al. 1996. A male-specific role for *Sox9* in vertebrate sex determination. *Development*, 122(9): 2813–2822.
- Khuda-Bukhsh A R, Chakrabarti J. 1999. Indication of the sex chromosome pair bearing Ag-NORs in a brackish water fish, *Scatophagus argus* showing male heterogamety. *Indian Journal of Experimental Biology*, 37(8): 793–797.
- Khuda-Bukhsh A R, Manna G K. 1974. Somatic chromosomes in seven species of teleostean fishes. *Chromosome Information Service*, 17: 5–6.
- Lecointre C, Pichon O, Hamel A, et al. 2010. Familial acampomelic form of campomelic dysplasia caused by a 960 kb deletion upstream of *SOX9*. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 149(6): 1183–1189.
- Luo Y S, Hu W, Liu X C, et al. 2010. Molecular cloning and mRNA expression pattern of *Sox9* during sex reversal in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *Aquaculture*, 306(1): 322–328.
- Seymour P A, Freude K K, Dubois C L. 2008. A dosage-dependent requirement for *Sox9* in pancreatic endocrine cell formation. *Developmental Biology*, 323(1): 19–30.
- Takamatsu N, Kanda H, Ito M, et al. 1997. Rainbow trout *SOX9*: cDNA cloning, gene structure and expression. *Gene*, 202(1/2): 167–170.
- Wada Y, Nishimura G, Nagai T, et al. 2009. Mutation analysis of *SOX9* and single copy number variant analysis of the upstream region in eight patients with campomelic dysplasia and acarytomic campomelic dysplasia. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 149(12): 2882–2885.
- Yokoi H, Kobayashi T, Tanaka M, et al. 2002. *Sox9* in a teleost fish, medaka (*Oryzias latipes*): Evidence for diversified function of *Sox9* in gonad differentiation. *Molecular Reproduction and Development*, 63(1): 5–16.
- Zhou R J, Liu L, Guo Y Q, et al. 2003. Similar gene structure of two *Sox9* genes and their expression patterns during gonad differentiation in a teleost fish, rice field eel (*Monopterus albus*). *Molecular Reproduction and Development*, 66(3): 211–217.
- 蔡泽平, 王毅, 胡家玮, 等. 2010. 金钱鱼繁殖生物学及诱导产卵试验. *热带海洋学报*, 29(5): 180–185.
- 程汉良, 姬南京, 彭永兴, 等. 2011. 彭泽鲫葡萄糖激酶基因全长 cDNA 克隆及表达分析. *动物营养学报*, 23(7): 1167–1175.
- 陈金平, 袁红梅, 王斌, 等. 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.
- 崔丹, 刘志伟, 刘南希, 等. 2013. 金钱鱼性腺发育及其组织结构观察. *水产学报*, 37(5): 696–704.
- 杜启艳, 常重杰, 王凤羽, 等. 2005. 鲤鱼中 *Sox9b* 基因的克隆和表达. *实验生物学报*, 38(5): 397–403.
- 兰国宝, 阎冰, 廖思明, 等. 2005. 金钱鱼生物学研究及回顾. *水产科学*, 24(7): 39–41.
- 李广丽, 刘晓春, 林浩然. 2005. 芳香化酶抑制剂 letrozole 对赤点石斑鱼 (*Epinephelus akaara*) 性逆转的作用. *生理学报*, 57(4): 473–479.
- 李海燕. 2007. 寄生于海洋鱼类鳃上的两种锚首虫 (包括一新种) 的记述. *广州大学学报: 自然科学版*, 6(2): 18–22.
- 施志仪, 程千千, 宋佳坤, 等. 2010. 西伯利亚鲟 *Sox9* 基因 cDNA 全长克隆、序列分析及其表达检测. *水产学报*, 34(5): 664–672.
- 汪奇, 郭正龙, 李延伸, 等. 2012. 来曲唑对暗纹东方鲀性腺分化及相关基因表达的影响. *动物学杂志*, 47(5): 16–23.
- 吴波, 张智敏, 邓思平, 等. 2014. 金钱鱼雌雄个体的形态差异分析. *上海海洋大学学报*, 23(1): 64–69.
- 张敏智, 邓思平, 朱春华, 等. 2013. 温度对金钱鱼卵巢发育的影响. *中国水产科学*, 20(3): 599–606.