

文章编号: 1004 - 7271(2008)01 - 0006 - 06

## 奥利亚罗非鱼 *SOX9* 基因 cDNA 全长的克隆及分析

曹丽萍, 俞菊华, 殷国俊, 李建林, 丁炜东

(中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 农业部水生动物遗传育种和  
养殖生物学重点开放实验室, 江苏 无锡 214081)

**摘要:** *SOX9* 基因是重要的转录调控因子, 与性别分化形成密切相关。以奥利亚罗非鱼 (*Oreochromis aurea*) 为研究材料, 使用 RT-PCR 和 RACE 法分离和克隆了奥利亚罗非鱼卵巢中 *SOX9* 基因 cDNA 的全长序列。序列全长 1 582 bp, 其中 5' 端非翻译区长 71 bp, 3' 端非翻译区长 75 bp, 开放性阅读框长 1 437 bp, 编码 478 个氨基酸。其中第 98 位开始共 81 个氨基酸为 HMG 保守盒。将奥利亚罗非鱼 *SOX9* 基因与虹鳟等八种动物的氨基酸序列相比较发现, 它们同源性达 75% 左右, 表明 *SOX9* 基因在进化中较保守。

**关键词:** 奥利亚罗非鱼; *SOX9*; RT-PCR

中图分类号: S 917 文献标识码: A

## The cloning and analysis of *SOX9* gene derived from *Oreochromis aurea*

CAO Li-ping, YU Ju-hua, YIN Guo-jun, LI Jian-lin, DING Wei-dong

(Key Open Laboratory for Genetic Breeding of Aquatic Animals and Aquaculture Biology, Ministry of Agriculture,  
Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Science, Wuxi 214081, China)

**Abstract:** *SOX9* gene is one of the important transcription factors involved in developments of many tissues and organs, particularly in sex determination and chondrogenesis. In this paper, RT-PCR and RACE (rapid amplification cDNA ends) methods were used for the isolation of the whole cDNA of *SOX9* gene from ovary of *Oreochromis aurea*. Sequence analysis revealed a 1 582 bp cDNA containing the 71 bp 5' -untranslated region, 75bp 3' -untranslated region and 1 437 bp open reading frame encoding 478 amino acids. HMG box of 81-amino acid motif was confirmed to have appeared from the 96th to 176th amino acid site. Sequence alignment exhibited the identity rate of amino acid of *SOX9* among eight kinds of animals including Tetraodon with more than 75%. The result indicated the *SOX9* gene is relatively conservative in the progress of evolution.

**Key words:** *Oreochromis aurea*; *SOX9*; RT-PCR

人类和动物性别决定机制的探讨, 一直是生命科学中的一个重要研究领域。近年来的研究表明, 性别决定是一个涉及进化时空的多基因活动的复杂发育调控过程。鱼类作为脊椎动物中最低等的一个类

收稿日期: 2007-03-13

基金项目: 农业部海洋与河口重点开放实验室开放课题(开-2-04-01)

作者简介: 曹丽萍(1977-), 女, 江苏无锡人, 硕士, 主要从事鱼类细胞免疫学方面的研究。E-mail: caolp@ffrc.cn

通讯作者: 丁炜东, E-mail: dingwd@ffrc.cn

群,是从水生到陆生进化上的一个重要环节,其性别决定具有原始性、多样性和可塑性等特点。鱼类中至今尚未发现类似哺乳动物中 *SRY* 基因那样对性别决定和分化具有决定性作用的基因。*SOX* 基因家族是在 HMG 保守盒内与哺乳动物性别决定基因 *SRY* 的相似形大于 60% 的一系列基因<sup>[1]</sup>。其中 *SOX9* 基因是紧靠 *SRY* 基因的下游基因,它的研究对于性别决定机制的研究有非常重要的意义<sup>[2]</sup>。

罗非鱼是我国常见的养殖鱼类,经济价值较大。雄性罗非鱼生长比雌性快,如果其性别控制能人为操纵,在同等条件下实行单性养殖,将会提高单位面积产量,降低成本,提高效益<sup>[3]</sup>。因而,研究罗非鱼的性别决定相关基因具有重要的实践意义。由于罗非鱼存在两套性染色体,且至今未发现存在异型染色体,给罗非鱼性别调控带来一定的困难。但可以试图通过分子遗传学的研究,从基因水平来探讨罗非鱼性别控制机制,为系统研究鱼类性别决定机制提供参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验鱼

奥利亚罗非鱼取自淡水渔业研究中心渔场,鱼重 50 g 左右,组织为卵巢。

#### 1.1.2 试剂

Trizol Reagent 购自 Promega; *M-MLV*、Rnase H、TdT 酶、凝胶回收试剂盒购自 Takara; *Taq* DNA 聚合酶、连接酶、限制性内切酶 (*EcoRI* 和 *HindIII*)、*Ex Taq* HS 等及克隆载体 pUCm-T, 购自上海生物工程有限公司; 宿主菌大肠杆菌 (*Escheichia coli*) JM109 为本实验室保存。

#### 1.1.3 仪器

使用 eppendorf Mastercycler personal PCR 仪。

#### 1.1.4 引物设计

引物 P1、P2 和 P3、P4 为根据已发表的 *SOX9* 基因保守区序列,采用 Primer5.0 设计; 引物 P5、P6 是根据卵巢 *SOX9* 基因阅读框序列设计的 3' RACE 的引物; P7 用于克隆卵巢 *SOX9* 基因 5' RACE 的引物。所有引物均由上海捷倍思基因技术有限公司合成,测序工作由上海生工完成。

P1: 5' -GCTACGACTGGACCCTGGTGCC (GC) ATGCC -3' ;

P2: 5' -TACACGCAGCTGACCCGGC -3' ;

P3: 5' -AGGACCACCCCGACTACAAGTACCAGCC-3' ;

P4: 5' -CGTTAGGGGGCAGGTACTGGTC (AG) AACTC (AG) T -3' ;

P5: 5' -GTAAAGAACGGGCAAAGCGAGG -3' ;

P6: 5' -TGTGAAGGTCCGGTACTGAT-3' ;

P7: 5' -CGCTCAGACCCAGCATAGGA-3' ;

AP 引物: 5' -CTGATCTAGAGGTACCGGATCC-3'

### 1.2 方法

#### 1.2.1 总 RNA 的抽提

取奥利亚罗非鱼卵巢,称重,用 Trizol Reagent 抽提总 RNA。用变性琼脂糖凝胶电泳,溴化已啶染色显示 28 s 和 18 s,检测 RNA 的完整性。

#### 1.2.2 保守片段的分离

取 2  $\mu$ g 卵巢总 RNA,以 OligodT-AP [dT-AP, 5' -CTGATCTAGAGGTACCGGATCC (T)<sub>16</sub>-3' ] 为引物,根据使用说明用 *M-MLV* 进行 RT 反应,然后用 10% 的 RT 液, P1 和 P2 进行 PCR 反应, PCR 反应体系为 25  $\mu$ L, 其中含 2.5  $\mu$ L 10  $\times$  反应缓冲液, 2  $\mu$ mol/L 氯化镁, 200  $\mu$ mol/L dNTP, 引物各 0.1  $\mu$ mol/L, 0.125 U *Taq* 酶。反应条件为: 94  $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 94  $^{\circ}$ C 预变性 30 sec, 58  $^{\circ}$ C 退火 45 sec, 72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 30 个循环, 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4  $^{\circ}$ C 保存。PCR 液用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳分离, 回收目的片段,

用 P3 和 P4 引物扩增回收液,反应体系同上,回收 PCR 产物。两次回收产物分别连接到 pUCm-T 载体,转化质粒,测序。

### 1.2.3 3'RACE

取 2  $\mu\text{g}$  总 RNA,以 dT-AP[ dT-AP,5'-CTGATCTAGAGGTACCGGATCC(T)<sub>16</sub>-3' ]为引物,根据使用说明用 *M-MLV* 进行 RT 反应,然后用 10% 的 RT 液,以 AP[ AP,5'-CTGATCTAGAGGTACCGGATCC-3' ]和 3'RACE 特异引物 P7 进行 PCR 反应,PCR 反应体系为 25  $\mu\text{L}$ ,同上,反应条件为:94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min,94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 30 sec,55  $^{\circ}\text{C}$  退火 45 sec,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min,30 个循环,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min,4  $^{\circ}\text{C}$  保存。PCR 液用 1.2 的琼脂糖凝胶电泳分离,回收,克隆,送测序。

### 1.2.4 5'RACE

方法原理参照文献[4-5],用 2  $\mu\text{g}$  总 RNA,以 5'RACE 第一个引物 P5,根据使用说明用 *M-MLV* 进行 RT 反应,然后加 RNaseH,分解 mRNA,用 DNA 回收试剂盒回收 cDNA,去除多余的 dNTP,引物等;再用 TdT 酶在 cDNA 3' 端加 poly(A),用试剂盒回收加了 poly(A) 尾的 cDNA,以此为模板,用 5'RACE 第 2 个引物 P6 及 dT-AP(同 3'RACE)为引物,进行 PCR,反应体系组成同 3'RACE,PCR 液稀释 10 倍,取 2  $\mu\text{L}$  为模板,再用引物 P7 和 AP,进行 PCR,反应体系组成同上,PCR 液用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳分离,回收,克隆并测序。

### 1.2.5 PCR 产物的连接与转化

切下琼脂糖胶板上的目的条带,用胶回收试剂盒纯化,在 T4DNA 连接酶的作用下与 pUCm-T 载体进行连接反应,连接产物转化到大肠杆菌 JM-109 的感受态细胞后,涂布于含 IPTG 和 X-gal 的 LB 固体培养基(AMP<sup>+</sup>)。挑白斑,抽提质粒。经 *EcoRI* 和 *HindIII* 双酶切鉴定,并以质粒为模板进行 PCR 产物扩增再鉴定。

### 1.2.6 序列分析

将所得 DNA 序列输入 Genbank 中已有的 *SOX* 基因信息资源进行比较,搜索最高同源基因。用 Dnastar 5.2, Dnaman 5.2 分析奥利亚罗非鱼卵巢 *SOX9* 序列,以氨基酸序列差异作为遗传距离,构建聚类图。

## 2 结果

### 2.1 *SOX9* 保守盒区的克隆

根据 RT-PCR 扩增先得到 P1 和 P2 的条带,约为 1 000 bp(图 1),再以 P3 和 P4 进行扩增,得到 400 bp 左右的一条带(图 1),PCR 产物分别连接 T 载体转化大肠杆菌,双酶切鉴定后,选择阳性质粒测序,测得片段分别长 940 bp 和 411 bp,经 Blast 分析,确定 P1 和 P2 的扩增产物即为奥利亚罗非鱼卵巢 *SOX9* 基因的保守片段。

### 2.2 3'RACE 结果

利用扩增出的奥利亚罗非鱼 *SOX9* 保守片段的序列,设计引物 P7。根据 3'RACE 操作流程,P7 和 AP 扩增得到 400 bp 的一条带(图 1),将其转化质粒,双酶切,将质粒测序,得到 435 bp 片段。经 Blast 分析,确定为奥利亚罗非鱼卵巢 *SOX9* 的 3' 端序列。

### 2.3 5'RACE

利用扩增出的奥利亚罗非鱼 *SOX9* 保守片段的序列,设计引物 P5 和 P6。根据 5'RACE 操作流程,最后获得 400 bp 左右的特异条带(图 1),转化 T 载体,双酶切鉴定后,将阳性质粒送生物公司测序。测序结果经 Blast 分析,确定为奥利亚罗非鱼卵巢 *SOX9* 的 5' 非翻译区,大小为 449 bp。

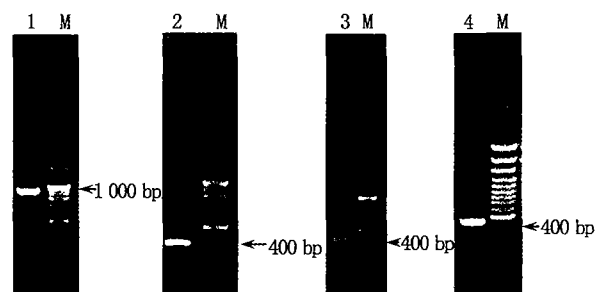


图 1 RT-PCR 产物琼脂糖电泳

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of RT-PCR product  
M:DNA 分子量标记。1、2、3、4 分别为引物 P1 与 P2、P3 与 P4、P7 与 AP、P5 与 P6 PCR 扩增产物

### 2.4 序列的拼接与分析

根据 3' RACE 和 5' RACE 的结果,使用 DNASTAR 5.2 把 3',5' 进行拼接,得到奥利亚罗非鱼卵巢 *SOX9* cDNA 序列(图 2),结果显示奥利亚罗非鱼 *SOX9* cDNA 全长共 1 582 bp,其中 5' 端非翻译区长 71 bp,3' 端非翻译区长 75 bp,开放阅读框长 1 437 bp,编码 478 个氨基酸。其中第 98 位开始共 81 个氨基酸为 HMG 保守盒(图 2)。

```

1      cacgctctgtcaggattctcaatccgacaaaactttcttcttcttcttcttcttcttctctcgcgatgaatctctcagtgctacgtgaagatggccgacgagca
                               M N L L E S Y V K M A D E Q
112    ggacaaatgtctctccgacgcaccgagtcgagcagctcggaaactctgcagcctcccctgtgagtcgagtcgggctctgacaccgagaaacacgagcgc
      D K C L S D A P S P S M S E D S A A S P C E S G S G S D T E N T R
203    cgccgtccgagaacagcgtgaagaagcagaggagaatgaaacaagtccctgtgtgcatccgacgagccgtgtcacaggtgctcaaaggctacgactg
      P P S E N R L K K D E E N E N K F P V C I R D A V S Q V L K G Y D W
303    gaccctggtgccgatccggtgcggttaacggatctaccaagaataagccccacgttaagagaccaatgaacgcgttcatggtgtggctcagcgtctcg
      T L V P M P V R V N G S T K N K P H V K R P M N A F M V W A Q A A R
405    gaggaagctggcggatcagctaccgcacftcacaacgcggagctcagcaagacactcggaaaactctggaggcttctcaatgaaggagagagaagcggccg
      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 G E K R P
505    ttcgtggaggaggctgagcgtctccgggtgcagcacaagaaggaccaccccgactacaagtaccagccccgaaaggaggaaagtctgtaaaagacgggcaaa
      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 V K N G Q
605    gcgagggcagggagcagcagacacacattccccaaacgcatcttcaaaagctctcagcagggcagccccctgcatccagcagtgaggagaggt
      S E G E D G S E Q T H I S P N A I F K A L Q Q A D P P A S S M G E V
705    gcattctctggagagcactcaggctcccagggtcccctaccctcccactaccctcccactaccctcccactaccctcccactaccctcccactaccctccc
      H S P G E H S G S Q G P P T P P T T P K T D V S S G K V D L K R E V
808    ggctcctcctccctgcctgatgtccgggtggcgacagctcaaacatcagctccgcgacgtggacatcggcagcgtgagcagtgatgtatctccatattg
      G L R S L P D G P G G R Q L N I D F R D V D I G E L S S D V I S H I
912    agacctctgatgtcaatgagttcgaccagtatctccctcccacggccaccgggctccaccaacgcagcgcagtaagttacactggcagctacagcatcag
      E T F D V N E F D Q Y L P P N G H P G S T N A A P V S Y T G S Y S I S
1010   cagcggcggcctccagtcagccccagtcaggaggcctggtgatggctaaaagcccgaaccagcagggacaacagcagcagcagcacaccctgacca
      S G G A P V S P Q S G G A W M A K S P N Q Q G Q Q Q Q Q H T L T
1111   ccctggggagcagcggggctcagcagggcgtcagaccagcagatagaccaccccgactacaagtaccagcctcgtccaccactcctcccagctctacac
      T L G S S G A S D G A Q T Q H R T T P T T S T S L A P P L L P S L H
1213   gcagctgacccggctcccctaccggcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
      A A D P A P L T P A S P E P N S N D F S E H Q A A N N S G T N A S Y
1313   tacagccacgagggcgggcgaggggctgggctgtactcaacttfcagctactgtgagcagcccgaccagagggccatgtacatcgcagacacaactg
      Y S H A G A G Q G V G L Y S T F S Y V S S P S Q R P M Y I A D T T
1417   ggggtgcctctgtaccagaccacagctcccagcatcactggaccagcagcagctgtacacacagctctcccggcctgatttctaaaaataagcttacc
      G V P S V P Q T H S P Q H H W D Q Q P V Y T Q L S R P *
1521   tttttgattgtattgcaataaaagagaaaatacttttagaaaaaaaaaaaaaa
  
```

图 2 奥利亚罗非鱼 *SOX9* cDNA 及其推导的氨基酸序列  
Fig. 2 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *O. ourea* *SOX9* cDNA  
其中下划线为 HMG box

将奥利亚罗非鱼 *SOX9* 基因 cDNA 序列推导的氨基酸序列与已知的鱼类和人等的 *SOX9* 基因氨基酸序列进行同源性分析(图 4)。结果表明,本实验所得奥利亚罗非鱼 *SOX9* 基因氨基酸序列与河豚 *SOX9* 基因的同源性最高,达 76%,与黄鳝的 *SOX9* 氨基酸序列相似性达 75%。与其他硬骨鱼类同源性在 65%左右。奥利亚罗非鱼 *SOX9* 基因 HMG 盒氨基酸序列同其他鱼类一样具有高度的保守性,HMG 盒中只有第 47 位氨基酸在人、虹鳟等动物中

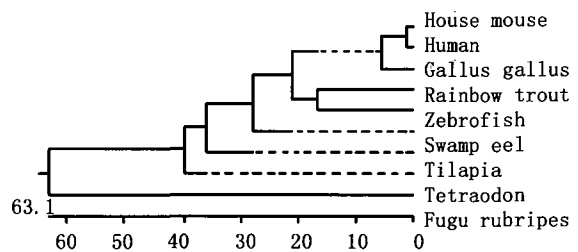


图 3 *SOX9* 系统进化树  
Fig. 3 Maximum-parsimony tree for *SOX9* coding sequences of *O. ourea* and other representative species



存在多态性。与人的同源性较高,为 80%。根据上述结果,以人、老鼠、鸡、虹鳟、奥利亚罗非鱼等进行系统发育分析,构建系统进化树(见图 3)。系统分析表明,奥利亚罗非鱼 *SOX9* 基因与河豚鱼属于同一分支,具有较高的亲源性。

### 3 讨论

本研究成功地从奥利亚罗非鱼卵巢中分离到了 *SOX9* 基因,序列分析及同源性分析表明该基因同样含有具有 DNA 结合能力的 HMG 盒,与其它动物 *SOX9* 基因核苷酸序列的相似性在 75% 左右,这与 *SOX9* 基因在性别决定及分化过程中高度保守性的结论是一致的。人类和小鼠中的研究表明 *SOX9* 基因在性别决定及分化过程中起着重要的作用,一个等位基因的突变将引起 *SOX9* 剂量不足而导致骨综合征和性反转<sup>[6-7]</sup>。该基因在迄今已研究的所有脊椎动物中都高度保守,说明了其功能的相似性和重要性。有关该基因在不同组织中的表达,以及与其它性控基因的关系等,还有待于进一步研究。

*SOX9* 基因被认为是哺乳动物 *SRY* 仅有的直接调节目标基因,在 *SRY* 基因表达后被激活,出现雄性特异性的上调<sup>[8]</sup>;在足细胞分化过程中起着重要的作用,因此也被称为足细胞分化因子;然后与 WT1 (Wilms' s tumor-associated zinc-finger gene, Wilms' s 肿瘤相关锌指基因)、SF1 (Steroidogenic factor 1, 类固醇生成因子 1) 共同作用调节抗穆勒氏激素 AMH 的表达,保证雄性性别的正常发育<sup>[9-10]</sup>。*SOX* 基因家族参与了广泛的发育调控过程并与性别决定和分化具有密切的关系<sup>[11]</sup>,因此,在鱼类中克隆并研究 *SOX* 基因,对于揭示高等动物中一些 *SOX* 基因的进化历程,研究这些基因的功能,透视高等动物的性别决定机制,发现新的性别基因都具有重要的理论和实践意义。

### 参考文献:

- [1] Foster J W, Dominguez-Steglich M A, Guioli S, *et al.* Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene[J]. *Nature*, 1994, 372: 525 - 530.
- [2] Denny P, Swift S, Brand N, *et al.* A conserved family of genes related to the testis determining gene, *SRY*[J]. *Nucleic Acids Research*, 1992, 20(11): 2887 - 2888.
- [3] 楼允东. 鱼类育种学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1999.
- [4] Frohman M A, Dush M K, Martin G R. Rapid production of full-length cDNA from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligo-nucleotide primer[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85: 8998 - 9002.
- [5] 俞菊华, 夏德全, 杨弘, 等. RACE 法分离团头鲂生长抑素全长 cDNA 及其序列测定[J]. *水产学报*, 2003, 27(6): 533 - 539.
- [6] Kato N, Fukase M, Motoyama T. Expression of a transcription factor, *SOX9*, in Sertoli-stromal cell tumors of the ovary[J]. *Int J Gynecol Pathol*, 2004, 23(2): 180 - 181.
- [7] Chaboissier M C, Kobayashi A, Vidal VI, *et al.* Functional analysis of *SOX8* and *SOX9* during sex determination in the mouse[J]. *Development*, 2004, 131(9): 1891 - 1901.
- [8] Canning C A, Lovell-Badge R. Sry and sex determination: How lazy Call it be [J]. *Trends in Genetics*, 2002, 18(3): 111 - 113.
- [9] Sekido R I, Bar V, Narvaez G, *et al.* *SOX9* is up-regulated by the transient expression of *SRY* specifically in Sertoli cell precursors[J]. *Dev Biol*, 2004, 274(2): 271 - 279.
- [10] Lasala C D, Carre-Eusebe D, Picard J Y, *et al.* Subcellular and molecular mechanisms regulating anti-Mullerian hormone gene expression in mammalian and nonmammalian species[J]. *DNA Cell Biol*, 2004, 23(9): 572 - 585.
- [11] Akiyama H, Chaboissier M C, Behringer R R, *et al.* Essential role of *SOX9* in the pathway that controls formation of cardiac valves and septa [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2004, 101(17): 6502 - 6507.