

西伯利亚鲟 *Sox9* 基因 cDNA 全长克隆、 序列分析及其表达检测

施志仪*, 程千千, 宋佳坤, 轩兴荣
(上海海洋大学水产与生命科学学院, 上海 201306)

摘要:为了研究 *Sox9* 基因在西伯利亚鲟侧线神经发育过程当中所起的调控作用,本研究利用 RT-PCR 和 RACE 方法获得了西伯利亚鲟 *Sox9* 基因 cDNA 全长序列,经序列分析表明,所克隆 *Sox9* cDNA 全长为 1 409 bp,包括开放阅读框(open reading frame, ORF) 1 083 bp, 5'端非翻译区(untranslated region, UTR) 19 bp 和 3'端非翻译区(untranslated region, UTR) 307 bp。1 083 bp 的 ORF 共编码 360 个氨基酸,相对分子质量为 41 221.7 U。序列分析表明,其与施氏鲟的亲缘关系较近,其次是斑马鱼。经实时荧光定量 PCR 技术对西伯利亚鲟 *Sox9* 基因在各组织以及在胚胎发育各时期中的相对表达量检测发现,*Sox9* 在西伯利亚鲟中的表达具明显的组织差异性和时间差异性。其中,在肝,肾,肌肉,胰中的相对表达量较低。然而,大脑组织中的表达量与以上 4 个组织相比,处于极高水平,达到胰脏中相对表达量 8.9 倍,达到表达量最低点肾脏中的近 21 倍。在胚胎发育的不同阶段,*Sox9* 均有表达。在原肠期、神经胚期及视泡形成期,*Sox9* 基因的表达量均较高,特别是在原肠期其表达量达到西伯利亚鲟整个胚胎发育期的最高点,相当于表达量最低点心脏形成期的 1.9 倍。在神经胚期和视泡形成期,*Sox9* 的相对表达量也相对处于较高水平,仅比原肠期略低,其相对表达量是心脏形成期 1.2 倍和 1.4 倍。本研究将为今后深入研究 *Sox9* 基因在西伯利亚鲟侧线神经节分化发育、细胞迁移过程中所起的调控作用积累资料。

关键词:西伯利亚鲟;*Sox9*;cDNA 全长;cDNA 末端快速扩增;表达检测
中图分类号:Q 786;S 917 **文献标识码:**A

西伯利亚鲟(*Acipenser baerii* Brandt)隶属鲟形目(*Acipenseriformes*)鲟科(*Acipenseridae*)鲟属(*Acipense*),为软骨硬鳞鱼,分布于西伯利亚河流和湖泊。鲟形目鱼类是一类原始古老的软骨硬鳞鱼类,在鱼类乃至整个脊椎动物进化史上占有重要的地位^[1]。西伯利亚鲟作为鲟形目鱼类中重要的一种,是地球上最为古老的物种和鱼类之一,因而具有极高的进化研究价值。随着分子生物学的兴起,人们对西伯利亚鲟的研究也逐渐深入,向西伯利亚鲟分子进化、胚胎和神经发育等相关功能基因的研究方面集中。

Sox 基因家族是在动物中发现的一类新的编码转录因子的基因家族,其编码的蛋白参与诸如

性别决定、骨组织发育、血细胞生成、神经系统发育、晶状体发育等早期胚胎发育过程^[2]。*Sox9* 是 *Sox* 基因家族中重要的一员,作为转录因子,在脊椎动物生长发育过程中起着重要的作用,特别是动物性别决定方面所起的作用早已为大家所重视,在鱼类的研究中,由于 *Sox9* 在性别控制方面所起的特殊作用^[3],主要研究集中于分子辅助育种方面,当前已经获得了多种物种例如奥里亚罗非鱼(*Oreochromis aurea*),黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*),黄鲢(*Monocpterus albus*)等经济价值较高的鱼类的 *Sox9* 基因序列^[4-6],同时在鱼类中有深入研究 *Sox9* 作为温度敏感型基因在调控性别分化通路中所起的关键性作用,在温度较低的情

收稿日期:2009-09-26 修回日期:2010-01-14

资助项目:上海市科委基础重大项目(073205109);上海市重点学科水生生物学建设项目(S30701)

通讯作者:施志仪, Tel:021-61900051, E-mail:zyshi@shou.edu.cn

况下,*Sox9* 的表达量降低,而影响性腺的分化发育,进一步影响鱼类的性别转化^[7]。与此同时,近来特别是 *Sox9* 在神经发育分化中所起的作用也已引起大家的重视。已有学者发现 *Sox9* 在非爪蟾 (*Xenopus laevis*) 早期神经节中有表达^[8],也有报道 *Sox9* 是鸡神经节发育分化迁移重要的调控因子^[9],更有学者研究发现在斑马鱼 (*Danio rerio*) 的神经节细胞的扩增和迁移中起着重要作用^[10]。

本研究采用 RT-PCR 和 RACE 法克隆出西伯利亚鲟 *Sox9* 基因 cDNA 全长,并对其进行序列分析及其蛋白质结构预测,同时利用实时荧光定量 PCR 技术,对该基因在西伯利亚鲟各组织及胚胎发育不同时期的表达量进行研究,以期进一步探究该基因在西伯利亚鲟侧线神经节发育分化中的作用。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

试验动物 西伯利亚鲟成鱼和胚胎均来自浙江千岛湖鲟龙科技有限公司养殖场,成鱼 100 尾,胚胎 500 尾,暂养于实验室循环水系统。

试验试剂 总 RNA 抽提试剂 RNAiso Reagent、反转录试剂 *PrimeScript*TM RT reagent Kit (Perfect for Real Time) cDNA 全长获取试剂盒: 5'-Full RACE Kit, 3'-Full RACE Core Set Ver. 2.0, 实时荧光定量试剂: SYBR[®] Premix *Ex Taq*TM

(perfect real time) 均购自宝生物工程(大连)有限公司。T 载体系统,大肠杆菌 DH5 α 、Marker 购自天根生物有限公司。其他化学试剂均购自上海生工生物工程有限公司。

1.2 试验方法

RNA 的提取 西伯利亚鲟成鱼(约 20 cm)活体解剖,取肝,脑,肾,肌肉,胰各组织于研磨器(RNAase free)中,同时参照施氏鲟胚胎发育的分期方法^[6],取西伯利亚鲟胚胎受精卵期,囊胚期,原肠期,神经胚期,视泡形成期,心脏形成期小胚胎 4 粒于研磨器(RNAase Free)中,加入 1 mL RNAiso reagent 试剂,匀浆后,将上清液加入 1.5 毫升离心管中,氯仿抽提,异丙醇沉淀,75% 酒精清洗,适量 0.1% DEPC 处理水溶解总 RNA。然后通过琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭(EB)染色显示 28S 和 18S 条带以检测 RNA 的完整性。

引物设计、合成 根据 GeneBank 中已报道的鱼类 *Sox9* 序列,运用 Primer Premier 5.0 软件结合 DNASTAR 分析软件及 BLAST 程序,设计了一对扩增保守区的引物,扩增产物经测序后在该序列内部设计一对巢式引物进行后续 RACE 试验,同时依据上述方法根据 GeneBank 中已报道的鱼类 β -actin 序列,设计一对扩增保守区的引物,用来做实时荧光定量 PCR 的内参的特异性引物。所有引物均由上海捷瑞生物工程技术服务有限公司合成(表 1)。

表 1 试验中所使用的引物
Tab.1 Primers used in the experiment

引物名称 name of primer	引物代码 code of primer	引物序列 sequence of primer
<i>Sox9</i> F	P1	5'-CAGACCGTCGGAGAATAGC-3'
<i>Sox9</i> R	P2	5'-GGAGTTGTGGGCGGAGTA-3'
5'RACEouter	P3	5'-CATGGCTACATGCTGACAGCCTA-3'
5'RACEinner	P4	5'-CGCGGATCCACAGCCTACTGATGATCAGTCGATG-3'
3'RACEouter	P5	5'-TACCGTCGTTCCACTAGTGATTT-3'
3'RACEinner	P6	5'-CGCGGATCCTCCACTAGTGATTTCACTATAGG-3'
<i>Sox9</i> innerF	P7	5'-CAGGTGCTGAAGGGTATGA-3'
<i>Sox9</i> innerR	P8	5'-CCAAAGTTTCCCGAGTGT-3'
β -actinF	P9	5'-ATGGTTGGTATGGACAGAAAGA-3'
β -actinR	P10	5'-ATGGCTGGGGTGTGAAGG-3'

5'RACE 及 3'RACE 5'RACE 试验以 5'-Full RACE Kit 内通用引物 P3、P4 和 *Sox9* 特异性引物 P2、P8 进行巢式 RT-PCR。OuterPCR 反应条件如下,94℃ 3 min, 以下运行 20 个循环:

94℃ 30 s, 52℃ 30 s, 72℃ 2 min。后续 72℃ 延伸 10 min。InnerPCR 反应条件为 94℃ 3 min, 以下运行 25 个循环: 94℃ 30 s, 54℃ 30 s, 72℃ 2 min。后续 72℃ 延伸 10 min。3'RACE 试验以

3'-Full RACE Core Set Ver. 2.0 内通用引物 P5、P6 与 *Sox9* 基因特异性引物 P1 和 P7 进行巢式 RT-PCR, 反应条件为 OuterPCR, 94 °C 3 min, 以下运行 20 个循环: 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 2 min。后续 72 °C 延伸 10 min。InnerPCR 反应条件为 94 °C 3 min, 以下运行 25 个循环: 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 2 min。后续 72 °C 延伸 10 min。

PCR 产物克隆及测序 将 RACE 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 用普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒对目的基因片段进行回收纯化, 并将纯化后的 RACE 产物与 PGM-T 载体连接构建重组质粒, 转化感受态大肠杆菌 DH5 α , 经琼脂糖 LB 平板(含 *Amp*⁺、IPTG 和 *X-gal*) 培养后, 筛选重组子进行插入片段检测。序列测定由上海桑尼生物工程技术服务有限公司完成。

生物信息学分析 应用 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.gov>) 中的 ORFfinder 程序进行开放阅读框(ORF)分析并将其推导为相应的氨基酸序列, 分析 CDS 起始区域及氨基酸数量。通过 BLAST 工具进行核酸序列相似性检索, 应用 MEGA 3.0 构建 NJ 系统进化树。蛋白质的分子量、等电点及基本性质分析用 Prot Param (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>) 进行预测。同时, 利用 <http://www.umass.edu/microbio/rasmol/> 提供的 Rasmol 软件对该序列编码的蛋白质序列的三维结构进行预测。

cDNA 第一链合成 以西伯利亚鲟各个组织及胚胎发育各个时期的 RNA 为模板, 利用 PrimeScriptTM RT 试剂盒 (TaKaRa, Japan) 进行 cDNA 第一链合成。10 μ L 反应体系: 2 μ L 5 \times PrimeScriptTM 缓冲液; 0.5 μ L PrimeScriptTM RT 酶混合液; 0.5 μ L OligoDT 引物 (50 μ mol/L); 0.5 μ L 随机引物 (100 μ mol/L); 总 RNA 150 ng; 加 H₂O (RNAase Free) 至 10 μ L。反转录反应条件为 37 °C 15 min, 85 °C 5 s。反转录产物 -20 °C 保存。

实时荧光定量 PCR 以西伯利亚鲟各组织和胚胎发育各个时期的 RNA 转录得到的 cDNA 为模板, 西伯利亚鲟 β -actin 作为内参基因进行实时荧光定量 PCR 试验。利用 SYBR[®] Premix Ex TaqTM (Perfect Real Time) 试剂, 使用

P7 和 P8 作为扩增 *Sox9* 特异性片段的引物, 利用 P9 和 P10 作为扩增 β -actin 的引物。扩增时均为 15 μ L 反应体系: SYBR[®] Premix Ex TaqTM 7.5 μ L, 引物各 0.3 μ L, cDNA 模板 1.5 μ L, 无菌 ddH₂O 5.4 μ L。使用美国 Bio-Rad IQ5TM 实时荧光定量监测系统, 基于三步法设置运行程序如下: 第一步 95 °C 10 min, 第二步进入 PCR 循环反应, 反应条件为 95 °C 10 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s, 运行 40 个循环, 且每一次在 72 °C 的时候开始采集荧光信号。第三步绘制熔解曲线, 从 55 °C 上升到 90 °C 每次温度变化 0.5 °C, 运行 10 s 并且采集荧光信号, 检测反应特异性, 整个 PCR 过程中荧光量变化由电脑监视器实时监控并记录。试验中每个样本均做 3 个重复, 每个重复使用 5 尾鱼。后续试验数据利用 IQ5 Optical System Software (Version 2.0) 进行初步处理后, 运用 2 ^{$\Delta\Delta$ Ct} 法进行试验数据统计分析。

2 结果

2.1 RNA 提取

将提取的西伯利亚鲟成鱼各组织及胚胎发育各时期 RNA 进行电泳检测, 电泳条带显示 28S、18S 条带清晰, 说明提取的 RNA 完整性良好, 符合后续 RT-PCR、RACE 扩增以及实时荧光定量 PCR 的要求。

2.2 同源区 RT-PCR 扩增结果

用引物 P1 和 P2 进行 RT-PCR 扩增, 1% 琼脂糖凝胶电泳结果显示, 在 500 ~ 750 bp 间有一条明显的目的带, 与预期的片段长度大小相符。测序得到一个长度为 547 bp 的序列, 同时对测序结果进行 BLAST 比对, 发现该序列与施氏鲟, 尼罗罗非鱼, 河豚, 鲤的同源性分别为 97%, 90%, 83%, 81%。故可初步推测是西伯利亚鲟 *Sox9* cDNA 的部分序列。

2.3 5'RACE 及 3'RACE 结果

以通用引物 P3、P4 和 *Sox9* 基因特异性引物 P2、P8 进行巢式 RT-PCR 完成 5'端扩增, 电泳, 在 750 ~ 1 000 bp 间有一条明显的目的带, 测序后得到一个长度为 866 bp 的序列。同样以通用引物 P5 和 P6 和 *Sox9* 基因特异性引物 P1 和 P7 进行巢式 RT-PCR, 进一步完成 3'端扩增, 电泳图上可看到在 750 bp 与 1 000 bp 间有一条明显的条带,

经测序后得到一个长度为 813 bp 的序列。

2.4 序列生物信息学分析

将 RT-PCR、5'RACE、3'RACE 扩增的序列进行拼接,获得西伯利亚鲟 *Sox9* 基因 cDNA 全长序列(图 1)。经 NCBI 上的 ORFfinder 工具进行序列分析显示:西伯利亚鲟 *Sox9* cDNA 序列全长 1 409 bp,包括 20 bp 的 5'端非翻译区,307 bp 的 3'

端非翻译区以及完整的 CDS 区,在 20 bp ~1 102 bp 间存在完整的阅读框,编码 360 个氨基酸。经查找,发现该序列中存在作为 *Sox* 基因家族的调控核心区域序列 AACAAT,同时还发现在 PloyA 上游 236 bp 处存在加尾信号序列 AATAA。

GCGGATCCACAGCCTACTG

1 ATGATCAGTCGATGGAAAACTCAAAGCAGATCAGTCCGTTTTCACATTTCCCTAAAAGAAATGGAAAATAAAAATAAAAGGAACATCTTC

1 M I S R W K T Q S R S V R F D I S L K E I G N K N K R N I F

91 TCITTTATGCAAGACTATCTTGCACITTTTAAATAAAAATGAACTGATCGTGTATGCTTCGCTACAAAAATGCACATGCATTCACACATTTATI

31 S F H Q D Y L A L L N K T E S C M L R L Q K M H M Q F H N I

181 TGTACACAGAACTTTAITTTGGGGTGTTCGAAAGAAAACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATCTCACCAAGGGACTTTGACAACTTCT

61 C Y T R T I L F A G V S K K I F F F F F F K S H Q G T L T T S

271 TTGTATCCCTACTCAGCTCGAGATTGACCATTTATGCCAAATCGGGCTATCTGTTTTTTTTTTTCTACTCACCTTCGTCGATTACGAT

91 L Y P H S A R D L T I Y A K S G Y L F F F S T H L R R F T I

361 TTTCGTATGAATCTACTCGACCCCTTCATGAAGATGACAGAGGACCAGGAGAAATGCTGTCAGACGCCCCAGCCCGAGCATGTCGGAG

121 F R H N L L D P F H K H T E D Q E K C L S D A P S P S H S E

451 GATTCGCGGGGTCCTCCGTCGGTCTGGATCGGGTTCGATGCTGAGAACACCAGACCCTCGGAGAATAGCTTGTGGGACCGGACGT

151 D S A G S P C P S G S G S D A E N T R P S E N S L L G P D S

541 CAGATCCGGACTTCAAAAAAGAGGGCGATGATGACAAATCCCGTTTGCATCAGGGATGCTGTTTCCAGGTCTGAAGGGCTATGAC

181 Q H P D F K K E G D D D K F P V C I R D A V S Q V L K G Y D

631 TGGACCTCGTACCCATGCCCCGTCGGGTGAAAGGAGCAGCAAAAACAAAGCCCTACGTTAAGAGACCAGTGAATGCTTCAATGGTGTGG

211 W T L V P H P V R V N G S S K H K P H V K R P H H A F H V W

721 GCTCAGGCTGCCAGGAGAAAGCTGGCAGACCAGTACCCGCTTTCACAAAGCAGAGCTCAGCAAAACACTCGGGAACCTTTGAGATTG

241 A Q A A R R K L A D Q Y P H L H N A E L S K T L G E L W R L

811 CTCACCAAGGCGAGAAAGCTCTTTTCGTTGAAGAGGCAGAGACTGAGGGTGCAGCACAAAGAAAGATCACCCGATTACAAATACAG

271 L H E G E E R P F V E E A E R L R V Q H K K D H P D Y K Y Q

901 CCGAGGAGAGGAAGCTCAGTGAAGAACGGCAGAACGAAAGCTGAAGACGGATCTGAGCAAAAGTCACTCTCACCCACTGCGATCTTCAA

301 P R R R K S V K N G Q N E A E D G S E Q S H I S P T A I F K

991 GCGCTGCAACAGGCGGATTCCTCCCTACTCTGCGTCCAGCATGAGCGAGGTGCAATTCCTCCCGGCGAGCATTCAGGTGAGACCCGAGCAAAA

331 A L Q Q A D S P H S A S S H S E V H S P G E H S G E T A D K

1081 TAA

361 ★

TTAACAATTATGTTACATTACAAATATCTTGCATCAATCATAACGACCTTCCAAATTTTAAATAAAAAAGTAGAGTATATGCACAAACACCTCCGG

TATACAGTTTGAGCAGCACTGCAAACATAACACTTGTTCCTTCTACTTACCTATTCAAAACAAACCACAGTGGAAAATACATATCATAGCGC

AAAAGCTTGTAGGTTTTTTTTTTTCTGAAATATTTAGGTAGATAGGCTTATCCAAATAGAACTGTTTTTTTTTGTGTTTTTTTTTTTAAATTT

AAATTTCCAAAAA

图 1 西伯利亚鲟 *Sox9* cDNA 核苷酸序列和氨基酸序列

小写字母代表 3'、5'端非翻译区;大写字母部分为编码区,上面为核苷酸序列,下面为氨基酸序列;★表示终止密码子;加尾信号序列 aataa 用方框标出;AACAAT 代表 *Sox* 家族 HMG 核心识别区域;C 代表半胱氨酸。

Fig.1 The cDNA and deduced amino acid sequences of *Sox9* gene of Siberian sturgeon

3',5' untranslated regions are shown as lowercases; Coding region is shown as uppercases; where the upper sequence indicates the nucleotide and the lower shows the amino acids; The region of putative signal peptide is underlined; Asterisk indicates stop codon, tailing signal aataa is boxed; AACAAT stands for HMG Core identification of regional of SOX family; C stands for cysteine.

对该序列运用分子进化遗传分析软件 MEGA3.0^[11] 采用邻接法 (Neighbor-Joining, NJ) 与其他物种分析 (表 2), 构建 NJ 树, 空位或缺失位点均当作配对删除 (pairwise deletion) 处理, 经分析发现西伯利亚鲟和施氏鲟作为较为古老的鱼类成为这个系统树的外群, 并与斑马鱼亲缘关系较近, 大马哈鱼与尼罗罗非鱼的关系最近, 并和鲤一起聚集成另一个亲缘分支 (图 2)。

表 2 序列分析所用的 *Sox9* 基因的来源和登录号

Tab.2 Origins and accession numbers of *Sox9* gene sequences in study

编号 code	物种 species	GenBank accession number
1	施氏鲟 <i>Acipenser schrenckii</i>	AY581214
2	鲤 <i>Cyprinus carpio</i>	AY205247
3	斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	BC093134
4	人 <i>Homo sapiens</i>	NM000346
5	家鼠 <i>Mus musculus</i>	NM011448
6	大马哈鱼 <i>Oncorhynchus keta</i>	AY627282
7	虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i>	NM001124270
8	尼罗罗非鱼 <i>Oreochromis niloticus</i>	DQ632575
9	孔雀鱼 <i>Poecilia reticulata</i>	DQ683727

在分析其序列编码的氨基酸时, 发现其存在 5 个半胱氨酸, 因此, 该蛋白中可能形成若干二硫键结构。利用 ExPASy Proteomics Server 上的 ProtParam 工具分析该序列编码蛋白的理化性质,

推测该蛋白的分子式为 $C_{1817}H_{2829}N_{521}O_{540}S_{19}$, 相对分子质量为 41 221.7, 等电点为 9.37, 理论半衰期大于 10 h, 不稳定参数为 66.83, 属于不稳定蛋白。同时, 利用 <http://www.umass.edu/microbio/rasmol/> 提供的 Rasmol 软件对该序列编码蛋白质的三维结构进行预测 (图 3), 发现该蛋白质具有 3 个 α 螺旋和 4 个 β 折叠。利用 Pfam 在线氨基酸序列分析发现从第 230 位氨基酸开始到第 298 位氨基酸结束共 69 个氨基酸编码其作为 *Sox* 家族最核心的 HMG 区域。同时其与鼠 *Sox9* 蛋白同源区 (DOI: 10.2210/pdb1wz6/pdb) 相比具极为相似的三维结构。

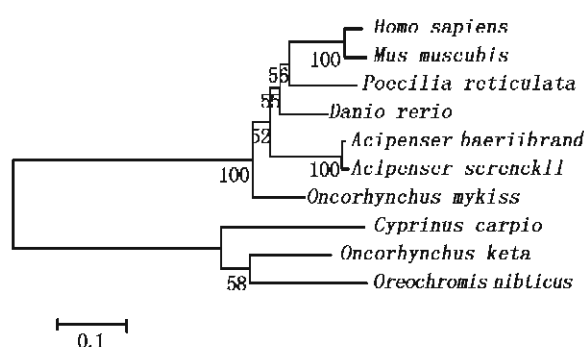


图 2 MEGA 3.0 构建系统树, NJ 树, Bootstrip 100 次

Fig.2 Construction system tree by MEGA 3.0
NJ tree, Bootstrip 100 times



图 3 西伯利亚鲟 (左) 和鼠 (右) *Sox9* 蛋白质三维结构图

Fig.3 Three-dimensional structure models of *Sox9* protein of Siberian sturgeon (left) and Murine bobby (right)

2.5 实时荧光定量 PCR 分析

运用实时荧光定量 PCR 技术,得出西伯利亚鲟 *Sox9* 基因虽在各组织中都有表达(图 4),但表达具明显的组织差异性和时间差异性。其中,在肝、肾、肌肉中的表达量相均对较低,且差别不大。在胰脏当中 *Sox9* 的相对表达量仅比以上四个组织略高,达到表达量最低点肾脏中的 2.4 倍。在大脑组织中,*Sox9* 基因的相对表达量是所有组织当中最高的,是表达量最低点肾脏中的近 21 倍,是胰脏中相对表达量的 8.9 倍。在胚胎发育的不同阶段,*Sox9* 基因也均有表达(图 5)。在原肠期、神经胚期及视泡形成期,*Sox9* 基因的 mRNA 相对表达量均较高,特别是在原肠期,其相对表达量达到西伯利亚鲟胚胎发育各时期的最高点,相当于表达量最低点心脏形成期的 1.9 倍。在神经胚期和视泡形成期,*Sox9* 的相对表达量也处于相对较高的水平,仅比原肠期略低,其相对表达量是心脏形成期的 1.2 倍和 1.4 倍。

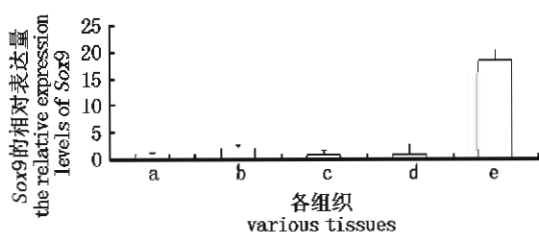


图 4 西伯利亚鲟 *Sox9* 基因在成鱼各组织相对表达量 a-e 依次为肝、胰、肾、肌肉、脑。

Fig. 4 The relative expression levels of Siberian sturgeon *Sox9* gene in various tissues

a-e: followed by liver, pancreas, kidney, muscle, brain.

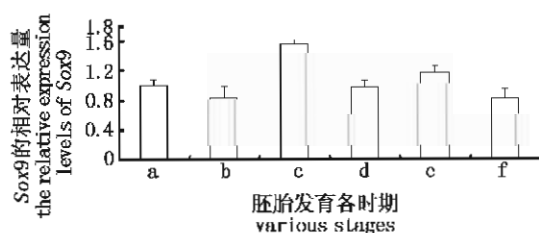


图 5 西伯利亚鲟 *Sox9* 基因在胚胎发育各时期相对表达量

a-f 依次为依次为受精卵期、囊胚期、原肠期、神经胚期、视泡形成期、心脏形成期。

Fig. 5 The relative expression levels of Siberian sturgeon *Sox9* gene in various stages

a-f: followed by fertilized egg, blastula stage, gastrula stage, neurula stage, formation of visual bubble, formation of heart.

3 讨论

本研究成功地用 RACE 法从西伯利亚鲟当中克隆出 *Sox9* 基因 cDNA 全长,该 cDNA 全长为 1 409 bp,编码 360 个氨基酸。序列分析及同源性分析表明该基因与其它动物有较高的相似度,特别是与其它大多数鱼类的相似性均在 80% 以上,说明该基因具有较强的保守性,也表明该基因在脊椎动物生命活动中所起的不可替代的重要作用。已经有大量研究表明,*Sox9* 基因在性别决定,软骨发育等起着极为重要作用^[12-13]。近来,该基因在神经系统分化和发育中所起的作用受到了各学者的重视,有研究表明 *Sox9* 基因在非洲爪蟾、鼠 (*Mus musculus*) 和鸡 (*Gallus gallus*) 的神经节前体细胞中表达,特别是在非洲爪蟾胚胎中,敲除 *Sox9* 基因会使多数神经节细胞发育相关的标志性基因不表达^[14-15],造成躯干神经节细胞大量死亡^[16]。同时还检测到 *Sox9* 基因是爪蟾神经节前体细胞中最早被激活的基因之一^[17]。*Sox9* 也被当做斑马鱼神经节前体细胞迁移的标志性基因,该基因在斑马鱼神经节前体细胞的后续迁移过程当中表达,并起重要作用^[18]。

分子进化分析表明,*Sox9* 基因与施氏鲟 (*Acipenser schrenckii*),虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*),斑马鱼的亲缘关系较近,与人、猴的亲缘关系也不远。进化生物学研究表明 *Sox9* 基因可能在 4.5 亿年前就已存在,在硬骨鱼这一鱼类分支形成之前。正由于在该基因翻译的转录因子蛋白的作用下,调控了诸如性别决定,软骨生成,神经系统发育、分化等一系列生命过程,所以千百年来该基因作为调控下游基因表达的关键性区域,并未发生根本性的变化^[19-20]。西伯利亚鲟 *Sox9* 基因所编码的转录因子蛋白在大多数情况下表达量较少且分子量较小,常与其他转录因子或配体蛋白形成复合体调控靶基因的表达,通常情况下以序列特异的方式识别结合于 WWCAAWG(其中 W 为 A 或 T)序列,使靶 DNA 发生弯曲,以非序列特异方式与十字架形的 DNA 结合^[21]。

Sox9 基因的表达不仅局限于某种特定组织或某一特定时期。有学者通过 Northern Blots 检测 *Sox9* 基因在成人和胎儿不同组织中的表达情况,结果显示 *Sox9* 基因在成人的大脑、胎盘、肝

脏、骨骼肌、肾脏、胰脏等组织中都有表达,在胎儿大脑、肝脏和肾脏中也有表达^[22]。本研究中发现西伯利亚鲟 *Sox9* 基因在成鱼中不同组织都有一定表达,在肝,肌肉,胰中的表达量相对较高且差别不大,而在肾脏中的表达量则相对较低,仅相当于脑中相对表达量的 5%,这也与在非洲爪蟾的研究当中得到的结论相似。在大脑中的大量表达究其原因可能与 *Sox9* 调控神经的发育、增殖有关,有文献报道该基因是调控颅神经节发育过程信号通路中一个重要的组成部分^[6]。同时本研究检测 *Sox9* 基因的表达也贯穿西伯利亚鲟胚胎发育整个过程,这点同鸡胚中研究得到的结论相同,*Sox9* 基因几乎在鸡胚发育各阶段都有一定表达,特别是在鸡胚发育的第 10 到第 18 阶段之间,表达量相对较高,在胚胎发育的 48 h 后即第 18 到第 20 阶段间 *Sox9* 的相对表达量达到一个高峰,由此推测在该时期,*Sox9* 的高水平表达是为启动 BMP4 信号通路从而进一步调控神经节细胞的迁移^[23]。本研究检测到 *Sox9* 在原肠期和神经胚期相对表达量相对较高,其原因可能是在原肠期 *Sox9* 的大量表达为西伯利亚鲟胚胎后续细胞分化、迁移、神经基板的形成等做准备;而在神经胚期,*Sox9* 的大量表达可能为后续神经板的特化做准备。已有研究表明脊椎动物胚胎发育过程中神经胚期胚胎外胚层增厚形成上皮型神经板,神经板两侧隆起形成神经褶,随后神经褶两侧向背中线合拢并愈合形成神经管。神经管的闭合是脑和脊髓正常发育的前提,这一发育过程异常则会导致神经管缺陷(neural tube defect, NTD)^[24]。在视泡形成期的其相对表达量也较高,可能因该时期神经基板和神经细胞迁移活动频繁。已经有研究表明 *Sox9* 在小鼠视网膜米勒胶质细胞的分化发育当中起着重要作用;同时还有研究表明在非洲爪蟾发育过程中眼的区域检测到了 *Sox9* 的表达;同时,在斑马鱼胚胎发育过程中也得到了类似结果,在眼部位检测到 *Sox9* 的表达异常活跃^[10,16,20]。

克隆 *Sox9* 基因对于揭示高等动物中 *Sox9* 基因的进化历程,研究该基因的功能,阐明高等动物的发育机制具有重要的理论和实践意义。本研究克隆出西伯利亚鲟 *Sox9* 基因 cDNA 全长,分析了其序列特征和分子进化特点,并通过实时荧光定量测定了其在各组织及胚胎发育不同时期

的相对表达量,这为后续进一步深入研究该基因的功能及探究该基因在西伯利亚鲟侧线神经节发育、分化调控信号通路中的位置打下基础。

参考文献:

- [1] 孟庆闻,缪学祖,俞泰济,等. 鱼类学[形态·分类][M]. 上海:上海科学技术出版社,1989:147-150.
- [2] Bowles J, Schepers G, Koopman P. Phylogeny of the *Sox* family of developmental transcription factors based on sequence and structural indicators [J]. *Dev Biol*, 2000, 227(2): 239-255.
- [3] 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.
- [4] 曹丽萍,俞菊华,殷国俊,等. 奥利亚罗非鱼 *Sox9* 基因 cDNA 全长的克隆及分析[J]. 上海海洋大学学报, 2008, 17(1): 6-11.
- [5] 俞菊华,李建林,曹丽萍,等. 黄颡鱼 *Sox9* 基因的分离及分析[J]. 农业生物技术学报, 2005, 13(5): 620-623.
- [6] 刘利,郭一清,周荣家. 黄鳝 *Sox9* 基因的克隆及其鉴定分析[J]. 遗传学报, 2001, 18(6): 535-539.
- [7] 周林燕,张修月,王德寿. 脊椎动物性别决定和分化的分子机制研究进展[J]. 动物学研究, 2004, 25(1): 81-88.
- [8] Shoemaker C M, Crews D. Analyzing the coordinated gene network underlying temperature-dependent sex determination in reptiles [J]. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2009, 20(3): 293-303.
- [9] Essex L J, Mayor R, Sargent M G. Expression of *Xenopus* snail in mesoderm and prospective neural fold ectoderm [J]. *Dev Dyn*, 1993, 198(2): 108-122.
- [10] Yan Y L, Willoughby J, Liu D. A pair of *Sox*: distinct and overlapping functions of zebra? sh *Sox9* co-orthologs in craniofacial and pectoral fin development [J]. *Development*, 2005, 132(5): 1069-1083.
- [11] Martin Cheung, James Briscoe. Neural crest development is regulated by the transcription factor *Sox9* [J]. *Development*, 2003, 130(23): 5681-5693.
- [12] 刘洪柏,宋苏祥,孙大江,等. 施氏鲟的胚胎及胚后发育研究[J]. 中国水产科学, 2000, 7(3): 3-10.
- [13] Kumar S, Dudley J, Nei M, et al. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software [J].

- Bioinformatics,2001,17(12):1244-1245.
- [14] Bergstrom D E, Young M, Albrecht K H, *et al.* Related function of mouse *Sox3*, *Sox9*, and SRY HMG domains assayed by male sex determination [J]. *Genesis*,2000,28(3-4):111-124.
- [15] Mertin S,Harley V R,McDowall S G. The DNA-binding specificity of *Sox9* and other Sox proteins [J]. *Nucleic Acids Research*,1999,27(5):1359-1364.
- [16] Spokony R F, Aoki Y, Saint G N, *et al.* The transcription factor *Sox9* is required for cranial neural crest development in *Xenopus* [J]. *Development*, 2002,129(2):421-432.
- [17] Hong C S, Pierre J, Jeannot S. *Sox* proteins and neural crest development [J]. *Seminars in Cell & Developmental Biology*,2005,16(6):694-703.
- [18] Cheung M, Chaboissier M C, Mynett A, *et al.* The transcriptional control of trunk neural crest induction, survival and delamination [J]. *Dev Cell*, 2005, 8(2): 179-192.
- [19] Mayor R, Morgan R, Sargent M G. Induction of the prospective neural crest of *Xenopus* [J]. *Development*,1995,121(3):767-777.
- [20] Muto A, Iida A, Satoh S. The group E *Sox* genes *Sox8* and *Sox9* are regulated by Notch signaling and are required for Muller glial cell development in mouse retina [J]. *Experimental Eye Research*,2009, 89(4):549-558.
- [21] Koopman P, Schepers G, Brenner S, *et al.* Origin and diversity of the *Sox* transcription factor gene family: genome-wide analysis in *Fugu rubripes* [J]. *Gene*, 2004,328(17):177-186.
- [22] Wegner M. From head to toes: The multiple facets of *Sox* proteins [J]. *Nucleic acids research*,1999,27(6):1409-1420.
- [23] Wagner T. Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene *Sox9* [J]. *Cell*,1994,79(6):1111-1120.
- [24] Jeffrey A, Golden M D, Chernoff G F. Intermittent pattern of neural tube closure in two strains of mice [J]. *Teratology*,1993,7(1):73-80.

Cloning, analysis and expression detection of the full-length cDNA of *Sox9* from the Siberian sturgeon (*Acipenser baerii* Brandt)

SHI Zhi-yi*, CHENG Qian-qian, SONG Jia-kun, XUAN Xing-rong
(College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: In order to further research the role of *Sox9* in the development of the Siberian sturgeon (*Acipenser baerii* Brandt)'s lateral line neuromast, the full-length *Sox9* cDNA of Siberian sturgeon had been successfully cloned by RT-PCR and rapid amplification of cDNA ends (RACE) methods. The full-length *Sox9* cDNA of Siberian sturgeon had 1 409 bp, which consisted of a 1 083 bp open reading frame (ORF) encoding 360 amino acids, a 19 bp 5' untranslated region (5'UTR) and a 307 bp 3' untranslated region (3'UTR). The molecular weight of this mature peptide was estimated to be 41 221.7U. Neighbor-Joining (NJ) method had been used for multiple alignment analyses, and Siberian sturgeon was closest to Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*). The Siberian sturgeon's *Sox9* gene was highly conservative to other species. These results were much similar to other studies that had already been done in blue tilapia (*Oreochromis aurea*), yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) and swamp eel (*Monopterus albus*). Meanwhile, in order to study the connection between the feature of the expression of the *Sox9* to the development of the Siberian sturgeon's lateral line neuromast, the fluorescent quantitative RT-PCR analysis was used for detecting *Sox9* relative expression levels in the different tissues and different embryonic development stages. *Sox9* had relatively low expression levels in liver, pancreas, kidney and muscle. However, in the brain, *Sox9* had very high expression levels, and the relative expression levels of the brain reached 8.9 times the quantity of the relative expression in the pancreas and 21 times the quantity of the relative expression in the kidney. In the different stages of the Siberian sturgeon embryonic development, *Sox9* expression had different relative expression levels. Its relative expression had no major differences and reached relatively high in gastrula stage, neurula stage and formation of visual bubble. Especially in the gastrula stage and neurula stage, *Sox9* relative expression reached 1.2 times and 1.4 times the quantity of formation of heart. All of these results were nearly same as the researches of zebrafish (*Danio rerio*), chicken (*Gallus gallus*) and mouse (*Mus musculus*). At the same time, the expression features showed *Sox9* might play a very important role in the development of the neuromast of the Siberian sturgeon which had already been found in the development processes of the zebrafish neuromast. This research will lay a foundation for the future study on the role of Siberian sturgeon's *Sox9* gene in the differentiation of lateral line ganglion development, cells migration processes and so on. At the same time, the study on the role of the *Sox9* in the cell signaling pathway of the development of the Siberian sturgeon's lateral line neuromast is required too.

Key words: *Acipenser baerii* Brandt; *Sox9*; full-length of cDNA; rapid amplification of cDNA ends (RACE); detection of expression

Corresponding author: SHI Zhi-yi. E-mail: zyshi@shou.edu.cn