

文章编号: 1674-5566(2019)06-0835-13

DOI:10.12024/jsou.20181202462

## 暗纹东方鲀 *sox9* 基因的克隆和组织表达分析

高莹莹<sup>1,2,3</sup>, 刘新富<sup>2,3</sup>, 胡鹏<sup>4</sup>, 刘滨<sup>2,3</sup>, 郭正龙<sup>5</sup>

(1. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306; 2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室, 山东 青岛 266071; 3. 青岛市鱼类种子工程与生物技术重点实验室, 山东 青岛 266071; 4. 内江师范学院, 四川 内江 641100; 5. 江苏中洋集团股份有限公司, 江苏 海安 226600)

**摘要:** 为初步探究暗纹东方鲀 *sox9* 基因在性腺发育和性别分化过程中的作用, 通过设计兼并引物、RACE 及荧光定量 PCR 技术, 成功克隆出暗纹东方鲀 *sox9* 基因的 cDNA 全长序列, 并分析其相应的生物信息学特征及其在雌雄个体的组织表达水平。结果表明: *sox9a* 基因 cDNA 全长为 1 248 bp (NCBI 登录号: MH218818), 包括 684 bp 的 ORF, 编码 227 个氨基酸, 297 bp 的 5'UTR 和 267 bp 的 3'UTR。 *sox9b* 基因全长为 1 941 bp (NCBI 登录号: MH218819), 包括 1 470 bp 的 ORF, 编码 489 个氨基酸, 306 bp 的 5'UTR 和 165 bp 的 3'UTR。同源性和系统发育分析结果表明暗纹东方鲀 *sox9* 基因与红鳍东方鲀同源性最高, 亲缘关系最近。氨基酸多重序列比对结果显示两个 *Sox9* 氨基酸序列的 HMG box 结构域在哺乳动物和鱼类中均高度保守。荧光定量 PCR 分析显示两个 *sox9* 基因普遍存在于雌鱼和雄鱼的各个组织中, 且均在雌鱼下丘脑中表达量最高, 在精巢中有少量表达, 卵巢中几乎不表达。总体来说, 除少数组织外, 两个 *sox9* 基因在雌鱼组织中的表达量普遍高于雄鱼。本研究为了解暗纹东方鲀 *sox9* 的遗传特性及相关的生理功能, 探索性别分化与性腺发育的分子调控机制提供理论依据。

**关键词:** 暗纹东方鲀; *sox9* 基因; cDNA 克隆; 生物信息学; 组织表达

**中图分类号:** S 917.4; Q 786 **文献标志码:** A

暗纹东方鲀 (*Takifugu obscurus*) 又名河鲀, 是我国长江中下游地区重要淡水养殖种类, 其营养价值丰富、肉质鲜美, 蛋白质和维生素以及硒、锌等微量元素含量丰富, 且脂肪含量低, 被称为“鱼中极品”<sup>[1-2]</sup>, 过去因受国内市场禁止销售的限制, 养殖产量多年以来一直在 1 万 ~ 2 万 t 范围内波动<sup>[3]</sup>。2016 年 9 月农业部办公厅和国家食品药品监督管理总局联合发布《关于有条件放开养殖红鳍东方鲀和养殖暗纹东方鲀加工经营的通知》<sup>[4]</sup>, 解除了暗纹东方鲀不准市场流通的禁令, 为暗纹东方鲀产业的二次创业和可持续发展提供了新的契机。暗纹东方鲀在 2.5 龄前雄鱼体质量生长速度大于雌鱼<sup>[5]</sup>, 且雄鱼组织的毒素量很低, 精巢营养价值高, 富含脱氧核糖核酸、鱼精蛋白和微量元素 Se 和 Zn<sup>[6]</sup>, 被认为是难得的珍贵食材, 有“西施乳”的美誉。一对精巢的价值

甚至超过雄鱼本身, 养殖全雄苗种的利润是养殖普通苗种的 1.5 倍以上。因此, 生产和养殖全雄暗纹东方鲀, 可以大幅度提高我国暗纹东方鲀的养殖经济效益。但遗憾的是, 目前有关暗纹东方鲀的性别调控机制及其性控技术的研究还较少。雄性哺乳动物的性别决定区域 (sex-determining region of Y chromosome, SRY)<sup>[7]</sup> 编码的蛋白质包含一个高度保守的区域, 称为高泳动组盒基序 (high mobility group box motif, HMG box motif), 属于高速泳动族类非组蛋白, 并且通过与 DNA 特异性结合来调控下游基因的表达<sup>[7-8]</sup>。 *sox* 基因是指与性别决定基因 SRY 相关的 HMG box 序列相似性大于 60% 的一系列基因<sup>[9-10]</sup>, 而 *sox9* 是 *sox* 基因家族 E 亚族的一员, 主要参与骨骼、神经系统和胰腺的发育以及肿瘤的形成等过程, 特别是在性别决定和分化过程中起着重要的调控作

收稿日期: 2018-12-07 修回日期: 2019-04-28

基金项目: 国家重点研发计划 (2017YFB0404001)

作者简介: 高莹莹 (1993—), 女, 硕士研究生, 研究方向为海水鱼类性控育种。E-mail: lshyy0419@163.com

通信作者: 刘滨, E-mail: liubin@ysfri.ac.cn

用<sup>[11-15]</sup>,在大鼠中,若 *sox9* 基因缺失会导致个体发生从雄性到雌性的性别逆转,同时 *sox9* 基因过表达则会导制 XX 雌性个体向雄性方向发育<sup>[16-18]</sup>。*sox9* 基因分为 *sox9a* 和 *sox9b* 两种类型,据报道,已经在斑马鱼 (*Danio rerio*)<sup>[19]</sup>、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)<sup>[20]</sup>、黄颡鱼 (*Pelteobagrus fulvidraco*)<sup>[21]</sup>、黄鳝 (*Monopterus albus*)<sup>[22]</sup>、鲤 (*Cyprinus carpio*)<sup>[23]</sup>、半滑舌鳎 (*Cynoglossus semilaevis*)<sup>[24]</sup> 和孔雀花鲈 (*Poecilia reticulata*)<sup>[25]</sup> 等鱼类中成功分离并克隆到 *sox9a* 或 *sox9b* 基因。证实了 *sox9* 基因在性别分化和性腺发育过程中发挥着重要的作用。在此基础上,本实验以暗纹东方鲀为研究对象,克隆 *sox9* 基因的 cDNA 全长序列,分析该基因的序列结构、相关生物信息学特征以及不同组织中的表达情况,为暗纹东方鲀 *sox9* 基因的遗传特性及相关生理功能的研究奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

暗纹东方鲀样本购自江苏省南通市中洋集团股份有限公司,选取雌鱼和雄鱼各 3 尾,体长为 14.2 ~ 15.5 cm,体质量为 150 ~ 200 g,分别剖取下丘脑、脑、垂体、性腺、心脏、肝脏、胆、胃、肠、肌肉、眼等组织,置于 RNA Store 保存液中, -20 °C 冷冻保存。

### 1.2 *sox9a* 和 *sox9b* 基因全长序列的克隆

采用 MiniBEST Universal RNA Extraction Kit (TaKaRa, 大连) 提取精巢组织总 RNA, 通过 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 完整性, 超微量分光光度计测定总 RNA 浓度。按照 SMARTer<sup>®</sup> RACE5'/3'Kit User Manual (Clontech, 美国) 说明书合成 cDNA 第一链。

根据已知河豚属鱼类的保守序列, 利用 DNAMAN 软件设计扩增引物 *sox9a*-F1/R1 和 *sox9b*-F1/R1 (表 1), 以合成的 cDNA 第一链为模板进行 *sox9a* 和 *sox9b* 基因保守片段的扩增, PCR 反应程序: 95 °C 预变性 5 min; 94 °C 30 s, 58 °C 40 s, 72 °C 40 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min; 4 °C 保存。PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测后, 送至上海生工生物工程有限公司测序。

根据获得的保守片段序列设计特异性引物

*sox9a*-F2、*sox9a*-F3、*sox9b*-F2、*sox9b*-F3 (3'-RACE) 和 *sox9a*-R2、*sox9a*-R3、*sox9b*-R2、*sox9b*-R3 (5'-RACE, 表 1), 用于 RACE 扩增 *sox9a* 和 *sox9b* 基因 cDNA 全长序列。使用 SMART RACE 试剂盒 (TaKaRa) 进行 5'-RACE 和 3'-RACE 的半巢式 PCR 扩增。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测后, 对目的条带切胶后进行纯化回收。切胶回收的 PCR 产物与 pEASY-T3 载体 (全式金生物, 北京) 连接, 采用热激法将 5 μL 连接产物转化至 20 μL Trans1-T1 感受态细胞 (全式金生物, 北京), 37 °C 过夜培养, 挑取单一克隆菌落。经 PCR 鉴定后, 送至上海生工生物工程有限公司测序。

采用 DNASTAR 软件将 5'-RACE、保守片段和 3'-RACE 的测序结果进行拼接, 获得暗纹东方鲀 *sox9a* 和 *sox9b* 基因的 cDNA 全长序列。同时将克隆的基因 cDNA 全长序列与暗纹东方鲀不同发育期性腺组织转录组测序的序列比较后发现一致, 证明克隆获得的 *sox9* 基因 cDNA 全长序列准确可靠。

### 1.3 *sox9a* 和 *sox9b* 基因的表达分析

取适量暗纹东方鲀雌鱼和雄鱼各组织, 提取总 RNA, 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 完整性, NanoDrop 2000 测定总 RNA 浓度。以暗纹东方鲀雌鱼和雄鱼提取的不同组织总 RNA 为模板, 按照 PrimeScript<sup>™</sup> RT reagent Kit with gDNA Eraser (TaKaRa, 大连) 说明书合成 cDNA 第一链。

根据已获得的 *sox9a* 和 *sox9b* 基因序列, 采用 DNAMAN 设计特异性引物 *sox9a*-F/R 和 *sox9b*-F/R (表 1), 以暗纹东方鲀雌鱼和雄鱼不同组织的 cDNA 第一链为模板, 以  $\beta$ -actin 为内参基因, 采用 Real-Time PCR 方法在 Line Gene 9600 型实时荧光定量 PCR 仪 (博日, 杭州) 上检测 *sox9a* 和 *sox9b* 基因在暗纹东方鲀不同组织中的相对表达量。反应程序: 94 °C 30 s; 94 °C 5 s, 55 °C 34 s, 40 个循环; 95 °C 15 s; 60 °C 1 min; 95 °C 15 s。每个实验样品设置 3 个重复, 实验步骤参考 SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> 试剂盒 (TaKaRa, 大连) 操作说明。

实时荧光定量 PCR 获得一系列 Ct 值, 数据分析采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法, 用 SPSS 16.0 软件进行数据的统计分析, 分析方法为单因素方差, 即当  $P < 0.05$  时为差异显著, 结果表示为平均值  $\pm$  标准误。

表 1 暗纹东方鲀 *sox9a* 和 *sox9b* 基因克隆和相对表达定量引物Tab.1 Cloning and relative expression quantitative primers of *sox9a* and *sox9b* genes in *T. obscurus*

引物 Primer	引物序列(5'-3') Primer sequence	扩增序列长度 Length of sequence/bp	用途 Purpose
<i>sox9a</i> -F1	AGTTCCTCCGTGTCATCAG	523	扩增核心片段 amplification of core fragments
<i>sox9a</i> -R1	TCCGTCCTGGGACTGGTC		
<i>sox9b</i> -F1	ATGCCGTGTCCAGGTCC	582	
<i>sox9b</i> -R1	TGAGCTGAACGTCCTCCGG		
<i>sox9a</i> -F2 (3'-RACE)	GTGCTGAAGGGCTACGACTGGACGCTGG	1 222	3'-RACE 第一轮 first round
<i>sox9a</i> -F3 (3'-RACE)	AACTCTGGGCAAACCTCTGGA	1 048	3'-RACE 第二轮 second round
<i>sox9b</i> -F2 (3'-RACE)	CGTGTCCCAGGTCCTCAAAGGCTACGAC	1 246	3'-RACE 第一轮 first round
<i>sox9b</i> -F3 (3'-RACE)	ACGATGGCCCCGGAGGACGTTACGTC	695	3'-RACE 第二轮 second round
<i>sox9a</i> -R2 (5'-RACE)	TCCGTCCTGGGACTGGTC	722	5'-RACE 第一轮 first round
<i>sox9a</i> -R3 (5'-RACE)	GCCTCGGCTGTTACTGTAG	529	5'-RACE 第二轮 second round
<i>sox9b</i> -R2 (5'-RACE)	TGAGCTGAACGTCCTCCGG	802	5'-RACE 第一轮 first round
<i>sox9b</i> -R3 (5'-RACE)	GCCTCGGCTGTTACTGTAG	529	5'-RACE 第二轮 second round
<i>sox9a</i> -F (qRT)	AACTCTGGGCAAACCTCTGGA	122	荧光定量 PCR
<i>sox9a</i> -R (qRT)	GCCTCGGCTGTTACTGTAG		
<i>sox9b</i> -F (qRT)	GAACTCTGGGCAAACCTCTGGA	122	
<i>sox9b</i> -R (qRT)	GCCTCGGCTGTTACTGTAG		
$\beta$ -actin F (qRT)	CAGGGAGAAGATGACCCAGA	128	real-time PCR
$\beta$ -actin R (qRT)	CATCACCAGACTCCATGACC		

#### 1.4 生物信息学分析

将拼接的暗纹东方鲀 *sox9a* 和 *sox9b* 基因的全长序列在 NCBI 数据库中进行 BLAST 比对,推断其开放阅读框序列并进行同源性分析;使用 DNAMAN 软件进行编码蛋白质的氨基酸多重序列比对分析;利用 MEGA 5.1 软件构建基于邻位相接法(NJ法)的系统进化树,并采用 1 000 次自举检验分析(bootstrap analysis)评估进化树分支节点的置信度。

借助 ExPASy ProtParam 工具推断两个 Sox9 蛋白质的基本理化性质,包括蛋白质的相对分子量、等电点、氨基酸组成和总平均亲水性等;使用 NetPhos 3.1 Server 程序预测磷酸化位点;使用 NetNGlyc 1.0 程序预测糖基化位点;利用 SMART 和 PROSITE 工具分别分析氨基酸序列的保守结构域及其功能域位点;借助 SOPMA 工具分别预测 Sox9a 和 Sox9b 蛋白质的二级结构;使用 ExPASy ProtScale 程序分析两个 Sox9 蛋白质的疏水性;采用 SignalP 4.1 预测信号肽剪切位点;采用 PSORT II Prediction 工具定位蛋白质的亚细胞;利用 TMHMM Server 2.0 程序分析跨膜区;借助 SWISS-MODEL 工具分别预测 Sox9a 和 Sox9b 蛋白质的三级结构。

## 2 结果与分析

### 2.1 暗纹东方鲀 *sox9a* 和 *sox9b* 基因克隆与序列特征

暗纹东方鲀 *sox9a* 基因 cDNA 序列全长 1 248 bp(不含多聚腺苷酸尾),包括 5'非编码区 297 bp,3'非编码区 267 bp(不含多聚腺苷酸尾),开放阅读框 684 bp,编码 227 个氨基酸。*sox9b* 基因 cDNA 序列全长为 1 941 bp(不含多聚腺苷酸尾),包括 5'非编码区 306 bp,3'非编码区 165 bp(不含多聚腺苷酸尾),开放阅读框 1 470 bp,编码 489 个氨基酸。

Sox9a 蛋白相对分子量为 25.66 ku,等电点为 6.56,蛋白分子式为  $C_{1112}H_{1747}N_{331}O_{351}S_9$ ;成熟蛋白质中含有 34 个带负电荷的酸性氨基酸(Asp + Glu)和 32 个带正电荷的碱性氨基酸(Arg + Lys)。推导出的氨基酸序列包括 16 个丝氨酸(Ser)、4 个苏氨酸(Thr)和 3 个酪氨酸(Tyr)等蛋白激酶磷酸化位点,1 个 N-糖基化位点,1 个 Pfam 结构域(11~93 位),1 个 HMG 盒结构域(103~173 位),见图 1a。二级结构中  $\alpha$ -螺旋(h)占 36.56%, $\beta$ -折叠(e)占 3.52%, $\beta$ -转角(t)占 6.17%,无规卷曲(c)占 53.74%。而 Sox9b 蛋白

相对分子量为 53.74 ku,等电点为 5.90,蛋白分子式为 C<sub>2331</sub>H<sub>3599</sub>N<sub>675</sub>O<sub>767</sub>S<sub>12</sub>,成熟蛋白质中含有带负电荷的酸性氨基酸(Asp + Glu)和带正电荷的碱性氨基酸(Arg + Lys)分别为 56 和 45 个。推导出的氨基酸序列包括 49 个丝氨酸、13 个苏氨酸和 9 个酪氨酸等蛋白激酶磷酸化位点,3 个 N-糖基化位点,1 个 Pfam 结构域(22 ~ 93 位),1 个 HMG 盒结构域(103 ~ 173 位)和 1 个低复杂度区保守结构域(231 ~ 243 位,见图 1b)。二级结构中 α-螺旋(h)占 19.43%,β-折叠(e)占 6.54%,β-转角(t)占 1.43%,无规卷曲(c)占 72.60%,这种二级结构组成可使得 Sox9b 蛋白质构象多样化,从而决定了 Sox9b 蛋白质功能的多样性。

Sox9a 和 Sox9b 蛋白质均属于不稳定的亲水性蛋白,存在信号肽剪切位点的概率分别仅为 0.1 和 0.101,因此推断两个 Sox9 蛋白质均不存在信号肽结构。亚细胞定位分析结果发现,Sox9a 和 Sox9b 蛋白质定位于细胞核、细胞质、线粒体和内质网的概率为 60.9%、26.1%、8.7% 和 4.3%,由此可推测两个 Sox9 蛋白质最有可能定位于细胞核,其次为细胞质。跨膜区分析结果显示,Sox9a 蛋白和 Sox9b 蛋白均没有跨膜结构域,而且氨基酸均位于胞外,由此可推断暗纹东方鲀两

个 Sox9 蛋白质可能是一种非跨膜蛋白,不发生跨膜运动。以上分析结果说明 Sox9a 和 Sox9b 蛋白均可能是一种非分泌性蛋白。除此之外,对 2 个 Sox9 蛋白进行三级结构同源建模。结果显示,Sox9a 蛋白三级结构的构型(图 2a)与 Sox9b 蛋白三级结构的构型(图 2b)相似,均包括 3 个 α 螺旋,以 L 形聚集在一起,其中螺旋 1 和 2 形成短臂,螺旋 3 和 N 末端链形成长臂。

### 2.2 暗纹东方鲀 *sox9a* 和 *sox9b* 基因同源性分析及氨基酸序列比对

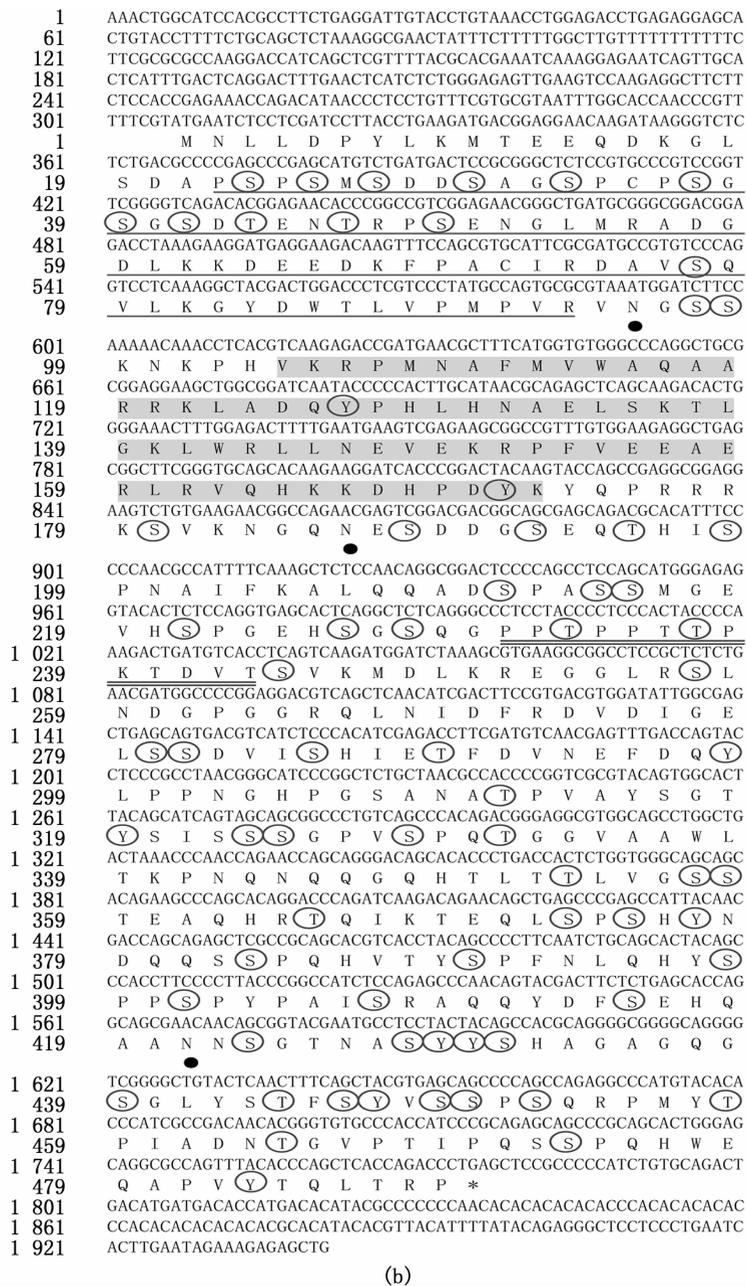
同源性分析结果显示:暗纹东方鲀 *sox9a* 与红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*, AY277964.1)、银鲫(*Carassius gibelio*, NM\_131643.1)、斑马鱼(*Danio rerio*, DQ098685.1)、金鱼(*Carassius auratus*, KP255974.1)和银鲳鱼(*Anoplopoma fimbria*, KC112918.1)等 5 种 *sox9a* 核苷酸序列的相似性分别为 99%、83%、83%、83% 和 82%;暗纹东方鲀 *sox9b* 与红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*, AY277965.1) *sox9b*、半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*, EU070762.1) *sox9*、军曹鱼(*Rachycentron canadum*, KX154794.1) *sox9*、银鲳鱼(*Anoplopoma fimbria*, KC112918.1) *sox9a*、黄鳍(*Monopterus albus*, AF378151.1) *sox9b*、青鳉(*Oryzias latipes*,

```

1 GCAGACTCTCCATCAACCCACAGAGCAGCTCGCCACTTCACATGTTCAAAGTTCAGCA
61 GAAGCGAGTCGTCGCTTGCAATCTGCTTTCGACTCTGTGAGAAGAAGAAAAAGAGACGG
121 AGCCTTGAAGATATTTTTCGACTTTTCTTCATTTTCACTTGAAGGATTCCGGGTTGC
181 CGCTCAGCTGCGCGGCTCAGCGGCTGTCACTGCAGTCTCCGGGCACATCGGTGGAATT
241 AGAAAAGGATTTTCTCCTTTTCTCTCGCAGCAGCTGTTCTCAAGGTCCTCGCATG
1 AATCTCCTCGACCCCTACCTGAAGATGACAGAAGAACAGGAGAAGTGTCACTCCGACGCT
301 N L L D P Y L K M (T) E E Q E K C H S D A
2 CCCAGCCCAGCATGTCCGAGGACTCCGCGGGCTCTCCGTGCCGTCCGGCTCCGGCTCG
361 P (S) P (S) M (S) E D (S) A G (S) P C P (S) G (S) G (S)
22 GACACTGAGAACACCAGACCGTCCGACAACCCACTCTTCTGGGTCCAGACTACAAGAAG
421 D (T) E N (T) R P (S) D N H L L L L G P D (Y) K K
42 GAGAAGCAAGAAGAGAAGTTCCTCCGTTGTCATCAGGATGCGGTGTCCAGGTGCTGAAG
481 E N E E E K F P V C I R D A V S Q V L K
62 GGCACGACTGGAGCTGGTGCCATGCCGTGCGCGTCAACGGCTCCAACAAAAATAAA
541 G Y D W T L V P M P V R V N G (S) N K N K
82
601 CCTCACGTCAAGAGACCCATGAACGCGTTCATGGTGTGGGCCAGGCTGCACGGAGGAAG
102 P H V K R P M N A F M V W A Q A A R R K
661 CTGGCCGATCAGTACCCGATCTGCACAACGCGAATGAGCAAACTCTGGCAAACTC
122 L A D Q (Y) P H L H N A E L S K T L G K L
721 TGGAGATTACTGAATGAGGTGGAGAAGCGCCGTTTCGTGGAGGAGGCAGAGCGTCTGAGG
142 W R L L N E V E K R P F V E E A E R L R
781 GTGCAGCACAAGAACCCACCCGACTACAAGTACCAAGCCGAGGCGGAGAAAATCTGTT
162 V Q H K K D H P D (Y) K Y Q P R R R K (S) V
841 AAAAAACGGCCAAAACGACCCCGAGGACGGAGAGCAAAACCCACATCTCACCAATGCCATC
182 K N G Q N D P E D G E Q (T) H I S P N A I
901 TTCAAGCGGCTGCAGCAGGCGACTCCCGAGCTCGAGTTTGGGCGAAGTTCATTCTCCA
202 F K A L Q Q A D (S) P A (S) (S) L G E V H (S) P
961 GCGCATCACTCAGGTGAGTGAACATGGATCAACGAATCCGAGCAGCGATGACGCGGATG
222 G D H (S) G E *
1 021 CTTTCTTACGATATATATTTTAAATCGGCTCAATATGACATTTTGAATTTTAC
1 081 AAGCCGTTGGCGCTTTTAGAGACACCTGTTAATTATTAATACCTGTTTTCACAAGCAAT
1 141 CGCAGAAATCCACCTGTCACTGCGCCAGCCATAAAACAATGACCACTCCCCCTTTGAGC
1 201 GTGTATTGCACTATAATGAGTCTTTAATGCCGAAATGCGTCAGTGAATAAAAAAAAAA
1 261 AAAAAAAAAAAAAA

```

(a)



(b)

起始密码子. ATG; 终止密码子. TGA(\*); 潜在的 N 糖基化位点. ●; 磷酸化位点. ○; 单下划线为 Pfam 保守结构域; 灰色阴影区为 HMG 盒结构域; 双下划线为低复杂度保守结构域

Initiation codon is ATG; Termination codon is TGA(\*); Potential N-glycosilation sites are indicated by closed black circle; Phosphorylation sites are represented by hollow circles; Pfam conservative domain is indicated by single underline; grey shadows are respectively the HMG-box domain region; Conservative domains with low complexity is indicated by double underscores

图 1 暗纹东方鲀 *sox9a* 基因 (a) 和 *sox9b* 基因 (b) cDNA 及其编码的氨基酸序列  
 Fig. 1 The cDNA sequence and deduced amino acid sequence of *sox9a* gene (a) and *sox9b* gene (b) in *T. obscurus*

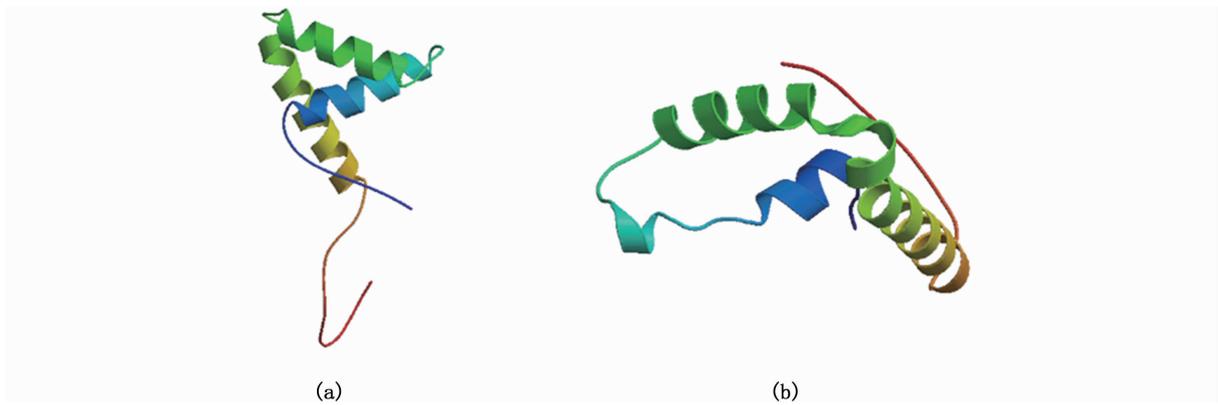


图 2 暗纹东方鲀 Sox9a (a) 和 Sox9b (b) 蛋白质的三级结构

Fig. 2 Tertiary structure of Sox9a (a) and Sox9b (b) protein in *T. obscurus*

NM\_001105085.1) *sox9*、和虹鳉 (*Oncorhynchus mykiss*, NM\_001124270.1) *sox9* 等核苷酸序列的相似性分别为 98%、86%、85%、83%、83%、81% 和 76%，同源性分析结果说明克隆得到的序列属于 Sox 家族，且与红鳍东方鲀同源性最高。氨基酸多重序列比对分析结果显示，哺乳动物或鱼类 Sox9a 和 Sox9b 氨基酸的 HMG 盒结构域均高度保守，除 148 位氨基酸残基处发生变异外其他序列完全相同，此外近 N-末端的氨基酸序列也高度保守(图 3~4)，表明这些保守区域可能与 *sox9a* 和 *sox9b* 基因生理功能的发挥有关。

### 2.3 暗纹东方鲀 Sox9a 和 Sox9b 系统进化树构建

基于邻位相接法 (neighbour-joining, NJ 法) 构建 Sox9 基因编码氨基酸序列的系统进化树，结果表明，暗纹东方鲀 Sox9 的系统进化树可分为两个大支：哺乳类和两栖类聚为一大支，所有鱼类聚为另一大支，其中鱼类这一大支又分为两个分支，暗纹东方鲀 Sox9a 和 Sox9b 的进化树分别位于不同的鱼类分支中，且均与同属的红鳍东方鲀紧密聚为一个小分支，亲缘关系最近，而与非洲

爪蟾、鼠和人等较高等脊椎动物的亲缘关系最远。这表明暗纹东方鲀 Sox9 基因的系统进化关系与传统的物种进化地位基本一致(图 5)。

### 2.4 暗纹东方鲀雌雄个体 *sox9a* 和 *sox9b* 基因的组织表达分析

#### 2.4.1 *sox9a* 基因在雌雄个体各组织中的表达分析

荧光定量 PCR 结果显示，*sox9a* 基因普遍存在于雌鱼和雄鱼的各个组织中(图 6)。比较 *sox9a* 基因在雌鱼不同组织中的表达水平，可以发现：*sox9a* 基因在雌鱼下丘脑中的表达量最高，与其他组织均有显著性差异 ( $P < 0.05$ )；除此之外，*sox9a* 基因在雌鱼脑、垂体、肝、胆、肠、肌肉、眼和胃等组织中表达水平较高。比较 *sox9a* 基因在雄鱼不同组织中的表达水平，可以发现 *sox9a* 基因在雄鱼肌肉中表达水平最高，与其他组织均有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。比较 *sox9a* 基因在雌雄个体相同组织中的表达水平，可以发现 *sox9a* 基因在雌鱼下丘脑、肝、胆、肠、眼和胃组织中的表达量明显高于雄鱼，仅在雌鱼性腺和肌肉组织中的表达量明显低于雄鱼。





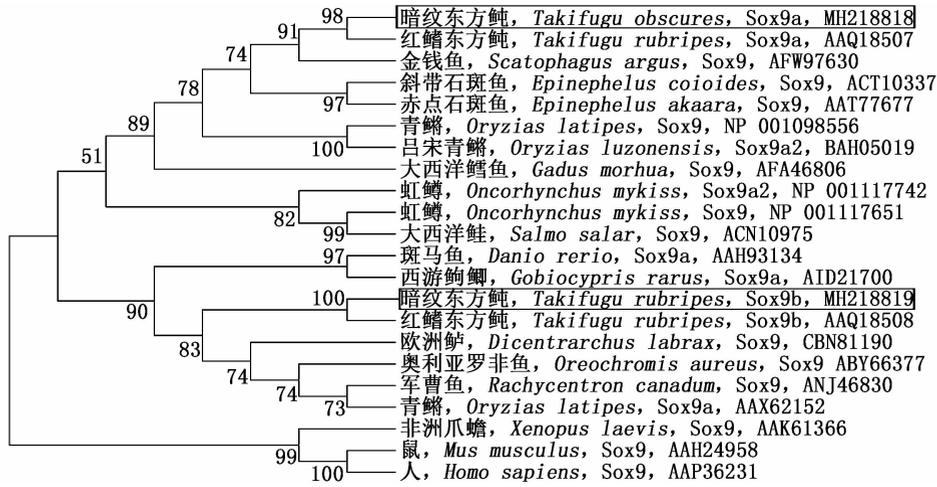
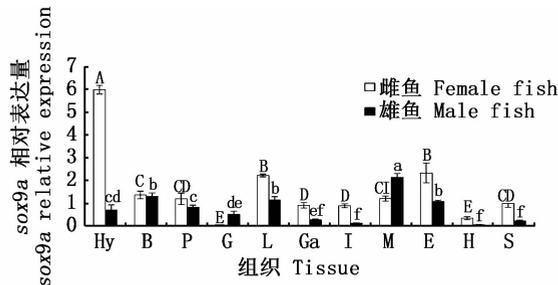


图 5 不同物种 Sox9 氨基酸序列的系统进化树

Fig. 5 Phylogenetic tree of Sox9 amino acid sequence from different species



Hy. 下丘脑; B. 脑; P. 垂体; G. 性腺; L. 肝; Ga. 胆; I. 肠; M. 肌肉; E. 眼; H. 心脏; S. 胃

雌鱼不同组织的显著性差异用大写字母表示,雄鱼不同组织的显著性差异用小写字母表示

Hy. hypothalamus; B. brain; P. pituitary; G. gonad; L. liver; Ga. gallbladder; I. intestine; M. muscle; E. eye; H. heart; S. stomach  
The significant differences of female tissues are shown in capital letters, and the significant differences in male tissues are shown in lower-case letters

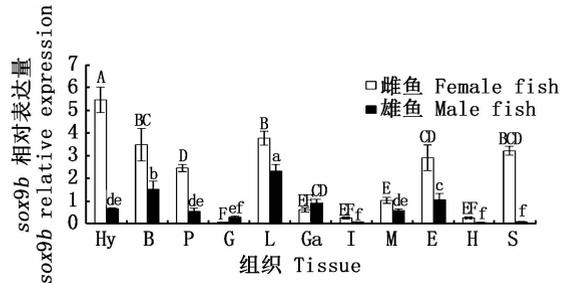
图 6 暗纹东方鲀 *sox9a* mRNA 的组织表达

Fig. 6 Expression of *sox9a* mRNA in various tissues of *T. obscurus*

### 2.4.2 *sox9b* 基因在雌雄个体组织中的表达分析

荧光定量 PCR 结果显示, *sox9b* 基因普遍存在于雌鱼和雄鱼的各个组织中(图 7)。比较 *sox9b* 基因在雌鱼不同组织中的表达水平,可以发现: *sox9b* 基因在雌鱼的下丘脑中表达量最高,与其他组织均有显著性差异( $P < 0.05$ );除此之外, *sox9b* 基因在雌鱼脑、垂体、肝、眼和胃等组织中表达水平较高。比较 *sox9b* 基因在雄鱼不同组织中

的表达水平,可以发现: *sox9b* 基因在雄鱼肝中表达水平最高,与其他组织均有显著性差异( $P < 0.05$ );除此之外, *sox9b* 基因在雄鱼下丘脑、脑、垂体、胆、肌肉和眼等组织中表达水平较高。比较 *sox9b* 基因在雌雄鱼个体相同组织中的表达水平,可以发现: *sox9b* 基因在下丘脑、脑、垂体、肝、眼和胃等组织中的表达具有明显的性别差异性,除性腺和肌肉以外的组织中,雌鱼 *sox9b* 基因的表达水平要明显高于雄鱼。



Hy. 下丘脑; B. 脑; P. 垂体; G. 性腺; L. 肝; Ga. 胆; I. 肠; M. 肌肉; E. 眼; H. 心脏; S. 胃

雌鱼不同组织的显著性差异用大写字母表示,雄鱼不同组织的显著性差异用小写字母表示

Hy. hypothalamus; B. brain; P. pituitary; G. gonad; L. liver; Ga. gallbladder; I. intestine; M. muscle; E. eye; H. heart; S. stomach  
The significant differences of female tissues are shown in capital letters, and the significant differences in male tissues are shown in lower-case letters

图 7 暗纹东方鲀 *sox9b* mRNA 的组织表达

Fig. 7 Expression of *sox9b* mRNA in various tissues of *T. obscurus*

### 3 讨论

#### 3.1 *sox9* 基因的转录形式

*sox9* 是一种含有高泳动组合基序的转录调节因子,同时也是一种与哺乳动物决定雄性性别直接相关的基因。研究表明,在鱼类基因组的进化过程中由于基因组的复制导致 *sox9* 基因内含子的剪切方式不同,从而产生多种亚型。到目前为止已报道的 *sox9* 转录形式分为两种,分别为 *sox9a* (也称为 *sox9a1*) 和 *sox9b* (也称为 *sox9a2*)。大多数鱼类主要存在 *sox9a* 和 *sox9b* 这两种亚型,如红鳍东方鲀<sup>[26]</sup>、斑马鱼<sup>[19]</sup> 和青鳉<sup>[20]</sup> 等。TAKASE 等<sup>[27]</sup> 从成年皱皮蛙 (*Rana rugosa*) 睾丸中分离出 *sox9* 基因的两种异构体亚型 *sox9a* 和 *sox9b*, 并发现 *sox9a* 含有完整 HMG 盒结构域,具有转录激活子功能,而 *sox9b* 不含 HMG 盒结构域及近 N-端氨基酸序列,其编码的氨基酸仅为 *sox9a* 编码氨基酸序列的 55%,不具有转录因子活性,因此推测 *sox9b* 基因可能是 *sox9a* 基因剪切包括 HMG 盒结构域在内的第一个外显子后的产物<sup>[27]</sup>。暗纹东方鲀克隆获得的 *sox9a* 基因大小与皱皮蛙 *sox9b* 基因的大小一致,但结构不同,区别在于暗纹东方鲀 *sox9a* 基因编码的氨基酸序列含有完整的 HMG 盒但缺失 C-末端序列;而暗纹东方鲀克隆获得的 *sox9b* 基因大小及结构与皱皮蛙的 *sox9a* 基因相同。由此可以看出 *sox9* 基因转录的形式及其结构具有物种的差异性。

#### 3.2 暗纹东方鲀 Sox9 蛋白功能域分析

Sox 家族具有转录因子典型的结构特征: HMG 盒 DNA 结合结构域和转录激活结构域。HMG 盒结构域由 1 个特征性基序、1 个核定位信号(NLS1)和 1 个核输出信号(NES)等 3 部分组成,此外 *sox9* 基因在近 C-末端也存在 1 个核定位信号 NLS2<sup>[28]</sup>, 其中特征性基序的序列为 AQAARRKL,核定位信号 NLS1 和 NLS2 序列分别为 VKRPMNAFMVWAQAARRK 和 RRRK,核输出信号序列为 LSKTLGKLWRL<sup>[29]</sup>。有一种蛋白并非是一直位于核内,而是需要经常往返于核质和细胞质之间,这类穿梭蛋白既含有核定位信号,同时又含有核输出信号,由此可知 Sox9 蛋白是一种同时含有 NLS 和 NES 的穿梭蛋白。

暗纹东方鲀克隆获得的 *sox9a* 和 *sox9b* 基因作为 *sox* 基因家族的一员,具有家族典型的 HMG

盒结构域、1 个特征性基序、2 个核定位信号(NLS1 和 NLS2)和 1 个核输出信号(NES)等结构,其中特征性基序、核定位信号 NLS1 和核输出信号 NES 位于 HMG 盒结构域内,核定位信号 NLS2 位于 HMG 盒结构域外,且这些结构域的位置与金钱鱼 (*Scatophagus argus*) 和泰国斗鱼 (*Betta splendens*) 的位置完全相同<sup>[29-30]</sup>, 这说明 HMG 盒在不同物种中均十分保守。除了这些结构以外,*sox9* 基因在近 C-末端 1/3 处存在 1 个反式转录激活结构域 (transactivation activation domain, TA 域),据报道人 Sox9 蛋白在 C 末端有 2 个富含脯氨酸-谷氨酸-丙氨酸 (Pro-Glu-Ala, PQA) 和脯氨酸-谷氨酸-丝氨酸 (Pro-Glu-Ser, PQS) 转录激活域,这两个结构域在进化上相当保守,因此推测 Sox9 蛋白因为含有 HMG 盒 DNA 结合结构域和反式转录激活结构域才具有转录因子活性<sup>[31]</sup>,若 Sox9 蛋白缺少 TA 域,可能会导致丢失转录激活能力<sup>[19]</sup>、无法发育为雄性个体<sup>[32]</sup>或性别逆转<sup>[33]</sup>,然而 TA 域在哺乳动物中较为保守但是在大多数鱼类的 C-末端是不保守的,因此鱼类 *sox9* 基因转录激活的机制可能与哺乳动物有所不同,需要其他保守域与 TA 域一起参与转录激活过程<sup>[33]</sup>。暗纹东方鲀 *sox9a* 基因编码的氨基酸序列具有完整的 HMG 结构域却丢失了 C-末端的转录激活结构域,而 *sox9b* 基因编码的氨基酸序列虽然不存在 PQA 区但具有完整的 HMG 结构域和 PQS 区,且在近 C-末端还存在几个高度保守的区域,可能代替 PQA 区的作用并与 PQS 区一起参与转录因子活性的激活过程,故此推测暗纹东方鲀 Sox9a 蛋白可能不具有转录因子活性,而 Sox9b 蛋白具有转录因子活性。

#### 3.3 暗纹东方鲀 *sox9a* 和 *sox9b* 基因的组织表达分析

在通常情况下,目的基因的组织表达模式能够在一定程度上反映该基因的生物学功能。荧光定量结果显示暗纹东方鲀 *sox9a* 和 *sox9b* 基因的 mRNA 均在雌鱼下丘脑中表达量最高,这说明暗纹东方鲀 *sox9a* 和 *sox9b* 基因在神经系统调控方面可能发挥十分重要的作用;在精巢中有少量表达,但在卵巢中不表达,这种表达情况与半滑舌鳎<sup>[24]</sup>、斑马鱼<sup>[19]</sup>、青鳉<sup>[20]</sup>、三倍体鲫鱼<sup>[34]</sup> 和胡子鲶<sup>[35]</sup> 的表达情况基本一致,这说明暗纹东方鲀 *sox9a* 和 *sox9b* 基因可能通过神经系统调控间接

参与精巢的发育过程,除此之外 *sox9a* 基因在其他组织如脑、垂体、肝、胆、肠、肌肉、眼和胃中也有低等水平的表达;*sox9b* 基因在下丘脑、脑、垂体、肝、眼和胃等组织中的表达具有明显的性别差异性,雌鱼中 *sox9b* 基因的表达水平要明显高于雄鱼,由此可知暗纹东方鲀 *sox9a* 和 *sox9b* 基因的功能比较复杂,参与了多种组织的发育和功能发挥,但具体的作用机制目前为止还尚未有文献报道过,其基因功能有待于进一步的研究和探索。*sox9a* 和 *sox9b* 基因的表达模式除上述特点外,还有另外两种情况:一种是既在精巢中表达又在卵巢中表达,如红鳍东方鲀<sup>[26]</sup> 和黄鳍<sup>[22]</sup> 中 *sox9a* 基因既在精巢中表达又在卵巢中表达,鲤鱼<sup>[23]</sup>、孔雀花鲈<sup>[25]</sup> 和黄鳍<sup>[22]</sup> 中 *sox9b* 基因既在精巢中表达又在卵巢中表达;另一种是 *sox9b* 基因仅在卵巢中表达,如红鳍东方鲀<sup>[26]</sup> 和斑马鱼<sup>[19]</sup> 等。这说明 *sox9a* 和 *sox9b* 基因不仅与精巢发育有关,还有可能参与卵巢的发育,这种性腺表达的差异可能与鱼的种类和发育时期有关。由暗纹东方鲀的组织表达谱可知 *sox9a* 和 *sox9b* 基因在雌鱼和雄鱼中的作用具有很大的区别,主要表现在神经调控、性腺及其他组织发育这 3 个方面,但具体的作用机制还有待于进一步地研究。

#### 4 结论

本实验首次克隆得到了暗纹东方鲀 *sox9a* 和 *sox9b* 基因的 cDNA 全长序列,并利用生物信息学方法分析了其序列结构、蛋白质的结构特点、相关的生物信息学特征以及基因的组织表达水平,为深入探索 *sox9a* 和 *sox9b* 基因在暗纹东方鲀性腺发育和性别分化过程中的生物学功能奠定了重要基础,也为今后实现河豚属鱼类良种人工繁育中的性别控制提供重要参考。

#### 参考文献:

- [1] 华元渝,顾志峰,邹宏海,等. 暗纹东方鲀生殖洄游期内毒素分布规律[J]. 水利渔业, 2002, 22(2): 12-14.  
HUA Y Y, GU Z F, ZOU H H, et al. Distribution of toxins in *Takifugu obscurus* during reproductive migration [J]. Water Conservancy Fishery, 2002, 22(2): 12-14.
- [2] 张娜,韦芬,鲍宝龙. 星点东方鲀及其共生细菌河豚毒素的提取与检测[J]. 2017,26(6):801-807.  
ZHANG N, WEI F, BAO B L. Extraction and detection of tetrodotoxin in *Takifugu niphobles* and its symbiotic bacterial [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2017,26(6): 801-807.
- [3] 张迪,杨正勇,张英丽. 中国河鲀养殖产业发展现状与发展对策[J]. 科学养鱼, 2017(12): 1-3.  
ZHANG D, YANG Z Y, ZHANG Y L. Current situation and development strategy of puffer fish culture industry in China [J]. Science Fish Farming, 2017(12): 1-3.
- [4] 刘延正,徐承旭. 河鲀“解禁”规模化养殖将成主流[J]. 水产科技情报, 2017, 44(5): 284-285.  
LIU Y Z, XU C X. Large-scale cultivation of puffer fish will become the mainstream [J]. Fisheries Science & Technology Information, 2017, 44(5): 284-285.
- [5] 华元渝,李廷友,邹宏海. 养殖型暗纹东方鲀生长与发育特性[J]. 水产学报, 2004, 28(1): 8-14.  
HUA Y Y, LI T Y, ZOU H H. Growth and development characteristics of captive *Takifugu obscurus* [J]. Journal of Fisheries of China, 2004, 28(1): 8-14.
- [6] 王丽雅,陶宁萍. 养殖的雄性暗纹东方鲀精巢营养分析及评价[J]. 营养学报, 2012, 34(4): 406-408.  
WANG L Y, TAO N P. Analysis and evaluation of the nutritional composition of the testes of farmed male pufferfish (*Takifugu obscurus*) [J]. Acta Nutrimenta Sinica, 2012, 34(4): 406-408.
- [7] 崔子龙,常卫华,王娟红. 反刍动物性控基因 SRY 最新研究进展[J]. 中国草食动物科学, 2018, 38(1): 53-56.  
CUI Z L, CHANG W H, WANG J H. Current advances in sex control SRY gene of ruminant [J]. China Herbivore Science, 2018, 38(1): 53-56.
- [8] 张秀华,井长勤. 哺乳动物性别决定基因的研究进展[J]. 新乡医学院学报, 2006, 23(6): 638-640.  
ZHANG X H, JING C Q. Progress of study on sex-determining gene of the mammal [J]. Journal of Xinxiang Medical College, 2006, 23(6): 638-640.
- [9] 冯爽,隋晓栋,李丹,等. *sox9* 在临床常见疾病中的研究进展[J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2016, 24(10): 3808-3812.  
FENG S, SUI X D, LI D, et al. Research development of *sox9* in clinical common diseases [J]. Chinese Journal of Clinicians (Electronic Edition), 2016, 24(10): 3808-3812.
- [10] 王正江,杨鸿梅. 结直肠癌中 *sox9* 的表达及临床意义[J]. 实用临床医药杂志, 2017, 21(1): 198-199.  
WANG Z J, YANG H M. Expression of *sox9* in colorectal cancer and its clinical significance [J]. Journal of Clinical Medicine in Practice, 2017, 21(1): 198-199.
- [11] 陈维,王昌留,王磊. *sox9* 基因的结构、功能及进化[J]. 生命的化学, 2012, 32(4): 310-315.  
CHEN W, WANG C L, WANG L. *sox9* gene: structure, function and evolution [J]. Chemistry of Life, 2012, 32(4): 310-315.
- [12] SEYMOUR P A, FREUDE K K, DUBOIS C L, et al. A dosage-dependent requirement for *sox9* in pancreatic

- endocrine cell formation[J]. *Developmental Biology*, 2008, 323(1): 19-30.
- [13] 唐君仪, 周冠楠, 谢志芳. 转录因子 *sox9* 调控软骨发育的研究进展[J]. *医学研究杂志*, 2013, 42(9): 19-20, 164. TANG J Y, ZHOU G N, XIE Z F. Advances in the regulation of cartilage development by transcription factor *sox9* [J]. *Journal of Medical Research*, 2013, 42(9): 19-20, 164.
- [14] 秦宏敏, 韩会峰, 沙广钊, 等. 软骨肉瘤相关基因 *sox9* (siRNA) 表达质粒的构建鉴定以及对肿瘤细胞生长和凋亡的影响[J]. *中国肿瘤临床*, 2008, 35(3): 158-161. QIN H M, HAN H F, SHA G Z, et al. Construction and identification of a siRNA expression plasmid targeting *sox9* and its effect on the growth and apoptosis of human chondrosarcoma cells [J]. *Chinese Journal of Clinical Oncology*, 2008, 35(3): 158-161.
- [15] 董婉如, 余莉莉, 陈明会, 等. *sox9* 基因变异引起的性别发育异常研究进展[J]. *中国计划生育学杂志*, 2016, 24(4): 270-273. DONG W R, YU L L, CHEN M H, et al. Advances in sex dysplasia caused by *sox9* gene variation[J]. *Chinese Journal of Family Planning*, 2016, 24(4): 270-273.
- [16] BARRIONUEVO F, BAGHERI-FAM S, KLATTIG J, et al. Homozygous inactivation of *sox9* causes complete XY sex reversal in mice [J]. *Biology of Reproduction*, 2006, 74(1): 195-201.
- [17] BISHOP C E, WHITWORTH D J, QIN Y J, et al. A transgenic insertion upstream of *sox9* is associated with dominant XX sex reversal in the mouse [J]. *Nature Genetics*, 2000, 26(4): 490-494.
- [18] VIDAL V P I, CHABOISSIER M C, DE ROOIJ D G, et al. *sox9* induces testis development in XX transgenic mice [J]. *Nature Genetics*, 2001, 28(3): 216-217.
- [19] CHIANG E F L, PAI C I, WYATT M, et al. Two *sox9* genes on duplicated zebrafish chromosomes; expression of similar transcription activators in distinct sites [J]. *Developmental Biology*, 2001, 231(1): 149-163.
- [20] KLÜVER N, KONDO M, HERPIN A, et al. Divergent expression patterns of *sox9* duplicates in teleosts indicate a lineage specific subfunctionalization [J]. *Development Genes and Evolution*, 2005, 215(6): 297-305.
- [21] 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. YU J H, LI J L, CAO L P, et al. Isolation and analysis of *sox9* derived from yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2005, 13(5): 620-623.
- [22] ZHOU R J, LIU L, GUO Y Q, 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*) [J]. *Molecular Reproduction and Development*, 2003, 66(3): 211-217.
- [23] 杜启艳, 常重杰, 王凤羽, 等. 鲤鱼中 *sox9b* 基因的克隆和表达[J]. *实验生物学报*, 2005, 38(5): 397-403. DU Q Y, CHANG Z J, WANG F Y, et al. The cloning and expression analysis of *sox9b* in *Cyprinus carpio* [J]. *Acta Biologica Experimentalis Sinica*, 2005, 38(5): 397-403.
- [24] DONG X L, CHEN S L, JI X S, et al. Molecular cloning, characterization and expression analysis of *sox9a* and *Foxl2* genes in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) [J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 2011, 30(1): 68-77.
- [25] SHEN X Y, CUI J Z, GONG Q L, et al. Cloning of the full-length coding sequence and expression analysis of *sox9b* in guppy (*Poecilia reticulata*) [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2007, 33(3): 195-202.
- [26] SHEN X Y, CUI J Z, YANG G P, et al. Expression detection of *Dmrt*s and two *sox9* genes in *Takifugu rubripes* (Tetraodontidae, Vertebrata) [J]. *Journal of Ocean University of China*, 2007, 6(2): 182-186.
- [27] TAKASE M, NOGUCHI S, NAKAMURA M. Two *sox9* messenger RNA isoforms: isolation of cDNAs and their expression during gonadal development in the frog *Rana rugosa* [J]. *FEBS Letters*, 2000, 466(2/3): 249-254.
- [28] SEKIDO R, LOVELL-BADGE R. Sex determination involves synergistic action of SRY and SF1 on a specific *sox9* enhancer [J]. *Nature*, 2008, 453(7197): 930-934.
- [29] 陈建华, 何毛贤, 牟幸江, 等. 金钱鱼 *sox9* cDNA 克隆及其表达分析[J]. *动物学杂志*, 2015, 50(1): 93-102. CHEN J H, HE M X, MOU X J, et al. cDNA cloning and mRNA expression analysis of *sox9* in *Scatophagus argus* [J]. *Chinese Journal of Zoology*, 2015, 50(1): 93-102.
- [30] 贺超, 洪广, 吴静娴, 等. 泰国斗鱼 *sox9* 基因的克隆及组织表达研究[J]. *安徽农业科学*, 2017, 45(8): 151-155, 179. HE C, HONG G, WU J X, et al. Study on cloning and tissue expression of *sox9* in *Betta splendens* [J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2017, 45(8): 151-155, 179.
- [31] QIN Y J, KONG L K, POIRIER C, et al. Long-range activation of *sox9* in Odd Sex (Ods) mice [J]. *Human Molecular Genetics*, 2004, 13(12): 1213-1218.
- [32] 裴开颜, 王介东. Y染色体性别决定区(Sry): 性别决定关键开关[J]. *生殖医学杂志*, 2012, 21(4): 400-405. PEI K Y, WANG J D. Sex-determining region of Y-chromosome (Sry): master switch of sex determination [J]. *Journal of Reproductive Medicine*, 2012, 21(4): 400-405.
- [33] SÜDBECK P, SCHMITZ M L, BAEUERLE P A, et al. Sex reversal by loss of the C-terminal transactivation domain of human *sox9* [J]. *Nature Genetics*, 1996, 13(2): 230-232.
- [34] GUO X H, YAN J P, LIU S J, et al. Isolation and expression analyses of the *sox9a* gene in triploid *Crucian carp* [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2010, 36(2): 125-133.
- [35] RATHER M A, BHAT I A, GIREESH-BABU P, et al. Molecular characterization of kisspeptin gene and effect of nano-encapsulated kisspeptin-10 on reproductive maturation in

*Catla catla*[J]. Domestic Animal Endocrinology, 2016, 56:

36-47.

## Molecular cloning and tissue expression analysis of *sox9* gene in *Takifugu obscurus*

GAO Yingying<sup>1,2,3</sup>, LIU Xinfu<sup>2,3</sup>, HU Peng<sup>4</sup>, LIU Bin<sup>2,3</sup>, GUO Zhenglong<sup>5</sup>

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Key Laboratory for Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, Shandong, China; 3. Qingdao Key Laboratory of Fish Seed Engineering and Biotechnology, Qingdao 266071, Shandong, China; 4. Neijiang Normal University, Neijiang 641100, Sichuan, China; 5. Jiangsu Zhongyang Group Company Limited, Hai'an 226600, Jiangsu, China)

**Abstract:** The purpose of this study was to preliminarily investigate the role of *sox9* gene in gonad development and sex differentiation in *Takifugu obscurus*. The full-length cDNA sequence of *sox9* gene in *Takifugu obscurus* is successfully cloned through the design of degenerate primer amplification, RACE and Real-time PCR technology, and subsequently its corresponding bioinformatics characteristics and the level of tissue and expression were also analyzed. The results showed that the full-length of *Takifugu obscurus sox9a* gene is 1 248 bp (NCBI accession number: MH218818), including a 684 bp ORF, encoding 227 amino acids; the 5'UTR is 297 bp and the 3'UTR is 267 bp. The full-length of *Takifugu obscurus sox9b* gene is 1 941 bp (NCBI accession number: MH218819), including a 1 470 bp ORF, encoding 489 amino acids; the 5'UTR is 306 bp and the 3'UTR is 165 bp. The results of homology and phylogenetic analysis showed that the two *sox9* sequences shared the highest homology and closest relationship with *Takifugu rubripes*. The results of multiple amino acid sequence alignment showed that the HMG box domains of the two Sox9 amino acid sequences were highly conserved in mammals and fish. Quantitative fluorescence PCR analysis showed that the two *sox9* genes are ubiquitous in all tissues of female and male fish, and they were most highly expressed in the hypothalamus of female fish, a little in the testis, and very little in the ovary. Overall, except for a few tissues, the expression of two *sox9* genes in tissues of females was generally higher than that of males. The purpose of this study was to understand the genetic characteristics and physiological functions of *sox9* in *Takifugu obscurus*, and to explore the molecular regulation mechanism of sex differentiation and gonadal development.

**Key words:** *Takifugu obscurus*; *sox9* gene; cDNA cloning; bioinformatics; tissue expression