

文章编号: 1000-0615(2019)08-1691-15

DOI: 10.11964/jfc.20181111531

## 大黄鱼 *sox9a/b* 基因的克隆与表达分析

张梦<sup>1</sup>, 朱阳阳<sup>1</sup>, 李完波<sup>1</sup>, 沈伟良<sup>2</sup>,  
吴雄飞<sup>2</sup>, 叶坤<sup>1</sup>, 王志勇<sup>1,3\*</sup>

(1. 集美大学农业农村部东海海水健康养殖重点实验室, 福建 厦门 361021;

2. 宁波市海洋与渔业研究院, 浙江 宁波 315103;

3. 青岛海洋科学与技术国家实验室, 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室, 山东 青岛 266071)

**摘要:** 为探究 *sox9* 基因在大黄鱼性别决定与分化过程中的作用, 利用 RACE 方法克隆得到大黄鱼 *sox9a* 和 *sox9b* 2 个基因, 采用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 分析其在雌雄个体不同组织和不同发育阶段的表达规律, 并检测了其在 17 $\beta$ -雌二醇处理后的遗传雄性和 17 $\alpha$ -甲基睾酮诱导处理后遗传雌性幼鱼中的表达变化。结果显示, 大黄鱼 *sox9a* cDNA 全长 2 442 bp (NCBI 登录号: MH996431), 包含 476 bp 5'UTR、466 bp 3'UTR、1 500 bp ORF, 编码 499 个氨基酸。大黄鱼 *sox9b* cDNA 全长为 2 199 bp (NCBI 登录号: MH996432), 包含 335 bp 5'UTR、415 bp 3'UTR、1 449 bp ORF, 编码 482 个氨基酸。qRT-PCR 分析显示, *sox9a* 基因主要在性腺、眼、脑、肝脏中表达, 精巢中的表达量显著高于卵巢; *sox9b* 在大黄鱼各组织中广泛表达, 但以精巢中表达量最高, 而卵巢中只有痕量表达。在鱼苗性腺发育初期, *sox9a/b* 的表达量都维持在较低水平; 随着鱼苗长大, *sox9a/b* 的表达量在 84 dph、123 dph 2 次达到高峰, 随后开始下降, 10 mpm 后又逐渐上升。17 $\beta$ -雌二醇处理能够显著下调遗传雄性大黄鱼 *sox9a* 和 *sox9b* 基因在性腺中的表达, 17 $\alpha$ -甲基睾酮处理则显著上调遗传雌性大黄鱼 *sox9a* 和 *sox9b* 基因在性腺中的表达。研究表明, *sox9a/b* 基因与大黄鱼性别发育和分化过程密切相关, 对大黄鱼精巢的发育与维持起重要的调控作用, 而且两个基因的功能可能具有一定程度的分化。

**关键词:** 大黄鱼; *sox9a/b* 基因; 克隆; 表达

**中图分类号:** Q 785; S 917.4

**文献标志码:** A

SRY 盒包含蛋白 (SRY-type-HMG box, SOX) 基因家族是一类与 SRY 保守区 HMG 基序具有 60% 以上同源性的统称<sup>[1]</sup>。Sox9 基因属于 SOXE 亚族<sup>[2]</sup>, 最早在人类丘脑发育不良 (campomelic dysplasia, CD) 患者中发现<sup>[3]</sup>。发病患者常伴有性别异常现象, 故推测该基因在某种程度上调控性别决定与性别分化。目前, 已在多种脊椎动物中成功克隆并证明 *sox9* 基因与睾丸的形成、发育及功能调控密切相关。在哺乳动物中, *sox9* 可以代替 *sry* 基因诱发雄性个体的正常发育<sup>[4]</sup>, 当 *sox9* 基因表达异常时会导致机体发生性反转<sup>[5-9]</sup>。在

对爬行类和鸟类的研究中发现, *sox9* 基因在精巢中高表达, 在卵巢中表达则被抑制<sup>[10-11]</sup>。在鱼类中, *sox9* 基因也受到了广泛地关注。研究表明, 在牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*)<sup>[12]</sup>、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)<sup>[13]</sup>、鲤 (*Cyprinus carpio*)<sup>[14]</sup>、黄颡鱼 (*Pelteobagrus fulvidraco*)<sup>[15]</sup>、金钱鱼 (*Scatophagus argus*)<sup>[16]</sup>、泰国斗鱼 (*Betta splendens*)<sup>[17]</sup>、点带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*)<sup>[18]</sup>、尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*)<sup>[19]</sup> 和大鳞副泥鳅 (*Paramisgurnus dabryanus*)<sup>[20]</sup> 中, *sox9* 基因在精巢中高表达, 可能对其精巢发育及雄性化具有调控作用。研究发

收稿日期: 2018-11-12 修回日期: 2019-03-05

资助项目: 国家自然科学基金重点项目 (U1705231); 海水鱼产业技术体系专项 (CARS-47-G04)

通信作者: 王志勇, E-mail: zywang@jmu.edu.cn

现, 黄鳝(*Monopterus albus*)<sup>[21]</sup>*sox9a*与*sox9b*基因在两性中均有表达; 大西洋鳕(*Gadus morhua*)<sup>[22]</sup>*sox9a*在精巢中特异性表达, *sox9b*的表达则无性别差异; 斑马鱼(*Danio rerio*)<sup>[23]</sup>中的*sox9a*在精巢中表达, 而*sox9b*仅在卵巢中表达; 此外, 青鳉(*Oryzias latipes*)<sup>[24]</sup>*sox9*在卵巢中的表达量高于精巢。可见, 不同鱼类的*sox9*基因的表达模式不尽一致。因此, 探索*sox9*基因在鱼类性别决定和分化调控中的角色具有重要意义。

大黄鱼(*Larimichthys crocea*)隶属于鲈形目(Perciformes)、石首鱼科(Sciaenidae)、黄鱼属(*Larimichthys*), 是我国近海重要的经济鱼类。大黄鱼生长具有显著的性别两态性, 同一养殖条件下, 雌性个体明显生长快、个体大, 因此, 研究大黄鱼的性别决定机制, 控制其性别分化具有重要意义。目前, 已有报道了与雄性化相关的基因*dmrt1*、*gsdf*、*amh*<sup>[25]</sup>; 与雌性化发育相关的基因*foxl2*、*cyp19a*<sup>[26-27]</sup>, 而有关大黄鱼*sox9*基因的研究还未见报道。

本实验克隆了大黄鱼*sox9a/b*基因cDNA全

长, 分析其在雌雄个体组织和不同发育阶段的表达规律, 并检测了其在雌激素处理后的遗传雄鱼和雄激素诱导的伪雄鱼中的表达变化, 为阐明其在大黄鱼性腺分化、发育、成熟中的功能奠定基础。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 实验材料

实验所用大黄鱼均采自福建省宁德市金铃水产科技有限公司。取性成熟大黄鱼胸鳍、脑、肝脏、脾脏、肠、肌肉、心脏、头肾、肾脏、眼、胃等组织, 取6 dph(孵化后6 d)、13、20、27、34、41、49、55、69、84、98、112、123 dph、7 mph(7月龄)、8、10、12及24 mph的大黄鱼性腺, 各4个重复, 提RNA备用。

实验所用引物名称及序列见表1, 引物合成及测序均由华大基因完成。

### 1.2 大黄鱼*sox9a/b*基因cDNA全长克隆

按照SMARTer RACE 5'/3' Kit (TaKaRa,

表1 引物名称及序列

Tab. 1 Primer names and sequences

引物名称 primer name	引物序列(5'→3') sequence (5' to 3')	用途 usage
<i>sox9a</i>	F: AAGAAAGACCATCCCGACTACAA R: TGCACCTCGCCAAACTA	中间片段克隆 partial sequence PCR
<i>sox9b</i>	F: AAGGGCTACGACTGGACGCT R: CTGTGTGTAATGGGCTGTTGCT	
<i>sox9a-5'</i>	GSP1: <u>GATTACGCCAAGCTT</u> CCGTGTTGTCGGCTATGGGT GSP2: <u>GATTACGCCAAGCTT</u> CCTGAGCCGCTCTGAGCCTCCACT	5'和3'端扩增 5' and 3' RACE
<i>sox9a-3'</i>	GSP1: <u>GATTACGCCAAGCTT</u> CTCAGGCAAGATGGACCTAAAGC GSP2: <u>GATTACGCCAAGCTT</u> TACCTACACGGGCACCTACAGCATC	
<i>sox9b-5'</i>	GSP: <u>GATTACGCCAAGCTT</u> TGGAGATGACTTCGCTGCTTA	
<i>sox9b-3'</i>	GSP: <u>GATTACGCCAAGCTT</u> TGAAGGGCTACGACTGGACG	
<i>β-actin</i>	F: TTATGAAGGCTATGCCCTGCC R: TGAAGGAGTAGCCACGCTCTGT	荧光定量 qRT-PCR
D- <i>sox9a</i>	F: CGTGTCCAGGTGCTCAA R: GAAGGCATTCATCGGTCT	
D- <i>sox9b</i>	F: AAGAAAGACCATCCCGACTACAA R: TGCACCTCGCCAAACTA	

注: 下划线为载体序列

Notes: The vector sequence is underlined

大连)说明书,以雌雄大黄鱼成鱼两者性腺组织总RNA为模板合成第一链cDNA。根据已知的 $sox9a/b$ 基因的核苷酸序列,设计正反向引物,扩增获得cDNA片段。根据获得的基因片段设计3'-RACE和5'-RACE的特异性引物(表1),进行3'和5'末端扩增。所有获得的cDNA片段经回收纯化后与pMD19-T连接,转化进大肠杆菌DH5 $\alpha$ 感受态细胞,并筛选阳性克隆测序。

### 1.3 生物信息学分析

用DNASar软件包中的SeqMan进行序列拼接。同源性分析采用BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)。开放阅读框查找(ORF Finder)按<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>进行。蛋白质理化性质分析(ProtParam)按<https://web.expasy.org/protparam/>进行。信号肽预测(SignalP 4.1)按<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>进行。跨膜区查找(TMhMM 2.0)按<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>进行。磷酸化位点查找(NetPhos 3.1)按<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>进行。糖基化位点查找(NetNGlyc 4.0)按<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>进行。氨基酸结构域分析(InterPro)按<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>进行。系统进化树构建采用MUSCLE和MEGA 5。

### 1.4 大黄鱼幼鱼的遗传性别鉴定

大黄鱼幼鱼的遗传性别鉴定采用本实验室开发的性别特异分子标记。判定方法为遗传雌性仅有1条384 bp的条带,而遗传雄性有2条条带,分别为194和384 bp<sup>[28]</sup>。

### 1.5 荧光定量PCR分析

将大黄鱼各组织和不同日龄/月龄的大黄鱼性腺cDNA稀释20倍作为模板,大黄鱼 $\beta$ -actin为内参基因,使用LightCycler 480 (Roche, USA)荧光定量PCR仪进行qRT-PCR检测。反应体系(20  $\mu$ L): 2 $\times$ SYBR Green I Master (Roche) 10  $\mu$ L, 引物各0.5  $\mu$ L, cDNA模板4  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 5  $\mu$ L。反应程序: 95  $^{\circ}$ C 预变性5 min; 95  $^{\circ}$ C 10 s, 60  $^{\circ}$ C 30 s, 共45个循环。每个样品做4个生物学重复, 3个技术重复。用2<sup>- $\Delta\Delta C_T$</sup> 方法计算相对表达量,用SPSS 22.0软件进行方差分析和多重比较。

### 1.6 激素处理

将17 $\beta$ -雌二醇(17 $\beta$ -estradiol, E2, Aladdin)粉

末溶于无水乙醇,按120 mg E2/kg饲料的量处理颗粒饲料,混匀、晾干、-20  $^{\circ}$ C保存备用。对照组饲料仅用等量无水乙醇处理。用处理后的饲料分别投喂孵化后41 d (41 dph)的大黄鱼,持续处理至120 dph。同理,利用17 $\alpha$ -甲基睾酮(17 $\alpha$ -methyltestosterone, MT, Aladdin)药浴( $1 \times 10^{-6}$ )与药饵(120 mg/kg)相结合的方式处理30 dph的人工雌核发育鱼苗(全部为遗传雌性),使其发育成伪雄鱼至2龄时取样。实验处理结束后,分别取对照组和处理组大黄鱼胸鳍(固定于95%乙醇)和性腺(用RNA保护液固定后-20  $^{\circ}$ C保存),用于DNA和RNA提取。

## 2 结果

### 2.1 大黄鱼 $sox9a/b$ 基因cDNA全长和氨基酸序列分析

大黄鱼 $sox9a$  cDNA全长2 442 bp (NCBI登录号: MH996431),包括5'非编码区(UTR) 476 bp、3'非编码区466 bp、开放阅读框(open reading frame, ORF)为1 500 bp,共编码499个氨基酸。预测其蛋白分子质量( $M_w$ )为54.3 ku,理论等电点(pI)为6.14。其中第103~173位氨基酸构成SOX-TCF\_HMG-box, 22~93为Sox\_N二聚化结构域。同时,在HMG结构域内存在1个特征性基序AQAARRKL, 2个独立的核定位信号NLS (NLS1: KRPMNAFMVWAQAARRK和NLS2: RRRK)。在N<sup>95</sup>区域存在核输出信号(N-x-S/T)。磷酸化位点(Phosphorylation sites)分析显示有53个丝氨酸(S)磷酸化位点, 13个苏氨酸(T)磷酸化位点和7个酪氨酸(Y)磷酸化位点(图1)。

大黄鱼 $sox9b$  cDNA全长为2 199 bp (NCBI登录号: MH996432),包括5'UTR 335 bp、3'UTR 415 bp、ORF为1 449 bp,编码482个氨基酸。预测其 $M_w$ 为53.3 ku, pI为6.23。其中第103~173位氨基酸构成SOX-TCF\_HMG-box, 23~93为Sox\_N二聚化结构域。SOX9B也存在一个特征性基序AQAARRKL, 2个独立的核定位信号NLS1和NLS2,及核输出信号NGS。磷酸化位点分析显示有39个丝氨酸(S)磷酸化位点, 13个苏氨酸(T)磷酸化位点和11个酪氨酸(Y)磷酸化位点(图2)。

### 2.2 大黄鱼 $sox9a/b$ 与其他物种 $sox9$ 基因的同源性及系统进化分析

利用NCBI数据库进行比对发现,大黄鱼

1 tagtttggcgtcacgtgctgtcgcaccaatcagaatcgggctttccggcaacgcacttata 60  
61 aagcccgcgtgcagagccgtttgcagttcaaagcactcgcgcggttctggggattgtactt 120  
121 ggagactagaaaggagcactttaccgtttcatcctgcagagttaaagcaaacctcttccc 180  
181 atctggcttcttttttttttgccttcttcaagcgcggatccgcttgcagaaaaagtc 240  
241 attctcggagtctgtcacaagctcatgcgtaaagacactcgcctctccaaactcggtttta 360  
30 cgcacaggagcaaaggagaaccagctgaattttctgtgcacttctctcagttgaaagact 360  
361 ttgattaaactcatcctggcaaggtaaagtcattttaaaaggcttttctctcgcgaga 420  
421 aagcagaataactccccccgttcacgcgtaatttggcaccacaaacagtttttcgtatga 480

1 M N 2  
481 atctctcgcacccttacctgaagatgacggatgaacaagacaagtgtctctctgatgcc 540

3 L L D P Y L K M T D E Q D K C L S D A P 22

541 cgagcccgcagcatgtccgaggactctcggggctctccgtgcccggtccggttcggg ctccg 600  
23 S P S M S E D S A G S P C P S G S G S D 42

601 acaccgagaacaccggccgtcagagaacgggctcctcagagcggacggagacttcaaga 660  
43 T E N T R P S E N G L L R A D G D F K K 62

661 aggacgaggacgataagttccccgcagtcacccgtgacgccgtgtcccaggtgctcaagg 720  
63 D E D D K F P A C I R D A V S Q V L K G 82

721 gttacgactggaccctcgtgcccatgccggtgcgcgttaacggatcttctaagaacaagc 780  
83 Y D W T L V P M P V R V **(N G S)** S K N K P 102

781 ctcacgttaagagaccgatgaatgccttcatgggtgtgggcgcaggctgcgcggaggaagc 840  
103 **H V** **K R P M N A F M V W** **A Q A A R R K** **L** 122

841 tggcggatcagtaccacacctgcataacgcggagctcagcaaaactctgggaaaactct 900  
123 **A D Q Y P H L H N A E L S K T L G K L W** 142

901 ggagactcctcaacgaaggggagaagcggccggttctgtggaggaggctgagcggctccggg 960  
143 **R L L N E G E K R P F V E E A E R L R V** 162

961 tgcagcacaagaaggatcaccggactacaaataccagccacggcggagaaagtctgtga 1 020  
163 **Q H K K D H P D Y K Y** Q P **R R R K** S V K 182

1 021 agaacggacagagcaggtctgaggacggcagcagcagacgcacatttccccgaatgcc 1 080  
183 N G Q S E S E D G S E Q T H I S P N A I 202

1 081 tcttcaaagctctccagcagcggactccccggcctccagatgggagaggtgcactctc 1 140  
203 F K A L Q Q A D S P A S S M G E V H S P 222

1 141 cgggtgagcactcaggctcccaagggccccctaccctcccaccaccccaagactgatg 1 200  
223 G E H S G S Q G P P T P P T T P K T D V 242

1 201 tcagctcaggcaagatggacctaaagcgcgaaggtggcctccgctctctgcctgatggcc 1 260  
243 S S G K M D L K R E G G L R S L P D G P 262

1 261 ccaacgggcgccaactcaac atcgactttcgtgatgtggacatcggggagctgagcagcg 1 320  
263 N G R Q L N I D F R D V D I G E L S S D 282

1 321 atgtcatctcccacatcagaccttcgacgtcaatgagttcgaccagtacctcccaccta 1 380  
283 V I S H I E T F D V N E F D Q Y L P P N 302

1 381 atggccacccggctctgctaccggccctggcaatgccacccagttacctacagggca 1 440  
303 G H P G S A T G P G N A T P V T Y T G T 322

1 441 cctacagcatcagcagtgagcccctgtcagcccgcaggcaggaggctcgcagcttgga 1 500  
323 Y S I S S G A P V S P Q A G G V A A W M 342

1 501 tggctaaaagccaaagccaacaggacagcagcagcagcagcacaccctgactaccttg 1 560  
343 A K S Q S Q Q G Q Q Q Q Q H T L T T L G 362

(图 1 Fig. 1)

```

1 561  gcagcagtggaggctcagaggcggtcaggcccagcacaggaccagatcaagacggagc 1 620
    363  S S G G S E A A Q A Q H R T Q I K T E Q 382
1 621  agctgagccccgagccactacagcgagcagcagggtcccccgagcacgtcacctacagcc 1 680
    383  L S P S H Y S E Q Q G S P Q H V T Y S P 402
1 681  cttcaacctgcagcactacagcccccttctctaccggccatctccagggcgcagc 1 740
    403  F N L Q H Y S P P S S Y P A I S R A Q Q 422
1 741  agtacgactactccgaccaccagggggcggaatgcagccaccgcctctactacagcc 1 800
    423  Y D Y S D H Q G G G N A A T A S Y Y S H 442
1 801  acgcgggggcggggcagggctcggggctgtactcgactttcagctacatgagcagtc 1 860
    443  A G A G Q G S G L Y S T F S Y M S S P S 462
1 861  gccagaggccatgtacacacccatagccgacaacacgggggttccctccatcccacaga 1 920
    463  Q R P M Y T P I A D N T G V P S I P Q S 482
1 921  gcagcccacagcactgggagcaggctccggtttacaccagctcaccagaccctgagctg 1 980
    483  S P Q H W E Q A P V Y T Q L T R P * 499
1 981  caccggcatgagactgagacaccacacacacacacacacacacacacacacacacacata 2 040
2 041  cacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacata 2 100
2 101  ctccctgaatcagacacttgaattggaagaagaggagaacgggacttgtgattggctcac 2 160
2 161  gtcgtgccttgcattgtatcttgatagaaactatataatTTTTtagagagatgaagaga 2 220
2 221  cttaggaaaaatcctcgtgtgaggattgattgttgatattcagtaggtactgtgtatggt 2 280
2 281  tctTTTTTTgtttggtTTTTTccccctcatacgctggcagtttgtaacctgtgggggg 2 340
2 341  tgggaggagtggggagggttaattatttgactgtagatagaaaaacgaaaaaaaaaagc 2 400
2 401  tttatatttggaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa 2442

```

图 1 大黄鱼 *sox9a* 基因 cDNA 全长及氨基酸序列

小写字母表示 cDNA 序列; 大写字母表示氨基酸序列; “\*” 表示终止密码; 灰色阴影表示 SOX-TCF\_HMG-box 保守序列; 下划线序列表示 Sox\_N 二聚化结构域; 斜体加粗序列表示特征性基序; 方框中序列表示核定位信号; 圆圈中序列表示糖基化位点; 下同

Fig. 1 Full-length sequence of cDNA and deduced amino acid sequences of *sox9a* in *L. crocea*

lowercase indicates cDNA sequence; uppercase indicates amino acid; “\*” indicates termination codon; grey shade indicates SOX-TCF\_HMG-box; underline indicates Sox\_N conserved domain; italic overstriking type indicates characteristic sequence; square frames indicate NLS1 and NLS2; circle represents glycosylation site; the same below.

*sox9a/b* 基因与绝大多数物种 *sox9* 基因的 HMG 盒氨基酸序列高度一致, 表明 HMG 盒在进化过程中非常保守(图 3)。利用 MegAlign 软件进行序列比对显示, 大黄鱼 SOX9A 的氨基酸序列与其他鱼类的氨基酸序列同源性较高, 与鲈形目的高体鲷 (*Seriola dumerili*)、尼罗罗非鱼、斑马宫丽鱼 (*Maylandia zebra*) 的 SOX9A 同源性较高为 94%~96%, 与鲑形目 (Salmoniformes)、鲹形目 (Pleuronectiformes)、鲉形目 (Scorpaeniformes)、刺鱼目 (Gasterosteiformes) 等其他鱼类 SOX9A 的相似性为 80%~90%, 与哺乳类、鸟类、爬行类、两栖类等高等脊椎动物的相似性为 70%~79% (表 2)。大黄鱼 SOX9B 的氨基酸序列与其他物种的 SOX9B 也具有较高的同源性, 尤其是与大多数鱼类的相似性均超过 80% (表 3)。

采用 MEGA 5 软件, 以邻接法 (neighbor-joining, NJ) 构建系统进化树 (图 4)。进化树分为 2 大

支, 哺乳类、鸟类、爬行类及两栖类聚为一支, 鱼类聚为一支。其中, 鱼类的 SOX9A 和 SOX9B 各自聚为一小支。大黄鱼 SOX9A 与裸盖鱼、三刺鱼、黑点青鲙、尼罗罗非鱼、斑马宫丽鱼聚为一小支, 且与同为鲈形目的尼罗罗非鱼、斑马宫丽鱼亲缘关系较近。大黄鱼 SOX9B 与鲉形目的金头鲷亲缘关系最近, 三斑海猪鱼次之, 与青鲙、虹鲙、大麻哈鱼等亲缘关系较远。

2.3 大黄鱼 *sox9a/b* 基因在不同组织和不同时期性腺的表达分析

以  $\beta$ -actin 为内参, 利用 qRT-PCR 检测大黄鱼 *sox9a/b* 基因在成鱼性腺、眼、脑、肝脏、肌肉、头肾、肾脏、脾脏、胃、肠共 10 个组织中的表达情况 (图 5、图 6)。结果显示, *sox9a* 主要在性腺、眼、脑、肝脏中表达。其中, 精巢的表达量显著高于卵巢 ( $P < 0.05$ ), 眼、脑、肝脏中两性的表

1 atggggactcttcagcaaatcctccaagagtagatctctcactcacatttctctttaaag 60  
61 ccacagttttaaagtgaagcattagaaagcgaagccacttgcaactcgctttctgtttg 120  
121 cgaaattgtgaaaagtcgaaaggagcgtcaaaaacttttatttttggttctttattttt 180  
181 atttttatttttttacttttaaggattcacgtttgccagtcaaaactgtgcgcctcaca 240  
241 ggctgtcactgcagtcctcgggcacagcacttggatttagaaagaaggattttctcttt 300  
301 ttttactgcgagaagctgttctttaattttttcgcatgaatctcctcgaccctacctaa 360

1 M N L L D P Y L K 9

361 agatgacagaagaacaggagaagtgtcactctgacgctcccagccccagcatgtcggagg 420  
10 M T E E Q E K C H S D A P S P S M S E D 29  
421 actccgcaggatcgccgtgtcctctgggtccggttcggacactgagaacaccggccgt 480  
30 S A G S P C P S G S G S D T E N T R P S 49  
481 ccgacaaccacctcctcttgggtccagactacaagaaagagggcgaagaagagaagttcc 540  
50 D N H L L L G P D Y K K E G E E E K F P 69  
541 ccgtgtgtattagagatgcggtgtcccagggtgttgaagggtacgactggacgtggtgc 600  
70 V C I R D A V S Q V L K G Y D W T L V P 89  
601 ccatgccggtgcgcgtcaacggctcaagtaaaaataagcctcacgtcaaaagaccatga 660  
90 M P V R V (N G S) S K N K P H V K R P M N 109  
661 acgcattcatggtctgggctcaagctgcacggaggaagctggccgatcaataccgcatc 720  
110 A F M V W A Q A A R R K L A D Q Y P H L 129  
721 tgcacaacgcggaactcagcaaaaccctgggcaaactttggagattgctcaacgaagtag 780  
130 H N A E L S K T L G K L W R L L N E V E 149  
781 agaagcgccctttgtggaagaagctgagcgtctgagagtgcagcataagaaagaccatc 840  
150 K R P F V E E A E R L R V Q H K K D H P 169  
841 ccgactacaatatcagccttaggcggagaaaatctgtcaagaacggacaaaacgatcccg 900  
170 D Y K Y Q P R R R K S V K N G Q N D P E 189  
901 aggacggcgagcaaacccacatctctccaaatgcatcttcaaggcactgcagcaggccg 960  
190 D G E Q T H I S P N A I F K A L Q Q A D 209  
961 attctccagcgtctagtttgggagaggtgcattctcctggagagcactcaggtcagtc 1 020  
210 S P A S S L G E V H S P G E H S G Q S Q 229  
1 021 aaggcccaccaacacctccaaccaccccccaagacagacctcccctccagcaaagctgacc 1 080  
230 G P P T P P T T P K T D L P S S K A D L 249  
1 081 tgaagcgtgagggcgcccaatgcaggagggcaccagtcgacagctcaatatcgactttg 1 140  
250 K R E G R P M Q E G T S R Q L N I D F G 269  
1 141 gaactgtggacattggtgagctaagcagcgaagtcatctccaacatggggagctttgatg 1 200  
270 T V D I G E L S S E V I S N M G S F D V 289  
1 201 tcgatgagtttgatcagtacctgccacctcacagccatgctggagtgaccggagcagccc 1 260  
290 D E F D Q Y L P P H S H A G V T G A A Q 309  
1 261 aggctggctacaccggcagctacggcatcagcagctcagttaaccaggcagccaatgtcg 1 320  
310 A G Y T G S Y G I S S S V N Q A A N V G 329  
1 321 gggcccacgcctggatgtcaaagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcactctctga 1 380  
330 A H A W M S K Q Q Q Q Q Q Q Q Q H S L T 349  
1 381 ccaccctgggtggaggaggagcaaggccagcagggtcaacagagaaccaccagatca 1 440  
350 T L G G G G E Q G Q Q G Q Q R T T Q I K 369  
1 441 agacagagcagctgagcccaagccactacagtgagcagcagggtctctccgcagcagctca 1 500

(图 2 Fig. 2)

```

370   T E Q L S P S H Y S E Q Q G S P Q H V T   389
1 501   cctatgggtccttcaacctgcagcactacagcacctcctcttaccctccatcacaagag   1 560
390   Y G S F N L Q H Y S T S S Y P S I T R A   409
1 561   cacagtatgactattcagaccaccaaagtgggtgccaactcctactacagccatgcagctg   1 620
410   Q Y D Y S D H Q S G A N S Y Y S H A A G   429
1 621   gccaaaggctctggcctgtactccaccttcagctacatgagccccagccagaggccgatgt   1 680
430   Q G S G L Y S T F S Y M S P S Q R P M Y   449
1 681   acacaccgatcgccgacaacaccgggtgccctctgtgccgcagaccacagtccacagc   1 740
450   T P I A D N T G V P S V P Q T H S P Q H   469
1 741   actgggagcaacagccatttacacacagctgtccaggccttgaggaggcagcctcagca   1 800
470   W E Q Q P I Y T Q L S R P *   482
1 801   ctgactgtacaacaccattccatgcatagacttcttttggcaggggctttgcgcta   1 860
1 861   ccatgccacacaccgttcattgccaacagaaaaacatgacaaggactttttatagtact   1 920
1 921   gaaaatatactcttggattggctcaccagcagctgcctttgtattgttcggaatcgtgatt   1 980
1 981   atatttttttagatataatgttttttaaaaaatcctctgtgaggacatacttgttataaa   2 040
2 041   tatttttagtatgtactgtgtatgtgttttgcctctgtcatcatcgtcatcataatcagtg   2 100
2 101   tcatcagcatcctcatcatcctgatttgaagggttaaacaggtttaaaggagcgggaatgc   2 160
2 161   cgggtaaaaaaaaacaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa   2199

```

图 2 大黄鱼 *sox9b* 基因 cDNA 全长及氨基酸序列Fig. 2 Full-length sequence of cDNA and deduced amino acid sequences of *sox9b* in *L. crocea*

表 2 SOX9A 氨基酸序列的同源性

Tab. 2 GenBank accession numbers and the identity of SOX9A

物种(登录号) species (accession no.)	同源性/% identity
人 <i>Homo sapiens</i> (CAA86598.1)	79.4
黑猩猩 <i>Pan troglodytes</i> (AAK01653.1)	79.1
小家鼠 <i>Mus musculus</i> (AF421878_1)	79.6
原鸡 <i>Gallus gallus</i> (BAA25296.1)	77.8
美国短吻鳄 <i>Alligator mississippiensis</i> (AAD17974.1)	78.0
非洲爪蟾 <i>Xenopus laevis</i> (NP_001084276.1)	78.4
高体鲷 <i>S. dumerili</i> (XP_022598265.1)	96.3
半滑舌鲷 <i>Cynoglossus semilaevis</i> (XP_008313399.1)	90.1
尼罗罗非鱼 <i>O. niloticus</i> (XP_005448042.1)	94.9
斑马宫丽鱼 <i>M. zebra</i> (XP_004557561.1)	94.3
裸盖鱼 <i>Anoplopoma fimbria</i> (AGH69791.1)	92.7
三刺鱼 <i>Gasterosteus aculeatus</i> (AAQ62978.1)	94.3
黑点青鳉 <i>Oryzias melastigma</i> (XP_024113797.1)	87.8

表 3 SOX9B 氨基酸序列的同源性

Tab. 3 GenBank accession numbers and the identity of SOX9B

物种(登录号) species (accession no.)	同源性/% identity
人 <i>Homo sapiens</i> (CAA86598.1)	75.0
黑猩猩 <i>P. troglodytes</i> (AAK01653.1)	74.8
小家鼠 <i>M. musculus</i> (AF421878_1)	75.2
原鸡 <i>G. gallus</i> (BAA25296.1)	74.4
美国短吻鳄 <i>A. mississippiensis</i> (AAD17974.1)	74.5
非洲爪蟾 <i>X. laevis</i> (NP_001087942.1)	75.5
金头鲷 <i>Sparus aurata</i> (AFV74659.1)	97.2
三斑海猪鱼 <i>Halichoeres trimaculatus</i> (BAV92755.1)	95.1
大鳞大麻哈鱼 <i>Oncorhynchus tshawytscha</i> (XP_024242336.1)	82.9
银大麻哈鱼 <i>Oncorhynchus kisutch</i> (XP_020309628.1)	82.6
虹鳟 <i>O. mykiss</i> (XP_021414510.1)	86.2
青鳉 <i>O. latipes</i> (AAX62151.1)	91.8

达量相近, 只有精巢表达量的1/2左右, 且雌雄个体间没有明显差异; 而在肌肉、头肾、肾脏、脾脏、胃、肠中都只有痕量表达。 *sox9b* 在雄性大黄鱼各组织(头肾除外)中广泛表达, 但以精巢中表达量最高, 而雌性大黄鱼脑、肝脏、眼、胃、

肌肉和肠中均有一定的表达量, 除肝脏和胃中表达量与雄鱼相近外, 其余组织中的表达量都低于雄鱼, 在卵巢中只有痕量表达, 在头肾、肾脏与脾脏中几乎检测不到其表达。

不同日龄(月龄)大黄鱼性腺中 *sox9a* 和 *sox9b* 基因表达趋势基本一致, 呈现先升高后降低再

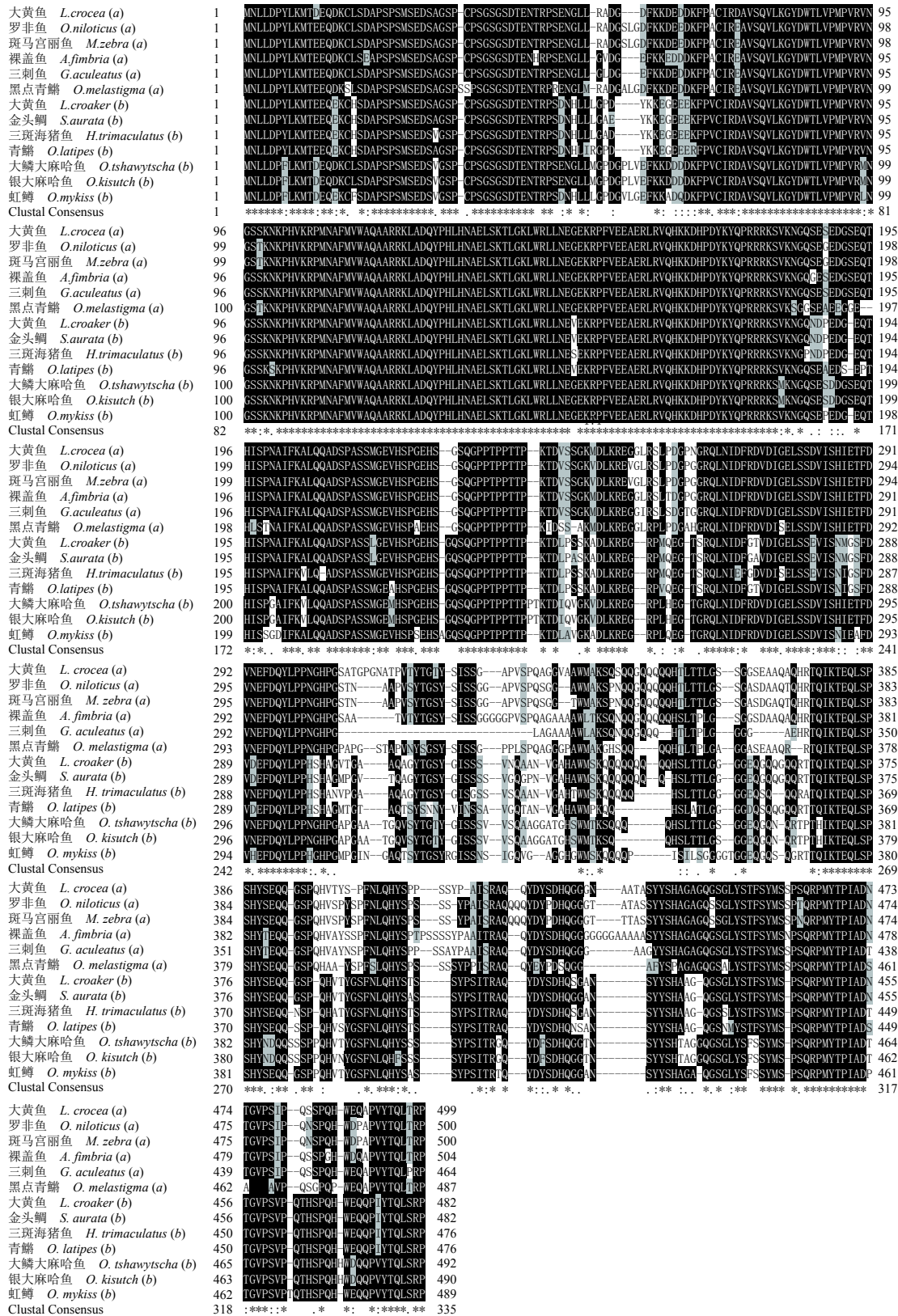


图3 大黄鱼SOX9A/B与其他物种SOX9A/B氨基酸序列比对

(a)表示sox9a; (b)表示sox9b; 下同

Fig. 3 Alignment of SOX9A/B amino acid sequences in *L. crocea* with those of other vertebrates

(a) indicates sox9a gene; (b) indicates sox9b gene; the same below



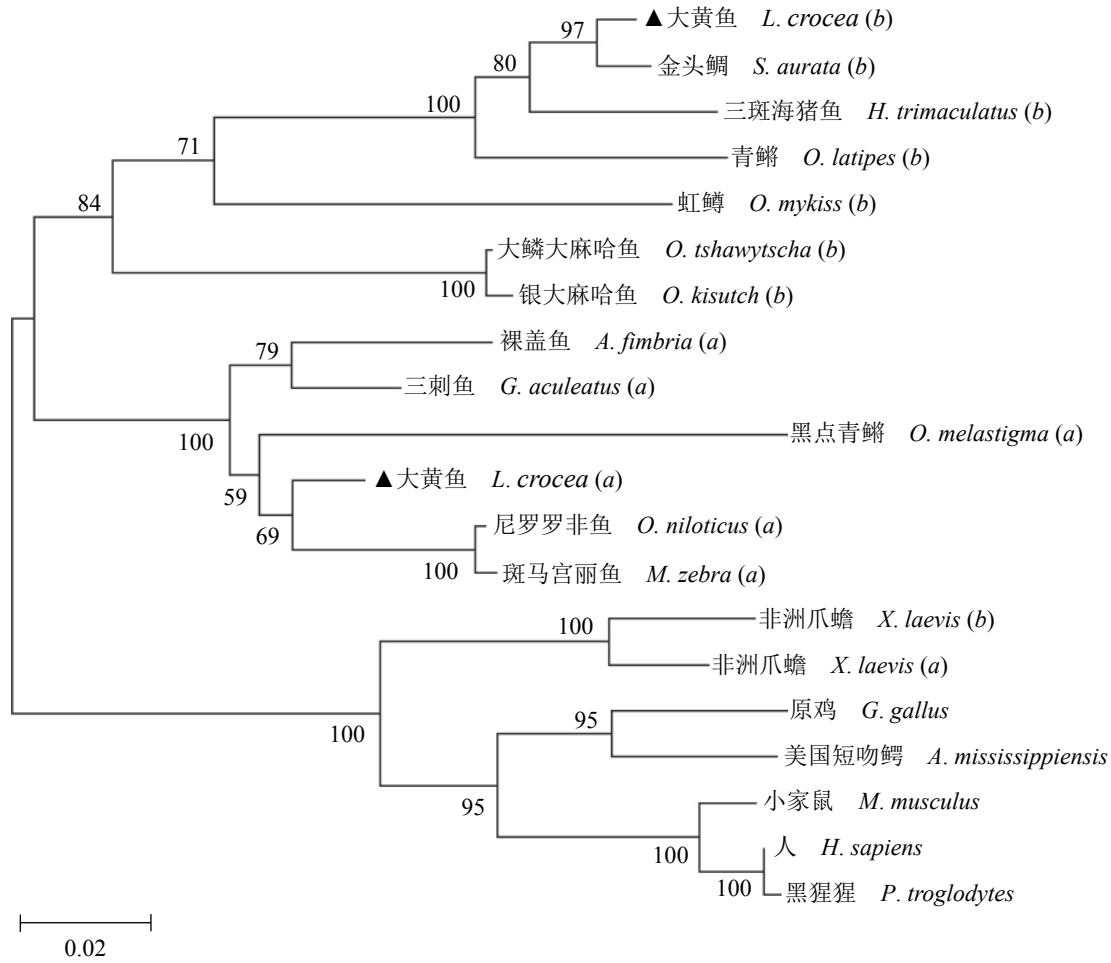


图 4 SOX9A/B蛋白质序列系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic analysis of amino acid sequences of SOX9A/B

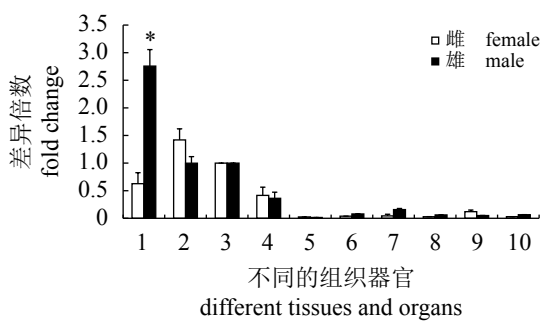


图 5 *sox9a*在大黄鱼不同组织中的表达分布

1. 性腺, 2. 眼, 3. 脑, 4. 肝脏, 5. 肌肉, 6. 头肾, 7. 肾脏, 8. 脾脏, 9. 胃, 10. 肠; “\*”表示差异显著( $P<0.05$ ); 下同

Fig. 5 Tissue distribution of *L. crocea sox9a*

1. gonad, 2. eye, 3. brain, 4. liver, 5. muscle, 6. headkindey, 7. kindey, 8. spleen, 9. stomach, 10. intestines; “\*” represents significant difference ( $P<0.05$ ); the same below

升高再降低再升高的趋势(图7, 图8)。从6 dph起到69 dph, *sox9a/b*的表达量都维持在较低水平,

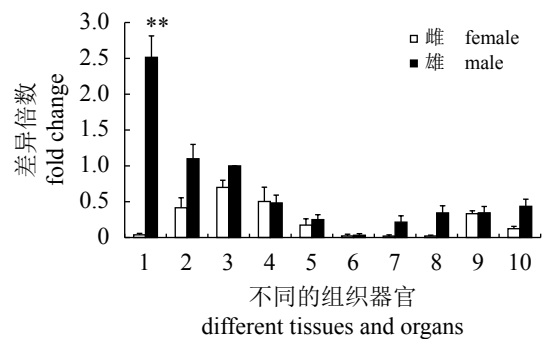


图 6 *sox9b*在大黄鱼不同组织中的表达分布

“\*\*\*”表示差异极显著( $P<0.01$ )

Fig. 6 Tissue distribution of *L. crocea sox9b*

“\*\*\*” represents highly significant difference ( $P<0.01$ )

在84 dph时都急剧上升达到高峰, *sox9a*的表达量随后急剧下降, 而*sox9b*的表达量下降幅度稍小。在123 dph *sox9a*和*sox9b*的表达量再一次急剧上升形成另一个表达高峰, 至8和7 mph时又显著

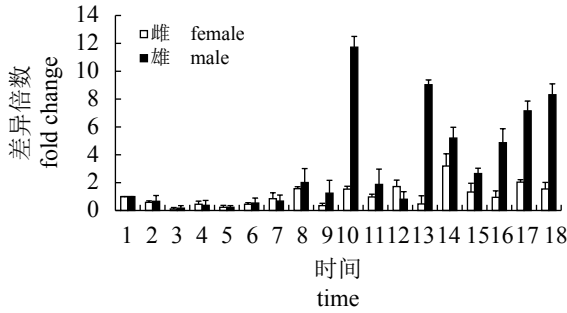


图7 不同日龄(月龄)大黄鱼性腺中 *sox9a* 基因的表达情况

1. 6 dph, 2. 13 dph, 3. 20 dph, 4. 27 dph, 5. 34 dph, 6. 41 dph, 7. 49 dph, 8. 55 dph, 9. 69 dph, 10. 84 dph, 11. 98 dph, 12. 112 dph, 13. 123 dph, 14. 7 mph, 15. 8 mph, 16. 10 mph, 17. 12 mph, 18. 24 mph; dph表示孵化后天数; mph表示孵化后月数; 下同

Fig. 7 Expression of *sox9a* in *L. crocea* gonad during different day/month post hatch

1. 6 dph, 2. 13 dph, 3. 20 dph, 4. 27 dph, 5. 34 dph, 6. 41 dph, 7. 49 dph, 8. 55 dph, 9. 69 dph, 10. 84 dph, 11. 98 dph, 12. 112 dph, 13. 123 dph, 14. 7 mph, 15. 8 mph, 16. 10 mph, 17. 12 mph, 18. 24 mph; dph represents day post hatch; mph represents month post hatch; the same below.

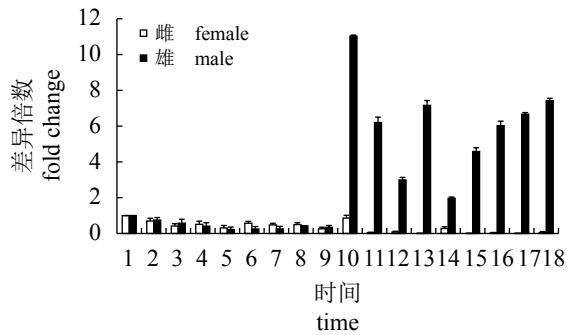


图8 不同日龄(月龄)大黄鱼性腺中 *sox9b* 基因的表达情况

Fig. 8 Expression of *sox9b* in *L. crocea* gonad during different day/month post hatch

下降到分别只有84 dph的22%和17%左右。之后又逐渐上升, 到24 mph时表达量又恢复到与123 dph时相近的较高水平。在雌鱼性腺中, *sox9a*一直维持较低水平的表达量, 而*sox9b*在84 dph后仅有痕量表达。

2.4 激素处理对大黄鱼性腺中 *sox9a/b* 基因表达的影响

与对照组相比, 17β-雌二醇处理组大黄鱼性

腺中*sox9a/b*的表达量均明显下降, 雄鱼的下降尤为显著, *sox9a*的表达量约只有对照组的1/7( $P < 0.05$ ), *sox9b*的表达量约只有对照组的1/24( $P < 0.01$ )(图9)。

*sox9a/b*基因在大黄鱼伪雄鱼性腺中表达量均显著高于正常雌鱼( $P < 0.05$ ), 而接近于正常雄鱼(图10)。

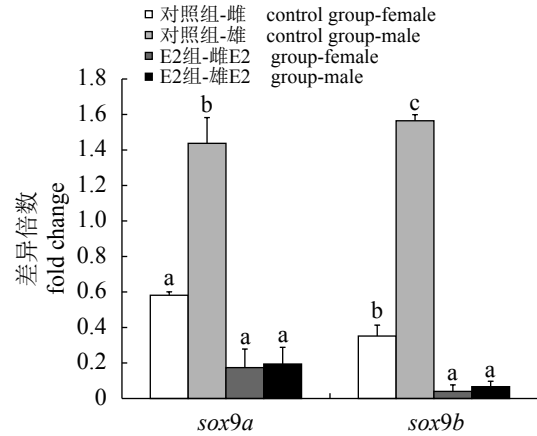


图9 E2处理后大黄鱼性腺中 *sox9a/b* 基因的表达情况

误差线上不同的小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ ); 相同小写字母表示差异不显著( $P > 0.05$ ); 下同

Fig. 9 Expression level of *sox9a/b* in *L. crocea* gonad after E2 treatment

The different lowercase letters above error bars indicate significant difference ( $P < 0.05$ ) and the same letters indicate no significant differences ( $P > 0.05$ ), the same below

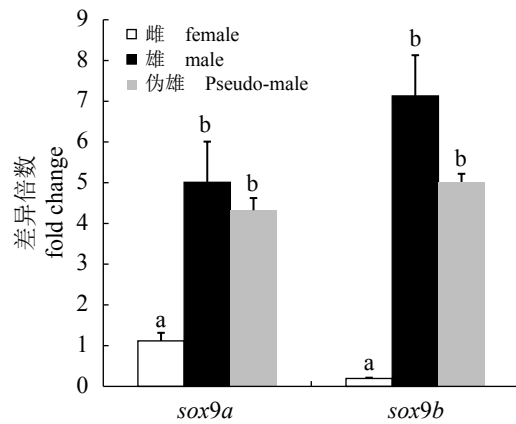


图10 *sox9a/b* 基因在大黄鱼正常雌雄鱼和伪雄鱼性腺中的相对表达量

Fig. 10 Expressions of *sox9a/b* gene in different *L. crocea* gonads from females, males and pseudo-males

### 3 讨论

性别决定与性别分化作为生命科学领域研究的热点问题一直被广泛研究与关注。目前,对哺乳动物的性别决定机制研究最为透彻,已知 $sry$ 基因是Y染色体上的性别决定基因<sup>[29]</sup>, $sox9$ 基因是最靠近 $sry$ 下游性别决定基因,在其性别决定中起重要作用<sup>[30-31]</sup>。鱼类处于生命进化过程中承前启后的关键位置,其性别决定机制多种多样<sup>[32-33]</sup>。已有研究表明,鱼类的 $sox9$ 基因在性腺发育过程中起到了一定作用<sup>[12-24]</sup>,而大黄鱼中尚未发现相关的研究报道。

本研究通过RACE克隆得到了大黄鱼 $sox9$ 基因的两亚型 $sox9a$ 和 $sox9b$ 基因的cDNA全长。通过比对发现,这两个基因与尼罗罗非鱼、青鳉等其他鱼类以及与哺乳类、两栖类、鸟类等高等脊椎动物均具有较高的相似性,HMG结构域更是高度保守。此外,均具有SOX9的典型特征,包括HMG结构域内的特征性基序AQAARRKL,2个独立的核定位信号NLS1和NLS2,及1个富含亮氨酸的核输出信号<sup>[34-35]</sup>。表明了SOX9蛋白结构在进化过程中的保守性,也预示了其功能的保守性。系统进化关系分析显示,哺乳类、鸟类、爬行类及两栖类的SOX9聚为一支,鱼类的SOX9A和SOX9B各自聚为一小支后再聚成与其他类群脊椎动物不同的另一支,各类群的分化关系明显。这表明鱼类(以及两栖类)SOX9A与SOX9B之间的分化是发生在类群(纲)的分化之后,并可能与鱼类在进化过程中经历了第三轮基因组复制有关<sup>[21, 23-24]</sup>。

qRT-PCR检测发现, $sox9a/b$ 基因在雌雄大黄鱼的多种组织中广泛表达,但在不同组织中的表达量不一致,以精巢中的表达量最高,表现出明显的组织特异性,这与在许多其他鱼类中观察到的结果一致<sup>[12-21]</sup>,表明 $sox9$ 基因可能参与了大黄鱼性腺发育过程。组织学观察表明,大黄鱼精巢形态分化发生在约在95日龄<sup>[36]</sup>,本研究中 $sox9a/b$ 基因在雄鱼孵化后第84天表达量达到高峰,在卵巢中也有少量表达,提示 $sox9$ 基因可能与原始生殖细胞的增殖有关,以此推测 $sox9$ 基因是大黄鱼性别调控级联通路上的一个关键基因,在精巢的发育过程中起着重要作用,对卵巢发育也有一定影响。在孵化后第123天,大黄鱼精巢中 $sox9a/b$ 基因的表达量又一次达到了一个

高峰,该时间点与 $gsdf$ 和 $amh$ 基因高表达的时间一致<sup>[25]</sup>,预示着在精巢分化后可能启动了一系列雄性相关基因的高表达,用于精巢进一步发育和维持。E2处理可以诱导遗传性雄鱼发育成生理性雌鱼(伪雌鱼),而MT处理则能诱导遗传性雌鱼发育成伪雄鱼<sup>[37-43]</sup>。本研究中E2处理后遗传性雄鱼 $sox9a$ 和 $sox9b$ 基因的表达受到抑制,表达量均显著下调,而MT处理则诱导遗传性雌鱼性腺中 $sox9$ 的表达, $sox9a$ 和 $sox9b$ 的表达量均显著升高,表达模式类似于正常雄鱼。这进一步说明 $sox9$ 与大黄鱼雄性性别分化及精巢发育密切相关,并在精巢的维持和性逆转过程中起重要作用;同时也提示可以在性腺出现组织学分化之前通过检测 $sox9$ 的表达模式来确定E2或MT处理是否发挥了作用。此外,本研究的结果显示, $sox9a/b$ 基因除了在精巢中高表达外,在脑、眼和肝脏中的也有较高的表达量,这可能与SOX9具有调控神经系统的分化和组织器官发育的功能有关<sup>[44-45]</sup>。值得指出的是,从本研究的结果看,大黄鱼 $sox9a/b$ 基因在不同组织、以及不同时期性腺中表达变化的规律总体上十分相似,但又不完全一致。相对于 $sox9b$ 而言, $sox9a$ 在卵巢、眼、脑中有较高的表达量,而在肌肉、胃以及雄鱼的肾脏、脾脏与肠道中, $sox9b$ 的表达量高于 $sox9a$ ,这表明大黄鱼 $sox9a/b$ 基因的功能可能也具有一定程度的分化,但具体的作用差异与机理尚需进一步研究。

综上所述,本研究成功克隆了大黄鱼 $sox9a/b$ 基因,组织表达谱和性腺中的时序表达谱分析表明,该两个基因均在雄性性腺中特异性高表达。E2处理后遗传性雄鱼 $sox9a/b$ 基因的表达受到严重抑制,而MT处理则能诱导遗传性雌鱼性腺中 $sox9a/b$ 基因发生高表达,表明 $sox9a/b$ 基因与大黄鱼雄性性别的分化和精巢的发育以及激素诱导性逆转过程密切相关。本研究的结果为阐明大黄鱼性别决定、发育、分化以及激素诱导性逆转的分子机制提供了参考。

#### 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(6506): 525-530.
- [2] Barrionuevo F, Scherer G. *SOX E genes: SOX9 and*

- SOX8* in mammalian testis development[J]. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2010, 42(3): 433-436.
- [3] Wagner T, Wirth J, Meyer J, *et al.* 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.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] Qin Y J, Bishop C E. *Sox9* is sufficient for functional testis development producing fertile male mice in the absence of *Sry*[J]. *Human Molecular Genetics*, 2005, 14(9): 1221-1229.
- [7] Kim G J, Sock E, Buchberger A, *et al.* Copy number variation of two separate regulatory regions upstream of *SOX9* causes isolated 46,XY or 46,XX disorder of sex development[J]. *Journal of Medical Genetics*, 2015, 52(4): 240-247.
- [8] Cox J J, Willatt L, Homfray T, *et al.* A *SOX9* duplication and familial 46, XX developmental testicular disorder[J]. *The New England Journal of Medicine*, 2011, 364(1): 91-93.
- [9] 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.
- [10] Moreno-Mendoza N, Harley V R, Merchant-Larios H. Differential expression of *SOX9* in gonads of the sea turtle *Lepidochelys olivacea* at male- or female-promoting temperatures[J]. *Journal of Experimental Zoology*, 1999, 284(6): 705-710.
- [11] Morais Da Silva S, Hacker A, Harley V, *et al.* *Sox9* expression during gonadal development implies a conserved role for the gene in testis differentiation in mammals and birds[J]. *Nature Genetics*, 1996, 14(1): 62-68.
- [12] 文爱韵, 尤锋, 孙鹏, 等. 牙鲆*sox9*基因的克隆与表达研究[J]. *海洋科学进展*, 2011, 29(1): 97-104.
- Wen A Y, You F, Sun P, *et al.* Study on cloning and expression of gene *sox9* in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. *Advances in Marine Science*, 2011, 29(1): 97-104(in Chinese).
- [13] Takamatsu N, Kanda H, Ito M, *et al.* Rainbow trout *SOX9*: cDNA cloning, gene structure and expression[J]. *Gene*, 1997, 202(1-2): 167-170.
- [14] 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(in Chinese).
- [15] 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(in Chinese).
- [16] 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, Mu 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(in Chinese).
- [17] 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(in Chinese).
- [18] Luo Y S, Hu W, Liu X C, *et al.* Molecular cloning and mRNA expression pattern of *sox9* during sex reversal in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*)[J]. *Aquaculture*, 2010, 306(1/2/3/4): 322-328.
- [19] Kobayashi T, Kajiura-Kobayashi H, Guan G J, *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*)[J]. *Developmental Dynamics*, 2008, 237(1): 297-306.
- [20] 常重杰, 周荣家, 余其兴. 大鳞副泥鳅中*Sox9*基因保守区的序列分析[J]. *遗传学报*, 2000, 27(2): 121-126.
- Chang Z J, Zhou R J, Yu Q X. The conservative region sequence analysis of *PdSox9* in *Paramisgurnus*

- dabryanus*[J]. *Acta Genetica Sinica*, 2000, 27(2): 121-126(in Chinese).
- [21] 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.
- [22] Johnsen H, Tveiten H, Torgersen J S, *et al.* Divergent and sex-dimorphic expression of the paralogs of the *Sox9*-*Amh*-*Cyp19a1* regulatory cascade in developing and adult atlantic cod (*Gadus morhua* L.)[J]. *Molecular Reproduction and Development*, 2013, 80(5): 358-370.
- [23] 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.
- [24] Yokoi H, Kobayashi T, Tanaka M, *et al.* *sox9* in a teleost fish, medaka (*Oryzias latipes*): evidence for diversified function of *Sox9* in gonad differentiation[J]. *Molecular Reproduction and Development*, 2002, 63(1): 5-16.
- [25] 林爱强, 谢仰杰, 徐双斌, 等. 大黄鱼 $gsdf$ 和 $amh$ 基因的克隆及表达分析[J]. *南方水产科学*, 2017, 13(6): 1-13.  
Lin A Q, Xie Y J, Xu S B, *et al.* Cloning and expression profiling of *gsdf* and *amh* genes in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*)[J]. *South China Fisheries Science*, 2017, 13(6): 1-13(in Chinese).
- [26] 陈芸, 周鹏, 张子平, 等. 大黄鱼 $cyp19a/b$ 基因的克隆与表达分析[J]. *集美大学学报(自然科学版)*, 2015, 20(2): 81-89.  
Chen Y, Zhou P, Zhang Z P, *et al.* Cloning and expression of *cyp19a/b* gene in large yellow croaker *Larimichthys crocea*[J]. *Journal of Jimei University (Natural Science)*, 2015, 20(2): 81-89(in Chinese).
- [27] 周鹏. 若干大黄鱼性腺发育相关基因的克隆与表达[D]. 厦门: 集美大学, 2009.  
Zhou P. Cloning and expression patterns of gonad related genes from large yellow croaker[D]. Xiamen: Jimei University, 2009 (in Chinese).
- [28] 林晓煜, 肖世俊, 李完波, 等. 大黄鱼性别特异SNP标记的开发与验证[J]. *水产学报*, 2018, 42(9): 1329-1337.  
Lin X Y, Xiao S J, Li W B, *et al.* Development and validation of sex - specific SNP markers in *Larimichthys crocea*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2018, 42(9): 1329-1337(in Chinese).
- [29] Margarit E, Coll M D, Oliva R, *et al.* SRY gene transferred to the long arm of the X chromosome in a Y-positive XX true hermaphrodite[J]. *American Journal of Medical Genetics*, 2000, 90(1): 25-28.
- [30] 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.
- [31] Kim Y, Kobayashi A, Sekido R, *et al.* *Fgf9* and *Wnt4* act as antagonistic signals to regulate mammalian sex determination[J]. *PLoS Biology*, 2006, 4(6): e187.
- [32] 梅洁, 桂建芳. 鱼类性别异形和性别决定的遗传基础及其生物技术操控[J]. *中国科学: 生命科学*, 2015, 58(2): 124-136.  
Mei J, Gui J F. Genetic basis and biotechnological manipulation of sexual dimorphism and sex determination in fish[J]. *Science China Life Sciences*, 2015, 58(2): 124-136.
- [33] Ospina-Álvarez N, Piferrer F. Temperature-dependent sex determination in fish revisited: prevalence, a single sex ratio response pattern, and possible effects of climate change[J]. *PLoS ONE*, 2008, 3(7): e2837.
- [34] Harley V R. The molecular action of testis-determining factors SRY and SOX9[J]. *Nature*, 2002, 244: 57-66.
- [35] Sinclair A H, Berta P, Palmer M S, *et al.* A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif[J]. *Nature*, 1990, 346(6281): 240-244.
- [36] 游秀容, 蔡明夷, 姜永华, 等. 大黄鱼性腺性别分化的组织学观察[J]. *水产学报*, 2012, 36(7): 1057-1064.  
You X R, Cai M Y, Jiang Y H, *et al.* Histological observation on gonadal sex differentiation in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2012, 36(7): 1057-1064(in Chinese).
- [37] Singh A K. Introduction of modern endocrine techniques for the production of monosex population of fishes[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2013, 181: 146-155.
- [38] Pérez M R, Fernandino J I, Carriquiriborde P, *et al.* Feminization and altered gonadal gene expression profile by ethinylestradiol exposure to pejerrey, *Odontesthes bonariensis*, a South American teleost fish[J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2012, 31(5): 941-946.
- [39] Park I S, Kim J H, Cho S H, *et al.* Sex differentiation and hormonal sex reversal in the bagrid catfish *Pseudobagr-*

- us fulvidraco* (Richardson)[J]. [Aquaculture](#), 2004, 232(1/2/3/4): 183-193.
- [40] Piferrer F. Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish[J]. [Aquaculture](#), 2001, 197(1/2/3/4): 229-281.
- [41] 楼允东. 鱼类性别控制研究的进展[J]. 上海海洋大学学报, 1992, 1(3/4): 168-173.
- Lou Y D. Progress on research of sex control in fish[J]. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 1992, 1(3/4): 168-173(in Chinese).
- [42] Nakamura M. Dosage-dependent changes in the effect of oral administration of Methyltestosterone on gonadal sex differentiation in *Tilapia mossambica*[J]. *Bulletin of the Faculty of Fisheries, Hokkaido University*, 1975, 26(2): 99-108.
- [43] 陈松林. 鱼类性别控制与细胞工程育种[M]. 北京: 科学出版社, 2013: 274-296.
- Chen S L. Sex control and cell engineering breeding of fish[M]. Beijing: Science Press, 2013: 274-296 (in Chinese).
- [44] Cheung M, Briscoe J. Neural crest development is regulated by the transcription factor Sox9[J]. [Development](#), 2003, 130(23): 5681-5693.
- [45] Chew L J, Gallo V. The Yin and Yang of Sox proteins: activation and repression in development and disease[J]. [Journal of Neuroscience Research](#), 2009, 87(15): 3277-3287.

## Cloning and expression of *sox9a/b* gene in the large yellow croaker (*Larimichthys crocea*)

ZHANG Meng<sup>1</sup>, ZHU Yangyang<sup>1</sup>, LI Wanbo<sup>1</sup>, SHEN Weiliang<sup>2</sup>,  
WU Xiongfei<sup>2</sup>, YE Kun<sup>1</sup>, WANG Zhiyong<sup>1,3\*</sup>

(1. Key Laboratory of Healthy Mariculture for the East China Sea, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Jimei University, Xiamen 361021, China;

2. Ningbo Ocean and Fisheries Institution, Ningbo 315103, China;

3. Function Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071, China)

**Abstract:** To elucidate the role of *sox9* in sex determination and differentiation of the large yellow croaker (*Larimichthys crocea*), the full length of *sox9a* and *sox9b* were cloned using reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR) and rapid amplification of cDNA ends (RACE). The difference of the gene expression in various tissues and development stages was analyzed through quantitative real-time PCR. Expression profiles of *sox9a/b* after 17 $\beta$ -estradiol or 17 $\alpha$ -methyl testosterone treatments were also examined. The full-length cDNA of *sox9a* gene is 2 442 bp (NCBI: MH996431), including a 476 bp 5' UTR, a 466 bp 3' UTR and a 1 500 bp ORF coding a polypeptide of 499 amino acids. The full-length cDNA of *sox9b* gene is 2 199 bp (NCBI: MH996432), including a 335 bp 5' UTR, a 415 bp 3' UTR and a 1 449 bp ORF coding a polypeptide of 482 amino acids. Quantitative Real-time PCR results showed that *sox9a* was primarily expressed in gonad, eye, brain, liver, and the expression level in testis was significantly higher than that in ovaries. *sox9b* was widely expressed in multiple tissues in large yellow croaker; the expression level was the highest in testes, but can be barely detected in ovaries. At early developmental stages of fry, *sox9a/b* was expressed at a lower level. *Sox9a/b* peaked at 84 dph (day post hatch) and 123 dph, then their expression declined and gradually rose again at 10 mph. In addition, 17 $\beta$ -estradiol can significantly down-regulate the expression of *sox9a* and *sox9b* in testes. 17 $\alpha$ -methyl testosterone can significantly elevate the expression of *sox9a* and *sox9b* in gonads. The study demonstrated that *sox9a/b* may play important roles in sex determination and differentiation in the large yellow croaker. However, the functions of the two genes may be different.

**Key words:** *Larimichthys crocea*; *sox9a/b* gene; cloning; expression

**Corresponding author:** WANG Zhiyong. E-mail: zywang@jmu.edu.cn

**Funding projects:** Joint Funds of the National Natural Science Foundation of China (U1705231); China Agriculture Research System (CARS-47-G04)