

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2017.17123

栉孔扇贝 *sox9* 基因的 cDNA 克隆及其在不同发育时期性腺中的表达特征

梁少帅, 于潇含, 杨丹丹, 秦贞奎

中国海洋大学, 海洋生物遗传学与育种教育部重点实验室, 山东 青岛 266003

摘要: SOX9 是 SOX 家族的 SOXE 亚族成员, 在脊椎动物骨骼发育、胰腺发育、性别决定与分化以及肿瘤形成中发挥重要的作用。*sox9* 在不同种类脊椎动物性腺中的表达存在差异, 在无脊椎动物性腺中的表达特征尚不清楚。本研究利用 RACE 技术克隆了栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) *sox9* (*Cf-sox9*) 全长的 cDNA 序列, 其长度为 2835 bp, 开放阅读框为 1413 bp, 编码 470 个氨基酸。预测的氨基酸序列具有 SOX 家族的 HMG-box 和 SOXE 亚族的高保守区域, 但没有脊椎动物羧基端的 Pro-Gln-Ser rich 区域。原位杂交和免疫组织化学技术确定 *Cf-sox9* mRNA 和 *Cf-SOX9* 蛋白均定位在栉孔扇贝精巢和卵巢的所有生殖细胞中, 并且在不同发育时期性腺中呈现了类似的表达规律, 即在精巢中, 阳性信号在精母细胞中最强, 在精子中最弱; 在卵巢中, 阳性信号在卵原细胞、卵母细胞以及成熟卵中呈现逐渐减弱的趋势。这一表达特征与脊椎动物性腺中多样的性别差异表达特征不同, 提示 *sox9* 在贝类性腺发育和配子发生中的作用可能与大多数脊椎动物不同。

关键词: 栉孔扇贝; *sox9*; 性腺; 配子发生

中图分类号: Q96

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2017)06-1184-09

SOX(SRY-related HMG-box genes)是一类含有 HMG-box 的转录因子, 主要与脊椎动物胚胎发生、性别决定、组织器官形成以及疾病发生等有关。目前已经发现了 30 多个 SOX 家族成员, 分属于 A~H 亚族^[1]。SOX9 是 SOXE 亚族成员, 也是该亚族中最受关注的成员之一, 其参与骨骼发育、胰腺发育、肿瘤形成等的调控, 特别在性别决定与分化中起关键作用^[2-5]。*sox9* 基因是继 *sry* 基因后发现的又一个与性别决定相关的基因, 但其在脊椎动物性别决定与分化中的表达和功能因物种不同而异。在哺乳类、鸟类和爬行动物中, *sox9* 仅在精巢中特异表达^[4, 6], 而在两栖类和鱼类中, *sox9* 在精巢和卵巢中均表达^[7-8]。已有的功能研究表明, *sox9* 与小鼠和太平洋丽龟的雄性性别决定密切相关^[9-11]。但 SOX9 在无脊椎动物性

腺发育以及性别分化中的作用如何迄今尚无相关的研究报道。本研究以性别稳定的栉孔扇贝为实验材料, 采用 RACE 技术克隆了栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) *sox9* (*Cf-sox9*) 全长 cDNA 序列, 采用原位杂交和免疫组化技术确定其在栉孔扇贝不同发育时期精巢和卵巢中的细胞学定位, 旨在为探索该基因在双壳动物中的功能提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

栉孔扇贝采自青岛沙子口海湾, 壳高为 (6.39±0.41) cm。解剖取栉孔扇贝性腺组织, 一部分于 4% 多聚甲醛中 4℃ 固定 24 h, 0.01 mol/L 磷酸缓冲液(PBS)洗 2 遍, 再经过梯度甲醇(体积分数分别为 25%、50%、75%、100%)脱水后, 保存于 -30℃

收稿日期: 2017-03-27; 修订日期: 2017-06-09.

基金项目: 国家 863 计划项目(2012AA10A402); 山东省自然科学基金资助项目(ZR2016CQ24).

作者简介: 梁少帅(1988-), 男, 博士研究生, 生殖与发育. E-mail: lshsh888@qq.com

通信作者: 秦贞奎, 讲师. E-mail: qinzk@ouc.edu.cn

冰箱中, 用于原位杂交和免疫组化实验; 另一部分性腺组织块迅速置于液氮中速冻后, 于-80℃冰箱中保存, 用于总 RNA 和总蛋白提取。

根据组织学特征和性腺指数(GSI), 将柄孔扇贝分为增殖期(GSI: 雄贝 4.07%, 雌贝 3.98%)、生长期(GSI: 雄贝 6.90%, 雌贝 6.87%)和成熟期(GSI: 雄贝 9.76%, 雌贝 9.62%)^[12]。根据公式 GSI=性腺重/软体重×100%, 计算各时期精巢和卵巢的 GSI。

1.2 总 RNA 提取和 RACE cDNA 第一链合成

采用异硫氰酸胍法提取柄孔扇贝增殖期精巢的总 RNA, 使用 RNase-free 的 DNase I 消除基因组 DNA, 紫外光分光光度计和 1.2%的琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 质量。使用 SMARTTM-RACE cDNA Amplification Kit (Clontech, 美国)并按照操作指南合成 RACE cDNA 第一链。

1.3 目的片段全长 cDNA 克隆及序列分析

根据柄孔扇贝转录组(GenBank accession no. SRX218546)中获得的 *sox9* cDNA 片段序列设计 RACE 特异引物, 5'-RACE: CGGAGGGGGAGT-GTTCATTTAGACC 和 3'-RACE: GTCCAAACG-GCGAGAAGAGGAAACC。以增殖期精巢 cDNA 为模板, 用 SMARTTM-RACE cDNA Amplification Kit 分别进行 5' 和 3'RACE 扩增。扩增产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测、胶回收、连接 pMD18-T 载体、转化大肠杆菌 DH5 α 后, 挑取单菌落, 送往华大基因测序。

使用 SeqMan 软件将获得的 5'RACE 和 3'RACE 片段进行拼接, 以获得全长 cDNA 序列。NCBI 在线 BLAST 程序(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), 分析目的蛋白序列与其他物种 SOX9 蛋白序列的一致性。使用 Clustal X 2.0 和 DNAMAN 软件进行多序列比对。使用 MEGA 5.0 软件并采用邻接法(neighbor joining, NJ)构建进化树。

1.4 原位杂交

根据 *Cf-sox9* 全长 cDNA 序列设计引物, 正向引物 Probe-S: ATTTAGGTGACACTATAGAAGC-GGTCCTGCCGCAATTAGCCTG (下划线为 SP6 启动子序列), 反向引物 Probe-AS: TAATACGAC-TCACTATAGGGAGACATGAGAGGTCTGTGTC

CTCGTCC (下划线为 T7 启动子序列), PCR 扩增获得一个 444 bp 的片段。将扩增产物回收, 使用 DIG RNA Labeling kit (Roche, 瑞士)并按照操作说明进行体外转录, 获得 *Cf-sox9* DIG 标记的 RNA 探针。

取各发育时期的柄孔扇贝性腺进行常规石蜡切片, 各时期卵巢的厚度均为 5 μm , 增殖期和生长期精巢厚度为 4 μm , 成熟期精巢为 3 μm 。将切片粘贴到涂有 0.1% 多聚赖氨酸的载玻片上, 37℃ 烤片过夜后, 依次进行二甲苯脱蜡和梯度酒精复水, 37℃ 下用 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 蛋白酶 K 消化 15 min, 原位杂交实验步骤参照冯政夫等^[13]的描述进行。显色结束后用 1% 的中性红进行复染, 封片后用 Nikon E80i 显微成像系统进行观察和拍照。

1.5 抗体制备和免疫印迹

根据 *Cf-sox9* 全长 cDNA 序列设计一对引物用以扩增其全长 ORF 序列, 正向引物 ORF-S: GAGCTCATGAGTGACTCTGATGAGAGC(下划线为 *SacI* 酶切位点), ORF-AS: CTCGAGTGTGA-ACCGGTTCCATGTCTG(下划线为 *XhoI* 酶切位点), 以柄孔扇贝增殖期精巢 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。将扩增产物回收后与 pMD-18T 载体连接, 再转入 DH5 α 感受态细胞中, 挑取单菌落, 送往华大基因测序。将含有目的基因 ORF 序列的 pMD-18T 载体与 pET-28a 表达载体分别用 *SacI* 和 *XhoI* 进行双酶切, 回收酶切产物后连接、转化到 BL21 表达菌中, 37℃ 倒置培养过夜。次日按照 1:100 接种扩大培养, 当 OD 值在 600 nm 波长下达到 0.5 时, 加入 1 mmol/L 异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(Isopropyl-β-D-thiogalactoside, IPTG)诱导表达 6 h, 收集总蛋白。用 8 mol/L 的尿素溶解包涵体蛋白并用镍柱纯化重组蛋白, 将纯化后的蛋白送往上海生工制备兔抗 *Cf-SOX9* 多克隆抗体。

通过 Western blot 检测 *Cf-SOX9* 多克隆抗体的有效性和特异性。使用动物组织蛋白提取试剂盒(CoWin, 中国)提取生长期柄孔扇贝精巢、卵巢的总蛋白, SDS-PAGE 电泳后, 按照正极-5 层滤纸-PVDF 膜-SDS-PAGE 胶-5 层滤纸-负极的顺序依次将其放入转膜仪(BIO-RAD, 美国)中 22 V 电压下转膜 20 min。按照 1:1000 的比例将 *Cf-SOX9* 多克隆抗体稀释于 5% 脱脂奶粉中, 4℃ 孵育过夜,

再用 HRP 标记的羊抗兔 IgG 抗体室温孵育 3 h, 使用 DAB 显色试剂盒(Roche, 瑞士)进行显色后, 于凝胶成像系统中拍照。

1.6 免疫组化

取各发育时期的栉孔扇贝性腺, 按照 1.4 的方法制备石蜡切片, 并脱蜡、复水。室温下, 用 3% 的 H_2O_2 (甲醇稀释)浸泡切片 15 min 以去除内源性过氧化物酶, 在 85 °C EDTA 溶液中浸泡 40 min 进行抗原修复。5% 的脱脂奶粉室温封闭切片 1 h, 按照 1 : 1000 的比例将 *Cf*-SOX9 多克隆抗体稀释于 5% 脱脂奶粉中, 4 °C 孵育过夜。用 HRP 标记的羊抗兔 IgG 抗体室温孵育 3 h 后, 用 DAB 显色试剂盒进行显色, 苏木精复染, 封片后用 Nikon E80i 显微成像系统进行观察和拍照。

2 结果与分析

2.1 *Cf-sox9* 全长 cDNA 的克隆及序列特征分析

通过 RACE 扩增获得 735 bp 的 5'-RACE 片段和 2448 bp 的 3'-RACE 片段。经过拼接后, 获得全长为 2835 bp 的 cDNA 序列(GenBank acc. no. KY618801)。该序列包含 149 bp 的 5' 非翻译区(untranslated region, UTR), 1413 bp 的开放阅读框(open reading frame, ORF)以及 1273 bp 的 3'UTR; 该 ORF 序列共编码 470 个氨基酸, 预测的蛋白分子质量为 51.97 kD, 等电点为 7.02。

BLAST 分析显示, 本实验预测的氨基酸序列与已知物种的 SOX9 蛋白具有同源性, 其中与合浦珠母贝(*Pinctada fucata*) SOX9 的一致性为 64%, 与黑蝶贝(*Pinctada margaritifera*) SOX9 的一致性为 64%, 与非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)SOX9 的一致性为 52%。多序列比对发现, 预测的氨基酸序列除了具有 SOX 家族的 HMG-box 外, 还具有 SOXE 亚族的高度保守序列(图 2); 此外, 栒孔扇贝预测蛋白的 HMG-box 序列和已报道的 SOXE 亚族蛋白 HMG-box 序列间的一致性高于 96% (图 1), 而与其他 SOX 亚族成员 HMG-box 序列之间的一致性低于 80%。然而, 在预测的氨基酸序列以及合浦珠母贝 (GenBank acc. no. KC462556.1) 和黑蝶贝 (GenBank acc. no. KJ907376.1) 的 SOX9 蛋白序列中, 均未发现脊椎动物 SOX9 蛋白羧基端所具有的 Pro-Gln-Ser rich 区域以及哺乳动物所具有的 Pro-Gln-Ala 区域(图 2)。系统进化分析发现, 预测的蛋白首先与合浦珠母贝和黑蝶贝的 SOX9 聚类, 再与欧洲横纹乌贼(*Sepia officinalis*)的 SOXE 聚类, 之后与 SOXE 亚族成员聚类(图 3)。

2.2 栒孔扇贝 *sox9* mRNA 和 SOX9 蛋白的细胞学定位

原位杂交结果显示, 栒孔扇贝 *sox9* mRNA 在卵巢的所有生殖细胞中均有表达, 在不同发育时期卵巢的各类型生殖细胞中的表达规律基本一致,

SOX9 人 <i>Homo sapiens</i>	PH KREMNAFMVWAQAAARRKLADQ P	HLHNAELSKTLGKLWRLIN ESEKRPFV EAERLRVQHKKD EDYKYQFRRRK	79
SOX9 小鼠 <i>Mus musculus</i>	PH KREMNAFMVWAQAAARRKLADQ P	HLHNAELSKTLGKLWRLIN ESEKRPFV EAERLRVQHKKD EDYKYQFRRRK	79
SOX9 鸡 <i>Gallus gallus</i>	PH KREMNAFMVWAQAAARRKLADQ P	HLHNAELSKTLGKLWRLIN ESEKRPFV EAERLRVQHKKD EDYKYQFRRRK	79
SOX9 短吻鳄 <i>Alligator mississippiensis</i>	PH KREMNAFMVWAQAAARRKLADQ P	HLHNAELSKTLGKLWRLIN ESEKRPFV EAERLRVQHKKD EDYKYQFRRRK	79
SOX9 丽鱼 <i>Lepidochelys olivaceasis</i>	PH KREMNAFMVWAQAAARRKLADQ P	HLHNAELSKTLGKLWRLIN ESEKRPFV EAERLRVQHKKD EDYKYQFRRRK	79
SOX9 非洲爪蟾 <i>Xenopus laevis</i>	PH KREMNAFMVWAQAAARRKLADQ P	HLHNAELSKTLGKLWRLIN ESEKRPFV EAERLRVQHKKD EDYKYQFRRRK	79
SOX9 赤点石斑鱼 <i>Epinephelus australis</i>	PH KREMNAFMVWAQAAARRKLADQ P	HLHNAELSKTLGKLWRLIN ESEKRPFV EAERLRVQHKKD EDYKYQFRRRK	79
SOX9 栒孔扇贝 <i>Chlamys farreri</i>	PH KREMNAFMVWAQAAARRKLADQ P	HLHNAELSKTLGKLWRLIN ESEKRPFV EAERLRVQHKKD EDYKYQFRRRK	79
SOX9 合浦珠母贝 <i>Pinctada fucata</i>	PH KREMNAFMVWAQAAARRKLADQ P	HLHNAELSKTLGKLWRLIN ESEKRPFV EAERLRVQHKKD EDYKYQFRRRK	79
SOX9 黑蝶贝 <i>Pinctada margaritifera</i>	PH KREMNAFMVWAQAAARRKLADQ P	HLHNAELSKTLGKLWRLIN ESEKRPFV EAERLRVQHKKD EDYKYQFRRRK	79
SOX8 人 <i>Homo sapiens</i>	PH KREMNAFMVWAQAAARRKLADQ P	HLHNAELSKTLGKLWRLIN ESEKRPFV EAERLRVQHKKD EDYKYQFRRRK	79
SOX8 小鼠 <i>Mus musculus</i>	PH KREMNAFMVWAQAAARRKLADQ P	HLHNAELSKTLGKLWRLIN ESEKRPFV EAERLRVQHKKD EDYKYQFRRRK	79
SOX8 非洲爪蟾 <i>Xenopus laevis</i>	PH KREMNAFMVWAQAAARRKLADQ P	HLHNAELSKTLGKLWRLIN ESEKRPFV EAERLRVQHKKD EDYKYQFRRRK	79
SOX8 斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	PH KREMNAFMVWAQAAARRKLADQ P	HLHNAELSKTLGKLWRLIN ESEKRPFV EAERLRVQHKKD EDYKYQFRRRK	79
SOX8 红鳍东方鲀 <i>Takifugu rubripes</i>	PH KREMNAFMVWAQAAARRKLADQ P	HLHNAELSKTLGKLWRLIN ESEKRPFV EAERLRVQHKKD EDYKYQFRRRK	79
SOX10 人 <i>Homo sapiens</i>	PH KREMNAFMVWAQAAARRKLADQ P	HLHNAELSKTLGKLWRLIN ESEKRPFV EAERLRVQHKKD EDYKYQFRRRK	79
SOX10 小鼠 <i>Mus musculus</i>	PH KREMNAFMVWAQAAARRKLADQ P	HLHNAELSKTLGKLWRLIN ESEKRPFV EAERLRVQHKKD EDYKYQFRRRK	79
SOX10 鸡 <i>Gallus gallus</i>	PH KREMNAFMVWAQAAARRKLADQ P	HLHNAELSKTLGKLWRLIN ESEKRPFV EAERLRVQHKKD EDYKYQFRRRK	79
SOX10 珊瑚蛇 <i>Micruurus fulvius</i>	PH KREMNAFMVWAQAAARRKLADQ P	HLHNAELSKTLGKLWRLIN ESEKRPFV EAERLRVQHKKD EDYKYQFRRRK	79
SOX10 非洲爪蟾 <i>Xenopus laevis</i>	PH KREMNAFMVWAQAAARRKLADQ P	HLHNAELSKTLGKLWRLIN ESEKRPFV EAERLRVQHKKD EDYKYQFRRRK	79
SOX10 斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	PH KREMNAFMVWAQAAARRKLADQ P	HLHNAELSKTLGKLWRLIN ESEKRPFV EAERLRVQHKKD EDYKYQFRRRK	79
SOX10 青鳉 <i>Oryzias latipes</i>	PH KREMNAFMVWAQAAARRKLADQ P	HLHNAELSKTLGKLWRLIN ESEKRPFV EAERLRVQHKKD EDYKYQFRRRK	79

图 1 不同物种 SOXE 亚族 HMG-box 的多序列比对

栉孔扇贝与其他物种的 HMG-box 一致性高于 96.43%。

Fig. 1 Multiple sequence alignment of the HMG-box of SOXE group from different species
The identity of HMG-box is over 96.43% between *C. farreri* and other species.

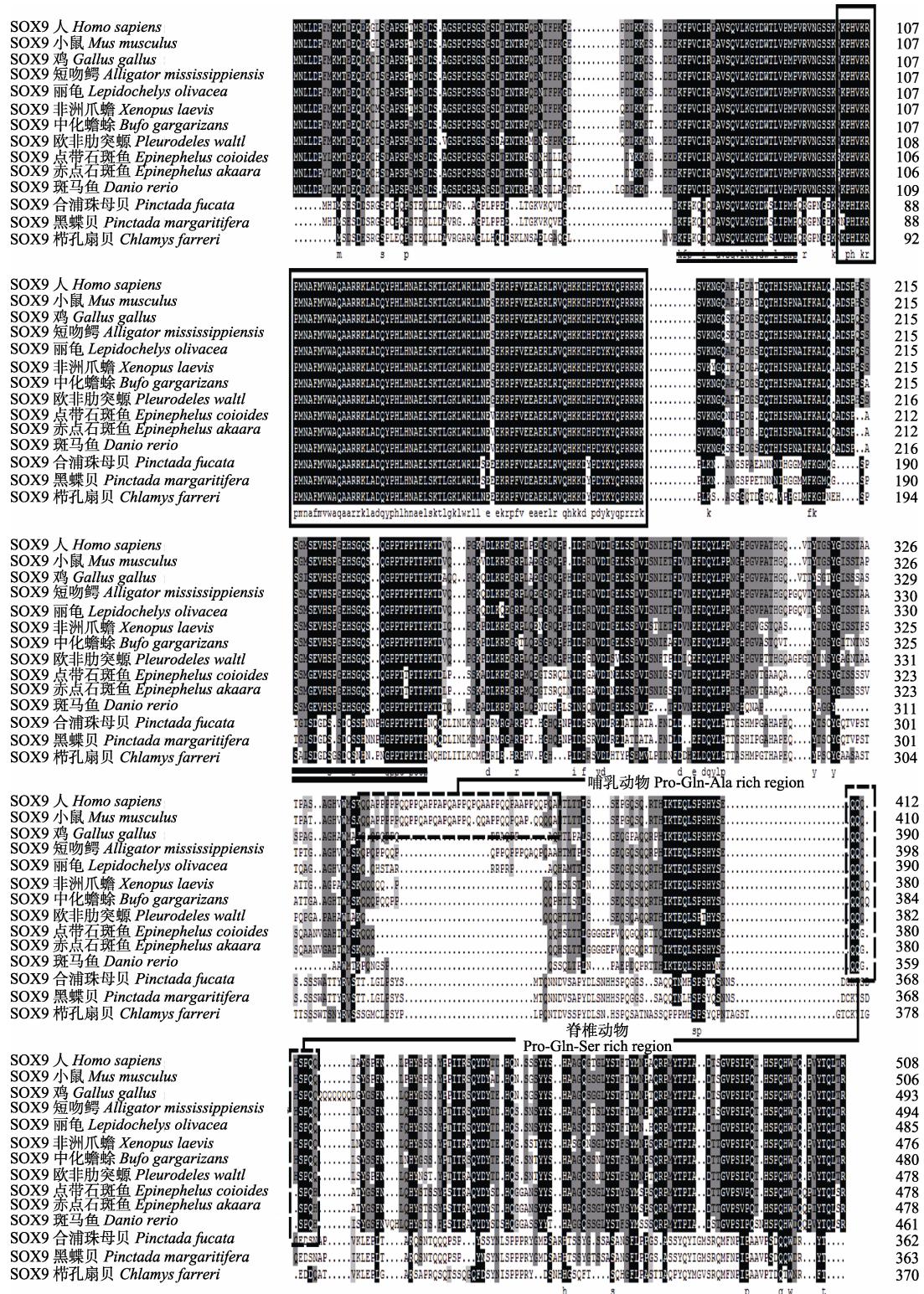


图 2 不同物种 SOX9 蛋白多序列比对

HMG-box 用方框标记; SOXE 亚族高度保守区用双下划线标记; 脊椎动物羧基端(富含脯氨酸、谷氨酰胺和丝氨酸的区域)和哺乳动物羧基端(富含脯氨酸、谷氨酰胺和丙氨酸的区域)的特异氨基酸富集区分别用竖向和横向虚线框标记。

Fig. 2 Multiple sequence alignment of the SOX9s from different species

HMG-box are boxed; SOXE highly conserved region are double underlined; C-terminal Pro-Gln-Ser rich region of vertebrate and the Pro-Gln-Ala rich region of mammal are boxed in vertical dotted line and lateral dotted line, respectively.

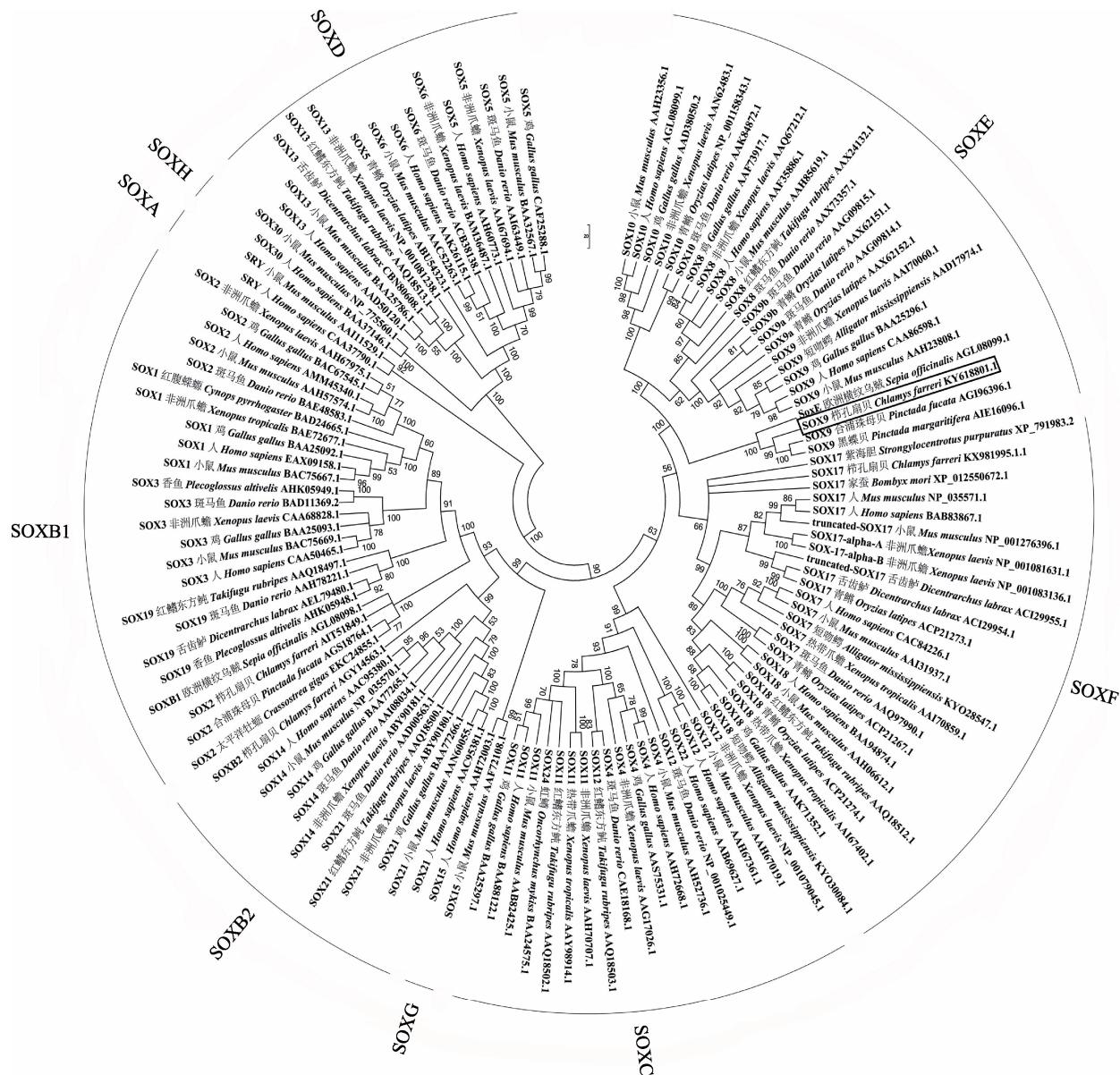


图 3 不同物种 SOX 蛋白的系统进化分析

Fig. 3 Phylogenetic analysis among SOX proteins from different species

即：阳性信号的强度在卵原细胞中最强，卵母细胞和成熟卵中的阳性信号强度逐渐减弱（图 4a~c）。SOX9 蛋白在栉孔扇贝不同发育时期卵巢中的细胞学定位与其 *sox9* mRNA 的结果基本一致（图 4f~h）。

在栉孔扇贝的精巢中，*sox9* mRNA 和 SOX9 蛋白同样定位在所有类型的生殖细胞中，并在各发育时期精巢的所有生殖细胞中呈现类似的表达规律，即阳性信号的强度在精母细胞中最高，精子中的阳性信号最弱（图 5a~g、i~o）。

使用 *Cf-sox9* 正义探针未在栉孔扇贝卵巢和

精巢中检测到阳性杂交信号（图 4d、图 5h），使用免疫前血清未在扇贝卵巢和精巢中检测到阳性信号（图 4i、5p）。Western blot 结果显示，栉孔扇贝 SOX9 的多克隆抗体在栉孔扇贝生长期精巢和卵巢总蛋白提取物中存在特异条带（图 4e）。

3 讨论

本研究获得的栉孔扇贝 cDNA 序列全长为 2835 bp，所推导的氨基酸序列与其他物种的 SOX9 高度同源，其序列中包含 SOX 家族保守的 HMG-box 结构域和 SOXE 亚家族保守序列，且与

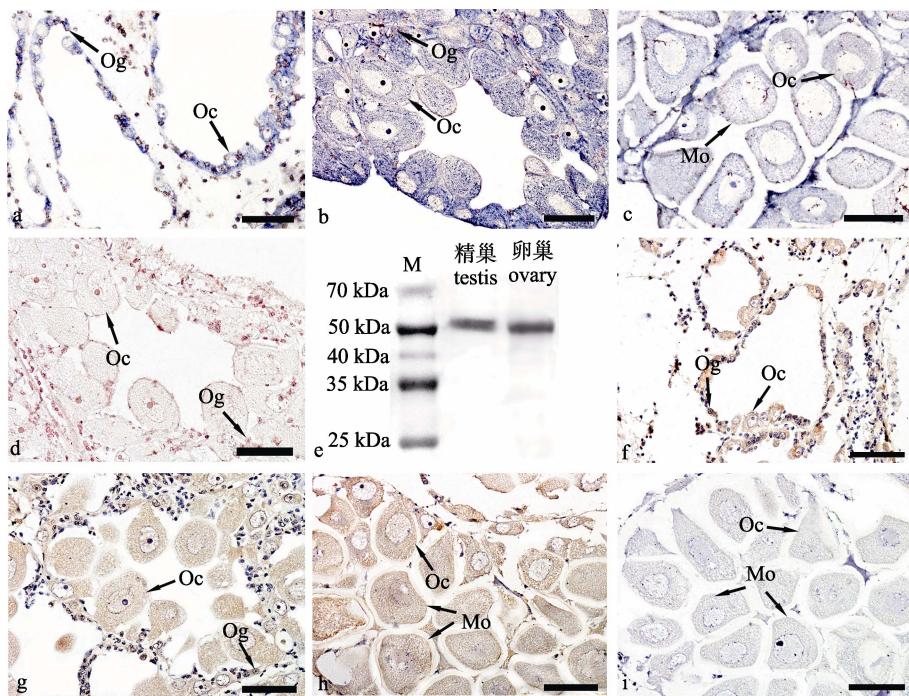


图4 柄孔扇贝 *sox9* mRNA 和 SOX9 蛋白在卵巢中的细胞学定位

a~c: 原位杂交, 蓝色为阳性探针信号; d: 使用阴性探针的原位杂交阴性对照; e: Western blot 检测, 在精巢和卵巢总蛋白提取物中存在特异条带; f~h: 免疫组化, 棕色为柄孔扇贝 SOX9 多克隆抗体信号; i: 使用免疫前血清的

免疫组化阴性对照. Mo: 成熟卵; Oc: 卵母细胞; Og: 卵原细胞. 标尺: 50 μm.

Fig. 4 Localization of *Cf-sox9* and *Cf-SOX9* in ovaries of *C. farreri* demonstrated by *in situ* hybridization and immunohistochemistry. a: proliferative stage; b: growing stage; c: mature stage; d: growing stage; f: proliferative stage; g: growing stage; h: mature stage; i: mature stage. a~c: positive signals with an antisense probe are indicated in blue by *in situ* hybridization; d: negative control for *in situ* hybridization with sense probe; e: a specific band is detected in testis or ovary extract on Western blotting; f~h: positive signals with anti-*Cf-SOX9* antibody are indicated in brown by immunohistochemistry; i: negative control for immunohistochemistry with pre-immune serum. Mo: mature oocyte; Oc: oocyte; Og: oogonium. Bar: 50 μm.

其他物种的 SOX9 聚类, 初步确定该序列为柄孔扇贝 *sox9* cDNA 全长序列。然而, 多序列比对发现, 柄孔扇贝和已报道的 2 种贝类(合浦珠母贝和黑蝶贝)SOX9 氨基酸序列中均缺失脊椎动物 SOX9 羧基端的 Pro-Gln-Ser rich 区域^[3]。Südbeck 等^[14]报道当人的 SOX9 羧基端的 Pro-Gln-Ser rich 区域发生无义突变或者移码突变时, 可能导致该区域的功能丢失, 进而引起男性的性逆转, 表明该区域与男性性别维持密切相关。由此我们推测, 从贝类到高等脊椎动物的物种进化中, SOX9 序列中该区域经历了从无到有的变化, 这种改变可能也是导致 SOX9 在不同物种性别决定中产生功能差异的原因之一, 但其具体功能有待进一步的探究。此外, 柄孔扇贝等非哺乳动物的 SOX9 中还缺失哺乳类 SOX9 特有的 Pro-Gln-Ala rich 区域。Agrawal 等^[15]发现小鼠、人、鸡以及鳄鱼的 SOX9

序列在 Pro-Gln-Ala rich 区域的基因编码能力低, 存在选择性剪切位点, 提出脊椎动物 SOX9 中 Pro-Gln-Ala rich 区域的缺失, 可能是发生了选择性剪切, 推测物种越低等, 该区域的缺失程度越大。据此, 我们初步认为, 柄孔扇贝等贝类中的这种 Pro-Gln-Ala rich 缺失应该也是由选择性剪切引起的, 至于这种缺失引起了哪些功能的改变, 有待进一步研究。再有, 一些脊椎动物的 *sox9* 存在 2 种转录本 *sox9a* 和 *sox9β*(缺失了 HMG-box), 如粗皮蛙(*Rana rugosa*)、斑马鱼(*Danio rerio*)、红鳍东方鲀(*Fugu rubripes*)、青鳉(*Oryzias latipe*)等^[7~8, 14~15]。本研究在柄孔扇贝中仅获得了一个具有完整 HMG-box 的 *sox9* 转录本, 这与已报道的合浦珠母贝和黑蝶贝的 *sox9* 一致^[16~17]。

sox9 在性腺中的表达特征存在物种间差异。在小鼠和鸡中, *sox9* 最初在性别尚未分化的性腺

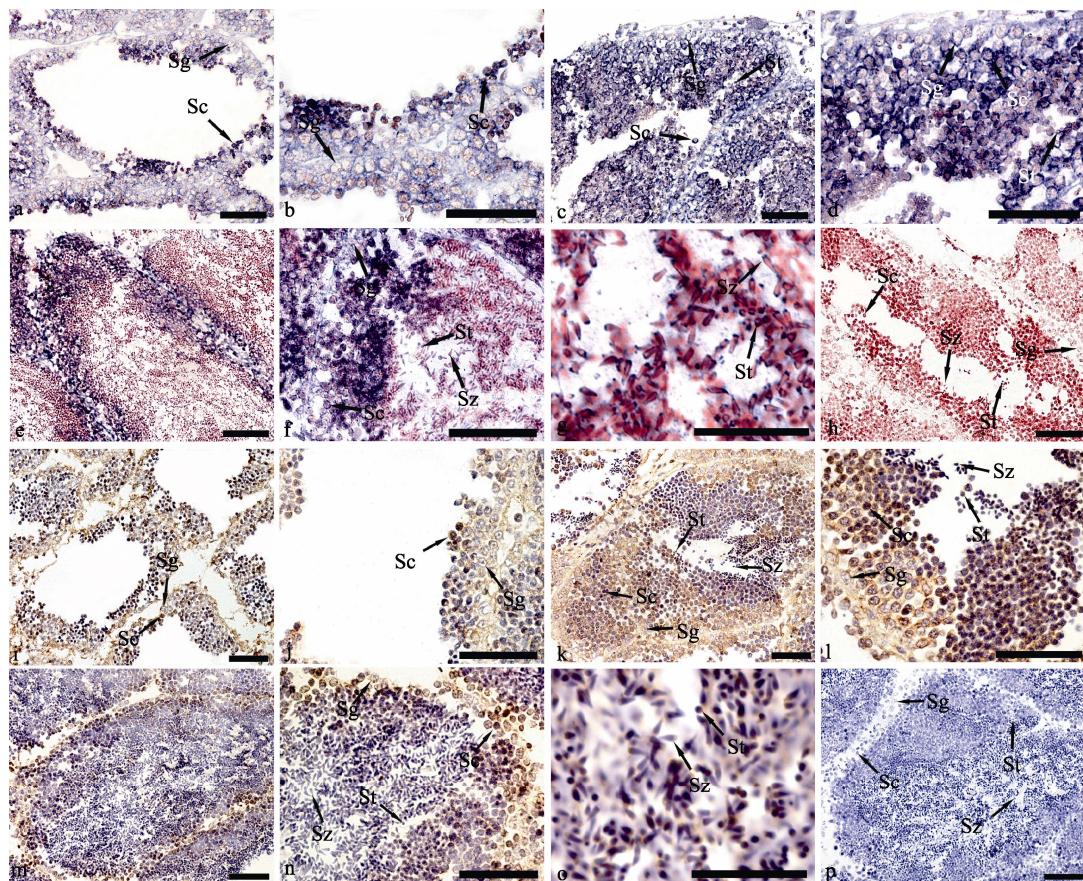


图 5 椅孔扇贝 *sox9* mRNA 和 SOX9 蛋白在精巢中的细胞学定位

a~b: 增殖期; c~d: 生长期; e~g: 成熟期; h: 生长期; i~j: 增殖期; k~l: 生长期; m~p: 成熟期。a~g: 原位杂交中, 蓝色为阳性探针信号; h: 使用阴性探针的原位杂交阴性对照; i~o: 免疫组化中, 棕色为椅孔扇贝 SOX9 多克隆抗体信号; p: 使用免疫前血清的免疫组化阴性对照。Sc: 精母细胞; Sg: 精原细胞; St: 精细胞; Sz: 精子。标尺: g 和 o 标尺为 25 μm, 其他标尺为 50 μm。

Fig. 5 Localization of *Cf-sox9* and *Cf-SOX9* in testes of *C. farreri* demonstrated by *in situ* hybridization and immunohistochemistry
a~b: proliferative stage; c~d: growing stage; e~g: mature stage; h: growing stage; i~j: proliferative stage; k~l: growing stage; m~p:
mature stage. a~g: positive signals with an antisense probe are indicated in blue by *in situ* hybridization; h: negative control is
indicated in h for *in situ* hybridization with sense probe; i~o: positive signals are indicated in brown by immunohistochemistry with
anti-*Cf-SOX9* antibody; p: negative control is indicated in p for immunohistochemistry with pre-immune serum. Sc: spermatocyte;
Sg: spermatogonium; St: spermatid; Sz: spermatozoon. Bar: 25 μm for g, o and 50 μm for others.

原基中低水平表达, 当 *sry* 基因表达后, *sox9* 在雄性个体的性腺中上调表达, 但在雌性个体的性腺中表达下调, 随着性腺性别的分化, *sox9* 只在精巢中表达。在小鼠中, *sox9* mRNA 与 SOX9 蛋白仅定位在精巢的支持细胞(sertoli cell)中^[4, 18]。在爬行类动物中, 如短吻鳄(*Alligator mississippiensis*)、黄腹彩龟(*Trachemys scripta*)以及丽龟(*Lepidochelys olivacea*)等温度依赖型性别决定的动物, 当胚胎孵化温度为促雄性温度时, *sox9* 的表达上调, 而在促雌性温度时, *sox9* 的表达下调^[6, 19~20]。在两栖类动物粗皮蛙(*Rana rugosa*)、澳洲蟾蜍(*Bufo marinus*)以及热带爪蟾(*Xenopus tropicalis*)变态发育的幼体中, 其发育中的精巢和卵巢均表达 *sox9* mRNA;

细胞学定位结果显示, 澳洲蟾蜍 *sox9* 定位在精巢的支持细胞和卵巢中卵黄发生前的卵母细胞中;当幼体发育至成体后, 粗皮蛙的 *sox9* 仅在精巢中表达, 而热带爪蟾的 *sox9* mRNA 及 SOX9 蛋白不仅在精巢的支持细胞中表达, 也在卵巢各阶段的卵母细胞中表达^[7, 21~22]。一些鱼类中的 *sox9* 基因由于具有 2 个转录本, 它们的表达似乎更多样化。斑马鱼的 *sox9a* 定位在精巢的支持细胞中, *sox9b* 在卵巢中表达, 且表达信号以卵黄发生前的卵母细胞中最强, 随着卵母细胞的发育和成熟信号强度逐渐降低^[16]; 红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)的 *sox9a* 在精巢和卵巢中均表达, 但 *sox9b* 仅在卵巢中表达^[23]; 青鳉中的 *sox9* 基因报道了 3 个转录本,

sox9a mRNA 定位在卵巢的各发育阶段卵母细胞中^[24], *sox9a2* 定位在精巢的支持细胞中^[25], 其 *sox9b* 则在精巢中表达^[8]。除此之外, 在虹鳟(*Onchorhynchus mykiss*)中仅报道了 1 个 *sox9* 转录本, 其在精巢中表达^[26]; 在网纹鳉(*Poecilia reticulata*)中也仅报道了一个转录本 *sox9b*, 但其在精巢和卵巢中均表达^[27]。总结鱼类中的研究可见, 在具有 2 个(或者 3 个)*sox9* 转录本的物种中, 不同的转录本似乎具有明显的单性性腺表达特征, 即这些转录本可能参与其不同性别性腺的功能维持甚至性腺性别形成; 但在仅有 1 个转录本的鱼类中, 其 *sox9* 的定位似乎没有性别差异, 亦即可能与性腺性别无关。本研究在柄孔扇贝中仅克隆获得了 1 种 *sox9* 转录本, 且其 mRNA 和蛋白在精巢和卵巢中的所有生殖细胞中均检测到了阳性信号, 暗示柄孔扇贝 *sox9* 与性腺的性别分化无关, 这一结果与那些仅有 1 个 *sox9* 转录本的鱼类(如网纹鳉 *sox9b*)表达特征类似, 但与大部分鱼类和其他脊椎动物中 *sox9* 的性腺表达特征不同。对于产生这种差异的原因尚不能解释, 还需要进一步研究。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] Bi W, Deng J M, Zhang Z, et al. *Sox9* is required for cartilage formation[J]. *Nat Genet*, 1999, 22(1): 85–89.
- [3] Seymour P A, Freude K K, Dubois C L, et al. A dosage-dependent requirement for *Sox9* in pancreatic endocrine cell formation[J]. *Dev Biol*, 2008, 323(1): 19–30.
- [4] da Silva S M, 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]. *Nat Genet*, 1996, 14(1): 62–68.
- [5] 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. [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.]
- [6] Western P S, Harry J L, Graves J A M, et al. Temperature-dependent sex determination: upregulation of *Sox9* expression after commitment to male development[J]. *Dev Dynam*, 1999, 214(3): 171–177.
- [7] 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 Lett*, 2000, 466(2–3): 249–254.
- [8] Klüver N, Kondo M, Herpin A, et al. Divergent expression patterns of *Sox9* duplicates in teleosts indicate a lineage specific subfunctionalization[J]. *Dev Genes Evol*, 2005, 215(6): 297–305.
- [9] Vida V P, Chaboissie M C, de Rooi D G, et al. *Sox9* induces testis development in XX transgenic mice[J]. *Nat Genet*, 2001, 28(3): 216–217.
- [10] Chaboissier M C, Kobayashi A, Vidal V I P, et al. Functional analysis of *Sox8* and *Sox9* during sex determination in the mouse[J]. *Development*, 2004, 131(9): 1891–1901.
- [11] Sifuentes-Romero I, Merchant-Larios H, Milton S L, et al. RNAi-mediated gene silencing in a gonad organ culture to study sex determination mechanisms in sea turtle[J]. *Genes*, 2013, 4(2): 293–305.
- [12] Liu J, Zhang Z, Zhang L, et al. Variations of estradiol-17 β and testosterone levels correlated with gametogenesis in the gonad of Zhikong scallop (*Chlamys farreri*) during annual reproductive cycle[J]. *Can J Zool*, 2014, 92(3): 195–204.
- [13] Feng Z F, Shao M Y, Sun D P, et al. Cloning, characterization and expression analysis of *Cf-dmrt4-like* gene in *Chlamys farreri*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2010, 17(5): 930–940. [冯政夫, 邵明瑜, 孙大鹏, 等. 柄孔扇贝 *Cf-dmrt4-like* 基因的克隆、序列特征及表达分析[J]. 中国水产科学, 2010, 17(5): 930–940.]
- [14] Südbeck P, Schmitz M L, Baeuerle P A, et al. Sex reversal by loss of the C-terminal transactivation domain of human SOX9[J]. *Nat Genet*, 1996, 13(2): 230–232.
- [15] Agrawal R, Wessely O, Anand A, et al. Male-specific expression of *Sox9* during gonad development of crocodile and mouse is mediated by alternative splicing of its proline-glutamine-alanine rich domain[J]. *Febs J*, 2009, 276(15): 4184–4196.
- [16] 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]. *Dev Biol*, 2001, 231(1): 149–163.
- [17] 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: 177–186.
- [18] Kent J, Wheatley S C, Andrews J E, et al. A male-specific role for *Sox9* in vertebrate sex determination[J]. *Development*, 1996, 122(9): 2813–2822.
- [19] 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]. *J Exp Zool*, 1999, 284(6): 705–710.

- [20] Shoemaker C, Ramsey M, Queen J, et al. Expression of *Sox9*, *Mis*, and *Dmrt1* in the gonad of a species with temperature-dependent sex determination[J]. *Dev Dynam*, 2007, 236(4): 1055–1063.
- [21] El Jamil A, Kanhoush R, Magre S, et al. Sex-specific expression of *Sox9* during gonadogenesis in the amphibian *Xenopus tropicalis*[J]. *Dev Dyn*, 2008, 237(10): 2996–3005.
- [22] Abramyan J, Feng C W, Koopman P. Cloning and expression of candidate sexual development genes in the cane toad (*Bufo marinus*)[J]. *Dev Dyn*, 2009, 238(9): 2430–2441.
- [23] Shen X, Cui J, Yang G, et al. Expression detection of *Dmrt5* and two *sox9* genes in *Takifugu rubripes* (Tetraodontidae, Vertebrata)[J]. *J Ocean U China*, 2007, 6(2): 182–186.
- [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]. *Mol Reprod Dev*, 2002, 63(1): 5–16.
- [25] Nakamoto M, Suzuki A, Matsuda M, et al. Testicular type *Sox9* is not involved in sex determination but might be in the development of testicular structures in the medaka, *Oryzias latipes*[J]. *Biochem Biophys Res Co*, 2005, 333(3): 729–736.
- [26] 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.
- [27] 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 Physiol Biochem*, 2007, 33(3): 195–202.

Molecular cloning of *sox9* cDNA and its expression characteristics in gonads at different developmental stages of *Chlamys farreri*

LIANG Shaoshuai, YU Xiaohan, YANG Dandan, QIN Zhenkui

Key Laboratory of Marine Genetics and Breeding, Ministry of Education; Ocean University of China, Qingdao 266003, China

Abstract: SOX9 is a member of the SOXE group in the SOX family, which plays an important role in sex determination and differentiation of vertebrates. *sox9* is specifically expressed in the testes of mammals, birds, and reptiles, and is expressed in both the testes and ovaries in amphibians and fishes. To measure the expression of *sox9* in the gonads of invertebrates, we cloned a 2835 bp full-length cDNA of the scallop *Chlamys farreri* *sox9* (*Cf-sox9*) which contains a 1413 bp open reading frame (ORF) encoding a 470-amino acid sequence with the HMG-box of the SOX family and the highly conserved region of the SOXE group, although there is no Pro-Gln-Ser-rich region at the C-terminus of vertebrate SOXE proteins. *Cf-sox9* DIG-labeled RNA probes and *Cf-SOX9* polyclonal antibodies were produced based on the *Cf-sox9* full-length cDNA sequence. ISH and immunohistochemistry detection showed that *Cf-sox9* transcripts and *Cf-SOX9* proteins were located in all germ cells of *C. farreri* testes and ovaries at different developmental stages. The expression patterns between *sox9* mRNA and SOX9 protein were similar. In the testes, the intensity of positive signals was highest in the spermatocytes and lowest in the spermatozoa. In the ovaries, the intensity of positive signals gradually decreased across the oogonia, oocytes, and mature oocytes. The expression characteristics of *Cf-sox9* in *C. farreri* gonads were different from that most of vertebrates, which show variability in expression between sex, suggesting its function of gonad development and gametogenesis might be different from vertebrates.

Key words: *Chlamys farreri*; *sox9*; gonad; gametogenesis

Corresponding author: QIN Zhenkui. E-mail: qinzk@ouc.edu.cn