

# 鲤鱼 *Sox 9* 基因 HMG 保守区的克隆及序列分析

华慧颖<sup>1\*</sup>, 王芳<sup>1</sup>, 常重杰<sup>2</sup>, 杜启艳<sup>2</sup>

(1. 中州大学 化工食品学院, 河南 郑州 450044; 2. 河南师范大学 生命科学院 河南 新乡 453007)

**摘要:** 为研究鲤鱼中与性别决定及骨组织发育相关基因 *Sox 9* 的特征及功能, 从大量常见养殖鲤鱼品种及黄河野生鲤鱼个体中克隆得到了多个版本 *CcSox 9* 基因的 HMG 保守区序列, 并对这些序列及国内外的其他鲤鱼 *Sox* 基因进行了启动子、多态性等序列分析。结果显示, 鲤鱼中至少存在 5 个版本的活性 *Sox 9* 基因及 1 个 *Sox 9* 假基因。这些基因在编码序列中存在一定的多态性, 在内含子序列中存在大量序列多态, 并且活性基因中都存在至少 1 个启动子序列。假基因无内含子序列, 在编码序列中存在多个终止密码子。

**关键词:** *Sox 9* 基因; 鲤鱼; 克隆; 序列分析

中图分类号: S965.116 文献标识码: A 文章编号: 1004-3268(2011)07-0147-05

## Cloning and Sequence Analyzing of *Sox 9* Genes' HMG Section of *C. carpio*

HUA Hui-ying<sup>1\*</sup>, WANG Fang<sup>1</sup>, CHANG Zhong-jie<sup>2</sup>, DU Qi-yan<sup>2</sup>

(1. Chemical Engineering and Food Department, Zhongzhou University, Zhengzhou 450044, China;

2. Biological Science College, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

**Abstract:** To investigate the features and functions of *Sox 9* genes which are related to sex-determination and bony-tissue-development in *C. carpio*, several *CcSox 9* genes were cloned from large quantity of individuals of several usual *C. carpio* varieties and wild Yellow River *C. carpio*. Sequences, including promoter-sequences, polymorphism, of these *CcSox 9* genes and other *CcSox 9* genes cloned by other domestic and foreign areas were analyzed. The results revealed that at least 5 active *CcSox 9* genes and a pseudo gene *PCcSox 9* were found. Abundant polymorphisms, including sequence polymorphisms and length polymorphisms, were found in these genes' coding sequences, especially introns. At least one promoter sequence can be found in each active *CcSox 9* gene's intron. Pseudo gene *PCcSox 9* has no intron and several terminal codons were found in its coding sequence.

**Key words:** *Sox 9* gene; *C. carpio*; Clone; Sequence analysis

*Sox*(SRY-related HMG-box)基因是在动物中发现的一个编码转录因子的庞大基因家族<sup>[1-3]</sup>, 在动物胚胎发育及多种生化过程中扮演着重要角色<sup>[4-6]</sup>。*Sox 9* 基因在哺乳动物中与性别决定、骨组织发育密切相关, 有关 *Sox 9* 基因的研究是近年来的研究热点之一<sup>[7-11]</sup>。鱼类的进化地位非常特殊, 处于从无脊椎动物向脊椎动物进化的关键节点, 其性别决定体系表

现出一定的原始特征(如存在性别反转、雌雄同体等现象), 但又有了相当程度的发展<sup>[12]</sup>。在鱼类中应该存在一些性别决定及分化、软骨组织发育遗传体系的成员及运行机制的原始形式, 因此, 对鱼类中 *Sox 9* 基因的研究具有非常重要的意义<sup>[13-14]</sup>。

鱼类是最原始的脊椎动物, 研究其骨骼发生发育及相关基因对于研究脊椎动物起源、骨组织进化

收稿日期: 2011-02-02

作者简介: 华慧颖(1972-), 女, 河南郑州人, 讲师, 硕士, 主要从事生物能源及动物遗传学研究。\*为通讯作者。

E-mail: vinnie\_h@163.com

©1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

及相关因素具有重要意义。鲤鱼是最重要的经济鱼种<sup>[15]</sup>，雌鱼的经济价值高于雄鱼，研究并控制其性别具有重要的经济价值。鉴此，以鲤鱼为研究对象，通过 PCR 技术获得了鲤鱼中多个版本的 *Sox 9* 基因，并对其编码序列及内含子序列进行了包括多态性在内的多种分析，以期研究 *Sox 9* 基因的进化与功能提供参考。

1 材料和方法

1.1 基因组的提取

多日多点购买兴国红鲤、荷包红鲤、建鲤等常见淡水养殖鲤鱼及野生黄河鲤鱼，共 56 尾(雌雄)，取其肝脏组织，用酚/氯仿/异戊醇法提取基因组 DNA，0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测所提基因组的质量<sup>[19]</sup>。

1.2 基因扩增及测序

根据前期工作及公开发表的 *Sox 9* 基因 HMG 盒区保守序列，设计简并性较高的引物 P1、P2。上游引物 P1: 5'-GG(C\T)(C\T)(G\T)(A\G)TA(C\T)TT(A\G)TA(A\G)T(C\T)(G\G)GG-3'; 下游引物 P2: 5'-CC(A\G)ATGAA(C\T)GC(G\G)TT(C\T)AT(G\G)GT(G\G)TGG-3'。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

采用降落 PCR 对多样品基因组 DNA 进行扩增<sup>[17]</sup>，扩增条件: 95℃预变性 5 min; 中间循环参数为 94℃变性 60 s, 退火 70 s, 退火温度从 69℃降至 45℃, 每下降 1℃1 个循环, 72℃延伸 90 s; 前面共运行 24 个循环, 最后再在 45℃运行 10 个循环; 最终在 72℃充分延伸 10 min, 结束反应后保存于 4℃条件下<sup>[18]</sup>。扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳。电泳条带纯化后用 pUCm-T 载体及 JM109 菌株进行克隆, 之后用 ABI3500 基因序列分析仪进行测序。每序列均经过正反 3 次重复测定, 确保测序结果的准确性。将所得序列先用 Pc gene 软件包进行分析, 推测其可能编码的蛋白质氨基酸序列。再将序列输入 GenBank 进行在线“nucleotide blast”同源性检索, 对检索结果进行分析, 确认其中 *Sox 9* 基因的身份并按照通行的 *Sox* 基因命名规则对其进行命名。

1.3 RT-PCR 法确定内含子剪接位点

序列分析结果表明, 在扩增到的 3 个 *CcSox9* 基因(鲤里 *Sox 9* 基因)内存在内含子, 为确定内含子剪接位点, 使用据前面所获 *CcSox9* 基因序列设计的 3 对特异性引物, 对鲤鱼脑总 RNA 进行 RT-PCR 扩增。

扩增所用的特异性引物(上海生工生物工程技术有限公司合成):

针对 *CcSox9a*: 引物 Pa1, 5'-GCTCGCGGAT-CAATAC-3', 引物 Pa2, 5'-TGATCTTTCTTGT-GCTG-3';

针对 *CcSox9b*: 引物 Pb1, 5'-GCTCAAGC-CGCGCGC-3', 引物 Pb2, 5'-GTCTTTCTTGT-GCTGCAC-3';

针对 *CcSox9c*: 引物 Pc1, 5'-GCTCAAGCG-GCGCGC-3', 引物 Pc2, 5'-GTCTTTCTTGTGCT-GGAC-3'。

扩增条件为: 94℃预变性 5 min; 中间各循环参数为 94℃ 60 s, 48℃ 60 s, 72℃ 60 s, 总计 30 个循环; 最终在 72℃充分延伸 10 min, 之后结束反应, 琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果。扩增产物回收、克隆、测序, 共得 3 个序列, 将这些序列输入 GenBank 查询所编码的氨基酸序列, 并进行同源搜索, 确定为 *Sox 9* 基因 HMG 盒区的编码序列后, 再将这些序列与前面所获 *Sox 9* 的基因组序列分别进行比较, 确定内含子剪接位点。

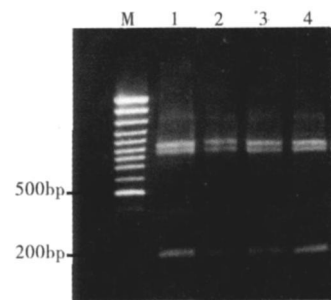
1.4 序列分析

采用 DNAMAN 软件对所获 *CcSox 9* 基因保守区编码序列及内含子序列进行比对、整理和初步分析, 并进一步采用 DNAsp5.0 对序列进行多态分析。

2 结果与分析

2.1 基因扩增结果

鲤鱼 *Sox 9* 基因扩增结果如图 1 所示。扩增产物测序结果表明, *Sox 9* 相关基因主要有 *CcSox9a*、*CcSox9b*、*CcSox9c* (NCBI GenBank 中序列接受号 AY205247 — AY205249), 另外还有假基因 *PcCSox9*, GenBank 中接受号为 AY318764。



M. DNA 分子 Ladder; 1—2. 雄性; 3—4. 雌性

图 1 鲤鱼基因组兼引物降落 PCR 结果

2.2 RT-PCR 扩增、测序结果及 *CcSox 9* 基因内含子位点确定

GenBank 查询结果显示, RT-PCR 扩增到的 3 个序列是 *CcSox 9* 基因 HMG 盒区编码序列(cDNA,

GenBank 注册号 AY205250、AY205251、AY205252)。将 3 个 cDNA 序列与相应 *CcSox9* 基因 DNA 序列比较, 确定了 3 个 *CcSox 9* 基因的内含子剪接位点<sup>[8, 19]</sup>。图 2—5 为所获 4 个 *CcSox 9* 基因的序列信息。其中, *CcSox 9a* 片段共 910bp, 其中内含子序列 714bp, 内含子剪接位点符合 AG-GT 规律; *CcSox 9b* 片段共 822bp, 其中内含子序列 616bp, 内

含子剪接位点符合 AG-GT 规律; *CcSox 9c* 片段共 332bp, 其中内含子序列 176bp, 内含子剪接位点一个为 AG-GT, 一个为 AG-AT, 比较特殊; *PCcSox 9* 片段共 212bp, 序列后半部分与人 *Sox 9* 基因同源性达到 64.9%, 但是在其前半部分出现了 4 个终止密码子, 没有内含子, 因此, 它应该是一个假基因, 被命名为 *PCcSox 9*。

```
CCAATGAATGCCTTTATGGTCTGGGCTCAAGCGCGCGCAGGAACTGGCGGACCAGTATCCACACCTGCACAACGCCGAG
P M N A F M V W A Q A A R R K L A D Q Y P H L H N A E
CTCAGCAAGACCTCGGCAAACTCTGGAGGTAGAGCATTTCATTGTTTATGAAGTGTAGGACAACCTCCAGAAGCCGGAGCA
L S K T L G K L W R
ACACTGATTTCATTAAGTCCAGCAAACTCACTGTATTATTAATATTAAGTGCATTGTTTCATAGCATTATTAATAA
GTCAGGCAACTACTGATAAGCTGTTTGGGAAATAAAGGGTAAAACTATAGCTTAGGCAATGGTGAATTAACCCCTTACTTCAG
TGCAGAAAAAGTTGTGTAGTCACTAAAACTTTGGTAACACTTTGGAAAAGGGAACACTTACTCACTATTAACATGACTTT
TCCCTCATAATTCTCAATTTGCTGCTTATTAATAGTTAGTATGGNAGCTTTTAAGTTTAGGTATGAGGTAGGATTAGGGA
TGTAAGATAAGGGCATGGAAGAAAAAGACATTAAATATGTGCTTAACACTACTAATAAATGGCTAATATTCTAGTAAATATGC
ATGCTAATAAGAACTAGTTAAGAGACCTAAAAATAAGTGTACCCAACTTTTAGTTTAAAGAAATTTAGTTCCGATCTGG
ATTACTTTATTCCTTTTTCCTGAATAATATTTTCTTAAGTGAACCAAAAAAGTAATAATCATAGTTTCCAAGAACAAAT
TTATACCTTTTGTAGGTTCTTTATTTGTTAACTAAGGTAGATCTTAGTATTGATTATTTCTCATGTGCTTTTGAGGTAA
L
CTGAATGAGGGCGAGAAGCGTCCATTGTGTGGAGGAGCGGAGCGTCTGAGGGTCCAGCACAAGAAAGACCACCCCACTACA
L N E G E K R P F V E E A E R L R V Q H K K D H P N Y
AGTACCAGCC
K Y Q
```

下划线者为编码序列, 编码序列下注为对应氨基酸序列, 其余为内含子序列。  
带框字符为内含子剪接位点所在位置, 阴影部分为启动子相关序列。下同

图 2 *CcSox 9a* 基因序列

```
CCAATGAACGCGTTTATGGTGTGGGCTCAAGCGCGCGCAGGAACTGGCGGATCAGTATCCGCACCTGCACAACGCCGAG
P M N A F M V W A Q A A R R K L A D Q Y P H L H N A E
CTCAGCAAGACCTCGGCAAACTCTGGAGGTAGAGAGAGAGACAATTCATTTACTTTGCTTCGTTTGTGTTGTCAGG
L S K T L G K L W R
ACTGCTCCAGAAGTCAGGAACTTTGTGTAGTACTATTAATTTGCAATGATTATAGCATTATTATGCAATGGTATAA
AATATTGATAAGCTTGAGAAAAATGTAACATTTGGGTAGTAAGGTAAAACTTTAGTTTAGTCAAAATAGTAAATTAACCTAA
CTTCACATGCACCTCAACACAGAAAAAGTTGTGGAGTCGGTAAAAACCTCCAGTTTAAAGAAAAGATGCTGATTACTTTATT
ACTTTTGGGTTTATGTAAGAAAAAGTAGTATCACTTAAAAAATAAATAATATAAGCTGNTTCAAGAACAACTCTATA
CCTTTTAAAGNTTATTATTATTAATTTGGACAAGATAAAGAAAGTNGATTACTTTTCTGAATTACTTTATTGCTTTTGC
GGGTTTACTTATTAAGAAAAAATAGATAAATAAAGAAAGATAGTCATATTCAAAAACAATTTGTACCTTAATGAAA
TGTCTGTTTGTTAATGAAGAATGCAAGGAAGTAATCTGAGCATTGGTTAATCTTGTGGATATGTGTAGGTACTGAAT
L L N
GAGGGCGAGAAGCGTCCGTTCTGTGGAGGAGCGGAGCGTCTGAGGGTGCAGCACAAGAAAGACCACCCGACTACAAGTACA
E G E K R P F V E E A E R L R V Q H K K D H P D Y K Y
GACC
R
```

图 3 *CcSox 9b* 基因序列

```
CCCATGAATGCGTTTCATCGTCTGGGCGCAAGCGCGCGCAGGAAGCTCGCGGATCAATACCCGCACCTCCACAACGCCGAG
P M N A F I V W A Q A A R R K L A D Q Y P H L H N A E
CTCAGCAAACTCTGGGCAAACTTTGGAGGTAAAAGCTTTTTCATTCTTTAACACACATTCTATTGCGTTTAAATTT
L S K T L G K L W R
ATTTGCACAAACTGCATTAATGCATATGCATAAGTACAGCACACAGCTGCATGCAGGATACACAATAGTAACAGT
ATGTACTGTAGGAAAGATTCATTGCTGTGCTCATTGGGAGATGTGTAACGAGGGTGAAGAAAGCGTCCCTTCGTGGAGGA
L L N E G E K R P F V E E
GGCTGAGCGCCTCAGGGTTCAGCACAAGAAAGATCACCCGATTACAAATACCGGCC
A E R L R V Q H K K D H P D Y K Y R
```

图 4 *CcSox 9c* 基因序列

另外, 在实验室后期工作中, 还扩增到了另一个版本的鲤鱼 *CcSox 9b* 基因 HMG 盒区片段, 长 809bp。经序列分析发现, 该片段有 1 个 603bp 的内含子, 内含子剪接位点符合 AG-GT 规律。湖南师范大学研究组扩增

到了 1 个鲤鱼 *Sox 9* 基因 HMG 盒区片段 (GenBank 接受号 EU105397), 长 918bp, 序列分析发现, 该片段有 1 个 701bp 的内含子, 内含子剪接位点符合 AG-GT 规律。这是目前能找到的所有 *CcSox 9* 基因序列信息。

GC GAAGGCCCATGAACGCTTTATGGTCTGGTCCAGAT TGA GAGACG TAAGATCATGGAGCAGTGGCCTGACATGCA  
A K A H E R F Y G L V P D \* E T \* D H G A V A \* H A  
CAATGC TGA GATTTCGAGCGCCTTGGAAAGCGCTGGAACTACTGCCTGATTATGAGAAGATACCCCTTCATCA AAGAG  
Q C \* D F E R L G K R W K L L P D Y E K I P F I K E  
GCTGAAAGTTGCGTCTAAAGCACATGGCTGACTATCCCGACTATAAGTACCAGCC  
A E R L R L K H M A D Y P D Y K Y Q

\*为终止密码子

图 5 *PCcSox9* 基因序列

2.3 基因序列分析

由以上分析结果可知,在鲤鱼中至少存在 5 个版本的活性 *Sox9* 基因和一个假基因 *PCcSox9*。

2.3.1 编码序列多态分析<sup>[20]</sup> 在对克隆到的 5 个活性 *CcSox9* 基因的保守区编码序列(206bp)分析(DNA sp5.0)中发现,可变位点共 38 个,其中单多态位点 26 个,分别存在于第 12、15、18、27、45、48、57、60、69、90、93、96、105、111、114、120、126、129、153、159、162、183、190、192、198、203 位,简约信息位点 12 个,分别存在于第 3、9、21、33、54、63、99、138、141、168、202、204 位。就目前得到的序列来看,这 38 个多态位点共组成了 4 种活性单倍型。*CcSox9bh* 与 *CcSox9bw* 的编码区序列完全相同;*CcSox9ah* 与 *CcSox9bhn* 仅在 189、202、203 3 个位点存在 A、G 颠换;*CcSox9c* 与其他几个基因均存在序列差异。

2.3.2 氨基酸序列多态分析 5 个活性 *CcSox9* 基因的保守区氨基酸序列差别极小,仅第 6 位 *CcSox9c* 由 M 变为 I, *CcSox9a* 第 64 位由 D 变为 N,第 68 位由 R 变为 Q,其余均一致。推测的假基因 *PCcSox9* 的氨基酸序列与其他基因差别较大。

2.3.3 内含子序列分析<sup>[21]</sup> 长度多态:活性 *Sox9* 基因都有内含子,内含子长度存在 704bp、701bp、616bp、603bp、176bp 共 5 种多态。

内含子剪接位点多态: *CcSox9c* HMG 盒右端的剪接点为 AG-AT,其余皆符合 AG-GT 规律。

内含子序列多态:由于内含子序列承受的遗传选择压力相对较小,因此,鲤鱼 *Sox9* 基因内含子序列变化非常大,尤其 *CcSox9c*,其内含子和其他几个鲤鱼 *Sox9* 基因相比短了 500bp 左右。但其所拥有的 176bp 序列与其他内含子序列的局部区段同源性达到了 59.4%。DNA sp5.0 软件分析显示,在 5 个基因内含子共同拥有的这段序列(含空缺共约 194bp)中,不可变位点 48 个,仅占 24.7%,说明序列在进化中变异较大;可变位点 120 个,单多态位点 51 个,简约信息位点 69 个。4 个内含子序列(包括本研究克隆得到的 *CcSox9a* (下称 *CcSox9ah*)、*CcSox9c* (下称 *CcSox9ch*)、2 个 *CcSox9b* (下称

*CcSox9bh*、*CcSox9bw*)、湖南师大克隆到的 *CcSox9b* (下称 *CcSox9bhn*)分析显示,不可变位点 298 个,占全部参比序列 734bp 的 40.6%;可变位点 270 个,单多态位点 12 个,简约信息位点 258 个。将长度较接近的内含子(*CcSox9bh* 与 *CcSox9bw*、*CcSox9ah* 与 *CcSox9bhn*)进行两两比较,发现 *CcSox9bh* 仅比 *CcSox9bw* 在 491 位后多了 1 个 13bp 的 polyA 尾; *CcSox9ah* 与 *CcSox9bhn* 相比仅 16 个差异位点,13 个单多态位点,10 个颠换,3 个置换,与本试验得到的 *CcSox9a* 相比,湖南 *Sox9b* 片段存在 3 个缺失。

启动子序列:在 5 个活性基因的内含子区域,都存在至少 1 个启动子序列(Pribnow 盒或 TATA 盒, *CcSox9ah*、*CcSox9bh*、*CcSox9ch* (图 2—图 4), *CcSox9bw* 及 *CcSox9bhn* 各含有 2 个启动子(1 个 Pribnow 盒、1 个 TATA 盒))。这也论证了内含子序列具有调控基因表达功能的推测。

3 讨论

综合分析鲤鱼 5 个版本基因的内含子和编码序列差异,鲤鱼 *Sox9* 基因至少存在 5 个活性版本。*CcSox9bh* 与 *CcSox9bw* 相比,仅前者内含子 491 位后 13bp 的 polyA 差异,两者编码序列完全一样,因此进化上关系很近; *CcSox9ah* 与 *CcSox9bhn* 的编码序列仅存 3 个位点的 A、G 颠换,内含子序列仅 16 个差异位点,因此在进化上关系也较近。*PCcSox9* 在序列中出现了 4 个终止密码子,且没有内含子序列。推测在进化过程中可能正因为丢失了内含子序列而表达受到影响,进而导致基因所受选择压力丧失,从而进一步发生了较大变异。因此,内含子在 *Sox9* 基因中应该具有非常重要的功能。*CcSox9c* 的内含子只剩下 176bp,但仍拥有 1 个 Pribnow 盒,仍具有相应的功能,因此可能 *Sox9* 基因内含子这一段较为重要,拥有这一段即可保障基因功能的正常发挥;从另一个角度也可以说,拥有不同类型内含子的 *Sox9* 基因的表达强度或表达场所与丰度会有差异<sup>[4]</sup>。

本研究所获得的信息对研究 *Sox9* 基因的进化

与功能具有一定的参考价值。继续研究这几个不同版本的 *CcSox 9* 基因的组织表达差异、时序表达差异、性别表达差异、病态与健康个体表达差异与序列多态性的关系, 则有可能揭开 *Sox 9* 基因在性别决定、软骨发育中的具体作用及作用方式; 研究和比较不同进化时序的动物中的 *Sox 9* 基因及其多态性, 可进一步探索 *Sox 9* 基因的进化及功能发展情况<sup>[22]</sup>。

#### 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: 339-355.
- [2] Chang C J, Du Q Y, Shao H W. New progress in *Sox* gene family [J]. *Hereditas*, 2002, 24(4): 470-476.
- [3] Pevny L H, Lovell Badge R. *Sox* genes find their feet [J]. *Current Opinion in Genetics & Development*, 1997, 7(3): 338-344.
- [4] Clarkson M J, Harley V R. Sex with two *Sox* on: SRY and *Sox 9* in testis development [J]. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 2002, 13(3): 106-111.
- [5] 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 *Sox 9* [J]. *Nature*, 1994, 372: 525-530.
- [6] Lunde K, Belting H G, Driever W. Zebrafish *pou5f1/pou2*, homolog of mammalian Oct 4, functions in the endoderm specification cascade [J]. *Curr Biol*, 2004, 14(1): 48-55.
- [7] 陈少坚, 郭风劲. *Sox 9* 基因促软骨形成作用机制研究进展 [J]. *国际骨科学杂志*, 2010, 31(2): 65-67.
- [8] 陈金平, 孙大江, 梁冰, 等. 两种鱼类 *Sox* 基因保守区的克隆和 *Sox 9* 基因保守区内含子的遗传变异性 [J]. *动物学报*, 2004, 50(4): 681-685.
- [9] Chen Dong, Wu Dengjun. Approaches for SNP genotyping [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2008, 2: 93-96.
- [10] Bell D M, Leung S C, Wheatley L J, *et al.* *Sox 9* directly regulates the type-II collagen gene [J]. *Nat Genet*, 1997, 16: 174-178.
- [11] Wagner T, Wirth J, Meyer J. Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene *Sox 9* [J]. *Cell*, 1994, 79: 1110-1120.
- [12] Zhou R J, Cheng H H, Zhang Q Y, *et al.* SRY-related genes in the genome of the rice field eel *Monopterus albus* [J]. *Genet Set Evol*, 2002, 34: 129-137.
- [13] Takamatsu N, Kanda H, Ito M. Rainbow trout *Sox 9*: cDNA cloning, gene structure and expression [J]. *Gene*, 1997, 202: 167-170.
- [14] Yan Y L, Miller C T, Nissen R M, *et al.* A zebrafish *Sox 9* gene required for cartilage morphogenesis [J]. *Development*, 2002, 129(21): 5065-5079.
- [15] 饶汉宗. 传统田鲤鱼苗繁育技术 [J]. *现代农业科技*, 2007(14): 189.
- [16] Yue G H, Orban L. Rapid isolation of DNA from fresh and preserved fish scales for polymerase chain reaction [J]. *Biotech*, 2001, 3: 199-204.
- [17] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆 [M]. 2 版. 金冬雁, 黎孟枫, 译. 北京: 科学出版社, 1995.
- [18] Schepers G E, Bullejos M, Hosking B M, *et al.* Cloning and characterization of the sry-related transcription factor gene *Sox8* [J]. *Nucleic Acids Research*, 2000, 28(6): 1473-1480.
- [19] Gala Burgos M, Llewellyn L, Mylonas C C, *et al.* Analysis of the *Sox* gene family in the European sea bass [J]. *Biochem Molecular Biol*, 2004, 137(2): 279-284.
- [20] David W, Stock Anne V, Buchanan, *et al.* Weiss; numerous members of the *Sox* family of HMG box-containing genes are expressed in developing mouth teeth [J]. *Genomics*, 1996, 37: 234-237.
- [21] Wang Yue-bing, Lang Zhi-hong, Huang Da-fang. Effects of pre-mRNA introns on regulation of eukaryotic gene expression [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2008, 4: 1-4.
- [22] Hurle J M. Expression of developing valves and autonomic mechanisms of development molecular evolution of *Sty* and *Sox* gene [J]. *Gene*, 2001, 270(1/2): 161-169.