

* 学术论文 *

异源四倍体鲫鱼 *Sox4* 基因部分序列及其 5' 端调控区启动子片段的克隆与分析*

刘季芳¹ 李伟¹ 刘少军^{**} 陶敏 龙昱 刘筠

湖南师范大学生命科学学院, 教育部蛋白质化学及鱼类发育生物学重点实验室, 长沙 410081

摘要 通过 PCR 技术从异源四倍体鲫鱼基因组 DNA 中分离到 *Sox4* 基因部分基序. 序列分析表明, 其 5' 端调控区具有多种启动子所特有的序列元件, 如 TATA 框, CAAT 框等, 据此推测, 它具有启动子活性. 采用高保真 PCR 方法克隆了异源四倍体鱼 *Sox4* 基因 5' 端调控区 600 bp 启动子片段, 将其插入启动子缺失的增强绿色荧光蛋白 (EGFP) 表达载体 pEGFP 1 中, 构建重组载体 pA tsox4EGFP 1. 通过瞬时转染 HeLa 细胞, 在倒置荧光显微镜下可检测到绿色荧光. 结果表明, 克隆的 *Atsox4* 基因 5' 端调控区具有启动子活性, 并成功构建了含四倍体鱼 *Sox4* 基因启动子片段的报告基因载体, 为以后研究 *Sox4* 基因表达调控的分子机制奠定了基础.

关键词 *Sox4* 启动子 EGFP (增强绿色荧光蛋白) 5' 端调控区

Sox 基因家族是一类以 *SRY* 基因为代表的, 具有一个高迁移率组 (HMG) 盒区, 其编码的蛋白质可以和 DNA 序列特异性结合的转录调控因子家族^[1], 对性别分化和组织器官的形成起着重要的作用. 例如, *Sox5* 和 *Sox6* 基因在成年小鼠的睾丸有表达^[2,3], 人的 *Sox9* 基因突变会导致性反转^[4]. 目前, 在进化位置明显不同的各类物种如哺乳类、鸟类、爬行类、两栖类、鱼类以及昆虫中克隆到了 40 多个 *Sox* 基因, 并对其序列和功能进行了研究. 迄今发现的所有 *Sox* 基因, 按其 HMG-box 的同源性程度可划分为从 A 到 J 共 10 个不同的亚族, 其中 *Sox4* 基因与 *Sox11*, *Sox12*, *Sox22*, *Sox24* 一起构成 C 亚族^[5]. 人、鼠、鸡和斑马鱼等的 *Sox4* 基因全长核苷酸序列表明 *Sox4* 基因由单一外显子组成, 没有内含子. *Sox4* 基因编码的蛋白质包括两个功能区域——位于 N 端的 HMG 盒区和位于 C 端的

转录激活区, 说明了 *Sox4* 基因的结构在进化中是高度保守的^[6-9]. 人类 *Sox4* 基因可在脑、心和睾丸组织中大量表达, 推测其功能不仅与性腺功能有关, 还可能在神经系统功能中有重要作用^[6]. Mavropoulos 等曾报道, 斑马鱼 *Sox4b* 基因在内分泌细胞中瞬时表达, 并且在 α 内分泌细胞的发生中具有至关重要的作用^[9]. 目前, 对于 *Sox4* 基因的转录和翻译后调控机制, 以及参与其调控的内在和外在因素均无报道. 我们以前的研究发现在红鲫 (*Carassius auratus red var.*, $2n=100$) (♀) \times 湘江野鲤 (*Cyprinus carpio L.*, $2n=100$) (♂) 中出现部分可育后代, 它们自交获得二倍体 F_2 群体^[10], 一些二倍体 F_2 个体能产生二倍体卵子和二倍体精子, 它们受精后在 F_3 代中形成了两性可育的异源四倍体鲫鱼, 该异源四倍体鲫鱼 F_3 交配形成了 F_4 代个体, 经过连续繁殖, 目前已繁殖到了 F_{16} , 形成了

2007 01 08 收稿, 2007 02 14 收修稿稿

* 国家自然科学基金 (批准号: 30330480, 30571444) 和教育部长江学者及创新团队计划基金 (批准号: IRT0445) 资助

** 通信作者, E-mail: lsj@hunnu.edu.cn

©1994-2018 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

一个遗传性状稳定的四倍体鱼新种群(F_3-F_{16})。异源四倍体鲫鲤与其二倍体父母本相比,在遗传组成上已发生了根本性的改变,它们具有两套红鲫染色体和两套鲤鱼染色体。那么,很有必要对他们的性别决定与分化机制进行研究。我们已对异源四倍体鱼性别决定相关基因 *Sox9b* 进行了初步研究,发现 *Sox9b* 在精巢宏量表达而在卵巢不表达^[11]。因此,为进一步研究可能参与四倍体鱼雄性性腺发育相关基因及其调控机制,本文克隆了四倍体鱼 *Sox4* 基因部分序列,并对其 5'端调控区启动子片段的活性进行了初步研究。实验结果显示克隆到的异源四倍体鲫鲤 *Sox4* 基因 600 bp 启动子能够指导外源增强型绿色荧光蛋白(EGFP)的表达,这为进一步研究四倍体鱼 *Sox4* 基因在转录和翻译过程中的调控机制以及此过程所涉及的调控因子具有极其重要的意义。

1 材料与方法

1.1 材料

异源四倍体鲫鲤取自位于湖南师范大学校内的国家四倍体鱼种资源保护基地,从其背动脉取血,加入抗凝剂充分混匀后, -80°C 保存。真核表达载体 pEGFP 1 和大肠杆菌(*E. coli*) DH5 α 由本室保存。克隆载体 pMD18 T 和高保真 *Ex Taq* 酶为 TaKaRa 公司产品,限制性内切酶、T4 DNA 连接酶由上海生工公司提供。质粒提取及纯化试剂盒购自 Omega 公司。Lipofectamine 转染试剂盒为 Invitrogen 公司产品。

1.2 基因组 DNA 的提取及 Sox 基因的扩增和克隆

采用上海生工生物公司的 UNIQ-10 柱式 DNA 抽提试剂盒从异源四倍体鲫鲤全血中提取基因组 DNA,具体操作按实验操作手册进行。

对异源四倍体鱼 *Sox* 基因 HMG 盒序列的扩增参照文献[12]进行。上游引物: 5' TGAAGCGACCCATGAA (C/T) G 3', 下游引物: 5' AGGTCG (A/G) TACTT (A/G) TA (A/G) T 3'。PCR 扩增产物经 Sangon 公司胶回收试剂盒纯化后连入 pMD18 T 载体,转化大肠杆菌(*E. coli*) DH5 α , 经酶切及电泳法筛选重组转化子^[13], 所得阳性克隆由 Sangon 生物公司测序。

1.3 Sox4 基因 5'端调控区启动子片段的扩增

根据已克隆的四倍体鱼 *Sox4* 基因 5'端调控区

序列设计一对特异引物(P1/P2), P1: 5' GAGCTCG AGAAATACACA TCAGCG TG TTTCA 3' P2: 5' GATAAGCTT TCACCG TGTCGCTAAAGAAAAC 3' 两端分别加入 *Xho*I 和 *Hind* III 酶切位点(用下划线表示)及保护碱基(用斜体表示)。以异源四倍体鱼基因组 DNA 为模板,用 P1/P2 引物进行 PCR 扩增。25 μL 反应体系中含有 1 \times 反应缓冲液, 1.5 mmol/L Mg^{2+} , 0.3 μmol 引物, 150 $\mu\text{mol/L}$ dNTPs, 1 U *Ex Taq* 酶。反应程序如下: 94°C 预变性 5 min, 每个循环包括 94°C 变性 30 s, 57°C 复性 40 s, 72°C 延伸 1 min, 共 30 个循环, 最后一个循环结束后在 72°C 延伸 7 min。PCR 产物经 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳分离, 切取目的片段进行亚克隆及测序。

1.4 重组载体 pAtsox4EGFP 1 的构建

用 *Xho*I 和 *Hind* III 分别对含 *Atsox4* 启动子片段质粒及 pEGFP 1 载体进行双酶切, 回收及纯化目的片段, 经 T4 DNA 连接酶连接过夜, 转化感受态细胞 DH5 α , 在卡那霉素抗性平板上挑选阳性克隆, 参照 Omega 公司质粒提取及纯化试剂盒说明书提取并纯化质粒 DNA, 再经双酶切鉴定重组载体 pAtsox4EGFP 1。

1.5 瞬时转染和报告基因检测

采用脂质体转染法。接种 1×10^5 生长良好的 HeLa 细胞于 35 mm 培养皿, 待细胞生长至适当汇合度(60%—70%)时, 吸去原有的正常培养基(DMEM + 10% FBS), 并用 D Hanks 液洗涤细胞 1—2 次, 更换成无血清的培养基(DMEM), 37°C 继续培养 5—6 h。分别取 10 μL Lipofectamine 转染试剂于 2 mL Eppendorf 管, 并用 500 μL 无血清无抗生素培养基(DMEM)稀释混匀, 再分别取 2 μg 待检测的重组质粒 pAtsox4EGFP 1 和作为对照的质粒 pEGFP 1 于 2 mL Eppendorf 管内, 并加入 500 μL 无血清无抗生素培养基, 然后将含 pAtsox4EGFP 1 或 pEGFP 1 的无血清无抗生素培养基分别滴入相应的装有 Lipofectamine 转染试剂的另两支 2 mL Eppendorf 管内, 室温放置 45 min, 分别加入至长有适当密度的 HeLa 细胞的培养皿中, 轻轻混匀, 37°C 培养。转染后 5—6 h 后视转染液对细胞的毒性大小更换新的正常培养基, 37°C 继续培养, 20 h 后在荧光显微镜下观察荧光报告基因的瞬时表达情况。

2 结果

2.1 *Atsox4* 基因部分序列的克隆及序列分析

异源四倍体鱼 *Sox* 基因的 PCR 扩增产物经亚克隆、测序及在 GenBank 中搜索发现 1957 bp 的扩增产物(命名为 *ATSox4*) 包含一个 *Sox4* 基因的 HMG box 基序和 5' 端调控区, 并且此片段在 HMG box 区没有内含子, 其 HMG box 区与人、鼠、鸡的 *Sox4* 以及斑马鱼的 *Sox4a* 和 *Sox4b* 基因对应核苷酸序列的同源性均在 88%—90% 之间, 对应的氨基酸序列同源性在 95%—98% 之间(表 1), 暗示了 *AtSox4* 基因在功能上的高度保守性. 经序

列分析后, 我们发现在 *Atsox4* 基因的起始密码子之前有一段大小为 1588 bp 的 5' 端调控区, 该区内具有启动子结构, 如 TATA 框、CAAT 框和 GC 框(图 1).

表 1 *AtSox4* 基因 HMG box 和其他 *Sox* 基因的同源性比较

物种	基因	氨基酸 1%	核苷酸 1%	登录号
人(<i>Homo Sapiens</i>)	<i>hSox4</i>	98	90	NM_003107
鼠(<i>Mus musculus</i>)	<i>mSox4</i>	97	88	NM_009238
小鸡(<i>Gallus gallus</i>)	<i>cSox4</i>	98	90	AY249864
斑马鱼(<i>Danio rerio</i>)	<i>zSox4a</i>	96	89	AY369081.1
斑马鱼(<i>Danio rerio</i>)	<i>zSox4b</i>	95	88	AY369082.1

```

AtSox4   TGAAGCGACCCATGAACGCAAACCGCAATGACGCTTTCAGTCGCATTATTTTCGCTGATGT 60
AtSox4   ACAGTCAAGTGAGGAGCGTGACATTATTCCAAAGATCTCACGCTTGAGCTCATGTTTTGG 120
AtSox4   GTAAACAATAACAAGGATGTAAGCAAACCGTTGAGAAAGATCTGTCGGTTGGTCGTTATG 180
AtSox4   TCATTCTTAAACAAATATAGATTCTGATGCATTAACAGCAGGCGAGCTGCGCTTGCTGC 240
AtSox4   ACTCTGCCATCTAGCGTCACTGCCGTCCAGTGTGTCTCGCGGGTGTGGACCAGGGGCA 300
AtSox4   GGGCTCTGTTCCGGTCCCGGTCAAACATGCACCGGTGTCTATGAAGCACTGGCGCGCGG 360
AtSox4   GCAGCAGGGGTAAGACGTGACGTACGACACAAACTTGTCCAGCGCCTTCAGCGCCTTAA 420
AtSox4   AGATCTCTCAGAATCTGGAGAGCGTGCTAGCCTCGAACTCTGCTACTGTTGCGTCTTCT 480
AtSox4   GATTGGGGCGTGCCTCTGTGACGAAGGACCGCCAGCTGCTCAGAGGCCCGCCCTCTC 540
AtSox4   CCGAACCAGCCAAAACAACGCGCATAGCCTGAACCTCACTCACTCAGCCTCGATC 600
AtSox4   CTGCCACAGTTCACCGACACAGCCCTGAGCACGAGACATGAGCGAGAGCTTGATGGCAGA 660
AtSox4   TATTGATTAATATAGCTACACAGAAAGTCCATTTAAAGCCTTCCATTATTCATGGGCAG 720
AtSox4   GATTCATTCATTTTGATGTATTGGCTATTTTCATGTTGTTTGTCTTTACATCTATAAG 780
AtSox4   TGCATGTCAGAAATGCAGTCTGTTATGAACATATCCAGATTTGTTTTCGAACTCAAAGCA 840
AtSox4   GAGTGTGTTTTATTCTAAGGATTAAGATCACGCCTCCCTTATTGACATGCAAAAAT 900
AtSox4   AAAATAAAAATACACATCAGCGTGTTCATTA AAAACTAAGTTGTGCGGTACACTGGAAT 960
AtSox4   GAGGTCAGACCCAAAGCTCCTCATTGCACGCGTGATGATTATTAGATTCTTTTTGGCG 1020
AtSox4   CAATGAAAAGAGAGTGGCGGTGTTTTTGGCTCGGGGAAGGGTAGAGACAGCAGCTCATTG 1080
AtSox4   GCCGCCGCCGTCGCTATTATACCATTGGAAACGGATAAAACTGCATGAAGCAGAATAGA 1140
AtSox4   AGTCTGTTGAACTTACAGACTGTTTTCAAGAGACGAACACTGTGCTAGCATCACATCC 1200
AtSox4   CGGTTTTCCCGCATGGTTTGAACGGGAAGGTTATGCAGAAGGAGTACAGATATCTCCGA 1260
AtSox4   AACTCGAACAGAATACACACTAACACTGAGCCCTCGCACCCTGCGCTCATATAAAACT 1320
AtSox4   TTCAACTGCTCTTCGACTGTACAGCATTATTACTGGATGCACGGACACTGTGGACATCG 1380
AtSox4   GACACTGTATCCGCTCCGTGAACGGTGTGATGAAGCCACGCCACGGCACTAAGCACGACT 1440
AtSox4   GAAGCGTGTGGTGCACACAGCTCTCCTCAGGACTACTATCAGACTGAGTTTTCTTTAGCGA 1500
AtSox4   CACGGTGGACTTGAGAGCGCACAGAGGCTCTCTCTCTCTCACACACACACACAC 1560
AtSox4   ACACACACACTCACAGACTGGTGTAGCA ATGGTCCAGAAAACAAGCAGCAGGGTGTTA 1618
                                     M V Q K T S S T V L
AtSox4   GCTGGGGACTCGTCCGATTCGGCGCGCTGGATCTGGACATGGCTTCTCCCCACCCCC 1678
A G D S S D S G A L D L D M A S S P T P
AtSox4   GGCTCCACGGCATCCGGGGTGACAAGCTTGACCCCGGCTGGTGCAAAACCCACAGCGGT 1738
G S T A S G G D K L D P G W C K T P S G

```

```

AtSox4  CACATCAAGAGACCGATGAACGCGTTCATGGTGTGGTCGCAAATCGAGAGGGCGCAAGATC 1798
        H I K R P M N A F M V W S Q I E R R K I
AtSox4  ATGGAGCAGTCACCGACATGCACAACGCGGAGATCTCCAAGAGACTCGGCAAGCGCTGG 1858
        M E Q S P D M H N A E I S K R L G K R W
AtSox4  AAGCTCCTCAAAGACAGCGACAAGATCCCGTTCATCCGAGAGGGCGAGCGCTCGGGCTC 1918
        K L L K D S D K I P F I R E A E R L R L
AtSox4  AAGCATGGCAGACTACCCCGACTACAAGTACCGACCT 1957
        K H M A D Y P D Y K Y R P
    
```

图 1 *AtSox4* 基因部分序列及其 5' 端调控区序列

TATA 框、CAAT 框和 GC 框分别用双下划线表示, HMG 保守区和起始密码(ATG)分别用下划线和方框表示

2.2 *Atsox4* 基因启动子片段的克隆

以异源四倍体鱼基因组 DNA 为模板, 通过特异引物(P1/P2)的 PCR 扩增, 分离到 600bp 启动子片段, 与预期的片段大小相符(图 2). 将此片段亚克隆及测序, 结果表明其序列与已知的 *Atsox4* 基因 5' 端调控区相应序列完全相同, 将所得到的 600bp 的 DNA 序列在 <http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html> 上进行潜在的真核转录因子识别位点的搜索分析表明, Score 值等于或大于 90.0 的转录因子结合位点共 44 个, 如 SRY, CAP, Nkx 2, HSP, GATA 1, GATA 2, CdxA 及 E2F, 而且 SRY, CAP, HSP, CdxA, Dfd 等具有多个特异结合位点(图 3).

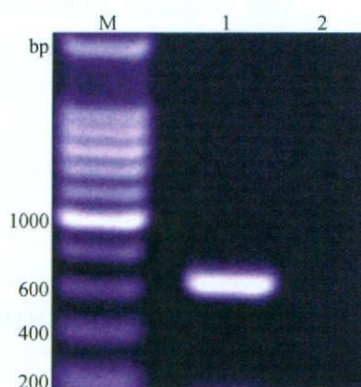


图 2 PCR 扩增异源四倍体鲫 *Sox4* 基因启动子

M, 200bp 分子标记; 1. *Sox4* 基因启动子片段; 2. 空白对照

```

908 AAATACACAT CAGCGTGTTC CATTAAAACT AAGTTTGTGC TGTACTCTGG entry      score
           ----->
           <-----
           <-----
           <-----
           M00148 SRY      94.5
           M00101 CdxA    92.1
           M00253 cap     90.5
           M00075 GATA-1  90.2

958 AATGAGGTCA GACCCAAAGC TCCTCATTGC ACGCGCTGAT GATTATTAGA entry      score
           ----->
           <-----
           <-----
           <-----
           M00253 cap     93.1
           M00230 Skn-1  92.6
           M00019 Dfd     91.0
           M00263 StuAp  90.8
           M00253 cap     90.5

1008 TTCCTTTTTG CGCCAATGAA AAGAGAGTGG GCGTGTTTTT GGCTCGGGGA entry      score
           ----->
           ----->
           >
           M00050 E2F     93.1
           M00048 ADR1    92.3
           M00019 Dfd     91.0

1058 AGGGTAGAGA CAGCAGCTCA TTGGCCGGCC GCCGTCGCTA TTATACCATT entry      score
           ----->
           <-----
           M00101 CdxA    91.4
           M00101 CdxA    91.4
    
```

1108	GGAAACGGAT AAAACTGCAT GAAGCAGAAT AGAAGTCTGT TGAAACTTAC	entry	score
	---->	<u>M00029</u> HSF	95.4
	---->	<u>M00028</u> HSF	95.3
	---->	<u>M00028</u> HSF	94.3
	---->	<u>M00029</u> HSF	93.7
1158	AGACTGTTTT CAAGAGACGA ACACTTGTGC TAGCATCACA TCCCGGTTTT	entry	score
	<-----	<u>M00120</u> d1	96.8
	---	<u>M00050</u> E2F	90.8
	<-----	<u>M00240</u> Nkx-2	90.7
1208	CCCGCATGGT TTGAACGGGG AAGGTTATGC AGAAGGAGTC AGATATCTTC	entry	score
	---	<u>M00120</u> d1	96.8
	---->	<u>M00028</u> HSF	95.3
	----->	<u>M00142</u> NIT2	95.0
	---->	<u>M00029</u> HSF	93.7
	----->	<u>M00048</u> ADR1	92.3
	----->	<u>M00142</u> NIT2	91.2
	---->	<u>M00050</u> E2F	90.8
1258	CGAAACTCGA ACAGAATACA CACTAACACT GAGCCCTCGC ACCACTGCGC	entry	score
	---->	<u>M00029</u> HSF	95.4
	---->	<u>M00028</u> HSF	94.3
	----->	<u>M00253</u> cap	93.3
	---->	<u>M00028</u> HSF	91.1
1308	TCATATACAA ACTTTCAACT GCTCTTCGAC TGTTACAGCA TTATTACTGG	entry	score
	<-----	<u>M00101</u> CdxA	97.9
	----->	<u>M00101</u> CdxA	93.6
	-----	<u>M00019</u> Dfd	92.5
1358	ATGCACGGAC ACTGTGGACA TCGGACACTG TATCCGCTCC GTGAACGGTG	entry	score
	->	<u>M00019</u> Dfd	92.5
	<-----	<u>M00076</u> GATA-2	90.1
1408	TGATGAAGCC ACGCCACGGC ACTAAGCAGC ACTGAAGCGT GTGGTGACC	entry	score
	----->	<u>M00271</u> AML-1a	100.0
	<-----	<u>M00253</u> cap	97.5
1458	AGCTCTCCTC AGGACTACTA TCAGACTGAG TTTTCTTTAG CGACACGGTG	entry	score
	<---	<u>M00028</u> HSF	100.0
	<---	<u>M00029</u> HSF	96.0
	<-----	<u>M00253</u> cap	95.8
	----->	<u>M00253</u> cap	90.8
	<-----	<u>M00148</u> SRY	90.0

图 3 *AtSox4* 基因启动子序列及推测的转录因子识别位点

箭头表示推测的转录因子识别位点

2.3 重组表达质粒的酶切鉴定

pA tsox4EGFP 1 重组载体经 *Xho*I 和 *Hind* III 双酶切, 1.0%琼脂糖凝胶电泳分离, 在紫外透射反射检测仪上观察可见一条 600 bp 的目的片段和 4.2 kb 的载体片段(图 4), 与预测的结果相符, 表明 *Atsox4* 启动子片段已被插入到载体 pEGFP 1 中, 将其命名为 pA tsox4EGFP 1.

2.4 绿色荧光蛋白的瞬时表达

将脂质体转染的 HeLa 细胞 37 °C 培养 20 h 后, 在倒置荧光显微镜下即可检测到明亮的绿色荧光, 即 EGFP 的表达信号(图 5(a)), 荧光强度随着培养时间的延长而增加(图 5(b)). 而转染启动子缺失的 pEGFP 1 质粒的 HeLa 细胞未见绿色荧光(图 5(c)).

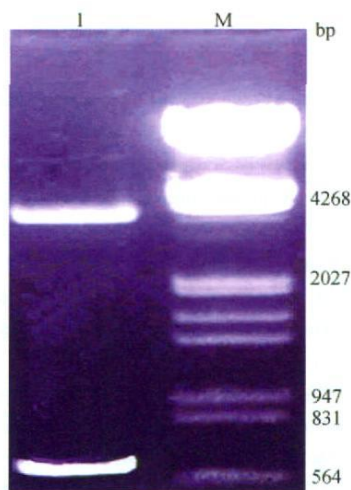


图 4 pAtSox4EGFP 1 重组质粒酶切图
L. pAtSox4EGFP 1; M. λ DNA 分子量标记

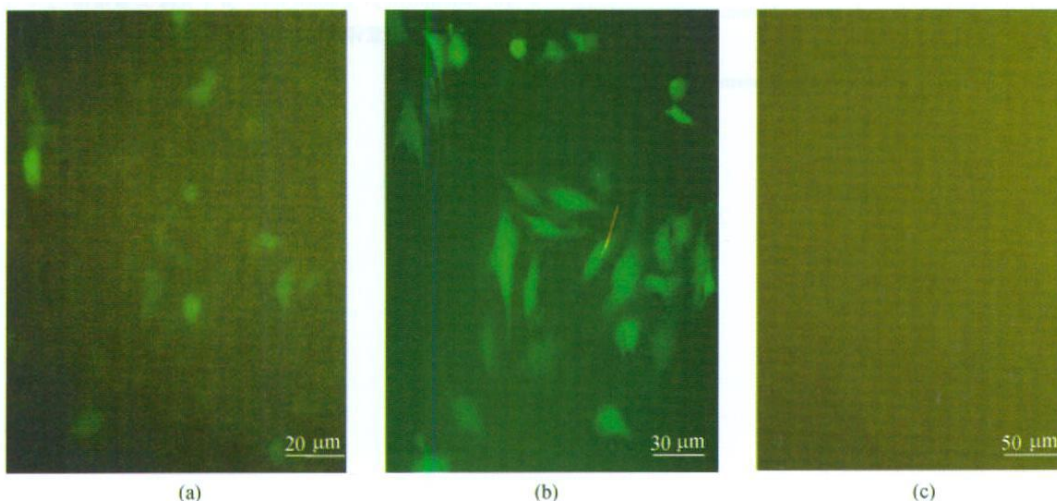


图 5 转染 HeLa 细胞后 EGFP 的表达

(a) 转染 pAtSox4EGFP 1 重组质粒 20h 后; (b) 转染 pAtSox4EGFP 1 重组质粒 24h 后; (c) 转染启动子缺失的 pEGFP 1 质粒

3 结论

本研究从异源四倍体鲫鲤基因组 DNA 中获得了 *Sox4* 基因 HMG box 部分基序与 5' 端调控区, 并从 5' 端调控区克隆了 600 bp 启动子片段, 然后对其启动子转录功能活性进行了初步分析. 为下一步研究 *AtSox4* 基因的表达调控提供了一个有力的研究工具. 通过对所得启动子片段进一步分析可知, 此区域是一些转录因子的基序区, 提示这些区域含帽子位点 (CAP) 及多个转录因子结合位点, 如 SRY, GATA-1 等, 这些转录因子可能参与

AtSox4 基因的表达调控. 有趣的是, 四倍体鱼 *Sox4* 基因启动子区具有 SRY 转录因子结合位点, 我们推测 SRY 基因可能参与 *AtSox4* 基因的表达调控, 而 *AtSox4* 基因的表达对雄性四倍体鱼的性腺发育可能具有重要意义. 因此, 深入研究不同转录因子对 *Sox4* 基因的确切作用位点, 将为进一步阐明 *Sox4* 基因的表达调控提供十分重要的信息.

致谢 本研究得到了本实验室姚占洲、罗凯坤老师及陈合格、邓觅、龚莉莉等同学的热心帮助, 作者深表谢意.

参 考 文 献

- 1 Pevny LH, Lovell Badge R. *Sox* genes find their feet. *Curr Opin Genet Dev*, 1997, 7(3): 338—344
- 2 Wright EM, Snopek B, Koopman P. Seven new members of the *Sox* gene family expressed during mouse development. *Nucleic Acids Res*, 1993, 21(3): 744
- 3 Conner F, Wright E, Denny P, et al. The SRY related HMG box containing gene *Sox 6* is expressed in the adult testis and developing nervous system of the mouse. *Nucleic Acids Res*, 1995, 23(17): 3365—3372
- 4 Foster JW, Steglich MAD, Guioli S, et al. Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY related gene. *Nature*, 1994, 372(6506): 525—530
- 5 常重杰, 杜启艳, 邵红伟. *Sox* 基因家族研究的新进展. *遗传*, 2002, 24(4): 470—476
- 6 Farr CJ, Easty DT, Ragoussis J, et al. Characterization and mapping of the human *Sox 4* gene. *Mamm Genome*, 1993, 4(10): 577—584
- 7 Hunt SMN, Clarke CL. Expression and hormonal regulation of the *Sox 4* gene in mouse female reproductive tissues. *Biol Reprod*, 1999, 61(2): 476—481
- 8 Maschhoff KL, Anziano PQ, Ward P, et al. Conservation of *Sox4* gene structure and expression during chicken embryogenesis. *Gene*, 2003, 320: 23—30
- 9 Mavropoulos A, Devos N, Biemar F, et al. *Sox4b* is a key player of pancreatic alpha cell differentiation in zebrafish. *Dev Biol*, 2005, 285(1): 211—223
- 10 Liu S J, Liu Y, Zhou G J, et al. The formation of tetraploid stocks of red crucian carp × common carp hybrids as an effect of interspecific hybridization. *Aquaculture*, 2001, 192: 171—186
- 11 Liu JF, Liu S J, Tao M, et al. Isolation and expression analysis of testicular type *Sox9b* in allotetraploid Fish. *Mar Biotechnol*, 2007, 17(3): 313—319
- 12 刘季芳, 刘少军, 张 纯, 等. 异源四倍体鲫鲤 *Sox 9a* 基因保守区序列的克隆及内含子剪接位点分析. *自然科学进展*, 2004, 14(6): 641—645
- 13 Sambrook J, Russell DW. *分子克隆实验指南(上、下册)(第三版)*, 黄培堂译. 北京: 科学出版社, 2002