

一个在中华绒螯蟹性腺中特异表达的 *Sox* 基因 HMG 盒区的克隆与鉴定^{*}

亓海燕 邱高峰^{**}

上海海洋大学农业部水产种质资源与养殖生态重点开放实验室, 上海 201306

摘要 根据人的睾丸决定因子(SRY)的高速泳动组蛋白区设计简并引物, 以中华绒螯蟹雌雄个体的基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 从雌雄体均扩出 220 bp 左右的条带, 说明中华绒螯蟹中存在 SRY 基因的同源体, 且无性别差异. 经克隆、测序后得到两条 SRY 盒区相关基因(*Sox* 基因)片段, *ES1* 和 *ES2*, 其序列与人相应 *Sox* 基因保守区的最高同源性分别为 66% 和 93%. *ES1* 和 *ES2* 在成体 8 种组织中的检测结果表明, *ES1* 在精巢、肌肉、心脏、肝脏、鳃、胸神经团、不同时期的卵巢及排出的成熟卵等组织中均表达, 而 *ES2* 只在精巢、成熟的卵巢以及排出的成熟卵中有表达, 说明 *ES2* 基因可能参与性腺的发育和早期胚胎发育过程.

关键词 中华绒螯蟹 *Sox* 基因 HMG 盒区 表达分析

Sox(SRY-related HMG box genes)基因是指与胚胎发育、性别决定、软骨形成以及神经系统发育等过程有关的一类基因, 一般称这类基因为 *Sox* 基因家族. 这个家族的第一个成员 SRY (sex-determining region of Y chromosome)基因是在 1990 年首先从人类 Y 染色体上分离得到的, 同年在小鼠中也发现了 *Sry* 基因^[1,2]. SRY/*Sry* 是哺乳动物睾丸决定因子 SRY 的前体基因, 睾丸决定因子 SRY 有一个 HMG (high mobility group)盒区, 可以与特异的 DNA 序列结合, 从而完成其调节作用. *Sox* 基因家族的共同特点就是有一个或者多个与 SRY 的 HMG 盒区相似的保守区域, 与其同源性都在 50% 以上^[3].

自小鼠的 *Sry* 基因发现以来, 已有越来越多不同动物的 *Sox* 基因被公布. 现有关研究已深入到进化地位明显不同的各个种类, 从低等的多孔动物^[4]到高等的哺乳类都有 *Sox* 基因的报道. 然而目前针对 *Sox* 基因的研究主要集中在脊椎动物, 对于无脊

椎动物的研究主要局限于模式动物果蝇和线虫^[3], 有关甲壳类 *Sox* 基因克隆的研究较少^[5], 到目前为止还没有关于甲壳类 *Sox* 基因表达研究的报道.

中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 是我国重要经济蟹类, 但是由于染色体数目多 ($2n=146$), 且呈点状, 核型分析困难^[6,7], 在细胞染色体遗传学上来研究其性别决定机制十分困难, 是否存在性染色体至今尚无定论. 本研究克隆了中华绒螯蟹两个 *Sox* 基因保守序列, 并检测了其转录本表达的组织分布, 其中一个基因只在性腺中表达, 可为今后研究中华绒螯蟹的性腺发育乃至性别分化过程提供重要分子标记.

1 材料与方法

1.1 材料

实验用的中华绒螯蟹于 2006 年 11 月—2007 年 4 月每月定期购自上海市铜川路水产市场, 购买后迅速运输到实验室进行解剖. 卵巢分期参照文献

2008-07-03 收稿, 2008-08-25 收修改稿

^{*} 上海市农委攻关项目(编号: 科 0510)和上海市重点学科海洋生物学(编号: J50701)资助项目

^{**} 通信作者, E-mail: gfqiu@shou.edu.cn

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

[8] 中组织切片方法进行. 最后取雄蟹 3 只, 卵巢不同时期的雌蟹各 2 只进行实验. 实验用蛋白酶 k, RNA 酶, dNTP, 均购于天根生物工程有限公司; Tris 饱和酚购于北京鼎国生物技术有限责任公司; ExTaq 酶, M-MLV RT 酶, DnaseI, RNase inhibitor 购自宝生物工程有限公司.

1.2 基因组 DNA 的提取

取中华绒螯蟹新鲜肌肉组织 100 mg 于 1.5 mL Eppendorf 管中, 剪碎, 加消化液 400 μ L (pH8.5 50 mmol/L Tris, cl, pH8.0 100 mmol/L EDTA, 2% SDS, 5 mol/L NaCl, 100 μ g/mL 蛋白酶 k), 56 $^{\circ}$ C 振荡消化过夜.

按酚-氯仿提取法提取 DNA, 终产物溶于 TE 中, 取 5 μ L 用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量, 取 2 μ L 用紫外分光光度计检测 DNA 的 OD 值, 其余样品置于 -20 $^{\circ}$ C 保存.

1.3 引物设计与 PCR 扩增

参照人 SRY 因子的保守区设计一对简并引物 DF 和 DR (表 1), 委托上海生工生物工程技术服务有限公司合成, 此对引物均可扩增人的 SRY 基因的 HMG-box 保守区序列, 目的片段长度为 220 bp.

PCR 反应体系为: 2.5 μ L 10 \times Buffer, 2 μ L dNTP (2.5 mmol/L dNTPs), 1 μ L 引物/条 (100 μ mol/L), 100 ng 模板 DNA, 0.125 μ L Ex Taq DNA 聚合酶 (5 U/ μ L), 加灭菌 ddH₂O 补足至 25 μ L.

PCR 循环条件为: 97 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 50 s, 53 $^{\circ}$ C 50 s, 72 $^{\circ}$ C 50 s, 40 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存. 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物, 凝胶成像仪拍照.

表 1 引物名称及序列

引物名称	序列 (5'→3')
DF	AGCGACCCATGAA ^{a)} GCN ^{b)} TTY ^{a)} AT
DR	TCY ^{a)} ACGAGGTCGATAY ^{a)} TTR ^{c)} TAR ^{c)} T
Sox F1	GAGAAGAGAGATTGTCAAATACGC
Sox R1	GCGCATGTCGAATTGCTTGAGCGC
Sox F2	GTCTGGTCTCGCATGCACGGCGTA
Sox R2	CTTGGCCTCGTTCGATGAAGGGA
beta F	CGACGGTCAGGTCATCACCA
beta R	ACGTCGCACTTCATGATGGA

a) C \ T; b) A \ G \ C \ T; c) A \ G

1.4 PCR 产物的纯化、克隆及测序

PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后, 在长波紫外灯下小心切下目的条带, 用捷瑞公司试剂盒纯化, 取纯化后 PCR 产物克隆. 连接反应及转化均按 TaKaRa 公司的 pMD19T-Vector 试剂盒的说明书进行. 挑取经菌落 PCR 筛选后的阳性克隆委托生物公司进行测序.

1.5 总 RNA 的提取

取中华绒螯蟹活体解剖, 迅速取其精巢、肌肉、心脏、肝脏、鳃、胸神经团、不同时期的卵巢组织以及排出的成熟卵等组织. 每个组织所取量约为 100 mg, 放入 1.5 mL Eppendorf 管中, 置液氮罐冷冻备用. 用 Trizol 试剂提取总 RNA, 最后溶于焦碳酸二乙酯 (DEPC) 处理过的无菌水中, 在 -70 $^{\circ}$ C 保存.

1.6 总 RNA 的平衡及处理

取质量良好的 RNA 2 μ L 于紫外分光光度计上测定其 OD 值, 计算 RNA 的浓度后平衡所有 RNA 样品浓度至 1 μ g/ μ L. 为消除可能的基因组 DNA 污染, 总 RNA 用 RNase-free DNase I (TaKaRa) 处理, 5 μ L 反应体系中含 1 μ g 总 RNA, 1.25 μ L 的 10 \times buffer 缓冲液, 0.5 μ L 的 DNA 酶 RNase-free DNase I 及 0.25 μ L 的 RNA 酶抑制剂 RNase inhibitor. 反应经 37 $^{\circ}$ C 25 min 酶切可能存在的基因组 DNA, 75 $^{\circ}$ C 10 min 使酶失活.

1.7 RT-PCR 反应

取 DNA 酶处理过的中华绒螯蟹所需各组织的总 RNA 500 ng 进行 cDNA 合成. 程序如下: 先加 RNA 500 ng, Random Primers (25 μ mol/L) 1 μ L, 加 RNA-free H₂O 补至 6 μ L 混合, 于 70 $^{\circ}$ C 恒温器上 10 min, 迅速置冰上, 然后按下述配方加入其他试剂, dNTP (10 μ mol/L) 0.5 μ L, 40 u/ μ L RNase 抑制剂 0.25 μ L, 200 u/ μ L M-MLV RT 酶 0.25 μ L, RNA-free H₂O 补至 10 μ L.

RT-PCR 反应条件为: 30 $^{\circ}$ C 10 min, 42 $^{\circ}$ C 60 min, 75 $^{\circ}$ C 15 min, 最后置冰上数分钟. 反应结束后于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存产物.

1.8 组织检测

根据已测出的中华绒螯蟹两个 Sox 基因保守区

序列 *ES1*, *ES2* 分别设计特异引物对 *SoxF1*, *SoxR1*; *SoxF2*, *SoxR2*(见表 1)用以检测其组织表达情况, 其中 *SoxF1*, *SoxR1* 可扩增目的片段长度为 145 bp, *SoxF2*, *SoxR2* 可扩增目的片段长度为 138 bp. 以管家基因 *beta-actin* 为阳性对照, 其引物对为 *betaF*, *betaR*(见表 1)可扩增目的片段长度为 132 bp.

PCR 反应体系为: 2 μ L 10 \times Buffer, 2 μ L dNTP (2.5 mmol/L dNTPs), 1 μ L 引物(10 μ mol/L)、1 μ L cDNA, 0.125 μ L Ex TaqDNA 聚合酶(5 U/ μ L), 加灭菌 ddH₂O 补足至 25 μ L.

PCR 循环条件为: 97 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 63 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存. 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物, 凝胶成像仪拍照.

2 结果

2.1 中华绒螯蟹基因组 PCR 扩增结果

用简并引物 *degenerateF* 和 *degenerateR* 对中华绒螯蟹基因组进行 PCR 扩增, 结果在雌雄个体均扩增出一条带, 且带型一致, 大小在 220 bp 左右. 这个结果初步说明中华绒螯蟹的基因组中含有 *SRY* 基因同源体, 且雌雄之间无性别差异. 进一步以测得的 *ES1*, *ES2* 序列设计的特异引物来扩增雌雄中

中华绒螯蟹基因组, 也分别得到一致条带(如图 1, 2), 说明所得的这两个基因在雌雄之间无差异.

2.2 测序及序列分析结果

挑选多个阳性克隆测序, 得到中华绒螯蟹雌雄个体中共两条不同的 *Sox* 基因同源序列. 分别命名为: *ES1* 和 *ES2*. 运用 Bioedit 及 clustal X 软件对这两个序列进行核苷酸序列及可能编码的氨基酸序列分析, 结果如图 3, 4.

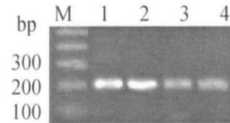


图 1 简并引物扩增中华绒螯蟹基因组 DNA
M: 100 bp DNA 分子量标准; 1—2: 雄性中华绒螯蟹;
3—4: 雌性中华绒螯蟹

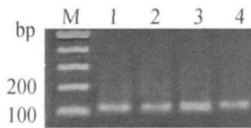


图 2 *ES1*, *ES2* 在中华绒螯蟹基因组中的检测
M: 100 bp DNA 分子量标准; 1: *ES2* 在雄性中华绒螯蟹中扩增;
2: *ES2* 在雌性中华绒螯蟹中扩增; 3: *ES1* 在雄性中华绒螯蟹中扩增;
4: *ES1* 在雌性中华绒螯蟹中扩增

<i>ES1</i>	AAGCGACCCATGAATGCGTTCATGGTGTGGTTCGAGATGGAGAGAAGAGAGATTGTCAAA	60
<i>ES2</i>	AAGCGACCCATGAACGCTTTCATGGTCTGGTCTCGCATGCAGCGCGTAAGATTGCTCAA	60
	***** ** ***** ***** * *** * * * ***** **	
<i>ES1</i>	TACGCCCCGACACCCACAACGCCGAGATCTCCAAGCAGCTAGGCCGTCGCTGGAAGATG	120
<i>ES2</i>	GAAAACCCAAAATGCACAACCTCCGAGATCTCCAACGCTCTGGCTCAGAGTGAAGCTG	120
	* *** * * ***** ***** * ** *** ***** **	
<i>ES1</i>	CTGACGGAGGAGCAGCGCGACCATACGGGATGAAGCCGAGCGCCTCAAGCAATTGCAC	180
<i>ES2</i>	CTGACGGAGGCCGAGAAGCGTCCCTTCATCGACGAGGCCAAGCGTCTTCGCGCCAGCAC	180
	***** ** *** * * * ** * * * * * * * *****	
<i>ES1</i>	ATGCGCGAGTATCCGGACTACAAATATCGACCTCGTAGAA	220
<i>ES2</i>	ATGAAAGAGCACCCAGACTACAAATATCGACCTCGTAGAA	220
	*** ** * ** *****	

图 3 两个 *Sox* 基因片段核苷酸序列比较
* 表示一致的核苷酸

```

ES1      KRPMNAFMVWSQMERRE | VKYAPDTHNAE | SKQLGRRWKML TEEQRRPYRDEAERLQQLH      60
ES2      KRPMNAFMVWSRMQRRK | AQENPKMHNSE | SKRLGSEWKLL TEAEKRPF | DEAKRLRAQH      60
          ***** * ** *   * ** **** * * ** ** * ** ** *
ES1      MREYPDYKYRPRR      73
ES2      MKEHPDYKYRPRR      73
          * * *****

```

图 4 两个 *Sox* 基因片段可能编码氨基酸序列比较

*表示一致的氨基酸

经 clustal X 进行序列对比分析后发现这两个序列的核苷酸同源性为 70%，氨基酸同源性为 66%。

习惯上，与 SRY 的 HMG 保守区有着 50% 以上相似性的蛋白都归为 *Sox* 基因蛋白，经序列搜索及比对后发现，ES1、ES2 与 SRY 在 HMG 盒区内的氨基酸序列同源性分别为 55% 和 70%，所以我们可以确定这两个序列都属于 *Sox* 基因家族中的成员。

2.3 与其他物种 *Sox* 基因序列比较结果

在 GenBank 数据库 blast 搜索与这两个 *Sox* 基因片段同源性最高的序列，然后通过 Bioedit 软件进

行序列比较分析，结果显示 ES1 序列与人类的 *Sox4* 和 *Sox11* 基因的同源性同为 66%，与意大利蜜蜂 (*Apis mellifera*) 的 *Sox1* 基因有着最高同源性为 75%。

ES2 与 *Sox21* 和 *Sox14* 基因都具有 93% 的氨基酸同源性，在对其序列进行比较后发现，在所有比较的这 73 个氨基酸残基中，有 7 个氨基酸位点存在差异。其中，与 *Sox14* 基因相同而与 *Sox21* 基因不同的位点有第 44 位和第 59 位；而与 *Sox21* 基因相同与 *Sox14* 不同的位点为第 42 位和第 49 位 (图 5)。

```

Human Sox21      KRPMNAFMVWSRAQRRKMAQENPKMHNSE | SKRLGAEWKLL TESEKRPF | DEAKRLRAMH      60
Zebrafish Sox21  KRPMNAFMVWSRAQRRKMAQENPKMHNSE | SKRLGAEWKLL TESEKRPF | DEAKRLRAMH      60
Mouse Sox21      KRPMNAFMVWSRAQRRKMAQENPKMHNSE | SKRLGAEWKLL TESEKRPF | DEAKRLRAMH      60
Pufferfish Sox21 KRPMNAFMVWSRAQRRKMAQENPKMHNSE | SKRLGAEWKLL TESEKRPF | DEAKRLRAMH      60
Rat Sox14        KRPMNAFMVWSRGQRRKMAQENPKMHNSE | SKRLGAEWKLL SEAEKRPY | DEAKRLRAQH      60
Chicken Sox14    KRPMNAFMVWSRGQRRKMAQENPKMHNSE | SKRLGAEWKLL SEAEKRPY | DEAKRLRAQH      60
Human Sox14      KRPMNAFMVWSRGQRRKMAQENPKMHNSE | SKRLGAEWKLL SEAEKRPY | DEAKRLRAQH      60
Platypus Sox14   KRPMNAFMVWSRGQRRKMAQENPKMHNSE | SKRLGAEWKLL SEAEKRPY | DEAKRLRAQH      60
ES2              KRPMNAFMVWSRMQRRK | AQENPKMHNSE | SKRLGSEWKLL TEAEKRPF | DEAKRLRAQH60
          ***** **** ***** ***** * **** ***** *

Human Sox21      MKEHPDYKYRPRR      73
Zebrafish Sox21  MKEHPDYKYRPRR      73
Mouse Sox21      MKEHPDYKYRPRR      73
Pufferfish Sox21 MKEHPDYKYRPRR      73
Rat Sox14        MKEHPDYKYRPRR      73
Chicken Sox14    MKEHPDYKYRPRR      73
Human Sox14      MKEHPDYKYRPRR      73
Platypus Sox14   MKEHPDYKYRPRR      73
ES2              MKEHPDYKYRPRR      73
          *****

```

图 5 ES2 与其他物种 *Sox14* 及 *Sox21* 基因的氨基酸序列比较

*表示一致的氨基酸

2.4 组织表达检测结果

对 *ES1* 和 *ES2* 在中华绒螯蟹精巢、心脏、肝脏、肌肉、鳃、胸神经团等 6 种组织及卵巢 5 个发育时期和排出的卵中进行表达检测, 检测时均以管家基因 *beta-actin* 作阳性对照. 检测结果显示 *ES1* 在检测的所有组织中均表达. 有趣的是, *ES2* 只在精巢、成熟的卵巢(卵母细胞生发泡破裂)以及排出的成熟卵中表达, 尤其在精巢及排出的成熟卵中有较强表达, 在其他组织及未成熟卵巢发育时期(包括卵黄发生前、中后期)中均不表达. 实验中, 各组织检测重复 3 次, 均可见一致结果. 如图 6, 7 所示:

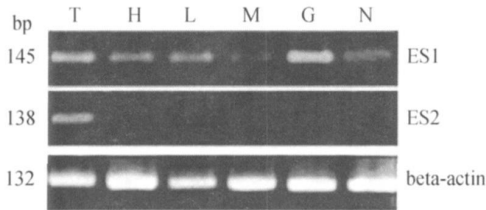


图 6 *ES1*, *ES2* 在中华绒螯蟹成体各组织及在卵巢中的表达检测结果

T: 精巢; H: 心脏; L: 肝脏; M: 肌肉; G: 鳃, N: 胸神经团

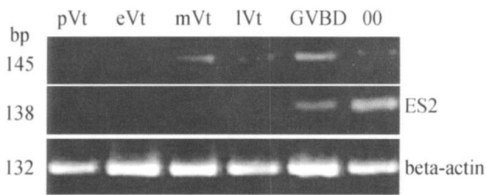


图 7 *ES1*、*ES2* 在中华绒螯蟹卵巢发育的 5 个时期以及排出的成熟卵中的表达检测结果

pVt: 卵黄发生前期; eVt: 卵黄发生早期; mVt: 卵黄发生中期; lVt: 卵黄发生后期; GVBD: 生发泡破裂期; OO: 排出的成熟卵

3 讨论

3.1 *Sox* 基因的保守性

目前在哺乳类、鸟类、爬行类、两栖类、昆虫等进化地位不同的动物中已发现的 *Sox* 基因种类有 40 余种^[9]. 但是, 在基因组的研究中, 性别专一的 *Sox* 基因 *SRY/Sry* 仅存在于哺乳动物雄性中, 其他动物的所有 *Sox* 基因未见有性别差异性.

近年利用单链构象多态性分析技术(sscp)报道过雌雄个体的分型间存在差异的现象, 如汪桂玲等^[10]对斑节对虾雌雄个体 *Sox* 基因 sscp 分析得到 3 种相异带型, 而杨超等^[11]也曾发现蛇的 *Sox* 基因 sscp 带型在雌雄个体间略有差异, 然而他们都未能提供序列测定结果来证实雌雄差异现象的存在.

本研究参照人的 *SRY* 保守区序列设计简并引物对中华绒螯蟹的雌雄个体基因组进行 *Sox* 基因扩增, 结果显示雌雄均可扩增出条带, 且大小一致, 经序列测定后发现其片段无性别差异性, 该结果与蛙类、龟类、鱼类等非哺乳动物的 *Sox* 基因研究报道一致^[12-14]. 利用测得的序列设计特异引物来扩增雌雄中华绒螯蟹的基因组, 发现均可得到一致条带, 此结果进一步证明了所得的两个 *Sox* 基因序列是在雌雄间无差异的, 说明在中华绒螯蟹的基因组中存在 *SRY* 的同源基因且无性别差异.

3.2 *Sox* 基因的命名

Sox 基因家族的所有成员可划分为 10 个亚族(A-J), 除 H, I, J 3 个亚族只有一个成员外, 其他亚族都至少有 3 个成员, 而且同亚族的成员在 HMG 盒区的同源性都在 80% 以上, 不同亚族成员间则低于这个值^[15]. 本研究得到的 *ES1 Sox* 基因片段与意大利蜜蜂的 *Sox1* 基因在 HMG 盒区有着最高的氨基酸同源性仅为 75%, 低于 80%, 根据 *Sox* 基因家族的分类规则, 该基因不属于任何一个亚族, 推测可能为一个新的 *Sox* 基因家族成员, 其名称需要待其全长得出及对其功能了解后才能加以确定.

按照 *Sox* 基因的一般命名规则, 是以与其保守区同源性最高的人类 *Sox* 基因为之命名, *ES2 Sox* 基因片段与人类的 *Sox14* 及 *Sox21* 基因的 HMG 区都有着最高的同源性, 均为 93%, 故难以确认 *ES2 Sox* 基因片段是 *Sox14* 还是 *Sox21*, 须待获得其全长后再为之定名, 因为根据 PCR 产物克隆到的部分 HMG 盒区序列来为基因定名的方法有些时候显得不很精确, 保守区的氨基酸序列差异较小. 曾经就有许多物种的 *Sox* 基因先根据保守区定名, 然后克隆到全长后却不得不改名的例子, 如仅根据 PCR 所得的片段, 小鼠中的 *Sox9* 被划分为 E 族成员, 而人类中的 *Sox9* 则被认为是 B 族的成员, 在得到

其全长并接合其他物种 E 族成员特点后确定 *Sox9* 应为 E 族而不是 B 族^[3]。

3.3 组织表达分析

在小鼠和鸡中, *Sox14* 基因的表达仅局限于发育的脑和脊髓的少数神经元中^[16], 在其他组织中没有表达, 而本研究中的 *Sox* 基因 *ES2* 在中华绒螯蟹的神经组织胸神经团中没有表达, 只在成熟期的卵巢中有较弱表达, 而在精巢及排出的成熟卵子中有较强的表达。可见, *ES2* 的表达类型是与其他物种的 *Sox14* 基因的表达类型不相同的。果蝇的 *Sox21b* 基因, 在其胚胎时期有较强的表达, 在成体果蝇中, *Sox21b* 则只在其雄性的头部有较弱的表达^[17]。蜜蜂的 *Sox21b* 基因在蜂王卵巢管中的滋养细胞及其卵子中有较强表达^[18]。*ES2* 在成熟卵巢中开始有微量表达至排出的卵子中有较强表达的现象说明它有可能作为母体内源 RNA 参与胚胎发育过程^[19], 这一表达特点是与果蝇及蜜蜂的 *Sox21b* 基因较为相似的。所以从组织表达类型来看 *ES2* 基因更接近于 *Sox21* 基因。

ES2 只在精巢及卵巢中的表达特点说明它有可能参与性腺的发育过程, 而它从成熟卵巢中开始有较弱表达, 到排出的卵子中有较强表达的现象还说明它有可能参与早期胚胎的发育过程, 然而其功能的确定仍然需要更深入的研究来证明。

参 考 文 献

- Gubbay J, Collignon J, Koopman P, et al. A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature*, 1990, 346(6281): 245-250
- Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, et al. A gene from the human sex determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA binding motif. *Nature*, 1990, 346: 240-244
- Michael W. From head to toes: The multiple facets of Sox proteins. *Nucleic Acids Research*. 1999, 27 (6): 1409-1420
- Jager M, Quéinnec E, Houliston E, et al. Expansion of the Sox gene family predated the emergence of the Bilateria. *Molecular*

- Phylogenetics and Evolution*, 2006, 39(2): 468-477
- 沈建明, 朱冬发, 吴琼. 三疣梭子蟹 *Sox* 基因 HMG 盒的克隆分析. *水产科学*, 2008, 27(2): 50-63
- 邱高峰, 堵南山, 赖伟. 日本沼虾染色体及其核型的研究. *海洋与湖沼*, 1994, 25(5): 493-498
- 王艺磊, 戴军, 姚扬烈, 等. 利用 AFLP 技术筛选锯缘青蟹性别差异 DNA 片段. *中国水产科学*, 2004, 11(4): 286-290
- 顾志敏, 何林岗. 中华绒螯蟹卵巢发育周期的组织学细胞学观察. *海洋与湖沼*, 1997, 28(2): 138-145
- Schepers GE, Teasdale RD, Koolartan P. Twenty pairs of Sox; Extent, homology, and nomenclature of the mouse and human Sox transcription factor gene families. *Dev Cell*, 2002, 3: 167-170
- 汪桂玲, 朱琴, 李家乐. 斑节对虾 *Sox* 基因 HMG 盒的 PCR 扩增及 SSCP 分析. *水产学报*, 2005, 29(4): 478-481
- 杨超, 杨传秀, 聂刘旺. 两种蛇 *Sox* 基因的 PCR-SSCP 分析. *动物学杂志*, 2003, 38(1): 8-12
- 陈冬生, 聂刘旺. 两种蛙 *Sox* 基因的 PCR-SSCP 分析. *激光生物学报*, 2005, 14(2): 103-107.
- 聂刘旺, 单祥年, 郭超文, 等. 两种龟类 *Sox* 基因的 PCR 扩增及 SSCP 分析的研究. *应用与环境生物学报*, 1999, 5(4): 378-381
- 杜启艳, 常重杰, 华慧颖, 等. 鲤鱼中 5 个 *Sox* 基因保守区的克隆和比较. *河南师范大学学报*, 2004, 32(4): 87-91, 107
- Bowles J, Schepers G, Koopman P. Phylogeny of the Sox family of developmental transcription factors based on sequence and structural indicators. *Dev Biol*, 2000, 227(2): 239-255
- Uchikawa M, Kamachi Y, Kondoh H. Two distinct subgroups of Group B Sox genes for transcriptional activators and repressors; their expression during embryonic organogenesis of the chicken. *Mech Dev*, 1999, 84(1-2): 103-120
- McKimmie C, Woerfel G, Russell S. Conserved genomic organization of Group B Sox genes in insects. *BMC Genet*, 2005, 6(1): 26
- Wilson MJ, Dearden PK. Evolution of the insect Sox genes. *BMC Evolutionary Biology* 2008, 8: 120
- Yamaguchia A, Leea KH, Fujimoto H, et al. Expression of the DMRT gene and its roles in early gonadal development of the Japanese pufferfish *Takifugu rubripes*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 2006, 1(1): 59-68