

DOI: 10.3724/SP.J.1035.2012.00205

池蝶蚌 *Sox2* 基因在不同组织及不同月龄精巢中的表达

曾柳根 徐 灵 王军花 盛军庆 辜 清 彭 扣 洪一江

(南昌大学生命科学与食品工程学院, 南昌 330031)

摘要: *Sox* 基因家族在胚胎发育过程和性别分化中起重要作用, 为研究池蝶蚌中 *Sox* 基因的功能, 以人 *SRY* 基因 HMG-box 保守区的序列设计简并引物, 以雌、雄池蝶蚌基因组 DNA 和精巢 cDNA 为模板进行扩增, 获得了 2 个不完全相同的序列, 分别为 DNA-HMG₁、DNA-HMG₂ 和 cDNA-HMG, 长度均为 220 bp, 编码 73 个氨基酸。与人等物种 *Sox1*、*Sox2*、*Sox3* 及 *Sox14* 有很高的同源性, 雌雄个体之间没有序列差异性。采用 RACE-PCR 扩增获得了池蝶蚌性腺 *Sox2* 部分 cDNA 片段, 长度为 1774 bp, 该序列核苷酸与欧洲帽贝的 *SoxB* 和人类的 *Sox2* 的同源性最高; 在部分开放阅读框 249 个氨基酸残基中, 具有 *Sox* 家族典型的 HMG-box 结构域, 与人类、小鼠、原鸡和斑马鱼等 *Sox2* 的 HMG-box 同源性为 98%。为了解该基因在各组织中的表达情况, 采用实时荧光定量 PCR 方法分析了外套膜、闭壳肌、鳃、肠、肝、肾、精巢和卵巢在内的 8 种组织 *hs-Sox2* 的表达情况, 结果显示, *hs-Sox2* 基因在 8 种组织中均有表达, 其中在肾脏中的表达量最高, 其次是肠与闭壳肌, 在雄性性腺中的表达量明显高于雌性性腺, 在肝脏中的表达量最低; 为了解 *hs-Sox2* 在不同性腺发育时期的表达情况, 采用实时荧光定量 PCR 方法分析了 5 个不同月龄的精巢组织中 *hs-Sox2* 的表达情况, 结果显示在 39 月龄性腺的表达量最高, 其次是 16 月龄性腺, 63 月龄蚌中的表达量最少。以上结果表明, *hs-Sox2* 基因可能参与了池蝶蚌精巢的发育及功能的维持。

关键词: 池蝶蚌; *Sox2* 基因; 性腺; 荧光定量 PCR; 表达分析

中图分类号: Q344⁺.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2012)02-0205-07

Sox 基因家族编码蛋白是一类重要的转录调控因子, 主要特征是具有一个编码 79 个氨基酸的保守基序 HMG-box, 可与 DNA 序列特异结合且具有空间异构性。*Sox* 基因家族广泛存在于各种动物中, 仅在哺乳动物中就发现了已有超过 30 多种 *Sox* 基因, 其功能参与性别决定、血细胞分化、骨生成、神经发育等早期胚胎发育事件^[1, 2]。早期的研究表明转录因子 *Sox2* 作为早期神经系统发育的重要因子和神经系统特异性基因之一参与了神经系统的发育, 如原肠初期的预定神经外胚层 *Sox2* 基因的表达^[3]; 在中枢神经系统早期发育中, 神经上皮中 *Sox2* 基因高度表达, 并调节了神经干细胞的发育^[4]。同时研究表明在人类中 *Sox2* 基因还参与了晶状体的发育, *Sox2* 的杂合突变会引起无眼及小眼畸形患者的出现^[5]。

在小鼠中, 剂量型等位基因突变引起的 *Sox2* 表达量低于正常水平的 40% 时会引起视网膜神经前体细胞的分化异常和小眼球症的发生^[6]。

近年的研究表明, *Sox2* 作为调节因子参与了多种器官的分化和形成。在胚胎干细胞中, *Sox2* 与 *Oct4* 因子组成胚胎干细胞调节网络, 直接调节胚胎干细胞中的其他因子的功能例如 *Nanog*、*Utf1*、*Fbx15*、*Fgf4*、*Lefty1* 等^[7-9], 同时 *Sox2* 与 *Oct4* 也相互调节^[10-12]。Yamanaka, *et al.*^[14] 研究发现 *Sox2*、*Cmcy*、*Klf4*、*Oct4* 这 4 个转录因子可以将小鼠尾尖的成纤维细胞转化成胚胎干细胞样细胞。同时 Roy, *et al.*^[15] 利用基因敲除的方法发现 *Sox2* 基因维持了成骨细胞的自我更新。Kelberman, *et al.*^[5] 研究发现 *Sox2* 基因的缺失会引起促黄体生成素的变化, 进一

收稿日期: 2011-01-24; 修订日期: 2011-10-29

基金项目: 国家公益性行业科研专项(200903028)“珍珠养殖技术研究与示范”; 国家自然科学基金(31160534)资助

作者简介: 曾柳根(1981—), 男, 江西泰和人; 博士研究生; 主要从事水生动物发育遗传学研究。E-mail: bingjianla2008@163.com

通讯作者: 洪一江, Tel: 0791-3969530; E-mail: yjhong2008@163.com

步影响生殖轴的发育;在对淡水贝类性别决定机制中所涉及的相关基因研究较少,贺艳萍等^[13]报道背角无齿蚌存在 *SRY* 同源基因。

池蝶蚌 (*Hyriopsis schlegelii*) 原产于日本滋贺县的琵琶湖^[16], 隶属软体动物门、瓣鳃纲、蚌科、帆蚌属, 与我国淡水育珠蚌三角帆蚌为同属不同种, 可作为优质淡水珍珠育珠蚌, 具有巨大经济价值。本项目组从日本引进池蝶蚌原种并取得人工繁殖成功后^[16], 已相继在育珠性能^[17]、人工选育^[18, 19]、免疫^[20]及胚胎发育^[21]等方面开展一定的研究。目前已研究了很多物种的 *Sox* 基因, 但对于具有重要进化地位和经济价值的淡水育珠蚌中的报道却鲜见。为了揭示 *Sox* 基因在贝类中的保守性, 了解贝类的性别决定和分化的分子机制, 本研究以池蝶蚌为研究对象, 克隆相关 *Sox* 基因, 探讨其在不同的组织中和在不同发育时间的性腺中的表达情况, 为淡水蚌的性别决定机制提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验材料取自江西省抚州市洪门水库国家级池蝶蚌良种场, 2004年、2005年繁育的 F_2 代及 2006年、2007年、2008年及 2009年繁育的 F_3 代池蝶蚌。蚌体质健壮, 形状标准, 生长线明显, 外套膜厚实, 内脏柔软饱满、外鳃完整无伤。

1.2 DNA、RNA 的提取与 SMART cDNA 的制备

利用改良柱式动物 DNA out 试剂盒(TIANZ)提取性腺组织基因组 DNA; 利用 TRIzol(Invitrogen)法提取性腺组织总 RNA; 并按照 Super Script II Reverse Transcriptase Kit(Invitrogen)的方法合成 SMART cDNA。

1.3 引物设计及 PCR 扩增

根据人的 *SRY* 基因家族的保守 HMG-box 结构域区序列设计 1 对简并引物, 以雌雄基因组 DNA 和性腺组织 cDNA 为模板扩增。PCR 程序: 95℃ 预变性 4min, 94℃ 变性 40s, 57℃ 复性 45s, 72℃ 延伸 60s, 35 个循环, 最后 72℃ 延伸 10min。

根据序列测定获得的池蝶蚌 cDNA 的中间核心片段, 设计特异性引物 3'GPS₁、3'GPS₂ 和 3'GPS₃, 扩增 3'端。用于 *hs-Sox2* 扩增所用的引物(表 1)。

1.4 荧光定量 PCR 检测池蝶蚌 *Sox* 的时空表达

Trizol 法提取 4 龄性成熟雄性池蝶蚌包括外套

膜、闭壳肌、鳃、肠、肝、肾、精巢和卵巢在内的 8 种组织及 5 个不同月龄的精巢组织的总 RNA, 反转录成 cDNA。根据所得到的 *hs-Sox2* 基因 cDNA 序列, 设计 *hs-Sox2* 的荧光定量 PCR 引物 S-R-1、S-R-2。选择本实验室克隆的池蝶蚌的 β -肌动蛋白基因(*β -actin*)作为内参, 设计的引物为 A-R-1, A-R-2, 序列(表 1)。

表 1 PCR 引物序列
Tab. 1 Sequences of PCR primers

引物名称 Primers	序列 Sequences(5'-3')
SOX Sense	AAGCGACCCATGAAYGCNTTYATNG
SOX Antisense	ACGAGGTCGGTAYTTRTARTYNGG
3'GPS ₁	GGGACAAAGACGCAAAATGGCT
3'GPS ₂	GCAAACGGTTAGGTGCGGAATG
3'GPS ₃	GAAGCCAAAAGACTACGAGCGA
S-R-1	ACAGGGGCAATATGGACAG
S-R-2	TTGTTCACACCTCCGTCTG
A-R-1	TAGGCAACGAGAGATTCAGG
A-R-2	TGCTGGAAGGTGGAGAGAG

2 结果

2.1 池蝶蚌基因组 HMG-box 的克隆及序列分析

以雌雄个体基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 并分别随机筛选 30 个阳性克隆测序。在雌雄基因组 DNA 的 PCR 产物中, 都存在 2 个 *Sox* 序列, 大小均为 220 bp, 编码 73 个氨基酸, 分别命名 DNA-HMG₁ 和 DNA-HMG₂, 且不存在雌雄间的差异。以 cDNA 为模板的 PCR 产物, 得到 1 个 *Sox* 序列, 简称为 cDNA-HMG, 大小 220 bp。CLUSTAL(1.83)分析, DNA-HMG₁ 和 DNA-HMG₂ 核苷酸同源性为 80%, cDNA-HMG 与 DNA-HMG₁ 核苷酸同源性为 97.2%; DNA-HMG₁ 和 DNA-HMG₂ 氨基酸序列同源性为 95.9%, cDNA-HMG 与 DNA-HMG₁ 氨基酸同源性为 100%。

Blastn 搜索其他物种同源核苷酸序列, 池蝶蚌 *Sox* 基因的 HMG(DNA-HMG₁、DNA-HMG₂ 和 cDNA-HMG)与人、小鼠、斑马鱼、红鳍东方鲀等物种的 *SOX1/Sox1*, *Sox1a*, *SOX2/Sox2*, *SOX3/Sox3* 和 *SOX14/Sox14* 有较高的同源性, 同源性达 70%—80%。

2.2 池蝶蚌 *Sox2* cDNA 序列拼接与分析

PCR 扩增获得的池蝶蚌 *Sox2* 部分 cDNA 序列, 该序列 1774 bp, 包含终止密码子 TAA、2 个加尾信

号(AATAAA)以及 15 个 mRNA 不稳定信号(ATTTA 和 ATTTTA), 3'端有 25 bp 的 poly(A)尾巴。7—756 bp 为池蝶蚌 *Sox2* 的部分开放阅读框, 编码 249 个氨基酸残基, 其中 1—67 aa 为保守的 *Sox* 超家族 HMG 结构域。将克隆的池蝶蚌 *Sox2* 暂命名为 *hs-Sox2*, 其序列已投递到 NCBI 网站, 登录号为 HQ840788。

2.3 池蝶蚌 *Sox2* 蛋白结构域及同源性分析

推导的氨基酸序列 BlastP 发现, 具有 HMG-box 和 SOXp 结构域, 长度分别为 67 个氨基酸和 73 个氨基酸。同源氨基酸序列搜索发现, 与欧洲冒贝 *SoxB* 蛋白的相似度最高为 64%, 与人、小鼠及原鸡等 *Sox2* 相似性为 51%—52%, 与斑马鱼的 *Sox2* 同源性为 50%。

HMG-box 的同源性比对发现, *hs-Sox* 的 HMG-box 与人类、小鼠、原鸡和斑马鱼 *Sox2* 的对应区的同源性为 98%, 且存在 “RPMNAFMVW” 的高度保守区域。HMG-box 中有 13 个 DNA 结合位点, 分别位于第 1、2、4、5、8、9、12、16、25、30、33、36、56 位氨基酸。

基于 HMG-box 结构域氨基酸序列, 用 MEGA 4.0 软件, 建立的 NJ 系统树(图 1), 池蝶蚌的 HMG-box 与长吻仙人鱼 *Sox2* 的 HMG-box 形成一簇。

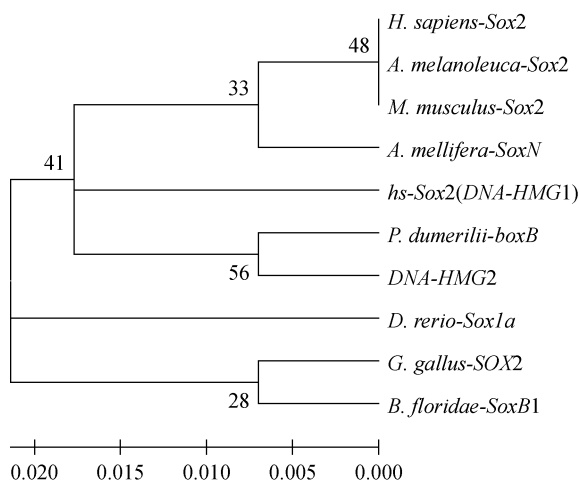


图 1 基于 HMG-box 氨基酸序列所构建的系统树

Fig. 1 Phylogenetic tree generated using the HMG-box
D. rerio: BC155138; *T. rubripes*: AY277952; *G. gallus*: AB092842;
H. sapiens: BC093865; *X. tropicalis*: BC135637; *R. livida*:
 EU927404; *B. maxima*: EU921557; *M. musculus*: BC118032

2.4 池蝶蚌不同组织中 *Sox2* 基因表达

以 8 种不同组织 cDNA 为模板, 荧光定量 PCR 扩增不同组织中的 *hs-Sox2*, 扩增曲线和溶解曲线情

况符合定量要求, 其 *Ct* 值可用来分析基因表达量。结果发现, 在 8 种不同的组织中都有 *hs-Sox2* 基因的表达, 但在肾脏中的表达量是最高的, 其次是肠和闭壳肌, 雄性性腺中的表达量比雌性性腺中的要高, 肝脏中的表达量最低。以肝脏中的表达量为对照, 利用相对定量的方法对不同组织中 *hs-Sox2* 基因的表达情况进行了分析(表 2、图 2)。其中肾的表达量为肝脏中的 32.9 倍, 肠与闭壳肌的表达量为肝脏的 17.3 和 17.5 倍, 雄性性腺中的表达量为肝脏的 7.91 倍, 雌性性腺中的表达量为肝脏的 1.09 倍, 其余组织的表达量为: 鳃为 5.04 倍和肠为 5.85 倍。

表 2 池蝶蚌不同组织中 *hs-Sox2* 基因表达相对定量分析结果
 Tab. 2 Relative quantification analysis of *hs-Sox2* gene expression in different tissues of *H. schlegelii*

样品名称 Samples	Target <i>Ct</i> values	Reference <i>Ct</i> values	Norm
肾 Kidney	28.17	30.81	32.9±3.51
肝 Liver	27.05	24.65	1
鳃 Gill	28.73	28.66	5.04±1.26
肠 Intestines	29.03	30.75	17.3±9.78
雄性腺 Testis	25.02	25.61	7.91±3.75
闭壳肌 Adductor muscle	28.63	30.37	17.5±8.94
外套膜 Mantle	29.69	29.85	5.85±3.53
雌性腺 Ovary	24.51	22.24	1.09±0.98

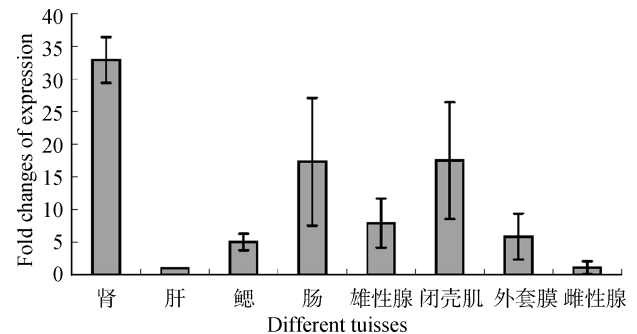


图 2 池蝶蚌不同组织中 *hs-Sox2* 表达的变化

Fig. 2 Varsity of *hs-Sox2* gene expression in different tissues of *H. schlegelii*

2.5 池蝶蚌不同年龄中 *Sox2* 基因的表达检测

以 63 月龄、51 月龄、39 月龄、27 月龄及 16 月龄池蝶蚌精巢 cDNA 为模板, 荧光定量 PCR 扩增 *hs-Sox2*。对不同月龄性腺的研究发现, 在 39 月龄雄性性腺中 *hs-Sox2* 的表达量最高, 其次是 16 月龄雄性性腺中, 63 月龄蚌中最少。以 63 月龄幼蚌中 *Sox2* 基因的表达量为对照。39 月龄是 63 月龄幼蚌的 4.81 倍、51、27 和 156 月龄池蝶蚌雄性分别是 63 月龄幼蚌的 1.03、1.74 和 2.21 倍(表 3、图 3)。

表 3 不同月龄池蝶蚌 *hs-Sox2* 基因表达相对定量分析结果
Tab. 3 Relative quantification analysis of *hs-Sox2* gene expression in different months of *H.schlegelii*

月龄 Months	性别 Sex	Target Ct Values	Reference Ct Values	Norm
63	性成熟雄性 Maturated Male	26.50	14.31	1
51	性成熟雄性 Maturated Male	26.96	14.53	1.03±0.37
39	性成熟雄性 Maturated Male	25.52	15.81	4.81±0.57
27	未成熟雄性 Immature Male	26.03	15.27	1.74±1.09
16	未成熟雄性 Immature Male	24.82	15.81	2.21±1.12

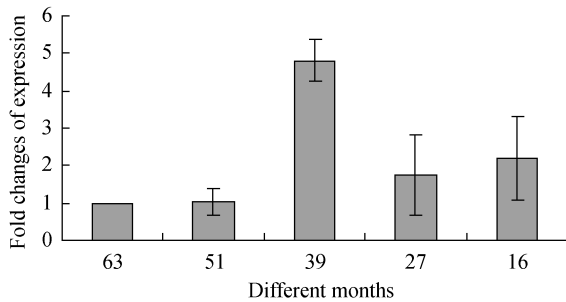


图 3 池蝶蚌不同月龄中 *hs-Sox2* 表达的变化

Fig. 3 Varity of *hs-Sox2* gene expression in different months of *H.schlegelii*

3 讨论

3.1 Sox 基因的进化保守性

利用同源克隆的方法从池蝶蚌的基因组中克隆了两个 HMG 序列, 与人和小鼠等物种 *Sox2* 的相应部分具有很高的同源性, 表明在池蝶蚌中存在着 *Sox* 基因, 与背角无齿蚌^[13]中存在的 *SRY* 基因的结果一致。

从池蝶蚌基因组中获得的 2 大小一致而序列不完全相同的 *Sox* 片段序列, 未发现性别特异性序列, 同样的结果也出现在蛙^[22]、龟^[23]和鱼^[24]等物种中, 这与在哺乳动物雄性基因组存在性别特异的 *SRY* 基因结果不一致。另外, 沈建明等^[25]根据人类 *SRY* 基因设计的简并引物, 对利用三疣梭子蟹雌性基因组 DNA 扩增 *Sox* 基因 HMG 盒时, 发现了两条大小不一的条带, 一条为 216 bp, 另一条为 400 bp, 同时发现三疣梭子蟹的 *Sox* 基因中含有内含子, 而扩增池蝶蚌 HMG 盒片段大小均为 220 bp, Blastn 搜索分析没有内含子的存在。依据 *Sox* 基因中内含子进化理论^[26], 推测池蝶蚌 *Sox* 基因可能与人和小鼠等物种 *Sox* 基因的功能具有很大的相似性。

Sox 基因编码一类含有保守的“5'-(A/T) (A/T) CAA(A/T)G-3'”的 DNA 结合位点的蛋白^[27]。根据 Bowles, *et al.*^[28]提出的定义, 标准 *Sox* 基因的 HMG

结构域中第 5—13 位点的序列为“RPMNAFMVW”, 从池蝶蚌基因组 DNA 和性腺 cDNA 中克隆的 *Sox* 基因推导的氨基酸序列都含有这个位点, 这与人和其他动物 *Sox* 一致。在无脊椎动物中, *SoxB* 基因家族包括: *SoxB*、*Dichaete*、*Sox21*、*SoxB1* 等^[29], *hs-Sox2* 与欧洲冒贝 *SoxB* 氨基酸序列的相似度达 64%, 与人类和小鼠 *Sox2* 的同源性为 50%。

3.2 Sox2 基因的功能及表达特性

SOXP 结构域为一类由 80 个核苷酸组成的 *Sox* 基因调节因子, 它具有与 HMG 结构域结合的能力, 在其氨基酸序列中存在着两段序列为“KKDK”和“LPG”的保守区域^[30]。Tanaka, *et al.*^[30]发现小鼠中 *Sox2* 的 SOXP 结构域介导了神经原基细胞中巢蛋白基因的调节。Zac, *et al.*^[31]研究斑马鱼网膜神经的发生时发现, 在 SOXP 敲除的个体中, 其视网膜节神经细胞层中的小清蛋白阳性细胞明显下降, 进一步影响了无长突神经细胞的分化。池蝶蚌 *Sox2* 推导的氨基酸序列中含有一个 73 个氨基酸序列组成的 SOXP 结构域, 在序列的 76 和 82 位存在两个保守序列, 我们推测池蝶蚌 *Sox2* 也可能具有此功能。

果蝇^[29]、非洲爪蟾^[2]等胚胎发育早期检测到 *Sox2* 表达且参与了中枢神经的形成, 人、小鼠 *Sox2* 还参与了晶状体的形成^[5, 6]。小鼠 *Sox2* 基因在心脏、肝脏、肾脏、胰脏、肺和胃都有表达且参与了各种器官的发育过程^[32]。池蝶蚌不同组织中 *Sox2* 表达检测, 也发现在所有八种组织中均有表达, *hs-Sox2* 在池蝶蚌肾脏中高表达, 暗示其可能对维持池蝶蚌肾脏的功能起着重要的作用; 然而 *hs-Sox2* 在池蝶蚌肝脏中的表达量最低, 这表明其对肝脏功能的维持可能不如肾脏重要。Avilion, *et al.*^[33]研究 *Sox2* 对小鼠早期胚胎发育的影响时发现在 *Sox2* 杂合型的个体虽然可正常发育, 但雄性生殖力下降。Kelberman, *et al.*^[5]研究发现 *Sox2* 基因的缺失会引起促黄体生成素的变化, 进一步影响生殖轴的发育。 *hs-Sox2* 基因

在雌雄性腺中都有表达, 推测 *hs-Sox2* 基因可能作为调控因子参与了性腺功能的维持。在雄性中的表达量明显高于雌性性腺中的量, 可能 *hs-Sox2* 对雄性性腺的作用更明显。

3.3 *Sox2* 基因 3'非编码区分子特征

mRNA 降解是基因表达调控的一个重要机制, 以往的研究表明 3'-UTR 对调节 mRNA 的稳定性起到一个很重要的作用^[34]。Shaw 和 Kamen^[35]将人工合成的 11 拷贝的 ATTTA 序列插入报告基因 3'非编码区转化烟草, 测得报告基因的 mRNA 迅速降解了, 说明 3'-UTR 内 ATTTA 序列的存在促进了该 mRNA 的降解。本研究所获得的序列在 3'-UTR 内含有 10 个 ATTTA 单元, 这表明 *hs-Sox2* 基因非常地不稳定, 并有可能介导 *hs-Sox2* 基因的定位, 参与多种组织的发育和分化。

参考文献:

- [1] Wegner M. From head to toes: The multiple facets of Sox proteins [J]. *Nucleic Acids Research*, 1999, **27**: 1409—1420
- [2] Guth S I E, Wegner M. Having it both ways: Sox protein function between conservation and innovation [J]. *Cell and Molecular Life Science*, 2008, **65**(19): 3000—3018
- [3] Mizuseki K, Kishi M, Matsui M, et al. Xenopus Zic-related-1 and Sox2, two factors induced by chordin, have distinct activities in the initiation of neural induction [J]. *Development*, 1998, **125**: 579—587
- [4] Episkopou V. Sox2 functions in adult neural stem cells [J]. *Trends Neurosci*, 2005, **28**: 219—221
- [5] Kelberman D, Rizzoti K, Avilion A, et al. Mutations within Sox2/SOX2 are associated with abnormalities in the hypothalamo-pituitary-gonadal axis in mice and humans [J]. *Journal Clinical Investigation*, 2006, **116**(9): 2442—2455
- [6] Taranova O V, Magness S T, Fagan B M, et al. Sox₂ is a dose-dependent regulator of retinal neural progenitor competence [J]. *Genes Development*, 2006, **20**: 1187—1202
- [7] Zappone M V, Galli R, Catena R, et al. Sox2 regulatory sequences direct expression of a β -geo transgene to telencephalic neural stem cells and precursors of the mouse embryo, revealing regionalization of gene expression in CNS stem cells [J]. *Development*, 2000, **127**: 2367—2382
- [8] Kuroda T, Tada M, Kubota H, et al. Octamer and Sox elements are required for transcriptional cis regulation of *Nanog* gene expression [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2005, **25**(6): 2475—2485
- [9] Nishimoto M, Fukushima A, Okuda A, et al. The gene for the embryonic stem cell coactivator UTF1 carries a regulatory element which selectively interacts with a complex composed of Oct-3/4 and Sox-2 [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1999, **19**(8), 5453—5465
- [10] Nakatake Y, Fukui N, Iwamatsu Y, et al. Klf4 cooperates with Oct3/4 and Sox2 to activate the Lefty1 core promoter in embryonic stem cells [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2006, **26**(20): 7772—7782
- [11] Miyagi M, Saito T, Mizutani K I, et al. The Sox-2 regulatory regions display their activities in two distinct types of multipotent stem cells [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2004, **24**(10): 4207—4220
- [12] Chew J L, Loh Y H, Zhang W, et al. Reciprocal transcriptional regulation of *Pou5f1* and *Sox2* via the Oct4/Sox2 complex in embryonic stem cells [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2005, **25**(14): 6031—6046
- [13] He Y P, Guo Y P, Ma E B. Studies on the phylogenetic conservation of *SRY* gene in some animals [J]. *Journal of Shanxi University (Natural Science Edition)*, 2002, **25**(3): 241—243 [贺艳萍, 郭亚平, 马恩波. *SRY* 基因在部分动物类群系统进化中保守性研究. 山西大学学报, 2002, **25**(3): 241—243]
- [14] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors [J]. *Cell*, 2006, **126**(4): 663—676
- [15] Basu-Roy U, Ambrosetti D, Favaro R, et al. The transcription factor Sox2 is required for osteoblast self-renewal [J]. *Cell Death and Differentiation*, 2010, **17**(8): 1345—1353
- [16] Xu M X, Hong Y J, Dai Y G, et al. Preliminary study on disease resistance of pearl bivalves (*Hyriopsis schlegelii*) to disease-causing sources of the *Hyriopsis cumingii* [J]. *Journal of Nanchang University (Natural Science)*, 2004, **28**(3): 262—265 [徐毛喜, 洪一江, 戴银根, 等. 池蝶蚌 (*Hyriopsis schlegelii*) 对三角帆蚌病源的抗病性. 南昌大学学报(理科版), 2004, **28**(3): 262—265]
- [17] Zhou C H, Xu M X, Ouyang S, et al. On the studies of some biological characteristics between *Hyriopsis schlegelii* and *H. cumingii* [J]. *Jiangxi Science*, 2003, **21**(2): 122—124 [周春花, 徐毛喜, 欧阳珊, 等. 池蝶蚌 (*Hyriopsis schlegelii*) 与三角帆蚌 (*H. cumingii*) 若干生物学性状比较研究. 江西科学, 2003, **21**(2): 122—124]
- [18] Luo J, Sheng J Q, Hong Y J, et al. Analysis of EST and MDH Enzymes for the Selected Breeding of *Hyriopsis schlegelii* [J]. *Journal of Hydroecology*, 2008, **1**(2): 48—52 [罗洁, 盛军庆, 洪一江, 等. 人工选育池蝶蚌的 EST 和 MDH 同工酶分析. 水生态学杂志, 2008, **1**(2): 48—52]
- [19] Guo H J, Luo J, Hong Y J, et al. Growth and genetic analysis on the selected breeding *Hyriopsis schlegelii* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2008, **32**(2): 220—224 [郭红军, 罗洁, 洪一江, 等. 人工选育池蝶蚌的生长及不同世代遗传分析. 水生生物学报, 2008, **32**(2): 220—224]
- [20] Hong Y J, Yu Y, Guo H J, et al. The activities of the antibacterial, bacteriolysis and phenolox- idase in the haemolymph of *Hyriopsis schlegelii* [J]. *Journal of Nanchang University*

- (Natural Science), 2008, **32**(1): 66—69 [洪一江, 余颖, 郭红军, 等. 池蝶蚌 (*Hyriopsis schlegeli*) 血淋巴的抗菌力、溶菌酶和酚氧化酶活力. 南昌大学学报(理科版), 2008, **32**(1): 66—69]
- [21] Yu Y, Hong Y J, Qiu Q J, *et al.* Embryonic development and breeding season gonad in *Hyriopsis schlegeli* [J]. *Chinese Journal of Zoology*, 2008, **43**(3): 102—107 [余颖, 洪一江, 邱齐骏, 等. 池蝶蚌胚胎发育与繁殖季节性腺的观察. 动物学杂志, 2008, **43**(3): 102—107]
- [22] Chen Q L, Ma W L, Zheng W L, *et al.* Sequences analysis of *Sox* gene and *Dmrt* gene of *Rana livida* [J]. *Acta Laser Biology Sinica*, 2007, **16**(3): 310—314 [陈启龙, 马文丽, 郑文岭, 等. 大绿蛙 *Sox* 基因和 *Dmrt* 基因的序列分析. 激光生物学报, 2007, **16**(3): 310—314]
- [23] Nie L W, Shan X N, Guo C W, *et al.* The clone and sequence analysis of *Sox* gene in the *P. megacephalum* [J]. *Acta Laser Biology Sinica*, 2000, (2): 106—109 [聂刘旺, 单祥年, 郭超文, 等. 平胸龟 *Sox* 基因的克隆和序列分析. 激光生物学报, 2000, (2): 106—109]
- [24] Guo B C, Li J B, Tong C B, *et al.* Cloning and sequence analysis of *Sox* genes in a tetraploid cyprinid fish, *Tor douronensis* [J]. *Chinese Science Bulletin*, 2008, **53**(13): 1988—1995
- [25] Shen J M, Zhu D F, Wu Q. Cloning and sequencing of *Sox* gene HMG-box in crab *Portunus trituberculatus* [J]. *Fisheries Science*, 2008, **27**(2): 59—63 [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): 59—63]
- [26] Su H, Lau Y F. Identification of the transcriptional unit, structural organization, and promoter sequence of the human sex determining region Y (*SRY*) gene, using a reverse genetic approach [J]. *American Journal of Human Genetics*, 1993, **52**(1): 24—244
- [27] 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
- [28] Bowles J, Schepers G, Koopman P. Phylogeny of the Sox family of developmental transcription factors based on sequence and structural indicators [J]. *Developmental Biology*, 2000, **227**: 239—255
- [29] Nichanun P, Steven R. No backbone but lots of sox: invertebrate *Sox* genes [J]. *International Journal Biochemistry & Cell Biology*, 2010, **42**(3): 453—564
- [30] Shinya T, Yusuke K, Aki T. *et al.* Interplay of SOX and POU factors in regulation of the nestin gene in neural primordial cells [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2004, **24**(20): 8834—8846
- [31] Zac P, Yoshihiro O, Motokazu T, *et al.* Reverse genetic analysis of neurogenesis in the zebrafish retina [J]. *Developmental Biology*, 2006, **293**(2): 330—347
- [32] Bass A J, Watanabe H, Mermel C H, *et al.* *Sox2* is an amplified lineage-survival oncogene in lung and esophageal squamous cell carcinomas [J]. *Nature Genetics*, 2009, **41**: 1238—1242
- [33] Avilion A A, Nicolis S K, Pevny L H, *et al.* Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX₂ function [J]. *Genes & Development*, 2003, **17**: 126—140
- [34] Ma L, Kong Q H, Zhao S H, *et al.* Potential regulatory role of the conserved elements in *Sox2* 3'untranslated region [J]. *Zoological Research*, 2009, **30**(6): 633—638 [马莉, 孔清华, 赵树华, 等. *Sox2* 基因 3'非翻译区保守元件对基因表达的调控作用. 动物学研究, 2009, **30**(6): 633—638]
- [35] Shaw G, Kamen R. A conserved AU sequence from the 3'untranslated region of G M-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation [J]. *Cell*, 1986, **46**: 65—66

EXPRESSION OF THE *SOX2* GENE IN DIFFERENT TISSUES AND DIFFERENT MONTHS ON TESTIS OF *HYRIOPSIS SCHLEGELII*

ZENG Liu-Gen, XU Ling, WANG Jun-Hua, SHENG Jun-Qing, GU Qing, PENG Kou and HONG Yi-Jiang

(College Life Science and Food Engineering, Nanchang University, Nanchang 330031, China)

Abstract: The *Sox* genes family comprises several transcription factors that share a highly conserved HMG (High-Mobility-Group) box and has been studied in many species, including a variety of vertebrates and several of invertebrates such as fruit fly, nematode and *Portunustrituberculatus*. But there are only few reports on *Sox* gene family of freshwater bivalve so far, which have important value in evolution and production. *H. schlegelii*, which originated from Lake Biwa in Japan and was introduced into China in 1998, is one of the representative freshwater pearl mussels. It has been widely applied in the Chinese freshwater pearl industry for its high quality pearl bearing ability. In order to know the function of *Sox* genes in this mussel, a degenerate PCR, referred to the HMG box of human *SRY* gene, was used to amplify the conserved sequence of HMG domains of *Sox* genes. Two different HMG sequences were got from DNA and the testis cDNA, named DNA-HMG₁, DNA-HMG₂ and cDNA-HMG. Amino acids sequences analysis showed that those HMG sequences had high homology with the *Sox1*, *Sox2*, *Sox3* and *Sox14* genes from other animals including human being. But there showed no difference between the male and female. A partial cDNA sequence of *Sox2* gene (referred as *hs-Sox2*) with 1774 bp including partial ORF and complete 3' untranslated region (UTR) was cloned from the testis cDNA by RACE-PCR methods. DNA sequences analysis showed that it had high homology with the *SoxB* gene in *Patella vulgata* and the *Sox2* gene in human being. The putative 249 amino acid sequence contained one conserved HMG box like the human *SYR* gene, and exhibited 98% homology with human, mouse, chicken and zebrafish. For further know the expression level of *Sox2* gene, real-time PCR method was used to examine its mRNA level in different tissues and different months on testis of *H. schlegelii*. Results showed that the *hs-Sox2* mRNA was ubiquitously expressed in all the tissues, with the highest in kidney, followed by intestine, adductor muscle, and the expression level in the testis was higher than that in the ovary. The result from the different months on testis revealed that *hs-Sox2* was transcribed mainly in the 39 months, followed by 16 months and lowly in the 63 months. These results suggested that *hs-Sox2* may be involved in the development of on testis in the *H. schlegelii* and may constitute clues for future work in order to better understand *Sox* protein.

Key words: *Hyriopsis schlegelii*; *Sox2* gene; Gonad; Real time PCR; Expression analysis