

动物学报 54(3):482-488, 2008

Acta Zoologica Sinica

文昌鱼性腺差减 cDNA 文库的构建*

刘晓慧 王 秀 王义权**

厦门大学生命科学学院, 福建 厦门 361005

摘 要 本研究以日本文昌鱼 (*Branchiostoma japonicum*) 性腺 cDNA 为材料, 应用抑制性差减杂交技术构建文昌鱼雌雄性腺的差减 cDNA 文库。正向差减杂交以卵巢为试验方、精巢为驱动方, 反向差减杂交以精巢为试验方、卵巢为驱动方, 将所获差减 cDNA 片段克隆插入质粒表达载体, 转化大肠杆菌 DH5, 最后获得的正、反向差减文库分别含 459、243 个重组子。PCR 扩增鉴定正、反向差减 cDNA 文库的插入片段, 其中 90% 左右的克隆皆能扩增出有效产物, 插入片段范围为 200 - 600 bp, 符合差减文库 PCR 产物片段的大小。随机选取 30 个阳性克隆测序分析, 得到 26 有效基因片段, 进一步从中选取 16 个序列, 用实时定量 PCR 对文库质量进行验证, 结果表明所建文库能够达到富集雌雄性腺差异表达基因的目的。文昌鱼性腺差减文库的构建, 为进一步分离、鉴定性腺分化和发育相关基因奠定了基础 [动物学报 54 (3): 482 - 488, 2008]。

关键词 文昌鱼 性腺 差减 cDNA 文库 抑制性差减杂交

Construction of subtractive cDNA library of the gonad of amphioxus *Branchiostoma japonicum**

LIU Xiao-Hui, WANG Xiu, WANG Yi-Quan**

School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, Fujian, China

Abstract In the present study, two subtracted cDNA libraries for gonads of amphioxus were constructed using the suppression subtractive hybridization (SSH) technique. cDNA from ovary was adopted as tester for the construction of a forward library, and then as a driver for the reverse library construction. Two-directional subtracted cDNA fragments were inserted into plasmid vectors, and subsequently the vectors were transferred into *E. coli* DH5. As a result, forward and backward subtracted cDNA libraries containing 459 and 243 clones respectively, were obtained and subjected to PCR analysis. Results confirmed that about 90% of the clones contained inserts of 200 - 600 bp in the two libraries, in accord with our prediction. Thirty of the positive clones were selected and sequenced randomly, and, of those sequenced clones, twenty-six gene fragments were obtained. Then, sixteen sequenced genes were further analyzed via Real-time PCR method. The results indicated that these genes were expressed differently between male and female gonads. The subtractive cDNA libraries of amphioxus gonads provide a foundation for further studies of the genes related to sexual differentiation and gonadal development [Acta Zoologica Sinica 54 (3): 482 - 488, 2008].

Key words Amphioxus, *Branchiostoma japonicum*, Gonad, Subtractive cDNA library, Suppression subtractive hybridization

文昌鱼在进化上占有极其重要的地位, 是介于低等无脊椎动物和脊椎动物之间的过渡类型 (Holland et al., 2004)。它身体构造简单, 但基本躯体构成与脊椎动物相同, 因而与脊椎动物有很强的可比性; 此外, 体型小, 皮肤透明, 肉眼即可观察到性腺等内部器官的发育情况; 同时文昌鱼性腺中的精、卵细胞发育比较同步 (张秋金, 2007)。

因此, 文昌鱼不仅是研究脊椎动物起源进化和发育生物学的理想模型, 同时也是研究性腺发育、性别分化和减数分裂发生机制的理想模型之一。

性别分化和性腺发育是一个复杂的多基因参与调控的过程, 是涉及到发育、遗传与进化等学科的交叉研究领域。该领域的研究不仅有助于我们认识从低等动物到人类性别分化和发育机制的进化规

2007-11-05 收稿, 2008-02-21 接受

* 国家自然科学基金资助项目 (No. 30470938, No. 30570208) [This research was funded by the grant from the National Natural Science Foundation of China (No. 30470938, No. 30570208)]

** 通讯作者 (Corresponding author). E-mail: wangyq@xmu.edu.cn

© 2008 动物学报 Acta Zoologica Sinica

律,也为人类性腺发育异常相关疾病的预防和治疗、为经济动物繁育实践中有目的的控制动物性腺发育等提供理论基础 (Ottolenghi et al., 2007; Matsuda et al., 2007)。迄今,性别分化和发育方面的研究在线虫、果蝇以及高等脊椎动物的研究中都取得了一定的进展,已确定哺乳动物性别决定的开关基因为 *Sry* 基因 (Koopman et al., 1991), 以及其它一些性别分化相关基因,如 *Sox9*、*Dax1*、*Dmrt1* 和 *Wnt4* 等 (Wright et al., 1995; Swain et al., 1998; Jordan et al., 2001), 这些基因中有一些只在脊椎动物性腺发育过程中有着保守的功能,只有 *Dmrt1* 基因从线虫等低等动物到高等动物中都是保守的 (Raymond et al., 1998)。尽管人们对果蝇、小鼠等模式动物的性别分化基因有较深入的了解,但是由于性别分化的调控涉及基因较多,加上物种之间性染色体组成上的差异,导致不同的物种在性别分化机制上存在不同 (Ignacio and Bruce, 1998), 果蝇与小鼠间更是由于亲缘关系较远而加大了这种差异,给比较高等与低等生物间性别分化增加了难度。而文昌鱼作为一个过渡类群,在研究性别分化相关基因以及性别分化和发育的分子机制方面有其独特的优势。为此,我们构建了文昌鱼雌雄性腺的差减 cDNA 文库,为进一步筛选和鉴定文昌鱼性别决定和性腺分化相关基因,研究文昌鱼的性别分化和性腺发育的分子机制做准备,也为深入了解从低等到高等动物性别分化和发育相关基因的进化以及功能演变奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

文昌鱼样品按本实验室此前的分类学鉴定标准对种名进行准确鉴定 (王义权等, 2004; Xu et al., 2005; Zhang et al., 2006), 为本实验室养殖的日本文昌鱼 (*Branchiostoma japonicum*), 取性腺发育成熟的个体雌、雄各 1 尾, 单独于清洁海水中暂养约 2 日, 其间不投喂饵料, 待肠道内食物残渣排净后, 取性腺组织用于总 RNA 的提取。

1.2 总 RNA 的提取和双链 cDNA 的合成

用 Trizol 试剂 (Takara 公司) 分别提取文昌鱼雌雄性腺组织的总 RNA, cDNA 合成用 Clontech 公司的 SMARTTM PCR cDNA Synthesis Kit。首先取约 500 ng 总 RNA 在 CDS 引物 (5'-AAGCAGTGGTATCAACCGCAGAGTACT₍₃₀₎VN-3') 和 SMART 寡聚核苷酸引物 (5'-AAGCAGTGGTATCAACCGCAGAGTACGC-

GGG3') 存在下, 72 °C 温育 2 min, 室温加入逆转录酶、dNTP, 42 °C 反转录 30 min, 得到第一链 cDNA。取稀释 5 倍后的第一链 cDNA 合成产物 10 μl, 加入 10 × Advantage^R 2 PCR 缓冲液 10 μl、dNTP 2 μl、引物 5' PCR Primer A (12 μmol/L) 2 μl、50 × Advantage^R 2 聚合酶混合物 2 μl, 在 100 μl 体系中进行 PCR 反应: 95 °C 1 min 预变性; 再按 95 °C 15 s、65 °C 30 s、68 °C 6 min 的参数进行 18 个循环。

1.3 抑制性差减杂交和差减效率检测

用 PCR-SelectTM cDNA Subtraction Kit (Clontech) 进行差减杂交。以雌鱼性腺 cDNA 为实验方 (Tester), 以雄鱼性腺 cDNA 为驱动方 (Driver), 所构建的文库为正向文库; 反之则为反向文库。

合成的双链 cDNA 分别用 *Rsa* 酶切, 酶切产物分别作为 Tester cDNA 和 Driver cDNA。将 Tester cDNA 分成两份, 分别与 adaptor 1 和 adaptor 2R (试剂盒提供) 连接, Driver cDNA 不与 adaptor 连接, 之后进行两轮杂交。首先将过量的 Driver cDNA 加到每份 Tester cDNA 中, 98 °C 变性后, 68 °C 杂交 8 h。第 2 次杂交是将第 1 次杂交的两份样品混合, 并再次加入变性的 Driver cDNA, 继续杂交 10 h。杂交产物随后以引物 primer 1 (试剂盒提供) 进行第 1 次 PCR 扩增, 第 1 次 PCR 产物再用引物 Nested primer 1 和 2R (试剂盒提供) 进行第 2 次 PCR 扩增, 特异地富集差异表达的 cDNA 片段。

用 *-actin* 基因特异引物 F: 5'-CTCCGGTATGTGCAAGGC-3', R: 5'-GCTGGCTGTTGAAGGTC-3', 对差减 cDNA 文库进行差减效率检测。PCR 反应条件: 94 °C 预变性 5 min, 再按 94 °C 30 s、60 °C 30 s、72 °C 1 min 的参数扩增 33 个循环。分别在第 18、23、28、33 循环处取 5 μl 电泳, 比较该基因在差减杂交前后的 cDNA 中丰度, 检测差减杂交的效率。

1.4 差减文库的构建和分析

将差减杂交的第 2 轮 PCR 产物纯化后连接到载体 pMD18-T vector (Takara), 转化 *E. coli* DH5⁺, 将菌液均匀地涂布在 LB/Amp⁺ 琼脂平板上, 在生化培养箱中于 37 °C 培养 16 h, 这样就构建了文昌鱼雌性性腺差异表达基因的差减文库 (正向差减文库) 和雄性性腺差异表达基因的差减文库 (反向差减文库)。挑取菌落, 用抑制差减杂交中的巢式引物进行 PCR 扩增, 观察是否有插入片段以及插入片段的大小和分布范围。

从差减文库中随机挑选 30 个阳性克隆进行测

序(正、反向各 15 个), 所得序列通过 NCBI 网站进行在线 Blast 分析。

1.5 Real-time PCR 定量基因在雌、雄性腺中的表达

取性腺成熟的雌、雄文昌鱼各 3 尾, 用 Trizol 试剂 (Takara 公司) 提取雌雄性腺的总 RNA, DNA 酶 (Rnase free, Takara) 消化去除 DNA, 用 SYBR

PrimeScript™ RT-PCR Kit (Takara) 进行反转录和 Real-time PCR 反应。从测序结果中随机挑选 16 条序列设计引物(正、反向差减库各 8 条), 引物序列及片段大小见表 1。PCR 反应条件: 94 °C 预变性 1 min, 再按 94 °C 15 s、58 °C 15 s、72 °C 25 s 的参数扩增 40 个循环。以 *-actin* 基因作参照对模板的初始量进行调整。

表 1 Real-time PCR 使用的引物序列

Table 1 Primer sequences used for Real-time PCR

克隆号 No.	上游引物 Upper primer	下游引物 Lower primer	产物大小 Fragment size (bp)
- <i>actin</i>	5'-TCTGGCATCATACCTTCTACAA-3'	5'-TCTGTGTCATCTTTTCCTGT-3'	232
O7	5'-TTTCCTTCAATTTCAGTCGICC-3'	5'-CGTCCAACAAAATGTCGAGGCT-3'	150
O86	5'-CGTCCAACAAAATGTCGAGGCT-3'	5'-TTTCCTTCAATTTCAGTCGICC-3'	149
O87	5'-ACTTCTGACTATTCGGGTG-3'	5'-CGTTTTGACGCATGTCCT-3'	136
O21	5'-CGAACACTGAACGCACTATACG-3'	5'-CACATATTTAGTAAAAATTGCC-3'	150
O74	5'-CCAGCATGACCAAGTAGAAC-3'	5'-GCCGAGGTACGACTGAAG-3'	139
O39	5'-AGCCTCTAACCAATCGG-3'	5'-TAAATCCAAGCAGCGT-3'	121
O73	5'-TCACGCACATCAACTACAATC-3'	5'-CCAATGACTCAAGAGTAGG-3'	140
O2	5'-TTCCCGGTGATTTACTGAC-3'	5'-ATTGGTGGCACTTGAACCC-3'	105
T4	5'-CTACAGGCACAGGTAACATCAC-3'	5'-AGCAATGGCAACGACAAC-3'	100
T2	5'-CACAAACAAAAGGCATTACTTC-3'	5'-ACTTAGTACAGCCTCCGATG-3'	100
T23	5'-GTGTAGGAGACGCTGTGTATGC-3'	5'-CTAGCCGATCCGATTGTC-3'	158
T31	5'-TCCGAGCCCAAGATGATG-3'	5'-GCAACAACACTATCTACAGG-3'	109
T1	F: 5'-CCTCTCCAATAGCAGAG-3'	5'-CGTTCCTTCAAGCATCCAT-3'	104
T72	5'-ATCTCCACAGCGGGTCTATC-3'	5'-GTCCGGAGTAAAGAAAGACG-3'	138
T5	5'-GTTTCTCCGTGACGATGTC-3'	5'-CCCCTGCCAATATCTAC-3'	110
T3	5'-TGAGTGATGACGGAAACC-3'	5'-GACAGTTCACCAATCAG-3'	127

克隆号中的“O”表示该克隆为卵巢差减库中的阳性克隆;“T”表示该克隆为精巢差减库中的阳性克隆。

“O” before the clone number indicates that the clone is selected from ovary subtracted cDNA library; “T” indicates the clone is selected from testis subtracted cDNA library.

2 结果

2.1 总 RNA 的提取和双链 cDNA 的合成

提取文昌鱼雌雄性腺的总 RNA, 经分光光度计检测 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值分别为 2.11 和 1.87, 电泳后总 RNA 的 18S rRNA 和 28S rRNA 条带清楚, 质量较好(图 1A)。用 Clontech 公司的 SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit, 直接从总 RNA 合成双链 cDNA, 电泳结果见图 1B。

2.2 差减效率检测

为了检测抑制差减文库中 Tester 和 Driver 共有的 cDNA 片段是否已被有效消除, 选择看家基因 *-actin* 作为标志, 以该基因在差减杂交后的 cDNA 与未经差减杂交 cDNA 的第 2 次 PCR 产物中量的差异为指标。结果 *-actin* 基因在未差减样品中经 18 次循环即可见到较微弱的特异性扩增条带, 且随扩增循环数的增加, 产物量也逐渐提高; 而在差减后的样品中经 28 次循环才能见到条带(图 2), 说明两

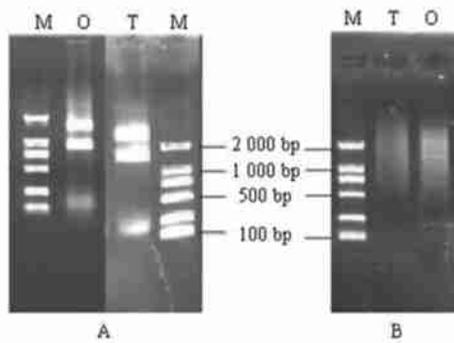


图 1 雌雄性腺总 RNA (A) 和双链 cDNA (B) 电泳图
M: DL-2000 分子量标记。O: 卵巢样品。T: 精巢样品。

Fig. 1 Electrophoresis of total RNA (A) and ds-cDNA (B) of ovary and testis

M: Molecular marker DL-2000. O: ovary. T: testis.

种组织中都存在而且丰度相同的基因已得到大幅度差减, 抑制差减杂交的效率较高。

2.3 抑制差减文库的建立及分析

差减后的第 2 次 PCR 扩增产物进行纯化和 T/A 克隆后, 正、反向差减 cDNA 文库分别获得 459 和 243 个重组子。应用 PCR 扩增进行鉴定, 结果 90% 左右的克隆皆能扩增出有效产物, 插入片段大小在 200 - 600 bp 之间, 与预期差减文库 PCR 产物片段的大小一致, 所建文库质量良好 (图 3)。

从差减库中随机挑选 30 个阳性克隆进行测序 (正、反向差减库各 15 个), 分析测序结果发现, 除 3 个克隆测序失败, 2 个克隆为重复外, 获得 26 个有效基因序列 (正向 14 个, 反向 12 个), 经与公共数据中已知基因比对, 其中正向库的 14 条序列中 2 个为已知基因, 分别为细胞周期相关因子和组蛋白, 反向的 12 条序列中有 6 条为已知基因, 分别为转运蛋白、淀粉样前体蛋白和一些酶类, 其

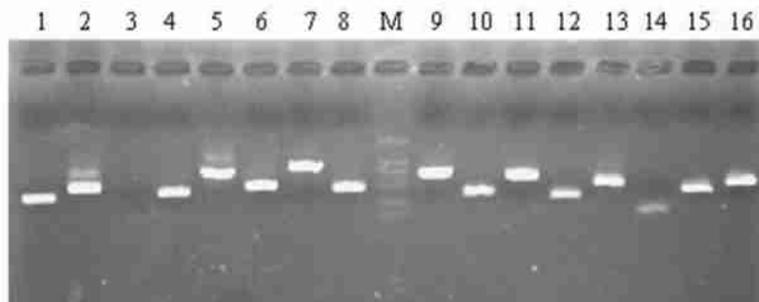


图 3 PCR 检测差减 cDNA 文库克隆的插入片段

M: DL-2000 分子量标记。1 - 16: 从正向差减文库中随机挑选的 16 个克隆。

Fig. 3 Identification of the inserted cDNA fragments in subtractive cDNA libraries by PCR

M: Molecular marker DL-2000. Lanes 1 - 16: Sixteen randomly picked clones from the subtractive cDNA libraries.

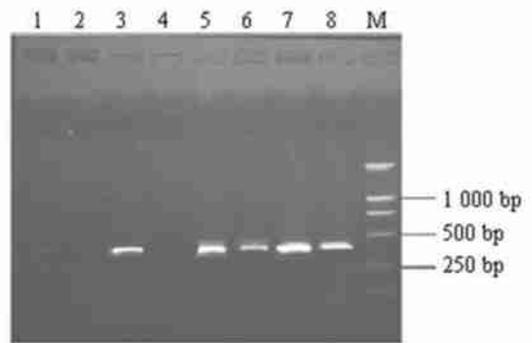


图 2 PCR 检测 β -actin cDNA 的差减效率

M: DL-2000 分子量标记。1、3、5、7: 未差减对照样品。2、4、6、8: 差减后样品。1、2: 18 个循环。3、4: 23 个循环。5、6: 28 个循环。7、8: 33 个循环。

Fig. 2 Subtraction efficiency of β -actin cDNA between subtracted and unsubtracted cDNAs detected by PCR

M: Molecular marker DL-2000. 1, 3, 5, 7: Products of unsubtracted cDNAs. 2, 4, 6, 8: Products of subtracted cDNAs. 1, 2: 18 cycles.

3, 4: 23 cycles. 5, 6: 28 cycles. 7, 8: 33 cycles.

余均属功能未知基因 (表 2)。

2.4 Real-time PCR 分析基因在雌雄性腺中的表达

为了进一步鉴定差减文库中得到的差异表达基因的可靠性, 从差减库的测序结果中选取 16 条序列 (正、反向差减库各 8 条) 设计特异引物 (表 1), 以 β -actin 为对照, 文昌鱼雌雄性腺的 cDNA 为模板, 进行 Real-time PCR 定量分析。结果表明, 16 个克隆的 cDNA 片段在雌雄性腺中均呈现差异表达 (图 4)。它们存在两种表达情况: 一类是在卵巢或精巢内特异表达, 如 O21 (组蛋白) 和 T5 (碳酸酐酶); 第二类是在卵巢和精巢内的表达量上存在差异, 如 O73 (细胞周期相关因子) 和 T23 (过氧化物酶)。

表 2 阳性克隆测序 cDNA 片段的同源性查询

Table 2 Homologue searching of the sequenced cDNA fragments from the positive clones

克隆号 No.	同源基因 Homologue	cDNA 大小 cDNA size (bp)	克隆号 No.	同源基因 Homologue	cDNA 大小 cDNA size (bp)
O7	未有显著相似序列 No significant similarity	412	T4	线粒体外膜转运酶 Translocase of outer mitochondrial membrane	325
O86	未有显著相似序列 No significant similarity	312	T2	主要易化超家族蛋白 Major facilitator superfamily protein	410
O87	假定蛋白 Hypothetical protein	338	T23	植烷酰辅酶 A 羟化酶 Phytanoyl-CoA hydroxylase	742
O21	组蛋白 H3 Histone H3	430	T31	淀粉样前体蛋白 Beta-amyloid precursor protein A	486
O74	未有显著相似序列 No significant similarity	193	T1	未有显著相似序列 No significant similarity	478
O39	未有显著相似序列 No significant similarity	565	T72	甲硫基腺苷激酶 Methylthioribose kinase	372
O73	细胞周期相关因子 Geminin	599	T5	碳酸酐酶 Carbonic anhydrase	597
O2	未有显著相似序列 No significant similarity	566	T3	假定蛋白 Hypothetical protein	716
O26	未有显著相似序列 No significant similarity	479	T11	未有显著相似序列 No significant similarity	319
O69	未有显著相似序列 No significant similarity	382	T15	未有显著相似序列 No significant similarity	314
O29	未有显著相似序列 No significant similarity	462	T36	未有显著相似序列 No significant similarity	322
O66	未有显著相似序列 No significant similarity	382	T7	未有显著相似序列 No significant similarity	302
O31	未有显著相似序列 No significant similarity	692			
O81	未有显著相似序列 No significant similarity	557			

克隆号中的“O”表示该克隆为卵巢差减库中的阳性克隆；“T”表示该克隆为精巢差减库中的阳性克隆。

“O” before the clone number indicates that the clone is selected from ovary subtracted cDNA library; “T” indicates the clone is selected from testis subtracted cDNA library.

3 讨 论

抑制性差减杂交是一种克隆差异表达基因的方法，其主要的优点在于，差减杂交消除了 cDNA 群体内各分子之间丰度的差异，通过均衡化作用使分离与低丰度 mRNA 对应的 cDNA 克隆成为可能；抑制性 PCR 的引入，能够选择性地扩增目的 cDNA 片段，使目的分子得到有效富集 (Diatchenko et al.,

1996)。在差减文库构建的过程中，得到大量完整的总 RNA 是实验的先决条件，而文库的差减效率则是衡量实验成功与否的最重要的指标。近几年 Clontech 公司推出的 SMARTTM PCR cDNA Synthesis Kit，大大减少了差减文库起始所需的 RNA 量，也使差减杂交技术的应用变得越来越广范。本研究在构建差减文库时，未进行 mRNA 纯化，应用 SMARTTM PCR cDNA Synthesis Kit 直接从总 RNA 合成

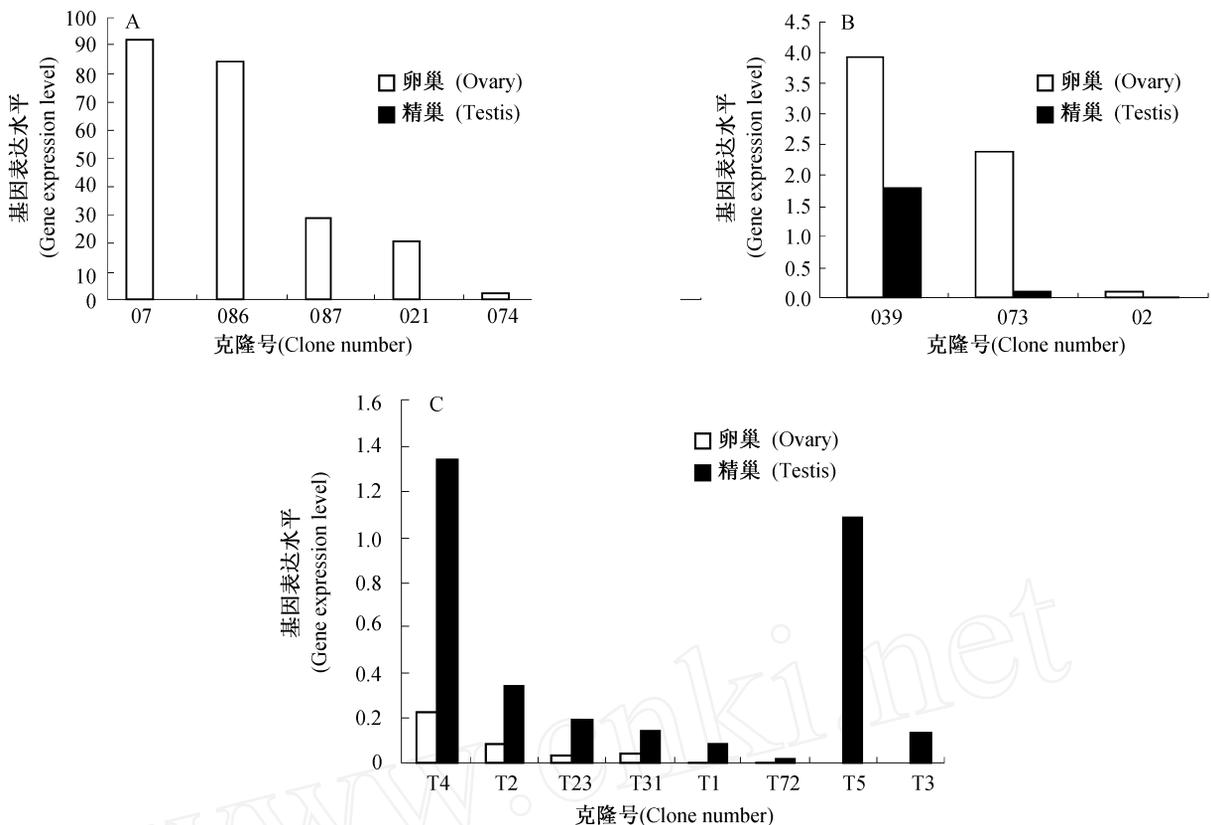


图 4 Real-time PCR 分析基因在雌雄性腺中的表达情况

A. 正向差减库中挑选的 5 个阳性克隆, 只在卵巢中特异表达, 精巢中未检测到。B. 正向差减库中挑选的 3 个阳性克隆的差异表达情况。C. 反向差减库中挑选的 8 个阳性克隆的差异表达情况。

Fig. 4 Analysis of gene expression pattern by Real-time PCR analysis

A. 5 positive clones from the forward subtracted library, only expressed in ovary, but no signal detected in testis. B. gene expression pattern of 3 positive clones from the forward subtracted library. C. gene expression pattern of 8 positive clones from the backward subtracted library.

了双链 cDNA, 在操作的过程中对每一阶段进行检测, 以 *-actin* 为标志检测差减实验的效率, RT-PCR 鉴定文库质量, 结果均符合实验要求, 表明文库构建成功。直接应用总 RNA 进行差减文库构建, 不但降低了对初始实验材料量的要求, 也在一定程度上简化了实验步骤, 但是否影响差减文库的阳性率, 还有待进一步大量测序来验证。

本研究获得的 26 个有效基因序列 (正向 14 个, 反向 12 个), 经与公共数据中已知基因比对, 正向的 14 条序列中 2 条为已知基因, 分别为细胞周期相关因子和组蛋白 H3, 组蛋白在卵巢中大量表达, 这与其在小鼠、鲑鱼等脊椎动物的卵巢中大量表达结果相一致, 说明组蛋白在卵子形成和发育中起到很重要的作用 (Lopez et al., 1997; 陈金平等, 2006); 反向的 12 条序列中有 6 条为已知基因, 分别为相关调节因子、结构蛋白和一些维持基本代谢的酶类, 其余均属功能未知基因。得到此结果的原因有几方面, 目前我们只是随机分析了有限的克

隆数目, 其它一些已知与性别分化相关的基因可能存在于其它未测序的克隆中, 在建库的差减过程中也可能造成某些基因的丢失。性别分化和性腺发育比较复杂, 涉及到一些我们目前还尚未认知的过程, 从线虫、果蝇和小鼠等一些模式动物的研究结果来看, 动物性别决定和性腺分化需大量基因参与, 涉及不同水平的基因表达调控, 这些相关基因包括 RNA 水平或 DNA 水平上的相关调节因子、结构蛋白以及酶类等 (Abbie and Mark, 2006; Boyer et al., 2004; Clement et al., 2007)。此外, 人们对文昌鱼的基因和基因组的研究刚开始不久, 有关基因的基础数据积累少, 这也使测得的序列暂时无法鉴定其所属的基因种类, 随着研究的深入, 有可能从这些目前未知基因中发现一些新基因。

文昌鱼进行性腺差减 cDNA 文库的构建, 有利于分离、鉴定性别分化和性腺发育相关基因, 从中找到启动性腺分化和发育的关键基因, 并以文昌鱼为模式系统研究这些基因的进化和功能, 从而为进

一步研究脊椎动物性别分化和性细胞发育调控的分子机制奠定基础。原始生殖细胞分化成精子和卵子的减数分裂是真核生物最根本的生命现象之一，虽然生物体中所有的细胞都拥有减数分裂必需的基因，却只有原始生殖细胞才发生减数分裂，因此原始生殖细胞内启动减数分裂和控制分裂进程的原因一直以来都是科学界最为关注的问题之一。文昌鱼的性腺是开展减数分裂控制机制研究的理想对象，构建性腺差减文库，并从中鉴定雌雄性腺特异表达基因，为从基因水平上揭示减数分裂的启动和雌雄配子形成的机制奠定了基础。

参考文献 (References)

- Abbie C, Mark VD, 2006. The control of sexual identity in the *Drosophila* germline. *Development* 133 (15): 2783 - 2791.
- Boyer A, Lussier JG, Sinclair AH, McClive PJ, Silversides DW, 2004. Pre-Sertoli specific gene expression profiling reveals differential expression of *Ppt1* and *Brd3* genes within the mouse genital ridge at the time of sex determination. *Biol. Reprod.* 71 (3): 820 - 827.
- Chen JP, Wang B, Wu WH, Liang B, Zhang SY, 2006. Cloning and screening of differentially expressed genes from testis and ovary of Amur sturgeon. *J. Fish. Sci. China* 13 (1): 8 - 12 (In Chinese).
- Clement TM, Anway MD, Uzumcu M, Skinner MK, 2007. Regulation of the gonadal transcriptome during sex determination and testis morphogenesis: comparative candidate genes. *Reproduction* 134 (3): 455 - 472.
- Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED, Siebert PD, 1996. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated of tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (12): 6025 - 6030.
- Holland LZ, Laudet V, Schubert M, 2004. The chordate amphioxus: an emerging model organism for developmental biology. *Cell Mol. Life Sci.* 61 (18): 2290 - 2308.
- Ignacio M, Bruce SB, 1998. The evolutionary dynamics of sex determination. *Science* 281 (5385): 1990 - 1994.
- Jordan BK, Mohammed M, Ching ST, Dot E, Chen XN, Dewing P, Swain A, Rao PN, Elejalde BR, Vilain E, 2001. Up-regulation of *WN7-4* signaling and dosage-sensitive sex reversal in humans. *Am. J. Hum. Genet.* 68 (5): 1102 - 1109.
- Koopman P, Gubbay J, Vivian N, Godfellow P, Lovell-Badge R, 1991. Male development of chromosomally female mice transgenic for *Sry*. *Nature* 351 (6322): 117 - 121.
- Lopez Fernandez LA, Lopez-Alanon DM, Castaneda V, Krimer DB, del Mazo J, 1997. Developmental expression of H3. 3A variant histone mRNA in mouse. *Int. J. Dev. Biol.* 41 (5): 699 - 703.
- Matsuda M, Shinomiya A, Kinoshita M, Suzuki A, Kobayashi T, Paul-Prasanth B, Lau EL, Hamaguchi S, Sakaizumi M, Nagahama Y, 2007. *DMY* gene induces male development in genetically female (XX) medaka fish. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104 (10): 3865 - 3870.
- Ottolenghi C, Pelosi E, Tran J, Colombino M, Douglass E, Nedorezov T, Cao A, Forabosco A, Schlessinger D, 2007. Loss of *Wnt4* and *Foxl2* leads to female-to-male sex reversal extending to germ cells. *Hum. Mol. Genet.* 16 (23): 2795 - 2804.
- Raymond CS, Shamu CE, Shen MM, Seifert KJ, Hirsch B, Hodgkin J, Zarkower D, 1998. Evidence for evolutionary conservation of sex-determining genes. *Nature* 391 (6668): 691 - 695.
- Swain A, Narvaez V, Burgoyne P, Camerino G, Lovell-Badge R, 1998. *Dax1* antagonizes *Sry* action in mammalian sex determination. *Nature* 391 (6669): 761 - 767.
- Wang YQ, Xu QS, Peng XX, Zhou HT, 2004. Taxonomic status of amphioxus *Branchiostoma belcheri* in Xiamen Beach estimated by homologous sequence of *Cyt b* gene. *Acta Zoologica Sinica* 50 (2): 202 - 208 (In Chinese).
- Wright E, Hargrave MR, Christiansen J, Cooper L, Kun J, Evans T, Gangadharan U, Greenfield A, Koopman P, 1995. The *sry*-related gene *Sax9* is expressed during chondrogenesis in mouse embryos. *Nat. Genet.* 9 (1): 15 - 20.
- Xu QS, Ma F, Wang YQ, 2005. Morphological and 12S rRNA gene comparison of two *Branchiostoma* species in Xiamen waters. *Exp. Zool. B. Mol. Dev. Evol.* 204 (3): 259 - 267.
- Zhang QJ, Zhong J, Fang SH, Wang YQ, 2006. *Branchiostoma japonicum* and *B. belcheri* are distinct lancelets (Cephalochordata) in Xiamen waters in China. *Zool. Sci.* 23 (6): 573 - 579.
- Zhang QJ, 2007. Taxonomy of genus *Branchiostoma* in Xiamen waters and continuous breeding of two lancelets in the laboratory. Doctor thesis. Xiamen: Xiamen University (In Chinese).
- 陈金平, 王斌, 吴文化, 梁冰, 张树义, 2006. 施氏鲟精巢和卵巢差减 cDNA 文库的构建和差异表达 EST 的筛选. *中国水产科学* 13 (1): 8 - 12.
- 王义权, 许群山, 彭宣宪, 周涵韬, 2004. 通过 *Cyt b* 基因同源序列比较评估厦门文昌鱼的分类学地位. *动物学报* 50 (2): 202 - 208.
- 张秋金, 2007. 厦门海域文昌鱼属 *Branchiostoma* 的分类及 2 种文昌鱼的实验室连续繁育. 博士学位论文. 厦门: 厦门大学.