

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.01.001

· 基础研究 ·

合浦珠母贝 SOX9 对 *Prismalin-14* 基因的调控研究*徐苙菲 刘阳嘉 庄小琼 谢莉萍[△] 张荣庆[△]

(清华大学生命科学学院 北京 100084)

摘要 目的: 研究合浦珠母贝转录因子 SOX9 对 *Prismalin-14* 的转录调控机制。**方法:** 应用在线预测软件 PROMO 分析 *Prismalin-14* 的启动子序列,以预测 *Prismalin-14* 启动子上可能的转录因子与其结合位点;运用细胞共转染实验和双荧光素酶报告系统以检测 SOX9 对 *Prismalin-14* 启动子的激活作用;构建 *Prismalin-14* 启动子截短体的荧光素酶报告载体,并和 SOX9 的真核载体共转到 HEK-293T 细胞中,再进行双荧光素酶报告系统检测 *Prismalin-14* 启动子的活性;构建 SOX9 截短体的真核表达载体,并与 *Prismalin-14* 启动子的荧光素酶报告载体共转到 HEK-293T 细胞中,再进行双荧光素酶报告分析 *Prismalin-14* 启动子的活性。**结果:** SOX9 能激活 *Prismalin-14* 的启动子的活性,并具有剂量效应;对 *Prismalin-14* 启动子进行截短后,不包含结合位点的 *Prismalin-14* 启动子的活性是野生型 *Prismalin-14* 启动子活性的 49%,推测 *Prismalin-14* 启动子上的 -415bp 到 -405bp 区域是 SOX9 激活作用的关键区域;对 SOX9 的 SRY-related HMG 结构域进行截短后,其对 *Prismalin-14* 启动子的激活作用显著减少,因此 SOX9 结构的完整对 *Prismalin-14* 启动子活性的激活作用是必须的。**结论:** *Prismalin-14* 的转录可能受 SOX9 调控,为进一步研究合浦珠母贝的转录调控机制提供基础,将有助于从分子水平上理解贝壳形成的上游调控机理。

关键词: 合浦珠母贝; SOX9; *Prismalin-14*; 转录调控

中图分类号: R-33; Q786 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2018)01-1-05

Research on the Regulation of *Prismalin-14* gene by SOX9 Protein in *Pinctada Fucata**XU Li-fei, LIU Yang-jia, ZHUANG Xiao-qiong, XIE Li-ping[△], ZHANG Rong-qing[△]

(School of Life Sciences, Tsinghua University, Beijing, 100084, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the transcription regulation mechanism of *Prismalin-14* by transcription factor SOX9 in the pearl oyster, *Pinctada Fucata*. **Methods:** The promoter sequence of *Prismalin-14* was analyzed by using the online prediction software PROMO to predict the possible transcription factors on the *Prismalin-14* promoter and its binding sites. Cell co-transfection experiments and dual luciferase reporter assay system were used to detect the activation of SOX9 on *Prismalin-14* promoter. Constructed the luciferase assay vector of the truncated promoter of the *Prismalin-14* and co-transfected into the HEK-293T cells with the eukaryotic expression vector of the SOX9. Then, the dual luciferase reporter assay system was used to analyze the activity of the *Prismalin-14* promoter. Constructed the eukaryotic expression vector of the truncated the SOX9 and co-transfected into the HEK-293T cells with the luciferase assay vector of the *Prismalin-14*. Then, dual luciferase reporter assay system was used to analyze the activity of the *Prismalin-14* promoter. **Results:** SOX9 up-regulated the promoter activity of the *Prismalin-14* with a dose effect. After truncated the *Prismalin-14* promoter, the activity of the promoter of the *Prismalin-14* without the binding site was 49% of the *Prismalin-14* promoter activity. As a result, the region -415 bp to -405 bp of the *Prismalin-14* promoter is the key region for activation activity of SOX9. After truncated the SRY-related HMG domain of SOX9, the activation of the *Prismalin-14* promoter was significantly reduced. As a result, the structural integrity of SOX9 was essential for the promoter of the *Prismalin-14* activation function. **Conclusions:** The transcription factor SOX9 regulates the expression of the *Prismalin-14* in the pearl oyster, *Pinctada fucata*. It provided a basis for the further study of the transcription regulation mechanism in the pearl oyster, *Pinctada fucata*. It will help understand the upstream regulation mechanism of shell formation from the molecular level.

Key words: *Pinctada Fucata*; SOX9; *Prismalin-14*; Transcription Regulation

Chinese Library Classification (CLC): R-33; Q786 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)01-1-05

* 基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31372508)

作者简介: 徐苙菲(1992), 硕士研究生, 研究方向: 生物矿化, 电话: 13121982910, E-mail: dreammy26@hotmail.com

[△] 通讯作者: 谢莉萍, 博士, 教授, 研究方向: 生物矿化, E-mail: lpxie@mail.tsinghua.edu.cn;

张荣庆, 博士, 教授, 研究方向: 生物矿化, E-mail: rqzhang@mail.tsinghua.edu.cn

(收稿日期: 2017-05-15 接受日期: 2017-06-08)

前言

贝壳与珍珠即是最经典的生物矿化的产物。贝壳的珍珠质有望成为骨修复材料,因此研究生物矿化的形成机理,将有助于提高生命科学、仿生材料学,乃甚至医学工程的研究开发层次,具有潜在的应用价值。在以往对于贝壳形成的机制的研究中,大多注重于识别新的基质蛋白与其功能分析,有关基质蛋白的转录调控研究较少。研究发现部分转录因子对基质蛋白基因的转录调控机制,例如: Pf-AP-1 能激活基质蛋白 *Pearlin*、*KRMP*、*Prsilkin39* 启动子活性^[1]; Pf-POU3F4 能激活基质蛋白 *Prismalin-14*、*Aspein* 启动子活性^[2]; Pf-C/EBP-A 与 Pf-C/EBP-B 能激活基质蛋白 *Shematin-2* 启动子活性^[3]。

SOX9 是一种重要的转录因子,其在脊椎动物生长发育过程中发挥了重要的作用,尤其在性别决定和软骨形成中具有关键的调控功能^[4]。SOX9 是 SOX 家族的一个重要成员,也是第一个发现含有内含子的 SOX 基因^[5]。SOX9 能够与多种蛋白结合,其中与基质蛋白的相互作用与矿化过程相关。以往的生物矿化研究中已发现在 TGFβ 信号通路中, SMAD3 会通过激活 SOX9 依赖性转录来诱导软骨的分化^[10,11]; SOX9 也会激活 *KRMP1* 来参与合浦珠母贝的生物矿化的过程^[12]; 在软骨形成过程中, SOX9 会与 SSP1 结合以抑制基质病态地矿化^[13,14]。研究合浦珠母贝体内 SOX9 在贝壳形成过程中的转录调控机制,将有助于对合浦珠母贝 SOX9 在矿化方面的功能进行补充完善。

1 材料与方法

1.1 实验材料

合浦珠母贝购于广东省湛江市水产市场,在实验室内培养于人工配置的盐度为千分之 33 的海水中,培养温度为 17~19℃。

1.2 *Prismalin-14* 基因启动子的生物信息学分析

运用在线软件分析及预测 *Prismalin-14* 启动子序列中的转录因子与其结合位点^[5]。具体如下:

PROMO (http://algen.lsi.upc.es/cgi-bin/promo_v3/promo/promoinit.cgi?dirDB=TF_8.3)

1.3 细胞转染实验相关载体的构建

根据 SOX9 和 *Prismalin-14* 序列设计 PCR 引物,构成 SOX9 和 *Prismalin-14* 启动子截短体的载体的引物序列见表 1。通过 PCR 得到目的片段后,对其片段和对应的载体进行双酶切和连接,其中,SOX9 和 *Prismalin-14* 启动子的载体是由海洋实验室提供^[6];连接 SOX9 截短体的真核表达载体为 pcDNA3.1 (+)-mycis; 连接 *Prismalin-14* 启动子截短体的荧光素酶报告载体为 pGL4.10。将连接产物转入感受态细胞 DH5α 中,37℃ 培养箱中过夜培养,挑选单一菌落,进行菌落 PCR,扩增得到的片段与目的基因大小相同时,送去睿博生物公司测序,当测序结果与设计的目的序列相同,即代表重组载体构建成功。

1.4 细胞培养

实验用的 HEK-293T 细胞使用 10% 胎牛血清 (Gibco)、100 单位 / 毫升的青霉素 (Gibco) 和 100 单位 / 毫升的链霉素 (Gibco) 的 DMEM 培养基 (Gibco), 在 37℃ 的充 5% 二氧化碳的恒温培养箱中进行培养,胰酶 (Gibco) 消化后传代,每天更换培养基。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Primer Sequences used in PCR

Primer	Sequence
SOX9-1-F	CCCAAGCTTATGCACATAAAACGTC-CATGAACGC
SOX9-2-F	CCCAAGCTTATGTACCAACCCCGCCGAGG
SOX9-JD-R	TTTTCCTTTTGGCGGCTCGTGTAC-CGTGCCATTGCT
P14-1-F	CCGCTCGAGTCGAGAGGATCCGTACT
P14-2-F	CCGCTCGAGCGTACTCGTAACGCAATGAT
P14-JD-R	CCCAAGCTTGAGAAATTGTCAGAAACGC

1.5 细胞转染

HEK-293T 的细胞转染参照高效真核转染试剂 VigiFect (威格拉斯, 中国)。

1.6 双荧光素酶活性测定

使用 Dual-Luciferase® Reporter Assay System 试剂盒 (Promega, 美国), 并使用 Varioskan 多功能酶标仪 (Thermo, 美国) 来测定双荧光素酶活性。

1.7 统计学分析方法

本研究利用 SPSS 统计软件进行统计。其中,运用 T-test 检测是否具有显著性差异, P 值小于 0.05, 为显著性差异。

2 结果

2.1 *Prismalin-14* 基因启动子上转录因子结合位点的预测

利用在线软件 PROMO 预测合浦珠母贝 *Prismalin-14* 启动子上可能的转录因子结合位点, 发现存在与 SOX9 的结合位点, CGAGAGGATCC。

2.2 *Prismalin-14* 启动子基础活性的检测

为了鉴定 *Prismalin-14* 启动子的基础活性, 将构建好的 *Prismalin-14* 启动子的荧光素酶报告载体转染入 HEK-293T 细胞中, 并用双荧光素酶报告系统检测其活性, 其中, 启动子活性鉴定结果如图 1 所示, 基质蛋白 *Prismalin-14* 启动子的相对荧光素酶活性是空载体对照组的 12 倍多, 这结果表示克隆到的 *Prismalin-14* 启动子在 HEK-293T 细胞中有较高的基础活性。

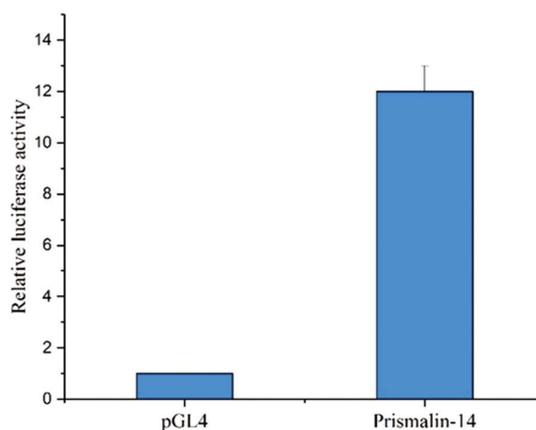


图 1 基质蛋白启动子的活性

Fig. 1 The activity of the matrix protein promoter

The promoter activity of *Prismalin-14* on luciferase reporter pGL4.10 was analyzed by double luciferase reporter assay. PGL4.10 was empty vector.

2.3 SOX9 对 *Prismalin-14* 启动子的激活作用

将 SOX9 的真核表达载体与 *Prismalin-14* 的荧光素酶报告载体共转染到 HEK-293T 细胞中,并用荧光素酶报告系统检测分析 *Prismalin-14* 基因启动子活性。结果表明,SOX9 能够明显激活 *Prismalin-14* 启动子, 的活性约为对照组空载体的 2.9 倍(图 2)。同时,我们也发现 SOX9 对 *Prismalin-14* 启动子活性的激活具有剂量效应,当 SOX9 的剂量越高,*Prismalin-14* 的启动子活性就越高(图 3)。

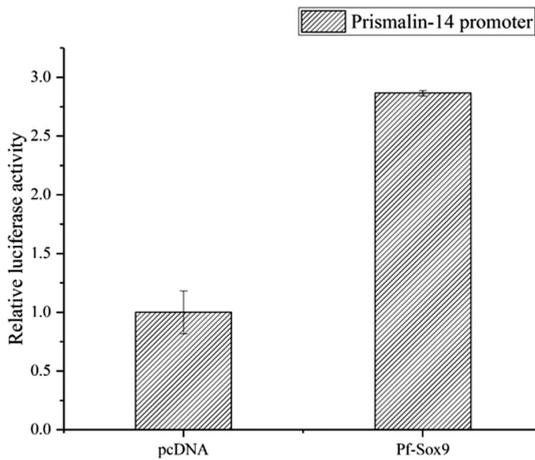


图 2 SOX9 对 *Prismalin-14* 启动子活性的激活作用

Fig.2 SOX9 active *Prismalin-14* promoter

SOX9 was constructed on pcDNA 3.1(+)-myc vector and co-transfected into HEK-293T cells. We used pcDNA3.1(+)-myc vector as control group. The dual luciferase assay results show SOX9 significantly promotes the promoter activity of *Prismalin-14*.

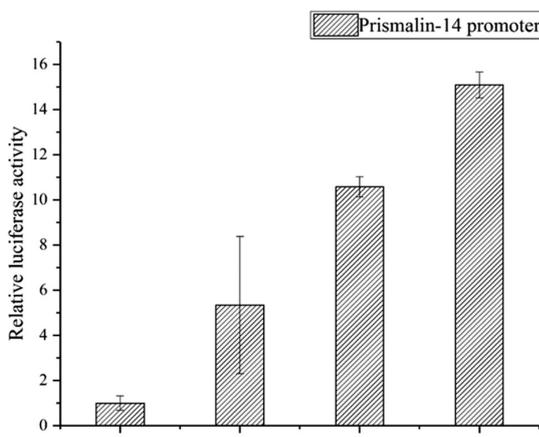


图 3 SOX9 对 *Prismalin-14* 启动子的剂量效应

Fig.3 SOX9 gene activates *Prismalin-14* gene promoter with a dose effect. Different doses of SOX9 was co-transfected into HEK-293T cells with 100 ng *Prismalin-14* per well. 1 represents 0 ng of SOX9 eukaryotic expression vector; 2 represents 125 ng of SOX9 eukaryotic expression vector; 3 represents 250 ng of SOX9 eukaryotic expression vector; 4 represents 500 ng of SOX9 eukaryotic expression vector.

2.4 SOX9 与 *Prismalin-14* 启动子的结合位点鉴定

之前应用在线软件 PROMO 预测分析 *Prismalin-14* 的启动子,结果显示,*Prismalin-14* 启动子上存在与转录因子 SOX9 的结合位点,该位点可能位于 -405 bp 到 -415 bp 之间。为了探寻

Prismalin-14 启动子上 SOX9 的潜在结合位点,我们设计并构建了两个 *Prismalin-14* 启动子截短体的荧光素酶报告载体: P14-1、P14-2, *Prismalin-14* 启动子截短体的结构如图 4 所示,其中, P14 为 *Prismalin-14* 启动子的全长序列; P14-1 具有结合位点但去除结合位点以前的 *Prismalin-14* 启动子序列; P14-2 则是不包含结合位点及结合位点以前的 *Prismalin-14* 启动子序列。将 *Prismalin-14* 与 SOX9 的真核表达载体共转染入 HEK-293T 细胞中,利用了双荧光素酶报告系统检测和分析,结果表明(见图 5),与野生型 P14 启动子相比, P14-1 和 P14-2 启动子的活性都明显降低,尤其是启动子 P14-2 仅为野生型 P14 启动子活性的 49%,降低了近一半。由于 P14-2 因此不包含与 SOX9 的结合位点,由此可以推测 *Prismalin-14* 启动子中 404bp 到 -414bp 区域是 SOX9 在的关键结合位点。

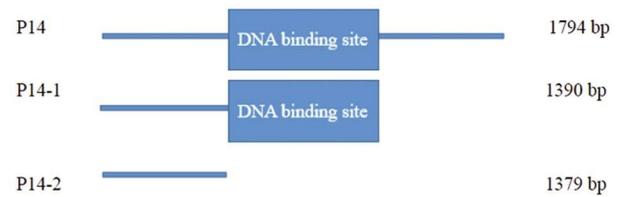


图 4 *Prismalin-14* 截短体结构示意图

Fig.4 The Schematic of *Prismalin-14* gene promoter truncations

P14 represents the *Prismalin-14* promoter; P14-1 represents the *Prismalin-14* promoter that cleaves the previous fragment of the -404 bp; P14-2 represents the *Prismalin-14* promoter that excludes the previous fragment of -414 bp.

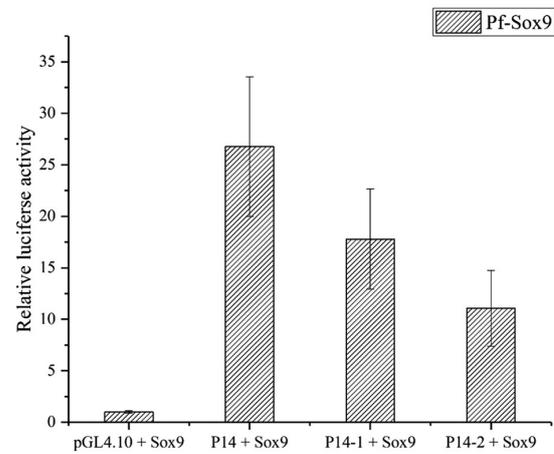


图 5 SOX9 与 *Prismalin-14* 启动子结合位点的鉴定

Fig.5 Identification of the binding site of SOX9 and *Prismalin-14* promoter

P14 promoter activity is the highest. The activity of P14-1 promoter is a little lower than P14 promoter. However, the activity of P14-2 promoter which without binding site is the lowest, its promoter activity was 49% of the P14 promoter. Among them, the P value of P14 and pcDNA was 0.02, the P value of P14-1 and P14 was 0.5, the P value of P14-2 and P14-1 was 0.01.

2.5 SOX9 基因结构域完整性对启动子激活作用的影响

为了检测 SOX9 的 HMG 结构域对转录激活的影响,我们构建了 SOX9 的两个截短体: SOX9 -1、SOX9 -2, SOX9 截短体的结构,如图 6 所示,其中, Sox9 为 SOX9 的全长序列, SOX9-1

是不包含在 HMG 结构域以前的 SOX9 序列,SOX9-2 是不包含 HMG 结构域及以前的 SOX9 序列。并与 *Prismalin-14* 启动子的重组载体共转入 HEK-293T 细胞中,再检测它们在 HEK-293T 细胞中的表达情况。实验结果显示 SOX9-1 对 *Prismalin-14* 基因启动子活性的激活作用与 SOX9 没有太大差别,但不包含 HMG 结构域的 SOX9-2 对 *Prismalin-14* 启动子的激活作用显著下降,如图 7 所示。这些结果显示着 SOX9 蛋白结构的完整性对于 *Prismalin-14* 启动子的激活作用是必须的。

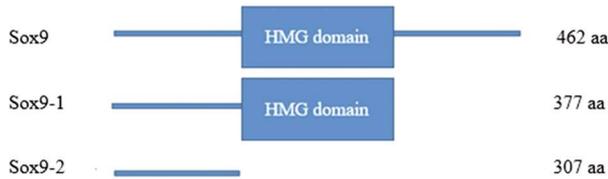


图 6 SOX9 截短体结构示意图

Fig.6 The Schematic of SOX9 truncations

Sox9 represents the SOX9 protein; Sox9-1 represents SOX9 that for truncating the 85th amino acid before. Sox9-2 represents SOX9 that for truncating the 155th amino acid before.

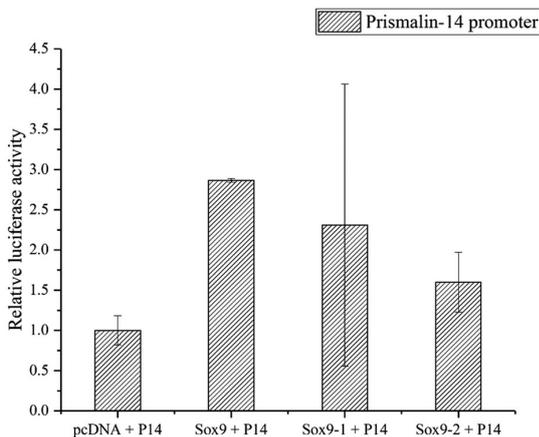


图 7 SOX9 与其截短体对 *Prismalin-14* 启动子活性的影响

Fig.7 Activation of *Prismalin-14* promoter by SOX9 and its truncated. The decrease in the length of SOX9 resulted in a decrease in the activity of the *Prismalin-14* promoter. When the HMG domain of SOX9 was completely removed, *Prismalin-14* promoter activity was almost not activate. These results showed the structural integrity of SOX9 was essential for the promoter of the *Prismalin-14* gene activation function.

3 讨论

本研究探讨了合浦珠母贝体内的 SOX9 对 *Prismalin-14* 启动子的转录调控作用,首先,为了探究合浦珠母贝基质蛋白 *Prismalin-14* 可能结合的转录因子及其结合位点,应用了在线软件 PROMO 预测与分析 *Prismalin-14* 启动子。接着,通过细胞共转染、双荧光素酶报告系统等实验来验证。我们发现了 SOX9 能激活 *Prismalin-14* 的启动子活性,约为对照组的 2.9 倍。这结果表示 SOX9 除了能够与 Smad3 结合^[10],进而激活基质蛋白 KRMP1 启动子的转录以外^[12],也能透过与基质蛋白 *Prismalin-14* 的结合来参与合浦珠母贝的生物矿化过程。同时,也得知了合浦珠母贝的基质蛋白 *Prismalin-14* 启动子除了能够

受转录因子 Pf-POU3F4 激活外^[2],亦能通过 SOX9 来激活 *Prismalin-14* 启动子活性。目前在合浦珠母贝的转录调控研究中,已知 SOX9 能激活的 KRMP1,而 KRMP1 与 *Prismalin-14* 皆是被报道为可能参与棱柱层形成的基质蛋白,因此推测 SOX9 可能主要调控了参与合浦珠母贝的贝壳棱柱层的形成过程的基质蛋白^[12,17]。

为了探究 SOX9 在 *Prismalin-14* 启动子上的结合位点,构建了 2 种 *Prismalin-14* 启动子的荧光素酶报告载体,与 SOX9 重组载体共转染入 HEK-293T 细胞中,运用双荧光素酶报告系统检测 *Prismalin-14* 启动子的活性。结果表明,在截短 *Prismalin-14* 启动子后,SOX9 对其的转录活性皆会降低,尤其在截除预测的 SOX9 结合位点后,*Prismalin-14* 启动子的活性大幅降低,由此推测 *Prismalin-14* 启动子上截去的 -405 bp 至 -415 bp 为 SOX9 对 *Prismalin-14* 启动子的结合位点。然而,*Prismalin-14* 启动子截掉预测与 SOX9 的结合位点后,转录活性仍比空载体高的原因,推测为 *Prismalin-14* 启动子的预测位点以外的 TATA 盒与 SOX9 结合,导致发生零星的转录作用,而在线软件预测的结合位点可能是 *Prismalin-14* 启动子与 SOX9 结合后能开始大量转录的片段。

在本研究中,为了进一步探究 SOX9 的完整性对 *Prismalin-14* 启动子激活作用的影响,构建了 2 种 SOX9 截短体的真核表达载体,再与 *Prismalin-14* 启动子的荧光素酶报告载体共转染入 HEK-293T 细胞中,利用双荧光素酶报告系统检测 SOX9 截短体对 *Prismalin-14* 启动子激活作用的影响。SRY 相关 HMG 盒是 SOX 基因家族的共同具有的一段编码大约 79 个氨基酸的特征保守序列^[9,18]。HMG 保守序列能将特异的线性 DNA 双螺旋打开,使基因启动子暴露出来,以加强转录作用,并会使 DNA 弯曲成一定角度,使两蛋白靠得更近后以构成转录调控所需的多蛋白复合体^[19]。结果表明,两种 SOX9 截短体皆会造成 *Prismalin-14* 启动子的激活作用降低,特别是在完全去除 HMG 结构域时,与 SOX9 激活的 *Prismalin-14* 启动子的活性相比,具有显著性差异。结果表明,SOX9 的完整性对 *Prismalin-14* 启动子的激活是必须的。

然而,截去结构域的 SOX9 对 *Prismalin-14* 启动子的转录活性仍然比空载体高,究其原因,推测为 SOX9 可能与其他转录因子共同激活 *Prismalin-14* 启动子,所以 *Prismalin-14* 启动子可能还能发生微小的转录作用,有待后续实验探究之。

在合浦珠母贝的珍珠及贝壳形成等生物矿化过程的研究中,基质蛋白的发现与其功能探讨一直是一个研究热点。近年来本实验室逐渐开始进一步探讨合浦珠母贝的转录因子是如何调控基质蛋白表达的上游转录调控机制的研究^[20]。日前关于基质蛋白的转录调控研究较少的原因,推测为缺乏合浦珠母贝自己的细胞体系。然而,目前以现有的技术还不能有效地成功转染合浦珠母贝的原代细胞,亦不能将外套膜原代细胞成功地传代,所以现今皆是利用哺乳动物的细胞系(如 HEK-293T 细胞系)来进行各种细胞的研究,虽然哺乳动物的细胞研究技术相当成熟,但在软体动物的蛋白表达中可能具有局限性,进而导致不能完全呈现合浦珠母贝的实际蛋白表达的情形。由此可见,开发出合浦珠母贝自身的成熟细胞系,对日后合浦珠母贝的研究是相当重要的。

然而, 本研究的开展是建立在成熟的合浦珠母贝的基础上, 在一般认知中, 普遍认为合浦珠母贝在胚胎发育时期和幼贝成长时期时会大量表达矿化相关基因以生成贝壳等矿物。为此, 日后可以进一步探究 SOX9 在胚胎发育时期及幼贝生长时期的转录调控模式是如何表达? 是否与在成熟贝时期相同? 而在这两个成长时期时 SOX9 又是如何调控基质蛋白? 与哪些基因共同参与调控机制呢? 这一部分的解答, 还有待于日后去深入探究。

本研究通过分子水平和细胞水平进行实验探究 SOX9 在合浦珠母贝的贝壳形成过程中的转录机制, 所获得的研究工作成功如下: 首先本研究通过细胞共转染和双荧光素酶报告系统实验检测分析, SOX9 能够激活 *Prismalin-14* 启动子的活性, 约为空载体对照组活性的 2.9 倍, 同时, 具有剂量效应; 也进一步利用 *Prismalin-14* 启动子截短体的荧光素酶报告载体与 SOX9 的真核表达载体共转染入 HEK-293T 细胞中, 并用双荧光素酶报告系统实验检测 *Prismalin-14* 启动子的活性, 以探究 SOX9 与 *Prismalin-14* 启动子的结合位点, 我们发现 *Prismalin-14* 启动子上的 -405 bp 到 -415 bp 区域可能是 SOX9 的关键作用区域; 同时, 我们亦通过将 SOX9 截短体的真核表达载体与 *Prismalin-14* 启动子的真核表达载体共转染入 HEK-293T 细胞中, 并以双荧光素酶报告系统实验检测 *Prismalin-14* 启动子的活性, 以探究了 SOX9 的结构域完整性对 *Prismalin-14* 启动子活性激活的影响, 实验结果显示 SOX9 的结构域缺损会造成 *Prismalin-14* 启动子活性的激活降低, 由此可推测 SOX9 的完整结构域对 *Prismalin-14* 启动子的转录调控作用是必须的。因此, SOX9 可能通过调控 *Prismalin-14* 启动子的转录调控作用, 以参与合浦珠母贝的贝壳与珍珠形成等生物矿化的过程。总而言之, 本研究提供了 SOX9 蛋白对基质蛋白 *Prismalin-14* 的转录调控机制的基础, 有助于从分子层面理解贝壳形成的上游调控机理。了解 SOX9 对其他蛋白的作用机制, 丰富合浦珠母贝的矿化理论。

参考文献(References)

- [1] 郑向南. 合浦珠母贝生物矿化相关转录因子的克隆鉴定及功能研究[D]. 清华大学, 2015
Zheng Xiang-nan. Cloning and Functional Studies on Biomineralization Related Transcription Factors in *Pinctada fucata*. Tsinghua University, 2015
- [2] Gao J, Chen Y, Yang Y, et al. The transcription factor Pf-POU3F4 regulates expression of the matrix protein genes *Aspein* and *Prismalin-14* in pearl oyster (*Pinctada fucata*) [J]. *The FEBS Journal*, 2016, 283(10): 1962-1978
- [3] 高静. 合浦珠母贝基质蛋白基因的转录调控研究 [D]. 清华大学, 2016
Gao Jing. Research on the transcription regulation of matrix protein genes in *Pinctada fucata* [D]. Tsinghua University, 2016
- [4] Kadaja M, Keyes B E, Lin M, et al. SOX9: a stem cell transcriptional regulator of secreted niche signaling factors [J]. *Genes Dev*, 2014, 28(4): 328-341
- [5] Hong X, Liu W, Song R, et al. SOX9 is targeted for proteasomal degradation by the E3 ligase FBW7 in response to DNA damage [J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(18): 8855-8869
- [6] Huang W, Chung U, Kronenberg H M, et al. The chondrogenic transcription factor Sox9 is a target of signaling by the parathyroid hormone-related peptide in the growth plate of endochondral bones [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2001, 98(1): 160-165
- [7] 陈少坚. Sox9 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
Chen Shao-jian. Research progress of Sox9 gene promote cartilage formation mechanism [J]. *International Journal of Orthopaedics*, 2010, 31(2): 65-67
- [8] Suzuki M, Murayama E, Inoue H, et al. Characterization of *Prismalin-14*, a novel matrix protein from the prismatic layer of the Japanese pearl oyster (*Pinctada fucata*) [J]. *Biochemical Journal*, 2004, 382(1): 205-213
- [9] 袁红梅, 张丽霞, 张虹, 等. Sox9 基因的研究进展 [J]. *黑龙江农业科学*, 2007, 3(4): 124-127
Yuan Hong-mei, Zhang Li-xia, Zhang Hong, et al. Progress of research on Sox9 [J]. *Heilongjiang Agricultural Sciences*, 2007, 3(4): 124-127
- [10] 周玉娟. 合浦珠母贝 TGF β 信号通路相关基因的克隆及功能研究 [D]. 清华大学, 2010
Zhou Yu-juan. Cloning and functional studies on genes related to TGF β signal pathways of *Pinctada fucata* [D]. Tsinghua University, 2010
- [11] Furumatsu T, Ozaki T, Asahara H. Smad3 activates the Sox9-dependent transcription on chromatin [J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2009, 41(5): 1198-1204
- [12] 刘骏. 基质蛋白在幼贝发育及贝壳形成中的表达调控研究 [D]. 清华大学, 2015
Liu Jun. Expression and regulating patterns of shell Matrix Proteins during larval development and shell formation [D]. Tsinghua University, 2015
- [13] Jacqueline D. Peacock D J H H. Sox9 Transcriptionally Represses *Spp1* to Prevent Matrix Mineralization in Maturing Heart Valves and Chondrocytes [J]. *PLoS ONE*, 2011, 6(10):
- [14] Peacock J D, Huk D J, Ediriweera H N, et al. Sox9 transcriptionally represses *Spp1* to prevent matrix mineralization in maturing heart valves and chondrocytes [J]. *PLoS One*, 2011, 6(10): e26769
- [15] Farre D. Identification of patterns in biological sequences at the ALGGEN server: PROMO and MALGEN [J]. *Nucleic Acids Research*, 2003, 31(13): 3651-3653
- [16] Messeguer X, Escudero R, Farre D, et al. PROMO: detection of known transcription regulatory elements using species-tailored searches [J]. *Bioinformatics*, 2002, 18(2): 333-334
- [17] Suzuki M, Nagasawa H. The structure-function relationship analysis of *Prismalin-14* from the prismatic layer of the Japanese pearl oyster, *Pinctada fucata* [J]. *FEBS J*, 2007, 274(19): 5158-5166
- [18] 陈维. Sox9 基因的结构、功能及进化 [J]. *生命的化学*, 2012, 32(4): 310-315
Chen Wei. The structure, function and evolution [J]. *Chemistry of life*, 2012, 32(4): 310-315
- [19] Harley V R, Lovell-Badge R, Goodfellow P N, et al. The HMG box of SRY is a calmodulin binding domain [J]. *FEBS letters*, 1996, 391(1-2): 24-28
- [20] Marin F, Luquet G. Molluscan shell proteins [J]. *Comptes Rendus Palevol*, 2004, 3(6): 469-492