

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20210315001

http://www.yykxjz.cn/

赵丹, 周丽青, 郑言鑫, 孙秀俊, 吴彪, 刘志鸿, 吴宙, 吴磊. *Foxl2* 基因在虾夷扇贝发育过程中的表达模式分析. 渔业科学进展, 2022, 43(3): 138–145

ZHAO D, ZHOU L Q, ZHENG Y X, SUN X J, WU B, LIU Z H, WU Z, WU L. Expression pattern of the *Foxl2* gene in the scallop *Patinopecten yessoensis* during development. Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(3): 138–145

Foxl2 基因在虾夷扇贝发育过程中的表达模式分析*

赵丹^{1,2} 周丽青^{1,2①} 郑言鑫⁵ 孙秀俊² 吴彪²
刘志鸿² 吴宙^{2,3} 吴磊^{2,4}

(1. 上海海洋大学 水产科学国家级实验教学示范中心 上海 201306;

2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室 山东 青岛 266071;

3. 浙江海洋大学国家海洋设施养殖工程技术研究中心 浙江 舟山 316022;

4. 江苏海洋大学海洋科学与水产学院 江苏 连云港 222005;

5. 中国水产科学研究院长岛增殖实验站 山东 烟台 265800)

摘要 *Foxl2* 是叉头状转录因子(forkhead transcription factor, *Fox*)基因家族的重要成员之一, 在卵巢发育和性别调控中发挥着重要作用。为探究 *Foxl2* 在虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)性腺发育中的表达调控模式, 利用生物信息学方法分析了虾夷扇贝 *Foxl2* 的序列特征; 采用半定量 PCR(RT-PCR)检测了 *Foxl2* 在不同组织中的表达差异。实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)和原位杂交技术(ISH)揭示了 *Foxl2* 在性腺发育 4 个时期(增殖期、生长期、成熟期和排放期)的时空表达变化。结果显示, 虾夷扇贝 *Foxl2* 序列包含 *Fox* 基因家族共有的 FH 结构域; 多重序列比较分析显示, 虾夷扇贝与栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)、欧洲大扇贝(*Pecten maximus*)的相似性最高, 分别为 98%、96%。系统进化树分析显示, 在不同物种以及进化的过程中, *Foxl2* 基因具有较高的保守性。定量分析和原位杂交结果显示, 原位杂交阳性信号主要定位在生殖细胞的细胞质中。在虾夷扇贝的鳃、肾、肝胰腺、精巢中, 都可检测到少量 *Foxl2* 转录本的存在, 在卵巢中表达量最高, 且在卵巢成熟期达到最高值。随着性腺发育和精细胞的逐级分化, *Foxl2* 的表达量呈下降趋势, 这与原位杂交的结果一致。研究表明, *Foxl2* 在虾夷扇贝卵巢发育中可能发挥重要作用, 推测其是雌性虾夷扇贝性腺发育调控中的关键基因, 可为今后阐明其在虾夷扇贝性别分化进程中的功能提供理论依据。

关键词 虾夷扇贝; *Foxl2*; 荧光定量 PCR; 原位杂交; 性腺发育

中图分类号 S917 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2022)03-0138-08

Foxl2 是叉头状转录因子(forkhead transcription factor, *Fox*)超家族的成员之一, 主要在垂体和卵巢中表达, 通过转录调节其目的靶基因的转录、蛋白表达, 参与生殖细胞的增殖与分化, 在动物卵巢发育和维持

* 国家自然科学基金项目(31672637)、浙江重中之重开放课题(KF2018008)和国家重点研发计划(2018YFD0900800)共同资助 [This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31672637), Zhejiang Provincial Top Discipline of Bioengineering of China (KF2018008), and National Key Research and Development Program of China (2018YFD0900800)]. 赵丹, E-mail: 1282095341@qq.com

① 通讯作者: 周丽青, 副研究员, E-mail: zhoulq@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2021-03-15, 收修改稿日期: 2021-04-15

中发挥重要作用(Uhlenhaut *et al.*, 2011), 与卵巢生殖细胞分化和卵巢功能的维持密切相关(Ellsworth *et al.*, 2006; Boulanger *et al.*, 2014)。

迄今为止, *Foxl2* 基因功能的深入研究集中在脊椎动物和部分无脊椎动物, 且结构高度保守。*Foxl2* 是脊椎动物卵巢分化的特异性标志物(Alam *et al.*, 2008)。据报道, *Foxl2* 在蛙(*Rana rugosa*)卵巢分化的早期起关键作用(Oshima *et al.*, 2008); 是山羊(*Capra hircus*)雌性性别决定因子(Boulanger *et al.*, 2014); *Foxl2* 的失活会导致小鼠(*Mus musculus*)卵巢发育异常(Escalier *et al.*, 2002); 同时, 敲除 *Foxl2* 和 *WNT4* 会导致小鼠表现出由雌性逆转为雄性的特征(Ottolenghi *et al.*, 2008)。*Foxl2* 在雄性鸡(*Gus gallus*)胚性腺中的错误表达抑制了睾丸发育途径(Major *et al.*, 2019)。以上研究表明, *Foxl2* 在脊椎动物卵巢中特异性表达, 对卵巢的发育起着重要作用。相对于脊椎动物, *Foxl2* 基因在无脊椎动物的研究较少。研究发现, *Foxl2* 主要在栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)和长牡蛎(*Crassostrea gigas*)的性腺和唇瓣中表达, 其中, 处于生长期卵巢的表达量是精巢的8倍(刘晓玲, 2012; Naimi *et al.*, 2009)。在三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii*)中, *Foxl2* 主要表达于颗粒细胞中, 与哺乳动物相似(叶容晖等, 2018)。

虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)因其多样的性别表现形式被认为是确定动物性别分化相关基因的最佳研究对象。虾夷扇贝隶属于瓣鳃纲(Lamellibranchia)、珍珠贝目(Pterioidea)、扇贝科(Pectinidae), 是我国北方重要的养殖经济物种。已有相关研究表明, *Foxl2* 在扇贝雌性性腺中含量丰富(Li *et al.*, 2018), 可能是扇贝性别决定和分化的关键候选基因(Li *et al.*, 2016)。但对于虾夷扇贝 *Foxl2* 基因在性腺发育中的时空表达模式尚未见有详细的报道。为进一步了解 *Foxl2* 在虾夷扇贝性腺发育不同时期中的表达特征, 本研究克隆了虾夷扇贝 *Foxl2* cDNA 编码区序列, 进行生物信息学分析, 并观察其组织表达规律, 旨在为 *Foxl2* 在虾夷扇贝性腺发育过程中的功能提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用贝为2龄虾夷扇贝, 购自山东烟台长岛生鲜市场, 性腺生殖周期包含增长期、生长期、成熟期和排放期共4个时期, 体重为(73.34±20.50) g。选取正常进食、排便的个体, 取扇贝部分性腺组织用于RNA提取和组织分布检测, 部分性腺组织浸入原位

杂交固定液(Servicebio, 中国)中。组织切片法结合性腺组织涂片法鉴定性别。

1.2 总 RNA 提取和 cDNA 合成

取大约 50 mg 冷冻的性腺组织, 在研钵中用液氮充分研磨。采用 Trizol 法提取虾夷扇贝性腺总 RNA, 通过 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性, NanoDrop 2000 分光光度计(Thermo Scientific, 美国)检测其纯度与浓度, 选取 OD_{260 nm/280 nm} 值在 1.90~2.2 范围、RNA 浓度>1000 ng/μL 的样本进行反转录。RNA 鉴定合格后, 采用 HiScript III RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper)试剂盒(Vazyme, 中国)并参照说明书合成 cDNA。-20℃保存。

1.3 *Foxl2* 基因的生物学分析

虾夷扇贝转录组数据分析获得的基因编码序列与 NCBI 数据库比对, 结果显示, 与虾夷扇贝的 *Foxl2* (登录号: XM_021497746)完全吻合, 命名为 *PyFoxl2*。

采用 ORF Finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)确定 *PyFoxl2* 的开放阅读框。在线分析软件 SMART(http://smart.embl-heidelberg.de/smart/set_mode.cgi?NORMAL=1)预测结构和功能域。使用 SignalP 5.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)预测 *PyFoxl2* 蛋白的信号肽, 并使用 TMHMM 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)预测跨膜区域。使用 BLAST 程序(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)对 *PyFoxl2* 进行碱基同源分析, 并进行蛋白质序列相似性搜索。使用 swiss model (<https://swissmodel.expasy.org/>)预测蛋白三级结构。通过 Jalview 比来自不同物种 *Foxl2* 的序列, 并使用 MEGA 7.0 软件的 Neighbor-Joining(NJ)方法构建 *PyFoxl2* 系统发育树。

1.4 半定量 RT-PCR

根据所获得的 *PyFoxl2* mRNA 转录本序列, 设计半定量 RT-PCR 引物 *Foxl2*-F 和 *Foxl2*-R (表 1)。以虾夷扇贝生长期的 cDNA 为模板, 使用 2×*Taq* Master Mix for PAGE 试剂盒(Vazyme, 中国)对目的基因进行 PCR 扩增。反应条件: 95℃ 3 min (预变性); 95℃ 15 s, 60℃ 15 s (退火), 循环 35 次; 72℃ 5 min (彻底延伸)。扩增产物经 2.0% 琼脂糖凝胶电泳检测目的基因。

1.5 荧光定量

根据开放阅读框 ORF (open reading frame)设计 *PyFoxl2* 定量 qRT-PCR 引物: *QFoxl2*-F 和 *QFoxl2*-R。使用 β -actin 基因(鲍相渤等, 2011)作为内参基因校正 cDNA 模板(表 1)。

表1 本实验所用引物
Tab.1 Primers used in this experiment

引物 Primer	序列 Sequence (5'~3')	用途 Usage
Foxl2-F	CGATGCTCCATTGGAAGAGT	RT-PCR
Foxl2-R	AAGTAGTCGTGGCGATCAGG	RT-PCR
β -actin-F	AGTCCCAATCTACGAAGGTTATG	RT-PCR and qRT-PCR
β -actin-R	CCAGTGATGAGGAGGAAGCAG	RT-PCR and qRT-PCR
QFoxl2-F	GGAAGAAAATGCCGATTCA	qRT-PCR
Q Foxl2-R	ACTCCCAACATGCTGTTCC	qRT-PCR
Y Foxl2	ATAGGGACCGCAGTGGTTGTCAGCAAATAA	原位杂交探针 <i>in situ</i> hybridization probe

分别以虾夷扇贝不同发育时期的性腺 cDNA 为模板对目的基因进行扩增。使用 ChamQ SYBR Color qPCR master mix 试剂盒(Vazyme, 中国)按照下列参数配制 qPCR 反应体系: $2\times$ ChamQ STBR Color qPCR master mix 10 μ L, 上下游引物各 0.4 μ L, cDNA 模板 2 μ L, $50\times$ ROX reference dye 1 0.4 μ L, 灭菌蒸馏水 6.8 μ L。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 30 s(预变性); 95 $^{\circ}$ C 10 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s(退火), 循环 40 次; 在 StepOnePlusTM(美国)进行 qPCR 反应, 每次反应 3 个重复, 各个样品 3 个平行实验。本实验结果采取 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 *PyFoxl2* 基因的相对表达量。利用 Prism 5 软件对实验数据进行统计和分析。

1.6 原位杂交

根据 *PyFoxl2* 基因的 ORF 区设计原位杂交探针 YFoxl2。取部分性腺组织, 切成 2 mm 左右的厚度, 用灭菌的镊子置于原位杂交液中常温固定 24 h 用于切片处理。正式原位杂交步骤: 固定的组织经石蜡切片后依次放入二甲苯 I 15 min-二甲苯 II 15 min-无水乙醇 I 5 min-无水乙醇 II 5 min-85%酒精 5 min-75%酒精 5 min-DEPC 水洗。用胃蛋白酶处理, 使靶

核酸片段暴露, 预杂交缓冲液(不含探针和硫酸葡聚糖)37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 接着滴加含探针的杂交液, 55 $^{\circ}$ C 杂交过夜。进行非特异结合探针的洗脱和残余 RNA 的消化后, 用 BSA(bovine serum albumin)封闭非特异性抗体 1 h, 滴加鼠抗地高辛标记 488(anti-DIG-488)进行抗体孵育 37 $^{\circ}$ C 40 min, 洗涤, 最后显色液(DAPI)进行显色, 于尼康正置荧光显微镜(日本)下观察并采集图像。

2 结果

2.1 *PyFoxl2* 序列分析

生物信息学分析结果显示, *PyFoxl2* ORF 序列长度为 1107 bp, 编码 368 个氨基酸。存在保守的 FH 结构域(128~218 bp); FH 结构域存在一个疑似核定位信号序列(nuclear localization signal sequence)RRRRMRR。*PyFoxl2* 蛋白无信号肽, 不存在明显的跨膜区域。因此, 推测其为一个胞内蛋白, 不属于膜蛋白。

2.2 *PyFoxl2* 空间结构预测

应用 Swiss-Model 同源建模服务器预测了 *PyFoxl2* 蛋白三维结构。结果显示, 该蛋白保守区主要由 3 个 α 螺旋、4 个 β 折叠和 2 个翼状结构组成(图 1)。

2.3 *PyFoxl2* 氨基酸序列同源性及进化树分析

从 NCBI 数据库里选择 7 个 *Foxl2* 代表性的物种的氨基酸序列进行同源比对分析。结果发现, *PyFoxl2* 与软体动物的氨基酸序列相似度较高, 其中, 与栉孔扇贝、欧洲大扇贝(*Pecten maximus*)的相似性最高, 分别为 98%、96%, 与美洲牡蛎(*Crassostrea virginica*)的相似性为 73% (图 2)。

为了了解 *Foxl2* 在不同物种中的进化关系, 使用 MEGA 7.0 软件的 Neighbor-Joining 法对 18 个物种构建系统进化树。结果显示, 软体动物聚为一支, 无脊

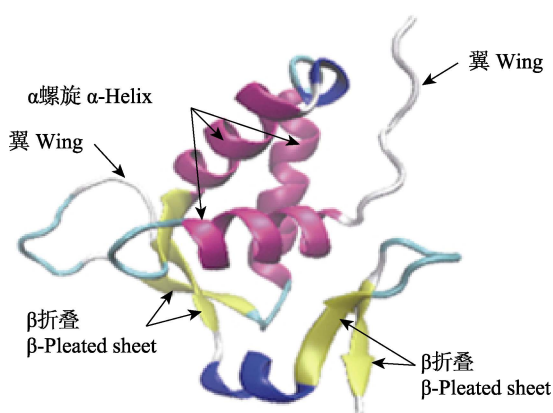


图1 *PyFoxl2* 叉头保守区推测的三维结构

Fig.1 Schematic structure of *PyFoxl2* forkhead domain

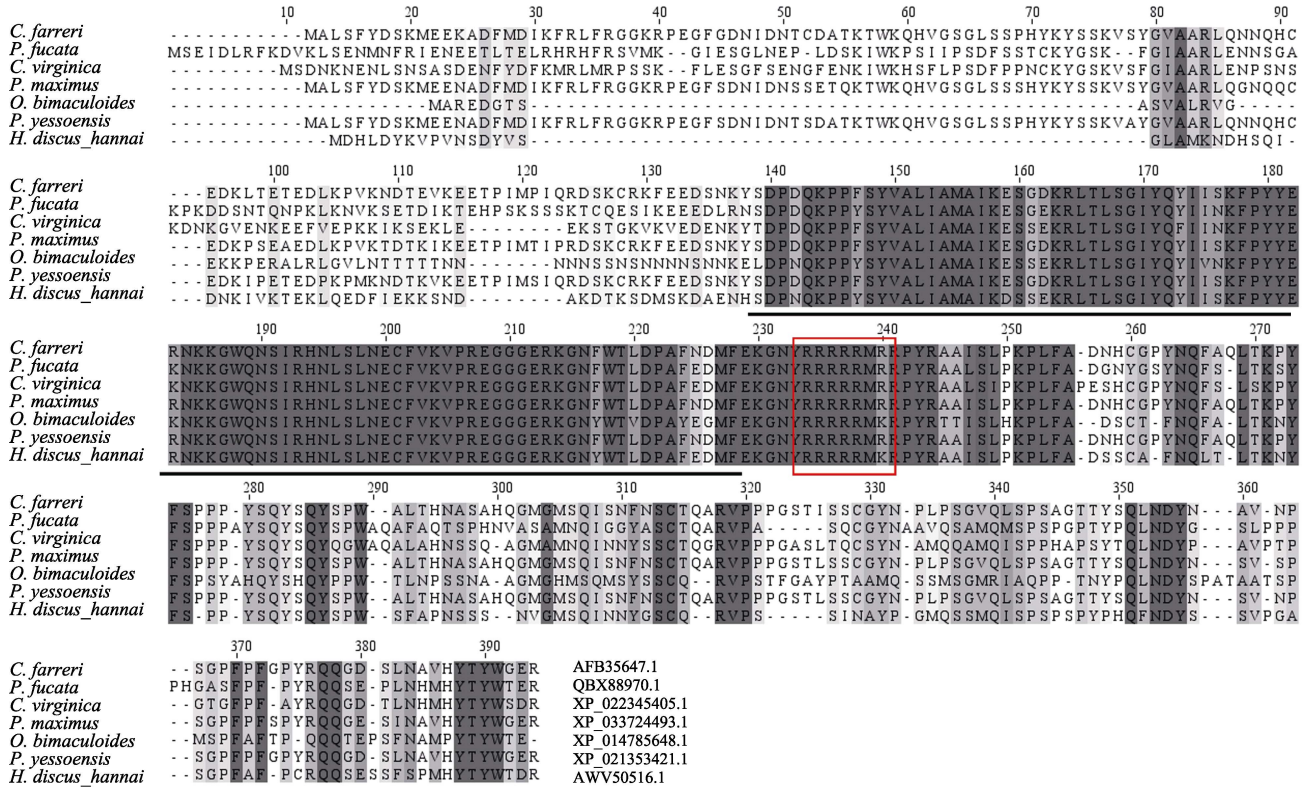


图 2 虾夷扇贝 *Foxl2* 与其他物种的同源性序列比对

Fig.2 *Foxl2* homologous sequence alignment between yesso scallop and other species

横线为 FH 结构域, 红色的框为核定位信号序列

物种 NCBI 登录号。栉孔扇贝: AFB35647.1; 合浦珠母贝: QBX88970.1; 美洲牡蛎: XP_022345405.1; 欧洲大扇贝: XP_033724493.1; 加州双斑蛸: XP_014785648.1; 虾夷扇贝: XP_021353421.1; 皱纹盘鲍: AWW50516.1。

横线为 DM 结构域, 红色的框为核定位信号序列

Species NCBI Login No. *C. farreri*: AFB35647.1; *P. fucata*: QBX88970.1; *C. virginica*: XP_022345405.1; *P. maximus*: XP_033724493.1; *O. bimaculoides*: XP_014785648.1; *P. yessoensis*: XP_021353421.1; *H. discus hannai*: AWW50516.1

The horizontal line is the forkhead domain, and the red box is the nuclear localization signal sequence

椎动物软体动物聚为一支, 节肢动物门单独分出一支。其中, 虾夷扇贝先与栉孔扇贝、长牡蛎、合浦珠母贝 (*Streptodera trachelostropha*) 等聚为一支, 这显示它们的亲缘关系较近, 形成的独立分支再与三角帆蚌聚为一支, 最后与脉红螺 (*Rapana venosa*) 聚为一支, 为软体动物门 (Mollusca) (图 3)。

2.4 *PyFoxl2* 在各组织中的表达

RT-PCR 分析 *PyFoxl2* 在虾夷扇贝生长期不同组织中的表达。结果显示, 在鳃、肾、肝胰腺中都可检测到少量 *PyFoxl2* 转录本的存在, 但在外套膜、闭壳肌中未见表达。 *PyFoxl2* 在卵巢中的表达量最高, 其表达量显著高于精巢 (图 4)。

2.5 *PyFoxl2* 在性腺发育不同时期的相对表达量

通过 qRT-PCR 分析构建了 *PyFoxl2* 在虾夷扇贝

性腺发育的时空表达模型。结果显示, *PyFoxl2* 在精巢的性腺发育周期中呈下降趋势; 在卵巢中呈先上升后下降的趋势, 其中, 在成熟期达到最大值 (图 5)。

2.6 *PyFoxl2* mRNA 在性腺组织中的细胞学定位

原位杂交结果显示, *PyFoxl2* 定位于所有生殖细胞的细胞质。在卵巢中, 与阴性对照组相比, *PyFoxl2* mRNA 在各时期的性腺分化细胞中均检测到阳性信号。其中, 卵原细胞的阳性信号最弱 (图 6A1~A2)。 *PyFoxl2* 卵巢增殖期的阳性信号弱于生长期和成熟期。在精巢中, 与阴性对照组相比, *PyFoxl2* 在精原和精母细胞中的表达呈阳性。在成熟期精巢中, 阳性信号随着生殖细胞的分化而逐渐减弱, 精子中没有检测到信号 (图 6B1~B4)。

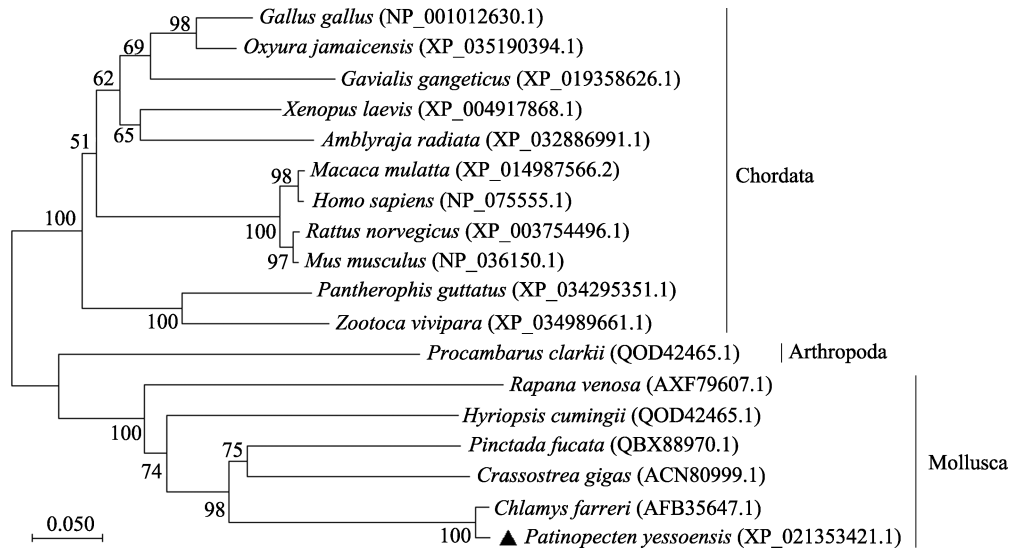


图 3 不同物种 Foxl2 蛋白系统进化分析

Fig.3 Phylogenetic analysis of Foxl2 protein from different species

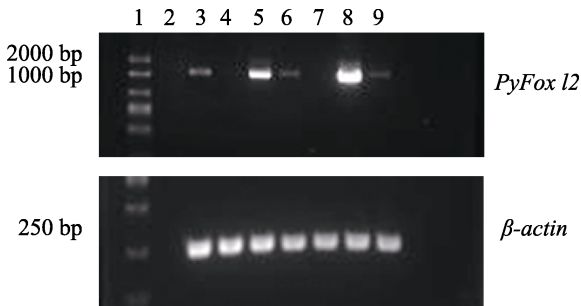


图 4 *PyFoxl2* 在不同组织中的表达

Fig.4 The expression of *PyFoxl2* in different tissues

- 1: DL 2000 marker; 2: 去离子水; 3: 鳃; 4: 外套膜;
5: 肾; 6: 肝胰腺; 7: 闭壳肌; 8: 卵巢; 9: 精巢
1: DL 2000 marker; 2: Deionized water; 3: Gill; 4: Mantle;
5: Kidney; 6: Hepatopancreas; 7: Adductor muscle;
8: Ovary; 9: Testis

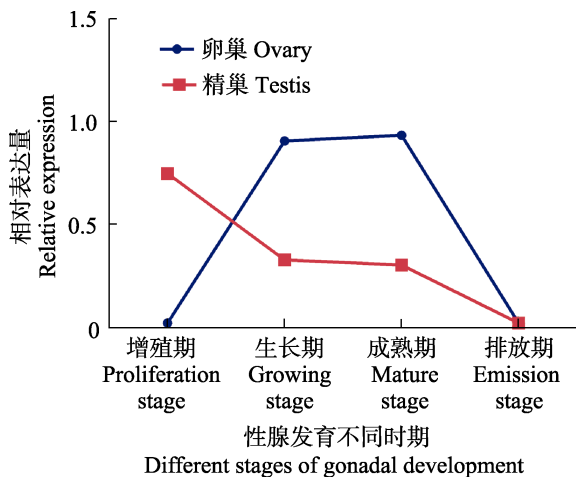


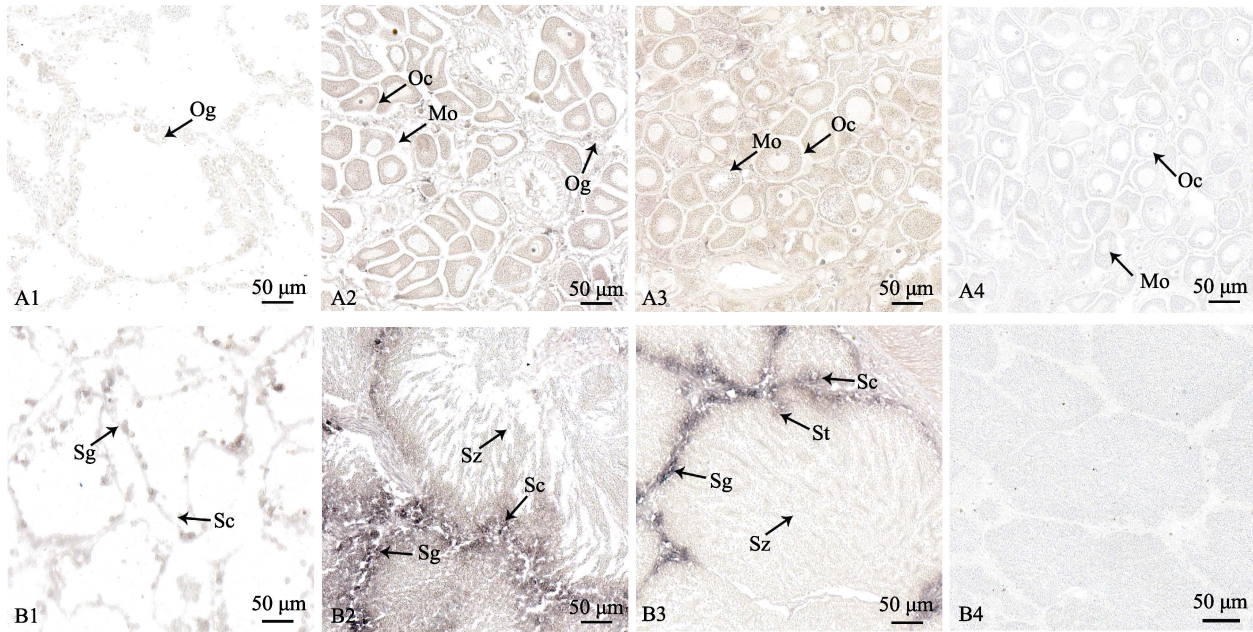
图 5 *PyFoxl2* 在虾夷扇贝性腺发育的时空表达模式

Fig.5 The expression pattern of *PyFoxl2* in gonadal development of *P. yessoensis*

3 讨论

本研究分析了 *PyFoxl2* 的序列, 发现其含有 *Fox* 基因家族的 FH 保守结构域序列特征。*Fox* 家族都含有一个叉头样 DNA 结合区域, 该叉头结构由 90 个氨基酸组成(曲中玉等, 2006), 包含 3 个 α 螺旋、4 个 β 折叠和 2 个翼状结构。其 α 螺旋与靶基因 DNA 双螺旋大沟结合, 其 β 折叠则与小沟结合(Fan *et al*, 2011), 以调控靶基因的表达。*Foxl2* 是一个转录因子, 该蛋白只有通过核膜进入细胞核内后, 才能发挥其调控作用, 而核定位信号序列是核内功能蛋白进入细胞核的结构基础, 是一些蛋白进入细胞核内的必要片段。通过序列对比发现, 在虾夷扇贝中发现的疑似核定位信号为 RRRRRMRR, 不同物种 *Foxl2* 的叉头框保守区都存在这个核定位信号序列。人(*Homo sapiens*) *Foxl2* 蛋白也在保守区的 C 端具有一段精氨酸和赖氨酸区(RRRRRMKR), 即 *Foxl2* 蛋白的细胞核定位信号序列, 参与该蛋白由细胞质进入细胞核的调控(Beysen *et al*, 2008), 该区域序列的突变将导致 *Foxl2* 转录因子不能顺利地进行亚细胞定位, 只能聚集在细胞核外, 影响其功能的正常发挥。虾夷扇贝 *Foxl2* 转录因子的疑似核定位信号如何引导其进入细胞核内并发挥功能有待今后进一步探讨。

对于不同物种的比较表明, *Foxl2* 主要在卵巢中表达。除此之外, 有学者在硬骨鱼类的脑垂体和鳃中检测到少量的表达, 并认为 *Foxl2* 在脑-垂体-性腺轴中具有潜在的作用(Alam *et al*, 2008; Wang *et al*, 2004)。本研究通过 RT-PCR 在虾夷扇贝鳃、肾和肝胰

图 6 *PyFoxl2* 在虾夷扇贝性腺发育不同时期的细胞学定位Fig.6 Cytological localization of *PyFoxl2* at different stages of gonadal development in *P. yessoensis*

A: 卵巢; B: 精巢; 1: 增殖期; 2: 生长期; 3: 成熟期; 4: 阴性对照

Mo: 成熟卵; Oc: 卵母细胞; Og: 卵原细胞; Sc: 精母细胞; Sg: 精原细胞; St: 精细胞; Sz: 精子

A: Ovary; B: Testis; 1: Proliferation stage; 2: Growing stage; 3: Mature stage; 4: Negative control;

Mo: Mature eggs; Oc: Oocyte; Og: Oogonium; Sc: Spermatocyte; Sg: Spermatogonium; St: Sperm cells; Sz: Sperm

腺中都检测到 *PyFoxl2* 转录本的存在。也有学者在三角帆蚌的研究中发现, *Foxl2* 在性腺、鳃、闭壳肌、足部、外套膜和肾脏中均有表达, 在卵巢的表达水平显著高于精巢(Wang *et al.*, 2020)。在栉孔扇贝的肝胰腺有微弱的表达(刘晓玲, 2012)。以上研究提示, *Foxl2* 基因功能不仅限于性腺和脑垂体方面, 可能在其他组织中也具有一定的功能。

Loffler 等(2003)研究认为, 小鼠在性别决定后, *Foxl2* 的表达立即上调, 促进卵巢分化。本研究通过对虾夷扇贝性腺发育不同时期的时空表达分析发现, *PyFoxl2* 在卵巢增殖期到生长期的表达量显著增加, 维持在成熟期, 而处于增殖期的虾夷扇贝性腺几乎可以判断出性别(高悦勉等, 2007)。因此, 推断 *PyFoxl2* 可能也是在虾夷扇贝性别决定后表达上调。在精巢中, 其表达量整体呈下降趋势。这个研究结果与长牡蛎中的相一致, 在长牡蛎性腺中, 生长期卵巢的表达量是精巢的 8 倍(Naimi *et al.*, 2009)。长牡蛎性腺是一个季节性发育的非持续表达的器官, 配子每年从生殖细胞开始增殖、分化、成熟。随着性腺小管的生长和分支, 它们通过周围的结缔组织扩散, 然后, 结缔组织退化(Berthelin *et al.*, 2001; Fabioux *et al.*, 2004)。 *Foxl2* 在虾夷扇贝卵巢中的表达量随着性腺的发育呈先上升后下降的趋势, 这个结果进一步证明 *Foxl2* 基

因的表达与卵细胞分化息息相关。而原位杂交阳性信号变化验证了 *Foxl2* 在卵巢发育中的周期性表达变化。此外, 通过原位杂交定位技术发现, *PyFoxl2* 仅定位在虾夷扇贝的生殖细胞中, 在成熟卵和卵母细胞中均检测到强阳性信号; 随着雄性生殖细胞的逐级分化, 阳性信号减弱。这个结果也与长牡蛎的一致, Naimi 等(2009)认为这一结果可能提示 *Foxl2* 基因在长牡蛎精巢发育成熟过程中也有一定的作用。而在栉孔扇贝中, *Foxl2* 不仅定位在生殖细胞中, 在体细胞中也有阳性信号(刘晓玲, 2012)。由此推测, *Foxl2* 对虾夷扇贝卵巢发育的调控起更重要的作用。

参 考 文 献

- ALAM M A, KOBAYASHI Y, HORIGUCHI R, *et al.* Molecular cloning and quantitative expression of sexually dimorphic markers *Dmrt1* and *Foxl2* during female-to-male sex change in *Epinephelus merra*. *General and Comparative Endocrinology*, 2008, 157(1): 75–85
- BAO X B, LIU W D, JIANG B, *et al.* Expression stability of reference genes for quantitative PCR in Japanese scallop *Patinopecten yessoensis*. *Fisheries Science*, 2011, 30(10): 603–608 [鲍相渤, 刘卫东, 姜冰, 等. 内参基因在虾夷扇贝定量 PCR 中表达稳定性的比较. *水产科学*, 2011, 30(10): 603–608]

- BERTHELIN C H, LAISNEY J, ESPINOSA J, *et al.* Storage and reproductive strategy in *Crassostrea gigas* from two different growing areas (Normandy and the Atlantic coast, France). *Invertebrate Reproduction and Development*, 2001, 40(1): 79–86
- BEYSEN D, MOUMN L, VEITIA R, *et al.* Missense mutations in the forkhead domain of *Foxl2* lead to subcellular mislocalization, protein aggregation and impaired transactivation. *Human Molecular Genetics*, 2008, 17(13): 2030–2038
- BOULANGER L, PANNETIER M, GALL L, *et al.* *Foxl2* is a sex determining gene in the goat. *Current Biology*, 2014, 24(4): 404–408
- ELLSWORTH BS, EGASHIRA N, HALLER J L. *Foxl2* in the pituitary: Molecular, genetic, and developmental analysis. *Molecular Endocrinology*, 2006, 20(11): 2796–2805
- ESCALIER D, ELOY L, GARCHON H J. Sex specific gene expression during meiotic prophase I: Xlr (X linked, lymphocyte regulated), not its male homologue Xmr (Xlr-related, meiosis regulated), is expressed in mouse oocytes. *Biology of Reproduction*, 2002, 67: 1646–1652
- FABIOUX C, POUVREAU S, LE ROUX F, *et al.* The oyster vasa-like gene: A specific marker of the germline in *Crassostrea gigas*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2004, 315(4): 897–904
- FAN J Y, HAN B, QIAO J, *et al.* Functional study on a novel missense mutation of the transcription factor *Foxl2* causes blepharophimosis-ptosis-epicanthus inversus syndrome (BPES). *Mutagenesis*, 2011, 26(2): 283–289
- GAO Y M, TIAN B, YU Y G, *et al.* The gonadal development and reproductive cycle of Japanese scallop *Patinopecten yessoensis* in Tahe Bay in Dalian. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2007, 22(5): 335–339 [高悦勉, 田斌, 于永刚, 等. 大连塔河湾海区虾夷扇贝的性腺发育与繁殖规律. *大连水产学院学报*, 2007, 22(5): 335–339]
- LI R J, ZHANG L L, LI W R, *et al.* *Foxl2* and *Dmrt1L* are Yin and Yang genes for determining timing of sex differentiation in the bivalve mollusk *Patinopecten yessoensis*. *Frontiers in Physiology*, 2018, 9: 01166
- LI Y P, ZHANG L L, SUN Y, *et al.* Transcriptome sequencing and comparative analysis of ovary and testis identifies potential key sex-related genes and pathways in scallop *Patinopecten yessoensis*. *Marine Biotechnology*, 2016, 18: 453–465
- LIU X L. Molecular cloning, expression pattern and function analysis of *Cf-foxl2* in the scallop *Chlamys farreri*. Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2012 [刘晓玲. 栉孔扇贝 *Cf-foxl2* 基因的克隆、表达模式及功能初探. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2012]
- LOFFLER K L, ZARKOWER D, KOOPMAN P, *et al.* Etiology of ovarian failure in blepharophimosis-ptosis-epicanthus inversus syndrome: *Foxl2* is a conserved, early-acting gene in vertebrate ovarian development. *Endocrinology*, 2003, 144(7): 3237–3243
- MAJOR A T, AYERS K, CHUE J, *et al.* *Foxl2* antagonises the male developmental pathway in embryonic chicken gonads. *Journal of Endocrinology*, 2019, 243(3): 211–228
- NAIMI A, MARTINEZ A S, SPECQ M L, *et al.* Molecular cloning and gene expression of *Cg-Foxl2* during the development and the adult gametogenetic cycle in the oyster *Crassostrea gigas*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2009, 154: 134–142
- OSHIMA Y, UNO Y, MATSUDA Y, *et al.* Molecular cloning and gene expression of *Foxl2* in the frog *Rana rugosa*. *General and Comparative Endocrinology*, 2008, 159(2/3): 170–177
- OTTOLENGHI C, PELOSI E, TRAN J, *et al.* Loss of *Wnt4* and *Foxl2* leads to female-to-male sex reversal extending to germ cells. *Human Molecular Genetics*, 2008, 16(23): 2795–2804
- QU Z Y, CHEN Z J. *Foxl2*: A transcription factor related with infertility. *Reproduction and Contraception*, 2006, 26(1): 40–43 [曲中玉, 陈子江. *Foxl2*—不孕有关的转录因子. *生殖与避孕*, 2006, 26(1): 40–43]
- UHLENHAUT N H, TREIER M. Forkhead transcription factors in ovarian function. *Reproduction*, 2011, 142(4): 489–495
- WANG D S, KOBAYASHI T, ZHOU L Y, *et al.* Molecular cloning and gene expression of *Foxl2* in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2004, 320(1): 83–89
- WANG G L, DONG S S, GUO P F, *et al.* Identification of *Foxl2* in freshwater mussel *Hyriopsis cumingii* and its involvement in sex differentiation. *Gene*, 2020, 754: 144853
- YE R H, RE H B. Molecular cloning and gene expression of *foxl2* and *sox14* gene from *Hyriopsis cumingii*. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2018, 49(1): 160–167 [叶容晖, 任海波. 三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii*)叉头蛋白 2 (*foxl2*)基因和性别决定框 14 (*sox14*)基因克隆与表达分析. *海洋与湖沼*, 2018, 49(1): 160–167]

Expression Pattern of the *Foxl2* Gene in the Scallop *Patinopecten yessoensis* during Development

ZHAO Dan^{1,2}, ZHOU Liqing^{1,2①}, ZHENG Yanxin⁵, SUN Xiujun², WU Biao²,
LIU Zhihong², WU Zhou^{2,3}, WU Lei^{2,4}

(1. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Qingdao, Shandong 266071, China; 3. National Engineering Research Center for Marine Aquaculture, Zhejiang Ocean University, Zhoushan, Zhejiang 316022, China; 4. College of Marine Science and Fisheries, Jiangsu Ocean University, Lianyungang, Jiangsu 222005, China; 5. Changdao Enhancement and Experiment Station, Chinese Academy of Fishery Sciences, Yantai, Shandong 265800, China)

Abstract *Foxl2*, an important member of the *Fox* (forkhead transcription factor) gene family, plays an important role in ovarian development and sex regulation. To explore the mode of expression regulation in the sex differentiation of the scallop *Patinopecten yessoensis*, we analyzed the *Foxl2* gene sequence characteristics of *P. yessoensis* using bioinformatics methods, and the expression of *Foxl2* in different tissues was detected *via* semi-quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-PCR). Quantitative RT-PCR and *in situ* hybridization revealed the temporal and spatial expression changes of *Foxl2* in the four stages of gonadal development (proliferation, growth, maturation, and emission stage). The results showed that the *Foxl2* sequence of *P. yessoensis* contains the FH domain shared by the *Fox* gene family, and the multiple sequence comparison analysis showed that *P. yessoensis* has the highest similarity with *Chlamys farreri* and *Pecten maximus* (98% and 96%, respectively). The phylogenetic tree analysis showed that the *Foxl2* gene is highly conserved in different species and in the process of evolution. The results of the quantitative analysis and *in situ* hybridization showed that the positive signal of the *in situ* hybridization was mainly located in the cytoplasm of the germ cells. A small amount of *PyFoxl2* transcripts were detected in the gills, kidneys, hepatopancreas, and testes. The expression level of *Foxl2* was the highest in the ovary and peaked in the mature stage of the ovary. In contrast, with the development of the testis and the gradual differentiation of the male gametes, the expression of *Foxl2* showed a declining trend, which is consistent with the results of the *in situ* hybridization. In conclusion, *Foxl2* may play a key role in the ovarian development of *P. yessoensis*. It is a key gene in the regulation of sex differentiation in female *P. yessoensis*. This study provides a theoretical basis for advancing our understanding of the sex differentiation and gonadal development of *P. yessoensis*.

Key words *Patinopecten yessoensis*; *Foxl2*; Real-time quantitative PCR; *in situ* hybridization; Gonadal development

① Corresponding author: ZHOU Liqing, E-mail: zhoulq@ysfri.ac.cn