

DOI: 10.12264/JFSC2022-0417

牙鲆 *foxl3* 的分子特征、亚细胞定位及组织表达

武宁宁¹, 刘翠¹, 汪惟超¹, 张俊玲^{1, 2, 3}

1. 上海海洋大学, 水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306;
2. 上海海洋大学, 水产动物遗传育种中心上海市协同创新中心, 上海 201306;
3. 上海海洋大学, 国家海洋生物科学国际联合研究中心, 上海 201306

摘要: 为明确牙鲆(*Paralichthys olivaceus*) *foxl3* 的结构和功能, 通过 PCR 克隆和测序获得了牙鲆 *foxl3* 的编码区(coding sequence, CDS)和 3'非编码区(untranslated region, UTR), 共 1089 bp, 其中开放阅读框(open reading frame, ORF) 750 bp, 编码 249 个氨基酸。Foxl3 二级结构包含一个 FH (Forkhead)结构域; 三级结构则包含 20.48%的 α 螺旋、15.26%的延伸链和 64.26%的无规则卷曲, 不均匀分布在蛋白多肽链上。比较多种生物 Foxl3 氨基酸序列发现, 牙鲆 Foxl3 与其他鱼类相似度较高, 其中与大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)同源性最高, 达到 91.97%, 与斑马鱼(*Danio rerio*)的同源性最低, 仅为 66.27%。通过氨基酸序列比对发现, 与 Foxl2 相比, Foxl3 在不同物种之间的差异更为显著, 说明 *foxl3* 的进化速度比 *foxl2* 快。亚细胞定位显示, Foxl3 细胞融合蛋白在细胞核和细胞质中表达。实时荧光定量 PCR 检测结果显示 *foxl3* 在牙鲆卵巢中表达量最高, 显著高于精巢等其他组织, 暗示 *foxl3* 可能在牙鲆卵巢发育与分化中具有重要意义。

关键词: 牙鲆; *foxl3*; 分子特征; 亚细胞定位; 组织表达

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005–8737–(2023)04–0406–09

Forkhead box L3 (*foxl3*)是 FOX (Forkhead box) 转录因子超家族的成员, 该家族在调控细胞发育、代谢、凋亡、增殖以及分化等方面具有重要作用^[1-2]。根据 DNA 结合区的氨基酸序列, 该家族可分为 A-S 几个亚家族^[3]。其中 Forkhead box L2 (*foxl2*)是这个家族的重要成员, 是芳香化酶启动子的上游调控因子, 参与卵巢的分化和功能的维持^[4]。在许多硬骨鱼类中, *foxl2* 有 2 个旁系同源基因, *foxl2a* (*foxl2*)和 *foxl2b* (*foxl3*), 这两个旁系同源基因被认为是鱼类特有的两个副本, 在性别分化和性腺发育的调控中发挥着重要作用^[5]。

关于 *foxl2* 的研究开展得比较多, 如常见的青鳉(*Oryzias latipes*)^[6]、斑马鱼(*Danio rerio*)^[7]、虹鳉(*Onchorhynchus mykiss*)^[8]、尼罗罗非鱼(*Oreochromis*

niloticus)^[9]、网纹石斑鱼(*Epinephelus merra*)^[10]以及牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)^[11]等。*foxl2* 主要通过脑–垂体–性腺轴来发挥作用, 是目前发现的脊椎动物卵巢决定和分化的最早标志性启动因子^[12]。在青鳉中研究证实, *foxl3* 作为一个开关基因, 参与了由 *rec8a* (减数分裂重组蛋白 a)和 *fbxo47* (F-box 蛋白 47)调节的两条独立的卵子发生途径, 从而调节卵泡的生成^[13-14]。Dai 等^[15]通过对尼罗罗非鱼转录组测序表明, *foxl3* 在雌性罗非鱼孵化后 30 d 的卵巢中表达最高, 在精巢中不表达。但在其他许多鱼类物种中, *foxl3* 则在精巢中的表达高于在卵巢中的表达, 例如大西洋鲑(*Salmo salar*)^[16]、欧洲鲈(*Dicentrarchus labrax*)^[17]、黄鳝(*Monopterus albus*)^[18]等。在黄鳝性逆转过程中,

收稿日期: 2022-12-15; 修订日期: 2023-02-17.

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31972772); 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室开放课题项目(ZZ-A11).

作者简介: 武宁宁(1995–), 女, 硕士, 研究方向为鱼类遗传与发育. E-mail: wnn0916@163.com

通信作者: 张俊玲, 博士, 教授, 研究方向为鱼类遗传与发育. E-mail: jlzhang@shou.edu.cn

foxl3 在性腺中表达量逐渐升高,但在精巢中的表达水平显著高于卵巢中^[18]。研究发现在日本鳗鲡 (*Anguilla japonica*)中, *foxl3* 在雄性中的表达显著高于雌性,表明 *foxl3* 可能在其性别决定中起着重要的作用^[19]。这些结果表明,在硬骨鱼类中 *foxl3* 的表达模式和功能存在较大差异。研究表明, *foxl3* 可能在硬骨鱼类卵母细胞减数分裂的起始阶段发挥作用,或者在精巢发育后期和精巢成熟过程中调节雄性特异性基因^[20-21]。总之, *foxl2* 在很多鱼类中已被研究,而 *foxl3* 在鱼类性别分化与发育中的功能,目前仍需要进一步研究^[5]。

牙鲆又称“左口鱼”、“比目鱼”,隶属鲽形目,是一种广泛分布于亚洲海岸的海水经济鱼类,其肉质细腻鲜美,营养价值丰富。在其生长发育过程中,雌鱼生长较快,个体明显大于雄鱼^[22-23]。因此,研究牙鲆的性腺分化与发育机制具有重要的意义。本研究通过 PCR 克隆和测序确认了牙鲆 *foxl3* 的 cDNA 序列,通过生物信息学分析了其分子特征和系统进化,通过实时荧光定量 PCR 技术研究了该基因在牙鲆各个组织的分布情况,应用亚细胞定位技术对其进行了定位分析,以期为进一步深入探讨 *foxl3* 在牙鲆性腺中的作用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

本实验所用牙鲆成鱼[(体重 660±50) g]采购于上海江杨水产市场。无菌环境下解剖获得牙鲆脑、心脏、肾脏、肝脏、胃、肌肉、精巢、卵巢、鳃和肠组织,经焦碳酸二乙酯(DEPC)水冲洗干净,在 TRizol 中匀浆提取总 RNA。

1.2 方法

1.2.1 RNA 的提取与 cDNA 的合成 用 TRizol 法进行牙鲆各组织总 RNA 的提取,分别用 NanoDrop 2000C (Theemo Scientific, 美国)和 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量和完整性。用 PrimerScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒(全式金,中国)反转录合成 cDNA 的第一条链。将 cDNA 稀释 5 倍置于-20 ℃保存。

1.2.2 牙鲆 *foxl3* 的分子克隆 通过查询 NCBI 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>),获得了预测的牙鲆 *foxl3* cDNA 序列(XM_020083018.1),该 cDNA 序列包括完整的开放阅读框(open rean-ding frame, ORF)和部分 3'非编码区(untranslated region, UTR)。根据查询的 cDNA 序列,设计 2 对特异性引物来进行 PCR 扩增并测序(表 1)。

表 1 实验所用引物序列
Tab. 1 Primers used in this study

引物名称 primer name	序列 (5'-3') sequence (5'-3')	用途 application
<i>foxl3</i> -F1	ATGTTTGATAACACCCACTACCCC	序列验证 sequence confirm
<i>foxl3</i> -R1	TCACAGAGTCCAGAAGTGCAGG	
<i>foxl3</i> -F2	GAACATGAGAGGAAAGAAACAAAGAG	
<i>foxl3</i> -R2	TGTATTTACATATATATATACATATATATATAAACCTATACTCTAC	
<i>foxl3</i> -qPCR-F	CAGCACTGACGAGGACAAGA	实时荧光定量
<i>foxl3</i> -qPCR-R	GTTGTGGCTTTCCAGAGGGT	Quantitative Real-time PCR
<i>foxl3</i> -F	TCGAGCTCAAGCTTCGAATTCATGTTTGATAACACCCACTACCCC	亚细胞定位
<i>foxl3</i> -R	GTACCGTCGACTGCAGAATTCTCACAGAGTCCAGAAGTGCAGG	subcellular localization
<i>18s</i> -F	CTGAGAAACGGCTACCACAG	实时荧光定量
<i>18s</i> -R	CAGCAACTTTAAGATACGC	Quantitative Real-time PCR

1.2.3 *foxl3* 生物信息学分析 用 DNAMAN 软件对克隆测序获得的 cDNA 序列进行比对与拼接,通过 ExPASy-ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>)在线分析牙鲆 Foxl3 的理化性质、疏水

性和等电点等;利用 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)网站在线预测其蛋白质二级结构、SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>)预测三级结构;利用 MEGA5.1 进行多序列比对,使

用 NJ 邻接法构建系统进化树。

1.2.4 pmir-pEGFP-N1-Foxl3 载体构建 利用 *EcoR* I 限制性内切酶对真核表达载体 pEGFP-N1 (Promega, 美国)进行酶切, 使用诺唯赞网站设计带有酶切位点和同源臂的特异性引物(表 1), 进行 PCR 扩增, 经 1%琼脂糖凝胶电泳检测得到目的条带。利用无缝克隆将目的片段与酶切后 pEGFP-N1 载体进行连接并转化, 得到重组质粒 pmir-pEGFP-N1-foxl3, 以含卡那霉素的 LB 培养基进行抗性筛选, 经菌液 PCR 鉴定无误后, 将菌液送至苏州安升达公司测序。测序无突变后进行扩大培养, 按照质粒提取试剂盒(Omega, 美国)说明书对重组质粒进行提取, 同时对重组质粒进行酶切验证。

1.2.5 细胞培养及转染 HEK-293T 细胞(人类胚胎肾细胞)来自本实验室储存, 培养于 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中。提前将生长状态良好的 293T 细胞均匀铺置在 6 孔板中, 待细胞密度达到 80% 左右时, 使用 LipfectamineTM 3000 reagent 转染试剂(Invitrogen, 美国)将上述重组质粒 pmir-pEGFP-N1-foxl3 转染进 293T 细胞中, 做好标记放回培养箱中继续培养。

1.2.6 Foxl3 亚细胞定位 待转染 36 h 之后, 吸出孔板中原有的培养基, 并用 PBS 轻轻洗涤细胞 3 次; 室温下, 用预冷的 4%多聚甲醛固定 20 min; 弃去多聚甲醛, 用 PBS 洗涤 3×2 min, 加入 DAPI 静置 10 min; 吸除 DAPI 再以 PBS 洗涤细胞 3 次, 每次 10 min, 并通过荧光倒置显微镜(OLYMPUS, 日本)观察。

1.2.7 foxl3 表达分析 根据获得的 *foxl3* cDNA 序列, 利用 Prime 5.0 设计牙鲈 *foxl3* 和内参基因 18S 的定量引物(表 1)。首先通过 Bio-Rad CFX96 荧光定量仪绘制关于牙鲈 *foxl3* 和内参基因 18S 的标准曲线, 当扩增效率在 90%至 110%范围内, 进行定量检测。反应体系(20 μL)为: 2×ChamQ Universal SYBR Qpcr Master Mix 10 μL, 上游引物和下游引物各 0.4 μL, cDNA 1 μL, RNase-free water 8.2 μL。反应条件为: 95 °C 3 min, 95 °C 5 s, 57 °C 30 s, 40 个循环, 65~95 °C 每个循环增

加 0.5 °C 需 5 s。每个样品设置 3 个技术重复和 3 个生物学重复, 荧光定量数据用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法来计算。

1.2.8 数据统计分析 所有数据均表示为平均值±标准误($\bar{x}\pm SE$), 采用 SPSS 19.0 进行统计学分析, 用 GraphPad Prism 7 软件进行作图, $P<0.05$ 时视为差异显著。

2 结果与分析

2.1 牙鲈 *foxl3* 的分子特性与系统进化特征

2.1.1 牙鲈 *foxl3* 的序列特征与理化性质 经 PCR 克隆得到牙鲈 *foxl3* 编码区(coding sequence, CDS)和 3'UTR 区, 共 1089 bp, 包括 750 bp 的开放阅读框和 289 bp 的 3'UTR, 该序列编码 249 个氨基酸(Aa), 含 20 种常见的 Aa, 其中脯氨酸的含量最高, 达到 10.4%, 其次为丝氨酸、精氨酸和天冬酰胺, 含量分别为 9.2%、7.6%以及 7.2% (图 1)。第 30~124 个 Aa 是 *foxl3* 的结构域, Foxl3 蛋白带正电荷(Arg+Lys)的残基总数为 28, 负电荷(Asp+Glu)的残基总数为 24。

ExPASy-ProtParam 预测结果显示, Foxl2 蛋白分子式为 C₁₅₁₈H₂₃₂₃N₄₃₅O₄₅₁S₂₀, 分子质量为 34.52 kD, 亲水系数(hydrophilic coefficient)为-0.832, 理论等电点(theoretical isoelectric point)达到 9.21, 不稳定系数(instability coefficient)为 64.67。而 Foxl3 的分子式为 C₁₂₇₁H₁₉₃₂N₃₆₆O₃₇₅S₁₁, 分子质量为 28.70 kD, 亲水系数(hydrophilic coefficient)为-0.842, 理论等电点(theoretical isoelectric point)为 8.77, 不稳定系数(instability coefficient)为 63.85。Foxl2 和 Foxl3 蛋白均属于不稳定酸性疏水蛋白。

Foxl2 蛋白二级结构包含 1 个 Forkhead 家族(FH superfamily)结构域和 3 个低复杂功能结构域, 而 Foxl3 蛋白只含有一个 FH 家族结构域。Foxl2 三级结构包含 16.34% α 螺旋、18.63%的延伸链和 65.03%的无规则卷曲; Foxl3 三级结构显示其包含 20.48% α 螺旋、15.26%的延伸链和 64.26%的无规则卷曲, 不均匀分布在多肽链上(图 2)。

2.1.2 牙鲈 *foxl3* 的同源性和系统进化 将牙鲈的 Foxl3 氨基酸序列与其他物种进行比对发现, 其结构域比较保守(图 3)。牙鲈的 Foxl3 氨基酸序

表 2 牙鲆 Foxl3 和 Foxl2 与其他物种氨基酸的一致性比较

Tab. 2 The amino acid sequence consistency comparison of Foxl3 and Foxl2 between *Paralichthys olivaceus* and other species

蛋白 protein	物种 species	氨基酸相似性/% amino acid similarity	登录号 accession no.
Foxl3	大菱鲆 <i>Scophthalmus maximus</i>	91.97	XM_035613877.1
Foxl3	大黄鱼 <i>Larimichthys crocea</i>	91.16	XM_019258752.2
Foxl3	尼罗罗非鱼 <i>Oreochromis niloticus</i>	89.16	XM_003438562.5
Foxl3	青鳉 <i>Oryzias latipes</i>	84.34	XM_011487873.3
Foxl3	半滑舌鲷 <i>Cynoglossus semilaevis</i>	83.52	XM_008315079.2
Foxl3	斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	66.27	NM_001195126.1
Foxl2	大菱鲆 <i>Scophthalmus maximus</i>	96.75	XM_035623781.2
Foxl2	青鳉 <i>Oryzias latipes</i>	96.41	NM_001104888.1
Foxl2	尼罗罗非鱼 <i>Oreochromis niloticus</i>	95.75	NM_001279778.1
Foxl2	黄鳝 <i>Monopterus albus</i>	95.75	XM_020586693.1
Foxl2	半滑舌鲷 <i>Cynoglossus semilaevis</i>	90.55	NM_001294199.1
Foxl2	斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	81.99	XM_021481464.1

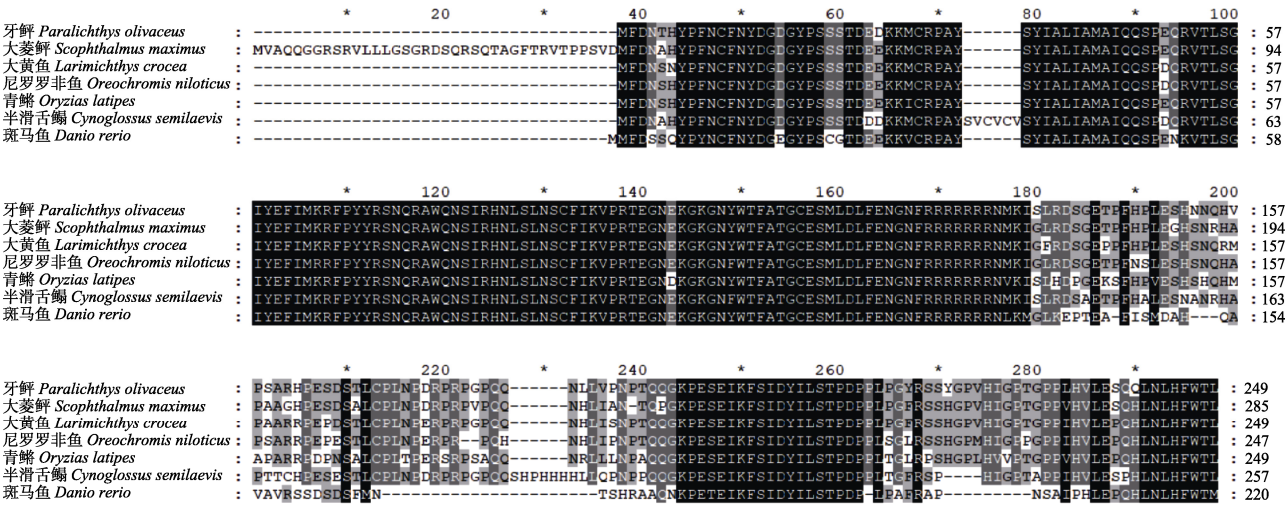


图 3 牙鲆 Foxl3 和其他物种氨基酸序列的比对分析

黑色区域代表保守的氨基酸; 灰色代表不同物种间的差异氨基酸。

Fig. 3 The amino acid sequence alignment of Foxl3 between *Paralichthys olivaceus* and other species
The black areas represent conserved amino acids. Gray represents different amino acids between species.

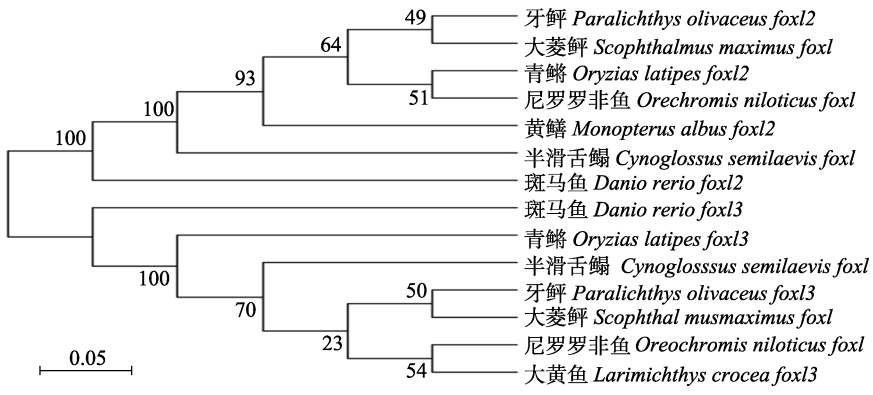


图 4 硬骨鱼类 Foxl2 和 Foxl3 蛋白的系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree of Foxl2 and Foxl3 proteins in teleost fishes

cDNA (750 bp)片段, 凝胶电泳验证结果显示获得的两条条带符合载体和目的条带大小, 表明 pmir-pEGFP-N1-*foxl3* 重组质粒构建成功(图 5)。

2.3 Foxl3 亚细胞定位

转染 36~48 h 后, 按照 DAPI 染色方法处理细胞样品, 通过荧光倒置显微镜观察可见 HEK-293T 细胞中 EGFP 蛋白为绿色, 细胞核呈蓝色, 两者蛋白的荧光不完全重合, 因此 EGFP 蛋白定位在细胞核和细胞质中; 而融合蛋白 EGFP-*foxl3* 的荧光与细胞核也不完全重合, 即定位在细胞质和细胞核中(图 6)。

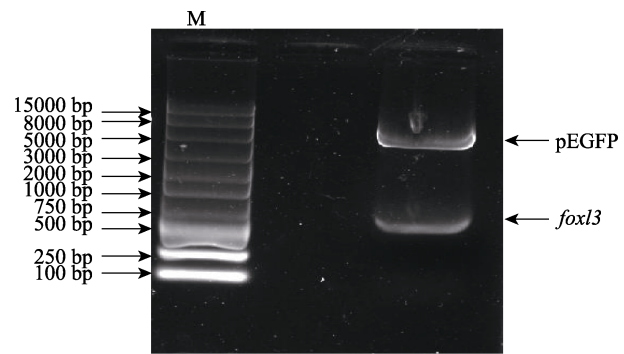


图 5 重组质粒的酶切验证结果
M: 15000 DNA Marker.
Fig. 5 Digestion verification of recombinant plasmid
M: 15000 DNA Marker.

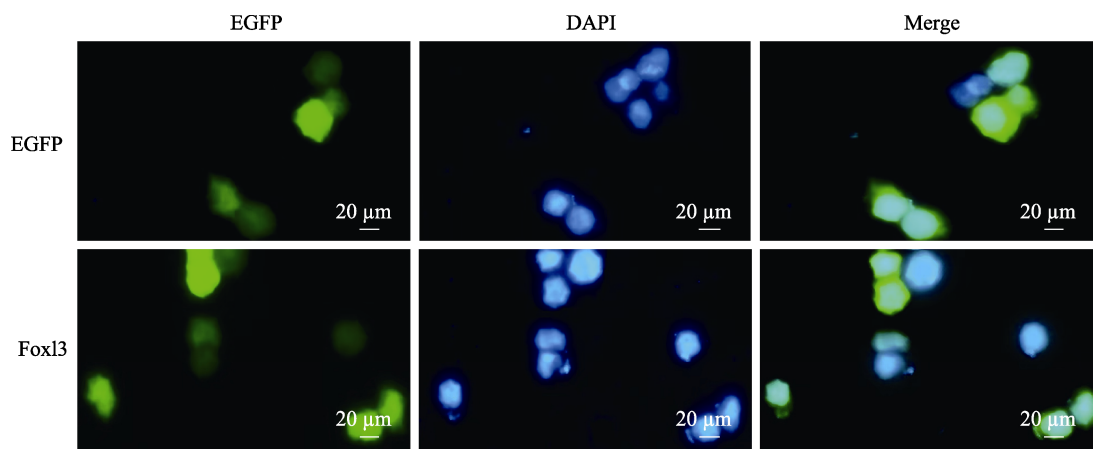


图 6 Foxl3 蛋白的亚细胞定位观察
Fig. 6 Subcellular localization observation of Foxl3 protein

2.4 foxl3 在牙鲆组织中的表达分布

实时荧光定量 PCR 结果显示, *foxl3* 在牙鲆成体的精巢、卵巢、脑、心脏、肝脏、肾脏、胃、鳃、肠和肌肉中均有表达, 但在不同组织中的表达量差异较大, 其中在卵巢中的表达量最高, 显著高于精巢以及其他组织($P<0.05$)(图 7)。

3 讨论

2004 年, Baron 等^[20]在虹鳉中发现了不同于 *foxl2* 的基因, 该基因的叉头区域属于 L2, 猜测可能是 *foxl2* 的旁系同源基因, 命名为 *foxl2b*, 又称为 *foxl3*。然而, 由于进化的原因, *foxl3* 在真兽亚纲动物中消失, 两个副本基因在硬骨鱼类中保留, 可以说 *foxl3* 作为鱼类特有的基因组副本而存在^[5,24]。在哺乳动物等高等脊椎动物中, *foxl2*

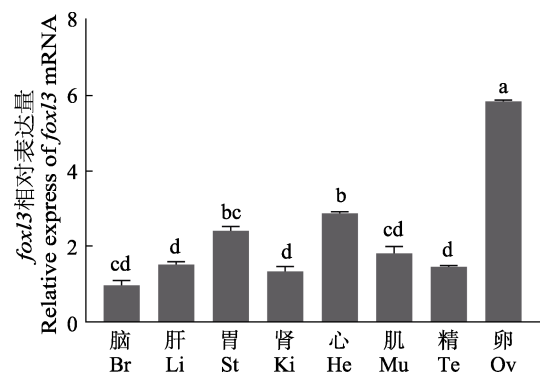


图 7 牙鲆 *foxl3* 基因的组织表达
Br: 脑; Li: 肝脏; St: 胃; Ki 肾脏; He: 心脏; Mu: 肌肉;
Gi: 鳃; In: 肠; Te: 精巢; Ov: 卵巢。
不同字母表示差异显著 ($P<0.05$)。

Fig. 7 The expression of *foxl3* gene in different tissues of *Paralichthys olivaceus*
Br: Brain ; Li: Liver; St: Stomach ; Ki: Kidney; He: Heart;
Mu: Muscle; Gi: gill; In: intestines; Te: Testis; Ov: Ovary.
Different letters indicate significant difference ($P<0.05$).

可能已经取代了鱼类和其他低等脊椎动物中 *foxl2* 和 *foxl3* 的功能^[25]。其中 *foxl2* 通常被认为是卵巢分化的标志基因, 其表达与芳香化酶一致, 芳香化酶是产生雌激素的关键, 而雄激素或者芳香化酶抑制剂能够下调雌性个体 *foxl2* 和 *foxl3* 的表达^[4,26]。

3.1 *foxl3* 的分子特征

本研究通过 PCR 克隆技术鉴定了牙鲆 *foxl3* 基因, 该基因全长 1089 bp, 开放阅读框 750 bp, 编码 249 个氨基酸, 其中脯氨酸含量最高。脯氨酸是构成蛋白质的 20 种氨基酸中唯一的亚氨基酸, 在蛋白质合成、创造健康细胞、代谢等方面发挥重要的作用。此外, 脯氨酸还是细胞内的一个关键的调节因子, 参与多种生理和生化过程^[27]。作为 FOX 家族的成员, Foxl3 与 Foxl2 结构相似, 都包含 1 个 FH 家族功能结构域, 此结构域广泛存在于各种真核生物细胞中。FH 蛋白在细胞极化、细胞分裂、细胞链接和黏附等方面发挥着重要作用。

系统进化树表明牙鲆 Foxl3 与大菱鲆、大黄鱼等硬骨鱼类聚为一支, 其中与大菱鲆的亲缘关系最近, 与 Foxl2 不属于同一分支。通过氨基酸序列比对分析发现, Foxl3 的结构域比较保守, 但综合来看, 牙鲆 Foxl2 比 Foxl3 更保守, 这与 Cocquet^[28]认为 Foxl2 在进化过程中的作用相对保守的观点是一致的。与 Foxl2 蛋白相比, 牙鲆 Foxl3 蛋白序列明显缺少部分片段, 表明 Foxl3 在不同物种之间差异显著, 进化速度是非常快的。*foxl2* 和 *foxl3* 之间的差异与鱼类中许多其他的旁系同源基因的高度保守形成明显的对比^[29]。造成这一现象的原因可能是因为副本基因 *foxl3* 功能的退化, 但是也可能是 *foxl3* 在进化过程中获得了新的功能^[20]。

3.2 *foxl3* 在鱼类中的表达分布

foxl2 和 *foxl3* 作为旁系同源基因被认为是在硬骨鱼类中所特有并且在硬骨鱼类的性腺发育中起着重要作用。研究发现, *foxl3* 在斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*) 精巢中的表达量显著高于卵巢等其他组织, 通过调节 *rec8* 或 *fbxo47* 的表达在精巢发育中起决定性作用^[30-31]。在处于自然性

逆转的黄鳝性腺中, *foxl3* 在精巢中的表达水平几乎是卵巢的 40 倍^[18]。但在青鳉中, *foxl3* 在卵巢的生殖细胞中高表达, 通过调节卵巢中减数分裂的进程, 抑制卵巢中精子的发生并促进卵泡的发育^[14,32]。在尼罗罗非鱼中, 通过原位杂交发现 *foxl3* mRNA 主要定位于卵巢卵原细胞中, 在精巢组织中则检测不到其表达^[15]。同样, 在虹鳟中, *foxl3* 在发育中的卵巢中高表达, 而在精巢中几乎检测不到 *foxl3* 的表达^[20]。而本研究与青鳉、尼罗罗非鱼和虹鳟的研究结果较为一致, *foxl3* 在牙鲆卵巢中的表达量显著高于精巢等其他组织, 呈现出明显的雌雄性别二态性。亚细胞定位结果进一步表明 Foxl3 细胞融合蛋白在细胞核和细胞质中表达, 为后续探讨 *foxl3* 在牙鲆性腺中的定位表达与功能研究提供了理论依据。

4 结论

本研究明确了牙鲆 *foxl3* 的 cDNA 序列, 并对其分子特征和系统发育进行了分析。亚细胞定位显示 Foxl3 在细胞核和细胞质中表达, 实时荧光定量 PCR 分析表明该基因主要在牙鲆的性腺组织中表达, 但呈现了明显的雌雄性别二态性, 暗示了 *foxl3* 可能在牙鲆的卵巢发育和分化过程中起着重要作用。

参考文献:

- [1] Tuteja G, Kaestner K H. Forkhead transcription factors II[J]. Cell, 2007, 131(1): 192.
- [2] Tuteja G, Kaestner K H. SnapShot: Forkhead transcription factors I[J]. Cell, 2007, 130(6): 1160.
- [3] Herman L, Todeschini A L, Veitia R A. Forkhead transcription factors in health and disease[J]. Trends in Genetics, 2021, 37(5): 460-475.
- [4] Guiguen Y, Fostier A, Piferrer F, et al. Ovarian aromatase and estrogens: A pivotal role for gonadal sex differentiation and sex change in fish[J]. General and Comparative Endocrinology, 2010, 165(3): 352-366.
- [5] Geraldo M T, Valente G T, Braz A S, et al. The discovery of Foxl2 paralogs in chondrichthyan, coelacanth and tetrapod genomes reveals an ancient duplication in vertebrates[J]. Heredity, 2013, 111(1): 57-65.
- [6] Nakamoto M, Muramatsu S, Yoshida S, et al. Gonadal sex differentiation and expression of *Sox9a2*, *Dmrt1*, and *Foxl2*

- in *Oryzias luzonensis*[J]. *Genesis* (New York, N Y: 2000), 2009, 47(5): 289-299.
- [7] Caulier M, Brion F, Chadili E, et al. Localization of steroidogenic enzymes and Foxl2a in the gonads of mature zebrafish (*Danio rerio*)[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2015, 188: 96-106.
- [8] Xu G F, Huang T Q, Jin X, et al. Morphology, sex steroid level and gene expression analysis in gonadal sex reversal of triploid female (XXX) rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2016, 42(1): 193-202.
- [9] Ijiri S, Kaneko H, Kobayashi T, et al. Sexual dimorphic expression of genes in gonads during early differentiation of a teleost fish, the Nile tilapia *Oreochromis niloticus*[J]. *Biology of Reproduction*, 2008, 78(2): 333-341.
- [10] 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*[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2008, 157(1): 75-85.
- [11] Si Y F, Ding Y X, He F, et al. DNA methylation level of *cyp19a1a* and *Foxl2* gene related to their expression patterns and reproduction traits during ovary development stages of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. *Gene*, 2016, 575(2): 321-330.
- [12] Kobayashi Y, Horiguchi R, Nozu R, et al. Expression and localization of forkhead transcriptional factor 2 (Foxl2) in the gonads of protogynous wrasse, *Halichoeres trimaculatus*[J]. *Biology of Sex Differences*, 2010, 1(1): 3.
- [13] Kikuchi M, Nishimura T, Saito D, et al. Novel components of germline sex determination acting downstream of *foxl3* in medaka[J]. *Developmental Biology*, 2019, 445(1): 80-89.
- [14] Kikuchi M, Nishimura T, Ishishita S, et al. *foxl3*, a sexual switch in germ cells, initiates two independent molecular pathways for commitment to oogenesis in medaka[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020, 117(22): 12174-12181.
- [15] Dai S F, Qi S S, Wei X Y, et al. Germline sexual fate is determined by the antagonistic action of *dmrt1* and *foxl3/foxl2* in tilapia[J]. *Development* (Cambridge, England), 2021, 148(8): dev199380.
- [16] von Schalburg K R, Yasuike M, Yazawa R, et al. Regulation and expression of sexual differentiation factors in embryonic and extragonadal tissues of Atlantic salmon[J]. *BMC Genomics*, 2011, 12: 31.
- [17] Crespo B, Lan-Chow-Wing O, Rocha A, et al. *foxl2* and *foxl3* are two ancient paralogs that remain fully functional in teleosts[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2013, 194: 81-93.
- [18] Gao Y, Jia D, Hu Q, et al. Foxl3, a target of miR-9, stimulates spermatogenesis in spermatogonia during natural sex change in *Monopterus albus*[J]. *Endocrinology*, 2016, 157(11): 4388-4399.
- [19] Wu G C, Jeng S R, Pan Y T, et al. The germline-specific expression of *Foxl3a* and its paralogous *Foxl3b* are associated with male gonadal differentiation in the Japanese eel, *Anguilla japonica*[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2019, 277: 56-65.
- [20] Baron D, Cocquet J, Xia X H, et al. An evolutionary and functional analysis of FoxL2 in rainbow trout gonad differentiation[J]. *Journal of Molecular Endocrinology*, 2004, 33(3): 705-715.
- [21] von Schalburg K R, Yasuike M, Davidson W S, et al. Regulation, expression and characterization of aromatase (*cyp19b1*) transcripts in ovary and testis of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2010, 155(2): 118-125.
- [22] Zhang H R, Li K, Zhang F Y, et al. The miR-200 family targeting *amh* affects the gonadal development of Japanese flounder[J]. *Fishes*, 2022, 7(3): 129.
- [23] Zhang Y Z, Chen S L, Wang L. Cloning, characterization, and expression analysis of a chemokine gene *CXCL9* from the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2020, 27(1): 35-45. [张永珍, 陈松林, 王磊. 牙鲆趋化因子基因 CXCL9 的克隆、鉴定与表达分析[J]. 中国水产科学, 2020, 27(1): 35-45.]
- [24] Gan R H, Wang Y, Li Z, et al. Functional divergence of multiple duplicated Foxl2 homeologs and alleles in a recurrent polyploid fish[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2021, 38(5): 1995-2013.
- [25] Sirotkin A V. Transcription factors and ovarian functions[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2010, 225(1): 20-26.
- [26] Zhang W M, Yang Y M, Peng Y L, et al. Differential synergism of *ftz-f1* homologues and Foxl2 on the activation of *Cyp19a1a* gene from rice field eel *Monopterus albus*, a protogynous hermaphroditic teleost[J]. *Biology of Reproduction*, 2010, 83(Suppl_1): 386.
- [27] Phang J M, Donald S P, Pandhare J, et al. The metabolism of proline, a stress substrate, modulates carcinogenic pathways[J]. *Amino Acids*, 2008, 35(4): 681-690.
- [28] Cocquet J. Evolution and expression of *FOXl2*[J]. *Journal of Medical Genetics*, 2002, 39(12): 916-921.
- [29] Robinson-Rechavi M, Laudet V. Evolutionary rates of

- duplicate genes in fish and mammals[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2001, 18(4): 681-683.
- [30] Lyu Q J, Hu J, Yang X K, et al. Expression profiles of dmrt and foxl3 during gonadal development and sex reversal induced by 17 α -methyltestosterone in the orange-spotted grouper[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2019, 274: 26-36.
- [31] Lin F M, Tong F, He Q, et al. In vitro effects of androgen on testicular development by the AR-foxl3-rec8/fbxo47 axis in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*)[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2020, 292: 113435.
- [32] Nishimura T, Sato T, Yamamoto Y, et al. foxl3 is a germ cell-intrinsic factor involved in sperm-egg fate decision in medaka[J]. *Science*, 2015, 349(6245): 328-331.

Molecular characteristics, subcellular localization, and tissue expression of *foxl3* from Japanese flounder

WU Ningning¹, LIU Cui¹, WANG Weichao¹, ZHANG Junling^{1, 2, 3}

1. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Germplasm Resources, Ministry of Education; Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
2. Aquatic Animal Genetic Breeding Center Shanghai Collaborative Innovation Center, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
3. International Research Center for Marine Biosciences, Ministry of Science and Technology; Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: In many teleost fishes, *foxl2a* (*foxl2*) and *foxl2b* (*foxl3*), two paragenetic homologous genes, are fish-specific copies and play important regulatory roles in biological processes such as embryonic development, metabolism, immunity, and differentiation. To clarify the structure and function of *foxl3* in *Paralichthys olivaceus*, the CDS and 3' UTR regions of *foxl3* in *Paralichthys olivaceus* were obtained by PCR cloning and sequencing, for a total of 1089 bp, including a 750 bp open reading frame. Among the 249 encoded amino acids, the content of proline was the highest. The secondary structure of *foxl3* contains a Forkhead domain. The tertiary structure contains 20.48% alpha helices, 15.26% extension chains, and 64.26% irregular coils, which are unevenly distributed on the protein polypeptide chains, and are unstable hydrophobic proteins. Comparison of the amino acid sequences of Foxl3 in various organisms showed that Foxl3 had a high similarity with that of other fishes. Among them, Foxl3 had the highest homology with *Scophthalmus maximus* (91.97%); the homology with *Danio rerio* was the lowest, at only 66.27%. Amino acid sequence alignment showed that Foxl3 had more significant differences among different species than Foxl2, indicating that *foxl3* evolved faster than *foxl2*. The secondary structure of Foxl3 contains a The phylogenetic tree results showed that the Foxl3 of *Paralichthys olivaceus* first groups with that of *Scophthalmus maximus*, and then with that of *Larimichthys crocea* and other teleost fishes, but is different from Foxl2. The results show that *Paralichthys olivaceus* is closely related to *Scophthalmus maximus*. Subcellular localization revealed that the cell fusion protein of Foxl3 is expressed in the nucleus and cytoplasm. Real-time PCR results showed that *foxl3* is expressed in all tissues of *Paralichthys olivaceus*, and the highest expression level was found in the ovary, where the expression was significantly higher than that in the testis and other tissues. In conclusion *foxl3* may play an important role in gonadal development and differentiation in *Paralichthys olivaceus*.

Key words: *Paralichthys olivaceus*; *foxl3*; molecular characteristics; subcellular localization; tissue expression

Corresponding author: ZHANG Junling. E-mail: jlzhang@shou.edu.cn