

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2013.00205

Foxl2 基因在栉孔扇贝发育过程中的表达图式

刘晓玲^{1,2}, 刘建国¹, 王丹¹, 张子炎¹, 张志峰¹

1. 中国海洋大学 海洋生物遗传育种教育部重点实验室, 山东 青岛 266003;

2. 烟台大学 生命科学学院, 山东 烟台 264005

摘要: *Foxl2* 基因在哺乳动物中是雌性相关基因, 参与卵巢发育和功能维持。本研究利用荧光定量 PCR 和原位杂交技术, 对栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)*foxl2*(*Cf-foxl2*)在发育过程中的表达图式进行了分析。研究发现 *Cf-foxl2* 在受精卵中呈低水平表达, 随着发育进行表达量增高, D 形幼虫期表达量最高, 之后表达量迅速下降。原位杂交结果显示 *Cf-foxl2* 表达量在担轮幼虫之前在体内均匀分布; 强阳性信号在担轮幼虫口凹附近呈对称分布; 至 D 形幼虫期强阳性信号主要集中在内脏团和外套膜边缘处; 之后信号消失, 直到性别分化后在卵巢中再次出现。本实验结果暗示 *Cf-foxl2* 与卵巢发育相关, 鉴于该基因在发育早期的持续性表达特征, 暗示其可能参与栉孔扇贝的早期发育过程。

关键词: 栉孔扇贝; *foxl2*; 发育; 表达

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2013)01-0205-06

Foxl2 是叉头框转录因子家族成员之一, 对该基因的研究主要集中在脊椎动物中。研究发现, *foxl2* 基因在脊椎动物的卵巢中呈高水平表达, 而在精巢中为弱表达甚至不表达, 普遍呈现性别二态性表达模式^[1]。较深入的功能研究仅在人(*Homo sapiens*)和小鼠(*Mus musculus*)中进行了报道, 该基因被确定主要与卵巢功能维持有关^[1-2]。

Foxl2 基因在动物发育过程中的研究主要体现在表达水平上, 并且启动表达的时间不尽相同。在小鼠中, *foxl2* 基因是在性别决定后的卵巢中表达, 而在鸡(*Gallus gallus*)中该基因在性别分化前便已启动表达, 研究者认为其参与了鸡的性别决定^[3], 青鳉(*Oryzias latipes*)中 *foxl2* 在卵巢开始分化后的卵巢体细胞中表达, 被认为参与卵母细胞分化^[4]。无脊椎动物中有关 *foxl2* 基因的研究报道相当有限, Tu 等^[5]通过海胆(*Strongylocentrotus purpuratus*)*foxl2* mRNA 在各期胚胎中的定

量表达结果, 推测其为合子基因, 但未能在各期胚胎中检测到相应的原位杂交信号。Naimi 等^[6]检测了太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)*foxl2* 基因在从受精后 7 d 到 4 月龄幼贝以及成体性腺组织的定量表达, 发现该基因在前述样本中均有不同程度的表达, 但未见明显的雌性高表达特征。有学者认为可能太平洋牡蛎性别组成不稳定, 导致 *foxl2* 的表达特征不明显^[6-8]。

栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)作为中国重要的海洋经济贝类, 具有相对稳定的性别组成^[9-10], 这一特点使其成为贝类性别分化相关基因筛选和鉴定的良好实验对象。笔者在前期研究中发现, 栉孔扇贝 *Cf-foxl2* 的表达特征与太平洋牡蛎的不尽相同, 但与脊椎动物类似, 也具有明显的性别二态性, 在卵巢中高水平表达^[11], 而该基因在栉孔扇贝性别分化过程中何时表达及其作用, 目前尚不清楚。本研究采用定量 PCR 和原位杂交技术,

收稿日期: 2012-07-22; 修订日期: 2012-09-21.

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(30901097); 青岛市科技计划基础研究项目(11-2-4-1-(10)-jch); 烟台大学青年基金项目(sm11zj7).

作者简介: 刘晓玲(1976-), 女, 博士, 讲师. E-mail: lxl2008i@163.com

通信作者: 张志峰, 教授. Tel: 0532-82031647 E-mail: zzfp107@ouc.edu.cn

分析了 *foxl2* 基因在栉孔扇贝发育过程中的表达特点,旨在揭示 *foxl2* 基因在栉孔扇贝发育中的表达图式,为深入探究该基因在贝类性别分化过程中的作用提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 材料

亲贝采自山东青岛市沙子口湾养殖区,实验室暂养后,阴干诱导配子排放,人工授精后于实验室水槽中培养,孵化前水温为 18℃。孵化后幼虫的培养水温为 18~20℃,担轮幼虫口沟形成(约 48 h)后投喂等鞭金藻(*Isochrysis galbana*),每天换水 1 次,每次换水量为原水量的 1/3。定期取栉孔扇贝各期胚胎(受精卵、卵裂期胚胎、囊胚、原肠胚)、幼虫(担轮幼虫、D 形幼虫、壳顶幼虫、附着前幼虫)和幼贝(壳高 6~10 mm)。

用于原位杂交实验的材料经 PBS 冲洗后,于 4%多聚甲醛(PFA)中固定过夜,梯度甲醇脱水至无水甲醇,于-20℃冰箱中保存;用于总 RNA 提取的材料用液氮冻存后保存于-80℃。每个发育时期取样 5 管,每管样本约为 200 μg。

1.2 RNA 提取及 cDNA 模板的制备

提取各期胚胎、幼虫的总 RNA^[12],并使用 DNA 酶 I (RNA-free)处理后,1%琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度法检测 RNA 的质量和浓度。按照 M-MLV 反转录试剂盒(Promega)说明进行 RNA 的反转录。将生成的 cDNA 模板保存于-20℃备用。

1.3 定量 PCR(qRT-PCR)

根据栉孔扇贝 *Cf-foxl2* 基因 cDNA 全长序列

(GenBank 注册号 JN642286)^[11]设计特异引物 P1/P2(表 1),根据栉孔扇贝 β -actin 基因 cDNA 全长序列(GenBank 注册号 AY335441)设计内参引物 A1/A2(表 1)。按照以下体系在 ABI 7500 Real-time PCR 仪上进行 PCR: 1 μL cDNA 模板(上述各期样本 cDNA 母液稀释 10 倍后使用), P1/P2 或 A1/A2(2 μmol/L)各 1 μL, 0.4 μL ROX, 10 μL 2×SYBR Green Master Mix, RNAase-free 水 6.6 μL。反应条件为: 95℃ 10 min; 40 个循环(95℃ 15 s, 60℃ 1 min),每管样本设 1 个重复。最后所得数据使用 ABI 7500 system SDS software(version 1.4, Applied Biosystems)分析。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 的方法进行数据分析,将附着前幼虫时期 *Cf-foxl2* 基因 mRNA 的表达量设定为 1 作为参照,其他各时期的相对表达量以参照的倍数表示。利用 SPSS 12.0 软件进行显著性分析(One-way ANOVA),最小显著差法(Least Significant Difference, LSD)多重检验对其进行统计分析,以 $P<0.05$ 表示显著性差异。

1.4 整体原位杂交

根据 *Cf-foxl2* 基因 cDNA 全长序列设计探针引物 P3/P4(表 1),利用 DIG RNA Labeling Kit (Roche, Mannheim, Germany)合成探针。保存于无水甲醇中的样品经梯度甲醇复水及 1×PBST(0.15 mol/L NaCl, 7.5 mmol/L Na₂HPO₄ 12H₂O, 2.5 mmol/L NaH₂PO₄ 2H₂O, 0.1% Tween-20)洗涤后,于 200 ng/mL 蛋白酶 K 中消化 30 min(37℃); 1×PBST 处理后,HB 溶液 (50%去离子甲酰胺, 100 μg/mL 酵母总 RNA, 5 mmol/L EDTA, 0.1%Tween

表 1 本实验所用引物序列
Tab.1 Primer sequences used in this study

引物 primer	引物序列(5'-3') sequence(5'-3')	扩增片段大小/bp amplification fragment size
P1	CCAGTTTGCTCAACTGACGA	103
P2	CTGATGTGCTGAGGCATTGT	
P3	TAATACGACTCACTATAGGGAGATATTGCTGACAACCACTGC (下划线为对应的 T7 启动子序列, T7 promoter sequence is underlined)	498
P4	ATTTAGGTGACACTATAGAAGGGTTCCTCGTCCACACATCTCC (下划线为对应的 SP6 启动子序列, SP6 promoter sequence is underlined)	
A1	TTCTTGGAATGGAATCTGC	303
A1	GCCAGACTCGTCGTATTCCT	

20, 1.5% Blocking reagent) 中预杂交 6 h(60℃); 之后在含 1 μg/mL 探针的 HB 液中杂交过夜(60℃); 杂交后经 SSC 洗脱、RNase 消化、抗体孵育、显色、4% PFA 固定、梯度乙醇脱水、二甲苯透明后将样本均匀点到干净的载玻片上, 用中性树脂封片, Nikon E80i 显微镜下观察后拍照。

1.5 组织原位杂交

保存于无水甲醇中的组织样经二甲苯透明后, 石蜡包埋并切片(厚度 7 μm), 切片经二甲苯及无水乙醇梯度复水, 用 1×PBT 冲洗, 利用 2 μg/mL 蛋白酶 K 于 37℃ 消化 15 min, 1×PBT 冲洗, 4%PFA 固定 20 min, 再经 1×PBT 冲洗, 后续步骤与 1.4 整体原位杂交一致。

2 结果与分析

2.1 *Cf-foxl2* mRNA 在栉孔扇贝早期发育中的定量分析

Cf-foxl2 mRNA 在栉孔扇贝未受精卵中呈现较高水平的表达(图 1), 但受精后其表达量显著下降($P<0.05$), 较未受精卵低 4.9 倍; 卵裂期胚胎表

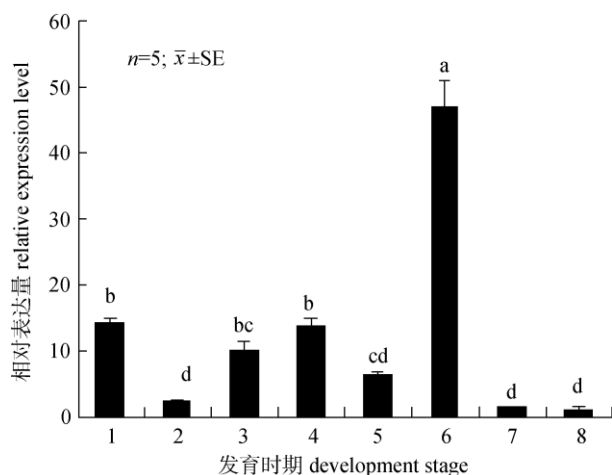


图 1 *Cf-foxl2* mRNA 在栉孔扇贝早期发育过程中的定量表达

1. 未受精卵; 2. 受精卵; 3. 桑椹胚; 4. 囊胚; 5. 担轮幼虫; 6. D形幼虫; 7. 壳顶幼虫; 8. 附着前幼虫。不同的字母代表具有显著性差异($P<0.05$)。

Fig.1 Expression of *Cf-foxl2* mRNA detected by qRT-PCR in *Chlamys farreri* during the early development.

1. Unfertilized egg; 2. Fertilized egg; 3. Morula; 4. Blastula; 5. Trochophore; 6. D-shaped larva; 7. Umbo larva; 8. Creeping larva. Different letters indicate significant differences ($P<0.05$).

达量迅速提高(如桑椹胚的表达量高于受精卵 4.2 倍), 至 D 形幼虫表达量达到最高(高于受精卵 19.7 倍), 之后表达量迅速下降, 至壳顶幼虫和附着前幼虫, 表达量仅为 D 形幼虫的 1/35 倍。

2.2 *Cf-foxl2* mRNA 在栉孔扇贝早期发育中的细胞学定位

整体原位杂交结果显示, 栉孔扇贝 *Cf-foxl2* 阳性信号从未受精卵、受精卵至各期卵裂胚中分布相对均匀, 略呈由内向外渐弱的规律(图 2 A~E)。进入幼虫阶段, 阳性信号开始集中, 其中在担轮幼虫中阳性信号明显集中在身体两侧口凹附近, 呈对称分布(图 2 F1, F2); D 形幼虫中阳性信号出现两处集中, 一处在外套膜边缘, 一处在内脏团偏背侧处(图 2 G)。壳顶幼虫中, 在内脏团和外套膜边缘隐约可见较弱的信号(图 2 H)。明显的 *Cf-foxl2* 阳性信号在性别刚分化的卵巢中再次被检测到(图 2 K), 但在性别未分化的性腺和刚分化的精巢中均未见明显的阳性信号(图 2 J、L)。在各期胚胎及幼虫中均无显色信号(图 A0~H0)。

3 讨论

发育过程是动物机体形态和生理发生大规模变化的一个过程, 这个过程涉及了诸多基因的参与。已知哺乳动物的 *foxl2* 基因参与卵巢的早期发育和功能维持, 然而该基因在低等动物发育早期的功能如何, 尚无明确的认识。本研究揭示了栉孔扇贝发育过程中 *foxl2* 基因的表达图式, 发现其在 D 形幼虫之前呈持续性表达, 之后便不能检测到 *foxl2* 基因的表达, 直到性别分化的卵巢中再次出现阳性信号, 暗示其参与卵巢的分化和发育。

通过 qRT-PCR 及原位杂交结果分析发现, *Cf-foxl2* mRNA 在未受精卵中即有表达, 显示该基因具有母源性表达模式。而受精后 *Cf-foxl2* mRNA 的表达显著下降($P<0.05$), 暗示了该基因在受精过程中可能被大量消耗或者降解。

原位杂交结果显示, *Cf-foxl2* mRNA 在栉孔扇贝受精卵和各发育期胚胎细胞中的分布规律基本一致, 均呈弥散性分布, 且由内向外信号强度渐弱。然而, *Cf-foxl2* mRNA 表达量在胚胎时期普遍

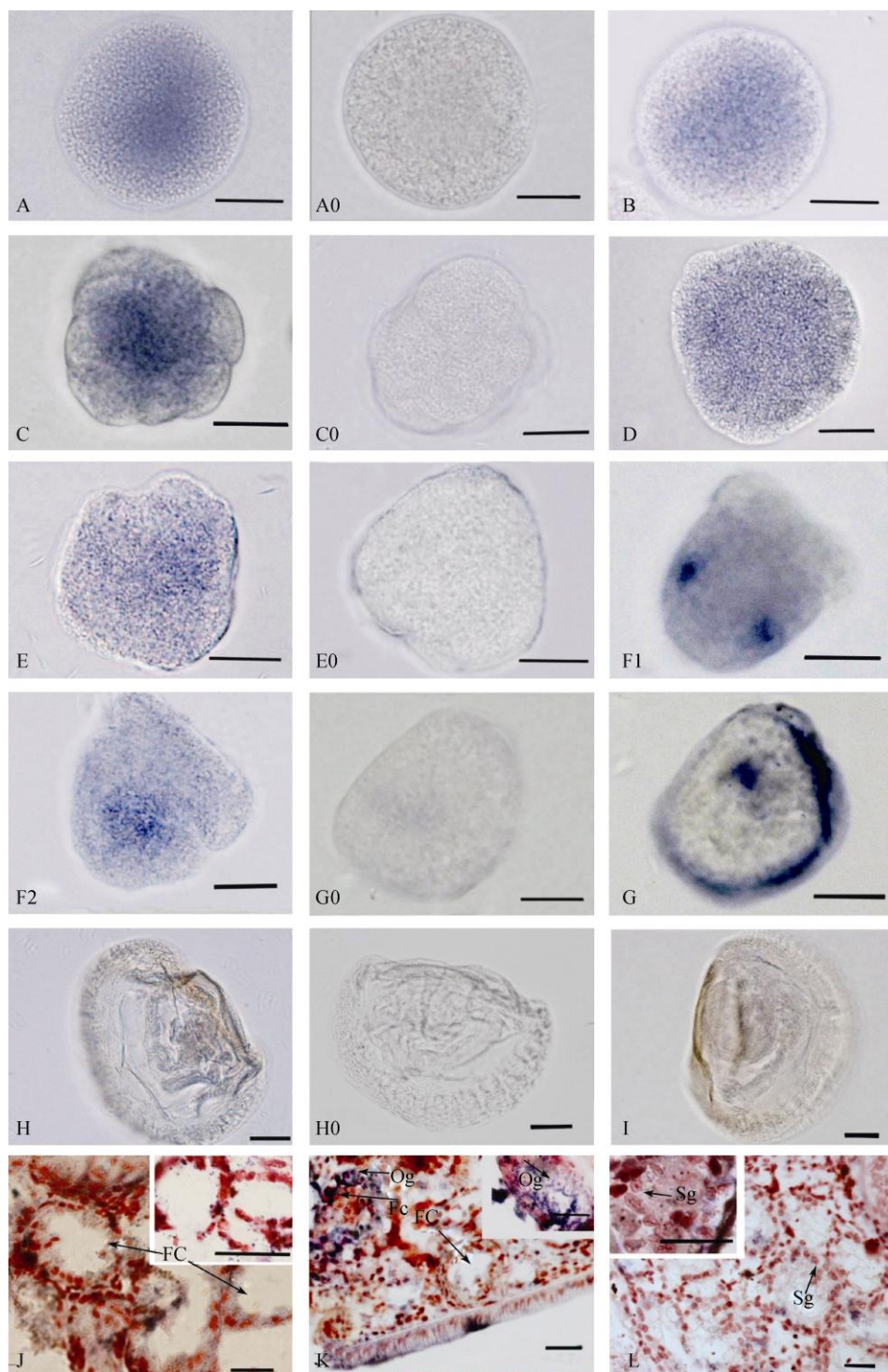


图 2 栉孔扇贝 *Cf-foxl2* mRNA 的定位

A. 未受精卵; B. 受精卵; C. 8 细胞; D. 囊胚; E. 原肠胚; F1. 担轮幼虫背面观; F2. 担轮幼虫侧面观; G. D 形幼虫; H. 壳顶幼虫; I. 附着前幼虫; J. 壳高 7.5 mm 幼贝的性别未分化性腺; K. 壳高 9.0 mm 幼贝的卵巢; L. 壳高 9.0 mm 幼贝的精巢; FC: 滤泡; Fc: 滤泡细胞; Og: 卵原细胞; Sg: 精原细胞. 标尺: 20 μ m. A0-H0. 阴性对照.

Fig.2 Location of *Cf-foxl2* mRNA detected by *in situ* hybridization in *Chlamys farreri*

A. Unfertilized egg; B. Fertilized egg; C. 8-cell; D. Blastula; E. Gastrula; F1. Trochophore (dorsal view); F2. Trochophore (side view); G. D-shaped larva; H. Umbo larva; I. Creeping larva; J. Sex undifferentiation gonad of 7.5 mm shell height juvenile; K. Ovary of 9.0 mm shell height juvenile; L. Testis of 9.0 mm shell height juvenile. FC: follicle; Fc: follicular cell; Og: oogonium; Sg: spermatogonium. Scale bar: 20 μ m. A0-H0. The negative hybridization with sense probe.

高于受精卵,这一表达特点与 Tu 等^[5]报道的海胆 *foxl2* 基因胚胎期表达结果是一致的,暗示受精启动了该基因的表达,也表明该基因参与并维持受精前后及胚胎各期细胞的发育。

栉孔扇贝在担轮幼虫和 D 形幼虫期 *Cf-foxl2* 呈现明显的集中表达。担轮幼虫时期主要在口凹附近对称分布于身体的两侧, D 形幼虫中则对称地分布于内脏团偏背侧和外套膜边缘。邵明瑜^[13]和 Fabioux 等^[14]分别在栉孔扇贝和太平洋牡蛎 *vasa* mRNA(生殖系的标记基因)的原位杂交结果中发现, *vasa* mRNA 的阳性信号也同样对称地集中在担轮幼虫的口凹附近和 D 形幼虫内脏团偏背侧,研究者认为, *vasa* 基因在该时期的对称分布预示着 PGC 的特化形成^[13], 并与生殖细胞的分化有关^[14]。本实验 *Cf-foxl2* 与 *vasa* mRNA 在表达位点的相似性,可能暗示 *foxl2* 基因与栉孔扇贝早期原始生殖细胞的特化和生殖腺的发生有一定的联系,有进一步研究的必要和意义。

董晓丽等^[15]对半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)孵化前早期胚胎的 *foxl2* 表达研究发现,该基因从多细胞期开始表达量不断上升,到原肠胚时期表达量最高,之后下降,一直到出膜前,表达都处于相对较低的水平。研究者认为原肠胚时期是功能和形态分化的决定时期,并推测该时期是性别分化相关基因的活跃时期, *foxl2* 可能在促使原始胚胎细胞向着形成性腺组织的胚层进行迁移过程中起到重要作用。一般认为栉孔扇贝 D 形幼虫是幼虫组织结构(如幼虫壳、消化系统等内脏器官)迅速构建的时期,本实验中,栉孔扇贝 D 形幼虫 *Cf-foxl2* mRNA 的表达量较胚胎时期显著提高($P < 0.05$),可能暗示了该基因参与某些幼虫器官的构建。冯政夫^[16]对栉孔扇贝 *Cf-dmrt4-like* 基因的研究发现,该性别相关基因在 D 形幼虫期的表达量是早期发育阶段中最高的,这个与本研究一致的结果暗示了 D 形幼虫可能是栉孔扇贝性别分化相关基因表达的活跃时期。栉孔扇贝 *foxl2* 基因在 D 形幼虫之后,经历了一个极低甚至不可见的表达,直到幼贝的性腺分化成为卵巢才再次显现阳性表达信号,但在同时期的精巢中未见表

达。这一表达特点与 2 龄栉孔扇贝中显示的表达特征一致^[11],进一步说明该基因与脊椎动物有类似的表达特征,可能参与栉孔扇贝卵巢的分化和发育。

参考文献:

- [1] 曲中玉, 陈子江. FOXL2—不孕有关的转录因子[J]. 生殖与避孕, 2006, 1: 40–43.
- [2] Cocquet J, De Baere E, Gareil M, et al. Structure, evolution and expression of the FOXL2 transcription unit [J]. Cytogenet Genome Res, 2003, 101: 206–211.
- [3] Loffler K A, Zarkower D, Koopman P. Etiology of ovarian failure in blepharophimosis ptosis epicanthus inversus syndrome: FOXL2 is a conserved, early-acting gene in vertebrate ovarian development [J]. Endocrinology, 2003, 144: 3237–3243.
- [4] Nakamoto M, Mastuda M, Wang D S, et al. Molecular cloning and analysis of gonadal expression of *Foxl2* in the medaka, *Oryzias latipes*[J]. Biochem Bioph Res Commun, 2006, 344: 353–361.
- [5] Tu Q, Brown C T, Davidson E H, et al. Sea urchin forkhead gene family: phylogeny and embryonic expression [J]. Dev Biol, 2006, 300 (1): 49–62.
- [6] 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*[J]. Comp Biochem Physiol B, 2009, 154: 134–142.
- [7] 姜波, 王昭萍, 于瑞海, 等. 多倍体贝类的繁殖生物学研究进展[J]. 海洋湖沼通报, 2004, 2: 73–79.
- [8] 吴仲庆. 水产生物遗传育种[M]. 第 3 版. 厦门: 厦门大学出版社, 1991: 44–45.
- [9] 杨凤影, 张弼. 不同地理种群栉孔扇贝营养成分的比较分析[J]. 安徽农业科学, 2009, 37 (9): 4073–4075.
- [10] 廖承义, 徐应馥, 王远隆. 栉孔扇贝的生殖周期[J]. 水产学报, 1983, 7(1): 1–13.
- [11] Liu X L, Zhang Z F, Shao M Y, et al. Sexually dimorphic expression of *foxl2* during gametogenesis in scallop *Chlamys farreri*, conserved with vertebrates [J]. Dev Genes Evol, 2012, 222: 279–286.
- [12] Sambrook J, Russell D W. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂等, 译. 北京: 科学出版社, 2002: 518–531.
- [13] 邵明瑜. 栉孔扇贝生殖相关基因 DEAD-box 家族和 *boule* 的 cDNA 克隆及其发育表达图式[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2006: 63–64.
- [14] Fabioux C, Huvet A, Lelong C, et al. Oyster *vasa-like* gene

- as a marker of the germline cell development in *Crassostrea gigas* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 320 (2): 592–598.
- [15] 董晓丽. 半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)线粒体基因组全序列和性别相关基因的克隆与表达分析[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2010: 96–97.
- [16] 冯政夫. 栉孔扇贝 *Cf-dmrt4-like* 基因的克隆、表达及功能分析[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2010: 79.

Expression pattern of the *foxl2* gene in the scallop *Chlamys farreri* during development

LIU Xiaoling^{1,2}, LIU Jianguo¹, WANG Dan¹, ZHANG Ziyang¹, ZHANG Zhifeng¹

1. Key Laboratory of Marine Genetics and Breeding of Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. College of life sciences, Yantai University, Yantai 264005, China

Abstract: *Foxl2* is a female related gene that plays a role in ovarian development and maintenance of function in mammals. However, little is known about the expression and function of *foxl2* during early embryonic development. We investigated the pattern of *foxl2* (*Cf-foxl2*) expression during development in the scallop, *Chlamys farreri*, using qRT-PCR and *in situ* hybridization. The expression of *Cf-foxl2* mRNA was low in the fertilized egg, but increased during development. The level of expression was highest in D-shaped larvae, after which levels declined significantly. *In situ* hybridization revealed that *Cf-foxl2* mRNA was evenly distributed in the embryos up to the trochophore stage, at which point we observed a strong positive signal concentrated in the ventral surface near the concave region of the mouth. The intensity of the signal increased significantly in D-shaped larvae, was strongest in the dorsal part of the visceral mass and the margin of mantle, and was distributed symmetrically. Thereafter, the signal disappeared until sex differentiation, at which time the signal was only detected in the ovary. Our results suggest that the *foxl2* gene participates in the regulation of ovarian development. Furthermore, given the persistent expression during the early development stages, we hypothesize that this gene plays a role in the development of *C. farreri*.

Key words: *Chlamys farreri*; *foxl2*; development; expression

Corresponding author: ZHANG Zhifeng. Tel: 86-532-82031647; E-mail: zzfp107@ouc.edu.cn