

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20241128004

http://www.yykxjz.cn/

孙晓璇, 成路遥, 孟振, 徐文腾, 刘新富, 张和森, 徐荣静. 大菱鲆 *figla* 基因的克隆及其在卵巢分化过程中的表达分析. 渔业科学进展, 2025, 46(6): 167–176

SUN X X, CHENG L Y, MENG Z, XU W T, LIU X F, ZHANG H S, XU R J. Cloning and expression analysis of *figla* during ovarian differentiation in turbot (*Scophthalmus maximus*). Progress in Fishery Sciences, 2025, 46(6): 167–176

大菱鲆 *figla* 基因的克隆及其在 卵巢分化过程中的表达分析*

孙晓璇^{1,2} 成路遥^{1,3} 孟 振^{1①} 徐文腾¹
刘新富¹ 张和森⁴ 徐荣静⁵

(1. 海水养殖生物育种与可持续产出全国重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 山东 青岛 266071;
2. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 3. 浙江海洋大学水产学院 浙江 舟山 316022; 4. 青岛通用水产
养殖有限公司 山东 青岛 266404; 5. 烟台开发区天源水产有限公司 山东 烟台 264001)

摘要 *figla* (factor in the germ cell line, alpha) 是生殖细胞中特异性表达的转录因子之一, 对于调控鱼类原始卵泡形成和卵巢发育起着关键作用。为了明确大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*) *figla* 基因序列及其在卵巢早期发育过程中的功能, 本研究以大菱鲆全雌苗种为实验对象, 采用 RT-PCR、cDNA 末端快速扩增 (RACE) 克隆获得大菱鲆 *figla* 基因的全长 cDNA 序列, 并通过半定量 PCR、实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)、原位杂交 (ISH) 对其组织表达分布和卵巢早期发育过程中的时空表达模式进行了研究。结果显示, 大菱鲆 *figla* 基因 cDNA 全长为 1 006 bp, 开放阅读框为 609 bp (150~758 bp), 编码 202 个氨基酸, 具有碱性螺旋-环-螺旋 (basic Helix-Loop-Helix, bHLH) 序列特征; *figla* 在大菱鲆性腺中特异表达, 卵巢中的表达水平高于精巢; 在不同发育时期的卵巢发育过程中, *figla* mRNA 于孵化后 25 日龄 (dph) 性腺中开始表达, 35 dph 显著增加, 此后直至 90 dph 表达水平持续增加; 原位杂交结果显示, *figla* mRNA 主要定位于卵母细胞胞质内。研究结果初步提示, *figla* 基因与大菱鲆卵巢和卵母细胞分化密切相关, 在促进卵泡形成和性腺分化方面起到关键作用。本研究结果为深入探索大菱鲆卵巢分化和发育的分子调控机制提供了参考依据。

关键词 大菱鲆; *figla* 基因; 初级卵母细胞; 性腺分化

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2025)06-0167-10

鱼类性别决定机制具有多样性, 而性别分化一般是由具备双向分化潜能的原始性腺在遗传、环境或二者共同作用下发育为卵巢或精巢的过程 (Devlin *et al*, 2002; Kitano *et al*, 2024; Strüssmann *et al*, 2002)。在卵巢的早期发育和分化过程中, 生殖细胞经历了原始生

殖细胞 (primordial germ cell, PGCs) 迁移、生殖细胞增殖和初级卵母细胞减数分裂启动 3 个主要阶段, 初级卵母细胞的出现被认为是卵巢分化完成的细胞学证据 (Nakamura *et al*, 1998; Yamamoto, 1968)。

figla (factor in the germ cell line, alpha) 基因编码

* 国家科技创新 2030 (2023ZD0405505)、国家重点研发计划 (2022YFD2400402)、国家海水鱼产业技术体系 (CARS-047-G31) 和山东省重点研发计划 (2019GHY112023) 共同资助。孙晓璇, Email: xiyi7941@foxmail.com

① 通信作者: 孟 振, 副研究员, Email: mengzhen@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2024-11-28, 收修改稿日期: 2025-02-08

一种生殖细胞特异性 bHLH (basic Helix-Loop-Helix) 转录因子, 已被证实参与哺乳动物和硬骨鱼类卵巢分化和发育, 调控原始卵泡和初级卵母细胞的形成。在 小鼠(*Mus musculus*)中, *Figla* 与转录因子 E12 形成异二聚体, 结合到基因序列上的 E-box 位点, 调节透明带 ZP1、ZP2、ZP3 基因启动子的活性, 从而调控透明带形成(Huntriss *et al*, 2002; 胡玥等, 2012); 缺失 *Figla* 转录因子会导致生殖细胞无法与性腺体细胞相互作用并最终凋亡(Viñas *et al*, 2012; Joshi *et al*, 2007)。在硬骨鱼类研究中, *figla* 是青鳉(*Oryzias latipes*)中最早发现的卵母细胞标记基因之一, 孵化后 1 日龄, 与减数分裂标记基因 *scp3* 和 *dmcl1* 一样, 呈现雌性特异表达。在尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)的研究中, 孵化后 30 日龄, 罗非鱼卵巢开始表达 *figla* 基因, 表达水平明显高于其他组织, 在雄性罗非鱼中过表达 *figla* 则导致精子生成受阻, 同时 *scp3* 和 *prm* 表达显著下降(Qiu *et al*, 2015)。此外, 在南方大口鲶(*Silurus meridionalis*) (胡重江, 2008)、大西洋鲑(*Salmo salar*) (Kleppe *et al*, 2017)、稀有鮡鲫(*Gobiocypris rarus*) (Yuan *et al*, 2014)、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*) (Liang *et al*, 2020)和半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*) (Li *et al*, 2016)等多种鱼类的研究结果表明, *figla* 基因在卵巢中表达水平显著高于精巢, 参与卵巢分化和卵母细胞发育, 可作为卵母细胞标记基因用于研究鱼类性别分化调控机制。

大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)是欧洲、亚洲和美洲十几个国家广泛养殖的海水鱼类品种, 具有典型的雌性生长优势, 中国养殖年产量可达 5 万余吨 (Meng *et al*, 2023; 谢婷等, 2023; 张邦胤等, 2024)。大菱鲆性别遗传决定机制为雌性异配型(ZW/ZZ), 已有报道证明性腺体细胞中的分子信号和性激素的产生是其性别决定和分化的关键因素(Robledo *et al*, 2015; Figueras *et al*, 2016; Ribas *et al*, 2016; Martínez *et al*, 2021), 但生殖细胞在减数分裂启动和卵巢发育维持中的作用机制尚不清楚。*Figla* 作为生殖细胞特异性转录因子, 普遍认为其通过对卵泡发育相关环节的调节来调控卵母细胞减数分裂的启动。尽管 Zhou 等 (2018)已经研究了 *figla* 在大菱鲆 8、14 和 24 mph (months post hatching, mph)不同卵巢发育时期的表达模式, 但缺少其在性别分化早期表达规律的研究。因此, 本研究通过克隆获得大菱鲆 *figla* 基因, 并以前期培育的全雌苗种为实验材料, 揭示其在仔、稚、幼鱼卵巢发育早期的表达规律, 探究 *figla* 基因在大菱

鲆原始卵泡和初级卵母细胞形成中的作用。在此基础上, 明确初级卵母细胞减数分裂启动时间, 以期为开展大菱鲆性别决定和分化分子机制研究提供指导。

1 材料与方法

1.1 实验材料

大菱鲆性腺 cDNA 源自课题组保存的孵化后 15~90 日龄(dph)全雌苗种腹部 cDNA 或性腺 cDNA。苗种取样方法为 15 dph 后间隔 5 d 取一次样品, 每次取 6~8 尾, 样品经 MS-222 (150 mg/L)快速麻醉后, 30 dph 前, 切除头、尾部, 保留完整腹部, 整体固定; 30~75 dph, 去除腹腔内脏后固定; 75 dph 后, 固定卵巢组织。1.5 龄雌雄鱼(各 3 尾)采自烟台开发区天源水产有限公司培育的全人工后备亲鱼群体, MS-222 麻醉后, 取脑、垂体、肝脏、肾脏、脾脏、鳃、心脏、肠、胃、肌肉、卵巢和精巢组织。组织样品均放入 RNA store 中, 然后转到-80 °C 冰箱保存, 用于总 RNA 的提取。另取卵巢组织保存于 4%多聚甲醛中, 用于原位杂交实验。

1.2 总 RNA 提取和 cDNA 合成

采用 RNA prep pure 动物组织总 RNA 提取试剂盒(天根, DP431)提取总 RNA, 以 DNase I 去除基因组 DNA, 经 1%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性, 超微量分光光度计(GE, 美国)检测 RNA 质量和浓度。各组织 RNA 分别用 Thermo RT 反转录试剂盒(154402)合成 cDNA 第一链, -20 °C 保存备用。

1.3 大菱鲆 *figla* 基因克隆

通过 RT-PCR 获得大菱鲆 *figla* 基因的保守片段, 所用引物为 *Figla*-F1 和 *Figla*-R1 (表 1), PCR 扩增体系为 cDNA 1 μL、PCR mix 12.5 μL、引物各 1 μL、ddH₂O 9.5 μL, 反应条件: 95 °C 预变性 3 min; 95 °C 变性 30 s, 65 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 35 个循环; 72 °C 延伸 5 min。

提取卵巢组织总 RNA, 用于 5'-RACE 和 3'-RACE cDNA 第一链合成, 合成的 cDNA 第一链分别用 5'/3'-RACE 试剂盒(Accurate Biology, AG11618)进行 PCR 扩增, 所用引物为 *FigGSP*-R5 和 *FigGSP*-F4 (表 1), 各操作步骤、反应体系及反应程序均按照试剂盒使用手册进行。产物经回收纯化、连接转化和测序后, 把所获序列和核心片段进行拼接, 得到 *figla* 基因的全长 cDNA 序列。

表 1 本研究所用的引物
Tab.1 Primers used in this study

引物 Primer	序列 Sequence (5'~3')
Figla-F1	AGAGGMRGAATTAATGAGCGACAT
Figla-R1	AACTGGTAHGCAGGCATCACACA
FigGSP-R5	ACTCTCCATAGGTCAGTCCCAAGCC
FigGSP-F4	AGTGGACACGCTAAAAGCTGCGACG
fig-qF	TCCGTATCTCTGCCGCTTC
fig-qR	TCGTTTCTTCACCGTTTGTT
actin-F	GTGGAGCGATTTGTCTGGTT
actin-R	CTCAATCTCGTGTGGCTGAA
Figla-probeF	ATTTAGGTGACACTATAGAAGAAGCGTATGGTGCCACTGA
Figla-probeR	TAATACGACTCACTATAGGGGTTGCAAAACCAGTCTCGTCA

注: R=A/G, M=A/C, H=A/C/T。

1.4 序列分析

cDNA 序列在 NCBI 数据库进行 BLAST 序列比对和同源性分析, 利用 ORF Finder 推测开放阅读框和氨基酸序列; 采用 ExPASy ProtParam 和 ExPASy ProtScale 分析 Figla 蛋白质的氨基酸组成、分子量、理论等电点等; TMHMM Server 2.0 进行蛋白质序列的跨膜区域分析; NetNGlyc1.0 和 NetPhos3.1 工具预测 *figla* 编码氨基酸存在的蛋白糖基化和磷酸化位点; SignalP 6.0 分析其潜在信号肽剪切位点; SOPMA 和 SWISS-MODEL 在线预测工具分析 Figla 蛋白的二级和三级结构; PSORT II Prediction 在线软件预测亚细胞定位; DNAMAN 和 MEGA 6.0 软件以邻位相连 (Neighbor-Joining) 法构建系统进化树 (bootstrap 值为 1 000)。

1.5 组织表达特征分析

以大菱鲆成鱼各组织 cDNA 为模板, 以 β -actin 基因为内参, 采用 actin-F、actin-R 和 fig-qF、fig-qR 引物 (表 1), 通过半定量 RT-PCR 方法检测 *figla* 基因在大菱鲆成鱼不同组织中的表达情况。以 15~90 dph 全雌大菱鲆苗种/性腺 cDNA 为模板, 每组检测 3 个样品, 采用 qRT-PCR 测定 *figla* 基因在大菱鲆早期性腺发育和分化阶段的表达水平, 反应条件: 95 °C 预变性 3 min; 95 °C 变性 7 s, 57 °C 退火 10 s, 72 °C 延伸 15 s, 40 个循环。实验数据采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行分析, 确定该基因在大菱鲆孵化后 15~90 d 的相对表达量。

1.6 原位杂交

根据克隆的 *figla* 基因序列设计特异性引物

Figla-probeF 和 Figla-probeR (表 1), 扩增的 PCR 产物经过纯化后作为制备探针的模板。按照地高辛 (DIG) 探针说明书 (Roche Applied Science, 11277073910) 操作, 生成含有地高辛标记的正义和反义 RNA 探针, 并使用 LiCl 沉淀法对探针进行纯化, 纯化后的探针保存于 -80 °C 中。

将保存于 4% 多聚甲醛中的大菱鲆卵巢组织按常规方法进行石蜡切片, 厚度为 6 μ m。完成切片后, 对卵巢标本进行脱蜡水化并固定, 在 60 °C 下用配制好的预杂交液 (25 mL 去离子甲酰胺 + 12.5 mL 20×SSC + 15 mL H₂O + 460 μ L 柠檬酸 + 50 μ L Tween 20 + 1 mL tRNA + 10 μ L 肝素) 预杂交 4 h。切片上滴加地高辛标记质量浓度为 200 ng/mL 的探针 1 mL, 60 °C 孵育过夜。次日对孵育好的切片进行洗涤, 并在室温下使用含有山羊血清的封闭液封闭 4 h 后, 4 °C 下使用抗 DIG 抗体孵育过夜。PBST 洗涤后加入显色液 BCIP/NBT, 在室温避光条件下进行显色反应, 待显色完全后, 将切片放入梯度乙醇中终止显色反应, 甘油明胶封片, 通过尼康 ECHPSE80i 显微镜观察和拍摄。

2 结果

2.1 大菱鲆 *figla* 基因全长 cDNA 序列

通过 RT-PCR 方法, 使用引物 Figla-F1 和 Figla-R1 扩增得到 534 bp 的保守片段。5'-RACE 和 3'-RACE 产物长度分别为 580 bp 和 579 bp, 将 5'-RACE、核心片段和 3'-RACE 序列拼接后得到 *figla* 基因全长, 其长度为 1 006 bp。开放阅读框 (ORF) 为 609 bp (150~758 bp), 编码含 202 个氨基酸的蛋白质 (图 1)。

```

1                                     GAGAGGTGGGGCCCTGATTAGTCTCAGGT
30 GTGCTTCCCCTCGGAGCTCGTTTGAACCTCCTTCGCTATCTCTGCCGCTTCCACGAGCGTA
90 CGGCCGCGTATCGCCGAGAAAGGTTTAAACGAGGGGCAACGCGTTGACGGGGCTTGACCAC
150 ATGTTCTCGTTGGGATGAAGGCGCCGCGGAGGAAGTATGAGCGACATCCTGAAGCGT
1   M F L V G M K A P A E E L M S D I L K R
210 CTGACGGGCGAGTCGGCGCTGCCGCGTACAGCAACATCGAGAAGTTTACAGCAGCCAAAG
21  L T G E S A L P A Y S N I E K F R R A K
270 GACGGCGTGTATTTCGTGCGCCGAGGACTTCAACCAAACGGTGAAGAAACGAGAGCTGGTC
41  D G V Y F V A E D F N Q T V K K R E L V
330 AACGCCAAGGAACGATTGAGAATTCGCAACTTGAATACTATGTTTCCCGCCTGAAGCGT
61  N A K E R L R I R N L N T M F S R L K R
390 ATGGTGCCACTGATGCGACCGGACCGGAAGCCAGTAAAGTGACACGCTAAAAGCTGCG
81  M V P L M R P D R K P S K V D T L K A A
450 ACGGAATACATCCGATTGCTTGTGTCAGTTTACAAGACACTGACAGTCAAGATGGCTGT
101 T E Y I R L L V A V L Q D T D S Q D G C
510 GGAAGTGAATTTCTAAAGAATGCAATCATTATGGTCAGACTGAAGGCTTGGGCAGTGAC
121 G T D F L K N A I T Y G Q T E G L G S D
570 CTATGGAGAGTGGATGATTTGCTGAACATGTCCGACGAGTGCATGGAAGATGGATTCAT
141 L W R V D D L L N M S D E C M E D G F T
630 ATGCCCCCAGAAGTGGTTACAGATGATGGAGATATGACGAGACTGGTTTTGCAACATTGT
161 M P P E V V T D D G D M T R L V L Q H C
690 GTGATGCCTGCATACCAGTTTATCATCCAAGTGGCACCTGATCAGACTTCGATGTCTCAA
181 V M P A Y Q F I I Q V A P D Q T S M S Q
750 CCTGTAAAGTGGTGTGGAACACAGATGGTTGAACCAAACCTGGAACATGCCAGGGCCC
201 P C *
810 TGTGCTTTGATGGAAGAATTTTCTTTGACAAGAATCCTCTTTTATTTGTCTTATTTACG
870 TTGACTTTTGAAATTTAAATTTTGTGAGTAAATATAAATGTGTTTTTATTTTATTTT
930 ACAAAGTGTATCCTTGGAGCCTTCAAATAAAGTTACGAGAAAGCTCCAAAAA
990 AAAAAAAAAAAAAA

```

图1 大菱鲆 *figla* 基因的 cDNA 及其氨基酸序列分析Fig.1 The cDNA nucleotide sequence and putative amino acid sequence of *figla* gene in turbot

阴影部分分别表示起始密码子 ATG 和终止密码子 TAA; *表示终止密码子。

The shaded areas represent the start codon (ATG) and the end codon (TAA), * indicates termination codon.

2.2 Figla 蛋白质结构分析

根据 ProtParam 分析得到 Figla 蛋白分子式为 $C_{1001}H_{1613}N_{275}O_{307}S_{16}$, 总原子数为 3 212, 分子量为 23 kDa, 理论等电点(pI)为 5.18, 不稳定系数为 53.90, 亲水性平均系数(grand average of hydrophilicity, GRAVY)为-0.325, 因此, 属于亲水性不稳定蛋白(图2),

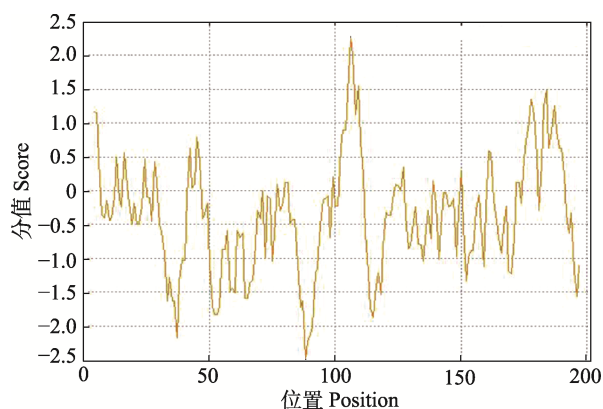


图2 大菱鲆 Figla 蛋白亲疏水性分析

Fig.2 Analysis of the hydrophilicity and hydrophobicity of Figla protein in turbot

摩尔消光系数为 13 200, 成熟蛋白含有的负电荷残基(Asp+Glu)和正电荷残基(Arg+Lys)分别为 30 和 26 个。Figla 蛋白二级结构中 α -螺旋、无规卷曲分别占 26.73%、72.28% (图 3a); 三级结构与乌鳢(*Channa argus*) Figla 蛋白(SWTL ID: A0A6G1Q0W7.1.A)的相似度较高, 为 88.06% (图 3b)。PSORT II 预测结果显示, 该蛋白主要存在于细胞核中。Figla 蛋白无跨膜区域和信号肽切割位点, 含有 18 个磷酸化位点, 其中包括 10 个丝氨酸磷酸化位点、5 个苏氨酸磷酸化位点和 3 个酪氨酸磷酸化位点, 同时存在 2 个 N-糖基化位点。

2.3 氨基酸序列比对及系统进化分析

利用 DNAMAN 软件对大菱鲆 Figla 氨基酸序列与半滑舌鳎(XP_016898215.1)、牙鲆(XP_019949545.1)、斑马鱼(*Danio rerio*) (NP_944601.2)、南方大口鲶(XP_046697496.1)、斑鳢(*Channa maculata*) (WRQ20287.1)、大西洋鲑(XP_014017212.1)、鲫鱼(*Carassius auratus*) (XP_026097726.1)、孔雀花鲈(*Poecilia reticulata*) (XP_008415890.1)、真鲷(*Pagrus major*) (BAH08687.1)、稀有鮰鲫(AID21698.1)、人类

(*Homo sapiens*) (NP_001004311.2) 11 个物种的氨基酸序列进行多重序列比对。结果显示, 与其他物种相比, 大菱鲆 *Figla* 氨基酸序列较为保守, 呈现典型的碱性螺旋-环-螺旋(bHLH)序列特征, 特别是硬骨鱼类的 *Figla* 氨基酸序列保守性很强。其中, 大菱鲆与牙鲆的同源性最高, 为 91.09%, 其次为真鲷和斑鲷(86.63%),

与半滑舌鲷同源性为 77.72% (图 4)。

基于上述物种的氨基酸序列, 使用 MEGA 6.0 软件, 以邻位相连法进行聚类分析并构建系统进化树。结果显示, 所有硬骨鱼类聚为一个分支, 其中与大菱鲆亲缘关系最近的是牙鲆, 二者与真鲷、斑鲷、半滑舌鲷、孔雀花鲈、大西洋鲑聚为硬骨鱼类一大分支(图 5)。

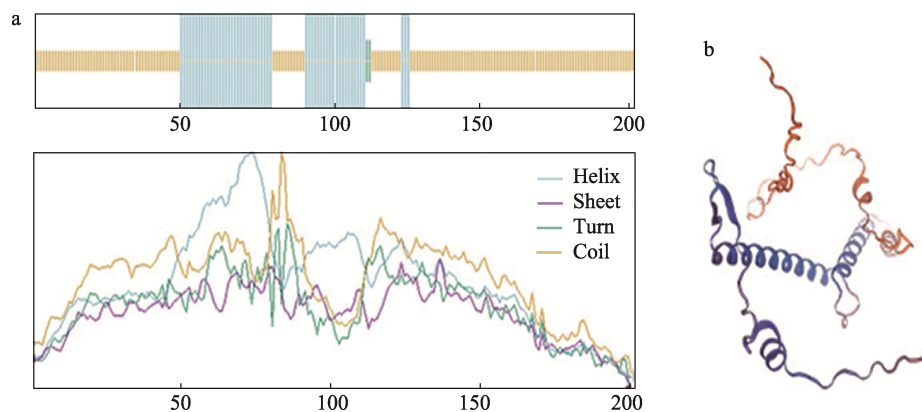


图 3 大菱鲆 *Figla* 蛋白二级结构(a)和三级结构(b)预测结果

Fig.3 Predicted secondary structure (a) and tertiary structure (b) of *Figla* protein in turbot

<i>Scophthalmus maximus</i> <i>Figla</i>	MFLVGVKAPAEELMSDILKRLTGESALPAYSI EKFRRAKLGIVFAEDFNCTVKKRELVNAKERL	66
<i>Cynoglossus semilaevis</i> <i>Figla</i> tv1	MVTNEVPVEELMSDYLKRVGTGESALPVFSNI EKFKRAKLGIVFAEDFNCTVKKRELVNAKERL	64
<i>Paralichthys olivaceus</i> <i>Figla</i>	MFLLLKMKVPAEELMGDILKRLTGESALPVYSNI EKFRRAKLGIVFAEDFNCTVKKRELVNAKERL	66
<i>Danio rerio</i> <i>Figla</i>	MSCENTGKKFRAI VGLMKVPERELMGDVLRESAEPSPVHVNI GKFLRLDGGVYI DTEDRDKAVKRRROLANAKERL	77
<i>Silurus meridionalis</i> <i>Figla</i>	MGLMKVPERELMGDILHSTETPSLPVHVNI GKFLRLDGGVYI DTEDRDKAVKRRROLANAKERL	65
<i>Channa maculata</i> <i>Figla</i>	MKVPPEELMSDILKRLTGESALPVYSNI EKFRRAKLGIVFAEDFNCTVKKRELVNAKERL	61
<i>Salmo salar</i> <i>Figla</i>	NATHVKYI TMKSFEVNAAVNSVPERELMGDILVSETGEPPLPSHSNI AKFKRGNGGLVHTEDVSEI VKRRRLVNAKERL	80
<i>Carassius auratus</i> <i>Figla</i>	MSADLTGRKFALVGLMKVPERELMGDILRESSEPSLPVHVSI GKFLRLDGGVYI DTEDRDKAVKRRROLANAKERL	77
<i>Poecilia reticulata</i> <i>Figla</i>	MKVPPEELMSDILKRLTGESALPVYSNI EKFRRAKLGIVFAEDFNCTVKKRELVNAKERL	61
<i>Pagrus major</i> <i>Figla</i>	MKVPPEELMSDILKRLTGESALPVYSNI EKFRRAKLGIVFAEDFNCTVKKRELVNAKERL	61
<i>Gobiocypris rarus</i> <i>Figla</i>	MSGEMPGRKFALVGLMKVPERELMGDILRESSEPSLPVHVNI GKFLRLDGGVYI DTEDRDKAVKRRROLANAKERL	77
<i>Homo sapiens</i> <i>Figla</i>	MDPAPGVLDPRAPPALGTPQAEVLEDVIREQCFG. PLPLQAAVCRLLKRLPSGGYSSTENLQLVLERRRVNAKERL	76
<i>Scophthalmus maximus</i> <i>Figla</i>	RI RNLTMSFRIKRMVPLVRPDRKPSKVDTLKAATEYI RLLVAVLCDT. DSCEGCGTDFLKNA. I TYGCTEGLGSLDVRV	144
<i>Cynoglossus semilaevis</i> <i>Figla</i> tv1	RI RNLTMSFRIKRMVPLVRPDRKPSKVDTLKAATEYI RLLVAVLCDT. DDHSSSGSDFLNSA. I TYGCTEGLGSLDVRV	142
<i>Paralichthys olivaceus</i> <i>Figla</i>	RI RNLTMSFRIKRMVPLVRPDRKPSKVDTLKAATEYI RLLVGLVCDT. DSHDGSCTDFLKNA. I TYGCTEGLGSLDVRV	144
<i>Danio rerio</i> <i>Figla</i>	RVRSLNSMFSYLRRI VPVNPDRKPSKVDMKAATEYI RLLSAVLNHTSDKGNENANVFLETG. I NYPSI NPDCSCLVNM	156
<i>Silurus meridionalis</i> <i>Figla</i>	RVRSLNSMFSYLRRI VPVNPDRKPSKVDMKAATEYI RLLSAVLNHTSDKGNENANVFLETG. I NYPSI NPDCSCLVNM	145
<i>Channa maculata</i> <i>Figla</i>	RI RNLTMSFRIKRMVPLVRPDRKPSKVDTLKAATEYI RLLVAVLCDT. DSHDGSCTDFLKNA. I TYGCTEGLGSLDVRV	139
<i>Salmo salar</i> <i>Figla</i>	RI KNNNSMFSRIKRMVPLVRPDRKPSKVDTLKAATEYI RLLVAVLCDT. DSNNGSKTDFLKNA. I NYATSDGMCGLDVRV	158
<i>Carassius auratus</i> <i>Figla</i>	RVRSLNSMFSYLRRI VPVNPDRKPSKVDMKAATEYI RLLSAVLNHTSDKGNENANVFLETG. I NYSSLETDCSCLVNM	156
<i>Poecilia reticulata</i> <i>Figla</i>	RI RNLTMSFRIKRMVPLVRPDRKPSKVDTLKAATEYI RLLVAVLCDT. DSHDGSCTDFLKNA. I TYGCTEGLGSLDVRV	139
<i>Pagrus major</i> <i>Figla</i>	RI RNLTMSFRIKRMVPLVRPDRKPSKVDTLKAATEYI RLLVAVLCDT. DSNEG. TDFLKNA. I TYGCTEGLGSLDVRV	137
<i>Gobiocypris rarus</i> <i>Figla</i>	RVRSLNSMFSYLRRI VPVNPDRKPSKVDMKAATEYI RLLSAVLNHTSDKGNENANVFLETG. I NYSSLETDCSCLVNM	156
<i>Homo sapiens</i> <i>Figla</i>	RI KNNLRGFAELKALVPFLPQSRKPSKVDTLKAATEYI RLLVAVLCDT. DSNEG. TDFLKNA. I TYGCTEGLGSLDVRV	156
<i>Scophthalmus maximus</i> <i>Figla</i>	DDLNNMSD. ECEMDGFTMPPEVVT. DGDVTRLVLCVMPAYCFI I CVAPDCTSMSCPC	202
<i>Cynoglossus semilaevis</i> <i>Figla</i> tv1	DDLNNMSD. ECI DDGFMSPGPVPE. DGMTRLMLCHCVMAYCFI I CVAPDCTTV	196
<i>Paralichthys olivaceus</i> <i>Figla</i>	DDLNNMSD. ECEMDGFTLPPEVTE. DGDVTRLVLCVMPAYCFI I CVAPDCTSMSCPC	202
<i>Danio rerio</i> <i>Figla</i>	EDALDSMS. SPFLS. ETVSLTAPLVNTSGADEDLNNMTVC. CVVPVY. VCVGSECTVASTLSSSV	220
<i>Silurus meridionalis</i> <i>Figla</i>	DEVLDS. LTSCSLSVTSPSAVAAEAD. EMDMSNMAVC. CTVPVY. VCVGSECTVASTLSSSV	202
<i>Channa maculata</i> <i>Figla</i>	DDLNNMSD. ECEMDGFTLPPEVTE. DGDVTRLVLCVMPAYCFI I CVAPDCTSMSCPC	197
<i>Salmo salar</i> <i>Figla</i>	DELDVSVSGVSGELSDGVNMTVPLVTTGFGAG. DGDVSLVLCVMPAYCFI I CVAPDCTSMSCPC	225
<i>Carassius auratus</i> <i>Figla</i>	EDVLEST. NPFLS. EGVSVAAPLVNTATGADDEI DLNNMTVC. CVVPVY. VCVGSECTVASTLSSSV	222
<i>Poecilia reticulata</i> <i>Figla</i>	DDLNNMS. EMEDEFITLPPEVTE. DGMTRLMLCHCVMAYCFI I CVAPDCTSMSCPC	195
<i>Pagrus major</i> <i>Figla</i>	DDLNNMS. EMEDEFITLPPEVTE. DGDVTRLVLCVMPAYCFI I CVAPDCTSMSCPC	193
<i>Gobiocypris rarus</i> <i>Figla</i>	EDALG. NPFLS. EGVSVAAPLVNTATGADDEI DLNNMTVC. CVVPVY. VCVGSECTVASTLSSSV	219
<i>Homo sapiens</i> <i>Figla</i>	TQH SCAFG. LKNEEGPWADGGSGEP. AHACRHSVMSTTEI I SPTR. SLDRFPEVELLSHRLPQV	219

图 4 大菱鲆 *Figla* 氨基酸与其他物种氨基酸序列比较

Fig.4 Alignment of *Figla* amino acid sequences between turbot and other species

序列中相同氨基酸残基用黑色背景表示, 同源性超过 75%用粉色背景表示, basic 代表的碱性区域用红色下划线标注,

Helix-Loop-Helix 代表的螺旋-环-螺旋区域用黑色方框标注。

The completely conserved positions are shaded in black, and position with > 75% similarity are shaded in pink.

The basic region (basic) is underlined with red line and the Helix-Loop-Helix (HLH) region is black boxed.

2.4 大菱鲆 *figla* mRNA 组织表达特征

采用半定量 RT-PCR 方法分析 *figla* mRNA 在大菱鲆雌、雄个体组织中的表达差异,以 β -actin 作为阳性对照。结果显示, *figla* 基因在卵巢中高表达,在精巢组织表达较弱,在脑、垂体、鳃、胃、脾、肠、肝脏、肾、心脏、肌肉等其他组织中均不表达(图 6)。

2.5 大菱鲆性腺发育早期表达规律

通过 qRT-PCR 分析了 *figla* 基因在全雌苗种 15~90 dph 的表达模式(图 7)。结果显示, *figla* mRNA 在 15~20 dph 不表达, 25 dph 检测到微弱的表达, 30~35 dph 表达量显著增加, 随着性腺/卵巢发育的进行, *figla* 基因的表达量持续升高, 90 dph 达最高值。

2.6 原位杂交

本研究采用组织切片原位杂交技术研究了 *figla* 基因在大菱鲆卵巢中的亚细胞定位。组织切片经 HE 染色(图 8A, 8a)后可观察到 1.5 龄的大菱鲆卵巢处于

小生长期,第 I、II 时相卵母细胞紧密排列在产卵板(ovarian lamella, OL)上, II 时相细胞内的核仁分布于核膜内缘。原位杂交结果(图 8B, 8C)显示, *figla* mRNA 信号主要分布在卵母细胞胞质中,正义探针未检测到明显的杂交信号。

3 讨论

本研究通过 RT-PCR 和 RACE 技术克隆获得大菱鲆 *figla* 基因, cDNA 序列全长为 1 006 bp, 其中开放阅读框为 609 bp, 共编码 202 个氨基酸, *figla* mRNA 仅在性腺组织表达, 且卵巢表达量显著高于精巢, 在卵巢早期发育和分化过程中, *figla* mRNA 最早于 25 dph 开始表达, 此后, 表达量逐渐增加, 90 dph 时达最高值。

通过对大菱鲆 *Figla* 氨基酸序列与其他物种进行多重比对分析, 其与牙鲆、真鲷、斑鲷、半滑舌鳎、孔雀花鲈、大西洋鲑等聚为硬骨鱼类一大分支, 而与鲤形目(Cypriniformes)物种亲缘关系较远。此外, 本

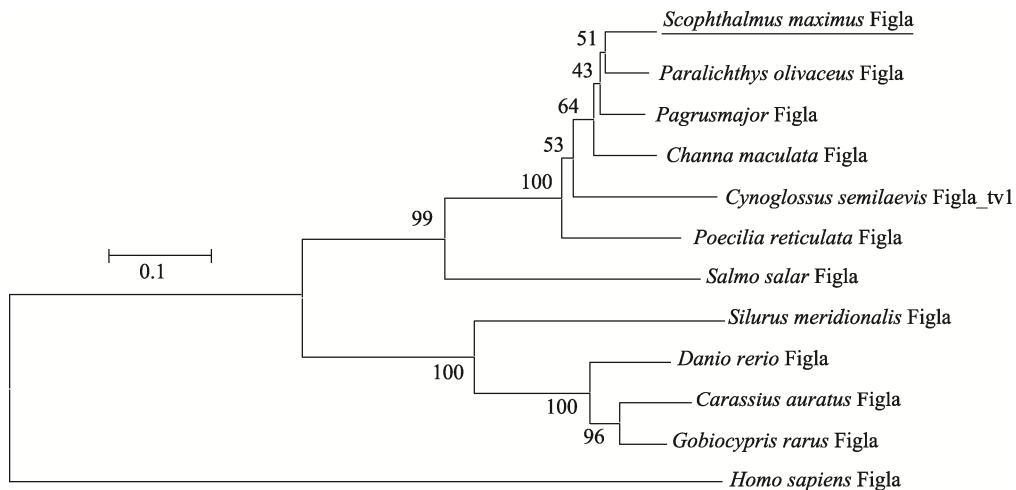


图 5 基于 Mega 6.0 NJ 方法的大菱鲆 *Figla* 与其他物种聚类分析

Fig.5 Phylogenetic tree of *Figla* amino sequences from turbot and other species based on neighbor-joining analysis with MEGA 6.0

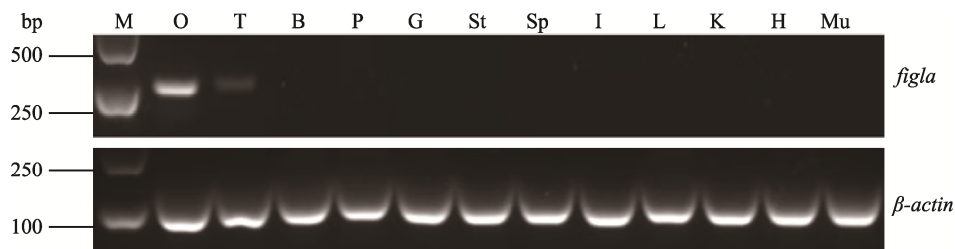


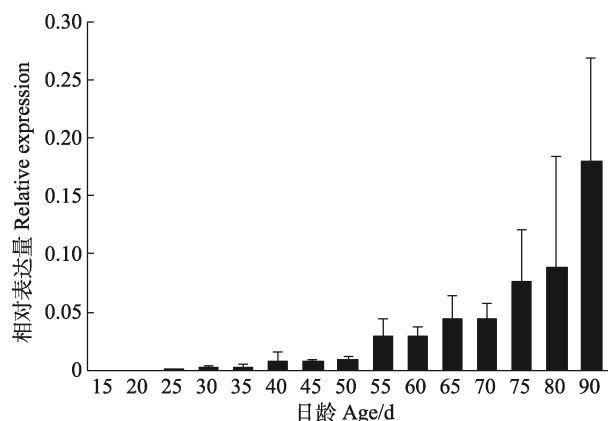
图 6 大菱鲆 *figla* 基因在不同组织中的表达

Fig.6 Expression of *figla* gene in different tissues of turbot

M: DNA 分子量标准 DL2000; O: 卵巢; T: 精巢; B: 脑; P: 垂体; G: 鳃; St: 胃;

Sp: 脾脏; I: 肠; L: 肝脏; K: 肾; H: 心; Mu: 肌肉。

M: DL2000 DNA Marker; O: Ovary; T: Testis; B: Brain; P: Pituitary; G: Gill; St: Stomach; Sp: Spleen; I: Intestine; L: Liver; K: Kidney; H: Heart; Mu: Muscle.

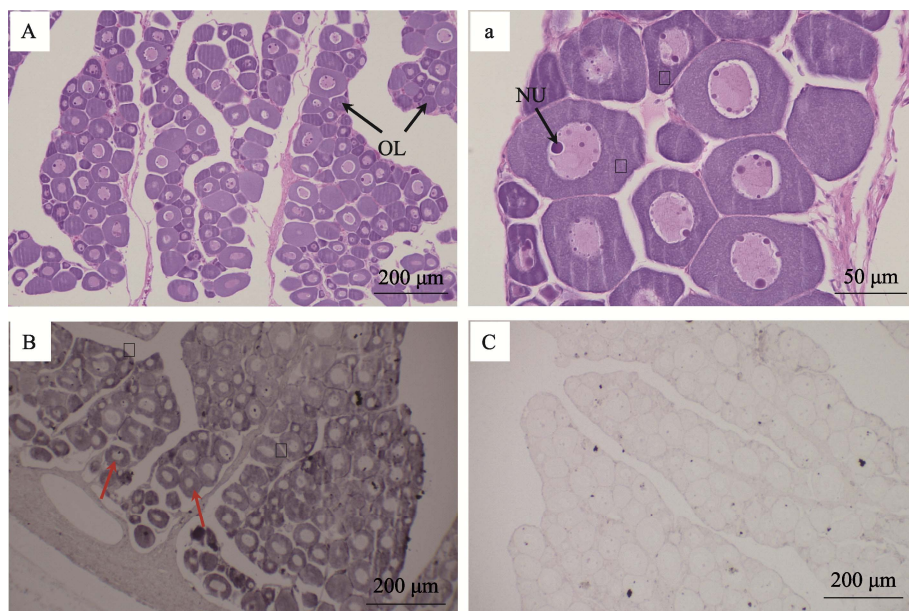
图 7 大菱鲆 *figla* 基因在不同发育时期的表达情况Fig.7 Expression of *figla* gene in different developmental stages of turbot

研究发现, *figla* 基因仅在性腺中表达, 杂交信号定位于卵母细胞中, 氨基酸序列具有典型的 bHLH 结构域, 符合 *figla* 基因特征, 因此可确定所得序列为大菱鲆 *figla* 基因。

在斑马鱼、青鳉、尼罗罗非鱼(Qiu *et al.*, 2015; 胡重江, 2008)、稀有鮑鲫、牙鲆等多种鱼类中均报道 *figla* 基因存在单一亚型, 然而在半滑舌鲷中报道了 *Figla* 具有 2 个亚型, 其中, *Figla_tv1* 主要在卵巢表达, 缺失部分 bHLH 结构域的 *Figla_tv2* 主要在伪雄

鱼的精巢中表达, 推测 *Figla_tv1* 参与调控卵泡发生过程, 而 *Figla_tv2* 通过调节类固醇激素的合成和代谢, 在伪雄鱼中调控精子生成(Li *et al.*, 2016)。本研究与 Zhou 等(2018)均克隆获得大菱鲆 *figla* 基因单一亚型, 与大多数硬骨鱼类相符。

figla mRNA 在不同动物组织中呈现明显的性腺特异性表达分布, 通过调控性腺发育过程中原始卵泡和卵母细胞的形成, 从而参与性腺的分化。在哺乳动物卵巢分化过程中, 生殖细胞减数分裂一旦开始, 颗粒细胞开始包围卵原细胞形成原始卵泡, 此后颗粒细胞进行有丝分裂形成颗粒层, 这些卵泡就成为初级卵泡。卵泡和卵母细胞的相互协调对于卵巢分化和发育过程至关重要。转录因子 *Figla* 在这个阶段会被激活并在生殖细胞中开始表达, 同时参与调节透明带基因的转录(Qu *et al.*, 2022; 哈斯高娃等, 2020; 庞春英等, 2015; 钱佳铭等, 2023)。小鼠的 *figla* mRNA 在胚胎发育后第 13.6 天的生殖嵴中被检测到, 此时卵原细胞启动减数分裂(Joshi *et al.*, 2007); 青鳉中, *figla* mRNA 在 1 dph 雌鱼特异性表达, 与减数分裂标记基因 *scp3* 和 *dmc1* 表达规律一致, 被视为初级卵母细胞的标记基因(Kanamori *et al.*, 2008); 在尼罗罗非鱼中, *figla* mRNA 首次出现于 10 dph 的雌性性腺中, 30 dph 表达量显著上升(Qiu *et al.*, 2015; 胡重江, 2008), 此时

图 8 大菱鲆卵巢中 *figla* 基因原位杂交结果Fig.8 *In situ* hybridization results of *figla* gene in the ovaries of turbot

A 和 a: 1.5 龄大菱鲆卵巢组织切片; B: 反义探针与卵原细胞的结合; C: 正义探针杂交显示无信号。

I: 第 I 时相卵母细胞; II: 第 II 时相卵母细胞; OL: 产卵板; NU: 核仁; 红色箭头指示为 *figla* 杂交信号。
A and a: Section of ovary tissue at 1.5-year-old; B: Binding of antisense probe to oocytes; C: Hybridization of sense probe showed no hybridization signal. I: Oocyte at Stage I; II: Oocyte at Stage II; OL: Ovarian lamella; NU: Nucleolus; The red arrow indicates *figla* hybridization signal.

尼罗罗非鱼性腺开始组织学分化,同时也是生殖细胞减数分裂启动的时期;斑马鱼 *figla* mRNA 最早在 20~26 dpf (days post fertilization) 幼鱼性腺中表达,且呈雌雄二态性,与性腺分化的组织学时期吻合(Qin *et al.*, 2018)。本研究通过大菱鲆 *Figla* 氨基酸序列分析和蛋白结构预测,确定其具有典型的 bHLH 转录因子家族结构特征,成鱼 *figla* mRNA 表达具有明显的组织特异性,在性腺组织中高度表达,卵巢相较精巢中表达量显著增加,与 Zhou 等(2018)报道的 *figla* 在大菱鲆 8、14、24 月龄卵巢和精巢中的表达规律和组织表达分布结果一致。然而 *figla* 在大菱鲆性腺分化过程中与原始卵泡和初级卵母细胞形成的关系仍不清楚。

明确大菱鲆性别决定和分化关键时期是开展生殖细胞发育和分化调控机制研究的基础。已有报道通过性腺转录组和性别分化相关基因的表达确定了大菱鲆性别分化的关键时期,并探讨了大菱鲆性别分化调控机制(Ribas *et al.*, 2016; Robledo *et al.*, 2015)。Robledo 等(2015)报道在大菱鲆体长为 5~6 cm、受精后 90 d 左右时, *cyp19a1a*、*amh* 和 *vasa* mRNA 在雌雄个体出现表达差异,可以作为性别分化起始的标志;与原始生殖细胞增殖相关的基因(*vasa*、*gsdf* 和 *tdrd1*)则在体长达到 4~6 cm (75~90 dpf) 时表达量增加。同样, Ribas 等(2016)根据性腺转录组分析和 *cyp19a1a*、*dmrt3* 基因表达规律确定大菱鲆卵巢分化时间为体长 5 cm (90 dpf)。而大菱鲆性别分化组织学和细胞学研究结果显示,在 20~35 dph 时部分个体 PGCs 数量出现增长, *vasa* 表达上调,而此时性腺还未分化。由于大菱鲆缺乏特异的性别相关分子标记,因此无法对其遗传性别进行鉴定,但推测这部分个体未来分化方向为卵巢。

本研究选用大菱鲆超雌亲鱼(WW♀)与普通雄鱼(ZZ♂)进行受精,获得遗传性别均为 ZW 型的全雌苗种(ZW♀),从而解决了大菱鲆缺乏性别特异分子标记的难题,为探索卵巢分化和卵母细胞发育机制研究提供了理想实验材料(Meng *et al.*, 2016)。此外,通过对大菱鲆 *figla* 基因在性腺组织中的表达特异性和卵母细胞表达定位结果的研究,还解决了仔、稚鱼期无法识别和剥离性腺组织的问题,为开展其在早期性腺发育的表达研究提供便利。qRT-PCR 研究结果表明,在全雌大菱鲆孵化后 15~90 d 期间, *figla* mRNA 首次 25 dph 的稚鱼中被检测到, 35 dph 显著增加,此后直至 90 dph 表达量持续上升。根据 Lin 等(2012)、Zhao 等(2017)和韩伟国(2011)的研究结果,大菱鲆卵巢组织学分化(卵巢腔的出现)时间为 40~60 dph,而可观察到的雌雄个体 PGCs 数量差异时间则最早可达 36~52 dph。此外,孟振(2015)通过高温诱导不同规格大

菱鲆性别逆转实验表明,大菱鲆温度敏感窗口期为 28~40 dph (体长 20~30 mm),早于性腺组织学分化时期。本研究大菱鲆 *figla* mRNA 在卵巢早期发育过程中的表达规律,与其性腺分化早期的 PGCs 增殖时期和温度敏感窗口期相吻合,由此可推测, *figla* 在早期卵泡发生过程中起转录调控作用,其上调表达能促进卵泡的正常发生。

综上,大菱鲆 *figla* 雌雄差异表达模式、卵母细胞表达定位和早期卵巢发育过程中表达规律研究结果表明,该基因在原始卵泡和卵母细胞形成中发挥重要作用,关于其在卵母细胞发育及性腺分化过程中的调控机制仍有待进一步深入研究。开展 *figla* 基因功能研究不仅可以加深对鱼类性别决定和分化调控机制的理解,还能为鱼类性别控制和养殖应用提供新思路和方法。

参 考 文 献

- DEVLIN R H, NAGAHAMA Y. Sex determination and sex differentiation in fish: An overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture*, 2002, 208(3/4): 191-364
- FIGUERAS A, ROBLEDO D, CORVELO A, *et al.* Whole genome sequencing of turbot (*Scophthalmus maximus*; Pleuronectiformes): A fish adapted to demersal life. *DNA Research*, 2016, 23(3): 181-192
- HAN W G. Histological sex differentiation of the gonads and a short-cut sexing technique in juvenile turbot *Scophthalmus maximus*. Master's Thesis of Ocean University of China, 2011 [韩伟国. 大菱鲆性腺分化组织学和早期性别快速鉴定技术的研究. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2011]
- HASI G W, CHEN X X, YI R H, *et al.* Primordial follicle formation and its mechanism. *Modern Animal Husbandry Science & Technology*, 2020(12): 1-3 [哈斯高娃, 陈小辛, 伊茹汗, 等. 原始卵泡形成研究进展. 现代畜牧科技, 2020(12): 1-3]
- HU C J. Molecular cloning and expression of several germ cell markers of the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* and southern catfish, *Silurus meridionalis*. Doctoral Dissertation of Southwest University, 2008 [胡重江. 罗非鱼和南方鲇生殖细胞几种分子标记的克隆和表达研究. 西南大学博士研究生学位论文, 2008]
- HU Y, CHU Z L, BAI Y F, *et al.* *Figla* overexpression induces differentiation of mouse embryonic stem cells toward female germ cells. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2012, 28(3): 240-247 [胡玥, 褚志礼, 白耀富, 等. *Figla* 基因过表达促进小鼠胚胎干细胞向雌性生殖细胞分化. 中国生物化学与分子生物学报, 2012, 28(3): 240-247]
- HUNTRISS J, GOSDEN R, HINKINS M, *et al.* Isolation, characterization and expression of the human Factor in the

- Germline alpha (FIGLA) gene in ovarian follicles and oocytes. *Molecular Human Reproduction*, 2002, 8(12): 1087–1095
- JOSHI S, DAVIES H, SIMS L P, *et al.* Ovarian gene expression in the absence of FIGLA an oocyte-specific transcription factor. *BMC Developmental Biology*, 2007, 7: 67
- KANAMORI A, TOYAMA K, KITAGAWA S, *et al.* Comparative genomics approach to the expression of *figla*, one of the earliest marker genes of oocyte differentiation in medaka (*Oryzias latipes*). *Gene*, 2008, 423(2): 180–187
- KITANO J, ANSAI S, TAKEHANA Y, *et al.* Diversity and convergence of sex-determination mechanisms in teleost fish. *Annual Review of Animal Biosciences*, 2024, 12: 233–259
- KLEPPE L, EDVARSEN R B, FURMANEK T, *et al.* *bmp15l*, *figla*, *smc1bl*, and *larpl6l* are preferentially expressed in germ cells in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Molecular Reproduction and Development*, 2017, 84(1): 76–87
- LI H L, XU W T, ZHANG N, *et al.* Two *Figla* homologues have disparate functions during sex differentiation in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Scientific Reports*, 2016, 6: 28219
- LIANG S S, WANG W X, WANG L J, *et al.* *Figla* gene roles in the proliferation of oocytes in the olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, 2020, 528: 735493
- LIN F, XU S H, MA D Y, *et al.* Germ line specific expression of a Vasa homologue gene in turbot (*Scophthalmus maximus*): Evidence for Vasa localization at cleavage furrows in euteleostei. *Molecular Reproduction and Development*, 2012, 79(11): 803–813
- MARTÍNEZ P, ROBLEDO D, TABOADA X, *et al.* A genome-wide association study, supported by a new chromosome-level genome assembly, suggests *sox2* as a main driver of the undifferentiated ZZ/ZW sex determination of turbot (*Scophthalmus maximus*). *Genomics*, 2021, 113(4): 1705–1718
- MENG Z. Studies on sex determination mechanism and chromosom engineering breeding in turbot, *Scophthalmus maximus*. Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2015 [孟振. 大菱鲆性别决定机制与染色体组工程育种技术的研究. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2015]
- MENG Z, LIU X F, LIU B, *et al.* Induction of mitotic gynogenesis in turbot *Scophthalmus maximus*. *Aquaculture*, 2016, 451: 429–435
- MENG Z, ZHANG B Y, SONG C E, *et al.* Optimal conditions for pressure shock induction of triploidy in turbot and a comparison of induction efficiency with cold shock. *Aquaculture Reports*, 2023, 33: 101775
- NAKAMURA M, KOBAYASHI T, CHANG X T, *et al.* Gonadal sex differentiation in teleost fish. *Journal of Experimental Zoology*, 1998, 281(5): 362–372
- PANG C Y, LU X R, ZHU P, *et al.* Cloning and transcriptional activity of promoter of buffalo zone *Pellucida 3* (ZP3) gene. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2015, 31(6): 1350–1356 [庞春英, 陆杏蓉, 朱鹏, 等. 水牛透明带 3 基因启动子克隆及转录活性检测. 江苏农业学报, 2015, 31(6): 1350–1356]
- QIAN J M, MIN Q W, DONG R R, *et al.* Molecular cloning and expression analyses of *Foxo3a* and *Foxo3b* genes in *Gobiocypris rarus*. *Fisheries Science*, 2023, 42(2): 222–232 [钱佳铭, 闵倩雯, 董然然, 等. 稀有鮡鲫 *Foxo3a*、*Foxo3b* 基因克隆和表达分析. 水产科学, 2023, 42(2): 222–232]
- QIN M M, ZHANG Z W, SONG W Y, *et al.* Roles of *Figla/figla* in juvenile ovary development and follicle formation during zebrafish gonadogenesis. *Endocrinology*, 2018, 159(11): 3699–3722
- QIU Y X, SUN S H, CHARKRABORTY T, *et al.* *Figla* favors ovarian differentiation by antagonizing spermatogenesis in a teleosts, Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *PLoS One*, 2015, 10(4): e0123900
- QU J B, LI R, LIU Y X, *et al.* Molecular characterization, expression pattern and transcriptional regulation of *figla* during gonad development in Japanese founder (*Paralichthys olivaceus*). *Journal of Ocean University of China*, 2022, 21(4): 1037–1050
- RIBAS L, ROBLEDO D, GÓMEZ-TATO A, *et al.* Comprehensive transcriptomic analysis of the process of gonadal sex differentiation in the turbot (*Scophthalmus maximus*). *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2016, 422: 132–149
- ROBLEDO D, RIBAS L, CAL R, *et al.* Gene expression analysis at the onset of sex differentiation in turbot (*Scophthalmus maximus*). *BMC Genomics*, 2015, 16: 973
- STRÜSSMANN C A, NAKAMURA M. Morphology, endocrinology, and environmental modulation of gonadal sex differentiation in teleost fishes. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2002, 26(1): 13–29
- VIÑAS A, TABOADA X, VALE L, *et al.* Mapping of DNA sex-specific markers and genes related to sex differentiation in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Marine Biotechnology*, 2012, 14(5): 655–663
- XIE T, GAO Y T, LI M Y, *et al.* Effects of three different anticoagulants on blood cell morphology, anticoagulation, and hematological parameters in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Progress in Fishery Sciences*, 2023, 44(2): 68–76 [谢婷, 高云涛, 李明月, 等. 3 种抗凝剂对大菱鲆血液抗凝效果、血细胞形态和血液生理生化指标的影响. 渔业科学进展, 2023, 44(2): 68–76]
- YAMAMOTO T. Permanency of hormone-induced reversal of sex-differentiation in the medaka, *Oryzias latipes*. *Zoological Science*, 1968, 41(4): 172–179
- YUAN C, WU T T, ZHANG Y Y, *et al.* Responsiveness of four gender-specific genes, *figla*, *foxl2*, *scp3* and *sox9a* to 17 α -ethinylestradiol in adult rare minnow *Gobiocypris rarus*. *General and Comparative Endocrinology*, 2014, 200: 44–53
- ZHANG B Y, YANG L, MENG Z, *et al.* Effect of temperature on energy budgets in triploid turbot juveniles, *Scophthalmus maximus*. *Progress in Fishery Sciences*, 2024, 45(5): 53–63 [张邦胤, 杨林, 孟振, 等. 温度对大菱鲆三倍体能量收支

的影响. 渔业科学进展, 2024, 45(5): 53–63]

ZHAO C Y, XU S H, LIU Y F, *et al.* Gonadogenesis analysis and sex differentiation in cultured turbot (*Scophthalmus maximus*). Fish Physiology and Biochemistry, 2017, 43(1):

265–278

ZHOU Q, ZHU Y, CHEN Z F, *et al.* Identification and expression analysis of *figla* gene in the turbot, *Scophthalmus maximus*. Aquaculture Research, 2018, 49(11): 3483–3490

(编辑 冯小花)

Cloning and Expression Analysis of *figla* During Ovarian Differentiation in Turbot (*Scophthalmus maximus*)

SUN Xiaoxuan^{1,2}, CHENG Luyao^{1,3}, MENG Zhen^{1①}, XU Wenteng¹,
LIU Xinfu¹, ZHANG Hesen⁴, XU Rongjing⁵

(1. State Key Laboratory of Mariculture Biobreeding and Sustainable Goods, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

2. College of Fisheries and Life Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

3. College of Fisheries, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China;

4. Qingdao General Aquaculture Co., Ltd., Qingdao 266404, China;

5. Yantai Development Zone Tianyuan Aquatic Products Co., Ltd., Yantai 264001, China)

Abstract The transcription factor gene *figla* (factor in the germ line, alpha), a member of the basic helix-loop-helix (bHLH) family, has been extensively documented for its pivotal role in mammalian ovarian development and primordial follicle formation. However, studies of *figla* in teleosts are less detailed than those in mammals. Turbot (*Scophthalmus maximus*), an important aquaculture species in Europe and China, exhibits sexual dimorphism in growth and body size and possesses a female heterogametic sex determination system (ZW female and ZZ male). Therefore, it is crucial to understand the mechanisms underlying sex determination and differentiation. This study exclusively used female individuals as experimental subjects to elucidate the complete cDNA sequence of *figla* in turbot and its role during early ovarian development. The full-length cDNA sequence of *figla* was cloned using RT-PCR and rapid amplification of cDNA ends techniques. Tissue expression distribution and spatiotemporal expression patterns during early ovarian development were investigated using semi-quantitative RT-PCR, real-time fluorescence quantitative PCR, and *in situ* hybridization. The full length of the *figla* gene cDNA had 1,006 base pairs (bp), with an open reading frame ranging from 150 bp to 758 bp, encoding 202 amino acids with a conserved bHLH domain. In the turbot gonads, *figla* exhibited specific expression, showing higher levels in the ovaries than in the testes. The expression pattern of *figla* mRNA was detected throughout various stages of ovarian development, commencing at 25 dph and progressively increasing until reaching its peak at 90 dph. *In situ* hybridization experiments revealed the predominant localization of *figla* mRNA within the cytoplasmic region of oocytes. In conclusion, the distinct expression pattern of *figla* in male and female turbot, its localization within primary oocytes, and its expression patterns during early ovarian development suggest a crucial role for this gene in the normal development of oocytes and ovaries. Further research is required to investigate the regulatory mechanisms underlying oocyte development and gonadal differentiation. The study of *figla* function not only enhances our understanding of sex determination and differentiation mechanisms in turbot but also provides novel insights and methodologies for sex control and breeding applications in this species.

Key words Turbot *Scophthalmus maximus*; *figla*; Primary oocyte; Gonadal differentiation

① Corresponding author: MENG Zhen, Email: mengzhen@ysfri.ac.cn