

Figla在尼罗罗非鱼卵巢分化和维持过程中的作用

周林燕¹, 邱永秀^{1,2*}

(1. 西南大学淡水鱼类资源与生殖发育教育部重点实验室, 重庆 400715;

2. 崇州市农村发展局, 四川 成都 611200)

摘要: 为了深入研究Figla在卵巢分化早期的功能, 实验通过转录激活因子样效应物核酸酶(transcription activator-like effector nucleases, TALEN)介导的基因组靶向修饰技术在雌性尼罗罗非鱼体内成功敲除了Figla基因。结果显示, TALEN能高效地对Figla基因进行靶向性编辑, 并通过测序筛选到不同碱基数目(4, 8, 20等)缺失的基因型个体。组织学观察发现Figla基因敲除阳性XX个体在3月龄时出现卵巢发育异常, 表现为卵母细胞和滤泡细胞大量或完全缺失, 并伴随体细胞的大量增生。免疫组化结果显示, 在Figla基因敲除阳性个体的卵巢中检测到雄激素合成酶(Cyp11b2)的表达, 但未检测到雌激素合成酶(Cyp19a1a)的表达。血清11-KT水平升高, 而E2水平随之降低。研究认为Figla在硬骨鱼类卵巢的分化和维持过程中发挥至关重要的作用。

关键词: 尼罗罗非鱼; Figla; 卵巢分化和维持; TALEN

中图分类号: Q 132.1; S 917.4

文献标志码: A

在哺乳动物中, 卵巢是一个既重要又独特的器官。其中, 卵原细胞的分化、始基卵泡的形成以及初级卵泡的转变, 是卵泡早期发育过程当中最为关键的环节。在卵子发生过程中, 卵母细胞中的大量基因表达经历着动态变化, 这些基因的表达受生殖细胞和体细胞中一系列转录因子之间相互作用的严密调控。因此, 鉴定这些在卵母细胞中表达的转录调控因子对于揭示其在卵巢滤泡分化过程中的特定功能具有重要意义^[1]。已有的研究表明, Figla(factor in the germ line, alpha)在该过程中发挥着举足轻重的作用。Figla是影响原始卵泡形成的碱性螺旋-环-螺旋转录因子^[2], 它在整个卵泡生成过程中持续在生殖细胞中表达, 是卵泡正常形成的必要条件, 因此它对原始卵泡和卵母细胞的发育都有着特殊的作用。

已有的研究表明, 小鼠Figla包含有HLH(helix-loop-helix)结构域, 能够结合到ZP(zona

pellucida)基因启动子区域的顺式作用原件E-Box9来调控ZP基因的表达^[3-4]。最早在交配后13 d的雌性胚胎生殖嵴中即可检测到小鼠Figla的表达, 并且在卵泡和生殖细胞簇的发育过程中持续表达。对于雌性胚胎, 缺乏Figla不会影响生殖细胞的迁移和增殖, 生殖嵴也会正常形成, 但是会导致出生后卵母细胞迅速退化消失, 原始卵泡也不能正常形成, 最终导致成体雌鼠不孕^[5]。微阵列(Microarray)分析发现, 和野生型个体相比, Figla^{-/-}个体卵巢中雌性基因如Serpinb6C[serine(or cysteine)peptidase inhibitor, clade B, member 6c], Arhgap20(Rho GTPase activating protein 20), Nalp4a(NLR family, pyrin domain containing 4A)等基因的表达量出现显著下调。相反, 雄性特异基因Slc2a3(solute carrier family 2, member 3, or Glut3), Tdrd6(tudor domain-containing 6), Irgc1(immunity-related GTPase family, cinema 1)等的表达水平异常上调。因此,

收稿日期: 2015-03-20 修回日期: 2015-10-27

资助项目: 国家自然科学基金青年基金(31572597); 中国高等教育博士科研启动基金(20130182130003); 西南大学人才引进科研基金(SWU111003); 中央高校基本科研基金(XDJK2015A004)

通信作者: 邱永秀, E-mail:15086862015@163.com

在卵子发生过程中, *Figla*可能抑制雄性生殖细胞相关基因的表达^[2,6]。人类的*Figla*缺失或突变可能会引起不同程度的卵巢发育异常或卵母细胞成熟障碍, 最终可导致卵巢早衰(premature ovarian failure, POF)和不孕不育症的发生^[7]。研究人员筛选出100名中国妇女体内导致卵巢早衰的突变基因, 结果发现*Figla*基因的3种不同的突变与卵巢早衰密切相关^[8]。因此, *Figla*基因在激活哺乳类卵巢分化的特定通路中发挥重要作用^[2]。已有研究发现, 通过构建转基因小鼠, 在雄性生殖细胞中异位表达*Figla*导致雄性相关基因下调、减数分裂受损和生殖细胞凋亡, 并伴随年龄相关的不育^[6]。总之, *Figla*基因被认为能够抑制雄性生殖细胞特异基因的表达, 激活雌性生殖细胞特异基因的表达, 对两性性别特异基因的表达起到平衡和调节的作用^[9]。

基于*Figla*在哺乳类卵巢分化过程中的重要作用, 该基因在青鳉(*Oryzias latipes*)、黑鲷(*Acanthopagrus schlegeli*)等物种体内陆续被克隆, 其在鱼体性腺发育过程或者性逆转过程中的表达模式也被研究。原位杂交研究发现, *Figla*基因在青鳉成鱼卵巢中大量表达, 然而在成鱼精巢中没有检测到*Figla*阳性信号^[10]。在黑鲷的研究中发现*Figla*在性逆转中可能发挥关键作用, 而这种作用是通过控制雄性支持细胞向雌性滤泡细胞的转化来实现的^[11]。已有研究证明在雄性尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)中过表达*Figla*可抑制精子发生相关基因的表达, 使得精巢发育受阻, 不能进行正常的减数分裂和精子发生^[12]。

迄今为止, *Figla*在人类和小鼠卵巢分化和维持过程中的功能已得到深入研究。尽管已有报道表明硬骨鱼类*Figla*在卵巢中呈现高水平表达, 但并没有直接的证据证明*Figla*在鱼类卵巢分化和维持中的作用。因此, 为了进一步了解鱼类*Figla*在性腺分化中的可能作用, 实验设计了有效的TALENs基因打靶位点, 围绕*Figla*在硬骨鱼类性别分化和性腺分化过程中的功能而展开了一系列研究。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本实验所用的尼罗罗非鱼于2007年从日本国立基础生物学研究所引进, 在西南大学(重庆北碚)培育建系, 获得单性鱼苗。性逆转假雄鱼♂(XX)是分别通过芳香化酶抑制剂从孵化后3~35

d处理鱼苗得到。全雌♀(XX)鱼苗由正常雌鱼♀(XX)的卵子与性逆转假雄鱼♂(XX)的精子通过人工授精获得, 受精卵置于自制孵化器中, 在26℃循环水孵化系统中孵化。孵化后的尼罗罗非鱼饲养于26℃循环水系统中, 光照时间与自然光照周期保持一致。

1.2 *Figla*基因敲除序列的设计

实验已从尼罗罗非鱼体内获得了*Figla*基因的全长序列(KP096546), 根据TALEN基因敲除技术的靶序列设计原则^[13]及美国康奈尔大学建立的TALEN设计网站(<http://bolglabx.plp.iastate.edu/TALEN/TALEN/>)对*Figla*基因进行靶向识别序列的设计, 找出合适的识别序列及靶序列。

1.3 TALEN敲除载体的构建及注射用mRNA的合成

采用多次酶切和连接构建靶位点上下游的14单元TALE模块^[14]。载体采用*Hind* III和*Nhe* I进行酶切, 单元采用*Hind* III和*Spe* I(*Nhe* I的同尾酶)进行酶切, 通过T₄ DNA连接酶将酶切后的载体和单元的回收产物再连接。通过pMD-19T载体通用引物(M13-F:CGCCAGGGTTTCCCAGTCCGAC; M13-R:AGCGGATAACAATTTCCACAGGA)进行PCR验证, 筛选出阳性克隆, 提取的质粒送交上海生物工程技术服务有限公司(中国上海)进行测序验证。在分别构建识别左臂和右臂的TALEN识别模块后, 采用*Spe* I和*Nhe* I双酶切识别模块, 同时, 表达载体pCS2-PEAS和pCS2-PERR用*Nhe* I单酶切并去磷酸化, 最后将识别模块和表达载体相连。然后, 利用*Not* I对表达载体pCS2-PEAS-*Figla*和pCS2-PERR-*Figla*进行线性化处理, 加入终浓度为5% SDS和80 μg/μL蛋白酶K, 在50℃下处理30 min, Qiagen PCR胶回收试剂盒进行纯化, 用无酶水将模板稀释至500 ng/μL。注射用mRNA按照Ambion试剂盒步骤进行合成。同时对未构建识别序列的表达载体进行mRNA的合成, 用于对照实验。

1.4 显微注射

将合成好的mRNA浓度稀释至200 ng/μL, pCS2-PEAS-*Figla*和pCS2-PERR-*Figla*按照1:1的比例混合, 加入1%的酚红作为指示剂。尼罗罗非鱼遗传全雌♀(XX)受精卵置于无菌平皿中, 利用显微注射系统在受精卵的1细胞期进行注射,

注射剂量为每个受精卵400~600 pg mRNA, 注射后的受精卵置于本实验室自制的26 °C恒温循环水孵化系统中进行孵化。

1.5 基因组DNA的提取, 目的片段的扩增及酶切检测

待注射的受精卵孵化后7 d, 取20尾幼鱼进行TALEN活性的验证。首先, 将20尾幼鱼合并后匀浆, 并采用酚/氯仿法提取基因组DNA。通过在*Figla*左右识别序列的上游和下游分别设计基因特异性引物(F: CTCCCAGCTCGCTTTT ACAT, R: TTGCTAACAGCGTCCCTC)进行PCR扩增。同时, 提取对照组和野生型个体的基因组DNA, 扩增出目的条带。通过1.2%琼脂糖凝胶电泳分离目的条带, 然后进行胶回收。利用靶序列之间的酶切位点*Fnu4H I*对回收产物进行酶切, 电泳检测是否存在未切开的条带并加以测序以确定构建的TALEN载体是否具有活性。

1.6 免疫组化

取出阳性*Figla*, 敲除个体性腺并通过波恩氏液进行固定。石蜡包埋、连续切片, 厚度为5 μm。二甲苯脱蜡、梯度酒精复水至75%乙醇后, 1×PBS洗5次, 每次5 min, 再用3% H₂O₂(80 mL 甲醇+10 mL 1×PBS缓冲液+10 mL 30% H₂O₂)室温避光处理10 min以封闭内源性过氧化物酶, 然后再用1×PBS洗5次, 正常血清封闭15 min, 分别滴加兔抗Cyp19a1a、Cyp11b2抗体37 °C孵育30 min, 同时PBS洗5次。滴加羊抗兔辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育30 min, PBS洗5次。DAB(3, 3N-diaminobenzidine tetrahydrochloride)显色, 苏木精复染, 流水冲洗15 min返蓝。梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树脂封片, 奥林巴斯BX51显微成像。

1.7 激素水平测定

通过尾静脉取血的方式, 分别抽取*Figla*基因敲除鱼和对照罗非鱼的全血, 并离心分离血清用于激素水平检测。采用雌激素(estradiol)和雄激素(11-ketotestosterone)EIA Kit(Cayman, USA)试剂盒检测血清雌激素和雄激素的水平。

2 结果

2.1 *Figla*打靶序列的设计及突变后序列检测

通过对*Figla*基因进行靶向识别序列的设计,

选择第一个外显子上的靶点(+22~+78)(图1-a), 左臂的识别序列长14 bp, 序列为CCATGAGTGAC ATT, 右臂的识别序列长14 bp, 序列为GCAGTAGAC AGGGA, 中间间隔28 bp的打靶序列为TTGAAGC GGCTGACGGGCG AGTCTGCGC, 其中有酶切位点*Fnu4H I*(GCNGC, 图1-a)。*Fnu4H I*酶切结果显示, 对照组和野生型个体DNA条带(366 bp)完全被切开(236和130 bp), 而实验组存在同样的已切开条带和未切开条带(366 bp)(图1-b)。未切开条带亚克隆测序得到的序列分析发现, 打靶序列中存在缺失4、8、20个等碱基的突变体(图1-c)。

2.2 *Figla*基因敲除对卵巢正常发育的影响

在孵化后3个月, 组织学观察(H.E染色)结果发现, *Figla*基因敲除XX个体的卵巢不能正常发育, 卵母细胞及滤泡细胞严重退化缺失, 以致性腺中央出现一个大空腔, 并且出现大量的体细胞增生, 因此整个性腺被体细胞充满, 仅剩数个卵母细胞(图版 I -1)。相反, 在3月龄正常卵巢中能观察到分化到不同时相的卵母细胞层(图版 I -2)。结果表明*Figla*在硬骨鱼类卵巢的发育和维持过程中起重要作用。

2.3 *Figla*基因敲除对卵巢相关基因表达的影响

利用免疫组织化学技术检测Cyp19a1a和Cyp11b2在3月龄罗非鱼*Figla*基因敲除阳性个体性腺中的表达情况。结果显示, 在*Figla*基因敲除阳性个体性腺中检测到了Cyp11b2阳性信号的表达(图版 II -1, 2), 然而, 只能检测到极少的Cyp19a1a阳性信号(图版 II -4, 5)。Cyp19a1a是芳香化酶编码基因, 在正常的XX个体的卵巢间质细胞中特异表达(图版 II -6); Cyp11b2是雄激素合成酶基因, 在精巢间质细胞特异性表达(图版 II -3)。

2.4 *Figla*缺失对雌激素和雄激素合成的影响

收集3月龄*Figla*基因敲除阳性个体和对照XX、XY血液, 分离血清并稀释, 采用酶联免疫法(EIA)检测雌激素(E2)和雄激素(11-KT)水平, 以便分析*Figla*缺失对雌、雄激素合成水平的影响。结果显示, *Figla*基因敲除阳性XX个体的11-KT水平与对照组XX个体相比显著升高, 但仍然低于正常XY个体(图2-a); 而E2的水平比正常XY个体高, 但显著低于正常XX个体水平(图2-b)。

3 讨论

已有的研究表明，哺乳类性别决定和分化的方向取决于雌性通路和雄性通路的对抗作用^[15-16]，在雄性中，Sry(sex-determining region on Y chromosome, 哺乳类雄性性别决定的总控制基因)在交配后12.5 d开始表达，并激活下游雄性特异基因Sox9和Fgf9的表达，进而诱导精巢分化。而在雌性中，Rspo1/Wnt/b-catenin通路和Foxl2激活

的雌激素合成通路既彼此独立，又协同作用，决定着卵巢的分化方向^[17-18]。在哺乳类，生殖细胞和体细胞的相互作用过程是卵巢分化和维持必不可少的，其中生殖细胞中Figla在这种cross-talk过程中发挥重要作用^[19]。在小鼠和青鳉体内，Figla也是一个卵母细胞特定的标记^[10]。在Figla基因纯合敲除(Figla^{-/-})小鼠，尽管胚胎期性腺的发育正常，但是在出生时卵巢无法形成原始卵泡，并且随着发育的进行出现大量卵母细

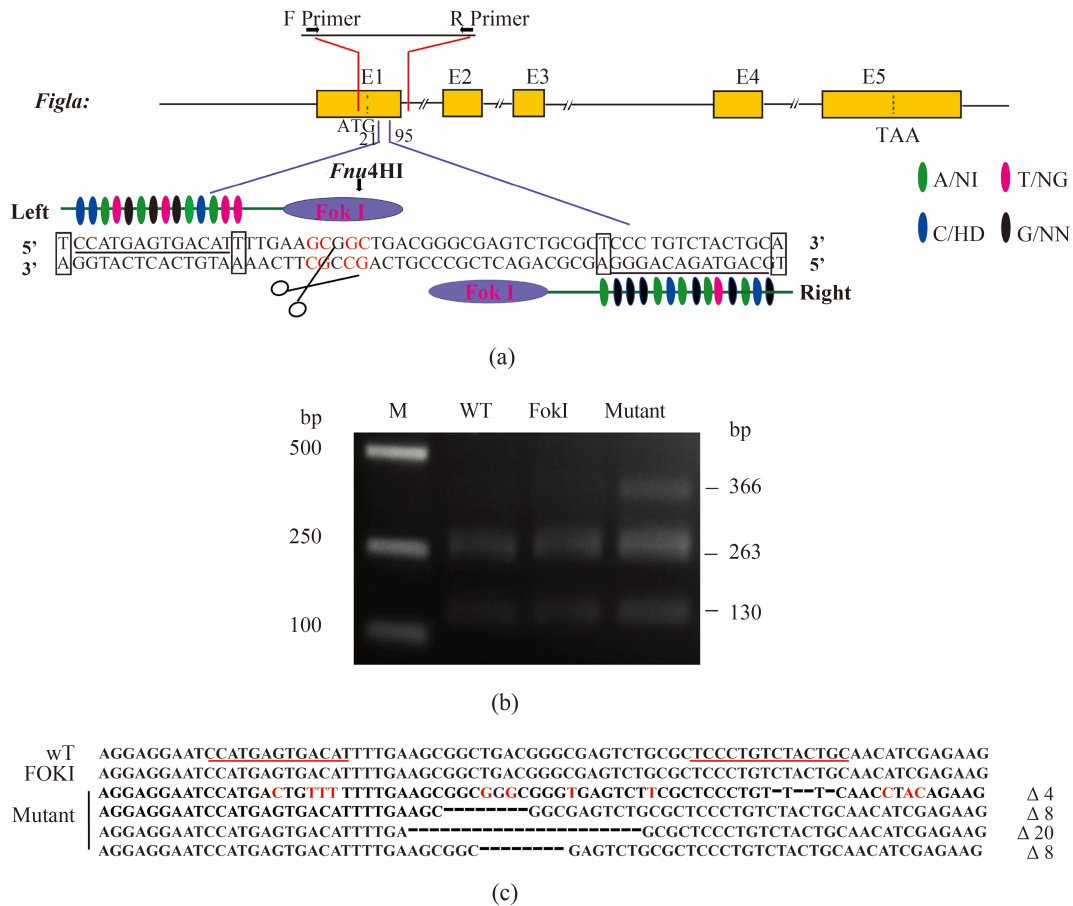


图1 Figla基因打靶序列的设计、酶切及突变序列检测

(a)将Figla基因的打靶位点设计在第1个外显子。酶切位点Fnu4HI用于后续突变分析。收集注射后72 h受精卵，提取基因组DNA，扩增目的片段用限制性内切酶酶切分析，进一步通过测序验证突变类型。F和R引物用于扩增目的片段。F. 正向引物；R. 反向引物。(b)酶切结果显示对照组WT、FokI被完全切分成2条带，敲除组(Mutant)除切开的2条带外，还存在明显未被切开的条带。M. 分子标记；WT. 野生型；FokI. 单靶臂注射组。(c)未切开条带测序结果分析。将突变序列和正常序列进行比对分析，删除和替换碱基分别通过空格和红色字表示。右边的数据表示删除或插入碱基的数目；Δ. 删除；M. 分子标记；WT. 野生型；FokI. 单靶臂注射组

Fig. 1 Gene structure of tilapia Figla, design of Figla-TALENs and mutant sequences

(a) Figla-TALENs were designed to target on the first exon. A cleavage site with Fnu4HI in the targeting sequence was used for mutation analysis. At 72 hours after injection, 20 embryos were randomly selected and pooled to extract their genomic DNA for PCR amplification. F and R primers were designed to amplify the fragment for digestion. F. forward primer; R. reverse primer. (b) Two bands were detected in control group of both wild type and single Tale arm injection, while an intact DNA fragment was observed in embryos injected with both pCS2-PEAS-Figla and pCS2-PERR-Figla. M. molecular Markers; WT. wild type; FokI. single Tale arm injection. (c) Sanger sequencing results from the uncleaved bands were listed. Numbers to the right of the sequences indicate the substitution (red) or deletions (space) of bases for each allele, with the number of indels; Δ. parentheses; M. DNA marker; WT. wide type; FokI. single TALE arm injection group

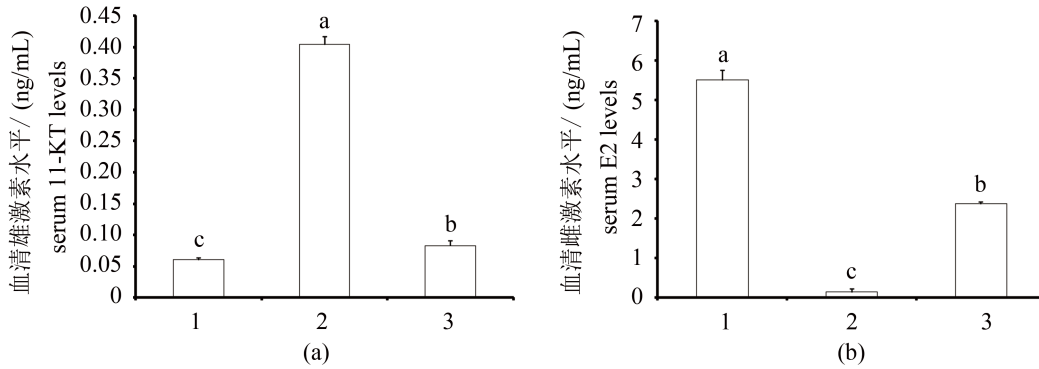


图2 *Figla*缺失对血清11-KT(a)和E2(b)水平的影响

数据表示3次测量的平均值±标准差; 1. 雌性对照; 2. 雄性对照; 3. *Figla*敲除; 误差线上不同字母表示统计分析后有显著差异($P < 0.05$)

Fig. 2 Impact of *Figla* deficiency on tilapia serum 11-KT(a) and E2(b) levels

Results were presented as the mean ± SD; 1. XX control; 2. XY control; 3. *Figla* KO; Bars bearing different letters differ ($P < 0.05$) by One-Way ANOVA

胞缺失, 以致出现卵巢萎缩和雌性不育^[5]。通过比较*Figla*基因敲除的卵巢和*Figla*基因过量表达的精巢的蛋白质组成, 发现于出生后卵子发生过程中, *Figla*在早期可激活相关卵母细胞特异基因的表达, 同时也可以抑制精子发生的相关通路^[20-21], 这些研究表明, *Figla*在两性生殖细胞特异基因的表达中起到平衡和调节的关键作用^[6]。通过免疫组化研究发现, 尼罗罗非鱼*Figla*仅在卵巢卵原细胞早期的卵母细胞中大量表达^[12]。因此, 尼罗罗非鱼*Figla*雌性特异的表达模式和初级卵母细胞的定位暗示该基因可能在尼罗罗非鱼卵巢的正常发育中起着重要作用。

长期以来由于存在技术瓶颈, 非模式生物如养殖鱼类基因的研究几乎都停留在克隆和表达谱的层面, 鲜有关于基因功能的研究报道, 因此, 极大地限制了这些经济物种的基因功能研究。TALEN介导的基因组靶向修饰技术的出现是对传统转基因功能研究技术的变革^[22], 本研究首次在尼罗罗非鱼体内利用TALEN靶向基因敲除技术对*Figla*基因进行编辑。在对敲除靶序列进行检测时, 将实验组未切开的条带回收、亚克隆并随机挑选阳性菌测序, 结果显示出不同程度的碱基缺失, 这说明了本研究中所构建的TALEN敲除系统具有极高的靶向性敲除效率。对3月龄*Figla*基因敲除XX个体进行组织学分析, 结果显示*Figla*基因敲除XX个体的卵巢不能进行正常发育, 卵母细胞及滤泡细胞严重缺失, 并伴随大量的体细胞增生。表明*Figla*对卵母细胞分化和滤泡细胞发育是必不可少的, 与哺乳类一

样, 实验推测*Figla*可能通过激活雌性通路, 同时抑制雄性通路一系列基因的表达, 最终促进卵巢的分化。同时, 免疫组化实验和EIA检测进一步证实了*Figla*在尼罗罗非鱼卵巢分化过程中发挥重要作用。*Figla*基因敲除导致雌激素合成酶基因(*Cyp19a1a*)的表达降低, 进而导致雌激素水平显著下降。大量离体和在体实验表明, 雌激素在鱼类雌性性别决定和分化过程中发挥重要作用, 因此雌激素是卵巢分化的天然诱导剂, 一旦有雌激素的合成, 无论遗传性别如何, 性腺都将发育为卵巢, 比如雌激素处理XY尼罗罗非鱼鱼苗能导致其完全性逆转为XY雌性。相反, 在性腺分化早期雌激素合成或作用受到抑制, 比如雌激素受体拮抗剂或者芳香化酶抑制剂处理XX尼罗罗非鱼, 导致性逆转为XX雄性^[23-24]。因此, 在*Figla*基因敲除的XX个体中, 雌激素的下降导致卵巢分化受阻, 表明*Figla*激活的通路可能通过促进雌激素合成水平, 进而调控卵巢分化过程。相反, 雄激素合成酶基因表达上调, 进而雄激素水平显著上升, 表明在*Figla*基因敲除的卵巢中出现了体细胞的雄性化现象, 此时的性腺正在经历从卵巢退化到精巢重建的过程。推测*Figla*可能通过抑制雄性通路基因, 进而促进卵巢分化。

综上所述, 在雌性尼罗罗非鱼体内敲除*Figla*基因可导致大量卵母细胞缺失, 使得卵巢发育受阻, 同时, 前滤泡细胞将转化为Sertoli和Leydig细胞。因此, 硬骨鱼类*Figla*在卵巢分化和维持过程中可能发挥重要作用。

参考文献:

- [1] 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[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2012, 28(3): 240-247.
- Hu Y, Chu Z L, Bai Y F, *et al.* Figla over expression induces differentiation of mouse embryonic stem cells toward female germ cells [J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2012, 28(3): 240-247 (in Chinese).
- [2] Joshi S, Davies H, Sims L P, *et al.* Ovarian gene expression in the absence of FIGLA, an oocyte-specific transcription factor [J]. BMC Developmental Biology, 2007, 767.
- [3] Littlewood T D, Evan G I. Transcription factors 2: Helix-loop-helix [J]. Protein Profile, 1995, 2(6): 621-702.
- [4] Athanikar J N, Osborne T F. Specificity in cholesterol regulation of gene expression by coevolution of sterol regulatory DNA element and its binding protein [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998, 95(9): 4935-4940.
- [5] Soyal S M, Amleh A, Dean J. FIG α , a germ cell-specific transcription factor required for ovarian follicle formation [J]. Development, 2000, 127(21): 4645-4654.
- [6] Hu W, Gauthier L, Baibakov B, *et al.* FIGLA, a basic helix-loop-helix transcription factor, balances sexually dimorphic gene expression in postnatal oocytes [J]. Molecular and Cellular Biology, 2010, 30(14): 3661-3671.
- [7] Suzumori N, Pangas S A, Rajkovic A. Candidate genes for premature ovarian failure [J]. Current Medicinal Chemistry, 2007, 14(3): 353-357.
- [8] Zhao H, Chen Z J, Qin Y Y, *et al.* Transcription factor Figla is mutated in patients with premature ovarian failure [J]. American Journal of Human Genetics, 2008, 82(6): 1342-1348.
- [9] Onichtchouk D, Aduroja K, Belting H G, *et al.* Transgene driving GFP expression from the promoter of the zona pellucida gene *zpc* is expressed in oocytes and provides an early marker for gonad differentiation in zebra fish [J]. Developmental Dynamics, 2003, 228(3): 393-404.
- [10] Kanamori A, Toyama K, Kitagawa S, *et al.* Comparative genomics approach to the expression of *figa*, one of the earliest marker genes of oocyte differentiation in medaka (*Oryzias latipes*) [J]. Gene, 2008, 423(2): 180-187.
- [11] Wu G C, Chang C F. Oocytes survive in the testis by altering the soma fate from male to female in the protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegelii* [J]. Biology of Reproduction, 2013, 88(1): 19.
- [12] Qiu Y X, Sun S H, Charkraborty T, *et al.* Figla favors ovarian differentiation by antagonizing spermatogenesis in a teleosts, Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. PLoS One, 2015, 10(4): e0123900.
- [13] Cermak T, Doyle E L, Christian M, *et al.* Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effect or-based constructs for DNA targeting [J]. Nucleic Acids Research, 2011, 39(12): e82.
- [14] Huang P, Xiao A, Zhou M G, *et al.* Heritable gene targeting in zebra fish using customized TALENs [J]. Nature Biotechnology, 2011, 29(8): 699-700.
- [15] Brennan J, Capel B. One tissue, two fates: molecular genetic events that underlie testis versus ovary development [J]. Nature Reviews Genetics, 2004, 5(7): 509-521.
- [16] Devlin R H, Nagahama Y. Sex determination and sex differentiation in fish: An overview of genetic, physiological, and environmental influences [J]. Aquaculture, 2002, 208(3-4): 191-364.
- [17] Chassot A A, Gillot I, Chaboissier M C. R-spondin1, WNT4, and the CTNNB1 signaling pathway: strict control over ovarian differentiation [J]. Reproduction, 2014, 148(6): R97-R110.
- [18] Eggers S, Ohnesorg T, Sinclair A. Genetic regulation of mammalian gonad development [J]. Nature Reviews Endocrinology, 2014, 10(11): 673-683.
- [19] Zamboni L, Upadhyay S. Germ cell differentiation in mouse adrenal glands [J]. Journal of Experimental Zoology, 1983, 228(2): 173-193.
- [20] Liang L, Soyal S M, Dean J. FIG α , a germ cell specific transcription factor involved in the coordinate expression of the zona pellucida genes [J]. Development, 1997, 124(24): 4939-4947.
- [21] Tripurani S K, Lee K B, Wang L, *et al.* A novel functional role for the oocyte-specific transcription factor newborn ovary homeobox (NOBOX) during early embryonic development in cattle [J]. Endocrinology, 2011, 152(3): 1013-1023.

- [22] De Francesco L. Move over ZFNs [J]. Nature Biotechnology, 2011, 29(8): 681-684.
- [23] 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.
- [24] Sun L N, Jiang X L, Xie Q P, *et al.* Transdifferentiation of differentiated ovary into functional testis by long-term treatment of aromatase inhibitor in Nile tilapia [J]. Endocrinology, 2014, 155(4): 1476-1488.

Functional studies of *Figla* in the ovarian differentiation and maintenance in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)

ZHOU Linyan¹, QIU Yongxiu^{1,2*}

(1. Key Laboratory of Freshwater Fish Reproduction and Development, Ministry of Education, Southwest University, Chongqing 400715, China;

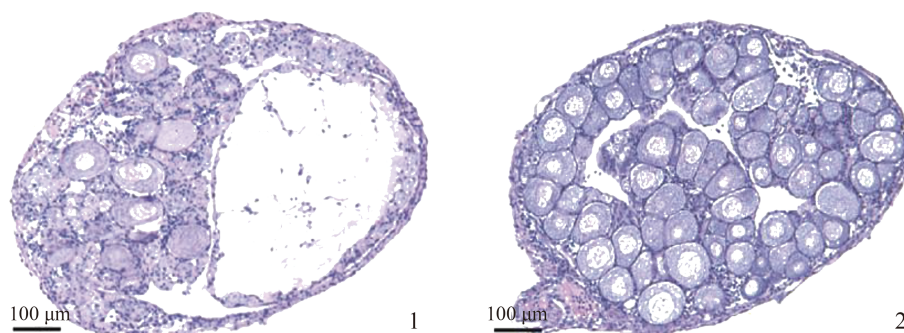
2. Bureau of Rural Development of Chongzhou, Chengdu 611200, China)

Abstract: *Figla* (factor in the germ line, alpha), encoding a germ cell-specific transcription factor, is a central regulator of oocyte-specific genes. In order to explore the potential role of *Figla* in fish gonadal differentiation, tilapia *Figla* gene was successfully targeted by TALENs (transcription activator-like effector nucleases) in XX individual and confirmed by genomic PCR and subsequent enzyme cleavage and sequencing. Consequently, the morphological and molecular changes in XX gonads were observed by H.E, IHC. Meanwhile, the alterations of E2 and 11-KT were also determined. From screening of different mutant genotypes with bases deletions (4, 8, 20, etc.), it was revealed that the efficiency of *Figla* gene targeting by TALEN was about 56.76%. Furthermore, deficiency of *Figla* gene in XX fish led to development of abnormal ovaries with severe degeneration or complete loss of oocytes and ectopic proliferations of somatic cells. Amazingly, IHC in *Figla*-deficient XX gonads revealed that male specific marker gene (*Cyp11b2*) for 11-KT production in leydig cells was expressed in the cells surrounding oocytes, however, *Cyp19a1a* was barely detectable which is strongly expressed in follicular cells of normal ovary. Notably, *Figla* deficiency led to dramatic decrease of E2 serum level along with augmentation in serum 11-KT level. Taken together, our data indicated that *Figla* might play an essential role in the ovarian differentiation and maintenance in tilapia fish.

Key words: *Oreochromis niloticus*; *Figla*; ovarian differentiation and maintenance; TALEN

Corresponding author: QIU Yongxiu. E-mail: 15086862015@163.com

Funding projects: National Natural Science Foundation of China(31572597); Specialized Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education of China(20130182130003); Research Foundation of Talent Introduction of Southwest University, China (SWU111003); Fundamental Research Funds for the Central Universities from Ministry of Education of China (XDJK2015A004)

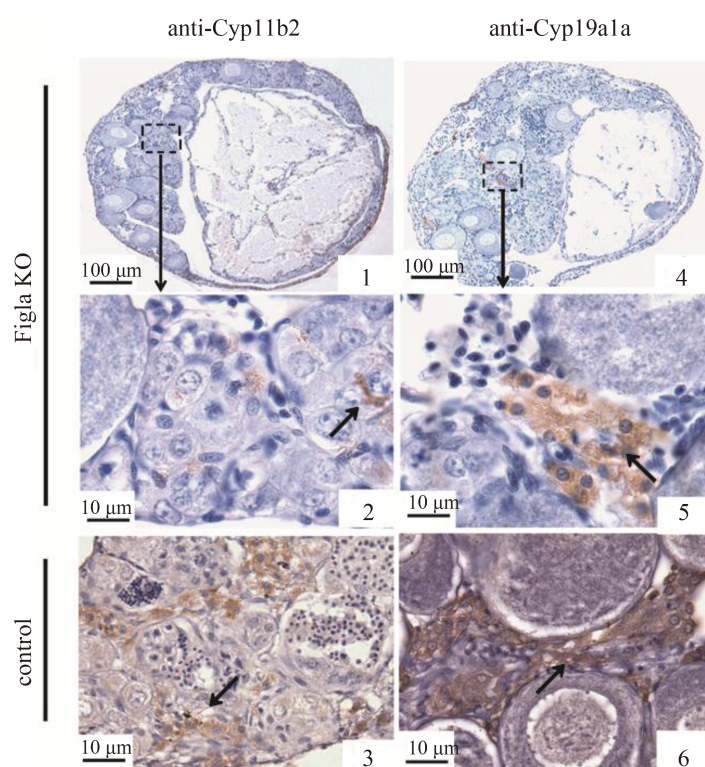


图版 I *Figla* 基因敲除个体3月龄性腺组织学观察

1. *Figla* KO, *Figla* 基因敲除阳性雌性个体卵巢; 2. control, 3月龄正常雌鱼卵巢

Plate I Histological observations of the 3-month-old control and *Figla* knock-out tilapia gonad

1. *Figla* KO, ovary of *Figla* gene knock-out female fish; 2. control, normal ovary of 3 months after hatching female



图版 II 免疫组化检测Cyp11b2和Cyp19a1a在3月龄对照组以及*Figla*缺失性腺中的表达

在*Figla*敲除的性腺中, 检测到Cyp11b2阳性信号表达于间质细胞(1, 2), 在相同部位检测到Cyp19a1a的表达(4, 5)。在对照组中, Cyp11b2在精巢间质细胞表达(3); Cyp19a1a在卵巢间质细胞表达(6)。2、5分别为1、4虚线框内区域的放大; 2、3箭头所指为Cyp11b2阳性信号, 5、6箭头所指为Cyp19a1a阳性信号; control, 对照组

Plate II Immunohistochemistry analysis of Cyp11b2 and Cyp19a1a expression in 3-month-old control and *Figla* knock-out XX tilapia gonad

Cyp11b2 signal was found in Leydig cells (1, 2), and Cyp19a1a was also expressed at the same place (4, 5). Cyp11b2 (11 β -hydroxylase, the key enzyme responsible for the production of androgen, 11-KT) was found to be highly expressed in Leydig cells of the control testis (3); Cyp19a1a (the key enzyme responsible for estrogen production) was found to be expressed in the control ovary interstitial cells(6). Panel 2 and 5 are the magnified images of the areas in the dotted square of panel 1 and 4, respectively; the arrows in panel 2, 3 and panel 5, 6 indicate the positive signals of Cyp11b2 and Cyp19a1a, respectively; control, the control group