

张梦倩, 张景琰, 葛红星, 等. 三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*) *foxl2* 基因功能初探及相关 miRNA 分析[J]. 海洋学报, 2022, 44(4): 85–94, doi:10.12284/hyxb2022060

Zhang Mengqian, Zhang Jingyan, Ge Hongxing, et al. Preliminary functional study of *foxl2* in *Portunus trituberculatus* and analysis of its related miRNA[J]. Haiyang Xuebao, 2022, 44(4): 85–94, doi:10.12284/hyxb2022060

三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*) *foxl2* 基因功能初探及相关 miRNA 分析

张梦倩¹, 张景琰², 葛红星¹, 刘萍^{2,3}, 李健^{2,3}, 孟宪亮^{3,4*}

(1. 江苏海洋大学 江苏省海洋生物技术重点实验室, 江苏 连云港 222005; 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. 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, 山东 青岛 266237; 4. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 农业农村部水生动物基因组学重点实验室, 山东 青岛 266071)

摘要: *foxl2* 在脊椎动物卵巢分化、发育和功能维持等方面具有重要作用, 然而其在三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*) 卵巢发育中的功能尚不明确。本研究首先克隆了三疣梭子蟹 *foxl2* (*Ptfoxl2*) 基因 cDNA 全长序列, 该基因 5' 和 3' 非编码区域 (UTR) 长度分别为 701 bp 和 211 bp, 开放阅读框的长度为 1 590 bp。基因表达分析结果显示, *foxl2* 在三疣梭子蟹不同组织中均有表达, 但在卵巢中表达量最高; 其在卵巢发育不同时期的表达存在显著差异, 在 V 期表达量最高; 切除眼柄后, 该基因的表达出现显著下降; 干扰该基因表达后, 卵巢 *vlg* 基因的表达显著上调。上述结果表明, *foxl2* 可能在三疣梭子蟹卵巢发育调控中发挥重要功能, 能够抑制卵巢组织中卵黄蛋白的合成。为进一步分析该基因的表达调控方式, 利用生物信息学方法, 预测了靶向 *foxl2* 的 miRNA, 并通过双荧光素酶报告基因检测实验, 从细胞水平验证了这些 miRNA 对 *Ptfoxl2* 的调控作用; 分析了其在卵巢发育不同时期以及切除眼柄后的表达模式。结果显示, 共转染 miR-9 类似物和包含 *foxl2* 3'UTR 的 pmirGLO 质粒组, 萤火虫酶与海肾荧光素酶活性比值出现显著下降, 且在卵巢发育过程及切除眼柄后与 *foxl2* 表达模式相反。该结果初步证实 miR-9 可以从转录后水平调控三疣梭子蟹 *foxl2* 基因的表达。

关键词: 三疣梭子蟹; *foxl2*; 切除眼柄; 卵巢发育; miRNA

中图分类号: S917.4

文献标志码: A

文章编号: 0253-4193(2022)04-0085-10

1 引言

foxl2 (forkhead box protein L2) 是 Forkhead 转录因子超家族的一员, 是哺乳动物卵巢发育最早的标志性启动基因^[1], 也是第一个被认定在卵巢发育中发挥重要作用的常染色体基因^[2]。2001 年, Crisponi 等^[3]在对睑裂狭小综合征伴随卵巢早衰患者致病基因的定

位研究中, 首次发现 *foxl2* 编码基因与卵巢发育相关, 研究结果显示, 所有被检测的卵巢早衰患者的 *foxl2* 基因都发生了突变。通过观察 *foxl2* 基因突变或缺失对小鼠卵巢的影响, 进一步确认了 *foxl2* 基因在卵巢发育中的重要作用。通过基因敲除的方法, 发现 *foxl2* 缺失的纯合子 (*foxl2*^{-/-}) 雌鼠的卵巢呈现小而不规则状态, 并且其中没有初级卵泡的形成, 卵巢发生退化, 没

收稿日期: 2021-10-18; 修订日期: 2021-11-16。

基金项目: 国家自然科学基金 (41976106, 41306178); 青岛市市南区科技计划 (2020-2-001-QT); 国家现代农业产业技术体系 (CARS-48); 中国水产科学研究院基本科研业务费 (2020TD46, 2018HY-ZD0201)。

作者简介: 张梦倩 (1997—), 女, 安徽省马鞍山市人, 研究方向为甲壳动物繁殖生物学。E-mail: 2080855236@qq.com

* 通信作者: 孟宪亮, 男, 副研究员, 主要从事甲壳动物生理学研究。E-mail: xlmeng@ysfri.ac.cn

有生育能力^[4-6]; *foxl2* 的突变也会造成卵巢发育的异常, 卵巢中的卵泡数量会减少, 卵巢出现早衰^[7]。在非哺乳类脊椎动物中, *foxl2* 基因与卵巢发育的密切相关性也已被证实^[8-11]。Shi 等^[12]研究了牙鲆 *foxl2* 基因的多态性与其卵巢发育之间的相关性, 发现 *foxl2* 单一位点的突变可以造成牙鲆卵巢指数的变化。 *foxl2* 在脊椎动物卵巢发育中不可或缺的作用使其成为研究卵巢发育分子调控机制非常重要的候选基因^[7, 13]。

对脊椎动物中的研究发现, *foxl2* 的表达受到 miRNA(miRNA) 的调控^[14]。miRNA 是一类平均长度为 22 bp 的内源性单链非编码 RNA, 能够与靶基因的 3' 非编码区域(Untranslated Region, UTR) 特异性结合, 抑制翻译或降解其 mRNA, 从转录后水平对靶基因表达进行负调控, 在动物的生长、发育、生殖等过程中都发挥重要作用^[15]。研究表明, miR-133b 可以靶向调控小鼠 *foxl2* 的表达, 进而调节其卵巢发育过程^[16]。近些年, miRNA 对卵巢发育的调控作用已成为甲壳动物生殖生物学研究的新热点。研究表明, miR-9 能够通过调控 ERK 信号通路关键基因进而调节拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*) 的卵巢发育^[17]。此外, miRNA 还参与了切除眼柄诱导三疣梭子蟹卵巢成熟的过程。

目前, 在无脊椎动物中有关 *foxl2* 的研究刚刚起步, 仅在海胆(*Strongylocentrotus purpuratus*)、太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)、栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)、中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)、拟穴青蟹等少数物种中获得了相应 *foxl2* 基因的 cDNA 序列。在对栉孔扇贝的研究发现, 干扰 *foxl2* 表达后, 卵巢发育相关基因的表达显著下调。而在拟穴青蟹中, 敲降 *foxl2* 后, 卵黄蛋白原基因(*vgt*) 的表达显著上调^[18]。上述研究表明, 该基因在贝类和甲壳类卵巢发育中均发挥作用, 但其功能可能存在差异。鉴于其在卵巢发育中具有重要作用, 开展 *foxl2* 表达调控研究可能会为研发生殖调控技术提供重要参考。然而, 有关无脊椎动物 *foxl2* 表达调控的研究较为罕见。

三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*) 隶属于甲壳亚门(Crustacea), 十足目(Decapoda), 梭子蟹科(Portunidae), 梭子蟹属(*Portunus*), 广泛分布于中国、韩国、日本等河口和沿海水域, 是我国重要的海水养殖种类。近些年, 梭子蟹养殖产业发展迅速, 2018 年养殖产量已达 11.38×10^4 t^[19]。然而, 由于对三疣梭子蟹生殖调控的认知不足, 未能建立起高效的生殖调控技术, 高质量苗种的产量无法满足需求, 严重限制了养殖产业的可持续发展。因此, 亟需深入开展三疣梭子蟹生殖调控机理研究。本研究克隆了三疣梭子蟹

foxl2(*Ptfoxl2*) 基因的 cDNA 全长序列; 分析了其在不同组织、不同发育时期以及切除眼柄后的表达模式; 研究了干扰该基因表达对 *vgt* 基因表达的影响; 预测了靶向 *foxl2* 的 miRNA, 并在细胞水平进行了验证; 分析了 miRNA 在不同发育时期以及切除眼柄后的表达特征。研究结果有助于深入理解三疣梭子蟹生殖调控机制, 为研发生殖调控新技术提供参考。

2 材料与方法

2.1 实验材料

实验所用三疣梭子蟹取自山东省昌邑市海丰水产养殖有限责任公司昌邑实验基地。选取附肢完整且无明显伤痕的雌性三疣梭子蟹, 体重为 52~261 g。在实验室条件下暂养 7 d。水温为 (20±2) °C、盐度为 31±1、pH 为 7.6±0.3, 持续充氧。每天 17:00 投喂鲜活菲律宾蛤仔, 8:00 清除箱底排泄物及食物残渣后更换 1/3~1/2 等温度的新鲜海水。

2.2 *Ptfoxl2* cDNA 全长克隆

根据三疣梭子蟹性腺转录组数据中 *foxl2* 基因片段序列^[20], 使用 Primer 5.0 软件设计 *foxl2* 3' 和 5' 特异性引物(表 1)。利用 Trizol 试剂提取三疣梭子蟹组织总 RNA, 采用 Nanodrop 微量分光光度计和琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量以及完整性。按照 SMART RACE Amplification Kits 说明书, 利用 cDNA 末端快速扩增(Rapid Amplification of cDNA Ends, RACE)所需的 cDNA 模板, 使用 Advantage 2 PCR Kit 进行 3' 和 5' 末端扩增。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳、凝胶回收试剂盒得到扩增的目的片段, 用 pMD18-T 载体连接所得目的片段, 并转入 DH5 α 感受态细胞中, 涂板过夜培养, 菌落检测后进行测序分析。

2.3 序列分析及系统进化分析

利用 VecScreen(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/vecscreen/>) 去除载体序列, 由 Contig express 软件进行序列拼接、ORFFinder(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 进行开放阅读框(Open Reading Frame, ORF) 预测及氨基酸翻译。利用 ExPASy(http://web.expasy.org/compute_pi/) 进行分子量及等电点的预测, 利用 Interpro Scan(<http://www.ebi.ac.uk/interpro/scan.html>) 进行蛋白质功能结构域分析。使用 Bioedit 软件对三疣梭子蟹 *foxl2* 氨基酸序列与从 GenBank 中下载的其他物种的 *foxl2* 氨基酸序列进行比对。

2.4 *Ptfoxl2* 基因的表达分析

2020 年 9 月至 2021 年 1 月, 收集三疣梭子蟹卵巢发育不同时期的样本。将梭子蟹在实验室条件下

表 1 实验所用引物的序列
Table 1 The sequences of the primers used in this study

引物名称	序列(5'-3')	用途
<i>foxl2</i> -3'	CGGGAACCTCGCAAGCTACACACAG	RACE
<i>foxl2</i> -5'	GGTAGTCGTCTTTCATCGTGCCGTAGG	RACE
UPM	CTAATACGACTCACTATAGGGC	RACE
<i>foxl2</i> -F	CGTTGCTCTGATCTCACTGC	qRT-PCR
<i>foxl2</i> -R	CGTCTTTCATCGTGCCGTAG	qRT-PCR
β -actin-F	CGAAACCTTCAACACTCCCG	qRT-PCR
β -actin-R	GGGACAGTGTGTGAAACGCC	qRT-PCR
dsRNA- <i>foxl2</i> -T7-F	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGCAGATGCAAAGCGGGAACCT	RNAi
dsRNA- <i>foxl2</i> -T7-R	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGGGAAAGCGTCTCCAGTCATC	RNAi
dsRNA-GFP-T7-F	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGCGACGTAAACGGCCACAAGTT	RNAi
dsRNA-GFP-T7-R	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGATGGGGGTGTTCTGTGGTAG	RNAi
miR-9	GCCTCTTTGGTTATCTAGCTGTAT	qRT-PCR

暂养 7 d。将样本卵巢组织分为两份,一份保存于液氮中,另一份采用 4% 多聚甲醛固定。参考吴旭干等^[21]对卵巢组织分期方法,在显微镜下观察三疣梭子蟹样品的组织学特征,并将卵巢分为 5 个时期。

根据三疣梭子蟹 *foxl2* 序列设计特异性引物(表 1),参照 AG SYBR Green Pro Taq HS qPCR 试剂盒说明书对三疣梭子蟹不同组织、不同发育时期 *foxl2* 基因相对表达量进行分析。反应体系(20 μ L): 10 μ L SYBR Green Pro Taq HS Premix II (2 \times), 0.4 μ L ROX Reference Dye II, 0.8 μ L 10 μ mol/L 的正反向引物、6.0 μ L DEPC 水和 2.0 μ L cDNA 稀释液。反应程序: 95 $^{\circ}$ C 30 s; 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 34 s, 40 个循环。*foxl2* 相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行计算。

2.5 切除眼柄实验

实验选用处于卵巢 III-IV 期三疣梭子蟹雌蟹为实验动物,切除眼柄方法采用烧红镊子紧捏眼柄基部 3 s。将切除双侧眼柄后的三疣梭子蟹养殖于室内循环水系统,为防止其打斗,每个 10 L 的养殖缸内仅放置 1 只梭子蟹。切除眼柄后 1 d、3 d、6 d 分别取 3 只三疣梭子蟹,解剖收集卵巢组织,样品均在液氮中速冻,并保存于-80 $^{\circ}$ C 超低温冰箱用于后续基因表达分析。

2.6 RNA 干扰实验

采用 New England Biolabs 公司的 HiScribe T7 High Yield RNA Synthesis 试剂盒合成 RNA 干扰实验(RNA interference, RNAi)所需的 *Ptfoxl2* dsRNA,所用引物序列见表 1。该实验以处于卵巢快速发育期(III-IV

期)的雌蟹(体重为(206.7 \pm 5.8)g)为实验动物,以注射绿色荧光蛋白(GFP)dsRNA 的个体为对照组,以注射 *Ptfoxl2* dsRNA 的个体为干扰组。GFP dsRNA 和 *Ptfoxl2* dsRNA 的注射剂量均为 2 μ g/g 体重,注射部位为第三步足基部。注射 24 h 和 48 h 后,对照组和干扰组分别取 3 个个体,解剖收集卵巢组织,液氮速冻,保存于-80 $^{\circ}$ C 超低温冰箱用于后续基因表达分析。

2.7 *Ptfoxl2* 相关 miRNA 预测和验证

通过 miRanda 和 RNAhybrid 软件预测潜在靶向 *Ptfoxl2* 3'UTR 区域的 miRNA。通过双荧光素酶报告基因检测实验,对预测 miRNA 对 *Ptfoxl2* 的调控作用进行验证。将 miRNA 类似物和阴性对照类似物(由通用生物股份有限公司合成),与包含有野生型和突变型 miRNA 结合位点 3'UTR 序列的 pmirGLO 质粒,分别共转染到 293T 细胞中。转染 48 h 后,使用 Dual-Luciferase Reporter Assay System(Promega)测定萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶活性相对值。

2.8 *Ptfoxl2* 相关 miRNA 的表达分析

利用 miRcute miRNA 提取分离试剂盒(天根生化科技有限公司)提取三疣梭子蟹不同组织、不同发育时期及切除眼柄后卵巢组织的 miRNA,使用 miRcute 增强型 miRNA cDNA 第一链合成试剂盒(天根生化科技有限公司)进行反转录,采用 miRcute 增强型 miRNA 荧光定量检测试剂盒(天根生化科技有限公司)检测 miRNA 在三疣梭子蟹不同组织、不同时期以及切除眼柄后的相对表达量。反应体系(20 μ L):

10 μL 2 \times miRcute Plus miRNA PreMix、0.4 μL 正反向引物、2.0 μL miRNA 第一链 cDNA、7.2 μL ddH₂O。反应程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 20 s、60 $^{\circ}\text{C}$ 34 s, 40 个循环。反应完成后相对表达量采用 2^{- $\Delta\Delta\text{Ct}$} 法计算。

2.9 统计学分析

采用 SPSS19.0 软件进行数据统计分析。两组之间比较应用独立样本 *t* 检验, 多组之间比较应用单因素方差分析。以 $p < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果与分析

3.1 *Ptfoxl2* 基因 cDNA 全长序列分析和系统进化分析

序列分析表明, *Ptfoxl2* 基因 cDNA 全长 2 502 bp (OK413951), 3'端和 5'端基因片段长度分别为 211 bp 和 701 bp, 包含 1 590 bp 的开放阅读框, 共编码 529 个氨基酸(图 1)。在线分析发现, *Ptfoxl2* 基因包含 1 个 Forkhead 结构域(228~323 aa)。通过 BLAST 同源性比对分析, 发现三疣梭子蟹 *Ptfoxl2* 氨基酸序列与拟穴青蟹 *Ptfoxl2* 的同源性最高, 为 96%; 与中华绒螯蟹、斑节对虾 (*Penaeus monodon*) 的同源性分别为 86%、85%, 且都含有 Forkhead 结构域(图 2)。

3.2 *Ptfoxl2* 基因表达分析结果

利用 Real-time PCR 技术, 分析了 *foxl2* 基因在三疣梭子蟹不同组织的表达分布特征。结果显示, *Ptfoxl2* 在所有被测组织中均有表达, 其在卵巢组织中的表达量最高 ($p < 0.05$), 其次为脑神经节、肝胰腺、胃、胸神经节等组织, 在血淋巴中的表达量最低(图 3A)。通过对 *Ptfoxl2* 在卵巢发育不同时期的表达分析发现, 该基因在不同时期的表达存在显著差异 ($p < 0.05$), 其在 V 期卵巢组织表达量最高, 其次为 III 期、IV 期, 在 II 期卵巢中表达量最低(图 3B)。切除眼柄后 *Ptfoxl2* 表达分析结果表明, 切除眼柄后第 1 天、第 3 天、第 6 天, 该基因在卵巢组织的表达量均显著下降 ($p < 0.05$)(图 3C)。

3.3 *Ptfoxl2* 干扰实验结果

与注射 GFP dsRNA 组三疣梭子蟹相比, 注射 *Ptfoxl2* dsRNA 的个体在 24 h 和 48 h 后, 卵巢 *Ptfoxl2* 的表达均出现了显著下调 ($p < 0.05$)(图 4A), 干扰效率分别为 60.24% 和 53.15%。qRT-PCR 结果显示, 注射 *Ptfoxl2* dsRNA 组 *vtg* 基因的表达显著上调 ($p < 0.05$)(图 4B)。

3.4 *Ptfoxl2* 相关 miRNA 的预测和双荧光素酶报告基因检测实验验证

生物信息学预测结果显示, miR-9 以及本实验在前期研究中新识别到的 2 个 miRNA—— novel-52 和 novel-68 可能与 *Ptfoxl2* 3'UTR 结合。通过双荧光素

酶报告基因检测实验, 对 miRNA 与 *Ptfoxl2* 靶向调控作用进行了验证(图 5)。结果显示, 共转染 novel-52 类似物和 pmirGLO-*Ptfoxl2*-3'UTR 组以及共转染 novel-68 类似物和 pmirGLO-*Ptfoxl2*-3'UTR 组萤火虫相对荧光素酶活性未出现显著变化 ($p > 0.05$), 而共转染 miR-9 类似物和 pmirGLO-*Ptfoxl2*-3'UTR 组萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶活性比值显著降低 ($p < 0.05$), 表明 miR-9 能够与 *Ptfoxl2* 基因 3'UTR 靶向结合。

3.5 *Ptfoxl2* 相关 miRNA 的表达分析结果

组织表达分布结果显示, miR-9 在三疣梭子蟹各组织中均有表达, 其在鳃、卵巢和胃中的表达量显著高于其他组织 ($p < 0.05$), 其次为肌肉、胸神经节, 脑神经节中的表达量最低(图 6A)。miR-9 在不同发育时期卵巢组织中的表达量存在显著差异 ($p < 0.05$), 随着卵巢发育其表达量先上升后下降, 在 IV 期达到最高, 在 V 期表达量出现显著降低(图 6B)。切除眼柄后, 卵巢组织中 miR-9 的表达量出现显著变化 ($p < 0.05$), 在第 1 天表达量出现显著上调, 在第 3 天达到最高值, 在第 6 天开始降低(图 6C)。

4 讨论

本研究克隆了三疣梭子蟹 *foxl2* 基因 cDNA 全长序列, 预测氨基酸序列包含 1 个高度保守的 Forkhead 结构域和 1 个核定位信号序列。同源性分析显示, *Ptfoxl2* 与其他蟹类 *foxl2* 序列具有较高的同源性, 其中与拟穴青蟹同源性高达 96%, 提示 *Ptfoxl2* 可能与拟穴青蟹 *foxl2* (*Spfoxl2*) 功能具有相似性。但是, *Ptfoxl2* 与 *Spfoxl2* 组织表达分布存在差异^[18]。虽然 *Ptfoxl2* 与 *Spfoxl2* 都在卵巢组织中高表达, 但 *Ptfoxl2* 在所检测的组织中均有表达, 而 *Spfoxl2* 仅在卵巢、精巢和肝胰腺中表达, 表明 *Ptfoxl2* 的功能可能具有多效性。

大量研究发现, *foxl2* 在脊椎动物卵巢颗粒细胞分化、卵巢发育和功能维持等方面具有重要作用。目前, *foxl2* 基因序列已在数种无脊椎动物中克隆获得, 但针对其功能的研究却鲜有报道。Liu 等^[22] 发现, *foxl2* 在栉孔扇贝中的表达呈明显的性别二态性, 在卵巢中的表达远高于精巢, 推测该基因在卵巢发育中发挥作用。Wei 等^[23] 发现, 海湾扇贝幼贝中 *foxl2* 的表达与雌激素的水平呈正相关, 推测该基因通过调控雌激素水平, 进而调节性腺分化过程。在对中华绒螯蟹的研究发现, *foxl2* 在卵巢成熟期表达量显著上调, 与 DDX20 和 FTZ-F1 结合, 抑制卵巢中 *vtg* 基因的表达。在不同组织中的表达分析结果显示, *Ptfoxl2* 在卵巢组织中的表达量最高, 显著高于其他组织, 暗示其

```

1          CAGGGGCAGAGAGCGCCTCTCCACCCACATCGCCAGGATTA
42 TGTTCACTTGACAGTTTCTCAACGCAGATCAGAAACACAAGCTGACTACCTTACTGCCA
102 CACAATCCCTCAAAGTCACTACTCGGAGGAAGACTTCCCCTGGGGACGACCAGTCCCAT
162 TAACATTGTGAACGAAAAGTCTGAAAACTTTTTCGGTCTCGGCGTCTTGGCTCTCCACC
222 CGACACCGACAGATTTTCTTAAACATCTTCATCACAAGGCGGGGTATCGAGACAGGAGTGC
282 CATCCTTAGGGCCACATGGCACAGCGACAGTTCGAGGGGGATCGGACTGGACGTGTGTCGT
342 TGTCATGGCGGGCTGTAGTGACCAGCGACTATCGGTGGTAGTGTGGTGTGTGTGTGAA
402 AAGTGGCTTTCAGGCCATCTCCTTACGCGCAGCTATCTCAAATGTGTAACACATTGCT
462 CAGTGGGCCAGCACAATGTGTGTCCAATGTTGGTGGTGGCATAGCATTCCCTTGATCC
522 GTTGTCTGATCTCACTGCTGCCAGGTGTCACAAGCAAACACCAGCCATATATTCGCCA
582 CACAATATCACCAAAGTGTTCGAGGTGTGCCAGAGGCCGTGTGCGACGCGTGGCTCGCTG
642 GCGGGGCACTCAGGCGAGGCCCGTGTGGTGGCGGCACCAGGCACCCCTCTCTACGGCAG
702 ATGAAAGACGACTACCTCGCCTCCAGTGACCACACGCAAGGTTATGGCGGGGGCAGCCTC
1  M K D D Y L A S S D H T Q G Y G G G S L
762 AGTGACATCAAGGGGAGGAGGAAAGTTTACCATTACCCGACGCAACGTCGCATCCCAAC
21  S D I K R E E E V Y H Y P P A T S H P N
822 CACCACTACAGGACTGAGGTGTACGGAAAGACTCTCCTGATGCCGCCCTCCAACCAGAG
41  H H Y R T E V Y G K T L L M P P L Q P E
882 GCGCAAGTCCACGCCGCTAAAGCCTACGACCACATCGACTCCACCAGCTCCACAGTCACG
61  A Q V H A A K A Y D H I D S T S S T V T
942 CCCTTCGAAGCGCAAAGGTATACGACAATAAACTCTACGACACCACCAAAGCCTATGAG
81  P F E A P K V Y D N K L Y D T T K A Y E
1 002 AAGATGTACATACCAAGGAATACGACAAGATGGCGATAGATCACATAAGTCCCTCCGTG
101  K M Y I T K E Y D K M A I D H I S P S V
1 062 TACGACAGTACGACCACAGACCCCTACGACAAGCTGTACTCGTCCAAAGTCCACATGGAG
121  Y D S H D H R P Y D K L Y S S K V H M E
1 122 GAAAAGATGGAGGAAGCCGCTACGACAAGTGTGCGACAAGACGTACAGGACTCTAGAG
141  E K M E E A A Y D K C C D K T Y R T L E
1 182 ACGTGGACTCCACTACGTACGACAGGCCCTACGACCGTCCAAGGTGGTGGAGCCAGTG
161  T L D S T T Y D R P Y D A S K V V E P V
1 242 GACTCAACCACGTACGAGAAGGTGACGCCCTGGACCCCGTGGCGACTTCCCTGCCGAG
181  D S T T Y E K V Q P L D P V A T S L P E
1 302 TCGCAAGATAAACCCCTCCACCAGTCCCTCCTCAGGATCAAAAAAGAGGAGAGCTAAG
201  S Q D K P S T T S S S G S K K E E S S K
1 362 GAGAATGGGGACCTGGACCCTAACAAAGAAACCACCTATTCTGTACGTGGCACTCATACC
221  E N G D L D P N K K P P Y S Y V A L I T
1 422 ATGGCCATCAAGGCCAGCCGGAGAGGAGATTGCAGCTGAGTGTGATTTACCAAGGATC
241  M A I K A S P E R R L Q L S E I Y Q W I
1 482 GCCAACAGTTCCCTTTCTACGCCAAGGAGAAGCCCAAGGAGAAGCAGGGCTGGAAGAAC
261  A N K F P F Y A K E N A K E K Q G W K N
1 542 TCTATTAGACACAACCTCAGCCTGAACGAGTGTTCCTGAAGCAGCCGCGGACGGAGC
281  S I R H N L S L N E C F L K Q P R D G S
1 602 GCGGGGGCGGCAAGGAAACTATTGGACGCTTGACCCCAAGCAGCAGGATATGTTTCGAA
301  G G G K G N Y W T L D P Q H E D M F E
1 662 CACGGTAACTTCAAGCGGCGACGAGAATGAGACGCCCTGCCAACCTTCTGCGCCAGCCT
321  H G N F K R R R R M R R P A N L L R Q P
1 722 TACCACCCCTACCTATCTTCCAGATCTCCCCGGGCGGAAGCTGGGGACTTGGCCAGATG
341  Y P P Y P I F Q I S P G G S W G L G G
1 782 CAAAGCGGGAACCTCGCAAGCTACACACAGGGAACGCGCGTGCACACCCCTCACTCTAT
361  Q S G N F A S Y T Q G T R V H T P H S Y
1 842 TCATACCCACAGATGAACCAGCTCCAAGGGCAGATGCGGCTCAGCGGAGGTATCGCAG
381  S Y P Q M N Q L Q G Q M R L S G G Y Q Q
1 902 TCAGCAGCTCCCTGGGCTCAACGCCTCTCACCTTAGCGCCTTAGGATCGAGTTTCCCA
401  I S S S L G S T P L T S S A L G S S F P
1 962 AGCCACCTGAGCGGGGACTGTTGGGCAGCTCCTCCCGTCCATATCATCCCGGGCAGC
421  S H L S G G L L G S S S P S I S S P G S
2 022 ACACACACCTCCTTGGGCTCGGCGCTGAACGTGGACCTCAGGCTCAGGCACAGGACTC
441  T H T S L G S A P E L W T S G S G T G L
2 082 CACTCCAGCCTCGGTCCGCGCAGTTTCTAGGATCCAGCAGTAGTTTGGGATCTCCCTCC
461  H S S L G A G S F L G S S S S L G S P S
2 142 GCCACACCCCTCCAGCCCTCTTCGGAAGCGGGCAGCAGCTACGGGGCGGGCCTGAAC
481  A T P F Q P S F G S G G S S Y G A G L N
2 202 GCGTGCCCGCTCAGGGTGAAGCTACCACCTCCTCCAGCTGACGCCCTCCCTACCCC
501  A C R R Q G E A T T S S Q L T P L P Y P
2 262 TACCCCTGCTGGCCAGACTCCAACCCTAACAGATGATGACTGGAGACGCTTTCCTGCA
521  Y P C W P D S K P *
2 322 CCGGCGTGAGGCGGCGCACAGGAGAGCCAGTGACCCTGACGTCACCTACCACACCCA
2 382 CGCACCCCTGACTGGCCGACGCCTCCACACACCTCCTTCACTATCGTTGCCATAATGTA
2 442 ACGATCCTGATTGGTGGCGAAACAGTGATCGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
2 502 A

```

图1 *Ptfoxl2* 基因 cDNA 全长序列以及推导的氨基酸序列Fig. 1 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of *Ptfoxl2* gene

FH 结构域用阴影表示; 起始密码子和终止密码子用方框标出; 下划线标注区域依次为 miR-9、novel-68 和 novel-52 的预测结合位点; 左侧数字为核苷酸和氨基酸位置

FH domain was marked with shadow; initiation codon and stop codon were marked with black box; the underlined regions were the predicted binding sites for miR-9, novel-68, and novel-52 in turn; the numbers on the left indicate the positions of nucleotide and amino acid



图 2 4 种甲壳动物 foxl2 氨基酸序列多重比对

Fig. 2 Multiple alignments of the amino acid sequences of foxl2 in four crustacean species

右侧数字为氨基酸位置;各物种 foxl2 基因序列 GenBank 登录号:三疣梭子蟹(OK413951)、拟穴青蟹(MN412580.1)、中华绒螯蟹(KF806733.1)、斑节对虾(XM_037939236.1);黑色代表氨基酸残基同源性 100%;红色代表氨基酸残基同源性 75%;蓝色代表氨基酸残基同源性 50%
The numbers on the right indicate the positions of the amino acids; the GenBank accession numbers of foxl2 gene were as follows: *Portunus trituberculatus* (OK413951), *Scylla paramamosain* (MN412580.1), *Eriocheir sinensis* (KF806733.1), *Penaeus monodon* (XM_037939236.1); black represents 100% homology of amino acid residues; red represents 75% homology of amino acid residues; blue represents 50% homology of amino acid residues

可能参与了三疣梭子蟹卵巢发育调控过程。该基因在卵巢发育过程中的表达模式与中华绒螯蟹相似,同样在卵巢近成熟期和成熟期表达量显著升高。该时期卵黄发生以外源性卵黄合成为主,即在胰腺腺内合成,通过血淋巴转运到卵巢组织,而卵巢内的卵黄合成减少。此外,干扰 Ptfoxl2 表达后,卵巢组织 vtg 基因的表达显著上调,这与拟穴青蟹 foxl2 干扰实验结果一致^[18]。上述结果表明,foxl2 可能在三疣梭子蟹卵巢发育中发挥重要作用,能够显著抑制内源性卵黄合成。

迄今,关于甲壳动物 foxl2 表达调控的研究还未见报道。切除眼柄是生产中常用的刺激甲壳类性腺成熟的方法,此方法通常认为是通过去除眼柄中 X-器官腺复合体分泌的性腺抑制激素(GIH)来刺激性腺成熟,但是切除眼柄会损伤亲体,且会造成卵质量下降、孵化率降低等问题^[24]。近些年,为了探寻替代眼柄切除的促熟新方法,国内外研究者针对切除眼柄诱导性腺发育的分子机制开展了较为深入的研究。已有研究表明,切除眼柄诱导卵巢成熟是一个涉及多种分子和信号通路的复杂过程。Uawisetwathana

等^[25]发现,切除斑节对虾眼柄能够激活性腺激素释放激素信号通路、孕酮介导的卵母细胞成熟等信号通路。本实验室前期研究发现,切除眼柄后,三疣梭子蟹 Cdk7、Cyclin H 等基因表达均出现显著上调,表明切除眼柄能够激活成熟促进因子(Maturation-Promoting Factor, MPF),从而促进卵母细胞成熟分裂^[26-27]。此外,切除眼柄会促进三疣梭子蟹甲基法尼酯合成相关蛋白的表达,激活钙离子信号通路^[28]。本研究中,三疣梭子蟹卵巢 foxl2 基因的表达在切除眼柄后第 1 天、第 3 天、第 6 天均出现了显著下调。因此,我们推测 Ptfoxl2 受眼柄神经内分泌因子的调控,参与了切除眼柄诱导卵巢成熟的过程。切除眼柄能够抑制 foxl2 的表达,进而促进卵黄合成。

近些年,miRNA 已被证实在甲壳动物卵巢发育中发挥重要作用。Song 等^[29]发现,miR-2 和 miR-133 通过调控 Cyclin B 的表达,控制中华绒螯蟹卵母细胞成熟过程。Jia 等^[30]对拟穴青蟹的研究表明,miR-277 参与眼柄中卵巢发育相关重要神经肽——卵黄抑制激素的表达调控。目前,miRNA 是否参与了甲壳动物 foxl2 基因的表达调控仍未知。本研究利用生物信

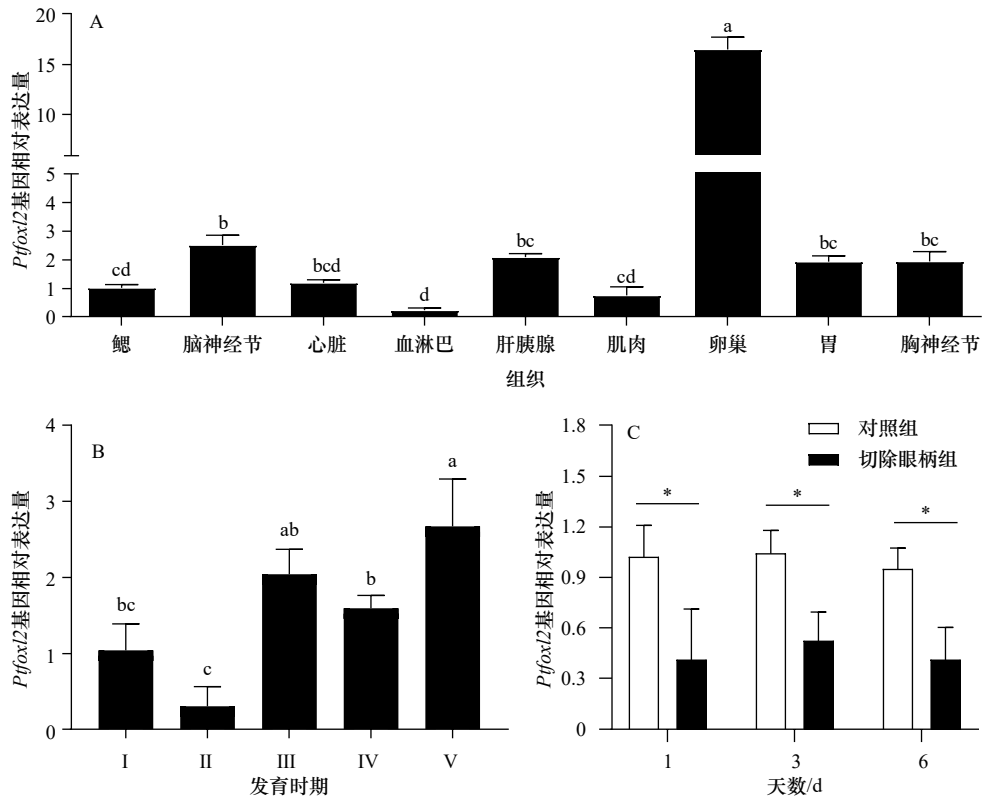


图3 *Ptfoxl2* 基因在三疣梭子蟹不同组织(A)、不同卵巢发育时期(B)以及切除眼柄后(C)的表达

Fig. 3 The expression of *Ptfoxl2* in different tissues (A), in different ovarian developmental stages (B) and after eyestalk ablation (C)

不同字母代表数据差异显著 ($p < 0.05$); *表示对照组和切除眼柄组表达存在显著差异 ($p < 0.05$)

Different letters indicate significant difference ($p < 0.05$); * indicates a significant difference between the control group and eyestalk ablation group ($p < 0.05$)

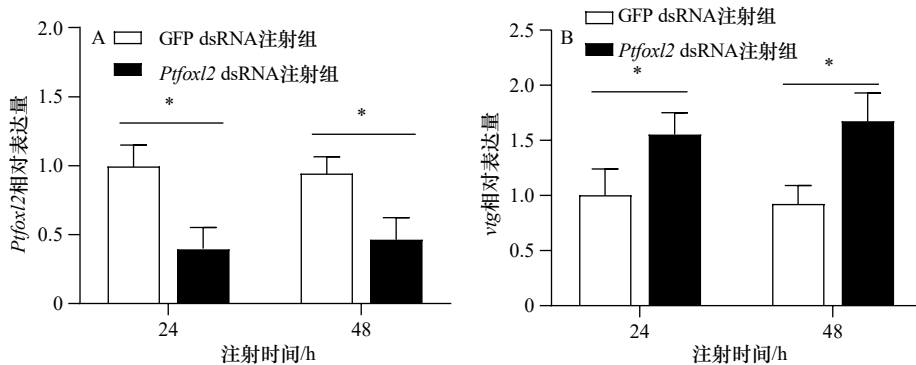


图4 注射 *Ptfoxl2* dsRNA 和 GFP dsRNA 后卵巢 *Ptfoxl2*(A) 和 *vtg*(B) 基因的表达

Fig. 4 Relative expression of *Ptfoxl2* (A) and *vtg* (B) in ovary after injecting *Ptfoxl2* dsRNA and GFP dsRNA

*表示存在显著差异 ($p < 0.05$)

* indicates a significant difference ($p < 0.05$)

息学方法预测了其靶基因,并通过双荧光素酶报告基因检测实验,从细胞水平进行了验证。结果显示,miR-9能够与 *Ptfoxl2* 3'UTR 靶向结合。分析显示,miR-9在鳃、肝胰腺组织和胃中表达量较高,但在这3个组织间无显著差异,表明miR-9可能具有多种功能。同一miRNA可能调控多个靶基因,其不同组织中可能也发挥不同的作用^[31]。在卵巢V期(成熟期),miR-9表达量显著下调,而 *Ptfoxl2* 表达则显著上调。

此外,切除眼柄后,卵巢miR-9的表达显著出现上调,而 *Ptfoxl2* 表达趋势与之相反,进一步表明,miR-9能够从转录后水平调控 *Ptfoxl2* 的表达。

5 结论

本研究克隆得到 *Ptfoxl2* 基因 cDNA 全长序列,分析了该基因在不同组织、不同发育时期卵巢组织以及切除眼柄后的表达模式,研究了干扰其表达对卵巢

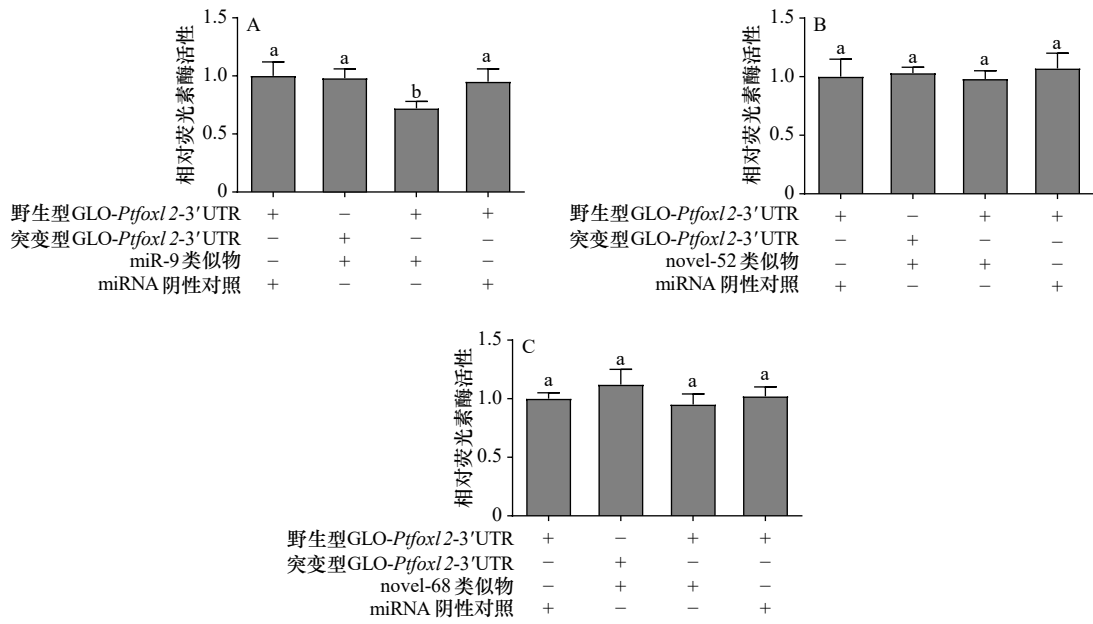


图 5 共转染野生型和突变型质粒和 miRNA 类似物后荧光素酶的相对活性

Fig. 5 Luciferase activity of the reporter plasmid containing wild-type or mutant target site after co-transfection of plasmid and miRNA mimics

+表示实验体系中存在该 miRNA 类似物或质粒; -表示实验体系中不存在该 miRNA 类似物或质粒; 不同字母代表数据差异显著 ($p < 0.05$)
 + indicates that the miRNA mimics or plasmid exists in the reaction system; - indicates that the miRNA mimics or plasmid doesn't exist in the reaction system;
 different letters indicate significant difference ($p < 0.05$)

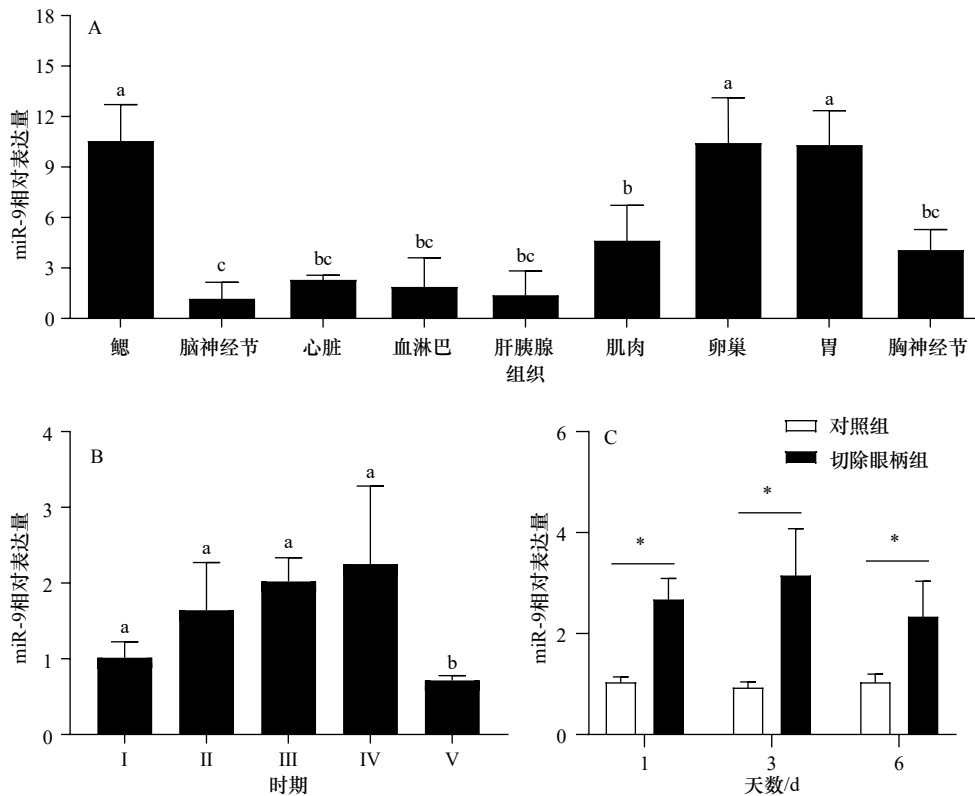


图 6 miR-9 在三疣梭子蟹不同组织(A)、不同卵巢发育时期(B)以及切除眼柄后(C)的表达

Fig. 6 The expression of miR-9 in different tissues (A), in different ovarian developmental stages (B) and after eyestalk ablation (C)

不同字母代表数据差异显著 ($p < 0.05$); *表示对照组和切除眼柄组表达存在显著差异 ($p < 0.05$)

Different letters indicate significant difference ($p < 0.05$); * indicates a significant difference between the control group and eyestalk ablation group ($p < 0.05$)

组织 *vtg* 基因表达的影响,初步证实 *Ptfoxl2* 参与三疣梭子蟹卵巢发育调控,能够抑制内源性卵黄合成。预测了靶向 *Ptfoxl2* 的 miRNA,并在细胞水平进行了验证。结合 miR-9 在卵巢发育不同时期以及切除眼柄

后的表达分析,首次证实 miRNA(miR-9)能够从转录后水平调控 *Ptfoxl2* 的表达。研究结果为深入开展三疣梭子蟹卵巢发育调控机制,研发生殖调控新技术提供了重要参考。

参考文献:

- [1] Cocquet J, Pailhoux E, Jaubert F, et al. Evolution and expression of *FOXL2*[J]. *Journal of Medical Genetics*, 2002, 39(12): 916–921.
- [2] De Baere E, Lemerrier B, Christin-Maitre S, et al. *FOXL2* mutation screening in a large panel of POF patients and XX males[J]. *Journal of Medical Genetics*, 2002, 39(8): e43–e43.
- [3] Crisponi L, Deiana M, Loi A, et al. The putative forkhead transcription factor *FOXL2* is mutated in blepharophimosis/ptosis/epicanthus inversus syndrome[J]. *Nature Genetics*, 2001, 27(2): 159–166.
- [4] Schmidt D, Ovitt C E, Anlag K, et al. The murine winged-helix transcription factor *Foxl2* is required for granulosa cell differentiation and ovary maintenance[J]. *Development*, 2004, 131(4): 933–942.
- [5] Uda M, Ottolenghi C, Crisponi L, et al. *Foxl2* disruption causes mouse ovarian failure by pervasive blockage of follicle development[J]. *Human Molecular Genetics*, 2004, 13(11): 1171–1181.
- [6] Uhlenhaut N H, Jakob S, Anlag K, et al. Somatic sex reprogramming of adult ovaries to testes by *FOXL2* ablation[J]. *Cell*, 2009, 139(6): 1130–1142.
- [7] Moumné L, Batista F, Benayoun B A, et al. The mutations and potential targets of the forkhead transcription factor *FOXL2*[J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2008, 282(1/2): 2–11.
- [8] Baron D, Cocquet J, Xia Xuhua, et al. An evolutionary and functional analysis of *FoxL2* in rainbow trout gonad differentiation[J]. *Journal of Molecular Endocrinology*, 2004, 33(3): 705–715.
- [9] Wang W C, Lai Y C. Molecular pathogenesis in granulosa cell tumor is not only due to somatic *FOXL2* mutation[J]. *Journal of Ovarian Research*, 2014, 7(1): 88.
- [10] Nakamoto M, Matsuda M, Wang Deshou, et al. Molecular cloning and analysis of gonadal expression of *Foxl2* in the medaka, *Oryzias latipes*[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006, 344(1): 353–361.
- [11] Oshima Y, Uno Y, Matsuda Y, et al. Molecular cloning and gene expression of *Foxl2* in the frog *Rana rugosa*[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2008, 159(2/3): 170–177.
- [12] Shi Bao, Wen H S, He Feng, et al. Association of reproductive performance with SNPs of *FOXL2* gene by SSCP in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2009, 153(1): 1–7.
- [13] Uhlenhaut N H, Treier M. *Foxl2* function in ovarian development[J]. *Molecular Genetics and Metabolism*, 2006, 88(3): 225–234.
- [14] 王雪芹. 稀有鮑鮑*Foxl2*基因的克隆及内分泌干扰物对其表达的影响[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2013.
Wang Xueqin. Molecular cloning and characterization of *foxl2* gene and its response to endocrine disrupting chemicals in rare minnow[D]. Yangling: Northwest A&F University, 2013.
- [15] 陈玲玲, 冯珊珊, 范祖森, 等. 非编码RNA研究进展[J]. *中国科学: 生命科学*, 2019, 49(12): 1573–1605.
Chen Lingling, Feng Shanshan, Fan Zusen, et al. Progress in non-coding RNA research[J]. *Science China Life Sciences*, 2019, 49(12): 1573–1605.
- [16] 贺小云, 刘秋月, 储明星. miRNA调控哺乳动物卵泡发育和卵母细胞成熟的研究进展[J]. *畜牧兽医学报*, 2019, 50(11): 2175–2185.
He Xiaoyun, Liu Qiuyue, Chu Mingxing. Advances in miRNA regulating mammalian follicular development and oocyte maturation[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2019, 50(11): 2175–2185.
- [17] Zhou Mingcan, Jia Xiwei, Wan Haifu, et al. miR-9 and miR-263 regulate the key genes of the ERK pathway in the ovary of mud crab *scylla paramamosain*[J]. *Marine Biotechnology*, 2020, 22(4): 594–606.
- [18] Wan Haifu, Zhong Jinying, Zhang Ziping, et al. Characterization of the *foxl2* gene involved in the *vtg* expression in mud crab (*Scylla paramamosain*)[J]. *Gene*, 2021, 798: 145807.
- [19] 农业农村部渔业渔政管理局. 中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2019.
Fisheries Administration of Ministry of Agriculture and Rural Affairs. China Fishery Statistical Yearbook 2019[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2019.
- [20] Meng Xianliang, Liu Ping, Jia Fulong, et al. De novo transcriptome analysis of *Portunus trituberculatus* ovary and testis by RNA-Seq: identification of genes involved in gonadal development[J]. *PLoS One*, 2015, 10(6): e0128659.
- [21] 吴旭干, 姚桂桂, 杨筱珍, 等. 东海三疣梭子蟹第一次卵巢发育规律的研究[J]. *海洋学报*, 2007, 29(4): 120–127.
Wu Xugan, Yao Guigui, Yang Xiaozhen, et al. A study on the ovarian development of *Portunus trituberculatus* in East China Sea during the first reproductive cycle[J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 2007, 29(4): 120–127.
- [22] Liu Xiaoling, Zhang Zhifeng, Shao Mingyu, et al. Sexually dimorphic expression of *foxl2* during gametogenesis in scallop *Chlamys farreri*, conserved with vertebrates[J]. *Development Genes and Evolution*, 2012, 222(5): 279–286.
- [23] Wei Huilan, Li Wanru, Liu Tian, et al. Sexual development of the hermaphroditic scallop *Argopecten irradians* revealed by morphologic, endocrine and molecular analysis[J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2021, 9: 646754.

- [24] Browdy C L, Samocha T M. The effect of eyestalk ablation on spawning, molting and mating of *Penaeus semisulcatus* de Haan[J]. *Aquaculture*, 1985, 49(1): 19–29.
- [25] Uawisetwathana U, Leelatanawit R, Klanchui A, et al. Insights into eyestalk ablation mechanism to induce ovarian maturation in the black tiger shrimp[J]. *PloS One*, 2011, 6(9): e24427.
- [26] 贾复龙, 孟宪亮, 刘萍, 等. 三疣梭子蟹细胞*Cdk7*基因克隆及其在卵巢发育中的表达[J]. 中国水产科学, 2016, 23(5): 1032–1040.
Jia Fulong, Meng Xianliang, Liu Ping, et al. Cloning and expression analysis of *Cdk7*, a gene involved in ovarian development, from swimming crab (*Portunus trituberculatus*)[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2016, 23(5): 1032–1040.
- [27] 贾复龙, 孟宪亮, 刘萍, 等. 三疣梭子蟹细胞周期蛋白H基因克隆及其在卵巢发育中的表达分析[J]. 中国海洋大学学报, 2016, 46(7): 62–69.
Jia Fulong, Meng Xianliang, Liu Ping, et al. Clong and expression in the ovarian development of *Cyclin H* gene of *Portunus trituberculatus*[J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2016, 46(7): 62–69.
- [28] Meng Xianliang, Zhang Mengqian, Gao Baoquan, et al. Integrative proteomic and microrna analysis: insights into mechanisms of eyestalk ablation-induced ovarian maturation in the swimming crab *Portunus trituberculatus*[J]. *Frontiers in Endocrinology*, 2020, 11: 533.
- [29] Song Ya'nan, Shi Lili, Liu Zhiqiang, et al. Global analysis of the ovarian microRNA transcriptome: implication for miR-2 and miR-133 regulation of oocyte meiosis in the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis* (Crustacea: Decapoda)[J]. *BMC Genomics*, 2014, 15(1): 547.
- [30] Jia Xiwei, Fang Zhiqiang, Zeng Xianyuan, et al. Regulation of VIH by miR-277 in the eyestalk of mud crab *Scylla paramamosain*[J]. *Aquaculture*, 2021, 534: 736254.
- [31] 张小辉. MiRNA及其合成通路相关基因在三疣梭子蟹性腺发育过程中的功能分析[D]. 上海: 上海海洋大学, 2017.
Zhang Xiaohui. Functional analysis of miRNA and the genes in the miRNA biogenesis pathway in gonadal development of *Portunus trituberculatus*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2017.

Preliminary functional study of *foxl2* in *Portunus trituberculatus* and analysis of its related miRNA

Zhang Mengqian¹, Zhang Jingyan², Ge Hongxing¹, Liu Ping^{2,3}, Li Jian^{2,3}, Meng Xianliang^{3,4}

(1. Jiangsu Provincial Key Laboratory of Marine Biotechnology, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, China; 2. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fisheries Science, Qingdao 266071, China; 3. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266237, China; 4. Key Laboratory of Aquatic Genomics, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract: The *foxl2* plays essential roles in regulating ovarian differentiation, development and functional maintenance of vertebrate. However, its function in ovarian development of the swimming crab *Portunus trituberculatus* remains unknown. In the present study, we firstly cloned the full-length cDNA of *P. trituberculatus foxl2* (*Ptfoxl2*) which contained a 5' untranslated region (UTR) of 701 bp, a 3' UTR of 211 bp, and an open reading frame (ORF) 1 590 bp. Gene expression analysis in different tissues showed that *Ptfoxl2* exhibited the highest expression in ovary. There were significant differences in its expression in different stages of ovarian development, and its expression was the highest in stage V. After eyestalk ablation, *Ptfoxl2* expression decreased significantly. In addition, RNAi of *Ptfoxl2* resulted in a significant reduction in *vitellogenin* expression of ovary. Taken together, these results indicated that *Ptfoxl2* played an important role in the regulation of ovarian development of *P. trituberculatus* by inhibiting endogenous vitellogenesis in maturation stage. In order to further analyze the post-transcriptional regulation of *Ptfoxl2*, the miRNAs targeting *Ptfoxl2* was predicted by bioinformatics analysis and the interaction between the miRNAs and *Ptfoxl2* was verified using the dual luciferase reporter assay. The results showed that the relative luciferase activity was significantly reduced after co-transfection of miR-9 mimics and pmirGLO-*Ptfoxl2*-3' UTR. Expression analysis showed that miR-9 exhibited opposite pattern at ovarian maturation stage and after eyestalk ablation. Collectively, the results demonstrated that miR-9 can regulate *Ptfoxl2* expression in the swimming crab.

Key words: *Portunus trituberculatus*; *foxl2*; eyestalk ablation; ovarian development; miRNA