

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2013.00260

栉孔扇贝 *wnt4* 基因 cDNA 克隆及表达分析

李海龙, 刘建国, 刘晓玲, 张志峰

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

摘要: 由栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)转录组数据库获得 *wnt4* 基因的一段表达序列标签(EST)序列, 利用 SMART-RACE 技术克隆了 *wnt4* 基因 cDNA 全长序列, 该序列长 1 239 bp, 其中开放阅读框为 1 068 bp, 可以编码 355 个氨基酸, 推导的氨基酸序列含有 WNT 家族特有序列, 且与沙蚕(*Platynereis dumerilii*)、海胆(*Heliocidaris erythrogramma*)、人(*Homo sapiens*)等物种 WNT4 同源性都在 60%以上。半定量 RT-PCR 结果显示, 除肾脏外, *wnt4* 基因在栉孔扇贝的精巢、卵巢、闭壳肌、肝胰腺、鳃、外套膜组织中均有表达, 但表达量较低。定量 RT-PCR 结果表明: *wnt4* 基因在成熟期的精卵巢中表达量最高, 增殖期和休止期表达量次之, 生长期表达量最低; 整个生殖周期中精巢表达量高于卵巢。该基因在栉孔扇贝多个组织中的表达特性, 暗示其参与了多样的生物学过程; 在性腺中的表达特征表明其可能参与两性性腺的发育并在生殖细胞成熟过程中发挥作用。

关键词: 栉孔扇贝; *wnt4* 基因; 克隆; 表达

中图分类号: Q959

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2013)02-0260-09

WNT(Wingless-type MMTV integration site family)作为一种重要的信号分子可以激活多种信号通路, 在动物的早期发育和各种细胞的生命活动中发挥着重要的作用^[1-4]。在小鼠(*Mus musculus*)、线虫(*Caenorhabditis elegans*)和果蝇(*Drosophila melanogaster*)中, *wnt* 基因的突变都表现出了异常的表型^[5], 此外, WNT 异常的表达或激活往往与人类肿瘤发生相关^[6]。

WNT4(Wingless-type MMTV integration site family, member 4) 是 WNT 家族成员之一, 其蛋白富含保守的半胱氨酸残基, 都有一段信号肽序列和 N-连接的糖基化位点^[7]。迄今该基因的 cDNA 已在人(*Homo sapiens*)、小鼠、非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)、斑马鱼(*Danio rerio*)、海胆(*Heliocidaris erythrogramma*)、果蝇、沙蚕(*Platynereis dumerilii*)、乌贼(*Euprymna scolopes*)、日本血吸虫

(*Schistosoma japonicum*)等物种中克隆获得, 并且相关的表达和功能研究也有了程度不同的研究报道^[8-13]。已发现在果蝇的视觉系统中, WNT4 蛋白沿着腹侧视网膜轴突分布, 并且能够调节视网膜成像的特异性^[14], 另外, 在果蝇卵巢的形态发生过程中, WNT4 通过影响粘着斑激酶表达位置和含量的变化来调节细胞的运动^[15]。又发现日本血吸虫 *wnt4* mRNA 在童虫、成虫及雌雄虫组织中均有表达, 且该基因的表达与血吸虫性别表型发育密切相关^[13]; *wnt4* 可在斑马鱼和鸡(*Gallus gallus*)发育的脑组织中表达, 且具有抑制细胞迁移的作用^[3,16]; *wnt4* 对肾脏发育是不可或缺的, 缺少 *wnt4* 的小鼠在出生后不久就因肾衰竭而死亡^[17], 后来发现 WNT4 对肾间叶细胞向上皮细胞的转化中起重要作用^[18]; WNT4 对哺乳动物生殖系统的发育可能是重要的, 缺失 *wnt4* 基因的小鼠导致 XX

收稿日期: 2012-06-29; 修订日期: 2012-08-06.

基金项目: 国家自然科学基金青年基金资助项目(30901097); 青岛市自然科学基金资助项目(11-2-4-1(10)-jch); 山东省自然科学基金重点基金资助项目(Z2008D02).

作者简介: 李海龙(1982-), 男, 博士研究生. E-mail: lihailong5517142@163.com

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

雌性胚胎的雄性化^[19]; 进一步发现, WNT4 在哺乳动物米勒氏管的退化、性腺发育以及类固醇激素的合成过程中都起到了重要的作用^[20]。

WNT4 作为一种重要的信号分子, 在一些物种中已有了深入地研究, 然而在贝类中的分子类型和作用迄今还没有被揭示。本研究采用 RACE 技术克隆了重要经济贝类—栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)的 *wnt4* 全长 cDNA 序列, 进一步采用半定量和定量 RT-PCR 技术揭示了该基因的空间表达和不同发育时期性腺中的表达特点。研究旨在为开展栉孔扇贝 *wnt4* 基因的功能以及贝类相关的 WNT 家族基因的研究提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

栉孔扇贝购自青岛市台东水产品市场。解剖取 3 个扇贝的各组织样本(增殖期的精巢、卵巢、闭壳肌、肝胰腺、鳃、肾和外套膜以及其他发育时期的精巢和卵巢), 于液氮中速冻后转移到-80℃冰箱保存, 用于总 RNA 的提取。同时取部分性腺组织于 Bouin's 液中固定 24 h 后, 储存于 70%乙醇中用于组织切片观察, 以确定性腺发育时期。

1.2 总 RNA 提取和 RACE cDNA 第一链合成

采用异硫氰酸胍法提取栉孔扇贝增殖期卵巢组织的总 RNA, 使用 SMARTTM-RACE cDNA Amplification Kit(Clontech)并按照操作指南合成 RACE cDNA 第一链。

1.3 栉孔扇贝 *wnt4* 基因片段的获得

在 GenBank 上找到人、斑马鱼、沙蚕、非洲爪蟾、乌贼等物种 WNT4 蛋白序列, 并将这些序列与栉孔扇贝转录组数据库进行比对, 得到了与这些物种 WNT4 相近的基因片段, 根据期望值、相似度、得分等参数将基因片段进行筛选, 并将最优参数组合的基因片段再次在 GenBank 上进行 Blast, 从而筛选出最符合栉孔扇贝 *wnt4* 基因的片段。

1.4 RACE-PCR 扩增

根据获得的 *wnt4* 基因片段设计外侧引物 W-F(5' CCACCTCTAGCTGATGGTATCCGATGGC 3')和内侧引物 N-F(5' CTCTTGCGCGGATGAACAG

CGTAGCAGC 3')。以 RACE cDNA 第一链为模板, 用 W-F 和 UPM 引物进行第一轮 PCR, 然后以第一轮 PCR 产物为模板, 用内侧引物 N-F 和 NUP 进行第二轮 PCR, 2 次 PCR 反应程序为: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 30 s, 68℃ 30 s, 72℃ 3 min, 循环数为 35; 72℃ 延伸 10 min。

1.5 PCR 产物检测、胶回收、克隆及测序

1.2%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物; 利用 DNA 凝胶纯化试剂盒(上海生工生物工程技术有限公司)回收目的片段产物, 回收片段连接到 PMD-18T 载体(大连宝生物工程有限公司)上并转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞(北京全式金生物技术公司)中, 涂板, 37℃ 培养过夜, 取抗氨苄青霉素的阳性克隆, 菌液 PCR 验证后, 送交华大基因公司测序。

1.6 序列分析及系统进化分析

用 DNASTar 软件对所获序列进行全长拼接; 通过 BLAST-P 程序在 GenBank 数据库中进行相似性搜索; 利用 DNASTar 软件进行蛋白分子量和等电点的预测; 氨基酸的多重比对采用 Clustal X 和 DNAMAN 完成; 信号肽区域预测采用 SignalP 4.0 软件进行; 糖基化采用在线软件 Glycosylation Predictor 预测; 系统发生树由 Clustal X 和 MEGA 4.0 程序中的邻接法(Neighbor Joining, NJ)构建。

1.7 半定量 RT-PCR

根据组织切片观察的结果(图版), 分别取增殖期扇贝精巢、卵巢、闭壳肌、肝胰腺、鳃、肾、外套膜组织, 采用如 1.2 方法提取总 RNA, 使用 PrimeScript RT reagent Kit(大连宝生物)并按照说明书将其反转录成 cDNA。根据已获得的栉孔扇贝 *wnt4* 全长 cDNA 序列设计正向引物 W-F(5' CCACCTCTAGCTGATGGTATCCGATGGC 3')和反向引物 W-R(5' CAGTACTACAATTCCACCGC CTGTTACGG 3'), 使用正向引物(5' ATGCCCTC CCTCACGCTAT 3')和反向引物(5' GCCAGACT CGTCGTATTCCT 3')扩增的栉孔扇贝 β -actin 基因(GenBank 序列号为 AAP88387)片段作为内参照, 检测 *wnt4* 基因在栉孔扇贝各组织中的表达。PCR 反应条件如下, β -actin 基因片段(长度为 594

bp)的 PCR 程序为: 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 45 s, 24 个循环; *wnt4* 基因(扩增长度为 226 bp): 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 30 s, 65℃ 30 s, 72℃ 30 s, 32 个循环。实验重复 3 次。

1.8 荧光定量 RT-PCR

依据组织学切片观察(图版), 分别取增殖期、生长期、成熟期和休止期的栉孔扇贝精巢和卵巢各 3 个个体的样本, 用 1.7 中的方法分别获得它们的 cDNA 模板, 依据已获得的 cDNA 全长序列设计栉孔扇贝 *wnt4* 基因特异性引物 W-Q-F(5' TGAAGACGTGTTGGAGAGCG 3')、W-Q-R(5' TTACAGGAATAAGGCGAGGC 3')和 β -actin 基因引物 β -actin-F(5' TTCTTGGAATGGAATCTGC 3')、 β -actin-R(5' ATTGTGCTACCACCGGAAG 3'), 以 β -actin 的表达(扩增片段长度为 156 bp)作为内参, 使用 ABI7500 型荧光定量 PCR 仪检测 *wnt4* 基因(扩增片段长度为 126 bp)在栉孔扇贝生殖周期性腺组织中的相对表达, 每个性腺组织做 2 个平行检测。荧光定量 RT-PCR 反应条件为: 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 15 s, 60℃ 1 min, 40 个循环。设定成熟期卵巢中该基因的表达量为“1”, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法对基因的相对表达量进行分析。所得数据以 3 样本数据的平均值 $\pm$ 标准误(mean $\pm$ SE)来表示, 使用 SPSS Statistic software (version 18.0) 进行单因素方差分析(One-Way ANOVA)和 Tukey B 检验法对其进行统计分析, 以 $P < 0.05$ 作为显著性差异。

2 结果与分析

2.1 栉孔扇贝 *wnt4* 全长 cDNA 序列特征和系统进化分析

利用 DNASTAR 软件去除载体序列并将其进行拼接, 得到了栉孔扇贝 *wnt4* 完整的 cDNA 序列。该序列全长为 1 239 bp(GenBank 注册号为 JQ071984), 其中开放阅读框为 1 068 bp, 编码 355 个氨基酸, 5'非编码区(Untranslated region, UTR)为 125 bp, 3' UTR 为 46 bp(图 1)。预测的栉孔扇贝 WNT4 蛋白分子质量为 39.863 kD, 等电点为 9.42。该氨基酸

序列含有 24 个 WNT 家族蛋白最重要的半胱氨酸保守序列(图 1)以及其他 100 多个 WNT 家族蛋白保守位点(图 2), 同时还含有 2 个 N-糖基化位点(位置为氨基酸残基 91 和 301)以及一段长为 26 个氨基酸的信号肽序列。

与已经报道的序列进行同源性比较的结果显示, 栉孔扇贝 WNT4 与沙蚕、海胆、中国地鼠(*Cricetulus griseus*)、袋鼠(*Macropus eugenii*)、人和乌贼 WNT4 氨基酸同源性分别为 68%、67%、65%、63%、62%和 61%。使用 MEGA 软件构建的 WNT4 氨基酸序列系统进化树显示, 栉孔扇贝 WNT4 首先与乌贼聚为一枝, 之后依次与文昌鱼(*Branchiostoma floridae*)和青鳉(*Oryzias latipes*)等聚类(图 3), 该基因的系统进化关系与传统的物种进化地位基本一致。

2.2 栉孔扇贝 *wnt4* 基因的空间表达

半定量 RT-PCR 检测结果表明, *wnt4* mRNA 除了在栉孔扇贝肾中没有表达外, 在其他的 6 种组织(精巢、卵巢、闭壳肌、肝胰腺、鳃、外套膜)中均有表达, 但表达量相对较低, 且各组织间存在差异, 其中在外套膜、闭壳肌、肝胰腺和精巢中的表达量略高于鳃和卵巢中的表达(图 4)。

2.3 栉孔扇贝 *wnt4* 基因在性腺发育中的定量表达分析

整个性腺发育周期中, *wnt4* 基因的表达量以成熟期最高, 且精巢的表达量显著性高于卵巢, 约为 2 倍($P < 0.05$); 增殖期和休止期表达量次之, 且显著低于成熟期, 其中增殖期精巢的表达量较成熟期精巢低约 7 倍, 增殖期卵巢的表达量较成熟期卵巢低约 2 倍, 休止期精巢的表达量较成熟期精巢低约 16 倍, 休止期卵巢的表达量较成熟期卵巢低约 3 倍; 生长期表达量最低, 且显著低于成熟期, 其中生长期精巢的表达量较成熟期精巢低约 30 倍, 生长期卵巢的表达量较成熟期卵巢低约 15 倍(图 5)。在整个性腺发育周期中, 除成熟期精卵巢之间及其与其他各时期的精卵巢之间表达存在差异外($P < 0.05$), 其他各个发育时期内及发育时期之间的精卵巢表达均未见差异($P > 0.05$)。

```

1  attgataaaaacctgtctgtgttttccccacacacagaacactactgaggaatttgtact
61  ttatttggggattttttacaaggactacattaactggtgatataagtaatacctacagtga
1  M K R P D S L Y I F I G V Y I L V Q I
121  taacgATGAAGCGACCGAGACTCTTTATATATCTTCATAGGAGTTTACATTCTAGTACAGA
20  P F L A D G I R W L S L A R M N S V A A
181  TTCCACCTCTAGCTGATGGTATCCGATGGCTATCTCTTGC CGGATGAACAGCGTAGCAG
40  I Q V P E M C D S L L G L V K R Q K K I
241  CAATACAGTTTCCTGAAATGTGTGATTCTTATTAGGATTAGTGAAACGACAGAAGAAAA
60  C R K N L E V M D S V K H G A H S A I D
301  TTTGTAGGAAAAATTTAGAAGTGATGGACAGCGTAAAACATGGTGCCCATTCAGCAATAG
80  E C Q F Q F R N R R W (N) C S T V N A K K
361  ACGAATGTCAATTTCAATTCGGTAACAGGCGGTGGAATTGTAGTACTGTAAACGCGAAAA
100  V F G N V L K L G T R E A S F V H A I S
421  AAGTATTTGGAATGTTCTTAAATTAGGTACCAGAGAAGCGTCATTTGTACATGCCATT
120  A A G V A H A V T R A C S S G A L S R C
481  CTGCAGCAGGTGTTGCGCAGCAGTCACGCGCGGTGCGAGTAGTGCGGCCCTAAGTAGGT
140  G C D R S V T G R S P K G F E W S G C S
541  GTGGTTGTGACAGATCAGTGACGGGACGGAGTCCCAAGGGATTTCGAGTGGTCTGGTTGTT
160  D N I A Y G T A F S K E F V D A R E R R
601  CAGACAATATAGCATATGGCACAGCGTTTTCAAAGAATTCGTTGATGCTCGTGAGAGAC
180  R N I K N S G R K L M N L H N N E A G R
661  GAAGAAATATTAATAAATTCTGGAAGAAACTGATGAATTTACATAACAACGAAGCCGGAA
200  K A V E D N M M K Q C K C H G V S G S C
721  GAAAGGCTGTTGAAGATAATATGATGAAGCAGTGTAATGCCATGGAGTTTCTGGATCTT
220  E L K T C W R A M P T F R N I G Q I I K
781  GTGAAGTGAAGACGTGTTGGAGAGCGATGCCTACATTACAGAAATATTGGACAAATTATCA
240  E K F D G A T E V K L D R N K L R P R L
841  AGGAGAAATTTGATGGAGCAACCGAAGTAAACTTTGATAGAAACAAGTTACGGCCTCGCC
260  I P V N P Q F K P H T N S D L V Y L I A
901  TTATTCCTGTAAACCCACAATTTAAACCTCACACTAATCAGATCTCGTATATCTGATCG
280  S P D F C E S D P K T G S L G T T G R V
961  CCTCCCTGACTTTTGTGAGTCAGACCCGAAGACAGGGTCCCTCGGCACAACGGGGAGGG
300  C (N) K T S K A I D G C D L M C C G R G Y
1021  TATGCAACAAGACATCAAAGCCATTGATGGATGTGATTTAATGTGCTGTGGTAGAGGAT
320  E T R R R K I V D R C S C K F H W C C Y
1081  ATGAGACTCGTAGAAGGAAAATAGTGGACAGGTGTTCTGTGAAGTTTCATTGGTGTGCT
340  V T C K K C E R E I D E H T C K *
1141  ACGTAACGTGTAAAAAGTGTGAACGAGAAATCGATGAACATACGTGTAAGTAAagggcag
1201  ataatcttcatacagaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

图1 栉孔扇贝 *wnt4* cDNA 序列和推测的氨基酸序列

小写字母代表 UTR 序列, 大写字母代表编码区序列; 双下划线代表翻译的起点和终点, 单下划线代表信号肽序列; 方框区域代表保守的半胱氨酸(C)残基, 括号区域代表预测的 N-糖基化位点。

Fig. 1 The cDNA sequence of *C. farreri wnt4* and the deduced amino acids sequence

The lowercase indicates the UTR sequence of *wnt4*, while, the uppercase indicates the encoding sequence. The start codon (ATG) and the stop codon (TAA) are double underlined, and the sequence for secretory signal peptide is underlined. Well-conserved cysteine residues are boxed and potential N-glycosylation sites are parenthesized.

3 讨论

3.1 栉孔扇贝 WNT4 序列结构及同源性分析

Roel 等^[7]报道, WNT 家族成员均为由 350 ~ 380 个氨基酸构成的蛋白, 都有一个或者多个 N-糖基化位点以及 23 或者 24 个保守的半胱氨酸残基, 并且分布着 100 多个保守位点。本研究发现栉孔扇贝 *wnt4* 基因编码 355 个氨基酸, 含有 2 个 N-糖基化位点以及 24 个保守的半胱氨酸残基, 并

且有超过 100 个的保守位点, 这与 Roel 等^[7]研究结果相一致。经过氨基酸序列同源比对分析, 本实验得到的栉孔扇贝 WNT4 与同为无脊椎动物的沙蚕、海胆同源性最高, 分别达到了 68% 和 67%, 与其他物种的 WNT4 同源性也达到了 60% 以上。上述分析表明, 本实验成功克隆了栉孔扇贝 *wnt4* 基因全长 cDNA 序列。

3.2 栉孔扇贝 *wnt4* 组织表达特征及分子类型分析

WNT4 作为一种信号分子普遍存在于生物体

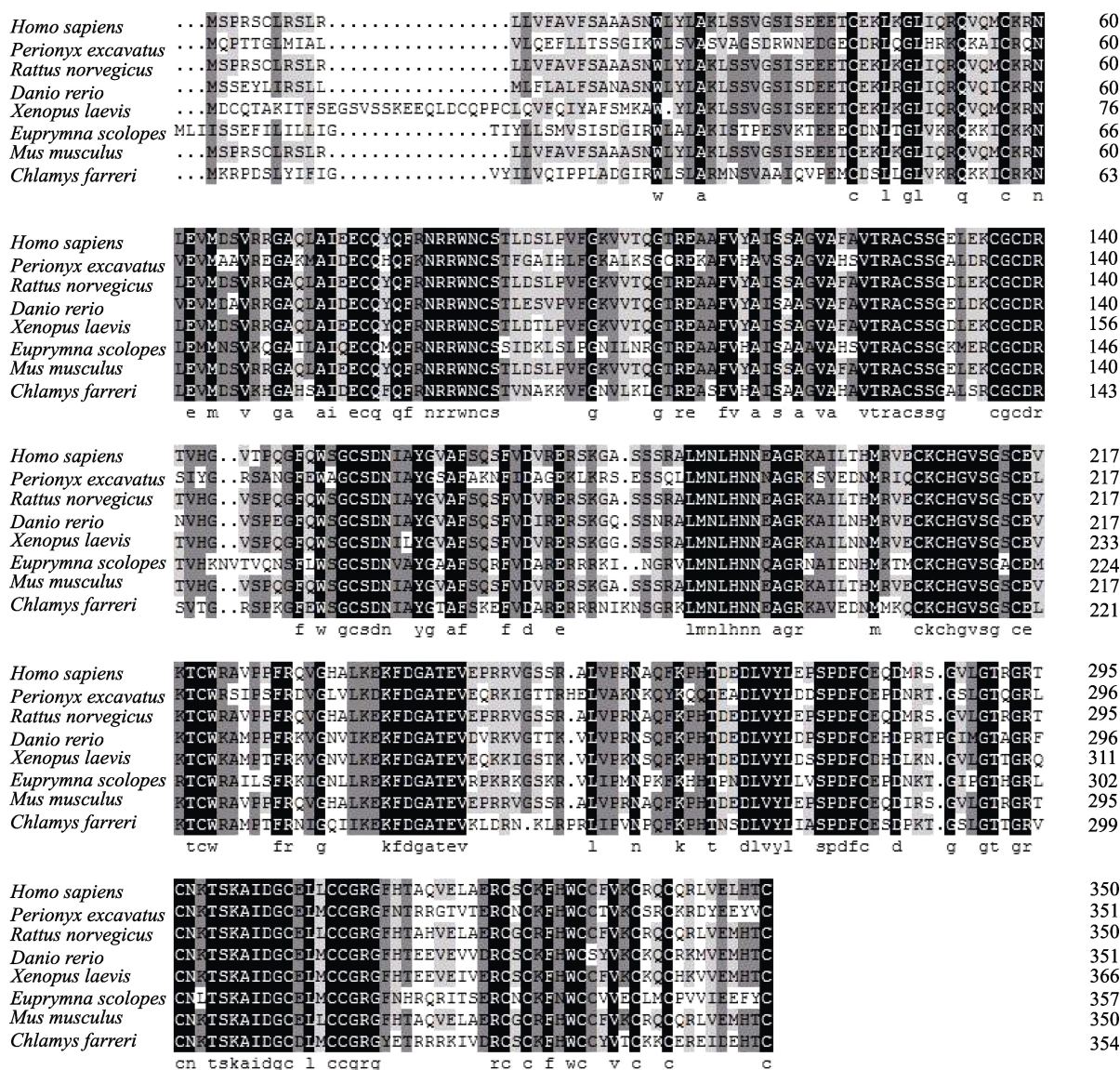


图 2 不同物种 WNT4 氨基酸序列多重比对分析

阴影区显示同源性的氨基酸, 其中黑色区代表氨基酸同源性为 100%, 深灰色区代表氨基酸的同源性为 75%以上, 浅灰色区代表氨基酸的同源性为 50%。人(*Homo sapiens*)、蚯蚓(*Perionyx excavatus*)、大鼠(*Rattus norvegicus*)、斑马鱼(*Danio rerio*)、非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)、乌贼(*Euprymna scolopes*)、小鼠(*Mus musculus*)、栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)。

Fig. 2 Multiple alignment of the deduced amino acid sequence among different species' WNT4

Shaded regions indicate residues sharing homology, black region is 100% homologous sequence, gray region is 75%, light gray region is 50%.

中, 并参与多个生命过程。Yu 等^[21]发现, 袋鼠 *wnt4* 基因在肌肉、肝、肾、肺、精巢和卵巢组织中都有表达; Haruyuki 等^[22]在鸡的骨骼肌前体细胞中过表达 WNT4 导致 Pax7 和 MyoD1 的表达上调和肌肉量显著地增加, 提出 WNT4 是生肌细胞迁移和分化的刺激因子。Maurus 等^[23]的研究发现, WNT4 是非洲爪蟾眼睛发育所必需的。与已报道

的结果类似, 本实验中栉孔扇贝 *wnt4* 基因也具有广泛的组织表达特点, 在所检测的多种组织(闭壳肌、肝胰腺、鳃、外套膜、精巢、卵巢)中均有表达, 且鉴于其低水平表达特点, 推测 *wnt4* 在栉孔扇贝可能也以信号分子的形式参与多种组织细胞的生命过程。Didier 等^[24]证实, WNT4 是非爪蟾前肾肾小管发生所必需的, 而小鼠 WNT4 缺失更

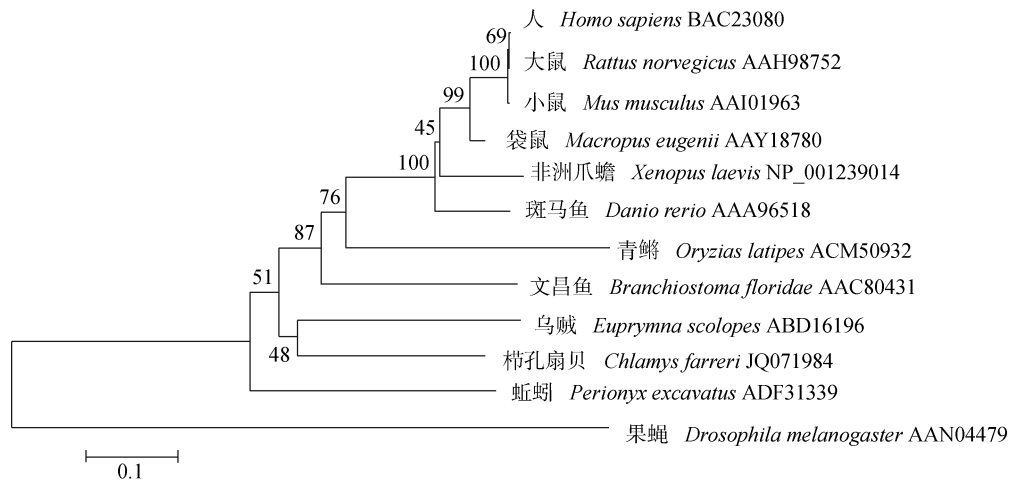


图 3 基于 WNT4 氨基酸序列绘制的系统树

Fig. 3 Phylogenetic tree of WNT4 based on the homologous of the amino acids

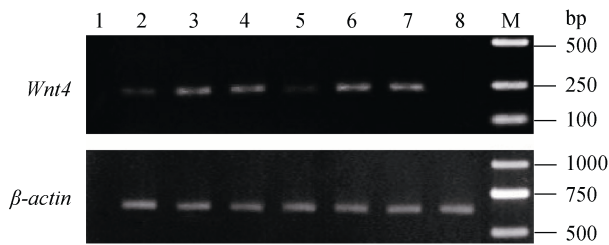


图 4 *wnt4* 基因在栉孔扇贝组织中的表达

M: DL 2000 Marker; 1: 水; 2: 鳃; 3: 外套膜; 4: 闭壳肌;
5: 卵巢; 6: 精巢; 7: 肝胰腺; 8: 肾

Fig. 4 Expression of *wnt4* in *C. farreri* tissues detected by RT-PCR

M: DL 2000 marker; 1: water; 2: gill; 3: mantle; 4: adductor muscle; 5: ovary; 6: testis; 7: hepatopancreas; 8: kidney.

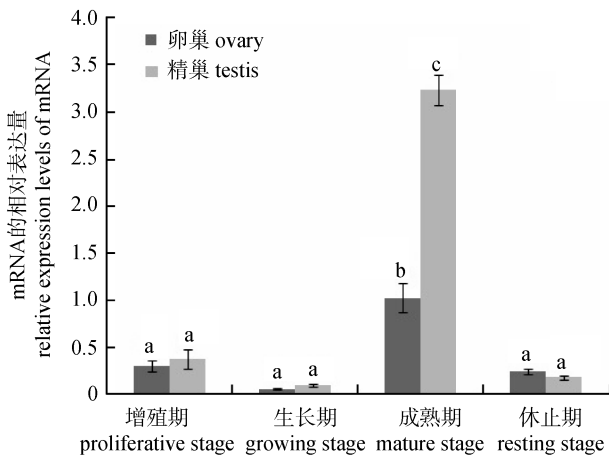


图 5 *wnt4* 基因在栉孔扇贝不同发育时期性腺中的表达不同的字母表示基因表达差异显著 ($P < 0.05$).

Fig. 5 Relative expression of the *wnt4* in *C. farreri* gonad during different developmental stages
Different letters indicate significant differences statistically ($P < 0.05$).

是因为发生肾衰竭而死亡^[17]。与已报道的结果不同, 本实验并没有检测到 WNT4 mRNA 在栉孔扇贝肾中的可见表达, 推测可能是由于栉孔扇贝在进化上的低等性, 其肾的结构和执行的生物学功能较高等动物相对简单, 可能并不需要 *wnt4* 基因参与相关的功能。已报道青鳉、斑马鱼、虹鳉 (*Oncorhynchus mykiss*) 等鱼类中存在两种 *wnt4* 基因^[25-27], *wnt4a* 和 *wnt4b*。Barbara 等^[27] 发现虹鳉 *wnt4a* 基因编码的蛋白与人、小鼠、鸡等脊椎动物 WNT4 蛋白氨基酸序列同源性大于 80%, 并且其 mRNA 在多种组织, 包括脑、鳃、肝、肌肉、皮肤、头肾、卵黄发生晚期的卵巢和一期精巢中都有表达; 而 *wnt4b* 基因编码的蛋白与上述脊椎动物 WNT4 蛋白的同源性低于 60%, 且其 mRNA 仅限于神经系统如脑和垂体中表达。本研究未在栉孔扇贝中发现两种 *wnt4* 基因的存在, 且根据栉孔扇贝 WNT4 与中国地鼠、袋鼠和人等脊椎动物 WNT4 氨基酸具有较高的序列同源性(大于 60%) 以及在多种组织中均有表达的特点, 我们认为栉孔扇贝 *wnt4* 更倾向于鱼类的 *wnt4a* 基因。

3.3 栉孔扇贝 *wnt4* 性腺表达及功能分析

WNT4 是一种分泌型的糖蛋白, 它参与了动物体多种器官的形成过程, 尤其是在哺乳动雌性生殖系统发育过程中发挥了重要的作用^[20]。近期在很多物种中发现, *wnt4* 基因与性别决定和性别分化紧密相关。Barrionuevo 等^[28] 报道, 小鼠 *wnt4*

基因在性别决定之前的性腺中表达, 性别决定之后, 在精巢中的表达特异性地下调, 而在卵巢中持续表达; Pascal 等^[20]观察到, *wnt4* 基因缺失的小鼠可导致雌性胚胎发生雄性化, 但未检测到支持细胞标记基因的表达和精巢组织的形成, 因此认为 *wnt4* 不是初级性别决定基因。本实验发现, 栉孔扇贝 *wnt4* 基因在不同发育时期的性腺中均有表达, 且在成熟期性腺中的表达量最高, 暗示该基因可能参与两性性腺的发育并在生殖细胞成熟过程中发挥作用; 进一步发现, 该基因在栉孔扇贝成熟期精巢中的表达量显著高于同时期卵巢中的表达量。这一性腺性别表达特点与虹鳟中 *wnt4a* 基因的表达^[27]类似。Katherine 等^[29]证明了小鼠 *wnt4* 基因与 *Sry* 基因互作来确保正常的支持细胞分化以及正常精巢和卵巢的发育, 至于在栉孔扇贝中是否也属于这种机制还需要进一步地实验来证明。

参考文献:

- [1] Ken M C, Yan I L. Wnt signaling: complexity at the surface [J]. *J Cell Sci*, 2006, 119 (3): 395–402.
- [2] Michael D G, Roel N. Wnt Signaling: Multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281 (32): 22429–22433.
- [3] Margaret H, Jill A, McMahon A P. Wnt expression patterns in chick embryo nervous system [J]. *Mechan Dev*, 1995, 52: 9–25.
- [4] Ken M, Cadigan R N. Wnt signaling: a common theme in animal development [J]. *Genes Dev*, 1997, 11: 3286–3305.
- [5] Carlos V C, Alonso M C, Johnston P, et al. Phenocopies induced with antisense RNA identify the wingless gene [J]. *Cell*, 1987, 50: 659–663.
- [6] Paul P. Wnt signaling and cancer [J]. *Genes Dev*, 2000, 14: 1837–1851.
- [7] Roel N, Harold E V. Wnt Genes [J]. *Cell*, 1992, 69: 1073–1067.
- [8] Mammalian Gene Collection (MGC) Program Team. Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences [J]. *PNAS*, 2002, 99 (26): 16899–16903.
- [9] McGrew L L, Arie P O, Randall T M. Analysis of Xwnt-A in embryos of *Xenopus laevis*: A Wnt family member expressed in the brain and floor plate [J]. *Development*, 1992, 115: 463–473.
- [10] Yacine G, Kathrin G, Denise A, et al. DWnt-4, a novel *Drosophila* Wnt gene acts downstream of homeotic complex genes in the visceral mesoderm [J]. *Development*, 1995, 121: 209–218.
- [11] Benjamin P, Nicolas L, Guillaume B, et al. Phylogenetic Analysis of the Wnt Gene Family: Insights from Lophotrochozoan Members [J]. *Curr Biol*, 2002, 12: 1395–1400.
- [12] Michael J F, Mary C S, Rudolf A R. Phylogenetic Relationships and Developmental Expression of Three Sea Urchin Wnt Genes [J]. *Mol Biol Evol*, 1998, 15 (7): 809–819.
- [13] 陶丽红, 姚利晓, 傅志强, 等. 日本血吸虫信号转导蛋白 *Sjwnt-4* 基因的克隆、表达及功能分析[J]. *生物工程学报*, 2007, 23(3): 392–397.
- [14] Makoto S, Daiki U, Satoshi M, et al. DWnt4 regulates the dorsoventral specificity of retinal projections in the *Drosophila melanogaster* visual system [J]. *Nat Neur*, 2006, 9 (1): 67–74.
- [15] Cohen E D, Marie C M, Rachel M H, et al. DWnt4 Regulates Cell Movement and Focal Adhesion Kinase during *Drosophila* Ovarian Morphogenesis [J]. *Dev Cell*, 2002, 2: 437–448.
- [16] Ungar A R, Kelly G M, Moon R T. Wnt4 affects morphogenesis when misexpressed in the zebrafish embryo [J]. *Mech Dev*, 1995, 52 (3): 153–164.
- [17] Stark K, Vainio S, Vassileva G, et al. Epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney regulated by Wnt-4 [J]. *Nature*, 1994, 372 (6507): 679–683.
- [18] Kispert A, Vainio S, McMahon A P. Wnt-4 is a mesenchymal signal for epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney [J]. *Development*, 1998, 125 (21): 4225–4234.
- [19] Vainio S, Heikkila M, Kispert A, et al. Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling [J]. *Nature*, 1999, 397 (6718): 405–409.
- [20] Pascal B, Vincent R H. Wnt4 action in gonadal development and sex determination [J]. *Intern J Biochem Cell Biol*, 2007, 39: 31–43.
- [21] Yu H S, Andrew J P, Geoffrey S, et al. Differential expression of WNT4 in testicular and ovarian development in a marsupial [J]. *BMC Dev Biol*, 2006, 6 (44): 1–13.
- [22] Haruyuki T, Kumiko T, Hiroaki O, et al. Involvement of Wnt4 signaling during myogenic proliferation and differen-

- tiation of Skeletal Muscle [J]. Dev Dyn, 2007, 236: 2800–2807.
- [23] Maurus D, Heligon C, Burger-Schwarzler A, et al. Noncanonical Wnt-4 signaling and EAF2 are required for eye development in *Xenopus laevis* [J]. EMBO J, 2005, 24 (6): 1181–1191.
- [24] Didier M E, Saulnier H G, Andrew B. Essential Function of Wnt-4 for Tubulogenesis in the *Xenopus* Pronephric Kidney [J]. Dev Biol, 2002, 248: 13–28.
- [25] Keiji I, Yoshiro T, Akira K. Production of Wnt4b by floor plate cells is essential for the segmental patterning of the vertebral column in medaka [J]. Development, 2010, 137: 1807–1813.
- [26] Liu A P, Arindam M, Heike E S, et al. Zebrafish wnt4b expression in the floor plate is altered in sonic hedgehog and gli-2 mutants [J]. Mech Dev, 2000, 91: 409–413.
- [27] Barbara N, Adele G, Alexis F, et al. Ovary-Predominant wnt4 Expression During Gonadal Differentiation is not Conserved in the Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Mol Repr Dev, 2012, 79: 51–63.
- [28] Barrionuevo F, Bagheri-Fam S, Klattig J, et al. Homozygous inactivation of Sox9 causes complete XY sex reversal in mice [J]. Biol Reprod, 2006, 74 (1): 195–201.
- [29] Katherine J-W, Mathieu D, Amanda S. Wnt4 is required for proper male as well as female sexual development [J]. Dev Biol, 2004, 276: 431–440.

Molecular cloning and expression analysis of *wnt4* cDNA from the Zhikong scallop *Chlamys farreri*

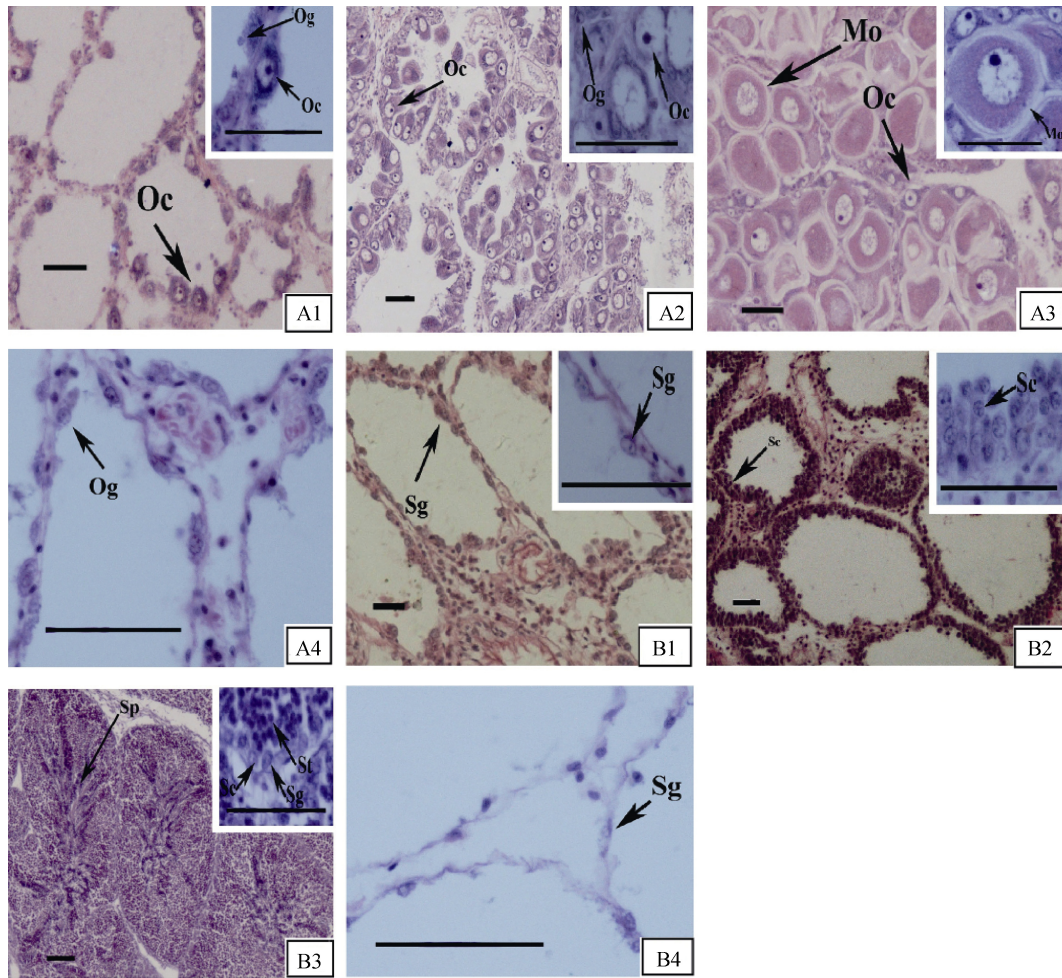
LI Hailong, LIU Jianguo, LIU Xiaoling, ZHANG Zhifeng

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

Abstract: An expressed sequence tag (EST) of *wnt4* (Wingless-type MMTV integration site family, member 4) was obtained from the transcriptome database of the Zhikong scallop (*Chlamys farreri*) and its entire cDNA sequence was acquired by SMART-RACE. The results indicated that the cDNA sequence of *C. farreri wnt4* was 1239 bp in length and encoded 355 amino acids. The WNT4 amino acids sequences were specific to the WNT family. Homologous analysis of the amino acids showed that *C. farreri* WNT4 was over 60% similar to most species of WNT4 including *Platynereis dumerilii*, *Heliocidaris erythrogramma* and *Homo sapiens*. Semi-quantative RT-PCR results showed no expression in the kidney tissue; however, *C. farreri wnt4* had large, wide but low expression levels in testes, ovary, adductor muscle, hepatopancreas, gill and mantle tissues. qRT-PCR results indicated that *wnt4* mRNA expression levels were highest in the testes and mature ovaries, with lower levels in the proliferative and resting stage and the lowest expression at the growing stage. The expression levels of *C. farreri wnt4* were characteristically testis-predominant during the entire reproductive cycle. The multiple tissue expression characteristics imply that WNT4 plays various biological roles in *C. farreri*. We can infer from the expression pattern in the gonads that WNT4 also contributes to the process of gonadal development and germ cell maturation.

Key words: *Chlamys farreri*; *wnt4* gene; cloning; expression

Corresponding author: ZHANG Zhifeng. E-mail: zzfp107@ouc.edu.cn



图版 I 栉孔扇贝不同发育时期性腺的组织学观察

A: 卵巢; B: 精巢; A1、B1: 增殖期; A2、B2: 生长期; A3、B3: 成熟期; A4、B4: 休止期; Oc: 卵母细胞; Og: 卵原细胞; MO: 成熟卵; Sg: 精原细胞; Sc: 精母细胞; St: 精细胞; Sp: 精子; 标尺: 50 μm .

Plate Histological observation on *C. farreri* gonads during developmental cycles

A: ovary; B: testis; A1、B1: proliferative stage; A2、B2: growing stage; A3、B3: mature stage; A4、B4: resting stage; Oc: oocyte; Og: oogonium; MO: mature oocyte; Sg: spermatogonium; Sc: spermatocyte; St: spermatid; Sp: sperm; bar=50 μm .