

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2018.17407

海蜇 *Frizzled1* 基因的克隆及在无性繁殖中的表达

潘滢^{1,2}, 朱玲^{2,3}, 周春娅^{2,4}, 陈四清², 庄志猛^{2,3}

1. 厦门大学海洋与地球学院, 福建 厦门 361005;
2. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室, 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071;
3. 青岛海洋科学与技术国家实验室, 山东 青岛 266237;
4. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306

摘要: 采用 RACE 技术解析了海蜇(*Rhopilema esculentum*) *Frizzled1* 基因的 cDNA 和基因组结构: *Re-Fzd1* 基因的全长 cDNA 为 2387 bp, 其中编码区为 1761 bp, 编码 586 个氨基酸的多肽。SMART 分析表明, *Re-Fzd1* 基因具备 Fzd 家族共同的结构特征, 包括: 一个由 23 个氨基酸组成的信号肽, 一个位于 N-末端富含 10 个保守半胱氨酸残基的半胱氨酸富集域(CRD), 一个含有 7 个跨膜片段的跨膜结构域, 以及一个含有 5 个重要的磷酸化位点的 C 端尾巴。多序列比对表明, *Re-Fzd1* 基因与刺胞动物贝螈(*Hydra echinata*)、水螅(*Hydra vulgaris*)、半球美螅水母(*Clytia hemisphaerica*)和海葵(*Nematostella vectensis*) *Fzd1* 具有高度相似性, 与来自脊椎动物人(*Homo sapiens*)、鼠(*Mus musculus*)、爪蟾(*Xenopus laevis*)和斑马鱼(*Danio rerio*)的 *Fzd1*、*Fzd2* 和 *Fzd7* 家族基因也具有较高的同源性。基于 N-J 法, 将人、鼠、爪蟾、斑马鱼和果蝇(*Drosophila melanogaster*)所有 Fzd 家族基因系统进化分析显示, 除果蝇外, 所有 Fzd 家族成员聚类成 4 个类群, 11 个亚家族, 海蜇 *Re-Fzd1* 基因首先与刺胞动物门的 *Fzd1* 聚类在一起, 然后与脊椎动物 *Fzd1*、*Fzd2* 和 *Fzd7* 三个家族聚成一个类群, 表明脊椎动物 *Fzd1*、*Fzd2* 和 *Fzd7* 家族可能与刺胞动物门的 *Fzd1* 起源于同一个共同祖先。*Re-Fzd1* 基因组序列中不含有内含子。实时荧光定量 PCR 结果显示, *Re-Fzd1* 基因在海蜇无性繁殖的 4 个发育阶段均有表达, 其中, 表达量最高的横裂体阶段是表达量最低的稚水母阶段的 3.67 倍。整体原位杂交显示, 在海蜇横裂体时期, *Re-Fzd1* 原位表达在触手、基座及发生横裂的部位。这些结果都表明, *Re-Fzd1* 不但参与了海蜇的早期发育过程, 还调控了海蜇无性繁殖的发生。

关键词: 海蜇; *Frizzled*; cDNA; 基因组结构; 整体原位杂交; 无性繁殖

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2018)06-1335-12

Wnt 信号通路是一类进化保守的信号途径, 调控生物发育的多个环节, 掌控细胞增殖、分化、凋亡和极性细胞命运^[1]。目前公认的 Wnt 信号途径主要有 3 条, 经典的 Wnt/ β -catenin 途径、平面细胞极性通路、Wnt/ Ca^{2+} 途径^[2]。在这 3 条途径中, Wnt 配体均需要与一种被称作“Frizzled”的细胞膜受体 (Fzd) 结合来完成信号转导^[3]。Fzd 基因编码的跨膜蛋白是 Wnt 途径的重要受体^[4], 首

次被发现在研究果蝇(*Drosophila melanogaster*)上皮细胞极性的阻断突变筛选试验过程中^[5]。随后, 在多种后口动物中也都发现了 Fzd 家族成员, 其中在脊椎动物中发现了至少 10 个成员, 果蝇中发现了 4 个成员, 秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)中发现了 3 个成员^[6]。随后, 在原始多细胞动物中也发现了 Fzd 家族成员的存在, 如海绵(*Suberites domuncula*)、水螅(*Hydra vulgaris*)和半

收稿日期: 2018-01-28; 修订日期: 2018-09-14.

基金项目: 国家自然科学基金项目(31372507); 鳌山科技创新计划项目(2016ASKJ02); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(20603022016001).

作者简介: 潘滢(1986-), 博士, 研究方向: 海洋生物技术. E-mail: py19860220@sina.com

通信作者: 朱玲, 博士, 副研究员, 研究方向: 分子生物学. E-mail: zhuling@ysfri.ac.cn

球美螅水母(*Clytia hemisphaerica*)等^[7-8]。Fzd 蛋白家族属于 G 蛋白偶联受体家族(GPCRs), 均包含 3 个明显的蛋白结构特征: 1)在细胞外的 N-末端, 具有一个保守的半胱氨酸残基富集域(cysteine-rich domain, CRD), 该区域能识别并结合 Wnt 配体; 2)具有一个由 7 个跨膜的 α 螺旋蛋白构成的疏水区; 3)具有一个 C 端“尾巴”, 能将信号传递给下游信号元件, 在不同的 Fzd 家族成员中长度是不同的^[9]。

刺胞动物(Cnidaria)结构简单, 仅具二胚层, 是最原始的后生动物。同时, 刺胞动物又具有复杂的生活史和发育模式, 有一个或多个可逆转的生活周期, 如从水母阶段转变成水螅阶段, 这种现象被认为是由一系列的复杂的生物途径控制的^[10]。而目前公布的刺胞动物门海葵(*Nematostella vectensis*)、鹿角珊瑚(*Acropora millepora*)、水螅等的基因组数据也显示, 刺胞动物基因组中保留了调控生长、发育、繁殖、代谢等生命过程的基础功能单元, 而高等动物则是在此基础上, 进化的更复杂, 调控的更精细^[11]。本研究拟通过解析海蜇

Wnt 信号通路中膜受体基因 Fzd 的分子结构, 探讨它在海蜇无性繁殖中的表达模式, 阐明 Wnt 信号途径在刺胞动物无性繁殖中的作用。

1 材料与方法

1.1 海蜇 *Re-Fzd1* 基因的全长 cDNA 克隆与测序

野生性成熟海蜇 cDNA 文库构建及测序参见文献[12]。选取与其他生物 Fzd 基因具有高度相似性的 EST 序列并设计 2 条特异性引物 *Re-Fzd1*F1 和 *Re-Fzd1*-R1(表 1)。*Re-Fzd1* 的 3'末端序列克隆利用载体通用引物 T7 与特异性引物 *Re-Fzd1*-F1 扩增; *Re-Fzd1* 的 5'末端序列利用载体通用引物 T3 与特异性引物 *Re-Fzd1*-R1 扩增。PCR 反应体系包括: 1.5 μ L MgCl₂ (25 mmol/L), 2 μ L dNTP (25 mmol/L), 2.5 μ L 10 $\times$ PCR buffer, 0.2 μ L (1 U) Taq 酶, 1 μ L 引物(10 μ mol/L), 1 μ L cDNA 模板, 15.8 μ L PCR 水; PCR 反应参数中退火温度见表 1。扩增产物切胶回收后连接到 pMD19-T(Takara) 载体, 转化至大肠杆菌感受态细胞 Top10 后, 筛选阳性克隆并测序。

表 1 海蜇 *Re-Fzd1* cDNA、基因组克隆和表达所用的引物
Tab. 1 Primers used for cDNA and genome cloning and mRNA expression of *Re-Fzd1* from *Rhopilema esculentum*

引物名称 primer name	序列 sequence	长度/bp length	退火温度/℃ annealing temperature
<i>Re Fzd1</i> -F1	5'-AGCCAGGGTTTGATGTTA-3'	18	57.2
T7 (Vector)	5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3'	22	
<i>Re Fzd1</i> -R1	5'-TGTCCTATCAGCCACAT-3'	18	56.5
T3 (Vector)	5'-AATTAACCCTCACTAAAGGG-3'	20	
<i>Re Fzd1</i> /2/7-F2	5'-CTGTTGGATGCCTTGTTGA-3'	18	56.8
<i>Re Fzd1</i> /2/7-R2	5'-GTCCCGCTTCTTCTTGAT-3'	18	
<i>Re Fzd1</i> /2/7-F3	5'-GAAATCAAGAAGAAGCGGGACT-3'	22	55.5
<i>Re Fzd1</i> /2/7-R3	5'-ATCGGTTTGTAAGGATAGTGAA-3'	22	
<i>Re Fzd1</i> /2/7-F4	5'-CGGTTGTTACTTCGTTAT-3'	18	55.0
<i>Re Fzd1</i> /2/7-R4	5'-TCATGGCTCCATTTCATT-3'	18	
<i>Re Fzd1</i> /2/7-F5	5'-ATTTGGTGGGTTATTCTTAC-3'	18	56.5
<i>Re Fzd1</i> /2/7-R5	5'-TGAGGGTTCTTTGGCATT-3'	18	
<i>Re Fzd1</i> /2/7-F6	5'-AATGCCAAAGAACCCTCA-3'	18	60.0
<i>Re Fzd1</i> /2/7-R6	5'-CTGGCACTGTGACAACCTTC-3'	20	
AC-F	5'-AACTGGGACGATATGGAGAAGA-3'	22	60.0
AC-R	5'-CGACCAGAGGCGTACAATGAG-3'	21	

1.2 海蜇水母体基因组 DNA 提取和 *Re-Fzd1* 的基因组克隆

用酚-氯仿法提取 DNA 参见[12], 并略有改

动。为防止提取过程中 DNA 的降解, 55℃水浴减为 45 min。

根据获得的 *Re-Fzd1* 基因的 cDNA 全长序列,

设计了6对基因特异性引物扩增 *Re-Fzd1* 的基因组全长, 详细的引物信息及其PCR反应参数中退火温度见表1, PCR反应体系及测序同1.1。

1.3 *Re-Fzd1* 基因的生物信息学分析

Re-Fzd1 的 cDNA 和氨基酸序列分析采用 BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) 和蛋白分析系统(<http://www.expasy.org/>)。 *Re-Fzd1* 及其他物种 Fzd 氨基酸多序列比对采用 ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) 进行。用 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 预测 *Re-Fzd1* 的蛋白结构域。基因邻接法(neighbor-joining)利用 Mega 6 构建 Fzd 家族的系统进化树^[13]。

1.4 *Re-Fzd1* 的表达分析

采用实时荧光定量PCR检测在海蜇不同发育阶段包括螅状体、横裂体、碟状体和稚水母, *Re-Fzd1* 基因的表达情况。定量引物 *Re-Fzd1*-F4 和 *Re-Fzd1*-R4 和作为内参的管家基因 β -actin 的引物 AC-F 和 AC-R 见表1。PCR反应参数为: 95℃, 30 s、95℃, 5 s、58℃, 30 s, 共35个循环。10 μ L 反应体系包括: 5 μ L SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (TaKaRa), 0.2 μ L ROX Reference Dye II, 0.2 μ L 引物 (10 μ mol/L), 1 μ L cDNA 模板和 3.4 μ L PCR 水。设3个重复, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行数据分析 (Livak et al., 2001)。数据处理中各组间均数比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA), $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

1.5 *Re-Fzd1* 的整体原位杂交

首先提取质粒并线性化, 利用体外转录法合成地高辛标记 RNA 探针。然后, 选取4%多聚甲醛固定好的海蜇横裂体, 用0.5×磷酸盐缓冲液(PBS)反复漂洗3遍, 转入96孔板, 进行预杂交和杂交。预杂交: 在杂交炉中, 将60℃的杂交缓冲液加入到装有样品的96孔板中预孵育3 h。预杂交缓冲液包括: 50% 甲酰胺, 5% 硫酸葡聚糖, 5% Denhardt 液, 1.3×SSC (pH 7.5), 5 mmol/L EDTA, 2%吐温-20, 50 μ g/mL 鲑鱼精子 DNA, 100 mg/mL 肝素钠和0.5% CHAPS。杂交: 加入地高辛标记的 RNA 探针(终质量浓度200 ng/mL), 60℃, 10 h。杂交后于60℃下依次经过50% MABT(含100 mmol/L 马来酸, 150 mmol/L NaCl, 0.1% Tween-20, pH

7.5), 4×SSC 洗脱20 min, 50% MABT, 2×SSC 洗脱20 min, 1×SSC 洗脱20 min, 0.2×SSC 洗脱20 min, 然后0.5×PBS 20 min 洗脱2次。抗体封闭与孵育: 将样品在抗体稀释液(1% BSA, 0.4% Triton X-100, 0.5×PBS, pH 7.5)中封闭1 h, 然后加入含有碱性磷酸酶标记的地高辛抗体(1:4000, Roche) 1 μ L, 4℃孵育过夜。次日, 室温下用 MABT 缓慢漂洗样品4次, 每次30 min。然后将样品在 NBT-BCIP 显色液(1:100, Roche)中室温显色1 h, 用甲醇终止显色, 进行拍照记录。

2 结果与分析

2.1 *Re-Fzd1* 的 cDNA 全长分析

将海蜇 Fzd1 的 EST 序列与 3'RACE、5'RACE 序列进行拼接, 获得了海蜇 Fzd1 基因(*Re-Fzd1*) 的全长 cDNA 序列为2387 bp。其中, 5'非编码区和3'非编码区分别长141 bp 和485 bp; 开放阅读框长1761 bp, 编码了586个氨基酸组成的多肽。预测理论分子量和等电点分别为66.898 kD 和9.10。*Re-Fzd1* 的氨基端包含23个氨基酸组成的信号肽, 为分泌蛋白(图1, Accession No. KJ719304)。

2.2 *Re-Fzd1* 的同源性和系统进化分析

SMART 分析表明, *Re-Fzd1* 具有典型 Fzd 家族的3个明显蛋白结构特征, 包括: 一个位于N-末端富含10个保守半胱氨酸残基的半胱氨酸富集域, 一个含有7个跨膜片段的跨膜结构域(图2, 图3), 以及一个含有5个重要的磷酸化位点(SIK₄₄₈₋₄₅₀, TdK₄₅₁₋₄₅₃, SgK₅₄₉₋₅₅₁, Swk₅₅₅₋₅₅₇, SsK₅₈₁₋₅₈₃) 的C端尾巴。

BLAST 分析发现, 推导的 *Re-Fzd1* 氨基酸序列与来自刺胞动物门的贝螅(*Hydractinia echinata*)、水螅(*H. vulgaris*)、半球美螅水母(*C. hemisphaerica*)和海葵(*N. vectensis*)的 Fzd1 具有很高的同源性, 其氨基酸序列一致性分别为54%、54%、51%和53%。同时, *Re-Fzd1* 与来自脊椎动物人(*Homo sapiens*), 鼠(*Mus musculus*), 爪蟾(*Xenopus laevis*)和斑马鱼(*Danio rerio*)的 Fzd1、Fzd2 和 Fzd7 家族具有较高的同源性, 其氨基酸序列一致性分别为48%~50%、48%~50%、50%~51%和49%~51%(表2)。对上述 Fzd 的半胱氨酸

```

1  GGAGCAGGTCTTGTGTTGTGAAACTTGCTGTTGGATGCCTTGTAACAATTGAAATAAC
61  AAAAAAGAAATAATCTTAAATGCAAACTATCAATGACTAGATTGAAAGACGTCTTATAGGA
121  GCGAGTTTATAAACTTAAACCATGGTGACTACTTGGGGATTTTTCGTACTTTTGATGCAT
1  M V T T W G F F V L L M H
181  TTAATTTTGTGTTTCGAGGAGAGTGCGTCCATATCGCCATCTAGATGCGAACCGATTACC
14  L I L L F E E S A S I S P S R C E P I T
241  ATTCCGCTATGTCAGGACATTCAATACAACAAACGGTATTTCCGAACCTACTTTCACAC
34  I P L C Q D I Q Y N K T V F P N L L S H
301  AGAAATCAAGAAGAAGCGGGACTTGAAGTTCATCAGTTTTTTTCCACTGGTTAAGGTAGAA
54  R N Q E E A G L E V H Q F F P L V K V E
361  TGCTCGAAGTATTTGAAATCTTTTTGTGTTTCAGTTTACGTGCCAATTTGCTCGGATAAA
74  C S K Y L K F F L C S V Y V P I C S G D K
421  GTGTCGACTCCCATTCACCATGTCGATTTTGTGCAAAAGTGCGAGAGACGGTTGTCTC
94  V S T P I P P C R I L C K V A R D G C L
481  AAATTGATGAATTGTTTCGGTTTTTCAGTGGCCTGAAGCATTACAATGCGAGAGATATCCA
114  K L M N S F G F Q W P E A L Q C E R Y P
541  GAAATGGGCTCCGGTAGTCTCTGTGTGGGAAAAAACTTTACCGAAAAAGAACGTGGTGGAA
134  E M G S G S L C V G K N F T E K E R G G
601  GACAAAAAGCCATCTGGCAATGGTAATAATGGAGGAAATGGTGGAAATACTAACCGCGAA
154  D K K P S G N G N N G G N G N T N K
661  CCGGGACCAAACTAATAAAAGAAATGATAGAAGAGAGCCAGGTTTGATGTTACCTTC
174  P G T K T N K R N D R R E P G F D V T F
721  AATATTTCTCAATTTAAACGGGTAAACCAATTTTCAGATGCCCTTCTGTTCAAAACAAA
194  N I S Q F K T G K P I F R C P S V Q N K
781  TCGGATGACAAGCATTATAACTTCATGGGCGAAATGGGCTGTGAGGTGAATGTACAAAC
214  S D D K H Y N F M G E M G C A G E C T T
841  ATTTACTTCAACCAAGGAACGAGATTTTCGCCGAAAGTGGATTTTATTTTGGGCCCTG
234  I Y F T T K E R D F A R K W I L F W A L
901  ATGTGTATATCTCTACCACTTCAGTTTATTGACTTATTTAATTGACATGAAGAGGTTT
254  M C I I S T T F S L L T Y L I D M K R F
961  CACTATCCTTACAAACCGATTATTTTCTATGCGGTTGTTACTTCGTTATTGCAGTTGTT
274  H Y P Y K P I I F L C G C Y F V I A V V
1021  TATATTGTCGATATGTGGCTGATAGGGACATATCATGTCATAAAGTAAATCTGGAACG
294  Y I V G Y V A D R D I S C H K V K S G T
1081  ATGCTTTACAACCAAGGAACAGAGAATGCAGGATGTACTGTCGTATTTATGTTCTTTAT
314  M L Y N Q G T E N A G C T V V F M F L Y
1141  TTCTTTACCATGGCATCTGCGATTGTTGGGTTATCTTACTTTGACCTGGTTTTTGGCG
334  F F T M A S A I W W V I L T L T W F L A
1201  GCAGGAATGAAATGGAGCCATGAAGCTATTGAAGGAAACTCGCAGTACTTCCACGCAGCG
354  A G M K W S H E A I E G N S Q Y F H A A
1261  GCCTGGGCACTCCCTGCCGCTAAAACCATCGCGATTCTGGCCATGCATGAAGTTGATGGA
374  A W A L P A A K T I A I L A M H E V D G
1321  GATGAGCTCAGTGGTATCTGTTTTGTTGGTGGTTCAAACCTTGCAAGCATTGCGAGGATTC
394  D E L S G I C F V G G S N L Q A L R K F
1381  TTGCTAGCCCCTCTGTTTCGTTTACCTTGTCTTGGCACGTTTTTCTTCTCGTGGTTTC
414  L L A P L F V Y L V L G T F F L L A G F
1441  ATCTCGTTGGTCCGCATACGGTCAGTTCTTAAGCACGATCAGTCGCTGAAAACCGACAAA
434  I S L V R I R S V L K H D Q S L K T D K
1501  CTTACACGCTGATGATCCGCTTGGTGTCTTCTCAATCCTGTACACGTTGCCAGCCATT
454  L T R L M I R I G V F S I L Y T L P A I
1561  ATTGTGATTGCATGCTGTTTTATGAACAGGCCCTACCGCCACACCTGGGACAGTGCATGG
474  I V I A C L F Y E Q A Y R H T W D S A W
1621  ATCAGATCTTGGTATAGAACAAAAATATTTGCAACGACATGCAAGTAGATAAAAAGTAC
494  I R S W Y R T K I F C N D M K Q V D K K Y
1681  TGTTCTAGTCAGATCATTGGAGTTGAGAGGCCAGACTTTGCTGTATACATGATAAAGTTC
514  C S S Q I I G V E R P D F A V Y M I K F
1741  CTGATGATGTTGATGGTAGGGATTACCTCTGGTTTTTGGATCTGGTCTGGCAACACATC
534  L M M L M V G I T S G F W I W S G K T L
1801  ACATCCTGGAAGGTTTTACTATGTGAGAATACTCAAAAGATCAATGCCAAAGAACCCT
554  T S W K R F Y Y V R I L K R S M P K N P
1861  CACTCACATGGACATGGTGCTTCATCCAGGACAAACGTGTGAAGTTAACCTCACAGAAA
574  H S H G H G A S S R T N V *
1921  CAAACAAGGCCTACTTGTAACTCTTGTCTGACACATGTATTGCAGTTGACAGTACATCA
1981  GAACAAATCAAATGAGTTGCCAGTTGGGGATTGTGTGCTGTACCTTTTGAAGTTGTCA
2041  CAGTGCCAGCCTCAAATAACACACTCCAGCTCTGCAACCACAATGATTTTTAAACAAAT
2101  GTTGTGAAGTTTGGACTGATCTTGTTTGTCAGCTCAGAAATAACAAGATTTTGGGGTG
2161  TACATCATAGAAACAGACATTTTAGTATCTACTTTGTAGAGGTGACATATAGCTTTTGT
2221  GGTTTATTTCTCACTTTACCATATGTAGAAATTTTGAACCCAAATAGGTGCATATGTTGT
2281  AAAACTCAAATTAATTTGATTTTGTTCGTTTTGCCATATTCATCAATCTTTGTAA
2341  AATAAAAGGCTAAGTTGTAATTAGCATTAAAAA

```

图 1 海蜇 *Re-Fzd1* 的全长 cDNA 及其推测的氨基酸序列

下划实线表示信号肽; 箭头表示酶切位点; 方框表示多聚腺苷酸加尾信号; *表达终止密码子。

Fig. 1 Full-length *Re-Fzd1* cDNA of *Rhopilema esculentum* and its deduced amino acid sequence

The underlined shows signal peptide and the arrows indicates restriction enzyme cutting site, the boxed means poly(A) signals and asterisk shows termination codon.

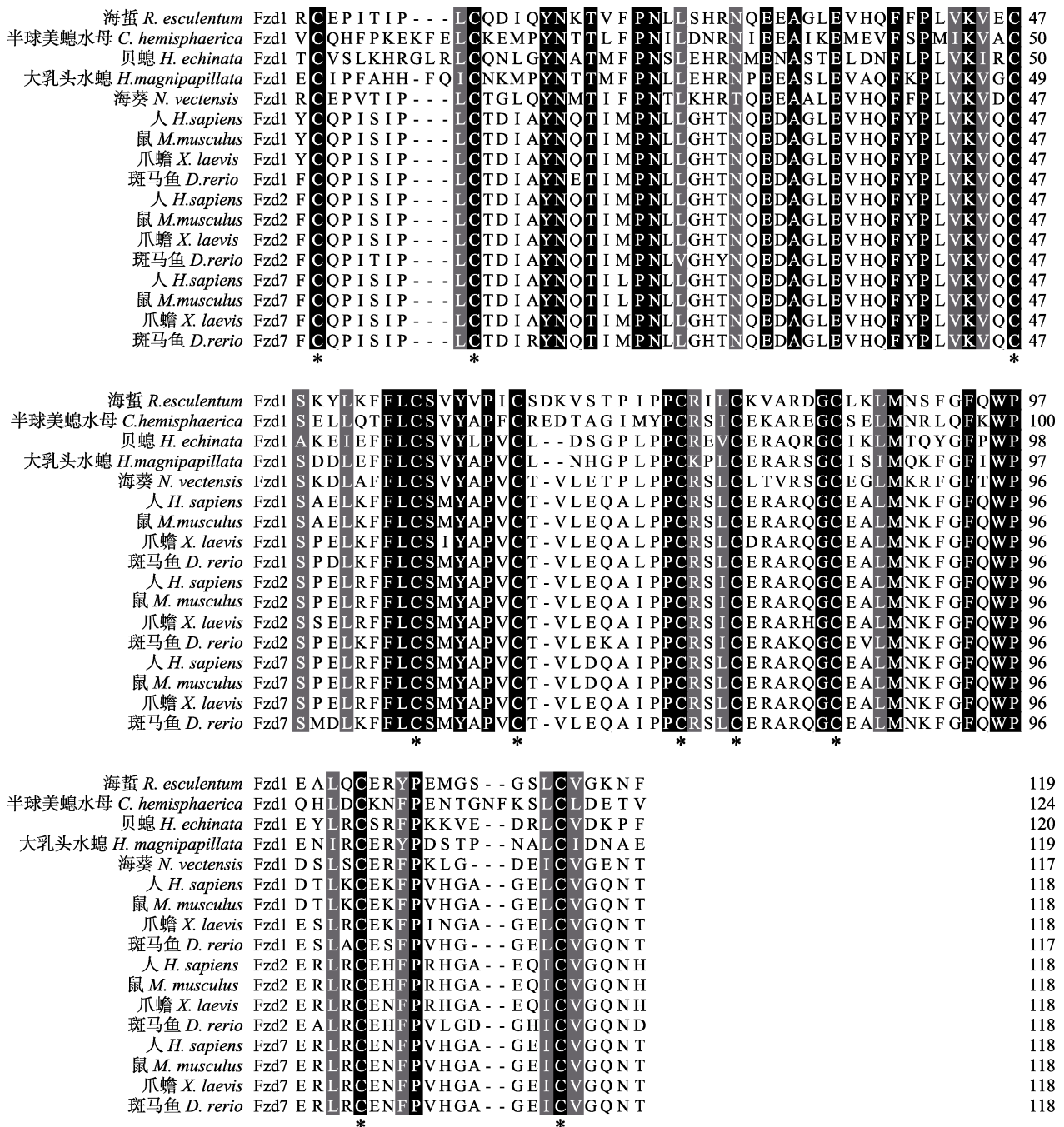


图2 海蜇 *Re-Fzd1* 与其他物种的 Fzd 的半胱氨酸残基富集域氨基酸的多序列比对
黑色表示相同氨基酸, 灰色表示相似氨基酸; *表达半胱氨酸残基富集域中 10 个高度保守的半胱氨酸残基

Fig. 2 Multiple sequence alignment of cysteine-rich domains (CRDs) found in Frizzled proteins from *Rhopilema esculentum* and other species

The black shadowing shows identical amino acids and the gray shadowing indicates similar amino acids.

Ten highly conserved cysteines of the cysteine-rich domain are marked with *.

保守区(CRD)和跨膜结构域分别进行多序列比对发现, 这两个 Fzd 家族共有的特征蛋白结构更加保守, 在半胱氨酸保守区, *Re-Fzd1* 与来自刺胞动物 Fzd1 和脊椎动物 Fzd1、Fzd2 和 Fzd7 家族的一

致性分别为 50%~64%(半球美螭水母除外)、63%~64%、61%~63%和 63%~64%; 而跨膜结构域的氨基酸的一致性也分别高达 59%~67%、58%~60%、59%和 58%(表 2)。

海蜇 <i>R. esculentum</i>	Fzd1	I	Y	F	T	T	K	E	R	D	F	A	R	K	W	I	L	F	W	A	L	M	C	I	I	S	T	T	F	S	L	L	T	Y	L	I	D	M	K	R	F	H	Y	P	Y	K	P	I	I	F	L	50
半球美螵水母 <i>C. hemisphaerica</i>	Fzd1	I	Y	F	E	K	T	E	K	E	F	A	R	N	W	V	L	F	W	S	I	V	C	M	L	S	T	A	F	T	L	L	T	F	V	V	D	M	P	R	F	R	Y	P	E	R	P	I	I	F	L	50
贝螭 <i>H. echinata</i>	Fzd1	I	Y	F	T	H	K	E	K	D	F	A	R	N	W	V	L	F	W	S	V	V	C	M	L	S	T	A	F	T	L	L	A	F	I	V	D	M	P	R	F	R	Y	P	E	R	P	I	I	F	L	50
大乳头水螅 <i>H. magnipapillata</i>	Fzd1	V	Y	F	T	G	K	E	K	D	F	A	R	N	W	V	L	F	W	S	V	V	C	L	I	S	T	A	F	T	L	V	T	F	F	C	L	I	C	Q	G	S	L	S	S	K	T	Y	Y	I	F	50
海葵 <i>N. vectensis</i>	Fzd1	V	F	F	T	K	R	E	R	E	I	A	R	M	W	T	G	I	W	A	I	L	C	A	V	S	T	L	F	T	I	L	T	F	L	I	D	M	R	R	F	R	Y	P	E	R	P	I	I	F	L	50
人 <i>H. sapiens</i>	Fzd1	M	Y	F	G	P	E	E	L	R	F	S	R	T	W	I	G	I	W	S	V	L	C	C	A	S	T	L	F	T	V	L	T	Y	L	V	D	M	R	R	F	S	Y	P	E	R	P	I	I	F	L	50
鼠 <i>M. musculus</i>	Fzd1	M	Y	F	G	P	E	E	L	R	F	S	R	T	W	I	G	I	W	S	V	L	C	C	A	S	T	L	F	T	V	L	T	Y	L	V	D	M	R	R	F	S	Y	P	E	R	P	I	I	F	L	50
爪蟾 <i>X. laevis</i>	Fzd1	M	Y	F	A	P	E	E	L	N	F	A	R	I	W	I	G	I	W	S	V	L	C	C	A	S	T	L	F	T	V	L	T	Y	L	V	D	M	K	R	F	S	Y	P	E	R	P	I	I	F	L	50
斑马鱼 <i>D. rerio</i>	Fzd1	M	Y	F	S	E	D	E	Q	K	F	A	R	I	W	I	G	I	W	S	V	L	C	C	A	S	T	L	F	T	V	L	T	Y	L	V	D	M	K	R	F	S	Y	P	E	R	P	I	I	F	L	50
人 <i>H. sapiens</i>	Fzd2	M	F	F	S	Q	E	E	T	R	F	A	R	L	W	I	L	T	W	S	V	L	C	C	A	S	T	F	F	T	V	T	T	Y	L	V	D	M	Q	R	F	R	Y	P	E	R	P	I	I	F	L	50
鼠 <i>M. musculus</i>	Fzd2	M	F	F	S	Q	E	E	T	R	F	A	R	L	W	I	L	T	W	S	V	L	C	C	A	S	T	F	F	T	V	T	T	Y	L	V	D	M	Q	R	F	R	Y	P	E	R	P	I	I	F	L	50
爪蟾 <i>X. laevis</i>	Fzd2	M	F	F	S	Q	D	E	I	R	F	A	R	I	W	I	L	I	W	S	V	L	C	C	A	S	T	F	I	T	V	T	T	Y	L	V	D	M	Q	R	F	R	Y	P	E	R	P	I	I	F	L	50
斑马鱼 <i>D. rerio</i>	Fzd2	M	F	F	T	D	Q	E	I	E	F	A	R	I	W	I	L	I	W	S	S	L	C	C	A	S	T	L	F	T	V	T	T	Y	I	V	D	M	Q	R	F	K	Y	P	E	R	P	I	I	F	L	50
人 <i>H. sapiens</i>	Fzd7	M	Y	F	K	E	E	R	R	F	A	R	L	W	V	G	V	W	S	V	L	C	C	A	S	T	L	F	T	V	L	T	Y	L	V	D	M	R	R	F	S	Y	P	E	R	P	I	I	F	L	50	
鼠 <i>M. musculus</i>	Fzd7	M	Y	F	K	E	E	R	R	F	A	R	L	W	V	G	V	W	S	V	L	C	C	A	S	T	L	F	T	V	L	T	Y	L	V	D	M	R	R	F	S	Y	P	E	R	P	I	I	F	L	50	
爪蟾 <i>X. laevis</i>	Fzd7	M	Y	F	K	E	E	V	R	F	A	R	L	W	V	G	I	W	A	I	L	C	C	I	S	T	L	F	T	V	L	T	Y	L	V	D	M	R	R	F	S	Y	P	E	R	P	I	I	F	L	50	
斑马鱼 <i>D. rerio</i>	Fzd7	M	Y	F	R	E	E	E	V	K	F	G	R	L	W	V	G	I	W	S	I	L	C	C	V	S	T	L	F	T	V	L	T	Y	L	V	D	M	R	R	F	R	Y	P	E	R	P	I	I	F	L	50

TM 1

海蜇 <i>R. esculentum</i>	Fzd1	C	G	CYFV	I	A	V	V	Y	I	V	G	Y	V	A	D	R	I	S	C	H	-	-	-	K	V	K	S	G	-	T	M	L	Y	N	Q	G	T	E	N	A	G	C	T	V	V	F	96			
半球美螵水母 <i>C. hemisphaerica</i>	Fzd1	S	G	CYFT	V	S	T	A	F	L	A	G	P	L	S	G	N	A	V	S	C	H	T	Q	L	K	N	R	R	G	E	I	E	L	N	Q	G	T	E	N	A	S	C	T	V	V	F	100			
贝螭 <i>H. echinata</i>	Fzd1	S	G	CYF	I	V	A	I	A	F	I	S	G	P	V	S	D	N	A	I	A	C	H	-	-	-	K	T	D	D	G	-	T	Q	L	N	Q	G	T	D	N	A	S	C	T	I	V	F	96		
大乳头水螅 <i>H. magnipapillata</i>	Fzd1	I	R	CYF	M	I	S	I	A	F	F	M	W	S	L	S	D	N	A	I	A	C	H	-	-	-	K	T	D	K	G	-	V	E	L	N	Q	G	T	E	N	A	A	C	T	V	D	F	96		
海葵 <i>N. vectensis</i>	Fzd1	S	G	CYFM	V	S	I	A	F	I	T	G	Y	V	A	G	D	K	I	A	C	N	-	-	-	E	P	I	K	K	G	F	P	K	T	L	V	Q	G	T	K	H	E	G	C	T	V	I	F	98	
人 <i>H. sapiens</i>	Fzd1	S	G	CY	T	A	V	A	V	A	Y	I	A	G	F	L	L	E	D	R	V	V	C	N	-	-	D	K	F	A	E	D	G	A	R	T	V	A	Q	G	T	K	K	E	G	C	T	I	L	F	98
鼠 <i>M. musculus</i>	Fzd1	S	G	CY	T	A	V	A	V	A	Y	I	A	G	F	L	L	E	D	R	V	V	C	N	-	-	D	K	F	A	E	D	G	A	R	T	V	A	Q	G	T	K	K	E	G	C	T	I	L	F	98
爪蟾 <i>X. laevis</i>	Fzd1	S	G	CY	T	M	V	A	I	A	Y	I	A	G	F	L	L	E	D	K	V	V	C	N	-	-	E	R	F	A	E	D	G	Y	K	T	V	A	Q	G	T	K	K	E	G	C	T	I	L	F	98
斑马鱼 <i>D. rerio</i>	Fzd1	S	G	CY	T	M	V	S	I	A	Y	I	A	G	F	L	L	E	D	K	V	V	C	N	-	-	E	Q	F	E	N	E	-	F	R	T	V	V	Q	G	T	K	K	E	G	C	T	I	L	F	97
人 <i>H. sapiens</i>	Fzd2	S	G	CY	T	M	V	S	V	A	Y	I	A	G	F	V	L	Q	E	R	V	V	C	N	-	-	E	R	F	S	E	D	G	Y	R	T	V	V	Q	G	T	K	K	E	G	C	T	I	L	F	98
鼠 <i>M. musculus</i>	Fzd2	S	G	CY	T	M	V	S	V	A	Y	I	A	G	F	V	L	Q	E	R	V	V	C	N	-	-	E	R	F	S	E	D	G	Y	R	T	V	V	Q	G	T	K	K	E	G	C	T	I	L	F	98
爪蟾 <i>X. laevis</i>	Fzd2	S	G	CY	T	M	V	S	V	A	Y	I	A	G	F	V	L	G	D	K	V	V	C	N	-	-	E	G	F	S	E	D	G	Y	K	T	V	V	Q	G	T	K	K	E	G	C	T	I	L	F	98
斑马鱼 <i>D. rerio</i>	Fzd2	S	G	CY	T	M	V	S	I	A	Y	I	A	G	F	V	L	G	D	K	V	V	C	N	-	-	E	S	F	F	P	D	S	Y	K	T	I	V	Q	G	T	K	K	E	G	C	T	I	L	F	98
人 <i>H. sapiens</i>	Fzd7	S	G	CY	F	M	V	A	V	A	H	V	A	G	F	L	L	E	D	R	A	V	C	V	-	-	E	R	F	S	D	D	G	Y	R	T	V	A	Q	G	T	K	K	E	G	C	T	I	L	F	98
鼠 <i>M. musculus</i>	Fzd7	S	G	CY	F	M	V	A	V	A	H	V	A	G	F	L	L	E	D	R	A	V	C	V	-	-	E	R	F	S	D	D	G	Y	R	T	V	A	Q	G	T	K	K	E	G	C	T	I	L	F	98
爪蟾 <i>X. laevis</i>	Fzd7	S	G	CY	F	M	V	A	V	A	T	A	G	F	L	L	E	E	R	A	V	C	V	-	-	E	R	F	S	E	D	S	Y	R	T	V	A	Q	G	T	K	K	E	G	C	T	I	L	F	98	
斑马鱼 <i>D. rerio</i>	Fzd7	S	G	CY	F	M	V	A	V	A	A	A	G	F	F	L	E	D	K	V	V	C	I	-	-	D	K	F	S	D	D	G	Y	K	T	V	A	Q	G	T	K	K	E	G	C	T	I	L	F	98	

TM 2

海蜇 <i>R. esculentum</i>	Fzd1	M	F	I	Y	F	F	T	M	A	S	A	I	W	V	V	I	L	T	L	T	W	F	L	A	A	G	M	K	W	S	H	E	A	I	E	G	N	S	Q	Y	F	H	A	A	A	W	A	L	P	A	146
半球美螵水母 <i>C. hemisphaerica</i>	Fzd1	M	I	I	Y	F	F	L	M	A	S	A	I	W	V	V	I	L	T	L	T	W	F	L	A	A	G	L	K	W	G	H	E	A	I	E	A	S	S	Q	Y	F	H	A	A	A	W	A	I	P	A	150
贝螯 <i>H. echinata</i>	Fzd1	M	L	I	Y	F	F	L	M	A	S	A	I	W	V	V	I	L	T	L	T	W	F	L	A	A	G	L	K	W	G	H	E	A	I	E	A	S	S	Q	Y	F	H	A	A	A	W	A	I	P	A	146
大乳头水螅 <i>H. magnipapillata</i>	Fzd1	M	F	I	Y	F	F	L	M	S	A	S	I	W	V	V	I	L	T	L	T	W	F	L	A	A	G	L	K	W	G	H	E	A	I	E	A	S	A	Q	Y	F	H	A	A	A	W	A	I	P	A	146
海葵 <i>N. vectensis</i>	Fzd1	M	M	L	Y	F	F	S	M	A	S	S	I	W	V	V	I	L	T	V	T	W	F	L	A	A	G	L	K	W	G	Q	E	A	I	E	A	N	S	Q	F	F	H	L	A	A	W	A	I	P	A	148
人 <i>H. sapiens</i>	Fzd1	M	M	L	Y	F	F	S	M	A	S	S	I	W	V	V	I	L	S	L	T	W	F	L	A	A	G	M	K	W	G	H	E	A	I	E	A	N	S	Q	Y	F	H	L	A	A	W	A	V	P	A	148
鼠 <i>M. musculus</i>	Fzd1	M	M	L	Y	F	F	S	M	A	S	S	I	W	V	V	I	L	S	L	T	W	F	L	A	A	G	M	K	W	G	H	E	A	I	E	A	N	S	Q	Y	F	H	L	A	A	W	A	V	P	A	148
爪蟾 <i>X. laevis</i>	Fzd1	M	M	L	Y	F	F	S	M	A	S	S	I	W	V	V	I	L	S	L	T	W	F	L	A	A	G	M	K	W	G	H	E	A	I	E	A	N	S	Q	Y	F	H	L	A	A	W	A	V	P	A	148
斑马鱼 <i>D. rerio</i>	Fzd1	M	M	L	Y	F	F	S	M	S	S	S	I	W	V	V	I	L	A	L	T	W	F	L	A	A	G	M	K	W	G	H	E	A	I	E	A	N	S	Q	Y	F	H	L	A	A	W	A	V	P	A	147
人 <i>H. sapiens</i>	Fzd2	M	M	L	Y	F	F	S	M	A	S	S	I	W	V	V	I	L	S	L	T	W	F	L	A	A	G	M	K	W	G	H	E	A	I	E	A	N	S	Q	Y	F	H	L	A	A	W	A	V	P	A	148
鼠 <i>M. musculus</i>	Fzd2	M	M	L	Y	F	F	S	M	A	S	S	I	W	V	V	I	L	S	L	T	W	F	L	A	A	G	M	K	W	G	H	E	A	I	E	A	N	S	Q	Y	F	H	L	A	A	W	A	V	P	A	148
爪蟾 <i>X. laevis</i>	Fzd2	M	M	L	Y	F	F	S	M	A	S	S	I	W	V	V	I	L	S	L	T	W	F	L	A	A	G	M	K	W	G	H	E	A	I	E	A	N	S	Q	Y	F	H	L	A	A	W	A	V	P	A	148
斑马鱼 <i>D. rerio</i>	Fzd2	M	M	L	Y	F	F	S	M	A	S	S	I	W	V	V	I	L	S	L	T	W	F	L	A	A	G	M	K	W	G	H	E	A	I	E	A	N	S	Q	Y	F	H	L	A	A	W	A	V	P	A	148
人 <i>H. sapiens</i>	Fzd7	M	V	I	Y	F	F	G	M	A	S	S	I	W	V	V	I	L	S	L	T	W	F	L	A	A	G	M	K	W	G	H	E	A	I	E	A	N	S	Q	Y	F	H	L	A	A	W	A	V	P	A	148
鼠 <i>M. musculus</i>	Fzd7	M	V	I	Y	F	F	G	M	A	S	S	I	W	V	V	I	L	S	L	T	W	F	L	A	A	G	M	K	W	G	H	E	A	I	E	A	N	S	Q	Y	F	H	L	A	A	W	A	V	P	A	148
爪蟾 <i>X. laevis</i>	Fzd7	M	I	I	Y	F	F	G	M	A	S	S	I	W	V	V	I	L	S	L	T	W	F	L	A	A	G	M	K	W	G	H	E	A	I	E	A	N	S	Q	Y	F	H	L	A	A	W	A	V	P	A	148
斑马鱼 <i>D. rerio</i>	Fzd7	M	I	I	Y	F	F	G	M	A	S	S	I	W	V	V	I	L	S	L	T	W	F	L	A	A	G	M	K	W	G	H	E	A	I	E	A	N	S	Q	Y	F	H	L	A	A	W	A	V	P	A	148

海蜇 <i>R. esculentum</i>	Fzd1	L	A	G	F	I	S	L	V	R	S	V	L	K	H	D	Q	S	L	K	T	D	K	L	T	R	L	M	I	R	I	G	V	F	S	L	Y	T	L	P	A	I	V	I	A	C	L	246				
半球美螅水母 <i>C. hemisphaerica</i>	Fzd1	F	S	G	F	L	A	L	I	R	I	R	K	V	L	K	D	D	H	S	L	R	T	D	K	L	T	R	L	M	I	R	I	G	I	F	S	V	L	Y	S	L	P	A	I	V	I	A	C	L	250	
贝螅 <i>H. echinata</i>	Fzd1	F	A	G	F	I	S	L	I	Q	I	R	K	V	L	K	D	D	S	S	L	R	A	E	K	L	T	R	L	M	V	R	I	G	I	F	S	L	Y	S	L	P	A	I	V	I	A	C	L	246		
大乳头水螅 <i>H. magnipapillata</i>	Fzd1	L	A	G	F	V	A	L	I	R	I	R	K	V	L	K	T	D	H	S	L	R	T	D	K	L	T	K	L	M	V	R	I	G	I	F	S	L	Y	S	L	P	A	I	V	I	A	C	L	246		
海葵 <i>N. vectensis</i>	Fzd1	L	A	G	F	I	S	L	F	R	V	R	S	V	L	K	D	D	Y	-	S	K	R	E	K	I	E	K	L	M	I	R	I	G	V	F	S	L	Y	T	V	P	A	L	V	V	I	G	C	L	247	
人 <i>H. sapiens</i>	Fzd1	L	A	G	F	V	S	L	F	R	I	R	T	I	M	K	H	D	G	-	T	K	T	E	K	L	B	K	L	M	V	R	I	G	V	F	S	V	L	Y	T	V	P	A	T	I	V	I	A	C	Y	247
鼠 <i>M. musculus</i>	Fzd1	L	A	G	F	V	S	L	F	R	I	R	T	I	M	K	H	D	G	-	T	K	T	E	K	L	B	K	L	M	V	R	I	G	V	F	S	V	L	Y	T	V	P	A	T	I	V	I	A	C	Y	247
爪蟾 <i>X. laevis</i>	Fzd1	L	A	G	F	V	S	L	F	R	I	R	T	I	M	K	H	D	G	-	T	K	T	E	K	L	B	K	L	M	V	R	I	G	I	F	S	V	L	Y	T	V	P	A	T	I	V	I	A	C	Y	247
斑马鱼 <i>D. rerio</i>	Fzd1	L	A	G	F	V	S	L	F	R	I	R	T	I	M	K	H	D	G	-	T	K	T	E	K	L	B	K	L	M	V	R	I	G	I	F	S	V	L	Y	T	V	P	A	T	I	V	I	A	C	Y	246
人 <i>H. sapiens</i>	Fzd2	L	A	G	F	V	S	L	F	R	I	R	T	I	M	K	H	D	G	-	T	K	T	E	K	L	E	R	L	M	V	R	I	G	V	F	S	V	L	Y	T	V	P	A	T	I	V	I	A	C	Y	247
鼠 <i>M. musculus</i>	Fzd2	L	A	G	F	V	S	L	F	R	I	R	T	I	M	K	H	D	G	-	T	K	T	E	K	L	B	R	L	M	V	R	I	G	V	F	S	V	L	Y	T	V	P	A	T	I	V	I	A	C	Y	247
爪蟾 <i>X. laevis</i>	Fzd2	L	A	G	F	V	S	L	F	R	I	R	T	I	M	K	H	D	G	-	T	K	T	E	K	L	E	R	L	M	V	R	I	G	V	F	S	V	L	Y	T	V	P	A	T	I	V	I	A	C	Y	247
斑马鱼 <i>D. rerio</i>	Fzd2	L	A	G	F	V	S	L	F	R	I	R	T	I	M	K	H	D	G	-	T	K	T	E	K	L	B	R	L	M	V	R	I	G	V	F	S	V	L	Y	T	V	P	A	T	I	V	I	A	C	F	247
人 <i>H. sapiens</i>	Fzd7	L	A	G	F	V	S	L	F	R	I	R	T	I	M	K	H	D	G	-	T	K	T	E	K	L	B	K	L	M	V	R	I	G	V	F	S	V	L	Y	T	V	P	A	T	I	V	L	A	C	Y	247
鼠 <i>M. musculus</i>	Fzd7	L	A	G	F	V	S	L	F	R	I	R	T	I	M	K	H	D	G	-	T	K	T	E	K	L	B	K	L	M	V	R	I	G	V	F	S	V	M	Y	T	V	P	A	T	I	V	L	A	C	Y	247
爪蟾 <i>X. laevis</i>	Fzd7	L	A	G	F	V	S	L	F	R	I	R	T	I	M	K	H	D	G	-	T	K	T	E	K	L	B	K	L	M	V	R	I	G	V	F	S	V	M	Y	T	V	P	A	T	I	V	L	A	C	Y	247
斑马鱼 <i>D. rerio</i>	Fzd7	L	A	G	F	V	S	L	F	R	I	R	T	I	M	K	H	D	G	-	T	K	T	E	K	L	B	K	L	M	V	R	I	G	V	F	S	V	L	Y	T	V	P	V	T	I	V	I	A	C	Y	247

TM 6

海蜇 <i>R. esculentum</i>	Fzd1	F	Y	E	Q	A	Y	R	H	T	W	D	S	A	W	I	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-------------------------	------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

图 3 海蜇 *Re-Fzd1* 与其他物种的 Fzd 的 7 个跨膜结构域的多序列比对

黑色表示相同氨基酸, 灰色表示相似氨基酸; 7 个跨膜结构域用下划线标识。

Fig. 3 Multiple sequence alignment of seven-transmembrane spanning (TMS) domains found in *Frizzled* proteins from *Rhopilema esculentum* and other species.

The black shadowing shows identical amino acids and the gray shadowing indicates similar amino acids. The seven transmembrane domains (TM1-TM7) are underlined.

应用 MEGA 6.1 程序, 采用邻接法构建 Fzd 的系统进化树(图 4)显示, 来自刺胞动物 Fzd1、脊椎动物人(*H. Sapiens*)、鼠(*M. Musculus*)、爪蟾(*X. Laevis*)和斑马鱼(*D. Rerio*)的所有 Fzd 家族成员聚类成 11

个家族, 4 大类群。来自刺胞动物的 Fzd1 聚类在一起, 然后与 Fzd1、Fzd2 和 Fzd7 家族形成一个类群, 表明脊椎动物 Fzd1、Fzd2 和 Fzd7 家族可能与刺胞动物门的 Fzd1 起源于同一个共同祖先。

表 2 海蜇 *Re-Fzd1* 与其他物种 *Fzd* 蛋白氨基酸一致性
Tab. 2 Amino acid sequence identities of *Re-Fzd1* from *Rhopilema esculentum* with other Frizzled proteins

GeneBank 登录号 accession no. in GenBank	生物和基因名称 organism and gene name	CRD 域的一致性/% identity in CRD domains	7-TMS 域的一致性/% identity in 7-TMS domains	全序列的一致性/% identity in full sequence
CAJ32309	<i>H. echinata</i> Fzd1	50	67	54
AF209200	<i>H. vulgaris</i> Fzd1	51	63	54
ABI98898	<i>C. hemisphaerica</i> Fzd1	40	64	51
XP_001647540	<i>N. vectensis</i> Fzd1	64	59	53
AF072872	<i>H. sapiens</i> Fzd1	63	58	48
NP_067432	<i>M. musculus</i> Fzd1	63	58	48
NP_001079207	<i>X. laevis</i> Fzd1	64	60	50
NP_001124086	<i>D. rerio</i> Fzd1	64	58	51
NP_001457	<i>H. sapiens</i> Fzd2	61	59	50
AAH49774	<i>M. musculus</i> Fzd2	61	59	50
NP_001083829	<i>X. laevis</i> Fzd2	61	59	51
NP_571215	<i>D. rerio</i> Fzd2	63	59	51
NP_003498	<i>H. sapiens</i> Fzd7	63	58	49
NP_032083	<i>M. musculus</i> Fzd7	63	58	48
NP_001079354	<i>X. laevis</i> Fzd7	63	58	50
NP_571214	<i>D. rerio</i> Fzd7	64	58	49

2.3 *Re-Fzd1* 的基因组结构分析

利用 6 对基因特异性引物扩增 *Re-Fzd1* 的基因组, 分别获得长度为 294 bp、678 bp、353 bp、230 bp、204 bp 和 700 bp 的 6 条片段, 经过拼接获得了长为 2022 bp 的 *Re-Fzd1* 基因组。将 *Re-Fzd1* 的基因组和 cDNA 全长序列进行比对分析发现, *Re-Fzd1* 基因组序列与 cDNA 序列完全相同, 表明该基因不存在内含子。

2.4 *Re-Fzd1* 的表达分析

海蜇不同发育阶段 *Re-Fzd1* 基因的表达结果如图 5 所示。在海蜇螅状体、横裂体、碟状体和稚水母 4 个发育阶段, *Re-Fzd1* 基因的均有表达, 但表达量具有明显差异。*Re-Fzd1* 在横裂体阶段的表达量最高, 分别是螅状体、碟状体和稚水母阶段表达量的 2.18, 2.05 和 3.67 倍。One-way ANOVA 分析结果显示: *Re-Fzd1* 基因在横裂体阶段的表达与螅状体、碟状体和稚水母阶段的表达呈极显著差异($P<0.01$), 而后面 3 个发育阶段间 *Re-Fzd1* 基因的表达差异不显著($P>0.05$)。

2.5 *Re-Fzd1* 在海蜇横裂体中的定位

为了解 *Re-Fzd1* 在海蜇无性繁殖—横裂生殖中的作用, 本研究采用整体原位杂交技术检测了

Re-Fzd1 在海蜇横裂体中的作用部位。整体原位杂交结果如图 6 所示, 在横裂体阶段, *Re-Fzd1* 除了在触手和基座上表达外, 还主要表达于横裂体发生横裂的部位。

3 讨论

Wnt 信号途径, 作为动物发育过程中一条多环节, 多作用位点的关键信号通路, 不但调控了动物早期发育的众多环节, 包括胚胎发育阶段的细胞增殖、细胞分化、细胞的极生化、细胞凋亡、细胞命运的决定等基本活动, 还在维持干细胞的多功能性进而调控成体正常生理代谢平衡中发挥作用^[14-15]。Fzd 作为 Wnt 信号途径的重要膜受体蛋白, 是经典的 Wnt/ β -catenin 途径、平面细胞极性通路和 Wnt/ Ca^{2+} 途径中的关键一环, 其蛋白结构特征, 家族成员分子及其作用模式, 已经在模式生物人(*Homo sapiens*)、鼠(*Mus musculus*)、爪蟾(*Xenopus laevis*)、斑马鱼(*Danio rerio*)及果蝇(*D. melanogaster*)中被解析^[9,16-17]。海蜇 *Re-Fzd1* 具有 Fzd 家族成员典型的分子结构和功能区: 分泌蛋白, 位于 N-末端一个富含 10 个保守半胱氨酸残基的半胱氨酸富集域(CRD), 一个含有 7 个跨膜

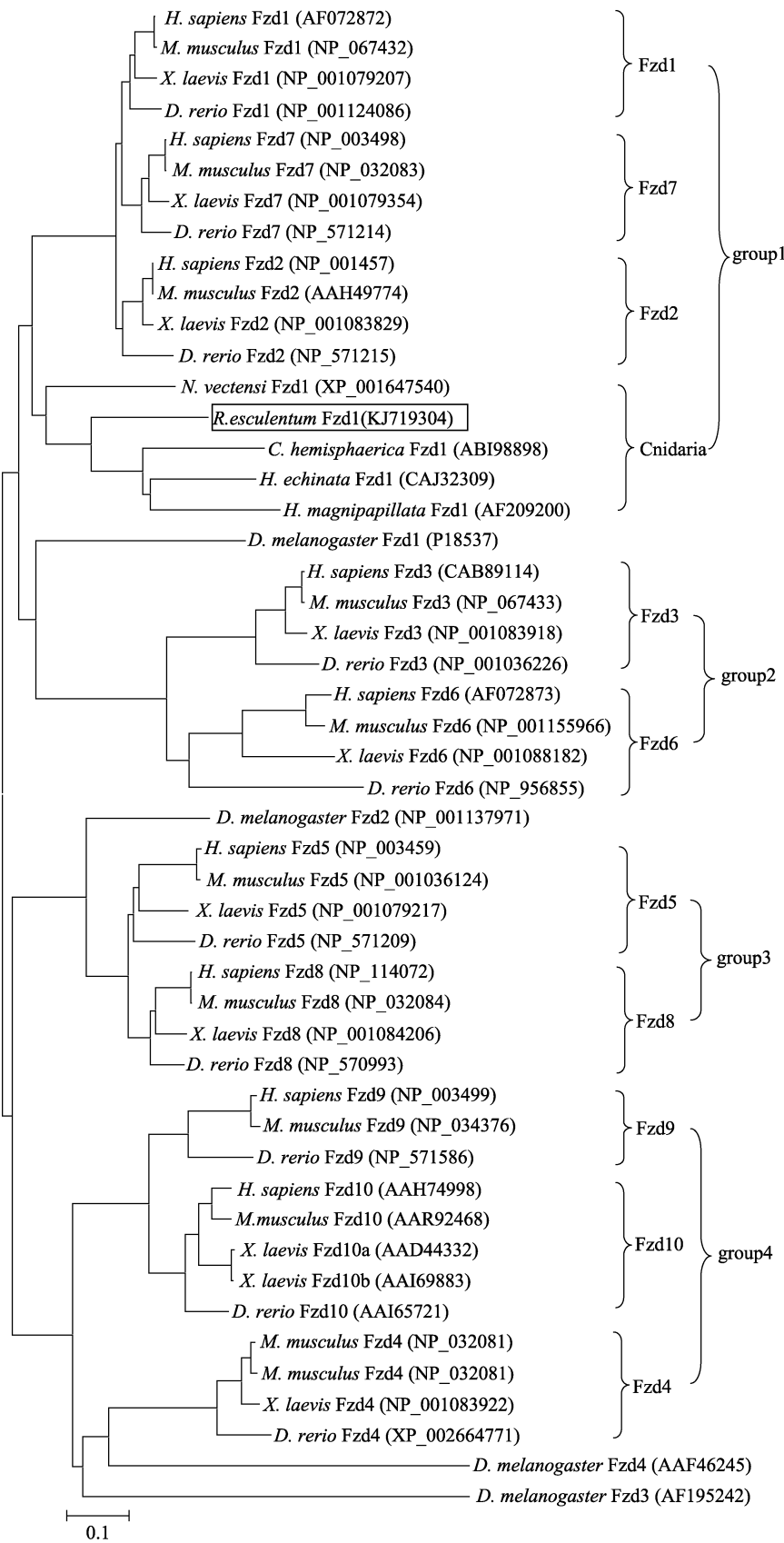


图 4 基于邻接法的 Fzd 氨基酸序列的系统进化树
Fig. 4 Phylogenetic tree of Frizzled based on neighbor-joining method

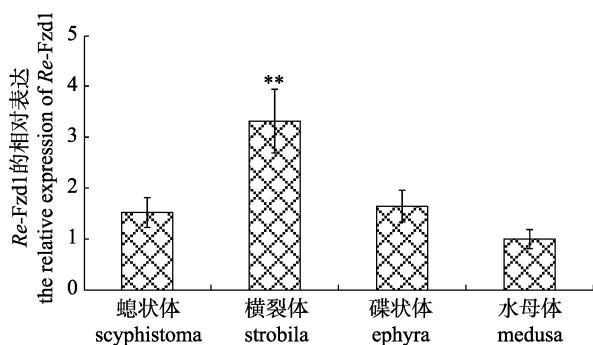


图 5 *Re-Fzd1* 在海蜇不同发育阶段的表达

Fig. 5 The expression of *Re-Fzd1* transcripts in different developmental stages of *Rhopilema esculentum*

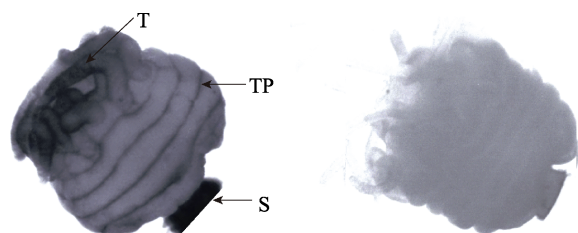


图 6 *Re-Fzd1* 在海蜇横裂体中的原位杂交结果
S: 基座; T: 触手; TP: 横裂部位。

Fig. 6 Whole mount *in situ* hybridization of *Re-Fzd1* in strobila of *Rhopilema esculentum*

S: substrate; T: tentacle; TP: transverse position.

片段的跨膜结构域, 以及一个含有 5 个重要的磷酸化位点的 C 端尾巴^[9]。Blast 分析表明, *Re-Fzd1* 基因与刺胞动物的 *Fzd1* 和来自脊椎动物 *Fzd1*、*Fzd2* 和 *Fzd7* 家族基因均具有较高的同源性。系统进化分析也显示, 海蜇 *Re-Fzd1* 基因首先与刺胞动物门的 *Fzd1* 聚类在一起, 然后与脊椎动物的 *Fzd1*、*Fzd2* 和 *Fzd7* 三个家族聚成一个类群, 表明刺胞动物门的 *Fzd1* 可能与脊椎动物 *Fzd1*、*Fzd2* 和 *Fzd7* 家族起源于同一个共同祖先。上述分析证实本研究获得的海蜇 *Re-Fzd1* 蛋白是 *Fzd* 家族新的一员。在脊椎动物中, *Fzd* 家族成员被精细的划分为 10 个家族(图 3), 根据 *Fzd* 氨基酸序列的系统进化树, 我们将这 10 个家族进行区分: 类群 1 包含 *Fzd1*、*Fzd2* 和 *Fzd7*; 类群 2 包含 *Fzd3* 和 *Fzd6*; 类群 3 包含 *Fzd5* 和 *Fzd8*; 类群 4 包含 *Fzd4*、*Fzd9* 和 *Fzd10*。由此我们推断, 所有脊椎动物的 *Fzd* 基因可能来自 4 个为刺胞动物和两侧动物的共同祖先所拥有原始的 *Fzd* 基因^[18]。而在无脊椎动物中, *Fzd* 家族成员要少很多, 如果蝇、海葵、海

胆中分别发现了 4 个^[19], 而秀丽隐杆线虫仅有 3 个^[6], 表明从无脊椎动物到脊椎动物, *Fzd* 家族显著扩张, 以便适应脊椎动物更精细复杂的发育过程^[18]。

Wnt 信号途径调控动物早期发育的研究目前主要集中在 *Wnt* 基因家族中^[19], 关于 *Fzd* 家族在动物早期发育中的作用报道主要集中在爪蟾和小鼠中。爪蟾 *Fzd8* 基因参与了原肠胚形成, *Fzd5* 调控了神经视网膜的发育, *Fzd7* 介导了原肠胚形成时的组织分离^[17,20]; 而 *Fzd9* 基因与其脑部神经发育有关^[21]。在小鼠中, *Fzd3* 和 *Fzd6* 基因对小鼠脑的形态发生有调节作用^[22], *Fzd9* 基因与大脑皮层的神经元前体细胞的增殖相关^[23-24]。在本研究中, *Re-Fzd1* 基因在海蜇无性繁殖 4 个发育阶段均有表达, 其中横裂体阶段的表达量最高, 是表达量最低的稚水母阶段的 3.67 倍。表明 *Re-Fzd1* 在海蜇不同生长发育阶段均有作用。横裂生殖作为海蜇无性繁殖的一种主要方式, *Re-Fzd1* 在此发育阶段的大量表达, 说明 *Re-Fzd1* 在海蜇无性繁殖过程发挥重要的调控作用^[25]。整体原位杂交结果也进一步验证 *Re-Fzd1* 在横裂生殖中的作用: *Re-Fzd1* 除了在触手和基座表达外, 主要表达横裂体发生横裂的部位, 表明 *Re-Fzd1* 基因是海蜇繁殖所必需的。目前的研究也表明, *Fzd* 基因家族在动物的有性繁殖过程中, 也发挥着重要作用, 特别是在早期胚胎发育, 细胞增殖、组织分化等关键信号通路中^[20-21]。鲤 *Fzd* 家族成员在受精后 24 h 均广泛表达, 表明几乎所有 *Fzd* 基因在早期胚胎发育阶段中作用^[26]。其中 7 个 *Fzd* 成员在鲤胚胎发育的阶段均保持较高的表达水平, 表明这些 *Fzd* 基因不仅对胚胎发育早期十分重要, 对孵化后发育和生理过程也是必需的^[26]。

参考文献:

- [1] Strutt D. Frizzled signalling and cell polarisation in *Drosophila* and vertebrates[J]. *Development*, 2003, 130(19): 4501-4513.
- [2] Lee P N, Pang K, Matus D Q, et al. A WNT of things to come: Evolution of Wnt signaling and polarity in cnidarians[J]. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2006, 17(2): 157-167.

- [3] Nusse R. Wnt signaling in disease and in development[J]. Cell Research, 2005, 15(1): 28-32.
- [4] Huang H C, Klein P S. The Frizzled family: receptors for multiple signal transduction pathways[J]. Genome Biology, 2004, 5: 234.
- [5] Adler P N. Planar signaling and morphogenesis in *Drosophila*[J]. Developmental Cell, 2002, 2(5): 525-535.
- [6] Wang Y S, Macke J P, Abella B S, et al. A large family of putative transmembrane receptors homologous to the product of the *Drosophila* tissue polarity gene *frizzled*[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1996, 271(8): 4468-4476.
- [7] Adell T, Neffkens I, Müller W E G. Polarity factor 'Frizzled' in the demosponge *Suberites domuncula*: identification, expression and localization of the receptor in the epithelium/pinacoderm[J]. FEBS Letters, 2003, 554(3): 363-368.
- [8] Momose T, Houliston E. Two oppositely localised frizzled RNAs as axis determinants in a cnidarian embryo[J]. PLoS Biology, 2007, 5(4): 889-899.
- [9] Wang H Y, Liu T, Malbon C C. Structure-function analysis of frizzleds[J]. Cellular Signalling, 2006, 18(7): 934-941.
- [10] Piraino S, Boero F, Aeschbach B, et al. Reversing the life cycle: medusae transforming into polyps and cell transdifferentiation in *Turritopsis nutricula* (Cnidaria, Hydrozoa)[J]. Biological Bulletin, 1996, 190(3): 302-312.
- [11] Putnam N H, Srivastava M, Hellsten U, et al. Sea anemone genome reveals ancestral eumetazoan gene repertoire and genomic organization[J]. Science, 2007, 317(5834): 86-94.
- [12] Zhou C Y, Zhu L, Pan Y, et al. Wnt5 gene from *Rhopilema esculentum*: cDNA cloning, genomic organization and mRNA expression[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2013, 44(4): 1115-1122. [周春娅, 朱玲, 潘滢, 等. 海蜇 (*Rhopilema esculentum*) Wnt5 基因: cDNA 克隆、基因组结构与表达[J]. 海洋与湖沼, 2013, 44(4): 1115-1122.]
- [13] Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6. 0[J]. Molecular Biology and Evolution, 2013, 30(12): 2725-2729.
- [14] Cadigan K M, Nusse R. Wnt signaling: a common theme in animal development[J]. Genes Development, 1997, 11(24): 3286-3305.
- [15] MacDonald B T, Tamai K, He X. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases[J]. Development Cell, 2009, 17(1): 9-26.
- [16] Winklbauer R, Medina A, Swain R K, et al. Frizzled-7 signalling controls tissue separation during *Xenopus* gastrulation [J]. Nature, 2001, 413(6858): 856-860.
- [17] Wong H C, Bourdela A, Krauss A, et al. Direct binding of the PDZ domain of Dishevelled to a conserved internal sequence in the C-terminal region of Frizzled[J]. Molecular Cell, 2003, 12(5): 1251-1260.
- [18] Schenkelaars Q, Fierro-Constain L, Renard E et al. Insights into Frizzled evolution and new perspectives[J]. Evolution & Development, 2015, 17: 160-169.
- [19] Klaus A, Birchmeier W. Wnt signalling and its impact on development and cancer[J]. Nature Review Cancer, 2008, 8(5): 387-398.
- [20] Leptin M. Gastrulation movements: the logic and the nuts and bolts [J]. Development Cell, 2005, 8(3): 305-320.
- [21] Kiecker C, Niehrs C. A morphogen gradient of Wnt/beta-catenin signalling regulates anteroposterior neural patterning in *Xenopus*[J]. Development, 2001, 128(21): 4189-4201.
- [22] Stuebner S, Faus-Kessler T, Fischer T, et al. Fzd3 and Fzd6 deficiency results in a severe midbrain morphogenesis defect [J]. Developmental Dynamics, 2010, 239(1): 246-260.
- [23] Wang Y, Thekdi N, Smallwood P M, et al. Frizzled-3 is required for the development of major fiber tracts in the rostral CNS[J]. Journal of Neuroscience, 2002, 22(19): 8563-8573.
- [24] Wang X, Li H, Qi X, et al. Characterization and expression of a novel Frizzled 9 gene in *Schistosoma japonicum*[J]. Gene Expression Patterns, 2011, 11(3-4): 263-270.
- [25] Chen J K, Ding G W. On the seasonal regularity of strobilation of edible medusa[J]. Journal of Fisheries of China, 1984, 8(1): 55-67. [陈介康, 丁耕芜. 海蜇横裂生殖季节规律[J]. 水产学报, 1984, 8(1): 55-67.]

Identification of *Frizzled1* from *Rhopilema esculentum* and its role in asexual reproduction

PAN Ying^{1,2}, ZHU Ling^{2,3}, ZHOU Chunya^{2,4}, CHEN Siqing², ZHUANG Zhimeng^{2,3}

1. College of Ocean and Earth Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China;
2. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;
3. Marine Biology and Biotechnology Laboratory, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266237, China
4. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: The cDNA and genome of *Frizzled1* from *Rhopilema esculentum* was cloned by the RACE technique. The full-length cDNA of *Re-Fzd1* was 2387 bp, containing an open reading frame (ORF) of 1761 bp encoding a poly-peptide with 586 amino acid residues. SMART analysis showed that *Re-Fzd1* shared common features of the *Frizzled* family, including a putative signal peptide with 23 amino acid residues, the N-terminal extracellular cysteine-rich domain (CRD) with 10 conserved cysteine residues, a transmembrane region composed of seven transmembrane segments, and a C-terminal “tail” with five key phosphorylation sites. The deduced amino acid sequence of *Re-Fzd1* had high homology and may share a common ancestor with that of *Frizzled1* in Cnidaria from *Hydra echinata*, *H. vulgaris*, *Clytia hemisphaerica*, and *Nematostella vectensis*, and that of *Frizzled1*, *Frizzled2*, and *Frizzled7* in vertebrates, including *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Xenopus laevis*, and *Danio rerio*, by the multiple sequence alignment and phylogenetic analysis. None of the introns were included in the genome of *Re-Fzd1*. Quantitative real-time PCR analysis revealed that the expression of *Re-Fzd1* transcript was detected in all four developmental stages. The mRNA expression level of *Re-Fzd1* was the highest in strobila, which was 3.67-fold ($P < 0.01$) of that in the medusa. Furthermore, the *Re-Fzd1* transcript was revealed in the tentacle and occurrence sites of strobilation in strobila by whole mount *in situ* hybridization. These results suggested that *Re-Fzd1* should be involved in the regulation of asexual reproduction and occurrence of strobilation in *R. esculentum*.

Key words: *Rhopilema esculentum*; *Frizzled1*; cDNA; genomic organization; whole mount *in situ* hybridization; asexual reproduction

Corresponding author: ZHU Ling. E-mail: zhuling@ysfri.ac.cn