

文章编号: 1674-5566(2020)06-0801-10

DOI:10.12024/jsou.20191202894

三角帆蚌中 *WNT4* 基因克隆及表达分析

刘斐斐¹, 崔晓羽¹, 董赛赛¹, 段胜华¹, 汪桂玲^{1,2,3}, 李家乐^{1,2,3}

(1. 上海海洋大学 农业农村部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306; 2. 上海海洋大学 上海市水产养殖工程技术研究中心, 上海 201306; 3. 上海海洋大学 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306)

摘要: 为进一步了解 *WNT4* 在三角帆蚌性别决定过程中的作用, 通过 RACE (Rapid-amplification of cDNA ends) 技术克隆获得了三角帆蚌 *WNT4* 基因的全长 cDNA, 共 1 560 bp, 其中 5'-UTR 396 bp、3'-UTR 24 bp, 开放阅读框 (ORF) 为 1 140 bp, 可以编码 379 个氨基酸, 且该序列含有 WNT 家族特有结构域。对 *WNT4* 的氨基酸序列进行同源性分析后, 发现该基因在物种间的进化关系和结构功能具保守性。通过实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 分析发现 *WNT4* 基因在三角帆蚌雌雄多个组织 (外套膜、闭壳肌、鳃、性腺、斧足和肝) 中均有表达, 表明其参与了多样的生物学过程, 在鳃、斧足和肝中表达量较高, 在性腺、闭壳肌和斧足中雌雄间有显著性差异, 且雌性三角帆蚌的性腺、闭壳肌表达量显著高于雄性。原位杂交结果显示, *WNT4* 在雌性三角帆蚌的卵母细胞上有明显的杂交信号, 推测 *WNT4* 基因与性别决定相关。

关键词: 三角帆蚌; 性别决定; *WNT4*; qRT-PCR; 原位杂交

中图分类号: S 917 **文献标志码:** A

中国是世界上最大的淡水珍珠生产国, 其中超过 80% 的淡水珍珠是由三角帆蚌 (*Hyriopsis cumingii*) 生产的^[1]。在蚌养殖中发现, 不育群体和单性群体具有十分明显的优势。性腺不发育可使能量转向体细胞生长, 提高个体的生长速度^[2]。三角帆蚌雌雄异体, 雌雄间的产珠性能存在显著性差异, 成年雄蚌较雌蚌显现出较好的产珠性能^[3]。目前, 性别决定和分化调控基因及发育调控机制在高等脊椎动物中已相继被发现, 但对三角帆蚌雌雄性别分化相关的分子机制研究较少。找到一种行之有效的分子技术鉴定方法, 可以在不损害蚌体本身的基础上, 有助于优质雌性育珠蚌的筛选。

WNT (Wingless-type MMTV integration site family) 基因家族通过编码分泌型糖蛋白信号分子可以激活多种信号通路, 在脊椎动物中广泛存在, 最初是在小鼠 (*Mus musculus*)^[4] 和果蝇 (*Drosophila melanogaster*)^[5] 中发现的。目前, 在高等脊椎动物中, 共发现了 19 种 WNT 家族成员

基因, 且均具有分泌型生长因子的特点^[6]。WNT 具有较高的保守性, 参与生物体内多种发育过程, 可以调控生物体细胞的增殖、分化和迁移, 在动物体的早期发育和器官形成过程中起着重要的作用^[7-8]。

WNT4 是 WNT 家族中重要的成员, 是调节 WNT/ β -catenin 信号通路的关键蛋白。目前在人类 (*Homo sapiens*)、小鼠、非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*)、斑马鱼 (*Danio rerio*)、栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*)、厚壳贻贝 (*Mytilus coruscus*) 中均有发现。研究表明, 在哺乳动物中 *WNT4* 基因在雌性性腺分化过程中发挥着重要的作用。维持雌性生殖过程需要 *WNT4*, 其在卵泡发育各个阶段都有表达, 包括繆勒氏管的形成^[9]、类固醇的生成、卵母细胞的存活^[10], 是卵巢分化的重要调控因子。在人类中, *WNT4* 能够与 *DAX1* 基因协同调控女性发育, 并阻止睾丸形成^[11], 在小鼠中, *WNT4* 在其繆勒氏管中有表达, 缺失该基因会导致雌性胚胎发生雄性化, 但过表达该基因则不会使雄性胚胎

收稿日期: 2019-12-30 修回日期: 2020-02-07

基金项目: 国家自然科学基金(31772835); 国家重点研发计划“蓝色粮仓科技创新”专项(2018YFD0901406)

作者简介: 刘斐斐(1994—), 女, 硕士研究生, 研究方向为三角帆蚌性别决定和分化。E-mail: 584048466@qq.com

通信作者: 汪桂玲, E-mail: glwang@shou.edu.cn

雌性化^[10-12]。在黑鲷 (*Acanthopagrus schlegeli*) 中, *WNT4* 参与了卵巢的早期发育、生长和成熟, 但并未参与性别分化^[13]。但在半滑舌鳎 (*Cynoglossus semilaevis*) 中, 卵巢的表达量显著低于精巢^[14]。在一些硬骨鱼中, 如斑马鱼、青鳉 (*Oryzias latipes*)、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 中具有两个 *WNT4* (*WNT4a* 和 *WNT4b*), 其中 *WNT4a* 具有高保守性, 在性腺等组织中均具有较高的表达量, 而 *WNT4b* 保守性较低。

然而在无脊椎动物中, 特别是在贝类中, *WNT4* 研究较少, 仅在栉孔扇贝、厚壳贻贝等海水贝类中有研究。本实验以三角帆蚌为实验对象, 通过 RACE 法获取了 *HcWNT4* 基因序列全长, 并通过荧光定量技术研究了其在三角帆蚌不同组织和不同发育时期的相对表达量, 通过原位杂交技术, 定位分析其在雌雄性腺中的分布情况, 初步探究了 *HcWNT4* 基因在三角帆蚌的性别决定及分化中的作用, 为进一步开展三角帆蚌中 *WNT* 基因家族研究提供参考资料。

1 材料与方法

1.1 实验动物

本实验所用三角帆蚌均选自浙江省武义养殖基地, 其中 1 月龄、2 月龄、3 月龄的个体放置于装有 RNASore 试剂 (天根, 北京) 的离心管中保存带回实验室, 4 至 8 月龄幼蚌每月定时取样, 成熟 2 龄三角帆蚌带回实验室 (26 ± 2) °C 暂养 1 周, 适当投喂小球藻。选取成熟 2 龄雌雄三角帆蚌各 9 只, 分别取其鳃、肝脏、斧足、闭壳肌、外套膜和性腺组织放入液氮, 并于 -80 °C 保存。

1.2 总 RNA 提取与 cDNA 合成

采用 TRIzol (Invitrogen, USA) 提取各组织总 RNA, 通过 NanoDrop 2000C (Thermo Scientific, 美国) 测定 RNA 含量, 并通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检查 RNA 的完整性。用 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (TaKaRa, 日本) 试剂盒参照操作指南获得 cDNA 模板, 反应体系如下: 5 × gDNA Eraser Buffer 5 μL, gDNA Eraser 1 μL, total RNA 适量 (500 ng), RNase Free dH₂O 补足至 10 μL, 42 °C 反应 2 min; 在上述反应液中加入 PrimeScript RT Enzyme Mix I 1 μL, RT Primer Mix 4 μL, 5 × PrimeScript Buffer 4 μL, RNase Free dH₂O 1 μL, 37 °C 15 min, 85 °C 5 s, 4 °C 保存, 使用前稀释 5 倍。

1.3 *HcWNT4* 序列全长的获取

从本实验室三角帆蚌珍珠囊转录组库^[15] 中获取 *HcWNT4* 基因部分序列, 通过 Primer Premier 5.0 软件设计引物 (表 1)。使用 SMART 5' RACE & 3' RACE (Clontech, 美国) 试剂盒合成 cDNA 第 1 条链, 并参照说明进行 3' 和 5' 扩增。PCR 扩增体系为 25 μL, 反应程序如下: 94 °C 预变性 3 min, 94 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 2 min, 30 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 保存。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物, 用 TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit Ver. 4.0 (TaKaRa, 日本) 纯化目的片段后, 克隆到 pCEM-T Easy (Promega, 美国) 载体上, 16 °C 连接 16 h, 并转入 DH5α 感受态细胞 (天根, 北京) 中, 涂平板, 37 °C 过夜。挑选阳性克隆样品送至生工 (上海) 测序, 与已知序列进行比对并进行拼接, 获得 *HcWNT4* 基因序列全长。

表 1 本实验所需引物

Tab. 1 Primers for the present study

引物名称 Primers name	序列 (5'-3') Sequences (5'-3')	用途 Purpose
W3'-1	GCGAGAGTCTGATTGGTTTG	3'RACE outer
W3'-2	TGACGACATTCAGAGAGGTGG	3'RACE inner
W5'-1	ATTCCATTTCTCAGCGGGAGTTGCC	5'RACE outer
W5'-2	GATCAATGACGACATTCAGAGAGGTGGG	5'RACE inner
HWαF	CAGGCCCGCTCTGTAATAAAA	荧光定量正向引物
HWαR	CATCGCACATAACAGCACCA	荧光定量反向引物
EFl-αF	GGAACITCCCAGGCAGACTGTGC	内参正向引物
EFl-αR	TCAAAAACGGGCCGAGAGAAT	内参反向引物
IWαF	CAGGCCCGCTCTGTAATAAAA	原位杂交正向引物
IWαR	TAATACGACTCACTATAGGGCATCGCACATAACAGCACCA	原位杂交反向引物

1.4 *HcWNT4* 序列分析及系统进化分析

使用 NCBI 数据库中的 Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 确认 *HcWNT4* 基因的序列。使用 ORFfinder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 测定 *HcWNT4* 的氨基酸序列。使用 ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) 分析 *HcWNT4* 的物理参数。使用 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) 预测三级结构。使用 Clustal W2 程序和 MEGA 7.0 中的邻接 (NJ) 方法构建系统进化树。

1.5 *HcWNT4* 荧光定量分析

检测反转后的各组织 cDNA 产物浓度,分别稀释到 100 ng/ μ L,利用 qRT-PCR 技术检测 *HcWNT4* 基因在三角帆蚌各个组织中表达量情况。研究表明 EF-1 α 在三角帆蚌各组织表达稳定,选其作为参照基因。使用 Primer Premier 5.0 软件对 *HcWNT4* 基因 ORF 区设计 qRT-PCR 特异性引物(表 1)。使用 TB GreenTM Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus, TaKaRa, 日本) 和 CFX96 仪 (Bio-Rad) 测定相对基因表达水平。反应体系 (20 μ L): 10 μ L 2 \times TB Green Premix Ex Taq, 6.8 μ L RNase Free 水, 0.8 μ L 上游引物和 0.8 μ L 下游引物, 1.6 μ L cDNA 模板。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 3 min, 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 共 40 个循环。使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算 *HcWNT4* 基因相对表达量。

1.6 原位杂交

用 Primer Premier 5.0 设计特异性引物,并在下游引物 5' 端加入 T7 启动子序列 (TAATACGACTCACTATAGGG)。纯化所得 PCR 产物作为体外转录模板,使用 T7 High Efficiency Transcription 试剂盒(全式金,北京)及 DIG RNA Labeling Mix (Roche, 德国) 得到标记探针,于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

选择 2 龄成熟雌雄三角帆蚌,将性腺组织在 4% 多聚甲醛中与焦碳酸二乙酯 (DEPC) 4 $^{\circ}$ C 固定 24 h,然后在 70% 乙醇中保存。将组织梯度脱水、包埋制片,用石蜡切片机 (Leica, 德国) 切片,厚度 8 ~ 10 μ m。然后根据 DIG nucleic acid

detection kit (SP6 / T7; Roche, 德国) 说明书进行原位杂交,用 NBT/BCIP 显色剂避光处理,使用 Leica DM 2500 显微镜 (Leica, 德国) 观察杂交信号并拍照。

1.7 数据分析

使用 SPSS 18.0 软件,采用单因素方差分析各组织及其各个时期之间的差异,并且 $P < 0.05$ 被认为具有统计学意义,使用 SigmaPlot 12.5 绘制条形图。

2 结果与分析

2.1 *HcWNT4* 全长 cDNA 的克隆及序列特征

通过 RACE 法克隆获得 *HcWNT4* 序列全长为 1 560 bp (登录号: MN866367), 其中 5'-UTR 为 396 bp, 3'-UTR 为 24 bp, 开放阅读框 (ORF) 为 1 140 bp, 编码了 379 个氨基酸(图 1)。预测其蛋白相对分子质量为 42.51 ku, 理论等电点为 8.82, 为亲水性蛋白。

2.2 *HcWNT4* 系统进化分析

同源性比对结果显示,三角帆蚌 *HcWNT4* 与栉孔扇贝和虾夷扇贝相似性最高,分别为 71.07% 和 70.51%, 与厚壳贻贝相似性为 67.88%, 与非洲爪蟾相似性较低,为 61.86%。

从 NCBI 数据库中下载 8 个代表性物种的 *WNT4* 氨基酸序列,使用 MEGA 7.0 软件构建 *WNT4* 的 NJ 系统进化树。结果表明,三角帆蚌 *HcWNT4* 与栉孔扇贝和虾夷扇贝的蛋白进化关系最近,与其他双壳类贝类序列聚类,远离斑马鱼和小鼠序列。因此,来自多种物种的 *WNT4* 之间存在高度序列保守性,表明其进化和结构具有保守性,推断具有功能相似性(图 2)。通过 SWISS-MODEL 程序预测了 *HcWNT4* 蛋白质三级结构(图 3), SWISS-MODEL 建模结果显示,同源模板与序列的相似性为 52.43%, GMQE 为 0.68, QMEAN 为 -2.21, 说明该蛋白与模板蛋白匹配度较高,其中, α 螺旋占 39%, β 折叠为 17%, TM 螺旋占 4%, 无规则卷曲为 34%。

1 gtaagttgttccaagataattcgcaactgaaaaaaaaagttcagcggatccactattcaaagg
 61 ttatcatattcaacggattttttatattcaggatcggattccaatattccttgtatcatt
 121 aatgtctatacatcattttaaggaacaaagacatatgtaaaatattgtcattaacgtgt
 181 aaaagacagaatgggtccttgtgtttaatttattatttcgtgattttctaacttttatttt
 241 cagtagacaataacttgttaatttctaaattccttgttcatcaagtgcacagttaaggaat
 301 acattccatcatttgaacaattaatgcgatgtgaatgatccattcatatgaaaaagcga
 361 tggaaagtgtgttacatgtgattcagtcacgggatac**ATG**TACAATTCAGCTTGGATTACA
 1 M Y N S A W I T

 421 TCAAAGAGTACTGAACTAAATTCTGGCGCAATGCAAGTGACAAGAATGTCACTGAGAGAC
 9 S K S T E L N S G A M Q V T R M S L R D

 481 ATATTCTCTGTTGTGATTGGAATCTATTTATTTGTTTGTTCATTTCCCAGAGAAGACAGGA
 29 I F S V V I G I Y L F V C H F P E K T G

 541 GGAATTC AATGGTTAGCTTTAGCAAAGATGACAAGTATAGCGGCGATTAACGCTCCAGAG
 49 G I Q W L A L A K M T S I A A I N A P E

 601 ACATGCGAGAGTCTGATTGGTTTGGTTGAAAGACAGAAGAAAATTTGTTATCGGCATCTA
 69 T C E S L I **G L V E R Q K K I C Y R H L**

 661 GAGATGATGGAGAGCGTTAAGGAAGGTGCTAACATCGCGATAGAAGAATGTCAGCATCAG
 89 **E M M E S V K E G A N I A I E E C Q H Q**

 721 TTTAGGAATAGAAGATGGAACGTAGTACAGTAGATCCAGTCAAATTATTTGGAAATGTT
 109 **F R N R R W N C S T V D P V K L F G N V**

 781 TTAAAATTAGGAACGCGGGAAGCGGCATTTGTGCATTCCATTTCCCTCAGCGGGAGTTGCG
 129 **L K L G T R E A A F V H S I S S A G V A**

 841 CATGCATTAACCCGCGCGTGCAGCAGTGGGGATTTAGAAAAGTGTGGGTGTGATAGGACA
 149 **H A L T R A C S S G D L E K C G C D R T**

 901 GTTCGGGGCCGCGAGTGGGAGGGATTCTGAATGGTCAGGTTGTTCCGATAATATCGCCTTT
 169 **V R G R S A E G F E W S G C S D N I A F**

 961 GGAACTGCATTCTCTAGAACATTCGTGGACGCTAGAGAGAGAAGGAAAAAGACAAAAAAT
 189 **G T A F S R T F V D A R E R R K K T K N**

1 021	ATTGATCGTATACTCATGAATCTACATAATAACGAAGCGGGAAGACGGGCTCTTGAAGAT
209	I D R I L M N L H N N E A G R R A L E D
1 081	AATGTACAAGTGGTGTGTAATGTACGGAGTGTCTGGCTCTTGTGAACTCAAGACTTGC
229	N V Q V V C K C H G V S G S C E L K T C
1 141	TGGCGATCAATGACGACATTCAGAGAGGTGGGAAATATATTAAAAGAAAAGTTTCGATGGC
249	W R S M T T F R E V G N I L K E K F D G
1 201	GCGACGGAAGTACGTTTGCAGAAAAAGAAGAGCTCTCAGGCGCTAGTTCGGTCAACCCA
269	A T E V R L Q K K K S S Q A L V P V N P
1 261	CAGTTTAAACACCACCCGACTCAGATTTGGTGTACCTTGTGGCCTCTCCAGACTTTTGC
289	Q F K H H T D S D L V Y L V A S P D F C
1 321	GAACCCGACTCAAAAACGGATCTTTAGGCACCTGCAGGCCGCGTCTGTAATAAAACATCA
309	E P D S K T G S L G T A G R V C N K T S
1 381	AAAGCTATAGATGGTTGTGATTTAATGTGTTGTGGGAGAGGATATGAACTAGGAAAGTG
329	K A I D G C D L M C C G R G Y E T R K V
1 441	ACAGTTACAGAGCGGTGCATGTGTAAATTTTTCTGGTGTCTTATGTGCGATGCAAGAAC
349	T V T E R C M C K F F W C C Y V R C K N
1 501	TGCGAACGTATTGTTGATGAACATTATTGTAAATAAagagcaaggaccaccccccccccccc
369	C E R I V D E H Y C K *

小写字母表示 3'-UTR 和 5'-UTR。大写字母表示编码区(上部为核苷酸,下部为氨基酸)。方框内 ATG/TAA 为起始密码子/终止密码子;阴影部分为 *HcWNT4* 保守区域氨基酸序列

Lowercase letters indicate 3'-UTR and 5'-UTR. Uppercase letters indicate the coding region (the upper part is the nucleotide and the lower part is the amino acid). In the box, ATG/TAA is the start codon/stop codon; the shaded part: amino acid sequence of the conserved region of *HcWNT4*

图 1 三角帆蚌 *HcWNT4* 基因 cDNA 序列及编码的氨基酸序列

Fig. 1 *HcWNT4* gene cDNA sequence and encoded amino acid sequence of *Hyriopsis cumingii*

2.3 *HcWNT4* 雌雄各组织表达差异分析

qRT-PCR 结果(图 4)显示,*HcWNT4* 基因在雌雄三角帆蚌的 6 个组织(性腺、鳃、外套膜、斧足、闭壳肌和肝脏)中均有表达,其中雌雄三角帆蚌均在斧足中相对表达量最高,在性腺、闭壳肌中雌性表达量均显著高于雄性,而在外套膜中雌性三角帆蚌显著低于雄性。

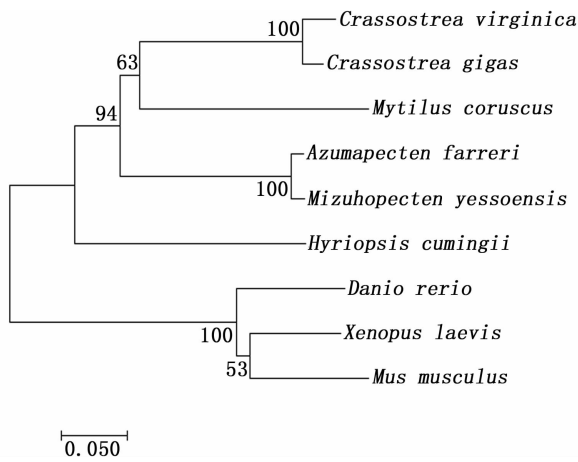
2.4 *HcWNT4* 在不同发育阶段性腺表达量分析

由图 5 可知,在三角帆蚌幼龄性腺发育阶段,1

月龄表达量最高,2 月龄次之,之后逐渐下降,在 5 月龄左右再次上升,之后趋于平缓,不同发育阶段性腺表达量存在显著性差异。

2.5 原位杂交结果分析

对 *HcWNT4* 基因在 2 龄成熟雌雄三角帆蚌性腺进行定位分析。原位杂交的结果显示在实验组中,雌性性腺中存在明显的蓝紫色杂交信号,主要位于卵母细胞的细胞膜上,但在雄性性腺中信号较弱,对照组中均无信号(图版)。



基于 MEGA 7.0 使用邻接 (NJ) 方法构建, 节点上的数字表示重复 1 000 次的自举 (Bootstrap) 检验置信值

The tree was constructed by MEGA 7.0 using the neighbour-joining (NJ) method with 1 000 bootstrap repeats

图 2 不同物种 *HcWNT4* 氨基酸序列构建的系统进化树
Fig. 2 Phylogenetic tree of *HcWNT4* amino acid sequences from different species

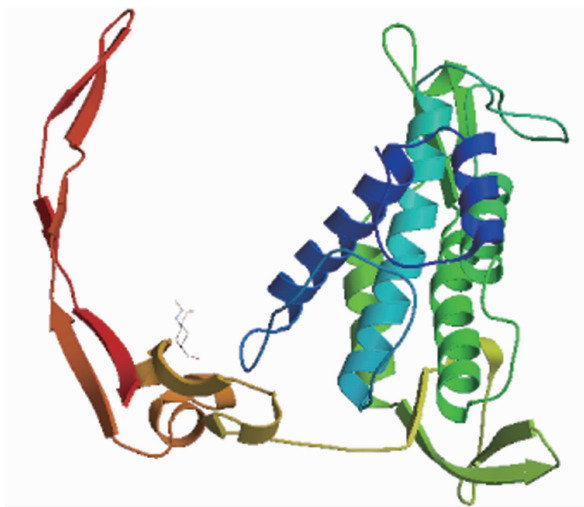


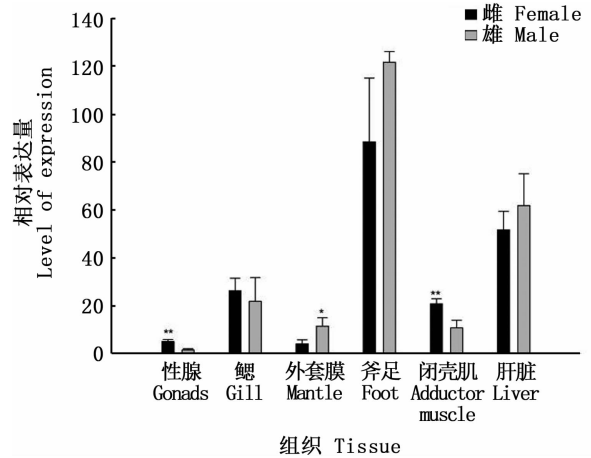
图 3 *HcWNT4* 三级结构预测

Fig. 3 *HcWNT4* tertiary structure prediction

3 讨论

WNT 信号通路在进化上是一条极保守的信号传导途径, 从无脊椎动物果蝇到脊椎动物斑马鱼、小鼠和人类中都存在这条信号通路, 它对于调控生物体内多种生物学过程都具有重要的作用。WNT 家族包含许多成员, 目前为止, 在哺乳动物中已经报道了 19 种 WNT 基因 (*Wnt1*、*Wnt2*、*Wnt2b*、*Wnt3*、*Wnt3a*、*Wnt4*、*Wnt5a*、*Wnt5b*、*Wnt6*、

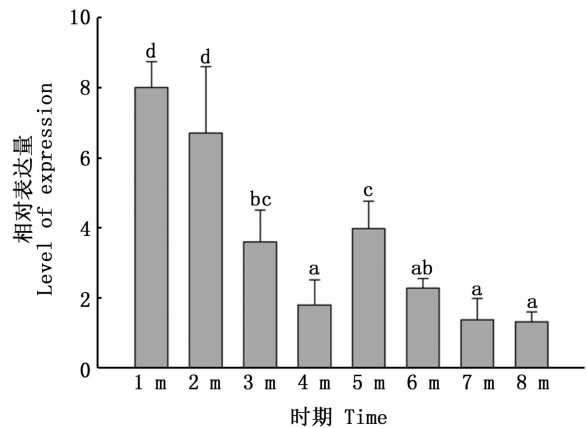
Wnt7a、*Wnt7b*、*Wnt8a*、*Wnt8b*、*Wnt9a*、*Wnt9b*、*Wnt10a*、*Wnt10b*、*Wnt11* 和 *Wnt16*)。其功能需要与卷曲蛋白受体和 LRP 共受体结合^[16]。WNT 蛋白参加生物体内多种发育过程, 包括细胞增殖分化、原肠腔发育、组织器官分化和成体细胞组织内维持稳态等。



* 表示雌雄间存在显著性差异 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

Significant differences are indicated by asterisks (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

图 4 *HcWNT4* 在 2 龄三角帆蚌各组织中相对表达量
Fig. 4 Relative expression of *HcWNT4* in different tissues of 2-year-old *H. cumingii*



不同字母 (a, b, c, d) 表示性腺不同发育时期表达存在显著性差异 ($P < 0.05$), 标有相同字母表示组间无显著性差异, ab, bc 含有相同字母, 表示组间差异不显著; 1m. 1 月龄; 2m. 2 月龄; 3m. 3 月龄; 4m. 4 月龄; 5m. 5 月龄; 6m. 6 月龄; 7m. 7 月龄; 8m. 8 月龄

Different letters (a, b, c, d) indicate significant difference in expression of gonads at different developmental stages ($P < 0.05$), identical letters indicate no significant difference between groups, ab, bc which have one identical letter indicated the expression levels are not significantly different from each other; 1m. 1 month; 2m. 2 months; 3m. 3 months; 4m. 4 months; 5m. 5 months; 6m. 6 months; 7m. 7 months; 8m. 8 months

图 5 1—8 月龄性腺组织相对表达量
Fig. 5 Relative expression of gonad tissue from 1 to 8 months

WNT4 能够激活性腺发育中的经典 WNT 信号传导途径^[17-18]。研究表明,*WNT4* 在不同生物内的多种组织中均有表达。在栉孔扇贝^[19]、厚壳贻贝^[20]和栉江珧(*Atrina pectinata*)^[21]中,其性腺、闭壳肌、鳃、外套膜中均有表达,推测 *WNT4* 可能参与了多种组织细胞的生命过程。本研究中,在雌雄三角帆蚌的 6 个组织中均有表达,且雌雄间存在差异,在卵巢中相对表达量显著高于其在精巢中的表达量,推测 *HcWNT4* 可能与卵巢发育有关,参与了三角帆蚌两性分化过程。在黑鲷和牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)中有相似的结果,*WNT4* 在卵巢中表达量均显著高于精巢^[13, 22]。在小鼠中,敲除其 *WNT4* 基因,并转入新型 *WNT4*,会导致卵巢卵泡细胞生成受损,雌性小鼠生育能力降低,最终导致卵巢早退,由此推测,*WNT4* 在卵泡细胞发育中起着至关重要的作用^[23]。在人类中,*WNT4* 基因突变可能会导致以缺乏子宫和输卵管以及雄激素过多的临床体征为特征的综合征,这表明 *WNT4* 基因在女性生殖道发育中起着关键作用^[24]。而在栉孔扇贝^[19]和虹鳟中^[25],结果却相反,精巢的表达量高于卵巢,这可能是由于物种差异及 *WNT4* 的多功能性所致。

早期表达中,幼蚌性腺在 1 月龄时表达量最高,之后逐渐下降,5 月龄再次上升后又缓慢下降,逐渐趋于平缓,推测 *HcWNT4* 参与了早期发育和性别分化过程。在栉江珧中,*WNT4* 在不同发育阶段的性腺中均有表达,在囊胚期和原肠期、稚贝阶段表达量较高,推测其在性腺生长过程中起着重要的作用,这一现象与牙鲆性腺中结果相似^[22]。而在长牡蛎(*Crassostrea gigas*)中,*WNT4* 在胚胎发育早期表达量较高,猜测该基因在早期发育阶段参与了某些器官的形成^[7],在哺乳动物中存在相似的结果,*WNT4* 参与哺乳动物早期胚胎发育,以及多种器官的发育,如肾脏、乳腺和生殖系统等。

为进一步了解 *HcWNT4* 基因在成熟三角帆蚌性腺中的表达位置,通过组织切片,地高辛标记法对 2 龄三角帆蚌雌雄性腺进行原位杂交,结果显示,在雌性三角帆蚌卵母细胞的细胞膜上有明显的蓝紫色杂交信号,而在精巢中信号较弱,这与实时荧光定量 PCR 结果一致,推测 *HcWNT4* 与雌性性腺分化和卵子形成有关。有研究表明,

WNT4 基因在卵泡发育过程中的颗粒细胞上均有表达,可以上调 *Amh* 的表达,对繆勒式管的形成、卵泡的发育必不可少^[10]。而在扩展莫尼茨绦虫(*Moniezia expansa*)中,通过核酸原位杂交分析发现,*WNT4* 基因在虫体的雌雄生殖细胞里均有表达,推测 *WNT4* 可能参与了其生殖细胞的发育过程^[26]。

本实验克隆了三角帆蚌 *HcWNT4* 基因序列全长,原位杂交结果显示,在雌性卵母细胞的细胞膜上有较明显的杂交信号,而在雄性精巢中杂交信号较弱,与 qRT-PCR 结果一致,推测 *HcWNT4* 基因可能与雌性性腺的分化和卵子形成有关。

参考文献:

- [1] 汪桂玲,白志毅,刘晓军,等. 三角帆蚌种质资源研究进展[J]. 水产学报, 2014, 38(9): 1618-1627.
WANG G L, BAI Z Y, LIU X J, et al. Research progress on germplasm resources of *Hyriopsis cumingii* [J]. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(9): 1618-1627.
- [2] 姜卫国,许国强,林岳光,等. 合浦珠母贝三倍体和二倍体的生长比较[J]. 热带海洋学报, 1991, 10(3): 1-7.
JIANG W G, XU G Q, LIN Y G, et al. Comparison of growth between triploid and diploid of *Pinctada martensii* (D.) [J]. Tropic Oceanology, 1991, 10(3): 1-7.
- [3] 何毛贤,沈琪,林岳光,等. 合浦珠母贝二倍体、三倍体和非整倍体群体的基因杂合度与生长比较[J]. 热带海洋学报, 2002, 21(4): 55-62.
HE M X, SHEN Q, LIN Y G, et al. Comparison of heterozygosity and growth between diploid, triploid and aneuploid pearl oyster *Pinctada martensii* (D.) [J]. Journal of Tropical Oceanography, 2002, 21(4): 55-62.
- [4] VAN OUYEN A, NUSSE R. Structure and nucleotide sequence of the putative mammary oncogene *int-1*; proviral insertions leave the protein-encoding domain intact[J]. Cell, 1984, 39(1): 233-240.
- [5] CABRERA C V, ALONSO M C, JOHNSTON P, et al. Phenocopies induced with antisense RNA identify the wingless gene[J]. Cell, 1987, 50(4): 659-663.
- [6] KESTLER H A, KÜHL M. From individual Wnt pathways towards a Wnt signalling network [J]. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 2008, 363(1495): 1333-1347.
- [7] 杨梅,许飞,刘俊,等. 长牡蛎(*Crassostrea gigas*) *Wnt4* 基因 cDNA 克隆与表达分析[J]. 海洋与湖沼, 2015, 46(1): 35-42.
YANG M, XU F, LIU J, et al. Molecular cloning and expression of *Wnt4* gene in pacific oyster *Crassostrea gigas*

- [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2015, 46(1): 35-42.
- [8] GORDON M D, NUSSE R. Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(32): 22429-22433.
- [9] 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.
- [10] VAINIO S, HEIKKILÄ M, KISPERT A, et al. Female development in mammals is regulated by *Wnt-4* signalling [J]. *Nature*, 1999, 397(6718): 405-409.
- [11] JORDAN B K, MOHAMMED M, CHING S T, et al. Up-regulation of *WNT-4* signaling and dosage-sensitive sex reversal in humans [J]. *The American Journal of Human Genetics*, 2001, 68(5): 1102-1109.
- [12] BERNARD P, HARLEY V R. *Wnt4* action in gonadal development and sex determination [J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2007, 39(1): 31-43.
- [13] WU G C, CHANG C F. *Wnt4* is associated with the development of ovarian tissue in the protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegelii* [J]. *Biology of Reproduction*, 2009, 81(6): 1073-1082.
- [14] HU Q M, ZHU Y, LIU Y, et al. Cloning and characterization of *Wnt4a* gene and evidence for positive selection in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) [J]. *Scientific Reports*, 2015, 4: 7167.
- [15] BAI Z Y, ZHENG H F, LIN J Y, et al. Comparative analysis of the transcriptome in tissues secreting purple and white nacre in the pearl mussel *Hyriopsis cumingii* [J]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e53617.
- [16] NIEHRS C. The complex world of WNT receptor signalling [J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2012, 13(12): 767-779.
- [17] MAATOUK D M, DINAPOLI L, ALVERS A, et al. Stabilization of β -catenin in XY gonads causes male-to-female sex-reversal [J]. *Human Molecular Genetics*, 2008, 17(19): 2949-2955.
- [18] LIU C F, PARKER K, YAO H H C. WNT4/ β -catenin pathway maintains female germ cell survival by inhibiting activin β B in the mouse fetal ovary [J]. *PLoS One*, 2010, 5(4): e10382.
- [19] 李海龙, 刘建国, 刘晓玲, 等. 栉孔扇贝 *wnt4* 基因 cDNA 克隆及表达分析 [J]. *中国水产科学*, 2013, 20(2): 260-268.
- LI H L, LIU J G, LIU X L, et al. Molecular cloning and expression analysis of *wnt4* cDNA from the zhikong scallop *Chlamys farreri* [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2013, 20(2): 260-268.
- [20] 徐跃峰, 李一峰, 梁箫, 等. 厚壳贻贝 *Wnt4* 基因时空表达 [J]. *水产学报*, 2016, 40(10): 1567-1575.
- XU Y F, LI Y F, LIANG X, et al. Temporal-spatial expression of *Wnt4* gene in the mussel *Mytilus coruscus* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2016, 40(10): 1567-1575.
- [21] 王昌勃, 李琪, 于瑞海, 等. 栉江珧 *wnt4* 基因 cDNA 的克隆表达及调控 [J]. *中国水产科学*, 2016, 23(5): 1041-1051.
- WANG C B, LI Q, YU R H, et al. Molecular cloning and expression analysis of *wnt4* from *Atrina pectinata* and effects of estradiol-17 β on its expression [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2016, 23(5): 1041-1051.
- [22] 翁申达. 牙鲆性别相关基因的克隆与表达分析 [D]. 青岛: 中国科学院研究生院(海洋研究所), 2013.
- WENG S D. Molecular cloning and expression patterns of sex-related genes in *Paralichthys olivacea* [D]. Qingdao: The Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2013.
- [23] PRUNSKAITE-HYYRYLAINEN R, SHAN J D, RAILO A, et al. *Wnt4*, a pleiotropic signal for controlling cell polarity, basement membrane integrity, and antimüllerian hormone expression during oocyte maturation in the female follicle [J]. *The FASEB Journal*, 2014, 28(4): 1568-1581.
- [24] BIASON-LAUBER A, KONRAD D, NAVRATIL F, et al. A *WNT4* mutation associated with Müllerian-duct regression and virilization in a 46, XX woman [J]. *The New England Journal of Medicine*, 2004, 351(8): 792-798.
- [25] NICOL B, GUERIN A, FOSTIER A, et al. Ovary-predominant *wnt4* expression during gonadal differentiation is not conserved in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Molecular Reproduction and Development*, 2012, 79(1): 51-63.
- [26] 王正荣, 张艳艳, 薄新文, 等. 扩展莫尼茨缘虫 *wnt* 基因在虫体不同发育体节的差异表达 [J]. *畜牧兽医学报*, 2016, 47(12): 2483-2492.
- WANG Z R, ZHANG Y Y, BO X W, et al. Differential expression of *wnt* genes in different proglottides of *Moniezia expansa* [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2016, 47(12): 2483-2492.

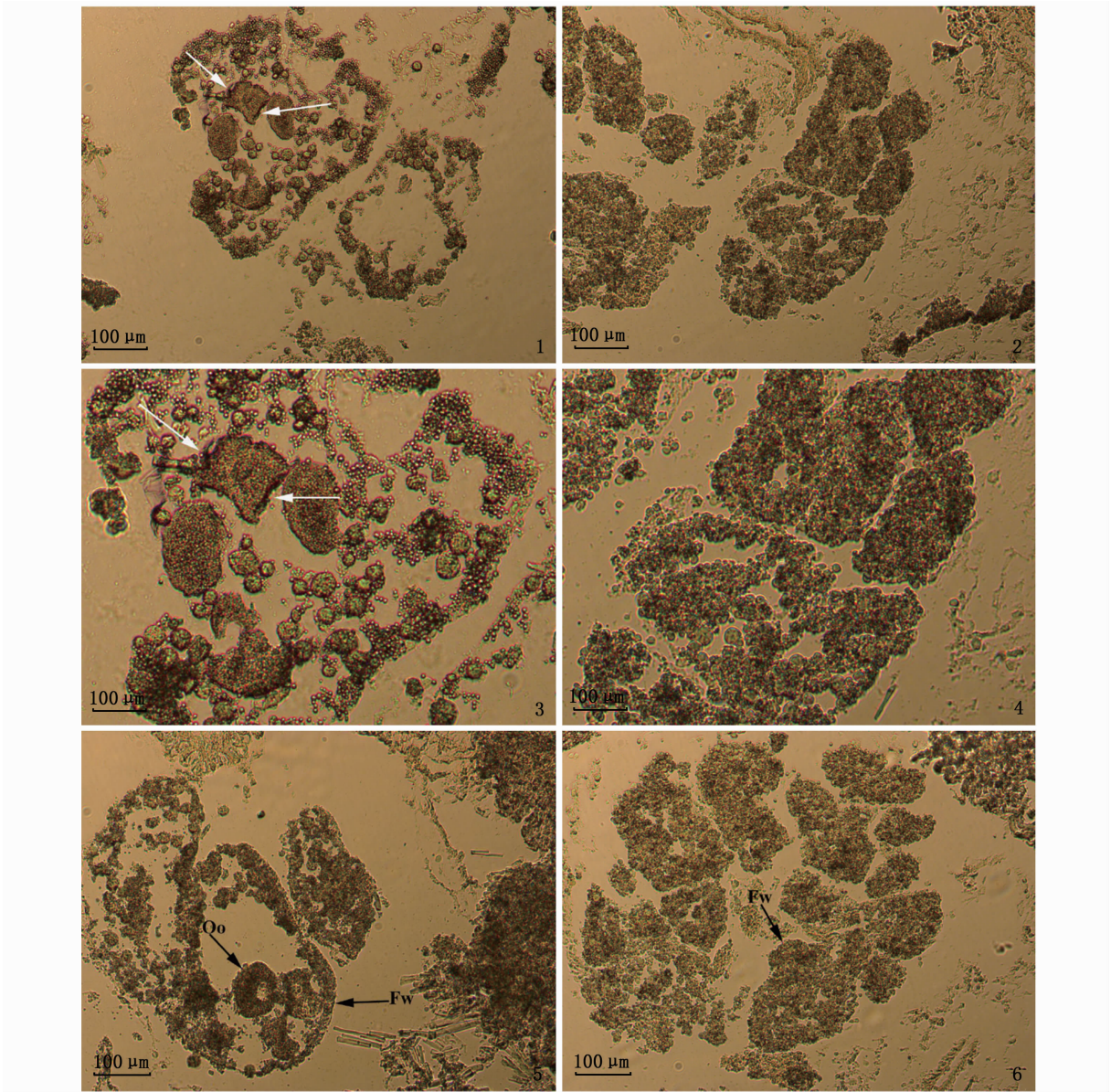
Cloning and expression analysis of *WNT4* gene in the *Hyriopsis cumingii*

LIU Feifei¹, CUI Xiaoyu¹, DONG Saisai¹, DUAN Shenghua¹, WANG Guiling^{1,2,3}, LI Jiale^{1,2,3}

(1. Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Shanghai Engineering Research Center of Aquaculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: In order to further understand the role of *WNT4* in the sex determination process of *Hyriopsis cumingii*, the full-length cDNA of *WNT4* gene was cloned by RACE method (Rapid-amplification of cDNA ends), which was 1 560 bp, including 5'-UTR 396 bp and 3'-UTR 24 bp. The open reading frame (ORF) was 1 140 bp, encoded a putative protein of 379 amino acids that contained a WNT family specific domain. Homology analysis of the amino acid sequence of *WNT4* showed that the evolutionary relationship and structural function of the gene were conserved among species. Real-time quantitative PCR (qRT-PCR) analysis of *WNT4* gene in the male and female tissues (the mantle, the adductor muscle, the gill, the gonad, the foot and the liver), indicated that it participated in diverse biological processes. It was highly expressed in gill, foot, and liver. There was significant difference between male and female in gonads, adductor muscle, and foot, and the expression of female gonads and adductor muscle was significantly higher than that of males. In situ hybridization results showed that there was obvious hybridization signal in the female oocyte cell. It was speculated that *WNT4* gene was related to sex determination.

Key words: *Hyriopsis cumingii*; sex determination; *WNT4*; qRT-PCR; in situ hybridization



1. 雌性实验组; 2. 雄性实验组; 3. 雌性局部放大; 4. 雄性局部放大; 5. 雌性阴性对照组; 6. 雄性阴性对照组; Oo. 卵母细胞; Fw. 滤泡壁

1. Female of Experimental group; 2. Male of Experimental group; 3. A partial enlargement of female; 4. A partial enlargement of male; 5. Female of negative control group; 6. Male of negative control group; Oo. Oocyte; Fw. Follicular wall

图版 *HcWNT4* 在 2 龄三角帆蚌性腺原位杂交

Plate *HcWNT4* in situ hybridization in 2-year-old of *H. cumingii* gonads