

doi: 10.7541/2017.121

## 池蝶蚌 $\beta$ -连环蛋白基因cDNA的克隆及表达特征分析

闫含笑 史建伍 盛军庆 王军花 洪一江

(南昌大学生命科学学院, 南昌 330000)

**摘要:** 为了解淡水贝类性别调控与分化机制, 课题组建立了池蝶蚌(*Hyriopsis schlegelii*)性腺转录组, 在转录组库中, 存在 $\beta$ -连环蛋白( $\beta$ -catenin)基因序列。实验对池蝶蚌 $\beta$ -catenin基因进行验证, 采用RACE技术克隆其cDNA全长, 命名为*Hs $\beta$ -catenin*。该序列全长4386 bp, 5'-非编码区为162 bp, 3'-非编码区为1758 bp, 开放阅读框为2466 bp, 编码821个氨基酸; 该蛋白结构域主要由12个ARM重复序列组成; 二级结构中,  $\alpha$ -螺旋占47.75%,  $\beta$ -折叠占1.22%, 随机卷曲占51.04%; 三级结构中含大量 $\alpha$ -螺旋且为右手超螺旋, 构成ARM结构域; 系统进化树分析表明, *Hs $\beta$ -catenin*与软体动物聚为一支, 然后与昆虫类聚为一支。实时荧光定量PCR(qRT-PCR)检测显示, *Hs $\beta$ -catenin*在肠中表达量最高, 其次是斧足和精巢。*Hs $\beta$ -catenin*基因在12月龄和36月龄表达量较高, 且在36月龄表达量最高, 表明其可能参与池蝶蚌的性别调控与分化作用。

**关键词:** 池蝶蚌; *Hs $\beta$ -catenin*; 组织表达; 克隆; 序列分析; qRT-PCR

**中图分类号:** Q344<sup>+</sup>1      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1000-3207(2017)05-0972-05

$\beta$ -连环蛋白( $\beta$ -catenin)是连环蛋白家族中的一个蛋白, 于1980年作为一种黏附因子被发现<sup>[1]</sup>。 $\beta$ -catenin有3个结构域, N末端区包括多个丝氨酸、苏氨酸残基作为多种酶的磷酸化位点; 中央区是最保守的区域, 含12—14个ARM结构域(犹狄重复结构域), 每个ARM结构域形成呈三角形排列的3个环形结构, 这些结构域因带正电荷在超螺旋结构中形成凹槽, 成为Wnt通路中许多信号分子的结合位点; C末端区含有转录激活区, 能够激活下游靶基因的转录<sup>[2]</sup>。 $\beta$ -catenin蛋白广泛存在于各类细胞中, 主要通过与其他分子形成复合物在不同组织结构中起作用<sup>[3]</sup>; 在细胞中主要有2个作用, 一是与细胞膜上的钙黏蛋白相互作用, 参与细胞间黏附, 二是作为Wnt信号通路中的关键信号分子调控细胞的生长、分化与凋亡<sup>[4]</sup>。依赖 $\beta$ -catenin的Wnt通路被称为经典Wnt通路, 多种Wnt通路上的信号分子与 $\beta$ -catenin结合形成破坏复合物, 细胞外分泌的Wnt配体作用于破坏复合物并使其降解,  $\beta$ -catenin浓度不断上升, 进而促进Wnt蛋白的表达; 而没有Wnt配体时,  $\beta$ -catenin不断被磷酸化, 浓度下降, Wnt通路被

阻断<sup>[5]</sup>。 $\beta$ -catenin被发现通过Wnt通路对性别调控、癌症的转移侵袭、神经系统的发育等途径起着重要作用。

池蝶蚌(*Hyriopsis schlegelii*)是优质的淡水珍珠育珠蚌, 在生长过程中存在雌雄同体现象, 但成熟后性别为单性<sup>[6]</sup>;  $\beta$ -catenin被发现在青鳞中具有诱导卵巢发育甚至使性腺性逆转的作用<sup>[7]</sup>, 我们在池蝶蚌性腺转录组中也发现有 $\beta$ -catenin, 是否同样对池蝶蚌的性别分化有调控作用?因此本研究对池蝶蚌 $\beta$ -catenin基因进行克隆, 分析其结构特征及在不同组织和不同年龄性腺中的表达量, 以为其功能分析奠定基础。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验材料

体质健壮池蝶蚌由江西省抚州市国家级池蝶蚌良种场提供, 养于实验室水族箱中, 水温18—25℃, 每天换已曝气自来水2次。

#### 1.2 实验方法

**RNA的提取和cDNA的合成**      经液氮研磨

收稿日期: 2016-10-19; 修订日期: 2017-01-14

基金项目: 国家自然科学基金(31660337); 江西省教育厅项目(GJJ150166)资助 [Supported by the National Natural Science Foundation of China (31660337); the Fund Project of Jiangxi Provincial Education Department (GJJ150166)]

作者简介: 闫含笑(1993—), 女, 山东临沂人; 硕士研究生; 主要研究方向为水生生物学。E-mail: yanhanxiao1993@163.com

通信作者: 洪一江(1963—), 教授; 主要研究方向为水产动物细胞与遗传育种。E-mail: yjhong2008@163.com

后池蝶蚌组织利用Trizol试剂盒(Invitrogen, USA)一步法提取总RNA, RNA浓度和纯度用核酸测定仪(Nanodrop 2000)测定, 并用DNase I (TaKaRa, Japan)消化处理总RNA以消除基因组DNA的残留, 最后采用1%琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。使用Super Script<sup>TM</sup> III Reverse Transcriptase Kit反转体系合成cDNA, 备用。

**池蝶蚌β-catenin cDNA的克隆** 依据本实验室已有的转录组数据设计上、下游引物, 扩增出β-catenin基因的中间片段。50 μL PCR反应体系为: cDNA模版1 μL, Ex Taq酶0.5 μL, 10×Ex Taq buffer 5 μL, dNTP(2.5 mmol/L)5 μL, 上下游引物各1 μL, ddH<sub>2</sub>O 36.5 μL。PCR反应条件为: 94℃预变性5min; 94℃ 30s, 59℃ 30s, 72℃ 30s, 35个循环; 72℃延伸10min。设计RACE PCR的5'端引物(GSP1和GSP2)和3'端引物(GSP3和GSP4)(表1)。用特异性引物和通用引物UPM(Long:Short=1:5)为两侧引物、cDNA为第一轮模版进行PCR扩增; 用特异性引物和通用引物NUP作为两侧引物, 将扩增产物稀释10—50倍作为模版进行第二轮PCR扩增, 获得PCR产物。25 μL PCR反应体系: cDNA模版1 μL, Ex Taq酶0.3 μL, 10×Ex Taq buffer 2.5 μL, dNTP(2.5 mmol/L)1.2 μL, 上下游引物各1 μL, ddH<sub>2</sub>O 18 μL。反应条件: 94℃预变性5min; 94℃ 30s, 59℃ 30s, 72℃ 30s, 35个循环; 72℃延伸10min。将PCR产物经1.0%琼脂糖凝胶电泳检验后, 用琼脂糖凝胶回收试剂盒(OMEGA公司)回收、纯化, 并与pMD19-T载体连接, 转入感受态细胞*E. coli* DH5α中, 于LB平板(含Amp<sup>+</sup>)培养, 阳性克隆经PCR鉴定后送至上海生工生物工程技术有限公司测序。获得的序列经MEGA软件分析确定为Hsβ-catenin基因。利用ORF finder([https://www.](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/)

[ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/))查找此cDNA序列的最大开放阅读框(ORF), 对翻译所得氨基酸序列进行一、二、三级结构预测分析, 利用MEGA软件构建分子系统树。

**qRT-PCR分析** 采用qRT-PCR技术检测Hsβ-catenin基因的组织转录差异性及不同年龄、不同性别中性腺组织的表达差异性。根据得到的Hsβ-catenin cDNA全长序列, 设计荧光定量PCR引物(表1)进行qRT-PCR。对于组织表达实验, 随机选取6只成熟池蝶蚌, 雌、雄各3只采取相同组织混合分别提取池蝶蚌卵巢、精巢、心脏、外套膜、肠、肾、肝、血和斧足各组织总RNA, 通过1%琼脂糖凝胶电泳检验RNA完整性。将RNA反转录为cDNA模板; 不同年龄、不同性别池蝶蚌Hsβ-catenin表达实验方案: 选取1—4龄雌、雄性池蝶蚌各3只, 取各年龄雌、雄性腺, 按上述方法获得cDNA模板。根据荧光定量试剂盒(嵌合检测法, Takara)进行qRT-PCR检测。20 μL PCR反应体系为: SYBR10 μL, 上、下游引物各0.4 μL, H<sub>2</sub>O 8.2 μL。每个样品设置3个平行, 以蒸馏水代替模板作为阴性对照。反应条件为: 95℃预变性5min; 94℃ 30s, 58℃ 30s, 72℃ 30s, 40个循环; 72℃延伸10min。以上实验均重复3次, SPSS软件分析Hsβ-catenin mRNA在池蝶蚌中的表达情况, 组织表达和不同年龄性腺表达均进行单因素方差统计分析。

## 2 结果

### 2.1 池蝶蚌Hsβ-catenin基因cDNA全长及其分析

**池蝶蚌Hsβ-catenin基因cDNA全长** 将测序结果用MEGA软件处理后拼接成完整的cDNA序列, 全长4386 bp(登录号为KY126093), 其中5'端非编码区162 bp, 3'端非编码区1758 bp, ORF框2466 bp, 共编码821个氨基酸。将拼接后的cDNA序列与实验室已有的转录组序列进行比对, 二者基本相同, 证明了实验结果的准确性。

**Hsβ-catenin蛋白结构域分析** 通过瑞士生物信息学研究所ExPASy服务器的SMART程序(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)分析池蝶蚌Hsβ-catenin蛋白结构域, 可知池蝶蚌Hsβ-catenin蛋白主要由12个ARM结构域组成。ARM结构是各物种中β-catenin蛋白的中央保守区, 从而验证了实验结果的准确性。

**Hsβ-catenin二级结构预测** 通过PredicProtein在线软件(<http://www.predictprotein.org/>)对池蝶蚌Hsβ-catenin的二级结构进行预测。预测可知二级结构中α-螺旋占47.75%, 分布比较均匀且大量分布; β-折叠占1.22%, 在各处均有分布, 总量较少; 随

表1 PCR相关引物序列

Tab. 1 Primers used for PCR

引物名称 Primer name	引物序列Primer sequence (5'-3')
Long	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTG GTATCAACGCAGAGT
Short	CTAATACGACTCACTATAGGGC
GSP1	ATTATTGCGTGACGACTAGCC
GSP2	ATGTGGTTGGTCAGGGTGGAT
GSP3	GCCATGGCCACATTGGTTTGA
GSP4	GCACTGCAGTTTTCTGACCAAAT
NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
β-catenin1	CACAGGAACAGGTTGATGATA
β-catenin2	GCCTGACTGACTACAACCTGA
β-actin1	AAGGTTACGCCCTTCCTCAT
β-actin2	GCCATTTCTGCTCAAAGTC

机卷曲占51.04%,在两端分布较多。根据蛋白表面暴露面积是否超过16%为标准对蛋白进行亲水性和疏水性预测,亲水性蛋白含量约为49.09%,疏水性蛋白含量约为50.91%。

**Hs $\beta$ -catenin三级结构预测** 通过瑞士生物信息所ExPASy服务器的SWISS-MODEL程序(<http://swissmodel.expasy.org/>)对池蝶蚌Hs $\beta$ -catenin的三级结构进行预测(图1)。图中含大量 $\alpha$ -螺旋且为右手螺旋,每3个 $\alpha$ -螺旋排列在一起形成1个超螺旋,即ARM结构域,中间区域共形成12个ARM重复区域;图中还包括少量 $\beta$ -折叠及大量无规则卷曲。三级结构预测结果与二级结构一致。

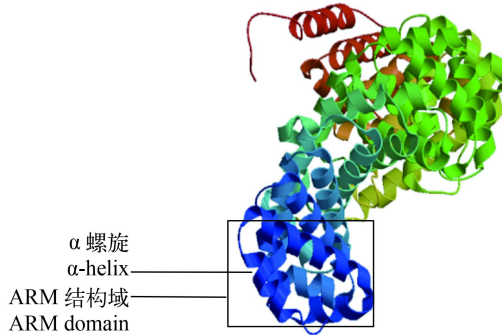


图1 Hs $\beta$ -catenin的三级结构预测

Fig. 1 The tertiary structure prediction of Hs $\beta$ -catenin

## 2.2 Hs $\beta$ -catenin基因的系统发育分析

在NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/orfig.cgi>)上查找各物种 $\beta$ -catenin基因的cDNA序列,利用MEGA软件分析可得到Hs $\beta$ -catenin基因的分子进化树(图2),由图可知,该基因序列比较保守,同源性较高。池蝶蚌Hs $\beta$ -catenin基因与软体动物的同源性很高,构成一个分支,其中与合浦珠母贝(*Pinctada martensii*)、栉孔扇贝(*Azumapecten farreri*)和太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)同源性最高,杂斑莲花青螺(*Lottia luchuana*)、海蜗牛(*Aplysia californica*)和大西洋舟螺(*Crepidula fornicata* Linnaeus)次之;与昆虫类的同源性也很高,如毛翼虫(*Chaetopterus variopedatus*)、杜氏阔沙蚕(*Platynereis dumerilii*)和大斑蝶(*Danaus plexippus*);与人类和鱼类的同源性相对较低。

## 2.3 池蝶蚌Hs $\beta$ -catenin组织表达分析

用荧光定量PCR技术检测池蝶蚌Hs $\beta$ -catenin在成熟个体9个组织中的表达(图3)。由图可知,Hs $\beta$ -catenin在各组织中均有表达,表达量从高到低为:肠、斧足、精巢、肝、卵巢、心脏、外套膜、肾和血,相对Hs $\beta$ -actin表达量分别为:8.44、4.43、3.05、2.22、1.84、1.00、0.92、0.64和0.06,表明其在生物体各组织中具有多种生物学功能,且在成熟

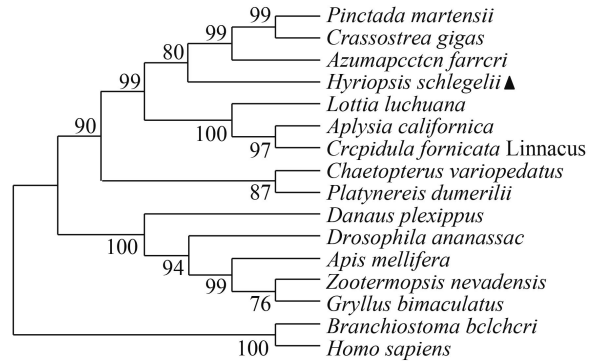


图2 不同物种 $\beta$ -catenin基因分子进化树

Fig. 2 The phylogenetic tree of  $\beta$ -catenin

合浦珠母贝*Pinctada martensii* (AKJ32471.1); 栉孔扇贝*Azumapecten Farreri* (AFU35436.1); 太平洋牡蛎*Crassostrea gigas* (NP\_001292224.1); 池蝶蚌*Aplysia californica* (NP\_001191600.1); 杂斑莲花青螺*Lottia luchuana* (XP\_009048556.1); 大西洋舟螺*Crepidula fornicata* Linnaeus (ADI48180.1); 白氏文昌鱼*Branchiostoma belcheri* (BAD12593.1); 意蜂*Apis mellifera* (NP\_001172034.1); 内华达古白蚁*Zootermopsis nevadensis* (KDR13423.1); 双斑蟋*Gryllus bimaculatus* (BAD00045.1); 大斑蝶*Danaus plexippus* (EHJ72882.1); 嗜凤梨果蝇*Drosophila ananassae* (XP\_001966028.1); 人类*Homo sapiens* (CAA61107.1)

池蝶蚌中精巢表达量高于卵巢,推测Hs $\beta$ -catenin在性腺发育成熟后更多地参与其他生物学功能。

## 2.4 池蝶蚌Hs $\beta$ -catenin在不同年龄性腺中的表达分析

池蝶蚌在5月龄出现性腺,12月龄雌雄可辨,36月龄性腺成熟。检测Hs $\beta$ -catenin在不同年龄、不同性腺中的表达情况(图4),结果显示其在3龄(约36月龄)中的表达最高,1龄(约12月龄)表达量次之,2龄(约24月龄)和4龄(约48月龄)表达量最少;在1到3龄中卵巢的表达量显著高于精巢的表达量,而到4龄时精巢反而略高于卵巢。

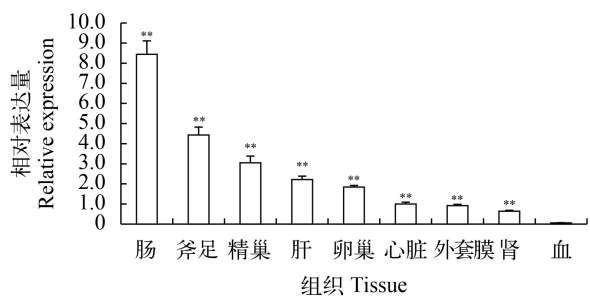


图3 Hs $\beta$ -catenin在各组织中的表达量

Fig. 3 The expression of Hs $\beta$ -catenin in different tissues

柱形图和竖线表示平均值 $\pm$ 标准差( $n=3$ ), \* $P<0.05$ ; \*\* $P<0.01$ 下同 Each symbol and vertical bar represent the mean  $\pm$  SD ( $n=3$ ). Significant differences are indicated with an asterisk. \*,  $P<0.05$ ; \*\*,  $P<0.01$ ; The same applies below



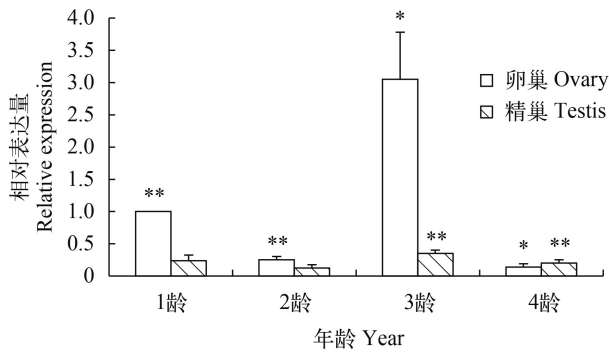


图4 *Hsβ-catenin*在不同年龄、不同性腺中的表达量

Fig. 4 The expression of *Hsβ-catenin* in different ages and different gonads

### 3 讨论

本研究首次获得池蝶蚌*Hsβ-catenin*基因的cDNA全长, 并对其结构特征和蛋白功能进行预测分析。由池蝶蚌*Hsβ-catenin*蛋白的结构域预测可知, 其主要由12个ARM结构域组成, 序列高度保守, 有典型的N末端区和C末端区, 与各种贝类甚至其他物种同源性较高, 预测结果与ARM重复序列的性质相同。ARM重复序列是约有40个氨基酸的串联重复序列, 通过在果蝇中起信号传导的作用首次被发现, 动物的ARM蛋白在细胞内信号转导和细胞骨架的调节等多种生命活动中起作用, 并参与 $\beta$ -catenin、腺瘤样息肉(APC)的肿瘤抑制蛋白和核运输因子importin  $\alpha$ 等蛋白的构建<sup>[8]</sup>。ARM结构高度保守, 仅有右手超螺旋结构, 普遍存在于真核细胞中, 如在拟南芥中起着细胞信号传导功能的ARM重复序列对生长发育和繁殖起着重要作用<sup>[9]</sup>。 $\beta$ -catenin包含3个区域, 各司其职, 第一个区域为N末端区, 含有GSK- $\beta$ 一致性的磷酸化位点; 第二个区域为中央区, 含有ARM重复序列, 能够与钙黏素、APC (Adenomatous polyposis coli)和TCF/LEF (T-cell Factor/Lymphoid Enhancing Factor)相互作用; 第三个区域为C末端区, 含有转录激活区, 对靶基因激活是所需的<sup>[10]</sup>。我们推测在经典Wnt通路中, 池蝶蚌 $\beta$ -catenin蛋白ARM结构域中央区可以与APC和其他信号分子结合形成破坏复合物, N末端区的磷酸化位点可与GSK-3 $\beta$ 作用, 使破坏复合物中的 $\beta$ -catenin不断被磷酸化, 无法进入细胞核中起作用; 当Wnt蛋白分泌时, GSK-3 $\beta$ 不能磷酸化 $\beta$ -catenin, 从而抑制降解复合物的形成, 导致胞浆中的 $\beta$ -catenin不被降解并进入细胞核, 中央区与核内转录因子LEF/TCF家族成员结合, 而C末端的转录激活区促进下游靶基因表达。

在非洲爪蟾胚胎中,  $\beta$ -catenin出现在所有细胞中, 参与细胞间黏附功能, 特别在形态发生活跃的

区域如囊胚和原肠胚的边缘区有 $\beta$ -catenin高水平表达; 在原基细胞基团之间也发现 $\beta$ -catenin高水平表达, 说明其参与生物发育过程<sup>[11]</sup>。 $\beta$ -catenin可以与FHL2相互作用促进小鼠肌细胞的分化<sup>[12]</sup>, Wnt经典通路的激活可以诱导小鼠肾单位的分化和肾的形成<sup>[13]</sup>。在人类<sup>[14]</sup>、果蝇<sup>[15]</sup>、非洲爪蟾<sup>[11]</sup>、罗非鱼<sup>[16]</sup>等物种中也都具有的广泛表达的特点。本研究表明, 池蝶蚌 $\beta$ -catenin在肠、斧足、精巢、肝、卵巢、心脏、外套膜、肾和血9个组织中均有表达, 而不是仅作为性别决定和性别调控基因大量出现在精巢和卵巢中, 表明其在生物体中广泛存在且可在不同组织中参与各种生理功能。根据在外套膜、斧足、肾及各细胞中的表达情况及其碱基序列的高度保守性, 我们推测, 其可能参与池蝶蚌肌细胞的分化与肾的形成, 并参与各组织内细胞间黏连等各种生理活动, 这与其他物种有功能类似; 但另一方面*Hsβ-catenin*在池蝶蚌各组织的表达量相对较低, 推测是由于Wnt信号通路在各组织中广泛存在。

$\beta$ -catenin是一种亲卵巢、抗精巢的信号分子, 对性别决定机制起着一定的作用并可导致性逆转。为了研究 $\beta$ -catenin是否可以阻断睾丸的发育通路, 在小鼠XY型性细胞中激活 $\beta$ -catenin的表达, 结果显示XY型小鼠雄性发育通路被阻断, 并造成雄性到雌性的性逆转<sup>[17]</sup>。目前一些 $\beta$ -catenin对性腺决定和分化作用的研究认为, 哺乳动物尚未分化的性腺的发育方向是由R-spondin 1、Wnt 4和 $\beta$ -catenin等信号分子介导的雌性信号通路和由Sry和Sox9等信号分子介导的雄性信号通路相互竞争决定的, 性腺最终朝着竞争占优势的一方发育<sup>[16]</sup>。我们对不同性别和不同年龄池蝶蚌中*Hsβ-catenin*基因的表达量也进行了分析, 结果发现, 12月龄雌雄可辨时卵巢中表达量较高, 36月龄的成熟卵巢中表达量最高。由此推测, *Hsβ-catenin*可能在池蝶蚌雌性性别决定与分化过程中起着调控作用。另外一个有趣现象是第一次性成熟后的卵巢完成了性腺分化, *Hsβ-catenin*表达量反而略低于精巢, 因此我们推测其可能不再行使性腺分化调控功能。

### 参考文献:

- [1] Muercheer, Wen B. New progresses of  $\beta$ -catenin in colon cancer [J]. *Journal of North Sichuan Medical College*, 2011, 26(6): 554—558 [木尔扯尔, 文彬. 结肠癌中 $\beta$ -catenin研究的新进展. 川北医学院学报, 2011, 26(6): 554—558]
- [2] Tan Y, Jiang N, Sun X. The research progress of  $\beta$ -catenin in ovarian cancer and chemoresistance [J]. *Maternal and Child Health Care of China*, 2015, 30(21):

- 3746—3749 [谭影, 姜宁, 孙信.  $\beta$ -catenin在卵巢癌及化疗耐药中的研究进展. 中国妇幼保健, 2015, **30**(21): 3746—3749]
- [3] Li H L. Cloning of genes *Wnt4*,  $\beta$ -catenin, *Dax1*, and their correlation to the gonadal development in scallop *Chlamys farreri* [D]. Ocean University of China. 2013 [李海龙. 栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)*Wnt4*,  $\beta$ -catenin及*Dax1*基因的克隆及其与性腺发育相关性的研究. 中国海洋大学. 2013]
- [4] He H. The research progress of  $\beta$ -catenin [J]. *Practical Clinical Medicine*, 2010, **11**(10): 120—123 [何欢.  $\beta$ -catenin的研究进展. 实用临床医学, 2010, **11**(10): 120—123]
- [5] Azzolin L, Panciera T, Soligo S, *et al.* YAP/TAZ incorporation in the  $\beta$ -Catenin destruction complex orchestrates the Wnt response [J]. *Cell*, 2014, **158**(1): 157—170
- [6] Wang B H. Study on development of the gonad of *Hyriopsis schlegelii* [D]. Nanchang University. 2010 [王滨花. 池螺蚌性腺发育的观察. 南昌大学. 2010]
- [7] Yu X G, Wu L M, Liu G, *et al.* Function in the ovary differentiation of *R-spondins* gene from teleost fish [C]. The 2012 Symposium of Chinese Society for Oceanology and Limnology and China Ichthyology Society. 2012 [于祥国, 吴利敏, 刘刚, 等. *R-spondins*基因在硬骨鱼类卵巢分化中的作用研究. 中国海洋湖沼学会、中国动物学会鱼类学分会2012年学术研讨会. 2012]
- [8] Hatzfeld M. The armadillo family of structural proteins [J]. *International Review of Cytology*, 1999, (186): 179—224
- [9] Coates J. Armadillo repeat proteins: beyond the animal kingdom [J]. *Trends in Cell Biology*, 2003, **13**(9): 463—471
- [10] Akiyama T. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling [J]. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2000, **11**(4): 273—282
- [11] Fagotto F, Gumbiner B M. Beta-catenin localization during *Xenopus embryogenesis*: accumulation at tissue and somite boundaries [J]. *Development*, 1994, **120**(12): 3667—3679
- [12] Martin B, Schneider R, Janetzky S, *et al.* The LIM-only protein FHL2 interacts with  $\beta$ -catenin and promotes differentiation of mouse myoblasts [J]. *Journal of Cell Biology*, 2002, **159**(1): 113—122
- [13] Kuure S, Popsueva A, Jakobson M, *et al.* Glycogen synthase kinase-3 inactivation and stabilization of  $\beta$ -catenin induce nephron differentiation in isolated mouse and rat kidney mesenchymes [J]. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2007, **18**(4): 1130—1139
- [14] Riggleman B, Wieschaus E, Schedl P. Molecular analysis of the armadillo locus: uniformly distributed transcripts and a protein with novel internal repeats are associated with a *Drosophila* segment polarity gene [J]. *Genes & Development*, 1989, **3**(1): 96—113
- [15] Helmbrecht K, Kispert A, Von W R, *et al.* Identification of a Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in human thyroid cells [J]. *Endocrinology*, 2001, **142**(12): 5261—5266
- [16] Wu F R. Molecular cloning, expression and characterization of several genes (*Rspo1*,  $\beta$ -catenin and *TSP-1*) involved in ovarian differentiation and development in *Tilapia* [D]. Southwest University. 2010 [吴凤瑞. 罗非鱼卵巢分化和发育相关基因*Rspo1*、 $\beta$ -catenin和*TSP-1*的克隆、表达和功能鉴定. 西南大学. 2010]
- [17] Maatouk D M, Dinapoli L, Alvers A, *et al.* Stabilization of  $\beta$ -catenin in XY gonads causes male-to-female sex-reversal [J]. *Human Molecular Genetics*, 2008, **17**(19): 2949—2955

## THE STRUCTURAL FEATURE AND EXPRESSION ANALYSIS OF *Hs* $\beta$ -CATENIN cDNA AND PROTEIN FROM *HYRIOPSIS SCHLEGELII*

YAN Han-Xiao, SHI Jian-Wu, SHENG Jun-Qing, WANG Jun-Hua and Hong Yi-Jiang

(The College of Life Science, Nanchang University, Nanchang 330000, China)

**Abstract:** In order to explore the mechanism of sexual development of freshwater shellfish, we established a gonadal transcriptome of *Hyriopsis schlegelii*. Based on the transcriptome library, this study investigated the  $\beta$ -catenin. The full-length cDNA was cloned by RACE PCR, which named *Hs* $\beta$ -catenin. The full length of *Hs* $\beta$ -catenin cDNA was 4386 bp that contained an open reading frame (ORF) of 2466 bp coding a protein of 821 amino acids. The protein was mainly composed of 12 ARM repeat sequences. In the secondary structure, the  $\alpha$ -helix accounted for 47.75% and the  $\beta$ -folding accounted for 1.22% were predicted. The tertiary structure had many  $\alpha$ -helixes, namely ARM domain. *Hs* $\beta$ -catenin gene was clustered with homologous genes from soft animal in the phylogenetic tree. *Hs* $\beta$ -catenin expressed highly in intestine and modestly in foot and testis. The expression level of *Hs* $\beta$ -catenin was high at the age of 12-month-old (gender differentiation) and 36-month-old (gonad mature), indicated that it might be involved in sexual development.

**Key words:** *Hyriopsis schlegelii*; *Hs* $\beta$ -catenin; Tissue expression; Clone; Sequence analysis; qRT-PCR