

doi: 10.7541/2018.058

黄颡鱼 *Wnt* 家族4个基因的克隆、组织表达及对铜的响应

张丽晗 罗智 有文静 李丹丹 吴坤 徐异桓

(华中农业大学水产学院, 动物遗传育种与繁殖教育部重点实验室, 武汉 430070)

摘要: 为探究 *Wnt* 家族成员在黄颡鱼卵巢发育中的作用, 研究首先采用 RT-PCR 和 RACE 技术获取了黄颡鱼 *Wnt5a*、*Wnt5b*、*Wnt7a* 和 *Wnt9b* 基因的全长 cDNA 序列, 即 1984、2905、2158 和 1622 bp, 其中 ORF 长度分别为 1124、1124、1049 和 1073 bp, 编码 375、375、350 和 358 个氨基酸。氨基酸序列比对和系统树分析显示, 这些基因十分保守, 黄颡鱼 WNT 与墨西哥丽脂鲤和斑马鱼比较接近。组织表达分析表明, 这些基因的 mRNA 在脑、脾脏、肾脏、鳃、心脏、肌肉、脂肪、肝脏及卵巢等组织中都有表达, 但表达水平不尽相同。*Wnt* 家族基因对铜的响应研究表明: 在暴露 28d 时, *Wnt7a* mRNA 水平随着铜浓度先上升后下降, 但是 *Wnt5a*、*Wnt5b* 和 *Wnt9b* 基因表达各个处理组无显著性差异; 在 56d, *Wnt5b* 在 60 $\mu\text{g Cu/L}$ 组最低, 其他 2 个组差异不显著, *Wnt9b* mRNA 水平随着铜浓度先上升后下降, 但是 *Wnt5a* 和 *Wnt7a* 基因表达各个处理组无显著性差异, 表明 *Wnt* 家族这些基因的功能发生了分化, 部分成员介导了铜影响黄颡鱼卵巢发育的调控。研究首次揭示了黄颡鱼 *Wnt* 家族部分成员的基因结构和功能, 为深入探讨他们在卵巢发育中的作用奠定了基础。

关键词: 黄颡鱼; *Wnt*; 分子特征; 组织表达; 铜暴露

中图分类号: Q344⁺.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2018)03-0463-10

Wnt 家族的基因最初是由 Nusse 和 Varmus 于 1982 年在鼠类乳腺癌病毒诱导的小鼠乳腺癌中克隆得到的, 并被命名为 Int-1, 该基因由于与后来报道的果蝇无翅基因 Wingless (Wg) 同源, 故将两者合并命名为 *Wnt*^[1]。自从 *Wnt* 家族在 1982 年被发现以来, 科学工作者已经陆续在哺乳动物基因组中发现了 19 种 *Wnt* 家族成员基因^[2]。进一步的研究证实, *Wnt* 基因家族与其他相关基因组成了一条复杂的信号传导途径——Wnt 信号途径 (Wnt signaling pathway)。Wnts 可以通过经典的 Wnt/ β -catenin 信号通路或者非经典 Wnt 信号通路 (包括 Wnt/ Ca^{2+} 信号通路和 Wnt/PCP 信号通路) 调节靶基因的表达, 在动物胚胎发育、细胞分化和器官发育等多种生命过程中发挥作用^[3-5]。

Wnt 通路是机体重要的信号转导通路之一, 在细胞增殖、分化、胚胎发育和卵泡生成方面具有重要的调节作用^[6,7]。因此, Wnt 信号转导通路的错误调节可导致包括卵巢发育失调在内的多种病理

变化^[3,8]。研究已证实, 以 *Wnt* 基因为配体的 Wnt 信号通路在进化中非常保守, 从低等的无脊椎动物到高等的哺乳动物都可以明显检测到该信号通路成员的表达^[5]。在鱼类, 目前仅在一些模式鱼类克隆得到了 *Wnt* 家族部分成员的 cDNA 序列, 如斑马鱼 (*Danio rerio*)^[9,10] 和青鳉 (*Oryzias latipes*)^[11] 等。最近, 曹梅等^[12] 基于斑点叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus*) 的基因组数据库, 通过与 NCBI 中存在的人 (*Homo sapiens*)、小鼠 (*Mus musculus*) 和斑马鱼等 Wnt 蛋白氨基酸序列进行比较, 发现斑点叉尾鲷 *Wnt* 基因家族成员共 20 种。然而, 在其他鱼类, 还没有有关 *Wnt* 家族成员 cDNA 序列克隆的报道, 也没有关于这些基因 mRNA 组织表达的研究。

铜是包括鱼类在内的所有脊椎动物必需的微量元素之一, 广泛地参与体内的许多生化过程, 然而, 过量的铜对生物体是有毒的^[13]。与其他脊椎动物不同, 鱼类可以经由鳃从水中吸收铜。我们前期研究发现水体铜暴露能影响黄颡鱼的卵巢发育和

收稿日期: 2017-05-04; 修订日期: 2017-06-27

基金项目: 国家自然科学基金优秀青年基金(31422056)资助 [Supported by the National Natural Science Foundation of China (31422056)]

作者简介: 张丽晗(1991—), 河北邢台人; 博士研究生; 主要研究方向为鱼类生殖生理。E-mail: zhlh8175@126.com

通信作者: 罗智, 博士生导师, 教授, E-mail: luozhi99@mail.hzau.edu.cn; luozhi99@aliyun.com

激素分泌^[14],然而相关机制尚不清楚。对哺乳动物的研究表明,Wnt介导的通路在卵巢发育和激素分泌过程中起着重要作用^[15]。Wnt通路能通过激活 β -catenin提高FSH的作用效果,因而促进腔前卵泡的生长,然而,过度活化 β -catenin对LH激素诱导的排卵和黄体化产生不利的影响^[16]。

鉴于Wnt家族基因和蛋白对卵巢发育的重要作用,我们假设Wnt家族成员介导了铜影响黄颡鱼卵巢发育和激素分泌的调控。所以,作为深入解析这些成员功能的第一步,本研究首先克隆了黄颡鱼Wnt家族4个基因(Wnt5a、Wnt5b、Wnt7a和Wnt9b)全长的cDNA序列,探讨了它们的组织表达模式;在此基础上研究了水体铜暴露对这些基因mRNA表达的影响,为深入研究Wnt家族基因在铜影响鱼类卵巢发育和激素分泌中所起的作用奠定基础,并解析鱼类Wnt家族基因的功能提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验鱼

本实验的黄颡鱼为一龄黄颡鱼,均购自武汉市上涉湖养殖场(东经114°15',北纬30°8'),分为2组。第一组黄颡鱼用于Wnt家族4个基因cDNA序列的克隆和组织表达水平的测定。用于基因克隆的黄颡鱼组织样品为肝脏和卵巢组织。用于基因表达谱测定的组织包括黄颡鱼的脑、脾脏、肾、鳃、心脏、肌肉、脂肪、肝脏和卵巢组织。取样参照本实验室的方法^[17,18]。

第二组黄颡鱼用于检测水体铜暴露对Wnt家族4个基因表达水平的影响。实验策略参照^[14]。简单说来,216尾规格均一的健康黄颡鱼[平均体重:(10.2±0.2)g,平均值±标准误]随机放入9个300L玻璃纤维缸中,每缸24尾。分别暴露在铜浓度为0(对照)、30(低)和60(高) $\mu\text{g/L}$ 的水体中,每个处理设3个重复(即3个缸),每天换水1次。水中铜浓度通过电感耦合等离子体质谱仪(ICP-MS)测定^[14],每周测定2次,实测值分别为(3±1)、(31±2)和(62±3) $\mu\text{g Cu/L}$ (平均值±标准误, $n=16$)。实验期间,黄颡鱼每天饱食投喂商业饲料2次[饲料Cu含量:(3.1±1)mg Cu/kg,平均值±标准误, $n=3$],每天换水1次。实验持续8周,在28d和56d时进行取样,每缸取6尾黄颡鱼提RNA用于基因表达测定。

1.2 实验药品

RNA提取试剂盒(Trizol Reagent)、逆转录试剂盒、3'-Full RACE Kit试剂盒、5'-Full RACE Kit试剂盒、荧光定量试剂盒、凝胶纯化回收试剂盒、

Taq酶、DNA Marker(2000)、dNTP等试剂购自大连宝生物公司(TaKaRa),胰蛋白胍和酵母粉购自Sigma公司,无水乙醇、氯仿、异丙醇等为中国国药分析纯产品。

1.3 Wnt家族基因cDNA序列的克隆

参照本实验室已有的方法^[17,18]。简要步骤如下:总RNA的提取参照Invitrogen公司的Trizol说明书进行。总RNA的质量通过琼脂糖凝胶电泳进行检测,其浓度及 A_{260}/A_{280} 通过Nanodrop ND2000分光光度计测定。然后,以提取的总RNA为模板,用TaKaRa公司的反转录试剂盒(PrimeScriptTM II 1st Strand cDNA Synthesis Kit)合成第一链cDNA。

根据GenBank及Ensembl数据库中已报道的鱼类Wnt家族基因序列,设计简并引物(表1),以扩增Wnt5a、Wnt5b、Wnt7a和Wnt9b基因cDNA核心片段。PCR反应程序如下:94℃预变性4min;94℃ 30s,55℃ 30s,72℃ 1min,30个循环;72℃延伸5min。PCR体系包括500 ng cDNA template、0.2 $\mu\text{mol/L}$ primer、5 μL 10×Ex Taq Buffer、2.5 mmol/L dNTP和1.25 U Ex Taq polymerase (TaKaRa,日本)。然后分别设计3'和5' RACE特异性引物(表1)进行巢式PCR反应,Outer-PCR反应参数为:94℃预变性3min;然后94℃ 30s,55℃ 30s,72℃ 1min,共25个循环;最后72℃再延伸10min。Inner-PCR反应参数为:94℃预变性3min;然后94℃ 30s,55℃ 30s,72℃ 1min,共30个循环;最后72℃终延伸10min。

1.4 序列分析

用DNASar软件将扩增得到的核心片段、3'和5'末端序列拼接,从而获得基因的cDNA全长序列。获得的核苷酸序列经NCBI进行BLAST,以确定该序列对应的基因亚型(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)。同时,运用DNASar软件找出开放阅读框(ORF)并翻译成氨基酸序列。序列比对和氨基酸同源性分析使用Clustal-W软件。进化树用MEGA 5.0软件采用邻接法(NJ)构建^[19],选择的最适进化模型为JTT+G^[20],每个节点的可信值进行1000次重复计算。

1.5 基因的组织分布和表达分析

参照文献^[17,18]采用实时荧光定量PCR(qPCR)方法检测,荧光定量引物见表2。qPCR反应参数为:95℃预变性30s;95℃ 5s,57℃ 30s,72℃ 30s,共40个循环。相对表达水平采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算^[21]。选用双内参(β -actin和gapdh)进行标准化。我们的预实验表明这2个内参组合在黄颡鱼不同组织及不同铜暴露浓度下的表达水平没有显著差异。

表 1 *Wnt5a*、*Wnt5b*、*Wnt7a*和*Wnt9b*基因克隆的引物序列Tab. 1 Primers used for the cDNAs cloning of *Wnt5a*, *Wnt5b*, *Wnt7a* and *Wnt9b* genes

引物名 Primers	序列 Sequences (5'—3')
Primers for partial fragment	
<i>Wnt5a</i> -F	TACGACAAGTDCCTGTCCGG
<i>Wnt5a</i> -R	CTTGCDACAAACTGATCGA
<i>Wnt5b</i> -F	TACCTACABCCTTACTCCGT
<i>Wnt5b</i> -R	CTTGCAVACGAACTGGTCGA
<i>Wnt7a</i> -F	CTCATACCKCAAACCCATGG
<i>Wnt7a</i> -R	CTCKTCCACAGCACATCAAG
<i>Wnt9b</i> -F	CGTGANTCCAAAGTAAGC
<i>Wnt9b</i> -R	GCAGCAGGCAKGC GGTC
Primers for 3' RACE PCR	
3' <i>Wnt5a</i> -1	GAGCCGAGCCCAGACTAC
3' <i>Wnt5a</i> -2	ACGGGCTCGCTGGGCACG
3' <i>Wnt5b</i> -1	TAACGCTCCCACCACCGA
3' <i>Wnt5b</i> -2	GCACAGGCTCGCTGGGAA
3' <i>Wnt7a</i> -1	ACTTGATGTGCTGTGGACGAG
3' <i>Wnt7a</i> -2	CCTATGTTAGTAAGCATCCGTGA
3' <i>Wnt9b</i> -1	ACTTTATGAGAAGAACGA
3' <i>Wnt9b</i> -2	GTCATTTACCTGTCTATC
3' RACE Outer	TACCGTCGTCCACTAGTGATTT
3' RACE Inner	CGCGGATCCTCCACTAGTGATTTCACTATAGG
Primers for 5' RACE PCR	
5' <i>Wnt5a</i> -1	TTCATAGCCAGAGACCACCA
5' <i>Wnt5a</i> -2	TACTGCATGTGGTCTCTGGTA
5' <i>Wnt5b</i> -1	AGCTGGCACAGCTTCTCTCTG
5' <i>Wnt5b</i> -2	TCCACCGTGTGCAGTTCCA
5' <i>Wnt7a</i> -1	ATGCTCCCTGCTTTAGTGT
5' <i>Wnt7a</i> -2	CCCTTACCTGGTGCTATTT
5' <i>Wnt9b</i> -1	CGTGAGTCCAAAGTAAGC
5' <i>Wnt9b</i> -2	ATTGCGAACTGGTAGCG
5' RACE Outer	CATGGCTACATGCTGACAGCCTA
5' RACE Inner	CGCGGATCCACAGCCTACTGATGATCAGTCGATG

Note: K-G/T; M-A/C; R-A/G; S-G/T; Y-C/T; B-G/T/C; D-G/A/T; H-A/T/C; V-G/A/C; N-A/T/G/C

1.6 数据分析

结果采用平均值±标准误(Mean±SEM) 进行表示。统计分析之前, 采用Kolmogorov-Smirnov检验所有数据的正态分布性。不同处理间方差的同质性使用Bartlett检验。实验处理组之间进行单因素方差分析和Duncan's多重比较检验。显著性水平取0.05。采用SPSS 19.0软件(SPSS, Michigan Avenue, Chicago, IL, USA) 进行数据分析处理。

2 结果

2.1 *Wnt5a*、*Wnt5b*、*Wnt7a*和*Wnt9b*序列的分子特征及进化分析

本研究通过RT-PCR和RACE方法获取*Wnt5a*、*Wnt5b*、*Wnt7a*和*Wnt9b*基因的cDNA全长序列, 长度分别为1984、2905、2158和1622 bp。序列分析显示, 它们的cDNA序列ORF长度分别为1124、1124、1049和1073 bp, 翻译成蛋白所得到的氨基酸数分别为375、375、350和358。黄颡鱼除WNT7A以外, WNT5A、WNT5B和WNT9B氨基酸序列都有信号肽酶切位点。黄颡鱼WNT5A和WNT5B都有24个保守的半胱氨酸残基, 4个保守的天冬酰胺残基和1个酪氨酸硫酸化位点(图 1)。黄颡鱼WNT7A蛋白有24个保守的半胱氨酸残基(图 2)。黄颡鱼WNT9B有23个保守的半胱氨酸残基和1个N糖基化位点(图 3)。

多肽序列比对发现黄颡鱼WNT5A、WNT5B、WNT7A和WNT9B氨基酸序列与其他鱼类和哺乳类的同源性分别为78.6%—83.4%、76.3%—88.4%、85.9%—89.3%和58.9%—85.9%。

黄颡鱼和其他脊椎动物WNTs氨基酸的进化树见图 4。在进化树中, 所有硬骨鱼WNTs独立聚集

表 2 荧光定量引物

Tab. 2 Primers used for real-time PCR

基因名 Gene	正向引物 Forward primer (5'—3')	反向引物 Reverse primer (5'—3')	长度 Size (bp)	登录号 Accession No.
<i>Wnt5a</i>	AAGACCTTCCACGAGACTGG	ATCATGAGTCGTGCGCTTTC	104	KY053801
<i>Wnt5b</i>	ATAGATCATGCACGCACCCT	AACTCACCTACACGCCGGAA	144	KY053802
<i>Wnt7a</i>	TTCACCTATGCCATCATTGCT	CACCCCACTTCCAACCCTC	117	KY421674
<i>Wnt9b</i>	GAAGTACAGCACCAGGTTCTCTC	TTCCAGCATGTCCGCACT	162	KY130404
<i>β-actin</i>	GCACAGTAAAGGCGTTGTGA	ACATCTGCTGGAAGGTGGAC	127	EU161065
<i>Gadph</i>	CACTGCCACCCAGAAGACA	AGGGACACGGAAAGCCAT	166	JQ068865
18S rRNA	CTGCCGGTGGTCTTCTTCCA	ATTCAGCGGGTCTGCTCGTC	185	GQ465236
<i>B2m</i>	GCTGATCTGCCATGTGAGTG	TGTCTGACACTGCAGCTGTA	185	KP938520
<i>Ubce</i>	TCAAGAAGAGCCAGTGGAGG	TAGGGGTAGTCGATGGGGAA	147	KP938524
<i>Hprt</i>	ATGCTTCTGACCTGGAACGT	TTGCGGTTCACTGCTTTGAT	180	KP938523
<i>Efla</i>	TGGAAGGTCGAGCGTAAGG	GCAGAGGAAGGCGAAGAGG	112	KR061492

Pf_Wnt5a MLFMRPSSSGVVRAMDRHGVAI TFLAFFMQVVEATSWWSLAMN. PLLI PEAYI GAQ	60
Pf_Wnt5b MLFMRPSSSGVVRAMDRHGVAI TFLAFFMQVVEATSWWSLAMN. PLLI PEAYI GAQ	60
Dr_Wnt5a MMLLKLKWTSSGVKDTPHLLFI TFCVFFLEI VDANSWWSLAMN. PLLI PEVYI GGQ	60
Dr_Wnt5b MDVRMNGHLLAVTLI VCNSQLLVANSWWSLAMN. PI QRPEMYI GAQ	49
Am_Wnt5a MFFRRLFWSGCVGAMDRHGVMAI TFLAFFMQVVEATSWWSLAMN. PLLI PEAYI GAQ	59
Am_Wnt5b	MSHVRRFYFLSFLTGRGMDAI QSLRFI LTI TLLACSSQRLAHANSWWSLAMN. PI QRPEMYI GAQ	67
Hs_Wnt5a MAGSAMSSKFFLVALAI FFSFAQVVI EANSWWSLGMNPNVQMSEVYI GAQ	51
Hs_Wnt5b MPSLLLLFTAALLSSVAQLLTDANSWWSLALN. PVQRPEMFI GAQ	45
# * #		
Pf_Wnt5a	PLCSQLVGLSKGQKKL CQL YQDHMQYI GEGAKTGI RECQYQFRHRRVNCSTVDNSSVF GRVMQI GSRE	128
Pf_Wnt5b	PLCSQLVGLSKGQRKLCQL YQDHMVYI GEGAMTGI KECQYQFRQRRVNCSTVDNTSVF GRVMHI GSRE	128
Dr_Wnt5a	PLCSQLSGLSKGQKKL CQL YQDHMQYI GEGAKTGI RECQHQFRHRRVNCSTVDNSTVL GRVMHI GSRE	128
Dr_Wnt5b	PLCSQLTGLSGGQRKLCQL YQDHMVYI GEGAKTGI KECQYQFRQRRVNCSTVDNTSVF GRVMHI GSRE	117
Am_Wnt5a	PLCSQLAGLSKGQKKL CQL YQDHMQYI GEGAKTGI RECQYQFRHRRVNCSTVDNSSVF GRVMQI GSRE	127
Am_Wnt5b	PLCSQLTGLSGGQRKLCQL YQDHMVYI GEGAKTGI KECQYQFRQRRVNCSTVDNTSVF GRVMQI GSRE	135
Hs_Wnt5a	PLCSQLAGLSGGQKKLCHLYQDHMQYI GEGAKTGI KECQYQFRHRRVNCSTVDNTSVF GRVMQI GSRE	119
Hs_Wnt5b	PVCSQLPGLSPGQRKLCQL YQEHMAYI GEGAKTGI KECQHQFRQRRVNCSTADNASVF GRVMQI GSRE	113
* * *		
Pf_Wnt5a	AAFTYAI SAAGVNVAVSRACREGELSSCGCSRAARPKDL PRDWLVGGCGDNLYGYRFSKEFVDARER	196
Pf_Wnt5b	AAFTYSI SAAGVNVAVSRACREGELSTCGCSRASRPKEL PRDWLVGGCGDNVNYGYRFAREFVDARER	196
Dr_Wnt5a	SAFAFAI SAAGVLHAVSRACREGALSSCGCSRASRPKDL PRDWLVGGCGDNLYGYRFSREFVDARER	196
Dr_Wnt5b	TAFITYAVSAAGVNVAVSRACREGELSTCGCSRAARPRDL PRDWLVGGCGDNVNYGYRFAREFVDARER	185
Am_Wnt5a	AAFTYAI SAAGVNVAVSRACREGELSSCGCSRAARPKDL PRDWLVGGCGDNLYGYRFSKEFVDARER	195
Am_Wnt5b	TAFITYAI SAAGVNVAVSRACREGELSTCGCSRAARPRDL PRDWLVGGCGDNVNYGYRFAREFVDARER	203
Hs_Wnt5a	TAFITYAVSAAGVNVAVSRACREGELSTCGCSRAARPKDL PRDWLVGGCGDNI DYGYRFAKEFVDARER	187
Hs_Wnt5b	TAFTHAVSAAGVNVAVSRACREGELSTCGCSRTARPKDL PRDWLVGGCGDNVEYGYRFAKEFVDARER	181
=====		
Pf_Wnt5a	EKTYEKASMESARLMMNLHNNEAGRMRVSDLAHVSCCKCHGVSGSCSLKT CWLQLADFRKVGDAL KEKY	264
Pf_Wnt5b	EKNYAKGSI DHARTLMMNLQNNEAGRMVYNLANVACKCHGVSGSCSLKT CWLQLADFRRVGFEFL KEKY	264
Dr_Wnt5a	EKTFKGSAAESARQMMNLHNNEAGRRI VSDLADVSCCKCHGVSGSCSLKT CWLQLADFRKVGDLV KEKY	264
Dr_Wnt5b	EKNYPRGSVEHARTLMMNLQNNEAGRMVYNLANVACKCHGVSGSCSLKT CWLQLADFRRVGFEFL KEKY	253
Am_Wnt5a	EKSYDKASMENARLLMMNLHNNEAGRMRVSDLAHVSCCKCHGVSGSCSLKT CWLQLADFRKVGDAL KEKY	263
Am_Wnt5b	EKNYPRGSI DHARTLMMNLQNNEAGRMVYNLANVACKCHGVSGSCSLKT CWLQLADFRRVGFEFL KEKY	271
Hs_Wnt5a	ERI HAKGSYESARI LMMNLHNNEAGRRTVYNLANADVACKCHGVSGSCSLKT CWLQLADFRKVGDAL KEKY	255
Hs_Wnt5b	EKNFAKGSSEEGRVLMMNLQNNEAGRRAVYKMAADVACKCHGVSGSCSLKT CWLQLAEFRKVGDRLL KEKY	249
* # * # *		
Pf_Wnt5a	DSAVAMKVNTRGKLVQVHSKFNSTPNHDLVYVPEPSDYCVQNHST GSLGTQGRLCNKTSSEGMDGCALM	332
Pf_Wnt5b	DSATAMRI NRRGKLEQVNQRFNAPTTEDLVYI DSPDYCLRNEST GSLGTHGRLCNKTSSEGMDGCALM	332
Dr_Wnt5a	DSAAAMRMNRRGKLVQVHSKFNSTPNHDLVYI DSPDYCVI RNSSSGSLGTQGRLCNKTSSEGMDGCALM	332
Dr_Wnt5b	DSAAAMRI NRRGKLELVNRRFNPTGEDLVYI DSPDYCLRNETT GSLGTQGRLCNKTSSEGMDGCALM	321
Am_Wnt5a	DSAAAMKLNRRGKLVQVHSKFNSTPNHDLVYI DSPDYCVI FNRTT GSLGTQGRLCNKTSSEGMDGCALM	331
Am_Wnt5b	DSAAAMRI NRRGKLEQVNRRFNPTGEDLVYI DSPDYCLRNEST GSLGTQGRLCNKTSSEGMDGCALM	339
Hs_Wnt5a	DSAAAMRLNSRGKLVQVNSRFNSTPTQDLVYI DSPDYCVRNEST GSLGTQGRLCNKTSSEGMDGCALM	323
Hs_Wnt5b	DSAAAMRVTRKGRLELVNSRFTQPTPEDLVYVDPSPDYCLRNEST GSLGTQGRLCNKTSSEGMDGCALM	317
** * * ** * *		
Pf_Wnt5a	CCGRGYDQFKATLVERCHCKFHMCYVVKCKRCTSLVDQFVC	373
Pf_Wnt5b	CCGRGYDQFKTYKHERCHCKFHMCYVVKCKRCTSLVDQFVC	373
Dr_Wnt5a	CCGRGYDQYKAELVERCHCKFHMCYVVKCKRCSI VDDQYVC	373
Dr_Wnt5b	CCGRGYDQFKTYKHERCHCKFHMCYVVKCKRCTSLVDQFVC	362
Am_Wnt5a	CCGRGYDQFTATLTERCHCKFHMCYVVKCKRCSRKVDQFVC	372
Am_Wnt5b	CCGRGYDQFKTYKHERCHCKFHMCYVVKCKRCTSLVDQFVC	380
Hs_Wnt5a	CCGRGYDQFKTVQTERCHCKFHMCYVVKCKKCTEI VDDQFVC	364
Hs_Wnt5b	CCGRGYNQFKSVQVERCHCKFHMCYVVKCKKCTEI VDDQYI C	358

图1 黄颡鱼(Pf: *Pelteobagrus fulvidraco*)WNT5A和WNT5B氨基酸序列与斑马鱼(Dr: *Danio rerio*)、墨西哥丽脂鲤(Am: *Astyanax mexicanus*)和人类(Hs: *Homo sapiens*)比对分析

Fig. 1 Alignment of *P. fulvidraco* (Pf: *Pelteobagrus fulvidraco*) WNT5A and WNT5B amino acid sequences with other species (Dr: *Danio rerio*; Am: *Astyanax mexicanus*; Hs: *Homo sapiens*)

灰色阴影部分表示相同的氨基酸残基; 上划线表示预测的信号肽酶切位点; 星号表示24个保守的半胱氨酸残基; 井号表示在寡糖连接一致区域的4个保守的天冬酰胺残基; 上划线表示Wnt-1家族特征, 实心点表示酪氨酸硫酸化位点

The identical residues are shaded with light grey. The region of potential signal peptidase cleavage sites (overline), 24 cysteines residues conserved among most Wnt5a and Wnt5b proteins (asterisks), 4 conserved asparagine residues in oligosaccharide linkage consensus sequences (sharp), the Wnt1 “family signature” (double overline) and the conserved tyrosine sulfation site (dot) are indicated

成一簇, 而两栖类和哺乳类WNTs聚集成另外一簇。与其他硬骨鱼类相比, 黄颡鱼WNT5A与墨西哥丽脂鲤(*Astyanax mexicanus*)比较接近, 黄颡鱼WNT9B与青鳉(*Oryzias latipe*)最近。黄颡鱼

WNT5B与墨西哥丽脂鲤(*Astyanax mexicanus*)和斑马鱼(*Danio rerio*)比较接近。硬骨鱼类WNT7A先与青鳉(*Oryzias latipes*)和斑马鱼(*Danio rerio*)聚成一簇, 再与黄颡鱼WNT7A共同聚成一簇。

Pf_Wnt7a	NSRKTRRVI FHI FLCLGI I YLKI GGFSSVVALGASII * CNKI PGLAPRQRTI * CQSRPDAI I VI GEGAQM	68
Dr_Wnt7a	NSRKTRRVMFHI FLCLGI I YLKMGGFSTVLALGASII CNKI PGLAPRQRI I CQSRPDAI I VI GEGAQM	68
Ol_Wnt7a	NSRRTRRVI LRVLLCLGI VYLKI GGFSSVVALGASII CNRI PGLAPRQRI I CQSRPDAI I VI GEGAQM	68
Hs_Wnt7a	MNRKARRCLGHLFLSLGMVYLRI GGFSSVVALGASII CNKI PGLAPRQRAI CQSRPDAI I VI GEGSQM	68
Pf_Wnt7a	GI NE CQF QF RHGRWNCS AL GERTVF GKEL KVGSK EAAFTYAI I AAGVAHAI TAACTQGTLSGCGCDKE	136
Dr_Wnt7a	GI NE CQF QF KHGRWNCS AL GERTVF GKEL KVGSK EAAFMYAI I AAGVAHAI TSACTRGNLSECS CDKD	136
Ol_Wnt7a	GI NE CQF QF KHGRWNCS AL GERTVF GKEL KVGSK EAAFTYAI I AAGVAHAI TAACTQGNLSDCS CDKE	136
Hs_Wnt7a	GLDE CQF QF RNGRWNCS AL GERTVF GKEL KVGSK EAAFTYAI I AAGVAHAI TAACTQGNLSDCGCDKE	136
Pf_Wnt7a	KQGFY NQEE GWKVGGS ADI RYGLS FSKMFVDAREI KQNARTL MNL HNNE VGRKI LEKNNRLECKCHG	204
Dr_Wnt7a	KQGFY AHDNGWKVGGS ADVRYGLGF S KVFMDAKEI KHSARTL MNL HNNE VGRKVLERNVRL ECKCHG	204
Ol_Wnt7a	KQGFY . . . KGWVGGS ADI RYGLGF S KDFI DAREVKQNARTL MNL HNNE VGRKVL EKNRLECKCHG	201
Hs_Wnt7a	KQGQYHRDE GWKVGGS ADI RYGI GF AKVVDAREI KQNARTL MNL HNNE AGRKI L EENKLECKCHG	204
Pf_Wnt7a	VS GS CTTKT CMTTLPKF RQLGYI LKDKYYQAVQVE PVRAS RNKRPTFLKI KKPYSYRKPMDTDLVYI E	272
Dr_Wnt7a	VS GS CATRTCMTTLPKF RELGYI LKDKYTS AI HVEPVKATRHKRPTFLKI KKPYSYRKPMDTDLVYI E	272
Ol_Wnt7a	VS GS CTTKT CMTTLPKF RELGYI LK EKYA QAVHVE PVKAS RNKRPKFLKI KKTYSYQKPLDTDLVYI D	269
Hs_Wnt7a	VS GS CTTKT CMTTLPQF RELGYVLKDKYNEAVHVE PVRAS RNKRPTFLKI KKPLSYRKPMDTDLVYI E	272
Pf_Wnt7a	KSPNYCEADPVT GSVGT QGRI CNKTAQQAN. SCDL NCCGRGYNT HQYS RVMQCNCCKFL MCCYVKCNTC	339
Dr_Wnt7a	KSPNYCEADLRS GSI GTQGRVCNKT L NHPNGCDL NCCGRGYNT HQYS RVMQCNCCKF MCCYVKCNTC	340
Ol_Wnt7a	KSPNYCEADHVT GSLG TKGRVCNKT IVQHI S GCDL NCCGRGYNT HQYS RVMQCNCCKFL MCCYVKCNTC	337
Hs_Wnt7a	KSPNYCEE DPVT GSVGT QGRACNKT APQAS. GCDL NCCGRGYNT HQYARVMQCNCCKF HMCCYVKCNTC	339
Pf_Wnt7a	SERTEVYTC*	348
Dr_Wnt7a	SERTEVYTC	349
Ol_Wnt7a	SERTEVYTC	346
Hs_Wnt7a	SERTEMYTC	348

图2 黄颡鱼(Pf: *Pelteobagrus fulvidraco*) WNT7A氨基酸序列与斑马鱼(Dr: *Danio rerio*)、青鳉(Ol: *Oryzias latipes*)和人类(Hs: *Homo sapiens*)和其他硬骨鱼类比对分析

Fig. 2 Alignment of *P. fulvidraco* (Pf: *Pelteobagrus fulvidraco*) WNT7A amino acid sequences with other species (Dr: *Danio rerio*; Ol: *Oryzias latipes*; Hs: *Homo sapiens*)

灰色阴影部分表示相同的氨基酸残基; 星号表示24个保守的半胱氨酸残基

The identical residues are shaded with light grey. 24 cysteines residues conserved among most Wnt7a proteins (asterisks) are indicated

2.2 *Wnt5a*、*Wnt5b*、*Wnt7a*和*Wnt9b*序列的组织表达模式

*Wnt5a*的mRNA在肌肉表达最高, 其次是脂肪组织, 而在其他组织(如脑、脾脏、肾脏、鳃、心脏、肝脏和卵巢)中无显著差异(图5A); *Wnt5b*在脾脏中的表达最高, 而在其他组织中无显著性差异(图5B); *Wnt7a*在肌肉中表达最高, 其次是脑、卵巢、脂肪和鳃, 而在其他组织中无显著性差异(图5C); *Wnt9b*在肌肉中表达最高, 而其他组织无显著性差异(图5D)。

2.3 水体铜暴露对*Wnt5a*、*Wnt5b*、*Wnt7a*和*Wnt9b*基因表达水平的影响

在暴露28d时, *Wnt7a* mRNA水平在30 μg Cu/L组最高, 其他2组差异不显著(图6A)。 *Wnt5a*、*Wnt5b*和*Wnt9b*基因的mRNA表达各个处理组无显著性差异。在暴露56d(图6B), *Wnt5b*在60 μg Cu/L组最低, 其他2个组差异不显著; *Wnt9b* mRNA

水平在30 μg Cu/L组最高, 其他2组差异不显著。

3 讨论

3.1 *Wnt5a*、*Wnt5b*、*Wnt7a*和*Wnt9b*序列的分子特征与进化分析

本研究克隆得到了黄颡鱼*Wnt5a*、*Wnt5b*、*Wnt7a*和*Wnt9b*基因的cDNA全长序列。分析这4个基因的蛋白序列发现, 它们具有一些保守的结构域, 如N-糖基化位点、信号肽酶切位点和保守的半胱氨酸残基等^[22-25]。本研究指出, WNT蛋白富含半胱氨酸, 这些半胱氨酸之间形成的二硫键对其正确折叠非常重要。N-糖基化是Wnt蛋白的一个重要修饰, 它们对Wnt的分泌和行使正常功能至关重要^[26]。多肽序列比对发现, 黄颡鱼WNT5A、WNT5B、WNT7A和WNT9B氨基酸序列与其他鱼类和哺乳类的同源性分别为78.6%—83.4%、76.3%—88.4%、85.9%—89.3%和58.9%—85.9%, 这与在哺乳动物中的报道相近^[22, 23, 27, 28]。进化树分析进一步发现,

Pf_Wnt9b	MRAG...TACLRL...LSALCIILHSHAAAYFGLTGQEP [~] LAFLLSSP.YSDESAGGKAHKQCEQMTL [~] T	62
Dr_Wnt9b	MRTGLPRTACPLR...LIALCILL...HAAAYFGLTGREP [~] LVLFPGP.FANEP [~] TNGKAHLKQCEQMTL [~] R	63
Am_Wnt9b	MRTGLPRTACLLPLTI [~] ALCALFA...HAAAYFGLTGREP [~] LLFLPSP.HPLEPPGGKAHKQCEQLSL [~] T	65
Hs_Wnt9b	MRPP...PALALA...GLCLLALPAAAA [~] YFGLTGREVL [~] TPFPGLGTAAAPAQGGAHLKQCDDLKLS	61
Pf_Wnt9b	RRQKRACRRREP [*] GMAETLRESVRLS [*] QMECRYQFRNERWNCSDGRGSL [~] LKRAF [~] KETAFL [~] LAVSSAALS [~] H	130
Dr_Wnt9b	RRQKRLCRREPGLAETLRESVRLS [*] LLECRYQFRNERWNCSDGRGSL [~] LKRGF [~] KETAFL [~] LAVSSAALS [~] H	131
Am_Wnt9b	RRQKRVCRRREPGLPETLRESVRLS [*] LLECRYQFRNERWNCSDGRGSL [~] LKRAF [~] KETAFL [~] LAVSSAALS [~] H	133
Hs_Wnt9b	RRQKQLCRREPGLAETLRDAHLGLLECFQFRHERWNCSELEGRMGLL [~] KRGF [~] KETAFL [~] YAVSSAAL [~] TH	129
Pf_Wnt9b	TLAKACSSGRMERTCDDT [*] PGLQOREAWQWGVCGDNLKYS [*] TRFLKKFLGQKRVS [*] KDLRAQVDAHNI [~] NA	198
Dr_Wnt9b	ALAKACSSGRMERTCDDSPGLQHREAWQWGVCGDNLKYS [*] TKFLKKFLGQKRVS [*] KDLRAQI [~] DAHNI [~] NV	199
Am_Wnt9b	ALAKACSSGRMERTCDDSPGLEQREAWQWGVCGDNLKYS [*] TKFLKKFLGQKRVS [*] KDLRAQI [~] DAHNI [~] NV	201
Hs_Wnt9b	TLARACSGRMERTCDDSPGLERQAWQWGVCGDNLKYS [*] TKFLSNFLGSKRGNKDLRARADAHN [~] THV	197
Pf_Wnt9b	GI [*] RAVKNGLV [*] TTCKCHGVS [*] GS [*] CAVRT [*] CWKQLSP [*] F [*] YVTGQLLKYRYDTAVRVLS [*] VTNAATGDTEL [~] AGPA	266
Dr_Wnt9b	GI [*] RAVKSGLKTTCKCHGVS [*] GS [*] CAVRT [*] CWKQLSP [*] F [*] QDTGHLLKYRYDTAVRVHS [*] VTNS [*] ATGETELAGP [~] R	267
Am_Wnt9b	GI [*] RAVKSGLKTTCKCHGVS [*] GS [*] CAVRT [*] CWKQLSP [*] F [*] HDTGRLLKFRYDTGVRVLS [*] LTNAATGETELAGP [~] R	269
Hs_Wnt9b	GI [*] KAVKSGLR [*] TTCKCHGVS [*] GS [*] CAVRT [*] CWKQLSP [*] F [*] RETGQVLKLYRYS [*] AVKVS [*] SATNEALGRLEL [~] WAPA	265
Pf_Wnt9b	RRG...DTTPRPHSELVFL [*] EDSPSF [*] CRPSRYSPGTAGRS [*] CAKDTSCSS [*] LCCGRGYNTALRLVTL [~] SCNC	332
Dr_Wnt9b	RHS...ITLPRRPTEL [*] VFL [*] EESPSF [*] CRPSRYSPGTAGRP [*] CSKDTSCSS [*] LCCGRGYNTALRLVTL [~] SCNC	333
Am_Wnt9b	RQGN...GAGPRARP [*] TDL [*] VFL [*] EESPSF [*] CRPSRYSPGTAGRP [*] CAKDTSCGS [*] LCCGRGYNTALRLVTL [~] SCNC	336
Hs_Wnt9b	RQGS [*] LTKGLAPRS [*] GDL [*] VYV [*] EDSPSF [*] CRPSKYS [*] PGTAGRVCSREAS [*] CS [*] LCCGRGYDTQSRL [~] VAF [~] SCHC	333
Pf_Wnt9b	QVRWCCHVE ^{**} CQT [*] CVREEE [*] VYTCKK [*]	356
Dr_Wnt9b	QVRWCCHVE ^{**} CQTC [*] LREEE [*] VYTCKK [*]	357
Am_Wnt9b	QVRWCCHVE ^{**} CQTC [*] LREEE [*] VYTCKK [*]	360
Hs_Wnt9b	QVQWCYVE ^{**} CQCC [*] QVEEL [*] VYTCKK [*]	357

图3 黄颡鱼(Pf: *Pelteobagrus fulvidraco*) WNT9B氨基酸序列与斑马鱼(Dr: *Danio rerio*)、墨西哥丽脂鲤(Am: *Astyanax mexicanus*)和人类(Hs: *Homo sapiens*)比对分析

Fig. 3 Alignment of *P. fulvidraco* (Pf: *Pelteobagrus fulvidraco*) WNT9B amino acid sequences with other species (Dr: *Danio rerio*; Am: *Astyanax mexicanus*; Hs: *Homo sapiens*)

灰色阴影部分表示相同的氨基酸残基; 上划线表示预测的信号肽酶切位点; 波浪号表示潜在的N糖基化位点; 星号表示Wnt9b氨基酸中保守的半胱氨酸残基

The identical residues are shaded with light grey. The region of potential signal peptidase cleavage sites (overlined), the potential N-linked glycosylation site (tilde), 23 cysteines residues conserved among most Wnt9b proteins (asterisks) are indicated

黄颡鱼WNT5A、WNT5B、WNT7A和WNT9B多肽与其他鱼类的亲缘关系与物种的分类地位相符, 与曹梅等^[12]在斑点叉尾鲴中的研究结果相似。

3.2 Wnt5a、Wnt5b、Wnt7a和Wnt9b序列的组织表达模式

研究基因的组织分布模式有助于我们初步了解这些基因的生理功能。Wnt家族成员作为一种信号分子普遍存在于生物体各个组织中, 并参与生物体多种组织细胞的生命过程。然而, 先于我们的研究, 目前在鱼类还没有有关这些基因mRNA组织表达模式的报道。我们的研究表明这4个Wnt基因在黄颡鱼各组织中均有表达, 但不同组织间的表达水平差异很大, 一方面表明Wnt家族的这4个基因在各个组织中起着广泛的作用, 另一方面不同组织差异性的表达模式可能反映了不同组织特有的生物学作用。因此, 这种表达差异被认为是Wnt基因功能的多样性造成的。相似地, 周春娅等^[25]指出海蜇Wnt5基因在不同的发育阶段均有表达, 但存在着明显的发育表达差异。此外, 在卵巢中的表达表明这

些基因可能在卵巢发育和成熟中起着重要的调控作用, 相似的结果在Sanchez等^[15]的研究中得到了证实。

3.3 水体铜暴露对Wnt5a、Wnt5b、Wnt7a和Wnt9b基因表达水平的影响

在本研究中, 我们假设铜对黄颡鱼卵巢发育和激素合成的影响与Wnt通路的变化有关。然而, 无论是在陆生(包括哺乳动物)还是水生动物, 目前还没有关于铜影响这些基因表达水平的报道; 而且, 目前仅见Wnt5a在哺乳动物卵巢发育和激素分泌过程中所起生物学作用的研究, 没有Wnt5b、Wnt7a和Wnt9b生物学功能的类似报道, 因此要进行深入的讨论非常困难。我们的研究表明: 在28d时, 黄颡鱼卵巢中的Wnt7a mRNA水平在30 μ g Cu/L组最高, 其他2组差异不显著; Wnt5a、Wnt5b和Wnt9b基因的mRNA表达各个处理组无显著性差异。而在56d, 卵巢中的Wnt5b在60 μ g Cu/L组最低, 其他2个组差异不显著; Wnt9b mRNA水平在30 μ g Cu/L组最高, 其他2组差异不显著。Wnt家族成员是一类富含半

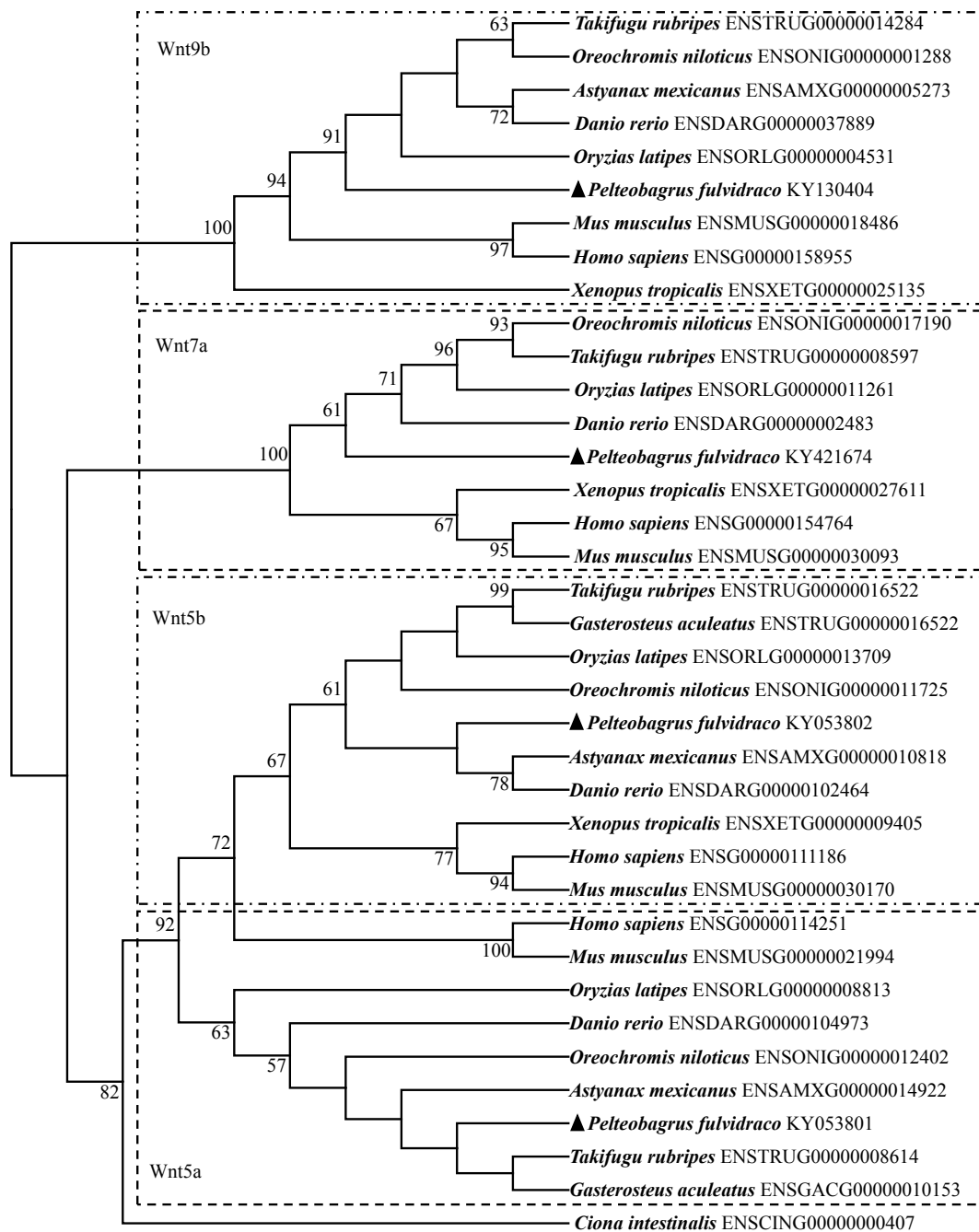


图4 脊索动物Wnts系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree based on the protein sequences of Wnts from *P. fulvidraco* (▲) and other chordate species using the neighbor-joining (NJ) method with 1000 bootstrap replicates

图中▲所示为黄颡鱼。选择的分析方法为NJ, 每个节点的可信值进行1000次重复计算。物种名称后为GenBank和EMBL登录号
GenBank and EMBL accession numbers were shown next to each species

胱氨酸的分泌型糖脂蛋白, 可以通过经典的Wnt/ β -catenin信号通路或者非经典Wnt信号通路 (包括Wnt/ Ca^{2+} 信号通路和Wnt/PCP信号通路) 调控机体的生命活动。有限的研究指出, Wnt5a是非经典Wnt信号通路的配体, 在哺乳动物雌性生殖系统发育过程中发挥了重要的作用。过表达Wnt5a能够抑制颗粒细胞的 β -catenin信号^[29]。Wu等^[7]在黑鲷

(*Acanthopagrus schlegeli*)的研究表明, *Wnt4*基因的上调和*cyp19a*基因的下调伴随着卵巢的生长, 说明Wnt信号通路参与并调控卵巢组织的生长与发育。本研究初步发现*Wnt5b*、*Wnt7a*和*Wnt9b*可能介导了铜影响黄颡鱼卵巢发育和激素合成的变化, 因此, 深入阐明*Wnt5b*、*Wnt7a*和*Wnt9b*在铜影响黄颡鱼卵巢发育和激素合成中的作用机制, 有助于揭示铜

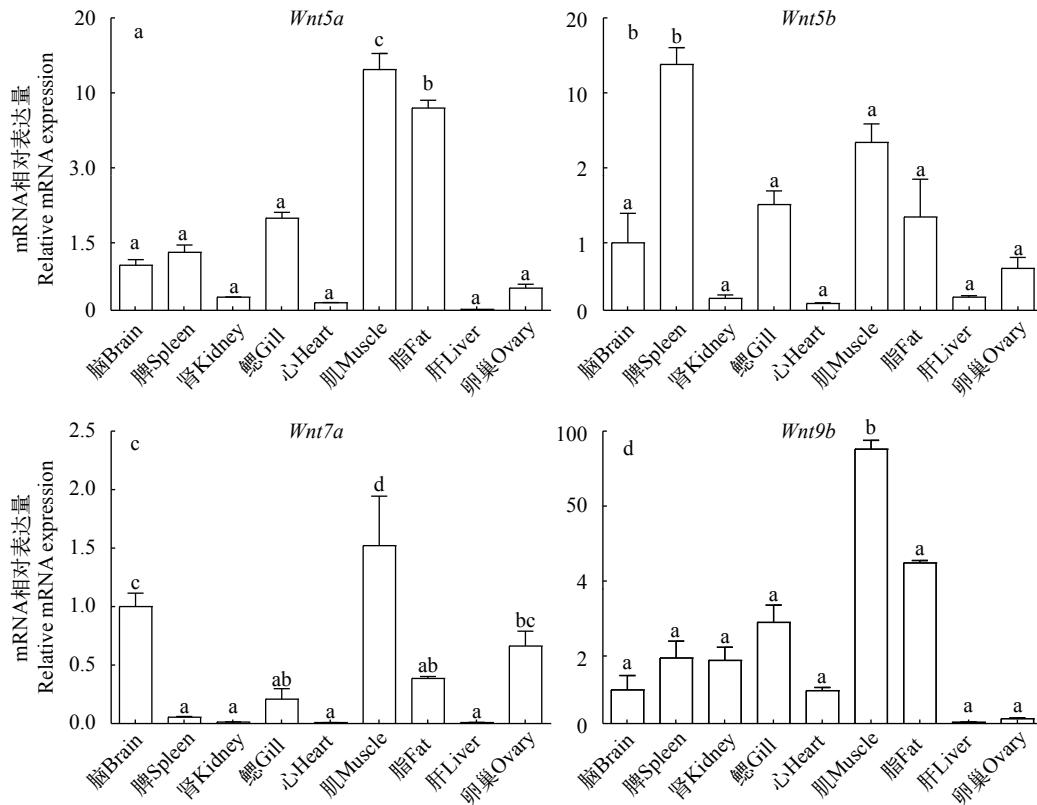


图5 黄颡鱼*Wnts*组织特异性表达分析

Fig. 5 The mRNA level of *Wnts* in the brain, spleen, kidney, gill, heart, muscle, fat, liver and ovary

相对mRNA水平通过qPCR定量,数值(平均值±标准误, $n=3$)用内参基因(β -actin和*gadh*)标准化;不同字母表示同一基因在不同组织中表达差异显著($P<0.05$)

Data (mean±SEM, $n=3$ replicate tanks, and 3 fish were sampled for each tank) were normalized to housekeeping gene (β -actin and *gadh*). Bars that do not share a letter are significantly different among different tissues ($P<0.05$)

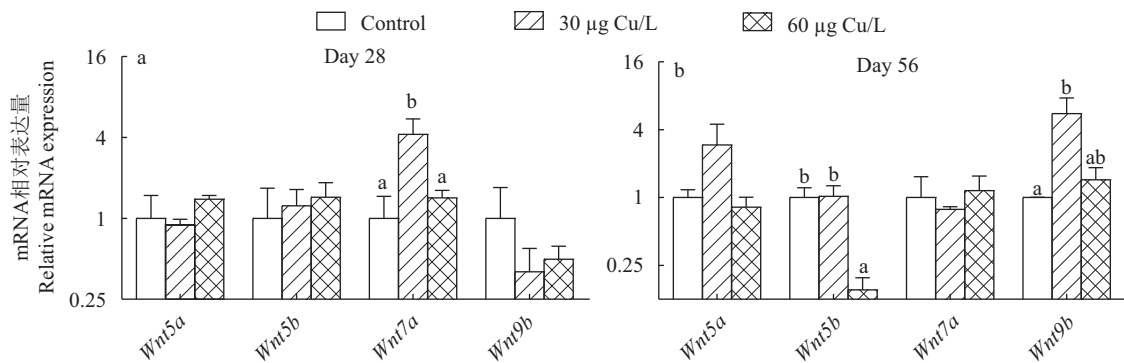


图6 第28天和第56天铜暴露对黄颡鱼卵巢中*Wnts*基因(*Wnt5a*、*Wnt5b*、*Wnt7a*和*Wnt9b*)mRNA表达的影响

Fig. 6 Effect of Cu exposure on the mRNA levels of genes (*Wnt5a*, *Wnt5b*, *Wnt7a* and *Wnt9b*) in the ovary of *P. fulvidraco* on days 28 and 56

结果用平均值±标准误表示 (Mean±SEM, $n=3$), 用内参基因(β -actin和*gapdh*)标准化; 不同字母表示数据间有显著差异($P<0.05$)

Data (mean±SEM, $n=3$ replicate tanks, and 3 fish were sampled for each tank) were normalized to housekeeping gene (β -actin and *gapdh*). Different letters indicate significant differences among groups ($P<0.05$)

影响黄颡鱼卵巢发育和激素合成的机理, 这将为研究铜的繁殖营养和毒性效应提供一个新思路。

本研究获取了*Wnt5a*、*Wnt5b*、*Wnt7a*和*Wnt9b*基因的cDNA全长序列, 为深入解析它们的功能奠定了基础; 这些基因在检测的9个组织中都有表达,

但表达水平相同, 表明它们会以信号分子的形式参与多种组织细胞的生命过程; 铜暴露差异性影响了*Wnt*家族4个基因的mRNA水平, 表明它们的基因功能发生了分化, 并可能介导了铜影响黄颡鱼卵巢发育的调控。

参考文献:

- [1] 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
- [2] Huelsken J, Behrens J. The Wnt signalling pathway [J]. *Journal of Cell Science*, 2002, **115**(21): 3977—3978
- [3] Logan C Y, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease [J]. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2004, **20**(1): 781—810
- [4] MacDonald B T, Tamai K, He X. Wnt/ β -catenin signaling: components, mechanisms, and diseases [J]. *Developmental Cell*, 2009, **17**(1): 9—26
- [5] Yin D Z, Song H Y. Regulation of Wnt Signaling: Mechanisms and biological significance [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2011, **33**(2): 103—111 [尹定子, 宋海云. Wnt信号通路: 调控机理和生物学意义. 中国细胞生物学学报, 2011, **33**(2): 103—111]
- [6] Komiya Y, Habas R. Wnt signal transduction pathways [J]. *Organogenesis*, 2008, **4**(2): 68—75
- [7] 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
- [8] Boerboom D, Paquet M, Hsieh M *et al.* Misregulated Wnt/ β -catenin signaling leads to ovarian granulosa cell tumor development [J]. *Cancer Research*, 2005, **65**(20): 9206—9215
- [9] Hua F, Sun W B, Gei J Y. Molecular cloning of Shh, Wnt5b and Catnb specific gene fragments from zebrafish embryos [J]. *Journal of Oral Science Research*, 2009, **25**(2): 129—131 [华芳, 孙卫斌, 葛久禹. 斑马鱼 Shh, Wnt5b 和 Catnb 特异性基因片段的克隆. 口腔医学研究, 2009, **25**(2): 129—131]
- [10] Liu A, Majumdar A, Schauerte H E, *et al.* Zebrafish wnt4b expression in the floor plate is altered in sonic hedgehog and gli-2 mutants [J]. *Mechanisms of Development*, 2000, **91**(1): 409—413
- [11] Li J Z, Liu Q, Wang D S, *et al.* Molecular cloning and identification of two *WNT4* genes from the medaka (*Oryzias latipes*) [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2012, **36**(5): 983—986 [李建中, 刘琼, 王德寿等. 日本青鳞2种 *WNT4* 基因的克隆及鉴定. 水生生物学报, 2012, **36**(5): 983—986]
- [12] Cao M, Wang X, Cui C, *et al.* Sequence analysis of *Wnt* gene family from catfish [J]. *Journal of Huaihai Institute of Technology* (Natural Science Edition), 2017, **26**(1): 76—81 [曹梅, 王兴强, 崔春辉, 等. 鲶鱼 *Wnt* 基因家族序列分析. 淮海工学院学报(自然科学版), 2017, **26**(1): 76—81]
- [13] Watanabe T, Kiron V, Satoh S. Trace minerals in fish nutrition [J]. *Aquaculture*, 1997, **151**(1): 185—207
- [14] Zhang L H, Luo Z, Song Y F *et al.* Effects and mechanisms of waterborne copper exposure influencing ovary development and related hormones secretion in yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* [J]. *Aquatic Toxicology*, 2016, **178**: 88—98
- [15] Sanchez A M, Viganò P, Quattrone F, *et al.* The WNT/ β -catenin signaling pathway and expression of survival promoting genes in luteinized granulosa cells: endometriosis as a paradigm for a dysregulated apoptosis pathway [J]. *Fertility and Sterility*, 2014, **101**(6): 1688—1696
- [16] Fan H Y, O'Connor A, Shitanaka M, *et al.* Beta-catenin (CTNNB1) promotes preovulatory follicular development but represses LH-mediate ovulation and luteinization [J]. *Molecular Endocrinology*, 2010, **24**(8): 1529—1542
- [17] Wu K, Zheng J L, Luo Z, *et al.* Carnitine palmitoyltransferases I gene in *Synechogobius hasta*: cloning, mRNA expression and transcriptional regulation by insulin in vitro [J]. *Gene*, 2016, **576**(1): 429—440
- [18] Wei C C, Luo Z, Song Y F, *et al.* Identification of autophagy related genes LC3 and ATG4 from yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* and their transcriptional responses to waterborne and dietborne zinc exposure [J]. *Chemosphere*, 2017, **175**: 228—238
- [19] Tamura K, Peterson D, Peterson N *et al.* MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2011, **28**(10): 2731—2739
- [20] Jones D T, Taylor W R, Thornton J M. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences [J]. *Computer Applications in the Biosciences: CABIOS*, 1992, **8**(3): 275—282
- [21] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. *Methods*, 2001, **25**(4): 402—408
- [22] Clark C C, Cohen I, Eichstetter I *et al.* Molecular cloning of the human proto-oncogene Wnt-5A and mapping of the gene (WNT5A) to chromosome 3p14-p21 [J]. *Genomics*, 1993, **18**(2): 249—260
- [23] Qian J, Jiang Z, Li M *et al.* Mouse Wnt9b transforming activity, tissue-specific expression, and evolution [J]. *Genomics*, 2003, **81**(1): 34—46
- [24] Fradkin L G, van Schie M, Wouda R R *et al.* The Drosophila Wnt5 protein mediates selective axon fasciculation in the embryonic central nervous system [J]. *Developmental Biology*, 2004, **272**(2): 362—375
- [25] 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. 海洋与湖沼, 2013, **44**(4): 1115—1122]

- [26] Mason J O, Kitajewski J, Varmus H E. Mutational analysis of mouse Wnt-1 identifies two temperature-sensitive alleles and attributes of Wnt-1 protein essential for transformation of a mammary cell line [J]. *Molecular Biology of the Cell*, 1992, **3**(5): 521—533
- [27] Lejeune S, Huguet E L, Hamby A, *et al.* WNT5A cloning, expression and upregulation in human primary breast cancers [J]. *Clinical Cancer Research*, 1995, **1**(2): 215—222
- [28] Bui T D, Lako M, Lejeune S *et al.* Isolation of a full-length WNT7A gene implicated in limb development and cell transformation, and mapping to chromosome 3p25 [J]. *Gene*, 1997, **189**(1): 25—29
- [29] Topol L, Jiang X, Choi H *et al.* Wnt-5a inhibits the canonical WNT pathway by promoting GSK-3-independent beta-catenin degradation [J]. *The Journal of Cell Biology*, 2003, **162**(5): 899—908

CLONING AND TISSUE EXPRESSION OF FOUR WNT GENES IN YELLOW CATFISH *PELTEOBAGRUS FULVIDRACO* AND THEIR RESPONSE TO COPPER EXPOSURE

ZHANG Li-Han, LUO Zhi, YOU Wen-Jing, LI Dan-Dan, WU Kun and XU Yi-Huan

(Key Laboratory of Agricultural Animal Genetics, Breeding and Reproduction, Ministry of Education, College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: Four full length *Wnt* cDNA sequences, designated *Wnt5a*, *Wnt5b*, *Wnt7a* and *Wnt9b*, were amplified by RT-PCR and RACE approaches from yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. The validated cDNAs of *Wnt5a*, *Wnt5b*, *Wnt7a* and *Wnt9b* were 1984, 2905, 2158 and 1622 bp in length, encoding peptides of 375, 375, 350 and 358 amino acid residues, respectively. The amino acid alignment and phylogenetic analysis revealed that Wnt sequences were relatively conserved among different vertebrates. All *Wnt* mRNAs were expressed in tested tissues (brain, spleen, kidney, gill, heart, muscle, mesenteric fat, liver and ovary) but with variable levels. Cu exposure for 28 days highly induced *Wnt7a* mRNA levels only at 30 µg Cu/L group. Cu exposure had no impact on mRNA levels of *Wnt5a*, *Wnt5b* and *Wnt9b* at day 28. On 56-day Cu exposure, mRNA levels of *Wnt5b* were not lowest at 60 µg Cu/L group and *Wnt9b* were the highest at 30 µg Cu/L group. *Wnt5a* and *Wnt7a* showed no significant differences among three groups. The present study indicated that functional differentiation exists in members of Wnt family, and some members may mediate the effect of Cu exposure on ovary development of yellow catfish.

Key words: *Pelteobagrus fulvidraco*; *Wnt*; Molecular characterization; Tissue distribution; Copper exposure