

圆斑星鲈(*Verasper variegatus*)*wt1* 基因的 克隆与表达分析*

杨珍珍^{1,2} 边力^{1,3} 张岩¹ 陈四清^{1,3} 常青¹
张盛农¹ 刘长琳¹ 葛建龙¹

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 2. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 3. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071)

摘要 圆斑星鲈(*Verasper variegatus*)雌鱼生长快, 成熟雌鱼个体大小是雄鱼的 2 倍以上, 开展性别相关基因的功能研究, 对于探究圆斑星鲈性别决定机制, 建立单性培育技术具有重要意义。本研究获得了 *wt1a* 及 *wt1b* 两个同源基因, *wt1a* 基因全长为 3263bp, 预测开放阅读框(ORF)长为 1245bp, 编码 415 个氨基酸, 5'-UTR 和 3'-UTR 分别长 372bp 和 1640bp; *wt1b* 基因全长为 2312bp, 预测开放阅读框(ORF)长为 1281bp, 编码 427 个氨基酸, 5'-UTR 和 3'-UTR 分别长 369bp 和 659bp。 *wt1a* 基因编码氨基酸分子量为 46.2kDa, 理论等电点为 9.24, 无跨膜结构及信号肽, 在 ORF 末端有 4 个锌指结构, 编码 KTS 三肽; *wt1b* 基因编码氨基酸分子量为 46.95kDa, 理论等电点为 8.99, 无跨膜结构及信号肽, 在 ORF 末端有 4 个锌指结构, 并且编码 KTS 三肽。基因表达结果表明: *wt1a* 和 *wt1b* 基因主要在圆斑星鲈性腺中表达, 精巢的表达高于卵巢, 肾脏的表达量显著高于其他组织, 推测 *wt1a* 基因和 *wt1b* 基因在性腺和肾脏发育过程及功能方面均发挥重要作用; 在早期发育阶段, *wt1a* 基因在原肠期之前微弱表达, 从原肠早期开始逐渐上升至神经胚期表达量达到最高, 之后逐渐下降, 直至孵化阶段, 推测 *wt1a* 基因在圆斑星鲈原始生殖细胞分化过程及性腺发育中发挥重要作用。

关键词 圆斑星鲈; *wt1*; 基因克隆; 表达分析

中图分类号 S917.4 doi: 10.11693/hyh20200300055

肾母细胞瘤系婴幼儿最常见的恶性肿瘤之一, 多发生于 3 岁以内儿童(Pelletier *et al*, 1991), 发病率约为 1/10000(Sharma *et al*, 1992)。1899 年 Max Wilms 首次对肾母细胞瘤进行了详细描述(Kreidberg *et al*, 1993), 因此, 又将其命名为 Wilms 瘤。1990 年 Gessler 等分离克隆出一个与 Wilms 瘤相关的基因(Gessler *et al*, 1990), 命名为 Wilms'tumor 1(*wt1*)。 *wt1* 基因可编码含有锌指结构的蛋白质, 在性腺发育及分化过程中识别、结合和调控雄性性别决定基因 *sry*(Hossain *et al*, 2001)、类固醇生成因子-1(sf-1) (Wilhelm *et al*, 2002)及苗勒管抑制物 *mis*(Hossain *et al*, 2003)等性别

发育关键基因。人类 *wt1* 基因突变会导致性腺和肾脏等器官发育异常及相关功能障碍(Klamt *et al*, 1998), 导致 Denys-Drash 综合征、Frasier 综合征及小儿肾癌等疾病。敲除小鼠 *wt1* 基因后, 其性腺及肾脏等器官均出现发育缺陷, 甚至导致肾功能衰竭(Wiener *et al*, 1996; Moore *et al*, 1999)。由于鱼类特有的基因组复制, *wt1* 基因分化为了 *wt1a* 和 *wt1b* 两个同源基因, 目前已在斑马鱼(*Danio rerio*)(Bollig *et al*, 2006)、青鳉(*Oryzias latipes*)(Klüver *et al*, 2009)、半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)(张红等, 2014)、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)(孙近近, 2016)、黄鳝

*中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费项目, 20603022016005 号。杨珍珍, 硕士研究生, E-mail: 1163603557@qq.com

通信作者: 陈四清, 博士生导师, 研究员, E-mail: chensq@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2020-03-04, 收修改稿日期: 2020-06-08

(*Monopterus albus*)(胡青等, 2014)及尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)(江东能, 2016)等开展了 *wt1* 基因的克隆及功能研究。

圆斑星鲈俗称花斑宝、花片等, 属脊索动物门(Chordata)、硬骨鱼纲(Osteichthyes)、鲈形目(Pleuronectiformes)、鲈科(Pleuronectidae)、星鲈属(*Verasper*)。其外观漂亮, 体型较大, 食性范围广, 生长速度快, 出肉率高, 抗病能力强, 肉质细腻鲜美, 鳍边坚韧有弹性, 富含多种氨基酸、维生素及微量元素, 属于名贵的海水品种, 目前已成为我国北方优良的养殖对象。在生长过程中, 雄性个体 3 年可性成熟, 雌性个体需要 4 年才可达到性成熟, 而且雌性个体的生长明显快于雄性个体。目前, 在圆斑星鲈中仅对 *gnrh* 基因(柳学周等, 2013)、*sox3* 基因(张乐乐, 2018)、*sox9* 基因(张乐乐等, 2018)及 *piwil2* 基因(杨珍珍等, 2020)做了相关研究, 其性别决定和生殖调控的分子机制仍不清楚, 因此我们利用 RACE 末端扩增技术克隆了圆斑星鲈 *wt1a* 和 *wt1b* 基因 cDNA 全长并分析了其序列结构特征, 利用实时荧光定量 PCR 技术对其不同发育时期的胚胎、仔鱼以及雌雄成鱼的不同组织进行表达分析, 以阐明 *wt1a* 和 *wt1b* 基因在圆斑星鲈性腺分化及发育中的作用, 为研究圆斑星鲈性别决定及单性繁育等提供新的靶标基因。

1 材料与方法

1.1 样品制备及 *wt1* 基因全长序列克隆

从山东省烟台天源水产有限公司采集圆斑星鲈不同发育时期的胚胎, 包括单细胞期(卵裂前胚盘隆起时期)(0h)、2 细胞期(4h)、8 细胞期(10h)、16 细胞期(12h)、32 细胞期(13h)、桑椹期(18h)、高囊胚期(20h)、低囊胚期(26h)、原肠早期(27h)、原肠中期(29h)、原肠晚期(77h)、神经胚期(98h)、晶体形成期(136h)、心跳出现期(163h)、孵化前期(188h)、脱膜孵化期(197h)、不同时期的仔稚鱼(孵化后 5d, 10d, 20d, 30d, 45d, 58d, 68d, 78d, 92d)及雌雄成鱼[体长(24.0±0.5)cm, 体重(330±20)g]的不同组织(脑、眼、鳃、心、肝、肠、脾、性腺、肾及肌肉), 将采集的样品用液氮充分研磨, 根据 Trizol(TaKaRa)实际说明书提取各组织的总 RNA, 经 Thermo 紫外分光光度计(NanoDrop 2000)和 1.2%的琼脂糖凝胶电泳检测, 将高质量的 RNA 用 SMARTTM RACE cDNA Amplification RACE (TaKaRa)试剂盒分别合成 3'RACE 和 5'RACE cDNA。之后根据本实验室构建

的转录组数据库获得 *wt1a* 和 *wt1b* 基因的 EST 序列, 利用 Primer Primer 5.0 软件设计 *wt1a* 和 *wt1b* 基因的 3'RACE 和 5'RACE 特异性引物(表 1), 以圆斑星鲈成鱼性腺组织 cDNA 为模板分别进行扩增, PCR 反应体系(20μL)为: Premix TaqTM (LA TaqTM Version 2.0) 10μL、3'或 5'特异性引物 0.8μL、UPM(或 NUP) 0.8μL、RACE-cDNA 1μL 及 ddH₂O 6.4μL。PCR 反应条件为: 94°C 5min; 94°C 30s, 3'或 5'特异性引物温度 30s, 72°C 1min, 35 个循环; 72°C 10min。扩增产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 并在紫外线下切胶, 并用 SanPrep 柱氏 DNA 凝胶回收试剂盒回收, 利用 PMD18-T Vector 试剂盒(TaKaRa)进行连接(PMD18-T Vector 1μL, Solution I 5μL 及纯化产物 4μL), 16°C 反应 3h。之后将连接液加入融化好的 DH5α (Code No 9057, TaKaRa)中培养, 挑取阳性单克隆, 经菌落 PCR 鉴定后, 筛选目的菌液送至华大基因进行测序。

1.2 *wt1* 基因序列分析

使用 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/orfig.cgi>), ExPASy (https://web.expasy.org/compute_pi/), SMART (<http://smart.emblheidelberg.de/>), Signal4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 和 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)在线生物学软件分析基因的开放阅读框、分子量、理论等电点、信号肽及跨膜结构域。并用 DNAMAN (Zemann *et al*, 2006)和 MEGA5.2 (Tamura *et al*, 2011)软件, 进行多重序列比对及构建系统进化树。

1.3 *wt1* 基因的表达特征分析

根据已获得的 *wt1* 基因全长序列, 设计荧光定量特异性引物, β -actin 作为内参基因(表 1)。使用 Applied BiosystemsTM 7500 Real Time PCR instrument 定量仪检测, 反应程序: 95°C 10min; 95°C 30s, 95°C 5s, 60°C 34s, 40 个循环; 95°C 15s; 60°C 1min; 95°C 15s。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 的计算方法分析相对表达量, 通过 SPSS 20.0 软件进行单因素分析, 利用 OriginPro 2017 作图, $P < 0.05$ 代表具有显著性差异。

2 结果

2.1 圆斑星鲈 *wt1* 基因全长和序列分析

通过扩增获得 *wt1a* 基因全长为 3263bp, 经预测开放阅读框(ORF)长为 1245bp, 编码 415 个氨基酸, 5'-UTR 和 3'-UTR 分别长 372bp 和 1640bp。经过生物学分析, 推断 *wt1a* 的 415 个氨基酸分子量为 46.2kDa, 理论等电点为 9.24, 无跨膜结构及信号肽,

表 1 本研究中所使用的引物
Tab.1 Nucleotide sequences of the PCR primers used in this study

引物	序列(5'—3')	目的
<i>wt1a</i> -S1	AGTAAAACCCCTTCCAATGCGAGA	核心验证
<i>wt1a</i> -A1	CTGACATCGCAAAACACCGTA	核心验证
<i>wt1b</i> -S1	CACTTCTCAGGGCAATTCACA	核心验证
<i>wt1b</i> -A1	CTTGGCTCAGATTTACCGTA	核心验证
<i>wt1a</i> -3'GSP-1	TCCGACACTTCTGAACACTGGT	RACE
<i>wt1a</i> -3'GSP-2	AGGAGAGAGGTGTCGTTTCATC	RACE
<i>wt1a</i> -5'GSP-1	CCGAGAAGTGGACGGTGAAGGC	RACE
<i>wt1a</i> -5'GSP-2	CCGACAGAAGTTTGGCTGGCGAC	RACE
<i>wt1b</i> -3'GSP-1	CGCTGGTCCAACCTGTCAGAAGA	RACE
<i>wt1b</i> -5'GSP-1	TGGCTGCTCGGACACGATTCTG	RACE
<i>wt1b</i> -5'GSP-2	TTGGTTCTCCGAAGGCTCCGAC	RACE
UPM-long	CTAATACGACTCACTATAGGGCAA GCAGTGGTATCAACGCAGAGT	RACE 通用引物
UPM-short	CTAATACGACTCACTATAGGGC	RACE 通用引物
NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	RACE 通用引物
<i>wt1a</i> -S2	GACAGGTAGAAAGGTAGAGA	全长验证
<i>wt1a</i> -A2	TCACATACACCCATTAGGA	全长验证
<i>wt1b</i> -S2	ATTCCCATCCGTGTCTTG	全长验证
<i>wt1b</i> -A2	AGTGAGTTCTTGCTCCCGA	全长验证
<i>wt1a</i> -RT-S	AGTAAAACCCCTTCCAATGC	qPCR
<i>wt1a</i> -RT-A	GGCAGTTAAACGGCTTC	qPCR
<i>wt1b</i> -RT-S	GCTGACTGAACCGTATG	qPCR
<i>wt1b</i> -RT-A	TGTAGGGAGAGTTTGGAT	qPCR
β -actin-S	TTCTGGTGATGGTGTGAC	qPCR
β -actin-A	GTGGTGGTGAAGGAGTAG	qPCR
M13-S	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC	菌落 PCR
M13-A	GAGCGGATAACAATTTACACAGG	菌落 PCR

ORF 末端有 4 个锌指结构, 编码 KTS 三肽(图 1)。*wt1b* 基因全长为 2312bp, ORF 长 1281bp, 编码 427 个氨基酸, 5'-UTR 和 3'-UTR 分别长 369bp 和 659bp。*wt1b* 的 415 个氨基酸分子量为 46.95kDa, 理论等电点为 8.99, 无跨膜结构及信号肽, ORF 末端有 4 个锌指结构, 编码 KTS 三肽(图 2)。

2.2 *wt1* 基因同源性和系统发育分析

将 *wt1a* 基因与其他物种进行比对, 结果显示 *wt1a* 基因保守性很高, 与黄尾鲷(*Seriola lalandi*)、尼罗罗非鱼、点带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)及黄鳍 (*Monopterus albus*) 同源性较高, 分别为 94.23%、93.01%、91.59% 及 91.57%, 其次与大黄鱼 (*Larimichthys crocea*)、青鳉及斑马鱼的同源性分别为

89.50%、89.90% 及 74.11%, 并且其锌指结构区氨基酸序列呈现高度保守(图 3)。*wt1b* 基因同样具有高保守性, 与牙鲆及大菱鲆同源性较高, 分别为 97.19% 及 93.21%, 其次与点带石斑鱼、攀鲈 (*Anabas testudineus*)、大黄鱼、尼罗罗非鱼、黄鳍、红鳍东方鲀 (*Takifugu rubripes*) 及青鳉的同源性分别为 89.95%、89.49%、89.02%、88.32%、88.08%、81.34% 及 80.84%。在锌指结构区同样呈现高度保守。系统进化树结果显示(图 5), 哺乳类、鸟类及爬行类聚为一大支, 鱼类的 WT1a 及 WT1b 分别为一大支, 其中圆斑星鲽 WT1b 与大菱鲆 WT1b 聚为一支, 关系较近。此外, 相较于 WT1b, 鱼类 WT1a 与哺乳类等的 WT1 关系较近。

1 AAGCAGTGGTATCAACGAGAAGCTACATGGGCTCAGACCTCTCTCCCTGAGTGAGCTCCATCTCTCTGCTGCTGCGGGACGAAACCGAAGCTCGCAGCTGATCCAGTCTCTCGT
121 GTCTCTTACTTCTTTTATTTCTGACTTTTCTGTGTGCCAGCAAACTTCTGTGCGGACTTAAGTGGTTTCCAGAGCGGCCGTCCCGAGGAGCAACGAGTCCACGACGTGACAGAGAAG
241 AAGAAGCTCTCTCAGGCTCTGCAAGATTGGAGGGTGGGGCTGGTCTGGGTACACAGCCGACAGGTAGAAAGTAGAGATCAAACTTTAAAAATGCTACCAACTCTCTCTCTC
361 CTCCCCTGGACCAGATGGTTTCAGACCTACGTGACCTGAACTCCCTGTGCCCTCTCCCGGGCCCGCCAGCCCGGGTCCCGGCTGACACGCGCCCTCAGTGGGCT
M G S D L R D L N S L L P P L P A G P S P G C P A L P V S T A P Q W A
481 CCAGTCTGGACTTCCACCCCGCCCTCCCTTACTCTCTCTGCGCCGCCACACCCCTGGGTCCACTCTTCATTAAAGCAGGAGCCACCTGGGGAACACAGTGGACCC
P V L D F H P A A S P Y S S L A A P H T P L G S H S F I K Q E P T W G T T V D P
601 CACCACACGAAAGCAGACCCCACTGTGGCTCAGGCCTTCCCGTCCACTTCTCGGGCAGTTTACGGGACGGGGCTGCAGGTACGGGTGACGCTTCCGGGCGCCCTCTCCG
H H H E A D P H C G L S A F T V H F S G Q F T G T G A C R Y G S A F G A P P P P
721 CCGACTCCAGCAACCGCCGCTGTGACAGCACCACACCAGCCCGGAGGATGTTACGCAACCCGCCATACCTGACCAACTGCATGGACACCCAGCAGGTGGCCGCAAC
P T S S Q P P P V T A P H H H Q P P G R M F S N P P Y L T N C M D T Q Q V A R N
841 CAGACAGTTACGGCGAGTGCATTCGATGGAGCCGGAAATACGGCCACACTCCGACGACACAGCTACAGTTCTCCAACCACTTCAAAACAGGAGCAGCTTAAACCCAGCAG
Q T G Y G A V A F D G A G N Y G H T P T H H S S Q F S N H T F K H E D A L T Q Q
961 AACACGATGGGTGAGCAGTATCTGTACTCTCTCTGTTTATGGATGCCACACCCGTGACAGCTGTACAGGCAGCCAGGCTGCTGCTGAGGAACCTTACAACGCCACGCA
N T M G E Q Q Y P V P P P V Y G C H T P S D S C T G S Q A L L L R N P Y N S H A
1081 ACAGGATACGACAGTACCCCAACCCCAATGGGTACAGCTGACAGCAGCAGTACCCGATACACACACAGGAGTCTTACGGGAATTCAGGAGTGGGGGTGCCAGCATCGCT
T G Y D S D P N T P M V Y S C S T Q Y R I H T H G V F R G I Q D V R R V P S I A
1201 CCGCCATCGTGGGTGGAGGCCAGGAAAGCGTCCGTTCATGTGCGCTACCCAGGATGCAACAGCGCTACTTCAAGTGTCTCACTTGCAGATGCACAGTGTAAACACACAGGG
P A I V R S E A S E K R P F M C A Y P G C N K R Y F K L S H L Q M H S R K H T G
1321 GAGAAACCGTACCAGTGTGAGTTCACAGACTGCGCCGGAGGTTTCCCGCTCCGACAGCTGAAACGACACACAGGAGACACAGGAGTAAACCCCTTCCAATGCGAGCGTGTGAG
E K P Y Q C E F T D C G R R F S R S D Q L K R H Q R R H T G V K P F Q C E T C Q
1441 AGAAAGTCTCTCGGCTGACCACCTTAAGACACACCCCGACTCATAAGTAAAACAGGAGAAGCCGTTAACTGCGCGTGGCCAACTGTGAGAAGAATTCGCCGGAGCGAC
R K F S R S D H L K T H T R T H T G K T S E K P F N C R W P N C Q K K F A R S D
1561 GAGCTGGTGGCACCACAATGCACAGGAACTCACAAGCTGACAGCTGCCATGTAACCCGAGTCCGGCCCCACGTCGCCCACTTACACGTAACATCTGGGTGACATC
E L V R H H N M H Q R N L T K L Q L A I *
1681 TGCTTTTATTTCTGCGACCCCTCTGTGCACTGCTGTGAAATCCAGCTGGGTCCATATGGGTGATGTGATTACATTTAAATAACTAGACACAACATCTGCATCAGAGGTA
1801 AAGTTCAGTCTGAAGGATTTCTACAGACGTGGGTTGAAAACAGTTTGTCTTGGAAATGTGATGTGACTTGAATTTTAAATTCACAAAACCCAGAAAACCCAGTGTGAGA
1921 AAACTTTGTCCTCGTTCGACTGAACAAGAAGACGACGATGTGAGGAGCAGGGCTCAAGCGGAGAATTCAGATTTTTCGCATCATAGTAATAAAATGTTCTCAACTTCAAG
2041 TGTTTTACATCCGATAAACCTTCGGATTTACTTGTGTTTCTTGAAGATGTTAAATATACCAACAAACAGAAAAACCAACTTAACGTCACTTCACTGTGCTGCTGCTGCT
2161 CAGGTTTTATCTCCACAGACTTTATCTGGTTTTGGACTTTTATCGGAGTTCATTCCAGTAAATACAGTTCCTGCTGGATTTGAATTTCTCATTCCGTAAGTCCGGTGGACGCTGA
2281 GTTCTCCAGGTTTTACTCACAGGATTCACAGCTGAGGTTTCTTATACGAGGTTTGTAAATATACAYGTGCACACCCCCCATTCGATCTACATTCACCTTATACGGCCCTGT
2401 GTCCGACACTTCTGAACACTGGTAACTTCCACGCTGCTGCTAAAGAAATCCCTCCGATGTGATGTCTCATCCGTCGCCACCGTGTGCACAGGAGGTCAAAGGTGACGCTGCGGC
2521 ACGTCGGCTGCAGCTCAGCTGTAATAATCTCTTCCAGTGAACGATGACTTTATTTATATCCCGTTCATTGACACAAATACCTCCRCCTGGATTCATTTAARAGGARAGAGGTGCTGT
2641 TTCATCCCTTAGCATAAACTAAAAAGCTGCCTTAAATTTGAGRAAAGATCAATGAATTAATCCGACTCCTTATACGGTGTGTTGCGGATGTCAGCTTTTGGTGTGTTGCTCGTCCG
2761 CATTAAAAAACTTTGCAACACGCTTCCCGGTTGATATTTGTTTCCGGCTGTGCTGCGTGCACCGCGGCTCTCGCGG6SGACGGCAGAGCCTCTGCTCTCTGTGGTGTGTA
2881 TATTGCTGGACTTGTACAGCGAGCTYTGAGATATGCTGCCGGTACACTGCCTCTGTGCCGGGAGCTTATGGTCAAGATGTAATAAAACCTCTTACAGTGGAACTGAACTCTG
3001 TCCACGGGGGAGAAACATGAACTGAACTGATGATTTACAGACTTCTTCTTCTTTGGACTTCTACTTTGTTGTTCTCTTTTCTGTGATGTGTTGAGATYTGAGTCGTA
3121 CAACACTGTGAGTGAACGTTTCTGCTCAACGTTGAGATTAATGAAAAATGCTGGTTCTCTCTGTTGTAATGTAATGTGACTGTTTGTATACAGCAACACTTTCAGTAAAA
3241 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

图1 *wtl1* 基因 cDNA 序列全长及其编码的氨基酸序列

Fig.1 Nucleotide sequence and deduced amino acids sequence of *wtl1*

注: 起始密码子(ATG)与终止密码子(TGA)用单线边框标出, KTS 是选择性剪接, 锌指结构区用单下划线标出, polyA 结尾用双下划线标出

```

1  AAGCGGTGGTATCAACGCAGATACATGGGAGACATTATAGAGACAGAGGCAAGGCACTGTTCCCTCACTGACTCTCACTTCCACCGCACTGCTGATACACAGGGAGCTCAGATT
121 TGGCAGATTTTGTTCATCATCGTGCCTCAATCAATGTCGTCATTTGGTTGGAAAAGATGGCTCCTGATGATTTGGGATAACTGATGTTTGTCTGTAGAGGACTTTCCTTCGTGCT
241 CGTTGTTTCTCAGGTTGAGTTTGTGCGCTGTAGGAGTTTATTACTGTGACTTTTAAATTTCCCATCCGTGCTTGTACTGGAATACCCCTCATCTCTCTGTGAAGTGTCTCGAGCTG
361 CCTTCAACAATGCTGACTGAACCGTATGGAGCCATGTCCATGGGTCAGAAGTTCGAGATCTGACCCTTTTAACTCCAGCGCCCCCATGCCATCTTACCAGGAGCTGGTGGTGGCTGT
      M L T E P Y G A M S M G S E V R D L T L L T P A P P M P S L P G A G G G C
481 GGGATGTCGGTTGGCACTGGCCAGTGGACCAACTGCTGGACCTCCATCCAACTCTCCCTACAGCTCCCTGCCCTCCACCCCTCCCTGATCAAGCAGGAACAGGTTGGGGGACCGG
      G M S V G T G Q W T Q L L D L H P N S P Y S S L P S H P S L I K Q E P G W G T A
601 GACCCCATAGAGGACCTCACTGTGGACCTGTGGGGCTTCACGGTGACATCTCAGGGCAATTCACAGGGGACGGCCCTGTGGGTGGAGCCCTGGGAGAACCACTACAGGTCAA
      D P I E D P H C G P C G A F T V H F S G Q F T G A G P C R V G A F G E P T T G Q
721 CCCAGAGTGTCCCAATGGGACTACCTGCCAGCTGTGTGGACAGTCCCCTGCAGCCAGGAACAGGGTTATGGAGCGGTGGTTGGACAGCAGCCCACTGTGGTACAGCTGGC
      P R V F P N G T Y L P S C V D S P P A A R N Q G Y G A V G L D S S P S C G H A A
841 TCCCACACACCCCTCAGCTCTCCAGCCTCTCTTTCAAACAGGAGACACACTGTACCTCCAAACATAGTTGACCAGCAGTACGGGGCGCTCTCCCATGTTGGTTGCCACAAT
      S H H T P Q L S S L S F K H E D T L S P P N N I V D Q Q Y G A P P P M F G C H N
961 CCTTCAGAAATCGTGTCCGAGCAGCCAGGCTCTGCTGTGAGAACTACAACAGTACAATGTTTACCAAATGGCATCTCAGCTGGAGTGTGAAAATGGAACAGATGAACAGCTGGCA
      P S E S C P S S Q A L L L R N Y N S D N V Y Q M A S Q L E C V K W N Q M N S L A
1081 TCTTCATGAAGACGGGTGTCATACAACAGTTATGACAGTACCCCATAGTCCACCTCCACCCATGCTTGTCACTGCTCAGTACCACATACACGCACACAGTGTGTCAGAGGACTA
      S S M K S G V H T T S Y D S D P I V P P P M L V S A Q Y H I H A H S V F R G L
1201 CAGGAGCTCAGACGGTACCTGGCATCGCTCCCTCTGTGTGAGGTGAGGCAATGAGAAGCGTCCATTTGTCTGTGCTTATCCAGGCTGCAGCAGAGATACTTCAAATGTCTCAT
      Q D V R R V P G I A P P V V R S E A N E K R P F V C A Y P G C S K R Y F K L S H
1321 CTGCAGATGCACGGCCGCAACACACCCGGAGAGAAGCCTTACCAGTGTGATTTACAGACTGTGGCCGAGATTCTCCCGCTCAGACAGTAAAGAGGCACCGCCGACACACAGGA
      L Q M H G R K H T G E K P Y Q C D F T D C G R R F S R S D Q L K R H Q R R H T G
1441 GTGAAGCCCTTTCAGTGCAGAGCTGTGACAGAAAAGTTTTCAGGGTACAGCACTTAAGACGCACACTCGGACTCATACAGTAAAACAAGTGAAGCCCTTACCTGCCGTGGTCC
      V K P F Q C E T C Q R K F S R S D H L K T H T R T H T G K T S E K P F T C R W S
1561 AACTGTCAAGAAGTTTGGCCGCTGACGAGCTGGTGCGCCACCACAGCATGCACCAGGAACCTGACCAAGCTGCAGCCTGCCATCTGACAGCAGGAGACGAGGAGGAGGACGA
      N C Q K K F A R S D E L V R H H S M H Q R N L T K L Q P A I *
1681 GGAGGACGAGGAGCAGGAGCAGGAGCAGGAGGAAAGGTGACAAAATGTTGTGCGAGCTAGTAGAGAGAGAAGCTTGGAGCCTGGTCAGCGGTATGGTGCCTTGTGACACTCGCTGAT
1801 GGGATGAGCAGCTGATGCCTCCCTCAGCCACGAGATGACGTCGGGAGCAAGACTCACTGATGATCCAGAGATCCCAAGAGCACCTCAACAGCGYTCGCTCATCTGACTTTAA
1921 AACTCAGRCTTTGAAAGGATACGGTAAATCTGAGCCAAGAATACATTTTTTTTATAGAGATGAGGAAAATATYGATTTTGGAAAATTCAGTACACTTGCACCTGGCTTTTGTGTTTATG
2041 TTAAGTTGTGTACCTTAAAAATGTGCTGAAAAATGTGCTGGACCATGTAACCTGGATTTAGGAAAATTTTTGTCATGAAGCTGAGCAGGAAAATTTTTGCTTTTGGTGAATGT
2161 GAACATAATTTCTACTACGCCACCACCACCACTGCTTTGTATATGTTGATTTGTCCACATTTATAGACATTCCTTTTGTATTTTCTGTGCTTTGTAGCTTTATAAAACGTCGT
2281 TCCACATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

图2 *wtlb* 基因 cDNA 序列全长及其编码的氨基酸序列

Fig.2 Nucleotide sequence and deduced amino acids sequence of *wtlb*

注: 起始密码子 ATG 与终止密码子 TGA 用单线边框标出, KTS 是选择性剪接, 锌指结构区用单下划线标出, polyA 结尾用双下划线标出

2.3 *Wtl* 基因在不同发育时期及不同组织中的表达分析

胚胎发育期研究结果显示(图 6), *wtlb* 基因在原肠期之前微弱表达, 从原肠早期开始逐渐上升至神经胚期表达量达到最高, 之后开始呈下降趋势, 直至孵化阶段; *wtlb* 基因从原肠晚期开始表达量逐渐升

高, 上升至神经胚期后开始下降, 并逐渐稳定。研究 *wtlb* 基因和 *wtlb* 基因在仔稚鱼不同发育时期中的表达量, 结果显示(图 7) *wtlb* 基因在孵后 10d 时的表达量显著高于本实验中的其他时期, *wtlb* 基因在孵后 5d 时的表达量显著高于本实验中的其他时期, 之后逐渐下降。

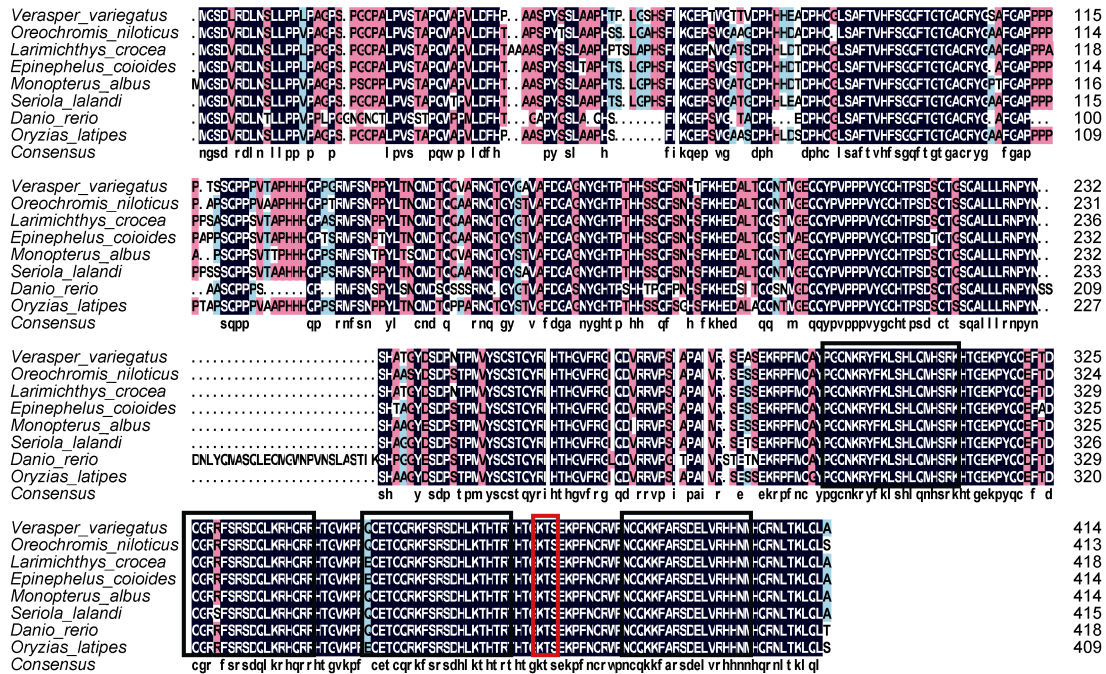


图 3 wt1a 基因编码氨基酸与其他物种 wt1a 基因编码氨基酸的多序列比对

Fig.3 Amino acid sequences alignment of wt1a gene with other species

注: 黑色边框为锌指结构区, 红色边框为 KTS。各物种 WT1a 蛋白序列登录号: 尼罗罗非鱼(XP_01312197.1)、点带石斑鱼(AFV66805.1)、大黄鱼(XP_027128155.1)、黄尾鲷(XP_023262779.1)、黄鳍(XP_020460125.1)、斑马鱼(NP_571121.1)和青鳉(NP_001098171.1)

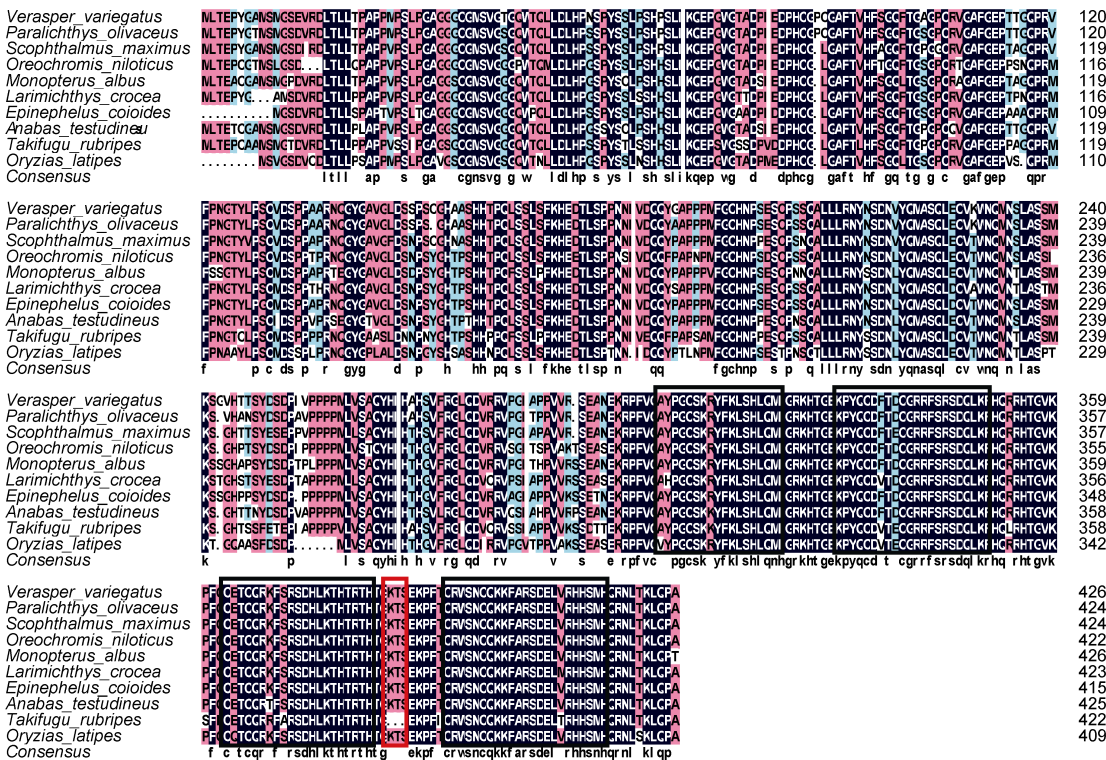


图 4 wt1b 基因编码氨基酸与其他物种 wt1b 基因编码氨基酸的多序列比对

Fig.4 Amino acid sequences alignment of wt1b gene with other species

注: 黑色边框为锌指结构区, 红色边框为 KTS。各物种 WT1b 蛋白序列登录号: 牙鲆(XP_019954195.1)、大菱鲆(AWP01692.1)、尼罗罗非鱼(ARU81315.1)、黄鳍(XP_020471329.1)、大黄鱼(XP_010740189.1)、点带石斑鱼(AFV66806.1)、攀鲈(XP_026234955.1)、红鳍东方鲀(XP_011617397.1)和青鳉(NP_001098390.1)

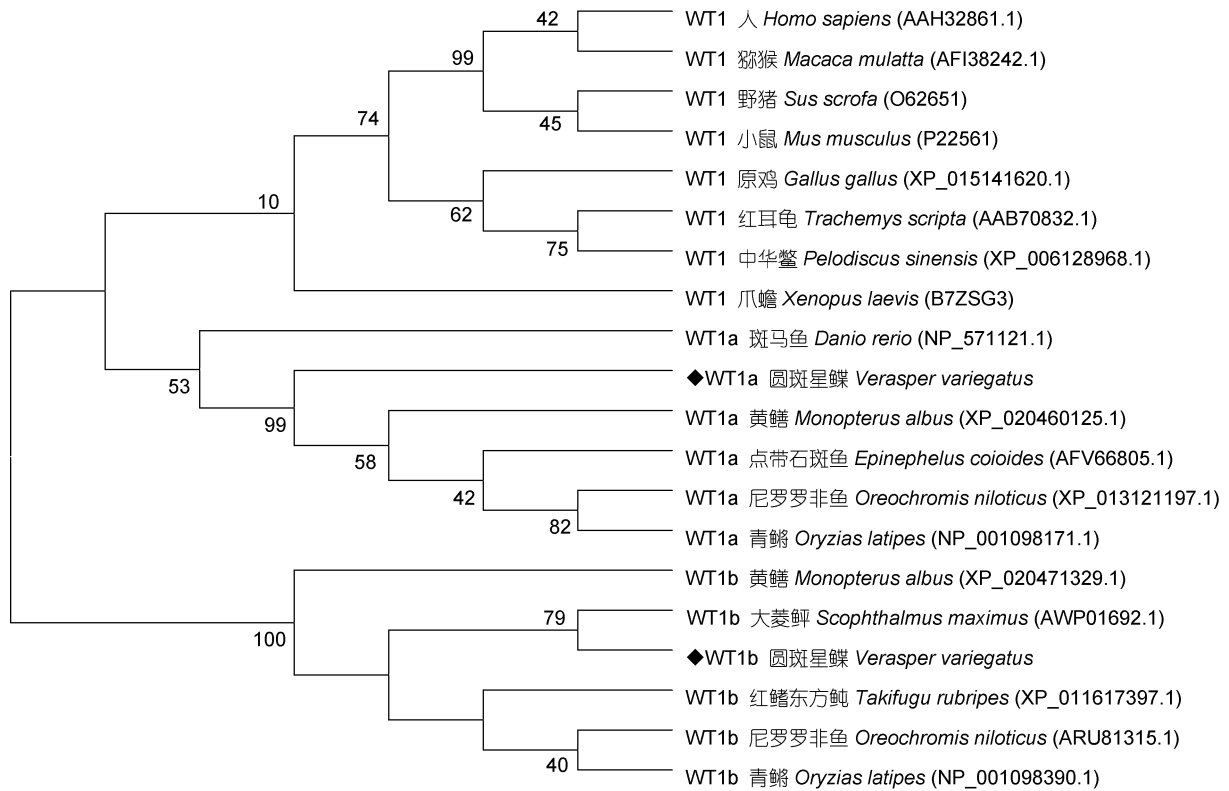


图 5 wt1 基因编码氨基酸序列的系统进化树

Fig.5 Phylogenetic tree for amino acid sequences of wt1 gene

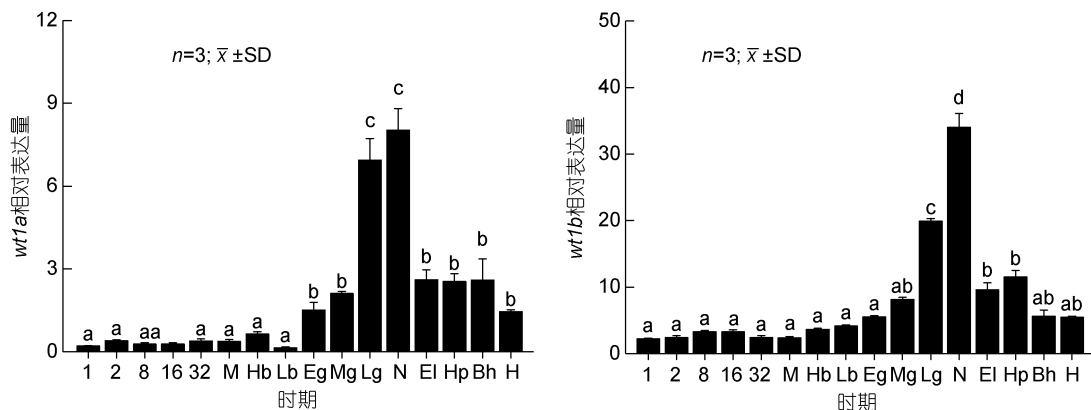


图 6 wt1 基因在胚胎发育不同阶段中的表达

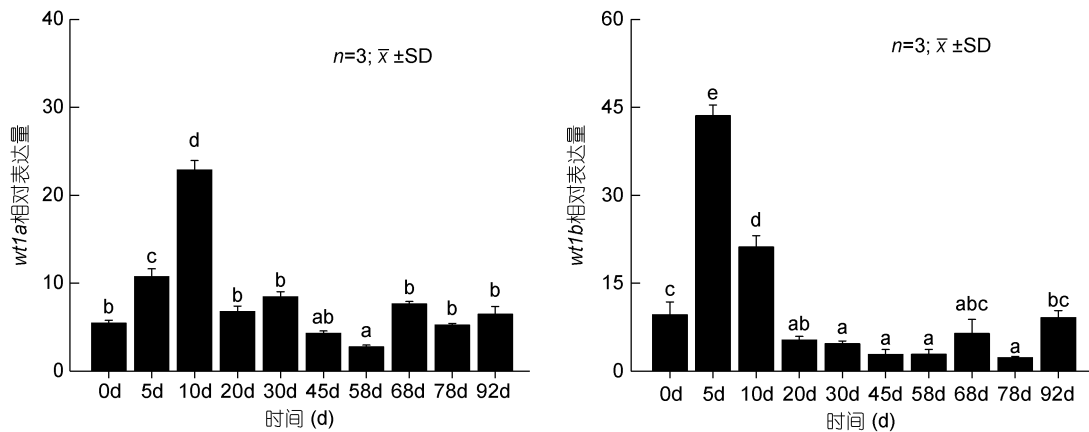
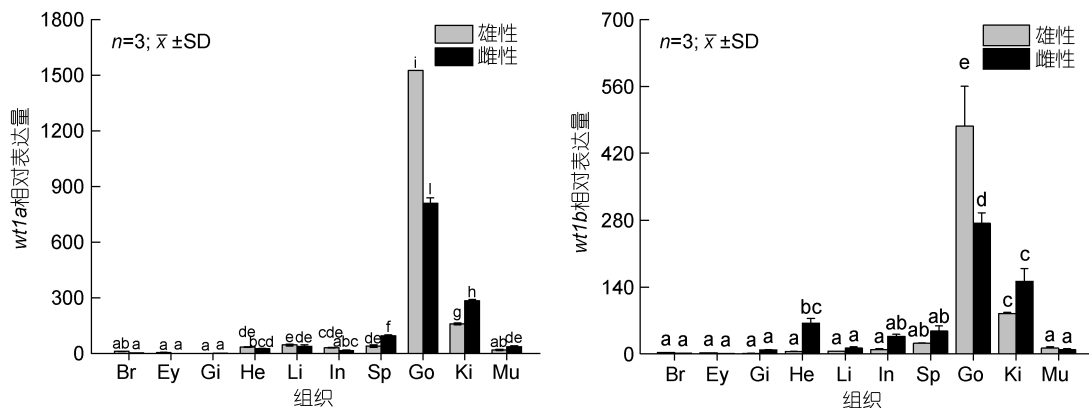
Fig.6 Relative expression characterization of wt1 gene at different development stages of the embryo

注: 1: 单细胞期; 2: 2 细胞期; 8: 8 细胞期; 16: 16 细胞期; 32: 32 细胞期; M: 桑椹胚期; Hb: 高囊胚期; Lb: 低囊胚期; Eg: 原肠早期; Mg: 原肠中期; Lg: 原肠晚期; N: 神经胚期; El: 晶体形成期; Hp: 心跳出现期; Bh: 孵化前期; H: 脱膜孵化。不同字母间表示差异显著 ($P < 0.05$), 下同

组织表达结果显示(图 8)wt1a 基因和 wt1b 基因在雌雄成鱼的各个组织中均有表达。wt1a 基因和 wt1b 基因在雄性成鱼精巢组织的表达量最高, 其次是雌性成鱼的卵巢组织, 肾组织中也有较高表达, 3 个组织的表达量均显著高于其他组织。

3 讨论

本研究用 RACE 方法获得了圆斑星鲃 wt1a 和 wt1b 基因全长, 分别命名为 Vvwt1a 基因和 Vvwt1b 基因。两个同源基因在 ORF 末端均具有连续四个 (Cys)₂(His)₂ 型锌指结构, 编码 KTS 三肽。同源性分

图 7 *wtl* 基因在不同发育时期仔鱼中的表达Fig.7 Relative expression characterization of *wtl* gene at the different stages of the larvae图 8 *wtl* 基因在不同组织中的表达Fig.8 Relative expression characterization of *wtl* gene in various tissues

注: Br: 脑; Ey: 眼; Gi: 鳃; He: 心脏; Li: 肝脏; In: 肠; Sp: 脾; Go: 性腺; Ki: 肾; Mu: 肌肉

析发现 *wtl1a* 基因和 *wtl1b* 基因编码氨基酸在羧基端锌指结构区域均具有很高的相似性。基因系统分析结果显示, 哺乳类、鸟类及爬行类聚为一大支, 鱼类的 *WT1a* 及 *WT1b* 分别为一大支, 其中圆斑星鲃 *WT1b* 与大菱鲆 *WT1b* 聚为一支, 关系较近。此外, 相较于 *WT1b*, 鱼类 *WT1a* 与哺乳类等的 *WT1* 关系较近, 该结果与半滑舌鳎(张红等, 2014)相似。研究发现 *wtl* 基因可通过锌指结构与 DNA、RNA 结合, 从而正常行使其功能(Morrison *et al*, 2008)。此外由于 *wtl* 基因具有多个翻译起始位点及不同的选择性剪接方式, 可编码多种蛋白亚型(Dong *et al*, 2015), 其中较为常见的+KTS 亚型蛋白主要在 RNA 加工过程中起重要作用, 并在小鼠的性别决定中起重要作用(Hammes *et al*, 2001)。综上, 我们推测 *wtl1a* 基因和 *wtl1b* 基因在圆斑星鲃性腺发育中具有重要作用。

在哺乳动物中, *wtl* 基因的突变会导致其性腺及

肾脏等器官发育异常。如小鼠中缺失 *wtl* 基因后, 其肾单位将无法形成, 导致间充质细胞无法正常增殖(Davies *et al*, 2004)。性腺分化过程中, 仅在小鼠精巢的支持细胞及卵巢的颗粒细胞中表达的 *wtl* 基因可以促进生殖细胞的成熟, 小鼠 *wtl* 基因缺失后, 精原细胞的分裂过程将被中断(Zheng *et al*, 2013),

wtl1a 基因在原肠期前表达低, 从原肠早期开始逐渐上升至神经胚期表达量达到最高, 之后逐渐下降, 该结果与斑马鱼(Bollig *et al*, 2006)、半滑舌鳎(张红等, 2014)及牙鲆(孙近近, 2016)的表达模式相似。研究发现, 神经胚期是原始生殖细胞分化的关键时期(康现江等, 2010), 因此推测 *wtl1a* 基因在圆斑星鲃原始生殖细胞分化过程中发挥作用。*wtl1b* 基因从原肠晚期开始表达量逐渐升高, 至神经胚期后下降, 并逐渐稳定, Bollig 等(2006)研究发现在斑马鱼胚胎时期检测到 *wtl1b* 基因在 12h(原肠期之后)时的表达量显著

增加,同时原位杂交结果显示 *wtlb* 基因在间介中胚层(原肠胚末期)表达,而间介中胚层将分化为泌尿生殖系统的主要器官,因此推测 *wtlb* 基因在性腺分化形成中发挥作用。作为同源性基因,*wtla* 和 *wtlb* 基因在圆斑星鲈胚胎发育过程中的神经胚期表达量均达到最高,表明 *wtla* 和 *wtlb* 基因均在圆斑星鲈原始生殖细胞分化过程中发挥作用,*wtla* 基因在圆斑星鲈胚胎发育中表达量显著上升时间较早,因此推测 *wtla* 基因在圆斑星鲈胚胎发育中较早地发挥作用,仍需进一步验证。

wtla 基因在孵后 10d 时的表达量显著高于其他时期,这一表达模式与牙鲆相似,在牙鲆中 *wtla* 基因对其生殖脊细胞的存活起着重要作用(孙近近,2016),因而 *wtla* 基因可能在圆斑星鲈性腺的发育过程中起作用;*wtlb* 基因在孵后 5d 时的表达量显著高于其他时期,之后逐渐下降,其表达量显著升高的时间早于 *wtla* 基因,推测在仔稚鱼发育过程中 *wtlb* 基因更早地发挥作用,但因相关研究较少,其在圆斑星鲈性腺发育中的作用仍需进一步研究。

wtla 基因和 *wtlb* 基因在精巢与卵巢中的表达量均显著高于其他组织,且精巢的表达量显著高于卵巢,其次在肾脏组织中的表达量显著高于其他组织。在斑马鱼(Bollig *et al*, 2006)和青鳉(Klüver *et al*, 2009)中,*wtl* 基因在性腺及肾脏中均具有较高表达,且在青鳉中发现 *wtl* 基因的突变会导致原始生殖细胞数量减少。在半滑舌鳎(张红等,2014)中,*wtla* 基因在性腺及肾脏中也有较高表达,且该研究显示 *wtla* 基因在性腺分化及发育过程中持续表达。在牙鲆(孙近近,2016)中,*wtla* 基因主要在性腺中表达,同样在精巢中的表达量高于卵巢,表明 *wtla* 基因在性腺发育及功能维持方面起重要作用。在黄鳝(胡青等,2014)中,*wtl* 基因在性腺及肾脏中高表达,且该基因对黄鳝精母细胞及卵母细胞的生长及成熟起一定的作用。综上,我们推测 *wtla* 基因和 *wtlb* 基因在性腺和肾脏发育过程及功能维持方面发挥重要作用。

4 结论

本研究用 RACE 方法获得了圆斑星鲈 *wtla* 和 *wtlb* 基因全长,分别命名为 *Vvwtla* 基因和 *Vvwtlb* 基因,其均具有 4 个锌指结构,编码 KTS 三肽。基因表达结果表明:*wtla* 和 *wtlb* 基因主要在圆斑星鲈性腺中表达,精巢的表达高于卵巢,肾脏的表达量显著高于其他组织,推测 *wtla* 基因和 *wtlb* 基因在性腺和

肾脏发育过程及功能方面均发挥重要作用;在早期发育阶段,*wtla* 基因在圆斑星鲈原始生殖细胞分化过程及性腺发育中发挥重要作用。*wtlb* 基因在性腺分化过程的发挥作用仍需进一步研究。

参 考 文 献

- 江东能,2016. *Gsdf* 和 *Wt1* 在罗非鱼性别分化和性腺发育中的功能研究. 重庆:西南大学博士学位论文,53—74
- 孙近近,2016. 牙鲆性腺相关 miR-200b 及 *dazl*, *wtl1a* 基因的鉴定与表达. 上海:上海海洋大学硕士学位论文,29—53
- 杨珍珍,边力,张岩等,2020. 圆斑星鲈 *piwil2* 基因的克隆与表达分析. 渔业科学进展,41(2): 103—112
- 张红,陈松林,刘洋等,2014. 半滑舌鳎 *WT1a* 基因的克隆与性别分化期的表达分析. 中国水产科学,21(1): 26—36
- 张乐乐,2018. 圆斑星鲈性腺分化过程及性别相关基因 *sox3*、*sox9* 的研究. 上海:上海海洋大学硕士学位论文,12—28
- 张乐乐,边力,常青等,2018. 圆斑星鲈 *sox9* 基因的克隆与表达. 渔业科学进展,39(6): 72—80
- 胡青,杨娇艳,高宇等,2014. 黄鳝 *WT1* 基因序列分析及在性腺发育过程中的表达. 华中农业大学学报,33(1): 73—79
- 柳学周,徐永江,廖梅杰等,2013. 圆斑星鲈促性腺激素释放激素基因克隆及表达特性. 中国水产科学,20(1): 12—24
- 康现江,宁静允,穆淑梅等,2010. 半滑舌鳎早期胚胎性腺原基分化的组织学. 河北大学学报(自然科学版),30(3): 296—300,306
- Bollig F, Mehringer R, Perner B *et al*, 2006. Identification and comparative expression analysis of a second *wtl* gene in zebrafish. *Developmental Dynamics*, 235(2): 554—561
- Davies J A, Ladomery M, Hohenstein P *et al*, 2004. Development of an siRNA-based method for repressing specific genes in renal organ culture and its use to show that the *Wt1* tumour suppressor is required for nephron differentiation. *Human Molecular Genetics*, 13(2): 235—246
- Dong L H, Pietsch S, Englert C, 2015. Towards an understanding of kidney diseases associated with *WT1* mutations. *Kidney International*, 88(4): 684—690
- Gessler M, Poustka A, Cavenee W *et al*, 1990. Homozygous deletion in Wilms tumours of a zinc-finger gene identified by chromosome jumping. *Nature*, 343(6220): 774—778
- Hammes A, Guo J K, Lutsch G *et al*, 2001. Two splice variants of the Wilms' tumor 1 gene have distinct functions during sex determination and nephron formation. *Cell*, 106(3): 319—329
- Hossain A, Saunders G F, 2001. The human sex-determining gene *SRY* is a direct target of *WT1*. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(20): 16817—16823
- Hossain A, Saunders G F, 2003. Role of Wilms Tumor 1 (*WT1*) in the transcriptional regulation of the Mullerian-Inhibiting substance promoter. *Biology of Reproduction*, 69(6): 1808—1814
- Klamt B, Koziell A, Poulat F *et al*, 1998. Frasier syndrome is caused by defective alternative splicing of *WT1* leading to an

- altered ratio of WT1 +/-KTS splice isoforms. Human Molecular Genetics, 7(4): 709—714
- Klüver N, Herpin A, Braasch L *et al*, 2009. Regulatory back-up circuit of medaka *Wtl* co-orthologs ensures PGC maintenance. Developmental Biology, 325(1): 179—188
- Kreidberg J A, Sariola H, Loring J M *et al*, 1993. WT-1 is required for early kidney development. Cell, 74(4): 679—691
- Moore A W, McInnes L, Kreidberg J A *et al*, 1999. YAC complementation shows a requirement for *Wtl* in the development of epicardium, adrenal gland and throughout nephrogenesis. Development, 126(9): 1845—1857
- Morrison A A, Viney R L, Ladomery M R, 2008. The post-transcriptional roles of WT1, a multifunctional zinc-finger protein. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer, 1785(1): 55—62
- Pelletier J, Schalling M, Buckler A J *et al*, 1991. Expression of the Wilms' tumor gene WT1 in the murine urogenital system. Genes & Development, 5(8): 1345—1356
- Sharma P M, Yang X, Bowman M *et al*, 1992. Molecular cloning of rat Wilms' Tumor complementary DNA and a study of messenger RNA expression in the urogenital system and the brain. Cancer Research, 52(22): 6407—6412
- Tamura K, Peterson D, Peterson N *et al*, 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Molecular Biology and Evolution, 28(10): 2731—2739
- Wiener J S, Marcelli M, Lamb D J, 1996. Molecular determinants of sexual differentiation. World Journal of Urology, 14(5): 278—294
- Wilhelm D, Englert C, 2002. The Wilms tumor suppressor WT1 regulates early gonad development by activation of *Sfl*. Genes & Development, 16(14): 1839—1851
- Zemann A, de Bekke A O, Kiefmann M *et al*, 2006. Evolution of small nucleolar RNAs in nematodes. Nucleic Acids Research, 34(9): 2676—2685
- Zheng Q S, Wang X N, Wen Q *et al*, 2013. *Wtl* deficiency causes undifferentiated spermatogonia accumulation and meiotic progression disruption in neonatal mice. Reproduction, 147(1): 45—52

CLONING AND EXPRESSION OF THE *WT1* GENE IN SPOTTED HALIBUT (*VERASPER VARIEGATUS*)

YANG Zhen-Zhen^{1,2}, BIAN Li^{1,3}, ZHANG Yan¹, CHEN Si-Qing^{1,3}, CHANG Qing¹, ZHANG Sheng-Nong¹,
LIU Chang-Lin¹, GE Jian-Long¹

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China; 2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071, China)

Abstract The spotted halibut (*Verasper variegatus*) is a rare and valuable marine fish species that inhabits the coast of the northern China. Mature females are much larger than males because of their faster growth. It will create substantial economic benefits to establish an all-female breeding technique for *V. variegatus*. A better understanding of sex-related genes will contribute to the improvement of a single-sex breeding technique. In this study, we successfully isolated the *wt1* gene of *V. variegatus*, which is named *Vvwt1a* and *Vvwt1b*. The total length of *wt1a* was 3263bp, including a 1245bp open reading frame (ORF), encoding 415 amino acids, the 5'UTR was 372bp and the 3'UTR was 1640bp. The total length of *wt1b* was 2312bp, including a 1281bp open reading frame (ORF), encoding 427 amino acids, the 5'UTR was 369bp and the 3'UTR was 659bp. Through biological analysis, the *wt1a* gene encoded amino acids, with a predicted molecular weight of 46.2kDa and an isoelectric point of 9.24, no transmembrane structure or signal peptide site was detected, there were four zinc finger structures at the end of ORF and encode KTS. The *wt1b* gene encoded amino acids, with a predicted molecular weight of 46.95kDa and an isoelectric point of 8.99, no transmembrane structure or signal peptide site was detected, there were four zinc finger structures at the end of ORF and encode KTS. Real-time fluorescence quantitative PCR technique was used to analyze the expression patterns of the *wt1* gene at different stages of embryo and larvae. The results show that the expression level of *wt1a* and *wt1b* genes in gonads was significantly higher than other tissues', and the expression level in the testis was significantly higher than in the ovary. Therefore, we speculated that *wt1a* and *wt1b* genes play important roles in gonad and kidney development and function. In the early stage of development, *wt1a* gene weakly expressed before the early gastrula, then the expression level gradually rose to the highest level in the neural embryo stage, followed by a decline until the hatching stage. It is speculated that *wt1a* gene might played a role in the differentiation process of primitive germ cells and gonad development.

Key words *Verasper variegates*; *wt1*; gene cloning; expression analysis