

海蜇(*Rhopilema esculentum*) Wnt5 基因: cDNA 克隆、基因组结构与表达*

周春娅^{1,2} 朱玲² 潘滢² 谢明松² 杨傲傲^{1,2}
陈四清² 庄志猛²

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 2. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室
山东省渔业资源与生态环境重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071)

摘要 采用转录组 454 GS FLX 测序和 RACE 技术,首次解析了海蜇 Wnt5 基因的 cDNA 和基因组结构。结果表明, Re-Wnt5 基因的 cDNA 全长 1647bp, 其中编码区长 1059bp, 编码了 353 个氨基酸的多肽; Re-Wnt5 基因组含有 4 个外显子和 3 个内含子。SMART 分析表明, Re-Wnt5 具有 Wnt 家族共同的结构特征, 包括一个由 20 个氨基酸组成的信号肽, 2 个 N-糖基化位点和 24 个保守的参与二硫键形成的半胱氨酸。多序列比对和系统进化分析表明, Re-Wnt5 基因与来自刺胞动物、无脊椎动物和脊索动物的 Wnt5、脊椎动物的 Wnt5a 和 Wnt5b 具有高度相似性, Wnt5a 和 Wnt5b 两个进化分支发生在脊索动物文昌鱼之后。实时荧光定量 PCR 显示, Re-Wnt5 基因在海蜇四个发育阶段均有表达, 其中横裂体阶段的表达量最高, 分别是螅状体、碟状体和水母体表达量的 12.38、9.99 和 13.01 倍。

关键词 海蜇; Wnt5; cDNA; 基因组结构; 实时荧光定量 PCR

中图分类号 Q346

Wnt 是一类脂质修饰的分泌型糖蛋白, 最初是作为一种原癌基因从鼠类乳腺癌病毒诱导的小鼠乳腺癌中克隆并被命名为 int-1, 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 (Nusse *et al*, 1984; Cabrera *et al*, 1987)。目前研究发现, Wnt 基因家族与其它相关基因组成了一条复杂的信号传导途径——Wnt 信号途径(Wnt signal pathway), Wnt 蛋白通过自分泌或旁分泌作用与位于细胞膜上的受体相结合, 激活细胞内信号通路, 调节靶基因的表达, 参与了从胚胎到成体几乎所有发育过程, 如控制胚胎早期发育(Klaus *et al*, 2008; 张平, 2001)、决定细胞分化(Prestwich *et al*, 2007)、调控细胞增殖及生长(Logan *et al*, 2004), 维持各种干细胞功能等(Willert *et al*, 2003; 尹定子等, 2011), 而 Wnt 信号途径失调也可导致多种代谢类疾病, 甚至癌症的发生

(Reya *et al*, 2005; 潘岩等, 2011)。

刺胞动物(Cnidaria)作为最原始的真后生动物, 结构简单, 只有内胚层和外胚层的分化, 是其它高等多细胞动物的起点。目前公布的海葵(*Nematostella vectensis*)基因组数据显示, 尽管海葵和人类的复杂性差异巨大, 但这两种动物的基因组具有很高的相似性, 刺胞动物作为真后生动物的原始祖先可能已经具有了操作动物的基本代谢、发育、神经、肌肉功能等的遗传“工具箱”(Putnam *et al*, 2007)。海蜇(*Rhopilema esculentum*)隶属于刺胞动物门、钵水母纲(Scyphozoa)、海蜇属(*Rhopilema*), 是目前国际公认品质最好、经济价值最高的可食用大型水母。因此, 研究海蜇 Wnt 信号途径, 解析 Wnt 基因家族的组成、结构和表达特点, 将为解决 Wnt 信号途径的起源和基因簇改变带来的生物多样性等研究提供重要参考。

* 国家重点基础研究发展计划(973)项目资助, 2011CB403605 号; 国家自然科学基金资助项目, 40976073 号, 40776090 号; 中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费资助, 2009-chb-03 号; 青岛市科技计划项目, 11-3-1-6-hy 号。周春娅, E-mail: chunyat@163.com

通讯作者: 朱玲, 博士, 副研究员, E-mail: zhuling@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2012-04-06, 收修改稿日期: 2012-05-29

1 材料与方法

1.1 海蜇转录组 454 GS FLX 测序与 EST 分析

野生性成熟海蜇(*Rhopilema esculentum*)采集于浙江杭州湾,运回山东荣成海蜇养殖场进行人工繁育。利用 TRIzol reagent (Invitrogen)分别提取海蜇螅状体、横裂体、碟状体和幼蛰的总 RNA 后等比例混合,用 SMARTTM cDNA Library Construction (Clontech)试剂盒构建 cDNA 文库。由夏威夷大学的 ASGPB 实验小组利用 Roche Next Generation Sequencer GS FLX System (a.k.a. 454 Sequencer)执行半板 454 GS FLX 测序,然后进行生物信息学分析并寻找与已知 Wnt5 基因同源的 EST 序列。

1.2 海蜇 Wnt5 基因(Re-Wnt5)基因的全长 cDNA 克隆与测序

根据选取的与其它生物 Wnt5 基因具有高度相似性的 EST 序列设计 2 条特异性引物 Re-Wnt5-F1 和 Re-Wnt5-R1(表 1)。利用 pBluescript SK(+/-)载体上的通用引物 T7 与特异性引物 Re-Wnt5-F1 扩增 Re-Wnt5 的 3'末端;用载体引物 T3 与特异性引物 Re-Wnt5-R1 扩增 Re-Wnt5 的 5'末端。25 μ L 的 PCR 反应体系包括: 2.5 μ L 10 \times PCR buffer, 1.5 μ L MgCl₂ (25mmol/L), 2 μ L dNTP (25mmol/L), 1 μ L 引物(10 μ mol/L), 0.2 μ L (1U) *Taq* 酶, 1 μ L cDNA 模板, 15.8 μ L PCR 水; PCR 反应参数中退火温度见表 1。扩增产物用琼脂糖凝胶电泳进行分离检测,切胶回收后连接到 pMD18-T (Takara)载体,转化至大肠杆菌感受态细胞 Top10 中,通过蓝白

斑筛选阳性克隆并测序。

1.3 海蜇水母体基因组 DNA 提取和 Re-Wnt5 的基因组克隆

用酚-氯仿法提取 DNA: 取伞盖约 1cm 的幼蛰剪碎,加入 0.4mL 提取液[100mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 100mmol/L EDTA (pH 8.0), 50 μ L 1% SDS, 8 μ L 20mg/ μ L 蛋白酶 K],充分混匀,55 $^{\circ}$ C 水浴 2h。用等体积的饱和酚-氯仿-异戊醇(25 : 24 : 1)反复抽提三次,加入 0.6 体积的异丙醇。然后用 600 μ L 冰无水乙醇沉淀 DNA,70%乙醇洗涤两次,自然干燥,加入 30 μ L 超纯水溶解。溶解的 DNA 经 1.5%琼脂糖电泳检测。

根据获得的 Re-Wnt5 基因的 cDNA 全长序列,设计 3 对特异性引物扩增 Re-Wnt5 基因组全长,PCR 反应参数中退火温度见表 1,PCR 反应体系及测序同上。

1.4 Re-Wnt5 基因的生物信息学分析

用 BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)和蛋白分析系统(<http://www.expasy.org/>)分析 Re-Wnt5 的 cDNA 和氨基酸序列。用 SMART(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)预测 Re-Wnt5 的蛋白结构域。用 ClustalW(<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>)进行 Re-Wnt5 与其它物种 Wnt5 氨基酸序列的多序列比对。根据多序列比对结果,用 Mega 4.1 采用邻接法(neighbor-joining)构建 Wnt5 的系统进化树(Tamura *et al.*, 2007)。

1.5 Re-Wnt5 的表达分析

实时荧光定量 PCR 用于检测 Re-Wnt5 在海蜇不同发育阶段——螅状体(scypistoma)、横裂体(strobila)、碟状体(ephyra)和稚水母(medusa)的表达。定量引物

表 1 海蜇 Re-Wnt5 cDNA、基因组克隆和表达所用的引物
Tab.1 Primers used for cDNA and genome cloning and mRNA expression of Re-Wnt5 from *R. esculentum*

引物名称	序列	长度(bp)	退火温度($^{\circ}$ C)
Re-Wnt5-F1	5'-GAACCAAAGGGCGACAGTGTA-3'	21	59.5
T7(Vector)	5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3'	22	
Re-Wnt5-R1	5'-CACTTGCCTATTGGTCCTTCA-3'	21	58.2
T3(Vector)	5'-AATTAACCCCTCACTAAAGGG-3'	20	
Re-Wnt5-F2	5'-TTCAACAACAGACATAGTAACCGAG-3'	25	55.8
Re-Wnt5-R2	5'-GGAAAGGTACAGTTCCATCGTCTGT-3'	25	
Re-Wnt5-F3	5'-GCTGTGCAACGAGTACAGGAACCAT-3'	25	56.5
Re-Wnt5-R3	5'-ATGTCCTGTGTTGCATCAGACCCCA-3'	25	
Re-Wnt5-F4	5'-CAAGAGGCTAGGCCTGACAGCCTG-3'	24	56.0
Re-Wnt5-R4	5'-TTCTTCAAGATATAACCAAGTTCCGT-3'	25	
Re-Wnt5-F5	5'-GATGGAACCTGAAACTACGGGAAAAG-3'	25	60.0
Re-Wnt5-R5	5'-TGTCTCTTAACATGAAAACCTCGCC-3'	25	
AC-F	5'-AACTGGGACGATATGGAGAAGA-3'	22	60.0
AC-R	5'-CGACCAGAGGCGTACAATGAG-3'	21	

Re-Wnt5-F5 和 Re-Wnt5-R5 和作为内参的管家基因 β -actin 的引物 AC-F 和 AC-R 见表 1。PCR 反应在 ABI 7500 Real-time PCR system (Applied Biosystems) 上进行, 20 μ L 反应体系包括: 10 μ L SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (Takara), 0.4 μ L ROX Reference Dye II, 0.4 μ L 引物 (10 μ mol/L), 2 μ L cDNA 模板和 6.8 μ L PCR 水。PCR 反应参数为: 95 $^{\circ}$ C 30s, 95 $^{\circ}$ C 5s, 60 $^{\circ}$ C 34s, 共 38 个循环。样品和内参分别设 3 个重复。反应结束后首先进行溶解曲线分析, 确认 Re-Wnt5 基因引物的特异性, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行数据分析(Livak *et al.*, 2001)。获得的数据应用 SPSS18.0 统计软件进行处理, 各组间均数比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 Re-Wnt5 的 cDNA 全长分析

Re-Wnt5 的 3' 末端扩增获得一条长 595bp 的片段, 5' 末端扩增得到一条长 883bp 的片段, 将上述序列与海蜇 Wnt5 的 EST 序列拼接, 获得海蜇 Wnt5 基因的 cDNA 全长序列(Accession No. KC291938)。Re-Wnt5 的 cDNA 全长序列 1646bp, 包括 5' 非编码区(5' UTR) 177bp, 3' UTR 407bp 及开放阅读框(ORF)1062bp, 其中 3' UTR 包括一个由 22bp 的腺苷酸组成的 Poly(A) 尾和一个 AATAAA 组成的多聚腺苷酸化信号(图 1)。ORF 编码了长 353 个氨基酸的多肽, 预测的分子量和理论等电点分别为 40.39kDa 和 9.17。Re-Wnt5 为分泌蛋白, 其信号肽由 20 个氨基酸组成, 酶切后的成熟肽预测的分子量和理论等电点分别为 38.25kDa 和 9.17。两个潜在的 N-糖基化位点 NCTF 和 NRTS 被识别在 74—77 和 299—302 位氨基酸。

2.2 Re-Wnt5 的同源性和系统进化分析

推导的 Re-Wnt5 氨基酸序列经 BLAST 分析发现, Re-Wnt5 与来自刺胞动物门的半球美螭水母 *Clytia hemisphaerica* (ACB15462)、贝螭 *Hydractinia echinata* (CAD54643)、大乳头水螅 *Hydra magnipapillata* (XP216311)和水螅 *Hydra vulgaris* (BAH237741)的 Wnt5 具有很高的同源性, 其氨基酸序列一致性在 44%—52%之间。而且, Re-Wnt5 与来自无脊椎动物的 Wnt5、文昌鱼的 Wnt5、脊柱动物的 Wnt5a 和 Wnt5b 也具有较高的同源性, 其氨基酸序列一致性分别在 42%—44%、43%、43%—45% 和 43%—45%之间。多序列比对发现, 来自不同物种的 Wnt5 基因的 N 端氨基酸变化较大, 相似性较低, 而中部和 C 端的保守

```

1  AGCGGACACAGGAAGCGAACTTACTTCCGAAACGTTTCAACAGTAAACAAGTTTGC
61  GGCCTTAATTCGTTTTCAACAACGCGTTCAACAACAGACATAGTAAACCGAGGTTCAAAGT
121  GGTATGGAAAGTGTCTTTAGCTGTCTGGAGTTGATTCATGATCAGAGGACAAACAATAG
1  1
181  GGCAACTTTGTTTTCAATGCAAGTTTTTTTGTGGTATTGCTATCTGGTGTGCACAGTTTC
2  G N F V F N A V F L L V L L S G V H S ↓ F
241  ATCATTAAACCGCTGTCAATTTGCTCAGCTCGAAGAGGGCTTTCACAAGACAAGTAAAG
22  I I K P L S I C S A R R R G L S Q R Q V K
301  CTGTGCAACGAGTACAGGAACCATATGCAAGTTTCAATTTGGATGGCACTAAGATGGCCTTG
42  L C N E Y R N H M Q P F I V D R G T K F L W
361  GATGAATGTCAAAGGCAATTTAAAGACAGAGCATGGAAGTACCTTTCTTTAAATCAC
62  D E C Q R Q F K D R R W N C T F P L N H
421  ATGCGTGGGTTTATTCGTACATCCCTAAAGGCCATAGAGAGGCTTTCATTTGTGCAGGCC
82  M R G F I P Y I P K G H R E A S F V H A
481  ATTTGTTTTCAGCTGGCACATTTTCATGCAAGTTAGCAGAGCTTGCATGGAAGCCAAGTGCAG
102  I V S A G T F H A V S R A C M E A K L T
541  TCACATTGCCATTGCGAGCAAGAGGCTAGGCTGACAGCCTGAGAAAGTCTTTTTATGG
122  S H C H C S Q E A R P I V D R G T K F L W
601  GCAGGTTGCGGTGATAAACCCTCCCTTATGGTTACAGCTTACGAAATTTATTCATGATGCC
142  A G C G D N L P Y G Y S F S K L F M D A
661  AGAGAACAGCTGGGGTCTGTATGCAACACAGGACATACAAAAGATCTCGCGTGTTTTAAATG
162  R E Q L G S D A T Q D I Q K I S R F L A
721  AACCTACACAACAACGAAGCTGGACGTAGGCGACTTATGGAAAACCTCATTGTGCAATGC
182  N L H N N E A G R R A L M E N S F V Q C
781  CGTTGCTATGGTCTATCAAAGGGCTGTCGACGCAAACTTGTATAGGACAGCTCAAACCA
202  R C H G L S K G C A T K T C Y R Q L K P
841  TTCAAAGCTGTCGGTGAATTTTGAAGGACCAATACGCAAGTGGCATTGAGTCGGAATTT
222  F K A V G E F L K D Q Y A S G I E S E I
901  TCCAGAGAGGGCTCCGGTACAGATGGAGAGTGAAGTCAAAGTACGGGAAAGTAC
242  S Q K R A P V H D G E M E L K L R E K Y
961  CCACAGTACCAGAAAATAAGCAACGGAACCTGGTATATCTTGAAGAATCGCCGAATTTAT
262  P Q Y Q K I S K R N L V Y L E E S P N Y
1021  TGCTAAAAGACATGTCTTTGGGCTCTTAGGAACCAAGGGCGACAGTGAATCGCACG
282  C L K D M S L G S L G T K G R Q C N R T
1081  TCGAAGGACTCAATAGCTGTAGCCTTTTGTGTCGGGCGAGGTTTCATGTTAAGAGA
302  S E G L N S C S L L C C G R G F H V K R
1141  CAGTTAACAGAGAAAAGTGGCGGTGTCATTTATTTGGTGTGCCACCTCAAGTGCCAA
322  Q L T R E S C A C Q F I W C C H L K C Q
1201  ACATCGGAAGTAGAGAAAACATGCACTATTGCAAGTAGACATAATATATGGCAATGTT
342  T C E V E K N M H Y C K *
1261  TTGTCGTGTACCGAGATATACAAGTATATGCTATTGCTGTATGGTGTGGAGAAAACGTCGCGCATG
1321  AGAGCGCGTCAAGTGTCCGGGACACATGGCAAGGACTGCTATGCTCAATTTGTTACAAAAT
1381  TTGCATCAAAAGCCTCACAACAGTGTAAATTTTGTGCAAAATGAGTAGAACCGCTCATGTT
1441  CACGTTGCATAAATGTAGGCGTAAGATGACCTTGAATTTCAACTGTTAGTTGTTATGAT
1501  TGAGAACGGAGAACTCTTTGTAGCTAGTAGAGATTGATTATAATATTATCATTAAA
1561  TATTGTTATGCTCAACAAAACG AATAAA GTTTGCAAACTTATTATAATTAATAAATTT
1621  TCGTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

图 1 海蜇 Wnt5 (Re-Wnt5)的全长 cDNA 及其推测的氨基酸序列

Fig.1 Full-length Wnt5 cDNA of *R. esculentum* (Re-Wnt5) and its deduced amino acid sequence

注: 下划线表示信号肽, 箭头表示酶切位点; 灰色阴影表示 Wnt 结构域; 方框表示多聚腺苷酸化尾信号; *表达终止密码子

性明显较高, 所有物种都具有 Wnt5 蛋白特征性的 24 个形成内部二硫键的半胱氨酸, 见图 2。

应用 MEGA 4.1 程序, 采用邻接法构建 Wnt5 的系统进化树(图 3)显示, 不同动物类群的 Wnt5 家族成员聚类成四个类群: 来自脊椎动物的 Wnt5a 和 Wnt5b 家族分别聚类为两个姊妹群, 然后经由文昌鱼与无脊椎动物的 Wnt5 聚类在一起, 最后与刺胞动物门的 Wnt5 类群形成从最原始的真后生动物到最复杂的哺乳动物的 Wnt5 的进化模式。

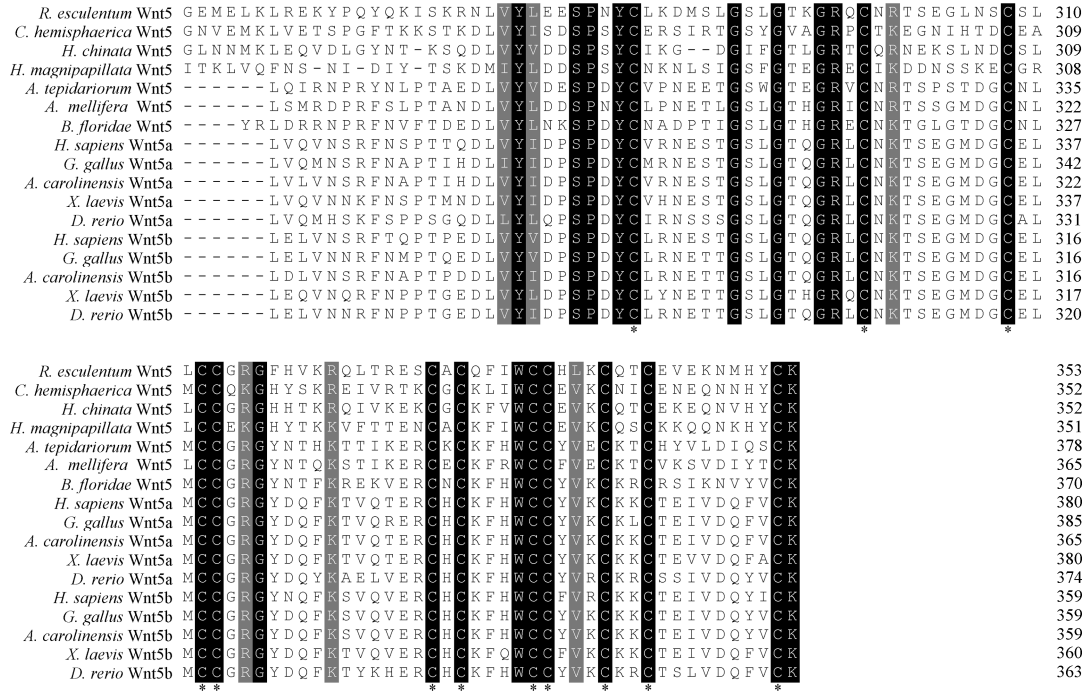


图 2 海蜇 Wnt5 与其它物种的 Wnt5 氨基酸多序列比对

Fig.2 Multiple sequence alignment of *R. esculentum* Wnt5 with Wnt5s from other species

注: 黑色表示相同氨基酸, 灰色表示相似氨基酸; *表达 Wnt5 家族 24 个保守的半胱氨酸残基

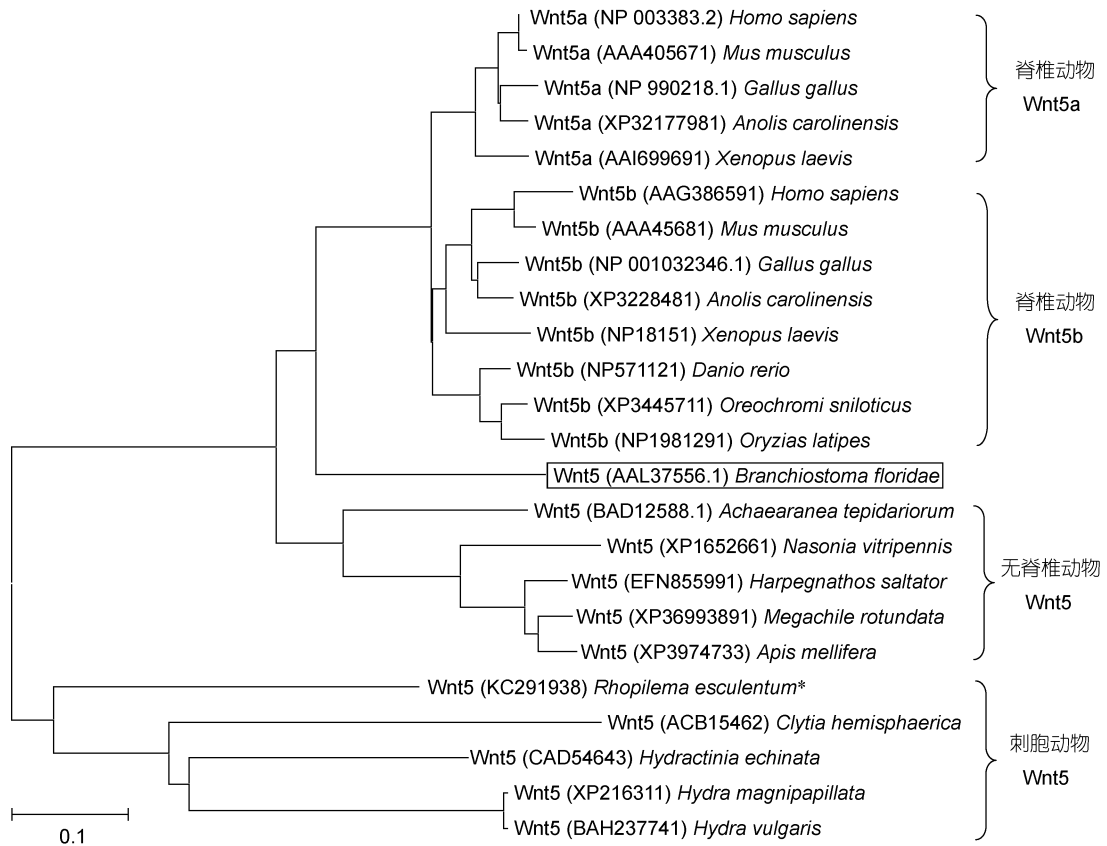


图 3 基于邻接法的 Wnt5 氨基酸序列的系统进化树

Fig.3 Phylogenetic tree of Wnt5 based on neighbor-joining method

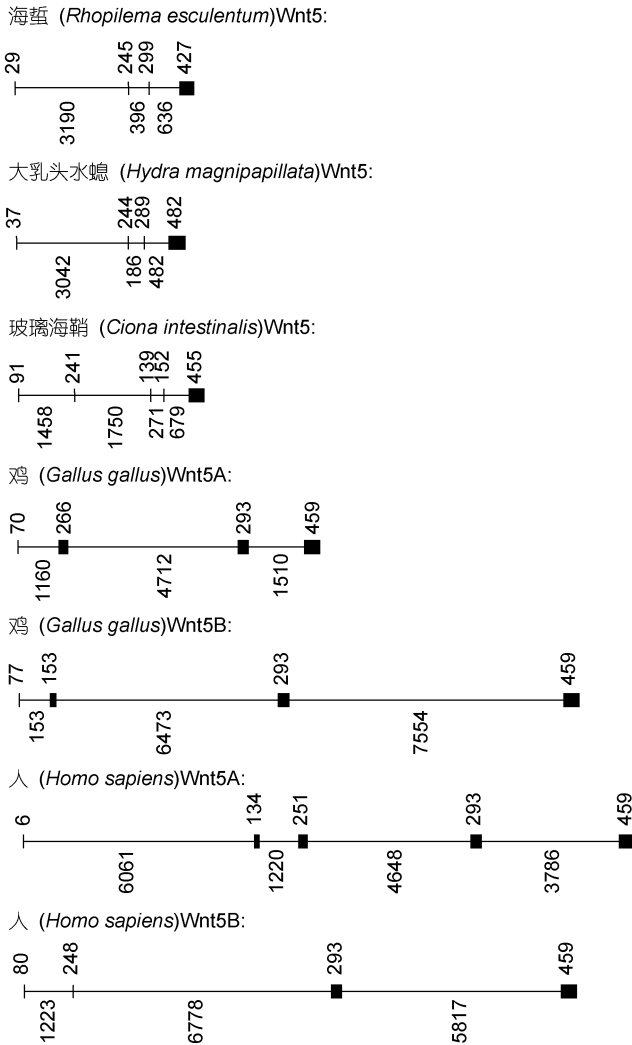


图 4 海蜇 Wnt5 与其它物种 Wnt5、Wnt5a 和 Wnt5b 的基因结构

Fig.4 Genomic organization of *R. esculentum* Wnt5 with Wnt5, Wnt5a and Wnt5b of other species

注: 黑色方块代表外显子; 直线代表内含子; 外显子和内含子大小用数字表示, 单位为 bp

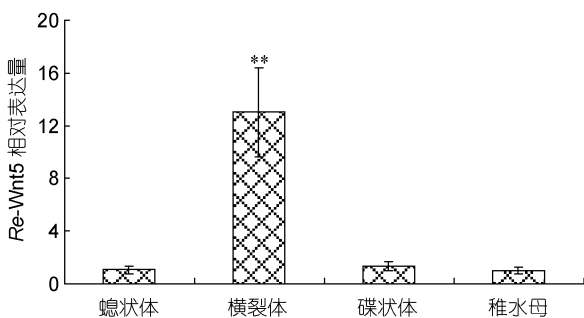


图 5 Re-Wnt5 在海蜇不同发育阶段的表达

Fig.5 The expression of Re-Wnt5 transcripts in different developmental stages of *R. esculentum*

2.3 Re-Wnt5 的基因组结构分析

采用 Overlap PCR 方法获得了长 5867bp 的

Re-Wnt5 基因组, 然后用 NCBI 上 Splign 内含子在线分析工具将其与 Re-Wnt5 的 cDNA 全长序列进行比对分析发现: 该基因共含有 4 个外显子和 3 个内含子, 且内含子-外显子的边界均符合“GT-AG”的剪接规则。不同物种 Wnt5 的基因组数据比较显示, Re-Wnt5 的外显子和内含子结构与刺胞动物大乳头水螅 Wnt5、脊椎动物鸡的 Wnt5a 和 Wnt5b 及人的 Wnt5b 相似, 但不同于无脊椎动物玻璃海鞘和人的 Wnt5a; 长度上, Re-Wnt5 与大乳头水螅和玻璃海鞘 Wnt5 相似, 但明显小于脊椎动物的 Wnt5a 和 Wnt5b (图 4)。

2.4 Re-Wnt5 的表达分析

采用实时荧光定量 PCR 技术分析了 Re-Wnt5 在海蜇不同发育阶段的表达特点如图 5 所示: Re-Wnt5 基因在海蜇的螅状体、横裂体、碟状体和稚水母 4 个发育阶段均有表达, 但存在着明显的发育表达差异, 其中横裂体阶段的表达量最高, 分别是螅状体、碟状体和稚水母表达量的 12.38、9.99 和 13.01 倍, 而表达量最低的发育阶段是碟状体阶段。one-way ANOVA 分析显示, 横裂体阶段与其它发育阶段的 Re-Wnt5 基因表达差异极显著 ($P < 0.01$), 而螅状体、碟状体和稚水母之间 Re-Wnt5 基因表达差异不显著 ($P > 0.05$)。

3 讨论

本研究采用转录组 454 GS FLX 测序和 RACE 技术, 首次解析了海蜇 Wnt5 基因的 cDNA 和基因组结构。Re-Wnt5 具有 Wnt 家族共同的结构特征, 包括: 1 个由 20 个氨基酸组成的信号肽, 2 个 N-糖基化位点, 24 个保守的参与二硫键形成的半胱氨酸(Fradkin *et al.*, 2004)。Blast 分析表明, Re-Wnt5 基因与来自刺胞动物、无脊椎动物和脊索动物的 Wnt5、脊椎动物的 Wnt5a 和 Wnt5b 具有高度相似性。基于邻接法构建 Wnt5 的系统进化树揭示, 来自刺胞动物门不同物种的 Wnt5 首先聚类为一支, 在脊索动物文昌鱼 Wnt5 之后, Wnt5a 和 Wnt5b 产生分歧, 形成了两个进化分支。基因组分析显示, Re-Wnt5 的结构与刺胞动物的 Wnt5、脊椎动物 Wnt5a 和 Wnt5b 的基因组相似; 但总长度仅类似于刺胞动物的 Wnt5, 明显小于脊椎动物 Wnt5a 和 Wnt5b。上述分析证实本研究获得的海蜇 Wnt5 蛋白是 Wnt5 家族新的一员。

已有研究表明, Wnt5 在调控动物的生长发育过程中发挥重要作用。Wnt5 调控海鞘的脊索发育: 从脊索形成到尾部分化, Wnt5 具有表达; 同时 Wnt5 还能单独控制海鞘胚胎的形态形成: 当将海鞘 Wnt5 的

mRNA 注射到受精卵中时, 其胚胎发育在神经胚时期出现了由于脊索细胞的不正常迁移而导致的形态缺陷(Sasakura *et al*, 2001)。类似的研究报道见于斑马鱼尾形成和软骨分化的形态形成过程(Rauch *et al*, 1997)、爪蟾的脊索发育的形态发生过程(Moon *et al*, 1993)以及鼠的胚胎发育和器官形成过程中(Yamaguchi *et al*, 1999)。在本研究中, Re-Wnt5 基因在海蜇的螅状体、横裂体、碟状体和幼蛰四个发育阶段均有表达, 其中横裂体阶段的表达量最高, 是螅状体、碟状体和幼蛰表达量的 12.38、9.99 和 13.01 倍。表明 Wnt5 不但参与了海蜇生长发育的各个阶段, 而且可能是调控海蜇横裂生殖的重要调控因子。横裂生殖是海蜇产生稚水母的最重要的无性生殖方式, 即螅状体经分节和变态两个紧密联系的发育阶段产生碟状体的过程(丁耕芜等, 1981; 陈介康等, 1984)。阐明海蜇横裂生殖规律, 不仅具有重要生物学意义, 而且也是海蜇养殖中稚水母大量人工培育、增殖放流必须解决的前提。海蜇 Wnt5 基因的成功克隆及在不同发育阶段初步解析了其在海蜇生长发育和横裂生殖中的调控作用, 作者下一步将以其作为靶基因, 探讨在不同生态条件下 Wnt5 表达规律, 从分子水平上开展海蜇的横裂生殖调控规律的研究。

参 考 文 献

- 丁耕芜, 陈介康, 1981. 海蜇的生活史. 水产学报, 5(2): 93—102
- 尹定子, 宋海云, 2011. Wnt 信号通路: 调控机理和生物学意义. 中国细胞生物学学报, 33(2): 103—111
- 张 平, 2001. Wnt 信号转导及其生物效应. 中国生物化学与分子生物学报, 17(4): 415—419
- 陈介康, 丁耕芜, 1984. 海蜇横裂生殖季节规律. 水产学报, 8(1): 55—67
- 潘 岩, 花永强, 刘鲁明, 2011. Wnt/ -catenin 信号通路在胰腺癌中的研究进展. 中国癌症杂志, 21(12): 969—972
- Cabrera C V, Alonso M C, Johnston P *et al*, 1987. Phenocopies induced with antisense RNA identify the wingless gene. Cell, 50: 659—663
- Fradkin L G, van Schie M, Wouda R R *et al*, 2004. The *Drosophila* Wnt5 protein mediates selective axon fasciculation in the embryonic central nervous system. Developmental Biology, 272: 362—375
- Klaus A, Birchmeier W, 2008. Wnt signalling and its impact on development and cancer. Nat Rev Cancer, 8: 387—398
- Livak K J, Schmittgen T D, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. Methods, 25: 402—408
- Logan C Y, Nusse R, 2004. The Wnt signaling pathway in development and disease. Annu Rev Cell Dev Biol, 20: 781—810
- Moon R T, Campbell R M, Christian J L *et al*, 1993. Xwnt-5A: A maternal Wnt that affects morphogenetic movements after overexpression in embryos of *Xenopus laevis*. Development, 119: 97—111
- Nusse R, van Ooyen A, Cox D *et al*, 1984. Mode of proviral activation of a putative mammary oncogene (int-1) on mouse chromosome 15. Nature, 307: 131—136
- Prestwich T C, Macdougald O A, 2007. Wnt/beta-catenin signaling in adipogenesis and metabolism. Curr Opin Cell Biol, 19: 612—617
- Putnam N H, Srivastava M, Hellsten U *et al*, 2007. Sea anemone genome reveals ancestral eumetazoan gene repertoire and genomic organization. Science, 317: 86—94
- Rauch G J, Hammerschmidt M, Blader P *et al*, 1997. Wnt5 is required for tail formation in the zebrafish embryo. Cold Spring Harbor Symp Quant Biol, 62: 89—96
- Reya T, Clevers H, 2005. Wnt signalling in stem cells and cancer. Nature, 434: 843—850
- Sasakura Y, Makabe K W, 2001. Ascidian Wnt-5 gene is involved in the morphogenetic movement of notochord cells. Development Growth Differ, 43: 573—582
- Tamura K, Dudley J, Nei M *et al*, 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular and Biological Evolution, 24:1596—1599
- Willert K, Brown J D, Danenberg E *et al*, 2003. Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. Nature, 423: 448—452
- Yamaguchi T P, Bradley A, McMahon A P *et al*, 1999. A Wnt5a pathway underlies outgrowth of multiple structures in the vertebrate embryo. Development, 126: 1211—1223

Wnt5 GENE FROM *RHOPILEMA ESCULENTUM*: cDNA CLONING, GENOMIC ORGANIZATION AND mRNA EXPRESSION

ZHOU Chun-Ya^{1,2}, ZHU Ling², PAN Ying², XIE Ming-Song², YANG Ao-Ao^{1,2},
CHEN Si-Qing², ZHUANG Zhi-Meng²

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai, 201306; 2. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Shandong Provincial Key Laboratory of Fishery Resources and Eco-environment, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao, 266071)

Abstract The cDNA and genome of Wnt5 from *Rhopilema esculentum* were for the first time cloned by 454 GS-FLX sequencing technique and RACE technique. The results show: (1) the full-length cDNA of Re-Wnt5 was 1646bp, containing an open reading frame (ORF) of 1059bp encoding a poly-peptide with 353 amino acid residues; (2) the genome of Re-Wnt5 contained four exons and three introns. SMART analysis showed that Re-Wnt5 shared common features of Wnt family, including a putative signal peptide of 20 amino acid residues, two N-glycosylation sites and the 24 conserved cysteine residues involved in the formation of the internal disulfide bridges. The deduced amino acid sequence of Re-Wnt5 had a high homology with that of Wnt5 from Cnidaria, invertebrate and Chordata, and as well that of Wnt5 and Wnt5b from vertebrate by the multiple sequence alignment and phylogenetic analysis. The Wnt5a and Wnt5b clusters occurred after the divergence of *Branchiostoma floridae*. Quantitative real-time PCR analysis revealed that the expression of Re-Wnt5 transcript was detected in all four developmental stages. The mRNA expression level of Re-Wnt5 was the highest in strobila, which was 12.38-fold ($P<0.01$), 9.99-fold ($P<0.01$), and 13.01-fold ($P<0.01$) of that in scyphistoma, ephyra and medusa, respectively.

Key words *Rhopilema esculentum*; Wnt5; cDNA; genomic organization; real-time PCR