

鲤 *WISP* 基因家族的克隆、表达及系统进化树的构建

孙婷^{1,2}, 刘伟^{1,3}, 徐鹏¹, 孙效文^{1*}

(1. 中国水产科学研究院水产生物应用基因组研究中心, 北京 100141;

2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;

3. 大连海洋大学生命科学与技术学院, 辽宁 大连 116023)

摘要: *Wnt1* 诱导分泌蛋白 (*WISP*) 基因家族与 *CYR61*、*CTGF*、*NOV* 基因共同构成了 *CCN* 家族。研究通过鲤基因组序列与斑马鱼 *WISP* 基因编码区全序列的比对获得 *WISP1a*、*WISP1b*、*WISP2*、和 *WISP3* 等 4 条序列。经过克隆、测序、比对拼接得到其开放阅读框, 分别是 1 089、1 077、1 038 和 1 026 bp, 它们都是由 5 个外显子和 4 个内含子构成, 分别编码 362、358、345 和 341 个氨基酸。分子系统学分析表明, 鲤 4 个 *WISP* 基因具有高度同源性, 其中 *WISP1a*、*WISP1b* 和 *WISP2* 均含有 4 个模块, *WISP3* 缺少第 2 个模块。通过 RT-PCR 检测 *WISP* 基因在鲤组织中的表达, 结果表明, *WISP1a* 鲤在 13 个组织中均有表达, 皮肤中表达最高, 脾、肠、卵巢次之, 其他组织中表达较低。*WISP1b* 在精巢、脑、皮肤、卵巢中表达较高。*WISP2* 在血液、鳃中表达较高。*WISP3* 在血液、脑、肝中表达较高。实时荧光定量 PCR 法分析 *WISP* 基因在鲤胚胎发育时期的表达, 结果表明, 除 *WISP3* 外, *WISP1a*、*WISP1b* 和 *WISP2* 在前期表达较高, 36 h 表达最低, 随后逐渐升高至第 6 天开始下降。

关键词: 鲤; *Wnt1* 诱导分泌蛋白; 克隆; 基因; 表达

中图分类号: Q 785; S 917.4

文献标志码: A

鲤科鱼类是世界上水产养殖生产中最重要鱼类之一, 鲤 (*Cyprinus carpio*) 蛋白含量高, 脂肪多为不饱和脂肪酸, 是中国淡水养殖的重要品种之一。关于鲤的生长发育目前有广泛研究, 而 *CCN* 家族生物学功能广泛, 可通过与其他信号分子如生长因子受体间的串话, 促进细胞生长、粘附、迁移, 诱导细胞凋亡及胞外基质的产生, 参与胚胎发育、血管生成、创伤修复、肿瘤生长等多种生物学过程, 对鲤的生长发育具有重要作用。该家族包括结缔生长因子 (connective tissue growth factor, *CTGF*)、*Cyr61* (cysteine-rich 61)、肾母细胞瘤过度表达基因 (nephroblastoma overexpressed gene, *nov*)、*WISP1* (*Wnt-1* induced secreted protein 1 或称 *elm1*)、*WISP2* (或 *Rcop-1*) 和 *WISP3*^[1-3], 由于 *CTGF*、*Cyr61* 和 *nov* 是这个家族的最初成员, 因此称这个家族为 *CCN* 家族。*CCN* 家族成

员的翻译产物是含 343 ~ 381 个氨基酸残基、相对分子质量为 35 ~ 40 ku 的分泌蛋白, 这些蛋白都含有 38 个保守的半胱氨酸, 均包含 4 个保守结构域 (domain): 1) 类胰岛素生长因子结合结构域 (*IGFBPs*); 2) C 型冯·维勒布兰德氏病结构域 (*vWC*); 3) 血小板反应蛋白-1 结构域 (*TSP1*); 4) 富含半胱氨酸的羧基端结构域 (*CT*)。不过 *WISP2* 和 *WISP3* 例外, *WISP2* 没有 C 末端模块且只有 28 个半胱氨酸, *WISP3* 通常在模块 2 上缺 4 个半胱氨酸。

WISP 基因作为 *CCN* 家族成员, 参与调节不同的发育过程, 如控制细胞增殖、粘附, 细胞极性以及确定细胞命运^[4-5], 是骨生长发育和形态发生重要的调控因子之一^[6-7]。但 *WISP* 基因在鲤生长发育过程中的表达规律及在骨的形成和形态发生中的调控作用还未见报道。本研究以鲤为研

收稿日期: 2011-10-02 修回日期: 2011-11-08

资助项目: 国家“八六三”高技术研究发展计划 (2011AA100401); 公益性行业 (农业) 科研专项项目 (200903045)

通讯作者: 孙效文, E-mail: sunxw2002@163.com

究对象,克隆了 *WISP* 基因,并利用半定量 RT-PCR 和实时荧光定量 PCR 检测其在不同组织和胚胎发育时期的表达差异,为进一步研究 *WISP* 基因对鱼类生长发育特别是在骨骼生长和胚胎发育中的作用提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料

实验用鲤取自中国水产科学研究院黑龙江水产研究所,暂养于中国水产科学研究院水产生物应用基因组研究中心。剪取新鲜鲤各组织(血液、脑、肝、脾、头肾、体肾、肠、鳃、心脏、皮肤、肌肉、卵巢和精巢)分别保存于 RNAsafeguard,储存在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱里。

1.2 RNA 的提取与 cDNA 的合成

用 TRIZOL 试剂盒(invitrogen, USA)分别提取血液、脑、肝、脾、头肾、体肾、肠、鳃、心脏、皮肤、肌肉、卵巢和精巢的总 RNA,并用无核苷酸水处理。反转录为 cDNA 之前用 NanoVue Plus Spectrophotometer (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, USA) 检测 RNA 的含量并用 1.5% 琼脂糖胶检测其完整性。每个组织取 3 μg RNA 先用 DNase I (amplification grade, Invitrogen) 前处理去掉其中的 DNA,再用反转录试剂盒[引物为 Oligo(dT)]合成 cDNA 第一条链,最后用 RNase 去掉剩余 RNA。cDNA 样品均用无核苷酸(DEPC)水稀释 10 倍备用。

1.3 *WISP* 基因在鲤中的克隆、测序与进化树的构建

利用斑马鱼 *WISP1a*、*WISP1b*、*WISP2*、*WISP3* 基因序列与鲤 EST 以及基因组序列进行 BLASTN 比对得到鲤 *WISP1a*、*WISP1b*、*WISP2*、*WISP3* 基因序列。利用包括各个组织的全鱼 RNA(3 μg) 反转录得到全鱼 cDNA,用 Primer 5.0 设计扩增 *WISP1a*、*WISP1b*、*WISP2*、*WISP3* 基因的引物 *Wispl1a* 2F、*Wispl1a* 2R、*Wispl1b* 3F、*Wispl1b* 3R、*Wispl2* 4F、*Wispl2* 1RR、*Wispl3h* F1、*Wispl3h* 1R(表 1),设计的引物要跨越至少一个内含子,以防基因组的污染而产生假阳性现象,所有的引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成,使用前将引物稀释至 10 mm/L。扩增得到的片段用 PMD-18T 载体[宝生物工程(大连)有限公司]克隆并测序(ABI 3130xl Genetic

Analyzer),测序 PCR 反应 10 μL 体系包括 cDNA 3 μL 、3 $\mu\text{mol/L}$ 上游引物 1 μL 、Bigdye 0.5 μL 、5 倍稀释的 seqbuffer 2 μL ,最后补水 3.5 μL 至终体积 10 μL ,PCR 条件为 98 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min,循环程序为 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 5 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 4 min,共 40 个循环,4 $^{\circ}\text{C}$ 保温。通过 BLASTN 比对分析与 *WISP* 基因开放阅读框序列相似度较高的其他物种 *WISP* 基因开放阅读框序列,使用软件 MEGA 5.0 构建系统进化树,计算方法为邻位相连法(Neighbor-Joining, NJ),自展内部分枝法(Bootstrapping)评定进化树的可靠性,重复次数为 1 000,并利用 BioEdit 7.0.1 软件进行 *WISP* 基因氨基酸序列的翻译和比对。

表 1 实验所设计的引物序列
Tab.1 The primers used in the experiment

引物 primer	引物序列(5'-3') primer sequence
<i>Wispl1a</i> 1F	TGCCAGAACCCACAGCGAGT
<i>Wispl1a</i> 1R	GCCGCAGGTCTTTGAGCAGG
<i>Wispl1b</i> 1F	TGGGAGAGACCTGTAATGAG
<i>Wispl1b</i> 1R	CCATTCACACACAGACAACG
<i>Wispl2</i> 1F	CGACCCTGTCAGCCTGTCT
<i>Wispl2</i> 1R	GCCAGTGTGGTAAGGAGTGC
<i>Wispl3</i> 1F	TTGTCTGCTTCGACCATGTG
<i>Wispl3</i> 1R	TTTGGACTTATTGGGAACGC
<i>Wispl1a</i> 2F	CGCTGTGTAATGAGTCTCAGCC
<i>Wispl1a</i> 2R	CATTGGGGTTTTACAGCTCAG
<i>Wispl1b</i> 3F	GTACCGCTGTCTGTGTGTAAT
<i>Wispl1b</i> 3R	CTCATTGACCTCATAGTACTGC
<i>Wispl2</i> 4F	CGTGTGCTCTTCAGTGTCACTGTTC
<i>Wispl2</i> 1RR	ATGAATAGGGGCAGTTGTAACG
<i>Wispl3h</i> F1	TACAGGGATCCTCCCTTAGC
<i>Wispl3h</i> 1R	AGCTACCATGAAGCACTGTG
β -actin-F	TGCAAAGCCGGATTCGCTGG
β -actin-R	AGTTGGTGACAATACCGTGC

1.4 *WISP* 基因在鲤各组织中的表达

采用半定量 RT-PCR^[8]的方法检测 *WISP* 基因在鲤各组织的表达,用 Primer 5.0 设计引物 *Wispl1a* 2F、*Wispl1a* 2R、*Wispl1b* 3F、*Wispl1b* 3R、*Wispl2* 4F、*Wispl2* 1RR、*Wispl3h* F1、*Wispl3h* 1R 以及 β -actin-F、 β -actin-R。先确定适当的循环数,使扩

增产物处在平台期前的线性增长范围内,并在1.5%琼脂糖凝胶上检测。基因 β -actin 与 WISP 的 PCR 反应体系为 1.0 μ L 鲤 cDNA 模板,2.0 μ L 10 \times Buffer,2.0 μ L 0.2 mmol/L dNTPs,0.1 μ L 1.0 U Taq 酶,1.2 μ L 2.0 mmol/L MgCl₂,1 μ mol/L 引物,最后补水至终体积 20 μ L。反应程序:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;循环程序为 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s,退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,(13~36 个循环);最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min;4 $^{\circ}$ C 保温。1.5%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物,溴化乙锭染色后在紫外凝胶成像仪(BIO-RAD)灯下观察、确定循环数。根据每个目的基因所确定的循环数对目的基因进行 13 个鲤组织 cDNA 的 PCR 扩增,并将扩增产物在 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测。利用 SPSS 15.0 的单因素方差分析(one way ANOVA)差异显著性。

1.5 WISP 基因在鲤各发育时期的表达

研究选取了鲤受精后 0,6,18,24,36,48,72 h,孵化后 3 和 6 d 的 cDNA,运用实时荧光定量法检测鲤各发育时期的表达。所用引物(Wisp1a 1F/1R、Wisp1b 1F/1R、Wisp2 1F/1R、Wisp3 1F/1R、 β -actin-F/R)序列如表 1 所示。目的基因的标准曲线是以全鱼 cDNA 10 倍系列(1.0 \times 10⁰,1.0 \times 10²,1.0 \times 10³,1.0 \times 10⁴,1.0 \times 10⁵ 倍)稀释为模板,PCR 反应体系为 1.0 μ L 鲤 cDNA(200 ng/ μ L),0.3 μ L(10 μ mol/L)上下游引物混合液,7.5 μ L SYBR Green reagent(东洋纺),最后补水至终体积 15 μ L。反应程序:95 $^{\circ}$ C 预变性 15 min;循环程序为 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s,60 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s(40 个循环)。平行试验重复 3 次,所有样品检测均设置阴性对照(无模板)以排除假阳性结果。反应在实时定量 7500 PCR 仪(Applied Biosystems)进行。每个目的基因的相对表达以内参 β -actin 为校准,数据由 7500 PCR 仪自带的软件分析得到,数据处理采用 2^{- $\Delta\Delta$ C_T}法^[9]。利用 SPSS 15.0 单因素方差分析进行组间比较, $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果

2.1 鲤 WISP 基因家族全长 cDNA 序列的分析及分子进化树的构建

利用斑马鱼 WISP 基因家族与鲤基因组进行 BLASTN 比对,并以鲤 cDNA 为模板进行克隆测

序验证,确定了 4 个鲤 WISP 基因,分别与斑马鱼中 WISP1a、WISP1b、WISP2 和 WISP3 基因相对应。

WISP 基因的 cDNA 序列结构及分析 鲤 WISP1a 全长 cDNA 为 1 089 bp(图 1-a),包含起始密码子 ATG 和终止密码子 TAA,编码 362 个氨基酸残基的多肽,N-末端含有 22 个氨基酸残基的信号肽,与斑马鱼 WISP1a 具有 86% 的相似性,ExPASy 在线软件预测其编码的蛋白质分子量为 41.17 ku,PI 值为 8.66。鲤 WISP1b 为 1 077 bp 的 cDNA 序列(图 1-b)。包含起始密码子 ATG 和终止密码子 TAA,编码 358 个氨基酸的多肽,与斑马鱼 WISP1b 具有 90% 的相似性,编码的蛋白质分子量为 41.04 ku,PI 为 8.42。鲤 WISP2 全长 cDNA 为 1 038 bp(图 1-c)。包含起始密码子 ATG 和终止密码子 TAA,编码 345 个氨基酸残基的多肽,N-末端含有一个 26 个氨基酸残基的信号肽,与斑马鱼 WISP2 具有 88% 的相似性,编码的蛋白质分子量为 38.37 ku,PI 为 8.22。鲤 WISP3 全长 cDNA 为 1 026 bp(图 1-d)。包含起始密码子 ATG 和终止密码子 TAA,编码 341 个氨基酸残基的多肽,N-末端含有一个 20 个氨基酸残基的信号肽,与斑马鱼 WISP2 具有 89% 的相似性,编码的蛋白质分子量为 37.9 ku,PI 为 9.10。

鲤 WISP1a、WISP1b、WISP2 及 WISP3 的氨基酸序列用 SMART 在线软件分析,结果发现,WISP1a、WISP1b 和 WISP2 均含有 4 个模块(图 2-a),WISP3 除没有第 2 个模块且第 2 模块少 4 个氨基酸残基外,其他 3 个模块与 WISP1a、WISP1b 和 WISP2 相同。多氨基酸序列比对显示,鲤 4 个 WISP 基因具有高度同源性(图 2-b)。

鲤 WISP 基因家族的进化树分析 鲤 4 个 WISP 基因与斑马鱼、人(*Homo sapiens*)、小鼠(*Mus musculus*)、褐家鼠(*Rattus norvegicus*)、原鸡(*Gallus gallus*)、沟鲈(*Ictalurus punctatus*)等进行 Clustal W 比对,用 MAGA 5.0 中 NJ 法进行进化树的构建确定其进化位置(图 3),哺乳动物和鱼类的 WISP 基因分别聚类在相应的群中,WISP1、WISP2、WISP3 分别聚类到各自相应的群中,鲤 WISP1a 与斑马鱼 WISP1a、沟鲈 WISP1 聚在一起,鲤 WISP1b 和斑马鱼 WISP1b 聚类在一起,随后共同聚类为 WISP1 群。

1 M T W L L M W V L L F A C V P Q I H R A F A Q D S
 1 ATGACTTGGCTTCTGATGTGGGTCTACTATTTGCTTGTGTACCACAGATTACAGAGCATTGGCCAGGATTCC
 26 S K M L S L P E P I T P E P Y N R T Q Y C H W P C
 76 TCTAAGATGTCTTACCAGAGCCATCACCCGGAGCCCTATAATCGCACCCAGTACTGCCACTGGCCCTGC
 51 K C P K T P P T C P P G V S L I M D G C D C C R A
 151 AAATGTCCTAAAACTCCCCACCTGTCACCAGGTGTGAGCTTGATCATGGACGGCTGGCATTGCTGCAGAGCA
 76 C A K Q V G E V C N E K E N C D H H R G L Y C D Y
 226 TGTGCCAAACAGGTGGGGAGGTTTGAACGAGAAGGAAAACTGTGACCATCATCGTGGCTTTACTGTGATTAC
 101 S A D K P R Y E K G V C A Y L Q G T G C E H K G V
 301 AGCGGGACAAGCCTAGGTACGAAAAAGGAGTATGTGCATATCTGCAGGGCACTGGCTGTGAGCACAAAGGTGTG
 126 I Y R N G Q S F Q P N C K Y Q C L C V N G A I G C
 376 ATCTATCGCAATGGCCAGAGCTTCCAGCCCAATGCAAAATACCAGTGTGTTGTGTGTAATGGGGCGATCGGATGT
 151 V S L C N E S Q P P R V W C Q N P Q R V K I P G R
 451 GTCTCGCTGTGTAATGAGTCTCAGCCCCAGGGTTTGGTGCCAGAACCCACAGCGAGTTAAAAATCCCCGGCCGC
 176 C C E Q W I C D E S R R G R K T A P R H T M A A L
 526 TGCTGTGAGCAGTGGATCTGTGATGAGTCCAGGAGGGGGCGAAGACAGCACCAAGACACAAATGGCTGCCCTG
 201 S S V K D N W H K N C V T Q T T S W S P C S K T C
 601 TCTAGTGTAAAAGACAACCTGGCACAAGAACTGTGTGACCCAGACAACTCCTGGAGTCCCTGCTCAAAGACCTGC
 226 G R G V S L R I T N N N K Q C Q M V K E S R L C N
 676 GGCCGTGGAGTGTCTTACGCATTACTAACAACAACAGCAGTGTGAGTGGTCAAAGAGAGCAGACTGTGCAAC
 251 I R P C K V D I A K H I K P G K K C L N I Y R E E
 751 ATCCGGCCTTGAAGGTGGACATCGCAAGCAGATCAAGCCTGGAAGAAGTGTGTAACATTTACAGGGAGGAA
 276 K P H N F T I S G C T S T N N Y W P K Y C G V C I
 826 AAGCCACACAACCTCACAATCTCAGGCTGTACAAGTACAAACAATTACTGGCCAAAGTATTGTGGAGTGTGATA
 301 D E R C C I P Y K S K T V E V D F Q C P N G S G F
 901 GATGAGCGTGTGATCCCTTACAAATCTAAGACTTGAAGTTCAGTCCCGAACCGGATCCGGCTTC
 326 T W Q I M W I N A C F C N L S C K N P N D I F T D
 976 ACCTGGCAGATCATGTGGATTAACGCTGCTTCTGCAACCTGAGCTGTAAAAACCCCAATGACATATTTACAGAT
 351 L E L Y H E R G E A G N *
 1051 CTAGAGCTGTACCATGAGAGAGGTGAGGCTGGAACCTGA

(a)

1 M W R L L S W I F L T A S L H Q A S S H N S T D S
 1 ATGTGGAGACTCCTGTCGTGGATTTTTTACTGCCAGTTTGCACCAGGCCAGTTCACCAACTCCACAGACTCT
 26 P L V T T D L D P Y N R Y C K W P C K C P K N
 76 CCTTGTGACCCACAGATTGGACCCATAAACCAGAAATCGATACTGCAAAATGGCCTGTAAAGTCCCTAAGAAT
 51 A P V C P H G V S L L T D G C D C C K A C A K Q V
 151 GCCCTGTTGCCACATGGGTCAGCTGTGACCGATGGATGTGACTGCTGCAAGCCCTGTGCCAAGCAGGTG
 76 G E T C N E R D T C D Y H K G L Y C D Y S A D K P
 226 GGGGAGACCTGTAATGAGAGAGATACCTGTGACTATCAAAAGGACTTACTGTGACTACAGTGTGACAAGCCG
 101 R Y E K G V C A Y V M G T G C E Y K G V I Y R N G
 301 AGGTACGAAAAGGGAGTGTGTGCATATGTTATGGGAACAGGCTGTGAGTATAAAGGTGTGATTTACCGTAATGGC
 126 Q S F Q P N C K Y R C L C V N G A I G C V S L C T
 376 CAAAGCTTCCAACCAATGTAAAGTCCGCTGTCTGTGTGTAATGGGGCGATTGGATGTGTGACTTTGCACC
 151 E S L P P R V W C Q S P K R V K I P G Q C C E K W
 451 GAGTCCCTACCGCCCGGTCTGGTGTGAGTCCGCAACAGAGTGAAGATCCAGGCCAGTGTGTGAGAAATGG
 176 I C E E S R K P R K T N P R H A P E D V S L T T N
 526 ATCTGCAAGAGTCCCGTAAACCACGACCAAGACCAACCCAGACAGCTCCTGAGGAGCGTGTCCCTCACAACATAAT
 201 D F W H K N C I T Q T T P W S P C S K T C G R G I
 601 GATTTTTGGCATAAAAAATTGCATTACCCAGACTACCCATGAGTCCCTGCTCAAAGACTGTGGCGGGGCATA
 226 S Q R I T N D N P G C V M E K E S R L C N L R P C
 676 TCACAGCGCATCACTAATGACAACCCTGGCTGTGTGATGGAGAAAGAGTCTGACTGTGTAACCTCCGACCTGT
 251 E V D I T K H F R P G K K C L N I Y R E P E F Q N
 751 GAGGTGGACATCACAAGCACTTTAGACCAGGTAAAAAATGCCTGAACATCTACCGTGAACCAGAGTTTCAGAAC
 276 F T I S G C V S K K A Y W P K Y C G V C T D E R C
 826 TTCACCATCTCAGGCTGTGTGAGTAAAGAAAGCGTATTGGCCCAAGTACTGTGGAGTCTGTACCGATGAGCGCTGC
 301 C I P Y K S K T I E V E F E C P N G S V F F W K Y
 901 TGATCCCATACAAGTCTAAGACCATCGAGGTGGAGTGTGAGTGTCCAAATGGTTCAGTTTTTCTGAAAATAC
 326 M W I N A C F C N L S C R N P N D I F A D L E Q Y
 976 ATGTGGATCAACGCTGCTTTTGCACCTCTCCTGCAGGAATCCAAATGATATCTTTGCAGATCTGGAGCAGTAC
 351 Y E V N E I V N *
 1051 TATGAGGTCAATGAGATTGTTAACTAA

(b)

1 M D K I Q R D R K N L M S W A L L F Y L G S Q V C
 1 ATGGACAAGATACAGAGAGACAGAAAAACCTAATGTATGGGCACTGCTGTTTACCTGGGCTCACAGGTGTGC
 26 C Q Q C G G P C Q C Q S S L P A C P E G V P L I L
 76 TGTCAGCAGTGTGGTGGCCCTGTGTCAGTGCACAAAGCTTTTACCAGCCTGCCAGAGGGCTTCTCTCATCTTT
 51 D G C Q C C Q V C A R Q Q G E A C S E L Y P C D G
 151 GATGGGTGCCAGTGTGTCAGGTGTGCAAGGCAGCAGGTGAGCCTGCAGTGTGATATCCGTGTGATGGT
 76 Q R S L Q C D Y S A S F P G E P G E C V S K K E L
 226 CAGCCAGCCTGCAATGTGACTACAGTGCAGCTTCCCTGGAGAGCCAGGAGTGTGTCAGTAAGAAGGAGTGT
 101 G C E H N G V S Y H E G Q V F Q P S C A L Q C H C
 301 GGCTGTGAGCATAATGGAGTCTCCTATCATGAAGGCCAGGTATTTACGCCCTCGTGTCTTCACTGTCACTGT
 126 S G G G V T C V P R C S E D V L L P T P D C P H P
 376 TCAGGTGGAGGGGTGACCTGTGTGCCCGGTGAGTGTGAGGATGTTCTCCTGCCACCCAGACTGCCCTCATCCT
 151 R R V Q Q P G K C C K E W V C E N M D N T V L Q D
 451 CGAAGGGTTCAACAACCAGGAAAATGCTGTAAAGAGTGGGTGTGAAAAATAGGACAACACAGTGTCCAGGAC
 176 A H I A G S D Q T M P A D S P Y Q T S P S S N C I
 526 GCTACATAGCAGGAAGTATGACACAATGCTGACAGACTCTCCATACCAACCAAGTCCAGTTCAAACCTGCATA
 201 D Q S A E W S A C S H T C G P G I S T R V S N Q N
 601 GACCAGAGCGCAGAGTGGAGCGCCTGCTCACACACCTGCGGGCTGGAATATCCACACGGGTGTCCAATCAGAAC
 226 L A C R L E M Q M R L C M I R P C Q P V L H R N P
 676 CTGGCCTGTGCGCTGGAGATGTCAGATGCGCTTGTGTATGATCCGACCCTGTCAGCTGTCTCCATAGAAAACCA
 251 Q W S R R K C Q P S Y R S A N P V R L F H Q G C Y
 751 CAGTGGTCAAGGAGGAAATGTCAACCAGTTACAGTTCAGCAAAACCCAGTGGGCTCTTCCACAGGGTGTCTAT
 276 S T R F Y R P R Y C G S C K D N R C C T P Y H T G
 826 AGTACGGGTTCTACAGGCCCGTTATTGCGGCTCATGTAAAGACAACCGTGTGTGACTCCTTACCACACTGGC
 301 T A L V T F R C P G G R L L K H A V M T I N S C I
 901 ACAGCACTGGTCACTTCCGCTGCCCTGGAGGAAGATGCTCAAACATGCTGTATGACCATCAACTCCTGCATC
 326 C R Y N C P Y S S G R A Y R E T P F W G *
 976 TGCCGTTAAACTGCCCTATTATCTGGAAGAGCATATAGAGAGACACCTTCTGGGGTTAG

(c)

```

1 M M L S L L C C V L L L F L S Q G A D S R Q K Q R
1 ATGATGCTATCACTACTGTGCTGTGTTCTGCTCTTTCTGAGTCAGGGTGTGATAGCAGGCAGAAGCAGCGG
26 E A T G L V E R R R Q F C S W P C K C G N R P L C A
76 GAAGCGACGGGCTGGTGGAGAGGAGGAGTCTGTAGCTGGCCGTGAAATGTGGCAACCGGCCGTGTGTGCC
51 P G V S S I L D G C G C C K T C A R Q I G E S C N
151 CCTGGTGCAGCTCCATCTGGATGGCTGGCTGCAAAACCTGTGCACGGCAGATTGGGGAATCATGCAAC
76 E R D L C D P H K S M Y C D F S K D Q P R Y E V G
226 GAAAGGATCTCTGTGACCCCTACAAAAGCATGTACTGTGACTTTCCAAAGACCAGCCAGTTATGAAGTTGGC
101 V C A Y M M G V G C D L N G A H Y D N G H A F Q P
301 GTCTGTGCTTACATGATGGGGTTGGTTGTGACCTGAATGGGGCTCACTATGATAACGGACACGCCTTCAACCC
126 S P L Y K C T C I A G A I G C T P A F I Q K P A G
376 AGCCCTCTACAAGTGCCTTGCATGCTGGAGCAATCGGCTGCACCTCCCTTATCCAAAAGCCGGCTGGA
151 M L S P A A L Q G R L P A G L K S N Q S P K H Q Q
451 ATGTTGAGTCCCGTCTCTTCAGGCGAGATTGCCAGCAGGACTCAAGAGCAATCAAAGCCCAACACCAGCAG
176 D T A Y R A M S A Y R D P P L A W K K N C L V Q T
526 GACACCGCTACAGGGCCATGTACAGGGATCCCTCCCTAGCCTGGAAGAAGAACTGTTGGTTACAGACC
201 T P W S P C S R T C G I G I S V R V N N D N S K C
601 ACACCTGGTCACCTGTTACGACCATCGGCATCGGCATCTCTGTACGAGTCAACAACGACAACAGCAAGTGT
226 E M R K E R R L C L L R P C D K N T L K G L K M P
676 GAGATGAGAAAAGAGCGCGACTTTGTCTGCTTCGACCATGTGATAAAAACACTCTAAAGGACTAAAGATGCCA
251 R G K T C R P K F Q A S K E E K L S L S G C T S V
751 AGAGGTAAAACCTGCAGACCGAAATCCAGGCCAGTAAAGAAGAGAAGCTCTCGCTGTCTGGTTACACGCGTT
276 K K H R P T Y C G I C T D K R C C V P N K S K M V
826 AAGAAGCACCGCCGACATACTGCGGCATCTGCACAGACAAGCGCTGTGCGTTCCCAATAAGTCCAAAATGGTG
301 N I E F H C K G G S N V L W K M Q W I T S C V C Q
901 AATATAGAGTTCCACTGCAAAGGGGATCTAACGTACTCTGGAAGATGCAGTGGATCACTTCTGTGTATGTCAG
326 R K C N D A N D M F S E L H L I *
976 AGGAAATGTAATGATGCTAATGATATGTTTCAGAGCTGCACCTAATTTAA

```

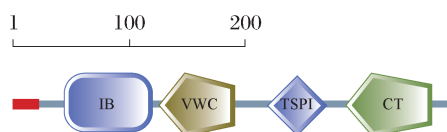
(d)

图1 *WISP1a* (a)、*WISP1b* (b)、*WISP2* (c)、*WISP3* (d) 的 ORF 序列及其所翻译的氨基酸序列

起始密码子 ATG, 终止密码子用 * 标注。

Fig. 1 The ORF nucleotide and deduced amino acid sequences of *WISP1a* (a), *WISP1b* (b), *WISP2* (c), *WISP3* (d) respectively

The start codon(ATG) is boxed and the stop codon(TGA) is represented with an asterisk.



(a)

	5	15	25	35	45	55	65	75
wisp1a	MTWLLMWVLL	FACVPQIHRA	FAQDSSKMLS	LPEPITPEPY	NRTQYCHWPC	KCPKTPPTCP	PGVSLIMDGC	DCCRACAKQV
wisp1b	MWRLLSWIFL	TASLHQSSH	NSTDSPLVIT	-----DLDPY	NRNRYCKWPC	KCPKSDPVCP	HGWSLLTDGC	DCCKACAKQV
wisp2	MDKIQRDRKN	LMSWALLFYL	GSQWCC----	-----	---QQCGGPC	QCQSSLPACP	EGWPLILDGC	QQCQVCARQQ
wisp3	MMLSLCCVLL	LLFLSQGADS	RQKQREAT--	-----GLV	ERRQPCSWPC	KCGNR-PLCA	PGWSSILDGC	GCCKTCARQI
	85	95	105	115	125	135	145	155
wisp1a	GEVNEREDTC	DHHRGLYCDY	SADKPRYEKG	VCAYLQGTGC	EHKGVLYRNG	QSFQPNCKYQ	CLCVNGAIGC	VSLCNEISQ-P
wisp1b	GETCNERDTC	DYHKGLYCDY	SADKPRYEKG	VCAYVMGTGC	EYNGVIYRNG	QSFQPNCKYR	CLCVNGAIGC	VSLCTESL-P
wisp2	GEACSELYPC	DGQRSLQCDY	SASFPG-EPG	ECVSKKELGC	EHNVSYSYHEG	QVFQPSALQ	CHCSGGGWTG	VPRCSEIDVLL
wisp3	GESCNERDLC	DPHRSMYCDF	SKDQPRYEVG	VCAYMMGVGC	DLNGAHYDNG	HAFQPSPLYK	CTCIAGAIGC	TPAFIQK--P
	165	175	185	195	205	215	225	235
wisp1a	PRVWCQNPR	VKIPGRCEBQ	WICDESRRGR	KTAPRHTMAA	LS-SVKDNWH	K----NCVTQ	TTSWSPCSKT	CGRGVSLRIT
wisp1b	PRVWCQSPKR	VKIPGQCCEK	WICEESRKR	KTMPRHAPPE	VSLTSMNDIWH	K----NCITQ	TTPWSPCSKT	CGRGISQRIS
wisp2	PTPDCPHPRR	VQQPGKCKE	WVCENMDNTV	LQDAHLAGSD	QTMPADSPYQ	TSPSSNCIDQ	SAEWSACSHT	CGPGISTRVS
wisp3	AGMLSPAALQ	GRLP----AG	LKSNQSPKHQ	QDTAYRAMSA	YR-DPPLAWK	K----NCLVQ	TTPWSPCSRT	CGIGISVRVN
	245	255	265	275	285	295	305	315
wisp1a	NNNKQCQMVK	ESRLCNLRPC	KVDIAKHIPK	--GKRLNIY	REEKPHNFTI	SGCTSTNNYW	PKYCGVCIDE	RCCIPYKSKT
wisp1b	NDNACNMMEK	ESRLCNLRPC	EVDITKHFPR	--GKRLNIY	REPEVQNFNTI	SGCVSTKAYW	PKYCGVCTDE	RCCIPYKSKT
wisp2	NQNLACRLEM	QMRCLMIRPC	QPVLHRNPQW	S--RRRCQPSY	RSANPVRLFH	QGCYSTRFYR	PRYCGSCKDN	RCCPTPYHTGT
wisp3	NDNSKCEMRK	ERRLCLLRPC	DKNTLKGLKM	PRGKTCRPFK	QASKEEKLSL	SGCTSVKKHR	PTYCGICTDK	RCCVNPNSKIM
	325	335	345	355	365			
wisp1a	VEVDFQCPNG	SGFTWQIMWI	NACFCNLSCK	NPND-IFTDL	ELYHERGEAG	N		
wisp1b	IEVEFVCPNG	SVFSWKYMWI	NACFCNLSCK	NPND-IFADL	EQYYEVMIEIV	N		
wisp2	ALVIFRCPPG	RLLKHAVMTI	NSCICRYMCP	YSSGRAYRET	PFWG-----	-		
wisp3	VNIEFHCKGG	SNVLWKMQWI	TSCVCRKCN	DAND-MFSEL	HLI-----	-		

(b)

图2 鲤 *WISP* 编码序列的结构及其氨基酸序列比对

(a) *WISP* 基因的 4 个模块。(b) 鲤 *WISP* 基因氨基酸序列的比对, *WISP1a*, *WISP1b*, *WISP2*, *WISP3* 分别含有 22、19、26、20 个氨基酸残基的信号肽(红色), *WISP3* 缺少第 2 个模块(绿色), 且其第 2 个模块缺少 4 个氨基酸残基, 蓝色为 *WISP* 基因第 3 模块 TPS1 的保守序列 WSXCSXTCG。

Fig. 2 The structure of *WISP* ORF and the Blastp result in common carp

(a) The domains of *WISP*: IB, VWC, TPS1 and CT domain. (b) The result of the blastp, *WISP1a*, *WISP1b*, *WISP2*, *WISP3* had peptides with 22, 19, 26 and 20 amino acids respectively (red). *WISP3* loosed the second domain (green) and the blue indicated that the conserved sequence of TPS1 domain was WSXCSXTCG.

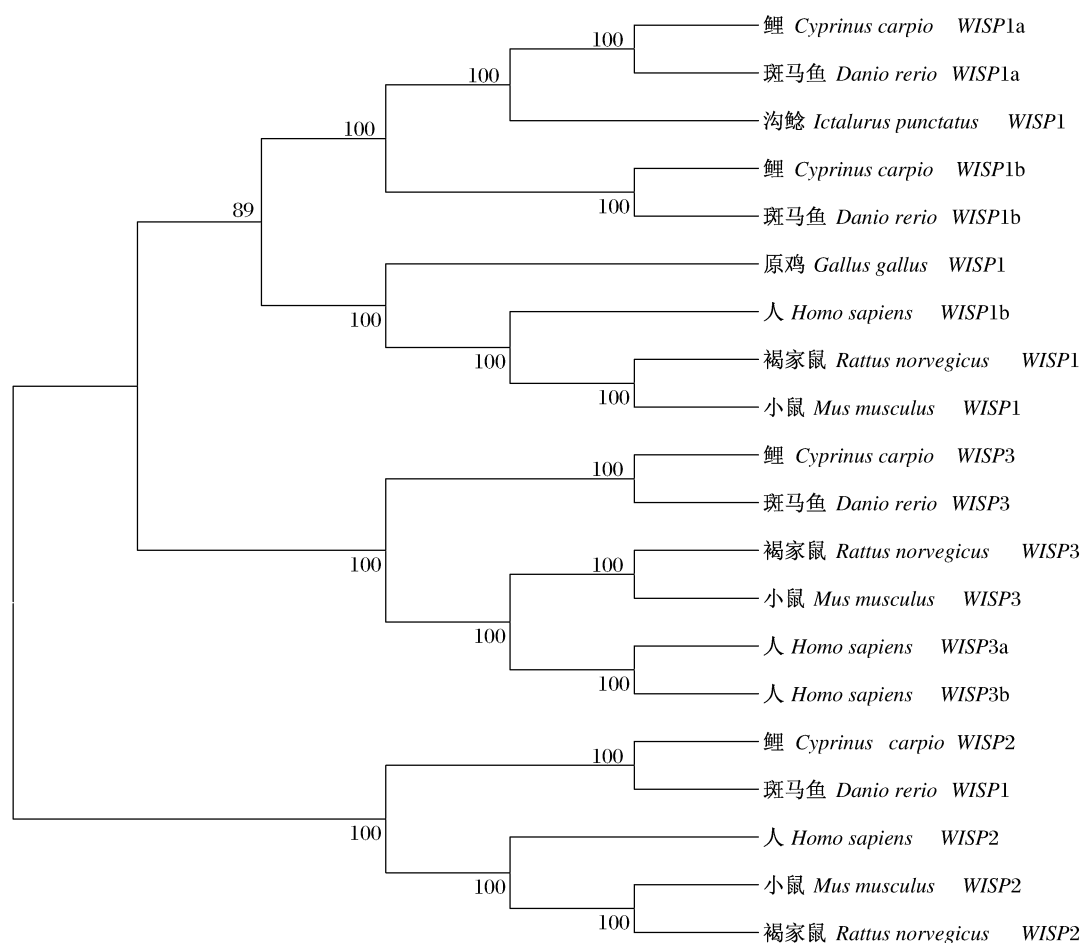


图 3 基于不同物种 WISP 基因核苷酸序列构建的分子系统树

Fig. 3 Phylogenetic tree of WISPs nucleotide sequences

WISP 基因 cDNA 序列进行 Clustal W 比对,用 MAGA 5.0 中 NJ 法进行进化树的构建,重复次数为 1 000,各物种 GenBank 登录号见表 2。

2.2 鲤 WISP 基因 mRNA 在组织中的表达

WISP 基因在组织中的表达用半定量方法检测。实验分别用 6 个不同循环数(21、24、27、30、33、36 个循环)对目的基因进行扩增,选择适当循环数,使扩增产物处在平台期前的线性增长范围内,分析定量扩增产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳(图 4),WISP1a 在 33 个循环达到最亮,36 循环的亮度基本保持不变,说明在 33 个循环已进入平台期,最后选取 31 为 PCR 扩增循环数。同理,WISP1b 在 30 个循环进入平台期,故最后选取 29 循环。WISP2、WISP3 在 33 个循环进入平台期,最后 WISP2、WISP3 选取 32 循环进行 PCR 扩增。 β -actin 在 23 个循环进入平台期,故最后选取 21 循环。

表 2 不同物种 WISP 基因 ORF 序列

Tab. 2 Nucleotide sequences of WISP used for phylogenetic tree construction and multiple sequences alignment

物种 species	基因 gene	GenBank 登录号 accession no.
斑马鱼 <i>D. rerio</i>	WISP1a	NM_001166230. 1
	WISP1b	GQ273496. 1
	WISP2	NM_001199101. 1
	WISP3	NM_001166231. 1
沟鲈 <i>I. punctatus</i>	WISP1	NM_001200341. 1
人 <i>H. sapiens</i>	WISP1	BC074841
	WISP2	NM_003881. 2
	WISP3a	BC105941
	WISP3b	NG_011748
褐家鼠 <i>R. norvegicus</i>	WISP1	NM_031716. 1
	WISP2	NM_031590. 1
	WISP3	NM_001170483. 1
小鼠 <i>M. musculus</i>	WISP1	NM_018865. 2
	WISP2	NM_016873. 2
	WISP3	NM_001127376. 1
原鸡 <i>G. gallus</i>	WISP1	NM_001024579. 1

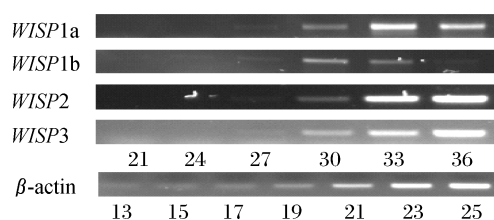


图4 目的基因与 β -actin 循环数确定的电泳图
Fig. 4 The amplification numbers of *WISP* and β -actin and the figure mean the amplification numbers

图5为鲤 *WISP* 基因及 β -actin 在各组织中表达凝胶电泳结果,利用 imageJ 分析得出目的基因在各组织表达的灰度值,分别除以 β -actin 在各

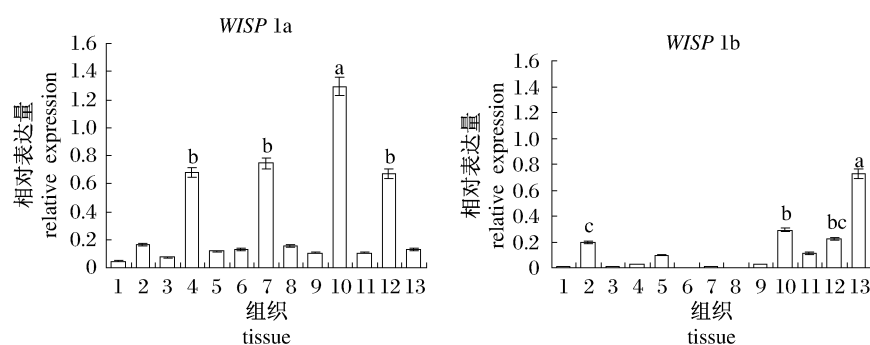


图5 鲤 *WISP* 基因与 β -actin 在 13 个组织中的表达电泳图

1. 血液,2. 脑,3. 肝,4. 脾,5. 头肾,6. 体肾,7. 肠,8. 鳃,9. 心脏,10. 皮肤,11. 肌肉,12. 卵巢,13. 精巢。不同字母表示差异显著。

Fig. 5 The expression of *WISP* and β -actin in 13 tissues

1. cells,2. brain,3. liver,4. spleen,5. head kidney,6. body kidney,7. intestine,8. gill,9. heart,10. skin,11. muscle,12. ovary,13. testicle.

Different letters (a, b, c et al) are significantly different ($P < 0.05$) among the treatments.

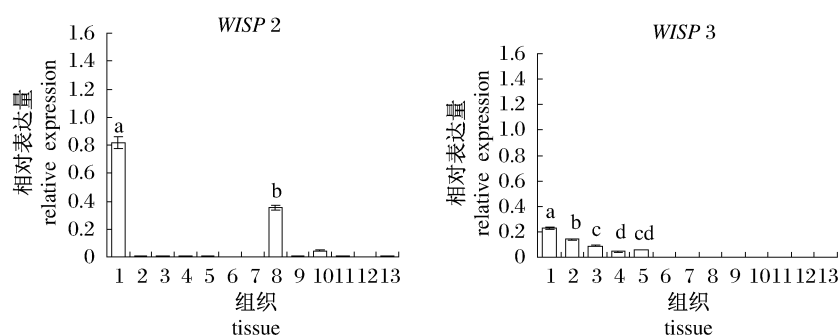


图6 *WISP* 基因在各组织中的相对表达量

1. 血液,2. 脑,3. 肝,4. 脾,5. 头肾,6. 体肾,7. 肠,8. 鳃,9. 心脏,10. 皮肤,11. 肌肉,12. 卵巢,13. 精巢。不同字母表示差异显著。

Fig. 6 The relative expression of *WISPs* in the tissues

1. blood,2. brain,3. liver,4. spleen,5. head kidney,6. body kidney,7. intestine,8. gill,9. heart,10. skin,11. muscle,12. ovary,13. testicle.

Different letters (a, b, c et al) are significantly different ($P < 0.05$) among the treatments.

2.3 实时荧光定量 PCR

鲤 *WISP* 基因在胚胎发育时期的表达用实时荧光定量相对定量中的 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法进行检测(图

组织表达的灰度值,得出相对灰度值,即为目的基因相对表达量。如图6所示, *WISP1a* 在 13 个组织中均有表达,皮肤中表达最高,脾、肠、卵巢次之,在其他组织中表达较低且血液中表达最低。 *WISP1b* 在精巢中表达最高,脑、皮肤、卵巢次之,在血液、肝、体肾、肠、等组织中表达较低或检测不到。此结果提示, *WISP1* 基因的两个拷贝已经分化出了空间表达差异,有可能会有一些功能上的异化。 *WISP2* 在血液中表达最高,次之,在其他组织中表达较低或检测不到。 *WISP3* 在血液中表达最高,脑次之,在肝、脾、头肾中表达较低,而在其他组织中检测不到或不表达。从 *WISP* 在血液中的表达推测其可能与骨的生长有关。

7),除 *WISP3* 外, *WISP1a*、*WISP1b* 和 *WISP2* 基因在鲤的 9 个胚胎发育时期均检测到, *WISP1a* 在受精后 0 h 相对表达量最高,6 h 次之,两者均显著

高于随后各时期的表达量,推测与受精卵的细胞增殖有关,在 24 和 48 h 的表达量高于除 0 和 6 h 外的其他时期的表达量,推测在这两个时期 *WISP1a* 行使一定的功能。*WISP1b* 在受精后 6 h 表达量最高,0 h 次之,18 h 最低,随后逐渐升高但幅度较小。*WISP2* 的表达起伏较大,从 0 h 到 24 h 都处在较高水平,6 h 表达量最高,在 36 h 降

到最低,随后都是逐渐升高最后在 6 d 时的表达量降低到稍低于 0 h 的水平,推测 *WISP2* 对胚胎发育具有重要功能并持续到孵化以后的生长发育时期。*WISP3* 在 0 h 到 24 h 期间不表达或没有被检测到,*WISP2* 和 *WISP3* 从 36 h 到 6 d 的表达规律相似,推测两者功能有一定的相关性。

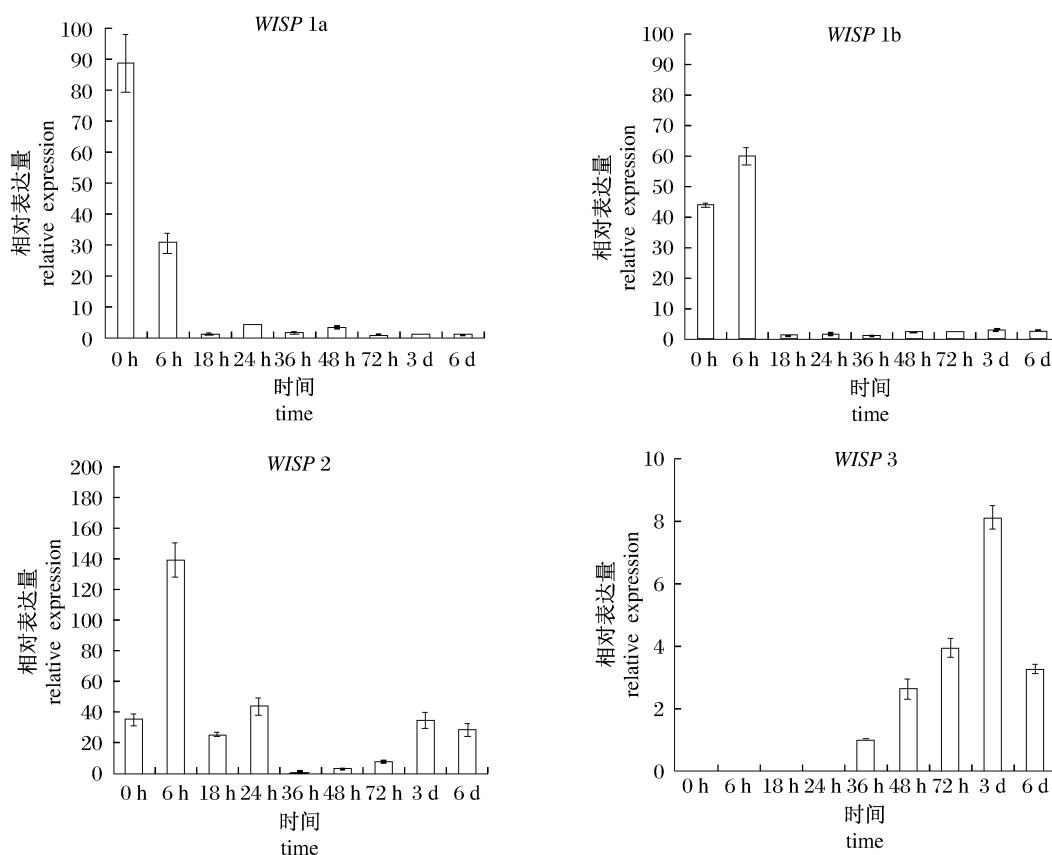


图 7 *WISP* 基因在各胚胎发育时期的相对表达量

Fig. 7 The relative expression of *WISPs* in the embryonic development periods

3 讨论

WISP 基因是 CCN 家族的重要成员之一,参与调节不同的发育过程,特别是对骨骼发育和胚胎发育具有重要的调控作用。通过对鲤 *WISP* 基因的克隆和表达研究有助于从分子水平阐明鲤骨骼生长和胚胎发育的调控机理。本实验得到鲤 4 个 *WISP* 基因,分别是 *WISP1a*、*WISP1b*、*WISP2* 和 *WISP3*。*WISP1a* 全长 cDNA 长 1 089 bp,编码 362 个氨基酸残基的多肽。*WISP1b* 的 cDNA 全长 1 077 bp,编码 358 个氨基酸残基的多肽。*WISP2* 全长 cDNA 长 1 038 bp,编码 345 个氨基

酸残基的多肽。*WISP3* 全长 cDNA 长 1 026 bp,编码 341 个氨基酸残基的多肽,且它们都具有 5 个外显子和 4 个内含子。鲤 *WISP1a*、*WISP1b*、*WISP2* 和 *WISP3* 与相对应的斑马鱼 *WISP* 基因具有较高的同源性^[10],分别为 86%、90%、88%、89% 的相似性。SMART 软件预测鲤 *WISP1a*、*WISP1b*、*WISP2* 都含有 4 个与 CCN 家族相同的保守模块:IB、vWC、TSP1 和 CT 模块。鲤 *WISP2* 有 C 末端的 CT 模块,与人、小鼠、鸡等的 *WISP2* 没有 CT 模块是不同的^[1-3],CT 模块与受体结合和二聚化有关,TGF- β 、血小板衍生生长因子和神经生长因子都作为二聚体而含有 CT 模块^[11],推

测鲤 *WISP2* 与其他受体的结合区域同其他 CCN 家族成员相同。鲤 *WISP3* 则缺少第 2 个模块 vWC, 只有 IB、TSP1 和 CT 三个模块, 而人和小鼠等哺乳动物的 *WISP3* 具有 vWC 模块^[1-3]。Force 等^[12]指出基因复制可使复制的基因获得不同的表达模式、新的功能或变成假基因。不清楚鲤 *WISP2* 和 *WISP3* 与哺乳动物直系同源基因是否会产生功能的不同, 但鲤 *WISP* 基因与斑马鱼 *WISP* 基因结构是相同的^[10], 且都具有 TPS1 模块的保守序列 WSXCSXXCG, 鲤 *WISP* 基因的结构与高等脊椎动物 *WISP* 基因同源性较高但又具有其特异性, 推测基因可能在从低等到高等动物的进化中产生了符合自身条件的变异。

哺乳动物和鱼类的 *WISP* 基因分别聚类在相应的群中, *WISP1*、*WISP2*、*WISP3* 分别聚类到各自相应的群中, 鲤 *WISP1a* 与斑马鱼 *WISP1a*、沟鲈 *WISP1* 聚在一起, 鲤 *WISP1b* 和斑马鱼 *WISP1b* 聚类在一起, 随后共同聚类为 *WISP1* 的群。此结果说明 *WISP1*、*WISP2*、*WISP3* 早于以上各物种的进化时间, 如果沟鲈没有其他 *WISP1* 基因的话, 推测 *WISP1* 的两个拷贝可能为鲤科鱼类特有, 甚至鲤中会有多个 *WISP1* 的拷贝, 但需要进一步的硬骨鱼类基因组研究的证据。研究发现斑马鱼、鲤的 *WISP* 基因与人和小鼠等哺乳动物编码的氨基酸链长度均不相同, 这可能是导致鱼类 *WISP* 基因与哺乳动物 *WISP* 基因同源性差异较大的原因, 推测与物种进化有关。刘春伟等^[13]指出可能由于进化程度不同, 导致 *ORL1* 基因在不同物种间同源性差异较大。

明确基因的表达规律是研究基因功能的重要手段之一。本研究利用 RT-PCR 和实时荧光定量 PCR 检测了鲤 *WISP* 基因在 13 个组织和 9 个胚胎发育时期的表达特点。结果表明, *WISP1a* 在鲤 13 个组织中皮肤、肠、脾、卵巢表达量相对较高, *WISP1b* 在精巢、脑、皮肤、卵巢中表达量相对较高, *WISP2* 主要在血液、鳃、皮肤中表达, 其中在血液中表达最高, *WISP3* 仅在血液、脑、肝、脾、头肾中检测到有表达。鲤各 *WISP* 基因在组织中的表达差异较大, 即使 *WISP1* 的两个拷贝其组织表达也大不相同, 推测鲤 *WISP* 基因间的功能差异较大, *WISP1a* 和 *WISP1b* 在血液中表达量很低, 而 *WISP2* 和 *WISP3* 都在血液中表达量最高, 推测可能与骨的发育和代谢有关, French 等^[6]指出

WISP1 可抑制软骨分化, *WISP2* 在成骨的成骨细胞、分散碱性磷酸酶阳性的骨髓细胞中均有高水平表达。实时荧光定量 PCR 的分析结果显示, *WISP1a*、*WISP1b* 和 *WISP2* 前期表达量较高, 推测可能与细胞增殖和分化有关, Cadigan 等^[4]指出 *WISP* 作为 Wnt 诱导分泌蛋白控制细胞增殖、粘附, 细胞极性以及确定细胞命运。*WISP1a* 在胚胎发育后期表达量很低, *WISP1b*、*WISP2* 和 *WISP3* 则逐渐升高至第 3 天, 随后降低, 推测可能与骨的发育和形成有关。Fernando 等^[10]指出 *WISP1b* 在斑马鱼受精后 50 ~ 56 h 的甲状腺中表达, 而 *WISP1a* 却在斑马鱼的胚胎早期没有被检测到; *WISP2* 在斑马鱼受精后 70 h 的咽弓表达, *WISP3* 在斑马鱼发育中的中线脑、耳泡中检测到, 而甲状腺和咽弓等都与骨的发育有间接或直接的关系。进一步确定 *WISP* 基因在鲤生长发育中的具体功能还需更多的如 FISH(荧光原位杂交)、Northern blot、基因敲除与敲入等方法的研究。

本研究利用斑马鱼 *WISP* 基因与鲤基因组进行 BLASTN 比对, 经过克隆测序验证得到鲤四个与斑马鱼相对应的 *WISP* 基因, 分别为 *WISP1a*、*WISP1b*、*WISP2*、*WISP3*。系统进化树和氨基酸序列比对分析显示, 鲤 *WISP* 基因与其他物种 *WISP* 基因存在高度同源性, 但鲤可能含 *WISP1* 的多个拷贝, 鲤 *WISP2* 和 *WISP3* 与哺乳动物同源基因的功能结构存在明显差异。采用 RT-PCR 法和实时荧光定量 PCR 法对鲤 *WISP* 基因的组织表达和胚胎发育时期的表达进行了分析, 从结果推测其与骨的生长发育有关。但鲤 *WISP* 基因是否具有多拷贝、其功能结构域的不同是否产生新的功能则不清楚, 其在鱼类生长发育过程中的规律还需要进一步研究。

对实验过程中张研博士、赵紫霞博士、李炯堂博士、冀培丰、万玉美等的帮助和支持表示衷心感谢。

参考文献:

- [1] Brigstock D R. The connective tissue growth factor/cysteine-rich61/nephroblastoma overexpressed (CCN) family[J]. *Endocrine Reviews*, 1999(20): 189-206.
- [2] Laul F, Lam S C. The CCN family of angiogenic regulators; the integrin connection[J]. *Experimental Cell Research*, 1999(248): 44-57.

- [3] Perbal B. NOV (nephroblastoma overexpressed) and the CCN family of genes: structural and functional issues[J]. *Molecular Pathology*,2001 (54) :57 – 79.
- [4] Cadigan K M, Nuse R. Wnt signaling: a common theme in animal development [J]. *Genes Development*,1997(11) :3286 – 3305.
- [5] Dale T C. Signal transduction by the Wnt family of ligands[J]. *Biochemistry*,1998(329) :209 – 223.
- [6] French D M,Kauk R J,D' souza A L,*et al.* *WISP-1* is an osteoblastic regulator expressed during skeletal development and fracture repair [J]. *The American Journal of Pathology*,2004(165) :855 – 867.
- [7] Hurvitz J R, Suwairi W M, van Hul W, *et al.* Mutations in the CCN gene family member *WISP3* cause progressive pseudorheumatoid dysplasia [J]. *Nature Genetics*,1999(23) :94 – 98.
- [8] Wang A M, Doyle M V, Mark D F. Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction [J]. *Proceeding of National Academy of Sciences*,1989 (86) :9717 – 9721.
- [9] Liva K J,Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta DeltaC (T)) method [J]. *J Methods*, 2001(25) :402 – 408.
- [10] Fernando C A, Conrad P A, Bartels C F, *et al.* Temporal and spatial expression of CCN genes in zebrafish[J]. *Developmental Dynamics*,2010(239) : 1755 – 1767.
- [11] Sun P D,Davies D R. The cystine-knotgrowth-factor superfamily [J]. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*,1995(24) :269 – 291.
- [12] Force A,Lynch M,Pickett F B,*et al.* Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations [J]. *Genetics*,1999(151) :1531 – 1545.
- [13] 刘春伟,孙超. 猪 *OLR1* 基因克隆及生物信息学分析 [J]. *西北农业学报*,2008,17(5) :51 – 55.

Molecular cloning, expression and phylogenetic tree's construction of *WISP* gene family in common carp

SUN Ting^{1,2}, LIU Wei^{1,3}, XU Peng¹, SUN Xiao-wen^{1*}

(1. *The Centre for Applied Aquatic Genomics, Chinese Academy of Fishery Sciences, Beijing 100141, China;*

2. *College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;*

3. *College of Aqua-life Science and Technology, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China)*

Abstract: Wnt-1 inducible signaling pathway proteins (*WISP*) constitute the CCN family with *CYR61*, *CTGF* and *NOV*. We used BLAST program at the NCBI to identify near matches in the common carp (*Cyprinus carpio*) genome database to each zebrafish (*Danio rerio*) *WISP*. *WISP1a*, *WISP1b*, *WISP2* and *WISP3* were identified respectively. ORF of the four isoforms of *WISP* were cloned and sequenced in common carp. *WISP1a* was 1 089 bp encoding polypeptides of 362 amino acids with a calculated Mw of 41.2 ku and PI of 8.66. *WISP1b* was 1 077 bp encoding a polypeptide of 358 amino acids with a calculated Mw of 41.0 ku and PI of 8.42. *WISP2* was 1 038 bp encoding polypeptides of 345 amino acids with a calculated Mw of 38.4 ku and PI of 8.22. *WISP3* was 1 026 bp encoding polypeptides of 341 amino acids with a calculated Mw of 37.9 ku and PI of 9.10. They all have 5 exons and 4 introns. Phylogenetic relationship analysis indicated that *WISP1*, *WISP2* and *WISP3* were highly homologous and were clustered to their corresponding subgroup respectively. *WISP1a*, *WISP1b* and *WISP2* all contained 4 conservative domains and *WISP3* lost the second domain in common carp. RT-PCR analysis revealed *WISP1a* to be expressed in most common carp tissues, with the principal expression in skin and weakest expression in blood cells. *WISP1b* was predominantly expressed in testicle, brain, skin and ovary. *WISP2* was highly observed in blood cells and gill. *WISP3* was most strongly expressed in blood cells and also expressed in brain, liver, spleen, head kidney and not detected in other tissues. Quantitative real-time PCR were used to analyse the expression of *WISP* in common carp development, and the result indicated that *WISP* transcriptions are expressed highly at the initial stage except *WISP3* and all lowest at 36 hpf and then increased before 6th d.

Key words: common carp (*Cyprinus carpio*); *WISP*; clone; gene; expression

Corresponding author: SUN Xiao-wen. E-mail: sunxw2002@163.com