

厚壳贻贝 *Wnt4* 基因时空表达

徐跃峰¹, 李一峰¹, 梁箫¹, 陈芋如¹, 杨金龙^{1,2*}

(1. 上海海洋大学 省部共建水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306;

2. 上海海洋大学 海洋科学研究院, 上海 201306)

摘要: 为探究 *Wnt4* 基因在厚壳贻贝幼虫发育阶段和组织生长过程中的作用, 通过 RACE 技术克隆了厚壳贻贝 *Wnt4* 基因 cDNA 全长序列, 该序列全长 3342 bp, 开放阅读框为 1074 bp, 编码 357 个氨基酸。该序列与人、小鼠、海胆、栉孔扇贝和长牡蛎等物种的同源性分别为 61%、61%、60%、71% 和 76%。通过实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 分析 *Wnt4* 基因在厚壳贻贝成体多个组织中(外套膜、闭壳肌、鳃、雌雄性腺、足和消化腺)均有表达, 其中在外套膜中表达量最高, 推测可能与贝壳形成有关; *Wnt4* 基因在厚壳贻贝幼虫发育阶段高表达主要集中在壳顶期, 并推测 *Wnt4* 基因可能参与了贝壳形态结构发生转变的过程以及某些器官的形成与发育。本研究为进一步开展双壳贝类 *Wnt* 基因家族的功能研究提供了理论依据。

关键词: 厚壳贻贝; *Wnt4*; 基因克隆; 表达分析

中图分类号: S 785; S 917.4

文献标志码: A

Wnt 基因家族是一类通过编码分泌性糖蛋白信号分子, 调节并控制生物体细胞存活、增殖和分化等过程, 在生物早期发育和器官形成中起着非常重要的作用^[1-4]。在线虫、环节动物、节肢动物、棘皮动物和脊椎动物体内都发现 *Wnt* 蛋白^[5-7]。在人类中, *Wnt* 信号通路被阻断导致发育紊乱^[8]。*Wnt3a* 在小鼠体内调控着增殖刺激以及决定造血干细胞的命运^[9]。*Wnt-2* 在果蝇体内通过引导色素细胞和肌肉前体细胞的迁移进而控制着雄性生殖特性^[10]。

Wnt4 是 *Wnt* 家族成员之一, 该基因已在人 (*Homo sapiens*)、小鼠 (*Mus musculus*)、非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*)、斑马鱼 (*Danio rerio*)、海胆 (*Heliocidaris erythrogramma*)、果蝇 (*Drosophila melanogaster*)、沙蚕 (*Platynereis dumerilii*)、栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*)、长牡蛎 (*Crassostrea gigas*) 和日本血吸虫 (*Schistosoma japonicum*) 等中均有相关基因表达和功能的研究^[3-4, 11-16]。在人类

中, *Wnt4* 是一个性别决定基因, 与 DAX1 协同调控女性发育并阻止睾丸的形成^[17]。*Wnt4* 在果蝇中不但参与调控视网膜轴突的正确导向^[18], 而且通过调节黏着斑促使细胞运动进而参与卵巢形态发生^[19]。*Wnt4* mRNA 首先表达在斑马鱼体节期的脑部, 对细胞的运动具有抑制作用^[20]。在许多无脊椎动物和脊索动物中, *Wnt* 信号通路参与调控个体生长发育, 如刺胞动物 (*Hydra vulgaris*) 体轴形成、多毛类 (*Hydroides elegans* 和 *Capitella* sp. 1) 体型分节、海鞘 (*Halocynthia roretzi*) 脊索细胞的形态发生运动及苔藓虫 (*Bugula neritina*) 变态过程^[21-24]。

在贝类中, *Wnt4* 基因在栉孔扇贝成体的各个组织(雌雄性腺、外套膜、闭壳肌、鳃和肝胰腺)中均有表达, 而在成熟的性腺中表达量最高, 并认为 *Wnt4* 基因对性腺生殖细胞的成熟具有重要作用^[3]。*Wnt4* 基因在长牡蛎各种组织中(雌雄性腺、消化腺、鳃、外套膜和唇瓣)均有表

收稿日期: 2016-04-25 修回日期: 2016-07-18

资助项目: 国家自然科学基金(41476131, 31101885); 上海高校高原学科建设项目(海洋科学); 上海海洋大学博士启动基金(A2-0203-00-100320)

通信作者: 杨金龙, E-mail: jlyang@shou.edu.cn

达,且 *Wnt4* 基因在胚胎发育的桑葚期表达量最高,推测 *Wnt4* 基因可能参与了某些器官的形成^[4]。近期有研究发现 *Wnt* 基因参与了合浦珠母贝 (*Pinctada fucata*) 贝壳再生修复^[25]。

厚壳贻贝 (*Mytilus coruscus*) 是我国重要的海产贝类,也是主要的贻贝养殖品种^[26]。以往的研究主要通过药理学^[27-29]、分子微生物学^[30-31]和神经发育生物学^[32]等角度阐述厚壳贻贝附着变态机制,对于 *Wnt* 信号通路是否调控双壳贝类附着变态过程仍是未知。本研究通过 RACE 技术克隆了厚壳贻贝的 *Wnt4* 基因全长 cDNA 序列,利用 qRT-PCR 技术分析该基因在成体不同组织和幼虫不同发育阶段的表达特点。旨在为探究 *Wnt4* 基因是否参与幼虫生长发育和附着变态过程,以及在厚壳贻贝个体生长发育过程中的作用,为贝类相关的 *Wnt* 家族基因的功能研究提供一定的理论基础和数据支撑。

1 材料与方法

1.1 实验材料

厚壳贻贝亲贝来自浙江省舟山市枸杞岛,解剖获取外套膜、闭壳肌、鳃、足、消化腺、雌性和雄性性腺共 7 个组织样品。本实验根据 Yang^[31]等所述方法进行人工受精和幼虫培育。用海水清洗亲贝,置于冰中过夜后,将亲贝放入 10 L 过滤海水 (FSW) 中,保持水温为 18 °C。当亲贝个体开始产卵时,将其单独转移到含 2 L FSW 的玻

璃烧杯中。用移液管将精子和卵子转移到一个含 2 L FSW 烧杯中,混匀受精。受精卵放于 18 °C 培养,每个 2 L 烧杯幼虫密度为 5 个/mL。收集厚壳贻贝担轮幼虫、D 形幼虫、壳顶幼虫、眼点幼虫和稚贝 5 个发育阶段的样品。样品置于 RNAlater 中 4 °C 保存,24 h 后弃 RNAlater, -80 °C 冰箱保存以便用于 RNA 的提取。

1.2 RNA 提取和 cDNA 合成

采用 Molluse RNA kit 试剂盒 (OMEGA, 美国) 提取厚壳贻贝鳃组织总 RNA,用 Nanodrop 2000 超微量分光光度计 (Thermo Scientific, 美国) 检测所提取的 RNA 浓度,并用 1% 琼脂糖电泳检测 RNA 的完整性。用 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech, 日本) 按照操作指南合成 RACE cDNA 第一条链。

1.3 *Wnt4* 基因克隆

根据厚壳贻贝转录组文库的注释信息,利用 Primer Premier 5.0 软件设计引物 *Wnt4*-F1、*Wnt4*-R1 (表 1) 扩增目的片段,25 μL 体系为: 10 × PCR Buffer 2.5 μL, dNTP Mixture (各 2.5 mmol/L) 0.5 μL, 正反向引物 (F/R) (10 μmol/L) 各 1 μL, *Taq* (5U/μL) 0.3 μL, ddH₂O 18.7 μL, cDNA 1 μL。PCR 反应程序为: 94 °C 预变性 4 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min 30 s, 35 个循环; 72 °C 终延伸 10 min。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, DNA 回收试剂盒 (生工生物, 上海) 纯化目的

表 1 厚壳贻贝 *Wnt4* 基因引物序列

Tab. 1 Sequences of primers used for amplification of *M. coruscus Wnt4* gene

引物名称 primer name	序列 (5'-3') sequence	用途 usage
<i>Wnt4</i> -F1	AAGAGAAGCGTCGTTGTGC	目的片段克隆
<i>Wnt4</i> -R1	TAAAGCAATGTGCTGAAA	目的片段克隆
<i>Wnt4</i> -3'RACE-F1	CACATTGCCTTTATCTTGCCTCA	3'RACE
<i>Wnt4</i> -3'RACE-F2	ATCATGTGCGACTGTAGGTTGGTC	3'RACE
<i>Wnt4</i> -5'RACE-R1	AACACCTGACCATTCAAATCCCT	5'RACE
<i>Wnt4</i> -5'RACE-R2	TGAGCTACACCAGCAGACGAAAGC	5'RACE
<i>Wnt4</i> -RT-F	AAATTGGGCACAAGAGAAGC	qRT-PCR
<i>Wnt4</i> -RT-R	TGTCTGAACACCCTGACCAT	qRT-PCR
18S rRNA-F	GACCTCGTTCTATTTTG	qRT-PCR
18S rRNA-R	GGTATCTGATCGTCTTCG	qRT-PCR

片段后连接到pMD 19-T载体(TaKaRa, 大连)上,转入大肠杆菌感受态细胞 *Escherichia coli* DH5 α (天根, 北京), 涂平板, 37 °C过夜培养, 挑选阳性克隆样品送上海生工测序后与已知序列进行比对。

根据获得的 *Wnt4* 基因序列, 分别设计3' 和5'RACE特异性引物(表1), 按照Clontech RACE说明书分别进行3'RACE和5'RACE扩增, PCR产物电泳、胶回收、连接和转化, 挑选阳性克隆样品送上海生工测序, 将所获序列和已知序列进行拼接, 获得 *Wnt4* 基因的全长。

1.4 序列分析

在NCBI数据库中利用在线ORF Finder(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)查找开放阅读框(ORF); 使用ProtParam(<http://web.expasy.org/protparam/>)预测编码蛋白的理化性质; Signal 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)预测信号肽序列; NetPhos 2.0 Server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>)预测蛋白质磷酸化位点; NetNGlyc 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>)预测糖基化位点; ClustalX软件进行氨基酸序列多重比对; MEGA 5.1软件采用邻位法(Neighbor-Joining)构建系统进化树。

1.5 实时荧光定量PCR

分别提取厚壳贻贝不同发育阶段幼虫(担轮幼虫、D形幼虫、壳顶幼虫、眼点幼虫)、稚贝及成贝不同组织(外套膜、闭壳肌、鳃、足、消化腺、雌性和雄性性腺)的总RNA, 并分别反转录成cDNA。根据已获得的 *Wnt4* 基因序列, 设计荧光定量引物 *Wnt4*-RT-F、*Wnt4*-RT-R(表1), 以18S *rRNA* 为内参基因^[33]。用FastStart Essential DNA Green Master试剂盒(Roche, 瑞士)进行qRT-PCR反应, 使用LightCycler 96 System荧光定量PCR仪(Roche, 瑞士)进行 *Wnt4* 基因在厚壳贻贝成体不同组织和各发育阶段幼虫的定量表达分析, 反应体系20 μ L: FastStart Essential DNA Green Master Mix 10 μ L, Primer FR(10 μ mol/L)各1 μ L, ddH₂O 3 μ L, cDNA 5 μ L, 每个样品做3个平行检测。PCR反应条件为: 95°C 10 min; 95°C 10 s, 60°C 10 s, 72°C 10 s, 45个循环。采用相对定量2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法计算目的基因的相对表达量。基因的表达量用平均值 \pm 标准误(Mean \pm SE)来表

示, 使用SPSS 19.0进行单因素方差分析(One-Way ANOVA), $P < 0.05$ 表示有显著性差异, $P < 0.01$ 表示存在极显著性差异。

2 结果与分析

2.1 *Wnt4* 基因全长cDNA序列特征和系统进化分析

通过RACE克隆技术得到了厚壳贻贝 *Wnt4* 基因全长(GenBank登录号: KX082977)。该基因全长3 342 bp, 包含567 bp的5'端非编码区, 1701 bp的3'端非编码区, 其中开放阅读框(ORF)为1074 bp, 编码357个氨基酸, 3'端非编码区有典型的多聚腺苷酸加尾信号序列AATAAA和PolyA尾。预测厚壳贻贝 *Wnt4* 蛋白分子量为40.121 ku, 等电点为9.16。该蛋白序列含有24个 *Wnt* 蛋白家族最重要的半胱氨酸残基序列, 2个N-糖基化位点(7和91), 一段长为26个氨基酸的信号肽序列, 以及100多个保守的 *Wnt4* 蛋白保守位点(图1-a)。此外, 磷酸化位点预测结果发现12个Ser、4个Thr和3个Tyr可能为蛋白激酶磷酸化位点。

将厚壳贻贝 *Wnt4* 蛋白序列和人(*H. sapiens*)、小鼠(*M. musculus*)、海胆(*Paracentrotus lividus*)、长牡蛎(*C. gigas*)和栉孔扇贝(*C. farreri*)进行同源性比对, 相似度分别为61%, 61%, 60%, 76%和71%。使用MEGA 5.1软件对厚壳贻贝及其他12个物种 *Wnt4* 的氨基酸序列构建系统进化树。结果显示, 厚壳贻贝首先与双壳贝类的长牡蛎和栉孔扇贝聚为一支, 之后与腹足纲海蜗牛(*Aphysia californica*)聚为一支, 再依次与棘皮动物海胆(*P. lividus*)和脊索动物文昌鱼(*Branchiostoma floridae*)等聚为一支(图1-b), 表明 *Wnt4* 基因的系统进化关系符合传统进化关系。

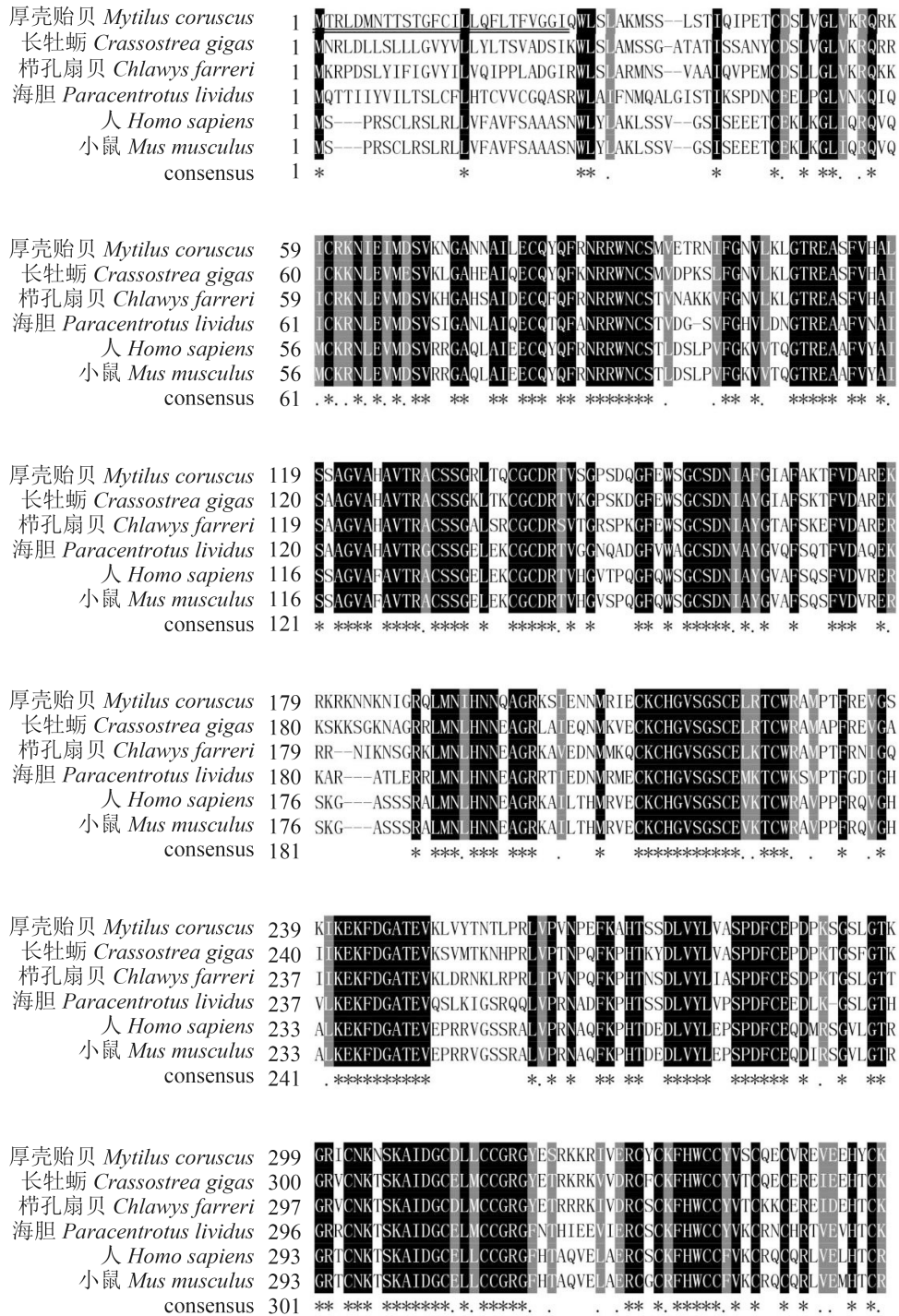
2.2 厚壳贻贝 *Wnt4* 基因成体各组织的表达分析

利用qRT-PCR技术检测 *Wnt4* 基因在厚壳贻贝不同组织中的表达情况, 将厚壳贻贝 *Wnt4* 基因在雌性性腺的表达量设为1, 其他以与它的倍数表示各样本的表达量(图2)。实验结果表明厚壳贻贝 *Wnt4* mRNA在外套膜、闭壳肌、鳃、足、消化腺、雌性和雄性性腺中均有表达, 但组织间存在差异, 在外套膜中表达量最高, 且差异极显著($P < 0.01$), 在其余6个组织中表达量都较低。

2.3 Wnt4基因在厚壳贻贝不同发育阶段的表达分析

将厚壳贻贝 *Wnt4* 基因在担轮幼虫的表达量设为1, 其他以与它的倍数表示各样本的表达量, *Wnt4* 基因在厚壳贻贝幼虫发育过程中的定

量表达结果显示, *Wnt4* 基因在壳顶幼虫中表达量最高, 极显著高于其他发育阶段的厚壳贻贝 ($P<0.01$), 表达量分别为担轮幼虫、D形幼虫、眼点幼虫和稚贝的17、38、34和28倍。其他各个时期幼虫或稚贝中的 *Wnt4* 表达量都相对较低,



(a)

(图1 Fig.1)

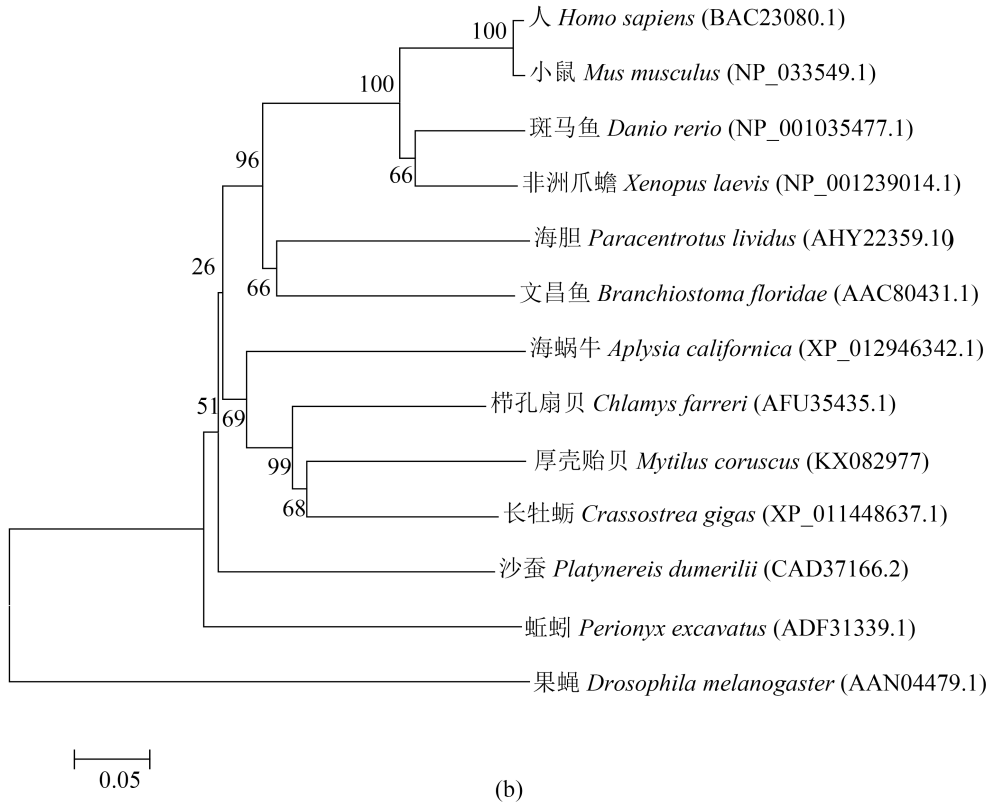


图 1 不同物种 *Wnt4* 氨基酸序列多重比对分析(a)和基于厚壳贻贝 *Wnt4* 氨基酸序列构建的系统进化树(b)
 黑色区域: 相同序列; 灰色区域: 50%以上的相似序列; “*”表示相同的氨基酸, “.”表示相似的氨基酸

Fig. 1 Multiple alignment of the *Wnt4* amino acid sequence from different species (a) and phylogenetic tree of *M. coruscus* *Wnt4* based on the homology of the amino acids (b)

Blank background: identical sequence; grey background: similar sequence; “*” indicates the same amino acid; “.” indicates amino acid with similarity

各组间无显著性差异($P>0.05$)(图3)。

3 讨论

Wnt 信号通路是一条保守的信号传导路径, 对于调节和控制生物体内许多重要的生物学过程具有十分重要的作用。关于 *Wnt* 信号通路研究已有大量报道, 但对于贝类的报道则相对较少。本研究表明, 厚壳贻贝 *Wnt4* 基因编码 357 个氨基酸, 有 2 个 N-糖基化位点和 24 个保守的半胱氨酸残基, 且含有 100 个以上的保守位点。这符合 *Wnt* 基因家族的特点^[6]。通过氨基酸序列比对分析表明厚壳贻贝 *Wnt4* 与同属双壳类的长牡蛎、栉孔扇贝同源性最高, 分别为 76% 和 71%, 并且与海胆、人和小鼠的 *Wnt4* 同源性也有 60% 以上, *Wnt4* 基因的系统进化关系符合传统进化关系。

附着变态过程是双壳贝类生长发育中非常

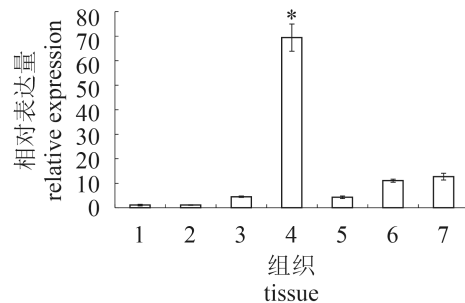


图 2 厚壳贻贝 *Wnt4* 基因在成体不同组织中的表达情况

1. 雌性性腺; 2. 雄性性腺; 3. 鳃; 4. 外套膜; 5. 闭壳肌; 6. 足; 7. 消化腺。“*”表示差异极显著($P<0.01$)

Fig. 2 The expression of the *Wnt4* gene in different tissues of *M. coruscus*

1. female gonad; 2. male gonad; 3. gill; 4. mantle; 5. adductor muscle; 6. foot; 7. digestive gland. “*” represent highly significant difference ($P<0.01$)

重要的一个阶段。*Wnt* 信号通路在多毛类(*Pseudopolydora vexillosa*)幼虫成为具有附着变态能力的

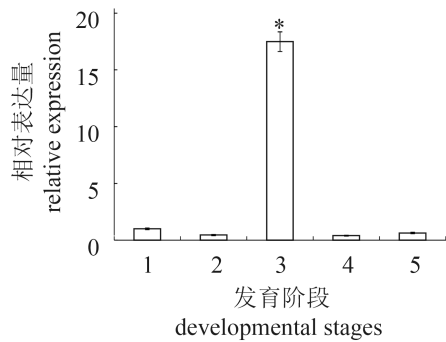


图3 厚壳贻贝 *Wnt4* 基因在不同发育阶段的表达情况
1.担轮幼虫; 2. D形幼虫; 3.壳顶幼虫; 4.眼点幼虫; 5.稚贝。
“*”表示差异极显著 ($P < 0.01$)

Fig. 3 The expression of the *Wnt4* gene at different developmental stages of *M. coruscus*

1. trochophore; 2. D-veliger Larvae; 3. umbo veliger larvae; 4. pediveliger larvae; 5. juvenile. “*”represent highly significant difference ($P < 0.01$)

幼虫 (competent larvae) 和变态过程中信号转导方面具有重要的作用^[34]。而本研究的结果与作者的假设截然不同, *Wnt4* 基因并没有在厚壳贻贝眼点幼虫 (具有附着变态能力的幼虫) 和稚贝期间高表达。在本研究中, 厚壳贻贝中 *Wnt4* 基因的高表达主要集中在壳顶幼虫阶段, 推测该基因可能参与了某些器官的形成与发育。相反, *Wnt4* 基因在长牡蛎 (*C. gigas*) 在壳顶幼虫阶段表达量相对较低, 而在早期胚胎发育阶段表达量较高, 因此推测长牡蛎的 *Wnt4* 基因可能通过信号分子的形式参与多种组织细胞的生命过程^[4]。 *Wnt4* 基因在厚壳贻贝和长牡蛎表达的差异, 这可能由于物种间的差异所致, 但具体原因尚有待进一步的解析。 *Wnt* 信号通路在合浦珠母贝担轮幼虫至D形幼虫时期之间显著富集^[25]。D形幼虫也是胚壳开始形成的时期^[25]。厚壳贻贝从D形幼虫发育到壳顶幼虫阶段, 其贝壳的形态结构发生了转变, 厚壳贻贝变态过程的显著特征是幼虫的面盘脱落、鳃的发育和次生壳的形成^[31], 推测 *Wnt4* 基因可能参与了这个过程。综上所述, 我们推测可能其他 *Wnt* 家族基因参与了厚壳贻贝附着变态过程, 对于 *Wnt* 家族基因调控附着变态过程的分子机制值得进一步研究。

先前的研究表明 *Wnt* 家族基因参与调控了生物体的生物矿化过程, 如骨骼、龟甲和贝壳生长等。在哺乳动物小鼠中, *Wnt* 家族基因参与长骨的形成, *Wnt4* 基因过表达导致软骨细胞减少

增殖并影响软骨细胞的成熟^[35]。同样, *Wnt4* 基因在小鼠中不但能够增强骨骼形成和成骨细胞分化, 而且能抑制小鼠破骨细胞的形成和骨吸收, 此外 *Wnt4* 蛋白还能减轻骨质疏松的骨质流失^[36-37]。在海龟中, 20个 *Wnt* 家族基因都在胚胎发育TK14时期表达, 但仅有 *Wnt5* 基因在海龟的背甲生长区域表达, 并推测 *Wnt5* 基因可能与背甲发育相关^[38]。贝类的外套膜是一个与生物矿化相关的组织, 通过许多贝壳有机质的分泌和离子的转运, 调控 CaCO_3 晶体沉淀形成贝壳^[39]。在贝类中, *Wnt* 信号通路中的三个基因 β -catenin, Dishevelled 和 T-cell factor 在合浦珠母贝外套膜中均有表达, 且贝壳切口后第4天, 这些基因的表达量显著上升, 作者推测可能与贝壳的形成有关^[14]。同样, *Wnt4* 基因在长牡蛎 (*C. gigas*) 和栉孔扇贝 (*C. farreri*) 外套膜中均有表达^[3-4]。在本研究中, *Wnt4* 基因在厚壳贻贝各个已检测组织中均有表达, 尤其在外套膜中表达量最高, 表明该基因可能在贝壳形成方面具有重要作用。而作为同属双壳贝类的长牡蛎, *Wnt4* 基因则在唇瓣、消化腺和鳃中高表达^[4], 我们推测 *Wnt4* 基因在厚壳贻贝和长牡蛎成体组织内表达的差异可能是由于不同物种的生物学功能以及进化中的变异所引起的。

本研究克隆得到了厚壳贻贝 *Wnt4* 基因全长, 推测该基因在生物矿化和贝壳形态发生方面具有重要作用。对该基因的准确生理功能和调控机制还需深入研究, 为进一步开展双壳贝类 *Wnt* 基因家族的功能研究提供了理论依据。

参考文献:

- [1] Zhong N, Gersch R P, Hadjiargyrou M. Wnt signaling activation during bone regeneration and the role of Dishevelled in chondrocyte proliferation and differentiation[J]. Bone, 2006, 39(1): 5-16.
- [2] Cadigan K M, Nusse R. Wnt signaling: a common theme in animal development[J]. Genes & Development, 1997, 11(24): 3286-3305.
- [3] 李海龙, 刘建国, 刘晓玲, 等. 栉孔扇贝 *Wnt4* 基因 cDNA 克隆及表达分析[J]. 中国水产科学, 2013, 20(2): 260-268.
Li H L, Liu J G, Liu X L, et al. Molecular cloning and expression analysis of *Wnt4* cDNA from the Zhikong scallop *Chlamys farreri*[J]. Journal of Fishery Sciences

- of China, 2013, 20(2): 260-268(in Chinese).
- [4] 杨梅, 许飞, 刘俊, 等. 长牡蛎(*Crassostrea gigas*) *Wnt4* 基因 cDNA 克隆与表达分析[J]. 海洋与湖沼, 2015, 46(1): 35-42.
- Yang M, Xu F, Liu J, *et al.* Molecular cloning and expression of *Wnt4* gene in pacific oyster *Crassostrea gigas*[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2015, 46(1): 35-42(in Chinese).
- [5] Siegfried E, Perrimon N. *Drosophila* wingless: a paradigm for the function and mechanism of Wnt signaling[J]. *Bioessays News & Reviews in Molecular Cellular & Developmental Biology*, 1994, 16(16): 395-404.
- [6] Nusse R, Varmus H E. *Wnt* genes. *Cell*, 1992, 69(7): 1073-1087
- [7] Benjamin P, Nicolas L, Guillaume B, *et al.* Phylogenetic analysis of the *Wnt* gene family: insights from lophotrochozoan members[J]. *Current Biology*, 2002, 12(16): 1395-1400.
- [8] Grzeschik K H, Bornholdt D, Oeffner F, *et al.* Deficiency of PORCN, a regulator of Wnt signaling, is associated with focal dermal hypoplasia[J]. *Nature Genetics*, 2007, 39(7): 833-835.
- [9] Luis T C, Weerkamp F, Naber B A E, *et al.* *Wnt3a* deficiency irreversibly impairs hematopoietic stem cell self-renewal and leads to defects in progenitor cell differentiation[J]. *Blood*, 2009, 113(3): 546-554.
- [10] Kozopas K M, Samos C H, Nusse R. *DWnt-2*, a *Drosophila* *Wnt* gene required for the development of the male reproductive tract, specifies a sexually dimorphic cell fate[J]. *Genes & Development*, 1998, 12(8): 1155-1165.
- [11] Mammalian Gene Collection (MGC) Program Team. Generation and initial analysis of more than 15 000 full-length human and mouse cDNA sequences[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99(26): 16899-16903.
- [12] McGrew L L, Otte A P, Moon R T. Analysis of *Xwnt-4* in embryos of *Xenopus laevis*: a *Wnt* family member expressed in the brain and floor plate[J]. *Development*, 1992, 115(2): 463-473.
- [13] Graba Y, Gieseler K, Aragnol D, *et al.* *DWnt-4*, a novel *Drosophila* *Wnt* gene acts downstream of homeotic complex genes in the visceral mesoderm[J]. *Development*, 1995, 121(1): 209-218.
- [14] Ferkowicz M J, Stander M C, Raff R A. Phylogenetic relationships and developmental expression of three sea urchin *Wnt* genes[J]. *Molecular Biology & Evolution*, 1998, 15(7): 809-819.
- [15] 陶丽红, 姚利晓, 傅志强, 等. 日本血吸虫信号转导蛋白 *Sjwnt-4* 基因的克隆、表达及功能分析[J]. 生物工程学报, 2007, 23(3): 392-397.
- Tao L H, Yao L X, Fu Z Q, *et al.* Cloning, expression and characterization of a gene encoding signal transduction protein *Wnt4* of *Schistosoma japonicum*[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2007, 23(3): 392-397(in Chinese).
- [16] 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(1-2): 409-413.
- [17] Jordan B K, Mohammed M, Ching S T, *et al.* Up-regulation of WNT-4 signaling and dosage-sensitive sex reversal in humans[J]. *American Journal of Human Genetics*, 2001, 68(5): 1102-1109.
- [18] Sato M, Umetsu D, Murakami S, *et al.* *DWnt4* regulates the dorsoventral specificity of retinal projections in the *Drosophila melanogaster* visual system[J]. *Nature Neuroscience*, 2006, 9(1): 67-75.
- [19] Cohen E D, Mariol M C, Wallace R M H, *et al.* *DWnt4* regulates cell movement and focal adhesion kinase during *Drosophila* ovarian morphogenesis[J]. *Developmental Cell*, 2002, 2(4): 437-448.
- [20] Ungar A R, Kelly G M, Moon R T. *Wnt4* affects morphogenesis when misexpressed in the zebrafish embryo[J]. *Mechanisms of Development*, 1995, 52(2): 153-164.
- [21] Wong Y H, Wang H, Ravasi T, *et al.* Involvement of Wnt signaling pathways in the metamorphosis of the bryozoan *Bugula neritina*[J]. *Plos One*, 2012, 7(3): e33323.
- [22] Sasakura Y, Makabe K W. Ascidian *Wnt-5* gene is involved in the morphogenetic movement of notochord cells[J]. *Development, Growth & Differentiation*, 2001, 43(5): 573-582.
- [23] Broun M, Gee L, Reinhardt B, *et al.* Formation of the head organizer in hydra involves the canonical Wnt pathway[J]. *Development*, 2005, 132(12): 2907-2916.

- [24] Seaver E C, Kaneshige L M. Expression of 'segmentation' genes during larval and juvenile development in the polychaetes *Capitella* sp. I and *H. elegans*[J]. *Developmental Biology*, 2006, 289(1): 179-194.
- [25] Gao J, Liu J, Yang Y, *et al.* Identification and expression characterization of three Wnt signaling genes in pearl oyster (*Pinctada fucata*)[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B, Biochemistry and Molecular Biology*, 2016, 196-197: 92-101.
- [26] 常抗美, 吴剑锋. 厚壳贻贝人工繁殖技术的研究[J]. *南方水产*, 2007, 3(3): 26-30.
Chang K M, Wu J F. Study on artificial propagation of *Mytilus coruscus*[J]. *South China Fisheries Science*, 2007, 3(3): 26-30(in Chinese).
- [27] Yang J L, Li S H, Li Y F, *et al.* Effects of neuroactive compounds, ions and organic solvents on larval metamorphosis of the mussel *Mytilus coruscus*[J]. *Aquaculture*, 2013, 396: 106-112.
- [28] Yang J L, Li W S, Liang X, *et al.* Effects of adrenoceptor compounds on larval metamorphosis of the mussel *Mytilus coruscus*[J]. *Aquaculture*, 2014, 426: 282-287.
- [29] 杨金龙, 陈芋如, 郭行磐, 等. 胆碱受体化合物对厚壳贻贝幼虫变态的调控作用[J]. *水产学报*, 2014, 38(12): 2012-2017.
Yang J L, Chen Y R, Guo X P, *et al.* Effects of cholinergic compounds on larval metamorphosis of the mussel *Mytilus coruscus*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(12): 2012-2017(in Chinese).
- [30] Li Y F, Guo X P, Yang J L, *et al.* Effects of bacterial biofilms on settlement of plantigrades of the mussel *Mytilus coruscus*[J]. *Aquaculture*, 2014, 433: 434-441.
- [31] Yang J L, Shen P J, Liang X, *et al.* Larval settlement and metamorphosis of the mussel *Mytilus coruscus* in response to monospecific bacterial biofilms[J]. *Biofouling*, 2013, 29(3): 247-259.
- [32] 杨金龙, 李树恒, 刘志伟, 等. 厚壳贻贝胚胎和早期幼虫神经系统发育的初步研究[J]. *水产学报*, 2013, 37(4): 512-519.
Yang J L, Li S H, Liu Z W, *et al.* Primary study on neuronal development of the embryo and early larvae of the mussel *Mytilus coruscus*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(4): 512-519(in Chinese).
- [33] Zhang D, Wang H W, Yao C L. Molecular and acute temperature stress response characterizations of caspase-8 gene in two mussels, *Mytilus coruscus* and *Mytilus galloprovincialis*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B, Biochemistry and Molecular Biology*, 2014, 177-178: 10-20.
- [34] Chandramouli K H, Sun J, Mok F S Y, *et al.* Transcriptome and quantitative proteome analysis reveals molecular processes associated with larval metamorphosis in the polychaete *Pseudopolydora vexillosa*[J]. *Journal of Proteome Research*, 2013, 12(3): 1344-1358.
- [35] Lee H H, Behringer R R. Conditional expression of *Wnt4* during chondrogenesis leads to dwarfism in mice[J]. *Plos One*, 2007, 2(5): e450.
- [36] Yu B, Chang J, Liu Y S, *et al.* Non-canonical Wnt4 prevents skeletal aging and inflammation by inhibiting NF- κ B[J]. *Nature Medicine*, 2014, 20(9): 1009-1017.
- [37] Chang J, Sonoyama W, Wang Z, *et al.* Noncanonical Wnt-4 signaling enhances bone regeneration of mesenchymal stem cells in craniofacial defects through activation of p38 MAPK[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(42): 30938-30948.
- [38] Wang Z, Pascual-Anaya J, Zadissa A, *et al.* Corrigendum: The draft genomes of soft-shell turtle and green sea turtle yield insights into the development and evolution of the turtle-specific body plan[J]. *Nature Genetics*, 2014, 46(6): 657-657.
- [39] 张文兵, 姚春风, 麦康森. 贝壳生物矿化的研究进展[J]. *海洋科学*, 2008, 32(2): 74-79.
Zhang W B, Yao C F, Mai K S. Progress in the studies on shell biomineralization[J]. *Marine Sciences*, 2008, 32(2): 74-79(in Chinese).

Temporal-spatial expression of *Wnt4* gene in the mussel *Mytilus coruscus*

XU Yuefeng¹, LI Yifeng¹, LIANG Xiao¹, CHEN Yuru¹, YANG Jinlong^{1,2*}

(1. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Shanghai Ocean University,

Ministry of Education, Shanghai 201306, China;

2. Institutes of Marine Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: To understand the potential mechanisms of the *Wnt4* gene at different development stages and adult tissues of the mussel *Mytilus coruscus*, the *Wnt4* gene was cloned by RACE technique. The full length of *Wnt4* gene was 3 342 bp with 1 074 bp of open reading frame (ORF) encoding 357 amino acids. Homologous analysis of the amino acids of *Wnt4* gene in *M. coruscus* shared high similarity with *Homo sapiens* (61%), *Mus musculus* (61%), *Paracentrotus lividus* (61%), *Chlamys farreri* (71%) and *Crassostrea gigas* (76%). qRT-PCR showed that *Wnt4* mRNA expression was detected in all tissues (mantle, adductor muscle, gill, foot, digestive gland, male and female gonad) and the highest expression was found in mantle, indicating that *Wnt4* gene may play an important role in shell formation. Relative gene expression of *Wnt4* during larval development stages including trochophore, D-shaped, umbo, pediveliger and the juvenile stage was also detected. The *Wnt4* mRNA was highest expressed in umbo stage larvae, suggesting that *Wnt4* gene may participate in the process of shell morphological structure change and certain organ formation and development. Taken together, the finding provides a new insight into investigating the function of *Wnt* gene family.

Key words: *Mytilus coruscus*; *Wnt4* gene; gene cloning; expression analysis

Corresponding author: YANG Jinlong. E-mail: jlyang@shou.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (No. 41476131, 31101885), the Shanghai University Plateau Discipline Project of Marine Sciences, and Shanghai Ocean University Doctoral Research Foundation (A2-0203-00-100320)