

黄鳝 WT1 基因序列分析及在性腺发育过程中的表达

胡青¹ 杨娇艳² 高宇¹ 郭威¹ 李大鹏¹

1. 华中农业大学水产学院/淡水水产健康养殖湖北省协同创新中心, 武汉 430070;

2. 华中师范大学生命科学学院, 武汉 430079

摘要 采用 RT-PCR 法从黄鳝(*Monopterus albus*)性腺 mRNA 中克隆获得了 WT1 基因, 根据其氨基酸序列有无 KTS 区将黄鳝 WT1 基因分为 2 种类型: WT1(-KTS)为 1 236 bp, WT1(+KTS)为 1 245 bp。与 NCBI/GenBank 上其他物种进行氨基酸序列比对, 发现它们与斜带石斑鱼的 WT1a 相似性最高, 分别为 93.2% 和 93.0%, 并且它们均在羧基端具有相似性很高的锌指结构区域。系统进化树分析发现, 黄鳝 WT1 基因与斜带石斑鱼 WT1a 聚类为一支。WT1 基因在黄鳝性腺、肾、肠、脾和心脏组织中都有表达, 且该基因在黄鳝雌性、间性和雄性性腺中的表达量在各时期都有先升高后降低的表达趋势。

关键词 黄鳝; WT1; 序列分析; 基因表达; 性逆转

中图分类号 Q 786; Q 959.482 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2014)01-0073-07

黄鳝(*Monopterus albus*), 隶属硬骨鱼纲(Osteichthyes)、辐鳍亚纲(Actinopterygii)、合鳃目(Synbranchiformes)、合鳃科(Symbranchidae)、黄鳝属, 为温热带淡水鱼类, 具有由雌到雄转变的性逆转现象^[1]。对黄鳝性逆转机制的研究不仅对阐明黄鳝的发育机制具有重要理论意义, 而且对黄鳝的科学养殖具有重要的应用价值^[2]。目前对黄鳝性逆转机制研究主要集中在阐明主要的性别相关基因上, 如 *P450arom*^[3]、*SOX9*^[4]、*DMRT1*^[5]、*JNK1*^[6] 和 *VASA*^[7], 这些基因已被证实与黄鳝的性逆转有关。

WT1 基因(Wilms' tumor suppressor gene)能编码一种羧基末端含有 4 个锌指结构且氨基末端富含脯氨酸和谷氨酸盐的蛋白质^[8], 早期研究发现该基因与哺乳动物性腺发育有关, 该基因的突变或缺失会导致哺乳动物生殖系统发育异常, 造成多种相关畸变^[9]。目前研究发现, WT1 基因在鱼类性腺组织中也有表达^[10-11], 且在斑马鱼生殖腺形成过程中显著表达^[12]。但 WT1 基因与黄鳝性腺发育是否有关还没有相关研究。笔者以黄鳝为研究对象, 克隆获得 WT1 基因的 cDNA 序列并进行分析, 比较 WT1 基因在黄鳝性腺不同发育时期中的差异表达,

以为阐明黄鳝性逆转的分子机制提供部分理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试鱼

黄鳝于 2012 年 5—6 月购自湖北省武汉市白沙洲大市场, 为野生群体, 体长 15~25 cm, 体质量 50~120 g, 体质健康, 试验前暂养于华中农业大学的水产实验创新中心实验室内。

1.2 黄鳝组织样品采集

用颈椎切断法处死黄鳝, 打开腹腔, 取其完整性腺和其他组织(血液、脑、肌肉、肾、脾、心、肝、皮肤、眼)。将性腺组织分为两部分, 一部分用 Bouin 氏液固定, 采用石蜡包埋、HE 染色方法制作组织切片, 以确定各性腺发育时期。通过黄鳝性腺组织学切片, 获得 9 个时期的黄鳝性腺样本, 其中, 根据卵母细胞的成熟度将雌性性腺分为雌性 III、IV 和 V 期; 根据卵母细胞的退化程度和精巢组织的发育程度将间性性腺分为间性 I、II 和 III 期; 根据精巢和精子的成熟度将雄性性腺分为雄性 I、II 和 III 期^[13]。另一部分剪成长度约 0.5 cm 样品分装入 1.5 mL 冻存管,

收稿日期: 2013-05-25

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(201003076)和国家自然科学基金项目(30970529)

胡青, 硕士研究生, 研究方向: 水生生物学. E-mail: 125485182@qq.com

通信作者: 李大鹏, 博士, 教授. 研究方向: 鱼类生理学. E-mail: ldp@mail.hzau.edu.cn

放入液氮中速冻,待样品取完后,转入 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存直至样品检测。

1.3 总 RNA 提取

试验用的器具经过 0.1% DEPC (diethyl pyrocarbonate, 焦碳酸二乙酯) 水浸泡过夜、双蒸水冲洗、高温高压灭菌。从冻存管中取出经组织切片鉴定处于同一时期的性腺样品($n=2$),分别提取 RNA,然后将其他组织样品($n=3$)分别混合后提取 RNA,提取方法按照 Trizol Reagent 说明书的步骤进行。

1.4 引物设计

根据已发表和登录在 NCBI/ GenBank 上已知鱼类 WT1 基因序列,用 Clustal W 法比对序列并在其保守区用 Primer Premier 5.0 和 Oligo 7 软件设计 1 对兼并引物(L-WT1F 和 L-WT1R),并根据 WT1 基因的测序结果设计 1 对特异性引物(WT1F 和 WT1R)。定量 PCR 以 18S rRNA(JX103158.1) 为内参基因,扩增引物为 18S-F 和 18S-R。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成(表 1)。

表 1 被检测基因的引物序列

Table 1 Sequences of primers for the genes tested

引物名称 Primer's name	引物序列(5'-3') Primer sequence	产物大小/bp Product size
L-WT1F	ATGGGBTCDGAHGTDGCGTGAC	1 239
L-WT1R	TCAGATGGHNAGCTGVAGCTTG	
WT1F	CACGCCGCACCTGACCAA	167
WT1R	CTGCTGCTCACCCATAGTGTCTCTG	
18S-F	GTGGAGCGATTTGCTGTGGTTA	143
18S-R	CGGACATCTAAGGGCATCAC	

1.5 WT1 基因的克隆、测序及标准品构建

取 $1\text{ }\mu\text{g}$ 的总 RNA 作为模板,采用 TaKaRa 提供的 PrimeScript[®] RT reagent Kit With gDNA Eraser(Perfect Real Time)在 $20\text{ }\mu\text{L}$ 体系中合成第 1 链 cDNA。以 $2\text{ }\mu\text{L}$ 雄性 cDNA 为模板,分别采用兼并引物 L-WT1F 和 L-WT1R 进行 PCR 扩增。PCR 反应条件为: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min, $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min,40 个循环, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。PCR 反应体系为: $25\text{ }\mu\text{L}$ 反应体系中含 $2\text{ }\mu\text{L}$ cDNA 模板,上下游引物各 $0.5\text{ }\mu\text{L}$, $9.5\text{ }\mu\text{L}$ 双蒸水, $12.5\text{ }\mu\text{L}$ Premix Taq(TaKaRa)。将目的片段回收、克隆,并送往华大基因测序。

将含有 WT1 基因的菌液扩大培养,用普通质粒小提试剂盒(天根生化科技有限公司)提取质粒作为标准品,并用 NANODROP 2000c(Thermo)测定质粒浓度,根据公式,拷贝数/mL = $(X \times 6.02 \times$

$10^{23}) / (Y \times 1 \times 10^6 \times 660)$, (X : 样品质量浓度, ng/ μL ; Y : 片段长度(bp, vector + insert)), 计算出标准品的拷贝数。最后将标准品按 10 倍逐级稀释成 7 个梯度,构建标准曲线。

1.6 序列分析及系统进化树构建

在 GenBank 中查询所有已登录物种的 WT1 的 cDNA 序列及其相应的氨基酸序列,利用 Megalign 软件中 Clustal W 法将推导出的黄鳝 WT1 基因的氨基酸序列与其他 10 个物种的氨基酸序列及其相似度进行比对分析,并用 MEGA5.05 软件采用 NJ 法(neighbor-joining method)构建了黄鳝与其他物种 WT1 基因的核苷酸系统发育树,用自展法(bootstrap)进行 1 000 次重复,获得一致系统树,并用一致性指数(consistency index, CI)来衡量分析结果的可靠性。

1.7 半定量 PCR

采用 18S rRNA 为内参基因,以检测 WT1 基因的表达情况。取 $1\text{ }\mu\text{g}$ 的总 RNA 反转录产物作为模板 cDNA。反应体系为 $25\text{ }\mu\text{L}$,其中 10 倍稀释的 cDNA $2\text{ }\mu\text{L}$, 10 mmol/L 的引物各 $0.5\text{ }\mu\text{L}$, Premix Taq(TaKaRa) $12.5\text{ }\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件为: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min, $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s,18S rRNA 为 13 个循环,WT1 为 35 个循环, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。聚合酶链式反应产物在 1% 的琼脂糖凝胶电泳上检测。

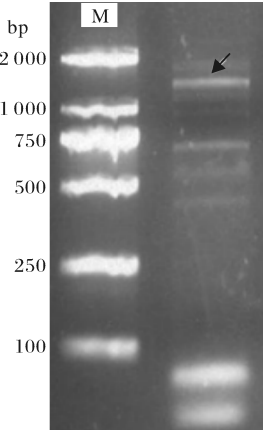
1.8 实时荧光定量 PCR

实时荧光定量 PCR 反应在 Rotor-Gene 2000 (QIAGEN) 荧光检测系统中进行。取 $1\text{ }\mu\text{g}$ 的总 RNA 反转录产物作为模板 cDNA。反应体系均为 $25\text{ }\mu\text{L}$,其中 $2\text{ }\mu\text{L}$ cDNA 模板,上下游引物各 $0.5\text{ }\mu\text{L}$, $9.5\text{ }\mu\text{L}$ 双蒸水, $12.5\text{ }\mu\text{L}$ SYBRGreen (TaKaRa)。PCR 反应条件为: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 热启动 30 s, $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s, $53\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 60 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s,30 个循环, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸时采集荧光信号。阴性对照以无 RNase 的水代替 cDNA 模板,每个样品及阴性对照均设 3 个重复。根据溶解曲线判断引物的特异性。在相同阈值下,Ct 值采用 Rotor-Gene Q Series Software 1.7 (QIAGEN, USA) 进行计算,然后根据标准曲线计算每个样本的表达量。GraphPad Prism. v 5.0 作图,以平均值 \pm 标准差表示,试验数据用 SPSS18.0 软件进行单因素方差分析(one-way ANOVA),然后用最小显著差数法(LSD)比较各样本数据之间的差异显著性,显著性水平为 $P < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 WT1 cDNA 序列的克隆结果及序列分析

PCR 扩增后在 1 000~2 000 bp 内获得 1 条较亮的条带(图 1)。连接测序后获得 2 个黄鳢 WT1 序列, 比对发现, 区别存在于羧基端的锌指结构区域内, 通过 3 个氨基酸残基 (lysine-threonine-serine,



M: 2 000 DNA marker; 图中箭头所指为目的条带 Target band is pointed by arrow.

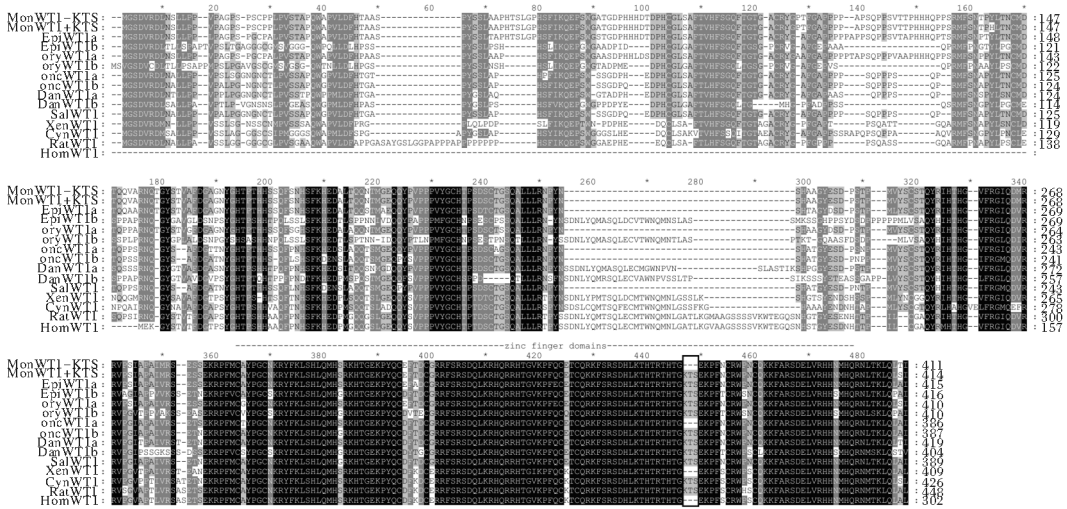
图 1 WT1 基因的 PCR 扩增结果

Fig. 1 The results of PCR amplification of WT1 gene

KTS) 的差异将该基因分别记为 WT1(-KTS) 和 WT1(+KTS)。WT1(-KTS) 为 1 236 bp, WT1(+KTS) 为 1 245 bp(图 2), 并且已将序列提交至 NCBI/GenBank, 登录号分别为 KC015038 和 KC015039。

通过 NCBI 中 BLAST 查找 GenBank 中已登录的同源序列, 结果显示试验获得的核苷酸序列均与已知的 WT1 核苷酸序列之间具有很高的相似性, 它们都与斜带石斑鱼 WT1a (GenBank No. JX564598. 1) 相似性最高, 都为 89%。通过与其他 10 个物种的 15 个序列之间氨基酸序列相似度进行比较后发现, 用 DNASTAR 软件包中的 EditSeq 软件推测获得的黄鳢 WT1(-KTS) 和 WT1(+KTS) ORF 的氨基酸序列相似度达到 98.8%, 它们与斜带石斑鱼 WT1a(AFV66805. 1) 的氨基酸序列的相似度最高, 分别为 93.2% 和 93.0%(图 3)。

用 MEGA5.05 软件采用 NJ 法(neighbor-joining method) 构建了黄鳢与 10 个物种 WT1 基因的核苷酸系统发育树(图 4)。结果表明, 以小鼠和人为外群, 黄鳢的 WT1(-KTS) 和 WT1(+KTS) 与斜带石斑鱼 WT1a 聚类为一支(bootstrap 74)。



Mon: *Monopterus albus*; Epi: *Epinephelus coioides*, WT1a | AFV66805. 1, WT1b | AFV66806. 1; Ory: *Oryzias latipes*, WT1a | ABG36853. 1, WT1b | ABG36854. 1; Onc: *Oncorhynchus mykiss*, WT1a | NP_001117766. 1, WT1b | AAK52720. 1; Dan: *Danio rerio*, WT1a | AAI62638. 1, WT1b | AAI24088. 1; Sal: *Salmo salar*, NP_001167249. 1; Xen: *Xenopus laevis*, NP_001079057. 1; Cyn: *Cynops pyrrhogaster*, BAA76399. 1, Rat: *Rattus norvegicus*, NP_113722. 2; Hom: *Homo sapiens*, AAH32861. 1.

图 2 10 个物种 WT1 氨基酸序列比较

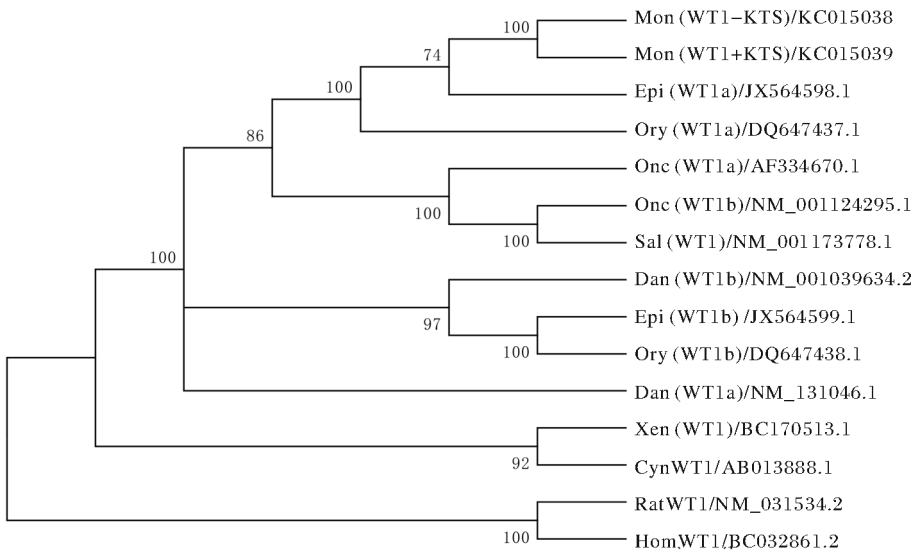
Fig. 2 Alignment of partial WT1 amino acid sequence of ten species

		相似度/% Percent identity																
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15		
差异性/% Divergence	1	■	98.8	93.2	62.6	86.0	83.0	92.2	57.8	78.6	63.6	83.5	69.4	67.2	68.7	68.9	1	Mon WT1-KTS
	2	0.7	■	93.0	62.7	85.5	84.3	92.9	59.0	77.8	63.4	84.8	68.5	66.3	68.4	68.5	2	Mon WT1+KTS
	3	5.8	6.3	■	63.6	85.5	83.8	92.9	58.8	78.3	63.9	84.6	69.7	67.0	68.7	68.5	3	Epi WT1a
	4	38.3	38.7	37.0	■	69.7	69.6	65.4	83.7	73.1	68.8	69.7	64.5	62.7	66.6	67.9	4	Epi WT1b
	5	11.8	12.4	13.0	34.8	■	93.5	85.8	65.5	88.9	68.7	94.6	77.7	75.1	76.4	69.5	5	Onc WT1a
	6	13.4	13.9	14.5	35.0	6.2	■	84.3	63.7	88.4	68.6	98.5	75.0	75.0	75.8	67.2	6	Onc WT1b
	7	6.5	6.7	7.2	35.0	11.8	13.6	■	60.0	79.3	65.1	85.6	67.0	65.9	68.5	67.9	7	Ory WT1a
	8	45.2	45.7	45.2	17.6	40.5	42.1	43.3	■	69.8	64.6	65.3	59.7	58.5	61.7	62.6	8	Ory WT1b
	9	14.3	15.1	15.7	37.5	11.2	12.1	16.0	46.4	■	73.0	88.7	75.6	73.3	74.0	74.5	9	Dan WT1a
	10	36.8	37.7	38.2	36.4	35.5	35.7	36.9	41.9	40.6	■	68.6	64.4	65.8	67.8	65.6	10	Dan WT1b
	11	12.7	13.2	13.9	34.9	5.4	1.6	12.9	41.5	11.8	36.0	■	74.6	75.3	75.6	67.2	11	Sal WT1
	12	28.8	29.6	29.2	45.0	22.9	26.3	31.1	53.2	33.5	47.7	26.6	■	79.5	81.4	81.8	12	Xen WT1
	13	33.2	33.3	33.5	46.6	29.2	29.0	35.1	54.4	36.0	44.7	29.7	22.8	■	77.9	80.8	13	Cyn WT1
	14	31.7	32.2	31.8	41.7	26.6	27.5	31.4	50.3	36.4	44.1	28.2	19.3	23.6	■	96.7	14	Rat WT1
	15	21.1	21.6	21.1	36.3	17.7	20.9	22.7	42.9	31.4	39.5	21.3	12.7	15.6	3.4	■	15	Hom WT1

图中物种缩写同图 2 The same abbreviations of species in Fig. 2.

图 3 10 个物种 WT1 氨基酸序列相似度比较

Fig. 3 Alignment of WT1 amino acid sequence identity of eleven species



图中物种缩写同图 2 The same abbreviations of species in Fig. 2.

图 4 WT1 基因核苷酸系统发育树

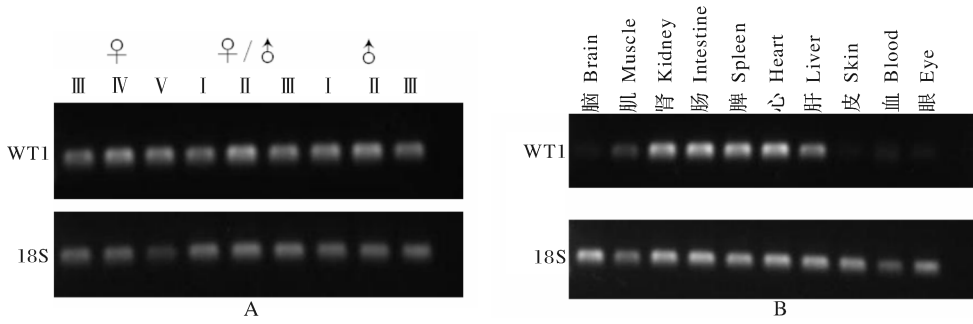
Fig. 4 Phylogenetic tree based on WT1 nucleotide sequences using NJ method

2.2 WT1 基因在黄鳝组织中的差异表达

WT1 基因在黄鳝性腺发育的不同时期均有表达(图 5A)。黄鳝 WT1 基因在肾、肠、脾、心、肝脏中有较高水平表达,肌肉中的表达量较低,而在脑、皮肤、血细胞和眼中几乎检测不到该基因的表达(图 5B)。

实时荧光定量 PCR 结果表明,WT1 基因在 IV 和 V 期的卵巢中的表达量显著高于其他发育时期

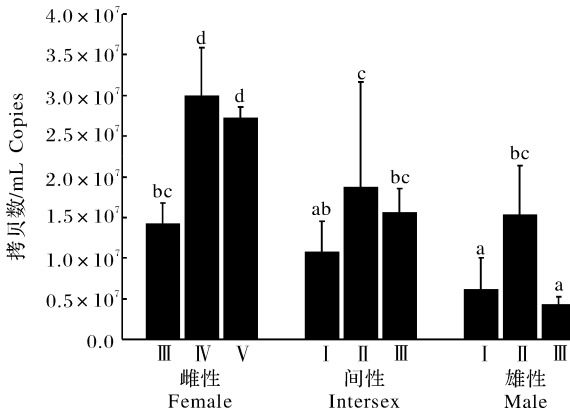
($P < 0.05$) (图 6)。另外,不管是在 III 期、IV 期、V 期的卵巢,还是在间性性腺或 I 期、II 期、III 期的精巢中,该基因的表达都有先显著升高($P < 0.05$)后略有下降的趋势,但在雄性中具有显著性下降趋势($P < 0.05$)。在雌性时期中,该基因在 IV 期卵巢中的表达量最高。在间性性腺发育的 3 个时期内,该基因在 II 期性腺中的表达量最高。在雄性中,该基因在 II 期精巢中的表达量最高。



A: *WT1* 基因在黄鳢性腺发育不同时期的差异表达(♀:雌性; ♀/♂:间性; ♂:雄性) Expression of *WT1* gene during different stages of gonadal development in *Monopterus albus* (♀: female, ♀/♂: intersex, ♂: male); B: *WT1* 基因在黄鳢不同组织间的表达差异 Expression of *WT1* gene in different tissues in *Monopterus albus*.

图 5 黄鳢性腺发育不同时期以及不同组织间 *WT1* 基因的表达差异

Fig. 5 Expression of *WT1* gene during different stage of gonadal development and different tissues in *Monopterus albus*



显著性水平为 $P < 0.05$ Significant difference is $P < 0.05$.

图 6 黄鳢性腺 *WT1* 基因在性腺不同发育时期的拷贝数

Fig. 6 The copies of *WT1* gene during different stage of gonadal development in *Monopterus albus*

3 讨论

本研究克隆获得了黄鳢 *WT1* 基因的 2 种剪切产物, *WT1*(+KTS)和 *WT1*(-KTS), 同时对该基因在黄鳢性腺不同发育时期以及不同组织间的表达差异进行了研究。通过黄鳢 *WT1* 基因开放阅读框序列与其他物种的 *WT1* 氨基酸序列比较后发现, 它们的相似性在羧基端很高, 这段相似性很高的区域为(Cys)₂(His)₂型的锌指结构区, 该区域在不同物种间是相当保守的, 而且 *WT1* 与 DNA 结合的活性可能是通过该锌指结构来实现的^[14], 这说明该结构可能对 *WT1* 基因功能的行使是非常重要的。在此区域内, 根据 3 个氨基酸残基(lysine-threonine-serine, KTS)的有无, 我们将黄鳢 2 种类型的 *WT1* 基因称为 *WT1*(+KTS) 和 *WT1*(-KTS), 黄鳢 *WT1* 存在这 2 种类型, 可能是由于该基因 RNA 剪

接、编辑和翻译起始过程中存在选择性的结果^[15], *WT1* 基因的这 2 种表达产物对早期和中后期的性腺发育起重要作用^[16], 而且 *WT1* 基因存在的 2 种剪切方式在脊椎动物进化中是保守的且在其转录调节和剪切功能上也是保守的^[16-17]。另外, 哺乳类、两栖类和鱼类 *WT1* 氨基酸序列最显著的差异是第 398 位、401 位和 426 位, 鱼类这些位点分别由 T(苏氨酸)、G(甘氨酸)和 E(谷氨酸)代替了哺乳类和两栖类的 K(赖氨酸)、E(谷氨酸)和 K(赖氨酸)。系统发育树的结果表明, 黄鳢 *WT1* 基因序列与斜带石斑鱼的亲缘关系最近。

在对哺乳动物的研究中发现, *WT1* 基因在肾、性腺和脾中都有较高水平表达^[18-19], 在对青鳉 (*Oryzias latipes*)^[20] 和斑马鱼 (*Danio rerio*)^[10] 的研究中发现, 该基因在心脏、肾、脾、肌肉和性腺中都有高水平表达, 本研究 *WT1* 基因在黄鳢的肾、肠、脾、心脏和性腺中也都有较高水平表达。敲除青鳉 *WT1* 基因会导致前肾发育异常^[20], 斑马鱼 *WT1a* 表达水平下降会造成肾间组织和前肾发育缺陷; *WT1b* 表达水平下降会造成胚胎肾小球和肾小管囊肿^[21], 哺乳类 *WT1* 基因突变会导致肾、性腺和脾等器官缺陷^[22], 如敲除 *WT1* 基因的小鼠会导致肾、性腺和肾上腺的发育受阻以及心脏和脾的形成障碍^[23]。因此, 该基因在黄鳢肾等器官中有高水平表达可能对该器官的形态与功能的维持起到了一定的作用。

WT1 基因的表达起始于泌尿生殖嵴、性腺和中肾等胚胎中胚层中^[24]。在对小鼠的研究中发现, *WT1* 基因表达最早出现在胚胎发育第 9 天的中胚层, 随后在性腺生殖嵴的支持细胞中表达; 在性腺分

化过程中,WT1 只在精巢的支持细胞中表达以及只在卵巢的颗粒细胞中表达,而这 2 种细胞均能促进生殖细胞的成熟^[25]。并且 WT1 基因敲除会使小鼠肾脏坏死以及导致性腺发育不全,这表明 WT1 对性腺分化是必需的^[26]。也有一些研究表明,小鼠 WT1 基因功能的缺失会引起性细胞的缺失^[9,27]。在硬骨鱼类中,首次发现 WT1 基因在青鳉性腺发育过程中表达,WT1 基因突变并不会对性腺的发育产生影响,但该基因的突变极大地降低了鱼类胚胎 PGC(原始生殖细胞)细胞的数量^[20]。此外,WT1 在控制生殖细胞存活的营养细胞中表达,这对支持细胞和生殖细胞的形成和功能的正常行使是非常重要的^[27]。本研究发现,WT1 基因在黄鳝雌性、间性和雄性性腺中都有表达,且存在表达量的显著差异,这似乎也预示着 WT1 基因在黄鳝性腺发育和分化中存在一定的作用。在其他对 WT1 基因的研究中也有证据表明,WT1 可以通过调控其他性别相关基因的表达来影响性腺发育的,如 WT1 通过调节 SOX9 基因的表达来影响精巢发育的,且对生殖嵴细胞的存活和增殖非常重要^[28];WT1 可以通过调节 SRY 基因的表达来影响哺乳动物的性别^[14];在性腺发育早期,WT1 可能与类固醇生成因子-1(SF-1,sertoidofenic factor-1)作用进而促进中性性腺嵴的形成^[29];WT1 也可以通过调节 β -连锁蛋白的表达进而调节性腺的发育^[30];而且 WT1 能够与苗勒氏管抑制物基因(MIS, mullerian-inhibiting substance)等下游基因结合,调节接下来的性别分化过程,同时 WT1 也可以通过与 SF-1 或 SOX9 的相互作用来共同调节 MIS 的表达,进而对性别分化也起到一定的调控作用^[31]。黄鳝 WT1 基因在雌性阶段表达量最高,且在 IV、V 期卵巢中的表达量显著高于 III 期卵巢,这种表达模式与黄鳝另一性别相关基因 JNK1 相反(I、II 期卵巢大于 III、IV 期卵巢)^[6],结果表明 WT1 可能对诱导卵母细胞的成熟起到重要作用。此外,在黄鳝性腺发育过程中,WT1 基因不管是在雌性 III 期、IV 期、V 期,还是在间性或雄性的 I 期、II 期、III 期都有先升高后降低的趋势,说明该基因不管是对卵母细胞的生长和成熟,还是对精母细胞的生长以及精子的成熟都起到了一定的作用。

参 考 文 献

- [1] LIU J K. Rudimentary hermaphroditism in the symbranchoid eel, *Monopterus albus* [J]. *Sinensia*, 1944, 15: 1-8.
- [2] 宋晓娟, 龚世园, 袁汉文, 等. 网箱养殖条件下黄鳝初次性成熟的年龄 [J]. *华中农业大学学报*, 2012, 31(5): 629-633.
- [3] LIU J F, GUIGUEN Y, LIU S J. Aromatase (P450arom) and 11β -hydroxylase (P45011 β) genes are differentially expressed during the sex change process of the protogynous rice field eel, *Monopterus albus* [J]. *Fish Physiol Biochem*, 2009, 35(3): 511-518.
- [4] ZHOU R J, LIU L, GUO Y Q, et al. Similar gene structure of two *Sox9a* genes and their expression patterns during gonadal differentiation in a teleost fish, rice field eel (*Monopterus albus*) [J]. *Mol Reprod Dev*, 2003, 66(3): 211-217.
- [5] HUANG X, GUO Y Q, SHUI Y, et al. Multiple alternative splicing and differential expression of *dmrt1* during gonad transformation of the rice field eel [J]. *Biol Reprod*, 2005, 73(5): 1017-1024.
- [6] XIAO Y M, CHEN L L, LIU J, et al. Contrast expression patterns of *jnk1* during sex reversal of the rice-field eel [J]. *J Exp Zool*, 2010, 314: 242-256.
- [7] 吕道远, 宋平, 陈云贵, 等. 黄鳝性腺自然逆转过程中 *vasa* 基因的表达分析 [J]. *动物学报*, 2005, 51(3): 469-475.
- [8] CALL K M, GLASER T, ITO C Y, et al. Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus [J]. *Cell*, 1990, 60(3): 509-520.
- [9] NATOLI T A, ALBERTA J A, BORTVIN A, et al. *Wt1* functions in the development of germ cells in addition to somatic cell lineages of the testis [J]. *Dev Biol*, 2004, 268(2): 429-440.
- [10] BOLLIG F, MEHRINGER R, PERNER B, et al. Identification and comparative expression analysis of a second *wrt1* gene in Zebrafish [J]. *Dev Dynam*, 2006, 235(2): 554-561.
- [11] NAKATSURU Y, MINAMI K, YOSHIKAWA A. Eel WT1 sequence and expression in spontaneous nephroblastomas in Japanese eel [J]. *Gene*, 2000, 245(2): 245-251.
- [12] 陈芸, 王艺磊, 田佳, 等. 斑马鱼性别决定相关基因的表达分析 [J]. *水生态学杂志*, 2010, 3(5): 10-16.
- [13] LIU C K, KU K Y. Histological changes in the gonad of *Monopterus* during sex transformation [J]. *Sinensia*, 1951, 2(1/2): 85-109.
- [14] HOSSAIN A, SAUNDERS G F. The human sex-determining gene SRY is a direct target of WT1 [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(20): 16817-16823.
- [15] WAGNE K D, WAGNER N, SCHEDL A. The complex life of WT1 [J]. *J Cell Sci*, 2003, 116(9): 1653-1658.
- [16] HAMMES A, GUO J K, LUTSCH G, et al. Two splice variants of the Wilms' tumor 1 gene have distinct functions during sex determination and nephron formation [J]. *Cell*, 2001, 106(3): 319-329.
- [17] HABER D A, SOHN R L, BUCKLER A J, et al. Alternative splicing and genomic structure of the Wilms tumor gene WT1 [J]. *P Natl Acad Sci U S A*, 1991, 88(21): 9618-9622.

- [18] PRITCHARD-JONES K, FLEMING S, DAVIDSON D, et al. The candidate Wilms' tumor gene is involved in genitourinary development[J]. *Nature*, 1990, 346: 194-197.
- [19] RACKLET R R, FLENNIKEN A M, KURIYAN N P, et al. Expression of the Wilms' tumor suppressor gene *WT1* during mouse embryogenesis[J]. *Cell Growth Differ*, 1993, 4(12): 1023-1031.
- [20] KLÜVER N, HERPIN A, BRAASCH I, et al. Regulatory backup circuit of medaka *Wt1* co-orthologs ensures PGC maintenance[J]. *Dev Biol*, 2009, 325: 179-188.
- [21] HSU H J, LIN G, CHUNG B C. Parallel early development of zebra fish interrenal glands and pronephros: differential control by *w1* and *ff1b*[J]. *Development*, 2003, 130(10): 2107-2116.
- [22] HERZER U, CROCOLL A, BARTON D, et al. The Wilms tumor suppressor gene *w1* is required for development of the spleen[J]. *Curr Biol*, 1999, 9(15): 837-840.
- [23] MOORE A W, MCINNES L, KREIDBERG J, et al. YAC complementation shows a requirement for *Wt1* in the development of epicardium, adrenal gland and throughout nephrogenesis [J]. *Development*, 1999, 126(9): 1845-1857.
- [24] ARMSTRONG J F, PRICHARD-JONES K, BICKMORE W A, et al. The expression of the Wilms' tumor gene, *WT1*, in the developing mammalian embryo[J]. *Mech Develop*, 1993, 40(1): 85-97.
- [25] PELLETIER J, SCHALLING M, BUCKLER A J, et al. Expression of the Wilms' tumor gene *WT1* in the murine urogenital system[J]. *Gene Dev*, 1991, 5(8): 1345-1356.
- [26] WIENER J S, MARCELLI M, LAMB D J. Molecular determinants of sexual differentiation[J]. *World J Urol*, 1996, 14(5): 278-294.
- [27] RAO M K, PHAM J, IMAM J S, et al. Tissue-specific RNAi reveals that *WT1* expression in nurse cells controls germ cell survival and spermatogenesis[J]. *Genes Dev*, 2006, 20(2): 147-152.
- [28] GAO F, MAITI S, ALAM N, et al. The Wilms tumor gene, *Wt1*, is required for *Sox9* expression and maintenance of tubular architecture in the developing testis[J]. *P Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(32): 11987-11992.
- [29] WILHELM D, ENGLERT C. The Wilms tumor suppressor *WT1* regulates early gonad development by activation of *Sf1*[J]. *Genes Dev*, 2002, 16(14): 1839-1851.
- [30] CHANG H, GAO F, GUILLOU F, et al. *Wt1* negatively regulates β -catenin signaling during testis development[J]. *Development*, 2008, 135(10): 1875-1885.
- [31] HOSSAIN A, SAUNDER G F. Role of Wilms Tumor 1 (*WT1*) in the transcriptional regulation of the Mullerian-inhibiting substance promoter[J]. *Biol Reprod*, 2003, 69(6): 1808-1814.

Sequence analysis and expression of the Wilms' tumor suppressor gene (*WT1*) during sex reversal in rice field eel, *Monopterus albus*

HU Qing¹ YANG Jiao-yan² GAO Yu¹ GUO Wei¹ LI Da-peng¹

1. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University/

Freshwater Aquaculture Collaborative Innovation Center of Hubei Province, Wuhan 430070, China;

2. College of Life Sciences, Central China Normal University, Wuhan 430079, China

Abstract Two major isoforms, with an insertion (+KTS) or exclusion (-KTS) in amino acid sequences, resulting from alternative splicing, were cloned from the gonad of rice field eel *Monopterus albus* by RT-PCR. The length of cDNA sequence of the two *WT1* isoforms, *WT1* (-KTS) and *WT1* (+KTS), were 1 236 bp and 1 245 bp, respectively. The results showed that the amino acid sequences of *WT1* (-KTS) and *WT1* (+KTS) in *M. albus* shared 93.2% and 93.0% identity with *WT1a* in *Epiplatys coiooides* respectively. They also contained highly similar zinc finger domains. The phylogenetic analyses showed that the two isoforms and *WT1a* of *E. coiooides* were clustered in the same branch. The semi-quantization results revealed that high expression levels of *WT1* gene can be found in gonads, kidney, intestine, spleen and heart. The real-time PCR results showed that *WT1* gene was expressed at each stage of the gonad development, and the expression increased first and then decreased.

Key words *Monopterus albus*; the Wilms' tumor suppressor gene; sequence analysis; gene expression; sex reversal

(责任编辑:边书京)