

黄颡鱼FZD家族4个基因的克隆、组织表达及对铜的响应

张丽晗, 罗智*, 有文静, 李丹丹, 吴坤, 潘亚雄

(华中农业大学水产学院, 动物遗传育种与繁殖教育部重点实验室, 湖北武汉 430070)

摘要: 实验采用RT-PCR和RACE克隆*fzd2*、*fzd3a*、*fzd4*和*fzd10*基因, 其cDNA全长分别为2 176、3 243、2 509和3 021 bp, 其中ORF长度分别为1 652、2 084、1 649和2 161 bp, 编码551、695、550和586个氨基酸。氨基酸序列比对和系统树分析显示, 4种基因十分保守, 黄颡鱼与斑点叉尾鮰亲缘关系最近。组织表达分析显示, 4种基因的mRNA在脑、脾脏、肾脏、鳃、心脏、肌肉、脂肪、肝脏及卵巢等组织中都有表达, 而其表达量不尽相同。FZD家族基因对铜的响应研究表明, 在暴露28 d时, *fzd3a* mRNA水平随着铜浓度的增加而增加, 但是*fzd2*、*fzd4*和*fzd10*基因表达各个处理组无显著性差异; 在56 d, *fzd2* mRNA水平在30 μg Cu/L组最高, 其他2个组差异不显著, *fzd3a*、*fzd4*和*fzd10*的基因表达在3个铜暴露组中均无显著差异, 表明*fzd*家族这些基因的功能发生了分化, 部分成员介导了铜影响黄颡鱼卵巢发育的调控。

关键词: 黄颡鱼; FZD; 分子特征; 组织表达; 铜

中图分类号: Q 785; S 917.4

文献标志码: A

Wnt信号转导通路是机体重要的转导通路之一, 在调节细胞增殖、分化、胚胎发育和卵泡生成方面具有重要作用^[1-2]。Wnt信号通路由一系列进化上保守的蛋白构成, 包括7次跨膜受体Frizzled (FZD)蛋白。FZD蛋白家族是G蛋白偶联受体亚家族成员之一, 在哺乳动物中已克隆鉴定了10种^[3], 并且表明FZD家族基因在卵巢发育各个时期广泛表达, 对卵巢发育和激素分泌起着重要的调控作用^[4]。在鱼类, 部分研究探讨了FZDs家族部分基因的cDNA序列和组织表达, 如斑马鱼(*Danio rerio*)^[5-6]、鲤(*Cyprinus carpio*)^[7]、斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)^[8]和米氏叶吻银鲷(*Callorhynchus milii*)^[9]等, 极少部分研究涉及到FZDs家族在鱼类发育过程中的生理作用^[5-6, 9]。但到目前为止, 这些基因和蛋白在鱼类卵巢发育和激素分泌中所起的作用尚不清楚^[2, 8]。

铜是包括鱼类在内的脊椎动物必需的微量元素之一, 广泛地参与体内的许多生化过程, 然而, 过量的铜对生物体是有毒的^[10]。与其他脊

椎动物不同, 鱼类可以经由鳃从水中吸收铜。前期研究发现水体铜暴露能影响黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)的卵巢发育和激素分泌^[11]。鉴于FZD家族基因和蛋白对卵巢发育的重要作用, 实验假设FZD家族成员介导了铜影响黄颡鱼卵巢发育和激素分泌的调控。所以, 作为深入解析这些成员功能的第一步, 本实验首先克隆了黄颡鱼*fzd2*、*fzd3a*、*fzd4*和*fzd10*基因全长的cDNA序列, 探讨了它们的组织表达模式, 研究了水体铜暴露对这些基因mRNA表达的影响, 为深入研究FZD家族基因在鱼类卵巢发育和激素分泌中的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验对象

本实验的黄颡鱼分为两组, 均购自武汉市某养殖场。第一组黄颡鱼用于FZD家族基因cDNA序列的克隆和组织表达水平的测定。用于基因

收稿日期: 2017-04-18 修回日期: 2017-07-19

资助项目: 国家自然科学基金(31422056)

通信作者: 罗智, E-mail: luozhi99@mail.hzau.edu.cn

克隆的黄颡鱼组织样品为肝脏和卵巢组织。用于基因表达谱测定的组织包括黄颡鱼的脑、脾脏、肾、鳃、心脏、肌肉、脂肪、肝脏和卵巢组织。取样参照本实验室的方法^[12-13]。

第二组黄颡鱼用于检测水体铜暴露对FZD家族基因表达水平的影响。实验策略参照Zhang等^[11]。即216尾规格均一的黄颡鱼随机放入9个缸中,每缸24尾。分别暴露在铜浓度为0(对照)、30(低)和60(高) $\mu\text{g/L}$ 的水体中,每个处理设3个重复(即3个缸)。水中铜浓度通过电感耦合等离子体质谱仪(ICP-MS)测定^[11],实测值分别为 (3 ± 1) 、 (31 ± 2) 和 (62 ± 3) $\mu\text{g Cu/L}$ (平均值 \pm 标准误, $n=16$)。实验期间,黄颡鱼每天投喂商业饲料2次。在28和56 d时进行取样,用于基因表达测定。

1.2 实验材料

RNA提取试剂盒(Trizol Reagent)、逆转录试剂盒、3'-Full RACE Kit试剂盒、5'-Full RACE Kit试剂盒、荧光定量试剂盒、凝胶纯化回收试剂盒、Taq酶、DNA Marker (2000)、dNTP等试剂购自大连宝生物公司(TaKaRa);胰蛋白酶和酵母粉购自Sigma公司;无水乙醇、氯仿、异丙醇等为中国国药分析纯产品。

1.3 FZD家族基因cDNA序列的克隆

参照本实验室已有的方法^[12-13]:总RNA的提取参照Invitrogen的TRIzol说明书进行。总RNA的质量通过琼脂糖凝胶电泳进行检测,其浓度及 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 值通过Nanodrop ND-2000分光光度计测定。然后,以提取的总RNA为模板,用TaKaRa的反转录试剂盒(PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit)合成第一链cDNA。

根据GenBank及Ensembl数据库中已报道的鱼类FZD家族基因序列,设计简并引物(表1),以扩增*fzd2*、*fzd3a*、*fzd4*和*fzd10*基因cDNA核心片段。PCR反应程序:94℃预变性4 min;94℃30 s,55℃30 s,72℃1 min,30个循环;72℃延伸5 min。然后分别设计3'和5'RACE特异性引物(表1)进行巢式PCR反应,Outer-PCR反应参数:94℃预变性3 min;然后94℃30 s,55℃30 s,72℃1 min,共25个循环;最后72℃延伸10 min。Inner-PCR反应参数:94℃预变性3 min;然后94℃30 s,55℃30 s,72℃1 min,共30个循环;最后72℃延伸10 min。

表1 黄颡鱼*fzd2*、*fzd3a*、*fzd4*和*fzd10* cDNA信息

Tab. 1 The information for *fzd2*, *fzd3a*, *fzd4* and *fzd10* cDNAs cloned from *P. fulvidraco*

信息 information	<i>fzd2</i>	<i>fzd3a</i>	<i>fzd4</i>	<i>fzd10</i>
长度/bp length	2 176	3 243	2 509	3 021
5'非翻译区/bp 5'-UTR	179	317	237	237
3'非翻译区/bp 3'-UTR	345	842	623	623
开放阅读框/bp ORF	1 652	2 084	1 649	2 161
氨基酸数量 number of amino acids	551	695	550	586
登录号 GenBank accession number	KY417141	KY221828	KY053805	KY053804

1.4 序列分析

用DNASar软件将扩增得到的核心片段、3'和5'末端序列拼接,从而获得基因cDNA全长。获得的核苷酸序列经NCBI进行BLAST,以确定该序列对应的基因亚型(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)。同时,运用DNASar软件找出开放阅读框(ORF)并翻译成氨基酸序列。序列比对和氨基酸同源性分析使用Clustal-W软件。进化树用MEGA 5.0软件采用邻接法(NJ)构建^[14],选择的最适进化模型为JTT+G^[15],每个节点的可信值进行1 000次重复计算。

1.5 基因的组织分布与表达分析

参照文献^[12-13],采用实时荧光定量PCR(qPCR)方法检测,荧光定量引物见表2。qPCR反应参数:95℃预变性30 s;95℃5 s,57℃30 s,72℃30 s,共40个循环。相对表达水平采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算^[16]。选用双内参(β -actin和GAPDH)进行标准化。预实验表明这两个内参组合在黄颡鱼不同组织及不同铜暴露浓度下的表达水平没有显著差异。

1.6 数据分析

结果采用平均值 \pm 标准误(mean \pm SE)表示。统计分析之前,采用Kolmogorov-Smirnov检验所有数据的正态分布性。不同处理间方差的同质性使用Bartlett检验。实验处理组之间进行单因素方差分析和Duncan氏多重比较检验。显著性水平取0.05。采用SPSS 19.0软件进行数据分析。

表 2 黄颡鱼FZD2, FZD3a, FZD4和FZD10氨基酸序列与其他鱼类同源性分析

Tab. 2 Amino acid sequence identity of FZD2, FZD3a, FZD4 and FZD10 between *P. fulvidraco* and other species %

基因 genes	斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	青鳉 <i>Oryzias latipes</i>	热带爪蟾 <i>Xenopus tropicalis</i>	小鼠 <i>Mus musculus</i>	犬 <i>Canis lupus familiaris</i>	马 <i>Equus caballus</i>	人 <i>Homo sapiens</i>
FZD2	87.6	81.4	80.1	78.9	78.9	81.7	79.5
FZD3a	78.5	74.7	69.1	70.7	70.4	70.3	70.6
FZD4	74.9	70.5	69.9	70.5	71.0	71.1	70.7
FZD10	90.3	81.5	76.0	73.7	74.7	76.5	74.8

注: Ensemble数据库登录号物种顺序依次为斑马鱼、青鳉、热带爪蟾、小鼠、犬、马、人

Notes: Ensemble databases accession numbers: FZD2 (ENSDARG00000054438, ENSORLG00000004204, ENSXETG000000008840, ENSMUSG00000050288, ENSCAFG00000014134, ENSECAG00000017678, ENSG00000180340); FZD3a (ENSDARG00000021664, ENSORLG00000015986, ENSXETG00000021149, ENSMUSG00000007989, ENSCAFG00000008293, ENSECAG00000018292, ENSG00000104290); FZD4 (ENSDARG00000104117, ENSORLG00000010775, ENSXETG00000010434, ENSMUSG00000049791, ENSCAFG00000004399, ENSECAG00000007698, ENSG00000174804); FZD10 (ENSDARG00000068213, ENSORLG00000013641, ENSXETG00000002931, ENSMUSG00000081683, ENSCAFG00000006800, ENSECAG00000001633, ENSG0000011432). The order of accession numbers of each gene corresponds to *Danio rerio*, *Oryzias latipes*, *Xenopus tropicalis*, *Mus musculus*, *Canis lupus familiaris*, *Equus caballus* and *Homo sapiens*, respectively

2 结果

2.1 *fzd2*、*fzd3a*、*fzd4*和*fzd10*序列的分子特征及进化分析

本研究通过RT-PCR和RACE方法获取*fzd2*、*fzd3a*、*fzd4*和*fzd10*基因的cDNA全长序列,长度分别为2 176、3 243、2 509和3 021 bp(表1)。序列分析显示它们的cDNA序列ORF长度分别为1 652、2 084、1 649和2 161 bp,翻译成蛋白所得到的氨基酸个数分别为551、695、550和586。黄颡鱼*fzd2*、*fzd3a*、*fzd4*和*fzd10*蛋白序列都含有7个跨膜域,2个第二第三细胞外环保守的半胱氨酸残基,N端含有2个潜在的N糖基化位点。*fzd3a*和*fzd4*有13个胞外环N端保守的半胱氨酸残基,而*fzd2*和*fzd10*有12个。多肽序列比对发现黄颡鱼*fzd2*、*fzd3a*、*fzd4*和*fzd10*氨基酸序列与其他鱼类和哺乳类的同源性分别为78.9%~87.6%、69.1%~78.5%、69.9%~74.9%和73.7%~90.3%(表2)。

在进化树中,所有硬骨鱼*fzds*独立聚为一支,而两栖类和哺乳类FZDs聚为另一支(图1)。与其他硬骨鱼类相比,黄颡鱼FZDs与斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)最近,且这两个物种与墨西哥丽脂鲤(*Astyanax mexicanus*)和斑马鱼聚为一支,其他硬骨鱼类聚为另一支。

2.2 *fzd2*、*fzd3a*、*fzd4*和*fzd10*序列的组织表达模式

*fzd2*在肌肉中表达最高,其次是脾脏、鳃和脂肪,而在其他组织中无显著差异(如脑、肾脏、心脏、肝脏和卵巢)(图2-a);*fzd3a*在卵巢中

的表达水平最高,然后依次是脑、肌肉和脂肪,而在其他组织中无显著性差异(图2-b);*fzd4*在脾脏中表达最高,其次是脂肪、鳃、脑、肝脏和肌肉,而在其他组织中无显著性差异(图2-c);*fzd10*在肌肉中表达最高,其次是脂肪、脾脏、卵巢和脑,而在肝脏和肾脏中无显著性差异(图2-d)。

2.3 水体铜暴露对*fzd2*、*fzd3a*、*fzd4*和*fzd10*基因表达水平的影响

在暴露28 d时,*fzd3a* mRNA水平随着铜浓度的增加而增加,但是*fzd2*、*fzd4*和*fzd10*基因表达各个处理组无显著性差异(图3-a)。在暴露56 d,*fzd2* mRNA水平在30 $\mu\text{g Cu/L}$ 组最高,其他2个组差异不显著。*fzd3a*、*fzd4*和*fzd10*的基因表达在3个铜暴露组均无显著性差异(图3-b)。

3 讨论

3.1 *fzd2*、*fzd3a*、*fzd4*和*fzd10*序列的分子特征与进化分析

本研究克隆得到了黄颡鱼*fzd2*、*fzd3a*、*fzd4*和*fzd10*基因的cDNA全长序列。分析这4个基因的蛋白序列可发现,它们具有一些保守的结构域,如7个跨膜域、2个第二、三细胞外环半胱氨酸残基,以及N端的2个潜在N糖基化位点^[17-18]。*fzd*基因N端富含半胱氨酸结构域与Wnt配体的结合有关^[19]。C端的丝氨酸/苏氨酸-XXX-缬氨酸结构域与蛋白结合有关^[20-21],相似的结构域在黄颡鱼*fzd2*中也存在,但是黄颡鱼的*fzd3a*、*fzd4*和*fzd10*都不含有这些结构域,这与其他学者的研

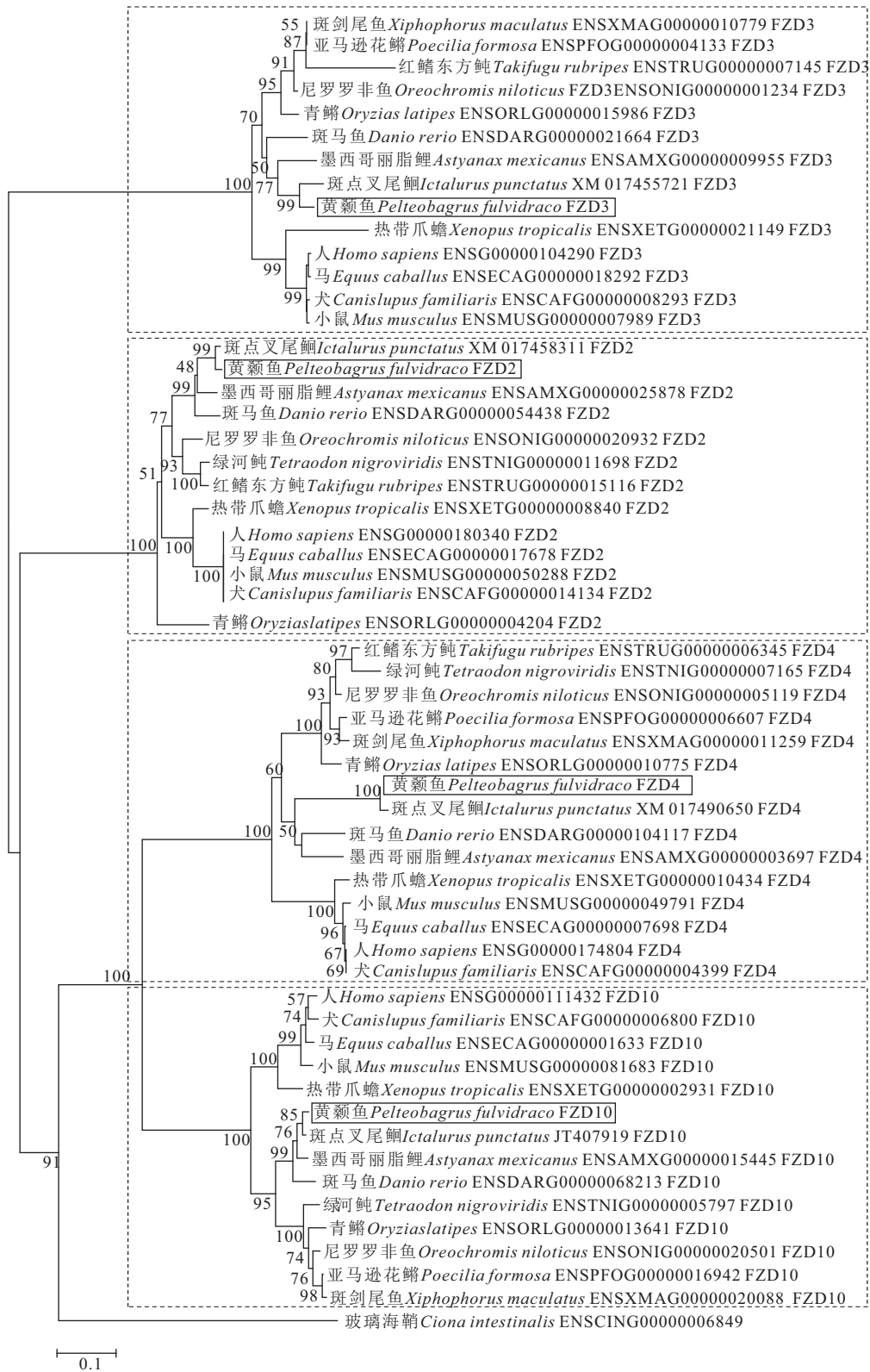


图 1 基于NJ法构建的脊椎动物FZD氨基酸序列的系统进化树

Bootstrap检验的重复次数为1 000次

Fig. 1 NJ phylogenetic tree of amino acid sequences from vertebrate NK-lysins

The tree is based on a 1 000 bootstrap procedure

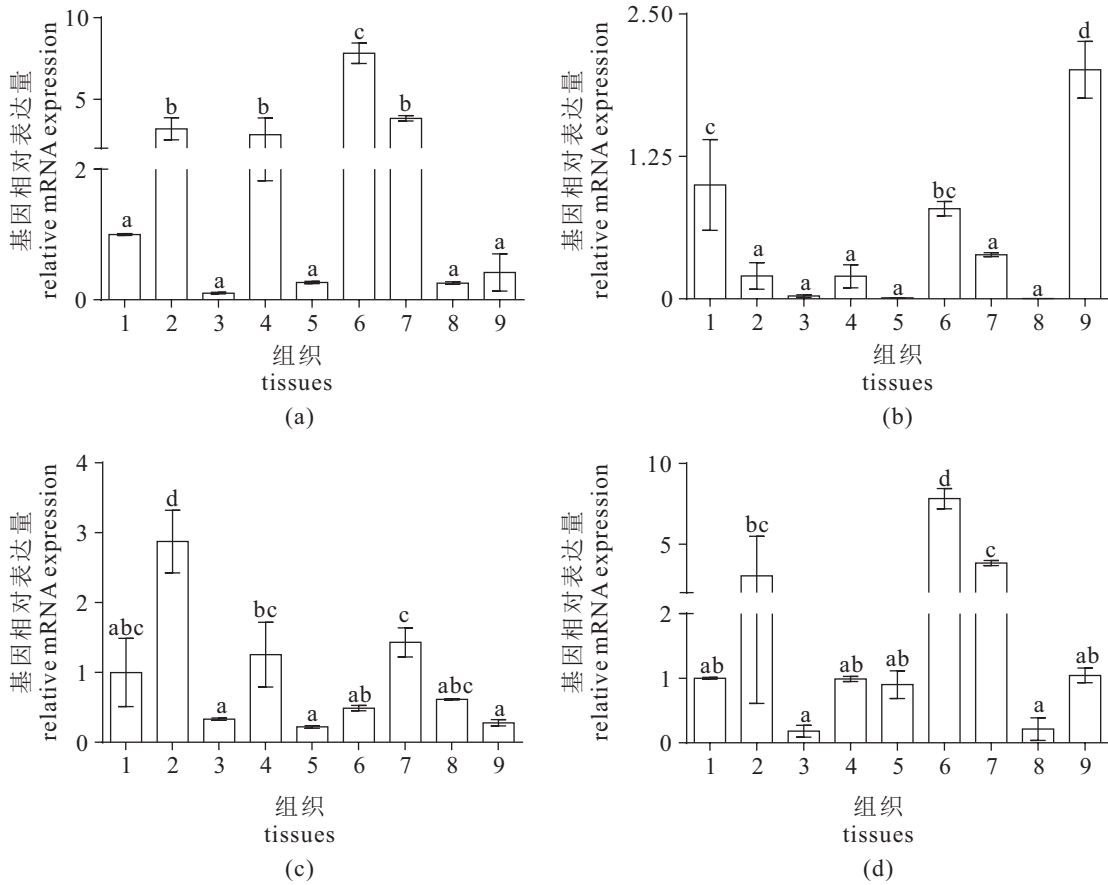


图2 黄颡鱼 *fzds* 在不同组织中的表达情况

1. 脑, 2. 脾, 3. 肾, 4. 鳃, 5. 心脏, 6. 肌肉, 7. 脂肪, 8. 肝脏, 9. 卵巢; 不同字母表示有显著性差异, 下同

Fig. 2 The relative expression of *P. fulvidraco fzds* in different tissues

(a) *fzd2*; (b) *fzd3a*; (c) *fzd4*; (d) *fzd10*. 1. brain, 2. spleen, 3. kidney, 4. gill, 5. heart, 6. muscle, 7. fat, 8. liver, 9. ovary; different letters indicate significant difference, the same below

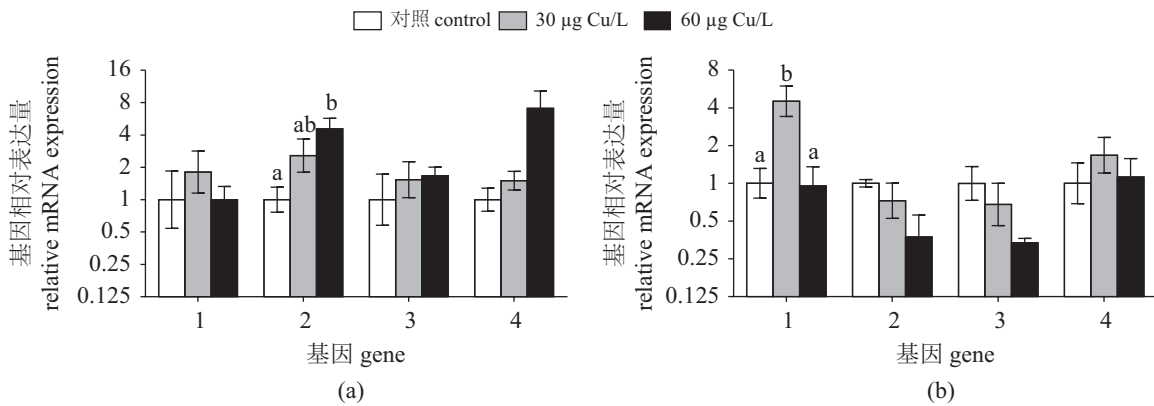


图3 第28天(a)和第56天(b)铜暴露对黄颡鱼卵巢中 *fzds* 基因 mRNA 表达的影响

Fig. 3 Effect of Cu exposure on the mRNA levels of genes in the ovary of *P. fulvidraco* on days 28 (a) and 56 (b)

1. *fzd2*, 2. *fzd3a*, 3. *fzd4*, 4. *fzd10*

究相似^[17-18, 22-23], 而造成C端不同的原因可能与 FZD蛋白参与不同的Wnt信号转导通路有关。进

化树分析进一步发现黄颡鱼FZD2、FZD3a、FZD4和FZD10多肽与其他鱼类的亲近性与物种

的分类地位相符,并且FZD2、FZD3a、FZD4和FZD10分别聚在4个不同的进化支中,其中FZD4与FZD10亲缘关系最近,与其他研究结果相似^[7]。

3.2 *fzd2*, *fzd3a*, *fzd4*和*fzd10*序列的组织表达模式

研究基因的组织分布模式有助于了解该基因的生理功能。在本研究中,4个*fzd*基因在黄颡鱼各组织中均有表达,但不同组织间的表达水平差异很大,这和其他鱼类中得到的结果一致^[7-8, 11],表明Wnt信号通路在各个组织中起着广泛的作用。另一方面,*fzd*基因表现出的组织特异性表达模式,可能反映不同组织特有的生物学作用,与Dong等^[7]的研究结果相似。而且,Dong等^[7]指出*fzd*基因在鲤的脑、心脏、脾脏和肝脏中的组织表达水平较高,而在肾脏中的表达水平较低。陈华谱等^[8]指出*fzd4*在斜带石斑鱼组织中广泛表达,其中在脑、肾脏、心脏和鳃组织中的表达水平较高。这些基因在卵巢中的广泛表达表明它们在卵巢发育和成熟中起着重要的调控作用^[4]。

3.3 水体铜暴露对*fzd2*, *fzd3a*, *fzd4*和*fzd10*基因表达水平的影响

本研究探讨了水体铜暴露对*fzd2*, *fzd3a*, *fzd4*和*fzd10*基因表达水平的影响。由于目前还没有有关铜对这些基因表达水平影响的相关报道,使得不同文献的比较非常困难。在本研究中,水体铜暴露28 d时,*fzd3a*基因表达随着铜浓度增加有上升趋势。最近研究发现,水体铜暴露能影响黄颡鱼卵巢发育、类固醇激素的合成和分泌^[11]。假设铜对黄颡鱼卵巢发育和激素合成的影响与Wnt通路的变化有关。因此,本研究测定了Wnt通路中FZD家族4个成员的表达水平。发现28 d铜暴露上调了*fzd3a*的mRNA水平,但是对*fzd2*、*fzd4*和*fzd10*基因表达没有显著影响。而在56 d,*fzd2* mRNA水平在30 μg Cu/L组最高,其他2个组差异不显著;水体铜暴露对*fzd3a*、*fzd4*和*fzd10*基因表达没有显著影响。所有研究表明铜暴露下这些基因的功能出现了分化,有可能产生新的功能,这一点在其他研究中也得到了证实^[7, 24]; *fzd3a*介导了28 d铜暴露影响黄颡鱼卵巢发育的调控,而*fzd2*介导了56 d铜暴露影响黄颡

鱼卵巢发育的调控。庞训胜等^[25]对小鼠的研究表明,FZD2定位在次级或有腔卵泡卵母细胞的胞质和胞膜内,FZD2有可能通过Wnt1信号参与对卵巢组织的发育调节。其他研究表明,Wnt信号通路能影响类固醇激素的合成^[2],但是相关机制有待深入探讨。

本研究获取了*fzd2*, *fzd3a*, *fzd4*和*fzd10*基因的cDNA全长序列,为深入解析它们的功能奠定了基础。这些基因在脑、脾脏、肾脏、鳃、心脏、肌肉、脂肪、肝脏及卵巢等组织中都有表达,但表达水平不同,表明它们广泛地参与体内的代谢;铜暴露差异性影响了FZD家族不同基因的mRNA水平,表明它们的基因功能发生了分化,并可能介导了铜影响黄颡鱼卵巢发育的调控。

参考文献:

- [1] Komiya Y, Habas R. Wnt signal transduction pathways[J]. *Organogenesis*, 2008, 4(2): 68-75.
- [2] Wu G C, Chang C F. *Wnt4* is associated with the development of ovarian tissue in the protandrous black Porgy, *Acanthopagrus schlegelii*[J]. *Biology of Reproduction*, 2009, 81(6): 1073-1082.
- [3] Bjarnadóttir T K, Gloriam D E, Hellstrand S H, et al. Comprehensive repertoire and phylogenetic analysis of the G protein-coupled receptors in human and mouse[J]. *Genomics*, 2006, 88(3): 263-273.
- [4] Harwood B N, Cross S K, Radford E E, et al. Members of the WNT signaling pathways are widely expressed in mouse ovaries, oocytes, and cleavage stage embryos[J]. *Developmental Dynamics*, 2008, 237(4): 1099-1111.
- [5] Sisson B E, Topczewski J. Expression of five frizzleds during zebrafish craniofacial development[J]. *Gene Expression Patterns*, 2009, 9(7): 520-527.
- [6] Nikaido M, Law E W P, Kelsh R N. A systematic survey of expression and function of zebrafish *frizzled* genes[J]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e54833.
- [7] Dong C J, Jiang L K, Peng W Z, et al. Phylogenetic and evolutionary analyses of the frizzled gene family in common carp (*Cyprinus carpio*) provide insights into gene expansion from whole-genome duplications[J]. *PLoS One*, 2015, 10(12): e0144037.
- [8] 陈华谱,洪广,邓思平,等.斜带石斑鱼Frizzled 4基因的克隆及表达分析[J]. *海南大学学报自然科学版*, 2016, 34(2): 177-184.

- Chen H P, Hong G, Deng S P, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of Frizzled 4 in Orange-spotted Grouper, *Epinephelus coioides*[J]. Natural Science Journal of Hainan University, 2016, 34(2): 177-184(in Chinese).
- [9] D'Souza D G, Rana K, Milley K M, *et al.* Expression of Wnt signaling skeletal development genes in the cartilaginous fish, elephant shark (*Callorhynchus milii*)[J]. General and Comparative Endocrinology, 2013, 193: 1-9.
- [10] Watanabe T, Kiron V, Satoh S. Trace minerals in fish nutrition[J]. Aquaculture, 1997, 151(1-4): 185-207.
- [11] Zhang L H, Luo Z, Song Y F, *et al.* Effects and mechanisms of waterborne copper exposure influencing ovary development and related hormones secretion in yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*[J]. Aquatic Toxicology, 2016, 178: 88-98.
- [12] Wu K, Zheng J L, Luo Z, *et al.* Carnitine palmitoyltransferase I gene in *Synechogobius hasta*: cloning, mRNA expression and transcriptional regulation by insulin *in vitro*[J]. Gene, 2016, 576(1): 429-440.
- [13] Wei C C, Luo Z, Song Y F, *et al.* Identification of autophagy related genes LC3 and ATG4 from yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* and their transcriptional responses to waterborne and dietborne zinc exposure[J]. Chemosphere, 2017, 175: 228-238.
- [14] Tamura K, Peterson D, Peterson N, *et al.* MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. Molecular Biology and Evolution, 2011, 28(10): 2731-2739.
- [15] Jones D T, Taylor W R, Thornton J M. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences[J]. Bioinformatics, 1992, 8(3): 275-282.
- [16] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [17] Sagara N, Toda G, Hirai M, *et al.* Molecular cloning, differential expression, and chromosomal localization of human *frizzled-1*, *frizzled-2*, and *frizzled-7*[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1998, 252(1): 117-122.
- [18] Kirikoshi H, Koike J, Sagara N, *et al.* Molecular cloning and genomic structure of human *frizzled-3* at chromosome 8p21[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2000, 271(1): 8-14.
- [19] Bhanot P, Brink M, Samos C H, *et al.* A new member of the *frizzled* family from *Drosophila* functions as a Wingless receptor[J]. Nature, 1996, 382(6588): 225-230.
- [20] Kornau H C, Schenker L T, Kennedy M B, *et al.* Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95[J]. Science, 1995, 269(5231): 1737-1740.
- [21] Songyang Z, Fanning A S, Fu C, *et al.* Recognition of unique carboxyl-terminal motifs by distinct PDZ domains[J]. Science, 1997, 275(5296): 73-77.
- [22] Kirikoshi H, Sagara N, Koike J T, *et al.* Molecular cloning and characterization of human *frizzled-4* on chromosome 11q14-q21[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1999, 264(3): 955-961.
- [23] Koike J, Takagi A, Miwa T, *et al.* Molecular cloning of *frizzled-10*, a novel member of the *frizzled* gene family[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1999, 262(1): 39-43.
- [24] Zheng J L, Luo Z, Zhu Q L, *et al.* Molecular characterization, tissue distribution and kinetic analysis of carnitine palmitoyltransferase I in juvenile yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*[J]. Genomics, 2013, 101(3): 195-203.
- [25] 庞训胜, 林春联, 许雪萍, 等. Wnt1和Frizzled 2在性成熟前小鼠卵巢组织定位及配受体关系的鉴定[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2011, 37(3): 289-294.
- Pang X S, Lin C L, Xu X P, *et al.* Localization of Wnt1 and Frizzled 2 and identification of their ligand-receptor relationship in the ovary tissue of immature mice[J]. Journal of Zhejiang University (Agriculture & Life Sciences), 2011, 37(3): 289-294(in Chinese).

Molecular characterization and tissue distribution of Frizzled (FZD) in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) by copper exposure

ZHANG Lihan, LUO Zhi*, YOU Wenjing, LI Dandan, WU Kun, PAN Yaxiong

(Key Laboratory of Agricultural Animal Genetics, Breeding and Reproduction, Ministry of Education,
College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: Four complete FZD cDNA sequences, designated *fzd2*, *fzd3a*, *fzd4* and *fzd10*, were amplified by RT-PCR and RACE approaches from *Pelteobagrus fulvidraco*. The validated cDNAs encoding for *fzd2*, *fzd3a*, *fzd4* and *fzd10* were 2 176, 3 243, 2 509 and 3 021 bp in length, encoding peptides of 551, 695, 550 and 586 amino acid residues, respectively. The amino acid alignment and phylogenetic analysis revealed that Fzd sequences were relatively conserved among different vertebrates, and *fzds* of *P. fulvidraco* were more closely related to those of *Ictalurus punctatus*. All *fzds* mRNAs were expressed in all tested tissues (brain, spleen, kidney, gill, heart, muscle, mesenteric fat, liver and ovary), but at variable levels. On day 28, *fzd3a* mRNA levels increased with increasing waterborne Cu concentration, but mRNA expression showed no significant differences among the three groups. On day 56, *fzd2* mRNA levels were the highest in 30 µg Cu/L group and showed no significant differences between other two groups, and mRNA levels of *fzd3a*, *fzd4* and *fzd10* showed no significant differences among three groups. The present study will be helpful to understanding the physiological functions of *fzd* genes.

Key words: *Pelteobagrus fulvidraco*; Frizzled (FZD); molecular characterization; tissue distribution; copper exposure

Corresponding author: LUO Zhi. E-mail: luozhi99@mail.hzau.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31422056)