

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20200516001

http://www.yykxjz.cn/

吴垚磊, 李仰真, 王娜, 马腾, 赵玉柱, 陈松林. 半滑舌鲷酪氨酸酶基因(*TYR*)和多巴色素异构酶基因(*DCT*)的克隆表达与分析. 渔业科学进展, 2021, 42(6): 42–52

WU Y L, LI Y Z, WANG N, MA T, ZHAO Y Z, CHEN S L. Expression analysis of *TYR* and *DCT* genes related to body color in *Cynoglossus semilaevis* at different periods and in different tissues. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(6): 42–52

半滑舌鲷酪氨酸酶基因(*TYR*)和 多巴色素异构酶基因(*DCT*)的克隆表达与分析*

吴垚磊^{1,2} 李仰真^{1,2} 王娜¹ 马腾^{1,2} 赵玉柱^{1,2} 陈松林^{1①}

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室
青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 山东 青岛 266071;

2. 上海海洋大学 水产科学国家级实验教学示范中心 上海 201306)

摘要 作为我国鲆鲷鱼类中的一种主要养殖品种,半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)有时会发生无眼侧黑化(Melanism)、有眼侧白化(Albinism)的体色异常现象。本研究克隆了半滑舌鲷体色相关的酪氨酸酶基因(*TYR*)和多巴色素异构酶基因(*DCT*)的 cDNA 序列,并对这 2 个基因进行系统发育分析和时空表达分析。实验获得了 *TYR* 基因编码区 cDNA 序列长度为 1620 bp, 编码 539 个氨基酸; *DCT* 基因编码区 cDNA 序列长度为 1551 bp, 编码 516 个氨基酸。结果显示, *TYR* 和 *DCT* 在 20 日龄前的鱼苗体内表达量较高,尤其是在变态关键时期(15~20 日龄)表达量最高,30 日龄时的表达量锐减到很低水平;在其他时期的皮肤组织中,这 2 个基因在有眼侧正常皮肤和无眼侧黑化皮肤的表达量最高,在有眼侧白化皮肤和无眼侧正常皮肤中表达量极低;在其他时期的其他组织中,在眼睛中的表达量最高,其次是肝脏,在脾脏和肌肉中表达量极低。研究表明, *TYR* 和 *DCT* 基因是半滑舌鲷无眼侧黑化发生和有眼侧体色维持的关键基因。本研究为查明半滑舌鲷体色异常机制提供了重要依据和参考。

关键词 半滑舌鲷; 体色; 酪氨酸酶基因(*TYR*); 多巴色素异构酶基因(*DCT*)

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2021)06-0042-11

半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)是我国特有的珍贵经济鱼类,年产量达 10 000 t 以上(农业农村部渔业局, 2019)。近年来,在人工育苗及养殖条件下,苗种经常出现体色异常现象,主要表现为有眼侧白化(即有眼侧原本的黑色素细胞无法正常合成黑色素,正常情况下有眼侧为黄或金黄色)和无眼侧黑化(即无眼侧黑色素细胞大量异常聚集,正常情况下无眼

侧为白色)(李仰真等, 2014),对其经济效益造成严重影响。

鲆鲷类具有与众不同的体色分布,这与其独特的变态发育过程有关。鲆鲷类的体色发生过程分为 2 个阶段:第 1 阶段,从出膜到其变态发育之前,黑色素细胞呈对称性分布,主要位于身体的两侧;第 2 阶段,眼睛向一侧移动,体型呈侧扁型,到变态发育完成,

* 国家自然科学基金项目(31702333)、现代农业产业技术体系(CARS-47-G03)和山东省泰山学者攀登计划项目共同资助 [This work was supported by National Natural Science Foundation of China (31702333), China Agriculture Research System (CARS-47-G03), and Taishan Scholar Climbing Program of Shandong Province]. 吴垚磊, E-mail: 1305495981@qq.com

① 通讯作者: 陈松林, 研究员, E-mail: chensl@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2020-05-16, 收修改稿日期: 2020-05-29

由体色对称转变成黑色素在有眼侧集中沉着, 而无眼侧几乎无黑色素沉着(Burton, 1988)。

研究表明, 酪氨酸酶(Tyrosinase, *TYR*)基因与人类疾病以及动物的体色具有密切关系。在黑色素的合成中, *TYR* 是其中的关键环节, 其 C 端有 2 个金属离子结合位点(与催化活性相关), 是一种双核铜结合蛋白; 其 N 端具有负责将合成的序列转运至胞内内质网进一步加工的信号肽(徐伟等, 2017)。

多巴色素异构酶(dopachrome tautomerase, *DCT*)是黑色素合成中的限速酶, 具有包括 *TYR*、*DCT*、*TYRP1* 在内的酪氨酸酶家族相似的蛋白质一级结构(王亚琪等, 2019)。*DCT* 在黑色素细胞内发挥调节功能, 使酪氨酸酶的催化作用处于较优状态。当其表达水平发生变化时, 体内的黑色素含量也会发生变化(孙学亮等, 2018)。王亚琪等(2019)研究发现, *DCT* 基因还调节细胞凋亡, 决定着细胞的存活状态。

目前, 鲜见海水鱼体色发育不同时期 *TYR*、*DCT* 的表达差异分析研究。近年来, 研究人员对半滑舌鳎无眼侧黑化的分子机制进行了研究, 发现视黄酸受体(宋雪松, 2018)、阿黑皮素原(POMC)(朱学武, 2016)、黑色素富集激素(MCH)及其受体等(徐永江等, 2017; 史学营等, 2017)在半滑舌鳎无眼侧黑化过程中发挥重要作用, 且在此过程中, 半滑舌鳎鳞片的组织学形态及相关调控过程也发生显著变化。本研究通过克隆半滑舌鳎 *TYR*、*DCT* 基因, 并通过 qRT-PCR 进行定量表达分析, 探讨这 2 个基因表达量与半滑舌鳎体色变化的关系, 旨在了解体色变化的分子基础, 为鱼类体色相关研究提供资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 样品采集 半滑舌鳎取自河北省唐山市维卓水产养殖有限公司。对亲鱼暂养、诱导性成熟, 并对其人工授精。待受精卵充分发育、仔鱼顺利出膜, 分别取出膜 1、5、10、15、20 和 30 d 的样品若干。待其生长至 3 月龄时, 取半滑舌鳎有眼侧黑色皮肤(正常)、有眼侧白化皮肤、无眼侧白色皮肤(正常)和无眼侧黑化皮肤样本; 取 6 月龄和 12 月龄半滑舌鳎有眼侧黑色皮肤(正常)、有眼侧白化皮肤、无眼侧白色皮肤(正常)、无眼侧黑化皮肤、肝、脾、眼、肌肉样本。以上样品置于 RNA 保存液(RNAwait, 北京索莱宝科技有限公司), 过夜后放入 -20°C 冰箱中保存, 备用。

1.1.2 实验试剂 RNA 提取使用 TRIZol reagent (TaKaRa), RNA 反转录试剂盒为 PrimeScript RT

reagent kit with a gDNA eraser (TaKaRa)。PCR 扩增试剂为 $2\times$ Taq PCR MasterMix、DNA Marker DL 2000, 胶回收试剂盒为 TIANgelTM 胶回收试剂盒(以上均为天根生化), 荧光定量表达使用 SYBR Premix Ex TaqTM (TaKaRa)。连接转化使用 pMD18-T Vector、Trans1-T1 感受态细胞(上海天根生物)、RNaseA-free ddH₂O、100 mg/mL 氨苄(Amp)、LB 液体培养基、固体抗 Amp LB 培养基。

1.2 实验方法

1.2.1 总 RNA 的提取 采集上述不同发育阶段的稚鱼以及 3 月龄幼鱼的不同皮肤组织; 取 6、12 月龄鱼的 4 种不同皮肤组织、眼、肝脏、脾脏、肌肉, 使用 TRIZol 法提取组织总 RNA, 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性, 并通过 NanoVueTM Plus 分光光度计检测 RNA 浓度及 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 值, -80°C 保存。

提取半滑舌鳎不同发育阶段的稚鱼样本, 3 月龄幼鱼的 4 种不同皮肤组织以及 6 月龄和 12 月龄个体的有眼侧正常皮肤、有眼侧白化皮肤、无眼侧正常皮肤、无眼侧黑化皮肤、眼、肝脏、脾脏和肌肉共 8 个组织的 RNA, 通过 PrimeScript RT reagent kit with a gDNA eraser (TaKaRa)反转录试剂盒进行反转录得到相应的 cDNA。

1.2.2 *TYR*、*DCT* 基因 cDNA 的克隆和序列测定

在 NCBI 的 GenBank 数据库中搜索半滑舌鳎 *TYR* 和 *DCT* 基因的预测序列。确定 *TYR*、*DCT* 基因的保守区, 用 Primer 5.0 在保守区设计特异性引物(表 1)。*TYR* 基因 PCR 扩增条件: 95°C 5 min, 之后 40 个循环(94°C 30 s, 58°C 30 s, 72°C 1.5 min), 72°C 7 min, 最后 4°C 保存; *DCT* 基因 PCR 扩增条件: 95°C 5 min, 之后 40 个循环(94°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 1.5 min), 72°C 7 min, 最后 4°C 保存。

扩增产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳分离后, 用 TIANgelTM 胶回收试剂盒(北京天根生化)对目的片段进行纯化回收, 连接至 pMD19-T1 载体(TaKaRa, 日本)上, 转化到 T1 感受态细胞中, 挑取其中的阳性克隆, 送至睿博兴科生物技术有限公司测序。

1.2.3 序列分析 经过 BioEdit 比对和 NCBI 在线 BLAST 程序, 检测所得序列的准确性, 并得到 *TYR*、*DCT* 基因 cDNA 序列, 通过 NCBI 搜索 *TYR*、*DCT* 基因的同源序列, 并使用 Blastx 程序检索蛋白相似性; 运用 DNAMAN 6.0 软件推导编码的氨基酸序列及蛋白分子量, 通过 SMART 在线数据库进行相关蛋白的信号肽及结构域预测, 并将半滑舌鳎和 GenBank 中其他物种的 *TYR*、*DCT* 蛋白序列进行比对分析;

通过 MEGA-X 软件,以邻接法 Neighbor-Joining (NJ) 构建系统进化树(Saitou *et al.*, 1987)。

1.2.4 实时荧光定量 PCR 分析 以测得的半滑舌鳎 *TYR*、*DCT* 基因序列为模板,设计定量引物(表 1),同时,将半滑舌鳎的 β -Actin 基因作为 *TYR*、*DCT* 基因的内参基因,合成其特异性引物(表 1)。使用 SYBR Premix Ex Taq™(TaKaRa)试剂盒,以得到的 cDNA 为模板,浓度为 100 ng/ μ L,在 ABI 7500 SDS 仪(美国

应用生物公司)上进行 qRT-PCR 反应。采用两步法,反应程序:95℃ 预变性 30 s,95℃ 5 s,58℃ 30 s,共 40 个循环;60℃ 30 s,72℃ 30 s,熔解曲线温度为 55℃~95℃。每个样品设 3 个生物学重复,3 个技术重复,使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 *TYR*、*DCT* 基因的相对表达量。用 Origin 7.5 软件作图,用 SPSS 17.0 软件进行单因素方差分析(one-way ANOVA)。通过 *T* 检验进行显著性比较, $P < 0.05$ 表示差异显著。

表 1 半滑舌鳎 *TYR* 基因克隆使用的 PCR 扩增引物

Tab.1 Primers used for PCR amplification of *TYR* of *C. semilaevis*

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'~3')	用途 Purpose
TYR-F1	ATGAGGACCCGGTTTGCATCTCTCGTCC	ORF 序列扩增 ORF sequence amplification
TYR-R1	TTACAGTGTGGTCTGATACGACGAGCC	ORF 序列扩增 ORF sequence amplification
β -Actin-F	GTAGGTGATGAAGCCCAGAGCA	内参基因 Internal reference gene
β -Actin-R	CTGGGTCACTTCTCCCTGT	内参基因 Internal reference gene
TYR-F	CTGGGAGAATGAGATAAGGA	Real-time PCR
TYR-R	ACGAGGAGAATACAGAGGC	Real-time PCR
DCT-F1	ATGATGAAGGCTTTGGGTCTAAGCCTTC	ORF 序列扩增 ORF sequence amplification
DCT-R1	CTAGGCCTCTCTGTGTACTTTCTATGTG	ORF 序列扩增 ORF sequence amplification
DCT-F	CGGAGA ACTGGACGAATC	Real-time PCR
DCT-R	CAGGAGACCGACGAAGACT	Real-time PCR

2 结果与分析

2.1 *TYR*、*DCT* 基因 cDNA 和编码蛋白序列分析

利用 RT-PCR 技术成功获得 *TYR* 基因完整编码序列。半滑舌鳎 *TYR* 基因编码区序列长为 1620 bp,共编码 539 个氨基酸,其编码的 *TYR* 蛋白预测分子量为 61.008 kDa,分析见图 1。

利用 RT-PCR 成功获得 *DCT* 基因完整编码序列。*DCT* 基因的开放阅读框为 1551 bp,编码 516 个氨基酸,*DCT* 蛋白预测分子量为 57.948 kDa (图 2)。

2.2 同源性比较与系统发育树

通过 NCBI 的 Blastp 程序,搜索 *TYR* 同源蛋白氨基酸序列,选取了大刺鳅(*Mastacembelus armatus*: XP_026189265.1)、斑马鱼(*Danio rerio*: AMO00812.1)、青鳉(*Oryzias latipes*: BAA06155.1)、尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*: XP_003441635.1)、黄金鲈(*Perca flavescens*: XP_028429419.1)、绿头鸭(*Anas platyrhynchos*: XP_005029640.2)、小鼠(*Mus musculus*: BAX25613.1)、人(*Homo sapiens*: AAA61242.1)等 16 种有代表性的物种并确定相似性(表 2),通过 MEGA-X 进行系统进化分析(图 3)。结果发现,半滑舌鳎 *TYR* 与鲈形目、颌针鱼目等鱼类为同一分支,

而爬行类、哺乳类等构成另外独立的分支。

NCBI 网站搜索 *DCT* 同源蛋白氨基酸序列,选取斑马鱼(*Danio rerio*: AAJ64222.1)、剑尾鱼(*Xiphophorus hellerii*: XP_032423860.1)、鲫鱼(*Carassius auratus*: XP_026126897.1)、红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*: XP_003961932.1)、褐牙鲈(*Paralichthys olivaceus*: XP_019945763.1)、雉鸡(*Phasianus colchicus*: XP_031466474.1)、欧亚野猪(*Sus scrofa*: BAF48040.1)等 19 种有代表性的物种,确定相似性(表 3),并通过 MEGA-X 进行系统进化分析(图 4)。

结果表明,半滑舌鳎 *DCT* 与鲈形目、鲱形目、鲤形目等其他鱼类形成独立的分支,而两栖、爬行和哺乳类形成另外的分支(图 4)。

2.3 *TYR*、*DCT* 基因表达差异分析

2.3.1 *TYR*、*DCT* 基因在半滑舌鳎早期发育阶段以及皮肤组织中的转录水平 在稚鱼发育不同时期的 qRT-PCR 结果显示(图 3),从出膜后 1~20 d 的仔鱼组织中,*TYR* 的表达总体上呈现递增趋势,尤其是在变态关键时期(15~20 日龄)表达量最高,30 日龄时表达量锐减到很低水平。3 个时期 *TYR* 基因的实时荧光定量结果显示(图 5),在半滑舌鳎各皮肤组织中,有眼侧黑色(正常)皮肤 *TYR* 基因的表达量随时间变化具有

```

1      ATGAGGACCCGGTTGCATCTCTCGTCCTGTTTCAGCTCGTCCAGACTGCTTTCTGCCAG
1      M R T R F A S L V L F Q L V Q T A F C Q
61     TTCCCTCGACCCTGTGCCACCTCAGAGGGACTACGGACCAAGGAGTGTGCCCCAGTGTGG
21     F P R P C A T S E G L R T K E C C P V W
121    GGAGGTGACGGCTCGGTCTGTGGTGCACCTCAGGCCGTGGTTTCTGCACCCGAGGTGCTG
41     G G D G S V C G A L S G R G F C T E V L
181    GTCTCAGACGAACCCGATGGGCCCCAGTACCCGCACAGCGGGATGGATGACAGAGAACGT
61     V S D E P D G G P Q Y P H S G M D D R E R
241    TGGCCTTTGGCCTTCTTTAACCGGACATGCCGTTGTGCGGGAAACTACGGAGGGTTTCGAC
81     W P L A F F N R T C R C A G N Y G G F D
301    TGGGAGAGTGTAGATTTCGGTTACTCGGGCTCCAACCTGTGCACAGTACAGGGAGTCCGCTG
101    C G E C R F G Y S G S N C A Q Y R E S V
361    CGCAGAAACATCATGAGCTTGCCACCCTGAGCAACCGAAAGTTCGTCTCCTACCTCAAC
121    R R N I M S L P T A E Q R K F V S Y L N
421    CTGGCCAAAAACACTGTCAACCGTACTATGTCATCGCCACGGGGACCAGAGCAGATG
141    L A K N T V N R D Y V I A T G T R A E M
481    GGGGGAAATGGTGAGAACCCATGTTCTCTGACATCAACACCTATGACCTGTTTGTCTGG
161    G G N G E N P M F S D I N T Y D L F V W
541    ATGCACTACTACGTGTCCCGGGACACCTTCTGGGAGGACCTGGCAACGTGTGGCGAGAC
181    M H Y Y V S R D T F L G G P G N V W R D
601    ATCGACTTTGCTCAGGAGTCCGGCCCTTCTGCGGTGGCACAGAGTCTACCTGCTTCAAC
201    I D F A H E S A A F L P W H R V Y L L H
661    TGGGAGAATGAGATAAGGAAGCTGACGGGTGATTTCAACTTCACCATCCCGTACTGGGAC
221    W E N E I R K L T G D F N F T I P Y W D
721    TGGAGAGACGCCAGTCTGTGTCAGGTGTGCACTGATGCGCTAATGGGGGAACGTAGCCCC
241    W R D A Q S C Q V C T D A L M G E R S P
781    CTCAACCCTAATCTCATCAGTCTGCTCTGTATTCTCCTCGTGAAGGTCATCTGCACT
261    L N P N L I S P A S V F S S W K V I C T
841    CATCATACGGAGTACAACAATCGGGAAGTCTTGTGTAACGCCACCGGGGAGGGTCCGCTG
281    H H T E Y N N R E E V L C N A T G E E G P L
901    TTGCGTAACCCAGGCAACCATGATCCAAACCGCGTGGCCCGACTCCCAACATCAGTGTG
301    L R N P G N H D P N R V A R L P T S A D
961    GTTGACTTCACCGTGGGCTGCTGACTACGAGACTGGACCCATGGACCGGTTACCAAC
321    V D F T V G L P D Y E T G P M D R F T N
1021   ATGAGCTTCAGGAATGTCTAGAGGGTTTTGCCAGTCCAGTGAACGGTATGGCAGTGCCA
341    M S F R N V L E G F A S P V N G M A V P
1081   GGCCAGAGCACCATGCACAATGCCTTACATGTTTTCATGAACGGCTCCATGTCTCTCAGT
361    G Q S T M H N A L H V F M N G S M S S V
1141   CAGGGTTCAGCCAACGACCCAATATTCCTGCTGCACCATGCCTTCATTGACGATTTTTT
381    Q G S A N D P I F L L H H A F I D S I F
1201   GAGCGATGGCTCAGGACCCATCAGCCTGTGAGGACACCTACCCTCGAGCCAATGCCCCC
401    E R W L R T H Q P V R S T Y P R A N A P
1261   ATCGGCCACAACGACGGTTACTACATGGTGCCATTTCTGCCCTCTATAGAAACGGAGAC
421    I G H N D G Y Y M V P F L P L Y R N G D
1321   TATTTCTGACCAACAAAGTTCTGGGCTACGAATACGCCTATCTGTTGGACCCCGGCCAG
441    Y F L T N K V L G Y E Y A Y L L D P G Q
1381   AGGTTTCATGCAGGAGTTCATCAGCCCTACCTGGAGGAGGCCAGCAGATCTGGCAGTGG
461    R F M Q E F I T P Y L E E A Q Q I W Q W
1441   CTCTGGGGCCGGCCTCCTGGGTGCTGTCGTCGCTTCGGTATTTGGACACTGTGCTG
481    L L G A G L L G A V V A S V F A T L V V
1501   GTGGCAAGGAGAAAGTGAAACGCAACCGAGGAGGAAGAGATCGTTGGGCTACGGCGAG
501    V A R R K W K R N Q R R K R S L G Y G E
1561   AGACAACCACTGCTGCAGAGCAGCTCGGAGGAAGGCTCGTTCGTATCAGACCACACTGTAA
521    R Q P L L Q S S S E E G S S Y Q T T L *

```

图 1 半滑舌鳎 *TYR* 基因 ORF 序列及推导的氨基酸序列

Fig.1 Open reading frame sequence of *C. semilaevis TYR* gene and the deduced amino acid sequence

推导的氨基酸序列用单字母表示, 从显示的起始甲硫氨酸开始计数

阴影部分: 起始密码子; 下划线: 信号肽; 双划线: 功能结构域; 方框部分: 跨膜结构域; 终止密码子用*表示。图 2 同

The deduced amino acid sequence is represented by a single letter, starting with the initial methionine shown. Start codon is marked in gray, signal peptide is marked with underline, the protein domain indicated with double line, the TSM is framed, and the termination codon is denoted by *. The same as in Fig.2


```

1      ATGATGAAGGCTTTGGGTCTAAGCCTTCTTTGTTTATTACTCTGGCCTGATTGTACACAG
1      M M K A L G L S L L C L L L W P D C T Q
61     GCTCAGTTTCTCGAGTGTGCTGTACAGTGGAGGGGATCGTGTCCAAGCAGTGTGCCCA
21     A Q F P R V C C T V E G I V S K Q C C P
121    GCTCTGGGTTTCAGATCCTGCCAATGTGTGTGGCTCTCTGTTGGGAAGAGGGAGCTGTACT
41     A L G S D P A N V C G S L L G R G S C T
181    GCAGTTCGAGTCGACAACAAACCCTGGGGAGGACCCTACAGACTGAGAAATGTTGACGAC
61     A V R V D N K P W G G P Y R L R N V D D
241    AGAGAGCGGTGGCCACAAAATCTTCAATCAGACATGCAGATGTACCGGAAACTTTGCA
81     R E R W P T K F F N Q T C R C T G N F A
301    GGTTACAACCTGCGGCCAGTGTAAATTTGGCTGGACTGGTCCCAACTGTGACCAAAGGAAA
101    G Y N C G Q C K F G W T G P N C D Q R K
361    TCCCCTGTGGTTCGGAAGAACATCCACTCTCTGACCCCGATGAGCTCCTGGAATTCCTC
121    S P V V R K N I H S L T P D E L L E F L
421    AATGCGCTGGAAGTGGCAAGAACACCATTACCCAGATTATGTTATTGCCACCCAGCAC
141    N A L E L A K N T I H P D Y V I A T Q H
481    TGGCTCGGCCTCCTGGGACCTAATGGAAGTGGCCGACGAGTGGCCAAACATCTCCATCTAC
161    W L G L L G P N G T E P Q V A N I S I Y
541    GACTTCTTTGTGTGGCAACATTACTATTTCAGTGAGAGACTCTTTTAGGTCCAGGACGT
181    D F F V W Q H Y Y S V R D T L L G P G R
601    CCATTTAAAGCCATTGATTTCTCACACAAAGGCCCGCCTTACATTACCTGGCACAGTGT
201    P F K A I D F S H K G P A F I T W H R F
661    CACCTTCTGAGTCTGGAGAGAGAGCTGCAGAGACTGACTGGGAATGAGAAGTTCGCAATA
221    H L L S L E R E L Q R L T G N E N F A I
721    CCATACTGGAATTCGCCACAGGCAGAGCGAGTGTGACGTGTGCACTGACTCCATGCTG
241    P Y W N F A T G Q S E C D V C T D S M L
781    GGGGCCGACAGCCCGAGAAGCCATCTCTCATCAGTAACCAGTCCAGGTTCTCCAGATGG
261    G A R Q P E N P S L I S N Q S R F S R W
841    GGAGTGGTGTGTAACAGCCTTGATGACTACAACCGCCTGGTGACTCTGTGTAACGGCACC
281    G V V C N S L D D Y N R L V T L C N G T
901    AGCGAGGGTTTCATTACGCGAGGGATTATGGAGCAGGGAAACATGTCTCTGCCTTCCATG
301    S E G F I Q R G I M E Q G N M S L P S M
961    GATGATGTGAGGAGCTGCCTTAGAATCCGAGAATTTGACACTTCCCCGTTTTTTACCAAC
321    D D V R S C L R I R E F D T S P F F T N
1021   TCTTCTCAGTTTCAGAAATGCACTGGAAGTTATGATAAACAGCAGGAGAGACTGGAC
341    S S F S F R N A L E G Y D K P D G E L D
1081   GAATCAGTCAACAACCTTCAACAACCTGGTCCACTCCATGCTCAATGGAACAAGCGTCTG
361    E S V N N L H N L V H S M L N G T S A L
1141   TCACACTCTGCAGCTAATGACCAATTTTTCTGGTCTCCATGCCTTTACTGATGCCATT
381    S H S A A N D P I F L V L H A F T D A I
1201   TTTGATGAGTGGATGCGCAGGATCCTTCCAATAATGCCACGTTTCCAGACGAAATGGCA
401    F D E W M R R I L P T N A T F P D E M A
1261   CCCATCGGTCACAACCGGGACTACAACATGGTCCGTTCTTCCCACCGATCACAAATGAA
421    P I G H N R D Y N M V P F F P P I T N E
1321   GAGATCTTTGTACATCTGAACAGCTGGGATATTCTTATGCTATTGACTTAGATGAATCA
441    E I F V T S E Q L G Y S Y A I D L D E S
1381   GACGGCGGAGCCAACGTGTTTCGTTGCTGGGCTCCACCTGGGAGGAGTCTTCGTCGGTCTC
461    D G G A N V F V L G S T L G G V F V G L
1441   CTGGTGCTCTGCCTGATCTTTGTGCTCTACGTGCATCAACGGAGAAAGAGTGGCTTTGAG
481    L V L C L I F V L Y V H Q R R K S G F E
1501   CCGCTGATAAAGGCAGACTTCACACATAGAAAGTACACAGAGGAGGCCTAG
501    P L I K A D F T H R K Y T E E A *

```

图2 半滑舌鲷 *DCT* 基因 ORF 序列及推导的氨基酸序列

Fig.2 Open reading frame sequence of *C. semilaevis DCT* gene and the deduced amino acid sequence

显著差异($P<0.05$), 从3月龄、6月龄到12月龄, 该基因表达量呈递增趋势, 而在有眼侧白化、无眼侧白色(正常)和无眼侧黑化皮肤中随时间变化差异不显著($P>0.05$); 同一时期, 4种皮肤组织 *TYR* 基因的表达

均存在显著差异($P<0.05$), 黑色皮肤中该基因的表达显著高于有眼侧白化、无眼侧白色(正常)皮肤, 而黑色皮肤之间和白色皮肤之间 *TYR* 基因的表达均无显著差异($P>0.05$) (图6)。

表 2 半滑舌鳎 TYR 氨基酸序列与其他脊椎动物的同源性比较

Tab.2 Comparison of homology of the precursor peptide sequences of TYR between *C. semilaevis* and other vertebrates

物种 Species	序列号 GenBank accession No.	与 TYR 同源性 Identity with TYR /%
半滑舌鳎 <i>Cynoglossus semilaevis</i>	-	100
大刺鳅 <i>Mastacembelus armatus</i>	XP_026189265.1	84.16
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	AMO00812.1	70.72
青鳉 <i>Oryzias latipes</i>	BAA06155.1	82.87
尼罗罗非鱼 <i>Oreochromis niloticus</i>	XP_003441635.1	82.50
黄金鲈 <i>Perca flavescens</i>	XP_028429419.1	84.53
日本锦蛇 <i>Elaphe climacophora</i>	BBC55647.1	56.27
平塔岛象龟 <i>Chelonoidis abingdonii</i>	XP_032624626.1	58.67
白喉雀 <i>Zonotrichia albicollis</i>	XP_005485837.1	57.56
绿头鸭 <i>Anas platyrhynchos</i>	XP_005029640.2	57.45
袋獾 <i>Sarcophilus harrisii</i>	XP_031817288.1	56.64
马 <i>Equus caballus</i>	XP_001492610.4	55.96
中华田园犬 <i>Canis lupus familiaris</i>	AAQ17535.1	56.46
欧亚野猪 <i>Sus scrofa</i>	BAD99580.1	57.75
小鼠 <i>Mus musculus</i>	BAX25613.1	58.20
人 <i>Homo sapiens</i>	AAA61242.1	56.83

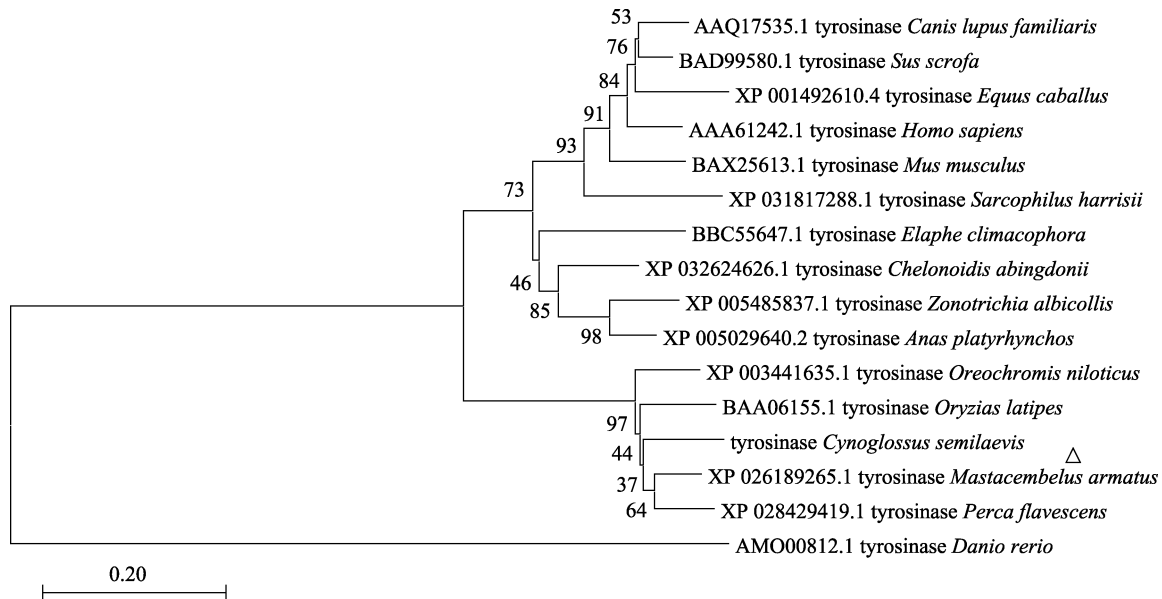


图 3 TYR 氨基酸序列的系统进化树分析

Fig.3 Phylogenetic tree based on TYR amino acid sequences

通过 qRT-PCR 技术, 检测 *DCT* 基因在不同时期仔鱼及成鱼皮肤组织中的表达情况(图 6)。结果显示, 从出膜后 1~20 d 的仔鱼组织中, *DCT* 的表达总体上呈递增趋势, 尤其在变态关键时期(15~20 日龄)表达量最高, 30 日龄时表达量锐减到很低水平。*DCT* 基因在不同发育时期的仔鱼体内的 qRT-PCR 结果显示(图 7), 在半滑舌鳎各皮肤组织中, 有眼侧黑色(正常)

皮肤、无眼侧黑化皮肤和无眼侧白色(正常)皮肤 *DCT* 基因的表达随时间变化显著递增($P < 0.05$), 而在有眼侧白化皮肤中随时间变化差异不显著($P > 0.05$); 同一时期, 4 种皮肤中 *DCT* 基因表达均存在显著差异($P < 0.05$), 黑色皮肤中该基因的表达显著高于白色皮肤($P < 0.05$), 而黑色皮肤之间和白色皮肤之间的 *DCT* 基因表达均无显著差异($P > 0.05$) (图 8)。

表 3 半滑舌鳎 DCT 氨基酸序列与其他脊椎动物的同源性比较

Tab.3 Comparison of homology of the precursor peptide sequences of DCT between *C. semilaevis* and other vertebrates

物种 Species	序列号 GenBank accession No.	与 DCT 同源性 Identity with DCT /%
半滑舌鳎 <i>Cynoglossus semilaevis</i>	-	100
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	AAJ64222.1	77.13
剑尾鱼 <i>Xiphophorus hellerii</i>	XP_032423860.1	77.71
鲫鱼 <i>Carassius auratus</i>	XP_026126897.1	80.43
钝头鲛 <i>Amblyraja radiata</i>	XP_032878815.1	62.88
红鳍东方鲀 <i>Takifugu rubripes</i>	XP_003961932.1	88.05
大西洋鲱 <i>Clupea harengus</i>	XP_012680545.2	77.33
大菱鲆 <i>Scophthalmus maximus</i>	AWP13184.1	88.95
褐牙鲆 <i>Paralichthys olivaceus</i>	XP_019945763.1	83.67
束带蛇 <i>Thamnophis elegans</i>	XP_032082150.1	53.59
西部锦龟 <i>Chrysemys picta bellii</i>	XP_005305072.1	53.84
凤头潜鸭 <i>Aythya fuligula</i>	XP_032060256.1	53.64
雉鸡 <i>Phasianus colchicus</i>	XP_031466474.1	54.28
朱红蜂鸟 <i>Calypte anna</i>	XP_008488531.2	59.07
袋獾 <i>Sarcophilus harrisii</i>	XP_003765843.1	55.11
斑海豹 <i>Phoca vitulina</i>	XP_032258657.1	71.52
欧亚野猪 <i>Sus scrofa</i>	BAF48040.1	55.94
锡金小鼠 <i>Mus pahari</i>	XP_021058514.1	55.49
黑叶猴 <i>Trachypithecus francoisi</i>	XP_033033323.1	55.43

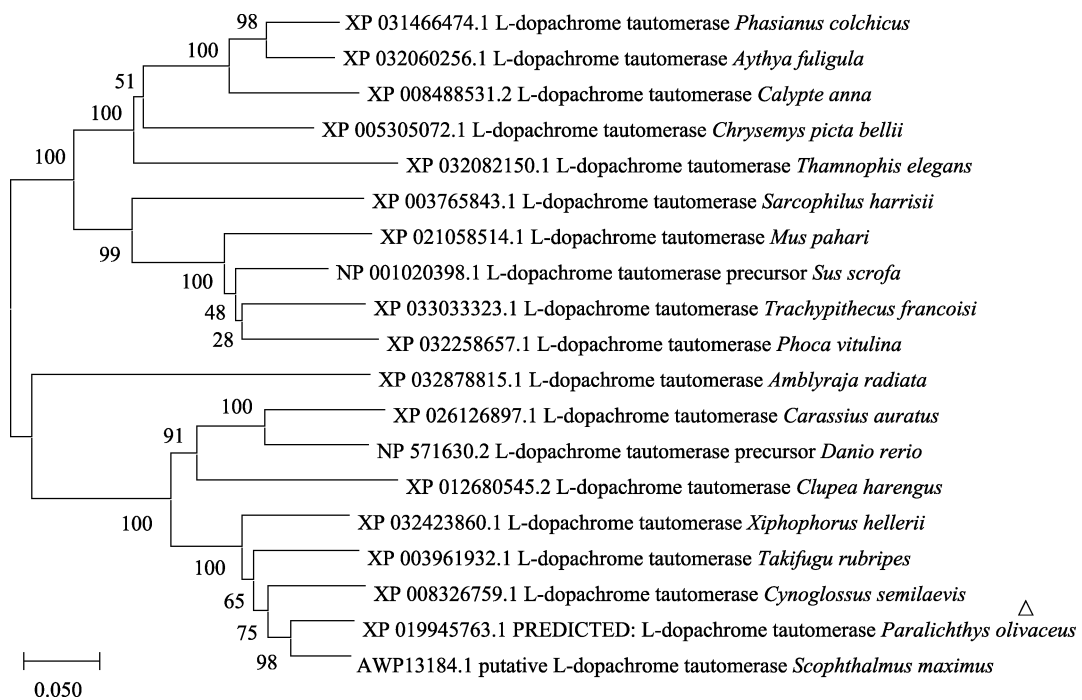


图 4 DCT 氨基酸序列的系统进化树分析

Fig.4 Phylogenetic tree based on DCT amino acid sequences

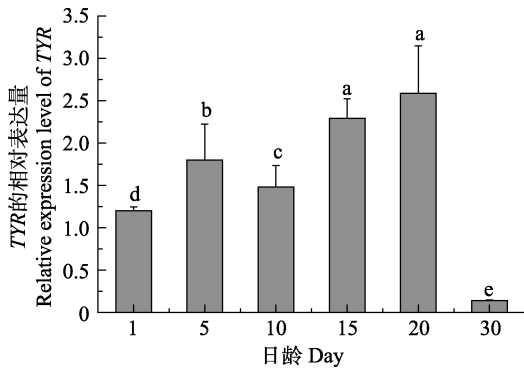


图 5 半滑舌鳎 *TYR* 早期生长发育阶段相对定量表达
Fig.5 Relative expression levels of *TYR* in *C. semilaervis* early developmental stage

不同字母表示差异显著($P<0.05$)。下同
Different letters indicated significant differences ($P<0.05$). The same as below

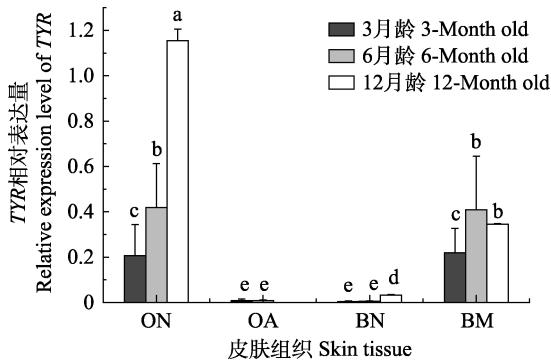


图 6 半滑舌鳎 *TYR* 皮肤组织相对定量表达
Fig.6 Relative expression levels of *TYR* in *C. semilaervis* skin tissues

ON: 有眼侧正常皮肤; OA: 有眼侧白化皮肤;
BN: 无眼侧正常皮肤; BM: 无眼侧黑化皮肤。下同
ON: Ocular-side black skin; OA: Ocular-side albinistic skin;
BN: Blind-side albinistic skin; BM: Blind-side skin with hypermelanosis. The same as below

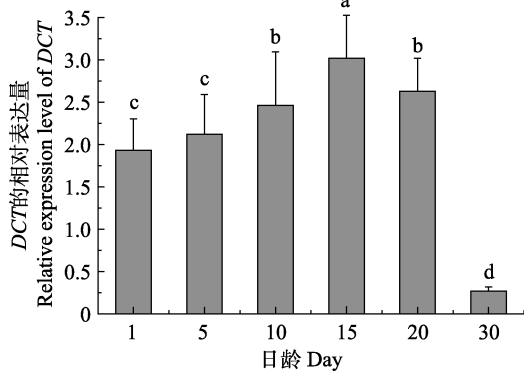


图 7 半滑舌鳎 *DCT* 在仔鱼生长发育阶段相对定量表达
Fig.7 Relative expression levels of *DCT* in *C. semilaervis* larvae developmental stage

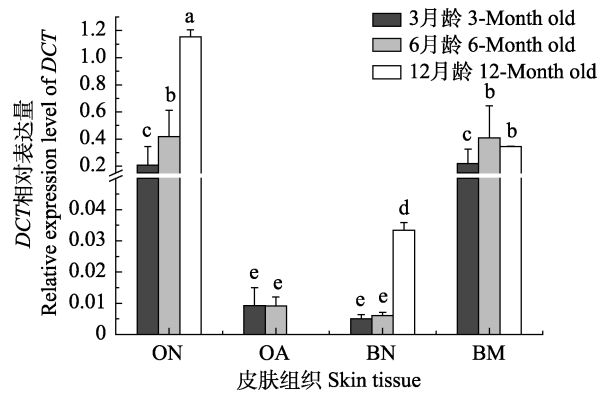


图 8 半滑舌鳎 *DCT* 皮肤组织相对定量表达
Fig.8 Relative expression levels of *DCT* in *C. semilaervis* skin tissues

2.3.2 不同组织中 *TYR*、*DCT* 基因的表达差异 半滑舌鳎的 6 月龄和 12 月龄, *TYR* 基因在不同组织中的表达情况如图 9、图 10 所示。在 6 月龄成鱼中, *TYR* 表达量在眼睛中最高, 表达最高为眼部组织; 另外, 有眼侧黑色皮肤和无眼侧黑化皮肤表达量也相对较高; 同时, 肝脏组织也具有较高的表达量, 在脾脏中极低表达, 在有眼侧白化皮肤、无眼侧正常(白色)皮肤和肌肉中几乎不表达。在 12 月龄半滑舌鳎中, *TYR* 在眼睛中表达最高, 但显著低于 6 月龄, 其有眼侧正常皮肤(黑色)、无眼侧黑化皮肤 *TYR* 的表达较高, 脾脏、肝脏中的表达极低, 无眼侧正常皮肤(白色)和肌肉中仅微量表达或几乎不表达。

在 6 月龄半滑舌鳎中, *DCT* 表达在眼睛中最高, 肝脏中也有较高的表达量; 另外, 有眼侧黑色皮肤和无眼侧黑化皮肤表达量相对较少, 有眼侧白化和无眼侧正常皮肤、脾脏、肌肉几乎不表达。在 12 月龄半

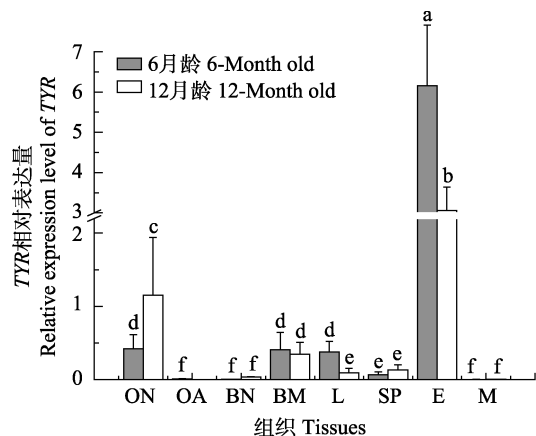


图 9 半滑舌鳎 *TYR* 在不同组织中的相对表达量
Fig.9 Relative expression levels of *TYR* in different tissues of *C. semilaervis*

L: 肝脏; SP: 脾脏; E: 眼; M: 肌肉。下同
L: Liver; SP: Spleen; E: Eye; M: Muscle. The same as below

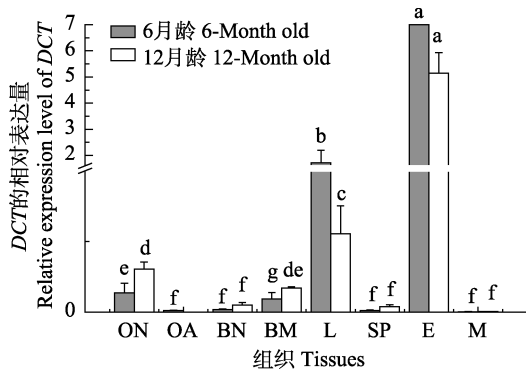


图10 半滑舌鲷 *DCT* 在不同组织中的相对表达量
Fig.10 Relative expression levels of *DCT* in different tissues of *C. semilaevis*

滑舌鲷中, *DCT* 在眼睛中表达最高, 但稍低于 6 月龄的表达量, 肝脏、有眼侧正常皮肤(黑色)、无眼侧黑化皮肤中有较高表达, 在无眼侧正常皮肤(白色)、脾脏和肌肉中几乎不表达。

3 讨论

3.1 序列分析

本研究利用 qRT-PCR 技术, 获得了半滑舌鲷的 *TYR* 基因的编码区序列, 其 CDS 序列由 539 个氨基酸构成, 编码的 *TYR* 蛋白预测分子量为 61.008 kDa, 其蛋白 N 端具有由 19 个氨基酸组成的信号肽, 具有指导蛋白质跨膜转移的作用; 中间有由 236 个氨基酸组成的功能性结构域, 与该蛋白执行黑色素合成的生理功能密切相关。氨基酸同源性分析显示, 半滑舌鲷 *TYR* 与其他鱼类的同源性高达 80%~85%, 与爬行动物、鸟类和哺乳动物存在 50%以上的同源性。

DCT 基因作为一种酪氨酸酶基因, 其表达能够影响酪氨酸酶的活性以及黑色素合成的效率。本研究通过基因克隆技术获得了半滑舌鲷 *DCT* 基因的编码区序列, 该基因蛋白序列由 516 个氨基酸组成, *DCT* 蛋白预测分子量为 57.948 kDa, 蛋白 N 端有由 21 个氨基酸组成的信号肽, 具有指导蛋白质跨膜转移的作用; 中间有由 231 个氨基酸组成的功能性结构域, 与该蛋白执行黑色素合成与沉着的生理功能密切相关。氨基酸同源分析显示, 半滑舌鲷 *DCT* 与其他硬骨鱼类有高达 77.33%~88.05%的同源性, 与爬行类、鸟类以及哺乳类存在 50%以上的同源性。

3.2 时空表达差异分析

通过实时荧光定量 PCR 技术, 检测了仔鱼 *TYR*、*DCT* 基因表达情况。结果显示, 从出膜后 1~20 d 的

仔鱼组织中, *TYR*、*DCT* 的表达总体上呈递增趋势, 表明 *TYR*、*DCT* 基因在半滑舌鲷变态发育过程中显著上调。

对半滑舌鲷不同生长时期的皮肤组织进行检测发现, *TYR* 基因在有眼侧白化皮肤和无眼侧白色皮肤(正常)中表达极低, 且随时期变化无显著差异; 该基因在有眼侧黑色(正常)皮肤和无眼侧黑化皮肤的表达量差异不大, 但随着时期变化存在递增趋势, 表达量为白色皮肤组织的 20 倍以上。Pomerantz 等(1975)和 Iwata 等(1990)先后发现 *TYR* 基因在人体黑色皮肤组织中活性显著高于非黑色皮肤组织, 这与本研究的结果基本一致。

DCT 基因在同时期半滑舌鲷有眼侧白化和无眼侧白色(正常)皮肤中表达较低, 无眼侧白色(正常)皮肤随时间变化存在递增趋势, 有眼侧白化皮肤随时间变化无显著差异; 该基因在有眼侧黑色(正常)皮肤和无眼侧黑化皮肤的表达差异不大, 均随时间变化有递增趋势, 表达量为白色皮肤的 4 倍以上。通过转录组技术对斑马鱼色素细胞分析显示, 黑色素细胞中 *DCT* 基因的表达显著高于其他色素细胞(Higdon *et al.*, 2013); *DCT* 基因在鲫(*Carassius auratus*) (Zhu *et al.*, 2016)和莫桑比克罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*) (Zhang *et al.*, 2017)黑色皮肤中的表达显著高于非黑色皮肤, 与本研究的结果相一致。

对半滑舌鲷其他组织检测发现, *TYR* 基因在半滑舌鲷眼睛中的表达量极高, 为肝脏表达量的 16 倍以上; 其次为肝脏和脾脏, 肌肉中的表达量极低, 且均随时间变化无显著差异。*DCT* 基因在同一时期半滑舌鲷的眼睛中表达最高, 约为肝脏表达量的 10 倍, 且随时间变化有递减趋势; 该基因在脾脏和肌肉中的表达量较低, 尤其是肌肉中的表达可忽略不计。以上差异表明, *TYR*、*DCT* 都与半滑舌鲷黑色素发生过程密切相关, 但生理功能存在一定的差异。本研究还发现, 该过程在眼睛中较黑色皮肤更为活跃。由此可以推测, 黑色素对于鲷鱼类眼色和视觉具有更重要的作用, 这有待后续实验进行充分验证。

4 结论

本研究结合 PCR 技术和 GenBank 序列比对, 获得半滑舌鲷酪氨酸酶相关基因 *TYR* 和 *DCT* 的编码区 cDNA 序列, 分析了其分子结构、同源性及系统进化特性, 通过定量方式研究了在组织中的表达特性。*TYR* 和 *DCT* 基因在脊椎动物中具有进化保守性, 均与爬行动物、鸟类和哺乳动物存在 50%以上的同源

性, 与其他鱼类存在高达 70% 以上的同源性。通过实时荧光定量 PCR 实验阐明了半滑舌鳎出膜后不同时期和不同组织中的 *TYR*、*DCT* 基因表达特性, 并分析了其与半滑舌鳎体色异常的关系, 本研究为揭示半滑舌鳎体色异常机制提供了重要依据和参考。

参 考 文 献

- BURTON D. Melanophore comparisons in different forms of ambicoloration in the flatfish *Pseudopleuronectes americanus* and *Reinhardtius hippoglossoides*. *Journal of Zoology*, 1988, 214(2): 353–360
- Fisheries and Fisheries Administration, Ministry of Agriculture and Rural Affairs. Chinese Fishery Statistics Yearbook. Beijing: Agricultural Press, 2019, 5–22 [农业农村部渔业渔政管理局. 中国渔业统计年鉴. 北京: 农业出版社, 2019, 5–22]
- HIGDON C W, MITRA R D, JOHNSON S L. Gene expression analysis of zebrafish melanocytes, iridophores, and retinal pigmented epithelium reveals indicators of biological function and developmental origin. *PLoS One*, 2013, 8(7): e67801
- IWATA M, CORN T, IWATA S, *et al.* The relationship between tyrosinase activity and skin color in human foreskins. *Society for Investigative Dermatology*, 1990, 95(1): 9–15
- LI Y Z, CHEN S L, XING H F, *et al.* The preliminary study of albinism in *Cynoglossus semilaevis*. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(1): 76–83 [李仰真, 陈松林, 邢贺飞, 等. 半滑舌鳎白化现象的初步研究. 水产学报, 2014, 38(1): 76–83]
- POMERANTZ S H, ANCES I G. Tyrosinase activity in human skin influence of race and age in newborns. *Journal of Clinical Investigation*, 1975, 55(5): 1127–1131
- SAITOU N, NEI M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 1987, 4(4): 406–425
- SHI X Y, LIU X Z, SHI Y, *et al.* Molecular characterization of *MCHR* and its correlation with blind-side hypermelanosis in *Cynoglossus semilaevis*. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(1): 91–102 [史学营, 柳学周, 石莹, 等. 半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)黑色素聚集素受体(*MCHR*)表达特性及其与无眼侧黑化的关系. 渔业科学进展, 2017, 38(1): 91–102]
- SONG X S. Cloning, expression patterns and physiological roles of two retinoic acid receptors in blind side hypermelanosis in *Cynoglossus semilaevis*. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2018 [宋雪松. 半滑舌鳎视黄酸受体克隆及其对无眼侧黑化的调控作用研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2018]
- SUN X L, GAO W W, SHI H Y, *et al.* Design and evaluation of primers for analysis of *TYR* gene expression in blood parrot (*Amphilophus*) by using real-time fluorescence quantitative PCR technique. *Tianjin Agricultural Sciences*, 2018, 24(12): 46–50 [孙学亮, 高微微, 石洪玥, 等. 血鹦鹉 *TYR* 基因表达 qPCR 分析的引物设计与评估. 天津农业科学, 2018, 24(12): 46–50]
- WANG Y Q, HU L L, WANG R N, *et al.* Advances in research on animal coat color candidate gene dopachrome-tautomerase (*DCT*). *Journal of Hebei Normal University of Science and Technology*, 2019, 33(1): 54–57 [王亚琪, 胡露露, 王瑞宁, 等. 动物毛色候选基因 *DCT* 的研究进展. 河北科技师范学院学报, 2019, 33(1): 54–57]
- XU W, FENG J Q, HUANG L, *et al.* Research progress on *TYR* gene. *China Animal Husbandry Journal*, 2017, 53(4): 23–26 [徐伟, 封竣淇, 黄兰, 等. *TYR* 基因研究进展. 中国畜牧杂志, 2017, 53(4): 23–26]
- XU Y J, ZHU X W, LIU X Z, *et al.* Cloning and expression of melanin-concentrating hormone in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(1): 81–90 [徐永江, 朱学武, 柳学周, 等. 半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)黑色素富集激素基因的克隆和表达. 渔业科学进展, 2017, 38(1): 81–90]
- ZHANG Y, LIU J, FU W, *et al.* Comparative transcriptome and DNA methylation analyses of the molecular mechanisms underlying skin color variations in Crucian carp (*Carassius carassius* L.). *BMC Genetics*, 2017, 18(1): 95
- ZHU W, WANG L, DONG Z, *et al.* Comparative transcriptome analysis identifies candidate genes related to skin color differentiation in red tilapia. *Scientific Reports*, 2016, 6: 31347
- ZHU X W. Studies on regulation mechanisms underlie blind-side hypermelanosis of farmed flatfish. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2016 [朱学武. 养殖鲆鲽类无眼侧黑化调控机制研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2016]

(编辑 冯小花)

Expression Analysis of *TYR* and *DCT* Genes Related to Body Color in *Cynoglossus semilaevis* at Different Periods and in Different Tissues

WU Yaolei^{1,2}, LI Yangzhen^{1,2}, WANG Na¹, MA Teng^{1,2}, ZHAO Yuzhu^{1,2}, CHEN Songlin¹①

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences; Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao, Shandong 266071, China; 2. National Experimental Teaching Demonstration Center of Aquatic Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract Melanin commonly exists in animal tissues. The animal body surface has different colors and abundant pigment patterns due to differences in the distribution and development of melanin and related cells. Different pigment patterns have important functions such as biological camouflage, courtship, etc., especially in fish. *Cynoglossus semilaevis*, one of the dominant aquaculture flatfish species in China, often suffers from two body color anomalies, i.e. melanism and albinism, which have hindered the development of high-quality seeds and aquaculture. In this study, cDNA sequences of two color-related genes (i.e. *TYR* and *DCT*) were cloned and phylogenetically analyzed. Further, expression levels of both genes were analyzed in different stages and in different tissues. The cDNA sequence length of *TYR* gene coding region is 1620 bp, encoding 539 amino acids. The length of the cDNA sequence in the coding region of *DCT* gene is 1551 bp, encoding 516 amino acids. In this study, it was found that the expression levels of *TYR* and *DCT* were high in fry that were less than 20-day-old, especially during the critical period of metamorphosis (15 to 20-day-old), and decreased to a very low level at 30-day-old. In other skin tissues, the expression levels of these two genes were highest in normal skin on the ocular side and in dark skin on the blind side, and extremely low in albino skin on the ocular side and in normal skin on the blind side. Among other tissues at other times, the highest expression was in the eye, followed by the liver, with very low expression in the spleen and muscles. Results show that *TYR* and *DCT* genes are the key genes for blind-side melanogenesis and ocular-side color maintenance in *C. semilaevis*. This study provides an important basis and reference for identifying the mechanism of color anomaly in *C. semilaevis*.

Key words *Cynoglossus semilaevis*; Body color; Tyrosinase gene (*TYR*); Dopa isomerase gene (*DCT*)

① Corresponding author: CHEN Songlin, E-mail: chensl@ysfri.ac.cn