

doi: 10.7541/2022.2020.304

西里伯斯青鳉 *tyr* 和 *slc24a5* 的克隆及表达分析

马元^{1,2} 仲颖^{1,2} 郭婧^{1,2} 李名友^{1,2}

(1. 上海海洋大学国家海洋生物科学国际联合研究中心, 上海 201306; 2. 上海海洋大学水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306)

摘要: 为了探究黑色素合成相关基因酪氨酸酶(Tyrosinase, *tyr*)和溶质载体24家族成员5(Solute carrier family 24, member 5, *slc24a5*)在西里伯斯青鳉(*Oryzias celebensis*)中的表达特征, 研究采用RACEs(Rapid Amplification of cDNA Ends)技术从西里伯斯青鳉精巢中克隆了*tyr*(*Octyr*)和*slc24a5*(*Ocslc24a5*)的全长cDNA(Complementary DNA)。*Octyr*的cDNA全长为2249 bp, 开放阅读框长1635 bp, 编码545个氨基酸; *Ocslc24a5*的cDNA全长为2065 bp, 开放阅读框长1542 bp, 编码514个氨基酸。氨基酸多重比对和系统发育树分析发现, *Octyr*和*Ocslc24a5*氨基酸序列非常保守, 均与日本青鳉同源性较高。通过PCR克隆了*Octyr*和*Ocslc24a5*的基因组DNA序列, 结果发现, *Octyr*开放阅读框跨越5个外显子, *Ocslc24a5*开放阅读框跨越8个外显子。荧光定量PCR(qRT-PCR)分析了*Octyr*和*Ocslc24a5*在不同组织和不同胚胎发育时期的相对表达水平, 结果显示, *Octyr*和*Ocslc24a5*在脑、眼、肝、肾、肠、皮肤、卵巢和精巢中均有表达, 且均在精巢中表达量最高, 其次是眼和脑; *Octyr*和*Ocslc24a5*在胚胎发育不同时期均有表达, 在胚胎发育到第7天时表达水平达到最高。利用0.25 mmol/L苯基硫脲(PTU)抑制胚胎黑色素沉积后进行整体原位杂交(WISH)发现, *Octyr*和*Ocslc24a5*的表达模式相似, 在囊胚期, *Octyr*和*Ocslc24a5*在所有胚胎细胞中均有表达; 在神经胚期, *Octyr*和*Ocslc24a5*主要在背部和卵黄膜中表达; 在体节期, *Octyr*和*Ocslc24a5*在眼睛、脑和背侧皮肤中表达。以上研究结果说明*Octyr*和*Ocslc24a5*可能参与西里伯斯青鳉黑色素的合成, 研究为深入了解西里伯斯青鳉黑色素形成的分子机制奠定基础。

关键词: *tyr*; *slc24a5*; 黑色素; 基因表达; 西里伯斯青鳉

中图分类号: Q344+1

文献标识码: A

文章编号: 1000-3207(2022)03-0282-10



体表的颜色是脊椎动物的重要表型, 具有物种识别、社会交流、光保护、择偶和对捕食者的警告和威胁等作用^[1,2]。体色的形成和维持需要一系列细胞因子、基因和生理因子的调控^[3]。黑色素作为一种生物色素, 在体色形成中发挥重要作用。黑色素由黑色素细胞合成, 黑色素合成途径非常保守且黑色素生物合成的分子机制已被广泛研究^[4]。体色基因在线网站中(www.espcr.org/micemut/)共记录了378个体色相关候选基因, 其中171个基因已经被克隆。酪氨酸酶(*tyr*)^[5]、酪氨酸相关蛋白-1(*tyrp-1*)^[6]、溶质载体24家族成员5(*slc24a5*)^[7]、溶质载体7家族成员11(*slc7a11*)^[8]、黑色素皮质激素受体1(*mclr*)^[9]和刺鼠蛋白(*asip*)^[10]等体色调控相关基因可诱导不同物种色素模式的突变。

*Tyr*又称单酚加氧酶, 广泛分布于不同的生物体内, *tyr*是黑色素合成过程中关键的限速酶。*tyr*主要调节黑色素合成的前两个步骤: 前体酪氨酸在*tyr*的催化下生成3,4-二羟基苯丙氨酸(多巴, DOPA), 多巴进一步被*tyr*氧化形成多巴醌(DQ)^[11]。多巴醌经过一系列复杂的调控形成真黑色素和褐色色素, 真黑色素产生黑色和棕色表型, 褐色色素产生黄色和红色表型。研究发现, 体内*tyr*活性的缺失会导致黑色素产生减弱或消失, 最终导致脊椎动物表现出不同程度的白化表型。在黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)中, *tyr*在正常和白化黄颡鱼组织中的表达水平具有显著差异^[6]。在虹鳉(*Oncorhynchus mykiss*)中通过Morpholino抑制*tyr*的表达, 在孵化后25d和35d时视网膜和皮肤的色素沉着明

收稿日期: 2021-01-15; 修订日期: 2021-06-24

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFD0901205); 国家自然科学基金(31672700)资助 [Supported by the National Key R & D Program of China (2018YFD0901205); the National Natural Science Foundation of China (31672700)]

作者简介: 马元(1995—), 女, 硕士研究生; 主要研究方向为西里伯斯青鳉体表色素研究。E-mail: 1906969579@qq.com

通信作者: 李名友, E-mail: myli@shou.edu.cn

显减少^[12]。通过CRISPR/Cas9技术单靶点敲除日本青鳞(*Oryzias latipes*)*tyr*基因, 日本青鳞眼部色素明显缺失^[13]。值得注意的是, 当去除*tyr*启动子区域的*Tol2*转座子后, 白化病表型的日本青鳞转化为野生型着色的青鳞^[5]。此外, 有研究表明, miR-330-5p是*tyr*强有力的负调控因子, 持续过表达miR-330-5p可导致色素沉着的消失^[14]。

*Slc24a5*是溶质载体24家族的第5个成员, 是人类(*Homo sapiens*)重要的色素沉着基因, *slc24a5*在南亚人色素沉着多样性中起着非常重要的作用^[15, 16]。*Slc24a5*基因编码的蛋白为NCKX5, NCKX5被证实定位在黑色素细胞的线粒体和高尔基体反面网络结构上, 而不是黑色素细胞的细胞膜上。线粒体中NCKX5的缺失削弱了黑素体中Ca²⁺的富集, 从而影响了黑素体的成熟和黑色素的产生^[17], *slc24a5*的表达模式与黑素团标记物基因(*tyrp2*)相似, 均在视网膜色素上皮和黑素团中表达^[7]。在黑色绵羊(*Ovis aries*)的皮肤中*slc24a5*的相对表达量是白色绵羊的20.53倍^[18]。在鸡(*Gallus gallus domesticus*)中, siRNA被证明可以有效抑制*slc24a5*的表达, *slc24a5*表达的减少导致黑色素合成也相应减少^[19]。鱼类上, 在金色斑马鱼(*Danio rerio*)中首次克隆研究了*slc24a5*, 并证明了*slc24a5*在色素沉着中起重要作用, 金色斑马鱼与野生型斑马鱼相比, 黑色素沉着明显延迟和减少, 将野生型的全长*slc24a5*转录本注射到纯合金色斑马鱼胚胎中, 黑色素沉着可在一定程度上恢复^[20]。

西里伯斯青鳞(*Oryzias celebensis*)是青鳞属的一种淡水鱼, 原产于印度尼西亚苏拉威西岛, 很可能在苏拉威西岛孤立的生活了超过2900万年^[21]。西里伯斯青鳞具有生长周期短、胚胎透明、繁殖快、雌雄表型差异显著等优点。在本研究中, 我们克隆了西里伯斯青鳞黑色素合成相关基因*Octyr*和*Ocslc24a5*, 通过荧光定量PCR(qRT-PCR)检测了这两个基因在不同组织和不同胚胎发育时期的表达, 整体原位杂交(WISH)分析了这两个基因在胚胎中的时空表达。本研究从分子生物学水平为解析*tyr*和*slc24a5*在西里伯斯青鳞黑色素沉积中的作用奠定基础, 为西里伯斯青鳞体色研究提供重要资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本研究所用的野生型西里伯斯青鳞饲养在上海海洋大学青鳞鱼房的循环水养殖系统中, 温度维持在28—29℃, pH维持在6.8—7.0, 保持14h的光照和10h黑暗的光周期。成年雌性西里伯斯青鳞每天可产约30枚卵, 胚胎发育阶段根据文献所述确定^[22]。

1.2 西里伯斯青鳞*tyr*和*slc24a5* cDNA的克隆

我们利用NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)和Ensembl(<https://asia.ensembl.org/index.html>)在线网站收集并整理其他物种*tyr*和*slc24a5*基因的序列信息。通过对其他物种核酸和氨基酸序列的比对, 在保守区域设计了这两个基因的简并引物(表1)。PCR扩增得到*Octyr*和*Ocslc24a5* cDNA的部分序列, 然后根据得到的cDNA部分序列设计基因特异性引物(表1)。使用SMART[®]RACEs试剂盒(Clontech)合成5'-RACE和3'-RACE的cDNA第一条链, 用合成的第一条链为模板, 通过PCR扩增得到两端的序列。将RACEs扩增到的片段和普通PCR得到的cDNA部分片段进行组装, 然后利用NCBI提供的BLAST工具确定组装序列是否正确。在正确序列的5'和3'端设计引物, 合成全长cDNA进行PCR验证。PCR产物经1%或2%琼脂糖凝胶电泳确定大小, 利用胶回收试剂盒(TaKaRa)对正确的片段进行回收。然后将回收产物连接到pGEM-T Easy载体(Promega)中, 再转化到感受态大肠杆菌DH5α菌株中。最后将阳性菌株送往上海迈普生物有限公司进行测序。

1.3 西里伯斯青鳞*tyr*和*slc24a5*基因组DNA的克隆

采用饱和NaCl法提取基因组DNA。剪取西里伯斯青鳞尾巴置于1.5 mL EP管中, 在管中加入STE缓冲液(10 mmol/L三羟甲基氨基甲烷盐酸盐(Tris-HCl)、1 mmol/L乙二胺四乙酸(EDTA)、0.1 mmol/L氯化钠(NaCl)、pH 8.0)、10%十二烷基硫酸钠(SDS)和蛋白酶K, 56℃水浴锅中消化过夜。将饱和NaCl加入上述管中, 轻轻摇匀, 加入氯仿混匀, 离心。取上清, 并在上清中加入异丙醇沉淀基因组DNA, 用75%的酒精洗涤两次。将基因组DNA溶解于1/1000 RNase溶液中, 置于-40℃供进一步分析使用。我们通过在在线网站Ensembl搜索并整理了小鼠、人类、斑马鱼和青鳞的基因组序列, 根据已公布的其他物种基因组序列和获得的CDS(Coding sequence)序列, 设计引物扩增*tyr*和*slc24a5*基因组DNA序列(表1)。

1.4 序列分析

使用DNAMAN和Vector NTI对*tyr*和*slc24a5*的氨基酸序列进行多重比对, 利用在线网站SignalP 5.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)进行信号肽预测, 利用在线网站TMHMM2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>)对蛋白的跨膜区域进行预测, 利用ProtParam工具(<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>)进行相对分子质量、等电点PI的预测, NetNGlyc1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/Net>

NGlyc)预测N端糖基化位点。此外,利用Mega 7.0软件采用相邻接法构建系统发育树。

1.5 荧光定量PCR

利用TRIzol法提取西里伯斯青鳉不同胚胎发

育时期(2-细胞期、囊胚期、原肠胚、神经胚、3d、7d和刚孵出的小鱼)和8个成年组织(脑、眼、肠、肾、肝、皮肤、卵巢和精巢)的总RNA。用1%琼脂糖凝胶电泳和NanoDrop 2000检测提取到

表 1 *tyr* 和 *slc24a5* 基因克隆和表达所用引物序列

Tab. 1 Primers for cloning and expression analysis of *tyr* and *slc24a5*

引物名称Primer name	序列Sequence (5'—3')	用途Usage
<i>Octyr</i> -DF	TAYTGGGAYTGGMNGAYGC	中间片段克隆
<i>Octyr</i> -DR	GGRTCRTTNGCNGANCCYTG	
<i>Ocslc24a5</i> -DF	GTAGCAGNGCNAACNTTYATG	
<i>Ocslc24a5</i> -DR	CCCNACNACNGTNACCATCC	
<i>Octyr</i> -5'race-R	GACTGCGGCTCCCCATCAGTTC	
<i>Octyr</i> -5'race-NR	GCACACGTCACAACCTGAGC	RACEs
<i>Octyr</i> -5'race-R1	GGGTGTCTGCTTGGCCAAGTTCAGG	
<i>Octyr</i> -5'race-NR1	CTGCACAATTGAAGCCATAAAGTTCC	
<i>Ocslc24a5</i> -5'race-R	GGTGCTGACCCCAATGTCCCCTTTCG	
<i>Ocslc24a5</i> -5'race-NR	CGGCTGTAACAAGTTCAGGAGCCGAAC	
<i>Octyr</i> -3'race-F	GGAGATCCCCAACTGGGTTGGGTAGC	全长cDNA验证和WISH
<i>Octyr</i> -3'race-NF	GCGAATGGATCTATGTCTCGGTGCAGG	
<i>Ocslc24a5</i> -3'race-F	GCGACGGTTCTGGAAGCAATGGTTCATG	
<i>Ocslc24a5</i> -3'race-NF	GCCGTTCTTCATGTCGGCTGTSIGVTTGGATC	
<i>Octyr</i> -cDNA-F	tctagaATGTGGCTTTCAGGAGTCG(XbaI)	
<i>Octyr</i> -cDNA-R	ctcgagCATAGCAGTCTGGTAGTTTGG(XhoI)	qRT-PCR
<i>Ocslc24a5</i> -cDNA-F	tctagaGTCAGTCTGCAATCTTGAGG(XbaI)	
<i>Ocslc24a5</i> -cDNA-R	ctcgagGTCAGTGCACAATCGTATAGG(XhoI)	
<i>Octyr</i> -qPCR-F	GCAGTGGCTCAGGAGGCATAATC	
<i>Octyr</i> -qPCR-R	GCAAGGAGGTGGGAGTATTCGTATC	
<i>Ocslc24a5</i> -qPCR-F	CGGAGAGCGACCTGAAGAGAATC	内参基因
<i>Ocslc24a5</i> -qPCR-R	CCAACAACAGTGACCATCCAGACTA	
<i>β-actin</i> -F	TTCAACAGCCCTGCCATGTAC	
<i>β-actin</i> -R	CCTCCAATCCAGACAGAGTATT	
<i>β-actin</i> -qPCR-F	GTGCTGTCTTTCCCTCCATC	
<i>β-actin</i> -qPCR-R	TCTCCATGTATCCCAAGTTG	基因组克隆
<i>Octyr</i> -genome-F1	GTTGTGACGTGTGCACGGATG	
<i>Octyr</i> -genome-R1	GTATTCCTCAGCTTGGGAGCAC	
<i>Octyr</i> -genome-F2	GCTGAGGAATACAACAACAGAGGAG	
<i>Octyr</i> -genome-R2	GCACCGAGGACATAGATCCATTCA	
<i>Octyr</i> -genome-F3	CCCATATTTCTTCTCCATCATGTG	
<i>Octyr</i> -genome-R3	GTGTCATTATTGTCGCTGTTGTG	
<i>Ocslc24a5</i> -genome-F1	CGCTGAGTTTGTCTCCACTG	
<i>Ocslc24a5</i> -genome-R1	CACCTATCACTTCCAAGGACGGT	
<i>Ocslc24a5</i> -genome-F2	TCTTCACCGTGCAGGAGAG	
<i>Ocslc24a5</i> -genome-R2	AAGGCTGTAACAAGTTCAGGAG	
<i>Ocslc24a5</i> -genome-F3	TCGGCTCCTGAACCTTGTTACA	
<i>Ocslc24a5</i> -genome-R3	ATGAACCATTTGCTTCCAGAACC	
<i>Ocslc24a5</i> -genome-F4	TATACCAGACACAGTGGCAAGT	
<i>Ocslc24a5</i> -genome-R4	AAGAGGATGTAGCAGATCAGAGAA	

注: F代表正向引物, R代表反向引物

Note: F. forward primer; R. reverse primer

的总RNA的质量。每个发育阶段的胚胎各收集45颗,每15颗作为一个重复。对三雌三雄成年西里伯斯青鳞进行组织取样,每条鱼的相同组织作为一个重复。按照反转录试剂盒(TaKaRa)说明进行反转录合成cDNA。 β -actin作为内参基因,与*Octyr*、*Ocslc24a5*进行平行扩增。qRT-PCR在Bio-Rad CFX Manager荧光定量PCR仪上进行。反应体系为SYBR Premix Ex Taq(2 $\times$)10 μ L,正向和反向引物各1 μ L,cDNA 2 μ L,ddH₂O定容至20 μ L。反应程序为:95 $^{\circ}$ C 30s,95 $^{\circ}$ C 5s,56 $^{\circ}$ C 20s,72 $^{\circ}$ C 15s,共40个循环。程序结束后进行熔解曲线分析,若溶解曲线呈现单峰则定量准确,并进行分析。对每个样本进行三次扩增,并做三个样本重复。每对引物设置一个阴性对照(用ddH₂O代替模板)。所有引物均是使用Primer6.0软件设计(表1)。使用2^{- $\Delta\Delta C_t$} 方法计算基因的相对表达量,利用GraphPad 5.0软件进行作图。

1.6 整体原位杂交

利用整体原位杂交检测*Octyr*和*Ocslc24a5* mRNA在不同胚胎发育时期的时空定位^[23]。利用全长CDS引物(*Octyr*-cDNA-F & R和*Ocslc24a5*-cDNA-F & R)扩增*Octyr*和*Ocslc24a5*的CDS序列,将得到的正确片段连接到T-easy载体中,分别命名为pt*Octyr*和pt*Ocslc24a5*。使用*Xba* I 或*Xho* I 酶切质粒使质粒线性化,然后使用地高辛(DIG)标记试剂盒(Roche)将线性化的质粒反转录合成正义和反义探针。因为日本青鳞黑色素最早出现在第22阶段(8—9个体节期)的卵黄囊上^[22],所以当胚胎发育到第20阶段或更早期时我们使用0.25 mmol/L苯基硫脲(PTU)处理胚胎以抑制胚胎中黑色素沉积。整体原位杂交具体步骤如文献[24]所述。每隔1—1.5h在显微镜下观察胚胎颜色,倒置体视镜(Nikon, SMZ25)进行拍照。

2 结果

2.1 *Octyr*和*Ocslc24a5*的克隆和序列分析

*Octyr*全长cDNA 2249 bp,包含126 bp 5'非编码区、488 bp 3'非编码区和1635 bp编码区,编码545个氨基酸(GenBank登录号: MW199762)。OcTyr蛋白的预测分子量为61.9 kD,等电点为6.17。用SignalP 5.0在线网站在*Octyr*的N端预测到18个氨基酸残基的信号肽。在*Octyr*氨基酸序列的C端预测到位于474—496 aa的跨膜结构域。在*Octyr*氨基酸序列中包含两个铜离子结合位点, CuA和 CuB,与其他脊椎动物相比该结构高度保守。同时,我们通过对OcTyr与其他脊椎动物的Tyr进行多重氨基酸比对,共发现14个保守的半胱氨酸残基。六个假

定N-糖基化位点也相对保守。

*Ocslc24a5*的全长cDNA序列包含160 bp 5'非编码区、363 bp 3'非编码区以及1542 bp的编码区,该编码区编码一个含有514个氨基酸残基,3'非编码区中具有典型的AATAAA聚腺苷酸化信号,提示该cDNA包含了*Ocslc24a5*的完整编码序列(GenBank登录号: MW199763)。OcSlc24a5预测分子量为56.6 kD,等电点为5.29。OcSlc24a5氨基酸序列包含12个跨膜区域,分别位于15—37、79—98、122—144、151—173、183—202、207—226、319—336、349—371、381—403、416—438、451—473和180—502 aa。

2.2 OcTyr和OcSlc24a5氨基酸序列比对及系统进化树分析

将OcTyr氨基酸序列与日本青鳞(*O. latipes*)、斑马拟丽鱼(*Maylandia zebra*)、罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)、鲤(*Cyprinus carpio*)、斑马鱼(*D. rerio*)、小鼠(*Mus musculus*)、人类(*H. sapiens*)的Tyr氨基酸序列进行比对。结果显示,在比对的这8个物种中, OcTyr与日本青鳞的同源性最高为93.7%。与斑马拟丽鱼和罗非鱼的同源性次之,均为79.7%,与鲤的同源性为63.7%,与斑马鱼的同源性为61.7%。与小鼠和人类的同源性依次为57.5%和56.2%。将OcSlc24a5氨基酸序列和其他脊椎动物的Slc24a5氨基酸序列进行比对, OcSlc24a5与鱼类中的日本青鳞(*O. latipes*)、罗非鱼(*O. niloticus*)、眼斑双锯鱼(*Amphiprion ocellaris*)和贝氏隆头鱼(*Labrus bergylta*)、斑马鱼(*D. rerio*)有着较高同源性,分别为97.2%、91.1%、90.8%、85.8%和82.8%,与小鼠(*M. musculus*)和人类(*H. sapien*)的同源性较低均为69.5%。

系统发育树显示, OcTyr和日本青鳞(*O. latipes*) Tyr聚成一个小分支,与其他鱼类聚成一个大分支,这与预期的一致(图1)。此外,两栖类、鸟类和哺乳动物的Tyr聚在另一个大分支。同时,根据构建的系统发育树,我们发现OcSlc24a5与罗非鱼(*O. niloticus*)、眼斑双锯鱼(*A. ocellaris*)、玻璃鱼(*Parambassis ranga*)和日本青鳞(*O. latipes*)亲缘关系较为亲近,聚在一个小分支上,与贝氏隆头鱼(*L. bergylta*)、齿鲱(*Denticeps clupeodites*)和斑马鱼(*D. rerio*)聚为一个大分支。最后两栖类、鸟类和哺乳动物的Slc24a5聚在另一个大分支(图1)。这些结果表明, OcTyr和OcSlc24a5的氨基酸序列在进化上是保守的。

2.3 *Octyr*和*Ocslc24a5*基因组DNA序列结构分析

通过PCR克隆并拼接得到*Octyr*和*Ocslc24a5*的基因组DNA序列。拼接得到6.3 kb的*Octyr*基因组

序列(GenBank登录号: MW240440), 开放阅读框跨越5个外显子, 与斑马鱼、人和小鼠的外显子数量相同。斑马鱼、人类和小鼠的*tyr*基因组长度是*Oc-*

*tyr*基因组长度的3.2—18.9倍(图2)。*Ocslc24a5*的基因组长度为6.08 kb(GenBank登录号: MW200252)。值得注意的是, 通过比较研究斑马鱼、人类和小鼠

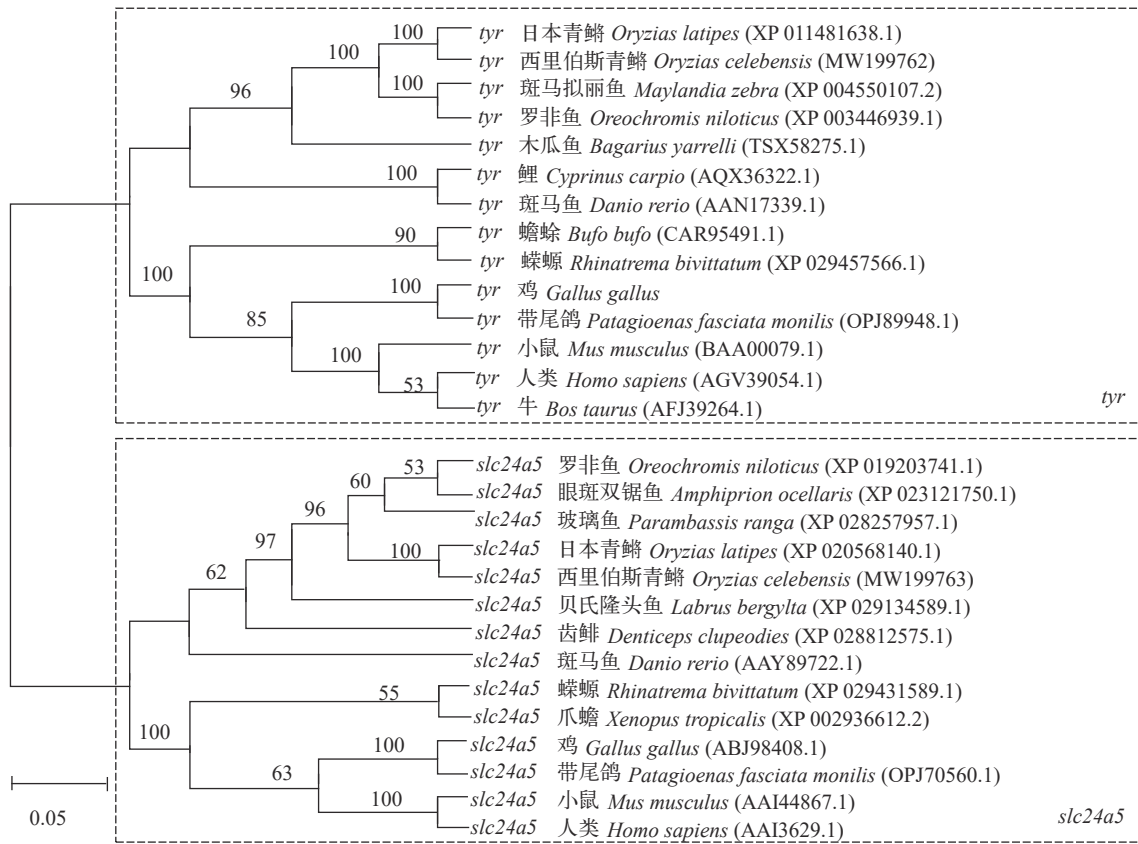


图1 Tyr和Slc24a5氨基酸序列系统进化树

Fig. 1 Phylogenetic tree of Tyr and Slc24a5 amino acid sequences

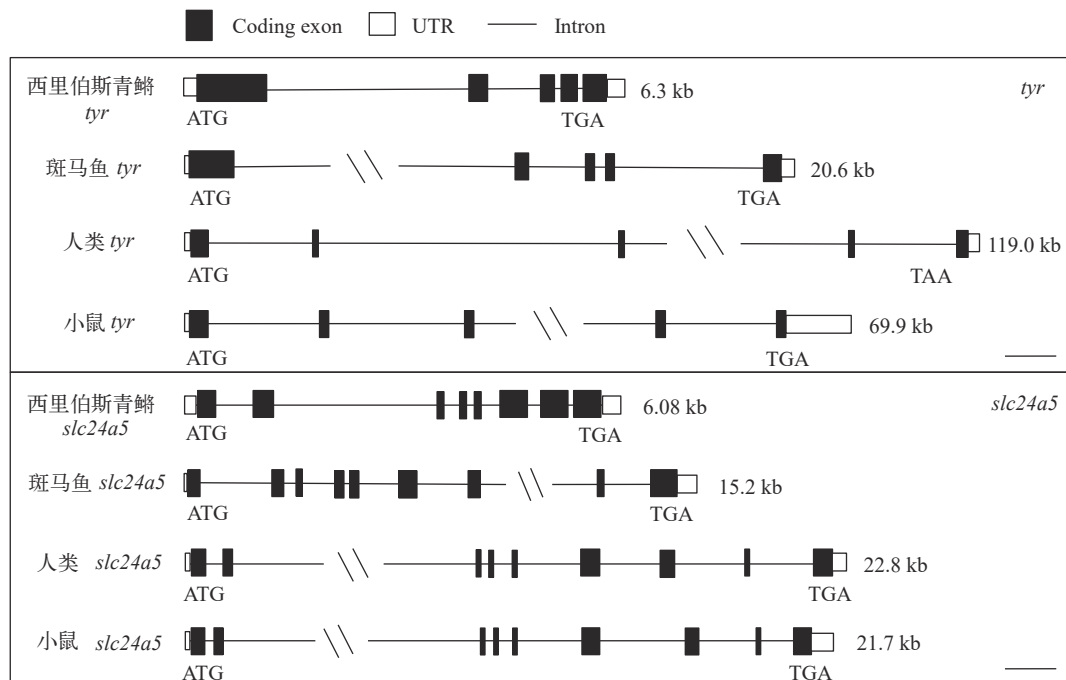


图2 *Octyr*和*Ocslc24a5*基因组结构分析

Fig. 2 Genomic organization of *Octyr* and *Ocslc24a5*

的基因组DNA结构, 我们发现*Ocslc24a5*的基因组有8个外显子和7个内含子, 而斑马鱼、人类和小鼠有9个外显子和8个内含子。斑马鱼、小鼠和人类的基因组长度分别是西里伯斯青鳞*slc24a5*基因的2.5倍、3.5倍和3.7倍(图2)。

2.4 *Octyr*和*Ocslc24a5*在成体组织和不同胚胎发育时期均有分布

采用qRT-PCR检测了*Octyr*和*Ocslc24a5*在不同组织中的相对表达水平。结果显示, *Octyr*和*Ocslc24a5*在脑、眼、肾、肝、肠、皮肤、卵巢和精巢等组织中均有表达(图3A和图3B)。在检测的8个组织中, *Octyr*在精巢中表达量最高, 其次是眼睛、脑和皮肤, 在肠中表达量最低, *Octyr*在精巢中表达量是眼睛的6倍, 大脑的17倍; *Ocslc24a5*在精巢、脑和眼睛高表达, 其中在精巢中表达量最高, 且卵巢中的表达量大于皮肤中的表达量, 精巢中的*Ocslc24a5*表达量大约是眼睛的2倍, 脑的8倍, 肠的1300倍。

同样, 采用qRT-PCR检测了*Octyr*和*Ocslc24a5*在西里伯斯青鳞不同胚胎发育时期(2-细胞期、囊胚期、原肠胚、神经胚、3d、7d和刚孵出的小鱼)的相对表达水平。孵化前, *Octyr*和*Ocslc24a5*的

表达均随着胚胎的发育逐渐增加; 孵化后, 基因表达水平均降低。*Octyr*在神经胚表达水平最低, *Ocslc24a5*在囊胚期表达水平最低。当胚胎发育到第7天时, 两个基因的表达均达到最高(图3C和图3D)。

2.5 *Octyr*和*Ocslc24a5*在胚胎中的时空表达

为了研究*Octyr*和*Ocslc24a5*在胚胎发育过程中的时空表达, 我们进行了整体原位杂交实验。结果显示, *Octyr*和*Ocslc24a5*的时空表达模式非常相似。在囊胚期的所有细胞中均检测到了*Octyr*和*Ocslc24a5*信号(图4A和图5A)。在神经胚和6体节期, 我们发现*Octyr*和*Ocslc24a5*在背部和卵黄膜上表达(图4B和4C和图5B和5C)。在24体节期和体节完成期, 这2个基因的信号在眼睛、中脑、间脑、后脑和侧背皮肤中都被检测到(图4D和4E、图5D和5E)。*Octyr*和*Ocslc24a5*的表达域逐渐从背部向全身扩散, 且表达水平随着发育而升高。在体节完成期使用正义探针作为阴性对照, 结果显示, 正义探针未检测到信号(图4F和图5F)。

3 讨论

3.1 *Octyr*和*Ocslc24a5*生物信息学分析

黑色素在动物体内分布广泛, 是体色形成和维持的重要因素之一。许多研究表明, *tyr*和*slc24a5*在脊椎动物黑色素的合成中起着至关重要的作用。*Octyr*的序列长度、蛋白分子量、等电点等与其他脊椎动物, 如小鼠^[25]、人^[26]和鸡^[27]相近。此外, 我们预测到*Octyr*有7个保守功能结构域, 这与其他脊椎动物的*tyr*蛋白功能结构域一致^[6, 28]。例如, 两个铜离子结合区域、位于N端的信号肽和五个糖基化位点等。有研究表明, 少于两个N-糖基化位点的*tyr*突变体不与钙蛋白相互作用, *tyr*酶活性完全消失^[29]。位于N端的信号肽由18个氨基酸组成, 负责将新合成的肽链运输到内质网进行加工。经过糖基化和内质网处理, 序列最终被运输到黑色素小体^[30]。两个保守的铜离子结合位点(CuA和CuB)含有6个保守的组氨酸残基, 它们在*tyr*的催化活性中发挥重要作用^[31]。*Ocslc24a5*编码514个氨基酸, 包含12个跨膜区域, 这些区域具有氨基酸转运的功能^[32]。此外, 多重氨基酸序列比对和系统发育树分析显示, *Octyr*和*Ocslc24a5*的氨基酸序列在进化关系上与日本青鳞最为接近。因此, 我们推测*Octyr*和*Ocslc24a5*基因的功能可能与日本青鳞相似。*Octyr*的开放阅读框有5个外显子, 与小鼠、人类和斑马鱼的外显子相同。值得注意的是, 我们发现*Ocslc24a5*基因组有8个外显子, 而小鼠、人类和斑马鱼基因组有9个外显子。综上, *Octyr*和*Ocslc24a5*在

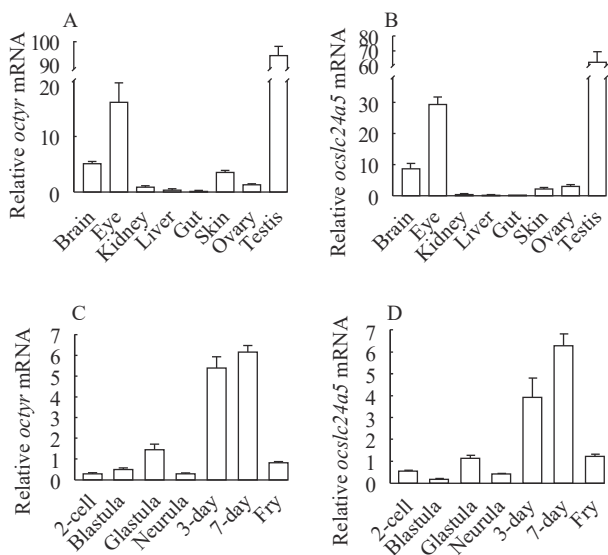


图3 *Octyr*和*Ocslc24a5*在不同组织和不同胚胎发育时期的相对表达水平

Fig. 3 The relative expression of *Octyr* and *Ocslc24a5* in different tissues and different embryo stages

A—B. 西里伯斯青鳞不同组织中*Ocslc24a5*和*Octyr*的相对表达水平; C—D. 西里伯斯青鳞不同胚胎发育时期*Octyr*和*Ocslc24a5*的相对表达水平

A—B. Real-time fluorescent quantitative PCR analysis of *Octyr* and *Ocslc24a5* in different tissues of *O. celebensis*. C—D. Real-time fluorescent quantitative PCR analysis of *Octyr* and *Ocslc24a5* in different embryo stages of *O. celebensis*

进化上是保守的。

3.2 *Octyr*和*Ocslc24a5*的组织 and 不同胚胎发育时期表达分析

*tyr*和*slc24a5*在成体组织和胚胎中的分布已在不同物种中得到广泛研究^[33, 34]。在本研究中, *Oc-tyr*在检测的所有成体组织中均有表达, 其中精巢中表达水平最高。然而, 在一些脊椎动物中, *tyr*基因在某些成体组织中不表达, 如文昌鱼的精巢和肠道^[35], 及泥鳅的腹肌和心脏^[36]中均未检测到*tyr*。在哺乳动物中, 不同毛色的山羊*tyr*表达水平不同, 深灰色山羊*tyr*的相对表达量是浅灰色个体的19.29倍^[37]。类似的, *Ocslc24a5*在所有检测的成体组织中均有表达, 在眼睛、大脑和精巢中高表达, 与鸡^[33]和斑马鱼^[38]相似。此外, *Oc-tyr*和*Ocslc24a5*基因在西里伯斯青鳉的肾和肝中表达, 肾和肝是鱼的重要免疫器官, 有研究表明*tyr*在体液免疫应答中起作用^[39], 因此, 我们推测*Oc-tyr*和*Ocslc24a5*在西里伯斯青鳉免疫反应过程中可能发挥作用。在胚胎发育过程

中, *Oc-tyr*和*Ocslc24a5*的转录本在2-细胞期就被检测到, 表明它们是母性遗传的。西里伯斯青鳉通常在胚胎发育到第9天时孵化, 在7个被测试的胚胎发育时期中, *Oc-tyr*和*Ocslc24a5*的相对表达水平均在胚胎发育到第7天时最高, 在这个孵化的关键时期, 幼鱼容易受到外界病原体的影响, 因此*Oc-tyr*和*Ocslc24a5*的高表达可能与提高孵化期免疫力相关。在孵化成小鱼后, *Oc-tyr*和*Ocslc24a5*的相对表达水平明显降低。这种现象与黄颡鱼^[6]、爪蟾^[7]和山羊^[37]相似, *tyr*和*slc24a5*的表达水平在孵化前的几个阶段相对较高。这些结果表明了*Oc-tyr*和*Ocslc24a5*与西里伯斯青鳉体色形成密切相关。

3.3 *Oc-tyr*和*Ocslc24a5*在胚胎中的时空表达分析

在斑马鱼*tyr*的研究中, *tyr*首先在视网膜色素上皮的背侧端发现转录, 随后在中脑、间脑、后脑和背侧转录本中被观察到^[40]。在文昌鱼的研究中, *tyr*分布在文昌鱼发育的各个时期^[35]。西里伯斯青鳉*Oc-tyr*同样分布在胚胎发育的各个时期, *Oc-tyr*首

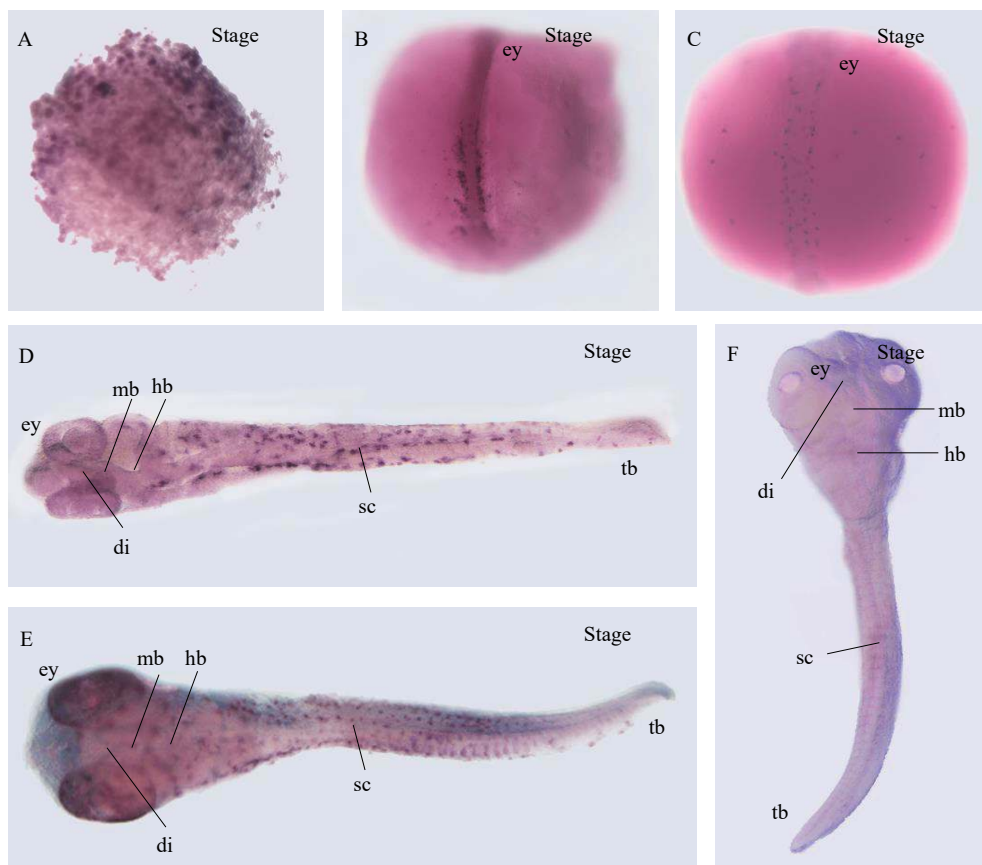


图4 *Oc-tyr*在胚胎中的时空表达

Fig. 4 Spatial and temporal expression of *Octyr* during embryogenesis

A. 11期, 囊胚晚期; B. 17期, 神经胚早期; C. 21期, 6体节期; D. 27期, 24体节期; E. 32期, 体节完成期; F. 32期, 阴性对照; ey. 眼睛; di. 间脑; mb. 中脑; hb. 后脑; sc. 脊髓; tb. 尾芽

A. Stage 11, late blastula stage; B. Stage 17, early neurula stage; C. Stage 21, 6 somite stage; D. Stage 27, 24 somite stage; E. Stage 32, somite completion stage; F. Stage 32, negative control; ey. eye; di. diencephalon; mb. midbrain; hb. hindbrain; sc. spinal cord; tb. tail bud

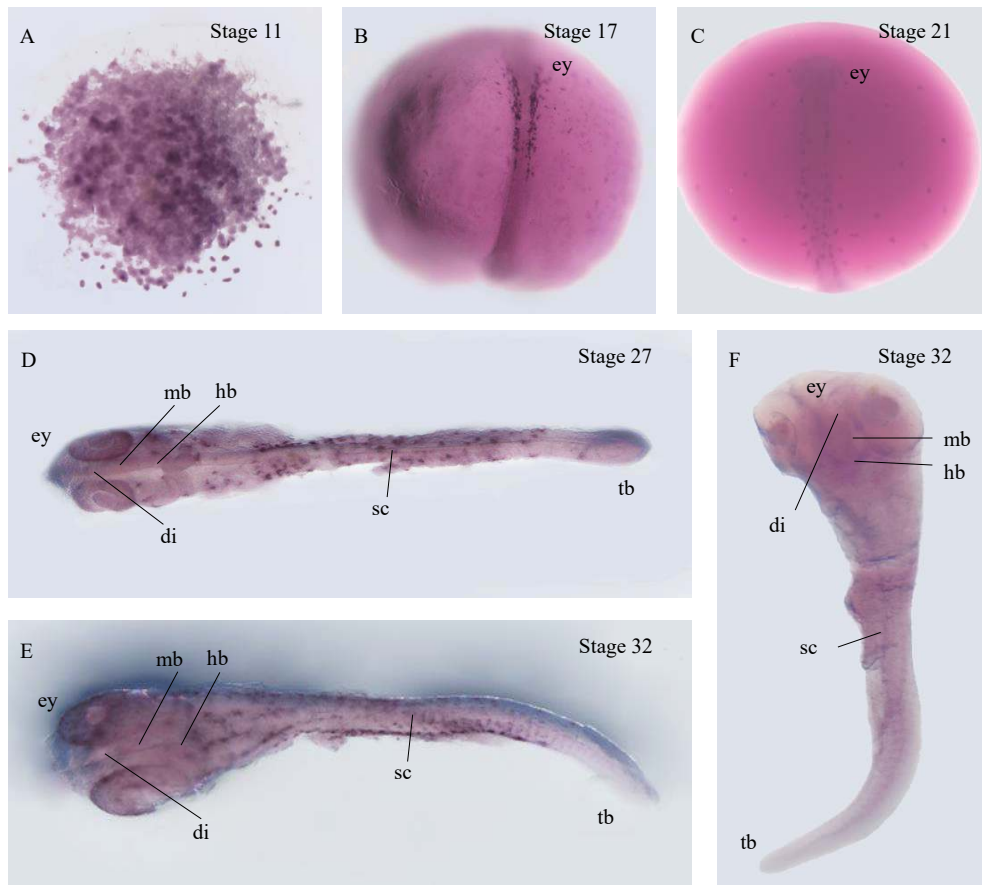


图 5 *Ocslc24a5*在胚胎中的时空表达

Fig. 5 Spatial and temporal expression of *Ocslc24a5* during embryogenesis

A. 11期, 囊胚晚期; B. 17期, 神经胚早期; C. 21期, 6体节期; D. 27期, 24体节期; E. 32期, 体节完成期; F. 32期, 阴性对照; ey. 眼睛; di. 间脑; mb. 中脑; hb. 后脑; sc. 脊髓; tb. 尾芽

A. Stage 11, late blastula stage; B. Stage 17, early neurula stage; C. Stage 21, 6 somite stage; D. Stage 27, 24 somite stage; E. Stage 32, somite completion stage; F. Stage 32, negative control; ey. eye; di. diencephalon; mb. midbrain; hb. hindbrain; sc. spinal cord; tb. tail bud

先在背部被检测到, 随着胚胎发育, *Octyr*在眼睛、皮肤和脑等部位表达, 且表达逐渐增加。在爪蟾中, 2-细胞期注射Morpholino导致爪蟾眼睛和表皮的黑素沉着减少, 在2-细胞期注射人类*slc24a5*能够挽救Morpholino带来的黑素沉着减少^[7]。*slc24a5*的表达模式与*tyrp-2*的表达模式相似, *tyrp-2*是一种已知的黑素团标记基因, 在斑马鱼胚胎中, 在黑素团和视网膜色素上皮细胞中均检测到*slc24a5*和*tyrp-2*^[38], 充分说明*slc24a5*的表达确实存在于黑素团中。这种表达模式与斑马鱼胚胎中所见的表达模式一致。*Ocslc24a5*的转录在中脑、间脑、后脑、背侧和眼睛中均被检测到。随着胚胎的发育, 在胚胎中检测到更多的*Ocslc24a5*信号。这表明西里伯斯青鳞的体色在胚胎期可能已经形成, *Octyr*和*Ocslc24a5*不仅与有西里伯斯青鳞体色形成相关, 也可能在西里伯斯青鳞的胚胎发育过程中发挥作用。

综上, 本研究克隆了西里伯斯青鳞*Octyr*和*Ocslc24a5*的全长cDNA, 并进行了生物学分析, 阐明了

*Octyr*和*Ocslc24a5*在西里伯斯青鳞胚胎中的时空表达模式。后续将采用分子生物学技术, 如CRISPR/Cas9或者Morpholino注射, 敲除或敲降*Octyr*和*Ocslc24a5*的表达, 以进一步了解这两个基因在西里伯斯青鳞黑素合成中的调控作用。我们的研究为阐明青鳞属的黑素合成奠定了基础, *Octyr*和*Ocslc24a5*在西里伯斯青鳞黑素合成中的作用、表达及调控机制有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Hubbard J K, Uy J A C, Hauber M E, *et al.* Vertebrate pigmentation: from underlying genes to adaptive function [J]. *Trends in Genetics*, 2010, **26**(5): 231-239.
- [2] Protas M E, Patel N H. Evolution of coloration patterns [J]. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2008, **24**(1): 425-446.
- [3] Inaba M, Yamanaka H, Kondo S. Pigment pattern formation by contact-dependent depolarization [J]. *Science (New York, N. Y.)*, 2012, **335**(6069): 677.
- [4] Logan D W, Burn S F, Jackson I J. Regulation of pig-

- mentation in zebrafish melanophores [J]. *Pigment Cell Research*, 2006, **19**(3): 206-213.
- [5] Iida A, Takamatsu N, Hori H, *et al.* Reversion mutation of ib oculocutaneous albinism to wild-type pigmentation in medaka fish [J]. *Pigment Cell Research*, 2005, **18**(5): 382-384.
 - [6] Zhang X T, Wei K J, Chen Y Y, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of *tyr* and *tyrp1* genes in normal and albino yellow catfish *Tachysurus fulvidraco* [J]. *Journal of Fish Biology*, 2018, **92**(4): 979-998.
 - [7] Williams R M, Winkfein R J, Ginger R S, *et al.* A functional approach to understanding the role of NCKX5 in *Xenopus* pigmentation [J]. *PLoS One*, 2017, **12**(7): e0180465.
 - [8] Wang L M, Bu H Y, Song F B, *et al.* Characterization and functional analysis of *slc7a11* gene, involved in skin color differentiation in the red tilapia [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology*, 2019(236): 110529.
 - [9] Jia Q, Cao C, Tang H, *et al.* A 2-bp insertion (c. 67_68insCC) in *MC1R* causes recessive white coat color in Bama miniature pigs [J]. *Journal of Genetics and Genomics*, 2017, **44**(4): 215-217.
 - [10] Rieder S, Taourit S, Mariat D, *et al.* Mutations in the agouti (*ASIP*), the extension (*MC1R*), and the brown (*TYRP1*) loci and their association to coat color phenotypes in horses (*Equus caballus*) [J]. *Mammalian Genome: Official Journal of the International Mammalian Genome Society*, 2001, **12**(6): 450-455.
 - [11] Hearing V J, Jiménez M. Mammalian tyrosinase-the critical regulatory control point in melanocyte pigmentation [J]. *The International Journal of Biochemistry*, 1987, **19**(12): 1141-1147.
 - [12] Boonantananasarn S, Yoshizaki G, Iwai K, *et al.* Molecular cloning, gene expression in albino mutants and gene knockdown studies of tyrosinase mRNA in rainbow trout [J]. *Pigment Cell Research*, 2004, **17**(4): 413-421.
 - [13] Fang J, Chen T, Pan Q, *et al.* Generation of albino medaka (*Oryzias latipes*) by CRISPR/Cas9 [J]. *Journal of Experimental Zoology, Part B, Molecular and Developmental Evolution*, 2018, **330**(4): 242-246.
 - [14] Rambow F, Bechadargue A, Saintigny G, *et al.* miR-330-5p targets tyrosinase and induces depigmentation [J]. *The Journal of Investigative Dermatology*, 2014, **134**(11): 2846-2849.
 - [15] Quillen E E, Shriver M D. SLC24A5: exchanging genetic and biochemical knowledge [J]. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 2008, **21**(3): 344-345.
 - [16] Basu Mallick C, Iliescu F M, Möls M, *et al.* The light skin allele of SLC24A5 in South Asians and Europeans shares identity by descent [J]. *PLoS Genetics*, 2013, **9**(11): e1003912.
 - [17] Zhang Z, Gong J, Sviderskaya E V, *et al.* Mitochondrial NCKX5 regulates melanosomal biogenesis and pigment production [J]. *Journal of Cell Science*, 2019, **132**(14): jcs232009.
 - [18] Tian X, Meng X L, Li X J, *et al.* Expression and tissue distribution analysis of *slc24a5* gene in sheep skins with different coat colors [J]. *Journal of Henan Normal University* (Natural Science Edition), 2015, **43**(4): 125-129.
 - [19] [田雪, 孟晓林, 李学军, 等. *Slc24a5*在不同毛色绵羊皮肤中的表达和定位研究 [J]. 河南师范大学学报(自然科学版), 2015, **43**(4): 125-129.]
 - [20] Liu X F, Luo J, Hu X X, *et al.* Repression of *Slc24a5* can reduce pigmentation in chicken [J]. *Frontiers in Bioscience (Elite Edition)*, 2011(3): 158-165.
 - [21] Smith D R, Spaulding D T, Glenn H M, *et al.* The relationship between Na(+)/H(+) exchanger expression and tyrosinase activity in human melanocytes [J]. *Experimental Cell Research*, 2004, **298**(2): 521-534.
 - [22] Takehana Y, Naruse K, Sakaizumi M. Molecular phylogeny of the medaka fishes genus *Oryzias* (Belontiiformes: Adrianichthyidae) based on nuclear and mitochondrial DNA sequences [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2005, **36**(2): 417-428.
 - [23] Iwamatsu T. Stages of normal development in the medaka *Oryzias latipes* [J]. *Mechanisms of Development*, 2004, **121**(7-8): 605-618.
 - [24] Zhu T, Gui L, Zhu Y, *et al.* Dnd is required for primordial germ cell specification in *Oryzias celebensis* [J]. *Gene*, 2018(679): 36-43.
 - [25] Li M, Hong N, Gui J, *et al.* Medaka *piwi* is essential for primordial germ cell migration [J]. *Current Molecular Medicine*, 2012, **12**(8): 1040-1049.
 - [26] Kwon B S, Wakulchik M, Haq A K, *et al.* Sequence analysis of mouse tyrosinase cDNA and the effect of melanotropin on its gene expression [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1988, **153**(3): 1301-1309.
 - [27] Giebel L B, Strunk K M, Spritz R A. Organization and nucleotide sequences of the human tyrosinase gene and a truncated tyrosinase-related segment [J]. *Genomics*, 1991, **9**(3): 435-445.
 - [28] Mochii M, Iio A, Yamamoto H, *et al.* Isolation and characterization of a chicken tyrosinase cDNA [J]. *Pigment Cell Research*, 1992, **5**(4): 162-167.
 - [29] Cesare P, Bonfigli A, Miranda M, *et al.* Transcriptional analysis of tyrosinase gene expression during *Bufo bufo* development [J]. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2019, **26**(1): 8-19.
 - [30] Branza-Nichita N, Negroiu G, Petrescu A J, *et al.* Mutations at critical N-glycosylation sites reduce tyrosinase activity by altering folding and quality control [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000, **275**(11): 8169-8175.
 - [31] Helenius A, Marquardt T, Braakman I. The endoplasmic reticulum as a protein-folding compartment [J]. *Trends in Cell Biology*, 1992, **2**(8): 227-231.
 - [32] Hearing V J, Tsukamoto K. Enzymatic control of pigmentation in mammals [J]. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 1991, **5**(14): 2902-2909.
 - [33] Tian X, Meng X, Wang L, *et al.* Molecular cloning, mRNA expression and tissue distribution analysis of *Slc7a11* gene in alpaca (*Lama paco*) skins associated with different coat colors [J]. *Gene*, 2015, **555**(2): 88-94.
 - [34] Luo J, Zhang W, Yu B, *et al.* cDNA Cloning, expression analysis of *Slc24a5* and its relationship with melanin de-

- position in chicken [J]. *Progress in Biochemistry & Biophysics*, 2008, **35**(1): 69-76.
- [34] Jiang Y L, Song H M, Liu Y, *et al.* Cloning and expression analysis of the developing sequence and tissue expression of TYR gene in *Amphiprophus citrinellus* [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2016, **24**(5): 697-707. [蒋燕玲, 宋红梅, 刘奕, 等. 橘色双冠丽鱼 TYR 基因的克隆及其发育时序和组织表达分析 [J]. 农业生物技术学报, 2016, **24**(5): 697-707.]
- [35] Pang Q, Liu X, Sun H, *et al.* Cloning, characterization and expression of tyrosinase-like gene in amphioxus *Branchiostoma japonicum* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, **34**(1): 356-364.
- [36] Xu X, Cao X, Gao J. Production of a mutant of large-scale loach *Paramisgurnus dabryanus* with skin pigmentation loss by genome editing with CRISPR/Cas9 system [J]. *Transgenic Research*, 2019, **28**(3-4): 341-356.
- [37] Chen W, Wang H, Dong B, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of tyrosinase gene in the skin of Jinling gray goat (*Capra hircus*) [J]. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2012, **366**(1-2): 11-20.
- [38] Lamason R L, Mohideen M A, Mest J R, *et al.* SLC24A5, a putative cation exchanger, affects pigmentation in zebrafish and humans [J]. *Science (New York, N. Y.)*, 2005, **310**(5755): 1782-1786.
- [39] Pang Q, Zhang S, Zhao B. Induction of phenoloxidas in the humoral fluids of amphioxus *Branchiostoma belcheri* by *Vibrio alginolyticus* and *Escherichia coli* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2009, **26**(4): 669-671.
- [40] Camp E, Lardelli M. Tyrosinase gene expression in zebrafish embryos [J]. *Development Genes and Evolution*, 2001, **211**(3): 150-153.

CLONING AND EXPRESSION ANALYSIS OF TYR AND $SLC24A5$ IN $ORYZIAS CELEBENSIS$

MA Yuan^{1,2}, ZHONG Ying^{1,2}, GUO Jing^{1,2} and LI Ming-You^{1,2}

(1. International Research Center for Marine Biosciences, Ministry of Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Melanin is widely distributed in animals and is one of the important factors in the formation and maintenance of body color. Many studies have shown that tyr and $slc24a5$ play crucial roles in the synthesis of melanin in vertebrates. tyr is the key rate-limiting enzyme in melanogenesis. It catalyzes and oxidizes the precursor tyrosine to form dopa-quinone, eumelanin and pheomelanin after a series of complex regulation. $slc24a5$ is the fifth member of the solute carrier 24 family, and the protein encoded by NCKX5, an important pigmentation gene in human. To explore the expression patterns of melanin-related genes tyr and $slc24a5$ in *O. celebensis*, the full-length cDNAs of *O. celebensis* tyr ($OcTyr$) and $slc24a5$ ($Ocslc24a5$) were cloned by rapid amplification of cDNA ends (RACEs). The full length of $OcTyr$ gene was 2249 bp, including a 126 bp 5' untranslated region (UTR), a 488 bp 3'UTR and a 1635 bp CDS for 545 amino acids. The full length of $Ocslc24a5$ gene was 2065 bp, including a 160 bp 5'UTR, a 363 bp 3'UTR and a 1542 bp open reading frame for 514 amino acids. Multiple alignments of amino acid and phylogenetic tree analysis revealed that the amino acid of $OcTyr$ and $Ocslc24a5$ were conserved, and they had high homologies with Japanese medaka. Genomic sequence of $OcTyr$ and $Ocslc24a5$ were obtained by PCR cloning. A total of 6.3 kb of the $OcTyr$ genome with 5 exons was cloned. The genome length of $Ocslc24a5$ was 6.08 kb. Interestingly, we found that the genome of $Ocslc24a5$ has eight exons and seven introns, while zebrafish, human and mouse have nine exons and eight introns. qRT-PCR showed that $OcTyr$ and $Ocslc24a5$ were expressed in brain, eye, liver, kidney, gut, skin, testis, and ovary, with the highest expression level in testis, followed by eye and brain. Both $OcTyr$ and $Ocslc24a5$ were abundant during embryonic development, with the highest expression level at the seventh day's embryo. In order to study the spatiotemporal expression pattern of $OcTyr$ and $Ocslc24a5$ in the development of embryos, whole mount *in situ* hybridization (WISH) assay was conducted. WISH indicated that the expression patterns of $OcTyr$ and $Ocslc24a5$ were similar. $OcTyr$ and $Ocslc24a5$ were detected in all embryonic cells at the blastula stage. $OcTyr$ and $Ocslc24a5$ were concentrated on the back and yolk membrane at the neurula. During the somitogenesis stage, $OcTyr$ and $Ocslc24a5$ were abundant in eye, brain and dorsal skin. In summary, $OcTyr$ and $Ocslc24a5$ may be involved in the synthesis of melanin in *O. celebensis*. This study provides important information for studying body color formation and lays a foundation for understanding the molecular mechanism of melanin formation in *O. celebensis*.

Key words: Tyr ; $Slc24a5$; Melanin; Gene expression; *Oryzias celebensis*