

半滑舌鳎体色白化相关突变位点的鉴定

孙建华, 鲍宝龙

Identification of mutation sites related to body color albinism in *Cynoglossus semilaevis*

SUN Jianhua, BAO Baolong

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.12024/jsou.20210403426>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

基因编辑酪氨酸酶(TYR)基因不同功能区对鱼类体色的影响

Fish coloration change from disrupting different functional regions in tyrosinase (TYR) gene by gene editing technology

上海海洋大学学报. 2020, 29(6): 811 <https://doi.org/10.12024/jsou.20191202872>

黑化牙鲆不同部位皮肤黑色素细胞和鳞片形态的比较

Comparative analysis of skin melanophore and scales in different parts of melanized Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*

上海海洋大学学报. 2019, 28(5): 708 <https://doi.org/10.12024/jsou.20190502632>

两种弧菌感染大黄鱼免疫相关基因的SNP位点分析

Analysis of SNP loci in immune-related genes of two species of *Vibrio* infecting large yellow croaker (*Larimichthys crocea*)

上海海洋大学学报. 2019, 28(5): 772 <https://doi.org/10.12024/jsou.20190402623>

瓯江彩鲤酪氨酸酶(TYR)基因的选择压力分析

Selection pressure analysis of tyrosinase (TYR) gene in Oujiang color common carp (*Cyprinus carpio* var. color)

上海海洋大学学报. 2016, 25(3): 329 <https://doi.org/10.12024/jsou.20150901537>

*somatostatin 1*基因突变斑马鱼仔鱼转录组分析

Transcriptome sequencing analysis of *somatostatin 1* gene mutation in zebrafish larvae

上海海洋大学学报. 2021, 30(5): 777 <https://doi.org/10.12024/jsou.20200403009>

文章编号: 1674-5566(2022)04-0849-09

DOI:10.12024/jsou.20210403426

半滑舌鳎体色白化相关突变位点的鉴定

孙建华^{1,2}, 鲍宝龙^{1,2}

(1.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; 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:对体色相关通路基因的 9 个错义突变位点进行测序调查,在体色黑化、体色白化和体色正常的半滑舌鳎小样本群体中发现 3 个突变位点与体色白化存在显著性相关,进一步通过扩大样本验证,显示 B 型内皮素受体第 160 位的 C/T 位点(*ertB*-160-C/T)与体色白化呈极显著性相关,酪氨酸酶第 473 的 G/A 位点(*tyr*-473-G/A)和花生四烯酸 5-脂氧合酶的第 1 178 位的 C/T 位点(*alox5*-1178-C/T)与体色白化呈显著性相关。这 3 个突变位点分别位于蛋白 Periplasmic_Binding_Protein_type1、Tyrosinase C-terminal 和 Lipoxygenase 结构域。qRT-PCR 检测表明:*ertB* 在白化半滑舌鳎中有眼侧正常和白化皮肤表达没有显著差异,而在无眼侧皮肤的表达显著高于有眼侧皮肤;在白化半滑舌鳎中 *tyr* 在有眼侧正常和白化皮肤的表达水平均显著高于无眼侧;白化半滑舌鳎中无眼侧 *alox5* 的表达水平均显著高于有眼侧,有眼侧白化区 *alox5* 的表达水平明显高于有眼侧正常皮肤。这些与半滑舌鳎养殖群体体色白化相关的突变位点可为今后半滑舌鳎的体色选育提供分子基础。

关键词:半滑舌鳎;体色异常;白化;突变位点

中图分类号:S 917 **文献标志码:**A

半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)是我国重要的海水养殖对象,在人工养殖半滑舌鳎群体中,经常出现体色异常现象,有眼侧部分皮肤缺乏色素细胞(白化)或无眼侧部分皮肤色素沉着过多(黑化)^[1-3]。体色白化或黑化虽然对鱼体没有病理影响,但体色异常被认为是一种劣质产品,大大降低了半滑舌鳎的市场价值。已有众多报道,半滑舌鳎等鲆鲽鱼类体色异常与环境及营养因素有关,但关于导致体色异常产生的分子遗传的研究还很少,目前尚无法从遗传选育角度降低体色异常的比例。

鲆鲽鱼类的体色异常是由遗传以及环境因素引起的,目前对于鲆鲽鱼类体色异常的研究和预防主要体现在养殖环境、营养水平和内分泌因素^[4-6]等方面。影响半滑舌鳎体色异常的因素主要有营养、水温、背景色、光照强度^[7-10]等。体色异常的遗传因素尚不清楚,目前在牙鲆体色异常的遗传分析中,鉴定出 adenylate cyclase type 6-like 第 2 677 位点(AC-2677-C/A)、cyclic AMP-

dependent transcription factor ATF-4-like 第 967 和 1 118 位点(ATF4-967-G/A、ATF4-1118-C/T)、inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 2-like 第 7 032 和 554 位点(Itp2-7032-C/T、Itp2-554-T/C)与牙鲆体色异常显著性相关^[11-12],牙鲆的体色形成,与来自水面的光线照射引起有眼侧和无眼侧的 9-顺-视黄酸合成水平差异有关,9-顺-视黄酸通过视黄酸受体 RXRs 起作用,因此能与 RXR 形成异二聚体的核受体,如甲状腺激素受体 TRs、全反式视黄酸受体 RARs、PPAR γ 等,以及这些受体的配体合成等相关通路都可能影响色素细胞的形成^[13]。此外,黑色素合成相关通路的基因突变也可能导致体色异常^[14-15]。牙鲆体色异常的基因突变位点与甲状腺合成通路和黑色素合成通路有关^[11-12]。

本研究对体色相关通路基因的 9 个错义突变位点进行了测序调查,发现有 3 个错义突变位点与半滑舌鳎白化相关,可为减少体色异常的半滑舌鳎育种工作提供分子基础。

收稿日期: 2021-04-29 修回日期: 2021-06-08

基金项目: 国家自然科学基金(31872546, 31472262)

作者简介: 孙建华(1994—),女,硕士研究生,研究方向为鱼类生物学。E-mail:2035150987@qq.com

通信作者: 鲍宝龙, E-mail:blbao@shou.edu.cn

1 材料与方法

1.1 材料

半滑舌鳎正常样本 81 尾、黑化样本 80 尾和白化样本 68 尾,其中小样本测序的正常、白化和黑化个体半滑舌鳎采自黄海水产有限公司(山东海阳),大量样本测序的正常、白化和黑化个体半滑舌鳎采自乾海源水产有限公司(天津)。每尾剪取小部分尾鳍,用作 DNA 提取。其中,5 尾半滑舌鳎白化样本的皮肤用作 RNA 提取,白化舌鳎采集有眼侧的白化皮肤和正常皮肤,无眼侧采集正常皮肤。

1.2 方法

从天津乾海源水产养殖有限公司采集 3 尾无眼侧黑化的半滑舌鳎,选取黑化半滑舌鳎无眼侧黑化皮肤和无眼侧正常皮肤,Trizol 法提取 RNA,运用 Illumina/Solexa 转录组测序的方法对成年黑化半滑舌鳎的无眼侧正常和无眼侧黑化

的皮肤进行转录组高通量测序分析。通过对皮肤的转录组数据的深度分析挖掘,在 Arachidonic acid metabolism、Thyroid hormone synthesis、Phototransduction、Melanogenesis、Retinol metabolism 和 PPAR signaling pathway 等 6 个体色相关通路中,筛选出与体色相关的位于编码区且错义突变率高的 9 个 SNP 位点(表 1)。

1.3 PCR 扩增以及产物测序

将采集的半滑舌鳎样本提取 DNA,以 DNA 为模板,用作 PCR 扩增的引物见表 1,PCR 反应体系为 25 μ L:12.5 μ L 2 \times Taq Plus Master Mix、1 μ L Primer F (10 μ mol/L)、1 μ L Primer R (10 μ mol/L)、1 μ L DNA 模板,无菌水 9.5 μ L。PCR 反应程序:95 $^{\circ}$ C 5 min,94 $^{\circ}$ C 30 s,64 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,40 个循环后,再 72 $^{\circ}$ C 10 min。经琼脂糖凝胶检测、目的条带清晰无杂带的 PCR 产物送上海生工公司进行测序。

表 1 SNP 位点信息和引物序列

Tab.1 SNP information and primer sequence

基因名称 Gene Name	SNP 位点 SNP position	密码子 Codon	上/下游引物 Forward / Reverse primer	Tm/ $^{\circ}$ C	片段大小 Size/bp	用途 Purpose
<i>tyrosinase-like (tyr-like)</i>	1 482 bp	AUG→AUA	AATCATTGCTGCTGCTGCTCTCA/ CGTCTCTGGGTTTATTGCTGGGAAT	59.6	119	PCR 引物 PCR primers
	1 490 bp	ACU→AAU		59.8		
<i>fzd4 frizzled class receptor 4 (fzd4) 5, 6-dihydroxyindole-2- carboxylic acid oxidase-like (5,6-dihyd) alox5 arachidonate 5- lipxygenase (alox5)</i>	569 bp	GGA→GAA	ACCACCTTCAGCCGCTCATA/ GACCACTGTCATAGCCGCACTG	60.0	391	PCR 引物 PCR primers
	814 bp	AGC→AAC	CCATTGGAGGCAGCGATTGTGA/ CACCGTGTGCTACTGCTGTAA	59.6	480	PCR 引物 PCR primers
	1 178 bp	CCU→UCU	GACTTCCATTAGCACCAGACTATCACA/ CACCGTGTGCTACTGCTGTAA	59.6	426	PCR 引物 PCR primers
	1 325 bp	UCC→GCC	GGTGTTCGCCATCGCCATCAA/ AGCCATCGTCTCTGTAGAAGAAGGT	59.1	296	PCR 引物 PCR primers
<i>putative all-trans-retinol13,14- reductase (putative-13-14)</i>	1 834 bp	GCC→GUG	TGGTGATGGTGGAGCCTGCTA/ GGAGGTCGATGTAGAGGATCTGGTT	59.2	255	PCR 引物 PCR primers
<i>tyr tyrosinase (tyr) endothelin receptor type B- like (ertB)</i>	473 bp	ACG→AGG	CTGCGGAGAGTGTAGATTGCGTTAC/ CAGGTCATAGGTTGTGATGTCAGAGA	59.7	232	PCR 引物 PCR primers
<i>tyr tyrosinase (tyr) endothelin receptor type B- like (ertB)</i>	160 bp	GUC→UUC	ACACCAACGCCTCCTTCTCACT/ AATTCGACAGATCCCGACCA	59.9	156	PCR 引物 PCR primers
			CCTGCCTGACTACGAGACTGGA/ ACTGAGGACATGGAGCCGTCA	60.0	162	RT-PCR 引物 RT-PCR primers
<i>alox5 arachidonate 5- lipxygenase (alox5) C</i>			GTGGAAGACGGTGGAGGTGACT/ GGATGCAGGAGACAGACGAGGA	60.0	129	RT-PCR 引物 RT-PCR primers
			TACGACTGGCTGCTGGCTAAGA/ ATGGCGATGGCGAACACCTC	60.0	113	RT-PCR 引物 RT-PCR primers
<i>β-actin</i>			TCACCACCACAGCCGAAAG/ ATGCCACAGGACTCCATACCAA	60.0	223	RT-PCR 引物 RT-PCR primers

1.4 基因型分析

纯合型半滑舌鳎 SNP 位点的测序峰图为单峰,杂合型半滑舌鳎 SNP 位点的测序峰图为双峰。分别统计测序结果中正常、黑化和白化半滑舌鳎的基因类型和每个基因型的数量,以及等位基因频率,最后用 SPSS 18.0 软件对正常和黑化半滑舌鳎、正常和白化半滑舌鳎、黑化和白化半滑舌鳎进行单因素方差分析,并对基因型分布进行独立性检验。 $\chi^2 > \chi_{0.05}^2 = 5.991, P < 0.05$,表明样本间具有显著性差异; $\chi^2 > \chi_{0.01}^2 = 9.21, P < 0.01$,表明样本间具有极显著差异。

1.5 蛋白质结构的生物信息学分析

从 NCBI 网站下载半滑舌鳎 *ertB*、*tyr*、*alox5* 蛋白的氨基酸序列 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)。用 SWISS-MODEL 预测蛋白的三维结构 (<https://www.swissmodel.expasy.org/>),使用包含 SNPs 的外显子区域进行建模,然后,选择得分最高的模型作为最终模型。

1.6 定量 RT-PCR

用 Trizol 法提取皮肤组织的总 RNA。用 Nanodrop 2000 测定 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 及浓度,再用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性。然后把 RNA 逆转录成 cDNA,以 cDNA 作为模板在

ABI 7500 定量 PCR 仪上进行定量 PCR。PCR 反应体系:qPCR Mix 10 μ L,上游引物(10 μ mol/L) 0.5 μ L、下游引物(10 μ mol/L) 0.5 μ L,cDNA < 100 ng,加 DEPC 水到 20 μ L。每个样品进行 3 组平行, β -actin 作为内参,引物序列见表 1。PCR 程序:95 $^{\circ}$ C 1 min,95 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,95 $^{\circ}$ C 30 s,共 40 个循环。内参基因和目的基因的相应扩增效率(E)均大于 95%。采用 7500 Software 2.3 软件进行溶解曲线分析,计算 C_t 值。相对表达量计算采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法,其数值用平均值 \pm 标准误 (Mean \pm SE) 表示, $n = 3$ 。

2 结果与分析

在各 16 尾正常、白化、黑化的半滑舌鳎样本中,对 7 个与体色形成相关通路基因的 9 个有义突变 SNP 位点进行基因型分析,发现 *arachidonate 5-lipoxygenase* 第 1 178 位的 C/T 位点(命名为 *alox5-1178-C/T*)、*endothelin receptor type B-like* 第 160 位的 C/T 位点(命名为 *ertB-160-C/T*) 和 *tyr tyrosinase* 第 473 位的 G/A 位点(命名为 *tyr-473-G/A*) 在正常、黑化和白化半滑舌鳎群体中的基因型分布具有显著性差异(表 2)。

表 2 SNP 位点小样本间的基因型分布和卡方值统计结果

Tab.2 Statistical results of genotype distribution and Chi-square value among large samples of SNP loci

SNP 位点 SNP locus	实验样本 Experimental sample	个数 Number	基因型 Genotype			基因型频率 Genotype frequency			卡方值 χ^2	
			CC	CT	TT	CC	CT	TT	正常舌鳎 Normal tongue sole	白化舌鳎 Normal tongue sole
<i>ertB-160-C/T</i>	正常舌鳎 Normal tongue sole	16	8	5	3	0.500 0	0.312 5	0.187 5	-	6.02 *
	黑化舌鳎 hypermelanosis tongue sole	16	5	6	5	0.312 5	0.375 0	0.312 5	1.280	4.01
	白化舌鳎 Albino tongue sole	16	2	11	2	0.133 3	0.733 3	0.133 3		
<i>tyr-473-G/A</i>	正常舌鳎 Normal tongue sole	16	GG	GA	AA	GG	GA	AA	-	7.986 *
	黑化舌鳎 hypermelanosis tongue sole	16	13	2	1	0.812 5	0.125 5	0.0625 0	1.037	9.696 **
	白化舌鳎 Albino tongue sole	16	14	2	0	0.875 0	0.125 0	0		
<i>alox5-1178-C/T</i>	正常舌鳎 Normal tongue sole	16	CC	CT	TT	CC	CT	TT	-	6.50 *
	黑化舌鳎 hypermelanosis tongue sole	16	3	7	4	0.214 3	0.500 0	0.285 7	1.480	2.56
	白化舌鳎 Albino tongue sole	16	2	6	8	0.125 0	0.375 0	0.500 0		
		16	0	5	11	0	0.312 5	0.687 5		

注: * 表示差异显著 ($P < 0.05$), ** 表示差异极显著 ($P < 0.01$)。

Notes: * shows significant difference ($P < 0.05$), ** shows extremely significant difference ($P < 0.01$).

ertB-160-C/T 位点中正常、白化、黑化半滑舌鳎的优势基因型分别为 CC (50.00%)、CT (73.33%)、CT (37.50%), 正常和白化半滑舌鳎

的显著性检验结果为 $\chi^2 = 6.02, P < 0.05$, 大于 $\chi_{0.05}^2 = 5.991$, 表明 *ertB-160-C/T* 位点与半滑舌鳎的白化性状显著相关。

tyr-473-G/A 位点中正常、白化、黑化半滑舌鳎的优势基因型分别为 GG (81.25%)、GA (60.00%)、GG (87.50%), 正常和白化半滑舌鳎的显著性检验结果为 $\chi^2 = 7.986, P < 0.05$, 表明 *tyr-473-G/A* 位点在正常和白化半滑舌鳎养殖群体间基因型分布具有显著性差异, 此位点与半滑舌鳎的白化性状显著相关。

alox5-1178-C/T 位点中正常、白化、黑化半滑舌鳎的优势基因型分别为 CT (50.00%)、TT (68.75%)、TT (50.00%), 正常和白化半滑舌鳎的显著性检验结果为 $\chi^2 = 6.5, P < 0.05$, 表明 *alox5-1178-C/T* 与半滑舌鳎的白化性状显著相关。

2.1 体色异常相关 SNP 位点的鉴定

为了进一步明确 *ertB-160-C/T* 位点、*tyr-473-G/A* 位点和 *alox5-1178-C/T* 位点与半滑舌鳎白化性状的相关性, 把正常、白化和黑化样本数扩

大到 50 尾以上, 分别对 60 尾正常的半滑舌鳎样本、54 尾黑化样本和 51 尾白化样本进行 SNP 测序分型。*ertB-160-C/T* 位点中正常、白化、黑化半滑舌鳎的优势基因型分别为 CC (58.33%)、CT 和 CC (40.74%)、CT (62.75%), 正常和白化半滑舌鳎样本间, 呈极显著性相关 (表 3), 表明 *ertB-160-C/T* 位点与半滑舌鳎发生白化有关。*tyr-473-G/A* 位点中正常、白化、黑化半滑舌鳎的优势基因型分别为 GG (74.51%)、GA (47.06%)、GG (72.55%), 正常和白化半滑舌鳎样本间呈显著性相关 (表 3), 表明 *tyr-473-G/A* 位点与半滑舌鳎发生白化有关。*alox5-1178-C/T* 位点中正常、白化、黑化半滑舌鳎的优势基因型分别为 CT (56.92%)、CT (51.92%)、CT (43.75%), 正常和白化半滑舌鳎样本间, 呈显著性相关 (表 3), 表明 *alox5-1178-C/T* 位点与半滑舌鳎发生白化相关。

表 3 SNP 位点大样本间的基因型分布和卡方值统计结果

Tab. 3 Statistical results of genotype distribution and Chi-square value among large samples of SNP loci

SNP 位点 SNP locus	实验样本 Experimental sample	个数 Number	基因型 Genotype			基因型频率 Genotype frequency			卡方值 χ^2	
			CC	CT	TT	CC	CT	TT	正常舌鳎 Normal tongue sole	白化舌鳎 Normal tongue sole
<i>ertB-160-C/T</i>	正常舌鳎 Normal tongue sole	60	35	20	5	0.583 3	0.333 3	0.083 4	-	12.29 **
	黑化舌鳎 hypermelanosis tongue sole	54	22	22	10	0.407 4	0.407 4	0.185 2	4.42	5.08
	白化舌鳎 Albino tongue sole	51	13	32	6	0.254 9	0.627 5	0.117 6		
<i>tyr-473-G/A</i>	正常舌鳎 Normal tongue sole	51	38	8	5	0.745 1	0.156 9	0.098 0	-	12.27 **
	黑化舌鳎 hypermelanosis tongue sole	51	37	11	3	0.725 5	0.215 7	0.058 8	0.99	9.14 *
	白化舌鳎 Albino tongue sole	51	22	24	5	0.431 4	0.470 6	0.098 0	-	-
<i>alox5-1178-C/T</i>	正常舌鳎 Normal tongue sole	65	6	37	22	0.092 3	0.569 2	0.338 5	-	6.39 *
	黑化舌鳎 hypermelanosis tongue sole	64	11	28	25	0.171 9	0.437 5	0.390 6	2.90	9.88 **
	白化舌鳎 Albino tongue sole	52	0	27	25	0	0.519 2	0.480 8	-	-

注: * 代表差异显著 ($P < 0.05$); ** 代表差异极显著 ($P < 0.01$)。

Notes: * shows significant difference ($P < 0.05$); ** shows extremely significant difference ($P < 0.01$).

2.2 *ertB*、*tyr* 和 *alox5* 蛋白质结构预测

ertB 基因编码区 (CDS) 为 1 239 bp, 编码 412 个氨基酸, 脯氨酸 (Pro) 在第 160 位突变为丝氨酸 (Ser)。*tyr* 基因 CDS 为 1 584 bp, 编码 527 个氨基酸, 在第 473 个氨基酸由甘氨酸 (Gly) 突变为谷氨酸 (Glu)。*alox5* 基因全长 cDNA 为 1 324 bp, 编码 440 个氨基酸; 在 1 178 个氨基酸处, 丙氨酸 (Ala) 突变为缬氨酸 (Val)。

ertB 基因特定匹配在 7tmA_ET-CR, 属于

7tm_GPCRs 超级家族, *ertB-160-C/T* 这个突变位点位于蛋白的 Periplasmic_Binding_Protein_type1 结构域, 是许多糖基溶质趋化和转运的主要受体, *ertB* 第 160 个氨基酸由 Pro 突变为 Ser, 可能会影响周质结合蛋白对糖基溶质趋化和转运。*tyr* 基因特定匹配在 Tyrosinase, 属于 Tyrosinase 超级家族。*tyr-473-G/A* 突变位点位于蛋白的 Tyrosinase C-terminal 结构域, *tyr* 第 473 个氨基酸由 Gly 突变为 Glu, 可能会影响酪氨酸酶的 C 端

结构域对酶活性的调节。*alox5* 基因特定匹配在 PLAT_LOX,属于 PLAT 超级家族,非特定匹配在 Lipoxygenase,属于 Lipoxygenase 超级家族,*alox5*-1178-C/T 突变位点位于蛋白的 Lipoxygenase 结构域,*alox5* 第 1 178 个氨基酸由 Ala 突变为 Val 时,可能会影响脂氧合酶的酶活性。

图 1 中 *ertB*-160-C 和 *ertB*-160-T 显示第 160 个氨基酸分别为 Pro 和 Ser 时,突变前后 *ertB* 蛋白质的三级结构整体折叠水平相似,但略有不同。*ertB* 蛋白质第 160 个氨基酸的突变使第 160 个氨基酸的丝氨酸和蛋白质之间形成不规则连接,*ertB*-160-T 尾部部分与蛋白质大分子相连(图 1 红色箭头)。*tyr*-473-G 和 *tyr*-473-A 显示第 473 个氨基酸由亲水性的 Gly 转变为疏水性的 Glu 时,*tyr* 蛋白质的三级结构的整体折叠水平相似,但有细微差别。*tyr*-473-G 的蛋白质一处由不规则卷曲变成 β 折叠,还有一处由 β 折叠变成不规则卷曲,而 *tyr*-473-A 的蛋白质结构变化与其相似(图 1 红色箭头)。*alox5*-1178-C 和 *alox5*-1178-T 显示第 1 178 个氨基酸分别为 Ala 和 Val 时,*alox5* 蛋白质的三级结构折叠水平相似,与突变前蛋白相比,突变后蛋白的空间结构发生了一定程度的变化 *alox5*-1178-T 从不规则卷曲变为 α 螺旋(图 1 中红色箭头)。

2.4 *ertB*、*tyr* 和 *alox5* 在正常和白化半滑舌鲷皮肤中的表达差异

qRT-PCR 检测表明:*ertB* 在白化半滑舌鲷中有眼侧正常与白化皮肤表达没有显著差异($P > 0.05$),而在无眼侧皮肤中的表达显著高于有眼侧皮肤($P < 0.01$);*tyr* 在有眼侧正常和白化皮肤的表达水平均显著高于无眼侧($P < 0.01$);白化半滑舌鲷中无眼侧 *alox5* 的表达水平均显著高于有眼侧($P < 0.05$),有眼侧白化区 *alox5* 的表达水平明显高于有眼侧正常皮肤($P < 0.01$)。如图 2。

3 讨论

通过直接测序法在正常、黑化和白化半滑舌鲷大样本群体中验证了 *ertB*-160-C/T、*tyr*-473-G/A、*alox5*-1178-C/T 基因型分布具有显著性差异;

通过 CD-search 工具预测基因的蛋白结构域发现这 3 个突变位点分别位于蛋白的 Periplasmic_Binding_Protein_type1、Tyrosinase C-terminal 和 Lipoxygenase 结构域,同时利用生物信息学预测蛋白质三维结构变化,发现突变后蛋白质结构与突变前存在差异,导致其功能可能发生变化;通过 RT-PCR 发现 B 型内皮素受体第 160 位的 C/T 位点(*ertB*-160-C/T)在正常与白化半滑舌鲷样本之间呈极显著性相关($P < 0.01$),酪氨酸酶第 473 的 G/A 位点(*tyr*-473-G/A)和花生四烯酸 5-脂氧合酶的第 1 178 位的 C/T 位点(*alox5*-1178-C/T)在正常与白化半滑舌鲷样本之间呈显著性相关($P < 0.05$)。表明这 3 个 SNP 位点与半滑舌鲷白化相关。

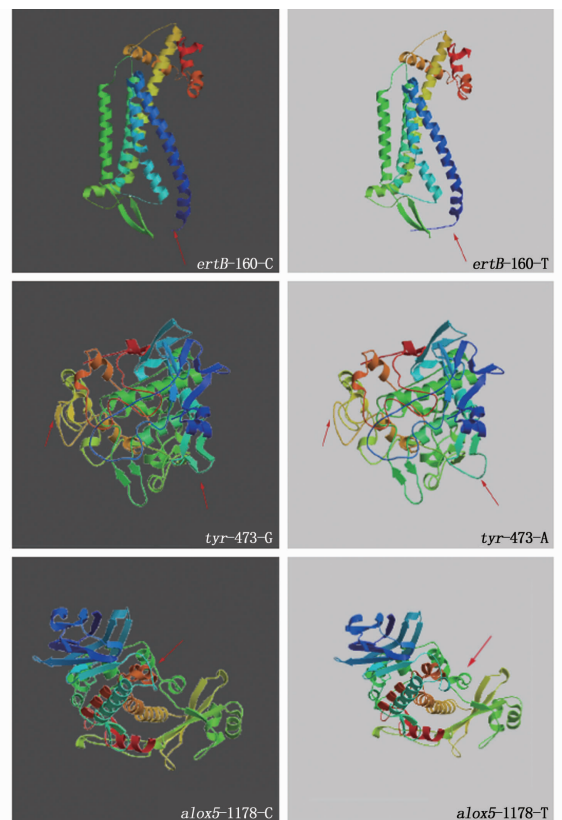
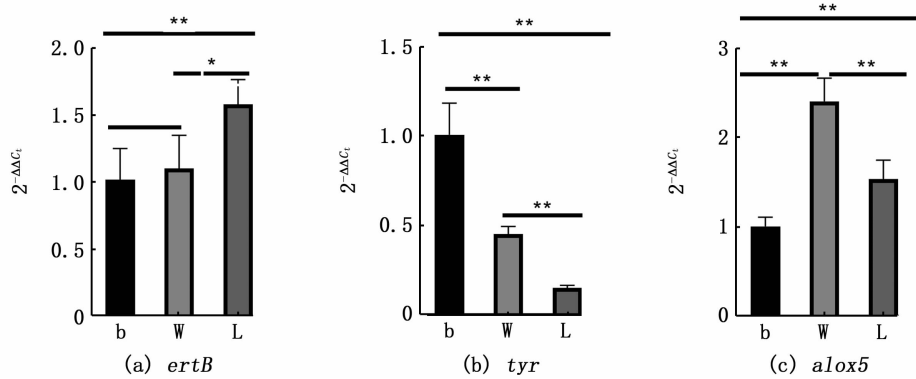


图 1 Swiss model 预测 *ertB*、*tyr* 和 *alox5* 蛋白以及含有 SNPs 的蛋白质的结构

Fig. 1 prediction of tertiary structure of *ertB*、*tyr* and *alox5* proteins and proteins containing SNPs by Swiss model



b. 有眼侧正常皮肤; W. 有眼侧白化皮肤; L. 无眼侧正常白皮肤。柱状图上方含 * 代表显著差异 ($P < 0.05$), ** 代表极显著差异 ($P < 0.01$)。

b. there was normal skin on the ocular side; W. there was albino skin on the eye side; L. normal white skin without eyes. The * above the histogram shows significant difference ($P < 0.05$), The ** shows extremely significant difference ($P < 0.01$).

图2 *ertB*、*tyr* 和 *alox5* 在白化半滑舌鲷中的定量检测结果

Fig. 2 Quantitative detection of *ertB*, *tyr* and *alox5* in pseudo-albino *Cynoglossus semilaevis*

ertB 是皮肤细胞黑色素不均匀沉积的重要靶点之一^[16]。内皮素 B 型受体 (*ertB*) 是 Edn1 的受体, *ertB* 与 Edn1 结合导致肌醇多磷酸酯水解产生肌醇三磷酸酯 (Ip3)。Ip3 可以激活体细胞中的 Ca^{2+} , 而二酰甘油可以通过活化磷脂酶 C γ 来激活 PKC, 使苏氨酸蛋白激酶 (Raf-1) 磷酸化。磷酸化的 Raf-1 会将信号传递给丝裂原活化蛋白激酶 (Mapk), 使 MEK, ERK 和 RSK 均按顺序被激活并发生磷酸化。最终磷酸化的 RSK 将信号传导至 cAMP 应答元结合蛋白 (CREB), 使其激活并发生磷酸化。磷酸化的 CREB 与 *mitf* 基因启动子结合, 调控 *mitf* 基因的转录, 并最终激活 *tyr* 基因, 合成黑色素。与此同时, 活化的 PKC 还可以基于 a-Msh 和黑皮质素受体 1 (Mc1r) 来提高 cAMP 水平。cAMP 通过信号转导激活 PKA, 而活化 PKA 也能引起 CREB 磷酸化, 磷酸化的 CREB 同样作用于 *MITF* 基因上, 导致黑色素的产生^[17]。

tyr 位于黑色素相关信号通路的下游, 在黑色素合成中起关键作用。鱼类背部体色的深浅主要与皮肤中黑色素细胞的数量有关^[18]。*tyr* 的表达水平直接影响真黑素和褪黑素的表达, 进而影响动物的体色^[19]。在模式生物斑马鱼中, 编辑破坏 *tyr* 基因的 CDS 区域对表型有显著影响, 而编辑 3'-UTR 中的非 poly-a 尾信号区域对表型没有显著影响^[20]。LIU 等^[21] 通过半滑舌鲷白化病相关连锁图谱, 鉴定并定位了 10 个具有简单序列

重复序列 (SSRs) 的白化相关基因, *tyr2* 基因就是其中之一。本研究发现与体色异常相关的 *tyr* 基因在深色皮肤和白色皮肤中有差异表达, 表达水平与色素沉着呈正相关, 与以前的研究结果一致。此外, 该 SNP 还位于 *tyr* 基因 CDS 区, 这与斑马鱼 *tyr* 基因编辑研究的结果一致^[20]。

alox5 是花生四烯酸脂氧合酶家族的成员, 也是炎症介质白三烯 (Lts) 和脂蛋白 (Lxs) 形成的初始催化酶。二十烷化合物如白三烯、前列腺素和血栓素是调节一系列重要的生理代谢途径^[22]。ALICIA 等报道, 用花生四烯酸 (ARA) 强化饲料喂养牙鲆, 由于 MSH 和 ACTH 的产生和释放速率不同, 可能导致白化的出现^[23]。KOVEN 等^[24] 发现, 在环境变化前喂食 ARA 的鲷鱼比在环境变化后喂食能更有效地抵抗环境变化的不利影响。这可能是因为幼鱼利用 ARA 合成细胞膜磷脂, 环境变化激活磷脂酶, 磷脂酶启动一系列生化反应, 产生具有高生物活性的 ARA, 调节鱼类对新环境的适应。其他研究表明, ARA 可提高鱼类对急性刺激的应激耐受性, 但不影响对慢性刺激的应激抵抗力^[24]。二十碳五烯酸 (EPA) 与花生四烯酸 (ARA) 比率小于 4 时对比目鱼大菱鲆的背部体色有不利影响^[23, 25-26]。然而, LUND 等^[27] 发现, 在欧洲比目鱼中, 饲料中 ARA 的含量与体色异常有关, 而与饲料中 ARA 和其他多不饱和脂肪酸的比例无关。

筛选到的 *ertB*、*tyr* 位于黑色素合成相关信号

通路中,这两个基因如果发生错义突变的话,可能会导致体色形成异常。*alox5* 是花生四烯酸合成通路中的关键酶,研究表明用花生四烯酸强化过的饲料喂养牙鲆会导致白化现象^[23],这与本实验中白化半滑舌鲷有眼侧白化皮肤高表达量的 *alox5* 结果一致。

综上所述,本研究首次对半滑舌鲷体色异常相关基因编码区的突变 SNPs 位点进行筛选与验证,最终得出位于 3 个基因上的 3 个 SNP 位点与半滑舌鲷假性白化病相关,为今后半滑舌鲷的体色选育提供了分子基础。

参考文献:

- [1] SUZUKI T, WASHIO Y, ARITAKI M, et al. Metamorphic *pitx2* expression in the left habenula correlated with lateralization of eye-sidedness in flounder[J]. *Development, Growth & Differentiation*, 2009, 51(9): 797-808.
- [2] 彭康康,张博,鲍宝龙,等. 黑化牙鲆不同部位皮肤黑色素细胞和鳞片形态的比较[J]. *上海海洋大学学报*, 2019, 28(5): 708-715.
PENG K K, ZHANG B, BAO B L, et al. Comparative analysis of skin melanophore and scales in different parts of melanized Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* [J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2019, 28(5): 708-715.
- [3] XING J B, KE Z H, LIU L P, et al. Eye location, cranial asymmetry, and behavior of different variants of *slatia senegalensis*[J]. *Aquaculture and Fisheries*, 2019, 5(4): 182-186.
- [4] 于朝磊, 常青, 吕云云. 甘露寡糖对半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis* Günther) 稚鱼生长、肠道发育和非特异性免疫水平的影响[J]. *渔业科学进展*, 2014, 35(6): 53-59.
YU C L, CHANG Q, LYU Y Y. Effects of Mannan oligosaccharide on the growth, intestinal development and non-specific immunity of tongue sole (*Cynoglossus semilaevis* Günther) postlarvae [J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2014, 35(6): 53-59.
- [5] 肖登元, 梁萌青, 王新星, 等. 饲料中不同水平维生素 A 对半滑舌鲷亲鱼繁殖性能及后代质量的影响[J]. *渔业科学进展*, 2014, 35(3): 50-59.
XIAO D Y, LIANG M Q, WANG X X, et al. Effects of dietary vitamin A supplementation on the reproduction and offspring quality of tongue sole *Cynoglossus semilaevis* [J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2014, 35(3): 50-59.
- [6] KANG D Y, KIM H C. Relevance of environmental factors and physiological pigment hormones to blind-side hypermelanosis in the cultured flounder, *Paralichthys olivaceus*[J]. *Aquaculture*, 2012, 356-357: 14-21.
- [7] SEIKAI T, MATSUMOTO J. Mechanism of pseudoalbinism in flatfish: an association between pigment cell and skin differentiation [J]. *Journal of the World Aquaculture Society*, 1994, 25(1): 78-85.
- [8] YOO J H, TAKEUCHI T, TAGAWA M, et al. Effect of thyroid hormones on the stage-specific pigmentation of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* [J]. *Zoological Science*, 2000, 17(8): 1101-1106.
- [9] SEIKAI T. Influences of fluorescent light irradiation, ocular side pigmentation, and source of fishes on the blind side pigmentation in the Young Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*[J]. *Aquaculture Science*, 1991, 39(2): 173-180.
- [10] MATSUD N, KASAGI S, NAKAMARU T, et al. Left-right pigmentation pattern of Japanese flounder corresponds to expression levels of melanocortin receptors (MC1R and MC5R), but not to agouti signaling protein 1 (ASIP1) expression [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2018, 262: 90-98.
- [11] PENG K K, ZHANG B, XU J, et al. Identification of SNPs related to hypermelanosis of the blind side by transcriptome profiling in the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. *Aquaculture*, 2020, 519: 734906.
- [12] ZHANG B, PENG K K, CHE J Y, et al. Single-nucleotide polymorphisms responsible for pseudo-albinism and hypermelanosis in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) and reveal two genes related to malpigmentation [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2021, 47(2): 339-350.
- [13] SHAO C W, BAO B L, XIE Z Y, et al. The genome and transcriptome of Japanese flounder provide insights into flatfish asymmetry [J]. *Nature Genetics*, 2017, 49(1): 119-124.
- [14] CONSIDINE R V, CONSIDINE E L, WILLIAMS C J, et al. Evidence against either a premature stop codon or the absence of obese gene mRNA in human obesity [J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 1995, 95(6): 2986-2988.
- [15] SONG Y N, XU Y X, DENG J C, et al. CRISPR/Cas9-mediated mutation of tyrosinase (Tyr) 3' UTR induce graying in rabbit [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 1569.
- [16] YIN L L, COELHO S G, VALENCIA J C, et al. Identification of genes expressed in hyperpigmented skin using meta-analysis of microarray data sets [J]. *Journal of Investigative Dermatology*, 2015, 135(10): 2455-2463.
- [17] IMOKAWA G, ISHIDA K. Inhibitors of intracellular signaling pathways that lead to stimulated epidermal pigmentation; perspective of anti-pigmenting agents [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2014, 15(5): 8293-8315.
- [18] 姚晓华, 王森, 鲍宝龙. 几种近海底层鱼类和中上层鱼类隐蔽伪装色的比较 [J]. *上海海洋大学学报*, 2020, 29(2): 199-208.
YAO X H, WANG S, BAO B L. Comparative analysis on the countershading between several marine pelagic fishes and demersal fishes [J]. *Journal of Shanghai Ocean University*,

- 2020, 29(2): 199-208.
- [19] ZHAO N, SU X M, LI H, et al. Schisandrin B inhibits α -melanocyte-stimulating hormone-induced melanogenesis in B16F10 cells via downregulation of MAPK and CREB signaling pathways [J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2021, 85(4): 834-841.
- [20] 许细丹, 陈红林, MANDAL B K, 等. 基因编辑酪氨酸酶 (*TYR*) 基因不同功能区对鱼类体色的影响[J]. 上海海洋大学学报, 2020, 29(6): 811-819.
- XU X D, CHEN H L, MANDAL B K, et al. Fish coloration change from disrupting different functional regions in tyrosinase (*TYR*) gene by gene editing technology [J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2020, 29(6): 811-819.
- [21] LIU Y, XU W, ZHANG B, et al. QTL detection for albinism-related loci in Chinese tongue Sole (*Cynoglossus senilavis*) [J]. *Journal of Ocean University of China*, 2018, 17(6): 1404-1410.
- [22] ZORIN B, PAL-NATH D, LUKYANOV A, et al. Arachidonic acid is important for efficient use of light by the microalga *Lobosphaera incisa* under chilling stress [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2017, 1862(9): 853-868.
- [23] ESTÉVEZ A, KANEKO T, SEIKAI T, et al. ACTH and MSH production in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) larvae fed arachidonic acid-enriched live prey [J]. *Aquaculture*, 2001, 192(2/4): 309-319.
- [24] KOVEN W, BARR Y, LUTZKY S, et al. The effect of dietary arachidonic acid (20:4n-6) on growth, survival and resistance to handling stress in gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae [J]. *Aquaculture*, 2001, 193(1/2): 107-122.
- [25] 张圆琴, 徐后国, 曹林, 等. 饲料中花生四烯酸对发育前期大菱鲆亲鱼性类固醇激素合成的影响 [J]. 水产学报, 2017, 41(4): 588-601.
- ZHANG Y Q, XU H G, CAO L, et al. Effects of dietary arachidonic acid on the sex steroid hormone synthesis in turbot broodstock before maturation [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2017, 41(4): 588-601.
- [26] HAMRE K, MOREN M, SOLBAKKEN J, et al. The impact of nutrition on metamorphosis in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) [J]. *Aquaculture*, 2005, 250(3/4): 555-565.
- [27] LUND I, STEENFELDT S J, HANSEN B W. Effect of dietary arachidonic acid, eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on survival, growth and pigmentation in larvae of common sole (*Solea solea* L.) [J]. *Aquaculture*, 2007, 273(4): 532-544.

Identification of mutation sites related to body color albinism in *Cynoglossus semilaevis*

SUN Jianhua^{1,2}, BAO Baolong^{1,2}

(1. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: 9 missense mutation sites of body color related pathway genes were sequenced and investigated. In three small sample populations of *Cynoglossus semilaevis* with hyperpigmentation, pseudoalbino or normal body color, it was found that three mutation sites are significant correlation with pseudoalbino. Further verification by expanding samples showed that the C/T site at position 160 of type B endothelin receptor (*ertB*-160-C/T) was extremely significantly correlated with pseudoalbino. The G/A site at position 473 of tyrosinase (*tyr*-473-G/A) and the C/T site at position 1178 of arachidonic acid 5-lipoxygenase (*alox5*-1178-C/T) were significantly correlated with pseudoalbino. The three mutation sites were located in the protein periplasmic-Binding-Protein-Type 1, tyrosinase C-terminal and lipoxygenase domains. RT-qPCR assay revealed that: There was no evident difference in *ertB* expression in different colored areas of the skin of albino half-smooth tongue sole on the eyed side, however, the expression of *ertB* in the skin on the eyeless side was prominently higher than that in the skin on the eyed side, and the expression level of *tyr* in both pigmented and non-pigmented parts of the eyed side were remarkably higher than those of the eyeless side; The expression level of *alox5* on the eyeless side was markedly higher than that on the eyed side; The *alox5* expression in the albino area on the eyed side was prominently higher than that in the pigmented area on the eyed side. The mutation sites related to pseudoalbino of *C. semilaevis* cultured population provides a molecular basis for body color breeding of *C. semilaevis* in the future.

Key words: *Cynoglossus semilaevis*; malpigmentation; pseudoalbino; mutation site