

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20170508001

http://www.yykxjz.cn/

王若青, 王娜, 王仁凯, 陈松林. 牙鲆 *tyrpl*a 和 *tyrpl*b 的鉴定及 *tyrpl*a 与 mmu-miR-143-5p_R+2 的调控关系. 渔业科学进展, 2018, 39(2): 49-58

Wang RQ, Wang N, Wang RK, Chen SL. The identification of *tyrpl*a and *tyrpl*b in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) and the regulation study of *tyrpl*a and mmu-miR-143-5p_R+2. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(2): 49-58

牙鲆 *tyrpl*a 和 *tyrpl*b 的鉴定及 *tyrpl*a 与 mmu-miR-143-5p_R+2 的调控关系*

王若青^{1,2} 王娜^{1,3①} 王仁凯^{1,2} 陈松林^{1,3}

(1. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071;

2. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 3. 青岛海洋科学与技术国家实验室 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071)

摘要 为了研究牙鲆白化发生过程中的分子调控机制, 本研究在获得正常和白化牙鲆转录组及 microRNA (miRNA) 深度测序数据的基础上, 对 tyrosinase related protein 1 (*tyrpl*) 和 mmu-miR-143-5p_R+2 (mmu-143) 进行了表达模式、靶基因预测及验证分析。首先通过 RACE 方法克隆得到白化相关基因 *tyrpl* 的 2 个转录本, 进化树分析表明这 2 个转录本分别是 *tyrpl*a 和 *tyrpl*b, 利用 RNAhybrid 软件预测到 mmu-143 可能与 *tyrpl*a 基因存在互作关系, 通过双荧光素酶实验初步验证了这一靶向关系。进一步的荧光定量结果显示, *tyrpl*a 基因在正常牙鲆皮肤中的表达量显著高于白化牙鲆皮肤的表达量, 正常牙鲆皮肤中 mmu-143 的表达量显著低于白化牙鲆皮肤中的表达量。本研究发现, 牙鲆 *tyrpl* 存在 2 个转录本, 分别是 *tyrpl*a 和 *tyrpl*b。双荧光素酶实验和定量 PCR 分析初步证实, *tyrpl*a 是 mmu-143 的靶基因, mmu-143 是通过调控 *tyrpl*a 基因的表达来影响牙鲆白化的。此研究结果为深入揭示牙鲆白化发生的分子机制提供重要的基础资料。

关键词 牙鲆; 白化; mmu-miR-143-5p_R+2; *tyrpl*a; *tyrpl*b

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)02-0049-10

白化是由于黑色素代谢障碍导致眼睛、皮肤、毛发黑色素量减少或缺乏而引起的一种体色异常现象。自然界中, 哺乳类(柯永亮, 2006)、鱼类(李仰真等, 2014)、鸟类(梁伟等, 2000)、爬行类(张秋金等, 2009) 等都存在白化个体。白化个体通常出现一系列病理学上的改变, 且因自身缺乏保护色而易被捕食, 因此, 白化个体的生存能力大大低于正常个体。白化具有广泛的遗传异质性, 是最早被研究的遗传性疾病之一

(Farabee, 1903)。哺乳动物如人和小鼠中白化研究最多, 截止到 2011 年, 在小鼠中已发现的与体色、毛发相关的基因突变多达 378 个(<http://www.espcr.org/micemut/>)。

自然界中生物体有多种多样不同的体色, 这是由于自身色素细胞能产生不同的色素。虽然哺乳动物中白化突变位点众多, 但色素细胞只有一种, 即黑色素细胞。鱼类中已发现的色素细胞共有 6 种: 黑色素细

* 国家自然科学基金项目(31472273)和山东省泰山学者攀登计划项目共同资助 [This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31472273), and the Taishan Scholar Climbing Program of Shandong Province]. 王若青, E-mail: wangruoqing515@163.com

① 通讯作者: 王娜, 副研究员, E-mail: wangna@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2017-05-08, 收修改稿日期: 2017-05-17

细胞、红色素细胞、黄色素细胞、虹彩细胞、白色素细胞和蓝色素细胞,暗示其可能的白化机制较哺乳动物更为复杂。白化在鱼类中的研究主要集中于模式鱼类斑马鱼(*Danio rerio*)、青鳉(*Oryzias latipes*)和穴居鱼类(Koga *et al*, 1997),而养殖鱼类中的研究较少。

牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)是一种冷温性底栖肉食鱼类,最适温度为 17℃~20℃,具有很高的营养和经济价值,深受消费者的喜爱,市场十分广阔,为我国重要的海水经济鱼种。牙鲆育苗过程中经常出现苗种高比例体色异常现象,即有眼侧皮肤白化和无眼侧黑化现象,严重影响了商品鱼价值(朱学武等, 2017)。目前,认为牙鲆白化主要与营养(Seikai *et al*, 1987; Yamamoto *et al*, 1992)、环境(Takahashi, 1994; Seikai, 2010)和生理因素(Burton *et al*, 1995; Seikai, 1992; Yoo *et al*, 2000)等相关,而不管是营养还是生理方面,归根到底都是由于分子水平的变化引起的。

MicroRNA(miRNA)多为 21~25 nt 高度保守的单链非编码小 RNA,能够通过其 3'端非翻译区(UTR)与靶 mRNA 相互作用而沉默靶 mRNA,在转录后调控过程中发挥重要作用。已发现多个 miRNA 参与调控哺乳动物黑色素细胞发育及相关疾病(Kim *et al*, 2014; Zhu *et al*, 2010; Dong *et al*, 2012)。牙鲆白化现象中是否涉及 miRNA 的表达及调控也值得深入研究。我们在前期研究中已经利用高通量测序技术获得了一批在牙鲆正常和白化皮肤中差异表达的基因和 miRNA。本研究在此基础上,选取 tyrosinase related protein 1 (*tyrp1*)和 mmu-miR-143-5p_R+2(mmu-143)开展了不同组织表达模式研究、靶基因预测及验证分析等,将为牙鲆白化发生分子机制的阐明提供重要的基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本实验用鱼为发育状况良好且无伤病的有眼侧皮肤全为黑色的正常牙鲆和发育状况良好且无伤病的有眼侧皮肤白化牙鲆,由山东省海阳市黄海水产有限公司提供。分别取 5 月龄正常和白化牙鲆的有眼侧皮肤、无眼侧皮肤、有眼侧肌肉、无眼侧肌肉、性腺、鳃、脑、肠、眼、心脏、肾脏、脾脏、肝脏 13 个组织样品,立即放入液氮中保存,以备后续提取 RNA 使用。293T 细胞培养于 37℃、5% CO₂ 条件下的细胞培养箱。

1.2 牙鲆各组织 Total RNA 的提取和 cDNA 第 1 链的合成

采用 TIANGEN miRcute miRNA 提取分离试剂

盒提取牙鲆各组织的 Total RNA,然后用 1%的琼脂糖凝胶电泳检测所提 RNA 的质量,用紫外分光光度计检测 RNA 的浓度。RNA 样品于-80℃保存。

各取 1 μg 的 Total RNA 用 FastQuant cDNA 第一链合成试剂盒(去基因组)进行反转录合成 cDNA 第 1 链,-20℃保存,用于克隆基因中间片段。用 SMARTer® RACE 5'/3'Kit (Clontech)合成 5'和 3' Ready,用于 5'和 3'RACE 的克隆。

1.3 *tyrp1* 基因的克隆

利用转录组测序结果鉴定出 *tyrp1* 的 2 个转录本: *tyrp1* GS_012029(*tyrp1*-29) 和 *tyrp1* GS_009038 (*tyrp1*-38),此处以 *tyrp1*-29 为例进行基因克隆介绍。以正常牙鲆有眼侧皮肤 cDNA 为模板,以 *tyrp1*-29-F1 和 *tyrp1*-29-R1(表 1)为引物进行中间片段的 PCR 扩增,反应体积为 50 μl,反应程序: 94℃, 5 min; 94℃ 30 s, 54℃ 30 s, 72℃ 50 s (35 个循环); 72℃, 10 min。将 PCR 产物回收后与 pMD18-T 进行连接转化反应,挑取 3~5 个阳性克隆送到瑞博兴科公司测序。利用 Vector NTI Advance 11 软件进行测序结果的对比分析。

利用验证的中间片段设计引物 *tyrp1*-29-5'GSP、*tyrp1*-29-5'NGSP、*tyrp1*-29-3'GSP 和 *tyrp1*-29-3'NGSP (表 1),以合成的 Ready 为模板进行 *tyrp1*-29 5'和 3'RACE 的巢式 PCR 扩增。一轮反应结束后,将一轮 PCR 产物稀释 50 倍作为二轮 PCR 的模板进行二轮 PCR,将 PCR 产物回收后与 pMD18-T 进行连接转化反应,挑取 3~5 个阳性克隆送到瑞博兴科公司测序。利用 Vector NTI Advance 11 软件进行测序结果的对比分析。

1.4 *tyrp1* 基因序列拼接及蛋白分析

在成功得到 *tyrp1*-29 和 *tyrp1*-38 基因的中间片段、5'端及 3'端后,用 Vector NTI Advance 11 进行序列拼接,获得完整的 *tyrp1*-29 和 *tyrp1*-38 序列,然后进行开放阅读框分析和蛋白质翻译。从 NCBI 中下载其他不同物种的 Tyrp1 的氨基酸序列,与得到的牙鲆 Tyrp1 氨基酸序列进行同源性比对,用 MEGA 5.0 软件中 NJ 法(Neighbor-joining Method)构建系统进化树,设置 1000 次 bootstraps 进行系统进化评估。

1.5 *tyrp1* 基因实时荧光定量 PCR

用 SYBR Premix Ex Taq 试剂盒(TaKaRa)进行实时荧光定量 PCR,用 Primer 6.0 设计定量引物 *tyrp1a*-qF 和 *tyrp1a*-qR(表 1)进行 *tyrp1a* 基因的荧光定量检测。以 β -actin 为内参,以正常和白化牙鲆的 13 个组织的 cDNA 为模板,各组织均选取 3 个平行的实

验个体, 每个实验个体 3 次重复。ABI 7500 Realtime PCR 仪(Applied Biosystems, 美国)扩增标准程序: 95°C 30 s; 95°C 5 s, 60°C 34 s (40 循环); 95°C 15 s; 60°C 1 min; 95°C 15 s。

1.6 *tyrpl1a* 与 miRNA 的互作关系预测

利用 RNAhybrid (https://bibiserv.cebitec.uni-bielefeld.de/rnahybrid?id=rnahybrid_view_submission) 将已克隆得到的 *tyrpl1a* 基因 3'UTR 序列与 miRNA 进行靶基因预测, 预测到 *tyrpl1a* 与 mmu-143 可能的靶向关系。

1.7 miRNA 的提取、反转录及荧光定量

由于 TIANGEN miRcute miRNA 提取分离试剂

盒提取的牙鲈各组织的 Total RNA 中包含 miRNA 等 small RNA, 因此, 可直接用 TIANGEN miRcute miRNA cDNA 第一链合成试剂盒进行反转录。

得到 miRNA 的 cDNA 后, 用 TM Utility 1.5-iTech 设计 mmu-143 上游定量引物 mmu-143-F(下游由定量试剂盒中提供)进行荧光定量检测。以 5S rRNA(表 1) 为内参, 以正常和白化牙鲈的 13 个组织的 miRNA cDNA 为模板, 各组织均选取 3 个平行的实验个体, 每个实验个体重复 3 次。用 miRcute 增强型 miRNA 荧光定量检测试剂盒(SYBR Green, TIANGEN)进行定量实验, 反应体系: 10 μ l 2 \times miRcute Plus miRNA Premix(with SYBR&ROX), mmu-143-F(10 μ mol/L)和

表 1 本研究所使用的引物
Tab.1 Primers used in this study

引物 Primer	序列 Sequence (5'~3')
tyrpl-29-F1	TACTACTCCGTCAGCAAGA
tyrpl-29-R1	GTCTCCTCAACCATTTCATCA
PMD18-T-F1	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC
PMD18-T-R1	AGCGGATAACAATTTACACAGGA
UPM	Long Primer: TAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT Shot Primer: CTAATACGACTCACTATAGGGC
NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
tyrpl-29-5'GSP	GATTACGCCAAGCTTTGGCAAAGTTCCAGTAGGGCAGGGCGAA
tyrpl-29-5'NGSP	GATTACGCCAAGCTTTGTGCCAAGTGACGAATCCGGGACCCCT
tyrpl-29-3'GSP	GATTACGCCAAGCTTCAGCAGGAAACGTCAACAGGCCGATGGT
tyrpl-29-5'NGSP	GATTACGCCAAGCTTCTGCTCCACACCTACACTGACGCCATCT
tyrpl1a-qF	ACAACCTGGCACATCTCTTCCT
tyrpl1a-qR	ACTCTGTCTCCTCAACCATTTCATCA
jf_actin-F	AATCGTGCCTGACATTAAGGAG
jf_actin-R	GGAAGGAAGGCTGGAAGAGG
mmu-143-F	GGTGCAGTGCTGCATCTCTG
5S rRNA	GCTTACGGCCATAACCACCCT
tyrpl-38-5'GSP	TTCTCGAACTGTGGGCTGTTGCCATCGG
tyrpl-38-5'NGSP	AGCTTGGTCCAGAGCGTTACGAATGCT
tyrpl-38-3'GSP	GCCAGGCGAGCTTTGGAGGTGTAGACTT
tyrpl-38-3'NGSP	ACATGCAGGCGAGAATGCTGGGTGAACC
tyrpl-38-F1	CTGTGGTGAGGAGGAATATC
tyrpl-38-R1	AGAGTTGGTGCTGATGGA
tyrpl1a-3'UTR_F	ACGCTCGAGGATGCGTGTGTTGAACACAAG
tyrpl1a-3'UTR_R	ACGGCGCCGCAAGTTGTAGGTGTTAATT
tyrpl1a-mut_F	TGATGCCAATTCTAGAATGCTGATT
tyrpl1a-mut_R	CCTTTAAATTGAAACACATTCTCAA
pGL-3_F	CAAGTGCAGGTGCCAGAACAT
pGL-3_R	CCAACAGTACCGGAATGCCAAG

Reverse Primer (10 $\mu\text{mol/L}$)各 0.4 μl , 2 μl 50 \times ROX Reference Dye, 1.5 μl miRNA 第一链 cDNA, 5.7 μl ddH₂O, 总体积 20 μl 。反应程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 34 s(40 循环); 熔解曲线分析。

1.8 双荧光素酶载体 pmiR-RB-REPORT™的构建及转染实验

为了证明 *tyrp1a* 3'UTR 与 miRNA mmu-143 存在靶对应关系, 采用双荧光素酶实验在 293T 细胞中进行验证, 所用的双荧光素酶报告载体 pmiR-RB-REPORT™及 mmu-143 mimic 和 mimic Ncontrol 均为广州市锐博生物科技有限公司设计提供。

用 Primer 6.0 设计分别带有 *Xho* I 和 *Not* I 酶切位点的上下游引物 *tyrp1a*-3' UTR_F 和 *tyrp1a*-3' UTR_R(表 1), 以正常牙鲆皮肤的 cDNA 为模板, PCR 扩增 *tyrp1a* 3' UTR 区片段并插入到 pmiR-RB-REPORT™载体的 hRluc 下游, 构建成载有靶片段的完整载体, 与 mmu-143 mimic 共转染至 293T 细胞中(表 2, A 组)。另外, 将 pmiR-RB-REPORT™上的靶片段用 TaKaRa MutanBEST Kit 进行突变后与 mmu-143 共同转染至 293T 细胞中, 作为一组对照实验(表 2, B 组)。正常和突变的载体分别与 miRNA 的阴性对照 NC 共转染作为 2 组对照(表 2, C 组和 D 组)。

表 2 细胞转染体系成分
Tab.2 The composition of cell transfection

组别 Groups	V_{DMEM} (μl)	Volume of MiRNA/ vector/lip2000
A 组	47	3 μl mmu-143 mimic (5 nmol/L)
	45.5	4.5 μl <i>tyrp1a</i> -WT(800 ng/ μl)
	47	3 μl lipofectamine 2000
B 组	47	3 μl mmu-143 mimic (5 nmol/L)
	47	3 μl <i>tyrp1a</i> -Mut (800 ng/ μl)
	47	3 μl lipofectamine 2000
C 组	47	3 μl miRNA NC (5 nmol/L)
	45.5	4.5 μl <i>tyrp1a</i> -WT (800 ng/ μl)
	47	3 μl lipofectamine 2000
D 组	47	3 μl miRNA NC (5 nmol/L)
	47	3 μl <i>tyrp1a</i> -Mut (800 ng/ μl)
	47	3 μl lipofectamine 2000

1.9 双荧光素酶实验

取对数生长期的 293T 细胞以每孔大约 5×10^4 细胞接种于 24 孔板中, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%的 CO₂ 的条件下培养过夜后, 采用 lipofectamine 2000 按照表 2 的体系

进行细胞转染, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h 后, 用碧云天公司提供的双荧光素酶报告基因检测试剂盒来检测并分析 miRNA 与靶片段是否有互作关系。

1.10 数据计算方法

定量 PCR 实验中基因或 miRNA 的相对表达水平采用 $2^{(-\Delta\Delta C_t)}$ 方法计算, 其数据为平均数 \pm 标准误(Mean \pm SE)。用 SPSS 17.0 分析软件采用单因素方差分析(One-way ANOVA), 并进行 Duncan 多重比较, 当 $P < 0.05$ 时认为差异显著, 当 $P < 0.01$ 认为差异极显著。

2 结果

2.1 牙鲆 *tyrp1* 基因全长及其蛋白分析

通过 RACE 方法成功克隆了 *tyrp1-29* 和 *tyrp1-28*, *tyrp1-29* 基因 cDNA 全长为 2145 bp, 开放阅读框(ORF)为 1566 bp, 5' UTR 区为 127 bp, 3' UTR 区为 452 bp(图 1)。用 Vector NTI Advance 11 软件查找 ORF 区并翻译成蛋白质, 基因编码区编码 521 个氨基酸, 预测蛋白质分子量为 58.34 kDa。分析蛋白质结构发现, 第 1~17 个氨基酸为信号肽, 第 84~112 个氨基酸为 EGF 区, 第 172~407 个氨基酸为 PFAM 结构域, 469~491 个氨基酸为跨膜区。

tyrp1-38 基因 cDNA 全长 1792 bp, 开放阅读框(ORF)为 1602 bp, 5' UTR 区为 49 bp, 3' UTR 区为 141 bp(图 2)。用 Vector NTI Advance 11 软件查找 ORF 区并翻译成蛋白质, 基因编码区编码 533 个氨基酸, 预测蛋白质分子量为 61.10 kDa。分析蛋白质结构发现, 第 27~70 个氨基酸为 NH 区, 第 137~190 个氨基酸为 GLA 区, 第 475~497 个氨基酸为跨膜区。

2.2 系统进化树构建

将在 NCBI 和 Ensemble 查找到的 11 种 *Tyrp1* 蛋白序列: 刺鱼(*Gasterosteus aculeatus*) *Tyrp1a* (ENSG-ACG00000019503)、青鳉 *Tyrp1a* (ENSORLG00000-004326)、河豚(*Fugu rubripes*) *Tyrp1a* (ENSTRUG-00000012615)、斑马鱼 *Tyrp1a* (ENSDARG00000029-204)、刺鱼 *Tyrp1b* (ENSGACG00000015912)、青鳉 *Tyrp1b* (ENSORLG00000004723)、斑马鱼 *Tyrp1b* (NP_001002749.1)、热带爪蟾(*Xenopus tropicalis*) *Tyrp1* (NP_001016476.1)、鸡(*Gallus gallus*) *Tyrp1* (NP_990376.2)、小鼠(*Mus musculus*) *Tyrp1* (NP_112479.1) 及人 (*Homo sapiens*) *Tyrp1* (NP_000541.1) 与牙鲆的 *Tyrp1-29* 和 *Tyrp1-38* 一起利用 MEGA 5.0 软件构建蛋白序列系统进化树(图 3), 序列号为 NP


```

1      acatggggactcttgggggatacatttctgcagacggagaggagcagcATGCACAGTCAGAGCATGTGGAGAGCGGGCTCTGGTGGTGACCTGTGTGCCGCCAAACGCTGGCCCA
1      M H S Q S M W R A G L L V V T L C A A Q T L A Q
121    GTTCCCCGTGAGTGTGTACCCCGAGGGGCTGCAGAGTGGTCAGTGTGCCCGTCCCTACAGGGTGGCTGGGGACGAGTGTGGCTCCAGCACAGGGAGGGGCGAGTGTGTGCCAT
25     F P R E C V T P E G L Q S G Q C C P S P T G V A G D E C G S S T G R G Q C V S I
241    TGCAGCAGACAACCGGGCCACGGACCCAGTATCCTTACGCGGGGCGAGACAGAGGAGAGGTGGCCGCTGAGGTTTTTCAACCCGACCTGCCAGTGAATGAAATTTAGTGGCTA
65     A A D N R R H G P Q Y P Y A G R D D R E R W P L R F F N R T C Q C N G N F S G Y
361    CAACTGCGGGGATGCCGACCGGCTGTCCGACCGAACTGTGATCAGAGGATCTCTGTGGTGAGGAAATATCATGCAGATGAGCCGCTCGGAGAAGCAAGCATTGCGAACGCTCT
105    N C G G C R H G L S G P N C D Q R I S V V R R N I M Q M S A S E K Q A F V N A L
481    GGACCAAGCTAAGAGGACCATCCACCCTGACCTGGTCATCTGTACTCGACGTACCAGGAGTGTGGGGCCGATGGCAACAGCCACAGTTCGAGAATCACCATTACAACACTT
145    D Q A K R T I H P D L V I C T R R Y Q E V F G P D G N S P Q F E N I T I Y N Y F
601    TGTGGAGCCACTACTCTGTGTCAGCAAACTACCTGGGCGCAGCCAGCGGAGCTTTGGAGGTGTAGACTTCTCCACGAGGGCCAGGTTTTGTACCTGGCACCGTTTCCATCT
185    V W S H Y Y S V S K T Y L G P G Q A S F G G V D F S H E G P G F V T W H R F H L
721    GTTGCAGCTGGAGAGACATGCAGGACATGCTGGTGAACCCACCTTTGCCCTGCCCTACTGGAACCTTGGCCATCGCGGCGAGTACTGTGATATGCACGGACGACCTGATGGGAC
225    L Q L E R D M Q D M L G E P T F A L P Y W N F A I G G S D C D I C T D D L M G A
841    CAGGAGTAGCTTTGACATGAACCTCATCAGCACCAACTCTGTGTTCTCCAGTGGAGGGTGCATGCGAGAGTGTGGACGACTACGACTCGCTGGGACCGTGTGCAACAACCTCAGAAAC
265    R S S F D M N S I S T N S V F S Q W R V I C E S V D D Y D S L G T V C N N S E T
961    CAGTCCCATCAGGAGAAACCCCGGGCAACGTGGCAGCGCCATGGTCAGAGGTGGCAGAGCCCAAGGACGTGTGGAGTGTGCTGGAGCTCAACACCTTCGACACGCGCCCTACTA
305    S P I R R N P A G N V A R P M V Q R L P E P K D V L D C L E L N T F D T P P Y Y
1081   CTCCAGTCTCCGAGAGCTTCAGGAACACCATAGAAGGCTACAGCGCCCTCAGGGGATGTACGACCCGGTGGTCCGCAGCCTCCACAACCTGGCCACCTCTTCTCAATGGGACGGG
345    S T S S E S F R N T I E G Y S A P Q G M Y D P V V R S L H N L A H L F L N G T G
1201   CGGCAGACTCACCTCTGCCCAACGATCCCATCTTTGCTGCTGCACACCTTACCAGCGCGTCTTGAAGAGTGGCTGAGCCGGCACGCGCCAGTGAATAGTGTACCCCGAGGA
385    G Q T H L S P N D P I F V L L H T F T D A V F E E W L S R H A P G E I V Y P E E
1321   GAACGCTCTATTGGGCACAACCCAGGTCCAACATGGTTCCTTGGCCTCTGTACCAACGCCGAGATGTTGTCTCTGCCCCAGAAAACCTGGGACTACTCTACGAGTCCAGTG
425    N A P I G H N R R S N M V P F W P P V T N A E M F V S A P E N L G Y S Y E V Q W
1441   GCCAGCTCGTGTACACCTGTCTGAGATCATACCATAGTATCGTTGCGGAGTGTGGTAGTGGCGGTGGTGGGCGGCGTATCGCCTGCGCTGTGCGTGGCCGCTCTACCGATC
465    P A R A Y T L S E I I T I A I V A A V L V V A V V G G V I A C A V R A R S Y R S
1561   GGCCGAGGCTTTGGAGCCGCTGCTGGGAGAGACTTTCGACGCTACTCTGAGGACACCGGGCTTTGGACAAATCGCAGTCTGTGCTGTCaaccatgcctttagagaggccttcaca
505    A E A L E P L L G E T F R R Y S E D D R R L D K S Q S V V *
1681   ttgtcatgcatttgtttctttttcttttttaataaccggacttttttaataaaggtaactggtgtcagagccaggaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
    
```

图 2 牙鲆 *tyrp1-38* 基因序列及其开放阅读框(ORF)预测的氨基酸序列
 Fig.2 ORF sequence and deduced amino acid sequence of *tyrp1-38* in Japanese flounder

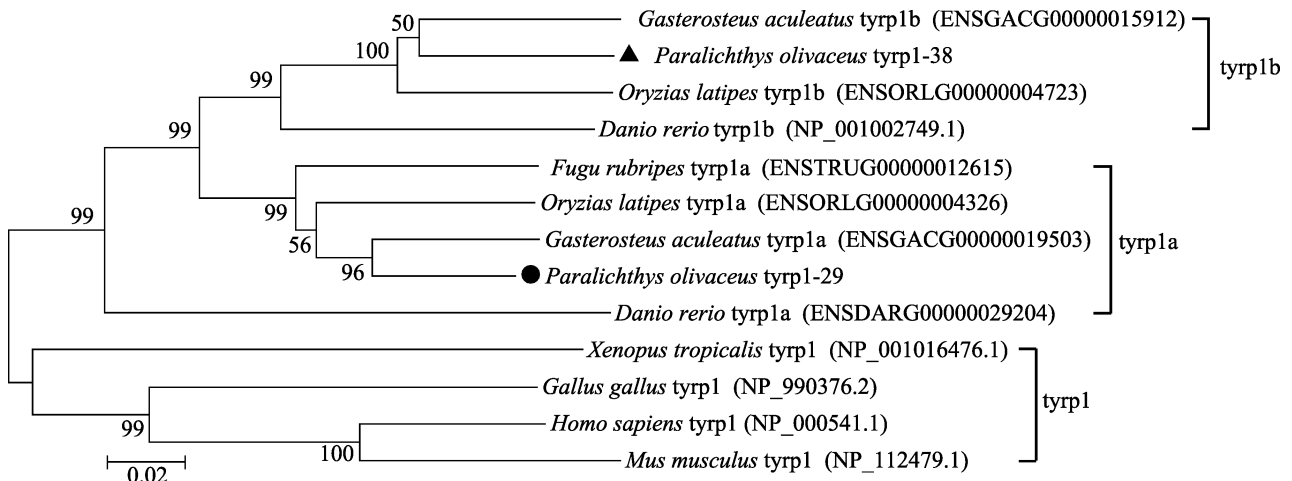


图 3 以 NJ 法建立的系统进化树
 Fig.3 The phylogenetic tree based on NJ method

括号内为蛋白序列在 GenBank/Ensembl 的登录号(除 *P. olivaceus* 外)
 GenBank/Ensembl numbers of nucleotide sequences are shown in the brackets (except *P. olivaceus*)

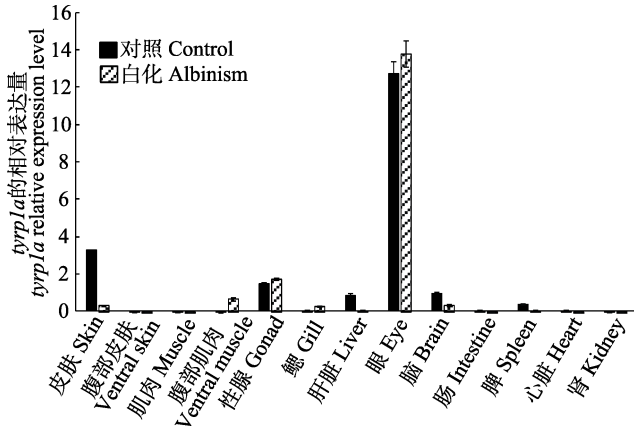


图 4 *tyrp1a* 基因在正常和白化牙鲈不同组织中的表达
Fig.4 Expression of *tyrp1a* in various tissues of control and albinism of *P. olivaceus*

在白化皮肤中的表达量约为正常皮肤中的 2 倍, 这一结果与之前的高通量测序结果一致。

2.6 双荧光素酶实验结果

MiRNA *mmu-143* 与其预测靶基因 *tyrp1a* 的双荧光素酶实验结果如图 7 所示。一般情况下, *mmu-143* mimics 跟阴性对照相比, 报告荧光值下调 30%及以上, 则认为 *mmu-143* mimics 对 *tyrp1a* 基因有调控作用。分析该实验双荧光素酶报告基因结果显示, *mmu-143* mimic 将 *tyrp1a*-WT 的报告荧光下调

38.2%, 对其预测靶位点进行突变后, *tyrp1a*-MU 的报告荧光下调 15.2%。该结果表明, *tyrp1a* 很可能是 *mmu-143* 的靶基因, *mmu-143* 通过调控 *tyrp1a* 基因的表达来影响牙鲈的白化情况。

3 讨论

黑色素主要起到吸收光照和色素沉积的作用, 而牙鲈皮肤白化主要是因为缺乏黑色素。黑色素是由酪氨酸酶及相关酶发挥作用合成的, 在脊椎动物中, 酪氨酸酶基因家族主要由三位成员组成: *tyrosinase* (*tyr*)、*tyrp1* 和 *tyrp2*(Nowak *et al*, 1997)。Tyrp1 被称为酪氨酸酶相关蛋白-1, 定位于小鼠 brown 位点, 该基因在真黑色素形成中发挥的关键作用已引起研究者们的高度重视(Ito, 2003; Jiménez-Cervantes *et al*, 1994)。研究发现, Tyrp1 是一种由内质网合成的跨膜蛋白, 通过高尔基体转运到黑色素体内(Ghanem *et al*, 2011), 其编码蛋白与酪氨酸酶(TYR)编码蛋白同源性高达 40%(Jackson *et al*, 1992), 与酪氨酸相关蛋白 2 (Tyrp2)共同构成酪氨酸酶家族来调控体内黑色素合成, 并且对黑色素细胞的发育、生存和功能起重要调节作用(Jiménez-Cervantes *et al*, 1994; Del *et al*, 1993; Hearing, 1999)。有实验证明, *tyrp1* 突变或缺失会导致狗(Schmutz *et al*, 2002)、猫(Schmidt-Küntzel *et al*,

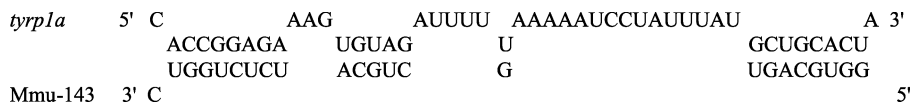


图 5 *mmu-143* 的靶基因预测
Fig.5 Target prediction of *mmu-143*

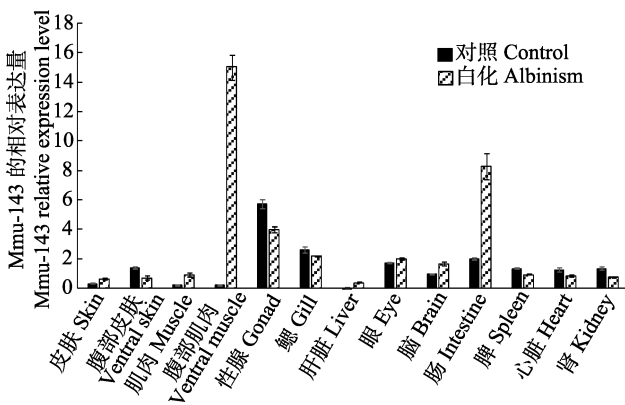


图 6 *mmu-143* 在正常和白化牙鲈不同组织中的表达
Fig.6 Expressions of *mmu-143* in various tissues of control and albinism of *P. olivaceus*

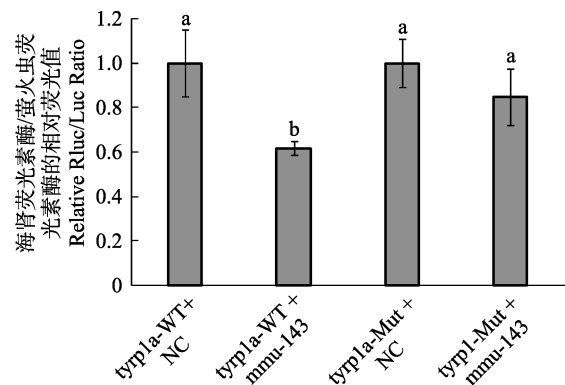


图 7 双荧光素酶实验结果
Fig.7 The results of dual luciferase experiment

不同的字母代表组间差异显著($P < 0.05$)
Different letters represented significant difference between groups ($P < 0.05$)

2005)、牛(Berryere *et al*, 2003)、羊(Gratten *et al*, 2007)和日本鹌鹑(Nadeau *et al*, 2007)的毛色变成灰色。已有报道显示,硬骨鱼类中大多存在 2 种 *tyrp1* 的同源基因,即 *tyrp1a* 和 *tyrp1b*(Braasch *et al*, 2007、2009)。本研究在牙鲆转录组数据中也发现了 *tyrp1* 的 2 个转录本,分析进一步证实这 2 个转录本 *tyrp1-29* 和 *tyrp1-38* 分别为 *tyrp1a* 和 *tyrp1b* 基因。

Tyrp1a 基因在正常和白化牙鲆的有眼侧皮肤、无眼侧皮肤、有眼侧肌肉、无眼侧肌肉、性腺、鳃、脑、肠、眼、心脏、肾脏、脾脏、肝脏这 13 个组织中的表达情况差异明显。正常和白化牙鲆各组织中 *tyrp1a* 表达量最高的是眼组织,且远远高于其他各组织的表达量,这一结果与彩鲤中的表达情况一致(李康乐, 2014),猜测 *tyrp1a* 可能参与牙鲆变态过程中眼睛的偏转及骨骼的重塑。定量结果显示,正常牙鲆皮肤中 *tyrp1a* 基因的表达量应远高于白化皮肤中的表达量,这与 *tyrp1a* 基因能促进黑色素细胞中黑素体的形成相关(崔嘉等, 2009),且与高通量测序结果一致。其次, *tyrp1a* 基因在正常和白化牙鲆的性腺和脑中均有表达,在腹部皮肤、背部肌肉、肠、肾和心脏中几乎不表达。

在哺乳动物和鸟类中已有实验证明, miRNA 能通过调控靶基因来控制黑色素的形成,如 miR508-3p (Zhang *et al*, 2017)、miR-21a-5p (Wang *et al*, 2016)、lpa-miR-nov-66 (Yang *et al*, 2015)、miR-204 (Apopo *et al*, 2015)等。MicroRNA-203 能与驱动蛋白 5b 相互作用,从而调控黑色素细胞中黑色素转运和酪氨酸酶表达(Noguchi *et al*, 2014; Zhang *et al*, 2014)。因此,通过对牙鲆 miRNA 的表达分析,可以帮助我们去探讨 miRNA 在基因表达调控中的功能,更好地解释 miRNA 在牙鲆白化中的分子调控机制。

通过 *tyrp1a* 基因与 *mmu-143* 的定量结果可以看出,二者在正常和白化牙鲆皮肤、肌肉、性腺、肝、脑和肠中的表达呈一定的反比例关系,例如 *tyrp1a* 在正常牙鲆皮肤中的表达量远高于白化皮肤,而 *mmu-143* 在白化牙鲆皮肤中的表达量约为正常皮肤中的 2.1 倍。RNAhybrid 软件预测结果显示,可基本确定二者存在靶基因关系,双荧光素酶实验进一步证实了这种负调控关系,说明 *mmu-143* 是通过调控 *tyrp1a* 基因的表达来影响牙鲆白化发生的。

本研究成功鉴定出牙鲆存在 2 种 *tyrp1* 基因, *tyrp1a* 和 *tyrp1b* 基因,定量结果显示, *tyrp1a* 在正常牙鲆皮肤中的表达量显著高于白化皮肤中的表达量,与 *mmu-143* 在正常和白化皮肤中的表达量刚好相反,

均与高通量测序结果一致。双荧光素酶实验结果证明 *tyrp1a* 与 *mmu-143* 存在靶基因互作关系。这一结果丰富了对牙鲆白化分子机制的认识。

参 考 文 献

- Apopo S, Liu H, Jing L, *et al*. Identification and profiling of microRNAs associated with white and black plumage pigmentation in the white and black feather bulbs of ducks by RNA sequencing. *Animal Genetics*, 2015, 46(6): 627–635
- Berryere TG, Schmutz SM, Schimpf RJ, *et al*. TYRP1 is associated with dun coat colour in Dexter cattle or how now brown cow? *Animal Genetics*, 2003, 34(3): 169–175
- Braasch I, Liedtke D, Volff JN, *et al*. Pigmentary function and evolution of *tyrp1* gene duplicates in fish. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 2009, 22(6): 839–850
- Braasch I, Liedtke D, Volff JN, *et al*. Pigmentary function and evolution of *tyrp1* gene duplicates in fish. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 2009, 22(6): 839–850
- Braasch I, Scharl M, Volff JN. Evolution of pigment synthesis pathways by gene and genome duplication in fish. *BMC Evolutionary Biology*, 2007, 7: 74
- Burton D, Vokey J, Mayo D. Adrenoceptors in cryptic patterning of a flatfish, *Pleuronectes americanus*. *Proceedings of the Royal Society Biological Sciences*, 1995, 261(1361): 181–186
- Cui J, Sun SR, Miao LX, *et al*. The research progress of TYRP1 regulate animal pigment formation. *Chinese Veterinary Surgeon*, 2009, 36(9): 94–96 [崔嘉, 孙守荣, 苗鲁旭, 等. TYRP1 基因控制动物色素形成的研究进展. *中国畜牧兽医*, 2009, 36(9): 94–96]
- Del MV, Ito S, Jackson I, *et al*. TRP-1 expression correlates with eumelanogenesis in human pigment cells in culture. *FEBS Letters*, 1993, 327(3): 307–310
- Dong C, Wang H, Xue L, *et al*. Coat color determination by miR-137 mediated down-regulation of microphthalmia-associated transcription factor in a mouse model. *RNA*, 2012, 18(9): 1679–1686
- Farabee WC. Notes on negro albinism. *Science*, 1903, 17(419): 75
- Ghanem G, Fabrice J. Tyrosinase related protein 1 (TYRP1/gp75) in human cutaneous melanoma. *Molecular Oncology*, 2011, 5(2): 150–155
- Gratten J, Slate J. Compelling evidence that a single nucleotide substitution in TYRP1 is responsible for coat-colour polymorphism in a free-living population of Soay sheep. *Proceedings of the Royal Society B Biological Sciences*, 2007, 274(1610): 619–626
- Hearing VJ. Biochemical control of melanogenesis and melanosomal organization. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, 1999, 4(1): 24–28
- Ito S. The IFPCS presidential lecture: a chemist's view of melanogenesis. *Pigment Cell Research*, 2003, 16(3): 230–236
- Jackson IJ, Chambers DM, Tsukamoto K, *et al*. A second tyrosinase-related protein, TRP-2, maps to and is mutated at the mouse slaty locus. *Embo Journal*, 1992, 11(2): 527–535

- Jiménez-Cervantes C, Solano F, Kobayashi T, *et al.* A new enzymatic function in the melanogenic pathway. The 5, 6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid oxidase activity of tyrosinase-related protein-1 (TRP1). *Journal of Biological Chemistry*, 1994, 269(27): 17993–18000
- Ke YL. Albino disease in humans and animals. *Science and Culture*, 2006, 11 [柯永亮. 人与动物中的白化病. 科学与文化, 2006, 11]
- Kim KH, Bin BH, Kim J, *et al.* Novel inhibitory function of miR-125b in melanogenesis. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 2014, 27(1): 140–144
- Koga A, Hori H. Albinism due to transposable element insertion in fish. *Pigment Cell Research*, 1997, 10(6): 377–381
- Li KL. Molecular cloning and expression analysis of pigmentation-related genes, Sox10, Agouti, Tyrp1 and Dct, in Oujiang color common carp, *Cyprinus carpio var.* Color. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2014 [李康乐. 甌江彩鲤体色相关基因 Sox10、Agouti、Tyrp1、Dct 的分子克隆与表达分析. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2014]
- Li YZ, Chen SL, Xing HF, *et al.* Preliminary study on the albinism of half-smooth tongue sole (*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]
- Liang W, Guo DS, Song J, *et al.* An example of a white silver larynx was found in the Xiaolongmen forest of Beijing. *Chinese Journal of Zoology*, 2000, 35(1): 59 [梁伟, 郭冬生, 宋杰, 等. 北京小龙门林场发现一例白化银喉长尾山雀. 动物学杂志, 2000, 35(1): 59]
- Nadeau NJ, Mundy NI, Gourichon D, *et al.* Association of a single-nucleotide substitution in TYRP1 with roux in Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Animal Genetics*, 2007, 38(6): 609–613
- Noguchi S, Kumazaki M, Yasui Y, *et al.* MicroRNA-203 regulates melanosome transport and tyrosinase expression in melanoma cells by targeting kinesin superfamily protein 5b. *Journal of Investigative Dermatology*, 2014, 134(2): 461–469
- Nowak MA, Boerlijst MC, Cooke J, *et al.* Evolution of genetic redundancy. *Nature*, 1997, 388(6638): 167–171
- Schmidt-Küntzel A, Eizirik E, O'Brien SJ, *et al.* Tyrosinase and tyrosinase related protein 1 alleles specify domestic cat coat color phenotypes of the albino and brown loci. *Journal of Heredity*, 2005, 96(4): 289–301
- Schmutz SM, Berryere TG, Goldfinch AD. TYRP1 and MC1R genotypes and their effects on coat color in dogs. *Mammalian Genome*, 2002, 13(7): 380–387
- Seikai T, Watanabe T, Shimozaki M. Influence of three geographically different strains of *Artemia* nauplii on occurrence of albinism in hatchery-reared flounder *Paralichthys olivaceus*. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 1987, 53(2): 195–200
- 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*. *Suisanzoshoku*, 2010, 39(1): 21–60
- Seikai T. Process of pigment cell differentiation in skin on the left and right sides of the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, during metamorphosis. *Ichthyological Research*, 1992, 39(1): 85–92
- Takahashi YI. Influence of stocking density and food at late phase of larval period on hypermelanosis on the blind body side in juvenile Japanese flounder. *Nihon-suisan-gakkai-shi*, 1994, 60(5): 593–598
- Wang P, Zhao Y, Fan R, *et al.* MicroRNA-21a-5p functions on the regulation of melanogenesis by targeting Sox5 in mouse skin melanocytes. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17(7): 959
- Yamamoto T, Fukusho K, Okauchi M, *et al.* Effect of various foods during metamorphosis on albinism in juvenile of flounder. *Nihon-suisan-gakkai-shi*, 1992, 58(3): 499–508
- Yang S, Fan R, Shi Z, *et al.* Identification of a novel microRNA important for melanogenesis in alpaca (*Vicugna pacos*). *Journal of Animal Science*, 2015, 93(4): 1622–1631
- Yoo JH, Takeuchi T, Tagawa M, *et al.* Effect of thyroid hormones on the stage-specific pigmentation of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Zoological Science*, 2000, 17(8): 1101–1106
- Zhang B, Zhang J, Sun L. In-depth profiling and analysis of host and viral microRNAs in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) infected with megalocytivirus reveal involvement of microRNAs in host-virus interaction in teleost fish. *BMC Genomics*, 2014, 15(1): 1–15
- Zhang J, Liu Y, Zhu Z, *et al.* Role of microRNA508-3p in melanogenesis by targeting microphthalmia transcription factor in melanocytes of alpaca. *Animal*, 2017, 11(2): 236–243
- Zhang QJ, Chen YL, Xie SH. An example of an albino Wang Jin snake was found in the Shaowu of Fujian. *Chinese Journal of Zoology*, 2009, 44(2): 47 [张秋金, 陈友铃, 谢少和. 福建邵武发现一例白化王锦蛇. 动物学杂志, 2009, 44(2): 47]
- Zhu XW, Xu YJ, Liu XZ, *et al.* Physiological mechanisms for degeneration of blind-side hypermelanosis in pond-cultured Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(1): 103–110 [朱学武, 徐永江, 柳学周, 等. 池塘养殖牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)无眼侧体色黑化消褪机理. 渔业科学进展, 2017, 38(1): 103–110]
- Zhu Z, He J, Jia X, *et al.* MicroRNA-25 functions in regulation of pigmentation by targeting the transcription factor MITF in Alpaca (*Lama pacos*) skin melanocytes. *Domestic Animal Endocrinology*, 2010, 38(3): 200–209

The Identification of *tyrp1a* and *tyrp1b* in Japanese Flounder (*Paralichthys olivaceus*) and the Regulation Study of *tyrp1a* and mmu-miR-143-5p_R+2

WANG Ruoqing^{1,2}, WANG Na^{1,3}①, WANG Renkai^{1,2}, CHEN Songlin^{1,3}

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. College of Fisheries and Life Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 3. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071)

Abstract The albinism in Japanese flounder aquaculture has become a common phenomenon and influenced its large-scale farming and market value. Based on the albinism and normal Japanese flounder transcriptome and miRNA sequencing, tyrosinase related protein 1(*tyrp1*) and mmu-miR-143-5p_R+2 (mmu-143) were chosen for expression pattern, target gene prediction and verification analysis. Firstly, *tyrp1a* and *tyrp1b* were screened and identified by RACE and phylogenetic analysis. Subsequently, RNA hybrid was used for the prediction of the targeting relationship between *tyrp1a* and miRNA mmu-143, which was further verified by dual luciferase experiment. Finally, the results of the quantitative real time-PCR (qRT-PCR) showed that the expression of *tyrp1a* gene in normal skin of Japanese flounder was significantly higher than the albinism skin, and the expression of mmu-143 in normal skin was significantly lower than the albinism skin. The present study identified two transcripts of *tyrp1a* and *tyrp1b* from Japanese flounder. Dual luciferase experiment and qRT-PCR analysis confirmed that *tyrp1a* was the target gene of mmu-143, and mmu-143 affected the albino of Japanese flounder by regulating *tyrp1a*. The results of this study will be helpful to fully understand the molecular mechanism of Japanese flounder albinism.

Key words Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*); Albinism; mmu-miR-143-5p_R+2; *tyrp1a*; *tyrp1b*

① Corresponding author: WANG Na, E-mail: wangna@ysfri.ac.cn