

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20210127001

http://www.yykxjz.cn/

朱优秀, 江炎亮, 张芹, 冯建新, 张瀚元, 吴碧银, 许建. 鲤 *trim25* 多拷贝基因进化和表达调控初探. 渔业科学进展, 2022, 43(3): 24-32

ZHU Y X, JIANG Y L, ZHANG Q, FENG J X, ZHANG H Y, WU B Y, XU J. Gene evolution and expression regulation of multiple copies of *trim25* in common carp, *Cyprinus carpio*. Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(3): 24-32

鲤 *trim25* 多拷贝基因进化和表达调控初探*

朱优秀^{1,2} 江炎亮² 张 芹³ 冯建新³
张瀚元² 吴碧银^{1,2} 许 建^{2①}

1. 上海海洋大学 水产科学国家级实验教学示范中心 上海 201306;
2. 中国水产科学研究院 农业农村部水生动物基因组学重点实验室 北京 100141;
3. 河南省水产科学研究院 河南 郑州 450044)

摘要 天然免疫系统是硬骨鱼类抵抗病毒感染的主要防御系统,三重基序(tripartite motif, TRIM)蛋白家族作为天然免疫系统的重要组成部分,参与病毒感染的免疫网络调控,其中,TRIM25已被证实在多种鱼类的免疫反应中发挥重要作用。本研究对鲤(*Cyprinus carpio*) *trim25* 基因的16个拷贝进行了序列进化分析、共线性分析和功能域结构分析,并比较了各拷贝在组织中的表达和顺式调控位点的差异。序列比对和系统进化分析结果均显示,位于鲤11和12号染色体上、结构完整的TRIM25的2个拷贝与金线鲃(*Sinocyclocheilus grahami*)和斑马鱼(*Danio rerio*)的TRIM25蛋白结构高度相似,与鲤科鱼类以外的其他物种的结构差异较大。基因共线性结果显示,*trim25* 基因上下游基因在不同物种的进化过程中相对保守。鲤TRIM25蛋白的结构分析显示,在鲤TRIM25的16个拷贝中,有6个拷贝具有完整功能结构域,其中,各有5个拷贝在鲤的肝与脑组织中高表达。在构建的表达数量性状基因座(eQTL)调控网络中,在肝和脑组织中分别筛选到5个和17个顺式调控*trim25* 基因表达的单核苷酸多态性(SNP)位点。本研究对鲤*trim25* 基因多个拷贝的序列差异进行了比较,并对鲤与其他物种TRIM25的序列、进化关系和共线性相似度进行了比较,揭示了鲤*trim25* 各拷贝间的结构多样性和在组织中的表达情况,筛选出了可能调控*trim25* 基因表达的SNP位点,为今后研究鲤TRIM25相关的调控和抗病研究提供了理论依据。

关键词 鲤; TRIM25; 蛋白结构; 系统进化树; eQTL

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2022)03-0024-09

天然免疫系统是宿主抵抗病原体感染的第一道防线,其对病原体的直接杀伤和清除作用是通过天然免疫分子和吞噬细胞实现的,其中,三重基序(tripartite motif, TRIM)家族蛋白作为具有抗病毒作用和天然免疫调节功能的代表性蛋白,成为近年来天然

免疫领域的研究热点。TRIM蛋白是一个结构相对保守的蛋白家族,广泛存在于无脊椎动物和脊椎动物的细胞中,其结构包括1个RING 锌指结构域、1~2个B-box 结构域、卷曲螺旋结构域(Coiled-coil, CC)以及C端可变结构域,因此,TRIM蛋白又被称为RBCC

* 中国水产科学研究院基本科研业务费(2020B003; 2020TD24)和国家重点研发计划(2018YFD0900102)共同资助 [This work was supported by the Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2020B003; 2020TD24), and National Key Research and Development Program (2018YFD0900102)]. 朱优秀, E-mail: zhuyx0508@163.com

① 通讯作者: 许 建, 副研究员, E-mail: xuj@cafs.ac.cn

收稿日期: 2021-01-27, 收修改稿日期: 2021-03-01

蛋白(Micale *et al*, 2016)。TRIM 蛋白家族作为一类重要的 E3 泛素连接酶, 参与信号转导、细胞凋亡、蛋白质加工和运输以及机体对病毒的应答等重要的生命过程。在人类医学研究中发现, 它们的改变与多种疾病的发生密切相关, 如发育障碍、神经退行性疾病、病毒感染和肿瘤(Tocchini *et al*, 2015)。

在硬骨鱼类中, TRIM 蛋白在天然免疫系统中同样发挥重要的作用。目前, 已在斑马鱼(*Danio rerio*)基因组中鉴定出 208 个 *trim* 基因, 在河豚(*Tetraodontidae*)基因组中发现了 66 个 *trim* 基因(Boudinot *et al*, 2011), 而人类基因组中包含了 75 个 *trim* 基因(Versteeg *et al*, 2013)。与人类相比硬骨鱼类的 *trim* 基因家族进化速度更快, 具有更高的多样性。在 *trim* 基因家族中, *trim25* 是非常重要的成员之一。近几年, 在鱼类的天然免疫系统研究中发现, TRIM25 蛋白在多个重要养殖鱼类, 如罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*)、鲤、大黄鱼(*Larimichthys crocea*)、石斑鱼(*Epinephelinae*)等的抗病毒过程中发挥了重要作用(Manokaran *et al*, 2015)。周真真等(2019)通过实时荧光定量 PCR 发现, TRIM25 在大黄鱼的心脏、脑、外周血、脾脏、皮肤、肌肉、头肾、肠和肝脏组织中均有表达, 其中, 在肝脏的表达水平最高; 当对大黄鱼注射 Poly (I:C)后, 在外周血、头肾、肝脏和脾脏中均检测到 *trim25* 基因表达量显著上调, 且均表现为先上升后下降的趋势, 提示 *trim25* 基因在大黄鱼抗病毒免疫反应中起着重要作用。Jin 等(2019)研究发现, 斑马鱼 TRIM25 通过靶向调控 RIG-I 蛋白的 2CARD 和 RD 结构域的 K63 泛素化, 促进斑马鱼对红点石斑鱼(*Epinephelus guttatus*)神经坏死病毒感染的先天免疫应答。Yang 等(2016)研究发现, 在石斑鱼脾脏细胞中过表达 TRIM25 可抑制病毒复制, 提高干扰素信号通路相关基因的表达水平。这些研究表明, TRIM25 在硬骨鱼对病毒感染的先天免疫应答中发挥了关键作用。在 Ross 团队开展的鲤抗疱疹病毒 QTL 研究中, 定位了 44 号染色体上的关联 SNP, 而 *trim25* 基因位于该 SNP 下游 6.5 kb, 提示 TRIM25 在鲤抗病毒免疫应答中的作用(Palaiokostas *et al*, 2018)。鲤是研究基因组进化和开展性状解析的重要模式物种, 由于鲤经历了第 4 轮全基因组复制, 多倍化的基因组具有较高的环境适应性, 基因组中多套拷贝的基因为性状的调控提供了丰富的变异来源和增加了调控的灵活性。以 *trim25* 为例, 鲤基因组中 *trim25* 的拷贝数高达 16 个。如何精确定位在抗病和免疫应答过程中具体发挥调控作用的基因拷贝, 阐述基因调控的遗传位点和作用机制, 需要进一步的精细分析。考虑到 SNP 对基因

表达的调控作用, 将 SNP 信息与基因表达结果整合分析成为性状解析的重要手段。表达数量性状基因座(expression quantitative trait loci, eQTL)分析将每个基因的表达量作为数量性状, 研究遗传突变与基因表达之间的相关性, 来寻找调控基因表达的位点及协同作用的基因, 以此来构建基因的调控网络(彭启迪, 2020)。eQTL 分析方法广泛应用于人类医学研究和动植物的性状解析, 通过分析与目的基因相关的基因组区域的表达水平(Guo *et al*, 2020; Kordas *et al*, 2019; Lowe *et al*, 2015; Nicolae *et al*, 2010; Walker *et al*, 2020), 阐明由基因变异引起表型改变的分子机制。然而, 在鱼类的性状解析中, eQTL 仍处于起步阶段, 仅在大西洋鲑(*Salmo salar*)(Aslam *et al*, 2020)、极地鱼(Jacobs *et al*, 2020)等几个物种中有少量报道。

本研究对鲤 *trim25* 基因的多个拷贝与人(*Homo sapiens*)、小鼠(*Mus musculus*)、爪蟾(*Xenopus laevis*)、原鸡(*Gallus gallus*)以及多种鱼类进行进化分析, 分析鲤 *trim25* 与几个主要模式物种的共线性。同时, 为比较鲤 *trim25* 基因各拷贝之间的差异, 对鲤 *trim25* 的 16 个拷贝进行结构分析及在多个组织中的表达研究。通过 *trim25* 的 eQTL 网络分析, 提取可能调控 *trim25* 基因表达的 SNP 位点, 旨在为今后研究鲤 *trim25* 基因的相关调控和抗病研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 TRIM25 蛋白序列的提取和比对

鲤 TRIM25 蛋白 16 个拷贝的氨基酸序列取自本课题组鲤全基因组序列和注释文件(Xu *et al*, 2019), 人、小鼠、原鸡、爪蟾、象鼻鲨(*Callorhynchus milii*)、腔棘鱼(*Latimeria chalumnae*)、红鳍东方鲀(*Takifugu rubripe*)、大黄鱼、石斑鱼、斑马鱼、金线鲃(*Sinocyclocheilus grahami*)的 TRIM25 蛋白序列通过 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>) 数据库查询获得。利用 NCBI 数据库中的 BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), 对 12 个物种的 TRIM25 氨基酸序列进行比对, 计算各物种与鲤 TRIM25 蛋白的一致性。

1.2 进化树的绘制、共线性分析和蛋白结构域预测

利用 ClustalW 对鲤、人、小鼠、鸡、爪蟾、象鼻鲨、腔棘鱼、红鳍东方鲀、斑马鱼、大黄鱼、金线鲃、石斑鱼的 TRIM25 氨基酸序列进行比对, 利用 RAxML 软件(V 7.2.8)构建进化树, 将 Bootstrap 设为 1000, 其他参数设为默认值。各物种 *trim25* 基因的共

线性数据,通过 NCBI 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)查询各物种 *trim25* 上下游基因获得。以鲤 TRIM25 的 16 个拷贝的蛋白序列为输入文件,用在线软件 SMART(<http://smart.emblheidelberg.de/>)(高进等,2016),预测鲤 TRIM25 的 16 个拷贝的蛋白结构域构成。

1.3 *trim25* 在组织中的表达和 eQTL 调控网络分析

采集 40 尾黄河鲤和 40 尾镜鲤的肝脏及脑组织,使用 RNeasy 试剂盒(Qiagen, 上海)提取 RNA,并委托测序公司利用 HiSeq2000 测序平台进行 150PE 的转录组测序。使用 Bowtie2 v2.3.4.2 和 Cufflinks 2.2.1 软件对转录组数据进行基因表达(FPKM 值)的计算,并提取每个样本中 *trim25* 的基因表达数据,采用 R 软件包 ggplot2 绘制箱式图来展示 *trim25* 的基因表达情况。从已有的鲤 SNP 变异数据集中提取对应样本的 SNP 分型数据和位置信息,结合基因表达数据和基因位置信息,利用 MatrixEqtL 软件进行顺式 eQTL 的分析,筛选标准为 $P < 10^{-5}$ 。

2 结果

2.1 鲤 TRIM25 蛋白的结构分析

蛋白结构预测显示,完整的鲤 TRIM25 蛋白包括 4 个结构域: RING、B-box、Coiled-coil 和 PRY/SPRY 结构域。其中, HHLG38G0859、HHLG11g0652、

HHLG12g0509、HHLG29g0701、HHLG3g0722 和 HHLG4g0919 这 6 个拷贝有完整的 4 个结构域; HHLG10g1061 缺少 PRY/SPRY 结构域, HHLG37g0859 缺少 Coiled-coil 结构域, HHLG13g0878、HHLG14g0181、HHLG6g0789 和 HHLG9g1073 只包含 RING 和 B-box 结构域。HHLG16g0672 只包含 RING 和 Coiled-coil 结构域, HHLG13g0902 只包含 B-box 和 Coiled-coil 结构域, HHLG46g0068 和 HHLG5g0226 只包含 RING 结构域。

2.2 *trim25* 共线性分析

为了更好地理解 *trim25* 基因在进化上的保守性,对鲤、人、小鼠、鸡、斑马鱼 5 个物种的 *trim25* 基因及其上下游基因进行了共线性分析(图 2)。由于鲤的染色体与斑马鱼存在 1:2 的映射关系,优先选择对应斑马鱼 *trim25* 基因所在染色体的鲤 11 12 号染色体上的 HHLG11g0652 和 HHLG12g05092 这 2 个拷贝来分析。从共线性图上可以看出, *trim25* 基因在进化上高度保守。*gdke* 是与 *trim25* 基因关联性最强的基因,存在于人、小鼠、鸡、斑马鱼及鲤 5 个物种。*coil* 是与人、小鼠、鸡 *trim25* 基因关联性较强的另一个基因;而 *dgke*、*rab11fip4b* 和 *utp6* 这 3 个基因均存在于斑马鱼与鲤 *trim25* 基因上下游。其中,位于鲤 12 号染色体上的 *trim25* 基因上下游的基因分布与斑马鱼完全一致;位于鲤 11 和 12 号染色体上的 *trim25* 基因的上

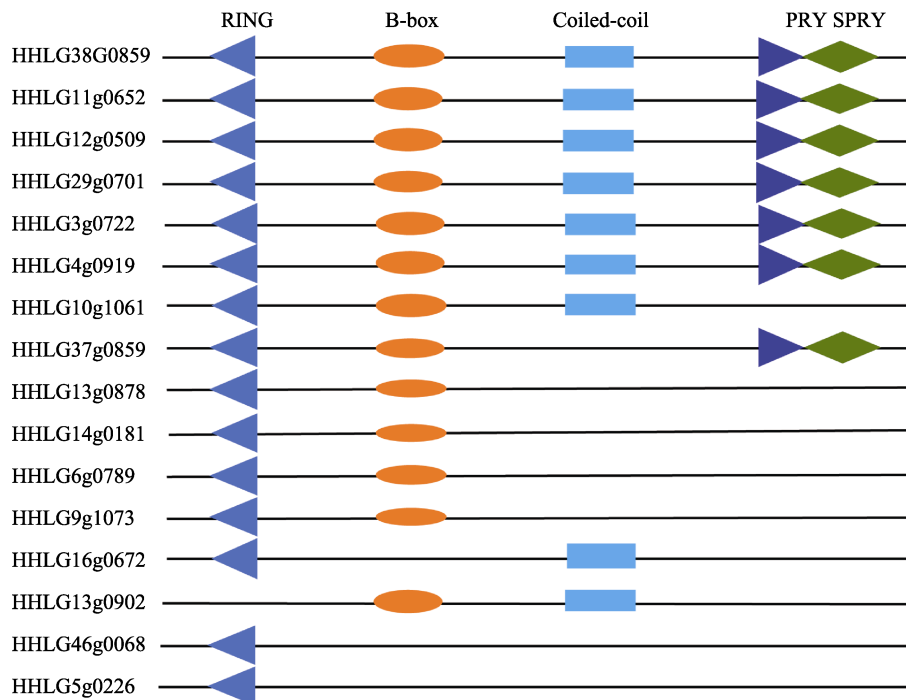


图 1 鲤 TRIM25 蛋白结构域

Fig.1 Protein domain prediction of TRIM25 in *Cyprinus carpio*

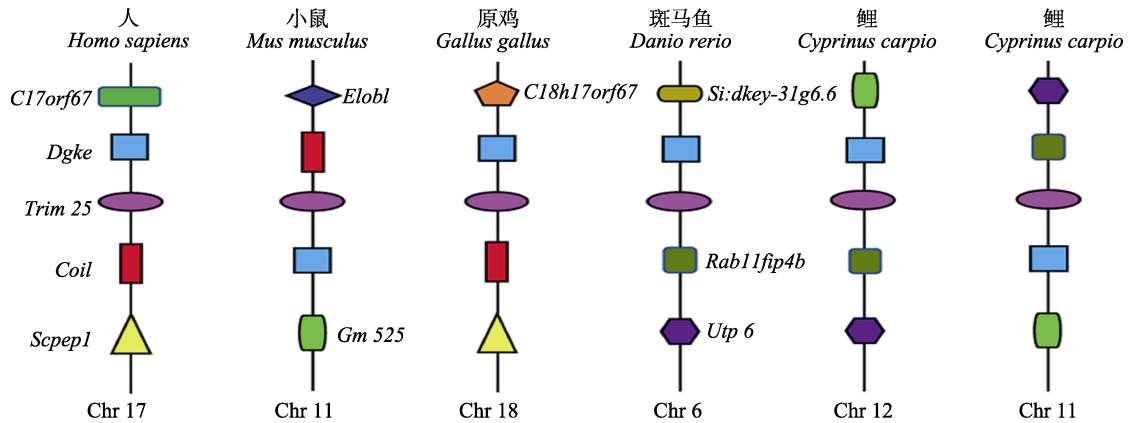


图 2 基因共线性分析

Fig.2 Synteny of genes neighboring *trim25*

下游基因构成一致，只是上下游位置完全颠倒，这可能是鲤 11 号染色体的该区域在进化过程中发生了倒位。

2.3 TRIM25 蛋白序列比对

从 NCBI 数据库中收集代表性物种(哺乳动物、两栖动物、鸟类、软骨鱼类和硬骨鱼类)的 TRIM25 蛋白氨基酸序列。由于鲤的染色体与斑马鱼存在 1:2 的映射关系，优先选择对应斑马鱼 TRIM25 所在染色体的鲤的 2 个拷贝中结构完整、氨基酸序列最长的 HHLG12g0509 蛋白与其他 11 个物种 TRIM25 蛋白进行序列比对(图 3)。鲤 16 个 TRIM25 拷贝的位置信息见表 1。12 个物种中，TRIM25 蛋白长度从 528 个氨基酸(爪蟾)到 734 个氨基酸(石斑鱼)，与鲤 TRIM25 蛋白一致性最高的是金线鲃，一致性最低的是爪蟾。

从序列比对的结果可以看出，哺乳动物中，人与小鼠 TRIM25 蛋白在 RING、B-box、Coiled-coil 和 PRY/SPRY 这 4 个结构域均高度相似，二者的主要差异在第 420~470 氨基酸之间。哺乳动物与鸡 TRIM25

蛋白在 Coiled-coil 和 PRY/SPRY 结构域高度相似，差异存在于 RING 和 B-box 结构域。腔棘鱼与象鼻鲨在 B-box 和 Coiled-coil 结构域高度相似，爪蟾 TRIM25 蛋白与其他物种相似性最低。海水鱼类中，大黄鱼与石斑鱼在 RING 结构域高度相近，红鳍东方鲀与前二者在 RING 结构域存在差异；三者的 B-box 和 Coiled-coil 结构域高度相似，但三者的 PRY/SPRY 结构域存在较大差异。鲤科鱼类中，斑马鱼、金线鲃和鲤在 RING、B-box 和 Coiled-coil 结构域高度相似；鲤与金线鲃的 PRY/SPRY 结构域高度相似，但斑马鱼的 PRY/SPRY 结构域与前二者存在差异。

2.4 TRIM25 系统进化分析

为了解析 TRIM25 在物种进化过程中的差异，构建了系统进化树(图 4)。可以看出，人与小鼠的 TRIM25 最为相近，其次是鸡。腔棘鱼作为一种原始的硬骨鱼类，其 TRIM25 也与上面 3 个物种相近。海水鱼类(大黄鱼、石斑鱼、红鳍东方鲀)单独聚为一支；鲤科鱼类中，位于鲤 11 和 12 号染色体上结构完整的

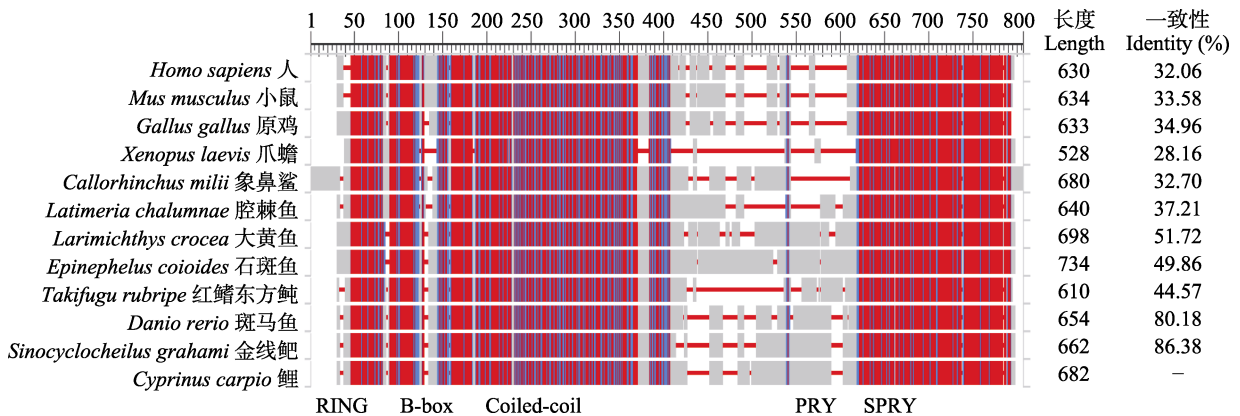


图 3 鲤 TRIM25 蛋白与其他物种的序列比对

Fig.3 Alignment of TRIM25 among *C. carpio* and other species

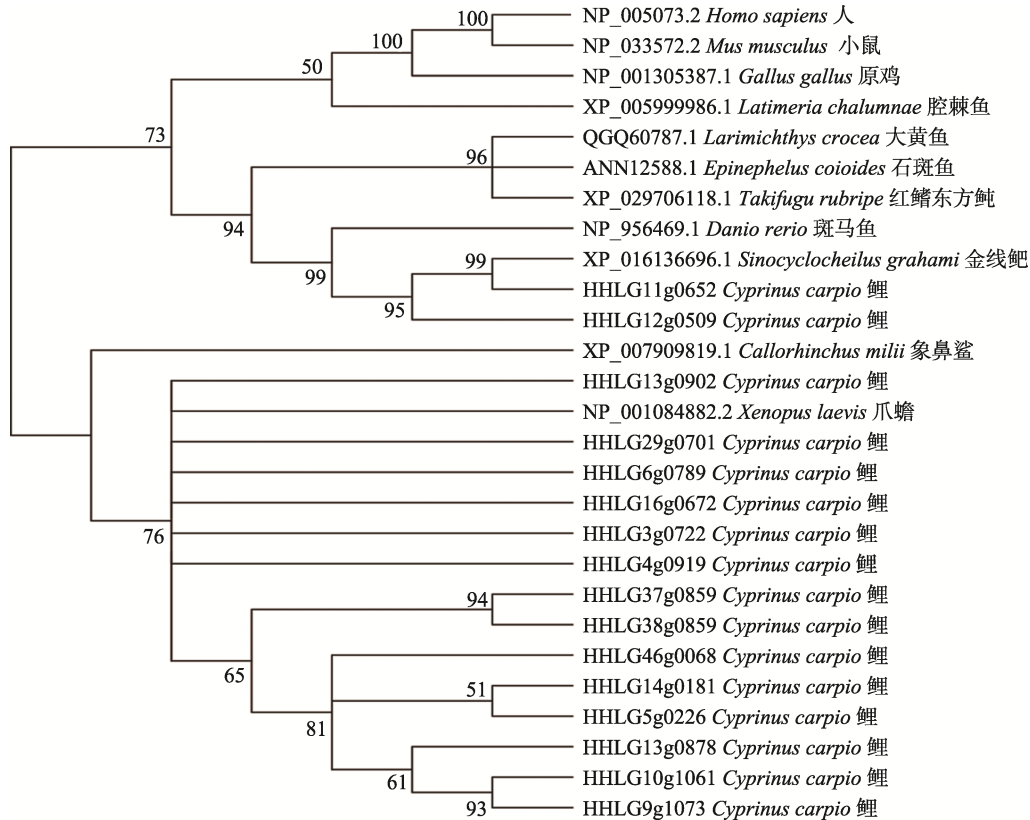


图 4 TRIM25 蛋白的系统进化树

Fig.4 Phylogenetic tree of TRIM25 proteins

表 1 鲤 *trim25* 基因位置信息Tab.1 Location information of *trim25* gene in *C. carpio*

| 基因序列 ID Gene ID | 染色体 Chromosome | 起始位置 Start | 终止位置 End |
|--------------------|-------------------|---------------|-------------|
| HHLG10g1061 | LG10 | 28 463 278 | 28 464 093 |
| HHLG11g0652 | LG11 | 19 734 938 | 19 745 074 |
| HHLG12g0509 | LG12 | 12 763 606 | 12 773 301 |
| HHLG13g0878 | LG13 | 29 994 196 | 30 002 309 |
| HHLG13g0902 | LG13 | 30 318 614 | 30 323 840 |
| HHLG14g0181 | LG14 | 5 309 992 | 5 315 952 |
| HHLG16g0672 | LG16 | 16 800 988 | 16 805 042 |
| HHLG29g0701 | LG29 | 21 206 550 | 21 212 314 |
| HHLG37g0859 | LG37 | 24 227 230 | 24 240 878 |
| HHLG38g0859 | LG38 | 24 205 967 | 24 218 593 |
| HHLG3g0722 | LG3 | 20 144 774 | 20 154 144 |
| HHLG46g0068 | LG46 | 1 324 110 | 1 324 622 |
| HHLG4g0919 | LG4 | 24 390 833 | 24 398 746 |
| HHLG5g0226 | LG5 | 6 475 495 | 6 476 125 |
| HHLG6g0789 | LG6 | 19 687 942 | 19 688 835 |
| HHLG9g1073 | LG9 | 30 777 527 | 30 780 651 |

HHLG11g0652、HHLG12g0509 拷贝与金线鲃和斑马鱼聚为一支；鲤其余的 TRIM25 拷贝与象鼻鲨和爪蟾更为相近。鲤异源四倍化过程中产生了大量的多拷贝基

因，基因的多个拷贝随着进化的压力出现了序列和结构的变化，最终导致亚功能化和去功能化。这些发生较大变异的基因拷贝，可能和其他物种聚到一起。

2.5 *trim25* 在黄河鲤及镜鲤肝脏和脑组织中的表达

在黄河鲤和镜鲤的肝脏中，表达量较高的 5 个拷贝是一致的，包括 HHLG10g1061、HHLG11g0652、HHLG12g0509、HHLG13g0878 和 HHLG16g0672。其他的 11 个拷贝在黄河鲤和镜鲤的肝脏组织中表达量极低或者几乎不表达。在黄河鲤和镜鲤的脑组织中，表达较高的 5 个拷贝相同，分别是 HHLG10g1061、HHLG11g0652、HHLG12g0509、HHLG13g0878 和 HHLG3g0722，脑组织和肝脏组织的 TRIM25 表达情况非常相似(图 5 和图 6)。

2.6 鲤 *trim25* 的调控网络分析

从课题组已构建的 eQTL 调控网络中提取出肝脏和脑组织中与 *trim25* 基因表达相关的顺式 SNP 位点。肝脏中筛选到的阳性 SNP 位点有 5 个，位于鲤第 4、6、12、13 和 37 号染色体上，分别调控 HHLG4g0919、HHLG6g0789、HHLG12g0509、HHLG13g0878 和 HHLG37g0859 这 5 个基因。脑组织中筛选到 17 个阳性位点，位于鲤第 6、11 和 13 号染色体上，其中，

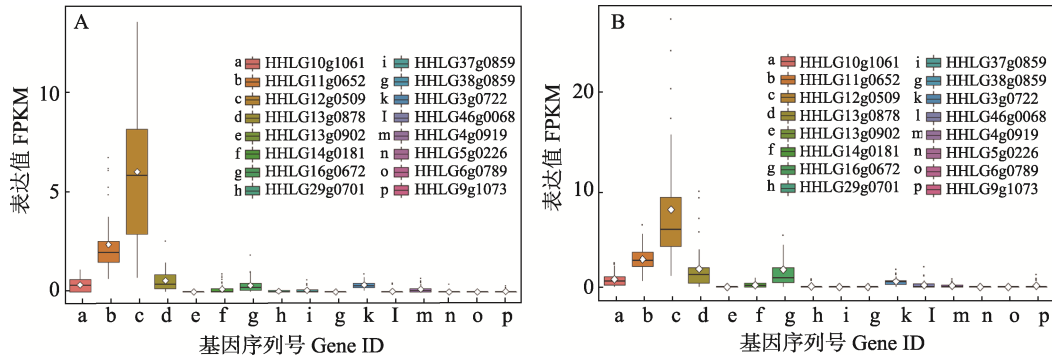


图 5 *trim25* 基因在黄河鲤(A)和镜鲤(B)肝脏组织中的表达

Fig.5 Expression of *trim25* genes of Yellow River carp (A) and Mirror carp (B) in liver tissue

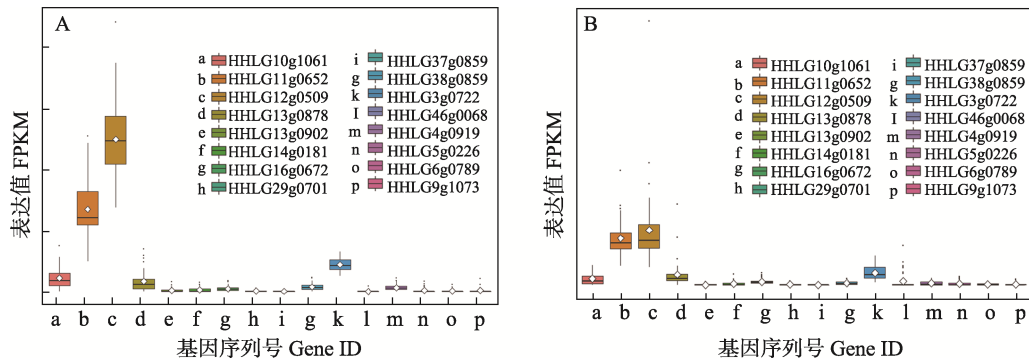


图 6 *trim25* 基因在黄河鲤(A)和镜鲤(B)脑组织中的表达

Fig.6 Expression of *trim25* genes of Yellow River carp (A) and Mirror carp (B) in brain tissue

表 2 鲤肝脏组织顺式调控 *trim25* 基因表达的 SNP

Tab.2 SNP loci in cis-regulation of *trim25* genes in liver of *C. carpio*

| 基因序列 ID Gene ID | SNP 标记 SNP ID | 相关系数 beta | P 值 P-value | FDR 校正后 FDR |
|--------------------|------------------|--------------|-----------------------|-----------------------|
| HHLG12g0509 | LG12:12157279 | 4.68 | 9.14×10^{-6} | 5.68×10^{-3} |
| HHLG13g0878 | LG13:30607588 | 1.16 | 7.52×10^{-6} | 5.06×10^{-3} |
| HHLG37g0859 | LG37:24669903 | 0.05 | 1.08×10^{-6} | 1.51×10^{-3} |
| HHLG4g0919 | LG4:23513641 | 0.18 | 9.75×10^{-6} | 5.91×10^{-3} |
| HHLG6g0789 | LG6:20084751 | 0.03 | 3.13×10^{-6} | 2.96×10^{-3} |

调控 HHLG6g0789 基因的有 1 个 SNP 位点, 调控 HHLG11g0652 基因的有 9 个 SNP 位点, 调控 HHLG13g0878 基因的有 6 个 SNP 位点, 调控 HHLG13g0902 的有 1 个 SNP 位点(表 2 和表 3)。

3 讨论

在进化过程中, 脊椎动物出现了 *trim* 基因数目的显著增加, 同时伴随着 SPRY 结构域的增加 (Sardiello *et al*, 2008)。目前, 已在人类基因组中鉴定出 75 个 *trim* 基因 (Versteeg *et al*, 2013), 在河豚基因组中发现了 66 个 *trim* 基因, 在斑马鱼基因组中鉴定出 208 个 *trim* 基因 (Boudinot *et al*, 2011), 说明 *trim*

家族数量在不同物种中的差异很大, 且与人类相比, 硬骨鱼类的 *trim* 基因家族进化速度更快。硬骨鱼类基因组中 *trim* 基因存在的多样性和丰富变异, 为 *trim* 基因家族的比较分析提供了理想的模型。鲤 TRIM25 蛋白属于 TRIM 家族第二类成员, 通过氨基酸多序列比对分析结果发现, 鲤与鲤科鱼类金线鲃、斑马鱼的 TRIM25 蛋白结构在 3 个保守结构域高度相似。鲤 12 号染色体上的 *trim25* 基因 HHLG12g0509 与斑马鱼上下游基因完全一致, *trim25* 基因下游的 2 个基因分别是 *rab11fip4b* 和 *utp6*; 上游距离 *trim25* 最近的基因是 *dgke*, *dgke* 也是哺乳动物人、小鼠、鸡、斑马鱼、鲤共有的基因; *coil* 基因是人、小鼠、鸡共有的基因。

表3 鲤脑组织顺式调控 *trim25* 基因表达的 SNP
Tab.3 SNP loci in cis-regulation of *trim25* genes in brain of *Cyprinus carpio*

| 基因序列 ID Gene ID | SNP 标记 SNP ID | 相关系数 beta | P 值 P-value | FDR 校正 FDR |
|--------------------|------------------|--------------|-----------------------|-----------------------|
| HHLG11g0652 | LG11:19043364 | -3.38 | 2.89×10^{-6} | 1.60×10^{-3} |
| HHLG11g0652 | LG11:19043382 | -3.25 | 6.61×10^{-6} | 2.75×10^{-3} |
| HHLG11g0652 | LG11:19044277 | -3.61 | 6.43×10^{-7} | 5.82×10^{-4} |
| HHLG11g0652 | LG11:19050242 | -3.22 | 7.62×10^{-6} | 3.01×10^{-3} |
| HHLG11g0652 | LG11:19221844 | 2.74 | 8.09×10^{-7} | 6.80×10^{-4} |
| HHLG11g0652 | LG11:20221841 | -3.25 | 6.67×10^{-6} | 2.76×10^{-3} |
| HHLG11g0652 | LG11:20262339 | 3.33 | 6.05×10^{-6} | 2.59×10^{-3} |
| HHLG11g0652 | LG11:20429556 | -3.44 | 1.78×10^{-6} | 1.16×10^{-3} |
| HHLG11g0652 | LG11:20548776 | -3.26 | 6.62×10^{-6} | 2.75×10^{-3} |
| HHLG13g0878 | LG13:29061261 | 2.01 | 9.81×10^{-6} | 3.54×10^{-3} |
| HHLG13g0878 | LG13:29111379 | 2.06 | 5.87×10^{-6} | 2.54×10^{-3} |
| HHLG13g0878 | LG13:29430220 | 2.04 | 3.28×10^{-6} | 1.74×10^{-3} |
| HHLG13g0878 | LG13:29906806 | 1.74 | 1.82×10^{-6} | 1.18×10^{-3} |
| HHLG13g0878 | LG13:30254648 | 2.62 | 3.35×10^{-6} | 1.76×10^{-3} |
| HHLG13g0878 | LG13:30810530 | 3.21 | 6.15×10^{-7} | 5.64×10^{-4} |
| HHLG13g0902 | LG13:29851998 | 0.18 | 5.11×10^{-6} | 2.32×10^{-3} |
| HHLG6g0789 | LG6:20260054 | 0.33 | 1.10×10^{-8} | 3.32×10^{-5} |

共线性的结果体现了硬骨鱼类与高等动物之间的进化差异,以及鲤在经历第4轮全基因组复制后,基因多样性有所增加。相对于鲤科其他二倍体鱼类,鲤经历了额外一轮全基因组复制,形成了四倍化的基因组,在基因组复制及之后的漫长进化过程中,基因组的许多区域产生大量的结构变异,如倒位、易位、插入、缺失等,类似鲤11号染色体的倒位现象大量存在。

本研究鉴定了鲤 TRIM25 蛋白有16个拷贝之多,这可能是进化过程中,由于环境压力导致的 *trim* 基因家族的扩张。此外,研究表明, *trim* 基因家族的扩展与先天免疫及适应性免疫的进化惊人得平行,这表明 TRIM 蛋白可能在日益复杂的免疫功能中发挥核心调节因子的作用(Malfavon-Borja *et al*, 2013; Versteeg *et al*, 2014)。在鲤 TRIM25 的16个拷贝中,有6个拷贝具有完整的结构域,而另外10个拷贝虽然具有 TRIM25 的部分结构域,但并不完整,这可能由于进化过程中发生了基因的亚功能化或去功能化。

为了精细定位鱼类抗病毒性状相关的基因和通路,高通量分子标记的采集和大样本的表型分析是非常必要的。对于鲤这样经历了第4轮全基因组复制的异源四倍化物种,许多基因发生了扩增和结构变异,增加了性状精准定位的难度。在 Ross 团队发表的鲤抗疱疹病毒 QTL 研究中,初步定位到 *trim25* 基因

(Palaiokostas *et al*, 2018),但由于其研究采用了旧版本参考基因组,装配和注释结果不够准确,因此,并未精确解析该基因的多拷贝的差异。本研究基于高质量的新版本基因组开展了鲤 *trim25* 基于多个拷贝的筛选和分析,为了解析 *trim25* 基因的调控机制,还开展了 eQTL 分析。eQTL 是 Jansen 等(2001)提出的将全基因组中每个基因的表达量作为数量性状,对其进行 QTL 定位分析的方法。eQTL 分析填补了基因型和表型之间的空白(Kim *et al*, 2012),与全基因组关联研究(GWAS)和差异表达分析的整合研究已经广泛应用于人类疾病研究和动植物育种研究(Joehanes *et al*, 2017; Nieuwenhuis *et al*, 2016; Pavlides *et al*, 2016), eQTL 分析新统计方法和软件的开发加速了该领域的进展(Zhu *et al*, 2016)。本研究鉴定了肝脏组织中多个调控位点,表明了肝脏与免疫功能的密切相关(Huang *et al*, 2013; Lee *et al*, 2010)。根据鲤的 TRIM25 在脑和肝脏组织的表达分析及 eQTL 分析结果,初步筛选了候选的调控位点,对于目前处于起步阶段的鲤抗病毒 QTL 和 GWAS 研究有重要的提示作用。

本研究初步定位了鲤 *trim25* 基因的多个拷贝,比较了鲤与其他物种的 *trim25* 序列差异、进化关系和共线性相似度,揭示了鲤 *trim25* 各拷贝之间的结构多样性和在组织中表达的分化情况,筛选了可能调控 *trim25* 基因表达的顺时调控位点,为今后鲤 *trim25*

的基因功能精细研究奠定了基础,也为鱼类抗病研究和育种提供了重要参考。

参 考 文 献

- ASLAM M L, ROBLEDO D, KRASNOV A, *et al.* Quantitative trait loci and genes associated with salmonid alphavirus load in Atlantic salmon: Implications for pancreas disease resistance and tolerance. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 10393
- BOUDINOT P, VAN DER AA LM, JOUNEAU L, *et al.* Origin and evolution of TRIM proteins: New insights from the complete TRIM repertoire of zebrafish and pufferfish. *PLoS One*, 2011, 6(7): e22022
- GAO J, MA J L, LIU Y, *et al.* Bioinformatics analysis of sox gene family in *Cynoglossus semilaevis*. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(2): 41–48 [高进, 马佳璐, 刘洋, 等. 半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*) Sox 基因家族生物信息学分析. *渔业科学进展*, 2016, 37(2): 41–48]
- GUO J, CAO K, DENG C, *et al.* An integrated peach genome structural variation map uncovers genes associated with fruit traits. *Genome Biology*, 2020, 21(1): 258
- HUANG L R, WOHLLEBER D, REISINGER F, *et al.* Intrahepatic myeloid-cell aggregates enable local proliferation of CD8(+) T cells and successful immunotherapy against chronic viral liver infection. *Nature Immunology*, 2013, 14(6): 574–583
- JACOBS A, CARRUTHERS M, YURCHENKO A, *et al.* Parallelism in eco-morphology and gene expression despite variable evolutionary and genomic backgrounds in a Holarctic fish. *PLoS Genetics*, 2020, 16(4): e1008658
- JANSEN R C, NAP J P. Genetical genomics: The added value from segregation. *Trends in Genetics*, 2001, 17(7): 388–391
- JIN Y, JIA K, ZHANG W, *et al.* Zebrafish TRIM25 promotes innate immune response to RGNNV infection by targeting 2CARD and RD regions of RIG-I for K63-linked ubiquitination. *Frontiers in Immunology*, 2019, 10: 2805
- JOEHANES R, ZHANG X, HUAN T, *et al.* Integrated genome-wide analysis of expression quantitative trait loci aids interpretation of genomic association studies. *Genome Biology*, 2017, 18(1): 16
- KIM Y A, PRZYTYCKA T M. Bridging the gap between genotype and phenotype via network approaches. *Frontiers in Genetics*, 2012, 3: 227
- KORDAS G, RUDRA P, HENDRICKS A, *et al.* Insight into genetic regulation of miRNA in mouse brain. *BMC Genomics*, 2019, 20(1): 849
- LEE W Y, MORIARTY T J, WONG C H, *et al.* An intravascular immune response to *Borrelia burgdorferi* involves Kupffer cells and iNKT cells. *Nature Immunology*, 2010, 11(4): 295–302
- LOWE W L Jr, REDDY T E. Genomic approaches for understanding the genetics of complex disease. *Genome Research*, 2015, 25(10): 1432–1441
- MALFAVON-BORJA R, SAWYER S L, WU L I, *et al.* An evolutionary screen highlights canonical and noncanonical candidate antiviral genes within the primate TRIM gene family. *Genome Biology and Evolution*, 2013, 5(11): 2141–2154
- MANOKARAN G, FINOL E, WANG C, *et al.* Dengue subgenomic RNA binds TRIM25 to inhibit interferon expression for epidemiological fitness. *Science*, 2015, 350(6257): 217–221
- MICALE L, CHAIGNAT E, FUSCO C, *et al.* The tripartite motif: Structure and function. 2016, 770: 11–25
- NICOLAE DL, GAMAZON E, ZHANG W, *et al.* Trait-associated SNPs are more likely to be eQTLs: Annotation to enhance discovery from GWAS. *PLoS Genetics*, 2010, 6(4): e1000888
- NIEUWENHUIS M A, SIEDLINSKI M, VAN DEN BERGE M, *et al.* Combining genomewide association study and lung eQTL analysis provides evidence for novel genes associated with asthma. *Allergy*, 2016, 71(12): 1712–1720
- PALAIOKOSTAS C, ROBLEDO D, VESELY T, *et al.* Mapping and sequencing of a significant quantitative trait locus affecting resistance to koi herpesvirus in common carp. *G3 (Bethesda)*, 2018, 8(11): 3507–3513
- PAVLIDES J M, ZHU Z, GRATTEEN J, *et al.* Predicting gene targets from integrative analyses of summary data from GWAS and eQTL studies for 28 human complex traits. *Genome Medicine*, 2016, 8(1): 84
- PENG Q D. Method for constructing and analyzing biological network based on eQTL data. Master's Thesis of Harbin Institute of Technology, 2020 [彭启迪. 基于 eQTL 数据的生物网络构建与分析方法. 哈尔滨工业大学硕士学位论文, 2020]
- SARDIELLO M, CAIRO S, FONTANELLA B, *et al.* Genomic analysis of the TRIM family reveals two groups of genes with distinct evolutionary properties. *BMC Evolutionary Biology*, 2008, 8: 225
- TOCCHINI C, CIOSK R. TRIM-NHL proteins in development and disease. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 2015, 47–48: 52–59
- VERSTEEG G A, BENKE S, GARCÍA-SASTRE A, *et al.* InTRIMsic immunity: Positive and negative regulation of immune signaling by tripartite motif proteins. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 2014, 25(5): 563–576
- VERSTEEG G A, RAJSBAUM R, SÁNCHEZ-APARICIO M T, *et al.* The E3-ligase TRIM family of proteins regulates signaling pathways triggered by innate immune pattern-recognition receptors. *Immunity*, 2013, 38(2): 384–398
- WALKER R L, RAMASWAMI G, HARTL C, *et al.* Genetic control of expression and splicing in developing human brain informs disease mechanisms. *Cell*, 2020, 181(2): 484

- XU P, XU J, LIU G, *et al.* The allotetraploid origin and asymmetrical genome evolution of the common carp *Cyprinus carpio*. *Nature communications*, 2019, 10(1): 4625
- YANG Y, HUANG Y, YU Y, *et al.* RING domain is essential for the antiviral activity of TRIM25 from orange spotted grouper. *Fish and Shellfish Immunology*, 2016, 55: 304–314
- ZHOU Z Z, JING F, WEI K, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of TRIM25 gene in *Larimichthys crocea*. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2019, 43(6): 1189–1196 [周真真, 景斐, 魏可, 等. 大黄鱼 TRIM25 基因克隆和表达分析. *水生生物学报*, 2019, 43(6): 1189–1196]
- ZHU Z, ZHANG F, HU H, *et al.* Integration of summary data from GWAS and eQTL studies predicts complex trait gene targets. *Nature Genetics*, 2016, 48(5): 481–487

(编辑 冯小花)

Gene Evolution and Expression Regulation of Multiple Copies of *trim25* in Common Carp, *Cyprinus carpio*

ZHU Youxiu^{1,2}, JIANG Yanliang², ZHANG Qin³, FENG Jianxin³,
ZHANG Hanyuan², WU Biyin^{1,2}, XU Jian^{2①}

(1. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Key Laboratory of Aquatic Genomics, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Beijing Key Laboratory of Fishery Biotechnology, Chinese Academy of Fishery Sciences, Beijing 100141, China; 3. Henan Academy of Fishery Sciences, Zhengzhou, Henan 450044, China)

Abstract The innate immune system is the main defense against viral infections in teleost fish. As an important part of the innate immune system, the TRIM protein family participates in the regulation of the immune network during virus infection. Among such proteins, TRIM25 has been reported to play an important role in the immune response of many types of fish. In this study, 16 copies of the *trim25* gene in common carp (*Cyprinus carpio*) were compared with those of other species by phylogenetic and syntenic analyses. Functional domain structures for 16 copies of the TRIM25 protein were predicted, and the expression and cis-regulatory network in tissues for each gene copy were compared. Sequence alignment and phylogenetic analysis showed that the TRIM25 protein structure of *C. carpio* was highly similar to that of *Sinocyclocheilus grahami* and *Danio rerio*, but distinct from that of other species beyond Cyprinidae. The results of gene synteny indicated that the upstream and downstream genes of *trim25* were relatively conserved in the evolution of different species. Structural analysis of TRIM25 showed that six of the sixteen copies in *C. carpio* had complete functional domains; five of these copies were highly expressed in liver and brain tissue. In the expression quantitative trait loci (eQTL) regulatory network for *trim25*, 5 and 17 SNPs were determined to regulate *trim25* expression in liver and brain tissue, respectively. In this study, the sequence differences of multiple copies of *trim25* in common carp were compared, and the evolutionary relationship and synteny of *trim25* were identified. The diversity of the structure and tissue expression of *trim25* genes in the common carp were revealed, and the SNP sites that may regulate *trim25* gene expression were identified, providing a reference for future research on *trim25* related regulation and disease resistance in the *C. carpio*.

Key words *Cyprinus carpio*; TRIM25; Protein structure; Phylogenetic tree; eQTL

① Corresponding author: XU Jian, E-mail: xuj@cafs.ac.cn