



半滑舌鲷 *lnc-XR_003049606.1* 及其靶基因 *pmelb* 在无眼侧皮肤黑化过程中的表达

胡元日^{1,2,3,4}, 杨倩^{1,2,3}, 王佳林^{1,2,3}, 李仰真^{1,2,3}, 许岩岩⁴,
崔忠凯^{1,2,3}, 程鹏^{1,2,3}, 陈松林^{1,2,3*}

(1. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;

2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室, 山东青岛 266071;

3. 山东省海洋渔业生物技术与遗传育种重点实验室, 山东青岛 266071;

4. 唐山市农业科学研究院, 河北唐山 063021)

摘要: 为探究人工养殖半滑舌鲷无眼侧皮肤经常出现黑化现象的成因, 实验根据本课题组前期全转录组数据分析结果预测得出 *lnc-XR_003049606.1* 与 *pmelb* 在基因层面上存在反式调控的关系。在半滑舌鲷无眼侧黑化皮肤中克隆获得 *pmelb* 的 cDNA 序列。生物信息学分析结果显示, *pmelb* 的 cDNA 序列全长 1 755 bp, 编码 584 个氨基酸, 其预测的蛋白分子量为 63.94 ku, 理论等电点为 5.12, 预测的二级蛋白结构含有 1 个 Pleckstrin 同源域、1 个布鲁顿酪氨酸激酶富胱氨酸基序、1 个 Src 同源 3 域、1 个 Src 同源 2 域和 1 个酪氨酸激酶催化结构域。系统进化树分析显示, *pmelb* 与其他鱼类对应的基因聚为一支。氨基酸同源性分析显示, 半滑舌鲷的 *pmelb* 与大菱鲆和牙鲆的相似性最高(分别为 68.05% 和 66.28%)。分别通过分析半滑舌鲷 *lnc-XR_003049606.1* 和 *pmelb* 的表达分析发现, *lnc-XR_003049606.1* 在 1 龄半滑舌鲷的皮肤和肝脏中表达, 皮肤中表达量在 60 d 达到顶峰, 随着时间延长而降低; 而 *pmelb* 则主要在皮肤中表达, 表达量在时间线上先升高再降低。本研究初步探究了 *lnc-XR_003049606.1* 和 *pmelb* 间的表达关系, 为进一步筛选半滑舌鲷无眼侧黑化过程中起作用的关键基因提供了思路。

关键词: 半滑舌鲷; *lncRNA*; *pmelb*; 体色; 黑化

中图分类号: S 965.3

文献标志码: A

半滑舌鲷 (*Cynoglossus semilaevis*) 是我国黄渤海地区分布的一种珍贵经济鱼类^[1]。自 20 世纪 90 年代, 由于过度捕捞, 半滑舌鲷的野生资源逐渐枯竭, 随后 2003 年开始实现工厂化养殖。随着集约化养殖的发展, 人工养殖的半滑舌鲷无眼侧

皮肤经常出现黑化现象, 而正常情况下无眼侧皮肤为白色。由于体色异常的问题, 黑化个体价格较正常个体低 20~30 元/kg, 严重影响了半滑舌鲷的经济效益^[2]。本实验室前期对半滑舌鲷无眼侧黑化个体无眼侧正常皮肤和黑化皮肤进行了全转

收稿日期: 2021-11-15 修回日期: 2021-12-15

资助项目: 国家自然科学基金(31702333); 中国水产科学研究院创新团队项目(2020TD20); 国家现代农业产业技术体系专项(CARS-47-G03); 山东省泰山学者攀登计划项目; 中国水产科学研究院基本科研业务费专项(2020XT0101)

第一作者: 胡元日(照片), 从事鱼类遗传育种研究, E-mail: 13414950418@163.com

通信作者: 陈松林, 从事鱼类基因资源发掘和抗病分子育种研究, E-mail: chensl@ysfri.ac.cn



录组测序 (NCBI BioProject ID: PRJNA760350), 发现 XR_003049606.1 (lnc-XR_003049606.1) 在半滑舌鳎无眼侧黑化皮肤和正常皮肤中差异表达, 根据反式调控的原理预测得到其靶基因 *pmelb*。

lncRNA 是一类长度超过 200 bp 且无编码蛋白能力的 RNA。越来越多研究表明 lncRNA 通过参与表观遗传、转录和转录后水平的基因表达调控生物生殖、胚胎发育、性别分化、免疫和代谢^[3]。根据转录 lncRNA 的 DNA 序列与靶基因的位置, lncRNA 调控作用可以分为顺式作用 (cis-acting) 和反式作用 (trans-acting)^[4]。lncRNA 顺式作用调控指的是同一染色体上的 lncRNA 以序列互补形式结合解链的 DNA 或未解链的染色质, 从而影响临近 mRNA 的一种转录调控方式; lncRNA 反式作用调控指的是 lncRNA 可以跨越染色体以结合增强子或者启动子的形式调控基因表达的方式^[5]。例如在猪 (*Sus scrofa domestica*) 骨骼肌中, lnc-ADAMTS9 通过顺式作用调控邻近基因 *ADAMTS9* 从而影响肌管的形成^[6]; 在小鼠 (*Mus musculus*) 中, lncRNA-H19 通过反式调控作用促进骨骼肌分化与再生^[7]。

前黑素小体蛋白 (premelanosome protein, PMEL) 是一种色素细胞特异性蛋白, 负责色素细胞器 (黑素体) 内纤维的形成^[8], 在脊椎动物色素沉着方面发挥着重要作用, 并且与黑素小体的成熟关系密切^[9]。*pmelb* 在部分脊椎动物上已经被证明其与动物的黑色素形成有关。例如, *pmelb* 发生错义突变可以导致马 (*Equus caballus*) 的毛色发生白化^[10]; *pmelb* 的缺失会导致斑马鱼 (*Danio rerio*) 黑素小体发生缺陷以及视觉系统衰退^[11]; 牛 (*Bos taurus*) 的 *pmelb* 突变会改变黑色素沉着, 导致毛色变淡^[9]。但是目前 *pmelb* 在半滑舌鳎上尚未有相关报道。

本实验从转录组数据中筛选出在半滑舌鳎无眼侧黑化皮肤和正常皮肤中差异表达的 lnc-XR_003049606.1, 根据反式作用原理预测到其靶基因是 *pmelb*, 然后对 lnc-XR_003049606.1 及其靶基因进行了表达分析, 初步确定了二者表达量之间的关系, 最后对其靶基因进行克隆和编码蛋白预测分析, 为进一步筛选半滑舌鳎无眼侧黑化过程起关键作用的关键基因提供了思路。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用的半滑舌鳎均取自唐山市维卓水产

养殖有限公司, 分别取 3 尾 1 龄鱼正常个体与黑化个体的脑、肝脏、肾脏、有眼侧皮肤、无眼侧正常皮肤和无眼侧黑化皮肤等组织。另外, 分别取 3 尾不同时期 (60、90、120 和 360 d) 无眼侧正常皮肤和黑化皮肤。上述样品一经采集立即置于液氮中速冻, 随后放置于 -80 °C 超低温冰箱中保存备用。

1.2 总 RNA 的提取和 cDNA 的合成

采用 TRIzol (Invitrogen) 法对上述半滑舌鳎的各组织进行 RNA 提取, 随后用琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性, 并且使用超微量紫外分光光度计 NanoDrop One 检测其纯度与浓度。使用 cDNA 反转录试剂盒将符合质量的 RNA 反转录为 cDNA。

1.3 半滑舌鳎 *pmelb* cDNA 的克隆

根据 NCBI 的 GenBank 数据库中半滑舌鳎 *pmelb* 提供的预测序列, 使用 Primer Premier 5.0 软件设计引物。以半滑舌鳎无眼侧黑化皮肤 cDNA 为模板进行 PCR 扩增验证。PCR 反应体系: ExTaq (TaKaRa) Mix 25 μ L, 上游引物 1 μ L, 下游引物 1 μ L, ddH₂O 21 μ L, 模板 cDNA 2 μ L; 反应程序: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 150 s, 38 个循环; 72 °C 延伸 7 min, 4 °C 保存。PCR 产物利用胶回收试剂盒 (南京诺唯赞生物科技有限公司) 回收纯化, 并连接到 Trans-T1 载体上进行后续克隆实验。最后经过挑选, 阳性克隆送至北京睿博兴科生物科技有限公司进行测序。

1.4 *pmelb* 序列分析

利用 DNASTAR 5.0.1 软件对 *pmelb* 序列进行拼接, 获得其 cDNA 序列并查找其开放阅读框 (ORF) 和氨基酸序列。通过 ClustalX2 软件和 NCBI 数据库中的 Primer-BLAST 功能进行物种之间的序列比对。利用在线工具 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 预测 PEMLB 的蛋白结构域。最后用 MEGA 11.0 软件构建系统进化树 (<https://www.megasoftware.net/>)。

1.5 实时荧光定量 PCR (qPCR) 分析

根据转录组获得的序列数据以及 NCBI 数据库设计 lnc-XR_003049606.1 和 *pmelb* 的荧光定量引物 (表 1) 进行 qPCR 表达分析, 以 β -actin 为内参基因。qPCR 反应在 QuanStudio™ 3 定量 PCR 仪上进行。按照 TB Green® Premix Ex Taq™ (Tli RNase

表 1 引物序列

Tab. 1 Sequence of primers

引物名称 primers	序列 (5'-3') sequences (5'-3')	用途 utilization
<i>pmelb</i> -1F	GGGCTGAGCTGACGATGT	克隆
<i>pmelb</i> -1R	ATGGTGACCGCAAATGGGA	克隆
<i>pmelb</i> -2F	TCTACCCTACCAGCAGCAGA	克隆
<i>pmelb</i> -2R	TGCCCTCAAACACGTCTATGC	克隆
<i>pmelb</i> -3F	GTCAGGCCACCACTCCT	克隆
<i>pmelb</i> -3R	TCTCCTCAGAAGCTTAGAGAGAAC	克隆
<i>pmelb</i> -4F	GGGATACTGCCATATTCCTGCA	克隆
<i>pmelb</i> -4R	CATGTGGGTGGTTCGAAAAGATGA	克隆
<i>pmelb</i> -QF	GGAGGAATACTGATGACAACG	qRT-PCR
<i>pmelb</i> -QR	CACCACTCTGGACCCTTT	qRT-PCR
<i>lncRNA</i> - QF	GGAGAGCTTGTCAATTTCTTGTG	qRT-PCR
<i>lncRNA</i> - QR	TCACTGTTTCATCGTTCGTTAAC	qRT-PCR
β -actin-F	TTCCAGCCTTCCTTCCTT	qRT-PCR
β -actin-R	TACCTCCAGACAGCACAG	qRT-PCR

seH Plus) ROX Bulk (TaKaRa) 说明书配成 20 μ L 反应体系, 扩增程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 共 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算基因相对表达量, 表达量用平均值 \pm 标准差表示。使用 R 语言 (R version 4.1.1) 进行单因素方差分析和独立性 *t* 检验分析, 显著水平标准设定为 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 *pmelb* 的 cDNA 序列和编码蛋白序列分析

pmelb 的 cDNA 序列编码序列 (CDS) 区长度为 1 755 bp, 编码 584 个氨基酸 (图 1)。该预测蛋

```

1      gggctgagctgacgATGTGGACTCCTGCTGTTCTACTCCTGCTGCTCCTGCTACTGCTGGGGTTCGTTTCACACA
1      M W T P A V L L L L L L L L L L G V V S H
76     CTGTGGCAAGGCCAAAACCCAGTTCATCCGTTATCCATCATGGAACACCAAGATGTATCCAGTCTGGAAAGATG
25     T V A R P K T Q F I R Y P S W N T K M Y P V W K D
151    GAGATCCACGGTACAAAGACTCCTGGAAGGTGGAAGGTGTCTTTAATGTAGGCAATGACTCACCCACTCTGA
50     G D P R Y K D S W K G G K V S F N V G N D S P T L
226    CTGGAGCCAAAGTTCAGTTCACCATAGAAAATAGAGTATCCACACACAGAGGGTGCAGCCTGGTGGAGAGGTGG
75     T G A K V T F T I E I E Y P H N Q R V Q P G G E V
301    TTTGGGCCGAAGACTGCATCATCAACGGAACAAAATACCACAAGTCTGAGCCAGTTTATCCAGCCCAGCCCACGG
100    V W A E D C I I N G T K Y H K S E P V Y P A Q P T
376    AGTGGGAGGCTGATTTTCTGATGGAACCAATTATAAAGGACCAGAAGCCGGATTATGTTTTTGTCTGGAAAA
125    E W E A D F P D G T P I I K D Q K P D Y V F V W K
451    CCCGGGTCAGTACTGGCAGGTGGAGGATGGCCCTCCTCCTCTGACCATTGGTACAGATGACATCCCCTG
150    T R G Q Y W Q V E D G P S S S L T I G T D D I P L
526    GCTCCTACACCATGGACGTAGTTCATCTACCCTACCCGAGCAGACAGAAGTTCATTCCTCTGGGATATGCCTCTG
175    G S Y T M D V V I Y H Y R S R Q K F I P L G Y A S
601    CACAGTTTCCATCACAGATCAAATCCCATTTGCGGTCCACCATGGACCAAGTCAACGACGACGAGCAGCAGAGACC
200    A Q F S I T D Q I P F A V T M D Q V N D V A A G D
676    TGGCCTTCACTCCAGAACAGGGCTATCGCTTTCACCGTCCGCTCCATGACCCAGCGACTACCTCAGTATGCAG
225    L R F I Q N R A I A F T V A L H D P S D A Y
751    ACATTACCTCAACTGGGACTTTGCAGATGGGAGTGGTGCCTCATATCCAGAGAGCTGACTGTCACCTCACACCT
250    D I T F N W D F A D G S G A L I S R E L T V T H T
826    ACGTCAGCTCTGGAACCTTCAAACCTAAAGTAAATGATCCAGGCTGCATCCCTGACAAGGCCTGTAATCCTACAG
275    Y V S S G T F K P K V M I Q A V I P D K A C N P T
901    CTGTGCTCCAAACAGGGCTCCGAATCCACATCAGGACCAGGACATCACAGTCAAACCTGTGGTCTCCACCCAGG
300    A A A P T R A P N P H Q D Q D I T V K P V V S T Q
976    CGACTGACCTCCATGTAATAGTGTGACATCAGACACAGAGGAGGACACTGCTGGAGGTGAAGCCCCACCGCT
325    A T D L H V I V S T S D T E E D T A G G E A P T A
1051   CCACCTCTCAGTTTGTCCAGGCCACCACTCCTCCTGTCATATACCAGATGACGTTGATGACGAGCAGCTC
350    S T S Q F V Q A T T P P P V H I P D D V D A G R A
1126   CAGGGGTGAAGGTGTGTCAGGAGGAATACTGATGACACGACTGCGTGATTACCGTTACGGCTCCTTCTGTACCA
375    P G V K V V R R N T D D N D C V I Y R Y G S F C T
1201   GCATAGACGTGTTTGGAGGCATCGAAACGGTGGCGTCAAACAAAATAGACAAAACCTGTGTGACAACACAGAAA
400    S I D V F E G I E T V A V K Q I D K P V L T T T E
1276   AGGGTTCAAGAGTGGTGGATATCACAGTACCTGCCAGGGAAGTCTTCTAAGGAGGTGTGACGTGTGATTCTGG
425    K G S R V V D I T V T C Q G S L P K E V C S V I L
1351   ATGCCGAGTGTTTAACTCCGATTCACACCGAGTGCAACGTGGTGGAGCCTTCTGTGGAGTGTGACGCTGGTCTCC
450    D A E C L T P I H T E C N V V E P S V E C Q L V L
1426   GTCACCTTCAATGACTCCGGTGTCTACTGATCAACGTGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTC
475    R H F F N D S G V Y C I N V S M S N D V S L G R T
1501   GTGCCAAAGTCCACATAGAGATGGGTCCAGGTGTTTCTCCTCAGGTGCCATTGCTCTGTACTGGGTGCTCCTGG
500    S A K V H I E M G P G V S S S G A I A L L G V L
1576   TGTTTGCTCTGGTGGTAGGATACTGCCATATTCCTGCAGACATTTGAAGTCTACGGACCTCTGAGGAGGACG
525    V F A L V V G I L P Y S C R H L K S Y G P L K E D
1651   GCCTTTTCTCTGGAGACCAGAAGCTCAGCCAGGCTCAGAGATCTTCAGTCTCTAAGCTTCTGAGGAGACCCG
550    G L F S G D Q K L S A Q R S S V L S K L R R P
1726   GGGTCATGGATGACGGTCTCTGCTGCAGCAGAAGCCGGTGTGAgcctgaatctggtgctcatctttcgaccac
575    G V M D D G P L L Q Q K P V *
1801   ccacatg

```

图 1 半滑舌鲷 *pmelb* 的 cDNA 序列和推测氨基酸序列

ATG 为起始密码子, “*”为终止密码子

Fig. 1 cDNA sequence and deduced amino acid sequence of the *pmelb* gene of *C. semilaevis*

ATG is the start codon, “*” is the stop codon

白的分子量为 63.94 ku, 理论等电点为 5.12。通过在线网站 SMART (<https://smart.embl-heidelberg.de/>) 分析氨基酸序列, 发现 PMELB 二级结构中含

有 1 个 Pleckstrin 同源域、1 个布鲁顿酪氨酸激酶富胱氨酸基序、1 个 Src 同源 3 域、1 个 Src 同源 2 域和 1 个酪氨酸激酶催化结构域 (图 2)。

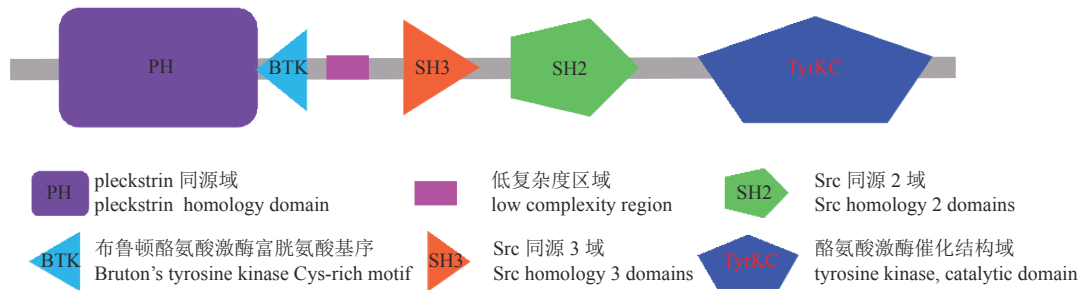


图 2 SMART 预测半滑舌鲷 PMELB 蛋白质结构

Fig. 2 SMART predicted PMELB protein structure of *C. semilaevis*

2.2 同源性比较与系统发育树

通过 NCBI 在线网站 BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 功能将半滑舌鲷 PMELB 的蛋白序列与牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*)、大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*)、斑马鱼、人 (*Homo sapiens*) 和小鼠等物种进行同源性比较, 结果显示, 半滑舌鲷与大菱鲆的相似度最高 (68.05%); 其次是与牙鲆, 相似度为 66.28% (表 2)。

系统进化树显示, 半滑舌鲷 PMELB 先与同为比目鱼类的牙鲆和大菱鲆以及鲈形目 (Perciformes) 的尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*)、大黄鱼 (*Larimichthys crocea*)、棘头梅童鱼 (*Collichthys lucidus*) 聚为一支, 再与虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)、斑马鱼聚为一大分支, 与人、小鼠、鸡 (*Gallus gallus*)、热带爪蟾 (*Xenopus tropicalis*) 同源性低而分离 (图 3)。

2.3 lnc-XR_003049606.1 与 pmelb 各组织差异表达

1 龄半滑舌鲷 4 个组织中的 lnc-XR_003049606.1 的 qPCR 结果显示, lnc-XR_003049606.1 在肝脏组织中的表达量最高, 其次是皮肤、脑和肾脏。其中该 lncRNA 表达量在肝脏、皮肤、肾脏中存在显著差异 ($P < 0.05$), 而在脑中的表达量不存在显著差异 (图 4-a)。

1 龄半滑舌鲷 4 个组织中 pmelb 的 qPCR 结果显示, pmelb 在皮肤组织中的表达量最高。而 pmelb 表达模式类似于 lnc-XR_003049606.1, 其表达量在肝脏、皮肤、肾脏中存在显著差异 ($P <$

表 2 半滑舌鲷 PMELB 氨基酸序列与其他物种同源性比较

Tab. 2 Comparison of homology between PMELB amino acid sequences between tongue sole and other species

物种 species	序列登记号 accession	PMELB 同源性/% identity with PMELB
半滑舌鲷 <i>C. semilaevis</i>		100
大菱鲆 <i>S. maximus</i>	XP_035502262.1	68.05
牙鲆 <i>P. olivaceus</i>	XP_019962975.1	66.28
大黄鱼 <i>L. crocea</i>	XP_010751709.3	65.24
棘头梅童鱼 <i>C. lucidus</i>	TKS76599.1	64.55
尼罗罗非鱼 <i>O. niloticus</i>	XP_003457123.3	64.34
虹鳟 <i>O. mykiss</i>	XP_021421656.2	56.42
鸡 <i>G. gallus</i>	XP_040510679.1	49.83
斑马鱼 <i>D. rerio</i>	XP_005162435.1	48.27
热带爪蟾 <i>X. tropicalis</i>	KAE8596504.1	35.45
小鼠 <i>M. musculus</i>	NP_068682.2	35.37
人 <i>H. sapiens</i>	NP_001307051.1	35.05

0.05), 在脑中的表达量则不存在显著差异 (图 4-b)。

2.4 lnc-XR_003049606.1 与 pmelb 在不同生长阶段的差异表达

在不同生长发育阶段, lnc-XR_003049606.1 在无眼侧皮肤的表达模式显示, 60 d 时表达量最高, 然后表达量随着时间逐渐降低。其中该 lncRNA 的表达量在 120 和 360 d 均有显著差异 ($P < 0.05$, 图 5-a)。

pmelb 的表达量在 90 d 时达到峰值, 随后在 120 d 时急剧下降, 到 360 d 时已经达到较低水平。从正常个体和黑化个体角度看, pmelb 在 90、120

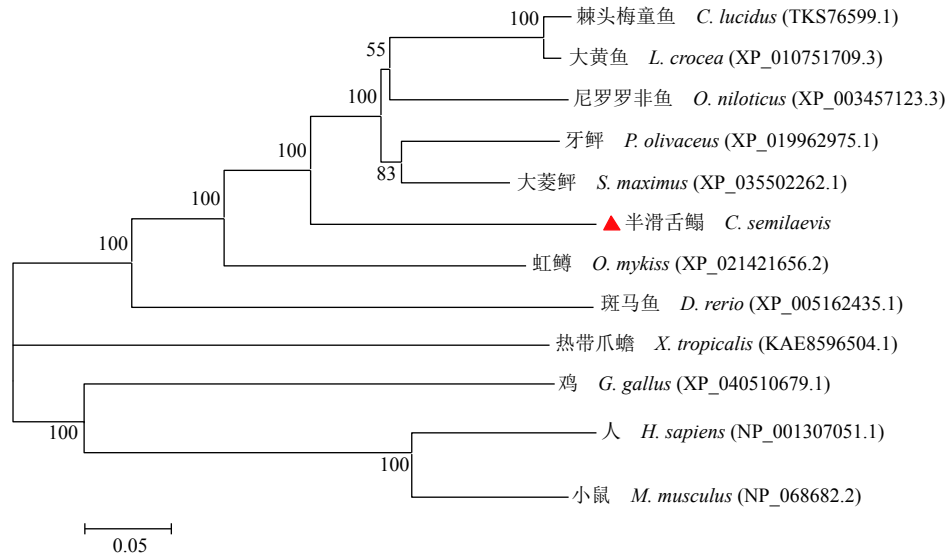


图 3 基于不同物种的 PMELB 氨基酸序列构建的邻接系统发育树

Fig. 3 Neighbour-joining phylogenetic tree constructed based on the amino acid sequences of PMELB from different species

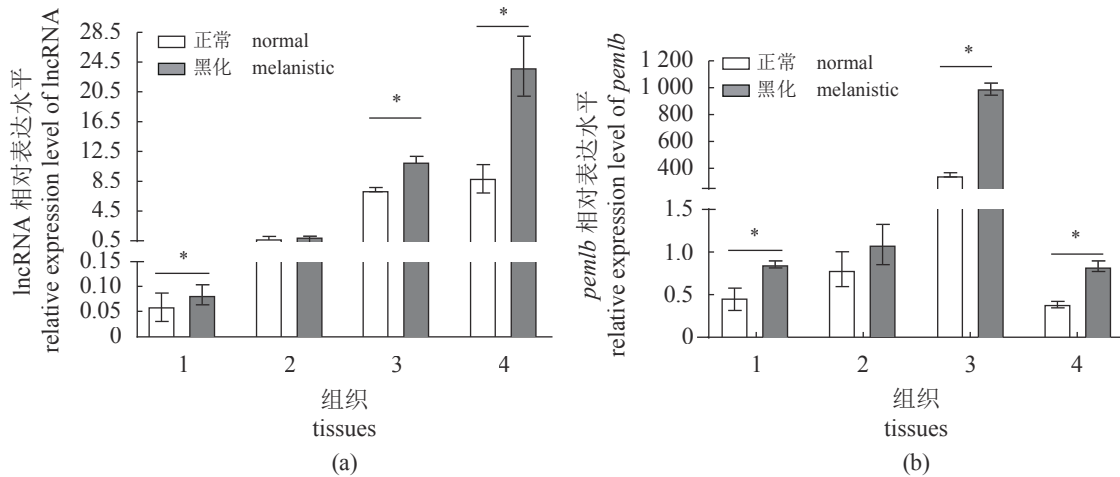


图 4 *lnc-XR_003049606.1* (a) 和 *pmelb* (b) 在半滑舌鳎正常和黑化个体不同组织中的表达水平

1. 肾脏, 2. 脑, 3. 皮肤, 4. 肝脏, *. $P < 0.05$

Fig. 4 Expression levels of the *lnc-XR_003049606.1* (a) and *pmelb* (b) in different tissues of *C. semilaervis*

1. kidney, 2. brain, 3. skin, 4. liver, *. $P < 0.05$

和 360 d 均存在显著差异 ($P < 0.05$, 图 5-b)。

3 讨论

鱼类身体颜色模式是一种重要且直观的表型特征, 并且具有重要的功能, 例如求偶、隐藏和逃避天敌^[12]。色素沉着失调引起鱼类体色变化是鱼类适应性机制研究的重要内容。近几年, 通过构建各种鱼类体色皮肤的转录组文库, 已经发掘了大量与鱼类体色相关的关键基因。例如, Zou 等^[12]通过转录组测序分析比较野生型和白化的黄

颡鱼 (*Pelteobagrus fulvidraco*), 在皮肤中发现了 27 个差异表达的基因; Gan 等^[13]对金鱼 (*Carassius auratus*) 皮肤进行了三代测序, 筛选出 13 个与黑色素发生和蝶啶合成有关的差异基因。在半滑舌鳎上, 有研究表明 *tyr*、*dct*、*mc1r* 等基因可能与其黑化有关^[14-15]。本课题组前期对半滑舌鳎无眼侧黑化皮肤和正常皮肤进行了全转录组测序, 筛选出差异表达的 *lnc-XR_003049606.1*, 并预测 *lnc-XR_003049606.1* 与 *pmelb* 存在反式调控关系, 通过分析 *pmelb* 的序列特征以及 *lnc-XR_003049606.1* 和 *pmelb* 的表达模式, 探索其在半滑舌鳎无眼侧皮

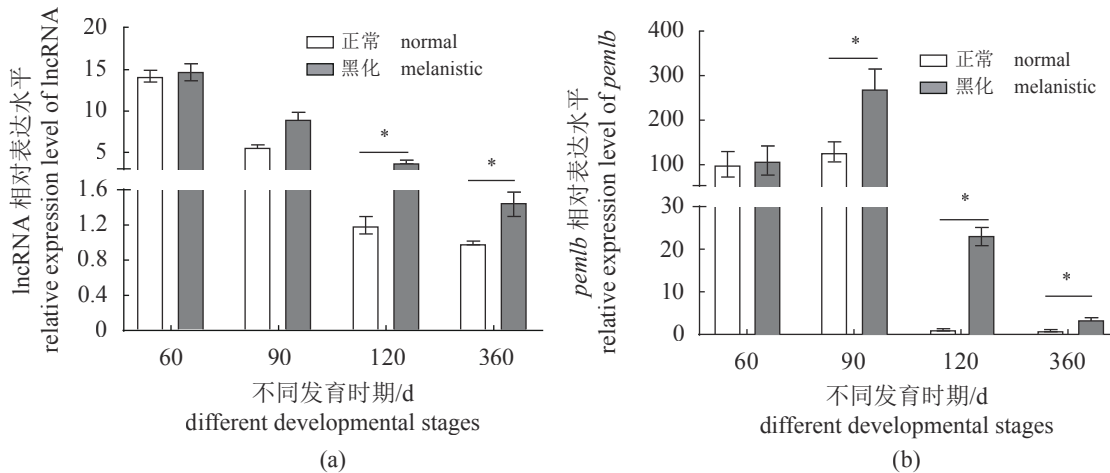


图 5 半滑舌鲷 *lnc-XR_003049606.1*(a) 和 *pmelb* (b) 在不同发育时期的无眼侧皮肤表达水平

Fig. 5 Expression levels of the *lnc-XR_003049606.1*(a) and *pmelb* (b) in the blind side skin of *C. semilaevis* at different developmental stages

肤黑化中可能具备的调控功能。

pmelb 是黑素小体原纤维的结构基础, 是黑色素合成先决条件。目前, *pmelb* 在畜禽动物中开展的研究已经有很多。已有研究表明, 沉默 *pmelb* 会导致增强溶酶体活性进而水解酪氨酸酶^[16]。但是, 该基因在半滑舌鲷体内的具体功能是什么, 其翻译蛋白在黑色素细胞中有什么作用, 仍然是一片空白。本研究通过克隆获得半滑舌鲷 *pmelb* 的 cDNA 序列, 并进行了序列分析。从 Smart 预测的二级蛋白结构中发现 PMELB 蛋白含有 1 个酪氨酸激酶催化结构域、2 个 Src 家族同源结构域以及 1 个布鲁顿酪氨酸富胱氨酸的 motif, 这与 Bissig 等^[17]所描述 PMEL 蛋白质结构不一样, 即 NTR (n 端结构域)、PKD (多囊肾结构域)、RPT (重复区) 和 KLD (kringle-like 结构域)。这印证了氨基酸比对以及系统进化树分析结果, 半滑舌鲷 *pmelb* 与人的同源性低而分离。*lnc-XR_003049606.1* 属于基因间区的 lncRNA, 也称为 lincRNA。它在 4 号染色体上的反义链上, 位于 2 个编码蛋白基因之间。这种类型的 lncRNA 具有高度的进化保守性, 本身可以与染色质修饰复合物结合从而调控共表达的基因^[18]。另外也有证据表明, lincRNA 可以通过结合转录因子以及表观修饰小分子来精准调控下游的基因表达^[19]。

本研究进行了半滑舌鲷 *lnc-XR_003049606.1* 和 *pmelb* 的表达分析。组织表达结果显示, *lnc-XR_003049606.1* 主要在肝脏和皮肤组织中表达, 虽然在黑化个体和正常个体肾脏中的表达量差异显著, 但是表达量都很低。而 *pmelb* 则主要在皮肤中表

达, 其表达量显著高于其他 3 个非色素沉着组织。这与 *tyr* 在半滑舌鲷黑化个体上的表达模式类似^[15], 这可能是因为 *pmelb* 在肝脏或者肾脏中还会行使其他功能。从关联性来看, 这 2 个基因在皮肤、肝脏和肾脏中都显著差异表达, 这侧面证明了 *pmelb* 和 *lnc-XR_003049606.1* 存在调控关系。从时间轴上来看, *lnc-XR_003049606.1* 和 *pmelb* 表达量随着发育阶段延长而逐渐减少。其中 *lnc-XR_003049606.1* 是一种逐渐递减的表达模式, 而 *pmelb* 基因的表达模式是随时间先升高后下降。另外对比 *lnc-XR_003049606.1* 和 *pmelb* 在时间轴上的表达趋势, 发现 *pmelb* 达到峰值的时间比 *lnc-XR_003049606.1* 要滞后。根据在罗非鱼上的最新研究, 通过遗传连锁图谱和基因敲除的方式证实 *pmel* 可以起到控制皮肤黑色素细胞丰度的作用^[20-21]。本研究认为半滑舌鲷黑化需要某些基因表达量达到阈值才会发生并通过某些机制维持黑化的进展, *pmelb* 可能就是维持黑化状态的基因之一, 而 *lnc-XR_003049606.1* 可能起到调控 *pmelb* 防止持续高表达的作用。虽然本研究得出 *lnc-XR_003049606.1* 的表达与 *pmelb* 可能存在调控的关系, 但具体的调控机制仍需进一步探索, 例如可以利用基因编辑技术^[22]对 *lnc-XR_003049606.1* 的敲除或过表达是否真实影响 *pmelb*, *lnc-XR_003049606.1* 通过什么方式影响 *pmelb*。

综上所述, 本实验对半滑舌鲷 *pmelb* 的 CDS 区进行克隆、序列分析和蛋白质结构分析以及其与 *lnc-XR_003049606.1* 的时空表达模式进行研究, 初步探究了 *lnc-XR_003049606.1* 与 *pmelb* 的表达

关系, 为进一步筛选半滑舌鲷无眼侧黑化过程起作用的关键基因提供了思路。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] 万瑞景, 姜言伟, 庄志猛. 半滑舌鲷早期形态及发育特征[J]. *动物学报*, 2004, 50(1): 91-102.
Wan R J, Jiang Y W, Zhuang Z M. Morphological and developmental characters at the early stages of the tonguefish *Cynoglossus semilaevis*[J]. *Acta Zoologica Sinica*, 2004, 50(1): 91-102 (in Chinese).
- [2] Li Y Z, Hu Y R, Zheng W W, *et al.* Insights into the heritable variation of hypermelanosis in Chinese tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*): potential for future selective breeding[J]. *Aquaculture*, 2021, 539: 736617.
- [3] Wang K C, Chang H Y. Molecular mechanisms of long noncoding RNAs[J]. *Molecular Cell*, 2011, 43(6): 904-914.
- [4] Li Z H, Ouyang H J, Zheng M, *et al.* Integrated analysis of long non-coding RNAs (LncRNAs) and mRNA expression profiles reveals the potential role of LncRNAs in skeletal muscle development of the chicken[J]. *Frontiers in Physiology*, 2017, 7: 687.
- [5] Fatica A, Bozzoni I. Long non-coding RNAs: new players in cell differentiation and development[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2014, 15(1): 7-21.
- [6] Wang L Q, He T, Zhang X, *et al.* Global transcriptomic analysis reveals LncADAMTS9 exerting an essential role in myogenesis through modulating the ERK signaling pathway[J]. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 2021, 12(1): 4.
- [7] Dey B K, Pfeifer K, Dutta A. The H19 long noncoding RNA gives rise to microRNAs miR-675-3p and miR-675-5p to promote skeletal muscle differentiation and regeneration[J]. *Genes & development*, 2014, 28(5): 491-501.
- [8] Watt B, Van Nile G, Raposo G, *et al.* PMEL: a pigment cell-specific model for functional amyloid formation[J]. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 2013, 26(3): 300-315.
- [9] Knaust J, Weikard R, Albrecht E, *et al.* Indication of premelanosome protein (PMEL) expression outside of pigmented bovine skin suggests functions beyond eumelanogenesis[J]. *Genes*, 2020, 11(7): 788.
- [10] Brunberg E, Andersson L, Cothran G, *et al.* A missense mutation in *PMEL17* is associated with the silver coat color in the horse[J]. *BMC genetics*, 2006, 7: 46.
- [11] Schonhaler H B, Lampert J M, Von Lintig J, *et al.* A mutation in the *silver* gene leads to defects in melanosome biogenesis and alterations in the visual system in the zebrafish mutant fading vision[J]. *Developmental Biology*, 2005, 284(2): 421-436.
- [12] Zou M, Zhang X T, Shi Z C, *et al.* A comparative transcriptome analysis between wild and albino yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*)[J]. *PLoS One*, 2015, 10(6): e0131504.
- [13] Gan W, Chuang-davidson, YW, Chen Z L, *et al.* Global tissue transcriptomic analysis to improve genome annotation and unravel skin pigmentation in goldfish[J]. *Scientific report*, 2021, 11(1): 1815.
- [14] Li K M, Zhao N, Zhang B, *et al.* Identification and characterization of the melanocortin 1 receptor gene (MC1R) in hypermelanistic Chinese tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2020, 46(3): 881-890.
- [15] 吴垚磊, 李仰真, 王娜, 等. 半滑舌鲷酪氨酸酶基因 (*TYR*) 和多巴色素异构酶基因 (*DCT*) 的克隆表达与分析[J]. *渔业科学进展*, 2021, 42(6): 42-52.
Wu Y L, Li Y Z, Wang N, *et al.* Expression analysis of *TYR* and *DCT* genes related to body color in *Cynoglossus semilaevis* at different periods and in different tissues[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2021, 42(6): 42-52 (in Chinese).
- [16] Sun L J, Hu L, Zhang P, *et al.* Silencing of *PMEL* attenuates melanization via activating lysosomes and degradation of tyrosinase by lysosomes[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2018, 503(4): 2536-2542.
- [17] Bissig C, Rochin L, Van Niel G. *PMEL* Amyloid Fibril Formation: the bright steps of pigmentation[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17(9): 1438.
- [18] Guttman M, Donaghey J, Carey BW, *et al.* lincRNAs act in the circuitry controlling pluripotency and differentiation[J]. *Nature*, 2011, 477(7364): 295-300.
- [19] Guo X D, Xu Y X, Wang Z K, *et al.* A linc1405/eomes complex promotes cardiac mesoderm specification and cardiogenesis[J]. *Cell stem cell*, 2018, 22(6): 893-908.e6.
- [20] Liu F, Sun F, Kuang G Q, *et al.* Identification of *Pmel17* for golden skin color using linkage mapping in Mozambique tilapia[J]. *Aquaculture*, 2022, 548: 737703.
- [21] Wang C X, Xu J, Thomas, D. K, *et al.* CRISPR knockouts of *pmela* and *pmelb* engineered a golden tilapia by regulating relative pigment cell abundance[Z]. Preprint. bioRxiv, 2021, doi: 0.1101/2021.12.09.471900.
- [22] 陈松林, 徐文腾, 刘洋. 鱼类基因组研究十年回顾与展望[J]. *水产学报*, 2019, 43(1): 1-14.
Chen S L, Xu W T, Liu Y. Fish genomic research: decade review and prospect[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2019, 43(1): 1-14 (in Chinese).

Expression analysis of LNC-XR_003049606-1 and its target gene *pmelb* in blind side skin melanization in *Cynoglossus semilaevis*

HU Yuanri^{1,2,3,4}, YANG Qian^{1,2,3}, WANG Jialin^{1,2,3}, LI Yangzhen^{1,2,3}, XU Yanyan⁴,
CUI Zhongkai^{1,2,3}, CHENG Peng^{1,2,3}, CHEN Songlin^{1,2,3*}

(1. School of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

3. Shandong Key Laboratory of Marine Fisheries Biotechnology and Genetic Breeding, Qingdao 266071, China;

4. Tangshan Academy of Agricultural Sciences, Tangshan 063021, China)

Abstract: Fish coloration has long been a scientific research hotspot, owing not only to complex biological mechanisms associated with the prominent phenotypic characteristics, but also to high evolutionary significance for adaptation. Lately, an increasing number of researches have focused on lncRNA, due to their involvement in biological regulatory function. However, studies on lncRNAs in non-model organism such as *Cynoglossus semilaevis* are still lacking, particularly on skin melanostic mechanism. *C. semilaevis* is an important farmed marine fish in China and is easy to present the melanistic problem of blind side skin in the process of artificial cultivation. The blind side pigment abnormalities would spread with varying degrees of areas. It has not been known how pigment is correctly transported to the corresponding skin in *C. semilaevis* so far. In order to investigate the blind side melanized mechanism of lncRNA and mRNA in *C. semilaevi*, this experiment predicted that lnc-XR_003049606.1 targets *pmelb* through trans-acting according to the results of the transcriptome analysis. Bioinformatics analysis revealed that the full length of the cDNA of *pmelb* was 1 755 bp, encoding 584 amino acids, with a predicted protein molecular weight of 63.94 ku and a theoretical isoelectric point of 5.12. The predicted secondary protein structure contains a Pleckstrin homology domain, a Bruton's tyrosine kinase Cys-rich motif, a Src homology 3 domains, a Src homology 2 domains and a tyrosine kinase catalytic domain. Phylogenetic tree analysis showed that *pmelb* was clustered with corresponding genes in other fishes. The amino acid homology analysis showed that *pmelb* had the highest similarity with *Scophthalmus maximus* and *Paralichthys olivaceus* (68.05% and 66.28%, respectively). Analysis of the spatio-temporal expression patterns on lnc-XR_003049606.1 and *pmelb* revealed that lnc-XR_003049606.1 was expressed in the skin and liver of 1-year-old tongue sole, with expression peaking in the skin at 60 days and then decreasing over time, whereas *pmelb* was mainly expressed in the skin, with expression increasing and then decreasing over the timeline. This study provided an idea for further screening the key genes that play a role in the process of blind side hypermelanotic skin in *C. semilaevi*.

Key words: *Cynoglossus semilaevis*; lncRNA; *pmelb*; body color; hypermelanosis

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

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31702333); Innovation Team Project of China Academy of Fisheries Science (2020TD20); China Agriculture Research System (CARS-47-G03); Taishan Scholar Climbing Project of Shandong Province; Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund, Chinese Academy of Fishery Sciences (2020XT0101)