



## 锦鲤墨蝶呤还原酶基因的克隆、表达和定位分析

胡菊<sup>1</sup>, 冯彩<sup>1</sup>, 马晓<sup>1</sup>, 吴利敏<sup>1</sup>, 刘慧芬<sup>1</sup>,  
宋红梅<sup>2</sup>, 胡隐昌<sup>2</sup>, 田雪<sup>1\*</sup>, 李学军<sup>1</sup>

(1. 河南师范大学水产学院, 河南省水产动物养殖工程技术研究中心, 河南新乡 453007;

2. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 农业农村部休闲渔业重点实验室, 广东广州 510380)

**摘要:** 为探究SPR在锦鲤体色形成中的作用, 实验利用RACE技术获得*spr* cDNA全长序列, 并分析其时空表达模式, 同时利用Western blot和免疫组织化学方法检测SPR蛋白在皮肤、鳍条和鳞片中的分布和表达情况。结果显示, *spr* cDNA全长879 bp, 包含132 bp和134 bp的5'和3'非编码区, 开放阅读框510 bp, 编码170个氨基酸残基。氨基酸序列比对和系统进化树分析显示, 锦鲤SPR具有保守的adh\_short\_C2结构域, 与金鱼相似性高达97.7%。*spr*在各组织中均有表达, 其中皮肤的表达量最高。*spr*在锦鲤个体发育的4个阶段表现为先降后升。纯红、纯白及红白3种体色锦鲤皮肤、鳞片和鳍条中*spr* mRNA和蛋白表达水平基本一致, 在纯红锦鲤皮肤中表达量最高, 红白锦鲤白色皮肤、鳞片和鳍条的表达量最低。SPR组织定位分析显示, 红色锦鲤和白色锦鲤皮肤中均检测到阳性信号, 其中红色皮肤阳性信号强度高于白色皮肤。研究表明, *spr*可能与锦鲤红/黄色素细胞的分化和形成具有一定相关性, 参与了锦鲤体色的形成。

**关键词:** 锦鲤; *spr*; 基因克隆; 蝶呤代谢; 体色

中图分类号: Q 785; S 917.4

文献标志码: A

体色是鱼类的重要表型性状之一, 由色素细胞形成<sup>[1]</sup>。鱼类皮肤及鳞片中色素细胞的种类、数量和分布都会影响其体色<sup>[2]</sup>。色素细胞由外胚层神经嵴细胞分化形成。在胚胎发育过程中, 神经嵴细胞沿背腹轴分化成包括色素细胞在内的不同类型细胞<sup>[3]</sup>。相对于哺乳动物只具有一种黑色素细胞, 鱼类具有6种色素细胞, 包括黑色素细胞、红色素细胞、黄色素细胞、虹彩细胞、蓝色素细胞和白色素细胞<sup>[4]</sup>。色素细胞不同, 所含有的色素颗粒存在较大差异。黑色素细胞具有黑色素色素小体, 红色素/黄色素细胞具有类胡萝卜素、蝶呤成分的红/黄色素小体。虹彩细胞合成嘧啶成分的色素小体<sup>[5-7]</sup>。现阶段,

黑色素细胞的分化和形成、黑色素合成等分子调控通路的研究较为清晰, 其他色素细胞的色素合成代谢调控研究较少<sup>[8-9]</sup>。因此, 探究其他色素细胞的色素代谢通路对认识鱼类体色的形成具有重要的理论意义和实际应用价值。

黄色素细胞是仅次于黑色素细胞最受关注的研究对象。黄色素细胞可以合成红/黄蝶呤色素小体, 在鱼类体色形成中具有重要地位。蝶呤是由嘧啶和吡嗪环组成的杂环复合物, 根据结构可以分为蝶呤和黄素2种类型。蝶呤合成通路主要包含3个部分, 第一部分从GTP合成BH<sub>4</sub>; 第二部分是BH<sub>4</sub>的补充合成路径; 第三部分合成具有颜色的蝶呤色素颗粒<sup>[10]</sup>。SPR、PTPS(6-

收稿日期: 2019-07-07 修回日期: 2019-10-12

资助项目: 国家自然科学基金青年科学基金(31402294); 河南省重点研发与推广专项(182102110164, 192102110192); 农业农村部休闲渔业重点实验室开放基金课题(2019N06)

通信作者: 田雪, E-mail: tianxue\_81@126.com

pyruvoyl tetrahydropterin synthase)和GTPCH(GTP cyclohydrolase)是蝶啶合成通路的关键酶,SPR参与BH<sub>4</sub>的补救通路,也是BH<sub>4</sub>从头合成途径中最后一步必需催化酶,同时也可与其他酶类共同作用形成蝶啶色素<sup>[11-13]</sup>。Negishi<sup>[14]</sup>利用免疫组织化学方法检测SPR在青鳞(*Orgzias latipes*)鳞片色素细胞中的表达定位,黄色素细胞中可检测到SPR的阳性信号,其表达量显著高于黑色素细胞。Andrade等<sup>[15]</sup>通过高密度图谱发现*spr*的多态性与壁虎橙色体色具有重要关联。斑马鱼(*Danio rerio*)授精后42 h头部开始出现黄色素细胞,72 h黄色素细胞增多,体色变黄,SPR也随着黄色素细胞的增多而升高<sup>[16]</sup>。随着分子生物学技术的快速发展,黄色素蝶啶合成通路研究不断更新,包括蝶啶通路基因的克隆,QTL定位和基因定点编辑技术。然而这些研究集中在青鳞、斑马鱼等模式动物中,且主要与*gtpch*和*pts*相关。尽管SPR在蝶啶通路中具有重要作用,但经济鱼类中*spr*克隆和功能分析的报道较少。

锦鲤(*Cyprinus carpio* var. *koi*)属鲤科(Cyprinidae)、鲤属(*Cyprinus*),体色鲜艳且多样,现人工培育的类型有100多种,具有重要的欣赏价值和经济价值<sup>[17]</sup>。目前为止,所有的锦鲤品系基本由杂交选育获得。但经杂交选育的锦鲤性

状极不稳定,具有较高观赏价值的锦鲤个体比例一般在0.01%~0.10%<sup>[12,18]</sup>。因此,研究其体色发生和形成机理,是锦鲤遗传育种中亟待解决的问题。红白锦鲤为锦鲤中的代表品种,其所具有的色素细胞主要包含红色素细胞、黄色素细胞和虹彩细胞<sup>[2]</sup>。为探究*spr*在锦鲤红色和白色体色形成中的作用,本实验对*spr*进行克隆,获得其cDNA全长,利用qRT-PCR、Western blot、免疫组化分析*spr* mRNA和蛋白在纯红、纯白和红白锦鲤中的表达情况,为更深入理解*spr*在锦鲤体色形成中的作用提供参考数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

河南师范大学水产养殖基地繁育的F<sub>1</sub>红白锦鲤,F<sub>2</sub>纯红和纯白锦鲤。丁香酚麻醉后根据表1分别对纯红、纯白和红白锦鲤进行取样。组织浸入加有RNAlater的0.5 mL EP管中4 °C过夜后放于-80 °C保存备用(Thermo Fisher公司,美国)。提取各组织总RNA(TaKaRa公司,大连),ND-2000核酸蛋白仪检测RNA浓度和OD值,1%琼脂糖凝胶电泳检测RNA完整性,合格RNA保存于-80°用于后续实验。

表1 锦鲤取样材料

Tab. 1 Sampling materials of koi

名称 name	数量 quantity	组织类别 tissue
F <sub>2</sub> 纯红锦鲤 F <sub>2</sub> whole red koi carp	6	皮肤、鳍条、鳞片、肌肉、肝脏、肠道
F <sub>2</sub> 纯白锦鲤 F <sub>2</sub> whole white koi carp	6	皮肤、鳍条、鳞片
F <sub>1</sub> 红白锦鲤 F <sub>1</sub> Kohaku koi carp	6	红色斑块: 皮肤、鳍条、鳞片; 白色斑块: 皮肤、鳍条、鳞片

### 1.2 *spr*基因克隆

根据PrimeScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit的说明书,将提取的所有组织总RNA合成第一链cDNA(TaKaRa公司,大连)。从实验室前期获得的锦鲤个体发育转录组数据库筛选与*spr*相关的序列,NCBI进行Blast比对,在开放阅读框范围选择相似性较高的区域设计正反向引物(表2)。以第一链cDNA为模板进行PCR反应:2×PCR Mixture 10 μL上下游引物各0.8 μL、模板4 μL、ddH<sub>2</sub>O 4.4 μL(TaKaRa公司,大连)。反应条件为:94 °C 2 min; 94 °C 30 s, 54.7 °C 30 s, 72 °C 2 min, 35个循环; 72 °C 5 min。1%琼脂

<http://www.sxuebao.cn>

糖凝胶电泳检测后切胶,纯化、连接和转化,菌液PCR检测阳性克隆,送上海生工生物公司测序。

根据*spr*中间片段序列设计5'和3'RACE引物(表2),根据SMARTer RACE 5'/3'试剂盒说明书进行PCR扩增(TaKaRa公司,大连),PCR产物经1%琼脂糖电泳检测后进行胶回收、连接和转化,送上海生物公司测序。

### 1.3 锦鲤*spr* cDNA序列比对及系统进化分析

将获得的*spr* cDNA序列用Lasergene软件进行拼接,NCBI进行Blastn同源性分析(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>),ORFfinder推测其开放

表 2 实验中所用引物序列

Tab. 2 Sequence of primers used in the study

引物 primer	序列(5'-3') sequence (5'-3')	用途 usage
<i>spr</i> -F	CTGAAGGAGGACATCATAACCCTG	中间片段扩增 partial sequence PCR
<i>spr</i> -R	CTAGAGCTCGTAGAAGTCCAGATG	
<i>spr</i> -3'Out	GTGGTCAACATCAGCTCTCTGTGTGCG	3'端扩增 3'RACE PCR
<i>spr</i> -3'In	TCGTGGGTCTTTACTGCACCGGAAAG	
<i>spr</i> -5'Out	GCACTCTTACATCCGGCTCCTCTGC	5'端扩增 5'RACE PCR
<i>spr</i> -5'In	GAAGCGAGACACGTCACCCAGAGAC	
<i>qspr</i> -F	TTTCTCGCAGTCTGGGTCT	定量PCR real-time PCR
<i>qspr</i> -R	AGCACTCTTACATCCGGCTCC	
UPM-L	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	通用引物 universal primer
UPM-S	CTAATACGACTCACTATAGGGC	
$\beta$ - <i>actin</i> -F	TGCAAAGCCGGATTGCTGG	内参基因 housekeeping gene
$\beta$ - <i>actin</i> -R	AGTTGGTGACAATACCGTGC	

阅读框与编码氨基酸序列(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>), SMART进行蛋白结构与分析(<http://smart.embl-heidelberg.de/>), MEGA 6.0邻接法构建系统进化树(bootstrap=1 000)。

#### 1.4 锦鲤*spr*组织和体色发育时期的表达分析

依据获得的开放阅读框序列设计qRT-PCR引物(表2), 以 $\beta$ -*actin*作为内参, 按照PrimeScript RT reagent Kit With gDNA Eraser(TaKaRa公司, 大连)试剂盒合成第一链cDNA进行qRT-PCR。反应体系为(20  $\mu$ L): SYBR 10  $\mu$ L、上下游引物各0.6  $\mu$ L、模板2  $\mu$ L、ddH<sub>2</sub>O 6.8  $\mu$ L。扩增程序: 95  $^{\circ}$ C 30 s, 95  $^{\circ}$ C 5 s、58  $^{\circ}$ C 20 s, 40个循环, 每个样品3个重复, 依据 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算*spr*在不同组织和发育时期的相对表达量。

#### 1.5 锦鲤SPR的组织分析

以IP裂解液:PMSF为100:1的比例配制总蛋白提取液(碧云天公司, 上海), 提取纯红、纯白和红白锦鲤的皮肤、鳍条及鳞片的总蛋白, BSA试剂盒测定蛋白浓度(碧云天公司, 上海)。取25 mg蛋白进行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE), 切胶、转膜, TBST缓冲溶液清洗3次、每次5 min, 5%脱脂奶粉封闭1 h, 一抗(Abcam公司, 英国)4  $^{\circ}$ C孵育过夜, TBST缓冲溶液清洗3次、每次5 min, 二抗孵育, TBST缓冲溶液清洗

3次、每次5 min, ECL显色(Thermo Fisher公司, 美国)、化学发光仪成像。

#### 1.6 锦鲤SPR在皮肤中的分布定位

纯红和纯白锦鲤皮肤用4%多聚甲醛固定, 梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋, 切片(7  $\mu$ m), 脱蜡, 3%双氧水孵育10 min, PBS缓冲溶液清洗3次, 每次5 min, 5%牛血清37  $^{\circ}$ C封闭20 min, 一抗4  $^{\circ}$ C孵育过夜, 37  $^{\circ}$ C孵育30 min, PBS缓冲溶液清洗3次, 每次5 min, 二抗37  $^{\circ}$ C孵育20 min, PBS缓冲溶液清洗3次, 每次5 min, DAB(北京中杉金桥生物公司, 北京)显色, ddH<sub>2</sub>O终止反应, 苏木素复染, 脱水、透明, 中性树脂胶封片, 非免疫牛血清替代一抗作为阴性对照。

#### 1.7 图像分析及统计学分析

Image-pro Plus 6.0软件(Media Cybernetics 公司, 美国)分析纯红、纯白和红白锦鲤皮肤、鳍条和鳞片的SPR和GAPDH免疫印迹结果, 测定目的条带面积和平均光密度, 蛋白质总量(IOD)=条带面积(px) $\times$ 平均光密度(OD), SPR与内参蛋白GAPDH对比, 进行半定量分析。利用SPSS 16.0 One-Way ANOVA统计分析所得数据并进行LSD和Duncan氏比较, 结果用平均值 $\pm$ 标准误(mean $\pm$ SE)表示。

## 2 结果

### 2.1 spr cDNA全长及其氨基酸序列分析

对克隆获得的锦鲤spr序列进行拼接，cDNA全长为879 bp，包含132 bp的5'非编码区，134 bp的3'非编码区及510 bp的开放阅读框，编码170个氨基酸，蛋白质分子质量为18.74 ku，等电点为6.10，亮氨酸含量达到15.9%，明显高于其他氨基酸，与小鼠SPR结果一致。锦鲤SPR在Asn-36和Asn-63有两个保守的N-糖基化结合位点。SPR是钙调蛋白激酶II的底物之一，锦鲤SPR蛋白具有3个钙调蛋白激酶II和2个蛋白C激酶的磷酸化位点。SMART预测SPR氨基酸序列结构域，得到一个3-165氨基酸残基的adh\_short\_C2保守结构域(图1，图2)。

### 2.2 锦鲤SPR氨基酸序列同源性和系统进化分析

利用MEGA6.0软件将锦鲤SPR氨基酸序列与金鱼(*Carassius auratus* No. XP\_026124531)，鲤(*Cyprinus carpio* No. XP\_018926689.1)，安水金线鲃(*Sinocyclocheilus anshuiensis* No. XP\_016306632.1)，斑马鱼(*Danio rerio* No. NC\_007116.7)，斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus* No. NC\_030443.1)，日本青鳉(*Oryzias latipes* No. NC\_019870.2)，印度青鳉(*Oryzias melastigma* No. NW\_020100721)，银大麻哈鱼(*Oncorhynchus kisutch* No. NC\_034202.1)，虹鳟(*Oncorhynchus mykiss* No. NC\_035105.1)，大西洋鲑(*Salmo salar* No. NC\_027310.1)，热带爪蟾(*Xenopus tropicalis* No. NC\_030677.1)，澳洲鬃狮蜥(*Pogona vitticeps* No. NW\_018150876.1)，原矛头

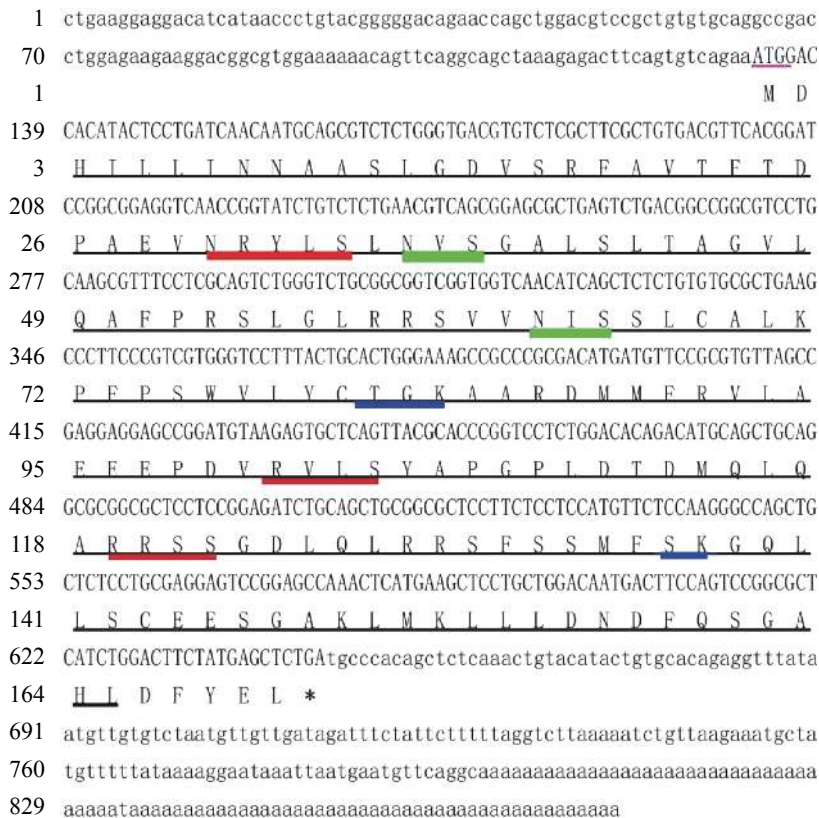


图1 红色锦鲤spr序列和氨基酸序列

小写字母分别为5'非编码区和3'非编码区，\*表示终止密码子；紫色下划线表示起始密码子，黑色下划线表示adh\_short\_C2结构域，红色下划线表示钙调蛋白激酶II位点，绿色下划线表示N-糖基化结合位点，蓝色下划线表示蛋白C激酶的磷酸化位点

Fig. 1 The spr mRNA sequence and amino acid sequence of the red koi

the marked purple line is the initial codon, whose front is the 5' non-coding region, and the TGA marked asterisk is the termination codon, followed by 3' non-coding region. The black underline is the adh\_short\_C2 domain, the red underlines are the calmodulin kinase II sites, the green underlines are the N-glycosylation binding sites, and the blue underlines are the phosphorylation sites of protein C kinase

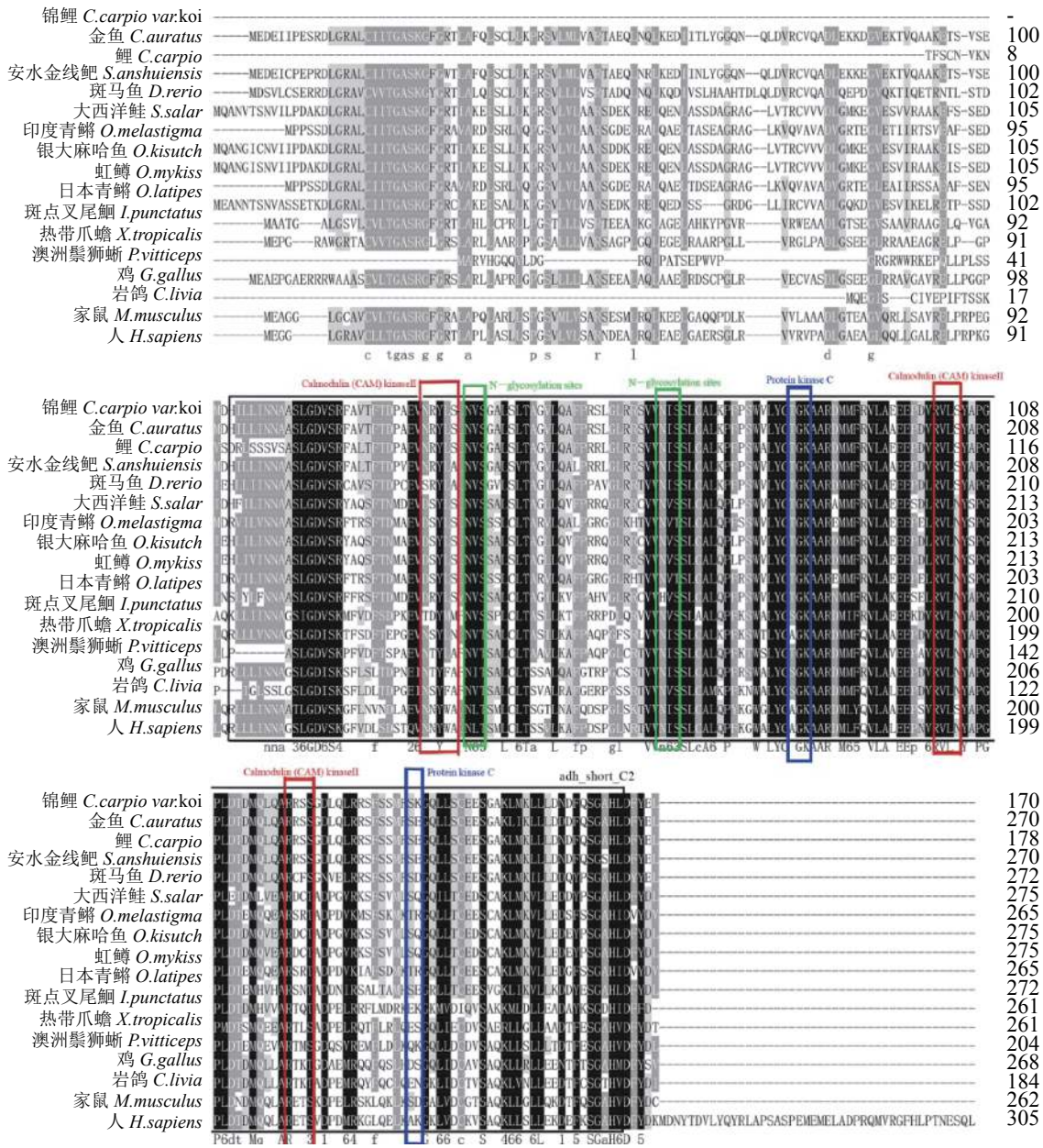


图 2 锦鲤SPR与其他鱼类SPR氨基酸同源性比对

黑色区域为完全相似, 灰色区域为75%相似; 黑框表示adh\_short\_C2结构域, 红框表示钙调蛋白激酶II位点, 绿框表示N-糖基化结合位点, 蓝框表示蛋白C激酶的磷酸化位点

Fig. 2 Koi carp SPR homology comparison with other fishes SPR amino acids

The black area: completely similar; the gray area: 75% similar; The black frame represents the adh\_short\_C2 domain, the red frame represents the calmodulin kinase II site, the green frames represent the N-glycation binding site, and the blue frames represent the phosphorylation site of protein C kinase

蝮(*Protobothrops mucrosquamatus* No. NC\_029519.1), 鸡(*Gallus gallus* No. NC\_006091.5), 岩鸽(*Columba livia* No. NW\_004973535), 人(*Homo sapiens* No. NC\_000002), 家鼠(*Mus musculus* No. NC\_000072.6)的SPR氨基酸序列进行同源性比较, SPR在硬骨鱼类中的保守性较高(65.7~97.7%), 与金鱼相似性最高, 为97.7%; 与金线鲃、鲤等鲤形目鱼类

的相似性介于85.3~94.8%, 与其他鱼类的相似性为65.7%~71.5%; 与两栖类、爬行类、鸟类和哺乳类的相似性较低。基于氨基酸序列比对结果构建系统发育树, 结果显示, 锦鲤SPR首先与鲤、安水金线鲃聚为一小支, 其次是金鱼, 随后与其他鱼类聚为一大支, 这与锦鲤的分类地位相一致(图3)。

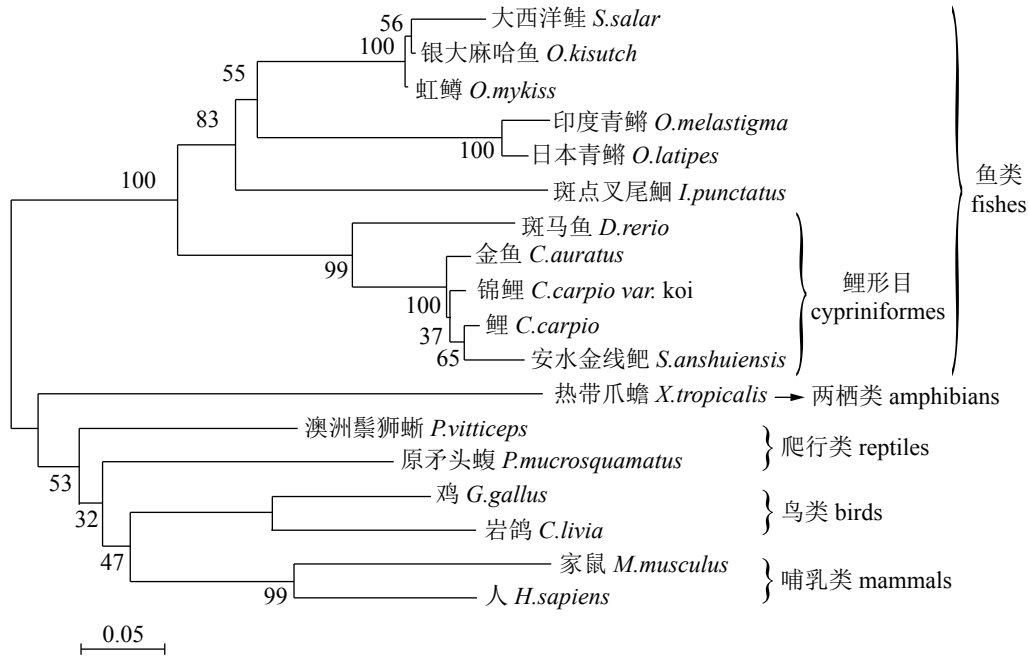


图 3 鱼类SPR氨基酸序列系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of the SPR proteins in fishes

2.3 锦鲤spr组织和发育阶段的表达分析

qRT-PCR结果显示, spr在肌肉、皮肤、鳞片、肝胰、肠及鳍条中均有表达, 皮肤中表达量显著高于其他组织(P<0.05), 肌肉次之, 鳍条中表达量最低(P<0.05) (图4-a)。spr在锦鲤个体发育阶段的各个时期均有表达, 表达趋势为先降

后升, 2 dph (day post hatching)表达量较高, 显著高于4 dph和6 dph (P<0.05), 但和12 dph表达量不存在显著差异(P>0.05) (图4-b)。

对不同体色锦鲤富含色素细胞的组织进行 spr表达分析(图4-c), 纯红锦鲤皮肤中 spr表达量显著高于其他组织(P<0.05)。红白锦鲤红色皮肤

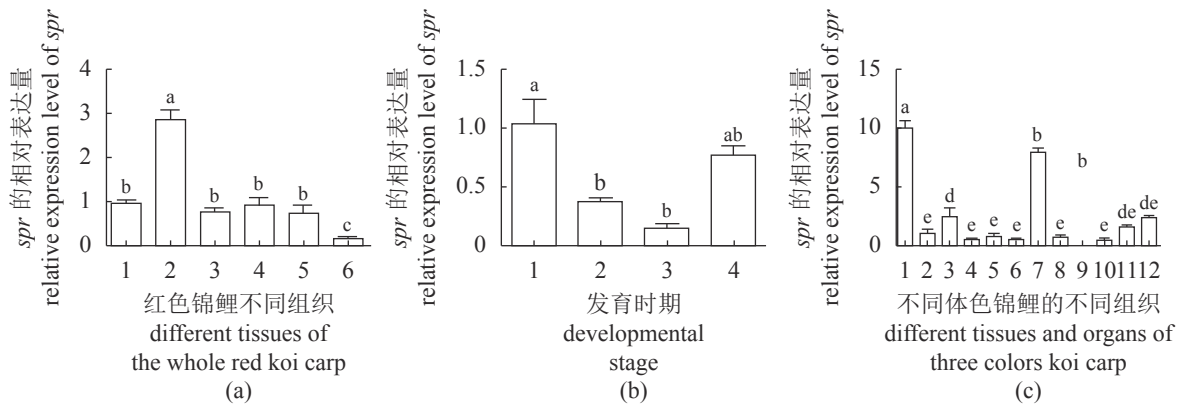


图 4 spr的相对表达量

不同的字母表示差异显著(P<0.05); (a) 1. 肌肉, 2. 皮肤, 3. 鳞片, 4. 肝胰, 5. 肠, 6. 鳍; (b) 1. 2 dph, 2. 4 dph, 3. 6 dph, 4. 12 dph; (c) 1. 纯红锦鲤皮肤, 2. 纯红锦鲤鳍条, 3. 纯红锦鲤鳞片, 4. 纯白锦鲤皮肤, 5. 纯白锦鲤鳍条, 6. 纯白锦鲤鳞片, 7. 红白锦鲤红色皮肤, 8. 红白锦鲤红色鳍条, 9. 红白锦鲤红色鳞片, 10. 红白锦鲤白色皮肤, 11. 红白锦鲤白色鳍条, 12. 红白锦鲤白色鳞片

Fig. 4 Relative expression level of spr

Different lowercases indicates significant difference (P<0.05); (a) 1. muscle, 2. skin, 3. scale, 4. liver, 5. intestines, 6. fin; (b) 1. 2 dph, 2. 4 dph, 3. 6 dph, 4. 12 dph, (c) 1. skins of whole red koi, 2. fins of whole red koi, 3. scales of whole red koi, 4. skins of whole white koi, 5. fins of whole white koi, 6. scales of whole white koi, 7. red skins of kohaku koi carp, 8. red fins of kohaku koi carp, 9. red scales of kohaku koi, 10. white skins of kohaku koi carp, 11. white fins of kohaku koi carp, 12. white scales of kohaku koi carp

和鳞片的表达量仅次于纯红锦鲤。白色皮肤、鳞片和鳍条的表达量最低( $P < 0.05$ )。

## 2.4 不同体色锦鲤SPR蛋白的Western blot分析

Western blot结果显示, 纯红、纯白和红白

锦鲤皮肤、鳍条和鳞片总蛋白中均存在于兔抗SPR多克隆抗体发生免疫阳性反应的蛋白质条带, 分子量约为18 ku。蛋白免疫印迹结果与mRNA表达情况基本一致, 红色组织中SPR蛋白表达量显著高于白色组织(图5)。

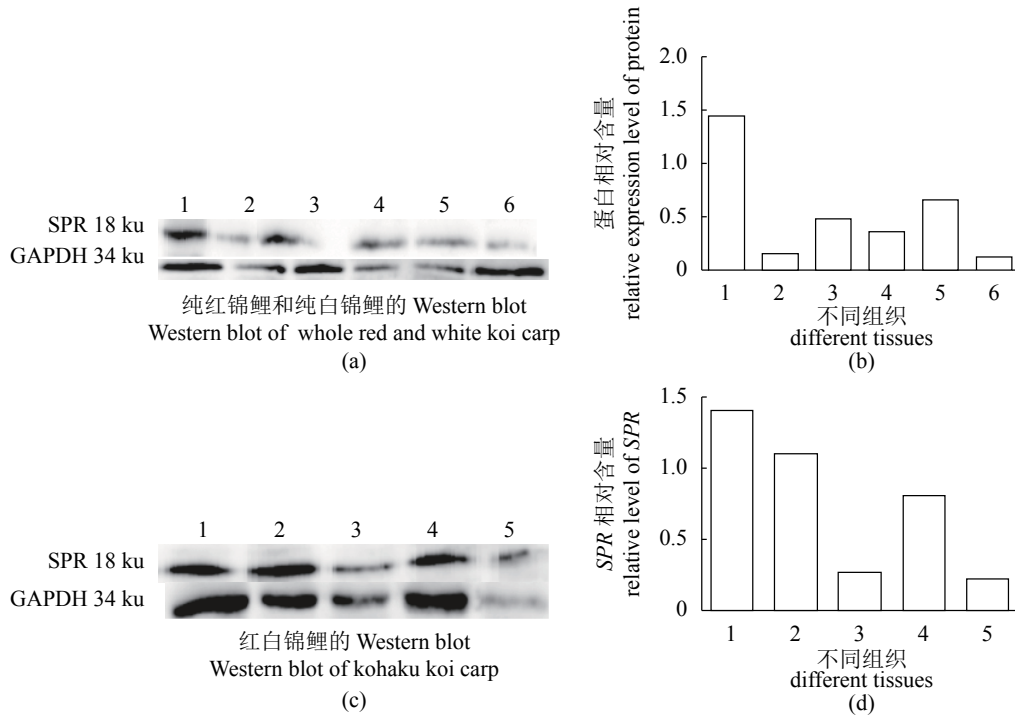


图 5 不同体色锦鲤SPR的Western blot 印迹实验结果

(a) (c) 1. 纯红锦鲤皮肤, 2. 纯红锦鲤鳍条, 3. 纯红锦鲤鳞片, 4. 纯白锦鲤皮肤, 5. 纯白锦鲤鳍条, 6. 纯白锦鲤鳞片; (b) (d) 1. 红白锦鲤红色皮肤, 2. 红白锦鲤红色鳞片, 3. 红白锦鲤白色皮肤, 4. 红白锦鲤白色鳞片, 5. 红白锦鲤尾鳍

Fig. 5 Western blot results of SPR in different koi skin colors

(a) (c) 1. skin of whole red koi, 2. fin of whole red koi, 3. Scale of whole red koi, 4. skin of whole white koi, 5. fin of whole white koi, 6. scale of whole white koi; (b) (d) 1. red skin of kohaku koi carp, 2. red scale of kohaku koi carp, 3. white skin of kohaku koi carp, 4. white scale of kohaku koi carp, 5. tail fin of kohaku koi carp

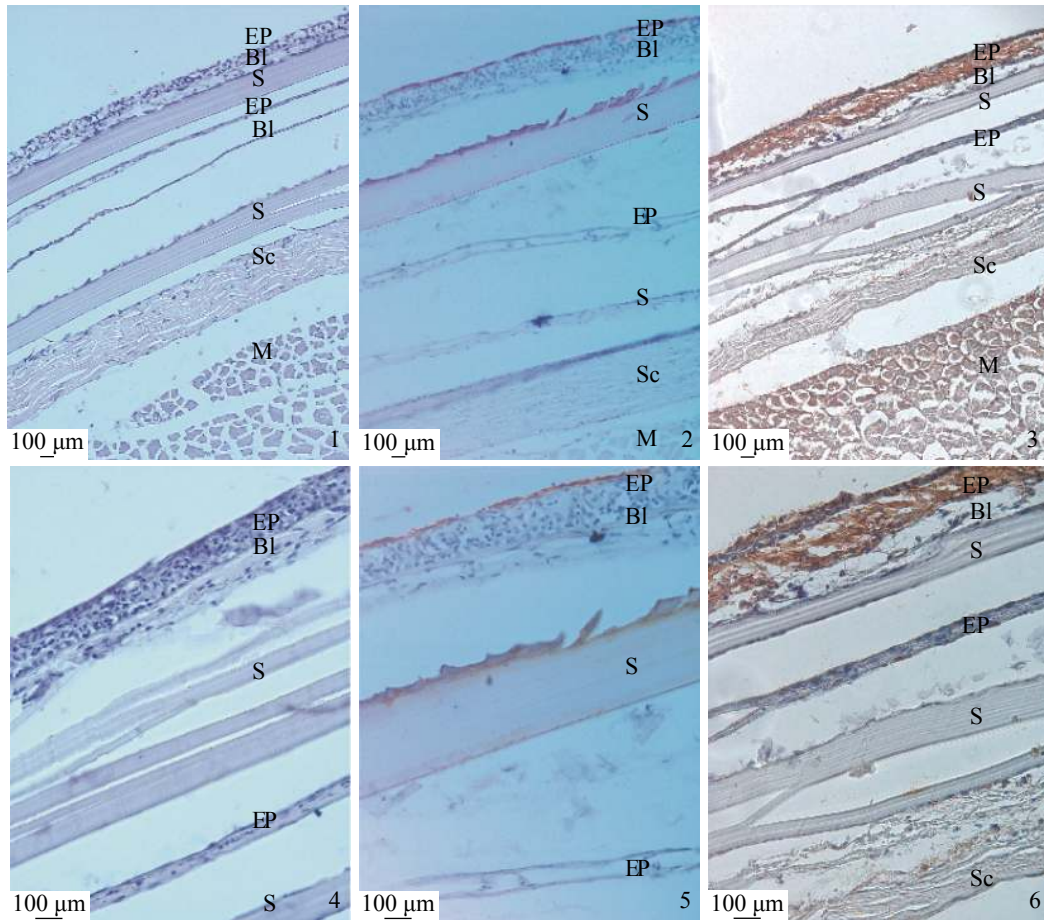
## 2.5 锦鲤SPR蛋白在皮肤组织中的定位

锦鲤的皮肤主要由表皮层和真皮层构成, 鳞片插入的位置在表皮层或表皮层与真皮层之间。表皮层具有色素细胞、角质化细胞和杯状细胞, 表皮和鳞片之间为基底层。鳞片和基底层也分布有色素细胞。真皮层包含鳞片和致密层。致密层和肌肉之间也具有色素细胞。纯红和纯白锦鲤表皮中均检测到SPR的阳性信号, 红色皮肤表皮、基底层和致密层阳性信号较白色皮肤更强。此外, 红色皮肤肌肉中也具有棕黄色阳性信号(图版)。

## 3 讨论

墨蝶呤是一种黄色素蝶呤, 最早发现于黑

腹果蝇中, 参与果蝇黄色体色的形成<sup>[19-21]</sup>。Ziegler等<sup>[11]</sup>概括了斑马鱼蝶啶通路, GTPCH、SPR和PTPS在斑马鱼体色形成中具有重要作用。本实验克隆所得的锦鲤SPR氨基酸序列具有1个保守的adh\_short\_C2结构域。SPR以NADPH为辅酶还原蝶啶等羰基类底物, adh\_short\_C2结构域属于脱氢酶/还原酶家族, 其中一大部分以NAD-或NADP-为辅酶进行氧化还原反应<sup>[22]</sup>。此外, 系统进化树分析显示, 锦鲤SPR与金鱼、鲤等鲤形目鱼类亲缘关系最近, 其次为鲈形目等其他硬骨鱼类, 与两栖类、鸟类和哺乳类亲缘关系最远, 符合锦鲤与其他物种的进化地位和亲缘关系。以上结果暗示本研究所克隆的序列为锦鲤的spr基因, 在蝶啶代谢通路中具有保守作用。



图版 不同体色皮肤组织中SPR的免疫组化结果

1~3. 阴性对照, 纯白锦鲤, 纯红锦鲤的200倍图片; (4~6)阴性对照, 纯白锦鲤, 纯红锦鲤的400倍图片; EP. 表皮, BI. 基底层, S. 鳞片, Sc. 致密层, M. 肌肉

**Plate Immunohistochemical results of SPR in different color skin tissues**

1-3. 200× images of negative control, whole white and whole red koi carp respectively; 4-6. 400× images of negative control, whole white and whole red koi carp respectively; EP. Epidermis, BI. Basal lamina, S. scale, Sc. stratum compactum, M. muscle

$BH_4$ 是多个代谢酶的辅助因子, 在组织和细胞中均有表达<sup>[23-26]</sup>。SPR是 $BH_4$ 从头合成和补充合成路径的关键催化酶, 在多个生理过程中发挥作用。Motoko等<sup>[27]</sup>发现球鼠妇(*Armadillidium vulgare*)雌性SPR的含量远远高于雄性, 参与球鼠妇婚姻色的形成。Mandic等<sup>[28]</sup>在金鱼肝脏、肠道、肌肉和性腺中也检测到 $spr$ 的表达。与金鱼 $spr$ 组织表达结果一致, 锦鲤各个组织中均检测到 $spr$ , 可能与SPR在 $BH_4$ 合成中的催化作用及 $BH_4$ 在多个组织中普遍存在具有一定关系。

本实验中,  $spr$ 在红色皮肤表达量最高, 鳍条和白色皮肤中表达量最低。蛋白印迹结果与qRT-PCR结果基本一致, 红色组织 $spr$ 蛋白表达量显著高于白色组织。这一结果同青鳞<sup>[11]</sup>和斑马鱼<sup>[14]</sup>的研究结果相似。 $spr$ 参与青鳞、斑马鱼色

素细胞的分化和形成, 在黄色素细胞中表达量显著高于黑色素细胞。纯红锦鲤与青鳞和斑马鱼一样同样具有红/黄色素细胞和虹彩细胞, 纯白锦鲤以虹彩细胞为主, 具有少量的黄色素细胞<sup>[29]</sup>。 $spr$ 在红色皮肤、鳞片中的高表达可能与其具有大量红/黄色素细胞有关。红/黄色素细胞主要合成类胡萝卜素/蝶啶成分为主的色素颗粒<sup>[30]</sup>,  $spr$ 的高表达可保证蝶啶色素的合成。相较于红/黄色素细胞, 白色组织的虹彩细胞可合成一部分无色的蝶啶颗粒, 但主要以嘌呤成分为主<sup>[4]</sup>。有趣的是Li等<sup>[17]</sup>利用转录组测序检测到 $spr$ 在红白锦鲤红色和白色斑块上表达量不存在显著差异, 与本研究结果并不一致。原因可能在于转录组取样采用的是2龄锦鲤, 测序样品包含鳞片和皮肤。本研究选用锦鲤体质量约在10 g左右, 皮肤



中并不包含鳞片。这也提示为了证实*spr*在锦鲤体色形成中的作用, 还需要通过遗传学正反向策略研究其在锦鲤蝶啶代谢通路中的作用。

*spr*在锦鲤个体发育的2和12 dph期表达量显著高于4和6 dph。斑马鱼个体发育过程中, *spr*也表现出类似情况<sup>[14]</sup>。随着孵化时间的增加, 色素细胞开始分化, 黑色素细胞、黄色素细胞和虹彩细胞依次出现、数量不断增加, 墨蝶呤和*spr*表达量呈递增趋势, 受精后第5天墨蝶呤和*spr*表达量均达到最高<sup>[11]</sup>。与斑马鱼个体发生一致, 锦鲤在2 dph完成所有色素细胞的分化, 整体表现为黄色, 因此2 dph *spr*表达量达到最高。12 dph是锦鲤从幼鱼体色模式向成鱼体色模式的转化阶段, 所有色素细胞向成鱼色素细胞转化, 数量也急剧增加, 有可能导致*spr*表达量的再次升高。由于前期实验中我们仅对纯红锦鲤体色发生过程进行了观察, 纯白和红白锦鲤是否表现同样表达模式, 还有待进一步观察分析。

免疫组织化学结果基本与qRT-PCR和Western blot结果一致, 红色表皮、真皮层和基底层SPR棕色阳性信号高于白色表皮, 这与色素细胞在鱼类皮肤中的分布位置和数量相一致。青鳉中也表现相似结果, 桔红色斑块皮肤真皮层和致密层黄色素细胞数量明显多于淡黄色皮肤斑块<sup>[31]</sup>。由于SPR不能作为黄色素细胞的定位标记物<sup>[11]</sup>, 我们无法确定带有棕色信号的细胞为黄/红色素细胞, 还需要利用透射电镜进一步确定锦鲤SPR是否仅在皮肤的黄/红色素细胞中分布。结合以上结果, *spr*在红色锦鲤或红白锦鲤红色皮肤中高表达, 参与锦鲤红/黄色素细胞蝶啶代谢通路, 可能在一定程度上影响锦鲤体色的形成。

本研究克隆和分析了锦鲤*spr*的cDNA序列, 并对其同源性和系统进化关系进行了分析。通过qRT-PCR、Western blot和免疫组织化学方法分析显示其在不同体色锦鲤皮肤组织中的表达和分布表现显著差异。实验结果初步证实*spr*与锦鲤红/黄色素细胞分化和形成具有一定相关性, 参与了锦鲤体色的形成。

#### 参考文献:

- [1] Holland P W H, Garcia-Fernández J, Williams N A, *et al.* Gene duplications and the origins of vertebrate development[J]. *Development*, 1994: 125-133.
- [2] Tian X, Pang X L, Wang L Y, *et al.* Dynamic regulation of mRNA and miRNA associated with the developmental stages of skin pigmentation in Japanese ornamental carp[J]. *Gene*, 2018, 666: 32-43.
- [3] Marshall N J, Cheney K. Color vision and color communication in reef fish[M]//Farrell A P. *Encyclopedia of fish physiology: from genome to environment*. San Diego, CA: Academic Press, 2011: 150-158.
- [4] Volkening A, Sandstede B. Iridophores as a source of robustness in zebrafish stripes and variability in *Danio* patterns[J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 3231.
- [5] Saunders L M, Mishra A K, Aman A J, *et al.* Thyroid hormone regulates distinct paths to maturation in pigment cell lineages[J]. *eLife*, 2019, 8: e45181.
- [6] Ichikawa Y, Ohtani H, Miura I. The erythrophore in the larval and adult dorsal skin of the brown frog, *Rana ornativentris*: Its differentiation, migration, and pigmentary organelle formation[J]. *Pigment Cell Research*, 1998, 11(6): 345-354.
- [7] Fujii R. Cytophysiology of fish chromatophores[J]. *International Review of Cytology*, 1993, 143: 191-255.
- [8] 王成辉. 鱼类体色变异的遗传基础研究进展简述[J]. *上海海洋大学学报*, 2012, 21(5): 737-742.  
Wang C H. Brief summary on genetic basis of pigmentation in fish[J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2012, 21(5): 737-742(in Chinese).
- [9] 张艳苹. 红鳍笛鲷皮肤转录组分析及体色相关基因克隆、表达与进化研究[D]. 长沙: 湖南师范大学, 2016.  
Zhang Y P. Study on skin transcriptome of crimson snapper (*Lutjanus erythropterus*), and their pigment genes related cloning, expression and evolution analysis[D]. Changsha: Hunan Normal University, 2016(in Chinese).
- [10] Oliphant L W, Hudon J. Pteridines as reflecting pigments and components of reflecting organelles in vertebrates[J]. *Pigment Cell Research*, 1993, 6(4): 205-208.
- [11] Ziegler I, McDonald T, Hesslinger C, *et al.* Development of the pteridine pathway in the zebrafish, *Danio rerio*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(25): 18926-18932.
- [12] 李晓敏, 李炯棠, 肖贵宝, 等. 红白锦鲤GTP环化水解酶1基因(*Gch1*)的表达及其进化分析[J]. *农业生物技术学报*, 2015, 23(7): 945-952.  
Li X M, Li J T, Xiao G B, *et al.* Expression and evolutionary analysis of GTP Cyclohydrolase 1 Gene

- (*Gchl*) in red-white koi carp (*Cyprinus carpio* var. koi)[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2015, 23(7): 945-952(in Chinese).
- [13] Tong X L, Liang P F, Wu S Y, *et al.* Disruption of PTPS gene causing pale body color and lethal phenotype in the silkworm, *Bombyx mori*[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(4): 1024.
- [14] Negishi S, Fujimoto K, Katoh S. Localization of sepiapterin reductase in pigment cells of *Oryzias latipes*[J]. *Pigment Cell Research*, 2003, 16(5): 501-503.
- [15] Andrade P, Pinho C, Pérez I de Lanuza G, *et al.* Regulatory changes in Pterin and carotenoid genes underlie balanced color polymorphisms in the wall lizard[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2019, 116(12): 5633-5642.
- [16] Ziegler I. The pteridine pathway in zebrafish: regulation and specification during the determination of neural crest cell-fate[J]. *Pigment Cell Research*, 2003, 16(3): 172-182.
- [17] 李梦荣, 田雪, 庞小磊, 等. 基于线粒体*COI*和*Cytb*基因序列的6种锦鲤(*Cyprinus carpio* koi)遗传多样性分析[J]. *淡水渔业*, 2018, 48(3): 13-18.
- Li M R, Tian X, Pang X L, *et al.* Genetic diversity of six species of *Cyprinus carpio* koi based on mitochondrial *COI* and *Cytb* gene sequences[J]. *Freshwater Fisheries*, 2018, 48(3): 13-18(in Chinese).
- [18] De Kock S, Gomelski B. Japanese ornamental koi carp: Origin, variation and genetics[M]//Pietsch C, Hirsch P. *Biology and Ecology of Carp*. Boca Raton, Florida: CRC Press, 2015: 27-53.
- [19] 李闻天, 龚美霞, 戴伟宏, 等. 家蚕墨蝶呤还原酶基因的体外表达及酶活性研究[J]. *激光生物学报*, 2014, 23(3): 257-263.
- Li W T, Gong M X, Dai W H, *et al.* *In vitro* expression and enzymatic properties research on sepiapterin reductase from the silkworm, *Bombyx mori*[J]. *Acta Laser Biology Sinica*, 2014, 23(3): 257-263(in Chinese).
- [20] Seong C, Baek K, Yoon J. Structure, chromosomal localization, and expression of the *Drosophila melanogaster* gene encoding sepiapterin reductase[J]. *Gene*, 2000, 255(2): 357-361.
- [21] Seong C, Kim Y A, Chung H J, *et al.* Isolation and characterization of the *Drosophila melanogaster* cDNA encoding the sepiapterin reductase[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 2009, 1443(1-2): 239-244.
- [22] Yang S J, Jan Y H, Gray J P, *et al.* Sepiapterin reductase mediates chemical redox cycling in lung epithelial cells[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288(26): 19221-19237.
- [23] Thöny B, Auerbach G, Blau N. Tetrahydrobiopterin biosynthesis, regeneration and functions[J]. *Biochemical Journal*, 2000, 347(1): 1-16.
- [24] De Paula Martins R, Glaser V, Aguiar Jr A S, *et al.* De novo tetrahydrobiopterin biosynthesis is impaired in the inflamed striatum of parkin<sup>-/-</sup> mice[J]. *Cell Biology International*, 2018, 42(6): 725-733.
- [25] Leiva A, Fuenzalida B, Westermeier F, *et al.* Role for tetrahydrobiopterin in the fetoplacental endothelial dysfunction in maternal supraphysiological hypercholesterolemia[J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 2016: 5346327.
- [26] Haruki H, Hovius R, Grønlund Pedersen M, *et al.* Tetrahydrobiopterin biosynthesis as a potential target of the kynurenine pathway metabolite Xanthurenic Acid[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2015, 291(2): 652-657.
- [27] Nakagoshi M, Takikawa S I, Negishi S, *et al.* Pteridines in the yellow-colored chromatophores of the isopod, *Armadillidium vulgare*[J]. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*, 1992, 373(2): 1249-1254.
- [28] Mandic S, Volkoff H. The effects of fasting and appetite regulators on catecholamine and serotonin synthesis pathways in goldfish (*Carassius auratus*)[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2018, 223: 1-9.
- [29] 田雪, 庞小磊, 王良炎, 等. MITFa及TYR基因在红色锦鲤体色发生不同阶段的表达分析[J]. *水产科学*, 2017, 36(2): 197-201.
- Tian X, Pang X L, Wang L Y, *et al.* Expression of MITFa and TYR gene in body color formation in red color koi carp *Cyprinus carpio* at different stages[J]. *Fisheries Science*, 2017, 36(2): 197-201(in Chinese).
- [30] Braasch I, Brunet F, Volff J N, *et al.* Pigmentation pathway evolution after whole-genome duplication in fish[J]. *Genome Biology and Evolution*, 2009, 1: 479-493.
- [31] Kottler V A, Koch I, Flötenmeyer M, *et al.* Multiple pigment cell types contribute to the black, blue, and orange ornaments of male guppies (*Poecilia reticulata*)[J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e85647.

## Molecular cloning and expression of sepiapterin reductase in Japanese ornamental carp (*Cyprinus carpio* var. *koi*)

HU Ju<sup>1</sup>, FENG Cai<sup>1</sup>, MA Xiao<sup>1</sup>, WU Limin<sup>1</sup>, LIU Huifen<sup>1</sup>,  
SONG Hongmei<sup>2</sup>, HU Yinchang<sup>2</sup>, TIAN Xue<sup>1\*</sup>, LI Xuejun<sup>1</sup>

(1. College of Fisheries, Engineering Technology Research Center of Henan Province for Aquatic Animal Cultivation,  
Henan Normal University, Xinxiang 453007, China;

2. Key Laboratory of Recreational Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Pearl River Fisheries Research Institute,  
Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China)

**Abstract:** The origin of teleost skin color is from chromatophores. Different chromatophores synthesize distinct pigments, including melanin, carotenoid, pteridine and purine. Sepiapterin is a yellow pteridines, which could be transformed into tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>) and yellow/red pteridines pigments together with sepiapterin reductase (SPR), dihydrofolate reductase (DHFR) and other enzymes. SPR is the last enzyme in the process of de novo BH<sub>4</sub> synthesis. In order to explore the function of *spr* in koi carp color formation, this study amplified the whole cDNA of *spr* and analyzed the spatio-temporal profile. Furthermore, we also detected the expression and distribution of SPR in the skin, fins and scales of koi carp with different colors by Western blot and immunochemistry methods. The results showed that the size of *spr* cDNA was 879 bp, including 132 bp and 134 bp 5' and 3' untranslated regions, and a 510 bp open reading frame encoding 170 amino acids. Sequences alignment and phylogenetic analysis revealed the *spr* gene of koi carp contained a adh\_short\_C2 conserved domain and had 97.65% similarity with gold fish. *spr* was expressed in every tissue, especially highest expressed in skin. In the four ontogenetic stages, the expression level of *spr* firstly decreased, then rose. The expression level of *spr* mRNA and protein in skins, fins and scales displayed the same condition among three colors (whole red koi carp, whole white koi carp and kohaku koi carp). The highest expression level was detected in whole red koi carp and rarely in white skin, fins and scales of kohaku koi carp. The immunohistochemical positive signals were detected in both skins of whole red and whole white koi carp, and intensively exhibited in red skin compared with white skin. All the results might indicate that the *spr* gene has relationship with the xanthophores/erythrophores differentiation and formation, involved in koi carp color formation.

**Key words:** *Cyprinus carpio* var. *koi*; *spr*; cloning; pteridine metabolism; color formation

**Corresponding author:** TIAN Xue. E-mail: tianxue\_81@126.com

**Funding projects:** National Natural Science Foundation Youth Fund (31402294); Key Scientific and Technological Project of Henan Province (182102110164, 192102110192), Open Fund of Key Laboratory of Recreational Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs (2019N06)