

文章编号: 1000-0615(2017)07-1006-11

DOI: 10.11964/jfc.20161210652

黄河鲤酪氨酸酶基因的克隆、表达模式及定位分析

王良炎, 田雪, 庞小磊, 李梦荣, 李学军*

(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)

摘要: 为探究 *Tyrosinase* (*Tyr*) 基因在黄河鲤体色形成中的作用, 利用生物显微镜对黄河鲤黑色鳞片、银色鳞片、鳍条色素细胞的组成进行观察, 并利用 RACE 克隆黄河鲤 *Tyr* 基因全长 cDNA 序列, 荧光定量 PCR 分析其不同组织中的表达情况, Western blot 印迹和免疫组织化学方法检测其蛋白的表达定位。结果显示, 黄河鲤具有黑色素细胞、黄色素细胞和虹彩细胞 3 种色素细胞, 3 种色素细胞的数量、种类和分布在不同组织中存在较大差异。黄河鲤 *Tyr* 基因 cDNA 全长 1717 bp (GenBank ID: No. KY305667), 其中 ORF 长 1605 bp, 编码 535 个氨基酸, 5'-UTR 区 41 bp, 3'-UTR 区 71 bp。蛋白同源分析发现, 黄河鲤 *Tyr* 与鲤科鱼类相似性最高, 与哺乳类及鸟类等脊椎动物相似性最低。系统进化分析显示, 黄河鲤 *Tyr* 与鲤、瓯江彩鲤、锦鲤和斑马鱼等鲤科鱼类的亲缘关系最近。实时定量 PCR 分析表明, *Tyr* 基因在黄河鲤不同组织中均有表达, 肌肉中的表达量最高, 其次是黑色皮肤, 另外在黄色皮肤、臀鳍和尾鳍等黑色素细胞存在的组织中也较高表达。Western blot 印迹结果显示, *Tyr* 基因在黑色皮肤中表达最高, 其次是臀鳍和尾鳍, 银色皮肤中没有表达。免疫组织化学结果显示, *Tyr* 基因在黑色皮肤的黑色素细胞和黏液细胞中有表达。研究表明, *Tyr* 基因表达水平与黑色素细胞数量和分布具有一定相关性, 参与黄河鲤体色的形成。

关键词: 黄河鲤; 体色; 黑色素; *Tyr* 基因

中图分类号: Q 785; S 965

文献标志码: A

黑色素是一种生物色素, 广泛分布于动物、植物、细菌和真菌中, 其存在的数量、性质与分布决定动物皮肤、毛发的颜色^[1]。Tyrosinase (简称 *Tyr*), 酪氨酸酶, 为含铜的氧化还原酶, 具有铜 A 和铜 B 位点, 是黑色素合成过程中的关键限速酶, 决定黑色素颗粒合成的速度和产量^[2]。*Tyr* 活力越高, 皮肤所形成的黑色素含量越高, *Tyr* 突变会造成动物白化现象(白化病)^[2]。鱼类黑色素形成通路同哺乳动物一致, *Tyr* 催化酪氨酸生成多巴, 之后多巴经过一系列反应形成黑色素^[3-4]。黑色素使动物皮肤呈现黑色或棕色, 有时出现黄色^[5-6]。目前 *Tyr* 基因已经在人类 (*Homo sapiens*)^[2]、小鼠 (*Mus musculus*)^[7]、中华鳖 (*Pelodiscus sinensis*)^[8]、海鞘 (*Halocynthia roretzi*)^[9] 等多

个物种中被克隆。此外, 橘色双冠丽鱼 (*Amphilophus citrinellus*)^[10]、青鳉 (*Oryzias latipes*)、锦鲤 (*Cyprinus carpio* Koi)^[11]、瓯江彩鲤 (*Cyprinus carpio* var. *color*)^[12]、金鱼 (*Carassius auratus*) 等鱼类的 *Tyr* 基因也已被克隆, 关于其与体色之间的关系也开展了大量研究, 主要包括 *Tyr* 基因在鱼类体色发育不同阶段以及不同品种或体色鱼类中的表达差异等, 为 *Tyr* 基因的功能研究奠定了基础。

黄河鲤 (*Cyprinus carpio haematopterus*), 隶属于鲤形目 (Cypriniformes), 鲤科 (Cyprinidae), 鲤属 (*Cyprinus*), 因其金鳞赤尾, 肉质鲜美而闻名, 是黄河流域主要名贵优质鱼类之一。本实验通过克隆黄河鲤 *Tyr* 基因, 并采用 qRT-PCR、western blot 等方法对其在黄河鲤中的表达情况进

收稿日期: 2016-12-20 修回日期: 2017-03-15

资助项目: 国家自然科学基金(31402294); 河南省国际科技合作计划项目(152102410040)

通信作者: 李学军, E-mail: xjli@htu.cn

行分析, 探讨 *Tyr* 基因与黄河鲤体色之间的关系, 旨在了解黄河鲤体色形成的分子基础, 为鱼类体色遗传和改良提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验用鱼及取材

本实验所用黄河鲤均取自河南师范大学水产养殖基地。选取1龄黄河鲤3条, 取背部黑色鳞片、腹部银色鳞片、鳍条在生物显微镜下进行观察。同时取背部黑色皮肤、腹部银色皮肤、尾鳍、臀鳍、黄色皮肤、背部肌肉、腹部肌肉、肝胰、肠、鳃、脑等组织放入液氮中保存。按照RNAiso Plus (TaKaRa, 大连)试剂说明书提取液氮保存组织的总RNA, RNA完整性用凝胶电泳方法检测, 其浓度及OD值用ND-2000核酸蛋白

仪进行测定。

1.2 黄河鲤 *Tyr* 基因全长的克隆

根据GenBank中的相关序列, 利用Primer 5.0 软件在其CDS区设计特异性引物 *Tyr*-F和 *Tyr*-R (表1), 用于 *Tyr* 中间片段的扩增。以提取的黄河鲤黑色皮肤的总RNA为模板, 按照PrimeScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa, 大连)说明书进行第一链cDNA的合成。以第一链cDNA为模板进行PCR扩增, 条件如下: 94 °C 预变性2 min; 94 °C 30 s, 65 °C 30 s, 72 °C 2 min, 共35个循环; 72 °C 延伸5 min。PCR扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测, 纯化后经连接、转化送上海生工公司进行测序。在已获得序列的基础上设计3'-RACE和5'-RACE的特异性引物(表1), 进行3'和5'末端扩增。

表 1 实验中所用引物序列

Tab. 1 The sequence of primers used in the study

引物名称 primer names	引物序列(5'-3') sequences	用途 usage
<i>Tyr</i> -F	GCTTCTGCCAAGTCGTCACGGTCTC	中间片段扩增 partial sequence PCR
<i>Tyr</i> -R	GTCAGAACTCCTGCACAAACCGCT	
3' RACE Out	CTTTGAGCAATGGCTGAGGAGACACC	3' 端扩增 3'- RACE PCR
3' RACE In	TTTACAGGACCCAAAGTCAGCGG	
5' RACE Out	GCTCCCAGAACAGCAGGTAAACG	5' 端扩增 5'- RACE PCR
5' RACE In	CGGCACACTGGCAGGTTTGGTT	
UPM-L	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCA GTGGTATCAACGCAGAGT	通用引物 universal primer
UPM-S	CTAATACGACTCACTATAGGGC	
q <i>Tyr</i> -F	TCGCGTTTACCTGCTGTCT	荧光定量 qRT-PCR
q <i>Tyr</i> -R	GCTGAGATGGTTGGGGTTGA	
β -actin-F	TGCAAAGCCGGATTCGCTGG	内参 housekeeping gene
β -actin-R	AGTTGGTGACAATACCGTGC	

使用SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit (TaKaRa, 大连)进行3'-和5'-RACE-Ready cDNA 的合成。进行扩增时, 分别以引物对3'-RACE Out & UPM-L和5'-RACE Out & UPM-L进行扩增。扩增产物稀释50倍作为巢式PCR模板, 以3'-RACE inner & UPM-S和5'-RACE inner & UPM-S 引物对进行第二轮嵌套PCR。扩增条件: 94 °C 预变性2 min; 94 °C 30 s, 59 °C 30 s, 72 °C 90 s, 共30个循环; 72 °C延伸5 min。对PCR产物的验证采用中间片段的克隆方法。

1.3 *Tyr* 基因序列分析

利用DNASTAR软件进行黄河鲤 *Tyr* 序列拼接。Open Reading Frame (ORF) Finder(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)推算其开放阅读框和编码氨基酸序列。SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)及SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)用于信号序列和蛋白结构域的分析。ClustalX2将黄河鲤 *Tyr* 氨基酸序列与GenBank中的其他物种的 *Tyr* 氨基酸序列进行同源性比对。

MEGA 6.0软件以邻接法(Neighbor-Joining, NJ)(bootstrap values为1000)构建系统发育树。

1.4 qRT-PCR分析黄河鲤Tyr基因的组织特异性表达

根据所获得的黄河鲤Tyr基因cDNA序列设计正反引物,并以 β -actin为内参基因(表1)。取1 μ g总RNA,按照PrimeScript RT reagent Kit With gDNA Eraser (TaKaRa, 大连)试剂说明书进行反转录。采用罗氏Light Cycle 96荧光定量PCR仪,参照SYBR® Premix Ex Taq™ (Tli RNaseH Plus)(TaKaRa, 大连)说明书进行qRT-PCR扩增。反应体系10 μ L: 5 μ L SYBR® Premix Ex Taq™ (TaKaRa, 大连), 0.3 μ L PCR Forward Primer (10 μ mol/L), 0.3 μ L PCR Reverse Primer (10 μ mol/L), 1.0 μ L cDNA模板, 3.4 μ L无菌水。扩增程序采用两步法: 95 °C预变性30 s; 95 °C 5 s, 60 °C 20 s, 40个循环, 每个样品3个平行。 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算黄河鲤实验样本中的Tyr相对表达量, SPSS16.0软件进行One-Way ANOVA统计分析所得数据。

1.5 Western blot印迹分析Tyr蛋白在不同组织中的表达

黄河鲤黑色皮肤、银色皮肤、臀鳍及尾鳍的总蛋白提取根据Western blot及IP细胞裂解液(碧云天, 上海)说明书进行, 蛋白浓度使用BCA蛋白浓度测定试剂盒(碧云天, 上海)进行测定, 每孔总蛋白加样量为25 μ g, 进行SDS-PAGE电泳, 100 mA恒流转印至PVDF膜, 转膜时间为1.5 h。室温下, 5%脱脂奶粉封闭1 h。PVDF膜用兔抗Tyr多克隆抗体(TBST 1:100稀释, Santa Cruz, H-109: sc-15341, 美国)和兔抗GAPDH多克隆抗体(TBST 1:100稀释, 杭州贤至生物公司)进行孵育, 4 °C过夜。TBST漂洗PVDF膜3次, 每次5 min。HRP-山羊抗兔IgG (TBST 1:5000稀释, 北京中杉金桥生物公司, 北京)37 °C摇床孵育PVDF膜1 h, 将PVDF膜用TBST漂洗3次, 每次5 min。ECL发光显色、暗室胶片(Canon, 苏州)曝光, 采集图像储存分析。

1.6 黄河鲤皮肤组织Tyr的免疫组织化学染色

取体色完全形成的1龄黄河鲤背部黑色皮肤和腹部银色皮肤, 4%多聚甲醛固定24 h, 酒精梯度脱水、二甲苯透明, 浸蜡2.5 h后包埋箱中包埋; 对包埋好的蜡块进行修块及切片, 厚度为6 μ m; 选择组织结构完整的石蜡切片脱蜡至水; 室温

下, 3% H₂O₂孵育10 min以去除内源性过氧化物酶, 切片经PBS缓冲溶液清洗3次, 每次5 min; 然后用5%非免疫牛血清在37 °C封闭20 min后甩干牛血清; 37 °C兔抗Tyr多克隆抗体(PBS 1:200稀释, Santa Cruz, 美国)孵育30 min, 4 °C过夜; 将切片在37 °C孵育20 min, PBS缓冲溶液清洗; 37 °C HRP-山羊抗兔IgG (PBS 1:5000稀释, 北京中杉金桥生物公司, 北京)孵育20 min, 阴性对照为非免疫牛血清, 切片经PBS缓冲溶液冲洗; 按照DAB试剂盒(北京中杉金桥生物公司, 北京)说明书进行显色反应, 反应时间为20 min, 蒸馏水终止反应, 用PBS缓冲液进行冲洗; 苏木素轻度复染后经脱水、透明后中性树胶封片。

2 结果

2.1 黄河鲤背部鳞片、腹部鳞片及鳍条色素细胞的观察

通过观察黄河鲤背部、腹部鳞片及鳍条色素细胞的组成, 发现黄河鲤有3种色素细胞即黑色素细胞、黄色素细胞和虹彩细胞(图1)。其中, 背部黑色鳞片具有黑色素细胞、黄色素细胞和虹彩细胞。腹部的银色鳞片具有2种色素细胞即黄色素细胞和虹彩细胞。鳍条具有黑色素细胞和黄色素细胞。不同部位色素细胞的数量和种类不同造成了其颜色的差异。

2.2 Tyr基因的全长克隆及序列分析

克隆序列经测序、拼接, 得到黄河鲤Tyr基因cDNA全长为1717 bp, 其中编码区长1605 bp, 编码535个氨基酸, 5'非编码区长41 bp, 3'非编码区长71 bp (图2)。序列已提交至GenBank (No. KY305667)。通过在线软件分析发现黄河Tyr与其他鱼类一样在N端有19个氨基酸残基的信号肽, 并有4个比较保守的结构域信号即EGF-like (LE) 结构域信号、铜离子结合区域CuA、CuB信号和双亮氨酸信号。黄河鲤Tyr蛋白包含13个半胱氨酸残基(cysteine, cys), 其中9个cys分布在近N端, 另4个分布在CuA和CuB之间(图2)。将黄河鲤的Tyr蛋白序列进行多重比对后(图3), 发现4个结构域均比较保守。

2.3 黄河鲤Tyr蛋白同源性比较及系统进化树构建

使用Clustal X2软件分析黄河鲤Tyr与其他物

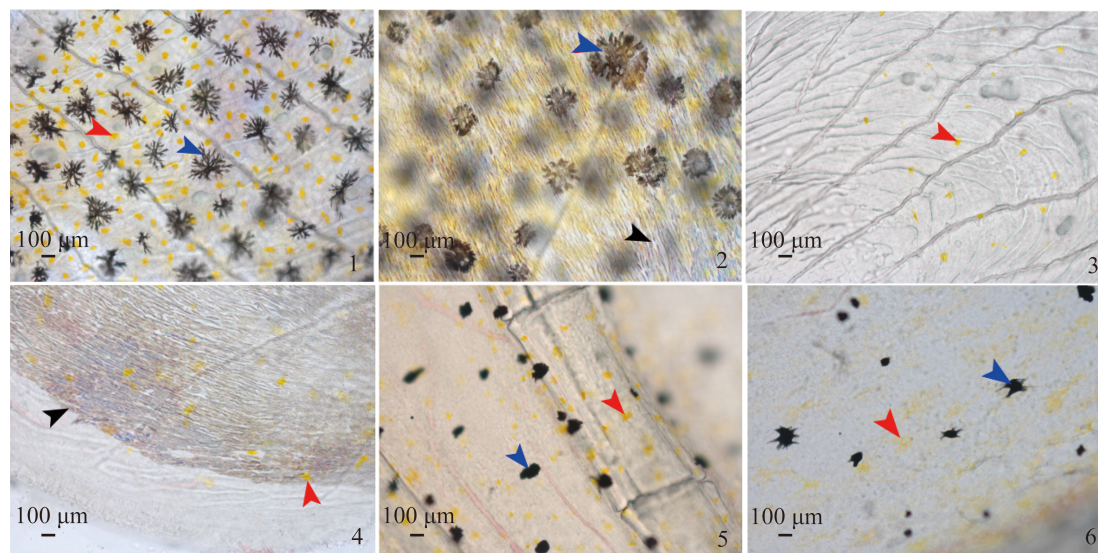


图 1 黄河鲤背部、腹部鳞片及鳍条色素细胞的观察

1. 背部黑色鳞片的正面观; 2. 背部黑色鳞片的背面观; 3. 腹部银色鳞片的正面观; 4. 腹部银色鳞片的背面观; 5、6. 臀鳍. 红色箭头: 黄色素细胞; 蓝色箭头: 黑色素细胞; 黑色箭头: 虹彩细胞

Fig. 1 Observation of chromatophores on back scales, abdomen scales and fin of Yellow River carp

1. The front view of black scales; 2. the back view of black scales; 3. the front view of silvery scales; 4. the back view of silvery scales; 5, 6. anal fin. The blue arrow: melanophores; the red arrow: xanthophores; the black arrow: iridophores

种氨基酸相似性(图3), 结果显示, 黄河鲤与鲤的相似性最高, 为99.6%, 与其他鱼类的相似性在63.5%~99.2%, 与其他脊椎动物的氨基酸相似性在60.3%~63.2%。采用NJ法构建蛋白系统发育树(图4), 结果显示: 黄河鲤与鲤的Tyr进化关系最近, 聚为一小支, 之后与瓯江彩鲤、锦鲤及斑马鱼(*Danio rerio*)等鲤科鱼类聚为一支, 与其他鱼类聚为一个大分支, 哺乳类、鸟类等其他脊椎动物聚为另一大支, 这与Clustal X2比对结果一致。

2.4 黄河鲤Tyr基因的组织特异性表达

qRT-PCR检测结果显示, 黄河鲤Tyr mRNA在所有组织中均有表达, 其中背部肌肉中的表达量最高, 其次为腹部肌肉、黑色皮肤、肝胰、黄色皮肤、臀鳍和尾鳍, 在银色皮肤中的表达量最低(图5)。在含有色素细胞的组织中, 黑色素细胞数量最丰富的黑色皮肤中Tyr表达量最高, 其次是黄色皮肤、尾鳍和臀鳍, 银色皮肤中表达量最低。

2.5 黄河鲤不同组织Tyr蛋白表达情况

Western blot印迹检测结果显示, 黄河鲤黑色皮肤、臀鳍和尾鳍的蛋白中有与Tyr多克隆抗

体发生免疫阳性反应的蛋白质条带, 分子量大小约为75 ku, 银色皮肤的蛋白中没有检测到与Tyr多克隆抗体发生免疫阳性反应的蛋白条带(图6-a)。对黄河鲤Tyr、内参GAPDH免疫印迹结果的分析显示: 在黄河鲤的黑色皮肤中Tyr的蛋白表达量最高, 其次为尾鳍和臀鳍, 在银色皮肤中没有检测到Tyr蛋白表达(图6-b)。

2.6 黄河鲤皮肤组织Tyr的免疫组织化学染色结果

黄河鲤皮肤主要由表皮层和真皮层组成, 鳞片的插入位置位于表皮层或表皮层与真皮层之间。黄河鲤银色皮肤中未发现黑色素细胞, 黑色皮肤中的真皮层和表皮层中存在黑色素细胞。Tyr免疫组织化学染色结果显示: 黄河鲤黑色皮肤中有棕黄色阳性反应, 银色皮肤中未见阳性反应物(图7)。黑色皮肤中, Tyr在黑色素细胞存在的位置有表达, 黏液细胞中也发现有阳性反应, 阴性对照组皮肤组织中未观察到阳性反应。

3 讨论

本实验获得黄河鲤Tyr基因cDNA全长序列1717 bp, 阅读框长1605 bp, 编码535个氨基酸,

1	ttttcctaactcttcggtgtctaattcgctctcgctctcgctc
1	M S L P L L L F F I Q
76	TCTTGAGTCCGTCTCCCCAGCAGTTTCTCGGCGGTGCACCACGCCGGACGCTCTCGGAGCAAGCGTGTCTGTC
12	F L S P S P Q Q F P R P C. T T P D V L R S K R C. C.
151	CGGTTTGGCCGGCGACGGTTTCGGTGTGCGGCTCCCTTTTCGGGTGAGGCTTCTGCCAGGACGTCACGGTCTCCG
37	P V W P G D G S V C G S L S G R G F C. Q D V T V S
226	ATCTTCCCAACGGGCGCAGTACCCGCAATTCAGGCCTGGACGACCGCAACATGGCCTCTGGTGTTTTACAACC
62	D L P N G P Q Y P H S S G L D D R E Q W P L V F Y N
	EGF-like domain
301	AAACCTGCCAGTGTGCCGCAACTACATGGGGTTCGACTGTGGCGAGTGCAAGTTCGGTTACTTCGGCGCCAATT
87	Q T C. Q C. A G N Y M G F D C. G E C. K F G Y F G A N
376	GCGGTGAACGACGGGAATCTGTGCGCAAAACATCTTCCAATATCCGTCTCTGAAAGGCAGAGGTTCATCTCGT
112	C. G E R R E S V R K N I F Q L S V S E R Q R F I S
451	ACCTCAATCTCGCCAAACATCAGTCAGCCGTGATTATATGATCGTGACGGGCGTGTACTCACAGATGAACACG
137	Y L N L A K T T V S P D Y M I V T G V Y S Q M N N
526	GCTCGACGCCCATGTTACCAACATCAGTGTGTATGATCTGTTCGTCTGGATGCACTATTACGTGTCCCGCATG
162	G S T P M F T N I S V Y D L F V W M H Y Y V F Y N
	CuA-binding
601	CACTGCTCGGGGTCGCCGGAACGTGTGGGCGACATTGACTTTGCACACGAATCGGCCGCTTTCTGCCATGGC
187	A L L G G P G N V W A D I D F A H E S A A F L P W
676	ATCGGTTTACCTGTGTCTCTGGGAGCATGAGATCCGGAAGCTGACCGGTGACTTTAACTTACCATCCCGTACT
212	H R V Y L L F W E H E I R K L T G D F N F T I P Y
751	GGGACTGGCGTACGCTCAGGACTGTCAAGTGTGCACGGATGAGCTGATGGGGCGACGCACTCTCAACCCCA
237	W D W R D A Q D C. Q V C. T D E L M G A R S P L N P
826	ACCTCAGCCCGTCTCGGTGTCTCTCTCTGGAAGTGATCTGTTCACAACCCGAAGACTACAAACCGCGTG
262	N L I S P S S V F S S W K V I C. S Q P E D Y N Q R
901	AGGTTTGTGTGACGGATCTCCAGAGGGACCGTTACTGCGTAATCCAGGAAACACGACCCAAACCGTGTCCCGC
287	E V L C. D G S P E G P L L R N P G N H D P R N V P
976	GGCTGCCACCTCCGACAGCTGGAGTCACTGCTGAGCCTAACAGAGTACGAGACGGGTCTGATGGACAGACGCG
312	R L P T S A D V E S V L S L T E Y E T G L M D R R
1051	CCAACTAGAGCTTCAGGAACGCTCTGGAAGGTTTTCGAGTCTGAGACGGGGTGGCAGTAACGGGGCAGAGCT
337	A N M S F R N A L E G F A S P E T G L A V T G Q S
	CuB-binding
1126	TGATGCACAACCTCTACAGTCTTCATGAACGGATCCATGTCTTCAGTGCAGGGATCCGCCAACGACCCCATCT
362	L M H N S L H V F M N G S M S S V Q G S A N D P I
1201	TCCTTCTACATCATGCCTTCATCGACAGCATCTTTGAGCAATGGCTGAGGAGACACGACCCCGGCACACACT
387	F L L H H A F I D S I F E Q W L R R H Q P R T H
1276	ACCCGACAGCCAACGCCCAATCGGACACAACGACGGCTTTTACATGGTCCCTTCATCCCTCTGTACAGAAACG
412	Y P T A N A P I G H N D G F Y M V P F I P L Y R N
1351	GAGATTATTCTCTCGACTAAAGCTCTGGGATATGAATATGCATATTTACAGGACCAAGTCAGCGGTTTGTGC
437	G D Y F L S T K A L G Y E Y A Y L Q D P S Q R F V
1426	AGGAGTTTCTGACGCGTATCTAGAGCAAGCTCAGCAGATCTGGCGCTGGCTGCTGGCCGCGGGGCTCTCGCGG
462	Q E F L T P Y L E Q A Q Q I W R W L L A G G L C
1501	CGGCTGTGGCGGAATTATGCAACTATTATCACCGTGGCGTGTGCGACGCGCTGAAGAGGCGAAAGTCATCGG
487	A A V A G I I A T I I T V A C R R R L K R R K S S
	Dileucine signal
1576	CGTACGGGAGAGACGCCACTGCTGAACAGCAGTGAAGAGGAGGGATCGACTTTCATGTGAGACTACACTGTGAa
512	A Y G E R Q P L L N S S E E E G S T S C Q T T L *
1651	taagagcgttaagcctacagacagtgccagcgaggacagatacgccaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

图2 黄河鲤Tyr基因序列和氨基酸序列

小写字母表示5'和3'非编码区；大写字母表示编码区。预测的信号肽用下划线表示，结构域EGF-like、CuA、CuB和双亮氨酸信号用方框表示。半胱氨酸残基位点下标有黑色圆点，*表示终止密码子

Fig. 2 Full-length nucleotide cDNA sequence and deduced amino acid sequences of Tyr in Yellow River carp

The lowercase letters indicate 5' and 3' UTR; and the ORF is presented in capital letters. EGF-like domain signature, CuA-binding, CuB-binding domains signature and dileucine signal are boxed. Conserved cysteine residues are indicated by black solid dots and the stop codon is indicated by an asterisk

具有4个保守区域(图2)，N端的EGF like结构域(C-x-C-x(2)-[V](2)-G-[C]-x-C) (x表示除脯氨酸外任意氨基酸)、两个保守铜离子结构域CuA、CuB以及双亮氨酸信号(E-X (2)-PLL)(图2)，这之前报道的脊椎动物Tyr蛋白结构域一致^[13-14]。黄河鲤Tyr蛋白N-末端具有指导蛋白质跨膜转移所必须的信号肽序列^[15](图2)。N端的EGF-like结构域与Tyr受体蛋白TRPs (tyrosinase receptor proteins)形成的多酶复合物相关^[16]。组氨酸(histidine)作为Cu²⁺的配体，是酶催化活性的必需残基。CuA和CuB作为Tyr的催化活性中心，是Cu²⁺与含有两个

组氨酸的结构域(H-x(4,5)-F-[LIVMFTP]-x-[FW]-H-R-x(2)-[LVMT]-x(3)-E)和(D-P-x-F-[LIVMFYW]-x(2)-x(3)-D)结合而形成的^[17]。位于Tyr蛋白C端的双亮氨酸信号可以将Tyr从细胞液中转移到黑色素小体，从而形成黑色素^[18]。序列比对结果显示黄河鲤Tyr具有13个cys，其中9个位于近N端，4个位于CuA、CuB之间，这与锦鲤^[11]、斑马鱼、虹鳟及橘色双冠丽鱼^[10]等物种的Tyr所包含的cys数量和位置一致，说明Tyr在鱼类间具有高度保守性。系统进化树分析发现黄河鲤Tyr氨基酸序列同鲤、瓯江彩鲤、锦鲤和斑马鱼等鲤科鱼类

的相似性最高, 亲缘关系最近, 与爬行类、哺乳类和鸟类相似性较低, 亲缘关系较远, 这一结果与黄河鲤的分类地位相一致(图4)。

鱼类体色多种多样, 主要由鳞片及皮肤所含色素细胞的种类、数量以及分布的不同导致^[19-20]。

本实验对黄河鲤背部和腹部鳞片、鳍条色素细胞进行观察, 发现黄河鲤主要有3种色素细胞即黑色素细胞、黄色素细胞和虹彩细胞, 其中黑色鳞片上的黑色素细胞最多, 鳍条次之, 而在银色鳞片上没有发现黑色素细胞(图1)。因此, 我

锦鲤 <i>C. carpio</i>	: —MSLP-LLFFQFSP-LQIPRFTTDPVRSRCPCWPGD-SVCGSLRGCGQVIT-SDLNCPYYPHGLDDREWFLVFNQT-ZCAGNYIGFCGEC-FG-FEACGR-116	锦鲤 <i>C. carpio</i>	: ES-RRITQLSVSE-QRISYLNLAKTIV-PYVITGV-SMN-NSTMFNINISYDLFVMMHY-SKALLGCGPNVIA-IDF-HSAAPLPHWRVLLFWE-116	锦鲤 <i>C. carpio</i>	: YVDRDAQGCCT-ELGARS-LNPLISPSFVSFWICSPDY-QREVLG-PEGPLRPGNDPN-VPLPTSAIVSVSLIYETGLMDRANFSRNLEGGSPETIL-355	锦鲤 <i>C. carpio</i>	: VTG-SLHNSLHVFMGSMSSVGSAN-PIFLHHFID-SIFEWRR-CPRTHTNAPIGHNDGFWMPFLPLRN-DYFLSKALGYBYAVLQDPSQRFVE-ELTYLQAAQ-475
斑马鱼 <i>D. rerio</i>	: —MSLP-LLFFQFSP-LQIPRFTTDPVRSRCPCWPGD-SVCGSLRGCGQVIT-SDLNCPYYPHGLDDREWFLVFNQT-ZCAGNYIGFCGEC-FG-FEACGR-116	斑马鱼 <i>D. rerio</i>	: ES-RRITQLSVSE-QRISYLNLAKTIV-PYVITGV-SMN-NSTMFNINISYDLFVMMHY-SKALLGCGPNVIA-IDF-HSAAPLPHWRVLLFWE-116	斑马鱼 <i>D. rerio</i>	: YVDRDAQGCCT-ELGARS-LNPLISPSFVSFWICSPDY-QREVLG-PEGPLRPGNDPN-VPLPTSAIVSVSLIYETGLMDRANFSRNLEGGSPETIL-355	斑马鱼 <i>D. rerio</i>	: VTG-SLHNSLHVFMGSMSSVGSAN-PIFLHHFID-SIFEWRR-CPRTHTNAPIGHNDGFWMPFLPLRN-DYFLSKALGYBYAVLQDPSQRFVE-ELTYLQAAQ-475
中华鳖 <i>P. sinensis</i>	: —MSLP-LLFFQFSP-LQIPRFTTDPVRSRCPCWPGD-SVCGSLRGCGQVIT-SDLNCPYYPHGLDDREWFLVFNQT-ZCAGNYIGFCGEC-FG-FEACGR-116	中华鳖 <i>P. sinensis</i>	: ES-RRITQLSVSE-QRISYLNLAKTIV-PYVITGV-SMN-NSTMFNINISYDLFVMMHY-SKALLGCGPNVIA-IDF-HSAAPLPHWRVLLFWE-116	中华鳖 <i>P. sinensis</i>	: YVDRDAQGCCT-ELGARS-LNPLISPSFVSFWICSPDY-QREVLG-PEGPLRPGNDPN-VPLPTSAIVSVSLIYETGLMDRANFSRNLEGGSPETIL-355	中华鳖 <i>P. sinensis</i>	: VTG-SLHNSLHVFMGSMSSVGSAN-PIFLHHFID-SIFEWRR-CPRTHTNAPIGHNDGFWMPFLPLRN-DYFLSKALGYBYAVLQDPSQRFVE-ELTYLQAAQ-475
马 <i>E. caballus</i>	: —MSLP-LLFFQFSP-LQIPRFTTDPVRSRCPCWPGD-SVCGSLRGCGQVIT-SDLNCPYYPHGLDDREWFLVFNQT-ZCAGNYIGFCGEC-FG-FEACGR-116	马 <i>E. caballus</i>	: ES-RRITQLSVSE-QRISYLNLAKTIV-PYVITGV-SMN-NSTMFNINISYDLFVMMHY-SKALLGCGPNVIA-IDF-HSAAPLPHWRVLLFWE-116	马 <i>E. caballus</i>	: YVDRDAQGCCT-ELGARS-LNPLISPSFVSFWICSPDY-QREVLG-PEGPLRPGNDPN-VPLPTSAIVSVSLIYETGLMDRANFSRNLEGGSPETIL-355	马 <i>E. caballus</i>	: VTG-SLHNSLHVFMGSMSSVGSAN-PIFLHHFID-SIFEWRR-CPRTHTNAPIGHNDGFWMPFLPLRN-DYFLSKALGYBYAVLQDPSQRFVE-ELTYLQAAQ-475
东方红鳍鲃 <i>I. rubripes</i>	: —MSLP-LLFFQFSP-LQIPRFTTDPVRSRCPCWPGD-SVCGSLRGCGQVIT-SDLNCPYYPHGLDDREWFLVFNQT-ZCAGNYIGFCGEC-FG-FEACGR-116	东方红鳍鲃 <i>I. rubripes</i>	: ES-RRITQLSVSE-QRISYLNLAKTIV-PYVITGV-SMN-NSTMFNINISYDLFVMMHY-SKALLGCGPNVIA-IDF-HSAAPLPHWRVLLFWE-116	东方红鳍鲃 <i>I. rubripes</i>	: YVDRDAQGCCT-ELGARS-LNPLISPSFVSFWICSPDY-QREVLG-PEGPLRPGNDPN-VPLPTSAIVSVSLIYETGLMDRANFSRNLEGGSPETIL-355	东方红鳍鲃 <i>I. rubripes</i>	: VTG-SLHNSLHVFMGSMSSVGSAN-PIFLHHFID-SIFEWRR-CPRTHTNAPIGHNDGFWMPFLPLRN-DYFLSKALGYBYAVLQDPSQRFVE-ELTYLQAAQ-475
小鼠 <i>M. musculus</i>	: —MSLP-LLFFQFSP-LQIPRFTTDPVRSRCPCWPGD-SVCGSLRGCGQVIT-SDLNCPYYPHGLDDREWFLVFNQT-ZCAGNYIGFCGEC-FG-FEACGR-116	小鼠 <i>M. musculus</i>	: ES-RRITQLSVSE-QRISYLNLAKTIV-PYVITGV-SMN-NSTMFNINISYDLFVMMHY-SKALLGCGPNVIA-IDF-HSAAPLPHWRVLLFWE-116	小鼠 <i>M. musculus</i>	: YVDRDAQGCCT-ELGARS-LNPLISPSFVSFWICSPDY-QREVLG-PEGPLRPGNDPN-VPLPTSAIVSVSLIYETGLMDRANFSRNLEGGSPETIL-355	小鼠 <i>M. musculus</i>	: VTG-SLHNSLHVFMGSMSSVGSAN-PIFLHHFID-SIFEWRR-CPRTHTNAPIGHNDGFWMPFLPLRN-DYFLSKALGYBYAVLQDPSQRFVE-ELTYLQAAQ-475
黄河鲤 <i>C. carpio haematopterus</i>	: —MSLP-LLFFQFSP-LQIPRFTTDPVRSRCPCWPGD-SVCGSLRGCGQVIT-SDLNCPYYPHGLDDREWFLVFNQT-ZCAGNYIGFCGEC-FG-FEACGR-116	黄河鲤 <i>C. carpio haematopterus</i>	: ES-RRITQLSVSE-QRISYLNLAKTIV-PYVITGV-SMN-NSTMFNINISYDLFVMMHY-SKALLGCGPNVIA-IDF-HSAAPLPHWRVLLFWE-116	黄河鲤 <i>C. carpio haematopterus</i>	: YVDRDAQGCCT-ELGARS-LNPLISPSFVSFWICSPDY-QREVLG-PEGPLRPGNDPN-VPLPTSAIVSVSLIYETGLMDRANFSRNLEGGSPETIL-355	黄河鲤 <i>C. carpio haematopterus</i>	: VTG-SLHNSLHVFMGSMSSVGSAN-PIFLHHFID-SIFEWRR-CPRTHTNAPIGHNDGFWMPFLPLRN-DYFLSKALGYBYAVLQDPSQRFVE-ELTYLQAAQ-475
锦鲤 <i>C. carpio</i>	: —MSLP-LLFFQFSP-LQIPRFTTDPVRSRCPCWPGD-SVCGSLRGCGQVIT-SDLNCPYYPHGLDDREWFLVFNQT-ZCAGNYIGFCGEC-FG-FEACGR-116	锦鲤 <i>C. carpio</i>	: ES-RRITQLSVSE-QRISYLNLAKTIV-PYVITGV-SMN-NSTMFNINISYDLFVMMHY-SKALLGCGPNVIA-IDF-HSAAPLPHWRVLLFWE-116	锦鲤 <i>C. carpio</i>	: YVDRDAQGCCT-ELGARS-LNPLISPSFVSFWICSPDY-QREVLG-PEGPLRPGNDPN-VPLPTSAIVSVSLIYETGLMDRANFSRNLEGGSPETIL-355	锦鲤 <i>C. carpio</i>	: VTG-SLHNSLHVFMGSMSSVGSAN-PIFLHHFID-SIFEWRR-CPRTHTNAPIGHNDGFWMPFLPLRN-DYFLSKALGYBYAVLQDPSQRFVE-ELTYLQAAQ-475
斑马鱼 <i>D. rerio</i>	: —MSLP-LLFFQFSP-LQIPRFTTDPVRSRCPCWPGD-SVCGSLRGCGQVIT-SDLNCPYYPHGLDDREWFLVFNQT-ZCAGNYIGFCGEC-FG-FEACGR-116	斑马鱼 <i>D. rerio</i>	: ES-RRITQLSVSE-QRISYLNLAKTIV-PYVITGV-SMN-NSTMFNINISYDLFVMMHY-SKALLGCGPNVIA-IDF-HSAAPLPHWRVLLFWE-116	斑马鱼 <i>D. rerio</i>	: YVDRDAQGCCT-ELGARS-LNPLISPSFVSFWICSPDY-QREVLG-PEGPLRPGNDPN-VPLPTSAIVSVSLIYETGLMDRANFSRNLEGGSPETIL-355	斑马鱼 <i>D. rerio</i>	: VTG-SLHNSLHVFMGSMSSVGSAN-PIFLHHFID-SIFEWRR-CPRTHTNAPIGHNDGFWMPFLPLRN-DYFLSKALGYBYAVLQDPSQRFVE-ELTYLQAAQ-475
中华鳖 <i>P. sinensis</i>	: —MSLP-LLFFQFSP-LQIPRFTTDPVRSRCPCWPGD-SVCGSLRGCGQVIT-SDLNCPYYPHGLDDREWFLVFNQT-ZCAGNYIGFCGEC-FG-FEACGR-116	中华鳖 <i>P. sinensis</i>	: ES-RRITQLSVSE-QRISYLNLAKTIV-PYVITGV-SMN-NSTMFNINISYDLFVMMHY-SKALLGCGPNVIA-IDF-HSAAPLPHWRVLLFWE-116	中华鳖 <i>P. sinensis</i>	: YVDRDAQGCCT-ELGARS-LNPLISPSFVSFWICSPDY-QREVLG-PEGPLRPGNDPN-VPLPTSAIVSVSLIYETGLMDRANFSRNLEGGSPETIL-355	中华鳖 <i>P. sinensis</i>	: VTG-SLHNSLHVFMGSMSSVGSAN-PIFLHHFID-SIFEWRR-CPRTHTNAPIGHNDGFWMPFLPLRN-DYFLSKALGYBYAVLQDPSQRFVE-ELTYLQAAQ-475
马 <i>E. caballus</i>	: —MSLP-LLFFQFSP-LQIPRFTTDPVRSRCPCWPGD-SVCGSLRGCGQVIT-SDLNCPYYPHGLDDREWFLVFNQT-ZCAGNYIGFCGEC-FG-FEACGR-116	马 <i>E. caballus</i>	: ES-RRITQLSVSE-QRISYLNLAKTIV-PYVITGV-SMN-NSTMFNINISYDLFVMMHY-SKALLGCGPNVIA-IDF-HSAAPLPHWRVLLFWE-116	马 <i>E. caballus</i>	: YVDRDAQGCCT-ELGARS-LNPLISPSFVSFWICSPDY-QREVLG-PEGPLRPGNDPN-VPLPTSAIVSVSLIYETGLMDRANFSRNLEGGSPETIL-355	马 <i>E. caballus</i>	: VTG-SLHNSLHVFMGSMSSVGSAN-PIFLHHFID-SIFEWRR-CPRTHTNAPIGHNDGFWMPFLPLRN-DYFLSKALGYBYAVLQDPSQRFVE-ELTYLQAAQ-475
东方红鳍鲃 <i>I. rubripes</i>	: —MSLP-LLFFQFSP-LQIPRFTTDPVRSRCPCWPGD-SVCGSLRGCGQVIT-SDLNCPYYPHGLDDREWFLVFNQT-ZCAGNYIGFCGEC-FG-FEACGR-116	东方红鳍鲃 <i>I. rubripes</i>	: ES-RRITQLSVSE-QRISYLNLAKTIV-PYVITGV-SMN-NSTMFNINISYDLFVMMHY-SKALLGCGPNVIA-IDF-HSAAPLPHWRVLLFWE-116	东方红鳍鲃 <i>I. rubripes</i>	: YVDRDAQGCCT-ELGARS-LNPLISPSFVSFWICSPDY-QREVLG-PEGPLRPGNDPN-VPLPTSAIVSVSLIYETGLMDRANFSRNLEGGSPETIL-355	东方红鳍鲃 <i>I. rubripes</i>	: VTG-SLHNSLHVFMGSMSSVGSAN-PIFLHHFID-SIFEWRR-CPRTHTNAPIGHNDGFWMPFLPLRN-DYFLSKALGYBYAVLQDPSQRFVE-ELTYLQAAQ-475
小鼠 <i>M. musculus</i>	: —MSLP-LLFFQFSP-LQIPRFTTDPVRSRCPCWPGD-SVCGSLRGCGQVIT-SDLNCPYYPHGLDDREWFLVFNQT-ZCAGNYIGFCGEC-FG-FEACGR-116	小鼠 <i>M. musculus</i>	: ES-RRITQLSVSE-QRISYLNLAKTIV-PYVITGV-SMN-NSTMFNINISYDLFVMMHY-SKALLGCGPNVIA-IDF-HSAAPLPHWRVLLFWE-116	小鼠 <i>M. musculus</i>	: YVDRDAQGCCT-ELGARS-LNPLISPSFVSFWICSPDY-QREVLG-PEGPLRPGNDPN-VPLPTSAIVSVSLIYETGLMDRANFSRNLEGGSPETIL-355	小鼠 <i>M. musculus</i>	: VTG-SLHNSLHVFMGSMSSVGSAN-PIFLHHFID-SIFEWRR-CPRTHTNAPIGHNDGFWMPFLPLRN-DYFLSKALGYBYAVLQDPSQRFVE-ELTYLQAAQ-475
黄河鲤 <i>C. carpio haematopterus</i>	: —MSLP-LLFFQFSP-LQIPRFTTDPVRSRCPCWPGD-SVCGSLRGCGQVIT-SDLNCPYYPHGLDDREWFLVFNQT-ZCAGNYIGFCGEC-FG-FEACGR-116	黄河鲤 <i>C. carpio haematopterus</i>	: ES-RRITQLSVSE-QRISYLNLAKTIV-PYVITGV-SMN-NSTMFNINISYDLFVMMHY-SKALLGCGPNVIA-IDF-HSAAPLPHWRVLLFWE-116	黄河鲤 <i>C. carpio haematopterus</i>	: YVDRDAQGCCT-ELGARS-LNPLISPSFVSFWICSPDY-QREVLG-PEGPLRPGNDPN-VPLPTSAIVSVSLIYETGLMDRANFSRNLEGGSPETIL-355	黄河鲤 <i>C. carpio haematopterus</i>	: VTG-SLHNSLHVFMGSMSSVGSAN-PIFLHHFID-SIFEWRR-CPRTHTNAPIGHNDGFWMPFLPLRN-DYFLSKALGYBYAVLQDPSQRFVE-ELTYLQAAQ-475

(图3 Fig. 3)

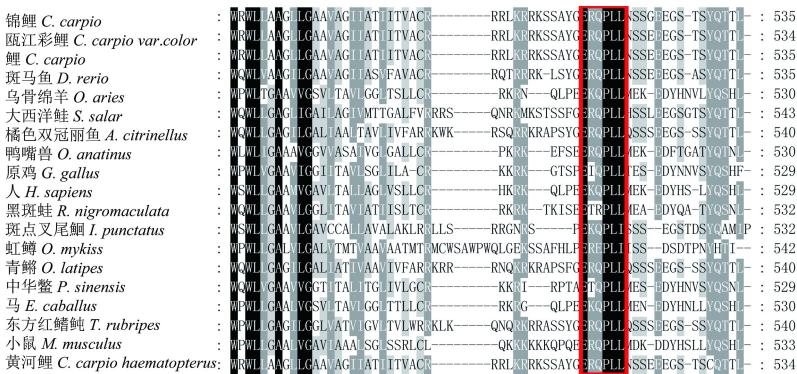


图3 黄河鲤Tyr与其他动物同源分子的氨基酸比对

使用ClustalX进行多序列比对，分别用黑色底纹和灰色底纹表示100%和75%的氨基酸残基相似度。13个保守的半胱氨酸用“*”表示。红色方框内的氨基酸分别为EGF-like结构域、铜离子结合区域CuA和CuB信号和双亮氨酸信号

Fig. 3 Amino acid sequence alignment of Tyr in Yellow River carp with other animals

The program ClustalX is used to align the Tyr sequences. The 100% and 75% identity among these sequences are respectively highlighted by black and grey shade. 13 conservative cysteine residues are identified by asterisk. Conserved N-terminal EGF-like domain signature, 2 copper-binding domains signature and dileucine signal signature are red boxed

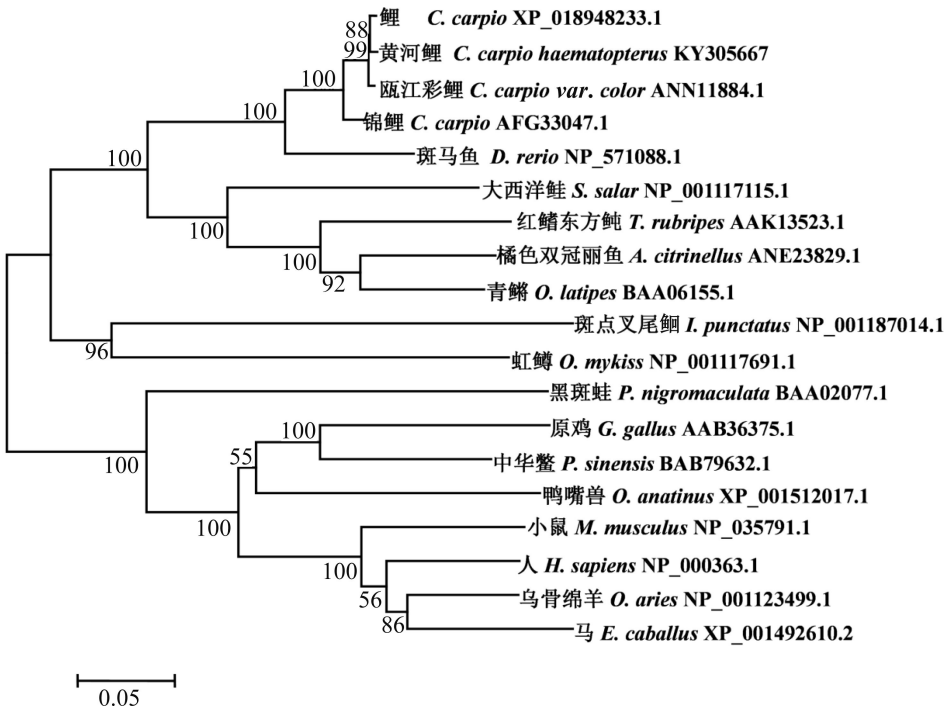


图4 Tyr氨基酸序列系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree of Tyr proteins from vertebrates

们猜测这3种色素细胞的数量和分布对黄河鲤体色形成具有重要作用，这也与徐伟等^[21]、李小兵等^[22]的研究结果相似。鱼类色素细胞的分化和形成受控于一系列复杂的基因激活和沉默程序^[14]。超过100个基因参与斑马鱼色素细胞分化和体色的形成^[23-24]，青鳉中发现38个与体色相关的基因^[25]。荷包红鲤和松浦镜鲤中，超过300个基因参与体

色的形成，可能导致两者之间体色的差异^[26]。在一系列复杂的基因中，Tyr参与黑色素合成，是黑色素合成信号通路中最为关键的限速酶之一，催化酪氨酸形成黑色素^[27-28]。研究发现，Tyr基因在不同种类间的组织表达模式不同^[10, 29]。青鳉中，Tyr仅在黑色素存在的眼和皮肤中被检测到；锦鲤中，Tyr在眼和黑色皮肤中的表达量

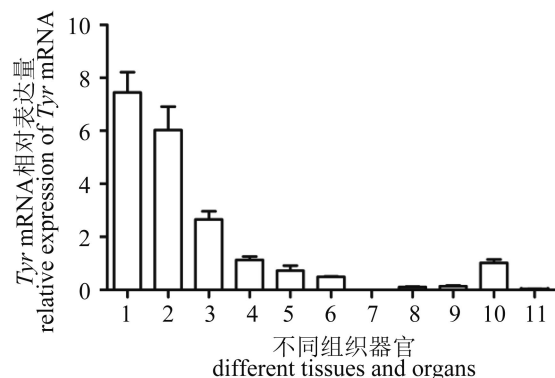


图 5 *Tyr* 基因在黄河鲤不同组织中的相对表达量

1. 背部肌肉; 2. 腹部肌肉; 3. 黑色皮肤; 4. 尾鳍; 5. 黄色皮肤; 6. 臀鳍; 7. 银色皮肤; 8. 肠; 9. 脑; 10. 肝胰; 11. 鳃

Fig. 5 Real-time PCR quantification of *Tyr* expression in different tissues of Yellow River carp

1. dorsal muscle; 2. caudal muscle; 3. black skin; 4. tail fin; 5. yellow skin; 6. anal fin; 7. silvery skin; 8. intestines; 9. brain; 10. liver pancreas; 11. gill

最高, 其次是脑、红色皮肤和黄色皮肤^[11, 30]。本实验发现几乎在所有组织中均检测到了 *Tyr* 的表达。其中, 肌肉中 *Tyr* 表达量最高, 黑色皮肤次之, 这与其他鱼类略有差别。利用 western blot 技术检测黑色皮肤、银色皮肤、鳍条中的

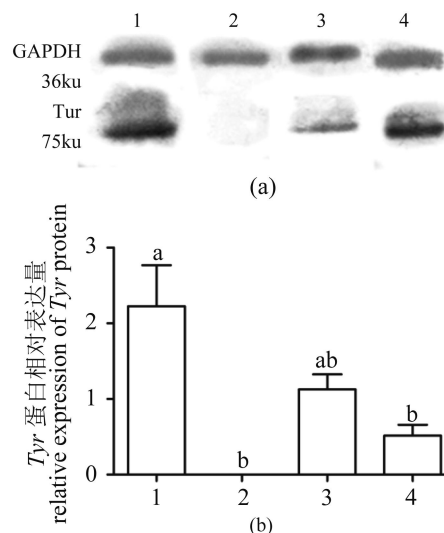


图 6 黄河鲤不同组织 *Tyr* 蛋白的表达情况

(a) Western blot 检测黄河鲤不同组织 *Tyr* 蛋白表达情况; (b) 黄河鲤不同组织 *Tyr* 蛋白相对表达量, 不同小写字母表示差异显著性 ($P < 0.05$); 1. 黑色皮肤; 2. 银色皮肤; 3. 臀鳍; 4. 尾鳍

Fig. 6 Analysis of *Tyr* protein expression in several tissues in Yellow River carp

(a) Western blot analysis of *Tyr* protein in different tissues. (b) The relatively expression of *Tyr* in different tissues in Yellow River carp, gained by Western blot analysis, different letter superscripts indicate significant differences ($P < 0.05$). 1. black skin; 2. silvery skin; 3. anal fin; 4. tail fin

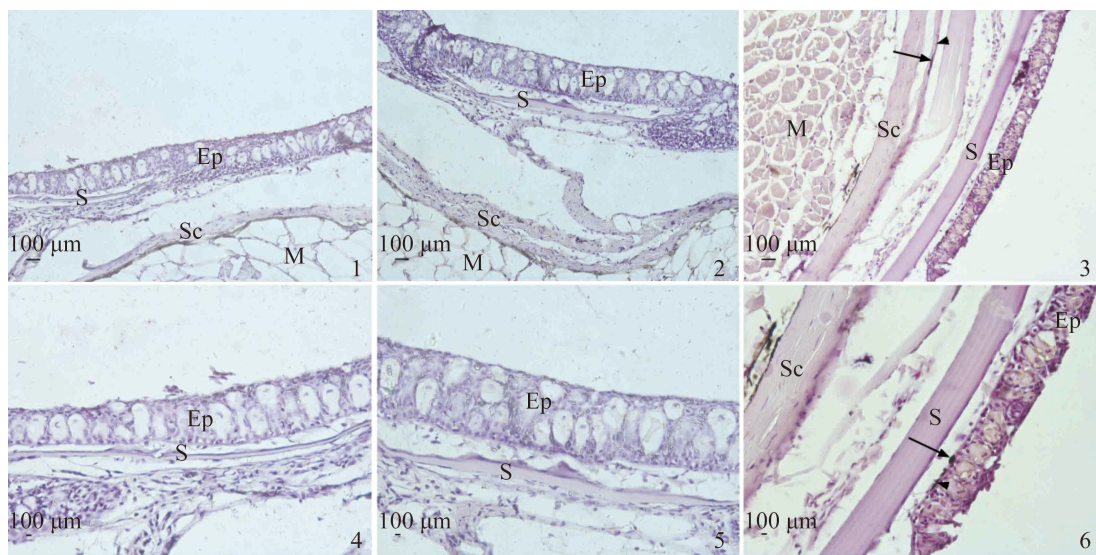


图 7 黄河鲤皮肤组织 *Tyr* 免疫组化染色

1, 4. 阴性对照; 2, 5. 黄河鲤银色皮肤组织 *Tyr* 免疫组织化学结果; 3, 6. 黄河鲤黑色皮肤组织 *Tyr* 免疫组织化学结果; Ep. 表皮层; S. 鳞片; Sc. 真皮致密层; M. 肌肉; 黑色箭头. 黑色素细胞; 无尾箭头. 黑色素细胞免疫反应位置(放大倍数: 1、2、3 $\times 200$, 4、5、6 $\times 400$)

Fig. 7 Expression of *Tyr* protein in skin tissue of Yellow River carp showed by immunohistochemical method

1, 4. control groups; 2, 5. expression of *Tyr* in silvery skin tissue of Yellow River carp; 3, 6. expression of *Tyr* in black skin tissue of Yellow River carp; Ep: epidermis; S: scale; Sc: stratum compactum; M: muscle; black arrow. melanophores; arrowhead. the positive reaction position of melanophores (Magnification: 1, 2, 3 $\times 200$; 4, 5, 6 $\times 400$)

Tyr蛋白表达情况,发现Tyr蛋白在黑色皮肤中表达量最高,臀鳍和尾鳍次之,银色皮肤中没有检测到Tyr的表达。人类中同样发现Tyr在色素沉着性皮肤组织中的表达显著高于非色素沉着性皮肤^[31]。免疫组织化学结果显示,黄河鲤的皮肤结构与一些体表无鳞或鳞片较小的鱼类略有差别^[32-33]。黄河鲤鳞片相对较大,其插入位置在表皮层或表皮层和真皮之间,并且鳞片间出现叠加,这与大西洋鲑的鳞片插入方式不同^[33]。另外由于鳞片的插入,黄河鲤皮肤的结构较为疏松。免疫组织化学结果显示,Tyr在黑色皮肤表皮层和黑色素细胞存在的位置有表达,银色皮肤中未发现Tyr阳性信号,这与qRT-PCR、western blot结果相一致,进一步证实Tyr表达量的高低与色素沉着具有密切关系。以上结果均表明,Tyr表达量与黑色细胞数量及分布具有一定相关性。

本实验成功克隆了黄河鲤Tyr的cDNA全长序列,进行了相关生物信息学分析,并对其在各组织中的表达和定位进行了检测,为进一步探讨黄河鲤黑色素的代谢机理和体色形成机制奠定基础。但要利用Tyr基因对黄河鲤体色进行选育和培育还需要更深入的研究。

王良炎和田雪为同等贡献第一作者。

参考文献:

- [1] Sánchez-Ferrer A, Rodríguez-López J N, García-Cánovas F, *et al.* Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism[J]. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1995, 1247(1): 1-11.
- [2] Giebel L B, Strunk K M, Spritz R A. Organization and nucleotide sequences of the human tyrosinase gene and a truncated tyrosinase-related segment[J]. *Genomics*, 1991, 9(3): 435-45.
- [3] 于雪, 于红, 孔令锋, 等. 太平洋牡蛎酪氨酸酶基因家族的系统发生分析[J]. *遗传*, 2014, 36(2): 135-144.
Yu X, Yu H, Kong L F, *et al.* Phylogenetic analysis of Tyrosinase gene family in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg)[J]. *Hereditas*, 2014, 36(2): 135-144(in Chinese).
- [4] Esposito R, D'Aniello S, Squarzon P, *et al.* New insights into the evolution of metazoan Tyrosinase gene family[J]. *Plos One*, 2012, 7(4): 292-293.
- [5] 刘金海, 王安利, 王维娜. 金鱼总色素及色素组分的比较研究[J]. *水生生物学报*, 2007, 31(1): 73-77.
Liu J H, Wang A L, Wang W N. Comparative studies on the total pigment and pigment components of goldfish[J]. *Acta hydrobiologica sinica*, 2007, 31(1): 73-77.
- [6] Hoekstra H E. Genetics, development and evolution of adaptive pigmentation in vertebrates[J]. *Heredity*, 2006, 97(3): 222-34.
- [7] Porter S, Mintz B. Multiple alternatively spliced transcripts of the mouse Tyrosinase-encoding gene[J]. *Gene*, 1991, 97(2): 277-82.
- [8] 张永正, 张海琪, 黄利英, 等. 中华鳖(*Pelodiscus sinensis*)不同种群酪氨酸酶(TYR)基因的克隆及其多态性分析[J]. *海洋与湖沼*, 2009, 40(3): 361-366.
Zhang Y Z, Zhang H Q, Huang L Y, *et al.* Clone of Tyr gene and polymorphism in populations of *Pelodiscus sinensis*[J]. *Oceanologia et limnologia sinica*, 2009, 40(3): 361-366(in Chinese).
- [9] Sato S, Masuya H, Numakunai T, *et al.* Ascidian tyrosinase gene: its unique structure and expression in the developing brain[J]. *Developmental Dynamics An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 1997, 208(3): 363.
- [10] 蒋燕玲, 宋红梅, 刘奕, 等. 橘色双冠丽鱼TYR基因的克隆及其发育时序和组织表达分析[J]. *农业生物技术学报*, 2016, 24(5): 697-707.
Jiang Y L, Song H M, Liu Y, *et al.* Cloning and expression analysis of the developing sequence and tissue expression of Tyr gene in *Amphilophus citrinellus* [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2016, 24(5): 697-707(in Chinese).
- [11] 王巍, 胡红霞, 孙向军, 等. 锦鲤酪氨酸酶基因序列分析及其在不同锦鲤品系不同组织中的表达[J]. *水产学报*, 2012, 36(11): 1658-1666.
Wang W, Hu H X, Sun X J, *et al.* Analysis of Tyrosinase gene and tissue expression in five different strains of Koi carp (*Cyprinus carpio* Koi)[J]. *Journal of fisheries of china*, 2012, 36(11): 1658-1666(in Chinese).
- [12] 杨新鑫, 王成辉, 马玉清, 等. 瓯江彩鲤酪氨酸酶基因的克隆与序列分析[J]. *上海海洋大学学报*, 2012, 21(1): 14-20.
Yang X X, Wang C H, Ma Y Q, *et al.* Cloning and

- sequence analysis of tyrosinase gene in Oujiang color common carp[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2012, 21(1): 14-20(in Chinese).
- [13] Müller G, Ruppert S, Schmid E, *et al.* Functional analysis of alternatively spliced Tyrosinase gene transcripts[J]. The EMBO Journal, 1998, 7(9): 2723-2730.
- [14] Sato S, Masuya H, Numakunai T, *et al.* Ascidian Tyrosinase gene: Its unique structure and expression in the developing brain[J]. Developmental Dynamics, 1997, 208(3): 363-374.
- [15] Wang N, Daniels R, Hebert D N. The cotranslational maturation of the type I membrane glycoprotein Tyrosinase: the heat shock protein 70 system hands off to the lectin-based chaperone system[J]. Molecular Biology of the Cell, 2005, 16(8): 3740-3752.
- [16] Jackson I, Chambers D, Tsukamoto K, *et al.* A second Tyrosinase-related protein, TRP-2, maps to and is mutated at the mouse slaty locus[J]. The EMBO Journal, 1992, 11(2): 527-535.
- [17] Spritz R A, Ho L, Furumura M, *et al.* Mutational analysis of copper binding by human Tyrosinase[J]. Journal of Investigative Dermatology, 1997, 109(2): 207-212.
- [18] Camacho-Hübner A, Rossier A, Beermann F. The *Fugu rubripes* Tyrosinase gene promoter targets transgene expression to pigment cells in the mouse[J]. Genesis, 2000, 28(3-4): 99-105.
- [19] 徐伟, 耿龙武, 李池陶, 等. 不同体色鲤、鲫鳞片的色素分布特点[J]. 上海海洋大学学报, 2012, 21(1): 41-47.
- Xu W, Geng L W, Li C T, *et al.* The distribution characteristics on scale chromatophore of carp and crucian carp in different body colors[J]. Journal of shanghai ocean university, 2012, 21(1): 41-47(in Chinese).
- [20] Inaba M, Kondo S. Pigment pattern formation by contact-dependent depolarization[J]. Science, 2012, 335(6069): 677-677.
- [21] 徐伟, 李池陶, 曹顶臣, 等. 几种鲤鲫鳞片色素细胞和体色发生的观察[J]. 水生生物学报, 2007, 31(1): 67-72.
- Xu W, Li C T, Cao D C, *et al.* Observation on scale chromatophore and body colors genesis of carp and crucian carp[J]. Acta hydrobiologica sinica, 2007, 31(1): 67-72(in Chinese).
- [22] 李小兵, 郑曙明, 吴青. 曼龙鱼色素细胞的显微观察[J]. 四川动物, 2012, 31(4): 538-540.
- Li X B, Zheng S M, Wu Q. Microscopic observation on chromatophores of *Trichogaster trichopterus*[J]. Sichuan Journal of Zoology, 2012, 31(4): 538-540(in Chinese).
- [23] Hirata M, Nakamura K, Kanemaru T, *et al.* Pigment cell organization in the hypodermis of zebrafish[J]. Developmental Dynamics, 2003, 227(4): 497-503.
- [24] Kelsh R N, Brand M, Jiang Y J, *et al.* Zebrafish pigmentation mutations and the processes of neural crest development[J]. Development, 1991, 123(1): 369-389.
- [25] Kelsh R N, Inoue C, Momoi A, *et al.* The Tomita collection of medaka pigmentation mutants as a resource for understanding neural crest cell development[J]. Mechanisms of Development, 2004, 121(7/8): 841-859.
- [26] Xu P, Zhang X, Wang X, *et al.* Genome sequence and genetic diversity of the common carp, *Cyprinus carpio*[J]. Nature Genetics, 2014, 46(11): 1212-1222.
- [27] Singh A P, Nüsslein-Volhard C. Zebrafish stripes as a model for vertebrate colour pattern formation[J]. Current Biology, 2015, 25(2): 81-92.
- [28] Han R, Baden H P, Brissette J L, *et al.* Redefining the Skin's pigmentary system with a novel Tyrosinase assay[J]. Pigment Cell Research, 2002, 15(4): 290-297.
- [29] Rodríguez López J N, Fenoll L G, Peñalver M J, *et al.* Tyrosinase action on monophenols: evidence for direct enzymatic release of o-diphenol[J]. Biochimica Et Biophysica Acta, 2001, 1548(2): 238-256.
- [30] Hidehito I, Yoshitaka B, Akihiko K, *et al.* Expression of the Tyrosinase-encoding gene in a colorless melanophore mutant of the medaka fish, *Oryzias latipes*[J]. Gene, 1994, 150(2): 319-324.
- [31] Commo S, Gaillard O, Thibaut S, *et al.* Absence of TRP-2 in melanogenic melanocytes of human hair[J]. Pigment Cell Research, 2004, 17(5): 488-497.
- [32] 蒋鑫, 潘连德, 马召腾. 松江鲈鱼皮肤的显微和亚显微结构[J]. 动物学杂志, 2012, 47(4): 96-103.
- Jiang X, Pan L D, Ma Z T. Microstructure and ultra-structure of the skin in roughskin sculpin (*Trachidermus fasciatus*)[J]. Chinese Journal of Zoology, 2012, 47(4): 96-103(in Chinese).
- [33] Hawkes J W. The structure of fish skin[J]. Cell and Tissue Research, 1974, 149(2): 159-172.

Molecular cloning, expression pattern and location of *Tyrosinase* gene in Yellow River carp (*Cyprinus carpio haematopterus*)

WANG Liangyan, TIAN Xue, PANG Xiaolei, LI Mengrong, LI Xuejun*

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

Abstract: Tyrosinase (*Tyr*) is the essential rate-limiting enzyme in melanogenesis. To study the relationship between *Tyr* gene and the formation of body color in *Cyprinus carpio haematopterus*, the black scales, silvery scales and fins were observed using microscope. Besides, we also obtained the full-length cDNA sequence of *Tyr* by rapid-amplification of cDNA ends (RACE) and examined the mRNA and protein expression levels of *Tyr* in different tissues using quantitative real-time PCR (qRT-PCR), Western blotting and immunohistochemical methods. The results showed that there were 3 kinds of pigment cells including melanophores, xanthophores and iridophores in different tissues, and the quantity, combination, and density of the chromatophores are varied. The full length cDNA of *Tyr* was 1717 bp (Genbank ID: No. KY305667), including 41bp at 5'-UTR, 71 bp at 3'-UTR, and a 1605 bp open reading frame encoded a peptide of 535 amino acids. Sequence analysis exhibited that *Tyr* from Yellow River carp had the highest amino acid similarity with Cyprinidae, while it had low similarity with mammalian and bird. And phylogenetic tree analysis indicated Yellow River carp has close relationship with Cyprinidae species like *Cyprinus carpio*, *Cyprinus carpio* Koi, *Cyprinus carpio color* and *Danio rerio*. qRT-PCR results revealed that *Tyr* mRNA was checked in all different tissues of Yellow River carp, among which the maximum level was detected in muscle, followed by black skin. In addition, *Tyr* also displayed a higher expression in the yellow skin, anal fin and caudal fin with abundant melanophores. But *Tyr* was not detected in the silvery skin lacking melanophores. The protein expression of *Tyr* in black skin, anal fin, caudal fin and silvery skin exhibited similar trend with *Tyr* mRNA. The immunohistochemical positive signals were detected in the melanophores and mucous cells of black skin. In conclusion, the expression level of *Tyr* is relevant to the abundance and location of melanophores, and could be associated with the body color formation of the Yellow River carp.

Key words: *Cyprinus carpio haematopterus*; body color; melanin; *Tyr* gene

Corresponding author: LI Xuejun. E-mail: xjli@htu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31402294); Project of International Scientific and Technological Cooperation of Henan Province (152102410040)