



## 湖栖鳍虾虎鱼皮肤和眼睛转录组比较

黎学友, 谢明花, 黄承勤, 汪 淳, 王中铎, 郭昱嵩, 董忠典\*

(广东海洋大学水产学院, 南海水产经济动物增殖重点实验室, 广东 湛江 524088)

**摘要:** 为了对湖栖鳍虾虎鱼的皮肤和眼睛进行转录组比较分析, 实验通过测序原始数据, 经 *de novo* 拼接、组装共获得 103 686 个单基因 (unigene), N50 和平均长度分别为 1 456 和 2 490 bp。在 Nr、Nt、KO、SwissProt、PFAM、GO 及 KOG 数据库中对上述 unigenes 进行注释, 分别有 57 380、37 343、31 700、51 277、47 020、47 555 和 25 604 个 unigenes 获得注释。对差异基因进行 KEGG 富集发现, 在黑色素生成途径中, *tyr*、*tyrp1* 和 *tyrp2* 等基因在皮肤中明显下调。基因表达差异分析显示, 在湖栖鳍虾虎鱼皮肤和眼睛中共有 8 113 个差异表达基因 (DEGs), 其中 3 174 个 DEGs 在皮肤中上调, 4 939 个 DEGs 在眼睛中上调。通过实时荧光定量 PCR (qPCR) 对 10 个 DEGs 的验证, 确定了 RNA-Seq 分析正确。本研究丰富了湖栖鳍虾虎鱼的体色研究, 为湖栖鳍虾虎鱼遗传资源的利用提供了数据, 也为进一步研究鱼类绚丽的体色形成机制提供了参考。

**关键词:** 湖栖鳍虾虎鱼; 皮肤; 眼睛; RNA-Seq; 色素形成; 体色

**中图分类号:** S 917.4

**文献标志码:** A

鱼类是种类最多的脊椎动物, 体色丰富多彩。随着经济的快速发展和人民生活水平的提高, 人们对鱼类的营养价值及其观赏价值的要求越来越高。鱼类绚丽多彩的体色是长期自然选择和环境适应的结果, 具有躲避敌害、吸引异性、伪装和警戒等作用<sup>[1]</sup>。生活在水体上层, 游泳速度快的鱼类, 体色通常比较单一, 而栖息于水底、草丛和礁石的鱼类体色通常较为丰富, 这与其所处环境相适应<sup>[2]</sup>。色素细胞的形成和转移、色素的合成与迁移共同决定了鱼类的体色<sup>[3]</sup>。在鱼类中, 已报道的色素细胞有 6 种, 包括黑色素细胞 (melanophores)、红色素细胞 (erythrophores)、黄色素细胞 (xanthophores)、虹彩细胞 (iridophores)、白色素细胞 (leucophores) 和蓝

色素细胞 (cyanophores)<sup>[4-5]</sup>。这些色素细胞排列组合以及色素细胞内色素颗粒扩散或集中, 形成了鱼类丰富的体色<sup>[6]</sup>。目前, 国内外学者已对一些模式生物如斑马鱼 (*Danio rerio*)、青鳉 (*Oryzias latipes*) 和三棘鱼 (*Gasterosteus aculeatus*) 等的色素细胞的功能和其他一些鱼类, 如锦鲤 (*Cyprinus carpio var. koi*) 和鲫 (*Carassius auratus*) 等的色素组成做了一些研究<sup>[7]</sup>, 但鱼类种类繁多, 不同种类的鱼体色各有差异, 其体色的形成机制也不尽相同。

湖栖鳍虾虎鱼 (*Gobiopterus lacustris*) 广泛分布于南海沿岸红树林水域, 其对盐度的耐受范围广, 便于实验室饲养<sup>[8]</sup>。湖栖鳍虾虎鱼机体几乎透明, 骨骼和器官肉眼可见, 发育过程易于

收稿日期: 2020-09-13 修回日期: 2020-10-28

资助项目: 国家自然科学基金 (41806195, 31201996); 广东省科技厅项目 (2017A030303075); 广东海洋大学创新强校项目 (230419069, 230419055); 广东海洋大学“南海学者计划”青年人才项目 (QNXX201903, 201807); 广东海洋大学博士启动项目

第一作者: 黎学友 (照片), 从事水产动物生态毒理研究, E-mail: lxcyj@163.com

通信作者: 董忠典, E-mail: zddong@gdou.edu.cn



观察,是研究体色和发育的理想模型<sup>[9-10]</sup>。目前,湖栖鳍虾虎鱼的研究处在资源调查和遗传多样性阶段,对其体色的相关研究匮乏。转录组技术(RNA-Seq)是一种利用高通量测序技术快速获得样品在某一发育阶段或功能状态下的转录本,用于探索基因表达谱、特异性状控制基因和相关调控机制的一种有效方法<sup>[11-12]</sup>。本研究对湖栖鳍虾虎鱼透明皮肤和黑色素聚集的眼睛进行转录组测序、基因功能注释和表达谱分析比较,实验结果将有助于探究湖栖鳍虾虎鱼机体透明的成因,有利于后续对其基因资源的开发和应用,同时也丰富了鱼类体色的研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 湖栖鳍虾虎鱼眼睛、皮肤总 RNA 提取

实验用湖栖鳍虾虎鱼采自广东湛江高桥国家级红树林保护区(109°47'8"E, 21°36'24"N),实验室暂养3个月(盐度15)后,随机挑选健康状况良好的湖栖鳍虾虎鱼雌雄各3尾,用MS-222麻醉后进行解剖取样。6尾个体眼睛组织混合为一个眼睛样本,6尾个体皮肤组织混合为一个皮肤样本。参照Trizol试剂(Invitrogen,美国)操作说明进行皮肤和眼睛总RNA的提取,并用DNase I[(宝日生物(北京)有限公司]去除基因组DNA污染。分别用1%的琼脂糖凝胶电泳和RNA Nano 6000(Agilent Technologies,美国)检测RNA的质量和完整性,使用Qubit® 2.0 Fluorometer(Life Technologies,美国)测定总RNA浓度。

### 1.2 cDNA 文库构建与测序

取皮肤和眼睛总RNA各1.5 μg用于各自cDNA文库构建和测序。首先用带有Oligo(dT)的磁珠富集真核生物mRNA,然后使用fragmentation buffer将mRNA片段化,之后分别合成2条cDNA链。合成的双链cDNA经纯化后先进行末端修复、加A尾并连接测序接头,再用AMPure XP beads进行片段大小选择。最后进行PCR扩增,并用AMPure XP beads纯化PCR产物,得到最终的文库。库检合格后,把不同文库按照有效浓度及目标数据量的需求pooling后进行Illumina HiSeq测序。文库构建和测序均由诺禾致源生物信息科技有限公司完成,其方法可参考Nan等<sup>[13]</sup>。

### 1.3 测序数据组装及基因功能注释

为了保证信息分析的质量和准确性,需要对原始数据(raw reads)进行分析和过滤,除去原始数据中含有的带接头(adapter)的、N(N表示无法确定碱基信息)的比例大于10%的以及低质量的reads(质量值Qphred ≤ 20的碱基数占整个reads的50%以上的reads),得到干净数据(clean reads)。采用Trinity(v 2.5.1版本)软件对clean reads进行转录本拼装,每个基因下最长的转录本被提取为单基因(unigene)<sup>[14]</sup>,作为后续分析的参考序列。

为获得全面的基因功能信息,使用在线软件BLAST对unigenes进行Nt注释;利用diamond软件(v0.8.22版本)对unigenes进行Nr、KOG、Swiss-Prot注释,使用KAAS软件进行KEGG注释<sup>[15]</sup>。使用HMMER 3.0软件进行Pfam注释<sup>[16-17]</sup>,最后以Blast2GO软件(v2.5版本)对Nr和Pfam软件的注释结果进行GO注释<sup>[18]</sup>。

### 1.4 基因表达水平和差异表达分析

使用RSEM中bowtie2软件将每个样品的clean reads与Trinity拼接得到的转录组进行比对,得到每个基因上的read count数目<sup>[19]</sup>。然后对read count数据进行标准化处理,进而分析基因的表达水平。DEG-seq为确定差异表达基因(DEGs)提供了统计方法,用DEG-seq进行差异分析。为了控制假阳性率,筛选阈值调整为 $q \text{ value} < 0.005$ 且 $|\log_2(\text{Fold Change})| > 1$ 。

### 1.5 差异基因的KEGG富集分析

KEGG是有关通路的主要公共数据库。Pathway显著性富集分析以KEGG Pathway为单位,应用超几何检验,找出差异基因相对所有被注释的基因显著富集的pathway。根据KEGG数据库资源,进行了通路富集分析,以进一步寻找明显富集的信号转导途径或代谢途径。使用KOBAS软件(v 2.0)检测KEGG通路中DEGs的统计富集<sup>[20]</sup>。

### 1.6 qPCR 验证

为了验证转录组数据的准确性,在转录组分析结果中选取了10个具有差异表达的基因(表1)进行实时荧光定量PCR(qPCR)。使用与转录组测序同批次的RNA进行反转录,获得相应的cDNA,稀释后每个样品进行2个技术重复,

以 *hpri1* 和 *eef1b* 为参考基因, 在 Roche Light Cycler 96(Roche, 瑞士) 定量仪进行 qPCR。反应体系包括 7.5  $\mu\text{L}$   $2 \times \text{SYBR Premix Ex Taq II}$  [宝日医生物技术(北京)有限公司, 中国], 上、下游引物各 0.4  $\mu\text{L}$ (10  $\mu\text{mol/L}$ ), 2  $\mu\text{L}$  cDNA, 4.7  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O, 总体积为 15  $\mu\text{L}$ 。反应程序采用三步法: 预变性 95  $^{\circ}\text{C}$  180 s; 95  $^{\circ}\text{C}$  5 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  15 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  30 s(收集荧光), 40 个循环; 熔解曲线分析 PCR 产物的特异性。最后, 使用 SPSS 17.0 软件及采用 2<sup>- $\Delta\Delta\text{C}_t$</sup>  方法分析结果。

表 1 引物及序列

Tab. 1 Primers and sequences		
基因ID gene ID	基因名称 gene name	引物序列 primer sequence
Cluster- 28847.26032	<i>gm2</i>	F: AGCATGTCCGATTCAACTCCT
		R: CCAACTCTGAACTTACGCCTC
Cluster- 28847.26186	<i>cryba4</i>	F: ACCAGAGCATCAAAGCAAGACA
		R: CCTGGAAGCACTCCTCATCGTA
Cluster- 28847.11511	<i>col10a1</i>	F: CGGGGATTGACAAGTGAAGAT
		R: AAAGGTTTGGGAGTGAGTGAGG
Cluster- 28847.10973	<i>papln</i>	F: ATGCCAGGTGATACGAGTGTTG
		R: CAGACCCGTGAGATTCATTGTG
Cluster- 28847.26015	<i>rho</i>	F: AACCAAGAAATCAGGAAGCCAATG
		R: CTGCTACGGTCGTCTGCTGTGC
Cluster- 28847.25751	<i>kita</i>	F: TGGATGGAGAAGTGGAAGAAGG
		R: ACGCTGGAAGGTGTAAGAGGA
Cluster- 28847.39341	<i>kiitlg</i>	F: TCCAGGACCTCAGACAAAACAC
		R: ACCCACCTTTATGTCCAACCAC
Cluster- 28847.21904	<i>tyr</i>	F: TGGAGGAATGCCAGACTTGTG
		R: GGACTGATGAGATTTGGATTGA
Cluster- 28847.29447	<i>cryba1a</i>	F: TAATGCTTGTACTCGCCTCCGTG
		R: CTATGGGATGGGCCAATAACGA
Cluster- 28847.30426	<i>gsn</i>	F: CCAGCACCCACAACTCCTTAT
		R: CTCCAAATCACTCCATTCAACAA
Cluster- 28847.23946	<i>eef1b</i>	F: AGACTTTGCGATAACAGCCG
		R: GACGATGATGACCTTGACCTG
Cluster- 28847.5025	<i>hpri1</i>	F: CGGTCAGTGTCTATTCAGCG
		R: CTGGAGCGAGTTTACATTCTC

## 2 结果

### 2.1 测序组装

本研究分别提取了湖栖鳍虾虎鱼皮肤和眼睛的总 RNA, 并构建了相应的 cDNA 文库。通过 Illumina NextSeq 500 平台对样品进行测序, 皮肤和眼睛分别获得 37 387 888 和 31 110 527 clean reads。用 Trinity 进行组装和拼接后获得 103 686 个 unigenes, 平均长度和 N50 分别为 1 456 和 2 490 bp。unigenes 长度范围为 201~26 253 bp (图 1), 其中长度大于 1 000 bp 的 unigenes 有 45 991 个。

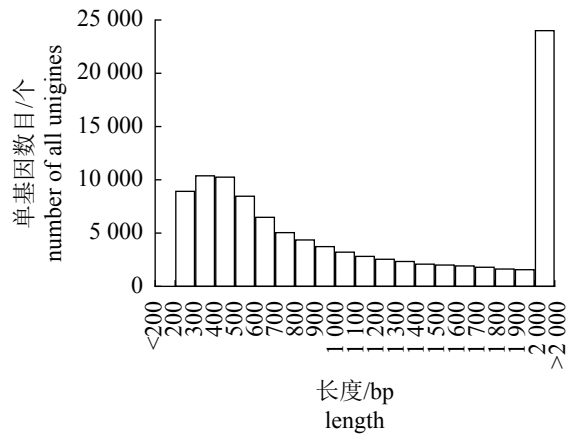


图 1 unigenes 长度分布

Fig. 1 Length distribution of assembled unigenes

### 2.2 转录组注释与分类

在 Nr、Nt、KO、SwissProt、PFAM、GO 和 KOG 这 7 个数据库中搜索组装获得的 unigenes, 结果显示, Nr 数据库成功匹配的单基因有 57 380 个 (55.34%), Nt 数据库成功匹配的单基因有 37 343 个 (36.01%), Swissprot data base 数据库成功匹配的单基因有 51 277 个 (49.45%), PFAM 数据库成功匹配的单基因有 47 020 个 (45.34%)。另外, 共有 12 437 个 unigenes 在所有数据库都获得了注释, 占基因总数的 11.99%(表 2)。

### 2.3 差异表达基因的鉴定与分析

对湖栖鳍虾虎鱼皮肤和眼睛差异基因数量进行分析, 共有 8 113 个 unigenes 表达差异显著, 其中 3 174 个 unigenes 在皮肤组织中上调, 4 939 个在皮肤组织中下调 (图 2)。

### 2.4 DEGs 的 KEGG 富集分析

为进一步了解 DEGs 的功能, 对所有 DEGs

表 2 基因注释成功率统计

**Tab. 2 Statistics of success rate of gene annotation**

类型 types	基因数目/个 number of genes	百分比/% percentage
Nr注释 annotated in Nr	57 380	55.34
Nt注释 annotated in Nt	37 343	36.01
KO注释 annotated in KO	31 700	30.57
SwissProt注释 annotated in SwissProt	51 277	49.45
PFAM注释 annotated in PFAM	47 020	45.34
GO注释 annotated in GO	47 555	45.86
KOG注释 annotated in KOG	25 604	24.69
所有数据库中的注释 annotated in all databases	12 437	11.99
至少一个数据库中的注释 annotated in at least one database	64 812	62.50
总单基因 total unigenes	103 686	100.00

进行 KEGG 富集分析，共有 4 388 个 DEGs 成功注释并分配到 294 个通路 (corrected  $P$ -value < 0.05)。其中，在前 20 个通路中，“光传导 (phototransduction)”、“昼夜节律 (circadian rhythm)”等通路与眼睛功能密切相关，“黏着斑 (focal adhesion)”和“紧密连接 (tight junction)”等通路与皮肤组织功能有关 (表 3)。另外，对黑色素合成通路 (melanogenesis) 分析发现，*tyr*、*tyrp1* 和 *tyrp2* 等与黑色素合成直接相关的基因显著下调 (图 3)。

2.5 qPCR 验证和组织表达检测

qPCR 检测转录组分析结果中 10 个表达差异显著的基因，并将其与转录组分析结果相比较，结果表明，这些基因的表达趋势与转录组分析结果一致，说明 RNA-Seq 结果的可靠性 (图 4)。

3 讨论

为了探讨湖栖鳍虾虎鱼体色透明的成因，本实验分别提取了湖栖鳍虾虎鱼透明的皮肤和

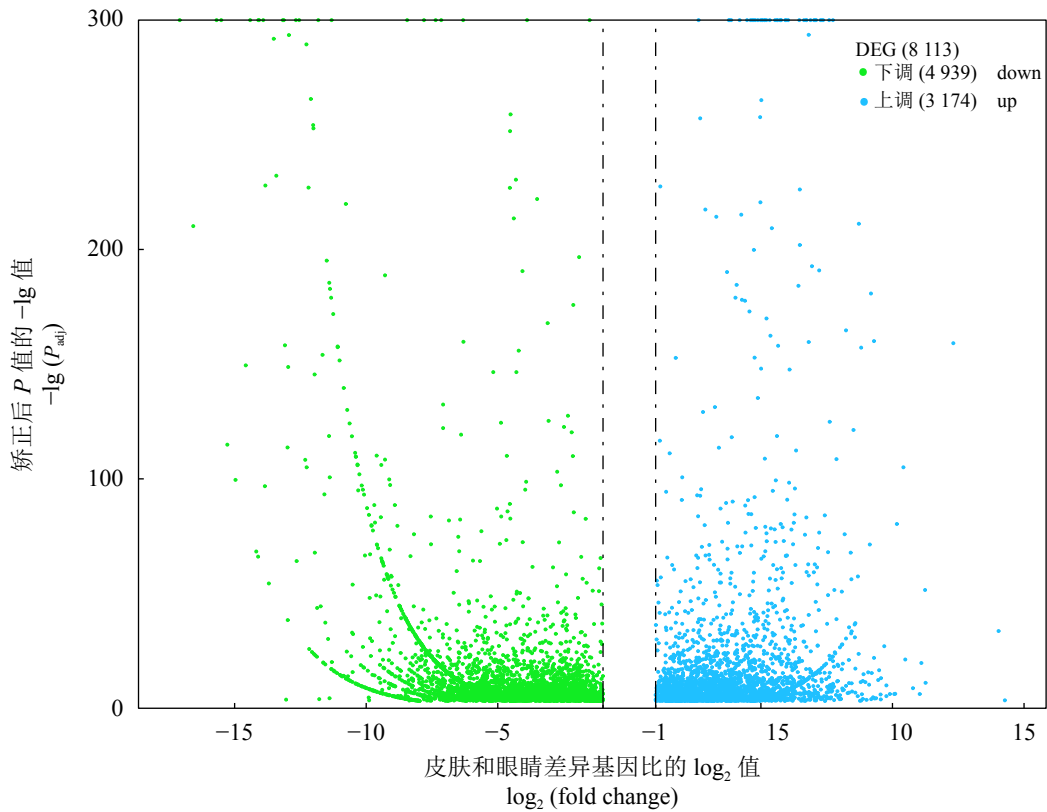


图 2 湖栖鳍虾虎鱼皮肤和眼睛转录组差异基因火山图

$P_{adj}$  表示校正后的  $P$  值

Fig. 2 Volcano map of different transcriptome genes in skin and eye of *G. lacustris*

$P_{adj}$  means the corrected  $P$  value

表 3 皮肤与眼睛差异基因 KEGG 极显著富集前 20 通路

**Tab. 3 KEGG highly significant enrichment top 20 pathway of differential expression (skin vs. eye) gene**

前20通路名称 top 20 term name	通路ID term ID	基因数目/个 gene number	校正P值 corrected P-value
光转导 phototransduction	ko04744	63	$1.16 \times 10^{-13}$
ECM-受体相互作用 ECM-receptor interaction	ko04512	89	$2.18 \times 10^{-6}$
心肌收缩 cardiac muscle contraction	ko04260	85	$4.37 \times 10^{-6}$
近端小管碳酸氢盐回收 proximal tubule bicarbonate reclamation	ko04964	40	$2.06 \times 10^{-5}$
突触小泡循环 synaptic vesicle cycle	ko04721	80	$3.56 \times 10^{-5}$
阿米巴病 amoebiasis	ko05146	88	$7.27 \times 10^{-5}$
蛋白质消化吸收 protein digestion and absorption	ko04974	77	$1.50 \times 10^{-4}$
心律失常性右室心肌病(ARVC) arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC)	ko05412	83	$2.08 \times 10^{-4}$
黏着斑 focal adhesion	ko04510	166	$3.96 \times 10^{-4}$
紧密连接 tight junction	ko04530	133	$2.12 \times 10^{-3}$
精氨酸和脯氨酸代谢 arginine and proline metabolism	ko00330	37	$2.55 \times 10^{-3}$
糖酵解/糖异生 glycolysis / gluconeogenesis	ko00010	53	$3.64 \times 10^{-3}$
细菌侵袭上皮细胞 bacterial invasion of epithelial cells	ko05100	78	$4.66 \times 10^{-3}$
阿尔茨海默氏病 Alzheimer's disease	ko05010	129	$5.56 \times 10^{-3}$
抗原处理和展示 antigen processing and presentation	ko04612	39	$8.52 \times 10^{-3}$
GABA能突触 GABA ergic synapse	ko04727	79	$9.23 \times 10^{-3}$
丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢 alanine, aspartate and glutamate metabolism	ko00250	32	$1.13 \times 10^{-2}$
昼夜节律 circadian rhythm	ko04710	32	$1.25 \times 10^{-2}$
I型糖尿病 type I diabetes mellitus	ko04940	18	$1.32 \times 10^{-2}$
氮素代谢 nitrogen metabolism	ko00910	14	$1.40 \times 10^{-2}$

深黑色的眼睛的 RNA, 构建了皮肤和眼睛的 cDNA 文库, 通过 RNA-Seq 获得了皮肤和眼睛的转录组数据。

Nr 数据库比对注释的结果显示, 有 21.7% 的 unigenes 和大黄鱼 (*Larimichthys crocea*) 基因高度同源, 有 21.5% 与深裂眶锯雀鲷 (*Stegastes partitus*) 基因高度同源, 原因可能是湖栖鳍虾虎鱼、大黄鱼和深裂眶锯雀鲷同属于鲷形目 (Perciformes)。6.9%、5.9% 和 3.4% 分别属于尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*)、小鼠 (*Mus musculus*) 和斑马拟丽鱼 (*Maylandia zebra*)。另外, 有 40.5% 的结果属于其他未知物种。

黑色素在黑色素小体的膜结合细胞器中合成, 动物的眼睛、皮肤、毛发的色素沉着是黑色素存在的一种表现。黑色素分为真黑色素和褐黑色素两种, 其中真黑色素能够控制黑色和褐色表型,

而褐黑色素主要影响棕色、红色和黄色<sup>[21]</sup>。上述两种色素的数量和比例决定了眼睛、皮肤和毛发的颜色<sup>[22]</sup>。在黑色素合成通路中, 黑色素皮质素-1 受体基因 (*mc1r*) 编码的 MC1R 是 G 蛋白偶联受体家族中最小的受体<sup>[23]</sup>, 该基因与其受体 *agouti* 相互作用控制真黑色素和褐黑色素的生成。*agouti* 会抑制 *mc1r* 的活性, 在没有 *agouti* 的情况下, *mc1r* 活性能通过第二信使激活机制提高细胞内的环腺苷酸 (cAMP) 水平, 进而激活真黑色素合成途径<sup>[24-25]</sup>。在本研究中, 转录组数据中 *mc1r* 在皮肤 (FPKM=0.29) 和眼睛 (FPKM=0.79) 中均处于低表达水平, 在眼睛中相对上调。湖栖鳍虾虎鱼的机体呈透明状, 也无明显体色, 可以清晰地看到内部器官, 可能是因为其表皮缺乏黑色素。*mc1r* 的低表达可能导致皮肤中的黑色素合成减少, 从而导致其皮肤呈透明状。虽然该基因在

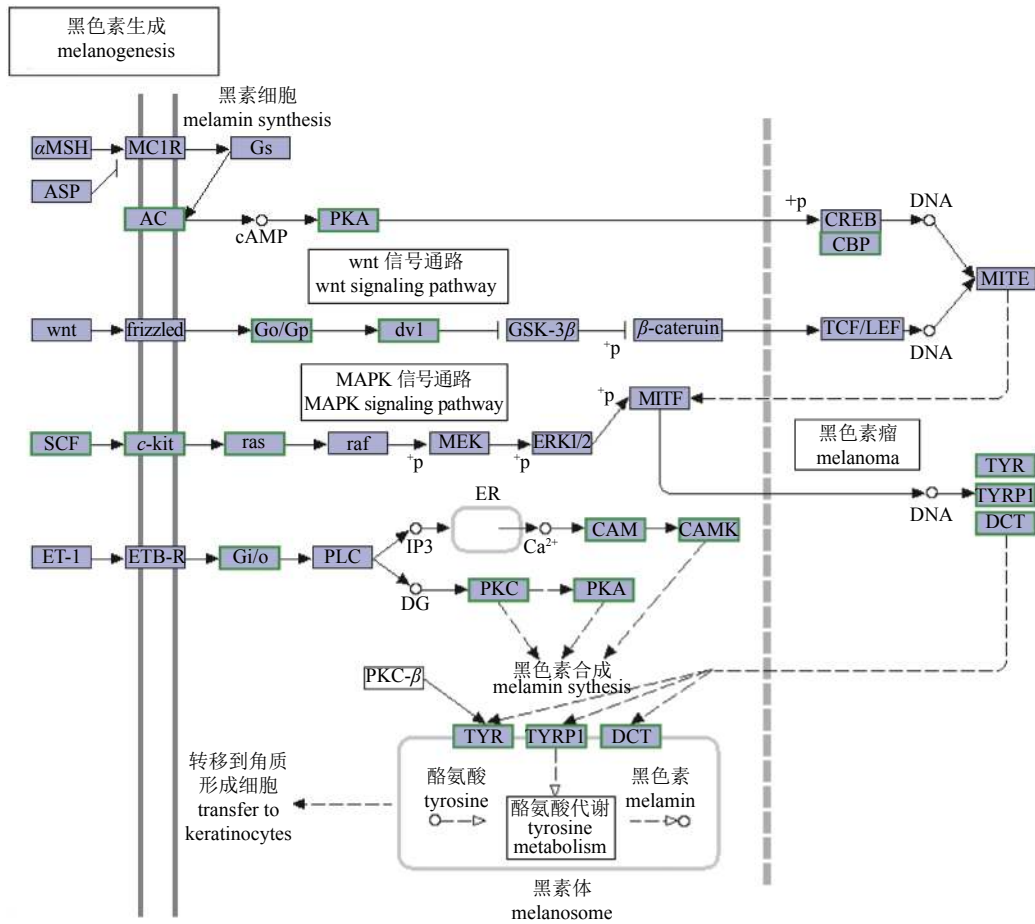


图 3 黑色素合成通路图

绿色边框表示基因表达在皮肤中相对眼睛下调

Fig. 3 Melanogenesis pathway

Green border indicates that the gene is down regulated in the skin relative to the eye

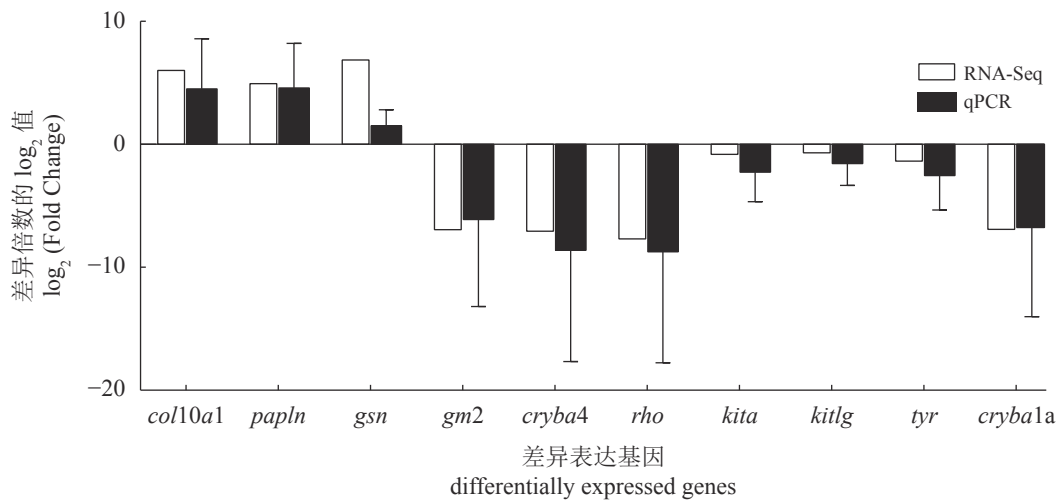


图 4 qPCR 检测 RNA-Seq 结果

Fig. 4 Validation of RNA-Seq data using qPCR

眼睛中也处于低表达，但眼睛中其他与黑色素合成直接相关的基因处于高表达水平，所以眼

睛呈黑色。

黑色素生成是一个复杂的过程，涉及了多

个生物学过程。本研究通过 KEGG 通路分析发现, 一些 DEGs 与黑色素生成通路有关。在黑色素生成途径中, 酪氨酸酶基因 (*tyr*)、酪氨酸酶相关蛋白酶 1 基因 (*tyrp1*) 和酪氨酸酶相关蛋白酶 2 基因 (*tyrp2*) 在皮肤中都出现了明显下调。酪氨酸酶 (TYR) 是一种氧化还原型酶, 具备脱氢酶和加氧酶 2 种生物催化剂功能, 2 个含铜离子位点构成了其活性中心。酪氨酸酶在黑色素的合成过程中起着限速酶的作用, 决定黑色素的合成速率<sup>[25-26]</sup>。TYR 与 TYRP-1 和 TYRP-2 构成酪氨酸酶基因家族 (TRP), 三者协同调控合成黑色素<sup>[27]</sup>。酪氨酸酶主要参与 2 个反应过程, 首先催化 L-酪氨酸羟基化转变为 L-多巴和氧化 L-多巴形成多巴醌, 然后以多巴醌为底物经一系列反应, 最终形成黑色素<sup>[28-29]</sup>。在对小鼠和人类 (*Homo sapiens*) 的研究中发现, 如果缺乏功能性酪氨酸酶, 就不会产生黑色素, 甚至还会出现白化病症状<sup>[30-32]</sup>。本研究中, 透明皮肤相对于黑色眼睛黑色素生成途径中 *tyr*、*tyrp1* 和 *tyrp2* 显著下调, 结合以往研究<sup>[25-27]</sup>, 推测这 3 种基因的低表达是导致湖栖鳍虾虎鱼体色透明的直接原因。

干细胞因子 (SCF, 又称钢因子或 Kit 配体) 是一种以膜结合和可溶性形式存在的生长因子, 它能促进造血祖细胞、黑素细胞和生殖细胞的增殖、迁移、存活和分化。而 c-Kit 是一种酪氨酸激酶受体<sup>[33]</sup>。虽然 SCF 和 c-Kit 在鱼类体色中研究较少, 但在哺乳动物胚胎发育过程中, 黑色素母细胞或黑色素细胞迁移、增殖和分化以及维持出生后皮肤黑色素生成中的作用中已有报道<sup>[34-36]</sup>。在本研究黑色素合成的 SCF/c-Kit 通路中, 相对于眼睛而言, 在皮肤中 *kitlg* 和 *kit* 明显下调。而 SCF/c-Kit 能通过基因表达调节 MITF 的数量, 从而提高黑色素的表达量。小眼畸形转录因子 (*mitf*) 是 bHLH-亮氨酸拉链转录因子家族的成员, 并且在视网膜细胞、肥大细胞、破骨细胞和黑素细胞的发育中起重要作用<sup>[37]</sup>。据报道, *mitf* 参与黑色素细胞的迁移和分化过程<sup>[38-39]</sup>。另外, *mitf* 位于黑色素合成通路中的中枢位置, 能接收和汇总上游通路中各基因传递的信号, 同时能编码 TYR 家族基因的转录因子, 从而对 *tyr* 和 *tyrp1* 的表达进行调控<sup>[40]</sup>。为了研究 *mitf* 与 *tyr* 和 *tyrp1* 的表达模式是否一致, 对该基因进行了定量分析。结果发现, 该基因在眼睛中相对

上调, 与 *tyr* 和 *tyrp1* 的表达模式一致, 表明 *mitf* 在湖栖鳍虾虎鱼黑色素生成过程中起着重要的作用。

黑素体是黑色素合成、储存和运输必不可少的细胞器。PMEL 是一种色素细胞特异性蛋白, 编码黑素体<sup>[41]</sup>。PMEL 负责黑素体内纤维层的形成, 这些纤维板在黑色素合成时充当黑色素聚合的模板, 有助于色素细胞行使最佳的功能。当 *pmel* 低表达或者突变时, 动物会表现出不同程度的色素衰退和色素细胞存活率降低<sup>[42]</sup>。在斑马鱼中, 通过 Cas9 敲除技术敲除了 *pmela* 中的 11 个碱基对, 引起了严重的色素沉着缺陷<sup>[41]</sup>。另外, 在鹌鹑 (*Coturnix japonica*) 中, *pmel* 出现无意义突变后, 由于 PMEL 功能的丧失, 可能导致了羽毛中的真黑素含量降低<sup>[43]</sup>。通过对湖栖鳍虾虎鱼皮肤和眼睛转录组分析发现, *pmel* 在眼睛中的表达量显著高于皮肤, 表明 *pmel* 在皮肤中的低表达导致皮肤中的黑色素含量缺乏, 可能是湖栖鳍虾虎鱼体色透明的成因之一。

#### 4 结论

本研究构建了湖栖鳍虾虎鱼眼睛和透明皮肤的 cDNA 文库, 通过转录组测序对皮肤和眼睛 mRNA 表达进行了比较分析, 共发现 8 113 个差异基因。进一步注释和分析 KEGG 通路发现, 黑色素合成通路中, *tyr*、*tyrp1* 和 *tyrp2* 等基因表达水平显著下调。综上, 推测湖栖鳍虾虎鱼的透明体色是受多个基因共同控制的, 其中 *tyr*、*tyrp1* 和 *tyrp2* 这 3 个基因的低表达是其体色透明的最直接因素, 皮肤中 *mc1r*、*kit* 和 *kitlg* 等基因的低表达是体色透明的重要原因。本研究结果有利于湖栖鳍虾虎鱼基因资源的开发和利用, 同时丰富了鱼类的体色研究, 也为进一步分析研究鱼类皮肤色素沉着机制提供了基础数据。

#### 参考文献 (References):

- [1] Sköld H N, Aspögren S, Wallin M. Rapid color change in fish and amphibians-function, regulation, and emerging applications[J]. Pigment Cell & Melanoma Research, 2013, 26(1): 29-38.
- [2] 蒋焯, 黄权. 鱼类体色成因及影响因素研究进展[J]. 水产科技情报, 2019, 46(2): 110-113.

Jiang Z, Huang Q. Research progress on the cause of

- formation of fish body color and its influencing factors[J]. *Fisheries Science & Technology Information*, 2019, 46(2): 110-113(in Chinese).
- [3] Odenthal J, Rossnagel K, Haffter P, *et al.* Mutations affecting xanthophore pigmentation in the zebrafish, *Danio rerio*[J]. *Development*, 1996, 123: 391-398.
- [4] Bagnara, J T, Matsumoto J. Comparative anatomy and physiology of pigment cells in nonmammalian tissues[J]. *The Pigmentary System: Physiology and Pathophysiology*, Second Edition, 2007: 11-59.
- [5] Fujii R. Cytophysiology of fish chromatophores[J]. *International Review of Cytology*, 1993, 143: 191-255.
- [6] Rawls J F, Mellgren E M, Johnson S L. How the zebrafish gets its stripes[J]. *Developmental Biology*, 2001, 240(2): 301-314.
- [7] 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).
- [8] Wang Z D, Liao J, Huang C Q, *et al.* Significant genetic differentiation of *Gobiopterus lacustris*, a newly recorded transparent goby in China[J]. *Mitochondrial DNA A: DNA Mapping, Sequencing, and Analysis*, 2018, 29(5): 785-791.
- [9] 廖健, 张顺, 龙水生, 等. 5种虾虎鱼类线粒体COI基因序列变异及系统进化[J]. *广东海洋大学学报*, 2016, 36(1): 7-12.  
Liao J, Zhang S, Long S S, *et al.* Sequence variation and molecular phylogeny of mitochondrial coi gene segments from five species of gobiidae family[J]. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2016, 36(1): 7-12(in Chinese).
- [10] 黄承勤, 廖健, 张顺, 等. 中国鳍虾虎鱼属(鲈形目: 虾虎鱼科)一新纪录种[J]. *广东海洋大学学报*, 2018, 38(2): 1-6.  
Huang C Q, Liao J, Zhang S, *et al.* A new record of gobiopterus (Perciformes: Gobiidae) in China[J]. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2018, 38(2): 1-6(in Chinese).
- [11] Du X X, Wang B, Liu X M, *et al.* Comparative transcriptome analysis of ovary and testis reveals potential sex-related genes and pathways in spotted knifejaw *Oplegnathus punctatus*[J]. *Gene*, 2017, 637: 203-210.
- [12] 邓素贞, 韩兆方, 陈小明, 等. 大黄鱼高温适应的转录组学分析[J]. *水产学报*, 2018, 42(11): 1673-1683.  
Deng S Z, Hang Z F, Cheng X M, *et al.* Transcriptome analysis of high-temperature adaptation in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2018, 42(11): 1673-1683(in Chinese).
- [13] Nan F R, Feng J, Lv J P, *et al.* Transcriptome analysis of the typical freshwater rhodophytes *Sheathia arcuata* grown under different light intensities[J]. *PLoS One*, 2018, 13(5): e0197729.
- [14] Grabherr M G, Haas B J, Yassour M, *et al.* Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome[J]. *Nature Biotechnology*, 2011, 29(7): 644-652.
- [15] Moriya Y, Itoh M, Okuda S, *et al.* KAAS: an automatic genome annotation and pathway reconstruction server[J]. *Nucleic Acids Research*, 2007, 35: W182-W185.
- [16] Eddy S R. Accelerated profile HMM searches[J]. *PLoS Computational Biology*, 2011, 7(10): e1002195.
- [17] Finn RD, Tate J, Mistry J, *et al.* The Pfam protein families database[J]. *Nucleic Acids Research*, 2008, 36: D281-D288.
- [18] Götz S, García-Gómez J M, Terol J, *et al.* High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite[J]. *Nucleic Acids Research*, 2008, 36(10): 3420-3435.
- [19] Li B, Dewey C N. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome[J]. *BMC Bioinformatics*, 2011, 12: 323.
- [20] Kanehisa M, Araki M, Goto S, *et al.* KEGG for linking genomes to life and the environment[J]. *Nucleic Acids research*, 2008, 36: D480-D484.
- [21] Ito S, Wakamatsu K, Ozek H. Chemical analysis of melanins and its application to the study of the regulation of melanogenesis[J]. *Pigment Cell Research*, 2000, 13(S8): 103-109.
- [22] Hallsson J H, Hafliadottir B S, Schepsky A, *et al.* Evolutionary sequence comparison of the *Mitf* gene reveals novel conserved domains[J]. *Pigment Cell Research*, 2007, 20(3): 185-200.
- [23] Rees J L. Genetics of hair and skin color[J]. *Annual Review of Genetics*, 2003, 37: 67-90.



- [24] Buscà R, Ballotti R. Cyclic AMP a key messenger in the regulation of skin pigmentation[J]. *Pigment Cell Research*, 2000, 13(2): 60-69.
- [25] 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): 435-445.
- [26] Hoekstra H E. Genetics, development and evolution of adaptive pigmentation in vertebrates[J]. *Heredity*, 2006, 97(3): 222-234.
- [27] Jimbow K. Biological role of tyrosinase-related protein and its relevance to pigmentary disorders (vitiligo vulgaris)[J]. *The Journal of Dermatology*, 1999, 26(11): 734-737.
- [28] 刘丽, 席冬梅, 陈亮, 等. 酪氨酸酶基因遗传变异的研究进展[J]. *中国畜牧兽医*, 2010, 37(12): 115-120.  
Liu L, Xi D M, Chen L, *et al.* Genetic variations of the tyrosinase gene[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2010, 37(12): 115-120(in Chinese).
- [29] Ito S, Wakamatsu K. Human hair melanins: what we have learned and have not learned from mouse coat color pigmentation[J]. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 2011, 24(1): 63-74.
- [30] Kenny E E, Timpson N J, Sikora M, *et al.* Melanesian blond hair is caused by an amino acid change in TYRP1[J]. *Science*, 2012, 336(6081): 554.
- [31] Imes D L, Geary L A, Grahn R A, *et al.* Albinism in the domestic cat (*Felis catus*) is associated with a tyrosinase (TYR) mutation[J]. *Animal Genetics*, 2006, 37(2): 175-178.
- [32] Ito S, Wakamatsu K. Quantitative analysis of eumelanin and pheomelanin in humans, mice, and other animals: a comparative review[J]. *Pigment Cell Research*, 2003, 16(5): 523-531.
- [33] Lennartsson J, Rönstrand L. Stem cell factor receptor/c-Kit: from basic science to clinical implications[J]. *Physiological Reviews*, 2012, 92(4): 1619-1649.
- [34] Botchkareva N V, Khlgatian M, Longley B J, *et al.* SCF/c-kit signaling is required for cyclic regeneration of the hair pigmentation unit[J]. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 2001, 15(3): 645-658.
- [35] Nishikawa S, Kusakabe M, Yoshinaga K, *et al.* In utero manipulation of coat color formation by a monoclonal anti-c-kit antibody: two distinct waves of c-kit-dependency during melanocyte development[J]. *The Embo Journal*, 1991, 10(8): 2111-2118.
- [36] Yoshida H, Hayashi S I, Shultz L D, *et al.* Neural and skin cell-specific expression pattern conferred by steel factor regulatory sequence in transgenic mice[J]. *Developmental Dynamics*, 1996, 207(2): 222-232.
- [37] Goding C R. Mitf from neural crest to melanoma: signal transduction and transcription in the melanocyte lineage[J]. *Genes & Development*, 2000, 14(14): 1712-1728.
- [38] Lister J A, Robertson C P, Lepage T, *et al.* Nacre encodes a zebrafish microphthalmia-related protein that regulates neural-crest-derived pigment cell fate[J]. *Development*, 1999, 126(17): 3757-3767.
- [39] Li S J, Wang C, Yu W H, *et al.* Identification of genes related to white and black plumage formation by RNA-Seq from white and black feather bulbs in ducks[J]. *PLoS One*, 2012, 7(5): e36592.
- [40] Ginger R S, Askew S E, Ogborne R M, *et al.* SLC24A5 encodes a trans-Golgi network protein with potassium-dependent sodium-calcium exchange activity that regulates human epidermal melanogenesis[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283(9): 5486-5495.
- [41] Lahola-Chomiak A A, Footz T, Nguyen-Phuoc K, *et al.* Non-Synonymous variants in premelanosome protein (PMEL) cause ocular pigment dispersion and pigmentary glaucoma[J]. *Human Molecular Genetics*, 2019, 28(8): 1298-1311.
- [42] Watt B, van Niel 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.
- [43] Ishishita S, Takahashi M, Yamaguchi K, *et al.* Nonsense mutation in *PMEL* is associated with yellowish plumage colour phenotype in Japanese quail[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 16732.

## Comparative analysis of skin and eye transcriptome in the *Gobiopterus lacustris*

LI Xueyou, XIE Minghua, HUANG Chengqin, WANG Chun,  
WANG Zhongduo, GUO Yusong, DONG Zhongdian\*

(Key Laboratory of Aquaculture in South China Sea for Aquatic Economic Animal of Guangdong Higher Education Institutes, Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China)

**Abstract:** *Gobiopterus lacustris* is a kind of small fish with strong adaptability to salinity and easy to raise in laboratory. It is an ideal model organism and environmental indicator species, whose body is transparent and its organs can be seen through naked eyes. In order to explore the cause of the transparent body color of *G. lacustris*, the transcriptome analysis of skin and eye of *G. lacustris* was carried out. A total of 103 686 unigenes were obtained by de novo splicing. The N50 and average length were 1 456 and 2 490 bp, respectively. In Nr, Nt, KO, SwissProt, PFAM, GO and KOG databases, 57 380, 37 343, 31 700, 51 277, 47 020, 47 555 and 25 604 unigenes were annotated respectively. KEGG enrichment showed that *tyr*, *tyrp1* and *tyrp2* were significantly down regulated in melanin production pathway. In addition, the results showed that there were 8 113 differentially expressed genes (DEGs) in the skin and eyes of *G. lacustris*, of which 3 174 were up-regulated in the skin and 4 939 in the eyes. The verification of 10 DEGs by qPCR confirmed that the RNA-Seq analysis was correct. This study enriches the body color research of *G. lacustris*, provides data for the utilization of *G. lacustris* genetic resources, and also provides a reference for further study on the formation mechanism of gorgeous body color of fish.

**Key words:** *Gobiopterus lacustris*; skin; eye; RNA-Seq; pigment formation; body color

**Corresponding author:** DONG Zhongdian. E-mail: zddong@gdou.edu.cn

**Funding projects:** National Natural Science Foundation of China (41806195, 31201996); Technology Planning Project of Guangdong Province, China (2017A030303075); Guangdong Ocean University Featured Innovation Project (230419069, 230419055); Guangdong Ocean University Nanhai Scholars Program Young Talent Project (QNXZ201903, 201807); Start-up Project from GDOU PhD