



Ccr-lncRNA172145 靶向 miR-206 在锦鲤体色调控中的作用初探

罗明坤^{1,2}, 王兰梅², 朱文彬², 傅建军², 董在杰^{1,2*}

(1. 南京农业大学无锡渔业学院, 江苏 无锡 214128;

2. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 农业农村部淡水渔业与种质资源利用重点实验室, 江苏 无锡 214081)

摘要: 为了解非编码 RNA 在锦鲤体色分化变异中的分子调控机制, 在课题组前期对锦鲤皮肤组织转录组测序的基础上, 筛选到 4 条在 3 种皮肤(黑色、红色、白色)组织中显著差异表达的 lncRNA; 基于 RNAhybrid 和 TargetScan 靶基因预测软件, 发现 lncRNA172145 与黑色素合成通路中 miR-206 之间存在靶向结合位点。借助 CPC、CPAT 及 CNIT 软件, 对 lncRNA172145 编码能力进行分析, 证实该序列为 lncRNA, 不具备编码蛋白的能力。然后, 利用 qRT-PCR 技术对该序列时空表达水平进行了检测, 发现在眼睛、黑色皮肤、鳍条及血液中表达量显著高于其他组织; 自原肠胚时期表达量开始显著上升, 高水平趋势一直持续到孵化后 20 d。通过双荧光素酶报告实验, 进一步证实 lncRNA172145 与 miR-206 之间存在靶向调控关系。最后, 通过合成 miR-206 拮抗剂, 对 miR-206 进行体内沉默, 发现与注射阴性对照拮抗剂组和 PBS 组相比, miR-206 拮抗剂组的 lncRNA172145 表达水平显著升高。研究表明, lncRNA172145 可能通过靶向到 miR-206, 参与到黑色素合成通路的调控, 这为后续深入挖掘二者在黑色素合成通路中具体的分子机制提供了基础资料。

关键词: 锦鲤; Ccr-lncRNA172145; miR-206; 体色

中图分类号: S 917.4

文献标志码: A

长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 是一类分布于细胞核或细胞质内, 片段长度大于 200 核苷酸 (nt) 的非编码 RNA, 因其分子内部存在特定复杂的二级空间结构, 能与 DNA、RNA 或蛋白质发生特异性的相互作用, 进而参与到多种细胞、组织及个体的生理调控中^[1-2]。通常, lncRNA 可通过表观遗传、转录及转录后等多种方式调控如 DNA 甲基化、组蛋白修饰及染色质重构等过程, 进而使目的基因沉

默或激活^[3]。此外, lncRNA 与 miRNA 间也存在相互调控, 如 lncRNA 可通过“分子海绵”的作用, 抑制 miRNA 表达; 也可通过与 miRNA 竞争性结合到靶向 mRNA 的 3'-UTR (untranslated region) 端, 间接抑制 miRNA 对 mRNA 的调控^[4]。近年来, 随着高通量测序技术的飞速发展, lncRNA 在水产动物中的研究也逐渐增多。如 Hu 等^[5] 通过高通量测序, 分析了异源四倍体及普通鲤 (*Cyprinus carpio*) 精巢组织的 lncRNA 信息, 分别

收稿日期: 2020-11-19 修回日期: 2021-01-02

资助项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (2019ZY22); 农业农村部现代农业人才支撑计划 (2016142); 江苏省研究生科研与实践创新计划 (KYCX18_0738)

第一作者: 罗明坤(照片), 从事水产动物遗传育种研究, E-mail: mingkunluo@163.com

通信作者: 董在杰, E-mail: dongzaijie@ffrc.cn



鉴定到 1 575 条及 939 条特异性表达 lncRNA。在对尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 雌、雄性腺差异 lncRNA 转录组分析的过程中, 彭锐等^[6]发现 lncRNA *Tcons_02477925* 在卵母细胞及性别分化的调控中可能发挥着重要作用。朱彦雨等^[7]在对黄喉拟水龟 (*Mauremys mutica*) 性别调控相关的 lncRNA 研究中发现, 精巢与卵巢组织中存在 9 573 个差异表达 lncRNA, 功能注释分析差异转录本主要参与到龟鳖动物性别分化和性腺发育等相关信号通路中。由此看来, lncRNA 可广泛参与到生物体各种生理活动过程, 而深入解析 lncRNA 具体的调控方式, 则有利于加强对水产动物功能基因与非编码基因间互作机制的认识。

锦鲤 (*Cyprinus carpio* var. *koi*) 隶属于鲤形目 (Cypriniformes), 为鲤的一个变种, 其体色多姿、体型修长、食性杂、易饲养, 在国内外观赏鱼市场中具有重要的地位^[8]。本课题组前期借助 Illumina 测序平台, 已经对锦鲤 3 种不同颜色 (红、黑、白) 皮肤组织的 lncRNA、mRNA 及 miRNA 信息进行了挖掘, 筛选到一些与色素细胞分化、沉着密切关联的基因和调控通路^[9-10]。与此同时, 研究鉴定到一条在黑色素合成通路中扮演重要角色的 miRNA, 即 miRNA-206, 并解析了其与其靶基因 *mc1r* (melanocortin-1 receptor) 之间的作用机制^[11]。基于此, 本研究在 lncRNA 测序结果的基础上, 进一步借助 CPC、CPAT 和 CNIT 软件, 以及 qRT-PCR、双荧光素酶报告系统和 miRNA 拮抗剂沉默技术, 初步分析了 *Ccr-lncRNA172145* (以下简称为 lncRNA172145) 序列的编码能力、时空表达特征, 及其与 miR-206 之间的作用关联, 研究结果为后续深入探讨 lncRNA172145 在黑色素合成通路中的分子机制提供了基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用鱼包含三色 (红、白、黑) 锦鲤和全红锦鲤两种, 均取自中国水产科学研究院淡水渔业研究中心宜兴杞亭基地。其中, 三色锦鲤体质量为 (200±4) g, 用于采集各组织; 全红锦鲤体质量 (13±1) g, 用于 miRNA 沉默注射实验。取样前, 先于 256 L 循环水系统暂养 1 周。然后, 随机取 3 条状态良好的三色锦鲤, 用丁香油进行麻醉; 无酶水擦拭皮肤表面, 并于无菌超净台

中, 分别采集红皮、白皮、黑皮、血液、肾脏、心脏、眼睛、鳃、肠、脑、脾脏、鳍条、肌肉、肝脏及性腺组织, 生理盐水清洗后, 液氮速冻, 转移至 -80 °C 冰箱备用。

此外, 于繁殖季节取锦鲤胚胎不同时期 (受精卵、卵裂、囊胚、原肠期、器官形成期、孵化及孵化后 20 d) 样品, 时期划分标准参考韩耀全等^[12]对乌原鲤胚胎时序划分; 各期样品用滤纸吸干水分后, 置于 RNA store, 然后带回实验室, 存于 -80 °C 冰箱备用。

1.2 RNA 提取及质量检测

总 RNA 的提取按照 TRIzol (Invitrogen, 美国) 试剂盒进行操作, 用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测其完整性, Nanodrop 2000 核酸蛋白仪 (Thermo, 美国) 检测 RNA 浓度和 OD 值, 并将合格 RNA 置于 -80 °C 低温保存备用。

1.3 lncRNA 序列编码能力分析

首先, 通过 ORFfinder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 在线工具对 lncRNA 序列的开放阅读框信息进行评估, 若 lncRNA 序列的 ORFs 值小于 300 nt, 说明满足要求^[13]。其次, 实验通过 CPC (Coding Potential Calculator)^[14]、CPAT (Coding Potential Assessment Tool)^[15] 及 CNIT (Coding-Non-Coding Identifying Tool)^[16] 软件进一步对 lncRNA 是否具有蛋白编码能力进行分析。

1.4 双荧光素酶报告实验

首先, 进行 lncRNA172145 基因双荧光素酶报告的质粒构建, 基于前期对不同皮肤组织的转录组文库测序数据, 获取 lncRNA172145 的 3' 序列及突变后的种子区域序列 (mut: gGGTttttgt-tGGtaTGTttttt, 大写字母代表突变后的碱基); 通过限制性内切酶 *Nhe* I 和 *Xho* I 对 pmirGLO 载体 (上海宇玫博生物科技有限公司) 进行双酶切, 该载体中包含萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶基因序列。然后, 经连接、转化与菌落鉴定步骤, 将含有目的序列的野生型质粒命名为 lncRNA 172145-wt, 而定点突变的突变型质粒命名为 lncRNA 172145-mut。

其次, 进行质粒转染, 选择 HEK293T 工具细胞 (上海宇玫博生物科技有限公司), 细胞经复苏、传代 (培养基成分: 80% DMEM + 20% 胎牛血清 + 1% 双抗) 后, 取对数生长期细胞制成悬

液, 计数, 并接种于 24 孔细胞培养板中。根据 Lipofectamine 2000 (Invitrogen, USA) 转染试剂说明进行操作, 将双荧光素酶报告质粒 (对照质粒 pmirGLO、lncRNA172145-wt 和 lncRNA172145-mut) 与 miRNA 质粒 (miRNA mimic-NC 和 miRNA-206 mimic) 两两分组共转染到细胞中, 共分为 6 个转染组 (表 1), 观察培养 24 h 后各组细胞的生长情况。

表 1 荧光素酶报告共转染实验分组

Tab. 1 Grouping of luciferase reporter co-transfection experiments

组别 group	成分 content
1	pmirGLO + miRNA-NC
2	pmirGLO + miRNA-206
3	lncRNA172145-wt + miRNA-NC
4	lncRNA172145-wt + miRNA-206
5	lncRNA172145-mut + miRNA-NC
6	lncRNA172145-mut + miRNA-206

最后, 按照 Dual-Luciferase Reporter Assay System 试剂 (Promega, USA) 说明书进行操作, 于 Synergy HT 酶标仪 (BioTek, 美国) 上检测荧光素酶活性, 记录萤火虫荧光素酶活性值。然后加入 Stop & Glo® Reagent 试剂, 移液枪吹打混匀 2 次, 测定记录海肾荧光素酶的活性值, 即为报告基因的发光值。按照海肾荧光素酶活性值/萤火虫荧光素酶活性值公式, 计算相对荧光素酶活性值。

1.5 体内沉默实验

首先, 合成 miR-206 拮抗剂 (湖州河马生物科技有限公司), 其具体序列为 5'-CsCsACACACACUCCUACAUCsCsAs-Chol-3'; 阴性对照拮抗剂序列为 5'-CsAsCGGUCCAGGCACUGUsGsUsAs-Chol-3'。两组中全链碱基均经过 2-甲氧基修饰, 其中 5'端含 2 个硫代修饰 (用小写字母“s”表示), 3'端含 4 个硫代修饰 (用小写字母“s”表示) 和胆固醇修饰 (用缩写词“Chol”表示); 另设一组为 PBS 对照。然后, 参考 Dong 等^[11] 实验筛选的最佳注射浓度, 将全红锦鲤随机分为 3 组 (20 尾/组), 通过尾静脉注射方法分别对每组实验鱼注射 miR-206 拮抗剂、阴性对照拮抗剂及 PBS 溶液。最后, 按照注射后 0、12、24、

48 和 72 h 时间点, 分别对各组进行采样 (3 尾/次), 取样部位为背部皮肤, 样品采集完成后迅速置于液氮中, -80 °C 保存, 用于后续定量分析。

1.6 荧光定量实验

以 β -actin 作为内参, 应用 Primer Premier 5 软件设计相关基因引物 (上海生工生物工程股份有限公司), 引物序列信息见表 2。按照 Prime Script™ RT Master Mix 试剂盒 (大连宝生物有限公司) 合成第一链 cDNA, 再按照 SYBR® Premix Ex Taq™ II 荧光定量试剂盒进行操作, 在 CFX96™ Real-time System (Bio-Rad, 美国) 系统上进行。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法^[17] 计算目的基因相对表达水平。

表 2 各序列的引物信息

Tab. 2 Primers information for each sequence

名称 name	序列(5' — 3') sequence
β -actin-F	CGTGATGGACTCTGGTGA
β -actin-R	ACAGTGTGGCATAACAGT
lncRNA172145-F	GCCACCACCCAAGAAGATCA
lncRNA172145-R	ATTTGTGTAGACTCGGGCCAG
lncRNA131643-F	GCCAGGTTCGTCTGTCCAAT
lncRNA131643-R	GGACCTTACCTGTCCGTCC
lncRNA89636-F	AGRCACGACTCAGGGAGACA
lncRNA89636-R	AGCGCTTGGTTCCTGCTAAA
lncRNA15058-F	ACACCATCCATCTGGCAGAG
lncRNA15058-R	CGGCCACATCAGACGAACAT
miR-206	GCGCGTGAATGTAAGGAAGT

1.7 数据分析

实验数据均以平均数±标准差 (mean±SD) 表示, 用 SPSS 22.0 软件进行单因素方差 (One-Way ANOVA) 分析, 并进行 LSD 和 Duncan 氏多重比较, $P < 0.05$ 为具有差异统计学意义。

2 结果

2.1 体色调控相关 lncRNA 筛选

在前期的研究中, 通过转录组测序技术, 对 lncRNA 在 3 种不同颜色 (红色、黑色、白色) 皮肤中的差异表达情况进行了挖掘, 并对黑色素合成通路中 miR-206 与 *mc1r* 基因间的调控机

制进行了解析。本实验筛选到 4 条显著差异表达的 lncRNA，发现这些 lncRNA 在黑色皮肤中的表达水平高于红色及白色皮肤 (表 3)。同时，通过 RNAhybrid^[18]和 TargetScan^[19]靶基因预测软件，

分析了 4 条序列中可能与 miR-206 存在互补位点的 lncRNA。lncRNA172145 序列的 414~424 nt (全长 1 212 nt) 位置与 miR-206 之间存在结合位点 (图 1)。

表 3 3 种皮肤组织中 lncRNA 的差异表达水平

Tab. 3 Differentially expressed lncRNA among three skin tissues

lncRNA 名称 lncRNA-name	红皮 RS-std	黑皮 BS-std	白皮 WS-std	FC 值 log ₂ FC	P 值 P value	FDR 值 FDR	类型 gene biotype
lncRNA172145	—	114.4	10.24	3.961	2.12×10 ⁻¹³	5.88×10 ⁻¹⁰	lncRNA
lncRNA131643	—	547.56	171.38	2.425	2.03×10 ⁻⁵	0.007 7	lncRNA
lncRNA89636	1.12	128.04	—	-7.745	9.43×10 ⁻⁷	0.000 7	lncRNA
lncRNA15058	0.88	63.32	—	-7.138	2.4×10 ⁻⁵	0.012 4	lncRNA

注：“—”表示样本中未检测到该 lncRNA，FDR 是针对显著性 P 值进行校正后的结果

Notes: “—” means that the lncRNA is not detected in the sample, and FDR is the result after correction for the significance of P value; RS. red skin, BS. black skin, WS. white skin

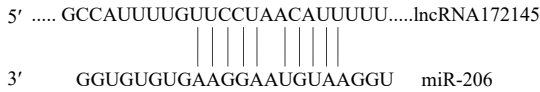


图 1 miR-206 与 lncRNA172145 结合位点分析

Fig. 1 Binding site analysis between miR-206 and lncRNA172145

2.2 lncRNA172145 序列编码能力分析

首先，对该序列 ORF 阅读框进行在线分析，结果发现序列中最长的阅读框碱基数目为 165 nt (起始：580 nt，终止：416 nt)，位于负链端，对应 54 个氨基酸 (表 4)；其他序列区域中阅读框的碱基数均小于该数值，可见 lncRNA172145 序列中没有可连续编码的碱基阅读框 (碱基数 ≥ 300 nt)，说明其不满足 mRNA 编码蛋白的要求^[13,20]。同时，又基于 3 种软件 (CPC、CPAT、CNIT)，进一步对 lncRNA172145 序列是否具有蛋白编码能力进行了分析。其中，CPC 软件预测结果证实，该序列的 ORF_FrameFinder 覆盖率仅为 8.42%，结构解析中也未发现有编码能力的碱基区域，说明该序列为非编码序列 (表 5)。CPAT 软件分析发现，该序列的 Coding Lable 显示为“no”，可能编码蛋白的概率为 0.000 183，说明其为非编码 RNA 序列 (原始数据略)。CNIT 的分析结果中，通过将序列的总长度 (1 212 nt) 转换为密码子长度 (Codon length) 之后，发现红色线条 (编码阅读框) 中 MMLCDS (The most-like CDS region) 的评分值较低 (0.392 49)，可能编码氨基酸的碱基片段长度极短 (495~593 bp)，证实其不具备编码蛋白

表 4 lncRNA172145 的 ORF 阅读框分析

Tab. 4 Open reading frame analysis of the lncRNA172145

链端 strand	起始位置 start	终止位置 stop	长度 (核苷酸/氨基酸) length (nt/aa)
-	580	416	165/54
+	956	1 114	159/52
-	360	202	159/52
+	871	1 026	156/51
+	686	802	117/38
-	967	860	108/35

注：“+”表示 RNA 信息对应 5’—3’ 序列方向的正义链，“-”表示相反方向的反义链

Notes: “+” indicates the sense strand of the RNA message corresponding to the 5’—3’ sequence direction and “-” indicates the antisense strand in the opposite direction

表 5 CPC 软件分析 lncRNA172145 的编码能力

Tab. 5 Coding capacity analysis of the lncRNA172145 by CPC

编号/ID lncRNA172145	编码/非编码 coding/noncoding	非编码 noncoding
同源性特征 homology features	编码潜力值 coding potential score	-1.290 2
	靶向数目 target number	0
	分值 score	0
	框架分值 frame score	0
ORF 检索	覆盖率/% coverage	8.42
ORF_FrameFinder	log-odds 得分 log-odds score	24.14

的能力 (图 2)。综上所述, 证实了这条通过高通量测序获得的 lncRNA172145 序列不具备蛋白编码能力, 为长链非编码 RNA。

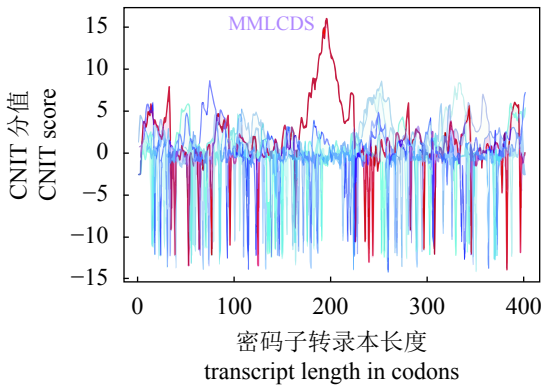


图 2 CNIT 软件分析 lncRNA172145 的编码能力 “MMLCDS”表示相似度最高的 CDS 区域, 红色线条表示正确的转录阅读框, 其他颜色线条代表另外几种转录阅读框

Fig. 2 Coding ability analysis of the lncRNA172145 by CNIT

“MMLCDS” indicates the CDS region with the highest similarity. Red line represents the correct transcription reading frame and the other five lines (blue) represent the other five reading frames

2.3 lncRNA172145 在锦鲤中的时空表达特征

为了进一步检测 lncRNA172145 序列的表达变化水平, 通过实时荧光定量技术分析了其在锦鲤不同组织和不同发育阶段的表达规律。在

不同组织的分析中, lncRNA172145 的整体表达趋势波动范围较大, 其中, 眼睛、黑色皮肤中的表达水平极显著 ($P<0.01$) 高于其他各组织, 而血液及鳍条中的表达水平显著 ($P<0.05$) 高于其他组织 (图 3-a)。在对不同发育时期的检测中, 发现 lncRNA172145 的表达水平在原肠胚时期开始显著 ($P<0.05$) 上升, 当胚胎发育至神经胚时期, 表达水平极显著 ($P<0.01$) 升高; 此后的高表达水平一直持续到孵化后 20 d (图 3-b)。

2.4 双荧光素酶报告实验

为了观察 lncRNA172145 与 miR-206 之间是否存在结合, 通过双荧光素酶报告对二者关系进一步验证。首先, 对经酶切、连接和转化后的菌落进行 PCR 扩增, 琼脂糖凝胶电泳结果发现野生型质粒 (lncRNA172145-wt) 和突变型质粒 (lncRNA172145-mut) 片段大小与预期一致; 对阳性菌落进一步测序, 发现质粒构建过程中未产生新的突变, 突变型质粒序列 (突变区域: gGGT-ttttggTGGtaTGTtttt) 与设计序列一致, 说明两种质粒构建成功。然后, 对培养 24 h 后各组细胞的生长情况进行观察, 发现转染后各组细胞培养情况良好, 密度较高 (图版); 通过对带有荧光标记的基因 (PE-GFP) 组照片进行细胞密度计数, 以间接反映各组细胞转染效率, 结果发现其转染效率在 80% 以上, 说明质粒转染成功。

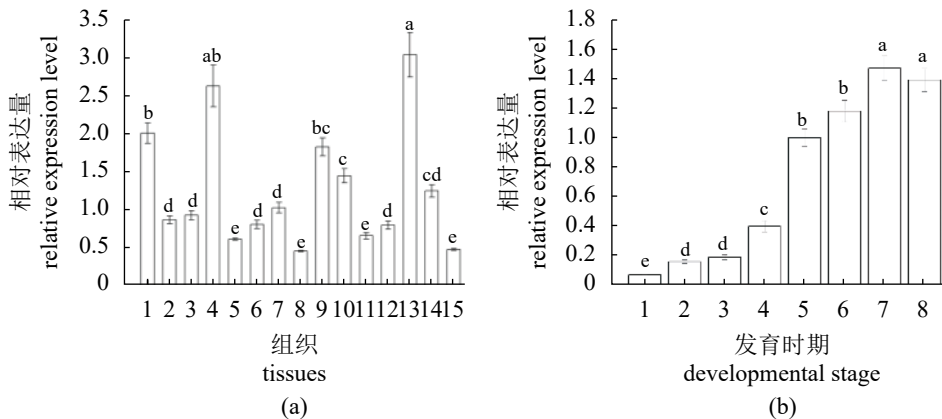
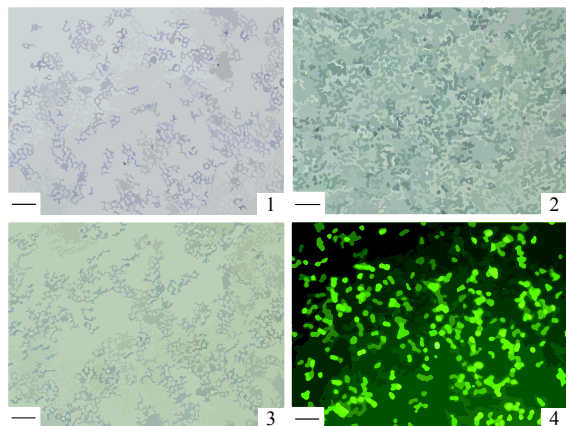


图 3 lncRNA172145 的相对表达水平

不同字母表示组间差异显著 ($P<0.05$), 下同; (a) 1. 血液, 2. 肾脏, 3. 心脏, 4. 眼睛, 5. 鳃, 6. 肠, 7. 脑, 8. 脾脏, 9. 鳍条, 10. 肌肉, 11. 肝脏, 12. 性腺, 13. 黑色皮肤, 14. 红色皮肤, 15. 白色皮肤; (b) 1. 受精卵, 2. 卵裂期, 3. 囊胚期, 4. 原肠胚期, 5. 神经胚期, 6. 器官形成期, 7. 孵化期, 8. 孵化后 20 d

Fig. 3 Relative expression level of lncRNA172145

Different lowercases indicate significant difference between groups ($P<0.05$), the same below; (a) 1. blood, 2. kidney, 3. heart, 4. eye, 5. gill, 6. intestine, 7. brain, 8. spleen, 9. fin, 10. muscle, 11. liver, 12. gonad, 13. black skin, 14. red skin, 15. white skin; (b) 1. zygote, 2. cleavage, 3. blastula, 4. gastrula, 5. neurula, 6. organogenesis, 7. hatching, 8. 20 days post-hatching



图版 细胞培养 24 h 后的转染效率

1. 空白对照组 293T 细胞白光照片；2. lncRNA172145-wt + miR-206 组白光照片；3. lncRNA172145-mut + miR-206 组白光照片；4. 带有 PE-GFP 基因的质粒单转组荧光照片。比例尺为 100 μ m

Plate Representative images of plasmid transfection efficiency after 24 h of 293T cell culture

1. white light photo of NC control 293T cells, 2. white light photo of lncRNA172145-wt + miR-206, 3. white light photo of lncRNA172145-mut + miR-206, 4. fluorescence photo of plasmid single transfer group with PE-GFP gene. Scale bar is 100 μ m

荧光素酶活性的检测结果如图 4，经统计学分析，发现 miRNA-NC 及 miR-206 mimic 对 pmir-GLO 空载体组的荧光活性无影响；共转染 miRNA-206 和野生型 lncRNA172145-wt 组中，荧光素酶活性显著降低 ($P < 0.05$)，降低比例约 31%；而 miRNA-206 + lncRNA172145-mut 组、miRNA-NC + lncRNA172145-wt 组和 miRNA-NC + lncRNA172145-mut 组中，荧光素酶的活性变化均不明显。表明 miR-206 能与 lncRNA172145 基因的靶位点特异性结合，前期生物信息学分析结果可靠。

2.5 miR-206 的体内沉默实验

为了进一步探究 miR-206 与 lncRNA172145 在锦鲤色素细胞调控过程中的关联作用，通过特殊化学修饰合成 miR-206 拮抗剂，并对其在体内沉默。通过实时荧光定量分析，发现注射后 12 h，实验组中 miR-206 的表达水平显著 ($P < 0.05$) 低于阴性对照及 PBS 组，而对照组和 PBS 组间 miR-206 的表达水平无显著差异；在 24、48 及 72 h 的分析结果中，发现实验组 miR-206 的表达水平仍显著 ($P < 0.05$) 低于其他两组 (图 5-a)。此外，在对 lncRNA172145 的表达水平检测中发现 miR-206 拮抗剂组，在注射 12 h 后，相对表达量较其他两组开始显著 ($P < 0.05$) 上升，而阴性对

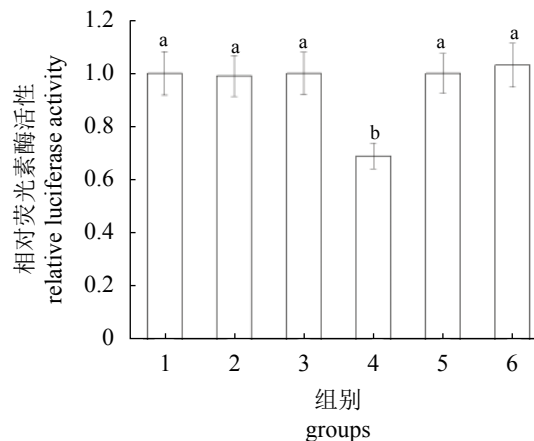


图 4 不同处理组的双荧光素酶活性检测结果

1. pmirGLO + miRNA-NC 组, 2. pmirGLO + miRNA-206 组, 3. lncRNA172145-wt + miRNA-NC 组, 4. lncRNA172145-wt + miRNA-206 组, 5. lncRNA172145-mut + miRNA-NC 组, 6. lncRNA172145-mut + miRNA-206 组

Fig. 4 Dual luciferase activity in different treatment groups

1. pmirGLO + miRNA-NC group, 2. pmirGLO + miRNA-206 group, 3. lncRNA172145-wt + miRNA-NC group, 4. lncRNA172145-wt + miRNA-206 group, 5. lncRNA172145-mut + miRNA-NC group, 6. lncRNA172145-mut + miRNA-206 group

照组和 PBS 组中 lncRNA172145 的表达水平无显著差异；在之后的各取样时间点，miR-206 沉默组中 lncRNA172145 的表达水平均较高，而其他两组无显著变化 (图 5-b)。

3 讨论

在基因进化过程中，lncRNA 曾被认为是“垃圾序列”，但随着测序技术的飞速发展，越来越多的 lncRNA 被鉴定出参与到生物体细胞分化、发育、免疫等众多生命活动过程中^[21]。近年来，有关 lncRNA 与 miRNA、mRNA 之间互作的研究也越来越多。Cesana 等^[22]在对人和小鼠骨骼肌分化的研究中发现，具有 miRNA 应答元件 (miRNA response element, MRE) 的 lncRNA 转录本，可以竞争性结合 miRNA，进而调控 miRNA 及其靶基因的表达水平。Feng 等^[23]在对不同壳色的长牡蛎 (*Crassostrea gigas*) 高通量测序研究中，分别发现了 427 条及 349 条差异表达的 lncRNA 和 mRNA，分析主要参与到色素沉着、生物矿化等生物学过程。Song 等^[24]对 *igf3* 基因被干扰前后鲤的性腺组织进行高通量测序，结果挖掘到 14 199 个 lncRNAs，其中 69 个表达上调，55 个表达

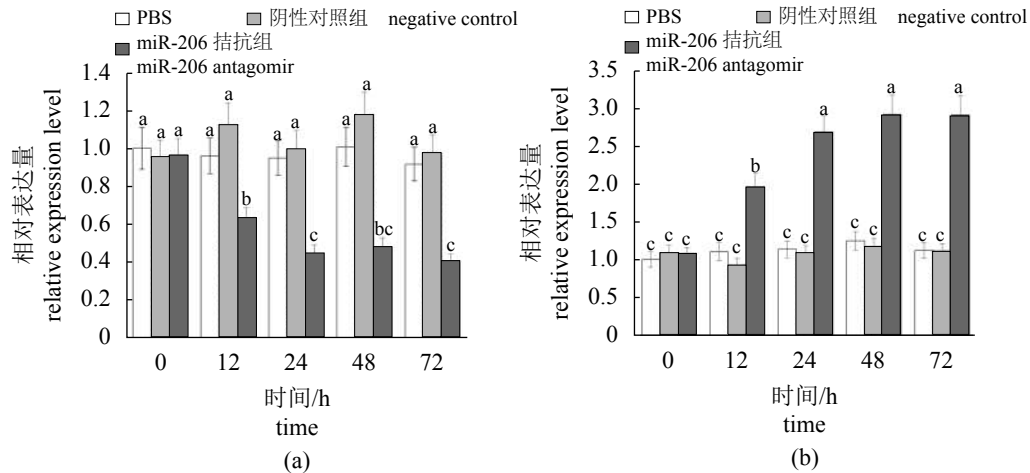


图 5 体内沉默实验中基因相对表达量

(a) 不同时间点各处理组中 miR-206 的表达水平; (b) 不同时间点各处理组中 lncRNA172145 的表达水平

Fig. 5 Relative gene expression in *in vivo* silencing experiments

(a) expression level of miR-206 in each treatment group at different time points, (b) expression level of lncRNA172145 in each treatment group at different time points

下调, 这些差异 lncRNAs 可能参与调控鲤性腺发育。但是, 在水产动物中有关 lncRNA 的研究还不够完善, 且多借助于测序技术筛选大批量的差异表达基因数目, 而深入开展分子调控机制的报道仍较少。

MiRNA 通常结合到基因的 3' 端非编码区, 降解靶 mRNA 或者阻遏靶 mRNA 的翻译, 从而调节基因的功能^[25]。与此同时, miRNA 也可以通过直接或间接作用于 lncRNA, 降低 lncRNA 的稳定性, 进而调节 lncRNA 并影响生物进程; 由于 lncRNA 也有 3' 非编码区结构, 因此 miRNA 可以像作用于 mRNA 一样, 与 lncRNA 的 3' 端结合从而直接抑制 lncRNA^[26]。在本研究中, 基于前期测序分析结果, 筛选到 lncRNA172145 序列在黑色皮肤中显著差异表达, 并通过靶基因预测软件分析其与 miR-206 之间存在 10 个互补碱基位点, 从而推测它可能参与到黑色素合成过程的调控。通常用于预测编码蛋白 RNA 和非蛋白编码 RNA 的方法有两种: 一是基于碱基比对原理 (alignment-based), 可以更好识别保守性较好的蛋白编码基因, 如 CPC、PhyloCSF 等软件; 二是根据 coding 和 non-coding 转录本序列的特征来进行划分, 包括 CNIT、CPAT 等软件^[27]。本研究中, 为了提高结果的准确性, 采用了 3 种软件同时对 lncRNA172145 序列进行分析, 其 ORF 阅读框最长为 165 nt, 编码能力得分均较低, 结果均证实其不具备连续编码氨基酸的能力。

在对时空表达水平的检测中, 实验发现 lncRNA172145 在眼睛、黑色皮肤、血液及鳍条组织中的含量显著高于其他组织 ($P < 0.05$), 这与前期在对 *mc1r* 基因表达特征分析时的结果基本一致, 分析可能与这些组织中黑色素细胞含量相对丰富有关^[11]。此外, 在对不同发育阶段的检测中, 发现胚胎发育至神经胚时, 表达水平极显著上升 ($P < 0.01$), 且高表达的水平一直持续到孵化后 20 d; 这与锦鲤早期色素形成一致^[28], 分析是由于此阶段神经嵴细胞开始形成, 而色素前体细胞起源于神经嵴细胞, 并向色素细胞分化造成^[29]。由此间接说明 lncRNA172145 可能参与早期色素细胞的迁移和分化过程。

此外, 通过双荧光素酶报告实验, 对 lncRNA172145 与 miR-206 是否存在互作关系进行了验证。通常, miRNA 可作用于靶基因 3' 端非编码区域而发挥功效, 故可将目的基因结合区域构建至载体中报告基因 luciferase 后面, 通过比较过表达或干扰 miRNA 后, 报告基因表达的改变 (检测荧光素酶活性变化), 可定量反映 miRNA 对目的基因的抑制作用, 也即用荧光值来判断 miRNA 是否与靶基因结合^[30]。实验结果证实, 过表达 miRNA-206 和野生型 lncRNA172145-wt 的转染组中, 荧光素酶活性相比其他组显著下降 (比例约 31%) ($P < 0.05$); 而在突变组 lncRNA172145-mut 中荧光素酶活性下降不显著, 由此说明 miR-206 与 lncRNA172145 序列间存在互作关系。同

时,通过进一步合成经化学试剂修饰的 miR-206 antagomir,其作用原理是与体内成熟 miRNA 竞争性结合,从而阻止 miRNA 与靶 mRNA 的互补作用,抑制 miRNA 发挥作用^[31],探究 miR-206 与 lncRNA172145 在体内的作用关联。研究结果发现沉默 miR-206 后, lncRNA172145 在背部皮肤中的表达水平相对于阴性对照 antagomir 组和 PBS 组,有显著上升的趋势 ($P < 0.05$)。之前的研究也表明沉默 miR-206 后,能显著上调靶基因 *mc1r* 的表达水平 ($P < 0.05$); 而 *mc1r* 基因在黑色素合成通路中起着类似“开关”的作用,其表达水平的高低与黑色素生成种类(真黑色素、褐黑色素)密切相关^[11]。由此说明, lncRNA172145 可能通过结合 miR-206,而间接参与调控黑色素合成,但 lncRNA172145 与 miR-206 之间,以及 lncRNA172145 在黑色素合成通路中是通过什么样的分子机制来发挥作用, *mc1r* 仅仅是作为靶基因受到 lncRNA172145 和 miR-206 的调控,还是会对二者进行反馈调节,需要进一步研究,本实验的开展为后续深入分析提供了理论资料。

参考文献 (References):

- [1] Schaukowitz K, Kim T K. Emerging epigenetic mechanisms of long non-coding RNAs[J]. *Neuroscience*, 2014, 264: 25-38.
- [2] 宋飞彪,俞贞贞,董在杰,等. lncRNA在水产动物中的研究进展[J]. 水产学报, 2020, 44(8): 1371-1383.
Song F B, Yu Z Z, Dong Z J, *et al.* Research progress of lncRNA in aquatic animals[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2020, 44(8): 1371-1383(in Chinese).
- [3] Sun M, Kraus W L. From discovery to function: the expanding roles of long noncoding RNAs in physiology and disease[J]. *Endocrine Reviews*, 2015, 36(1): 25-64.
- [4] 易红,张政. lncRNA与miRNA相互作用对疾病的影响[J]. 基础医学与临床, 2016, 36(2): 267-271.
Yi H, Zhang Z. The influence of interaction between lncRNA and miRNA on diseases[J]. *Basic & Clinical Medicine*, 2016, 36(2): 267-271(in Chinese).
- [5] Hu F Z, Xu K, Zhou Y F, *et al.* Different expression patterns of sperm motility-related genes in testis of diploid and tetraploid cyprinid fish[J]. *Biology of Reproduction*, 2017, 96(4): 907-920.
- [6] 彭锷,宋凌云,乔栖梧,等. 尼罗罗非鱼雌性性腺关键 lncRNA的鉴定和表达分析[J]. 西南师范大学学报(自然科学版), 2019, 44(6): 40-45.
- Peng K, Song L Y, Qiao X W, *et al.* Identification and expression analysis of a key lncRNA in the gonads of female Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. *Journal of Southwest China Normal University (Natural Science Edition)*, 2019, 44(6): 40-45(in Chinese).
- [7] 朱彦雨,刘晓莉,王亚坤,等. 黄喉拟水龟性别调控相关 lncRNA和mRNA的筛选及初步分析[J]. 水产学报, 2020, 44(12): 1960-1975.
Zhu Y Y, Liu X L, Wang Y K, *et al.* Identification and analysis of lncRNAs and mRNAs involved in sex regulation in Asian yellow pond turtle (*Mauremys mutica*)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2020, 44(12): 1960-1975(in Chinese).
- [8] De Kock S, Gomelsky 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.
- [9] Luo M K, Wang L M, Yin H R, *et al.* Integrated analysis of long non-coding RNA and mRNA expression in different colored skin of koi carp[J]. *BMC Genomics*, 2019, 20(1): 515.
- [10] Luo M K, Wang L M, Zhu W B, *et al.* Identification and characterization of skin color microRNAs in koi carp (*Cyprinus carpio* L.) by Illumina sequencing[J]. *BMC Genomics*, 2018, 19(1): 779.
- [11] Dong Z J, Luo M K, Wang L M, *et al.* MicroRNA-206 regulation of skin pigmentation in koi carp (*Cyprinus carpio* L.)[J]. *Frontiers in Genetics*, 2020, 11: 47.
- [12] 韩耀全,何安尤,蓝家湖,等. 乌原鲤的胚胎发育特征[J]. 水产科学, 2018, 37(3): 368-373.
Han Y Q, He A Y, Lan J H, *et al.* Embryonic developmental of Chinese ink carp[J]. *Fisheries Science*, 2018, 37(3): 368-373(in Chinese).
- [13] El-Gebali S, Mistry J, Bateman A, *et al.* The Pfam protein families database in 2019[J]. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(D1): D427-D432.
- [14] Kong L, Zhang Y, Ye Z Q, *et al.* CPC: Assess the protein-coding potential of transcripts using sequence features and support vector machine[J]. *Nucleic Acids Research*, 2007, 35(S2): W345-W349.
- [15] Wang L G, Park H J, Dasari S, *et al.* CPAT: Coding-Potential Assessment Tool using an alignment-free
中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

- logistic regression model[J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(6): e74.
- [16] Guo J C, Fang S S, Wu Y, *et al.* CNIT: a fast and accurate web tool for identifying protein-coding and long non-coding transcripts based on intrinsic sequence composition[J]. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(1): 516-522.
- [17] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [18] Rehmsmeier M, Steffen P, Höchsmann M, *et al.* Fast and effective prediction of microRNA/target duplexes[J]. *RNA*, 2004, 10(10): 1507-1517.
- [19] Garcia D M, Baek D, Shin C, *et al.* Weak seed-pairing stability and high target-site abundance decrease the proficiency of Isy-6 and other microRNAs[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2011, 18(10): 1139-1146.
- [20] Hu L, Xu Z Y, Hu B Q, *et al.* COME: a robust coding potential calculation tool for lncRNA identification and characterization based on multiple features[J]. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45(1): e2.
- [21] Wu Z M, Liu X X, Liu L, *et al.* Regulation of lncRNA expression[J]. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 2014, 19(4): 561-575.
- [22] Cesana M, Cacchiarelli D, Legnini I, *et al.* A long non-coding RNA controls muscle differentiation by functioning as a competing endogenous RNA[J]. *Cell*, 2011, 147(2): 358-369.
- [23] Feng D D, Li Q, Yu H, *et al.* Transcriptional profiling of long non-coding RNAs in mantle of *Crassostrea gigas* and their association with shell pigmentation[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 1436.
- [24] Song F B, Wang L M, Zhu W B, *et al.* Long noncoding RNA and mRNA expression profiles following *igf3* knockdown in common carp, *Cyprinus carpio*[J]. *Scientific Data*, 2019, 6(1): 190024.
- [25] Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay[J]. *Nature Review Genetics*, 2010, 11(9): 597-610.
- [26] 白凤庭, 李林, 陈军豪, 等. 非编码RNA与骨骼肌发育研究进展[J]. *中国畜牧兽医*, 2020, 47(11): 3584-3594.
- Bai F T, Li L, Chen J H, *et al.* Research progress on non-coding RNA and skeletal muscle development[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2020, 47(11): 3584-3594(in Chinese).
- [27] 孙磊, 张林, 刘辉. 基于RNA-Seq的长非编码RNA预测[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2012, 39(12): 1156-1166.
- Sun L, Zhang L, Liu H. Prediction of Long non-coding RNAs based on RNA-Seq[J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2012, 39(12): 1156-1166(in Chinese).
- [28] 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).
- [29] Rawls J F, Mellgren E M, Johnson S L. How the zebrafish gets its stripes[J]. *Developmental Biology*, 2001, 240(2): 301-314.
- [30] Alcaraz-Pérez F, Mulero V, Cayuela M L. Application of the dual-luciferase reporter assay to the analysis of promoter activity in Zebrafish embryos[J]. *BMC Biotechnology*, 2008, 8(1): 81.
- [31] Krützfeldt J, Rajewsky N, Braich R, *et al.* Silencing of microRNAs *in vivo* with 'antagomirs'[J]. *Nature*, 2005, 438(7068): 685-689.

Preliminary study on the role of Ccr-lncRNA172145 in targeting miR-206 in the regulation of skin color of *Cyprinus carpio* var. *koi*

LUO Mingkun^{1,2}, WANG Lanmei², ZHU Wenbin², FU Jianjun², DONG Zaijie^{1,2*}

(1. Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214128, China;

2. Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Freshwater Fisheries Research Centre, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China)

Abstract: Long non-coding RNA (lncRNA) is a type of RNA with a length of over 200 nucleotides that can interact with DNA, RNA, or proteins to regulate target genes at the transcriptional, post-transcriptional, and epigenetic levels. Based on the previous transcriptome sequencing data of *Cyprinus carpio* var. *koi* skin tissues, we screened four lncRNAs that were significantly differentially expressed in three skin tissues (black, red and white). In order to further explore the function of these lncRNAs in skin color differentiation and synthesis, a preliminary study of the relationship between their functions and miRNAs was also conducted. Firstly, the target binding sites between lncRNA172145 and miR-206 in the melanogenesis pathway were identified through RNAhybrid and TargetScan target gene tools. Then, the coding ability of lncRNA172145 was detected by CPC, CPAT, and CNIT software, and the results confirmed that this sequence was lncRNA with no protein coding ability. The temporal and spatial expression levels of this sequence were further analyzed by qRT-PCR, and it was demonstrated that the levels were significantly higher in the eyes, black skin, fins and blood than those in other tissues; and the expression levels started to increase significantly from the gastrulation stage, and the high-level trend continued until 20 days after hatching. Additionally, with the help of dual luciferase reporter assay, the existence of a targeted regulatory relationship between lncRNA172145 and miR-206 was further verified. Finally, miR-206 was silenced *in vivo* by synthesizing miR-206 antagonist, and the results showed that the expression level of lncRNA172145 in the miR-206 antagonist group, was significantly higher compared to the negative control antagonist group and the PBS group. These findings suggest that lncRNA172145 could be involved in the regulation of the melanogenesis pathway by targeting to miR-206, providing the fundamental information for further research into the specific molecular mechanisms of their roles in the melanogenesis pathway, as well as the role of long non-coding RNAs in regulating fish body pigmentation and differentiation.

Key words: *Cyprinus carpio* var. *koi*; Ccr-lncRNA172145; miR-206; skin color

Corresponding author: DONG Zaijie. E-mail: dongzj@ffrc.cn

Funding projects: Central Public Interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2019ZY22); Modern Agricultural Talent Support Program Project of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs (2016142); Post-graduate Research and Practice Innovation Program of Jiangsu Province (KYCX18_0738)