

红鳍笛鲷(*Lutjans erythropterus*)酪氨酸酶 相关蛋白 1 基因克隆及表达分析*

张艳苹^{1,2} 王中铎¹ 郭昱嵩¹ 刘 丽¹ 刘楚吾^{1,2①}

(1. 广东海洋大学水产学院 湛江 524088; 2. 湖南师范大学生命科学学院 长沙 410000)

摘要 本文利用 RACE 技术克隆获得红鳍笛鲷(*Lutjans erythropterus*)酪氨酸酶相关蛋白 1 基因全长, 并利用生物信息学方法对该基因的 mRNA 序列特征、氨基酸序列特征、分类及系统发生进行了分析。结果表明, 在红鳍笛鲷中, 酪氨酸酶相关蛋白 1 基因含有 TYRP1a 和 TYRP1b 两个拷贝, 其中 TYRP1a 序列全长 3178bp, 开放阅读框(ORF)长 1566bp, 5'端 235bp, 3'端 1377bp; TYRP1b 基因 cDNA 全长 1871bp, ORF 区长 1656bp, 5'端 89bp, 3'端 126bp。序列分析发现, TYRP1a 和 TYRP1b 基因与其它物种的同源基因保守性较高, 尤其是酪氨酸酶基因家族典型的酶活性位点序列在脊椎动物中具有高度保守性。进化分析发现, TYRP1a 和 TYRP1b 基因的种间同源性高于两个基因间的同源性。荧光定量 PCR 数据分析表明, TYRP1a 和 TYRP1b 基因都在眼睛部位具有最高表达, TYRP1b 在黑色皮肤也有较高表达。结果可为进一步阐述 TYRP1 基因在红鳍笛鲷身体和眼睛部位的色素合成机制提供一定的理论基础。

关键词 红鳍笛鲷; 酪氨酸酶相关蛋白 1 基因; 基因克隆; 表达分析

中图分类号 Q953 **doi:** 10.11693/hyhz20160200039

黑色是动物中分布最广泛的颜色, 在光吸收、光保护和体色构成上具有重要作用(Lin *et al.*, 2007)。颜色深浅变化主要是由黑色素细胞内合成的黑素体分布种类及数量差异引起的(Kuriyama *et al.*, 2006; Leclercq *et al.*, 2010)。酪氨酸酶基因家族基因编码的酪氨酸酶及酪氨酸酶相关蛋白是催化酪氨酸酶生成黑色素的关键酶。在脊椎动物中, 该基因家族成员包括酪氨酸酶基因(TYR 基因)、酪氨酸酶相关蛋白 1 基因(TYRP1)和酪氨酸酶相关蛋白 2 基因(TYRP2 基因)(del Marmol *et al.*, 1996)。它们的序列具有高度一致性, 共同作用于黑色素细胞, 调节黑素生成的种类和数量(Nordlund *et al.*, 2006)。作为酪氨酸酶基因家族基因的一员, TYRP1 虽然在结构上与 TYR 和 TYRP2 基因类似, 但因其功能具有物种特异性, 具体功能目前尚无定论(Sarangarajan *et al.*, 2001; Braasch *et al.*,

2009)。普遍认可的是 TYRP1 可能起着起稳定 TYR 基因的功能的作用, 同时也参与维持黑素体超微结构和影响黑色素细胞生长及死亡(Sarangarajan *et al.*, 2000; Kobayashi *et al.*, 2007; 高莉等, 2010)。在小鼠中, TYRP1 基因突变可能导致小鼠棕色毛发的出现, 在人类中, TYRP1 基因特定位点突变是人类 OCA3 (oculocutaneous albinism type 3)发生的主要原因(Boissy *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 2011; Kamaraj *et al.*, 2013)。在硬骨鱼中, TYRP1 基因的主要功能也是参与黑色素生成, 如在斑马鱼和青鳉中, TYRP1 主要在眼睛和皮肤等黑素生成部位表达(Braasch *et al.*, 2009)。

由于鱼类特有的基因组复制现象, 酪氨酸酶基因家族基因在硬骨鱼中发生了基因扩张现象。但复制基因的保留方式存在种间差异, 例如斑马鱼(*Danio rerio*)中仅有一个 TYRa, 2 个 TYRP1 基因; 而青鳉

* 广东省高等学校优秀青年教师培养计划资助项目, Yq2013091 号; 广东海洋大学创新强校项目, GDOU2013050307 号。张艳苹, 博士研究生, E-mail: zhangyanping6000@163.com

通讯作者: 刘楚吾, 教授, 博士生导师, E-mail: liucw@gdou.edu.cn

收稿日期: 2016-02-24, 收修改稿日期: 2016-03-13

(*Oryzias latipes*)中 TYR 和 TYRP1 的两个复制基因都存在; 青斑河豚 (*Tetraodon nigroviridis*)中有两个 TYR 和一个 TYRP1a 基因(Camacho-Hübner *et al*, 2002; Braasch *et al*, 2007)。

红鳍笛鲷(*Lutjanus erythropterus*)是我国南海重要的经济鱼类, 主要分布在印度洋和西太平洋海域, 属于底栖珊瑚礁鱼类, 体色鲜艳, 通体鲜红色, 又称红鱼, 仅尾柄部具有鞍马状黑色斑块(Guo *et al*, 2007; Zhang *et al*, 2015)。属于比较理想的研究笛鲷属鱼类体色进化的代表物种。

本研究以红鳍笛鲷皮肤转录组数据为对象, 利用生物信息学方法, 鉴定红鳍笛鲷酪氨酸酶相关蛋白 1 基因, 从分子水平解析红鳍笛鲷 TYRP1 基因的基本结构和组织表达。

1 材料与方法

1.1 材料

实验用鱼购自广东省湛江市霞山区东风市场, 体重(300±10)g, 体长(27±1)cm, 实验室暂养 3d 后取样, 暂养条件: 水温(26±2)℃, 光暗周期 14h: 10h。采用 MS-222 将实验鱼麻醉后快速取样, 样品由液氮速冻后, 置于-80℃保存。克隆材料为红鳍笛鲷黑色皮肤部位, qRT-PCR 的实验材料为红鳍笛鲷成体的黑色皮肤、红色皮肤、脑、肉和眼睛 5 个组织的总 RNA, 每个基因个体重复 6 次。

1.2 主要试剂

MS-222 购自 Sigma 公司; M-MLV RTase cDNA Synthesis Kit 购于 Promega 公司; Trizol 购于 Invitrogen 公司; RACE 试剂盒(clontech)和 Maxima SYBR Green qPCR 分别购自 Roche 和 Thermo 公司, 其它试剂均为国产分析纯试剂。

1.3 RACE 获得目的基因全长序列

根据红鳍笛鲷转录组数据库中注释为 TYRP1 的 unigene 序列设计引物获得目的基因中间片段, 再采用 RACE 技术, 设计基因特异性引物进行 5'cDNA 和 3'cDNA 末端的克隆。5'RACE 和 3'RACE 的操作按照 clontech 的 SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit 说明书进行, 将获得的目的片段分离纯化并连接到 pMD18-T 载体上, 然后再转化到 JM109 感受态细胞中, 通过菌落 PCR 挑选阳性克隆并送上海生工进行测序, 将测序后的序列与已知的片段进行拼接获得目的基因的 cDNA 全长。所用特异性引物见表 1

1.4 生物信息学分析

用 DNAMAN 软件将测序获得的结果进行拼接, 得到 TYRP1 基因的全长 cDNA 序列。编码框及非编码区的预测利用 NCBI 在线网站 ORF finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/orf.cgi>)来预测。分子量和等电点在 Expasy 网站 (http://web.expasy.org/compute_pi/)进行分析, 蛋白质结构域利用 SMART 软件(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)在线分析。同时, 利用 ClustalW2 软件将 TYRP1 与其它已知物种同源基因进行比对分析。使用 MEGA 5.0 软件, 以邻位相连法(neighbor-joining)构建系统进化树。

1.5 荧光定量 PCR 法检测目的基因在红鳍笛鲷不同组织的差异表达

利用 Beacon Designer 软件分别在其编码区范围内设计荧光定量 PCR 所需的特异性引物, 内参为 β -actin。引物均由上海生工生物工程技术服务有限公司合成, 采用 ULTRAPAGE 纯化方式。取红鳍笛鲷黑色皮肤、红色皮肤、眼、脑和肉 5 个组织, 提取总 RNA 后反转录得到 cDNA 模板进行荧光定量 PCR。每个基因设置 3 个技术重复和 6 个实验重复。实验数据以红鳍笛鲷肌肉组织作为对照, 排除每 3 个重复中 Ct 值有较大差异的数据, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因在各组织的相对表达量, 数据分析选用 SPSS 21.0 进行显著性差异分析, 当 $P<0.05$ 时为显著差异。

2 结果

2.1 TYRP1 在红鳍笛鲷皮肤中存在情况

查找红鳍笛鲷转录组数据中注释为 TYRP1 基因的 unigene 序列, 同时下载尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)TYRP1a (ENSONIP00000009562)和 TYRP1b (ENSONIP00000011122)序列对转录组数据进行本地 blast, 结果两两验证确定红鳍笛鲷中存在 TYRP1 的两个拷贝基因。

2.2 TYRP1 基因核苷酸序列分析

将测序获得的 5'上游及 3'下游序列与中间片段利用 DNAMAN 软件进行拼接, 分别获得 TYRP1a 和 TYRP1b 序列的 cDNA 全长。由图 1 可知, TYRP1a 序列全长 3178bp, 其中开放阅读框(ORF)区长 1566bp, 编码 521 个氨基酸, 5'端 235bp, 3'端 1377bp, 预测其分子量 58.4kDa, 等电点为 5.38; 由图 2 可知, TYRP1b 基因 cDNA 全长 1871bp, 其中 ORF 区长 1656bp, 编码 551 个氨基酸, 5'端 89bp, 3'端 126bp。

表 1 TYRP1 基因克隆和荧光定量引物

Tab.1 The primers used in this experiment

基因	引物序列(5'—3')	用途
TYRP1a-5-outer	GGTGGAGTAGTAGGGCGCGTGTCA	5'RACE
TYRP1a-5-inner	CAGATTGTTCCACGCGTGTCTAGTCC	5'RACE
TYRP1a-3-outer	GTCACAACAGGGGCTACAACATGGT	3'RACE
TYRP1a-3-inner	GTGCGCCGTGCGGCCAGGTCTTAC	3'RACE
TYRP1b-5-outer	TCCCCTGCTGCCCTGTAGGAGATG	5'RACE
TYRP1b-5-inner	GAGACCCACTCGCCACATGCTCTGA	5'RACE
TYRP1b-3-outer	CCCCACCTTACTACTCCACCTCTCTGA	3'RACE
TYRP1b-3-inner	GCCTCCTGTACCAATGCTGAGATGTT	3'RACE
<i>Tyrp1a</i> -qPCR-F	CCGATCCGTTTCTTTAAC	荧光定量
<i>Tyrp1a</i> -qPCR-R	CCTCACAACATTAACCTCTC	荧光定量
<i>Tyrp1b</i> -qPCR-F	CTAAGAGGACCAATTCAC	荧光定量
<i>Tyrp1b</i> -qPCR-R	CTGACGGAGTAATAGTG	荧光定量
β -actin-F	GCCTTCCTTCATTGGTA	内参基因
β -actin-R	GCTGTGATCTCCTTCTG	内参基因

1 ctctagagattaagcagtggttcaacgcagagtagatctgggggaaatagaagctggggcctgggcatgggagggggagwttttacaca
91 cacttagttgacagagaaaagtcatyckgsggtgtttaagtagtactcatctggatgaggtattagttaaattgtacatttacaggtgaa
181 tattcgctccaaatcagacgcagccgtgcgtaaagtttggcaccgcttttggataATGTTTCAGTGCTGCTTTTGGTTCTTGTGGGCGC
1 MFQCCFLVVLVGA
271 GGTGGTGTGAGGCCAGTTCGCCAGGGAGTGTGTGACACCCGAAGGACTCAGGAGTGGACAGTGTCTCCGTGCGCTCCGGACTCAA
13 VVVSSAQFPRECVTP E G L R S G Q C C P S P S G L N
361 CAACGACCCGTGCGCGCCAGCACCCGTGCGGACAGTGCATCATCACGGTGGACGCGCGCCGACGCGCTCAGTATCCGCAAGA
43 N D P C G A S T G R G Q C V S I T V D A R P H G P Q Y P H D
451 CGGACGGGACGATCGGAGAGATGGCCGATCCGTTTCTTAAACGGACCTGTCACTGTAAACGGAACTTCACCGTTTAACTGCGGCCG
73 G R D D R E R W P I R F F N R T C Q C N G N F T G F N C G R
541 CTGCAGACCGGATGGACTGGACCAACTGTGACCAGAGAGTTAATGTTGTGAGGAGAAAGTGTGACAGTCTCAGCGCTGAGGAGAACGG
103 C R H G W T G A N C D Q R V N V V R R N V M Q L S A E E K R
631 TGCGTTTGTGAACGCGCTGGACCAAGCCGACGCGTGCACCCGACCTGGTGTATCGCCACACGCGCTACCGGAGATCTTCGGGCC
133 A F V N A L D Q A K R T V H P D L V I A T R R Y A E I F G P
721 CGACGGGAACACCATGCACTTCGAGAACATCACCATCTACACTACTTTGTGTGGTCCCACTACTCTCCGTGAGCAAGACGTTCTCTGGG
163 D G N T M Q F E N I T I Y N Y F V W S H Y F S V S K T F L G
811 TGCGTCCAGCGTCTCCAGAGCCAGGAGCTTCTGACATGAGTCTCTGAGCCCACTCCATCTTCGCCCAGTGGAGGGTCTGTCTGAGAGT
193 P G Q A S F G G V D F S H E G P G F V T W H R Y H L L Q L E
901 GAGAGACATGACGACATGCTGAAGACCCCTCTCGCCCTGCGCTACTGGAACCTTTGCCATCGGTGGAAGCACATGTGACATCTGCAC
223 R D M Q D M L Q D P S F A L P Y W N F A I G S T C D I C T
991 AGACCGCTGATGGAGCCAGGAGCAGCTTCGACATGAGTCTCTGAGCCCACTCCATCTTCGCCCAGTGGAGGGTCTGTCTGAGAGT
253 D D L M G A R S S F D M S S L S P N S I F A Q W R V V C E S
1081 CGTAGAGGACTACGACACGCTGGGAACAATCTGCAACAACACCGAGACTTCTCCATCAGAAGGAACCCAGCAGGAACCTCAACAGGCC
283 V E D Y D T L G T I C N N T E T S P I R R N P A G N V N R P
1171 GATGTCACCGTCTCCAGAGCCAGGAGCTGGCAGAGTGCCTGACAGTCAACACTTTTGACACGCGCCCTACTACTCCACCTCCTC
313 M V Q R L P E P Q D V A E C L Q V N T F D T P P Y Y S T S S
1261 TGAAGCTTCAGAAACAAATCGAAGGCTACAGCGCCCGCAAGGAACTACGACCCGCTGGTGGAGGCTCCACAACTTGGCCCTCT
343 R D M Q D M L Q D P S F A L P Y W N F A I G S T C D I C T
1351 TTTCCTGAACGGCAGGAGGAGAGTCACTCTACCAATGACCCCTCTCTGCTGCTTACACCTACACCGAGCTATATTTGA
373 F L N G T G G Q T H L S P N D P I F V L L H T Y T F N D
1441 TGAGTGGTTGAGGAGACATGCTCCAGATTCGGCTGTATCTGAGAAAATGCCCCATTGGTCACAACAGGGGCTACAACATGGTGCC
403 E W L R R H G P D S A V Y P E E N A P I G H N R G Y N M V P
1531 TTTCGCGCTCCGGTGAATAACCTGAGATGTTTGAATGCCCCGTAAGCTGTTACTCTTATGAAGCTGAATGGCCAGGTCACCC
433 F W P P V T N A E M F V T A P E N L G Y S Y E A E W P G Q P
1621 TTTCACCTCACTGAATCATCACTGACAAATAGTTGCTGCCCTTGTGTTGTGCTGATATTCGCGCCACTACGTCGCGCGCTGCG
463 F T L T E I I T M T I V A A L V V V A V I F A A T T C A V R
1711 CGCCAGGTCTTACAAATGGAGGGCCACCGCTCTGCTGGGGATCAGTACCAGCGCTACGACATGACAAAAGCCAGTCTGTAGTCTA
493 A R S Y K M E G H Q P L L G D Q Y Q R Y D D D K S Q S V V *
1801 gattcctgtttaaacatgagccacaccaaagtcctctctctttattttgacagtgacagaaatagcagtttgttaaaggcaggaaat
1891 aatcttttgcctcttatcagctggtgtagttcattttgctttaacaatagcacagatgtgaacaattacatttccccagtgaaactac
1981 gaacaagaatcattgaagatttttttaaggaaggtttttaacagtaaaagattgaaaaggttctaggaaaatttgaaaatggaaaac
2071 agtggttcaaatgaagtgacatgaacgactgaagtgatggtgtgatgacacaccacagtggtgctggtcttctgtaggcttttat
2161 aacgacatgtcggtatcaacaaggataccttctgtgttttagaggttgattttacattattagggtatcagggtgaaattattgttagatt
2251 ctggtgtgggattcagagtggttctttaaatttttgaacatatttaaagtaacagagcaatacaggcaataaattaaattttaataag
2341 ttctaccatgttcattagtttttaacacttggagtttatctgacttaacagtttagtttagttgcaaatagcatcatcaaatggtttttc
2431 aagtggtataaatgcaatgtccatgcaacagagccataacgcccacagggtgcaatagttcaatttttgaaactcttcaagtagcttg
2521 tcaaaaggtagaagatagcttctgttttttaagtagtgtagaataaactgatccgagtgacctaataattatttaaatgaatgaaga
2611 gataaccagataaaaacagggtgataaattcagaagaatgtagcgaggtgcaacaggttgtaaccagagacttcaactgaacttgcgtac
2701 ttatacaacatgcagcttttattcttatttctgtttttaaataaactcaatttgttgaaatgggtcgtaagtctatttctgttttaca
2791 ttatatacttctgcaaatgttgttgatctgggtgcatgcacaaattatttaaattgataaattttacagccagcagagtggtttatc
2881 aaactttacactgacactgaatgtagctgtgtgattaaaacattataaacaacagaaatattatgtatgcacacaacattattataaa
2971 catctcattacttatggaacatgcatctttagtgagttctttcatctagaatttttcaattatttggacctgcacttatttgcactt
3061 gtgcatgtctttaaatagcttattagctctcccccacgattatgggggtattagattagccatttgcctgatggtcgagctgtaactcct
3151 cctaattattggtaccacttttaacaataag

图 1 红鳍笛鲷 *TYRP1a* 基因序列分析Fig.1 Analysis on the sequence of *TYRP1a* gene

图中编码区(CDS)及推导的氨基酸序列用大写字母表示, 非编码(UTR)区用小写字母表示

```

1      ctcatgtgtactctgctctattctgctgtgtgtgtcttacaagaaggactggtcatgtgtctcaataactattttaagccaggaaataggaA
91     TGGGCCGACTCTTGGGGGGGCTACAGTTCTGCAGCCAGACAGAGAGGAGCAGCATGCACAGTCAGAGCATGTGGCGAGTGGTCTCTTGG
1      M G R L L G G L Q F C S Q T E R S S M H S Q S M W R V G L L
181    TGGTGACCCATATGCGTGACCCTAACACTGGCCAGTTCCCGGGAGTGCGTCACCCCGAGGGGCTGCAAGCGCCAGTGTGCCCAT
30     V V T L C V T L T L A Q F P R E C V T P E G L Q S G Q C C P
271    CTCCTACAGGGGCAGCAGGGGACGAGTGTGGCTCCAGCAGGGGAGGGGAGTGTGTGTCCATCACTGCAGACAACCGCGTCATGGAC
60     S P T G A A G D E C G S S T G R G Q C V S I T A D N R R H G
361    CACAGTACCCCTTACACTGGCGTGATGACAGAGATGTGGCCAAATGAGATTTTCAACCGCACTTGCCAGTGTAAACGGGAATTTACGG
90     P Q Y P Y T G R D D R E M W P M R F F N R T C Q C N G N F S
451    GCTACAAGTCCGGGCGCTGTGACACGGGCTGACCGGACCAAACTGTGATCAGAGGGTCTCTGTGGTATAGGAGGAATATATGCAGATGA
120    G Y N C G R C R H G L T G P N C D Q R V S V V R R N I M Q M
541    GCTCAGCTGAGAAGCGGGCATTGTGAATGCTTTGGACCAAGCTAAGAGGACCACTTACCCCTGACCTGGTCACTGCACAAGACGCTACC
150    S S A E K R A F V N A L D Q A K R T I H P D L V I C T R R Y
631    AGGAGGTGTTTGGCCCGATGGCAACACACACAGTTTGACAACTACCGTTTACAACACTTTGTTTGGAGCCACTATTACTCCGCTCA
180    Q E V F G P D G N T P Q F D N I T V Y N Y F V W S H Y Y S V
721    GTAAACCTACCTGGGGCCAGGGCAGACAGCTTTGGCGGTGTGCACTTCTCCACGAGGGGCGGGTGTGTCACCTGGCACCCTTTTC
210    S K T Y L G P G Q T S F G V D F S H E G P G F V T W H R F
811    ATCTGCTGCAACTGGAGAGACATGCGAGACATGCTGGGCGACCCACATTGCTCTGCCCTACTGGAAGTTTGCATCGGTGGCAGCG
240    H L L Q L E R D M Q D M L G D P T F A L P Y W N F A I G G S
901    AGTGTGACATCTGCACCGACAGCTGCTGGGAGCCAGGAGCTCTTCGACATGAGCTCTATCAGCCCCAACTCTGTGTTCTCCAGTGGA
270    E C D I C T D D L L G A R S S F D M S S I S P N S V F S Q W
991    GGGTCATCTGCGAGAGTGTGGATGACTACGACACTTTGGGACCGTGTGCAACAGCACTGAGACCACTCTATCAGGAGGAACCCAGCCG
300    R V I C E S V D D Y D T L G T V C N S T E T S P I R R N P A
1081   GCAACGTGGCTGCGCCCATGCTGCGAGGGCTGCCAGGCCACAGGATGTGTTAGACTGTCTTGAGCTCAACACCTTCGACACCCCACTT
330    G N V A R P M V Q R L P E P Q D V L D C L E L N T D T P P
1171   ACTACTCCACTCTCTGAGAGCTTCAAGAACACCACTTGAAGGCTACAGCGCCCCAGGGGATGTATGACCCAGTATCCGACGCTCC
360    Y Y S T S S E S F R N T I E G Y S A P Q G M Y D P V I R S L
1261   ACAATTGGGCCCACTCTTCTCAACGGGACAGGGCGGACAGCACTCACTCTCGCCCAACGATCCATCTTTGCTCTGTCACACAGTTCA
390    H N L A H L F L N G T G G Q T H L S P N D P I F V L L H T F
1351   CCGACGCAATCTTCGATGAGTGGCTCAGCAGACCAACCAAGGTGAAATAGTTTACCTGAGGAGAACGCTCTTGGGACACAACCGGA
420    T D A I F D E W L S R H Q P G E I V Y P E E N A P I G H N R
1441   GATTCAACATGGTTCTTCTGGCTCTGTCACCAATGCTGAGATGTTGTCTCTGCCCCAGAAAACCTGGGATACTCTTATGAGGTCC
450    R F N M V P F W P P V T N A E M F V S A P E N L G Y S Y E V
1581   AGTGGCCCACTCGTGCCTACACCTGTCTGAGATCATCACTATGCCATCGTTGCGGCGGTGCTGGTGGTGGGCGGTGGTGGGAGTCA
480    Q W P T R A Y T L S E I I T I A I V A A V L V V A V V G G V
1621   TCGCCTGTGCCGTGCGGCCGCTCTACCGCTCAGCTGAGGCTCTGAGGCGCTGCTGGGAGAGACTTCCGACGCTACTCAGAGGACG
510    I A C A V R A R S Y R S A E A L E P L L G E T F R Y S E D
1711   ACCGGAGGTTTGACAAATCAGAGTCTGTTGCTAATgacgagcctttctacagaggccttaacatttttcatgctgtttttcaacttttt
540    D R R F D K S Q S V V *
1801   ttattccctacttcttctaataaagttgaactggttttgaaccccaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

图 2 红鳍笛鲷 *TYRP1b* 基因序列分析Fig.2 Analysis on sequence of *TYRP1b* gene

图中编码区(CDS)及推导的氨基酸序列用大写字母表示, 非编码(UTR)区用小写字母表示

2.3 TYRP1 基因氨基酸序列比对分析

利用 Expsy 在线软件预测 TYRP1a 蛋白的分子量 58.4kDa, 等电点为 5.38; TYRP1b 蛋白分子量为 61.7kDa, 等电点为 5.56。同时采用 Clustalx 软件对红鳍笛鲷与其它脊椎动物的 TYRP1 氨基酸序列进行多序列比对。如图 3 所示, 发现红鳍笛鲷 TYRP1 氨基酸序列与其它脊椎动物的同源序列具有较高的保守性, 其中酪氨酸酶基因家族典型的酪氨酸酶金属离子结合位点和大量的半胱氨酸残基位在脊椎动物中是高度保守的。使用 SMART 软件对红鳍笛鲷两个 TYRP1 进行蛋白质序列分析, 发现分别在 172—407 和 196—431 位存在酪氨酸酶基因家族典型的酪氨酸酶结构域(图 4)。采用 MEGA5.0 对红鳍笛鲷 TYRP1 基因与其它硬骨鱼类、青蛙、家鸡、人和小鼠等 10 种脊椎动物的进化关系进行分析(图 5), 结果显示, 红鳍笛鲷与尼罗罗非鱼和棘鱼的亲缘关系较近。同时还发现, 对

于含有两个 TYRP1 基因复制子的硬骨鱼类来讲, TYRP1 基因的两个复制子分别与直系同源基因聚在一起, 而后两个旁系同源体聚在一起, 最后与青蛙、鸡、人与小鼠等只有一个 TYRP1 基因的脊椎动物聚在一起, 说明 TYRP1 基因的复制是发生在硬骨鱼类特有的基因组复制事件中。

2.4 TYRP1 基因组织表达分析

采用荧光定量 PCR 检测了红鳍笛鲷 TYRP1a 和 TYRP1b 基因在黑色皮肤、红色皮肤、眼睛、肌肉和脑中的表达, 见图 6。结果显示, TYRP1a 和 TYRP1b 基因都在眼睛部位显示出最高表达量。不同的是, TYRP1a 在除眼睛外的其它部位表达量都较低, 而 TYRP1b 在黑色皮肤部位也显示较高表达。此外, 比较两个基因在同一部位的表达量时, 发现 TYRP1b 在眼睛、黑色皮肤和红色皮肤等黑色素生成部位的表达量都高于 TYRP1a 基因; 而在脑和肌肉中, 两个基因都表现出微弱表达。

		C	CC	C	
Tilapia Tyrp1b	--MYSQSLWSVG-LVWTLCTTLTQAQFPRECVTEGLQSGQCCP----	SPTG	VAGDE	CGS	54
Crimson snapper Tyrp1b	-----MWRVGLLVVTLCTVTLTQAQFPRECVTEGLQSGQCCP----	SPTG	AAGDE	CGS	49
Medaka Tyrp1b	-----MWREALLVVTLCAGLALAQFPRECVTEGLRSGQCCP----	SPTG	ASGDE	CGS	49
Stickleback Tyrp1b	-----MWRAVLLLTMTSVTLTTQAQFPRECVTAAGLQSGQCCP----	SPVG	AVGDE	CGS	49
Zebrafish Tyrp1b	-----MWKSVCLVL-MCVVVTRAQFPQRCMTPEGLRSGTCCP----	SPTG	LANDE	CGS	49
Stickleback Tyrp1b	-----MWRCCLVLVGAVLVS-AQFPRECVTEGLRSGQCCP----	APSG	LPGDP	CGL	49
Crimson snapper Tyrp1a	-----MFQCCFLVLVGAVVVS-AQFPRECVTEGLRSGQCCP----	SPSG	LNDPC	GA	49
Tetraodon Tyrp1a	-----MLARCVFLLLSAAVVR-AQFPQRCVTEGLRSGQCCP----	APPG	FNDPC	GA	49
Fugu Tyrp1a	-----MFARCVFLLLSAAVVR-AQFPQRCVTEGLRSGQCCP----	SPPG	DDDDP	CGA	49
Medaka Tyrp1a	-----MWRSCLVLFASALAVS-AQFPRECVTEGLRSGQCCP----	SPPG	VDDDP	CGF	49
Tilapia Tyrp1a	-----MWQFFFLVIVGAVVVS-AQFPRECVTEGLRSGQCCP----	SPSG	LNDPC	GS	49
Zebrafish Tyrp1a	-----MFGLYGAVLLLVHALVLVVTQFPVVCVTAEGLSAQCCP----	SPNG	LDDDP	CGA	51
Frog Tyrp1	MSLYKNCSLYIVVILFLHHYDQVSAQFPQCATQAALLSGECCPGLFPGQSPDPNDQCG				60
Human Tyrp1	-MSAPKLLSLGCIFFPLLLFQQARQFPQCATVEALRSGMCCP-DLSPVSGPGTDRCS				58
Mouse Tyrp1	-MKSYNVLPYIISLFLMLFYQVWAQFPRECANIEALRRGVCCP-DLLPSSGPGTDCGS				58
Chicken Tyrp1	-MQLP-MLLLVSLPLLLNMFKPAEAQFPQCATIESLRSGMCCP-DYFPVFGPGTDQCGV				57
		**** *	*	***	
		C	CC	C	
Tilapia Tyrp1b	STGRGQCVSITADNRHGPQYPYAGRDDRERWPLRFFNRTCRCNGNFTGYNCGRCHGLT				114
Crimson snapper Tyrp1b	STGRGQCVAIAADNRHGPQYPYSGRDDRERWPLRFFNRTCRCNGNFTGYNCGRCHGLT				109
Medaka Tyrp1b	STGRGQCVAIAADNRHGPQYPYAGRDDRERWPLRFFNRTCRCNGNFTGYNCGRCHGLT				109
Stickleback Tyrp1b	STGRGQCVAIAADNRHGPQYPYAGRDDRERWPLRFFNRTCRCNGNFTGYNCGRCHGLT				109
Zebrafish Tyrp1b	ISGRGQCVSITADNRHGPQYPYHGRDDRERWPLRFFNRTCRCNGNFTGFNCGRCHGLT				109
Stickleback Tyrp1b	SAGRGQCVSVAADARPHGPQYPHGRDDRERWPLRFFNRTCRCNGNFTGYNCGRCHGLT				109
Crimson snapper Tyrp1a	STGRGQCVSITVDARPHGPQYPHGRDDRERWPLRFFNRTCRCNGNFTGFNCGRCHGLT				109
Tetraodon Tyrp1a	SAGRGQCVSIAVDARPHGPQYPHGRDDRERWPLRFFNRTCRCNGNFTGFNCGRCHGLT				109
Fugu Tyrp1a	STGRGQCVSITVDARPHGPQYPHGRDDRERWPLRFFNRTCRCNGNFTGFNCGRCHGLT				109
Medaka Tyrp1a	SAGRGQCVSITVDARPHGPQYPHGRDDRERWPLRFFNRTCRCNGNFTGFNCGRCHGLT				109
Tilapia Tyrp1a	STGRGQCVPVAVDTQPHGPQYPHGRDDRERWPLRFFNRTCRCNGNFTGFNCGRCHGLT				109
Zebrafish Tyrp1a	SLGRGQCVDVSADTRAHGPQYPYTGDRDRESWPRFFTRACRCNGNFTGFNCGRCHGLT				111
Frog Tyrp1	SLGRGQCQVPTVDTIRPHGPQYRLDGLDDREQWPIRFFNRTCRCNGNFTGFNCGRCHGLT				120
Human Tyrp1	SSGRGRCEAVTADSRPHSPQYPHGRDDRERWPLRFFNRTCRCNGNFTGFNCGRCHGLT				118
Mouse Tyrp1	SSGRGRCEAVTADSRPHSPQYPHGRDDRERWPLRFFNRTCRCNGNFTGFNCGRCHGLT				118
Chicken Tyrp1	STGRGRCVQVTDSRPHGPQYHGRDDRERWPLRFFNRTCRCNGNFTGFNCGRCHGLT				117
	***:*	: *	: *	: *	
		C	H	C	
Tilapia Tyrp1b	GPNCQDQRI SVVRNIMQMSAAEKQAFVNALDQAKRTVHPDLVICTRRYQELFGPDGNTPQ				174
Crimson snapper Tyrp1b	GPNCQDQRI SVVRNIMQMSAAEKQAFVNALDQAKRTVHPDLVICTRRYQELFGPDGNTPQ				169
Medaka Tyrp1b	GADCDQDQRI SVVRNIMQMSAAEKQAFVNALDQAKRTVHPDLVICTRRYQELFGPDGNTPQ				169
Stickleback Tyrp1b	GPNCQDQRI SVVRNIMQMSAAEKQAFVNALDQAKRTVHPDLVICTRRYQELFGPDGNTPQ				169
Zebrafish Tyrp1b	GPNCQDQRI SVVRNIMQMSAAEKQAFVNALDQAKRTVHPDLVICTRRYQELFGPDGNTPQ				169
Stickleback Tyrp1b	GANCQDQRI SVVRNIMQMSAAEKQAFVNALDQAKRTVHPDLVICTRRYQELFGPDGNTPQ				169
Crimson snapper Tyrp1a	GANCQDQRI SVVRNIMQMSAAEKQAFVNALDQAKRTVHPDLVICTRRYQELFGPDGNTPQ				169
Tetraodon Tyrp1a	GANCQDQRI SVVRNIMQMSAAEKQAFVNALDQAKRTVHPDLVICTRRYQELFGPDGNTPQ				169
Fugu Tyrp1a	GANCQDQRI SVVRNIMQMSAAEKQAFVNALDQAKRTVHPDLVICTRRYQELFGPDGNTPQ				169
Medaka Tyrp1a	GANCQDQRI SVVRNIMQMSAAEKQAFVNALDQAKRTVHPDLVICTRRYQELFGPDGNTPQ				169
Tilapia Tyrp1a	GPNCQDQRI SVVRNIMQMSAAEKQAFVNALDQAKRTVHPDLVICTRRYQELFGPDGNTPQ				169
Zebrafish Tyrp1a	GECCQDQRI SVVRNIMQMSAAEKQAFVNALDQAKRTVHPDLVICTRRYQELFGPDGNTPQ				171
Frog Tyrp1	GDNCQDQRI SVVRNIMQMSAAEKQAFVNALDQAKRTVHPDLVICTRRYQELFGPDGNTPQ				180
Human Tyrp1	GAACQDQRI SVVRNIMQMSAAEKQAFVNALDQAKRTVHPDLVICTRRYQELFGPDGNTPQ				178
Mouse Tyrp1	GAACQDQRI SVVRNIMQMSAAEKQAFVNALDQAKRTVHPDLVICTRRYQELFGPDGNTPQ				178
Chicken Tyrp1	GPTCQDQRI SVVRNIMQMSAAEKQAFVNALDQAKRTVHPDLVICTRRYQELFGPDGNTPQ				177
	* *	: ****	: *	: *	
		H	H	H	
Tilapia Tyrp1b	FENITIIYNYFVWSHYYSVSKTYLGPQGTSFGGVDF	HEGPGFVTWHRFH	LQLERDMQ	--	232
Crimson snapper Tyrp1b	FDNITIIYNYFVWSHYYSVSKTYLGPQGTSFGGVDF	HEGPGFVTWHRFH	LQLERDMQ	--	227
Medaka Tyrp1b	FENITIIYNYFVWSHYYSVSKTYLGPQGTSFGGVDF	HEGPGFVTWHRFH	LQLERDMQ	--	227
Stickleback Tyrp1b	FENITIIYNYFVWSHYYSVSKTYLGPQGTSFGGVDF	HEGPGFVTWHRFH	LQLERDMQ	--	227
Zebrafish Tyrp1b	VENITIIYNYFVWSHYYSVSKTYLGPQGTSFGGVDF	HEGPGFVTWHRFH	LQLERDMQ	--	227
Stickleback Tyrp1b	FENVITIIYNYFVWSHYYSVSKTYLGPQGTSFGGVDF	HEGPGFVTWHRFH	LQLERDMQ	--	227
Crimson snapper Tyrp1a	FENITIIYNYFVWSHYYSVSKTYLGPQGTSFGGVDF	HEGPGFVTWHRFH	LQLERDMQ	--	227
Tetraodon Tyrp1a	FQNVITIIYNYFVWSHYYSVSKTYLGPQGTSFGGVDF	HEGPGFVTWHRFH	LQLERDMQ	--Q	228
Fugu Tyrp1a	FENITIIYNYFVWSHYYSVSKTYLGPQGTSFGGVDF	HEGPGFVTWHRFH	LQLERDMQ	--	229
Medaka Tyrp1a	FENVITIIYNYFVWSHYYSVSKTYLGPQGTSFGGVDF	HEGPGFVTWHRFH	LQLERDMQ	--	227
Tilapia Tyrp1a	FENVITIIYNYFVWSHYYSVSKTYLGPQGTSFGGVDF	HEGPGFVTWHRFH	LQLERDMQ	--	227
Zebrafish Tyrp1a	FQNVITIIYNYFVWSHYYSVSKTYLGPQGTSFGGVDF	HEGPGFVTWHRFH	LQLERDMQ	--	229
Frog Tyrp1	FENISIIYNYFVWSHYYSVSKTYLGPQGTSFGGVDF	HEGPAFLTWHRYH	LQLERDMQ	--	238
Human Tyrp1	FENISIIYNYFVWSHYYSVSKTYLGPQGTSFGGVDF	HEGPAFLTWHRYH	LQLERDMQ	--	236
Mouse Tyrp1	FENISIIYNYFVWSHYYSVSKTYLGPQGTSFGGVDF	HEGPAFLTWHRYH	LQLERDMQ	--	236
Chicken Tyrp1	FENISIIYNYFVWSHYYSVSKTYLGPQGTSFGGVDF	HEGPAFLTWHRYH	LQLERDMQ	--	235
	..:****	* *	..:****	* *	

	C	C	C
Tilapia Tyrp1b	DMLGNPTFALPYWNFAIGGSECDICTDILLGARSTFDMSISPNVSFSQWRVICSVDY	292	
Crimson snapper Tyrp1b	DMLGDPTFALPYWNFAIGGSECDICTDILLGARSSFDMSISPNVSFSQWRVICSVDY	287	
Medaka Tyrp1b	NMLGDPSFALPYWNFAIGGSECDICTDILLMGARSSFDMSISPNVSFSQWRVICSVEDY	287	
Stickleback Tyrp1b	DMLGDPTFALPYWNFAIGGSECDICTDELLGARSSFDMSISSNVFSQWRVICSVEDY	287	
Danio Zebrafish Tyrp1b	DMLGDPSFALPYWNFAIGGSECDICTDILLGARSSFDNTGISNVSFSQWRVICSVEEY	287	
Stickleback Tyrp1b	DMLQDPFALPYWNFAIGGSTCDICTDILMGARSSFDMSLSNLSFAQWRVICSVEDY	287	
Crimson snapper Tyrp1a	DMLQDPFALPYWNFAIGGSTCDICTDILMGARSSFDMSLSPNSIFAQWRVVCSVEDY	287	
Tetraodon Tyrp1a	DMLRDPFALPYWNFAIGGSTCDICTDILMGARSFADANGISANSIFSQRVVCSVEDY	288	
Fugu Tyrp1a	DMLQDPFALPYWNFAIGGSACDICTDILMGARSFGFIDAIANSIFSRRVVCSVEDY	287	
Medaka Tyrp1a	DMLQDPFALPYWNFAIGGTCDICTDILMGARSTFDSNLSNVSIFSQRVVCSVEDY	287	
Tilapia Tyrp1a	DMLQNPSFALPYWNFAIGGNTCDICTDILMGARSNFDMSLSNVSIFSQRVVCSVEDY	287	
Zebrafish Tyrp1a	DMLRDPFALPFWDFSTGGSECDICTDILMGARSFDTAISNSIFSRSRVCSVEDY	289	
Frog Tyrp1	VMLRDPSFALPYWNFAIGGNOCIDCTDLLGARSNFANLLSTNSVFSQQVVCVEYEDY	292	
Human Tyrp1	EMLQEPPSFALPYWNFAIGKNCVIDCTDILMGSRSNFDSLISPNVSFSQRVVCDSDLEDY	296	
Mouse Tyrp1	EMLQEPPSLPYWNFAIGKNCVDCTDILMGSRSNFDSLISPNVSFSQRVVCSSELEY	296	
Chicken Tyrp1	NMLQDSTFLPYWNFAIGQNTCDICDDLMGARSNFDVSLISQNSIFSQRVLCESIEDY	295	
	** : . ** : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *		
	C	C	C
Tilapia Tyrp1b	DTLGTICNSTESSPIRRNPAGNVARPMPQRLPEPKDVLDCLINTFTPPYYTSSSESFR	352	
Crimson snapper Tyrp1b	DTLGTVCNSTETSPIRRNPAGNVARPMPQRLPEPDVLDCLNLNTFTPPYYTSSSESFR	347	
Medaka Tyrp1b	DTLGTICNSTESSPIRRNPAGNVARPMPQRLPEPDVLECLNLNTFTPPYYTSSSESFR	347	
Stickleback Tyrp1b	DSMGTVCNNTTETSPIRRNPAGNVARPMPQRLPEPDVLDCLNLNTFTPPYYTSSSESFR	347	
Zebrafish Tyrp1b	ETLGTICNNTESSPIRRNPAGNVARPMPQRLPEPDVIDCLNLNTFTPPYYTSSSQSFR	347	
Stickleback Tyrp1b	DTLGTICNSTETSPIRRNPAGNVARPMPQRLPEPDVLCQVNTFTPPYYTSSSESFR	347	
Crimson snapper Tyrp1a	DTLGTICNNTTETSPIRRNPAGNVNRPMQRLPEPDVAECQVNTFTPPYYTSSSESFR	347	
Tetraodon Tyrp1a	DTLGTICNSTETSPIRRNPAGNVNRPMQRLPEPDVADCLQVNTFTPPFYTSSSESFR	348	
Fugu Tyrp1a	DTLGTVCNSTETSPIRRNPAGNVNRPMQRLPEPDVADCLQVNTFTPPFYTSSSESFR	349	
Medaka Tyrp1a	DTLGTICNSTETSPIRRNPAGNVNRPMQRLPEPDVADCLQVNTFTPPYYTSSSESFR	347	
Tilapia Tyrp1a	DTLGTICNSTESSPIRRNPAGNVNRPMQRLPEPDVADCLQVNTFTPPFYTSSSESFR	347	
Zebrafish Tyrp1a	DTLGTICNSTESSPIRRNPAGNVARPMPQRLPEAQDVAAACLEIDAFTPPFYTSSSDSFR	349	
Frog Tyrp1	ESLGTICNSTRNSPIRRNPAGNVARPMPQRLPEPDVACLVLNMFTDTPFFSDSSSESFR	358	
Human Tyrp1	DTLGLTCNSTEDGPIRRNPAGNVARPMPQRLPEPDVACQCLEVGFLDTPPFYSNSTNSFR	356	
Mouse Tyrp1	DTLGLTCNSTEGGPIRRNPAGNVGRPAQRLPEPDVTQCLEVRVFDTPPFYSNSTDSFR	356	
Chicken Tyrp1	DSLGTICNSTEGGPIRRNPAGNVARPMPQRLPEPDVACQCLEVGIFTDTPPFYSNSTDSFR	355	
	::::**:* : . ***** ** *****:** **:: *****:* * :****		
	H H H		
Tilapia Tyrp1b	NTIEGYSAPQGMYPVIRSLHNLHLFLNGTGQTHLSPIDPIFVLLHTFTD IFDEWLR	412	
Crimson snapper Tyrp1b	NTIEGYSAPQGMYPVIRSLHNLHLFLNGTGQTHLSPIDPIFVLLHTFTD IFDEWLS	407	
Medaka Tyrp1b	NSIEGYSAPQGMYPVIRSLHNLHLFLNGTGQTHLSPIDPIFVLLHTFTD VFDEWLR	407	
Stickleback Tyrp1b	NTIEGYSAPQGMYPVIRSLHNLHLFLNGTGQTHLSPIDPIFVLLHTFTD IFDEWLQ	407	
Zebrafish Tyrp1b	NTIEGYSAPQGNYPVVRSLHNLHLFLNGTGQTHLSPIDPIFVLLHTFTD IFDEWLQ	407	
Stickleback Tyrp1b	NTIEGYSAPKGNYDPVVRSLHNLHLFLNGTGQTHLSPIDPIFVLLHTYTD IFDEWLR	407	
Crimson snapper Tyrp1a	NTIEGYSAPKGNYDPVVRSLHNLHLFLNGTGQTHLSPIDPIFVLLHTYTD IFDEWLR	407	
Tetraodon Tyrp1a	NTIEGYSAPKGNYDPIVRSLHNLHLFLNGTGQTHLSPIDPIFVLLHTYTD IFDEWLR	408	
Fugu Tyrp1a	NTIEGYSAPKGNYDPIVRSLHNLHLFLNGTGQTHLSPIDPIFVLLHTYTD IFDEWLR	409	
Medaka Tyrp1a	NTIEGYSAPKGNYDPVVRSLHNLHLFLNGTGQTHLSPIDPIFVLLHTYTD IFDEWLR	407	
Tilapia Tyrp1a	NTIEGYSAPKGNYDPIVRSLHNLHLFLNGTGQTHLSPIDPIFVLLHTFTD IFDEWLR	407	
Zebrafish Tyrp1a	NSIEGYSAPGPGYDPVVRSLHNLHLFLNGTGQTHLSPIDPIFVLLHTFTD IFDEWLR	409	
Frog Tyrp1	NTIEGYSPEPNGYNTPVVRSLHNLHLFLNGTGQTHLSPIDPIFVLLHTFTD VFDEWLR	418	
Human Tyrp1	NTIEGYSPTGKYDPAVRSLHNLHLFLNGTGQTHLSPIDPIFVLLHTFTD VFDEWLR	416	
Mouse Tyrp1	NTIEGYSAPTGYDPAVRSLHNLHLFLNGTGQTHLSPIDPIFVLLHTFTD VFDEWLR	416	
Chicken Tyrp1	NTIEGYSDPGKYDPAVRSLHNLHLFLNGTGQTHLSPIDPIFVLLHTFTD VFDEWLR	415	
	* : **** * * * : * : ***** : ***** : **** :		
	H H H		
Tilapia Tyrp1b	RHQ-P-GDTVYPDENAPIGHNRFRNMFVPVPTNAEMFVAPENLGSYEYEQWPARTFTL	471	
Crimson snapper Tyrp1b	RHQ-P-GEIVYPEENAPIGHNRFRNMFVPVPTNAEMFVAPENLGSYEYEQWPTRAYTL	466	
Medaka Tyrp1b	RHQ-P-GEVVPYDENAPIGHNRFRNMFVPVPTNAEMFVAPENLGSYEYEQWPAPRLTL	466	
Stickleback Tyrp1b	RHQ-P-GEVMYPEENAPIGHNRFRNMFVPVPTNAEMFVAPANLGSYEYEQWP-----	460	
Zebrafish Tyrp1b	RHTAAGTLAYPEENAPIGHNRFRNMFVPVPTNAEMFVAPDNLGYTYEQWPTRAYTI	467	
Stickleback Tyrp1b	RHSP-DSTLYPQENAPIGHNRGNMFVFPVPTNAEMFVAPENLGSYEAEPWQPQALT	466	
Crimson snapper Tyrp1a	RHSP-DSAVYPEENAPIGHNRGNMFVFPVPTNAEMFVAPENLGSYEAEPWQPQFTL	466	
Tetraodon Tyrp1a	RHNP-GSAVYPEENAPIGHNRGNMFVFPVPTNAEMFVAPDNLGSYEAEPWQPQFTL	467	
Fugu Tyrp1a	RHSP-GTAVYPEENAPIGHNRGNMFVFPVPTNAEMFVAPDNLGSYEAEPWQPQFTL	468	
Medaka Tyrp1a	RHGP-DVAYYPDENAPIGHNRGNMFVFPVPTNSEMFVAPDNLGSYEAEPWQPQFTL	466	
Tilapia Tyrp1a	RHSP-DAAVYPEQNAPIGHNRGNMFVFPVPTNSEMFVAPENLGSYEAEPGENFTL	466	
Zebrafish Tyrp1a	RHTA-DVSSYPLENAPIGHNRFRNMFVPVPTNAEMFVSAADSLGSYEYEQWPASRALTL	468	
Frog Tyrp1	RHNA-DSSQYPLENAPIGHNRGNMFVFPVPTNEMFTAPENLGSYEYEQWPASRALST	477	
Human Tyrp1	RYNA-DISTFPLENAPIGHNRGNMFVFPVPTNTEMFTAPDNLGYTYEQWPSREFSV	475	
Mouse Tyrp1	RYNA-DISTFPLENAPIGHNRGNMFVFPVPTNTEMFTAPDNLGYTYEQWPGQFTV	475	
Chicken Tyrp1	RYSA-DISTYLENAPIGHNREYNMFVFPVPTNEMFTAPENLGSYDIEWPGRALRV	474	
	* : * : ***** : ***** : **** : * : **** : * :		

Tilapia Tyrp1b	SEIISVAVIAAVLVVVVGIIACAMRSHSYNSAEALEPLLAETYYRRYSEEDR-RLDKSQSVV	533
Crimson snapper Tyrp1b	SEIITIAIVAAVLVVAVVGGVIACAVRARSYRSAEALEPLLGETFRYSEDDR-RFDKSSQSVV	528
Medaka Tyrp1b	SEIITVAVVAAVVVVAALGGLIACVVRARSHSAEALQPLLGETFRSYSEDDR-RLDKSQSVV	528
Stickleback Tyrp1b	SEIITIAIVAVVLVVAVVGGVIGCAVRARSYRSAEGLLEPLLGEQFRYSEDER---HASQSVV	460
Zebrafish Tyrp1b	TEIITVAIVAAALMLVAVVFAAGTTCVAVRARSYK-MEGHQPLLGDHYQRYD-----DAKSQSVV	527
Stickleback Tyrp1b	TEIITMTIVAALVVAVVIFAATTCAVRARSYK-MEGHQPLLGDQYQRYD-----DDKSQSVV	523
Crimson snapper Tyrp1a	TEIITMGVVIALVVAVVIFAATTCAVRARSYK-MEGHQPLLGDQYQRYD-----DDKSQSVV	522
Tetraodon Tyrp1a	TEIITMAVVVALVVAVVIFAATTCAVRARSYK-MEGHQPLLGDQYQRYG-----DDKSQSVV	524
Fugu Tyrp1a	TEIITMAIVAAALVVAVVIFAATTCAVRARSYK-MEGHQPLLGDQYQRYD-----DDKSQSVV	527
Medaka Tyrp1a	SEIITMAIVAAALVVAVVIFAATTCAVRARSYK-MEGHQPLLGDQYQRYD-----DDKSQSVV	524
Tilapia Tyrp1a	TEIITMAIVAAALVVAVVIFAATTCAVRARSYK-MEGHQPLLGDQYQRYD-----DDKSQSVV	523
Zebrafish Tyrp1a	TQIITVTVVAALIIIVAVVIFAATCVVRSRSGF-TETRQPLLGDQYQRYD-----EQHKTQSVV	525
Frog Tyrp1	TEIITVAVVSALVLVAIIFAATCIIISRRKN--DAFQPLLGESEYPRYAED---REQNTQSV-	536
Human Tyrp1	PEIIAIAVVGALLLVAIFGTASYLIRARRSM-DEANQPLLTDQYQCYAEEYEKLQPNPNSV	538
Mouse Tyrp1	SEIITIAVVAALLLVAIFGVASCLIRSRSTK-NEANQPLLTDHYQRYAEDYEELPNPNHSV	538
Chicken Tyrp1	TEMITIAIVTALVLVAIIFAAACIVRAKKNR-DELHQPLLTDQYQHYSDDYDGIATPSQSVV	537

图3 TYRP1 氨基酸序列与其它脊椎动物氨基酸序列比对

Fig.3 Multi-alignment of TYRP1 of other vertebrates

C: 半胱氨酸残基; H: 组氨酸残基; 下划线: EGF motif; 星号: 黑素体分选信号; 方框: 铜离子结合位点



图4 SMART 软件预测的 TYRP1a(左)和 TYRP1b(右)蛋白质结构域

Fig.4 Analysis of TYRP1a (left) and TYRP1b (right) protein structure with SMART software

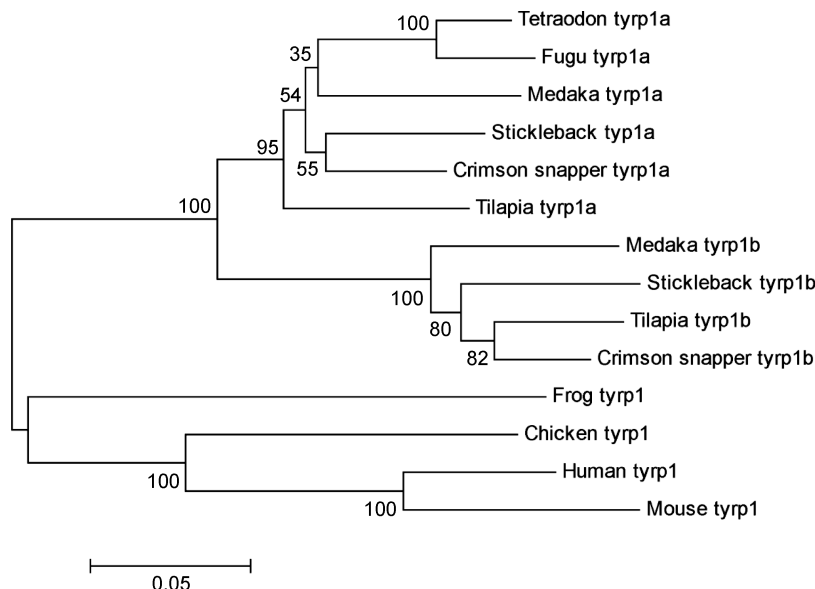


图5 基于 TYRP1 氨基酸序列的系统进化树

Fig.5 The Neighbor-Joining (NJ) phylogenetic tree constructed based on TYRP1 amino acid sequences

3 讨论

大约 4.5 亿年前, 硬骨鱼祖先与四足动物分化后又经历了其特有的基因组复制, 许多基因在人类、鸟类及四足动物中仅有一个拷贝, 而在鱼类中存在两个不同的直系同源/旁系同源基因(Yamanoue *et al.*, 2006)。Braasch 等(2007)通过对五种常见硬骨鱼的体色基因统计分析发现, 黑色素合成通路中约 3/4 的基

因在硬骨鱼中存在 2 个拷贝。本研究通过将红鳍笛鲷转录组数据中注释为 TYRP1 的 unigene 序列与尼罗罗非鱼两个 TYRP1 基因的本地 blast 结果两两验证, 确定红鳍笛鲷中含有 TYRP1a 和 TYRP1b 两个基因, 并得到其 unigene 序列, 应用 RACE 技术克隆获得两个基因的 cDNA 序列全长。软件分析发现红鳍笛鲷 TYRP1a 和 TYRP1b 基因都含有具有典型的酪氨酸酶结构域(Tyrosinase)。序列同源性比对分析发现,

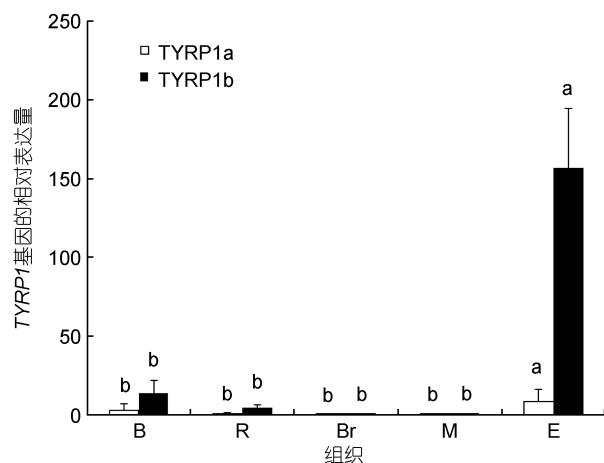


图 6 *TYRP1* 基因在红鳍笛鲷不同组织中的表达分布

Fig.6 Expression patterns of *TYRP1* gene in different tissues of *L. erythropterus*

B: 黑色皮肤; R: 红色皮肤; Br: 脑; M: 肌肉; E: 眼睛; 柱上的不同字母表示差异显著($P < 0.05$); 相同字母表示差异不显著($P > 0.05$)

TYRP1a 和 *TYRP1b* 基因在脊椎动物中具有较高的保守性, 尤其对于与酪氨酸酶基因家族基因典型酶活性有关的位点(del Marmol *et al*, 1996; Camacho-Hübner *et al*, 2002), 如多个半胱氨酸残基、6 个组氨酸残基、高度疏水的跨膜区、C 端由亮氨酸和酪氨酸残基组成的胞质尾, 在脊椎动物中是高度保守的。其中一个半胱氨酸富集区含有 EGF-motif (epidermal-growth factor)位点, 该位点在蛋白质-蛋白质相互作用中起重要作用(Jackson, 1994)。6 个组氨酸残基构成 2 个各包含 3 个组氨酸残基的铜离子结合位点, 该位点对于维持酪氨酸酶的酶活性起基本作用(Furumura *et al*, 1998)。红鳍笛鲷 *TYRP1a* 和 *TYRP1b* 氨基酸序列分别在 469—491 和 493—515 为高度疏水的跨膜结构域。研究发现该结构与其后的 C 端胞质尾共同协作确保将 *TYRP1* 蛋白转运到黑素体并与黑素体特有的膜结构结合(Jimbow *et al*, 2000)。以上信息表明, 在分子水平, 红鳍笛鲷两个 *TYRP1* 基因之间及与其它物种的蛋白具有很高的同源性。

为了进一步研究 *TYRP1a* 和 *TYRP1b* 基因在红鳍笛鲷中的功能, 采用荧光定量 PCR 技术对 *TYRP1a* 和 *TYRP1b* 基因在红鳍笛鲷不同组织的表达进行了检测。结果发现, *TYRP1a* 和 *TYRP1b* 基因均在眼睛部位显示出最高表达。同时, *TYRP1b* 在黑色皮肤和红色皮肤中也有一定表达, 且黑色皮肤部位表达高于红色皮肤。已有研究报道 *TYRP1* 基因在多种动物中都参与了黑色素的合成, 高莉等(2008)发现 *TYRP1* 基因在黑色素含量高的棕色羊驼毛皮中的表达量高

于白色羊驼中; 黑色家兔皮肤组织中 *TYRP1* 基因的平均表达水平显著高于白色家兔(朱亮等, 2013); 在鱼类中, Braasch 等(2009)通过原位杂交实验发现: 斑马鱼中, *TYRP1b* 在黑色素生成部位如眼睛、皮肤和鳍条中均有表达; 青鳉中, *TYRP1a* 和 *TYRP1b* 基因在眼睛中都有表达。眼睛和黑色皮肤是红鳍笛鲷中黑色素含量最高的部位, 据此推测 *TYRP1a* 和 *TYRP1b* 在红鳍笛鲷也具有参与黑色素的合成有关的功能。

荧光定量 PCR 结果同时显示, 在红鳍笛鲷中, *TYRP1b* 在眼睛和黑色皮肤等部位的表达量明显高于 *TYRP1a*, 表明红鳍笛鲷中 *TYRP1a* 与黑色素合成的功能较弱。推测或许与两个 *TYRP1* 基因的差异进化有关。诸多研究发现经过基因组复制后的两个旁系同源体的差异进化是导致鱼类物种进化和多样性的重要原因(Meyer *et al*, 1999; Klüver *et al*, 2005; Jovelín *et al*, 2007; Ohno, 2013)。通过对硬骨鱼复制基因的进化研究发现, 复制后的基因一般有三种进化模式: 去功能化, 亚功能化和新功能化(Lynch *et al*, 2004; Hahn, 2009)。青鳉中 *MIFT2* 基因相比于 *MITF1* 基因功能逐渐减弱, 趋向于去功能化或新功能化(Li *et al*, 2013); 南极鱼(Antarctic zoarcid fish)中唾液酸合成酶基因(SAS)的一个基因进化出与抗冻有关的新功能(Deng *et al*, 2010)。关于红鳍笛鲷中复制基因的进化模式仍需进一步研究。

本实验成功克隆了红鳍笛鲷 *TYRP1a* 和 *TYRP1b* 两个基因的 cDNA 全长, 通过在红鳍笛鲷不同部位表达量的分析, 确定 *TYRP1b* 在红鳍笛鲷中具有更广泛的表达, 且在眼睛和皮肤等黑色素生成部位有更高的表达量, 该结果可以为继续深入研究红鳍笛鲷体色相关基因在基因复制后的功能进化提供理论基础。

参 考 文 献

- 朱 亮, 蔡月琴, 屠 珏等, 2013. 实验兔酪氨酸酶基因家族表达水平与毛色和虹膜颜色性状的关系研究. 中国比较医学杂志, 23(10): 13—16
- 高 莉, 赵英虎, 刘朝亮等, 2010. 酪氨酸酶相关蛋白 1 调控黑色素形成的研究进展. 畜牧与饲料科学, 31(10): 114—116, 119
- 高 莉, 董常生, 郝晓燕等, 2008. 羊驼酪氨酸酶基因家族在不同毛色个体中的基因表达水平. 畜牧兽医学报, 39(7): 895—899
- Boissy R E, Zhao H, Oetting W S *et al*, 1996. Mutation in and lack of expression of tyrosinase-related protein-1 (TRP-1) in melanocytes from an individual with brown oculocutaneous albinism: a new subtype of albinism classified as "OCA3". American Journal of Human Genetics, 58(6): 1145—1156

- Braasch I, Liedtke D, Volff J N *et al*, 2009. Pigmentary function and evolution of *tyrp1* gene duplicates in fish. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 22(6): 839—850
- Braasch I, Scharl M, Volff J N, 2007. Evolution of pigment synthesis pathways by gene and genome duplication in fish. *BMC Evolutionary Biology*, 7(1): 74
- Camacho-Hübner A, Richard C, Beermann F, 2002. Genomic structure and evolutionary conservation of the *tyrosinase* gene family from Fugu. *Gene*, 285(1—2): 59—68
- del Marmol V, Beermann F, 1996. Tyrosinase and related proteins in mammalian pigmentation. *FEBS Letters*, 381(3): 165—168
- Deng C, Cheng C H C, Ye H *et al*, 2010. Evolution of an antifreeze protein by neofunctionalization under escape from adaptive conflict. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(50): 21593—21598
- Furumura M, Solano F, Matsunaga N *et al*, 1998. Metal ligand-binding specificities of the tyrosinase-related proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 242(3): 579—585
- Guo Y S, Wang Z D, Liu C W *et al*, 2007. Phylogenetic relationships of South China Sea snappers (genus *Lutjanus*; family Lutjanidae) based on mitochondrial DNA sequences. *Marine Biotechnology*, 9(6): 682—688
- Hahn M W, 2009. Distinguishing among evolutionary models for the maintenance of gene duplicates. *Journal of Heredity*, 100(5): 605—617
- Jackson I J, 1994. Molecular and developmental genetics of mouse coat color. *Annual Review of Genetics*, 28(1): 189—217
- Jimbow K, Park J S, Kato F *et al*, 2000. Assembly, target-signaling and intracellular transport of tyrosinase gene family proteins in the initial stage of melanosome biogenesis. *Pigment Cell Research*, 13(4): 222—229
- Jovelín R, He X J, Amores A *et al*, 2007. Duplication and divergence of *fgf8* functions in teleost development and evolution. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 308B(6): 730—743
- Kamaraj B, Purohit R, 2013. *In silico* screening and molecular dynamics simulation of disease-associated nsSNP in TYRP1 gene and its structural consequences in OCA3. *BioMed Research International*, 2013: 697051
- Klüver N, Kondo M, Herpin A *et al*, 2005. Divergent expression patterns of *Sox9* duplicates in teleosts indicate a lineage specific subfunctionalization. *Development Genes and Evolution*, 215(6): 297—305
- Kobayashi T, Hearing V J, 2007. Direct interaction of tyrosinase with Tyrp1 to form heterodimeric complexes in vivo. *Journal of Cell Science*, 120(24): 4261—4268
- Kuriyama T, Miyaji K, Sugimoto M *et al*, 2006. Ultrastructure of the dermal chromatophores in a lizard (Scincidae: *Plestiodon latiscutatus*) with conspicuous body and tail coloration. *Zoological Science*, 23(9): 793—799
- Leclercq E, Taylor J F, Migaud H, 2010. Morphological skin colour changes in teleosts. *Fish and Fisheries*, 11(2): 159—193
- Li M Y, Zhu F, Hong Y H, 2013. Differential evolution of duplicated medakafish *miif* genes. *International Journal of Biological Sciences*, 9(5): 496—508
- Lin J Y, Fisher D E, 2007. Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature*, 445(7130): 843—850
- Lynch M, Katju V, 2004. The altered evolutionary trajectories of gene duplicates. *Trends in Genetics*, 20(11): 544—549
- Meyer A, Scharl M, 1999. Gene and genome duplications in vertebrates: the one-to-four (-to-eight in fish) rule and the evolution of novel gene functions. *Current Opinion in Cell Biology*, 11(6): 699—704
- Nordlund J J, Boissy R E, Hearing V *et al*, 2006. *The Pigmentary System: Physiology and Pathophysiology*. 2nd ed. London: Wiley-Blackwell, 213—229
- Ohno S, 2013. *Evolution by Gene Duplication*. New York, NY: Springer Science & Business Media, 12—18
- Sarangarajan R, Boissy R E, 2001. Tyrp1 and oculocutaneous albinism type 3. *Pigment Cell Research*, 14(6): 437—444
- Sarangarajan R, Zhao Y, Babcock G *et al*, 2000. Mutant alleles at the *Brown* locus encoding tyrosinase-related protein-1 (TRP-1) affect proliferation of mouse melanocytes in culture. *Pigment Cell Research*, 13(5): 337—344
- Yamanoue Y, Miya M, Inoue J G *et al*, 2006. The mitochondrial genome of spotted green pufferfish *Tetraodon nigroviridis* (Teleostei: Tetraodontiformes) and divergence time estimation among model organisms in fishes. *Genes & Genetic Systems*, 81(1): 29—39
- Zhang K H, Li Z, Lei J *et al*, 2011. Oculocutaneous albinism type 3 (OCA3): analysis of two novel mutations in TYRP1 gene in two Chinese patients. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 61(3): 523—529
- Zhang Y P, Wang Z D, Guo Y S *et al*, 2015. Morphological characters and transcriptome profiles associated with black skin and red skin in Crimson Snapper (*Lutjanus erythropterus*). *International Journal of Molecular Sciences*, 16(11): 26991—27004

MOLECULAR CLONING AND EXPRESSION OF TYRP1 GENE IN *LUTJANUS ERYTHROPTERUS*

ZHANG Yan-Ping^{1,2}, WANG Zhong-Duo¹, GUO Yu-Song¹, LIU Li¹, LIU Chu-Wu^{1,2}

(1. Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China;

2. College of Life Science, Hunan Normal University, Changsha 410000, China)

Abstract To explore the gene repertory of TYRP1 of *Lutjanus erythropterus*, we cloned the full length of two TYRP1 (TYRP1a and TYRP1b) genes by using rapid-amplification of cDNA ends (RACE) technology based on the unigene sequence annotated as TYRP1 in the transcriptome database of *L. erythropterus*. The full lengths are 3178bp and 1871bp, encoding 521 and 551 amino acids, respectively. Multiple sequence alignment showed both TYRP1 genes were highly conserved in vertebrate. We found that both genes contained a typical domain of tyrosinase family as revealed with the SMART software. Phylogenetic analysis showed that fish TYRP1 duplicates might have shared an ancient whole genome duplication (WGD) event in the common ancestor. In addition, real-time PCR indicated that both genes could be found in the eyes; however, divergence expression was also found between the two genes, apart from the eyes; and TYRP1b was also found in the skin. The findings may offer a theoretical basis for elucidating mechanism of pigment formation in the body and the eyes of the fish.

Key words *Lutjanus erythropterus*; tyrosinase-related protein 1; gene cloning; gene expression