

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2013.01139

瓯江彩鲤体色相关基因 *Sox10* 的分离与表达分析

李康乐, 胡建尊, 颜标, 王成辉

农业部淡水水产种质资源重点实验室, 上海海洋大学, 上海 201306

摘要: 为探明鱼类体色变异的相关调控因子, 采用 RT-PCR 及 RACE 技术获得总长度为 2 830 bp 的瓯江彩鲤 (*Cyprinus carpio* var. *color*) *Sox10* 基因 cDNA 序列。该基因序列的 5'和 3'非编码区分别为 9 bp 和 1 375 bp, 开放阅读框 1 446 bp, 编码 481 个氨基酸。氨基酸序列的系统发育分析表明, 瓯江彩鲤 *Sox10* 基因的氨基酸序列与部分物种的相似性在 59%~94%。RT-PCR 分析表明, 该基因在瓯江彩鲤皮肤、肌肉、眼睛和鳃表达量最高, 鳃和心表达量次之, 肾和肝没有表达。荧光定量 PCR 分析显示, *Sox10* 基因在体色类型为白色(“粉玉”体色)的表达量显著地高于其他体色($P<0.05$), “粉花”黑色皮肤中的表达量最低, 显著低其他体色类型($P<0.05$), 而其他体色类型的表达差异不显著($P>0.05$)。结果发现, *Sox10* 基因在瓯江彩鲤的体色变异中发挥着调控作用。

关键词: 瓯江彩鲤; *Sox10* 基因; 体色; RT-PCR; 基因调控

中图分类号: Q595.468

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2013)06-1139-09

鱼类体色丰富多彩, 而且富于变化。不同品种、不同个体或者不同性别都可能表现出不同的体色, 甚至同一个体摄食不同饵料或在不同水域环境中也会出现差异。鱼类的体色不但具有观赏价值, 而且对于选育也非常重要, 是区分鱼类品种和检验纯度的重要指标, 也可作为疾病诊断的模型^[1-3]。国内主要在色素细胞^[4-6]和表型^[7-9]方面研究鱼类体色, 而国外对于体色变异相关基因在动物上研究较多^[10-13], 在鱼类方面研究相对较少^[14-16]。瓯江彩鲤(*Cyprinus carpio* var. *color*)作为一种鲤科鱼类, 体色丰富, 有 5 种基本类型(“全红”、“粉玉”、“大花”、“麻花”、“粉花”)^[17], 是研究鱼类体色遗传的良好材料。

Sox10 基因是 *Sox* 基因家族的一员, 在早期的神经嵴细胞发育和分化中发挥着重要作用^[18]。若缺少 *Sox10*, 快速迁徙的多能神经嵴细胞在未达到成熟阶段就会死亡。研究发现缺失 *Sox10* 基因的小鼠

始祖细胞出现发育阻滞^[19]。*Sox10* 基因在黑色素细胞形成过程中也发挥着重要作用, 它调控 *Mitf* 基因的表达^[20-21], 从而调控黑色素的迁移和分化。因为 *Mitf* 基因通过调控酪氨酸酶基因家族的表达来调控黑色素的产生^[22]。此外, *Sox10* 基因还可调控黑色素合成所需的一种催化酶(*Dct*)基因的表达^[21]。关于 *Sox10* 基因的研究, 人们大多集中在高等动物中^[23-24], 鱼类中的报道较为少见^[25-26], 而目前尚未见 *Sox10* 基因对鱼类体色作用的研究报道。本研究通过克隆瓯江彩鲤的 *Sox10* 基因, 探讨该基因对鱼类体色变异的作用, 为鱼类体色遗传研究积累资料。

1 材料与方法

1.1 实验材

实验鱼取自浙江龙泉省级瓯江彩鲤良种场的四种体色瓯江彩鲤(“全红”、“大花”、“粉玉”和“粉

收稿日期: 2013-01-08; 修订日期: 2013-06-14.

基金项目: 国家自然科学基金项目(30972250); 国家公益性行业[农业]科研专项(200903045).

作者简介: 李康乐(1988-), 男, 硕士研究生, 研究方向为水产动物种质资源与种苗. E-mail: kll427@163.com

通信作者: 王成辉, 教授. Tel: 021-61900439. E-mail: wangch@shou.edu.cn

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3446.S.20130730.1215.001.html>

网络出版时间: 2013-07-30 12:10

花”)一龄鱼种, 体质量在 50 g 左右。

1.2 实验方法

1.2.1 总 RNA 的提取 采集上述 4 种体色鱼的皮肤、肌肉、眼睛、鳃、肾、鳔、心及肝等组织, 其中“大花”体色的红表皮和黑表皮、“粉花”体色的白表皮和黑表皮分开取样, 按照 RNAiso Plus(Takara, Japan)使用说明书提取总 RNA。用 RNase free ddH₂O(Takara, Japan) 溶解提取的总 RNA。1.0%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性和丰度, 并检测 RNA 的浓度及 A_{260}/A_{280} 值。

1.2.2 Sox10 基因全长 cDNA 的克隆和序列测定 参照 GenBank 中鲤近源物种的 Sox10 基因序列, 在 BioEdit^[27] 软件中比对后确定其保守区, 根

据保守区设计多对扩增短片段引物(表 1), 并对扩增的短片段克隆测序。

3'RACE 使用 Takara(3'-Full RACE Core Set Ver.2.0)试剂盒。用 Primer 5.0^[28] 软件设计 3'RACE 引物。用基因特异性引物 Outer Primer(3S3F)和 Inner Primer(3S5F)(表 1)进行扩增。反应参数: 94℃ 3 min; 94℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 2 min, 共 35 个循环; 72℃ 10 min。

5'RACE 使用 Clontech 的 SMARTERTM RACE cDNA Amplification Kit 以及 Advantage[®]2 PCR Kit。5'RACE 引物为 Out Primer(5S5R)、Inner Primer(5S1R)(表 1)。反应参数: 94℃ 3 min; 94℃ 30 s, 68℃ 30 s, 72℃ 3 min, 共 38 个循环。

表 1 瓯江彩鲤 Sox10 基因克隆和表达分析所用引物
Tab.1 Primers for Sox10 gene cloning and tissue expression analysis in Oujiang color common carp

引物 primer	序列(5'-3') sequence(5'-3')	用途 usage
2S1F	GGTGGAATGAGTCCCGG	Sox10 小片段扩增
2S1R	GAGCTCGGCGTTRTGCAG	
3S1F	TTGAGGAAGCAGCATAAGAAAG	
3S1R	ATTGGCTGTGRCTGACCTC	
4S1F	TTYGGWAAYGTGGACATTGG	
4S5R	RKGTGGTGATACGGGCTGCT	
Sp1F	GCGGTCAGTCAGGTGCTTA	
Sp1R	GGCTGCTCCCAGTGTGTTG	
Sy1F	ACAGCCCAACACACTGGGA	
Sy1R	GGCACTGATATTTACACACGC	
Sy2F	GCGTGTGTAAATATCAGTGCC	Sox10 3'RACE
Sy2R	GCTGTTTGTGTGCTGTTCTG	
3TS3F	GCCTAATTTTCGAGTTTCCGGTAT	
3TS5F	GCTACTGTTTGTCATCCCTGAA	
5S5R	GGCGTTATGCAGGTGCGGATACTGAT	Sox10 5'RACE
5S1R	GTCGTCGTCTTCGTCGGACTTCACC	
DS1F	AAAACTCTGGAGGCTGCTGAA	Sox10 qPCR
DS1R	TTGTAATGCGATTGGCTGTGA	
β- actin1F	TGCTATGTGGCTCTTGACTT	β-actin qPCR
β- actin1R	CTGGGCACCTGAACCTCT	

扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测, 用杭州博日公司的 BioSpin Gel Extraction Kit 对产物进行回收, 连接载体 PMD19-T(Takara, Japan), 转化到 TOP10 感受态大肠杆菌(Tiangen, 北京)中, 挑取阳性克隆送到上海美吉生物有限公司测序。

1.2.3 生物信息学分析 使用 NCBI Blast(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行同源序列搜索; 蛋白质相似性搜索使用 Blastx 程序(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>); 使用 ORF Finder 程序(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)分析

开放阅读框并推导氨基酸序列, 检测 RACE 结果的准确性; 使用在线软件 Clustalw2(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>)进行氨基酸序列比对; 用 MAGE5.0 软件^[29]构建 NJ 系统进化树^[30]。

1.2.4 实时荧光定量 PCR 分析 将“大花”分成红表皮和黑表皮两种类型, “粉花”也分白表皮和黑表皮两种类型, 与“全红”红表皮、“粉玉”白表皮共同进行实时荧光定量 PCR 检测。按照反转录试剂盒 PrimeScript[®] RT reagent Kit(Takara, Japan)说明书合成 cDNA。根据已经获得的 *Sox10* 基因设计定量引物 DS1F 和 DS1R(表 1), 根据鲤 β -actin 基因序列设计内参引物 β -actin1F 和 β -actin1R(表 1)。利用这两对引物进行实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)分析。用 10 倍梯度稀释的“粉玉”白表皮 cDNA 制作荧光定量 PCR 标准曲线。在 Bio-Rad CFX96 上进行定量扩增, 使用 Takara 公司 SYBR Premix Ex Taq[™] 试剂盒, 反应参数: 预变性 95℃ 30 s; 95℃ 5 s, 60℃ 30 s, 共 40 个循环, 溶解曲线 60~95℃。PCR 扩增完成后对产物进行溶解曲线分析, 确定为特异性扩增。每个样品设置 3 个重复, 未加模板的反应作为阴性对照。

按照 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法进行荧光定量的数据分析^[31], 用 SPSS Statistics 17.0(IBM, USA)进行单因素方差分析(ANOVA)和 Dunnett 方法多重比较。

2 结果与分析

2.1 cDNA 克隆和测序

本实验得到瓯江彩鲤 *Sox10* 基因 cDNA 全长序列为 2 830 bp, 由 1 446 bp 的编码区和 9 bp 的 5'UTR 区和 1 375 bp 的 3'UTR 区组成(GenBank Accession No: KC480581; 图 1), 具有脊椎动物典型的加尾信号 AATAAA 和 Poly(A)尾巴。

2.2 *Sox10* 的同源比较分析

瓯江彩鲤 *Sox10* 基因的开放阅读框共编码 481 个氨基酸(图 1)。所得的氨基酸通过 NCBI 的在线 BLAST 同源比对, 核酸序列与斑马鱼 (*Danio rerio*, NP_571950.1)、大鳞副泥鳅 (*Paramisgurnus dabryanus*, AFD97051.1)、泥鳅 (*Misgurnus anguillicaudatus*, AFD97052.1)、青鳉 (*Oryzias latipes*, NP_001158343.1)、半滑舌鳎 (*Cynoglossus semilaevis*, ABW87298.1)、斜带

石斑鱼 (*Epinephelus coioides*, AFF57872.1)、人 (*Homo sapiens*, NP_008872.1)、猪 (*Sus scrofa*, NP_001093403.1) 和鼠 (*Mus musculus*, NP_035567.1) 的同源性依次为 94%、95%、87%、73%、68%、67%、59%、61% 和 59%, 从氨基酸序列比对图(图 2)可以看出, 6 种鱼类与 3 种高等生物的 *Sox10* 基因存在明显差异。

构建的氨基酸进化树显示(图 3), 该基因把采用的脊椎动物分成了 2 个主要的族群, 其中 1 族群主要由陆上动物组成; 鱼类构成另外一族。瓯江彩鲤与其他鲤形目鱼类, 如斑马鱼、大鳞副泥鳅等聚于同一支。

2.3 *Sox10* 基因的组织分布检验

使用特异性引物 DS1F、DS1R 进行组织分布的半定量 RT-PCR 检测, 发现 *Sox10* 基因在瓯江彩鲤的皮肤、肌肉、眼睛和鳃表达量最高, 鳃和心表达量次之, 肾和肝没有表达(图 4)。

2.4 不同体色间的表达差异

Sox10 基因在不同体色皮肤组织中的 qRT-PCR 结果如图 5 所示。*Sox10* 基因在“粉玉”白表皮中的表达量最高, 且显著地高于其他体色类型 ($P < 0.05$); “粉花”白表皮表达量次之, 但与“大花”红表皮、“大花”黑表皮、“全红”红表皮的差异不显著 ($P > 0.05$); “粉花”黑表皮中的表达最低, 显著低于其他体色类型 ($P < 0.05$)。

3 讨论

本研究克隆得到的瓯江彩鲤 *Sox10* 基因与其他脊椎动物的 *Sox10* 基因具有较高的同源性, 系统发育树将分析所用的脊椎动物分成 2 个主要的族群, 其中陆上动物构成一个族群; 鱼类组成另一个族群。进一步发现瓯江彩鲤与其他鲤形目鱼类, 如斑马鱼、大鳞副泥鳅等聚于同一支。该基因的系统进化关系与传统的物种进化地位基本一致。

研究表明, 哺乳动物与鱼类 *Sox10* 基因的组织表达不完全相同。如大鼠, *Sox10* 基因在大脑中表达很丰富, 但在心脏、肌肉、睾丸、肝、肾上腺、脾、肺和肾没有表达^[32]。在成人组织, *Sox10* 基因在脑、结肠、心脏大量表达, 前列腺、膀胱、胰脏、肝和胃中少量表达或不表达, 且在成人睾丸中也检测到少量的 *Sox10* 基因^[33]。*Sox10* 基因在鱼类的组织分

```

1 agaggaccgATGTCGGCGGAGGAGCAGATATGTCAGAGGTGGAATGAGTCCCGGGGTC
1 M S A E E H S M S E V E M S P G V
61 TCGGACGACGGTCACTCCATGTCCCCGGTCACTCGTCCGGTGCTCCCGGCGGGGCGGAC
18 S D D G H S M S P G H S S G A P G G A D
121 TCCCTCTTCCCGTCAAGCGTCTCAGATGCAGGGCGTCCGTGATGATGAGCCCGGAGTC
38 S P L P G Q A S Q M Q G V G D D E P G V
181 TCCGCGGGGTGTCGGTGAAGTCCGACGAAGACGACGACCGCTTCCCATCGGCATCCGC
58 S A G V S V K S D E D D D R F P I G I R
241 GAGGCGGTCACTCAGGTGCTTAACGGTTACGACTGGACGCTCGTGCCCATGCCCGTCCGC
78 E A V S Q V L N G Y D W T L V P M P V R
301 GTGAACCTCGGCAGCAAGAACAAGCCGACGTGAAGCGGCCGATGAACGCGTTTCATGGTG
98 V N S G S K N K P H V K R P M N A F M V
361 TGGGCGCAGGCGCGCGCAGGAACTAGCGGATCAGTATCCGCACCTGCATAACGCCGAG
118 W A Q A A R R K L A D Q Y P H L H N A E
421 CTAGTAAAACACTCGGAAACTCTGGAGGCTGCTGAATGAGTCCGATAAAGAGGCGTTT
138 L S K T L G K L W R L L N E S D K R P F
481 ATCGAGGAAGCCGAGCGTTTGAAGGAAGCAGCATAAGAAAGATTACCTGAGTACAAGTAC
158 I E E A E R L R K Q H K K D Y P E Y K Y
541 CAGCCACGTAGACGAAGAACCGCAACCGGGATCCAACCTCTGAGGCCGACGCCACTCT
178 Q P R R R K N G K P G S N S E A D G H S
601 GAGGGTGAGGTCACTACAGCAATCGCATTACAAAAGCCTGCACCTGGAGGTGGACAT
198 E G E V S H S Q S H Y K S L H L E V A H
661 GCGGGGCGCAGGATCACCATTGGGCGATGGACACCATCCTACGCTACAGGTACAGAGT
218 G G A A G S P L G D G H H P H A T G Q S
721 CATAGCCCTCCGACACCCCTACCACTCTAAAACAGAATTACAGGCGGTAAATCCGGC
238 H S P P T P P T T P K T E L Q G G K S G
781 GAGGGGAAGCGTGAAGCGGATCCTCCAGGAGCGGTTAGGGTTCGAGCAGCAGGAGC
258 E G K R E G G S S R S G L G V G A D G S
841 TCCGCTCTCTATCCGCCAGCGGAAAACCGCATATTGATTTTGGAAATGTGGACATTGGC
278 S A S S S A S G K P H I D F G N V D I G
901 GAGATCAGCCATGAGGTGATGGCAACATGGAGCCGTTGACGTGAACGAGTTCGACCAG
298 E I S H E V M A N M E P F D V N E F D Q
961 TACTGCCGCCAACCGGCACCGCAGTCATCGAGTGGCACAAGCGCTGGGTCTTCGGCT
318 Y L P P N G H P Q S S S G T S A G S S A
1021 TCGCCGTACACTTACGGCATCTCCAGTGCCTGGCAGCCGCTAGCGGCCACTCCACCGCC
338 S P Y T Y G I S S A L A A A S G H S T A
1081 TGGCTTTCCAAGCAGCAGCTGCCGTCCAGCAGCACTTGGGATCGGATGGCGGGAAGACG
358 W L S K Q Q L P S Q Q H L G S D G G K T
1141 CAGATTAAGAGTGAGACGCACTTCTCCAGTGACGCTGCGGCGAGCGGTACATGTACA
378 Q I K S E T H F S D A A A S G S H V T
1201 TACTGCCACACTACAGCGCGCCTTCCCTCGCTGGCGTCCGCGCGCAGTTCCGCCGAA
398 Y L P H Y S A A F P S L A S R A Q F A E
1261 TACGCCGAGCACCAGCGTCCGGCTCATACTACGCCCACTCTAGCCAGACTCTGGCCTT
418 Y A E H Q A S G S Y Y A H S S Q T P G L
1321 TACTCCGCCTTCTCTACATGGGCCCTTACAGAGGCCCTGTACACGCCCATACCAGAT
438 Y S A F S Y M G P S Q R P L Y T A I P D
1381 CCCGGCTCCGTGCCGAGTCGCACAGCCCAACACACTGGGAGCAGCCGTATACACCACC
458 P G S V P Q S H S P T H W E Q P V Y T T
1441 TTATCGCGACCGTGAagcaacattctggtttgtatccagtcgctgaagggtccaacaga
478 L S R P *
1501 agtgtgactgaaaatcatgacacatgctcactgcaccacaatctgcacagactgaaatc
1561 tgagagaaacttgcgtgtgtggagatctgcagggaacatattctcactgacctcaggtt
1621 ataaaaacttccagcaccgacacagattcactcaacacatagatgaaggaggcagaaattt
1681 gacaccagtggtctctcatgagacatataacaaaagtcttgagacaaaattatcaaaa
1741 atccaaacaaaattggtgcagtttctgaaactctgttttagtttggcagtaaacactcaaac
1801 atacategaccgctcacttccactcatatatacgtacacacaaacatacttaccctga
1861 tgcattattctgtacatccatgtgtgtgacttttttaatttgtatgaatgaataatct
1921 ctttttataacaaaataaggccatattgtttatatacaacaaataatggcgttttcgtt
1981 gttgtaacttttctattgttgttactcttgttatttgtattgccaataactacactgaaa
2041 agtcttccaccactgtctagtgtttgttaattgacatttgttttattgacttccagctgt
2101 gtaaatatcagtgccaggatgcgataattacgcgttttacctattactccaaacacacag
2161 gtggagtactgtaattgcagtgtttccgtcacatcggaattagcctaatttcagatttccg
2221 gtatatagattacatttttagataaacaccgctagtccacagtcacatcagctactgttt
2281 gtcateccctgaaaaattcaaatataatcacacggatctatttccagggcacaaactttat
2341 cagccgttagcctatgggaatataatttgcacacgtgacaatgtaatacgcaattttg
2401 aaagagcgccattttgtatttcttggaaataatgtccgttcagaacactgccagttca
2461 agattttttattttttatgagaataaaaacatttgcggtattttttctaaagacagtc
2521 tgttactgtaaacttttagttatttgacattttcttcccttttggtactttttagttttg
2581 ccccttaatttagtactgttcagaaacagcaacaaacagctttctttagttattac
2641 agaataattatttattttgtttgtttttgtttttgtttttttatcagttgtttttat
2701 tctgatgttggaaactttgtgtaattttgtgggtaaaagtgtttgtttttctttatca
2761 gtgtaaatagaagagatgcagtgactaacttccctcacttttaataaagctgcagtcgtg
2821 aaaaaaaaaa

```

图 1 瓯江彩鲤 *Sox10* 基因 cDNA 序列和推导的氨基酸序列

阴影部分表示 ploy(A)尾巴; 末端的加尾信号 aataaa 用斜体加下划线表示; 下划线示起始密码子 ATG; * 示终止密码子; 小写字母示 5'- 和 3'-UTR.

Fig.1 cDNA and putative amino-acid sequences of *Sox10* gene in Oujiang color common carp

The ploy A signal is shade in gray; the terminal signal aataaa is underlined with italic in the 3'-end; the start codon ATG is underlined; the stop codon is indicated by an asterisk; the lowercase indicated 5' and 3' UTR.

```

石斑鱼 Epinephelus coioides Sox10a      MSGEEHSLSEAELSPGGSDDGHSLSPQTQP--GAPTRQDSPLTGPPQQLTSLCVADGSEED  58
青鳉 Oryzias latipes Sox10b             MSREEQSLSEVELSPGMSDDSCSQSPGHS-LGAAGAGESPLHG-QQHP---QMDGESAGC   55
半滑舌鲷 Cynoglossus semilaevis Sox10  ----AGLSEVELSPGMSDDSRMSMPGQSSSGATGGGDSPLHG-HQQVRLAALDDASAQC  54
彩鲤 Cyprinus carpio 'color' Sox10      MSAAEHSMESEVEMSPGVSDDGHSMSPGHS-SGAPGGADSPLP--GQASQMVGVDDEPGV  57
大鳞副泥鳅 Paramisgurnus dabryanus Sox10  MSTEEHSLSEVEMSPGVSDDGHSMSPGHS-SGAAGGPDSPLP--CQPSQMSGVGEEVAGV  57
斑马鱼 Danio rerio Sox10               MSAAEHSMESEVEMSPGVSDDGHSMSPGHS-SGAPGGADSPLP--GQPSQMSGVGEEVAGV  57
泥鳅 Misgurnus anguillicaudatus Sox10    MSTEEHSLSEVEMSPGVSDDGHSMSPGHS-SGAAGGPDSPLP--CQPSQMSGVGEEVAGV  57
人 Homo sapiens Sox10                  -MAEEQDLSEVELSPVGSEEPRLCLSPGSAPSLGPDGGGGGG-----SGLRASPGPGELGK  53
猪 Sus scrofa Sox10                    -MAEEQDLSEVELSPVGSEEPRLCLSPGSAPSLGPDGGGGGGGG---SGLRASPGPGELGK  56
小鼠 Mus musculus Sox10                -MAEEQDLSEVELSPVGSEEPRLCLSPGSAPSLGPDGGGGGG-----SGLRASPGPGELGK  53

      .**..**  *::  .**  .  .  .  .
石斑鱼 Epinephelus coioides Sox10a      GG-DRAKSEIEDDRFIGIREAVSQVLDGYDWTLPMPVVRVNGNKAAPHVKRPMNAFMV  117
青鳉 Oryzias latipes Sox10b             S---SAKSDDEDERFPAGIREAVSQVLKCYDWTLPMPVVRVNGSKNKPVKRPMNAFMV  112
半滑舌鲷 Cynoglossus semilaevis Sox10  S---SARSDDEDERFPAGIREAVSQVLDGYDWTLPMPVVRVNSGGESKPHVKRPMNAFMV  111
彩鲤 Cyprinus carpio 'color' Sox10      SAGVSVKSDEDDDRFIGIREAVSQVLNGYDWTLPMPVVRVNSGSKNKPVKRPMNAFMV  117
大鳞副泥鳅 Paramisgurnus dabryanus Sox10  SGGVSVKSDEDDDRFIGIREAVSQVLNGYDWTLPMPVVRVDSGSKSKPHVKRPMNAFMV  117
斑马鱼 Danio rerio Sox10               SGGVSVKSDEDDDRFIGIREAVSQVLNGYDWTLPMPVVRVNSGSKSKPHVKRPMNAFMV  117
泥鳅 Misgurnus anguillicaudatus Sox10    SGGVSVKSDEDDDRFIGIREAVSQVLNGYDWTLPMPVVRVNSGSKSKPHVKRPMNAFMV  117
人 Homo sapiens Sox10                  VKKEQQDGEADDDKFPVCIREAVSQVLSGYDWTLPMPVVRVNGASKSKPHVKRPMNAFMV  113
猪 Sus scrofa Sox10                    VKKEQQDGEADDDKFPVCIREAVSQVLSGYDWTLPMPVVRVNGASKSKPHVKRPMNAFMV  116
小鼠 Mus musculus Sox10                VKKEQQDGEADDDKFPVCIREAVSQVLSGYDWTLPMPVVRVNGASKSKPHVKRPMNAFMV  113

      .**..**  **..*****  *****:  .  *****
石斑鱼 Epinephelus coioides Sox10a      WAQAARRKLADQYPHLHNAELSKTLGKLWRLNEDSKRPFIEEAERLRKQHKKDYPEYKY  177
青鳉 Oryzias latipes Sox10b             WAQAARRKLADQPHPLHNAELSKTLGKLWRLNEDSKRPFIEEAERLRKQHKKDYPDYKY  172
半滑舌鲷 Cynoglossus semilaevis Sox10  WAQAARRKLADQPHPLHNAELSKTLGKLWRLNEDSKRPFIEEAERLRKQHKKDYPDYKY  171
彩鲤 Cyprinus carpio 'color' Sox10      WAQAARRKLADQYPHLHNAELSKTLGKLWRLNEDSKRPFIEEAERLRKQHKKDYPEYKY  177
大鳞副泥鳅 Paramisgurnus dabryanus Sox10  WAQAARRKLADQYPHLHNAELSKTLGKLWRLNEDSKRPFIEEAERLRKQHKKDYPEYKY  177
斑马鱼 Danio rerio Sox10               WAQAARRKLADQYPHLHNAELSKTLGKLWRLNETDKRPFIEEAERLRKQHKKDYPEYKY  177
泥鳅 Misgurnus anguillicaudatus Sox10    WAQAARRKLADQYPHLHNAELSKTLGKLWRLNEDSKRPSIEEAERLRKQHKKDYPEYKY  177
人 Homo sapiens Sox10                  WAQAARRKLADQYPHLHNAELSKTLGKLWRLNEDSKRPFIEEAERLRMQHKKDHDPDYKY  173
猪 Sus scrofa Sox10                    WAQAARRKLADQYPHLHNAELSKTLGKLWRLNEDSKRPFIEEAERLRMQHKKDHDPDYKY  176
小鼠 Mus musculus Sox10                WAQAARRKLADQYPHLHNAELSKTLGKLWRLNEDSKRPFIEEAERLRMQHKKDHDPDYKY  173

      *****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****
石斑鱼 Epinephelus coioides Sox10a      QPRRRKNGKLA---PANESDSQGEGEASHSQSHYKTLHL--EHNGGAGSPLGDLHHHHHH  232
青鳉 Oryzias latipes Sox10b             QPRRRKNGKLTGTG-SGSEADGQLEGEVTH---YKGLQLEVAHGGGAESLLADGHHHP---  224
半滑舌鲷 Cynoglossus semilaevis Sox10  QPRRRKNGKIGSG-SGSEADGNSE-----  194
彩鲤 Cyprinus carpio 'color' Sox10      QPRRRKNGKPG---SNSEADGHSEGEVSHSQSHYKSLHLEVAHGGGAAGSPLGDGHHHP---  231
大鳞副泥鳅 Paramisgurnus dabryanus Sox10  QPRRRKNGKPG---SSSEGDGHSEAEVSHSQSHYKSLHLEVAHSGAAGSPLGDGHHHP---  231
斑马鱼 Danio rerio Sox10               QPRRRKNGKPG---SSSEADAHSEGEVSHSQSHYKSLHLEVAHGGGAAGSPLGDGHHHP---  231
泥鳅 Misgurnus anguillicaudatus Sox10    QPRRRKNGKLG---TNSETDGHSEGEVSHSQSHYKSLHLEVAH--AGSPLGDGHHHP---  229
人 Homo sapiens Sox10                  QPRRRKNGKAAQGEAECPGGEAEQGGTAAIAHAHYKSAHLDRHPG-EGSPMSDGNPE---  229
猪 Sus scrofa Sox10                    QPRRRKNGKAAQGESECPGGEAEQGGAAIAHAHYKSAHLDRHPG-EGSPMSDGNPE---  232
小鼠 Mus musculus Sox10                QPRRRKNGKAAQGEAECPGGEAEQGGAAIAHAHYKSAHLDRHPG-EGSPMSDGNPE---  229

      *****
石斑鱼 Epinephelus coioides Sox10a      HH--HPAGQGHSPPTPTTPKTELQSGKLSDAKREGAAGAAGSGGPRGALGVGAEGASG  290
青鳉 Oryzias latipes Sox10b             ---HAAGQSHSPPTPTTPKTEALAGKAGDGKR-----DGGGN-GSSRASMGAEGGS-  272
半滑舌鲷 Cynoglossus semilaevis Sox10  -----GHSPPTPTTPKTEPQSGKAGDGKR-----DGGGN-VGSRGNAGLEGSS-  237
彩鲤 Cyprinus carpio 'color' Sox10      ---HATGQSHSPPTPTTPKTELQGGKSGEGKR-----EGGS--SRSLGLVGADGSSA  279
大鳞副泥鳅 Paramisgurnus dabryanus Sox10  ---HTTGQSHSPPTPTTPKTELQGGKSGEGKR-----EGGA--SRSLGLVGADGSSA  279
斑马鱼 Danio rerio Sox10               ---HATGQSHSPPTPTTPKTELQGGKSGEGKR-----EGGA--SRSLGLVGADGSSA  279
泥鳅 Misgurnus anguillicaudatus Sox10    ---HATGQNHSPPTPTTPKTELQGGKSGEGKR-----EGGAGGSRGGLGVGADGSSS  279
人 Homo sapiens Sox10                  ---HPSGQSHGPPTPTTPKTELQSGK-ADPKR-----DGRS-  262
猪 Sus scrofa Sox10                    ---HPSGQSHGPPTPTTPKTELQSGK-ADPKR-----DGRS-  265
小鼠 Mus musculus Sox10                ---HPSGQSHGPPTPTTPKTELQSGK-ADPKR-----DGRS-  262

      .*****  **..**  : **

```

图 2 *Sox10* 基因氨基酸序列的多重比对(待续)Fig.2 Multiple sequence alignment of amino acid sequence of *Sox10* gene (be continued)

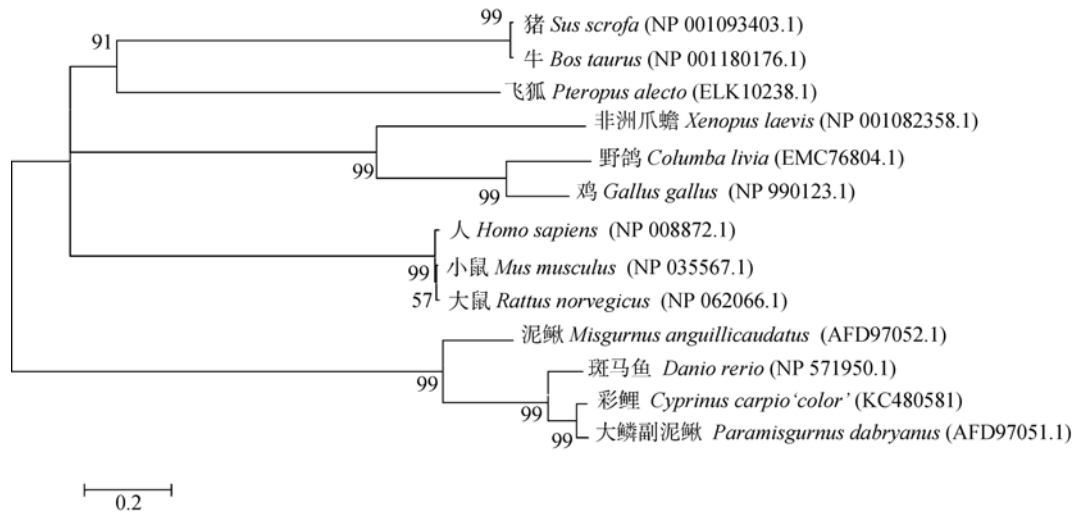


图 3 基于 *Sox10* 基因氨基酸序列构建的部分脊椎动物系统进化树

Fig.3 Phylogenetic tree of representative vertebrates based on amino acid sequences of *Sox10* gene

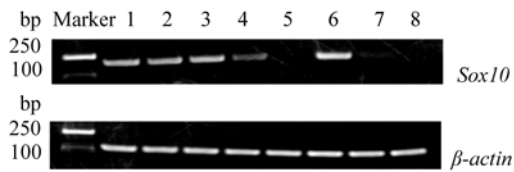


图 4 瓯江彩鲤 *Sox10* 基因半定量 RT-PCR 检测结果

1. 皮肤; 2. 肌肉; 3. 眼睛; 4. 鳃; 5. 肾; 6. 鳔; 7. 心; 8. 肝.

Fig.4 RT-PCR results for gene expression of *Sox10* in different tissues of Oujiang color common carp

1. skin; 2. muscle; 3. eye; 4. gill; 5. kidney; 6. swim bladder; 7. heart; 8. liver

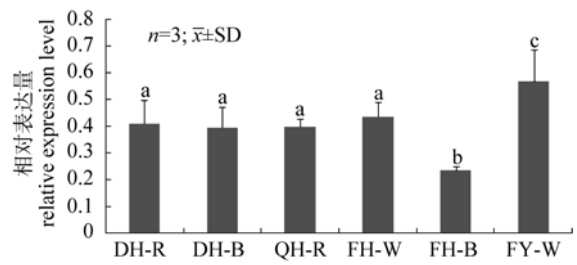


图 5 瓯江彩鲤不同体色皮肤中 *Sox10* 基因的 qRT-PCR 检测结果

DH-R: 大花红表皮; DH-B: 大花黑表皮; QH-R: 全红红表皮; FH-W: 粉花白表皮; FH-B: 粉花黑表皮; FY-W: 粉玉白表皮. 不同字母表示基因表达差异显著 ($P<0.05$).

Fig. 5 Quantitative RT-PCR results of *Sox10* gene in skin tissues from different color pattern of Oujiang color common carp

DH-R is "Dahua" red skin, DH-B is "Dahua" black skin, QH-R is "Quanhong" red skin, FH-W is "Fenhua" white skin, FH-B "Fenhua" black skin, FY-W "Fenyu" white skin. Different letters indicate significant differences statistically ($P<0.05$).

Agouti 基因表达量高会减弱 *Mitf* 的表达及启动子活性, 使 *Mitf* 与酪氨酸酶基因 *M-box* 的结合减少,

从而导致酪氨酸表达下调, 最终导致黑色素生成减少^[37]。本实验中, *Sox10* 基因在“大花”黑表皮中表达略低, 但与“大花”红表皮和“全红”红表皮差异不是很大; 然而在“粉花”黑表皮中的表达量却显著低于“粉花”白表皮和“粉玉”白表皮, 表明在瓯江彩鲤中 *Sox10* 表达量低时, 表皮主要显黑色。而我们之前对“大花”和“粉花”的研究发现, *agouti* 基因表达量高时皮肤呈现的颜色是红色和白色, 而 *agouti* 基因表达量低时呈黑色(待发表资料)。因此由本实验结果推测 *Sox10* 基因激活 *Mitf* 基因表达的同时, 且 *Mitf* 基因与酪氨酸酶基因结合的过程中受到 *Agouti* 基因表达量高的影响。

鱼类体色变异主要与黑色素的合成有关, 黑色素细胞能产生两种不同类型的黑色素, 称之为真黑色素和褐黑色素, 二者的比例决定着皮肤的颜色^[38]。而在黑色素合成信号通路中, *Sox10* 基因调控其他基因共同参与黑色素合成, 从而影响体色分布。因而对皮肤中 *Sox10* 基因的研究, 可为体色遗传探讨奠定一定基础。

本实验结果初步验证了 *Sox10* 基因表达量的高低影响瓯江彩鲤的体色分布, 但鱼类体色的变化差异不仅仅是个别或几个基因决定, 而是由许多基因共同调控黑色素合成而完成的。对于参与瓯江彩鲤体色变异的其他相关基因还有待进一步加以研究。

参考文献:

- [1] Ceol C J, Houvras Y, White R M, et al. Melanoma biology and the promise of zebrafish[J]. *Zebrafish*, 2008, 5(4): 247–256.
- [2] Kelsh R N. Genetics and evolution of pigment patterns in fish[J]. *Pigm Cell Res*, 2004, 17(4): 326–336.
- [3] Parichy D M, Johnson S L. Zebrafish hybrids suggest genetic mechanisms for pigment pattern diversification in *Danio*[J]. *Dev Genes Evol*, 2001, 211(7): 319–328.
- [4] 刘金海, 王安利, 王维娜, 等. 水产动物体色色素组分及着色剂研究进展[J]. *动物学杂志*, 2002, 37(3): 92–96.
- [5] 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.
- [6] 刘晓东, 陈再忠. 2008. 鱼类色素细胞和体色调控[J]. *水产科技情报*, 2008, 35(1): 13–18.
- [7] 徐伟, 白庆利, 刘明华, 等. 彩鲤与红鲤杂交种体色遗传的初步研究[J]. *中国水产科学*, 1999, 6(1): 33–36.
- [8] 徐伟, 白庆利, 曹顶臣, 等. 彩鲤、红鲤、银鲤体色发育生物学初步观察[J]. *水产学杂志*, 1999, 12(1): 61–63.
- [9] 徐伟, 曹顶臣, 李池陶, 等. 水晶彩鲤、红鲤、锦鲤、荷包红鲤杂交子代的生长和体色研究[J]. *水产学报*, 2005, 29(3): 339–343.
- [10] Hoekstra H E, Hirschmann R J, Bunday R A, et al. A single amino acid mutation contributes to adaptive beach mouse color pattern[J]. *Science*, 2006, 313(5783): 101–104.
- [11] Lin J Y, Fisher D E. Melanocyte biology and skin pigmentation[J]. *Nature*, 2007, 445: 843–850.
- [12] Beermann F, Orlow S J, Lamoreux M L. The Tyr (albino) locus of the laboratory mouse[J]. *Mamm Genome*, 2004, 15(10): 749–758.
- [13] Hou L, Panthier J J, Arnheiter H. Signaling and transcriptional regulation in the neural crest-derived melanocyte lineage: interactions between KIT and MITF[J]. *Development*, 2000, 127: 5379–5389.
- [14] Lister J A, Close J, Raible D W. Duplicate mitf genes in zebrafish: Complementary expression and conservation of melanogenic potential[J]. *Dev Biol*, 2001, 237(2): 333–344.
- [15] Basolo A L. Genetic linkage and color polymorphism in the southern platyfish (*Xiphophorus maculatus*): A model system for studies of color pattern evolution[J]. *Zebrafish*, 2006, 3(1): 65–83.
- [16] Sugie A, Terai Y, Ota R, et al. The evolution of genes for pigmentation in African cichlid fishes[J]. *Gene*, 2004, 343(2): 337–346.
- [17] 王成辉, 李思发, 曾伟光, 等. 瓯江彩鲤体色与生长的遗传—环境互作分析[J]. *上海水产大学学报*, 2004, 13(2): 103–106.
- [18] Cheng Y C, Cheung M, Abu-Elmagd M M, et al. Chick *Sox10*, a transcription factor expressed in both early neural[J]. *Dev Brain Res*, 2000, 121(2): 233–241.
- [19] Kapur R P. Early death of neural crest cells is responsible for total enteric aganglionosis in *Sox10^{Dom}/Sox10^{Dom}* mouse embryos[J]. *Pediatr Devel Pathol*, 1999, 2(6): 559–569.
- [20] Bondurand N, Pingault V, Goerich D E, et al. Interaction among *Sox10*, *Pax3* and *Mitf*, three genes altered in waardenburg syndrome[J]. *Hum Mol Genet*, 2000, 9(13): 1907–1917.
- [21] Potterf S B, Mollaaghababa R, Hou L, et al. Analysis of *Sox10* function in neural crest-derived melanocyte development: Sox10-dependent transcriptional control of dopachrome tautomerase[J]. *Dev Biol*, 2001, 237(2): 245–257.
- [22] Yasumoto K I, Amae S, Udono T, et al. A big gene linked to small eyes encodes multiple *mitf* isoforms: many promoters make light work[J]. *Pigm Cell Res*, 1998, 11(6): 329–336.
- [23] Watanabe K W, Takeda K, Katori Y, et al. Expression of the *Sox10* gene during mouse inner ear development[J]. *Mol Brain Res*, 2000, 84(1-2): 141–145.
- [24] Miyahara K, Kato Y, Koga H, et al. Visualization of enteric neural crest cell migration in *Sox10* transgenic mouse gut using time-lapse fluorescence imaging[J]. *J Pediatr Surg*, 2011, 46(12): 2305–2308.
- [25] Elworthy S, Pinto J P, Pettifer A, et al. Phox2b function in the enteric nervous system is conserved in zebrafish and is sox10-dependent[J]. *Mech Develop*, 2005, 122(5): 659–669.
- [26] Dutton K A, Pauliny A, Lopes S S, et al. Zebrafish colourless encodes *sox10* and specifies non-ectomesenchymal neural crest fates[J]. *Development*, 2001, 128: 4113–4125.
- [27] Hall T. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT[J]. *Nucleic Acids Symposium Series*, 1999, 41: 95–98.
- [28] Singh V K, Mangalam A K, Dwivedi S, et al. Primer premier program for design of degenerate primer from a protein sequence[J]. *BioTechniques*, 1998, 24(2): 318–319.
- [29] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. *Mol Biol Evol*, 2011, 28(10): 2731–2739.
- [30] Saitou N, Nei M. The Neighbor-Joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. *Mol Biol Evol*, 1987, 4(4): 406–425.
- [31] 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.
- [32] Kuhlbrodt K, Herbarth B, Sock E, et al. *Sox10*, a novel

- transcriptional modulator in glial cells[J]. *J Neurosci*, 1998, 18(1): 237–250.
- [33] Bondurand N, Kobetz A, Pingault V, et al. Expression of the *Sox10* gene during human development[J]. *Febs Lett*, 1998, 432(3): 168–172.
- [34] Deng S P, Chen S L. cDNA cloning, tissues, embryos and larvae expression analysis of *Sox10* in half-smooth tongue-sole, *Cynoglossus semilaevis*[J]. *Mar Genom*, 2008, 1(3-4): 109–114.
- [35] Aoki Y, Saint-Germain N, Gyda M, et al. *Sox10* regulates the development of neural crest-derived melanocytes in *Xenopus*[J]. *Dev Biol*, 2003, 259(1): 19–33.
- [36] Hou L, Pavan WJ. Transcriptional and signaling regulation in neural crest stem cell-derived melanocyte development: do all roads lead to *Mitf*[J]. *Cell Res*, 2008, 18: 1163–1176.
- [37] 白瑞, 张美萍, 乔德瑞, 等. MITF 基因与动物毛色的研究进展[J]. 上海畜牧兽医通讯, 2006(4): 2–3.
- [38] 范瑞文, 董常生, 郝晓燕, 等. 哺乳动物毛色色素 Agouti 基因位点的研究进展[J]. 动物医学进展, 2004(3): 59–61.

Isolation and expression analysis of *Sox10* gene relating body color variation in Oujiang color common carp

LI Kangle, HU Jianzun, YAN Biao, WANG Chenghui

Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: The numerous and diverse body color of fish was not only excellent materials to study the molecular mechanism of body color and body color inheritance, body color evolution, and it was also an ideal model to diagnosis disease. Now, five basic and stable body color patterns have existed in Oujiang color common carp (*Cyprinus carpio* var. *color*), namely “Quanhong”, “Dahua”, “Mahua”, “Fenyu” and “Fenhua”, respectively. This fish can be a very good model and material for studying body color inheritance. At the melanin synthesis signaling pathway, skin color was regulated by a small group genes. *Sox10* gene plays an important role in the formation of melanin, it regulates the birth, migration and differentiation of melanin. However, the effect of *Sox10* gene on body color has not been reported. Four healthy lines of Oujiang color carp (“Quanhong”, “Dahua”, “Fenyu”, “Fenhua”) were collected from the provincial farm of the Zhejiang. Then the skin, muscle, eye, gill, kidney, swim bladder, heart, and liver were taken out, furthermore, the black skin and red skin were sampled separately of “Dahua”, the same with black skin and white skin of “fenhua”. Total RNA was extracted using Trizol, and reverse transcribed into the First-strand cDNA. Primers were designed by Primer5 program, and the right products were purified and sequenced. The obtained sequence was analyzed by Bioedit, Clustalw, Mega and other bioinformatics softwares. The total length of *Sox10* gene cloned in Oujiang color common carp is 2 830 bp which contains 9 bp 5' untranslated regions (UTR) and 1 375 bp 3'-UTR, and 1 446 bp open reading frame (ORF) encoding 481 amino acids. The phylogenetic analyses showed that there were 59%–94% similarities in amino acid sequence with some of previously reported other species. RT-PCR analysis revealed that the gene was highly expressed in skin, muscle, eyes and swim bladder, weakly expressed in gill and heart and no expression were found in kidney and liver. Real-time PCR showed that the expression of the *Sox10* gene in white skin (“Whole white” body color) was significantly higher than other color patterns ($P<0.05$), and the significantly lowest expression in black skin of “Fenhua” color pattern ($P<0.05$), but there were no significant difference in expression level among the other color patterns ($P>0.05$). The results primarily indicated that the *Sox10* gene is important in regulating body color variation in Oujiang color common carp. The information that obtained provides an important basis for conducting future studies on body color, and regulatory mechanisms in melanin synthesis signaling pathway, and provides an important theoretical basis for further research in body color selection during selective breeding in fish.

Key words: *Cyprinus carpio* var. *color*; *Sox10*; body color; real-time PCR; gene regulation

Corresponding author: WANG Chenghui . E-mail: wangch@shou.edu.cn