

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2020.19328

多巴色素异构酶基因对瓯江彩鲤黑斑体色的影响

司周旋, 陈红林, 许细丹, 王军, 王成辉

上海海洋大学农业农村部淡水水产种质资源重点实验室, 上海海洋大学水产科学国家级实验教学示范中心, 上海海洋大学上海水产养殖工程技术研究中心, 上海 201306

摘要:多巴色素异构酶(dopachrome tautomerase, Dct)是酪氨酸酶家族的重要成员之一, 在黑色素合成过程中具有重要作用。为了解多巴色素异构酶基因(*Dct*)对鲤的黑色体色的影响, 本研究以瓯江彩鲤(*Cyprinus carpio* var. *color*)的“粉花”体色类型为研究对象, 在对该基因进行克隆和表达分析的基础上, 应用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术研究该基因对瓯江彩鲤黑斑体色的影响。结果发现, 瓯江彩鲤存在 2 个 *Dct* 基因(*Dct1*、*Dct2*), 它们的 CDS 长度均为 1548 bp, 共编码 515 个氨基酸, 均包含 8 个外显子; *Dct1* 与 *Dct2* 的核苷酸序列相似度为 95.55%, 氨基酸序列相似度为 94.95%。荧光定量 PCR 结果显示, 基因 *Dct1* 在“粉花”体色瓯江彩鲤的黑斑皮肤中的表达量显著高于白色皮肤, 而 *Dct2* 在白色皮肤中的表达量却显著高于黑斑皮肤($P < 0.05$)。应用 CRISPR/Cas9 技术同时对两个基因敲除结果显示, *Dct1* 和 *Dct2* 高度突变的瓯江彩鲤皮肤中的黑色素细胞呈点状, 树突结构退化, 表现出黑斑面积缩小、黑色斑块不明显现象。本研究表明, *Dct* 基因突变对瓯江彩鲤黑斑体色存在重要影响, 与 *Dct2* 相比, *Dct1* 在鲤的黑斑体色形成中发挥着更大的作用。

关键词: *Dct* 基因; 瓯江彩鲤; 黑色素; 基因编辑; CRISPR/Cas9

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2020)06-0605-08

黑色素是脊椎动物重要的色素种类之一, 具有隐蔽、保护机体不受紫外损伤等多种功能^[1-2]。黑素体是黑色素合成的主要细胞结构^[3], 黑色素的胞内合成是黑色体色或体表黑斑形成的基础。了解黑色体色的形成与黑色素生成的分子机制, 对理解脊椎动物适应进化、生物系统发育乃至细胞功能调控机制都具有重要意义^[4]。脊椎动物存在真黑色素(eumelanin)和褐黑色素(pheomelanin)两种类型的黑色素, 哺乳动物的黑色素合成以真黑色素为主, 鱼类中尚未有褐黑色素的相关报道。真黑色素的合成主要分为两个阶段: 第一个阶段是酪氨酸(L-tyrosine)经多巴醌(L-dopaquinone)转化为多巴色素(L-dopachrome); 第二个阶段是多巴色素转化为 5,6-二羟基吲哚(5,6-dihydroxyindole, DHI)或 5,6-二羟基吲哚羧(5,6-dihydroxyindole-2-

carboxylic acid, DHICA), 然后以 DHI 或 DHICA 为底物合成黑色素^[5]。在脊椎动物, 已发现超过 250 种基因影响黑色体色的形成^[6], 这些基因通过调控黑色素细胞的形成、迁移、增殖和基因转录等方式调控着黑色体色的变化^[7-8]。其中, 酪氨酸酶合成家族的相关基因(*Tyr*、*Tyrp1*、*Dct*)作为黑色素合成的关键酶基因, 其蛋白在黑色素合成过程中发挥主要的催化作用^[9]。

多巴异构酶基因(*Dct*)作为酪氨酸酶合成家族的成员之一, 其合成的蛋白具有多巴异构酶活性, 在黑色素合成的第二阶段通过调节多巴素向 DHI 或 DHICA 间的转化来调控黑色体色的形成^[10-11]。目前关于 *Dct* 对体色表型的影响研究主要集中在哺乳动物的毛色性状, 如小鼠(*Mus musculus*)中 *Dct* 的敲除会使突变体毛色变淡^[12]。在鱼类, *Dct*

收稿日期: 2019-11-04; 修订日期: 2019-12-17.

基金项目: 国家自然科学基金项目(31772840); 广西科技重大专项(桂科 AA17204095-7).

作者简介: 司周旋(1994-), 男, 硕士研究生, 研究方向为水产动物种质资源与苗种工程. E-mail: sizhouxuan@qq.com

通信作者: 王成辉, 教授, 博士生导师, 研究方向为水产动物种质资源与苗种工程. E-mail: wangch@shou.edu.cn

对鳟(*Salmo marmoratus*)的大理石体色表型产生一定影响^[13]。但总体上 *Dct* 对鱼类体色表型的影响研究较少,尚缺乏较有力的实证研究。

鲤(*Cyprinus carpio*)是世界范围内广泛养殖的经济鱼类,除食用性能外,有些鲤还具有非常重要的观赏价值,如日本锦鲤。因而,鲤的体色遗传规律与机制研究也较为广泛。瓯江彩鲤(*Cyprinus carpio* var. *color*)为鲤的体色变异体,是分布于浙江省瓯江流域的地方性经济种类,具有丰富的体色类型^[14]。笔者实验室经多年选育,已培育出“全红”、“大花”、“麻花”、“粉玉”和“粉花”5种遗传稳定体色类型的瓯江彩鲤“龙申 1 号”品种(品种登记号:GS01-002-2011),为鲤的体色遗传机制研究提供了良好材料。同时,笔者通过 CRISPR/Cas9 基因编辑技术研究了体色相关基因 *Asip* 对瓯江彩鲤黑斑性状的影响^[15],为体色遗传机制研究奠定了平台基础。然而,鲤科鱼类特有的基因组复制事件,造成了色素相关基因的复制和多拷贝化,增加了鲤体色遗传机制的复杂性。目前,对鲤的体色遗传与决定机制的基础研究仍非常薄弱,如 *Dct* 基因对鲤黑色体色的影响程度尚不了解。本研究在对瓯江彩鲤的 2 个 *Dct* 基因(*Dct1* 和 *Dct2*)进行克隆、结构分析和表达检测的基础上,通过 CRISPR/Cas9 基因编辑技术研究了 *Dct* 基因对瓯江彩鲤体色表型的影响,以期对鲤的体色遗传基础与机制研究积累资料。

1 材料与方法

1.1 材料与组织

本研究的实验材料为瓯江彩鲤“龙申 1 号”的“粉花”体色类型(代号 WB),饲养于上海海洋大学水产动物物种试验站,繁育亲本先前通过与“粉玉”体色的交配来确定了分析基因的纯合性。

2018 年 5 月,对“粉花”体色繁育亲本自交构建家系,人工授精获得的受精卵一部分用于显微注射(见 1.5),剩余部分孵化后培育至 8 月龄时,取背部黑色和白色皮肤于液氮中速冻,保存于 -80 °C 冰箱用于后续的表达分析。

1.2 *Dct* 基因克隆与序列分析

使用 Trizol 法提取皮肤组织的总 RNA,方法

参照说明书进行(大连宝生物工程有限公司)。提取的总 RNA 通过凝胶电泳检测完整性后,使用 Nanodrop 2000 确定质量和浓度。使用 Prime-Script™ RT reagent Kit (大连宝生物工程有限公司)反转录成 cDNA,保存于 -20 °C 冰箱,用于基因克隆和定量表达分析。

从鲤的基因组中可知,*Dct* 存在基因加倍现象,有 *Dct1* 和 *Dct2* 两个基因^[16]。根据基因组和本实验室的转录组序列,设计引物(表 1)进行两个 *Dct* 基因的 CDS 区域扩增,将扩增片段连接至 Pmd^{19-T} 载体,转化至 DH5 α 感受态细胞,然后挑选阳性克隆进行测序。应用 NCBI 在线对比(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)来确定瓯江彩鲤与斑马鱼(*Danio rerio*)*Dct* 基因之间的相似性。

1.3 *Dct* 基因的定量表达分析

取“粉花”体色类型瓯江彩鲤的黑色和白色皮肤组织进行实时荧光定量表达分析,使用 primer-blast 在线软件(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>)分别设计基因 *Dct1* 与 *Dct2* 的定量表达引物,并设计内参基因 β -actin 的扩增引物(表 1)。使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法^[17]计算 2 个 *Dct* 基因的相对表达量。

1.4 基因敲除 sgRNA 靶点设计与体外转录

利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术同时对瓯江彩鲤的 *Dct1*、*Dct2* 基因进行敲除以观察该基因对黑色体色的影响。在靶点设计前,进一步对亲鱼的 *Dct1*、*Dct2* 基因外显子区域进行 PCR 产物测序,验证其基因型的纯合性。使用在线程序(<http://zifit.partners.org/ZiFiT/CSquare9Nuclease.aspx>)在该基因的第 2 外显子区域设计靶点序列(表 1)。

合成含有靶点序列的 Target 序列与反向 Scaffold 序列(上海生工生物工程股份有限公司),然后通过 PCR 扩增以合成 sgRNA 模板。PCR 反应体系为: Target 合成链 1.5 μ L, Scaffold 合成链 1.5 μ L, Taq Mix 酶 10 μ L, 去离子水 7 μ L。PCR 反应程序为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 1 min; 65 °C 复性 1 min; 72 °C 延伸 1 min; 34 个循环后, 72 °C 延伸 5 min, 然后 4 °C 保存。纯化回收 sgRNA 模板后,用 Promega P1300 体外转录试剂

表 1 瓯江彩鲤 *Dct* 的扩增引物与基因敲除靶点序列
Tab. 1 PCR Primers and targeting sequences for *Dct* genes in *Cyprinus carpio* var. *color*

序列名称 sequence name	序列(5'-3') sequence (5'-3')	用途 application
<i>Dct1</i> , <i>Dct2</i> -CDS-F	ATGAGGAGATCGATTGTGTTGG	CDS 扩增引物
<i>Dct1</i> , <i>Dct2</i> -CDS-R	TTACGCGTCCTCTGTGTATTT	CDS 扩增引物
<i>Dct1</i> -exon2-F	TTCAATCAAGTGTGTCCCAAT	<i>Dct1</i> 靶点区域验证引物
<i>Dct1</i> -exon2-R	AAACCACCGTTTTGAAATCC	<i>Dct1</i> 靶点区域验证引物
<i>Dct2</i> -exon2-F	GGACACTTTAGCAATCGCAGA	<i>Dct2</i> 靶点区域验证引物
<i>Dct2</i> -exon2-R	GGCAGTGTTACAGCAGCTC	<i>Dct2</i> 靶点区域验证引物
<i>Dct1</i> -RT-PCR-F	AACGACGTCAGAAGCTGCCT	<i>Dct1</i> 荧光定量引物
<i>Dct1</i> -RT-PCR-R	CCAGAGCGTTCCTGAAGCTGA	<i>Dct1</i> 荧光定量引物
<i>Dct2</i> -RT-PCR-F	CAGGAACGCGCTGGAAGGAT	<i>Dct2</i> 荧光定量引物
<i>Dct2</i> -RT-PCR-R	GCTGGTCCCGTTGAGGAACA	<i>Dct2</i> 荧光定量引物
β -actin-RT-PCR-F	CTCTGTCTGGATCGGAGGTT	荧光定量内参引物
β -actin-RT-PCR-R	GACGATGGATGGTCCAGACT	荧光定量内参引物
Target- <i>Dct1</i> -1	CAGCACTGGCTGGGCCTGCT(+)	<i>Dct1</i> 敲除靶点
Target- <i>Dct1</i> -2	GATGACGTAATCAGGGTGGA(-)	<i>Dct1</i> 敲除靶点
Target- <i>Dct1</i> -3	TCCACCCTGATTACGTCATC(-)	<i>Dct1</i> 敲除靶点
Target- <i>Dct2</i> -1	ATCGCCACACAGCACTGGCT(+)	<i>Dct2</i> 敲除靶点
Target- <i>Dct2</i> -2	GGCCGAGCTGTGACCAGCGC(+)	<i>Dct2</i> 敲除靶点
Target- <i>Dct2</i> -3	GCCCTGCGCTGGTCACAGCT(-)	<i>Dct2</i> 敲除靶点
Target- <i>Dct1</i> 2-1	CGCTGAGCTGCAGGAGTTCC(+)	<i>Dct1</i> 、 <i>Dct2</i> 敲除靶点
Target- <i>Dct1</i> 2-2	GGAACCTCTGCAGCTCAGCG(-)	<i>Dct1</i> 、 <i>Dct2</i> 敲除靶点

盒(美国 Promega 公司)进行体外转录合成 sgRNA。最后对 sgRNA 用乙醇沉淀法纯化回收, DEPC 水溶解, 经 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测其质量和 NanoDrop2000 检测浓度后, 保存于-80 ℃ 冰箱, 以备显微注射。

1.5 显微注射与检测

参照 Chen 等^[15]的方法, 对“粉花”体色亲鱼进行人工授精和受精卵显微注射。注射后 2 d 采用酚-氯仿抽提法提取胚胎 DNA, 使用靶点检测引物(表 1)进行 PCR 扩增并测序, 以确定是否敲除成功。待敲除突变型瓯江彩鲤发育至 5 月龄时, 剪取其尾鳍, 使用靶点检测引物进行 PCR 扩增敲除区域并测序, 根据测序峰图筛选靶点区域高度突变的个体。然后对高突变的靶点区域进行单克隆测序, 统计敲除效率和敲除类型, 对比 *Dct* 高突变瓯江彩鲤与野生型瓯江彩鲤的体色表型差异并采集照片。

2 结果与分析

2.1 瓯江彩鲤 *Dct* 基因结构

通过基因克隆, 发现瓯江彩鲤 *Dct1* (GenBank

登录号为 MN830545)、*Dct2* (GenBank 登录号为 MN830546)的 CDS 长度均为 1548 bp, 共编码 515 个氨基酸(图 1), 它们分别位于鲤基因组的 LG5Scaffold000001386 上, 均包含 8 个外显子。序列比对发现, *Dct1* 与 *Dct2* 的核苷酸序列相似度为 95.55%, 氨基酸序列相似度为 94.95%。*Dct1*、*Dct2* 与斑马鱼 *Dct* 的核苷酸序列相似度分别为 86.16%、85.51%; 与斑马鱼 *Dct* 的氨基酸序列相似度分别为 88.16%、86.80%。

2.2 瓯江彩鲤 *Dct* 的皮肤表达特征

荧光定量 PCR 结果显示, 基因 *Dct1*、*Dct2* 在“粉花”体色瓯江彩鲤黑斑皮肤和白色皮肤的表达水平存在显著差异(图 2), 其中 *Dct1* 在“粉花”黑斑皮肤中的表达量显著高于白色皮肤($P<0.05$), 而 *Dct2* 在“粉花”白色皮肤中的表达量却显著高于黑斑皮肤($P<0.05$)。

2.3 瓯江彩鲤的 *Dct* 基因敲除

显微注射后的胚胎敲除检测结果显示, 20 个胚胎中 8 个胚胎的 *Dct* 基因受到了不同程度的敲除影响。通过对敲除的瓯江彩鲤尾鳍 DNA 进行 PCR 扩增和产物测序, 根据测序峰图筛选出 *Dct1*、

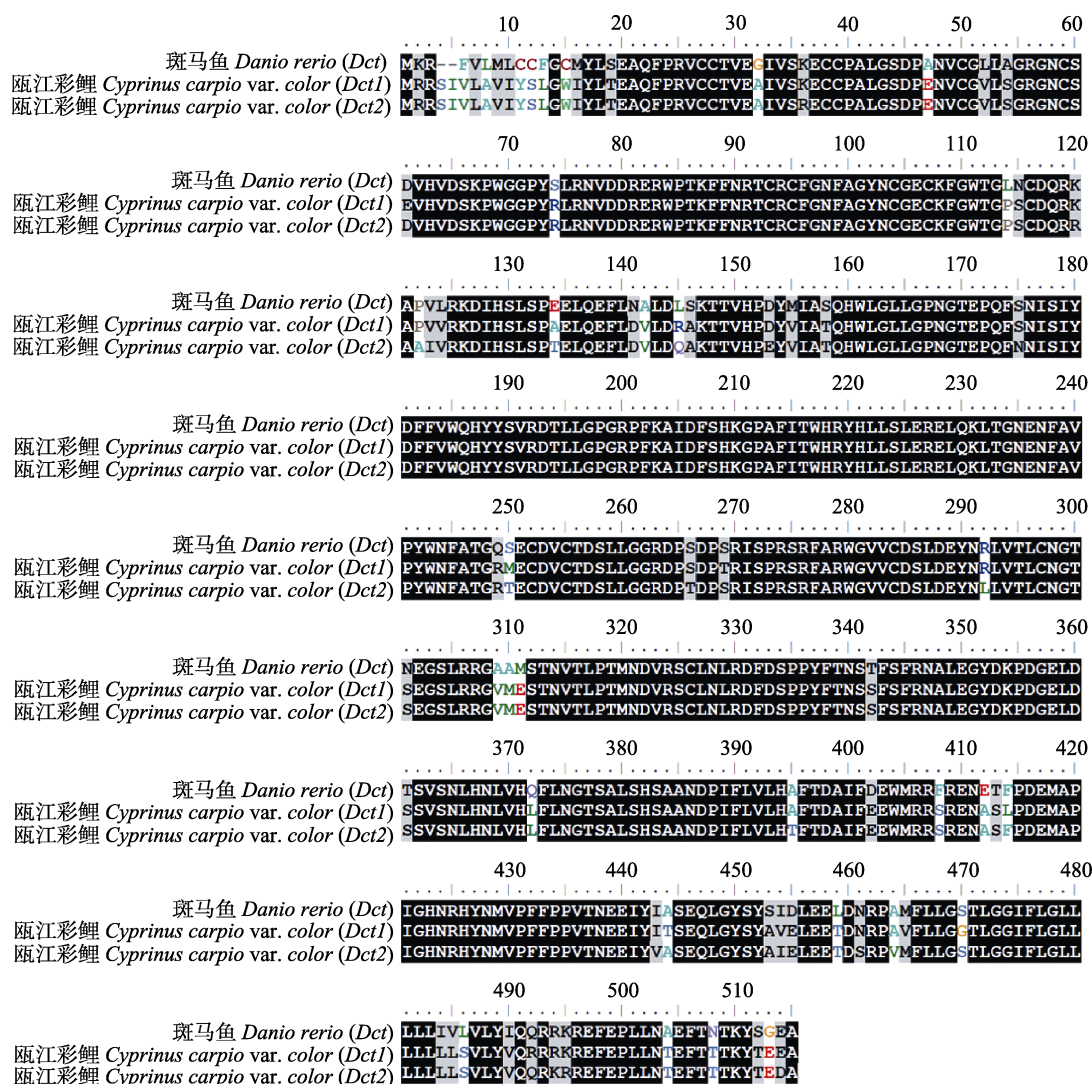


图 1 瓯江彩鲤和斑马鱼 Dct 的氨基酸序列多重比较

Fig. 1 The alignment result of amino acid sequence for Dct between zebrafish and *Cyprinus carpio* var. *color*

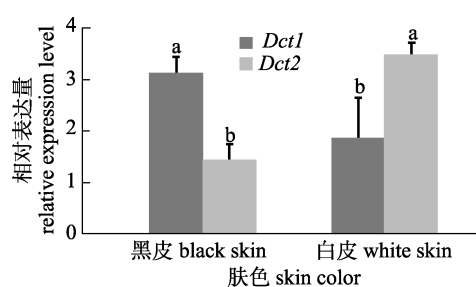


图 2 *Dct1*、*Dct2* 在“粉花”体色瓯江彩鲤黑斑与白色皮肤组织中的相对表达量

柱上不同字母表示同一基因在不同体色皮肤中的表达量差异显著 ($P < 0.05$).

Fig. 2 Relative expression profiles of *Dct1* and *Dct2* genes in black and white skin of “WB” color pattern of *Cyprinus carpio* var. *color*. Different letters on the bar represent significant difference in gene expression for the same gene between different types of skin tissue ($P < 0.05$).

Dct2 同时具有较高突变效率的部分瓯江彩鲤个体 (图 3A), 单克隆分型结果显示, 筛选得到瓯江彩鲤的 *Dct1*、*Dct2* 基因突变型条带均多于野生型条带, 即敲除效率大于 50% (图 3B)。由于同时使用了多个 sgRNA 靶点, 不同靶点的作用时期也可能存在一定的差异, 敲除瓯江彩鲤中有小片段缺失、较大片段缺失、插入等多种突变类型, 其中绝大多数突变类型造成了 *Dct* 的基因移码突变 (图 3B)。

与野生型瓯江彩鲤相比, *Dct1*、*Dct2* 高度突变的瓯江彩鲤皮肤出现黑斑面积较野生型小、黑色斑块不明显现象 (图 4A、图 4B)。体式显微镜下观察结果显示, *Dct* 高度突变个体的黑色素细胞呈点

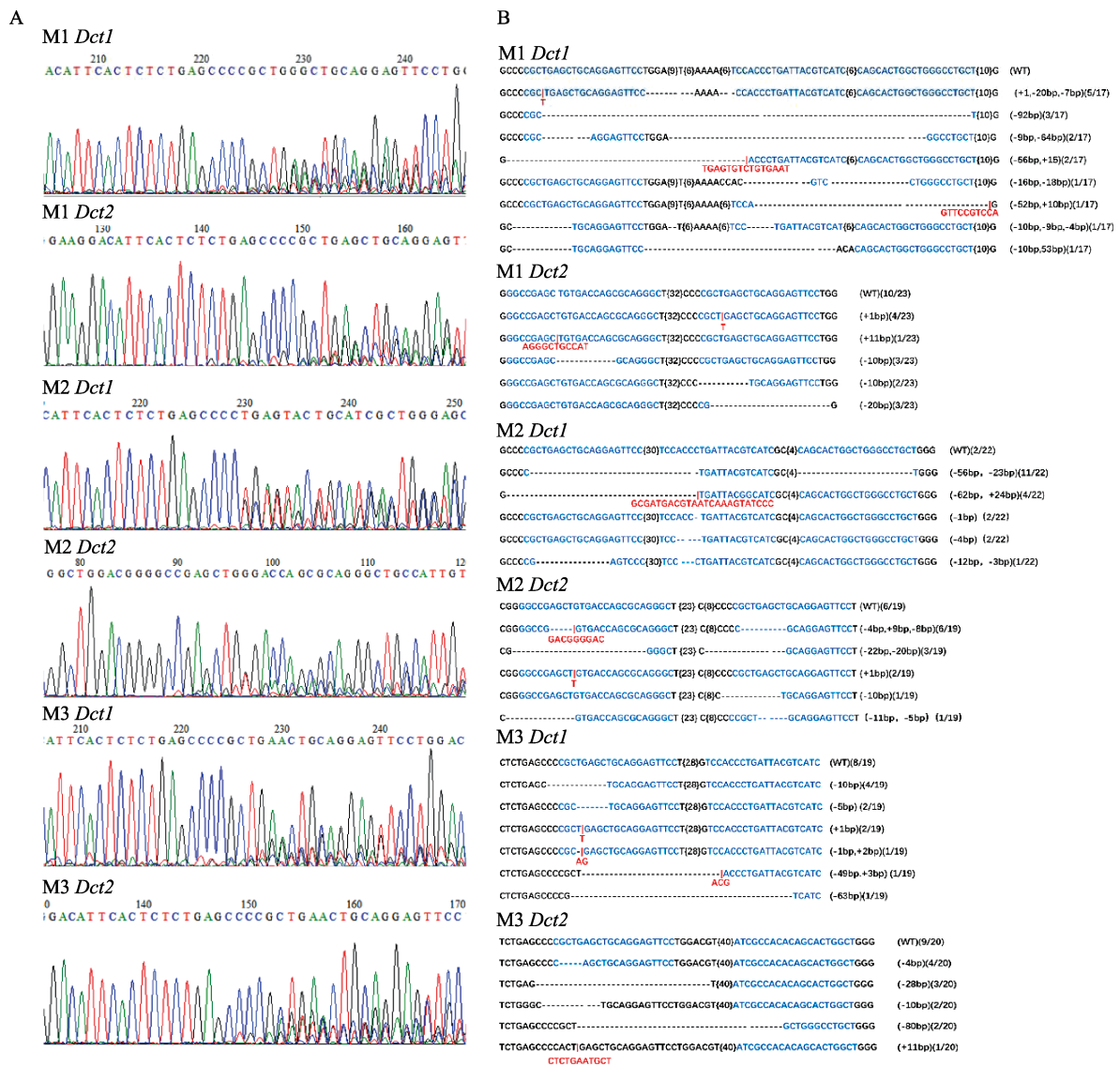


图 3 瓯江彩鲤 *Dct* 敲除区域 Sanger 测序峰图(A)和单克隆分型(B)

M1、M2、M3 分别为 *Dct* 基因的不同敲除突变瓯江彩鲤个体。图 B 中红色为插入序列，蓝色为靶点位置所在序列。

Fig. 3 Sequence mutation profiles (A) and monoclonal clone types (B) for different knock-out patterns in *Dct* genes of *Cyprinus carpio* var. *color*

M1, M2 and M3 represent different knock-out individuals of *Cyprinus carpio* var. *color*.

In fig. B, target sequences are marked in blue, and insertions are marked in red.

状且树突结构退化，而野生型瓯江彩鲤的黑色素细胞呈块状且树突结构明显(图 4C、图 4D)。

3 讨论

基因复制是同一个基因组内存在基因多个拷贝的现象，对物种适应进化具有重要的意义^[18]。硬骨鱼类中，鲤科鱼类额外的全基因组复制事件(WGD)使得基因组四倍化，因此基因复制现象在鲤中更为常见^[19]。复制后的基因在进化过程中通

常可能面临着被净化剔除、成为假基因或者获得新的功能的可能^[20-22]。本研究确定了瓯江彩鲤基因组中包含 2 个 *Dct* 基因拷贝，结构完整且均能够被正常的转录，说明 2 个 *Dct* 基因都具有一定的功能。瓯江彩鲤 2 个 *Dct* 基因 CDS 区域长度一致，外显子分布一致，氨基酸比对相似性达 95.55%，表明 *Dct1*、*Dct2* 基因可能具有相似的功能。瓯江彩鲤 *Dct1* 基因较 *Dct2* 基因与斑马鱼相似度更高，由此认为 *Dct1* 与斑马鱼 *Dct* 为直系同源基因，

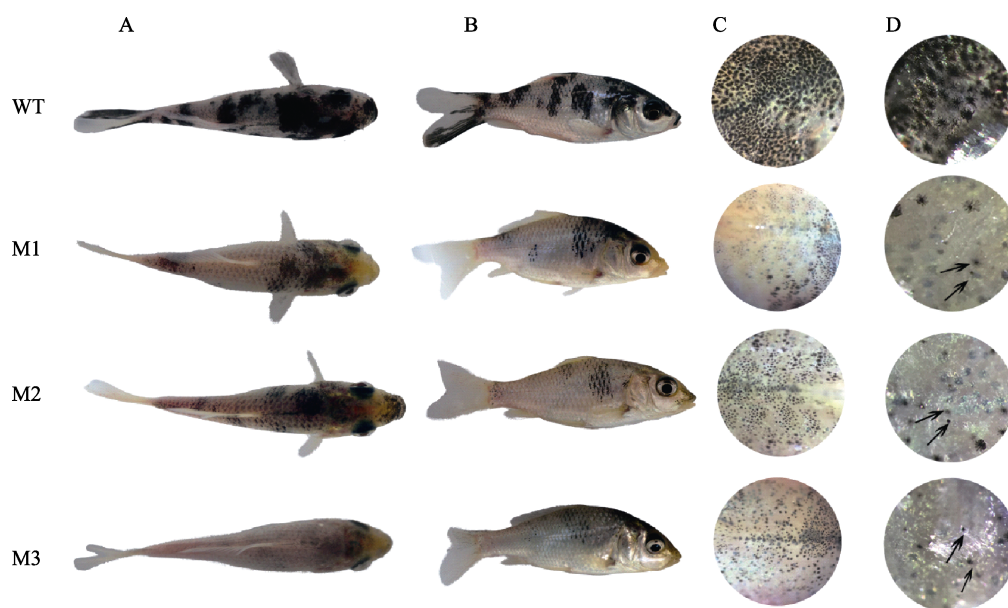


图 4 “粉花”体色瓯江彩鲤 *Dct* 基因不同敲除突变的表型特征

WT 为野生型瓯江彩鲤, M1、M2、M3 分别 *Dct* 敲除突变瓯江彩鲤个体。A、B 分别为背部、侧面黑斑观察, *Dct* 敲除突变瓯江彩鲤黑斑较野生型缩小且不明显; C、D 为体式显微镜 20 倍、40 倍局部观察, D 中箭头指向 *Dct* 敲除突变瓯江彩鲤中呈点状且树突结构退化黑色素细胞。

Fig. 4 Phenotype of *Dct* mutated *Cyprinus carpio* var. color of the “WB” pattern

WT represents wild type “WB” fish and M1, M2 and M3 represent different *Dct* mutated “WB” individuals. A and B respectively show the pigment pattern observation from dorsal and lateral direction, which show diminished black patch in *Dct* mutated *Cyprinus carpio* var. color compared to wildtype. C and D display the melanocytes observation in stereomicroscope with magnification of 20 and 40, respectively. In D, the arrows aim at abnormal melanocytes, which tend to be punctate and non-dendritic, in *Dct* mutated *Cyprinus carpio* var. color.

Dct2 基因可能由 *Dct1* 发展而来, 瓯江彩鲤 2 个 *Dct* 之间是否存在代偿效应有待进一步研究。

斑马鱼不同类型色素细胞转录组分析结果显示, *Dct* 基因在黑色素细胞中的表达显著高于其他类型的色素细胞^[23]; 在莫桑比克罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*)和鲫(*Carassius auratus*)中, *Dct* 基因在黑色皮肤中的表达显著高于非黑色皮肤^[24-25]。*Dct* 基因在黑色素细胞中的较高表达, 对于黑色素的胞内合成具有重要的作用。本研究发现, *Dct1* 和 *Dct2* 基因在同一个体的不同体色皮肤中具有不同的表达模式, *Dct1* 在黑斑皮肤的表达量显著高于白色皮肤, 而 *Dct2* 则却相反, 在白色皮肤中的表达显著于黑斑皮肤, 由此可以推测, *Dct1* 基因可能在瓯江彩鲤黑色体色的形成过程中发挥着主导作用。

瓯江彩鲤独特的黑斑体色特征, 使其成为研究鱼类黑色体色形成的良好材料, Chen 等^[15]通过 CRISPR/Cas9 基因编辑技术发现 *Asip* 基因的缺失

会导致瓯江彩鲤黑色斑块的弥散。在本研究中, *Dct* 基因的缺失造成瓯江彩鲤黑色斑块面积的缩小以及黑色素细胞树突结构的退化, 说明 *Dct* 基因对瓯江彩鲤黑色素细胞的增殖和形态维持有一定的影响。黑色素细胞由神经脊细胞分化迁移形成, *Dct* 基因在斑马鱼胚胎时期的干扰与过表达显著影响神经脊中神经原细胞的数量^[26]。在本研究中, *Dct* 高度突变个体表现出较多的树突结构退化的点状黑色素细胞, 这些黑色素细胞中的黑色素数量较正常黑色素细胞少, 表明 *Dct* 基因的敲除对黑色素细胞形态和黑色素数量造成了影响, 进而对黑斑面积造成了影响。*Dct* 基因在小鼠胚胎干细胞的敲除研究表明^[12], *Dct* 敲除小鼠毛色中的黑色素含量较正常小鼠明显降低, 这与本研究中的结果较为一致。*Dct* 具有催化合成 DHICA 的作用, 而 DHICA 是比 DHI 更为稳定的黑色素合成底物^[27], *Dct* 敲除可能导致了 DHICA 比例降低, 从而引起黑色素含量的降低。目前本研究仅分析

了 *Dct* 基因 F_0 嵌合突变体表型变化, 由于瓯江彩鲤的性成熟需要 2 年, 尚未获得基因型纯合突变个体, *Dct* 基因对瓯江彩鲤黑斑体色的影响将后续作进一步研究。

参考文献:

- [1] Rudh A, Qvarnström A. Adaptive colouration in amphibians[J]. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2013, 24(6-7): 553-561.
- [2] Dubey S, Roulin A. Evolutionary and biomedical consequences of internal melanins[J]. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 2014, 27(3): 327-338.
- [3] Akazaki S, Takahashi T, Nakano Y, et al. Three-dimensional analysis of melanosomes isolated from B16 melanoma cells by using ultra high voltage electron microscopy[J]. *Microscopy Research*, 2014, 2(1): 1-8.
- [4] Lapedriza A. Gene regulatory network of melanocyte development[D]. Bath: University of Bath, 2015.
- [5] Pillaiyar T, Namasivayam V, Manickam M, et al. Inhibitors of melanogenesis: An updated review[J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2018, 61(17): 7395-7418.
- [6] International Federation of Pigment Cell Societies. Color genes[EB/OL]. (2011-10-02) [2020-04-05]. <http://www.espcr.org/micemut>.
- [7] Mort R L, Jackson I J, Patton E E. The melanocyte lineage in development and disease[J]. *Development*, 2015, 142(4): 620-632.
- [8] Pavan W J, Sturm R A. The genetics of human skin and hair pigmentation[J]. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 2019, 20:41-72.
- [9] D'Mello S A N, Finlay G J, Baguley B C, et al. Signaling pathways in melanogenesis[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17(7): 1144.
- [10] Aroca P, Solano F, Salina C, et al. Regulation of the final phase of mammalian melanogenesis. The role of dopachrome tautomerase and the ratio between 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid and 5,6-dihydroxyindole[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1992, 208(1): 155-163.
- [11] Novellino L, Napolitano A, Prota G. 5,6-dihydroxyindoles in the Fenton reaction: A model study of the role of melanin precursors in oxidative stress and hyperpigmentary processes[J]. *Chemical Research in Toxicology*, 1999, 12(10): 985-992.
- [12] Guyonneau L, Murisier F, Rossier A, et al. Melanocytes and pigmentation are affected in dopachrome tautomerase knockout mice[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2004, 24(8): 3396-3403.
- [13] Sivka U, Snoj A, Palandačić A, et al. Identification of candidate genes involved in marble color pattern formation in genus *Salmo*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 2013, 8(3): 244-249.
- [14] Cheng Q Q, Wang C H, Li S F, et al. The studies of variations of growth rate and survival rate of different pigmentation types of color common carp[J]. *Fisheries Science & Technology Information*, 2001, 28(2): 56-58, 63. [程起群, 王成辉, 李思发, 等. 不同体色瓯江彩鲤生长率和存活率的差异研究[J]. *水产科技情报*, 2001, 28(2): 56-58, 63.]
- [15] Chen H L, Wang J, Du J X, et al. ASIP disruption via CRISPR/Cas9 system induces black patches dispersion in Ojiang color common carp[J]. *Aquaculture*, 2019, 498: 230-235.
- [16] Xu P, Zhang X F, Wang X M, et al. Genome sequence and genetic diversity of the common carp, *Cyprinus carpio*[J]. *Nature Genetics*, 2014, 46(11): 1212-1219.
- [17] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [18] Stephens S G. Possible significance of duplication in evolution[M]. New York: Academic Press, 1951, 4: 247-265.
- [19] David L, Blum S, Feldman M W, et al. Recent duplication of the common carp (*Cyprinus carpio* L.) genome as revealed by analyses of microsatellite loci[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2003, 20(9): 1425-1434.
- [20] Conrad B, Antonarakis S E. Gene duplication: A drive for phenotypic diversity and cause of human disease[J]. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 2007, 8(1): 17-35.
- [21] des Marais D L, Rausher M D. Escape from adaptive conflict after duplication in an anthocyanin pathway gene[J]. *Nature*, 2008, 454(7205): 762-765.
- [22] Hahn M W. Distinguishing among evolutionary models for the maintenance of gene duplicates[J]. *Journal of Heredity*, 2009, 100(5): 605-617.
- [23] Higdon C W, Mitra R D, Johnson S L. Gene expression analysis of zebrafish melanocytes, iridophores, and retinal pigmented epithelium reveals indicators of biological function and developmental origin[J]. *PLoS ONE*, 2013, 8(7): e67801.
- [24] Zhu W B, Wang L M, Dong Z J, et al. Comparative transcriptome analysis identifies candidate genes related to skin color differentiation in red tilapia[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 31347.
- [25] Zhang Y Q, Liu J H, Fu W, et al. Comparative Transcriptome and DNA methylation analyses of the molecular mechanisms underlying skin color variations in Crucian carp (*Carassius carassius* L.)[J]. *BMC Genetics*, 2017, 18: 95.
- [26] Jiao Z X, Zhang Z G, Hornyak T J, et al. Dopachrome tautomerase (*Dct*) regulates neural progenitor cell proliferation[J]. *Developmental Biology*, 2006, 296(2): 396-408.
- [27] Urabe K, Aroca P, Tsukamoto K, et al. The inherent cytotoxicity of melanin precursors: A revision[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1994, 1221(3): 272-278.

Effect of *Dct* on pigmentation patterns in Oujiang color common carp

SI Zhouxuan, CHEN Honglin, XU Xidan, WANG Jun, WANG Chenghui

Key Laboratory of Freshwater Fisheries Germplasm Resources, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education; Shanghai Engineering Research Center of Aquaculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: Pigmentation is a widespread phenomenon in vertebrates that enables vertebrates to adapt to their environment. For example, it can improve concealment and prevent damage from ultraviolet light. Over 250 genes are known to influence the process of melanin synthesis or the formation of pigmentation patterns. Among them, the tyrosinase family genes encode the key enzyme that catalyzes melanogenesis. Dopachrome tautomerase (*Dct*) is a tyrosinase family member and plays a role in catalyzing 5,6-dihydroxyindole (DHI) to 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA), which is an important substrate for melanin synthesis. However, the effect of *Dct* on fish pigmentation patterns remains unclear. Common carp is an important aquatic species and there are many varieties of this fish. Oujiang color common carp (*Cyprinus carpio* var. *color*) is one of these varieties and it has obvious black patches on its skin, which make them a useful material for investigating the function of the *Dct* gene during pigmentation formation in common carp. In addition, multiple gene copies are common in the Cyprinidae due to additional genome duplication. The effects of *Dct* copies on Oujiang color carp during melanogenesis remain unclear. The influence of *Dct* on pigment pattern of black patches in the “WB” pattern of Oujiang color common carp was investigated by cloning *Dct* genes and measuring their gene expression levels in black patches and white skin tissue using an RT-PCR analysis. CRISPR/Cas9 gene editing technology was used to construct highly mutated *Dct* “WB” individuals of Oujiang color common carp and the phenotypes of *Dct* mutated carps were observed. This study showed that two *Dct* genes (*Dct1* and *Dct2*) were detected in Oujiang color common carp. When their DNA sequences in the genome were compared, the results showed that *Dct1* and *Dct2* both had CDS sequences that contained 1548 bp nucleotides and encoded 515 amino bases. The alignment results between *Dct1* and *Dct2* showed that they had 95.55% nucleotide sequence similarity and 94.95% similarity of amino acid sequences. When they were compared to the *Dct* amino acid sequence in zebrafish, the results showed that *Dct1* and *Dct2* shared similarities of 86.16% and 85.51% in their nucleotide sequences and 88.16% and 86.80% in their amino acid sequences, respectively. The gene expression results revealed that *Dct1* and *Dct2* had different expression patterns in the black and white skin areas of the “WB” pattern Oujiang color common carp. *Dct1* expression was significantly higher in the black patch region than in the white skin region ($P < 0.05$). Meanwhile, *Dct2* expression in the white skin areas was significantly higher than in the black patch areas ($P < 0.05$). The observation of *Dct* mutated phenotype showed that, the black patch regions were smaller on the *Dct* mutated fishes (mutated efficiency > 50%) and there were more non-dendritic like melanocytes appeared. In conclusion, this study showed that *Dct1* and *Dct2* may have similar functions during the synthesis of melanin because their amino acid sequences were almost identical. However, the RT-PCR results indicated that *Dct1* played a dominant role in melanogenesis due to its relatively higher expression in black patch tissue. The CRISPR/Cas9 gene editing technology results for *Dct*-mutated individuals revealed that the deficiency in *Dct* genes influenced the pigment pattern of black patches and the morphology of melanocytes in oujiang color common carp. These results offer new insights into the functional effects of *Dct* genes on pigmentation in common carp.

Key words: *Dct* gene; *Cyprinus carpio* var. *color*; melanin; gene editing; CRISPR/Cas9

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