

何丽斌, 黄镇, 吴水清, 等. 基于转录组测序技术对调控毕加索小丑鱼(Picasso clownfish)白化体征关键基因的研究[J]. 海洋学报, 2022, 44(2): 67–76, doi:10.12284/hyxb2022050

He Libin, Huang Zhen, Wu Shuiqing, et al. Transcriptome analysis identifies candidate genes related to albinism mechanism in the skin of the Picasso clownfish[J]. Haiyang Xuebao, 2022, 44(2): 67–76, doi:10.12284/hyxb2022050

# 基于转录组测序技术对调控毕加索小丑鱼 ( Picasso clownfish ) 白化体征关键基因的研究

何丽斌<sup>1,2</sup>, 黄镇<sup>2,3</sup>, 吴水清<sup>1</sup>, 郑乐云<sup>1</sup>

(1. 福建省水产研究所, 福建 厦门 361013; 2. 福建师范大学 生命科学学院, 福建 福州 350117; 3. 福建省特色海洋生物资源可持续利用重点实验室, 福建 福州 350117)

**摘要:** 毕加索小丑鱼 ( Picasso clownfish ) 因其皮肤中的白色斑块分布杂乱抽象而得名, 同时也由于其白色斑块的形成无规律性和稀缺性, 属于名贵的小丑鱼, 因此, 解析毕加索小丑鱼的皮肤白斑形成机制, 可以为毕加索小丑鱼的人工育种提供理论依据。在本研究中, 我们对 3 种体色毕加索小丑鱼的背鳍和臀鳍之间的身体相同部位 3 种色块 ( 黑色、黄色、白色 ) 的皮肤进行了转录组测序。研究结果显示, 与黄色和黑色皮肤组织相比, 在白色皮肤组织中存在大量差异表达基因。其中与黑色素产生相关的信号通路 ( 例如黑色素生成、Hedgehog 信号通路和 Wnt 信号通路 ) 中的基因在白色皮肤组织中呈下调表达趋势。进一步对 3 种颜色皮肤组织中参与黑色素生成途径的基因进行详细分析, 发现上游调控基因 ( 如 *ednrba* 和 *mitfa* ) 表达量从黑色到黄色至白色皮肤组织中逐步下调, 但下游参与黑色素合成的核心基因 ( 包括 *tyr*、*tyrp1b* 和 *dct* ) 则在白色皮肤组织中表达出现显著下调。最后, 本研究通过荧光定量 PCR 验证了转录组数据的可靠性。本研究结果将为今后人为干扰基因表达从而达到调控小丑鱼体色提供理论依据。

**关键词:** 白化现象; 毕加索小丑鱼; 转录组测序; 差异表达基因

中图分类号: S965.8

文献标志码: A

文章编号: 0253-4193(2022)02-0067-10

## 1 引言

海洋观赏鱼类的体色多彩多样, 是脊椎动物最丰富的形态特征之一, 对于动物生存、进化具有重要的意义。体色及其形状、纹路等不同色素模式是鱼类最直观的适应性状之一, 影响着鱼类的聚集、躲避敌害、警告猎食者或竞争者及性选择, 且对鱼类的识别具有重要的意义<sup>[1-2]</sup>。

小丑鱼属于雀鲷科 ( Pomacentridae ), 海葵鱼亚科 ( Amphiprioninae )<sup>[3]</sup>。小丑鱼在世界范围内共有 20 多

种, 是重要的海洋观赏鱼类<sup>[4]</sup>。其中, 毕加索小丑鱼是黑背小丑鱼 ( *Amphiprion percula* ) 自交产生的后代中出现的品种<sup>[5]</sup>, 由于其皮肤组织具有不规则的白色、黄色和黑色斑块与纹路, 因而具有较高的观赏性与商品价值。由于黑色或者黄色个体的皮肤组织发生白化现象, 最后导致其出现不规则的白色斑块皮肤。白化的特征表现为皮肤、头发和眼睛中缺乏黑色素, 是自然界中常见的体色变异<sup>[6]</sup>。已有研究表明<sup>[7]</sup>, 白化的表型在不同种类的动物中受到不同的基因表达调控, 因此, 白化表型产生的分子机制因种而

收稿日期: 2021-08-12; 修订日期: 2021-11-10。

基金项目: 厦门市科技局科技计划 ( 3502Z20142008 ); 福建省财政海洋与渔业结构调整专项 ( [2016]841、[2019]HYJG11 ); 福建省省属公益类科研院所基本科研专项 ( 2021R1013001 )。

作者简介: 何丽斌 ( 1971— ), 女, 福建省厦门市人, 副研究员, 研究方向为海洋观赏生物繁育。E-mail: 670170442@qq.com

异。已有的研究表明<sup>[8]</sup>,白化现象与溶酶体途径在遗传上有关,并与人类疾病相关。在渔业生产中,体色也是一个重要的价值特征,例如白化海参的市场价值明显高于正常颜色的海参(黑褐色、灰褐色或者黄褐色)<sup>[9]</sup>。因此,阐明白化产生的分子机制不仅有益于人体健康,而且为体色育种提供重要线索。

## 2 材料与方 法

### 2.1 材料采集

实验用毕加索小丑鱼取自福建省水产研究所生态实验室,为同一亲本产生的后代。根据《ARRIVE 2.0 指南》和美国国立卫生研究院《实验动物护理和使用指南》(NIH 出版物编号 8023, 1978 年修订)进行动物样品采集工作和实验方案制定。排除性别差异和体型相似(体长为  $(35.2 \pm 1.5)$  mm),实验随机挑选了 9 尾的亚成鱼个体,包括 3 尾白化鱼、3 尾黄色鱼(以

下简称黄鱼)和 3 尾黑色鱼(以下简称黑鱼)(图 1a),3 种鱼在胸鳍与臀鳍身体两侧之间相同部位分别呈现白色、黄色、黑色的皮肤组织。在本研究中,将白化样本编号为 A\_1、A\_2 和 A\_3,黄色样本编号为 Y\_1、Y\_2 和 Y\_3,黑色样本编号为 B\_1、B\_2 和 B\_3。实验剥取了鱼的皮肤组织后将组织切成小块并在磷酸盐缓冲盐溶液(Phosphate Buffered Saline, PBS)中洗涤 3 次。实验将每份样品的皮肤组织均分为两份,将一份储存在液氮中备用,另一份用于提取总 RNA。

### 2.2 转录组测序

使用 TRIzol 试剂(Invitrogen, 加拿大)从皮肤组织中提取总 RNA 后通过 Agilent 2 100 方法检测 RNA 样品纯度、浓度和完整性。质量控制后,使用 oligo(dT)磁珠从每个样品的  $1 \mu\text{g}$  总 RNA 中分离带 poly(A)的 mRNA,随后采用超声处理成随机片段。使用 TruSeq

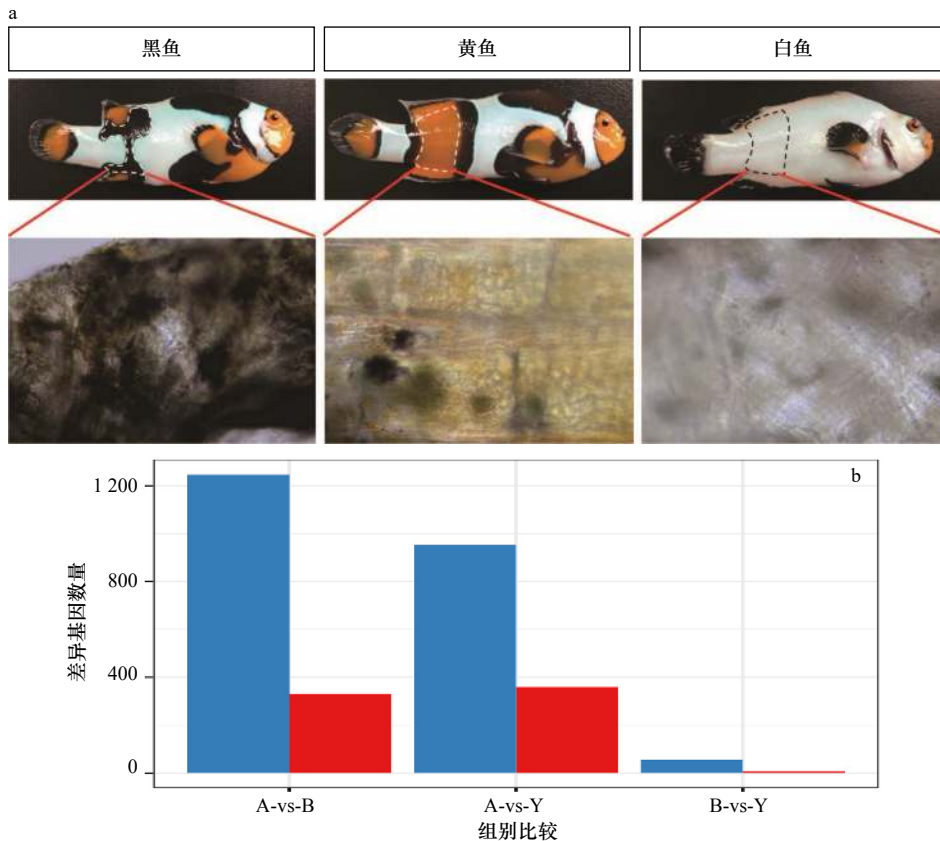


图 1 3 种小丑鱼皮肤组织的表型差异以及基因表达差异

Fig. 1 Phenotypic differences and gene expression differences in skin tissues from three species of Picasso clownfish

a. 对 3 种鱼在胸鳍与臀鳍身体两侧之间相同部位(白色、黄色、黑色的皮肤组织)进行取样的组织形态图; b. 白色、黑色和黄色样本差异表达的基因数量比较柱状图(红色代表上调基因,蓝色代表下调基因);图中 A 表示白色皮肤组织, B 表示黑色皮肤组织, Y 表示黄色皮肤组织  
a. Histomorphogram of the sample locations from the same parts (white, yellow, and black skin tissues) between the pectoral and anal fins of the three fish species; b. the histogram of the number of differentially expressed genes in the white, black and yellow samples (red represents up-regulated genes, blue represents down-regulated genes); A represents white skin tissue, B represents black skin tissue, and Y represents yellow skin tissue

RNA文库制备试剂盒 v2(Illumina, 美国)构建 cDNA 文库, 基于 Illumina HiSeq™ 2500 高通量平台, 以 Pair-end 150 bp 双端测序模式对 cDNA 文库进行转录组测序。

### 2.3 序列比对

为了获得高质量的数据, 使用 SolexaQA 软件从原始读数数据中修剪接头和低质量读数<sup>[10]</sup>。以眼斑双锯鱼 (*Amphiprion ocellaris*) (GenBank: NXFZ00000000.1) 为参考基因组, 利用 HISAT2 软件, 将过滤后的转录组数据使用默认参数与参考基因组进行比对。通过 Burrows Wheeler (BWA) 软件将过滤后的基因组测序数据与参考基因组进行比对<sup>[11-12]</sup>。

### 2.4 差异表达基因分析

使用 Hisat2-build v 21.0<sup>[13]</sup> 软件构建参考基因组的索引, 使用 HISAT v 2.1.0<sup>[13]</sup> 将转录组数据比对至参考基因组。基于基因长度计算每个基因的表达量 (FPKM), 并使用 StringTie<sup>[14]</sup> v1.3.5 软件计算基因的读数计数。本研究中的差异表达基因 (Differentially Expressed Genes, DEGs) 分析采用 BH 法校正的  $p$  值 ( $p < 0.05$ ) 为标准阈值。

### 2.5 GO 功能富集和 KEGG 通路富集分析

以  $p < 0.05$  为阈值, 分别使用 GOseq R Bioconductor 包和 KOBAS 2.0 对差异基因进行 GO 功能富集和 KEGG 通路富集分析<sup>[14-15]</sup>。

### 2.6 qPCR 验证

通过 Primer Premier 5.0 软件设计靶基因 (*adcy5*、*akdp7*、*crabp1*、*creb3l2*、*ednrb*、*flt4*、*fzd2*、*gng10*、*ivns1abp*、*nkiras1*、*robo4*、*ssbp2*、*tspi2*、*wnt11*、*zdhhc2*) 的引物 (表 S1), 所设计的引物均不同的外显子上, 在 qPCR 检测中避免基因组 DNA 污染。使用 Promega 公司的 GoScript™ Reverse Transcriptase System 试剂盒将总 RNA 逆转录合成 cDNA。使用 Maxima SYBR Green qPCR Mix (2X) 进行 qRT-PCR, 总反应体积为 20  $\mu$ L, 包括 10  $\mu$ L SYBR qPCR Mix、0.8  $\mu$ L 正向引物、0.8  $\mu$ L 反向引物、2  $\mu$ L cDNA 和 6.4  $\mu$ L 无 RNase 的水。PCR 扩增程序: 95°C 30 s、95°C 5 s、59°C 10 s、72°C 15 s 共 40 个循环。通过 Bio-Rad 公司的 iQ5 软件检测荧光信号并计算熔解温度。以  $\beta$ -actin 为对照, 采用 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> 法分析各靶基因的相对表达量<sup>[16]</sup>。本实验对转录组测序样本的所有 3 个生物学重复均使用 3 个技术重复进行基因表达量验证。

## 3 结果

### 3.1 转录组测序

通过样品取样、RNA 提取、文库构建和上机测序, 本实验 9 份样品获得的原始读数数量在 450×

10<sup>4</sup>~650×10<sup>4</sup> 之间, 数据质控后 93%~98% 的读数为可用读数。每个样品与参考基因组的比对率均大于 75%。通过 FPKM 值估计皮肤组织中基因的表达水平, 结果显示, 所有样品中基因表达的分布相似, 表明没有系统性的基因表达差异。样本间的相关系数结果显示, 所有样本都表现出良好的相关性, 且同一组的样本表现出更强的相关性水平, 表明每组都有良好的生物学重复。

### 3.2 差异表达基因的鉴定

本实验通过进一步比较 3 组样品之间的转录组表达量来分析 DEGs。结果显示, 与黄色皮肤样品相比, 白色皮肤样品中有 1 312 个 DEGs, 其中包括 359 个上调基因和 953 个下调基因 (表 S2)。与黑色皮肤样品相比, 白色皮肤样品中总共有 1 578 个 DEGs, 包括 331 个上调基因和 1 247 个下调基因 (表 S3)。此外, 黑色皮肤与黄皮肤样品相比存在 65 个 DEGs, 其中 9 个下调基因, 56 个上调基因 (表 S4, 图 1b)。基于组间的 DEGs, 利用基因的表达值对样本进行聚类, 结果显示, 所有样品表现出与肤色一致的聚类模式 (图 2)。本实验发现基于 DEGs 比基于全基因组表达数据有更好的聚类结果, 表明 DEGs 能够反映组间的核心差异。

### 3.3 差异表达基因在与黑色素生成相关的生物过程中的功能作用

为了进一步解析毕加索小丑鱼白色皮肤中特异性 DEGs 的功能, 我们对白色和黄色相比 (标记为 A-vs-Y) 的 DEGs、白色和黑色相比 (标记为 A-vs-B) 的 DEGs 分别进行了 GO 功能富集和分析 (图 3)。结果显示, A-vs-Y 和 A-vs-B 的差异基因集均在蛋白质结合 (如细胞黏附和趋化因子受体结合)、蛋白质转运 (如核转运)、蛋白质入细胞核和调控信号 (如生长调节和酶调节活性) 这些 GO 生物学过程中存在显著的富集水平 (表 S5, 表 S6)。我们也对这些差异基因进行了 KEGG 通路富集, 结果显示, 存在 7 条富集显著的信号通路 ( $p < 0.05$ ), 包括细胞外基质-受体互作黏着斑、细胞黏附分子、紧密连接、细胞因子-细胞因子受体相互作用、钙信号通路和酪氨酸代谢 (表 S7)。同时, 我们还发现许多 DEGs 参与 Wnt 信号通路、Hedgehog 信号通路、苯丙氨酸代谢和黑色素合成通路。虽然这些通路在 KEGG 富集分析中不显著, 但它们与色素细胞分化和皮肤颜色密切相关。

我们将黑色与白色皮肤的转录组数据进行相比, 发现在白色皮肤样品中涉及与黑色素生成的基因存在下调趋势 (例如 *ednrb*、*ednra*、*tyr*、*mitfa* 和 *dct*)。结果

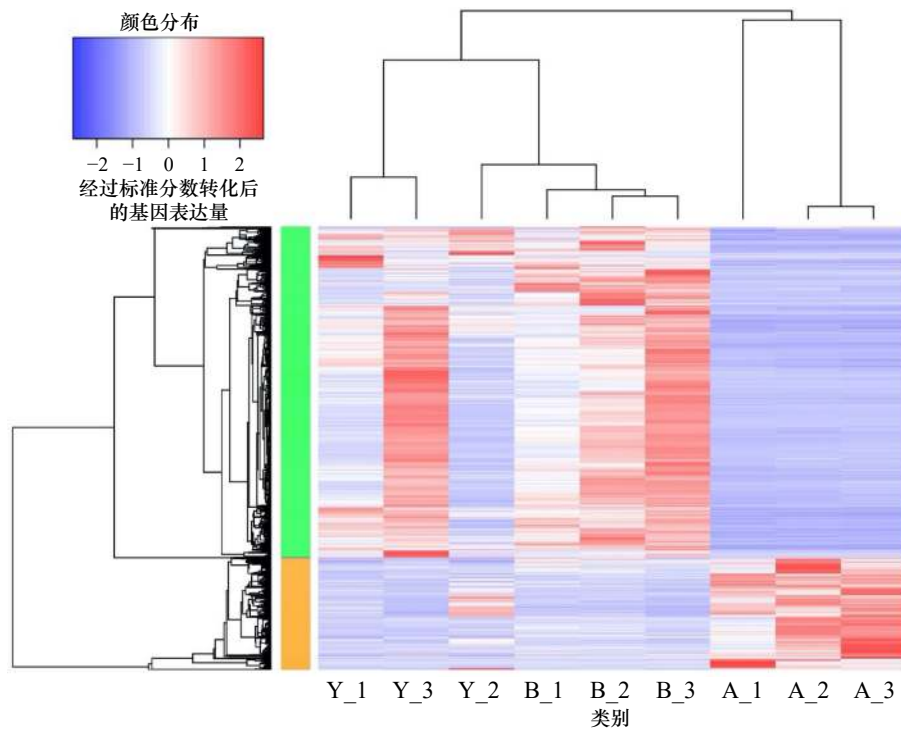


图 2 基于差异表达基因对 3 种样本和基因进行层次聚类

Fig. 2 Hierarchical clustering of 3 samples and genes using differentially expressed genes

对 3 种颜色的皮肤样品组间的差异基因绘制基因表达值的热图, 并进行聚类分析, 结果显示, 相同组别的样品能聚为一类, 说明这些组间的差异基因能够反映组间的核心差异; 图中蓝色与红色分别代表了低表达与高表达基因, A 表示白色皮肤组织, B 表示黑色皮肤组织, Y 表示黄色皮肤组织

A heatmap of gene expression values is drawn for the differential genes between the three color skin sample groups, and cluster analysis is performed, the results show that the samples of the same group can be grouped into one category, indicating that the differential genes between these groups can reflect the core differences between the groups; blue and red in the figure represent low- and high-expressed genes, and A represents white skin tissue, B represents black skin tissue, Y represents yellow skin tissue

显示, 虽然多数基因表达水平没有出现显著下调, 但参与黑色素合成的 25 个基因在白化皮肤中的表达水平出现了明显的降低 (图 4)。此外, 我们还发现了在 Hedgehog 信号通路和 Wnt 信号通路中的 DEGs (包括 *wnt9b*、*wnt5b*、*wnt11* 和 *wnt3a*), 显示出从黑色到黄色到白化样本其表达水平逐渐降低的现象。以上结果表明, 这些基因在黄色和白化皮肤组织中的抑制表达可能会阻断信号传导过程和下游生物合成途径 (包括黑色素生物合成)。因此, 通过多个信号通路的基因表达水平研究表明, 毕加索小丑鱼的白色皮肤的产生可能是由多个信号通路上的异常基因表达共同引起的。

### 3.4 使用实时荧光定量 PCR 进行差异表达基因验证

为了验证以上分析结果, 我们使用黑色素生物合成通路中 5 个核心的 DEGs (*adcy5*、*creb3l2*、*ednrb*、*fd2*、*wnt11*) 以及在 A-vs-Y 和 A-vs-B 比较之间随机选择了 10 个 DEGs (*akap7*、*crabp1*、*flt4*、*gng10*、*ivns1abp*、*nkiras1*、*robo4*、*ssbp2*、*tfpi2*、*zdhhc2*) 设计引物, 通过

荧光定量 PCR 相对定量法检测这些基因的表达情况, 并与转录组分析结果进行比较。得到的基因表达量的结果与转录组测序所得结果趋势一致 (图 5)。5 个 DEGs 的表达水平 (例如 *ednrb*) 均显示出一致的变化趋势 (图 5), 证实了转录组分析结果的可靠性。

## 4 讨论

毕加索小丑鱼为黑背心公子小丑鱼 (*Amphiprion percula*) 的遗传变异体<sup>[5]</sup>, 以其不规则的条纹图案和体色深受广大消费者的喜爱, 而在养殖过程中产生的白色皮肤花纹杂乱无章的毕加索小丑鱼极为珍贵, 但其皮肤产生白色皮肤的遗传机制目前仍然未知<sup>[5]</sup>。已有研究表明<sup>[17-18]</sup>, 关键基因的异常表达 (例如 *tyr*) 与白化现象密切相关。在本研究中, 我们对毕加索小丑鱼的同一部位, 但是不同颜色的皮肤组织进行了转录组测序, 确定了小丑鱼不同颜色皮肤组织的 DEGs, 并分析了白色皮肤组织中 DEGs 的生物学功能。

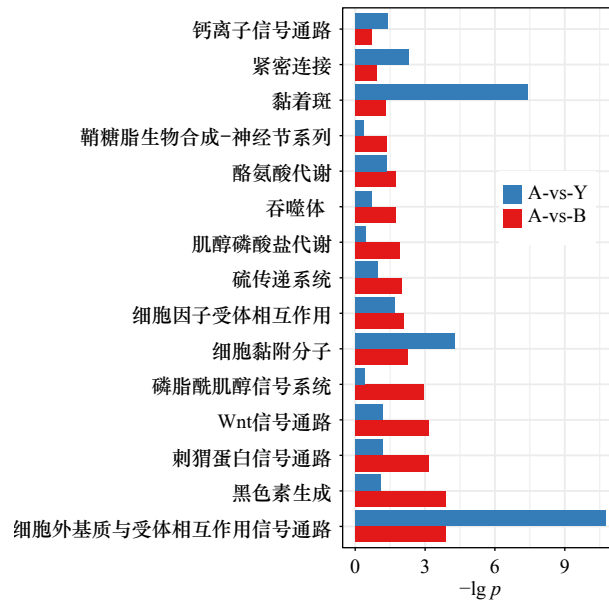


图3 基于白色-黄色(A-vs-Y)和白色-黑色(A-vs-B)皮肤组织的组间差异表达基因生物学功能富集

Fig. 3 Biological function enrichment of intergroup differentially expressed genes based on white-yellow (A-vs-Y) and white-black (A-vs-B) skin tissues

分别将白色皮肤与黄色皮肤之间、白色皮肤与黑色皮肤之间的差异基因进行生物学功能富集分析,结果以柱状图的形式体现;图中的纵坐标表示生物学功能类目,横坐标表示对显著性 $p$ 进行对数计算后的值;柱状图中蓝色表示白色-黄色皮肤组织的组间差异表达基因功能富集结果;红色表示白色-黑色组间差异表达基因功能富集结果

The differential genes between white skin and yellow skin, white skin and black skin are analyzed by biological function enrichment analysis, and the results are shown in the form of a histogram; the ordinate in the figure represents the biological function category, and the abscissa represents the right statistical significance  $p$  is calculated by logarithm; blue in the histogram represents the enrichment results of differentially expressed genes between white skin and yellow skin tissues; red represents the enrichment results of differentially expressed genes between white group and black group

在3种皮肤组织两两比对的差异基因数目中,白色与黑色相比的差异基因数目最多,白色与黄色相比的次之,而黑色与黄色相比的差异基因数目最少,提示在皮肤组织从黑色到黄色再到白色中,存在许多基因的表达受到逐层抑制现象。我们对白色与黑色、白色与黄色相比得到的DEGs进行了KEGG通路的功能富集分析,结果表明,这些DEGs参与了细胞外基质受体相互作用、黑色素生成、Hedgehog信号通路和Wnt信号通路的调控。许多参与细胞外基质受体相互作用的膜受体的基因(如 $lama2/3/4$ 、 $thbs1b/2a/3a/4a$ 、 $vtna$ 和 $argn$ )在白色皮肤组织中表达水平出现显著下调(表1)。有研究结果表明,许多细胞外基质受体相互作用基因可能影响早期色素细胞增殖或分化,进而影响黑色素细胞对肤色的调控<sup>[19]</sup>。Wnt信号通路也与黑色素合成有关,已有研究表明<sup>[20]</sup>,抑制Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路会抑制黑色素生成。有研究报道<sup>[21]</sup>称, $wnt1$ 在调节黑色素细胞的分化方面发挥重要作用,并且 $wnt1$ 基因在Wnt信号通路和Hedgehog信号通路中都起调控作用,本研究发现,毕加索

小丑鱼白色皮肤的 $wnt1$ 基因表达量明显低于黑色皮肤,表明 $wnt1$ 基因在调控小丑鱼皮肤中的黑色素生成方面发挥重要作用。

我们还分析了其他色素细胞中涉及基因的表达水平(包括黄素、红素、虹色素、白细胞和氰基),发现这些基因在黄色和黑色样本之间存在显著的表达差异(表2)。而已有研究显示<sup>[22]</sup>, $Sox5$ 作为 $Pax7a$ 的下游基因发挥作用,控制叶黄素的分化和发育。本实验发现,参与叶黄素分化的 $Sox5$ 基因(表S2,表S3)在白色-黄色和白色-黑色比较中均表现出显著的基因表达差异,这可解释黄色和白化皮肤之间的颜色差异。

有研究显示<sup>[6,10]</sup>,黑色素合成中的核心功能基因出现基因突变是导致许多物种白化现象的重要原因。研究结果显示,多数基因在黑色和白化样本之间表现出差异表达,并且表现出从黑色到黄色再到白化样本逐层递减表达的现象,并观察到参与黑色素合成的3个核心基因( $tyr$ 、 $tyrp1b$ 和 $dct$ )在白色皮肤样本中均出现基因表达量急剧下降现象。我们还发现,大多数差异表达的基因均表现出从黑色到黄色再到白

化样品逐渐降低的表达,与许多参与黑色素生成的重要基因显示出一致的表达模式。如图 4 所示,我们发现 11 个基因(*ednrba*、*calmlb*、*adc5/9*、*kitlga*、*kitb*、*wnt*、*fzd2/9a*、*mitfa*、*tyr*、*tyrp1b* 和 *dct* 基因)的表达水平在黑色样品中最高,但却在黄色和白色样本出现下调。其中, *tyr* 基因负责编码酪氨酸酶,该酶有研究报道是黑色素合成的限速酶<sup>[23]</sup>; *tyrp1* 基因是一种酪氨酸酶相关蛋白,特异性位于黑色素细胞中,参与黑色素合成<sup>[24]</sup>; 而 *kitlga* 基因是编码 KIT 的配体<sup>[25]</sup>, 在调节酪氨酸酶

基因家族的转录和黑色素合成中发挥作用<sup>[26-27]</sup>; *MITF* 基因的突变与人类的白化病有关<sup>[28]</sup>, 并且有研究表明, *MITF* 基因表达量差异会影响黑色素合成和黑色素细胞存活<sup>[29]</sup>。综上所述,我们解析了毕加索小丑鱼不同颜色皮肤组织的转录水平差异基因,发现了一批与黑色素生成密切相关的基因在白色皮肤组织中表达量明显下调的现象,为研究小丑鱼白色皮肤发生机理提供了理论基础,并为今后人为干扰基因表达从而达到调控小丑鱼体色提供理论依据。

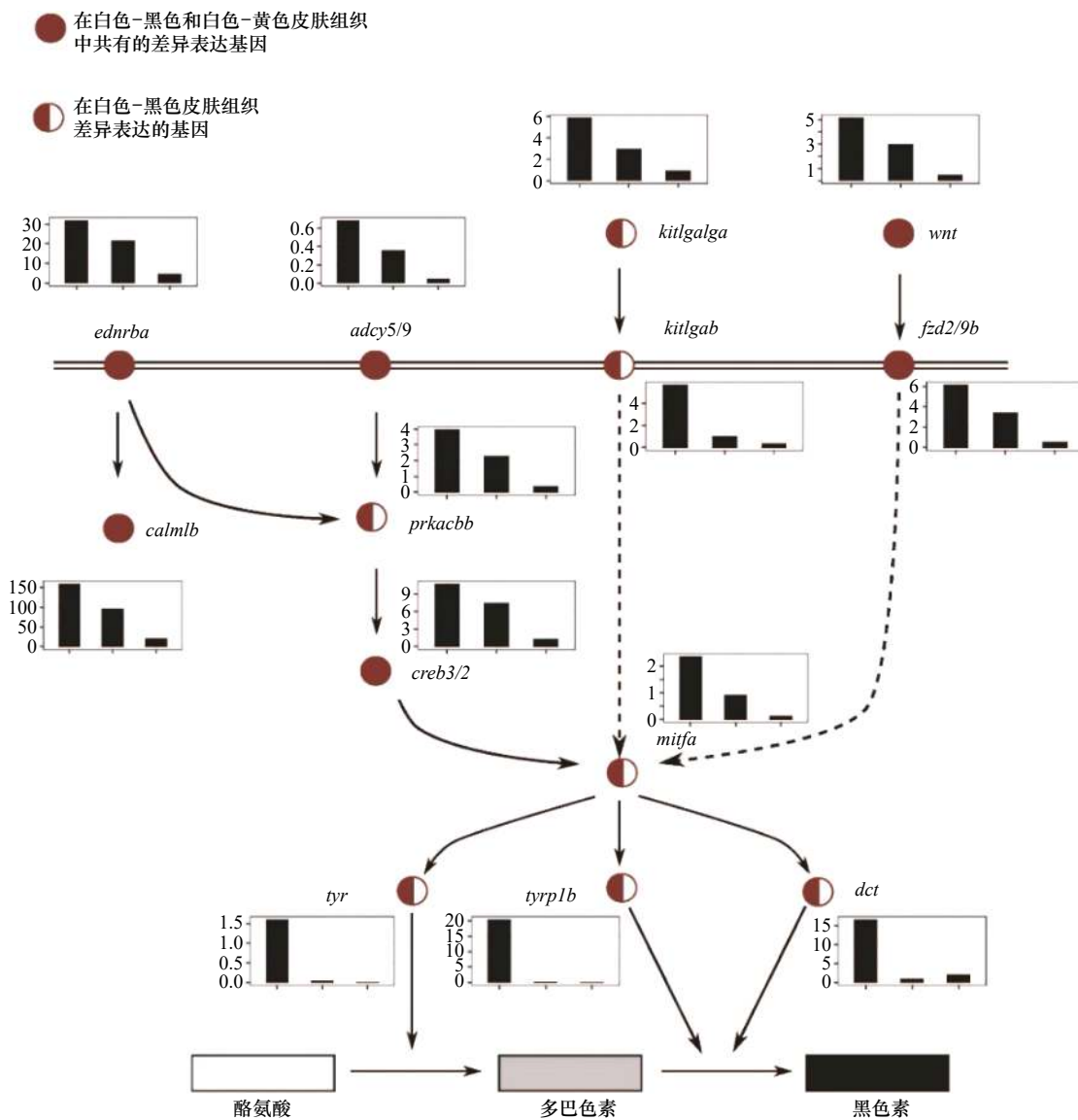


图 4 参与黑色素生成的关键功能基因的表达

Fig. 4 Gene expression for key functional genes involved in the melanogenesis

利用 KEGG 中黑色素生成的信号通路图绘制差异基因的表达量,结果显示,参与黑色素合成的基因在白化皮肤中的表达水平出现了明显的降低;基因表达值的柱状图中,横坐标为皮肤样品分组:黑色、黄色、白色,纵坐标为基因表达值

The genes related to the melanin production signal pathways involved in the differentially expressed gene set are displayed according to the KEGG signal pathway network diagram, the results show that the expression levels of genes involves in melanin synthesis in albino skin decreases significantly, gene expression in the histogram of values, the abscissa is the skin sample grouping: black, yellow, and white, the ordinate is the gene expression value

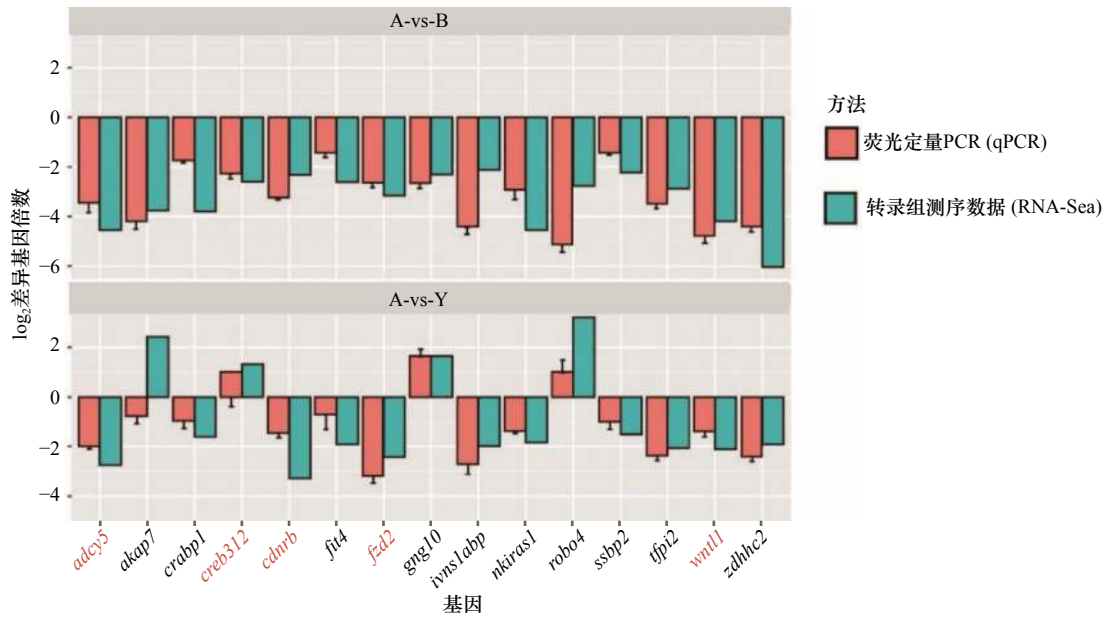


图 5 参与黑色素生成的关键功能基因的验证

Fig. 5 Validation of key functional genes involved in melanin production

对 3 种皮肤中参与黑色素生成的关键功能基因进行了 qPCR 定量检测, 并且与 RNA-Seq 结果进行了比较, 结果显示, qPCR 检测的结果与 RNA-Seq 结果趋势一致; 柱状图中橙色为 qPCR 结果, 绿色为转录组测序结果; 横坐标为基因名称、纵坐标为基因表达差异倍数的指数值  
The qPCR quantitative detection of the three key functional genes involved in melanin production in the three skins is carried out and compared with the RNA-Seq results; the results show that the qPCR detection results are consistent with the RNA-Seq results, the orange in the histogram is the qPCR results, green is the results of transcriptome sequencing; the abscissa is the gene name, and the ordinate is the logarithm value of the gene expression difference multiple

表 1 参与 ECM 受体相互作用的基因表达量

Table 1 Expressions for genes involved in the ECM-receptor interactions

基因	黑色组	黄色组	白化组	p		
				黑色组-白化组	黄色组-白化组	黑色组-黄色组
<i>lama4</i>	9.987 78	9.551 99	1.912 65	0.048 021	0.003 065 8	-
<i>lamb2</i>	2.030 23	1.908 29	0.240 762	0.010 657	-	-
<i>lamc3</i>	2.631 32	1.869 03	0.103 129	0.016 746	2.08×10 <sup>-5</sup>	-
<i>thbs4a</i>	4.882 85	4.003 67	0.478 414	0.004 048 3	0.030 008	-
<i>thbs3a</i>	2.570 68	1.254 72	0.325 228	0.031 983	-	-
<i>thbs1b</i>	5.467 59	3.475 92	0.604 727	0.025 22	0.024 468	-
<i>thbs2a</i>	10.35 64	10.496	1.277 17	0.006 781 1	0.001 110 6	-
<i>vtna</i>	2.027 04	2.436 56	11.291 6	0.003 468 3	0.002 593 6	-
<i>tmn</i>	6.482 15	6.320 78	0.590 092	0.001 820 7	-	-
<i>agr</i>	8.560 42	5.392 49	0.883 212	0.003 222 3	0.010 75	-

注: -代表p值大于0.05, 差异不显著。

表 2 参与色素沉积过程的基因表达量

Table 2 Expressions for genes involved in the pigmentation process

基因	黑色组	黄色组	白化组	p		
				黑色组-白化组	黄色组-白化组	黑色组-黄色组
<i>ctbp2a</i>	6.801 22	7.092 78	1.113 95	0.036 481	0.028 891	-

续表 2

基因	黑色组	黄色组	白化组	<i>p</i>		
				黑色组-白化组	黄色组-白化组	黑色组-黄色组
<i>mchr2</i>	3.631 97	3.477 461	0.014 295	0.011 072	—	—
<i>nfkb1</i>	15.722 4	11.551	2.368 45	0.017 66	—	—
<i>oca2</i>	4.023 96	4.049 391	0.029 648	0.010 23	—	—
<i>pmela</i>	32.245 9	0.477 803	1.195 4	0.005 307 1	—	0.003 714 6
<i>psen2</i>	12.918 4	7.191 93	1.428 85	0.004 749	—	—
<i>sort1a</i>	1.131 69	0.685 34	0.073 58	0.007 554 2	—	—
<i>vdrb</i>	3.722 03	1.365 91	0.326 538	0.013 358	—	—

注:—代表*p*值大于0.05, 差异不显著。

### 参考文献:

- [1] Braasch I, Volf J N, Scharl M. The evolution of teleost pigmentation and the fish-specific genome duplication[J]. *Journal of Fish Biology*, 2008, 73(8): 1891–1918.
- [2] Hubbard J K, Uy J A C, Hauber M E, et al. Vertebrate pigmentation: from underlying genes to adaptive function[J]. *Trends in Genetics*, 2010, 26(5): 231–239.
- [3] Gordon A K. The effect of diet and age-at-weaning on growth and survival of clownfish *Amphiprion percula* (Pisces: Pomacentridae)[D]. Grahamstown: Rhodes University, 1999.
- [4] Marcionetti A, Rossier V, Bertrand J A M, et al. First draft genome of an iconic clownfish species (*Amphiprion frenatus*)[J]. *Molecular Ecology Resources*, 2018, 18(5): 1092–1101.
- [5] He Libin, Wu Shuiqing, Luo Huiyu, et al. The complete mitochondrial genome of the Picasso clownfish: genomic comparisons and phylogenetic inference among Amphiprioninae[J]. *Mitochondrial DNA: Part B*, 2020, 5(3): 2990–2991.
- [6] Oetting W S, King R A. Molecular basis of albinism: mutations and polymorphisms of pigmentation genes associated with albinism[J]. *Human Mutation*, 1999, 13(2): 99–115.
- [7] Oetting W S. Albinism[J]. *Current Opinion in Pediatrics*, 1999, 11(6): 565–571.
- [8] Griffiths G M. Albinism and immunity: whats the link?[J]. *Current Molecular Medicine*, 2002, 2(5): 479–483.
- [9] Xing Lili, Sun Lina, Liu Shilin, et al. Transcriptome analysis provides insights into the mechanism of albinism during different pigmentation stages of the albino sea cucumber *Apostichopus japonicus*[J]. *Aquaculture*, 2018, 486: 148–160.
- [10] Cox M P, Peterson D A, Biggs P J. SolexaQA: at-a-glance quality assessment of Illumina second-generation sequencing data[J]. *BMC Bioinformatics*, 2010, 11(1): 485.
- [11] Kim D, Langmead B, Salzberg S L. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements[J]. *Nature Methods*, 2015, 12(4): 357–360.
- [12] Li Heng, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform[J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(14): 1754–1760.
- [13] Pertea M, Kim D, Pertea G M, et al. Transcript-level expression analysis of RNA-seq experiments with HISAT, StringTie and Ballgown[J]. *Nature Protocols*, 2016, 11(9): 1650–1667.
- [14] Young M D, Wakefield M J, Smyth G K, et al. Gene ontology analysis for RNA-seq: accounting for selection bias[J]. *Genome Biology*, 2010, 11(2): R14.
- [15] Xie Chen, Mao Xizeng, Huang Jiaju, et al. KOBAS 2.0: a web server for annotation and identification of enriched pathways and diseases[J]. *Nucleic Acids Research*, 2011, 39(S2): W316–W322.
- [16] Ding Kui, Zhang Libin, Sun Lina, et al. Transcriptome analysis provides insights into the molecular mechanisms responsible for evisceration behavior in the sea cucumber *Apostichopus japonicus*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 2019, 30: 143–157.
- [17] Lavado A, Jeffery G, Tovar V, et al. Ectopic expression of tyrosine hydroxylase in the pigmented epithelium rescues the retinal abnormalities and visual function common in albinos in the absence of melanin[J]. *Journal of Neurochemistry*, 2006, 96(4): 1201–1211.
- [18] Smircich P, Eastman G, Bispo S, et al. Ribosome profiling reveals translation control as a key mechanism generating differential gene expression in *Trypanosoma cruzi*[J]. *BMC Genomics*, 2015, 16(1): 443.
- [19] Ren Hangxing, Wang Gaofu, Jiang Jing, et al. Comparative transcriptome and histological analyses provide insights into the prenatal skin pigmentation in goat (*Capra hircus*)[J]. *Physiological Genomics*, 2017, 49(12): 703–711.
- [20] Cho M, Ryu M, Jeong Y, et al. Cardamonin suppresses melanogenesis by inhibition of *Wnt/β*-catenin signaling[J]. *Biochemical and Bio-*



- physical Research Communications, 2009, 390(3): 500–505.
- [21] Dunn K J, Brady M, Ochsenbauer-Jambor C, et al. WNT1 and WNT3a promote expansion of melanocytes through distinct modes of action[J]. *Pigment Cell Research*, 2005, 18(3): 167–180.
- [22] Nagao Y, Suzuki T, Shimizu A, et al. Sox5 functions as a fate switch in medaka pigment cell development[J]. *PLoS Genetics*, 2014, 10(4): 1004246.
- [23] Tief K, Hahne M, Schmidt A, et al. Tyrosinase, the key enzyme in melanin synthesis, is expressed in murine brain[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1996, 241(1): 12–16.
- [24] Ghanem G, Fabrice J. Tyrosinase related protein 1 (TYRP1/gp75) in human cutaneous melanoma[J]. *Molecular Oncology*, 2011, 5(2): 150–155.
- [25] Picardo M, Cardinali G. The genetic determination of skin pigmentation: *KITLG* and the *KITLG/c-Kit* pathway as key players in the onset of human familial pigmentary diseases[J]. *Journal of Investigative Dermatology*, 2011, 131(6): 1182–1185.
- [26] Fang Dong, Tsuji Y, Setaluri V. Selective down-regulation of tyrosinase family gene *TYRP1* by inhibition of the activity of melanocyte transcription factor, *MITF*[J]. *Nucleic Acids Research*, 2002, 30(14): 3096–3106.
- [27] Seo E Y, Jin S P, Sohn K C, et al. *UCHL1* regulates melanogenesis through controlling *MITF* stability in human melanocytes[J]. *Journal of Investigative Dermatology*, 2017, 137(8): 1757–1765.
- [28] George A, Zand D J, Hufnagel R B, et al. Biallelic mutations in *MITF* cause coloboma, osteopetrosis, microphthalmia, macrocephaly, albinism, and deafness[J]. *The American Journal of Human Genetics*, 2016, 99(6): 1388–1394.
- [29] Hornyak T J, Hayes D J, Chiu L Y, et al. Transcription factors in melanocyte development: distinct roles for *Pax-3* and *Mitf*[J]. *Mechanisms of Development*, 2001, 101(1/2): 47–59.

## 补充材料

表 S1 验证黑色素生成关键功能基因表达的荧光定量 PCR 引物

表 S2 白化与黄色皮肤之间的差异基因

表 S3 白化与黑色皮肤之间的差异基因

表 S4 黄色与黑色皮肤之间的差异基因

表 S5 白色与黑色皮肤之间的差异基因的功能富集分析结果

表 S6 白色与黄色皮肤之间的差异基因的功能富集分析结果

表 S7 不同皮肤之间的差异基因的信号通路富集分析结果

补充材料可通过 <https://www.hyxbocan.cn/> 获取。补充材料未进行排版和编辑, 内容的准确性和科学性由作者承担。

## Transcriptome analysis identifies candidate genes related to albinism mechanism in the skin of the Picasso clownfish

He Libin<sup>1,2</sup>, Huang Zhen<sup>2,3</sup>, Wu Shuiqing<sup>1</sup>, Zheng Leyun<sup>1</sup>

(1. Fisheries Research Institute of Fujian, Xiamen 361013, China; 2. College of Life Science, Fujian Normal University, Fuzhou 350117, China; 3. Fujian Key Laboratory of Special Marine Bio-resources Sustainable Utilization, Fuzhou 350117, China)

**Abstract:** Picasso clownfish is named for its disorderly and abstract distribution of white patches in its skin. At the same time, due to the irregular and scarce formation of white patches, it belongs to a valuable clownfish. Therefore, analyzing the formation mechanism of skin white spots in Picasso clownfish can provide a theoretical basis for the artificial breeding of Picasso clownfish. In this study, we sequenced the transcriptome of the skin of three color blocks (black, yellow and white) in the same part of the body between the dorsal fin and hip fin of Picasso clown-

fish. The results show that there are a large number of differentially expressed genes (DEGs) in white skin compared with yellow and black skin. Among them, the genes in the signal pathways related to melanin production (such as melanin production, hedgehog and Wnt signal pathways) show a downward trend in white skin tissue. The expression of upstream regulatory genes (such as *ednrba* and *mitfa*) decrease gradually from black to yellow to white skin tissue, but the expression of downstream core genes involved in melanin synthesis (including *Tyr*, *tyrp1b* and *dct*) decreases significantly in white skin assembly. Finally, the validity of transcriptome data is verified by fluorescence quantitative PCR. The results of this study will provide a theoretical basis for future people to interfere with gene expression to regulate clownfish body color.

**Key words:** albinism; Picasso clownfish; transcriptome sequencing; differentially expressed gene