

橘色双冠丽鱼体色相关基因 *mc1r* 的组织表达分析

周康奇^{①②} 宋红梅^① 潘贤辉^{①②} 刘奕^① 蒋燕玲^① 杨叶欣^①
牟希东^① 刘超^① 胡隐昌^{①*} 郑曙明^{②*}

① 农业农村部休闲渔业重点实验室, 广东省现代休闲渔业工程技术研究中心, 中国水产科学研究院珠江水产研究所 广州 510380;

② 西南大学, 淡水鱼类资源与生殖发育教育部重点实验室 重庆 400700

摘要: 黑素皮质素受体 1 基因 (*mc1r*) 是动物体色形成的关键调控因子, 为探讨 *mc1r* 基因在橘色双冠丽鱼 (*Amphilophus citrinellus*) 体色褪黑过程中的调控作用, 本研究利用 cDNA 末端快速克隆 (RACE) 技术首次获得橘色双冠丽鱼 *mc1r* 的 cDNA 全序列, 并利用荧光定量 PCR 分析了橘色双冠丽鱼体色变化不同时期和不同组织中 *mc1r* 基因的表达差异。获得 cDNA 全长序列 1 699 bp, 共编码氨基酸 325 个, 开放阅读框 (ORF) 为 978 bp, 5'非编码区 (UTR) 497 bp, 3'非编码区 (UTR) 224 bp。氨基酸序列和系统发育分析表明, 橘色双冠丽鱼与人 (*Homo sapiens*)、斑马鱼 (*Danio rerio*)、大黄鱼 (*Larimichthys crocea*) 和尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 相似度分别为 55.1%、77.1%、90.15% 和 96.92%。荧光定量 PCR 结果表明, *mc1r* 在橘色双冠丽鱼胚胎发育 9 个时期均有不同程度的表达, 且随着胚胎发育表达量逐渐减少, 推测在胚胎发育的早期阶段该基因的基础表达水平即可启动参与体色细胞形成的腺苷酸循环。在“黑色-灰白色-黄色”三个体色蜕变期, *mc1r* 在尾鳍、鳞片、皮肤的表达均呈先降低再稍升高的变化趋势, 均在灰白色过渡期呈现最低值, 推测这与 *mc1r* 和 *Agouti* 存在竞争性结合, 及 *mc1r*、*tyr*、*tyr1* 三者是否处于适当、平衡状态有关。橘色双冠丽鱼长至近成鱼期, 非正常褪黑鱼 (即未完全褪黑) 各组织 *mc1r* 表达量均比正常褪黑鱼 (完全褪黑) 高, 其中皮肤组织的相对表达量显著高于正常褪黑鱼 ($P < 0.05$), 可见鱼体体表褪黑程度与 *mc1r* 表达量呈负相关。在成熟鱼体 11 个组织中 *mc1r* 均有不同程度的表达, 其中, 鳞片显著高于其他组织 ($P < 0.05$), 说明橘色双冠丽鱼 *mc1r* 的主要表达部位是鳞片。本研究通过了解体色变异相关基因表达特征, 为鱼类体色遗传和体色改良研究积累资料。

关键词: 橘色双冠丽鱼; 黑素皮质素受体 1 基因 (*mc1r*); 克隆; 表达分析; 褪黑

中图分类号: Q786 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2019) 01-45-12

Expression Analysis of *mc1r* Gene Relating to Body Color Variation in *Amphilophus citrinellus*

基金项目 国家自然科学基金青年基金项目 (No. 802037), 广东省渔港建设和渔业产业发展专项 (No. A201601C09), 国家产种质资源共享服务平台“珠江水系种质资源标准化整理、整合与共享”项目 (No. 2018DKA30470);

* 通讯作者, E-mail: huyc22@163.com, zhsm22@163.com;

第一作者介绍 周康奇, 女, 硕士研究生; 研究方向: 观赏鱼遗传育种; E-mail: 2472797247@qq.com.

收稿日期: 2018-05-28, 修回日期: 2018-09-19 DOI: 10.13859/j.cjz.201901007

ZHOU Kang-Qi^{①②} SONG Hong-Mei^① PAN Xian-Hui^{①②} LIU Yi^① JIANG Yan-Ling^①
 YANG Ye-Xin^① MU Xi-Dong^① LIU Chao^① HU Yin-Chang^{①*} ZHENG Shu-Ming^{②*}

① Key Laboratory of Recreational Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guangdong Modern Leisure Fisheries Engineering Technology Center, Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380; ② The Key Laboratory of Freshwater Fish Resources and Reproductive Development of the Ministry of Education, China Southwest University, Chongqing 400700, China

Abstract: Melanocortin receptor 1 gene (*mc1r*) is a crucial regulatory factor for body color formation in animals. In order to explore the role of *mc1r* gene during body color variation in *Amphilophus citrinellus*, *mc1r* full-length cDNA was obtained for the first time by rapid-amplification of cDNA ends (RACE) technique. The total length of *mc1r* was 1 699 bp containing 497 bp 5' untranslated region (UTR), 224 bp 3'-UTR, and 978 bp open reading frame (ORF) encoding 325 amino acids (Fig. 1). Sequence analysis of amino acids and phylogenetic analysis indicated that the similarity of *mc1r* encoded protein sequence of *A. citrinellus* showed 55.1%, 77.1%, 90.15% and 96.92% similarity with that of *Homo sapiens*, *Danio rerio*, *Larimichthys crocea* and *Oreochromis niloticus*, respectively (Fig. 4). Analysis revealed that *mc1r* was expressed at different levels in all 9 embryonic periods. With the development of embryo, the expression level of *mc1r* decreased gradually (Fig. 7). The results suggested that the basic expression level of *mc1r* initiated adenylate cycle in early stage of embryonic development, then involved in the formation of pigment cells. In three periods of body color changes (black to hoar to yellow), the expression of *mc1r* was decreased first and then increased slightly in caudal fin, scales and skin and its expression was the lowest in the gray white transition stage (Fig. 8). It was presumed that there might be a competitive combination between *mc1r* and *Agouti*, and that the color might be related to appropriate balance among three genes, *mc1r*, *tyr*, and *tyr1* in the process of body color changes of *A. citrinellus*. When the fish grew to near maturity, individuals with incomplete black-fading showed higher *mc1r* expression compared to those with complete black-fading ($P < 0.05$, Fig. 9), and surface melatonin was negatively correlated with the *mc1r* expression. *mc1r* gene was expressed in all 11 tissues, and its expression in scale was significantly higher than in other tissues ($P < 0.05$, Fig. 10). The present study revealed expression features of genes related to color variation, and the data are important for further studying fish body color heredity and body color improvement.

Key word: *Amphilophus citrinellus*; Melanocortin receptor 1 (*mc1r*); Cloning; Expression analysis; Melatonin

黑素皮质素受体1(melanocortin receptor 1, MC1R)是促黑色素细胞激素(melanocyte stimulating hormone, MSH)的受体,为黑素皮质素受体(melanocortin receptor, MCRs)家族成员之一,由毛色扩展位点编码形成,具有G蛋白亲和受体的跨膜特点。MC1R蛋白有7个跨膜结构域以及两个配体(杨永升等 2004)。当*mc1r*基因分别与 α -促黑色素激素(α -MSH)和促肾上腺皮质激素(adrenocorticotropi,

ACTH)两个配体结合时,激活环腺苷酸酶,经由G蛋白耦合的环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)信号通路,引起cAMP含量上升,调节黑色素细胞内的一系列级联反应,提高酪氨酸酶(tyrosinase, TYR)的表达量,进而使黑色素细胞增殖(Fitzgerald et al. 2006),因此*mc1r*基因对动物体色的形成起到重要调控作用。目前在人(Adalsteinsson et al. 1987)、羊驼(*Vicugna pacos*)(任玉红等 2012)、

貉 (*Nyctereutes procyonoides*) (孙静 2012) 等高等脊椎动物中的 *mc1r* 结构、功能和信号通路已有较为深入研究, 在瓯江彩鲤 (*Cyprinus carpio* var. *color*) (胡建尊等 2013)、大菱鲂 (*Scophthalmus maximus*) (郭忠宝等 2009) 等少数鱼类中也开展了初步研究。

橘色双冠丽鱼 (*Amphilophus citrinellus*) 隶属鲈形目 (Perciformes) 慈鲷科 (Cichlidae) 双冠丽鱼属, 又称红魔鬼鱼。从仔鱼到幼鱼生长过程中出现典型的“体色褪黑”现象, 呈现“黑-灰-黄”三个变化阶段。目前, 已有学者在血鸚鵡鱼 (*Cichlasoma synspilum* ♀ × *Cichlasoma citrinellum* ♂) (林永丰 2010)、金鱼 (*Carassius auratus*) 和眼斑星丽鱼 (*Astronotus ocellatus*) 等鱼类中都观察到相似的褪黑现象 (蒋燕玲等 2016), 前期褪黑是否完全是决定鱼后期扬色效果的关键。鱼类体色形成涉及到遗传、营养及环境等多个因素的影响, 从遗传角度, 围绕黑色素合成通路相关基因的调控是研究鱼类早期体色褪黑这一复杂生物学特征的切入点, 蒋燕玲 (2016) 围绕黑色素合成通路中的酪氨酸酶基因 (*tyr*) 发现, 在橘色双冠丽鱼三个典型体色蜕变期中 *tyr* 相对表达量逐渐降低, 可能与各种色素细胞的分布比例有潜在关系 (蒋燕玲 2016); 林永丰 (2010) 在对血鸚鵡鱼各褪黑时期黑色素的生成及调控研究中, 认为酪氨酸酶不单参与黑色素的生成, 且其中间产物多巴 (dopa) 也是其他生化反应的原料, 这些研究为阐明鱼类褪黑机制积累了资料。本文旨在获得橘色双冠丽鱼 *mc1r* 基因 cDNA 序列全长, 了解该基因结构特点, 以及通过实时荧光定量 PCR 方法分析 *mc1r* 在橘色双冠丽鱼不同组织和不同时期的表达模式, 探讨 *mc1r* 基因在该种鱼体色褪黑过程中的表达特征及其功能, 为深入了解橘色双冠丽鱼体色褪黑分子机制奠定基础, 为鱼类体色遗传与体色改良相关研究提供资料。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

本实验材料橘色双冠丽鱼, 采自中国水产科学研究院珠江水产研究所观赏鱼基地。首先对亲鱼进行 10 d 左右的暂养, 挑选健硕无伤亲鱼进行雌雄 1:1 配对, 每对亲鱼单独培育, 使其自然产卵。通过早期鱼苗培育技术对受精卵进行孵育, 获得卵裂期、囊胚期、原肠期、视泡期、神经胚期、心形成期、血液循环期、出膜期、出膜 1 d 共 9 个时期的胚胎样本 ($n=3$); 将出膜的小鱼继续培养长大, 在鱼成长过程中呈现“黑色-灰白色-黄色”三个褪黑阶段, 在三个阶段分别取样, 各阶段取 6 尾鱼的尾鳍、鳞片、皮肤样本 ($n=3$); 长至约 4 月龄时 (正常鱼应完成褪黑), 分别对褪黑完全和褪黑未完全的鱼进行取样, 各取 6 尾鱼的尾鳍、鳞片、皮肤的样本 ($n=3$); 长至成熟时, 对亮黄色鱼的尾鳍、鳞片、皮肤、眼、脑、鳃、心、肾、性腺、肌肉、鳔等 11 种组织进行取样 ($n=3$)。所取材料均用液氮速冻后保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱, 用于 RNA 提取。

1.2 *mc1r* 的 cDNA 全长克隆

总 RNA 的提取及 cDNA 第一链的合成, 取 2 份成熟橘色双冠丽鱼皮肤样品, 使用试剂盒 Tissue RNA Kit (OMEGA) 提取总 RNA, 通过电泳和 SynergyTM NEO HTS 多功能酶标仪检测 RNA 的完整性和纯度及浓度, 用反转录试剂盒 PrimeScriptTM II1st Strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa) 反转录获得 cDNA 第一链, 置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

从 NCBI 的 GenBank 数据库中搜索与橘色双冠丽鱼近缘物种的 *mc1r* 序列, 通过软件 BioEdit 比对确定保守区, 参考莫桑比克罗非鱼 (*Oreochromis mossambicus*) (CAI38756.2)、伯氏朴丽鱼 (*Astatotilapia burtoni*) (NP001302476.1) *mc1r* 序列设计橘色双冠丽鱼 *mc1r* 保守序列引物 *mc1r*-F 和 *mc1r*-R (表 1), 由广州艾基生物技术有限公司合成。50 μl PCR 体系包括 ddH₂O 37.8 μl , 2.5 mmol/L dNTPs 4 μl , 10 × Buffer 5 μl , 模板 cDNA 1.2 μl , 上下游引

物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 各 0.8 μl , rTaq 0.4 μl 。反应参数: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 60 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 60 s, 30 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。PCR 产物用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳分离, 切胶, 胶回收用试剂盒 TIANGel Midi Purification Kit (TIANGEN), 再将胶回收产物连接到 pMD19-T Vector (TaKaRa) 载体上, 随后转化到大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 感受态细胞 (TaKaRa), 筛选阳性克隆测序。

根据测序结果设计 3'RACE 巢式 PCR 引物 *mc1r*-3'n 和 *mc1r*-3'w, 5'RACE 巢式 PCR 引物 *mc1r*-5'n 和 *mc1r*-5'w (表 1), 用 SmarterRace5'/3'Kit Components (TaKaRa) 分别扩增 *mc1r* 的 3'端和 5'端序列, 再分别进行胶回收、连接、转化、克隆和测序。将 *mc1r* 中间序列、3'端序列及 5'端序列通过 VectorNTI 软件进行拼接, 得到完整的橘色双冠丽鱼 *mc1r* cDNA 序列 (图 1)。

1.3 *mc1r* 的时空表达

用 RNA 提取试剂盒分别提取各样本总 RNA, 用 SynergyTM NEO HTS 多功能酶标仪测定其 RNA 浓度和纯度, 取 1.5 ng RNA 用 PrimrScript RT Reagebt Kit with gDNA Erase (TaKaRa) 反转录成 cDNA。

选用橘色双冠丽鱼 β -actin (登录号 NC-023526) 作为内参基因, 引物 β -actin-RT-F 和 β -actin-RT-R (表 1)。根据测得的橘色双冠丽鱼 *mc1r* 的 cDNA 序列设计一对荧光定量 PCR 引物 *mc1r*-RT-F 和 *mc1r*-RT-R (表 1), 其扩增片段大小约 200 bp。分别将 β -actin-RT-F 和 β -actin-RT-R, 以及 *mc1r*-RT-F 和 *mc1r*-RT-R 两对引物的 PCR 扩增产物连接到 pMD19-T Vector 载体上, 并转入大肠杆菌感受态细胞中, 经测序比对后, 将阳性克隆菌落进行扩大培养, 用 TIANprep Mini Plasmid Kit (TIANGEN) 提取质粒。

纯化后的质粒用 SynergyTM NEO HTS 多功能酶标仪测定浓度, 对标准样品进行 10 倍连续梯度稀释, 共设 12 个浓度, 分别为原浓

表 1 实验中合成的引物

Table 1 Synthetic primers in experiments

引物名称 Primer code	引物序列 (5' - 3') Primer sequence (5' - 3')
<i>mc1r</i> -F	GAGCGAAACTGGCTGAACT
<i>mc1r</i> -R	CAGGCGAGGATGAGGATAA
<i>mc1r</i> r-3'n	GCCCTTTCTTTCTACACCTTATCC
<i>mc1r</i> -3'w	GCCAATCCACAAGTATGAAGG
<i>mc1rr</i> -5'n	TGAAGTAGTACATAGGCGAGTGC
<i>mc1r</i> -5'w	ATGACGTTGTCCAGGTGGC
<i>mc1rr</i> -RT-F	TACCTTTAGTGGTTGCCAGAGACG
<i>mc1r</i> -RT-R	TCACACGCCCGAAGCAAAAAGAACAC
β -actin-RT-F	TTGTTTCAGCCAGTTCCC
β -actin-RT-R	AACCAAACCTGCATTTCG

度的 $10^{-1} \sim 10^{-12}$ 倍, 用 QuantStudio6 Flex 仪器和软件制作标准曲线, 所有标准曲线 R^2 均大于 0.99, 斜率在 -3.3 左右, 视为标准曲线制作成功。用 SYBR Green Master Mix 试剂盒, 在 QuantStudio6 Flex 仪器上进行荧光定量 PCR 反应。

荧光定量 PCR 体系: 共 20 μl , 含 ddH₂O 8 μl , 上下游引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 各 0.5 μl , SYBR Green Master Mix 10 μl , cDNA 1 μl 。反应条件: 50 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 40 个循环; 溶酶曲线: 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s。用 QuantStudioTM Real-Time PCR Software v1.2 软件计算每个样品 (1 μl) 的目的基因和内参基因扩增后的拷贝数 (quantity, Qty), 每个样品的目的基因与内参基因拷贝数值之比即为目的基因相对表达量, 公式为 $P = \frac{\sum_n x_i/n}{\sum_n y_i/n}$, 式中, P 表示相对表达量, x_i 表示第 i 个样本目的基因的表达式, y_i 表示第 i 个样本内参基因表达式, n 表示样本数量。数据分析运用 SPSS 20 软件进行单因素方差分析 (One-Way ANOVA) 和多重比较 (Duncan) 分析差异显著性, 得到 *mc1r* 基因在橘色双冠丽鱼各组织的相对表达量。

2 结果

2.1 橘色双冠丽鱼 *mc1r* 的 cDNA 全长和氨基酸序列分析

本研究利用 cDNA 末端快速克隆技术 (rapid-amplification of cDNA ends, RACE), 通过 VectorNTI 软件拼接获得橘色双冠丽鱼 *mc1r* 的 cDNA 全序列 1 699 bp (登录号 2078989), 5'非编码区 (untranslated region, UTR) 为 497 bp, 3'-UTR 为 224 bp, 开放阅读框 (open reading frame, ORF) 为 978 bp, 共编码氨基酸 325 个。3'端具有典型性 AATAAA 加尾信号和 Poly(A) 尾 (图 1)。用 ProtParam 和 ProtScale 软件预测显示, MC1R 蛋白的分子量约为 36.97 ku, 理论等电点 pI 为 6.65, 亲水性系数为 0.799, 表明为疏水性。运用 SignalP 4.1 程序分析, 其信号肽剪切位点分值 (C) 的最大值为 0.108, 剪

切位点分值 (Y) 的最大值为 0.118, 信号肽区域分值 (S) 的最大值为 0.204, 均小于 0.5 阈值, 因此推测该蛋白不含有信号肽。用 TMHMM 和 NCBI 中 Conserved Domains 程序分析, 该蛋白含有 7 个跨膜区域, 其中, 51 ~ 70 氨基酸处为第一个跨膜区, 第 2 ~ 7 个跨膜氨基酸位置分别为 83 ~ 103、125 ~ 147、168 ~ 190、200 ~ 222、243 ~ 265 和 280 ~ 302 (图 2), 只含 1 个保守域 (7tm-GPCRs, 图 3)。用 NetPhos 2.0 和 NetNGlyc 1.0 软件程序分析得到, 该蛋白包含 6 个丝氨酸磷酸化位点、2 个苏氨酸磷酸化位点和 1 个酪氨酸磷酸化位点, 仅在 5'端有 3 个 N-糖基化位点, 且无 O-糖基化位点。使用 SOPMA 预测该蛋白二级结构, 该蛋白二级结构存在 α 螺旋、 β 折叠、无规则卷曲和延

```

1  GCA GTG GTA TCA ACG CAG AGT ACA TGG GGC TCT TCT CAA AGA CGG TGT TCA CTG TCA CCA TGT TGC AAG AAT TTT GGC GGA TGG GGT GTC
91  TGA GTG AAA ACA TGA ACT TCG TGC GCA ATG TTT TGA TGG ATA AGA AAA TGT TAC AGA OCT COG TTC CAG ATT ACA CGA GTC GTG AGA CGC
181 ACC TTT AAT CGG GAC AAA CTC TCC GAA GAG TTT TTA GGT TAA TTA ATG GTT GAA ATA AAT ACC CTT AGA CTG TTA GCG TGG ACT CTG TGG
271 ATA CTG GAC AGT CGA GGC TTT CAT GGG TTT AAC AAT TAA ACA GTT CGG ATG AGA AGC TTG AIT TTC CAA CTG GCT GAG AAG CAA OCT GTA
361 ACT GCA ACA GCT GAT GCC GAA GCA TOC TGT AAA CTA CGG AGA CAG CTG ATG AAA CTT TTT CAT TTT GAC ACT TTG CTG CAG TAA AAC CCA
451 AAC AGA GCA OCT GCA AAA CTG TCA GTT ATC TCA CTG AAG TCA GAT ATG GAA ATG ACC AAC GGG TCT CTG CAG TAC COC TCC ATA CTT CAC
M E M T N G S L Q Y P S I L H
541 GCG GAC TTC GCG GCG CTA AAT GAC TAT ATG GAG GAG AAC GAA ACC AAC TOC ACC GTT GGA GAG CGA AAC TGG CTG AAC TGC GTT CAG ATC
A D F G A L N D Y M E E N E T N S T V G E R N W L N C V Q I
631 CGG ATA CCC CAG GAG CTC TTC TTG GCG CTG GGG CTC ATC AGT CTG GTG GAG AAC ATC TTG GTC ATC CTG GCG AIT ATT AAA AAC CGA AAC
R I P Q E L F L A L G L I S L V E N I L V I L A I I K N R N
721 CTG CAC TGG OCT ATG TAC TAC TTC ATC TGC TGT CTG GOC GTG TOC GAC ATG CTT GTC AGC GTC AGC AAC GTG GCG GAG ACC ATA TTC ATG
L H S P M Y Y F I C C L A V S D M L V S V S N V A E T I F M
811 CTT CTT AAT GAT CAC GGT CTT CTG GAT GTG CAC OCT GGT ATG CTG CCG CAC CTG GAC AAC GTC ATC GAC GTG ATG ATC TGC AGC TCT GTG
L L N D H G L L D V H P G M L R H L D N V I D V M I C S S V
901 GTA TOC TCT CTC TOC TTT TTG TGC ACC ATC GOC GCG GAT CCG TAC ATC ACC ATC TTT TAC GCG CTA OGG TAT CAC AGC ATC ATG ACT ACT
V S S L S F L C T I A A D R Y I T I F Y A L R Y H S I M T T
991 CAC OGA GCC ATC ATC ATC ATC GTG GTG GTG TGG CTG GCC AGC ATC ACG TCC AGC ATC CTC TTC ATC GTG TAT CAC ACC GAC AAT GCT GTC
H R A I I I I V V V W L A S I T S S I L F I V Y H T D N A V
1081 ATC GTG TGC CTC GTT ACC TTC TTC TGC ACT ACT CTG GTA TTC AAC GOC GTG TTG TAC CTG CAC ATG TTT GTC CTG GCG CAC GTG CAT TCT
I V C L V T F F C T I L V F N A V L Y L H M F V L A H V H S
1171 CGG GCG ATC GTG GCT TTC CAC AAA AAC AGG GCG CAA TOC ACA AGT ATG AAG GGT GCG ATT ACT CTC ACG ATC CTG CTA GGG GTC TTT ATT
R R I V A F H K N R R Q S T S M K G A I T L T I L L G V F I
1261 TTA TGC TGG GGC CCT TTC TTT CTA CAC CTT ATC CTC ATC CTC GOC TGC COC ACC AGT TOC TTC TGC AAC TGT TTC TTT OGA AAC TTT AAC
L C W G P F F L H L I L I L A C P T S S F C N C F F R N F N
1351 CTT TTC CTC ATT CTC ATC ATC TGT AAT TCC CTC ATC GAT CCG CTC ATA TAC GOC TAC CCG AGC CAG GAG CTG OGT AAA ACC CTG CAG GAG
L F L I L I I C N S L I D P L I Y A Y R S Q E L R K I L Q E
1441 ATG ATC CTG TGT TCT TTT TGC TTC GGC GTG TGA CAT TGT ACG CAT TCA GGA AAA AAG GCG AGG GCA AAA CAT OGT CCA CTA TCT TCA ACA
M I L C S F C F G V *
1531 TTA TTT ACG AAG ATA AAA CAA GCC ATA AGT GAT ATT TGT TTA AAC TTA CAG ATG TTG COC GTG CAA GAG TGC ACG TGA AAG TTG AAG ACT
1621 CTC TCA TAT AAT AGA CAT TTT AAA AAT AAA ACT GGG TTT GTG TTA GTT ATA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA

```

图 1 橘色双冠丽鱼 *mc1r* 全长 cDNA 序列及其推测氨基酸序列

Fig. 1 The full length cDNA and deduced amino acid sequences of *mc1r* gene in *Amphilophus citrinellus*

方框为起始密码子; *为终止密码子; 下划线为加尾信号; 波浪线为 Poly A 尾。

The letters box showed start codon; "*" symbol for tag termination codon; Underline for adding tail signal with Ploy (A) tail; Wavy line symbol for Ploy (A) tail.

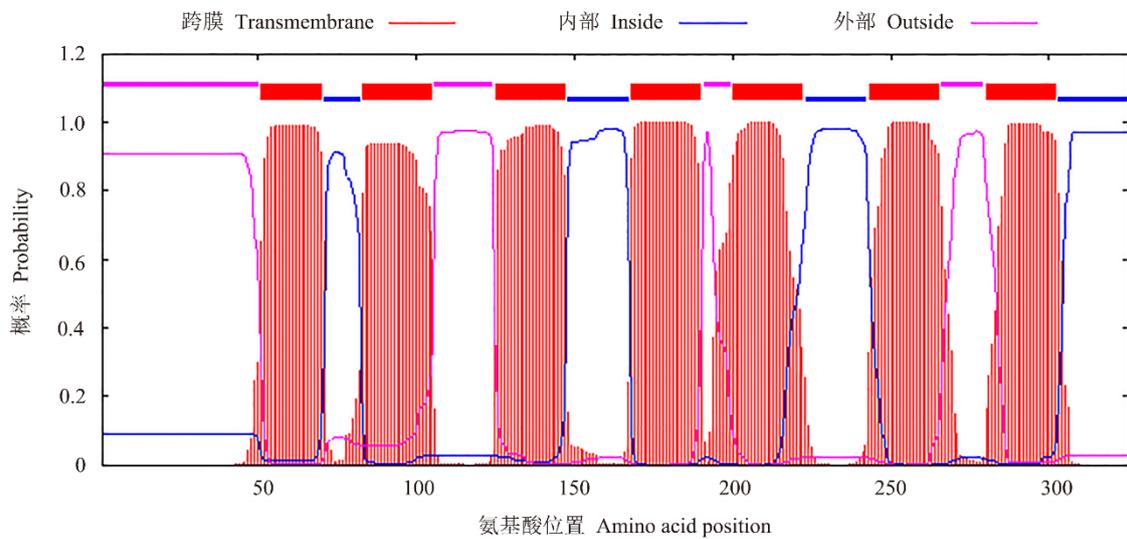


图 2 TMHMM 程序预测的橘色双冠丽鱼 *mc1r* 氨基酸跨膜区域分析

Fig. 2 The prediction of *mc1r* gene protein transmembrane receptors in *Amphiphopus citrinellus* using TMHMM program

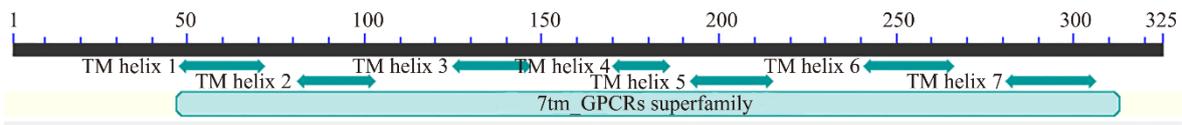


图 3 NCBI 中 Conserved Domains 程序分析橘色双冠丽鱼 MC1R 蛋白含有 1 个保守域 (7tm-GPCRs)

Fig. 3 The prediction of MC1R gene protein containing one conserved domain (7tm-GPCRs) from *Amphiphopus citrinellus* using Conserved Domains program in NCBI

图中刻度为氨基酸排列位置; TM helix 1~7 为螺旋跨膜 1~7。

The scale is the position of amino acids; TM helix 1 - 7 symbol for helical transmembrane.

伸链四种结构, 其中, 163 个 α 螺旋结构, 比例为 50.15%; 28 个 β 折叠结构, 比例为 8.62%; 58 个无规则卷曲结构, 比例为 17.85%; 76 个延伸链结构, 比例为 23.38% (图 4)。用 SWISS-MODEL 预测三级结构也表明, 主要含有 α 螺旋和延伸链结构 (图 5)。

2.2 *mc1r* 同源比对与系统进化树分析

利用 Clustalx 软件将橘色双冠丽鱼 *mc1r* 氨基酸序列与其他 16 个物种进行比对, 其与人、斑马鱼 (*Danio rerio*)、大黄鱼 (*Larimichthys crocea*) 和尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) MC1R 蛋白相似度分别为 55.1%、77.1%、90.15%、96.92%。通过 MAGE 5.2 软件中邻接

法构建进系统树, 哺乳动物与鱼类为两个独立的进化分支, 橘色双冠丽鱼首先与莫桑比克罗非鱼、尼罗罗非鱼、布氏新亮丽鲷 (*Neolamprologus brichardi*)、伯氏朴丽鱼、斑马拟丽鱼 (*Maylandia zebra*) 等亲缘关系最近的慈鲷科鱼类聚为一支, 其中橘色双冠丽鱼 *mc1r* 序列与莫桑比克罗非鱼同源性最高 (97.23%), 与 Clustalx 结果相一致, 其次与尼罗罗非鱼、斑马拟丽鱼、布氏新亮丽鲷达到 96%, 然后与其他鲤科鱼类聚为一支 (图 6)。

2.3 *mc1r* 基因表达差异分析

2.3.1 胚胎不同发育时期 *mc1r* 基因表达 荧光定量 PCR 检测结果显示, *mc1r* 在卵裂期、

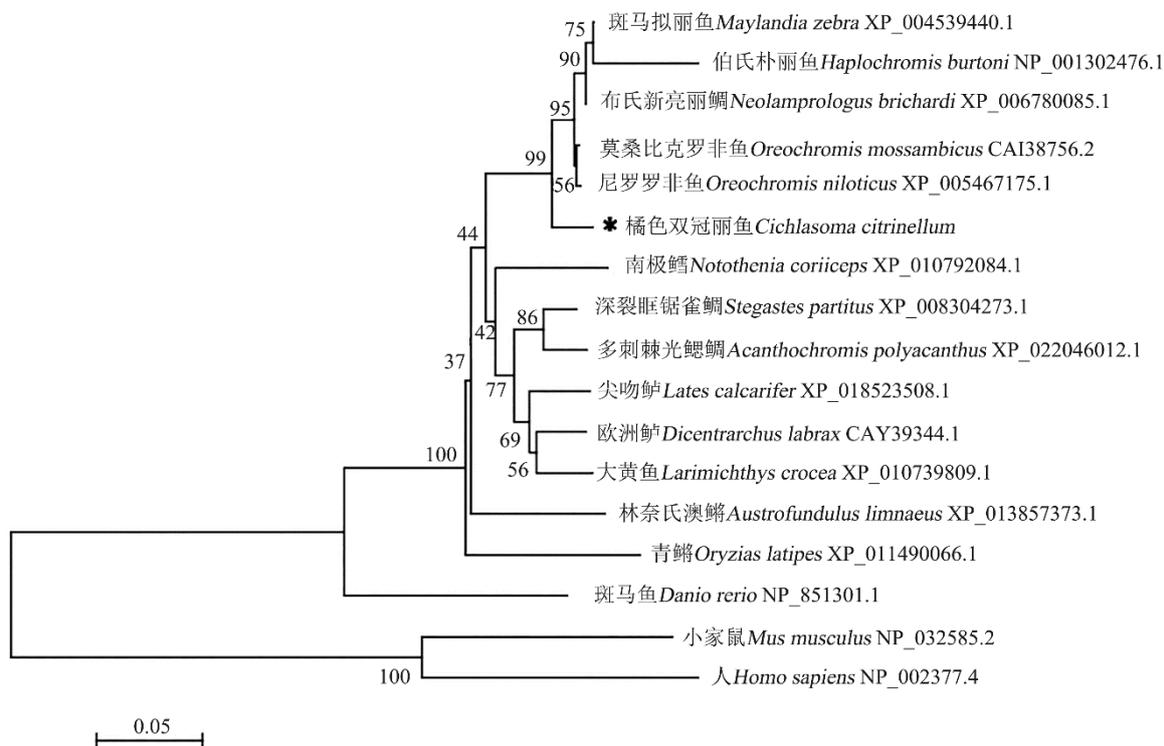


图 6 基于 *mc1r* 基因编码蛋白质序列构建的系统进化树

Fig. 6 Phylogenetic tree constructed based on *mc1r* gene coding protein sequence

各支上数值表示经 1 000 次运算得到的引导值；标尺表示每单位氨基酸的变化率。

The values on each branch represent the guiding values obtained by 1 000 operations. The scale represents the rate of change per unit of amino acid.

鳞片中的相对表达量最高，显著高于其他组织 ($P < 0.05$)，其余 10 种组织表达量差异不显著 ($P > 0.05$) (图 10)。

3 讨论

3.1 *mc1r* 生物信息学分析

本研究获得橘色双冠丽鱼 *mc1r* cDNA 全序列长为 1 699 bp，推测其共编码氨基酸 325 个，与莫桑比克罗非鱼 *mc1r* 编码区氨基酸数量相同 (牟春艳等 2015)。根据进化树分析结果显示，橘色双冠丽鱼 MC1R 蛋白序列同莫桑比克罗非鱼、尼罗罗非鱼、布氏新亮丽鲷等鲈形目鱼类同源性最高，亲缘关系最近，与哺乳类同源性较低，亲缘关系较远，这一分析结果与橘色双冠丽鱼属于慈鲷科鱼类的分类地位相一

致。也进一步说明了 *mc1r* 序列相对保守。MC1R 蛋白信号肽剪切位点分值、剪切位点分值和信号肽区域分值均小于 0.5 阈值，因此推测该蛋白不含有信号肽，为不分泌蛋白。该蛋白含有 7 个跨膜结构域，有研究表明该结构域主要表达于动物的黑色素细胞，是 G 蛋白耦合受体中最小的一个 (于云柱等 2010)。

3.2 *mc1r* 基因表达差异分析

3.2.1 胚胎不同发育时期 *mc1r* 基因表达差异分析 *mc1r* 在橘色双冠丽鱼的 9 个胚胎发育时期均有不同程度的表达，其中在卵裂期、囊胚期和原肠期表达量较高，随着胚胎发育，表达量逐渐减少，在发育至神经胚期 (19 h) 时表达量骤减。在对胚胎取样时对色素生长情况观察发现，胚胎发育至血液循环期 (即发育至 39 h)

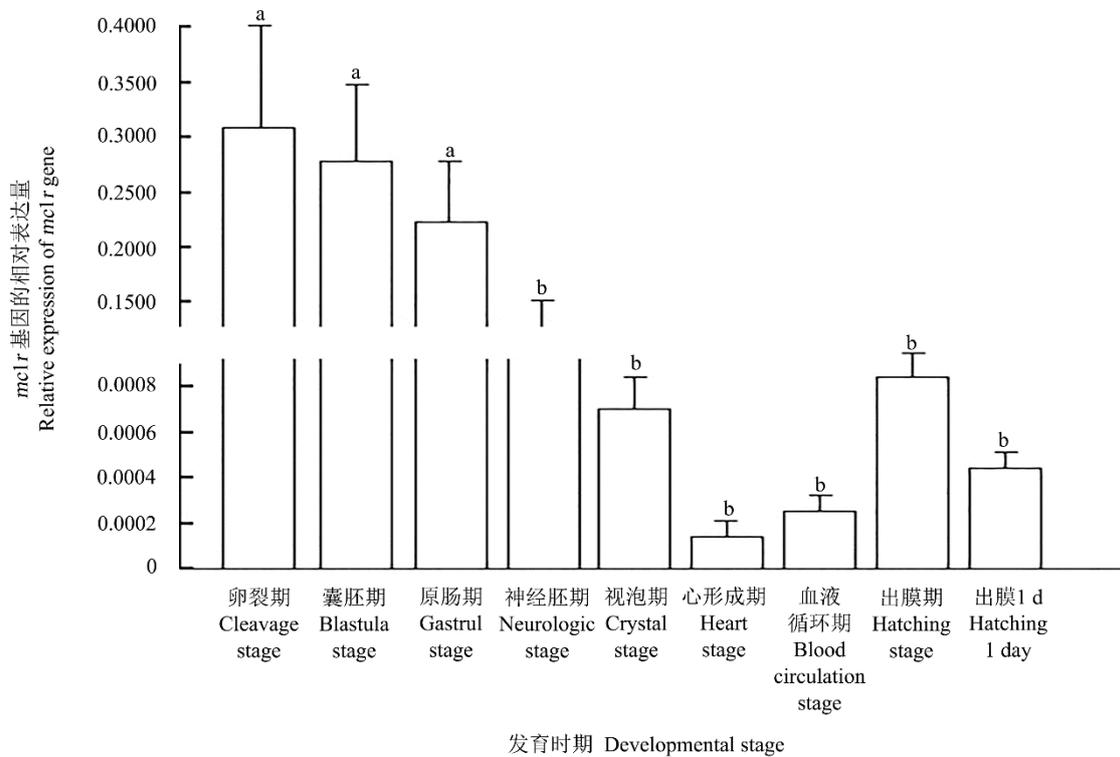


图 7 *mc1r* 在胚胎 9 个发育时期的表达差异分析 ($n = 3$)

Fig. 7 Analysis of *mc1r* gene expression at 9 developmental stages

内参基因: β -actin; 不同字母代表差异显著 ($P < 0.05$)。Reference gene: β -actin; Different letters indicated significant difference ($P < 0.05$).

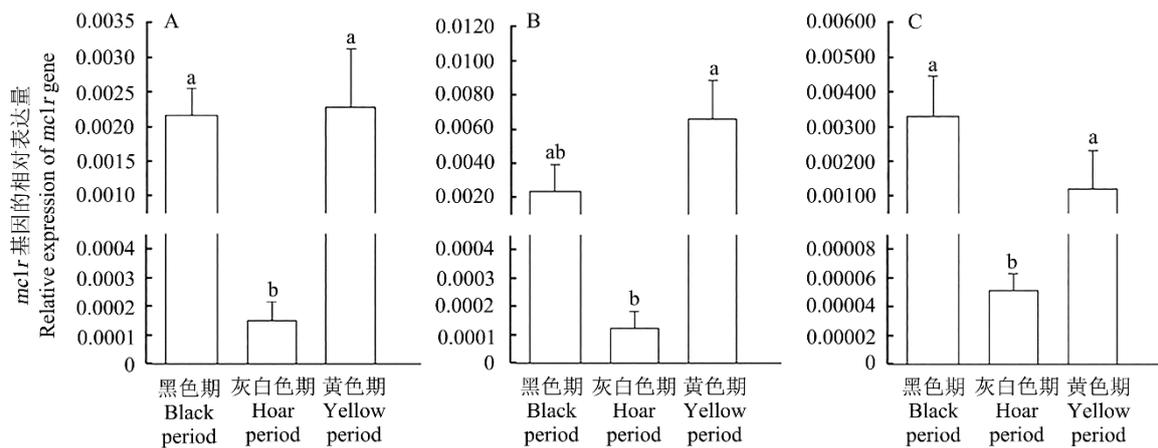


图 8 *mc1r* 在不同体色过渡时期的表达差异分析 ($n = 3$)

Fig. 8 Analysis of *mc1r* gene expression at different periods of color transition

A. 尾鳍; B. 鳞片; C. 皮肤。内参基因: β -actin; 不同字母代表差异显著 ($P < 0.05$)。

A. Tail fin; B. Scale; C. Skin. Reference gene: β -actin; Different letters showed significant difference ($P < 0.05$).

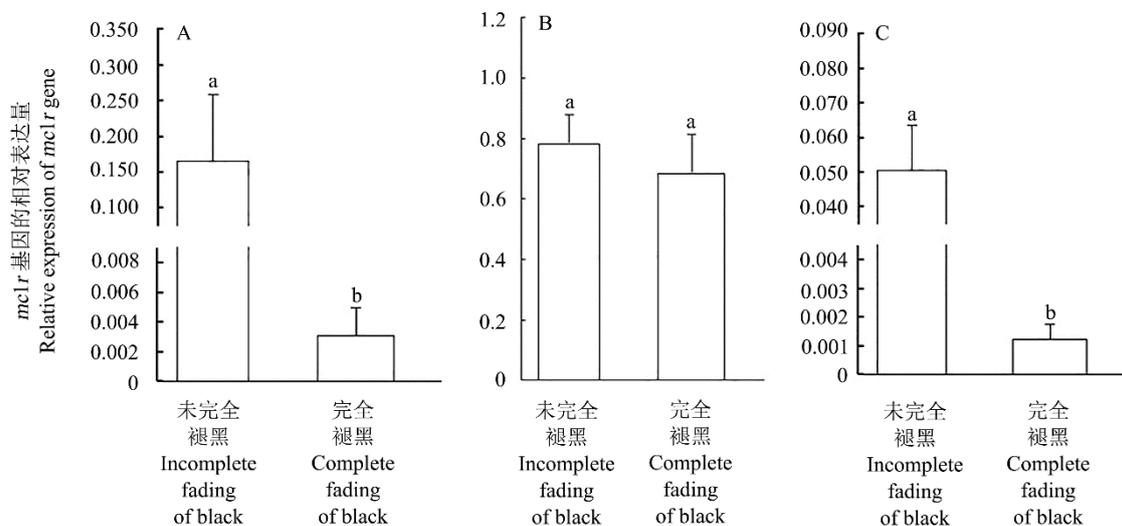


图 9 *mc1r* 在褪黑不完全和褪黑完全 3 个组织中的表达差异分析 ($n = 3$)

Fig. 9 Analysis of *mc1r* gene expression in three tissues of incomplete or complete black-fading individuals

A. 尾鳍; B. 鳞片; C. 皮肤。内参基因: β -actin; 不同字母代表差异显著 ($P < 0.05$)。

A. Tail fin; B. Scale; C. Skin. Reference gene: β -actin; Different letters significant difference ($P < 0.05$).

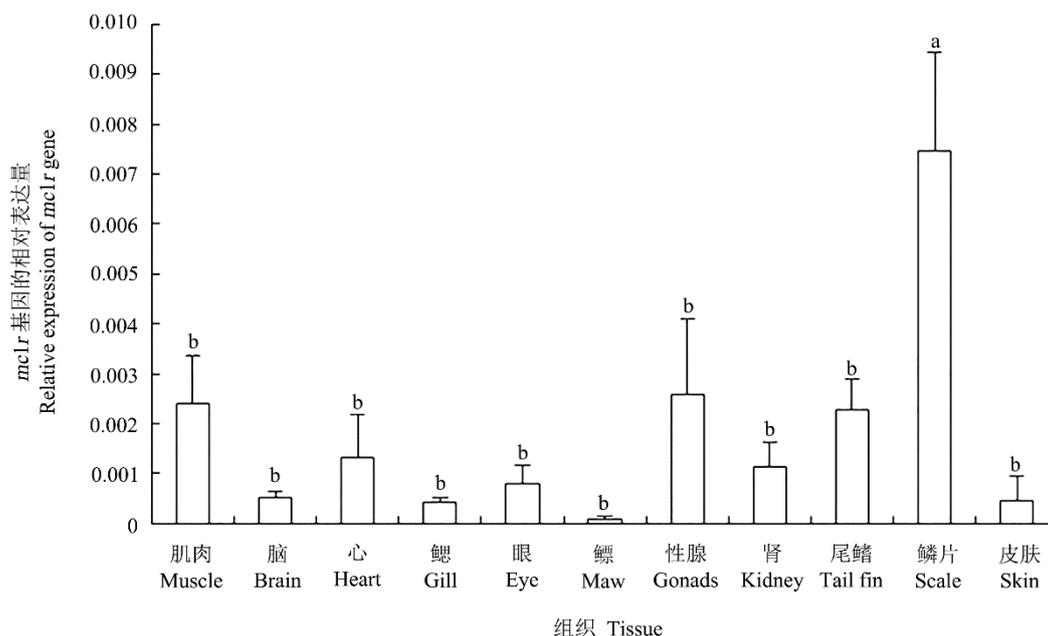


图 10 *mc1r* 在 11 种组织中的表达差异分析 ($n = 3$)

Fig. 10 Analysis of *mc1r* gene expression in eleven tissues

内参基因: β -actin; 不同字母代表差异显著 ($P < 0.05$)。Reference gene: β -actin; Different letters indicated significant difference ($P < 0.05$).

时才逐渐长出点状色素细胞, 至出膜期色素细胞形态长大, 数量变多, 与前期观察结果相一

致 (韦敏侠等 2015)。而在胚胎的卵裂期、囊胚期、原肠期和神经胚期这四个时期 *mc1r* 相

对大量表达时, 色素细胞并没有生成, 而在血液循环期后色素细胞开始出现至变大变多时 *mc1r* 却只有少量表达。蒋艳玲 (2016) 在橘色双冠丽鱼 9 个胚胎发育时期测得 *mc1r* 下游基因 *tyr* 相对表达量呈逐渐上升趋势。推测可能因本实验所测的 *mc1r* 相对表达量是在整个胚胎的表达总量, 且 *mc1r* 的基因功能也活跃于细胞再生、机体免疫及炎症反应等其他方面, 反而印证 *mc1r* 基础表达水平即可启动腺苷酸循环, 接着通过生理生化等一系列级联反应能让黑色素细胞生长、增殖这一观点 (Fitzgerald et al. 2006, 孙静 2012); 再者, 可能在胚胎发育后期, 黑色素细胞形成的同时黄色素细胞也在生长, 两者的生长可能会相互影响 (Djurđević et al. 2015)。

3.2.2 不同体色过渡时期 *mc1r* 基因表达差异分析

鱼类体表皮素有真黑色素和褐黑色素两种, 其中真黑色素呈现棕色和黑色表型, 褐黑色素为红色和黄色表型, 这两种色素都来源于同一信号通路, 都在酪氨酸酶基因调控下表达, 而在这一信号中 *mc1r* 与 *Agouti* 基因共同起着类似于“开关的重要作用” (蒋艳玲 2016)。*Agouti* 基因能编码刺鼠信号蛋白 (agouti signaling protein, ASP), 是 *mc1r* 的拮抗物, 当 *Agouti* 表达时, 与 *mc1r* 的两个配体 α -MSH 和 ACTH 产生竞争性结合, 阻断激活 cAMP, 导致真黑色素的合成被抑制, 从而造成细胞内褐黑色素的合成和储存 (Hoekstra 2006); 当 *Agouti* 不表达时, *mc1r* 的基础表达启动腺苷酸循环, 促进 *tyr* 表达, 使酪氨酸羟化成多巴醌 (dopaquinone), 多巴醌在酪氨酸酶相关蛋白 1 基因 (*tyr1*) 与相关蛋白 2 基因 (*tyr2*) 共同作用下产生真黑色素 (Kim et al. 2000, Robbins 2007, 蒋艳玲 2016)。此外, *Agouti* 还可以抑制 *tyr* 的活性, 以及降低 TRY 与 TYR1 蛋白表达水平 (孙静 2012)。而且在黑色素合成通路中, *mc1r*、*tyr*、*tyr1* 均处于适当且平衡状态时真黑色素才能合成和储存 (Hoekstra 2006)。

蒋艳玲 (2016) 在橘色双冠丽三个典型体

色蜕变期中测得尾鳍、鳞片、皮肤的 *tyr* 相对表达量呈逐渐降低趋势, 而在本实验中, 橘色双冠丽鱼在体色蜕变期, 尾鳍、鳞片、皮肤 *mc1r* 相对表达量均呈先降低再增加的变化趋势, 均在灰白色过渡期为表达量最小, *tyr* 作为 *mc1r* 的下游基因, 两者间并不是正相关或负相关的比例关系, 胡建尊等 (2013) 对瓯江彩鲤 *mc1r* 进行研究时也发现类似现象, 鱼体白色皮肤中 *mc1r* 的表达量稍高于黑色皮肤组织。推测可能与 *Agouti* 的存在会竞争性结合 *mc1r* 有关, *mc1r* 升高的同时 *Agouti* 也大量存在, 阻止真黑色素的合成 (胡建尊等 2013); 另外虽然 *mc1r* 相对表达量较高, 但 *mc1r* 跟其下游基因 *tyr*、*tyr1* 所处的状态有关, 当这三者处于不适当、不平衡状态, 真黑色素亦不能合成和储存 (Hoekstra 2006); 且本实验中黄色鱼取样时间为第 90 天, 鱼体虽呈黄色, 但黄色素细胞下层依然有黑色素细胞沉着, 而下沉的黑色素细胞已经处于收缩、凋亡或被巨噬细胞吞噬这个过程中, 因此亦能检测到 *mc1r* 的表达 (Dickman et al. 1988, 韦敏侠等 2015)。

3.2.3 褪黑完全和未完全 *mc1r* 基因表达差异分析

本实验对褪黑完全和未完全的橘色双冠丽鱼取样时发现, 褪色未完全的鱼黑斑一般在尾鳍末端较明显。对其尾鳍、鳞片、皮肤三种组织进行 *mc1r* 表达量测定结果显示, 褪黑未完全鱼皮肤和尾鳍的相对表达量显著高于褪黑完全鱼 ($P < 0.05$)。推测橘色双冠丽鱼体表褪黑完全程度与 *mc1r* 表达量可能呈负相关。

3.2.4 成鱼不同组织 *mc1r* 基因表达差异分析

研究发现, 哺乳动物的 *mc1r* 与皮肤色素沉积密切相关, 其主要在皮肤的黑素细胞及毛囊中表达 (聂庆华等 2008)。不同鱼类的组织中 *mc1r* 基因也有着不同的表达模式, 瓯江彩鲤在皮肤、眼、肌肉中表达量较大, 在鳃、心、肾、肝、鳔等组织表达量极少 (胡建尊等 2013); 在青鳉 (*Oryzias latipes*)、新月鱼 (*Xiphophorus maculatus*) 的成鱼所有组织中均有表达 (Selz et al. 2007); 而在红鳍东方鲀 (*Takifugu rubripes*)

和河豚 (*Fugu*) 中, 仅在脑中有少量表达 (Klovins et al. 2004)。在本实验中, 成熟橘色双冠丽鱼鱼体不同组织中该基因均有不同程度的表达, 且鳞片中的表达量最高, 显著高于其他组织 ($P < 0.05$); 性腺、肌肉次之, 在鳃中只有极少量表达; 鳞片相对表达量为鳃的 50 倍。结合蜕变期及褪黑完全和未完全完全两个实验数据, 均表明橘色双冠丽鱼 *mc1r* 表达的主要部位在皮肤及其衍生物 (鳞片) 中。

参 考 文 献

- Adalsteinsson S, Hersteinsson P, Gunnarsson E. 1987. Fox colors in relation to colors in mice and sheep. *Journal of Heredity*, 78(4): 235–237.
- Dickman M C, Schliwa M, Barlow G W. 1988. Melanophore death and disappearance produces color metamorphosis in the polychromatic Midas cichlid (*Cichlasoma citrinellum*). *Cell & Tissue Research*, 253(1): 9–14.
- Djordjević I, Kreft M E, Sušnik B S. 2015. Comparison of pigment cell ultrastructure and organisation in the dermis of marble trout and brown trout, and first description of erythrophore ultrastructure in salmonids. *Journal of Anatomy*, 227(5): 583–595.
- Fitzgerald L, Fryer J, Dwyer T, et al. 2006. Effect of melanotan1, [Nle4, D-Phe7]-a-MSH, on melanin synthesis in humans with *MC1R* variant alleles. *Peptides*, 27(2): 388–394.
- Hoekstra H E. 2006. Genetics, development and evolution of adaptive pigmentation in vertebrates. *Heredity*, 97(3): 222–234.
- Kim K S, Mendez E A, Marklund S, et al. 2000. Rapid communication: linkage mapping of the porcine *Agouti* gene. *Journal of Animal Science*, 78(5): 1395.
- Klovins J, Haitina T, Fridmanis D, et al. 2004. The melanocortin system in fugu: determination of *pomc/agrp/mcr* gene repertoire and synteny, as well as pharmacology and anatomical distribution of the MCRs. *Molecular Biology & Evolution*, 21(3): 563–579.
- Robbins I S. 2007. Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature*, 445(7130): 843.
- Selz Y, Braasch I, Hoffmann C, et al. 2007. Evolution of melanocortin receptors in teleost fish: The melanocortin type 1 receptor. *Gene*, 401(1/2): 114–122.
- 郭忠宝, 仇雪梅, 白杨, 等. 2009. 大菱鲆 *MC1R* 基因克隆与序列分析. *生物技术通报*, (7): 109–112.
- 胡建尊, 李康乐, 项松平, 等. 2013. 瓯江彩鲤体色调控相关因子 *MC1R* 的克隆与表达分析. *上海海洋大学学报*, 22(4): 518–523.
- 蒋燕玲. 2016. 橘色双冠丽鱼体色发育变化及体色相关基因 *TYR* 的克隆与表达研究. 上海: 上海海洋大学硕士学位论文.
- 蒋燕玲, 宋红梅, 刘奕, 等. 2016. 橘色双冠丽鱼 *TYR* 基因的克隆及其发育时序和组织表达分析. *农业生物技术学报*, 24(5): 697–707.
- 林永丰. 2010. 血鸚鵡色素生成及调控机制之研究. 基隆: 台湾海洋大学硕士学位论文.
- 牟春艳, 郑曙明, 任胜杰, 等. 2015. 不同体色血鸚鵡鱼的色素细胞种类、数量及色素含量. *水产科学*, 34(8): 497–501.
- 聂庆华, 刘清神, 方梅霞, 等. 2008. 犬 *MC1R* 基因的分子进化分析. *遗传*, 30(4): 469–474.
- 任玉红, 杨刚, 范瑞文, 等. 2012. 黑素皮质素受体 1 (*MC1R*) 在不同毛色羊驼皮肤组织中表达与定位研究. *畜牧兽医学报*, 43(7): 1049–1055.
- 孙静. 2012. 红褐色突变貉毛色基因 *MC1R* 的序列分析及其表达水平的研究. 青岛: 青岛农业大学硕士学位论文.
- 韦敏侠, 宋红梅, 祁宝伦, 等. 2015. 橘色双冠丽鱼胚后色素细胞发育与体色变化. *上海海洋大学学报*, 24(1): 28–35.
- 杨永升, 李宁, 邓学梅, 等. 2004. 黑素皮质素受体 1 哺乳动物黑色素形成中的关键基因. *遗传*, 26(4): 544–550.
- 于云柱, 何奕多, 刘丽, 等. 2010. 黑素皮质素受体 1 (*MC1R*) 基因的研究进展. *中国畜牧兽医*, 37(6): 232–233.