

虹鳟 *mc1r* 基因的克隆、序列分析及在不同发育阶段和组织的表达分析

吴深基^① 赵璐^{①#} 黄进强^{①*} 李永娟^② 张倩^①
潘玉财^① 王晓澜^① 刘哲^①

① 甘肃农业大学动物科学技术学院 兰州 730070; ② 甘肃农业大学理学院 兰州 730070

摘要: 黑色素皮质素 1 受体基因 (*mc1r*) 是控制动物色素合成的重要基因, 为探讨 *mc1r* 基因与虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 体色变异的关系, 本研究利用 cDNA 末端快速扩增 (RACE) 技术获得虹鳟 *mc1r* 基因的 cDNA 全长序列, 并对其编码的蛋白进行了生物信息学分析, 同时利用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 分析该基因在野生型虹鳟 (虹鳟) 和黄色突变型虹鳟 (金鳟) 体色发生不同时期 (从受精期至 12 月龄) 及成鱼背部皮肤、腹部皮肤、背部肌肉、腹部肌肉、眼、脑、鳃、中肾、头肾、肠、肝、脾和心 13 种组织中的表达差异。结果显示, *mc1r* 基因序列全长为 4 518 bp, 开放阅读框 1 017 bp, 编码 338 个氨基酸。氨基酸序列分析发现, 虹鳟 Mc1r 蛋白具有 7TM_GPCR_Srsx 结构域。通过氨基酸序列同源比对与系统进化分析表明, Mc1r 蛋白序列在鱼类间具有较高的保守性。qRT-PCR 结果表明, *mc1r* 基因在虹鳟与金鳟的受精期就开始表达, 且在受精期至桑葚期胚胎的表达量高于胚胎后期; *mc1r* 基因在虹鳟与金鳟相同时期表达比较结果显示, 该基因在受精期、4 细胞期、16 细胞期、囊胚期、原肠期、神经期、体节期、1 日龄、3 日龄、7 日龄胚胎或个体以及 1 月龄、2 月龄、3 月龄和 6 月龄背部皮肤中的表达均差异显著 ($P < 0.05$); *mc1r* 基因在 12 月龄虹鳟和金鳟的 13 种组织中均有表达, 其中, 该基因在虹鳟与金鳟的背部皮肤、腹部皮肤和脑中的表达量较高, 显著高于其他组织 ($P < 0.05$), 且虹鳟背部皮肤中该基因的表达量高于金鳟背部皮肤 ($P > 0.05$)。以上结果表明, *mc1r* 基因可能与虹鳟体色变异密切相关。本研究可为后期进一步深入阐明虹鳟体色变异的分子机制提供基础资料。

关键词: 虹鳟; 体色; 黑色素皮质素 1 受体基因 (*mc1r*); 基因克隆; 表达分析

中图分类号: Q955 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263 (2021) 05-746-10

Cloning, Sequencing and Expression Analysis of *mc1r* Gene in Different Developmental Stages and Tissues of Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss*

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 31760755);

* 通讯作者, E-mail: huangjinq@163.com;

第一作者介绍 吴深基, 男, 硕士研究生; 研究方向: 动物遗传学理论与应用; E-mail: 1753548729@qq.com;

共同第一作者 赵璐, 女, 硕士研究生; 研究方向: 动物遗传学理论与应用; E-mail: 1283267706@qq.com.

收稿日期: 2021-01-05, 修回日期: 2021-05-31 DOI: 10.13859/j.cjz.202105011

WU Shen-Ji^① ZHAO Lu^{①#} HUANG Jin-Qiang^{①*} LI Yong-Juan^② ZHANG Qian^①
PAN Yu-Cai^① WANG Xiao-Lan^① LIU Zhe^①

① College of Animal Science and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070;

② College of Science, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China

Abstract: Melanocortin 1 receptor gene (*mc1r*) is an important gene that controls pigment synthesis in animals. To explore the relationship between *mc1r* gene expression level and body color variation in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*), the present work obtained the full-length cDNA sequence of the gene by rapid-amplification of cDNA ends (RACE) technology, and the encoded protein was analyzed by bioinformatics. Simultaneously, quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was used to detect the expression levels of *mc1r* gene in different developmental stages (from fertilization stage to 12 months post hatch) and tissues (dorsal skin, ventral skin, dorsal muscle, ventral muscle, eye, brain, gill, midkidney, headkidney, intestine, liver, spleen and heart) of wild-type and yellow mutant Rainbow Trouts, respectively. The results showed that *mc1r* gene was 4 518 bp, containing 1 017 bp open reading frame (ORF) (encoding 338 amino acid residues), 532 bp 5' untranslated region (UTR), and 2 969 bp 3' UTR. Sequence analysis revealed that Mc1r protein of Rainbow Trout had the 7TM_GPCR_Srsx structural domain, and sequence analysis of amino acids and phylogenetic tree analysis indicated that conservation of Mc1r was higher in fish than that in other vertebrates (Table 2 and Fig. 2). qRT-PCR results showed that *mc1r* gene began to express at the fertilized egg stage of wild-type and yellow mutant Rainbow Trouts, and the expression in the early embryonic stages (from fertilized egg stage to multi-cell stage) was higher than that in the late embryonic stages (Fig. 3). Moreover, there were significant differences ($P < 0.05$) in the expression level of *mc1r* gene at the same stages between wild-type and yellow mutant Rainbow Trouts, including fertilized egg stage, 4-cell, 16-cell, blastula, gastrula, neurula, somite stage, 1 day post hatch, 3 days post hatch, 7 days post hatch, 1 month post hatch, 2 months post hatch, 3 months post hatch and 6 months post hatch (Fig. 3). *mc1r* gene also widely expressed in various tissues in 12 months post hatch wild-type and yellow mutant Rainbow Trouts, with the higher expression levels in dorsal skin, ventral skin and brain, when compared to other tissues ($P < 0.05$) (Fig. 4). Moreover, the expression level of *mc1r* gene in dorsal skin of wild-type was higher than that of yellow mutant Rainbow Trout ($P > 0.05$) (Fig. 4). In conclusion, the expression level of *mc1r* gene might be closely related to body color variation of Rainbow Trout. The results of this study provided valuable data for later studies on the molecular mechanism of Rainbow Trout body color variation.

Key words: Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*); Body color; Melanocortin 1 receptor gene (*mc1r*); Cloning; Expression analysis

体色作为脊椎动物最为多样化的表型特征之一, 其对物种的生存繁衍、躲避敌害以及光保护等方面具有十分重要的意义 (Jiang et al. 2014)。体色的多样化是在遗传、环境、营养和生理因素的作用下而导致色素细胞组成差异所引起的, 是一种复杂的生物学过程 (Zhu et al.

2016)。黑色素细胞为目前研究最为广泛且深入的色素细胞类型, 研究发现其合成受到很多黑色素相关基因的共同调控 (Lim et al. 2019)。黑素皮质素 1 受体基因 (melanocortin 1 receptor, *mc1r*) 最早在黑色素细胞中被发现, 是皮肤黑色素合成中的关键基因, 该基因只由

一个外显子编码且其蛋白包含 7 个跨膜结构域,为 G 蛋白偶联受体-黑素皮质素受体家族成员之一(封竣淇等 2017)。 α -促黑色素激素(α -melanocyte-stimulating hormone, α -MSH)和促肾上腺皮质激素(adrenocorticotrophic hormone, ACTH)是 *Mcl1r* 的两个配体,当受体和配体结合时,会改变 G 蛋白偶联受体的结构,从而通过 cAMP 信号通路去刺激小眼畸形相关转录因子基因(microphthalmia-associated transcription factor, *mitf*)的转录以及酪氨酸酶基因家族[tyrosinase (*tyr*)、tyrosinase related protein 1 (*tyrp1*)和 tyrosinase related protein 2 (*tyrp2*)]基因的表达,最终达到对体色的调控(于云柱等 2010, Dong et al. 2020)。迄今为止, *mcl1r* 基因作为唯一可以解释人类黑色素生成生理变异的基因,其在高等脊椎动物中已有较为深入的研究,如在小鼠(*Mus musculus*)、马(*Equus caballus*)、牛(*Bovine*)、羊(*Ovis aries*)和家禽中发现该基因的突变会造成毛色变淡,且任玉红等(2009)发现, *mcl1r* 基因和蛋白在棕色羊驼(*Lama glama*)皮肤中的表达量都显著高于白色皮肤。因此,该基因已成为研究体色变异的主要候选基因之一。

虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)是我国重要的冷水性经济鱼类,且主要养殖两种品系,一种为背部皮肤呈灰黑色的野生型虹鳟(虹鳟),另一种为背部皮肤呈黄色的突变型虹鳟(金鳟)(Boonanuntasarn et al. 2004)。据报道,养殖金鳟比虹鳟在产量、生长速度 and 经济效益方面都有所提升,说明体色变异对虹鳟的经济价值和品种选育均会造成很大影响(邵东宏等 2008)。体色作为虹鳟重要的经济性状,研究发现金鳟背部皮肤没有黑色素细胞存在(Hattori et al. 2020),说明这种体色的变异是缺乏黑色素引起的,因此,研究黑色素相关基因的表达对虹鳟皮肤黑色素沉积的影响,对于从本质上揭示虹鳟体内黑色素沉积的调控机理很有必要。目前在橘色双冠丽鱼(*Amphilophus citrinellus*)(周康奇等 2019)、瓯江彩鲤(*Cyprinus carpio* var. *color*)(胡建尊等 2013)

等鱼类已获得 *mcl1r* 基因的 cDNA 全长,并通过实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR)检测发现, *mcl1r* 基因的表达量与皮肤黑色素沉积密切相关。我们推测 *mcl1r* 基因的表达量与虹鳟体色的变异可能存在紧密关系。前期在 2 月龄虹鳟和金鳟皮肤转录组数据对比分析时,意外发现 *mcl1r* 基因在金鳟表达上调,这与该基因在大多数其他不同体色鱼类中的表达模式相反(Wang et al. 2017, Zhang et al. 2017)。因此,为了弄清 *mcl1r* 基因在虹鳟与金鳟色素沉积前后的表达情况,本研究利用 cDNA 末端快速扩增(rapid-amplification of cDNA ends, RACE)技术获得该基因的 cDNA 全长序列,且通过 qRT-PCR 方法分析其在虹鳟与金鳟体色发生不同时期和不同组织中的相对表达量,以探讨 *mcl1r* 基因的表达量与虹鳟体色变异的相关性,为后期虹鳟体色变异分子机制的深入研究积累基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验动物与样品采集

本研究所用材料虹鳟和金鳟均采自甘肃农业大学水产科学实训中心。通过早期鱼苗培育技术对受精卵进行孵育并进行连续取样,获得受精期、4 细胞期、16 细胞期、桑葚期、囊胚期、原肠期、神经期、体节期和心跳期的胚胎,出膜后 1 日龄、3 日龄、5 日龄、7 日龄、10 日龄个体去除卵黄囊和头部的整体,以及 1 月龄、2 月龄、3 月龄、6 月龄及 12 月龄个体的背部皮肤。待虹鳟与金鳟长至约 12 月龄时,分别各取 3 尾发育状况良好、无伤病以及体重大小一致的个体,经间氨基苯甲酸乙酯甲烷磺酸盐(tricaine methanesulfonate, MS-222)麻醉后,快速取不同组织样品,包括背部皮肤、腹部皮肤、背部肌肉、腹部肌肉、眼、脑、鳃、中肾、头肾、肠、肝、脾和心共 13 个组织,投入液氮中保存,用于后续 RNA 提取。

1.2 总 RNA 的提取

按照 Total RNA 提取试剂盒(TIANGEN, 北京)使用说明书提取上述各组织样品的总

RNA, 并使用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的完整性, 用 Nanodrop 核酸检测仪 (Thermo, USA) 测定总 RNA 的浓度和纯度, 后置于 -80 °C 保存。

1.3 *mc1r* 基因 cDNA 全长克隆和序列测定

根据虹鳟皮肤转录组注释的 *mc1r* 基因 (ID: LOC110506598), 利用 Primer 5.0 设计特异性引物 *mc1r*-1F 和 *mc1r*-1R 及 *mc1r*-2F 和 *mc1r*-2R (表 1), 用于 *mc1r* 基因中间片段的扩增。以虹鳟背部皮肤的总 RNA 为模板, 按照 PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa, 大连) 说明书中规定的体系和程序进行第一条链 cDNA 的合成, 并以其为模板进行以下 PCR 扩增反应。PCR 反应体系 50 μl: 10 × buffer 5 μl, dNTP 2.5 μl (2.5 mmol/L), *Taq* DNA 酶 0.75 μl (5 U/μl), 正反向引物 (10 μmol/L) 各 1.25 μl, cDNA 模板 2.5 μl (380 mg/L), 双蒸水 36.75 μl。PCR 反应程序: 94 °C 5 min; 94 °C 45 s, 55 °C 45 s, 72 °C 150 s, 35 个循环; 72 °C 10 min。

表 1 本研究所用的引物

Table 1 Primer sequences used in the research

引物名称 Primer name	序列 Sequence (5' - 3')
<i>mc1r</i> -1F	CCATCATCAAGAACC GCAATC
<i>mc1r</i> -1R	GAAAGCCATCGAATGCAACA
<i>mc1r</i> -2F	GCACATTTATTCCAGGGTTAC
<i>mc1r</i> -2R	GATAAGTTTGAGCCTTGTTCTG
<i>mc1r</i> -5'GSP	GATTACGCCAAGCTTTCCAGGTGCCGAG CATTTCAGGTG
<i>mc1r</i> -3'GSP	GATTACGCCAAGCTTGCTCTTCTGCTCCT GCGTCACCTTTTCG
<i>mc1r</i> -3'NGSP	GATTACGCCAAGCTTTATGGCTGTGTGTC AGAACCAAGGCTC
UPM	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAG TGGTATCAACGCAGAGT
UPS	CTAATACGACTCACTATAGGGC
<i>mc1r</i> -3F	CCAGGGAGCAGA AACTCTACGA
<i>mc1r</i> -3R	GATTGCGGTTCTTGATGATGG
<i>β-actin</i> -F	TGGGGCAGTATGGCTTGTATG
<i>β-actin</i> -R	CTCTGGCACCCCTAATCACCTCT

根据获得的中间片段设计 *mc1r*-5' 基因特

异性引物 (gene specific primer, GSP)、*mc1r*-3'GSP 和 *mc1r*-3' 巢式基因特异性引物 (nested gene specific primer, NGSP) (表 1), 按照 SMARTer® RACE 5'/3' Kit (Clontech, 美国) 说明书中规定的体系和程序分别扩增 *mc1r* 基因的 5' 和 3' 末端。3' 端首轮 PCR 结束后, 将产物稀释 50 倍作为巢式 PCR 的模板。对以上所有 PCR 产物进行胶回收、连接、转化和挑菌, 最后通过菌落 PCR 筛选 3 ~ 5 个阳性克隆至上海生物科技有限公司进行测序。

1.4 序列分析

使用 DNAMAN 9.0 对 *mc1r* 基因 5' 末端、中间片段及 3' 末端测序所得序列进行拼接, 后经过 NCBI 中 BLAST 程序 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 检测 RACE 结果的正确性, 最终得到 *mc1r* 基因的 cDNA 全长序列。通过 NCBI 中 ORF finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/orfig.cgi>) 分析开放阅读框并推导所编码的氨基酸序列。使用 Protaram (<https://web.expasy.org/protaram/>) 和 Protscale (<https://web.expasy.org/protscale/>) 分析蛋白质的理化性质和亲疏水性, 并利用 TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 和 NCBI 中 Conserved Domains 程序 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 分析蛋白质跨膜结构, 使用 SMART (<https://smart.embl-heidelberg.de/>) 分析蛋白质结构域, 蛋白质二级和三级结构分别使用 SOPMA (<https://npsa-prabi.ibcp.fr/>) 和 SWISS-MODEL (<http://www.swissmodel.expasy.org/>) 进行分析, 运用 Clustalx 1.83 软件进行蛋白同源比对。利用 MEGA 7.0 软件中的邻接 (neighbor-joining, NJ) 法构建基因的系统进化树。

1.5 qRT-PCR 分析

根据已获得的虹鳟 *mc1r* 基因序列设计荧光定量引物 *mc1r*-3F 和 *mc1r*-3R, 以 *β-actin* 基因为内参 (表 1)。首先, 利用 PrimeScript™ RT reagent Kit (TaKaRa, 大连) 将上述已提取的 RNA 反转录合成 cDNA; 之后, 以 cDNA 为模

板进行 qRT-PCR 反应, 每个样品设置 3 个重复。20 μl 反应体系包括 ddH₂O 7.5 μl , 上下游引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 各 1 μl , SYBR Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) 10 μl , cDNA 0.5 μl (380 mg/L)。反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 34 s, 40 个循环; 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s。通过溶解曲线分析目的基因的特异性, 并使用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法计算 *mc1r* 基因相对于 β -actin 基因的 mRNA 表达量。以 SPSS 19.0 中的单因素方差分析 (One-Way ANOVA) 和多重比较 (Duncan) 进行显著性分析 (王巍等 2012), 当 $P < 0.05$ 时为差异显著, $P < 0.01$ 时为差异极显著。

2 结果与分析

2.1 *mc1r* 基因 cDNA 和编码蛋白质序列分析

本研究经克隆测序后获得 *mc1r* 基因 cDNA 全长为 4 518 bp (GenBank 登录号: MW 281061), 其中, 开放阅读框 (open reading frame, ORF) 为 1 017 bp, 编码 338 个氨基酸, 5'非编码区(untranslated region, UTR)为 532 bp, 3'UTR 为 2 969 bp 且 3'末端含有 25 bp 的 Poly (A) 尾, 但不含脊椎动物典型的加尾信号 (AA TAAA)。ProtParam 分析显示, Mc1r 蛋白的分子式为 C₁₇₆₆H₂₇₈₁N₄₃₇O₄₆₆S₃₃, 理论等电点 PI 为 7.89, 理论分子质量约为 38.65 ku, 平均亲水系数为 0.747, 表明 Mc1r 蛋白为疏水性蛋白质。ProtScale 分析发现, 位于第 34 位的丙氨酸的亲水性最强 (亲水系数 - 2.367), 第 252 位的缬氨酸的亲水性最弱 (疏水系数 3.278)。经过 TMHMM 和 Conserved Domains 分析, 该蛋白含有 7 个跨膜结构域, 其中, 第 50 ~ 69 氨基酸为第一个跨膜结构域, 第 2 ~ 7 个跨膜氨基酸分别位于氨基酸序列的 82 ~ 104、124 ~ 146、167 ~ 189、199 ~ 221、242 ~ 264 和 279 ~ 301。用 SMART 分析发现, Mc1r 蛋白只含有一个保守结构域 (7TM_GPCR_Srsx)。运用 SOPMA 分析二级结构, Mc1r 蛋白包含 169 个 α 螺旋结构 (50.01%)、9 个 β 折叠 (2.66%)、

93 个无规卷曲 (27.51%) 和 67 个延伸结构 (19.82%)。三级结构分析表明, 该蛋白也主要以 α 螺旋和无规卷曲为主 (图 1)。

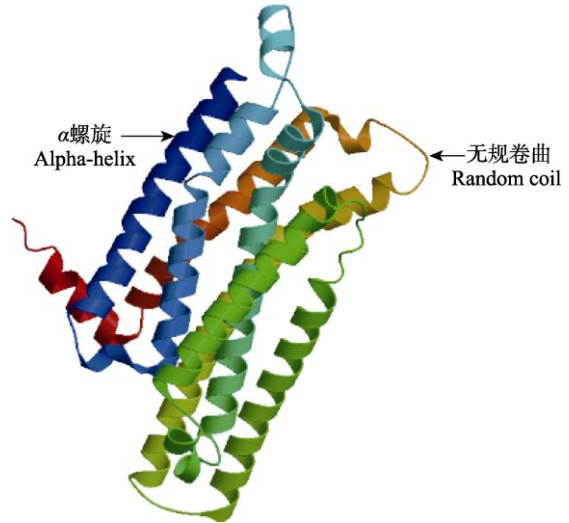


图 1 虹鳟 Mc1r 蛋白的三级结构

Fig. 1 The tertiary structure of Mc1r protein in Rainbow Trout

2.2 同源比对与系统进化分析

同源比对和系统进化分析发现, 基于 *mc1r* 基因编码的氨基酸序列, 虹鳟与大鳞大马哈鱼 (*Oncorhynchus tshawytscha*, XP_024296087.1) 的同源性高达 99.11%, 与斑马鱼 (*Danio rerio*, NP_851301.1) 的同源性为 77.71%, 它们聚为一支; 其他鱼类, 如青鳉 (*Oryzias latipes*, XP_011490066.1)、斑马拟丽鱼 (*Maylandia zebra*, XP_004539440.1)、尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*, XP_005467175.1) 聚为另一大支; 与家鸡 (*Gallus gallus*, NP_001026633.1)、小鼠 (*Mus musculus*, NP_032585.2) 及人类 (*Homo sapiens*, NP_002377.4) 的同源性较低 (表 2 和图 2)。

2.3 *mc1r* 基因在虹鳟与金鳟不同发育时期的表达差异分析

从虹鳟与金鳟受精期至 12 月龄发育过程的 qRT-PCR 结果显示, *mc1r* 基因在整个发育阶段都有表达, 其中, 分别在虹鳟与金鳟 4 细

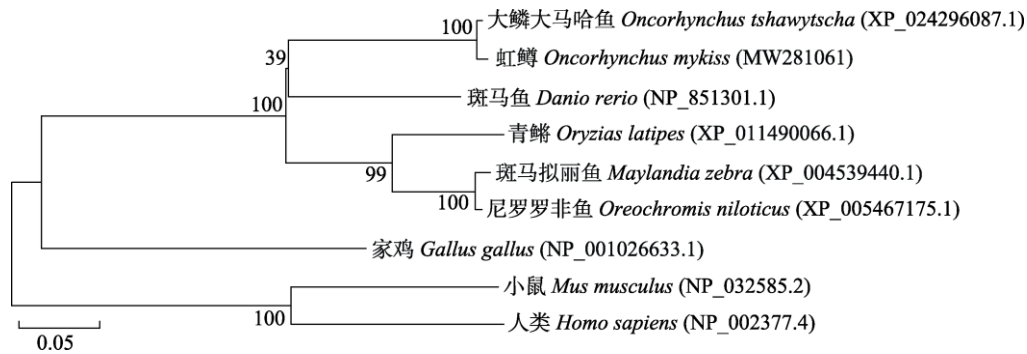


图 2 虹鳟与部分脊椎动物 *mc1r* 基因氨基酸序列系统发育关系

Fig. 2 Phylogenetic relationships of *mc1r* gene amino acid in Rainbow Trout and selected vertebrates

各支上的数值表示经 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.

表 2 虹鳟与其他物种 *Mc1r* 氨基酸序列多重比对

Table 2 Alignment of the amino acid sequences of *Mc1r* proteins in different species

物种 Species	序列号 GenBank No.	同源性 Homology (%)
虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i>	MW281061	100.00
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	NP_851301.1	77.71
青鳉 <i>Oryzias latipes</i>	XP_011490066.1	78.43
大鳞大马哈鱼 <i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	XP_024296087.1	99.11
斑马拟丽鱼 <i>Maylandia zebra</i>	XP_004539440.1	78.10
尼罗罗非鱼 <i>Oreochromis niloticus</i>	XP_005467175.1	78.43
小鼠 <i>Mus musculus</i>	NP_032585.2	57.79
人类 <i>Homo sapiens</i>	NP_002377.4	59.32
家鸡 <i>Gallus gallus</i>	NP_001026633.1	64.31

胞期胚胎和 3 月龄个体背部皮肤的表达量最高, 均显著高于其他各时期 ($P < 0.05$), 且该基因在虹鳟与金鳟受精期、4 细胞期、16 细胞期、多细胞期和囊胚期胚胎的表达量高于胚胎后期, 在胚胎后期几乎不表达, 出膜后表达量又开始呈升高的趋势; 虹鳟与金鳟相同时期的表达结果比较显示, *mc1r* 基因在受精期、4 细胞期、16 细胞期、囊胚期、原肠期、神经期胚胎和 1 日龄、7 日龄个体的躯体部位以及 1 月龄、3 月龄和 6 月龄个体背部皮肤中的表达量存在极显著差异 ($P < 0.01$), 在体节期胚胎、3 日龄个体的躯体部位和 2 月龄个体背部皮肤中

的表达差异显著 ($P < 0.05$), 桑葚期、心跳期胚胎和 5 日龄、10 日龄个体的躯体部位以及 12 月龄个体背部皮肤中该基因的表达没有显著差异 ($P > 0.05$) (图 3)。

2.4 *mc1r* 基因在虹鳟与金鳟不同组织中的表达差异分析

mc1r 基因在 12 月龄虹鳟和金鳟不同组织的差异表达见图 4。在虹鳟中, 该基因在腹部皮肤的表达量最高, 其次是背部皮肤和脑; 在金鳟中, 背部皮肤中 *mc1r* 基因的表达量最高, 其次是腹部皮肤和脑; 在以上这三个组织中的表达量均显著高于其他组织 ($P < 0.05$)。 *mc1r* 基因在虹鳟背部皮肤中的表达量高于金鳟背部皮肤 ($P > 0.05$)。虹鳟与金鳟相同时期的表达量比较, 该基因在腹部皮肤、腹部肌肉、肝、脾和心中的表达差异极显著 ($P < 0.01$), 在背部肌肉、眼睛、鳃、头肾和肠中的表达差异显著 ($P < 0.05$), 背部皮肤、脑和中肾中 *mc1r* 基因的表达差异不显著 ($P > 0.05$)。

3 讨论

黑色素是动物表层结构中最重要色素, 其主要存在于表皮基底层、毛囊、视网膜上皮和虹膜中, 起到皮肤色素沉积从而有效保护皮肤免受紫外线损伤和维持正常视觉功能的作用 (Lin et al. 2007)。研究发现 *mc1r* 基因在黑色

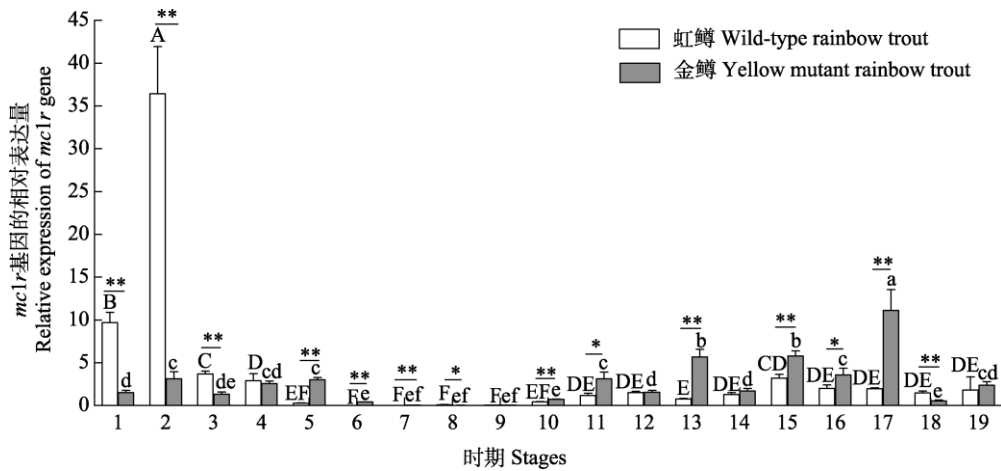


图 3 *mc1r* 基因在虹鳟与金鳟不同发育时期的表达

Fig. 3 Expression of *mc1r* gene at different developmental stages of wild-type and yellow mutant Rainbow Trout

内参基因: β -actin; $n = 3$; 虹鳟不同发育时期的差异分析用大写字母表示, 金鳟不同发育时期的差异分析用小写字母表示, 不同的字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 相同字母或一个字母相同一个字母不同表示差异不显著 ($P > 0.05$); 虹鳟与金鳟同一发育时期的差异分析用 * 和 ** 表示, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Reference gene: β -actin; $n = 3$; The difference analysis of wild-type and yellow mutant Rainbow Trout at different developmental stages are expressed in uppercase and lowercase letters, respectively, different letters indicate significant difference ($P < 0.05$), the same letters or one same letter and one different letter represent no significant difference ($P > 0.05$); The differences between wild-type and yellow mutant Rainbow Trout at the same developmental stages are indicated by * and **, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

1. 受精期; 2. 4 细胞期; 3. 16 细胞期; 4. 桑葚期; 5. 囊胚期; 6. 原肠期; 7. 神经期; 8. 体节期; 9. 心跳期; 10. 1 日龄; 11. 3 日龄; 12. 5 日龄; 13. 7 日龄; 14. 10 日龄; 15. 1 月龄; 16. 2 月龄; 17. 3 月龄; 18. 6 月龄; 19. 12 月龄。

1. Fertilized egg stage; 2. 4-cell; 3. 16-cell; 4. Multi-cell; 5. Blastula; 6. Gastrula; 7. Neurula; 8. Somite stage; 9. Heartbeating stage; 10. 1 day post hatch; 11. 3 days post hatch; 12. 5 days post hatch; 13. 7 days post hatch; 14. 10 days post hatch; 15. 1 month post hatch; 16. 2 months post hatch; 17. 3 months post hatch; 18. 6 months post hatch; 19. 12 months post hatch.

素细胞中特异表达, 其调控的信号通路被认为是合成黑色素数量和类型 (真黑色素或褐黑色素) 的主要决定性因素 (Li et al. 2020)。虽然黑色素的生成受到多种因素的控制, 但是 *mc1r* 基因的存在是有效合成黑色素所必需的 (Wolf et al. 2016)。在哺乳动物和鸟类中还发现黑色素合成量与 *mc1r* 基因的表达水平呈正比 (Tezuka et al. 2011), 说明其是皮肤黑色素沉积不可或缺的调控基因。

本研究获得虹鳟 *mc1r* 基因 cDNA 序列全长为 4 518 bp, 开放阅读框 1 017 bp, 编码 338 个氨基酸。序列分析发现, Mc1r 蛋白包含 7 个跨膜结构和一个 Srsx 组成的 7TM_GPCR_Srsx 结构域, 这与半滑舌鳎 (*Cynoglossus semilaevis*) Mc1r 蛋白结构一致 (Li et al. 2020),

说明这些结构在 Mc1r 蛋白中是相对保守的。而且, Mc1r 蛋白结构可以分为 N 和 C 末端且各自发挥着不同的功能, 其中细胞外的 N 末端尾巴发挥配体亲和力和信号锚点的作用, 而处于 GTP 结合蛋白偶联受体的 C 末端在蛋白从内质网到质膜的运输过程以及受体与 G 蛋白在质膜中相互作用都发挥着重要功能 (Wolf et al. 2016)。蛋白同源比对和系统发育结果发现, 虹鳟 Mc1r 蛋白在硬骨鱼类和哺乳动物间呈现不同的同源性及亲缘关系, 其中, 虹鳟与大鳞大马哈鱼编码的氨基酸个数一致且亲缘关系最近, 与禽类和哺乳类的同源性最低, 亲缘关系最远, 这一分析结果与虹鳟属于鲑科鱼类的分类地位相一致。

研究基因差异表达能更好地揭示表型性状

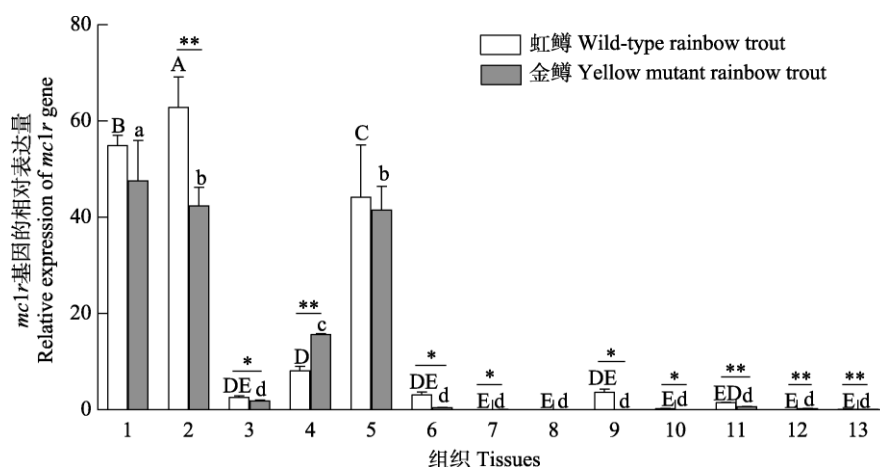


图 4 *mc1r* 基因在虹鳟与金鳟不同组织中的表达

Fig. 4 Expression of *mc1r* gene in various tissues of wild-type and yellow mutant Rainbow Trout

内参基因: β -actin; $n = 3$; 虹鳟不同发育时期的差异分析用大写字母表示, 金鳟不同发育时期的差异分析用小写字母表示, 不同的字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 相同字母或一个字母相同一个字母不同表示差异不显著 ($P > 0.05$); 虹鳟与金鳟同一发育时期的差异分析用*和**表示, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Reference gene: β -actin; $n = 3$; The differences of wild-type and yellow mutant Rainbow Trout at different developmental stages are expressed in uppercase and lowercase letters, respectively, different letters indicate significant difference ($P < 0.05$), the same letters or one same letter and one different letter represent no significant difference ($P > 0.05$); The difference analysis between wild-type and yellow mutant Rainbow Trout at the same developmental stages are indicated by * and **, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

1. 背部皮肤; 2. 腹部皮肤; 3. 背部肌肉; 4. 腹部肌肉; 5. 脑; 6. 眼睛; 7. 鳃; 8. 中肾; 9. 头肾; 10. 肠; 11. 肝; 12. 脾; 13. 心。
1. Dorsal skin; 2. Ventral skin; 3. Dorsal muscle; 4. Ventral muscle; 5. Brain; 6. Eye; 7. Gill; 8. Midkidney; 9. Headkidney; 10. Intestine; 11. Liver; 12. Spleen; 13. Heart.

之间差异的内在机理。本研究采用 qRT-PCR 方法检测虹鳟与金鳟体色发生不同时期及成鱼不同组织中 *mc1r* mRNA 差异表达情况。结果发现, *mc1r* 基因在虹鳟与金鳟胚胎前期(受精期至桑葚期)的表达量显著高于胚胎后期, 这与 *mc1r* 基因在橘色双冠丽鱼胚胎中的表达模式一致(周康奇等 2019)。在对虹鳟胚胎进行取样时观察发现, 处于受精期至桑葚期的虹鳟和金鳟胚胎正处于细胞分裂阶段, 此时色素细胞还未开始形成, *mc1r* 基因相对表达较高, 可能由于 *mc1r* 基因发挥其他的生物学功能, 比如细胞再生、机体免疫和炎症反应等(孙静 2012)。虹鳟背部皮肤除黑色素细胞外, 还存在黄色素细胞, 因此, 在虹鳟胚胎后期表达量较低可能是由于两种色素细胞增殖和生长相互影响造成的(Djurđević et al. 2015, Hattori et al. 2020), 同时也说明虹鳟胚胎后期 *mc1r* 的基础

表达水平足以通过 cAMP 信号通路刺激黑色素细胞的增殖和生长。与此同时, 黑色素细胞是来源于神经嵴细胞, 从神经导管迁移至胚胎中, 研究发现 Mc1r 蛋白的激活与表皮黑色素细胞的增殖与存活紧密相关, 此阶段 *mc1r* 基因在虹鳟中的表达量要高于金鳟, 这可能为后期虹鳟与金鳟体色差异奠定了基础(Selz et al. 2007, Thomas et al. 2008)。从虹鳟心跳期至 1 月龄背部皮肤, *mc1r* 基因的表达量呈逐渐升高的趋势。周康奇等(2019)在橘色双冠丽鱼的血液循环期之后发现随着黑色素开始出现并增多, *mc1r* 基因在刚出膜时和出膜后 1 天的表达量都较血液循环期的高, 这与本研究结果相一致, 说明 *mc1r* 基因在此阶段逐渐升高可能由于黑色素细胞增殖导致黑色素不断增多而引起的。本研究还发现, 从心跳期胚胎至 3 月龄阶段背部皮肤, *mc1r* 基因在金鳟中的表达量要高

于虹鳟,而在6月龄和12月龄这两个阶段背部皮肤表达量却相反,说明该基因在虹鳟与金鳟中的相对表达处于动态过程。此外,*mc1r*基因除在黑色素细胞中发挥重要作用外,也在金鱼(*Carassius auratus*)的黄色素细胞和斑马鱼的虹彩细胞中表达(Kobayashi et al. 2011),且Cal等(2019)在斑马鱼中发现*mc1r*基因与黄色素细胞数量密切相关,推测出膜后*mc1r*基因的高表达可能与金鳟黄色素细胞有关,但其表达量与黄色素细胞数量的关系还有待进一步研究。

对12月龄虹鳟与金鳟不同组织中*mc1r*基因的表达结果分析发现,该基因在所有组织中都有一定的表达且主要集中在背部和腹部皮肤、背部和腹部肌肉及脑,这与*mc1r*基因在青鳉中的组织表达模式一致(Selz et al. 2007),但该基因只在河豚(*Takifugu rubripes*)的脑中有微弱的表达(Klovins et al. 2004),说明*mc1r*基因在不同鱼类中其组织表达模式存在较大差异。*mc1r*在黑色素合成通路中属于正调控基因,许多研究发现在黑色素沉积表型的背部皮肤中该基因的表达量比白化表型的高,例如,Wang等(2017)发现相比于野生型牙鲈(*Paralichthys olivaceus*),*mc1r*基因的表达量在白化型个体中下调;Zhang等(2017)也发现*mc1r*基因在鲫鱼(*Carassius auratus*)灰黑色皮肤中的表达量要高于红色皮肤,且在其他脊椎动物中也有类似的发现(Du et al. 2017),这与我们的结果相一致,再次验证了该基因的高表达有利于皮肤黑色素的产生,也说明*mc1r*基因的差异表达可能是造成虹鳟体色变异的重要原因之一。同时*mc1r*基因在虹鳟腹部皮肤的表达量显著高于背部皮肤,虽然有研究发现黑色素细胞可以通过背腹轴迁移方式到腹部皮肤中(Hultman et al. 2010),但虹鳟腹部皮肤中黑色素细胞数量可能远不及背部皮肤,且在金鳟腹部皮肤中也有较高的表达,再次说明*mc1r*基因的高表达可能与非黑色素细胞有关,如黄色素细胞、红色素细胞和虹彩细胞等。除 α -促

黑色素激素外,促肾上腺皮质激素也是*mc1r*基因的重要配体,在半滑舌鳎中发现*mc1r*基因在脑中高表达(Li et al. 2020)。本研究发现*mc1r*基因在虹鳟与金鳟脑中也具有较高的表达,这可能与脑是促肾上腺皮质激素的分泌部位有关。

本研究克隆了虹鳟*mc1r*基因的cDNA全长序列,进行了相关生物信息学分析,并分别对其在虹鳟与金鳟体色发生不同时期和成鱼13个组织中的表达进行了检测,本研究结果可为后期深入阐明虹鳟体色变异的分子机制积累资料。

参 考 文 献

- Boonanuntasarn S, Yoshizaki G, Iwai K, et al. 2004. Molecular cloning, gene expression in albino mutants and gene knockdown studies of tyrosinase mRNA in rainbow trout. *Pigment Cell Research*, 17(4): 413–421.
- Cal L, Suarez-Bregua P, Braasch I, et al. 2019. Loss-of-function mutations in the melanocortin 1 receptor cause disruption of dorso-ventral countershading in teleost fish. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 32(6): 817–828.
- Djurđević 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): 58–595.
- Dong Z, Luo M, Wang L, et al. 2020. MicroRNA-206 regulation of skin pigmentation in koi carp (*Cyprinus carpio* L.). *Frontiers in Genetics*, 11: 47.
- Du Z, Huang K, Zhao J, et al. 2017. Comparative transcriptome analysis of raccoon dog skin to determine melanin content in hair and melanin distribution in skin. *Scientific Reports*, 7(1): 40903.
- Hattori R S, Yoshinaga T T, Butzge A J, et al. 2020. Generation of a white-albino phenotype from cobalt blue and yellow-albino rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Inheritance pattern and chromatophores analysis. *PLoS One*, 15(1): e0214034.
- Hultman K A, Johnson S L. 2010. Difference contribution of direct-developing and stem cell-derived melanocytes to the zabrafish

- larval pigment pattern. *Developmental Biology*, 337(2): 425–431.
- Jiang Y, Zhang S, Xu J, et al. 2014. Comparative transcriptome analysis reveals the genetic basis of skin color variation in common carp. *PLoS One*, 9(9): e108200.
- 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 and Evolution*, 21(3): 563–579.
- Kobayashi Y, Chiba H, Mizusawa K, et al. 2011. Pigment-dispersing activities and cortisol-releasing activities of melanocortins and their receptors in xanthophores and head kidneys of the goldfish *Carassius auratus*. *General and Comparative Endocrinology*, 173(3): 438–446.
- Li K, Zhao N, Zhang B, et al. 2020. Identification and characterization of the melanocortin 1 receptor gene (MC1R) in hypermelanistic Chinese tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 46(3): 881–890.
- Lim J, Nam S, Jeong J H, et al. 2019. Kazinol U inhibits melanogenesis through the inhibition of tyrosinase-related proteins via AMP kinase activation. *British Journal of Pharmacology*, 176(5): 737–750.
- Lin J Y, Fisher D E. 2007. Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature*, 445(7130): 843–850.
- 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.
- Tezuka A, Yamamoto H, Yokoyama J, et al. 2011. The *MC1R* gene in the guppy (*Poecilia reticulata*): Genotypic and phenotypic polymorphisms. *BMC Research Notes*, 4: 31.
- Thomas A J, Erickson C A. 2008. The making of a melanocyte: the specification of melanoblasts from the neural crest. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 21(6): 598–610.
- Wang N, Wang R, Wang R, et al. 2017. The integrated analysis of RNA-seq and microRNA-seq depicts miRNA-mRNA networks involved in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) albinism. *PLoS One*, 12(8): e0181761.
- Wolf H E M, Boulanger M C, D'Orazio J A. 2016. Melanocortin 1 receptor: structure, function, and regulation. *Frontiers in Genetics*, 7: 95.
- Zhang Y, Liu J, Fu W, et al. 2017. Comparative transcriptome and DNA methylation analyses of the molecular mechanisms underlying skin color variations in crucian carp (*Carassius carassius* L.). *BMC Genetics*, 18(1): 95.
- Zhu W, Wang L, Dong Z, et al. 2016. Comparative transcriptome analysis identifies candidate genes related to skin color differentiation in red tilapia. *Scientific Reports*, 6: 31347.
- 封竣淇, 徐伟, 黄兰, 等. 2017. *MC1R* 基因的研究进展. *中国畜牧兽医*, 44(4): 1141–1148.
- 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.
- 任玉红, 任彬, 范瑞文, 等. 2009. 羊驼 *MC1R* 基因克隆及其在不同毛色个体中表达水平研究. *畜牧兽医学报*, 40(6): 841–845.
- 邵东宏, 李勤慎, 陈静. 2008. 鲢鳙鱼类养殖技术之二 甘肃金鲢与虹鳟生长对比试验研究. *中国水产*, (2): 35–36.
- 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, 8–10.
- 王巍, 胡红霞, 孙向军, 等. 2012. 锦鲤酪氨酸酶基因序列分析及其在不同锦鲤品系不同组织中的表达. *水产学报*, 36(11): 1658–1666.
- 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.
- 周康奇, 宋红梅, 潘贤辉, 等. 2019. 橘色双冠丽鱼体色相关基因 *mc1r* 的组织表达分析. *动物学杂志*, 54(1): 45–56.