

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20201215004

http://www.yykxjz.cn/

陈旭东, 邬国强, 宋红梅, 汪学杰, 牟希东, 刘奕, 刘超, 胡隐昌. 橘色双冠丽鱼体色相关基因 *mitf* 的结构及表达调控特性. 渔业科学进展, 2022, 43(2): 107-118

CHEN X D, WU G Q, SONG H M, WANG X J, MU X D, LIU Y, LIU C, HU Y C. Structure and expression analysis of body color-related *mitf* gene in *Amphilophus citrinellus*. Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(2): 107-118

## 橘色双冠丽鱼体色相关基因 *mitf* 的结构及表达调控特性\*

陈旭东<sup>1,2</sup> 邬国强<sup>1,2</sup> 宋红梅<sup>2①</sup> 汪学杰<sup>2</sup> 牟希东<sup>2</sup>  
刘奕<sup>2</sup> 刘超<sup>2</sup> 胡隐昌<sup>2</sup>

(1. 上海海洋大学 水产科学国家级实验教学示范中心 上海 201306; 2. 中国水产科学研究院珠江水产研究所 农业农村部休闲渔业重点实验室 广东省水产动物免疫技术重点实验室 广东 广州 510380)

**摘要** 为了解小眼畸形相关转录因子 *mitf* 基因在鱼类早期体色褪黑过程中的调控作用, 本研究采用 cDNA 末端快速扩增(RACE)技术获得橘色双冠丽鱼(*Amphilophus citrinellus*) *mitf* 基因 cDNA 序列全长, 利用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)技术检测其在橘色双冠丽鱼胚胎不同发育时期、体色褪黑不同时期和各个组织中的表达规律。获得 *mitf* 基因 2 个亚型, 其中, *mitf1* 的 cDNA 全长为 1816 bp, 包括 5'非编码区(UTR) 158 bp、3'UTR 428 bp、开放阅读框(ORF) 1230 bp, 共编码 409 个氨基酸; *mitf2* 的 cDNA 全长为 1638 bp, 包括 5'UTR 160 bp、3'UTR 428 bp 和 ORF 1050 bp, 共编码 349 个氨基酸。同源性和系统进化分析显示, *mitf1* 和 *mitf2* 聚在一小支, 与慈鲷科(Cichlidae)鱼类同源性最高, 与哺乳类动物同源性较低。qRT-PCR 结果显示, 在成鱼各个组织中, *mitf1* 和 *mitf2* 均有不同程度表达, 其中, 眼部表达量最高且显著高于其他组织( $P < 0.05$ ), 肌肉、脑和肾脏也有较高表达; *mitf1* 和 *mitf2* 在胚胎各个发育时期均有表达, 在受精卵时期表达量最高, 显著高于其他胚胎期; 随着橘色双冠丽鱼体色由黑色过渡到橘黄色, *mitf1* 和 *mitf2* 在鱼皮肤、鳞片、尾鳍中的表达均呈逐渐下降的趋势, 表明 *mitf* 基因表达与鱼体色由黑到黄转变的表型间存在关联性, 推测与鱼体色发育阶段色素细胞的分化和分布比例的动态变化相关。本研究通过了解鱼类体色发育和变异的分子基础, 可为鱼类色素细胞发育和体色人工改良积累资料。

**关键词** 橘色双冠丽鱼; 小眼畸形相关转录因子(MITF); qRT-PCR; 黑色素细胞

**中图分类号** S91 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2022)02-0107-12

MITF (microphthalmia-associated transcription factor) 发现(Hertwig, 1942), 突变体的后代会出现小眼畸形、即小眼畸形相关转录因子, 于放射诱导的突变小鼠中 早发性耳聋、皮毛和虹膜色素减退等症状。MITF 是

\* 广东省基础与应用基础研究基金项目(2020A1515010304)、中国东盟海上合作基金(CAMC-2020F)和国家水产种质资源共享服务平台(NFGR-2020)共同资助 [This work was supported by Basic and Applied Basic Research Foundation of Guangdong Province (2020A1515010304), China-ASEAN Maritime Cooperation Fund (CAMC-2020F), and National Freshwater Genetic Resource Center (NFGR-2020)]. 陈旭东, E-mail: 979926926@qq.com

① 通讯作者: 宋红梅, 副研究员, E-mail: shm1227@126.com

收稿日期: 2020-12-15, 收修改稿日期: 2021-01-26

动物皮肤、眼睛和羽毛色素中黑色素细胞发育的关键调控因子(Lin *et al.*, 2019), 具有基本-螺旋-环-亮氨酸拉链(basic helix-loop-helix-leucine zipper, bHLHZip)结构, 以二聚体的形式与酪氨酸家族启动子 Mbox 高度结合, 通过直接调控 *dct*、*tyr*、*tyrp1*、*c-kit* 和 *bcl2* 等基因的表达, 从而在黑色素细胞的发育、存活、迁移、增殖和分化过程中发挥重要作用(Steingrimsson *et al.*, 2004)。在哺乳动物中, *mitf* 基因的突变或缺失可能会导致动物耳朵、眼睛、毛发、体色等表型发生改变, 如鹌鹑(*Coturnix*)白色羽毛的产生(Minvielle *et al.*, 2010)、马(*Equus caballus*) (Hauswirth *et al.*, 2019)和犬(*Canis lupus familiaris*) (Korberg *et al.*, 2014)皮毛白色斑点的出现等。在鱼类中, *mitf* 作为治疗黑色素瘤潜在的靶基因, 已在斑马鱼(*Danio rerio*)中开展了大量研究(Lister *et al.*, 2014), 在青鳉(*Oryzias latipes*) (Li *et al.*, 2013)、锦鲤(*Cyprinus carpio*) (Liu *et al.*, 2015)、鲫鱼(*Carassius auratus*, red var.) (Zhang *et al.*, 2017)等鱼类中也开展了 *mitfa* 在胚胎和各个成鱼组织中表达情况的研究, 初步探索了 *mitfa* 在鱼类体色形成过程中的作用, 但其具体的调控机制及与其他体色相关基因的联级作用仍未被阐明。

橘色双冠丽鱼(*Amphilophus citrinellus*), 俗称红魔鬼, 原产于中南美洲的尼加拉瓜、哥斯达黎加等地, 是一种既可食用又可观赏的大型热带鱼类(Barluenga *et al.*, 2010; Kautt *et al.*, 2012)。通常 1 龄可达性成熟, 成熟后的丽鱼体色为橘红色或橘色, 生产上常将其作为父本与红头丽鱼(*Cichlasoma synspilum*)杂交, 产生更具观赏性的子一代血鸚鵡鱼(*A. citrinellus*♂×*C. synspilum*♀)。橘色双冠丽鱼在发育过程中会出现体色过渡的现象, 体色由最初黑色过渡至灰色, 灰色再过渡至亮黄色, 这一现象称为体色褪黑(蒋燕玲, 2016), 主要是由于色素细胞的形成、增殖、迁移和分化所致。橘色双冠丽鱼含 4 种色素细胞, 包括黑色素细胞、黄色素细胞、红色素细胞和虹彩细胞, 其中, 红色素细胞和虹彩细胞只在特定部位分布且数量较少, 黑色素细胞和黄色素细胞在“黑色-灰色-黄色”3 个时期均有分布, 孵化后至体色由黑到黄的转变过程中, 黑色素细胞数量呈逐渐增加而后又减少的趋势, 黄色素细胞数量则呈一直增加趋势(韦敏侠等, 2015)。目前, 国内外对鱼类早期体色褪黑这一复杂生物学过程的研究相对较少, 其调控机制仍不明确。

鱼类体色的形成和分布主要是由其体表鳞片和皮肤中色素细胞的类型、分布和数量所决定(Shi *et al.*, 2015; Yu *et al.*, 2012), 目前, 已在鱼类中鉴定出 6 种

色素细胞, 包括黑色素细胞、黄色素细胞、红色素细胞、虹彩细胞、白色素细胞和蓝色素细胞(Volkening *et al.*, 2018)。其中, 黑色素细胞分布最为广泛, 含有大量的黑色素颗粒, 能够吸收特定波长的入射光, 使鱼的颜色呈现黑色/灰色(Zhang *et al.*, 2017)。黑色素细胞起源于外胚层神经嵴细胞, 由神经嵴细胞经黑素母细胞、黑素干细胞发育成黑色素细胞(Cohen *et al.*, 2016), 黑色素细胞的形成受一系列通路和基因的严格调控(Hou *et al.*, 2008), 其中, MC1R/ $\alpha$ -MSH 信号通路(Newton *et al.*, 2007)、PI3K/Akt 信号通路(Khaled *et al.*, 2002)、MAPK 信号通路(Wang *et al.*, 2017)、WNT/ $\beta$ -catenin 信号通路(Yamada *et al.*, 2010)、NO 信号通路(Park *et al.*, 2009)为最常见的 5 条信号通路, *mitf* 作为这 5 条通路共有的靶向基因, 直接关联黑色素细胞发育所必需的多个基因的表达, 包括 *dct*、*tyr*、*c-kit* 和 *bcl2* 等, 对黑色素细胞存活、迁移、增殖和分化起着关键性作用(Steingrimsson *et al.*, 2004)。本研究拟聚焦黑色素合成关键基因 *mitf*, 检测其在橘色双冠丽鱼各组织、胚胎发育各时期和体色褪黑转换期的表达模式, 了解其在鱼类体色褪黑调控中的作用规律。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

橘色双冠丽鱼取自中国水产科学研究院珠江水产研究所。选取性成熟且体色为橘色的健康双亲进行配对, 获取不同发育时期的胚胎, 包括受精卵、卵裂期、原肠期、神经期、视泡期、听泡期、心脏形成期、血液循环期等 8 个时期胚胎(蒋燕玲, 2016)。在体色发育的 3 个褪色阶段“黑色、灰白、黄色”各取 3 尾鱼, 剥离鳞片、皮肤和尾鳍。同样选取性成熟且体色为淡黄色的橘色双冠丽鱼 3 尾, 分离鳃、脑、肌肉、性腺、眼、肾和心脏 7 个组织, 均用 Trizol 处理, 于  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱保存, 用于 RNA 提取和荧光定量分析。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 *mitf* 基因 cDNA 全长克隆** 取性成熟橘色双冠丽鱼皮肤、鳞片、尾鳍于 Trizol 中, 按 Tissue RNA kit (OMEGA)操作步骤提取总 RNA, 通过 1%琼脂糖凝胶电泳和 Synergy<sup>TM</sup> NEO HTS 多功能酶标仪检测 RNA 的完整性、纯度及浓度。利用 Prime Script<sup>TM</sup> II 1st strand cDNA synthesis kit (TaKaRa)反转录试剂盒合成 cDNA 第一链, 置于  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱保存。

根据已知慈鲷科(Cichlidae)鱼类保守序列, 利用 Primer 5.0 软件设计扩增引物 *mitf*-F 和 *mitf*-R (表 1),

以 cDNA 第一链为模板, 扩增目的基因片段。25  $\mu\text{L}$  扩增体系: 16.75  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O, 4  $\mu\text{L}$  dNTP mix, 2.5  $\mu\text{L}$  10 $\times$ Buffer, 0.5  $\mu\text{L}$  模板, 上下游引物各 0.5  $\mu\text{L}$ , 0.25  $\mu\text{L}$  rTaq 酶。反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$  预变性 3 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, 35 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$  后延伸 5 min。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 送广州艾基生物有限公司测序。根据测序结果设计 *mitf* 5'和 3'巢式引物(表 1), 通过 Smarter Race 5'/3' kit components (TaKaRa) 进行 5'末端和 3'末端序列扩增。扩增后 PCR 产物进行胶回收、连菌、37 $^{\circ}\text{C}$  培养过夜, 挑选阳性克隆进行测序。利用软件 Vector NTI 将 *mitf* 5'端、3'端及其中间序列拼接, 从而获得橘色双冠丽鱼完整 *mitf* cDNA 序列(图 1 和图 2)。

**1.2.2 生物信息学分析** 将拼接好的橘色双冠丽鱼 *mitf* 基因在 NCBI 数据库中通过 blast 功能进行同源性分析, 利用 ORF finder 查找开放阅读框; 采用 ExPASy ProtParam 分析 MITF 蛋白的理化性质, 包括蛋白质分子量、理论等电点、亲水系数等; 借助 Signal IP 4.1 进行信号肽预测; 利用 TMHMM 2.0 查找跨膜结构域; 使用 NetPhos 3.1 工具进行磷酸化位点的查找; 通过 NetNGlyc 4.0 查找糖基化位点, 借助 InterPro 进行氨基酸结构域的分析; 使用 SOPAMA 预测蛋白质二级结构; 利用 MEGA 7 软件构建系统进化树。

**1.2.3 *mitf* 基因荧光定量分析** 通过 RNA 提取试剂盒提取各胚胎、组织样品 RNA, 利用琼脂糖凝胶电泳和酶标仪检测其完整性及浓度。取 1 ng RNA 用 EVOM-MLV 反转录试剂盒合成 cDNA 第一链, 存于

-20 $^{\circ}\text{C}$  冰箱待用。根据 *mitf1*、*mitf2* 基因全长设计特异性引物(表 1), 以  $\beta$ -actin 为内参基因, 采用 Real-Time PCR 方法在 QuantStudio6 Flex 仪器上对橘色双冠丽鱼各时期胚胎和不同组织进行荧光定量分析。20  $\mu\text{L}$  反应体系: SYBR Green master mix 10  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 8  $\mu\text{L}$ , cDNA 1  $\mu\text{L}$ , 上下游引物(10  $\mu\text{mol/L}$ )各 0.5  $\mu\text{L}$ 。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, 每个样品 3 个重复。*mitf* 基因相对表达量的具体计算公式参考蒋燕玲等(2016)。利用 SPSS 22.0 软件进行单因素方差分析(one-way ANOVA)和 Duncan 多重比较。

## 2 结果

### 2.1 *mitf* 基因 cDNA 全长和氨基酸序列分析

获得橘色双冠丽鱼 *mitf* 基因 2 个亚型 *mitf1* 和 *mitf2*, 其中, *mitf1* cDNA 全长为 1816 bp, 5'UTR 长 158 bp, 3'UTR 长 428 bp, 开放阅读框(ORF)为 1230 bp, 共编码 409 个氨基酸。预测其蛋白质分子量为 39.1 kDa, 理论等电点为 5.23, 亲水性系数为-0.603。TMHMM2.0 查找发现无跨膜结构。磷酸化位点分析显示, 该蛋白包含 27 个丝氨酸(S)磷酸化位点、9 个苏氨酸(T)磷酸化位点、5 个酪氨酸(Y)磷酸化位点。使用 SOPAMA 预测蛋白二级结构, 其中,  $\alpha$  螺旋结构 131 个(占 37.01%),  $\beta$  折叠 22 个(占 6.21%), 无规则卷曲结构 177 个(占 50%), 延展链结构 24 个(占 6.78%)。

表 1 引物序列  
Tab.1 Primer sequences

引物名称 Primer name	序列 Sequence (5'~3')	用途 Purpose
<i>mitf</i> -F	CAGCAGGTGAGGCAGTATC	<i>mitf1</i> 、 <i>mitf2</i> 基因核心片段扩增
<i>mitf</i> -R	TCTGTAGGTATCTGGTCAAAGG	
<i>mitf1</i> -5'-R	ACTGGTGGGTCGCTATAAATC	<i>mitf1</i> 、 <i>mitf2</i> 基因 5'端扩增
<i>mitf1</i> -5'-R1	AAGGTGATGGTGCCGTTGTTGAG	
<i>mitf2</i> --5'-R	GGAAACATCTGGAGACATTGAG	
<i>mitf</i> -3'-F	TTCTTGGTACTGCCCATCCGAG	<i>mitf1</i> 、 <i>mitf2</i> 基因 3'端扩增
<i>mitf</i> -3'-F1	CCTCAACAACGGCACCATCACCTT	
<i>mitf1</i> -RT-F	ACGGCAAGAAGAAAACC	qRT-PCR
<i>mitf1</i> -RT-R	TTCTCGCAGTTGGAGCTAAGG	
<i>mitf2</i> -RT-F	ACAGTCATTATCAGGTGC	
<i>mitf2</i> -RT-R	TCTCTTCTCACAGTTGG	
$\beta$ -actin-F	TTGTTTCAGCCAGTTCCC	参照基因
$\beta$ -actin-R	AACCAAACCTGCATTCGC	Reference gene

```

1 ACATGGGACAGATCCAGCTGCAAGAGATGCCAGTGTGGCCACTGGCAGGGTCGAGCATGTAGGAAAGCGGCAAGAAAACCAGC
91 GACCCCTCTGCACCACAGCACCACACAGTGTCTCAACCACCTGACGCTCCACCTGGCCAGGCTGCATGAGCCAGCGCTCCATAAAA
V Q K V Q S H L E S P T K Y H I Q Q A Q R Q Q V R Q Y L S T
181 GTCCAGAAAGTGCAGTCCACCTGGAAAGTCCACCAAATACCACATCCAGCAGGCTCAGCGGAGCAGGATGAGCAGTATCTGCCACC
T L G G K A G S Q C S S Q P P E H S M P P G P G S S A P N S
271 ACCCTGGGTGGTAAAGCTGGCAGCCAGTGTCTCGAGCCAGCCCCCGAGCACAGCATGCCACCTGGGCTGGCAGCTGCACCCAAACAGT
P M A L L T L S S N C E K E L C V I Q M D D V I D D I I S L
361 CCTATGGCTTGTACCTTAGCTCCAAGTCCGAGAAAGAGCTTTGTGTATACAGATGGATGATGTCATTGATGATATTTAGCTTG
E S S Y N E D V L G L M D P G L Q M N N Q L P V S G N L L D
451 GAGTCAAGTACAATGAAGATGTTCTGGACTGATGGACCCGGGACTTCAAATGAACAACAGCTTCTGTGTGGAATTTACTGGAT
V Y S N Q G L P L P G L A I N N C P P N I K R E F T A P G M
541 GTGTACTCAACCAAGGACTTCCGCTACCAGGCTTGGCCATCAACAATGCCACCCCAACATAAAAGGGAATTTACAGCTCCTGGCATG
K Q V L D K P G S C G Q Y E N Y Q R P E S F P V E A E V R A
631 AAGCAAGTACTGGCAAGCCTGGATCCTGTGGCCAGTATGAAACTATCAAAGCCAGAGAGCTTCCAGTAGAGCCGAGTTCCTGCT
L A K E R Q K K D N H N L I E R R R R R F N I N D R I K E L G
721 CTGGCCAAAGAGAGACAGAAGAAGGATAACCACAACCTAATGAACGAAGACGGAGATTCAACATCAATGATCGCATTAAAGAGCTGGGA
T L I P K S N D P D M R W N K G T I L K A S V D Y I R K L Q
811 ACCTTAATACCCAAGTCAAATGATCCAGACATGCGCTGGAATAAGGGCACTATTCTGAAAGCCTCAGTGGACTATATCAGGAAATTCAG
R E Q Q R A K E L E C R Q R K L E H A N R H L M L R I Q E L
901 CGGGAGCAGCAGAGAGCAAGGAGCTTGAAGTGCAGCAACCGAAGCTGGAACATGCAATCGCCACCTGATGCTGCTATACAGGAGCTG
E I Q A R A H G L T V V S S T S V C A S E L M A R A I K Q E
991 GAGATCCAAGCCCGTCTCATGTTTACAGTCTGTCCATCCACATCTGCTGCGCATCAGAGCTGATGGCGGAGCCATCAAACAGGAG
P V L G D C P S E L Y Q H S S A P D M S P P T T L D L N N G
1081 CCCGTTCTGGTACTGCCATCCGAGCTTACCAGATAGCTCCGCCCCGACATGTCCTCCCAACCAACTGGACTCAACAAGGCT
G T I T F D Q I P T D A G E P G P Y G S S S A C K M K E L V
1171 ACCATCACCTTTGACCAGATACCTACAGATGCAGGGGAACCTGGACCCATGGCAGCTCCAGTGCCTGTAATAAAGAGCTGGTAAGA
D N T L G P I S P S D P L L S S M S P D V S S S I D S H H T
1261 GACAACACCTTAGGGCAATTTCCCCAGTGTATCCCTGCTGCTCAATGTCTCCAGATGTTCCAGCAGCATGCAGACCCACCATACC
S S S S L D D E E R G C *
1351 TCCAGTCAAGTCTGGATGACGAAGAGCGTGGCTGTAGCCCAACGGCATGATCTACGTTGACACTTAGATTTATAGCCACCACAGTG
1441 AGACACCAACATTACAGATATCATGTGAGTCAATAAAATAACTCATGAATGCATATTTTCTACTTTGTCCACTCTGCTGAGAAACT
1531 TTGAGTGTACATAGTCGGACAGCTCAGAATTGCATATAATATCCACAGTGTCTGGGAAACATAATTACAGCTCATTTTGGGCTTTAAA
1621 ATCTGTTTATTTTAAATATACTTTAAACATTTTCATATTTTCTAAATACACAGTGGATTGGGGAAGTAATGTCAAAGATATATGGTG
1711 CATGTGTGAAAATGCATTTGTGATAATAGCACATGTAATTTAGAAATAATAATAATATTTAGAAATTCAAAAAATAAAAAAAAAA
1801 GAAAAAATAAAAAAAAAA

```

图 1 橘色双冠丽鱼 *mitf1* 基因 cDNA 全长及氨基酸序列

Fig.1 Full-length sequence of cDNA and deduced amino acid sequences of *mitf1* in *A. citrinellus*

方框为起始密码子 ATG; \*代表终止密码子; 灰色阴影区域代表 bHLHzip 结构域。下同  
Grey box is the initiation codon; "\*" is the termination codon; Grey shade is bHLHzip domain. The same as below

```

1 ACATGGGGAATACAGTCAATATCAGGTGCAGTCCACCTGGAAAGTCCACCAAATACCACATCCAGCAGGCTCAGCGGACAGGTTG
91 AGGCAGTATCTGTCCACCACCTGGTGGTAAAGCTGGCAGCCAGTGTCTCGAGCCAGCCCCCGAGCACAGATCCACCTGGGCTGGC
S S A P N S P M A L L T L S S N C E K E M D D V I D D I I S
181 AGCAGTGCACCAACAGTCCATAGGCTTGTACCTTAGCTCCAAGTGTGAGAAAGAGATGGATGATGTCATTGATGATATTTAGC
L E S S Y N E D V L G L M D P G L Q M N N Q L P V S G N L L
271 TTGGAGTCAAGTACAATGAAGATGTTCTGGACTGATGGACCCGGGACTTCAAATGAACAACAGCTTCTGTGTGGAATTTACTG
D V Y S N Q G L P L P G L A I N N C P P N I K R E F T A P G
361 GATGTGTACTCAACCAAGGACTTCCGCTACCAGGCTTGGCCATCAACAATGCCACCCCAACATAAAAGGGAATTTACAGCTCCTGGC
M K Q V L D K P G S C G Q Y E N Y Q R P E S F P V E A E V R
451 ATGAAGCAAGTACTGGCAAGCCTGGATCCTGTGGCCAGTATGAAACTATCAAAGCCAGAGAGCTTCCAGTAGAGCCGAGTTCCTG
A L A K E R Q K K D N H N L I E R R R R R F N I N D R I K E L
541 GCTCTGGCCAAAGAGAGACAGAAGAAGGATAACCACAACCTAATGAACGAAGACGGAGATTCAACATCAATGATCGCATTAAAGAGCTG
G T L I P K S N D P D M R W N K G T I L K A S V D Y I R K L
631 GGAACCTTAATACCAAGTCAAATGATCCAGACATGCGCTGGAATAAGGGCACTATTCTGAAAGCCTCAGTGGACTATATCAGGAAATTA
Q R E Q Q R A K E L E C R Q R K L E H A N R H L M L R I Q E
721 CAGCGGGAGCAGCAGAGAGCCAGGAGCTTGAAGTGCAGCAACCGAAGCTGGAACATGCAATCGCCACCTGATGCTGCTATACAGGAG
L E I Q A R A H G L T V V S S T S V C A S E L M A R A I K Q
811 CTGGAGATCCAAGCCCGTCTCATGTTTACAGTCTGTCCATCCACATCTGCTGCGCATCAGAGCTGATGGCGGAGCCATCAAACAG
E P V L G D C P S E L Y Q H S S A P D M S P P T T L D L N N
901 GAGCCGTTCTGGTACTGCCATCCGAGCTTACCAGCATAGCTCCGCCCCGACATGTCCTCCCAACCAACTGGACTCAACAAC
G T I T F D Q I P T D A G E P G P Y G S S S A C K M K E L V
991 GGCACCATCACCTTTGACCAGATACCTACAGATGCAGGGGAACCTGGACCCATGGCAGCTCCAGTGCCTGTAATAAAGAGCTGGTA
R D N T L G P I S P S D P L L S S M S P D V S S S I D S H H
1081 AGAGACAACCCCTTAGGGCAATTTCCCCAGTGTATCCCTGCTGCTCAATGTCTCCAGATGTTCCAGCAGCATGCAGACCCACCAT
T S S S S L D D E E R G C *
1171 ACCTCAGTCAAGTCTGGATGACGAAGAGCGTGGCTGTAGCCCAACGGCATGATCTACGTTGACACTTAGATTTATAGCCACCACCA
1261 GTGAGACCAACAACTTACAGATATCATGTGAGTCAATAAAATAACTCATGAATGCATATTTTCTACTTTGTCCACTCTGCTGAGAA
ACTTTGAGTGTACATAGTCGGACAGCTCAGAATTGCATATAATATCCACAGTGTCTGGGAAACATAATTACAGCTCATTTTGGGCTTT
1441 AAAATCTGTTATTTTAAATATACTTTAAACATTTTCATATTTTCTAAATACACAGTGGATTGGGGAAGTAATGTCAAAGATATATG
1531 GTGCATGTGAAAATGCATTTGTGATAATAGCACATGTAATTTAGAAATAATAATAATATTTAGAAATTCAAAAAATAAAAAAAAAA
1621 AAAGAAAAAATAAAAAAAAAA

```

图 2 橘色双冠丽鱼 *mitf2* 基因 cDNA 全长及氨基酸序列

Fig.2 Full-length sequence of cDNA and deduced amino acid sequences of *mitf2* in *A. citrinellus*

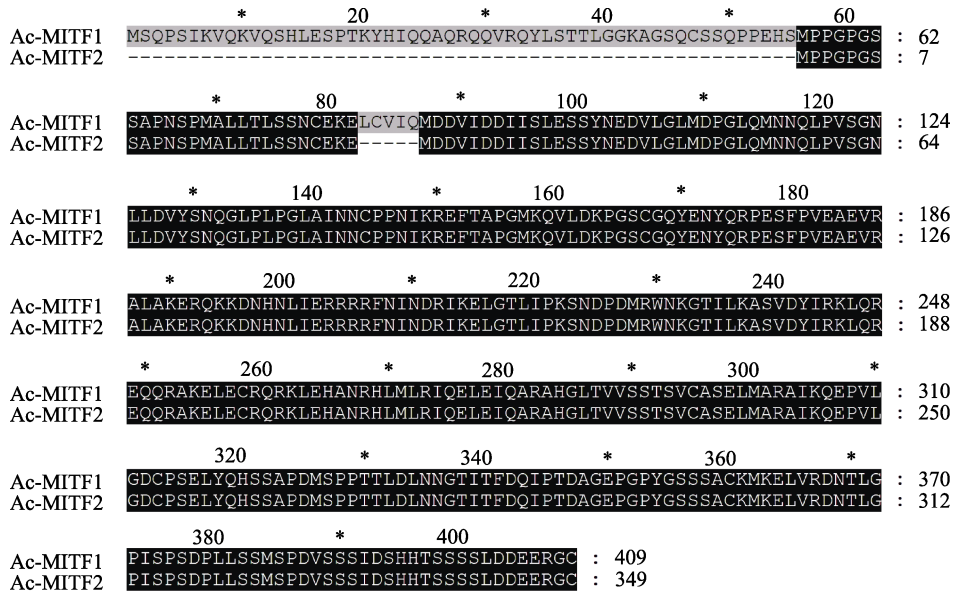


图 3 橘色双冠丽鱼 *mitf1*、*mitf2* 基因的氨基酸序列比对  
 Fig.3 Amino acid sequence alignment of *mitf1* and *mitf2* genes in *A. citrinellus*

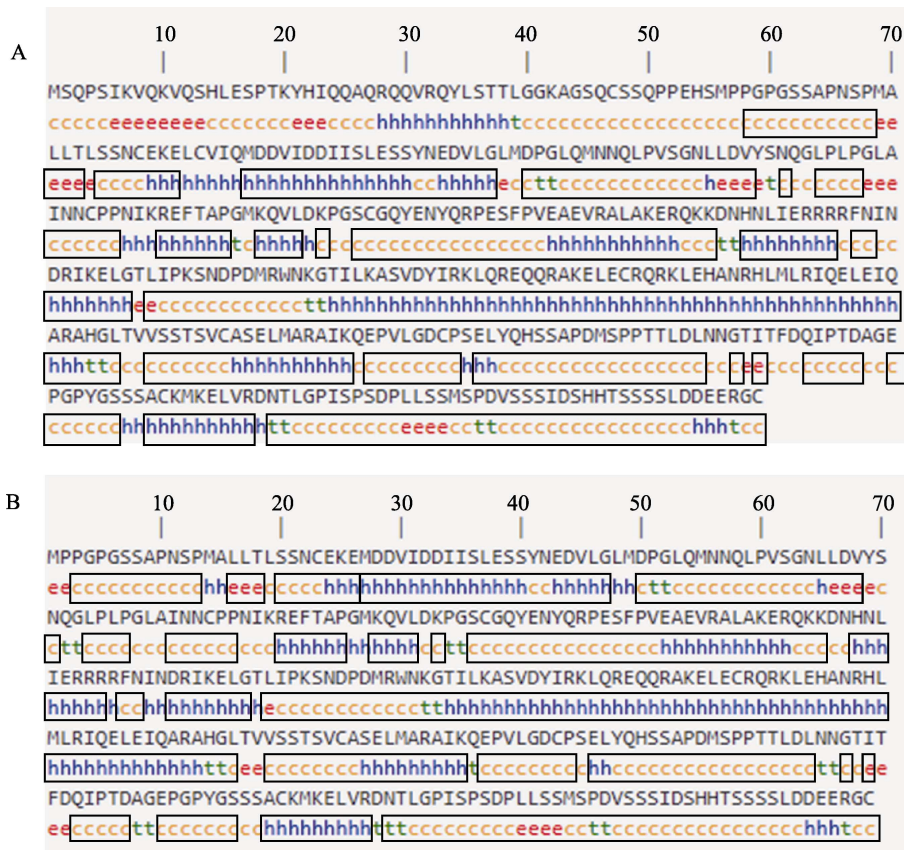


图 4 橘色双冠丽鱼 MITF1、MITF2 蛋白二级结构预测  
 Fig.4 Prediction of the secondary structure of MITF1 and MITF2 proteins in *A. citrinellus*

A: MITF1; B: MITF2; h:  $\alpha$ 螺旋; e: 延展链; c: 无规则卷曲; t:  $\beta$ 折叠;

灰色方框为 MITF1、MITF2 蛋白二级结构的相同部分

A: MITF1; B: MITF2; h: Alpha helix; e: Extended strand; c: Random coil; t: Beta turn;  
 Grey boxed are the consensus of the secondary structure of MITF1 and MITF2 proteins

*mitf2* 的 cDNA 全长为 1638 bp, 5'UTR 长 160 bp, 3'UTR 长 428 bp, ORF 为 1050 bp, 共编码 349 个氨基酸。预测其蛋白质分子量为 38.5 kDa, 理论等电点为 5.23, 亲水系数为 -0.645。*mitf1* 和 *mitf2* 氨基酸序列比对结果显示(图 3), *mitf1* 亚型氨基酸序列与 *mitf2* 亚型相比, 在 0~53 的位置多 53 个氨基酸, 82~86 的位置多 5 个氨基酸, 其余位置完全相同。TMHMM 2.0 查找发现无跨膜结构。磷酸化位点分析显示, 该蛋白包含 27 丝氨酸(S)磷酸化位点、9 个苏氨酸(T)磷酸化位点、5 个酪氨酸(Y)磷酸化位点。使用 SOPAMA 预测蛋白二级结构(图 4), 其中,  $\alpha$  螺旋结构 142 个(占 40.69%),  $\beta$  折叠 14 个(占 4.01%), 无规则卷曲结构 174 个(占 49.86%), 延展链结构 19 个(占 5.44%)。与 *mitf1* 蛋白二级结构相比, 除 0~53 和 82~86 位置多出氨基酸及个别位点结构不同外, 二级结构基本一致。

## 2.2 *mitf* 基因同源比对和系统进化树分析

橘色双冠丽鱼 2 个亚型 *mitf1* 和 *mitf2* 的 bHLHzip 结构氨基酸序列与大多数物种高度一致, 表明 bHLHzip 结构在进化过程中较为保守。利用 MegAlign 软件分析橘色双冠丽鱼 *mitf* 氨基酸序列与其他物种的同源性(表 2), 结果显示, 橘色双冠丽鱼 *mitf1* 氨基酸序列与斑马拟丽鱼(*Maylandia zebra*)、尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)和萨伊蓝六间(*Cyphotilapia frontosa*)等鱼类同源性最高, 分别为 90.7%、91.9%和 93%, 与其他硬骨鱼类如大黄鱼(*Larimichthys crocea*)、斑鱼(*Channa argus*)和孔雀鱼(*Poecilia reticulata*)也有较高的同源性, 分别达到了 85.6%、87.4%和 82.1%, 而与人(*Homo sapiens*)、黑猩猩(*Pan troglodytes*)、鸡(*Gallus gallus*)和非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)则相对较低, 只有 60%、60.9%、58.9%和 63.1%。

表 2 *mitf1*、*mitf2* 氨基酸序列的同源性  
Tab.2 GenBank accession number and the identity of *mitf1* and *mitf2*

物种(登录号) Species (Accession No.)	<i>mitf1</i> 同源性 <i>mitf1</i> identity /%	<i>mitf2</i> 同源性 <i>mitf2</i> identity /%
黑猩猩 <i>Pan troglodytes</i> (XP_009444117.2)	60.9	60.9
人 <i>Homo sapiens</i> (NP_001171896.1)	60.0	59.8
鼠 <i>Mus musculus</i> (NP_032627.1)	60.0	59.3
牛 <i>Bos taurus</i> (XP_015314994.1)	60.4	60.3
野猪 <i>Sus scrofa</i> (XP_013837338.2)	61.3	60.9
半滑舌鳎 <i>Cynoglossus semilaevis</i> (XP_016891652.1)	60.8	63.2
犬 <i>Canis lupus familiaris</i> (AAQ74413.1)	61.0	60.3
非洲爪蟾 <i>Xenopus laevis</i> (BBA54891.1)	63.1	64.4
鸡 <i>Gallus gallus</i> (BAA25648.1)	58.9	58.5
斑马拟丽鱼 <i>Maylandia zebra</i> (XP_024658401.1)	90.7	94.8
尼罗罗非鱼 <i>Oreochromis niloticus</i> (XP_005450213.1)	91.9	94.5
萨伊蓝六间 <i>Cyphotilapia frontosa</i> (ABD48780.1)	93.0	95.1
大黄鱼 <i>Larimichthys crocea</i> (XP_027138861.1)	85.6	87.1
斑鱼 <i>Channa argus</i> (AMA02077.1)	87.4	88.1
孔雀鱼 <i>Poecilia reticulata</i> (ABI64148.1)	82.1	83.5
斑马鱼 <i>Danio rerio</i> (XP_021332449.1)	68.8	67.8
虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i> (XP_021425474.1)	77.7	77.9
大马哈鱼 <i>Oncorhynchus tshawytscha</i> (XP_024237694.1)	76.3	77.6
尼加拉瓜始丽鱼 <i>Archocentrus centrarchus</i> (XP_030584900.1)	98.0	99.4
伯氏朴丽鱼 <i>Haplochromis burtoni</i> (XP_014184787.1)	93.0	95.1
布氏新亮丽鱼 <i>Neolamprologus brichardi</i> (XP_006784801.1)	91.5	93.7
盲曹鱼 <i>Lates calcarifer</i> (XP_018554530.1)	87.8	90.8
大西洋玛丽鱼 <i>Poecilia mexicana</i> (XP_014858201.1)	83.1	84.2

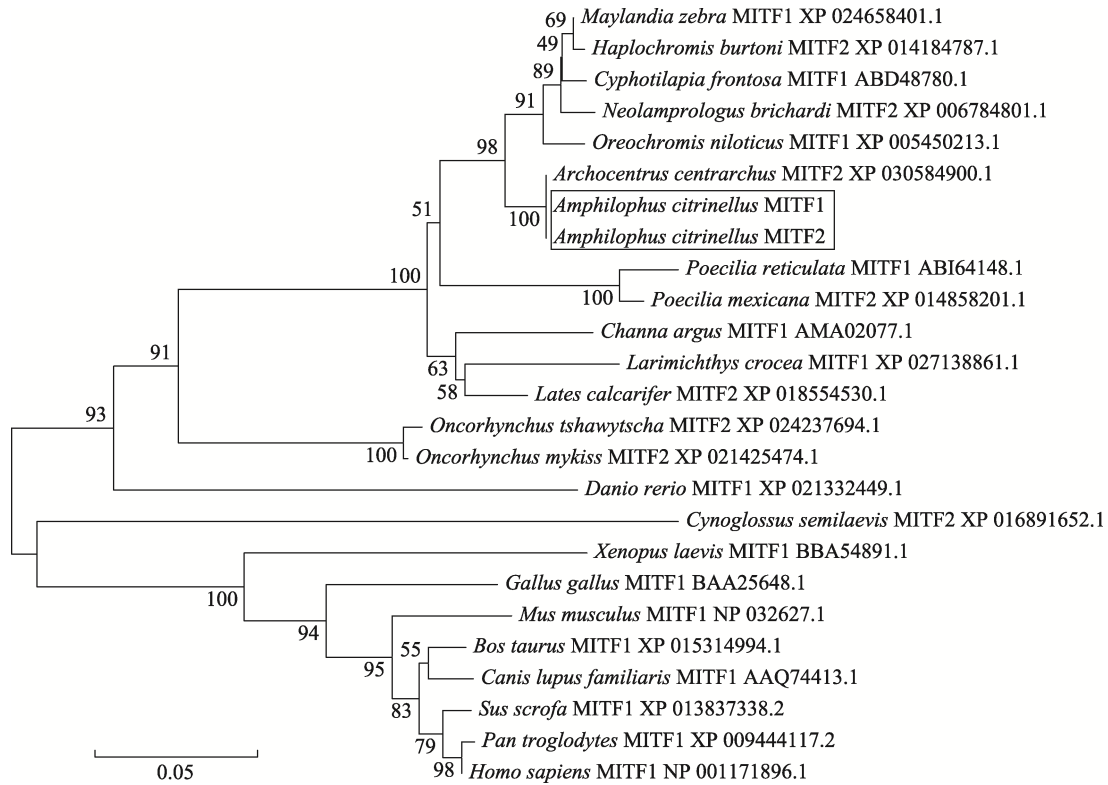


图 5 MITF1、MITF2 蛋白质序列系统进化树

Fig.5 The phylogenetic tree of protein sequences of MITF1 and MITF2

橘色双冠丽鱼 *mitf2* 氨基酸序列与人、黑猩猩、鸡和非洲爪蟾同源性同源也相对较低, 分别为 59.8%、60.9%、58.5%和 64.4%, 而与尼加拉瓜湖始丽鱼 (*Archocentrus centrarchus*)、伯氏朴丽鱼(*Haplochromis burtoni*)、布氏新亮丽鲷(*Neolamprologus brichardi*)和盲曹鱼(*Lates calcarifer*)同源性则相对较高, 都达到了 90%以上。

以邻接法(Neighbor-joining)构建橘色双冠丽鱼 MITF1、MITF2 系统进化树(图 5)。进化树分为两大支, 哺乳类、鸟类、爬行类聚为一大支, 橘色双冠丽鱼与其他慈鲷科、鲑科、鲤科鱼类聚为另一大支。其中, 橘色双冠丽鱼 MITF1、MITF2 和尼加拉瓜湖始丽鱼聚为一小支, 与斑马拟丽鱼、布氏新亮丽鲷、伯氏朴丽鱼、萨伊蓝六间、尼罗罗非鱼等鱼类亲缘关系最近; 而与人、黑猩猩、小鼠、原鸡、非洲爪蟾等亲缘关系则相对较远。

### 2.3 *mitf* 基因的表达差异分析

**2.3.1 胚胎不同发育时期中的 *mitf* 基因表达** *mitf1* 在 8 个胚胎发育时期均有不同程度的表达, 其中, 受精卵时期表达量最高, 显著高于其他 7 个时期( $P<0.05$ ), 随着胚胎的发育, 表达量逐渐下降, 在神经期和视泡期只有微量表达。胚胎在发育至听泡期时表达量骤然

上升( $P<0.05$ ), 随后在心脏形成期和血液循环期又呈现下降趋势(图 6); *mitf2* 在橘色双冠丽鱼胚胎发育的

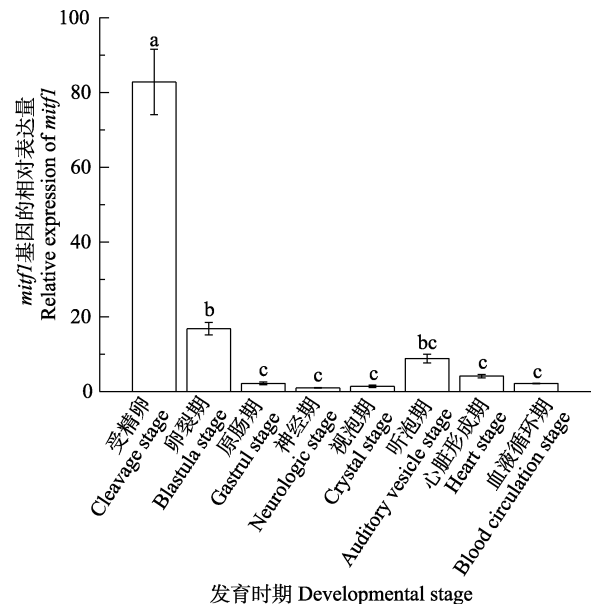


图 6 *mitf1* 在胚胎 8 个发育时期的表达差异分析  
 Fig.6 Analysis of *mitf1* gene expression at eight developmental stages

不同字母代表差异显著( $P<0.05$ )。下同  
 Different letters show significant difference ( $P<0.05$ ). The same as below

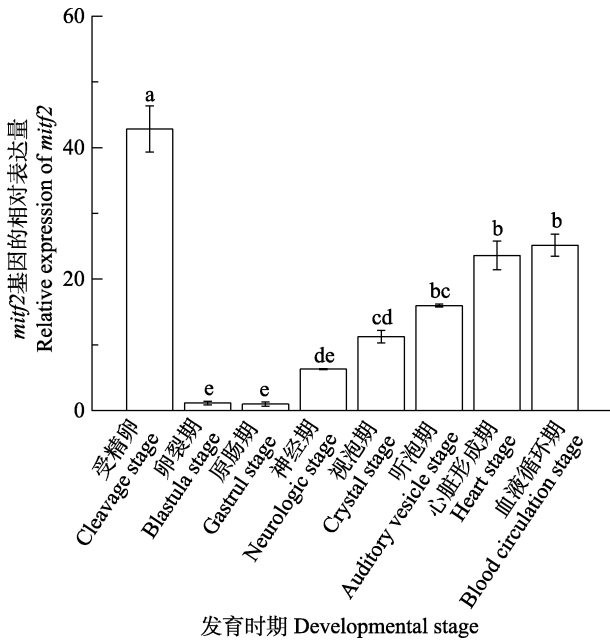


图7 *mitf2* 在胚胎8个发育时期的表达差异分析  
Fig.7 Analysis of *mitf2* gene expression at eight developmental stages

8个时期也均有表达,在受精卵时期表达量最高,显著高于其他发育时期( $P < 0.05$ )。在卵裂期、原肠期表达量骤然降低,只有微量表达。发育至神经期时表达量升高,直至血液循环期均呈上升趋势,表达量不断增加(图7)。

**2.3.2 体色过渡3个时期 *mitf* 基因的表达模式** 橘色双冠丽鱼在“黑色-灰色-黄色”3个典型的体色过渡时期,在皮肤、鳞片、尾鳍, *mitf1*、*mitf2* 均有不同程度的表达(图8和图9)。其中,在黑色过渡期皮肤中 *mitf1* 表达量最高,显著高于灰色和黄色过渡期( $P < 0.05$ ),灰色过渡期表达量略高于黑色过渡期,但无显著差异,整体呈逐渐下降的趋势,在鳞片和尾鳍中, *mitf1* 的表达趋势与在皮肤中基本一致;在皮肤中, *mitf2* 在黑色过渡期表达量最高,随着橘色双冠丽鱼发育,表达量逐渐降低,但无显著差异( $P > 0.05$ ),在鳞片和尾鳍中, *mitf2* 在3个过渡时期的表达量同样呈现下降的趋势,黑色过渡期表达量最高,显著高于灰色过渡期和黄色过渡期( $P < 0.05$ ),灰色过渡期表达量高于黄色过渡期,但无显著差异( $P > 0.05$ )。

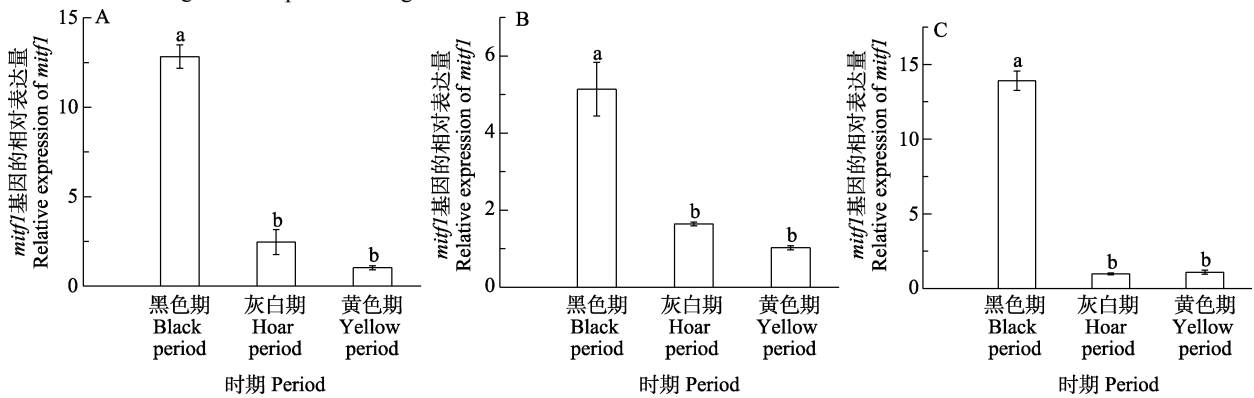


图8 *mitf1* 在不同体色过渡时期的表达差异分析  
Fig.8 Analysis of *mitf1* gene expression at different periods of color transition

A: 皮肤; B: 鳞片; C: 尾鳍  
A: Skin; B: Scale; C: Tail fin

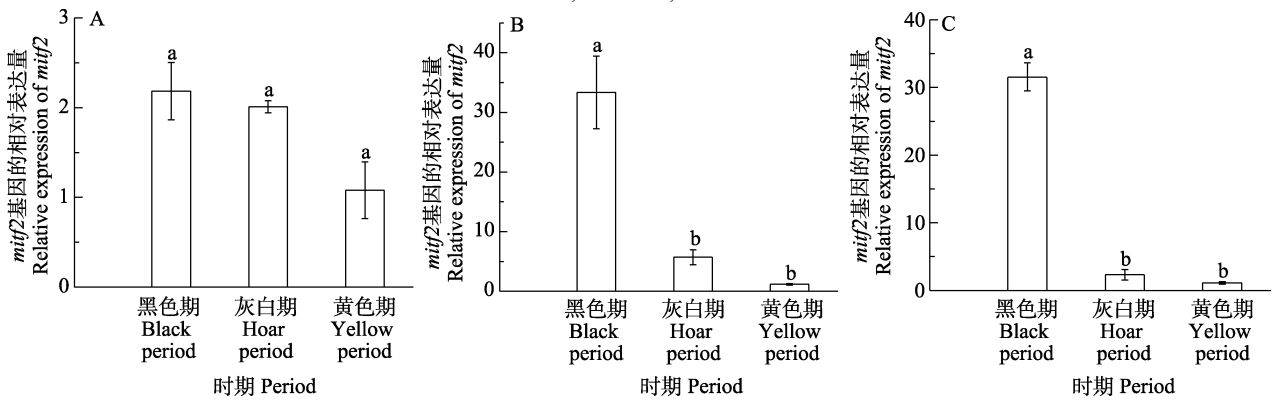


图9 *mitf2* 在不同体色过渡时期的表达差异分析  
Fig.9 Analysis of *mitf2* gene expression at different periods of color transition

A: 皮肤; B: 鳞片; C: 尾鳍  
A: Skin; B: Scale; C: Tail fin



**2.3.3 成鱼不同组织中的 *mitf* 基因表达差异** 通过实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测 *mitf1* 和 *mitf2* 在橘色双冠丽鱼不同组织中的表达差异(图 10)。结果显示, *mitf1* 在各个组织中均有表达, 眼部表达量最高, 显著高于其他 6 个组织( $P < 0.05$ ), 肌肉、肾、心脏、脑表达量也相对较高, 性腺和鳃表达量则相对低一些。*mitf2* 在 7 个组织中也均有表达, 眼部表达量同样显著高于其他组织( $P < 0.05$ ), 在鳃、脑、性腺、心脏组织中的表达量极低, 只有微量的表达, 肾和肌肉中的表达量也相对较低(图 11)。

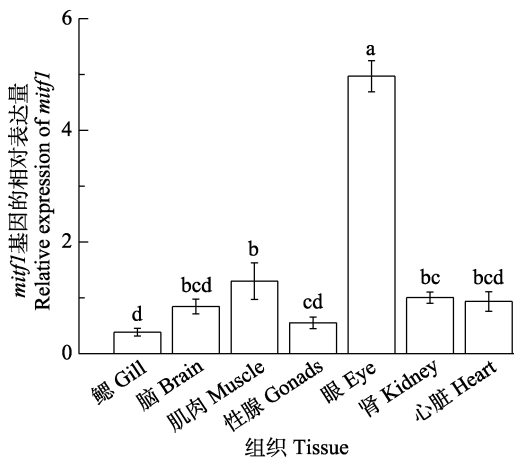


图 10 *mitf1* 在 7 种组织中的表达差异分析

Fig. 10 Analysis of *mitf1* gene expression in seven tissues

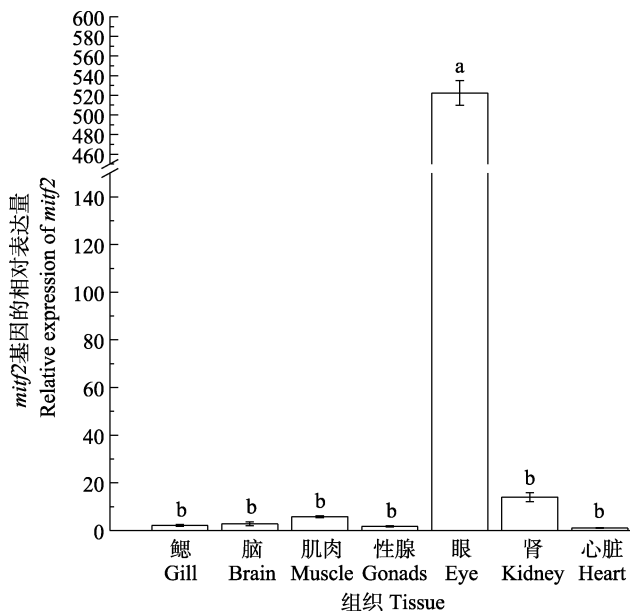


图 11 *mitf2* 在 7 种组织中的表达差异分析

Fig. 11 Analysis of *mitf2* gene expression in seven tissues

### 3 讨论

#### 3.1 *mitf* 基因的 cDNA 全长和氨基酸序列分析

通过 RACE 技术获得橘色双冠丽鱼 *mitf* 基因 cDNA 全长, 2 个亚型 MITF1 和 MITF2 均具有 3 个结构域: 靠近 N 末端的 MITF\_TFEB\_C\_3\_N 结构域、bHLHZip 结构域和一个未知功能结构域(DUF3371)。bHLHZip 结构域作为 MITF 蛋白的功能区域, 在进化过程中高度保守, 其中, HLHZip 区域能够与自身或转录因子 TFEB (transcription factor EB)、TFEC、TFE3 形成同源或异源二聚体, 通过 Basic 区域与特异的 DNA 结合行使蛋白功能, 特异性 DNA 指包含 5'-CACGTG-3'或 5'-TCATGTG-3'结构的 DNA 序列, 即 E-box 或 M-box (Bentley *et al*, 1994; Hemesath *et al*, 1994)。在哺乳动物中, 受不同启动子调控, *mitf* 编码多个蛋白质异聚体, 包括 MITF-A、B、C、D、E、H、J、M、MC、CM 等(Hershey *et al*, 2005; Shiohara *et al*, 2008), 在鱼类中, 从斑马鱼、青鳉分离得到 *mitf* 的 2 种亚型 *mitfa* 和 *mitfb* (Altschmied *et al*, 2002), 这 2 种亚型在功能上发生了分化, *mitfa* 对黑色素细胞的形成、增殖、迁移和分化起着重要的调控作用, 而 *mitfb* 不参与黑色素细胞的发育, 只在眼色素上皮细胞中表达, 参与眼调控的发育(Lister *et al*, 2014), 本研究克隆的 *mitf1* 和 *mitf2* 为 *mitf* 基因 2 个亚型, 均属于 *mitfa* 亚型, 理化性质分析结果显示, *mitf1* 和 *mitf2* 的蛋白质二级结构极为相似, 荧光定量结果显示, *mitf1* 和 *mitf2* 除了在胚胎期表达量有差异外, 在各个组织和各转换时期表达量变化趋势基本一致, 因此, 推测 *mitf1* 和 *mitf2* 更多保留了 *mitfa* 基因功能, 未出现明显基因功能分化。同源比对发现, 橘色双冠丽鱼 *mitf1*、*mitf2* 与尼加拉瓜湖始丽鱼、萨伊蓝六间、斑鱼等鱼类具有较高的同源性, 与哺乳类、鸟类、爬行类等同源性较低, 符合橘色双冠丽鱼传统进化地位。

#### 3.2 *mitf* 基因表达差异分析

**3.2.1 *mitf* 基因在胚胎发育时期的表达** *mitf1* 和 *mitf2* 在橘色双冠丽鱼 8 个胚胎发育时期均有表达, 其中, 在受精卵时期表达量最高, 显著高于其他发育期( $P < 0.05$ ), 表现出明显的时期特异性。研究发现, *mitf* 基因也在其他动物胚胎发育期开始表达, 但表达的时期较晚, 如非洲爪蟾胚胎在 21/22 期开始表达 (Kumasaka *et al*, 2010), 鸡(Mochii *et al*, 1998)和鼠 (*Mus musculus*)(Nakayama *et al*, 1998)胚胎则在 5 日龄

和 9.5 日龄开始表达。在青鳉中, *mitf* 基因在胚胎整个发育过程中最早表达于 2 细胞期(Li *et al.*, 2013a、b), 这与橘色双冠丽鱼表达模式相类似。蒋燕玲等(2016)对橘色双冠丽鱼胚胎组织学观察发现, 黑色素细胞在血液循环期才开始出现, 而 *mitf* 在受精卵时期即出现高表达现象, 结合前人报道, 推测鱼类发育早期 *mitf* 不仅调节黑色素细胞分化和发育, 对视网膜色素上皮细胞、破骨细胞和肥大细胞也有不同程度的调控作用(Bauer *et al.*, 2009)。在卵裂期, *mitf1*、*mitf2* 基因表达量骤减, *mitf1* 随胚胎发育表达量继续降低直至听泡期骤升后又继续下降, 而 *mitf2* 随胚胎发育表达量逐渐升高直至血液循环期, 仍呈现上升趋势, 预示 *mitf* 基因可能在黑色素细胞的发育过程中扮演着十分重要的角色。

**3.2.2 *mitf* 基因在不同褪色时期表达模式** 在 3 个体色过渡时期中, 皮肤、鳞片、尾鳍的 *mitf1* 和 *mitf2* 的表达量均呈逐渐下降的趋势, 其中, 黑色时期表达量最高, 除皮肤的 *mitf2* 基因表达量在 3 个过渡时期无显著差异外, 黑色时期鳞片和尾鳍中的表达量显著高于灰色期和黄色期, 与 *mitf* 下游基因 *TYR* 在橘色双冠丽鱼不同褪黑时期逐渐降低的表达模式基本一致(蒋燕玲等, 2016)。这与鱼体表面各种色素细胞的比例与分布也存在对应关系, 韦敏侠等(2015)研究发现, 橘色双冠丽鱼在黄色时期皮肤中的黄色素细胞和红色素细胞数量和分布比例增多, 黑色素细胞相对减少且处于凝集状态。在红鲫鱼发育过程中, *mitfa* 基因也呈现相同的表达趋势, 通过组织学观察发现, 红鲫鱼黑色素细胞数量随着其发育的进行逐渐减少, 体色由灰色逐渐过渡至红色, *mitfa* 表达量随之降低(Zhang *et al.*, 2017)。Liu 等(2015)检测了不同品系锦鲤中 *mitfa* 基因表达量, 发现含有黑色素细胞较多的, 体色偏白或偏黑的锦鲤 *mitfa* 表达量较高, 而含黑色素细胞较少的, 体色呈红白或全黄的锦鲤皮肤的 *mitfa* 表达量偏低, 表明 *mitfa* 表达量与黑色素细胞数量和分布比例呈正相关, 印证了 *mitfa* 基因对黑色素细胞发育和分布的重要作用, 本研究中 *mitf1* 和 *mitf2* 均属于 *mitfa*, 且也在黑色期表达量最高, 与此结果相对应。而且黄色时期橘色双冠丽鱼皮肤中可检测到 *mitfa* 基因的表达(Liu *et al.*, 2015), 可见其可能还参与调控其他色素细胞形成。

**3.2.3 *mitf* 基因在成鱼不同组织间的表达差异** *mitf1*、*mitf2* 亚型在橘色双冠丽鱼各组织中均有表达, 与 *mitf* 在青鳉中的表达趋势相类似(Li *et al.*, 2013a、b), 其中, 眼部表达量最高且显著高于其他组织, 表明 *mitf* 基因参与了橘色双冠丽鱼眼的发育调节。在哺乳动物中,

大量研究表明, *mitf* 基因的突变可能导致眼畸形的发生, 如小鼠眼畸形(Hertwig, 1942)、犬眼睛出现缺陷(Stritzel *et al.*, 2009)、牛眼睛变小(Wiedemar *et al.*, 2014)等均与 *mitf* 缺失有着密切关系, *mitf* 基因在哺乳动物眼睛发育中有着不可或缺的作用。脉络膜裂(CF)的闭合是眼睛发育的一个关键步骤, 研究显示, *mitf* 基因在颅神经嵴细胞中发挥作用, 促进脉络膜裂的闭合, 是眼睛正常发育必不可少的调节基因(Michael *et al.*, 2018)。但 Lane 等(2012)研究发现, 在具有 *mitfb* 基因突变的斑马鱼或 *mitfa*、*mitfb* 双基因突变的斑马鱼中, 其眼部发育正常, 与野生型斑马鱼无明显差异, 这一结果说明了 *mitf* 基因在斑马鱼眼睛发育过程中并非必要的, 这一结论具有颠覆性。因此, *mitf* 基因在动物眼睛发育过程中是否为必需基因值得探讨, 但本研究中, *mitf1* 和 *mitf2* 均表现为眼部表达量最高, 仍然支持其在眼睛发育中起着必不可少的作用。

## 参 考 文 献

- ALTSCHMIED J, DELFGAAUW J, WILDE B, *et al.* Subfunctionalization of duplicate *mitf* genes associated with differential degeneration of alternative exons in fish. *Genetics*, 2002, 161(1): 259–267
- BARLUENGA M, MEYER A. Phylogeography, colonization and population history of the Midas cichlid species complex (*Amphilophus* spp.) in the Nicaraguan crater lakes. *BMC Evolutionary Biology*, 2010, 10(1): 326–326
- BAUER G L, PRAETORIUS C, BERGSTEINSDOTTIR K, *et al.* The role of MITF phosphorylation sites during coat color and eye development in mice analyzed by bacterial artificial chromosome transgene rescue. *Genetics*, 2009, 183(2): 581–594
- BENTLEY N J, EISEN T, GODING C R. Melanocyte-specific expression of the human tyrosinase promoter: Activation by the microphthalmia gene product and role of the initiator. *Molecular and Cellular Biology*, 1994, 14(12): 7996–8006
- COHEN M A, WERT K J, GOLDMANN J, *et al.* Human neural crest cells contribute to coat pigmentation in interspecies chimeras after in utero injection into mouse embryos. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(6): 1570–1575
- HAUSWIRTH R, HAASE B, BLATTER M, *et al.* Mutations in MITF and PAX3 cause “splashed white” and other white spotting phenotypes in horses. *PLoS Genetics*, 2019, 15(8): e1002653
- HEMESATH T J, STEINGRIMSSON E, MCGILL G, *et al.* Microphthalmia, a critical factor in melanocyte development, defines a discrete transcription factor family. *Genes and Development*, 1994, 8(22): 2770–2780
- HERSHEY C L, FISHER D E. Genomic analysis of the Microphthalmia locus and identification of the MITF-J/*mitf*-J isoform. *Gene*, 2005, 347(1): 73–82
- HERTWIG P. Neue Mutationen und Koppelungsgruppen bei der

- Hausmaus. *Zeitschrift für Induktive Abstammungs- und Vererbungslehre*, 1942, 80(1): 220–246
- HOU L, PAVAN W J. Transcriptional and signaling regulation in neural crest stem cell-derived melanocyte development: Do all roads lead to *mitf*. *Cell Research*, 2008, 18(12): 1163–1176
- JIANG Y L, SONG H M, LIU Y, *et al.* Cloning and analysis of TYR gene and its development stages and tissue expression in *Amphilophus citrinellus*. *Chinese Journal of Agricultural Biotechnology*, 2016, 24(5): 697–707 [蒋燕玲, 宋红梅, 刘奕, 等. 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*, 2016, 24(5): 697–707]
- JIANG Y L. The development of body color of *Amphilophus citrinellus* and the cloning and analysis of body color-related gene TYR expression. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2016 [蒋燕玲. 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. 上海海洋大学硕士学位论文, 2016]
- KAUTT A F, ELMER K R, MEYER A. Genomic signatures of divergent selection and speciation patterns in a natural experiment, the young parallel radiations of Nicaraguan crater lake cichlid fishes. *Molecular Ecology*, 2012, 21(19): 4770–4786
- KHALED M. Glycogen synthase kinase 3beta is activated by cAMP and plays an active role in the regulation of melanogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(37): 33690–33697
- KORBERG I B, SUNDSTROM E, MEADOWS J R S, *et al.* A simple repeat polymorphism in the MITF-M promoter is a key regulator of white spotting in dogs. *PLoS One*, 2014, 9(8): e104363
- KUMASAKA M, SATO H, SATO S, *et al.* Isolation and developmental expression of *mitf* in *Xenopus laevis*. *Developmental Dynamics*, 2010, 230(1): 107–113
- LANE B M, LISTER J A. Otx but not *mitf* transcription factors are required for zebrafish retinal pigment epithelium development. *PLoS One*, 2012, 7(11): e49357
- LI M, ZHU F, HONG N, *et al.* Alternative transcription generates multiple *mitf* isoforms with different expression patterns and activities in medaka. *Pigment Cell and Melanoma Research*, 2013a, 27(1): 48–58
- LI M, ZHU F, HONG Y. Differential evolution of duplicated medaka fish *mitf* genes. *International Journal of Biological Sciences*, 2013b, 9(5): 496–508
- LIN R, LIN W, ZHOU S, *et al.* Integrated analysis of mRNA expression, CpG island methylation, and polymorphisms in the MITF gene in ducks (*Anas platyrhynchos*). *BioMed Research International*, 2019(3): 8512467
- LISTER J A, CAPPER A, ZENG Z Q, *et al.* A conditional zebrafish MITF mutation reveals MITF levels are critical for melanoma promotion vs. regression *in vivo*. *Journal of Investigative Dermatology*, 2014, 134(1): 133–140
- LISTER J A, ROBERTSON C P, LEPAGE T, *et al.* Nacre encodes a zebrafish microphthalmia-related protein that regulates neural-crest-derived pigment cell fate. *Development*, 1999, 126(17): 3757–3767
- LIU J H, WEN S, LUO C, *et al.* Involvement of the *mitfa* gene in the development of pigment cell in Japanese ornamental (Koi) carp (*Cyprinus carpio* L.). *Genetics and Molecular Research*, 2015, 14(1): 2775–2784
- MICHAEL H T, GRAFF-CHERRY C, CHIN S, *et al.* Partial rescue of ocular pigment cells and structure by inducible ectopic expression of *mitf*-M in MITF-deficient mice. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 2018, 59(15): 6067–6073
- MINVIELLE F, BED'HOM B, COVILLE J L, *et al.* The “silver” Japanese quail and the MITF gene: Causal mutation, associated traits and homology with the “blue” chicken plumage. *BMC Genetics*, 2010, 11: 15
- MOCHII M, MAZAKI Y, MIZUNO N, *et al.* Role of *mitf* in differentiation and transdifferentiation of chicken pigmented epithelial cell. *Developmental Biology*, 1998, 193(1): 47–62
- NAKAYAMA A, NGUYEN M T T, CHEN C C, *et al.* Mutations in microphthalmia, the mouse homolog of the human deafness gene MITF, affect neuroepithelial and neural crest-derived melanocytes differently. *Mechanisms of Development*, 1998, 70(1/2): 155–166
- NEWTON R A, ROBERTS D W, LEONARD J H, *et al.* Human melanocytes expressing MC1R variant alleles show impaired activation of multiple signaling pathways. *Peptides*, 2007, 28(12): 2387–2396
- PARK H Y, KOSMADAKI M, YAAR M, *et al.* Cellular mechanisms regulating human melanogenesis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2009, 66(9): 1493–1506
- SHI X Y, XU Y J, WU N N, *et al.* Preliminary studies on blind-side hypermelanosis of *Cynoglossus semilaevis*: Chromatophores observation and expression of proopiomelanocortin. *Progress in Fishery Sciences*, 2015, 36(2): 45–54 [史学营, 徐永江, 武宁宁, 等. 半滑舌鳎 (*Cynoglossus semilaevis*) 体表色素细胞观察及 POMC 表达特性分析. *渔业科学进展*, 2015, 36(2): 45–54]
- SHIOHARA M, SHIGEMURA T, SUZUKI T, *et al.* MITF-CM, a newly identified isoform of microphthalmia-associated transcription factor, is expressed in cultured mast cells. *International Journal of Laboratory Hematology*, 2008, 31(2): 215–226
- STEINGRIMSSON E, COPELAND N G, JENKINS N A. Melanocytes and the Microphthalmia transcription factor network. *Annual Review of Genetics*, 2004, 38(1): 365–411
- STRITZEL S, FRITSCHKE J, WOEHLKE A, *et al.* Multiple ocular malformations in two sheepdogs homozygous for the merle mutation. Mutation analysis of the SILV gene and association study using MITF-associated markers. *Tieraerztliche Praxis Ausgabe Kleintiere Heimtiere*, 2009, 37(4): 229–238
- VOLKENING A, SANDSTEDTE B. Iridophores as a source of robustness in zebrafish stripes and variability in *Danio* patterns. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 3231
- WANG Y, VIENNET C, ROBIN S, *et al.* Precise role of dermal fibroblasts on melanocyte pigmentation. *Journal of Dermatological Science*, 2017, 88(2): 159–166
- WEI M X, SONG H M, QI B L, *et al.* Pigment cells development and body color variation of postembryonic development in *Amphilophus citrinellus*. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2015, 24(1): 28–35 [韦敏侠, 宋红梅, 祁宝伦, 等. 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*, 2015, 24(1): 28–35]
- WIEDEMAR N, DROEGEMUELLER C. A 19-Mb de novo deletion on BTA 22 including MITF leads to microphthalmia

- and the absence of pigmentation in a Holstein calf. *Animal Genetics*, 2014, 45(6): 868–870
- YAMADA T, AKAMATSU H, HASEGAWA S, *et al.* Melanocyte stem cells express receptors for canonical *Wnt*-signaling pathway on their surface. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2010, 396(4): 837–842
- YU D D, LIU H J, GUAN J, *et al.* Early ontogeny of chromatophores and body color changes of *Acanthopagrus schlegelii*. *Progress in Fishery Sciences*, 2012, 33(5): 1–7 [于道德, 刘洪军, 关健, 等. 黑棘鲷早期色素细胞发育与体色变化. *渔业科学进展*, 2012, 33(5): 1–7]
- ZHANG Y, LIU J, PENG L, *et al.* Comparative transcriptome analysis of molecular mechanism underlying gray-to-red body color formation in red crucian carp (*Carassius auratus*, red var.). *Fish Physiology and Biochemistry*, 2017, 43(5): 1387–1398

(编辑 冯小花)

## Structure and Expression Analysis of Body Color-Related *mitf* Gene in *Amphilophus citrinellus*

CHEN Xudong<sup>1,2</sup>, WU Guoqiang<sup>1,2</sup>, SONG Hongmei<sup>2①</sup>, WANG Xuejie<sup>2</sup>,  
MU Xidong<sup>2</sup>, LIU Yi<sup>2</sup>, LIU Chao<sup>2</sup>, HU Yinchang<sup>2</sup>

- (1. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;  
2. Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Laboratory of Leisure Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guangdong Modern Leisure Fisheries Engineering Technology Research Center, Key Laboratory of Aquatic Animal Immune Technology of Guangdong Province, Guangzhou, Guangdong 510380, China)

**Abstract** Microphthalmia-associated transcription factor (MITF) is a transcription factor with a typical basic helix-loop-helix-leucine zipper structure. It is a key transcription factor in the melanin synthesis pathway in animals by activating downstream genes to initiate melanin synthesis. In order to explore the regulatory action of *mitf* during body color variation in *Amphilophus citrinellus*, the full-length cDNA of the *mitf* gene was cloned using the rapid amplification of cDNA ends technique, and the difference in gene expression in different developmental stages of embryos, different stages of body melanin, and various tissues in *A. citrinellus* were analyzed through qRT-PCR. Two mutant sequences of *mitf* were obtained. The full-length of *mitf1* cDNA was 1816 bp, including a 158 bp 5'UTR, a 428 bp 3'UTR, and a 1230 bp ORF coding a polypeptide of 409 amino acids. The full-length of *mitf2* cDNA was 1638 bp, including a 160 bp 5' UTR, a 428 bp 3'UTR, and a 1050 bp ORF coding a polypeptide of 349 amino acids. The analysis of the homology and phylogenetic tree results showed that *mitf1* and *mitf2* clustered into a small branch in the phylogenetic tree, which had the highest homology with Cichlidae fish and low homology with mammals. The results of the qRT-PCR showed that *mitf1* and *mitf2* were expressed to varying degrees in various tissues of adult fish, among which the expression in the eyes was the highest and was significantly higher than in other tissues ( $P < 0.05$ ), and the expression in muscle, brain, and kidney tissue was also higher. The *mitf1* and *mitf2* genes were expressed in all stages of embryonic development, and the expression level was highest in the cleavage stage, which was significantly higher than the other embryonic stages. With the body color transition from black to orange, the expression of *mitf1* and *mitf2* genes decreased gradually in the fish skin, scales, and tail fins. It showed that the expression of *mitf* was positively correlated with changes in body color from black to yellow in *A. citrinellus*, which may be related to the dynamic change in the differentiation and distribution ratio of pigment cells in the body color development stage of fish. Through understanding the molecular basis of fish body color development and variation, this study accumulates data for fish pigment cell development and the artificial improvement of fish body color.

**Key words** *Amphilophus citrinellus*; *mitf*; qRT-PCR; Melanocyte

① Corresponding author: SONG Hongmei, E-mail: shm1227@126.com