

# 半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)黑色素 富集激素基因的克隆和表达

徐永江<sup>1,2</sup> 朱学武<sup>1,3</sup> 柳学周<sup>1,2①</sup> 史学营<sup>1,3</sup>

史 宝<sup>1,2</sup> 王 滨<sup>1,2</sup> 李 斌<sup>1,3</sup>

(1. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 青岛市海水鱼类种子工程与生物技术重点实验室 中国水产科学研究院  
黄海水产研究所 青岛 266071; 2. 青岛海洋科学与技术国家实验室 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室  
青岛 266071; 3. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306)

**摘要** 为研究黑色素富集激素基因(*MCH*)表达调控与半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)无眼侧黑化性状的关系,通过分子克隆获得了半滑舌鳎*pMCH2*,通过NCBI获得了*pMCH1* cDNA序列,分析了*pMCH* mRNA的组织表达特性,探索了脑垂体和皮肤中的*pMCH* mRNA表达与无眼侧黑化程度的关系。结果显示,*pMCH1* cDNA序列长476 bp,编码134个氨基酸,与鲈形目、鲤形目和鲑形目鱼类的*pMCH1*氨基酸聚为1个进化分支。*pMCH2* cDNA序列全长为626 bp,编码147个氨基酸,与鲈形目和鲑形目鱼类的*pMCH2*氨基酸聚为1个进化分支。2种*MCH* mRNA在垂体中表达量最高,同时,*MCH1* mRNA在除肌肉外的其他组织中均可检测到表达;*MCH2* mRNA在脑、有眼侧皮肤、无眼侧正常皮肤、性腺和鳃组织中也可检测到较高表达。*MCH* mRNA表达与无眼侧黑化程度的关系分析显示,脑垂体和皮肤中*MCH1* mRNA表现出相似的表达变化趋势,都是10%黑化组的表达量最高,而后随黑化程度加大显著降低。对于*MCH2*而言,无眼侧正常鱼和无眼侧50%黑化鱼的脑垂体中都具有较高的*MCH2* mRNA表达水平,但在无眼侧10%黑化组和无眼侧80%黑化组,其表达水平显著降低。皮肤中*MCH2*表现出随黑化程度加大而显著升高的趋势。本研究结果可为认识*MCH*基因与半滑舌鳎无眼侧黑化性状的表达调控关系提供基础资料。

**关键词** 半滑舌鳎; 黑色素富集激素; 无眼侧黑化; 表达调控

**中图分类号** S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)01-0081-10

在鱼类中,黑色素富集激素(Melanin concentration hormone, MCH)基因最初是从大马哈鱼(*Oncorhynchus keta*)中分离鉴定出来的(Kawauchi *et al.*, 1983)。在体色调控方面, MCH的主要功能是弱化或抑制鲈鲷类无眼侧黑化发生。Takeshi等(2007)对牙鲈(*Paralichthys olivaceus*)的研究发现,白色养殖环境下无眼侧黑化比例显著低于黑色养殖环境,而且白色养殖环境下脑

*MCH* mRNA表达水平显著高于黑色养殖环境,表明*MCH*在抑制牙鲈无眼侧黑化方面具有重要调控作用。外源MCH处理可令条斑星鲷(*Verasper moseri*)有眼侧皮肤黑化程度大为弱化,同时脑中的*MCH* mRNA的表达水平升高(Takahashi *et al.*, 2004)。20世纪80年代以来,从大马哈鱼(Minsh *et al.*, 1989)、罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)(Gröneveld *et al.*, 1993)、虹鳟

\* 国家鲈鲷类产业技术体系项目(CARS-50)和国家国际科技合作专项(2013DFA31410)共同资助 [This work was supported by China Agriculture Research System (CARS-50) and International Science and Technology Cooperation Program of China (2013DFA31410)]. 徐永江, E-mail: xuyj@ysfri.ac.cn

① 通讯作者: 柳学周, 研究员, E-mail: liuxz@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2016-03-02, 收修改稿日期: 2016-05-06

(*Oncorhynchus mykiss*)(Baker *et al.*, 1995)、金鱼(*Carassius auratus*)(Mizusawa *et al.*, 2009)、斑马鱼(*Danio rerio*)(Berman *et al.*, 2009)、美洲拟鲮(*Pseudopleuronectes americanus*)(Tuziak *et al.*, 2012)和星斑川鲮(*Platichthys stellatus*)(Kang *et al.*, 2013)等多种鱼类的脑中相继得到了 MCH 类神经肽,特别是由斑马鱼、美洲拟鲮和星斑川鲮等中均鉴定出 MCH 的 2 种亚型基因(*MCH1* 和 *MCH2*)。Kang 等(2013)研究发现,在星斑川鲮对白色与暗色背景适应过程中,其无眼侧体色和丘脑中的 *MCH1*、*MCH2* mRNA 水平都发生了明显的差异表达变化,另有研究证实, *MCH1* 对无眼侧黑化有抑制作用(Amiya *et al.*, 2005), *MCH2* 表达量的增加导致鱼类皮肤颜色变白(Mizusawa *et al.*, 2015),表明 *MCH1* 和 *MCH2* 均参与了鲆鲽类无眼侧体色的变化调控。

半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)为暖温性近海大型底层鱼类,我国近岸海域均有分布,以渤海、黄海为多,是一种理想的增殖放流和人工养殖种类,现已成为我国鲆鲽类三大主导养殖种类之一(邓景耀等, 1988; 柳学周等, 2006)。随着养殖业的发展,养殖半滑舌鲷无眼侧体色黑化的问题日益凸显,这种无眼侧黑化现象严重影响了其市场价格(比正常鱼低 20%–30%),成为阻碍半滑舌鲷养殖产业持续发展的瓶颈之一。为深入认识半滑舌鲷无眼侧黑化发生及其抑制调控机制,作者研究了 *MCH* 基因的结构及组织表达特性,分析了其表达调控与无眼侧黑化程度的关系,以期探究 *MCH* 调控半滑舌鲷无眼侧黑化的作用机制提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验用半滑舌鲷取自山东省日照市海洋资源增殖站。取样实验鱼 3 尾,全长为 25–35 cm,体重为

250–450 g,用 MS-222 (260 mg/L)麻醉致死,快速置于冰上,取性腺、肝脏、心脏、胃、肠、脾、肾、头肾、垂体、脑、鳃、肌肉、有眼侧皮肤、无眼侧黑化皮肤(黑皮)、无眼侧正常皮肤(白皮),共 15 个组织,投入液氮中速冻,后转入–80℃超低温冰箱保存,提取总 RNA,进行基因克隆和组织表达分析。

取同一产卵批次的全长为 10–15 cm 的半滑舌鲷 12 尾,按照其无眼侧黑化面积的不同划分为 4 组(0、10%、50%、80%),每组 3 尾,取其脑垂体(脑与垂体合并)和皮肤组织,用于分析 *MCH* mRNA 表达与无眼侧黑化程度的关系。

### 1.2 总 RNA 提取和 cDNA 第 1 链的合成

利用 RNAiso Plus(TaKaRa, 日本)分别提取 1.1 中 15 个组织的总 RNA,以 1%琼脂糖凝胶电泳和 Nanodrop2000 (Thermo, 美国)检测 RNA 的质量和浓度。

取 1 μg 脑组织 RNA,以 PrimeScript RT reagent Kit 反转录试剂盒(TaKaRa, 日本)合成 cDNA 第 1 链,于–20℃保存,用于中间片段克隆。以 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech, 美国)合成 5'-RACE 及 3'-RACE cDNA 第 1 链,用于 RACE 实验。取各组织的总 RNA,用反转录合成 cDNA 第 1 链,用于 *MCH* mRNA 的定量表达分析。各操作步骤均严格按照试剂盒说明书进行。

### 1.3 *MCH2* 基因 cDNA 克隆

*pMCH2* 核心片段序列从 NCBI 下载(GenBank 序列号: XM\_008315412.1),设计 *MCH2* 的 RACE 引物 MCH2-GSP5、MCH2-GSP3、MCH2-NGSP5、MCH2-NGSP3(表 1),应用 SMART™ RACE cDNA 扩增试剂盒(TaKaRa, 日本)扩增 *pMCH2* 的 cDNA 全长序列。以脑第 1 链 cDNA 为模板,用 Smart RACE Advantage 2 PCR 试剂盒(Clontech, 美国)进行 PCR 扩增。第 1 次梯度 PCR 使用引物 MCH2-5'OUTER 和 MCH2-3'OUTER,

表 1 半滑舌鲷 *MCH2* cDNA 序列克隆引物  
Tab.1 Primers used for cloning *MCH2* of *C. semilaevis*

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'–3')	作用 Purpose
UPM-long	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	5'和 3'-RACE PCR
UPM-short	CTAATACGACTCACTATAGGGC	5'和 3'-RACE PCR
NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	5'和 3'-RACE 巢式 PCR
MCH2-5'OUTER	TTCCCCAGCAGGGTCGGTAAACTCT	MCH2 5'-RACE PCR
MCH2-5'INNER	GGTTTCCGTCGTCTGCTCTGTAGTTGTT	MCH2 5'-RACE 巢式 PCR
MCH2-3'OUTER	ATCGTCTGGTGACCTCTGACCCCTG	MCH2 3'-RACE PCR
MCH2-3'INNER	CCGCCACAGGAGTCGTGATGTTTTTC	MCH2 3'-RACE 巢式 PCR

反应体系(25  $\mu$ l): 17.25  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O、2.5  $\mu$ l Buffer、0.5  $\mu$ l 50 $\times$ dNTP Mix、0.5  $\mu$ l 50 $\times$ Advantage 2 Polymerase Mix、1.25  $\mu$ l cDNA、2.5  $\mu$ l UPM 引物和 0.5  $\mu$ l OUTER 引物; PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 30 s、67 $^{\circ}$ C 30 s(每个循环递减 0.5 $^{\circ}$ C)、72 $^{\circ}$ C 1 min, 15 个循环; 94 $^{\circ}$ C 30 s、58 $^{\circ}$ C 30 s、72 $^{\circ}$ C 1 min, 共 28 个循环。

以 *pMCH2* 第 1 次 PCR 产物为模板, 使用引物 MCH2-5'INNER 和 MCH2-3'INNER 分别进行巢式 PCR, 反应体系(25  $\mu$ l)为: 1.25  $\mu$ l 第 1 次 PCR 产物稀释液、19.25  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O、2.5  $\mu$ l Buffer、0.5  $\mu$ l 50 $\times$ dNTP Mix、0.5  $\mu$ l 50 $\times$ Advantage 2 Polymerase Mix、0.5  $\mu$ l NUP 引物、0.5  $\mu$ l INNER 引物, PCR 扩增条件同第 1 次 PCR。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳后, 切胶回收、连接、转化, 接种至 LB 固体培养基, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。以通用引物 M13F 和 M13R 进行菌落 PCR 扩增, 反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, (94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 50 s) 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。挑选阳性克隆送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

#### 1.4 *MCH* mRNA 的定量表达分析

根据从 NCBI 下载的 *pMCH1*(GenBank 序列号: XP\_008322511.1)的 cDNA 序列和本研究获得的半滑舌鲷 *pMCH2* 的 cDNA 序列全长, 分别设计 2 对定量

引物 MCH1-DF 和 MCH1-DR、MCH2-DF 和 MCH2-DR, 以  $\beta$ -actin 为内参设计定量引物  $\beta$ -actin-F 和  $\beta$ -actin-R, 定量 PCR 所用各引物序列见表 2。

*$\beta$ -actin*、*pMCH1* 和 *pMCH2* 定量 PCR 扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s, 95 $^{\circ}$ C 5 s, 58 $^{\circ}$ C 20 s, 共 40 个循环。标准曲线制作以脑 cDNA 为模板(同 1.3)进行 5 倍梯度稀释成 6 个标准品进行。每一组织样品的分析设置 3 个重复, 每次实验均设置空白对照, PCR 特异性扩增效率为 95%–106%。

#### 1.5 结果分析

*pMCH* 基因的序列拼接、氨基酸序列推导、分子量预测、等电点预测及氨基酸同源性分析均使用 DNASTAR 5.0.1, 信号肽预测使用 SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)。氨基酸序列比对和系统进化分析使用 ClustalX 2.0.12 (<http://www.clustal.org/download/current/>) 和 MEGA 5.1 (<http://www.megasoftware.net/mega51.html>)。系统进化树构建使用 MEGA 5.1 软件中 Neighbor-joining 法(自展值为 1000)。

定量 PCR 分析利用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  方法计算目的基因的相对表达量(Livak *et al.*, 2001)。实验数据采用 SPSS(17.0 版本)统计进行单因素方差分析(One-way ANOVA)和 Duncan's 多重比较分析, 当  $P < 0.05$  时为差异显著。

表 2 半滑舌鲷 *MCH1*、*MCH2* 和  $\beta$ -actin 实时定量 PCR 用引物序列

Tab.2 Primers used in real-time PCR assays for *MCH1*, *MCH2* and  $\beta$ -actin of *C. semilaevis*

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'-3')	作用 Purpose
MCH1-DF	ATGCGTCCGTCACCTGCTATC	<i>MCH1</i> Real-time PCR
MCH1-DR	TGTCGTCGTCTTTGGTCATC	
MCH2-DF	AGCCTGGGTTTCGTTACTGG	<i>MCH2</i> Real-time PCR
MCH2-DR	TTTCCGTCGTCTGCTCTGTA	
$\beta$ -actin-F	GTAGGTGATGAAGCCCAGAGCA	$\beta$ -actin Real-time PCR
$\beta$ -actin-R	CTGGGTCATCTTCTCCCTGT	

## 2 结果

### 2.1 *pMCH* cDNA 序列结构分析

半滑舌鲷 *pMCH1* cDNA 序列长为 476 bp, 包括 405 bp 的开放阅读框(ORF)、71 bp 的 3'非编码区(3'-UTR), 编码 134 个氨基酸, 信号肽长为 24 个氨基酸(图 1), 成熟肽分子量为 14.8 kDa, 等电点为 6.46。*pMCH2* cDNA 序列全长为 626 bp, 包括 444 bp 的 ORF、32 bp 5'-UTR 和 150 bp 的 3'-UTR, 编码

147 个氨基酸, 信号肽长为 18 个氨基酸(图 1), 成熟肽的分子量为 16.2 kDa, 等电点为 5.89。

半滑舌鲷 *MCH* 2 个亚基序列的 C 端区域均有 1 个 RR 裂解位点, 其成熟肽序列中都包含有 2 个保守的环状结构, 由 2 个半胱氨酸残基相互间形成二硫键形成。*MCH1* 成熟肽含有 17 个氨基酸(DNMRCMVG-RVYRPECWEV), 而 *MCH2* 成熟肽则由 21 个氨基酸(ELDMLRCMIGRVYRPECWGTSN)组成, 这种氨基酸组成的差异提示其可能存在功能上的差异。

*PMCH1*

1 ATG CGT CCG TCA CTG CTA TCC GTG ATC TTC GCT GTC TCG CTC ATT TTC AAG TGC TAC GTG 60  
 1 M R P S L L S V I F A V S L I F K C Y V 20  
 61 CTC TCA GGC GCA CTG CCC ATG ATG ACC AAA GAC GAC AAC GCG TTA GAC CAG GAG ACA 120  
 21 L S G A L P M M T K D D D N A L D Q E T 40  
 121 TTT GCT TCG CTG CTG AGC GAT AAG GCG ACG GAA AAT GGC CTA GCT GAT GGA GAT CTG GGC 180  
 41 F A S L L S D K A T E N G L A D G D L G 60  
 181 GCA GAC CTG AAG GCG AGA GGC TCC AAG ATC ATC GTC GTG GCC AGC CCA AAC CTT TTG AGG 240  
 61 A D L K A R G S K I I V V A S P N L L R 80  
 241 GAC CTG CGG GTG CTG AAC GGT GGG ATG TCA CTG TAC AAG AGA CGA GCG GAC AAC CAG GTC 300  
 81 D L R V L N G G M S L Y K R R A D N Q V 100  
 301 TCC ACC GCT TCC GAC ACC AAC CAG GAC ATG GAC ATC CCC ATC CTG AGG AGG GAC AAC ATG 360  
 101 S T A S D T N Q D M D I P I L R R D N M 120  
 361 AGG TGC ATG GTG GGA CGA GTC TAC AGG CCG TGC TGG GAG GTG TAG GAC CGG GAG AGA GAG 420  
 121 R C M V G R V Y R P C W E V \* 134  
 421 AGA GGC GTT CTC CAT GTC TTC ATC GTC CTC AAC ATC CTC CTA ATA AAC CCC CAA AA

*PMCH2*

-32 AC ATG GGG ATC AGC AGA TTC AGA GGC TCC ACC  
 1 ATG ATC TCC GTC TCC TCC GTC CTC ATC ACT TTG GTG CTG TCC TCA GTC CTG AGC AGC CAC 60  
 1 M I S V S S V L I T L V L S S V L S S H 20  
 61 CTA GTG GTC GTA GCC ATG CCC GAG ACC AAG GGA GAA GAT GCC ATG ATG GAG CAG GAC AGC 120  
 21 L V V V A M P E T K G E D A M M E Q D S 40  
 121 CTG GGT TCG TTA CTG GGG GAG GAG AGC CTG ACG GAC CGA GCC ATG CTT CCA TCA GCG TAT 180  
 41 L G S L L G E E S L T D R A M L P S A Y 60  
 181 GCT AAC GGC CTG ATG TTG AAC AAC TAC AGA GCA GAC GAC GGA AAC CCT AAC GTT CTA ATT 240  
 61 A N G L M L N N Y R A D D G N P N V L I 80  
 241 TTC TCG GAC ATG CGG CAA AAA GGA CAG GGC ATT CGT GGG CTG AGT CCA GGT TTT ACC CGA 300  
 81 F S D M R Q K G Q G I R G L S P G F T R 100  
 301 AGC CTT CCT CAA ATC ACA GAC CGA AAG ATG AAC CAG TCC CCG GGC GAA TAT AGT CTG AAA 360  
 101 S L P Q I T D R K M N Q S P G E Y S L K 120  
 361 ATG GAT CGA CGA AAC ACT GAA CTT GAC ATG CTG CGC TGC ATG ATA GGC AGA GTT TAC CGA 420  
 121 M D R R N T E L D M L R C M I G R V Y R 140  
 421 CCC TGC TGG GGA ACC TCC AAC TGA ACG CAT CAT CAA AAA TCC AAT ACC TTA TTG TTG TGT 480  
 141 P C W G T S N \* 147  
 481 GTT TAG ATC TTT TTA TTC ATT TTC CTT GTA CAA ACA AAC AAT TGT GCA CAG AAC ATA AAA 540  
 541 CAA AAT AAA AAA TGT ATT TAA TCG TAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA 594

图1 半滑舌鳎 *pMCH1* 和 *pMCH2* 基因的 cDNA 序列及其推导的氨基酸序列Fig.1 Nucleotides and deduced amino acid sequences of *pMCH1* and *pMCH2* cDNA of *C. semilaievis*

虚线部分为信肽序列, 实线部分为 MCH 成熟肽序列, 3'-UTR 端 AATAA 序列以方框标注,

终止密码子(TGA)以星号标注, 圆圈部分为组成二硫键的半胱氨酸残基

Signal peptide was indicated by a broken underline; the mature peptide of MCH was indicated by an underline; the nucleotides corresponding to the polyadenylation signal in the 3'-untranslated region (AATAA) were marked with box; the asterisk indicated the stop codon (TGA); the cysteine residues to form disulfide linkage were circled

## 2.2 氨基酸序列同源性分析

半滑舌鳎 *MCH* 的氨基酸序列与鲈形目、鲆形目鱼类 *MCH* 的氨基酸序列的相似性最高为 57.3%~66.9%。其中, *pMCH1* 与牙鲆、条斑星鲽、星突江鲽、

罗非鱼等具有较高的氨基酸相似性(58.4%~66.9%), 与软骨鱼类的相似性为 37.3%, 而与哺乳类的相似性降至 30%以下; *pMCH2* 基因的氨基酸序列与条斑星鲽、星突江鲽、牙鲆和布氏新亮丽鲷(*Neolamprologus*

*brichardi*)具有较高相似度(56.0%–61.3%),与哺乳动物的相似度降低到 25%以下,但与大鼠(*Rattus norvegicus*)的同源性却高达 53.7%(表 2)。MCH 2 个亚基间氨基酸相似度仅为 22.3%,但其成熟肽序列高度保守,C 端区域都具有保守的 RR 裂解位点,且都有 2 个保守的环状结构。

### 2.3 系统进化分析

半滑舌鲷 *pMCH1* 和 *pMCH2* 亚基分别处于 2 个不同的进化分支。*pMCH1* 与鲈形目、鲤形目和鲑形目鱼类的 *pMCH1* 处于同 1 个小分支,并与其他鱼类的 *pMCH1* 组成 1 个大分支;而 *pMCH2* 则与鲈形目、鲑形目鱼类的 *pMCH2* 组成 1 个小分支,并且与其他鱼类的 *pMCH2* 以及鸟类、哺乳类和人的 *MCH* 组成 1 个大分支(图 3)。表明 *MCH* 的 2 个亚基的进化分化时间可能比较早。

### 2.4 MCH mRNA 的组织表达特性

*MCH1* 和 *MCH2* 都在垂体中的表达量最高。另

外, *MCH1* mRNA 在脑、有眼侧皮肤、性腺、脾脏、肝脏和肠中检测到较高表达,而无眼侧黑化皮肤、无眼侧正常皮肤、心脏、头肾和鳃中表达量较低,肌肉中未检测到表达; *MCH2* mRNA 在脑、有眼侧皮肤、无眼侧正常皮肤、性腺和鳃中检测到较高表达,而无眼侧黑化皮肤、脾脏、肠、胃、心脏和头肾中有少量表达。有眼侧皮肤中 *MCH1* mRNA 表达显著高于无眼侧黑化皮肤和无眼侧正常皮肤,无眼侧黑化皮肤中 *MCH1* mRNA 表达显著高于无眼侧正常皮肤;有眼侧皮肤和无眼侧正常皮肤中 *MCH2* mRNA 表达显著高于无眼侧黑化皮肤(图 4)。

### 2.5 MCH mRNA 表达与无眼侧黑化程度的关系

检测了无眼侧黑化程度不同的半滑舌鲷脑垂体和皮肤中 *MCH* mRNA 的表达情况(图 5)。*MCH1* mRNA 在脑垂体和皮肤中表现出类似的表达变化趋势,都在 10%黑化组表达量达最高值,而后随着黑化程度的增加显著降低。对于 *MCH2* 而言,无眼侧正常鱼和无眼侧 50%黑化鱼的脑垂体中都具有较高

表 3 半滑舌鲷 *MCH* 氨基酸序列与其他脊椎动物的相似度比较

Tab.3 Homology comparison of the precursor peptide sequences of *MCH* genes between *C. semilaevis* and other vertebrates

物种 Species	序列号 GenBank Accession No.	同源性 Homology (%)	
		<i>pMCH1</i>	<i>pMCH2</i>
半滑舌鲷 <i>C. semilaevis</i> -1	XP_008322511.1	100	22.3
半滑舌鲷 <i>C. semilaevis</i> -2	XM_008315412.1	22.3	100
牙鲆 <i>P. olivaceus</i> -1	ABY73341.1	66.9	21.1
牙鲆 <i>P. olivaceus</i> -2	AAF67166.1	27.6	56.0
条斑星鲈 <i>V. moseri</i> -1	BAC82350.1	66.2	21.1
条斑星鲈 <i>V. moseri</i> -2	BAO58688.1	25.8	59.3
美洲拟鲈 <i>P. americanus</i> -1	AEE36642.1	37.3	12.2
美洲拟鲈 <i>P. americanus</i> -2	AEE36640.1	23.8	53.3
布氏新亮丽鲷 <i>N. brichardi</i> -1	XP_006803543.1	59.1	23.1
布氏新亮丽鲷 <i>N. brichardi</i> -2	XP_006780942.1	24.0	57.3
星斑川鲈 <i>P. stellatus</i> -1	AHB33367	61.8	23.1
星斑川鲈 <i>P. stellatus</i> -2	AHB33368.1	27.2	61.3
罗非鱼 <i>O. niloticus</i> -1	XP_003440133.1	58.4	21.1
罗非鱼 <i>O. niloticus</i> -2	XP_005475951.1	24.1	53.1
网纹鲈 <i>Poecilia reticulata</i> -1	XP_008422825.1	55.5	23.8
网纹鲈 <i>P. reticulata</i> -2	XP_008399128.1	25.7	40.1
红鳍东方鲀 <i>Takifugu rubripes</i> -1	XP_003965152.1	50.0	24.5
红鳍东方鲀 <i>T. rubripes</i> -2	XP_003972798.1	25.2	44.2
大马哈鱼 <i>O. keta</i> -1	P17640.1	42.9	27.2
大马哈鱼 <i>O. keta</i> -2	P69156.1	42.2	25.5
斑马鱼 <i>D. rerio</i>	NP_001189471.1	25.7	23.2
大鼠 <i>Rattus norvegicus</i>	AAA41580.1	23.6	53.7
鸡 <i>Gallus gallus</i>	ADL61813.1	18.8	21.1
路氏双髻鲨 <i>Sphyrna lewini</i>	BAM63324.1	37.3	24.8
人 <i>Homo sapiens</i>	AAA63214.1	23.0	21.8

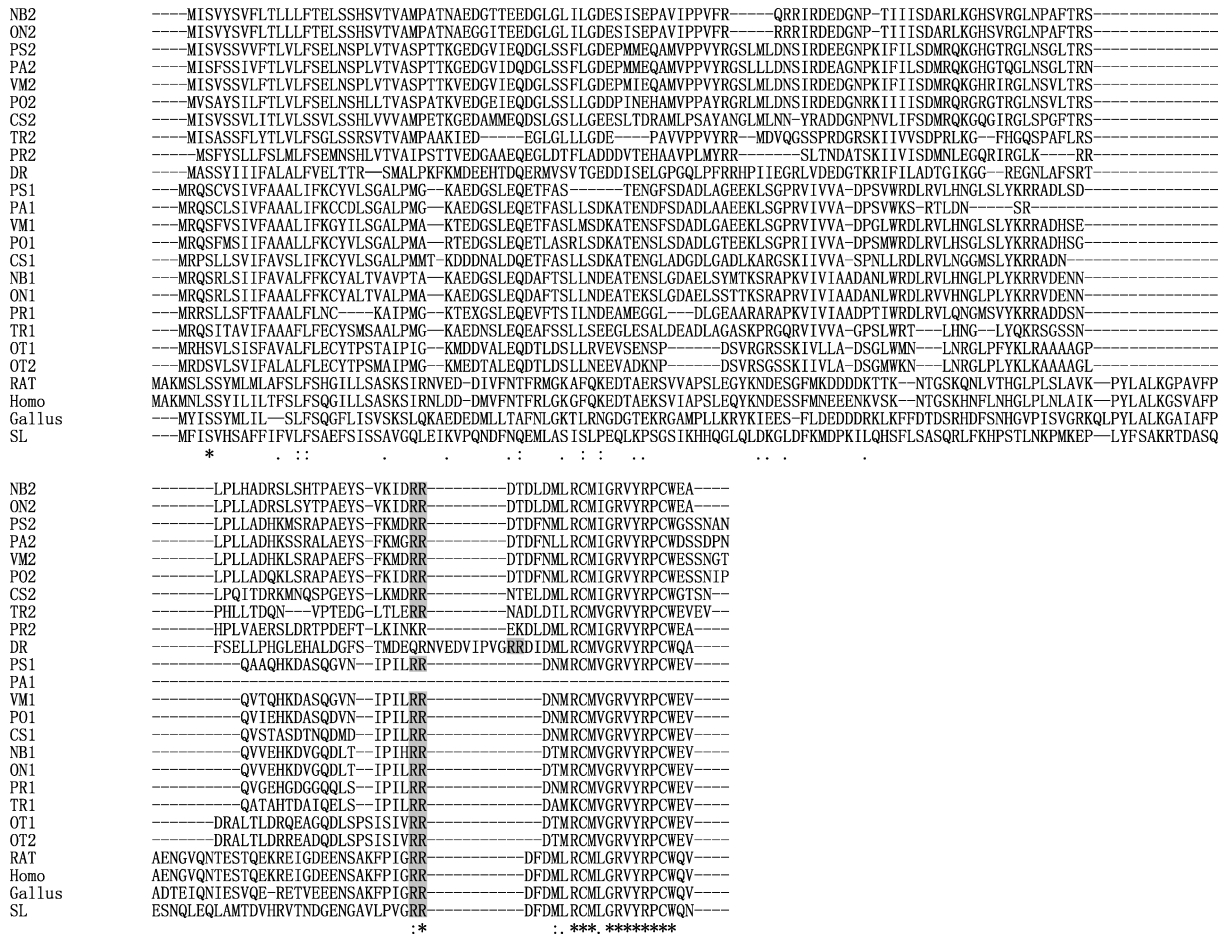


图 2 半滑舌鲷 MCH 氨基酸与其他脊椎动物 MCH 氨基酸序列比对

Fig.2 Comparison of the amino acid sequences of *C. semilaevis* MCH gene and other vertebrates

灰色为二元精氨酸残基组成的蛋白质水解切割位点；MCH 氨基酸序列号见表 3；“\*”表示一致的氨基酸；“.”表示高度保守度的氨基酸；“.”表示低保守度的氨基酸；在部分序列引入空白(连字符表示)来最大限度进行比对分析；NB1、NB2：布氏新亮丽鲷；ON1、ON2：罗非鱼；PS1、PS2：星斑川鲈；PA1、PA2：美洲拟鲈；VM1、VM2：条斑星鲈；PO1、PO2：牙鲆；CS1、CS2：半滑舌鲷；TR1、TR2：红鳍东方鲀；PR1、PR2：网纹鲈；OT1、OT2：大马哈鱼；DR：斑马鱼；RAT：褐鼠；Homo：人类；Gallus：鸡；SL：路氏双髻鲨

The dibasic (RR) cleavages of various MCHs were shown in shadow; GenBank accession numbers are shown in Tab.3; Asterisks (\*) indicated identical amino acid sequences; Dot (.) indicated highly conserved amino acid sequences; Dot (.) indicated amino acid sequences of low degree conserved; Gaps (indicated by hyphens) were introduced in some sequences to maximize alignment; NB1, NB2: *N. brichardi*; ON1, ON2: *O. niloticus*; PS1, PS2: *P. stellatus*; PA1, PA2: *Pseudo-pleuronectes americanus*; VM1, VM2: *V. moseri*; PO1, PO2: *P. olivaceus*; CS1, CS2: *C. semilaevis*; TR1, TR2: *T. rubripes*; PR1, PR2: *P. reticulata*; OT1, OT2: *O. keta*; DR: *D. rerio*; RAT: *R. norvegicus*; Homo: *H. sapiens*; Gallus: *Gallus*; SL: *S. lewini*

mRNA 表达水平，但在无眼侧 10%黑化组和无眼侧 80%黑化组其表达水平显著降低。皮肤中 MCH2 的表达量表现出随黑化程度加大而显著增强的趋势，在无眼侧 80%黑化组则显著升高至最高值。

### 3 讨论

本研究获得了半滑舌鲷 pMCH2 的 cDNA 序列全长。结合 NCBI 数据库已有 pMCH1 序列，比对分析了半滑舌鲷 2 个 MCH 亚基的结构，发现其氨基酸同

源性仅为 22.3%，特别是在成熟肽序列上差异明显，表明其进化保守性较低，其生理功能可能存在显著差异。系统进化分析表明，半滑舌鲷 MCH 的 2 个亚基分别属于 2 个不同的进化分支，表明其祖先基因复制分化的时间可能较早，且朝两个不同方向进化，其具体功能的差异尚需进一步研究确证。

本研究发现，半滑舌鲷 MCH mRNA 在垂体中表达量最高，这与美洲拟鲈(Tuziak et al, 2012)、星斑川鲈(Kang et al, 2013)和牙鲆(Jeon et al, 2003) MCH

mRNA 主要在脑和垂体中表达的研究结果相似。半滑舌鳎 *MCH1* mRNA 在除肌肉外的其他组织中均可检测到表达; *MCH2* mRNA 在脑、有眼侧皮肤、无眼侧正常皮肤、性腺和鳃也可检测到较高表达, 其他外围组织中微量表达, 这与牙鲆 *MCH* mRNA 的组织表达特性不同, 牙鲆 *MCH* mRNA 在除垂体外的其他组织

中没有检测到表达(Jeon *et al*, 2003)。而 Kang 等(2013)对星斑川鲷 *MCH* 的研究表明, 除垂体外, 只在鳃和精巢中检测到 *MCH1* mRNA 微量表达, 鳃、心、精巢中 *MCH2* mRNA 微量表达。在美洲拟鲷中则发现, *MCH1* mRNA 在除心和肝脏外的其他组织中均可检测到表达, *MCH2* mRNA 在所有组织中均检测到表

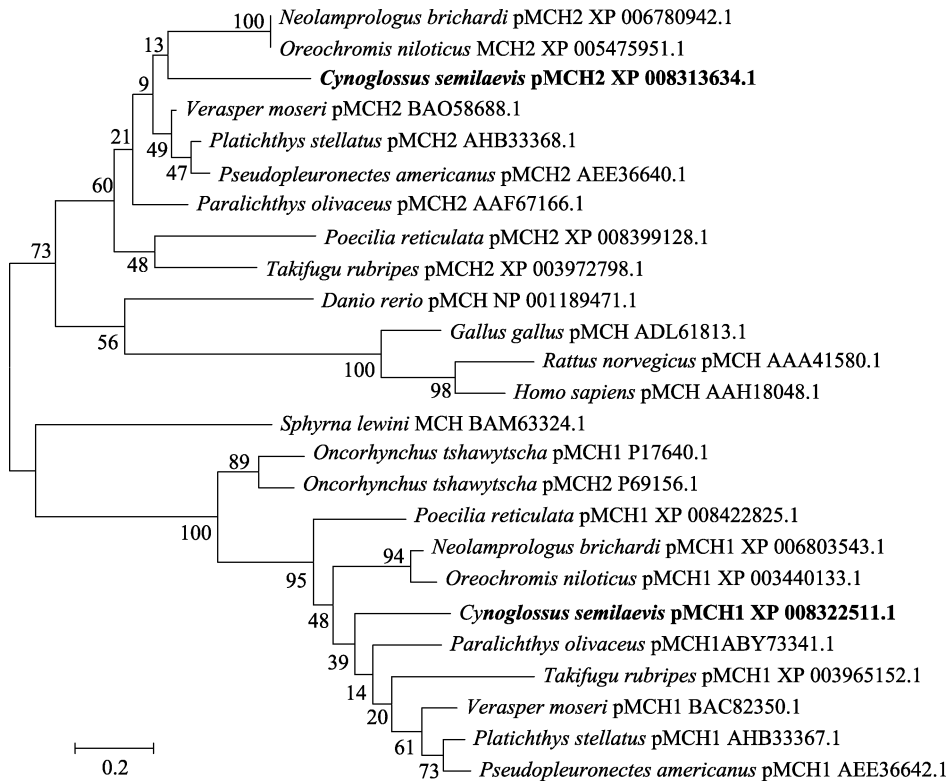


图 3 基于 *MCH* 氨基酸序列的 NJ 系统进化树

Fig.3 NJ phylogenetic tree based on the *MCH* amino acid sequences

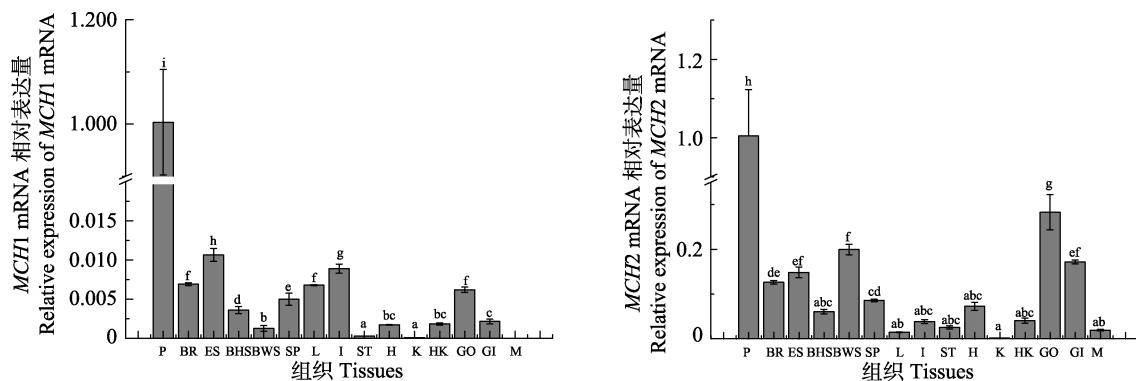


图 4 半滑舌鳎 *MCH* mRNA 的组织表达分析

Fig.4 Spatial expression pattern of *MCH* mRNA in *C. semilaevis*

P: 垂体; BR: 脑; ES: 有眼侧皮肤; BHS: 无眼侧黑化皮肤; BWS: 无眼侧正常皮肤; SP: 脾; L: 肝; I: 肠; ST: 胃; H: 心脏; K: 肾; HK: 头肾; GO: 性腺; GI: 鳃; M: 肌肉。不同字母代表差异显著( $P < 0.05$ ), 下同

P: Pituitary; B: Brain; ES: Eye-side skin; BHS: Blind-side skin with hypermelanosis; BWS: Normal blind-side white skin; SP: Spleen; L: Liver; I: Intestine; ST: Stomach; H: Heart; K: Kidney; HK: Head kidney; GO: Gonad; GI: Gill; M: Muscle. Bars with different letters differed significantly ( $P < 0.05$ ), the same as below

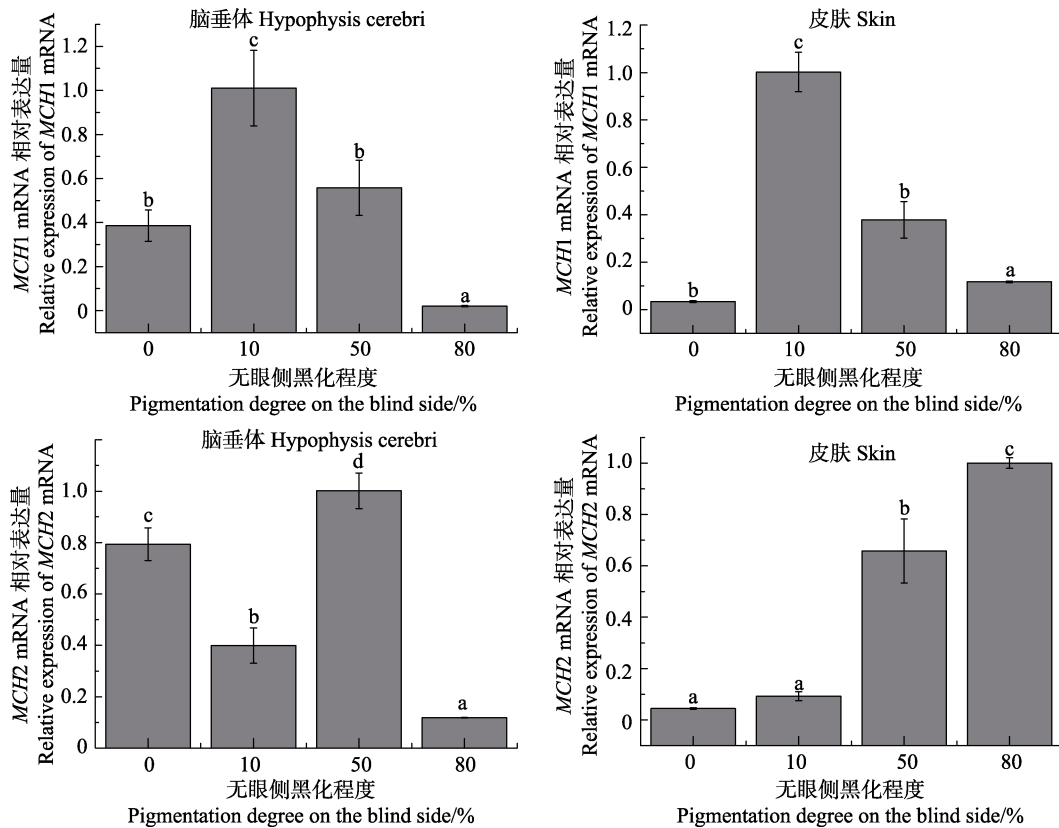


图 5 半滑舌鲷 *MCH* mRNA 表达与无眼侧黑化程度的关系

Fig. 5 The relationship between expression levels of *MCH* mRNA and pigmentation degree on the blind side of *C. semilaervis*

达, 而且生殖腺和内脏中表达量较高(Tuziak *et al.*, 2012), 这与本研究结果相似, 可能是由种的差异性及其生理功能的不同决定的。另外, 半滑舌鲷 *MCH* 的组织表达的广泛性, 也说明 *MCH* 除了内分泌外, 可能还以自分泌或旁分泌的形式参与半滑舌鲷其他生理活动的过程调控。近年来, *MCH* 被视为一种重要的生理调控因子而进行了许多的功能研究, 如摄食活动与体重(Kawano *et al.*, 2002)、睡眠与觉醒(Peyron *et al.*, 2009)和体内能量平衡(MacNeil *et al.*, 2013)等调节功能。

对牙鲆、星斑川鲷和星突江鲷的研究都表明, *MCH* 具有抑制无眼侧黑化发生和发育的生理调控作用(Kang *et al.*, 2013; Takanishi *et al.*, 2007; Takeshi *et al.*, 2007)。本研究分析了半滑舌鲷 2 种 *MCH* 亚基与无眼侧黑化程度的关系, 发现垂体和皮肤中 *MCH1* mRNA 在无眼侧黑化发生过程中表现出类似的变化趋势, 其表达水平都在黑化发生早期(无眼侧 10%黑化)达峰值, 但随着黑化程度的增加却显著降低, 表明无论垂体还是皮肤中的 *MCH1* 都主要参与了黑化的早期发生过程调控, 而随着黑化程度的增加其调控作用减弱, 其可能的机制值得今后深入解析。研究还发现,

半滑舌鲷无眼侧正常鱼和无眼侧 50%黑化鱼的脑垂体中都具有较高的 *MCH2* mRNA 表达水平, 但在无眼侧 10%黑化组和无眼侧 80%黑化组表达水平却显著降低, 表明垂体 *MCH2* 可能不是通过直接的内分泌途径参与调控无眼侧黑化过程, 可能有其他体色因子通过不同的信号途径参与了黑化的调控过程。而在皮肤组织中, 发现 *MCH2* mRNA 表达水平随黑化程度增加而显著升高, 并在无眼侧 80%黑化组显著升高至最高值, 表明皮肤 *MCH2* 对无眼侧黑化现象的发生和发展过程起到了关键的调控作用, 今后应深入开展其表达调控的相关机制研究, 进一步解析 *MCH2* 的生理功能。

## 参 考 文 献

- Amiya N, Amano M, Takahashi A, *et al.* Effects of tank color on melanin-concentrating hormone levels in the brain, pituitary gland, and plasma of the barfin flounder as revealed by a newly developed time-resolved fluoroimmunoassay. *General and Comparative Endocrinology*, 2005, 143(3): 251–256
- Baker B, Levy A, Hall L, *et al.* Cloning and expression of melanin-concentrating hormone genes in the rainbow trout brain. *Neuroendocrinology*, 1995, 61(1): 67–76



- Berman JR, Skariah G, Maro GS, *et al.* Characterization of two melanin-concentrating hormone genes in zebrafish reveals evolutionary and physiological links with the mammalian mch system. *Journal of Comparative Neurology*, 2009, 517(5): 695–710
- Deng JY, Meng TX, Ren SM, *et al.* Species composition, abundance and distribution of fishes in the Bohai Sea. *Marine Fisheries Research*, 1988, 9: 11–89 [邓景耀, 孟田湘, 任胜民, 等. 渤海鱼类种类组成及数量分布. 海洋水产研究, 1988, 9: 11–89]
- Gröneveld D, Hut MJ, Balm PHM, *et al.* Cloning and sequence analysis of hypothalamus cDNA encoding tilapia melanin-concentrating hormone. *Fish Physiology and Biochemistry*, 1993, 11(1–6): 117–124
- Jeon JM, Song YH. Cloning of melanin-concentrating hormone cDNA gene from olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Journal of the Korean Fisheries Society*, 2003, 36(5): 442–448
- Kang DY, Kim HC. Functional characterization of two melanin-concentrating hormone genes in the color camouflage, hypermelanosis, and appetite of starry flounder. *General and Comparative Endocrinology*, 2013, 189: 74–83
- Kawano H, Honma S, Hayashi A, *et al.* Melanin-concentrating hormone neuron system: The wide web that controls the feeding. *Anatomical Science International*, 2002, 77(3): 149–160
- Kawauchi H, Kawazoe I, Tsubokawa M, *et al.* Characterization of melanin-concentrating hormone in chum salmon pituitaries. *Nature*, 1983, 305(5932): 321–323
- Liu XZ, Zhuang ZM, Ma AJ, *et al.* Operative technologies for seedling rearing of *Cynoglossus semilaevis* Günther. *Marine Fisheries Research*, 2006, 27(2): 17–24 [柳学周, 庄志猛, 马爱军, 等. 半滑舌鲷苗种生产技术的开发研究. 海洋水产研究, 2006, 27(2): 17–24]
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408
- MacNeil DJ. The role of melanin-concentrating hormone and its receptors in energy homeostasis. *Frontiers in Endocrinology*, 2013, 4: 49
- Minth CD, Qiu H, Akil H, *et al.* Two precursors of melanin-concentrating hormone: DNA sequence analysis and *in situ* and immunochemical localization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1989, 86(11): 4292–4296
- Mizusawa K, Kawashima Y, Sumuma T, *et al.* Involvement of melanin-concentrating hormone 2 in background color adaptation of barfin flounder *Verasper moseri*. *General and Comparative Endocrinology*, 2015, 214: 140–148
- Mizusawa KL, Saito Y, Wang Z, *et al.* Molecular cloning and expression of two melanin-concentrating hormone receptors in goldfish. *Peptides*, 2009, 30(11): 1990–1996
- Peyron C, Sapin E, Leger L, *et al.* Role of the melanin-concentrating hormone neuropeptide in sleep regulation. *Peptides*, 2009, 30(11): 2052–2059
- Takahashi A, Itoh T, Nakanishi A, *et al.* Molecular cloning of proopiomelanocortin cDNA in the ratfish, a holocephalan. *General and Comparative Endocrinology*, 2004, 135(1): 159–165
- Takahashi A, Kosugi T, Kobayashi Y, *et al.* The melanin-concentrating hormone receptor 2 (MCH-R2) mediates the effect of MCH to control body color for background adaptation in the barfin flounder. *General and Comparative Endocrinology*, 2007, 151(2): 210–219
- Takeshi Y, Masafumi A, Noriko A, *et al.* Hypermelanosis on the blind side of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* is diminished by rearing in a white tank. *Fisheries Science*, 2007, 73(2): 466–468
- Tuziak SM, Volkoff H. A preliminary investigation of the role of melanin-concentrating hormone (MCH) and its receptors in appetite regulation of winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*). *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2012, 348(1): 281–296

(编辑 马瑾艳)

## Cloning and Expression of Melanin-Concentrating Hormone in Half-Smooth Tongue Sole (*Cynoglossus semilaevis*)

XU Yongjiang<sup>1,2</sup>, ZHU Xuewu<sup>1,3</sup>, LIU Xuezhou<sup>1,2,①</sup>, SHI Xueying<sup>1,3</sup>,  
SHI Bao<sup>1,2</sup>, WANG Bin<sup>1,2</sup>, LI Bin<sup>1,3</sup>

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture; Qingdao Key Laboratory for Marine Fish Breeding and Biotechnology; Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071; 3. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

**Abstract** Hypermelanosis is an abnormal coloration that commonly occurs on the blind-side of half-smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis* in captivity, resulting in deterioration in flesh quality and reduced market price. This problem has become the bottleneck for sustainable development of flatfish farming industry. Melanin-concentrating hormone (MCH) is produced in pituitary acting as an inhibitor for hypermelanosis in fish. The present study aims to identify the role of MCH in regulating the blind-side hypermelanosis in *C. semilaevis*. cDNAs encoding two *MCH* alleles (*pMCH1* and *pMCH2*) were cloned using RACE method and their structures were analyzed. The spatial and temporal expression patterns of *MCH* mRNA were measured using the quantitative real-time PCR. Results showed that *C. semilaevis pMCH1* cDNA sequence was 476 bp in length and encoded 134 amino acids, which shares high identity (66.9%) with *Paralichthys olivaceus*. *C. semilaevis pMCH1* was clustered with the Pleuronectiformes, Tetraodontiformes and Perciformes species based on the phylogenetic analysis. By contrast, *C. semilaevis pMCH2* cDNA sequence was 626 bp in length and encoded 147 amino acids. The transcript levels of both *MCH1* and *MCH2* had the highest expression level in pituitary compared to other tissues. *MCH1* mRNA was also detected among other tissues. Furthermore, *MCH2* mRNA was highly expressed in the brain, eye-side skin, blind-side skin, gonad and gill, whereas the peripheral tissue had relatively low expression level. Correlating the *MCH* mRNA expression levels and the degree of the blind-side hypermelanosis showed that, *MCH1* mRNA expression levels in the pituitary and skin had similar trends, which peaked when fish had about 10% blind-side hyperpigmentation, and then significantly reduced as the blind-side hypermelanosis level increased. For fish with normal blind-side coloration and 50% blind-side hyperpigmentation, their pituitary *MCH2* mRNA levels were significantly higher than those from fish with 10% and 80% blind-side hyperpigmentation. The skin *MCH2* mRNA level significantly increased with the increased hyperpigmentation degree on the blind-side of fish. The present study provides new insights into the mechanisms underlying the regulation of blind-side hypermelanosis in *C. semilaevis*.

**Key words** *Cynoglossus semilaevis*; Melanin-concentrating hormone; Hypermelanosis on the blind-side; Expression regulation

① Corresponding author: LIU Xuezhou, E-mail: liuxz@ysfri.ac.cn