

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897-20140117001

程炜轩, 许国焕, 熊达, 等. 黄颡鱼黑色素细胞原代培养及迁移相关基因克隆分析 [J]. 生态毒理学报, 2014, 9(6): 1035-1040

Cheng W X, Xu G H, Xiong D, et al. Primary culturing of melanoma cells and cloning analysis of migration-related gene in *Pelteobagrus fulvidraco* [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2014, 9(6): 1035-1040 (in Chinese)

黄颡鱼黑色素细胞原代培养及迁移相关基因克隆分析

程炜轩^{1,2,3,4,5}, 许国焕^{1,2,*}, 熊达^{1,2}, 张丽^{1,2}, 吴清洋^{1,2}, 郭莹姿², 谭文俊²

1. 广东省微生物研究所, 广州 510070
2. 广东碧德生物科技有限公司, 广州 510663
3. 广东省菌种保藏与应用重点实验室, 广州 510070
4. 广东省微生物应用新技术公共实验室, 广州 510070
5. 广东省部共建华南应用微生物国家重点实验室, 广州 510070

收稿日期: 2014-01-17 录用日期: 2014-03-14

摘要: 黑素皮质素受体-1 (MC1R) 在鱼体中对黑色素细胞的分化及迁移起主要的调控作用, 而且在神经系统和免疫系统中均表现出重要的生理功能。本研究对黄颡鱼表皮黑色素细胞的培养条件进行探索, 并在此基础上对 MC1R 基因进行克隆, 为后续研究黄颡鱼黑色素异常的细胞及分子机理研究提供基础。结果表明, 黄颡鱼表皮黑色素细胞在 27 °C 培养条件下, 72 h 开始贴壁生长, 培养基中添加 20% 小牛血清培养效果比添加 10% 小牛血清好。此外, 我们对黄颡鱼 MC1R 基因进行克隆。MC1R 基因克隆方面, 黄颡鱼 MC1R 基因全长为 936 bp, 编码 312 个氨基酸, 与剑尾鱼 (*Xiphophorus maculatus*)、孔雀鱼 (*Poecilia reticulata*)、条斑星鲈 (*Verasper moseri*)、海鲈 (*Dicentrarchus labrax*)、大菱鲆 (*Psetta maxima*) 等 5 种鱼类 MC1R 基因的同源性分别为 97%、96%、90%、90%、90%, 系统分析结果显示, 黄颡鱼 MC1R 基因在进化树上的位置与黄颡鱼的分类所处位置基本吻合。黄颡鱼表皮黑色素细胞原代培养的条件为: 27 °C, 添加 20% 小牛血清, 所克隆基因为黄颡鱼 MC1R 基因。本研究为后续研究黄颡鱼黑色素异常的细胞及分子机理研究提供基础。

关键词: 黑素皮质素受体; 原代培养; 克隆; 黄颡鱼

文章编号: 1673-5897(2014)5-1035-06 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Primary Culturing of Melanoma Cells and Cloning Analysis of Migration-related Gene in *Pelteobagrus fulvidraco*

Cheng Weixuan^{1,2,3,4,5}, Xu Guohuan^{1,2,*}, Xiong Da^{1,2}, Zhang Li^{1,2}, Wu Qingyang^{1,2}, Guo Yingzi², Tan Wenjuan²

1. Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou 510070, China
2. Bide biotechnology Co., Ltd. of Guangdong, Guangzhou 510663, China
3. State Key Laboratory of Applied Microbiology, South China, Guangzhou 510070, China
4. Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangzhou 510070, China
5. Guangdong Open Laboratory of Applied Microbiology, Guangzhou 510070, China

Received 17 January 2014 accepted 14 March 2014

基金项目: 广东省科学院青年科学研究基金

作者简介: 程炜轩 (1981-), 男, 博士, 从事水生动物生理生态研究, E-mail: chan714@126.com;

* 通讯作者 (Corresponding author), E-mail: xghfish@163.com

Abstract: Melanocortin receptor-1 (MC1R) played a major role in the regulation of cell differentiation and migration in melanoma cells, and also had an important physiological function in the nervous system and the immune system in fish. In this study, we explored the culture conditions of epidermal melanocytes in *Pelteobagrus fulvidraco*. The results showed that *Pelteobagrus fulvidraco* epidermal melanocytes adhered after 72 h at 27 °C. The culture medium supplemented with 20% fetal calf serum was preferred compared to 10% supplemented during the culture. In addition, we cloned 936-bp MC1R gene which is encoding 312 amino acids in *Pelteobagrus fulvidraco*. The homologies between *Pelteobagrus fulvidraco* and other fishes including swordtail fish (*Xiphophorus maculatus*), guppy (*Poecilia reticulata*), streak Star flounder (*Verasper moseri*), sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and turbot (*Psetta maxima*) were 97%, 96%, 90%, 90% and 90%, respectively. System analysis showed that *Pelteobagrus fulvidraco* MC1R gene in the position of evolutionary tree was coincide with the location of classification. Consensus results in *Pelteobagrus fulvidraco* were observed based on molecular evolutionary analysis on MC1R gene and taxonomy. It was proved that the primary culture conditions of *Pelteobagrus fulvidraco* epidermal melanocytes in is: 27 °C, supplemented with 20% fetal calf serum, and the cloned gene was *Pelteobagrus fulvidraco* MC1R. Our research could provide a basis for subsequent researches on the cellular and molecular mechanism of lacking melanin symptoms in *Pelteobagrus fulvidraco*.

Keywords: melanocortin receptor; primary culture; cloning; *Pelteobagrus fulvidraco*

鱼类的体色主要依赖于皮肤中色素细胞的存在,体内环境受神经、受体和内分泌系统的控制。外部环境则主要受应激条件、环境背景、健康状况、生长发育和社会地位等因素的影响而发生改变。在鱼体色当中,黑体色是最常见的,与外部环境变化相适应的体色。当鱼从白色背景的养殖环境中转移至黑色背景的养殖环境中,鱼体色变黑。此外,当鱼类受到应激时,如罗非鱼在高浓度非离子氨(UA 浓度为 $0.178 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 的水中处理 3 h 后,体色也发黑,平均灰级从 15.1 阶下降到 9.3 阶^[1]。由于鱼类体色是一个可视性状,而且当鱼受到特定药物应激也能在一定程度上引起黑体色变化,因此,通过观察鱼黑体色变化能瞬时粗筛出水环境中某些有害物质的存在。

而要建立起较为精确的黑体色对有害物质的检测体系,首先需要解决有害物质与黑体色变化的内在联系。鱼的黑体色由皮肤中黑色素细胞的数量、分布密度以及黑色素体在黑色素细胞中的分布状态所决定。鱼类色素细胞不是通过细胞分裂来进行增殖的,而是由神经嵴细胞迁移到皮肤、眼睛等处,分化成前色素细胞,再由前色素细胞分化形成幼小的色素细胞,再发育为成熟的色素细胞。鱼类不同色素受到外界影响的机制不同,如黄色素的形成往往与鱼体脂肪中吸收、沉积的叶黄素、类胡萝卜素等营养因素有关,相对于黄色素,黑色素的形成更为复杂,期间受到多种激素、生理因子的调节和控制,如果在期间的任何一个环节出现生理性错误,都将影

响到黑色素细胞的迁移、分化和生长发育,并导致皮肤中成熟的黑色素细胞的数量和分布密度,进而影响到鱼体的体色状态^[2]。因此鱼类黑色素对于环境有较为敏感的指示作用。相对于活鱼,将鱼类培养细胞作为实验对象,有着活体鱼无法比拟的优点:(1) 相对于活鱼个体,鱼类细胞数量要大很多,对于药物筛选或者毒素排查等工作,细胞检测可以大大减少工作量,而且相对于养殖鱼类,细胞培养成本更低;(2) 活鱼养殖过程中受到养殖条件限制,影响因素众多,而细胞培养因为,实验条件可以精确控制,所以重复性好。Andersson^[3]等利用毒素阻碍黑色素细胞中色素扩散的现象,发展出快速检测动物体是否受到毒素感染的技术。

黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*) 属鲶形目(Siluriformes)、鲿科(Bagridae)、黄颡鱼属(*Pelteobagrus* Bleeker),生态环境的适应性较广,对营养和其它环境因素的要求不高,是我国特有的优质养殖品种。黄颡鱼体色艳丽,正常情况下体侧有黑斑,其余部分为黄色。在人工集约化养殖条件下,目前黄颡鱼体色异常以黑色素缺失表现出的黄化现象最为突出,据调查,广东出现体色异常的黄颡鱼占了个体总数的 10% ~ 15%,而个别养殖户,体色异常率更是在 30% ~ 50%,在淡水养殖鱼类中,体色异常率如此高的品种也较为少见。

黑素皮质素受体-1 (melanocortin receptor-1, MC1R) 是 5 种已发现的黑素皮质素受体家族成员

之一,属于跨膜 G-蛋白耦联受体超级家族,现已明确黑素皮质素系统(MC)广泛参与了多种生理通路的调控,包括色素沉着、摄食行为、体重和能量代谢平衡、抗感染、性功能和疼痛等功能。MC1R 主要在脑、眼、脊椎、黑色素细胞中表达^[4],在哺乳动物和鸟中,MC1R 与 α -黑素细胞刺激素(α -MSH) 特异结合,促使角朊细胞分泌多种细胞因子,促进真黑色素(emelanin)的合成,从而使动物毛色或羽色呈黑色,是哺乳动物黑色素形成中的主要基因。与哺乳类动物不同,MC1R 基因在鱼体中,MC1R 对黑色素细胞的分化及迁移起主要的调控作用^[5]。使用基因敲除技术抑制 MC1R 基因表达,可导致在黑暗环境中生长的斑马鱼失去控制黑色素细胞迁移的能力,从而使斑马鱼呈白化症状^[6]。本研究通过确立黑色素细胞的培养方法及克隆色素迁移相关基因,为后续研究,有害物质对黄颡鱼黑色素细胞生长、分化以及基因的影响提供基础,有利于阐明鱼体中黑色素调控的分子及细胞机理,也为色素细胞与相关基因监控环境有害物质体系的建立提供基础研究资料。

1 材料和方法(Materials and methods)

1.1 黄颡鱼黑色素细胞原代培养

1.1.1 实验试剂

1×双抗浓度:青霉素 100 U·mL⁻¹,链霉素 100 μg·mL⁻¹;小牛血清(浓度 99%)购于 GIBCO 公司;新洁尔灭(浓度 95%)购于广州环凯公司。

1.1.2 实验取材

黄颡鱼,购于广州市黄沙水产品市场,将黄颡鱼剪腮放血致死,0.01%高锰酸钾溶液浸泡消毒 30 min,用 0.1%新洁尔灭洗涤鱼体 3 次,在超净工作台内,用酒精棉球消毒鱼体,无菌取皮肤组织。

1.1.3 细胞培养

采用组织块培养法^[7],用刀片分离皮肤组织的黑色素细胞层,用含 10×双抗的 DPBS 洗 2 次,再用 1×双抗的 DPBS 洗 2 次,经 1×双抗的无血清培养液洗 2 次,彻底清洁后,用眼科剪将含黑色素的组织剪至 0.1 mm³大小,移至培养皿中,分成 2 组,每组各加 5 mL M199 培养基,其中一组 M199 培养基中含小牛血清 10%,另一组为 20%,均含 2×双抗并在浓度为 0.5%的 CO₂培养箱中 27℃培养,隔日换液。

1.2 黄颡鱼 MC1R 基因序列的克隆与分析

1.2.1 总 RNA 提取和 cDNA 第一链的合成

从黄颡鱼中分离脑组织,使用 DEPC 处理,灭菌消毒的针筒对脑组织进行匀浆后,总 RNA 的提取

表 1 试剂盒 PCR 引物序列
Table 1 PCR primer sequence of TaKaRa RNA LA PCRTM Kit(AMV) Ver. 1. 1

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequences
Random 9 mers	5'-(P) NNNNNNNNN-3'
Control F-1 Primer	5'-CTGCTCGCTTCGCTACTTGA-3'
Control R-1 Primer	5'-CGGCACCTGCTCCTACGAGTTG-3'
M13 Primer M4	5'-GTTTTCCTCCAGTCACGAC-3'

与纯化按 Promega 公司的 SV Total RNA Isolation System 试剂盒推荐方法进行。cDNA 第一链的合成使用 TaKaRa RNA LA PCRTMKit(AMV) Ver. 1. 1 试剂盒,引物参见表 1,操作按试剂盒推荐方法进行。

1.2.2 黄颡鱼 MC1R 基因克隆

根据 GeneBank 已公布的鱼类 MC1R 氨基酸序列的保守区域,用 Primer 5.0 设计一对简并引物:MC1R01F: 5'-ATG(A/G)ACTACAACCCGC-TA-3'与 MC1R02R: 5'-CTACATGCCAAAG-CACC-3'用于扩增 MC1R 基因核心序列。以黄颡鱼 cDNA 为模板,用 Taq DNA 聚合酶(Takara)进行 PCR 扩增,扩增条件为:94℃预变性 3 min,94℃ 1 min,40℃ 1 min,72℃ 1 min 为一循环,共 30 个循环,最后 72℃延伸 5 min,得到黄颡鱼 MC1R 基因 cDNA 片段。

1.2.3 PCR 产物的克隆、序列分析及系统树构建

PCR 产物经 2%琼脂糖凝胶电泳纯化,H. Q. &Q. Gel Extraction Kit II 回收后克隆至 pMD 19-T 载体(Takara),转化感受态 E. coli DH5a,利用 M13 正反向引物,通过 PCR 筛选阳性克隆,阳性克隆菌液由上海英骏生物技术公司 ABI 3730 测序仪进行测序。用 NCBI (http://www. Ncbi. Nlm. Nih. gov/ BLAST/) 或 Vector NTI suite 6.0 中的 BLAST 功能进行序列比对和拼接,并进行序列同源性分析。使用 Mega 5.0 软件采用邻接法构建(NJ method)系统树,1000 次重复计算靴带(bootstrap)值。

2 结果(Results)

2.1 皮肤组织原代细胞培养

黄颡鱼黑色素细胞属成纤维型细胞,在 27℃,培养基中含 20%小牛血清的培养条件下,48 h 开始进入快速生长期,72 h 后细胞开始贴壁生长(图

1)。

2.2 MC1R 基因克隆

2.2.1 同源性分析

黄颡鱼 MC1R 基因核心片段全长 936 bp (图 2), 编码 312 个氨基酸, 将该序列与 Genbank 中已发表的剑尾鱼、孔雀鱼、条斑星鲈 (Verasper moseri, 序列号: AB287974)、海鲈 (Dicentrarchus labrax, 序列号:

FN377856)、大菱鲆等 5 种鱼类进行 blast 分析。结果显示, 黄颡鱼 MC1R 基因与它们的相似度分别为 97%、96%、90%、90%、90% (图 3)。

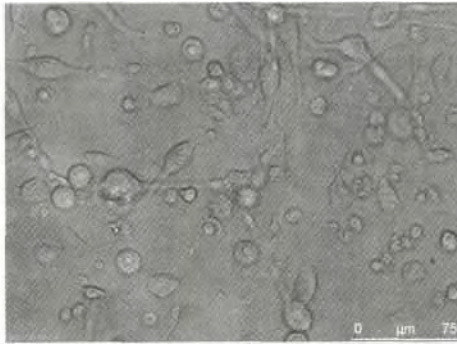


图 1 黑色素皮肤组织原代细胞培养

Fig. 1 Primary melanoma cell culture of skin tissue

```

1 ATGGACTACAACCGCTAAATGACATTATGGACGAGAAACCAACGAATCCACGCTCGGT
61 GAGCGGAACCTGTGCGGCTGCGTCCAGATCCGGATCCCGCAGGAGCTTTCTTGGCGCTG
121 GGCATCATCAGCCTGGTGGAGAACATCCTGGTGATCCTGGCGATCATCAGGAACCGCAAC
181 CTGCACTCGCCATGTACTACTTCACTCTGCTGCTGCGCTGGCGGTGTCGACATGCTGGTGA
241 GTCAGCAACGTGGTGGAGACCATCTTCATGCTCTGCTGACGACGACGCGCTTCTGGACGTG
301 CACCGGGGCTGCTGCGCCACCTGGACAACGTCATCAGCTGATGATCTGCAGCTCCGTG
361 GTGCTCTGCTCTCTCTCTGTCACCATCGCGCGGACCGCTACATCACCATCTCTAC
421 GCGCTGCGCTACACAGCATCATGACCACGACGCGCGCTCAGCATCATCGCGGTGGT
481 TGGCTGGCCAGCGTCCCTCCAGCATCTCTTCATCGTGACACACGCAACCGCGTC
541 ATCGTGTGCTGGTCACTCTCTCTGTCATCACTGCTGTTCAACGCGCGCTCTACCTG
601 CACATGTTGCTGTTGGCCACGTCACCTCGCGGCGATCACCGGCTTTCACAAAGGCAGG
661 CGCCAGTCCACGATGAAGGCGCGATCACCTCACCATCTGCTCGGGTCTTCATT
721 CTGCTGCGGGGCTTCTCTCTCACCCTCATCTCTGCTCGCTCGCCACCACTGCTCC
781 TTCTGCAATGCTCTCTCGGAACTTTAACCTTTCTAATTCTGATCATCTGCACTCC
841 CTCATCGACCGCTCATCTATGCTACAGGACGAGGAGCTGCGCAAAACCTCGAGGAG
901 CTGGTCTGTGCTCTGCTGCTTTGGCATGTAG
  
```

图 2 黄颡鱼 MC1R 基因 cDNA 核心序列

Fig. 2 The nucleotide sequence of Pelteobagrus fulvidraco MC1R cDNA sequence

黄颡鱼 <i>Pelteobagrus fulvidraco</i>	1	MDFNNS-SLRVQMDYNLNDIDKPTNSTLGERNLSCVQTRIPQELFLALGILIS
剑尾鱼 <i>Xiphophorus maculatus</i>	1	MDFNNS-SLRVLDVEPNLITEIDENETNSTLGERNLSCVQTRIPQELFLALGILIS
孔雀鱼 <i>Poecilia reticulata</i>	1	MDFNNS-SLRVLDVEPNLITEIDENETNSTLGERSSPCVQTRIPQELFLALGILIS
条纹星鲈 <i>Verasper moseri</i>	1	MNSNRSHASTLIVELGPPSDYMDENETNSTLGERNLSCVQTRIPQELFLALGILIS
海鲈 <i>Dicentrarchus labrax</i>	1	MEMSNRSLHNPSTLIVDFGLNDPMEENETNSTLGERNLSCVQTRIPQELFLALGILIS
大菱鲆 <i>Psetta maxima</i>	1	YPATLIVDFGLDLYMDENETNSTLGERSSPCVQTRIPQELFLALGILIS
黄颡鱼 <i>Pelteobagrus fulvidraco</i>	61	LVENILVLAITKRNHLSPMYFFICCLAYSDMLVSYSNVYETFMILLNDHGLDVBPGM
剑尾鱼 <i>Xiphophorus maculatus</i>	61	LVENILVLAITKRNHLSPMYFFICCLAYSDMLVSYSNVYETFMILLNDHGLDVBPGM
孔雀鱼 <i>Poecilia reticulata</i>	61	LVENILVLAITKRNHLSPMYFFICCLAYSDMLVSYSNVYETFMILLNDHGLDVBPGM
条纹星鲈 <i>Verasper moseri</i>	61	LVENILVLAITKRNHLSPMYFFICCLAYSDMLVSYSNVYETFMILLNDHGLDVBPGM
海鲈 <i>Dicentrarchus labrax</i>	61	LVENILVLAITKRNHLSPMYFFICCLAYSDMLVSYSNVYETFMILLNDHGLDVBPGM
大菱鲆 <i>Psetta maxima</i>	61	LVENILVLAITKRNHLSPMYFFICCLAYSDMLVSYSNVYETFMILLNDHGLDVBPGM
黄颡鱼 <i>Pelteobagrus fulvidraco</i>	121	LRHLNVLIDVMTCSVYSSLSFLCTAADRYITTFYALRYHSIMTQRAVITLAVYVLAS
剑尾鱼 <i>Xiphophorus maculatus</i>	121	LRHLNVLIDVMTCSVYSSLSFLCTAADRYITTFYALRYHSIMTQRAVITLAVYVLAS
孔雀鱼 <i>Poecilia reticulata</i>	121	LRHLNVLIDVMTCSVYSSLSFLCTAADRYITTFYALRYHSIMTQRAVITLAVYVLAS
条纹星鲈 <i>Verasper moseri</i>	121	LRHLNVLIDVMTCSVYSSLSFLCTAADRYITTFYALRYHSIMTQRAVITLAVYVLAS
海鲈 <i>Dicentrarchus labrax</i>	121	LRHLNVLIDVMTCSVYSSLSFLCTAADRYITTFYALRYHSIMTQRAVITLAVYVLAS
大菱鲆 <i>Psetta maxima</i>	121	LRHLNVLIDVMTCSVYSSLSFLCTAADRYITTFYALRYHSIMTQRAVITLAVYVLAS
黄颡鱼 <i>Pelteobagrus fulvidraco</i>	181	VASSILFVYVHTDNAYIVCLVTFECITLVFNALYLHMEVLAHVSRRTAFHGRGRQST
剑尾鱼 <i>Xiphophorus maculatus</i>	181	VASSILFVYVHTDNAYIVCLVTFECITLVFNALYLHMEVLAHVSRRTAFHGRGRQST
孔雀鱼 <i>Poecilia reticulata</i>	181	VTSILFVYVHTDNAYIVCLVTFECITLVFNALYLHMEVLAHVSRRTAFHGRGRQST
条纹星鲈 <i>Verasper moseri</i>	181	VASSILFVYVHTDNAYIVCLVTFECITLVFNALYLHMEVLAHVSRRTAFHGRGRQST
海鲈 <i>Dicentrarchus labrax</i>	181	VTSILFVYVHTDNAYIVCLVTFECITLVFNALYLHMEVLAHVSRRTAFHGRGRQST
大菱鲆 <i>Psetta maxima</i>	181	VASSILFVYVHTDNAYIVCLVTFECITLVFNALYLHMEVLAHVSRRTAFHGRGRQST
黄颡鱼 <i>Pelteobagrus fulvidraco</i>	241	SMKGATLTLLGVFTLNGPFFLHLITLICTPSPFCNCFERNFLFLITLGNLSLIDP
剑尾鱼 <i>Xiphophorus maculatus</i>	241	SMKGATLTLLGVFTLNGPFFLHLITLICTPSPFCNCFERNFLFLITLGNLSLIDP
孔雀鱼 <i>Poecilia reticulata</i>	241	SMKGATLTLLGVFTLNGPFFLHLITLICTPSPFCNCFERNFLFLITLGNLSLIDP
条纹星鲈 <i>Verasper moseri</i>	241	SMKGATLTLLGVFTLNGPFFLHLITLICTPSPFCNCFERNFLFLITLGNLSLIDP
海鲈 <i>Dicentrarchus labrax</i>	241	SMKGATLTLLGVFTLNGPFFLHLITLICTPSPFCNCFERNFLFLITLGNLSLIDP
大菱鲆 <i>Psetta maxima</i>	241	SMKGATLTLLGVFTLNGPFFLHLITLICTPSPFCNCFERNFLFLITLGNLSLIDP
黄颡鱼 <i>Pelteobagrus fulvidraco</i>	301	LYAYRSQELRKLQELVLCSCPGV*
剑尾鱼 <i>Xiphophorus maculatus</i>	301	LYAYRSQELRKLQELVLCSCPGV*
孔雀鱼 <i>Poecilia reticulata</i>	301	LYAYRSQELRKLQELVLCSCPGV*
条纹星鲈 <i>Verasper moseri</i>	301	LYAYRSQELRKLQELVLCSCPGV*
海鲈 <i>Dicentrarchus labrax</i>	301	LYAYRSQELRKLQELVLCSCPGV*
大菱鲆 <i>Psetta maxima</i>	301	LYAYRSQELRKLQELVLCSCPGV*

图 3 黄颡鱼与剑尾鱼 (*Xiphophorus maculatus*, 序列号: DQ 866828)、孔雀鱼 (*Poecilia reticulata*,

序列号: AB563501)、条斑星鲈 (*Verasper moseri*, 序列号: AB287974)、海鲈 (*Dicentrarchus labrax*,

序列号: FN377856)、大菱鲆 (*Psetta maxima*, 序列号: FJ605360) 等 5 种鱼类的氨基酸序列比对, 相同序列用阴影标示

Fig. 3 Alignment of the deduced amino acid sequences of Pelteobagrus fulvidraco MC1R and other vertebrates.

he identical residues are indicated by shadow. *Xiphophorus maculatus* (Genbank: DQ 866828), *Poecilia reticulata* (Genbank: 3501), *Verasper moseri* (Genbank: AB287974), *Dicentrarchus labrax* (Genbank: FN377856) and *Psetta maxima* (Genbank: FJ605360)

2.2.2 系统进化树的构建及分析

将黄颡鱼 MC1R 与人 (*Homo sapiens*, 序列号: AF153431)、小鼠 (*Mus musculus*, 序列号: NM 008559)、牛 (*Bos Taurus*, 序列号: NM 174108)、绿头鸭 (*Anas platyrhynchos*, 序列号: EU 877264)、斑马鱼 (*Danio rerio*, 序列号: NM 180970)、鲤鱼 (*Cyprinus carpio*, 序列号: JX 989223)、红鳍东方鲀 (*Takifugu rubripes*, 序列号: AY 227791)、牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*, 序列号: AB661668)、剑尾鱼、孔雀鱼、大菱鲆、条斑星鲽、海鲈等, 用 Vector NTI suite 6.0 进行序列比对, 再用 Mega 5 构建系统进化树。系统进化树显示, 黄颡鱼 MC1R 与剑尾鱼处于同一进化树分枝 (图 4)。

3 讨论 (Discussion)

黄颡鱼皮肤组织黑色素细胞在 27 °C 培养条件下, 72 h 后开始贴壁生长, 与其吻端组织生长成层的时间大致相同^[8]。过往对黄颡鱼的养殖研究也显示, 其最适生长水温为 25-28 °C^[9]。培养基中, 添加适量的小牛血清, 可以用来模仿生理条件, 且提供

必须的生长因子、附着因子、微量元素等^[10]。本研究显示, 皮肤黑色素细胞在添加了 20% 小牛血清的培养基中, 生长情况比 10% 添加量更好, 而吻端细胞培养结果则是添加 10% 小牛血清优于添加 20% 小牛血清^[8]。这可能与培养部位不同有关, 鱼类色素细胞是由神经嵴细胞迁移到皮肤、眼睛等处, 经过前色素细胞、黑色素细胞, 发育为成熟的色素细胞, 而吻端细胞是直接分裂产生, 增值方式不同, 细胞培养所需要的营养条件也可能相应不同。

在已报道的鱼中, MCR 系统共有 MC1-MC5 这 5 种亚型^[9], 河鲀和牙鲆目前均已经克隆出 MC1R, MC2R, MC4R, MC5R 四种亚型基因^[11], 另外, 七鳃鳗、鲨鱼、肉鳍鱼、辐鳍鱼都已经有所报道^[12-13], 五种亚型当中, 与鱼黑体色相关的基因被证实为 MC1R^[13]。MC1R 基因相当保守, 除了锦鲤这种体色较为复杂的鱼类^[14], 其他鱼类大多无内含子^[17]。在已经克隆的鱼类 MC1R 基因中, 莫桑比克罗非鱼 MC1R 基因编码 325 个氨基酸^[18], 而花斑剑尾鱼 MC1R 基因为 323 个氨基酸^[17], 本研究发现黄颡鱼 MC1R 基因编码 312 个氨基酸, 与前述结果相近。

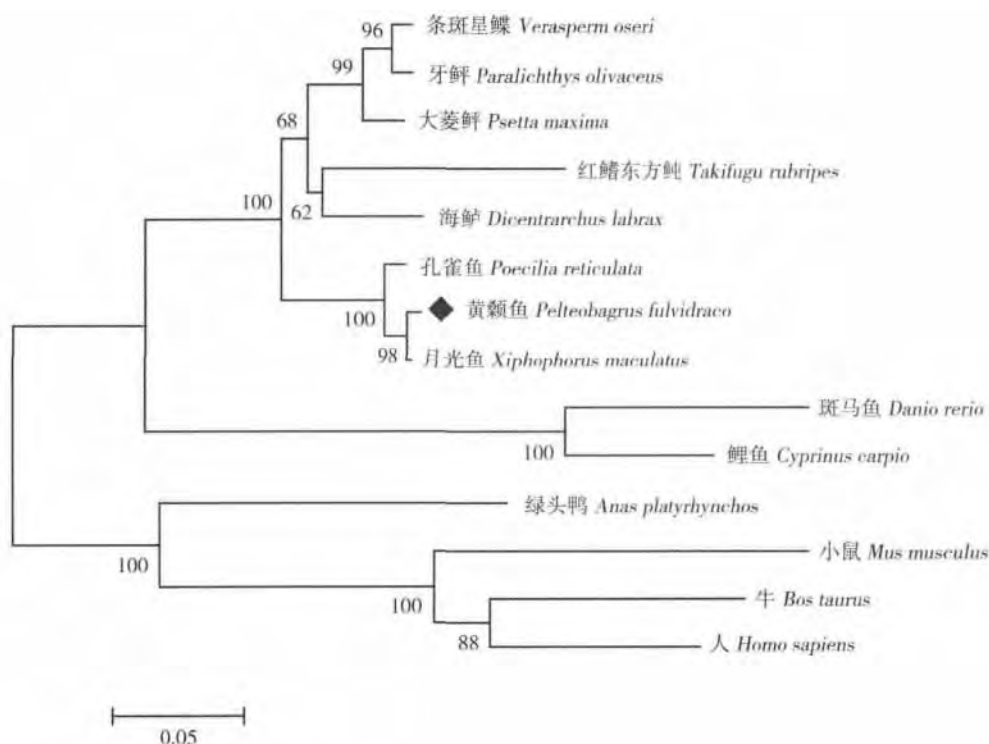


图 4 用 NJ 法构建的黄颡鱼 MC1R 基因与其他物种间的系统进化树, 菱形标记为目标物种, 比例尺 = 0.2, 表示物种间的进化距离

Fig. 4 Phylogenetic tree of *Pelteobagrus fulvidraco* MC1R by NJ method, target species were marked by rhombus. measuring scale = 0.2, demonstrate interspecific evolutionary distance

在分类学上,黄颡鱼属鲿科,而鲿科是鲇类中比较原始的一个类群,这类型的鱼个体小,外型相似,现记录有 30 种^[9]。序列比对显示,黄颡鱼 MC1R 与其他鱼类相似度较高,保守区域较大,显示黄颡鱼 MC1R 基因与其他鱼类相似,而同源性分析显示,黄颡鱼与剑尾鱼处在同一分支,与斑马鱼、鲤鱼、红鳍东方鲀、牙鲆、剑尾鱼、孔雀鱼、大菱鲆、条斑星鲽、海鲈等鱼类处在较近位置,与哺乳类及禽类动物,如绿头鸭、牛、鼠、人等的亲缘关系较远。这与黄颡鱼本身所处的分类地位相类似^[9]。证明克隆基因是黄颡鱼 MC1R 基因。本研究结果提供了黑色素细胞的培养方法及黑色素迁移相关基因 MC1R 的序列克隆,将成为后续研究黄颡鱼 MC1R 基因表达与黑色素细胞的黑素合成、迁移的关系,以及黑体色缺失与细胞、分子调控关系的基础研究资料。

通讯作者简介: 许国焕(1963—),男,研究员,主要研究方向为水产养殖营养与环境,发表学术论文 20 余篇。

参考文献:

- [1] 徐建瑜,刘鹰. 基于计算机视觉的罗非鱼适应环境的体色变化研究[J]. 水生生物学报,2009,33(2): 164-168
- Xu J Y, Liu Y. Study on colormodification of tilapia *Oreochromis Niloticus* under environmental background and stress by computer vision[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2009, 33(2): 164-168 (in Chinese)
- [2] Parichy D M. Animal pigment pattern: An integrative model system for studying the development, evolution, and regeneration of form[J]. Seminars in Cell and Developmental Biology, 2009, 20: 63-64
- [3] Andersson T P, Filippini D, Suska A. Frog melanophores cultured on fluorescent microbeads: Biomimic-based Biosensing[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2005, 21: 111-120
- [4] Wolf K, Quimby M C. Established eurythermic line of fish cells in vitro[J]. Science, 1962, 135(3508): 1065-1066
- [5] Logan D W, Burn S F, Jackson I J. Regulation of pigmentation in zebrafish melanophores[J]. Pigment Cell Research, 2006, 19(3): 206-213
- [6] Jennifer R, Pia R L, Natalie L R, et al. Mc1r pathway regulation of zebrafish melanosome dispersion[J]. Zebrafish, 2008, 5(4): 289-295
- [7] 张卓然. 培养细胞学与细胞培养技术[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2004: 23-57
- [8] 孔祥婷,沈颂东,姜德勋,等. 黄颡鱼吻端细胞培养研究[J]. 淡水渔业, 2009, 39(2): 19-25
- Kong X T, Shen S D, Jiang D X, et al. A preliminary study on snout tissue culture from *Pelteobagrus fulvidraco* [J]. Freshwater Fisheries, 2009, 39(2): 19-25 (in Chinese)
- [9] 王武,余卫忠,石张东. 江黄颡鱼适宜生长水温的研究[J]. 水产科技情报, 2003, 30(1): 13-15
- Wang W, Yu W Z, Shi Z D. Effects of water temperature on growth of *Pseudobagrus vachelli* [J]. Fisheries Science and Technology Information, 2003, 30(1): 13-15 (in Chinese)
- [10] Mcquillan D J, Handley C J, Campbell M A, et al. Stimulation of proteoglycan biosynthesis by serum and insulin-like growth factor-I in cultured bovine articular cartilage[J]. Biochemical Journal, 1986, 240(2): 423-430
- [11] Kobayashi Y, Chiba H, Mizusawa K, et al. Pigment-dispersing activities and cortisol-releasing activities of melanocortins and their receptors in Xanthophores and head kidneys of the goldfish *Carassius auratus* [J]. General and Comparative Endocrinology, 2011, 173(3): 438-446
- [12] Klovins J, Haitina T, Fridmanis D, et al. The melanocortin system in Fugu: Determination of POMC/AGRP/MCR gene repertoire and synteny, as well as pharmacology and anatomical distribution of the MCRs [J]. Molecular Biology and Evolution, 2004, 21(3): 563-579
- [13] Schi th H B, Haitina T, Ling M K, et al. Review evolutionary conservation of the structural, pharmacological, and genomic characteristics of the melanocortin receptor subtypes [J]. Peptides, 2005, 26(10): 1886-900
- [14] Haitina T, Klovins J, Takahashi A, et al. Functional characterization of two melanocortin (MC) receptors in lamprey showing orthology to the MC1 and MC4 receptor subtypes [J]. BMC Evolutionary Biology, 2007, 7(1): 101
- [15] Gieslak M, Reissmann M, Hofreiter M, et al. Colours of domestication [J]. Biological Reviews, 2011, 86(4): 885-899
- [16] Braasch I, Brunet F, Volf J N, et al. Pigmentation pathway evolution after whole-genome duplication in fish [J]. Genome Biology and Evolution, 2009, 1(15): 479-493
- [17] Selz Y, Braasch I, Hoffmann C, et al. Evolution of melanocortin receptors in teleost fish: The melanocortin type I receptor [J]. Gene, 2007, 401(1-2): 114-122
- [18] Van der Salm A L, Pavlidis M, Flik G, et al. The acute stress response of red porgy, *Pagrus pagrus*, kept on a red or white background [J]. General and Comparative Endocrinology, 2006, 145(3): 247-253
- [19] 李捷. 中国南方鲿科鱼类的动物地理与系统进化[J]. 广东: 华南师范大学, 2006: 1-2
- [20] 杨干荣. 湖北鱼类志[M]. 湖北: 科学技术出版社, 1987: 159