

文章编号: 1000-0615(2019)07-1560-09

DOI: 10.11964/jfc.20180511269

橘色双冠丽鱼黑素皮质素受体1基因(MC1R) 整胚原位杂交

潘贤辉^{1,2}, 宋红梅¹, 周康奇^{1,2}, 汪学杰¹, 刘奕¹, 牟希东¹,
余梵冬¹, 杨叶欣¹, 刘超¹, 郑曙明², 胡隐昌^{1*}

(1. 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, 广东广州 510380;

2. 西南大学, 淡水鱼类资源与生殖发育教育部重点实验室, 重庆 402460)

摘要: 为探究黑素皮质素受体1基因(MC1R)在橘色双冠丽鱼胚胎发育和体色形成过程中的表达定位及功能, 本研究首先制备了MC1R基因的RNA正反义探针, T7方向转录的正义RNA探针质量浓度为447.529 ng/μL, SP6方向转录的反义RNA探针质量浓度为342.698 ng/μL。经10~20倍稀释后的探针用于原位杂交, MC1R基因探针表达定位显示, 随橘色双冠丽鱼胚胎的发育杂交信号总体呈逐渐减弱趋势, 原肠期和视泡期其卵黄和胚体侧卧部分有杂交信号分布; 出膜期其脊柱、卵黄囊及其内容物和色素细胞内出现杂交信号; 出膜期第1天, 卵黄表面有信号分布。总体来看, 杂交信号在脊索、卵黄囊、卵黄囊内容物质及色素细胞有特异表达, 而以正义探针作为阴性对照组在5个胚胎阶段均无任何信号, 杂交信号显现的MC1R表达定位说明其在橘色双冠丽鱼色素细胞的分化、迁移中起到重要调控作用, 也与神经、营养、免疫功能相关, 初步建立了鱼类体色相关基因功能和定位研究的整胚原位杂交方法。

关键词: 橘色双冠丽鱼; 黑素皮质素受体1; 整胚原位杂交; 定位分析; 探针; MC1R

中图分类号: Q 785; S 917.4

文献标志码: A

整胚原位杂交(whole mount *in situ* hybridization, WISH)是研究动物胚胎发育及器官形成过程中基因表达定位和基因功能的重要手段, 又称整体原位杂交。原位杂交技术是1969年Gall等^[1]首先建立并应用于非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)染色体上, 成功定位了多拷贝顺序。2007年, Westfield^[2]首次将此技术应用到斑马鱼(*Danio rerio*)的组织切片中, 检测基因的表达和定位。目前, 原位杂交技术的应用越来越广泛, 在模式生物中已有应用^[3]。WISH技术在鱼类功能基因研究中也大量应用, 并出现双色WISH和多荧光WISH技术^[4-6]。但多荧光WISH技术成本较贵, 且荧光易猝灭, 须及时获取杂交结果; 而传统WISH技

术显色的杂交胚胎可于适宜条件下进行长期保存^[7-9]。整胚原位杂交实验流程一般为探针杂交、抗体孵育和显色观察^[10-11]。

橘色双冠丽鱼(*Amphilophus citrinellus*)属鲈形目(Perciformes)、丽鱼科(Cichlidae)、双冠丽鱼属(*Amphilophus*), 俗称红魔鬼鱼, 因其鲜艳的体表颜色和活泼的泳姿被大众喜爱。但包括橘色双冠丽鱼在内的大多数观赏鱼或食用鱼都有早期体色褪黑现象, 而早期鱼体表褪黑程度是决定观赏鱼后期扬色效果和市场价值的关键。目前, 针对鱼类体色早期褪黑这一生物学特征的研究仍不多见, 从遗传角度, 围绕黑色素合成通路中相关基因的调控, 是研究鱼类早期体色

收稿日期: 2018-05-02 修回日期: 2018-12-12

资助项目: 广东省自然科学基金(2015A030313700); 国家自然科学基金青年科学基金(802037); 广东省渔港建设和渔业产业发展专项(A201601C09)

通信作者: 胡隐昌, E-mail: huyc22@163.com

褪黑这一复杂生物学特征的切入点。在经典体色合成通路中,黑素皮质素受体1(melanocortin receptor 1, MC1R)基因能起到调控动物体色形成的重要作用,MC1R蛋白具有 α -促黑色素激素(α -MSH)和促肾上腺皮质激素(ACTH)2个配体,当结合2个配体时再激活环腺苷酸酶,经由cAMP信号通路引起cAMP含量上升,提高酪氨酸酶基因(tyrosinase, *Tyr*)的表达量,最终使黑色素细胞增殖^[12-13]。

关于MC1R基因功能已在人(*Homo*)^[14]、貉(*Nyctereutes procyonoides*)^[15]、羊驼(*Vicugna pacos*)^[16]等高等脊椎动物毛色形成中的作用上开展了一些研究;在瓯江彩鲤^[17](*Cyprinus carpio var. color*)等少数鱼类上也初步开展了该基因的结构和表达分析研究。蒋燕玲^[18]发现在橘色双冠丽鱼胚胎发育过程中,MC1R作为黑色素合成通路中的下游基因其相对表达量呈逐渐升高模式;而本实验在前期研究中发现,MC1R在橘色双冠丽鱼胚胎发育过程中的表达模式为相对表达量逐渐减少,与*Tyr*表达模式完全相反。为进一步了解MC1R基因的功能和表达定位,现通过整胚原位杂交技术开展进一步实验,制备用作检测目标基因表达的反义探针,及用作阴性对照的RNA正义探针,通过杂交信号追踪橘色双冠丽鱼MC1R基因在胚胎发育时期的表达定位,了解MC1R基因在胚胎形成过程中基因功能和表达图式,为深入了解橘色双冠丽鱼在胚胎期黑色素合成通路的分子机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验对象为橘色双冠丽鱼所产各阶段胚胎,取自中国水产科学研究院珠江水产研究所观赏鱼实验基地。对2~4龄亲鱼进行培育,保证日常投喂,控制适宜的养殖水温(23~28 °C)和充足的溶解氧,挑选健硕无伤亲鱼进行配对(15对),置于温室内60 cm×60 cm×80 cm的水族缸中使其自然产卵,隔离亲本,分别取原肠期、视泡期、血液循环期、出膜期、出膜第1天的胚胎样本用4%甲醛溶液固定,置于4 °C保存。

1.2 实验仪器和设备

OLYMPUS DP25CCD显微镜、Nikon SMZ-1500体式显微镜、LF-III杂交炉(宁波新芝生物科

技股份有限公司)、分光光度计(Hitachi U-2001)、聚合酶链式反应扩增仪(美国ABI GeneAmp-9700)、多功能酶标仪(BioTek Cytation™ 5)等。

1.3 实验试剂

质粒纯化试剂盒、限制性内切酶试剂盒、地高辛(DIG)核酸探针测试试剂盒、RNA体外转录试剂盒(MAXIscript SP6/T7, Ambion, USA);收集线性化模板试剂盒(PCR clean up, Axygen); pEASY-BluntE2 (TransGen Biotech, 北京); pEASY-T3载体(TransGen Biotech, 北京); DNase I (NEB, M0303S); 酵母tRNA(Sigma, 1002222576); NBT/BCIP(Roche, 11442074001); 阻断剂(Roche, 11096176001); 抗体(Roche, 11093274910); 肝素钠(Sigma, 1002020777); 链蛋白酶(Sigma, 1002332206); 蛋白酶K(Amresco, 0706); DDT(Sigma, 646563); miniRNA Quick Spin Columns (Roche, 11814427001); 苯甲酸苄酯和苯甲醇(Sigma, 美国); Mastermix(诺唯赞)。所用引物由广州艾基生物技术有限公司合成。

1.4 实验所需试剂配制

蛋白酶K: 用DEPC水将蛋白酶K配成质量浓度为10 mg/mL的母液(-20 °C保存)。使用前用1×PBST缓冲液以1:1000的比例稀释为10 μ g/mL。

缓冲液: 121.1 g Tris和58.5 g NaCl, 溶于DEPC水中。

链霉蛋白酶: 取390 mg链霉蛋白酶粉末溶于13 mL缓冲液中,使其质量浓度为30 mg/mL,置于37 °C水浴1 h,分装于-20 °C保存。使用时用1×PBS缓冲液稀释至质量浓度为1 mg/mL。

酵母tRNA母液: 5 g粉末溶于100 mL DEPC水中,终质量浓度50 mg/mL,4 °C保存。

肝素母液: 100 mg粉末溶于1 mL DEPC水中,使其终质量浓度为100 mg/mL,-20 °C保存。

1×PBST缓冲液(1 L, 室温): 1 mL Tween-20, 100 mL 10×PBS缓冲液,用DEPC水定容至1 L;再配制成75%、50%和25%的PBST缓冲液备用。

20×SSC母液(200 mL): 2×SSC 100 mL,使用前用65 °C水浴预热(100 μ L Tween-20, 1 mL 20×SSC,用DEPC水定容100 mL);再配制成75%、50%和25%的2×SSC备用;相同方法配制0.2×SSC 500 mL,再配制成75%、50%和25%的0.2×SSC备用。

预杂交缓冲液Hybe-: 1 mL Tween-20, 250 mL

20×SSC, 500 mL甲酰胺, 9.2 mL 1 mol/L柠檬酸, 用DEPC水定容至1 L, 室温保存, 使用前用65 °C水浴预热。

杂交缓冲液Hybe+: 向Hybe-中加入肝素和酵母tRNA, 二者终质量浓度分别50和500 μg/mL, 4 °C保存, 使用前用65 °C水浴预热配制成75%、50%和25%的杂交缓冲液Hybe+备用。

分别配制1 mol/L MgCl₂、5 mol/L NaCl、1 mol/L柠檬酸、30% H₂O₂、5% KOH、75% 甲醇、50% 甲醇和25% 甲醇。

MAB溶液: 11.6 g马来酸和8.8 g NaCl, 溶于950 mL DEPC水中, 用固体NaOH调节使pH值为7.5, 用DEPC水定容至1 L, 共配制2份, 室温保存。

MABT溶液: 向1 L MAB溶液中加入1 mL Tween-20, 使其终体积浓度为0.1%, 室温保存。再配制成75%×MABT、50%×MABT和25%×MABT备用。

平衡缓冲液: 1 mL 20% Tween-20、20 mL 1 mol/L的Tris-HCl(pH 9.5)、10 mL 0.5 mol/L、MgCl₂、4 mL 5 mol/L的NaCl, 用DEPC水定容至50 mL, 共配制4份, 现配现用。

封闭液: 20 g Blocking Reagent溶于1 L MAB溶液, 使之终质量浓度为2%, 65 °C水浴加热, 摇晃至彻底溶解, 分装于-20 °C保存, 使用前提前解冻。

抗体溶液: anti-Digoxigenin-AP Fab Fragments以1:5 000溶于封闭液, 现配现用。

脱色液: 7 mL无菌水中加入2 mL 30% H₂O₂和1 mL 5% KOH。

显色液: 左旋咪唑稀释50倍, NBT/BCIP稀释20倍, 加入平衡缓冲液中。

包埋液: 苯甲酸苄酯和苯甲醇以2:1混合。

1.5 探针载体的构建与RNA探针制备

参考曹建萌等^[1]的研究, 取不同发育时期橘色双冠丽鱼胚胎, 提取总RNA反转录为cDNA。参考伯氏妊丽鱼(*Astatotilapia burtoni*)、莫桑比克罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*)等鱼类的MC1R保守区设计克隆引物Y-823-F: GAGGCTTT-CATGGGTTTAAACA, 和Y-823-R: CAGAAGA-AGGTAACGAGGCACA, 克隆获得目的片段为823 bp。将目的片段转到pEASY-T3载体上, 获得重组载体pEASY-T3-MC1R。以重组载体pEASY-T3-MC1R为模板, 全式金通用载体M13F: GTAA-

AACGAGGGCCAGT; 和M13R: CAGGAAA-CAGCTATGAC为上下游引物, 进行PCR扩增。PCR产物经纯化后为探针合成的模板。扩增体系和程序: 10 μL 2×Mastermix, 7 μL超纯水, 1 μL T7, 1 μL SP6, 1 μL探针模板质粒。扩增反应程序: 95 °C 3 min; 95 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 60 s, 35循环; 72 °C 10 min, 4 °C保存。合成RNA反义探针时所用合成酶时需要注意的原则: 重组载体pEASY-T3-MC1R用T7引物测序, 若测序结果为同向, 则要用SP6去合成, 若测序结果为反向, 则要用T7去合成; 反之, 若要用SP6引物测序, 若测序结果为同向, 则要用T7去合成, 若测序结果为反向, 则要用SP6去合成。而正义探针合成则需要与之相反的酶。

探针体外转录模板的制备 根据测序结果确定该基因插入的T7方向, 参照以上RNA反义探针合成酶的使用原则, 以T7/SP6为引物, 目标菌液为模板, 反应体系与程序同上, 进行PCR扩增。纯化模板是将上述PCR产物利用无酶污染的PCR clean up(Axygen)试剂盒收集线性化模板。回收溶剂为无核酸的超纯水, 回收体积均为15 μL。纯化步骤: 在反应体系中加入3倍体积的Buffer PCR-A, 混匀; 将混匀后的溶液转移到PCR产物制备管中, 置于2 mL离心管中, 13 140 r/min离心1 min, 弃滤液; 将PCR产物制备管置于2 mL离心管中, 加700 μL Buffer W2, 13 140 r/min离心1 min, 弃滤液。将PCR产物制备管置于2 mL离心管中, 加400 μL Buffer W2, 13 140 r/min离心1 min。将PCR产物制备管置于洁净的1.5 mL离心管中, 在制备管膜中央加15 μL无核酸酶污染的超纯水, 室温静置1 min。13 140 r/min离心1 min洗脱DNA; 取1 μL样品进行1%琼脂糖凝胶电泳, 检查回收的量, 剩余样品冻于-20 °C备用。

探针的体外转录 将上述纯化后的模板用T7/SP6 RNA聚合酶进行体外合成, 使用RNA体外转录试剂盒进行转录。按试剂盒说明书要求依次加入10×transcription buffer 2 μL(室温下溶解)、10 mmol/L ATP 1 μL、10 mmol/L CTP 1 μL、10 mmol/L GTP 1 μL、10 mmol/L UTP 0.6 μL、3.5 mmol/L UTP-11-DIG 1 μL, RNA polymerase mix(T7/SP6)2 μL, 模板DNA 11.4 μL, 轻弹混匀离心后, 37 °C水浴1.5 h; 反应完成后, 加入1 μL DNase I, 于37 °C水浴20 min, 以去除残留的DNA模板; 加30 μL DEPC水扩大体积至50 μL,

加5 μL 无核酸酶污染的3 mol/L醋酸钠(pH 5.2)和3倍体积的无水乙醇, $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 过夜沉淀, $4\text{ }^\circ\text{C}$ 13 140 r/min离心20 min后弃上清液, 沉淀晾干后以20 μL 无核酸酶超纯水重悬。取1 μL 探针进行1%琼脂糖凝胶电泳, 检测探针完整性; 用核酸蛋白分析仪检测探针浓度。用Hybe+缓冲液将探针稀释, 使其浓度为10 ng/ μL , 置于 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 保存。使用时用Hybe+缓冲液再稀释10~20倍。合成正义探针方法同上。

1.6 橘色双冠丽鱼整胚原位杂交实验

胚胎样品准备 取所需时期的胚胎, 用1 mg/mL链蛋白酶去除卵壳, 处理至少20 min; 吸出链蛋白酶, 加1 mL 4%多聚甲醛固定液(PFA)固定10 min, 吸出PFA, 再加新1.5 mL 4% PFA, 置于 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 下固定、过夜; 吸出PFA, 加50%乙醇洗1次, 无水乙醇洗2次, 置室温脱水4 h, 转于 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 保存。

探针杂交 选择所需时期的胚胎, 用25% PBST+75%甲醇、50%PBST+5甲醇、75%PBST+25%甲醇处理5 min, 再用PBST处理5 min, 重复4次。脱色处理: 长出色素的胚胎, 用PBS缓冲液洗10 min, 再加入脱色液, 开盖置于解剖镜外置光源下进行脱色。胚胎通透处理: 用10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 蛋白酶K处理未出膜的胚胎, 使其通透。对受精后24 h后的胚胎进行处理, 24~36 h处理10 min, 37 h出膜前期处理40 min; 用PBST缓冲液洗5 min, 重复3次, 洗脱蛋白酶K; 去除PBST缓冲液, 加入预杂交液Hybe-, 在 $65\text{ }^\circ\text{C}$ 杂交炉中预杂交15 min; 去除Hybe-, 加入Hybe+, 在 $65\text{ }^\circ\text{C}$ 杂交炉中预杂交4 h。结束后, 加入1 mL RNA探针(使用前用Hybe+溶液稀释1 ng/ μL), 置于 $60\text{ }^\circ\text{C}$ 杂交炉中杂交过夜。

抗体孵育 将探针回收, 置于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 保存, 可重复利用2~3次。以下洗涤在 $65\text{ }^\circ\text{C}$ 进行操作: 杂交液Hybe-洗10 min; 25% 2 \times SSC和75% Hybe+洗10 min; 50% 2 \times SSC和50% Hybe+洗10 min; 75% 2 \times SSC和25% Hybe+洗10 min; 2 \times SSC洗10 min; 0.2 \times SSC洗15 min, 重复4次。以下洗涤在室温慢速摇床上进行操作: 75% 0.2 \times SSC和25% MABT洗5 min; 50% 0.2 \times SSC和50% MABT洗5 min; 25% 0.2 \times SSC和75% MABT洗5 min; MABT洗5 min, 重复3次。用封闭液进行封闭, 在室温下慢速摇晃孵育4 h, 去除封闭液, 加入抗体(1:5 000稀释至封闭液中), $4\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜。

显色 将抗体回收, 置于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 保存, 可

重复利用2~3次。将非特异性抗体洗去。室温下在慢速摇床上用MABT洗涤30 min, 重复2次; 室温下在慢速摇床上用PBT缓冲液洗涤30 min, 重复2次; 加入平衡缓冲液(加入左旋咪唑母液使其终质量浓度为0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 洗涤10 min; 加入显色液(NBT/BCIP溶液稀释至20倍于平衡缓冲液中, 加入左旋咪唑母液且稀释至50倍), 洗涤10 min, 用锡箔纸盖住避光显色, 约每20 min显微镜观察显色情况。显色完成后, 室温下用4%甲醛固定液避光固定15~25 min, 使显色终止; 用70%酒精洗涤30 min, 重复3次, 使背景色去除; 然后加入包埋液包埋后显微镜下观察, 进行图像采集。样品的长期保存需加入新70%酒精, 用封口膜密封, 于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 保存。

2 结果

2.1 探针的合成效果与特异性验证

探针模板的扩增电泳检测结果显示, 平行2组扩增产物都在1 000 bp左右有特异性扩增条带(图1-a), 将扩增的目标条带送测序。将探针模板T7测序结果与MC1R基因目标序列进行比对, 扩增片段与目的片段一致。合成的MC1R基因的RNA正义探针(用作阴性对照用, 图1-b箭头所指)和反义探针(用作检测目标基因表达, 图1-c箭头所指)2条带(18S和28S)清晰, 具有较好的完整性。通过核酸蛋白分析仪检测探针质量浓度, T7方向转录的正义RNA探针浓度为447.529 ng/ μL , OD₂₆₀为2.05; SP6方向转录的反义RNA探针浓度为342.698 ng/ μL OD₂₆₀为2.07。

2.2 橘色双冠丽鱼MC1R基因在胚胎发育中的整胚原位杂交表达

杂交结果显示, MC1R基因在橘色双冠丽鱼胚胎发育的表达定位随着胚胎的发育, 信号总体呈逐渐减弱趋势(图2-a~e)。在鱼胚胎发育的早期—原肠期信号较强(图2-a-), 随着胚胎发育, 视泡期、血液循环期、出膜期和出膜1 d这4个时期MC1R基因信号逐渐变微弱(图2-b~e)。在原肠期和视泡期除在卵黄囊内有信号, 胚体侧卧部分也有信号分布(图2-a-, b-, 箭头所指)。在出膜期, 脊柱、卵黄囊及其内容物质, 及色素细胞内有信号分布(图2-d-, 箭头所指)。在出膜期1 d, 在卵黄内有信号分布, 脊柱处没有信号分布(图2-e-, 箭头所指), 而以正义探针作为阴

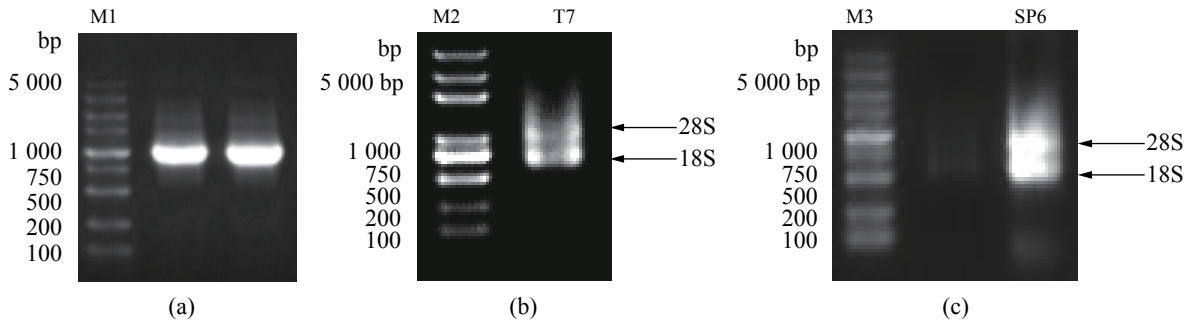


图 1 MC1R探针电泳检测

(a) 探针模板PCR产物电泳图, (b) T7方向转录的正义RNA探针电泳图, (c) SP6方向转录的反义RNA探针电泳图; M1、M2、M3为标准物质5 000

Fig. 1 Electrophoresis detection of MC1R probes

(a) probe template PCR product electrophoresis, (b) T7 direction transcribed justice RNA probe, (c) antisense RNA probe electrophoresis of SP6 transcription; M1, M2, M3. Marker 5 000.

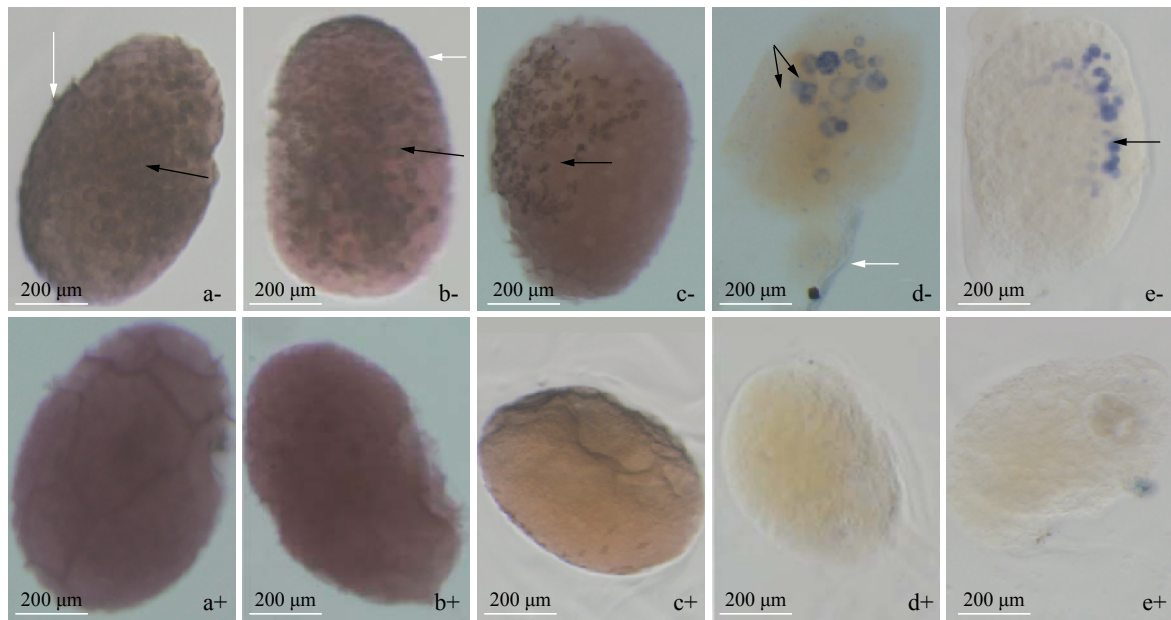


图 2 橘色双冠丽鱼MC1R基因整胚原位杂交结果

a~e-. 反义探针, a+~e+. 正义探针; a. 原肠期, b. 视泡期, c. 血液循环期, d. 出膜, e. 出膜1 d; 箭头为MC1R信号表达部位, 其中白色箭头为信号在胚体侧卧部分的表达

Fig. 2 Result of MC1R gene whole-mount in situ hybridization for A. citrinellus

a~-e-. antisense probe, a+~e+. sense probe; a. gastrul-stage, b. crystal-stage, c. blood circulatio-stage, d. hatching-stage, e. hatching 1 day; the arrow represents the MC1R signal expression site, the white arrow represents the expression of the signal in the lateral lying part of the embryo body

性对照组, 在5个胚胎阶段均无任何信号(图2-a+~e+)。

3 讨论

在进行探针杂交前为抑制胚胎黑色素生成, 一般会在胚胎长出色素前在水中加入苯基硫脲(N-phenylthiourea, PTU)等^[19], 或配制脱色液对黑色素进行化学脱色^[11,20]。本实验目标基因与色

素细胞分化、色素合成相关, 不能做抑制处理, 且PTU可能会对胚胎发育有一定影响, 因此, 实验采用化学脱色的方法去除色素, 使结果更容易观察。脱色、显色等具体处理方法参考了曹建萌等^[11]在尼罗罗非鱼(*O. niloticus*)整胚原位杂交的改进技术, 用30% H₂O₂和5% KOH配制成脱色液进行脱色, 结果脱色效果明显, 证明此方法可行。

链霉菌蛋白酶是一种蛋白裂解酶,能裂解胃表面的黏液和胃黏液壁膜细胞,在临床上是一种有效的消泡剂,也常用于裂解卵膜表面的蛋白、壁膜细胞以进行整胚原位杂交的膜壳处理^[11,21-22]。在进行鱼类整胚原位杂交时,胚胎采集后一般是通过显微镊或皮试针在体视显微镜下徒手剥去卵壳,或用链霉菌蛋白酶除掉卵壳^[23-24]。可能橘色双冠丽鱼胚胎本身卵膜的结构较特殊,卵壳坚硬不易剥除,本实验前期通过徒手剥卵壳没有达到理想效果,因此,最终使用链霉菌蛋白酶尝试去除卵壳,保证显色液和探针能进入胚胎内,从表达图式上看,卵壳去除效果良好。

参考蒋燕玲^[18]对橘色双冠丽鱼胚胎发育观察发现,胚胎发育至39 h后(心跳期)出现黑色素细胞。韦敏侠等^[25]对该鱼胚后发育色素细胞观察发现,刚出膜仔鱼眼睛为透明,眼睛未见黑色素细胞,卵黄囊上分布许多颜色较淡的黑色素细胞,其次在头部和背上脊椎附近也出现许多黑色素细胞。本实验杂交结果显现了MC1R基因在橘色双冠丽鱼胚胎发育中的表达定位,随着胚胎的发育杂交信号总体呈逐渐减弱趋势,在鱼胚胎发育的早期—原肠期信号较强,视泡期、血液循环期、出膜和出膜1 d这4个时期MC1R基因信号逐渐变微弱,说明MC1R基因已经参与在该鱼的胚胎早期发育过程中。胚胎发育至原肠期和视泡期,在卵黄和胚体侧卧部分有杂交信号分布;出膜期,在脊柱、卵黄和色素细胞处有杂交信号分布;出膜期1 d,在卵黄内有信号分布。可见,杂交信号在脊柱、卵黄和卵黄囊上的色素细胞处有特异表达,推测MC1R基因与神经、营养、免疫以及色素细胞分化、迁移等生理功能有关。而程炜轩等^[26]在黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)黑色素细胞迁移相关基因研究中也指出,MC1R基因在鱼体中除对黑色素细胞分化、迁移起着主要调控作用外,在免疫系统和神经系统中都表现出重要生理功能。

前期本课题组也对该鱼各胚胎期进行了MC1R相对定量PCR检测,表达模式为随着胚胎发育,表达量逐渐减少,这一结果与整胚原位杂交结果相一致,印证了实验的准确性。分析显示,橘色双冠丽鱼在胚胎发育前期MC1R基因有大量表达,但其黑色素并未见生成,而发育至后期MC1R相对表达量减少时,黑色素却逐渐生成。这可能是由于MC1R与Agouti存在竞争性结合,在

MC1R与其受体 α -MSH结合时产生拮抗,MC1R大量存在的同时Agouti也升高,导致真黑色素的合成受阻^[17]。另外,本实验所定位的MC1R表达总量是在整个胚胎上,而MC1R的基因功能也活跃在其他如细胞再生、炎症反应、参与机体免疫等方面,且MC1R的基础表达水平即可启动腺苷酸循环,通过生理生化等一系列级联反应能让黑色素细胞生长、增殖^[13,15]。因此,MC1R基因在前期表达量较大时并未出现黑色素也属正常。

4 结论

本实验成功制备MC1R基因的RNA正义探针和反义探针。MC1R基因探针表达定位显示,MC1R杂交信号随着橘色双冠丽鱼胚胎的发育总体呈逐渐减弱趋势。与本课题组前期进行胚胎发育9个发育时期相对定量PCR检测中MC1R相对表达量逐渐减少的结果相一致。在原肠期和视泡期、血液循环期、出膜期及出膜1 d,杂交信号均有不同程度的显现。而以正义探针作为阴性对照组在5个胚胎阶段均无任何信号。本实验初步建立鱼类体色相关基因功能和定位研究的整胚原位杂交技术流程。通过杂交信号可直观显现MC1R表达定位,证明其可能参与调控神经、营养、免疫以及色素细胞分化、迁移等生理功能。

参考文献:

- [1] Gall J G, Pardue M L. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1969, 69(2): 378-383.
- [2] Westerfield M. The zebrafish book: a guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*)[M]. 5th ed. Eugene: University of Oregon Press, 2007.
- [3] 杨冰洁. 几种紫薇属植物染色体制片技术优化及原位杂交体系的建立[D]. 北京: 北京林业大学, 2013.
Yang B J. Optimization of chromosome sectioning and establishment of FISH and GISH of *Lagerstroemia* L.[D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2013 (in Chinese).
- [4] 鲁翠云, 张明昭, 李超, 等. 荧光原位杂交技术在鱼类基因定位研究中的应用[J]. 水产学杂志, 2013, 26(4): 51-57.
Lu C Y, Zhang M Z, Li C, et al. Application of

- fluorescence *in situ* hybridization (FISH) techniques in gene location in fish[J]. *Chinese Journal of Fisheries*, 2013, 26(4): 51-57(in Chinese).
- [5] Cao J M, Li S Q, Zhang H W, *et al.* High mobility group B proteins regulate mesoderm formation and dorsoventral patterning during zebrafish and *Xenopus* early development[J]. *Mechanisms of Development*, 2012, 129(9-12): 263-274.
- [6] Lauter G, Söll I, Hauptmann G. Multicolor fluorescent *in situ* hybridization to define abutting and overlapping gene expression in the embryonic zebrafish brain[J]. *Neural Development*, 2011, 6: 10.
- [7] 陈琼霞, 镇鸿燕, 李艳, 等. 基于石蜡包埋组织荧光原位杂交的技术问题[J]. *中国医药指南*, 2013, 11(13): 382.
- Chen Q X, Zhen H Y, Li Y, *et al.* Based on fluorescence *in situ* hybridization of paraffin-embedded tissue[J]. *Guide of China Medicine*, 2013, 11(13): 382(in Chinese).
- [8] 靳雁斌, 丁学锋, 司慧远, 等. 小鼠 *Cpne5* 基因 mRNA 水平的表达分布及其在胚胎的表达定位[J]. 标记免疫分析与临床, 2013, 20(2): 93-96.
- Jin Y B, Ding X F, Si H Y, *et al.* Expression of mouse *Cpne5* gene mRNA in various tissues and its location in embryo[J]. *Labeled Immunoassays and Clinical Medicine*, 2013, 20(2): 93-96(in Chinese).
- [9] 蒋丽, 王阳阳, 程安达, 等. 鲤鱼 (*Cyprinus carpio*) 外异蛋白 A 受体 *Edar* 基因的克隆及表达定位[J]. 生物技术通报, 2013(12): 99-107.
- Jiang L, Wang Y Y, Cheng A D, *et al.* Preliminary study of *Edar* gene cloning and localization of expression in *Cyprinus carpio*[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2013(12): 99-107(in Chinese).
- [10] 叶寒青, 陈松林, 刘洋, 等. 表达绿色荧光蛋白基因的花鲈胚胎干细胞株的建立及其体外分化[J]. *高技术通讯*, 2006, 16(1): 61-66.
- Ye H Q, Chen S L, Liu Y, *et al.* Establishment and differentiation *in vitro* of sea perch embryonic stem cell line expressing GFP gene[J]. *Chinese High Technology Letters*, 2006, 16(1): 61-66(in Chinese).
- [11] 曹建萌, 卢迈新, 叶星, 等. 尼罗罗非鱼整胚原位杂交技术的建立和初步应用[J]. *水产学报*, 2014, 38(11): 1847-1854.
- Cao J M, Lu M X, Ye X, *et al.* A novel protocol of whole mount *in situ* hybridization (WISH) and its primary application in Nile tilapia[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(11): 1847-1854(in Chinese).
- [12] 杨永升, 李宁, 邓学梅, 等. 黑素皮质素受体 1: 哺乳动物黑色素形成中的关键基因[J]. *遗传*, 2004, 26(4): 544-550.
- Yang Y S, Li N, Deng X H, *et al.* *MC1R*: the key gene in mammalian melanin synthesis[J]. *Hereditas (Beijing)*, 2004, 26(4): 544-550(in Chinese).
- [13] FitzGerald L M, Fryer J L, Dwyer T, *et al.* Effect of MELANOTAN[®], [Nle⁴, D-Phe⁷]- α -MSH, on melanin synthesis in humans with *MC1R* variant alleles[J]. *Peptides*, 2006, 27(2): 388-394.
- [14] Adalsteinsson S, Hersteinsson P, Gunnarsson E. Fox colors in relation to colors in mice and sheep[J]. *Journal of Heredity*, 1987, 78(4): 235-237.
- [15] 孙静. 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[D]. 青岛: 青岛农业大学, 2012.
- Sun J. Sequence analysis and expression level study on *MC1R* gene in reddish-brown raccoon dog[D]. Qingdao: Qingdao Agricultural University, 2012 (in Chinese).
- [16] 任玉红, 杨刚, 范瑞文, 等. 黑素皮质素受体 1 (*MC1R*) 在不同毛色羊驼皮肤组织中的表达与定位研究[J]. *畜牧兽医学报*, 2012, 43(7): 1049-1055.
- Ren Y H, Yang G, Fan R W, *et al.* Expression and immunolocalization of melanocortin receptor 1 (*MC1R*) in alpaca skin with different coat color[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2012, 43(7): 1049-1055(in Chinese).
- [17] 胡建尊, 李康乐, 项松平, 等. 瓯江彩鲤体色调控相关因子 *MC1R* 的克隆与表达分析[J]. *上海海洋大学学报*, 2013, 22(4): 518-523.
- Hu J Z, Li K L, Xiang S P, *et al.* Cloning and expression analysis of color-related regulation factor *MC1R* in Oujiang color common carp[J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2013, 22(4): 518-523(in Chinese).
- [18] 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[D]. 上海: 上海海洋大学, 2016.
- Jiang Y L. Body color variation and cloning, expression analysis of *TYR* gene in *Amphilophus citrinellus*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2016 (in Chinese).
- [19] 孙桂金, 潘杰, 刘可春, 等. 苯硫脲对斑马鱼黑色素生

- 成及早期发育的影响[J]. *水产科学*, 2011, 30(7): 387-390.
- Sun G J, Pan J, Liu K C, *et al.* Effects of N-phenylthiourea (PTU) on melanogenesis and early development in zebrafish (*Danio rerio*)[J]. *Fisheries Science*, 2011, 30(7): 387-390(in Chinese).
- [20] 徐永江, 朱学武, 柳学周, 等. 半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)黑色素富集激素基因的克隆和表达[J]. *渔业科学进展*, 2017, 38(1): 81-90.
- Xu Y J, Zhu X B, Liu X Z, *et al.* Cloning and expression of melanin-concentrating hormone in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(1): 81-90(in Chinese).
- [21] 王东, 方军, 厉有名, 等. 链霉蛋白酶提高胃镜检查图像可见度的前瞻性、多中心、双盲、随机对照临床研究[J]. *中华消化内镜杂志*, 2013, 30(11): 604-607.
- Wang D, Fang J, Li Y M, *et al.* Effectiveness of premedication with pronase for visualization of the mucosa during endoscopy: a double-blinded, multi-center, prospective, randomized study[J]. *Chinese Journal of Digestive Endoscopy*, 2013, 30(11): 604-607(in Chinese).
- [22] 纪莉莎, 管泐, 姜昕. 链霉蛋白酶在胃镜检查中的临床应用[J]. *中国继续医学教育*, 2015, 7(23): 129-130.
- Ji L S, Guan Y, Jiang X. Application of pronase in gastroscopy examination[J]. *China Continuing Medical Education*, 2015, 7(23): 129-130(in Chinese).
- [23] 樊站治, 彭忠禄, 谢华平, 等. 斑马鱼整体原位杂交的技术改良[J]. *激光生物学报*, 2010, 19(1): 115-119.
- Fan H Y, Peng Z L, Xie H P, *et al.* Improvement of whole-mount *in situ* hybridization to zebrafish embryos[J]. *Acta Laser Biology Sinica*, 2010, 19(1): 115-119(in Chinese).
- [24] 张春霞, 刘峰. 斑马鱼高分辨率整胚原位杂交实验方法与流程[J]. *遗传*, 2013, 35(4): 522-528.
- Zhang C X, Liu F. A brief protocol for high-resolution whole mount *in situ* hybridization in zebrafish[J]. *Hereditas (Beijing)*, 2013, 35(4): 522-528(in Chinese).
- [25] 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[J]. *上海海洋大学学报*, 2015, 24(1): 28-35.
- Wei M X, Song H M, Qi B L, *et al.* Pigment cells development and body color variation of postembryonic development in *Amphilophus citrinellus* (Günther 1864)[J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2015, 24(1): 28-35(in Chinese).
- [26] 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).

Melanocortin receptor 1 gene (*MC1R*) of *Amphilophus citrinellus* by whole-mount *in situ* hybridization

PAN Xianhui^{1,2}, SONG Hongmei¹, ZHOU Kangqi^{1,2}, WANG Xuejie¹, LIU Yi¹, MOU Xidong¹,
YU Fandong¹, YANG Yexin¹, LIU Chao¹, ZHENG Shuming², HU Yinchang^{1*}

(1. Key Laboratory of Recreational Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China;

2. The Key Laboratory of the Ministry of Education of Freshwater Fish Resources and Reproductive Development, China Southwest University, Chongqing 402460, China)

Abstract: In order to explore the melanocortin receptor 1 gene (*MC1R*) in *Amphilophus citrinellus* embryo development and the formation of the body color expression location and function of the test preparation of *MC1R* gene RNA is antisense probes, T7 has sense direction of transcription of RNA probe concentration is 447.529 ng/ μ L, SP6 direction of transcription antisense RNA probe concentration is 342.698 ng/ μ L. After 10 to 20 times dilution probe was used for *in situ* hybridization, the *MC1R* gene probe expression positioning shows that *A. citrinellus* embryo developmental hybridization signal was weakening trend in general, the intestinal phase and bubble phase, yolk and lateral embryonic body parts have a hybridization signal distribution; in the film stage, hybridization signals appeared in the spine, yolk sac and yolk sac contents and pigment cells. There is a signal distribution on the yolk surface. In general, hybridization signals are specifically expressed in chordate, yolk sac and yolk sac contents and pigment cells, and the sense probe as a negative control group in five embryonic stages without any signal, sage *MC1R* expression positioning shows that the signal is revealed in *A. citrinellus* pigment cells that play an important regulating role in differentiation, migration, and are also associated with nerve, nutrition, immune function, preliminary establishment of fish body color related gene function and orientation of the entire embryo in situ hybridization method.

Key words: *Amphilophus citrinellus*; melanocortin receptor 1; whole-mount *in situ* hybridization; positioning analysis; hybridization probes; *MC1R*

Corresponding author: HU Yinchang. E-mail: huyc22@163.com

Funding projects: Natural Science Foundation of the Guangdong Province, China (2015A030313700); National Natural Science Foundation Youth Fund(802037); Fishing Port Construction and Fishery Industry Development in Guangdong Province(A201601C09)