



长牡蛎*MITF*基因表达及与壳色的关联

杨佳敏¹, 王 勇¹, 王晓通^{2*}, 包永波^{1*}

(1. 浙江万里学院生物与环境学院, 浙江 宁波 315100;

2. 鲁东大学农学院, 山东 烟台 264025)

摘要: 为了解长牡蛎*MITF*基因的表达及其与壳色的关联, 验证了长牡蛎中的4个*MITF*基因, 对长牡蛎*MITF*氨基酸序列进行了序列分析和多序列比对, 分析了长牡蛎幼体发育各时期的转录组, 采用荧光定量PCR的方法研究长牡蛎各组织及黑壳、白壳牡蛎特定部位mRNA表达情况。4个*MITF*基因中有3个基因可能为假基因, 有表达的长牡蛎*MITF*基因共编码448个氨基酸, 为亲水性不稳定蛋白, 含有N端结构域(MITF_TFEB_C_3_N super-family)和高度保守的功能性结构域HLH结构域。转录组分析发现*MITF*在长牡蛎个体发育的各个时期均有表达, 在稚贝期达到最高。组织表达结果显示*MITF*在外套膜中的表达水平显著高于其他组织。*MITF*在黑壳牡蛎闭壳肌中的表达量显著低于白壳牡蛎, 而在黑壳牡蛎外套膜中的表达量高于白壳牡蛎, 但不显著。在黑壳、白壳牡蛎外套膜边缘的表达量都显著高于内侧。研究表明, 长牡蛎*MITF*基因可能在牡蛎壳形成早期就参与了黑色素的生成调控和个体的生长发育, 可调控牡蛎酪氨酸酶*Tyr2*基因, 参与外套膜和贝壳中黑色素的形成。本研究为进一步研究牡蛎壳色形成机制奠定了基础。

关键词: 长牡蛎; *MITF*; 基因表达; 壳色关联; 黑色素

中图分类号: Q 785; S 917.4

文献标志码: A

小眼畸形相关转录因子(microphthalmia-associated transcription factor, MITF), 由于能与TFEB、TFE3或TFEC形成同源或异源二聚体并和DNA发生特异性结合, 并与后三者共同组成了MiT转录因子超家族^[1], 同时具有典型的螺旋—环—螺旋—亮氨酸拉链结构, MITF也是bHLH家族成员之一, 与黑色素细胞分化密切相关^[2]。MITF在人类(*Homo sapiens*)的黑色素细胞和黑色素瘤细胞中通过识别位于靶基因启动子区高度保守序列以启动基因转录, 进而调控与黑色素形成相关的酪氨酸基因家族的合成^[3]。此外, MITF也在 α -黑色素细胞刺激素有关途径^[4]、激活蛋白酯酶C途径^[5]、刺鼠信号蛋白相关途径^[6]等黑色素形成的信号通

路中处于重要位置。

在斑马鱼(*Danio rerio*)中, *MITF*a的突变扰乱了神经嵴成黑色素细胞的形成^[7]。在仿刺参(*Apostichopus japonicus*)中的研究显示, 白化刺参个体中黑色素细胞较少, 合成色素能力差, 可能与*MITF*的表达显著下降密切相关^[8]。对非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)的*MITF*基因进行原位杂交发现, 其在不同类型的色素细胞、成黑色素细胞、视网膜色素上皮细胞和骨骺中表达^[9]。张廷焕等^[10]在对猪*MITF-M*的转录调控研究中鉴定出3个转录活性显著变化区域, 其中2个为正调控区域, 1个为负调控区域, 还发现了转录因子KLF4可能可以抑制*MITF-M*的转录活性, 从而调控黑色素细

收稿日期: 2019-06-07 修回日期: 2019-07-25

资助项目: 国家自然科学基金(31672678, 41876193); 国家重点研发计划(2018YFD0901400); 宁波市国际合作项目(2016D10017); 浙江省“生物工程”重中之重学科学子创新计划项目(CX2017044); 山东省泰山学者专项(tsqn201812094); 山东省自然科学基金(ZR2019MC002)

通信作者: 王晓通, E-mail: wangxiaotong999@163.com; 包永波, E-mail: bobbao2001@gmail.com

胞中合成和沉积黑色素。杨玉静等^[11]在研究绵羊(*Ovis aries*)MITF-M功能时发现,绵羊的MITF-M可能是通过调节*TYR*和*TYRP-1*的表达量进而控制绵羊黑素细胞中黑色素的生成。

长牡蛎(*Crassostrea gigas*)是重要的海产经济贝类之一^[12],牡蛎壳也是一种潜在的生物材料^[13],目前通过选育牡蛎壳黑品系以研究优良性状也是牡蛎养殖研究的重要方向之一^[14]。有研究者提出,牡蛎中黑色素可以减少闭壳肌的氧化损伤,也有大量研究表明牡蛎的成活率与壳色的着色度有一定关联^[15]。与野生长牡蛎相比,壳黑品系具有更强的环境适应能力,是一种具有生长和抗逆优势的选育性状^[16]。MITF是黑色素形成的关键调控因子,但在牡蛎黑壳形成的作用和调控机制等方面未见报道。本研究通过分析长牡蛎MITF的基因表达及其与壳色的关联,为阐明牡蛎中MITF的功能及在牡蛎黑色素及壳色形成中的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用长牡蛎均采自山东乳山某牡蛎养殖场。实验所用牡蛎如图1所示。暂养7 d后,在3个普通白壳牡蛎个体中分别取闭壳肌、外套膜、鳃、肝胰腺、血淋巴、性腺组织。在4个经选育的黑壳牡蛎和4个普通白壳牡蛎中分别取闭壳肌、外套膜内侧及边缘部位组织,所有取样组织在液氮中冷冻保存,用于后续实验。



图1 选育的黑壳牡蛎(a)和野生普通白壳牡蛎(b)

Fig. 1 Selected black-shelled oysters (a) and wild white-shelled oysters (b)

1.2 基因验证

基于本实验室前期对冠轮动物(Lophotrochozoa) *bHLH*基因分类和进化分析中发现,长牡蛎中有4个MITF基因(MITF1-XP_011447560、MITF2-XP_011411985、MITF3-XP_011425390、MITF4-XP_011451326)^[17],根据其基因序列,使用Primer Premier

5.0软件设计RT-PCR引物(100-200 bp)进行PCR扩增以验证基因。根据来自NCBI基因表达综合数据库(序列号 GSE31012)和相关报道的补充材料^[18]的长牡蛎各器官的转录组数据,以FPKM(fragments per kilobase million)作为评估基因表达水平的参数对长牡蛎各器官的MITF基因进行差异表达分析。

1.3 序列分析

根据长牡蛎MITF基因序列,利用The Sequence Manipulation Suite(<http://www.bioinformatics.org/sms/>)在线预测软件来寻找开放阅读框;通过ProtParam(<https://web.expasy.org/protparam/>)软件预测长牡蛎MITF的理化性质,使用ProtScale(<https://web.expasy.org/protscale/>)软件预测长牡蛎MITF的疏水性;从NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中获取其他物种MITF序列;利用CD search寻找长牡蛎及各物种MITF中含有的保守结构域(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>);利用DNAMAN 8.0软件将长牡蛎MITF氨基酸序列与其他物种序列进行比对。

1.4 基因mRNA表达分析

基于长牡蛎各发育时期的转录组数据,以FPKM评估MITF基因在长牡蛎各发育阶段的差异表达情况,该数据同样来自上述NCBI基因表达综合数据库和相关材料。选用基因验证中成功扩增出目的基因片段的RT-PCR引物,引物序列如表1所示。提取成熟个体各组织的总RNA后,采用TaKaRa公司的PrimeScript™ RT reagent Kit对RNA进行反转录获得cDNA。使用LightCycler® 480 II (Roche)对长牡蛎各组织及黑壳、白壳牡蛎闭壳肌、外套膜的边缘和内侧部位的MITF基因进行荧光定量PCR,使用Livak等^[19]的方法对数据进行分析,并进行显著性检验以获得各组织中的相对表达情况。

表1 实验所用引物序列

Tab. 1 Primers sequence in the experiment

引物 primers	序列 sequences(5'-3')	功能 function
<i>Cg</i> -MITF-F	TCCACAACACTTCCCA TTCA	荧光定量引物
<i>Cg</i> -MITF-R	CTTTGCCACATTCTCTT TTCC	荧光定量引物
β -actin-F	GTGCTACGTGCCCCTGG ACTT	内参引物
β -actin-R	TCGCTCGTTGCCAATGG TGAT	内参引物

2 结果

2.1 基因验证

对4个MITF基因进行PCR验证后, 只有MITF1能扩增出目的条带, 其余基因均无条带(图2)。对4个MITF基因的转录组数据进行分析后发现, 除MITF1基因在各组织中的FPKM值均处于较高水平外, 其余3个基因的FPKM值小于1, 可能为无效表达。因此仅根据MITF1进行后续实验, 下文中涉及的长牡蛎MITF均为MITF1。

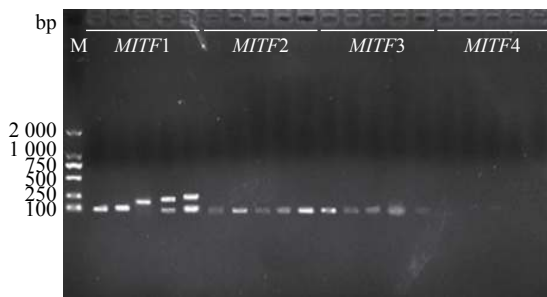


图2 四个MITF基因的PCR验证电泳图

Fig. 2 Electrophoretogram of PCR amplification of four MITF genes

M. Marker

2.2 序列分析

长牡蛎MITF氨基酸序列分析显示, 长牡蛎MITF共编码448个氨基酸, 预测为不稳定、亲水性蛋白, 含有2个显著的保守结构域, 分别为位于53~198位的N端结构域(MITF_TFEB_C_3_N superfamily)和278~335位的螺旋—环—螺旋(HLH)结构域, 其中HLH结构域含有DNA结合位点、E-box/N-box 特异性位点以及二聚结构。对各物种MITF序列进行保守结构域分析得到表2, 其中N端结构域仅未出现在扁形动物埃及血吸虫(*Schistosoma haematobium*)中, 而HLH结构域存在于所有涉及物种的MITF序列中, 碱性亮氨酸拉链(bZip)只出现在脊索动物文昌鱼(*Branchiostoma belcheri*)和脊椎动物的两栖类、鸟类、爬行类、哺乳类中。将长牡蛎MITF序列与部分物种进行多序列比对, 结果显示长牡蛎MITF与这些物种MITF的氨基酸序列一致性为26%~52%(图3), 但它们共同的HLH结构域中的E-box/N-box 特异性位点和二聚体位点在物种间都很保守。

2.3 各发育时期MITF基因转录组表达分析

分析各发育时期的长牡蛎转录组数据, 结

表2 各物种MITF保守结构域分析

Tab. 2 Analysis of conserved structural domains of MITF sequences of each species

物种 species	序列号 accession no.	保守结构域 conserved structural domain		
		MITF_TFEB_C_3_N	HLH	bZIP
萼柱珊瑚 <i>Stylophora pistillata</i>	PFX34296.1	+	+	-
埃及血吸虫 <i>Schistosoma haematobium</i>	XP_012798852.1	-	+	-
虾夷扇贝 <i>Mizuhopecten yessoensis</i>	XP_021364176.1	+	+	-
长牡蛎 <i>Crassostrea gigas</i>	XP_011447560	+	+	-
刺参 <i>Apostichopus japonicus</i>	PIK62754.1	+	+	-
大型蚤 <i>Daphnia magna</i>	JAN88814.1	+	+	-
文昌鱼 <i>Branchiostoma belcheri</i>	XP_019634219.1	+	+	+
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	NP_571922.2	+	+	-
南亚野鲮 <i>Labeo rohita</i>	RXN35099.1	+	+	-
非洲爪蟾 <i>Xenopus laevis</i>	NP_001093747.1	+	+	-
大鲵 <i>Andrias davidianus</i>	QBX05109.1	+	+	+
红耳龟 <i>Trachemys scripta elegans</i>	AVX28371.1	+	+	+
美国短吻鳄 <i>Alligator mississippiensis</i>	XP_014460639.1	+	+	+
鸡 <i>Gallus gallus</i>	XP_015148453.2	+	+	+
鹌鹑 <i>Coturnix japonica</i>	XP_015730833.1	+	+	+
人 <i>Homo sapiens</i>	NP_001341533.1	+	+	+
马 <i>Equus caballus</i>	NP_001157346.1	+	+	-

注: +, 存在; -, 不存在

Notes: +, exist; -, not exist

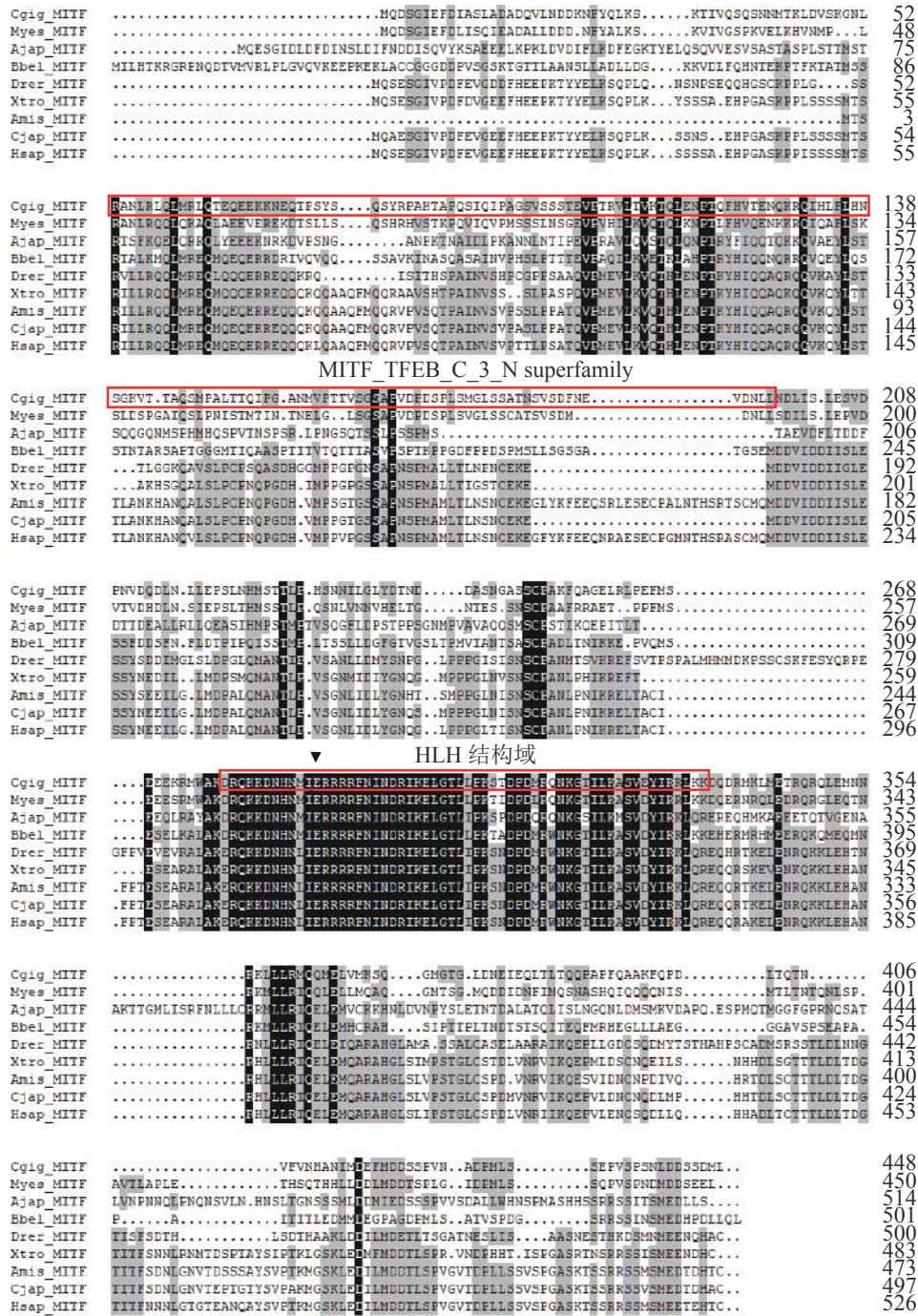


图3 长牡蛎MITF与其他物种的多序列比对

一致的序列为黑色背景，相似序列为灰色背景。红框区域为2个保守结构，前者为N端结构域，处于MITF、转录因子EB、转录因子EC、转录因子E3中，后者为HLH结构域。▼. E-box/N-box特异性结合位点.Cgig. 长牡蛎，XP_011447560；Myes. 虾夷扇贝，XP_021364176.1；Ajap. 刺参，PIK62754.1；Bbel. 白氏文昌鱼，XP_019634219.1；Drer. 斑马鱼，NP_571922.2；Xtro. 非洲爪蟾，NP_001093747.1；Amis. 美国短吻鳄，XP_014460639.1；Cjap. 鹌鹑，XP_015730833.1；Hsap. 人，NP_001341533.1

Fig. 3 Multiple sequence alignment of MITF from *C. gigas* with other known MITF amino acid sequences

The same sequence has a black background and similar sequences have a gray background. The red box region contains two conserved structures. The former is the N-terminal domain which is located in MITF, transcription factor EB, transcription factor EC, and transcription factor E3, while the latter is the HLH domain. ▼. E-box/N-box specific binding site. Cgig. *Crassostrea gigas*, XP_011447560.1; Myes. *Mizuhopecten yessoensis*, XP_021364176.1; Ajap. *Apostichopus japonicus*, PIK62754.1; Bbel. *Branchiostoma belcheri*, XP_019634219.1; Drer. *Danio rerio*, NP_571922.2; Xtro. *Xenopus tropicalis*, NP_001093747.1; Amis. *Alligator mississippiensis*, XP_014460639.1; Cjap. *Coturnix japonica*, XP_015730833.1; Hsap. *Homo sapiens*, NP_001341533.1

果显示长牡蛎 *MITF* 基因在各生长发育时期均有表达, 总体表达量随着胚胎和个体发育存在波

动, 但总体表达量趋势上升, 至成贝达到最高峰(图4)。

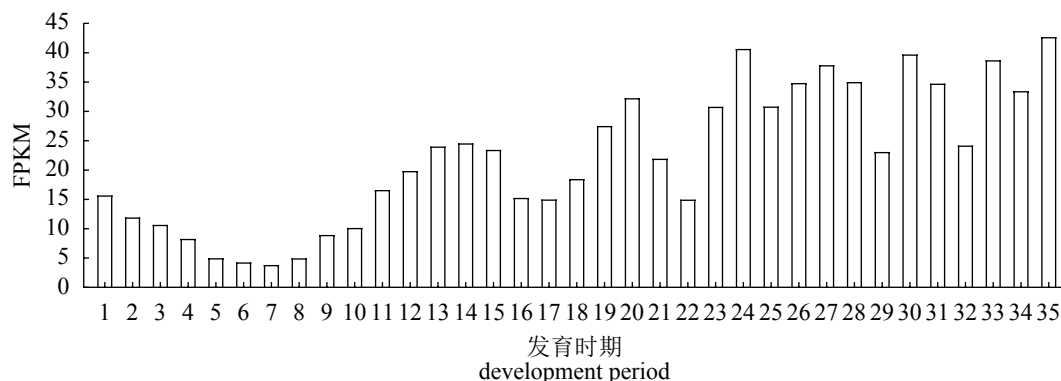


图4 长牡蛎发育各时期 *MITF* 基因转录组表达结果

FPKM. 每百万测序碱基中的每千个转录子测序碱基中所包含的测序片段数。1. 受精卵, 2. 二细胞期, 3. 四细胞期, 4. 早期桑葚期, 5. 桑葚期, 6. 囊胚期, 7. 早期原肠胚期, 8. 原肠胚期, 9~13. 担轮幼虫期, 14~15. 早期D型幼虫期, 16~22. D型幼虫期, 23~24. 早期壳顶幼虫期, 25~30. 壳顶幼虫期, 31~32. 晚期壳顶幼虫期, 33~34. 足面盘幼虫期, 35. 稚贝期

Fig. 4 Expression analysis of *MITF* gene transcriptome during the development of *C. gigas*

FPKM. fragments per kilobase million. 1. fertilized egg, 2. two-cell phase, 3. four-cell stage, 4. early mulberry stage, 5. mulberry period, 6. blastocyst stage, 7. early gastrula stage, 8. gastrula stage, 9-13. larval stage of trocar, 14-15. early D larval stage, 16-22. D type larval stage, 23-24. early apical larval stage, 25-30. apical larval stage, 31-32. late apical larval stage, 33-34. larval stage of plantar disc, 35. juvenile stage

2.4 组织荧光定量表达分析

对普通养殖牡蛎的各组织进行荧光定量, 结果显示, 鳃、性腺、闭壳肌、血淋巴、肝胰腺、外套膜均含有 *MITF* 基因, 且该基因在外套膜中表达量显著高于其他组织(图5)($P < 0.05$), 其次为闭壳肌, 在血淋巴、性腺、肝胰腺中表达量较低, 鳃中表达量显著低于其他组织($P < 0.05$)。

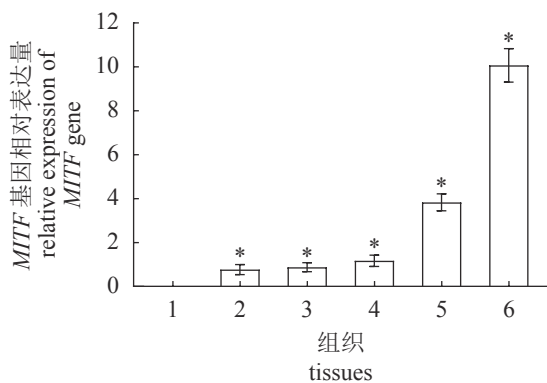


图5 *MITF* 基因在长牡蛎各组织中的相对表达分析

1. 鳃, 2. 肝胰腺, 3. 性腺, 4. 血淋巴, 5. 闭壳肌, 6. 外套膜; 与鳃比较, 柱标*表示差异显著($P < 0.05$), 下同

Fig. 5 Relative expression analysis of *MITF* gene in *C. gigas* tissues

1. gill, 2. digestive gland, 3. goand, 4. hemocytes, 5. adductor muscle, 6. mantle; compared with the gill, * indicates significant difference, $P < 0.05$, the same below

长牡蛎 *MITF* 基因在各组织中的表达量总体为外套膜>闭壳肌>血淋巴>性腺>肝胰腺>鳃。

2.5 黑、白壳牡蛎 *MITF* 表达对比分析

对黑壳、白壳牡蛎闭壳肌进行荧光定量后显示, 白壳牡蛎闭壳肌中 *MITF* 基因的表达量显著高于黑壳牡蛎闭壳肌(图6)($P < 0.05$)。

解剖中发现外套膜边缘部位有明显黑色物

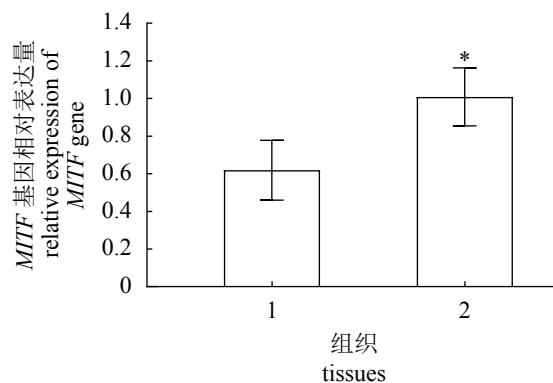


图6 *MITF* 基因在黑壳、白壳牡蛎闭壳肌中的相对表达量

1. 黑壳牡蛎闭壳肌, 2. 白壳牡蛎闭壳肌

Fig. 6 Relative expression of *MITF* gene in the adductors of black shell and white shell oysters

1. adductor muscle in black shell oyster, 2. adductor muscle in white shell oyster

质沉积(图7中MO), 而内侧无黑色物质(图7中MI)。对黑壳、白壳牡蛎的外套膜边缘及内侧组织的cDNA进行荧光定量后, 结果显示黑壳牡蛎外套膜内侧的*MITF*基因的表达量高于白壳牡蛎外套膜, 但差异不显著(图8)。外套膜边缘*MITF*基因的表达量均显著高于内侧表达量($P<0.05$)。

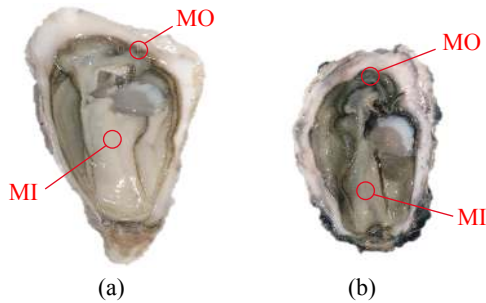


图7 黑壳(a)、白壳(b)牡蛎内部结构图

MO. 外套膜边缘, MI. 外套膜内侧

Fig. 7 Inner structure diagram of black shell (a) and white shell (b) of oyster

MO. outside of mantle, MI. interior of the mantle

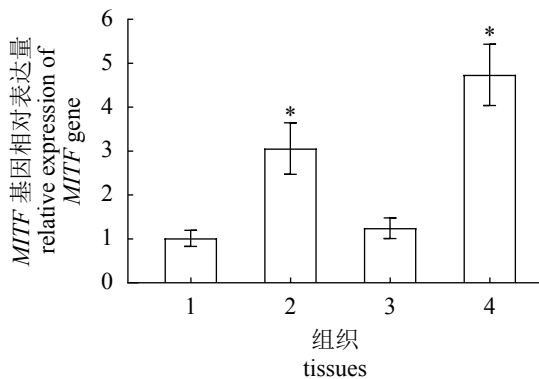


图8 *MITF*基因在黑壳、白壳牡蛎外套膜内侧及边缘的相对表达图

1. 白壳牡蛎外套膜内侧, 2. 白壳牡蛎外套膜边缘, 3. 黑壳牡蛎外套膜内侧, 4. 黑壳牡蛎外套膜边缘; 与黑壳牡蛎外套膜内侧进行比较

Fig. 8 Relative expression analysis of *MITF* gene in the inner and outer edge of the mantle of black shell and white shell oysters

1. interior of the mantle in white shell oyster, 2. outside of the mantle in white shell oyster, 3. interior of the mantle in black shell oyster, 4. outside of the mantle in black shell oyster; compared with the interior of the mantle in white shell oyster

3 讨论

根据PCR结果和转录组分析得出, *MITF2*、*MITF3*、*MITF4*在长牡蛎中不表达或极少表达,

<http://www.sxuebao.cn>

可能为假基因。参考其他贝类中只有1个*MITF*基因^[17], 由此推断, 在长牡蛎中也只有1个*MITF*基因, NCBI登记为XP_011447560。

对长牡蛎*MITF*的氨基酸序列进行保守结构域分析后得到的2个结构域中, HLH结构域含有DNA结合位点、E-box/N-box特异性位点以及二聚结构, 能通过形成同源或异源二聚体发挥功能。对各物种进行保守结构域分析后发现, *MITF*中的bZip结构只在脊索动物和脊椎动物的两栖类、鸟类、哺乳类中有发现, 而在扁形动物、腔肠动物、节肢动物、棘皮动物、软体动物以及鱼类的*MITF*序列中尚未发现。bZip结构域与HLH结构域相距较近且往往有重叠区域, bZip结构域也是转录因子的重要功能结构域之一, 2个相同结构的亮氨酸残基能形成二聚体, 借助碱性氨基酸残基与DNA结合^[20], 通过去除小鼠*MITF*序列中的部分亮氨酸会导致蛋白的DNA结合功能丧失, 因此, 对于含有bZip结构的*MITF*蛋白而言, 亮氨酸拉链结构在维持蛋白质功能稳定性中具有重要作用^[1]。多序列比对结果显示, *MITF*中的HLH结构域具有高度保守性, 其中的E-box/N-box特异性位点是结合启动子重要位点, 在各物种中完全保守, 所以该结构域也是*MITF*发挥作用的功能性位点。因此, *MITF*在不同的物种中可能具有相同或相似的功能。

长牡蛎各发育时期*MITF*基因表达结果显示, 该基因的表达量在早期原肠胚期前下降, 表明*MITF*基因可能在该段时期内的生长发育中参与度不高; 在担轮幼虫期和D型幼虫期, *MITF*基因表达量变化幅度较大, 在此期间幼虫逐渐形成I期胚壳, 两侧覆盖D型透明贝壳, 表明*MITF*基因可能在胚壳形成时开始发挥作用; 从壳顶幼虫期到稚贝期, *MITF*基因的表达量均处于较高水平, 该2个时期处于II期胚壳及钙质壳形成时期, 表明*MITF*基因可能在壳形成早期就参与了黑色素的调控和生成, 对该时期个体的生长发育有重要作用。

长牡蛎*MITF*基因在各组织中的表达量为外套膜>闭壳肌>血淋巴>性腺>肝胰腺>鳃。有研究表明, 牡蛎中酪氨酸酶*Tyr2*基因在外套膜中的表达量最高, 其次为闭壳肌, 在血淋巴、肝胰腺中的表达量较低, 在鳃中的表达量最低^[21]。因此, *MITF*基因在牡蛎各组织中的表达情况与酪氨酸酶基因*Tyr2*的组织表达情况较一致。而在对人类

酪氨酸酶基因的研究中发现, *MITF*能通过结合酪氨酸酶远端元件(TDE)的CATGTG基序特异性激活酪氨酸酶基因的启动子活性^[22]。所以, 推测牡蛎*MITF*与人*MITF*功能相似, 可通过其本身的HLH功能性保守结构域的DNA结合作用来调控酪氨酸酶*Tyr2*基因的表达, 从而调控黑色素的形成。

黑白壳牡蛎*MITF*基因表达比对实验结果显示, 闭壳肌中*MITF*基因表达与牡蛎壳颜色深度相反, 黑壳牡蛎中表达量高而白壳牡蛎中表达量低, Yu等^[23]的研究表明, 牡蛎闭壳肌瘢痕与相应的壳外表面无相关性, 其着色过程是独立的, 因此*MITF*基因在闭壳肌中的表达情况可能同样与壳色无相关性。黑壳牡蛎内侧和边缘的外套膜中的表达量高于白壳牡蛎, 但差异不显著, 由于牡蛎贝壳着色与外套膜边缘着色可能是同一个生理学过程^[24], 贝类壳层形成的经典模型认为, 壳层矿化发生在外套膜的分泌基质中, 壳层蛋白由外套膜和分泌体产生^[25], 外套膜与壳的形成有关, 因此推测*MITF*基因与壳色的形成也有关系, 但可能不是最关键的基因。黑、白壳牡蛎外套膜边缘*MITF*基因表达量均显著高于内侧, 牡蛎外套膜中的黑色物质被证实为黑色素^[26], 在对牡蛎酪氨酸酶*Tyr2*基因的研究中, 同样显示外套膜边缘部位表达量显著高于内侧^[21], 表明在外套膜中, *MITF*的表达与黑色素沉积以及酪氨酸酶*Tyr2*基因的表达相一致。所以在长牡蛎中, *MITF*可能正调控外套膜中酪氨酸酶*Tyr2*基因的表达, 且与黑色素的形成有显著相关性。

本研究通过分析*MITF*基因在长牡蛎组织和发育阶段中的表达情况, 发现*MITF*在外套膜中高表达, 且在黑壳牡蛎的外套膜外侧高表达, 推测*MITF*可能参与了牡蛎外套膜和壳黑色素的形成。本实验结果为阐明长牡蛎中*MITF*的功能及黑色素和壳色形成分子机制奠定了基础。

参考文献:

- [1] Hemesath T J, Steingrímsson E, McGill G, *et al.* Microphthalmia, a critical factor in melanocyte development, defines a discrete transcription factor family[J]. *Genes & Development*, 1994, 8(22): 2770-2780.
- [2] 王勇, 陈克平, 姚勤. bHLH转录因子家族研究进展[J]. *遗传*, 2008, 30(7): 821-830.
- Wang Y, Chen K P, Yao Q. Progress of studies on bHLH transcription factor families[J]. *Hereditas*, 2008, 中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries
- 30(7): 821-830(in Chinese).
- [3] 刘文艳, 李园, 蔡永强, 等. 黑色素细胞中*MITF*相关信号通路调控因子的研究进展[J]. *畜牧与兽医*, 2017, 49(8): 125-128.
- Liu W Y, Li Y, Cai Y Q, *et al.* Research progress of the regulators involved in *MITF*-related signaling pathways in melanocytes[J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2017, 49(8): 125-128(in Chinese).
- [4] Wakamatsu K, Graham A, Cook D, *et al.* Characterisation of ACTH peptides in human skin and their activation of the melanocortin-1 receptor[J]. *Pigment Cell Research*, 1997, 10(5): 288-297.
- [5] 于志慧, 白瑞, 范瑞文, 等. α -黑素细胞刺激素(α -MSH)对羊驼皮肤黑色素细胞增殖和黑素生成的影响[J]. *畜牧兽医学报*, 2010, 41(9): 1095-1101.
- Yu Z H, Bai R, Fan R W, *et al.* Effect of α -MSH on proliferation and melanin synthesis of alpaca skin melanocytes *in vitro*[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2010, 41(9): 1095-1101(in Chinese).
- [6] Tachibana M. *MITF*: a stream flowing for pigment cells[J]. *Pigment Cell Research*, 2000, 13(4): 230-240.
- [7] Lister J A, Close J, Raible D W. Duplicate *mitf* genes in zebrafish: complementary expression and conservation of melanogenic potential[J]. *Developmental Biology*, 2001, 237(2): 333-344.
- [8] Zhao H L, Yang H S, Zhao H, *et al.* Differences in *MITF* gene expression and histology between albino and normal sea cucumbers (*Apostichopus japonicus* Selenka)[J]. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2012, 30(1): 80-91.
- [9] Kumasaka M, Sato H, Sato S, *et al.* Isolation and developmental expression of *mitf* in *Xenopus laevis*[J]. *Developmental Dynamics*, 2004, 230(1): 107-113.
- [10] 张廷焕, 柴捷, 陈磊, 等. 猪*MITF-M*的转录调控分析[J]. *畜牧兽医学报*, 2018, 49(11): 2349-2358.
- Zhang T H, Chai J, Chen L, *et al.* Transcriptional regulation analysis of pig *MITF-M* gene[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2018, 49(11): 2349-2358(in Chinese).
- [11] 杨玉静, 张丹瑾, 聂瑞强, 等. 绵羊*MITF-M*在黑素细胞中过表达后的功能分析[J]. *中国农业科学*, 2016, 49(21): 4214-4221.
- Yang Y J, Zhang D J, Nie R Q, *et al.* The function analysis of over-expression of oar *MITF-M* in

- melanocytes[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2016, 49(21): 4214-4221(in Chinese).
- [12] 赵宗武, 李琪, 张景晓, 等. 壳白长牡蛎家系幼体生长存活比较及生长性状遗传参数评估[J]. *水生生物学报*, 2019, 43(2): 315-321.
Zhao Z W, Li Q, Zhang J X, *et al.* Genetic parameters and growth traits in white shell families of pacific oyster (*Crassostrea gigas*)[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2019, 43(2): 315-321(in Chinese).
- [13] Wang X T, Li L, Zhu Y B, *et al.* Oyster shell proteins originate from multiple organs and their probable transport pathway to the shell formation front[J]. *PLoS One*, 2013, 8(6): e66522.
- [14] Xu L, Li Q, Yu H, *et al.* Estimates of heritability for growth and shell color traits and their genetic correlations in the black shell strain of pacific oyster *Crassostrea gigas*[J]. *Marine Biotechnology*, 2017, 19(5): 421-429.
- [15] 丛日浩, 李琪, 葛建龙, 等. 长牡蛎4种壳色家系子代的表型性状比较[J]. *中国水产科学*, 2014, 21(3): 494-502.
Cong R H, Li Q, Ge J L, *et al.* Comparison of phenotypic traits of four shell color families of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*)[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2014, 21(3): 494-502(in Chinese).
- [16] 种金豆, 李琪, 王涛. 长牡蛎壳黑选育品系和野生群体在摄食和代谢方面的比较[J]. *水产学报*, 2019, 43(4): 1038-1047.
Chong J D, Li Q, Wang T. Comparison of feeding and metabolism between black-shell strain and wild population of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2019, 43(4): 1038-1047(in Chinese).
- [17] Bao Y B, Xu F, Shimeld S M. Phylogenetics of Lophotrochozoan bHLH genes and the evolution of lineage-specific gene duplicates[J]. *Genome Biology and Evolution*, 2017, 9(4): 869-886.
- [18] Zhang G F, Fang X D, Guo X M, *et al.* The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation[J]. *Nature*, 2012, 490(7418): 49-54.
- [19] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [20] Izawa T, Foster R, Chua N H. Plant bZIP protein DNA binding specificity[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1993, 230(4): 1131-1144.
- [21] 于雪. 长牡蛎酪氨酸酶基因家族的克隆、表达和系统发生分析[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2014.
Yu X. Molecular cloning, expression and phylogenetic analysis of the tyrosinase gene family in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*)[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2014(in Chinese).
- [22] Yasumoto K, Yokoyama K, Shibata K, *et al.* Microphthalmia-associated transcription factor as a regulator for melanocyte-specific transcription of the human tyrosinase gene[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1994, 14(12): 8058-8070.
- [23] Yu W C, He C, Cai Z Q, *et al.* A preliminary study on the pattern, the physiological bases and the molecular mechanism of the adductor muscle scar pigmentation in Pacific oyster *Crassostrea gigas*[J]. *Frontiers in Physiology*, 2017, 8: 699.
- [24] Kang J H, Kang H S, Lee J M, *et al.* Characterizations of shell and mantle edge pigmentation of a Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in Korean Peninsula[J]. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 2013, 26(12): 1659-1664.
- [25] Furuhashi T, Schwarzinger C, Miksik I, *et al.* Molluscan shell evolution with review of shell calcification hypothesis[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2009, 154(3): 351-371.
- [26] 于文超, 何成, 武长路, 等. 长牡蛎(*Crassostrea gigas*)贝壳与外套膜中黑色素的提取和鉴定[J]. *海洋与湖沼*, 2015, 46(4): 909-914.
Yu W C, He C, Wu C L, *et al.* Extraction and identification of melanin in shell and mantle of Pacific oyster *Crassostrea gigas*[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2015, 46(4): 909-914(in Chinese).

Expression of *MITF* gene and its correlation with shell color in *Crassostrea gigas*

YANG Jiamin¹, WANG Yong¹, WANG Xiaotong^{2*}, BAO Yongbo^{1*}

(1. College of Biological & Environmental Sciences, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, China;

2. Agricultural College, Ludong University, Yantai 264025, China)

Abstract: In order to understand the expression of *MITF* gene and its association with shell color in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, we verified the four *MITF* genes in oyster, analyzed the sequence and compared with multiple sequences of other species. And the transcriptome of each stage of oyster development was analyzed. We also studied the mRNA expression in different tissues and mantle of black shell and white shell oysters. We found that three of the four *MITF* genes were pseudogenes, which were confirmed by transcriptome and RT-PCR, and the only expressed *MITF* gene in oyster encodes 448 amino acids. *MITF* protein is a hydrophilic and unstable protein and contains a N-terminal domain (*MITF_TFEB_C_3_N* superfamily) and HLH domain which is a highly conserved functional domain. Transcriptome analysis found that *MITF* was expressed at various stages of ontogeny of *C. gigas*, and the expression reached the highest level at the juvenile stage. The results of mRNA expression in tissues showed that the expression level of *MITF* in mantle was significantly higher than those in other tissues. The expression level of *MITF* in the adductor muscle of oysters with black shell was significantly lower than that of oysters with white shell. However, the expression level in the mantle of oysters with black shell was higher than that of oysters with white shell, but not significant. Both in black and white shell oysters, the expression of *MITF* gene in the outer edge of the mantle is significantly higher than in the inner edge. The results show that *MITF* gene of *C. gigas* might participate in the regulation of the melanin's formation and the development of oysters at the early stage of oyster shell formation, and it might also regulate tyrosinase *Tyr2* gene of oyster and participate in the formation of melanin in mantle and shell. This study lays a foundation for further study on the formation mechanism of shell color in oysters.

Key words: *Crassostrea gigas*; *MITF*; mRNA expression; shell color association; melanin

Corresponding authors: WANG Xiaotong. E-mail: wangxiaotong999@163.com;

BAO Yongbo. E-mail: bobbao2001@gmail.com

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31672678, 41876193); National Key R & D Program of China (2018YFD0901400); Ningbo Science and Technology International Cooperation Research Projects (2016D10017); Zhejiang Provincial Top Key Discipline of Biological Engineering (CX2017044); Special Funds for Taishan Scholars Project of Shandong Province (tsqn201812094); Shandong Provincial Natural Science Foundation (ZR2019MC002)