

文章编号: 1674-5566(2013)04-0518-06

## 瓯江彩鲤体色调控相关因子 *MC1R* 的克隆与表达分析

胡建尊<sup>1</sup>, 李康乐<sup>1</sup>, 项松平<sup>2</sup>, 王 剑<sup>2</sup>, 朱丽艳<sup>1</sup>, 王成辉<sup>1</sup>

(1. 上海海洋大学 农业部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306; 2. 浙江龙泉省级瓯江彩鲤良种场, 浙江 龙泉 323700)

**摘要:** 黑素皮质素1受体(melanocortin 1 receptor, *MC1R*)是动物黑色素合成通路中的关键基因之一,对动物的体色和毛色有重要影响。瓯江彩鲤(*Cyprinus carpio* var. *color*)具有5种基本体色类型(“全红”、“粉玉”、“大花”、“粉花”和“麻花”),其中后3种带有黑色斑点或斑块,是研究动物黑色素合成机制的良好材料之一。克隆了瓯江彩鲤的*MC1R*基因,并进行了“全红”、“大花”、“粉玉”、“粉花”4种体色间的表达差异分析。研究发现,瓯江彩鲤的*MC1R*基因的全长cDNA序列为1 914 bp,包括637 bp 5'-UTR(非转录区)、311 bp 3'-UTR及966 bp ORF(开放阅读框)。该基因由一个外显子编码(321个氨基酸),有7个跨膜结构域。瓯江彩鲤与鲫的编码区核苷酸同源率达98%,与斑马鱼达93%;不同体色间的编码区只存在一个核苷酸无义突变(C/G),因而氨基酸序列完全相同。qRT-PCR表明,*MC1R*基因在眼睛的表达量显著高于皮肤、肌肉、鳃、肾脏、鳔、心、肝等组织( $P < 0.05$ );但在4种体色间不存在显著的表达差异( $P > 0.05$ )。研究结果表明:瓯江彩鲤体色类型中的黑色斑块不是由*MC1R*基因直接决定,还有待对其它体色相关基因或调控因子的研究。

**研究亮点:** 对在黑色素合成通路中起着类似“开关”作用的*MC1R*基因进行了克隆、序列分析和瓯江彩鲤体色间的表达差异分析,排除了*MC1R*基因与瓯江彩鲤黑色斑纹的直接相关性,为鱼类体色变异相关基因研究积累了有益资料。

**关键词:** 瓯江彩鲤; 黑斑体色; *MC1R*; 表达差异; 相关性

**中图分类号:** S 917

**文献标志码:** A

黑素皮质素1受体(melanocortin 1 receptor, *MC1R*)基因,为G蛋白偶联受体(G protein-coupled receptor)家族中最小的受体,由一个外显子编码,其蛋白质有7个跨膜结构域<sup>[1]</sup>。该基因是动物黑色素合成通路中的关键基因之一<sup>[2-3]</sup>,起着类似“开关”的重要作用<sup>[4]</sup>。当*MC1R*基因表达时,即可启动腺苷酸循环,刺激酪氨酸酶(Tyrosinase)基因的表达,通过黑色素合成通路中相关基因的作用,进而实现对体色的调控<sup>[5]</sup>。大量研究表明,*MC1R*基因的变异,会对动物的毛色以及鸟类的羽色产生重要影响<sup>[6-8]</sup>。

瓯江彩鲤(*Cyprinus carpio* var. *color*)是浙江省瓯江流域等地广泛养殖的地方性鲤科鱼类,在

当地俗称“田鱼”。此鱼具有食用和观赏的双重价值,不仅生长迅速,是稻田或池塘等水体养殖的良好对象,而且体色丰富,也是探讨鱼类体色遗传的极好材料<sup>[9]</sup>。当前,瓯江彩鲤具有5种基本体色:“全红”(全身体表均为红色)、“大花”(红色体表镶嵌大块黑色斑块)、“麻花”(红色体表和各鳍条散布黑色斑点)、“粉玉”(全身体表均为白色)、“粉花”(白色体表镶嵌大块黑色斑块)。黑斑(斑块或斑点)是瓯江彩鲤体色表型的主要特点之一,在上述5种基本体色类型中,3种出现了黑斑。为了解瓯江彩鲤黑斑产生的分子基础,本文对该鱼的*MC1R*基因进行了克隆和序列分析,并探讨了该基因在瓯江彩鲤不同组织以

收稿日期: 2013-03-18 修回日期: 2013-05-06

基金项目: 国家公益性行业[农业]科研专项(200903045);上海市科学技术委员会项目(123919N1100);浙江省科学技术委员会项目(2010C32088)

作者简介: 胡建尊(1985—),女,硕士研究生,研究方向为水产动物种质资源与种苗工程。E-mail: hujianzun423@126.com

通信作者: 王成辉, E-mail: wangch@shou.edu.cn

及不同体色类型间的表达差异。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验用鱼为浙江龙泉省级瓯江彩鲤良种场的瓯江彩鲤“龙申1号”(品种登记号:GS01-002-2011)一龄鱼种,体重约50 g。取“全红”、“大花”、“粉玉”和“粉花”4种体色类型,每种体色各取3尾。每尾鱼采集皮肤、肌肉、眼睛、鳃、肾、鳔、心、肝等8种组织,其中对“大花”的红底表皮和黑色斑块表皮、“粉花”的白底表皮和黑色斑块表皮分开采样,以进一步了解黑斑的遗传变异。样品用液氮速冻后,放于-80℃冰箱中保存待用。

### 1.2 RNA提取与 *MC1R* 基因克隆

对上述样本组织,应用RNAiso Plus提取试剂盒(宝生物工程大连有限公司)进行总RNA提取,琼脂糖电泳检测提取的RNA完整性和丰度,用OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>值检测RNA纯度。

根据NCBI中斑马鱼(AY161847)及金鱼(AB618067)的*MC1R*序列,设计引物(表1)进行瓯江彩鲤*MC1R*基因部分片段和5'RACE、3'RACE扩增。

3'-RACE使用3'-Full RACE Core Set Ver. 2.0试剂盒(宝生物工程大连有限公司)进行,反应条件为94℃3 min;94℃30 s,57℃30 s,72℃1 min,共35个循环;72℃10 min。

5'-RACE使用购自Clontech公司的SMARTER™ RACE cDNA扩增试剂盒和advantage® 2 PCR试剂盒进行,反应条件为94℃3 min;94℃30 s,68℃30 s,72℃3 min,共36个循环。

扩增产物用2%琼脂糖凝胶电泳检测,用TIANgel Midi纯化试剂盒(天根生化科技北京有限公司)纯化回收目的片段,纯化产物连入*PMD19-T*载体,转化TOP10感受态细胞,挑取阳性克隆送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

表1 瓯江彩鲤*MC1R*基因扩增与表达分析所用引物

Tab.1 Primers for *MC1R* gene cloning and tissue expression analysis in Oujiang color common carp

引物	引物序列(5'-3')	用途
MC1R1F	GAAGGAAAAGAACATCTAACAGAC	片段克隆
MC1R1R	GCTATTGCTAAGAATGCGAC	
MC1R3'-Outer	GTGTTACGGCGGTTCTGTA	3'RACE
MC1R3'-Inner	TCCTCACCTGTCCCACCAAT	
MC1R5'-Outer	CAGATGACGAAAACCCCGAGCAGGA	5'RACE
MC1R5'-Inner	CGCCGAGCGTTGCGTTCAAAGTTATGTT	
Dm1F	AGGAATCTCCACTCGCCAA	qRT-PCR
Dm1R	GCCCGTGTCCGTCAATAA	
$\beta$ -actinF	TGCTATGTGGCTCTTGACTT	$\beta$ -actin qRT-PCR
$\beta$ -actinR	CTGGGCACCTGAACCTCT	

### 1.3 序列分析

使用NCBI Blast(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)进行*MC1R*基因的同源序列搜索;蛋白质相似性搜索使用Blastx程序(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>);使用ORF Finder程序(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)分析开放阅读框并推导氨基酸序列;使用在线软件Clustal 2(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/Clustal2>)进行氨基酸序列比对;用TMHMM Server v. 2.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)在线分析预测蛋白的跨膜区域;用MAGE 5.0软件<sup>[10]</sup>构建相关物种的NJ系统进化

树。

### 1.4 表达分析

体色间的表达分析:将“大花”分成红表皮和黑表皮两种类型,“粉花”也分白表皮和黑表皮两种类型,与“全红”红表皮、“粉玉”白表皮共同进行实时荧光定量PCR(qRT-PCR)检测。表达定量检测引物为DM1F和DM1R,内参引物为 $\beta$ -actinF和 $\beta$ -actinR。qRT-PCR反应条件为95℃30 s;95℃5 s,60℃30 s,共40个循环,熔解曲线温度为60~95℃。每个样本设置3个重复,空白对照中用RNase free ddH<sub>2</sub>O代替模板。

组织间的表达分析:进行皮肤、肌肉、眼睛、

鳃、肾、鳔、心、肝等 8 种组织的实时荧光定量 PCR 检测,方法同上。

qRT-PCR 数据分析采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  [11] 法。用 SPSS 17.0 (SPSS Inc., Chicago, USA) 软件分析不同体色模式、不同组织间 *MC1R* 基因相对表达量的差异显著性。

## 2 结果

### 2.1 *MC1R* 基因序列分析

本实验所得瓯江彩鲤 *MC1R* 基因 cDNA 全长

为 1 914 bp,其中开放阅读框为 966 bp(编码 321 个氨基酸),5'-UTR 为 637 bp,3'-UTR 为 311 bp(图 1),具有脊椎动物典型的加尾信号 AATAAA 和 Poly(A)尾巴。通过在线分析发现瓯江彩鲤的 *MC1R* 基因的蛋白也为 7 个跨膜结构域(图 2),与其他报道物种相符 [12]。进一步验证不同体色间该基因的 DNA 序列差异,发现只在开放阅读框第 783 bp 处发生了一个无义突变(C/G),而体色间的氨基酸序列完全相同。

```

1   acgcggggggctgactcgctaccactggatgacaggaagaggagagacagagggaaa
61  agagatgatcatcctcatcattgcgctcagaggagacgacagggaatcattaaaaggcgc
121 tcctatgattattattattattattattattttgtcaccgctgccttccctgaggaccac
181 cttgcgtttttgttctccctctgtctcgcatatcttttagtaataggctactacactggtg
241 agttttaaactcgcgaaaacgcaattgcatataatcctaaataattacagaaaactttat
301 gtctcttaatggctggaacaataattgatcttgacaaggaagccatcaaatacaagtc
361 tgaggcgtgcccgtgaaagagcgcaagttgaggacttatactgtgctgtatgctgcag
421 taatattaaaaggtaaaactgctgtgctgttctcttatagctgtattcgtttcgttcat
481 aatctctaataataaaaataacaattttggagaattgctagaattgatcatgatgactg
541 gaacggtctctgttttaattgtcaaagtggtggaagaaaagaacatccaacagactga
601 aaataacttaatgagaacggacactgactgaaggagcATGAACGACTCGTCGCCCATTA
1   M N D S S R H Y
661 CTTGAGCATGAAACACATGGACTACATATATAATATTGACAATAACATAACTTTGAACGC
9   F S M K H M D Y I Y N I D N N I T L N A
721 AAGCCTCGGCGAAATGAATGCCACAGGGATCGCCCAATCATGATCCCTCAGGAATTGT
29  T L G E M N A T G I A Q I M I P Q E L F
781 TCTAATGCTAGGCTTGATCAGTTTGGTGAAAACATCTTGGTGGCGGCCATCATCAA
49  L M L G L I S L V E N I L V V A A I I K
841 GAACAGGAATCTCCACTCGCAATGTATTATTTTCATCTGCTGTCTGGCGGTGTGAGACAT
69  N R N L H S P M Y Y F I C C L A V S D M
901 GCTGGTGAGCGTCAGTAATGTGGTGGAGACTCTTCATGTTATTGACGGAGCACGGGCT
89  L V S V S N V V E T L F M L L T E H G L
961 GCTGCTTGTACGGCAAAGATGTTACAGCACTTAGACAAATGATCGACATTAATGATATG
109 L L V T A K M L Q H L D N V I D I M I C
1021 CAGCTCTGTCGTTTCCTCTTTGCTGTTCCCTGTCGACTATTGCGGGGACCGCTATATCAC
129 S S V V S S L S F L C T I A A D R Y I T
1081 CATCTTTTACGCGCTTCGGTACCATAGCATCATGACCACACAAACGCGCCGTGGCCATCAT
149 I F Y A L R Y H S I M T T Q R A V A I I
1141 CGCGGTGGTGTGGCTCACCAGCATCACCTCGAGCTCTTTATTTATCGTTTATCACACTGA
169 A V V W L T S I T S S S L F I V Y H T D
1201 CAACGCAGTCATCGCTGTCTCGTACGTTTGGCTTGACGTTGGTGTTCACGGCGGT
189 N A V I A C L V T F F G L T L V F T A V
1261 TCTGTACCTGCACATGTTTCCTGCGGCACTCCACTCCAGACGCATATGGCTCTCCA
209 L Y L H M F I L A H V H S R R I M A L H
1321 TAAGAGTCGCGGCAAGCCACTAGCATGAAGGGACCACTACTGACCATCCGTGATCGG
229 K S R R Q A T S M K G A I T L T I L L G
1381 GGTTCGTCATCTGCTGGGGCCGTTTTTCTCCACCTGATCCCTCATCCCTCACCTGTCC
249 V F V I C W G P F F L H L I L I L T C P
1441 CACCAATCCTTACTGCAAGTGTATTTTCACTGATTTCACTCTGTTTCAATTCATTATCAT
269 T N P Y C K C Y F S H F N L F L I L I I
1501 ATGCAACTCGCTTATAGACCTCTCATTTACGCGTATCGCAGTCCAGGAGTTCGCAAGAC
289 C N S L I D P L I Y A Y R S Q E L R K T
1561 GCTAAAAGAAATGATTTTTTGCTCGTGGTCTTTTGAATATGagtaattccttctagagg
309 L K E M I F C S W F F A I *
1621 aagtaattccttcaggagcatctcgatgatgtaattgtattgtcctatattattcagat
1681 ctcatctctgcaaatagcgtcctttagctctctctacaactttacagaaaaatacctc
1741 agatacctgctgaccgagagaacttttagacgcaaaactctttgactgattttctctatga
1801 aataaataacaattgaaccatttgatttttgatttacataaattatgcttgatgggata
1861 aataatgtggctcagcatatgacatgtataagtcctgttagttaaaaaaaaaa

```

图 1 瓯江彩鲤 *MC1R* 基因的 cDNA 序列及推测氨基酸序列

Fig.1 cDNA and putative amino acid sequences of *MC1R* gene in Oujiang color common carp

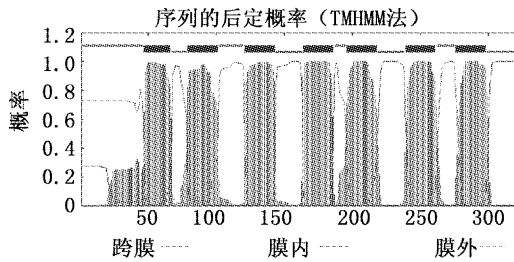


图2 瓯江彩鲤 *MC1R* 基因的蛋白跨膜结构域预测

Fig.2 The predicted transmembranes domain of *MC1R* gene in Oujiang color common carp

## 2.2 同源比较与系统进化分析

同源比较与系统进化分析发现,瓯江彩鲤 *MC1R* 基因与鲫 (*Carassius auratus*) 的编码区核苷酸同源性高达 98%, 与斑马鱼 (*Danio rerio*) 的同源性为 93%, 与墨西哥丽脂鲤 (*Astyanax mexicanus*) 的同源性为 83%, 它们聚为一支 (图 3); 其它鱼类, 如条斑星鲃 (*Verasper moseri*)、牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*)、大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*)、弗氏假鳃鲈 (*Nothobranchius furzeri*)、花斑剑尾鱼 (*Xiphophorus macullatus*)、孔雀鱼 (*Poecilia reticulata*)、鲈鱼 (*Dicentrarchus labrax*)、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 等聚为另一大支; 而与人 (*Homo sapiens*) 和小鼠 (*Mus musculus*) 的同源性较低 (图 3)。

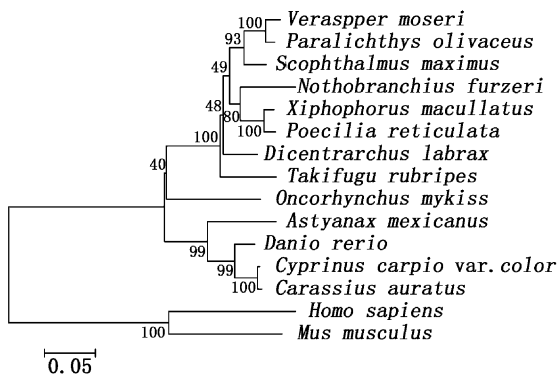


图3 部分物种 *MC1R* 基因的系统关系树

Fig.3 Phylogenetic tree of *MC1R* gene in the partially studied species

## 2.4 表达差异分析

*MC1R* 基因在瓯江彩鲤不同体色间的表达差异如图 4 所示。发现“粉玉”皮肤中的相对表达量最高, 其次为“粉花”白表皮、“大花”黑表皮、“全红”红表皮、“粉花”黑表皮, 而“大花”红表皮

的相对表达量最低, 但相互间的表达差异均不显著 ( $P > 0.05$ )。

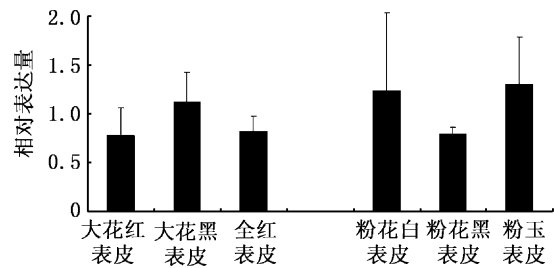


图4 *MC1R* 基因在瓯江彩鲤不同体色间的表达差异  
Fig.4 Expression profiles of *MC1R* gene in skin tissues from different color patterns of Oujiang color common carp

不同组织间 *MC1R* 基因的表达差异见图 5。发现眼睛的表达量最高, 显著高于其他组织 ( $P < 0.05$ ), 皮肤和肌肉次之, 鳃、肾、鳔、心、肝等组织的相对表达量很小, 与前 3 种组织相差甚远。除眼睛外, 其它 7 种组织间的表达差异均不显著 ( $P > 0.05$ )。

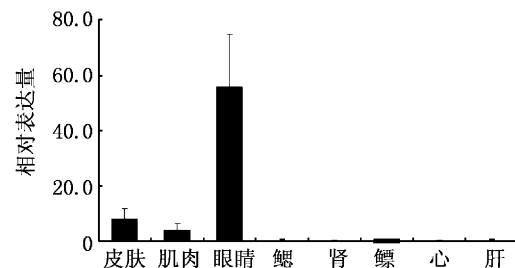


图5 *MC1R* 基因在瓯江彩鲤不同组织间的表达差异  
Fig.5 Expression profiles of *MC1R* gene in different tissues of Oujiang color common carp

## 3 讨论

*MC1R* 基因在哺乳类高等动物由扩展位点 E 编码<sup>[12]</sup>, 长度一般为 310 多个氨基酸, 如人类是 317 个氨基酸, 鸡为 314 个氨基酸<sup>[13]</sup>。SALM 等<sup>[14]</sup>报道莫桑比克罗非鱼 *MC1R* 基因编码 325 个氨基酸, SELZ 等<sup>[15]</sup>发现花斑剑尾鱼 *MC1R* 基因为 323 个氨基酸。本实验发现瓯江彩鲤 *MC1R* 基因编码 321 个氨基酸, 与前述结果相近, 表明 *MC1R* 基因较为保守。*MC1R* 基因的克隆和序列多态性研究已经有诸多报道, 但该基因的表达差异研究还少有涉及<sup>[16]</sup>。哺乳动物的 *MC1R* 基因

主要在毛囊和皮肤黑素细胞中表达,与皮肤色素沉积密切相关<sup>[17]</sup>。任玉红等研究发现羊驼的皮肤表皮、毛囊周围外根鞘组织、真皮乳头以及毛球周围均有 MC1R 蛋白表达<sup>[18]</sup>,这与 BÖHM 等<sup>[19]</sup>报道的人 *MC1R* 的表达位置一致。在不同鱼类,*MC1R* 基因有着不同的表达模式:如新月鱼 (*Xiphophorus maculatus*) 在脑、眼、鳃、皮肤和睾丸中都有表达,在肌肉和肝脏中有少量的表达;斑马鱼 (*Danio rerio*) 在脑、眼、皮肤和睾丸中有表达,而在鳃、肝脏、肌肉和卵巢没有表达;青鳉 (*Oryzias latipes*) 在所有成体组织中有表达<sup>[15]</sup>。河豚和红鳍东方鲀则只在脑中有微弱表达<sup>[20]</sup>。本实验中 *MC1R* 基因在瓯江彩鲤的眼、皮肤、肌肉中有大量表达,鳃、心、肾、肝、鳔等组织有极少量表达,与其他鱼类也略有差别,显示该基因在不同物种中其组织表达存在较大差异性。

动物羽毛毛色的表型差异主要是由黑色素的种类和分布不同造成的。黑色素包括真黑色素 (Eumelanin, 负责产生黑色和棕色表型) 和褐黑色素 (Pheomelanin, 负责产生黄色和红色表型)<sup>[5]</sup>。两种色素的数量和分布又受到相关基因的调控。*MC1R* 基因是独特的双功能控制受体,它由  $\alpha$ -促黑素皮质素 ( $\alpha$ -MSH) 激活,其颉颃物为 *Agouti* 蛋白,二者共同作用导致哺乳动物毛色的变异。 $\alpha$ -MSH 与 ACTH (促肾上腺皮质激素) 是 *MC1R* 的配体,当它们与黑色素细胞膜上的 *MC1R* 结合后,会激活膜上的腺苷酸环化酶系统,产生 cAMP,进而激活酪氨酸激酶大量产生,导致色素细胞产生真黑色素<sup>[8]</sup>。当 *Agouti* 蛋白存在时,其与  $\alpha$ -MSH 或 ACTH 竞争性结合 *MC1R*,阻止激活 cAMP,真黑色素的合成被切断,而以褐黑色素为最终产物的反应途径被激发,从而实现对动物体色的调控。而在本实验中,瓯江彩鲤不同体色间 *MC1R* 基因的氨基酸序列完全相同,表明 *MC1R* 基因编码的蛋白没有发生改变,对黑斑未产生直接影响。表达分析发现,*MC1R* 基因虽在不同体色间不存在显著表达差异,但在白色皮肤 (粉玉和粉花白表皮部分) 中的表达量稍高于其他皮肤组织,这种结果令人意外。由于 *MC1R* 基因是调控黑色素合成通路中众多基因的一个,其下游还有其它基因发挥作用 (如酪氨酸酶基因、酪氨酸相关蛋白基因等)。此外,*Agouti* 基因的存在会竞争性结合 *MC1R*,阻止真黑色素的合成。

因而,瓯江彩鲤的体色差异较为复杂,还有待于我们的进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] REES, JONATHAN L. Genetics of hair and skin color[J]. Annual Review of Genetics, 2003,37(1):67-90.
- [2] TAKEUCHI S, SUZUKI H, HIROSE S, et al. Molecular cloning and sequence analysis of the chick melanocortin 1-receptor gene[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression, 1996,1306(2):122-126.
- [3] KIJAS J M, WALES R, TORNSTEN A, et al. Melanocortin receptor 1 (*MC1R*) mutations and coat color in pigs[J]. Genetics, 1998,150(3):1177-1185.
- [4] HOEKSTRA H E. Genetics, development and evolution of adaptive pigmentation in vertebrates [J]. Heredity, 2006,97(3):222-234.
- [5] 杨永升,李宁,郑学梅,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.
- [6] 王乐,张斌,郑文新,等. 动物毛色与黑素皮质素受体 1 (*MC1R*) 基因[J]. 草食家畜, 2009,143(6):10-12.
- [7] 舒文,杨舒黎,邓卫东,等. 乌骨绵羊 *MC1R* 基因多态性研究[J]. 畜牧与兽医,2006,38(4):5-7.
- [8] 杨永升,邓学梅,李宁,等. *MC1R* 是控制鸡黑色素形成的候选主效基因[J]. 生物化学与生物物理进展, 2004,31(6):500-505.
- [9] 刘豪,王成辉,杨新鑫,等. 红、白两种体色瓯江彩鲤的抑制性差减杂交[J]. 上海海洋大学学报,2009,18(6):662-666.
- [10] TAMURA K, PERERSON D, PETERSON N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance and maximum parsimony methods [J]. Molecular Biology and Evolution, 2011, 28(10):2731-2739.
- [11] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method[J]. Methods,2001,25(4):402-408.
- [12] 于云柱,何奕多,刘丽,等. 黑素皮质素受体 1 (*MC1R*) 基因的研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2010,37(6):232-233.
- [13] 迟良,李兰,潘庆杰,等. 乌骨鸡黑色素皮质素受体-1 基因的克隆、序列分析与原核表达[J]. 中国农业科学, 2012,45(5):966-972.
- [14] 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.
- [15] SELZ Y, BRAASCH L, HOFFMANN C, et al. Evolution of melanocortin receptors in teleost fish: the melanocortin type 1 receptor[J]. Gene,2007,401(1):114-122.
- [16] 周兵. 浙东白鹅和朗德鹅 *MC1R* 基因变异与定量表达研

- 究[D]. 成都:四川农业大学,2010:1-65.
- [17] 聂庆华,刘清神,方梅霞,等. 犬 *MC1R* 基因的分子进化分析[J]. 遗传,2008,30(4):469-474.
- [18] 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.
- [19] BÖHM M, EICKELMANN M, ZHUO L, et al. Detection of functionally active melanocortin receptors and evidence for an immunoregulatory activity of  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone in human dermal papilla cells[J]. Endocrinology, 2005,146(11):4635-4646.
- [20] 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.

## Cloning and expression analysis of color-related regulation factor *MC1R* in Oujiang color common carp

HU Jian-zun<sup>1</sup>, LI Kang-le<sup>1</sup>, XIANG Song-ping<sup>2</sup>, WANG Jian<sup>2</sup>, ZHU Li-yan<sup>1</sup>, WANG Cheng-hui<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Provincial Farm of Oujiang Color Common Carp, Longquan 323700, Zhejiang, China)

**Abstract:** Melanocortin 1 receptor (*MC1R*), one of the key genes in animal melanin synthesis pathway, plays an important role in determining animal body color and coat color. Oujiang color common carp (*Cyprinus carpio* var. *color*), characterized as five kinds of body color patterns with black patches (e. g. “whole red”, “whole red with big black patch”, “whole red with scattered black spots”, “whole white” and “whole white with big black patch”), has been considered as a good material or model in studying animal melanin synthesis mechanism. In this paper, *MC1R* gene was cloned and sequenced, and its expression profile in the four body color patterns (“whole red”, “whole red with big black patch”, “whole white” and “whole white with big black patch”) and tissues were also analyzed in Oujiang color common carp. The result showed that the full-length cDNA of *MC1R* was 1 914 bp, containing a 5' un-translated region (UTR) of 637 bp, a 3'-UTR of 311 bp and an open reading frame (ORF) of 966 bp. This gene has only one exon encoding 321 amino acids and predicting 7 transmembrane domains. There were 98% nucleotide similarity with *Carassius auratus* and 93% similarity with *Danio rerio*. However, Only one nucleotide nonsense mutation (C/G) in the coding region was found among different color patterns, indicating the same amino acid sequence among them. The result of qRT-PCR indicated that the expression of *MC1R* in eyes was significantly higher ( $P < 0.05$ ) than that in skin, muscles, gills, kidney, bladder, heart and liver. It was surprising that there was no significant expression difference among the different color patterns ( $P > 0.05$ ). This finding showed that *MC1R* gene is not a determinant factor in controlling color patterns of Oujiang color common carp, and it is necessary to conduct further studies in other color-related genes or factors.

**Key words:** *Cyprinus carpio* var. *color*; body color with black patch; *MC1R* gene; expression difference; correlation