

# 半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*) 黑色素聚集素受体(MCHR)表达特性 及其与无眼侧黑化的关系\*

史学营<sup>1,3</sup> 柳学周<sup>1,2①</sup> 石莹<sup>4</sup> 徐永江<sup>1,2</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;  
4. 青岛市渔业技术推广站 青岛 266071)

**摘要** 利用 cDNA 末端快速克隆技术(RACE)获得了半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*) 2种黑色素聚集素受体(MCHR1 和 MCHR2)的 cDNA 全长序列,并采用定量 PCR 技术分析了 MCHR mRNA 的组织表达特性,研究了其与无眼侧黑化程度的关系。结果显示,半滑舌鳎 MCHR1 cDNA 序列全长为 1685 bp,开放阅读框(ORF)长为 1080 bp,编码 359 个氨基酸,与牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)同源性高达 83.3%。系统进化分析显示,半滑舌鳎 MCHR1 与鲱形目、鲽形目和鲈形目鱼类聚为 1 个小分支。MCHR2 cDNA 序列全长为 1626 bp,ORF 长为 1044 bp,编码 347 个氨基酸,与鲽形目同源性最高达到 90%以上。系统进化分析显示,半滑舌鳎 MCHR2 与鲱形目、鲈形目鱼类聚为 1 个小分支。MCHR1 mRNA 在鳃中表达量最高,而 MCHR2 mRNA 在有眼侧皮肤中表达量最高,性腺次之。另外,MCHR1 和 MCHR2 mRNA 在其他组织中均检测到表达,这表明半滑舌鳎黑色素聚集素(MCH)可能通过内分泌方式和各组织中的 MCHR 介导参与生理调控。不同黑化面积表达分析显示,在无眼侧黑化发生早期,脑垂体中 MCHR1 mRNA 显著升高,在无眼侧 50%黑化组达到峰值,皮肤中 MCHR1 mRNA 在无眼侧 10%黑化组显著升高,其后保持较高水平;脑垂体和皮肤中 MCHR2 mRNA 表达表现出一致的变化趋势,在无眼侧黑化发生早期都达到峰值,其后逐渐下降至相对较低水平。表明 MCHR 可能直接或通过其他信号通路参与了半滑舌鳎无眼侧黑化性状的调控过程。

**关键词** 半滑舌鳎;黑色素聚集素受体;基因克隆;表达调控;无眼侧黑化

**中图分类号** S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)01-0091-12

黑色素聚集素(Melanin concentration hormone, MCH)是一种垂体神经肽,最早从大马哈鱼(*Oncorhynchus keta*)的垂体中被分离鉴定(Kawauchi *et al*, 1983),具

有调节体色、色素沉着、摄食(Kang *et al*, 2013; Kawauchi, 2006)、能量平衡、压力、繁殖、行为、知觉和神经内分泌的作用(Kawauchi *et al*, 2004; Forray, 2003;

\* 国家鲆鲽类产业技术体系(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)]. 史学营, E-mail: shixueying0106@sina.com

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

收稿日期: 2015-11-05, 收修改稿日期: 2015-12-30

Griffond *et al.*, 2002; Pissios *et al.*, 2003)。在硬骨鱼类中, MCH 被认为是体色生理变化的一个关键调节因子(Kishida *et al.*, 1989; Suzuki *et al.*, 1995), 其通过 G 蛋白偶联受体(MCHR)发挥生理作用, 调节色素细胞内色素颗粒凝聚而使体色变浅。第 1 个 MCH 的受体 MCHR1 是在哺乳动物中发现的(Chambers *et al.*, 1999; Lakaye *et al.*, 1998; Lembo *et al.*, 1999; Saito *et al.*, 1999)。随后, 在人类基因组数据中, 第 2 个受体 MCHR2 被鉴定, 并且从人脑 cDNA 文库中克隆获得(An *et al.*, 2001; Hill *et al.*, 2001; Mori *et al.*, 2001; Rodriguez *et al.*, 2001)。哺乳动物 MCHR 一般有 2 个亚型, 而啮齿动物只有 1 个 MCHR 亚型(Tan *et al.*, 2002)。硬骨鱼类, 如金鱼(*Carassius auratus*)(Mizusawa *et al.*, 2009)、条斑星鲮(*Verasper moseri*)(Takahashi *et al.*, 2009)和美洲拟鲮(*Pseudopleuronectes americanus*)(Tuziak *et al.*, 2012)等, 一般有 2 种 MCHR 亚型, 而在斑马鱼(*Danio rerio*)中发现了 3 种 MCHR 亚型: MCHR1a、MCHR1b 及 MCHR2。其中, MCHR1a 只在胚胎期表达, MCHR1b 和 MCHR2 在胚胎期和成体期都表达, 且 MCHR2 在成体期表达水平明显升高(Berman *et al.*, 2009; Logan *et al.*, 2003), 表明了其亚型基因功能的分化。MCHR1 与啮齿类动物摄食行为和体内能量平衡调控有关(Wang *et al.*, 2001)。在鱼类中, MCHR 与摄食行为和体色调控有关, 如饥饿条件下, 美洲拟鲮 MCHR2 mRNA 表达量无变化, 而 MCHR1 mRNA 表达量升高, 说明 MCHR1 参与了其摄食调节(Tuziak *et al.*, 2012)。Takahashi 等(2004)对条斑星鲮的研究表明, MCH 和 MCHR 相互作用调控黑色素颗粒的聚合。有眼侧皮肤在白色养殖环境下, MCHR2 mRNA 表达量低于黑色养殖环境, 而 MCHR1 mRNA 水平却没有变化, 表明 MCHR2 可能主要参与体色对环境的适应调节(Takahashi *et al.*, 2007)。目前, 鱼类 MCH 与 MCHR 系统对体色的调控作用及其机制仍不明了, 亟待开展深入的研究来阐释 MCHR 调节 MCH 作用的信号途径。

半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)为我国鲆鲽类三大主导养殖品种之一, 已形成规模化养殖产业(姜言伟等, 1993; 邓景耀等, 1988; 柳学周等, 2014)。近年来, 在养殖生产中发现, 养殖鱼存在较高比例的无眼侧黑化现象(60%以上), 且无眼侧黑化鱼市场价格较无眼侧正常鱼低 20%–30%, 严重影响其养殖效益, 成为制约产业持续发展的瓶颈之一。开展半滑舌鲷无眼侧黑化调控机制研究已极为迫切。MCH 对硬骨鱼类特别是鲆鲽类无眼侧体色黑化具有明显的抑制作用, 因此, 有必要研究 MCH/MCHR 系统在养殖半滑舌鲷无眼侧黑化调控中的作用及其可能机制, 以

期为全面认识养殖半滑舌鲷无眼侧黑化的分子机制, 建立实用的体色调控技术提供基础资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验用鱼及样品处理

实验用半滑舌鲷于 2013 年 6–8 月取自山东青岛某养殖场。取样实验鱼 3 尾, 全长为 25–35 cm, 体重为 250–350 g, 用于 MCHR 基因克隆与组织表达特性分析。实验鱼以 MS-222 (280 mg/L)麻醉后, 快速取性腺、肝脏、心脏、胃、肠、脾、肾、头肾、垂体、脑、鳃、肌肉、有眼侧正常皮肤、无眼侧黑化皮肤、无眼侧正常皮肤组织投入液氮速冻后, 转入–80℃保存, 用于总 RNA 的提取。

选择同一批次受精卵孵化的鱼苗, 按照发育进程, 分别挑选无眼侧黑化面积为 10%、50%和 80%的半滑舌鲷各 3 尾, 以无眼侧正常半滑舌鲷为对照。实验鱼体长为 8–10 cm, 体重为 4–6 g, 每个黑化组分别取脑垂体与皮肤组织, 用于分析 MCHR mRNA 表达与无眼侧黑化程度的关系。因实验鱼个体较小, 取样时将脑与垂体合并取样, 皮肤组织(去除肌肉)整体取样。

### 1.2 总 RNA 提取和 cDNA 第 1 链合成

利用 RNAiso Plus (TaKaRa, 日本)试剂盒并按照操作说明提取各组织样品的总 RNA, 通过 1%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的质量, Nanodrop 2000 (Thermo, 美国)测定 RNA 浓度。取适量脑组织总 RNA, 以 PrimeScript™ II 1st strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa)合成 cDNA 第 1 链, 于–20℃保存用于中间片段的克隆。以 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech, 美国)合成 5'-RACE 及 3'-RACE cDNA 第 1 链, 用于 MCHR 基因 RACE 全长克隆。取适量各组织样品的总 RNA, 用 PrimeScript RT Reagent Kit with gDNA Eraser 反转录试剂盒(TaKaRa, 日本)合成 cDNA 第 1 链, 用于 MCHR mRNA 组织表达特性及其与无眼侧黑化程度分析。各操作步骤均严格按照使用说明书进行。

### 1.3 中间片段扩增

根据 GenBank 登记的鲆鲽类 MCHR2 序列保守区设计特异引物 MCHR2-F 和 MCHR2-R (表 1), 以脑 cDNA 为模板, 扩增半滑舌鲷 MCHR2 基因的核心序列, PCR 反应体系(25 μl): 0.3 μl Taq 酶、2.5 μl 10× PCR Buffer、2 μl dNTP Mixture、1 μl 模板、1 μl MCHR2-F、1 μl MCHR2-R、17.2 μl ddH<sub>2</sub>O。反应条

件: 94°C 5 min; 94°C 30 s, 58°C 30 s, 72°C 50 s, 34 个循环; 72°C 延伸 10 min。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳分离后, 切胶回收目的条带并纯化。回收 PCR 产物与 pEASY-T1 载体(全式金, 中国)连接, 转化至 Trans1-T1 感受态细胞(全式金, 中国), LB 固体培养基 37°C 培养过夜, 挑取阳性克隆送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序; *MCHR1* 的中间序列已在 NCBI 数据库登录(序列号: XM\_008316788.1), 直接下载其序列用于 RACE 引物设计。

#### 1.4 *MCHR* 的 RACE 扩增

根据 NCBI 数据库登记的 *MCHR1* 和 *MCHR2* 中间片段设计 RACE 引物 *MCHR1*-GSP1、*MCHR1*-GSP2、*MCHR1*-NGSP1、*MCHR1*-NGSP2、*MCHR2*-GSP1、*MCHR2*-GSP2、*MCHR2*-NGSP1、*MCHR2*-NGSP2(表 1), 用 Smart RACE Advantage 2 PCR 试剂盒(Clontech, 美国)进行梯度 PCR 扩增。第 1 次 PCR 使用引物 *MCHR1*-GSP1、*MCHR1*-GSP2 和 *MCHR2*-GSP1、*MCHR2*-GSP2, 反应体系: 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 和 GSP 引物 0.5  $\mu$ l, 共计 25  $\mu$ l。PCR 反应条件为 94°C 30 s; 70°C 30 s, 16 个循环, T<sub>m</sub> 每个循环降低 0.5°C, 72°C 延伸 1 min; 然后, 94°C 30 s, 63°C 30 s, 72°C 60 s, 28 个循环, 最后 72°C 延伸 10 min。

以第 1 次 PCR 产物为模板, 使用引物 *MCHR1*-NGSP1、*MCHR1*-NGSP2 和 *MCHR2*-NGSP1、*MCHR2*-NGSP2 进行巢式 PCR, 反应体系: 1.25  $\mu$ l 第 1 次 PCR 产物的稀释液、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、0.5  $\mu$ l NGSP 引物, 共计 25  $\mu$ l。PCR 反应条件同第 1 次 PCR。PCR 产物于 1%琼脂糖凝胶电泳检测后, 对目的条带进行胶回收、载体连接、转化、筛选阳性克隆并测序。

#### 1.5 *MCHR* mRNA 定量表达分析

根据获得的半滑舌鳎 *MCHR1* 和 *MCHR2* 的 cDNA 序列设计定量 PCR 引物 *MCHR1*-DF、*MCHR1*-DR 和 *MCHR2*-DF、*MCHR2*-DR(表 1), 以  $\beta$ -actin 为内参, 设计引物  $\beta$ -actin-F 和  $\beta$ -actin-R (表 1)(Li *et al*, 2010)。利用 Mastercycler ep *realplex* real-time PCR 仪(Eppendorf, 德国), 使用 SYBR Premix Ex *Taq*<sup>TM</sup> II 试剂盒(Takara)进行定量扩增, PCR 体系(20  $\mu$ l)为 2  $\mu$ l cDNA 模板, 0.8  $\mu$ l 上、下游引物(10  $\mu$ mol/L), 10  $\mu$ l SYBR Premix Ex *Taq*<sup>TM</sup> II 和 6.4  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O。PCR 反应条件为 95°C 预变性 30 s, 95°C 5 s, 58°C (*MCHR1*)、60°C (*MCHR2*) 20 s 共 40 个循环。每个样品测试设置 3 个重复。*MCHR* mRNA 的表达量以  $\beta$ -actin mRNA 表达量为基础, 利用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  方法计算获得(Livak *et al*, 2001)。

表 1 半滑舌鳎 *MCHR* 基因克隆使用的 PCR 扩增引物序列

Tab.1 Nucleotide sequences of primers used for PCR amplification of *MCHR* of *C. semilaevis*

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'-3')	用途 Usage
MCHR2-F	ATCCTGTGCTCGGTTGGAGTTAT	中间片段克隆
MCHR2-R	GGAACCATCTGTTTTGACGACTG	
UPM-long	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGC AGAGT	5'和 3'-RACE PCR
UPM-short	CTAATACGACTCACTATAGGGC	
NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	5'和 3'-RACE 巢式 PCR
MCHR1-GSP1	CGTTGTAGGCGTAGTTGAAGGCGATG	5'-RACE PCR
MCHR2-GSP1	GGTGATGGTGGGCGTGTGTTGCT	
MCHR1-NGSP1	GCCAAAAGGAAGTGAACCA	5'-RACE 巢式 PCR
MCHR2-NGSP1	CTCTTCTCTGAGGTGGGTTGGACAAT	
MCHR1-GSP2	TCCATCGCCTTCAACTACGCCTAC	3'-RACE PCR
MCHR2-GSP2	CAGTGGGTCTTTGGAACTTTATGTGTA	
MCHR1-NGSP2	CGAGTGAACCCAGTAAGACCGACG	3'-RACE 巢式 PCR
MCHR2-NGSP2	GTTCTGATTGCTGGTCGCCCTAC	
MCHR1-DF	CCAATCCGCTTCGACTACAT	MCHR1 qPCR
MCHR1-DR	GACCGGCGTACATCAACAC GTGCATGATGTGGCTGGAC	MCHR2 qPCR
MCHR2-DF	GTGGTAGAGGGTGAGGGAGTAGAA	
MCHR2-DR		
$\beta$ -actin-F	GTAGGTGATGAAGCCCAGAGCA	$\beta$ -actin qPCR
$\beta$ -actin-R	CTGGGTCATCTTCTCCCTGT	



半滑舌鲷 MCHR2 cDNA 序列全长为 1626 bp, 包括 213 bp 的 5'UTR、1044 bp 的 ORF 和 369 bp 的 3'UTR, 编码 347 个氨基酸。N 端第 1-47 位氨基酸为信号肽序列, 4 个糖基化位点分别位于第 2、11、15 和 23 位氨基酸, 存在 7 个跨膜结构域, 位置分别为 41-63、76-98、118-140、152-174、204-226、247-269 和 282-304 位氨基酸。3'UTR 区含有 1 个加尾信号 AATAA (图 2)。编码蛋白预测的分子量为 39.8 kDa, 等电点为 9.16。

### 2.2 MCHR 的氨基酸序列同源性比较

同源性分析显示, 半滑舌鲷 MCHR1 的氨基酸序列与鲈形目、鲈形目的相似度达 81.8%-83.3%, 与牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)的相似度为 83.3%, 与爬行类、鸟类和人的相似度分别为 63.5%、62.2%和 14.1%。半滑舌鲷 MCHR2 的氨基酸序列与鲈形目的相似度达到 90%以上, 与鲤形目鱼类相似度为 33.0%-75.7%,

而与爬行类、鸟类和人的相似度分别仅为 33.6%、29.6%和 34.2%。另外, 半滑舌鲷 MCHR1 和 MCHR2 的氨基酸序列相似度仅为 30.1%(表 2)。

利用 ClustalX 2.0.12 对半滑舌鲷 MCHR 的氨基酸序列与其他物种的 MCHR 氨基酸序列进行了比较(图 3)。结果发现, 半滑舌鲷与其他鱼类 MCHR 的氨基酸序列保守性较强, 仅在 C 端和 N 端删除了一些氨基酸, 中间部分较为保守。

### 2.3 MCHR 系统进化分析

构建了半滑舌鲷 MCHR 和其他脊椎动物 MCHR 的系统进化树(图 4), 半滑舌鲷 MCHR1 与鲈形目、鲈形目鱼类聚为 1 个小分支, 与其他硬骨鱼类和鸟类、爬行类、人类聚为 1 个大分支; 半滑舌鲷 MCHR2 与鲈形目聚为 1 个小分支, 与其他硬骨鱼类聚为 1 个大分支, 与 MCHR1 遗传距离较大, 分别向 2 个方向进化。

-213										ACA TGG GGA TTC TGC TGC AGT TTG TCT TCA CAG
-180	AGT CAC ACG GCT GAG ATG ATC AGC CTG GAG CCC GTG CTC CGG TCG CTG GGG TTT TAT ATT									
-120	TGA GTT TCA GAG GAG AAC CGC TGC CGT CCA GCA GGG AGT GCG CGC ACT TGG AGA GTG CGT									
-60	AAA TCT GCT GTC CAA CTT TGG GAA GCG GAG CGC GCG CGC GTC TGG AAC GAG GAC CCG AAG									
1	ATG AAC GAC TCC GGG GTG TTC TGC AAA GGC AAC CAG TCG GAC AAC ATG ACA GAG CCG TCA									
1	M N D S G V F C K G N Q S D N M T E P S									
61	TGT CTG AAC TCG ACT CGG CCG ACG TAC AAC CAC ATC GAC ATC ACC ACC TTC ATG CAC ATC									
21	C L N S T R P T Y N H I D I T T F M H I									
121	TTC CCC TCC ATC TAC GGC ATC CTG TGC TCG GTC GGA GTG ATT GCC AAC GGA CTG GTC ATT									
41	F P S I Y G I L C S V G V I A N G L V I									
181	TAC GCG GTG GCG GCG TGC AAG AAG AAG ATG GTG TCC GAC ATC TAC GTG CTG AAC CTG GCC									
61	Y A V A A C K K M V S D I Y V L N L A									
241	ATA GCC GAC ATG CTG TTC CTG CTG GTG ATG CCC TTC AAC ATC CAC CAG CTG GTC AGG GAC									
81	I A D M L F L L V M P F N I H Q L V R D									
301	AGA CAG TGG GTC TTT GGG AAC TTT ATG TGT AAA GCG GTT GTG GTG GTG CAG GTC AGT AAC									
101	R Q W V F G N F M C K A V V V V D V S N									
361	CAG TTC ACC ACC GTG GGG ATT GTT ACT GTG CTG TGC ATT GAT CGG TAC ATA GCC ATT GTC									
121	Q F T T V G I V T V L C I D R Y I A I V									
421	CAC CCC ACC TCA GAG AAG AGG ACC ATC CAC TGG ACC ATC ATA ATC AAC ACA CTG GTG TGG									
141	H P T S E K R T I H W T I I I N T L V W									
481	GTG GGC AGC TTC CTC CTC ACC GTG CCG GTC ATG ATG TAC GCC AGG GTG GAG CGC AAG CAG									
161	V G S F L L T V P V M M Y A R V E R K Q									
541	CAC ATG GAG GTG TGC ATG ATG TGG CTG GAC GGT CCC GAG GAC ATG TAC TGG TAC ACC TTC									
181	H M E V C M M W L D G P E D M Y W Y T F									
601	TAC CAG TCC ATC CTG GGC TAC ATC ATT CCT CTC ATC ATC ACC ACC TTC TAC TCC CTC									
201	Y Q S I L G Y I I P L I I I S T F Y S L									
661	ACC CTC TAC CAC GTC TTC AGC TCC GTC CGC CGC GTC AAA CGC AAG CAG ACG GTT TGG GCT									
221	T L Y H V F S S V R R V K R K Q T V W A									
721	AAA CGG GCC ACC AAG ATG GTG CTG ATG GTA ATT GCA TTG TTC CTG ATT TGC TGG TCG CCC									
241	K R A T K M V L M V I A L F L I C W S P									
781	TAC CAT GTC ATT CAA GTG ATC AAC CTG AGC AAC AAC ACG CCC ACC ATC ACC TTC GTA TAT									
261	Y H V I Q V I N L S N N T P T I T F V Y									
841	GTC TAC CAC ATC AGC ATC TGC CTG AGC TAC TCC CAC AGC TGC ATC AAC CCG CTC ATG CTG									
281	V Y H I S I C L S Y S H S C I N P L M L									
901	CTC ATC TTC GCC CAG AAC TAT CGC GAC CGC CTC TGT CGC AGA AAC GCC CCG CAC AGC TCC									
301	L I F A Q N Y R D R L C R R N A P H S S									
961	CAG CAC TCC TCC AAG CTC ACG GTG GTC AAA ACG GAT GGT TCC AGC GTA ACC AGT AAC CCC									
321	Q H S S K L T V V K T D G S S V T C S N P									
1021	AAC TAC CGC TGC ACG GTT GTG <u>TGA</u> AAC GTT GTA GAT ATT TAT GTA AAC GCT TTG ATG CCG									
341	N Y R C T V V *									
1081	ACT TCA AAA TGA CTC GCG GTG ATG AGA AGT GTC GGC CGT GAA ATC ACA CCC TCG GTG TTT									
1141	CCA CAA TTG TAA ATG ACT GAA AGG AGA GTG GGT GCA CAG CAC CAT CAT CAT CAT CAT CAT									
1201	CAT CAT CAT CAT CAT CAT CAT CAT CAT CAT CAT CAT CAT CAT CAT CAT CAT CAT CAT									
1261	CAT CAT CTT CAT CTT CAT CAT CAT CAT CAT CAT CAT CAT CAT CAT CAT CAT CAT CAT									
1321	ATG AAC CTC AGG TCG CAC CAA AGG TTT GTT TTT ACA <u>GAA TAA</u> AGG AAG GTG ACC TTC TCC									
1381	AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA									

图 2 半滑舌鲷 MCHR2 基因 cDNA 全长序列及推导的氨基酸序列

Fig.2 The full-length cDNA sequence of *C. semilaevis* MCHR2 gene and deduced amino acid sequence

表 2 半滑舌鲷 *MCHR* 氨基酸序列与其他脊椎动物的同源性比较  
 Tab.2 Comparison of homology of the precursor peptide sequences of *MCHR* gene between *C. semilaevis* and other vertebrates

物种 Species	序列号 GenBank accession no.	与 MCHR1 同源性 Homology with MCHR1 (%)	与 MCHR2 同源性 Homology with MCHR2 (%)
半滑舌鲷 <i>C. semilaevis</i> -1		100.0	30.1
半滑舌鲷 <i>C. semilaevis</i> -2		30.1	100.0
牙鲆 <i>P. olivaceus</i> -1	ACJ45803.1	83.3	31.6
牙鲆 <i>P. olivaceus</i> -2	ACJ45804.1	30.3	91.0
条斑星鲽 <i>V. moseri</i> -1	BAF49517.1	81.8	31.4
条斑星鲽 <i>V. moseri</i> -2	BAF49518.1	30.7	91.6
美洲拟鲽 <i>P. americanus</i> -1	AEE36641.1	6.5	13.8
美洲拟鲽 <i>P. americanus</i> -2	AEE36643.1	12.3	9.5
布氏新亮丽鲷 <i>Neolamprologus brichardi</i> -1	XP_006787523.1	81.8	32.0
布氏新亮丽鲷 <i>N. brichardi</i> -2	XP_006781728.1	5.5	10.5
罗非鱼 <i>Oreochromis niloticus</i> -1	XP_003447997.1	81.8	32.0
罗非鱼 <i>O. niloticus</i> -2	XP_003445904.1	31.0	87.3
网纹鲈 <i>Poecilia reticulata</i> -1	XP_008412904.1	80.1	31.9
网纹鲈 <i>P. reticulata</i> -2	XP_008418194.1	30.7	84.4
红鳍东方鲀 <i>Takifugu rubripes</i> -1	XP_003972036.1	76.4	32.7
红鳍东方鲀 <i>T. rubripes</i> -2	XP_003970585.1	29.9	81.0
斑点雀鳢 <i>Lepisosteus oculatus</i> -1	XP_006635517.1	68.9	31.9
斑点雀鳢 <i>L. oculatus</i> -2	XP_006631982.1	31.1	71.8
鲫鱼 <i>Carassius auratus</i> -1	BAH70338.1	66.9	31.3
鲫鱼 <i>C. auratus</i> -2	BAH70339.1	32.4	75.5
斑马鱼 <i>D. rerio</i> -1a	XP_001343144.1	67.7	30.0
斑马鱼 <i>D. rerio</i> -1b	XP_692413.3	66.0	30.7
斑马鱼 <i>D. rerio</i> -2	XP_001921716.2	34.3	33.0
扬子鳄 <i>Alligator sinensis</i> -1	XP_006018414.1	63.5	28.7
扬子鳄 <i>A. sinensis</i> -2	XP_006020523.1	33.7	33.6
鸡 <i>Gallus gallus</i> -1	XP_004946431.1	62.2	29.6
人 <i>Homo sapiens</i> -1	CAC16691.1	14.1	14.7
人 <i>H. sapiens</i> -2	AAK32193.1	34.1	34.2

#### 2.4 *MCHR* mRNA 的组织表达特性

半滑舌鲷 *MCHR1* mRNA 在鳃中表达量最高, 有眼侧皮肤、性腺、脾脏和无眼侧正常皮肤中检测到较高的表达量, 而垂体、脑、无眼侧黑化皮肤、肝、肠、心脏中表达量较低, 胃、肾、头肾、肌肉中检测到微量表达; 半滑舌鲷 *MCHR2* mRNA 在有眼侧皮肤中表达量最高, 性腺次之, 而在垂体、脑、无眼侧黑化皮肤、无眼侧正常皮肤和头肾中有少量表达, 在肝、肠、胃、肾、肌肉、心脏和脾脏中微量表达(图 5)。 *MCHR* 在性腺中的高表达表明其可能会参与生殖活动调控。另外, 有眼侧皮肤中这 2 种 *MCHR* 亚基表达水平均显著高于无眼侧黑化和正常皮肤, 而无眼侧黑化皮肤中, *MCHR1* 表达显著低于无眼侧正常皮肤, 无眼侧

黑化皮肤中 *MCHR2* 则显著高于无眼侧正常皮肤, 表现出差异表达特性。

#### 2.5 *MCHR* mRNA 表达调控与无眼侧黑化程度的关系

本研究分析了半滑舌鲷脑垂体和皮肤中 *MCHR* mRNA 表达与无眼侧黑化程度的关系(图 6)。无眼侧黑化发生早期, 脑垂体中的 *MCHR1* mRNA 显著升高, 在无眼侧 50%黑化组达峰值, 其后又显著降低; 皮肤中的 *MCHR1* mRNA 在无眼侧 10%黑化组显著高于对照组, 其后保持较高表达水平。脑垂体和皮肤中的 *MCHR2* mRNA 表达表现出一致的变化趋势, 在无眼侧黑化发生早期(10%黑化组), 垂体和皮肤中的 *MCHR2* mRNA 都达到峰值, 随后逐渐下降至相对较低水平。

AS2	-----MNEIQAAACWNTSPDLFNKSW-----GHHYQVISAEE T I I L P S L I G I C S T G L I G N I L I V I T I I R T K-----K K S I P D I Y I C N L A I A D L V H I I G M P F L
Homo2	-----M N P F H A S C W N T S A E L L N K S W N-----K E F A V Q T A S V D T K I L P S M I G I C S T G L V G N I L I V F T I I R S R-----K K V T P D Y I C N L A I A D L V H I I G M P F L
DR2	-----M N A M V E L L E P V W N F T L K F D N G T R A N E T T A G H A F E A D E Y I N I V H T E-----T T I L P A F I G F L C S T G L V G N I L V L T L R S A-----K K V T P D Y I C N L A I A D L V H I I G M P F L
PA2	-----M N D T G I P C R N N Q T A N L T D P A C L N-----S T R P S Y S H I D I T T F-----M H I F P T I Y G I L C S V G V I A N G L V I Y A V A A C K-----K K M V S D I Y V L N L A I A D M L F L L V M P F N
VM2	-----M G D G T F C N-----Q T A N L T D P A C L N-----S T R P S Y S H I D I T T F-----M H I F P T I Y G I L C S V G V I A N G L V I Y A V A A C K-----K K M V S D I Y V L N L A I A D M L F L L V M P F N
PO2	-----M N D S G V F C G N Q S D M-----S T R P T A N I D I T T F-----M H I F P T I Y G I L C S V G V I A N G L V I Y A V A A C K-----K K M V S D I Y V L N L A I A D M L F L L V M P F N
CS2	-----M N D T G I L C K N N Q T S F A D Q S C Q N-----S T P S P Y S Q I D I T T F-----M H I F P S I Y G I L C S V G V A N G L V I Y A V A A C K-----K K M V S D I Y V L N L A I A D M L F L L V M P F N
NB2	-----M N D T G I L C K N N Q T S F A D Q S C Q N-----S T P S P Y S Q I D I T T F-----M H I F P S I Y G I L C S V G V A N G L V I Y A V A A C K-----K K M V S D I Y V L N L A I A D M L F L L V M P F N
ON2	-----M N D T G I L C K N N Q T S F A D Q S C Q N-----S T P S P Y S Q I D I T T F-----M H I F P S I Y G I L C S V G V A N G L V I Y A V A A C K-----K K M V S D I Y V L N L A I A D M L F L L V M P F N
PR2	-----M N D T G I L C K N N Q T S F A D Q S C Q N-----S T P S P Y S Q I D I T T F-----M H I F P S I Y G I L C S V G V A N G L V I Y A V A A C K-----K K M V S D I Y V L N L A I A D M L F L L V M P F N
TR2	-----M N D T G I L C K N N Q T S F A D Q S C Q N-----S T P S P Y S Q I D I T T F-----M H I F P S I Y G I L C S V G V A N G L V I Y A V A A C K-----K K M V S D I Y V L N L A I A D M L F L L V M P F N
CA2	-----M N D T G I L C K N N Q T S F A D Q S C Q N-----S T P S P Y S Q I D I T T F-----M H I F P S I Y G I L C S V G V A N G L V I Y A V A A C K-----K K M V S D I Y V L N L A I A D M L F L L V M P F N
LO2	-----M N D T G I L C K N N Q T S F A D Q S C Q N-----S T P S P Y S Q I D I T T F-----M H I F P S I Y G I L C S V G V A N G L V I Y A V A A C K-----K K M V S D I Y V L N L A I A D M L F L L V M P F N
GA1 us	-----M N D T G I L C K N N Q T S F A D Q S C Q N-----S T P S P Y S Q I D I T T F-----M H I F P S I Y G I L C S V G V A N G L V I Y A V A A C K-----K K M V S D I Y V L N L A I A D M L F L L V M P F N
LO1	-----M T P R P H I D W I L P Q D T R C E L L Q A R K T Q O T C P I P G D I F S R Q M V A E R-----P A P Y T-----N V I M P S L F S I C F L G V G N L I V I Y T I V K K K L R C K Q T V P D I F I N L S I V D L L F L L G M P F L
GA1 us	-----M T P R P H I D W I L P Q D T R C E L L Q A R K T Q O T C P I P G D I F S R Q M V A E R-----P A P Y T-----N V I M P S L F S I C F L G V G N L I V I Y T I V K K K L R C K Q T V P D I F I N L S I V D L L F L L G M P F L
LO1	-----M A P-----I N S L I N F P S T S-----E A R N G S V A E K-----P A P Y T-----N V I M P S L F S I C F L G V G N L I V I Y T I V K K K L R C K Q T V P D I F I N L S I V D L L F L L G M P F L
NB1	-----M T Y V N-----S S L Y S K A-----S R L P S Y A E R G H A P Y T-----D V I M P S I I G V I C F S G I I G N C I V I Y T I V K K T K R A K Q T V P D I F I N L S I V D L L F L L G M P F L
ON1	-----M D F F N T N F S-----I D G S N T T-----A E D G A L H C-----G A I L P V I F G I I C F L G I I G N C I V M Y T I M K K T C R A K Q T V P D I F I N L S I V D L L F L L G M P F L
ON1	-----M D F F N T N F S-----I D G S N T T-----A E D G A L H C-----G A I L P V I F G I I C F L G I I G N C I V M Y T I M K K T C R A K Q T V P D I F I N L S I V D L L F L L G M P F L
PR1	-----M D F L N V S Y F S-----N G D S N T R-----A E D D A P I C-----G A S L P V I F G I I C F L G I I G N C I V I T I L K K T C R A K Q T V P D I F I N L S I V D L L F L L G M P F L
PO1	-----M D F I N D S N F S-----M H N S N T T A V Y G A L I S-----S A I L P V I F G I I C F L G I I G N C I V M Y T I I K K T C R A K Q T V P D I F I N L S I V D L L F L L G M P F L
VM1	-----M D F H-----D S N F S-----V P H N S T T P A V D G I C M Y M T I I K K T C R A K Q T V P D I F I N L S I V D L L F L L G M P F L
CS1	-----M D L Y N D S N S S-----L A D S N I T A V N G A L Y S-----S A I L P V I F G I I C F L G I I G N C I V I T I M K K N C H A K Q T V P D I F I N L S I V D L L F L L G M P F L
TR1	-----M L-----L P G-----A S A E E G T P G S-----S A V L P V I F G I I C F L G I V A N S A I Y T I V Q K T C H A K Q T V P D I F I N L S I V D L L F L L G M P F L
CA1	-----M D F N V T P P E N S S-----D E N N S S G H L H A D T D E Q V H-----N V L M P S I Y G V I C P V G I I G N C I V I T I V K K N K P A Q T V P D I F I N L S I A D L L F L L G M P F L
DR1b	-----M S T S G M R F R R E I K P Y S Q T G D Y Q R K I V M D F N M T P E N S S-----N E S N S G H L H A D T D E Q V H-----N V L M P S I Y G V I C P V G I I G N C I V I T I V K K N K P A Q T V P D I F I N L S I A D L L F L L G M P F L
DR1a	-----M D F P E D S E N S S L-----R L S N S S Q I Q V N T D D Q Y-----N A I L P S I F G I I C F L G I S G N S I V Y T I I K K T C R A K Q T V P D I F I N L S I V D L L F L L G M P F L
Homo1	-----M D F P E D S E N S S L-----R L S N S S Q I Q V N T D D Q Y-----N A I L P S I F G I I C F L G I S G N S I V Y T I I K K T C R A K Q T V P D I F I N L S I V D L L F L L G M P F L
PA1	-----M D F P E D S E N S S L-----R L S N S S Q I Q V N T D D Q Y-----N A I L P S I F G I I C F L G I S G N S I V Y T I I K K T C R A K Q T V P D I F I N L S I V D L L F L L G M P F L
AS2	I H Q W A R G E W F G S P L C T I V T S L D T C N Q F A C S A I M T V M S L D R Y L A V Q P F R L T H L R T I S K T I R V N L C L W I A S L L I V F A W Y T K V I K P K D G L E S C A F D L T-----S P D H V W Y T L Y L I T I T T F F
Homo2	I H Q W A R G E W F G S P L C T I I T S L D T C N Q F A C S A I M T V M S V D R Y F A L Q P F R L T R W K T R Y K T I R I N L G L W A A S F I L A L P V W Y S K V I K F K D G V E S C A F D L T-----S P D D V W Y T L Y L I T I T T F F
DR2	I H Q W A R G E W F G S P L C T I I T S L D T C N Q F A C A A V M T A M S L D R Y L A V H P F R L S L R T R S K T I R I N L F V W A A S F I M V L P A W Y H A K V I R F R D R G E S C A F D L T-----S P K Q V L W Y T L Y L I T I T T F F
PA2	I H Q L V R D R Q W F G F N M C K A V V V D V S N Q F T T V G I V T V L C I D R Y A I A V H P T-----S E K R T I H W T I M I N I L V M L G S F L L T V P V M Y A K V E R R Q H-----L E V C M M N I D-----G P E D M Y W Y T F Q S I L G Y I I
VM2	I H Q L V R D R Q W F G F N M C K A V V V D V S N Q F T T V G I V T V L C I D R Y A I A V H P T-----S E K R T I H W T I M I N I L V M L G S F L L T V P V M Y A K V E R R Q H-----L E V C M M N I D-----G P E D M Y W Y T F Q S I L G Y I I
PO2	I H Q L V R D R Q W F G F N M C K A V V V D V S N Q F T T V G I V T V L C I D R Y A I A V H P T-----S E K R T I H W T I M I N I L V M L G S F L L T V P V M Y A K V E R R Q H-----L E V C M M N I D-----G P E D M Y W Y T F Q S I L G Y I I
CS2	I H Q L V R D R Q W F G F N M C K A V V V D V S N Q F T T V G I V T V L C I D R Y A I A V H P T-----S E K R T I H W T I I N T L V W G S F L L T V P V M Y A R V E R R Q H-----M E V C M M N I D-----G P E D M Y W Y T F Q S I L G Y I I
NB2	I H Q L V R D R Q W F G F N M C K A V V V D V S N Q F T T V G I V T V L C I D R Y A I A V H P T-----S E K R T I H W T I I N T L V W G S F L L T V P V M Y A R V E R R Q H-----M E V C M M N I D-----G P E D M Y W Y T F Q S I L G Y I I
ON2	I H Q L V R D R Q W F G F N M C K A V V V D V S N Q F T T V G I V T V L C I D R Y A I A V H P T-----S E K R T I H W T I I N T L V W G S F L L T V P V M Y A R V E R R Q H-----M E V C M M N I D-----G P E D M Y W Y T F Q S I L G Y I I
PR2	I H Q L V R D R Q W F G F N M C K A V V V D V S N Q F T T V G I V T V L C I D R Y A I A V H P T-----S E K R T I H W T I I N T L V W G S F L L T V P V M Y A R V E R R Q H-----M E V C M M N I D-----G P E D M Y W Y T F Q S I L G Y I I
TR2	I H Q L V R D R Q W F G F N M C K A V V V D V S N Q F T T V G I V T V L C I D R Y A I A V H P T-----S E K R T I H W T I I N T L V W G S F L L T V P V M Y A R V E R R Q H-----M E V C M M N I D-----G P E D M Y W Y T F Q S I L G Y I I
CA2	I H Q L V R D R Q W F G F N M C K A V V V D V S N Q F T T V G I V T V L C I D R Y A I A V H P T-----S E K R T I H W T I I N T L V W G S F L L T V P V M Y A R V E R R Q H-----M E V C M M N I D-----G P E D M Y W Y T F Q S I L G Y I I
LO2	I H Q L V R D R Q W F G F N M C K A V V V D V S N Q F T T V G I V T V L C I D R Y A I A V H P T-----S E K R T I H W T I I N T L V W G S F L L T V P V M Y A R V E R R Q H-----M E V C M M N I D-----G P E D M Y W Y T F Q S I L G Y I I
GA1 us	I H Q L V R D R Q W F G F N M C K A V V V D V S N Q F T T V G I V T V L C I D R Y A I A V H P T-----S E K R T I H W T I I N T L V W G S F L L T V P V M Y A R V E R R Q H-----M E V C M M N I D-----G P E D M Y W Y T F Q S I L G Y I I
LO1	I H Q L G N G S W F G A M C T V I T A L D S N S Q I V S Y T I L T A M T D R Y L A T V H P I R F N Y R T P C V A A V I G L W V L S F L T I I P V M Y A G L M P L P D G S V A C A L L P D P V T D I T Y W F T L Y Q F L A F A I
GA1 us	I H Q L G N G S W F G A M C T V I T A L D S N S Q I V S Y T I L T A M T D R Y L A T V H P I R F N Y R T P C V A A V I G L W V L S F L T I I P V M Y A G L M P L P D G S V A C A L L P D P V T D I T Y W F T L Y Q F L A F A I
NB1	I H Q L G N G S W F G A M C T V I T A L D S N S Q I V S Y T I L T A M T D R Y L A T V H P I R F N Y R T P C V A A V I G L W V L S F L T I I P V M Y A G L M P L P D G S V A C A L L P D P V T D I T Y W F T L Y Q F L A F A I
ON1	I H Q L G N G S W F G A M C T V I T A L D S N S Q I V S Y T I L T A M T D R Y L A T V H P I R F N Y R T P C V A A V I G L W V L S F L T I I P V M Y A G L M P L P D G S V A C A L L P D P V T D I T Y W F T L Y Q F L A F A I
PR1	I H Q L G N G S W F G A M C T V I T A L D S N S Q I V S Y T I L T A M T D R Y L A T V H P I R F N Y R T P C V A A V I G L W V L S F L T I I P V M Y A G L M P L P D G S V A C A L L P D P V T D I T Y W F T L Y Q F L A F A I
PO1	I H Q L G N G S W F G A M C T V I T A L D S N S Q I V S Y T I L T A M T D R Y L A T V H P I R F N Y R T P C V A A V I G L W V L S F L T I I P V M Y A G L M P L P D G S V A C A L L P D P V T D I T Y W F T L Y Q F L A F A I
VM1	I H Q L G N G S W F G A M C T V I T A L D S N S Q I V S Y T I L T A M T D R Y L A T V H P I R F N Y R T P C V A A V I G L W V L S F L T I I P V M Y A G L M P L P D G S V A C A L L P D P V T D I T Y W F T L Y Q F L A F A I
CS1	I H Q L G N G S W F G A M C T V I T A L D S N S Q I V S Y T I L T A M T D R Y L A T V H P I R F N Y R T P C V A A V I G L W V L S F L T I I P V M Y A G L M P L P D G S V A C A L L P D P V T D I T Y W F T L Y Q F L A F A I
TR1	I H Q L G N G S W F G A M C T V I T A L D S N S Q I V S Y T I L T A M T D R Y L A T V H P I R F N Y R T P C V A A V I G L W V L S F L T I I P V M Y A G L M P L P D G S V A C A L L P D P V T D I T Y W F T L Y Q F L A F A I
CA1	I H Q L G N G S W F G A M C T V I T A L D S N S Q I V S Y T I L T A M T D R Y L A T V H P I R F N Y R T P C V A A V I G L W V L S F L T I I P V M Y A G L M P L P D G S V A C A L L P D P V T D I T Y W F T L Y Q F L A F A I
DR1b	I H Q L G N G S W F G A M C T V I T A L D S N S Q I V S Y T I L T A M T D R Y L A T V H P I R F N Y R T P C V A A V I G L W V L S F L T I I P V M Y A G L M P L P D G S V A C A L L P D P V T D I T Y W F T L Y Q F L A F A I
DR1a	I H Q L G N G S W F G A M C T V I T A L D S N S Q I V S Y T I L T A M T D R Y L A T V H P I R F N Y R T P C V A A V I G L W V L S F L T I I P V M Y A G L M P L P D G S V A C A L L P D P V T D I T Y W F T L Y Q F L A F A I
Homo1	I H Q L G N G S W F G A M C T V I T A L D S N S Q I V S Y T I L T A M T D R Y L A T V H P I R F N Y R T P C V A A V I G L W V L S F L T I I P V M Y A G L M P L P D G S V A C A L L P D P V T D I T Y W F T L Y Q F L A F A I
PA1	I H Q L G N G S W F G A M C T V I T A L D S N S Q I V S Y T I L T A M T D R Y L A T V H P I R F N Y R T P C V A A V I G L W V L S F L T I I P V M Y A G L M P L P D G S V A C A L L P D P V T D I T Y W F T L Y Q F L A F A I
AS2	P L P L I C Y L I L L C Y T W E M Y Q N K K A G C Y N T G I P R Q R V M R L T K M V L V L V G V F V S A A P Y H V M Q L V N L R I S Q P T L A F V G Y V S I C L S Y A S S I N P F L Y L L S G N F Q K R L S Q C T S I K V M T P
Homo2	P L P L I C Y L I L L C Y T W E M Y Q N K K A G C Y N T G I P R Q R V M R L T K M V L V L V G V F V S A A P Y H V M Q L V N L R I S Q P T L A F V G Y V S I C L S Y A S S I N P F L Y L L S G N F Q K R L P Q-----I Q R R T
DR2	P L P L I C Y L I L L C Y T W E M Y Q N K K A H R Y N T S L P R E R V R L T K M V L V L V A P L V S V G P H I L Q L V N L S V P R P S L A Y I H T C Y L S Y A S S I N P F Y I L L S G N F R R L V C R D P T P S M S Y
PA2	-----P T T F I Y A H I S I C L S Y S H S C I N P L M L L I F A Q N Y R D L R C R N-----M L N S S Q
VM2	-----P T T F I Y A H I S I C L S Y S H S C I N P L M L L I F A Q N Y R D L R C R N-----M L N S S Q
PO2	-----P T T F I Y A H I S I C L S Y S H S C I N P L M L L I F A Q N Y R D L R C R N-----M L N S S Q
CS2	-----P T T F I Y A H I S I C L S Y S H S C I N P L M L L I F A Q N Y R D L R C R N-----M L N S S Q
NB2	-----P T T F I Y A H I S I C L S Y S H S C I N P L M L L I F A Q N Y R D L R C R N-----M L N S S Q
ON2	-----P T T F I Y A H I S I C L S Y S H S C I N P L M L L I F A Q N Y R D L R C R N-----M L N S S Q
PR2	-----P T T F I Y A H I S I C L S Y S H S C I N P L M L L I F A Q N Y R D L R C R N-----M L N S S Q
TR2	-----P T T F I Y A H I S I C L S Y S H S C I N P L M L L I F A Q N Y R D L R C R N-----M L N S S Q
CA2	-----P T T F I Y A H I S I C L S Y S H S C I N P L M L L I F A Q N Y R D L R C R N-----M L N S S Q
LO2	-----P T T F I Y A H I S I C L S Y S H S C I N P L M L L I F A Q N Y R D L R C R N-----M L N S S Q
GA1 us	-----P T T F I Y A H I S I C L S Y S H S C I N P L M L L I F A Q N Y R D L R C R N-----M L N S S Q
LO1	-----P T T F I Y A H I S I C L S Y S H S C I N P L M L L I F A Q N Y R D L R C R N-----M L N S S Q
NB1	-----P T T F I Y A H I S I C L S Y S H S C I N P L M L L I F A Q N Y R D L R C R N-----M L N S S Q
ON1	-----P T T F I Y A H I S I C L S Y S H S C I N P L M L L I F A Q N Y R D L R C R N-----M L N S S Q
PR1	-----P T T F I Y A H I S I C L S Y S H S C I N P L M L L I F A Q N Y R D L R C R N-----M L N S S Q
PO1	-----P T T F I Y A H I S I C L S Y S H S C I N P L M L L I F A Q N Y R D L R C R N-----M L N S S Q
VM1	-----P T T F I Y A H I S I C L S Y S H S C I N P L M L L I F A Q N Y R D L R C R N-----M L N S S Q
CS1	-----P T T F I Y A H I S I C L S Y S H S C I N P L M L L I F A Q N Y R D L R C R N-----M L N S S Q
TR1	-----P T T F I Y A H I S I C L S Y S H S C I N P L M L L I F A Q N Y R D L R C R N-----M L N S S Q
CA1	-----P T T F I Y A H I S I C L S Y S H S C I N P L M L L I F A Q N Y R D L R C R N-----M L N S S Q
DR1b	-----P T T F I Y A H I S I C L S Y S H S C I N P L M L L I F A Q N Y R D L R C R N-----M L N S S Q
DR1a	-----P T T F I Y A H I S I C L S Y S H S C I N P L M L L I F A Q N Y R D L R C R N-----M L N S S Q
Homo1	-----P T T F I Y A H I S I C L S Y S H S C I N P L M L L I F A Q N Y R D L R C R N-----M L N S S Q
PA1	-----P T T F I Y A H I S I C L S Y S H S C I N P L M L L I F A Q N Y R D L R C R N-----M L N S S Q
AS2	ER-----E V N N I E N T M K S S F-----
Homo2	EK-----E I N N M G N T L K S H F-----
DR2	ER-----E I Q-----A P R S S F-----
PA2	HS-----S K L I V K V D G S S T-----N N P S Y R-----L T V-----C T V-----
VM2	HS-----S K L I V K V D G S S T-----N N P S Y R-----L T V-----C T V-----
PO2	HS-----S K L I V K V D G S S T-----N N P S Y R-----L T V-----C T V-----
CS2	HS-----S K L I V K V D G S S T-----N N P S Y R-----L T V-----C T V-----
NB2	HS-----S K V T V K T D G S S T-----N D P N Y R-----C T V I-----
ON2	HS-----S K V T V K T D G S S T-----N D P N Y R-----C T V I-----
PR2	HS-----S K V T V K T D G S S T-----N D P N Y R-----I T V I-----
TR2	QS-----S K V T V K A D G S A N N E L I T T A P P S D K P R A P L S T C V L-----
CA2	SS-----S K T-----T G S S V S-----P D T S H R-----C T V I-----
LO2	SS-----S K T V K T D G S S T-----I-----G D T N Y R-----C T V I-----
GA1 us	R N S S I N N S S I T Q C L K L A P E S T Q Q T Q L E D F S P H S L P V T A V H N S S A N N S M T N A S I C L K L A S D S T Q Q T P L P E D S S-----H S L P A T A A A H R-----
NB1	R-----V N N S T T E G S V S L R V P E S L Q C C P L G D S H S G L P V T A V R R V-----V N P S T T D G S A S R V M V P E G A Q Q E P A-----C R E M I P S N V A P E R V-----V N P S T D G S S V R M V P L P Q G E-----C R E-----L P S M A P E R-----
ON1	R-----V N P S T T D G S A S R V M V P E G A Q Q E P A-----C R E M I P S N V A P E R V-----V N P S T D G S S V R M V P L P Q G E-----C R E-----L P S M A P E R-----
PR1	R-----V N P S T T D G S A S R V M V P E G A Q Q E P A-----C R E M I P S N V A P E R V-----V N P S T D G S S V R M V P L P Q G E-----C R E-----L P S M A P E R-----
PO1	R-----V N P S T T D G S A S R V M V P E G A Q Q E P A-----C R E M I P S N V A P E R V-----V N P S T D G S S V R M V P L P Q G E-----C R E-----L P S M A P E R-----
VM1	R-----V N P S T T D G S A S R V M V P E G A Q Q E P A-----C R E M I P S N V A P E R V-----V N P S T D G S S V R M V P L P Q G E-----C R E-----L P S M A P E R-----
CS1	R-----V N P S T T D G S A S R V M V P E G A Q Q E P A-----C R E M I P S N V A P E R V-----V N P S T D G S S V R M V P L P Q G E-----C R E-----L P S M A P E R-----
TR1	R-----V N P S T T D G S A S R V M V P E G A Q Q E P A-----C R E M I P S N V A P E R V-----V N P S T D G S S V R M V P L P Q G E-----C R E-----L P S M A P E R-----
CA1	R-----V D P-----A E G-----S V S L R L A P D G L Q Q S Q S-----S R E L L P V T A V H R-----
DR1b	R-----A D P-----A D G-----S V S L R L A P D V A Q Q S Q S-----S R E L L P V T A V H R-----
DR1a	R-----V N P S T E A-----T V S L R L A T D C Q R I V P A-----D N S E-----
Homo1	R-----V N P S T E A-----T V S L R L A T D C Q R I V P A-----D N S E-----
PA1	R-----V N P S T E A-----T V S L R L A T D C Q R I V P A-----D N S E-----

图 3 半滑舌鲷与其他物种的 MCHR 氨基酸序列比较  
 Fig.3 Comparison of the amino acid sequences of *C.semilaevis* MCHR and other species

“\*”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;MCHR 氨基酸序列号见表 2; AS1、AS2: 扬子鳄; CA1、CA2: 鲫鱼; CS1、CS2: 半滑舌鲷; DR1a、DR1b、DR2: 斑马鱼; Gallus: 鸡; Homo1、Homo2: 人; LO1、LO2: 斑点雀鲷; NB1、NB2: 布氏新亮丽鲷; ON1、ON2: 尼罗罗非鱼; PA1、PA2: 美洲拟鲈; PO1、PO2: 网纹鲈; PR1、PR2: 牙鲆; TR1、TR2: 红鳍东方鲀; VM1、VM2: 条斑星鲷  
 Asterisks (\*) indicated identical amino acid sequences; Dot (.) indicated highly conserved amino acid sequences; Dot (.) indicated amino acid sequences of low degree conserved; GenBank accession numbers were shown in Tab. 2; AS1, AS2: *A. sinensis*; CA1, CA2: *C. auratus*; CS1, CS2: *C. semilaevis*; DR1a, DR1b, DR2: *D. rerio*; Gallus: *G. gallus*; Homo1, Homo2: *H. sapiens*; LO1, LO2: *L. oculatus*; NB1, NB2: *N. brichardi*; ON1, ON2: *O. niloticus*; PA1, PA2: *P. americanus*; PR1, PR2: *P. reticulata*; PO1, PO2: *P. olivaceus*; TR1, TR2: *T. rubripes*; VM1, VM2: *V. moseri*

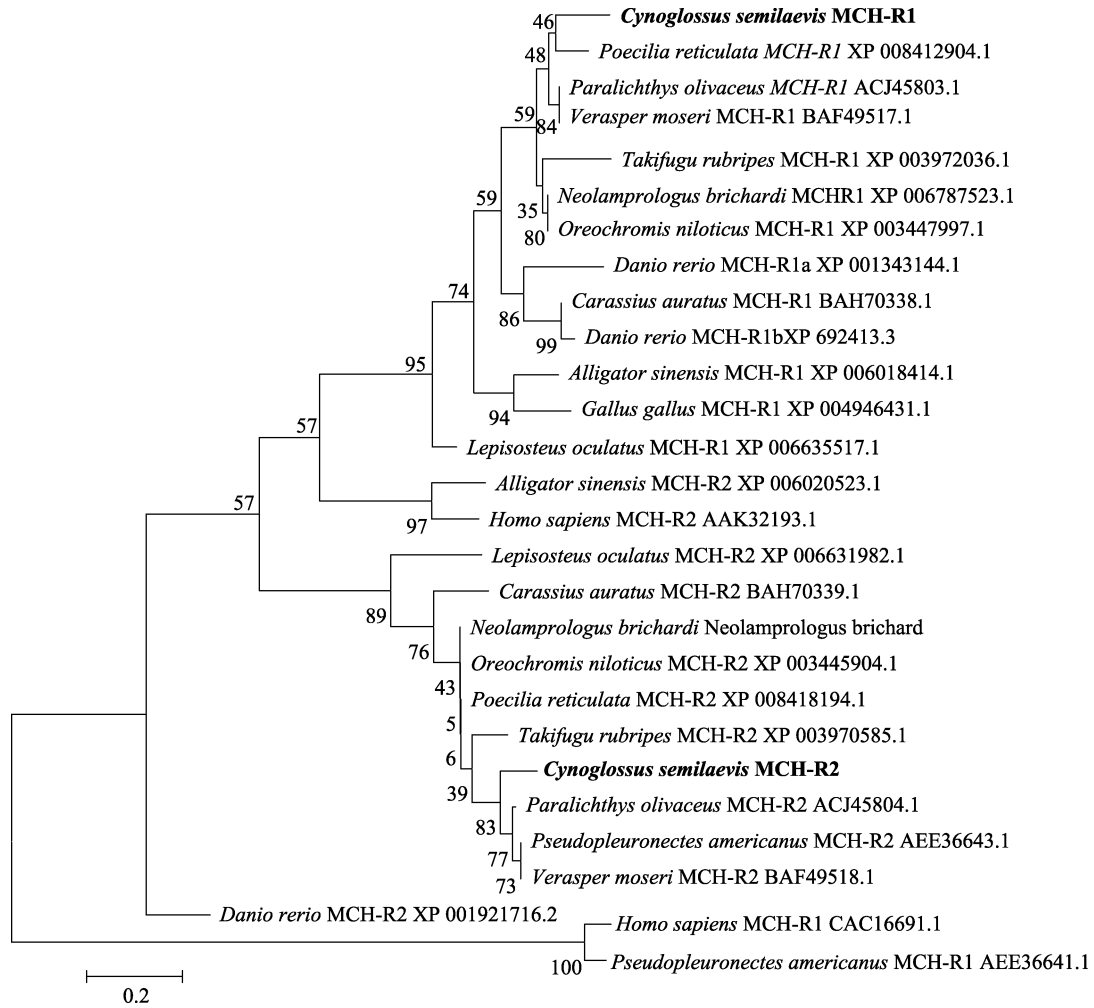


图 4 基于 MCHR 氨基酸序列的 NJ 系统进化树

Fig.4 NJ phylogenetic tree based on MCHR amino acid sequences

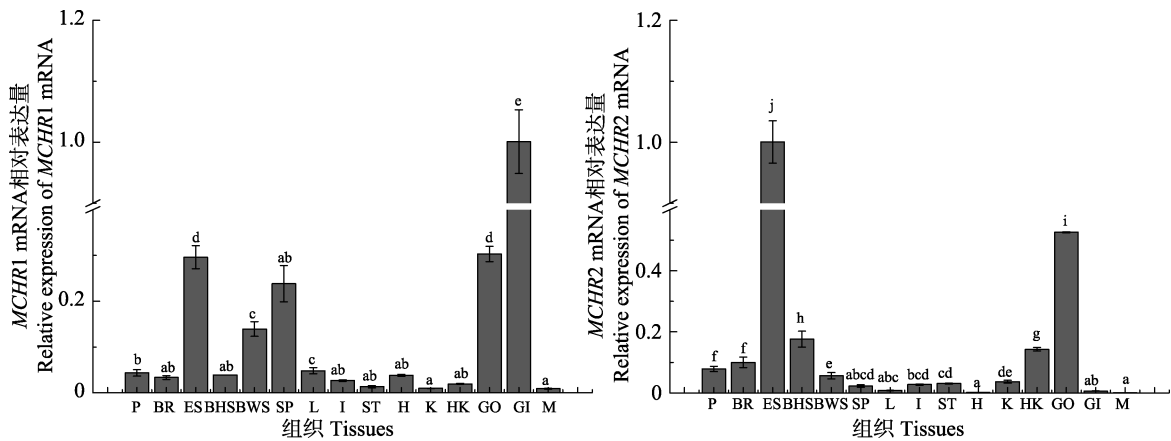


图 5 半滑舌鳎 MCHR mRNA 在不同组织中的相对表达量

Fig.5 Relative expression of MCHR mRNA in different tissues of *C.semilaevis*

P: 垂体; BR: 脑; ES: 有眼侧皮肤; BHS: 无眼侧黑化皮肤; BWS: 无眼侧白皮肤; SP: 脾; L: 肝; I: 肠; ST: 胃; H: 心; K: 肾; HK: 头肾; GO: 性腺; GI: 鳃; M: 肌。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 hypermelanosis skin; BWS: Blind-side white skin; SP: Spleen; L: Liver; I: Intestine; ST: Stomach; H: Heart; K: Kindey; HK: Head kidney; GO: Gonad; GI: Gill; M: Muscle. Different letters denoted significant differences ( $P < 0.05$ ), the same as below



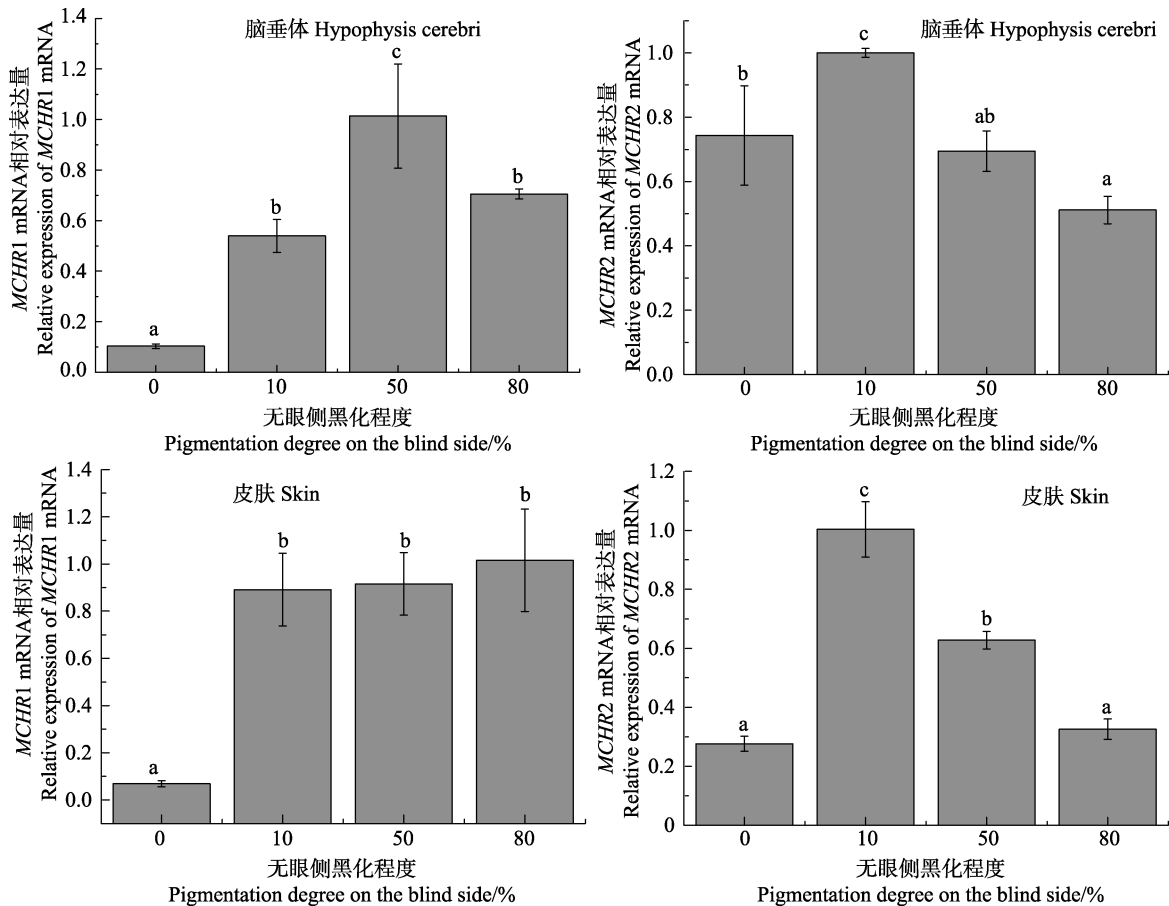


图 6 半滑舌鳎脑垂体和皮肤中 *MCHR* mRNA 的表达与无眼侧黑化程度的关系

Fig.6 Correlation between expression of *MCHR* mRNAs in hypophysis cerebri and skin of *C. semilaevis* and its pigmentation degree on the blind-side

## 2.6 *MCHR* 编码蛋白质三级结构预测

通过 SWISS-MODEL 网站预测了半滑舌鳎 *MCHR* 编码的蛋白质的三级结构,如图 7、图 8 所示。

## 3 讨论

本研究获得了半滑舌鳎 *MCHR* 的 2 个亚型 *MCHR1* 和 *MCHR2* cDNA 序列全长,并研究了其组织表达特性和不同黑化面积表达特性,为进一步研究 *MCH* 对体色调控的作用信号途径提供了基础。本研究获得了半滑舌鳎 2 个 *MCHR* 亚型的结构,这种单个或多个亚型的现象可能是由早期基因组的复制或或者在进化分离过程中丢失造成的。在基因结构方面,半滑舌鳎 *MCHR1* 编码 359 个氨基酸,含有 7 个糖基化位点,其中,3 个位于 N 端,1 个位于 C 端。美洲拟鳎 *MCHR1* 序列中没有发现糖基化位点(Tuziak *et al.*, 2012),条斑星鳎中含有 5 个糖基化位点,其中 2 个 N 端糖基化位点(Takahashi *et al.*, 2007)。*MCHR2* 编码 347 个氨基酸,含有 4 个 N 端糖基化位点和 7 个跨膜

结构域,这与条斑星鳎的 *MCHR2* 序列中糖基化位点数量与位置相同(Takahashi *et al.*, 2007),而在美洲拟鳎 *MCHR2* 只发现 1 个糖基化位点、3 个跨膜结构域(Tuziak *et al.*, 2012)。糖基化位点的存在可赋予蛋白质传导信号的功能,同时糖基化有助于某些蛋白的正确折叠,而跨膜结构对于受体蛋白发挥生物学功能起到决定性作用。不同鱼种间 *MCHR* 基因结构的差异可能与种的特异性和 *MCHR1* 功能的差异有关,具体机制还有待研究确认。同源性分析和系统进化分析表明,半滑舌鳎 *MCHR1* 和 *MCHR2* 的进化保守性较强,特别是 *MCHR1*。但 *MCHR1* 和 *MCHR2* 的氨基酸同源性仅为 30.1%,表明在进化过程中,其祖先基因发生了复制和功能分化,且这种分化发生的时期可能较早。

组织表达分析显示,半滑舌鳎 *MCHR1* mRNA 主要在鳃、有眼侧皮肤、性腺、脾脏和无眼侧白皮中表达,这种广泛的表达特性与美洲拟鳎 *MCHR1* 的研究结果相似(Tunisia *et al.*, 2012),而对条斑星鳎的研究发现, *MCHR1* 只在脑中表达(Takahashi *et al.*, 2007),说明 *MCHR1* 的生理功能具有种属特异性。本研究还

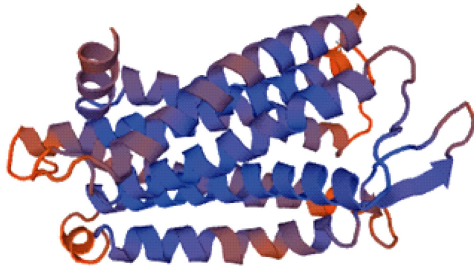


图7 SWISS-MODEL 预测的半滑舌鲷 MCHR1  
蛋白三级结构

Fig.7 Tertiary structure of *C. semilaevis* MCHR1 protein  
predicted by SWISS-MODEL

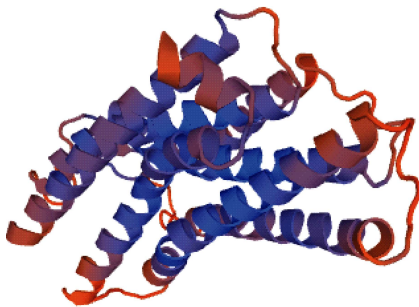


图8 SWISS-MODEL 预测的半滑舌鲷 MCHR2  
蛋白三级结构

Fig.8 Tertiary structure of *C. semilaevis* MCHR2 protein  
predicted by SWISS-MODEL

发现, *MCHR2* mRNA 主要在有眼侧皮肤、性腺中表达,这与美洲拟鲷和条斑星鲷的研究结果一致。说明半滑舌鲷 *MCHR2* 可能具有与美洲拟鲷和条斑星鲷类似的生理功能,参与皮肤黑化和摄食行为的调控(Takahashi *et al.*, 2007; Tuziak *et al.*, 2012)。除主要靶器官外,在半滑舌鲷其他组织中也检测到 *MCHR* mRNA 的表达,这种表达模式在美洲拟鲷(Tuziak *et al.*, 2012)、条斑星鲷(Takahashi *et al.*, 2007)、斑马鱼(Berman *et al.*, 2009)、金鱼(Mizusawa *et al.*, 2009)等鱼类中也同样存在,暗示 *MCHR* 可能与其他硬骨鱼类一样具有多样化的生理功能。

本研究发现,半滑舌鲷有眼侧皮肤中 *MCHR* 的表达水平显著高于无眼侧黑化皮肤和无眼侧正常皮肤,表明皮肤中的 *MCHR* 直接参与了黑色素细胞的代谢调控过程。在 *MCH* 的研究中,我们发现半滑舌鲷 *MCH1* 和 *MCH2* 的主要靶器官为垂体,而本研究发现, *MCHR1* 和 *MCHR2* 的主要靶器官分别为鳃和有眼侧皮肤,提示 *MCHR* 介导 *MCH* 的生理功能可能是通过旁分泌和自分泌的信号途径。与无眼侧黑化皮肤和正常皮肤相比,有眼侧皮肤中 *MCH* 和 *MCHR* 的表达水平都显著升高。同时,在无眼侧黑化皮肤中的 *MCH1* 和 *MCHR1* 表达水平显著高于无眼侧正常皮

肤,而无眼侧黑化皮肤中 *MCH2* 和 *MCHR2* 表达水平显著低于无眼侧正常皮肤。由此说明, *MCH/MCHR* 信号系统在有眼侧体色调控和无眼侧黑化调控过程中可能存在协同作用,但具体的作用途径和机制尚需深入研究验证。

Takahashi 等(2004)在条斑星鲷 *MCHR* 的研究中发现, *MCH* 通过与 *MCHR* 结合控制着色素细胞中黑色素颗粒的聚合。条斑星鲷有眼侧皮肤中, *MCH* 通过与 *MCHR2* 特异结合调控体色以适应不同环境背景的变化,如白色养殖环境下有眼侧皮肤 *MCHR2* mRNA 表达量低于黑色养殖环境,表明 *MCHR2* 可能直接参与了对养殖环境的适应调控(Takahashi *et al.*, 2007)。本研究初步揭示了 *MCHR* 与无眼侧黑化发生过程的关系,结合 *MCH* 的表达情况,发现在无眼侧黑化程度不同的半滑舌鲷垂体中, *MCH1* 和 *MCHR1* 具有互补表达的变化趋势,即无眼侧 10%黑化鱼垂体 *MCH1* 达峰值后显著下降,而 *MCHR1* 在 10%黑化鱼中表达开始升高,而在 50%黑化鱼中达峰值并在 80%黑化鱼中保持较高水平,这种互补表达特性提示了 *MCH* 与 *MCHR* 之间可能存在协同调控作用。皮肤中 *MCH1* 与 *MCHR1* 也存在类似的协同表达调控关系,其具体的信号通路尚需进一步研究。作者还发现,垂体和皮肤中的 *MCH1* 与 *MCHR2* 都分别存在类似的表达变化趋势, *MCH* 可能与 *MCHR1*、*MCHR2* 同时结合而发挥生理功能。有趣的是,我们发现半滑舌鲷垂体和皮肤中 *MCH2* 与 *MCHR1*、*MCHR2* 也具有类似的表达调控关系。综上所述, *MCH/MCHR* 系统对半滑舌鲷无眼侧黑化性状发生和发展的过程具有重要的调控作用,但 *MCH/MCHR* 结合作用途径及机制尚不明了。目前研究尚无法确定哪种因子是参与无眼侧黑化调控的关键因子,通过构建基因敲除型模式鱼类可能为基因的功能解析提供支撑,探明 *MCH/MCHR* 信号系统对无眼侧黑化的调控作用机制将有利于建立实用的体色调控技术。

## 参 考 文 献

- An S, Cutler G, Zhao JJ, *et al.* Identification and characterization of a melanin-concentrating hormone receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98(13): 7576-7581
- 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

- Chambers J, Ames RS, Bergsma D, *et al.* Melanin-concentrating hormone is the cognate ligand for the orphan G-protein-coupled receptor SLC-1. *Nature*, 1999, 400(6741): 261–265
- Deng JY, Meng TX, Ren SM, *et al.* Composition and quantity distribution of the Bohai Sea fish species. *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]
- Forray C. The MCH receptor family: Feeding brain disorders? *Current Opinion in Pharmacology*, 2003, 3(1): 85–89
- Griffond B, Baker BI. Cell and molecular cell biology of melanin concentrating hormone. *International Review of Cytology*, 2002, 213(4): 233–277
- Hill J, Duckworth M, Murdock P, *et al.* Molecular cloning and functional characterization of MCH2, a novel human MCH receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(23): 20125–20129
- Jiang YW, Wang JR, Chen RS, *et al.* Artificial fry rearing of *Cynoglossus semilaevis* Günther in Bohai Sea. *Marine Fisheries Research*, 1993, 14: 25–33 [姜言伟, 万瑞景, 陈瑞盛, 等. 渤海半滑舌鳎人工育苗工艺技术的研究. *海洋水产研究*, 1993, 14: 25–33]
- 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
- Kawauchi H, Baker BI. Melanin-concentrating hormone signaling systems in fish. *Peptides*, 2004, 25(10): 1577–1584
- Kawauchi H, Kawazoe I, Tsubokawa M. Characterization of melanin concentrating hormone in chum salmon pituitaries. *Nature*, 1983, 305(5932): 321–323
- Kawauchi H. Functions of melanin-concentrating hormone in fish. *Journal of Experimental Zoology Part A Comparative Experimental Biology*, 2006, 305(9): 751–760
- Kishida M, Baker BI, Eberle AN. The measurement of melanin concentrating hormone in trout blood. *General and Comparative Endocrinology*, 1989, 74(2): 221–229
- Lakaye B, Minet A, Zorzi W, *et al.* Cloning of the rat brain cDNA encoding for the SLC-1 G protein-coupled receptor reveals the presence of an intron in the gene. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1998, 1401(2): 216–220
- Leμπο PM, Grazzini E, Cao J, *et al.* The receptor for the orexigenic peptide melanin-concentrating hormone is a G-protein-coupled receptor. *Nature Cell Biology*, 1999, 1(5): 267–271
- Li ZJ, Yang LJ, Wang J, *et al.*  $\beta$ -Actin is a useful internal control for tissue-specific gene expression studies using quantitative real-time PCR in the half-smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis* challenged with LPS or *Vibrio anguillarum*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2010, 29(1): 89–93
- Liu XZ, Zhuang ZM. *Reproduction biology and culture technology of half-smooth tongue sole Cynoglossus semilaevis*. Beijing: China Agriculture Press, 2014, 1–10 [柳学周, 庄志猛. 半滑舌鳎繁育理论与养殖技术. 北京: 中国农业出版社, 2014, 1–10]
- 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
- Logan DW, Bryson-Richardson RJ, Pagán KE, *et al.* The structure and evolution of the melanocortin and MCH receptors in fish and mammals. *Genomics*, 2003, 81(2): 184–191
- 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
- Mori M, Harada M, Terao Y, *et al.* Cloning of a novel G protein-coupled receptor, SLT, a subtype of the melanin-concentrating hormone receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2001, 283(5): 1013–1018
- Pissios P, Maratos-Flier E. Melanin-concentrating hormone: From fish skin to skinny mammals. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 2003, 14(5): 243–248
- Rodriguez M, Beauverger P, Naime I, *et al.* Cloning and molecular characterization of the novel human melanin-concentrating hormone receptor MCH2. *Molecular Pharmacology*, 2001, 60(4): 632–639
- Saito Y, Nothacker HP, Wang Z, *et al.* Molecular characterization of the melanin-concentrating-hormone receptor. *Nature*, 1999, 400(6741): 265–269
- Suzuki M, Narnaware YK, Baker BI, *et al.* Influence of environmental colour and diurnal phase on MCH gene expression in the trout. *Journal of Neuroendocrinology*, 1995, 7(4): 319–328
- Takahashi A, Kobayashi Y, Amano M, *et al.* Structural and functional diversity of proopiomelanocortin in fish with special reference to barfin flounder. *Peptides*, 2009, 30(7): 1374–1382
- 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
- Takahashi A, Tsuchiya K, Yamanome T, *et al.* Possible involvement of melanin concentrating hormone in food intake in a teleost fish, barfin flounder. *Peptides*, 2004, 25(10): 1613–1622
- Tan CP, Sano H, Iwaasa H, *et al.* Melanin-concentrating hormone receptor subtypes 1 and 2: Species-specific gene expression. *Genomics*, 2002, 79(6): 785–792
- 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
- Wang S, Behan J, O'Neill K, *et al.* Identification and pharmacological characterization of a novel human melanin-concentrating hormone receptor, mch-r2. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(37): 34664–34670

## Molecular Characterization of *MCHR* and Its Corelation with Blind-Side Hypermelanosis in *Cynoglossus semilaevis*

SHI Xueying<sup>1,3</sup>, LIU Xuezhou<sup>1,2①</sup>, SHI Ying<sup>4</sup>, XU Yongjiang<sup>1,2</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; 4. Qingdao Extension Station of Fisheries Technology, Qingdao 266071)

**Abstract** The full-length cDNA of melanin concentration hormone receptor (*MCHR*) was isolated from the brain of *Cynoglossus semilaevis* using RACE (rapid amplification of cDNA ends) method. The spatial and temporal expression patterns of *MCHR* mRNA in different tissues were analyzed to link with the degree of pigmentation on the blind-side of fish by the quantitative real-time PCR. Results showed that *C. semilaevis* *MCHR1* cDNA sequence was 1685 bp in length and contained a 642 bp of open reading frame encoding 359 amino acids. It shared 83.3% identity with *Paralichthys olivaceus*. Based on the phylogenetic analysis, *C. semilaevis* *MCHR1* was clustered with the Pleuronectiformes, Cyprinodontiformes and Perciformes species. In addition, *C. semilaevis* *MCHR2* cDNA sequence was 1626 bp in length and contained a 1044 bp of open reading frame encoding 347 amino acids. The identity was more than 90% homology to pleuronectiformes species. *C. semilaevis* *MCHR2* was clustered with the pleuronectiformes and perciformes species based on the phylogenetic analysis. *MCHR1* mRNA was mainly expressed in gill and *MCHR2* mRNA was primarily expressed in the eye-side skin, followed by gonad. The spatial expression patterns of *MCHR* mRNA implied that *MCHR* regulates the physiology of *C. semilaevis* through endocrine, paracrine and autocrine pathways. Pituitary *MCHR1* mRNA level significantly increased during the initial stage of blind-side pigmentation and peaked when fish had 50% pigmentation on the blind-side. By comparison, skin *MCHR1* mRNA maintained at high levels during the pigmentation occurring on the blind-side of fish. Both pituitary and skin *MCHR2* mRNA levels peaked when fish had about 10% blind-side pigmentation, then significantly decreased as the degree of pigmentation reduced. The results showed that the *MCHR* is directly or indirectly involved in the regulation of blind-side hypermelanosis in half-smooth tongue sole.

**Key words** *Cynoglossus semilaevis*; Melanin concentration hormone receptor; Gene cloning; Expression regulation; Hyperpigmentation on blind side

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