

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20201009001

http://www.yykxjz.cn/

胡伟, 吴慧, 袁汉文, 郜卫华, 陈敦学, 郭利伟, 许巧情. 草鱼褪黑激素受体 *Mtnr1* 基因克隆及组织表达分析. 渔业科学进展, 2022, 43(1): 141-152

HU W, WU H, YUAN H W, GAO W H, CHEN D X, GUO L W, XU Q Q. Molecular cloning and expression analysis of the melatonin receptor gene in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(1): 141-152

草鱼褪黑激素受体 *Mtnr1* 基因克隆及组织表达分析*

胡伟^{1,2} 吴慧² 袁汉文^{1①} 郜卫华^{1①} 陈敦学³ 郭利伟¹ 许巧情¹

(1. 长江大学 湿地生态与农业利用教育部工程研究中心 湖北 荆州 434023; 2. 湖南师范大学 省部共建淡水鱼类发育生物国家重点实验室 湖南 长沙 410081; 3. 贵州大学动物科学学院 贵州 贵阳 550025)

摘要 为了探究褪黑激素受体(melatonin receptor, *Mtnr1*)基因在草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)中的表达模式和功能, 采用 RACE 技术从草鱼组织中克隆获得 *Mtnr1* 基因的 6 个亚型(*Mtnr1Aa*、*Mtnr1Ab*、*Mtnr1Alike*、*Mtnr1Ba*、*Mtnr1Bb* 和 *Mtnr1C*)的 cDNA 序列, 采用 ProtParam、TMpred、NetPhos、NetNGlyc、Signal4.1 及 Phyre2 等在线软件对 *Mtnr1* 基因的 6 种亚型进行生物信息学分析。同时, 通过实时荧光定量 PCR 检测 6 种亚型在不同组织中的表达。结果显示, *Mtnr1* 基因 6 个亚型 cDNA 全长分别为 2045、2036、2031、2799、2535 和 2477 bp, 分别编码 350、351、344、356、347 和 361 个氨基酸。6 种亚型均由 7 个跨膜结构域、NRY 结构域、CYICHS 结构域和 NAXXY 结构域及 G 蛋白偶联受体结合位点组成, 同时含有多个磷酸化位点和糖基化位点。*Mtnr1* 基因 6 个亚型蛋白均由 20 种氨基酸组成, 均属于稳定的亲水性蛋白。氨基酸序列比较分析发现, 6 种亚型与其他鱼对应的亚型同源性很高, 分别为 93.1%~99.4%、84.8%~95.2%、82.8%~96.8%、90.1%~97.5%、79.7%~98.3%和 90.6%~95.6%。邻接法构建系统进化树显示, 6 种亚型均与鲤科(Cyprinidae)鱼类聚为一支, 与鲤鱼(*Cyprinus carpio*)、鲫鱼(*Carassius auratus*)和斑马鱼(*Danio rerio*)亲缘关系最近。此外, 6 种亚型 mRNA 在草鱼肝脏、心脏、鳃、脑、肌肉、前肠、中肠、后肠和肾脏 9 个组织中均有表达, 其中, *Mtnr1Aa* 和 *Mtnr1Ba* 基因分别在脑和肾脏中表达量最高, 表明 *Mtnr1Aa* 和 *Mtnr1Ba* 可能在草鱼的神经调节和免疫反应中发挥重要作用。

关键词 褪黑激素受体; 草鱼; 分子克隆; 组织表达

中图分类号 S917.4 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2022)01-0141-12

褪黑激素(melatonin)是一种广泛分布于动物、植物、细菌和真菌中的天然小分子物质(Xu *et al.*, 2017)。在哺乳动物中, 褪黑激素主要由下丘脑中的松果体在夜间分泌, 在性腺、骨髓、视网膜、晶状体、肾脏和

* 省部共建淡水鱼类发育生物国家重点实验室开放课题基金(2019KF010)、湿地生态与农业利用教育部工程研究中心(KF201913)和黔科合支撑([2019]2344)共同资助 [This work was supported by State Key Laboratory of Developmental Biology of Freshwater Fish (2019KF010), the Engineering Research Center of Ecology and Agricultural Use of Wetland, Ministry of Education (KF201913), and Guizhou National Science and Technology Support Program ([2019]2344)]. 胡伟, E-mail: huwei19872006@163.com

① 通讯作者: 袁汉文, 副教授, E-mail: hanwen_yuan@126.com; 郜卫华, 副教授, E-mail: gwh105@126.com

收稿日期: 2020-10-09, 收修改稿日期: 2020-10-29

肝脏等组织中也有发现(Carpentieri *et al.*, 2012; Acuña-Castroviejo *et al.*, 2014)。褪黑激素不仅具有调节昼夜节律、清除自由基的作用(Han *et al.*, 2017), 还能通过内分泌、旁分泌和自分泌方式保护细胞抗氧化和炎症损伤、改善胰岛素抵抗(Heo *et al.*, 2018)、调控生殖发育(Maitra *et al.*, 2016)、调节脂质代谢(Yang *et al.*, 2017)和控制血压(de Berardis *et al.*, 2013)。褪黑激素还能参与维持神经元的内稳态(Hermoso *et al.*, 2016)和保护机体免疫系统的功能(艾克拜尔·热合曼等, 2018; Zhang *et al.*, 2019)。

褪黑激素的功能主要通过与其高亲和力的特异性褪黑激素受体(melatonin receptor, *Mtnr1*)结合, 再进一步启动信号级联反应, 参与细胞内各种生理过程。*Mtnr1* 属于 G 蛋白偶联受体超级家族(Brydon *et al.*, 1999), 与其他 G 蛋白偶联受体结构相似, 包括 7 个跨膜域、1 个 G 蛋白结合位点、多个磷酸化以及糖基化位点(Klosen *et al.*, 2019)。另外, 第 3 跨膜域的下游含有 NRY 结构域和 C(C/Y) ICHS 结构域, 第 7 跨膜域中存在 NPXXY 结构域(Reppert *et al.*, 1995b; Klosen *et al.*, 2019)。*Mtnr1* 在脊椎动物中存在 3 种不同亚型, 分别为 *Mtnr1A* (Mel 1a 或 MT1)、*Mtnr1B* (Mel 1b 或 MT2)和 *Mtnr1C* (Mel 1c 或 GPR50) (Reppert *et al.*, 1995a), 而哺乳动物中仅有前 2 种亚型: *Mtnr1A* 和 *Mtnr1B* (Gaildrat *et al.*, 2000), 仅在鱼类等低等脊椎动物中发现第 3 种亚型 *Mtnr1C* (Dufourny *et al.*, 2008)。此外, 鱼类特有基因组加倍事件导致 *Mtnr1A* 和 *Mtnr1B* 存在多个不同亚型, 如斑马鱼(*Danio rerio*) *Mtnr1Aa* 和 *Mtnr1Ab* (Reppert *et al.*, 1995b); 虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*) *Mtnr1Aa*、*Mtnr1Ab* 和 *Mtnr1B* (Mazurais *et al.*, 1999); 星点东方鲀(*Takifugu niphobles*) *Mella1.4*、*Mella1.7* 和 *Mellb* (Ikegami *et al.*, 2009b); 大弹涂鱼(*Boleophthalmus pectinirostris*) *Mella1.4*、*Mella1.7* 和 *Mellb* (朱文博等, 2012; Hong *et al.*, 2014); 大西洋鲑(*Salmo salar*) *Mtnr1Aa*、*Mtnr1Aaβ*、*Mtnr1Ab*、*Mtnr1al* 和 *Mtnr1B* (Ciani *et al.*, 2019); 金鱼(*Carassius auratus*) *Mella1.4*、*Mella1.7* 和 *Mellb* (Ikegami *et al.*, 2009a)。值得注意的是, *Mtnr1* 广泛参与机体神经调节(Klosen *et al.*, 2019)、节律同步(Ikegami *et al.*, 2009b)、内分泌激素合成(Ciani *et al.*, 2019)和生长繁殖(Ikegami *et al.*, 2009b; Hong *et al.*, 2014)等生理活动。例如, 敲除 *Mtnr1A* 基因后的小鼠表现出焦虑、类似抑郁症, 增加了奖励和上瘾倾向, 降低了快速眼动睡眠(Comai *et al.*, 2019), 生理节律(包括年生殖节律)也发生改变(Ng *et al.*, 2017)。另外,

Mtnr1 在机体的细胞和体液免疫反应过程发挥积极作用, 如在人(*Homo sapiens*)淋巴细胞(Jurkat)和单核细胞(U937)研究中发现, 褪黑激素能通过 *Mtnr1* 增强其白细胞介素 IL-2 和 IL-6 分泌(García-Mauriño *et al.*, 2000), 添加 *MtnrB* 抑制剂 Luzindole 后, 不仅降低了人淋巴细胞中 IL-2 和 IL-2 受体的分泌(Carrillo-Vico *et al.*, 2004), 还增强了前列腺素 E2 对 IL-2 的抑制效果(Carrillo-Vico *et al.*, 2005)。此外, 褪黑激素能促进野生型和 *MtnrA* 敲除型小鼠脾淋巴细胞增殖, 而抑制 *MtnrA* 蛋白后增殖现象消失(Drazen *et al.*, 2001)。这些研究证实了 *Mtnr1* 参与哺乳动物神经活动和免疫过程, 但有关硬骨鱼类 *Mtnr1* 的研究仍处于起步阶段。

草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)是我国重要的淡水经济鱼类, 其 2018 年产量达到 550 万 t (农业农村部渔业渔政管理局等, 2019)。草鱼疾病的暴发与其免疫调节能力密切相关, 褪黑激素在机体免疫过程中具有重要作用, *Mtnr1* 是褪黑激素发挥生理功能的关键受体分子, 因此, 解析 *Mtnr1* 基因在草鱼免疫调节中的功能对草鱼疾病的免疫防治具有重要意义。本研究以草鱼为研究对象, 克隆得到 *Mtnr1* 基因 6 种异构性的全长 cDNA 序列, 通过生物信息学技术, 研究不同亚型的序列和结构特征, 同时, 采用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR)检测 6 种亚型在不同组织/器官中的分布和表达模式, 研究结果可为 *Mtnr1* 在脊椎动物中的进化补充数据, 同时, 可为后续深入研究其基因功能以及揭示 *Mtnr1* 在草鱼免疫过程中的作用奠定分子基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验草鱼购自湖北荆州水产市场, 大小规格为 (1.00±0.25) kg, 暂养在实验室循环养殖系统 2 周。水温为 (24±2) °C。饱食投喂 2 次/d (09:00 和 17:00)。暂养结束后, 饥饿 24 h 取样, 用 MS-222 (10 mg/L)麻醉鱼体, 在冰上迅速取出其肝脏、心脏、鳃、脑、肌肉、前肠、中肠、后肠和肾脏 9 个组织, 液氮速冻后, 存于 -80 °C 冰箱备用。

1.2 实验方法

1.2.1 总 RNA 的提取和 cDNA 的合成 采用 Total RNA kit I 提取试剂盒(Omega, 美国)提取总 RNA, 使用 1%的琼脂糖凝胶电泳和超微量核酸蛋白测定仪 (Thermo Scientific, 美国)检测 RNA 完整性和浓度。

利用 MonScript™ RT III Super Mix with dsDNase (two-step) (莫纳, 苏州) 合成 cDNA, 严格按照试剂盒说明书操作, PCR 产物保存于 -20℃。

1.2.2 草鱼 *Mtnr1* 基因全长 cDNA 克隆 利用斑马鱼、鲤鱼 (*Cyprinus carpio*)、鲫鱼 (*Carassius auratus*) 以及哺乳动物人类、褐家鼠 (*Rattus norvegicus*) 等已公布 *Mtnr1A*、*Mtnr1B* 和 *Mtnr1C* 基因序列, 比对保守区域后设计引物 (表 1), 进行扩增实验。再基于获得的部分 cDNA 序列, 分别利用 RACE 技术, 按照 RACE 试剂盒 (TaKaRa) 对 *Mtnr1* 的 5' 和 3' 端进行扩增。扩增产物测序正确后, 通过 DNASStar 软件拼接获得完整的 cDNA 序列。

1.2.3 *Mtnr1* 基因序列分析 利用 NCBI 中 Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) 分析获得的 *Mtnr1* 不同亚型 cDNA 序列的正确性。通过 NCBI 网站的 ORF Finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 查找 *Mtnr1* 不同亚型的 ORF 框。使用 ExPASy (<http://web.expasy.org/translate/>) 翻译 *Mtnr1* 不同亚型 cDNA 编码蛋白序列。利用 ProtParam 在线软件预测 *Mtnr1* 不同亚型的蛋白基本理化特性 (<https://web.expasy.org/protparam/>)。通过 Tmpred 在线软件对 *Mtnr1* 不同亚型的跨膜域进行预测 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/#opennewwindow>)。并采用 Singal4.1 软件预测其信号肽。采用 Phyre2 软件对 *Mtnr1* 不同亚型蛋白质的三级结构进行预测 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>)。利用 Cell-PLoc2.0 在线软件 (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc-2/>) 预测 *Mtnr1* 的亚细胞定位。通过 NetPhos 和 NetNGlyc 软件分别对蛋白磷酸化位点 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) 和糖基化位点 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) 进行分析。采用 ClustalW 软件对 *Mtnr1* 不同亚型不同物种间进行序列比对和一致性分析。最后利用 MEGA 5.2 软件, 以邻接法 (NJ) 对 *Mtnr1* 构建系统进化树, 设定 bootstrap 值为 1000。

1.2.4 草鱼 *Mtnr1* 基因的表达模式 随机选取 4 条暂养后的草鱼, 分别提取 9 个不同组织 (肝脏、心脏、鳃、脑、肌肉、前肠、中肠、后肠和肾脏) 的总 RNA, 设置 4 个生物学重复。以总 RNA 为模板, 按照 MonScript™ RT III Super Mix with dsDNase (莫纳, 苏州) 说明书合成 cDNA, 并将 cDNA 稀释 10 倍作为 RT-qPCR 模板, 保存于 -20℃ 备用。*Mtnr1* 基因的组织表达模式测定方法参考侯吉伦等 (2019): 依据克隆获得的草鱼 *Mtnr1* 基因序列, 利用 Primer 5.0 软件, 设计 *Mtnr1* 基因 RT-qPCR 定量引物 RT-F 和 RT-R,

并以 β -actin 为内参基因 (表 1)。根据说明书设置定量反应体系: SYBR® fast qPCR master mix II 20 μ L, cDNA 模板 4 μ L, 引物各 0.5 μ L。RT-qPCR 反应程序: 95℃ 5 min; 95℃ 15 s, 60℃ 30 s, 72℃ 20 s, 共 40 个循环。利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法 (Livak *et al.*, 2002) 检测 *Mtnr1* 不同亚型在不同组织中的表达模式。

1.3 统计分析

实验结果均采用平均值 \pm 标准误 (Mean \pm SE) 表示, 为确保实验过程中数据的准确性, 设置 4 个生物学重复, 每个生物学重复设置 3 个技术重复。采用 SPSS 18.0 进行统计分析, 采用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 的 Tukey 法对 *Mtnr1* 不同亚型的相对表达量进行两两比较, 显著性水平设置为 0.05。

2 结果与分析

2.1 *Mtnr1* 基因亚型 cDNA 序列分析

利用 DNASStar 将克隆获得的 cDNA 进行拼接, 并通过 NCBI 中的 Blast 对获取的序列进行正确性验证, 本实验克隆得到草鱼 6 个 *Mtnr1* cDNA 序列, 分别为 *Mtnr1Aa*、*Mtnr1Ab*、*Mtnr1Alike*、*Mtnr1Ba*、*Mtnr1Bb* 和 *Mtnr1C*, 并将其提交至 NCBI 的 GenBank, 序列号分别为 MT883605、MT883607、MT883608、MT883606、MT883609 和 MT883610, 其全长分别为 2045、2036、2031、2799、2535 和 2477 bp (表 2)。ProtParam 软件预测发现, 草鱼 *Mtnr1* 基因编码蛋白的氨基酸数、分子量和等电点分别见表 2。*Mtnr1Aa*、*Mtnr1Ab*、*Mtnr1Alike*、*Mtnr1Ba*、*Mtnr1Bb* 和 *Mtnr1C* 基因编码蛋白均由 20 种氨基酸组成, 含量最高的氨基酸分别为缬氨酸 (12.6%)、缬氨酸 (11.3%)、亮氨酸 (11.6%)、亮氨酸 (13.0%)、亮氨酸 (11.6%) 和亮氨酸 (12.5%), 含量最低的氨基酸分别为色氨酸 (1.7%)、组氨酸 (1.4%)、谷氨酰胺 (1.5%)、组氨酸 (1.1%)、组氨酸 (1.2%) 和组氨酸 (1.4%)。带正 (负) 电氨基酸残基数分别为 28 (17)、18 (32)、19 (33)、17 (35)、16 (30) 和 11 (31)。原子组成分别为 $C_{1853}H_{2853}N_{461}O_{475}S_{18}$ 、 $C_{1877}H_{2905}N_{463}O_{479}S_{17}$ 、 $C_{1836}H_{2845}N_{463}O_{458}S_{15}$ 、 $C_{1820}H_{2883}N_{489}O_{470}S_{18}$ 、 $C_{1819}H_{2825}N_{463}O_{463}S_{13}$ 和 $C_{1839}H_{2885}N_{481}O_{484}S_{20}$ 。蛋白质不稳定系数分别为 35.19、35.32、30.93、38.67、35.74 和 34.75, 均属于稳定蛋白。总平均亲水性分别为 0.560、0.560、0.556、0.490、0.675 和 0.502, 均为亲水性蛋白。脂肪酸指数分别为 113.77、116.36、120.90、115.24、119.28 和 109.58。

表1 草鱼褪黑激素受体 *Mtnr1* 基因克隆扩增引物
Tab.1 Amplification primers used for cloning *Mtnr1* genes from *C. idella*

引物 Primer	序列 Sequence (5'~3')	片段大小 Size/bp	
ORF 克隆引物 Primers for ORF cloning	<i>Mtnr1Aa</i> F	TGGGCGTCAGTGTAAATCGG	674
	<i>Mtnr1Aa</i> R	GAGTCTTTTCTTGGGCTTCA	
	<i>Mtnr1Ab</i> F	CTCCCTGGGTCGCCACAAC	633
	<i>Mtnr1Ab</i> R	CGTCGTGAGGCGTGAGTTT	
	<i>Mtnr1Alike</i> F	GGAAATCGGGACAGCAAAT	712
	<i>Mtnr1Alike</i> R	CCAGCAGACAGCGAACAAC	
	<i>Mtnr1Ba</i> F	CTCGGTGCTCAGAAATAGAAA	480
	<i>Mtnr1Ba</i> R	CACCCAAATCCTCAGATAACA	
	<i>Mtnr1Bb</i> F	CGGAAACTGAGAAATGCTG	853
	<i>Mtnr1Bb</i> R	TGATGGCTGGCGAGGGTTT	
	<i>Mtnr1C</i> F	GGTCGGTCTTCAACATCAC	547
	<i>Mtnr1C</i> R	CAACCCATAAACAACAGCAT	
RT-qPCR 引物 Primers for RT-qPCR	<i>Mtnr1Aa</i> F	GGTGATTTTCTCCGTCT	153
	<i>Mtnr1Aa</i> R	ATGTATCCCAGGTTCCA	
	<i>Mtnr1Ab</i> F	CCTTACGAGACCACGCT	247
	<i>Mtnr1Ab</i> R	ATCCCAAGTTCCATCCA	
	<i>Mtnr1Alike</i> F	GAGGATGGTGGAGGGAA	261
	<i>Mtnr1Alike</i> R	AGGACGAGTGGGTAGGG	
	<i>Mtnr1Ba</i> F	CTCGGTGCTCAGAAATA	105
	<i>Mtnr1Ba</i> R	ACCAGAGGGTAGGGATA	
	<i>Mtnr1Bb</i> F	AACCTCGGAGAACAAGT	283
	<i>Mtnr1Bb</i> R	GGGTAGGGATAGAAAGC	
	<i>Mtnr1C</i> F	GACTCTATTCACGCCAG	209
	<i>Mtnr1C</i> R	GCAGAAAGAAACCACAC	
β -actinF	CGTGACATCAAGGAGAAG	115	
β -actinR	GAGTTGAAGGTGGTCTCAT		

表2 草鱼褪黑激素受体 *Mtnr1* cDNA 基本信息
Tab.2 The information of *Mtnr1* cDNA of *C. idella*

项目 Items	<i>Mtnr1Aa</i>	<i>Mtnr1Ab</i>	<i>Mtnr1Alike</i>	<i>Mtnr1Ba</i>	<i>Mtnr1Bb</i>	<i>Mtnr1C</i>
全长 Full length /bp	2045	2036	2031	2799	2535	2477
开放阅读框 ORF /bp	1053	1056	1035	1071	1044	1086
5'非翻译区 5'-Untranslated region (UTR)/bp	325	410	550	1001	506	267
3'非翻译区 3'-Untranslated region (UTR)/bp	667	570	446	727	1491	1124
分子量 Molecular weight/kDa	39.765	39.794	39.213	39.868	39.005	40.118
等电点 Isoelectric point (pI)	9.19	9.42	9.39	9.97	9.68	9.68
氨基酸数 Number of amino acids	350	351	344	356	347	361
跨膜域 Transmembrane domain	7	7	7	7	7	7
GenBank 登录号 GenBank accession No.	MT883605	MT883607	MT883608	MT883606	MT883609	MT883610

2.2 *Mtnr1* 亚型蛋白结构分析

利用 TMpred 在线软件对草鱼 *Mtnr1* 的 6 种亚型蛋白跨膜域进行分析。结果显示, 草鱼 *Mtnr1* 的 6 种亚型均存在 7 个跨膜结构, 包括 N 端、跨膜区域、细胞膜内和膜外区域以及 C 端, 表明其为非膜内蛋白。通过 Cell-PLoc 2.0 在线软件预测 *Mtnr1* 的 6 种亚型编码蛋白亚细胞定位, 显示均定位于细胞膜。通过 SignalP4.1 预测草鱼 *Mtnr1* 的 6 种基因编码蛋白质的氨基酸序列, 均未发现信号肽序列, 说明 6 种亚型编码蛋白均为非分泌型蛋白。利用 Phyre2 在线软件构造草鱼 *Mtnr1* 的 6 种模拟蛋白 3D 亚型与人 *Mtnr1A* 和 *Mtnr1B* 蛋白以及斑马鱼的 6 种模拟结构对比, 结果显示, 蛋白结构较为相似(图 1)。此外, 通过多重氨基酸序列比较可知, *Mtnr1* 的 6 种亚型具有 NRY 结构域、CYICHS 结构域、NAXXY 结构域和 G 蛋白偶联受体结合位点(图 2)。利用 NetNGlyc 1.0 和 NetPhos 3.1 预测功能位点, 结果发现, 6 种亚型受体的糖基化位点和磷酸化位点数分别为 *Mtnr1Aa* (Asn⁴、Asn⁹ 和 Asn^{117/22}、*Mtnr1Ab* (Asn⁷、Asn¹³ 和 Asn¹²¹)/28、*Mtnr1Alike* (Asn³⁷ 和 Asn¹⁴⁴)/17、*Mtnr1Ba* (Asn⁴、Asn¹⁰ 和 Asn¹²²)/24、*Mtnr1Bb*(Asn¹⁰ 和 Asn¹²¹)/25 和 *Mtnr1C* (Asn⁷、Asn²⁵ 和 Asn¹²¹)/30。

2.3 *Mtnr1* 同源性及系统进化分析

基于 ClustalW, 对草鱼 *Mtnr1* 的 6 种不同亚型编码的氨基酸序列同已有物种的 *Mtnr1* 序列同源性进行比较分析, 结果见表 3。6 种亚型与其他鱼对应的亚型同源性很高, 分别为 93.1%~99.4%、84.8%~95.2%、82.8%~96.8%、90.1%~97.5%、79.7%~98.3%

和 90.6%~95.6%。另外, 运用 MEGA 5.2 软件构建草鱼 *Mtnr1* 的 6 种亚型氨基酸序列的系统进化树(图 3), Bootstrap 重复次数设为 1000 次迭代。结果表明, 构建的进化树与氨基酸的多重比较结果较一致。草鱼 *Mtnr1* 的 6 种亚型均与其他鱼类的对应亚型聚为一支, 且与鲤鱼、鲫鱼和斑马鱼亲缘关系最近。

2.4 草鱼 *Mtnr1* 组织表达模式

采用 RT-qPCR 技术检测了 *Mtnr1* 基因在草鱼肝脏、心脏、鳃、脑、肌肉、前肠、中肠、后肠和肾脏 9 个组织的表达情况。结果显示, *Mtnr1* 的 6 种亚型在所检测的组织中均有表达(图 4)。其中, *Mtnr1Aa* 基因在脑组织中表达量最高($P < 0.05$), 肾脏、鳃、中肠、心脏次之, 而在肝脏组织中表达量最低($P < 0.05$)。 *Mtnr1Ab* 基因在脑组织中表达量最高($P < 0.05$), 然后依次为肾脏、肌肉、后肠、肝脏和心脏, 在鳃、前肠及中肠中表达量最低($P < 0.05$), 而鳃、前肠以及中肠之间表达量无显著差异($P > 0.05$)。 *Mtnr1Alike* 基因在肾脏中表达量最高($P < 0.05$), 然后依次为脑、前肠、后肠和中肠, 而在肝脏中表达量最低($P < 0.05$)。 *Mtnr1Ba* 基因 mRNA 水平在脑中表达量最高, 其次在肾脏、前肠和中肠表达量居中, 随后心脏、鳃、肌肉和后肠中表达量次之, 且它们之间无显著性差异($P > 0.05$), 在肝脏中表达量最低($P < 0.05$)。 *Mtnr1Bb* 在脑中含量最高, 其次为心脏, 在其余组织中含量最低且它们之间无显著性差异($P > 0.05$)。 *Mtnr1C* 基因表达量在肾脏组织中最高($P < 0.05$), 其次为脑、中肠和心脏, 在肝脏组织中含量为最低($P < 0.05$)。此外, 从对亚型表达热图可知(图 5), 6 种亚型均在脑和肾脏组

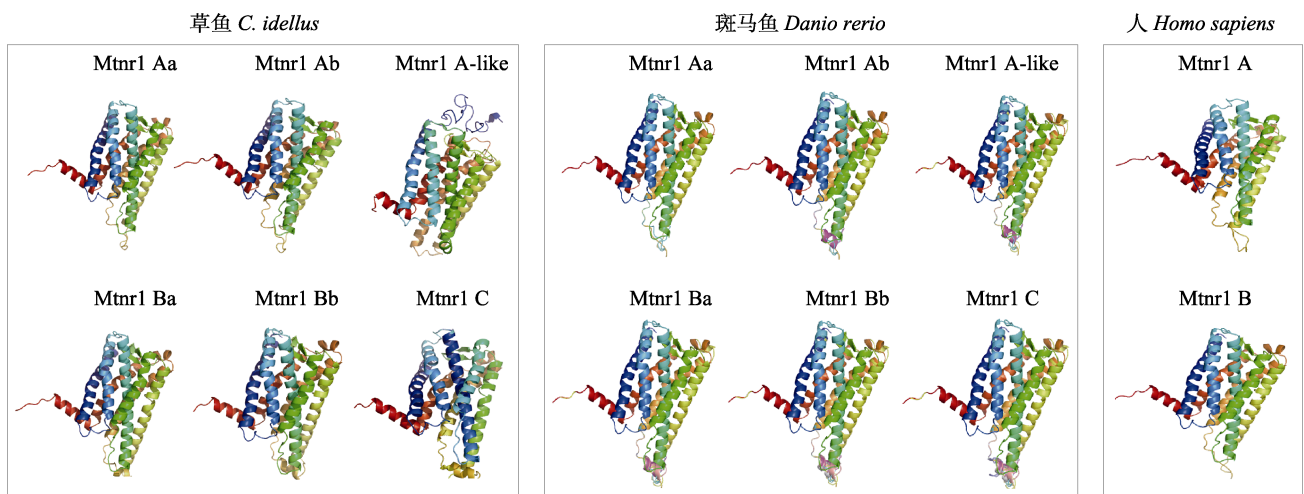


图 1 草鱼、斑马鱼和人的基于 *Mtnr1* 亚型氨基酸序列预测的蛋白 3D 结构

Fig.1 Protein structure prediction of *C. idellus*, *Danio rerio* and *Homo sapiens* based on sequences of *Mtnr1*

表3 草鱼 Mtnr1 氨基酸序列与其他物种对应氨基酸序列的同源性

Tab.3 Homologies of deduced amino acid sequences of six Mtnr1 isoforms gene of *C. idellus* and other species

基因 Gene	物种 Species	GenBank 登录号 GenBank accession No.	同源性 Homology/%		
<i>Mtnr1Aa</i>	斑马鱼	<i>Danio rerio</i>	BC092957.1	98.3	
	鲤鱼	<i>Cyprinus carpio</i>	XP_018944101.1	99.1	
	西藏高原鳅	<i>Triplophysa tibetana</i>	KAA0722433.1	96.3	
	虹鳟	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	XP_021429243.1	93.1	
	鲫鱼	<i>Carassius auratus</i>	XP_026059679.1	99.1	
	南亚黑鲮	<i>Labeo rohita</i>	RXN25576.1	99.4	
	人类	<i>Homo sapiens</i>	EU432127.1	76.5	
	褐家鼠	<i>Rattus norvegicus</i>	EDL78848.1	73.4	
	非洲爪蟾	<i>Xenopus laevis</i>	XP_018098666.1	81.4	
	<i>Mtnr1Ab</i>	斑马鱼	<i>Danio rerio</i>	ENSDART0000053916.7	94.0
鲤鱼		<i>Cyprinus carpio</i>	XP_018934752.1	94.6	
鲫鱼		<i>Carassius auratus</i>	XP_026108656.1	94.3	
南亚黑鲮		<i>Labeo rohita</i>	RXN35264.1	95.4	
滇池金线鲃		<i>Sinocyclocheilus grahami</i>	XP_016147465.1	95.2	
大西洋鲑		<i>Salmo salar</i>	XP_014068290.1	84.8	
人类		<i>Homo sapiens</i>	EU432127.1	77.1	
非洲爪蟾		<i>Xenopus laevis</i>	XP_018098666.1	80.2	
褐家鼠		<i>Rattus norvegicus</i>	EDL78848.1	75.8	
<i>Mtnr1Alike</i>		斑马鱼	<i>Danio rerio</i>	NP_001153381.1	96.5
	鲤鱼	<i>Cyprinus carpio</i>	XP_018970593.1	96.8	
	鲫鱼	<i>Carassius auratus</i>	XP_026081130.1	95.3	
	青鳉	<i>Oryzias latipes</i>	XP_004073660.2	80.8	
	黄颡鱼	<i>Tachysurus fulvidraco</i>	XP_026991627.1	82.8	
	星斑蓝子鱼	<i>Siganus guttatus</i>	ABF67976.1	82.3	
	非洲爪蟾	<i>Xenopus laevis</i>	XP_018124082.1	70.3	
	<i>Mtnr1Ba</i>	斑马鱼	<i>Danio rerio</i>	NM_131395.1	96.3
鲤鱼		<i>Cyprinus carpio</i>	XP_018947444.1	97.2	
鲫鱼		<i>Carassius auratus</i>	XP_026117651.1	96.6	
南亚黑鲮		<i>Labeo rohita</i>	RXN13080.1	97.5	
西藏高原鳅		<i>Triplophysa tibetana</i>	KAA0701767.1	92.4	
红腹水虎鱼		<i>Pygocentrus nattereri</i>	XP_017541760.1	92.5	
遮目鱼		<i>Chanos chanos</i>	XP_030632747.1	90.1	
人类		<i>Homo sapiens</i>	NM_005959.3	59.5	
非洲爪蟾		<i>Xenopus laevis</i>	XP_018105845.1	61.4	
<i>Mtnr1Bb</i>		斑马鱼	<i>Danio rerio</i>	NP_571469	97.7
	鲤鱼	<i>Cyprinus carpio</i>	XP_018945256.1	96.3	
	西藏高原鳅	<i>Triplophysa tibetana</i>	KAA0703961.1	95.4	
	虹鳟	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	XP_021444087.1	79.7	
	鲫鱼	<i>Carassius auratus</i>	XP_026103520.1	96.5	
	南亚黑鲮	<i>Labeo rohita</i>	RXN27147.1	98.3	
	人类	<i>Homo sapiens</i>	NM_005959.3	65.6	
	非洲爪蟾	<i>Xenopus laevis</i>	XP_018105845.1	69.7	
	<i>Mtnr1C</i>	斑马鱼	<i>Danio rerio</i>	NM_001161484.1	95.3
		鲤鱼	<i>Cyprinus carpio</i>	XP_018953519.1	95.6
西藏高原鳅		<i>Triplophysa tibetana</i>	KAA0716666.1	88.2	
鲫鱼		<i>Carassius auratus</i>	BAI65865.1	96.1	
南亚黑鲮		<i>Labeo rohita</i>	RXN29625.1	90.6	
非洲爪蟾		<i>Xenopus laevis</i>	NP_001081388.1	68.8	

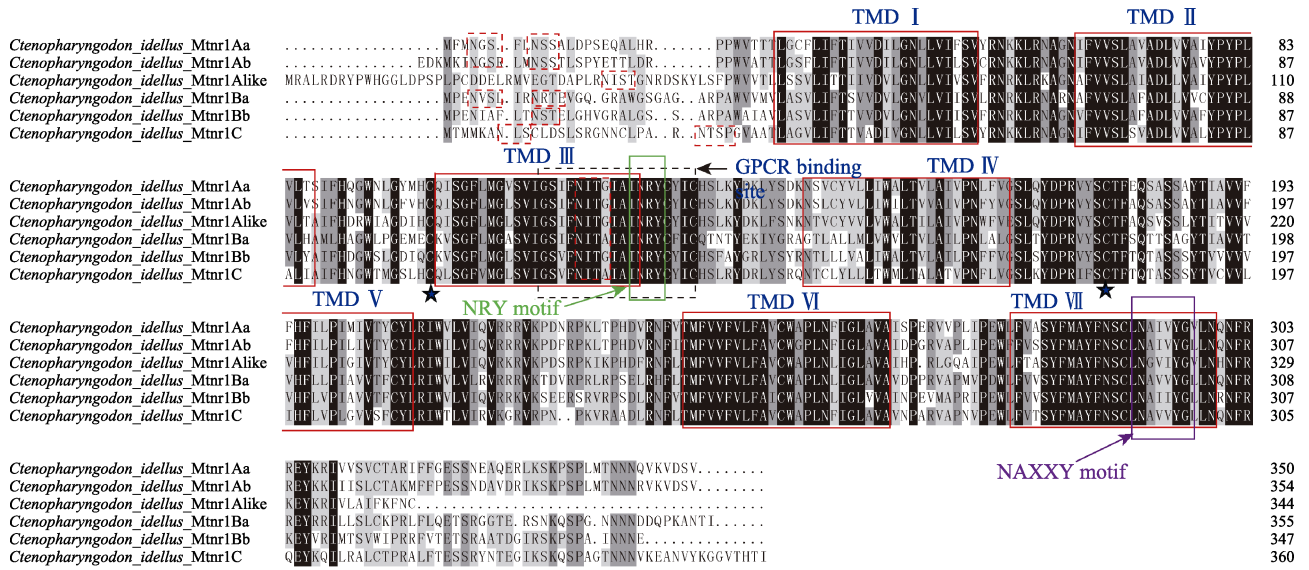


图 2 草鱼不同 *Mtnr1* 亚型氨基酸序列多重比对分析结果

Fig.2 Multiple alignment of the deduced amino acid sequence of grass carp *Mtnr1* subtypes

利用 DNAMAN (V9.0)对亚型氨基酸序列进行多重比对, 保守区域用黑色表示。

红色实线框中分别为 7 个跨膜域(编号 I~VII); 黑色虚线框中为 G-蛋白偶联受体结合位点; 绿色实线框中为 NRY 结构域; 紫色实线框中为 NAXXY 结构域; 红色虚线框为糖基化位点。黑色五角星为半胱氨酸

Multiple alignments were generated using DNAMAN 9.0, and conserved amino acids shaded in black.

Red boxes show seven transmembrane domain (TMD) I~VII. The dotted boxes show the binding site of G-protein coupled receptors. The green box shows conserved NRY motif. The purple box shows the NAXXY motif. The red dot boxes show the NetNGlyc sites. The pentagrams show cysteines

织中大量表达, 其次为肠道组织, 进一步发现, 在脑组织中 *Mtnr1Aa* 基因表达量最高($P<0.05$), 其次为 *Mtnr1Ba*、*Mtnr1C*、*Mtnr1Alike* 和 *Mtnr1Bb*, 而 *Mtnr1Ab* 基因表达量最低($P<0.05$) (图 5)。在肾脏组织中发现 *Mtnr1Ba* 表达量最高, 其次为 *Mtnr1C*、*Mtnr1Alike*、*Mtnr1Aa* 和 *Mtnr1Ab*, 而 *Mtnr1Bb* 基因表达量最低($P<0.05$) (图 5)。另外, 在前肠中发现 *Mtnr1Ba* 基因表达量最高($P<0.05$), 其次为 *Mtnr1Alike*、*Mtnr1C*、*Mtnr1Aa* 和 *Mtnr1Bb*, 而 *Mtnr1Ab* 表达量最低($P<0.05$)。中肠中 *Mtnr1Ba* 基因表达量最高($P<0.05$), 其次为 *Mtnr1C*、*Mtnr1Alike*、*Mtnr1Aa* 和 *Mtnr1Bb*, 而 *Mtnr1Ab* 表达量最低($P<0.05$)。后肠中 *Mtnr1Ba* 和 *Mtnr1Alike* 基因表达量最高($P<0.05$), 且二者之间无显著差异($P>0.05$), 其次为 *Mtnr1C*、*Mtnr1Aa* 和 *Mtnr1Ab*, 而 *Mtnr1Bb* 表达量最低($P<0.05$) (图 5)。

3 讨论

本研究成功克隆得到草鱼 *Mtnr1* 基因 6 个亚型的 cDNA 全长序列, 全长序列长度为 2031~2799 bp, 编码的氨基酸个数为 344~361, 无信号肽序列, 均属于非分泌型蛋白。*Mtnr1* 的 6 种亚型由 7 个跨膜结构(I~

VII)构成, 属于典型的 G 蛋白偶联受体(Shiu *et al*, 1998)。多序列比对结果显示, 草鱼 *Mtnr1* 存在 NRY 结构域、CYICHS 结构域、NAXXY 结构域和 G 蛋白偶联受体结合位点以及多个糖基化和磷酸化位点, 这与大西洋鲑和大弹涂鱼的 *Mtnr1* 基因研究结果一致(Hong *et al*, 2014; Ciani *et al*, 2019; Klosen *et al*, 2019), 暗示草鱼 *Mtnr1* 在进化中具有较高的保守性。另外, 6 种亚型的 3D 结构与斑马鱼和人的 *Mtnr1* 空间结构相似, 进一步证实其进化保守性。同时, 同源性比较发现, 草鱼 *Mtnr1* 基因 6 种亚型(*Mtnr1Aa*、*Mtnr1Ab*、*Mtnr1Alike*、*Mtnr1Ba*、*Mtnr1Bb* 和 *Mtnr1C*) 与其他鱼对应的 *Mtnr1* 亚型同源性很高, 分别为 93.1%~99.4%、84.8%~95.2%、82.8%~96.8%、90.1%~97.5%、79.7%~98.3%、和 90.6%~95.6%。系统进化树结果显示, 草鱼 *Mtnr1* 基因 6 种亚型与鲤鱼、鲫鱼和斑马鱼等鲤科(Cyprinidae)鱼类的各亚型聚为一支, 表明草鱼 *Mtnr1* 与鲤科鱼类亲缘关系较近, 这与它们的进化地位一致。

Mtnr1 的 6 种亚型基因在草鱼脑、肝脏、心脏、鳃、肌肉、前肠、中肠、后肠和肾脏 9 个组织中均有表达, 表明 *Mtnr1* 可能广泛参与机体各种生理活动(Hong *et al*, 2014)。本研究发现, *Mtnr1Aa*、*Mtnr1Ab*、

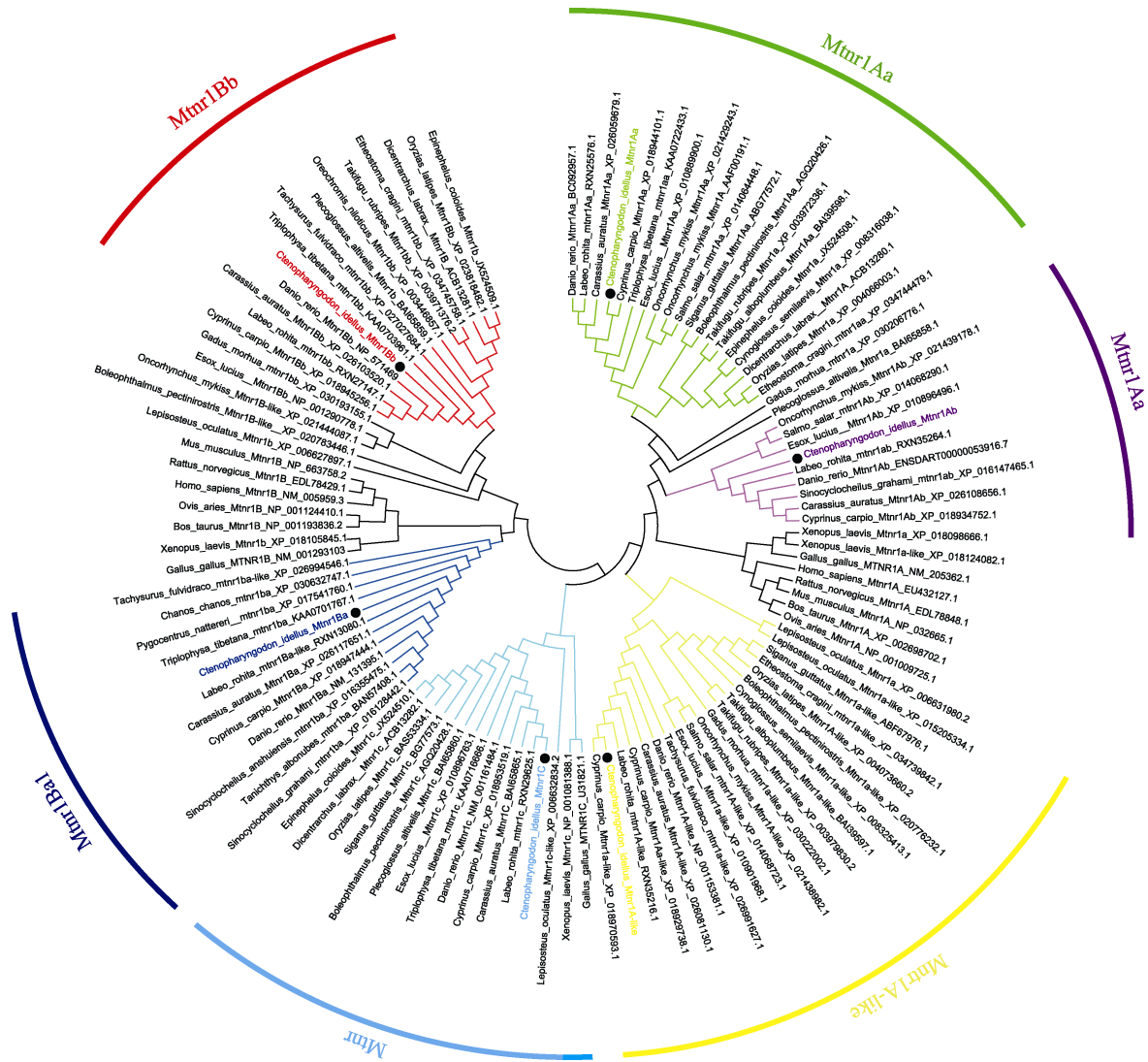


图 3 采用 MEGA 5.2 软件构建的基于草鱼 Mtnr1 氨基酸序列的 NJ 系统进化树

Fig.3 Phylogenetic tree based on the protein sequences of Mtnr1 from *C. idellus* and other vertebrate species using the neighbor-joining (NJ) method in MGEA 5.2

Mtnr1Ba 和 *Mtnr1Bb* 4 种亚型集中在脑组织中表达, 暗示其主要参与神经调节相关的活动(Klosen *et al.*, 2019)。这与大西洋鲑(Ciani *et al.*, 2019)、星点东方鲀(Ikegami *et al.*, 2009b)和金鱼(Ikegami *et al.*, 2009a)中的研究相似。如 Ikegami 等(2009b)研究发现, *Mel1a* 1.4、*Mel1a* 1.7 和 *Mel1b* 均在星点东方鲀脑组织、视网膜、脑垂体和外围组织中表达, 且在脑组织中表达量最高。另外, 褪黑激素在生物钟网络中既是视交叉上核(suprachiasmatic nuclei, SCN)的时钟输出, 又是内部同步器, 表明它的主要功能是充当时钟输如“time giver”(Pevet *et al.*, 2011)。而褪黑激素功能发挥依赖于 *Mtnr1* 的表达, *Mtnr1* 在脑组织中的高表达, 间接证实褪黑激素在草鱼机体神经调节过程中具有重要作用。

此外, 本研究显示, *Mtnr1Ba* 基因在草鱼前肠、中肠和后肠中均高表达, *Mtnr1Alike* 在后肠中高表达, *Mtnr1* 的表达呈现组织差异性。这与哺乳动物和水禽类中的研究类似, 如大鼠 *MT2* 在其结肠中 mRNA 水平最高, 而 *MT1* 基因在十二指肠内表达量最高, 在回肠和空肠中表达低(Stebelová *et al.*, 2010); *MT1* 和 *MT2* 在人胃肠道肌间神经丛、肠上皮和胃肠血管中均有表达, 且在大肠上皮表达量最高(Söderquist *et al.*, 2015); 鸭肠道 2-¹²⁵ 碘褪黑素结合位点密度大小依次为回肠、空肠>十二指肠、结肠>盲肠(Lee *et al.*, 1993)。另外, 研究表明, *Mtnr1* 介导褪黑激素作用肠道粘膜肌层和肠肌间神经丛发挥免疫功能, 抵抗各种病原微生物的侵袭(Esteban-Zubero *et al.*, 2017)。本研究中, *Mtnr1* 基因在肠道不同部位表达量存在差异,

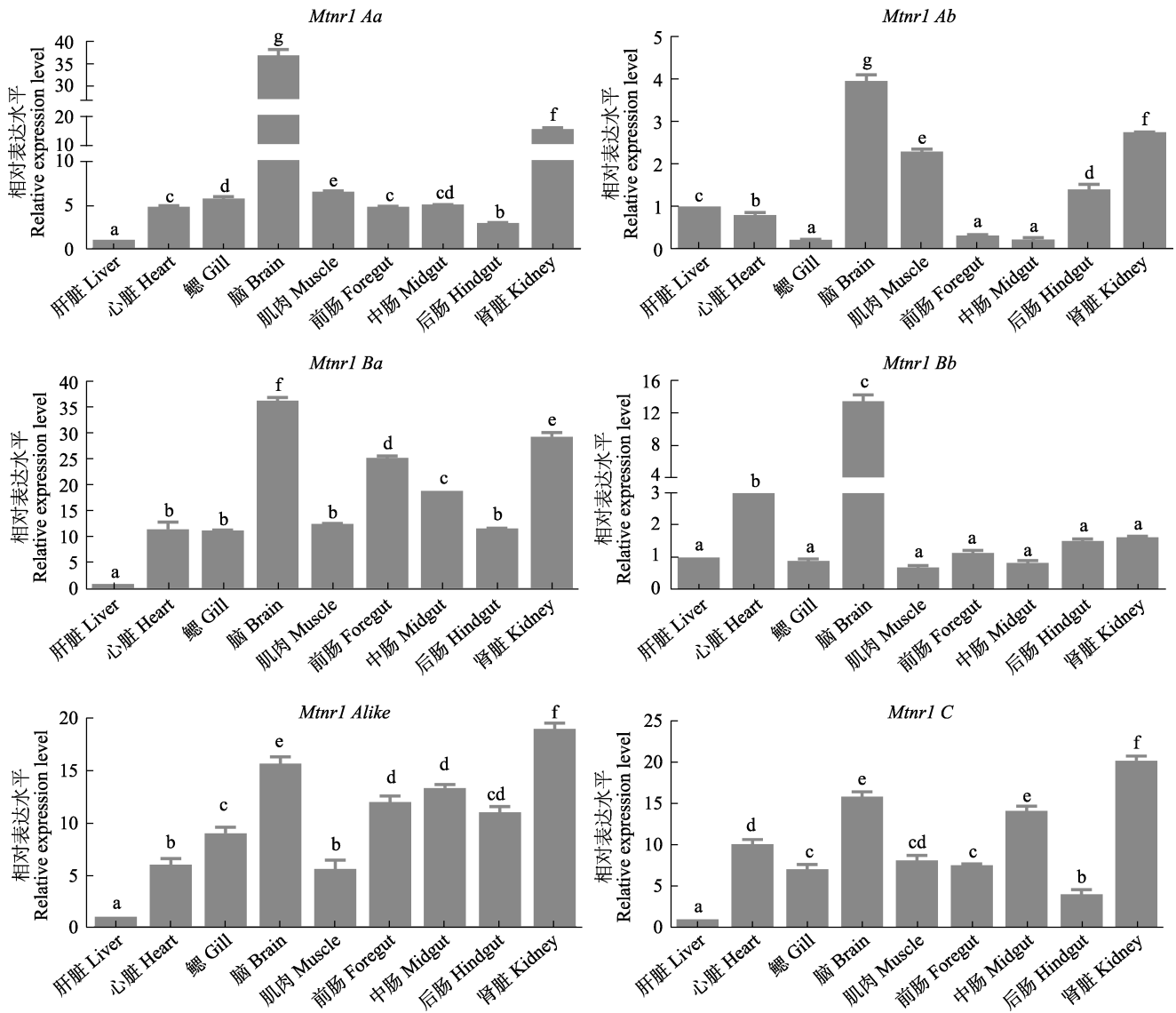


图 4 草鱼 *Mtnr1* 基因 6 种亚型在不同组织中的表达模式
 Fig.4 Expression of 6 isoforms of *Mtnr1* mRNA in different tissues of *C. idellus*

值为平均值±标准误($n=4$), 以 β -actin 基因表达量作为内参基因, 设置 3 个技术重复。不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)

Data represent Mean±SE ($n=4$), expressed relative to expression of the housekeeping gene β -actin. Three technological repetitions were performed for each sample. Different letters indicate significant differences among the different tissues ($P<0.05$)

暗示 *Mtnr1* 在草鱼肠道不同部位可能发挥不同的免疫功能, 但尚需进一步研究。

值得注意的是, 本研究发现, 除 *Mtnr1Alike* 和 *Mtnr1C* 亚型外, *Mtnr1Aa*、*Mtnr1Ab* 和 *Mtnr1Ba* 也在肾脏中高表达, 这与金鱼中的研究结果类似(Ikegami *et al*, 2009a), 而与欧洲鲈鱼(*Dicentrarchus labrax*) (Sauzet *et al*, 2008)鳃、星点东方鲀(Ikegami *et al*, 2009b)神经和垂体表达相异, 究其原因可能是亚型基因表达存在物种和组织的特异性。肾脏作为鱼体主要的免疫器官, 免疫功能相关基因在该组织中呈现高表达(侯吉伦等, 2019), 在哺乳动物小鼠的胸腺和肾脏

免疫器官中已经证实, *Mtnr1*mRNA 表达量较高(Carrillo-Vico *et al*, 2003)。本研究结果显示, 草鱼 *Mtnr1* 亚型 mRNA 在肾脏中表达量高, 暗示 *Mtnr1* 可能与免疫相关。而褪黑激素主要通过与其高亲和力的特异性 *Mtnr1* 蛋白结合, 随后启动信号级联反应在靶细胞上介导各种生理活动(Klosen *et al*, 2019)。另外, 褪黑激素可以直接作用于机体的免疫活性过程, 如 Cuesta 等(2008)研究发现, 金头鲷(*Sparus aurata*)注射褪黑激素后, 血液中过氧化物酶、吞噬作用和活性氧中间体等活性以及干扰素-1 β 、主要组织相容性复合体、病毒相关效应和淋巴标记等基因表达显著上升。

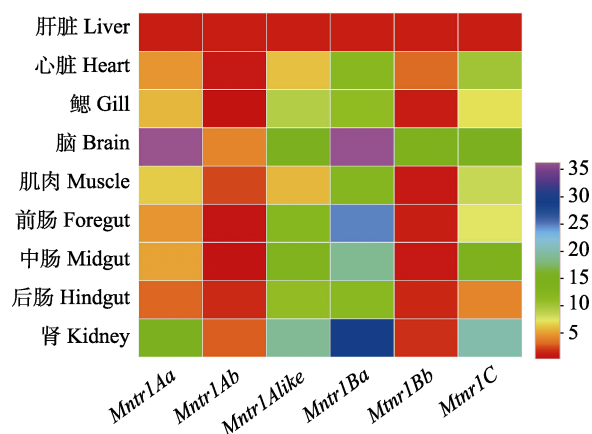


图5 *Mtnr1* 亚型的组织表达热图

Fig.5 Heatmap of expression pattern of the *Mtnr1* family mRNA in different tissues of *C. idellus*

基因表达水平从高到低依次为紫色到红色

The levels of gene expression in the heatmap from high to low: purple to red

同样地,相对于对照组,注射褪黑激素后中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*)血淋巴中超氧化物歧化酶活性显著增加,丙二醛的含量显著下调(She *et al.*, 2019)。目前,尽管本研究 *Mtnr1* 基因在肾脏中高表达,但仅推测 *Mtnr1* 亚型介导了草鱼的免疫反应,而草鱼受到病原或褪黑激素刺激后, *Mtnr1* 亚型的表达和免疫效应情况并不清楚,需要后续开展实验进一步探究。

综上所述,本研究首次在草鱼组织中成功克隆得到 *Mtnr1* 的 6 种亚型的 cDNA 序列,并对其序列结构进行了分析,通过对 6 种亚型在组织表达模式的研究,初步表明 *Mtnr1Aa* 和 *Mtnr1Ba* 基因与草鱼神经调节和免疫反应有关,为今后深入研究 *Mtnr1Aa* 和 *Mtnr1Ba* 基因在草鱼神经调节和免疫功能方面提供了理论依据。

参 考 文 献

- ACUÑA-CASTROVIEJO D, ESCAMES G, VENEGAS C, *et al.* Extrapineal melatonin: Sources, regulation, and potential functions. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2014, 71(16): 2997–3025
- BRYDON L, PETIT L, DE COPPET P, *et al.* Polymorphism and signalling of melatonin receptors. *Reproduction, Nutrition, and Development*, 1999, 39(3): 315–324
- Bureau of Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Fisheries Technology Extension Center, China Society of Fisheries. China fishery statistical yearbook 2019. Beijing: China Agriculture Press, 2019 [农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 2019 中国渔业统计年鉴. 北京: 中国农业出版社, 2019]
- CARPENTIERI A, DÍAZ DE BARBOZA G, ARECO V, *et al.* New perspectives in melatonin uses. *Pharmacological Research*, 2012, 65(4): 437–444
- CARRILLO-VICO A, CALVO J R, ABREU P, *et al.* Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance: Possible role as intracrine, autocrine, and/or paracrine substance. *FASEB Journal*, 2004, 18(3): 537–539
- CARRILLO-VICO A, GARCIA-PERGANEDA A, NAJI L, *et al.* Expression of membrane and nuclear melatonin receptor mRNA and protein in the mouse immune system. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2003, 60(10): 2272–278
- CARRILLO-VICO A, LARDONE P J, FERNANDEZ-SANTOS J M, *et al.* Human lymphocyte-synthesized melatonin is involved in the regulation of the interleukin-2/interleukin-2 receptor system. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2005, 90(2): 992–1000
- CIANI E, FONTAINE R, MAUGARS G, *et al.* Melatonin receptors in Atlantic salmon stimulate cAMP levels in heterologous cell lines and show season-dependent daily variations in pituitary expression levels. *Journal of Pineal Research*, 2019, 67(3): e12590
- COMAI S, LOPEZ-CANULA M, DE GREGORIO D, *et al.* Melatonin MT1 receptor as a novel target in neuropsychopharmacology: MT1 ligands, pathophysiological and therapeutic implications, and perspectives. *Pharmacological Research*, 2019, 144: 343–356
- CUESTA A, CEREZUELA R, ESTEBAN M A, *et al.* In vivo actions of melatonin on the innate immune parameters in the teleost fish gilthead seabream. *Journal of Pineal Research*, 2008, 45(1): 70–78
- DE BERARDIS D, MARINI S, FORNARO M, *et al.* The melatonergic system in mood and anxiety disorders and the role of agomelatine: Implications for clinical practice. *International Journal of Molecular Sciences*, 2013, 14(6): 12458–12483
- DRAZEN D L, BILU D, BILBO S D, *et al.* Melatonin enhancement of splenocyte proliferation is attenuated by luzindole, a melatonin receptor antagonist. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 2001, 280(5): 1476–1482
- DUFOURNY L, LEVASSEUR A, MIGAUD M, *et al.* GPR50 is the mammalian ortholog of Mel1c: Evidence of rapid evolution in mammals. *BMC Evolutionary Biology*, 2008, 8: 105
- ESTEBAN-ZUBERO E, LÓPEZ-PINGARRÓN L, ALATORRE-JIMÉNEZ M A, *et al.* Melatonin's role as a co-adjuvant treatment in colonic diseases: A review. *Life Science*, 2017, 170: 72–81
- GAILDRAT P, FALCÓN J. Melatonin receptors in the pituitary of a teleost fish: mRNA expression, 2-[¹²⁵I]iodomelatonin binding and cyclic AMP response. *Neuroendocrinology*,

- 2000, 72: 57–66
- GARCÍA-MAURIÑO S, POZO D, CALVO J R, *et al.* Correlation between nuclear melatonin receptor expression and enhanced cytokine production in human lymphocytic and monocytic cell lines. *Journal of Pineal Research*, 2000, 29(3): 129–137
- HAN L S, WANG H C, LI L, *et al.* Melatonin protects against maternal obesity-associated oxidative stress and meiotic defects in oocytes via the SIRT3-SOD2-dependent pathway. *Journal of Pineal Research*, 2017, 63(3): e12431
- HEO J I, YOON D W, YU J H, *et al.* Melatonin improves insulin resistance and hepatic steatosis through attenuation of alpha-2-HS-glycoprotein. *Journal of Pineal Research*, 2018, 65(2): e12493
- HERMOSO D A M, SHIMADA L B C, GILGLIONI E H, *et al.* Melatonin protects female rats against steatosis and liver oxidative stress induced by oestrogen deficiency. *Life Sciences*, 2016, 157: 178–186
- HONG L Y, HONG W S, ZHU W B, *et al.* Cloning and expression of melatonin receptors in the mudskipper *Boleophthalmus pectinirostris*: Their role in synchronizing its semilunar spawning rhythm. *General and Comparative Endocrinology*, 2014, 195: 138–150
- HOU J L, GUO Y N, FU Y S, *et al.* Cloning and expression analysis of *efhd2* and *tbc1d25* gene in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(3): 57–68 [侯吉伦, 郭亚男, 付元帅, 等. 牙鲆 *efhd2* 和 *tbc1d25* 基因的克隆和表达分析. *渔业科学进展*, 2019, 40(3): 57–68]
- IKEGAMI T, AZUMA K, NAKAMURA M, *et al.* Diurnal expressions of four subtypes of melatonin receptor genes in the optic tectum and retina of goldfish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A, Molecular and Integrative Physiology*, 2009a, 152(2): 219–224
- IKEGAMI T, MOTOHASHI E, DOI H, *et al.* Synchronized diurnal and circadian expressions of four subtypes of melatonin receptor genes in the diencephalon of a puffer fish with lunar-related spawning cycles. *Neuroscience Letters*, 2009b, 462(1): 58–63
- KLOSEN P, LAPMANEE S, SCHUSTER C, *et al.* MT1 and MT2 melatonin receptors are expressed in nonoverlapping neuronal populations. *Journal of Pineal Research*, 2019, 67(1): e12575
- LEE P P, PANG S F. Melatonin and its receptors in the gastrointestinal tract. *Neurosignals*, 1993, 2(4): 181–193
- LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR. *Methods*, 2002, 25(4): 402–408
- MAITRA S K, HASAN K N. The role of melatonin as a hormone and an antioxidant in the control of fish reproduction. *Frontiers in Endocrinology*, 2016, 7: 38
- MAZURAS D, BRIERLEY I, ANGLADE I, *et al.* Central melatonin receptors in the rainbow trout: Comparative distribution of ligand binding and gene expression. *Journal of Comparative Neurology*, 1999, 409(2): 313–324
- NG K Y, LEONG M K, LIANG H, *et al.* Melatonin receptors: Distribution in mammalian brain and their respective putative functions. *Brain Structure and Function*, 2017, 222(7): 2921–2939
- PEVET P, CHALLET E. Melatonin: Both master clock output and internal time-giver in the circadian clocks network. *Journal of Physiology*, 2011, 105(4/5/6): 170–182
- REHEMAN A, FENG X W. The distribution of melatonin receptors and its influence on the immune system. *Contemporary Animal Husbandry*, 2018(12): 48–52 [艾克拜尔·热合曼, 冯昕炜. 褪黑激素受体的分布及其对免疫系统的作用. *当代畜牧*, 2018(12): 48–52]
- REPPERT S M, GODSON C, MAHLE C D, *et al.* Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel1b melatonin receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1995a, 92(19): 8734–8738
- REPPERT S M, WEAVER D R, CASSONE V M, *et al.* Melatonin receptors are for the birds: Molecular analysis of two receptor subtypes differentially expressed in chick brain. *Neuron*, 1995b, 15(5): 1003–1015
- SAUZET S, BESSEAU L, HERRERA P P, *et al.* Cloning and retinal expression of melatonin receptors in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *General and Comparative Endocrinology*, 2008, 157(2): 186–195
- SHE Q, HAN Z, LIANG S, *et al.* Impacts of circadian rhythm and melatonin on the specific activities of immune and antioxidant enzymes of the Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*). *Fish and Shellfish Immunology*, 2019, 89: 345–353
- SHIU S Y W, PANG S F. An updated phylogenetic analysis of vertebrate melatonin receptor sequences: Reflection on the melatonin receptor nomenclature by the Nomenclature Subcommittee of the International Union of Pharmacology. *Biological Signals and Receptors*, 1998, 7: 244–248
- SÖDERQUIST F, HELLSTRÖM P M, CUNNINGHAM J L. Human gastroenteropancreatic expression of melatonin and its receptors MT1 and MT2. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0120195
- STEBELOVÁ K, ANTTILA K, MÄNTTÄRI S, *et al.* Immunohistochemical definition of MT2 receptors and melatonin in the gastrointestinal tissues of rat. *Acta Histochemica*, 2010, 112(1): 26–33
- XU P F, WANG J L, HONG F, *et al.* Melatonin prevents obesity through modulation of gut microbiota in mice. *Journal of Pineal Research*, 2017, 62(4): e12399
- YANG W, TANG K, WANG Y, *et al.* Melatonin promotes triacylglycerol accumulation via MT2 receptor during differentiation in bovine intramuscular preadipocytes. *Scientific Reports*, 2017, 7: 15080

ZHANG C, ZHANG Q, PANG Y, *et al.* The protective effects of melatonin on oxidative damage and the immune system of the Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) exposed to deltamethrin. *Science of Total Environment*, 2019, 653(25): 1426–1434

ZHU W B, LIAN H B, HONG W S, *et al.* Localization of

melatonin receptor Mel1a in mudskipper (*Boleophthalmus pectinirostris*). *Journal of Xiamen University (Natural Science)*, 2012, 51(6): 1092–1096 [朱文博, 连惠波, 洪万树, 等. 褪黑激素受体亚型 Mel_{1a}在大弹涂鱼体内的分布. *厦门大学学报(自然科学版)*, 2012, 51(6): 1092–1096]

(编辑 冯小花)

Molecular Cloning and Expression Analysis of the Melatonin Receptor Gene in Grass Carp (*Ctenopharyngodon idella*)

HU Wei^{1,2}, WU Hui², YUAN Hanwen¹①, GAO Weihua¹①, CHEN Dunxue³, GUO Liwei¹, XU Qiaoqing¹

(1. *Engineering Research Center of Ecology and Agricultural Use of Wetland, Ministry of Education, Yangtze University, Jingzhou, Hubei 434023, China*; 2. *State Key Laboratory of Developmental Biology of Freshwater Fish, School of Life Sciences, Hunan Normal University, Changsha, Hu'nan 410081, China*;
3. *School of Animal Science, Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550025, China*)

Abstract In the present study, six isoforms of melatonin receptor 1 (*Mtnr1*) were cloned from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) using RACE technology and bioinformatic analysis. The distribution pattern of the six paralogs in different tissues was detected using real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). The full-length cDNAs of the six isoforms (*Mtnr1Aa*, *Mtnr1Ab*, *Mtnr1Alike*, *Mtnr1Ba*, *Mtnr1Bb*, and *Mtnr1C*) were 2045, 2036, 2031, 2799, 2535, and 2477 bp, with open reading frames (ORF) of 1053, 1056, 1035, 1071, 1044, and 1086 bp, encoding 350, 351, 344, 356, 347, and 361 amino acids, respectively. All of the proteins contain 7 transmembrane domains (TM), an NRY motif, a CYICHS motif, a NAXXY motif, conserved residues interacting with G-proteins in the TM₃, asparagine-linked glycosylation sites, and several phosphorylation sites. The six *Mtnr1* proteins are composed of 20 amino acids and are stable hydrophobic proteins. Protein sequence identity analysis showed that the six *Mtnr1* isoforms share 93.1%~99.4%, 84.8%~95.2%, 82.8%~96.8%, 90.1%~97.5%, 79.7%~98.3%, and 90.6%~95.6% identities with their respective counterparts in other fishes. Phylogenetic analysis revealed that six grass carp *Mtnr1* paralogs were clustered into the Cyprinidae clade, sharing a close relationship with those of *Danio rerio*, *Cyprinus carpio*, and *Carassius auratus*. In addition, the expression of the six *Mtnr1* isoform genes was detected in the liver, heart, gill, brain, muscle, forgut, midgut, hindgut, and kidney tissues. Results showed that *Mtnr1Aa* and *Mtnr1Ba* were highly expressed in the brain and kidney, suggesting that they might play a vital role in nervous system regulation and the immune response in grass carp, respectively.

Key words Melatonin receptor; *Ctenopharyngodon idella*; Gene cloning; Tissue expression

① Corresponding author: YUAN Hanwen, E-mail: hanwen_yuan@126.com; GAO Weihua, E-mail: gwh105@126.com