

doi: 10.7541/2016.144

鄱阳湖泥鳅黑色素聚集激素1基因及其蛋白结构特征分析

徐敏圣 史建伍 胡芳琴 肖芳美 方磊 盛军庆 王军花 洪一江

(南昌大学生命科学学院, 南昌 330031)

摘要: 为研究黑色素聚集激素(Melanin-concentrating hormone, MCH)在泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)皮肤黑色素沉着过程中所起的作用, 研究采用RACE-PCR技术首次克隆出了鄱阳湖泥鳅前黑色素聚集激素1(Prepro-melanin-concentrating hormone 1, *Pmch1*)基因cDNA全长序列, 将其命名为*MaPmch1*。运用生物信息学软件对*MaPmch1*基因及其蛋白的理化性质和结构特征进行了分析, 构建了系统进化树。其cDNA全长为570 bp, 存在一个长度为110 bp的CpG岛, 位于263—372 bp; 该基因开放阅读框共375 bp, 编码含124个氨基酸的蛋白质, 共有7个潜在的磷酸化位点; PMCH1蛋白经水解产生17个氨基酸的环形神经肽黑色素聚集激素1(MCH1)。PMCH1和MCH1均为亲水性蛋白, 二级结构以无规则卷曲为主; MCH1超二级结构具有一个反平行 β -折叠片层, 通过二硫键连接形成环形神经肽。同源性分析表明鄱阳湖泥鳅MCH1(*MaMCH1*)氨基酸序列与其他硬骨鱼类的高度一致。系统进化树显示, 包括泥鳅在内的鲤形目PMCH1聚为一支, 且物种间PMCH1的亲缘关系与传统的分类地位相吻合。在脊椎动物中, MCH存在高度保守的序列RCM*GRVYRPCW (*代表随机氨基酸), 证明该基因在进化上是极为保守的。

关键词: 泥鳅; 鄱阳湖; *Pmch*基因; 黑色素聚集激素

中图分类号: Q344⁺.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2016)06-1114-07

黑色素聚集激素最初是从大麻哈鱼的脑下垂体腺中分离出的一种包含17个氨基酸的环形神经肽, 能调节鱼类皮肤色素沉着而得名^[1]。MCH是由前原黑色素聚集激素基因(Prepro-melanin-concentrating hormone, *Pmch*)编码的, PMCH蛋白C末端17到20几个不等的氨基酸经裂解产生神经肽MCH, 这些氨基酸通过二硫键形成环状, 环内氨基酸序列具有很高的保守性^[2, 3]。哺乳动物的MCH主要在下丘脑外侧区(Lateral hypothalamic, LH)和未定带区(Zona incerta, ZI)中表达^[4], 通过结合并激活两种G蛋白偶联受体(MCHR1和MCHR2), 参与摄食活动和机体能量平衡的调节^[5, 6], 同时对动物的睡眠与觉醒^[7], 沮丧等情绪^[8]也具有调控作用。某些鱼类MCH具有MCH1和MCH2两个亚型, 这两个亚型的表达密切相关, 但所处的下丘脑神经元种类

却不相同^[9]。鱼类MCH调控系统非常复杂:一方面, 它可将黑色素颗粒聚集在色素细胞核附近, 从而改变鱼鳞的折射率和减淡鱼类皮肤的颜色^[2, 3], 该功能与 α -黑色素细胞刺激激素(α -melanophore-stimulating hormone, α -MSH)调节黑色素分散的功能是相反的; 另一方面, 通过对金鱼和玉丽体鱼等的研究^[10-13], 发现MCH也参与了摄食活动和能量平衡的调节, 并且MCH摄食调节功能在不同鱼类中存在很大的差异性。

泥鳅隶属于鲤形目, 鳅科, 花鳅亚科, 泥鳅属。鄱阳湖泥鳅按花斑有无及大小分为大花斑泥鳅、小花斑泥鳅和无花斑泥鳅3种性状^[14]。*MaMCH1*是否具备与鱼类MCH1相似的功能, 在泥鳅黑色素斑形成过程中是否发挥着作用, 是值得进行深入研究的。本研究首次克隆出鄱阳湖泥鳅*MaPmch1*基

收稿日期: 2015-09-17; 修订日期: 2016-01-25

基金项目: 江西省科技支撑计划重大项目(20152ACF60013); 江西省特种水产产业技术体系(JXARS-10); 江西省科技支撑计划(20123BBF61121, 20123BBE50096, 20132BBF60052)资助 [Supported by the Major Project of Jiangxi Province Science and Technology Support Program (20152ACF60013); Jiangxi Province Technology System for Special Aquaculture Industries (JXARS-10); Jiangxi Province Science and Technology Support Program (20123BBF61121, 20123BBE50096, 20132BBF60052)]

作者简介: 徐敏圣(1992—), 男, 江西上饶人; 硕士; 主要研究方向水生生物遗传育种学。E-mail: 360886464@qq.com

通信作者: 洪一江, E-mail: yijianghong@126.com

因cDNA全长序列,运用生物信息学软件对其cDNA序列和预测的蛋白质结构特征进行了分析和讨论,为MaMCH1功能的研究提供了方向和开展泥鳅体斑性状遗传育种工作奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验用泥鳅由江西省上饶市鄱阳湖原地水产品养殖基地提供。选用4月龄泥鳅,体斑排列均匀,无杂斑、杂色,背部皮肤黑色且有光泽,体长10—12 cm,体重10 g左右,体质健康肥满。于室外玻璃池中流水暂养,实验前去离子水冲洗鱼体。泥鳅全脑位于两眼间的部位。取材时剪下鱼脑,剪出鱼脑两眼间的部位,仔细剖开即可见乳白色的泥鳅全脑,其总长1—1.5 cm,宽约0.5 cm。

1.2 方法

泥鳅脑组织总RNA提取和cDNA第一条链合成 参照TRIzol[®] Reagent (美国, Life Technologies) 产品操作手册提取泥鳅脑组织总RNA, 1%琼脂糖凝胶电泳和微量分光光度计GENOVA NANO (英国, JENWAY) 检测RNA纯度和完整性。参照SuperScript[™] III Reverse Transcriptase (美国, Invitrogen[™]) 产品使用说明书合成cDNA第一条链, 使用泥鳅 β -actin基因引物(β -actin F和 β -actin R, 表1) 进行PCR检测cDNA模板。

Pmch1基因cDNA序列克隆 通过同源比对鲤科鱼类Pmch1序列, 设计引物mch-midF和mch-midR(表1), 参照TaKaRa公司Ex Taq酶使用说明书克隆泥鳅MaPmch1基因cDNA部分序列。反应条件为95℃预变性5min; 95℃变性30s, 61℃退火30s, 72℃延伸30s, 35个循环; 72℃延伸10min。

根据上述实验获得的部分序列, 设计5'-RACE引物mch5'-1和 mch5'-2, 3'-RACE引物mch3'-1和 mch3'-2, UPM为每一轮PCR的通用引物, 如表1所示。RACE-PCR第一轮模板为cDNA, 第二轮模板为稀释30倍后的第一轮PCR产物。反应体系参照TaKaRa公司La Taq酶使用说明书, 反应条件为95℃预变性5min; 95℃变性30s, 特异性引物T_m值退火30s, 72℃延伸1min, 35个循环; 72℃延伸10min。

扩增产物用1%琼脂糖凝胶电泳检测, 参照The E.Z.N.A.[™] Gel Extraction Kit (美国, Omega) 使用说明书进行目的条带的回收。目的条带经T/A克隆后, 送菌液至生工生物工程上海(股份)有限公司进行测序。

Pmch1基因cDNA全长序列拼接及结构特征分析 MaPmch1基因cDNA全长序列由MEGA4.1软件拼接完成, ORF Finder软件推导氨基酸序列, MethPrimer预测DNA序列甲基化情况, ExPASy ProtParam tool预测蛋白质的理化性质, SMART和InterPro软件预测蛋白质保守结构域, NetPhos 2.0 server预测蛋白磷酸化位点, PSIPREDv3.3软件预测蛋白质二级结构, ClustalW2软件进行蛋白质同源性分析, 及MEGA4.1软件的邻位相连法(NJ)建立系统进化树。

2 结果

2.1 MaPmch1基因cDNA全长序列及特征分析

拼接结果 特异性引物mch-midF和mch-midR克隆出一段193 bp的核苷酸序列, RACE-PCR分别获得5'端克隆产物259 bp和3'端克隆产物245 bp。测序结果利用MEGA4.1进行序列比对, 拼接出MaPmch1基因cDNA全长序列为570 bp, 5'非编码序

表1 MaPmch1基因克隆所用引物信息

Tab. 1 Primers used for cloning MaPmch1 gene

引物名称Primer	引物序列Sequences (5'-3')	退火温度T _m (°C)
β -actin F	AGGGAGTGATGGTTGGTATGG	59
β -actin R	TGTTGGCTTTGGGATTGAGG	
mch-midF	GGCTGACTCCAATCTGCTGAG	61
mch-midR	CTAACTTCCCAGCAAGGTCG	
Long	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTA	
Short	TCAACGCAGAGT	
mch5'-1	CTAATACGACTCACTATAGGGC	
mch5'-2	AACTCAAACCTTCCCAGCATGGC	60
mch3'-1	AGACTTTAGGGTTCTCAGCAGAT	58.4
mch3'-2	ACTCCAATCTGCTGAGAACCCTA	60.2
	ATCGCCATCATCAGAAGGGACAC	62

注: 所用引物均由上海生物工程技术服务有限公司合成

Note: All the primers used were synthesized by Sangon Biotech

列长43 bp, 3'非编码序列长152 bp, 有AATAAA Poly (A)加尾信号, 开放阅读框(ORF)长为375 bp, 编码一个包含124个氨基酸的蛋白质。

DNA甲基化 使用MethPrimer软件预测了不同物种*Pmch*基因DNA甲基化情况(表 2)。发现

*MaPmch1*基因cDNA序列上共有18个CpG, 存在一个长度为110 bp的CpG岛, 位于263—372 bp处。金鱼、斑马鱼、齐口裂腹鱼、人和小鼠的*Pmch*均未预测出CpG岛的存在, 而大麻哈鱼、罗非鱼和星斑川鲷具有长度不等的CpG岛。

表 2 *Pmch*基因DNA甲基化预测结果

Tab. 2 The predicted results of DNA methylation of *Pmch* gene

物种名Species	CpG		CpG岛	
	数量Number	比例Ratio (%)	长度Length (bp)	位点Sites (bp)
泥鳅 <i>Misgurnus anguillicaudatus</i>	18	6.13	110	263—372
齐口裂腹鱼 <i>Schizothorax prenanti</i>	14	4.75	—	—
金鱼 <i>Carassius auratus</i>	14	4.91	—	—
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	15	5.06	—	—
大麻哈鱼 <i>Oncorhynchus keta</i>	26	4.97	126	259—384
罗非鱼 <i>Oreochromis mossambicus</i>	24	8.00	208	190—397
星斑川鲷 <i>Platichthys stellatus</i>	37	12.40	329	67—395
小鼠 <i>Mus. musculus</i>	15	4.05	—	—
人 <i>Homo sapiens</i>	3	0.80	—	—

2.2 MaPMCH1蛋白理化性质和结构特征分析

理化性质 ExPASy ProtParam tool预测MaPMCH1蛋白的分子式是C₅₉₄H₉₉₄N₁₇₀O₁₈₇S₁₀, 分子量(MW)为13.83 kD, 理论等电点(Theoretical pI)为5.39。SMART软件预测该序列的1—24位点为信号肽, 78—124位点为Pro-MCH结构域(图 1), 序列的93—105位点为神经肽NEV, 108—124位点为神经肽MCH(氨基酸序列: Asp-Thr-Met-Arg-Cys-Arg-Val-Gly-Arg-Val-Tyr-Arg-Pro-Cys-Trp-Glu-Val)。预测MCH蛋白的分子量为2.10 kD, 理论等电点为8.06, 总平均疏水性指数(GRAVY)为-0.235, 是亲水性蛋白。



图 1 MaPMCH1蛋白结构域示意图

Fig. 1 Structure of MaPMCH1 in *Misgurnus anguillicaudatus*

蛋白磷酸化 NetPhos 2.0 server软件预测MaPMCH1蛋白共有7个潜在的磷酸化位点, 分别为Ser³⁹、Ser⁴¹、Ser⁴³、Ser⁵⁵、Ser⁸⁸、Thr⁸⁹、Thr¹⁰⁹, 而酪氨酸被磷酸化的可能性很小。发现成熟MCH1没有潜在被磷酸化的氨基酸位点。

二级结构 PSIPREDv3.3软件预测的结果如图 2所示, MaPMCH1蛋白大部分为无规则卷曲

(79.84%), α -螺旋主要出现在信号肽序列上, 共占16.93%, 序列存在一个 β -折叠(3.23%)。成熟MCH1无 α -螺旋, 第2—7和9—16位氨基酸形成两个 β -折叠, 占肽链总氨基酸的70.59%, 其余氨基酸为无规则卷曲, 占29.41%。

2.3 MaPMCH1蛋白同源性分析和系统进化树构建

同源性分析 选取22个不同物种和亚型的PMCH氨基酸序列, 通过ClustalW2软件, 与MaPMCH1氨基酸序列进行同源比对。结果显示: MaPMCH1与鲤形目鱼类PMCH1同源性最高, 其中与斑马鱼的同源性达73.39%; 其次为鲑科鱼类(45%—49%), 最后为鲤形目PMCH2、哺乳纲PMCH和鸟纲PMCH, 最低为14.52%(野猪)。仅分析MCH序列的同源性, 发现所选硬骨鱼纲MCH1序列几乎一致, 并且MCH(不分亚型)存在一段高度保守的序列: RCM*GRVYRPCW(*表示随机氨基酸)。

系统进化树构建 采用MEGA 4.1软件邻位相连法[Neighbor-Joining(NJ) method]构建系统进化树(图 3)。PMCH1亚型同属一大支, 硬骨鱼纲PMCH2亚型、鸟纲PMCH和哺乳纲PMCH同属另一大支(除大麻哈鱼和虹鳟PMCH2); 泥鳅、斑马鱼、金鱼和齐口裂腹鱼PMCH1聚成鲤形目鱼类一支。据图推测, *Pmch*基因在进化上非常保守。

3 讨论

神经肽MCH是由前黑色素聚集激素经翻译后

加工过程产生的环形肽,通过下丘脑或垂体释放,参与增强脊椎动物的食欲和调节鱼类皮肤色素沉着^[2, 13]。目前斑马鱼^[9]、星斑川鲈^[13]、大麻哈鱼^[15]、美洲拟鲈^[16]和虹鳟^[17]等均克隆出了该基因的两个亚型,即*Pmch1*和*Pmch2*,研究发现鱼类之间的*Pmch1*基因在结构和功能上相似,而*Pmch2*基因与哺乳动物*Pmch*基因具有较高的同源性。通过同源比对和系统进化树分析泥鳅前原黑色素聚集激素1基因, *MaPmch1*基因与同为鲤形目鱼类斑马鱼、金鱼^[18]和齐口裂腹鱼的*Pmch1*基因亲缘关系最近,与其他鱼类*Pmch1*基因的同源性次之,而与鸟纲、哺乳纲的*Pmch*基因同源性最差。这说明物种间前原黑色素聚集激素1基因的同源关系与传统的分类地位相吻合。其次, *Pmch*基因两个亚型的差别也在系统树上得以区分, *MaPmch1*基因与鱼类*Pmch2*亚型亲缘关系较远。因此可确认克隆获得的*Pmch*基因为*Pmch1*亚型。

在脊椎动物中,通过水解二元精氨酸残基组成的蛋白质水解切割位点(RR),硬骨鱼类PMCH1亚型切割产生NEV和MCH1,而硬骨鱼类PMCH2亚型和哺乳动物PMCH可产生NGE、NEI和MCH2/MCH^[9, 19, 20]。MaPMCH1蛋白271—272和316—317位点分别存在一个二元精氨酸残基组成的蛋白质水解切割位点,切割后产生神经肽NEV和MaMCH1。MaMCH1与其他物种MCH相似,都具有一个由10个氨基酸组成的环状结构,通过Cys⁵和Cys¹⁴两个半胱氨酸组成的二硫键连接起来的,且这10个氨基酸同源性极高。在23个MCH氨基酸序列中,ClustalW2比对发现环内只有一个氨基酸会根据纲的不同而发生变化,该氨基酸序列为RCM*GRVYRPCW(*代表随机氨基酸)。PSIPREDv3.3预测MaMCH1的二级结构具有两个 β -折叠形成一个反平行 β -折叠片层,推测其超二级结构模型是由两个 β -折叠形成的一个 β 发夹(β -hairpin),再经一个二硫键将其连接而形成环状神经肽(图4)。

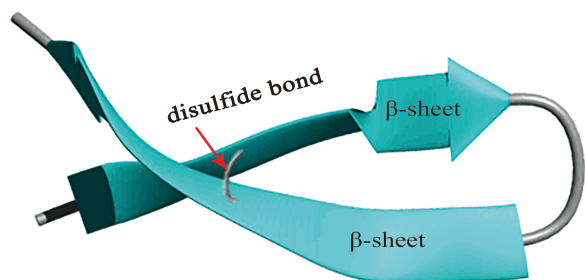


图4 MaMCH1超二级结构预测模型

Fig. 4 The predicted super-secondary structure of MaMCH1

本文预测出MaPMCH1蛋白有7个丝/苏氨酸磷酸化位点,而没有酪氨酸磷酸化位点,预测该蛋白并不能与其他蛋白形成复合体。MaMCH1蛋白没有磷酸化位点,通过预测MaMCH1蛋白的磷酸化位点,对人工合成该环形神经肽具有重要的指导意义。

DNA甲基化在基因转录调控中发挥着重要的作用^[21]。CpG双核苷酸大部分均处于DNA甲基化状态,非甲基化的CpG呈局部聚集倾向,形成CpG双核苷酸相对聚集区域,称为CpG岛。虽然CpG岛一般为非甲基化的,但是部分CpG岛的异常甲基化将对基因转录活性造成抑制作用^[22]。关于鱼类*Pmch1* DNA甲基化的研究甚少,但DNA甲基化对哺乳动物皮肤色素的调控却已经被证实。多项研究证实, DNA甲基化异常与黑素瘤、皮肤基底细胞癌、皮肤鳞状细胞癌、皮肤T细胞淋巴瘤的发生密切相关^[23]。 *MaPmch1*基因cDNA序列存在一个长度为110 bp的CpG岛,推测DNA甲基化参与了*MaPmch1*基因的转录调控,通过CpG岛的甲基化来抑制*Pmch1*基因表达,调控黑色素细胞中色素颗粒的聚集情况。

国内外学者对鱼类MCH系统的功能有许多探究, MCH1被认为参与了鱼类色素沉着的调节, MCH2调控鱼类食欲和摄食能力,然而并没有明确的证据证明两者之间功能的差异。白色背景条件下饲养的斑马鱼其皮肤黑色素颗粒发生聚集,发现*Pmch1*表达量显著上调, *Pmch2*也发生适当的变化,而禁食能显著增加*Pmch2*的表达;表明斑马鱼MCH1主要参与体色调节,与摄食调控无明显关联, MCH2适度地参与了体色调节^[9]。对美洲拟鲈进行饥饿实验,美洲拟鲈*Pmch1*的表达量发生明显上调, *Pmch2*却没有明显变化,说明美洲拟鲈的MCH1基因是一个调控食欲和能量代谢的因子^[16]。在星斑川鲈中发现其MCH1与体色调控和摄食活动都有关,而MCH2只参与了与体色调控^[13]。鄱阳湖泥鳅MCH1的结构特征与这些鱼类的相似,表明其功能也具有一定相似性。据此推断,如果MaMCH1具有调节体色和增强食欲的双重功能,那么*Ma Pmch1*表达的上调是否既能促进泥鳅不同黑色体斑的形成,也能促进其体重的增长。另外, MCH1具有调节体色的作用,但其对泥鳅黑色体斑的形成所发挥的作用却是未知的。

参考文献:

- [1] Kawauchi H, Kawazoe I, Tsubokawa M, *et al.* Characterization of melanin-concentrating hormone in chum sal-

- mon pituitaries [J]. *Nature*, 1983, **305**(5932): 321—323
- [2] Kawauchi H. Functions of melanin-concentrating hormone in fish [J]. *Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology*, 2006, **305**(9): 751—760
- [3] Geiger B M, Gras-Miralles B, Ziogas D C, *et al.* Intestinal upregulation of melanin-concentrating hormone in TNBS-induced enterocolitis in adult zebrafish [J]. *PLoS One*, 2013, **8**(12): e83194
- [4] Whiddon B B, Palmiter R D. Ablation of neurons expressing melanin-concentrating hormone (MCH) in adult mice improves glucose tolerance independent of MCH signaling [J]. *The Journal of Neuroscience*, 2013, **33**(5): 2009—2016
- [5] Santollo J, Eckel L A. Oestradiol decreases melanin-concentrating hormone (MCH) and MCH receptor expression in the hypothalamus of female rats [J]. *Journal of Neuroendocrinology*, 2013, **25**(6): 570—579
- [6] Chee M J S, Pissios P, Prasad D, *et al.* Expression of melanin-concentrating hormone receptor 2 protects against diet-induced obesity in male mice [J]. *Endocrinology*, 2013, **155**(1): 81—88
- [7] Hassani O K, Lee M G, Jones B E. Melanin-concentrating hormone neurons discharge in a reciprocal manner to orexin neurons across the sleep-wake cycle [J]. *Proceedings of National Academy of Sciences of USA*, 2009, **106**(7): 2418—2422
- [8] Adamantidis A, Thomas E, Foidart A, *et al.* Disrupting the melanin-concentrating hormone receptor 1 in mice leads to cognitive deficits and alterations of NMDA receptor function [J]. *European Journal of Neuroscience*, 2005, **21**(10): 2837—2844
- [9] Berman J R, Skariah G, Maro G S, *et al.* Characterization of two melanin-concentrating hormone genes in zebrafish reveals evolutionary and physiological links with the mammalian MCH system [J]. *Journal of Comparative Neurology*, 2009, **517**(5): 695—710
- [10] Matsuda K, Shimakura S, Maruyama K, *et al.* Central administration of melanin-concentrating hormone (MCH) suppresses food intake, but not locomotor activity, in the goldfish, *Carassius auratus* [J]. *Neuroscience Letters*, 2006, **399**(3): 259—263
- [11] Matsuda K, Shimakura S, Miura T, *et al.* Feeding-induced changes of melanin-concentrating hormone (MCH)-like immunoreactivity in goldfish brain [J]. *Cell and Tissue Research*, 2007, **328**(2): 375—382
- [12] Sirkin D P, Cánepa M. Melanin concentrating hormone (MCH) is involved in the regulation of growth hormone in *Cichlasoma dimerus* (Cichlidae, Teleostei) [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2012, **176**(1): 102—111
- [13] Kang D Y, Kim H C. Functional characterization of two melanin-concentrating hormone genes in the color camouflage, hypermelanosis, and appetite of starry flounder [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2013, **189**: 74—83
- [14] Zeng L G, Zhang W, Gan Y F, *et al.* The genetic diversity of loach *Misgurnus anguillicaudatus* from the Poyang Lake [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2010, **34**(5): 966—972 [曾柳根, 张伟, 甘云飞, 等. 鄱阳湖区泥鳅遗传多样性研究. 水生生物学报, 2010, **34**(5): 966—972]
- [15] Ono M, Wada C, Oikawa I, *et al.* Structures of two kinds of mRNA encoding the chum salmon melanin-concentrating hormone [J]. *Gene*, 1988, **71**(2): 433—438
- [16] Tuziak S M, Volkoff H. A preliminary investigation of the role of melanin-concentrating hormone (MCH) and its receptors in appetiteregulation of winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) [J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2012, **348**(1): 281—296
- [17] Baker B, Levy A, Hall L, *et al.* Cloning and expression of melanin-concentrating hormone genes in the rainbow trout brain [J]. *Neuroendocrinology*, 1995, **61**(1): 67—76
- [18] Cerdá-Reverter J M, Canosa L F, Peter R E. Regulation of the hypothalamic melanin-concentrating hormone neurons by sex steroids in the goldfish: possible role in the modulation of luteinizing hormone secretion [J]. *Neuroendocrinology*, 2006, **84**(6): 364—377
- [19] MacNeil D J. The role of melanin-concentrating hormone and its receptors in energy homeostasis [J]. *Frontiers in Endocrinology*, 2013, **4**: 1—12
- [20] Allaeys I, Bouyer K, Loudes C, *et al.* Characterization of MCH-gene-overprinted-polypeptide —immunoreactive material in hypothalamus reveals an inhibitory role of pro-somatostatin1–64 on somatostatin secretion [J]. *European Journal of Neuroscience*, 2004, **19**: 925—936
- [21] Fan S C, Zhang X G. Progress of bioinformatics study in DNA methylation [J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2009, **36**(2): 143—150 [凡时财, 张学工. DNA甲基化的生物信息学研究进展. 生物化学与生物物理进展, 2009, **36**(2): 143—150]
- [22] Patil S, Rao R, Raj T. DNA methylation induced epigenetic silencing: a potential biomarker and therapeutic target for head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Journal of International Oral Health*, 2015, **7**(4): i—ii
- [23] Zeng Y, Kang X J. DNA methylation and skin neoplasms [J]. *International Journal of Dermatology and Venereology*, 2015, **41**(4): 253—255 [曾颖, 康晓静. DNA甲基化与皮肤肿瘤的研究进展. 国际皮肤性病杂志, 2015, **41**(4): 253—255]

STRUCTURE CHARACTERISTICS OF MELANIN-CONCENTRATING HORMONE 1 GENE AND ITS PROTEIN FROM *MISGURNUS ANGUILLICAUDATUS*

XU Min-Sheng, SHI Jian-Wu, HU Fang-Qin, XIAO Fang-Mei, FANG Lei, SHENG Jun-Qing, WANG Jun-Hua and HONG Yi-Jiang

(School of Life Sciences, Nanchang University, Nanchang 330031, China)

Abstract: Melanin-concentrating hormone (MCH) played an important role in the process of skin melanin pigmentation. In order to know its characteristics and function, the cDNA sequence of the MCH (refers to *MaPmch1*) from loach of the Poyang Lake was first cloned by RACE-PCR. Bioinformatics approaches were used to analyze physico-chemical property, conserved domains, secondary structures, homologous analysis and phylogenetic tree. The full length of *MaPmch1* gene was 570 bp that contained an open reading frame of 375 bp encoding 124 amino acid residues. A CpG island with the length of 110 bp in the cDNA sequence of *MaPmch1* was located in 263—372 bp. It was predicted that the MaPMCH1 contained seven potential phosphorylation sites. A 17-AA-amidated cyclic neuropeptide named MaMCH1 was generated from MaPMCH1 after hydrolyzing. MaPMCH1 and MaMCH1 were predicted to be hydrophilic proteins mainly contained random coil for their secondary structures. The super secondary structure of MaMCH1 with an antiparallel β -plated sheet, was connected by a disulfide bond. Homology analysis indicated that the amino acid sequence of MaMCH1 was highly conserved with other bony fishes. The phylogenetic tree showed that MaPMCH1 and Cyprinid fish's PMCH1 were in the same branch, and the genetic relationship of PMCH1 was conserved with the traditional classification status. In vertebrate, RCM*GRVYRPCW (* as random amino acid) was a highly conserved sequence, suggesting that *Pmch1* gene was highly conserved during the evolution.

Key words: *Misgurnus anguillicaudatus*; Poyang Lake; *Pmch* gene; Melanin-concentrating hormone