

学校编码: 10384  
学号: 22320141151366

密级\_\_\_\_\_

廈門大學

硕士学位论文

# 大弹涂鱼黑视蛋白基因的研究

Studies of melanopsin in the mudskipper *Boleophthalmus*  
*pectinirostris*

杨明姝

指导教师姓名: 洪万树 教授  
专业名称: 海洋生物  
论文提交日期: 2017 年 9 月  
论文答辩时间: 2017 年 6 月

2017 年 9 月

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为（厦门大学海洋与地球学院洪万树老师）课题（组）的研究成果，获得（厦门大学海洋与地球学院洪万树老师）课题（组）经费或实验室的资助，在（厦门大学海洋与地球学院洪万树老师）实验室完成。（请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明）

本人声明该学位论文不存在剽窃、抄袭等学术不端行为，并愿意承担因学术不端行为所带来的一切后果和法律责任。

声明人（签名）：

指导教师（签名）：

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目 录

摘要.....	I
Abstract.....	III
缩略语表.....	VI
<b>第一章 绪论</b> .....	<b>1</b>
1.1 大弹涂鱼的形态分类.....	1
1.2 大弹涂鱼的生物学特性.....	2
1.3 视觉视蛋白（Visual opsin）和非视觉蛋白（Non-visual opsin）.....	3
1.4 黑视蛋白.....	4
1.4.1 黑视蛋白的发现.....	4
1.4.2 黑视蛋白的命名.....	7
1.4.3 黑视蛋白的分子结构.....	7
1.4.4 黑视蛋白的光化学机制.....	8
1.4.5 黑视蛋白的作用光谱.....	10
1.4.6 黑视蛋白的功能.....	10
1.5 本研究的目的和意义.....	12
参考文献.....	13
<b>第二章 大弹涂鱼全脑的组织学</b> .....	<b>18</b>
2.1 大弹涂鱼全脑的组织学.....	19
2.1.1 实验材料.....	19
2.1.2 实验方法.....	20
2.2 结果.....	21
2.2.1 大弹涂鱼全脑外部形态结构.....	22
2.2.2 大弹涂鱼脑的 H.E.染色和尼氏染色.....	24
2.3 讨论.....	28
参考文献.....	29
<b>第三章 大弹涂鱼四种黑视蛋白基因亚型的克隆和组织表达</b> .....	<b>30</b>

3.1 大弹涂鱼四种黑视蛋白基因亚型的分子克隆.....	30
3.1.1 实验材料.....	30
3.1.2 实验方法.....	32
3.2 大弹涂鱼四种黑视蛋白基因亚型的组织表达.....	42
3.2.1 实验材料.....	42
3.2.2 实验方法.....	43
3.3 结果.....	45
3.3.1 总 RNA 的提取.....	45
3.3.2 大弹涂鱼 <i>ef1<math>\alpha</math></i> 中间片段的克隆.....	46
3.3.3 大弹涂鱼四种黑视蛋白基因亚型的全长 cDNA 序列及分析.....	46
3.3.4 大弹涂鱼四种黑视蛋白基因亚型的系统进化分析.....	54
3.3.5 大弹涂鱼四种黑视蛋白基因亚型的组织表达.....	56
3.4 讨论.....	61
参考文献.....	63
<b>第四章 大弹涂鱼四种黑视蛋白基因亚型的日周期、半月周期和季节</b>	
<b>表达.....</b>	<b>65</b>
4.1 大弹涂鱼四种黑视蛋白基因亚型的周日表达.....	66
4.1.1 实验材料.....	66
4.1.2 实验方法.....	66
4.2 大弹涂鱼四种黑视蛋白基因亚型的半月周期表达.....	66
4.2.1 实验材料.....	66
4.2.2 实验方法.....	67
4.3 大弹涂鱼四种黑视蛋白基因亚型的季节表达.....	67
4.3.1 实验材料.....	67
4.3.2 实验方法.....	68
4.4 实验结果.....	68
4.4.1 大弹涂鱼四种黑视蛋白基因亚型的周日表达.....	68
4.4.2 大弹涂鱼四种黑视蛋白基因亚型的半月周期表达.....	70
4.4.3 大弹涂鱼四种黑视蛋白基因亚型的季节表达.....	73

4.5 讨论.....	75
参考文献.....	77
结论与展望.....	81
1 结论.....	81
2 展望.....	81
特色与创新.....	82
在学期间科研情况 .....	83

厦门大学博硕士学位论文摘要库

**Contents**

Chinese abstract .....	I
English abstract .....	III
Abbreviations and symbols .....	VI
Chapter 1 General introduction.....	1
1.1 Morphological classification of <i>Boleophthalmus pectinirostris</i> .....	1
1.2 Biological characteristics of <i>Boleophthalmus pectinirostris</i> .....	2
1.3 Visual opsin and Non-visual opsin.....	3
1.4 Melanopsin .....	4
1.4.1 Discovery of melanopsin .....	4
1.4.2 Nomenclature of melanopsin.....	7
1.4.3 Structure of melanopsin.....	7
1.4.4 Photochemistry of melanopsin .....	8
1.4.5 Action spectrum of melanopsin .....	10
1.4.6 The functions of melanopsin .....	10
1.5 Objectives and significance of this study.....	12
References .....	13
Chapter 2 Histological analysis of <i>Boleophthalmus pectinirostris</i> brain .	18
2.1 Histological analysis of <i>Boleophthalmus pectinirostris</i> brain.....	19
2.1.1 Materials .....	19
2.1.2 Methods .....	20
2.2 Results .....	21
2.2.1 External structure of <i>Boleophthalmus pectinirostris</i> brain.....	22
2.2.2 Hematoxylin-eosin stain and nissol stain in the brain of <i>Boleophthalmus pectinirostris</i> .....	24
2.3 Discussion .....	28
References .....	29

Chapter 3 Gene cloning and tissue expression of melanopsin subtypes from <i>Boleophthalmus pectinirostris</i> .....	30
3.1 Cloning of four melanopsin subtypes cDNA .....	30
3.1.1 Materials .....	30
3.1.2 Methods .....	32
3.2 Tissue distribution of four melanopsin mRNAs in <i>Boleophthalmus pectinirostris</i> .....	42
3.2.1 Materials .....	42
3.2.2 Methods .....	43
3.3 Results .....	45
3.3.1 Extraction of total RNA.....	45
3.3.2 Analysis of <i>efl<math>\alpha</math></i> cDNA in <i>Boleophthalmus pectinirostris</i> .....	46
3.3.3 Analysis of four melanopsin cDNA and amino acid sequences in <i>Boleophthalmus pectinirostris</i> .....	46
3.3.4 Phylogenetic analysis of four melanopsin subtypes .....	54
3.3.5 Tissue distribution of four melanopsin mRNAs in <i>Boleophthalmus pectinirostris</i> .....	56
3.4 Discussion .....	61
References .....	63
Chapter 4 Diurnal, semilunar and seasonal variations of four melanopsin subtypes genes in <i>Boleophthalmus pectinirostris</i> .....	65
4.1 Diurnal variations of four melanopsin subtypes in <i>Boleophthalmus pectinirostris</i> .....	66
4.1.1 Materials .....	66
4.1.2 Methods .....	66
4.2 Semilunar variations of four melanopsin subtypes in <i>Boleophthalmus pectinirostris</i> .....	66
4.2.1 Materials .....	66
4.2.2 Methods .....	67



4.3 Seasonal variations of four melanopsin subtypes in <i>Boleophthalmus pectinirostris</i> .....	67
4.3.1 Materials .....	67
4.3.2 Methods .....	68
4.4 Results .....	68
4.4.1 Diurnal variations of four melanopsin subtypes in <i>Boleophthalmus pectinirostris</i> .....	68
4.4.2 Semilunar variations of four melanopsin subtypes in <i>Boleophthalmus pectinirostris</i> .....	70
4.4.3 Seasonal variations of four melanopsin subtypes in <i>Boleophthalmus pectinirostris</i> .....	73
4.5 Discussion .....	75
References .....	77
Conclusions and prospects.....	81
1 Conclusions .....	81
2 Prospects.....	81
Characteristics and innovation.....	82
Scientific research during postgraduate study .....	83

## 摘要

大弹涂鱼 (*Boleophthalmus pectinirostris*) 是生活于潮间带淤泥滩涂的一种两栖鱼类。课题组前期研究表明, 雌性大弹涂鱼生殖群体在繁殖季节出现半月周期的产卵现象, 血清中的性类固醇激素、褪黑素、间脑中的褪黑素受体亚型基因 *mntnr1a1.4* 和卵巢中的褪黑素受体亚型基因 *mntnr1a1.7* 也具有明显的半月周期变化节律, 并且半月周期峰值出现的时间与产卵时间基本一致。为了进一步了解大弹涂鱼黑视蛋白与褪黑素以及半月周期产卵习性的关系, 本文采用分子生物学等方法克隆了大弹涂鱼四种黑视蛋白基因亚型 (*opn4m1*、*opn4m3*、*opn4x1*、*opn4x2*), 研究了其在不同组织、日周期、半月周期和不同季节中的表达情况。并在光学显微镜下观察研究了大弹涂鱼的全脑外部形态结构和组织细胞学特征。主要结果如下:

1. 大弹涂鱼脑组织可分为前脑、中脑和后脑三大部分。前脑包括了嗅球、端脑以及间脑。大弹涂鱼的端脑较发达且由两半球组成。中脑包括了视顶盖等部分, 后脑由小脑和延脑组成。

2. *opn4m1* 基因亚型全长为 2299 bp, 可编码 496 个氨基酸, 5'端有一个 621 bp 的非编码区, 3'端有一个 187 bp 的非编码区; *opn4m3* 基因亚型全长为 3381 bp, 可编码 546 个氨基酸, 5'端有一个 126 bp 的非编码区, 3'端有一个 1614 bp 的非编码区; *opn4x1* 基因亚型全长为 1588 bp, 可编码 419 个氨基酸, 5'端有一个 176 bp 的非编码区, 3'端有一个 152 bp 的非编码区; *opn4x2* 基因亚型全长为 2668 bp, 可编码 516 个氨基酸, 5'端有一个 900 bp 的非编码区, 3'端有一个 217 bp 的非编码区。系统进化分析显示四种黑视蛋白基因亚型属于两大分支: *opn4x* (*Xenopus laevis*) 和 *opn4m* (Mammalian), 并且将四种基因亚型分别命名为 *opn4m1*、*opn4m3*、*opn4x1*、*opn4x2*。

3. 荧光定量方法分析结果显示, 虽然四种黑视蛋白基因亚型在雌性大弹涂鱼的不同组织中的分布不一样, 但在眼睛中黑视蛋白基因亚型的表达量显著高于脑、皮肤、鳃、肾、肌肉、脾、卵巢组织; 且肝脏、肠道组织都未检测到四种黑视蛋白的 mRNA。

4. 不论在脑组织或者眼睛中, 黑视蛋白的周日变化表达都存在相似特点:

在上午（04:30-10:30）都维持低的表达水平；且同一种黑视蛋白基因亚型在不同脑区的周日表达变化并不是完全一致的，特别是 *opn4m3* 基因亚型在端脑和间脑出现了相反的两端表达趋势。

5. 生殖高峰期，雌性大弹涂鱼端脑中黑视蛋白 *opn4m3* 和 *opn4x1* 亚型基因的表达呈现明显的半月周期表达规律，一个月内有二个周期，在每个周期都出现一个峰值，且峰值出现的时间与大弹涂鱼血清中褪黑素、性类固醇激素峰值出现的时间及产卵时间基本一致；在眼睛和间脑中并没有检测到半月周期的表达变化规律。

6. 荧光定量分析发现，无论是端脑还是间脑，黑视蛋白基因亚型 *opn4m3* 和 *opn4x2* 在生殖高峰期（5-7 月）的表达量都没有显著变化；*opn4m1* 在端脑中的表达量 5 月份呈现显著的上调，但在间脑中并没有显著变化；端脑中 *opn4x1* 的表达量在 3 月的表达量最低，4 月的表达量升高 ( $p < 0.05$ )，5-6 月表达量达到高峰。而在间脑中 *opn4x1* 的表达量在 4 月显著增加后，5-6 月表达量却出现降低，7 月份表达量又升高。

综上所述提示，端脑中的黑视蛋白基因亚型可能是大弹涂鱼半月周期产卵节律的调控因子，光照信息通过端脑传递到 HPG 轴或直接作用于褪黑素来发挥其调控雌性大弹涂鱼的产卵活动。

关键词：大弹涂鱼；黑视蛋白；半月周期；克隆表达

## Abstract

The burrow-dwelling species of the mudskipper *Boleophthalmus pectinirostris* is widely distributed in the marine intertidal regions. In our previous study, during the spawning season, the female mudskipper stock exhibits a semilunar spawning pattern, variations of plasma steroid hormones, melatonin, melatonin receptor genes of *mtnr1a1.4* in the diencephalon and *mtnr1a1.7* in the ovary, were synchronized obviously with semilunar periodicity. In addition, the peaks of semilunar rhythm coincided with the timing of spawning in this species. To improve our understanding of linkage between melanopsin and melatonin, and semilunar spawning physiology in this species, in this study, using molecular biological method, we cloned all melanopsin subtypes (*opn4m1*, *opn4m3*, *opn4x1*, *opn4x2*) from *B. pectinirostris*, and analyzed their tissue distribution, diurnal, semilunar and seasonal variations. In addition, we studied the external structure and cytoarchitecture of *B. pectinirostris* brain under optical microscope. The main results and conclusions are as follows:

1. The brain of *B. pectinirostris* can be mainly divided into three parts: the forebrain, midbrain and hindbrain. The forebrain is composed of the olfactory bulbs, telencephalon and diencephalon. Telencephalon is well developed and composed of two hemispheres. The midbrain contains the optic tectum and other components. The hindbrain consists of cerebellum and myelencephalon.

2. The full sequence of *opn4m1* was 2299 bp, which encoded a protein of 496 amino acids, flanked by 187 bp of 3' UTR and 621 bp of 5' UTR. The cloned complete sequence of *opn4m3* was 3381 bp, encoding a protein of 546 amino acids. 5' and 3' UTR regions were 126 and 1614 bp. The full length of the *opn4x1* cDNA was 1588 bp, including encoding 419 amino acids, 176 bp in the 5' UTR and 152 bp in the 3' UTR. The 2668 bp *opn4x2* cDNA codes for a 516-aa protein, there were 900 bp and 217 bp in the 5' and 3' UTR regions, respectively. Phylogenetic analysis of known melanopsin genes in vertebrates further verified that the four melanopsin subtypes cloned from *B. pectinirostris* can be divided into two branches, the mammalian-like

(*opn4m*) and the *Xenopus*-like (*opn4x*) melanopsins, designated as *opn4m1*, *opn4m3*, *opn4x1*, *opn4x2*, respectively.

3. Quantitative real-time PCR was used to analyze the expression of the four melanopsin subtypes in different tissues of *B. pectinirostris*. The results showed that all four melanopsin subtypes had different abundances in different tissues of female, and expressed significantly higher in the eyes than other tissues (brain, skin, gill, kidney, muscle, spleen, ovary), while the four melanopsin subtypes were not observed in the liver and intestine.

4. Diurnal expression of melanopsin mRNAs showed similar patterns in both brain and eyes, low in the morning (04:30-10:30). The same subtype showed various diurnal expressions in different brain regions, especially the *opn4m3* mRNAs displaying the opposite trends in the telencephalon and diencephalon.

5. During peak spawning period, the transcript levels of *opn4m3* and *opn4x1* in the telencephalon displayed obviously semilunar rhythms in the female mudskippers, exhibiting two cycles within a lunar month, each one with a peak. Moreover, the peaks coincided with the timing of spawning, the plasma levels of melatonin and steroid hormones in this species. The transcript levels *opn4m3* and *opn4x1* did not show any semilunar expression patterns in the diencephalon and eyes.

6. Using real time PCR, we found that levels of *opn4m3* and *opn4x2* did not significantly change in the telencephalon and diencephalon during the peak spawning (May and July). The *opn4m1* mRNA was significantly up-regulated in the telencephalon during May, but not in the diencephalon. In the telencephalon, the expression of *opn4x1* was the lowest before the spawning season (March), while during the peak spawning season (from April to June) *opn4x1* was significantly up-regulated and reached the highest level. However, in the diencephalon, the transcript level of *opn4x1* increased significantly in April, was down-regulated from May to June, and was significantly up-regulated in July.

Taken together, the results from the present study suggested that melanopsin subtypes in telencephalon may be the regulation factor of semilunar spawning activity

in the mudskipper *B. pectinirostris*; light information is transferred to the HPG axis through the telencephalon or acts directly on melatonin to modulate spawning of female mudskippers.

Key Words: *Boleophthalmus pectinirostris*; Melanopsin; Semilunar rhythm; Cloning and expression

厦门大学博硕士学位论文摘要库

## 缩略语表

缩略语	英文全称	中文全称
cGMP	Cyclic guanosine monophosphate	环磷酸鸟苷
RGC	Retinal ganglion cell	视网膜神经节细胞
SCN	Suprachiasmatic nucleus	视交叉上核
GPCR	Guanosine-binding protein coupled receptor	G 蛋白偶联受体
LH	Luteinizing hormone	促黄体激素
NCBI	National center for biotechnology	美国国家生物信息中心
ORF	Open reading frame	开放阅读框
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
Melatonin	N-acetyl-5-methoxytryptamine	褪黑激素
Amp	Ampicillin	氨苄青霉素
BAN	4-bromoanisole	4-溴苯甲醚
BLAST	Basic local alignment search tool	基本局域联想搜索工具
Bp	Base pair	碱基对
cDNA	Complementary DNA	互补脱氧核糖核酸
DEPC	Diethyl pyrocarbonate	焦碳酸二乙脂
DNA	Deoxyribonucleic acid	脱氧核糖核酸
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid	乙二胺四乙酸
FSH	Follicle-stimulating hormone	促滤泡激素
LB	Luria-bertani medium	LB 培养
SOC	Supraoptic/Chiasmatic nucleus	视上核
TRPC	Transient receptor potential channel	瞬时受体电位通道
SAD	Seasonal affective disorder	季节性情绪失控
LED	Light-emitting diode	发光二极管
$\alpha$ -MSH	$\alpha$ -Melanocyte stimulating hormone	$\alpha$ -黑色素细胞刺激素
POMC	Proopiomelanocortin	阿黑皮素原

## 第一章 绪论

### 1.1 大弹涂鱼的形态分类

大弹涂鱼 (*Boleophthalmus pectinirostris*) 隶属于脊索动物门 (Chordata)、脊椎动物亚门 (Vertebrate)、硬骨鱼类 (Osteichthyes)、辐鳍亚纲 (Actinopterygii)、鲈形目 (Perciformes)、鰕虎鱼亚目 (Gobioidei)、背眼鰕虎鱼亚科 (Oxudercinae)、大弹涂鱼属 (*Boleophthalmus*)。一般体长 10-20 cm, 体重 20-50 g<sup>[1]</sup>。

体型延长, 鱼体前部呈现亚圆筒形, 体后方侧扁; 鱼尾柄高而短; 背腹缘平直。头大, 稍侧扁。吻前倾斜, 圆钝, 大于眼径。口大, 前位, 平裂。舌大且前端是不游离的。每侧有 2 个鼻孔, 且相距较远: 前鼻孔位于吻褶前缘, 呈角状突出; 后鼻孔较小, 呈圆形, 位于眼的前缘<sup>[1,2]</sup>。大弹涂鱼具有突出的眼, 处于背侧位, 相互靠近。眼的间隔狭窄, 小于眼径, 具有相当弯曲的角膜, 稍扁平的晶状体, 以适应空中视觉, 这与空气中光线强的适应有关<sup>[3]</sup>。中等年龄的弹涂鱼 (*Periophthalmus*) 眼球的直径可达 4 mm。角膜很厚 (3.8 mm), 并且很弯曲。晶状体稍扁, 直径为轴长的 1.14 倍。其视网膜中以圆锥细胞为主, 是对空气视觉及增加视敏度的适应, 色素上皮很薄, 但色素含量很多。弹涂鱼在每平方毫米的视网膜表面具有 90,000 个神经细胞和 225,000 个视觉细胞<sup>[4]</sup>。眼下方具 1 个眼窝, 且下眼睑发达, 可将眼部分收入。上颌骨后端向后可达眼的后缘下方。上下颌约等长。上下颌各有 1 行牙, 上颌牙呈现锥状, 最前方每侧 3 个牙呈现犬牙状; 下颌牙斜向外, 平卧状, 齿端斜截形成, 或有 1 凹缺。颞骨、犁骨和舌上均无齿。

体表皮较厚, 没有侧线, 身体体色呈深褐色, 体背为黑褐色, 腹部呈灰色。身体及头部表面均被小圆鳞, 前部鳞较细小, 后部鳞大。胸鳍的基部亦被细圆鳞。背鳍与尾鳍上可见蓝色圆点。背侧可见 6 个黑色条状带, 身体有不规则的分布着绿褐色斑点。胸鳍基部宽大, 肌肉柄发达, 且有黄绿色虫纹图案, 腹鳍愈合成吸盘。有 2 个背鳍: 第 1 背鳍很小, 具有 5 条鳍棘, 第 3 棘最长, 鳍棘的末端成丝状延长, 第 2 背鳍与臀鳍的长度大体相等, 第 2 背鳍有 3 条灰白色横线, 颜色艳丽。尾鳍呈楔形, 较宽大 (图 1-1)。雌雄异体, 雄性尿殖乳突小而尖, 雌性尿殖乳突色红, 大且圆, 随着卵巢发育而增大<sup>[1,2,5]</sup>。



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库