

东北荷包猪 MC4R 基因的多态性分析

邹剑戎, 苏玉虹* (辽宁医学院, 辽宁锦州 121000)

摘要 [目的] 分析荷包猪 MC4R 基因 TaqI 酶切位点多态性, 为了解其遗传特点奠定基础。[方法] 利用 PCR-RFLP 技术研究荷包猪保种群体 MC4R 基因型分布情况, 并与国内外猪种的 MC4R 基因频率进行比较。[结果] 不同品系猪的 MC4R 基因的 Asp298Asn 突变分布差别显著。荷包猪 MC4R 基因优势基因型为 AA, 基因型频率为 66.67%, 而 BB 基因型未能检出。荷包猪 MC4R 基因型与国内梅山猪、民猪和莱芜猪等稍有不同, 与国外汉普夏、大白、皮特兰等差别较大, 总体显示国内地方猪种 298Asp 基因为优势基因, 而外种猪基因 Asp298Asn 突变率显著高于我国地方猪种。[结论] 该研究为荷包猪资源保存、品种选育和开发利用提供了科学依据。

关键词 MC4R 基因; 多态性; 荷包猪

中图分类号 S828 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)34-14900-02

Polymorphism Analysis on Melanocortin-4 Receptor (MC4R) Gene in Northeast Hebao Pig

ZOU Jianrong et al (Liaoning Medical College, Jinzhou, Liaoning 121000)

Abstract [Objective] The aim was to analyze the polymorphism of TaqI restriction site of melanocortin-4 receptor (MC4R) gene in northeast Hebao pig and lay the foundation for understanding its genetic characteristics. [Method] The distribution condition of the genotype of the conservation population of Hebao pig was studied by PCR-RFLP technique and the gene frequency of MC4R of the pig species between home and abroad were compared. [Result] The distribution of Asp298Asn mutation of MC4R gene of pigs in different species had significant difference. The preponderant genotype of MC4R gene of Hebao pigs was AA and the genotype frequency was 66.67%, but the genotype of BB was not detected. MC4R genotype of Hebao pig had slight difference with that of some Chinese species such as Mishan pig, Min pig and Laiwu pig, and had large difference with some foreign species such as Hampshire pig, Large White pig and Pietrain pig. On the whole, it showed that 298Asp gene of the Chinese pig species was preponderant, but Asp298Asn mutation rate of the gene of the foreign pig species was significant higher than that of the Chinese pig species. [Conclusion] The research provided the scientific basis for the resource preservation, variety breeding and the development and utilization of Hebao pig.

Key words MC4R gene; Polymorphism; Hebao pig

黑素皮质激素受体 4 (melanocortin-4 receptor, MC4R) 是下丘脑腹内侧核分泌的一种肽类物质, 是 G 蛋白偶联受体超家族的一个亚型^[1]。MC4R 在人和鼠的体重、能量稳态和采食量的调控中具有重要作用^[2]。MC4R 基因敲除小鼠的研究表明: MC4R 与体重、代谢率和血清胰岛素水平显著相关^[3]。MC4R 的移码突变可以导致人类的肥胖^[4]。自猪 MC4R 基因克隆以来, 学者们对其进行了大量研究。MC4R 基因第 7 跨膜结构功能域的一个高度保守区内发生了一个错义突变 (G/A), 产生了 TaqI 酶切位点的改变, 猪的这一突变使 MC4R 蛋白第 298 位氨基酸发生天冬酰胺代替天冬氨酸的错义突变, 因此, MC4R 可分为 AA、AB、BB 3 种基因型^[5]。Kim 等研究显示, MC4R 基因型与猪背膘厚、110 kg 日龄、试验期日增重和日采食量显著相关, 可作为猪的重要经济性状的候选基因^[6]。

荷包猪是东北民猪的一个小型类群, 因其外形酷似“荷包”而得名, 主要分布于辽西交通不便的山区一带。荷包猪抗逆性强, 耐粗饲, 肌间脂高, 由于其肌纤维细密, 大理石花纹明显, 肉质细嫩, 肉味香浓, 故有“北方香猪”之美称, 是我国宝贵的地方良种资源, 目前已被列入《国家畜禽品种资源保护名录》。笔者利用 PCR-RFLP 技术, 研究荷包猪保种群体 MC4R 基因型的分布情况, 并与国内外猪种的 MC4R 基因频率进行比较, 了解其遗传特点, 旨在为荷包猪资源保存、品种选育和开发利用提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 材料 荷包猪由辽宁省家畜家禽遗传资源保存利用中心提供, 共 72 头, 采集其耳组织样。将采集后的样品迅速浸

泡在 75% 酒精溶液中, 实验室冷冻保存备用。

1.2 方 法

1.2.1 DNA 的提取。采用传统的苯酚-氯仿抽提法提取基因组 DNA, TE Buffer 溶解后, -20℃ 保存备用。

1.2.2 引物设计与合成。参考相关文献报道的 MC4R 的引物序列设计引物, 引物由上海生物工程技术服务有限公司合成。引物序列为: F: 5'-TACCCTGACCACTCTTGATTG-3'; R: 5'-ATAGCAACAGATGATCTCTTTG-3'。

1.2.3 PCR 扩增。PCR 反应总体积为 20 μl, 反应体系如下: 10 × buffer 2 μl, dNTP (2.5 mmol/L) 1 μl, 引物 (20 pmol/μl) 各 1 μl, MgCl₂ (2.5 mmol/L) 1 μl, Taq DNA 聚合酶 (10 U/μl) 0.2 μl, DNA 模板 50 ng, 加双蒸水至 20 μl。PCR 反应条件: 95℃ 变性 4 min, 35 个循环 (94℃ 变性 45 s, 58℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1 min), 72℃ 延伸 8 min。PCR 产物于 4℃ 保存备用。用 2% 琼脂糖电泳检测 PCR 产物。

1.2.4 PCR-RFLP 分析及电泳检测。以限制性酶 TaqI 酶切 PCR 产物, 酶切反应体系 20 μl, 其中 PCR 产物 10 μl、TaqI 酶 5 U, 65℃ 酶切 4~5 h。酶切产物用 4% 琼脂糖胶电泳检测, EB 染色。出现 156、70 bp 2 个条带的个体为 AA 型, 只出现 226 bp 条带的个体为 BB 型, 同时出现 226、156 和 70 bp 3 个条带的个体为 AB 型。

1.3 统计分析 利用 SPSS13.0 计算基因型和基因频率, 并对其进行 Hardy-Weinberg 平衡适合性检验。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增结果 MC4R 基因 PCR 扩增产物片段长度为 226 bp, 图 1 箭头所示特异性条带为扩增产物。

2.2 MC4R 基因 298 位点 PCR-RFLP 的检测结果 由图 2 可知, 扩增片段的酶切产物出现了 AA 型和 AB 型 2 种类型。

2.3 MC4R 基因基因型及基因频率的分布 荷包猪 MC4R 基因型见表 1, 可知 AA 型为优势基因型, 298Asp 等位基因频

基金项目 辽宁省科技厅基金 (2005408002 和 2004408002)。

作者简介 邹剑戎 (1982-), 男, 湖北武汉人, 硕士研究生, 研究方向: 分子遗传学。* 通讯作者。

收稿日期 2008-09-27

率达83.33%。对该基因在荷包猪群体的遗传分布进行 Hardy-Weinberg 平衡适合性检验,结果发现该位点分布符合 Hardy-Weinberg 平衡($\chi^2 = 2.88, P > 0.05$)。

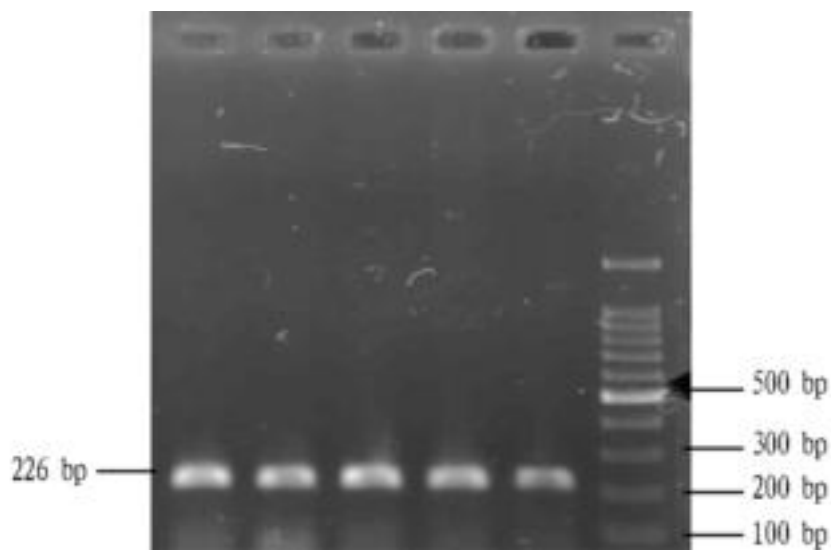
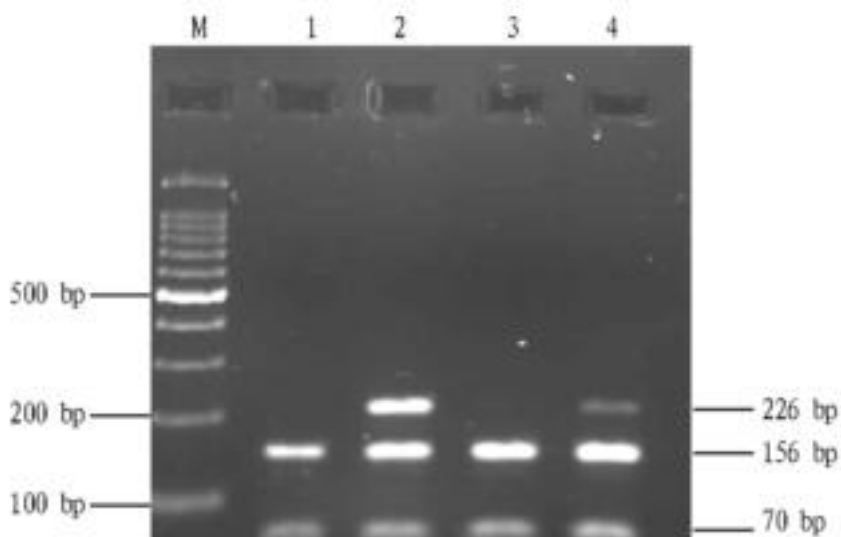


图1 MC4R 基因PCR 扩增结果

Fig.1 PCR amplification results of MC4R gene



注:M 为100 bp DNA marker ;1,3 为 AA 型;2,4 为 AB 型。

Note: M, 100 bp DNA marker; 1 and 3, Genotype AA; 2 and 4, Genotype AB.

图2 MC4R 基因PCR 产物 TaqI 酶切结果

Fig.2 The enzyme digestion results of PCR products of MC4R gene by TaqI enzyme

表1 荷包猪 MC4R 基因 Asp298Asn 位点基因型分布

Table 1 The genotype distribution of MC4R gene at Asp298Asn locus in Hebao Hg

项目 Item	基因型 Genotype			等位基因频率 % Allele frequency	
	AA	AB	BB	298Asp	298Asn
检测数 头 Detected number (n)	48.00	24.00	0	-	-
频率 %Frequency	66.67	33.33	0	83.3	16.67
期望值 头 Expectation value (n)	50.00	20.00	2	-	-

大量研究发现不同品系猪的 MC4R 基因的 Asp298Asn 突变分布差异显著。由表1、2 可知,荷包猪 AA 基因型为优势基因型,频率达66.67%,而 BB 基因型未能检出,这与国内的梅山猪、民猪、二花脸猪和莱芜猪等地方猪略有不同。荷包猪与外种猪 MC4R 基因型差别明显,如汉普夏猪均为 BB 型,杜洛克和大白猪中 298Asn 基因频率较高;长白猪中 2 个等位基因分布均衡或表现 298Asp 为优势基因;皮特兰猪中 298Asp 基因频率高于 298Asn。总体显示国内地方猪种 298Asp 基因为优势基因,而外种猪基因 Asp298Asn 突变率显

著高于我国地方猪种。

表2 不同猪品种 MC4R 基因基因型和等位基因频率

Table 2 The genotype frequency and gene frequency of MC4R gene in different pig breeds

品种 Breeds	检测数 头 Detected number (n)	基因型 Genotype			等位基因频率 % Gene frequency		参考 文献 Reference
		AA	AB	BB	298Asp	298Asn	
荷包猪	72	48	24	0	83.33	16.67	
Hebao Hg							
民猪 Min Hg	40	40	0	0	100	0	[7]
二花脸猪	65	64	1	0	99.20	0.80	[7]
Ehuaian Hg							
梅山猪	16	16	0	0	100	0	[8]
Mishan Hg							
莱芜猪	33	33	0	0	100	0	[9]
Laiwu Hg							
大白猪	44	0	2	42	2.30	97.70	[7]
Yorkshire Hg							
汉普夏猪	23	0	0	23	0	100	[10]
Hampshire Hg							
皮特兰猪	98	0	7	91	3.60	96.40	[7]
Retran Hg							
大白×莱芜	95	51	40	4	74.70	25.30	[9]
Yorkshire Hg × Laiwu Hg							
大白×蓝塘	111	30	62	19	50.40	49.60	[7]
Yorkshire Hg × Lantang Hg							

3 结论与讨论

(1) MC4R 在调控动物采食行为和能量平衡中起重要作用,可以作为影响猪经济性状的候选基因。Kim 等发现猪 MC4R 基因高度保守区内发生了一个错义突变 Asp298Asn, 并指出该位点多态性与猪的许多经济性状显著相关:等位基因 A 代表 298Asp, 与少背膘厚、慢增长速度、低采食量相关;等位基因 B 代表 298Asn, 与高背膘厚、快速增长速度、高采食量相关^[6]。对该突变进行功能分析,结果显示:298Asp 是 MC4R 信号传递给腺苷酸环化酶形成正常 G 蛋白偶联所必需的,该突变与猪的肥胖和生长速度有关^[11]。Bruun 等研究了汉普夏和长白杂交群体中不同基因型的平均背膘厚:AA 型为 9.1 mm、AB 型为 10.6 mm、BB 型为 11.1 mm,加性效应为 1.0 mm^[11]。对商品猪的研究也证实了 MC4R 基因 298 位点的 Asp298Asn 突变与背膘厚相关,且 BB 基因型个体背膘厚显著高于 AB 型和 BB 型^[9]。Houston 等研究大白猪群体发现 298Asp 的背膘厚、日增重、日采食量(13.3 mm、733 g、1 933 g)与 298Asn 的背膘厚、日增重、日采食量(14.7 mm、805 g、2 098 g)有显著差异^[12]。C.Oilo 进一步证实了 Asp298Asn 突变与猪的屠宰性状(腰肌和肩部)和肉质(脂肪酸成分)有关^[13]。

(2) 品系特异性可能导致 Asp298Asn 突变效应不同,Kim 等在梅山×大白品系内发现 A 等位基因显示出与其他 4 种品系相反的功能。刘桂兰等在大白×梅山品系内发现 298Asp 等位基因可以增加背膘厚^[8],与 Kim 等研究结果一致。Sachowiak 等用波兰大白猪、波兰长白猪和一个合成系共 679 头检测 MC4R Asp289Asn 突变与日采食量、背膘厚和

(下转第 14904 页)

- microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing[J]. *Cell*, 2005, 123:631 - 640.
- [14] GREGORY R I, YAN K P, AMUTHAN G, et al. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs[J]. *Nature*, 2004, 432:235 - 240.
- [15] HAN J, LEE Y, YEOMK H, et al. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing[J]. *Genes Dev*, 2004, 18:3016 - 3027.
- [16] HAN J, LEE Y, YEOMK H, et al. Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex[J]. *Cell*, 2006, 125:887 - 901.
- [17] HWANG H W. A hexanucleotide element directs microRNA nuclear import[J]. *Science*, 2007, 315:97 - 100.
- [18] HUIVAGNER G, ZAMORE P D. A microRNA in a multiple-turnover RNA enzyme complex[J]. *Science*, 2002, 297:2056 - 2060.
- [19] JACKSON R J, STANDAR N. How do microRNAs regulate gene expression? [J]. *Si-STKE*, 2007, 2(367):34 - 41.
- [20] KETTING R F, HSCHER S E, BERNSTEIN E, et al. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*[J]. *Genes Dev*, 2001, 15:2654 - 2659.
- [21] LAGOS QUINTANA M, RAUHUT R, LENDECKEL W, et al. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs[J]. *Science*, 2001, 294:853 - 858.
- [22] LANDTHALER M, YALCIN A, TUSCHL T. The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and its *D. melanogaster* homolog are required for miRNA biogenesis[J]. *Genes Dev*, 2004, 18:2162 - 2167.
- [23] LAUN C, HILM P, WEINSTEIN G, et al. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Science*, 2001, 294:858 - 862.
- [24] LECHELIER C H, DUNOYER P, ARAR K, et al. A cellular microRNA mediates antiviral defense in human cells[J]. *Science*, 2005, 308:557 - 560.
- [25] LEE R C, AMBROS V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Science*, 2001, 294:862 - 864.
- [26] LEE R C, FEINBAUM R L, AMBROS V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*[J]. *Cell*, 1993, 75(5):843 - 854.
- [27] LEE Y, AHNC, HAN J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing[J]. *Nature*, 2003, 425:415 - 419.
- [28] LEE Y, KIM M, HAN J, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II[J]. *EMBO J*, 2004, 23:4051 - 4060.
- [29] LEWIS B P, SHIH H, JONES RHOADES M W, et al. Prediction of mammalian microRNA targets[J]. *Cell*, 2003, 115:787 - 798.
- [30] LU J, GETZ G, MISKA E A, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers[J]. *Nature*, 2005, 435:834 - 838.
- [31] MARONEY P A, YU Y, FISHER J, et al. Evidence that microRNAs are associated with translating messenger RNAs in human cells[J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2006, 13:1102 - 1107.
- [32] PFEFFER S, ZAVOLAN M, GRASSER F A, et al. Identification of virus-encoded microRNAs[J]. *Science*, 2004, 304:734 - 736.
- [33] REINHART B J, SLACK F, BASSON M, et al. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Nature*, 2000, 403(6772):901 - 906.
- [34] REINHART B J, WEINSTEIN E G, RHOADES M W, et al. MicroRNAs in plants[J]. *Genes Dev*, 2002, 16(13):1616 - 1626.
- [35] RUBY J G, JAN C, PLAYER C, et al. Large-scale sequencing reveals 21U-RNAs and additional microRNAs and endogenous siRNAs in *C. elegans* [J]. *Cell*, 2006, 127:1193 - 1207.
- [36] SCHWARZ D S, HUIVAGNER G, DUT, et al. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex[J]. *Cell*, 2003, 115:199 - 208.
- [37] SLACK F J, BASSON M, HUIVAGNER G, et al. The *lin-41* RBCC gene acts in the *C. elegans* heterochronic pathway between the *let-7* regulatory RNA and the LIN-29 transcription factor[J]. *Mol Cell*, 2000, 5:659 - 669.
- [38] SULLIVAN C S, GRUNDHOFF A T, TEVETHIAS, et al. SV40-encoded microRNAs regulate viral gene expression and reduce susceptibility to cytotoxic T cells[J]. *Nature*, 2005, 435:682 - 686.
- [39] YEKIA S, SHIH H, BARTHEL D P. MicroRNA-directed cleavage of *HoxB8* mRNA[J]. *Science*, 2004, 304:594 - 596.
- [40] WGHIMAN B, HAI, RUMKUN G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans* [J]. *Cell*, 1993, 75:855 - 862.
- [41] YEKIA S, SHIH H, BARTHEL D P. MicroRNA-directed cleavage of *HoxB8* mRNA[J]. *Science*, 2004, 304:594 - 596.
- [42] YI R, QIN Y, MACARAI G, et al. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs [J]. *Genes Dev*, 2003, 17:3011 - 3016.

(上接第14901页)

腹脂的连锁关系,结果显示该位点多态性与日采食量、背膘厚和腹脂无明显相关^[14]。Park等在野猪×大白品系中发现该突变与生长速度和脂肪性状无明显相关^[15]。而Kim等在伯克群×约克夏(n=525)中发现Asp289Asn突变与脂肪沉积性状显著相关。不同的研究结果表明MC4R的遗传背景可能对Asp298Asn的突变效应起着重要作用。

(3) 荷包猪是我国宝贵的猪种资源之一,现仅存少数量的保种群。在荷包猪的特殊遗传背景下,MC4R基因位点的突变与荷包猪的生产性能有何关系,是否存在其他与经济性状相关的多态位点,有待进一步研究。荷包猪前身是辽西野猪,有着独特的抗逆性,耐粗饲力,肉质极佳,对其进行分子水平研究,可以为荷包猪的保种和进一步开发利用提供重要科学依据。

参考文献

- [1] GANIZI M W A, KONDA Y, et al. Molecular cloning, expression, and gene localization of a fourth melanocortin receptor[J]. *J Biol Chem*, 1993, 268:174 - 179.
- [2] COLE R D. The central melanocortin system and energy homeostasis[J]. *Trends Endocrinol Metab*, 1999, 10:211 - 216.
- [3] HUSZAR D, LYNCH C A, FAIRCHILD HUNTRESS V, et al. Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice[J]. *Cell*, 1997, 88:131 - 141.
- [4] VASSE C, CLEMENT K, GUY-GRAND B, et al. A frameshift mutation in human MC4R is associated with a dominant form of obesity[J]. *Nat Genet*, 1998, 20:113 - 114.
- [5] KIM K S, LARSEN H J. Mapping and investigation of novel candidate for fatness, growth, and feed intake in the pig[J]. *Breeding and Physiology*, 1999, 137:20 - 21.
- [6] KIM K S, LARSEN N, SHORT T, et al. A missense variant of the porcine melanocortin-4 receptor (MC4R) gene is associated with fatness, growth, and feed intake traits[J]. *Anim Genome*, 2000, 11(2):131 - 135.
- [7] CHEN M, WANG A G, FUJ L, et al. Different allele frequencies of MC4R gene variants in Chinese pig breeds[J]. *Ach Tierz Dummerstorf*, 2004, 47(5):463 - 468.
- [8] 刘桂兰, 蒋思文, 熊远著, 等. 猪资源家系MC4R基因扫描及其与脂肪性状的相关分析[J]. *遗传学报*, 2002, 29(6):497 - 501.
- [9] 杨晓慧, 刘源, 唐辉, 等. 猪MC4R基因Asp298Asn位点的多态性及其与商品猪背膘厚的关系[J]. *农业生物技术学报*, 2008, 16(3):407 - 411.
- [10] BRUN C S, JORGENSEN C B, NELSEN V H, et al. Evaluation of porcine melanocortin 4 receptor (MC4R) gene as a positional candidate for a fatness QTL in a cross between Landrace and Hampshire [J]. *Anim Genet*, 2006, 37:359 - 362.
- [11] KIM K S, REE C Y, HSU W H, et al. Functional and phylogenetic analyses of a melanocortin-4 receptor mutation in domestic pigs[J]. *Domestic Animal Endocrinology*, 2004, 26:75 - 86.
- [12] HOUSTON R D, CAMERON N D, RANCE K A. A melanocortin four receptor (MC4R) polymorphism is associated with performance traits in divergently selected large white pig populations [J]. *Anim Genet*, 2004, 35(5):386 - 390.
- [13] OVILLO C, FERNANDEZ A, RODRIGUEZ M C, et al. Association of MC4R gene variants with growth, fatness, carcass composition and meat and fat quality traits in heavy pigs[J]. *Meat Science*, 2006, 73:42 - 47.
- [14] STACHOWAK M, SZYDLOWSKI M, OBARZANEK FOJT M, et al. An effect of a missense mutation in the porcine melanocortin-4 receptor (MC4R) gene on production traits in Polish pig breeds is doubtful [J]. *Anim Genet*, 2006, 37(1):55 - 57.
- [15] PARK H B, CARLBORG O, MARKLUND S, et al. Melanocortin 4 receptor (MC4R) genotypes have no major effect on fatness in a Large White × Wild Boar intercross [J]. *Anim Genet*, 2002, 33:155 - 157.
- [16] 强巴央宗, 张浩, 凌遥, 等. 藏猪黑素皮质激素受体4基因TaqI多态性分析[J]. *中国畜牧杂志*, 2007, 43(23):1 - 3.
- [17] LI C Q, JIN H, GUO X F, et al. RFLP analysis of melanocortin 4 receptor gene in ram of cashmere goat [J]. *Agricultural Science & Technology*, 2008, 9(3):49 - 52, 55.