

鸡 MC4R 基因新突变位点的发现

陶勇^{1,2}, 王金玉^{1*}, 李国辉¹, 胡玉萍¹

(1.扬州大学动物科学与技术学院, 江苏扬州 225009; 2.江苏畜牧兽医职业技术学院, 江苏泰州 225300)

摘要 [目的]为深入研究鸡 MC4R 基因和分子育种提供参考。[方法]采用饱和酚/氯仿法从鸡血中提取 DNA, 利用 PCR-SSCP 和 DNA 测序的方法, 对京海黄鸡 MC4R 基因的单核苷酸多态性进行分析。[结果]对 PCR 产物进行 SSCP 分析, 2 对引物均表现出多态性。引物 A 得到 2 种基因型(AA 型和 AB 型)。引物 Z 也得到 2 种基因型(CC 型和 CD 型)。将测序结果与发表的鸡 MC4R 基因序列的比较结果进行比较, 发现 2 个单核苷酸多态位点, 其中 A 引物扩增序列中的多态位点为 662 bp 处 G→C 的点突变造成的, 而 Z 引物扩增序列中的多态位点是由于在 733-734 bp 插入了一个 C 碱基引起的。[结论]该研究中未检测到 BB 和 DD 纯合基因型, 这可能与在京海黄鸡培育过程中采用分子标记方法进行选择有关。

关键词 京海黄鸡; MC4R 基因; SNPs

中图分类号 S831 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)11-04528-02

Discovery of New Mutation Points in Chicken MC4R Gene

TAO Yong et al (College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009)

Abstract [Objective] The research aimed to provide reference for further study on chicken MC4R gene and its molecular breeding. [Method] DNA was extracted from chicken blood by using saturated hydroxybenzene/ chloroform method. And the single nucleotide polymorphism of MC4R gene in Jinghai yellow chicken was analyzed by using the methods of PCR-SSCP and DNA sequencing. [Result] The PCR products were analyzed by SSCP and 2 pairs of primers showed the polymorphism. Two kinds of genotypes (AA type and AB type) were obtained from primer A and 2 kinds of genotypes (CC type and CD type) were obtained from primer Z. The comparison results between the sequencing results and the reported MC4R gene sequences showed that 2 single nucleotide polymorphic loci were found. The polymorphic loci in the amplified sequences of primer A was caused by point mutation from G to C at 662 bp and that in the amplified sequences of primer was caused by inserting one C base at 733-734 bp. [Conclusion] In this study, pure genotypes BB and DD were not detected, which was probably related with the molecular marker method used in the breeding of Jinghai yellow chicken.

Key words Jinghai yellow chicken; MC4R gene; SNPs

MC4R (Melanocortin-4 receptor) 即促黑激素皮质受体, 是动物下丘脑腹内侧核分泌的一类肽类物质, 可与脑部分泌的天然内源配体 α -促黑激素 (α -MSH, alpha melanocyte stimulating hormone) 结合, 抑制体重的增加。在哺乳动物中, MC4R 具有介导 Leptin 蛋白的功能, 是一个调节能量平衡与能量动态平衡的重要信号分子, 其主要作用是控制食欲、体重和能量代谢^[1-2]。

鸡 MC4R 基因定位在 2 号染色体的 2q12 处, 是一个单拷贝基因, 仅含有 1 个外显子, 其编码序列长度为 996 bp, 编码 332 个氨基酸, 在肾上腺、性腺、脾、脂肪和脑等组织中表达^[3]。哺乳动物的 MC4R 基因研究较多^[4-7], 而鸡 MC4R 基因的研究鲜有报道^[8-10]。笔者采用 PCR-SSCP 及测序方法对京海黄鸡进行 MC4R 基因单核苷酸多态性分析, 以期为进一步研究鸡 MC4R 基因提供资料, 并为鸡分子育种研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验鸡群 试验所用的京海黄鸡全部由江苏省海门京海黄鸡集团有限公司提供, 共 141 只, 其中公鸡 69 只, 母鸡 72 只, 每鸡翅下静脉取血 2.0 ml 左右, 其中 0.5 ml 加入裂解液中摇匀至透亮, 制成血液稀释液, 放于冰盒中带回实验室备用。

1.2 DNA 提取 参照文献[11]的方法, 采用常规的饱和酚/氯仿方法提取鸡血 DNA。

基金项目 江苏省高新技术项目(BG2004316); 江苏省“青蓝工程”培养基金资助项目。

作者简介 陶勇(1975-), 男, 江苏仪征人, 在读博士生, 讲师, 从事遗传标记与动物育种研究。* 通讯作者, 博士生导师, 教授, E-mail: jywang@yzu.edu.cn。

收稿日期 2008-02-13

1.3 引物设计与 PCR 扩增 根据发表的鸡 MC4R 基因序列(Genbank 登录号为: AB012211), 采用 Oligo primer6.0 软件设计 2 对引物, A 引物 Forward: 5'TCCATAAGATGAATTCACCCAG3', Reverse: 5'TTGCCACAATGACCAAGACG3'; Z 引物 Forward: 5'AAGCTTGCGCACATCCAAGT3', Reverse: 3'GCTGCCGAGCAGAACTAAT5'。2 对引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成。

扩增反应总体积为 25 μ l, 其中包括: 1 μ l 基因组 DNA 模板(100 ng/ μ l), 2 μ l 10 \times buffer(25 mmol/L), 2.2 μ l Mg²⁺(10 pmol/ μ l), 0.8 μ l dNTP 混合物(各 2.5 mmol/L), 引物各 1 μ l (均为 5 pmol/L), 0.2 μ l Taq 酶(2 U/ μ l)。反应条件为: 94.0 $^{\circ}$ C 预变性 10.0 min, 94.0 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 55.6 $^{\circ}$ C 复性 1 min, 72.0 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 35 个循环, 最后 72.0 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4.0 $^{\circ}$ C 保温。PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶中电泳, 结束后用 UVP 凝胶成像系统分析检测扩增结果。

1.4 SSCP 分析 移取 2 μ l PCR 产物和 5 μ l 的 loading buffer[98% 甲酰胺、0.025% 溴酚兰、0.025% 二甲苯 FF, 10 mmol/L EDTA(pH 值 8.0)、2% 甘油]混合, 98.0 $^{\circ}$ C 变性 10 min 后, 迅速插入冰中, 冰浴 10 min, 使之保持变性状态, 变性后的 PCR 产物进行非变性聚丙烯酰胺凝胶(PAGE30%, Acr: Bis=29:1)电泳, 10 V/cm 电泳 14~16 h 后, 银染显色。

1.5 克隆与测序 根据 PCR-SSCP 分析结果, 用胶回收试剂盒(BBI, Canada)回收不同基因型的扩增片段, 纯化后连接到 pGEMT easy 载体上, 转化到 DH5 α 上, 酶切鉴定后交由上海生工生物工程技术有限公司 ABIPRISM377DNA 自动测序仪完成序列测定, 独立测序 2 次。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增产物 用所设计的引物对京海黄鸡鸡群的

DNA 进行 PCR 扩增,PCR 产物经检测,特异性扩增良好,片段长度与所设计的片段大小一致,可以用来进行 SSCP 分析。

2.2 扩增产物 PCR-SSCP 分析 对 PCR 产物进行 SSCP 分析,2 对引物都表现出多态性,引物 A 得到 2 种基因型(图 1),分别为 AA 型和 AB 型,没有检测到 BB 型;引物 Z 也得到 2 种基因型(图 2),分别为 CC 型和 CD 型,DD 型未检测到。

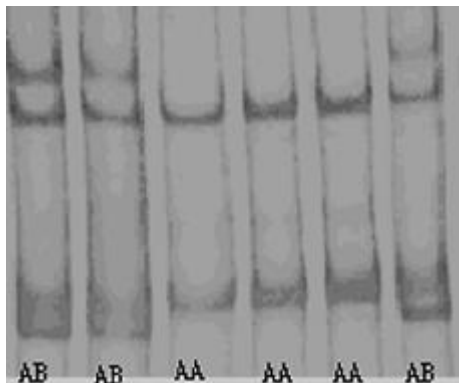


图 1 MC4R 基因 A 引物 PCR-SSCP 检测结果
Fig. 1 PCR-SSCP detection result of MC4R gene A primer

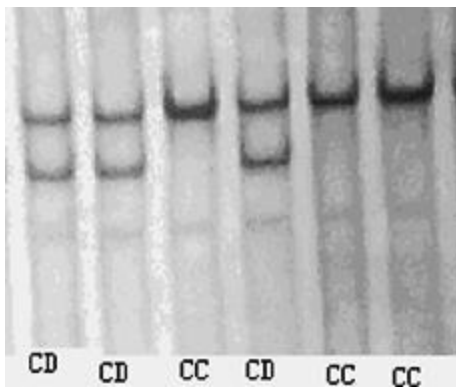


图 2 MC4R 基因 Z 引物 PCR-SSCP 检测结果
Fig. 2 PCR-SSCP detection result of MC4R gene Z primer

2.3 多态性基因片段的克隆和测序 根据测序结果,对照发表的鸡 MC4R 基因序列发现,A 引物所扩增序列中的多态位点是由 662 bp 处 G→C 的点突变造成的(图 3),而 Z 引物所扩增序列中的多态位点是由于 733~734 bp 之间插入 1 个 C 碱基引起的(图 4)。

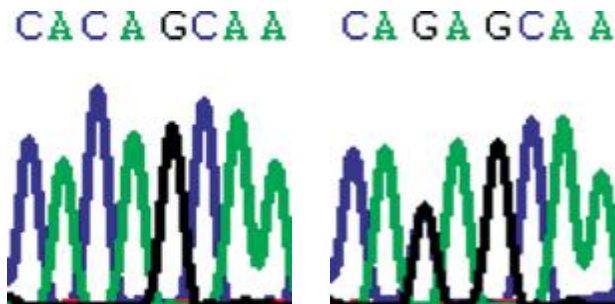


图 3 A 引物扩增序列中的点突变位点
Fig. 3 Insertion site in amplification sequence of A primer

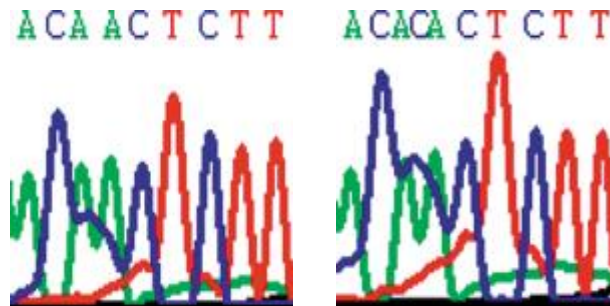


图 4 Z 引物扩增序列中的插入位点
Fig. 4 Insertion site in amplification sequence of Z primer

MC4R 基因表达部位在下丘脑、丘脑、海马组织、胎盘、十二指肠、胰腺、胃,主要生理功能是控制食欲、体重、能量代谢,调节采食行为和能量平衡。霍明东等^[9]以东北农业大学建立的高低脂双向选择肉鸡品系为研究材料,采用 PCR-SSCP 和测序方法检测 MC4R 基因编码区的 SNPs,结果在编码区发现 1 个 G315T 的突变。仇雪梅等^[10]利用 PCR-SSCP 和 DNA 测序的方法,对资源家系 F₂ 代鸡群 MC4R 基因多态性进行了分析,发现存在 4 个单核苷酸多态位点,其中,在 MC4R 基因 5' 调控区 -524 bp 发生了 C→T 碱基转换突变,在编码区发生了 G61A 碱基错义突变、G315T 碱基颠换突变和 C336T 转换突变。在该研究中,笔者也发现了鸡 MC4R 基因 G662C 点突变和 733~734 bp 间 C 碱基插入 2 个新的突变位点。

在京海黄鸡 MC4R 基因多态性分析过程中,所用的 A 引物仅检测到 AA 和 AB 种基因型,并未发现 BB 基因型,Z 引物仅检测到 CC 和 CD 种基因型,未发现 DD 基因型,这一结果可能与其实际育种情况是一致的。京海黄鸡是新培育的江苏省省级优质肉鸡新品种,培育过程中采用分子标记方法加强选择,可能是该研究中未检测到 BB 和 DD 纯合基因型的原因,这一结果也为京海黄鸡的进一步改良提供了有益的参考。

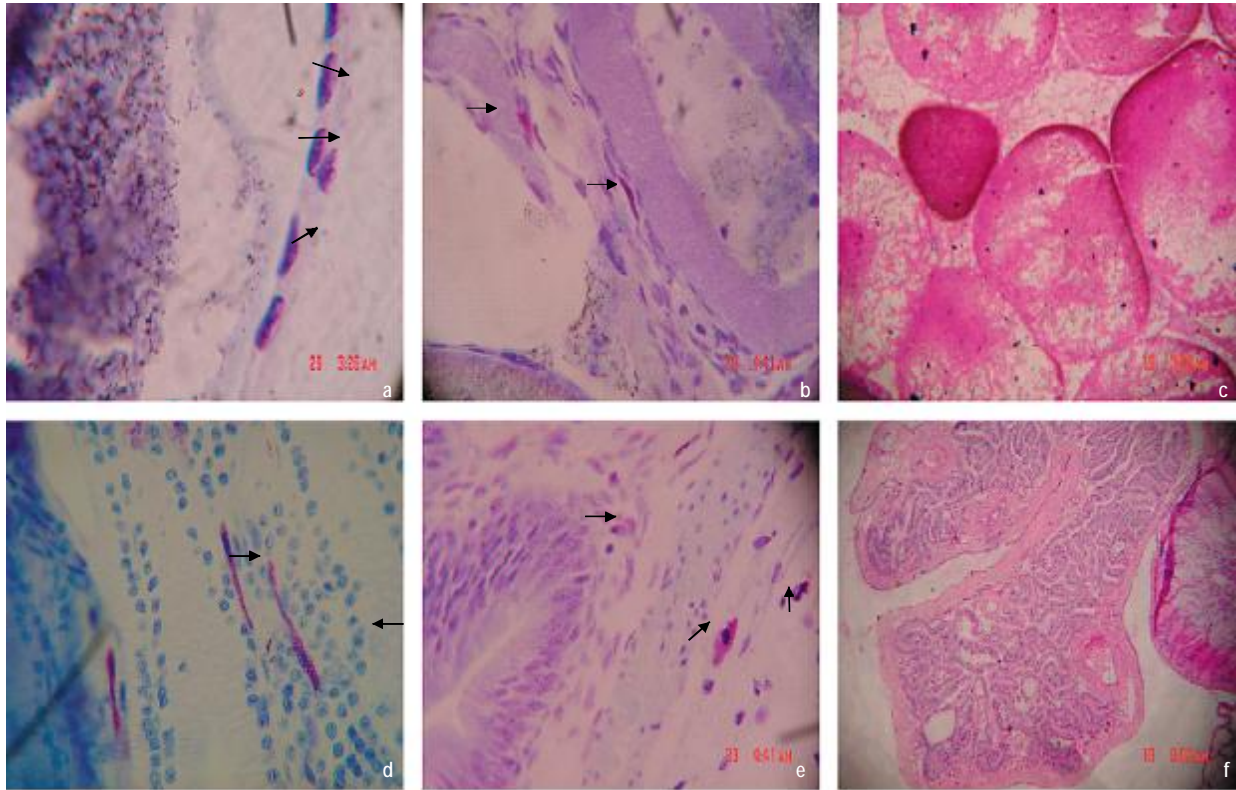
参考文献

- [1] YEO G S, FAROOQI I S, CHALLIS B G, et al. The role of melanocortin signalling in the control of body weight: Evidence from human and murine genetic models[J]. *QJM*, 2000, 93(1): 7-14.
- [2] SINHA P S, SCHIOTH H B, TATRO J B. Roles of the melanocortin-4 receptor in antipyretic and hyperthermic actions of centrally administered alpha-MSH[J]. *Brain Res*, 2004, 1001(1/2): 150-158.
- [3] TAKEUCHI S, TAKAHASHI S. Melanocortin receptor genes in the chicken - Tissue distributions[J]. *Gen Comp Endocrinol*, 1998, 112(2): 220-231.
- [4] MA L, TATARANNI P A, BOGARDUS C, et al. Melanocortin 4 receptor gene variation is associated with severe obesity in Pima Indians[J]. *Diabetes*, 2004, 53(10): 2696-2699.
- [5] VALLI-JAAKOLA K, LIPSANEN-NYMAN M, OKSANEN L, et al. Identification and characterization of melanocortin-4 receptor gene mutations in morbidly obese Finnish children and adults[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004, 89(2): 940-945.
- [6] VALLE E, HABERMANN F A, MOORE S S, et al. Genomic localization and SNP discovery in the bovine melanocortin receptor 4 gene (MC4R)[J]. *Anim Genet*, 2004, 35(4): 351-352.
- [7] HOUSTON R D, CAMERON N D, RANCE K A. A melanocortin-4 receptor (MC4R) gene polymorphism is associated with performance traits in divergently selected Large White pig populations[J]. *Anim Genet*, 2004, 35(5): 386-390.
- [8] 仇雪梅, 李宁, 吴常信, 等. 用放射杂交板定位鸡的 MC4R 基因及其

(下转第 4531 页)

3 小结与讨论

MC4R 是黑素皮质素家族 5 个成员之一,哺乳动物



注:a,b 是卵巢肥大细胞;c 是卵巢 H.E 染色;d,e 是输卵管的肥大细胞;f 是输卵管 H.E 染色。

Note: a, b. Ovary mast cells; c. Ovary H. E staining; d, e. Mast cells in fallopian tube; f. H. E staining in fallopian tube.

图 1 牛蛙卵巢、输卵管中 MC 形态结构

Fig. 1 Morphological structure of mast cells in ovary and fallopian tube of bullfrog

3 结论与讨论

该研究采用改良 TB 法对雌性牛蛙的性器官卵巢、输卵管进行染色,结果显示,MC 背景染色较好,组织的结构易定位,MC 形态结构较清晰,易于辨别。这可能是在配制改良 TB 染液时,用加热煮沸法,促使 TB 充分氧化熟化,增强了其着色力所致。这与于洪川等对蟾蜍和牛蛙皮肤 MC 的形态学研究结果相同^[6]。说明用改良后的 TB 染色能较好地显示牛蛙的睾丸、卵巢、输卵管内的 MC。

该试验结果表明,牛蛙输卵管中的 MC 在黏膜层、肌层及外膜均有分布,也见有 MC 沿血管外周分布。对小鼠、人输卵管 MC 的研究发现:小鼠输卵管的 MC 呈卵圆形,体积大,多分布于外膜结缔组织,黏膜层和肌层中少见;人输卵管的 MC 分布在肌层的最多,MC 大小不等,形态多样,有圆形、椭圆形、梭形等,颗粒致密。这与陆佰荣等的报道不一致^[2]。

牛蛙卵巢中 MC 沿着卵泡和卵泡膜分布。这与 Parshed

等及 Gupta 等研究的家禽卵巢中的 MC 的分布相类似^[7-8],但不完全一致。

参考文献

- [1] 高登惠,许乐仁,姚红艳.山羊肥大细胞组织化学及形态学研究[J].畜牧兽医学报,2000,31(1):88-93.
- [2] 陆佰荣,廉洁,金明顺,等.天花粉对小鼠输卵管肥大细胞的作用研究[J].Journal of Qiqihar Medical College,2001,Vol.22, No.1
- [3] 杨建平.甲苯胺蓝显示子宫肥大细胞的改进染色法[J].生殖与避孕,1987,7(1):75-76.
- [4] 晏长荣,汪琳,孟运莲,等.输卵管妊娠时输卵管壁肥大细胞的研究[J].中国组织化学与细胞化学杂志,2002,11(3):286.
- [5] BMNDON E P, IDZERDA R L, MCKNIGHT G S. Targeting the mouse genome: A compendium of knockouts [J]. Curt Biol, 1995, 5: 625-634.
- [6] 于洪川,魏智清,张书起,等.蟾蜍和牛蛙皮肤肥大细胞的形态学研究[J].宁夏大学学报:自然科学版,2005(3):268-270.
- [7] PARSHAD R K, KO THPALIA K. Distribution and characteristics of mast cells in the chick ovary[J]. Brit Poult Sci, 1993, 34(1):652-71.
- [8] GUPTA S K, GILBERT A B. Mast cells in the ovary of Gallus gallus domesticus [J]. Br Poult Sci, 1988, 29(2):245-249.
- [10] 仇雪梅,李宁,邓学梅,等.鸡 MC4R 基因的 SNPs 及其与屠体性状的相关研究[J].中国科学:C 辑生命科学,2006,36(2):127-133.
- [11] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. 分子克隆实验指南[M]. 2 版.金冬雁,黎孟枫,侯云德,等,译.北京:科学出版社,1998.

(上接第 4529 页)

在鸡和人染色体上同源区的比较分析[J].遗传学报,2004,31(12):1356-1360.

- [9] 霍明东,王守志,李辉.MC4R 基因多态性与鸡生长和体组成性状的相关研究[J].东北农业大学学报,2006,37(2):184-189.