

# 狐狸 *MC1R* 基因编码区 c. 40A>C 和 c. 41C>T 相邻变异研究

徐桂利<sup>1</sup>, 张文香<sup>1</sup>, 段玲欣<sup>1</sup>, 巩元芳<sup>1\*</sup>, 葛慕湘<sup>1</sup>, 刘谢荣<sup>1</sup>, 王书朋<sup>2</sup>, 果新苓<sup>2</sup>, 刘铮铸<sup>1\*</sup>

(1. 河北科技师范学院动物科技学院, 秦皇岛 066004; 2. 河北东光县农业局, 东光 061600)

**摘要:** 为了检测狐狸 *MC1R* 基因多态性及其与毛色表型的相关性, 本研究采集两个狐属 12 种毛色共计 163 只狐狸的皮肤组织样, 利用 PCR 扩增和产物直接测序的方法获得狐狸 *MC1R* 基因 1 054 bp 长的核苷酸序列, 并进行了 SNPs 筛查。用 PopGen32 和 SHEsis 软件对突变位点进行了群体遗传学分析, 用 PANTHER 软件评估了突变对基因产生的功能影响, 用 SPSS 二元变量相关统计方法分析了多态位点与毛色表型间的相关性。结果表明, 狐狸 *MC1R* 基因编码区 40(c. 40A>C) 和 41 位点(c. 41C>T) 存在 2 个相邻错义突变, 导致其编码的第 14 位氨基酸发生了变异: 当第 40 位点为 A 时, 氨基酸由苏氨酸(Thr)转变为异亮氨酸(Ile); 当第 40 位点为 C 时, 氨基酸由脯氨酸(Pro)转变为亮氨酸(Leu)。北极狐属狐在 41 位点基因型全部为 TT 型, 而狐属狐大部分个体均为 CC 型, 不存在 TT 型, 推测该位点可能是区分狐狸属间的一个重要功能位点。PANTHER 预测获知第 41 位点突变导致的氨基酸替换(p. Pro14Leu)对 *MC1R* 功能有显著影响。SPSS 二元变量相关分析结果表明, 41 位点多态性与狐狸毛色表型存在显著低度相关性, 推测狐狸 *MC1R* 基因编码区第 41 位点可能是参与其毛色形成的一个相对重要功能位点。

**关键词:** 狐狸; *MC1R* 基因; 40 和 41 位点; 多态性; 毛色

中图分类号: S829.9; S813.3

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2016)10-2020-07

## Study on Adjacent Variation of c. 40A>C and c. 41C>T of Fox *MC1R* Gene in Different Populations

XU Gui-li<sup>1</sup>, ZHANG Wen-xiang<sup>1</sup>, DUAN Ling-xin<sup>1</sup>, GONG Yuan-fang<sup>1\*</sup>, GE Mu-xiang<sup>1</sup>,  
LIU Xie-rong<sup>1</sup>, WANG Shu-peng<sup>2</sup>, GUO Xin-ling<sup>2</sup>, LIU Zheng-zhu<sup>1\*</sup>

(1. College of Animal Science and Technology, Hebei Normal University of Science & Technology, Qinhuangdao 066004, China;

2. Agriculture Bureau of Dongguang County in Hebei Province, Dongguang 061600, China)

**Abstract:** In order to detect the relationship between polymorphism of *MC1R* gene and coat color in fox, a total of 163 skin samples of 12 coat color foxes were collected. The nucleotide sequence (1 054 bp) of fox *MC1R* gene were obtained by the method of PCR and direct sequencing, and the polymorphism were analyzed. The population genetics were analyzed using PopGen32 and SHEsis softwares. The effect of mutations on the function of *MC1R* gene was evaluated using PANTHER software. The relationships between the variable sites and coat color were analyzed by the statistical methods of SPSS bivariate correlation analysis. Two adjacent missense mutations (c. 40A>C and c. 41C>T) were found in the coding region of fox *MC1R* gene, which resulted in codon change of p. Thr14Ile or p. Pro14Leu. When 40 site was A, it led to the substitution between three-

收稿日期: 2016-02-24

基金项目: 国家自然科学基金(31272412); 河北省自然科学基金(C2013407101; C2016407114); 河北省高等学校创新团队领军人才培养计划(LJRC004); 河北科技师范学院科学研究基金(1)

作者简介: 徐桂利(1986-), 男, 山东临沂人, 硕士生, 主要从事动物分子遗传育种研究, E-mail: 296881485@163.com

\* 通信作者: 巩元芳, 教授, E-mail: gyfkeyan@163.com; 刘铮铸, 教授, E-mail: liuzhengzhu@163.com

onine (Thr) and isoleucine (Ile). When 40 site was C, it led to the substitution between proline (Pro) and leucine (Leu). All the genotypes of two coat color foxes belonging to *Alopex* were TT. However, the genotypes of most coat color foxes belonging to *Vulpes* were CC. It was supposed that 41 site was important in distinguishing *Alopex* and *Vulpes*. The in silico functional analysis showed that the amino acid substitution at p. Pro14Leu had significant impact on the function of MC1R. The statistical analysis showed the polymorphism of 41 site had significant low correlation with the fox coat color. The results indicate that SNP c. 41C>T in the coding region of the MC1R gene is probably associated with the coat color in fox.

**Key words:** fox; MC1R gene; 40 and 41 sites; polymorphism; coat color

毛色是动物表型的一种,对于狐狸来说毛色是衡量其毛皮经济价值的一个重要指标。动物的毛色是由黑色素基因控制的。黑色素主要包括两大类:一类为真黑色素,另一类为褐黑色素,随着黑色素种类和含量不同,动物毛发的颜色也会发生相应变化,真黑色素和褐黑色素所含比例大小决定了毛色的深浅程度<sup>[1]</sup>。目前,世界上人工饲养的狐狸大约有 40 多种不同色型,分类学上归属于两个属:狐属 (*Vulpes*) 和北极狐属 (*Alopex*)<sup>[2-3]</sup>。

有关狐狸黑素皮质素受体 1 (Melanocortin 1 receptor, MC1R) 基因多态性及其与毛色表型的相关性研究很少,目前仅有少量报道<sup>[4-5]</sup>。D. I. Våge 等<sup>[4]</sup> 1997 年报道, MC1R 基因编码区 373 位点的突变 (c. 373T>C) 能引起狐属狐银黑色毛的产生,该课题组 2005 年又发现 MC1R 基因编码区 13 和 839 两个位点的错义突变 (c. 13G>T 和 c. 839T>G) 可阻滞蓝色北极狐冬季蓝色被毛的表达<sup>[5]</sup>。近年来,国内外有关人类和哺乳动物 MC1R 基因多态性与毛色表型的相关性研究较多,但大多数都是针对基因单个位点的突变与毛色表型的相关性研究, J. S. Palmer 等<sup>[6]</sup> 和 E. E. Bashmakova 等<sup>[7]</sup> 均报道,人类 MC1R 基因编码蛋白 151、160 和 294 (Arg151Cys、Arg160Trp 和 Asp294His) 的变异与红发有关。M. Abitbol 等<sup>[8]</sup> 报道驴 MC1R 基因编码区 629 位点的一个单碱基突变 (c. 629T>C) 与红色毛有很强的相关性。李洪涛等<sup>[9]</sup> 报道哈萨克羊 MC1R 基因 218 位点突变 (T218A) 对黑色毛有显性作用。郭多等<sup>[10]</sup> 报道家犬 MC1R 基因编码第 306 位氨基酸的密码子存在一个由 CGA 到 TGA 的终止突变,使 MC1R 基因的翻译终止,导致黄色毛的形成。有关两个相邻位点的变异及其与动物毛色表型的相关性研究目前鲜有报道。

鉴于以上研究背景,本研究拟采用 PCR 扩增和

产物直接测序的方法,分析 MC1R 基因的多态性及其与狐狸毛色表型的相关性。研究结果将为探明 MC1R 基因调控狐狸毛色机理以及在生产上培育出满足人类需求的更多彩色狐狸奠定分子理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验动物

本研究所用 163 只成年狐狸来自河北省秦皇岛市昌黎县金岛“狐、貉、貂育种场”,其中赤狐 18 只、银黑狐 28 只、白银狐 14 只、巧克力狐 9 只、黑理石狐 6 只、红理石狐 5 只、银十字狐 11 只、金十字狐 2 只、琥珀狐 5 只、日晖狐 2 只、蓝色北极狐 47 只、白色北极狐 16 只,其中蓝色北极狐和白色北极狐归属于北极狐属,其余毛色狐狸均归属于狐属。

样品采集:11 月底至 12 月初,从受试狐狸体侧无菌手术采集 1 cm<sup>2</sup> 左右的皮肤组织块,去毛,投至已灭菌的 1.5 mL 离心管中,然后将离心管迅速投入液氮中冷冻并置于 -80 °C 冰箱保存,备用。

### 1.2 基因组 DNA 的提取

基因组 DNA 的提取采用传统的酚-氯仿抽提法<sup>[11]</sup>, TE 溶解, -20 °C 冻存。

### 1.3 引物设计和 PCR 扩增

根据 GenBank 数据库中登载的赤狐 MC1R 基因序列 (序列号: X90844), 用 Primer3 (<http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3-www.cgi>) 设计扩增产物包含整个编码区、大小为 1 055 bp 的 1 对引物, 其上游序列为: 5'-GAACTG-AGCGAGACACCTGA-3', 下游序列: 5'-ATCACC-ACCTCCCTTTGCCCA-3'。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

PCR 扩增反应体系为 50 μL: 基因组 DNA 1 μL (75 ng · μL<sup>-1</sup>), 10 × LA PCR Buffer II (Mg<sup>2+</sup> Plus) 5 μL, 2.5 mmol · L<sup>-1</sup> dNTPs 8 μL, 上游引物

( $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )  $1 \mu\text{L}$ , 下游引物 ( $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )  $1 \mu\text{L}$ , TaKaRa LA *Taq*<sup>®</sup> 聚合酶 ( $5 \text{U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )  $0.5 \mu\text{L}$ , 灭菌  $\text{dH}_2\text{O}$   $33.5 \mu\text{L}$ 。

PCR 反应条件:  $94 \text{ }^\circ\text{C}$  预变性 5 min;  $94 \text{ }^\circ\text{C}$  变性 45 s,  $64 \text{ }^\circ\text{C}$  退火 45 s,  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  延伸 1 min, 30 个循环;  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  总延伸 10 min。扩增产物经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳并在凝胶自动成像仪上检测。

#### 1.4 PCR 产物回收、测序

对于效果良好且量足够的扩增产物, 回收纯化后, 由上海生工生物技术有限公司进行测序。

#### 1.5 SNPs 筛查及多态性分析

将 163 个不同毛色狐狸个体 *MC1R* 基因所得序列与网上登载的赤狐相应序列 (X90844) 用 BioEdit (v7.0.5.2)<sup>[12]</sup> 和 DNAMAN (5.2.2.0) 软件进行比对及相似性分析。变异位点的等位基因、基因型以及单倍型及其频率的分析, 分别用 PopGen32 (version 1.31)<sup>[13]</sup> 和 SHEsis 软件<sup>[14]</sup> 计算完成。

#### 1.6 功能预测

编码区突变对基因产生的功能影响采用 PANTHER 软件<sup>[15-16]</sup> 进行评估。该软件根据已知功能蛋白质家族多条序列的比对信息, 分析蛋白质家族中不同位置氨基酸发生变化时, 对蛋白质功能产生的影响程度。可能产生的影响用特定位置取代进化保守值 (Substitution position-specific evolutionary-conservation score, subPSEC) 来衡量, 该指标进一步表述为异义替换 SNP 对蛋白质功能损害的概率 ( $P_{\text{deleterious}}$ )。subPSEC 值或  $P_{\text{deleterious}}$  越小 (即越是趋向负值方向) 表明越有可能对蛋白质功能产生损害。

#### 1.7 统计分析

利用 SPSS16.0 软件中二元变量相关分析法统计分析狐狸 *MC1R* 基因多态位点与毛色表型的相关性。

## 2 结果

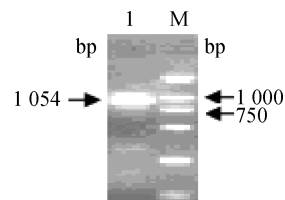
### 2.1 PCR 扩增结果

利用所设计的引物, 以其中 1 只供试银黑狐基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 结果见图 1。

从图 1 可以看出, PCR 条带接近于 1 000 bp, 且整齐、清晰、亮度也较好, 初步说明扩增产物就是预期的目的条带。

### 2.2 测序结果分析

将以上银黑狐的扩增产物回收纯化后委托上海



1. PCR 产物; M. DNA 相对分子质量标准  
1. PCR product; M. DNA marker DL 2000

图 1 狐狸 *MC1R* 基因的 PCR 扩增

Fig. 1 Agarose gel electrophoretogram of fox *MC1R* PCR product (1 054 bp)

生工生物技术有限公司进行双向测序, 测序结果经 BioEdit (v7.0.5.2) 和 DNAMAN (5.2.2.0) 拼接整理, 获得 1 054 bp 长的一段核苷酸序列, 该序列与 GenBank 上登载的赤狐 *MC1R* 基因相应序列比对后, 相似性高达 99.53%, 说明所得序列就是银黑狐 *MC1R* 基因的序列。进一步分析获知该序列包括 5' UTR 区 54 bp、编码区 954 bp 和 3' UTR 区 46 bp。

### 2.3 SNPs 筛查及分析

以上所得银黑狐序列加上剩余 162 只狐狸的 PCR 产物测序后, 用 BioEdit (v7.0.5.2) 软件进行比对分析, 发现编码区第 40 (c. 40A>C) 和 41 位点 (c. 41C>T) 存在 2 个相邻的错义突变, 导致其编码的第 14 位氨基酸的变异: 当第 40 位点为 A 时, 氨基酸由苏氨酸 (Thr) 转变为异亮氨酸 (Ile), 当第 40 位点为 C 时, 氨基酸由脯氨酸 (Pro) 转变为亮氨酸 (Leu)。另外, 对于第 40 位点, 狐属狐 (包括赤狐、银黑狐等 10 种毛色狐) 存在 3 种基因型: AA、AC 和 CC, 而北极狐属狐 (包括蓝色北极狐和白色北极狐 2 种毛色狐) 只有 CC 一种基因型。对于第 41 位点, 狐属狐 (包括赤狐、银黑狐等 10 种毛色狐) 存在 2 种基因型: CC 和 CT 型, 而北极狐属狐 (包括蓝色北极狐和白色北极狐 2 种毛色狐) 只有 TT 一种基因型。两位点基因型的分布和变异情况见表 1 和图 2。

### 2.4 突变位点群体遗传学分析

利用 PopGen32 (version 1.31) 和 SHEsis 软件对 163 只受试狐狸 *MC1R* 基因编码区第 40 和 41 相邻突变位点等位基因和基因型频率进行了计算 (表 2), 同时对两位点进行了单倍型的构建 (表 3)。由表 2 可知, 两位点 C 等位基因的频率都较高, 分别为 0.855 和 0.524。由表 3 可知, 两位点共构建 3 种单倍型: H1 (AC)、H2 (CC) 和 H3 (CT), 其中 H2 和 H3 的频率较高, 分别为 0.380 和 0.476, 为优势单倍型。

表 1 不同毛色狐狸 *MC1R* 基因编码区第 40 和 41 位点的基因型变异

Table 1 Identified genetic variations in 12 fox sub-populations with different coat color patterns

属 Genus	不同毛色狐狸 Different coat color fox	变异 Variation				
		c. 40A>C		c. 41C>T		
狐属 <i>Vulpes</i>	赤狐(18)Red fox	AA(3)	AC(4)	CC(11)	CC(17)	CT(1)
	银黑狐(28)Silver fox		AC(10)	CC(18)	CC(19)	CT(9)
	白银狐(14)White Silver fox	AA(3)	AC(6)	CC(5)	CC(14)	
	巧克力狐(9)Chocolate fox			CC(9)	CC(4)	CT(5)
	黑理石狐(6)Black Marble fox	AA(2)	AC(4)		CC(6)	
	红理石狐(5)Red Marble fox	AA(2)	AC(2)	CC(1)	CC(5)	
	银十字狐(11)Black Cross fox			CC(11)	CC(1)	CT(10)
	金十字狐(2)Gold Cross fox			CC(2)		CT(2)
	琥珀狐(5)Amber fox			CC(5)	CC(2)	CT(3)
北极狐属 <i>Alopex</i>	日晖狐(2)Sun Glow fox	AA(1)		CC(1)	CC(2)	
	蓝色北极狐(47)Arctic Blue fox			CC(47)		TT(47)
	白色北极狐(16)Arctic White fox			CC(16)		TT(16)

表 2 狐狸 *MC1R* 基因编码区第 40 和 41 相邻突变位点的等位基因和基因型频率Table 2 Frequencies of genotypes and alleles at 40 and 41 sites in coding region of fox *MC1R* gene

突变位点 Mutation site	基因型频率 Genotype frequency						等位基因频率 Allele frequency					
	基因型		频率		基因型		频率		等位基因		频率	
	Geno.	Freq.	Geno.	Freq.	Geno.	Freq.	Allele	Freq.	Allele	Freq.		
c. 40A>C	AA	0.066	AC	0.157	CC	0.777	A	0.145	C	0.855		
c. 41C>T	CC	0.428	CT	0.190	TT	0.379	C	0.524	T	0.476		

表 3 狐狸 *MC1R* 基因编码区第 40 和 41 相邻突变位点单倍型频率Table 3 Haplotype frequencies of *MC1R* gene covering the 2 polymorphic sites in foxes

单倍型 Haplotype	频率 Frequency	突变位点 Mutation site	
		c. 40A>C	c. 41C>T
H1	0.145	A	C
H2	0.380	C	C
H3	0.476	C	T

## 2.5 编码区 40 和 41 相邻突变位点对 *MC1R* 功能的影响

为了推测 *MC1R* 基因编码区第 40 和 41 位点突变对蛋白功能的影响,用 PANTHER 软件对比了与其进化相关的蛋白质中特定位置发生突变时对

蛋白质功能的影响程度,由此得到功能损伤的似然值(表 4)。subPSEC 值是特定位置的野生型和突变型氨基酸的概率比值的负对数,该值在 0(中性的)~ -10(极可能对蛋白质功能有害)之间连续变化<sup>[17]</sup>。

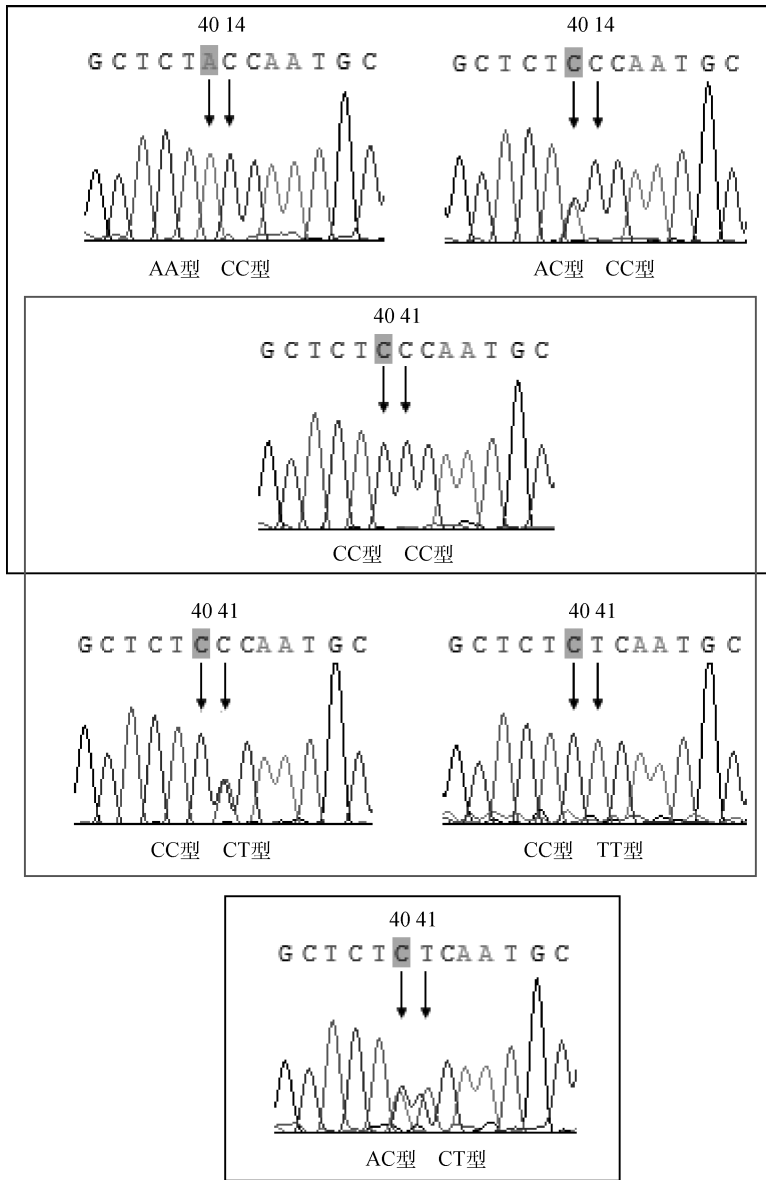


图 2 狐狸 *MC1R* 基因编码区 40 和 41 位点的突变  
 Fig. 2 The mutation of 40 and 41 sites in coding region of fox *MC1R* gene

表 4 *MC1R* 第 14 位氨基酸变异的 subPSEC 和  $P_{deleterious}$  值  
 Table 4 The subPSEC and  $P_{deleterious}$  scores of the 14th amino acid substitution

核苷酸变异 Nucleotide variation		氨基酸变异 Amino acid variations	subPSEC 值 subPSEC scores	$P_{deleterious}$ 值 $P_{deleterious}$ scores
40 位点	41 位点			
40 位点为 A 时	c. 41C>T	p. Thr14Ile	-1.625 94	0.201 97
40 位点为 C 时	c. 41C>T	p. Pro14Leu	-4.204 46	0.769 32

2.6 统计分析结果

通过 SPSS 二元变量相关分析得出狐狸 *MC1R* 基因编码区第 40 位点基因型与毛色表型之间的相关系数( $r$ )为-0.050,二者不具相关性, $P=0.455$ ,

无统计学意义。第 41 位点基因型与毛色表型之间的相关系数( $r$ )为-0.359,二者具低度相关, $P=0.000$ ,说明二者有显著相关性(表 5)。

表 5 MC1R 基因第 40 和 41 位点变异与毛色表型的相关分析结果

Table 5 The correlation analysis between genotype at 40 and 41 sites and coat color

位点 Site	相关系数( <i>r</i> ) Correlation coefficient	<i>P</i> 值 <i>P</i> value	结果 Result
40	-0.050	0.455	不相关,无统计学意义
41	-0.359**	0.000	低度相关

$|r| < 0.3$  为不相关;  $0.3 \leq |r| < 0.5$  为低度相关;  $0.5 \leq |r| < 0.8$  为中度相关;  $0.8 \leq |r| < 1$  为高度相关。  $P < 0.05$  时, 两个变量间相关性显著; 当  $P < 0.01$  时, 两个变量间相关性非常显著,  $P > 0.05$  时, 两个变量间没有显著的相关性<sup>[18]</sup>

$|r| < 0.3$  indicate no correlation;  $0.3 \leq |r| < 0.5$  indicate low correlation;  $0.5 \leq |r| < 0.8$  indicate moderate correlation;  $0.8 \leq |r| < 1$  indicate high correlation.  $P < 0.05$  indicate significant correlation;  $P < 0.01$  indicate extremely significant correlation;  $P > 0.05$  indicate no significant correlation

### 3 讨论

近年来,随着人们对化工染料污染的担忧和崇尚自然风潮的兴起,绿色、天然、环保、优质毛皮动物产品已成为广大生产者与消费者的追求目标。因此,创制并选育天然彩色毛皮动物新品种,将成为现代畜牧业发展的紧迫任务,而探明毛皮动物彩色绒毛分子遗传机制是实现上述目标的重要理论基础。狐狸是一种重要的毛皮动物,其与家犬均归属于犬科,有关家犬 MC1R 基因的相关研究已有大量报道,并已证实该基因与其毛色有关<sup>[19-21]</sup>,但有关狐狸 MC1R 基因的相关研究则相对较少。J. M. Newton 等<sup>[19-20]</sup>发现家犬 MC1R 蛋白的 90 和 306 位点变异(S90G 和 R306ter)分别与其黑/棕和红/黄毛色相关。D. L. Dreger 等<sup>[21]</sup>发现家犬 MC1R 蛋白的 78 位点变异(p. Gly78Val)与 Saluki 和 Afghan Hound 家犬的毛色有关。以上研究都是针对单碱基突变与毛色的相关性研究。本研究分析了狐属和北极狐属 12 种毛色共计 163 只狐狸 MC1R 基因编码区序列,在第 40 和 41 位点发现了 2 个相邻的错义突变:c. 40A>C 和 c. 41C>T。当 40 位点为 A 时,导致其编码的第 14 位氨基酸发生苏氨酸向异亮氨酸的转变(p. Thr14Ile);当 40 位点为 C 时,导致第 14 位氨基酸发生脯氨酸向亮氨酸的转变(p. Pro14Leu),这一结果与 J. Nowacka-Woszuik 等<sup>[22]</sup>的研究结果相一致。J. Nowacka-Woszuik 等<sup>[22]</sup>在分析家犬、赤狐、北极狐和貉 MC1R 基因编码区的变异时,也发现了赤狐编码区第 40 和 41 位点的变异,但由于其缺乏表型记录没有分析两位点与毛色表型的相关性。本研究中,北极狐属狐 MC1R 基因编码区第 41 位点只有 TT 一种基因型,而狐属狐则有 CC 和 CT

2 种基因型,不存在 TT 基因型,推测该位点可能是区分狐狸属间的一个重要功能位点。群体遗传分析表明,对于 40 位点,C 为优势等位基因(0.855),单倍型 H2(CC,0.380)和 H3(CT,0.476)为优势单倍型,说明大部分狐狸 40 位点均为 C 等位基因。通过 PANTHER 软件功能预测,当 40 位点为 C 时,p. Pro14Leu 处的 subPSEC 和  $P_{deleterious}$  值分别是 -4.204 46 和 0.769 32,表明该处氨基酸替换对 MC1R 功能有重要影响。SPSS 二元变量统计分析结果表明,狐狸 MC1R 基因编码区第 41 位点多态性与毛色表型存在显著低度相关性,推测第 41 位点可能是参与毛色形成的一个相对重要功能位点。

### 4 结论

本研究采用 PCR 扩增和产物直接测序的方法获得了狐属和北极狐属共计 163 只不同毛色狐狸 MC1R 基因的编码区序列,在第 40 和 41 位点发现 2 个相邻错义突变(c. 40A>C 和 c. 41C>T)。群体遗传分析表明,狐狸 MC1R 基因编码区 41 位点可能是区分狐狸属间的一个重要功能位点。PANTHER 软件功能预测 41 位点突变(c. 41C>T)导致的氨基酸替换(p. Pro14Leu)对 MC1R 功能有重要影响。SPSS 二元变量统计分析结果进一步表明,41 位点多态性与狐狸毛色表型存在显著相关性。

### 参考文献 (References):

- [1] BENNETT D C, LAMOREUX M L. The color loci of mice—a genet iccentury[J]. *Pigment Cell Res*, 2003, 16 (4): 333-344.
- [2] 马泽芳, 崔 凯. 貉狐貉实用养殖技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2014.

- MA Z F, CUI K. Practical breeding techniques of mink, fox and raccoon dog[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2014. (in Chinese)
- [3] 佟煜仁, 张志明. 毛皮动物毛色遗传及繁育新技术[M]. 北京: 金盾出版社, 2009.  
TONG Y R, ZHANG Z M. New technology for coat color genetics and breeding of fur animal[M]. Beijing: Jindun Press, 2009. (in Chinese)
- [4] VÅGE D I, LU D, KLUNGLAND H, et al. A non-epistatic interaction of agouti and extension in the fox, *Vulpes vulpes*[J]. *Nat Genet*, 1997, 15(3): 311-315.
- [5] VÅGE D I, FUGLEI E, SNIPSTAD K, et al. Two cysteine substitutions in the MC1R generate the blue variant of the Arctic fox (*Alopex lagopus*) and prevent expression of the white winter coat[J]. *Peptides*, 2005, 26(10): 1814-1817.
- [6] PALMER J S, DUFFY D L, BOX N F, et al. Melanocortin-1 receptor polymorphisms and risk of melanoma: is the association explained solely by pigmentation phenotype? [J]. *Am J Hum Genet*, 2000, 66(1): 176-186.
- [7] BASHMAKOVA E E, KRASITSKAYA V V, BONDAR A A, et al. Bioluminescent assay to detect melanocortin-1 receptor (MC1R) polymorphisms (R160W, R151C, and D294H)[J]. *Mol Biol (Mosk)*, 2015, 49(6): 953-958.
- [8] ABITBOL M, LEGRAND R, TIRET L. A missense mutation in melanocortin 1 receptor is associated with the red coat colour in donkeys[J]. *Anim Genet*, 2014, 45(6): 878-880.
- [9] 李洪涛, 曾献存, 张文祥, 等. 哈萨克绵羊 MC1R 和 ASIP 基因多态性及表达量与被毛颜色表型相关性的研究[J]. 畜牧兽医学报, 2013, 44(3): 366-375.  
LI H T, ZENG X C, ZHANG W X, et al. Analysis of the relationship between polymorphism/mRNA expression levels of MC1R and ASIP and coat color phenotype in Kazakh sheep[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2013, 44(3): 366-375. (in Chinese)
- [10] 郭多, 巴彩凤, 苏玉虹, 等. 犬 MC1R 基因 R306ter 与毛色性状相关性研究[J]. 中国实验动物学报, 2004, 12(2): 100-102.  
GUO D, BA C F, SU Y H, et al. Study on the relationship between r306ter loci in mc1r gene and coat color trait in dogs[J]. *Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica*, 2004, 12(2): 100-102. (in Chinese)
- [11] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. Molecular cloning[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [12] HALL T A. BioEdit: A user-friendly biological sequences alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT[J]. *Nucleic Acids Symp Ser*, 1999, 41: 95-98.
- [13] YE H F C, YANG R C, BOYLE T. POPGENE version 1. 31: Microsoft Windows-based freeware for population genetic analysis-Quick User Guide[M]. University of Alberta and Centre for International Forestry Research. Edmonton, AB Canada, 1999: 1-28.
- [14] SHI Y Y, HE L. SHEsis, a powerful software platform for analyses of linkage disequilibrium, haplotype construction, and genetic association at polymorphism loci[J]. *Cell Res*, 2005, 15(2): 97-98.
- [15] BRUNHAM L R, SINGARAJA R R, PAPE T D, et al. Accurate prediction of the functional significance of single nucleotide polymorphisms and mutations in the ABCA1 gene[J]. *PLoS Genet*, 2005, 1(6): e83.
- [16] THOMAS P D, KEJARIWAL A, GUO N, et al. Applications for protein sequence-function evolution data: mRNA/protein expression analysis and coding SNP scoring tools[J]. *Nucleic Acids Res*, 34 (Web Server issue): W645-650.
- [17] 苗永旺, 吴桂生, 王磊, 等. 黑色素皮质素受体 1 基因对水牛毛色遗传的影响[J]. 中国科学 C 辑: 生命科学, 2009, 39(12): 1155-1161.  
MIAO Y W, WU G S, WANG L, et al. The role of MC1R gene in buffalo coat color[J]. *Science in China (Series C: Life Sciences)*, 2009, 39(12): 1155-1161. (in Chinese)
- [18] 孙逸敏. 利用 SPSS 软件分析变量间的相关性[J]. 新疆教育学院学报, 2007, 23(2): 120-123.  
SUN Y M. Using SPSS software to analyze the correlation between variables [J]. *Journal of Xinjiang Education Institute*, 2007, 23(2): 120-123. (in Chinese)
- [19] NEWTON J M, WILKIE A L, HE L, et al. Melanocortin 1 receptor variation in the domestic dog[J]. *Mamm Genome*, 2000, 11(1): 24-30.
- [20] WANG G D, CHENG L G, FAN R X, et al. Signature of balancing selection at the MC1R gene in Kunming dog populations[J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e55469.
- [21] DREGER D L, SCHMUTZ S M. A new mutation in MC1R explains a coat color phenotype in 2 "old" breeds: Saluki and Afghan hound[J]. *J Hered*, 2010, 101(5): 644-649.
- [22] NOWACKA-WOSZUK J, SALAMON S, GORNA A, et al. Missense polymorphisms in the MC1R gene of dog, red fox, arctic fox and Chinese raccoon dog[J]. *J Anim Breed Genet*, 2013, 130(2): 136-141.