

鹌鹑 MC4R 基因编码区群体遗传变异检测分析*

查明恒, 李明丽, 兰国湘, 鲁绍雄**

(云南农业大学 动物科学技术学院, 云南 昆明 650201)

摘要: 根据 GenBank 数据库提供的鹌鹑黑素促黑素受体 4 (MC4R) 基因序列, 设计出 5 对扩增引物, 采用 PCR-SSCP 分段检测方法对朝鲜鹌鹑 MC4R 基因外显子区域的多态性进行了检测, 并对存在多态性的 DNA 片段进行了序列测定。SSCP 分析的结果显示, 第 4 号引物扩增的基因片段具有明显的多态性, 并检测到了 3 种基因型 (AA 型, AB 型, BB 型)。将测序结果与 GenBank 数据库中鹌鹑 MC4R 基因序列进行比对, 发现了一个单核苷酸多态性 (SNP) 位点: 855bp 位点存在一个 T→C 同义转换突变。基因型 AA, AB 和 BB 的频率分别为 0.193 3, 0.686 7 和 0.120 0; 等位基因 A 和 B 的频率分别为 0.536 7 和 0.463 3; 多态信息含量 (*PI*C) 和杂合度 (*H*) 分别为 0.373 6 和 0.497 4; χ^2 检验的结果表明, 该突变位点的基因频率未处于 Hardy-Weinberg 平衡状态 ($P < 0.01$)。

关键词: 鹌鹑; MC4R 基因; 单核苷酸多态性

中图分类号: S 837 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-390X (2011) 04-0484-04

Polymorphisms in Coding Region of MC4R Gene in Quail

ZHA Ming-heng, LI Ming-li, LAN Guo-xiang, LU Shao-xiong

(College of Animal Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract: Five pairs primers were designed according to the sequence of quail melanocortin-4 receptor (MC4R) gene in the GenBank database. The polymorphisms of the exon region of Korean quail MC4R gene were segmentally detected by PCR-SSCP method, and the polymorphic DNA fragments were sequenced. The results of SSCP showed that obvious polymorphisms were detected in the amplified fragments of the primer 4, and 3 genotypes, AA, AB and BB were detected. One single nucleotide polymorphisms (SNPs) site, a synonymous mutation of T→C at 855 bp was detected, when comparing the sequencing results with quail MC4R gene sequence in GenBank. The frequencies of genotype AA, AB and BB were 0.193 3, 0.686 7 and 0.120 0 respectively. The frequencies of allele A and B were 0.536 7 and 0.463 3 respectively. The polymorphism information content (*PI*C) and heterozygosity (*H*) were 0.373 6 and 0.497 4 respectively. The result of χ^2 test showed that the gene frequency of the mutation site in the population was not in Hardy-Weinberg equilibrium ($P < 0.01$).

Key words: quail; MC4R gene; single nucleotide polymorphisms

收稿日期: 2010-11-22

修回日期: 2010-12-14

网络出版时间: 2011-07-11 10:59

* 基金项目: 云南省教育厅科学研究基金项目 (08Y0172)。

作者简介: 查明恒 (1986-), 男, 云南文山山人, 在读硕士研究生, 主要从事动物分子遗传研究。

E-mail: zhamingheng@126.com

** 通讯作者 Corresponding author: 鲁绍雄 (1972-), 男, 云南镇雄人, 教授, 博士, 主要从事动物遗传育种研究。

E-mail: shxlu@263.net

网络出版地址: http://www.cnki.net/kcms/detail/53.1044.S.20110711.1059.201104.484_034.html

黑素促黑素受体-4 (MC4R) 属于黑素促黑素家族的一员, MC4R 具有介导瘦素 (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^[1], 具有控制动物食欲、体重和能量代谢的作用^[2]。1997年, HUSZAR等^[3]对敲除 MC4R 基因的小鼠进行了研究, 发现敲除 MC4R 基因的小鼠出现遗传性肥胖, 表现出多食、胰岛素分泌过多、肥胖等症状。之后, 国外学者又对人 MC4R 基因的多态性进行了研究, 发现 MC4R 基因的错义突变会使 MC4R 功能失活, 从而导致肥胖症^[4]。

在畜禽 QTL 的检测研究中, MC4R 基因常作为影响畜禽生长及胴体性状的候选基因而加以研究, 美国学者对猪的 MC4R 基因的错义突变研究表明, MC4R 基因编码区的一个错义突变, 可引起膘厚、体重和采食量的显著变化^[5]。2004年, 仇雪梅等^[6]用杂交放射板将鸡的 MC4R 基因定位于2号染色体 (q12) 上, 为进一步研究禽类的 MC4R 基因提供了理论基础。GenBank 数据库显示, 鹌鹑 MC4R 基因仅有1个外显子, 全长996 bp, 编码332个氨基酸。MC4R 基因在其他畜禽上已有大量研究报告, 众多文献表明, MC4R 基因在不同物种乃至不同品种中都具有明显的多态性, 且基因突变后的基因型与生长性状和胴体

性状间存在着不同程度的关联。这为鹌鹑等研究相对滞后的物种提供了重要的借鉴。本研究充分借鉴其他动物尤其是在禽类上的研究成果, 通过基因分段 PCR-SSCP 技术来检测鹌鹑 MC4R 基因的多态位点, 以期对鹌鹑重要经济性状的基因检测提供一定的基础和依据。

1 材料与方法

1.1 试验动物

本文所用的试验动物为150只朝鲜鹌鹑 (公母各半), 在相同的饲料营养水平和环境条件下进行饲养, 40日龄时屠宰, 取肝脏样置于-20℃保存备用。

1.2 基因组 DNA 提取

采用酚-氯仿法提取鹌鹑肝脏 DNA, 并用紫外光度仪检测和用分光光度计进行浓度确认, 将 DNA 浓度稀释到50~100 ng/mL, -20℃保存。

1.3 引物设计和 PCR 扩增

根据 GenBank 数据库提供的鹌鹑 MC4R 基因序列 (GenBank 登录号: GQ859461), 采用 primer premier 5 软件设计结合手工检验, 进行分段引物设计, 设计出5对 PCR 扩增引物 (具体序列见表1), 引物由上海英俊生物技术有限公司合成。

表1 鹌鹑 MC4R 基因分段扩增引物

Tab. 1 Segmental amplification primers of quail MC4R gene

引物序号 No. of primer	引物序列 sequence of primers	位置/bp location	产物大小/bp size of products	退火温度/℃ annealing temperature
1	Forward primer: 5' - AAAAGGAGGATTTCAGAGG - 3'	- 70	304	53
	Reverse primer: 5' - CATAGCCGAATGGAGGT - 3'	234		
2	Forward primer: 5' - GTTTCGGTCATTGTGGC - 3'	184	287	51.5
	Reverse primer: 5' - TGGTACTGGAGGGCATA - 3'	470		
3	Forward primer: 5' - TTATGCCCTCCAGTACC - 3'	453	243	55
	Reverse primer: 5' - CCAGTCCCCGGAAGAAC - 3'	695		
4	Forward primer: 5' - ATGATGGCTCGAATGCA - 3'	646	276	50.5
	Reverse primer: 5' - CTCCTGACTCCGAAATG - 3'	921		
5	Forward primer: 5' - CCCCTACAATCCTTACTG - 3'	810	204	47

PCR 扩增反应体系为50 μL, 含有 Mg²⁺ 的 10 × buffer (25 mmol/L) 5 μL, dNTP (2.5 mmol/L) 2 μL, 上引、下引 (20 pmol/mL) 各为 0.5 μL, 基因组 DNA 模版 1.5 μL, Taq 酶 (5U/μL) 0.2 μL。反应条件为94℃预变性8 min, 94℃变性

40 s, 退火温度如表1所示, 退火时间均为35 s, 72℃延伸45 s, 35个循环结束后72℃延伸8 min, 最后于4℃保存。扩增结果用1.5%的琼脂糖凝胶电泳, 在WD-9413B型凝胶成像分析仪中进行检测。

1.4 SSCP 检测分析和测序

将 6 μ L Loading Buffer (98% 甲酰胺, 0.025% 溴酚蓝, 0.025% 二甲苯 FF, 10 mmol/L EDTA (pH 8.0), 2% 甘油) 与 4 μ L PCR 产物充分混合, 99 $^{\circ}$ C 变性 12 min, 立即放入冰水混合物中里冰浴 5 min, 使产物保持变性状态, 之后, 采用浓度为 12% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶进行电泳。稳压 110 V 电泳 12 h 后, 采用银染显色方法进行检测。根据 SSCP 检测的结果, 不同基因型各随机挑选 3 个样品, 纯化后送南京金斯瑞生物科技有限公司, 用 ABI3730DNA 自动测序仪器进行测序。测序结果采用 DNAMAN 软件进行氨基酸序列比较。

1.5 群体遗传变异分析

根据基因型检测结果, 统计出 3 种基因型个体数, 计算出群体的基因型频率、等位基因频率、多态信息含量 (PIC) 和杂合度 (H), 并进行 Hardy-Weinberg 平衡检验。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增与 SSCP 检测

利用所设计的 5 对引物对鹌鹑的 DNA 进行 PCR 扩增, 扩增产物经电泳检测, 特异性良好, 扩增片段与预期片段大小一致, 无杂带 (图 1), 可进行 SSCP 分析。将 5 对引物所扩增的 PCR 产物全部进行 SSCP 分析, 并在第 4 对引物检测中发现了多态性, 得到 3 种基因型, 分别命名为 AA, AB, BB 基因型, 见图 2。

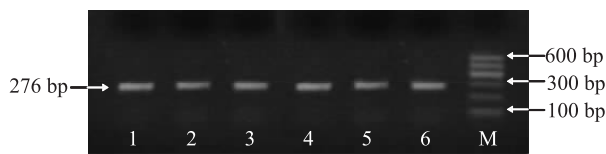


图 1 鹌鹑MC4R基因4号引物PCR扩增结果
Fig.1 PCR amplification results of quail MC4R gene using primer 4

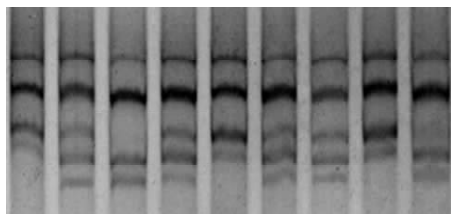


图 2 鹌鹑MC4R基因4号引物PCR-SSCP检测结果
Fig.2 PCR-SSCP detection results of quail MC4R gene using primer 4

2.2 序列测定

将 4 号引物 3 种基因型产物进行测序的结果显示, AA 基因型与 GenBank 数据库中的序列完全一致, 在 855 bp 位点为 T/T 纯合子; 而 BB 基因型在第 855 bp 位点为 C/C 纯合子, 即与 A 等位基因相比, B 等位基因发生了一个 T \rightarrow C 的转换 (图 3), AB 基因型在第 855bp 位点为 T/C 杂合子。

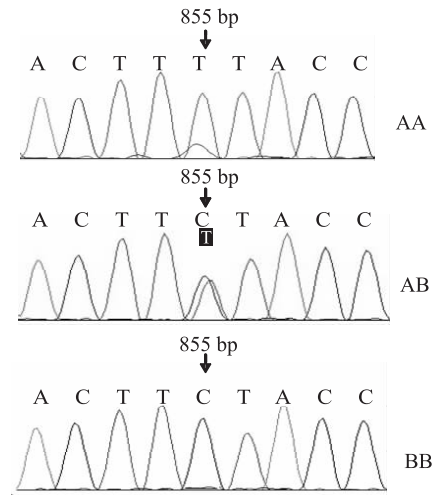


图 3 4号引物扩增序列中的突变位点
Fig.3 Mutation sites in the sequences amplified by primer 4

2.3 MC4R 基因突变位点的遗传多态性

根据 PCR-SSCP 的基因型判定结果, 统计出群体的基因型频率、等位基因频率 (表 2)。 χ^2 检验的结果显示, 所分析的鹌鹑群体 MC4R 基因 855 bp 处突变位点的基因频率未处于 Hardy-Weinberg 平衡状态 ($P < 0.01$)。突变位点的多态信息含量 (PIC) 为 0.373 6, 杂合度 (H) 为 0.497 4, 表明该群体在这一突变位点上的遗传多态性较为丰富。

表 2 MC4R 基因的基因型频率与基因频率

Tab.2 Genotype and gene frequencies of MC4R

基因型 genotype	个体数 number of detected	基因型频率 genotypic frequency	等位基因 allele	基因频率 genotypic frequency	χ^2 值 χ^2 value
AA	29	0.193 3	A	0.536 7	21.74
AB	103	0.686 7			
BB	18	0.120 0	B	0.463 3	

3 讨论

大量研究表明, MC4R 基因在动物体内下丘

脑、胰腺、胃均有表达^[7], 具有控制食欲、调节能量平衡的作用^[8]。CAUCHI 等^[9]也通过全基因组扫描实验发现人 M4CR 基因与肥胖基因 (FTO 基因) 存在着关联, M4CR 基因的变异会对 FTO 基因的表达起到一定的影响。本研究首次采用 PCR-SSCP 方法在鹌鹑 M4CR 基因 855 bp 位点发现一个 T→C 单碱基转换, 通过密码子比较, 属于同义突变。群体遗传变异分析的结果显示, 所分析的朝鲜鹌鹑群体在该突变位点上的遗传多态性较为丰富。研究结果为进一步研究鹌鹑的遗传多样性以及主要经济性状的候选基因提供了新的遗传标记。

有关家禽 MC4R 基因多态性与生长等经济性状的关系, 目前尚无确切的研究结论, 尤其是在鹌鹑上的研究更为鲜见。国内学者仇雪梅等^[10]对中国农业大学隐性白羽鸡资源家系 F2 代鸡群的 MC4R 基因多态性进行了分析, 发现 MC4R 基因在编码区 61 bp 位点发生了碱基的错义颠换突变 (G→A), 在编码区 315 bp 位点发生了碱基的同义颠换突变 (G→T) 和 336 bp 位点发生同义转换突变 (C→T), 通过最小二乘分析 SNPs 与胴体性状的关系, 3 个变异位点的基因型与鸡的体重、全净膛重、腿肉重等存在显著或极显著的关系。陶勇等^[11]以京海黄鸡为试验材料, 分析了 MC4R 基因在京海黄鸡群体中的多态性。结果表明, MC4R 基因编码区第 662 bp 位点发生碱基错义颠换突变 (G→C), 在京海黄鸡中检测到了 AA、AB 和 BB 3 种基因型, 并发现不同基因型的京海黄鸡在体重上差异极显著。通过众多关于 MC4R 基因的研究文献得知, MC4R 基因在不同畜禽中的突变位点及突变形式是不同的, 其突变之后与生长性状的关联性也不尽相同。从基因频率分布的检验结果来看, 本文所发现的鹌鹑 MC4R 基因 855 bp 处突变位点的基因频率并未处于 Hardy-Weinberg 平衡状态, 预示着该位点可能与某些人工选择的性状间存在着一定关联, 这需要结合生长性能等测定数据来进一步分析确认。

[参考文献]

- [1] ANDERSSON L. Melanocortin receptor variants with phenotypic effects in horse, pig and chicken [J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2003, 994 (6): 313 - 318.
- [2] HOGGARD N, HUNTER L, DUNCAN J S, et al. Regulation of adipose tissue leptin secretion by alpha-melanocyte-stimulating hormone and agouti-related protein: Further evidence of an interaction between leptin and the melanocortin signalling system [J]. *Journal of Molecular Endocrinology*, 2004, 32 (1): 145 - 153.
- [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 (1): 131 - 141.
- [4] ROSMOND R, CHAGNON M, BOUCHARD C, et al. A missense mutation in the human melanocortin-4 receptor gene in relation to abdominal obesity and salivary cortisol [J]. *Diabetologia*, 2001, 44 (10): 1335 - 1338.
- [5] 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]. *Mammalian Genome*, 2000, 11 (2): 131 - 135.
- [6] 仇雪梅, 李宁, 吴常信, 等. 用放射杂交板定位鸡的 MC4R 基因以及其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.
- [7] XU B, GOULDING E H, ZANG K, et al. Brain-derived neurotrophic factor regulates energy balance downstream of melanocortin-4 receptor [J]. *Nature neuroscience*, 2003, 6 (7): 736 - 742.
- [8] YEO G S H, 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]. *Quarterly Journal of Medicine*, 2000, 93 (1): 7 - 14.
- [9] CAUCHI S, STUTZMANN F, CAVALCANTI-PROENÇA C, et al. Combined effects of MC4R and FTO common genetic variants on obesity in European general populations [J]. *Journal of Molecular Medicine*, 2009, 87 (5): 537 - 546.
- [10] 仇雪梅, 李宁, 邓学梅, 等. 鸡 MC4R 基因的 SNPs 及其与胴体性状的相关研究 [J]. *中国科学 (C 辑)*, 2006, 36 (2): 127 - 133.
- [11] 陶勇, 李国辉, 王金玉, 等. 京海黄鸡 MC4R 基因多态性及其与生长性能的关联分析 [J]. *中国家禽*, 2008, 30 (5): 21 - 24.
- [1] ANDERSSON L. Melanocortin receptor variants with phenotypic effects in horse, pig and chicken [J]. *Annals of*