

# 美洲水貂刺鼠信号蛋白基因 SNPs 检测 及其与毛色表型的关联分析

宋兴超, 徐超, 刘宗岳, 岳志刚, 丛波, 刘琳玲, 杨福合\*

(中国农业科学院特产研究所, 吉林省特种经济动物分子生物学省部共建国家重点实验室, 长春 130112)

**摘要:** 旨在检测刺鼠信号蛋白(*Agouti* signaling protein, *Agouti*)基因外显子 2、内含子 2、外显子 3 及部分内含子 3 的单核苷酸多态性(Single nucleotide polymorphisms, SNPs)在不同毛色美洲水貂群体中的分布, 探讨该基因变异与水貂被毛颜色表型的相关性。以金州黑水貂、吉林白水貂、银蓝水貂、咖啡水貂和珍珠色水貂共计 430 个样本的血液基因组 DNA 为模板, 采用 PCR 扩增和 Sanger 双脱氧链终止测序技术, 对 *Agouti* 基因序列进行 SNPs 检测, 并将突变位点与水貂毛色表型进行关联分析。结果表明, 获得的美洲水貂 *Agouti* 基因长度为 2 510 bp, 内含子 2 存在 4 个 SNPs: g. 18G>A, g. 159A>G, g. 235G>T 和 g. 1189C>T, 部分内含子 3 检测到 6 个 SNPs: g. 252C>T, g. 290A>C, g. 298G>C, g. 340A>G, g. 343T>C 和 g. 379T>C, 在外显子 2 和 3 区域并未检测到 SNPs 位点。关联分析表明, *Agouti* 基因 7 个 SNPs(内含子 2: g. 1189C>T; 内含子 3: g. 252C>T, g. 290A>C, g. 298G>C, g. 340A>G, g. 343T>C 和 g. 379T>C)位点的基因型均与水貂毛色表型极显著相关( $P < 0.0001$ ), 且部分内含子 3 中的 5 个 SNPs 位点(g. 290A>C, g. 298G>C, g. 340A>G, g. 343T>C 和 g. 379T>C)可能处于紧密连锁状态。研究结果初步表明, *Agouti* 基因可能是影响美洲水貂被毛颜色的候选基因或与决定毛色性状主效基因相连锁的分子标记。

**关键词:** 美洲水貂; *Agouti* 基因; 毛色表型; 单核苷酸多态性; 关联分析

中图分类号: S865.2<sup>+</sup>2.2

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2016)04-0723-10

## Single Nucleotide Polymorphisms Detection of *Agouti* Gene and Its Association with Coat Color Phenotype in American Mink (*Neovison vison*)

SONG Xing-chao, XU Chao, LIU Zong-yue, YUE Zhi-gang, CONG Bo, LIU Lin-ling, YANG Fu-he\*  
(State Key Laboratory of Special Economic Animal Molecular Biology, Institute of Special Animal and Plant Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130112, China)

**Abstract:** The aim of this study was to research single nucleotide polymorphisms of *agouti* signal protein(*Agouti*)gene and analyze the association of SNPs with coat color phenotype in American mink(*Neovison vison*). The DNA of blood from 5 mink breeds (Jinzhou black, Jilin white, Silverblue, Coffee and Pearl mink) that possessed significant difference in coat color phenotype were selected as templates, SNP sites were screened by PCR and Sanger double chain termination sequencing technology, and then the relationship between the mutation sites of *Agouti* gene and coat color phenotype were analyzed in 430 minks. The results showed that the obtained mink *Agouti* gene was 2 510 bp in length. Total 10 SNPs were screened from 430 individuals of 5 coat color breeds, of which 4 SNPs (g. 18G>A, g. 159A>G, g. 235G>T and g. 1189C>T) were located in intron 2 and 6 SNPs (g. 252C>T, g. 290A>C, g. 298G>C, g. 340A>G, g. 343T>C and g. 379T>C) were detected from partial intron 3 of *Agouti* gene, while no SNPs was discovered in exon 2

收稿日期: 2015-06-08

基金项目: 国家重点基础研究发展计划-973 项目(2012CB722907); 水貂优良种质资源及选育技术引进-948 项目(2014-Z8)

作者简介: 宋兴超(1982-), 男, 河北保定人, 博士生, 助理研究员, 主要从事特种经济动物遗传育种研究, E-mail: songxingchao@caas.cn

\* 通信作者: 杨福合, 研究员, 博士生导师, 主要从事特种经济动物种质资源收集、评价及遗传育种研究, E-mail: yangfh@126.com

and 3. Association analysis of 7 SNPs in *Agouti* gene with coat color phenotype indicated that all sites were very significantly ( $P < 0.0001$ ) correlated with coat color phenotype of American mink. In addition, the 5 loci including g. 290A>C, g. 298G>C, g. 340A>G, g. 343T>C and g. 379T>C might show closely linked phenomenon. Results of the present study indicated that *Agouti* gene might be the candidate gene or linked with the major gene affecting the coat color phenotype of American mink.

**Key words:** American mink; *Agouti* gene; coat color phenotype; SNPs; correlation analysis

哺乳动物皮肤、被毛的颜色和鸟类的羽色是一种重要的质量性状,也是动物形态选择、品种归属识别及鉴定的重要依据之一<sup>[1]</sup>。野生美洲水貂(*Neovison vison*)全身被毛一致,呈深褐色,在家养条件下称为标准貂,彩色水貂是深褐色标准貂的突变型,目前已出现 30 多个毛色突变基因(包括复等位基因),并通过各种组合,已增加至 100 余种<sup>[2]</sup>。彩色水貂皮色泽鲜艳、绚丽多彩,具有较高的经济价值,根据毛色可以分为黑色系、白色系、浅褐色系和灰蓝色系 4 大类<sup>[3]</sup>。水貂作为一种小型珍贵毛皮动物,其被毛颜色是决定貂皮质量及价值最重要的指标,培育出新颖美观的彩貂新品种是当前水貂的主要育种方向之一,应用分子生物学技术克隆水貂毛色相关基因,筛选与水貂被毛颜色表型相关的单核苷酸多态性(Single nucleotide polymorphisms, SNPs)位点,通过分子标记辅助选择(Marker assisted selection, MAS)可以加快彩貂良种的选育进度。

近年来,关于水貂毛色发生的分子遗传学机理研究备受关注。S. Cirera 等<sup>[4]</sup>研究表明,银蓝水貂黑素亲和素(Melanophilin, MLPH)蛋白缺失肌动蛋白 Va (MYO5A)结合域可导致稀释色型。R. Anistoroaei 等<sup>[5]</sup>报道,酪氨酸酶(*Tyrosinase*)基因外显子 1 的错义突变(g. 138T>A)可能与水貂的白化表型相关。宋兴超等<sup>[6]</sup>对美洲水貂黑色素皮质激素受体-1(Melanocortin-1 receptor, MC1R)基因完整编码区进行克隆及生物信息学分析。被毛颜色的形成主要受控于毛囊中黑色素细胞合成及分泌的真黑色素(Eumelanin)和褐黑色素(Pheomelanin)的比例及分布,是涉及多个基因与位点共同进行调控的复杂信号通路,该通路涉及黑色素细胞发育、黑色素小体形成与转运、黑色素合成与类型转变等生物学过程,其中,刺鼠信号蛋白(*Agouti* signal protein gene, *Agouti*)基因是参与调控大多数脊椎动物毛色性状的一个主效基因,该基因主要通过调控色素合成过程中真黑色素和褐黑色素之间的转换来控制毛

色的发生<sup>[7]</sup>。*Agouti* 基因外显子与非编码区突变对小鼠<sup>[8]</sup>、家猫<sup>[9]</sup>、山羊<sup>[10]</sup>和驴<sup>[11]</sup>毛色的影响机制已有相关报道。但是该基因对水貂毛色性状的调控方式还不清楚,因此,研究探讨 *Agouti* 基因变异与水貂毛色表型的相关性,对于进一步揭示水貂毛色形成的分子遗传学机制尤为重要。本研究以 5 个不同毛色水貂群体为研究对象,通过 PCR 扩增及 Sanger 双脱氧链终止测序技术对 *Agouti* 基因外显子 2、内含子 2、外显子 3 和部分内含子 3 区域进行 SNPs 位点检测,并对该基因突变位点与水貂毛色表型进行关联分析,旨在筛查与水貂被毛颜色相关的分子遗传标记,以期为深入研究 *Agouti* 基因调控水貂毛色性状的功能提供参考。

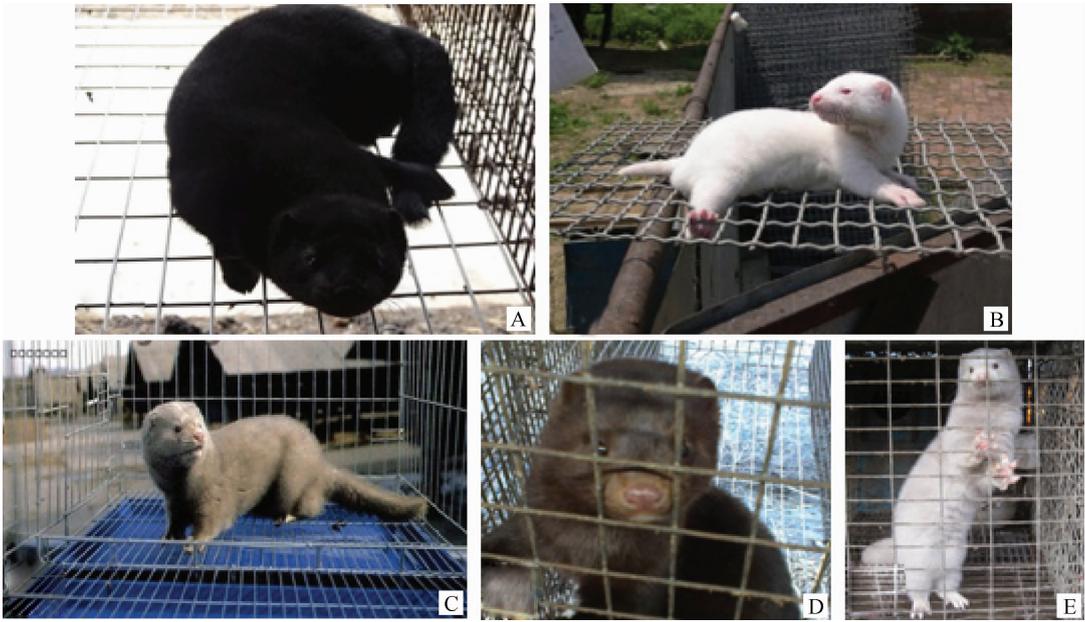
## 1 材料与方法

### 1.1 血液采集及基因组 DNA 提取

以 2 个培育品种和 3 个引进品种共计 5 种毛色表型 430 个样本为研究对象(图 1)。其中培育品种包括金州黑水貂(图 1A, JZH, 120 只)和吉林白水貂(图 1B, JLB, 86 只),引进品种包括银蓝水貂(图 1C, YL, 95 只),咖啡水貂(图 1D, KF, 86 只)和珍珠色水貂(图 1E, ZZ, 43 只)。样本取自大连名威貂业有限公司和中国农业科学院特产研究所毛皮动物试验基地 7 月龄左右、雄性家养美洲水貂血液,水貂取皮时用一次性无菌注射器心采血 5.0 mL 置于真空采血管中,参考文献<sup>[12]</sup>中酚-氯仿抽提法提取水貂血液基因组 DNA,灭菌超纯水溶解,经琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测完整性、含量及纯度,稀释为  $70 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ,  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  保存备用。

### 1.2 主要试剂

DNA 提取所用试剂购于天根生化科技(北京)有限公司,DL2000 DNA Marker、PCR 产物纯化试剂盒、Ex Taq DNA 聚合酶和 dNTPs 均购自宝生物工程(大连)有限公司,琼脂糖购自 Promega 公司。



A. 金州黑水貂;B. 吉林白水貂;C. 银蓝水貂;D. 咖啡水貂;E. 珍珠色水貂

A. Jinzhou black mink;B. Jilin white mink;C. Silverblue mink;D. Coffee mink;E. Pearl mink

图 1 不同被毛颜色的美洲水貂

Fig. 1 Different coat color in American mink

### 1.3 引物设计、PCR 扩增及测序

因 GenBank 数据库中未公布美洲水貂 *Agouti* 基因序列信息,所以本研究以与水貂同属鼬科动物的雪貂(序列号:XM\_004785317) *Agouti* 基因 mRNA 序列作为参考,将该序列在 Ensembl 数据库中雪貂全基因组数据库进行检索,获得一段 4 321 bp 雪貂 *Agouti* 基因核苷酸序列,以该序列作为假定的美洲水貂 *Agouti* 基因,利用 Primer Premier 5.0 和 Oligo 6.0 软件筛选 3 对引物(表 1),扩增水貂 *Agouti* 基因。引物序列由上海生工生物工程有限公司合成。

表 1 扩增美洲水貂 *Agouti* 基因序列引物信息

Table 1 Information of primer sequences for amplifying American mink *Agouti* gene

引物 Primer	序列(5'→3') Sequence	退火温度/℃ T <sub>m</sub>	延伸时间/s Extended time	扩增区域 Amplified region
<i>Agouti</i> -1	F:CTATCGGAACACTTAGGAAATGGGT R:TTATTAATTGGTGGTATACAGGGC	57.5	30	外显子 2
<i>Agouti</i> -2	F:TTGGATTTCCCTTCTGTCTCTATTG R:TCTTCTTTTCCGCTCTTTTCTACT	60.2	82	内含子 2+外显子 3
<i>Agouti</i> -3	F:GAAGCACTGAACAAGAAATCCAAA R:CCATCCAGGTAATCCACTAACA	59.5	62	部分内含子 3

反应体系 25  $\mu\text{L}$ :Ex *Taq* DNA 聚合酶(5 U  $\cdot$   $\mu\text{L}^{-1}$ ) 0.25  $\mu\text{L}$ , 10  $\times$  PCR Buffer (Mg<sup>2+</sup> Plus) 2.5  $\mu\text{L}$ , dNTPs 2.0  $\mu\text{L}$ ,模板 DNA 1.0  $\mu\text{L}$ (70 ng  $\cdot$   $\mu\text{L}^{-1}$ ), 上、下游引物(10 pmol  $\cdot$   $\mu\text{L}^{-1}$ )各 1  $\mu\text{L}$ ,灭菌超纯水 17.25  $\mu\text{L}$ 。反应循环参数:94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min;94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,T<sub>m</sub>(表 1)退火 30 s,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 30~82 s(表 1),35 个循环;72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min;4  $^{\circ}\text{C}$  保存。PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测,将目的片段经过切胶、回收纯化后,送上海生工生物工程有限公司进行双向测序。

## 1.4 数据分析

1.4.1 SNPs 位点识别与基因型判定 利用 BioEdit 7.0 生物软件的 ClustalW Multiple alignment 程序对获得的美洲水貂 *Agouti* 基因序列进行比对,检测 SNPs 位点;通过测序峰图软件 Chromas 5.0 判定 SNPs 位点的基因型,单一峰为纯合基因型,套峰为杂合基因型。

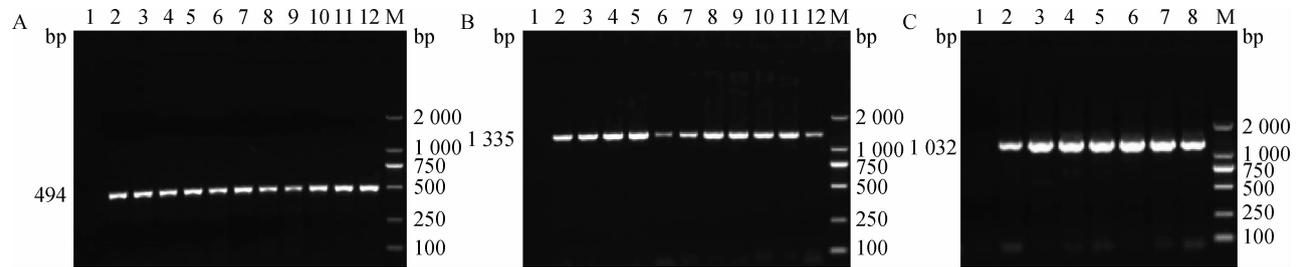
1.4.2 基因型、等位基因频率统计及 SNPs 位点与毛色性状关联分析 采用 Popgene 1.32 软件计算基因型频率和等位基因频率,并利用 SAS 9.2 统计软件的  $\chi^2$  独立性检验程序进行 SNPs 位点基因型与毛色表型的关联分析( $P < 0.05$  表示差异显著,

$P < 0.01$  为差异极显著)。

## 2 结果

### 2.1 *Agouti* 基因 PCR 产物检测

利用设计引物(表 1)进行水貂 *Agouti* 基因扩增,1.2%的琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物(图 2),3 对引物均获得特异性的产物,*Agouti*-1 引物扩增片段为 494 bp(图 2A),*Agouti*-2 引物扩增片段为 1 335 bp(图 2B),*Agouti*-3 引物扩增片段为 1 032 bp(图 2C),3 个片段大小与预期设计扩增长度一致,单一无拖尾,表明引物特异性较好,适合进行测序分析。



M. DNA 相对分子质量标准;1. 阴性对照;2~12. 产物。A. *Agouti*-1;B. *Agouti*-2;C. *Agouti*-3  
M. DL2000 DNA marker;1. Negative control;2-12. The products of *Agouti* gene. A. *Agouti*-1;B. *Agouti*-2;C. *Agouti*-3

图 2 水貂 *Agouti* 基因 3 对引物 PCR 产物电泳

Fig. 2 Electrophoresis of the products of *Agouti* gene in mink from 3 pairs primers

### 2.2 SNPs 位点筛查及基因型判定

参照雪貂 *Agouti* 基因序列结构特征分析 3 对引物的测序结果,共获得美洲水貂 *Agouti* 基因 2 510 bp 核苷酸序列,其中外显子 2、内含子 2、外显子 3 和部分内含子 3 长度分别为 160、1 256、62 和 967 bp(序列号 KJ488543)。利用 BioEdit 7.0 软件中的 ClustalW Multiple alignment 程序对 5 个不同毛色水貂群体的测序结果进行比对,筛查 SNPs 位点,结合测序峰图判定每个位点的基因型。SNPs 位点的命名原则:每个内含子的第 1 个起始碱基标记为“1”,在不同毛色水貂 *Agouti* 基因内含子 2 和 3 中,共检测到 10 个 SNPs(图 3 和表 2),外显子 2 和 3 区域均未检测到多态位点。内含子 2 中检测到 4 个 SNPs,其中吉林白水貂、咖啡水貂和珍珠色水貂仅检测到 3 个位点发生变异:g. 18G>A、g. 159A>G 和 g. 1189C>T,每个位点均包括 3 种基因型;金州黑水貂仅检测到 1 个变异位点:g. 235G>T,包括 2 种基因型;银蓝貂这 4 个突变位点均存在。部分内含子 3 上,在不同毛色水貂群体间检测到 6 个 SNPs:g. 252C>T、g. 290A>C、g. 298G>C、

g. 340A>G、g. 343T>C 和 g. 379T>C,6 个 SNPs 位点在 5 种毛色水貂群体中分别存在 3 种基因型。

### 2.3 *Agouti* 基因内含子 2 序列 4 个 SNPs 位点基因型及等位基因频率的分布

对获得的 5 个不同毛色品种的 430 只水貂 *Agouti* 基因内含子 2 序列进行分析,统计各毛色表型中 4 个 SNPs 的基因型和等位基因频率。由表 3 可见,在 g. 18G>A 和 g. 159A>G 位点上,5 种不同毛色水貂中 G 和 A 等位基因频率均较高,为优势等位基因,其中金州黑水貂 G 和 A 等位基因的基因频率最高,均为 1.000 0,即金州黑水貂群体在这 2 个位点未发生变异;在其它毛色品种中,这 2 个等位基因的分布大致相似。对于 g. 235G>T 位点,仅在金州黑水貂和银蓝水貂群体间检测到变异位点,存在 GG 和 TT 两种基因型,然而,对于位点 g. 1189C>T,金州黑水貂、吉林白水貂、咖啡水貂和珍珠色水貂均存在 CC、CT 和 TT 3 种基因型,且 CT 基因型在吉林白水貂中为优势等位基因型,而银蓝水貂未检测到 TT 基因型。由此推测,g. 1189C>T 位点可能与吉林白水貂的白色被毛表型相关。

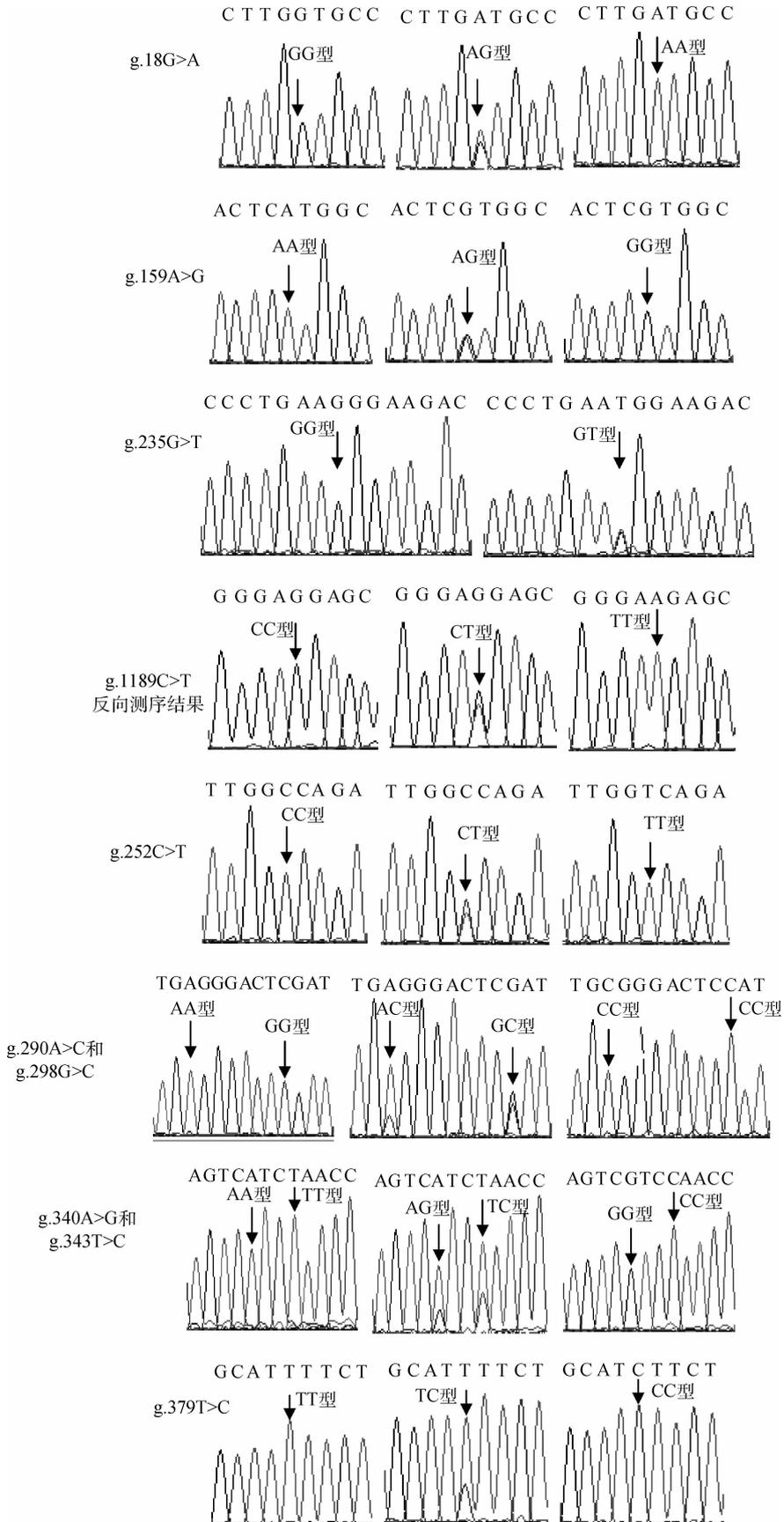
图 3 美洲水貂 *Agouti* 基因 SNPs 位点测序Fig. 3 Sequencing profiles of *Agouti* gene from American mink with different coat color

表 2 水貂 *Agouti* 基因 10 个 SNPs 的信息Table 2 The information of 10 SNPs in mink *Agouti* gene

项目 Item	SNP1	SNP2	SNP3	SNP4	SNP5	SNP6	SNP7	SNP8	SNP9	SNP10
位置/bp Position	18	159	235	1189	252	290	298	340	343	379
突变 Mutation	G/A	A/G	G/T	C/T	C/T	A/C	G/C	A/G	T/C	T/C
分布 Distribution	Intron 2	Intron 2	Intron 2	Intron 2	Intron 3					

表 3 *Agouti* 基因内含子 2 序列 4 个 SNPs 在 5 个不同毛色水貂群体中的基因型与等位基因频率Table 3 Genotype and allele frequency of 4 SNPs for *Agouti* gene intron 2 in 5 coat color mink breeds

突变位点 SNPs	基因型与等位基因 Genotype and allele	不同毛色水貂群体 Different coat color populations of mink				
		金州黑水貂 JZH	吉林白水貂 JLB	银蓝水貂 YL	咖啡水貂 KF	珍珠水貂 ZZ
g. 18G>A	GG	1.000 0(120)	0.744 2(64)	0.821 1(78)	0.837 2(72)	0.534 9(23)
	GA	0.000 0(0)	0.220 9(19)	0.147 4(14)	0.151 2(13)	0.418 6(18)
	AA	0.000 0(0)	0.034 9(3)	0.031 5(3)	0.011 6(1)	0.046 5(2)
	G	1.000 0	0.854 7	0.894 7	0.912 8	0.744 2
	A	0.000 0	0.145 3	0.105 3	0.087 2	0.255 8
g. 159A>G	AA	1.000 0(120)	0.825 6(71)	0.810 5(77)	0.883 7(76)	0.534 9(23)
	AG	0.000 0(0)	0.151 2(13)	0.168 4(16)	0.104 7(9)	0.418 6(18)
	GG	0.000 0(0)	0.023 2(2)	0.021 1(2)	0.011 6(1)	0.046 5(2)
	A	1.000 0	0.901 2	0.894 7	0.936 1	0.744 2
	G	0.000 0	0.098 8	0.105 3	0.063 9	0.255 8
g. 235G>T	GG	0.933 3(112)	1.000 0(86)	0.936 8(89)	1.000 0(86)	1.000 0(43)
	GT	0.066 7(8)	0.000 0(0)	0.063 2(6)	0.000 0(0)	0.000 0(0)
	TT	0.000 0(0)	0.000 0(0)	0.000 0(0)	0.000 0(0)	0.000 0(0)
	G	0.966 7	1.000 0	0.963 2	1.000 0	1.000 0
	T	0.033 3	0.000 0	0.036 8	0.000 0	0.000 0
g. 1189C>T	CC	0.358 3(43)	0.348 8(30)	0.821 1(78)	0.616 3(53)	0.744 2(32)
	CT	0.441 7(53)	0.534 9(46)	0.178 9(17)	0.313 9(27)	0.232 6(10)
	TT	0.200 0(24)	0.116 3(10)	0.000 0(0)	0.069 8(6)	0.023 2(1)
	C	0.579 2	0.616 3	0.910 5	0.775 3	0.860 5
	T	0.420 8	0.383 7	0.089 5	0.226 7	0.139 5

括号内的数字为该基因型个体数。下表同

Figures in brackets are the individual number of the genotype. The same as below

#### 2.4 *Agouti* 基因部分内含子 3 序列 6 个 SNPs 位点基因型及等位基因频率的分布

利用引物 *Agouti*-3 对 5 个不同毛色水貂品种的 430 个样本进行扩增, 获得所有个体 6 个 SNPs

的基因型数据, 并统计各群体各位点的基因型与等位基因频率(表 4)。结果显示, 5 个水貂群体的 6 个位点均发生了突变。g. 252C>T 位点的 C 等位基因在 5 个毛色水貂群体中为优势等位基因, 其中金

州黑水貂群体突变率最低,等位基因 T 频率为 0.222 2。除金州黑水貂品种外,g.290A>C 位点的 C 等位基因在吉林白水貂、银蓝水貂、咖啡水貂和珍珠色水貂群体中为优势等位基因。g.298G>C、g.

340A>G、g.343T>C 和 g.379T>C 位点在各群体中等位基因频率与 g.290A>C 位点完全一致,初步推测,这 5 个变异位点在所有群体内可能处于紧密连锁状态,或者与控制水貂毛色表型的位点连锁。

表 4 *Agouti* 基因内含子 3 序列 6 个 SNPs 在 5 个不同水貂毛色群体中的基因型与等位基因频率

Table 4 Genotype and allele frequency of 6 SNPs for *Agouti* gene intron 3 in 5 coat color mink breeds

突变位点 SNPs	基因型与等位基因 Genotype and allele	不同毛色水貂群体 Different coat color populations of mink				
		金州黑水貂 JZH	吉林白水貂 JLB	银蓝水貂 YL	咖啡水貂 KF	珍珠水貂 ZZ
g.252C>T	CC	0.666 7(80)	0.500 0(43)	0.526 3(50)	0.511 6(44)	0.255 8(11)
	CT	0.222 2(27)	0.430 2(37)	0.452 6(43)	0.360 5(31)	0.627 9(27)
	TT	0.111 1(13)	0.069 8(6)	0.021 1(2)	0.127 9(11)	0.116 3(5)
	C	0.777 8	0.715 1	0.752 6	0.691 9	0.569 8
	T	0.222 2	0.284 9	0.247 4	0.308 1	0.430 2
g.290A>C	AA	0.475 0(57)	0.244 2(21)	0.052 6(5)	0.069 8(6)	0.046 5(2)
	AC	0.208 3(25)	0.500 0(43)	0.115 8(11)	0.348 8(30)	0.325 6(14)
	CC	0.316 7(38)	0.255 8(22)	0.831 6(79)	0.581 4(50)	0.627 9(27)
	A	0.579 2	0.494 2	0.110 5	0.244 2	0.209 3
	C	0.420 8	0.505 8	0.889 5	0.755 8	0.790 7
g.298G>C	GG	0.475 0(57)	0.244 2(21)	0.052 6(5)	0.069 8(6)	0.046 5(2)
	GC	0.208 3(25)	0.500 0(43)	0.115 8(11)	0.348 8(30)	0.325 6(14)
	CC	0.316 7(38)	0.255 8(22)	0.831 6(79)	0.581 4(50)	0.627 9(27)
	G	0.579 2	0.494 2	0.110 5	0.244 2	0.209 3
	C	0.420 8	0.505 8	0.889 5	0.755 8	0.790 7
g.340A>G	AA	0.475 0(57)	0.244 2(21)	0.052 6(5)	0.069 8(6)	0.046 5(2)
	AG	0.208 3(25)	0.500 0(43)	0.115 8(11)	0.348 8(30)	0.325 6(14)
	GG	0.316 7(38)	0.255 8(22)	0.831 6(79)	0.581 4(50)	0.627 9(27)
	A	0.579 2	0.494 2	0.110 5	0.244 2	0.209 3
	G	0.420 8	0.505 8	0.889 5	0.755 8	0.790 7
g.343T>C	TT	0.475 0(57)	0.244 2(21)	0.052 6(5)	0.069 8(6)	0.046 5(2)
	TC	0.208 3(25)	0.500 0(43)	0.115 8(11)	0.348 8(30)	0.325 6(14)
	CC	0.316 7(38)	0.255 8(22)	0.831 6(79)	0.581 4(50)	0.627 9(27)
	T	0.579 2	0.494 2	0.110 5	0.244 2	0.209 3
	C	0.420 8	0.505 8	0.889 5	0.755 8	0.790 7
g.379T>C	TT	0.475 0(57)	0.244 2(21)	0.052 6(5)	0.069 8(6)	0.046 5(2)
	TC	0.208 3(25)	0.500 0(43)	0.115 8(11)	0.348 8(30)	0.325 6(14)
	CC	0.316 7(38)	0.255 8(22)	0.831 6(79)	0.581 4(50)	0.627 9(27)
	T	0.579 2	0.494 2	0.110 5	0.244 2	0.209 3
	C	0.420 8	0.505 8	0.889 5	0.755 8	0.790 7

## 2.5 *Agouti* 基因 SNPs 位点与水貂毛色表型的关联分析

根据筛选到 SNPs 位点所形成的不同基因型及其在不同毛色群体中频率的差异,由于个别毛色群体在 g. 18G>A、g. 159A>G 和 g. 235G>T 位点处的基因型数量<5,不具有统计学意义,且位点 g. 290A>C 与 g. 298G>C、g. 340A>G、g. 343T>C、g. 343T>C 的等位基因频率完全一致,因此选取 3 个 SNPs,即 g. 1189C>T、g. 252C>T、g. 290A>C,分别进行卡方独立性检验(表 5),分析各位点基因

型与毛色表型的相关性。结果表明,内含子 2 中 1 189 位、内含子 3 中 252 位、290 位各基因型在不同毛色群体中差异极显著( $P<0.0001$ ),另外,由于内含子 3 中 g. 298G>C、g. 340A>G、g. 343T>C 和 g. 379T>C 可能与 g. 290A>C 位点处于紧密连锁状态,因此,笔者推测 g. 1189C>T、g. 252C>T、g. 290A>C、g. 298G>C、g. 340A>G、g. 343T>C 和 g. 379T>C 位点均可能与水貂毛色表型存在一定的相关性。

表 5 *Agouti* 基因 SNPs 位点的各基因型分布及其与毛色的关联分析

Table 5 Association between genotype of *Agouti* gene SNPs and coat color phenotype

位点 SNPs	基因型 Genotype	不同毛色群体频数 Number of different coat color					$\chi^2$	P
		金州黑水貂	吉林白水貂	银蓝水貂	咖啡水貂	珍珠水貂		
		JZH	JLB	YL	KF	ZZ		
g. 1189C>T	CC	43	30	78	53	32	77.750 1	<0.000 1
	CT	53	46	17	27	10		
	TT	24	10	0	6	1		
g. 252C>T	CC	80	43	50	44	11	34.698 1	<0.000 1
	CT	27	37	43	31	27		
	TT	13	6	2	11	5		
g. 290A>C	AA	57	21	5	6	2	133.732 8	<0.000 1
	AC	25	43	11	30	14		
	CC	38	22	79	50	27		

## 3 讨论

随着测序成本的逐渐下降,在所有 SNPs 的检测方法中,对欲检测片段进行扩增、直接测序是最为准确的方法,该方法主要用于 SNPs 位点的检测及分型,通常情况下,纯合型 SNPs 位点的测序峰图为单一峰型,而杂合型 SNPs 位点的测序峰为套峰,因而很容易将其区分,通过直接测序方法进行 SNPs 筛查的检出率接近 100%<sup>[13]</sup>。本试验采用 PCR 产物直接测序技术,对 5 个不同毛色水貂群体 *Agouti* 基因进行了单核苷酸多态性检测,在内含子 2 和部分内含子 3 区域共检测到 10 个 SNPs 位点。与非翻译区相比,5 个毛色水貂群体 *Agouti* 基因外显子 2 和 3 未检测到变异位点,这与 M. Girardot 等<sup>[14]</sup>在牛上和 X. L. Li 等<sup>[15]</sup>在山羊中的研究结果一致。J. Voisey 等<sup>[16]</sup>也未检测到人 *Agouti* 基因外显子 2 和

3 具有多态性。初步推断,*Agouti* 基因外显子 2 和 3 在所选取的水貂样本中相对保守,应进一步增加样本量或检测更多的毛色类型个体,同时筛查其他外显子区域以确保水貂 *Agouti* 基因编码区是否存在与毛色表型相关的遗传标记位点。

在内含子 2 所检测到的 4 个 SNPs 位点中,g. 18G>A 和 g. 159A>G 位点仅存在于吉林白水貂、银蓝水貂、咖啡水貂和珍珠色水貂群体中,且 GG 和 AA 为优势基因型,但是金州黑水貂群体中未见这两个变异位点。g. 235G>T 位点仅在金州黑和银蓝水貂群体中存在少量 GT 基因型,因此推测这 3 个 SNPs 位点与水貂的毛色表型关系不大,可能是在个体自然进化或品种选育过程中产生的稀有变异碱基。关于 g. 1189C>T 位点,CT 基因型在白色水貂群体频率最高,且经卡方独立性检验表明,该位点形成的基因型与水貂毛色表型极显著相关( $P<$

0.000 1),所以 g. 1189C>T 位点的 CT 基因型可能与美洲水貂的白色被毛性状存在关联,该位点或者是控制水貂白色被毛表型的主控位点,或者是与控制水貂白色表型的位点存在连锁关系,需要进一步试验验证。部分内含子 3 中的 g. 252C>T 位点形成的 CT 基因型在珍珠色水貂群体中的频率最高(0.627 9),CT 基因型可能与珍珠色水貂的毛色相关。g. 290A>C、g. 298G>C、g. 340A>G、g. 343T>C 和 g. 379T>C 位点的突变纯合子基因型频率(0.831 6)在银蓝水貂群体中的频率最高,与银蓝水貂的灰蓝色被毛表型存在关联( $P<0.000 1$ ),也可能与控制银蓝水貂毛色表型的位点存在连锁关系。

本研究检测到的水貂 *Agouti* 基因 7 个 SNPs 位点中,内含子 2 中与白色表型相关的 g. 1189C>T、内含子 3 中与珍珠色表型相关的 g. 252C>T 位点以及与银蓝色表型相关的 g. 290A>C、g. 298G>C、g. 340A>G、g. 343T>C 和 g. 379T>C 位点可能与某个等位基因连锁,从而表现出不同的基因型,对应不同的毛色表型。前人研究证实,*Agouti* 基因表达的 ASIP 蛋白与  $\alpha$ -MSH 竞争性结合 MC1R,进一步导致真黑色素合成数量减少,生成浅色被毛<sup>[17]</sup>。根据彩貂毛色遗传基因型可知<sup>[3]</sup>,吉林白水貂(基因型:bbcc)和珍珠色水貂(基因型:ppkk)都属于两对纯合隐性基因组合色型,银蓝水貂的基因型为 pp,这 3 种毛色均为浅色表型,与 *Agouti* 基因表达的 ASIP 蛋白拮抗  $\alpha$ -MSH 与 MC1R 相结合的理论相符。尽管本试验检测的 SNPs 存在于内含子中,但有研究表明 *Agouti* 基因内含子的变异可以导致其编码 mRNA 存在不同的剪接体,通过修复蛋白合成而影响相应蛋白的调控功能<sup>[18]</sup>。

## 4 结 论

本研究对美洲水貂 *Agouti* 基因的 SNPs 进行检测并分析了内含子 2 和 3 中的 10 个 SNPs 与水貂毛色性状的相关性,发现 7 个 SNPs 位点与水貂浅色被毛表型存在关联。该结果提示,*Agouti* 基因可作为影响美洲水貂被毛颜色的主效候选基因或与决定毛色性状的主效基因连锁的分子遗传标记,为解析 *Agouti* 基因调控水貂毛色性状的分子遗传学机制奠定基础。

## 参考文献 (References):

[1] 李 宁,方美英. 家养动物驯化与品种培育[M]. 北

京:科学出版社,2012.

LI N, FANG M Y. Animal domestication and breed development[M]. Beijing: Science Press, 2012. (in Chinese)

[2] 佟煜仁,张志明. 图说毛皮动物毛色遗传及繁育新技术[M]. 北京:金盾出版社,2009:18-27.

TONG Y R, ZHANG Z M. Figure for coat color genetics and new reproductive technology of fur animals[M]. Beijing: Jindun Publishing House, 2009: 18-27. (in Chinese)

[3] 华 盛,华树芳. 毛皮动物高效健康养殖关键技术[M]. 北京:化学工业出版社,2009:2-8.

HUA S, HUA S F. The key technologies for efficient and healthy farming in fur animal[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2009: 2-8. (in Chinese)

[4] CIRERA S, MARKAKIS M N, CHRISTENSEN K, et al. New insights into the melanophilin (MLPH) gene controlling coat color phenotypes in American mink[J]. *Gene*, 2013, 527(1): 48-54.

[5] ANISTOROEI R, FREDHOLM M, CHRISTENSEN K, et al. Albinism in the American mink (*Neovison vison*) is associated with a tyrosinase nonsense mutation[J]. *Anim Genet*, 2008, 39(6): 645-648.

[6] 宋兴超,徐 超,岳志刚,等. 美洲水貂 (*Neovison vison*) 黑素皮质激素受体-1 (MC1R) 基因序列鉴定及生物信息学分析[J]. 畜牧兽医学报, 2015, 46(5): 752-759.

SONG X C, XU C, YUE Z G, et al. Identification and bioinformatic analysis on melanocortin-1 receptor gene (MC1R) of American mink (*Neovison vison*) [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2015, 46(5): 752-759. (in Chinese)

[7] VALVERDE P, HEALY E, JACKSON I, et al. Variants of the melanocyte-stimulating hormone receptor gene are associated with red hair and fair skin in humans[J]. *Nat Genet*, 1995, 11(3): 328-330.

[8] VOISEY J, VAN DAAL A. *Agouti*: from mouse to man, from skin to fat[J]. *Pigment Cell Res*, 2002, 15(1): 10-18.

[9] EIZIRIK E, YUHKI N, JOHNSON W E, et al. Molecular genetics and evolution of melanism in the cat family[J]. *Curr Biol*, 2003, 13(5): 448-453.

[10] 唐春娟,李祥龙,周荣艳,等. 山羊 *Agouti* 基因第 1 内含子 T128 缺失在中国主要地方山羊品种中的变异[J]. 畜牧兽医学报, 2009, 40(3): 320-326.

TANG C J, LI X L, ZHOU R Y, et al. Study on genetic diversity of T128 del in *Agouti* gene intron 1 in Chinese main indigenous goat breeds[J]. *Acta Veteri-*

- naria et Zootechnica Sinica*, 2009, 40(3): 320-326. (in Chinese)
- [11] ABITBOL M, LEGRAND R, TIRET L. A missense mutation in the agouti signaling protein gene (*ASIP*) is associated with the no light points coat phenotype in donkeys[J]. *Genet Sel Evol*, 2015, 47: 28.
- [12] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. Molecular cloning (Third edition) [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2002: 461-512.
- [13] 王兴平, 罗仍卓么, 李 峰, 等. 湘西黄牛 *Myf5* 和 *Pax7* 基因的 SNPs 检测及其与体尺性状的关联分析 [J]. 畜牧兽医学报, 2014, 45(9): 1531-1537.
- WANG X P, LUORENG Z M, LI F, et al. Identification of SNPs in *Myf5* and *Pax7* genes and association analysis with body measurement traits in Xiangxi cattle [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2014, 45(9): 1531-1537. (in Chinese)
- [14] GIRARDOT M, MARTIN J, GUIBERT S, et al. Widespread expression of the bovine *Agouti* gene results from at least three alternative promoters [J]. *Pigment Cell Res*, 2005, 18(1): 34-41.
- [15] LI X L, ZHAO J W, TANG C J, et al. Sequencing of part of the goat *Agouti* gene and SNP identification [J]. *Biochem Genet*, 2010, 48(1-2): 152-156.
- [16] VOISEY J, BOX N F, VAN DAAL A. A polymorphism study of the human *Agouti* gene and its association with *MC1R* [J]. *Pigment Cell Res*, 2001, 14(4): 264-267.
- [17] SUZUKI I, TADA A, OLLMANN M M, et al. Agouti signaling protein inhibits melanogenesis and the response of human melanocytes to  $\alpha$ -melanotropin [J]. *J Invest Dermatol*, 1997, 108(6): 838-842.
- [18] 张 天. 不同毛色山羊皮肤组织 *ASIP* 蛋白表达与 *Agouti* 基因剪接体类型研究 [D]. 保定: 河北农业大学, 2014.
- ZHANG T. Study on expression of *ASIP* protein and *Agouti* gene spliceosome types in skin tissue of different coat color goat [D]. Baoding: Agricultural University of Hebei, 2014. (in Chinese)

(编辑 程金华)