

张俊,钱勇,钟声,等.波尔山羊 MC4R 胞内 3 环基因片段单核苷酸多态性对体重的影响[J].江苏农业科学,2014,42(3):13-15.

# 波尔山羊 MC4R 胞内 3 环基因片段单核苷酸多态性对体重的影响

张俊,钱勇,钟声,孟春花,王慧利,曹少先

(江苏省农业科学院畜牧研究所/江苏省农业科学院动物品种改良和繁育重点实验室,江苏南京 210014)

**摘要:**为探讨黑素皮质素受体 4(melanocortin receptor-4, MC4R) 基因多态性对波尔山羊生长性状的影响,对波尔山羊 MC4R 基因进行了克隆测序,筛选多态性位点。结果表明:MC4R 胞内 3 环基因片段存在 2 个碱基颠换,分别是编码区 663 bp 处 C/A 颠换,693 bp 处 C/T 颠换;其中 693 bp 处 C/T 存在于 Csp6 I 酶切位点内,以此建立了基于 Csp6 I 酶切的 PCR-RFLP 检测方法,并对 163 只波尔山羊进行检测分析;在受检波尔山羊中检测到 CC、CT 2 种基因型,2 种基因型在波尔山羊各月龄体重方面差异均不显著,且在群体中表现为低度多态,群体遗传杂合度较低,表明 C693T 位点在波尔山羊群体中的遗传一致性较高。

**关键词:**黑素皮质素受体 4;克隆;PCR-RFLP;波尔山羊;生长

**中图分类号:** Q343.1<sup>+</sup>5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)03-0013-03

黑素皮质素受体-4(melanocortin receptor-4, MC4R) 分布于动物脑组织和肾上腺髓质,是从动物下丘脑腹内侧核分泌的一种肽类物质<sup>[1]</sup>,其主要作用是通过与脑分泌的天然内源配体  $\alpha$ -促黑激素( $\alpha$ -Melanocyte stimulating hormone,  $\alpha$ -MSH)结合,从而抑制体重增加<sup>[2]</sup>。1993 年 Gantz 等最先克隆出人的 MC4R 基因,并将其定位于人染色体 18q21.3<sup>[3]</sup>。1997 年 Huszar 等首次证明了 MC4R 在能量平衡中的关键作用,即遗传敲除 MC4R 基因的小鼠出现遗传性肥胖,表现多食、肥胖、胰岛素分泌过多等症状<sup>[4-5]</sup>。此后又有大量研究发现,MC4R 在家畜的背膘厚、日增重、采食量等生长性状中具有重要生物学活性,可作为选择动物生长性状的遗传标记。本研究对波尔山羊 MC4R 基因进行了克隆和测序,寻找波尔山羊 MC4R 基因的多态性位点,分析其多态性与波尔山羊体重的关联,期为山羊分子育种提供参考。

## 1 材料与与方法

### 1.1 试验材料

163 只波尔山羊样本由江苏省农业科学院六合动物实验基地统一饲养管理,营养水平以及管理水平保持一致。各月龄波尔山羊体重资料均由该基地提供。对各个体采集耳组织样,置冰桶中带回实验室, -20℃ 保存。

### 1.2 组织 DNA 提取

组织样 DNA 的提取采用酚/仿抽提法,TE Buffer 溶解后 -20℃ 保存。

收稿日期:2013-07-19

基金项目:公益性行业(农业)科研专项(编号:201303143-06);江苏省科技支撑计划(编号:BE2010372);江苏省农业科技自主创新资金[编号:CX(11)1032]。

作者简介:张俊(1982—),女,江苏南京人,助理研究员,主要从事羊分子育种研究。E-mail:applepuding@163.com。

通信作者:曹少先,博士,研究员。Tel:(025)84390352;E-mail:caoshaoxian@163.com。

### 1.3 MC4R 基因扩增

根据 GenBank:EU622853.2 设计引物。上游引物序列: TCCAAGTGATGCCGACCAG,下游引物序列: CTGGGCACT-GCTTCACATC。PCR 反应体系 20  $\mu$ L,含模板 DNA 60 ng, 5 U/L Taq 聚合酶 0.2  $\mu$ L, 10 mmol/L dNTP 0.4  $\mu$ L, 10  $\mu$ mol/L 引物各 0.6  $\mu$ L, 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 1.2  $\mu$ L, 10 $\times$ 缓冲液 2  $\mu$ L,添加灭菌双蒸水至 20  $\mu$ L。PCR 反应程序:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 30 s, 56℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 90 s, 35 个循环;72℃ 延伸 10 min。

### 1.4 克隆与测序

PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,随机选取 10 只波尔山羊的 PCR 产物用 TaKaRa 胶回收试剂盒回收后与 PMD-19T 载体连接,16℃ 培养过夜,转化到大肠杆菌感受态细胞中,37℃ 培养 16 h,挑阳性克隆送上海英骏公司测序。

### 1.5 突变位点筛选

将 11 个阳性克隆的测序结果与 GenBank 序列对比,确定突变位点。

### 1.6 PCR-RFLP 分析

1.6.1 目的基因扩增 根据测序结果选择其中一个突变位点(位于 Csp6 I 识别序列内),设计 1 对引物扩增 MC4R 基因 Csp6 I 位点上游 158 bp,下游 80 bp,共 238 bp 序列,上游引物序列为 GTGTCTGGGCGTCTTGTTTC,下游引物序列为 AG-CAGACGACGAAGACCC。PCR 反应体系为 20  $\mu$ L,含模板 DNA 60 ng, 5 U/L Taq 聚合酶 0.2  $\mu$ L, 10 mmol/L dNTP 0.4  $\mu$ L, 10  $\mu$ mol/L 引物各 0.6  $\mu$ L, 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 1.2  $\mu$ L, 10 $\times$ 缓冲液 2  $\mu$ L,添加灭菌双蒸水至 20  $\mu$ L。PCR 反应程序: 94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 30 s, 59℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 15 s, 35 个循环。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭(EB)染色检测扩增结果。

1.6.2 基因型的确定 采用 Csp6 I 对 PCR 扩增产物进行酶切。酶切反应体系 16  $\mu$ L,含 PCR 产物 4  $\mu$ L, 10 U/L Csp6 I 0.5  $\mu$ L, 10 $\times$ 缓冲液 1  $\mu$ L,灭菌双蒸水 10.5  $\mu$ L。37℃ 酶切

3 h。均用 3% 琼脂糖凝胶电泳检测酶切产物,EB 染色,培清 JS-780 全自动凝胶成像分析仪进行成像分析。CC 基因型得到 238 bp 的 1 个片段,CT 基因型得到 80、158、238 bp 等 3 个片段。

1.7 数据分析

对不同基因型的山羊体重体尺资料采用 SPSS 软件的 Independent-Samples T Test 工具进行关联分析。

2 结果与分析

2.1 MC4R 基因片段的扩增

对 10 只波尔山羊 DNA 模板分别进行 MC4R 基因片段 PCR 扩增,在 1 400 bp 左右得到 1 条特异性条带(图 1),与预期结果一致。

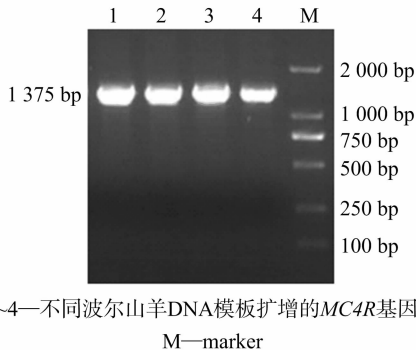


图1 波尔山羊MC4R 基因片段的扩增

2.2 测序筛选多态位点

将 10 只波尔山羊 DNA 模板扩增得到的 MC4R 基因片段克隆后进行测序,测序结果表明在 MC4R 胞内 3 环基因片段发现 2 个点突变,663 bp 处 C/A 单碱基颠换(图 2),693 bp 处 C/T 单碱基颠换(图 3)。经分析 693 bp 处 C/T 变异处于 Csp6 I 酶切位点内。

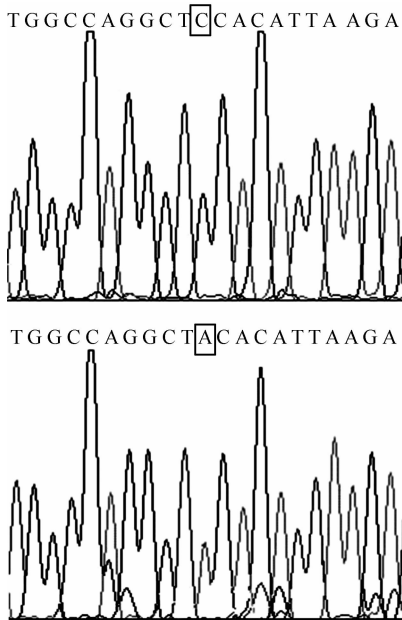


图2 663 bp处C/A单碱基颠换

2.3 PCR-RFLP 检测方法的建立

对 163 只波尔山羊样本进行 PCR 扩增,在 238 bp 左右得

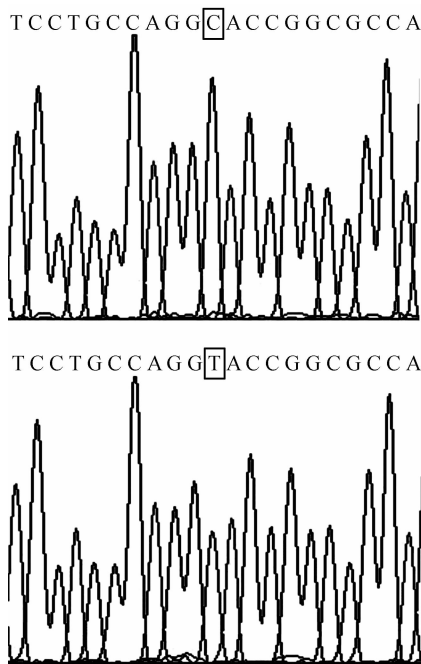
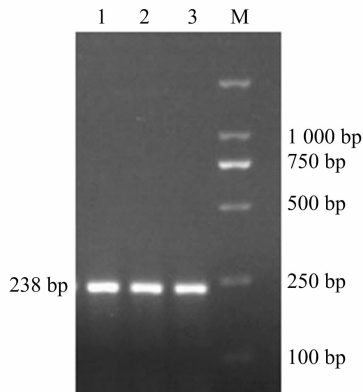


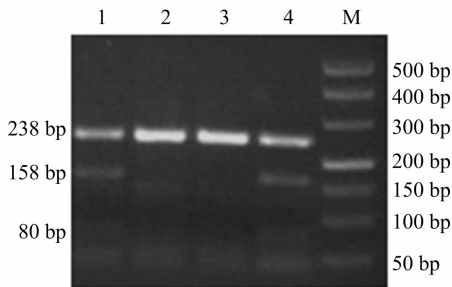
图3 693 bp处C/T单碱基颠换

到 1 条特异性条带(图 4),与预期结果一致。采用限制性内切酶 Csp6 I 对 PCR 扩增产物进行消化,结果出现 2 种基因型,分别命名为 CC、CT。CC 基因型得到 238 bp 1 个片段(图 5,泳道 2、3);CT 基因型得到 238、158、80 bp 3 个片段(图 5,泳道 1、4)。



泳道1~3—PCR扩增产物; M—marker

图4 波尔山羊MC4R 基因片段PCR扩增



CC—泳道2、3; CT—泳道1、4; M—marker

图5 波尔山羊MC4R 基因片段Csp6 I 酶切电泳分析

2.4 MC4R 基因群体遗传学分析

2.4.1 基因型频率在波尔山羊群体中的分布 在 163 只受

试波尔山羊中,以 CC 基因型居多,占 78.5%;CT 基因型较少,占 21.5%(表 1);C 为优势基因。

2.4.2 遗传特性分析 由表 1 可见,C693T 位点在波尔山羊群体中均表现为低度多态[多态信息含量(PIC) < 0.25],而且群体遗传杂合度较低,表明该多态位点在波尔山羊群体中

的选择潜力不大,遗传一致性较高。

2.5 不同基因型对波尔山羊体重的影响

对受检波尔山羊 C693T 位点 2 种基因型的山羊体重进行 *t* 检验,结果表明各月龄山羊体重差异均不显著(表 2)。

表 1 波尔山羊 MC4R 基因 C693T 位点的基因型和等位基因频率及遗传多样性

群体	样本数 (只)	基因型比例(%)		等位基因比例(%)		多态信息含量	杂合度	有效等位基因数
		CC	CT	C	T			
波尔山羊	163	78.5	21.5	89.3	10.7	0.173	0.192	1.237

表 2 波尔山羊 MC4R 基因 C693T 位点不同基因型的体重

基因型	初生重 (kg)	1 月龄重 (kg)	3 月龄重 (kg)	6 月龄重 (kg)	9 月龄重 (kg)	周岁龄重 (kg)
CC	3.30 ± 0.04	7.50 ± 0.18	13.88 ± 0.35	20.91 ± 0.48	29.11 ± 0.71	49.65 ± 1.59
CT	3.29 ± 0.09	7.35 ± 0.35	13.90 ± 0.64	21.27 ± 1.17	27.52 ± 1.04	45.09 ± 2.56

基因型	1 周岁重 (kg)	1 月龄日增重 (g)	3 月龄日增重 (g)	6 月龄日增重 (g)	9 月龄日增重 (g)	周岁日增重 (g)
CC	4.45 ± 0.11	140.36 ± 4.79	117.83 ± 3.66	97.99 ± 2.63	94.07 ± 3.03	126.36 ± 4.30
CT	4.56 ± 0.15	134.86 ± 10.46	117.93 ± 6.49	99.67 ± 6.50	89.63 ± 3.75	114.25 ± 7.08

3 结论与讨论

大量研究表明,MC4R 基因在动物采食和能量平衡调控中起关键作用,目前已发现猪、牛、兔、犬、鸡等动物的 MC4R 基因存在与体重性状相关的 SNPs。Kim 等首次报道 MC4R 基因 Asp298Asn 突变与猪的背膘厚、生长速度、采食量显著相关<sup>[6]</sup>。刘洪瑜等发现,牛的 MC4R 基因 1069 C/G 突变显著影响了体斜长及胸围<sup>[7]</sup>。蒋美山等对兔 MC4R 基因 237 bp 处 A/G 突变的研究显示,该位点显著影响兔体重、全净膛重、饲料转化率<sup>[8]</sup>。张轶博等发现,比格犬 MC4R 基因 226 bp 处的 C/A 变异与体重显著相关<sup>[9]</sup>。仇雪梅等发现,MC4R 基因 5' 调控区和编码区的 4 个突变对鸡体重、屠体性状有显著影响<sup>[10]</sup>。曾献存等发现,不同 MC4R 基因的中国美利奴羊体斜长和腰角宽差异显著<sup>[11]</sup>。但山羊 MC4R 基因多态性及其与生产性状关联分析未见报道。

已有研究显示,MC4R 的胞内 3 环对于 MC4R 与 G 蛋白的偶联活性十分重要<sup>[12]</sup>。通过克隆测序,本研究发现波尔山羊 MC4R 胞内 3 环基因片段存在 2 个 SNPs,即 C663A、C693T,均为无义突变,不引起氨基酸的改变。其中 693 bp 处的 C/T 单碱基颠换导致产生限制性内切酶 *Csp6 I* 识别位点,据此建立了该 SNP 位点的 PCR-RFLP 检测方法。通过对 163 只波尔山羊检测发现,只检测出 2 种基因型,以 CC 型居多,CT 型较少,C 为优势基因。*t* 检验表明,检测出的 2 种基因型在受检波尔山羊各月龄体重方面差异均不显著,且该位点在波尔山羊群体中表现为低度多态(PIC < 0.25),说明其在波尔山羊群体中的选择潜力不大。但该位点在波尔山羊群体中是否均只存在 2 种基因型及其对体重的影响,以及 C663A 位点对体重、体尺性状的影响,还须要进一步研究。

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: Monthly Journal of the Association of Physicians, 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 Research, 2004, 1001(1/2): 150-158.

[3] Gantz I, Miwa H, Konda Y, et al. Molecular cloning, expression, and gene localization of a fourth melanocortin receptor[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1993, 268(20): 15174-15179.

[4] 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.

[5] 方晓敏, 孟瑶琴, 任守文, 等. 6 个主效基因在苏钟猪分子育种中的应用价值[J]. 江苏农业学报, 2012, 28(5): 1074-1078.

[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]. Mammalian Genome, 2000, 11(2): 131-135.

[7] 刘洪瑜, 王恒, 任春环, 等. 牛 MC4R 基因多态性与体尺性状的相关分析[J]. 中国兽医学报, 2012, 32(9): 1309-1311, 1343.

[8] 蒋美山, 陈仕毅, 赖松家, 等. 兔黑素皮质素受体 4 (MC4R) 基因多态性及其与体重及屠体性状的关联研究[J]. 遗传, 2008, 30(12): 1574-1578.

[9] 张轶博, 巴彩凤, 苏玉虹, 等. 比格犬 MC4R 基因多态性与体重相关性的研究[J]. 遗传, 2006, 28(10): 1224-1228.

[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, 2006, 36(2): 127-133.

[11] 曾献存, 陈韩英, 贾 斌, 等. MC4R 和 PROPI 基因多态性及合并基因型与中国美利奴羊生长性状的关联分析[J]. 畜牧兽医学报, 2011, 42(9): 1227-1232.

[12] Kim D H, Shin S W, Baik J H. Role of third intracellular loop of the melanocortin 4 receptor in the regulation of constitutive activity[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2008, 365(3): 439-445.