

野猪 MC4R 基因的克隆及变异初步研究

杨秀芹^① 于浩^① 顾志刚^① 刘娣^{①②*}

(^①东北农业大学动物科技学院 哈尔滨 150030 ;^②黑龙江省农业科学院 哈尔滨 150086)

摘要 :黑素皮质素受体 4 是在人类肥胖研究中发现的重要调节因子,参与调节动物的体重、采食量和能量稳态,缺失 MC4R 基因的突变纯合体小鼠出现遗传性肥胖。为了进一步揭示其群体遗传变异,寻找新的遗传标记,本研究对野猪(*Sus scrofa ussuricus*) MC4R 基因进行了克隆(GenBank accession No. DQ388767)和序列分析,并对所发现的错义突变进行了基于限制性内切酶 *Hind*Ⅲ 的 PCR-RFLP 分析。序列分析表明野猪与民猪 MC4R 基因的编码区序列完全相同,与大白猪相比存在 4 个 SNPs;对 14 头野猪的酶切多态性分析表明该突变位点是多态位点,并且 3 种基因型的分布符合 Hardy-Weinberg 定律。结果表明,野猪具有独特的遗传信息。

关键词 :野猪;MC4R 基因;PCR-RFLP

中图分类号 S813.1 文献标识码 A 文章编号 0250-3263(2007)02-71-04

The MC4R Gene Cloning and Mutation Analysis in Wild Boar

YANG Xiu-Qin^① YU Hao^① GU Zhi-Gang^① LIU Di^{①②*}

(^① Northeast Agricultural University, Harbin 150030 ;^② Agricultural Academy of Heilongjiang Province, Harbin 150086, China)

Abstract :Melanocortin 4 receptor (MC4R) is associated with human obesity and plays an important role in the regulation of body weight, food intake and energy balance. MC4R knockout mice develop hereditary obesity. In order to further reveal its genetic variability in population, and to find new genetic markers, MC4R gene of Wild Boar (*Sus scrofa ussuricus*) was cloned and analyzed. The polymorphic analysis on the newly found missense variant was done with PCR-RFLP using the endonuclease *Hind*Ⅲ. Sequence analysis showed that the CDS identity between Wild Boar and Min Pig was 100%, and that there were four SNPs between Wild Boar and Yorkshire. Polymorphic analysis made clear that the variant was polymorphic site, and that the distribution of three genotypes conformed to the Hardy-Weinberg law. Our results indicate that Wild Boar has its unique genetic information.

Key words :Wild Boar; MC4R gene; PCR-RFLP

黑素皮质素受体-4 (melanocortin receptor 4, MC4R),由单一外显子编码,含有 332 个氨基酸残基,具有 7 个跨膜结构,是跨膜 G 蛋白耦联受体(G-protein coupled receptors, GPCRs)超家族的成员之一^[1]。MC4R 大量存在于动物中枢神经系统的各个区域中,包括大脑皮质、丘脑、下丘脑、脑干和脊髓^[2],能够通过中枢神经系统调节体重,主要表现为抑制摄食,导致血糖、胰岛素和瘦素水平降低,从而减少体脂、降低体重,在动物的体重、能量稳态和采食量的调控中具有

重要作用。1997 年, Huszar 等^[3]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(MC4R^{-/-})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。因

基金项目 黑龙江省杰出青年基金(No. JC-05-19),黑龙江省科技攻关项目(No. GB05B106);

* 通讯作者, E-mail: liudi1963@163.com;

第一作者介绍 杨秀芹,女,博士研究生,讲师;研究方向:动物分子遗传学, E-mail: xiuqin163@163.com.

收稿日期 2006-08-22, 修回日期 2006-11-04

此, MC4R 作为肥胖的重要调节因子倍受关注。

野猪(*Sus scrofa ussuricus*)是我国重要的资源兽类之一,几乎分布于我国各地。随着人们生活水平的提高,崇尚绿色成为饮业发展的趋势,现在驯养野猪和利用纯种野猪与优质纯种家猪杂交,生产特色野猪已很普遍。特色野猪肉因为具有肉味鲜美、口感好、营养丰富、野味特色的优点而得到人们的青睐。本文以生长于黑龙江小兴安岭的东北野猪为研究对象,对脂肪性状的主效基因 MC4R 进行克隆和多态性分析,以期对野猪、家猪杂交育种提供分子水平的理论支持。

1 材料与与方法

1.1 实验动物 野猪(14头)由牡丹江大海林林场提供,取耳组织,用75%的酒精保存,常温下带回实验室。

1.2 DNA 的提取、PCR 扩增与测序 DNA 提取用酚-氯仿法提取基因组 DNA。PCR 反应:根据 GenBank 上提供的家猪 MC4R 序列(序列号 NM214173)设计一对引物,扩增野猪 MC4R 基因的全长编码区,序列如下:F:5' ATG AAC TCA ACC CAT CAC C 3',R:5' TTA ATA TCT GCT AGA CAA ATC ACA G 3'。反应条件:94℃变性 30 s,55℃退火 45 s,72℃延伸 1 min,35 个循环。PCR 产物的克隆与测序:随机挑选 2 个个体进行 PCR 扩增,扩增产物回收纯化后,连接于 PMD18-T 载体,转化大肠杆菌 DH5 α ,各随机挑取 3 个阳性克隆,摇菌培养,送上海博亚生物工程有限公司测序。

1.3 PCR-RFLP 分子检测技术的建立 根据 2 个野猪 MC4R 基因的测序结果建立了基于限制性内切酶 *Hind* III 的 PCR-RFLP 分子检测技术,检测 171 bp 处的变异在野猪中的分布情况。酶切反应的终体积为 20 μ l,含有限制性内切酶 *Hind* III 3 U,在推荐的温度下酶切 2 h 后,用 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4 序列分析与数据处理 用 DNAMAN 软件进行同源性比对;利用蛋白质功能位点数据库 PROSITE 对蛋白的结构域进行预测;用

ProtParam tool 软件进行氨基酸组成、等电点分析;用 TMpred 进行跨膜区分析。

统计参数包括(1)基因频率(2)基因型频率(3)基因频率方差 $Var(P_i) = \frac{1}{2n}(P_i + P_{ii} - 2P_i^2)$,式中,Var 表示方差, i 表示某一多态位点的等位基因, P_i 、 P_{ii} 表示相应基因频率和基因型频率的样本统计值, n 表示样本数(4)杂合度 $H = 1 - \sum_{i=1}^m P_i^2$,式中, m 表示某一多态位点上的等位基因数, i 、 P_i 含义同(3)。采用 HWSIM 程序(<http://krunch.med.yale.edu/hwsim/>)对群体内不同基因型分布进行 Hardy-Weinberg 平衡的卡方适合性检验。

2 结果

2.1 野猪 MC4R 基因的克隆和序列分析 猪 MC4R 基因仅含有一个外显子,编码区序列长度为 999 bp,本研究所设计的引物覆盖了整个编码区。PCR 扩增产物经过琼脂糖凝胶电泳检测发现一条清晰明亮的区带,长度在 1 kb 左右(图 1 3、4 泳道)。测序结果表明野猪 MC4R 基因编码区全长也是 999 bp,包含起始密码子 ATG 和终止密码子 TAA,编码 332 个氨基酸残基的蛋白质。2 个野猪之间的序列比对发现在 171 bp 处存在着一个错义突变:A/G 转换导致第 57 位氨基酸发生了 I/M 替代,并且该突变造成了 *Hind* III 酶切位点的增减。利用 ProtParam tool^①对编码氨基酸进行分析,发现 MC4R 的分子量为 36 946.7 u,等电点为 7.136,碱性氨基酸残基和酸性氨基酸残基的含量分别为 17%。TMpred^②分析发现 MC4R 多肽链含有 7 个跨膜结构(图 2,表 1),分数超过 500 的被认为非常可靠。该突变位于第一个跨膜区内。利用蛋白质功能位点数据库 PROSITE^③对野猪的 MC4R 编码氨基酸进行结构功能域分析,发现两个结

① <http://www.expasy.org/tools/protparam>

② http://www.ch.embnet.org/software/TMPred_form.html

③ <http://www.expasy.cn/prosite>

构功能域和多个磷酸化位点(表 2),该处变异不在这些功能域之内。

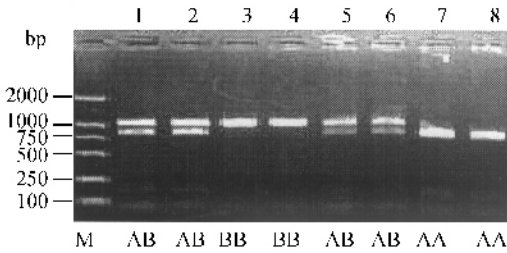


图 1 野猪 MC4R 基因 *Hind*Ⅲ 酶切示意图

Fig.1 Digestion of MC4R with *Hind*Ⅲ

数字表示泳道,其下面对应的字母表示基因型。M:Marker DL2000, The number indicated electrophoresis lane and the letters were genotype.

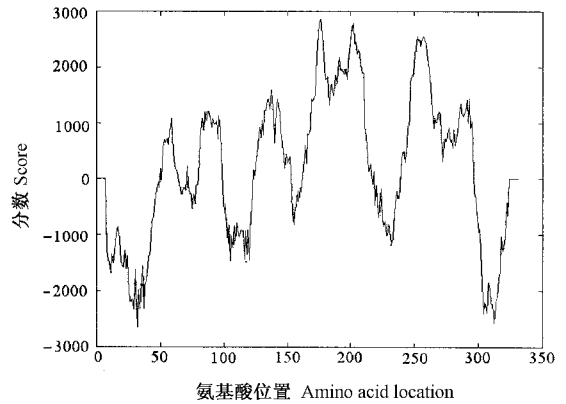


图 2 TMpred 预测的野猪 MC4R 的 7 个跨膜结构

Fig.2 Seven transmembrane domains of MC4R predicted by TMpred

表 1 野猪 MC4R 跨膜区的区间位置

Table 2 Locations of transmembrane domains of MC4R in Wild Boar

跨膜区 Transmembrane	1	2	3	4	5	6	7
氨基酸位置 Amino acids	50 ~ 69	81 ~ 103	123 ~ 145	166 ~ 188	192 ~ 214	245 ~ 267	282 ~ 304

表 2 Prosite 预测的野猪 MC4R 的结构域

Table 2 Motifs MC4R predicted by Prosite

结构域 Motif	氨基酸位置 Amino acids
7 跨膜域受体(视紫红质家族) 7 transmembrane receptor (rhodopsin family)	61 ~ 302
G 蛋白耦联受体家族 1 结构域 G-protein coupled receptors family 1 profile	61 ~ 302
G-蛋白耦联受体家族 1 标记 G-protein coupled receptors family 1 signature	135 ~ 151

同源性为 99.6%,氨基酸同源性为 99.1%,并且,所有变异都是转换,说明在 MC4R 基因突变时存在着转换偏倚现象。

表 3 野猪与民猪、大白猪 MC4R 基因编码区的比较

Table 3 The comparison of MC4R CDS among Wild Boar, Min Pig and Yorkshire

核苷酸位置 Nucleotide	171	175	551	758	892
野猪 Wild Boar	A/G	T	T	T	G
民猪 Min Pig	GT	T	T	G	
大白猪 Yorkshire	A	C	C	C	A

2.2 野猪与家猪 MC4R 的核苷酸和氨基酸序列比较 将野猪与本实验室克隆的民猪、大白猪 MC4R 的核苷酸和氨基酸序列进行同源性比对,野猪和民猪的核苷酸组成完全相同,和大白猪相比,存在 4 个碱基的差异(表 3),其核苷酸

2.3 野猪 MC4R 基因的酶切多态性分析 对 14 头野猪 MC4R 基因进行了基于限制性内切酶 *Hind*Ⅲ 的 PCR-RFLP 分析,酶切后产生 3 种基因型,酶切后只产生一条片段的,也就是在扩增产物中不含有 *Hind*Ⅲ 酶切位点的,命名为

表 4 *Hind*Ⅲ 多态位点各参数值

Table 4 Statistic value of *Hind*Ⅲ polymorphic site

基因型 Genotype	统计数 Number	基因型频率 Genotype frequency	基因 Gene	基因频率 Gene frequency	基因频率方差 Gene frequency variance	杂合度 Heterozygosity
AA	7	0.500 0	A	0.678 6	0.01	0.436 3
AB	5	0.357 1				
BB	2	0.142 8	B	0.321 4	0.01	

BB 型 酶切后产生 171 bp 和 828 bp 2 条片段的命名为 AA 型 酶切后产生 171 bp、828 bp 和 999 bp 3 条片段的命名为 AB 型(图 1)。各参数统计值见表 4。 χ^2 适合性检验表明 3 种基因型在野猪群体内的分布符合 Hardy-Weinberg 平衡定律($\chi^2 = 0.471 < \chi_{0.05(2)}^2$)。

3 讨 论

本研究根据 GenBank 上登陆的家猪 MC4R 基因序列,设计出一对特异性引物,首次克隆了野猪 MC4R 基因(Genbank accession No: DQ388767),通过测序比对后找到一个新的多态性酶切位点,并通过分析其在 14 头野猪中的分布发现这是一个高度多态位点,为进一步揭示 MC4R 基因的功能提供了基础。从表 4 可以看出 A 基因频率明显高于 B 基因,但两基因频率方差相同,说明 A、B 基因频率的差异可能是由于抽样误差引起的。野猪群体内 A、B 基因频率在理论上应该相等,基因杂合度值接近 0.5,表明该位点属于多态位点。

MC4R 是影响脂肪性状的一个主效基因,早期的研究发现在猪 MC4R 基因第 7 跨膜结构功能域的一个高度保守区内发生了错义突变(G→A),由此产生 Taq I 酶切位点的改变^[4]。Chen 等^[5]根据该位点的酶切多态性变化,对 9 个中国地方品种猪、4 个法国引进品种猪以及长白猪与蓝塘猪杂交产生的 F₂ 代共约 600 个样本进行了 PCR-RFLP 分析,发现该位点的突变与背膘厚、生长率显著相关,刘桂兰等^[6]的研究也表明该 G→A 突变有作为脂肪性状选择标记的潜在价值。本研究在野猪中发现的 Hind III 多态位点在家猪中是否也存在,是否和野猪高瘦肉率、低脂肪的特点相关,能否成为一个新的遗传标记来指导生产实践值得进一步研究。

过去,对家猪 MC4R 基因的研究多集中在第 7 跨膜结构功能域的错义突变,通过检索没有发现有关该 Hind III 多态位点的报道,提示了野猪群体内有独特的遗传变异信息,具有很高的应用潜力,为野猪、家猪杂交育种提供了分子水平的可行性。

适合性检验表明 3 种基因型的分布符合 Hardy-Weinberg 平衡定律,但由于野猪采样困难,样本量较小,该结果可能存在偏差。

1988 年肖增褊^[7]等在《辽宁动物志》里将中国野猪按照地理分布划分为 5 个亚种:台湾亚种(*Sus scrofa taiwanus*)、川西亚种(*S. s. moupinensis*)、新疆亚种(*S. s. nigripes*)、华南亚种(*S. s. chirodontus*)和东北亚种(*S. s. ussuricus*)。本研究的野猪采自黑龙江小兴安岭,在种属划分上应属于东北亚种。大量的研究表明,家猪的起源大致可以分为欧洲野猪(*S. s. ferus*)和亚洲野猪(*S. s. vittatus*)两大类,本研究选择了我国的地方猪种东北民猪及欧洲引进猪种大白猪 MC4R 基因与所克隆的野猪 MC4R 基因序列进行比对,发现野猪与民猪之间不存在差异,与大白猪之间存在 4 个单核苷酸多态位点,从编码基因的角度说明野猪与民猪的遗传距离近,与大白猪的遗传距离相对较远,也为民猪的东北野猪起源提供了依据。

参 考 文 献

- [1] Fan W, Boston B A, Kesterson R A, et al. Role of melanocortin in ergicneurons feeding and the agouti obesity syndrome. *Nature*, 1997, **385**: 165 ~ 168.
- [2] Oosterom J, Nijenhuis W A J, Schapper W M M, et al. Conformation of the core sequence in Melanocortin peptides directs selectivity for the Melanocortin MC3 and MC4 receptors. *The Journal of Biological Chemistry*, 1999, **274**(24): 16 853 ~ 16 860.
- [3] Huszar D, Lynch C A, Fairchild-Huntress V, et al. Targeted disruption of the melanocortin4 receptor results in obesity in mice. *Cell*, 1997, **88**: 131 ~ 141.
- [4] 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. *Mammalian Genome*, 2000, **11**(2): 131 ~ 135.
- [5] Chen M, Fu J, Wang A, et al. Different allele frequencies of MC4R gene variants in Chinese pig breeds. *Archives of Animal Breeding*, 2004, **47**(5): 463 ~ 468.
- [6] 刘桂兰, 蒋思文, 熊远著等. 猪资源家系 MC4R 基因扫描及其与脂肪性状的相关分析. *遗传学报*, 2002, **29**(6): 497 ~ 501.
- [7] 肖增褊. 辽宁动物志. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 1998, 204 ~ 206.