

猪黑素皮质素受体 4 基因的单倍型检测与分析

张冬杰

(黑龙江省农业科学院 畜牧研究所,黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要:黑素皮质素受体 4(melanocortin 4 receptor, MC4R)是 G 蛋白耦联受体超家族的一个成员,在人和许多动物的体重、能量稳态和采食量的调控中发挥重要作用。现采用直接克隆测序的方法对 23 头长白猪、25 头大白猪、19 头民猪和 7 头野猪的 MC4R 基因进行了测序与分型。共检测到 SNP 位点 72 个,其中发生频率在 2 次以上的 SNP 位点有 6 个,有 3 个为错义突变,引起了多肽链氨基酸的替代;6 个 SNP 位点共组成了 14 种单倍型,其中 H1、H3、H5、H6、H7、H9、H11 和 H14 为首次发现的单倍型。

关键词:猪;黑素皮质素受体 4 基因;测序;单倍型

中图分类号:S828;Q78

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2011)12-0014-02

黑素皮质素受体 4 基因(melanocortin 4 receptor, MC4R)为 G 蛋白耦联受体超家族成员,在动物的采食量、生长速度、背膘以及能量稳态的调控中,都起着重要的作用^[1]。MC4R 通过 2 种不同类型的配体:激活型配体和抑制型配体来产生抑制采食的细胞信号或者是提高食欲的细胞信号,通过黑素皮质素受体系统来决定下丘脑对采食量的调控作用^[2]。其编码区第 298 位氨基酸突变(Asp298Asn)与猪的生长速度和背膘厚呈显著相关^[3],同时还是介导 Leptin 交感神经活动的重要中介物。可见,MC4R 基因的生物功能非常强大,关于该基因的研究报道也较多,但一直没有关于该基因单倍型的报道,该研究采用直接克隆测序的方法对猪的 MC4R 基因进行了单倍型检测与分析,期望能对 MC4R 基因的研究提供更多的科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

长白猪 23 头,大白猪 25 头,民猪 19 头,野猪 7 头,共计 74 个个体的 DNA 由黑龙江省农业科学院畜牧研究所分子实验室保存和提供。

1.2 方法

1.2.1 PCR 扩增 根据 Gen Bank 上已登录的猪的 MC4R 基因序列自行设计引物,用于扩增 MC4R 基因的完整编码区,引物序列为: M1: 5'-ATGAAGTCAACCCATCACCA-3', 5'-TTA-

ATATCTGCTAGACAAATCACA-3'。PCR 反应程序为: 94℃ 变性 30 s, 58℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 45 s, 30 个循环。

1.2.2 PCR 产物的克隆与测序 分别扩增 74 个个体的 MC4R 基因, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 扩增产物使用天根的胶回收试剂盒纯化后, 连接于 PMD18-T 载体, 转化大肠杆菌 DH5α, 各随机挑取 3 个阳性克隆, 摇菌培养, 送北京华大测序。

1.2.3 数据整理与分析 使用 DNAMAN 软件对所测的数据进行整理与分析; 使用 Clustal X 1.83 软件进行全部序列的比对与分析; 使用 DNASTAR 软件进行单倍型的分型。

2 结果与分析

2.1 多态位点分析

利用直接测序的方法对 74 个个体的 MC4R 基因编码区进行了多态性检测, 共寻找到 72 个 SNP 位点, 将其中只发生一次的 SNP 位点去掉后, 共有 6 个 SNP 位点的发生次数在 2 次以上, 为 MC4R 基因的多态性位点。在这 6 个 SNP 位点中, 有 3 个为错义突变, 引起了多肽链氨基酸的替代(见表 1)。

表 1 MC4R 基因的多态位点

序号	核苷酸	氨基酸替代	突变型等位基因频率/%			
			长白猪 (23)	大白猪 (25)	民猪 (19)	野猪 (7)
1	A66G	—	4.35	0	0	14.29
2	C143G	P48R	0	0	5.26	14.29
3	C175T	—	4.35	4.00	21.05	28.57
4	T176C	L59P	4.35	4.00	0	0
5	C597A	—	0	0	0	28.57
6	G892A	D298N	0	44.00	0	0

收稿日期: 2011-08-01

作者简介: 张冬杰(1980-), 女, 黑龙江省佳木斯市人, 博士, 助理研究员, 从事猪的分子遗传育种研究。E-mail: djzhang8109@163.com。

2.2 单倍型分析

6 个 SNPs 共组成了 14 种单倍型,每种单倍型的具体组成见表 2,其中 H1、H3、H5、H6、H7、H9、H11 和 H14 为首次发现的单倍型。

表 2 单倍型分析结果

	A66G	C143G	C175T	T176C	C597A	G892A
H1	A	G	T	T	C	G
H2	A	C	T	T	C	G
H3	G	C	T	T	C	G
H4	A	C	C	T	C	A
H5	A	G	C	T	C	A
H6	A	G	C	T	A	G
H7	A	C	C	T	A	G
H8	A	C	C	T	C	G
H9	G	C	C	T	C	G
H10	A	C	T	T	C	G
H11	A	C	C	C	C	G
H12	A	C	T	T	C	G
H13	A	C	C	T	C	A
H14	A	C	C	C	C	A

3 结论与讨论

该研究采用了直接测序的方法,对猪的 MC4R 基因进行了单倍型分析,发现了 8 个前人

没有发现的新单倍型^[4]。新单倍型的发现,可以为下一步的基因功能分析、SNP 位点检测等奠定基础。构建单倍型最常用的方法是利用计算机直接从家系的基因型推导,单倍型频率的估算通过最大期望值算法获得,该法虽然简便但错误率较高,而且因为需要建立家系,花费昂贵。另外,单倍型的构建还可以通过单个个体测序的方法实现^[5]。采用测序的方法对目的基因进行单倍型分析,具有快速、简单易行和结果准确等优点。

参考文献:

[1] 杨秀芹,于浩,顾志刚,等.野猪 MC4R 基因的克隆及变异初步研究[J]. 动物学杂志,2007,42(2):71-74.
[2] 张金伟,陈代文,李云兰.黑素皮质素受体系统在动物采食调控中的作用机制及研究进展[J]. 饲料博览:技术版,2009(7):7-11.
[3] 杨晓慧,刘源,唐辉,等.猪 MC4R 基因 Asp298Asn 位点的多态性及其与商品猪背膘厚的关系[J]. 农业生物技术学报,2008,16(3):407-411.
[4] DAndrea M,Pilla F,Giuffra E,et al. Structural analysis and haplotype diversity in swine LEP and MC4R genes[J]. J. Anim Breed Genet,2008,125(2):130-136.
[5] 杜红丽,崔建勋,张细权.利用 DNA 池和测序技术快速筛查候选效应单倍型[J]. 农业生物技术学报,2008,16(2):281-285.

Porcine MC4R Gene Haplotypes Detection and Analysis

ZHANG Dong-jie

(Animal Husbandry Research Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086)

Abstract: Melanocortin-4 receptor(MC4R)is a member of the superfamily of G protein coupled receptors, which affects body weight, energy homeostasis and food intake in human and many animals. The coding region of MC4R gene in 23 landrace, 25 large white pig, 19 Min pig and 7 wild boar were investigated using clone sequence method. The results showed that 72 SNPs were found, the frequency in which happened more than twice were 6, 3 were missense mutation, caused the substitution of amino acids polypeptide chain. 6 SNPs composed 14 haplotype, H1, H3, H5, H6, H7, H9, H11 and H14 were first found.

Key words: pig; MC4R gene; sequence; haplotype

欢迎订阅、刊登广告
加盟理事会