

鸡基因 *MC3R* 和 *MC4R* 的 RFLP 多态性 及其与胴体性状的相关性

曹顶国, 周艳, 雷秋霞, 韩海霞, 李福伟, 谿岩*

(山东省农业科学院 家禽研究所, 山东 济南 250023)

摘要: 采用 PCR-RFLP 方法, 检测黑素皮质素受体 3 基因(*MC3R*)和受体 4 基因(*MC4R*)在济宁百日鸡、汶上芦花鸡和莱芜黑鸡中的多态性, 并分析各多态位点不同基因型与鸡胴体性状的相关性, 在 3 个供试群体中共检测到 2 个突变位点, 分别在 *MC3R* 基因 1 424 nt 处(A→G)和 *MC4R* 基因 923 nt 处(G→T), 并据此分别建立了 2 个基因的 *Dde I* 和 *Fbr I* 限制性内切酶检测体系。*MC3R* 基因多态位点对活体重($P=0.0418$)和胸肌重($P=0.0126$)有显著影响; *MC4R* 基因多态位点对肌间脂宽($P=0.0366$)有显著影响。多重比较结果表明, 在 *MC3R* 基因多态位点产生的 3 种基因型中, *MN* 基因型个体的活体重和胸肌重均显著高于基因型 *MM* 个体和 *NN* 个体($P<0.05$), 屠体重和半净膛重均显著高于 *MM* 个体, 全净膛重显著高于 *MN* 个体; *MC4R* 基因多态位点产生的 3 种基因型中, *AB* 基因型个体的屠体率和肌间脂宽均显著高于基因型 *BB* 个体($P<0.05$)。

关键词: 鸡; *MC3R* 基因; *MC4R* 基因; 胴体性状

中图分类号: S831.2 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2010)05-0556-05

Restriction fragment length polymorphism in *MC3R* and *MC4R* genes and their association with carcass traits in chicken

CAO Ding-guo, ZHOU Yan, LEI Qiu-xia, HAN Hai-xia, LI Fu-wei, LU Yan*

(Institute of Poultry Science, Academy of Agricultural Sciences of Shandong Province, Jinan 250023, China)

Abstract: The SNPs of *MC3R* and *MC4R* genes in Jining Bairi chicken, Wenshang Luhua chicken and Laiwu Black chicken were detected by PCR-RFLP method. And the correlation between the polymorphism loci and the carcass traits were analyzed. As a result, an A/G mutation at nt 1 424 in *MC3R* gene and a G/T mutation at nt 923 in *MC4R* gene were identified, and the corresponding detection systems of *Dde I* and *Fbr I* were established. The statistical analysis showed that the *MC3R* polymorphism locus had a significant association with live weight ($P=0.0418$) and breast muscle weight ($P=0.0126$). The *MC4R* polymorphism locus had a significant association with intermuscular fat width ($P=0.0366$). The multiple-range test indicated that in *MC3R* polymorphism locus, the LSM of live body weight, carcass weight, semi-eviscerated weight, eviscerated weight and breast muscle weight of *MN* chickens were significantly higher than *MM* chickens or *NN* chickens ($P < 0.05$). In *MC4R* polymorphism locus, the percentage of LSM of carcass and intermuscular fat width of *AB* chickens were significantly higher than *BB* chickens ($P < 0.05$).

Key words: chicken; *MC3R* gene; *MC4R* gene; carcass traits

黑素皮质素受体3基因(*MC3R*, melanocortin-3 receptor)和受体4基因(*MC4R*, melanocortin-4

收稿日期: 2010-02-02

基金项目: 国家“863”计划项目(2008AA101001); 山东良种工程重大项目(2007lz014); 国家行业科技计划项目(3-26); 国家科技支撑计划项目(2008BADB2B07)

作者简介: 曹顶国(1973—), 男, 山东嘉祥人, 硕士, 副研究员, 主要从事家禽遗传育种研究; *通讯作者, luyan1957@163.com

receptor) 同属黑素皮质素受体家族。该家族 *MC1R*~*MC5R* 5个成员所介导的生物学效应非常广泛,但功能各异,其中,*MC3R*和*MC4R*主要与食欲、体重、采食行为和平衡能力有关^[1]。鸡*MC3R*基因是单拷贝基因,仅包含1个外显子,编码区全长978 bp,编码325个氨基酸,与人和鼠的相应蛋白分别具有75.3%和76.8%的同源性^[2]。Butler等^[3]删除鼠基因组中绝大多数*MC3R*基因编码序列后,发现敲除鼠呈现出了独有的代谢综合征,虽然其体重没有明显增加,但脂肪含量增加了50%~60%。Levine^[4]发现*MC3R*基因可能与不依赖胰岛素肥胖的候选基因受体有关,可能对调节采食行为有重要作用。鉴于*MC3R*在体重和采食调控上的重要作用,有学者以鸡和鸽子为试材,也开展了关于*MC3R*基因的相关研究^[2,5-6],但目前对其功能还没有完全认识清楚。鸡*MC4R*基因被定位在2号染色体上,由长996 bp的单一外显子构成,编码331个氨基酸。关于*MC4R*基因突变与人肥胖病症相关性的研究已取得了很大进展^[7-11],在猪上也发现了与脂肪性状相关的*MC4R*基因多态位点^[12-13]。*MC4R*基因对鸡生长有显著影响^[14-16],但对脂肪性状影响不显著。这与有关哺乳动物*MC4R*基因的研究结论不一致,与*MC4R*基因在鸡和哺乳动物中的表达、调控存在较大差异有关^[15]。笔者将基因*MC3R*和*MC4R*作为影响鸡屠体和脂肪性状的候选基因,采用PCR-RFLP技术,检测其在3种地方鸡种中的多态性,并建立统计模型,分析多态位点与鸡屠体和脂肪性状的相关性,为下一步将基因*MC3R*和*MC4R*应用于分子育种提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

试材汶上芦花鸡、济宁百日鸡和莱芜黑鸡取自山东省农业科学院家禽研究所试验种鸡场。饲养全阶段由专人管理,营养水平一致。随机抽取每品种150日龄的60个个体,公、母各半。

1.2 方 法

1.2.1 引物设计

所有供试个体进行翅静脉采血,EDTA 抗凝,

酚/氯仿抽提基因组 DNA。

根据鸡基因 *MC3R* (GenBank 号 AB017137)和 *MC4R*(GenBank 号 AB012211)的 DNA 序列,采用 Primer5 和 Oligo6 软件各设计 1 对引物。引物由上海英俊生物工程有限公司合成 *MC3R* 基因 (707 bp) F: 5'-ATGGAAAACATCCTCGTC-3';R: 5'-TTGCAC ATTATCAAGACCA G-3'。*MC4R* 基因(610 bp) F: 5'-TAGCCAAGAACAAGAACC-3';R: 5'-GGGCAG GAGATGTAG AAA -3'。

1.2.2 PCR 扩增与 PCR-RFLP 分析及序列分析

PCR扩增体系(10 μ L): 2 \times Taq PCR MasterMix (北京天为时代)5 μ L, ddH₂O 3.6 μ L, 引物(10 pmol/ μ L)各0.3 μ L, 模板DNA(50 ng/ μ L)0.8 μ L。

PCR程序: 94 $^{\circ}$ C 5 min, 94 $^{\circ}$ C 40 s, 51.6 $^{\circ}$ C(50.6 $^{\circ}$ C)40 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 35个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸10 min。

酶切体系: 酶切反应体系 15 μ L, 其中, *Dde I*(*Fbr I*)0.5 μ L(0.5 U), 10 \times Buffer G 1 μ L, PCR 产物8 μ L, ddH₂O 5.5 μ L, 37 $^{\circ}$ C水浴过夜。

用2.5%琼脂糖凝胶电泳检测酶切产物。RFLP 检测后,于每个基因型取2个不同个体的PCR扩增产物,在济南力戈科技有限公司进行克隆测序。

1.2.3 检测指标及数据分析

所有屠宰指标测定和胴体性状指标计算均按照文献[17]的方法进行。用SAS6.12软件分析基因型效应对性状测定值的影响。

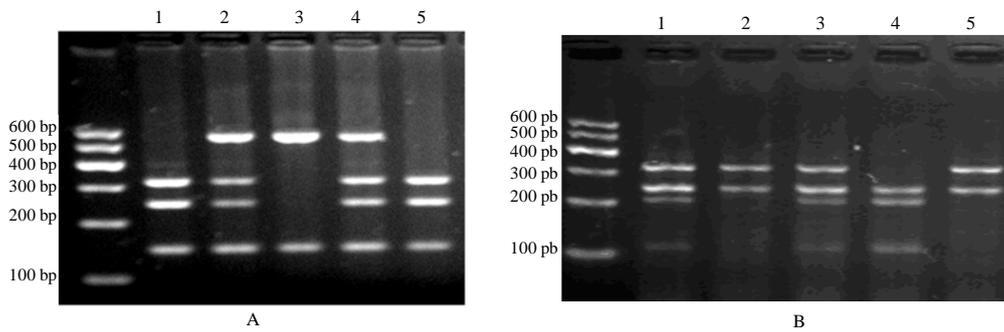
分析模型: $Y = \mu + G + S + L + e$, 其中, Y 为性状观测值, μ 为群体均值, G 为基因型效应, S 为性别效应, L 为品种效应, e 为随机残差效应。

2 结果与分析

2.1 PCR-RFLP 检测结果

由图 1 可见, *MC3R* 基因 *Dde I* 酶切位点在 3 个地方鸡种中表现出 3 种基因型: *MM* 基因型(319、245、143 bp), *NN* 基因型(564、143 bp)和 *MN* 基因型(564、319、245、143 bp)。*MC4R* 基因 *Fbr I* 多态性酶切位点在 3 个地方鸡种中也表现出 3 种基因型: *AA* 型(244、208、112、46 bp), *BB* 型(320、244、

46 bp)和 AB 型(320、244、208、112、46 bp)。



A MC3R(泳道1、5为基因型MM, 2、4为基因型MN, 3为基因型NN); B MC4R(泳道1、3为基因型AB, 2、5为基因型BB, 4为基因型AA)。

图1 MC3R和MC4R酶切结果

Fig.1 RFLP detection of MC3R and MC4R genes in different individuals

2.2 序列分析

测序结果(图2, 箭头所指为发生碱基替代的位置)表明, 各酶切位点多态性均由该段序列中的1个核苷酸的点突变造成, 分别为基因MC3R的1424 nt处(A→G突变)和基因MC4R的923 nt处(G→T突变)。将两位点突变后的核苷酸序列翻译成氨基酸序列后, 发现两位点突变均未导致相应氨基酸序列改变, 因此, 两多态位点发生的点突变均是同义突变。将与Genbank发布序列一致的纯合基因型命名为野生型, 根据这个原则, 基因型MM和AA为野生型, NN和BB为突变型, MN和AB为杂合型。

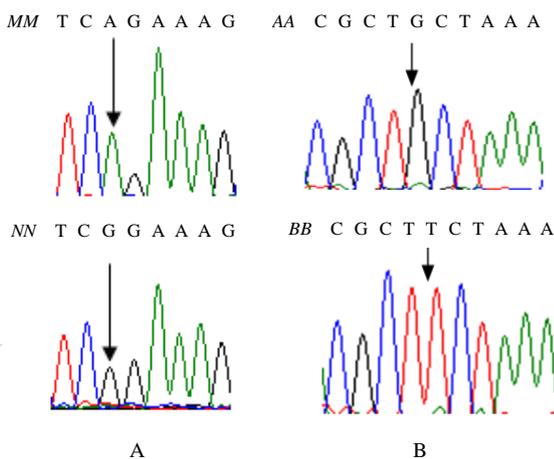


图2 MC3R(A)和MC4R(B)酶切位点的序列分析

Fig.2 Sequence analysis for the isolated genotype of MC3R and MC4R

2.3 MC3R和MC4R多态位点的基因型频率和等位基因频率

表1结果表明, 对于MC3R基因, 在汶上芦花鸡和济宁百日鸡中NN的基因型频率最高, 在莱芜黑鸡中MN的基因型频率最高, 在3个品种中, 等位基因N均表现为优势等位基因。表2结果表明, 对于MC4R基因, 在汶上芦花鸡中, 杂合基因型AB的基因型频率最高, 纯合基因型AA次之, BB最低。在济宁百日鸡和莱芜黑鸡中, AA基因型频率明显高于另2种基因型, 表现为优势基因型, 等位基因A在供试群体中表现为优势等位基因。

表1 MC3R多态位点的基因型频率和等位基因频率

Table 1 Genotype frequency and allele frequency of the MC3R polymorphism locus

鸡品种	基因型频率			等位基因频率	
	MM	MN	NN	M	N
汶上芦花	0.055 6	0.1666 7	0.777 7	0.138 9	0.861 1
济宁百日	0.169 5	0.372 9	0.457 6	0.355 9	0.644 1
莱芜黑	0.074 1	0.481 5	0.444 4	0.314 8	0.685 2

表2 MC4R酶切位点的基因型频率和等位基因频率

Table 2 Genotype frequency and allele frequency of the MC4R polymorphism locus

鸡品种	基因型频率			等位基因频率	
	AA	AB	BB	A	B
汶上芦花	0.266 6	0.516 7	0.216 7	0.525 0	0.475 0
济宁百日	0.583 3	0.300 0	0.116 7	0.733 3	0.266 7
莱芜黑	0.633 3	0.333 3	0.033 4	0.800 0	0.200 0

2.4 MC3R和MC4R多态位点基因型与屠体性状的关联分析

由表3、表4可见, MC3R多态位点对活体重

($P=0.0418$)和胸肌重($P=0.0126$)影响显著。*MC4R* 多态位点对肌间脂宽($P=0.0366$)影响显著。

表 3 *MC3R* 基因型与屠体性状的相关分析

Table 3 Correlation analysis between *MC3R* genotypes and carcass traits

性状指标	最小二乘均值±标准误		
	<i>MM</i>	<i>MN</i>	<i>NN</i>
活体重/g	(1348.16±65.84)b	(1517.96±37.90)a	(1418.71±29.83)b
屠体重/g	(1244.34±60.47)b	(1390.11±34.81)a	(1311.87±27.40)ab
屠体率/%	92.61±0.70	91.61±0.40	92.45±0.31
半净膛重/g	(1118.35±67.51)b	(1256.25±38.86)a	(1149.54±30.59)ab
半净膛率/%	82.21±1.56	82.54±0.90	80.80±0.70
全净膛重/g	(935.57±60.30)ab	(1056.56±34.71)a	(960.44±27.32)b
全净膛率/%	68.53±1.63	69.38±0.94	67.46±0.74
胸肌重/g	(129.55±8.45)b	(154.65±4.87)a	(139.04±3.83)b
胸肌率/%	14.66±0.72	14.72±0.41	14.58±0.32
腿肌重/g	222.78±20.99	245.07±12.08	218.30±9.51
腿肌率/%	23.16±0.89	22.95±0.51	22.41±0.40
腹脂重/g	21.57±8.52	19.69±4.90	28.49±3.86
腹脂率/%	2.85±0.92	1.98±0.53	3.04±0.41
肌间脂宽/mm	8.13±1.17	6.36±0.67	6.90±0.53
皮脂厚/mm	4.55±0.49	4.46±0.28	4.62±0.22
肌内脂含量/%	1.82±0.27	1.52±0.15	1.72±0.12

表 4 *MC4R* 基因型与屠体性状的相关分析

Table 4 Correlation analysis between *MC4R* genotypes and carcass traits

性状指标	最小二乘均值±标准误		
	<i>AA</i>	<i>AB</i>	<i>BB</i>
活体重/g	1426.25±33.79	1464.44±33.23	1439.05±55.20
屠体重/g	1314.06±30.80	1353.11±30.28	1309.66±50.31
屠体率/%	(92.22±0.33)a	(92.42±0.33)	(91.08±0.55)b
半净膛重/g	1166.33±33.97	1190.93±33.4	1173.73±55.49
半净膛率/%	81.47±0.79	81.07±0.78	81.45±1.30
全净膛重/g	976.51±30.41	990.67±29.9	991.89±49.67
全净膛率/%	68.11±0.83	67.39±0.82	68.76±1.36
胸肌重/g	139.66±4.46	143.88±4.38	144.76±7.28
胸肌率/%	14.48±0.36	14.69±0.35	14.73±0.59
腿肌重/g	226.48±10.41	222.79±10.2	229.84±17.01
腿肌率/%	22.85±0.43	22.20±0.42	22.82±0.71

腹脂重/g	22.54±4.62	33.46±4.54	18.28±7.55
腹脂率/%	2.57±0.48	3.41±0.47	1.88±0.79
肌间脂宽/mm	(6.18±0.59)	(8.20±0.58)	(6.16±0.96)b
皮脂厚/mm	4.37±0.26	4.91±0.26	4.51±0.43
肌内脂肪含量/%	1.64±0.13	1.72±0.13	1.72±0.21

多重比较结果表明, *MC3R* 基因多态位点产生的 3 种基因型中, *MN* 基因型个体的活体重和胸肌重显著($P<0.05$)高于基因型 *MM* 个体和 *NN* 个体, 屠体重和半净膛重显著高于 *MM* 个体, 全净膛重显著高于 *MN* 个体。另外, *MN* 基因型个体的半净膛率、全净膛率、胸肌率和腿肌重也最高, 但与其他 2 种基因型个体间差异不显著($P>0.05$)。

MC4R 基因多态位点产生的 3 种基因型中, *AB* 基因型个体的屠体率和肌间脂宽显著高于基因型 *BB* 个体($P<0.05$), 与基因型 *AA* 个体间差异不显著($P>0.05$)。此外, *AB* 基因型个体的活体重、屠体重、半净膛重、腹脂重、腹脂率和皮脂厚也最高, 但与其他 2 种基因型个体间差异不显著($P>0.05$)。

3 结论与讨论

本研究结果表明, *MC3R* 基因 *Dde I* 多态位点对 3 种地方鸡种的活体重和胸肌重有显著影响, 对屠体重、半净膛重和全净膛重也有一定的影响。蒋思文等^[5]以白洛克鸡 3 代参考家系群体为试材, 发现了 5 个 *MC3R* 多态位点, *MC3R* 基因 A549G 多态位点各基因型显著影响公鸡和母鸡的体重以及公鸡腹脂含量。王彦等^[6]以 5 个优质肉鸡新品系统系和 3 个杂交系鸡群为试材, 发现 *MC3R* 基因在 8 个鸡群中存在 A1424G 的突变, 该突变位点除对半净膛率和腿肌率无显著影响($P>0.05$)外, 对屠宰前重、屠体重、胸肌重、腿肌重、腹脂重和皮脂厚等屠体性状有显著($P<0.05$)或极显著($P<0.01$)影响, 对胸肌中粗蛋白含量和肌内脂肪含量影响显著($P>0.05$)。李世鹏等^[2]发现 *MC3R* 基因 T91G 突变位点各基因型对石岐肉鸽活重、屠体重、全净膛重均有显著影响($P<0.05$)。本研究中, *MC3R* 基因突变位点对 3 个地方鸡种的屠体性状有显著影响与以上文献报道结果一致; *Dde I* 多态性位点对 3 个鸡种的肌间脂宽和

腹脂重等脂肪性状影响不显著,与文献[5、6]报道不一致。虽然*MC3R*基因对人和小鼠的肥胖和脂肪性状有一定影响,但其作用机制还不清楚^[16],而且有关*MC3R*基因对其他经济动物脂肪性状影响的研究相对较少,因此,有必要采用其他群体或分子手段来深入研究*MC3R*基因对鸡脂肪性状的影响,进一步验证以上结论。

本试验中*MC4R*基因多态位点虽然对屠体率有一定的影响,但其最主要的作用体现在脂肪性状上,*MC4R*基因除对肌间脂宽具有显著影响外,对腹脂重和腹脂率也有一定的影响。这与*MC4R*基因主要影响人体重和肥胖的结论^[7-11]一致,也与*MC4R*基因影响猪脂肪性状的结论^[12-13]一致,但与*MC4R*基因多态性与鸡脂肪性状相关不显著的结论^[5-6]不一致,

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]. *Quarterly J Med*, 2000, 93(1): 7-14.
- [2] 李世鹏, 杜智恒, 宁方勇, 等. 鸽黑素皮质素受体 3、4(*MC3R*、*MC4R*)基因多态性与生长性状的相关分析[J]. *遗传*, 2008, 30(10): 1333-1340.
- [3] Butler A A, Kesterson R A, Khong K, et al. A unique metabolic syndrome causes obesity in the melanocortin-3 receptor-deficient mouse[J]. *Endocrinology*, 2000, 141(9): 3518-3521.
- [4] Levine A S. From melanoma to obesity: The many roles of the melanocortins[J]. *Trends in Endocrinol Metab*, 2001, 12(1): 411-421.
- [5] 蒋思文, Jacobsson Lina, Kerje Susanne, 等. 参考家系鸡黑素皮质素受体-3 基因多态性与体重关系研究[J]. *遗传学报*, 2002, 29(4): 322-325.
- [6] 王彦, 苏毅, 刘益平, 等. 鸡 *MC3R* 基因多态性及其与屠体和肉质性状的相关性[J]. *畜牧兽医学报*, 2007, 38(10): 1027-1031.
- [7] 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: 131-141.
- [8] Yeo G S, Farooqi I S, Aminian S, et al. A frameshift mutation in *MC4R* associated with dominantly inherited human obesity[J]. *Nat Genet*, 1998, 20: 111-112.
- [9] Valsse C, Clement K, Guy-Grand B, et al. A frameshift mutation in human *MC4R* is associated with a dominant form of obesity[J]. *Nat Genet*, 1998, 20: 113-114.
- [10] 蔡妹冰, 贾伟平, 方启晨, 等. F261S-肥胖患者中黑皮素4受体基因的新突变[J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2004, 20: 372-375.
- [11] 邵新宇, 贾伟平, 蔡妹冰, 等. 人黑皮素4受体F261S突变基因的克隆和功能验证[J]. *中华医学杂志*, 2005, 85: 366-369.
- [12] 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]. *Mamm Genome*, 2000, 11: 131-135.
- [13] 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[J]. *遗传学报*, 2002, 29(6): 497-501.
- [14] 霍明东, 王守志, 李辉. *MC4R*基因多态性与鸡生长和体组成性状的相关研究[J]. *东北农业大学学报*, 2006, 37(2): 184-189.
- [15] 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 生命科学*, 2006, 36(2): 127-133.
- [16] 苏毅, 蒋小松, 朱庆. 优质肉鸡黑素皮质素受体3、4基因单核苷酸多态性与生产性状相关研究[D]. 雅安: 四川农业大学动物科技学院, 2006.
- [17] NY/T823—2004 家禽生产性能名词术语和度量统计方法[S].

责任编辑: 王赛群

英文编辑: 罗文翠