

罗非鱼 *MC4R* 基因克隆及与其生长相关的 SNPs 位点

刘福平^{1,2}, 白俊杰¹, 叶星¹, 李胜杰¹, 李小慧¹, 于凌云¹

(1. 中国水产科学研究院 珠江水产研究所 中国水产科学研究院热带亚热带鱼类选育与养殖重点开放实验室, 广东 广州 510380; 2. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306)

摘要: 黑素皮质素受体-4 (Melanocortin receptor-4, *MC4R*) 是 5 种已发现的黑素皮质素受体家族成员之一, 属于跨膜 G-蛋白耦联受体超级家族, 对于调节动物的采食量、体质量及能量稳态有着重要的作用。本研究采用基因组步移技术获得了尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) *MC4R* 基因组 DNA 序列。该基因全长 2 547 bp, 其中 5' 侧翼序列长为 1 481 bp, 3' 侧翼序列长为 82 bp, 编码区序列长为 984 bp, 只有 1 个外显子。采用 PCR 产物直接测序法、PCR-RFLP 和 CRS-PCR 技术对尼罗罗非鱼 *MC4R* 基因启动子和外显子区域进行了 SNPs 位点的检测和分型, 结果共检测到 5 个 SNPs 位点 (-G1 000C、-T974A、C276T、C561T 和 C708T), 其中外显子上的 3 个 SNPs 位点均为同义突变。利用一般线性模型分析 5 个 SNPs 位点与尼罗罗非鱼生长性状的关系, 结果表明, 5 个 SNPs 位点不同基因型之间体质量均值差异最大值分别为 9.5%、23.2%、14.4%、18.6% 和 13.5%, 没有达到显著水平 ($P>0.05$)。将 5 个 SNPs 位点不同基因型组合成 7 种双倍型 (去掉频率小于 3% 的组合), 关联分析表明, 在体质量和体长这 2 个主要生长性状方面, 双倍型 D4 与 D1、D3、D6 存在显著性差异 ($P<0.05$), 双倍型 D2 与 D3、D6 也存在显著性差异 ($P<0.05$)。因而可以考虑将 *MC4R* 基因作为影响罗非鱼体质量等生长性状的候选基因, 应用于罗非鱼分子标记辅助育种。[中国水产科学, 2009, 16 (6): 816-823]

关键词: 尼罗罗非鱼; *MC4R*; SNPs; 双倍型; 关联分析

中图分类号: Q959

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2009)06-0816-08

黑素皮质素受体-4 (melanocortin-4 receptor, *MC4R*) 是下丘脑腹内侧核 (VMH) 分泌的一类肽类物质^[1], 为黑素皮质素受体家族 5 个成员之一。*MC4R* 属于含 7 个跨膜区的 G-蛋白耦联受体 (G-protein coupled receptors, GPCRs) 超级家族^[2], 主要分布于中枢神经系统的各个区域中。*MC4R* 通过与其内源性激动剂 α -黑色素细胞刺激素 (alpha-melanocyte stimulating hormone, α -MSH) 及拮抗剂 agouti 相关蛋白 (agouti related protein, AGRP) 的相互作用起着调节食欲和能量代谢的作用^[3-4]。Huszar 等^[5] 对小鼠的 *MC4R* 基因进行遗传敲除, 小鼠出现遗传性肥胖, 表现出多食、肥胖、胰岛素分泌过多等

症状, 首次证明了 *MC4R* 基因在动物能量平衡中的关键作用。

MC4R 基因在动物体质量和能量代谢中的重要作用, 引起了国内外许多学者的关注。将 *MC4R* 基因作为一个候选基因用于筛选与动物生长性状相关联的单核苷酸多态性 (Single nucleotide polymorphisms, SNPs) 位点已经得到了广泛的应用。张轶博等^[6] 通过克隆犬 *MC4R* 基因和进行 SNPs 位点筛选, 对突变造成的 *Psh*AI 酶切位点进行了 PCR-RFLP 分型, 结果表明, *MC4R* 基因型与体质量显著相关 ($P<0.05$), 可以考虑将 *MC4R* 基因作为影响犬体质量的候选基因。Kim 等^[7] 利用 PCR-RFLP 技术检测到在猪 *MC4R* 基

收稿日期: 2008-12-22; 修订日期: 2009-02-28.

基金项目: 农业部“948”项目 (2006-G55); 国家“十一五”科技支撑计划项目 (2006BAD01A1201); 国家科技基础条件平台工作项目 (2005DKA21103).

作者简介: 刘福平 (1983-), 男, 在读硕士研究生, 从事水产动物遗传育种研究.

通讯作者: 白俊杰. Tel: 020-81616129; E-mail: jjbai@163.net

因 298 bp 处碱基由 G → A (氨基酸由 Asp → Asn), 并分析了 2 种等位基因对猪生长性状的影响,发现等位基因 1 (*Asp*298)在肥胖程度、后背厚度、生长速度、饲料摄食量方面都要比等位基因 2 (*Asn*298)差一些。Ovilo 等^[8]通过 PCR-RFLP 分析猪的 *MC4R* 基因,发现在外显子上有 2 个突变点(709 bp 处 C → T,1 426 bp 处 G → A),并分析了这 2 个突变点对猪生长相关性状的影响。在鱼类方面,斑马鱼、虹鳟、金鱼、鲤、河鲢和翻车鱼的 *MC4R* 基因已经成功克隆,但国内外关于 *MC4R* 基因突变与生长性状的关联分析尚未见报道。本研究旨在通过克隆罗非鱼 *MC4R* 基因组 DNA 序列,筛选其 SNPs 位点,进而分析 *MC4R* 基因 SNPs 位点与尼罗罗非鱼生长性状的相关性,为开展罗非鱼分子标记辅助育种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源 克隆 *MC4R* 基因所用的尼罗罗非鱼取自珠江水产研究所高要水产科技园;实验用尼

罗罗非鱼群体(120 尾)取自鹭业国家级罗非鱼原种场。

1.1.2 主要试剂 *Taq* DNA 聚合酶体系为上海申能博彩公司产品, pMD18-T vector system 购自宝生物工程(大连)有限公司;胶回收(E.Z.N.A Gel Extraction Kit)试剂盒为美国 OMEGA 公司产品; Universal GenomeWalker Kit 购自 Clontech 公司; DNA 提取试剂盒购自北京天根时代公司;大肠杆菌 DH5α 由本实验室保存;引物由上海生工生物技术有限公司合成;测序由上海英骏生物技术有限公司完成。

1.1.3 引物设计及合成 参照本实验室已克隆的 *MC4R* 基因 cDNA 序列,分别设计 2 条下游引物(R1 和 R2)进行基因组步行法 5' 侧翼序列的扩增和 2 条上游引物(F1 和 F2)进行 3' 侧翼序列的扩增;最后根据获得的罗非鱼 *MC4R* 基因组序列设计 7 对引物(P1-P7)用于 *MC4R* 基因 SNPs 位点的筛选。引物交由上海生工生物技术有限公司合成,各引物信息见表 1。

表 1 罗非鱼 *MC4R* 基因各引物信息
Tab. 1 Primers of *MC4R* gene of tilapia

引物 Primer	引物序列(5'-3') Sequences of primers (5'-3')	最适退火温度 T_m /℃ Annealing temperature	产物长度 /bp Length of products	用途 Purpose
R1 R2	CAGTGGTGCTTTCCGAGTAAATGATG TGTTGTGGTATCGCAGGGCATAGAAG	67	1542	5' 侧翼序列扩增
F1 F2	GTGCCATCACCCTCACCATTCTCC TCCTTGGGGTATTTGTGGTATGCTG	67	315	3' 侧翼序列扩增
P1	F: GCTTATTTCCACTGAGGT R: TCACACATACAGCAGAGC	55	853	用于筛选外显子 SNPs 的扩增
P2	F: CACAACAGGAGCCAAACC R: TGAGGCATTAGAGACACTGTC	58	258	用于 C276T 位点的 <i>Taq</i> I 酶切
P3	F: AACATTGTCACCCTGCCTCG R: ACAGTGGTGCTTTCCGAGTC	55	104	用于 C561T 位点的 <i>Taq</i> I 酶切
P4	F: TACCGGGCAACGCTCCGAT R: CAAATACCCCAAGGAGAATG	55	78	用于 C708T 位点的 <i>Hinf</i> I 酶切
P5	F: AACACACAGGGACAGACAAC R: AAATTGCCTGAGCTTTGG	55	1490	用于筛选启动子 SNPs 的扩增
P6	F: GAGCCATTCTAGCCAGTTC R: ACCGACACTCAGCATAAAC	58	208	用于 -G1 000C 位点 <i>Sty</i> I 酶切
P7	F: TCATGCGGCCAGCAAGAAG R: ACCGACACTCAGCATAAAC	60	145	用于 -T974A 位点 <i>Mbo</i> II 酶切

1.2 方法

1.2.1 罗非鱼基因组 DNA 的提取 采用实验鱼活体尾静脉取血,加入预先装有抗凝剂(ACD)的离心管中(抗凝剂与血液的体积比约为 6:1),根据天根时代(TIANGEN)离心柱型基因组 DNA 提取试剂盒介绍的方法提取血液基因组 DNA,0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量和浓度,−20 ℃保存。

1.2.2 罗非鱼 *MC4R* 基因 5' 侧翼序列和 3' 侧翼序列的扩增 根据 Universal GenomeWalker Kit 试剂盒说明进行操作,第一次 PCR 反应条件: 94 ℃下 25 s, 72 ℃下 3 min,共 7 个循环,接下来 94 ℃下 25 s, 67 ℃下 3 min,共 32 个循环。循环结束后 67 ℃延伸 7 min; 以第一次 PCR 产物稀释液(第一次 PCR 产物与去离子水的体积比为 1:49)为模板进行第二次 PCR,反应条件为: 94 ℃下 25 s, 72 ℃下 3 min,共 5 个循环,接下来 94 ℃下 25 s, 67 ℃下 3 min,共 26 个循环。循环结束后 67 ℃延伸 7 min。反应结束后,取 5 μL 第二次 PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶上进行电泳检测。基因组步行法扩增 3' 侧翼序列和 5' 侧翼序列的方法相一致,只是 PCR 反应所用的基因特异引物不同。

1.2.3 采用 PCR-RFLP 对 SNPs 位点进行分型 PCR 产物经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测后,用限制性内切酶酶切,酶切体系: PCR 产物 5 μL, Buffer 1 μL, 酶 0.5 μL, ddH₂O 3.5 μL。酶切产物用 10% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳($V_{\text{Acr}}:V_{\text{Bis}}=29:1$),140 V 衡压电泳 3 h 后,银染显色。

1.2.4 利用 CRS-PCR 对 SNPs 位点进行分型

创造酶切位点法(Created Restriction Site PCR, CRS-PCR)是根据引物碱基错配技术设计的检测单碱基突变的简单易行的方法。其原理是: 根据单碱基突变位点的碱基替代情况设计 PCR 引物,其中 1 条引物根据突变位点邻近序列设计,人为引入错配碱基,使得引物 3' 端和单碱基突变的一种突变型在 PCR 扩增后形成 1 个酶切位点,酶切电泳后即可进行基因型分型,从而使单碱基突变位点可用于 PCR-RFLP 分析。错配引物设计应用在线引物设计软件:

dCAPS Finder2.0 (<http://helix.wustl.edu/dcaps/dcaps.html>)。

1.2.5 数据统计 统计不同基因型样本的数量,计算它们的基因型频率和等位基因频率,卡方分析进行独立性检验。用 SPSS15.0 统计分析软件对基因型与生长性状进行一般线性模型分析(General Linear Model, GLM)。

2 结果与分析

2.1 罗非鱼 *MC4R* 基因组 DNA 的克隆

采用基因组步行法,用 R1 和 AP1 进行 *MC4R* 基因 5' 侧翼序列的扩增,电泳检测为一片拖带,没有得到预期大小的片段,接着用该产物为模板,以 R2 和 AP2 做巢式扩增,获得一条 1 500 bp 左右的片段(图 1-a),测序结果为 1 542 bp; 用相同的方法只是特异引物不同,得到了 3' 侧翼序列,长度为 315 bp(图 1-b)。

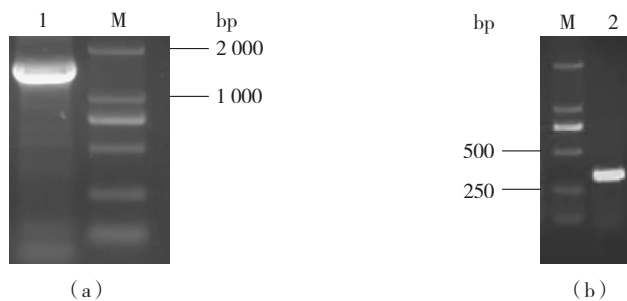


图 1 *MC4R* 基因组 DNA 的扩增结果

(a): 1, 5' genomewalker 扩增结果; (b): 2, 3' genomewalker 扩增结果; M: DL2 000 bp DNA marker.

Fig. 1 Amplification result of *MC4R* genomic DNA

(a): 1, PCR amplified product of 5' genomewalker; (b): 2, PCR amplified product of 3' genomewalker; M: DL2 000 bp DNA marker.

2.2 罗非鱼 *MC4R* 基因序列分析

将罗非鱼 *MC4R* 基因的核心片段、5' 及 3' 侧翼序列用 Vector NTI8.0 软件拼接获得了 *MC4R* 基因组 DNA 序列, 全长为 2 547 bp, 其中 5' 侧翼区长为

1 481 bp, 3' 侧翼区长为 82 bp, 编码区长为 984 bp, 由单一外显子组成, 转录起始点位于 ATG 转录起始密码子前的 478 bp 处(图 2)。

```

-1481 CTGTAACAGGGTGAGAGGCGGGGTACACCCTGGACAGGTCGCCAGTCTGTGCGAGGGCCA
-1421 ACACACAGGGACAGACAACCATTCACACTCACTCGCACATTACACCTAGTGGCAATTTG
-1361 AATTATCCAATTAACCTATCCCCACAAGTTGCATGTCTTTGGACGGTGGGAGGAAGCCGG
-1301 AGTACACGCAAAACAGGGGAAAAACATGCAAACTCCACACAGAAAGACCCGACCTGATGG
-1241 TGGAAATTGAACTCAGGACCTTCTTACTGTGCGGCAACAGTGCTAACCACCGTGCCAATGT
-1181 GCTGCCCTAGATTTTATCTTCTCAAAGATATTTAAGGCTGTGTGGGAGTTTGGCAAACC
-1121 AGTCTACATTTGTTTTTGTAGCTGGAGAAGACATGATTGAGGATTCAGGATTTCAGGA
-1061 GAATGGAGCCATTCTAGCCAGTCTTGTGAGCTATTCAGTCGATGTATAACCACATGTGC
-1001 ACTTGGTTCATGCGGCCAGCAATAAGCTGAGACTCAGCCTTTTTTGTCAAACATTTTAA
-941 TTTATTTTCCAAATTTTTTAAACTTCTTTATGTTTCGATTTTACATTAGTTTACTC
-881 TTTAGTTGTGTGTTTATGCTGAGTGTGCGTTCTCGTTGGCTCTTGGACTTTTCGATC
-821 TGTGAAAAGTGCTAGATAAAATAAGATTGCTTGCTTCCACCTAAAGTTGATAATTCATG
-761 GTGTTTGATGTTTTCATCGTTATATGAAAACCGATGCTGCTGAATTAGATTTCACAGAAA
-701 TGTTCACATCCCTGAGATTGAAACACTGTGAAAGTCTTCTCATGTGTGTCATTGGG
-641 TCTGATTCAATTTAAATCTACATTCATGCGTCAGCCCAAACCTTGTCTCTCTCCCACTT
-581 TATCAGCAAGCGGATAGGACAGAAGGCAGCCAGGAGGGTAAGGGTTGGTGTGTATGTGT

-521 GTGTGTTTCAATATAACAGGAGCGAGTGAGAGCGAGTGAGACCACAGTAGCTTGCGAAG
-461 TGAAGATCTGCCTGCAGTCGTGCAGCGAGCTGCTGCGCTCTGCCTCTCATGTTCCCGCTC
-401 ACTGTTGATCACTCTCACACACATTTGCTTTTGTAGCTGCTTCTGCTTCACTTATCTGC
-341 CTTACATCTTCTTACTTTAACTTCTCACTACACTGTTCCCTCCAGAGTGGAGAGATGAG
-281 AGCAGAGCTGTGGGACTGTGTTTTGTTGAGAACAATAACTGCAGCGAACGTTGAAGAAA
-221 ATTGCCTCTTGGAACGCCAGAGGGGTGAAAAGGGAAGAAGGAGCACTGGCTAAGAGTTT
-161 TTTTCTACTCTTTTTTTTCTTCTTCTCGGGGCGCAGAGGTGCGCTCCAGATAATGAGGA
-101 TGATCCAAAGCCCACACACACTGAGACTTTAACGGACAACTAGCTGGACACTTAACAACG
-41 GAGAAAATAACCAAGGAGAAAGGAATTTAAAGAAGCCATTATGAATGCCACAGAATACC
20 ATGGACTGATCCAAGGCTACCACAACAGGAGCCAAACCTCAGGCAATTTGCCATTTAACA
80 AAGACTTATCAGGAGAGGAAAAAGACTCATCTTCTGGATGTTATGAGCAGCTGCTTATTT
140 CCACTGAGGTTTTCTCACTCTGGGCATCATCAGTTTGCTGGAGAATCCTGGTTGTTG
200 CTGCTATAATCAAAAACAAGAACCTTCATTCACCTATGTACTTTTTATCTGTAGCCTTG
260 CAGTTGCTGACATGCTCTGTCAAGTGTCTTAATGCCTCAGAGACTATTGTTATAGCACTCA
320 TCAATGGAGGCAGCCTGACCATCCCCGTCACACTGATTAAGCATGGACAACGTTTTTG
380 ACTCTATGATCTGTAGCTCTCTGTTGGCATCCATCTGCAGTTTGCTAGCGATCGCCATCG
440 ACCGCTATATCACCATCTTCTATGCCCTGCGATACCACAACATTGTACCCCTGCGTCGTG
500 CAATGCTGGTCATCAGCAGCATCTGGACGTGCTGCACCATTTCCGGCATCTTGTTCATCA
560 TTTACTCGGAAAGCACCAGTGTACTCATCTGCCTCATCACCATGTTCTTCAACATGCTGG
620 TGCTATGGCATCACTCTACGTCCACATGTTCTGTTGGCTCGCCTGCACATGAAGCGGA
680 TCGCAGCCCTACCGGGCAACGCTCCCATCTCAGCAGCGTGCCAACATGAAGGGTGCCATCA
740 CCCTCACCATTCTCTTGGGGTATTTGTTGATGCTGGGCACCCCTTTTCTCCACCTCA
800 TCCTTATGATCAGCTGCCCAGGAACCCCTACTGCACCTGCTTCATGTCACACTTCAACA
860 TGTACCTCATCTCATCATGTGCAACTCTGTCATTGACCCCATCATCTATGCTTTTCGCA
920 GCCAAGAGATGAGAAAAACCTTCAAAGAGATTTTCTGCTGCTCGCATGCTCTGCTGTATG
980 TGTGAGCTGCCTGTAAAGTGTCCGCTGTGAACCCACAGCCTGCAATTTAAATCAAAACCT
1040 GGCCAACATGGACTCTGAGAGTATGAT

```

图 2 罗非鱼 *MC4R* 基因组序列

转录起始密码子用箭头标记, 起始和终止密码子用粗体标记, 微卫星位点用阴影标记, **CT** 表示 SNPs 位点。

Fig. 2 Genomic sequences of the tilapia *MC4R* gene

The predicted transcription start site is indicated with an arrow. The initiation and termination codons are shown in bold letters.

A microsatellite site is shadowed in light gray. **CT** Means sites of SNPs.

2.3 罗非鱼MC4R基因SNPs位点筛选和群体分析结果

用引物(ProF, ProR)和(F2, R2)对随机挑取的10个样本MC4R基因启动子和外显子区域进行PCR扩增,分别得到大小为1490 bp和853 bp的片段,送去测序。将测序结果进行比对,共发现了5个SNPs位点,分别为:-G1 000C、-T974A、C276T、C561T和C708T。

第1个SNPs位点形成了*Sty* I酶切位点,因而采用PCR-RFLP方法检测;对于另外4个SNPs位点设计相应的错配引物P1-F、P2-R、P3-R和P4-F,分别构成相应的酶切位点*Mbo* II、*Taq* I、*Taq* I和*Hinf* I,120个样本经酶切后部分电泳检测结果如图3。

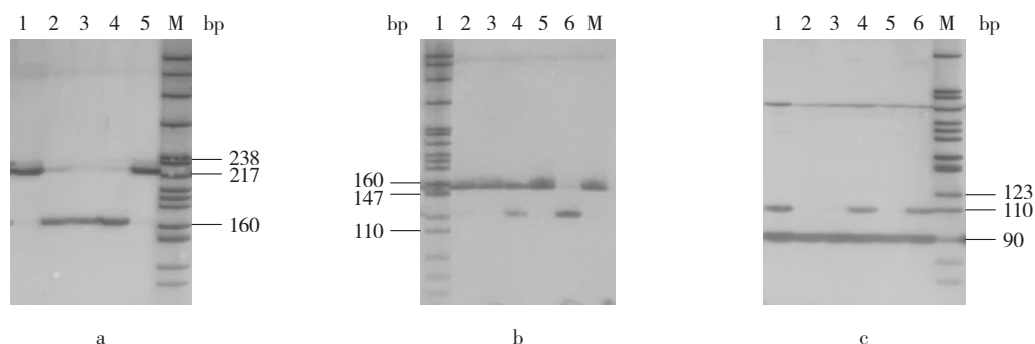


图3 部分SNPs位点酶切电泳图

(a) -G1 000C *Sty* I酶切;(b) -T974A *Mbo* II酶切;(c) C561T *Taq* I酶切; M: PBR322 DNA/*Msp*I Marker.

Fig. 3 PAGE electrophoresis of 5 SNPs sites

(a) SNPs-G1 000C demonstrated by *Sty* I PRC-RFLP;(b) SNPs-T974A demonstrated by *Mbo* II CRS-RFLP;(c) SNPs C561T demonstrated by *Taq* I CRS-RFLP; M: PBR322 DNA/*Msp*I Marker.

2.4 MC4R基因多态性与罗非鱼生长性状关联分析

卡方分析表明,罗非鱼MC4R基因不同SNPs位点P值均大于0.05,说明基因型频率符合Hardy-Weinberg定律(表2)。对5个SNPs位点不同基因型的体质量等生长性状进行一般线性模型(GLM)分析,结果表明,5个SNPs位点不同基因型之间体质量均值差异最大值分别为9.5%、23.2%、14.4%、18.6%和13.5%,没有达到显著水平($P>0.05$),详见表3。将5个SNPs位点不同基因型组合成7种双倍型(去掉频率小于3%的组合),关联分析表明,在体质量和体长这2个主要生长性状方面,双倍型D4与D1、D3、D6存在显著性差异($P<0.05$),双倍型D2与D3、D6也存在显著性差异($P<0.05$),详见表4。这说明双倍型D4和D2与罗非鱼生长性状呈负相关,从育种角度来看,应该淘汰这种不利基因型个体,选择优势基因型个体,以加快育种进程。

3 讨论

动物体质量及体内的脂肪含量受遗传、环境和行为等因素的影响,通过脂肪合成和分解代谢通路的负反馈调节环调控^[9],MC4R基因是此调控系统的重要成员^[10]。MC4R基因突变与猪^[11]、犬^[12]及家禽^[13-14]等动物生长性状的关系已有相关报道,而在鱼类方面,MC4R基因突变对体质量、体长等生长性状影响至今尚未见相关报道。本研究通过克隆罗非鱼MC4R基因并对其进行SNPs筛选,发现了5个SNPs位点,其中启动子区域有2个,另外3个在编码区。作为影响罗非鱼生长性状的主要候选基因,MC4R基因的突变将以不同方式从各个方面来影响罗非鱼的生长性状。

启动子是基因功能调控区域,通过与转录因子结合而控制着基因转录的起始时间和表达程度。基因启动子部分发生突变,则有可能导致基因表达的调节障碍,从而影响其生物学作用。本研究在启动子区域检测到的2个SNPs位点可能会影响到MC4R

表 2 *MC4R* 基因酶切多态性的分布结果
Tab. 2 Result of PCR-RFLP *MC4R* Gene

位 点 Locus	样本数 Number	基因型频率(个体数) Genotype frequency (Number)			基因频率 Gene frequency		H-W 平衡 Hardy-Weinberg eguiliberum	平均杂合度 Average heterozygosity
		AA	AB	BB	A	B		
-G1000C	119	0.35 (42)	0.43 (51)	0.23 (26)	0.57	0.43	$\chi^2=2.05$ ($P=0.15$)	0.49
-T974A	120	0.55 (66)	0.43 (51)	0.02 (3)	0.76	0.24	$\chi^2=3.46$ ($P=0.06$)	0.36
C276T	119	0.43 (51)	0.46 (55)	0.11 (13)	0.66	0.34	$\chi^2=0.07$ ($P=0.78$)	0.45
C561T	108	0.39 (42)	0.49 (53)	0.12 (13)	0.64	0.36	$\chi^2=0.21$ ($P=0.64$)	0.46
C708T	118	0.46 (54)	0.45 (53)	0.08 (11)	0.68	0.32	$\chi^2=0.12$ ($P=0.73$)	0.43

表 3 *MC4R* 基因 SNPs 位点不同基因型与尼罗罗非鱼生长性状的关联分析
Tab. 3 Association of *MC4R* gene polymorphisms with growth traits in tilapia

SNPs 位点 SNPs site	基因型 (样本量) Genotype (<i>n</i>)								$\bar{x} \pm SE$
		体质量 /g Body weight	体长 /cm Body length	体高 /cm Body depth	体宽 /cm Body width	头长 /cm Head length	尾柄长 /cm Caudal peduncle length	尾柄高 /cm Caudal peduncle depth	
-G1000C	CC (42)	69.21±5.30	11.51±0.28	5.15±0.17	2.18±0.08	3.67±0.08	1.13±0.03	1.70±0.05	
	CG (51)	64.66±4.81	11.05±0.25	4.96±0.15	2.10±0.07	3.55±0.07	1.08±0.03	1.65±0.04	
	GG (26)	63.21±6.74	11.10±0.36	4.95±0.21	2.10±0.10	3.61±0.10	1.13±0.04	1.67±0.06	
	TT (66)	62.22±4.19	10.98±0.22	4.92±0.13	2.07±0.06	3.56±0.06	1.09±0.02	1.63±0.04	
-T974A	TA (51)	70.93±4.77	11.54±0.25	5.18±0.15	2.20±0.07	3.66±0.07	1.13±0.03	1.73±0.04	
	AA (3)	58.33±19.65	10.96±1.04	4.73±0.62	1.93±0.28	3.47±0.29	1.11±0.11	1.59±0.18	
C276T	CC (51)	70.73±4.72	11.43±0.25	5.14±0.15	2.19±0.07	3.65±0.07	1.14±0.03	1.73±0.04	
	CT (55)	62.14±4.59	11.01±0.24	4.92±0.15	2.08±0.07	3.54±0.07	1.08±0.03	1.63±0.04	
	TT (13)	61.81±9.45	11.27±0.50	5.01±0.30	2.11±0.14	3.68±0.14	1.09±0.05	1.63±0.09	
C561T	CC (42)	66.87±12.92	11.18±1.85	5.01±1.17	2.14±0.55	3.59±0.52	1.10±0.19	1.68±0.33	
	CT (53)	63.51±38.77	11.03±1.96	4.95±1.14	2.08±0.50	3.54±0.52	1.10±0.20	1.64±0.32	
	TT (13)	75.35±33.67	11.77±1.60	5.37±0.94	2.29±0.44	3.78±0.39	1.12±0.20	1.75±0.28	
C708T	CC (54)	70.21±4.66	11.41±0.25	5.13±0.15	2.18±0.07	3.65±0.07	1.14±0.14	1.72±0.04	
	CT (53)	61.89±4.70	11.00±0.25	4.90±0.15	2.07±0.07	3.53±0.07	1.08±0.03	1.63±0.04	
	TT (11)	64.41±10.32	11.39±0.55	5.13±0.33	2.16±0.15	3.72±0.15	1.09±0.03	1.68±0.09	

表 4 *MC4R* 基因不同双倍型(diploptype)与尼罗罗非鱼生长性状的关联分析
Tab. 4 Association study of *MC4R* gene diploptype with growth traits in tilapia

双倍型 Diploptype	SNPs 位点 SNPs site					频率 Frequency (<i>n</i>)	体质量 /g Body weight	体长 /cm Body length
	-G1 000C	-T974A	C276T	C561T	C708T			
D1	CG	TA	CC	CC	CC	20.88% (19)	73.26±7.53 ^{ab}	11.61±0.41 ^{ab}
D2	GG	TT	CC	CC	CC	16.48% (15)	55.53±8.47 ^{bc}	10.58±0.46 ^{bc}
D3	GG	TT	CC	CT	CC	5.49% (5)	90.10±14.67 ^a	12.47±0.80 ^a
D4	CG	TT	CT	CT	CT	24.18% (22)	51.75±6.99 ^c	10.24±0.38 ^c
D5	CC	TA	CT	CT	CT	20.88% (19)	67.71±7.57 ^{abc}	11.38±0.41 ^{abc}
D6	CG	TA	CT	CT	CT	3.30% (3)	87.33±18.94 ^{ab}	12.17±1.03 ^{ab}
D7	CC	TT	TT	TT	TT	8.79% (8)	62.56±11.60 ^{abc}	11.31±0.63 ^{abc}

注: 同一列不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。
Note: Values with different superscript letters within a column indicates significant difference at $P<0.05$.

基因的表达量,从而影响罗非鱼的生长性状。一般线性模型分析证实了,启动子区域的2个SNPs位点对罗非鱼体质量、体长等生长性状有一定的影响。仇雪梅等^[15]用最小二乘分析证实 *MC4R* 基因5'调控区域C→T突变的BB基因型与鸡体质量等性状之间存在显著相关性($P<0.05$)。由于有关 *MC4R* 基因的结构、调控元件的研究还很少,其启动子区域碱基突变而引起生长性状改变的作用机理尚不清楚,还有待深入研究。

MC4R 基因编码区有3个SNPs位点,均属于同义突变。同义突变虽然不改变氨基酸的序列,但有可能通过改变所编码蛋白质的结构来发挥作用或者使mRNA产生不同的折叠方式,进而使mRNA合成、成熟、运输及翻译发生变化,最终导致生物功能的变化^[16]。利用一般线性模型对 *MC4R* 基因编码区上的3个突变所产生的不同基因型与生长性状进行分析,结果表明 *MC4R* 基因的同义突变对罗非鱼的体质量和体长等方面有影响。

作为一种关联分析和连锁不平衡分析的传统方法,单标记分析存在着位点信息模糊和不够精确等问题^[17],单倍型(Haplotype)分析方法的出现很好地解决了这些问题。虽然一个基因内存在多个SNPs位点,但多数研究集中于某一位点,而实际上对不同SNPs位点进行整体研究,即由这些不同SNPs位点构成单倍型更利于发现基因与疾病或某种表型的相关性。Oscarson等^[18]将药物代谢酶 *CYP2D6* 基因中的3个突变对酶功能活性影响进行了研究,结果表明,其中任何单一的SNPs对酶功能几乎没有影响,但是由这3个SNPs构成的单倍型 *CYP2D6* *17使酶活性丧失了将近80%。由于不同SNPs之间存在相互作用,因而由单倍型构成的双倍型比单个SNPs能够提供更多而准确的信息^[19]。对 *MC4R* 基因不同双倍型与罗非鱼生长性状进行关联分析,结果显示,在体质量和体长这2个主要生长性状方面,双倍型D4与D1、D3、D6存在显著差异,双倍型D2与D3、D6存在显著差异($P<0.05$)。He等^[20]用PCR-SSCP检测牙鲈 *ERα* 基因的多态性并进行关联分析,结果表

明双倍型D1与牙鲈的繁殖性状显著相关($P<0.05$)。Lei等^[21]利用PCR-RFLP和PCR-SSCP技术对鸡 *IGFBP2* 基因的5个SNPs位点进行了分型,结果显示,双倍型H1H5在鸡生长和胴体性状方面要显著优于双倍型H4H10($P<0.05$)。

研究表明, *MC4R* 基因启动子区域和编码区的突变导致了罗非鱼生长性状的改变,利用一般线性模型对双倍型进行分析也证实了 *MC4R* 基因的多态性与体质量、体长等生长性状存在显著相关性。因此,可以考虑将 *MC4R* 基因作为影响罗非鱼生长性状的主要候选基因,应用于罗非鱼分子标记辅助育种。

参考文献:

- [1] Yeo G S, Farooqi I S, Challis B G, et al. The role of melanocortin signaling in the control of body weight: evidence from human and murine genetic models [J]. *Q J Med*, 2000, 93: 7-14.
- [2] Xu B, Goulding E H, Zang K, et al. Brain-derived neurotrophic factor regulates energy balance downstream of melanocortin-4 receptor [J]. *Nat Neurosci*, 2003, 6 (7): 736-742.
- [3] Sinha P S, Schioth H B, Tatro J B, et al. Roles of the melanocortin-4 receptor in antipyretic and hyperthermic actions of centrally administered alpha-MSH [J]. *Brain Res*, 2004, 1 001 (1-2): 150-158.
- [4] Haskell-Luevano C, Monck E K. Agouti-related protein functions as an inverse agonist at a constitutively active brain melanocortin-4 receptor [J]. *Regulatory Peptides*, 2001, 99: 1-7.
- [5] 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.
- [6] 张铁埔, 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): 62-66.
- [7] Kwan S K, Niels L, Tom S, 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: 12-16.
- [8] Ovilo C, Fernandez A, Rodriguez M C, et al. Association of *MC4R* gene variants with growth, fatness, carcass composition and meat and fat quality traits in heavy pigs [J]. *Meat Science*, 2006, 73: 4-10.
- [9] Schwartz M W, Woods S C. Central nervous system control of food intake [J]. *Nature*, 2000, 404 (6 778): 661-671.
- [10] Fisher S L, Yagaloff K A, Bum P. Melanocortin-4 receptor: a novel signaling pathway involved in body weight regulation [J]. *Int J Obes Metab Disord*, 1999, 23: 54-58.
- [11] 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.
- [12] Anna S, Monika S, Izabela S, et al. Polymorphisms and chromosomal location of the *MC4R* (melanocortin-4 receptor) gene in the dog and red fox [J]. *Gene*, 2007, 399 (1–2): 247–252.
- [13] Carmen B, Jose A C, Carlos M, et al. Allelic incidence in several pig breeds of a missense variant of pig melanocortin-4 receptor (*MC4R*) gene associated with carcass and productive traits; its relation to IGF2 genotype [J]. *Meat Science*, 2006, 73: 144–150.
- [14] 陶勇, 李国辉, 胡玉萍, 等. *MC4R*、*POU1F1* 基因对京海黄鸡生长性能的遗传效应 [J]. *遗传*, 2008, 30 (7): 900–906.
- [15] 仇雪梅, 李宁, 邓学梅, 等. 鸡 *MC4R* 基因的 SNPs 及其屠体性状的相关研究 [J]. *中国科学: C 辑*, 2006, 36 (2): 127–133.
- [16] Shen L X, Basilion J P, Stanton Jr V P, et al. Single-nucleotide polymorphisms can cause different structural folds of mRNA [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 7 871–7 876.
- [17] Daly M J, Rioux, Schaffner S F. High-resolution haplotype structure in the human genome [J]. *Nat Genet*, 2001, 29: 229–232.
- [18] Oscarson M, Hildestrand M, Johansson I, et al. A combination of mutation in the CYP2D6*17 (*CYP2 D6Z*) allele causes alterations in enzyme function [J]. *Mol Pharmacol*, 1997, 52: 1 034–1 040.
- [19] Stephens M, Smith N, Donnelly P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data [J]. *Am J Hum Genet*, 2001, 68: 978–989.
- [20] He F, Wen H S, Dong S L, et al. Identification of estrogen receptor α gene polymorphisms by SSCP and its effect on reproductive traits in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology: Part B*, 2008, 150: 278–283.
- [21] Lei M M, Nie Q H, Peng X, et al. Single nucleotide polymorphisms of the chicken insulin-like factor binding protein 2 gene associated with chicken growth and carcass traits [J]. *Genetics*, 2005, 84: 1 191–1 198.

Cloning of *MC4R* gene and study on the association between SNPs of *MC4R* and growth trait in tilapia (*Oreochromis niloticus*)

LIU Fu-ping^{1,2}, BAI Jun-jie¹, YE Xing¹, LI Sheng-jie¹, LI Xiao-hui¹, YU Ling-yun¹

(1. Key Lab of Tropical and Subtropical Fish Breeding & Cultivation, Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China; 2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Melanocortin receptor-4 (*MC4R*) is one of members of the family of melanocortin receptors (*MCR*) and belongs to the family of seven transmembrane G-protein coupled receptors. It can affect food intake, body weight and energy homeostasis. In this research, the genomic sequence of Tilapia *MC4R* is amplified from DNA isolated by using GenomeWalker technique. The sequence analysis results showed that the full-length of *MC4R* gene is 2 547 bp with an open reading frame (ORF) of 984 bp. Five SNPs sites in promoter and exon were identified from *MC4R* gene by using sequencing (–G1 000C, –T974A, C276T, C561T and C708T). The polymorphisms were genotyped by PCR-RFLP and CRS-PCR. A general linear model was used to statistically analyze associations of *MC4R* gene polymorphisms with growth traits. The most difference of mean body weight among 5 different genotype were 9.5%, 23.2%, 14.4%, 18.6% and 13.5%, but the difference was not significantly different ($P > 0.05$). Seven diplotype, with the minor allelic frequencies of above 3%, were constructed based on five SNPs in the experiment population. Association analysis indicated that there was significant association between diplotype and body weight and body length ($P < 0.05$). By multiple comparisons, we found that the mean of body weight or body length for diplotype D4 showed significant association with D1, D3 and D6, D2 also showed significant association with D3 and D6 ($P < 0.05$). *MC4R* gene could be a candidate modifier gene for tilapia growth traits which would be useful for tilapia molecular breeding. [Journal of Fishery Sciences of China, 2009, 16 (6): 816–823]

Key words: Tilapia (*Oreochromis niloticus*); *MC4R*; SNPs; diplotype; association analysis

Corresponding autor: BAI Jun-jie. E-mail: jjbai@163.net