

比格犬黑皮质素受体3基因A167T对体质量性状的影响**

杜 鹏, 巴彩凤, 周艳彬, 张轶博, 宋慧娟

Effects of melanocortin-3 receptor gene A167T on the body weight trait of Beagle dogs

Du Peng, Ba Cai-feng, Zhou Yan-bin, Zhang Yi-bo, Song Hui-juan

Center of
Experimental Animal,
Liaoning Medical
University, Jinzhou
121001, Liaoning
Province, China

Du Peng★, Studying
for master's degree,
Center of
Experimental Animal,
Liaoning Medical
University, Jinzhou
121001, Liaoning
Province, China
yxydp@126.com

Correspondence to:
Ba Cai-feng, Master,
Professor, Master's
supervisor, Center of
Experimental Animal,
Liaoning Medical
University, Jinzhou
121001, Liaoning
Province, China
bacaifeng@163.com

Supported by: the
Foundation of
Science and
Technology
Department of
Liaoning Province,
No. 2007408001-6*

Received: 2009-09-23
Accepted: 2009-11-02

辽宁医学院实验
动物中心, 辽宁省
锦州市 121001

杜 鹏★, 男,
1981年生, 甘肃
省天水市人, 汉
族, 辽宁医学院在
读硕士, 主要从事
免疫分子生物学
的研究。
yxydp@126.com

通讯作者: 巴彩
凤, 硕士, 教授,
硕士生导师, 辽宁
医学院实验动物
中心, 辽宁省锦
州市 121001
bacaifeng@163.
com

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225
(2010)15-02740-04

收稿日期: 2009-09-23
修回日期: 2009-11-02
(20090923010/W·Z)

Abstract

BACKGROUND: Melanocortin-3 receptor (MC3R) gene mutation is an important factor in weight gain.

OBJECTIVE: To analyze the relationship between MC3R gene mutations and body weight traits in Beagle dogs.

METHODS: The blood samples were taken from 112 Beagle dogs, and their body weights were recorded, then their genomic DNA was extracted. The A167T site of MC3R gene was detected by the methods of AS-PCR, and mutant-type MC3R gene was sequenced. The relationships between MC3R genotypes distribution and body weight were observed.

RESULTS AND CONCLUSION: The A167T site of Beagle canine MC3R gene was found with two alleles A and T and three genotypes AA, AT and TT. Statistical analysis showed that the base substitution of T167A had significant influence on canine body weight ($P < 0.05$). It suggested that MC3R gene mutation can lead to a significant increase in canine body weight, which can be used as a candidate gene for body weight labeling.

Du P, Ba CF, Zhou YB, Zhang YB, Song HJ. Effects of melanocortin-3 receptor gene A167T on the body weight trait of Beagle dogs. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(15): 2740-2743.

[http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: MC3R 基因突变是引起体质量增加的重要因素之一。

目的: 分析比格犬 MC3R 基因突变与体质量性状的关系。

方法: 抽取 112 只比格犬血液, 记录体质量数据, 然后提取 DNA; 采用 AS-PCR 技术对 MC3R 基因 A167T 位点进行分析, 并克隆测序。观察比格犬 MC3R 基因 T167A 的基因型分布及其与体质量的关系。

结果与结论: 167 位点表现为 A、T 2 个等位基因和 AA、AT 及 TT 3 种基因型; T167A 碱基置换对犬体质量有显著影响($P < 0.05$)。表明 MC3R 基因突变可致犬体质量增加, 可作为犬体质量标记的候选基因。

关键词: 黑皮质素受体 3; 体质量; AS-PCR; 比格犬; 基因型

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.15.019

杜鹏, 巴彩凤, 周艳彬, 张轶博, 宋慧娟. 比格犬黑皮质素受体 3 基因 A167T 对体质量性状的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(15):2740-2743. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

黑素皮质素受体 3(melanocortin-3 receptor, MC3R)是跨膜G蛋白耦联受体超家族成员之一, 具有7次跨膜结构, 主要在下丘脑腹内侧核、弓状核和脊髓等部位表达。MC3R的主要功能是增加能量消耗、降低摄食效率和减少脂肪储量, 对体质量调节有十分重要的作用^[1-5]。近年来, 学者们发现MC3R基因突变是引起体质量增加的重要因素之一, 并从肥胖者体内发现一些对体质量有重要影响的突变点, 如T6K, A70T, V81I, M134I, F157I, I183N, F284A, A293 T, I335S和X361S等^[5-10]。

研究发现, 在体质量调节机制中, 任何一个环节出现异常都会导致体质量调节紊乱, 特别是MC3R基因突变所致的体质量失衡更是一

个极其重要而常见的原因。犬MC3R基因全长 1 665 bp, 编码序列为972 bp, 为单一外显子, 编码的蛋白为323个氨基酸。实验对112只比格犬进行了MC3R基因突变与体质量相关性的分析, 为犬的遗传育种奠定理论基础。

1 材料和方法

设计: 单一样本观察。

时间及地点: 实验于2009年在辽宁医学院省高校分子细胞生物学与新药开发重点实验室完成。

材料: 随机选取两岁比格犬112只, 由解放军军事医学科学院实验动物中心提供, 属封闭群, 未怀孕雌犬61只, 雄犬51只, 身体健康。实验过程中对动物处置符合2006年科学技术部发布的《关于善待实验动物的指导性意见》^[11]。

主要试剂:

主要试剂	来源
TaqDNA 聚合酶、pMD18-T 载体、 <i>EcoR</i> I、 <i>Hind</i> III、 <i>Mbo</i> I、 DNA Ladder Marker、DH5a 感受态细胞	大连宝生物公司
AxyPrep 血基因组 DNA 小量提取试剂盒、 AxyPrep 质粒小量提取试剂盒、 AxyPrep 凝胶回收试剂盒	Axygenbio 公司
所用引物	由大连宝生物公司合成

实验方法:

犬血液基因组DNA的提取: 采集犬前肢静脉血5 mL, 0.5 mL抗凝剂(0.5 mol/L EDTA)抗凝。应用AxyPrep血基因组DNA小量提取试剂盒提取犬基因组DNA, -20 °C保存。

目的基因的获取: 根据GenBank公布的犬MC3R基因序列(GenBank登录号: FJ005193), 利用引物设计软件primer premier 5.0设计PCR引物。引物序列如下: F: 5' ATG AAC GCT TCG TGC TGC CTA C 3', R: 5' CTA CCC CAG GTT CAT GCC GTT G 3', 反向引物中去除终止密码子TAG, 扩增片段长度为972 bp。PCR反应体系如下: 基因组DNA 1 μ L, dNTP 1 μ L, MgCl₂ 1 μ L, 10 $\times$ buffer(Mg²⁺ free)2 μ L, 正向引物1 μ L, 反向引物1 μ L, Taq DNA聚合酶 0.2 μ L, 加超纯水至总体积20 μ L。PCR反应条件: 94 °C, 5 min; 94 °C, 50 s, 60 °C, 50 s, 72 °C, 60 s, 30个循环; 72 °C, 10 min。PCR产物用 10 g/L琼脂糖凝胶电泳检测。

目的基因的测序: 5只比格犬PCR产物利用DNA凝胶回收试剂盒回收和纯化, 与pMD18-T 载体连接, 16 °C过夜, 次日转化到大肠杆菌DH5a感受态细胞, 37 °C培养14~16 h。通过蓝白斑筛选白色菌落扩大培养。提取质粒后用*EcoR* I 和 *Hind* III双酶切鉴定, 10 g/L琼脂糖凝胶电泳检测观察结果, 取20 μ L阳性质粒送大连宝生物公司测序。

AS-PCR 法检测A167T多态位点: 将所测序列与GenBank上该基因编码区序列(GenBank登录号: FJ005193)blast比对发现, 其中两样品有A167T碱基置换。利用Premier 5.0软件设计等位基因特异性引物序列如下: 两条公用引物: F: 5' ATG AAC GCT TCG TGC TGC CTA C 3', R: 5' CTA CCC CAG GTT CAT GCC GTT G 3'; 野生型引物F 5' GCA TCG TCA GTC TGC TGG AAA A 3', 突变型引物R: 5' GGC CAG GAT GAC CAG GAT GA 3'。反应体系: 基因组DNA 1 μ L, dNTP 1 μ L, MgCl₂ 1 μ L, 10 $\times$ buffer (Mg²⁺ free)2 μ L, 两条公用引物各1 μ L, 野生型和突变型引物各1 μ L, TaqDNA聚合酶 0.2 μ L, 超纯水10.8 μ L, 总体积20 μ L。PCR反应条件: 94 °C, 5 min; 94 °C, 50 s, 60 °C, 50 s,

72 °C, 60 s, 30个循环, 72 °C, 10 min。PCR产物用10 g/L琼脂糖凝胶电泳检测, 凝胶成像系统观察和记录AS-PCR结果。

主要观察指标: 分析比格犬MC3R的基因型分布及其与体质量的关系。

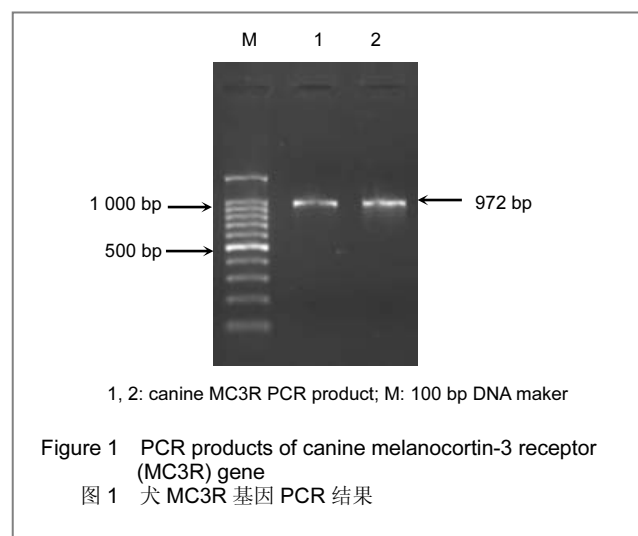
统计学分析:

基因频率和基因型频率: 采用直接计数法计算各基因位点等位基因频率和基因型频率, 采用 χ^2 检验进行Hardy-Weinberg平衡吻合性检验, 按Hardy-Weinberg定律计算预期杂合度。

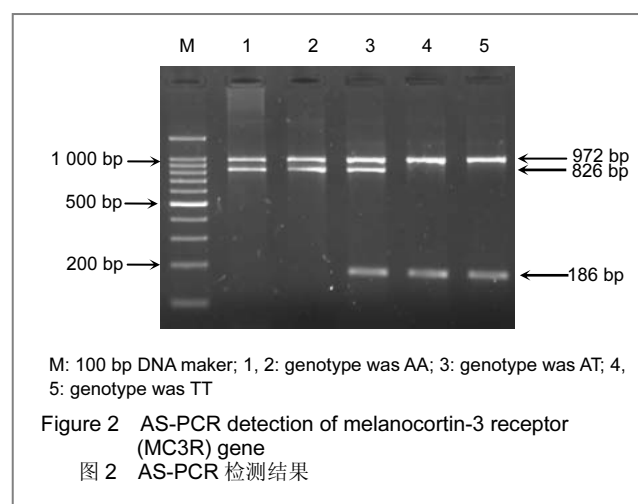
基因型与犬体质量的统计分析: 利用SPSS 13.0统计软件对基因型与体质量进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 PCR扩增片段结果 用所设计的引物对比格犬进行PCR扩增, 经10 g/L琼脂糖凝胶电泳检测, 结果如图1所示, 扩增片段与预期片段大小基本一致(972 bp), 且无非特异性扩增。

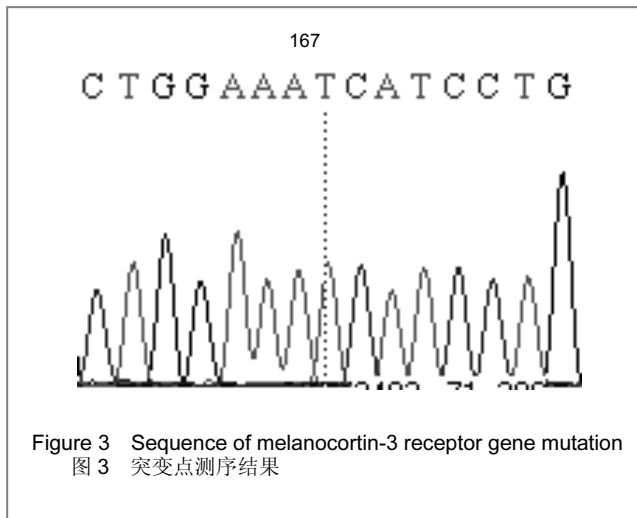


2.2 AS-PCR法检测结果 见图2。



对比格犬所有个体用AS-PCR技术进行多态性分析, 经20 g/L琼脂糖凝胶电泳检测。根据AS-PCR4条引物扩增的片段, 可分为3种基因型: AA、AT和TT。AA型, 由于167位点没有突变, 可见两条带(972 bp和826 bp); AT型, 则可见3条带 (972 bp、826 bp、186 bp); TT型由于167位点突变, 电泳可显示两条带(972 bp、186 bp)。

2.3 突变型MC3R基因的克隆测序结果 在经AS-PCR检测过的样本中, 将检测到的突变基因型的PCR产物进行回收、克隆测序, 结果见图3。



将所测序列与NCBI数据库基因编码区序列进行Blast比对分析, 结果表明: MC3R基因编码区第167处碱基发生了碱基置换, A167T导致所编码的氨基酸改变(N56F), 属于错义突变。

2.4 比格犬MC3R基因167位点基因型与体质量性状的相关性分析 AS-PCR分析结果表明, 167位点表现为A、T二个等位基因和AA、AT及TT3种基因型。A、T等位基因频率分别为63.6%和36.4%, 基因杂合度(H)为0.52。基因型频率AA为60.7%, AT为8%, TT为31.3%。经 χ^2 检验, 比格犬 $P > 0.05$, 说明基因型频率符合Hardy-Weinberg定律, 见表1。

表1 S-PCR 和 PCR-RFLP 检测结果 Table 1 Results of AS-PCR and PCR-PFLP (%)						
Breed	Sample number	Genotype frequency			Allele frequency	
		AA	AT	TT	A	T
Beagle dogs	112	60.7	8	31.3	63.6	36.4
Hardy-Weinberg		$\chi^2 = 0.437$		$P > 0.05$	$H = 0.52$	

在比格犬中, TT型犬的体质量均值最高, AA型犬的体质量均值最低。基因型间两两比较显示TT型犬与AA型犬体质量差异明显, 差异有显著性意义($P < 0.05$)。AT型犬与TT型和AA型犬体质量比较差异无显著性意义

($P > 0.05$), 见表2。

表2 MC3R A167T 基因型与犬体质量统计分析 Table 2 Statistical analysis of the genotypes of T167A with canine body weight ($\bar{x} \pm s$)			
Trait	Genotype		
	AA	AT	TT
Body weight (kg)	8.92 $\pm$ 2.35	9.41 $\pm$ 2.71	10.37 $\pm$ 2.64 ^a
Statistical analysis	df = 2	F = 3.954	P < 0.05
^a P < 0.05, vs. AA			

3 讨论

基于人、鸽子、鸡等的MC3R基因已有研究结果^[12-14], 本实验随机抽取5只比格犬DNA样本进行克隆测序, 发现两样本167位碱基A置换为T。采用AS-PCR技术对所有样本进行了MC3R基因多态性分析, 结果发现44只比格犬存在碱基置换, 其中35只比格犬为TT型, 9只为AT。犬MC3R基因167位点所编码的第56位氨基酸位于一次跨膜区的胞浆面, 是高度保守的序列, A167T可导致56氨基酸天冬酰胺变为苯丙氨酸。研究证实一、三次跨膜区是重要的配体结合区域, 而二、七次跨膜区既是十分重要的配体结合区也是信号转导区^[5], 因此作者推测该错义突变可能影响MC3R与配体结合。在本实验中, 首次发现犬MC3R基因存在A167T碱基置换, 在其他物种尚未见报。

统计学分析显示, A167T与体质量相关。TT型犬与AA型犬比较, TT型犬体质量显著增加, 说明MC3R基因突变是引起体质量增加的因素之一。因此, 作者考虑将MC3R基因作为犬体质量标记的候选基因, TT型犬适合做为肉类犬, AA型犬适用于各类实验用犬。在下一实验阶段, 本课题组将对犬MC3R基因突变对其功能的影响做进一步研究。

4 参考文献

- [1] Wikberg JE. Melanocortin receptors perspectives for novel drugs. Eur J Pharmacol. 1999;375(1-3):295-310.
- [2] Chhajlani V, Muceniece R, Wikberg JE. et al. Molecular cloning of a novel human melanocortin receptor. Biol. Chem. 1993;195(2): 866-873.
- [3] Chhajlani, V. Distribution of cDNA for melanocortin receptor subtypes in human tissues. Biochem. Mol. Biol. 1996;38:73-80.
- [4] Getting SJ, Gibbs L, Clark AJ, et al. POMC gene derived peptides activate melanocortin type 3 receptor on murine macrophages, suppress cytokine release and inhibit neutrophil migration in acute experimental inflammation. Immunol. 1999;162:7446-7453.
- [5] Wang SX, Fan ZC, Tao YX. et al. Functions of acidic transmembrane residues in human melanocortin-3 receptor binding and activation. Biochem Pharmacol. 2008;76(4): 520-530.
- [6] Tao YX. Functional characterization of novel melanocortin-3 receptor mutations identified from obese subjects. Biochim Biophys Acta 2007;1772:1167-1174.
- [7] Mencarelli M, Walker GE, Maestri S, et al. Sporadic mutations in melanocortin receptor 3 in morbid obese individuals. Eur J Hum Genet. 2008;16:581-586.

- [8] Tao YX, Segaloff DL. Functional characterization of melanocortin-3 receptor variants identify a loss-of-unction mutation involving an amino acid critical for G protein-coupled receptor activation. Clin Endocrinol Metab.2004;89:3936-3942.
- [9] Rached M, Buronfosse A, Begeot M, et al. Inactivation and intracellular retention of the human I183N mutated melanocortin 3 receptor associated with obesity. Biochim Biophys Acta.2004; 1689:229-234.
- [10] Feng N, Young SF, Aguilera G, et al. Co-occurrence of two partially inactivating polymorphisms of MC3R is associated with pediatric-onset obesity. Diabetes.2005;54:2663-2667.
- [11] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Guidance Suggestions for the Care and Use of Laboratory Animals. 2006-09-30.
中华人民共和国科学技术部. 关于善待实验动物的指导性意见. 2006-09-30.
- [12] Li SP, DU ZH, Ning FY, et al. orrelation analysis between MC3R and MC4R gene polymorphism and growth traits in pigeon. Yi Chuan. 2008;30(10): 1333-1340.
- [13] Sharma P, Bottje W, Okimoto R. Polymorphisms in uncoupling protein, melanocortin 3 receptor, mela- nocortin 4 receptor, and pro-opiomelanocortin genes and association with production traits in a commercial broiler line. Poult Sci. 2008;87(10):2073-2786.
- [14] Wang Y, Su Y, Liu YP, et al. Xumu Shouyi Xuebao.2007;38(10): 1027-1031.
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.

来自本文课题的更多信息--

基金资助: 辽宁省科技厅基金(2007408001-6)。

利益冲突: 无利益冲突。

 ISSN 1673-8225 CN 21-1539/R 2010 年版权归《中国组织工程研究与临床康复》杂志社所有

组织工程研究中基因治疗的病毒载体和非病毒载体: 本刊中文部

1 重组腺病毒介导TIMP1基因对类风湿关节炎大鼠滑膜新生血管的影响

张育(扬州大学临床医学院, 江苏省扬州市225001)

推荐理由: 课题通过将带有绿色荧光蛋白基因和基质金属蛋白酶组织抑制因子1基因的重组腺病毒(rAD-GFP-TIMP1)感染HEK-293A细胞进行病毒扩增,并在荧光显微镜下借助GFP进行监控和筛选,收获病毒,采用超速离心法纯化,用紫外分光光度法检测重组腺病毒的颗粒数,纯化后的rAD-GFP-TIMP1和rAD-GFP滴度分别为: 5.7×10^{12} pfu/mL, 4.8×10^{12} pfu/mL; A_{260nm}/A_{280nm} 均>1.3,病毒滴度及纯度均可满足实验需要。进一步用rAD-GFP-TIMP1感染ECV-304获得成功提示病毒活力正常,为体内动物实验打下了良好的基础。

创新要点: 探讨了重组腺病毒介导的TIMP1(rAD-GFP-TIMP1)基因治疗实验性类风湿关节炎,选题较为前沿。

新闻来源: 来源于《中国组织工程研究与临床康复》2009年41期第8097页张育等的文章“重组腺病毒介导TIMP1基因对类风湿关节炎大鼠滑膜新生血管的影响”。

2 携带cdc2-siRNA重组腺相关病毒的包装

魏佳军(武汉大学人民医院神经内科, 湖北省武汉市430060)

推荐理由: 选择AAV作为基因工程治疗载体,是基于它的以下特点和优势:①可感染的人类细胞范围广,包括分裂细胞和非分裂细胞(如神经元)。②因缺少病毒基因,对人类无任何病原性,对宿主无免疫源性。③固定整合于19号染色体上,无致癌及致突变作用。④插入的siRNA表达时间长,可稳定发挥干扰作用。⑤以辅助质粒p-Helper代替辅助病毒进行重组腺相关病毒的包装,克服了传统AAV需要腺病毒辅助其进行复制的缺点,不仅显著提高了包装效率,而且避免了辅助病毒的污染,安全性好。近年来,已经有不少学者采用rAAV作为基因工程治疗载体对多种疾病进行了的基因治疗,并获得了良好的效果。

实验所构建并包装获得的携带cdc2-siRNA的rAAV,能有效沉默真核细胞cdc2基因表达。该重组病毒的成功构建有可能为一些神经变性疾病如阿尔茨海默病、C型尼曼皮克病提供新的基因工程治疗手段。

新闻来源: 来源于《中国组织工程研究与临床康复》2009年28期第5549页姜新朋等的文章“携带cdc2-siRNA重组腺相关病毒的包装”。

3 重组人骨形态发生蛋白2腺病毒载体的构建与鉴定

彭亮权(深圳市第二人民医院运动医学科, 广东省深圳市518035)

推荐理由: 目前报道的重组腺病毒构建方法较复杂,构建周期长,导致重组腺病毒构建的成功率较低。BLOCK-IT™重组腺病毒构建系统,其核心是Gateway™技术,该技术是基于λ噬菌体的位点特异性高效重组系统,其不同于以往的费时及效率低的方法,可实现载体在多个目的表达系统间的平行转移和基因的快速克隆,同时仍保持正确的开放读码框和方向,该技术利用ccdB选择方法,避免了以往重组过程中的反复鉴定和纯化。

实验利用Gateway™技术,快速高效的构建了Ad-hBMP2,有效缩短了构建周期,提高了构建效率,为进一步采用骨形态发生蛋白2进行骨基因治疗奠定了实验基础。

新闻来源: 来源于《中国组织工程研究与临床康复》2009年20期第3942页胡雪峰等的文章“重组人骨形态发生蛋白2腺病毒载体的构建与鉴定”。

4 重组腺病毒载体Ad5-hBDNF-EGFP的构建与鉴定

王长昇(福建医科大学附属第一医院骨科 福建省福州市350005)

推荐理由: 首次选用了5型复制缺陷型腺病毒(Ad5),E1、E3双缺失腺病毒载体,采用AdMax包装系统,将外源基因的穿梭质粒与携带了腺病毒大部分基因组的骨架质粒,利用Cre/loxP重组酶系统,脂质体介导共转染293细

胞,在293细胞内包装产生带有hBDNF和EGFP基因的以CMV为启动子的重组腺病毒Ad5-hBDNF-EGFP,提高重组效率,具有一定的创新性。该系统具有操作简便、重组效率高、获得的病毒产率高、目的基因的表达量高等特点,在基因治疗方面应该有较好的应用前景。

新闻来源: 来源于《中国组织工程研究与临床康复》2009年20期第3947页王长昇等的文章“重组腺病毒载体Ad5-hBDNF-EGFP的构建与鉴定”。

5 Wnt7b重组反转录病毒载体的构建及其在C3H10T1/2中的表达

陈婷婷(同济大学附属第十人民医院内科, 上海市200072)

6 抑制人BI-1基因表达shRNA重组慢病毒表达载体的构建

吴丹(北京大学医学部基础医学院医学遗传学系, 北京市100191)

7 人端粒酶反转录酶和绿色荧光蛋白融合基因慢病毒表达载体的构建

梁旭亮(暨南大学附属第一医院消化科, 广东省广州市510632)

8 慢病毒载体有效转移并感染心肌成纤维细胞

方欣(华中科技大学同济医学院附属协和医院老年病科, 湖北省武汉市430022)

9 真核表达载体pcDNA3-CTLA4Ig的构建及体内表达

赵国华(辽宁省肿瘤医院, 辽宁省沈阳市110044)

10 阳离子脂质体转染Hela细胞的实验

段艳(中国科学院大连化学物理研究所, 辽宁省大连市116023)

全文详见: www.crter.org/Html/2010_03_27/2_64024_2010_03_27_100501.html