

荷斯坦奶牛红毛性状的基因检测及红毛形成机制的探讨

甘海云^{①②} 李建斌^① 王洪梅^① 高运东^① 刘文浩^① 李景鹏^② 仲济峰^{①*}

(^①山东省农业科学院奶牛研究中心 济南 250100 ;^②东北农业大学生命科学院 哈尔滨 150030)

摘要 : 荷斯坦奶牛黑素皮质素受体 1 (MC1R) 基因 310 G 缺失突变产生 *e* 等位基因, 导致红白花毛色。实验利用 PCR-RFLP 和 DNA 测序技术建立了荷斯坦奶牛红毛性状的基因检测方法, 并在 4 个荷斯坦奶牛全同胞家系中得到了证实, 可见其可用于鉴定携带 *e* 等位基因的种公牛, 以指导奶牛育种。通过分析黑素皮质素 (MC) 受体蛋白家族序列, 找到了 MC1R 蛋白结构与功能的区域 (TM3、TM6、TM7 和 EL3)。利用 VHMPT 软件预测 MC1R 突变蛋白的结构, 结果显示其丢失了 TM3、TM6、TM7 和 EL3 区, 也失去了与 α -促黑素 (α -MSH) 结合的区域, 最终导致红毛的产生。

关键词 : 荷斯坦奶牛 ; MC1R ; 红毛形成机制

中图分类号 : Q953 文献标识码 : A 文章编号 : 0250-3263(2007)02-75-06

Genetic Analysis of Red Coat Color Formation in Holstein Cows

GAN Hai-Yun^{①②} LI Jian-Bin^① WANG Hong-Mei^① GAO Yun-Dong^①

LIU Wen-Hao^① LI Jing-Peng^① ZHONG Ji-Feng^{①*}

(^① Research Centre of Dairy Cattle, Shandong Academy of Agricultural Science, Jinan 250100 ;

^② College of Life Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract : A G310 deletion of MC1R gene in Holstein Cow creates *e* allele, leading to red-white coat color. The genetic analysis of red coat color in Holstein Cow was conducted by using PCR-RFLP and DNA sequence technology. This method has been proved effective in four full-sib pedigrees of Holstein Cows and can be used to identify the bull with *e* allele and to assist dairy cow breeding. By analyzing the amino acid sequences of melanocortin receptor, we found that TM3, TM6, TM7 and EL3 were essential for the structure and function of melanocortin-1 receptor. The structure of mutated melanocortin-1 receptor was predicted by VHMPT program, and it was indicated that mutated Melanocortin-1 Receptor lost its TM3, TM6, TM7 and EL3, as well as the α -MSH binding region. As a result, the red coat color was induced.

Key words : Holstein Cow ; MC1R ; Red coat color

哺乳动物毛发、皮肤的颜色主要由黑色素的数量、性质与分布所决定。黑色素可分为两种: 黑色至棕色的真黑色素 (eumelanin) 和黄色至红色的伪黑色素 (pheomelanin)^[1]。在黑色素的形成中黑素皮质素受体 1 (melanocortin-1-receptor, MC1R) 起着关键的作用, 其属于 G 蛋白偶联的黑素皮质素受体。 α -促黑素 (α -

melanocyte stimulating hormone α -MSH) 及肾上腺皮质激素 (adrenocorticotrophic hormone, ACTH) 与

基金项目 山东省良种产业化项目 (No. 2003-3009), 山东省农业科学院青年科研基金项目 (No. 2005YQ048) ;

* 通讯作者, E-mail: zhongjifeng@tom.com ;

第一作者介绍 甘海云, 男, 硕士, 研究方向: 遗传育种。

收稿日期: 2006-08-14, 修回日期: 2006-11-05

MC1R 结合引起 cAMP 水平的提高,并且激发酪氨酸酶水平的提高,导致真黑色素的形成。有 agouti 信号蛋白存在时,其与 α -MSH 或 ACTH 竞争性结合 MC1R,真黑色素的合成被切断,而以伪黑色素为最终产物的反应途径被激发^[2,3]。

牛 MC1R 基因定位在第 18 号染色体,长 954 bp,编码 317 个氨基酸,主要存在 3 个等位基因(E^D , E^+ , e)。 E^D 存在 T 296 C 的置换突变,在表型上主要表现黑色毛色; E^+ 为野生型基因,表现各种毛色; e 基因 310 编码区从 ATG 开始的 310 位置)处缺失一个碱基 G,导致移码突变,产生一个早熟的 MC1R 蛋白,表现或强或弱的红毛表型^[4-6]。本实验利用 PCR-RFLP 和 DNA 测序技术建立了荷斯坦奶牛红毛性状的基因检测方法,分析了 MC1R 蛋白结构与功能的区域,以及缺失突变对其结构与功能的影响,并初步探讨了红毛的形成机理。

1 材料与方法

1.1 样本来源 选取济南市周边奶牛场 4 个全同胞家系的 27 头荷斯坦奶牛采集全血。

1.2 全血基因组 DNA 提取 根据 Diana 等^[7] 血液 DNA 提取方法提取 27 头荷斯坦奶牛基因组 DNA。

1.3 PCR-RFLP 分析 根据 GenBank 上已发表牛、人、小鼠的 MC1R 基因序列保守区设计一对引物。上游:5'-GGACGATGCCTGCACTTGGCTCCC-3',下游:5'-TGCCACCCTCACCAGGAGCACTGC-3' 扩增 MC1R 基因全部的编码区。

PCR 反应体系为 50 μ l,其中含有基因组 DNA 约 100 ng,引物各 20 pmol/L,dNTPs 10 mmol/L,MgCl₂ 1.5 mmol/ μ l,Taq 酶(高保真 DNA 聚合酶)1 U。PCR 扩增条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,62 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,35 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。

参考 Rouzaud 等^[8] 的方法,PCR 产物用限制性内切酶 *Msp* I 进行酶切。取适量的酶切产物,进行 1% 琼脂糖凝胶电泳。

1.4 DNA 测序分析 根据 PCR-RFLP 分析结果,选取 3 种基因型的 PCR 产物样本直接测序

验证,测序工作由上海生物工程公司完成。

1.5 利用生物信息学初步分析 MC1R 蛋白 从 NCBI 蛋白数据库中找出黑素皮质素受体家族中典型的蛋白序列(包括人、鼠、牛、羊、鸡的),其序列号为:CAA53943、CAA80962、AAB36517、AAA35791、CAA50005、CAA52918、AAC13541、BAA11336、AAB31361、CAA46589、CAA47865、CAA83239、AAA41577、Q9GLJ8、P56451。用 Vector NTI Suite 9 软件进行序列联配,找出保守结构和关键的功能区域。再用蛋白结构预测软件 VHMPT 预测移码突变后的 MC1R 蛋白的结构,分析其结构和功能变化,找出红毛产生的可能原因。

2 结果

2.1 PCR-RFLP 结果 对所采集的样品进行 PCR 扩增,产物经琼脂糖凝胶电泳,结果显示,可扩增出一条长约 760 bp 的条带,与理论预计值 768 bp 相符(图 1)。

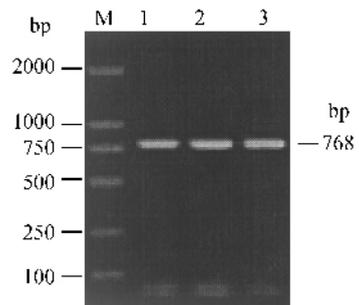


图 1 MC1R 基因的 PCR 扩增产物

Fig.1 PCR products of MC1R gene

1 和 2 为 2 头黑白花牛样本;3 为 1 头红白花牛样本;M 为 DL2000 DNA 分子量标准。

Lines 1 and 2 are samples from black-white cow, line 3 is sample from red-white cow, and M is DL2000 represents molecular marker.

PCR 产物经 *Msp* I 酶切, E/E 得到 328 bp、249 bp、191 bp 的片段; E/e 得到 519 bp、328 bp、249 bp、191 bp 的片段; e/e 得到 519 bp、249 bp 的片段(图 2)。检测结果与 Rouzaud 等人报道的一致^[8]。

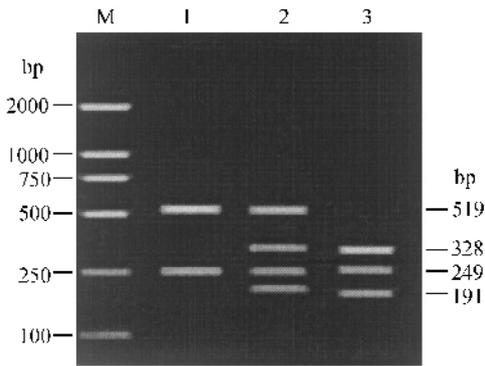


图2 MC1R 基因的 PCR-RFLP 产物

Fig.2 PCR-RFLP products of MC1R gene

1 为 *e/e* 基因型样本 ; 2 为 *E/e* 基因型样本 ; 3 为 *E/E* 基因型样本 ; M 为 DL 2000 DNA 分子量标准。

Line 1 is the sample of *e/e* genotype , line 2 is the sample of *E/e* genotype , line 3 is the sample of *E/E* genotype , and M is DL 2000 represents molecular marker .

实验所检测的 4 个荷斯坦奶牛全同胞家系共 27 头奶牛 MC1R 基因型情况如表 1 , 结果表明 , 检测的结果和毛色表形结果一致。

2.2 测序结果 图 3 为正常的 MC1R 基因 (*E/E* 基因型) 测序峰图 ; 图 4 为突变的 MC1R 基因 (*e/e* 基因型) 测序峰图 , 可见其 310 处缺失 G

碱基(箭头所示);图 5 为 *E/e* 基因型 MC1R 基因测序峰图 , 其 310 前测序质量非常好 , 但 310 后测序峰突然变的凌乱 , 并且 310 处 G 峰和 T 峰重叠(图 5 箭头所示) , 测序峰图经 Mutation Surveyor 软件(采用反相关曲线技术把 *E* 基因单链和 *e* 基因单链峰图分别提取出来 , 对比这两个单链峰图)验证为 *E/e* 基因型。

表 1 4 个荷斯坦奶牛全同胞家系 MC1R 基因型情况

Table 1 The MC1R genotypes of four full-sib pedigrees of Holstein Cow

家系	毛色	基因型
1	父本	黑白花 <i>E/e</i>
	母本	黑白花 <i>E/E</i>
	子代	5 头黑白花 4 头 <i>E/E</i> , 1 头 <i>E/e</i>
2	父本	黑白花 <i>E/e</i>
	母本	红白花 <i>e/e</i>
	子代	3 头黑白花 3 头 <i>E/e</i> 3 头红白花 3 头 <i>e/e</i>
3	父本	黑白花 <i>E/E</i>
	母本	黑白花 <i>E/E</i>
	子代	5 头黑白花 <i>E/E</i>
4	父本	红白花 <i>e/e</i>
	母本	红白花 <i>e/e</i>
	子代	3 头红白花 3 头 <i>e/e</i>

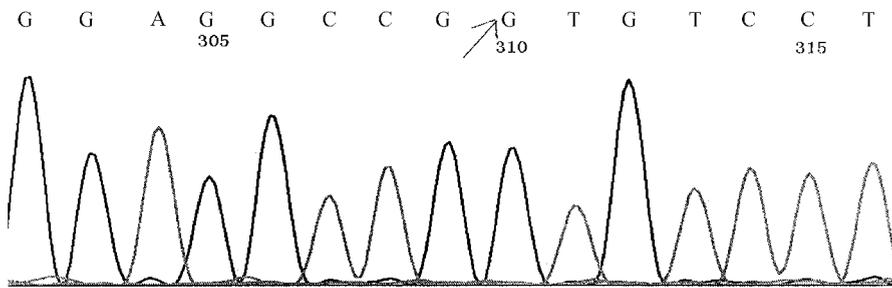


图 3 *E/E* 基因型测序峰图

Fig.3 Partial chromatogram of the *E/E* genotype

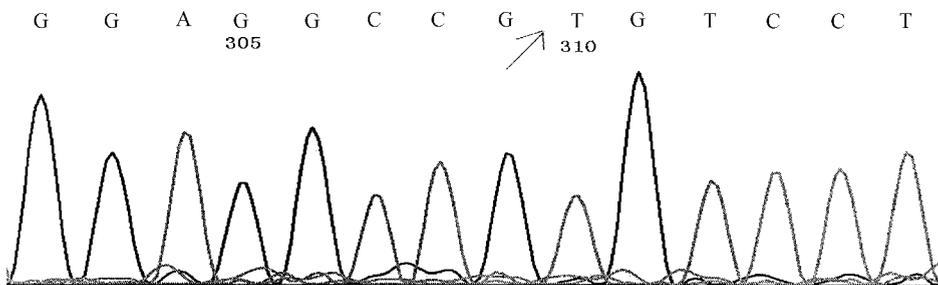


图 4 *e/e* 基因型测序峰图

Fig.4 Partial chromatogram of the *e/e* genotype

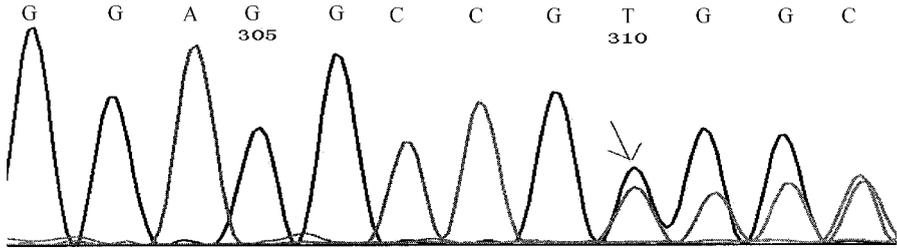


图 5 *E/e* 基因型测序峰图

Fig.5 Partial chromatogram of the *E/e* genotype

2.3 MC1R 蛋白结构功能区域的预测以及突变蛋白的初步分析 对 NCBI 蛋白数据库中人、鼠、牛、羊、鸡的 MC 受体蛋白家族进行联配,并统计了其 7 个跨膜区、3 个胞外环区和 N-末端的保守残基和易变残基数。结果表明(图 6)7 个跨膜区中, TM3、TM6、TM7 比较保守;3 个胞外环区只有 EL3 保守;N-末端非常易变。由此看出 TM3、TM6、TM7 和 EL3 区域的残基是 MC 受体蛋白结构和功能必须的氨基酸。而移码突变的 MC1R 基因在 468 处停止翻译,翻译出了一个缩短的 MC1R 蛋白。VHMPT 软件预测的蛋白结构(图 7)没有了 MC 受体蛋白实现结构功能的 TM3、TM6、TM7 和 EL3 区域。

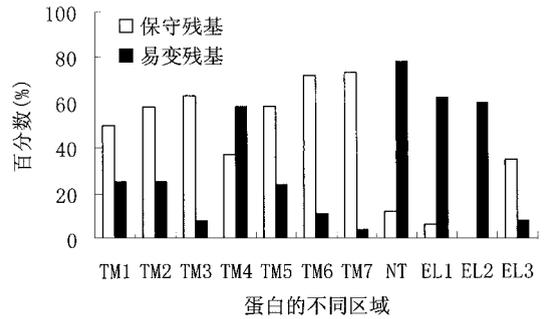


图 6 MC 受体不同区域保守碱基与易变碱基的比例

Fig.6 Proportion of conserved and varying residues in different regions of the MC receptor

TM1~7 表示 1~7 跨膜区;NT 表示 N 末端;
EL1~3 表示胞外环区。

Indicated are the transmembrane regions (TM1-7), the N terminus (NT), and the three extracellular loops (EL1-3).

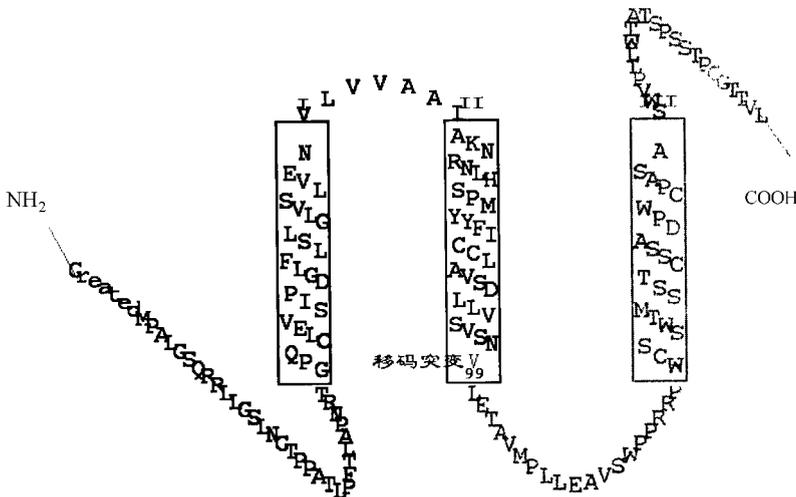


图 7 VHMPT 软件预测的 MC1R 突变蛋白二级结构

Fig.7 The secondary structure of MC1R mutetin predicted by VHMPT program

3 讨 论

3.1 检测方法的生产实践应用 近来有奶牛养殖户反应,买到的荷斯坦黑白花种公牛的冻精和自家荷斯坦黑白花奶牛交配后产出了红白花色犊牛,于是怀疑种公牛是否是纯种荷斯坦奶牛,并产生了一些商业纠葛。本方法利用 PCR-RFLP 和 DNA 测序技术建立了 MC1R 隐性 *e* 等位基因的检测方法,并在 4 个荷斯坦奶牛家系中得到了证实。此方法在生产实践中可以用于鉴定携带红毛 *e* 等位基因的种公牛,以指导奶牛繁育。

3.2 *E/e* 基因型序列的分析 *e* 等位基因 310 处缺失了一个 *Msp* I 限制性内切酶的酶切位点,所以可以利用 PCR-RFLP 检测携带 *e* 基因的荷斯坦奶牛,并对 *E/e* 基因型和 *e/e* 基因型的个体进一步测序验证。对 *E/e* 基因型的测序峰图(图 5),由于 310 处碱基的缺失造成其后测序峰图变凌乱,如用一般的突变检测软件分析,该序列会产生多个假阳性突变,这里采用 Mutation Surveyor 软件^[9]对乱峰反相关处理,它可以把野生型序列(*E* 基因)和缺失突变型序列(*e* 基因)测序峰分离出来,通过对比这两个峰图可以看出突变型序列由于缺失 G 引起序列偏移,偏移的位数为一个碱基。此软件在分析杂合子基因型测序峰图中十分有用,比如:有时会发现某突变样本的测序峰图其 5'端一部分测序质量不错,然而从某一位置开始,测序峰图突然变凌乱,而 base call 结果中含有大量错误信息或者 N。这时也许会认为是测序质量过差而抛弃这个结果,但经 Mutation Surveyor 软件分析后,会发现这是一个杂合子突变。

3.3 MC1R 突变蛋白结构和功能的初步分析

蛋白序列中一些氨基酸残基对于蛋白特定结构的稳定性起着关键作用。当一个残基起着关键作用时,往往没有其他残基能替代它,同时这个残基保持结构的稳定,并在进化家族所有成员中被保留下来。同样,关键的功能残基常常也被保留。通过分析人、鼠、牛、羊、鸡 MC 受体蛋白序列的保守区,结果表明,MC 受体蛋白家

族 TM3、TM6、TM7 和 EL3 区域的很多氨基酸残基就被保留了下来,可见这些区域的氨基酸残基是 MC 受体蛋白实现结构与功能必不可少的。1999 年, Yang 等^[10]通过引入突变发现 MC 受体蛋白的 EL2 和 EL3 是 α -MSH 结合所必须的区域。2005 年, Sanchez 等^[11]报道 Thr314、Cys315 和 Trp317 是 MC1R 蛋白与 α -MSH 结合的关键氨基酸。而 *e* 等位基因的 MC1R 蛋白移码突变在核酸序列 468 处停止了翻译,翻译出来的蛋白只有 155 个氨基酸(图 7),其既失去了 MC 受体蛋白家族实现结构与功能的 TM3、TM6、TM7 和 EL3 区域,也失去了与 α -MSH 结合的 Thr314、Cys315 和 Trp317。所以可能最终以伪黑色素为产物的途径被激发,导致红色毛色的形成。

参 考 文 献

- [1] Adalsteinsson S, Bjarnadottir S, Vage D I, et al. Brown coat color in Icelandic cattle produced by the loci extension and agouti. *Journal of Heredity*, 1995 **86**: 395 ~ 398.
- [2] Klungland H, Vage D I, Gomez-Raya L, et al. The role of melanocyte-stimulating hormone (MSH) receptor in bovine coat color determination. *Mammalian Genome*, 1995 **6**: 636 ~ 639.
- [3] Kathleen G, Mountjoy L, Robbins S. The cloning of a family genes that encode the melanocortin receptor. *Science*, 1997, **257**: 1 248 ~ 1 251.
- [4] Cone R D, Lu D, Koppula S, et al. The melanocortin receptors: agonists, antagonists, and the hormonal control of pigmentation. *Recent Prog Horm Res*, 1996 **51**: 287 ~ 317.
- [5] Joerg H, Fries H R, Meijerink E, et al. Red coat color in Holstein cattle is associated with a deletion in the MSHR gene. *Mammalian Genome*, 1996 **7**: 317 ~ 318.
- [6] Sawyer T K, Hadley M E, Hruby V J, et al. Alpha-melanocyte-stimulating hormone structure-activity studies comparative analysis of melanotropic and CNS bioactivities. *Synapse*, 1988 **2**: 289 ~ 292.
- [7] Dianna S, Irma O. Single-step PCR for detection of brucella from blood and milk of infected animals. *Clinical Microbiology*, 1995 **23**: 3 087 ~ 3 090.
- [8] Rouzaud F, Martin J, Delourme D, et al. A first genotyping assay of French cattle breeds based on a new allele. *Genet Sel*, 2000 **32**: 511 ~ 520.
- [9] Bardelli A, Parsons D W, Silliman N, et al. Mutational analysis

-
- of the tyrosine kinome in colorectal cancers. *Science* ,2003 **9** : 300.
- [10] Yang Y K , Dickinson C J , Zeng Q , *et al* . Contribution of melanocortin receptor exoloops to agouti-related protein binding. *Biological Chemistry* ,1999 **274** :14 100 ~ 14 106.
- [11] Sanchez M J , Sanchez B L , Guillo L A . The melanocortin-1 receptor carboxyl terminal pentapeptide is essential for MC1R function and expression on the cell surface. *Peptides* ,2005 , **26** :1 848 ~ 1 857 .