

奶牛红毛基因分型及蛋白结构预测研究

李秋玲¹, 张争锋², 李建斌¹, 王洪梅¹, 高运东¹, 侯明海¹, 仲跻峰¹

(1 山东省农业科学院 奶牛研究中心, 山东 济南 250100;

2 山东省计算中心, 山东 济南 250014)

[摘要] 【目的】通过对奶牛 *MC1R* 基因核苷酸序列的分析和蛋白结构的预测, 探讨奶牛红白花毛色形成的分子机制。【方法】采用 PCR-RFLP 技术对奶牛 *MC1R* 基因进行分型, 利用生物信息学方法对其蛋白结构特征进行模拟分析。【结果】共检测出与毛色表型有关的 3 种基因型, 其中 EE 基因型在黑白花奶牛中占优势, ee 基因型在红白花奶牛中占优势。蛋白结构预测结果显示, ee 基因型个体的缺失突变使蛋白质翻译提前终止, 进而引发二级结构改变, 导致红白花奶牛个体的出现。【讨论】E 等位基因主要与黑色毛色形成有关, e 等位基因主要与红色毛色形成有关。

[关键词] 奶牛; 毛色; *MC1R*; 蛋白结构

[中图分类号] S823.9+11.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2008)06-0025-04

Study on red coat color gene and prediction of protein structure in dairy cattle

LI Qiu-ling¹, ZHANG Zheng-feng², LI Jian-bin¹, WANG Hong-mei¹,
GAO Yun-dong¹, HOU Ming-hai¹, ZHONG Ji-feng¹

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

2 Shandong Computer Science Center, Jinan 250014)

Abstract: 【Objective】The objective of this study was to study the nucleotide sequence of *MC1R* gene and predict its protein structure in dairy cattle, and investigate the molecular mechanism of red coat color formed. 【Method】The PCR-RFLP method was used to genotype the individuals. The bioinformatics and biotechnology software were used to predict the secondary structure. 【Result】The result showed that EE genotype was the dominant genotype in black and white herd while ee in red and white herd. Secondary structure change caused by deletion mutation resulted in an earlier terminating of the translation, which led the formation of red coat color. 【Conclusion】The allele E was mainly related with black coat color while e with red.

Key words: dairy cattle; coat color; *MC1R* gene; protein structure

我国的荷斯坦奶牛毛色以黑白花为主, 偶尔会出现红白花毛色。以往由于过度追求品种毛色的统一性, 红白花奶牛被当作不受欢迎的个体。近年来有研究表明, 红白花牛的产奶水平虽然不及黑白花

牛, 但乳脂率较高, 并有较强的耐热性^[1]。因此, 研究奶牛红毛形成的机制, 进一步培育出红白花奶牛新品系, 已成为动物育种学家的研究方向之一。哺乳动物毛发、皮肤的颜色, 主要是由黑色素的种类与

* [收稿日期] 2007-06-22

[基金项目] 国家“863”计划项目(2006AA1021D9, 2007AA10Z169); 山东省农业科学院科研创新基金项目(2006YCX028); 山东省农业科学院青年科研基金项目(2006YQN038)

[作者简介] 李秋玲(1979—), 女, 吉林敦化人, 硕士, 主要从事动物遗传育种研究。E-mail: liqiuling2000@yahoo.com.cn

[通讯作者] 仲跻峰(1964—), 男, 江苏淮安人, 博士, 研究员, 主要从事奶牛繁育研究。E-mail: zhongjifeng@tom.com

数量决定的。黑色素可分为两类,即黑色至棕色的真黑色素(Eumelanin)和黄色至红色的伪黑色素(Pheomelanin)^[2-5]。在黑色素的形成过程中,黑素皮质素受体 1(Melanocortin-1-receptor, MC1R)起着关键的作用,其属于 G 偶联蛋白受体。牛 MC1R 基因位于 18 号染色体上^[6], ORF 长 954 bp, 编码 317 个氨基酸。MC1R 基因的 EE 基因型为野生型, 其编码的蛋白质具有 7 个跨膜结构域、3 个细胞内环和一个锚定在黑色素细胞膜上的 COOH—。而 MC1R ORF 310 bp 处的缺失突变导致了 ee 基因型的出现, 其编码的氨基酸发生移码突变, 产生 1 个早熟的平头 MC1R 蛋白, 该蛋白只有 3 个跨膜结构域^[7], 表现出或强或弱的红毛表型^[8-9]。目前, 关于奶牛红毛形成的机制还不是十分清楚, 这给奶牛毛色育种工作带来了一定的困难。为此, 本研究以 MC1R 为候选基因, 采用 PCR-RFLP 技术研究了奶牛该位点的多态性, 并利用生物信息学方法预测了野生型和突变型 MC1R 蛋白的结构, 探讨了红毛的形成机理, 以期对奶牛毛色的遗传学研究和育种工作提供理论基础和技术贮备。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验牛群 试验牛群共有 255 头奶牛, 包括济南市周边奶牛场 6 个全同胞家系(33 头奶牛)和 222 头随机样本(其中 201 头黑白花奶牛、21 头红白花奶牛), 经颈静脉采血, ACD 抗凝, -20 ℃ 冻存备用。

1.1.2 主要试剂 Taq DNA 聚合酶、dNTP、pGEM-T Easy 载体和 DNA 片段回收纯化试剂盒等, 均购自济南赛恩斯生物技术有限公司。

1.2 奶牛基因组 DNA 的制备

用酚/氯仿抽提法提取试验牛基因组 DNA, 溶于 TE(Tris-EDTA)缓冲液, 4 ℃ 保存备用。

1.3 奶牛 MC1R 基因的 PCR 扩增

根据 GenBank 公布的牛 MC1R 基因序列(GenBank 登录号 NM_174108.2), 用 Primer 5.0 设计引物。引物序列分别为: PL: 5'-GGTGAG TCT CGT GGA GAA CG-3', PR: 5'-CGT AGA AGA TGG AGA TGT AGC G-3'。均由上海生工生物技术有限公司合成。

PCR 反应总体系 20 μL: 包括 10×PCR Buffer 2.0 μL, 20 mmol/L Mg²⁺ 1.5 μL, 2 mmol/L dNTP 2 μL, 10 mmol/L 上下游引物各 0.5 μL, Taq DNA

聚合酶 0.3 μL, DNA 模板 1 μL, ddH₂O 12.3 μL。

PCR 反应程序: 95 ℃ 5 min; 94 ℃ 30 s, 57 ℃ 30 s, 72 ℃ 30 s, 30 个循环; 72 ℃ 延伸 10 min, 4 ℃ 保存。

1.4 奶牛 MC1R 基因的 RFLP 分析

RFLP 分析体系为 10 μL: PCR 产物 3 μL, 限制性内切核酸酶 *Msp* I (10 U/μL) 0.3 μL, 10×酶切缓冲液 1.0 μL, ddH₂O 5.7 μL, 37 ℃ 温育 6 h, 酶切产物用 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.5 克隆测序

经 PCR-RFLP 分析后, 利用试剂盒回收纯化不同基因型个体的 PCR 扩增产物, 将回收后的 DNA 片段连接到 pGEM-T easy 载体上, 转入大肠杆菌 DH5α 菌株, 每种基因型单独挑 2 个克隆分别测序。

1.6 奶牛 MC1R 蛋白的结构分析

对野生型和突变型的牛 MC1R 氨基酸序列进行蛋白结构预测, 并运用 Kyte-Doolittle 方法和 Emmini 原则, 分别对蛋白疏水区、表面暴露区及蛋白体系中的电荷分布进行预测。

2 结果与分析

2.1 奶牛 MC1R 基因的 PCR-RFLP

2.1.1 PCR 扩增结果 对所采集的样品进行 PCR 扩增, 对扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳, 其结果(图 1)显示, 特异性扩增良好, 可直接进行 RFLP 分析。

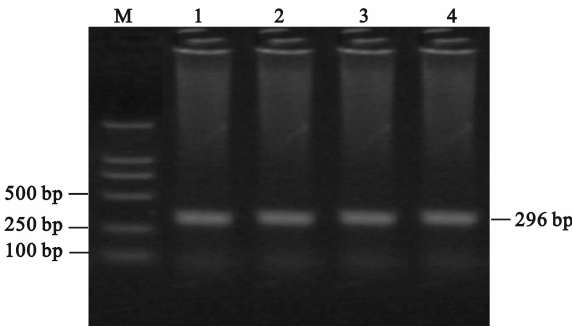


图 1 奶牛 MC1R 基因的 PCR 扩增产物电泳结果

1,2. 黑白花牛样本; 3,4. 红白花牛样本; M. Marker DL2000

Fig. 1 PCR result of MC1R gene in dairy cattle

1,2. PCR products in black and white cattle;

3,4. PCR products in red and white cattle; M. Marker DL2000

2.1.2 RFLP 分析 由图 2 可见, PCR 产物经 *Msp* I 酶切后, 得到 E/E、E/e 和 e/e 3 种基因型, 其中 E/E 酶切后得到 160 和 136 bp 的片段; E/e 酶切后得到 296, 160, 136 bp 的片段; e/e 酶切后得到 296 bp 的片段。

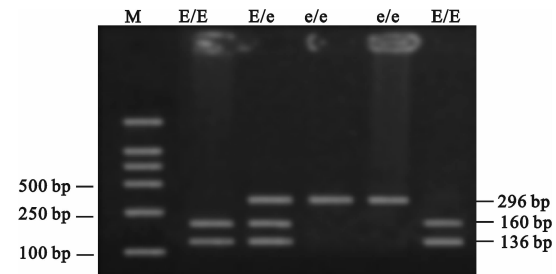


图2 奶牛 MC1R 基因的 RFLP 分析结果
Fig. 2 Results of PCR-RFLP analysis of RFLP of the MC1R gene in dairy cattle

表 1 奶牛 MC1R 基因的基因型频率和等位基因频率

Table 1 Genotype frequencies and allele frequencies of the MC1R gene in dairy cattle

群体 Population	样品数 Simple number	基因型频率 Genotype frequency			等位基因频率 Allele frequency	
		E/E	E/e	e/e	E	e
黑白花 Black and white	201	0.970(195)	0.030(6)	0.000(0)	0.985	0.015
红白花 Red and white	21	0.000(0)	0.095(2)	0.905(19)	0.048	0.952

2.3 奶牛 MC1R 基因的测序结果

通过测序发现,e/e 基因型个体在 MC1R ORF 310 bp 处发生 G 碱基缺失突变;E/e 基因型个体在 310 bp 前测序结果较好,但 310 bp 后测序峰突然变得凌乱,且 310 bp 处 G 峰和 T 峰重叠。利用 Mutation Surveyor 软件将 E 基因单链和 e 基因单链峰图分别提取出来,比对这两个单链峰图,验证其为 E/e 基因型。

2.4 奶牛 MC1R 蛋白的结构预测

在正常情况下,蛋白质并不是以完全伸展的多肽链形式存在,而是以紧密折叠的结构存在的,并且通常由其构象决定蛋白质行使其功能的能力。奶牛 MC1R 蛋白的二级结构预测结果显示,野生型 MC1R 蛋白中至少形成 7 个 α -螺旋,10 个 β -折叠,其中有跨膜 α -螺旋 3 个。按照 Kyte-Doolittle 的氨基酸亲水标准,可知野生型 MC1R 蛋白的亲水区(≥ 0)是 4~11,27~34,64~72,162~165,215~217,219~238 和 300~311 区段氨基酸。依据 Emini 原则,预测 MC1R 表面暴露区为 6~9,27~31,64~69,162~164 和 224~231 区段氨基酸,其中最有可能位于蛋白质表面的区域为 224~231 和 300~309 区段氨基酸。依据氨基酸带电情况,预测在多肽链上,6~11,28~32,63~72,149~155,158~165,183~188,207~240,258~262,276~280 和 305~308 区段的氨基酸为正电荷区;而在 14~18,33~44,53~57,76~86,92~96,100~104,115~127,131~135,267~296 和 310~317 区段,氨基酸为负电荷区。

2.2 奶牛 MC1R 基因的基因型频率及等位基因频率

对随机样本各种基因型频率及等位基因频率的分析结果见表 1。由表 1 可知,黑白花牛 MC1R 基因中 E 等位基因占优势(E 的频率为 0.970);红白花牛 MC1R 基因中的 e 等位基因占优势(e 的频率为 0.905)。在 6 个奶牛家系中发现,红白花牛存在着 E/e 基因型个体。

突变型 MC1R 蛋白结构由于氨基酸的组成和序列发生改变,导致其蛋白质的构象发生改变,从而影响了其功能。突变型 MC1R 蛋白结构中只形成 2 个 α -螺旋,5 个 β -折叠,其中有 3 个跨膜 α -螺旋。按照 Kyte-Doolittle 的氨基酸亲水标准,可知突变型 MC1R 亲水区(≥ 0)是 4~11,27~34,64~72,105~131 和 143~149 区段氨基酸。依据 Emini 原则,预测 MC1R 表面的暴露区为 6~9,27~31,64~69,106~111 和 142~147 区段氨基酸,其中最有可能位于蛋白质表面的区域为 106~110 和 142~145 区段氨基酸。依据氨基酸带电情况,预测在多肽链上 6~11,28~32,63~72,107~112 区段,氨基酸为正电荷区;而在 14~18,33~44,53~57,76~86,92~96,100~104,120~131 和 148~152 区段,氨基酸为负电荷区。

3 讨论与结论

本研究采用 PCR-RFLP 和 DNA 测序技术,研究了奶牛 MC1R 基因与毛色表型的关系,结果表明,黑白花奶牛中的优势等位基因为 E(频率为 0.970),而红白花奶牛中优势等位基因为 e(频率为 0.905);在 6 个奶牛家系中,证实 E 等位基因主要与黑色毛色形成有关,e 等位基因主要与红色毛色形成有关。以往研究表明,e 相对 E 是隐性基因,只有在 e 等位基因纯合的状态下,毛色才表现为红色^[9-11]。但本研究发现,红白花牛中存在 E/e 基因型,测序结果显示,MC1R 基因编码区 310 bp 以前的测序结果非常好,但 310 bp 后测序峰比较凌乱,

并且于 310 bp 处 G 峰和 T 峰出现重叠。测序峰图经 Mutation Surveyor 软件分析后,证明所测序个体的确为 E/e 基因型个体。PCR-RFLP 和 DNA 测序均证明,红白花牛中确实存在 E/e 基因型个体。由此推测,牛红色毛色除由 MC1R 基因控制外,可能还与其他基因有关。

DNA 测序的速度远远超过蛋白质的测序和分析速度,而且目前蛋白质结构测定和分析难度较大、费用较高,且某些蛋白质难以形成晶体而无法进行结构分析。因此,根据蛋白质氨基酸序列预测蛋白质可能的结构显得非常重要^[12]。本研究应用生物信息学技术和分子生物学软件,对野生型 MC1R 蛋白和突变型 MC1R 蛋白的二级结构进行了预测和分析。Jose 等^[13]研究表明,E 等位基因编码的 MC1R 蛋白具有激活腺苷酸环化酶功能,可使细胞内的 cAMP 浓度升高,激活 c 基因导致酪氨酸酶合成增多,真黑色素合成增加,伪黑色素合成减少,于是形成了黑色毛色表型。而发生在 ORF 310 bp 处的核苷酸缺失突变,使编码氨基酸发生移码突变, α -螺旋和 β -折叠结构明显减少,表面暴露区和电荷区也明显缩短,翻译出一个不成熟的蛋白质,使其功能发生变化,从而导致中国荷斯坦牛表现为红色毛色。这也证实了这样的受体不能与 α -促黑素(α -MSH)结合^[14],但可能与 Agouti 蛋白结合的结论^[15]。奶牛 MC1R 基因 ORF 310 bp 处核苷酸可能是 MC1R 受体的关键部分,因为人和马 Extension 位点与毛色有关的大多数点突变均发生在这个区域,且已在人上发现这个区域的点突变与人的红发和红肤有关^[16],因此更深入地研究该区域与色素沉积形成的机制,将有可能应用到人类肤色的研究上。

[参考文献]

[1] 秦志锐. 奶牛良种引种指导 [M]. 北京:金盾出版社,2003:41-42.
Qin Z R. Elite introduction guider for dairy cattle [M]. Beijing: Jindun Publishing House,2003:41-42. (in Chinese)

[2] Adalsteinsson S,Bjarnadottir S,Vage D I. Brown coat color in Icelandic cattle produced by the loci extension and agouti [J]. Journal of Heredity,1995,86:395-398.

[3] Daria G,Hannes J,Mika A C,et al. Expression and function of agouti signaling protein in cattle [J]. Animal Science Journal, 2006,77:33-41.

[4] Reissmann M,Bierwolf J,Brockmann G A. Two SNPs in the SILV gene are associated with silver coat colour in ponies [J]. Animal Genetics,2007,38(1):1-6.

[5] Gutiérrez-Gil B,Wiener P,Williams J L. Genetic effects on coat colour in cattle: dilution of eumelanin and pheomelanin pigments in an F2-Backcross Charolais×Holstein population [J]. BMC Genetics,2007,8:56.

[6] Werth L A,Hawkins G A,Eggen A,et al. Rapid communication:Melanocyte stimulating hormone receptor (MC1R) maps to bovine chromosome 18 [J]. J Anim Sci,1996,74:262.

[7] Francois R,Juliette M,Paul F G,et al. A first genotyping assay of French cattle breeds on a new allele of the extention gene encoding the melanocortin-1 receptor [J]. Genet Sel,2000,32: 511-520.

[8] Cone R D,Lu D,Koppula S,et al. The melanocortin receptors: agonists,antagonists,and the hormonal control of pigmentation [J]. Recent Prog Horm Res,1996,51:287-317.

[9] Joerg H,Fries H R,Meijerink E,et al. Red coat color in Holstein cattle is associated with a deletion in the MSHR gene [J]. Mammalian Genome,1996,7:317-318.

[10] Jeffrey J,Seitz,Sheila M. A missense mutation in the bovine MGF gene is associated with the roan phenotype in Belgian Blue and Shorthorn cattle [J]. Mammalian Genome,1999,10: 710-712.

[11] Sylvain G,Michael G,Hubert L. Pheomelanin coat colour dilution in French cattle breeds is not correlated with the TYR, TYRP1 and DCT transcription levels [J]. Pigment Cell Res, 2004,17:337-345.

[12] 郝柏林,张淑蓉. 生物信息学手册 [M]. 上海:上海科学技术出版社,2002:250-256.
Hao B L,Zhang S Y. Handbook of Bioinformatics [M]. Shanghai:Shanghai Science Technology Publishing House,2002:250-256. (in Chinese)

[13] Jose C,Garcia B,Berta L,et al. Melanocortin-1 receptor structure and functional Regulation [J]. Pigment Cell Res,2005, 18:393-410.

[14] Schioth H B,Muceniece R,Szardenmgs M,et al. Characterization of D117A and H260A mutations in the melanocortin 1 receptor [J]. Mol Cell Endocrinol,1997,126:213-219.

[15] Roubbms L S,Nadeau J H ,Johnson K R,et al. Pigmentation phenotypes of variant extension locus alleles result from point mutations that alter MSH receptor function [J]. Cell,1993, 72:827-834.

[16] Valverde P,Healy E,Jackson I,et al. Variants of the melanocyte-stimulating hormone receptor gene are associated with red hair and fair skin in humans [J]. Nature Genet,1995,11: 328-330.