

缩骨鲫(*Carassius auratus sogu* var.)MC4R 克隆、 组织分布以及与生长相关 SNPs 的筛选*

杨 扬¹ 周惠强¹ 舒 琥^{1①} 蓝昭军² 李 强¹ 谷平华²

(1. 广州大学生命科学学院 广州 510006; 2. 韶关市水产研究所 韶关 512006)

摘要 黑色素皮质素受体-4 (Melanocortin receptor-4, MC4R)是 G 蛋白偶联受体超家族成员, 在能量调控中发挥重要作用。本实验采用同源克隆以及染色体步移对缩骨鲫(*Carassius auratus sogu* var.)MC4R 基因进行克隆, 对其核苷酸序列和推测的氨基酸序列进行生物信息学分析, 通过 Real-time PCR 对其 mRNA 组织分布进行研究, 并对缩骨鲫 MC4R 编码区潜在的与生长相关的 SNPs 进行筛选。本实验克隆 MC4R 基因组基因长度为 2854bp, 只包含一个外显子, 长度为 981bp, 共编码 326 个氨基酸, MC4R 共有七个跨膜结构, 是较为稳定的疏水蛋白。缩骨鲫 MC4R 与鲫鱼的 MC4R 氨基酸序列的同源性最高达到 99.3%, 与 MC3R 和 MC5R 同源性相对其他 MCRs 成员较高。缩骨鲫 MC4R mRNA 在脑中表达量最为显著, 眼中次之, 肌肉、卵巢和肾脏中表达较少, 在鳃、肠、心脏和肝胰腺中微量表达。在 MC4R 的 CDs 区内检测到 6 个与生长潜在相关的 SNPs: 两个错义突变(A199G 和 A881C), 4 个同义突变(A123G, C231T, A444G 和 C480T)。本实验可为缩骨鲫生长和发育的分子机制研究以及遗传育种提供基础资料。

关键词 黑色素皮质素受体-4 (MC4R); 缩骨鲫; 克隆; 组织分布; 单核苷酸多态

中图分类号 Q953; S917.4 **doi:** 10.11693/hyhz20170100025

黑色素皮质素受体-4 (melanocortin receptor-4, MC4R) 属于黑色素皮质激素受体 (melanocortin receptors) 家族, 是 G 蛋白偶联受体超家族成员, 具有 7 个跨膜结构, 为典型的视紫红质受体蛋白(Jangprai *et al*, 2011)。黑色素皮质素受体与其配体—阿黑皮素原 (POMC) 的衍生物所组成的黑色素皮质素系统在生物体代谢调控和能量平衡中扮演着重要的角色 (Ellacott *et al*, 2004)。MC4R 是该系统中的重要组成部分, 其功能十分广泛, 与能量代谢 (Ellacott *et al*, 2004)、食物摄入 (Bertile *et al*, 2006)、性行为 (Van der Ploeg *et al*, 2002) 以及疼痛感触 (Vrinten *et al*, 2000) 均有关联。MC4R 可接受多种受体, 它可以受到 α -MSH 的激活, 促使生物体加快代谢, 抑制进食, 抑制体重增长; 也可以受到刺鼠蛋白 (agouti), 刺鼠相关蛋白

(AGRP) 以及神经肽 Y (NPY) 的抑制, 抑制生物体代谢, 促进生物体觅食, 减缓体重降低 (左北瑶等, 2011)。在人类中, MC4R 的突变可以引起肥胖症 (Vaisse *et al*, 1998)。有统计显示, 有 4% 的肥胖患者都是由于 MC4R 基因突变引起的 (Froguel *et al*, 2001)。在小鼠中敲除该基因, 小鼠表现出多食、肥胖、胰岛素分泌过多等症状 (Huszar *et al*, 1997)。由于 MC4R 在能量调控中发挥的重要作用, 在疾病治疗和农业方面, MC4R 受到越来越多的关注。

MC4R 作为一种脑神经受体主要分布于脑中, 在其他组织内也有着不同程度的分布。MC4R 的组织表达在哺乳动物和家禽有着较多的研究。Mountjoy 等 (1994) 通过原位杂交技术对大鼠脑内 MC4R 的表达进行检测, 结果显示 MC4R 在皮质、丘脑、下丘脑、脑

* 国家公益性行业 (农业) 重大专项, 201303048 号; 广东省自然科学基金项目, 2015A0303135092 号; 广东省科技计划项目, 2014A020208145 号。杨 扬, E-mail: 214453598@qq.com

通讯作者: 舒 琥, 博士, 教授, E-mail: shuhu001@126.com

收稿日期: 2017-01-29, 收修改稿日期: 2017-03-04

干和脊髓内均有表达。王婕等(2011)对鸭的 MC4R 基因的组织表达差异进行了分析, 结果显示, 肌肉、脂肪、心脏、肾脏、脾脏和脑中均有不同程度的表达。在鱼类中, MC4R 的组织表达在齐口裂腹鱼(*Schizothorax prenati*, Wei *et al.*, 2013), 金鱼(*C. auratus* var., Cerdá-Reverter *et al.*, 2003), 虹 鳟(*Oncorhynchus mykiss*, Haitina *et al.*, 2004)和蛇皮鱼(*Snakeskin gourami*, Jangprai *et al.*, 2011)等鱼中有所研究, 均在脑中有着较高的表达。

单核苷酸多态(single nucleotide polymorphisms, SNPs)是指在基因组水平上由单个核苷酸的变异所引起的 DNA 序列多态性(Lander, 1996)。SNPs 分布极为广泛, 平均每 1000bp 的基因就含有一个 SNPs (Zhao *et al.*, 2003)。分布于基因内的 SNP 可能会对 mRNA 的表达, 翻译和剪切以及蛋白质的结构和功能造成影响, 从而导致生物体性状的改变(Carroll *et al.*, 2005)。MC4R 的 SNPs 与生物体的性状关联分析在家畜和家禽中有着广泛的研究, 但在鱼类中罕有报道, 只对吉富罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)和红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*) MC4R 的 SNPs 有所研究(刘福平等, 2009; 张丽等, 2012)。

缩骨鲫(*C. auratus* sogu var.)主要分布于湖南与广东, 因其尾部脊椎萎缩而得名, 在广东有一定规模的养殖(谢楠等, 2016)。其躯体较高, 体长约为体高的 1.6 倍。距背鳍前基部三分之一处的后部脊椎骨呈萎缩状, 尾柄长远小于尾柄高。背鳍后基部的两侧肌肉发达。这种体型并非病态, 而是纯粹的遗传所致(俞豪祥等, 1986)。缩骨鲫肉质鲜美, 营养丰富, 但是生长较为缓慢。故以能量代谢密切相关的 MC4R 作为本实验的候选基因, 对其克隆, 序列分析, 表达分布以及检测与生长潜在相关 SNPs, 为缩骨鲫生长和发育的分子机制研究以及遗传育种提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验用鱼

实验用缩骨鲫 14 尾, 体质量为(106±8.7)g, 取自广东韶关水产研究所, 饲养于广州大学水产养殖室的水族箱内。

1.2 实验试剂

Ezup 柱式动物基因组 DNA 抽提试剂盒和 SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒购自生物工程(上海)股份有限公司; Taq 酶和 RNA keeper 购自 Vazyme Biotech 公司。PMD19-T、大肠杆菌 DH5α 感受态、

RNAiso、PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)和 SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus), ROX plus 均购自 TaKaRa 公司。

1.3 引物设计和序列的克隆

根据鲫鱼 MC4R 基因设计两对 CDs 区域的引物(MC4R1F, MC4R1R, MC4R2F 和 MC4R2R)和一对 3' 非翻译区引物(MC4R3F 和 MC4R3R), 根据已扩增出缩骨鲫 MC4R 片段, 设计三条染色体步移引物 MC4R4、MC4R5、MC4R6 和一对 Real-time PCR 引物(表 1)。剪取 25mg 缩骨鲫背部肌肉, 使用生工 DNA 提取试剂盒抽提基因组 DNA。使用上述的引物对缩骨鲫基因组 DNA 进行扩增, 纯化后, 转入大肠杆菌, 送至上海美吉生物医药科技有限公司测序并使用 Seqman 拼接。

表 1 用于缩骨鲫 MC4R 基因克隆、表达分析和 SNPs 筛选的引物

Tab.1 Primers used for cloning and expression analysis of MC4R in <i>C. auratus</i> sogu var.	
引物	序列(5'→3')
MC4R1F	ATGAACACCTCACATCATCATG
MC4R1R	TGGTGAAGAACATGCTGATAAG
MC4R2F	CTACATCACAACTCTTCTACGCT
MC4R2R	CTATACACACAGAGAGGTCAAT
MC4R3F	ATGTGCAACTCGGTCATAGACC
MC4R3R	GGGATAAATGAGAGTTTATTGGAGG
MC4R4	GGGTCATGATGTTGTGGTAGCG
MC4R5	GAAGATCGTGATGTAGCGGTCC
MC4R6	CAAATGGAGGCCAACAGTGAGC
QMC4RF	AGCTGTAGCAGACTTGTTGGTC
QMC4RR	TGTTCTTGATGATGCTCTCGCG
β-actinF	CAGCCATCCTTCCTAGGTATG
β-actinR	TCTGCATACGGTCAGCAATGC

1.4 MC4R 基因的序列拼接及分析

将测序获得 MC4R 基因片段利用 DNASTar 7.1 的 Seqman 对序列进行拼接、比对, 获得缩骨鲫 MC4R 基因组基因全序列, NCBI 登录号为 KX988002。利用 ExPASy-ProtParam tool 在线分析工具分析缩骨鲫 MC4R 基因编码蛋白的理化性质。使用 TMHMM Server v. 2.0 对缩骨鲫 MC4R 蛋白的跨膜结构预测。使用 Mega 5.0 软件对已公布的部分 MC4R 以及 MCR 家族的氨基酸序列(表 2)进行多重比对, 并使用 NJ 法构建分子系统发育树, Bootstrap 检验重复 1000 次。

1.5 缩骨鲫 MC4R 的组织分布表达分析

取 3 尾缩骨鲫的 9 个组织: 脑、眼、心脏、卵

巢、肝胰脏、肠、肾脏、鳃和肌肉迅速放入 RNA keeper 中,使用 trizol 法提取总 RNA,使用 2%琼脂糖电泳检测 RNA 质量。按照 PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)说明书进行反转录。该实验使用的荧光定量 PCR 平台是 ABI7000,按照 SYBR[®] Premix Ex TaqTM II (Tli RNaseH Plus)试剂盒要求进行 Real-time PCR 对 9 种组织的 mRNA 表达量进行检测,每一个样品设置三个重复。对 PCR 产物进行溶解曲线检测,并送至上海美吉生物医药科技有限公司测序,以确定扩增基因为目的基因。本实验使用 β -actin 作为内参基因(表 1),QMC4RF 和 QMC4RR 作为缩骨鲫 MC4R 特异性引物。使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法对不同组织的相对表达量进行计算并作图。

表 2 用于构建系统发育树的 MC4R 以及 MCRs 氨基酸序列
Tab.2 GenBank accession numbers of MC4R and MCRs used in this study

物种	登录号	蛋白
缩骨鲫 <i>C. auratus</i> sogu var.	KX988002	MC4R
鲫鱼 <i>C. auratus</i>	CAD58853.1	MC4R
鲤鱼 <i>Cyprinus carpio</i>	CBX89936.1	MC4R
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	NP_775385.1	MC4R
齐口裂腹鱼 <i>S. prenanti</i>	AGF80338.1	MC4R
三刺鱼 <i>Gasterosteus aculeatus</i>	ALF99996.1	MC4R
赤虹 <i>Dasyatis akajei</i>	BAU98233.1	MC4R
五线鲈 <i>Aphyosemion striatum</i>	SBP15058.1	MC4R
拉氏假鳃鲈 <i>Nothobranchius rachovii</i>	SBR74851.1	MC4R
剑尾鱼 <i>Xiphophorus maculatus</i>	AHC02878.1	MC4R
乌鳢 <i>Channa argus</i>	AMM02541.1	MC4R
金钱鱼 <i>Scatophagus argus</i>	AOQ25859.1	MC4R
牙鲆 <i>Paralichthys olivaceus</i>	ADP09415.1	MC4R
海鲈 <i>Dicentrarchus labrax</i>	CBN82190.1	MC4R
非洲爪蟾 <i>Xenopus tropicalis</i>	XP_004915370.1	MC4R
原鸡 <i>Gallus gallus</i>	NP_001026685.1	MC4R
灰雁 <i>Anser anser</i>	ABF19809.1	MC4R
原鸽 <i>Columba livia</i>	ACC60975.1	MC4R
家鼠 <i>Mus musculus</i>	NP_058673.2	MC4R
人 <i>Homo sapiens</i>	NP_005903.2	MC4R
牛 <i>Bos Taurus</i>	NP_776535.1	MC4R
绵羊 <i>Ovis aries</i>	AFJ95892.1	MC4R
鲫鱼 <i>C. auratus</i>	CAE11349.1	MC5R
斑马鱼 <i>D. rerio</i>	AAI62747.1	MC3R
斑马鱼 <i>D. rerio</i>	AAO24742.1	MC1R
斑马鱼 <i>D. rerio</i>	AAO24743.1	MC2R

1.6 与生长相关的 SNPs 的检测

在一同时孵化,饲养条件相同的缩骨鲫群体内,选取 5 条较大个体和 5 条较小个体,作为筛选与生长相关的 SNPs 的样本,并剪其鳍条,提取基因组 DNA。将提取的 10 尾缩骨鲫基因组 DNA 混合成基因池,使用 MC4R1F、MC4R1R、MC4R2F 和 MC4R2R 两对引物以该基因池为模板分别对两段 CDs 进行扩增,并送至上海美吉生物医药科技有限公司测序,得到的结果使用 Chromas 2.33 查看,筛选 SNPs 点,并对 SNPs 位点进行初步分析。

2 结果

2.1 缩骨鲫的 MC4R 基因组基因获得与分析

缩骨鲫 MC4R CDs 以及 3'非翻译区的扩增片段如图 1 所示,启动子区域通过染色体步移获得,MC4R 基因组基因长度为 2854bp,只包含一个外显子,长度为 981bp,共编码 326 个氨基酸,缩骨鲫 MC4R 序列的具体分析见图 2。推测的 MC4R 蛋白预计分子量为 36531.58,等电点为 8.45。其氨基酸组成中以亮氨酸(Leu)的含量最高(12.6%),含量最低的是色氨酸(Trp),为 1.5%,其他氨基酸含量在 1.8%—10.7%之间。此蛋白不稳定系数为 35.65,是一种较为稳定的蛋白。此外,蛋白质氨基酸残基亲疏水性总平均数(GRAVY)为-0.713,此蛋白为疏水蛋白。

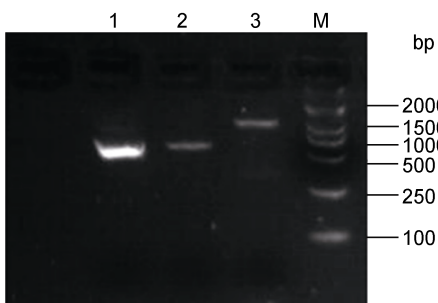


图 1 缩骨鲫 MC4R 部分基因组序列扩增结果
Fig.1 PCR result of MSTN of *C. auratus* sogu var.
注: 1—3 为表 1 中引物 PCR 扩增产物, M 为 DL2000 DNA Marker

2.2 缩骨鲫 MC4R 氨基酸序列的跨膜结构分析

缩骨鲫 MC4R 氨基酸序列的跨膜结构使用 TMHMM Server v. 2.0 进行分析,结果显示,该蛋白共有七个跨膜结构,与其他 G 蛋白偶联受体相同。跨膜蛋白 N-末端位于细胞膜外, C-末端位于细胞膜内七个跨膜结构的位置分别为 45—67, 79—101, 121—143, 163—185, 195—217, 243—265 和 280—302(图 2)。

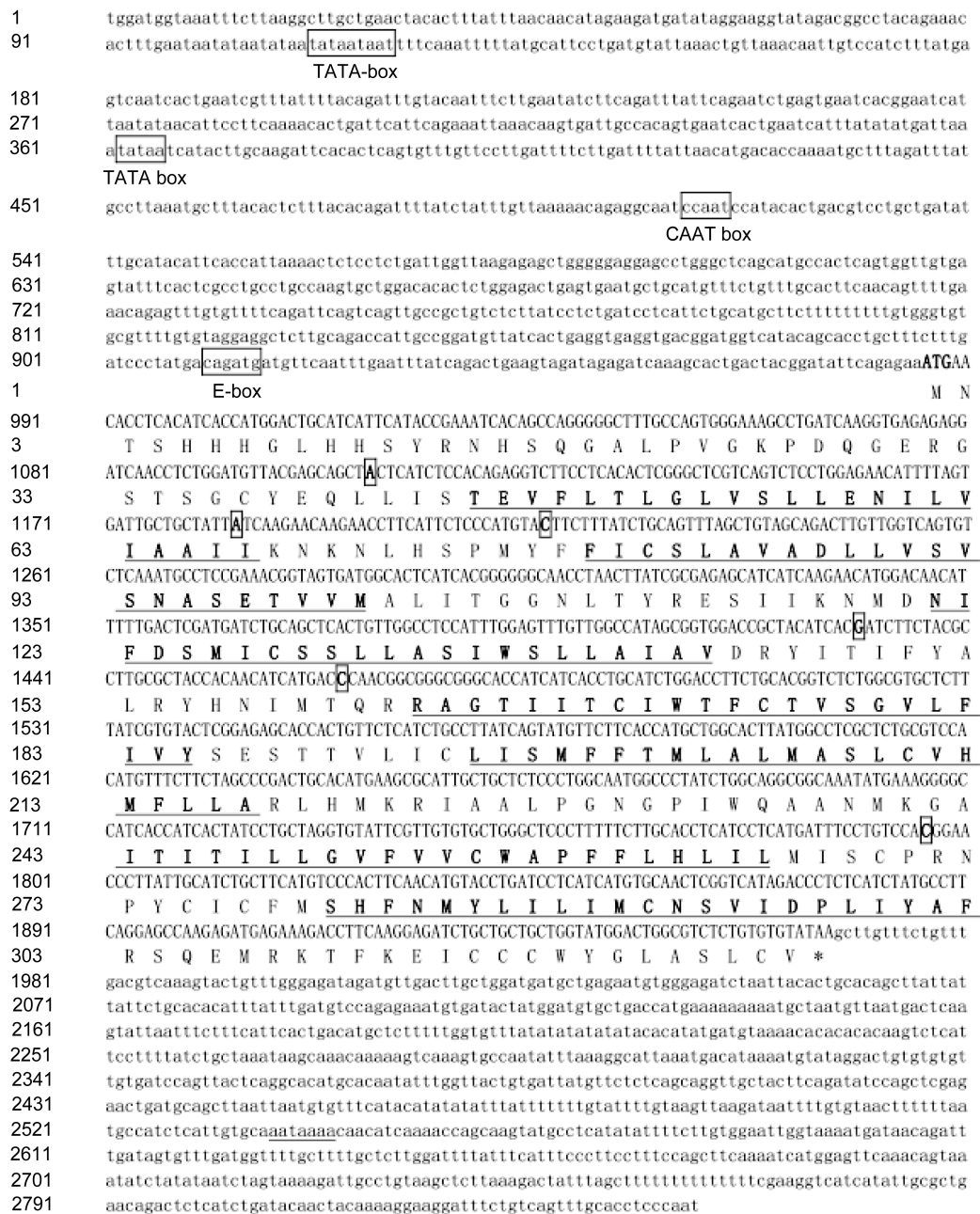


图 2 缩骨鲫 MC4R 核苷酸序列与推测的氨基酸序列

Fig.2 MC4R nucleotide sequence and predicted amino acid sequence of *C. auratus* sogu var.

注: 加框表示启动子元件, 下划线表示跨膜结构, 加粗表示启动子, 阴影部分表示加尾信号, 下划线加粗表示跨膜结构, 加框加粗表示 SNPs, 星号表示终止密码子

2.3 缩骨鲫 MC4R 的同源性分析

对比 GenBank 中已经公布的一些物种的 MC4R 和 MCRs 氨基酸序列, 结果显示, 缩骨鲫与鲫鱼的 MC4R 氨基酸序列的同源性最高达到 99.3%, 与鲤鱼的同源性次之达到 98.6%, 缩骨鲫与其他鲤科鱼类的同源性为 97.9%—97.5%, 鲤科鱼类中的 MC4R 非常保守。缩骨鲫与其他硬骨鱼类的同源性为 83.4%—

79.7%, 与软骨鱼类赤鲉的同源度为 75.3%, 与陆生动物的同源度为 71.2%—68.9%。在 MCRs 家族中, 缩骨鲫 MC4R 与鲫鱼的 MC5R 最为同源, 达到 68.4%。另外, 与斑马鱼的 MC3R 的同源度为 60.5%, 与斑马鱼 MC1R 的同源度为 42.5%, 与斑马鱼的 MC2R 同源度为 25.7%。总而言之, MC4R 在不同的物种内相对保守, MCRs 家族间有着较大差异。

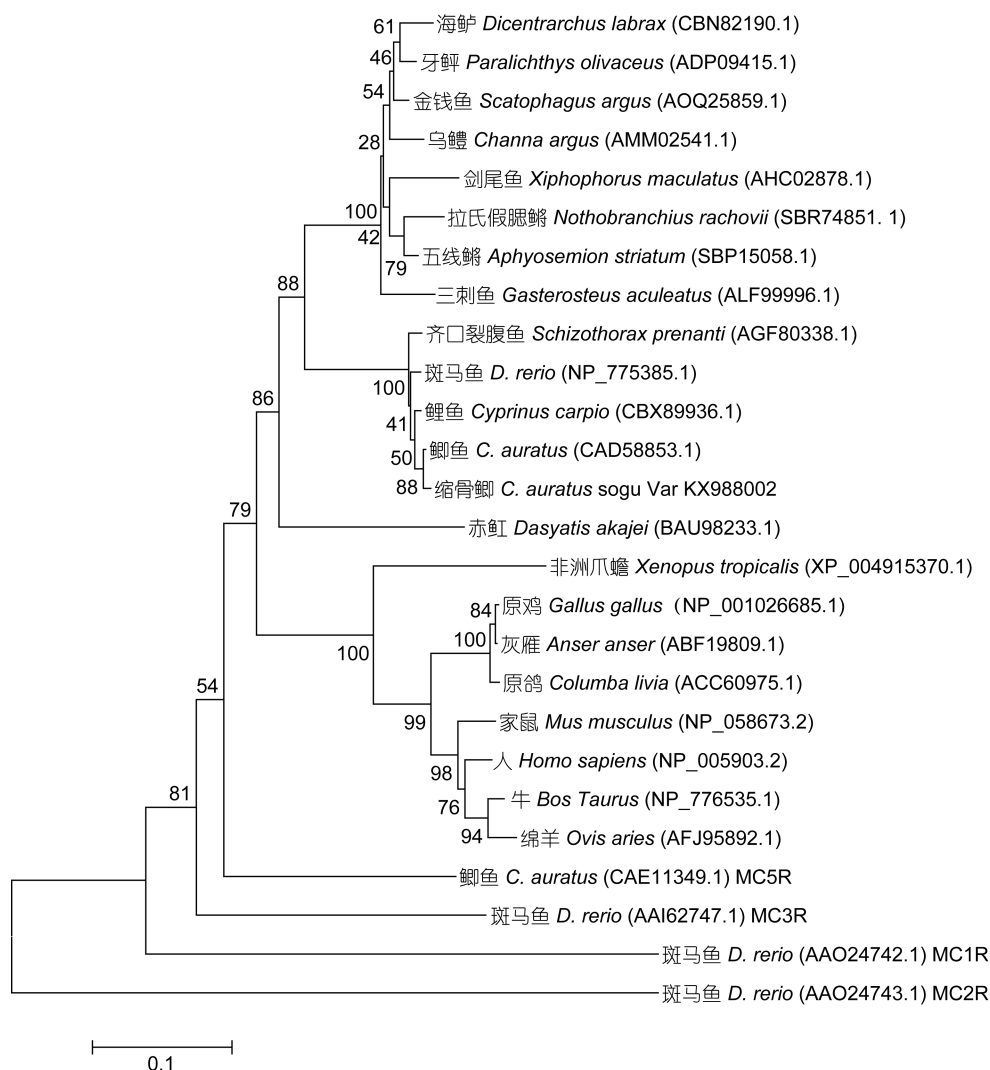


图3 不同物种 MC4R 以及 MCRs 家族氨基酸序列的系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree of MC4R of different species and MCRs family

2.4 缩骨鲫 MC4R 在不同组织的转录表达分布

通过 Real-time PCR 对缩骨鲫 MC4R 在不同组织内的表达量研究。Real-time PCR 的扩增产物溶解曲线为单峰，测序结果确认扩增产物为目的片段。Real-time PCR 结果表明，在缩骨鲫脑中 MC4R 含量最高，眼中次之，肌肉，卵巢和肾脏中表达较少，在鳃、肠、心脏和肝胰腺中微量表达(图 4)。

2.5 缩骨鲫 MC4R 编码区 SNPs 检测

在缩骨鲫的 CDs 区域中，有 6 个 SNPs 被检测到(图 2)，以编码区第 1 个核苷酸为 1，编码区下游为正，对 SNPs 进行命名，分别为 A123G、A199G、C231T、A444G、C480T 和 A881C(图 5)，A123G 位同义突变(CTA>CTG)，均编码亮氨酸；A199G 为错义突变(ATC>GTC)，分别编码异亮氨酸和缬氨酸，均为非

极性氨基酸，该突变位于第一个跨膜结构内；C231T 为同义突变(TAC>TAT)，均编码酪氨酸；A444G 为同

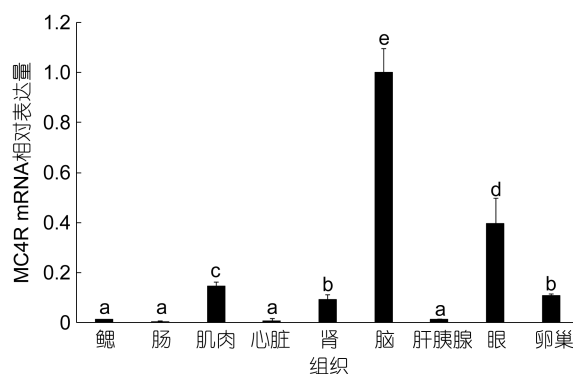


图4 缩骨鲫 MC4R mRNA 在不同组织内的表达

Fig.4 Relative expression of MC4R mRNA in tissues of in *C. auratus* sogu var.

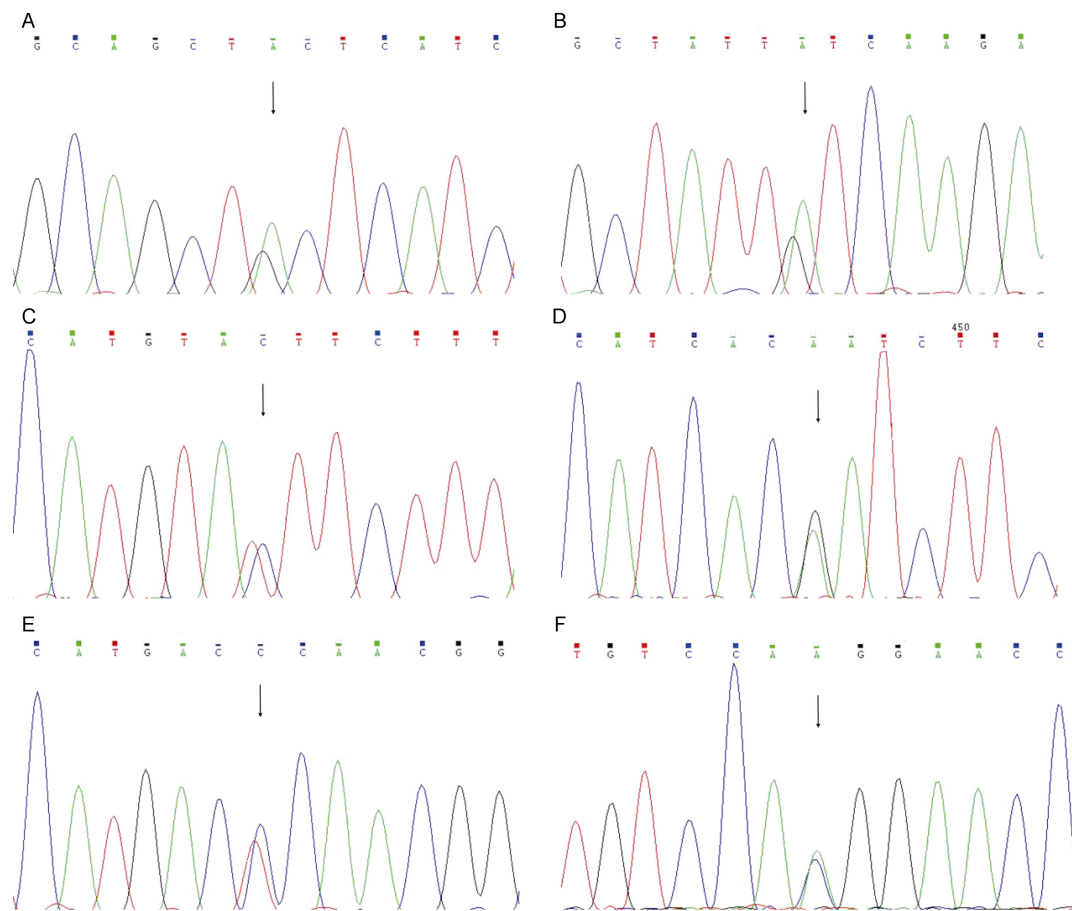


图5 缩骨鲫 MC4R 编码区的 SNPs 位点

Fig.5 The SNPs in CDs of *C. auratus sogu* var.

注: A—F 分别代表 A123G, A199G, C231T, A444G, C480T 和 A881C 的测序峰图

义突变(ACG>ACA), 均编码苏氨酸; C480T 为同义突变(ACT>ACC), 均编码苏氨酸, A881C 位错义突变(CAC>CAA), 分别编码组氨酸和谷氨酰胺, 位于第四个细胞外结构区。这些突变均可能对缩骨鲫的生长数量性状造成影响。

3 讨论

缩骨鲫 MC4R 与部分 GenBank 公布 MC4R 的序列和 MCRs 家族成员比对显示, 缩骨鲫与鲫鱼的同源性最高达到 99.3%, 这与刘良国等(2005)采用 RAPD 方法分析鲫鱼品系所得出的结果相符: 缩骨鲫可能是由普通鲫鱼分化而来。鲤科鱼类中, MC4R 的同源性都很高, 可达 97.5%—99.3%, 这意味着 MC4R 在生理调控方面可能有着重要作用。MC4R 与其他 MCR 家族成员同源度为 25.7%—68.4%, 其中, MC4R 与 MC3R 和 MC5R 的同源性相对其他 MCRs 成员较高, 分别为 68.4%和 60.5%, 有报道称这三个黑色素皮质素受体在功能上有所重叠(Shukla *et al*, 2013), 这可

能是由于 MC4R 与 MC5R 和 MC3R 相对于其他 MCR 家族成员分化时间较短有关。另外, Klovins 等(2004)的实验结果显示在白斑角鲨(*Squalus acanthias*)中, MC4R 与 MC3R 和 MC5R 的同源性相对于其他 MCRs 成员也是最高的, 本实验结果与其相符。多重比对显示, 鱼类中的 MC4R 与陆生动物有着较大的差异, 鱼类 MC4R 氨基酸长度多为 326—327aa, 但是陆生动物中 MC4R 氨基酸残基长度一般 332aa 左右。另外, 通过 MC4R 氨基酸序列构建的分子系统发育树与形态学的系统分类结果基本吻合。

缩骨鲫的 MC4R mRNA 表达主要分布于脑中, 在肌肉, 肾脏, 眼和卵巢中也有不同程度的分布, 在鳃, 肝胰腺, 肠和心脏中微量表达。缩骨鲫在脑, 肌肉, 肾脏, 眼和卵巢中的表达与蛇皮鱼较为相似(Jangprai *et al*, 2011); 在金鱼中, MC4R 在脑, 眼和性腺中同样有着显著的分布(Cerdá-Reverter *et al*, 2003)。在虹鳟中, MC4R 也主要集中于脑, 肾脏和性腺中表达, 但在肌肉中表达较少, 与缩骨鲫相异。

MC4R 作为一种中枢神经受体,故而在脑中有着较高的表达(Ellacott *et al*, 2004); MC4R 与性行为有着密切的关联,这可能是 MC4R 在性腺中有着显著的表达的原因(Lh *et al*, 2002); MC4R 在肾中的显著表达,可能与肾脏是重要的调节能量平衡的器官并且肾脏中有着 POMC 衍生物的存在有关(Bertile *et al*, 2006)。有报道称 MC4R 存在于肌肉中,可能与代谢调节有关(刘欣等, 2012),但是其对肌肉及其周围组织的作用尚不清楚。

本实验共发现位于缩骨鲫 MC4R 编码区上的 6 个 SNPs, 其中四个同义突变, 两个错义突变, 在很多研究中, 同义突变同样会影响生物体的生长性状, 这主要是因为同义突变可能会改变蛋白的折叠空间结构, 导致蛋白的功能发生变化(Kimchi-Sarfaty *et al*, 2007), 这在多种动物中均有报道(刘德武等, 2008; 付金秀等, 2016)。Komar(2007)也认为只有少数的同义突变属于中性突变, 大部分的同义突变会对个体造成影响。A199G 为错义突变(ATC>GTC), 分别编码异亮氨酸和缬氨酸, 但均为非极性疏水氨基酸, 这种变化并不会对该蛋白造成致命的影响, 但是很有可能影响缩骨鲫的性状。A881C 为错义突变(CAC>CAA), 分别编码组氨酸和谷氨酰胺, 位于第四个细胞外结构区, 两个氨基酸均为极性氨基酸, 同样不是致命的, 但是否对缩骨鲫的个体性状有影响, 还需要大规模的群体进行 SNPs 与性状的关联分析。

4 结论

本文采用同源克隆及染色体步移对缩骨鲫 MC4R 基因进行了克隆, 得到了缩骨鲫 MC4R 的基因序列长度为 2854bp, 只包含一个外显子, 长度为 981bp, 共编码 326 个氨基酸, MC4R 共有七个跨膜结构, 是较为稳定的疏水蛋白。该基因与其他鱼类相比具有较高的同源度, 但与陆生动物的同源度相对较低。缩骨鲫 MC4R mRNA 在脑中表达量最为显著, 眼中次之, 肌肉、卵巢和肾脏中表达较少, 在鳃、肠、心脏和肝胰腺中仅微量表达。另外还发现了位于编码区上的 6 个潜在的与生长性状相关联的 SNP 位点。本实验可为研究缩骨鲫的生长和发育的调控机制以及分子辅助育种提供基础资料和理论依据。

参 考 文 献

王 婕, 刘小林, 侯水生等, 2011. 北京鸭 MC4R 基因的克隆及其组织表达的差异. 西北农业学报, 20(1): 29—34
左北瑶, 钱宏光, 2011. MC4R 基因研究进展. 中国草食动物,

31(5): 45—50
付金秀, 郭红威, 李 超等, 2016. 鸡 DGAT2 基因第 7 外显子多态性与生产性能的关联. 农业生物技术学报, 24(5): 689—696
刘 欣, 金勇君, 杨美子等, 2012. MC5R 在促黑素对骨骼肌细胞脂肪酸氧化影响中的作用. 中国现代医学杂志, 22(17): 12—16
刘良国, 赵 俊, 陈湘麟, 2005. 彭泽鲫两个雌核发育克隆与三个鲫鱼品系的 RAPD 分析. 淡水渔业, 35(2): 13—16
刘福平, 白俊杰, 叶 星等, 2009. 罗非鱼 MC4R 基因克隆及其与生长相关的 SNPs 位点. 中国水产科学, 16(6): 816—823
刘德武, 杜颖军, 张 豪等, 2008. 猪 Leptin 基因的 SNP 筛查及其与生长性状的关联分析. 华中农业大学学报, 27(2): 251—257
张 丽, 仇雪梅, 王 娟等, 2012. 红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)MC4R 基因的多态性分析. 生物技术通报, (7): 97—102
俞豪祥, 张海明, 1986. “缩骨鲫”的生物学及养殖试验初报. 水产科技情报, (3): 21
谢 楠, 刘 凯, 冯晓宇, 2016. 鲫鱼常见品种概述. 杭州农业与科技, (4): 13—17
Bertile F, Raclot T, 2006. The melanocortin system during fasting. Peptides, 27(2): 291—300
Carroll L, Voisey J, van Daal A, 2005. Gene polymorphisms and their effects in the melanocortin system. Peptides, 26(10): 1871—1885
Cerdá-Reverter J M, Ringholm A, Schiöth H B *et al*, 2003. Molecular cloning, pharmacological characterization, and brain mapping of the melanocortin 4 receptor in the goldfish: involvement in the control of food intake. Endocrinology, 144(6): 2336—2349
Ellacott K L, Cone R D, 2004. The central melanocortin system and the integration of short- and long-term regulators of energy homeostasis. Recent Progress in Hormone Research, 59: 395—408
Froguel P, Boutin P, 2001. Genetics of pathways regulating body weight in the development of obesity in humans. Experimental Biology and Medicine, 226(11): 991—996
Haitina T, Klovins J, Andersson J *et al*, 2004. Cloning, tissue distribution, pharmacology and three-dimensional modelling of melanocortin receptors 4 and 5 in rainbow trout suggest close evolutionary relationship of these subtypes. Biochemical Journal, 380(2): 475—486
Huszar D, Lynch C A, Fairchild-Huntress V *et al*, 1997. Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. Cell, 88(1): 131—141
Jangprai A, Boonanuntanasarn S, Yoshizaki G, 2011. Characterization of melanocortin 4 receptor in *Snakeskin gourami* and its expression in relation to daily feed intake and short-term fasting. General and Comparative Endocrinology, 173(1): 27—37
Kimchi-Sarfaty C, Oh J M, Kim I W *et al*, 2007. A “silent” polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. Science, 315(5811): 525—528
Klovins J, Haitina T, Ringholm A *et al*, 2004. Cloning of two

- melanocortin (MC) receptors in spiny dogfish: MC3 receptor in cartilaginous fish shows high affinity to ACTH-derived peptides while it has lower preference to γ -MSH. *European Journal of Biochemistry*, 271(21): 4320—4331
- Komar A A, 2007. Silent SNPs: impact on gene function and phenotype. *Pharmacogenomics*, 8(8): 1075—1080
- Lander E S, 1996. The new genomics: global views of biology. *Science*, 274(5287): 536—539
- Lh V D P, Martin W J, Howard A D *et al*, 2002. A role for the melanocortin 4 receptor in sexual function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(17): 11381—11386
- Mountjoy K G, Mortrud M T, Low M J *et al*, 1994. Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4-R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain. *Molecular Endocrinology*, 8(10): 1298—1308
- Shukla C, Koch L G, Britton S L *et al*, 2013. Differential contribution of brain-region-specific melanocortin 5 receptor to physical activity levels in lean vs. obesity-prone rats. *The FASEB Journal*, 27: 935.1
- Vaisse C, Clement K, Guy-Grand B *et al*, 1998. A frameshift mutation in human MC4R is associated with a dominant form of obesity. *Nature Genetics*, 20(2): 113—114
- Van der Ploeg L H T, Martin W J, Howard A D *et al*, 2002. A role for the melanocortin 4 receptor in sexual function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(17): 11381—11386
- Vrinten D H, Gispen W H, Groen G J *et al*, 2000. Antagonism of the melanocortin system reduces cold and mechanical allodynia in mononeuropathic rats. *The Journal of Neuroscience*, 20(21): 8131—8137
- Wei R B, Yuan D Y, Zhou C W *et al*, 2013. Cloning, distribution and effects of fasting status of melanocortin 4 receptor (MC4R) in *Schizothorax prenanti*. *Gene*, 532(1): 100—107
- Zhao Z M, Fu Y X, Hewett-Emmett D *et al*, 2003. Investigating single nucleotide polymorphism (SNP) density in the human genome and its implications for molecular evolution. *Gene*, 312: 207—213

CLONE, EXPRESSION, AND SCREENING OF GROWTH ASSOCIATED SNPS OF *CARASSIUS AURATUS* SOGU VAR.

YANG Yang¹, ZHOU Hui-Qiang¹, SHU Hu¹, LAN Zhao-Jun², LI Qiang¹, GU Ping-Hua²
 (1. School of Life Science, Guangzhou University, Guangzhou 510006, China;
 2. Shaoguan Fisheries Research Institute, Shaoguan 512006, China)

Abstract Melanocortin reporter-4 (MC4R) belongs to G-protein-coupled receptors family; it plays an important role in energy regulation. By homologous cloning and chromosome walking, MC4R gene of *Carassius auratus* sogu var. was cloned, and the expression of MC4R gene were studied based on real-time PCR. Meanwhile, SNPs (single nucleotide polymorphisms) of the MC4R in CDs region were detected by Sanger sequences. The result show that the length of MC4R genome gene was 2854bp that contain one 981-bp exon, the CDs code 326 amino acid. The MC4R contained 7 transmembrane structure and was a stable hydrophobin. Through sequence alignment of MC4Rs from different species and other members of MCRs, we found that the *C. auratus* is the closest species to *C. auratus* sogu var. The homology ratio is 99.3%, the MC4R was far from other MCRs members. The real-time PCR result shows that MC4R mRNA was most expressed in brain, and then in eyes; and less expressed in muscle, ovary, and kidney. Weak MC4R mRNA was expressed in gill, intestine, heart and hepatopancreas. In the codon sequence, six SNPs were detected: two missense mutations, and four silent mutations. The results shall be insightful to understand the growth of *C. auratus* sogu var., and offer fundamental data for molecular markers of *C. auratus* sogu var.

Key words melanocortin reporter-4 (MC4R); *Carassius auratus* sogu var.; clone; tissue expression; single nucleotide polymorphisms (SNPs)