

家兔 MITF 基因部分外显子多态性的 PCR-SSCP 分析

何孟颀^{1,2}, 李挺^{1,2}, 王晓明^{1,2}, 潘雨来³, 吴信生^{1,2*}

(1.江苏省动物遗传繁育与分子设计重点实验室, 江苏 扬州 225009; 2.扬州大学 动物科学与技术学院, 江苏 扬州 225009; 3.江苏省金陵种兔场, 江苏 江宁 211103)

摘要: 小眼畸形相关转录因子 MITF 是色素细胞的发育成熟中的重要因子, 可调控酪氨酸基因家族的表达, 参与黑素生成的调控, 从而影响动物的毛色。本实验采用 PCR-SSCP 技术, 检测白色獭兔、海狸色獭兔和闽西南黑兔群体中家兔 MITF 基因的 5 个外显子和部分内含子区域的多态性, 结果发现, 引物 1、2、5、7 的扩增片段均未表现出多态, 在获得的大小为 255 bp 的引物 4 扩增片段中发现一个 SNP (C43T) 位点, 在各群体中表现为 3 种等位基因型 AA、BB、AB。测序结果表明第 4 外显子扩增片段的突变位于 5' 端的内含子区域, 不影响氨基酸序列。统计结果显示, 白色獭兔群体不处在哈代温伯格平衡状态 ($P < 0.05$), 其余群体则均处于平衡状态。闽西南黑兔群体表现出中度多态 ($0.5 > PIC > 0.25$), 其余群体为低度多态。

关键词: 家兔; MITF; 毛色; 多态性; PCR-SSCP

中图分类号: S829.1 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286 (2012) 03-0575-05

PCR-SSCP Polymorphism of Parts of Exons in MITF Gene in Rabbit

HE Meng-jie^{1,2}, LI Ting^{1,2}, WANG Xiao-ming^{1,2}, PAN Yu-lai³, WU Xin sheng^{1,2*}

(1.Key Laboratory of Animal Heredity Breeding and Molecular Designing, Jiangsu Province, Yangzhou 225009, China; 2.College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China; 3. Jinling Rabbit Farm, Jiangsu Province, Jiangning 211103, China)

Abstract: Microphthalmia-Associated Transcription Factor plays an important role in the growth of pigment cells, which affects the furry colors by controlling the expression of tyrosinase gene family, and participating the regulation of melanin producing. In this study, the polymorphism five exons and parts of introns of MITF gene were detected by PCR-SSCP in three rabbit populations include White Rex rabbit, Chinchilla Rex rabbit and Minxinan Black rabbit. The results indicated that the primers 1, 2, 5 and 7 did not display polymorphism, and a 255 bp polymorphism segment was obtained by primer 4. The polymorphism of the segment obtained by primer 4 was controlled by A and B alleles and formed three genotypes, namely AA, BB, AB. The result of cloning and sequencing showed that there was one single nucleotide mutation (C/T) at 43bp in 5' end of the extended segment, and it did not change the encoding amino acid. Statistical results showed that the MITF gene SSCP sites in White rabbit population was at Hardy-Weinberg disequilibrium ($P < 0.05$), the other populations' were at Hardy-Weinberg equilibrium. PIC of Minxinan Black rabbit population was of medium polymorphism ($0.5 > PIC > 0.25$), others were of low polymorphism.

Key words: rabbit; Microphthalmia-Associated Transcription Factor (MITF); hair color; polymorphism; PCR-SSCP

收稿日期: 2011-11-25 修回日期: 2012-04-02

基金项目: 国家现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-44-1)

作者简介: 何孟颀(1987—), 男, 硕士生, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究, E-mail: flysky.cn@163.com; *通讯作者: 吴信生, 教授, E-mail: xswu@yzu.edu.cn.

动物毛色的形成主要是由毛囊黑色素细胞产生的真黑素和褐黑素之间的转换形成的^[1], 研究发现 MITF (Microphthalmia- Associated Transcription Factor, MITF) 参与了多种细胞包括色素细胞、肥大细胞、破骨细胞的发育、分化和功能调节, 尤其在色素细胞中起关键作用^[2]。MITF 是小眼畸形相关转录因子, 它具有基本-螺旋-环-螺旋-亮氨酸拉链 (basic-Helix-Loop-Helix-Leucine Zipper, bHLHZip) 结构。小鼠 MITF 基因定位于第 6 号染色体, 该基因的结构基因由 9 个外显子构成, 编码的蛋白称 MITF 蛋白, MITF 蛋白由 419 个氨基酸残基构成, 其中包含 1 个 bHLHZip 结构, 该结构为蛋白质功能区^[3]。MITF 可调控酪氨酸酶基因家族的表达, 从而参与黑素生成的调控^[4]。酪氨酸酶基因家族的 3 个成员: 酪氨酸酶 (TYR)、酪氨酸酶相关蛋白-1 (TYRP-1)、酪氨酸酶相关蛋白-2 (TYRP-2) 基因的启动子都含有一个 “Mbox” 的结构, Mbox 的核心结构为 “CATGTG”, MITF 可以与该结构结合, 从而反式激活相应的基因表达^[5]。MITF 通过与酪氨酸酶基因家族启动子作用, 一方面指导酪氨酸酶基因在黑素细胞中特异性表达, 另一方面参与外界刺激对黑素细胞黑素的调控^[5]。黑素主要分为表现为黑、棕色的真黑素和表现为红、黄色的褐黑素, 皮肤褐/真黑素比例的不同决定不同的皮肤类型。真黑素/褐黑素的比例主要受 α -MSH 和 ASP 调控。 α -MSH/MC-1 信号刺激真黑素的生成, 而 ASP 信号刺激褐黑素的生成^[6]。研究发现 ASP 能抑制 α -MSH、毛喉素诱导的真黑素生成, 在该过程中酪氨酸酶、TRP-1、TRP-2 表达下调。进一步研究表明, α -MSH 诱导的 MITF 基因的表达以及 MITF 与酪氨酸酶基因启动子 Mbox 的结合能够被 ASIP 抑制, 从而导致酪氨酸酶表达下调, 最终真黑素生成减少^[7]。

目前关于 MITF 基因在家兔毛色形成方面的研究较少, 本试验的目的是通过 PCR-SSCP 方法寻找 MITF 基因部分序列中的碱基突变位点, 分析 MITF 基因在不同家兔群体中的多态性, 探索 MITF 基因与家兔毛色变化之间可能存在的相关性, 为家兔皮、毛生产中的毛色选种选育提供一定的参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验兔 101 只白色獭兔、143 只海狸色獭兔样本均来自浙江余姚兔场, 60 只闽西南黑兔样本来自福建省农业科学院, 对这些样本进行耳缘静脉采血, 抗凝处理后用于提取 DNA。

1.1.2 主要试剂 TE 缓冲液 (pH 8.0); 10×TNE; 10% SDS; 20 mg/mL 蛋白酶 K; 10×TBE; 30% 丙烯酰胺贮存液 (49:1); 10% 过硫酸铵 (AP)。

1.1.3 引物设计与合成 根据小鼠的 MITF 基因编码区序列, 在 GenBank 数据库中 Blast 得到兔的相应 MITF 基因编码区序列, 采用软件 Prime5.0 设计引物 (表 1), 并使用 Oligo6.0 进行引物检测。设计引物由上海生工生物试剂公司合成。

表 1 PCR 扩增的引物序列
Tab.1 Primers sequences of PCR amplification

引物名称 Primer	扩增位置 Amplified position	引物序列 Primer sequences	预扩增片段长度 / bp Amplified length	退火温度/℃ Annealing temperature
引物 1 Primer 1	第 1 外显子	F: 5' -CAGGGCTGCTGTGATAAAG-3' R: 5' -CAGACGCCAAACAGGAATA-3'	217	60
引物 2 Primer 2	第 2 外显子	F: 5' -ACTGTCTTCTTTCCCTCCG-3' R: 5' -GCGTAGTGTAAGAAAACAGGAG-3'	304	60
引物 4 Primer 4	第 4 外显子	F: 5' -TGGATAAGAAAGGACTGTGGAT-3' R: 5' -GAAAGTTCAGGAACAAGGGAGA-3'	255	61
引物 5 Primer 5	第 5 外显子	F: 5' -GTATCTGTGAGTGGGTGAA-3' R: 5' -GAGGCATATTTGCTATCTGT-3'	301	60
引物 7 Primer 7	第 7 外显子	F: 5' -TGTTACTAATAGCCCTTCC-3' R: 5' -GGACACTTCTTTACCCTAG-3'	221	60

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 提取 采用常规的氯仿-苯酚法提取基因组 DNA, 溶于 TE 中, 采用 NanoDrop ND-1000 测定仪测定 DNA 浓度, 并取部分 DNA 稀释至 100 ng/μL, 4 °C 保存备用。

1.2.2 PCR 扩增 PCR 反应体系为 DNA 模板 1 μL, 10×PCR Buffer (Mg²⁺ Plus) 2 μL, dNTPs (2.5 mmol/L) 2.0 μL, 上下游引物各 1 μL, Taq 酶 (5 U/μL) 0.2 μL, 加超纯水至总体积为 20 μL。PCR 反应程序为: 95 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 40 s, 适宜温度退火 40 s, 72 °C 延伸 40 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。

1.2.3 SSCP 分析 20 μL PCR 产物中加入 7 μL 上样缓冲液混匀, 98 °C 变性 15 min, 立即冰浴 10 min。点样 10 μL 于 PAGE 胶, 130 V 电泳 13~15 h。电泳后, 银染显色, 根据其多态性进行分型。

1.2.4 测序 对具有单核苷酸多态性的 PCR 扩增片段送至上海生工生物试剂公司进行双向测序。

1.2.5 数据分析 利用 AlignIR V2.0 和 Chromas 软件进行 DNA 序列比对, 分别统计基因频率、基因型频率, 并计算期望杂合度 (He), 公式为:

$$He = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2 \quad (1)$$

(1)式中: He 代表某一位点的杂合度, n 是该位点的等位基因数, P_i 是该位点上第 i 个等位基因频率; 根据 Botstein 等^[8]提出的公式, 计算得到多态信息含量 (polymorphism information content, PIC), 以度量群体多态程度。

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2P_i^2 P_j^2 \quad (2)$$

(2)式中, n 为等位基因数目; P_i 和 P_j 分别为第 i 个和第 j 个等位基因在群体中的基因频率)。应用 SPSS 13.0 对多态位点的基因型频率分布进行 Hardy-Weinberg 平衡检验。

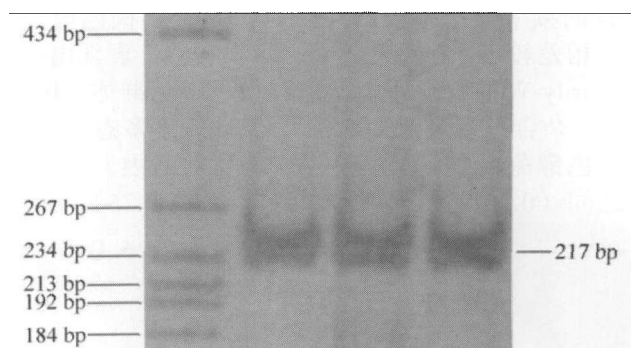
2 结果与分析

2.1 各外显子产物的扩增

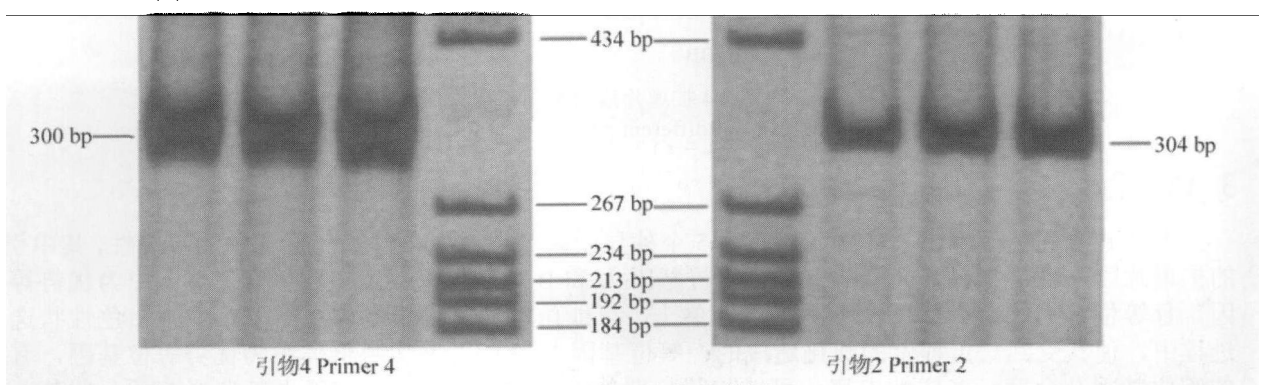
用 10 g/L 中性聚丙烯酰胺凝胶检测所获得的各种引物扩增产物片段大小 (图 1、2、3) 与预期结果基本一致, 且特异性较好, 说明所设计引物均可用于进行下一步不同家兔群体遗传多样性的分析。

2.2 PCR-SSCP 结果

通过 SSCP 分析, MITF 基因的引物 1、2、5、7 扩增片段经变性反应后, 在 10 g/L 中性聚丙烯酰胺凝胶 (Act/Bis 为 49:1), 电泳后只出现一种带型, 而引物 4 的扩增片段有 3 种带型, 分别记为 AA、AB、BB (图 4)。



引物1 Primer 1
图1 引物1产物扩增图
Fig.1 PCR product of primer 1



引物2、引物4产物扩增图
图2 PCR product of primer 2 and primer 4

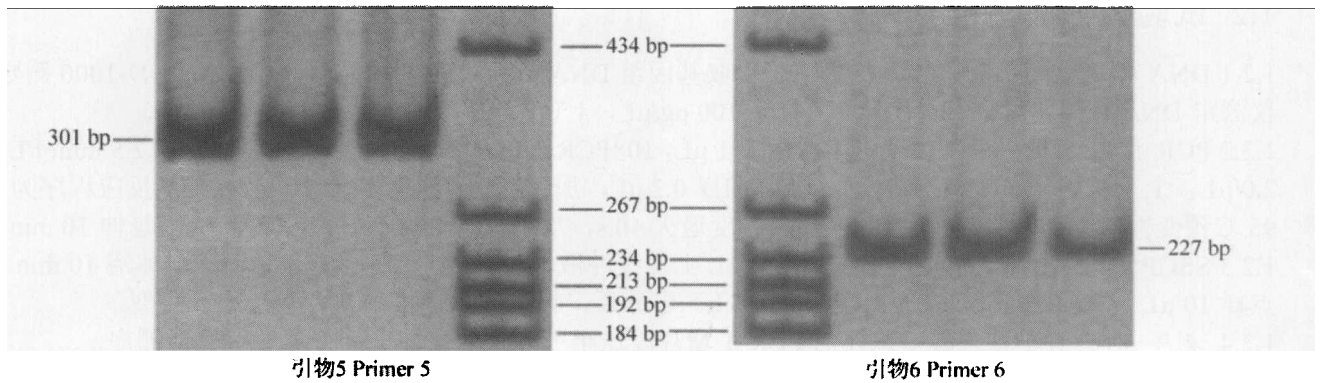


图 3 引物 5、引物 7 产物扩增图
Fig.3 PCR product of primer 5 and primer 7

2.3 测序结果

部分样品的引物 4 扩增片段 SSCP 多态性测序结果如图 5 所示，并标出了差异位点。在该引物扩增片段中，B 等位基因与 A 等位基因相比，存在第 43 位点的 C→T 碱基突变，该突变位于第 4 外显子 5'端的非编码区。

2.4 不同家兔群体引物 4 扩增片段突变位点的遗传特性

从遗传特性的数据中可发现，3 个群体的等位基因 A 的频率分别为 0.45、0.846、0.965，等位基因 B 的频率分别为 0.55、0.154、0.035。闽西南黑兔群体 (FB) 中 BB 为优势基因型，A、B 等位基因频率相差较小，杂合程度最高 (0.495)，表现出中度多态 ($0.5 > PIC > 0.25$)， X^2 检验结果表明该群体处于 Hardy-Weinberg 平衡状态；白色獭兔群体 (BT) 中 AA 为优势基因型，A、B 两等位基因频率差异最大，杂合程度最低 (0.068)，表现低度多态 ($PIC < 0.25$)，不处于 Hardy-Weinberg 平衡状态 ($P < 0.05$)；海狸色獭兔群体 (HL) 中 AA 为优势基因型，两等位基因频率差异较大，杂合程度则介于以上 2 个群体之间 (0.261)，表现低度多态 ($PIC < 0.25$)，并且群体处于 Hardy-Weinberg 平衡状态。

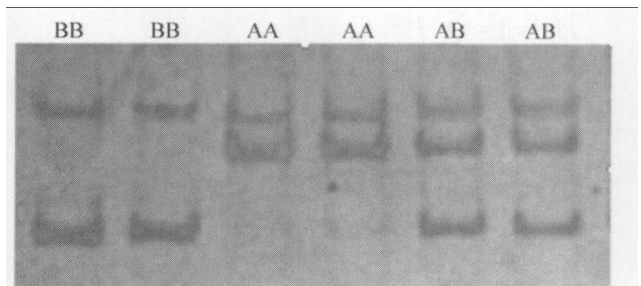


图 4 引物 4 扩增片段的 PCR-SSCP
Fig.4 PCR-SSCP PAGE electrophoresis patterns of the segment obtained by primer 4

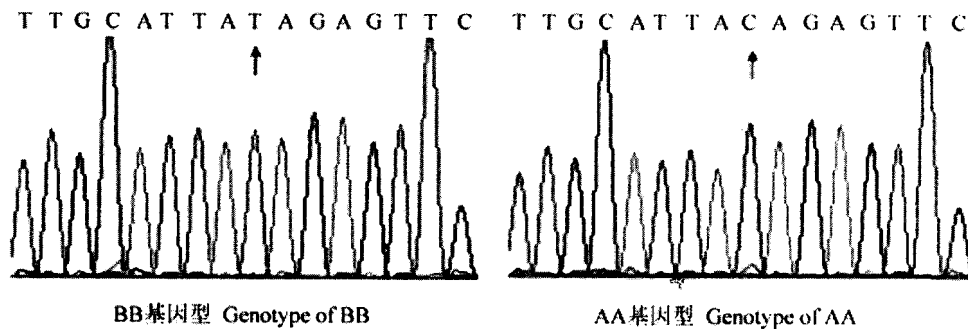


图 5 引物 4 扩增片段的不同基因型测序结果
Fig.5 The sequencing result of different genotypes at the segment obtained by primer 4

3 讨论

本试验研究了毛色相关基因 MITF 的 5 个外显子区域在 3 个不同家兔群体中的多态性，其中引物 4 的扩增片段发现了 3 种基因型，有 2 个等位基因 A 和 B。等位基因 A 在白色獭兔群体中为优势等位基因，且等位基因的杂合度低，基因多态性单一，可能由于养殖场根据生产需要，加强白色性状选育的过程中，使其受到一定程度的纯化造成的；等位基因 B 在闽西南黑兔群体中为优势等位基因，有较高的等位基因杂合度，多样性丰富，可能与其长期处于野生生存环境，未经人工选择有关。此外，在采样过程中观察到海狸色獭兔和闽西南黑兔这两个群体的个体间毛色变化程度也相对较高，也与试验所得数据反映的趋势基本一致。

表2 不同群体中引物4扩增片段突变位点的遗传特性

Tab. 2 The characteristic of the mutation in the segment obtained by primer 4 loci in different rabbit populations

群体 Populations	样本数 Samples	基因型频率 Genotype frequency			基因频率 Allele frequency		<i>He</i>	<i>PIC</i>	X^2 Value
		AA	AB	BB	A	B			
FB	60	0.250 (15)	0.400 (24)	0.350 (21)	0.450	0.550	0.495	0.372	2.210
HL	143	0.720 (103)	0.252 (36)	0.028 (4)	0.846	0.154	0.261	0.227	0.156
BT	101	0.940 (95)	0.050 (5)	0.010 (1)	0.965	0.035	0.068	0.065	6.831

表中 FB 为闽西南黑兔, HL 为海狸色獭兔, BT 为白色獭兔。

FB present Minxinan Black rabbits, HL present Beaver Rex rabbits, BT present White Rex rabbits.

此外, 对阿帕卢萨马的研究^[9]表明了 MITF 与 MGF 基因是造成阿帕卢萨马皮毛斑点形成的原因。阿帕卢萨马的毛色是表现为花色或呈斑纹状的白色马, 在蹄部和鼻镜部表现不同色素颜色的, 这可能是由 MITF 基因发生突变而导致的色素沉积不全^[9]。以上试验结果和相关研究结论均提示 MITF 基因可能和毛色的变化有一定的关联。

虽然检测到的碱基突变发生在第四外显子 5' 端的内含子区域, 不影响转录结果, 但目前已有文献报导, 5' 和 3' 端非编码区的突变、同义突变虽不改变编码的氨基酸, 但因为改变了核苷酸序列, 有可能影响涉及转录后加工, 影响切接信号顺序, 影响启动子区重要碱基等, 改变 mRNA 的构象、降低 mRNA 的稳定性等^[8,10-11], 最后都可能影响基因的表达。

由于哺乳动物的毛色形成与变化是复杂的多基因共同参与调节的结果, 单从一个基因的变化角度是很难阐明其规律与机制的, 所以根据本实验的结果, 只能推测 MITF 基因与家兔毛色的变化存在一定的关联, 此次发现的内含子序列突变可能与该基因对毛色性状的调控有一定相关, 其具体的影响机制有待进一步的研究来阐明。

参考文献:

- [1] Abdel-Malek Z, Swope V B, Suzuki I, et al. Mitogenic and melanogenic stimulation of normal human melanocytes by melanotropic peptides [J]. Proc Nat Acad Sci USA, 1995, 92 (5): 1789-1793.
- [2] Moore K J, Insight into the microphthalmia gene [J]. Trends Genet, 1995, 11: 442-448.
- [3] Hodgkinson C A, Moore K J, Nakayama A, et al. Mutations at the mouse microphthalmia locus are associated with defects in a gene encoding a novel basic-helix-loop-helix-zipper protein [J]. Cell, 1993, 74(2): 395-404.
- [4] Yasumoto K, Udono T, Shibahara S, et al. A big gene linked to small eyes encodes multiple mitf isoforms: many promoters make light work [J]. Pigment Cell Res, 1998, 11(6): 329-336.
- [5] 刘栋, 朱文元. MITF 与黑素细胞的发育、分化和功能调节 [J]. 细胞生物学杂志, 2002, 10: 346-351.
- [6] Furumura M, Sakai C, Abdel-Malek Z, et al. The interaction of agouti signal protein and melanocyte stimulating hormone to regulate melanin formation in mammals [J]. Pigment Cell Res, 1996, 9: 191-203.
- [7] Aberdam E, Bertolotto C, Sviderskaya E V, et al. Involvement of microphthalmia in the inhibition of melanocyte lineage differentiation and of melanogenesis by agouti signal protein [J]. J Biol Chem, 1998, 273(31): 19560-19565.
- [8] Kimchi-Sarfaty C, Oh J M, Kim I W, et al. A "Silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity [J]. Science, 2007, 315 (5811): 525-528.
- [9] 白瑞, 张美萍, 乔德瑞, 等. MITF 基因与动物毛色的研究进展 [J]. 上海畜牧兽医通讯, 2006(4): 2-3.
- [10] Duan J, Wainwright M S, Comeron J M, et al. Synonymous mutations in the human dopamine receptor D2 (DRD2) affect mRNA stability and synthesis of the receptor [J]. Human Molecular Genetics, 2003, 12(3): 205-216.
- [11] Chamary J V, Parmley J L, Hurst L D. Hearing silence: nonneutral evolution at synonymous sites in mammals [J]. Nature Reviews Genetics, 2006(2): 98-108.