鸡*MC4R*基因的SNPs及其与屠体性状的相关研究*

仇雪梅[①②] 李 宁[①**] 邓学梅[③] 赵兴波[③] 孟庆勇[①] 王秀利[②]

(① 中国农业大学农业生物技术国家重点实验室, 北京 100094; ② 大连水产学院生命科学与技术学院, 大连 116023; ③ 中国农业大学动物科技学院, 北京 100094)

摘要 黑素皮质素受体(MC4R, melanocortin-4 receptor)基因的突变与猪、鼠和人等的食欲、肥胖、生长等性状有关, 而鸡*MC4R*基因的功能却知之甚少. 利用PCR-SSCP(single strand conformation polymorphism)和DNA测序的方法, 对资源家系F_2代鸡群*MC4R*基因多态性进行了分析, 发现存在4个单核苷酸多态(SNPs, single nucleotide polymorphisms)位点. 其中, 在*MC4R*基因 5′调控区−524 nt发生了碱基的转换突变(C→T), 导致突变型基因比野生型基因多了一个NF-E2和一个cap转录因子结合位点; 在MC4R编码区(61 nt)发生了碱基的错义突变(G→A), 导致此处蛋白质的氨基酸由甘氨酸变为精氨酸; 在*MC4R*编码区315和336 nt发生了碱基的颠换突变(G→T)和转换突变(C→T), 这两个突变为同义突变. 通过最小二乘分析SNPs与屠体性状的关系, 结果是突变的BB, DD和FF等基因型与鸡的体重、全净膛重(或半净膛重)、腿肉重等存在显著(P<0.05)或极显著(P<0.01)的关系, 但与腹脂重不显著. 结果表明, *MC4R*基因可以作为影响和控制鸡体重、生长等屠体性状的主要候选基因.

关键词 黑素皮质素受体4 SNPs 鸡 屠体性状

黑素皮质素受体4(MC4R, melanocortin-4 receptor)是下丘脑腹内侧核(VMH)分泌的一类肽类物质[1], 为黑素皮质素家族5个成员之一. MC4R属于G-蛋白耦联受体(GPCRS, G-protein coupled receptors)超级家族, 为跨膜神经受体[2,3]. MC4R可与脑部分泌的天然内源配体α-促黑激素(α-MSH, alpha melanocyte-stimulating hormone)结合, 抑制体重的增加[4]. 在哺乳动物中, MC4R具有介导Leptin蛋白的功能, 是一个调节能量平衡与能量动态平衡的重要的信号分子[2], 其主要作用是控制食欲、体重、能量代谢[5,6]. Dubern等人[7]对

收稿日期: 2005-06-13; 接受日期: 2005-12-05

* 国家自然科学基金创新群体基金和国家重点基础研究发展规划项目(973)(批准号: G20000161)资助

** 联系人, E-mail: ninglbau@public3.bta.net.cn

63 位肥胖儿童的*MC4R*克隆序列直接测序，并对AGRP(agouti-related protein) 和 α-MSH 进行 PCR-RFLP和PCR-SSCP分析的方法来评测，说明肥胖基因的表达在个体的突变位点是可变的，且得出结论“*MC4R*突变可引起儿童肥胖”. 瑞典学者Rosmond等人[8]对人*MC4R*的一个错义突变的研究发现，*MC4R*基因的错义突变对腹脂分配、Leptin和唾液皮质醇浓度变化有作用，提出了*MC4R*控制食欲和能量消耗是由于基因问题使*MC4R*失活，从而导致肥胖. Huszar等人[9]用敲除*MC4R*基因的方法，发现小鼠出现多食肥胖. Kim等人[10]研究猪的*MC4R*基因的错义突变，一个氨基酸改变编码的错义突变，发现可引起膘厚、体重和采食量显著变化.

鸡的*MC4R*基因是一个单拷贝基因，仅含有一个外显子，其编码序列长度为 996 bp，编码 332 个氨基酸，与人和鼠的*MC4R*基因有 86.4%~88.1%同源性，在肾上腺、性腺、脾、脂肪和脑等组织表达[11]. 哺乳动物的*MC4R*基因研究文献较多[12~18]，而鸡*MC4R*基因的主要功能未见有详细的报道. 根据鸡的生长发育和生理生化特点及*MC4R*基因的表达，可以将*MC4R*基因作为鸡生长和肉质性状候选基因进行深入的研究[19,20]. 因此，利用中国农业大学的鸡的资源家系做了*MC4R*基因的单核苷酸多态(SNPs, single nucleotide polymorphisms)，并对其与鸡生长和屠体性状进行研究，为了解*MC4R*基因的功能及其对鸡的分子育种提供理论基础.

1 材料和方法

1.1 材料

(1) 实验动物：以明星肉鸡和丝毛乌骨鸡构建资源家系产生的F_2代为实验素材，其中肉鸡做父本为正交系，乌骨鸡做父本为反交系，正反交各 4 个家系共 730 只鸡做为实验材料.

(2) 主要试剂、仪器：*Taq* DNA聚合酶和蛋白酶K购自默克公司(MERCK Co.)；10×PCR缓冲液(500 mmol/L KCl, 100 mmol/L Tris-HCl, 15 mmol/L $MgCl_2$, 1%明胶)、dNTPs购自Amersham Pharmacia 公司；PCR产物回收试剂盒(GeneClean Ⅲ kit)购自Qbiogene公司. 还有一些常规试剂购自中国农业大学供应科. 实验中使用仪器主要包括Gene Amp PCR System 9700(PERKIN ELMER)，DYY-III2 稳压电泳仪(北京六一仪器厂)和ABI 377 DNA sequencer (PERKIN ELMER)等.

(3) 引物的设计与合成：根据 GenBank 中鸡*MC4R*(登录号：AB012211)基因的序列，采用 Oligo primer(6.0 版)软件设计 11 对引物，引物由上海生工生物公司合成. 这 11 对引物的序列、位置及其 PCR 产物大小见表 1.

1.2 方法

(1) 样品采集和屠体性能测定：资源家系F_2代 12 周龄时翅静脉采血，用草酸盐抗凝，–20℃保存；之后屠宰和分割，称量活体重(g)、胸肌重(g)、腿肌重(g)、半净膛重(g)、全净膛重(g)和腹脂重(g)等，并计算出相应的产率. 屠体性能测定的具体方法和步骤按王启贵等人[21]的报道进行.

(2) DNA提取：从冰箱中取出冻血，室温放置至融化后，用常规的酚/氯仿抽提制备鸡基因组DNA[22]，然后把DNA样品溶于灭菌水，浓度在 100 ng/μL，–20℃冻存备用.

(3) PCR 扩增：PCR 扩增反应体系均为 25 μL，其中 10×PCR 缓冲液 2.5 μL，dNTPs 2 μL，上游引物和下游引物各 25 pmol，*Taq* 酶 1.5 U，模板 DNA 约 50 ng. PCR 反应条件为：预变性 94℃ 5 min 后；进入如下循环：94℃，30 s，56℃，30 s，72℃，30s；30 个循环后，72℃延伸 7 min. PCR 产物在 2.5%琼脂糖凝胶中电泳，检测 PCR 产物的质量，决定下一步在 SSCP 中的用量.

(4) SSCP 分析和克隆测序：1 μL 的 PCR 产物和 5 μL 的上样缓冲液(98%甲酰胺，0.025%溴酚蓝，0.025%二甲苯 FF, 10 mmol/L EDTA(pH 8.0), 2%甘油)于 98℃变性 10 min 后，迅速放于冰上；冰浴 10 min，保持变性状态，变性后的 PCR 产物进行非变性聚丙烯酰胺凝胶(PAGE 30%, Acr∶Bis=29∶1)电泳；10 V/cm 电泳 14~16 h 后，银染显色. 对SSCP分析后的纯合基因型个体，各取3个个体的PCR扩增产物进行回收纯化，经 PCR 扩增产物测序反应后，在 ABI 377 测序仪上进行测序.

表 1　*MC4R* 基因的因物序列

引物名称	引物序列	位置/bp	PCR 产物大小/bp
P1	Forward Primer: 5′-AAGCTTGCGCACATCCAAGT-3′ Reverse Primer: 5′-GCTGCCGAGCAGAAACTAAT-3′	−608~−377	232
P2	Forward Primer: 5′-GCAGCAGTCACTTGAGCATT-3′ Reverse Primer: 5′-GCGCTCTCAAAGATGCAGAT-3′	−380~−180	201
P3	Forward Primer: 5′-CTTTGAGAGCGCAAACCAGT-3′ Reverse Primer: 5′-TGCTGGGTGAAATTCATCTT-3′	−191~18	210
P4	Forward Primer: 5′-CTCCAGCCTCTCCATTTCTG-3′ Reverse Primer: 5′-GCGAATGGAGGTTCTTGTTC-3′	28~229	202
P5	Forward Primer: 5′-GCCAAGAACAAGAACCTCCA-3′ Reverse Primer: 5'-AATTGATGCAAGCAGGGAAC-3'	205~408	204
P6	Forward Primer: 5′-AGTTCCCTGCTTGCATCAAT-3′ Reverse Primer: 5′-CAGATGATGACAACGCTGCT-3′	388~584	197
P7	Forward Primer: 5′-CATTCTCATGGCATCCCTTT-3′ Reverse Primer: 5′-GGATTGTAGGGGCAGGAGAT-3′	612~821	210
P8	Forward Primer: 5′-AGGGGCCATCACTCTCACTA-3′ Reverse Primer: 5′-GAGCTCCTGACTCCGAAATG-3′	723~924	202
P9	Forward Primer: 5′-GGAGTCAGGAGCTCAGGAAA-3′ Reverse Primer: 5′-GGAGGGAAGGGAAAGAGAAA-3′	911~1116	206
P10	Forward Primer: 5′-CCTTCCCTCCCATCTTTGTA-3′ Reverse Primer: 5′-TGCACTGTAACTCAGGCAAGTT-3′	1107~1337	231
P11	Forward Primer: 5′-TGCATATTGGTTGATAATGTTCC-3′ Reverse Primer: 5′-CAGGATTGCTGCTGTTTGAG-3′	1334~1546	213

(5) *MC4R* 基因的 5′ 调控区潜在的调控元件及蛋白结合位点的预测: 在网站 http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html 上利用 TFSEARCH(1.3 版)软件进行在线分析.

(6) 屠体性状及其与 SNP 的生物统计分析: 序列分析采用 DNAMAN 软件, 之后根据 SSCP 得到的 SNPs 划分基因型. 将 GenBank 上的鸡 *MC4R* 基因序列定为野生型基因型, 突变个体的基因型为突变型基因型. 根据所检测群体的数据结构, 利用 SAS(8.2 版)统计软件包的 PROC-GLM 对所发现的突变位点与鸡的生长和屠体性状进行统计分析. 统计分析模型: $y=\mu+j+s+r+e$, 其中 y 为生产性能观察值, μ 为生产性能的最小二乘均值, j 为基因型对生产性能的效应值, s 为性别对生产性能的效应值, r 为正反交对生产性能的效应值, e 为随机残差效应.

2　结果

2.1　PCR-SSCP 的结果与分析

本研究设计了 11 对引物, 对资源家系F_2鸡群的 *MC4R*基因共 2224 个碱基全序列进行了PCR扩增. 通过对相应的 11 个片段的PCR产物进行SSCP分析, 发现有 3 对引物的PCR产物存在多态. 这 3 对引物分别是P1, P4 和P5, 其PCR-SSCP结果如下:

利用引物 P1 对鸡的 *MC4R* 基因 5′调控区进行 PCR 扩增, 得到了 232 bp 的目的片段. 对该片段的 PCR 产物进行 SSCP, 发现存在多态性(图 1(a)), AA 为野生型基因型, BB 为突变型基因型, AB 为杂合基因型. 引物 P4 的 PCR-SSCP 结果见图 1(b), CC 基因型为与 GenBank 中的序列(登录号: AB012211)一致, DD 为突变基因型. 同样 EE 基因型和 FF 基因型为引物 P5 的 PCR-SSCP 结果(图 1(c)).

2.2　多态性片段的克隆和测序结果

对上述存在SNP的3对引物每一种纯合基因型个体的PCR产物至少进行 3 次测序, 然后将F_2鸡群中测得的含突变位点的序列与GenBank的*MC4R*基因已知序列(登录号: AB012211)进行同源性比较, 发现共存在 4 个点突变. 这 4 个点突变的位置、其碱基变化及其相应的氨基酸变化, 以及不同基因型的碱基序列见表 2. 本文规定*MC4R*基因编码区的第 1 个碱基为+1, 沿编码区方向顺流而下均用正值表示, 溯流而上的调控区部分均用负值表示. 由表 2 可知, 第 1 对引物P1 扩增的PCR产物中存在多态, 即−524

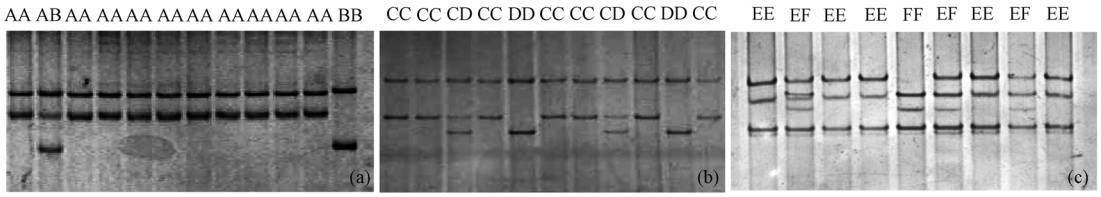

图 1 不同引物的 SSCP 电泳图

(a) 引物 P1 的 SSCP 分析; (b) 引物 P4 的 SSCP 分析; (c) 引物 P5 的 SSCP 分析

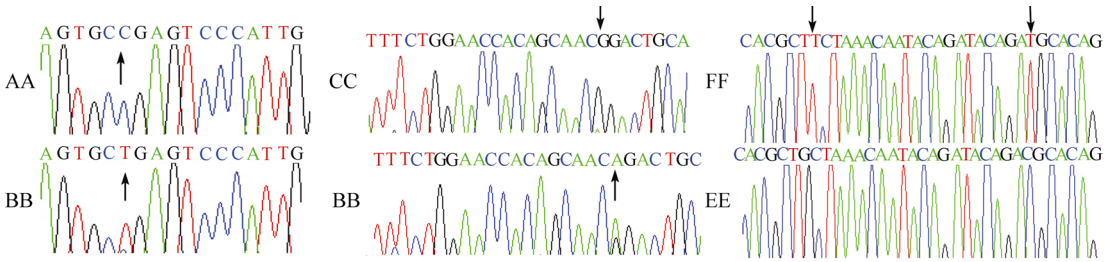

图 2 不同基因型的部分序列测序结果

表 2 不同基因型的序列比对结果

基因型	碱基序列 (5′→3′)	突变位置	碱基变化	氨基酸变化[a)]
GenBank	ACTTTCTGCA GTGCCGAGTC CCATTGGCTG			
AA	ACTTTCTGCA GTGCCGAGTC CCATTGGCTG			
BB	ACTTTCTGCA GTGC***T***GAGTC CCATTGGCTG	−524	C→T	
GenBank	TTCTGGAACC AGAGCAACGG ACTGCACAGG			
CC	TTCTGGAACC AGAGCAACGG ACTGCACAGG			
DD	TTCTGGAACC AGAGCAAC***A***G ACTGCACAGG	61	G→A	G21R
GenBank	CTGCTAAACA ATACAGATAC AGACGCACAG			
EE	CTGCTAAACA ATACAGATAC AGACGCACAG			
FF	CT***T***CTAAACA ATACAGATAC AGA***T***GCACAG	315, 336	G→T; C→T	L105L; D112D

a) G 示甘氨酸(Gly); R 示精氨酸(Arg); L 示亮氨酸(Leu); D 示天冬氨酸(Asp)

位发生了 C→T 的转换突变; 引物 P4 扩增的 PCR 产物中存在多态是在 61 位发生了 G→A 的转换突变, 该突变为一错义突变, 使相应的第 21 位的甘氨酸 G(Gly)变为精氨酸 R(Arg); 第 5 对引物 P5 扩增的 PCR 产物中存在 2 处碱基的改变, 即在第 315 位和第 336 位发生了 G→T 和 C→T 的突变, 这两个突变为同义突变. 不同基因型的部分测序峰图见图 2.

2.3 *MC4R* 基因 5′ 调控区潜在的调控元件及蛋白结合位点的预测分析

通过网站 http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html 上的 TFSEARCH(1.3 版)软件, 对鸡 *MC4R* 基因 5′ 调控区(–608~–1)潜在的调控元件及蛋白结合位点进行了预测. 结果显示, 突变基因型 BB 比野生型的 AA 基因型多了一个 NF-E2 蛋白结合位点和一个 cap 转录因子. *MC4R* 基因 5′调控区上的调控元件及蛋白结合位点预测结果见表 3.

2.4 *MC4R* 基因的不同基因型与鸡屠体性状的最小二乘分析

本研究采用最小二乘分析方法对 *MC4R* 基因 5′ 调控区和编码区上的 3 个多态的不同基因型与鸡屠体性状进行了统计分析.

对资源家系F_2代个体的屠体性状与*MC4R* 5′调控区的不同基因型进行的的最小二乘分析结果见表 4. 结果表明, 由鸡*MC4R*基因 5′ 调控区的的突变所产生的 3 种基因型中, BB基因型个体的体重、半净膛重和腿肉重显著高于AA基因型和AB基因型个体(P<0.05); 在胸肉重和腹脂重两个性状上, 上述 3 种基因型个体间的差异不显著(P>0.05).

表 3　转录因子与 *MC4R* 基因 5′调控区结合方式的预测结果

AA 基因型的位点	BB 基因型的位点
HSF	HSF
HSF	HSF
HSF	HSF
HSF	HSF
ADR1	NF-E2
CCAAT	ADR1
cap	cap
GATA-1	CCAAT
NF-1	cap
cap	GATA-1
cap	NF-1
CdxA	cap
STRE	cap
NF-Y	CdxA
cap	STRE
	NF-Y
	cap

资源家系F_2代个体的*MC4R*引物P4 的不同基因型与鸡屠体性状的最小二乘分析结果见表 5. DD基因型个体的体重、半净膛重显著高于CC因型个体的体重、半净膛重($P<0.05$), 并且标准误较大. 而在胸肉重、腿肉重和腹脂重等 3 个性状上, 上述 3 种基因型个体间的差异不显著($P>0.05$).

同样利用最小二乘分析法对 *MC4R* 基因引物P5 的不同基因型与鸡屠体性状进行了统计分析. 结果(见表 6)表明, FF 基因型个体的体重、全净膛重、胸肉重、腿肉重显著高于 EE 基因型个体的体重、全净膛重、胸肉重、腿肉重($P<0.05$), 但在腹脂重上 3 种基因型个体间的差异不显著($P>0.05$).

3　讨论

本研究根据哺乳动物*MC4R*基因具有控制食欲、体重、能量代谢和肥胖等功能[7~13], 开展鸡*MC4R*基因对生长和屠体性能影响的相关研究. 通过对鸡*MC4R*整个基因的PCR-SSCP分析, 发现存在 4 个具有生物学意义的SNPs, 一个是在 5′调控区, 另 3 个是编码区.

*MC4R*基因的 5′调控区是基因功能调控区. 调控序列DNA是关于基因选择性表达的信息, 可能与调控蛋白质相互作用而修饰自己的双螺旋空间结构, 以便更好地为调控蛋白质所识别. 本研究检测到的该基因 5′调控区的C→T的转换突变, 导致此处多了一个NF-E2 蛋白结合位点和一个转录启始因子cap信号. 因此, BB基因型转录因子和蛋白结合位点的增加及其位置的改变可能会影响*MC4R*基因的表达量[23,24], 从而使MC4R的量有所差异, 进而影响生长和屠体性能. 最小二乘分析证实该基因 5′端调控区的BB基因型与鸡体重、半净膛重和腿肉重等性状之间存在显著的相关关系. 然而, 有关*MC4R*基因的结构、调控元件的研究很少, 其 5′调控区上碱基的改

表 4　*MC4R*基因 5′调控区的SSCP多态性与屠体性状最小二乘分析(x±SD)[a)]

基因型	个体数	体重/g	半净膛重/g	胸肉重/g	腿肉重/g	腹脂重/g
AA	195	1660.16±27.53[a]	1167.62±21.93[a]	93.28±2.30[a]	126.01±3.06[a]	45.14±2.86[a]
AB	50	1599.20±42.08[a]	1101.12±33.53[a]	91.91±3.52[a]	122.00±4.67[a]	41.84±4.37[a]
BB	18	1777.62±70.18[b]	1269.88±55.92[b]	100.68±5.86[a]	145.28±7.80[b]	49.89±7.29[a]

a) 字母相同示性状均数差异不显著($P>0.05$), 字母相异示性状均数差异显著($P<0.05$)

表 5　MC4R基因引物P4 的SSCP多态性与屠体性状最小二乘分析(x±SD)[a)]

基因型	个体数	体重/g	半净膛重/g	胸肉重/g	腿肉重/g	腹脂重/g
CC	310	1623.49±21.10[a]	1135.29±16.67[a]	91.42±1.643[a]	126.70±2.07[a]	46.58±2.13[a]
CD	260	1685.45±22.39[b]	1177.89±17.69[b]	94.09±1.74[a]	129.64±2.19[a]	45.70±2.26[a]
DD	37	1717.62±49.07[b]	1213.88±38.78[b]	93.62±3.82[a]	133.16±4.82[a]	41.68±4.96[a]

a) 字母相同示性状均数差异不显著($P>0.05$), 字母相异示性状均数差异显著($P<0.05$)

表 6　*MC4R*基因引物P5 的SSCP多态性与屠体性状最小二乘分析(x±SD)[a)]

基因型数	个体	体重/g	半净膛重/g	胸肉重/g	腿肉重/g	腹脂重/g
EE	101	1605.84±29.30[a]	1024.80±20.85[a]	89.68±2.29[a]	124.35±2.87[a]	42.70±3.03[a]
EF	247	1665.94±21.05[b]	1061.83±14.98[b]	93.10±1.64[b]	129.18±2.06[b]	47.78±2.17[a]
FF	168	1697.45±26.03[b]	1078.83±18.52[b]	96.65±2.033[b]	131.75±2.55[b]	44.78±2.69[a]

a) 字母相同示性状均数差异不显著($P>0.05$), 字母相异示性状均数差异显著($P<0.05$)

变对鸡肉用性状产生的作用机理, 目前尚不清楚, 还有待于进一步研究.

MC4R 基因编码区有 3 个突变位点. 一个是引物 P4 位于 MC4R 基因序列的 61 位的核苷酸 G→A 转换, 这个错义突变 MC4R 蛋白的甘氨酸变为精氨酸. 甘氨酸属非极性氨基酸, 精氨酸属极性氨基酸, 氨基酸的变化可能会引起蛋白活性的改变, 进而影响其功能的发挥. 利用最小二乘对 *MC4R* 基因编码区上的这个多态所产生的不同基因型与屠体性状的关系进行的分析, 结果显示 *MC4R* 基因的错义突变对鸡的生长和屠体等方面有影响. 在性状的表现上, DD 基因型的体重和半净膛重显著高于 CD 和 CC 基因型的个体的相应性状值(P<0.05). 另两个是引物 P5 的位于 *MC4R* 基因序列的 315 位点的 G→T 颠换和位于 336 位点的 C→T 转换, 这两个 SNP 没有引起氨基酸的变化, 为同义突变. 但突变基因型 FF 个体的体重、全净膛重、胸肉重、腿肉重显著高于 EE 基因型个体的(P<0.05)相应指标. 这样的数据说明突变影响了鸡的产肉量, 增加了鸡的体重. 我们对同义突变的作用效果很感兴趣, 但作用机理目前尚不清楚.

综上可知*MC4R*基因 5′ 调控区、编码区上的突变对鸡的体重、屠体性状有显著影响, 但对腹脂没有显著的影响. 这一结果和大多文献表明哺乳动物*MC4R*基因主要影响体重和肥胖[10~13]的结论不十分一致, 但或许证实了Takeuchi等人[13]的结果: 即鸡的*MC4R*基因在脑、脂肪、肾上腺和生殖腺等组织表达, 而哺乳动物*MC4R*仅在脑组织表达, 二者基因表达与调控存在着较大的差别.

本研究的结果表明, *MC4R* 基因 5′ 调控区和编码区的突变是导致鸡生长和屠体表型变异的主要原因, 最小二乘分析也证实了 *MC4R* 基因的多态性与体重、生长和屠体性状有显著的相关性. 因此, *MC4R* 基因是影响鸡生长和屠体等性状的主要候选基因, 对 *MC4R* 基因的深入研究将为蛋鸡和肉鸡的分子育种和生产奠定了理论基础.

参 考 文 献

1 Yeo G S, Farooqi I S, Challis B G, Jackon R S, O'Rahilly S. The role of melanocortin signalling in the control of body weight: Evidence from human and murine genetic models. QJM, 2000, 93(1): 7~14[DOI]

2 Andersson L. Melanocortin receptor variants with phenotypic effects in horse, pig, and chicken. Ann N Y Acad Sci, 2003, 994: 313~318

3 Xu B, Goulding E H, Zang K, Cepoi D, Cone R D, Jones K R, Tecott L H, Reichardt L F. Brain-derived neurotrophic factor regulates energy balance downstream of melanocortin-4 receptor. Nat Neurosci, 2003, 6(7): 736~742[DOI]

4 Sinha P S, Schioth H B, Tatro J B. Roles of the melanocortin-4 receptor in antipyretic and hyperthermic actions of centrally administered alpha-MSH. Brain Res, 2004, 1001(1~2): 150~158[DOI]

5 Hoggard N, Hunter L, Duncan J S, Rayner D V. Regulation of adipose tissue leptin secretion by alpha-melanocyte-stimulating hormone and agouti-related protein: Further evidence of an interaction between leptin and the melanocortin signalling system. J Mol Endocrinol, 2004, 32(1): 145~153[DOI]

6 Costa J L, Brennen M B, Hochgeschwender U. The human genetics of eating disorders lessons from the leptin/melanocortin system. Child Adolesc Psychiatr Clin N Am, 2002, 11(2): 387~397[DOI]

7 Dubern B, Clement K, Pelloux V, Froguel P, Girardet J P, Guy-Grand B, Tounian P. Mutational analysis of melanocortin-4 receptor, agouti-related protein, and alpha-melanocyte- stimulating hormone genes in severely obese children. J Pediatr, 2001, 139(2): 204~209[DOI]

8 Rosmond R, Chagnon M, Bouchard C, Bjorntorp P. A missense mutation in the human melanocortin-4 receptor gene in relation to abdominal obesity and salivary cortisol. Diabetologia, 2001, 44 (10): 1335~1338[DOI]

9 Huszar D, Lynch C A, Fairchild-Huntress V. Targeted disruption of the melanocortin-4-reeptor results in obesity in mice. Cell, 1997, 88(1) :131~141[DOI]

10 Kim K S, Larsen N, Short T, Plastow G, Rothschild M F. A missense variant of the porcine melanocortin-4 receptor (MC4R) gene is associated with fatness, growth, and feed intake traits. Mammalian genome, 2000, 11(2): 131~135[DOI]

11 Takeuchi S, Takahashi S. Melanocortin receptor genes in the chicken——Tissue distributions. Gen Comp Endocrinol, 1998, 112(2): 220~231[DOI]

12 Srinivasan S, Lubrano-Berthelier C, Govaerts C, Picard F, Santiago P, Conklin B R, Vaisse C. Constitutive activity of the melanocortin-4 receptor is maintained by its N-terminal domain and plays a role in energy homeostasis in humans. J Clin Invest, 2004, 114(8): 1158~1164 [DOI]

13 Ma L, Tataranni P A, Bogardus C, Baier L J. Melanocortin 4 re-

ceptor gene variation is associated with severe obesity in Pima Indians. Diabetes, 2004, 53(10): 2696~2699

14 Lubrano-Berthelier C, Le Stunff C, Bougneres P, Vaisse C. A homozygous null mutation delineates the role of the melanocortin-4 receptor in humans. J Clin Endocrinol Metab, 2004, 89(5): 2028~2032[DOI]

15 Starowicz K, Bilecki W, Sieja A, Przewlocka B, Przewlocki R. Melanocortin 4 receptor is expressed in the dorsal root ganglions and down-regulated in neuropathic rats. Neurosci Lett, 2004, 358(2): 79~82 [DOI]

16 Valli-Jaakola K, Lipsanen-Nyman M, Oksanen L, Hollenberg A N, Kontula K, Bjorbaek C, Schalin-Jantti C. Identification and characterization of melanocortin-4 receptor gene mutations in morbidly obese finnish children and adults. J Clin Endocrinol Metab, 2004, 89(2): 940~945 [DOI]

17 Valle E, Habermann F A, Moore S S, Crews D H, Benkel B F. Genomic localization and SNP discovery in the bovine melanocortin receptor 4 gene (MC4R). Anim Genet, 2004, 35(4): 351~352[DOI]

18 Houston R D, Cameron N D, Rance K A. A melanocortin-4 receptor (MC4R) polymorphism is associated with performance traits in divergently selected Large White pig populations. Anim Genet, 2004, 35(5): 386~390 [DOI]

19 仇雪梅, 李　宁, 邓学梅, 吴常信. 影响动物肉质性状主要候选基因的研究进展. 遗传, 2002, 24(5): 571~574

20 仇雪梅, 李　宁, 吴常信, 王秀利. 用放射杂交板定位鸡的 MC4R 基因及其在鸡和人染色体上同源区的比较分析.遗传学报, 2004, 31(12): 1356~1360

21 王启贵, 李　宁, 邓学梅, 连正兴, 李　辉, 吴常信. 鸡细胞外脂肪酸结合蛋白基因单核甘酸多态性与腹脂性状关系的研究. 中国科学, C 辑, 2001, 31(3): 266~270

22 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T, Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989

23 Doevendans P A, van Bilsen M. Transcription factors and the cardiac gene programme. Int J Biochem Cell Biol, 1996, 28(4): 387~403[DOI]

24 Cormier P, Pyronnet S, Salaun P, Mulner-Lorillon O, Sonenberg N. Cap-dependent translation and control of the cell cycle. Prog Cell Cycle Res, 2003, 5: 469~475