

4个不同地理种群中华鳖 POMC 基因 全长 cDNA 克隆及其序列分析

张林^{1,2} 邹世平² 艾晓辉² 吴涛³

1. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 武汉 430223;

2. 中国水产科学研究院长江水产研究所/农业部淡水鱼类质量监督检验测试中心, 武汉 430223;

3. 武汉工业学院动物科学与营养工程学院, 武汉 430023

摘要 为探讨中华鳖不同地理种群 POMC 基因的多态性, 建立区分中华鳖不同地理种群的分子遗传标记, 采用 RT-PCR 的方法扩增得到 4 个不同地理种群(太湖鳖种群、沙鳖种群、台湾鳖种群和黄河鳖种群)中华鳖的 POMC 基因, 对该基因进行克隆及序列测定, 并对所测序列进行比较, 分析其 SNP 位点, 并对所得的 SNP 位点进行验证。结果显示: 4 个不同地理种群中华鳖所扩增的 POMC 基因的核苷酸序列均为 786 bp; 以 megalin 软件比较分析 4 个不同地理种群中华鳖的 POMC 基因, 发现该序列中共有 15 个多态性核苷酸位点, 经过验证, 第 129 位核苷酸的变异为台湾鳖种群不同于其他种群的变异, 第 441 位核苷酸变异为太湖鳖种群不同于其他种群的变异, 第 168 和 396 位核苷酸为黄河鳖种群不同于其他种群的变异, 第 531 和 618 位核苷酸为沙鳖种群不同于其他种群的变异。结果表明, 中华鳖的 POMC 基因存在多态性, 不同地理种群中华鳖 POMC 基因均有各自特异的核苷酸序列, 可以作为区分中华鳖的不同地理种群的分子遗传标记。

关键词 中华鳖; 不同地理种群; POMC 基因; 单核苷酸多态性; 分子遗传标记

中图分类号 S 966.5 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2012)05-0645-05

阿片黑素促皮质素原(POMC)是动物脑和垂体中多种活性肽类的共同前体, 在动物体内通过 POMC 基因的组织细胞特异性表达和加工而产生不同的活性肽, 如 ACTH、MSH、 β -内啡肽等, 如在垂体前叶 ACTH 细胞中, POMC 被加工为 ACTH 和 β -促脂素(β -LPH), 而在垂体中叶的促黑素细胞中 POMC 被加工为 α -MSH、 β -LPH 和 β -内啡肽等。这些活性肽类在动物的应急、摄食和能量代谢等的调节中起着重要作用。人 POMC 基因定位于 2p23.3, 编码 267 个氨基酸, 该基因紧靠营养物质进食量的数量性状位点(QTL)^[1]、血清瘦素水平 QTL^[2]和肥胖 QTL^[3]。POMC 基因和其他几个食欲控制关键基因如 Leptin^[4]和 Leptin 受体^[5], 已用于一些肥胖病的遗传检测。牛 POMC 基因位于一个与平均日增重和屠体质量相关的 QTL^[6]。Buchanan 等^[7]利用连锁作图的方法将该基因定位于牛 11 号染色体上, 并且还发现 1 个距转录起始位点 288 bp 的 C>T 同义突变, 该突变引入了 1 个

Bts I 酶切位点, 该位点与牛的屠体质量、眼肌面积相关, 并以该突变位点被申请了牛生长速度选择标记的专利。Shen 等^[8]早在 2003 年首次报道了中华鳖的 POMC 基因 mRNA 全序列, 该基因除了在脑和垂体表达外, 在其他很多的外周组织均有表达。人体或多种哺乳动物的 POMC 均与生长性状相关, 中华鳖的 POMC 基因可能也与中华鳖的生长性状相关。因此笔者对不同地理种群中华鳖的 POMC 基因的多态性位点差异性进行比较分析, 旨在建立鉴别中华鳖不同地理种群的分子遗传标记。

1 材料与方法

1.1 受试动物及试剂

试验所用不同地理种群的中华鳖幼鳖, 分别采集于安徽(太湖鳖种群)、湖南(沙鳖种群)、福建(台湾鳖种群)和山东(黄河鳖种群)。验证所用的不同地理种群的中华鳖采集自全国各地的中华鳖养殖场。

收稿日期: 2011-11-22

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(2011JBFA19)

张林, 助理研究员, 研究方向: 淡水鱼类种质资源检测, E-mail: zhanglhg@163.com

通讯作者: 邹世平, 研究员, 研究方向: 淡水鱼类种质资源与遗传育种, E-mail: ZSP@yfi.ac.cn

血液样本 RNA 提取纯化试剂盒 (TaKaRa Catrimox-14[®] RNA Isolation Kit Ver. 2. 11, 货号: DWA005), cDNA 合成试剂盒 (TaKaRa M-MLV RTase cDNA Synthesis Kit, 货号: D6130), 凝胶回收试剂盒, PBS 缓冲液, TE 缓冲液, 核酸染料 Green View, 电泳级琼脂糖。

Qiagen RNA 提取纯化仪, PCR 仪 (IO-RAD Laboratories); 紫外凝胶成像系统 (BIO-RAD Laboratories)。

1.2 动物处理

每个种群取中华鳖幼鳖 10 只, 共 40 只, 带回实验室后每只鳖采取抗凝血 3~5 mL 用于 RNA 的提取。

1.3 RNA 提取

中华鳖血液 RNA 的提取采用 TaKaRa 公司的血液样本 RNA 提取纯化试剂盒提取, 操作按试剂盒说明书进行。

1.4 cDNA 的合成

cDNA 的合成采用的是 TaKaRa 公司的 cDNA 合成试剂盒, 以所提的中华鳖 RNA 为模板, 进行 cDNA 的合成, 操作按试剂盒说明书进行。

1.5 引物设计和 PCR 扩增

根据 GenBank 中已发表的中华鳖的 POMC 基因序列 (GenBank 登录号: AY099290. 1) 设计引物, 对不同地理种群的中华鳖的 POMC 基因组进行扩增。引物由北京奥科生物科技有限公司合成, 引物

序列如下: 上游引物: 5'-TATGCTGAAACCCGT-GCGGA -3', 下游引物: 5'-GGTGTCTACTGGC-CCTTCTTG-3'。PCR 扩增条件: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 45 s, 60. 5 °C 复性 45 s, 72 °C 延伸 50 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min; 4 °C 保存。产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.6 PCR 产物测序及 SNP 位点分析

经 1% 琼脂糖凝胶电泳后, 用 Quantity EQ 凝胶成像分析系统检测过的 PCR 产物进行琼脂糖凝胶纯化回收, 将纯化回收的 PCR 产物送往北京奥科生物科技有限公司进行基因测序, 并对测序所得的基因序列进行同源性分析和 SNP 位点分析。

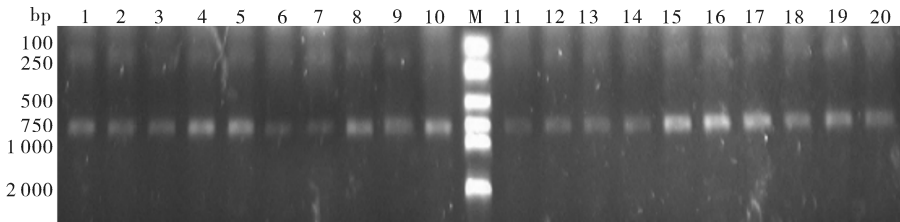
1.7 SNP 位点的验证

为进一步验证所获得的 SNP 位点的可信性, 又从不同的中华鳖原种场, 分别采取 4 个不同地理种群的中华鳖各 50 只, 并分别对其 POMC 基因进行扩增与序列分析, 进一步对各个地理种群中华鳖的 SNP 位点进行确认。

2 结果与分析

2.1 不同中华鳖 POMC 基因的 PCR 扩增

以不同地理种群中华鳖血液 RNA 为模板, 经 RT-PCR 扩增, 得到了中华鳖 POMC 基因的编码核苷酸序列, 大小约为 760 bp 的目的条带, 与预期结果相符 (图 1)。



1~5: 黄河鳖种群 Huanghe River population; 6~10 太湖鳖种群 Taihu Lake population; 11~15: 沙鳖种群 *Pelodiscus axenaria* population; 16~20: 台湾鳖种群 Taiwan-introduced population; M: DL 2000 marker.

图 1 不同地理群中华鳖 POMC 基因编码核苷酸序列的 PCR 扩增

Fig. 1 PCR amplification of POMC gene from different population *Pelodoiscus sinensis*

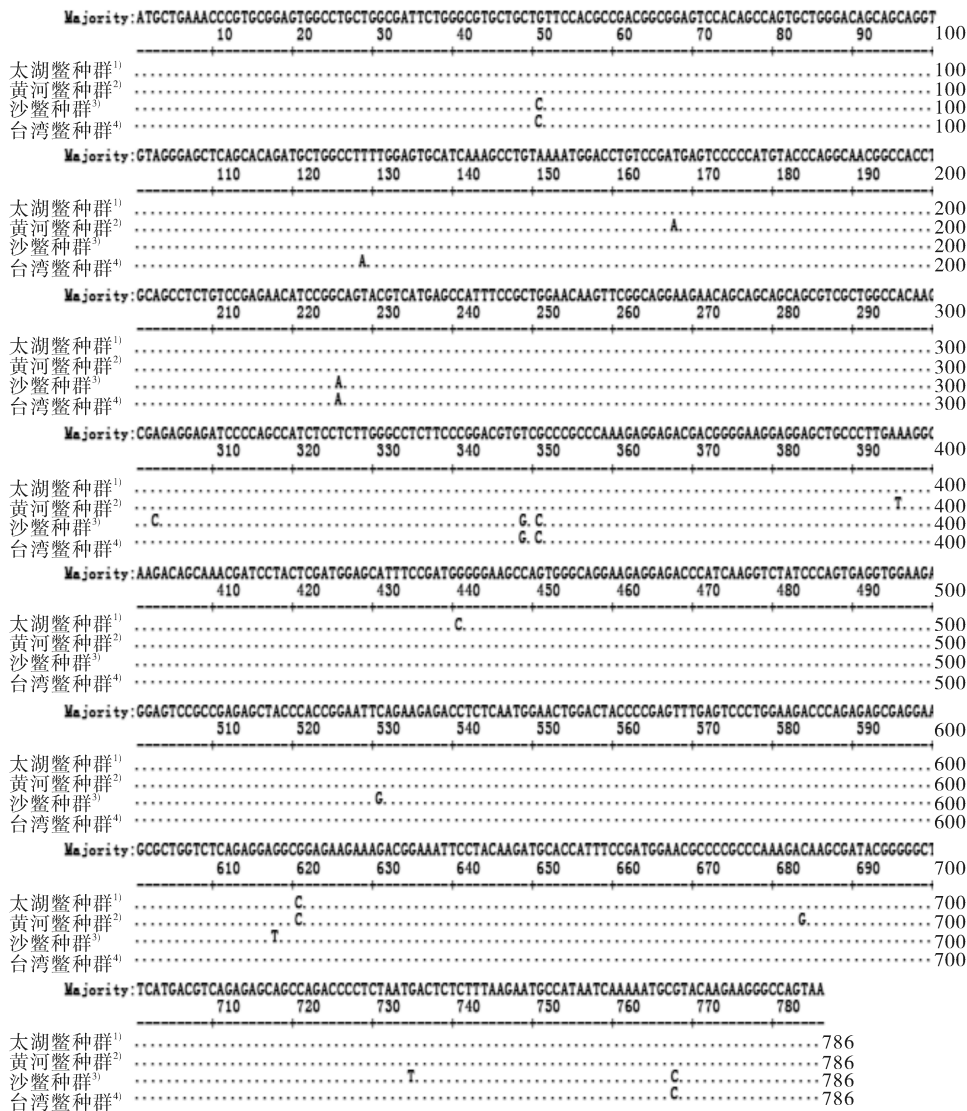
2.2 不同品种中华鳖 POMC 基因的序列测定及 SNP 位点分析

分别扩增了 4 个不同地理种群各 10 只中华鳖的 POMC 基因, 并对各个地理种群的每个中华鳖 POMC 基因序列进行测定与分析, 结果表明: 所得的 4 个不同地理种群中华鳖的 POMC 基因高度保守, 各个种群内的不同个体的 POMC 基因 100% 的同源, 不同地理种群之间也有 99% 的同源性, 所得

到的 POMC 基因与已报道的中华鳖的同源性高达 99%; 与龟类的 POMC 基因的同源性也高达 95%, 表明 POMC 基因在中华鳖不同地理种群之间高度保守。4 种中华鳖的 POMC 基因扩增序列长度相同, 均为 786 bp, 编码由 261 个氨基酸组成的 POMC 多肽。用 Megalign 序列比对分析软件对 4 个地理种群的中华鳖 POMC 基因进行比对分析, 并列出了核苷酸发生变异的位置 (图 2), 结果显示: 不

同地理种群的中华鳖 POMC 基因一共有 15 个核苷酸多态性位点, 碱基发生变异的位点在第 51、129、168、226、303、349、351、396、441、531、618、621、684、735 和 768 个碱基处, 其中第 51、129、303、349、351、621 和 768 位的碱基变化为同义突变, 其余 8 个碱基的变化为非同义突变; 15 个碱基的变异均为碱基颠换, 其中 13 个碱基的变异发生在密码子的第 3 位, 2 个碱基的变异发生在密码子的第 1 位, 没有变异发生在第 2 位, 这主要是由于密码子 3 个位点受到的选择压力明显不同, 造成突变过程偏向于密码子第 3 位点。15 个核苷酸多态性位点中, 第 129 位的核苷酸在台湾鳖种群中为 A, 其余 3 个中华鳖地理

种群为 C, 此位点可以作为台湾鳖区别于中华鳖其他地理种群的一个分子标记; 第 441 位的核苷酸在太湖鳖种群中为 C, 其余 3 个中华鳖地理种群为 G, 此位点可以作为太湖鳖区别于中华鳖其他地理种群的一个分子标记; 第 168、396 和 684 位的核苷酸在黄河鳖种群中分别为 A、T 和 G, 其余 3 个地理种群为 T、A 和 C, 此位点可以作为黄河鳖区别于中华鳖其他地理种群的一个分子标记; 第 303、531、618 和 735 位的核苷酸在沙鳖种群中分别为 C、G、T 和 T, 其余 3 个地理种群为 A、C、G 和 G, 此位点可以作为沙鳖区别于中华鳖其他地理种群的一个分子标记。



1)太湖鳖种群 Taihu Lake population; 2)黄河鳖种群 Huanghe River population; 3)沙鳖种群 *Pelodiscus axenaria* population; 4)台湾鳖种群 Taiwan-introduced population.

图 2 不同地理群中华鳖 POMC 基因编码核苷酸序列多态性分析

Fig. 2 Polymorphism analysis of the POMC gene from different population *Pelodiscus sinensis*

2.3 SNP 位点的验证

对采集于不同原种场的 4 个地理种群的中华鳖进行 POMC 基因的克隆、序列测定与分析,并与上面所分析的 SNP 位点进行比较,证实所获得的 SNP 位点的可信性。结果表明:所获得的台湾鳖特异的 SNP 位点,即中华鳖 POMC 基因第 129 位的 A,与其他养殖场的台湾鳖的 POMC 基因是 100% 相符,此位点可以作为台湾鳖区别于中华鳖其他地理种群的一个分子标记;所获得的太湖鳖特异的 SNP 位点,即中华鳖 POMC 基因第 441 位的 C,与其他养殖场太湖鳖的 POMC 基因也是 100% 相符,该位点可以作为太湖鳖区别中华鳖其他地理种群的一个分子标记;所获得的黄河鳖特异的 SNP 位点,即中华鳖 POMC 基因第 168、396 位的 A 和 T,与其他养殖场黄河鳖的 POMC 基因是 100% 相符,但是其 684 位的 G,与其他养殖场黄河鳖的 POMC 基因只有 80% 相符,其中有一个养殖场 6 只黄河鳖的此位点为 T,另一个养殖场 4 只黄河鳖此位点为 C,表明经过进一步的验证分析,此位点不能作为黄河鳖区别于中华鳖其他地理种群的分子标记,只有第 168、396 位的 A 和 T 可以作为黄河鳖区别于中华鳖其他地理种群的分子标记;所获得的沙鳖特异的 SNP 位点,即中华鳖 POMC 基因第 531 和 618 位的 G 和 T,与其他养殖场沙鳖的 POMC 基因是 100% 的相符,但是其第 303 位的 A 与其他养殖场沙鳖的 POMC 基因只有 90% 的相符,其中有一个养殖场的 3 只沙鳖的此位点为 C,另一个养殖场的 2 只沙鳖此位点为 T;其 735 位的 T,与其他养殖场的沙鳖的 POMC 基因只有 78% 的相符,其中有一个养殖场的 4 只沙鳖的此位点为 C,一个养殖场的 2 只沙鳖此位点为 G,另一个养殖场的 5 只沙鳖此位点为 A,表明此位点也不能作为沙鳖区别于中华鳖其他地理种群的分子标记,只有第 531 和 618 位的 G 和 T 可以作为沙鳖区别于中华鳖其他地理种群的分子标记。

3 讨论

自从 1979 年首次报道了牛的 POMC 基因 cDNA 以来,到目前为止,大多数脊椎动物代表种类的 POMC 一级结构都已阐明,如哺乳类^[9]、两栖类^[10-11]、辐鳍鱼类^[12-13]和无颌类^[14-15]。对这些不同来源的 POMC 基因 cDNA 的分析表明,在脊椎动物进化过程中,由于基因的重复增加了 POMC 基因的拷贝数,或因基因内部 MSH 区域的重复或缺失,

而造成 POMC 基因的多样性^[16]。

另外研究发现 POMC 基因表达产物 ACTH 作用于肾上腺皮质可促进糖皮质激素的产生。而糖皮质激素与肥胖有关,它直接调控肥胖基因的表达^[17-18],通过肥胖基因表达产物达到对体质量的调控。POMC 基因的另一表达产物 α -MSH 则是采食的强效调控因子。 α -MSH 对 MC3R 和 MC4R 均有很高的亲和力,并且 MC3R 和 MC4R 缺陷型小鼠表现暴食和肥胖。POMC 基因还参与体脂分布的调控。Baker 等^[19]报道,人 POMC 基因均与腰臀比例(衡量体脂分布的指标)存在极显著相关。而体脂分布已成为动物育种工作者密切相关的问题,因为体脂分布会影响肉品质。肌间脂肪是影响肉品质的重要因素,而腹脂沉积则增加生产成本。

本研究以不同地理种群的中华鳖为研究对象,分析不同地理种群中华鳖的 POMC 基因的多态性位点,这些多态性位点差异可以作为中华鳖不同地理种群鉴别的分子标记。中华鳖不同地理种群 POMC 基因的差异是否与中华鳖的生长速度及中华鳖肉品质相关还需进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] CAI G, COLE S A, BASTARRACHEA R A, et al. Quantitative trait locus determining dietary macronutrient intakes is located on human chromosome 2p22 [J]. *Clin Nutr*, 2004, 80 (5): 1410-1414.
- [2] ROTIMI C N, COMUZZIE A G. The quantitative trait locus on chromosome 2 for serum leptin levels is confirmed in African-Americans [J]. *Diabetes*, 1999, 48(3): 643-644.
- [3] HAGER J, DINA C, FRANCKE S, et al. A genome-wide scan for human obesity genes reveals a major susceptibility locus on chromosome 10 [J]. *Nat Genet*, 1998, 20(3): 304-308.
- [4] MONTANGUE C T, FAROOQI I S, WHITEHEAD J P, et al. Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans [J]. *Nature*, 1997, 387: 903-908.
- [5] CLEMENT K, VAISSE C, LAHLOU N, et al. A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction [J]. *Nature*, 1998, 392: 398-401.
- [6] THUE T D, BUCHANAN F C. Linkage mapping of POMC to bovine chromosome 11 [J]. *Anim Genet*, 2003, 34 (2): 146-160.
- [7] BUCHANAN F C, THUE T D, YU P, et al. Single nucleotide polymorphisms in the corticotrophin releasing hormone and proopiomelanocortin genes are associated with growth and carcass yield in beef cattle [J]. *Anim Genet*, 2005, 36(2): 127-131.
- [8] SHEN S T, LU L M, CHEN J R. Molecular cloning of proopiomelanocortin (POMC) cDNA from mud turtle, *Pelodiscus*

- sinensis* [J]. Gen Comp Endocrinol, 2003, 131(2): 192-201.
- [9] DOUGLASS J, CIVELLI O, HERBERT E. Polypeptide gene expression: generation of diversity of neuroendocrine peptides [J]. Ann Rev Biochem, 1984, 53: 665-715.
- [10] HILARIO E, LIHRMANN I, VAUDRY H. Characterization of cDNA encoding proopiomelanocortin in the frog *Rana ridibunda* [J]. Biochem Biophys Res Comm, 1990, 173: 653-659.
- [11] PAN F, CHENG W C. Nucleotide sequence of bullfrog proopiomelanocortin cDNA [J]. Nucl Acids Res, 1989, 17: 5843.
- [12] AMEMIYA Y, TAKAHASHI A, DORES R M. Sturgeon proopiomelanocortin has a remnant of γ -elanotropin [J]. Biochem Biophys Res Comm, 1997, 230: 452-456.
- [13] SALBERT G, CHAUVEAU I, BONNEC G. One of the two trout proopiomelanocortin messenger RNAs potentially encodes new peptides [J]. Mol Endocrinol, 1992, 6: 1605-1612.
- [14] HEINING J A, KEELEY F W, ROBSON P. The appearance of proopiomelanocortin early in vertebrate evolution: cloning and sequencing of POMC from a lamprey pituitary cDNA library [J]. Gen Comp Endocrinol, 1995, 99: 137-144.
- [15] TAKAHASHI A, AMEMIYA Y, SARASHI M, et al. Melanotropin and corticotropin are encoded on two distinct genes in the lamprey, the earliest evolved extant vertebrate [J]. Biochem Biophys Res Comm, 1995, 231: 490-496.
- [16] TAKAHASHI A, AMEMIYA Y, NOZAKI M, et al. Evolutionary significance of proopiomelanocortin in agnatha and chondrichthyes [J]. Comp Biochem Physiol, 2001, 129: 283-289.
- [17] DEVOS P, SALADIN R, AUWERX J, et al. Induction of obesity gene expression by corticosteroids is accompanied by body weight loss and reduced food intake [J]. Biol Chem, 1995, 270(27): 15958-15961.
- [18] MURAKAMI T, IIDA M, SHIMA K. Dexamethasone regulates obesity expression in isolated rat adipocytes [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1995, 214(3): 1260-1267.
- [19] BAKER M, GAUKRODGER N, MAYOSI B M, et al. Association between common polymorphisms of the proopiomelanocortin gene and body fat distribution [J]. Diabetes, 2005, 54(8): 2492-2496.

Clone and polymorphism of POMC gene in four populations of *pelodoiscus sinensis*

ZHANG Lin^{1,2} ZOU Shi-ping² AI Xiao-hui² WU Tao³

1. Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuhan 430223, China;

2. Freshwater Fish Germplasm Quality Supervision and Testing Center, Ministry of Agriculture, Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuhan 430223, China;

3. School of Animal Science and Nutritional Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China

Abstract To study the polymorphism of the proopiomelanocortin (POMC) gene and establish the molecular genetic marker for identifying different population of *Pelodoiscus sinensis*, populations from Taihu Lake, Huanghe River, Taiwan-introduced and *Pelodiscus axenaria*, were collected to get the blood. The POMC gene was amplified by RT-PCR, sequenced and analyzed thereafter. Fifteen SNPs were detected in the PCR-amplified 786 bp fragments. One SNP at nucleotide 129 in Taiwan-introduced population, one SNP at nucleotide 441 in Taihu Lake population, two SNPs at nucleotide 168 and 396 in Huanghe River population, and two SNPs at nucleotide 531 and 618 in *P. axenaria* were identified. The results showed that the POMC gene of *P. sinensis* showed polymorphic, the POMC gene of different population has specific mutation site, which can be used as a molecular genetic marker for identifying different population of *P. sinensis*.

Key words *Pelodoiscus sinensis*; different population; POMC gene; SNP; molecular genetic marker

(责任编辑:边书京)