

研究快报

MC1R 是控制鸡黑色素形成的候选主效基因*

杨永升^{1,2)} 邓学梅³⁾ 李 宁²⁾** 傅 衍¹⁾ 朱睦元¹⁾ 吴常信³⁾⁽¹⁾ 浙江大学生命科学院, 杭州 310029; ⁽²⁾ 中国农业大学农业生物技术国家重点实验室, 北京 100094;⁽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 1 (melanocortin 1-receptor, MC1R) 基因是控制动物黑色素合成的重要基因. 采用多聚酶链反应-单链构象多态性分析 (PCR-SSCP) 以及 DNA 测序的方法, 在由丝羽乌骨鸡与明星肉鸡为亲本建立的中国农业大学资源家系群体鸡 MC1R 基因的编码区检测到 3 个单核苷酸多态位点, 并对该单核苷酸多态性进行了分析. 结果显示, 鸡 MC1R 基因编码区引物 3 扩增片段多态性是由 G→A (867 位) 点突变引起的, 引物 5 扩增片段的多态性是由 C→T (1 292 位) 与 C→G (1 377 位) 两个点突变引起的, 最后对单核苷酸多态性与肤色、肉色、胫色与内脏膜色等黑色素性状进行了卡方独立性分析, 结果显示, MC1R 基因编码区 867 处突变与鸡的肤色性状显著相关 ($P < 0.05$), 1 292 处突变与鸡的活体胫色性状显著相关 ($P < 0.05$), 1 377 处突变与鸡的肉色性状显著相关 ($P < 0.05$). 研究表明, MC1R 基因可能是鸡黑色素性状的主效基因或者与鸡控制黑色素性状的主效基因连锁.

关键词 鸡, 黑色素, 黑素皮质素受体 1 (MC1R), 单核苷酸多态 (SNP)

学科分类号 Q38

黑素皮质素受体 1 (melanocortin 1-receptor, MC1R) 基因在哺乳动物中由 extension 位点编码^[1], 为 G 蛋白耦合的受体黑素皮质素受体 (melanocortin receptors, MCRs) 家族成员之一. MC1R 基因只有一个编码区, 其编码的蛋白质有 7 个跨膜结构域, 主要表达于动物的黑色素细胞^[2], 为 G 蛋白耦合受体中最小的一个.

在哺乳动物中, 皮肤与毛发的颜色主要是由毛皮中的真黑色素 (黑色与褐色) 与伪黑色素 (红色与黄色) 的相对数量与分布情况所决定的. α -促黑素 (α -melanocyte stimulating hormone, α -MSH) 与 MC1R 结合引起环腺苷酸水平的提高, 并且激发酪氨酸酶水平的提高, 导致真黑色素的形成^[3]. 迄今, 研究表明在哺乳动物的人、鼠、马、牛、绵羊、猪、犬及狐狸中都发现了 MC1R 基因的突变与黑色素性状变异或皮肤癌等疾病有关^[4~11]. 至于鸟类, 目前对其黑色素沉积的分子机理研究还较为缺乏, Takeuchi 等 1996 年首次克隆了鸡的 MC1R 基因, 并证实它为鸡 Extendeds black (E) 位点所编码^[12], 随后不久, 他们发现了鸡不同的 MC1R 基因型对应不同的羽色, 并且根据在鸡与鼠中同样的 MC1R 突变对应相同的色素变异, 推测鸡与哺乳动物中 MC1R 功能的调节机制可能是一致

的^[13]. Theron 等^[14] (2000 年) 在鹌鹑中也检测到与鸡类似的 MC1R 突变. Kerje 等^[15] 最近的研究结果也表明 MC1R 的突变与鸡的羽色有关.

乌骨鸡又称乌鸡, 主要特点是乌皮、乌肉、乌骨. 其以独特的滋补、药用价值享誉中外, 是一种珍贵的优良鸡种. 国内外的研究表明, 乌骨鸡的滋补、药用价值与其体内富含的黑色素有关^[16~18]. MC1R 作为动物黑色素沉积中的重要基因引起了生物界的广泛关注, 研究 MC1R 基因的结构与功能对阐明黑色素沉积的分子机理具有十分重要的理论意义. 本研究中, 我们以 MC1R 基因作为影响鸡黑色素性状的候选基因, 以中国农业大学丝羽乌骨鸡与明星肉鸡杂交的资源家系鸡群为材料, 在鸡的 MC1R 基因的编码区发现了 3 个单核苷酸多态 (single nucleotide polymorphisms, SNPs) 位点, 并详尽分析了这些 SNPs 与鸡黑色素性状的遗传关系, 旨在寻找调控鸡黑色素沉积的主效基因, 为更

* 国家重点基础研究发展规划项目 (973) (G20000161), 国家自然科学基金资助项目 (30200149) 和国家杰出青年科学基金资助项目 (39725022).

** 通讯联系人.

Tel: 010-62813323, E-mail: ninglbau@public3.bta.net.cn

收稿日期: 2004-04-14, 接受日期: 2004-05-28

加合理地开发利用乌骨鸡这一宝贵的家禽资源提供一定的理论依据, 同时为今后研究鸟类及哺乳动物黑色素形成的分子机理等提供一定的分子基础.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验鸡群与基因组 DNA: 实验鸡群为中国农业大学农业生物技术国家重点实验室建立的丝羽乌骨鸡与明星肉鸡杂交产生的资源家系鸡亲本代与 F_2 代群体, 其中明星肉鸡为父本正交系, 丝羽乌骨鸡为父本反交系, 取正反交各四个家系. 12 周龄时翅静脉采血, 草酸盐抗凝, 苯酚氯仿抽提之后, TE 溶解 -20°C 保存. 屠宰记录肤色、活体胫色、屠体胫色 (屠宰时褪去胫的角质化表皮后颜色)、肉色、心脏膜色、肌胃膜色、骨膜色等黑色素性状.

1.1.2 主要试剂: 引物由上海生物工程公司合成, TaqDNA 聚合酶与 dNTPs 购自大连宝生物工程有限公司, pMD-18T Vector 购自 Promega 公司, DNA 片段回收纯化试剂盒与质粒提取纯化回收试剂盒购自北京华美生物工程公司, 测序反应在中国农业大学农业生物技术国家重点实验室完成.

1.2 方法

1.2.1 引物设计: 根据 Takeuchi 等^[12] 报道的鸡 MC1R 基因编码区全序列约 1 kb, 用 Oligo6.0 软件跨越整个编码区设计 5 对引物. 引物 1 (373 ~ 619), F1: 5' CGCACGGGGGCTTTGTAGG 3', R1: 5' TTCTCCACCAGGCTCACCAG 3'. 引物 2 (601 ~ 849), F2: 5' TGGTGAGCCTGGTGGAGAAC 3', R2: 5' AGAGGGAGGACACGACGGAG 3'. 引物 3 (839 ~ 1 078), F3: 5' GTCCTCCCTCTCCTTCCT 3', R3: 5' TGAATGTAGAGCACCAGC 3'. 引物 4 (1 051 ~ 1 264), F4: 5' TGGTCCTCATGCTGGT-GCTC 3', R4: 5' AAGGGGTTGGTGGGGCAGGT 3'. 引物 5 (1 248 ~ 1 438), F5: 5' TGCCCCACCAAC-CCCTTCT 3', R5: 5' CATCCATCCATCCATCCTC 3'.

1.2.2 PCR 扩增: PCR 扩增体系为 25 μl (10 $\times$ PCR 缓冲液 2.5 μl , 10 mmol/L dNTPs 2 μl , 20 $\mu\text{mol/L}$ 上游引物 1 μl , 20 $\mu\text{mol/L}$ 下游引物 1 μl , 2 U/ μl TaqDNA 聚合酶 1 μl , 100 $\mu\text{g/L}$ DNA 模板 1 μl , 双蒸水 15.5 μl). PCR 扩增程序为: 94°C , 5 min, 1 个循环; 94°C , 30 s, 58°C (引物 1)、 64°C (引物 2)、 60°C (引物 3)、 61°C (引物 4)、 60°C (引物 5), 30 s, 72°C , 30 s, 33 个循环;

72°C , 7 min, 1 个循环; 4°C 保温.

1.2.3 单链构象多态性 (SSCP) 分析: 1 μl PCR 产物和 5 μl 上样缓冲液 (98% 去离子甲酰胺、0.025% 溴酚蓝、0.025% 二甲苯青、10 mmol/L EDTA (pH 8.0)、10% 甘油), 98°C 变性 10 min, 迅速冰浴 5 min, 使之保持变性状态. 样品在 12% (引物 1)、12% (引物 2)、12% (引物 3)、14% (引物 4) 与 16% (引物 5) 非变性聚丙烯酰胺凝胶 (Acr: Bis = 29:1) 中电泳 (5 V/cm, 16 h) 后进行银染显色.

1.2.4 克隆测序: 经 SSCP 分析后, 不同基因型个体的 PCR 扩增产物在 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳后, 用柱式胶回收试剂盒进行回收纯化, 回收后的 DNA 片段用 pMD-18T Vector 连接后转化 DH5 α 菌株, 酶切鉴定后, 用质粒提取试剂盒提取质粒 DNA 作为测序模板, 每一种纯合的基因型单独挑两个克隆分别测序, 对只有一种纯合子出现的杂合子基因型挑取 6 个克隆进行测序. 所有测序在 ABI PRISM 377 测序仪上进行.

1.2.5 统计分析: 用卡方独立性检验分析单核苷酸多态位点的基因型分布与鸡黑色素性状的关系, 分析软件为 SAS 软件包 (8.02 版).

1.2.6 蛋白质结构预测网站: http://www.cbi.pku.edu.cn/mirror/predictprotein/submit_def.html

2 结果与分析

2.1 PCR-SSCP 分析结果

首先将全部的 5 对引物在资源家系鸡亲本群体中的 PCR 扩增片段进行 SSCP 电泳分析, 结果发现引物 3 与引物 5 的 PCR 扩增片段存在多态. 经测序验证后对这两对引物的全部 F_2 代个体的扩增片段进行了 PCR-SSCP 分析. 引物 3 的 PCR 扩增片段 SSCP 电泳结果有 3 种基因型 (图 1), 分别命名为 AA、BB 与 AB. 引物 5 的 PCR 扩增片段 SSCP 检测结果有 4 种基因型 (图 2), 根据其 SSCP 电泳的带型情况分别命名为 CC、DD、CD 与 CE.

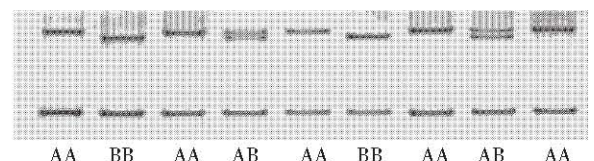


Fig. 1 PCR-SSCP analysis with primer 3 in different individuals

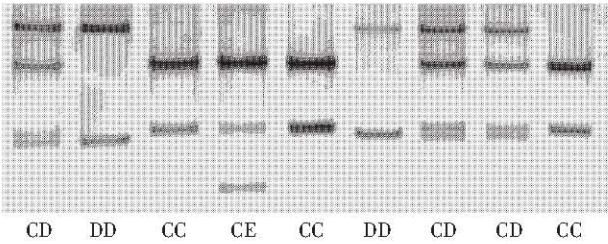


Fig. 2 PCR-SSCP analysis with primer 5 in different individuals

2.2 SNPs 的序列分析

对引物 3 扩增所得到的两种纯合基因型片段进行回收、克隆和测序. 结果表明: AA 型的序列与 GenBank (D78272) 中的序列一致, 而 BB 型与 AA 型的序列相比有一个碱基发生了突变: G→A (867 位) (图 3), 并导致第 137 位氨基酸的改变: Ala137Thr. 对于引物 5 来说, 出现了 4 种基因型, 是由 2 个点突变造成的. 对两种纯合的基因型 CC、DD 的测序表明: CC 型的序列与 GenBank (D78272) 中的序列一致; 而 DD 型与 CC 型的序列相比有一个碱基发生了突变: C→G (1 377 位) (图 4), 并导致 307 位氨基酸的改变: Arg307Gly. CE 基因型推测的是纯合子 CC 与 EE 的杂合子, 所以采取挑取多个克隆 (7 个) 的方法进行测序, 结果显示, 有 4 个克隆的测序结果与 GenBank (D78272) 中的序列一致, 为 CC 基因型, 有 3 个克隆的测序结果与 CC 基因型相比较有一个碱基发生了突变: C→T (1 292 位), 命名为 EE 基因型 (图 5), 但此处的突变是沉默突变, 没有引起所编码氨基酸的改变. 根据这 2 个点突变分别对引物 5 出现的 4 种基因型进行分类, 然后对 1 292 和 1 377 处这 2 个点突变的基因型分别进行统计分析.

AA: CTTCTCTGGGGCTCATCGCCGTGGACCGCTA

BB: CTTCTCTGGGGCTCATCACCGTGGACCGCTA

Fig. 3 Sequence comparison of AA and BB genotype in chicken MC1R gene coding sequence (Primes 3)

CC: GCTCCGGCGGACGCTGCGGGAGGTGGTGCT

DD: GCTCCGGCGGACGCTGCGGGAGGTGGTGCT

Fig. 4 Sequence comparison of CC and DD genotype in chicken MC1R gene coding sequence (Primer 5)

CC: AGCTATTTCAACCTCTTCTCATCCTCATC

EE: AGCTATTTCAATCTCTTCTCATCCTCATC

Fig. 5 Sequence comparison of CC and EE genotype in chicken MC1R gene coding sequence (Primer 5)

通过网站 http://www.cbi.pku.edu.cn/mirror/predictprotein/submit_def.html 对突变前后 MC1R 蛋白的结构变化进行了预测. 结果显示: Ala137Thr 突变与 Arg307Gly 突变分别位于 MC1R 蛋白的第三与第七跨膜区, Arg307Gly 突变导致 MC1R 蛋白上此位置的蛋白激酶 C 磷酸化位点 (protein kinase C phosphorylation site) 丢失, 从而使 MC1R 上 PKC 磷酸化位点由 2 个减少为 1 个.

2.3 SNPs 与黑色素性状的关系

2.3.1 鸡亲本群体中各单核苷酸多态位点的基因型分布: 引物 3 与引物 5 在资源家系鸡亲本代群体扩增片段检测到的 SNPs 基因型分布情况见表 1. 中国农业大学农业生物技术国家重点实验室建立的鸡的资源家系亲本代包括 A 系与 C 系两个系. A

Table 1 The genotype distributions of amplified fragments among founder population chickens

SNPs	Genotype	Line A		Line C	
		Number	Frequency/%	Number	Frequency/%
Mut. 1	AA	34	94.444	16	55.172
	BB	0	0	4	13.793
	AB	2	5.556	9	31.035
	Total	36	100	29	100
Mut. 2	CC	36	100	14	48.276
	DD	0	0	3	10.345
	CD	0	0	12	41.379
	Total	36	100	29	100
Mut. 3	CC	24	66.667	26	89.655
	CE	12	33.333	3	10.345
	Total	36	100	29	100

Mut. 1, 2, 3: Mutation at base position 867, 1 377 and 1 292, respectively.

系为明星肉鸡亲本，其特征为：白羽、白皮肤、内脏膜无色、肉色微红、活体胫色为黄色，屠体胫色白色。C 系为丝羽乌骨鸡亲本，具有白羽、黑皮肤、活体与屠体胫色黑色、黑肉、黑色内脏膜的特征。

2.3.2 鸡 F₂ 代群体中 MC1R 基因型分布与黑色素性状的关系：本实验中黑色素性状是以等级划分的，具体记录的黑色素性状有肤色、活体胫色、屠体胫色、肉色、心脏膜色、肌胃膜色与骨膜色。对资源家系鸡 F₂ 代群体进行各 SNPs 基因型的检测，

统计各黑色素性状中不同颜色组合的基因型分布情况并进行卡方独立性检验。各黑色素性状中不同颜色组合的基因型分布结果见表 2。卡方独立性检验结果表明：867 处突变各基因型分布在不同肤色性状中差异显著 ($P < 0.05$)，1 377 处突变各基因型分布在不同肉色性状中差异显著 ($P < 0.05$)，1 292 处突变各基因型分布在不同活体胫色性状中差异显著 ($P < 0.05$)。但这 3 处突变各基因型分布在其他黑色素性状中差异不显著。

Table 2 The relations between the MC1R genotype distributions with melanin traits among F₂ chickens

SNPs	Genotype	Color class								Total	χ^2
		Black	Grey	White	White with black spots	Cream	Yellow	Red	Green		
Mut. 1 and skin color	AA	29	72	201	78	11	16	—	—	407	$\chi^2 = 12.8282^{1)}$ $P < 0.05$
	AB	12	12	58	13	0	4	—	—	99	
	BB	1	6	18	3	4	2	—	—	34	
	Total	42	90	277	78	15	22	—	—	540	
Mut. 2 and meat color	CC	—	50	108	—	—	97	154	—	409	$\chi^2 = 7.2962^{2)}$ $P < 0.05$
	CD	—	20	31	—	—	21	50	—	122	
	DD	—	6	7	—	—	2	3	—	18	
	Total	—	76	146	—	—	120	207	—	549	
Mut. 3 and live shank color	CC	54	132	113	76	—	91	—	60	526	$\chi^2 = 12.8270^{3)}$ $P < 0.05$
	CE	2	9	13	16	—	7	—	3	50	
	Total	56	141	126	92	—	98	—	63	576	

Mut. 1, 2, 3: Mutation at base position 867, 1 377 and 1 292, respectively; ¹⁾ χ^2 value after yellow was combined with white and cream (浅浅黑色) was combined with grey (浅黑色); ²⁾ χ^2 value after red and yellow were combined with white; ³⁾ χ^2 value after yellow was combined with white.

3 讨 论

利用中国农业大学研究黑色素性状鸡的资源家系，对 MC1R 基因的编码区进行了 SNPs 的检测，并对这些检测到的 3 个 SNPs 与肤色、胫色、肉色、内脏膜色等黑色素性状关系进行了卡方独立性检验。结果显示：867 处突变与鸡的肤色显著相关 ($P < 0.05$)，1 292 处突变与鸡的活体胫色显著相关 ($P < 0.05$)，1 377 处突变与鸡的肉色显著相关 ($P < 0.05$)。由此推测，MC1R 基因可能是鸡黑色素性状的候选主效基因或者与控制鸡黑色素性状的主效基因连锁。

色素表型的划分往往较为困难，我们采取对黑色素性状记录时尽量分得细一些，在对不同色素性

状中各种颜色组合的基因型分布进行卡方独立性分析时，我们根据不同色素性状的具体情况与卡方独立性检验准确性的需要，把一些颜色组合合并到相关的颜色组合中去。具体到在对 867 处突变与肤色关系进行分析时，由于家禽的白色与黄色肤色（包括胫色）本身主要是受类胡萝卜素基因 W 控制的一对显隐性性状^[19]，不属于 MC1R 基因所调控的黑色素系统，另外本研究中资源家系鸡亲本群体鸡中白肤的明星肉鸡在白肤上是纯合的，其纯繁的 F₂ 代后代群体的肤色不出现肤色的分离，资源家系鸡 F₂ 代群体中出现较少的黄色肤色（22 个），可能是白肤鸡中皮下脂肪含量较高的个体，所以我们把这些黄色肤色个体合并入白色肤色中进行分析。浅浅黑色的总数太少（15 个），分布到各基因

型中的个体更少,影响卡方检验的准确性,又加上其本身也是黑色与白色中间的过渡色,所以把它合并到相似的表型浅黑色。至于浅黑色肤色,推测可能是鸡皮肤中表皮显性白(I)基因对真皮黑色素稀释作用的结果^[19],所以把它单独作为一个颜色组合来分析。鸡皮肤与胫上黑斑(white with black spots)的形成原因至今仍不清楚,可能与转座子的转座等遗传因素有关,所以在分析时也尽量把其作为一个单独的颜色组合。在对1 377处突变与肉色进行分析时,红色、黄色与白色肉色都是肉本色,本研究中所测定的肌色均为胸肌肉色,记录时的红、黄与白这几种肉色多与屠宰时放血干净与否等操作及环境因素有关,不是遗传上的差异所致,所以把它们合并在一起作为肉本色这一颜色组合来分析。在分析1 292处突变与活体胫色进行分析时,黄色与白色胫由类胡萝卜素基因W影响造成的,合并在一起进行分析,绿胫可能是由于类胡萝卜素的叶黄素与真皮黑色素的交互作用造成^[19],所以也单独作为一个颜色组合来分析。

真核生物基因编码区上核苷酸的突变往往会引起蛋白质结构的改变从而会影响其功能。本研究得到了鸡MC1R基因编码区上3个单碱基突变,其中有两处已经引起了所编码的氨基酸改变,另一处是沉默突变,它们均显示出与鸡黑色素性状显著相关。其中Arg307Gly突变导致了MC1R上一个蛋白激酶C磷酸化位点的丢失,PKC是一类蛋白激酶,在跨膜信号的传递过程中起着重要作用,已有研究证实 α -MSH与MC1R结合后,诱导黑色素形成涉及蛋白激酶C的磷酸化激活^[20~22]。由此推测,Arg307Gly突变后MC1R受体上PKC磷酸化位点的减少,可能会影响到PKC的激活,从而影响鸡体内 α -MSH与MC1R结合后诱导黑色素的形成。

另外,从资源家系鸡亲本群体中MC1R的基因型分布情况来看,本研究所检测到MC1R基因编码区的3处点突变,在有广泛黑色素表型的乌骨鸡中与无黑色素表型的明星肉鸡中有极大的差异。其中867处突变与1 377处突变在乌骨鸡中有较高的频率,突变纯合子与杂合子总和分别达到44.828%与51.724%,但在明星肉鸡中出现的频率却分别是很低(仅有5.556%的突变杂合子)和为零,1 292处突变杂合子(本研究没有检测到突变纯合子)在明星肉鸡中的频率是33.333%,显著高于在乌骨鸡中的频率10.354%(表1),由此初步推测MC1R基因的这3处突变可能与鸡黑色素的沉积

有关。

广泛的黑色素沉积是乌骨鸡特有的重要经济性状,同时鸡又是研究鸟类遗传与发育理想的模式动物,阐明其体内的黑色素沉积机理对研究乌骨鸡及整个鸟类黑色素的形成机制有重要的意义。本研究的结果表明,MC1R可能是控制鸡黑色素形成的主效基因,这将为以鸡作为模型动物研究人类与其他动物的黑色素沉积、黑色素相关疾病的发生等分子机理奠定一定的理论基础。

致谢 感谢中国农业大学动物科技学院张勤教授对本研究中实验数据的统计分析给予的帮助。

参 考 文 献

- 1 Robbins 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. *Cell*, 1993, **72** (6): 827 ~ 834
- 2 Lu D, Willard D, Patel I R, *et al.* Agouti protein is an antagonist of the melanocyte-stimulating hormone receptor. *Nature*, 1994, **371** (6500): 799 ~ 802
- 3 Mountjoy K G, Robbins L S, Mortrud M T, *et al.* The cloning of a family of genes that encode the melanocortin receptors. *Science*, 1992, **257** (5074): 1248 ~ 1251
- 4 Rana B K, Hewett-Emmett D, Jin L, *et al.* High polymorphism at the human melanocortin 1 receptor locus. *Genetics*, 1999, **151** (4): 1547 ~ 1557
- 5 Robbins 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. *Cell*, 1993, **72** (6): 827 ~ 834
- 6 Marklund L, Moller M J, Sandberg K, *et al.* A missense mutation in the gene for melanocyte-stimulating hormone receptor (MC1R) is associated with the chestnut coat color in horses. *Mamm Genome*, 1996, **7** (12): 895 ~ 899
- 7 Klungland H, Vage D I, Gomez-Raya L, *et al.* The role of melanocyte-stimulating hormone (MSH) receptor in bovine coat color determination. *Mamm Genome*, 1995, **6** (9): 636 ~ 639
- 8 Vage D I, Klungland H, Lu D, *et al.* Molecular and pharmacological characterization of dominant black coat color in sheep. *Mamm Genome*, 1999, **10** (1): 39 ~ 43
- 9 Kijas J M, Wales R, Tornsten A, *et al.* Melanocortin receptor 1 (MC1R) mutations and coat color in pigs. *Genetics*, 1998, **150** (3): 1177 ~ 1185
- 10 Newton J M, Wilkie A L, He L, *et al.* Melanocortin 1 receptor variation in the domestic dog. *Mamm Genome*, 2000, **11** (1): 24 ~ 30
- 11 Everts R E, Rothuizen J, van Oost B A. Identification of a premature stop codon in the melanocyte-stimulating hormone receptor gene (MC1R) in Labrador and Golden retrievers with yellow coat colour. *Anim Genet*, 2000, **31** (3): 194 ~ 199
- 12 Takeuchi S, Suzuki H, Yabuuchi M, *et al.* Molecular cloning and sequence analysis of chick melanocortin-1 receptor gene. *Biochim Biophys Acta*, 1996, **1306** (2~3): 122 ~ 126
- 13 Takeuchi S, Suzuki H, Yabuuchi M, *et al.* A possible involvement of melanocortin 1-receptor in regulating feather color pigmentation in

- the chicken. *Biochim Biophys Acta*, 1996, **1308** (2): 164 ~ 168
- 14 Theron E, Hawkins K, Bermingham E, *et al.* The molecular basis of an avian plumage polymorphism in the wild: a melanocortin-1-receptor point mutation is perfectly associated with the melanic plumage morph of the bananaquit, *Coereba flaveola*. *Curr Biol*, 2001, **11** (8): 550 ~ 557
 - 15 Kerje S, Lind J, Schutz K, *et al.* Melanocortin 1-receptor (MC1R) mutations are associated with plumage colour in chicken. *Animal Genetics*, 2003, **34** (4): 241 ~ 248
 - 16 徐幸莲, 庄 苏, 陈伯祥. 乌骨鸡黑色素对延缓果蝇衰老的作用. *南京农业大学学报*, 1999, **22** (2): 329 ~ 350
Xu X L, Zhuang S, Chen B X. *J Nanjing Agricultural University*, 1999, **22** (2): 329 ~ 350
 - 17 郑从义, 胡国斌, 屈三甫, 等. 黑色素对流感病毒诱导细胞凋亡的抑制效应. *武汉大学学报*, 1999, **45** (4): 469 ~ 472
Zheng C Y, Hu G B, Qu S P, *et al.* *J Wuhan University*, 1999, **45** (4): 469 ~ 472
 - 18 Corsaro C. Melanins in physiological conductions protect against lip operoxidation. A study on albino and pigmented *Xenopus*. *Pigm Cell Res*, 1995, **8** (5): 279 ~ 282
 - 19 Crawford R D. *Poultry Breeding and Genetics* Amsterdam: Elsevier, 1990. 151 ~ 159
 - 20 Buffey J, Thody A J, Bleehen S S, *et al.* Alpha-melanocyte-stimulating hormone stimulates protein kinase C activity in murine B16 melanoma. *J Endocrinol*, 1992, **133** (3): 333 ~ 340
 - 21 Park H Y, Gilchrist B A. Protein kinase C: biochemical characteristics and role in melanocyte biology. *J Dermatol Sci*, 1993, **6** (3): 185 ~ 193
 - 22 Park H Y, Russakovsky V, Ao Y, *et al.* Alpha-melanocyte stimulating hormone-induced pigmentation is blocked by depletion of protein kinase C. *Exp Cell Res*, 1996, **227** (1): 70 ~ 79

MC1R Is The Candidate Gene Regulating Melanin Synthesis in Chicken*

YANG Yong-Sheng^{1,2)}, DENG Xue-Mei³⁾, LI Ning²⁾ **, FU Yan¹⁾, ZHU Mu-Yuan¹⁾, WU Chang-Xin³⁾

(¹⁾ College of Life Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China;

²⁾ The State Key Laboratories for Agrobiotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094, China;

³⁾ College of Animal Science and Technology, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract Melanocortin 1-receptor (MC1R) gene is a key gene in melanogenesis in mammal. Three single nucleotide polymorphisms (SNPs) were detected in MC1R gene exon using PCR-SSCP and DNA sequencing in chicken. Then these SNPs were analyzed in a CAU three-generation chicken population whose founder population are broiler and white-silk chickens. The result of these analysis indicated that the polymorphisms of the amplified fragment of primer pair 3 is due to a single point mutation G867A, and primer pair 5 is due to two other single point mutations C1292T and C1377G. Lastly, the relations between SNPs and chicken melanin traits were analyzed, the results showed that there was significant correlation ($P < 0.05$) between the G867A mutation and chicken skin color, between the C1292T mutation and chicken live body shank color and between the C1377G mutation and chicken meat color. The results of the study indicated that MC1R gene is the candidate gene that regulates melanin traits in chicken.

Key words chicken, melanin, melanocortin 1-receptor, single nucleotide polymorphism (SNP)

* This work was supported by grants from The Special Funds for Major State Basic Research of China (G20000161), The National Natural Science Foundation of China (30200149) and National Outstanding Youth Fund of China (39725022).

** Corresponding author. Tel: 86-10-62893323, E-mail: ninglbau@public3.bta.net.cn

Received: April 14, 2004 Accepted: May 28, 2004