研究报告

小鼠 Agouti 基因变异及生物信息学分析

何晓丹[1],赵莹[2],赵丽亚[2],肖君华[1],周宇荀[1],李凯[1]

(1. 东华大学生物科学与技术研究所,上海 2016203; 2. 上海实验动物研究中心,上海 201203)

【摘要】 **目的** 分析候选基因 Agouti 的多态性,揭示染色体工程小鼠毛色差异的分子机制。**方法** 首先,用测色仪检测小鼠的毛色差异。其次,利用 DNA 芯片进行全基因组扫描确定候选基因 Agouti。最后,运用生物信息学软件分析 Agouti 基因 cDNA 序列和氨基酸序列的多态性,预测突变对蛋白结构和功能产生的影响。**结果** 发现 Agouti 基因 cDNA 序列上存在 5 个 SNPs,使 Agouti 信号蛋白产生了 3 个错义突变。生物信息学分析发现,其中一个错义突变使该蛋白丢失了一个 β 折叠,并且其三级结构发生改变,最终导致与受体结合的能力相较于野生型有所下降。**结论** 在毛色基因 Agouti 的编码区发现了一个新的错义突变,该突变使 Agouti 信号蛋白与受体结合能力下降,最终导致小鼠的毛色由浅灰色变为深灰色。

【关键词】 Agouti 基因;单核苷酸多态性;单倍型;DNA 芯片;生物信息学

【中图分类号】Q95-33 【文献标识码】A 【文章编号】1005-4847(2014) 03-0007-08

Doi:10.3969/j.issn.1005 -4847.2014.03.002

Bioinformatics analysis of mice Agouti gene polymorphism

HE Xiao-dan[1], ZHAO Ying[2], ZHAO Li-ya[2], XIAO Jun-hua[1], ZHOU Yu-xun[1], LI Kai[1]

(1. Institute of Biological Sciences and Biotechnology, Donghua University, Shanghai 201620, China;
2. Shanghai Laboratory Animal Research Center, Shanghai 201203)

【**Abstract**】 **Purpose** Polymorphisms of candidate gene Agouti was analyzed in order to reveal the molecular mechanisms of coat color difference in chromosome engineering mice. **Methods** Firstly, differences of mouse coat color was detected by color measurement spectrophotometer. Then, candidate gene Agouti was found by whole genome scanning based on DNA chip. Finally, cDNA and amino acid sequence polymorphisms were analyzed, as well as the influence of protein properties and function after mutation was predicted by bioinformatics software. **Results** There are five SNPs in the Agouti cDNA sequences, resulting in three missense mutations in the amino acid sequence of Agouti signaling protein. Bioinformatics analysis revealed that one β sheet deletion in the secondary structure of the mutant protein, as well as tertiary structure changed, leading to decrease of binding ability. **Conclusion** A novel missense mutation is found in candidate Agouti gene. It plays critical role in receptor binding activity, and may reflect on mice coat color changing from light gray to dark gray eventually.

【**Key words**】 Agouti gene; Single nucleotide polymorphism; Haplotype; DNA chips; Bioinformatics; Mice

在哺乳动物毛囊细胞中,α-促黑色素细胞激素(α-melanocyte stimulating hormone, α-MSH)与黑色素细胞膜上的黑素皮质素受体 1(melanocortin-1 receptor, MC1R)结合,能激活膜上的腺苷酸环化酶系统,引起细胞内环腺苷酸的升高,从而激活酪氨酸酶,催化黑色素细胞从血液中摄取的酪氨酸经高尔基复合体变成多巴及多巴醌,最后合成皮肤黑色素的主要成分—真黑素[1-5]。Agouti 基因编码的 Agouti 信号蛋白(Agouti signaling protein, ASP)对 α-促黑色素细胞激素(α-MSH)和黑素皮质素受体

[基金项目]国家自然科学基金(编号:31171199),上海市创新行动实验动物研究项目(编号:11140900200)。

[作者简介]何晓丹(1988 -),女,硕士研究生,研究方向:小鼠遗传学。Tel:021 -67792650;E-mail: hxdqy123@126.com

[通讯作者]李凯(1978 -),男,副研究员,研究方向:小鼠遗传学。Tel:021 -67792652;E-mail: likai@dhu.edu.cn

MC1R 的结合起到拮抗作用,从而使毛囊黑色素细胞合成褐黑素而不是真黑素[6]。

Agouti 信号蛋白表达量的高低或者与受体结合能力的改变,会影响毛囊黑色素细胞合成真黑素或褐黑素能力[7-9]。Bultman 等[10]研究表明隐性等位基因 *a* (non-agouti)是由于 Agouti 基因的第一个内含子中插入了一个 11 kb 的反转录转座子,使 Agouti 基因发生了功能丧失性突变。最典型的例子是 C57BL/6J 小鼠,该品系具有 *a*/*a* 基因型,不能正常表达 Agouti 信号蛋白,从而使褐黑素水平降低,真黑素升高,其皮毛呈现纯黑色。文献报道,可活黄 A^{vy} 小鼠胚胎发育早期 IAP 启动子上 CpG 岛不同程度的甲基化会影响 Agouti 信号蛋白的表达,甲基化程度升高,后代小鼠毛发颜色也随之变深;反之,则变浅[11-14]。

本实验室在小鼠染色体工程研究[15]中,采集国内 25 个不同区域的野生小鼠作为供体,将 C57BL/6J 作为受体,选定 1 号染色体,采用连续回交的方法进行染色体替换,形成“特异染色体替换小鼠群体”。在该群体中,每个个体的 1 号染色体来源不同,其余染色体完全一致,都来源于 C57BL/6J 品系。利用 SNP 芯片,对“野生来源小鼠 1 号染色体替换系”进行全基因组扫描后,发现 2 号染色体上有一个与小鼠毛色紧密连锁的区段:rs13476817-rs13476889,其中存在一个与野生毛色相关的候选基因 Agouti。为此利用生物信息学方法对 Agouti 基因及其编码产物的理化性质、序列特征、蛋白质结构以及生物学功能进行预测和分析,旨在分子水平理解 Agouti 基因编码序列的突变对毛色的影响,以期为进一步研究小鼠毛色的遗传规律提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 动物饲养与样本采集

在构建野生小鼠 1 号染色体替换群体的过程中,人工筛选保留毛色深浅差异明显的 8 个灰色小鼠品系作为实验样本(回交 7 次后代),其供体分别源自崇明、泰州、嘉兴、南汇、雉城、临沂、枣庄、金山,对应图 1 中的 1-4 号和 6-9 号样本。C3H/He(购自上海实验动物资源中心西普尔-必凯公司)小鼠毛色为灰色,作为参照样本,对应图 1 中的 5 号样本。小鼠的饲养繁殖实验在东华大学实验动物设施内[SYXK(沪) 2008-0059]进行。

取不同品系和 C3H/He 的成年小鼠背部皮肤,用清水洗净,烘干,利用电脑测色配色仪 Datacolor 650 测其 K/S,K 表示被测物体的吸收系数,S 表示散射系数。根据 Kubelka-Munk 染色深度方程计算固体试样中的有色物质浓度,K/S 值越大,有色物质浓度越高,即固体试样表面颜色越深。

1.2 DNA 提取及芯片分析

DNA 提取采用 Axygen 基因组 DNA 抽提试剂盒,操作步骤依说明书进行。以 0.8% 琼脂糖凝胶电泳和 NanoDrop 2000c 超微量分光光度计(Thermo Fisher Scientific, 美国)确定 DNA 质量和浓度。SNP 芯片采用 Mouse MD linkage(Illumina,美国),由晶能生物技术(上海)有限公司完成。

1.3 RNA 提取与逆转录 PCR

Trizol 法抽提 5 日龄的小鼠皮肤组织样本总 RNA,具体操作按照说明书进行。提取的总 RNA 用 DEPC 处理水充分溶解,1% 琼脂糖凝胶电泳检测其完整性, -80℃保存备用。

用 Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 进行逆转录合成 cDNA,操作参照说明书进行。PCR 反应体系(25 μL):10 × PCR buffer 2.5 μL, dNTPs (2.5 mmol/L) 2.5 μL,上下游引物(2 μmol/L)各 1.25 μL,Taq 酶 1.5 U 和 cDNA 模板 30 ng, DEPC 处理水补足。PCR 反应程序:95℃ 预变性 2 min;95℃ 变性 30 s,61℃ 退火 90 s,72℃ 延伸 1 min,40 个循环;72℃ 延伸 10 min 后冷却至 4℃ 保存。扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测后,送上海生工生物工程有限公司进行测序。

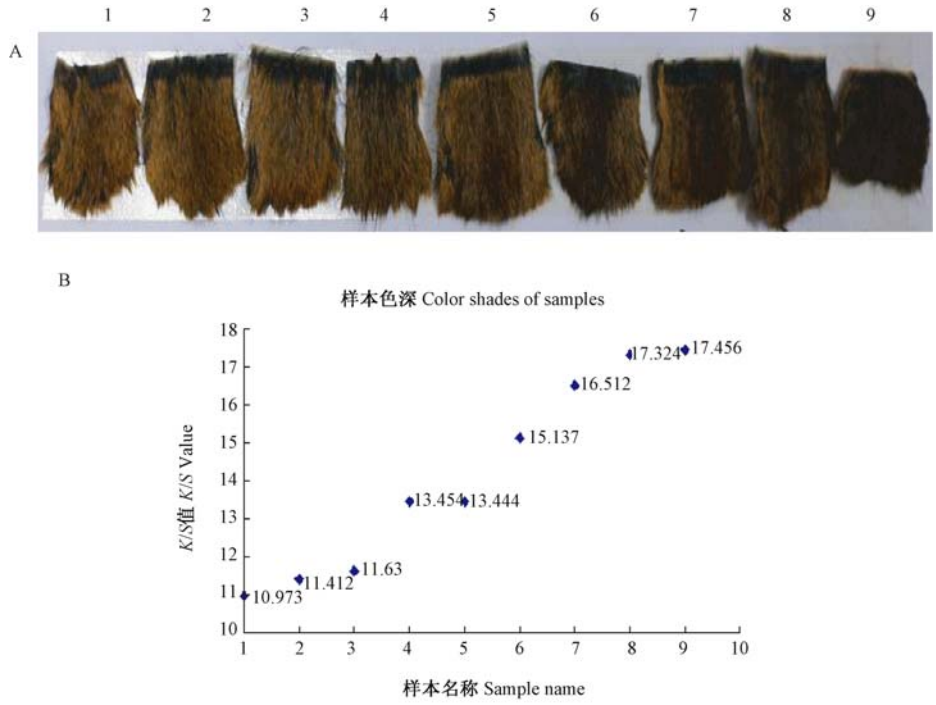
1.4 数据分析

对全基因组 SNP 芯片扫描数据进行单倍型分析,卡方检验单倍型与理论值的差异。采用 Chromas 软件分析测序序列,并用 DNAMAN 软件将测序所得序列与 NCBI 上的其他哺乳动物序列进行相似性比较。由 PROVEAN[16] (http://provean.jcvi.org/index.php)预测氨基酸替换对蛋白质生物功能的影响。使用 PDBsum Generate (http://www.ebi.ac.uk/thorntonsrv/databases/pdbsum/Generate.html)进行蛋白质二级结构预测和比对,以及 Swiss-Model (http://swissmodel.expasy.org/) 和 Swiss-PdbView 软件分别预测蛋白质的三级结构以及其与受体的结合情况。

2 结果

2.1 小鼠毛色表型差异

根据直接观察,8 个品系小鼠间存在明显色差(图 1A),利用电脑测色配色仪检测这几个品系和 C3H/He 小鼠毛色(图 1B),C3H/He 小鼠的 K/S 值为 13.44,8 个品系的 K/S 值分别居于其两侧。按 C3H/He 小鼠的 K/S 值为界划分,可将这 8 种品系的小鼠划分为浅灰和深灰两种类型。



注:1 ~4 号为浅灰色小鼠样本,5 号为 C3H/He 小鼠,6 ~9 号为深灰色小鼠样本。

图 1　不同品系灰色小鼠皮毛(A)与色深(B)

Note: 1-4 are light gray mice, No. 5 is a C3H/He mouse, No. 6-9 are deep gray mice.

Fig. 1　Different skin fur (A) and shades (B) of different gray mice

2.2　全基因组扫描与候选基因定位

对 N7 代小鼠进行 SNP array 芯片全扫,共扫描 1449 个位点。扫描结果显示(表 1),在野生小鼠连续回交七代后,部分染色体上仍存在少量的杂合子。比较黑色小鼠和灰色小鼠的杂合度与理论值的差异,发现 2 号染色体($P < 0.01$)明显偏离理论值,达极显著差异;而其他染色体上的 P 值皆大于 0.2,表明与理论值相接近,差异无显著性。

对其进行单倍型分析,结果如图 2 所示,将毛色相关基因定位到 2 号染色体上的 rs13476817 和 rs13476889 之间。上述两个 SNP 遗传距离在 60.37cM 和 97.89cM 之间,候选区段内只有 Agouti 基因与小鼠毛色相关,因此选定该基因为候选基因。

2.3　测序及氨基酸对比结果

2.3.1　候选基因的 cDNA 序列多态性

候选基因 cDNA 测序结果表明 Agouti 基因开放读码框(ORF)长 396 bp,编码的 Agouti 信号蛋白具有 131 个氨基酸(图 3A)。与 NCBI 参考序列比对,确定 C3H/He 小鼠的 Agouti 基因序列无任何变化,因此定义为野生型。

8 个品系加上 C3H/He 小鼠的多序列比对结果显示,浅灰鼠或深灰鼠在其编码框的第 37 bp 处都具有 A→G 突变;浅灰鼠在 108 bp 和 110 bp 处发生 G→A 突变,以及在 309 bp 处发生 A→G 突变;深灰鼠在 286 bp 处发生 C→G 突变。在这 5 个发生突变的位点中,其中有 4 个位点发生碱基转换,1 个位点发生碱基颠换。根据比对结果,将浅灰鼠发生的突变类型定义为Ⅰ类突变型,有三个碱基转换;深灰鼠发生的突变类型定义为Ⅱ类突变型,有一个碱基转换和一个碱基颠换。

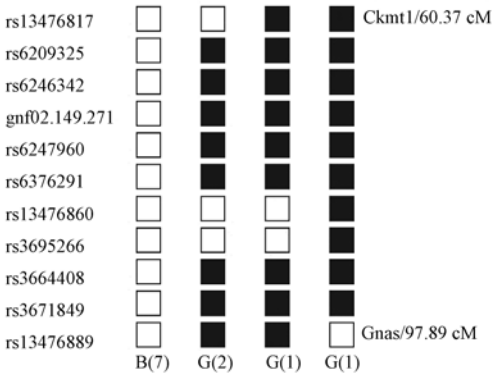
表 1 全基因组扫描结果

Tab. 1 The results of genome-wide scan

染色体 Chromosomes	SNP 探针 SNP probe	黑色小鼠 Black mice	杂合子 Heterozygote	灰色小鼠 Gray mice	杂合度 Heterozygosity	*P* 值 *P* value
Chr. 2	95	95	0	84	0. 116	2. 26E – 15 *
Chr. 3	83	83	0	83	0	0. 248
Chr. 4	73	73	0	73	0	0. 282
Chr. 5	84	84	0	84	0	0. 248
Chr. 6	82	82	0	82	0	0. 254
Chr. 7	74	74	0	74	0	0. 275
Chr. 8	58	56	2	58	0	0. 247
Chr. 9	64	63	1	64	0	1
Chr. 10	66	66	0	65	0. 015	0. 975
Chr. 11	56	56	0	56	0	0. 346
Chr. 12	66	66	0	66	0	0. 306
Chr. 13	58	58	0	58	0	0. 337
Chr. 14	62	62	0	62	0	0. 321
Chr. 15	60	60	0	60	0	0. 329
Chr. 16	50	50	0	50	0	0. 373
Chr. 17	49	49	0	49	0	0. 378
Chr. 18	47	47	0	47	0	0. 388
Chr. 19	35	35	0	35	0	0. 456
Chr. X	88	88	0	88	0	0. 237

注：* 表示 $P < 0.01$，与理论值比较差异有显著性。

Note: * Indicates $P < 0.01$, with a highly significant difference between the observed and theoretical values.



B: Black，黑色小鼠；G: Gray，灰色小鼠。□：纯合子；■：杂合子。括号内的数值为每个单倍型块的样本数。

图 2 单倍型分析结果

Note: B: Black mice; G: Gray mice. □: Homozygous; ■: Heterozygous. The numbers in brackets are the sample numbers of haplotypes.

Fig. 2 The results of haplotype analysis

2. 3. 2 氨基酸序列多态性

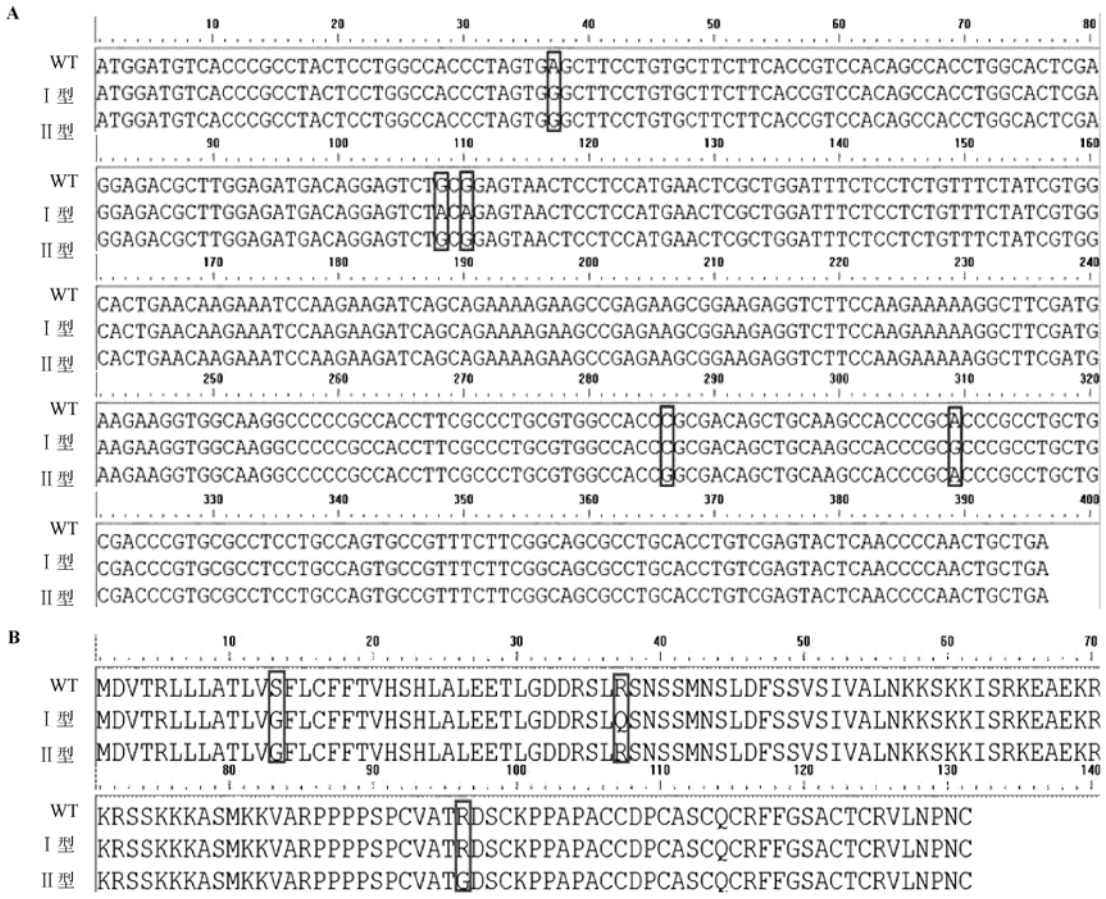
氨基酸序列比对结果表明（图 3B），两类突变型在第 108 位和 309 位的碱基被替换后所编码的氨基酸保持不变，产生同义突变；第 37 位的突变发生在信号肽上，导致丝氨酸突变为甘氨酸。Ⅰ类突变型第 110 位的突变发生在功能区的 N 端，导致精氨酸突变为谷氨酰胺。Ⅱ类突变型第 286 位的突变发生在富含半胱氨酸的 C 末端，导致精氨酸突变为甘氨酸。分别将这三处突变进一步分析。

利用 Signal P 4. 1 Server 软件分析Ⅰ类突变型和Ⅱ类突变型的 Agouti 信号蛋白，表明信号肽上的突变没有影响蛋白质的功能，其信号肽的长度、剪切位点仍与野生型的一致。

为增加检测的灵敏度，利用 PROVEAN 预测单一氨基酸替换对 Agouti 信号蛋白质功能区的影响，设定阈值为 – 1. 3，其准确度（balanced acurracy）达到 76. 1%。此时发现Ⅰ类突变型功能区的 R37Q 的得分为 – 0. 103，大于 – 1. 3，说明该突变对 Agouti 信号蛋白的功能无明显影响；而Ⅱ类突变型 C 末端的 R96G 的得分为 – 1. 344，小于 – 1. 3，则该突变可能影响 Agouti 信号蛋白的功能。

2. 3. 3 序列保守性

哺乳动物间 Agouti 信号蛋白的多序列比对结果显示（如图 4），Agouti 信号蛋白在不同物种间相似性较高，小鼠和人类、牛、马、兔、羊等的相似性分别为 79%、77%、77%、81%、76%。在不同物种间，第 13 位和第 37 位的氨基酸则都存在不同程度的多态性。该分析还表明，C 末端的半胱氨酸富含区具有高度的保守性，其中第 101 位（即小鼠 Agouti 基因氨基酸序列的第 96 位）的氨基酸均为精氨酸（R），在不同物种间极为保守，因此Ⅱ类突变型 C 末



注：WT 为野生型小鼠；Ⅰ型为Ⅰ类突变型；Ⅱ型为Ⅱ类突变型。

图 3　Agouti 基因 cDNA 序列多态性（A）和氨基酸（B）序列多态性

Note: WT means wild type mice; Type I means type I mutant; Type II means type II mutant.

Fig. 3　The polymorphisms of Agouti cDNA sequence (A) and amino acid sequence (B)

端的 R96G 有可能影响蛋白质性质与功能。

2.4　ASP 信号蛋白结构预测

2.4.1　氨基酸改变对蛋白质二级结构的影响

分别对野生型、Ⅰ类突变型和Ⅱ类突变型的 Agouti 信号蛋白进行二级结构预测，如图 5A 所示。结果表明Ⅰ类突变型和野生型的二级结构一致，Ⅱ类突变型的 Agouti 信号蛋白二级结构的 C 末端比野生型多了一个 γ 转角和一个二硫键，但少了一个 β 转角，该 β 转角的缺失导致Ⅱ类突变体上其余的 β 转角相较于野生型都发生了不同程度的变化（图 5B），这些突变可能会改变 Agouti 信号蛋白的三级结构。

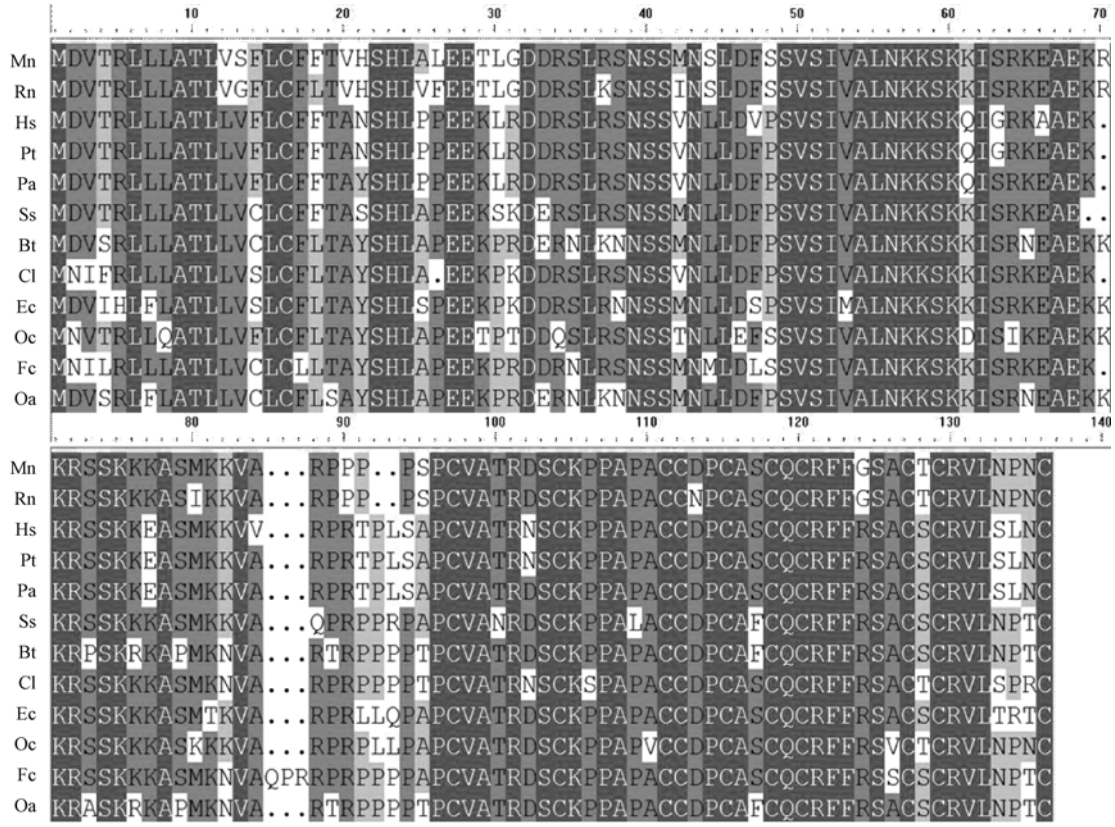
2.4.2　预测 Agouti 信号蛋白的三级结构与受体的结合

预测 Agouti 信号蛋白的三级结构时发现，相较于野生型，Ⅰ类突变型未发生任何变化，Ⅱ类突变型 Agouti 信号蛋白的 C 末端缺失一个 β 折叠（如图 6 所示箭头），导致 Agouti 信号蛋白的正确折叠受到影响，这一结果符合 Agouti 信号蛋白的 C 末端（92－131AA）高度保守[17]的特性。

在模拟 Agouti 信号蛋白与黑素皮质素受体 MC1R 的结合（图 7）时发现，Ⅱ类突变型的空间结构由紧密型变为疏散型。从三维结构模拟图中可以看出，野生型 Agouti 信号蛋白与受体 MC1R 结合的残基为 116 位精氨酸（Arg）、117 位苯丙氨酸（Phe）和 118 位的苯丙氨酸（Phe），配体与受体结合紧密。但是突变后的 Agouti 信号蛋白与受体结合的残基仅剩 117 位的苯丙氨酸（Phe），与受体的结合明显松散。

3　讨论

本研究在深灰色与浅灰色小鼠这两组小鼠中，共发现 5 个 SNPs，产生 3 个氨基酸突变，其中两个无明显影响，第三个突变改变了 Agouti 信号蛋白的



注：背景色深浅表示相似性程度的高低，即背景色越深，相似度越高。Mm：小鼠；Rn：褐家鼠；Hs：人类；Pt：黑猩猩；Pa：东非狒狒；Ss：野猪；Bt：牛；Cl：家犬；Ec：马；Oc：家兔；Fc：猫；Oa：绵羊。

图 4 12 种哺乳动物 Agouti 基因在氨基酸组成上的比较分析

(Note: The shade of background color indicate similarity, the heavier the color, the higher similarity. Mm: *Mus musculus*; Rn: *Rattus norvegicus*; Hs: *Homo sapiens*; Pt: *Pan troglodytes*; Pa: *Papio anubis*; Ss: *Sus scrofa*; Bt: *Bos taurus*; Cl: *Canis lupus familiaris*; Ec: *Equus caballus*; Oc: *Oryctolagus cuniculus*; Fc: *Felis catus*; Oa: *Ovis aries*)

Fig. 4 Comparative analysis of amino acid composition of Agouti gene in twelve mammals

正确折叠，进而影响了 Agouti 信号蛋白的结构与功能。

从物种间的保守性角度来分析，Agouti 基因在 C 末端非常保守，尤其是 92～131 氨基酸，而本研究的 C 末端 R96G 恰好位于该区域，该位点在物种间相似性程度达 100%，推测该区域内的突变会导致生物学功能的改变。

Willard 等[18]用酶对 Agouti 信号蛋白进行消化后发现，C 末端（保留 81～131 氨基酸残基的蛋白片段）仍具有完整的 Agouti 信号蛋白生物活性；研究 Agouti 基因的突变发现，Agouti 信号蛋白（ASP）的 N 端糖基化位点和主要富含半胱氨酸区的 C 末端对保留 ASP 完整的生物学功能十分重要，而富含赖氨酸/精氨酸残基的中间区的基因突变似乎不影响 ASP 的生物学功能[19-20]。本研究证实，Ⅰ类突变型 Agouti 编码区的突变没有发生在 N 端连接的糖基化位点和 C 末端，对蛋白质的结构和功能没有任何影响。Ⅱ类突变型的 Agouti 编码区的突变不仅发生在 Agouti 信号蛋白的 C 末端，而且还发生在 KxxxxKxxR 这个重要的模序[21]中。

根据文献报道，Agouti 信号蛋白 C 末端第 83 位 Val→Ala 的突变会降低抑制 α-MSH 结合到受体 MC1R 的能力[23]。这与本研究发现 Agouti 信号蛋白 C 末端 R96G 会降低 ASP 与 MC1R 结合效价的结果相一致。进一步利用生物信息学分析时发现，该突变使Ⅱ类突变型 Agouti 信号蛋白在突变位点比野生型缺少了一个 β 折叠，导致其构象不如野生型紧密；同时其与受体 MC1R 的结合位点仅剩 117 位的苯丙氨酸，而不是残基三联体（Arg-Phe-Phe，RFF）[21-22]，导致与受体的结合能力有所下降。利用电脑测色配色仪对不同品系间存在毛色差异的小鼠进行毛色检测（图 1），发现Ⅱ类突变型小鼠的毛色相较于野生型和Ⅰ类突变型小鼠偏向于较深的灰色。

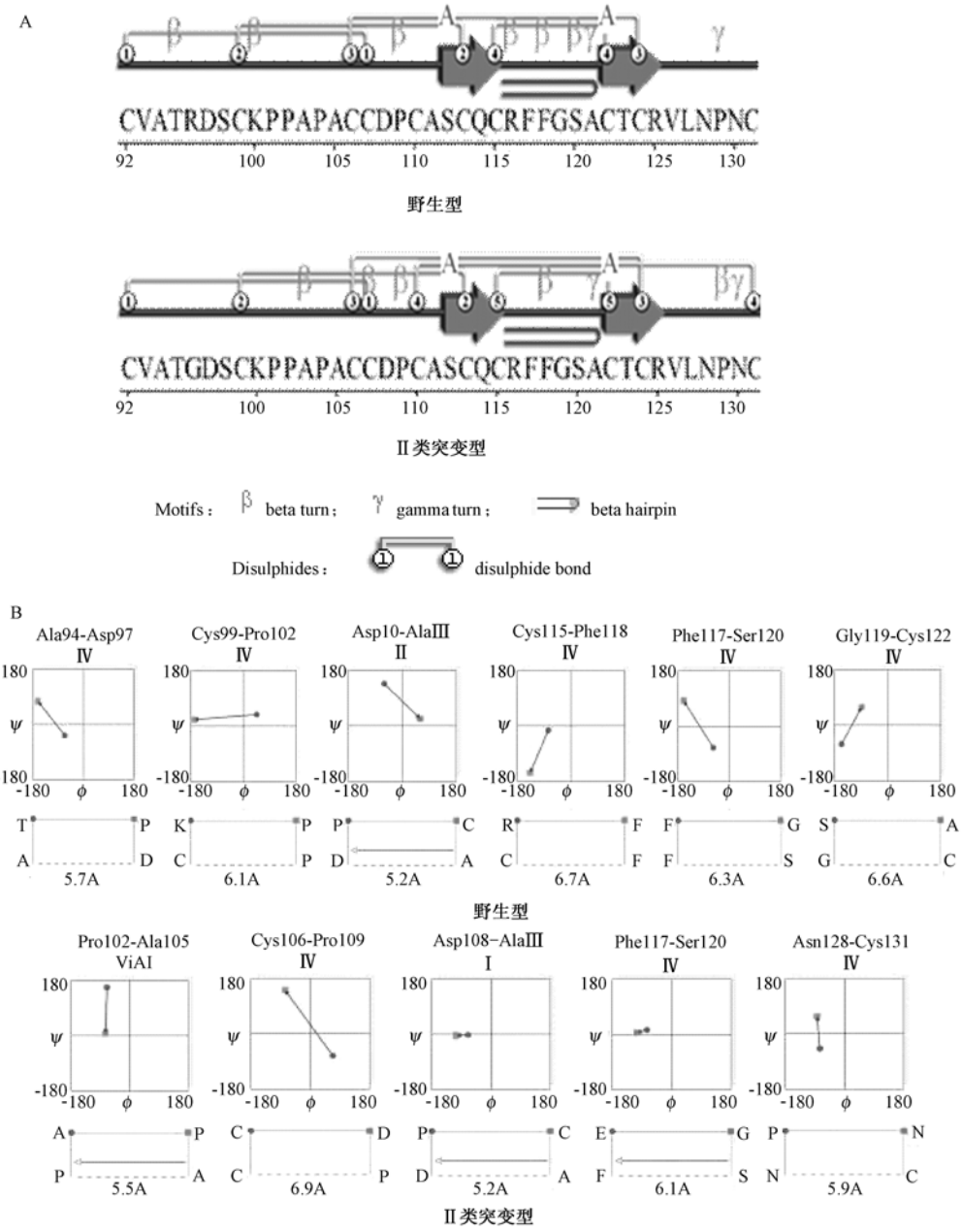


图 5　Agouti 信号蛋白二级结构预测

Fig. 5　Prediction of the secondary structure of Agouti signaling protein

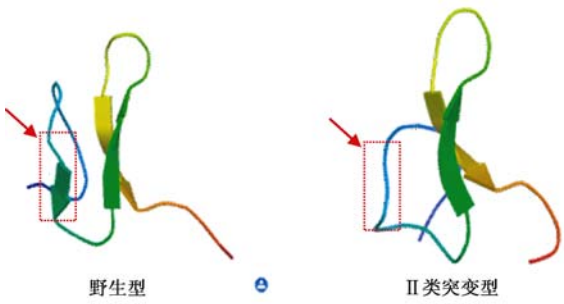


图 6　Agouti 信号蛋白的三级结构预测

Fig. 6　Prediction of the tertiary structure of Agouti signaling protein

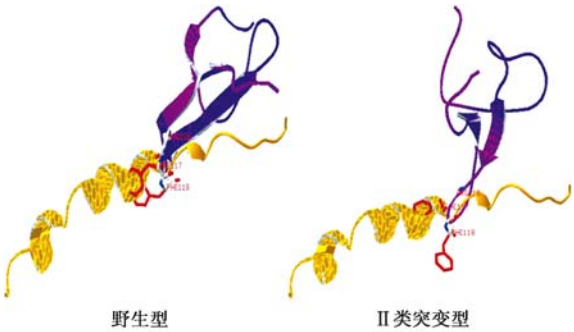


图 7　Agouti 信号蛋白与受体 MC1R 的结合

Fig. 7　Agouti signaling protein binding to MC1R

综上所述,本研究在候选基因 Agouti 编码区发现的突变(R96G)为重要错义突变,生物信息学预测该突变降低了 Agouti 信号蛋白抑制 α-MSH 结合到受体 MC1R 的能力,使毛囊黑色素细胞主要合成真黑素而不是褐黑素,导致真黑素/褐黑素的比例升高,影响毛色的表型。

参 考 文 献

[1] Klungland H, Våge DI, Gomez-Raya L, et al. The role of melanocyte-stimulating hormone (MSH) receptor in bovine coat color determination [J]. Mamm Genome, 1995, 6(9): 636 – 639.

[2] Kondo T, Hearing VJ. Update on the regulation of mammalian melanocyte function and skin pigmentation [J]. Expert Rev Dermatol, 2011, 6(1):97 – 108.

[3] Videira IF, Moura DF, Magina S. Mechanisms regulating melanogenesis [J]. An Bras Dermatol, 2013, 88(1): 76 – 83.

[4] Chluba-de Tapia J, Bagutti C, Cotti R, et al. Induction of constitutive melanogenesis in amelanotic mouse melanoma cells by transfection of the human melanocortin-1 receptor gene [J]. J Cell Sci, 1996, 109:2023 – 2030.

[5] Kingsley EP, Manceau M, Wiley CD, et al. Melanism in peromyscus is caused by independent mutations in Agouti [J]. PLoS ONE. 2009, 4(7):e6435.

[6] Swope VB, Jameson JA, McFarland KL, et al. Defining MC1R regulation in human melanocytes by its agonist α-melanocortin and antagonists agouti signaling protein and β-defensin 3 [J]. J Invest Dermatol, 2012, 132(9):2255 – 2262.

[7] Sakai C, Ollmann M, Kobayashi T, et al. Modulation of murine melanocyte function in vitro by agouti signal protein [J]. EMBO J, 1997, 16(12):3544 – 3552.

[8] Suzuki H. Evolutionary and phylogeographic views on Mc1r and Asip variation in mammals [J]. Genes Genet Syst, 2013, 88(3):155 – 164.

[9] 杨云青, 高丹玫, 郭宗圣. Agouti 和 Agouti 相关蛋白的一些生物学内涵 [J]. 动物学杂志, 2008, 43(5):144 – 152.

[10] Bultman SJ, Klebig ML, Michaud EJ, et al. Molecular analysis of reverse mutations from nonagouti (a) to black-and-tan (a^t) and white-bellied agouti (A^w) reveals alternative forms of agouti transcripts [J]. Genes Dev, 1994, 8(4):481 – 490.

[11] Waterland RA, Jirtle RL. Transposable elements: targets for early nutritional effects on epigenetic gene regulation [J]. Mol Cell Biol, 2003, 23(15):5293 – 5300.

[12] Dolinoy DC, Weidman JR, Waterland RA, et al. Maternal genistein alters coat color and protects A^{vy} mouse offspring from obesity by modifying the fetal epigenome [J]. Environ Health Perspect, 2006, 114(4):567 – 572.

[13] Dolinoy DC, Huang D, Jirtle RL. Maternal nutrient supplementation counteracts bisphenol A-induced DNA hypomethylation in early development [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(32):13056 – 13061.

[14] Rosenfeld CS, Sieli PT, Warzak DA, et al. Maternal exposure to bisphenol A and genistein has minimal effect on A^{vy}/a offspring coat color but favors birth of agouti over nonagouti mice [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, 110(2):537 – 542.

[15] 晁天柱, 陈国强, 赵莹等. 用于“野生小家鼠来源一号染色体替换系”构建的 PCR-LDR 分型系统 [J]. 中国实验动物学报, 2011, 19(5):372 – 376.

[16] Choi Y, Sims GE, Murphy S, et al. Predicting the functional effect of amino acid substitutions and indels [J]. PLoS ONE, 2012, 7(10): e46688.

[17] Miltenberger RJ, Mynatt RL, Bruce BD, et al. An agouti mutation lacking the basic domain induces yellow pigmentation but not obesity in transgenic mice [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999, 96(15):8579 – 8584.

[18] Willard DH, Bodnar W, Harris C, et al. Agouti structure and function: characterization of a potent alpha-melanocyte stimulating hormone receptor antagonist [J]. Biochemistry, 1995, 34(38):12341 – 12346.

[19] Eberle AN, Bódi J, Orosz G, et al. Antagonist and agonist activities of the mouse agouti protein fragment (91 – 131) at the melanocortin-1 receptor [J]. J Recept Signal Transduct Res, 2001, 21(1):25 – 45.

[20] Perry WL, Nakamura T, Swing DA, et al. Coupled site-directed mutagenesis/transgenesis identifies important functional domains of the mouse agouti protein [J]. Genetics, 1996, 144(1):255 – 264.

[21] Virador VM, Santis C, Furumura M, et al. Bioactive motifs of agouti signal protein [J]. Exp Cell Res, 2000, 259(1):54 – 63.

[22] Patel MP, Cribb Fabersunne CS, Yang YK, et al. Loop-swapped chimeras of the agouti-related protein and the agouti signaling protein identify contacts required for melanocortin 1 receptor selectivity and antagonism [J]. J Mol Biol, 2010, 404(1):45 – 55.

[23] Kiefer LL, Ittoop OR, Bunce K, et al. Mutations in the carboxyl terminus of the agouti protein decrease agouti inhibition of ligand binding to the melanocortin receptors [J]. Biochemistry, 1997, 36(8):2084 – 2090.

[收稿日期] 2013-12-17