

研究论著

拉布拉多犬髌关节发育不良相关基因的 SNP 位点的检测*

赵明媛 韩芳 李雅婵 俞剑熊 张雅丽 周子娟 王福金 王爱国 王靖宇

(大连医科大学实验动物中心,大连 116044)

摘要:目的 检测拉布拉多犬基因组 DNA 中与髌关节发育不良密切相关的 5 个基因中的 6 个 SNP 位点,以期为拉布拉多犬的选育提供有效的遗传学诊断方法。方法 经影像学诊断,筛选出典型的 6 只髌关节发育不良和 11 只正常拉布拉多犬作为实验对象,采取静脉血,提取血细胞的基因组 DNA 样本,采用 PCR/测序方法对 17 个样本的 5 个基因中的 6 个 SNP 位点:LAMA2(CFA1:70997779),LRR1(CFA8:29247021),SCR(CFA24:28944481),COL6A3(CFA25:51031100,51040259)和 FN1(CFA37:25095511)进行变异型检测,并统计分析 SNP 位点的变异型与髌关节发育不良犬关联度。结果 LAMA2(CFA1:70997779),LRR1(CFA8:29247021),SCR(CFA24:28944481),COL6A3(CFA25:51031100)和 FN1(CFA37:25095511)SNP 位点的变异型与拉布拉多犬的髌关节发育不良没有显著相关性($P>0.05$)。COL6A3(CFA25:51040259)SNP 位点的 A/A 型与拉布拉多犬的髌关节发育不良存在极显著相关性($P=0.007$)。结论 COL6A3(CFA25:51040259)SNP 位点的 A/A 型可能成为拉布拉多犬髌关节发育不良的实用性遗传学诊断指标,但尚需大样本确认。

关键词:拉布拉多犬;髌关节发育不良(CHD);单核苷酸多态性(SNP);遗传学诊断

中图分类号: R394.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-6179(2015)04-0021-05

导盲犬是专门培训用来为视障人士提供向导服务的工作犬^[1]。导盲犬的产出率低,成本高是目前困扰导盲犬事业的难题^[2]。导盲犬的低产出率主要归因于犬的生理病患和培训效率,而髌关节发育不良(CHD)正是淘汰导盲犬的首要生理病患。犬的髌关节发育不良是一种以髌关节发育异常为主要症状的多基因遗传疾病,使犬无法正常行走,给犬生活造成重大的影响^[3,4]。目前,国内外仅有数篇文献对犬髌关节发育不良相关 SNPs 的多态性做了初步探讨^[5-8],但都没有涉及遗传学分子诊断的实用性验证。本研究以中国导盲犬大连培训基地典型髌关节发育不良的拉布拉多为研究对象,对已报道与髌关节发育不良显著相关的 5 个基因中的 6 个 SNP 位点的多态性进行了检测,以期为拉布拉多犬的选育提供有效的遗传学诊断方法。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物:拉布拉多犬 17 只,由中国导盲犬大连培训基地提供。

1.1.2 主要试剂与仪器:真空采血管,购于江苏康健医疗用品有限公司;Blood Extraction Kit 试剂盒,购于宝生物(大连)生物技术有限公司;琼脂糖凝胶回收试剂盒,购于北京天根生化科技有限公司。主要仪器包括动物 X 光机(AVChoice 400,代尔公司),PCR 仪(美国 Thermo 公司);电泳仪(北京百晶生物技术有限公司);Gel DocTM EZ 成像仪(Bio RAD 公司)等。

1.2 方法

1.2.1 影像学诊断:采用动物 X 光机对中国导盲犬大连培训基地的拉布拉多犬的髌关节进行影像学诊断,髌关节发育不良的发病程度采用 Norberg 角来度量,方法为在一张标准的 OFA(Orthopedic

收稿日期:2015-07-06

* 基金项目:国家自然科学基金(No.31272392)

作者简介:赵明媛(1989-),女,硕士。研究方向:分子遗传学。E-mail:yujianxiongzy@163.com

通信作者:王靖宇,E-mail:wangjingyus@163.com;王爱国,E-mail:wangaiguotl@hotmail.com

Foundation for Animal)片子上,在两股骨头中心作一连线,再由股骨头中心向髌臼前侧缘作直线,这两线夹角为 Norberg 角, Norberg 角的范围一般在 50° ~ 120°之间,角度越小,表示关节松弛越严重^[4],使股骨头易于或完全脱出髌臼,从而导致行走不便或无法行走的病症。最终筛选出典型的 6 只髌关节发育不良和 11 只正常拉布拉多犬作为实验对象,拉布拉多正常犬和典型髌关节发育不良犬如图 1 所示。

1.2.2 基因组 DNA 的提取:从犬前肢静脉采血 5 mL,置于含 EDTA 抗凝剂的真空采血管中。采用 Blood Extraction Kit 试剂盒提取血细胞中的基因组 DNA,具体操作步骤按试剂盒说明书进行。

1.2.3 引物设计:依据文献中已报道的与髌关节发育不良相关的 5 个基因的 6 个 SNP 位点^[4-6],在 UCSC 数据库 (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>)上进行基因位点确认,以 SNP 位点为中心选取 DNA 序列,应用 Primer 3.0 软件 (<http://primer3.ut.ee/>)进行引物设计,并对设计的引物进行 PCR 验证和条件优化。基因的 SNP 位点信息及引物序列详见表 1。

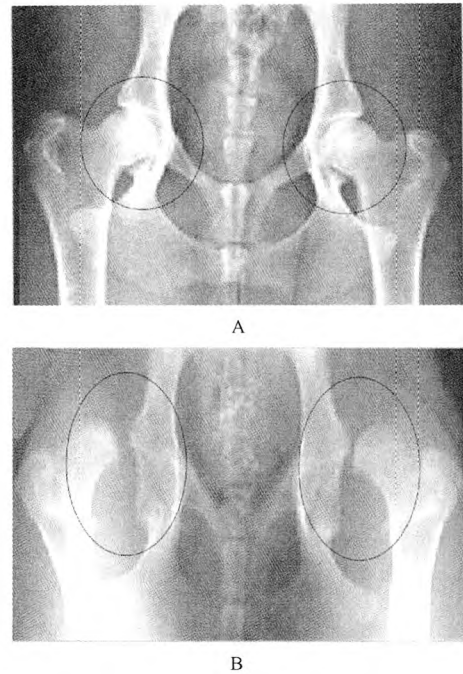


图 1 犬髌关节 X 光影像图
注:A:正常犬;B:典型髌关节发育不良犬
Fig.1 X ray image of the dog hip joint
Note:A: normal; B: severe of CHD

表 1 髌关节发育不良相关基因的 SNP 位点信息及引物序列

Table 1 The bioinformation and primer sequences of SNPs of the CHD related genes

CFA	Gene	SNP	location	Renferences	Primer Sequences (5'-3')
1	LAMA2	A > T	70997779	Ineke C. M. Lavrijsen (2014)	Forward: gggcctcctcttctgatgact Reverse: ccctgggaagcttctgtact
8	LRR1	C > T	29247021	Ineke C. M. Lavrijsen (2014)	Forward: tggctactgaagcgctgtta Reverse: ggcttcctttctctaatctgac
24	SRC	C > G	28944481	Lena Fels (2014)	Forward: aatgggcatcggttttacc Reverse: tgcagagggttgggttctct
25	COL6A3	A > G	51031100	Ineke C. M. Lavrijsen (2014)	Forward: tcttgacttacgggtccacc Reverse: gctctatcaaaaggaacgggg
		A > G	51040259		Forward: cgtcccttgcatggttaaat Reverse: tatcttcaagagccctctgg
37	FN1	T > A	25095511	Sophia Pfahler (2012)	Forward: tccccttatgtagtacgtgca Reverse: cccctatctgcctttctca

1.2.4 SNPs DNA 片段获取和纯化:PCR 反应条件:预变性 94 ℃ 5 min;PCR 循环:94 ℃ 1 min, 60 ℃ 1 min, 72 ℃ 1 min, 循环 35 次;延伸 72 ℃ 7 min。凝胶成像系统显影,应用琼脂糖凝胶回收试剂盒对目的条带进行回收和纯化。

1.2.5 测序及 SNP 位点分型:上述纯化的 DNA 片段,委托宝生物(大连)生物技术有限公司进行测序。通过测序数据的分析,确认髌关节发育不良相关 SNPs 位点在拉布拉多犬中的多态性类型。

1.3 统计方法

采用 SPSS 13.0 统计学软件,应用 χ^2 检验对髌关节发育不良相关基因的 SNPs 位点多态性与髌关节发育不良进行关联度分析, $P < 0.05$ 为显著相关。

2 结果

2.1 LAMA2 基因的 CFA1: 70997779 SNP 位点的多态性检测及分析

以中国导盲犬大连培训基地的 6 只典型髌关节

发育不良和 11 只正常的拉布拉多犬为对象,对 LAMA2 基因的 CFA1:70997779 SNP 位点进行 PCR/测序和统计学分析,结果如表 2 所示:A/A、A/T、T/T 型在正常犬和髌关节发育不良犬中所占比例均没有显著差异($P>0.05$)。

表 2 LAMA2 基因 CFA1:70997779 SNP 位点的检测及分析
Table 2 The detection and analysis of LAMA2

CFA1:70997779 SNP loci			
LAMA2	正常犬	髌关节发育不良犬	P 值
A/A	7(64%)	5(83%)	0.474
A/T	3(27%)	1(17%)	0.515
T/T	1(9%)	0(0%)	0.296
总计	11	6	

2.2 LRR1 基因的 CFA8:29247021 SNP 位点的多态性检测及分析

对 LRR1 基因的 CFA8:29247021 位点进行 PCR/测序和统计学分析,结果如表 3 所示:C/C、C/T、T/T 型在正常犬和髌关节发育不良犬中所占比例均没有显著差异($P>0.05$)。

表 3 LRR1 基因的 CFA8:29247021 SNP 位点的检测及分析
Table 3 The detection and analysis of LRR1

CFA8:29247021 SNP loci			
LRR1	正常犬	髌关节发育不良犬	P 值
C/C	4(31%)	2(33%)	0.893
C/T	8(62%)	4(67%)	0.864
T/T	1(8%)	0(0%)	0.369
总计	11	6	

2.3 SCR 基因的 CFA24:28944481 SNP 位点的多态性检测及分析

对 SCR 基因的 CFA24:28944481 位点进行 PCR/测序和统计学分析,结果如表 4 所示:C/C、C/G、G/G 型在正常犬和髌关节发育不良犬中所占比例均没有显著差异($P>0.05$)。

表 4 SCR 基因的 CFA24:28944481 SNP 位点的检测及分析
Table 4 The detection and analysis of SCR

CFA24:28944481 SNP loci			
SCR	正常犬	髌关节发育不良犬	P 值
C/C	3(27%)	2(33%)	0.707
C/G	4(36%)	2(33%)	0.876
G/G	4(36%)	2(33%)	0.876
总计	11	6	

2.4 COL6A3 基因的 CFA25:51031100 SNP 位点的多态性检测及分析

对 COL6A3 基因的 CFA25:51031100 位点进行

PCR/测序和统计学分析,结果如表 5 所示:A/A、A/G、G/G 型在正常犬和髌关节发育不良犬中所占比例均没有显著差异($P>0.05$)。

表 5 COL6A3 基因的 CFA25:51031100 SNP 位点的检测及分析
Table 5 The detection and analysis of

COL6A3 CFA25:51031100 SNP loci			
COL6A3	正常犬	髌关节发育不良犬	P 值
A/A	6(55%)	4(67%)	0.628
A/G	3(27%)	2(33%)	0.707
G/G	2(18%)	0(0%)	0.155
总计	11	6	

2.5 COL6A3 基因的 CFA25:51040259 SNP 位点的多态性检测及分析

对 COL6A3 基因的 CFA25:51040259 位点进行 PCR/测序和统计学分析,结果如表 6 所示:A/A 型在正常犬(18%)和髌关节发育不良犬(50%)中所占比例存在极显著差异($P=0.007$),与髌关节发育不良显著相关;A/G 和 G/G 在正常犬和髌关节发育不良犬中所占比例均没有显著差异($P>0.05$)。

表 6 COL6A3 基因的 CFA25:51040259 SNP 位点的检测及分析
Table 6 The detection and analysis of

COL6A3 CFA25:51040259 SNP loci			
COL6A3	正常犬	髌关节发育不良犬	P 值
A/A	2(18%)	3(50%)	0.007**
A/G	7(64%)	3(50%)	0.629
G/G	2(18%)	0(0%)	0.155
总计	11	6	

2.6 FN1 基因的 CFA37:25095511 SNP 位点的多态性检测及分析

对 FN1 基因的 CFA37:25095511 位点进行 PCR/测序和统计学分析,结果如表 7 所示:T/T、T/A、A/A 型在正常犬和髌关节发育不良犬中所占比例均没有显著差异($P>0.05$)。

表 7 FN1 基因的 CFA37:25095511 SNP 位点的检测及分析
Table 7 The detection and analysis of FN1

CFA37:25095511 SNP loci			
FN1	正常犬	髌关节发育不良犬	P 值
T/T	3(27%)	3(50%)	0.145
T/A	6(55%)	3(50%)	0.858
A/A	2(18%)	0(0%)	0.155
总计	11	6	

3 讨论

本文选用了文献中已报道的与髌关节发育不良密切相关的 5 个基因中的 6 个 SNP 位点^[5,7,8]。有研究表明,这 5 个基因 (LAMA2, LRR1, COL6A3, FN1 和 SCR) 与软骨形成、发育和生理机能,软骨基质组织功能,细胞支架重组和破骨细胞存活有关^[9~13]。因此,这些基因的表达变化或功能异常可能与髌关节发育不良密切相关。CFA1:70997779 和 CFA25:51031100、CFA25:51040259 SNP 位点分别位于 LAMA2 的第 33 外显子和 COL6A3 基因的第 15 和 8 外显子中,为同义变异;CFA8:29247021 和 CFA24:28944481、CFA37:25095511 SNP 位点分别位于 LRR1 的 3'-UTR 区和 SCR、FN1 基因的上游序列中,这些 SNP 位点的变异可能会对相关基因的表达和功能产生影响,因而有可能成为髌关节发育不良的候选遗传学诊断指标。

我们的检测结果表明, COL6A3 SNP 位点 (CFA25:51040259) 的 A/A 型在正常和髌关节发育不良拉布拉多犬中的比例有极显著性差异 (表 5), 与髌关节发育不良疾病具有显著相关性 ($P = 0.007$)。COL6A3 基因编码胶原蛋白 VI 的 $\alpha 3$ 链, 是软骨细胞周围基质的特有成分, 对软骨细胞具有重要的保护作用, COL6A3 基因变异会导致关节异常松弛^[5]。CFA25:51040259 SNP 位点位于 COL6A3 的第 8 个外显子上, 为同义变异, 该变异可能会对 COL6A3 基因的表达及功能产生影响。特别是, 在本实验的小样本检测中, 该 SNP 位点就与髌关节发育不良呈现出显著相关性, 表明 COL6A3 SNP 位点 (CFA25:51040259) 的 A/A 型可能成为拉布拉多犬髌关节发育不良的实用性遗传检测指标, 但还需大样本验证。

SCR (CFA24:28944481) 和 FN1 (CFA37:25095511) SNP 位点的变异型在正常和髌关节发育不良拉布拉多犬中的比例没有显著差异, 与已报道的文献不一致^[7,8], 这可能是由本实验中犬只的样本量少及犬种不同等原因导致的。而在 Ineke 的研究中^[5], 使用的犬只样本也是拉布拉多犬, 但该文文献中筛选出的与髌关节发育不良显著相关的 LAMA2 (CFA1:70997779)、LRR1 (CFA8:29247021)、COL6A3 (CFA25:51031100) 和 COL6A3 (CFA25:51040259) 4 个 SNP 位点中, 在本研究中仅

证实了 CFA25:51040259 SNP 位点的显著相关性, 其他 3 个 SNP 位点的变异型在正常和髌关节发育不良拉布拉多犬中的比例并没有显著差异。因此, 大样本检测获得的显著相关性遗传学变异需通过进一步的实验验证, 以确实其成为实用性遗传学诊断指标可能性。

综上所述, COL6A3 SNP 位点 (CFA25:51040259) 的 A/A 型与拉布拉多犬的髌关节发育不良具有显著的相关性, 该位点可能会成为拉布拉多犬的髌关节发育不良疾病的实用性遗传学诊断指标, 但还需大样本确认。

参考文献

- [1] 俞剑熊, 张雅丽, 周子娟, 等. 拉布拉多犬与金毛猎犬毛色基因 MC1R (R306ter) 与 TYRP1 (Q331ter) SNP 位点的检测 [J]. 实验动物科学, 2014, 31(3): 37~41.
- [2] 俞剑熊, 张雅丽, 周子娟, 等. 犬毛色、毛色基因型及性别与导盲犬培训成功率的相关性研究 [J]. 实验动物科学, 2014, 31(6): 32~35.
- [3] 马 昆, 张变松, 卢德章, 等. 犬髌关节发育不良的诊断遗传控制和预防管理 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2011, (2): 103~105.
- [4] Guo G, Zhou Z, Wang Y, et al. Canine hip dysplasia is predictable by genotyping [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2011, 19(4): 420~429.
- [5] Ineke C. M. Lavrijsen, Peter A. J. Leegwater, Alan J. Martin, et al. Genome Wide Analysis Indicates Genes for Basement Membrane and Cartilage Matrix Proteins as Candidates for Hip Dysplasia in Labrador Retrievers [J]. PLoS One, 2014, 9(1): e87735.
- [6] Fels L, Marschall Y, Philipp U, et al. Multiple loci associated with canine hip dysplasia (CHD) in German shepherd dogs [J]. Mamm Genome, 2014, 25(5/6): 262~269.
- [7] Fels L, Distl O. Identification and Validation of Quantitative Trait Loci (QTL) for Canine Hip Dysplasia (CHD) in German Shepherd Dogs [J]. PLoS Onem 2014, 9(5): e96618.
- [8] Pfahler S, Distl O. Identification of quantitative trait loci (QTL) for canine hip dysplasia and canine elbow dysplasia in Bernese mountain dogs [J]. PLoS One, 2012, 7(11): e49782.
- [9] Shibuya S, Wakayama Y, Inoue M, et al. Merosin (laminin-2) localization in basal lamina of normal skeletal muscle fibers and changes in plasma membrane of merosin-deficient skeletal muscle fibers [J]. Med Electron Microsc, 2003, 36(4): 213~220.
- [10] Jang L K, Lee Z H, Kim H H, et al. A novel leucine-rich repeat protein (LRR-1): Potential involvement in 4 - 1BB-mediated signal transduction [J]. Mol Cells, 2001, 12(3): 304~312.
- [11] Peters H C, Otto T J, Enders J T, et al. The protective role of the pericellular matrix in chondrocyte apoptosis [J]. Tissue Eng Part A, 2011, 17(15/16): 2017~2024.
- [12] Boyce B F, Xing L, Yao Z, et al. SRC inhibitors in metastatic

bone disease[J]. *Clinical Cancer Research*, 2006, 12(20 Pt 2):6291s~6295s.

[13] MacLeod J N, Burton-Wurster N, Gu D N, *et al.* Fibronectin

mRNA splice variant in articular cartilage lacks bases encoding the V, III-15, and I-10 protein segments[J]. *J Biol Chem*, 1996, 271: 18954~18960.

Detection for SNPs of Canine Hip Dysplasia (CHD) Related Genes in Labrador Retrievers

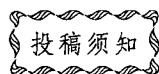
ZHAO Ming-yuan, HAN Fang, LI Ya-chan, YU Jian-xiong, ZHANG Ya-li,

ZHOU Zi-juan, WANG Fu-jin, WANG Ai-guo, WANG Jing-yu

(Laboratory Animal Center, Dalian Medical University, Dalian 116044, China)

Abstract: Objective To provide an efficient genetic diagnostics method for Labrador Retrievers, 6 SNPs of 5 canine hip dysplasia (CHD) related genes in genomic DNA of Labrador Retrievers were detected. **Method** 11 normal and 6 typical CHD Labrador Retrievers were selected by imaging diagnosis. The vein blood was sampled and the genomic DNA was isolated from white blood cells. The PCR/sequencing method was used to analyze the variants of 6 SNPs in 5 canine hip dysplasia (CHD) related genes (LAMA2 (CFA1:70997779), LRR1 (CFA8:29247021), SCR (CFA24:28944481), COL6A3 (CFA25:51031100, 51040259), and FN1 (CFA37:25095511)). Furth more, the association between the SNP variants and CHD was analyzed by Chi-square Test. **Result** The variants of LAMA2 (CFA1:70997779), LRR1 (CFA8:29247021), SCR (CFA24:28944481), COL6A3 (CFA25:51031100), and FN1 (CFA37:25095511) SNP loci were not significantly associated to CHD ($P > 0.05$). A/A variants in COL6A3(CFA25:51040259) SNP locus was significantly associated to CHD ($P = 0.007$). **Conclusion** A/A variants in COL6A3(CFA25:51040259) SNP locus might be used as a practical genetic detection index for CHD diagnostics in Labrador Retrievers. However, further confirmation in large-sample is required.

Key words: Labrador Retrievers; CHD; SNP; genetic diagnostics



关于“阿拉伯数字”的使用

凡是可以使用阿拉伯数字且很得体的地方均应使用阿拉伯数字。世纪、年代、年、月、日、时刻必须使用阿拉伯数字,年份必须用全称。对科技期刊来说,凡处在计量单位和计数单位前面的数字,包括9以下的各位数字,除个别特例外,均应使用阿拉伯数字。不是表示科学计量和有统计意义数字的一位数可以用汉字,例如:一本教材,两种商品等。4位以上(含4位)的数字,采用三位分节法,节和节之间空开1/4格的间距。

本刊编辑部