



拉布拉多犬神经类型相关基因 SNP 的分析 *

赵明媛 俞剑熊 韩芳 李雅婵 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 中与神经类型密切相关的 4 个基因中的 6 个 SNP 位点, 以期为拉布拉多犬神经类型的早期鉴定提供分子遗传学鉴定指标。方法 依据中国导盲犬大连培训基地成熟的导盲犬神经类型行为学评估标准, 选取典型的安静、活泼、胆小型(弱型)三种神经类型的犬各 4 只为研究对象, 采取静脉血, 提取血细胞的基因组 DNA 样本, 采用 PCR/测序方法和 PCR-RFLP 分析法对 12 个样本 4 个基因的 6 个 SNP 位点: COMT (G482A)、MOAB(T199C)、ABCB1(A985T、T3442C、377 - 378 insC)、GNB1L(961 - 962 insG) 进行变异型检测, 并统计分析 SNP 位点的变异型与神经类型的关联度。结果 COMT 基因 G482A SNP 位点的 G/A 型在胆小型犬中所占比例显著高于其在活泼型和安静型中所占比例 ($P = 0.014; P = 0.014$), A/A 型在活泼型犬中所占比例显著高于安静型和胆小型中所占比例 ($P = 0.025; P = 0.025$); MAOB 基因 T199C SNP 位点的 T/C 型在安静型犬中所占比例显著高于其在活泼和胆小型犬中所占比例 ($P = 0.025; P = 0.025$); ABCB1 基因 A985T SNP 位点的 T/A 型在活泼型犬中所占比例显著低于其在安静和胆小犬中所占比例 ($P = 0.014; P = 0.014$); ABCB1 基因 T3442C SNP 位点的 T/C 型在胆小型犬中所占比例显著高于其在活泼和安静型犬中所占比例 ($P = 0.025; P = 0.025$); ABCB1 基因的 377 - 378 insC 和 GNB1L 基因的 961 - 962 insG 均没有发现显著性差异 ($P > 0.05$)。结论 COMT 基因 G482A SNP 位点的 G/A 型和 A/A 型, MAOB 基因 T199C SNP 位点的 T/C 型, ABCB1 基因 A985T SNP 位点的 T/A 和 ABCB1 基因 T3442C SNP 位点的 T/C 型与拉布拉多犬神经类型具有显著相关性, 可做为拉布拉多犬神经类型早期鉴定的分子遗传诊断指标, 但尚需大样本确认。

关键词:拉布拉多犬; 神经类型; 单核苷酸多态性(SNP); 分子遗传学诊断

中图分类号: Q819 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006 - 6179(2015)03-0038-06

导盲犬是视障人士的“眼睛和助手”, 能协助视障人士的工作、学习和与周围环境的交流, 是任何其他工具无法比拟的首选^[1]。目前育种犬和导盲犬主要依据行为学测试的方法进行筛选, 该方法不但效率低, 而且消耗大量的人力物力, 导致导盲犬的培训成功率低, 成本居高不下^[2]。因此, 开发一种有效、简便的早期选育导盲犬的方法就显得十分重要。犬的神经类型是犬行为的标志性特点^[3], 分为安静型、活泼型、兴奋型和胆小型(弱型), 正是神经类型的不同导致了行为的个体差异。因此, 导盲犬的培训成功与否, 除了与培训技术方法有关外, 主要由犬的神经类型所决定。在选育过程中, 筛选出有利于育种或训练的神经类型的犬是关键环节, 而犬的神

经类型主要由遗传因素决定, 这为建立导盲犬早期选育的遗传学方法提供了可能。由于拉布拉多犬性情温顺^[4], 因此典型兴奋型的拉布拉多犬所占比例极少。本研究依据中国导盲犬大连培训基地成熟的犬神经类型评估方法, 筛选出典型的安静、活泼、胆小三种神经类型的拉布拉多犬为研究对象, 对已报道的与神经类型相关的 4 个基因^[5~8]的 6 个 SNP 位点进行检验, 以期建立导盲犬早期选育的遗传学分子标记。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物: 由中国导盲犬大连培训基地提

收稿日期: 2015-04-11

*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: circle8love@126.com

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

供。依据神经类型的行为学评估标准,分别筛选出典型的安静、活泼、胆小型(弱型)三种神经类型的拉布拉多犬各4只,共12只。

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,购于大连宝生物生物技术有限公司;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 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 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。

1.2.2 引物设计:选出文献中已报道的与神经类型相关的4个基因^[5~8]的6个SNP位点。其中 COMT 和 MAOB 的2个SNP位点的鉴定引物参照相关文献^[6,9],ABCB1 和 GNB1L 的4个SNP位点为自行设计,具体步骤如下:在 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>)上比对出相应的SNP位点,然后以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。

表1 神经类型相关基因的SNP位点信息及引物序列

Table 1 The bioinformation and primer sequences of the SNP loci of nerve pattern related genes

Gene	SNP	Primer Sequences (5' - 3')
COMT	G482A	Forward: tgccaggatgtggccatgtcac Reverse: caactcaaagcggttgcctccac
MOAB	T199C	Forward: tccatggatacacctcaagg Reverse: tgatggatgagacgcctctac
	A985T	Forward: gaaagcttatcacggccaaca Reverse: cactcaagccaaacaccactc
ABCB1	T3442C	Forward: aatgtccatgtggctccgag Reverse: tggtgtatgtggcttcctt
	377 - 378 insC	Forward: attacagtggatcggtgct Reverse: gtgttaagctccccaaacgtc
GNB1L	961 - 962 insG	Forward: ttgtgtatgtcaagatccgg Reverse: gttagatcgaccatgtcg

1.2.3 序列的扩增和RFLP分析:根据参考文献^[9]设定PCR反应条件,PCR产物用限制性内切酶Hinf I(Pst I)进行酶切,酶切体系为:PCR产物5 μL,

Buffer 1 μL,ddH₂O 3 μL,酶1 μL;酶切产物经10%的聚丙烯酰胺凝胶电泳,120 V 衡压电泳3 h后,显色后进行多态性判定。

1.2.4 序列的扩增纯化和测序分析: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。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,确认神经类型相关SNPs位点在拉布拉多犬中的多态性类型。

1.3 统计方法

采用SPSS13.0统计学软件,应用 χ^2 检验对神经类型相关基因的SNPs位点多态性与三种神经类型进行关联度分析, $P < 0.05$ 为显著相关。

2 结果

2.1 COMT 基因的 G482A SNP 位点的分型及分析

以中国导盲犬大连培训基地的典型的安静、活泼、胆小三种类型拉布拉多犬各4只为检测对象,对 COMT 基因的 G482A SNP 位点的进行 RFLP 分型和统计学分析,结果显示:G/A型在胆小型(50%)犬中所占比例显著高于活泼型(0%)和安静型(0%)($P < 0.05$);A/A型在活泼型(25%)犬中所占比例显著高于安静型(0%)和胆小型(0%)($P < 0.05$);而 G/G型在安静、活泼、胆小这三种类型中所占比例均没有显著差异($P > 0.05$)。(图1、表2)

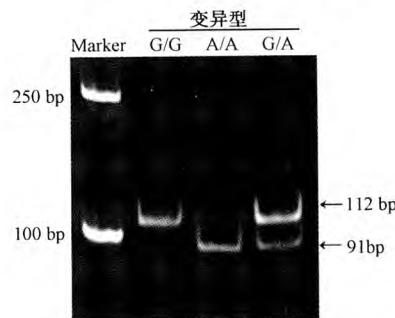


图1 COMT 基因 G482A SNP 位点的 PCR-RFLP 检测

Fig. 1 Variants of COMT G482A SNP loci analyzed by PCR-RFLP

2.2 MAOB 基因的 T199C SNP 位点的分型及分析

对 MAOB 基因的 T199C SNP 位点进行 RFLP 分

型和统计学分析,结果显示:T/C型在安静型(25%)犬中所占比例显著高于活泼型(0%)和胆小型(0%)($P < 0.05$);而T/T、C/C型在安静、活泼、

胆小这三种类型中所占比例均没有显著差异($P > 0.05$)。(图2、表3)

表2 COMT基因的G482A SNP位点的分型及分析

Table 2 The analysis of COMT G482A SNP loci

COMT	活泼	安静	胆小	P值		
				活泼 vs 安静	活泼 vs 胆小	安静 vs 胆小
G/G	3 (75%)	4 (100%)	2 (50%)	0.285	0.212	0.102
G/A	0 (0%)	0 (0%)	2 (50%)	—	0.014*	0.014*
A/A	1 (25%)	0 (0%)	0 (0%)	0.025*	0.025*	—

表3 MAOB基因的T199C SNP位点的分型及分析

Table 3 The analysis of MAOB T199C SNP loci

MAOB	活泼	安静	胆小	P值		
				活泼 vs 安静	活泼 vs 胆小	安静 vs 胆小
T/T	2 (75%)	2 (50%)	3 (75%)	—	0.212	0.212
T/C	0 (0%)	1 (25%)	0 (0%)	0.025*	—	0.025*
C/C	2 (50%)	1 (25%)	1 (25%)	0.121	0.121	—

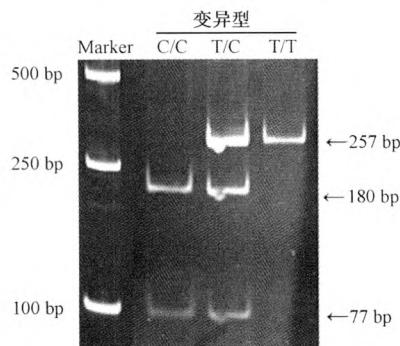


图2 MAOB基因的T199C SNP位点的PCR-RFLP检测

Fig. 2 Variants of MAOB T199C SNP loci analyzed by PCR-RFLP

2.3 ABCB1基因的A985T SNP位点的分型及分析

对ABCB1基因的A985T SNP位点的进行

PCR/测序鉴定和统计学分析,结果显示:T/A型在活泼型(0%)犬中所占比例显著低于安静型(50%)和胆小型(50%)($P < 0.05$);而T/T、A/A型在安静、活泼、胆小这三种类型中所占比例均没有显著差异($P > 0.05$)。(图3、表4)

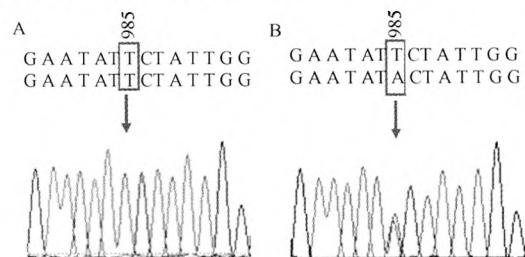


图3 ABCB1基因的A985T SNP位点的测序检测

A: T/T型, B: T/A型

Fig. 3 ABCB1 A985T SNP loci analyzed by sequencing

A: T/T, B: T/A

表4 ABCB1基因的A985T SNP位点的分型及分析

Table 4 The analysis of ABCB1 A985T SNP loci

ABCB1	活泼	安静	胆小	P值		
				活泼 vs 安静	活泼 vs 胆小	安静 vs 胆小
T/T	4 (100%)	2 (50%)	2 (50%)	0.102	0.102	—
T/A	0 (0%)	2 (50%)	2 (50%)	0.014*	0.014*	—
A/A	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	—	—	—

2.4 ABCB1基因的T3442C SNP位点的分型及分析

对ABCB1基因的T3442C SNP位点的进行PCR/测序鉴定和统计学分析,结果显示:T/C型在

胆小型(25%)犬中所占比例显著高于活泼型(0%)和安静型(0%)($P < 0.05$);而T/T、C/C型在安静、活泼、胆小这三种类型中所占比例均没有显著差异($P > 0.05$)。(图4、表5)

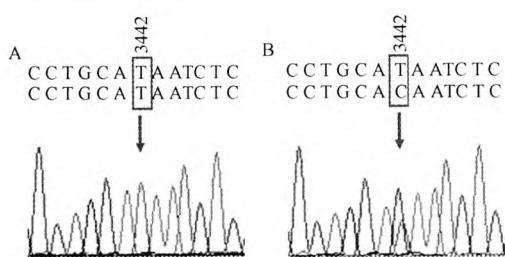


图 4 ABCB1 基因的 T3442C SNP 位点的测序结果
A 为 T/T 型,B 为 T/C 型

Fig. 4 The sequencing of ABCB1 T3442C SNP
A: T/T; B: T/C

2.5 ABCB1 基因的 377 - 378 insC SNP 位点的检测及分析

对 ABCB1 基因的 377 - 378 insC SNP 位点的进行 PCR/测序鉴定和统计学分析,结果显示:在活泼、安静和胆小型犬的检测中均没有发现插入的 C 碱基。(图 5、表 6)

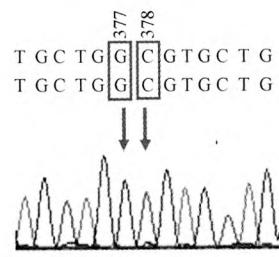


图 5 ABCB1 基因 377 - 378 insC SNP 位点的测序检测

Fig. 5 ABCB1 377 - 378 insC SNP loci
analyzed by sequencing

2.6 GNB1L 基因的 961 - 962 insG SNP 位点的检测及分析

对 GNB1L 基因的 961 - 962 insG SNP 位点的进行 PCR/测序鉴定和统计学分析,结果显示:在活泼、安静和胆小型犬的检测中均没有发现插入的 G 碱基。(图 6、表 7)

表 5 ABCB1 基因的 T3442C SNP 位点的分型及分析
Table 5 The analysis of ABCB1 T3442C SNP loci

ABCB1	活泼	安静	胆小	P 值		
				活泼 vs 安静	活泼 vs 胆小	安静 vs 胆小
T/T	4(100%)	4(100%)	3(75%)	—	0.285	0.285
T/C	0(0%)	0(0%)	1(25%)	—	0.025*	0.025*
C/C	0(0%)	0(0%)	0(0%)	—	—	—

表 6 ABCB1 基因的 377 - 378 insC SNP 位点的检测及分析
Table 6 The analysis of ABCB1 377 - 378 insC SNP loci

ABCB1	活泼	安静	胆小
-/-	4	4	4
-/C	0	0	0
总计	4	4	4

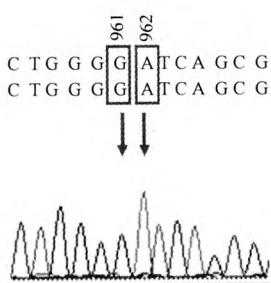


图 6 GNB1L 基因的 961 - 962 insG SNP 位点的测序结果
Fig. 6 The sequencing of GNB1L 961 - 962 insG SNP

表 7 GNB1L 基因的 961 - 962 insG SNP 位点的检测及分析
Table 7 The analysis of GNB1L 961 - 962 insG SNP loci

GNB1L	活泼	安静	胆小
-/-	4	4	4
-/G	0	0	0
总计	4	4	4

3 讨论

本文选用了文献中已报道的与神经类型密切相关的 4 个基因中的 6 个 SNP 位点^[5~8]。有研究表明,儿茶酚胺转移酶 (COMT) 和 单酰胺氧化酶 (MAOB) 具有降解单胺类神经递质的生物功能,其活性与神经活动和行为密切相关^[8]。COMT 通过调节大脑皮质额叶的多巴胺水平,影响大脑的工作记忆和认知功能,也是精神分裂症和焦虑行为的重要候选基因,与犬的分离焦虑症有密切的关系^[9,10]; MAOB 通过调节这些神经递质的表达水平作用于运动、情感和认知等行为,与逃避、冲动和攻击等一些行为有关,其 T199C 位点可能与不同品种犬的攻击行为有关^[5,8]。ABCB1、GNB1L 已被证明与中枢神经系统的功能、精神类疾病以及行为特征等密切相关^[6,7]。已报道的这 4 个基因的 6 个 SNP 位点均位于基因的外显子中,COMT 的 G482A、MAOB 的 T199、ABCB1 的 A985T 和 T3442C SNP 的变化会导致错义变异,从而使所编码的氨基酸发生变化,进而可能会对相关基因的表达和功能产生影响;而

ABCB1 的 377 – 378 insC 和 GNB1L 的 961 – 962 insG SNP 碱基的插入则导致移码变异, 进而导致蛋白功能的缺失。因此, 这些 SNP 位点可能成为拉布拉多犬神经类型早期鉴定的分子遗传学指标。

我们的检测结果表明, COMT 基因的 G482A SNP G/A 型在胆小型犬中所占比例显著高于活泼型和安静型(表 2), ABCB1 基因的 T3442C SNP 位点的 T/C 型在胆小型犬中所占比例显著高于活泼型和安静型(表 5), 这两个基因的 SNP 位点有可能成为检测胆小型拉布拉多犬遗传学诊断的候选标志; COMT 基因的 G482A SNP A/A 型在活泼型犬中所占比例显著高于安静型和胆小型中所占比例(表 2), ABCB1 基因的 A985T SNP 位点的 T/A 型在活泼型犬中所占比例显著低于安静型和胆小型(表 4), 该两个的 SNP 位点有可能成为检测活泼型拉布拉多犬遗传学诊断的候选标志; 在 MAOB 基因的 T199C SNP 位点的 T/C 型在安静型犬中所占比例显著高于活泼型和胆小型(表 3), 因此这个基因的 SNP 位点有可能成为检测安静型拉布拉多犬遗传学诊断的候选标志。但以上数据还需大样本验证。

但在我们检测的 12 只犬中, 均没有发现 ABCB1 基因的 377 – 378 insC 和 GNB1L 基因的 961 – 962 insG 的移码变异(表 6~7), 这可能是由于本研究中的样本量较少、犬的品种差异、以及移码变异出现的几率很小等原因导致的。因此, ABCB1 基因的 377 – 378 insC 和 GNB1L 基因的 961 – 962 insG 这两个 SNP 位点在实践中可能不适宜作为拉布拉多犬神经类型早期鉴定的分子遗传学指标。

综上所述, COMT 基因的 G482A SNP 位点的 G/A 型和 A/A 型, MAOB 基因的 T199C SNP 位点的 T/C 型, ABCB1 基因的 A985T SNP 位点的 T/A 和

ABCB1 基因的 T3442C SNP 位点的 T/C 型有望成为拉布拉多犬神经类型早期鉴定的分子遗传学诊断指标, 但尚需大样本确认。

参 考 文 献

- [1] 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.
- [2] 王福金, 王爱国, 王亮, 等. 偏侧性测试在预测成功导盲犬中的应用[J]. 实验动物科学, 2012, 3(57): 60~63.
- [3] 纪捷. 话说犬的神经类型及其特征[J]. 中国工作犬业, 2010, 5(5): 46~48.
- [4] 杜晓鹏, 顾或. 赏析拉布拉多犬与金毛猎犬[J]. 中国工作犬业, 2010, 7(7): 52~54.
- [5] Takeuchi Y, Hashizume C, Arata S, et al. An approach to canine behavioural genetics employing guide dogs for the blind[J]. Anim Genet, 2009, 40(2): 217~24.
- [6] Hashizume C, Masuda K, Momozawa Y, et al. Identification of an cysteine-to-arginine substitution caused by a single nucleotide polymorphism in the canine monoamine oxidase B gene[J]. J Vet Med Sci, 2005, 67(2): 199~201.
- [7] Hung C C, Chiou M H, Huang B H, et al. Impact of genetic polymorphisms in ABCB1, CYP2B6, OPRM1, ANKK1 and DRD2 genes on methadone therapy in Han Chinese patients[J]. Pharmacogenomics, 2011, 12(11): 1525~33.
- [8] Li Y, Zhao Q, Wang T, et al. Association study between GNB1L and three major mental disorders in Chinese Han populations[J]. Psychiatry Res, 2011, 187(3): 457~9.
- [9] 李小慧. 犬主要行为形状及其相关基因的研究[D]. 南京, 南京农业大学, 2006, 55~73.
- [10] Masuda K, Hashizume C, Kikusui T, et al. Breed differences in genotype and allele frequency of catechol O-methyltransferase gene polymorphic regions in dogs[J]. J Vet Med Sci, 2004, 66(2): 183~187.

Analysis of SNPs Associated with Nerve Pattern Related Genes in Labrador Retrievers

ZHAO Ming-yuan, YU Jian-xiong, HAN Fang, LI Ya-chan, 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 Analysis of 6 SNPs associated to nerve pattern related 4 genes in Labrador Retrievers to provide a early-stage molecular genetic index for nerve pattern diagnostics. **Method** According to the behavior evaluation standards of China guide dog training center, the dogs belong to typical nerve patterns (quiet, active, and timid (weak) type, 4 dogs each) were selected. The vein blood was sampled and the genomic DNA was

isolated from blood cells. The PCR/sequencing and PCR-RFLP method were used to analyze the variants of 6 SNPs in nerve pattern related 4 genes: (COMT (G482A) , MOAB (T199C) , ABCB1 (A985T , T3442C , 377 – 378 insC) , GNB1L(961 – 962 insG)). Furthmore , the association between the SNP variants and nerve patterns was analyzed by Chi-square Test. **Result** G/A variants in COMT (G482A) SNP locus in the proportion of timid dogs was significantly higher than that in the active and quiet dogs ($P = 0.014; P = 0.014$) , A/A variants in COMT (G482A) SNP locus in the proportion of active dogs was significantly higher than that in the quiet and timid dogs ($P = 0.025; P = 0.025$) ; T/C variants in MAOB (T199C) SNP locus in the proportion of quiet dogs was significantly higher than that in the active and timid dogs ($P = 0.025; P = 0.025$) ; T/A variants in ABCB1 (A985T) SNP locus in the proportion of active dogs was significantly lower than that in the quiet and timid dogs ($P = 0.014; P = 0.014$) ; T/C variants in ABCB1 (T3442C) SNP locus in the proportion of timid dogs was significantly lower than that in the quiet and active dogs ($P = 0.025; P = 0.025$) ; No ABCB1 (377 – 378 insC) and GNB1L (961 – 962 insG) SNP loci was found. **Conclusion** G/A and A/A variants in COMT (G482A) , T/C variants in MAOB (T199C) , T/A variants in ABCB1 (A985T) and T/C variants in ABCB1 (T3442C) are significantly associated to nerve patterns and might be used as a molecular genetic index for nerve pattern diagnostics in Labrador Retrievers. However, further large sample analysis is required.

Key words:Labrador Retrievers; nerve pattern; SNP; molecular genetic diagnostics

(上接第 12 页)

Effect of Glutamine on Expression of Immune-related Genes in Plague Virus Infected Duck Intestine

ZHANG Yuan-yuan¹ , ZHAO Li-li¹ , WANG Lei¹ , NIU Yin-jie¹ , HAN Ling-xia¹ , LIU Sheng-wang² , CHEN Hong-yan¹

(1. Laboratory Animal and Comparative Medicine, State Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150001, China)

(2. Division of Avian Infectious Diseases, National Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150001, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of Glutamine (Gln) on the intestine physiological activity and the pathway in normal ducks and the models infected with the plague virus. Method 280 specific pathogen free (SPF) ducklings were randomly divided into eight groups. Gln was administrated at different doses (0 , 0.5 , 1 , 2 g/kg/ feed/d) by oral gavage to the control groups and the model groups infected with 0.2 mL duck plague virus (DPV) (0.2 mL 2000TCID50) , respectively. The procedures were performed for 6 days. Effects of Gln in control and model ducklings were detected , and expression of the Toll like receptor 4 (TLR4) pathway genes were determined. Result Expression of TLR4 pathway mRNAs was increased significantly in normal group ($P < 0.05$) , but reduced significantly in the model groups ($P < 0.05$). **Conclusion** Gln improves immunity in duckling intestine through the TLR4 pathway , and resists the immune-mediated injury caused by DPV.

Key words:glutamine; duck; duck plague virus; duodenum; TLR4 pathway