

拉布拉多犬与金毛寻回猎犬基因组中与髌关节发育不良相关基因 COL6A3、FN1 的 SNP 位点检测^{*}

白 静 马雪娜 陈舒婷 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 检测拉布拉多犬与金毛寻回猎犬基因组 DNA 中与髌关节发育不良密切相关的 COL6A3 基因、FN1 基因中的 3 个 SNP 位点, 以期对拉布拉多犬与金毛寻回猎犬幼犬的选育提供有效的遗传学诊断方法。**方法** 全国范围内募集经过影像学诊断的髌关节发育不良的拉布拉多犬 8 只、金毛寻回猎犬 5 只, 中国导盲犬大连培训基地提供经影像学诊断的健康的拉布拉多犬 23 只、金毛寻回猎犬 7 只作为实验对象, 静脉采血, 提取血细胞的基因组 DNA 样本, 采用 PCR/测序方法对 COL6A3 基因上的 2 个 SNP 位点 (CFA25 : 51031100, 51040259) 和 FN1 基因的 1 个 SNP 位点 (CFA37 : 25095511) 进行基因型检测, 并统计分析 SNP 位点的基因型与髌关节发育不良的关联度。**结果** COL6A3 (CFA25 : 51031100, 51040259) 和 FN1 (CFA37 : 25095511) SNP 位点的基因型与犬的髌关节发育不良没有显著相关性 ($P>0.05$)。**结论** COL6A3 (CFA25 : 51031100, 51040259) 和 FN1 (CFA37 : 25095511) SNP 位点均不能成为拉布拉多犬与金毛寻回猎犬髌关节发育不良的实用性遗传学诊断指标。

关键词:髌关节发育不良; 拉布拉多犬; 金毛寻回猎犬; COL6A3; FN1

中图分类号: R394.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-6179(2019)03-0035-05

DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.03.007

犬髌关节发育不良 (Canine Hip Dysplasia, CHD) 是一种受多基因调控的先天性遗传疾病, 多见于大型或特大型犬, 如拉布拉多犬、金毛寻回猎犬等。患有 CHD 的犬因关节磨损疼痛而行走困难^[1-2]。CHD 不能通过药物治疗痊愈, 临床手术是唯一有效的治疗途径^[1]。但这方面的医疗资源紧缺, 手术费用昂贵。因而在育种时期对 CHD 犬的筛选尤为重要, 不仅可减少疼痛犬, 也可节省大量的社会资源。其中, 采用遗传学基因诊断的方法淘汰具有 CHD 倾向的繁育犬, 是有效避免出现 CHD 犬的理想方法。

髌关节发育不良的成因尚不明确, 目前认为有两种主要原因: 关节松弛 (包括韧带、肌肉、关节囊) 和软骨内成骨障碍, 或者这两个过程的综合作用^[2-3]。COL6A3 基因与 FN1 基因分别参与了肌肉

组织、软骨基质的组成^[4-5], 特别是, 有报道称 COL6A3 基因的 2 个 SNP 位点 (CFA25 : 51031100, 51040259) 和 FN1 基因的 1 个 SNP 位点 (CFA37 : 25095511) 与 CHD 显著相关^[3, 6-7]。但这两个基因的 SNP 位点能否成为有效预测髌关节发育不良的实用性遗传学诊断指标, 还有待进一步的实验验证。

培育成本高和培训成功率低是导盲犬事业目前面临的两大难题^[8-9], 犬只的淘汰主要包括性情和健康两方面原因, 而 CHD 是健康原因中的首要因素。因而筛选有 CHD 患病倾向的犬对提高导盲犬的培训成功率、降低导盲犬的培育成本具有重要意义。本实验通过对与 CHD 显著相关的 COL6A3 和 FN1 基因上的 3 个 SNP 位点的多态性进行检测, 验证其能否成为 CHD 的实用性遗传学诊断指标, 以期对导盲犬的选育提供有效的筛选方法。

收稿日期: 2018-05-25

^{*} 基金项目: 国家自然科学基金 (No. 31272392)

作者简介: 白 静 (1992—), 女, 硕士, 研究方向: 分子遗传学. E-mail: 429027993@qq.com

通信作者: 王靖宇 (1964—), 男, 教授, 研究方向: 动物行为学. E-mail: wangjingyus@163.com

王爱国 (1970—), 男, 教授, 研究方向: 分子遗传学. E-mail: wangguotl@hotmail.com

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物:髋关节发育不良(X光片诊断)的拉布拉多犬 8 只、金毛寻回猎犬 5 只;健康的拉布拉多犬 23 只、金毛寻回猎犬 7 只。部分犬(8 只)为全国范围内募集所得,其余犬(37 只)均由中国导盲犬大连培训基地提供。

1.1.2 主要试剂与仪器:EDTA-K2 真空采血管,购于江苏宇力医疗器械有限公司;Blood Extraction Kit 试剂盒,购于宝生物(大连)生物技术有限公司;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(BioRAD 公司)等。

1.2 方法

1.2.1 影像学诊断:采用动物 X 光机对犬的髋关节进行影像学诊断,髋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 Foundation for Animal) 片子上,在两股骨头中心作一连线,再由股骨头中心向髋臼前侧缘作直线,这两线夹角为 Norberg 角,Norberg 角的范围一般在 50°~120°之间,大于等于 105°被认定为健康犬(图 1A 所示),股骨头没有脱节但 Norberg 角小于等于 90°(图 1B 所示)或股骨头完全脱出髋臼(图 1C 所示)被认定为重度 CHD。

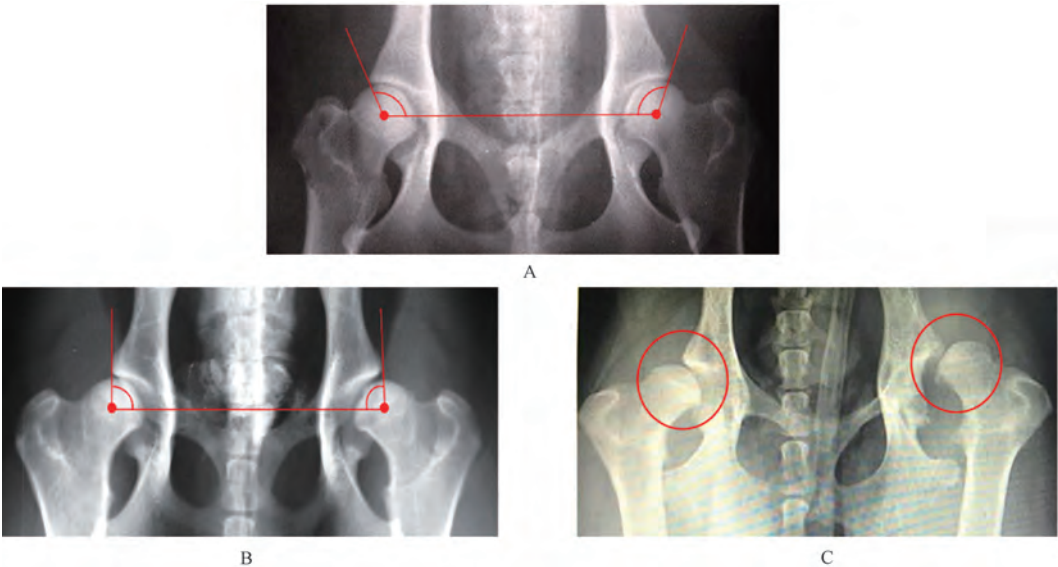


图 1 犬髋关节 X 光影像图

注:A:健康犬;B、C:重度髋关节发育不良犬

Fig.1 X ray image of the dog hip joint

Note: A: normal; B、C: CHD

1.2.2 基因组 DNA 的提取:从犬的前肢静脉采血 3~5 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:依据文献中已报的与犬髋关节发育不良相关的 COL6A3 和 FN1 基因的 3 个 SNP 位点^[3, 6],在 NCBI 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)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。

表 1 COL6A3 和 FN1 基因 SNP 位点的生物学信息及引物序列

Table 1 The bioinformation and primer sequences of SNPs of COL6A3 and FN1 genes

CFA	Gene	SNP	location	Primer Sequences (5'-3')
25	COL6A3	A>G	51031100	Forward: tctgtacttacgggtccacc Reverse: gctctatcaaaaggaacgggg
25	COL6A3	A>G	51040259	Forward: cgtcccttgcatggtgtaaat Reverse: tatcttcaagagggcccctgg
37	FN1	T>A	25095511	Forward: tccccttatgtagtacctgtca Reverse: cccctatctgccttttctca

1.2.4 测序及 SNP 位点分型:DNA 样本经 PCR 扩增后,委托宝生物(大连)生物技术有限公司进行测序。通过对测序数据的分析,确认 SNP 位点的多态性类型(图 2)。

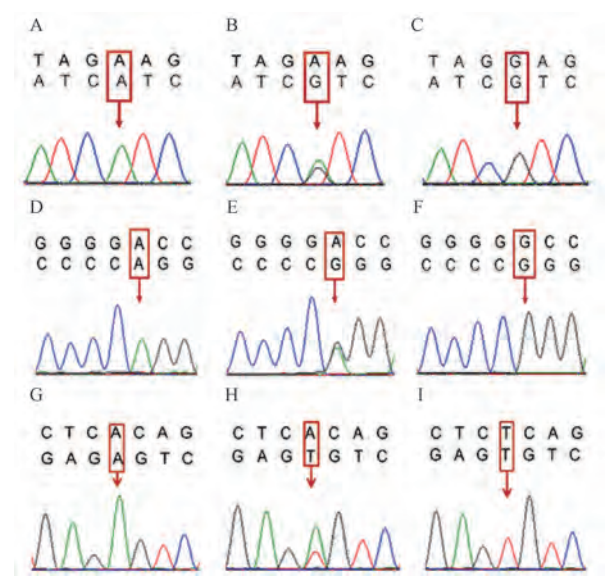


图 2 COL6A3 及 FN1 基因的 SNP 位点的测序检测
注:A、B、C 为 COL6A3CFA25 : 51040259 SNP 位点上的 A/A 型, A/G 型,G/G 型;D、E、F 为 COL6A3CFA25 : 51031100 SNP 位点上的 A/A 型,A/G 型,G/G 型;G、H、I 为 FN1 CFA37 : 25095511 SNP 位点上的 A/A 型,A/T 型,T/T 型。

Fig.2 SNP loci of COL6A3 and FN1 analyzed by DNA sequencing

Note: A, B, C: COL6A3 CFA25 : 51040259 SNP loci;
D, E, F: COL6A3 CFA25 :51031100SNP loci;
G, H, I: FN1CFA37 : 25095511 SNP loci

1.3 统计方法

采用 SPSS19.0 统计学软件,应用 χ^2 检验对基因的 SNP 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 COL6A3 基因的 CFA25:51040259 SNP 位点的多态性检测及分析

以 13 只髌关节发育不良犬与 30 只健康犬为研究对象,对 COL6A3 基因的 CFA25 : 51040259 位点进行 PCR、测序和统计学分析,结果如表 2 所示:A/A、A/G、G/G 型在健康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 COL6A3 基因的 CFA25:51040259 SNP 位点的检测及分析

Table 2 The detection and analysis of COL6A3 CFA25 : 51040259 SNP loci				
COL6A3	健康犬	髌关节发育不良犬	χ^2 值	P 值
A/A	6 (20%)	5 (38.46%)	1.62	0.20
A/G	18 (60%)	5 (38.46%)	1.69	0.19
G/G	6 (20%)	3 (23.08%)	0.05	0.82
总计	30	13		

2.2 拉布拉多犬中 COL6A3 基因的 CFA25:51040259 SNP 位点的检测及分析

以 8 只髌关节发育不良的拉布拉多犬与 23 只健康的拉布拉多犬为研究对象,对 COL6A3 基因的 CFA25:51040259 位点进行 PCR、测序和统计学分析,结果如表 3 所示:A/A、A/G、G/G 型在健康拉布拉多犬和髌关节发育不良的拉布拉多犬中所占比例均没有显著差异($P>0.05$)。但 A/A 型所占比例呈现出有差异的趋势($P=0.07$)。

表 3 拉布拉多犬中 COL6A3 基因的 CFA25:51040259 SNP 位点的检测及分析

Table 3 The detection and analysis of COL6A3 CFA25 : 51040259 SNP loci in the Labrador retriever				
COL6A3	健康犬/只	髌关节发育不良犬/只	χ^2 值	P 值
A/A	4 (17.39%)	4 (50%)	3.30	0.07
A/G	14 (60.87%)	4 (50%)	0.29	0.59
G/G	5 (21.74%)	0 (0%)	2.07	0.15
总计	23	8		

2.3 金毛寻回犬中 COL6A3 基因的 CFA25:51040259 SNP 位点的检测及分析

以 5 只髌关节发育不良的金毛寻回猎犬与 7 只健康的金毛寻回猎犬为研究对象,对 COL6A3 基因的 CFA25:51040259 位点进行 PCR、测序和统计学分析,结果如表 4 所示:A/A、A/G、G/G 型在健康的金毛寻回猎犬和髌关节发育不良的金毛寻回猎犬中所占比例均没有显著差异($P>0.05$)。但 G/G 型在髌关节发育不良的金毛寻回猎犬中有占主要基因型的趋势($P=0.1$)。

表 4 金毛寻回猎犬中 COL6A3 基因的 CFA25:51040259 SNP 位点的检测及分析

Table 4 The detection and analysis of COL6A3 CFA25 : 51040259 SNP loci in the Golden retriever				
COL6A3	健康犬/只	髌关节发育不良犬/只	χ^2 值	P 值
A/A	2 (28.57%)	1 (20%)	0.11	0.74
A/G	4 (57.14%)	1 (20%)	1.66	0.20
G/G	1 (14.29%)	3 (60%)	2.74	0.10
总计	7	5		

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

以 14 只髌关节发育不良犬与中国导盲犬大连培训基地的 21 只健康犬为研究对象,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 型在健康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	健康犬/只	髌关节发育不良犬/只	χ^2 值	P 值
A/A	14 (66.67%)	9 (64.29%)	0.02	0.88
A/G	3 (14.29%)	4 (28.57%)	1.07	0.30
G/G	4 (19.05%)	1 (7.14%)	0.97	0.32
总计	21	14		

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

以 12 只髌关节发育不良犬与 30 只健康犬为研究对象,对 FN1 基因的 CFA37:25095511 位点进行 PCR、测序和统计学分析,结果如表 6 所示:A/A、T/A、T/T 型在健康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 FN1 基因的 CFA37:25095511
SNP 位点的检测及分析

Table 6 The detection and analysis of FN1 CFA37:25095511 SNP loci				
FN1	健康犬/只	髌关节发育不良犬/只	χ^2 值	P 值
A/A	6 (20%)	4 (33.33%)	0.84	0.36
T/A	17 (56.67%)	6 (50%)	0.15	0.70
T/T	7 (23.33%)	5 (41.67%)	1.41	0.24
总计	30	12		

3 讨论

CHD 是一种受多基因调控、性状复杂并和多个染色体区域相关联的障碍疾病,其遗传方式尚不明确。目前研究表明,可能有 2 种遗传体系影响 CHD 的发生,一是控制髌关节周围关节囊松弛的基因,二是控制髌臼发育不良的多基因系统,或两者的单独或协同作用^[10]。其中髌关节松弛具有较高的遗传率^[11],已有研究表明,COL6A3 与 FN1 基因均与髌

关节松弛相关^[3, 6-7]。

COL6A3 基因编码胶原蛋白 VI 中的 $\alpha 3$ 链,如发生纯合突变将导致胶原蛋白 VI 的减少,而胶原蛋白是软骨细胞、软骨纤维的主要成分,与关节松弛密切相关^[4]。有研究报道其 SNP 位点 (CFA25 : 51040259) 的 A/A 型在正常和髌关节发育不良的拉布拉多犬的比例有极显著性差异^[12]。但我们的实验结果表明,COL6A3 基因的 SNP 位点 CFA25 : 51040259 及 CFA25 : 51031100 的三种基因型 (A/A、A/G、G/G) 在健康犬和髌关节发育不良犬中所占比例均没有显著差异 (表 2, 表 5)。由于本研究的对象包括拉布拉多犬与金毛寻回猎犬,考虑到可能存在的不同品种犬之间的遗传差异,我们又分别对这两种犬的测序结果进行了单独分析。结果表明,拉布拉多犬与金毛寻回猎犬中患 CHD 犬的 COL6A3 基因 SNP 位点 (CFA25 : 51040259) 的基因型趋向不同,拉布拉多犬趋向于 A/A 型,而金毛寻回猎犬趋向于 G/G 型,但并无显著差异 (表 3, 表 4)。虽然本研究的样本量相对较少,但也充分说明 COL6A3 基因的 SNP 位点 CFA25 : 51040259 及 CFA25 : 51031100 不能作为 CHD 实用性的诊断指标。

FN1 基因与软骨细胞外基质的组分以及软骨基质组织的功能密切相关^[5]。有报道表明 FN1 基因的 SNP 位点 CFA37 : 25095511 与伯恩山犬、德国牧羊犬的 CHD 疾病显著相关^[6-7]。但本研究结果表明,FN1 基因的该 SNP 位点基因型在健康犬和髌关节发育不良犬中的比例没有显著差异 (表 6),并且在拉布拉多犬与金毛寻回猎犬犬种内部的独立分析也不存在显著差异,说明该 SNP 位点不能作为 CHD 实用性的诊断指标。

本次研究没有检测出差异的原因主要有以下几点:第一,CHD 的致病原因和遗传体系尚未明确,关节松弛与 CHD 发生的具体联系尚不清楚,导致关节松弛的基因是否直接影响 CHD 的产生还需更多的实验验证;第二,CHD 倾向于多基因遗传调控,COL6A3 和 FN1 基因可能与 CHD 疾病有关联,但可能不是与 CHD 显著相关的主效基因,或是这 3 个 SNP 位点并不能代表 COL6A3 及 FN1 基因的影响作用;第三,本次研究对象的样本量较小,有待扩大样本进行进一步验证。

综上所述,COL6A3 和 FN1 基因的 CFA25 : 51031100,51040259 和 CFA37 : 25095511 SNP 位点均不能作为拉布拉多犬与金毛寻回猎犬髌关节发育

不良的实用性遗传学诊断指标。我们将继续检测其他与 CHD 相关候选基因的可能性遗传标记,以期为拉布拉多犬与金毛寻回猎犬幼犬的选育探寻有效的 CHD 遗传学诊断方法。

参 考 文 献

[1] 郝志香,李乐,鲁毅,等.浅谈犬髋关节发育不良[J].农家科技旬刊, 2016,(7):174.

[2] Morgan J P, Wind A, Davidson A P. Hereditary bone and joint diseases in the dog: osteochondroses, hip dysplasia, elbow dysplasia[J].Veterinary Journal,2002,**164**(1):79-80.

[3] Lavrijsen I C, Leegwater P A J, Martin A J, *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.

[4] Demir E, Sabatelli P, Allamand V, *et al.* Mutations in COL6A3 Cause Severe and Mild Phenotypes of Ullrich Congenital Muscular Dystrophy [J]. AM J HUM GENE, 2002, **70**(6): 1446-1458.

[5] Macleod J N, Burton W 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**(31): 18954-18960.

[6] 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): 49782.

[7] Fels L, Distl O. Identification and Validation of Quantitative Trait Loci (QTL) for Canine Hip Dysplasia (CHD) in German Shepherd Dogs [J]. Plos One, 2014, **9**(5): e96618.

[8] 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,**29**(3):57-60.

[9] 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.实验动物科学, 2014,**31**(6): 32-35.

[10] 王迎松,胡侦明,劳汉昌. 髋关节发育不良的分子遗传学研究进展[J].中国矫形外科杂志, 2004,**12**(7): 540-543.

[11] Ohlerth S, Lang J, Busato A, *et al.* Estimation of genetic population variables for six radiographic criteria of hip dysplasia in a colony of Labrador Retrievers [J]. American Journal of Veterinary Research, 2001, **62**(6): 846-852.

[12] 赵明媛,韩芳,李雅婵,等. 拉布拉多犬髋关节发育不良相关基因的 SNP 位点的检测 [J].实验动物科学, 2015,**32**(4): 21-25.

SNPs Detection for Canine Hip Dysplasia (CHD) Related Genes COL6A3 and FN1 in Labrador Retrievers and Golden Retrievers

BAI Jing, MA Xuena, CHEN Shuting, ZHOU Zijuan, WANG Fujin, WANG Aiguo, WANG Jingyu
(Laboratory Animal Center, Dalian Medical University, Dalian 116044, China)

Abstract: Objective To provide possible genetic markers for Labrador Retrievers and Golden Retrievers, 3 SNPs in canine hip dysplasia (CHD) related genes COL6A3 and FN1 were detected. **Method** Eight typical CHD in Labrador Retrievers and 5 typical CHD in Golden Retrievers confirmed by imaging diagnosis were collected from everywhere of China, 23 normal Labrador Retrievers and 7 normal Golden Retrievers were provided by China Guide Dog Training Centre. 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 2 SNPs in COL6A3 (CFA25: 51031100, 51040259), and 1 SNPs in FN1 (CFA37: 25095511). In addition, the association between the SNP variants and CHD was analyzed by Chi-square Test. **Result** The SNPs variants of COL6A3 (CFA25: 51031100, 51040259), and FN1 (CFA37: 25095511) were not significantly associated with CHD ($P>0.05$). **Conclusion** The SNPs of COL6A3 (CFA25: 51031100, 51040259) and FN1 (CFA37: 25095511) cannot be used as a practical genetic detection index for CHD diagnostics in Labrador Retrievers and Golden Retrievers.

Key words:CHD; Labrador Retrievers; Golden Retrievers; COL6A3; FN1