

SLC1A2 基因 SNP 位点与拉布拉多和金毛猎犬 活跃度的相关性研究*

马雪娜 白 静 陈舒婷 雒 东 李雅婵 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 SLC1A2 基因 SNP 位点与拉布拉多和金毛猎犬活跃度的相关性,以期为导向盲犬早期选育筛选有效的遗传学分子标记。**方法** 选取中国大连导盲犬培训基地的 99 只犬(拉布拉多犬 80 只,金毛猎犬 19 只),采用 Passive test(PT)行为测试法对犬的活跃度进行评估。同时采集该 99 只犬的静脉血,提取血细胞中的基因组 DNA 样本,采用 PCR/测序方法对该 99 只犬的 SLC1A2 基因 T129C、T1549G 和 T471C 3 个 SNP 位点进行基因型鉴定,并统计分析犬的活跃度与 SLC1A2 SNP 位点的相关性。**结果** SLC1A2 基因的 3 个 SNP 位点中,T129C 和 T1549G 位点没有多态性,分别仅存在 C/C 型和 G/G 型。T471C 位点存在 3 种基因型:T/T、T/C 和 C/C。这 3 种基因型与活跃度、性别以及品种间不存在显著相关性($P>0.05$)。另外,品种与活跃度之间也没有显著相关性($P>0.05$),但性别与活跃度间存在显著相关性($P=0.049$)。**结论** SLC1A2 基因的 T129C、T1549G 和 T471C 位点与导盲犬的活跃度不具有显著相关性,不能作为导盲犬的遗传学筛选的指标。由于性别与活跃度间存在显著相关性,因而在行为学测试中,对犬的活跃度评分标准应雌雄有别。

关键词:拉布拉多;金毛猎犬;SLC1A2;单核苷酸多态性;活跃度

中图分类号: Q351 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-6179(2019)05-0009-07

DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.05.002

导盲犬是应用动物行为学原理进行培训的、专门为视障人士提供向导服务的工作犬^[1]。导盲犬的筛选标准是考察犬是否具备高效学习能力,并有主动完成工作意愿的、性情稳定的犬。其中,活跃度是考察犬的重要指标之一。活跃度适中的犬,对主人依恋程度低、稳定性强,是培育导盲犬的重要条件之一^[2-3]。由于行为测试的结果受众多因素的影响,不能十分客观地对犬进行早期预测,因而如果能够结合遗传学分子标记来判断犬的活跃度,将大大提升导盲犬的培育效率。

SLC1A2 基因编码的谷氨酸转运蛋白位于中枢神经系统的突触中,可以及时清除细胞外空间的兴奋性神经递质谷氨酸,维持突触中低水平的谷氨酸浓度,保证有效的神经传导^[4-5]。此前,SLC1A2 基因多用于人类疾病方面的研究,大多研究表明

SLC1A2 基因的异常与人类的中风、创伤、阿尔茨海默病、肌萎缩性侧索硬化和亨廷顿病等神经系统疾病密切相关^[4]。近期研究发现,该基因还与人类和猫的情感觉醒和侵略相关^[6-7]。有研究发现 SLC1A2 基因的多态性与拉布拉多犬的活动水平相关^[8]。因此,本实验将采用 Passive test(PT)测试^[9]评价犬的活跃程度,同时检测其 SLC1A2 的多态性,验证 SLC1A2 多态性与活跃度之间的相关性,以期为导向盲犬早期选育筛选有效的遗传学分子标记。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物:拉布拉多犬 80 只,金毛猎犬 19 只,犬只及相关信息均由中国导盲犬大连培训基地

收稿日期:2019-05-06

* 基金项目:国家自然科学基金(No.31272392);

作者简介:马雪娜(1993—),女,硕士,研究方向:分子遗传学.E-mail:2640842410@qq.com

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,博士,教授,研究方向:动物行为学.E-mail:wangjingyus@163.com

王爱国(1970—),男,博士,研究方向:分子生物学.E-mail:wangaiguotl@hotmail.com

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(许可证号:苏食药监械生产许可证 2001-0330 号);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 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 基因型检测方法

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:基因 SLC1A2 的 3 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 SLC1A2 基因 SNP 位点引物序列

SNP	rs# cluster ID	引物序列(5'→3')	产物长度	退火温度
		Primers		
SLC1A2;c.471T>C	rs852831878	F:CCCCAAACTCAAGAAGCAGC R:ATTAGGAGGCTGGAGGGAC	168 bp	62 ℃
SLC1A2;c.129T>C	rs850926201	F:GCAGGTGGAAGTACGAATGC R:CGAGAGAGCCAGAGAAGAGG	161 bp	62 ℃
SLC1A2;c.1549T>G	rs851519479	F:ACTATTGACTCCCAGCATCGA R:AGGAAATCGAGCATGCACTA	206 bp	60 ℃

1.2.3 PCR 检测和测序分析:PCR 反应条件:预变性 94 ℃ 5 min;PCR 循环:94 ℃ 1 min,退火温度 1 min,72 ℃ 1 min,循环 35 次;延伸 72 ℃ 7 min。凝胶成像系统显影。将显影明显的产物,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 SNPs 位点在测试犬中的基因型。

1.3 活跃度评价方法

1.3.1 场地设施及 PT 测试方法 行为学 PT 测试在长方形室内进行,室内无实验外的其他任何杂物,立体图及平面图如图 1 所示。测试步骤如下:实验

人员由 M 门进入测试室,自然站立于点 E。犬主人带着犬由 N 门进入测试室,锁好门,站立于 D 点,与实验人员相对。测试开始时,松开犬链,让犬在室内自由活动。测试期间,不允许主人和实验人员发出任何声音、做出任何动作、与犬不能有任何交流。3 min 后主人从 N 门离开,留下犬和实验人员在测试室内。然后实验人员坐在事先准备好的圆凳上阅读(E),不能发出任何声音、不能做出任何动作且不能与犬有任何交流。3 min 后测试结束,实验人员带领犬从 M 门走出测试室(图 1)。

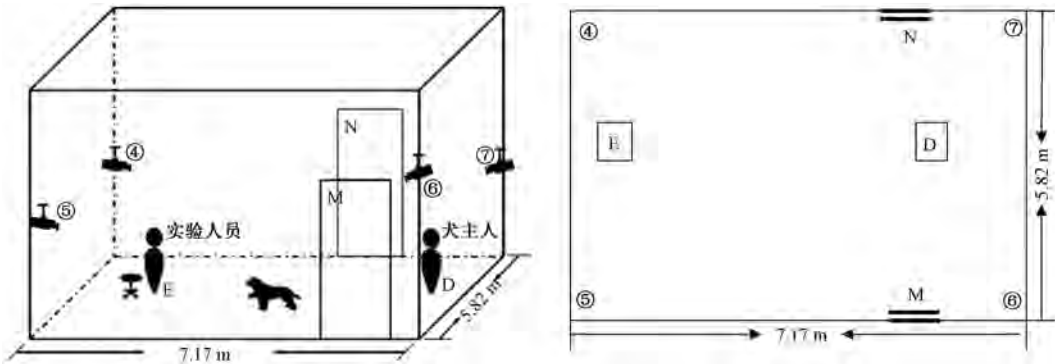


图 1 PT 测试示意图

注:E 点为实验人员的所在位置;D 点为犬与主人进入测试场地的所在位置;
图中④-⑦为安装在高处的高清摄像头;M 与 N 为实验人员出入的门

Fig.1 Schematic diagram of Passive Test

Note: E, the location of researcher; D, the location of owner and dog; ④-⑦, the installed cameras; M and N, the doors

PT 测试结束后,根据犬在实验中的行为表现,结合测试中的观察要点及行为类型(表 2)针对其行为表现包括静止时间、探索时间、探索范围、是否发出声音等判断活跃度高低,活跃程度越高得分越高,进行 1~5 分的评价(表 3),评分人员为基地的训导员和有经验的实验人员。主人在时和主人不在时分两个阶段进行评分。

表 2 测试中评分的行为类型
Table 2 Behavior types in Passive Test

行为类型	Behavior type	定义	Definition
探索行为		犬在测试室内的探索行为,包括嗅闻、奔跑等	
安静行为		犬坐、卧、趴下等行为	
社会活动		犬与主人和陌生人之间的互动,靠近、注视、嗅闻等	
对门的行为		扒门或在门口之间徘徊、嗅闻发出声音等	
对陌生人的行为		注视着人,或是靠近,坐卧在身边等	

表 3 被动测试各变量评分依据
Table 3 Scoring criteria for each variable of Passive Test

考察变量	观察时机	1 分→5 分
Variable	Situation	Scoring of Passive Test
活跃程度	犬主人在测试室内	稳定在不同活动方式间转换的积极活跃行为
活跃程度	犬主人离开测试室后	稳定在不同活动方式间转换的积极活跃行为

1.4 统计方法

采用 SPSS19.0 统计学软件,利用 ANOVA 检验对 SLC1A2 基因 SNPs 位点多态性与各种性状进行关联度分析, $P<0.05$ 为显著相关。

2 结果

2.1 SLC1A2 基因 3 个 SNP 位点的多态性分析

为了明确 SLC1A2 基因 3 个 SNP 位点的基因

型,我们将 SLC1A2 基因的 3 个 SNP 位点的 PCR/测序结果通过 BIOEDIT 软件进行了比对分析,发现在所测试的导盲犬中 c.129T>C (T129C) 位点的基因型都是 C/C 型,c.1549T>G (T1549G) 位点都是 G/G 型,这两个位点在金毛猎犬和拉布拉多犬中均没有多态性。因此,这两个位点不再进行后续的分析。而 c.471T>C (T471C) 位点基因型具有多态性,经检测有 3 个基因型,分别为 T/C 型、T/T 型和 C/C 型(图 2)。

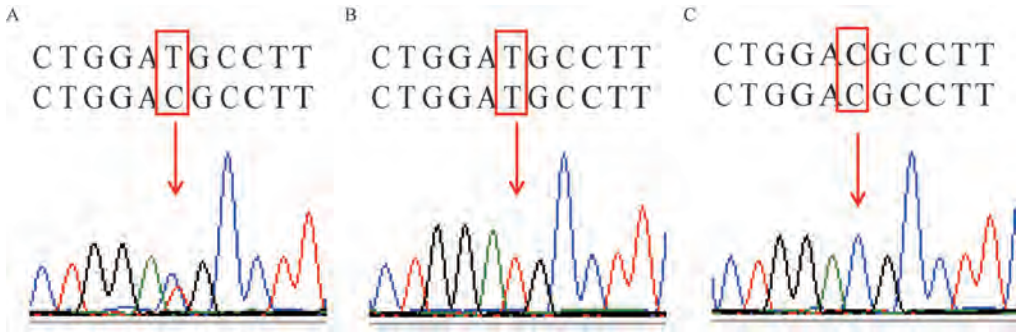


图 2 SLC1A2 基因 SNP 位点 (c.471C>T) 的测序结果

注:A. T/C 型; B. T/T 型; C. C/C 型

Fig.2 The sequencing results of SLC1A2 SNP loci (c.471C>T)

Note: A: T/C, B: T/T, C: C/C

2.2 活跃度与品种、性别的相关性分析

为了观察导盲犬的活跃度是否与品种、性别之间具有相关性,我们将测试犬只的品种、性别以及其

活跃度评分进行了统计学分析,其结果如图 3 所示:不同品种间,金毛猎犬活跃度的平均得分为 (2.76 ± 0.28) ,拉布拉多犬活跃度的平均得分为 $(2.61 \pm$

0.11),两者得分情况基本持平,经统计学分析活跃度与品种间没有显著性差异($P>0.05$);不同性别间,雄性犬只的活跃度得分为(2.83 ± 0.14),雌性犬只的活跃度得分为(2.41 ± 0.15),雄性犬只的活跃度明显高于雌性犬只,据统计结果显示活跃度与性别间的差异较为显著($P=0.049$)。

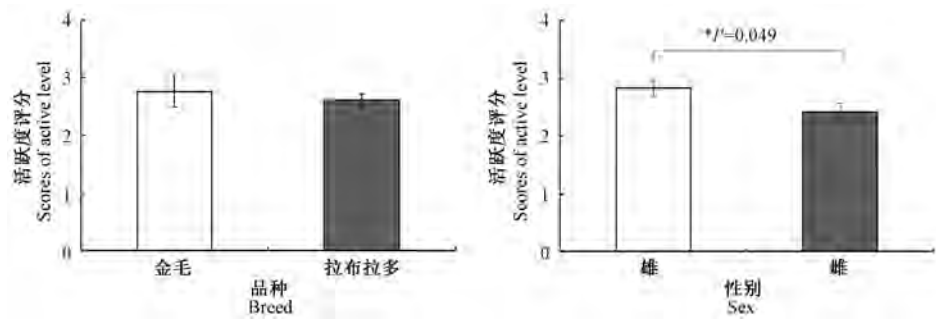


图 3 活跃度与品种、性别的相关性分析
Fig.3 Analysis of the correlation between activity level and breed or sex

2.3 基因型与品种、性别的相关性分析
为了明确导盲犬的品种、性别是否与 T471C 位点的 3 种基因型间具有相关性,我们对测试犬只的品种、性别以及其相对的基因型进行了统计学分析,结果如图 4 所示:不同品种间,金毛猎犬和拉布拉多犬的基因型分布趋势基本一致,均以 T/T 型居多,

其次为 T/C 型,最少的是 C/C 型;不同性别间,雄性和雌性的基因型分布趋势一致,也是以 T/T 型居多,其次为 T/C 型,最少的是 C/C 型。据统计分析,基因型与品种、性别之间没有显著的相关性($P>0.05$)。

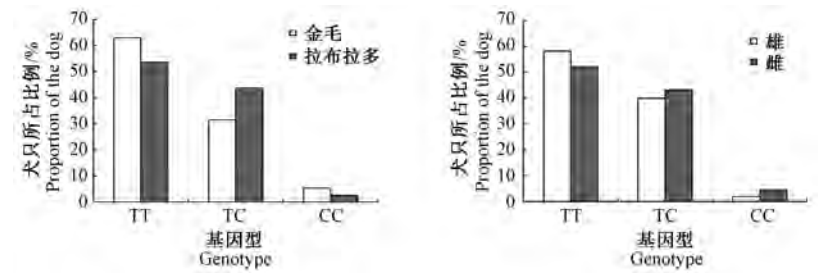


图 4 基因型与品种、性别的相关性分析
Fig.4 Analysis of the correlation between genotype and breed or sex

2.4 基因型与活跃度的相关性分析
为了明确导盲犬的活跃度是否与 T471C 位点的多态性相关,我们对所测试的犬只的基因型和其活跃度进行了统计学分析,其结果如图 5 所示:在不同的评分区间,T/T 型,T/C 型和 C/C 型这 3 种基因型的分布趋势基本一致。即在各评分区间,T/T 型的犬只数量最多,其次为 T/C 型。而对于 C/C 型的犬只,活跃度都集中在 2~4 分。对于不同基因型的犬,其所对应的活跃度的平均得分,C/C 型最高(3.50 ± 0.29),其次为 T/T 型(2.68 ± 0.16),最后为 T/C 型(2.52 ± 0.16)。但统计学分析结果显示,基因型与活跃度间没有显著相关性($P>0.05$)。为了探讨犬对主人的依恋程度是否与 T471C 的多态性

存在一定的相关性,我们对所测试导盲犬被动测试两种状态下的活跃度与其基因型进行了统计学分析。结果显示,被动测试的两种状态与 T471C 的多态性之间也没有显著相关性($P>0.05$)。T/T 型、T/C 型和 C/C 型的活跃度均呈现先降低后升高的趋势。相对于主人在时,主人不在时的 C/C 型犬只活跃度有明显升高的趋势。主人在时的 T/T 型和 T/C 型犬只活跃度明显低于主人不在时的活跃度。主人在时,T/T 型和 T/C 型的活跃度集中在 2~2.5 分之间,主人不在时的活跃度集中在 2.5~3 分之间,而 C/C 型犬只的活跃度相比 T/T 型和 T/C 型要高出许多,集中在 3~4 分之间。尤其是,主人在时的 C/C 型犬只活跃度高于主人不在时。

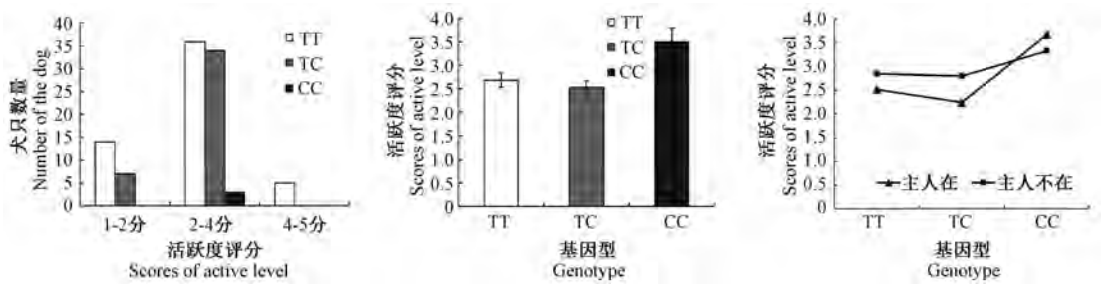


图 5 基因型与活跃度的相关性分析

Fig.5 Analysis of the correlation between genotype and activity level

3 讨论

导盲犬是视障人士的“眼睛和助手”,能够协助视障人士正常出行、工作、学习、确保其能够与周围环境顺利交流,是任何其他工具无法比拟的首选。目前育种犬和待训犬主要依据行为学测试的方法进行筛选,该方法不但效率低下,而且消耗大量的人力、物力和财力,致使导盲犬的培训成功率低,成本居高不下^[10],是导盲犬培训道路上的一大障碍。因此,在犬培训前期,寻找有效可行的预测待训犬能否成为导盲犬的方法,对于提高培训成功率、降低培训成本具有现实的重要意义^[11-12]。目前,导盲犬和育种犬的选育主要通过行为测试对其进行评估,但测试结果受测试犬的生理状态、测试人员的主观判断和环境变化等因素的影响,得出的结论可能会与实际有较大的偏差。这种工作方法带有一定的主观性,且效率低下,进步也不明显。依据犬行为特征的分子遗传学基础,建立与犬性状相关的分子遗传标记,早期筛选适于训练使用的个体,就能有效地降低时间、节约成本,更能够提高导盲犬的培训成功率。

有相关研究表明 SLC1A2 基因与犬的活跃度有一定的关联性,但目前并没有更多的研究数据支持这一观点^[13]。而在筛选待训犬时,活跃程度是一个重要的评价指标,犬的活跃度过高会导致犬的注意力不容易集中,且影响犬的稳定性,而活跃度过低的犬,其工作意愿性比较差,都不利于培训成为导盲犬。本研究首先利用 PT 测试对 99 只犬的行为反应进行了一系列的考察和评分,从而对犬的活跃程度进行评估。同时检测了这 99 只犬 SLC1A2 的 3 个 SNP 位点的基因型。统计结果显示,T129C 位点的基因型全部是 C/C 型,T1549G 位点也都是 G/G

型,该实验结果表明这两个位点不具有多态性,基因型相对比较保守,不易发生突变。而经过测试发现 T471C 位点是一个同义突变的多态位点,有 3 种基因型,分别为 T/T 型、T/C 型和 C/C 型。其中,T/T 型的犬数量占大多数,其次是 T/C 型, C/C 型的最少(仅有 3 只)。这一结果与 Takeuchi 等^[8]的研究结果不符,他研究的样本数据主要采集于日本当地,因此,这种差异有可能是犬的血统或地域不同而引起的,也可能是导盲犬育种计划的选择性差异导致的。

我们对 99 只犬的品种、性别以及活跃度进行的统计学分析结果表明,活跃度与品种间没有显著相关性,但是活跃度与性别之间存在显著差异,表现为雄性犬的活跃度明显高于雌性犬,这个结果与 Serpell and Hsu 的研究结果相符合^[14]。但也有与本研究结果相反的研究报道^[8],这种不符的结果有可能与训导员平时训练时使用的关键词相关,也可能受地区环境和遗传选择的影响。

Takeuchi 等人的研究结果显示 T471C 的多态性与性别、活跃度具有显著相关性^[8],而我们的研究结果表明,基因型与品种、性别和活跃度之间并不存在显著相关。但是 T/T 型犬只的活跃度确实要比 T/C 型与 C/C 型犬只的活跃度高,而这与 Takeuchi 等人的研究结果却相符,这表明 T 基因在犬的活跃水平上有一定的决定作用。另有研究表明,T471C 与柴犬的攻击性行为显著相关^[15],而攻击行为也属于活跃度的范畴中,这种不一致性有可能是犬种差异和遗传因素造成的,拉布拉多和金毛犬的性情天生就比较温顺、稳定。我们的研究还分析了 PT 测试中的两种状态是否与 T471C 的多态性有一定的联系,研究结果表明这两者间并没有显著相关性。但是可以通过分析看出,犬对主人存在一定的依恋性,相对的主人对犬有一定的安抚作用。主人在时,



犬在陌生环境中相对比较放松,顾忌较少,情绪上变化不是很大,性情比较稳定。而当主人离开时,犬会相对比较暴躁,相应的其活跃度会增加,性情趋于不稳定,严重者有可能产生分离焦虑。我们与 C/C 型犬只的训练情况进行了比对,结果发现,这 3 只犬都是拉布拉多犬,且其中有两只已经被淘汰,1 只还在训练,而 C/C 型的活跃度过高确实不宜培训成为导盲犬。但由于样本量过少,目前还不能确定该基因型是否能成为导盲犬前期筛选的一个指标,还有待于大样本的验证。

综上所述,活跃度与性别呈现显著相关。SLC1A2 基因 T471C 位点与导盲犬的活跃度不具有显著相关性,不能作为导盲犬遗传学筛选的指标。

参 考 文 献

[1] Fallani G, Previde E P, Valsecchi P. Do disrupted early attachments affect the relationship between guide dogs and blind owners? [J] Applied Animal Behaviour Science, 2006, **100**: 241-257.

[2] Batt L, Batt M, Baguley J, *et al.* The effects of structured sessions for juvenile training and socialization on guide dog success and puppy-raiser participation [J]. Journal of Veterinary Behavior: Clinical Applications and Research, 2008, **3**:199-206.

[3] Parthasarathy V, Crowell-Davis S L. Relationship between attachment to owners and separation anxiety in pet dogs (Canis lupus familiaris) [J]. Journal of Veterinary Behavior: Clinical Applications and Research, 2006, **1**:109-120.

[4] Kanai Y, Smith C P, Hediger M A. The elusive transporters with a high affinity for glutamate [J]. Trends in Neurosciences, 1993, **16**:365.

[5] Tanaka K, Watase K, Manabe T, *et al.* Epilepsy and Exacerbation of Brain Injury in Mice Lacking the Glutamate Transporter GLT-1 [J]. Science, 1997, **276**:1699-1702.

[6] Siegel A, Schubert K. Neurotransmitters regulating feline aggressive behavior [J]. Reviews in the Neurosciences, 1995, **6**: 47-61.

[7] Swann A C. Neuroreceptor mechanisms of aggression and its treatment [J]. The Journal of Clinical Psychiatry, 2003, **64**: 26-35.

[8] Takeuchi Y, Hashizume C, Arata S, *et al.* An approach to canine behavioural genetics employing guide dogs for the blind [J]. Animal genetics, 2009, **40**:217-224.

[9] Svartberg K, Forkman B. Personality traits in the domestic dog (Canis familiaris) [J]. Applied Animal Behaviour Science, 2002, **79**:133-155.

[10] Svartberg K. Shyness-boldness predicts performance in working dogs. Applied Animal [J] Behaviour science, 2002, **79**:157-174.

[11] Scandurra A, Prato-Previde E, Valsecchi P, *et al.* Guide dogs as a model for investigating the effect of life experience and training on gazing behaviour [J]. Animal cognition, 2015, **18**:937-944.

[12] Batt L S, Batt M S, Baguley J A, *et al.* Factors associated with success in guide dog training [J]. Journal of Veterinary Behavior: Clinical Applications and Research, 2008, **3**:143-151.

[13] Ogata N, Hashizume C, Momozawa Y, *et al.* Polymorphisms in the canine glutamate transporter-1 gene: identification and variation among five dog breeds [J]. Journal of Veterinary Medical Science, **68**:157-159.

[14] Serpell J A, Hsu Y Y. Development and validation of a novel method for evaluating behavior and temperament in guide dogs [J]. Applied Animal Behaviour Science, 2001, **72**:347-364.

[15] Takeuchi Y, Kaneko F, Hashizume C, *et al.* Association analysis between canine behavioural traits and genetic polymorphisms in the Shiba Inu breed [J]. Animal genetics, 2009, **40**:616-622.

(下转至第 20 页)



Establishment and Evaluation of a Rat Model of Cognitive Impairment after Traumatic Brain Injury

GUO Xinrong¹, MA Xiaowei²

(1. *Acupuncture and Massage Department, Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Xi'an 712046, China*)

(2. *Department of Teaching management Affairs, Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Xi'an 712046, China*)

Abstract: Objective To explore the preparation and evaluation of an animal model of cognitive impairment after Traumatic brain injury. **Method** Sixty healthy male SD rats and the remaining 48 rats after water maze screening were randomly divided into blank control group, model control group and model group. The electric Cortical Contusion Impactor was used to attack the model and water maze screening was used to determine the cognitive impairment rats after TBI. The changes of vital signs, nerve function and motor function, Morris water maze test, contents of MMP-2, MMP-9, SOD and MDA were observed. **Result** Compared with the blank group, there were significant differences in vital signs and behavioral indicators ($P < 0.05$), latency of water maze test and space exploration test ($P < 0.01$), serum MMP-2, MMP-9 and MDA levels ($P < 0.01$), and SOD levels ($P < 0.01$). **Conclusion** The model preparation scheme proposed in this paper can simulate the cognitive impairment after craniocerebral injury, and has good stability, reproducibility, **Objective** evaluation, and better operation of animal model platform and evaluation system, which is worthy of reference in similar studies.

Key words: cognitive impairment; Traumatic brain injury; model preparation; experimental animals

(上接第 14 页)

Correlation between SNP Loci of SLC1A2 and the Activity Level of Labrador and Golden Retriever

MA Xuena, BAI Jing, CHEN Shuting, LUO Dong, LI Yachan, ZHOU Zijuan,

WANG Fujing, WANG Aiguo, WANG Jingyu

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

Abstract: Objective To determine the correlation between the SNP loci of SLC1A2 and the activity level of Labrador and Golden Retriever for selection of effective genetic biomarkers. **Method** Ninety-nine dogs (80 Labrador and 19 Golden) were selected from the Chinese guide dog training center of Dalian. The activity levels of the dogs were evaluated by Passive Test. Venous bloods of the dogs was collected and the genomic DNA was isolated from white blood cells. Three SNP loci of SLC1A2 gene, T129C, T1549G, and T471C, were detected by PCR/sequencing method. Finally, the correlations between activity level and genotypes were analyzed. **Result** The T129C and T1549G loci of SLC1A2 gene were not polymorphic. The T471C locus had three genotypes: T/T, T/C and C/C. There was no significant correlation between the three genotypes of T471C and the activity level, sex, and breed ($P > 0.05$). There was also no significant correlation between the activity level and the breed. However, there was significant correlation between activity level and sex ($P = 0.049$). **Conclusion** There is no significant correlation between SNP loci of SLC1A2 gene and activity levels of Labrador and Golden Retriever.

Key words: Labrador; Golden Retriever; SLC1A2; SNP; Activity level