

马 *DRD4* 基因部分序列克隆和 PCR-RFLP 分析

范彩云^{1,2}, 芒来^{2*}, 程建波³, 森裕司⁴

(1. 河南科技学院动物科学学院, 新乡 453003; 2. 内蒙古农业大学动物科学与医学学院, 呼和浩特 010018; 3. 中国农业大学动物科学技术学院, 北京 10094; 4. 东京大学大学院兽医动物行动学研究室, 东京 113-8657, 日本)

摘要: 克隆了马 *DRD4* 基因完整第 1 内含子及部分第 1、2 外显子序列, 并用 *StuI* 限制性内切酶通过 PCR-RFLP 技术检测了包括引入品种、培育品种和地方品种 6 个类型共 270 匹马的 *DRD4* 基因部分序列多态性。用 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳将酶切产物分离, 并用银染法显色。结果经 *StuI* 内切酶消化表现出多态, 由 3 种共显性等位基因控制, 出现了 6 种基因型; 经 Hardy-Weinberg 平衡检验, 乌审马 (WS)、巴而虎马 (BH) 和乌珠穆沁马 (WZ) ($P > 0.05$) 达到平衡, 而其余均未达到平衡 ($P < 0.05$)。

关键词: 马; *DRD4* 基因; 克隆; 多态性; PCR-RFLP

中图分类号: S821.2

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2008)01-0012-04

Cloning and PCR-RFLP Analysis of the Dopamine Receptor D4 Gene Partial Sequence of Horses

FAN Cai-yun^{1,2}, MANG Lai^{2*}, CHENG Jian-bo³, MORI Yu-ji⁴

(1. College of Animal Science, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453003, China; 2. College of Animal Science and Veterinary, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010018, China; 3. College of Animal Science and Technology, China Agricultural University, Beijing 10094, China; 4. Laboratory of Veterinary Ethology, The University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan)

Abstract: In this paper, partial sequence of horse *DRD4* gene was cloned including intron1, partial exon1 and exon2. And restriction enzyme *StuI* was used to analyze the polymorphism of the *DRD4* gene sequences of 270 horses from 6 types including importing breed, cultivating breed and local breed. The products of digestion with restriction enzyme *StuI* were detected by 8% non-denatured polyacrylamide gel electrophoresis and showed in silver staining protocol. The result indicated restriction enzyme *StuI* showed polymorphism. Six kinds of genotypes were found in six populations, which were controlled by three alleles. The results of χ^2 test showed that genotypes frequency of horse *DRD4* gene in TB, SH, XN did not fit with Hardy-Weinberg equilibrium ($P < 0.05$), but that in WS, BH and WZ fit with Hardy-Weinberg equilibrium ($P > 0.05$).

Key words: horses; *DRD4* gene; cloning; polymorphism; PCR-RFLP

多巴胺是脑内主要的儿茶酚胺类神经递质, 它控制着哺乳动物的运动、认知和情感等。多巴胺 D4 受体 (Dopamine receptor D4, *DRD4*) 基因有几个区

域存在多态现象。这些多态与性格或神经紊乱存在相关性已被证实^[1]。尤其 *DRD4* 基因是第 1 个被发现与性格有关的基因, 如人类第 3 外显子 1 个 48 bp

收稿日期: 2006-10-16

基金项目: 日本学术振兴会科学研究费资助 (H17-05479)

作者简介: 范彩云 (1980-), 女, 内蒙古包头人, 博士, 主要从事分子遗传学与马科学研究, E-mail: fancaiynnmgbt@163.com

* 通讯作者: 芒来, 教授, 博导, 主要从事分子数量遗传学与马科学研究, E-mail: dmanglai@yahoo.com.cn

序列重复的不同次数与追求新颖有关^[2],而且类似于这种与性格相关的短串联重复序列多态(VNTR)现象在非人灵长类^[3]和狗^[4-5]等哺乳动物中都有报道。此外,也有进行关于人和狗 *DRD4* 基因非编码区多态与性格行为的相关性研究。而近几年随着赛马业的发展,对马匹的要求也越来越高,不仅要求耐力强、速度快,而且性格气质也非常重要,1匹携带不良性格基因的马,无论在多好的环境中都将是1匹性格不良的马;而1匹性格稳定、可靠的马,即使是在恶劣的环境之下也会表现稳定、令人放心、易于饲养管理和调教(调教可以改变马匹骨骼与肌肉的长短、角度和连接方式,改善各部位的结构,使不同用途的马匹表现出更加优异的特定性能^[6])等特点。在日本已有对马 *DRD4* 基因第3外显子的VNTR与行为进行相关性研究的报道,并取得一定进展^[7]。然而,对马 *DRD4* 基因非编码区的研究至今仍是一个空白。笔者在以前研究的基础上^[8]对马 *DRD4* 基因第1内含子及部分第1、第2外显子进行克隆,并对其进行PCR-RFLP分析,为寻找更多与性格行为相关的遗传标记奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料及试剂

基因组从三河马SH(内蒙古自治区呼伦贝尔市陈巴尔虎旗,51个)、巴尔虎马BH(内蒙古自治区呼伦贝尔市新巴尔虎左旗,54个)、锡尼河马XN(内蒙古自治区呼伦贝尔市鄂温克旗,45个)、乌珠穆沁马WZ(内蒙古自治区锡林郭勒盟东、西乌珠穆沁旗,40个)、纯血马TB(北京华骏育马场,50个)、乌审马WS(内蒙古自治区鄂尔多斯市鄂托克前旗、鄂托克旗30个)血液中提取,于TE溶液中溶解, -20℃保存;

引物由宝生物工程(大连)有限公司合成;LA *Taq* DNA聚合酶、dNTPs、pMD19-T Vector 购自宝生物工程(大连)有限公司;DNA片段回收纯化试剂盒、质粒提取纯化试剂盒购自杭州维特洁生化技术有限公司;Marker为宝生物公司的DL2000;测序反应由宝生物工程(大连)有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 引物设计及合成 根据GenBank已发表的人(NM000797)、鼠(NM007878)、雪貂(AY394848)的*DRD4*基因cDNA序列保守区设计一对引物(由大连宝生物公司合成):

正向引物:5'-CTGCAGACGCCACCAACT-3'

反向引物:5'-TGGCGCACAGGTTGAAGAT-3'

1.2.2 PCR扩增 PCR反应体系:总体积为20 μL,其中包括10×GC Buffer II缓冲液10.0 μL, dNTPs 3.2 μL,正、反引物(20 pmol/μL)各0.4 μL, LA *Taq* DNA Polymerase 1U,模板DNA约60 ng, ddH₂O 5.2 μL。PCR反应条件:94℃预变性5 min,94℃变性40 s,56.5℃退火30 s,72℃延伸60 s,35个循环;72℃延伸7 min;4℃保存。PCR产物用1.2%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.3 克隆与测序 PCR产物用1.2%的琼脂糖凝胶电泳检测,将目的带切下后用DNA凝胶纯化试剂盒(杭州维特洁生化技术有限公司)进行回收,回收后的PCR产物片段与pMD19-T载体连接并转化到*E. coli* DH5α感受态细胞,经鉴定正确的重组克隆子送大连宝生物公司测序。

1.2.4 PCR产物的酶切 用*Stu*I限制性内切酶按照试剂说明书(分别购自上海生物工程有限公司和大连宝生物有限公司)的推荐方法进行酶切消化。酶切产物通过8%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳和银染法进行检测,其中Acr/Bis为29:1,200 V电压电泳1.5~2.0 h。选取代表不同纯合型的个体PCR产物纯化后送大连宝生物公司测序。

2 结果

2.1 克隆测序

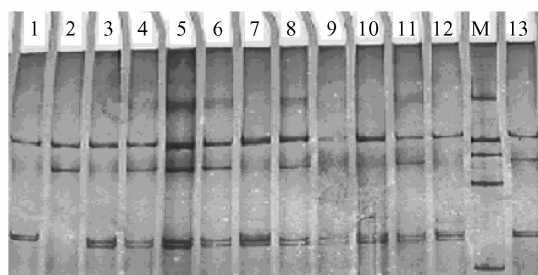
随机挑取各2个阳性重组子送大连宝生物工程有限公司测序,并将所得到的序列与GenBank已登录的EF561289进行比对,发现此序列包括了马*DRD4*基因全部第1内含子和第1外显子3'末端的93 bp序列及第2外显子5'端99 bp序列,且经所得6个品种马序列进行比对发现存在1个插入/缺失多态和一些点突变。

2.2 PCR-RFLP和纯合子测序

采用限制性内切酶*Stu*I对纯血马、三河马、锡尼河马、乌珠穆沁马、乌审马和巴尔虎马共270匹马*DRD4*基因第1内含子及部分第1、第2外显子的PCR扩增产物进行消化,结果出现了6种基因型,分别命名为AA、BB、CC、AB、AC、BC;由A、B、C3个复等位基因控制。酶切结果见图1。

将其纯合型测序并利用DNASar软件比对,以GenBank已登录(EF012228)的序列为对照,结果可以看出,不同基因型的酶切片段大小分别为AA

(316,324,1 121 bp)、BB(333,324,1 121 bp)、CC(640,1 121 bp)、AB(316,324,333,1 121 bp)、AC(316,324,1 121,640 bp)、BC(333,324,1 121,640 bp),纯合子 BB型、AA型是1 461处17 bp序列插入、缺失产生的长度不同的2种态型,CC型是在1 444 bp处发生G→A的转换,导致缺失了1个 *Stu* I的酶切位点AG↓GCCT。



M, DL2000 marker ;1. BB;2. CC;3,7,9,10. AA; 4,5,6,8,11. AC;12. AB;13. BC

图1 PCR产物 *Stu* I酶切

Fig.1 Electrophoretic patterns of digested PCR products with *Stu* I

2.3 PCR-RFLP 结果的统计分析及 χ^2 检验

统计分析表明:除纯血马外其余马群体的优势基因型及等位基因均为 AA型和 A;纯血马为 AB型和 B(表1)。 χ^2 适合性检验结果表明,乌珠穆沁马、巴而虎马和乌审马 χ^2 值分别为 1.27 ($P > 0.05$)、9.11 ($P > 0.05$)和 0.75 ($P > 0.05$),说明乌珠穆沁马、巴而虎和乌审马的 *Stu* I酶切位点处于 Hardy-Weinberg 平衡状态,而锡尼河马、三河马和纯血马均未达到 Hardy-Weinberg 平衡状态。经 χ^2 独立性检验结果表明,纯血马与其余各品种马基因型分布均表现出极显著性差异 ($P < 0.01$),三河马与乌审马表现出极显著性差异 ($P < 0.01$),乌审马与巴尔虎马也表现出极显著性差异 ($P < 0.01$),三河马与乌珠穆沁马表现出显著性差异 ($P < 0.05$),而其它品种马之间差异均不显著 ($P > 0.05$) (表2)。从以上分析可知,马 *DRD4* 基因 *Stu* I位点基因型分布具有一定品种特异性,但其分布无明显规律性。

表1 不同品种马 *Stu* I位点基因型和基因频率分布

Table 1 Genotype distribution and allele frequencies at *Stu* I site of different horse breeds

品种 Breeds	样本数 Sample size	基因型频率 Genotype frequency						等位基因频率 Allele frequency			χ^2 值 χ^2 value
		AA	BB	CC	AB	AC	BC	A	B	C	
锡尼河 XN	45	0.444 (20)	0.133 (6)	0.044 (2)	0.156 (7)	0.200 (9)	0.022 (1)	0.622	0.222	0.156	11.39*
巴尔虎 BH	54	0.370 (20)	0.130 (7)	0.056 (3)	0.296 (16)	0.130 (7)	0.019 (1)	0.583	0.287	0.130	9.11
乌珠穆沁马 WZ	40	0.575 (23)	0.025 (1)	0.000 (0)	0.175 (7)	0.175 (7)	0.050 (2)	0.750	0.138	0.112	1.26
乌审马 WS	30	0.533 (16)	0.000 (0)	0.067 (2)	0.033 (1)	0.333 (10)	0.033 (1)	0.717	0.033	0.250	0.75
三河马 SH	51	0.392 (20)	0.176 (9)	0.078 (4)	0.255 (13)	0.059 (3)	0.039 (2)	0.549	0.324	0.127	21.05**
纯血马 TB	50	0.040 (2)	0.280 (14)	0.100 (5)	0.420 (21)	0.020 (1)	0.140 (7)	0.260	0.560	0.180	14.48**

df=5; $\chi^2_{(0.05)} = 11.07$; $\chi^2_{(0.01)} = 15.09$; * 表示差异显著 ($0.01 < P < 0.05$); ** 表示差异极显著 ($P < 0.01$)。下同

* means significant difference ($0.01 < P < 0.05$); ** means most significant difference ($P < 0.01$). The same as below

表2 不同基因型在不同品种中分布的差异显著性检验

Table 2 The χ^2 test of genotype of *Stu* I site in different horse breeds

品种 Breeds	锡尼河马 XN	巴尔虎马 BH	乌珠穆沁马 WZ	乌审马 WS	三河马 SH
巴尔虎马 BH	3.257				
乌珠穆沁 WZ	6.091	9.694			
乌审马 WS	8.330	15.846**	8.361		
三河马 SH	6.049	2.553	12.868*	20.428**	
纯血马 TB	36.952**	27.123**	47.662**	54.635**	21.578**

3 讨 论

3.1 本研究用限制性内切酶 *Stu I* 对 *DRD4* 基因第 1 内含子及部分第 1、第 2 外显子序列进行 PCR-RFLP 分析,检测到 6 种基因型,3 个等位基因,Hardy-Weinberg 平衡性检验表明,乌珠穆沁马、巴尔虎马和乌审马的 *Stu I* 酶切位点处于 Hardy-Weinberg 平衡状态,而锡尼河马、三河马和纯血马均未达到 Hardy-Weinberg 平衡状态,从品种产生的历史来看,三河马为培育品种,纯血马为国外引进品种,后代繁育大多是人工选择交配,尤其是纯血马,其后代繁衍有着更为严格的人工选择,必然会造成基因分布的不平衡。乌审马、锡尼河马、乌珠穆沁马和巴尔虎马属于蒙古马中不同的地方类群,这些群体在各自相对封闭的环境中自然繁育而成,其基因分化比较平衡。锡尼河马本为地方品种,主要分布于呼伦贝尔的鄂伦村,近些年,由于当地牧民热衷于速度赛马活动,逐渐在锡尼河马中有意导入部分外血,以提高锡尼河马的速度,其后代繁育过程人工选择的比例在加大,因此其基因分布也会出现不平衡现象^[9]。

3.2 本研究中发现了 17 bp 片段的插入(BB)/缺失(AA)和 1 处 G→A 转换(CC)多态现象,且除了纯血马以 AB 型为优势基因型外,其余马都以 AA 型为主,这种现象除了可能是由于类群不同导致,也可能与马的一些行为特点有关。在人类,已有报道内含子区域的变异与人类的性格行为及精神失常有关。比如,色氨酸羟化酶基因的第 7 内含子变异与精神分裂症的侵害性有关^[10];五羟色胺运载蛋白(5HHT)基因的第 2 内含子变异与焦虑紧张有关^[11]。就 *DRD4* 基因而言,在人类已报道其第 1 内含子存在 G 的重复次数多态性,但已证明其与精神分裂症的易感性没有关系^[1]。在灵长类^[12]及狗^[13]还发现了 *DRD4* 基因第 2 内含子存在不同片段的插入/缺失多态,但已证明这种多态与报道基因的表达没有关系。那么存在于马 *DRD4* 基因第 1 内含子这种 17 bp 片段的插入/缺失是否影响报道基因的表达,并且这 6 种基因型与马的性格行为又存在怎样的相关性,还有待于在以后的研究中适当扩大样本含量,并进行相应行为学试验才能予以证实。

参考文献:

[1] BARR C L, KENNEDY J L, LICHTER J B, et al. Alleles at the dopamine D4 receptor locus do not con-

tribute to the genetic susceptibility to schizophrenia in a large Swedish kindred[J]. American Journal of Medical Genetics,1993, 48: 218-222.

- [2] BENJAMIN J, LI L, PATTERSON C, et al. Population and familial association between the D4 dopamine receptor gene and measures of Novelty Seeking[J]. Nature Genetics, 1996,12: 81-84.
- [3] LIVAK K J, ROGERS J, LICHTER J B. Variability of dopamine D4 receptor (*DRD4*) gene sequence within and among nonhuman primate species[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,1995,92: 427-431.
- [4] NIIMI Y, INOUE-MURAYAMA M, MURARYAMA Y, et al. Allelic variation of the D4 dopamine receptor polymorphicregion in two dog breeds, Golden retriever and Shiba[J]. The Journal of Veterinary Medical Science,1999,61: 1 281-1 286.
- [5] ITO H, NARA H, INOUE-MURAYAMA M, et al. Allele frequency distribution of the canine dopaminereceptor D4 gene exon III and I in 23 breeds[J]. The Journal of Veterinary Medical Science,2004,66: 815-820.
- [6] 吴克亮,吴常信. 马科学研究动态与马业发展[J]. 畜牧兽医学报, 2005, 36(4): 412-416.
- [7] HASEGAWA T, SATO F, ISHIDA N. Determination and variability of nucleotide sequences for D4 dopamine receptor genes (*DRD4*) in genus *Equus*[J]. Journal of Equine Science, 2002,13: 57-62.
- [8] 范彩云,芒 来,程建波,等. 6 个品种马 *DRD4* 基因克隆与序列比较分析[J]. 畜牧兽医学报,2007, 38(8):866-871.
- [9] 芒 来. 动物数量遗传学[M]. 内蒙古农业大学,2003:4.
- [10] HONG C J, TSAI S J, WANG Y C. Association between tryptophan hydroxylase gene polymorphism (A218C) and schizophrenic disorders[J]. Schizophrenia Research,2001,49: 59-63.
- [11] MELKE J, LANDEN M, BAGHEI F, et al. Serotonin transporter gene polymorphisms are associated with anxiety-related personality traits in women[J]. American Journal of Medical Genetics,2001,105: 458-463.
- [12] SCHIMADA M K, INOUE-MURAYAMA M, UUDA Y, et al. Polymorphism in the second intron of dopamine receptor D4 gene in humans and apes[J]. Biochemical and Biophysical Research Communication,2004,315: 1 186-1 190.
- [13] HIDETOSHI N, MIHO I M, AKIKO K, et al. Novel polymorphism of the canine dopamine receptor D4 gene intron II region[J]. Animal Science Journal, 2005, 76: 81-86.