

单胺氧化酶 B 单核苷酸多态性与幼犬 工作行为性状的关联分析

李小慧^{1,2}, 茆达干¹, 徐汉坤³, 马大君³, 陈鹏¹, 杨利国^{1,4*}

(1. 南京农业大学动物繁育研究所, 江苏 南京 210095; 2. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广东 广州 510380;
3. 公安部南京警犬研究所, 江苏 南京 210012; 4. 华中农业大学动物科技学院, 湖北 武汉 430070)

摘要: 测定了 204 条德国牧羊犬、拉布拉多犬、史宾格犬二月龄幼犬对人依恋性和服从性、衔取、争夺游戏和胆量等行为性状, 同时用 PCR-RFLP 方法检测各犬单胺氧化酶 B (*MAOB*) 基因型。用 χ^2 检验 *MAOB* 基因多态性的基因型和基因频率在品种间的分布, 发现基因型和基因频率在犬品种之间差异极显著 ($P < 0.01$)。构建一般线性模型分析 *MAOB* 基因型与行为性状的关系, 发现 *MAOB* 基因型对幼犬的衔取行为有显著影响 ($P < 0.05$)。TC 基因型犬的衔取得分值均高于 TT 型 ($P < 0.01$)。这些结果表明, *MAOB* 基因可能是影响犬衔取行为的主效基因或与主效基因紧密连锁的标记基因, 可用于建立选择犬衔取性状的基因标记辅助选择方法。

关键词: 犬; 犬单胺氧化酶 B 基因; 单核苷酸多态性; 工作行为性状

中图分类号: S829.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-2030 (2007) 03-0105-05

Association between the canine monoamine oxidase B (*MAOB*) gene polymorphisms and traits of main working behaviors in puppies

LI Xiao-hui^{1,2}, MAO Da-gan¹, XU Han-kun³, Ma Da-jun³, CHEN Peng¹, YANG Li-guo^{1,4*}

(1. Research Institute of Animal Breeding & Reproduction, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;
2. Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China;
3. Nanjing Policedog Institute of the Ministry of Public Security, Nanjing 210012, China;
4. College of Animal Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: Behavior traits such as affability and obedience to human, fetch and retrieve, tug of war, fear and courage were tested in 204 two-month old puppies from 3 breeds (German Shepherd Dog, Labrador Retriever, English Springer Spaniel). The polymorphism of monoamine oxidase B (*MAOB*) gene was detected by PCR-RFLP. χ^2 analysis indicated that genotypes and allelic frequencies of *MAOB* gene were significantly different among the three breeds ($P < 0.01$). Associated analysis of *MAOB* polymorphism and behavioral traits tested were conducted with general linear model analysis using SAS software. The results showed that *MAOB* polymorphism has significant effect on fetch and retrieve ($P < 0.05$). The scores of fetch and retrieve behavior of TC genotype puppies were higher than that of TT ($P < 0.01$). It suggested that *MAOB* gene could be candidate gene locus or a linked marker to a major gene which affects fetch and retrieve behavior of dog significantly.

Key words: dog; monoamine oxidase B (*MAOB*) gene; single nucleotide polymorphism (SNP); traits of working behavior

工作犬比普通犬具有更突出的优秀品质, 如服从性强、兴奋性高、胆量大、喜欢与人游戏等。在犬投入到训练以前, 应该对其兴奋性、胆量和游戏欲望等进行评估, 以确定它是否适合用作工作犬。现有工作犬评定方法大多是相关人员根据主观经验进行, 受测试犬的生理状态、测试人员的主观差异和测试环境变化的影响, 得出的判断可能会与实际有偏差。因此, 建立快捷有效的评定方法对于促进工作犬的挑选和育种具有重要意义。

随着分子生物学技术在动物育种中的广泛应用, 已发现许多动物的重要性状主效基因和连锁分子标记。对犬的行为性状遗传研究表明, 大部分性状具有中或高的遗传力, 如犬对人的服从性遗传力达到

收稿日期: 2005-12-29

基金项目: 公安部 B 类项目 (20039729505)

作者简介: 李小慧, 博士研究生, E-mail: lxh152706@yahoo.com.cn。* 通讯作者: 杨利国, 教授, 博士生导师, 从事动物繁殖育种研究, E-mail: ylg@hzau.edu.cn。

0.37, 犬的胆量和争夺游戏行为遗传力分别为 0.46 和 0.48, 衔取行为遗传力也在 0.20 ~ 0.21 之间^[1-3]。因此, 找到决定犬工作行为性状的主效基因及其连锁标记, 就可以建立犬工作性状基因标记辅助选择方法, 提高工作犬的选育工作效率。

单胺氧化酶 B (MAOB) 基因是行为分子遗传研究的重要候选基因之一, 具有氧化降解脑和外周组织中单胺, 如五羟色胺、多巴胺、去甲肾上腺素等神经递质的作用, 可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^[4]。人类低水平血小板的单胺氧化酶活性 (trbc-MAO) 可能导致逃避、冲动和攻击等一些性格及行为^[5]。敲除 MAOB 基因后, 小鼠对新奇环境反应削弱^[6]。各种试验显示, 人类单胺氧化酶 B 在体内的活性受遗传因素影响。对人类双生子研究发现, 血小板的单胺氧化酶 B 活性的遗传控制因素达到 76%^[7]。人 MAOB 基因第 13 内含子的一个单核苷酸多态 (A-G) 与脑和血小板的 MAOB 活性有关, 带 A 等位基因个体酶活性显著低于带 G 等位基因个体^[8]。

分析犬 MAOB 基因的遗传变异, 发现在基因编码序列第 188 个碱基有 *Hinf* I 酶切多态位点。根据行为特点不同的品种犬间的基因频率分布差异, Hashizume 等^[9]推测 MAOB 基因可能与犬的攻击行为有关。本试验以兴奋性、攻击性和训练使用等行为具有很大差异的工作犬品种——德国牧羊犬、拉布拉多犬和史宾格犬的二月龄幼犬为研究对象, 测定其对人的依恋性和服从性、衔取、争夺游戏和胆量等行为性状; 同时, 采用限制性片段长度多态性 (RFLP) 方法检测 MAOB 基因编码序列第 199 个碱基 T-C 多态性, 分析不同基因型与犬行为性状之间的联系, 旨在寻找与犬工作行为性状相关的分子标记。

1 材料与方法

1.1 试验动物及饲养管理

试验动物来自公安部南京警犬研究所, 全部为 2005 年 2 至 8 月出生的 60 日龄左右的幼犬。其中德国牧羊犬 42 条 (公犬 20 条, 母犬 22 条)、拉布拉多犬 74 条 (公犬 45 条, 母犬 29 条)、史宾格犬 88 条 (公犬 34 条, 母犬 54 条)。所有品种的幼犬在 45 日龄断奶, 每日定时饲喂全价配合饲料 (6:00, 11:00, 17:00), 定时换水。每天早晨管理员打扫犬舍, 10:00 至 11:00 和 15:00 至 16:00 为运动时间。所有品种犬饲喂日粮和管理方法保持一致。

1.2 幼犬行为测试方法

参考 Wilsson 等^[2]对幼犬行为的测试方法, 并略作改进。测试了幼犬对人的依恋性和服从性、衔取欲望和胆量等在犬训练过程中有重要作用的行为性状。测试时间为 2005 年 4 月至 10 月, 测试地点在公安部南京警犬研究所。为了排除周围环境对幼犬行为的干扰, 测试在封闭的房间内进行, 温度 25 ℃。房间内安装与计算机连接的摄像头, 实时记录幼犬在测试过程中的行为表现。所有犬的测试人员保持一致, 助手一人躲藏在遮蔽物内引导和协助测试进行。测试共分 4 部分, 对犬各种行为表现进行评分 (括号内数字为得分)。

1.2.1 社会行为测试 测试人员 (TL) 进入房间, 静立 15 s, 而后蹲下来拍手招呼犬, 最多 5 次, 如犬不主动接近, 主动靠近犬。当犬来到 TL 跟前时, TL 站起缓慢走开 2 步, 如犬不跟随, 呼叫犬以吸引犬的注意力, 鼓励犬跟随。绕房间行走。完成后蹲下用手压幼犬背部, 下压 30 s。评估标准如下:

1) 犬对 TL 的反应: 犬主动与人接触, 摇尾, 跳向人 (5); 犬毫不犹豫地主动靠近人, 摇尾 (4); 犹豫一下后, 垂尾, 主动靠近人 (3); 最初退缩, 垂尾, 迟疑前来或允许 TL 靠近 (2); 不前来, 当 TL 靠近时表现发抖、夹尾、逃离等行为 (1)。

2) 随行表现: 愿意跟随, 跑到脚下, 咬 TL 的脚 (5); 愿意跟随, 跑到脚下 (4); 愿意跟随 (3); 迟疑跟随 (2); 不跟随或走开 (1)。

3) 约束表现: 猛烈挣扎, 左右摆动 (5); 断续挣扎 (4); 挣扎, 然后不动 (3); 没有挣扎 (2); 当 TL 的手放在其身体上时即趴下 (1)。

1.2.2 游戏行为测试 TL 用一块结实的棉布吸引幼犬的注意力, 如果犬扑咬并与 TL 争夺, TL 用力与犬来回争夺持续 1 min。评估标准: 积极争夺, 人用力时死死咬住 (5); 咬住布, 但人用力争夺时松口 (4); 只是扑、咬布, 但没有咬住 (3); 表现出兴趣, 但无任何动作 (2); 无兴趣 (1)。

1.2.3 衔取行为测试 TL 向幼犬出示纸团, 吸引幼犬注意力, 当幼犬表现出一定兴趣后, 将纸团抛向

距犬 1.5 m 左右的地方,并发出口令鼓励犬将球衔回。上述动作重复 5 次。评估标准:1) 衔:立即追逐,衔(5);追逐,嗅闻后衔(4);追逐,嗅闻后衔一下,失去兴趣(3);追逐,嗅闻,不衔(2);无兴趣(1)。2) 取:衔取后,立即返回给 TL(5);衔取后,立即返回但不愿意给 TL(4);衔取后,不返回,跑开,不愿意给 TL(3);衔后丢掉(2);无兴趣(1)。

1.2.4 胆量测试 将幼犬引导至测试场中央,位于测试场外面的助手制造刺耳的金属噪音,如果幼犬逃离,声音停止后 TL 诱导幼犬接近声源。评估标准:1) 对声音的震惊反应:没有震惊表现,定位并寻找声源(5);轻微震惊,定位声源(4);震惊,后退,而后定位声源(3);畏缩,后退较远距离,跑向 TL(2);迅速逃离,惊惶失措,嚎叫(1)。2) 对声音的探求反应:立即,主动接近声源(5);后退,返回接近声源(4);后退,向声源张望,声音停止后返回(3);不主动接近声源,在 TL 的诱导下,接近(2);不主动接近声源,在 TL 的诱导下,也不愿接近(1)。

1.3 犬 MAOB 基因多态性测定

1.3.1 DNA 提取和主要试剂 测试完成后,每个试验动物前肢静脉采血 1 mL,ACD 抗凝,采用北京时代天根生化公司的 DNA 提取试剂盒提取血样 DNA; *Taq* DNA 聚合酶、dNTP、限制性内切酶 *Hinf* I 购自大连宝生物公司; pBR322/*Msp*I DNA Marker 购自华美生物工程公司;丙烯酰胺、N,N'-亚甲双丙烯酰胺等均购自上海捷倍思基因技术有限公司。

1.3.2 引物合成和序列扩增 引物设计参照文献 [9],由大连宝生物公司合成。PCR 反应体系:10 × Buffer 1 μL, 25 mmol · L⁻¹ MgCl₂ 0.6 μL, 10 mmol · L⁻¹ dNTP 0.6 μL, 10 mmol · L⁻¹ 引物各 0.5 μL, *Taq* DNA 聚合酶 0.5 U, 50 ng · μL⁻¹ DNA 模板 1 μL, 双蒸水 6.3 μL。PCR 的反应条件:95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 60 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 保存。

1.3.3 RFLP 分析和电泳 PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测后,用限制性内切酶 *Hinf* I 酶切,酶切体系:PCR 产物 5 μL, Buffer 1 μL, 酶 0.5 μL, 双蒸水 3.5 μL。酶切产物用 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳 ($V(\text{Acr}) : V(\text{Bis}) = 29:1$), 140 V 恒压电泳 3 h 后,银染显色。

1.4 数据统计与分析

计算 3 个品种 MAOB 基因多态位点的等位基因频率和基因型频率,进行独立性检验。构建一般线性模型 (general linear model, GLM) 分析基因型与行为性状之间的联系。幼犬的行为不仅与品种有关,还受性别、母犬的胎次和同胞数的影响^[2,10],在构建统计模型时应考虑上述因素。构建模型如下:性状观察值 = 群体平均值 + 基因型均值 + 品种效应值 + 性别效应值 + 胎次效应值 + 同胞数效应值 + 基因型 × 品种互作效应 + 随机残差效应,计算不同基因型工作行为性状得分的最小二乘均数和标准误,并进行显著性检验和多重比较。统计软件为 SAS 8.2。

2 结果与分析

2.1 RFLP 和电泳结果

图 1 显示,扩增片段长为 257 bp,如是 CC 基因型,则经 *Hinf* I 酶切为 180 bp 和 77 bp 2 个片段;如果是 TT 基因型则 PCR 产物切不开;如为 TC 基因型,经 *Hinf* I 酶切后电泳条带为 257、180 和 77 bp 3 个片段。

2.2 不同品种犬的 3 种基因型及等位基因频率

MAOB 基因位于 X 染色体上,公犬没有杂合个体,因此将每个品种公犬和母犬的基因型分别进行分析。德国牧羊犬、拉布拉多犬、史宾格犬 MAOB 基因的 SNP T199C 基因型频率见表 1。 χ^2 检验表明,不同基因型在 3 个品种中分布差异极显著 (雄性: $\chi^2 = 32.08$, $P < 0.01$; 雌性: $\chi^2 = 31.44$, $P < 0.01$),说明基因分布与品种有关。3 个品种之间的基因频率差异极显著 ($\chi^2 = 16.12$, $P < 0.01$)。

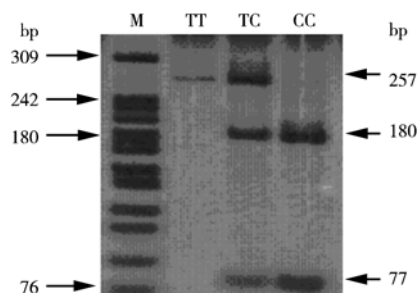


图 1 犬 MAOB 基因 SNP T199C PCR-RFLP 聚丙烯酰胺电泳图谱

Fig. 1 Canine MAOB SNP T199C demonstrated by PCR-RFLP and PAGE electrophoresis

表 1 *MAOB* 基因多态位点在 3 个品种犬的基因型频率和基因频率
Table 1 Genotype and gene frequency of *MAOB* in the three dog breeds

品种 Breed	基因型频率 Genotype frequency							基因频率 Gene frequency	
	样本数 Size	公 Male		样本数 Size	母 Female			C	T
		CC	TT		CC	TT	CT		
德国牧羊犬 German Shepherd Dog	20	0.35	0.65	22	0.23	0.36	0.41	0.39	0.61
拉布拉多犬 Labrador Retriever	45	0.49	0.51	29	0.14	0.62	0.24	0.40	0.60
史宾格犬 English Springer Spaniel	34	0.12	0.88	54	0.04	0.65	0.31	0.17	0.83

2.3 不同基因型与行为测试中各性状的关系

对所有犬不同基因型个体的工作行为性状差异进行显著性检验和多重检验,发现 *MAOB* 基因 *Hinf I* 酶切多态性与二月龄幼犬的衔和取行为显著相关 ($P < 0.05$)。对 3 种基因型的衔和取行为的得分值进行多重比较,TC 型的衔和取行为得分最高,与 TT 型之间差异极显著 ($P < 0.01$),与 CC 型之间差异不显著。3 种基因型在其他行为性状之间的差异不显著(表 2)。

MAOB 基因位于 X 染色体上,只有母犬存在 TC 型个体,性别之间工作行为性状之间的差异可能会影响统计分析结果,因此进一步分析性别对工作行为性状的影响,统计分析结果表明,性别对二月龄幼犬的工作行为性状没有影响(统计结果未显示)。

表 2 *MAOB* 基因型与二月龄幼犬工作行为性状的关系(最小二乘均数 ± 标准误)

Table 2 Phenotype value of behavior traits related to working of puppies with different genotype of *MAOB* gene ($LSM \pm SE$)

行为性状 Behavior traits	基因型 Genotype			<i>F</i> 检验 <i>F</i> -test	
	TT	TC	CC	<i>F</i>	<i>P</i>
对人反应 Reaction to TL	3.35 ± 0.21	3.00 ± 0.29	3.24 ± 0.31	0.77	0.466
随行 Following	3.63 ± 0.20	3.49 ± 0.27	3.35 ± 0.29	0.53	0.592
约束 Restriction	3.29 ± 0.22	3.64 ± 0.31	2.98 ± 0.32	1.48	0.231
衔 Fetch	3.10 ± 0.26 ^A	4.04 ± 0.36 ^B	3.37 ± 0.38 ^{AB}	3.53	0.031
取 Retrieve	2.49 ± 0.26 ^A	3.43 ± 0.35 ^B	2.67 ± 0.38 ^{AB}	3.55	0.031
争夺游戏 Tug	2.63 ± 0.22	2.91 ± 0.30	2.69 ± 0.33	0.44	0.647
对声音震惊反应 Shock to noise	3.00 ± 0.20	3.56 ± 0.28	2.87 ± 0.30	1.13	0.324
对声音探求 Exploration to noise	2.76 ± 0.17	2.94 ± 0.23	2.67 ± 0.24	0.50	0.604

注:同行数据不同大写字母表示差异极显著 ($P < 0.01$)。Values in the same row with different capital letters mean $P < 0.01$.

3 讨论

本试验所选动物全部为 2 月龄幼犬,这主要考虑所测试的行为性状特点和犬的行为发育阶段等因素。在 12 周以前环境因素对犬的行为影响较小,主要为遗传效应和母源效应^[10]。2 月龄后幼犬进入幼训阶段,对人的依恋性和服从性、胆量等行为通过后天培养可能会有所改变。因此,选用 2 月龄幼犬更能真实地反映遗传因素对犬行为性状的作用。

在 3 个品种中,德国牧羊犬和拉布拉多犬的基因频率基本相同,与史宾格犬则差异较大。这可能是因为前 2 个品种不仅应用广泛,而且在全世界的养犬爱好者中比较流行,群体数量较大,而史宾格犬起源于英国,仅仅在最近几十年才被开发为工作犬,群体较小,受到强烈的选择压力。另外一个可能是犬品种进化的结果,根据 Parker 等^[11]的报道,德国牧羊犬、拉布拉多犬从同一个祖先进化而来,同属于一个进化分支,而史宾格犬则与这 2 个品种进化距离较远。

本试验中,所测试的几种性状只有衔和取行为在不同的基因型之间有差异。衔和取行为平均得分最高的是 TC 基因型,TC 与 TT 型之间差异极显著,这表明 *MAOB* 基因与衔和取行为性状有一定的相关性,TC 型个体衔取欲望较好。犬 *MAOB* 基因可能是影响犬衔取欲望差异的主效基因或与主要基因紧密连锁的标记基因。

犬的衔取行为是一个人与犬的互动过程。研究显示,在人与犬的互动过程中,犬一些神经递质和激素都发生变化,包括多巴胺、苯基乙胺(β -phenylethylamine), β -内啡肽和催产素等等,特别是血清中多巴胺和苯乙酸(phenyl acetic acid,苯基乙胺的代谢产物)分别提高 73% 和 68%,差异极显著^[12]。而在 *MAOB* 降解的体内单胺类物质中,多巴胺和 β -phenylethylamine 与 *MAOB* 的亲合力最高^[13]。此外,

MAOB 必须与辅酶 FAD (黄素腺嘌呤二核苷酸) 结合才能发挥作用^[14], 犬 MAOB 基因 SNP T199C 引起第 67 位氨基酸残基由半胱氨酸变为精氨酸, 而第 62 到 103 氨基酸之间是 MAOB 的辅酶 FAD 的结合位置^[9], SNP 可能引起蛋白结构变化, 影响辅酶结合, 从而导致对单胺类物质氧化脱氨效率的改变^[15]。

在工作犬的育种和挑选中, 犬的衔取欲望是重要的依据指标之一。工作犬训练的基础是建立对人依恋和服从性, 而犬衔取欲望的强弱是决定服从性训练效率和成败的重要因素。根据本研究结果, 可以在实际工作中将 MAOB 基因作为犬衔取性状的候选基因继续深入研究, 并探索性地用于挑选工作犬和在分子标记辅助选择中用于对犬衔取性状的遗传改良及固定。

参考文献:

- [1] Goddard M E, Beilharz R G. Genetics of traits which determine the suitability of dogs as guide-dog for the blind [J]. *Appl Anim Ethol*, 1982, 9(3/4): 299-315
- [2] Wilsson E, Sundgren P-E. Behaviour test for eight-week old puppies-heritabilities of tested behaviour traits and its correspondence to later behaviour [J]. *App Anim Beha Sci*, 1998, 58(1/2): 151-162
- [3] Wilsson E, Sundgren P-E. The use of a behaviour test for selection of dogs for service and breeding. II. Heritability for tested parameters and effect of selection based on service dog characteristics [J]. *App Anim Beha Sci*, 1997, 54(2/3): 235-241
- [4] Nagatsu T. Progress in monoamine oxidase(MAO) research in relation to genetic engineering [J]. *Neurotoxicology*, 2004, 25(1/2): 11-20
- [5] Oreland L, Hallman J. The correlation between platelet MAO activity and personality: short review of findings and a discussion on possible mechanisms [J]. *Prog Brain Res*, 1995, 106: 77-84
- [6] Lee M, Chen K, Shih J C, et al. MAO-B knockout mice exhibit deficient habituation of locomotor activity but normal nicotine intake [J]. *Genes Brain Behav*, 2004, 3(4): 216-227
- [7] Pedersen N L, Oreland L, Reynolds C, et al. Importance of genetic effects for monoamine oxidase activity in thrombocytes in twins reared apart and twins reared together [J]. *Psychiatry Res*, 1993, 46(3): 239-251
- [8] Garpenstrand H, Ekblom J, Forslund K, et al. Platelet monoamine oxidase activity is related to MAOB intron 13 genotype [J]. *J Neural Transm*, 2000, 107(5): 523-530
- [9] Hashizume C, Masuda K, Momozawa Y, et al. Identification of a 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
- [10] Beaver B V. *Canine Behavior: A Guide for Veterinarians* [M]. Philadelphia: W B Saunders Company, 1999: 138
- [11] Parker H G, Kim L V, Sutter N B, et al. Genetic structure of the purebred domestic dog [J]. *Science*, 2004, 304(5674): 1160-1164
- [12] Odendaal J S J, Meintjes R A. Neurophysiological correlates of affiliative behaviour between humans and dogs [J]. *Vet J*, 2003, 165(3): 296-301
- [13] Shih J C, Chen K, Ridd M J. Monoamine oxidase: from genes to behavior [J]. *Annu Rev Neurosci*, 1999, 22: 197-217
- [14] Hashizume C, Suzuki M, Masuda K, et al. Molecular cloning of canine monoamine oxidase subtypes A(MAOA) and B(MAOB) cDNAs and their expression in the brain [J]. *J Vet Med Sci*, 2003, 65(8): 893-898
- [15] Gottowik J, Malherbe P, Lang G, et al. Structure/function relationships of mitochondrial monoamine oxidase A and B chimeric forms [J]. *Eur J Biochem*, 1995, 230(3): 934-942

责任编辑: 周广礼