

DOI:10.3969/j.issn.1000-7083.2011.02.001

单胺氧化酶 B 基因单核苷酸多态性与藏獒 对陌生人攻击行为的关联分析

丁晓麟, 马大君, 张汇东
(公安部南京警犬研究所, 南京 210012)

摘要:采用行为测试的方法,测定藏獒和拉布拉多犬在陌生人接近时的攻击行为差异,应用 PCR-RFLP 技术检测单胺氧化酶 B(MAOB)基因第 3 外显子单核苷酸多态性,分析其在藏獒(陌生人接近时进行攻击)和拉布拉多犬(陌生人接近时无攻击行为)两个品种间基因型频率与基因频率分布差异。结果表明:MAOB 基因型频率与基因频率在两个品种中分布差异不显著($P > 0.05$)。 χ^2 适合性检验显示,藏獒处于 Hardy-Weinberg 极不平衡状态($P < 0.01$),拉布拉多犬处于 Hardy-Weinberg 平衡状态($P > 0.05$)。藏獒和拉布拉多犬品种间,在陌生人接近时的攻击行为差异与 MAOB 基因 T119C 多态性可能无直接关系。

关键词:犬;单胺氧化酶 B 基因;单核苷酸多态性;攻击行为

中图分类号: Q959.8; Q55 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7083(2011)02-0166-04

Association between the Tibetan Mastiff Monoamine Oxidase B Gene Single Nucleotide Polymorphism and Stranger-directed Aggressive Behaviour

DING Xiao-lin, MA Da-jun, ZHANG Hui-dong

(Nanjing Policedog Institute of the Ministry of Public Security, Nanjing 210012, China)

Abstract: The aggressive behavior in Tibetan mastiffs and Labrador retrievers when approached directly by a stranger was tested by a behavioural test. The polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) was adopted to detect monoamine oxidase B (MAOB) gene exon 3 polymorphism, and their genotypes and allelic frequency were estimated among Tibetan mastiffs (aggression when a stranger approaches) and Labrador retrievers (non-aggression when a stranger approaches). These results indicated that genotypes and allelic frequency of the MAOB gene were not significantly different between the two breeds ($P > 0.05$). The result of χ^2 showed that the Tibetan mastiff is biased significantly from Hardy-Weinberg equilibrium ($P < 0.01$), while the Labrador retriever fits the Hardy-Weinberg equilibrium ($P > 0.05$). Thus the behavioral differences seen in Tibetan mastiffs and Labrador retrievers when a stranger approaches may not relate directly to the MAOB gene T119C polymorphism.

Key words: canine; monoamine oxidase B gene; SNP; aggressive behavior

单胺氧化酶 B(monoamine oxidase B, MAOB)是行为分子遗传研究的重要候选基因之一。MAOB 通过氧化脱氨基作用降解脑内和外周组织内生物胺,主要为苯乙胺、多巴胺、苄胺,其抑制剂为苄甲炔胺。人类研究表明,MAOB 通过调节神经递质的表达水平而影响人的运动、情感和认知等行为(Nagatsu, 2004)。人类 MAOB 基因第 13 内含子单核苷酸多态性与其在脑内和血小板中活性有关(Balciuniene *et al.*, 2002)。在血小板中,低水平的 MAOB 活性可能导致感觉寻求、单一性逃避、冲动和攻击等个性特征

(Oreland & Hallman, 1995)。人类双生子研究发现,血小板的单胺氧化酶活性受遗传控制达到 76% (Pedersen *et al.*, 1993)。Hashizume 等(2005)对犬的 MAOB 基因进行克隆测序,发现犬的 MAOB 基因与人的高度相似,随后分析 MAOB 基因多态性,发现 MAOB 基因第 3 外显子上(编码序列第 199 位核苷酸上)存在一个 T-C 突变位点,该突变导致第 67 位氨基酸由半胱氨酸变为精氨酸。本研究采用 PCR-RFLP 技术检测 MAOB 基因第 3 外显子单核苷酸多态性,分析 MAOB 基因在陌生人接近时有攻击行为

收稿日期:2010-05-26 接受日期:2010-06-12 基金项目:公安部 B 类项目(20039729505)

作者简介:丁晓麟(1981~),男,研究实习员,主要从事犬行为遗传学研究, E-mail: njjcyjjs015936@163.com

的藏獒和无攻击行为的拉布拉多犬群体中的遗传特性,探讨 MAOB 基因遗传多态性与犬在陌生人接近时攻击行为性状之间的关系,旨在寻找与犬攻击行为性状相关的分子标记。

1 材料和方法

1.1 试验材料

拉布拉多犬 55 头,来自公安部南京警犬研究所。藏獒 44 头,来自民间。所有犬通过行为测试方法挑选出来。拉布拉多犬群由攻击行为测试得分为 1 分的个体组成,藏獒犬群由得分 ≥ 2 分的个体组成。测试完成后,所有实验犬前肢静脉采血 1 mL,ACD 抗凝,采用 DNA 提取试剂盒提取血样 DNA, -20°C 保存 DNA。

1.2 主要试剂

DNA 提取试剂盒购自北京时代天根生化公司(TIANGEN)。TaqDNA 聚合酶、dNTP、限制性内切酶 Hinf I 购自大连宝生物公司(TaKaRa)。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 攻击行为测试

测试人员身穿白大褂,隐蔽在距离犬 20 m 远的地方,犬主人紧握牵引带牢牢控制住犬。测试开始时,隐蔽的测试人员现身并拍手引起犬注意,随后测试人员目光紧盯犬并匀速向其靠近。当测试人员到达距犬 1 m 的地方时停下。观察人员记录犬在整个测试过程中的行为反应,并根据以下标准进行评分。犬在测试人员接近过程中,始终极力威胁或攻击测试人员(5 分);测试人员距犬 < 15 m 时,犬表现威胁或攻击行为(4 分);测试人员距犬 < 10 m 时,犬表现威胁或攻击行为(3 分);测试人员距犬 < 5 m 时,犬表现威胁或攻击行为(2 分);犬始终无任何威胁或攻击测试人员行为表现(1 分)。

1.4 引物合成和 PCR 扩增

引物参考文献(Hashizume *et al.*, 2005)设计,由大连宝生物公司合成。上游引物:5'-TCCATGGATACACCTCAAGG-3';下游引物:5'-TGATGGATGAGACGCTCTAC-3'。PCR 总反应体系为 20 μL ,包括:10 \times buffer 2 μL , 25 mmol/L MgCl_2 1.2 μL , 10 mmol/L dNTP 0.4 μL , 10 mmol/L 上下游引物各 1 μL , Taq 酶 0.2 μL , 50 ng/ μL DNA 模板 1 μL ,其余用超纯水补足。PCR 反应条件为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性

30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 60 s, 35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.5 RFLP 分析和电泳检测

PCR 产物用限制性内切酶 Hinf I 酶切,酶切体系为:PCR 产物 5 μL , Buffer 1 μL , 酶 0.5 μL , 超纯水 3.5 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 5 h。酶切产物用 10% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 [V(Acr):V(Bis) = 29:1], 120 V 恒压电泳 12 h 后,银染显色。

1.6 数据统计分析

利用 SPSS 13.0 软件包对种间基因型频率和等位基因频率差异进行 χ^2 检验,并用 χ^2 适合性检验进行群体标记位点的 Hardy-Weinberg 平衡状态判定。

2 结果

2.1 PCR-RFLP 和电泳结果

PCR 产物大小为 257 bp, 特异性好。如果是 CC 基因型,则经 Hinf I 酶切为 180 bp 和 77 bp 两个片段;如果是 TT 基因型,则 PCR 产物切不开;如为 TC 基因型,经 Hinf I 酶切电泳条带为 257 bp、180 bp 和 77 bp 三个片段,如图所示。

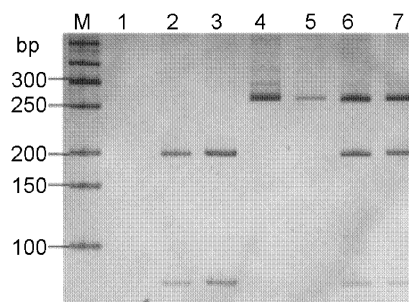


图 犬单胺氧化酶 B 基因第 3 外显子扩增产物的 Hinf I 酶切分析
Fig. Canine MAOB gene exon 3 PCR products restriction analysis with restriction endonuclease Hinf I

泳道 M. DNA marker, 1. 阴性对照, 2, 3. CC 基因型, 4, 5. TT 基因型, 6, 7. TC 基因型

Lane M. DNA marker, Lane 1. negative control, Lane 2, 3. CC genotype, Lane 4, 5. TT genotype, Lane 6, 7. TC genotype

2.2 不同犬群的基因型频率和基因频率分析

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分别进行分析。陌生人接近时表现攻击行为的藏獒和无攻击行为的拉布拉多犬两个群体中 MAOB 基因第 3 外显子多态位点的等位基因频率和基因型频率见表。经卡方适合性检验,藏獒处于 Hardy-Weinberg 极不平衡状态 ($P < 0.01$),拉布拉多犬处于 Hardy-Weinberg 平衡状态 ($P > 0.05$)。藏獒和拉布拉多犬品种间基因型和等位基因频率分布无显著性差异 ($\chi^2 = 2.105, P > 0.05$)。

表 MAOB 基因多态性在 2 个品种中的基因型频率和等位基因频率
Table Genotype and allele frequencies of MAOB gene polymorphism in two dog breeds

品种 Breed	基因型频率 Genotype frequency(%)					基因频率 Allele frequency(%)	
	公 Male		母 Female			C	T
	CC	TT	CC	TT	TC		
藏獒 Tibetan Mastiff	50.0(13)	50.0(13)	38.9(7)	27.8(5)	33.3(6)	52.3	47.7
拉布拉多犬 Labrador Retriever	45(9)	55(11)	8.6(3)	31.4(11)	60(21)	40.9	59.1

3 讨论

攻击行为指任何形式的有目的的伤害另一个生物体,而为该生物体所不愿接受的行为(周朝韵等, 2005)。攻击行为是犬在进化和驯养过程中形成的产物,属于犬的正常行为(Wilson & Daly, 1986)。长期以来,犬攻击行为严重危害社会公众安全,造成巨大的经济损失,并引发一系列动物福利问题。犬攻击行为根据动机不同可分为支配型攻击行为、领土型攻击行为、占有型攻击行为、护仔型攻击行为、疼痛型攻击行为、恐惧型攻击行为、狩猎型攻击行为、游戏型攻击行为、转移型攻击行为、种内攻击行为、自发型攻击行为、病理型攻击行为、学习型攻击行为(Blackshaw, 1991; Popova *et al.*, 1993)。犬个性心理学研究发现,犬攻击行为的个性特质包括犬对陌生人攻击、对主人攻击和对其他犬攻击,不同类型的攻击行为特质之间相关性很低(Liinamo *et al.*, 2007)。因此,在研究犬攻击行为遗传基础时,应准确区分不同类型的攻击行为。藏獒性情刚毅、力大凶猛,对陌生人具有极强的攻击性。拉布拉多犬性情温和、活泼好动,对陌生人无攻击性。本试验采用行为测验的方法区分藏獒和拉布拉多犬在陌生人接近时攻击行为差异,结果表明行为测试方法可以用来区分犬在陌生人接近时攻击行为个体差异。

MAOB 作为降解单胺类神经递质的重要酶类,其活性与神经活动和行为密切联系。先前的研究已经证实,MAOB 主要分布于犬脑内下丘脑、海马体和伏隔核等区域,而脑部的这些区域主要参与调控情感状态,其中包括攻击行为(Krotewicz & Romaniuk, 1995)。Reisner 等(1996)研究表明犬脑脊液中多巴胺代谢产物——高香草酸水平降低时,犬具有明显的冲动性攻击行为。脑内多巴胺的调节主要依赖于 MAOB。MAOB 必需与辅酶黄素腺嘌呤二核苷酸(flavin adenine dinucleotide, FAD)结合才能发挥氧化脱氨基作用(Shih *et al.*, 1999)。Gottowik 等(1995)推测人的 MAOB 与 FAD 结合的关键区域位

于 62 到 103 个氨基酸之间。对人类和大鼠 MAOB 的研究已经证实, FAD 与 MAOB 结合时精氨酸相对于半胱氨酸作用更加重要。Hashizume 等(2005)发现犬 MAOB 与 FAD 结合位点与人的相似,犬 MAOB 基因编码序列第 199 位碱基突变(T-C)导致第 67 位氨基酸由半胱氨酸变为精氨酸,该氨基酸变化可能引起蛋白质结构和功能发生变化,影响 MAOB 与 FAD 的结合从而导致其对单胺类神经递质氧化脱氨效率的改变,进一步研究在品种分类上不同攻击性品种间 MAOB 基因频率,发现低攻击性品种金毛寻回猎犬 C 等位基因频率小于 0.1,而高攻击性品种迷你雪纳瑞犬 C 等位基因频率大于 0.83。

本研究同样发现藏獒和拉布拉多犬 MAOB 基因编码序列第 199 位碱基存在 T-C 突变,并且藏獒 C 等位基因频率大于拉布拉多犬,但两者差异不显著。与 Hashizume 等(2005)研究不同,本文采用行为测验的方法区分犬在陌生人接近时攻击行为差异,在此基础上,分析在陌生人接近时有攻击行为的藏獒和无攻击行为的拉布拉多犬品种间 MAOB 基因频率差异。结果表明,藏獒和拉布拉多犬品种间在陌生人接近时的攻击行为差异可能与 MAOB 基因 T119C 多态性无直接关系。神经生物学研究表明,攻击行为的发生和发展受多种相关基因共同作用,而单基因研究殊难全面阐明基因间的相互作用及多基因对表型的共同影响效应。因此,有关攻击行为的遗传研究应进行多基因突变位点联合分析,以期得到各种相关基因变异共同作用下对攻击行为的影响。攻击行为是遗传和环境因素共同作用的结果。在分析遗传因素对攻击行为的作用时,也应考虑环境和社会因素对攻击行为的作用,哪一部分作用更强,尚有待进一步研究。

4 参考文献

- 周朝韵, 张晓斌, 沙维伟. 2005. 攻击行为生物学基础研究现状[J]. 中国行为医学科学, (5): 475 ~ 478.
- Balciuniene J, Emilsson L, Oreland L, *et al.* 2002. Investigation of the

- functional effect of monoamine oxidase polymorphisms in human brain [J]. *Hum Genet*, 110(1): 1~17.
- Blackshaw JK. 1991. An overview of types of aggressive behaviour in dogs and methods of treatment[J]. *Appl Anim Behav Sci*, 30(3-4): 351~361.
- Gottowik J, Malherbe P, Lang G, *et al.* 1995. Structure/function relationships of mitochondrial monoamine oxidase A and B chimeric forms [J]. *Eur J Biochem*, 230(3): 934~942.
- Hashizume C, Masuda K, Momozawa Y, *et al.* 2005. 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*, 67(2): 199~201.
- Krotewicz M, Romaniuk A. 1995. Social interactions in cats: regional brain monoamine distribution in dominant and submissive cats[J]. *Acta Neurobiol Exp*, 55(4): 271~279.
- Liinamo AE, van den Berg L, Leegwater PAJ, *et al.* 2007. Genetic variation in aggression related traits in Golden Retriever dogs [J]. *Appl Anim Behav Sci*, 104(5): 95~106.
- Nagatsu T. 2004. Progress in monoamine oxidase (MAO) research in relation to genetic engineering[J]. *Neurotoxicology*, 25(1-2): 11~20.
- Oreland L, Hallman J. 1995. The correlation between platelet MAO activity and personality: short review of findings and a discussion on possible mechanisms[J]. *Prog Brain Res*, 106: 77~84.
- Pedersen NL, Oreland L, Reynolds C, *et al.* 1993. Importance of genetic effects for monoamine oxidase activity in thrombocytes in twins reared apart and twins reared together[J]. *Psychiatry Res*, 46(3): 239~251.
- Popova NK, Nikulina EM, Kulikov AV. 1993. Genetic analysis of different kinds of aggressive behavior[J]. *Behav Genet*, 23: 491~497.
- Reisner IR, Mann JJ, Stanley M, *et al.* 1996. Comparison of cerebrospinal fluid monoamine metabolite levels in dominant-aggressive and non-aggressive dogs[J]. *Brain Res*, 714(1-2): 57~64.
- Shih JC, Chen K, Ridd MJ. 1999. Monoamine oxidase: from genes to behavior[J]. *Annu Rev Neurosci*, 22(1): 197~217.
- Wilson M, Daly M. 1986. Competitiveness, risk taking, and violence: the young male syndrome[J]. *Ethol Sociobiol*, 6(1): 59~73.

(上接第 165 页)

- 汪晓琳, 鲍毅新, 郑荣泉, 等. 2007. 黑腹绒鼠消化道长度和重量的季节变化[J]. *兽类学报*, 27(3): 284~287.
- 魏辅文, 冯祚建, 王祖望. 1998. 野生动物对生境选择的研究概况 [J]. *动物学杂志*, 33(4): 48~52.
- 吴华, 胡锦涛. 2001. 四川唐家河羚牛、鬃羚、斑羚春冬季生境选择比较研究[J]. *生态学报*, 21(10): 1627~1633.
- 颜忠诚, 陈永林. 1998. 动物的生境选择[J]. *生态学杂志*, 17(2): 43~49.
- 曾斌, 彭丽, 翟学昌, 等. 2009. 赣南不同坡向杉阔混交林物种多样性初步研究[J]. *福建林业科技*, 36(3): 80~97.
- 赵定全, 刘少英, 张金钟, 等. 1994. 黑腹绒鼠日食量测定及社鼠等食性观察[J]. *四川林业科技*, 15(4): 38~41.
- Jefrey A, Kaminski M, Davis Marcell K. 2007. Disturbance effects on small mammal species in a managed appalachian forest [J]. *Am Midl Nat*, 157: 385~397.
- Julie SM, Mark SB, Douglas WS, *et al.* 2005. Habitat selection by elk before and after wolf reintroduction in Yellowstone national park [J]. *Journal of Wildlife Management*, 69(4): 1691~1707.
- Mariana L, Nadia G, Nora B. 2000. Microhabitat selection of five sigmodontine rodents in a forest-steppe transition zone in north western Patagonia [J]. *Stud Neotrop Fauna & Environm*, 35: 85~90.
- Masashi H, Akrio A, Liang K L, *et al.* 1991. Karyotypes of the Taiwan Vole *Microtus kikuchii* and the Père Davids Vole *Eothenomys melanogaster* from Taiwan [J]. *Mamm Soc Japan*, 16(1): 41~45.
- Robert JF, Christine WM. 2006. On the evolution of hidden leks and the implications for reproductive and habitat selection behaviours [J]. *Elsevier*, 71: 1247~1251.
- Wendy S, Kerry JW. 2001. Differences in habitat selection between Chatham petrels (*Pterodroma axillaris*) and broad-billed prions (*Pachyptila vittata*): implications for management of burrow competition [J]. *New Zealand Journal of Ecology*, 25(2): 65~69.
- Zhang Zejun, Zhan Xiangjiang, Yan Li, *et al.* 2009. What determines selection and abandonment of a foraging patch by wild giant pandas (*Ailuropoda melanoleuca*) in winter? [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 16: 79~84.