

獭兔酪氨酸酶相关蛋白 1 (Tyrrp1) 基因序列分析及外显子多态性研究

郝晔^{1,2}, 施丽娟^{1,2}, 闫晓荣^{1,2}, 赵博昊^{1,2}, 朱杰^{1,2}, 陈阳^{1,2}, 翁巧琴³, 吴信生^{1,2,*} (1. 扬州大学动物科学与技术学院, 江苏扬州 225009; 2. 江苏省动物繁育与分子设计重点实验室, 江苏扬州 225009; 3. 浙江省余姚市欣农兔业有限公司, 浙江余姚 315400)

摘要 [目的] 探索獭兔酪氨酸酶相关蛋白 1 (Tyrrp1) 基因在毛色形成过程中的分子机制。[方法] 对獭兔 Tyrrp1 基因序列的核苷酸序列、编码产物的基本理化性质等进行预测和分析, 同时利用 PCR-SSCP (Single strand conformation polymorphism analysis of polymerase chain reaction products) 技术检测 Tyrrp1 基因 CDS 序列的多态性分布状况。[结果] 信息学分析发现, TYRPI 蛋白是不稳定的亲水性蛋白, 有信号肽, 具有酪氨酸酶家族特征性功能结构域。多态性检测发现仅在 Tyrrp1 基因 CDS 的 483 bp 处存在 1 个 C→T 的同义突变, 位于外显子 2 上, 该碱基的突变没有造成氨基酸的改变 (AUC→AUT, 异亮氨酸)。Hardy-Weinberg 平衡检验表明, 青紫蓝色獭兔群体处于非平衡状态, 白色獭兔群体处于平衡状态。青紫蓝色兔群体为中度多态信息含量 ($0.25 < PIC < 0.50$), 白色獭兔群体为低度多态信息含量 ($PIC < 0.25$)。[结论] Tyrrp1 基因对獭兔的毛色有一定的影响。该研究结果可为獭兔毛色的选种选育提供一定的参考。

关键词 獭兔; Tyrrp1; SNPs; 序列分析

中图分类号 S829.1 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2016)09-164-04

Analysis of Polymorphism of Exons in Tyrosinase-Related Protein 1 (Tyrrp1) Gene in Rex Rabbit (*Oryctolagus cuniculus*)

HAO Ye^{1,2}, SHI Li-juan^{1,2}, YAN Xiao-rong^{1,2}, WU Xin-sheng^{1,2,*} et al (1. College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009; 2. Jiangsu Key Laboratory of Animal Genetics & Breeding Design, Yangzhou, Jiangsu 225009; 3. Zhejiang Yuyao Xinnong Rabbit Industry Co., Ltd., Yuyao, Zhejiang 315400)

Abstract [Objective] To discuss the molecular mechanism of tyrosinase-related protein 1 (Tyrrp1) gene of Rex rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) during the formation of hair color. [Method] The Tyrrp1 gene sequence, the nucleotide sequence, and the basic physical and chemical properties of coding products were forecasted and analyzed. At the same time, PCR-SSCP (single-strand conformational polymorphism) was used to detect the distribution of CDS sequences of Tyrrp1. [Result] Bioinformatics analysis found out that Tyrrp1 protein was an unstable hydrophilic protein, which had a signal peptide and a functional domain of the tyrosinase family. The polymorphism detection result indicated that the exon 2 of Tyrrp1 in 29 bp (the gene CDS 483 bp) had a C→T mutation, and the nucleotide mutation did not lead to the amino acid change (AUC→AUT, isoleucine). Hardy-Weinberg equilibrium test showed that the Chinchilla Rex rabbit population was at Hardy-Weinberg disequilibrium, the white Rex rabbit population was at Hardy-Weinberg equilibrium. PIC of chinchilla Rex rabbit population was of medium polymorphism ($0.25 < PIC < 0.50$), white Rex rabbit population was of low polymorphism ($PIC < 0.25$). [Conclusion] Tyrrp gene has certain effects on the hair color of Rex rabbit. This research provides certain references for the selection of hair color of Rex rabbit.

Key words Rex rabbit; Tyrrp1; SNPs; Sequence analysis

Tyrrp1 基因是第 1 个克隆成功的色素基因, 由于该基因编码的蛋白与酪氨酸酶同源, 因此被称为酪氨酸酶相关蛋白 1 (Tyrosinase-related protein-1, TYRPI)^[1]。很多学者提出了黑色素生物合成的三酶理论, 即酪氨酸酶、多巴色素互变酶和 5,6-二羟基吲哚羧酸氧化酶, 它们对黑色素的形成都有十分重要的作用, 其中 Tyrrp1 基因编码的 5,6-二羟基吲哚羧酸氧化酶是酪氨酸酶重要的协同因子, 与酪氨酸 (Tyrosine, TYR)、酪氨酸酶相关蛋白 2 (Tyrosinase-related protein-2, TYRPI2) 一起组成酪氨酸酶相关蛋白家族^[2]。也有研究表明, Tyrrp1 基因除了直接参与黑色素的生成反应外, 还可能帮助稳定并调节酪氨酸酶的催化活性, 参与维持黑色素小体的结构, 并影响着黑色素细胞的增殖和凋亡^[3-4]。笔者通过 PCR 技术扩增 Tyrrp1 基因 7 个外显子的序列, 对 Tyrrp1 基因氨基酸序列进行了生物学信息分析, 并利用 PCR-SSCP 技术和直接测序的方法对每个外显子进行多态性检测, 分析 Tyrrp1 基因在不同颜色獭兔 (*Oryctolagus cuniculus*) 群体的多态性, 探索其与獭兔毛色形成的关系, 旨在为獭兔毛色的选种选育提供一定的参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验动物。随机抽取同批出生、健康的 6 月龄青紫蓝色獭兔 392 只、白色獭兔 174 只, 共 566 只獭兔作为试验对象, 试验个体均来自浙江省余姚市欣农兔业有限公司。

1.1.2 试剂。蛋白酶 K、10 × TBE、Tris、EDTA、丙烯酰胺等试剂均购自生物 (上海) 工程有限公司; 10% 过硫酸铵、TEMED、SDS、甘油、甲醛等试剂均购自北京鼎国生物技术有限责任公司。

1.1.3 引物设计。根据 NCBI 网站上公布的兔 Tyrrp1 基因全序列 (登录号: NC_013669.1), 分别在 7 个外显子区域外的邻近内含子区域设计并合成特异性较好的引物, 引物由生工生物工程 (上海) 有限公司合成, 引物信息见表 1。

1.1.4 Tyrrp1 基因序列分析软件。利用 ExPASy 工具对基因编码的蛋白质性质进行分析, 利用 ProtParam 分析蛋白的氨基酸序列组成、相对分子质量和等电点等理化性质, 利用网上在线工具 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>), 分析 TYRPI 蛋白结构域, 并使用 NPS@ 服务器上的 SCOPMA 分析预测蛋白的二级结构。利用 TMPRED (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html) 进行蛋白质序列的跨膜区分析; 运用 ProtScale (<http://web.expasy.org/protscale/>) 进行氨基酸序列的亲水性分析。利用 Swiss-Model (<http://swissmodel.expasy.org/>) 对 TYRPI 编码蛋白进行高

基金项目 现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-44-1); 江苏高校优势学科建设工程资助项目 (PAPD 2014-134)。

作者简介 郝晔 (1992 -), 女, 河北保定人, 硕士研究生, 研究方向: 动物遗传与育种。* 通讯作者, 教授, 博士, 博士生导师, 从事动物遗传育种与繁殖研究。

收稿日期 2016-02-21

级结构预测。

表 1 引物信息
Table 1 The information of primers

引物 Primer	引物序列 Primer sequence (5'→3')	片段大小 Fragment size//bp	退火温度 Annealing temperature °C
1	F:TTTACAGCTGGACTTTGGTCT R:GCTTTGAACCTCATACAAGCCT	454	59
2	F:TCCCACAAAGCAGATATCTCA R:CAGCAAAGGCATCTCGTCT	323	58
3	F:ACAAGCAGAGAATACTAACAGA R:CTCCTAGCTGTAATTTGGAAC	205	57
4	F:TAAGATTCTAAGCGTTGACCT R:CTAGACCAGTTGGAAGCACAC	168	58
5	F:TTTGCAATAGTTTTACTCTTCT R:CAGTGGCATCTTAATAATCCC	180	50
6	F:TAATATTAACAAGTTGCCT R:TAAAATACATTTCAATGCTT	147	48
7	F:TTTTCTTTTTCAATAGGTCA R:CTGAATATTCGGACTCACA	206	51

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 提取。采用传统酚/氯仿抽提法提取獭兔耳组织样基因组 DNA,使用 TE 稀释到 100 ng/μL,使用 NanoDrop ND-1000 核酸浓度测定仪测定 DNA 浓度,一般 OD 值的范围为 1.7~1.9,峰图平滑的样品可用。

1.2.2 PCR 扩增。PCR 反应体系(20 μL)为:10 × PCR Buffer 2 μL,10 mmol/L dNTPs 2 μL,10 pmol/L 上、下游引物各 1 μL,5 U/μL Taq 酶 0.2 μL,100 ng/μL DNA 模板 1 μL,ddH₂O 12.8 μL。PCR 反应条件如下:95 °C 预变性 5 min;95 °C 变性 30 s,适宜的温度退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,35 个循环;72 °C 最终延伸 10 min,10 °C 下保存。

1.2.3 PCR-SSCP 检测。在 20 μL PCR 扩增产物中加入 5 μL 上样缓冲液,混合体系在 98 °C 变性 10 min 后,置于 -20 °C 冰箱中冷却 5 min,于 10% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳迅速点样,先用 250 V 电泳,10 min 后将电压调至 120 V,电泳 12 h。银染显色后观察是否有不同带型。若有不同带型出现,将其 PCR 产物送至生工生物工程(上海)有限公司测序,以鉴定碱基突变的类型。

1.3 数据分析

1.3.1 基因频率和基因型频率。基因频率(Gene frequency)是指群体中某一特定等位基因与其他等位基因的比率;基因型频率(Genotypic frequency)是指群体中某特定基因型个体数占全部个体数的比率。

1.3.2 哈代-温伯(Hardy-Weinberg)平衡检验。

$$\chi^2 = \sum \frac{(O-E)^2}{E} \quad (1)$$

式中, O (Observed)代表每个基因型的观测数目; E (Expected)代表每个基因型在哈代-温伯平衡定律成立的假定下的期望数目。

1.3.3 杂合度(Heterozygosity, H_e)。杂合度即基因多样性^[3],期望杂合度的计算公式为:

$$H_e = 1 - \sum_{i=1}^k p_i^2 \quad (2)$$

式中, H_e 为期望杂合度; k 为等位基因数; p_i 为第 k 个座位第 i 个等位基因的频率。

1.3.4 多态信息含量(Polymorphism information content, PIC)。按照以下公式计算多态信息含量(PIC):

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^k p_i^2 - \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k 2p_i p_j^2 = 2 \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k p_i p_j (1 - p_i p_j) \quad (3)$$

式中, k 为等位基因数目, p_i 和 p_j 分别为第 i 和第 j 个等位片段的频率。

2 结果与分析

2.1 Tyrrp1 基因各外显子的扩增结果 对该基因的 7 个外显子序列进行扩增,并用 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测。检测扩增片段大小所用的 Marker 均为 DL 500 Marker。从图 1 可以看出,Tyrrp1 基因各外显子的条带特异性均较好,杂带较少,特异条带的片段大小与理论值一致。经 PCR-SSCP 检测后,在 Tyrrp1 基因外显子 1、3、4、5、6、7 中均未检测到多态位点,仅在外显子 2 上检测到 2 个等位基因、3 种基因型(AA、BB、AB)。

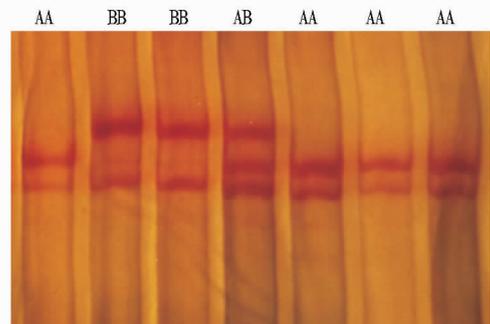


图 1 Tyrrp1 基因外显子 2 不同基因型的电泳图谱

Fig. 1 The SSCP electrophoresis image of different genotypes of Tyrrp1 exon 2

2.2 Tyrrp1 基因多态序列分析 使用 AlignIR V2.0 软件,将测序得到的 DNA 序列进行对比。从图 2~3 可以看出,Tyrrp1 基因外显子 2 在 29 bp(整个基因 CDS 的 483 bp)处有 1 个 C→T 的突变,碱基的突变并没有造成氨基酸的改变(AUC→AUT,异亮氨酸),为同义突变。

2.3 Tyrrp1 基因外显子 2 的遗传多样性分析 白色和青紫蓝色獭兔外显子 2 各基因型和基因型频率经卡方适合性检验,BB 基因型频率在青紫蓝色獭兔中较高,在白色獭兔中较低,表明等位基因 B 是青紫蓝色獭兔群体中的优势等位基因,而在白色獭兔中等位基因 A 是优势等位基因。Hardy-Weinberg 平衡检验表明,青紫蓝色獭兔群体处于非平衡状态,白色獭兔群体处于平衡状态。青紫蓝色兔群体为中度多态信息含量($0.25 < PIC < 0.50$),白色獭兔群体为低度多态信息含量($PIC < 0.25$)。青紫蓝色獭兔杂合度较高,白色獭兔杂合度较低(表 2)。

2.4 Tyrrp1 基因序列分析

2.4.1 TYRPI 氨基酸序列的理化性质。根据 GenBank 数据库上已发表的家兔的 Tyrrp1 基因序列可知,家兔的 Tyrrp1 基因位于 1 号染色体上,全长 15 843 bp,有 7 个外显子和 6 个内含子。编码序列由 1683 个碱基组成,编码 560 个氨基酸

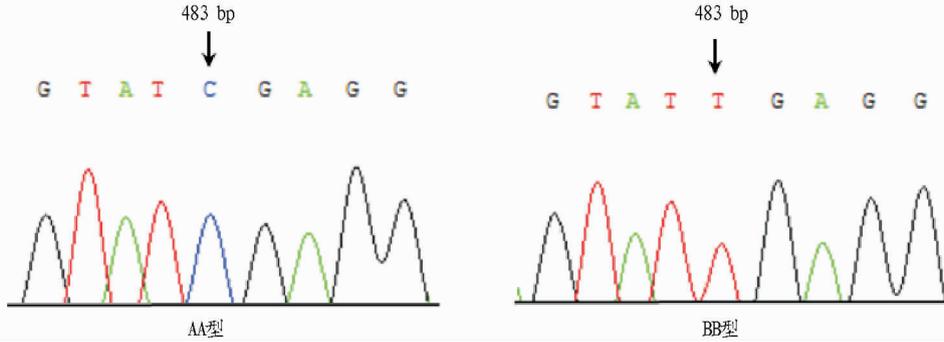


图2 外显子2中AA和BB基因型的测序结果

Fig.2 The sequencing result of AA and BB genotypes at exon 2



图3 不同基因型间外显子2核苷酸序列的比较

Fig.3 Homologous comparison of nucleotide sequence of exon 2 in different genotypes

表2 2个家兔群体 *Tyrrp1* 外显子2上多态位点的生物学信息统计

Table 2 Biological information statistics of exon 2 of *Tyrrp1* loci in 2 rabbit populations

群体 Population	样本数 Sample number//只	基因型频率 Genotype frequency			等位基因频率 Allele frequency		H_e	PIC	χ^2
		AA	AB	BB	A	B			
C	392	0.215(84)	0.330(129)	0.455(178)	0.380	0.620	0.471	0.360	35.114
W	174	0.779(127)	0.202(33)	0.018(3)	0.880	0.120	0.210	0.189	0.246

注:C为青紫蓝獭兔,W为白色獭兔;当 $df=2$ 时, $\chi^2_{(0.01)}=9.21$, $\chi^2_{(0.05)}=5.99$ 。

Note:C was Chinchilla Rex rabbits,W was White Rex rabbit;when $df=2$, $\chi^2_{(0.01)}=9.21$, $\chi^2_{(0.05)}=5.99$.

残基,是一个较为保守的基因。经 ProtParam 在线软件预测,分子式为 $C_{2802}H_{4268}N_{786}O_{831}S_{30}$,原子总数为 8 717 个,分子量为 63 223.2 kD,理论等电点为 6.06。在所有编码氨基酸中,Leu(L)含量最高,为 8.6%,Trp(W)只占 1.8%(表3)。带负电荷残基的总数量(ASP + Glu)为 56,带正电荷残基的总数量(Arg + Lys)为 47,不稳定指数是 52.92,证明这个蛋白质不稳定。

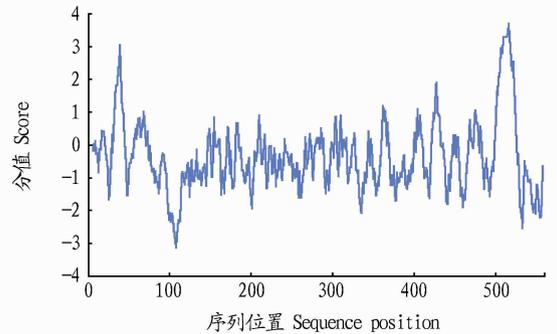
表3 TYRP1 的氨基酸组成

Table 3 Composition of TYRP1 amino acid

名称 Name	数量 Number	比率 Ratio//%	名称 Name	数量 Number	比率 Ratio//%
Ala(A)	34	6.1	Lys(K)	11	2.0
Arg(R)	36	6.4	Met(M)	12	2.1
Asn(N)	34	6.1	Phe(F)	30	5.4
Asp(D)	29	5.2	Pro(P)	39	7.0
Cys(C)	18	3.2	Ser(S)	41	7.3
Gln(Q)	27	4.8	Thr(T)	37	6.6
Glu(E)	27	4.8	Trp(W)	10	1.8
Gly(G)	35	6.2	Tyr(Y)	19	3.4
His(H)	18	3.2	Val(V)	31	5.5
Ile(I)	24	4.3	Pyl(O)	0	0.0
Leu(L)	48	8.6	Sec(U)	0	0.0

从图4可以看出,TYRP1 蛋白疏水性最大值为 3.711,最小值为 -3.133。TYRP1 的主要亲水平均值(GRAVY)值是

-0.381,由于 GRAVY 值的范围介于 -2 与 2 之间,其为正值时表明此蛋白为疏水蛋白,而负值表明为亲水蛋白,因此该蛋白是亲水蛋白。同时,TYRP1 氨基酸序列内绝大多数为亲水性残基,表明 *Tyrrp1* 基因编码蛋白为水溶性蛋白。



注:水平线表示氨基酸残基数,垂直线代表相对的亲水区。0 以上为疏水区,0 以下为亲水区。

Note:Horizontal lines indicated the amino acid residues,and the vertical lines represented the relative hydrophilic regions. Above zero was a hydrophobic region,and the following was a hydrophilic area.

图4 TYRP1 氨基酸序列亲疏水性分析

Fig.4 Analysis of the hydrophilic property of TYRP1 amino acid sequence

2.4.2 TYRPI 氨基酸序列的二级结构和三级结构预测。通过 NPS@ 服务器上的 SOPMA 对 TYRPI 进行二级结构预测,结果如表 4 所示。其中, TYRPI 蛋白二级结构以 α -螺旋和无规则卷曲为主,有利于稳定蛋白质的结构,无规则卷曲是 TYRPI 蛋白最大的结构元件。这表明 TYRPI 蛋白的二级结构为混合型。

从图 5 可以看出,三级结构序列的相似度达到 84.17%, E-value 值为 0,说明模型与提交的预测蛋白序列匹配性较好。

表 4 TYRPI 蛋白的二级结构分析

Table 4 Analysis of TYRPI secondary protein structure

名称 Name	SOPMA	
	数量 Number	比率 Ratio//%
α -螺旋 Alpha helix (Hh)	191	34.11
3_{10} 螺旋 3_{10} helix (Gg)	0	0
Pi 螺旋 Pi helix (Ii)	0	0
β -片层 Beta bridge (Bb)	0	0
延伸串 Extended strand (Ee)	106	18.93
β -转角 Beta turn (Tt)	41	7.32
弯曲 Bend region (Ss)	0	0
无规则卷曲 Random coil (Cc)	222	39.64
不确定区 Ambiguous states	0	0
其他 Other states	0	0

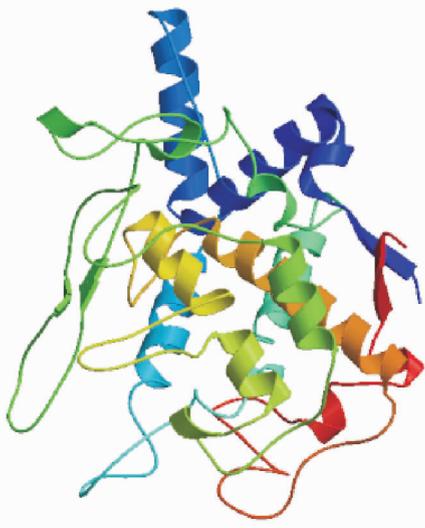


图 5 TYRPI 的三级结构模型

Fig. 5 The tertiary structure model of TYRPI

2.4.3 TYRPI 氨基酸序列的功能性结构域预测。利用 SMART (Simple Modular Architecture Research Tool, 简单模块构架搜索工具) 分析结果显示 TYRPI 蛋白有 3 个功能性片段(图 6)。红色区(1~47)代表信号肽;灰色区(205~440)代表酪氨酸酶家族特征性区域;蓝色区(502~524)代表跨膜区。

3 讨论与结论

大量研究表明, *Tyrrp1* 基因与动物的毛发颜色和羽色相关,该基因编码的 5,6-二羟基吡啶羧酸氧化酶,是酪氨酸酶重要的协同因子,在黑色素的形成中具有十分重要的作用。

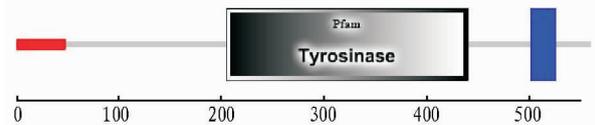


图 6 獭兔 TYRPI 蛋白序列的 SMART 分析结果

Fig. 6 SMART analysis results of TYRPI in rabbit

人类 *Tyrrp1* 基因外显子 6 上的 1 个碱基缺失,致使开放阅读框截短,导致 TYRPI 蛋白丧失活性,使得其对酪氨酸羟化酶的催化作用减弱,引起眼皮肤白化病 3 (OCA3)^[5]。Rieder 等^[6]研究发现灰色马皮肤中 *Tyrrp1* 基因的表达量较非灰色马低,推测 *Tyrrp1* 基因与马的隐性灰色性状相关。Li 等^[7]研究发现,鸭不同羽色中 *Tyrrp1* 基因的表达存在差异,黑羽鸭中 *Tyrrp1* 基因的表达量为白羽鸭的 10 000 倍以上。研究表明, *Tyrrp1* 基因编码的 TYRPI 多巴色素互变异构酶 (DCT) 一起催化多巴醌转化为真黑色素,影响黑色素小体的成和黑色素细胞的增殖与凋亡,也可直接参与黑色素的生成^[8]。

为了揭示 *Tyrrp1* 基因在毛色形成过程中的作用机制,笔者获取了獭兔 *Tyrrp1* 基因序列,对 *Tyrrp1* 氨基酸序列的理化性质进行分析,初步断定该蛋白为亲水不稳定蛋白,加上二级结构及模体分析,可以对该蛋白的结构及功能进行初步推测。笔者对 TYRPI 蛋白氨基酸序列的分析结果与已有的报道^[9]相吻合,该蛋白为 I 型跨膜糖蛋白,定位在黑色素体的囊膜上,相当大部分区域溶于黑色素体囊内的溶胶内,单独工作不稳定,需要通过类表皮生长因子基序等同其他蛋白如酪氨酸酶结合的方式稳定工作, α -螺旋和无规则卷曲是 TYRPI 蛋白序列大量的结构元件,散布于整个蛋白质中;SMART 分析显示了该蛋白的 3 个功能性片段,即 N 端的信号肽,中间相当大片的酪氨酸酶相关家族特征性结构域及 C 端的跨膜结构域。

目前,很多国内外学者研究 *Tyrrp1* 基因的多态性在毛色形成过程中的作用。李蓓等^[10]研究发现蒙古马 *Tyrrp1* 基因外显子 2 的 1 个错义突变与深色毛色相关。Rieder 等^[11]研究发现马 *Tyrrp1* 基因外显子 2 的 SNP (C189T) 引起苏氨酸到蛋氨酸的错义突变。Gratten 等^[12]对黑色和浅色素艾绵羊 *Tyrrp1* 基因的研究发现,外显子 4 的 869 bp 处存在错义突变 (T869G),浅色素艾羊基因型全为 TT,黑色素艾羊基因型为 GG 或 GT,表明该位点的突变与索艾绵羊毛色相关。徐莹^[13]对 3 种羽色朝鲜鹌鹑 *Tyrrp1* 基因 PCR-SSCP 分析发现在 *Tyrrp1* 基因存在 2 个多态性位点 (T367C 和 C1153T),但未发现这 2 个多态性位点与朝鲜鹌鹑羽色之间存在显著相关性。该研究中对 *Tyrrp1* 的 CDS 序列的多态性分布状况进行检测,检测了獭兔 *Tyrrp1* 基因 7 个外显子的多态性,在其基因外显子 1、3、4、5、6、7 中未检测到多态位点,仅在外显子 2 的 29 bp (整个基因 CDS 的 483 bp) 处有 1 个 C→T 的同义突变。遗传多样性分析发现,青紫蓝獭兔群体的 *He* 值高于白色獭兔群体,说明它们具有更为丰富的遗传多样性,更好的选择潜力。多态信息含量 (PIC) 是用来衡量基因片段多态性的重

3 合福高铁沿线旅游联合营销对策

3.1 重视微旅游市场开发 高铁使人们从远距离、低频率的观光游转向近距离、高频率的休闲游,造就了一个基数庞大且发展迅速的微旅游市场。合福高铁将三省景区都融入了“4 h 旅游圈”,传统的“长线游”也逐渐向“短线游”、“周末2~3日游”等微旅游形式转变,旅游频率逐渐增加,对于旅游目的地的经济贡献总量也呈现出相当大的累积效应。

3.2 加强移动智能营销平台的应用 信息时代4G智能手机的普及使旅客多通过网络、手机APP等电子商务平台购买旅游产品。高铁站、景区也要加强高铁旅游移动智能的信息网络。调查显示,旅客对于微信的使用率较高,因此可在候车室、列车座椅靠背等设置沿线各旅游目的地旅游资讯的二维码,让旅客通过扫描二维码关注各旅游目的地公共平台,参与微信互动,从而达到深度宣传的效果。积极加强与各旅游网站的合作,在移动智能平台建设上,深度融合微信、微博等社交软件,及时分享各景区旅游攻略、旅游主题活动等,推动旅游营销方式的转型升级。

3.3 完善高铁配套设施建设 高铁为沿线旅游目的地带来高品质的客流。根据旅客特点,可从旅游设施和旅游服务两个方面进行完善,适应现代高铁旅游市场的需要,开通各高铁站至景区的旅游专线,提供高铁旅游“直通车”,实现旅客“零换乘”。

3.4 建立区域旅游合作机制 加强旅游合作,形成旅游共同体。政府、旅游主管部门要加强交流,组建沿线旅游联盟,

发挥旅游资源特色,形成旅游资源互补和旅游发展合力,实现区域旅游的转型升级,努力实现地区旅游一体化。建立旅游资源和旅游服务共享机制,实现各景区无缝对接,真正将“同城效应”运用到旅游实践中。

4 结论

笔者基于合福高铁游客调查数据,研究了合福高铁开通后对游客旅游消费行为的影响,但限于样本数量有限,结论的普遍适用性和应用推广性有待增强,对高铁与游客旅游行为的内在影响机制缺乏深层次研究,这在后续调查中有待进一步研究。

参考文献

- [1] KOBAYASHI K, OKXIMURA M. The growth of city systems with high-speed railway systems [J]. The annals of regional science, 1997, 31(1): 39-56.
- [2] 姚梦汝, 罗聪, 夏晓丽, 等. 高铁游客旅游行为研究: 基于宁杭高铁沿线城市的分析 [J]. 江苏商论, 2015(7): 8-12.
- [3] 于秋阳. 铁路旅游潜能释放与产品创新 [J]. 旅游学刊, 2015, 30(1): 8-10.
- [4] 崔莉, 厉新建, 张芳芳. 郑西高铁乘客行为偏好与旅游发展分析 [J]. 地域研究与开发, 2014, 33(2): 94-98.
- [5] 冯英杰, 吴小根, 刘泽华. 高速铁路对城市居民出行行为的影响研究: 以南京市为例 [J]. 地域研究与开发, 2014, 33(4): 121-125.
- [6] 厉新建, 崔莉, 万文平, 等. 高铁乘客的旅游特征与消费偏好分析 [J]. 北京第二外国语学院学报, 2013(11): 63-71.
- [7] 张文新, 刘欣欣, 杨春志, 等. 城际高速铁路对城市旅游客流的影响: 以南京市为例 [J]. 经济地理, 2013, 33(7): 163-168.
- [8] 汪德根, 陈田, 陆林, 等. 区域旅游流空间结构的高铁效应及机理: 以中国京沪高铁为例 [J]. 地理学报, 2015, 70(2): 214-233.
- [9] 汪德根, 陈田, 李立, 等. 国外高速铁路对旅游影响的研究及启示 [J]. 地理科学, 2012, 32(3): 322-328.
- [10] RIEDER S, STRICKER C H, JOERG H, et al. A comparative genetic approach for the investigation of ageing grey horse melanoma [J]. J Anim Breed Genet, 2000, 117(2): 73-82.
- [11] LI S J, WANG C, YU W, et al. Identification of genes related to white and black plumage formation by RNA-Seq from white and black feather bulbs in ducks [J]. PLoS one, 2012, 7(5): 36592.
- [12] AROCA P, URABE K, KOBAYASHI T, et al. Melanin biosynthesis patterns following hormonal stimulation [J]. J Biol Chem, 1993, 268(34): 25650-25655.
- [13] SARANGARAJAN R, BOISSY R E. Tyrp1 and oculocutaneous albinism type 3 [J]. Pigment Cell Res, 2001, 14(6): 437-444.
- [14] LI B, HE X, ZHAO Y, et al. Tyrosinase-related protein 1 (TYRP1) gene polymorphism and skin differential expression related to coat color in Mongolian horse [J]. Livestock science, 2014, 167: 58-64.
- [15] RIEDER S, TAOURIT S, MARIAT D, et al. Mutations in the agouti (ASIP), the extension (MC1R), and the brown (TYRP1) loci and their association to coat color phenotypes in horses (*Equus caballus*) [J]. Mamm Genome, 2001, 12(6): 450-455.
- [16] GRATTEN J, BERARDI D, LOWDER B V, et al. Compelling evidence that a single nucleotide substitution in TYRP1 is responsible for coat-colour polymorphism in a free-living population of Soay sheep [J]. P Roy Soc Lond B Bio, 2007, 274(1610): 619-626.
- [17] 徐莹. TYR, TYRP1 基因与朝鲜鹌鹑羽色相关性研究 [D]. 洛阳: 河南科技大学, 2014: 29-39.

(上接第167页)

要指标,在外显子2的基因型中,青紫蓝獭兔群体的PIC值介于0.25与0.50之间,外显子2基因座呈中度多态,说明该群体对于外显子2基因型的选择具有一定的潜力,这些结果与基因杂合度的研究结果基本一致。此外,青紫蓝色獭兔群体偏离了哈代-温格平衡,可以初步断定该位点的突变有利于真黑色素的合成。基因及基因型在群体中的分布情况也支持该推论,因此Tymp1基因对獭兔的毛色有一定影响。

参考文献

- [1] 崔嘉, 孙守荣, 苗鲁旭, 等. TYRP1 基因控制动物色素形成的研究进展 [J]. 中国畜牧兽医, 2009, 36(9): 94-96.
- [2] 高莉, 赵英虎, 刘朝亮, 等. 酪氨酸酶相关蛋白1调控黑色素形成的研究进展 [J]. 畜牧与饲料科学, 2010, 31(10): 114-116.
- [3] KOBAYASHI T, HEARING V J. Direct interaction of tyrosinase with Tyrp1 to form heterodimeric complexes in vivo [J]. J Cell Sci, 2007, 120(Pt 24): 4261-4268.
- [4] RAD H H, YAMASHITA T, JIN H Y, et al. Tyrosinase-related proteins suppress tyrosinase-mediated cell death of melanocytes and melanoma cells [J]. Exp Cell Res, 2004, 298(2): 317-328.
- [5] BOISSY R E, ZHAO H, OETTING W S, et al. Mutation in and lack of expression of tyrosinase-related protein-1 (TRP-1) in melanocytes from an individual with brown oculocutaneous albinism: A new subtype of albinism