

台灣乳牛群之瓜胺酸症檢測⁽¹⁾

林德育⁽²⁾ 黃鈺嘉⁽²⁾ 陳若菁⁽²⁾

楊德威⁽³⁾ 蕭宗法⁽⁴⁾ 張秀鑾⁽²⁾

收件日期：90 年 6 月 10 日；接受日期：90 年 8 月 30 日

摘 要

瓜胺酸症是一種“尿循環”的遺傳缺陷疾病，雙隱性純合型的罹患仔牛在出生後一週內就會死亡。這種“尿循環”的遺傳缺陷無法正常排氨，剛出生的得病的仔牛外觀正常，然而仔牛出生後卻因為無法自行排毒，因此神經問題逐步嚴重，通常仔畜在一週內就會死亡。為了解瓜胺酸症在台灣牛隻之分布情形，本試驗共檢測七個牧場（北部三場及南部四場）與來自北部與東部地區參與 DHI 計畫的自留小公牛，全部共 1,690 頭荷蘭乳牛。採集血樣後，進行瓜胺酸症 DNA 基因型鑑定。在全部 1,690 頭荷蘭乳牛中僅檢測出 1 頭雜合型牛（0.06%），此外系譜比對近 20 年進口冷凍精液，亦僅發現 1,200 劑缺檢測資訊的可疑精液進口而已，顯示此一曾廣泛發生澳洲的荷蘭牛族群遺傳疾病，對本省乳牛影響不大。

關鍵詞：台灣荷蘭牛、瓜胺酸症、聚合酶連鎖反應。

緒 言

牛瓜胺酸症（Citrullinemia），又稱精氨基琥珀酸合成酶缺失症（argininosuccinate synthetase deficiency），是一種可遺傳的疾病，已於近年來陸續發現於澳洲的荷蘭牛族群中（Harper *et al.* 1988, Healy *et al.* 1991）。該疾病的發生呈現“體細胞隱性遺傳”的特性，雙隱性純合型的罹患仔牛在出生後五天左右就會死亡。這是一種“尿素循環”的遺傳缺陷，尿循環在大多數的哺乳類（包括牛）是一種排出多餘的氨之重要機制。氨的含量會隨著含氮化合物（如胺基酸）的分解而升高。得病的小牛剛出生時外觀正常，因為其母畜的子宮內有能力為其排出氨毒。然而，當小牛出生後卻因為自己無法自行排毒，導致神經問題逐步的嚴重。第一天時會有精神不振的情形出現，隨後

-
- (1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 1079 號。
 - (2) 行政院農業委員會畜產試驗所家畜育種系。
 - (3) 行政院農業委員會畜產試驗所畜牧場。
 - (4) 行政院農業委員會畜產試驗所新竹分所。

會步伐不穩、失明、無法站立及抽搐，通常仔畜在五日內就會死亡。由於台灣牛隻與精液進口頻繁，受公牛傳遞遺傳疾病之影響很大（黃等，1998），而本項遺傳疾病於澳洲調查結果頻度曾高達牛群的 10%（Robinson and Shanks, 1991）。過去台灣曾自澳洲大量進口母、女牛，牛群中是否會受到瓜胺酸症遺傳疾病的威脅？需要進行田間牛群採樣檢測才能明瞭。

材料與方法

I. 血樣 DNA 來源

血樣 DNA 來源是牛淋巴球黏力缺失症（BLAD）檢測計畫與牛隻血型檢測計畫所萃取的 DNA，該 DNA 含有 1997 年 7 月至 1999 年 12 月間 DHI 計畫 50 戶牧場的 74 頭自留荷蘭乳牛小公牛 DNA 樣品以及採集的七個牧場（北部三場及南部四場）的公、母牛樣本，牛隻合計 1,690 頭。

II. 聚合酶連鎖反應

應用 Dennis *et al.* (1989) 所提出的引子（CitF 與 CitR），以牛隻血樣 DNA 為模板（template），經聚合酶連鎖反應（polymerase chain reaction, PCR）可以獲得 176 bp 的 DNA 片段，將所得 DNA 片段再利用限制酶 *Ava*II 切割後，經電泳、染色後呈相，正常型牛（TC）具 98 和 78 bp 兩個片段，雜合型牛（CT）則具有 176、98 和 78 bp 三個片段。有病型牛（CIT）則會有 176 bp 一個片段。經取得 Robinson 研究所提供的瓜胺酸症雜合型個體之 DNA 作為比對樣品，並應用 Dennis *et al.* (1989) 所設計的一組 PCR 引子 CitF 與 CitR 之核苷酸序列分別為：

CitF : 5'- GTGTTTCATTGAGGACATC -3'

CitR : 5'- CCGTGAGACACTACTTG -3'

聚合酶連鎖反應中，反應物添加濃度與添加量如表 1 所示。反應的微量管滴入一滴礦物油後，離心一次，使礦物油在上避免水分蒸發。操作步驟均在外吹式無菌操作櫃進行。PCR 反應條件依序為 94℃ 5 分鐘；再以 94℃ 1 分鐘、54℃ 30 秒、72℃ 40 秒，共進行 35 次循環；最後為 72℃ 5 分鐘。

表 1. 牛瓜胺酸症檢測 PCR 反應添加量

Table 1. Ingredients in PCR reaction mixture for citrullinemia test

Ingredient	Concentration	Volume
Polymerase Taq	5 U / μ l	0.3 μ l
Primer CitF	10 pmole / μ l	1.0 μ l
Primer CitR	10 pmole / μ l	1.0 μ l
dNTP	25 ng / μ l	1.0 μ l
10X PCR Buffer		2.5 μ l
Distall. water		9.2 μ l
Template DNA	25-40 ng / μ l	10.0 μ l
Total volume		25.0 μ l

III. 遺傳型鑑別

取 $10\mu\text{l}$ PCR 產物與限制酶 *AvaII* (Boehringer Mannheim, Germany, $10\text{U}/\mu\text{l}$) $0.5\mu\text{l}$ 、 $10\times$ buffer $1.5\mu\text{l}$ 及 $3\mu\text{l}$ 無菌去離子水於 37°C 反應 3 小時後。使用 3.0% agarose gel，並以市售 50 base pair ladder (Boehringer Mannheim, Germany) 當 DNA 片段大小標記，於 100 伏特電壓，泳動 45 分鐘後呈相。當 DNA 樣本加入正向引子 (CitF) 和反向引子 (CitR)，得到聚合酶連鎖反應產物 176 bp DNA 片段 (自 175 至 350 個核苷酸序列)，經限制酶 *AvaII* 分切正常型 (Normal) 的基因在 252-G↓GACC-256，故會被切成兩個片段 98 bp、78 bp；有病型 (Affected) 則在 252-GGACT-256 無限制酶 *AvaII* 辨識的分切序列，故無分切點，仍為 176 bp 一個片段。雜合型牛 (Carrier) 則會呈現三個片段 (176 bp、98 bp 和 78 bp) 的電泳相 (圖 1)。

IV. 統計分析

計算瓜胺酸症不同遺傳型的頻率，並搜尋比對近二十年進口冷凍精液系譜是否有雜合型共同祖先的子畜精液進口。

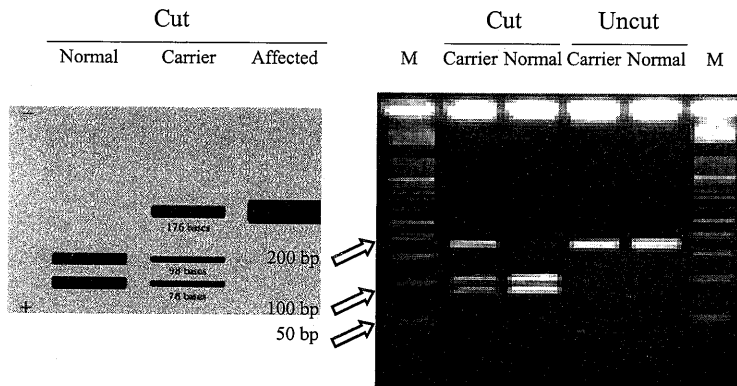


圖 1. 左側為荷蘭乳牛瓜胺酸症遺傳型檢測正常型 (normal)、雜合型 (carrier) 及有病型 (affected) 的理想電泳圖。右側為檢測已知遺傳型的控制樣品實際電泳圖影像。176 bp 的未分切片段 (uncut)，與經限制酶 *AvaII* 分切 (cut) 後的片段之電泳相，正常型切割成 78 p 及 98 bp 兩個片段，雜合型則擁有三種不同 78 bp, 98 bp 及 176 bp 的片段。M：50bp DNA 片段標記。

Fig. 1. Left image is diagrammatic electrophoresis pattern of three genotypes, normal, carrier and citrullinemia affected, after *AvaII* digestion and right image is the tested results of the control sample, carrier, and tested normal samples. Carrier had 78bp, 98bp and 176bp three fragments, but normal cow only had 78bp and 98bp two fragments. M: 50 bp ladder marker.

結果與討論

本試驗共檢測 1,690 頭荷蘭乳牛之瓜胺酸遺傳型，結果如表 2 所示，其中包括來自七個乳牛場的 1,616 頭公、母牛中皆為正常型，而 74 頭自留小公牛中則檢測出有 1 頭為雜合型，以總頭數計算其頻率為 0.06%。通常有病型的胚胎會在出生後一週內死亡，故正如預期地並未檢測出任何有病型的個體。

已查出的瓜胺酸症的最重要源頭公畜（或許還有別的公畜）名為 Linmack Kris King 公牛。而這頭北美洲輸出至英國的公牛，其精液則廣泛的被澳洲、紐西蘭、英國或是南非等多國使用 (Healy *et. al.*, 1991)。它的父畜 Gray View Crisscross，在美國 1960 年代也曾是一頭廣受歡迎的公牛。目前已經證實這頭父畜也是個雜合型，而它的部份後裔亦是雜合型。由於 Crisscross 僅有 2,000 個登錄的後裔，因此瓜胺酸症在北美地區族群樣品抽檢後發現問題並不嚴重，估計僅在 0.5% 以下 (Robinson *et. al.*, 1993)。

本項調查結果顯示，台灣過去雖曾自澳洲進口不少乳牛，但近二十年來並未進口 Crisscross 或其子代的乳牛冷凍精液，僅於民國 67 年進口過一隻與 Crisscross 同父異母的公牛 1,200 劑冷凍精液，其除缺乏遺傳檢資訊外，亦無任合後裔被北美地區選為製備冷精液之公牛。因此牛群中帶有牛瓜胺酸症不良基因的牛隻推估在 0.1% 以下，未來定期抽檢進口冷凍精液與母牛群即可有效避免該不良基因於台灣牛群中擴散。

表 2. 檢測台灣乳牛群瓜胺酸症型的遺傳型頻率

Table 2. Frequencies of tested genotypes for deficiency of citrullinemia in Holsteins of Taiwan

Herd	Farm code and region ¹	Genotype				Frequency of CT (%) ²
		Normal	Carrier	Affected	Total	
Lactating cow	Farm 1	351	0	0	351	0
	Farm 2	103	0	0	103	0
	Farm 3	91	0	0	91	0
	Farm 4	718	0	0	718	0
	Farm 5	131	0	0	131	0
	Farm 6	208	0	0	208	0
Bull	Farm 7	14	0	0	14	0
Young bull	North region	55	0	0	55	0
	East region	18	1	0	19	5.3
Total		1689	1	0	1690	0.06

¹ Farm 1, 2, 5 and 6 located in south region of Taiwan, Farm 3, 4 and 7 located in north region of Taiwan.

² CT (%) = percentage of carrier (CT) in total = (CT/Total) × 100.

誌 謝

澳洲 Healy, P. J. 博士提供檢測引子供測試及美國伊利諾大學 Robinson, J. L. 博士提供比對用 DNA 樣品，特此誌謝。

參考文獻

- 黃鈺嘉、吳松鎮、曾青雲、李世昌、楊德威、張秀鑾。1998。臺灣荷蘭乳牛不良遺傳基因頻率探討。畜產研究 31(3)：299~304。
- Dennis, J. A., P. J. Healy, A. L. Beaudet and W. E. O'Brien. 1989. Molecular definition of bovine argininosuccinate synthetase deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86(20)：7947~7951.
- Harper, P. A., P. J. Healy, J. A. Dennis and A. B. Martin. 1988. Ultrastructural findings in citrullinemia in Holstein-Friesian calves. *Acta Neuropathol (Berl)* 76(3)：306~310.
- Healy, P. J., J. A. Dennis, L. M. Camilleri, J. L. Robinson, A. L. Stell and R. D. Shanks. 1991. Bovine citrullinemia traced to the sire of Linmack Kriss King. *Aust Vet J.* 68(4)：155.
- Robinson, J. L. and R. D. Shanks. 1991. Citrullinemia, Another Inherited Disorder of Dairy Cattle. *Illinois Dairy Report*, pp. 22~25.
- Robinson, J. L., J. L. Burns, C. E. Magura and R. D. Shanks. 1993. Low incidence of citrullinemia carriers among dairy cattle of the United States. *J Dairy Sci.* 76(3)：853~858.

Investigation of Citrullinemia of Dairy Cattle in Taiwan⁽¹⁾

Der-Yuh Lin⁽²⁾, Yu-Chia Huang⁽²⁾, Jo-Ching Chen⁽²⁾,
Te-Wei Yang⁽³⁾, Thung-Fa Shiao⁽⁴⁾ and Hsiu-Luan Chang⁽²⁾

Received Jun. 10, 2001 ; Accepted Aug. 30, 2001

Abstract

Bovine citrullinemia is an autosomal recessive disorder in Holstein cattle that results in calf mortality. Affected calves are unable to get rid of ammonia and display neurological symptoms that become progressively worse, leading to death within one week of birth. For understanding the defect gene frequency of Taiwan Dairy cattle, a total of 1690 samples, Holstein cows and young bulls from different herds, were sampled and tested for genotypes of citrullinemia. With a mutation-specific assay of leukocyte DNA, one heterozygote cow was detected among all samples tested, corresponding to an incidence of 0.06%. With evidence of less than 1% ($1/1690 = 0.06\%$) carrier, citrullinemia, a serious genetic defect of Holsteins in Australia, is not a significant genetic disease in Taiwan.

Key words : Taiwan Holstein, Citrullinemia, Polymerase chain reaction.

-
- (1) Contribution No. 1079 from Taiwan Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.
(2) Dept. of Animal Breeding, COA-TLRI, Hsinhua, Tainan 712, Taiwan, R.O.C.
(3) Research Farm, COA-TLRI, Hsinhua, Tainan 712, Taiwan, R.O.C.
(4) Hsinchu Branch Institute, COA-TLRI, Hsinchu 300, Taiwan R.O.C.