

台灣山羊黏多醣症基因型頻率⁽¹⁾

林德育⁽²⁾ 陳若菁⁽²⁾ 黃鈺嘉⁽²⁾ 林炯仁⁽³⁾ 陳坤照⁽⁴⁾
陳水財⁽⁵⁾ 莊璧華⁽⁶⁾ 吳明哲⁽²⁾⁽⁷⁾

收件日期：97年2月22日；接受日期：97年3月24日

摘要

檢測 2912 頭山羊之黏多醣症第三型 (G6S) 基因型，包括努比亞山羊 1209 頭、阿爾拜因山羊 991 頭、撒能山羊 245 頭、波爾山羊 139 頭、台灣黑山羊 129 頭、吐根堡山羊 51 頭、賴滿嬌山羊 39 頭、努比亞雜交山羊 73 頭、波爾雜交山羊 18 頭及阿爾拜因雜交山羊 18 頭。G6S 正常型 (AA) 有 94.1% (2741/2912)，其中努比亞種有 6 頭為有病型 (BB) 及 130 頭為雜合型 (AB) 為最多，佔該品種的頻率有 11.2% (136/1209)；而在阿爾拜因、撒能及波爾山羊亦發現有雜合型個體，此結果與國外報告不同，可能與各國登錄制度中，放寬級進到一定百分率可登錄為純種羊有關。正常型與雜合型的分佈在公母兩性別相近 5.6% 及 6.0%。本試驗共有台灣 41 家養羊場參加，應用基因選種技術進行種羊選種，將有助於整體生產體系之效率提高。

關鍵詞：山羊、黏多醣症、遺傳缺陷。

緒言

山羊黏多醣症 (Mucopolysaccharidosis, MPS) IIID 型，是一種遺傳缺陷所導致的代謝性疾病。黏多醣學名為醣胺多醣 glycosaminoglycans (GAGs)，是體內含量最豐富的多醣體；因 GAGs 的溶液態具有高黏度，故稱為黏多醣 mucopolysaccharide。黏多醣症的發生是因為黏多醣逐步分解中所需的酵素缺乏或異常所造成的疾病，因此造成細胞內 GAGs 的累積，目前尚無治癒此疾病的醫學解決方案 (李及蔡，2000)。人類已發現的黏多醣症共分為七型 (MPS I、II、

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告1433號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所遺傳育種組。

(3) 中華民國養羊協會。

(4) 行政院農業委員會畜產試驗所台東畜繁殖場。

(5) 行政院農業委員會畜產試驗所恒春分所。

(6) 行政院農業委員會畜產試驗所花蓮種畜繁殖場。

(7) 通訊作者，E-mail: mcwu@mail.tlri.gov.tw。

III、IV、VI、VII、IX），不同型下尚有不同的亞型，各為不同的溶菌酶（lysozyme）缺乏或異常所引起；同一亞型內亦曾檢測出多種不同的分生突變（Jansen *et al.*, 2007），除第二型為 X- 性聯隱性遺傳外，其他的均為體染色體隱性遺傳。黏多醣症症狀複雜多變，除了生長遲滯、外貌變形、生理功能損害外，亦有造成麻醉危險的案例報告（陳等，2001）。據線上動物孟德爾遺傳資料庫收集統計（Online Mendelian Inheritance in Animals, OMIA），黏多醣症除人類外，在狗、貓、牛、山羊、鸕鶿（emu）等亦有發生。而目前發現於山羊的黏多醣症是歸類於 MPS IIID 型（相當於人類黏多醣症第三型聖菲利伯氏症 D 型），僅有單一品種努比亞（Nubian）山羊的 GNS（N-acetylglucosamine-6-sulphatase, 又稱 G6S）基因的單點突變的分子生物報告（Cavanagh *et al.*, 1995; Thompson *et al.*, 1992），為一簡單的隱性基因遺傳，其突變點的位置在 G6S cDNA 第 322 個核苷酸上（C→T）。Hoard *et al.*（1998）檢測美國密西根 20 場養羊場共 552 頭努比亞山羊之黏多醣症遺傳缺陷基因頻率，發現高達 25.2%（139/552）雜合型個體與 1.3%（7/552）有病型個體；而林等（2004a）利用台灣特定牧場的調查亦發現台灣努比亞山羊的黏多醣症遺傳缺陷基因頻率高達近 25% 的雜合型個體存在。隨後的研究應用 DNA 序列的點突變多態性發展出的山羊黏多醣症遺傳缺陷之單股構型多態性（single-strand conformation polymorphism, SSCP）基因型檢測方法，可以快速有效率的檢測出山羊黏多醣症（林等, 2004b）。

依 2000 年品種結構之調查，台灣飼養之羊隻其主要品種有五種。主供肉用之本地黑羊約占 7.8%、乳用白色撒能種占 8.57%，餘為乳肉兼用種之努比亞 16.37%、阿爾拜因 10.59%、土根堡 3.22% 及占 50% 之雜種羊，故乳、肉羊場兼有者甚多。台灣肉用山羊飼養品種目前還是以本地山羊及乳肉兼用之努比亞的雜交品種，為國內肉羊拍賣市場的主流。努比亞山羊血源影響台灣肉羊生產很大，加上國外許多品種協會中允許含有 87.5% 的單一品種血源於登錄系統中記錄，所以亦有機會引入帶有努比亞血源的其它品種山羊，造成此不良基因未查覺的無形損失。因此，本試驗針對台灣不同的地區養羊場之不同山羊品種羊隻進行山羊黏多醣症的基因型頻率分析，並同步提供山羊篩除選種建議，以期逐年降低此不良基因帶來的經濟損失。

材料與方法

I. 血樣DNA來源

分別由中華民國養羊協會協助台灣 38 個民間養羊場羊隻個體血樣採集，以及來自畜產試驗所 3 個分所場的羊隻血液樣品，2006 至 2007 兩年共 2912 頭羊隻個體血樣，進行山羊黏多醣症基因型檢測。包括努比亞山羊 1209 頭、阿爾拜因山羊 991 頭、撒能山羊 245 頭、波爾山羊 139 頭、台灣黑山羊 129 頭、吐根堡山羊 51 頭、賴滿嬌山羊 39 頭、努比亞雜交山羊 73 頭、波爾雜交山羊 18 頭及阿爾拜因雜交山羊 18 頭。

II. DNA萃取

取羊隻血樣3~5 ml，以市售DNA萃取試劑組 Puregene™ DNA Isolation Kits（Gentra Systems, USA）萃取白血球 DNA。

III. 聚合酶連鎖反應

應用 Leipprandt *et al.*（1995）所提出的引子組，核苷酸引子序列分別為Forward（G6S_F）：5' -CTTATgTgCCAAgTgCTCTC-3'；Reverse（G6S_R）：5' - CCTCCAGAGTGTGTTAACC-3'。聚合酶連鎖反應中，反應物添加種類、濃度或添加量如表 1 所示。反應的微量管滴入一滴礦

物油，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°C 5 分鐘；再以 94°C 1 分鐘、55°C 30 秒、72°C 30 秒，共進行 35 次循環；最後為 72°C，10 分鐘。

表 1. 山羊黏多醣症檢測 PCR 反應添加量

Table 1. Ingredients in PCR reaction mixture for caprine N-acetylglucosamine -6-sulphatase deficiency (G6S) test

Ingredient	Concentration	Volumn
Polymerase Taq (SuperTherm, BT)	5 U / μ L	0.3 μ L
Primer G6S_F	10 pmole / μ L	1.0 μ L
Primer G6S_R	10 pmole / μ L	1.0 μ L
DNTP	25 ng / μ L	1.0 μ L
10X PCR buffer		2.5 μ L
Distilled water		9.2 μ L
DNA template	25-40 ng / μ L	10.0 μ L
Total volume		25.0 μ L

IV. 遺傳型鑑別

取 10 μ L PCR 產物與 0.5 μ L 限制酶 *Ava*I (Promega, USA, 10 U / μ L)、1.5 μ L 10X buffer 及 3 μ L 無菌去離子水於 37°C 反應 2 小時後，以市售 50 base pair ladder 當 DNA 片段大小標記；使用 4.0% agarose gel，於 Mupid II 電泳槽以 100 伏特電壓，泳動 60 分鐘後，將 agarose gel 置入含 ethidium bromide 0.5X TBE buffer 中染色 20 分鐘後，利用紫外燈 (Spectroline, USA) 觀察 G6S (PCR-RFLP) 指印。當 DNA 樣本加入正向引子 (G6S_F) 和反向引子 (G6S_R)，得到聚合酶連鎖反應產物 96 bp DNA 片段 (自 G6S cDNA 290 至 385 個核苷酸序列)，經限制酶 *Alu*I 分切，有病型 (BB) 的基因在 319-AG↓CTGAG-325 處有 *Alu*I 分切點，故會被切成 66 bp 與 30 bp 二個片段；正常型 (AA) 則無此限制酶 *Alu*I 分切點，故仍為一個 96 bp 片段。雜合子型 (AB) 則會呈現三個片段 (96 bp、66 bp、和 30 bp) 的電泳相 (圖 1)。

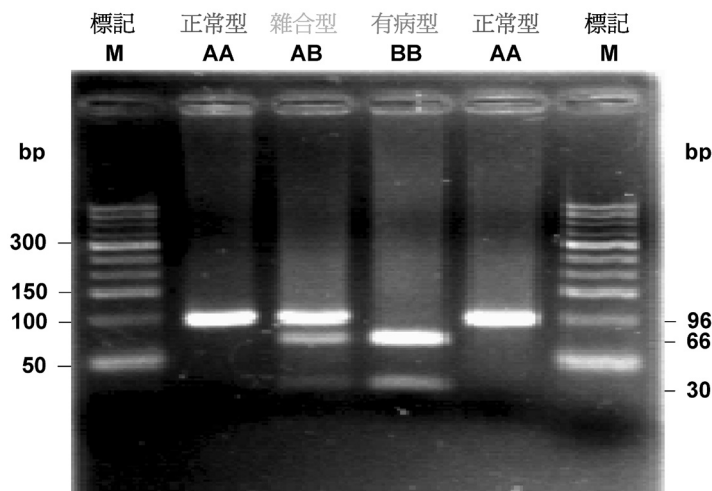


圖1. 山羊之黏多醣症 (G6s) 基因型電泳圖。

Fig. 1. The electrophoresis genotype patterns of caprine N-acetylglucosamine-6-sulphatase deficiency (G6s).

V. 統計分析：

計算山羊黏多醣症不同遺傳型的頻率，並依據記錄進行獨立性檢定分析。

結果與討論

所有檢測羊隻中有 6 頭 (0.2%) 為有病型 (BB)，4.6% 為雜合型 (AB)；所有 G6S 有病型羊隻皆為其努比亞山羊；而雜合型頻率分別為努比亞山羊 10.7%、阿爾拜因山羊 2.0%、撒能山羊 0.8%、波爾山羊 1.4%、台灣黑山羊 7.8% 及 努比亞雜交山羊 1.4%。所有檢測的賴滿嬌山羊、吐根堡山羊、波爾雜交山羊及阿爾拜因雜交山羊皆為正常型。各縣市的檢測頭數如圖 1 所示，檢測結果定期更新於動態網頁 (http://pigbase.angrin.tlri.gov.tw/pigfarm/goat_g6s_test.asp)，以台南、屏東及台東採集的樣本較多。各個羊場的雜合型及有病型佔全場的百分率不同，較高的幾場均為努比亞飼養場，雜合型及有病型合計可佔全場的 20% 以上 (圖3)，顯見清除不良基因的工作需要持續的推動。從表 2 結果發現黏多醣症基因不侷限於努比亞，但努比亞的頻率最高；在樣本最多的兩品種努比亞及阿爾拜因，可發現其頻率分配的不獨立性，努比亞的雜合型遠高於阿爾拜因 (10.7% vs. 2.0%)。此項結果可能與各國登錄制度中，放寬級進到一定百分率可登錄為純種羊有關。依此發現與美國密西根大學指出僅發現於努比亞山羊略有出入 (Cavanagh *et al.*, 1995)，因為台灣羊隻來自多國，除努比亞山羊外，由於其他品種亦有檢測出黏多醣症基因型，經此全面篩檢結果已推翻黏多醣症僅存在單一品種的說法。表 3 則為不同性別的黏多醣症基因型頻率，若略去性別不詳的兩個樣品，正常型與雜合型的分佈在公母兩性別相近 5.6% 及 6.0%。本試驗共有 41 家養羊場參加，除完成台灣山羊黏多醣症基因型頻率普查外，亦實踐應用基因選種技術進行種羊選種，將有助於整體肉羊生產體系之效率提高。

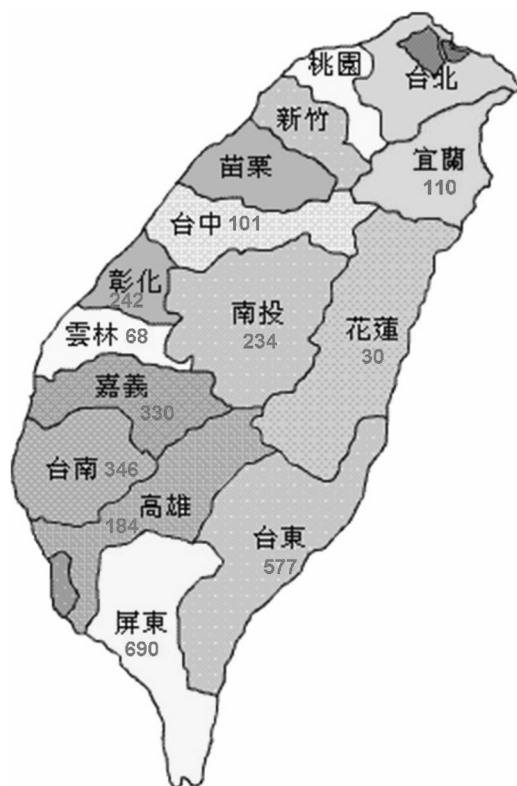


圖 2. 從台灣不同縣市採集的樣品數。

Fig. 2. Number of samples collected from different counties of Taiwan.

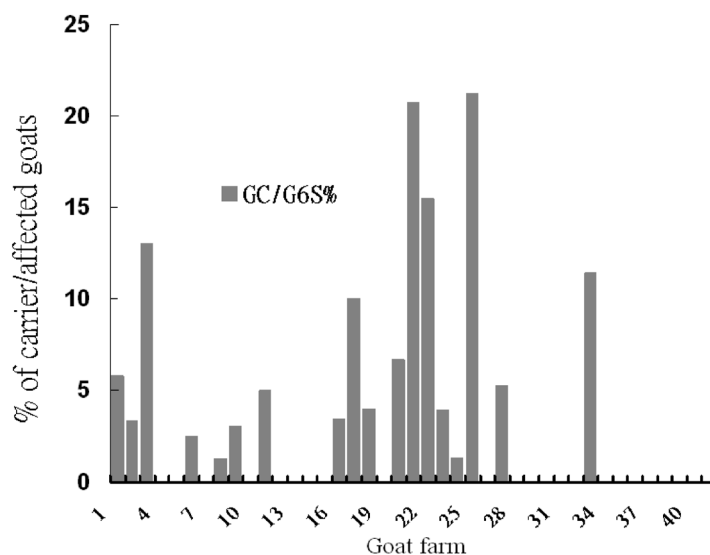


圖 3. 不同種羊場的雜合型 (AB) 及有病型 (BB) 佔全場的百分率。

Fig. 3. Carrier (AB) and affected (BB) goat percentages of caprine mucopolysaccharidosis IIID in different farms.

表 2. 台灣山羊品種黏多醣症基因型頻率

Table 2. Genotype frequency of caprine mucopolysaccharidosis IIID in Taiwan goat breeds

Breed	Number	Frequency (%)		
		Normal (AA)	Carrier (AB)	Defected(BB)
Nubian	1209	88.7 (1073)	10.7 (130)	0.5 (6)
Alpine	991	98.0 (971)	2.0 (20)	0 (0)
Saanen	245	99.2 (243)	0.8 (2)	0 (0)
Boer	139	98.6 (137)	1.4 (2)	0 (0)
Taiwan Black Goat	129	92.2 (119)	7.8 (10)	0 (0)
Toggenburg	51	100.0 (51)	0 (0)	0 (0)
LaMancha	39	100.0 (39)	0 (0)	0 (0)
Nubian crossbred	73	98.6 (72)	1.4 (1)	0 (0)
Boer crossbred	18	100.0 (18)	0 (0)	0 (0)
Alpine crossbred	18	100.0 (18)	0 (0)	0 (0)
Total	2912	94.1 (2741)	5.7 (165)	0.2 (6)

The integer in parenthesis is number of goats tested.

Chi-Square was significant, $P < 0.05$, for the upper 2 by 2 sub-table (breed by genotype, Nubian / Alpine and Normal / Carrier).

表 3. 不同性別山羊的黏多醣症基因型頻率

Table 3. Genotype frequency of caprine mucopolysaccharidosis IIID in different sex

Sex	Number	Frequency (%)		
		Normal (AA)	Carrier (AB)	Defected (BB)
Male	637	93.3 (594)	6.0 (38)	0.78 (5)
Female	2273	94.4 (2145)	5.6 (127)	0.04 (1)
Unknown	2	100 (2)	-	-
Total	2912	94.1 (2741)	5.7 (165)	0.2 (6)

The integer in parenthesis is number of goats tested.

Chi-Square was not significant, $P > 0.05$, for the upper 2 by 2 sub-table (sex by genotype, Female / Male and Normal / Carrier).

參考文獻

- 李雅雯、蔡國威。2000。黏多醣症的成因：臨床觀察與治療。中央研究院生物化學研究所論文集 26:433-445。
- 林德育、黃鈺嘉、陳若菁、魯學智、黃政齊、張秀鑾。2004a。山羊黏多醣症遺傳缺陷之DNA檢測。畜產研究 37(3): 223-232。
- 林德育、黃鈺嘉、陳若菁、張秀鑾、吳明哲。2004b。山羊黏多醣症遺傳缺陷之 SSCP 基因型檢測。中畜會誌 33(4): 100。
- 陳應麟、林炫沛、滿恬恬、鄭清榮。2001。Clinical Experience in Anesthetic Management for Children with Mucopolysaccharidoses: Report of Ten Cases. *Acta Paediatrica Taiwanica* 42(5):306-308.
- Cavanagh, K. T., J. R. Leipprandt, M. Z. Jones and K. Friderici. 1995. Molecular defect of caprine N-acetylglucosamine-6-sulphatase deficiency. A single base substitution creates a stop codon in the 5'-region of the coding sequence. *J. Inherit. Metab. Dis.* 18:96.
- Hoard, H. M., J. R. Leipprandt, K. T. Cavanagh, N. K. Truscott, B. A. Levene, K. H. Friderici and M. Z. Jones. 1998. Determination of genotypic frequency of caprine mucopolysaccharidosis IIID. *J. Vet. Diagn. Invest.* 10:181-183.
- Jansen A. C., H. Cao, P. Kaplan, K. Silver, G. Leonard, L. De Meirleir, W. Lissens, I. Liebaers, M. Veilleux, F. Andermann, R. A. Hegele and E. Andermann. 2007. Sanfilippo syndrome type D: Natural history and identification of 3 novel mutations in the GNS Gene. *Arch Neurol.* 64:1629-1634.
- Leipprandt, J. R., K. Friderici, D. J. Sprecher and M. Z. Jones. 1995. Prenatal test for caprine N-acetylglucosamine-6-sulphatase deficiency and sex identification. *J. Inher. Metab. Dis.* 18:647-648.
- Thompson, J. N., M. Z. Jones, G. Dawaon and P. S. Huffman. 1992. N-acetylglucosamine 6-sulphatase deficiency in a Nubian goat: A model of Sanfilippo syndrome type D (mucopolysaccharidosis IIID). *J. Inherit. Metab.* 15:760-768.

Frequency of caprine mucopolysaccharidosis IIID genotypes in Taiwan ⁽¹⁾

Der-Yuh Lin ⁽²⁾ Jo-Ching Chen ⁽²⁾ Yu-Chia Huang ⁽²⁾
Jeong-Ren Lin ⁽³⁾ Kuen-Jaw Chen ⁽⁴⁾ Shui-Tsai Chen ⁽⁵⁾
Pi-Hwa Chuang ⁽⁶⁾ and Ming-Che Wu ^{(2) (7)}

Received : Feb. 22, 2008 ; Accepted : Mar. 24 , 2008

Abstract

Caprine mucopolysaccharidosis IIID, or N-acetylglucosamine 6-sulfatase deficiency (G6S), is a recessive inherited disorder of goat. There were 2912 goat DNA samples tested from 41 herds of 1209 Nubians, 991 Alpines, 245 Saanens, 139 Boers, 51 Toggenburgs, 129 Taiwan Black Goats and 39 LaManchas. The normal genotypes were only 94.1% in total. The heterozygote and defected Nubians was as high as 11.3% (136/1209), 6 defected and 130 heterozygote goats in 1209 Nubians. However, carriers were also found in other breeds. There were 2.0%, 0.8%, 1.4%, 7.8% and 1.4% heterozygotes found in Alpines, Saanens, Boers, Taiwan Black Goats and Nubian crossbreds, respectively. One of the possible reasons was that upgrading goats could be listed in several goats associations in the world. The carriers frequencies in male and female were 5.6% and 6.0%, respectively, and no association was found. In addition of the survey of the G6S frequency, genotype-assisted selection was practiced to improve the meat goat production efficiency in Taiwan.

Key words: Caprine, Mucopolysaccharidosis. Genetic deficiency.

(1) Contribution No. 1433 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

(2) Breeding and Genetics Division, COA-LRI, Hsinhua 712, Tainan, Taiwan, R.O.C.

(3) Goat Farm Association R.O.C, Chiayi City 600, Taiwan, R.O.C.

(4) Taitung Animal Propagation Station, COA-LRI, Taitung 954, Taiwan, R.O.C.

(5) Hengchun Branch, COA-LRI, Pingtung 946, Taiwan, R.O.C.

(6) Hualien Animal Propagation Station, COA-LRI, Hualien 973, Taiwan, R.O.C.

(7) Corresponding author, E-mail : mcwu@mail.tlri.gov.tw.