

臺灣乳牛群短脊椎綜合症基因檢測之初探⁽¹⁾

廖仁寶⁽²⁾ 陳若菁⁽²⁾ 陳玟岑⁽²⁾ 蔡新興⁽³⁾ 黃金山⁽³⁾ 陳志毅⁽⁴⁾
蕭宗法⁽³⁾ 李國華⁽⁴⁾ 周宜昌⁽⁵⁾ 吳明哲⁽²⁾ 張秀鑾⁽⁶⁾⁽⁷⁾

收件日期：104 年 3 月 19 日；接受日期：104 年 5 月 22 日

摘 要

乳牛短脊椎綜合症為一隱性遺傳缺陷，會導致高乳量牛群之懷孕母牛流產或死產之重大經濟損失。本研究旨在建立與檢測乳牛族群短脊椎綜合症基因型，藉以瞭解臺灣乳牛群中該基因型頻率。試驗樣品總計有 441 個，分別為來自四家乳牛場之 409 頭乳牛血液樣品與 32 個乳牛冷凍精液樣品。試驗結果顯示，在所有檢測的乳牛樣本中，其基因型鑑定結果，35 個乳牛血液樣品與 1 個冷凍精液樣品為雜合型，雜合型頻率分別為 8.56 與 3.13%，其餘樣品皆為正常型。檢測結果顯示我國乳牛群中，雜合型頻率不可忽視，故如何減少酪農產業之潛在損失，應為當務之急。因此，有必要嚴密監控冷凍精液之短脊椎綜合症基因型與篩檢仔牛群，防止短脊椎綜合症雜合型個體持續進入我國乳牛族群，俾利逐步篩除此一不良基因。

關鍵詞：短脊椎綜合症、乳牛、基因型鑑定、冷凍精液。

緒 言

在分子遺傳檢測技術尚未普及前，乳牛先天性隱性遺傳缺陷常未能即時發現，導致於後裔中發現時，已無法阻擋該頭種公牛不良基因的散布。國際著名高乳量之荷蘭牛 Bell 家族公牛廣為散播牛淋巴球黏力缺失症 (bovine leukocyte adhesion deficiency, BLAD) 之遺傳缺陷不良基因於全球，就是一個最鮮明的案例 (Shuster *et al.*, 1992)。乳牛繁殖性狀相關遺傳缺陷除 BLAD 外，尚有脊椎畸形複合症 (complex vertebral malformation, CVM)、短脊椎綜合症 (brachyspina syndrome, BS)、單譜症 (deficiency of uridine monophosphate synthase, DUMPS) 及瓜胺酸症 (citrullinemia) (Windsor and Agerholm, 2009)；其中後兩者出現在乳牛群的頻率已相當低 (Robinson *et al.*, 1993；黃等, 1998；林等, 2001)。

BS 病例首度在 2006 年發現於丹麥 (Agerholm *et al.*, 2006)，隨後荷蘭與丹麥 (Agerholm and Peperkamp, 2007; Charlier *et al.*, 2012)、義大利 (Testoni *et al.*, 2008)、加拿大 (Agerholm *et al.*, 2010)、德國 (Buck *et al.*, 2010) 及美國 (VanRaden *et al.*, 2011) 陸續有荷蘭牛 BS 個案研究報導，且不論是荷蘭、義大利、加拿大或美國之有病致死牛隻系譜追蹤，均可追溯到一頭名號為 Sweet Haven Tradition (NAAB: 023HO00206；個體號 HOUSA000001682485) 之共同祖先 (Agerholm and Peperkamp, 2007; Testoni *et al.*, 2008; Agerholm *et al.*, 2010; Buck *et al.*, 2010; VanRaden *et al.*, 2011; Charlier *et al.*, 2012)；其中義大利兩頭死產之荷蘭牛仔牛，經系譜確認具同父異母半同胞之親屬關係。同時，2012 年有學者進一步指出 BS 係因牛第 21 號染色體上 FANCI 基因發生 3.3 kb 片段的缺失 (Charlier *et al.*, 2012)，導致懷孕母牛早期流產或死產，造成酪農經濟損失；並確認其為一種隱性致死遺傳缺陷。此外，研究報告指出，追蹤 10 頭 BS 雜合型之中國荷蘭牛公牛系譜，不論經由父方或母方系譜資料均可追溯到共同祖先為 Sweet Haven Tradition 公牛，並進一步推測上述 BS 雜合型公牛，經由其兩頭高乳量育種價後裔公牛 Bis-May Tradition Cleitusn (NAAB: 001HO01464; HOUSAM1879085) 與 Rothrock Tradition Leadman (NAAB: 008HO02024; HOUSAM1983348) 之冷凍精液，散播 BS 缺陷基因至中國乳牛群中 (Fang *et al.*, 2013)。我國酪農進口美國與加拿大高乳量育種價種公牛冷凍精液，以提升乳牛群乳量，可能亦有 BS 雜合型母牛。

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 2235 號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所遺傳育種組。

(3) 行政院農業委員會畜產試驗所產業組。

(4) 行政院農業委員會畜產試驗所新竹分所。

(5) 臺南市動物防疫保護處。

(6) 國立屏東科技大學動物科學與畜產系。

(7) 通訊作者，E-mail：hlachang@mail.npust.edu.tw。

行政院農業委員會統計報告顯示，102 年我國在養荷蘭牛約有 13 萬頭，其中泌乳牛約 6 萬頭，年產乳量約 36 萬公噸，產值約達 94 億元（行政院農業委員會統計室，2013）。基於培育我國高乳量優質種乳牛與提升生產效益，瞭解我國乳牛群與繁殖性狀相關的重要遺傳缺陷基因頻率分布與來源，並監控與避免因引進攜帶遺傳缺陷之種源，尤其是冷凍精液，所導致酪農產業之重大損失。因此，本研究旨在建立乳牛 BS 基因型篩檢平臺，並應用於民間荷蘭牛母牛與部分進口乳牛冷凍精液之篩檢，期瞭解臺灣乳牛族群 BS 基因型頻率分布，俾供酪農參考。

材料與方法

I. 試驗動物血樣與精液樣品

分別自四家乳牛場取得 112、108、32 及 157 頭荷蘭牛血液樣品，共計 409 頭，其中包括 48 頭為仔公牛。應用 DNA 萃取套組 (DNA Isolation Kit for Mammalian Blood, Roche) 與標準操作流程進行 gDNA 萃取，以供檢測用。同時，另為瞭解進口乳牛冷凍精液之 BS 基因型頻率分布，自代理進口商購得 32 頭公牛之冷凍精液（每頭各 1 劑），參照與修改套組提供之操作手冊，進行冷凍精液 gDNA 萃取 (QIAamp[®] DNA Mini Kit, Qiagen, Germany)。

II. PCR 反應

參照 Fang *et al.* (2013) 檢測法，測試與修改後進行 BS 基因型鑑定。使用正反向引子分別為 BSF: 5'-GCTCAAGTAGTTAGTTGCTCCACTG-3' 與 BSR: 5'-ATAAATAAATAAGCAGGATGCTGAAA-3'。PCR 反應組成分為 100–200 ng 模板 DNA、0.25 mM dNTP、每個引子 0.5 μ M、1 \times 反應緩衝液及 0.75 U（單位）Taq 聚合酶 (TaKaRa Bio Inc.)，反應總體積為 20 μ L。PCR 反應條件：第一步變性，94 $^{\circ}$ C、5 min；第二步循環增幅 35 次，94 $^{\circ}$ C、30 s，60 $^{\circ}$ C、45 s，72 $^{\circ}$ C、2 min 30 s；第三步延長，72 $^{\circ}$ C、10 min。

III. 基因型鑑定

取 10 μ L PCR 產物與 2 μ L 的載入染劑混合均勻後，進行 1.5% 瓊脂膠體電泳分析。電泳完成後，利用溴化乙錠染色，並在紫外線燈箱上顯像，再以數位影像分析系統存取影像 (AlphaImager System, Alpha Innotech, USA)。在電泳圖片上，BS 基因型的標的片段有 3,738 bp 與 409 bp 兩條泳帶，BS 正常基因型者僅具 3,738 bp 片段，而 BS 雜合型者則同時具 3,738 bp 與 409 bp 兩個泳帶片段（圖 1）。

IV. 統計分析

利用統計分析系統軟體 (SAS, 2012) 進行統計分析，以卡方檢驗 (Chi-squared test) 進行四家乳牛場牛群中，Sweet Haven Tradition 後裔母牛群和非後裔母牛群者之 BS 雜合型個體頻率之場別差異比較。

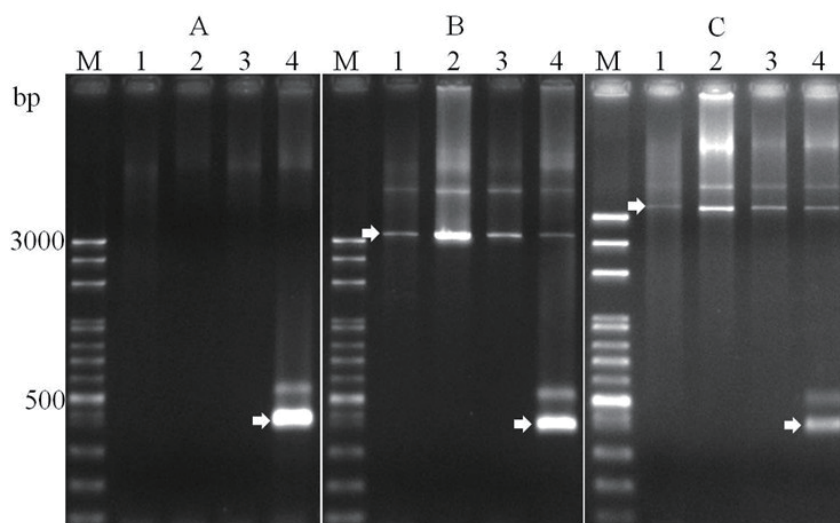


圖 1. BS 基因型較佳檢測條件結果。A：引子黏合溫度 58 $^{\circ}$ C、時間 1 min。B：引子黏合溫度 60 $^{\circ}$ C、時間 45 s。C：引子黏合溫度 62 $^{\circ}$ C、時間 45 s。M：100 bp 之大小標記，Lanes 1-3：樣品 BS 基因型為正常型，Lane 4：樣品 BS 基因型為雜合型。A、B 及 C 之樣品相同。箭頭所指處分別為 3,738 bp 與 409 bp 片段。

Fig. 1. Testing conditions for better identification of BS genotypes. A: Primer annealing temperature was 58 $^{\circ}$ C for 1 min; B: Primer annealing temperature was 60 $^{\circ}$ C for 45 s; C: Primer annealing temperature was 62 $^{\circ}$ C for 45 s. M: 100 bp DNA ladder. Lanes 1-3: Samples with BS normal genotype. Lane 4: Sample with BS carrier genotype. The samples were the same for testing in A, B and C. Arrows indicate the target bands of 3738 bp and 409 bp, respectively.

結果與討論

I. 牛隻 BS 基因型鑑定最佳反應條件與篩檢平臺建立

應用 Fang *et al.* (2013) 法之黏合條件，採用溫度 58℃、時間 1 min 進行 BS 基因型檢測，結果如圖 1A 所示。電泳圖片上僅能清楚見到雜合型樣品的 409 bp 片段與約 550 bp 非專一性增幅片段之泳帶，卻無法增幅出正常型與雜合型樣品共有之 3,738 bp 片段。因此，本試驗在大量篩檢試驗樣品前，先行進行引子不同黏合溫度與時間比較，以尋求較佳反應條件。當提高引子黏合溫度至 60℃ 與減少黏合時間為 45 s 時，正常與雜合基因型樣品具有之泳帶片段皆可正確顯示 (圖 1B)；但亦同時出現約 550 bp 與大於 4 kb 之非專一性增幅片段。為消除如圖 1B 之非專一性增幅片段，繼續提高引子黏合溫度至 62℃ 時，所得結果 (圖 1C) 與前者 (圖 1B) 相較發現，兩者均出現相同之非專一性增幅片段，雖然兩者皆可成功檢測出標的片段，但檢測效果則以圖 1B 較為清晰。因此，設定本試驗最佳反應條件為黏合溫度 60℃、時間 45 s，反應總體積為 20 μ L；包含 100 – 200 ng 模板 DNA、0.25 mM dNTP、0.5 μ M 每個引子、1 \times 反應緩衝液及 0.75 U Taq 聚合酶。此與 Fang *et al.* (2013) 檢測法之反應組成總體積為 25 μ L，包含 100 ng 模板 DNA、0.4 mM dNTP、1 μ M 每個引子、1 \times 反應緩衝液及 1.5 U Taq 聚合酶相較，除減少循環反應時間與節省整體檢測時間外，亦因試劑用量減少，進而降低樣品檢測成本。

II. 乳牛場 BS 雜合型頻率

四家乳牛場採樣牛隻樣品之 BS 基因型頻率如表 1 所示，計發現 A 場有 6 頭為雜合型，頻率為 5.36%；B 場有 15 頭雜合型，頻率為 13.89%；C 場 30 頭母牛中有 2 頭為雜合型，頻率為 6.67%，其餘 28 頭母牛與 2 頭仔公牛為正常型；D 場 111 頭母牛有 9 頭為雜合型，頻率為 8.11%，而 46 頭公牛中，雜合型者有 3 頭，頻率為 6.52%。整體而言，受測乳牛群雜合基因型頻率平均為 8.56%，其中公與母牛 BS 雜合型頻率分別為 6.25 與 8.86%；此結果與美國 (6%) (VanRaden *et al.*, 2011)、荷蘭 (7.4%) (Charlier *et al.*, 2012) 及中國 (3.8%) (Fang *et al.*, 2013) 之篩檢結果相較為高。因 BS 為隱性致死遺傳缺陷，故本試驗樣品中未偵測到具遺傳致死性之純合基因型個體。

表 1. 乳牛短脊椎綜合症基因型頻率

Table 1. Frequency of brachyspina syndrome genotype on four dairy cattle herds

Selected farm	No. of cattle genotyped	BS genotype			Frequency of carrier (%)
		Normal	Carrier	Affected	
A	112 ♀	106	6	0	5.36
B	108 ♀	93	15	0	13.89
C	30 ♀	28	2	0	6.67
	2 ♂	2	0	0	0
D	111 ♀	102	9	0	8.11
	46 ♂	43	3	0	6.52
Total	409	374	35	0	8.56

BS 基因型檢測之 361 頭泌乳母牛群中，具系譜資料者有 247 頭 (68.4%)，其中 91 頭母牛係由 32 頭 AI 公牛之進口冷凍精液所生產之女兒牛，而此 32 頭 AI 公牛皆為國際著名公牛 Sweet Haven Tradition 之後裔。具系譜之母牛群中，BS 雜合型頻率為 10.12%(25/247)；其中 Sweet Haven Tradition 後裔母牛群被檢出 BS 雜合型個體為 18 頭，其頻率為 19.78% (18/91)，顯著地較非後裔母牛群者之頻率 (7/156) 為高 ($P < 0.001$)；此與文獻推測 Sweet Haven Tradition 公牛為 BS 遺傳缺陷基因攜帶者之結果一致。

四家乳牛場牛群樣本 BS 基因型鑑定結果，A、B、C 及 D 場母牛樣本 BS 雜合型頻率分別為 5.36、13.89、6.25 及 7.64%，但場別間差異不顯著 ($P = 0.12$)。雜合型頻率最高之 B 場母牛群中，計有 15 頭為雜合型；其中有 6 頭母牛之父方種源為冷凍精液 007HO06695 (Latuch Convincer Farley-ET，個體號 HOUSA000129069717)，另有 4 頭母牛之父方種源為冷凍精液 007HO07858 (Rauscher Mars 999-Grand-ET，個體號 HOUSA000060839913)。追蹤前述兩頭 AI 公牛之基因資訊登錄發現，兩者均無紅色毛色基因 (TR)，遺傳缺陷基因 (CVM-BLAD-DUMP) 之基因型鑑定均為正常型 (TV-TL-TD)；但缺少 BS 基因型資料。進一步追查使用 007HO06695 與 007HO07858 冷凍精液之配種紀錄時，發現有與配之母牛為 BS 正常型，卻生出 BS 雜合型的仔牛，故能確認二者的 BS 基因型為雜合型 (圖 2)。值得注意的是，追蹤個體號為 HOUSA000129069717 與 HOUSA000060839913 之公牛父母源

系譜發現，二公牛均可經由 Rothrock Tradition Leadman 與 Bis-May Tradition Cleitus 祖先血緣，持續追溯到共同祖先 Sweet Haven Tradition 公牛 (圖 2)。

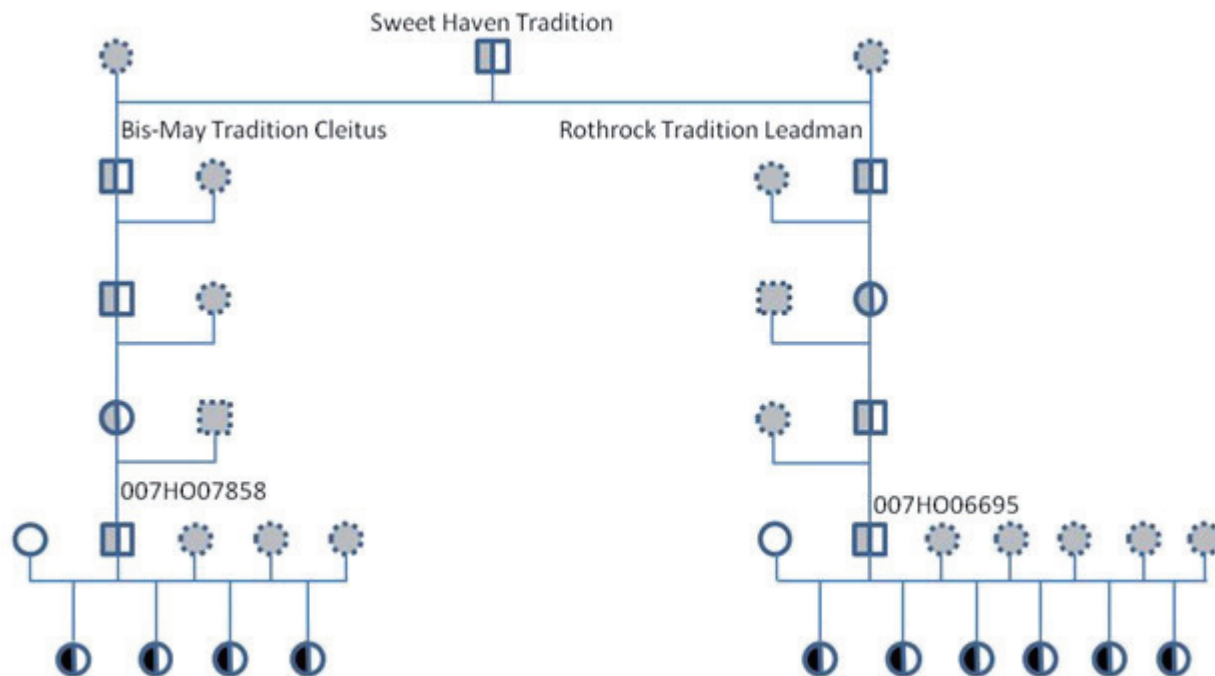


圖 2. B 場 10 頭被鑑定為 BS 雜合型母牛與相關母牛之系譜圖。公牛 Latuch Convincer Farley-ET 冷凍精液 007HO06695 配種 6 頭母牛，其中 1 頭為正常型，其餘 5 頭未檢測。公牛 Rauscher Mars 999-Grand-ET 冷凍精液 007HO07858 配種 4 頭母牛，其中 1 頭為正常型，其餘 3 頭未檢測。白圓表正常型母牛；半黑圓表雜合型母牛；點線灰圓表未鑑定之母牛；點線灰方表未鑑定之公牛；半灰圓表依系譜推定為雜合型之母牛；半灰方表依系譜推定為雜合型之公牛。

Fig. 2. Genealogical diagram of 10 identified BS carrier cows and related cows on Farm B. The bull Latuch Convincer Farley-ET (007HO06695) was sire to 6 cows; one cow was tested as BS normal genotype and the others were not tested. The bull Rauscher Mars 999-Grand-ET (007HO07858) was sire to 4 cows; one cow was tested as BS normal genotype and the others were not tested. White circle = normal female; half filled black circle = female BS carrier; dashed gray circle = not tested female; dashed gray square = not tested male; half filled gray circle = presumed female BS carrier based on pedigree analysis; half filled gray square = presumed male BS carrier based on pedigree analysis.

III. 進口乳牛精液 BS 雜合型頻率

檢測 32 劑來自 32 頭公牛之進口冷凍精液 BS 基因結果發現，雜合型頻率為 3.13% (1/32)，其餘皆為正常型。另進一步追蹤系譜顯示，有 12 頭公牛均可追溯血緣至 Sweet Haven Tradition 公牛，其中個體號為 HOUSA000001682485 之公牛所生產冷凍精液 001HO09276 為 BS 雜合型 (頻率 8.33%)；其亦為 Bis-May Tradition Cleitus 公牛之後裔。

綜合言之，為篩除我國乳牛群之遺傳缺陷基因，除應避免攜帶不良基因之種源 (包括活體動物、精液及卵) 進口外，亦須積極進行種源源頭管控，經由篩檢、監控及追蹤，避免經由繁殖配種而散播不良基因於乳牛族群中。

誌 謝

感謝梅桂牧場與林鳳營牧場慷慨與熱心提供試驗樣品與資料，得以完成本研究，謹申謝忱。

參考文獻

行政院農業委員會統計室。2013。農業統計年報。行政院農業委員會。臺北市。Online: <http://agrstat.coa.gov.tw/sdweb/public/book/Book.aspx>。

- 林德育、黃鈺嘉、陳若菁、楊德威、蕭宗法、張秀鑾。2001。臺灣乳牛群之瓜胺酸症檢測。畜產研究 34：279-284。
- 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 31：299-304。
- Agerholm, J. S. and K. Peperkamp. 2007. Familial occurrence of Danish and Dutch cases of the bovine brachyspina syndrome. BMC Vet. Res. 3: 8.
- Agerholm, J. S., F. McEvoy and J. Arnbjerg. 2006. Brachyspina syndrome in a Holstein calf. J. Vet. Diagn. Invest. 18: 418-422.
- Agerholm, J. S., J. DeLay, B. Hicks and M. Fredholm. 2010. First confirmed case of the bovine brachyspina syndrome in Canada. Can. Vet. J. 51: 1349-1350.
- Buck, B. C., R. Ulrich, A. Wöhlke, H. Kuiper, W. Baumgärtner and O. Distl. 2010. Vertebral and multiple organ malformations in a black and white German Holstein calf [Article in German]. Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr. 123(5-6): 251-255. Abstract in English.
- Charlier, C., J. S. Agerholm, W. Coppieters, P. Karlskov-Mortensen, W. Li, G. de Jong, C. Fasquelle, L. Karim, S. Cirera, N. Cambisano, N. Ahariz, E. Mullaart, M. Georges and M. Fredholm. 2012. A deletion in bovine FANCI gene compromises fertility by causing fetal death and brachyspina. PLoS One 7: e43085.
- Fang, L., Y. Li, Y. Zhang, D. Sun, L. Liu, Y. Zhang and S. Zhang. 2013. Identification of brachyspina syndrome carriers in Chinese Holstein cattle. J. Vet. Diagn. Invest. 25: 508-510.
- 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: 853-858.
- SAS. 2012. SAS/STAT User's Guide, Version 9.4. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- Shuster, D. E., M. E. Kehrli, Jr., M. R. Ackermann and R. O. Gilbert. 1992. Identification and prevalence of a genetic defect that causes leukocyte adhesion deficiency in Holstein cattle. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89: 9225-9229.
- Testoni, S., A. Diana, E. Olzi and A. Gentile. 2008. Brachyspina syndrome in two Holstein calves. Vet. J. 177: 144-146.
- VanRaden, P. M., K. M. Olson, D. J. Null and J. L. Hutchison. 2011. Harmful recessive effects on fertility detected by absence of homozygous haplotypes. J. Dairy Sci. 94: 6153-6161.
- Windsor, P. and J. Agerholm. 2009. Inherited diseases of Australian Holstein-Friesian cattle. Aust. Vet. J. 87: 193-199.

The pilot study on genotype screening of brachyspina syndrome on dairy cattle herds in Taiwan ⁽¹⁾

Ren-Bao Liaw ⁽²⁾ Jo-Ching Chen ⁽²⁾ Wen-Cen Chen ⁽²⁾ Shin-Shing Tsay ⁽³⁾
Chin-Shan Huang ⁽³⁾ Jih-Yih Chen ⁽⁴⁾ Tzong-Faa Shiao ⁽³⁾ Kuo-Hua Lee ⁽⁴⁾
Yi-Chang Chou ⁽⁵⁾ Ming-Che Wu ⁽²⁾ and Hsiu-Lan Chang ⁽⁶⁾⁽⁷⁾

Received: Mar. 19, 2015; Accepted: May 22, 2015

Brachyspina syndrome (BS) is inherited autosomal recessively in Holstein cattle, which would result in miscarriage or stillbirth for dairy cows and thus cause unpredictable economic losses to dairy farmers. The purpose of this study is to reveal bovine brachyspina syndrome carriers frequency in dairy cattle population. A total of 441 samples were genotyped, which were 409 blood samples from four dairy farms and 32 frozen bovine semen samples. Thirty-five blood samples and one frozen semen were identified as BS carriers and the others were normal. The frequencies of carriers for blood samples and frozen semen were 8.56 and 3.13%, respectively. Because of high frequency in BS carrier genotype, it implies that the dairy farmers have potential losses due to BS. Therefore, the BS genotypes of bovine frozen semen needs to be under surveillance and ensure no BS carrier calves into dairy cattle population in Taiwan. Thus, it is possible to eliminate gradually the genetic deficiency in the future.

Key words: Brachyspina syndrome, Dairy cattle, Genotyping, Frozen semen.

(1) Contribution No. 2235 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

(2) Breeding and Genetics Division, COA-LRI, Hsinhua, Tainan 71246, Taiwan, R.O.C.

(3) Animal Industry Division, COA-LRI, Hsinhua, Tainan 71246, Taiwan, R.O.C.

(4) Hsin-Chu Branch, COA-LRI, Xihu, Miaoli 36843, Taiwan, R.O.C.

(5) Tainan City Animal Health Inspection and Protection Office, Tainan City Government, Xinying, Tainan 73064, Taiwan, R.O.C.

(6) Department of Animal Science, National Pingtung University of Science & Technology, Pingtung 91201, Taiwan, R.O.C.

(7) Corresponding author, E-mail: hlachang@mail.npust.edu.tw.