

臺灣乳牛群膽固醇缺失症基因檢測⁽¹⁾

廖仁寶⁽²⁾ 陳若菁⁽²⁾ 蔡新興⁽³⁾ 黃金山⁽³⁾ 陳水財⁽⁴⁾ 陳志毅⁽⁵⁾
李國華⁽⁶⁾ 蕭宗法⁽³⁾ 吳明哲⁽²⁾ 張秀鑾⁽⁷⁾⁽⁸⁾

收件日期：106 年 3 月 20 日；接受日期：106 年 4 月 11 日

摘 要

膽固醇缺失症為近來在荷蘭乳牛發現的一種隱性遺傳缺陷，具膽固醇缺失症的仔牛會連續下痢終至死亡，而造成酪農戶的經濟損失。因此，本研究目的在建立與檢測乳牛膽固醇缺失症基因型，藉以瞭解臺灣乳牛群中該基因型頻率，供作酪農選配參考。逢機採樣 6 家荷蘭乳牛場母牛計 539 頭樣品進行檢測，結果顯示，雜合型頻率 1.86% (10/539)，其餘樣品皆為正常型；顯示膽固醇缺失症基因已藉由進口冷凍精液進入臺灣荷蘭乳牛群中，基因頻率雖低於 2%，但仍有必要嚴密監控，以防止此一不良基因經由進口冷凍精液持續進入我國乳牛族群，損害酪農產業收益。

關鍵詞：膽固醇缺失症、乳牛、冷凍精液、基因型鑑定。

緒 言

荷蘭牛常見與繁殖性狀相關的遺傳缺陷有淋巴球黏力缺失症 (bovine leukocyte adhesion deficiency, BLAD)、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, CITL) (Windsor and Agerholm, 2009; VanRaden *et al.*, 2011)，其中單譜症與瓜胺酸症出現在荷蘭牛群的頻率已相當低 (Robinson *et al.*, 1993; 黃等, 1998; 林等, 2001)。近來發現一種與脂肪代謝異常相關的隱性遺傳缺陷，稱為膽固醇缺失症 (cholesterol deficiency, CD)，有病型仔牛在出生後不久便發生自發性的連續下痢，大部分在數天或數月後死亡 (Kipp *et al.*, 2015)。Kipp *et al.* (2015) 利用 GWAS (genome-wide association study) 與同合子基因定位 (homozygosity mapping) 技術，發現與 CD 相關的基因位於牛第 11 號染色體上。Menzi *et al.* (2016) 進一步應用次世代定序技術，發現該染色體上的 APOB (apolipoprotein-B) 基因的 exon5 有 1.3 kb 長的跳躍子 (transposable element) 插入而引發正常蛋白質縮短，並造成功能異常。經由系譜追查與基因檢測，發現公牛 Maughlin Storm (NAAB: 073HO02012; HOCAN000005457798) 為可能攜帶 CD 基因的始祖 (VanRaden and Null, 2015; Menzi *et al.*, 2016; Schütz *et al.*, 2016)。

CD 為一種無法治療的遺傳疾病，有病型乳牛無法正常吸收飼糧中的脂質，其血液中總膽固醇 (total cholesterol, TC)、游離膽固醇 (free cholesterol, FC)、高密度脂蛋白質膽固醇 (high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C)、低密度脂蛋白質膽固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、極低密度脂蛋白質膽固醇 (very low density lipoprotein cholesterol, VLDL-C)、三酸甘油酯 (triacylglycerides, TAG) 及磷脂質 (phospholipids, PL) 顯著低於純合正常型者。由於 CD 造成肝脂肪代謝、類固醇合成及細胞膜功能異常，進而影響乳牛健康、生長及繁殖性狀 (Gross *et al.*, 2016)。Mock *et al.* (2016) 指出 6 頭有病 CD 純合型的牛隻有發展遲緩、體重過輕、間歇性腹瀉、低膽固醇血症與低三酸甘油酯症狀，而病理表徵則會出現脂肪癩與小腸上皮細胞胞質內脂質空泡；經系譜追蹤發現這些牛隻均具公牛 Maughlin Storm 血緣。

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 2558 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技術服務組。

(5) 行政院農業委員會畜產試驗所宜蘭分所。

(6) 行政院農業委員會畜產試驗所新竹分所。

(7) 國立屏東科技大學動物科學與畜產系。

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

依行政院農業委員會統計顯示，104 年我國在養荷蘭牛約 13.2 萬頭，其中泌乳牛約 6.2 萬頭，年產乳量約 37.5 萬公噸，產值約達 98.3 億元（農業統計年報行政院農業委員會統計室，2015）。基於培育我國優質種乳牛與提升生產效益，除須瞭解我國乳牛族群重要遺傳缺陷基因頻率分布與來源外，亦須監控與避免引進攜帶遺傳缺陷的種原，尤其是進口冷凍精液管控制我國乳牛群產能與生產效益更為重要。CD 為影響酪農產業發展的一種重要遺傳缺陷，故本研究旨在建立乳牛 CD 基因型篩檢平臺，並實際應用於民間荷蘭牛遺傳篩檢，瞭解與評估臺灣乳牛族群 CD 基因型頻率分布，俾供酪農選配參考。

材料與方法

I. 試驗動物血液與毛氈樣品

以電腦亂數方式挑選全臺灣北、中、南部乳牛場，並電話詢問牧場負責人對乳牛基因檢測之意願，結果有 6 家乳牛場（北部 2 家、中部 1 家及南部 3 家）願意參加基因檢測計畫，並分別隨機取得 113、61、16、92、112 及 145 頭荷蘭牛血液或尾根毛氈樣品，共計 539 頭。當樣品為血液時，則應用 DNA 萃取套組 (DNA Isolation Kit for Mammalian Blood, Roche, Germany)，參照與修改所提供的方法進行血樣 DNA 萃取，並依離心沉澱物 (pellet) 大小，加入適量溶離緩衝液 (elution buffer)，進行溶解；當樣品為尾根毛氈時，則參考應用 DNeasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen, Germany) 開發之 DNA 萃取方法 (<https://www.qiagen.com/it/resources/resourcedetail?id=a5a065dc-e287-4a61-b917-9792e25ab42f&lang=en>)，進行毛氈 DNA 萃取，隨後以 35 μ L 溶離緩衝液進行溶離。

II. PCR 反應

參照 Menzi *et al.* (2016) 研究，進行 CD 基因型鑑別較佳條件測試。使用引子有三種，分別為針對正常型的正向引子 BCDF1: 5'-GGTGACCATCCTCTCTCT GC-3' 與反向引子 BCDR: 5'-AGTGGAACCCAGCTCCATTA-3'；以及針對突變型的正向引子 BCDF2: 5'-CACCTTCCGCTATTTCGAGAG -3'。PCR 反應組成分為 20 – 50 ng 模板 DNA、2.5 nmol dNTP、5 pmol 每個引子、1 \times 反應緩衝液及 0.5 U (單位) *Taq* 聚合酶 (TaKaRa Bio Inc., Japan)，反應總體積為 15 μ L。梯度 PCR 反應條件：第一步變性，94°C、5 min；第二步循環增幅 35 次，94°C、30 s，55 – 65°C、30 s，72°C、30 s；第三步延長，72°C、10 min。依據梯度 PCR 反應結果選定較佳條件為：第一步變性，94°C、5 min；第二步循環增幅 35 次，94°C、30 s，60°C、30 s，72°C、30 s；第三步延長，72°C、10 min。

III. 基因型判別

取 5 μ L PCR 產物與 1 μ L 載入染劑 (loading dye) 混合均勻後，進行 1.5% 瓊脂膠體電泳分析。電泳後，利用 SYBR safe (Invitrogen, USA) 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, AlphaInnotech, USA)。電泳圖片顯示，CD 基因型的標的片段有 249 bp 與 436 bp 兩條泳帶；其中正常純合基因型牛隻僅具 249 bp 片段，有病純合基因型者僅具 436 bp 片段，而雜合型個體則同時具 249 bp 與 436 bp 兩個泳帶片段。

IV. DNA 片段定序

將電泳膠片上 249 bp 與 436 bp 泳帶片段，分別切割取下，進行 DNA 溶離回收 (Clean/gel Extraction kit, Biokit, Taiwan)。以定序試劑 BigDye Terminator V3.1 (Applied Biosystems, USA) 進行定序反應，並以 BCDR 為定序引子，增幅後之產物經純化步驟，再以 DNA 自動定序儀 (ABI3730 DNA Analyzer, Applied Biosystems, USA) 解序後，應用序列分析軟體 (Sequencing Analysis Software v5.4, Applied Biosystems, USA) 進行分析。最後將解序與分析所得 DNA 序列上傳至 NCBI 網頁 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)，以 BLASTn 程式 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 進行與資料庫比對分析。

結果與討論

I. 牛隻 CD 基因型鑑定較佳反應條件與篩檢平臺建立

Menzi *et al.* (2016) 研究報告未提及 PCR 反應組成分與溫度設定條件，故在檢測平臺設定前，必須先確立 PCR 反應組成分與溫度條件。因 PCR 產物大小在 450 bp 以下，故在循環增幅之變性、黏合及延長各階段溫度停留時間僅需 30 s 即可，而較佳黏合溫度之取得，則以拉梯度方式由 55 – 65°C 進行測試。黏合溫度測試結果如圖 1

所示，無論正常型 (圖 1A) 或雜合型 (圖 1B) 樣品，應用 55 – 65°C 條件，皆可獲得相關基因型的正確 DNA 片段圖譜。同時，Kamiński and Ruś (2016) 試驗指出 PCR 條件為：第一步變性，94°C、3 min；第二步循環增幅 35 次，94°C、30 s，60°C、30 s，72°C、30 s；第三步延長，72°C、5 min。因此，基於本研究圖 1 結果，設定 CD 基因檢測之反應條件為黏合溫度 60°C、時間 30 s；而反應總體積為 15 μ L，包含 20 – 50 ng 模板 DNA、2.5 nmol dNTP、每個引子 5 pmol、1 \times 反應緩衝液及 0.5 U *Taq* 聚合酶。應用上述設定條件，進行正常型或雜合型樣品檢測，結果如圖 2 所示，本研究檢測法所需使用試劑量，較 Kamiński and Ruś (2016) 檢測法少，故可降低樣品檢測成本，且所得 PCR 產物電泳圖像可明確鑑別正常型與雜合型。

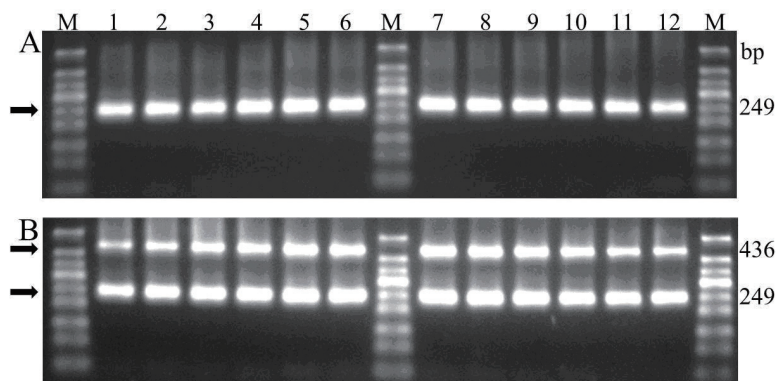


圖 1. CD 基因型較佳檢測條件測試結果。A：CD 正常型。B：CD 雜合型。Lanes 1 – 12：黏合溫度梯度 PCR 產物片段，溫度依序為 55.0、55.5、56.0、57.0、58.2、59.4、60.6、61.8、63.0、64.0、64.5 及 65.0°C，Lane M：50 bp DNA 大小標梯 (50 – 450 bp)。箭頭所指處分別為 249 bp 與 436 bp 片段。

Fig. 1. Optimized conditions for identification of CD genotypes. A: CD normal genotyping; B: CD carrier genotyping. Lane M: 50 bp DNA ladders (50–450 bp); Lanes 1-12: PCR annealing temperature gradient from 55–65 °C as follows: 55.0, 55.5, 56.0, 57.0, 58.2, 59.4, 60.6, 61.8, 63.0, 64.0, 64.5, and 65.0 °C for each well. Arrows indicate the target bands of 249 bp and 436 bp, respectively.

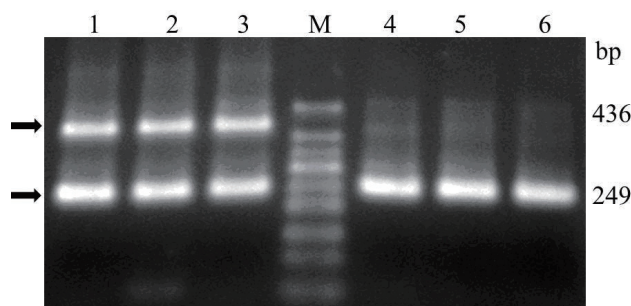


圖 2. CD 基因型之鑑別。Lanes 1 – 3：CD 雜合型，Lanes 4 – 6：CD 正常型。Lane M：50 bp DNA 大小標梯 (50 – 450 bp)。箭頭所指處分別為 249 bp 與 436 bp 片段。

Fig. 2. Identification of CD genotypes. Lanes 1-3: Normal samples; Lanes 4-6: Carrier samples; Lane M: 50 bp DNA ladders (50-450 bp). Arrows indicate the target bands of 249 bp and 436 bp, respectively.

II. CD 基因型 DNA 片段序列確認

將 PCR 增幅所得 249 bp 與 436 bp 兩 DNA 片段進行回收純化與定序，並將兩片段分析後之序列，應用 NCBI 網站 BLAST 工具進行資料庫比對顯示，該兩片段皆屬於 APOB 基因之部分序列 (圖 3)，故可確認本研究 PCR 增幅標的正確性與證實本檢測法的有效性。進一步將前述兩片段序列與 Menzi *et al.* (2016) 的結果進行比對，結果發現本研究鑑別之兩種不同基因型 (正常型與突變型) 之對偶基因 DNA 序列和分界點，與前者研究結果一致。

III. 乳牛場 CD 雜合型頻率

6 家乳牛場母牛樣品之 CD 基因型檢測結果如表 1 所示，發現 A 場有 2 頭為雜合型，頻率為 1.77%；B 場有 4 頭雜合型，頻率為 6.56%；C 場有 1 頭為雜合型，頻率為 6.25%；E 場則有 3 頭為雜合型，頻率為 2.68%；然 D 與 F 場檢測牛隻皆為正常型。整體而言，檢測 539 頭乳牛中，有 10 頭為雜合型，平均頻率為 1.86%。Kamiński and Ruś (2016) 檢測波蘭 27 頭荷蘭公牛，結果發現有 9 頭為雜合型，頻率高達 33.33%；Gross *et al.*

(2016) 檢測瑞士 254 頭成年荷蘭公牛，則發現有 36 頭為雜合型，頻率為 14.17%。Kipp *et al.* (2016) 指出，在 2012 年 APOB 基因單套型與雜合型最大頻率分別為 6.35% 與 12.25%，但在 2016 年時，兩者的頻率分別降低為 4.2 與 7.87%。當本研究之檢測結果與上述研究報告比較時，可發現國內 CD 雜合型頻率遠低於國外者。

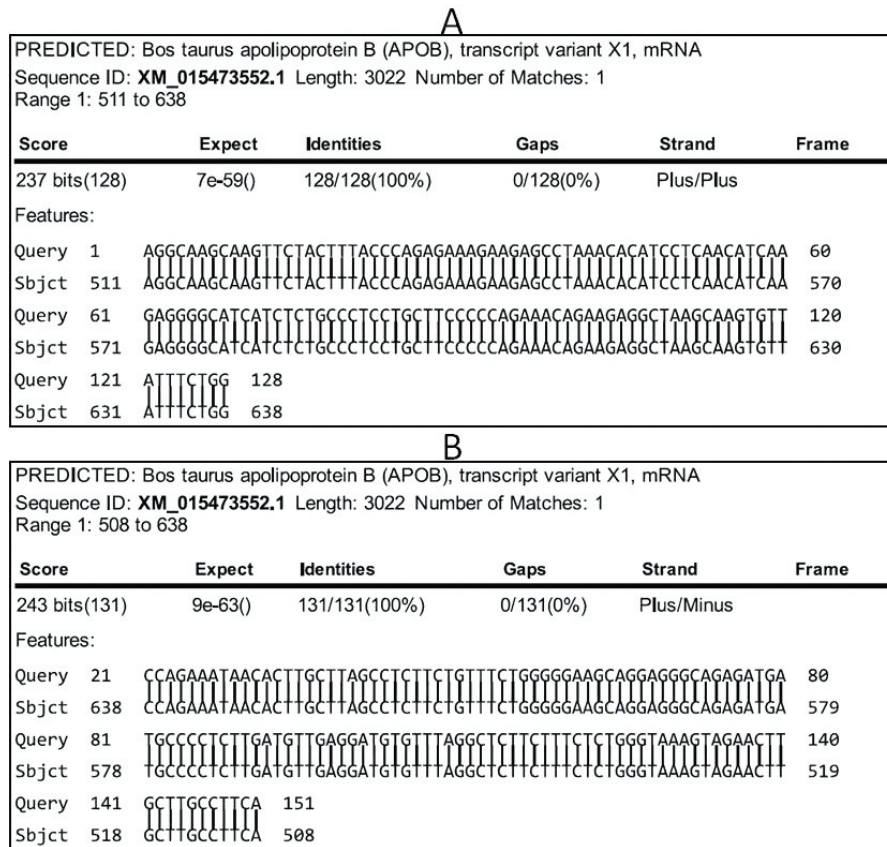


圖 3. CD 基因型之兩種 DNA 片段序列比對結果。

A：正常型對偶基因 (249 bp) 片段定序序列比對結果，B：突變型對偶基因 (436 bp) 片段定序序列比對。

Fig. 3. DNA sequence alignment of two target fragments from CD genotyping.

A: The alignment of normal alleles (249-bp fragment); B: The alignment of mutant alleles (436-bp fragment).

表 1. 本試驗乳牛膽固醇缺乏症基因型頻率

Table 1. Frequency of cholesterol deficiency genotype on six dairy cattle herds in this study

Herd	No. of cattle genotyped	CD genotype			Frequency of carrier (%)
		Normal	Carrier	Affected	
A	113	111	2	0	1.77
B	61	57	4	0	6.56
C	16	15	1	0	6.25
D	92	92	0	0	0
E	112	109	3	0	2.68
F	145	145	0	0	0
Total	539	529	10	0	1.86

追蹤本研究 10 頭 CD 雜合型母牛血緣發現，五頭可查得明確系譜資料；其中四頭母牛分別為公牛 Braedale Freeman (200HO03070, HOCAN000006906786)、Braedale Goldwyn (200HO03205, HOCAN000010705608) (2 頭) 及 Morningview Allstar-ET (007HO08778, HOUSA000136169884) 之後代，進一步利用臺灣乳牛雲端資訊服務網 (<http://www.tlrhc.gov.tw/>) 之公牛遺傳性能資訊查詢系統 (陳及李, 2015)，追查此三頭冷凍精液公牛的四代系譜資料顯示，Braedale Freeman 之雄親、Braedale Goldwyn 之外祖父及 Morningview Allstar-ET 之祖父皆為 Maughlin Storm；而另一頭 CD 雜合型母牛的外祖父即為 Maughlin Storm。因此，五頭 CD 雜合型母牛皆為公牛

Maughlin Storm 後裔，故本研究結果與文獻推測公牛 Maughlin Storm 為 CD 遺傳缺陷基因攜帶者之結果一致。

綜合言之，荷蘭牛為我國酪農業最重要的乳牛品種，且不時從中發現新的遺傳缺陷。因此，為有效提升我國酪農產業收益，應從遺傳育種源頭採行必要措施，除需有效監控與全力篩除我國荷蘭母牛群之遺傳缺陷基因外；更應禁止攜帶不良基因之種原進口，不論活體動物、冷凍精液或冷凍胚，方可杜絕經由繁殖配種而散播不良基因於我國優質種乳牛群。

誌 謝

承蒙行政院農業委員會經費支持 (105 農科 -2.5.1- 畜 -L1)，並感謝 6 家乳牛場慷慨與熱心提供試驗樣品與相關資料，使得本研究得以順利完成，謹申謝忱。

參考文獻

- 行政院農業委員會統計室。2015。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。
- 陳志毅、李國華。2015。國際乳用種公牛遺傳評估查詢系統 (SIGB) 之建置 I. 優質種公牛性能資訊查詢模組。畜產研究 48：224-233。
- 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。
- Gross, J. J., A. C. Schwinn, F. Schmitz-Hsu, F. Menzi, C. Drögemüller, C. Albrecht and R. M. Bruckmaier. 2016. Rapid Communication: Cholesterol deficiency-associated APOB mutation impacts lipid metabolism in Holstein calves and breeding bulls. *J. Anim. Sci.* 94: 1761-1766.
- Kamiński, S. and A. Ruś. 2016. Cholesterol deficiency-new genetic defect transmitted to Polish Holstein-Friesian cattle. *Pol. J. Vet. Sci.* 19: 885-887.
- Kipp, S., D. Segelke and S. Schierenbeck. 2015. A new Holstein haplotype affecting calf survival. *Proceedings of the 2015 Interbull Meeting, July 09-12, 2015, Orlando, Florida, USA. Interbull Bulletin* 49: 49-53.
- Kipp, S., D. Segelke, S. Schierenbeck, F. Reinhardt, R. Reents, C. Wurmser, H. Pausch, R. Fries, G. Thaller, J. Tetens, J. Pott, D. Haas, B. B. Raddatz, M. Hewicker-Trautwein, I. Proios, M. Schmicke and W. Grünberg. 2016. Identification of a haplotype associated with cholesterol deficiency and increased juvenile mortality in Holstein cattle. *J. Dairy Sci.* 99: 8915-8931.
- Menzi, F., N. Besuchet-Schmutz, M. Fragnière, S. Hofstetter, V. Jagannathan, T. Mock, A. Raemy, E. Studer, K. Mehinagic, N. Regenscheit, M. Meylan, F. Schmitz-Hsu and C. Drögemüller. 2016. A transposable element insertion in APOB causes cholesterol deficiency in Holstein cattle. *Anim. Genet.* 47: 253-257.
- Mock, T., K. Mehinagic, F. Menzi, E. Studer, A. Oevermann, M. H. Stoffel, C. Drögemüller, M. Meylan and N. Regenscheit. 2016. Clinicopathological phenotype of autosomal recessive cholesterol deficiency in Holstein cattle. *J. Vet. Intern. Med.* 30: 1369-1375.
- 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.
- Schütz, E., C. Wehrhahn, M. Wanjek, R. Bortfeld, W. E. Wemheuer, J. Beck and B. Brenig. 2016. The Holstein Friesian lethal haplotype 5 (HH5) results from a complete deletion of TBF1M and cholesterol deficiency (CDH) from an ERV-(LTR) insertion into the coding region of APOB. *PLoS ONE* 11: e0154602.
- 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.
- VanRaden, P. M. and D. J. Null. 2015. Holstein haplotype for cholesterol deficiency (HCD). Website of US Council of Dairy Cattle Breeding. <https://www.cdcb.us/reference/changes/HCD-inheritance.pdf>.
- Windsor, P. and J. Agerholm. 2009. Inherited diseases of Australian Holstein-Friesian cattle. *Aust. Vet. J.* 87: 193-199.

Genotype screening on cholesterol deficiency of dairy cattle herds in Taiwan ⁽¹⁾

Ren-Bao Liaw ⁽²⁾ Jo-Ching Chen ⁽²⁾ Shin-Shing Tsay ⁽³⁾ Chin-Shan Huang ⁽³⁾ Shui-Tsai Chen ⁽⁴⁾
Jih-Yih Chen ⁽⁵⁾ Kuo-Hua Lee ⁽⁶⁾ Tzong-Faa Shiao ⁽³⁾ Ming-Che Wu ⁽²⁾ and Hsiu-Luan Chang ⁽⁷⁾⁽⁸⁾

Received: Mar. 20, 2017; Accepted: Apr. 11, 2017

Abstract

Cholesterol deficiency (CD) is an inherited autosomal recessive defect and has been identified recently in Holstein cattle, which results in idiopathic diarrhea to death of calves, and thus causes unpredictable economic losses to dairy farmers. The purpose of this study was to optimize the genotyping protocol and survey bovine cholesterol deficiency carrier frequency in Taiwan dairy cattle populations, and thereby offered a low risk and basic mating strategy for dairy farmers. A total of 539 cow samples from 6 dairy herds were genotyped. Ten samples were genotyped as CD carriers, which accounts for 1.86% (10/539) in terms of frequency, and the others were normal. Although the carrier frequency was low (< 2%) compared to those in other countries, CD unfavorable allele was indeed introduced to Taiwan's cattle populations by artificial insemination. Pedigree analysis suggested that the frozen semen products were originated from the decedents of Maughlin Storm bull and/or due to imported adult cows. The CD genotypes of bovine frozen semen products need further surveillance to ensure no CD carrier calves born in Taiwan, and thus, the loss of dairy industry due to CD defect can be avoided.

Key words: Cholesterol deficiency, Dairy cattle, Frozen semen, Genotyping.

(1) Contribution No. 2558 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) Technology Service Division, COA-LRI, Hsinhua, Tainan 71246, Taiwan, R.O.C.

(5) Ilan Branch, COA-LRI, Wu-Chieh, Ilan 26846, Taiwan, R.O.C.

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

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

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