

應用聚合 鏈鎖反應技術與限制 切割多型性檢測緊迫敏感豬

陳銘正 林佳靜 李盈漢 吳伊倫 李易儒 林瑞毓 張俊達 王祥宇

國立宜蘭技術學院 畜產系

摘要

本試驗之目的乃建立聚合 鏈鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)與限制 切割多型性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)技術, 檢測豬鈣離子釋放管道(calcium release channel, CRC)基因是否突變, 俾快速鑑定豬緊迫敏感徵候群(porcine stress syndrome, PSS)基因。豬血液與精液樣品萃取之基因組 DNA(genomic DNA, gDNA)做為 PCR 之模板, 以 CRC 基因之 1614-1633 鹼基序列為上游引子, 另以 1957-1976 鹼基序列之互補序列為下游引子, 經聚合 鏈鎖反應後得 363 鹼基對(base pair, bp)之 DNA 片段。以 *Hha* I 限制 切割此片段, 經電泳後可由限制 分切片段區分緊迫敏感基因為純合子或雜合子。正常純合子、雜合子、PSS 純合子三者之 DNA 片段長度組合分別為(231, 132 bp)、(363, 231, 132 bp)與(363 bp)。採樣分析宜蘭某豬場豬隻 CRC 遺傳型, 發現正常純合子、雜合子與 PSS 純合子之豬隻分別佔 60 %、35 %與 5 %, 估計緊迫敏感基因頻率為 22.5 %。應用 PCR 技術可以快速判定 PSS 豬隻, 且可準確分辨基因型為雜合子或純合子。

關鍵詞：聚合 鏈鎖反應、鈣離子釋放管道、豬緊迫敏感徵候群

The Use of Polymerase Chain Reaction and Restriction Fragment Length Polymorphism to Detect the Gene for Porcine Stress Syndrome

Ming-Cheng Chen Chai-Ching Lin Yieng-Han Lee Yi-
Luen Wu Yi-Ru Lee Ruei-Yu Lin Chiun-Da Chan
Hsiang-Yu Wang

Department of Animal Science
National Ilan Institute of Technology

Abstract

Pigs with mutated CRC gene have genetic disorder which can result in porcine stress syndrome (PSS). The purpose of this study was to establish polymerase chain reaction (PCR) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) techniques for detecting mutation of calcium release channel (CRC) gene among pigs. All genomic DNA extracted from pig blood and semen samples were provided as PCR templates. The forward primer used in PCR amplification was corresponding to nucleotides 1614 to 1633, whereas the reverse primer was complementary to nucleotides 1957 to 1976 of CRC gene. A 363-bp nucleotide fragment was amplified by PCR method. Being restricted with *Hha* I and gel electrophoresis, the CRC genotypes of pigs were determined by their DNA fragment patterns. The fragment length consisted of (231, 132 bp), (363, 231, 132 bp) and (363 bp) represented normal homozygous,

heterozygous and PSS homozygous genotypes, respectively. By analyzing CRC genotypes of pigs sampled from one of the farms located in I-Lan, it was found that there were 60 %, 35 % and 5 % of pigs determined to be normal homozygous, heterozygous and PSS homozygous genotypes. The PSS gene frequency was 22.5 %. The PCR method for amplifying CRC gene could be used for rapidly detecting the PSS and distinguishing heterozygous from homozygous genotype of normal pigs.

Key words: Polymerase chain reaction, Calcium release channel, Porcine stress syndrome

一、前言

豬緊迫敏感綜合徵候群已被證實為一種遺傳疾病，受緊迫敏感基因的影響[1]。緊迫敏感基因影響豬隻生長、繁殖及屠體品質等性狀之表現[2]。緊迫敏感豬比非緊迫敏感豬更容易受到緊迫而死亡，窩仔數減少，與生長緩慢，肉豬屠宰後產生肌肉灰白色、質地鬆軟、有滲出液的水樣肉(pale, soft, exudative meat, PSE)，造成養豬業及肉品加工業重大的經濟損失。

PSS 豬也並非沒有優點，它在生長性能方面有較佳的飼料效率和飼料換肉率[2]。屠體方面，有較高的瘦肉量及較大的腰眼面積[2]。為減少 PSS 引起的損失必須清除豬群中 PSS 基因。與之相反者，為了改善飼料效率與增加瘦肉量，卻傾向把 PSS 基因選留在豬群中，此兩者如何取捨端賴育種決策，唯最重要者乃先能建立準確辨別種豬 PSS 遺傳型之技術。以鹵乙烷測定(halothane test)可以誘導 PSS 敏感豬產生緊迫症狀，受測豬隻吸入 3%鹵乙烷氣體 3 分鐘內四肢產生僵直現象者，判定為緊迫敏感豬[3]。但並非全部 PSS 純合子型豬均對鹵乙烷產生反應，Webb and Tordan (1978)之研究指出，有 3%純合子豬隻對鹵乙烷不敏感。無法以鹵乙烷測定檢出[4]。又緊迫基因為隱性遺傳，雜合型(AB)與正常純合子(AA)豬隻均對鹵乙烷無反應，因此兩者無法被鹵乙烷測定區分之。尤有甚者，鹵乙烷測定所用之儀器，在各現場操作之準確性不一，反應判定時不同人員主觀看法互有差異，操作耗費人力等，更增加篩檢緊迫敏感豬之困難。

最近 PSS 已被證實係鈣離子釋放管道基因產生突變所致，即第 1843 鹼基由 C 突變為 T(圖 1)，逐致轉譯出之蛋白質，在第 615 個胺基酸由精胺酸 (arginine) 轉變為半胱胺酸(cysteine)[5]，此種基因之點突變，使吾人有機會應用聚合鏈鎖反應配合限制切割多型性檢測之。

PCR 是應用人工方法將一段模板 DNA，藉耐熱性 DNA 聚合酶之聚合作用，經由重複循環的模板 DNA 變性(denaturing)，引子(primer)煉合(annealing)與 DNA 聚合酶之延長(extention)複製，將鵝的 DNA 片段以指數般速度累積，經 20 個循環，即可得到百萬倍產物。

本試驗之目的，嘗試在本校建立聚合鏈鎖反應與限制切割多型性技術，快速鑑定豬是否具有緊迫敏感基因；並應用此等技術分析種豬場豬隻 PSS 基因頻率，俾預測豬群具緊迫敏感綜合徵候群之比例。

1

2

二、材料與方法

3 (一) 基因組 DNA 之萃取

4 1、自全血中萃取 DNA

5 將 2 ml 含 EDTA 抗凝劑之全血以 3000 rpm 離心 10 分鐘，取出含白血球層之 buffy
6 coat，以 0.9 % NaCl 洗滌 2 次之後，加入 1 ml TNE 溶液(10 mM Tris-Cl, pH 8.0 ;
7 150 mM NaCl;10 mM EDTA)，再加入 10 % SDS(最終濃度 0.5 %)與 10 mg/ml 蛋白
8 (proteinase K, 最終濃度 100 µg/ml)，置於 55 °C 水浴槽隔夜培養。以酚、酚/氯
9 仿及氯仿各萃取一次，俾變性去除溶液中之蛋白質。然後加入等量異丙醇
10 (isopropanol)混合，以 12000 rpm 離心 15 分鐘後，俾將 DNA 沉澱，再以 70%酒精及
11 純酒精各洗一次。最後將此 DNA 溶於 500 µl 之 TE 溶液(10 mM Tris-Cl, pH 8.0 ;
12 1 mM EDTA)中，置於 55 °C 水浴槽 12-16 小時，使 DNA 完全溶解。

13 2、自精液中萃取 DNA

14 依照 Anderson *et al.*(1986)所述方法[6]，首先將 1 ml 含 10⁸精子精液離心，去除
15 精漿，再懸浮於 200 µl 含 2 % 2-mercaptoethanol、10 mM Tris(pH8.0)、100 mM
16 NaCl、10 mM EDTA(pH8.0)與 0.5 % SDS 之溶液中，置於 50 °C 下培養 30 分鐘後，添
17 加 proteinase K(最終濃度 200 µg/ml)，繼續作用 2 小時後，即可應用酚與氯仿進
18 行 DNA 萃取，最後將 DNA 沈澱，溶於 TE 溶液中備用。

19 (二) DNA 濃度測定

20 取樣品中之 DNA 30 µl 加上 TE 溶液 570 µl 充分混合，以紫外光光電比色計測 A260
21 及 A280 吸光值與比值，並以 1 OD=50 µg/ml 換算樣品 DNA 濃度。

22 (三) 洋菜膠(agarose gel)電泳

23 萃取之基因組 DNA，加入十分之一體積之 loading dye(0.25 % bromophenol blue ,
24 20 % Ficoll 400 , 0.1 mM EDTA , 1 % SDS)，混勻後置入以 TAE 緩衝液(40 mM
25 Tris-acetate , 2mM EDTA)配製成 0.8 %洋菜膠中，在電壓為 100V 之條件下進行電泳，
26 30 分鐘後將膠體置於溴乙錠(ethidium bromide, EthBr)溶液中染色，在 UV 箱中觀
27 察 DNA 之完整性。

28 (四) 聚合 鏈鎖反應複製 CRC 基因片段

29 前述血液或精液樣品 DNA 100 ng 為模板，依鄭(1997)所述[7]，設計 CRC 基因之

1 1614-1633 鹼基序列為上游引子，另以 1957-1976 鹼基序列之互補序列為下游引子，
2 引子濃度分別為 0.5 μ M；進行 PCR 時，溶液中並含有 200 μ M dNTP 1 μ l (2U) BerTaq
3 polymerase(伯昂，台北)、1.5 mM $MgCl_2$ 、10 mM Tris-Cl、與 50 mM KCl，反應最終
4 容積為 50 μ l。PCR 係在 DNA 熱循環器(PE2400，Perkin Elmer Cetus)內進行，先
5 以 95 進行 5 分鐘，使 DNA 變性為單股，之後進行 35 個循環之 DNA 複製，每個循環
6 包括 95、60 與 72 各 1 分鐘，分別進行 DNA 變性，引子煉合與 DNA 增長，最後
7 以 72 持續 5 分鐘，俾完成 DNA 之增長。反應物之 PCR 產物則應用 2%之洋菜膠進行
8 電泳，確認複製 DNA 之長度為 363 bp。

9 (五) 限制 切割多型性分析 CRC 基因

10 取 16 μ l PCR 產物，分別以 1.5U 之 *Hha* I 或 *BsiHKA* I 限制 加以切割；*Hha* I 限
11 制 係於 37 恆溫箱內作用 2 小時，*BsiHKA* I 限制 則於 65 水浴作用 3 小時以
12 上。限制 反應後之產物以 2%洋菜膠電泳分析，確認 CRC 基因之遺傳型(genotype)。

13 (六) 緊迫敏感基因遺傳型頻率與基因頻率之估算

14 檢測某種豬場種豬 60 頭，依照 PCR 與限制 切割多型性確認個別豬隻緊迫敏感基因
15 之遺傳型(AA、AB 與 BB)比例，並依照馬(1971)所述方法估算其基因頻率[8]。

17 三、結果與討論

18 由血液中萃取之基因組 DNA 經洋菜膠電泳分析如圖 2 所示，所有基因組 DNA 在 23 kb
19 位置都有濃厚之紋帶，顯然經由分離白血球 DNA，可以獲得完整之 gDNA。圖 3 所示為由
20 精液中萃取之 gDNA 電泳圖，大多數均可獲得完整之 DNA，唯部份樣品(如 2 號樣品)，在
21 萃取過程中 DNA 斷裂，因此在電泳中可看到 4 到 23 kb 長短不等之片段，逐致形成模糊
22 現象，雖然對後續 PCR 分析未造成影響，但本萃取方法仍需進一步改進，俾獲更完整之
23 gDNA。圖 4 所示者為 PSS 純合子、雜合子、與正常純合子豬隻 gDNA，經 PCR 與 *Hha* I 及
24 *BsiHKA* I 限制 切割之電泳結果。CRC 基因經 PCR 複製後均可產生 363bp 片段，當應用
25 *Hha* I 限制 切割後，正常純合子豬之 CRC 基因第 1843 鹼基位置可被切割，形成 231 及
26 132 bp 兩段 DNA；若為緊迫敏感純合子豬，其 1843 鹼基位置由 C 突變為 T，*Hha* I 限制
27 無法切割，遂仍保持一 363 bp 片段；若僅一對偶基因突變，即雜合子，則在 363、231、
28 與 132 bp 各有 DNA 片段。與之相反者，*BsiHKA* I 限制 恰可切割突變位置，因此 PSS
29 純合子、雜合子與正常純合子之 DNA 片段組合分別為(233、130 bp)、(363、233、130 bp)

1 與(363 bp)。在圖 4 中未能清楚顯示 130 bp 或 132 bp 之 DNA 片段，乃本試驗所用之照
2 相系統解析度不足所致，惟實際將電泳膠置於 UV 箱上，以肉眼目視足可清楚看出該片段
3 之有無，因此藉由此兩種限制 切割之多型性，均可以分辨豬隻是否帶有緊迫敏感基因。

4 檢查宜蘭縣某豬場 60 頭種豬之緊迫敏感基因，經 PCR 與 *Hha* I 切割，部份結果如
5 圖 5 所示，樣品 1、2、3 在 363、231、132 bp 位置各有一 DNA 片段，應係複製之 CRC
6 基因中，部份無法被 *Hha* I 切割所致，因此判斷為雜合子，遺傳型為 AB；樣品 4 僅在 363
7 bp 位置有 DNA 片段，顯然經 PCR 複製之 DNA，不為 *Hha* I 切割，其 CRC 兩個對偶基因第
8 1843 位置之核 酸均已由 C 改變為 T，致第 1842 至 1845 之鹼基序列為 GTGC，不為 *Hha* I
9 所認，無法被切割，因此應判斷為緊迫敏感基因純合子，遺傳型為 AB；樣品 5、6 在 231
10 與 132 bp 各有一 DNA 片段，原有之 PCR 產物 363 bp 之 DNA 片段已不見，乃兩對偶 CRC
11 基因之第 1842 至 1845 鹼基序列仍維持為 GCGC，可以被 *Hha* I 限制 所切割，因此為正
12 常純合子，遺傳型為 AA。綜合 60 頭種豬緊迫敏感基因檢查結果，緊迫敏感症之遺傳型
13 為純合子之 AA 與 BB 型分別為 60 % (36 / 60) 與 5 % (3 / 60)，雜合子之 AB 型為 35 %
14 (21 / 60) ，B 之基因頻率為 22.5 %，依哈溫定律(Hardy-Weinberg law)估算，若本豬
15 場對緊迫敏感基因未加以選拔，則遺傳型頻率與緊迫敏感基因頻率將達平衡狀態，即每
16 百頭豬隻中，將有 5 頭純合子 BB 型豬有機會產生緊迫敏感症狀；若以鹵乙烷測定，完全
17 淘汰 BB 型者，則前三代豬群 B 之基因頻率將分別降為 18.42 %、15.55 % 與 13.46 % ，
18 遂致 BB 之遺傳型頻率分別降至為 3.39 %、2.42 % 與 1.81%。欲將 B 基因頻率由 20 %
19 降至 10 %，需選拔 5.7 世代方可完成；持續進行多代選拔，仍無法將 B 基因自豬群中
20 完全清除。但以 PCR 技術檢定 PSS 基因，並完全淘汰具有 B 基因之種豬(AB 與 BB)，則經
21 配種產生之下一代豬隻，將不再具有 B 基因，完全為 AA 型，B 基因頻率可在 1 個世代內
22 由 22.5 % 降至 0 %。

23 24 四、結 論

25 本試驗應用聚合 鏈鎖反應方法，配合限制 切割多型性，檢測豬鈣離子釋放管道
26 基因第 1843 鹼基是否發生點突變，可輕易分辨豬隻為緊迫敏感豬(BB)，並可準確地從鹵
27 乙烷測定陰性反應豬中區分正常純合型豬(AA)與雜合型豬(AB)。

五、參考文獻

1. Harbitz, I., B. Chowdhary, P. D. Thomsen, W. Davies, U. Kaufmann, S. Kran, I. Gustavsson, K. Christensen and J.G. Hauge (1990), "Assignment of the porcine calcium release channel gene, a candidate for the malignant hyperthermia locus to the 6p11-q21 segment of chromosome 6", *Genomics*, Vol.8, pp.243-248.
2. Simpson, S.P. and A.J. Webb (1989), "Growth and carcass performance of British Landrace pigs heterozygous at the halothane locus." *Anim. Prod.*, Vol.49, pp. 503-509.
3. 高瑞娟、賴永裕、吳松鎮、張秀鑾(1991),「抗緊迫豬群之選育：I. 鹵乙烷檢測技術與緊迫基因頻率」。中畜會誌，第二十卷，增刊，p.4。
4. Webb, A. J. and C.H. Jordan (1978), "Halothane sensitivity as a field test for stress-susceptibility in the pig", *Anim. Prod.*, Vol. 26, pp.157-168.
5. Fujii, I., K. Otse, F. Zorzato, S. DeLeon, V.K. Khanna, J. E. Weiler, P.J. O'Brien and D. H. MacLenan (1991), "Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia.", *Science*, Vol. 253, pp.448-451.
6. Anderson, L., J. Bohme, L. Rask and P. A. Peterson (1986), "Genomic hybridization of bovine class II major histocompatibility gene. I. Extensive polymorphism of DQ and DQ genes.", *Anim. Genet.*, Vol. 17, p.95.
7. 鄭益謙、劉名允、劉學陶、黎漢龍(1997),「豬緊迫綜合症之基因型檢測技術探討」。中華獸醫誌，第二十三卷，第三期，第 274-282 頁。
8. 馬春祥 (1971), *家畜育種學*，第 372-424 頁，國立編譯館，正中書局，台北。

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41

1843

-GTG-GCC-GTG-CGC-TCC-AAC-CAA-
-TGC-

圖 1. CRC 基因第 1843 鹼基突變位置之鹼基序列

Fig. 1. Sequence of nucleotides within the CRC gene showing mutation at position 1843(Fujii *et al.*, 1991)

圖 2. 血液中萃取基因組 DNA 之電泳圖。

Fig. 2. The electrophoresis map showing genomic DNA extracted from pig whole blood.

M: DNA/*Hind* marker.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44

圖 3. 精液中萃取基因組 DNA 之電泳圖。

Fig. 3. The electrophoresis map showing genomic DNA extracted from pig semen.
M: DNA/*Hind* marker.

圖 4. 不同 PSS 遺傳型之 PCR 產物經 *Hha* I 與 *BsiHKA* I 限制 切割之圖譜。

Fig. 4. Restriction map of PCR products after digestion by *Hha* I and *BsiHKA* I restriction enzymes in different PSS genotype.
M: 100 bp ladder marker. P: PCR product. AA, AB and BB: genotype of CRC gene.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11

圖 5. 血液樣品經 PCR 複製與 *Hha* I 限制 切割之圖譜。

Fig. 5. Restriction map of PCR products from different blood samples after *Hha* I restriction enzymes digestion.
M: 100 bp ladder marker.