

利用 PCR-SSCP 检测荷斯坦奶牛瓜氨酸血症

魏玉春¹, 刘丑生², 王新庄³, 王志刚², 孙秀柱², 韩旭²

(1 西北农林科技大学 动物医学院, 陕西 杨凌 712100; 2 全国畜牧总站畜禽牧草种质资源保存利用中心, 北京 100193;

3 河南农业大学 牧医工程学院, 河南 郑州 450000)

[摘要] **【目的】**建立荷斯坦奶牛瓜氨酸血症的 PCR-SSCP 检测方法。**【方法】**根据 GenBank 公布的荷斯坦奶牛精氨酸琥珀酸合成酶基因(Ass)第 5 外显子核苷酸序列(登录号: M2619), 设计并合成 1 对特异性引物, 应用 PCR-SSCP 方法检测北京市周边牛场 173 头荷斯坦奶牛瓜氨酸血症的隐性基因, 并利用 PCR-RFLP 和 DNA 序列测定验证检测结果的准确性。**【结果】**PCR-SSCP 检测的 173 头奶牛中有 1 头是瓜氨酸血症携带者, 与 PCR-RFLP 和 DNA 序列测定结果一致, 携带率为 0.58%。**【结论】**建立了荷斯坦奶牛瓜氨酸血症的 PCR-SSCP 检测方法, 该方法简单快捷、准确性高、成本低廉, 适合荷斯坦奶牛的大规模检测。

[关键词] 荷斯坦奶牛; 瓜氨酸血症; PCR-SSCP 检测

[中图分类号] S858.236.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2009)08-0031-05

Detecting Citrullinemia in Holstein Calves using PCR-SSCP analysis

WEI Yu-chun¹, LIU Chou-sheng², WANG Xin-zhuang³,
WANG Zhi-gang², SUN Xiu-zhu², HAN Xu²

(1 College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 National Animal Husbandry & Veterinary Service of the Ministry of Agriculture (MOA), Beijing 100193, China;

3 College of Animal Science and Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou, Henan 450000, China)

Abstract: **【Objective】**The study established a method to detect Citrullinemia by polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism analysis. **【Method】**A pair of primers were designed and synthesized according to nucleotide sequences of the exon 5 for argininosuccinate synthetase gene in Holstein Calves, published in Genbank and under accession number: M2619. Polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism was used to analyze exon 5 for argininosuccinate synthetase of 173 Holstein Calves in Beijing, and the results were verified by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism and DNA sequencing. **【Result】**One of the 173 Holstein Calves was Citrullinemia carrier, and the carrying rate was 0.58%. This result was consistent with that of the polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism and DNA sequencing. **【Conclusion】**A method detecting Citrullinemia by polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism analysis was established. This method is not only simple and convenient, but also has a high accuracy and low cost, which is more suitable for large-scale Citrullinemia investigation.

Key words: Holstein Calf; Citrullinemia; PCR-SSCP detection

* [收稿日期] 2008-11-24

[基金项目] 农业部畜禽牧草品种资源保护项目(农财发[2007]43号); 科技部《畜禽种质资源》资助项目(2007DKA21101)

[作者简介] 魏玉春(1983—), 男, 内蒙古巴彦淖尔市人, 在读硕士, 主要从事胚胎工程研究。E-mail: Weiychun223@163.com

[通信作者] 刘丑生(1964—), 男, 甘肃庆阳人, 副研究员, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究。E-mail: liuchousheng@sina.com

瓜氨酸血症(Citrullinemia, CN)是荷斯坦奶牛尿素循环发生代谢紊乱的一种常染色体单碱基突变隐性遗传缺陷病,1986年由澳大利亚学者 Harper 等^[1]首次在牛上发现后,德国^[2]、美国^[3]、捷克^[4]等国家相继报道了荷斯坦牛群中存在 CN 隐性基因。国内也有相关报道,2001年, Lin 等^[5]对 1 690 头台湾地区奶牛进行检测,结果发现 CN 基因的携带率为 0.06%;2006年,李建斌等^[6]利用限制性片段长度多态性(Restriction fragment length polymorphism, RFLP)技术,对山东省的荷斯坦奶牛进行抽样检测,结果发现 CN 基因的携带率为 1.18%。Robinson 等^[3]通过分析 CN 个体的基因型发现, CN 个体精氨酸琥珀酸合成酶基因(*Ass*)第 5 外显子第 256 个碱基发生 C→T 突变,导致 *Ass* 基因第 5 外显子第 86 个密码子 CGA 转变为终止密码子 TGA,使其翻译产物 *Ass* 变成含 85 个氨基酸的无酶活性蛋白质,导致瓜氨酸不能转变为精氨酸琥珀酸而大量积蓄于组织及血液中,从而造成尿素循环发生代谢障碍,使氨无法转变为尿素排出体外,由此引发一系列神经症状。CN 病牛出生时表现正常,但不久出现精神沉郁、步态紊乱、惊厥、失明等症状,一般出生后 7 d 内死亡,死亡率为 100%^[7],这给广泛应用人工授精技术的奶牛业造成了巨大的经济损失。因此, CN 遗传缺陷引起了国内外奶牛育种工作者的重视。通过分子生物学方法检测奶牛群体中 CN 隐性基因,已成为奶业发达国家奶牛育种中提高牛群种质的一个重要手段。但利用单链构象多态性(Single-Strand Conformation Polymorphism, SS-CP)技术检测 CN 隐性基因,在荷斯坦奶牛选育中尚未开展。

目前, CN 隐性基因分子生物学检测方法主要是 PCR-RFLP 方法^[3-8],该方法要求建立阳性对照才能保证检测结果的准确性,且费时、成本较高,不适合规模化检测。因此,建立一种准确、快速、经济的检测 CN 隐性基因的分子诊断方法十分必要。为此,本研究建立了检测 CN 隐性基因的快捷、准确的 PCR-SSCP 分析方法,以期为提高我国奶牛遗传育种水平、培育更加优良的种公牛奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 血样 对北京市周边牛场荷斯坦奶牛前腔静脉采血 20 mL,共 173 份,加 ACD 抗凝(血液(mL):ACD(mg)=6:1),4℃下运回实验室,

-20℃冷藏保存^[9]。

1.1.2 试剂和仪器 GeneAmp9700PCR 仪,美国 Applied Biosystems 公司产品;凝胶成像分析系统,美国 Alpha Innotech 公司产品;ABI3100-Avant 全自动遗传分析仪,美国 Applied Biosystems 公司产品;Taq DNA 聚合酶、10×Taq DNA Buffer、dNTPs、DNA 回收试剂盒、甲酰胺等电泳检测试剂,大连(宝)生物工程有限公司产品。

1.2 引物的设计与合成

1.2.1 PCR-SSCP 引物 依据 GenBank 上牛 *Ass* 基因序列(登录号:M26198)^[10],用 Oligo6.0 设计检测 CN 隐性基因的 PCR 引物:CNS:5'-GTTTGTG-GAGGAGTTCATCTG-3';CNA:5'-ATCTGGTC-GTTCCCCTTT-3'。引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成,预期扩增产物长度为 177 bp。

1.2.2 PCR-RFLP 引物 采用 Grupe 等^[2]的方法设计引物序列,A1 5'端增加了 GGACC *Ava* II 酶切位点和 GGCCAG 6 bp 碱基;E1 5'端增加了 GGACC *Ava* II 酶切位点和 TTCCTG 6 bp 碱基,以利于 PCR 扩增。A1:5'-GGCCAGGGACCGTGTTCATTGAG-GACATC-3';E1:5'-TTCCTGGGACCCCGTGAGACACATACTTG-3'。引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成,预期扩增产物长度为 199 bp。

1.3 荷斯坦奶牛 CN 基因的 PCR-SSCP 分析

1.3.1 基因组 DNA 的提取 应用血液基因组 DNA 提取试剂盒(Tiagen 公司)进行全血基因组 DNA 提取。

1.3.2 PCR 扩增 利用 CNS 和 CNA 进行 PCR 扩增,PCR 反应体系为 25 μL,其中含 DNA 模板 1 μL(约 100 ng),10×buffer 2.5 μL, dNTPs(25 mmol/L)0.3 μL, CNS 和 CNA (2 pmol/μL)各 1 μL, Mg²⁺ (25 mmol/L)1.5 μL, Taq 酶(5 U/μL)0.3 μL,补 ddH₂O 至 25 μL。PCR 反应参数为:94℃ 4 min;94℃ 45 s,56℃ 45 s,72℃ 45 s,35 个循环;72℃ 延伸 40 min,降温至 4℃ 结束。取 3 μL PCR 产物进行 20 g/L 琼脂糖电泳检测。

1.3.3 SSCP 分析 取 5 μL PCR 产物,加入 5 μL 变性剂(体积分数为 95%去离子甲酰胺,10 mmol/L EDTA,5 g/L 溴酚蓝,5 g/L 二甲苯氰),在 PCR 仪上 95℃ 变性 10 min,随后冰浴 3 min,然后取水相 3 μL 上样,在 4℃、250 V 电压下进行 80 g/L 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 8 h,取下凝胶,进行银染^[11]。

1.4 荷斯坦奶牛 CN 基因的 PCR-RFLP 分析

1.4.1 PCR 扩增 对 SSCP 分型后的 AA 和 AB

基因型,利用 A1 和 E1 进行 PCR 扩增,*Ava* II 酶切,进行重复验证。PCR 反应体系为 25 μ L,其中 DNA 模板 1 μ L(约 100 ng),10 $\times$ buffer 2.5 μ L,dNTPs(25 mmol/L) 0.2 μ L,Mg²⁺ (25 mmol/L) 1.8 μ L,A1 和 E1 (2 pmol/ μ L)各 1 μ L,*Taq* 酶(5 U/ μ L)0.3 μ L,补 ddH₂O 至 25 μ L。PCR 反应参数为:94 $^{\circ}$ C 4 min;94 $^{\circ}$ C 45 s,55 $^{\circ}$ C 45 s,72 $^{\circ}$ C 45 s,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 40 min,降温至 4 $^{\circ}$ C 结束。

1.4.2 RFLP 分析 取 PCR 产物 8 μ L,加 *Ava* II 5 U,10 $\times$ *Ava* II Basal Buffer 2 μ L,补 ddH₂O 至 18 μ L,在 30 $^{\circ}$ C 水浴中 *Ava* II 酶切过夜,酶切产物进行 20 g/L 琼脂糖电泳。电泳完毕,将琼脂糖凝胶放入凝胶成像系统观察、拍照。

1.5 荷斯坦奶牛 CN 基因扩增产物的纯化与测序 对 SSCP 和 RFLP 分析后的 AA 和 AB 基因型 PCR 产物进行回收纯化,利用 ABI3100-Avant 全自动遗传分析仪进行正、反方向序列测定,进一步验证基因分型的结果。

2 结果与分析

2.1 荷斯坦奶牛 CN 基因的 PCR-SSCP 结果

2.1.1 PCR 结果 由图 1 可知,1~5 号牛 CN 基因经 CNS 和 CAN 进行 PCR 扩增后,均得到 1 条长度为 177 bp 的 DNA 片段,与试验预期结果相吻合,可以进行 SSCP 分析。

2.1.2 SSCP 结果 经 PCR-SSCP 分析(图 2),1~4 号牛 CN 基因具有 AA 基因型,为正常个体;5 号牛具有 AB 基因型,为 CN 隐性携带个体。检测的 173 头荷斯坦奶牛中有 1 头是 CN 隐性携带个体,

携带率为 0.58%。

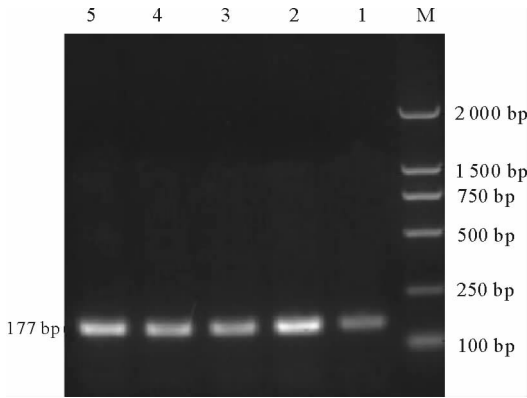


图 1 荷斯坦奶牛 CN 基因 PCR-SSCP 的 PCR 结果

Fig.1 PCR result of CN gene for PCR-SSCP in Holstein Calves
M, DL 2000 marker;1~5. PCR 产物
M, DL 2000 marker;1~5. PCR products

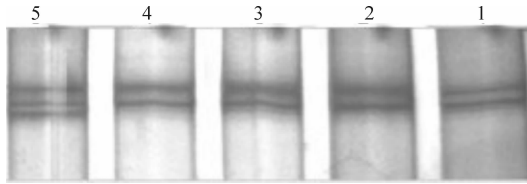


图 2 荷斯坦奶牛 CN 基因的 SSCP 结果
1~4. AA 型;5. AB 型

Fig.2 SSCP analysis of CN gene in Holstein Calves
1~4. AA types;5. AB types

2.2 荷斯坦奶牛 CN 基因的 PCR-RFLP 结果

2.2.1 PCR 结果 由图 3 可知,1~5 号牛 CN 基因经 A1 和 E1 进行 PCR 扩增后,均得到 1 条长度为 199 bp 的 DNA 片段,与试验预期结果相吻合,可以进行 RFLP 分析。

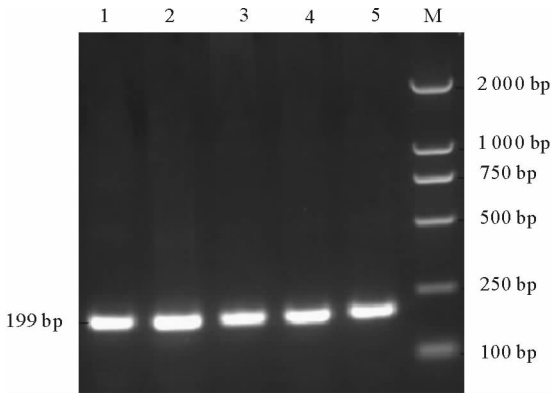


图 3 荷斯坦奶牛 CN 基因 PCR-RFLP 的 PCR 结果
M, DL 2000 marker;1~5. PCR 产物

Fig.3 PCR result of CN gene for PCR-RFLP in Holstein Calves
M, DL 2000 marker;1~5. PCR products

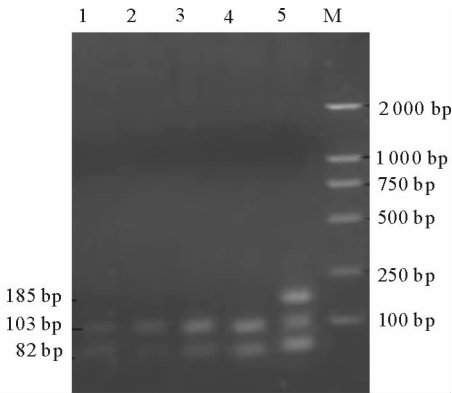


图 4 荷斯坦奶牛 CN 基因的 RFLP 结果
M, DL 2000 marker;1~4. AA 型;5. AB 型

Fig.4 RFLP analysis of CN gene in Holstein Calves
M, DL 2000 marker;1~4. AA types;5. AB types

2.2.2 RFLP 结果 PCR 扩增产物经 *Ava* II 酶切后,1~4 号牛的 CN 基因产生 103 和 82 bp 2 条泳带,为 AA 基因型,属正常个体;5 号牛 CN 基因发生 C→T 突变,丢失了 *Ava* II 酶切位点,产生 185, 103 和 82 bp 3 条泳带,为 AB 基因型,属 CN 隐性携带个体(图 4)。

2.3 不同基因型荷斯坦奶牛的 DNA 序列测定结果

为了进一步验证基因分型结果,对具有不同基因型的荷斯坦奶牛个体进行序列测定,用 DNA-MAN 软件与 GenBank 上的基因序列进行同源性分析,结果发现,AA 型个体的 *Ass* 基因第 5 外显子第 256 位碱基为 C,与 GenBank 上公布的牛 *Ass* 基因序列(M26198)相同,属于正常个体;而 AB 型个体 *Ass* 基因第 5 外显子第 256 位碱基为 N,是 CN 隐性携带个体所具有的基因。

不同基因型荷斯坦奶牛的序列测定结果(图 5)表明,图 2 中的基因分型结果是正确的,验证了 PCR-SSCP 的准确性,充分说明采用 PCR-SSCP 检测 CN 有害基因的方法是可行的。

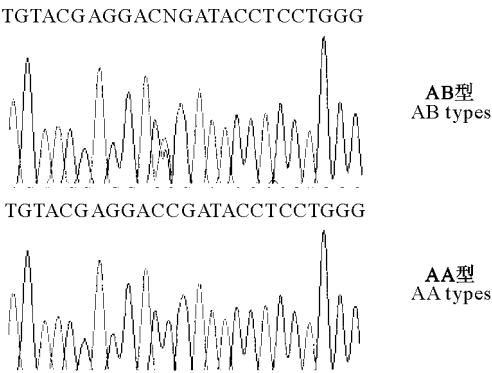


图 5 荷斯坦奶牛 *Ass* 基因第 5 外显子 AA 和 AB 基因型的测序结果
Fig. 5 Sequencing results of AA, AB genotypes in exon 5 for *Ass* gene in Holstein Calves

3 讨 论

近年来,国外奶业发达国家在种公牛基因检测和分子选育技术方面开展了大量的研究工作^[4,12],并建立了种公牛遗传缺陷基因的分子检测方法和育种方案,同时在种公牛系谱上明确标注隐性基因的携带情况,以合理指导种公牛的选种、选配工作,有效降低了隐性基因的不良影响。CN 的检测技术在国外已非常成熟,检测结果已作为种公牛系谱的一部分。在国外,2007 年波兰奶牛育种者 Anna 等^[13]用 PCR-SSCP 成功对波兰荷斯坦种公牛脊柱畸形

综合症(CVM)进行了检测。在国内,李艳华等^[14]用 PCR-SSCP 成功检测了北京市荷斯坦种公牛白细胞黏附缺陷症(BLAD),携带率为 1.9%;2008 年,Qin 等^[15]用 PCR-SSCP 成功检测了我国部分荷斯坦种公牛 CVM,携带率为 14.7%。这些研究表明,PCR-SSCP 在荷斯坦奶牛遗传疾病基因突变检测上有广泛的应用前景。目前,我国有种公牛 2 000 多头,但对 CN 的携带率尚不清楚,这就严重影响了奶牛群体的改良,因此在我国有必要对 CN 进行调查、检测和研究。本研究采用 PCR-SSCP 的方法建立了一种检测 CN 隐性基因的新方法,并且通过 PCR-RFLP 和 DNA 序列测定的验证,说明 SSCP 是一种检测 CN 隐性基因的有效方法。

SSCP 的原理是:单链 DNA 片段呈复杂的空间折叠构象,这种立体结构主要是由其内部碱基配对等分子内相互作用力来维持的,当有一个碱基发生改变时,会或多或少地影响其空间构象,使构象发生改变;空间构象有差异的单链 DNA 分子在聚丙烯酰胺凝胶中受排阻大小不同,因此,通过非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,可以非常敏锐地将构象上有差异的分子分离开。PCR-SSCP 分析法的优点在于:操作简单,不需要特别贵重的仪器,技术容易掌握,PCR 产物变性后无需特殊处理就可直接电泳;实验步骤少,周期短,所用试剂常见,成本较低;适合于大样本筛选,在做测序之前采用此法可大大避免盲目测序所带来的工作量,加快测序速度。该方法是检测 DNA 单碱基突变最为直观而精确的试验技术手段之一,对长度 100~300 bp 突变 DNA 片段的检测灵敏度可达 90% 以上^[16]。

为提高 SSCP 分析的检出率,本研究还对影响 SSCP 技术的各种因素进行了摸索和优化。100 g/L 非变性聚丙烯酰胺凝胶与 80 g/L 非变性聚丙烯酰胺凝胶相比,单链 DNA 条带泳动速率慢,而且对 AB 型基因的分选效果差。80 g/L 非变性聚丙烯酰胺凝胶在 18 ℃ 下的条带泳动速率快于 4 ℃,但对 AB 型基因的分选效果差。碱变性剂与体积分数 95% 去离子甲酰胺变性剂相比,SSCP 图像较为模糊。

本研究利用 PCR-SSCP 检测的 173 头荷斯坦奶牛中,有一头是 CN 隐性携带个体,携带率为 0.58%。虽然 CN 发生率不高,但如果近交率较大时,将严重影响牛群的繁殖性能。因此,建立的 CN 隐性基因 PCR-SSCP 检测技术可以在全国种公牛站推广应用,排除 CN 隐性基因携带者,避免和降低

优秀种公牛传播扩散 CN 隐性基因的风险。

4 结 论

成功建立了荷斯坦奶牛瓜氨酸血症的 PCR-SS-CP 检测方法,该方法简单快捷、准确性高、成本低廉,适合荷斯坦奶牛的大规模检测。

[参考文献]

[1] Harper P A W, Healy P J, Dennis J A, et al. Citrullinemia as a cause of neurological disease in neonatal Ftiesian calves [J]. Aust Vet J, 1986, 63(11): 378-379.

[2] Grupe S, Dietl G, Schwerin M. Population survey of citrullinemia on German Holsteins [J]. Livestock Production Science, 1996, 45(1): 35-38.

[3] Robinson J L, Bums J L, Magura C E, et al. Low incidence of citrullinemia carriers among dairy cattle of the United States [J]. Journal of Dairy Science, 1993, 76(3): 853-858.

[4] Citek J, Rehout V, Hajkova J, et al. Monitoring of the genetic health of cattle in the Czech Republic [J]. Veterinarni Medicina, 2006, 51(6): 333-339.

[5] Lin D Y, Huang Y C, Chen J C, et al. Investigation of citrullinaemia of dairy cattle in Taiwan [J]. Journal of Taiwan Livestock Research, 2001, 34(4): 279-284.

[6] 李建斌,王洪梅,高运东,等. 利用 PCR-RFLP 检测中国荷斯坦牛遗传缺陷—瓜氨酸血症 [J]. 生物技术通报, 2006(6): 97-99.
Li J B, Wang H M, Gao Y D, et al. Detection of an inherited defect: Citrullinemia by PCR-RFLP in Chinese Holstein Dairy Cattle [J]. Biotechnology Bulletin, 2006(6): 97-99. (in Chinese)

[7] Harper P A W, Healy P J, Dennis J A, et al. Ultrastructural findings in citrullinemia in Holstein-Friesian calves [J]. Acta Nenropathol, 1988, 76(3): 306-310.

[8] Patel R K, Singh K M, Soni K J, et al. Lack of carriers of citrullinaemia and DUMPS in Indian Holstein cattle [J]. Appl Genet, 2006, 47(3): 239-242.

[9] 李秋玲,许尚忠,咎林森,等. 3 个牛品种 UCP3 基因第 5 内含子和第 6 外显子部分序列的多态性研究 [J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版, 2006, 34(11): 11-14.
Li Q L, Xu S Z, Zan L S, et al. Study on polymorphisms of part sequence of intron 5 and exon 6 of bovine UCP3 gene [J]. Jour of Northwest Sci-Tech Univ of Agri and For: Nat Sci Ed, 2006, 34(11): 11-14. (in Chinese)

[10] Dennis J A, Healy P J, Beaudet A L, et al. Molecular definition of bovine argininosuccinate synthetase deficiency [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1989, 86: 7947-7951.

[11] Bassam B J, Caetano-Anolles G, Gresshoff P M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels [J]. Anal Biochem, 1991, 196: 80-83.

[12] Mohammad R N, Amir N, Fereidoun E S, et al. Investigation of two recessive disorders in breeder bullsof Abbas Abad animal breeding center [J]. Iranian Journal of Biotechnology, 2005, 3(2): 88-89.

[13] Anna R, Stanislaw K. Prevalenceof complex vertebral malformation carriers among Polish Holstein-Friesian bulls [J]. Appl Genet, 2007, 48(3): 247-252.

[14] 李艳华,张胜利,韩广文,等. 利用单链构象多态性检测牛白细胞黏附缺陷症方法的建立 [J]. 遗传, 2007, 29(12): 1471-1474.
Li Y H, Zhang S L, Han G W, et al. A method for detecting bovine leukocyte adhesion deficiency in Holstein calves using polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism analysis [J]. Hereditas, 2007, 29(12): 1471-1474. (in Chinese)

[15] Qin C, Dong X S, Ying Y, et al. Identification of complex vertebral malformation carriers in Chinese Holstein [J]. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 2008, 20(2): 228-230.

[16] Glavac D, Dean M. Optimization of the single-strand conformation polymorphism (SSCP) technique for detection of point mutations [J]. Hum Mutat, 1993, 2(5): 404-414.