

# 不良遺傳型頻率與混合樣本數對 DNA 遺傳檢測的經濟效益影響<sup>(1)</sup>

黃鈺嘉<sup>(2)</sup> 林德育<sup>(2)</sup> 陳若菁<sup>(2)</sup>  
楊德威<sup>(3)</sup> 張秀鑾<sup>(2)</sup>

收件日期：88 年 7 月 20 日；接受日期：88 年 9 月 1 日

## 摘 要

以雜合型及正常型牛淋巴球黏力缺失症母牛 (BL 與 TL) 的全血或 DNA 進行 1:1、1:3、1:4 至 1:9 的混合後，再以混合的樣本進行後續的遺傳檢測工作，如 DNA 的聚合酶連鎖反應與限制酶切割等。結果顯示即使是 1:9 的混合仍可測出雜合型 (BL) 的存在。但是隨著混合樣本數的增加，膠片上雜合型特有的條帶就會漸淡，在 5 隻樣本混合時 (1:4) 呈相的效果仍不錯。經濟效益模擬分析：假設共有 1000 隻待檢測動物，依不良遺傳型的頻率變化與不同的混合樣本數對 DNA 遺傳檢測所需的總次數進行估算，只要混合樣本中測出有雜合型者，則需回溯重測個別原未混合的樣本。估算結果顯示：不良遺傳型的頻率在 0.1% 之下時，只要能正確的檢測出帶有雜合型的混合樣本，則越多的樣本混合應越有經濟效益，但是隨著不良遺傳型的頻率增加到 10%，則混合樣本的效益就不存在。綜合所述，以現階段的技術而言，混合樣本之 DNA 遺傳檢測可應用於經濟價值較低且不良遺傳型頻率很低 (反之或接近 100% 時) 的遺傳篩選應用。

關鍵詞：混合 DNA、混合樣本、遺傳檢測。

## 緒 言

混合樣本曾被用於探討 DNA 指紋的應用，選擇同一父畜的兩極化後裔群 (例如：高產與低產)，混合同群後裔的 DNA 以略去父畜的共同條帶及母畜低頻率的雜帶，希望能藉著兩極化畜群的條帶差異比對尋找到有用的遺傳標記 (Dunnington *et al.*, 1992)。由於 DNA 遺傳檢測成本很高，就經濟層面而言，畜禽個體逐一篩檢成本太高。雖然遺傳疾病源於突變基因所引起，然而不同的遺傳疾病雜合型頻率變異很大，高頻度的雜合型，混合樣本後必定仍需高頻度的重測，經濟層面而言不見得有利。牛的淋巴球黏力缺失症是美國獸醫師柯里默博士等人在一項乳房炎防治的相關研究中發現 (Kehrli *et al.*, 1990; Kehrli *et al.*, 1992)，並命名為 Bovine Leukocyte Adhe-

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告 986 號

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所育種系

(3) 行政院農業委員會畜產試驗所畜牧場

sion Deficiency，國際上簡稱為 BLAD，隨後他所領導的研究群組研發了分生檢測的方法 (Shuster *et al.*, 1992)，各國的接續研究皆驗證了此一不良遺傳基因已藉由冷凍精液的使用擴散到全球各地 (Jorgensen *et al.*, 1993; Nagahata *et al.*, 1997; 黃等, 1998)。雖然有病的仔畜很難在自然環境下存活過八月齡，宜全面清除此一不良遺傳基因，然而高昂的檢測費用，業界只能檢測製作冷凍精液的優異公牛，剩下的母牛群只能靠著使用篩選過的冷凍精液，逐年稀釋族群中雜合型的頻率。

由於引起牛的淋巴球黏力缺失症的 CD-18 基因，在檢測技術上已有了很大的改進，DNA 的判讀容易 (Kriegesmann *et al.*, 1997)，本研究希望能以這樣的題材來探討如何更有效率的清除牛群的不良基因。除了測試混合樣本是否仍能測出樣本中挾帶的雜合型外，同時亦探討不同遺傳型頻率與混合樣本數對 DNA 遺傳檢測的經濟效益影響。

## 材料與方法

以雜合型及正常型的牛淋巴球黏力缺失症牛隻 (BL 與 TL) 的全血先行 1:1、1:3、1:4 至 1:9 的比例混合後，萃取混合血樣的 DNA，或先萃取個體母牛的 DNA 再進行 1:1、1:3、1:4 至 1:9 的比例混合，之後再以兩種不同的混合 DNA 樣本進行後續的遺傳檢測工作。所使用的引子是 Kriegesmann *et al.* (1997) 所提出，正、逆向引子核苷序列分別為：

BLAD3：5' CCTGCATCATATCCACCAG 3' BLAD4：5' GTTTCAGGGGAAGATGGAG 3'。

PCR 反應條件設為：起動：94℃，5 分。循環：94℃，30 秒；58℃，30 秒；72℃，30 秒。共循環 33 次。終止：72℃，5 分。可以獲得 343 bp 的聚合酶連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 產物，再將 PCR 產物利用限制 *TaqI* 切割 (以總量為 10  $\mu$  L，比例分別為：PCR 產物 5  $\mu$  L：限制酶 *TaqI* 1  $\mu$  L (10 U/ $\mu$  L)：1  $\mu$  L Buffer：3  $\mu$  L 無菌水；反應溫度：65℃；反應時間：3 hrs)。於 100 伏特電壓下電泳 60 分鐘 (3.0 % agar gel)。電泳後呈相如下：正常型 (TL) 具有 191 和 152 bp 兩個片段。雜合型 (BL) 則具有 343、191 和 152 bp 三個片段。有病型 (BLAD) 則僅有 343 bp 一個片段。

經濟效益模擬分析：假設共有 1000 待檢測動物，依不良遺傳型的頻率變化與不同的混合樣本數對 DNA 遺傳檢測所需的總次數進行估算，只要混合樣本中測出有雜合型者 (或有病型者)，則需回溯重測個別原未混合的樣本。

基本計算公式為：

始測數 = 總樣本數 / 混合樣本數，有餘數則商採全進位

重測機率 =  $1 - (1 - P_{\text{雜合型}})^n$  = 樣本中至少有一個雜合型的機率

$n$  為混合樣本數， $n > 1$

$P_{\text{雜合型}}$ ：雜合型機率

加測數 = 始測數 \* 重測機率 \* 混合樣本數

總測數 = 始測數 + 加測數

## 結果與討論

不論是先行血液混合後萃取 DNA 或萃取個體牛隻的 DNA 後再依比例混合，兩種方法所得的 343bp PCR 產物的未分切片段 (U) 與限制酶 *TaqI* 分切後的片段之電泳相，二者間若以肉眼辨視不易區別，圖 1 為萃取個體牛隻的 DNA 後再依比例混合所得結果。結果顯示即使是 1:9 的

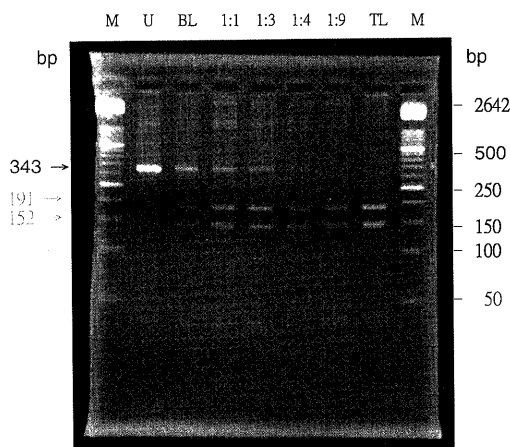


圖 1. 荷蘭牛淋巴球黏力缺失症基因檢測於雜合牛(BL)、正常牛(TL)與 BL:TL 不同樣本混合比例，以 BLAD3/BLAD4 引子經 PCR 增幅所生 343bp PCR 產物的未分切片段(U)與限制酶 *TaqI* 分切後的片段之電泳相。

M: 50bp DNA 片段標記。

Fig. 1. Electrophoresis pattern of DNA mixes of Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency genotypes. DNA mixes was sampled by different BL/TL ratio. BLAD3 and BLAD4 were the primers for the polymerase chain reaction (PCR) and *TaqI* was the restriction enzyme for the 343 bp PCR product. U:uncutfragment. M: 50 bp ladder marker.

混合仍可測出雜合型 (BL) 的存在。但是隨著混合樣本數的增加，膠片上雜合型特有的條帶就會漸淡，在五隻樣本混合時常 (1:4) 呈相的效果仍不錯，1:9 時電泳呈相則較差。

Plotsky *et al.* (1993) 曾利用 9-10 頭相近屠體腹脂性能雞隻的混合 DNA 進行 DFP (DNA fingerprint) gradient analysis。Hillel *et al.* (1993) 亦利用 9 頭牛的混合血液萃取 DNA 進行 DFP 型態的研究，結果指出不論是先行血液混合後再萃取 DNA 或萃取個體牛隻的 DNA 後再等量混合所得的 DFP 型態相同，這些結果與本試驗混合 DNA 檢測是否含有雜合型 (BL) 母牛所得到的相似。

經濟效益模擬分析結果顯示(圖 2)：不良遺傳型的頻率在 0.1% 之下時，只要能正確的檢測出帶有雜合型的混合樣本，則較多的樣本混合仍有經濟效益(如 50 個樣本混合)，但是隨著不良遺傳型的頻率增加到 10% 時，則混合樣本的效益就不存在了，甚至要作更多次的檢測。綜合而言，以現階段的技術而言，混合樣本之 DNA 遺傳檢測可應用於經濟價值較低且不良遺傳型頻率很低(反之或接近 100% 時)的遺傳篩選應用。本試驗雖然只作雜合型與正常型混合的模擬，推行到包含有病型時亦是同樣的結果，只是更改  $P_{\text{雜合型}}$  為  $P_{\text{雜合型或有病型}}$ ，檢測到 343、191 和 152 bp 三個片段或僅一個 343 bp 片段的 PCR 產物均需重測混合樣本中的各個個體。

以混合樣本進行 DNA 檢測可應用於雜合型頻度在 10% 以下的族群 (1% 以下更好)，如乳牛的單譜症 (Deficiency of uridine monophosphate synthase, DUMPS) 或瓜胺酸症 (Citrullinemia) 的遺傳疾病檢測，可採五至十個樣本混合篩檢母牛群或驗證冷凍精液的雜合型。

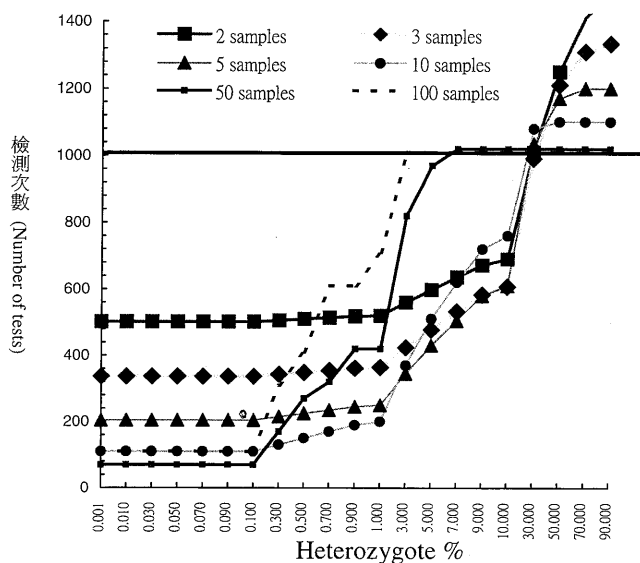


圖 2. 一千個採樣中之雜合型百分率與不同混合樣本數所需之檢測次數。

Fig. 2. Number of tests needed by different carrier percentage and different ratio mixes in a total of 1000 samples.

## 參考文獻

- 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(3)：299-304。
- Dunnington E. A., A. Haberfeld, L. C. Stallard, P. B. Siegel and J. Hillel. 1992. Deoxyribonucleic acid fingerprint bands linked to loci coding for quantitative traits in chickens. *Poult. Sci.* 71:1251-1258.
- Hillel J., D. Kalay, O. Gal, Y. Plotsky, P. Weisberger and A. Haberfeld. 1993. Application of multilocus molecular markers in cattle breeding 2. Use of blood mixes. *J. Dairy Sci.* 76: 653-657.
- Kehrli, M. E., F. C. Schmalstieg, D. C. Anderson, M. J. Van Der Maaten, B. J. Hughes, M. R. Ackermann, C. L. Wilhelmsen, G. B. Brown, M. G. Stevens and C. A. Whetstone. 1990. Molecular definition of the bovine granulocytopeny syndrome: Identification of deficiency of the Mac-1(CD11b/CD18) glycoprotein. *Am. J. Vet. Res.* 51(11): 1826-1836.
- Kehrli, M. E., D. E. Shuster and M. R. Ackermann. 1992. Leukocyte adhesion deficiency among Holstein cattle. *Cornell Vet.* 82:103-109.
- Kriegesmann B., S. Jansen, B. G. Baumgartner and B. Brenig. 1997. Partial genomic structure of the bovine CD18 gene and the refinement of test for bovine leukocyte adhesion deficiency. *J. Dairy Sci.* 80:2547-2549.
- Nagahata H., T. Miura, K. Tagaki, M. Ohtake, H. Noda, T. Yasuda and K. Nioka. 1997. Prevalence and allele frequency estimation of bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD)

- in Holstein-Friesian cattle in Japan. *J. Vet. Sci.* 59:233-238.
- Orgensen C. B., J. S. Agerholm, J. Pedersen and P. D. Thomsen. 1993. Bovine leukocyte adhesion deficiency in Danish Holstein-Friesian cattle 1. PCR screening and allele frequency estimation. *Acta Vet. Scand.* 34:231-236.
- Plotsky Y., A. Cahaner, A. Haberfeld, U. Lavi, S. J. Lamont and J. Hillel. 1993. DNA fingerprint bands applied to linkage analysis with quantitative trait loci in chickens. *Anim. Genetics* 24:105-110.
- Shuster, D. E., M. E. Kehrli, 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.* 89:9225-9229.

# **Influence of Undesired Genotype Frequency and Number of Samples Mixed on Economic Efficiency of Genetic Testing<sup>(1)</sup>**

Yu-Chia Huang<sup>(2)</sup>, Der-Yuh Lin<sup>(2)</sup>, Jo-Ching Chen<sup>(2)</sup>,  
Tei-Wei Yang<sup>(3)</sup> and Hsiu-Luan Chang<sup>(2)</sup>

Received July 20, 1999; Accepted Sep. 1, 1999

## **Abstract**

Samples of whole blood of different genotypes of Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency, BL and TL (carrier and normal), were mixed from 1:1, 1:3, 1:4 to 1:9 and then had the DNA extracted, followed by genotyping procedures. In comparison, the mixed samples collected from extracted DNA from individual animal were mixed in the same ratio. Both restricted enzyme PCR products showed that from up to 1:9 mixed samples the existence of carrier (BL) genotype could be detected. However, the increase of the number of samples also decreased the blackness of the band of the image, and the five samples mixed, in the 1:4, could generate acceptable image for visual judgement. Simulation study of economic efficiency of DNA test was based on frequencies of undesired genotypes of 1,000 animals and numbers of samples mixed. If the mixed sample was detected and contained undesired genotypes, a redo test would need to be performed for each unmixed sample. As the undesired genotypes were under 0.1%, the more samples mixed the less tests were required. However, if the undesired genotypes were more than 10%, mixed samples showed only little benefit over unmixed test. Mixed DNA test could be applied in screening undesired genotypes for animals with less economic values especially when the undesired genotypes frequency was low.

Key words: Mixed samples, DNA mixes, Genetic testing.

- 
- (1) Contribution No. 986 From Taiwan Livestock Research Institute, Council of Agriculture  
(2) Department of Animal Breeding, COA-TLRI, Hsinhua, Tainan, Taiwan. R.O.C.  
(3) Animal Farm, COA-TLRI, Hsinhua, Tainan, Taiwan. R.O.C.