

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2008.01223

牛脊柱畸形综合征检测方法的建立与应用

王洪梅, 李建斌, 侯明海, 王长法, 李秋玲, 仲跻峰

山东省农业科学院奶牛研究中心, 济南 250100

摘要: 牛脊柱畸形综合征(Complex vertebral malformation, CVM)是近年来新发现的致死性牛常染色体隐性遗传缺陷病。由于编码 UDP-N-乙酰葡萄糖胺载体的 *SLC35A3* 基因发生 G→T 的突变而引起本病的发生, 可引起胎牛死胎、流产、早产。为了解我国正常的荷斯坦牛(黑白花奶牛)的 CVM 携带和发生情况, 建立、应用创造酶切位点 PCR(Created restriction site PCR, CRS-PCR)、等位基因特异性 PCR(Allele-specific polymerase chain reaction, AS-PCR)检测方法检测了表型正常的 436 头荷斯坦母牛和 93 头荷斯坦公牛, 检测到 3 头 CVM 携带者, 其中杂合母牛 1 头, 杂合公牛 2 头, 携带率分别为 0.60%、2.20%。此方法简便、可靠, 为奶牛 CVM 有害基因的分型和筛选提供了新的方法和思路, 为我国奶牛的分子选育提供了可靠的理论依据。

关键词: 脊柱畸形综合征; 基因突变; AS-PCR; CRS-PCR; 荷斯坦牛

The development and application of method for detecting bovine complex vertebral malformation

WANG Hong-Mei, LI Jian-Bin, HOU Ming-Hai, WANG Chang-Fa, LI Qiu-Ling, ZHONG Ji-Feng

Dairy Cattle Center of Shandong Academy of Agricultural Sciences, Ji'nan 250100, China

Abstract: Complex vertebral malformation (CVM), a lethal autosomal recessive inherited defect in Holstein calves, was newly reported worldwide. The molecular cause of CVM was a substitution of guanine by thymine (G→T) in a solute carrier family 35 member 3 gene (*SLC35A3*), encoding UDP-N-acetylglucosamine transporter. It was characterized by stillborn, abortion, and premature birth. The objective of this study was to study the actual carrier frequency of the CVM mutation in a population of Chinese Holstein (=Chinese Black-and-White) normal cattle. The normal 436 Holstein cows and 93 Holstein bulls were genotyping by using the Created Restriction Site PCR (CRS-PCR) and Allele-specific PCR (AS-PCR) methods. There were two bulls and one cow in three observed CVM-carriers. In the Holstein dairy cattle and Holstein bull population, the percentages of CVM carriers were estimated as 0.60% and 2.20% respectively. This study provided a more reliable and useful method for extensive screening of CVM and also offers a theoretical basis for molecular diagnosis in Holstein calves.

Keywords: CVM; genetic mutations; AS-PCR; CRS-PCR; Chinese Holstein cattle

收稿日期: 2008-01-04; 修回日期: 2008-02-26

基金项目: 国家高技术研究发展计划项目(863 计划)(编号: 2006AA10Z1D9)、公益性行业科研专项(编号: nyhyzx07-036-09)和山东省良种工程项目(编号: 2006LZ10-04)资助[Supported by Hi-Tech Research and Development Program of China (863 Program)(No. 2006AA10Z1D9) and the Public Welfare Vocation Scientific Research Foundation of China (No. nyhyzx07-036-09) and the Well-bred Project from Shandong Government of China (No. 2006LZ10-04)]

作者简介: 王洪梅(1974-), 女, 山东临沂人, 硕士研究生, 助理研究员, 专业方向: 动物遗传育种与繁殖。E-mail: homey68@163.com

通讯作者: 仲跻峰(1964-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 牛遗传育种与繁殖。E-mail: sdex2@163.com

牛脊柱畸形综合征(Complex vertebral malformation, CVM)是近年来新发现的致死性牛常染色体隐性遗传缺陷病^[1],主要表现为胎儿流产、死胎、早产,多见于妊娠 260 天前的流产,严重影响荷斯坦牛的繁殖力,延长产犊间隔,增加母牛淘汰率^[2,3],CVM病牛出现胸、颈椎缩短,大量椎骨愈合且脊柱侧凸,前肢腕关节对称弯曲等症状^[4,5],但CVM携带者表现正常。CVM首次发现于丹麦荷斯坦牛^[4],相继于荷兰、日本、德国、美国等国家有相关报道^[6~12]。Thomsen等^[13]证实了牛CVM的发生是由于编码UDP-N-乙酰葡萄糖胺载体的溶质转运家族35-3(Solute carrier family 35 member 3, *SLC35A3*)基因第4外显子559处发生G→T突变,导致180处缬氨酸置换为苯丙氨酸,致使异常的核苷酸糖转运到高尔基体。根据这一突变位点,国外学者已建立PCR-PIRA、PCR-SSCP检测方法,检测牛群CVM杂合子^[12,14]。

长期以来,我国荷斯坦牛种质(种牛、胚胎、精液)严重依赖进口,国内荷斯坦公牛和种子母牛群可能存在一定比例的CVM携带者,一旦两杂合体交配,后代将出现25%的发病隐性纯合个体,由于公

牛携带者不表现症状,但其冻精一旦被大规模使用,隐性缺陷基因就会在牛群中快速传播,这将给奶牛业造成了巨大的经济损失。本研究采用AS-PCR、CRS-PCR及DNA测序技术,建立、应用CVM的分子生物学检测方法,从而为了解我国荷斯坦牛CVM携带者的状况及CVM的净化,对培育优良的种公牛和奶牛生产的可持续发展具有重要的意义。

1 材料和方法

1.1 样本采集

随机采集山东地区436头荷斯坦种子母牛的血样样本,颈静脉采血,ACD抗凝,于-20℃保存;收集国内部分种公牛站的93头现役荷斯坦公牛冷冻精液,液氮保存。

1.2 方法

1.2.1 引物设计

根据*SLC35A3*基因的序列(GenBank登录号:AY160683);针对基因突变位点设计引物,引物序列见表1,由上海生工生物工程技术有限公司合成。

表1 检测CVM的引物序列

Table 1 Sequence of the primers used to detect CVM

名称 Name	序列 Sequences(5' → 3')
AS-PCR	AS-G: CACAATTTGTAGGTCTCATGGCAG AS-T: CACAATTTGTAGGTCTCATGGCAT AS: GGAACCAAAAAGGGATGTGA
CRS-PCR	CRS-1: CACAATTTGTAGGTCTCA <u>CT</u> GCA CRS-2: GGAACCAAAAAGGGATGTGA

注:下划线及加粗位置为创造酶切位点处。

Note: The underlined nucleotides indicate creation of a restriction site.

1.2.2 DNA的提取

按常规的酚-氯仿法提取基因组DNA。

1.2.3 PCR反应体系及条件

AS-PCR、CRS-PCR均为20 μL的PCR反应体系,其中10×PCR Buffer(含15 mmol/L的Mg²⁺)2.0 μL、10 mmol/L dNTPs 0.5 μL、10 pmol/μL的引物各0.5 μL、*Taq* DNA聚合酶1U、100 ng/μL的DNA模板1.0 μL。其中AS-PCR为双管PCR,反应体系中引物分别为AS-G、AS和AS-T、AS,CRS-PCR反应体系中引物为CRS-1、CRS-2。反应程序均为:94℃预变性3 min,94℃20 s、58℃20 s、72℃30 s,共30个循环,72℃5 min,降温至4℃保存。取PCR

产物于1%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.4 RFLP分析

取CRS-PCR反应产物4 μL,限制性内切酶*Pst*I 5 U,补加三蒸水至8 μL,37℃12 h,3%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.5 基因测序

将纯合子个体的PCR产物在1%琼脂糖凝胶电泳,纯化回收目的DNA片段。回收后的DNA用T4-DNA连接酶克隆到pGEM-T载体,并转化到大肠杆菌DH-5α菌株中。蓝白斑筛选后,经PCR及酶切鉴定后测序。对杂合子个体进行PCR产物测序。测序工作由上海生工生物工程技术有限公司完成。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增

对所采集的样品分别进行 AS-PCR、CRS-PCR, 扩增 *SLC35A3* 基因, 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 均扩增到与理论预计值相符的条带, 见图 1。

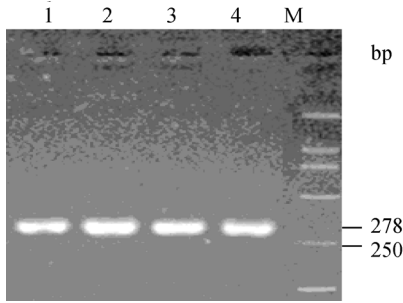


图 1 牛 *SLC35A3* 基因的 PCR 扩增产物
1, 2: *SLC35A3* 基因的 AS-PCR 扩增产物; 3, 4: *SLC35A3* 基因 CRS-PCR 扩增产物; M: DL2000 Marker。

Fig. 1 PCR products of *SLC35A3* gene
1, 2: AS-PCR products; 3, 4: CRS-PCR products of the *SLC35A3* gene; M: DL2000 Marker.

2.2 基因型分析

AS-PCR 采用 AS-G、AS 引物扩增正常的等位基因, AS-T、AS 引物扩增含突变位点的等位基因, 含突变基因的携带者则能被以上两对引物扩增(图 2)。正常基因纯合子(-/-)的 CRS-PCR 产物被 *Pst* 消化为 258、20 bp 两条片段, 而突变基因杂合子(+/-)则被消化为 278、258、20 bp 3 条片段(图 3)。结果表明, AS-PCR、CRS-PCR 分型结果一致。

对 *SLC35A* 基因外显子 4 的正常纯合子个体 3 头进行克隆测序, 对所检测到的突变杂合子个体进行 PCR 产物测序。结果表明, 正常纯合子 *SLC35A3* 基因外显子 4 的序列与 GenBank 中登录的 *SLC35A* 基因的序列一致, 并提交到 GenBank, 登录号为 EF555203。而杂合子的 *SLC35A* 基因在 559 处发生 G T 突变, 使其编码缬氨酸置换为苯丙氨酸(图 4)。

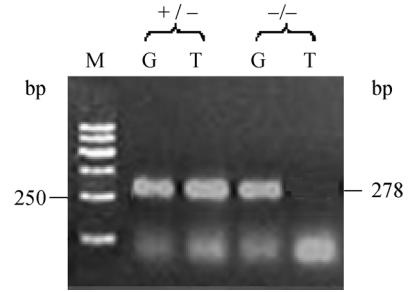


图 2 牛 *SLC35A3* 基因外显子 4 的 AS-PCR 结果
Fig. 2 AS-PCR of exon 4 of bovine *SLC35A3* gene

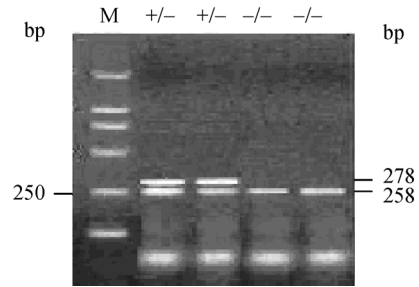


图 3 牛 *SLC35A3* 基因外显子 4 的 RFLP 结果
Fig. 3 RFLP genotyping of bovine *SLC35A3* gene exon 4

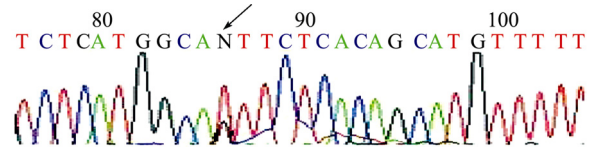


图 4 牛 *SLC35A* 基因外显子 4 的测序结果
发生 G T 突变位点如箭头所示。
Fig. 4 Sequencing of mutant *SLC35A3* gene exon 4
The arrow indicates the presence of a G T mutation in exon 4 in one of the alleles of *SLC35A3* gene in carrier cattle.

2.3 CVM 检测结果

在试验荷斯坦牛群中共检测到 CVM 杂合子 3 头, 其中公牛为 2 头, 试验牛群及公牛的 CVM 携带率分别为 0.6%、2.2%, 不同基因型个体数量、基因型频率见表 2。

表 2 中国荷斯坦牛 *SLC35A3* 基因的不同基因型数量及基因型频率
Table 2 Genotype and allele frequencies in the *SLC35A3* locus in studied Chinese Holstein cattle

试验牛群 Group of animals	数量 No. of animals	基因型数量与频率 No. and frequency of genotypes allele frequency			
		G/G		T/G	
公牛 Bulls	93	91	0.978	2	0.022
母牛 Cows	436	435	0.998	1	0.002
试验牛 All dairy cattle	529	526	0.994	3	0.006

2.4 CVM 携带者的系谱分析

在本研究中,共检测 93 头荷斯坦种公牛,检测到的 2 头杂合子,根据系谱资料,其中一头杂合子(A)的祖父(C)和另一头杂合子(B)的外祖父(D)为 CVM 携带者,C 和 D 均为美国著名公牛 Carlin-M Ivanhoe Bell(E)的儿子(图 5)。

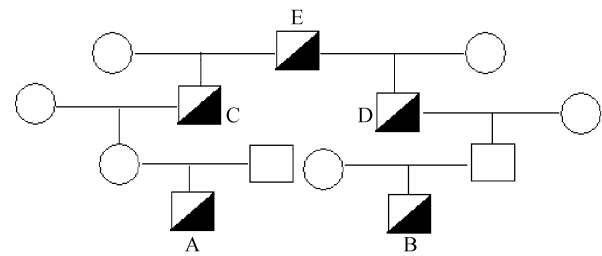


图 5 CVM 携带者的系谱资料分析
Fig. 5 Pedigrees of CVM Carriers

3 讨论

本研究建立的牛脊柱畸形综合征AS-PCR、CRS-PCR检测方法快速、准确,可应用于荷斯坦牛CVM的早期检测。AS-PCR、CRS-PCR检测方法是检测单碱基突变的有效方法^[15,16]。由于 $SLC35A3$ 基因发生G→T突变,没有酶切位点,可通过AS-PCR方法,设计两条引物,其3'端碱基分别与正常碱基和突变碱基配对,与正常碱基配对的引物只能扩增正常序列,与突变碱基配对的引物只能扩增突变序列。CRS-PCR考虑在突变位点附近引入一个错配碱基从而使野生型产生新的酶切位点而得以检测。本研究通过筛选AS-PCR引物,优化PCR反应条件,仅使用普通Taq DNA聚合酶扩增即可获得理想的扩增效果,从而降低检测成本。CRS-PCR反应中,应用Pst 消化PCR产物时,首先确定最佳酶浓度,以避免消化不彻底而产生假阳性。

控制CVM的传播,发现表型正常的杂合子,特别是公牛杂合子尤为重要。美国著名公牛Carlin-M Ivanhoe Bell(1667366)及它的父亲Pen-state Ivanhoe Star(1441440)均为CVM杂合子,由于后代优秀的生产性能,Bell及其后代公牛被广泛应用于许多国家的奶牛育种,使CVM在世界范围内广泛传播,据统计,1997 年澳大利亚出生的牛群中,Bell的后代占39%,CVM杂合子为11.8%^[17];英国排名前100名验证公牛中有16头为CVM杂合子^[18],丹麦、日本、瑞典荷斯坦公牛的CVM 携带率分别为31%、32.5%、

23%(表 3),因此,奶业发达国家纷纷开始淘汰CVM携带者。而目前我国存栏荷斯坦公牛(包括后备公牛)约1800余头,由于受检测群体所限,本研究仅检测93头荷斯坦种公牛,检测到的2头杂合子,CVM公牛杂合子所占比例为2.2%,所占比例虽不高,但不足以说明国内公牛群的现状。因此,有必要对所有的荷斯坦公牛进行DNA水平的CVM检测。

表 3 部分国家荷斯坦公牛 CVM 携带者的数量及频率
Table 3 Numbers and frequency of CVM carriers among Holstein bulls in some countries

国家 Country	检测公牛的数量 No. of bulls tested	CVM 携带者公牛 CVM carrier bulls		参考文献 References
		No.	%	
日本 Japan	40	13	32.50	[9]
德国 Germany	957	126	13.20	[10]
瑞典 Sweden	228	53	23.00	[2]
美国 USA	11868	2108	17.76	[18]
丹麦 Denmark	No data	No data	31.00	[13]
波兰 Polish	605	150	24.79	[12]

美国荷斯坦协会规定,用“CV”标记CVM携带者,“TV”标记非携带者^[19],制定计划逐渐淘汰CVM携带者,并对所有后裔测定公牛进行严格的DNA检测,其他奶业发达国家已将CVM的筛选纳入育种规划中,对CVM进行净化。特别在2000~2002年期间,世界奶业发达国家纷纷淘汰Bell家族种牛,而此阶段恰为我国进口种牛最多的时期,并引进大量潜在CVM携带者的没有系谱资料的荷斯坦母牛,由于超数排卵和胚胎移植技术的应用,母牛对隐性遗传疾病的传播所起的作用越来越大,一旦后代培育成为种公牛,对整个牛群的影响将更大^[20],这将严重威胁我国奶牛育种和奶业的健康发展。当前,我国荷斯坦奶牛存栏逾1300万头,受到流产、死胎等繁殖障碍的问题严重困扰,除加强传染性繁殖障碍疾病的防制,CVM的潜在危害决不能忽视,解决CVM问题刻不容缓,应对种子奶牛群抽样检测,并发布测定结果,以此为依据对全国CVM状况进行准确评估,以制定长远规划净化牛群,这是一项长期艰巨的任务。

参考文献(References):

[1] Bendixen C, Svendsen S, Jensen H, Panitz F, Aasberg A, Holm LE, Horn P, Thomsen B, Jeppesen M, Nielsen VH, Jonker M. Genetic test for the identification of carriers of

- complex vertebral malformations in cattle. *World Intellectual Property Organization*, 2002, Publication No. PCT/WO 02/40709 A2 United States Patent: 7094544.
- [2] Berglund B, Persson A, Stalhammar H. Effects of complex vertebral malformation on fertility in Swedish Holstein cattle. *Acta Vet Scand*, 2004, 45(3-4): 161-165. [\[DOI\]](#)
- [3] Mohamed EG, Masashi A, Toshihiko S, Asako K, Masahide N. Complex vertebral malformation in Holstein cows in Japan and its inheritance to crossbred F₁ generation. *Anim Repro Sci*, 2008, 103(3-4): 348-354. [\[DOI\]](#)
- [4] Agerholm JS, Bendixen C, Andersen O, Arnbjerg J. Complex vertebral malformation in Holstein calves. *J Vet Diagn Invest*, 2001, 13(4): 283-289.
- [5] Nielsen US, Aamand GP, Andersen O, Bendixen C, Nielsen VH, Agerholm JS. Effects of complex vertebral malformation on fertility traits in Holstein cattle. *Livestock Prod Sci*, 2003, 79(2): 233-238. [\[DOI\]](#)
- [6] Wouda W, Visser IJ, Borst GH, Vos JH, Zeeuwen AA, Peperkamp NH. Developmental anomalies in aborted and stillborn calves in the Netherlands. *Vet Rec*, 2000, 147(21): 612.
- [7] Duncan RB Jr, Carrig CB, Agerholm JS, Bendixen C. Complex vertebral malformation in a holstein calf: report of a case in the USA. *J Vet Diagn Invest*, 2001, 13(4): 333-336.
- [8] Revell S. Complex vertebral malformation in a Holstein calf in the UK. *Vet Rec*, 2001, 149(21): 659-660.
- [9] Nagahata H, Oota H, Nitani A, Oikawa S, Higuchi H, Nakade T, Kurosawa T, Morita M, Ogawa H. Complex vertebral malformation in a stillborn Holstein calf in Japan. *J Vet Med Sci*, 2002, 64(12): 1107-1112. [\[DOI\]](#)
- [10] Konersmann Y, Wemheuer W, Brenig B. Origin distribution and relevance of the CVM defect within the Holstein-Friesian population. *Zuchungskunde*, 2003, 75(1): 9-15.
- [11] Agerholm JS, Andersen O, Almskou MB, Bendixen C, Arnbjerg J, Aamand GP, Nielsen US, Panitz F, Petersen AH. Evaluation of the inheritance of the complex vertebral malformation syndrome by breeding studies. *Acta Vet Scand*, 2004, 45(3-4): 133-137. [\[DOI\]](#)
- [12] Rušć A, Kamiński S. Prevalence of complex vertebral malformation carriers among Polish Holstein-Friesian bulls. *J Appl Genet*, 2007, 48(3): 247-252.
- [13] Thomsen B, Horn P, Panitz F, Bendixen E, Petersen AH, Holm LE, Nielsen VH, Agerholm JS, Arnbjerg J, Bendixen A. A missense mutation in the bovine SLC35A3 gene, encoding a UDP-N-acetylglucosamine transporter, causes complex vertebral malformation. *Genome Res*, 2006, 16(1): 97-105. [\[DOI\]](#)
- [14] Kanae Y, Endoh D, Nagahata H, Hayashi M. A method for detecting complex vertebral malformation in Holstein calves using polymerase chain reaction-primer introduced restriction analysis. *J Vet Diagn Invest*, 2005, 17(3): 258-262.
- [15] ZHAO Chun-Jiang, LI Ning, DENG Xue-Mei. The establishment of method for identifying SNP genotype by CRS-PCR. *Hereditas (Beijing)*, 2003, 25(3): 327-329. 赵春江, 李宁, 邓学梅. 应用创造酶切位点法检测单碱基突变. *遗传*, 2003, 25(3): 327-329.
- [16] ZHAO Chun-Jiang, LI Ning, DENG Xue-Mei. Establishment of the method for identifying the extracellular fatty acid binding protein genotypes with allele-specific-PCR. *J Agric Biotechnol*, 2003, 11(3): 273-275. 赵春江, 李宁, 邓学梅. AS-PCR 技术检测鸡 EX-FABP 基因型方法的建立. *农业生物技术学报*, 2003, 11(3): 273-275.
- [17] Man WY, Nicholas FW, James JW. A pedigree-analysis approach to the descriptive epidemiology of autosomal-recessive disorders. *Preventive Vet Med*, 2007, 78(3-4): 262-273. [\[DOI\]](#)
- [18] Holstein U.K. 2004. Subject: CVM. Online. Available at: <http://www.holstein-uk.org/>. Accessed Dec. 1, 2004.
- [19] Holstein Association USA, 2004. Bulls Recorded as Carrier (CV) or Tested Free (TV) of CVM. "Internet" Available from: www.holsteinusa.com; modified, 2006, Apr 29; cited 2006 May 22.
- [20] Malher X, Beaudeau F, Philipot JM. Effects of sire and dam genotype for complex vertebral malformation (CVM) on risk of return-to-service in Holstein dairy cows and heifers. *Theriogenology*, 2006, 65(6): 1215-1225. [\[DOI\]](#)

欢迎订阅 2009 年《畜牧兽医学报》(月刊)

《畜牧兽医学报》是由中国科协主管, 中国畜牧兽医学会主办, 《畜牧兽医学报》编委会、中国农业科学院北京畜牧兽医研究所编辑出版的畜牧兽医学术性期刊。创刊于 1956 年 7 月, 读者对象为大、专院校的师生和各级畜牧兽医生产、科研工作者等。刊登畜牧兽医行业较高水平的学术论文和专业研究报告以及对生产实践具有指导性和启发性的文章。

《畜牧兽医学报》是行业内创刊早、学术水平高、影响大的全国中文核心期刊, 现被国内外多家数据库及文摘期刊收录。

2006-2008 年《畜牧兽医学报》连续 3 次获得中国科协精品科技期刊工程项目(C类)资助。本刊已开通网站, 欢迎广大作者网上注册投稿、浏览网刊。

本刊 2009 年为月刊, 大 16 开。邮发代号: 82-453。国外代号: M446。定价 20 元, 全年 240 元。全国各地邮局均可订阅。漏订的用户请直接汇款至本刊编辑部补订。

地址: 北京市海淀区圆明园西路 2 号中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 邮编: 100193

电话: 010-62815987 E-mail: xmsyxb@263.net <http://www.xmsyxb.com>