

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2013.00623

## 牛蜘蛛腿综合征两个致病位点检测方法的建立

初芹<sup>1</sup>, 焦士会<sup>2</sup>, 王雅春<sup>2</sup>, 刘林<sup>3</sup>, 刘爱荣<sup>4</sup>, 吴宏军<sup>5</sup>, 谢振全<sup>6</sup>, 侯诗宇<sup>6</sup>, 耿繁军<sup>7</sup>, 汪聪勇<sup>7</sup>, 黄锡霞<sup>8</sup>, 谭世新<sup>9</sup>, 谈锐<sup>10</sup>, 张毅<sup>2</sup>, 俞英<sup>2</sup>, 张沅<sup>2</sup>

1. 北京市农林科学院畜牧兽医研究所, 北京 100097;
2. 中国农业大学动物科技学院, 畜禽育种国家工程实验室, 北京 100193;
3. 北京奶牛中心, 北京 100192;
4. 内蒙古呼伦贝尔市海拉尔农垦集团有限责任公司, 呼伦贝尔 021008;
5. 内蒙古谢尔塔拉种牛场, 呼伦贝尔 021008;
6. 鞍山恒利奶牛场, 鞍山 114200;
7. 河南省鼎元种牛育种有限公司, 郑州 450046;
8. 新疆农业大学动物科学学院, 乌鲁木齐 830052;
9. 天山畜牧生物工程有限公司, 昌吉 831109;
10. 新疆维吾尔自治区畜牧总站, 乌鲁木齐 830009

**摘要:** 牛蜘蛛腿综合征(Arachnomelia syndrome, AS)是一种隐性遗传疾病, 虽然在瑞士褐牛和西门塔尔牛中症状相同, 然而却是由两个不同的基因突变引起的, 分别是 *SUOX* 基因 c.363-364insG 突变和 *MOCSI* 基因 c.1224\_1225delCA 突变。文章利用 51 头西门塔尔牛及 80 头与配母牛和 106 头杂交后代, 以及 55 头新疆褐牛公牛为研究群体, 通过荧光标记引物 PCR 扩增结合毛细管电泳技术, 建立了一种荧光自动化检测方法, 能够快速、准确、一次性实现对引起牛 AS 疾病的两个突变位点的同时检测, 为今后我国牛群中 AS 致病位点的筛查工作奠定了基础。

**关键词:** 蜘蛛腿综合征; 西门塔尔牛; 褐牛; sulfite oxidase gene (*SUOX*); molybdenum cofactor synthesis step 1 gene (*MOCSI*)

## Establishment of the detection method for two causative genes of cattle arachnomelia syndrome

CHU Qin<sup>1</sup>, JIAO Shi-Hui<sup>2</sup>, WANG Ya-Chun<sup>2</sup>, LIU Lin<sup>3</sup>, LIU Ai-Rong<sup>4</sup>, WU Hong-Jun<sup>5</sup>, XIE Zhen-Quan<sup>6</sup>, HOU Shi-Yu<sup>6</sup>, GENG Fan-Jun<sup>7</sup>, WANG Cong-Yong<sup>7</sup>, HUANG Xi-Xia<sup>8</sup>, TAN Shi-Xin<sup>9</sup>, TAN Rui<sup>10</sup>, ZHANG Yi<sup>2</sup>, YU Ying<sup>2</sup>, ZHANG Yuan<sup>2</sup>

1. Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097, China;

收稿日期: 2012-09-17; 修回日期: 2013-01-03

基金项目: 国家科技攻关计划(编号: 2011BAD28B02), 现代农业产业技术体系专项资金(编号: CARS-37)和长江学者与创新团队发展计划(编号: IRT1191)资助

作者简介: 初芹, 博士, 助理研究员, 研究方向: 动物遗传育种。Tel: 13501156449; E-mail: chuqinsd@163.com

通讯作者: 王雅春, 博士, 副教授, 研究方向: 动物遗传育种与分子数量遗传学。E-mail: wangyachun@cau.edu.cn

致谢: 感谢德国宝牛公司、法国 Coopex 公司、北京奶牛中心、内蒙家畜改良工作站、河南省鼎元种牛育种有限公司、新疆维吾尔自治区畜禽繁育改良总站、内蒙古谢尔塔拉种牛场和鞍山恒利奶牛场提供本研究的样品。

网络出版时间: 2013-3-12 15:25:22

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20130312.1525.003.html>

2. Key Laboratory of Agricultural Animal and Breeding, National Engineering Laboratory for Animal Breeding, College of Animal Science and Technology, China Agricultural University, Beijing 100193, China;
3. Beijing Dairy Cattle Centre, Beijing 100192, China;
4. Hailaer Farm Buro, Hailaer 021008, China;
5. Xiertala Breeding Farm, Hailaer Farm Buro, Hailaer 021008, China;
6. Anshan Hengli Dairy Farm, Anshan 114200, China;
7. Dingyuan Seedstock Bulls Breeding Ltd. Company, Zhengzhou 450046, China;
8. College of Animal Science, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China;
9. Xinjiang Tianshan Animal Husbandry Bio-engineering Co. Ltd, Changji 831109, China;
10. Xinjiang General Livestock Service, Urumqi 830009, China

**Abstract:** Arachnomelia syndrome (AS) is a recessive inherited disease in cattle. Although the arachnomelia phenotypes are virtually identical in Brown Swiss and Simmental cattle, the causative mutation are different, which are a 1 bp insertion c.363-364insG in the sulfite oxidase (*SUOX*) gene and a 2 bp deletion c.1224\_1225delCA in the molybdenum cofactor synthesis step 1 (*MOCSI*) gene, respectively. In the current study, combining fluorescence PCR with capillary electrophoresis technology, an automatic fluorescence method was established, which could detect the two causative loci rapidly and correctly with a single reaction. Samples from 51 Simmental bulls, 80 cows mated artificially using semen of Simmental bulls and their resulted 106 progeny, together with 55 Xinjiang Brown were collected and used for validation of the newly designed methods. Our results have laid a foundation for screening AS disease causing mutations in Chinese cattle.

**Keywords:** arachnomelia syndrome; Simmental; Brown Swiss; sulfite oxidase gene (*SUOX*); molybdenum cofactor synthesis step 1 gene (*MOCSI*)

牛蜘蛛腿综合征(Arachnomelia syndrome, AS)是一种先天性致死性遗传疾病,患病犊牛体重较轻,头部、背部和四肢骨骼均表现畸形,出生时或出生不久后死亡<sup>[1-5]</sup>。该病最早是于1975年由德国科学家 Rieck 和 Schade 报道<sup>[1]</sup>,主要存在于德系西门塔尔牛和瑞士褐牛群体中。虽然在两个品种中,AS 症状相似,但其致病基因却并不相同。在瑞士褐牛群体中,AS 是由位于牛第 5 号染色体 BTA5 上的 *SUOX*(Sulfite oxidase)基因外显子 4 上的一个 G 碱基的插入 c.363-364insG 突变所致。经预测,插入突变会导致亚硫酸盐氧化酶的氨基酸序列从 124 位发生移码突变,提前产生终止密码子,导致发病<sup>[2,3]</sup>。而在西门塔尔牛群体中,AS 是由位于牛 23 号染色体上的 *MOCSI*(Molybdenum cofactor synthesis step 1)基因外显子 11 上的一个 2 bp 缺失突变 c.1224\_1225delCA 引起的,经预测该突变将造成移码突变,产生不成熟的短链蛋白,导致 MoaC 结构域丢失,进而引起编码的蛋白 *MOCS1A* 功能丧失<sup>[4]</sup>。无论在哪个群体中,该遗传疾病的爆发都源于大量使用携带者公牛冻精造成致病基因的广泛传播,从而导致患病犊牛的出现。

西门塔尔牛是世界闻名的乳肉兼用品种,为提高我国西门塔尔牛生产性能和开展奶牛品种间杂交生产试验,我国自 2006 年陆续引进法国、德国等国家的西门塔尔牛冻精,在新疆、内蒙古、黑龙江、辽宁等省区应用,产生了大量后代。此外,我国新疆褐牛是经长期选育出来的优秀的乳肉兼用型品种,含有瑞士褐牛血液<sup>[6]</sup>。

因此,本研究希望建立一种简便、快捷、准确的检测方法,同时实现对两个 AS 致病位点的一次性有效检测,方便用于我国牛群 AS 致病基因的筛查,尽早发现和剔除不利基因位点,防止该病在我国牛群中的传播。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验群体

本研究共包括 292 头牛的样品。其中,51 份来自德国、法国进口以及北京、内蒙、河南、新疆等地的西门塔尔牛种公牛冻精,80 头荷斯坦牛/三河牛与配母牛以及 106 头后代的抗凝血或耳组织样,另外 55 份来自新疆的含瑞士褐牛血液的新疆褐牛冻精(表 1)。冻精基因组 DNA 提取参考文献<sup>[7]</sup>,血液

样品及耳组织 DNA 提取分别采用的是试剂盒 DP319 和 DP304(天根, 北京)。

## 1.2 荧光引物 PCR 及基因型判定

参考 NCBI 网站公布的 *MOCSI* 基因(登录号: 615878)和 *SUOX* 基因(登录号: 509837)序列, 使用 Oligo v6.0 在突变位点附近设计引物, 并在上游引物 5'端连接荧光标记, 具体见表 2。

由于多重 PCR 容易造成干扰, 本研究采取两对荧光引物分别进行 PCR 扩增, 扩增体系为 20  $\mu$ L, DNA 模板 50 ~ 100 ng, 引物终浓度为 1  $\mu$ mol/L, dNTP 的浓度为 4 $\times$ 0.25 mmol/L, *Taq* 酶 1 U(TaKaRa)。PCR 扩增结束后, 2%琼脂糖电泳检测扩增效果, 并初步估计产物浓度。两对引物所扩增的 PCR 产物等量混样后稀释。

取混合稀释后的样品 1  $\mu$ L, 加入 9  $\mu$ L 甲酰胺, 0.6  $\mu$ L 分子内标 400HD, 混匀。95  $^{\circ}$ C 变性 5 min, 迅速 4  $^{\circ}$ C 冰浴 5 min。ABI3700 自动测序仪毛细管电泳跑胶进行分离。基因型判定借助 ABI Prism GeneMapper 4.0 软件完成。

## 1.3 测序验证

为了保证结果的准确性, 本研究还对荧光方法判定的不同基因型个体随机选取 2 个, 进行序列验证, 在北京华大基因研究中心纯化和 Sanger 测序。

## 2 结果与分析

### 2.1 荧光自动化检测方法的建立

首先, 以从冻精(或血液、耳组织)提取的基因组 DNA 为模板, 分别对 *SUOX* 基因 c.363-364insG 突变和 *MOCSI* 基因 c.del1224\_1225CA 突变两个位点进行荧光引物的 PCR 扩增, 经 2%琼脂糖凝胶电泳检测确认有无扩增产物, 并根据检测条带亮度初步估计 PCR 产物的量。

然后, 等量混合两个基因的扩增产物, 按比例稀释后, 毛细管电泳检测其基因型, 共发现了两种基因型(图 1)。其中图 1a 在 249、251 bp 处出现两个主峰, 在 274 bp 处出现一个主峰, 也就是说 *MOCSI* 基因 c.del1224\_1225CA 位点为杂合子, 是西门塔尔牛 AS 致病突变的携带者, 而在 *SUOX* 基因 c.363-364insG 位点为纯合子野生型, 为褐牛 AS 致病突变的非携带者; 图 1b 在 251 bp 处和 274 bp 处均只出现一个主峰, 表示该个体 *MOCSI* 基因和 *SUOX* 基因突变位点均为纯合子野生型, 是西门塔尔牛 AS 致病突变和褐牛 AS 致病突变的非携带者。测序后的序列结果与公布序列比较, 也证实了分型的准确性。

理论上而言, 如果检测样本中含有 *SUOX* 基因突变位点, 则除了在 274 bp 处观测到一个信号峰外, 在 273 bp 处同样应该观察到另一个信号峰, 而本研究的 292 个个体中均未检测到该 273 bp 信号峰的存在, 表示这 292 个个体都不含有 *SUOX* 基因 c.363-364insG 突变位点。

### 2.2 两个突变位点在群体中的检测结果

#### 2.2.1 *MOCSI* 基因 c.1224\_1225delCA 突变

荧光检测结果显示, 51 头西门塔尔公牛, 除了一头德系西门塔尔公牛 ROMEL 的基因型为图 1a 外, 其余 50 头公牛基因型均为图 1b。也就是说, 除了 1 头西门塔尔公牛为 *MOCSI* 基因 c.1224\_1225delCA 突变携带者外, 其余都是正常个体, 即非携带者。80 头中国荷斯坦母牛和三河牛母牛在 *MOCSI* 基因 c.1224\_1225delCA 突变位点处都是正常个体。106 头西门塔尔公牛后代只有 ROMEL 的 12 头后代是西门塔尔牛 AS 的携带者, 其余的也都是正常个体。

#### 2.2.2 *SUOX* 基因 c.363-364insG 突变

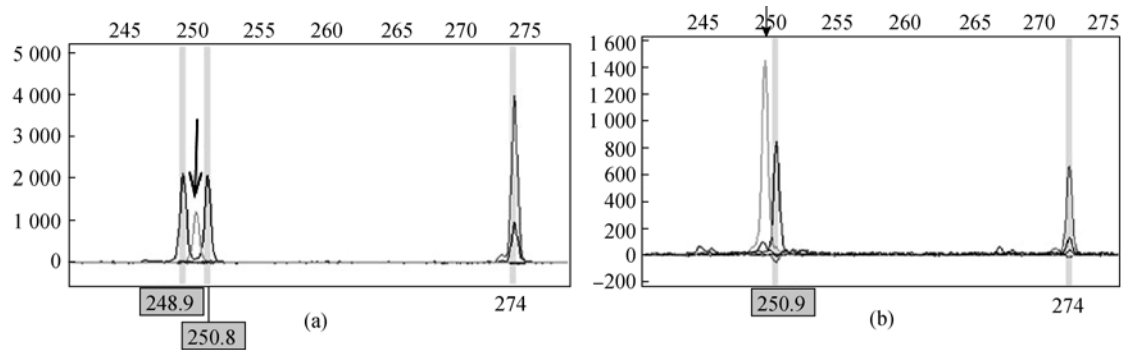
所有检测的 292 头牛, 包括 55 头新疆褐牛, 都未检测到褐牛蜘蛛腿综合征致病位点 *SUOX* 基因

表 1 实验样品信息

群体	品种	样品数	样品类型	样品来源
西门塔尔牛及 其杂交群体	西门塔尔公牛	51	冻精	德国宝牛公司、北京奶牛中心、内蒙家畜改良工作站、河南省鼎元种牛育种有限公司、新疆维吾尔自治区畜禽繁育改良总站
	荷斯坦/三河母牛	80	EDTA 抗凝血	内蒙古海拉尔市谢尔塔拉种牛场、鞍山恒利奶牛场
	杂交后代	106	耳组织	内蒙古海拉尔市谢尔塔拉种牛场、鞍山恒利奶牛场
褐牛	新疆褐牛公牛	55	冻精	天山畜牧种公牛站、新疆畜禽繁殖改良总站
总计		292		

表 2 荧光引物

引物名称	上游引物(5'→3')	下游引物(5'→3')	产物长度(bp)	荧光标记	复性温度( )
MOCSI	CTGAGTCTCCTCTTCTGTTTTCA	GTTGGCATCTGAGTCCAGGT	251	5'-FAM	63
SUOX	CTCAAGAGTCCACCACGCAGAT	ATGGAGGGTGCCTTGTCGTC	274	5'-HEX	63

图 1 *SUOX* 基因 c.363-364insG 和 *MOCSI* 基因 c.del1224\_1225CA 位点同时检测结果

(a) 西门塔尔公牛 ROMEL 及其 12 头后代的检测峰图, ROMEL 是 *MOCSI* 基因 c.del1224\_1225CA 位点的携带者(249 bp, 251 bp)、*SUOX* 基因 c.363-364insG 位点的野生型纯合子(274 bp); (b) : 其他样本的检测峰图, *MOCSI* 基因 c.del1224\_1225CA 位点的野生型纯合子(251 bp)、*SUOX* 基因 c.363-364insG 位点的野生型纯合子(274 bp)。黑色箭头所示信号峰为 250 bp 内标。

c.363-364insG 突变的存在。

### 3 讨论

本研究通过选择西门塔尔牛及其杂交群体、以及新疆褐牛为试验材料, 建立起了一种荧光自动化检测方法, 能够一次性同时对引起西门塔尔牛和瑞士褐牛蜘蛛腿综合征的两个突变位点进行检测。该方法只需要合成荧光引物, 通过一次 PCR 扩增后, 再结合毛细管电泳进行跑胶, 收集荧光信号, 即可完成分型。检测方法简便易操作、检测效率高, 而且适用于大规模样品的检测, 应用价值较高, 便于推广使用。

荧光自动化检测方法的优点在于可以对多个位点、多个片段进行同时检测, 能够区分 1 bp 的差异, 在微卫星标记分型中应用非常广泛<sup>[8,9]</sup>。本研究涉及到的两个突变位点, 分别为 1 bp 的插入突变和 2 bp 的缺失突变, 使用两对荧光引物 PCR 扩增结合毛细管电泳就可以同时对引起褐牛 AS 的突变位点 *SUOX* 基因 c.363-364insG, 以及西门塔尔牛 AS 的突变位点 *MOCSI* 基因 c.del1224\_1225CA 位点进行检测。与传统的 PCR-RFLP 方法或等位基因特异性 PCR(Allele specific PCR)<sup>[4]</sup>相比较, 荧光自动化检测方法, 操作更加简便, 省略了多次加样、混样的步骤, 并且通过荧光信号的收集准确读取片段长度, 实现

自动化判型, 结果受人因素为影响小, 更加准确可靠。与焦士会等<sup>[10]</sup>、田月珍等<sup>[11]</sup>建立的针对褐牛 AS 致病位点, *SUOX* 基因 c.363-364insG 突变的测序或者荧光自动化检测方法相比, 本研究建立的方法能够一次检测两个位点, 更加经济, 更加高效。

使用建立的荧光自动化检测方法对 292 个样本的判定结果表明, 不存在褐牛 AS 不利基因位点, 这与焦士会<sup>[10]</sup>、席艾力·依明<sup>[12]</sup>等的研究结果相一致。只检测到了 1 头德系西门塔尔公牛 ROMEL 及其 12 头后代是西门塔尔牛 AS 的携带者。据了解, ROMEL 的后代还没有作为后备牛进入到冻精生产中, 但是 ROMEL 在中国牛群体中的使用, 很可能导致西门塔尔牛 AS 致病基因传入我国牛群, 需要引起足够的重视。

目前, 我国已经建立了许多牛遗传疾病的检测方法, 如脊椎畸形综合征(Complex vertebral malformation, CVM)<sup>[13]</sup>、牛白细胞黏附缺陷病(Bovine leukocyte adhesion deficiency, BLAD)<sup>[14]</sup>、瓜氨酸血症(Citrullinemia, CN)和尿苷酸核酶缺乏症(Deficiency of uridinemonophosphate synthase, DUMPS)<sup>[15]</sup>等。本研究首次在国内建立了同时对牛蜘蛛腿综合征两个致病基因位点的检测方法, 进一步完善了我国牛遗传缺陷分子检测体系, 可以用于中国牛群以及引进牛群大规模的遗传疾病检测工作中, 尽早发

现和杜绝牛蜘蛛腿综合征致病基因在中国牛群中的散播。

#### 参考文献(References):

- [1] Rieck GW, Schade W. Arachnomelia (spider limbs), a new hereditary fatal malformation syndrome of cattle. *Dtsch Tierärztl Wochenschr*, 1975, 82(9): 342–347. [DOI](#)
- [2] Drögemüller C, Rossi M, Gentile A, Testoni S, Jörg H, Stranzinger G, Drögemüller M, Glowatzki-Mullis ML, Leeb T. Arachnomelia in Brown Swiss cattle maps to chromosome 5. *Mamm Genome*, 2009, 20(1): 53–59. [DOI](#)
- [3] Drögemüller C, Tetens J, Sigurdsson S, Gentile A, Testoni S, Lindblad-Toh K, Leeb T. Identification of the bovine Arachnomelia mutation by massively parallel sequencing implicates sulfite oxidase (*SUOX*) in bone development. *PLoS Genet*, 2010, 6(8): e1001079. [DOI](#)
- [4] Buitkamp J, Semmer J, Götz KU. Arachnomelia syndrome in Simmental cattle is caused by a homozygous 2-bp deletion in the molybdenum cofactor synthesis step 1 gene (*MOCSI*). *BMC Genet*, 2011, 12: 11. [DOI](#)
- [5] 焦士会, 王雅春, 张沅. 牛蜘蛛腿综合征: 一种骨骼系统畸形遗传疾病. *遗传*, 2011, 33(1): 36–39. [DOI](#)
- [6] 郑丕留, 张仲葛, 陈效华, 涂友仁. 中国牛品种志. 上海: 上海科学技术出版社, 1988. [DOI](#)
- [7] 陈慧勇. 利用中国荷斯坦牛定位 BTA6 上影响产奶性状的 QTLs[学位论文]. 北京: 中国农业大学, 2005. [DOI](#)
- [8] 程本义, 夏俊辉, 龚俊义, 杨仕华. SSR 荧光标记毛细管电泳检测法在水稻 DNA 指纹鉴定中的应用. *中国水稻科学*, 2011, 25(6): 672–676. [DOI](#)
- [9] 李荣岭, 张桂香, 王志刚, 王慧, 韩旭, 王冬蕾, 王均辉. 微卫星标记对 12 个中外牛品种群体遗传结构的研究. *遗传*, 2007, 29(12): 1463–1470. [DOI](#)
- [10] 焦士会, 田月珍, 努尔比亚·吾布力, 吴宏军, 刘爱荣, 张胜利, 黄锡霞, 王雅春, 张沅. 瑞士褐牛蜘蛛腿综合征致病位点检测方法的建立. *中国奶牛*, 2011, (10): 1–5. [DOI](#)
- [11] 田月珍, 焦士会, 谭世新, 周光瑞, 黄锡霞, 王雅春, 张胜利, 张沅. 新疆褐牛蜘蛛腿综合征的遗传检测. *畜牧与兽医*, 2012, 44(7): 77–79. [DOI](#)
- [12] 席艾力·依明, 王雅春, 黄锡霞, 田可川, 田月珍, 郭俊清, 谭世新, 付雪峰, 热伊莱·伊卜拉伊木. 新疆褐牛核心群母牛蜘蛛腿综合征的遗传检测. *中国兽医学报*, 2012, 32(9): 1295–1298. [DOI](#)
- [13] Chu Q, Sun DX, Yu Y, Zhang Y, Zhang Y. Identification of complex vertebral malformation carriers in Chinese Holstein. *J Vet Diagn Invest*, 2008, 20(2): 228–230. [DOI](#)
- [14] 孙艺, 孙东晓, 张沅. 中国荷斯坦牛白细胞粘附缺陷病遗传分析. *中国奶牛*, 2007, (11): 7–10. [DOI](#)
- [15] 谢岩, 范学华, 吴晓平, 张毅, 刘林, 公维嘉, 陈绍祜, 孙东晓, 张胜利, 张沅. 中国荷斯坦公牛 CN 和 DUMPS 遗传缺陷检测及系谱分析. *畜牧兽医学报*, 2012, 43(3): 376–381. [DOI](#)