



刘志玲, 吴晓薇, 康伟, 等. 荷斯坦牛脊椎畸形综合征 *TaqMan* 荧光 PCR 检测方法的建立与应用[J]. 华南农业大学学报, 2015, 36(5): 26-30.

# 荷斯坦牛脊椎畸形综合征 *TaqMan* 荧光 PCR 检测方法的建立与应用

刘志玲<sup>1,2</sup>, 吴晓薇<sup>1,2</sup>, 康伟<sup>3</sup>, 朱道中<sup>1,2</sup>, 刘中勇<sup>1,2</sup>, 陈增荣<sup>3</sup>, 郭霄峰<sup>4</sup>

(1 广东出入境检验检疫局 检验检疫技术中心, 广东 广州 510623; 2 广东省动植物与食品进出口技术措施研究重点实验室, 广东 广州 510623; 3 广州出入境检验检疫局, 广东 广州 510623; 4 华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642)

**摘要:**【目的】建立快速筛查牛脊椎畸形综合征 (Complex vertebral malformation, CVM) 基因携带者的方法, 在牛群中逐渐淘汰 CVM 基因携带者以减少养牛业损失。【方法】根据 GenBank 已发表的 CVM 基因的 *SLC35A3* 基因序列, 设计合成了 2 对特异性引物和 2 条 *TaqMan* 探针, 建立了牛脊椎畸形综合征 *TaqMan* 探针检测方法。对方法的特异性和敏感性进行分析后, 应用该方法对临床样本进行检测, 并与测序方法进行比较。【结果和结论】该方法能有效区分突变型、野生型和杂合型个体。各种基因型的检测灵敏度为: 突变型质粒拷贝数  $1 \times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$ , 杂合型质粒拷贝数  $1 \times 10^4 \mu\text{L}^{-1}$ , 野生型质粒拷贝数  $5 \times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$ 。从 292 份荷斯坦牛全血中检出 6 份 CVM 基因携带者, 与测序方法结果一致。本研究建立的方法简便快捷、准确率高, 适合大样本筛选和口岸现场快速筛查。

**关键词:** 荷斯坦牛; 脊椎畸形综合征; *TaqMan* 荧光 PCR

中图分类号: S823.3

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2015)05-0026-05

## Establishment and application of *TaqMan* real-time PCR to detect the complex vertebral malformation in Holstein cattle

LIU Zhiling<sup>1,2</sup>, WU Xiaowei<sup>1,2</sup>, KANG Wei<sup>3</sup>, ZHU Daozhong<sup>1,2</sup>,  
LIU Zhongyong<sup>1,2</sup>, CHEN Zengrong<sup>3</sup>, GUO Xiaofeng<sup>4</sup>

(1 Inspection and Quarantine Technology Center, Guangdong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Guangzhou 510623, China;

2 Guangdong Key Laboratory of Import and Export Technical Measures of Animal, Plant and Food, Guangzhou 510623, China;

3 Guangzhou Entry-Exit Inspection and Quarantine, Guangzhou 510623, China;

4 College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

**Abstract:**【Objective】The objective of this study was to establish a rapid assay to detect complex vertebral malformation (CVM) gene carrier so as to gradually eliminate CVM gene carriers for a lower loss in the cattle-feeding industry. 【Method】In this study, a pair of primer and two *TaqMan* probes were designed according to the sequence of *SLC35A3* gene from GenBank. A *TaqMan* real-time PCR assay for CVM gene was developed. DNA samples from clinical Holstein cattles were analysed by the assay, and the results were used for comparison with sequencing method. 【Result and conclusion】The assay could effectively differentiate mutant type, wild type and hybrid type of CVM gene. The sensitivity of three types was  $1 \times 10^3$ ,  $5 \times 10^3$  and  $1 \times 10^4 \mu\text{L}^{-1}$ , respectively. Six out of 292 tested Holstein cattles were identified to be CVM gene carriers. The results were consistent with the sequencing method. The *TaqMan* real-time PCR is a rapid and reliable method for extensive screening of CVM gene at the port of entry.

收稿日期: 2014-07-30 优先出版时间: 2015-07-27

优先出版网址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/44.1110.s.20150727.1455.032.html>

作者简介: 刘志玲 (1984—), 女, 兽医师, 硕士, E-mail: zhilingyes@163.com; 通信作者: 吴晓薇 (1975—), 女, 高级兽医师, 博士研究生, E-mail: wuxiaowei8@126.com

基金项目: 公益性行业 (质检) 科研专项 (201210122)

<http://xuebao.scau.edu.cn>

**Key words:** Holstein cattle; complex vertebral malformation; *TaqMan* real-time PCR

牛脊椎畸形综合征 (Complex vertebral malformation, CVM) 是由常染色体上 *SLC35A3* 基因单碱基突变 (G→T) 引起的隐性遗传病, 该基因隐性纯合 (CV/CV) 时奶牛可致死。病牛的主要临床症状为脊椎弯曲畸形、两前腿筋腱缩短、颈短和心脏畸形, 同时出现一系列综合症状<sup>[1]</sup>。妊娠奶牛还会发生早期流产、胎牛死胎、早产, 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。CVM 的遗传缺陷最早由丹麦科学家于 2001 年发现报道<sup>[2]</sup>, 引起了各国奶牛育种协会和育种工作者的重视。美国、英国、日本、瑞典、波兰和德国等国家相继报道了在荷斯坦牛群中存在 CVM 有害基因<sup>[3-8]</sup>。近年, 在中国荷斯坦牛群中也检出一定数量的 CVM 基因携带者<sup>[9-10]</sup>。

CVM 基因隐性纯合时表现病征, CVM 基因携带者表现正常, 但 CVM 基因携带者公牛在人工授精时会传播 CVM 缺陷基因, 一旦两杂合体交配, 隐性缺陷基因传播风险将大大提高, 将给奶牛业造成巨大经济损失。因此有必要建立快速、准确的方法从 DNA 水平筛查出表型正常的隐性遗传缺陷杂合子, 通过剔除 CVM 基因携带者公牛有效地控制 CVM 遗传缺陷, 减少畜群养殖的经济损失。

目前, CVM 有害基因的分子检测方法主要有等位基因特异性扩增方法 (Allele-specific polymerase chain reaction, ASPCR) 和聚合酶链式反应-引物诱导限制性分析 (Polymerase chain reaction-primer introduced restriction analysis, PCR-PIRA) 方法<sup>[11-12]</sup>, 但成本较高, 不适合规模化检测。李艳华等<sup>[9]</sup>采用聚合酶链式反应-单链构象多态性 (PCR-Single strand conformation polymorphism, PCR-SSCP) 方法对荷斯坦牛进行诊断分析, 但 PCR 扩增产物需要同时进行琼脂糖凝胶电泳和聚丙烯酰胺电泳来判定基因型。王帅等<sup>[10]</sup>应用错配 PCR 突变分析技术 (PCR mismatch amplification mutation assay, PCR-MAMA) 从国内荷斯坦公牛中检出 CVM 基因携带者, 该方法同样需要采用琼脂糖凝胶电泳判定结果。本研究根据 GenBank 已发表的 CVM 基因的 *SLC35A3* 序列, 设计合成了 1 对特异性引物和 2 条 *TaqMan* 探针, 经过反应条件的优化, 建立了奶牛脊椎畸形综合征 *TaqMan* 探针荧光 PCR 检测方法, 该方法只需 1 次加样便可直接从仪器中判定结果、避免了电泳等繁琐操作。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器

SLAN96P 荧光定量 PCR 仪器为上海宏石医疗

科技有限公司产品; 高速离心机为湖南湘仪科教仪器有限公司产品; 高压蒸汽灭菌器为上海博讯生物仪器有限公司产品。

### 1.2 样本

采集某口岸隔离期的荷斯坦种母牛的全血样品 292 份, 采用天根生化科技 (北京) 有限公司的血液、细胞、组织基因组 DNA 提取试剂盒 (货号: DP304-02), 从血液中提取基因组 DNA。按试剂盒说明操作, 提取后的基因组 DNA 于 -20 °C 条件下冻存备用。

### 1.3 质粒

CVM 基因的野生型质粒 (G/G 型)、突变型质粒 (T/T 型) 和杂合型质粒 (G/T 型) 由中国检验检疫科学研究院构建与保存。

### 1.4 引物、探针的设计与合成

根据 GenBank 已发表的奶牛遗传缺陷 CVM 基因的 *SLC35A3* 序列, 应用 DNASTAR 软件设计特异性 PCR 的引物和分别针对 CVM 基因野生型 (*SLC35A3-W*) 和突变型 (*SLC35A3-M*) 的探针。引物由上海捷瑞生物科技有限公司合成, 探针由上海基康生物技术有限公司合成。具体序列如表 1。

表 1 荧光 PCR 的引物与探针

Tab. 1 Primers and probes for real-time PCR

引物与探针名称	引物序列(5'→3')	产物大小/bp	$t_{退火}/^{\circ}\text{C}$
F1	AGCTGGCTCACAATTTGTAGGT		
R1	CTCAAAGTAAACCCAGCAAAG		
<i>SLC35A3-W</i>	VIC-TCATGGCA GTTCTCA	79	60
<i>SLC35A3-M</i>	FAM-TCATGGCA TTTCTCA		

### 1.5 检测方法的建立

分别取 1 μL 制备的 T/T 基因型、G/G 基因型、G/T 基因型混合质粒 DNA 作为模板, 荧光定量 PCR 反应体系包含 2 × Mix buffer 15 μL, 上、下游引物各 0.5 μL (10 μmol · L<sup>-1</sup>), 2 条探针各 1 μL (10 μmol · L<sup>-1</sup>), 加入超纯水至 30 μL。反应条件为 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s (采集荧光信号 FAM 和 VIC), 40 个循环; 反应在 SLAN96P 上进行。采用 SLAN96P 自带的分析软件进行分析。根据循环结束后终点荧光信号值的差异, 以 FAM 和 VIC 的荧光值为变量, 构建双变量散点图, 鉴定样品是否为野生型、突变型或杂合型。

### 1.6 特异性试验

为验证此方法检测特异性, 以 CVM 基因的突变型、野生型和杂合型的质粒标准品作为模板, 进行 *TaqMan* 荧光 PCR 检测。

## 1.7 敏感性试验

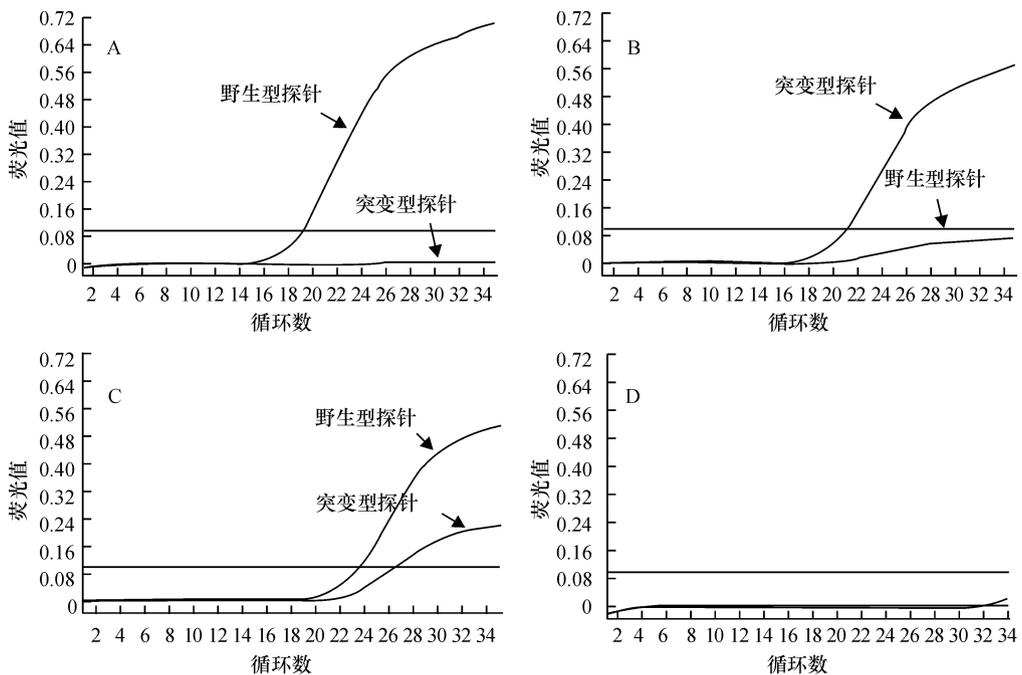
将质粒标准样品测定浓度后,按10倍的倍比稀释,以系列稀释度样品做为模板进行扩增,直至某一稀释度样品检测不出信号,将该浓度作为样品的检测下限,以测试该方法的灵敏度.

## 1.8 临床血液样品的检测

采用所建立的 *TaqMan* 探针检测方法对292份荷斯坦种母牛血液样品提取的DNA进行检测.

## 1.9 探针法的准确性比较

对 *TaqMan* 探针法分析为 G/T 基因型的样品以及部分为 G/G 基因型的样品进行普通测序分析,验证该方法与测序法的符合率,从而评价探针法的准确性.



A:野生型模板的扩增; B:突变型模板的扩增; C:杂合型模板的扩增; D:阴性模板的扩增.

图1 CVM 基因特异性试验

Fig.1 Specificity tests for CVM gene

## 2.2 敏感性试验

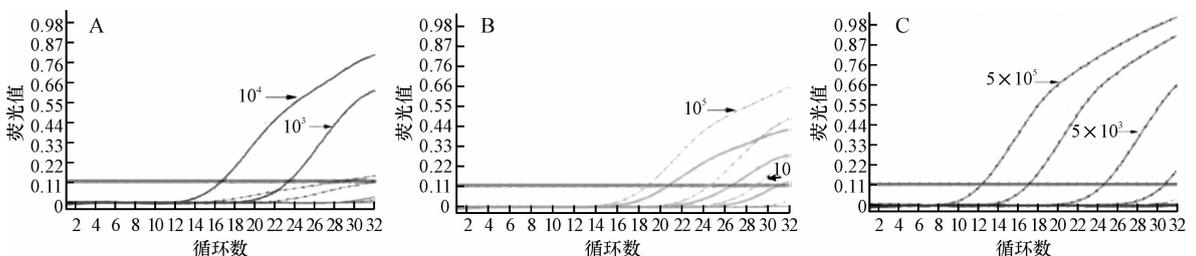
采用质粒提取试剂盒纯化阳性克隆质粒DNA,用微量核酸分光光度计测纯化质粒DNA样品的浓度.根据公式:质粒拷贝数 = 质粒DNA质量浓度 ( $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) / (质粒分子碱基数  $\times 10^{-15} \mu\text{g}$ ),将纯化

## 2 结果与分析

### 2.1 特异性分析

用双探针和引物在优化的反应程序下检测时,突变型、野生型和杂合型质粒标准品能够很好地区分,具体结果如图1所示.以野生纯合型质粒为模板扩增的结果显示野生型探针出现典型扩增,突变型探针未有荧光信号(图1A);以突变纯合型质粒为模板扩增的结果显示突变型探针出现典型扩增,野生型探针未有荧光信号(图1B).杂合型模板2种探针的信号都得到了有效的扩增,混合引物和探针能将突变型和野生型的模板有效地区分开来(图1C).针对阴性对照模板2种探针均未有起跳信号(图1D).

质粒DNA质量浓度换算成单位体积对应基因拷贝数.由此计算得到的各种基因型的检测灵敏度为:突变型质粒拷贝数  $1 \times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$  (图2A),杂合型质粒拷贝数  $1 \times 10^4 \mu\text{L}^{-1}$  (图2B),野生型质粒拷贝数  $5 \times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$  (图2C).



A:突变型模板; B:杂合型模板; C:野生型模板.

图2 CVM 基因敏感性试验

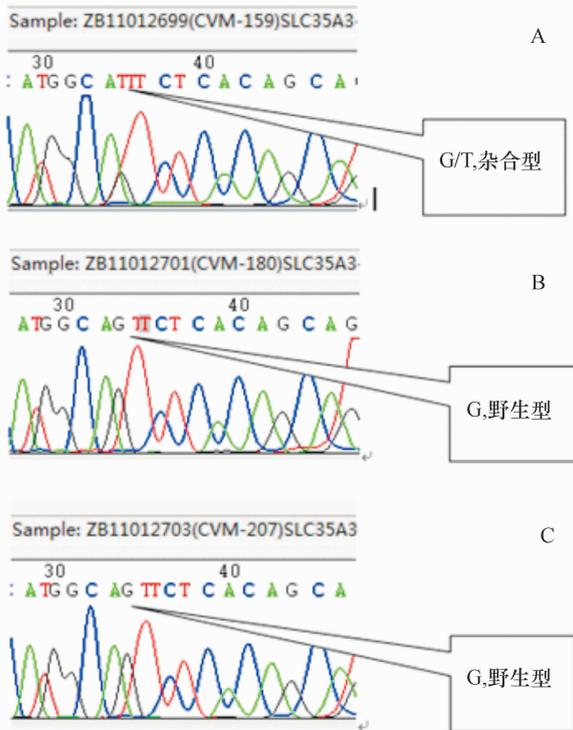
Fig.2 Sensitivity tests for CVM gene

## 2.3 临床样品的检测

在临床样品检测中,设 G/G、T/T 和 T/G 基因型质粒为对照,将 *TaqMan* 探针法的荧光 PCR 曲线分成 3 组.3 组基因型区别明显,有 3 种熔解曲线,292 例样品中 286 份为 G/G 基因型,6 份为 T/G 基因型.

## 2.4 准确性分析

从检测的临床样品中,挑选 3 个杂合型样品和 5 个野生型样品做测序分析,测序结果和 *TaqMan* 探针法分型结果吻合(图 3),说明 *TaqMan* 探针检测方法准确可靠.



A:G/T 杂合型;B、C:G/G 野生型.

图 3 临床样品基因组 DNA 测序图

Fig. 3 Graphics of genomic DNA sequencing of clinical samples

## 3 讨论

近年,我国多份研究报告显示,从国外引进的荷兰牛及国内奶牛厂养殖的荷兰牛中检出 *CVM* 基因携带者<sup>[9-10,13-14]</sup>.说明目前国内存在一定数量的 *CVM* 基因携带者.要防止 *CVM* 给养牛业带来损失最彻底的办法是在奶牛群体中彻底剔除 *CVM* 隐性有害基因,采用传统的数量遗传学方法——测交,需要进行长期的后裔测验,既费力又费钱.采用分子生物学方法可快速、准确、经济地筛查出种牛基因型.PCR-SSCP 法、PCR-MAMA 法与 PCR-PIRA 是有效筛查 *CVM* 致病基因的分子生物学方法,但 PCR 扩增产物需要同时进行酶切、琼脂糖电泳或聚丙烯酰胺凝胶电泳来判断基因型<sup>[9-10,13]</sup>,电泳检测环节相对

繁琐.

实时荧光 PCR 方法可以直接检测核酸,准确性高,且不需后续电泳,操作简便.探针法的优胜在于在上、下游引物之间引入了 1 条与目的模板特异性结合的荧光标记探针,增加了实时荧光 PCR 的特异性和敏感性<sup>[15]</sup>.本研究根据 GenBank 已发表的 *CVM* 基因的 *SLC35A3* 序列,设计合成了 1 对特异性引物和 2 条 *TaqMan* 探针,建立了奶牛脊椎畸形综合征 *TaqMan* 探针检测方法.检测方法能有效地区分突变型、野生型和杂合型.各种基因型质粒拷贝数的检测灵敏度为:突变型质粒拷贝数  $1 \times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$ ,杂合型质粒拷贝数  $1 \times 10^4 \mu\text{L}^{-1}$ ,野生型质粒拷贝数  $5 \times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$ .

李艳华等<sup>[9]</sup>采用 PCR-SSCP 法对北京地区 242 头公牛样品和 403 头母牛样品进行检测分析,*CVM* 基因携带率为母牛 5.71% 和公牛 8.82%.王帅等<sup>[10]</sup>利用 PCR-MAMA 法检测 154 头公牛,发现 23 头 *CVM* 基因携带者,携带率为 15.58%.范学华等<sup>[13]</sup>建立 PIRA-PCR 法从 587 头种公牛中检出携带者 56 头,携带率为 9.54%.本研究建立的 *TaqMan* 探针检测方法从 292 头母牛样品中检出 6 头 *CVM* 基因携带者,携带率为 2.29%.

为控制 *CVM* 对我国奶业生产带来的负面影响,首先应从牛群中筛选出 *CVM* 基因携带者,在选种、选配尽量不使用 *CVM* 基因携带者公牛和 *CVM* 基因携带者母牛配种,以减少隐性有害基因纯合致死给奶业生产带来的危害.另一方面,从国外引进种牛、牛遗传物质时应严防 *CVM* 基因携带者的潜入.本研究建立的方法简便快捷、准确率高,适用样品宽泛,适合大批样本筛选和口岸现场快速筛查.该方法对进一步提高我国检验检疫系统的检疫把关能力、防止不合格的国外相关产品进入国内,保护我国适当的动物卫生健康水平,促进我国奶牛业的健康发展,具有重要意义.

## 参考文献:

- [1] NIELSEN U S, AAMAND G P, ANDERSEN O, et al. Effects of complex vertebral malformation on fertility traits in Holstein cattle [J]. *Livestock Prod Sci*, 2003, 79 (2): 233-238.
- [2] DUNCAN R B, CARRIG C B, AGERHOLM J S, et al. Complex vertebral malformation in a Holstein calf: Report of a case in the USA [J]. *J Vet Diagn Invest*, 2001, 13 (4): 333-336.
- [3] AGERHOLM J S, BENDIXEN C, ANDERSEN O, et al.

- Complex vertebral malformation in a Holstein calves[J]. *J Vet Diagn Invest*, 2001, 13(4): 283-289.
- [4] REVELL S. Complex vertebral malformation in a Holstein calf in the UK[J]. *Vet Rec*, 2001, 149(21): 659-660.
- [5] NAGAHATA H, OOTA H, NITANAI A, et al. Complex vertebral malformation in a Stillborn Holstein Calf in Japan [J]. *J Vet Med Sci*, 2002, 64(12): 1107-1112.
- [6] BERGLUND B, PERSSON A, STALHAMMAR H. Effects of complex vertebral malformation on fertility in Swedish Holstein cattle [J]. *Acta Vet Scand*, 2004, 45(3): 161-165.
- [7] RUSC A, KAMINSKI S. Prevalence of complex vertebral malformation carriers among Polish Holstein-Friesian bulls [J]. *J Appl Genet*, 2007, 48(3): 247-252.
- [8] SCHUTZ E, SCHARFENSTEIN M, BREINIG B. Implication of complex vertebral malformation and bovine leukocyte adhesion deficiency DNA-based testing on disease frequency in the Holstein population [J]. *J Dairy Sci*, 2008, 91(12): 4854-4859.
- [9] 李艳华, 乔绿, 张胜利, 等. 北京地区荷斯坦牛脊柱畸形综合征的调查研究[J]. *中国奶牛*, 2011(8): 4-7.
- [10] 王帅, 赵学明, 朱化彬. 部分中国荷斯坦种公牛脊柱畸形综合征携带状况的检测和分析[J]. *畜牧兽医学报*, 2011, 42(7): 1027-1031.
- [11] GHANEM M E, AKITA M, SUZUKI T, et al. Complex vertebral malformation in Holstein cows in Japan and its inheritance to crossbred F1 generation [J]. *Anim Reprod Sci*, 2008, 103(3): 348-354.
- [12] KANAE Y, ENDOH D, NAGAHATA H, et al. A method for detecting complex vertebral malformation in Holstein calves using polymerase chain reaction-primer introduced restriction analysis [J]. *J Vet Diagn Invest*, 2005, 17(3): 258-262.
- [13] 范学华, 张毅, 公维嘉, 等. 我国荷斯坦种公牛 CVM 遗传缺陷基因的分子检测[J]. *中国畜牧杂志*, 2010, 46(19): 14-17.
- [14] 王洪梅, 李建斌, 侯明海, 等. 牛脊椎畸形综合征检测方法的建立与应用[J]. *遗传*, 2008, 30(9): 1223-1227.
- [15] 翟新验, 卢胜明, 刘钧. 实时 TaqMan PCR 技术在兽医学中的应用 [J]. *实验动物科学与管理*, 2002, 19(2): 50-53.

【责任编辑 柴 焰】

## 欢迎订阅 2016 年《华南农业大学学报》

《华南农业大学学报》是华南农业大学主办的综合性农业科学学术刊物。本刊主要报道农业各学科的科研学术论文、研究简报、综述等, 涵盖动物科学与兽医学、农学、园艺学、土壤肥料、植物保护、生物学、林业科学、农业工程与食品科学等学科。本刊附英文目次和英文摘要。读者对象主要是农业院校师生、农业科研人员和有关部门的专业干部。

本刊为《中国科学引文数据库》、《中国科技论文统计源(中国科技核心期刊)》及《中国学术期刊综合评价数据库》等固定刊源, 并排列在中国科学引文数据库被引频次最高的中国科技期刊 500 名以内。被《中文核心期刊要目总览》遴选为综合性农业科学核心期刊。为美国《化学文摘》、美国《剑桥科学文摘》、俄罗斯《文摘杂志》、英国《CABI》、英国《动物学记录》、《中国生物学文摘》及国内农业类文摘期刊等多家国内外著名文摘固定刊源。

国内外公开发售, 欢迎订阅。双月刊, 逢单月上旬出版, A4 幅面。定价 15.00 元, 全年 90.00 元。自办发行, 参加全国非邮发报刊联合征订发行, 非邮发代号: 6573。

订阅款邮汇至: 300381 天津市卫津南路李七庄邮局 9801 信箱, 全国非邮发报刊联合征订服务部。

《华南农业大学学报》编辑部