



台灣山羊族群鈣蛋白酶抑制蛋白基因多態性調查

謝佳容 陳若菁 吳明哲

1. 行政院農委會畜產試驗所遺傳育種組

一、前言

鈣蛋白酶抑制蛋白(Calpstatin)具有抑制鈣蛋白酶(Calpain)的功能，是決定肌肉生成與肉質柔嫩度的關鍵因子。先前研究中已證實在山羊的鈣蛋白酶抑制蛋白基因(CAST)中，位於exon 1C與exon 1D間，長約620 bp的片段裡具有基因多態性。本調查以PCR-RFLP分析台灣常見山羊族群，包含台灣黑山羊花蓮品系、台灣黑山羊恆春品系、吉安山羊、墾丁山羊、努比亞山羊、阿爾拜因山羊與撒能山羊等品種的CAST多態性，結果顯示台灣山羊族群100%為MM型。因此，進一步藉由定序分析了解此區段是否有台灣山羊族群特有的多態性。結果顯示努比亞山羊與阿爾拜因山羊在此區段的第190 bp、第362 bp、397 bp與475 bp處多有變異發生，而臺灣本土山羊與撒能山羊則無此情況。而了解山羊CAST基因的多態性可做為未來山羊基因選種的基礎。

二、試驗材料及方法

1. 本試驗使用之山羊品種與各品種頭數如表1所示。

2. 血樣採集

受試羊隻經由頸靜脈採血約5 mL，裝入有抗凝血劑的試管中存放於4°C下。

3. 山羊genomic DNA萃取

利用genomic DNA萃取試劑組，抽取genomic DNA，並冷凍保存。

4. PCR-RFLP

先以Othman, E. (2016)所提供之引子如表2，以山羊基因體DNA為模板進行PCR，其反應試劑配方與反應時間如表3與4所示。再取3 uL的PCR產物進行限制酵素MspI與NcoI剪切，處理後之產物以3.5%洋菜凝膠進行電泳分析。

5. PCR產物定序

取2 uL PCR產物依據標準操作程序以定序儀ABI 3730進行定序。

6. 定序結果分析

PCR產物定序結果以VectorNTI分析軟體進行DNA序列判讀，並標註變異位點。

表1. 本試驗羊隻品種與頭數

Breeds	Numbers
台灣黑山羊-花蓮品系 (HL)	3
台灣黑山羊-恆春品系 (HC)	14
吉安山羊 (JA)	3
墾丁山羊 (KT)	4
努比亞山羊 (NU)	37
撒能山羊 (SA)	22
阿爾拜因山羊 (AL)	22
Total	105

表2. 本試驗所用引子序列

Primer	Sequence	Ref.
cCAST_F	TGGGGCCCAATGACGCCATCGATG	Othman, 2016
cCAST_R	GGTGGAGCAGCACTTCTGATCACC	

表3. PCR試劑配方

Ingredients	Volume
Genomic DNA	1 ul
FW Primer (10 uM)	0.5 ul
RV Primer (10 uM)	0.5 ul
10X Buffer	2 ul
dNTP Mixture	1.6 ul
DNA Polymerase	0.1 ul
H ₂ O	14.3 ul
Total volume	20 ul

表4. PCR反應條件

Temperature	Time	Cycles
94°C	5 min	1
94°C	30 sec	
55°C	30 sec	30
72°C	30 sec	
72°C	10 min	1
4°C	∞	

三、試驗結果

1. PCR-RFLP結果

在MspI限制酶剪切的結果如圖1，顯示所有樣本皆有長度分別為336 bp與284 bp的片段產生，意謂受試的羊隻皆為之前文獻中所定義的MM型。而嘗試用另一個限制酶NcoI處理樣本，結果如圖2，僅一個來自於台灣黑山羊的樣本呈現同時具有620 bp、374 bp與248 bp片段，其餘樣本皆對NcoI的處理無反應。由此可知相較於過去文獻中所分析的中東地區原生種山羊與綿羊在此620 bp的片段可以MspI或NcoI加以鑑別，台灣的羊隻不論原生的黑山羊族群或外來的商用族群在此二酵素的切位均無變異。因此，我們進一步以定序的方式來了解各品種山羊族群在此一區段的差異。

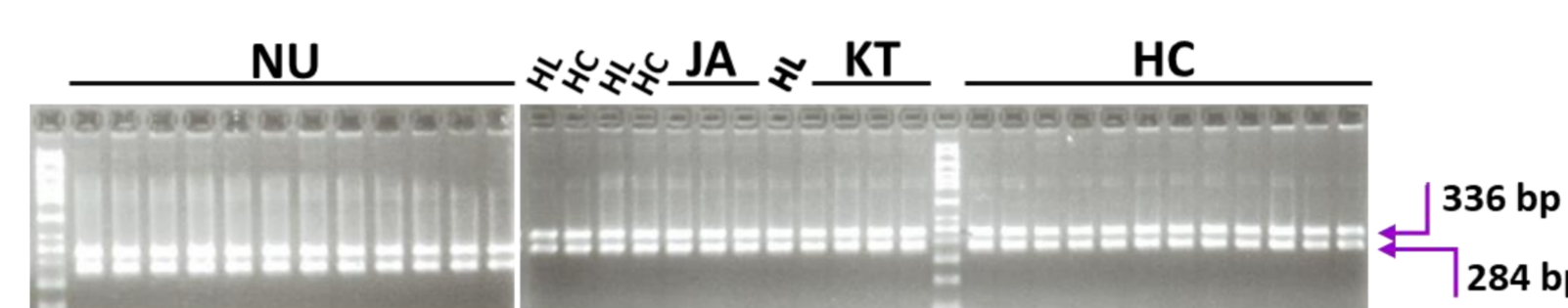


圖1. MspI限制酶剪切結果

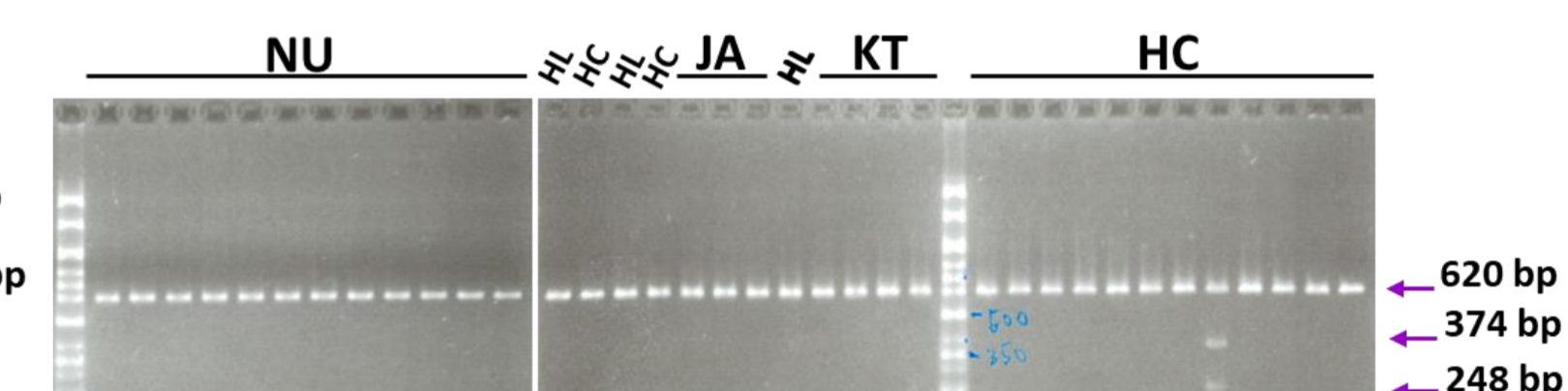


圖2. NcoI限制酶剪切結果

2. 定序結果與基因型判別

以NCBI中所提供之山羊CAST基因序列(GenBank: KX722536.1)為參考序列定義基因位點，在比對各品種山羊此620 bp片段的序列後，發現本土的黑山羊族群在此區域具有高度的一致性，惟外來的商用品種努比亞山羊及阿爾拜因山羊分別在190 bp、362 bp、397 bp與475 bp處有規律的出現鹼基的變化。比較外來商用品種在各位點的基因型與基因頻率(表5至表8)，撒能山羊與本土黑山羊族群相似，在此一區段內具高度一致性。而在326 bp位點處(表6)，只有努比亞山羊表現出變異，阿爾拜因山羊與撒能山羊一樣無變異。由此結果我們可以再進一步的了解這些基因是否具有連鎖不平衡的現象，並且這些族群是否有符合哈溫定律。

表5. 位於190 bp處的變異點其基因型與基因頻率

Breed	Genotype Frequencies						Allele Frequencies	
	GG		GA		AA		G	A
	No.	Freq.	No.	Freq.	No.	Freq.	Freq.	Freq.
Nubian	30	81.1%	6	16.2%	1	2.7%	89.2%	10.8%
Sanna	22	100.0%	0	0.0%	0	0.0%	100.0%	0.0%
Alpine	8	36.4%	12	54.5%	2	9.1%	63.6%	36.4%

表6. 位於326 bp處的變異點其基因型與基因頻率

Breed	Genotype Frequencies						Allele Frequencies	
	GG		GA		AA		G	A
	No.	Freq.	No.	Freq.	No.	Freq.	Freq.	Freq.
Nubian	27	73.0%	9	24.3%	1	2.7%	85.1%	14.9%
Sanna	22	100.0%	0	0.0%	0	0.0%	100.0%	0.0%
Alpine	22	100.0%	0	0.0%	0	0.0%	100.0%	0.0%

表7. 位於397 bp處的變異點其基因型與基因頻率

Breed	Genotype Frequencies						Allele Frequencies	
	GG		GA		AA		G	A
	No.	Freq.	No.	Freq.	No.	Freq.	Freq.	Freq.
Nubian	30	81.1%	6	16.2%	1	2.7%	89.2%	10.8%
Sanna	22	100.0%	0	0.0%	0	0.0%	100.0%	0.0%
Alpine	8	36.4%	12	54.5%	2	9.1%	63.6%	36.4%

表8. 位於475 bp處的變異點其基因型與基因頻率

Breed	Genotype Frequencies						Allele Frequencies	
	GG		GA		AA		G	A
	No.	Freq.	No.	Freq.	No.	Freq.	Freq.	Freq.
Nubian	30	81.1%	6	16.2%	1	2.7%	89.2%	10.8%
Sanna	22	100.0%	0	0.0%	0	0.0%	100.0%	0.0%
Alpine	8	36.4%	12	54.5%	2	9.1%	63.6%	36.4%

四、結論

CAST基因分別在山羊的乳肉品質上扮演重要的角色，因此本試驗為台灣常見山羊品種CAST基因基因型的初探，未來將結合體測資料、屠體資料及乳質檢測資料加以分析，以期藉由這些遺傳標記協助我們進行優質山羊的選育。