

即時聚合酶鏈鎖反應檢測努比亞山羊黏多醣症之基因型分析 Genotypic Analysis of Caprine Mucopolysaccharidosis Type IID by Real-time PCR Platform

朱家德⁽¹⁾ 林德育⁽¹⁾ 賴永裕⁽¹⁾ 陳若菁⁽¹⁾ 吳明哲⁽¹⁾ 張秀鑾⁽²⁾

⁽¹⁾行政院農業委員會畜產試驗所 ⁽²⁾國立屏東科技大學

C. T. Chu⁽¹⁾, D. Y. Lin⁽¹⁾, Y. Y. Lai⁽¹⁾, J. C. Chen⁽¹⁾, M. C. Wu⁽¹⁾ and H. L. Chang⁽²⁾

⁽¹⁾Taiwan Livestock Research Institute ⁽²⁾National Pingtung University of Science and Technology

緒言

山羊黏多醣症 (Mucopolysaccharidosis, MPS) IID型，是一種遺傳缺陷所導致的代謝性疾病。黏多醣學名為醣胺多醣 glycosaminoglycans (GAGs)，是體內含量最豐富的多醣體；因GAGs的溶液態具有高黏度，故稱為黏多醣 mucopolysaccharide。據線上動物孟德爾遺傳資料庫收集統計 (Online Mendelian Inheritance in Animals, OMIA)，黏多醣症除人類外，在狗、貓、牛、山羊、鴯 (emu) 等亦有發生。目前發現於山羊的黏多醣症是歸類於 MPS IID 型 (相當於人類黏多醣症第三型聖菲利柏氏症 D 型)，僅有單一品種努比亞 (Nubian) 山羊的 GNS (N-acetylglucosamine-6-sulphatase, 又稱 G6S) 基因的單點突變的分子生物報告 (Cavanagh *et al.*, 1995; Thompson *et al.*, 1992)，為一簡單的隱性基因遺傳，其突變點的位置在 G6S cDNA 第 322 個核苷酸上 (C→T)。

材料與方法

本試驗努比亞山羊為5場養羊場提供94頭種羊血液樣本。以螢光引子 (FAM/HEX-labelled Primer) 標記之即時聚合酶連鎖反應基因型檢測技術，分析努比亞山羊黏多醣症之正常型及有病型個體。將分析結果進行序列片段定序分析，並與山羊黏多醣症原MS-PCR檢測方法進行結果比對，期藉即時聚合酶連鎖反應基因型檢測平台建立，可精準判定山羊黏多醣症基因型，並降低基因型檢測時間與耗材成本。

結果與討論

運用即時聚合酶連鎖反應技術結果顯示，正常型基因型者具 FAM 藍色螢光，雜合型基因型者同時具 FAM/HEX 呈現綠色螢光，而有病型基因型者則具 HEX 紅色螢光 (圖1)。經序列片段定序結果顯示，正常型 G6S cDNA 第318-322之DNA序列為 GAGCC，有病型G6S cDNA 第318-322之DNA序列為 GAGCT (圖2)。分別運用即時聚合酶連鎖反應 (Real-time PCR)、聚合酶連鎖反應-限制酵素片段多態性 (PCR-RFLP) 與基因片段定序 (DNA Sequencing) 檢測方法比對5場養羊場提供94頭種山羊黏多醣症基因型結果顯示 (表1)，此3種檢測法判定之基因型皆相符合。綜合上述結果，以即時聚合酶連鎖反應檢測技術做為判斷努比亞山羊黏多醣症之正常型及有病型個體，可為另一種迅速判定山羊GNS黏多醣症基因型之檢測模式。

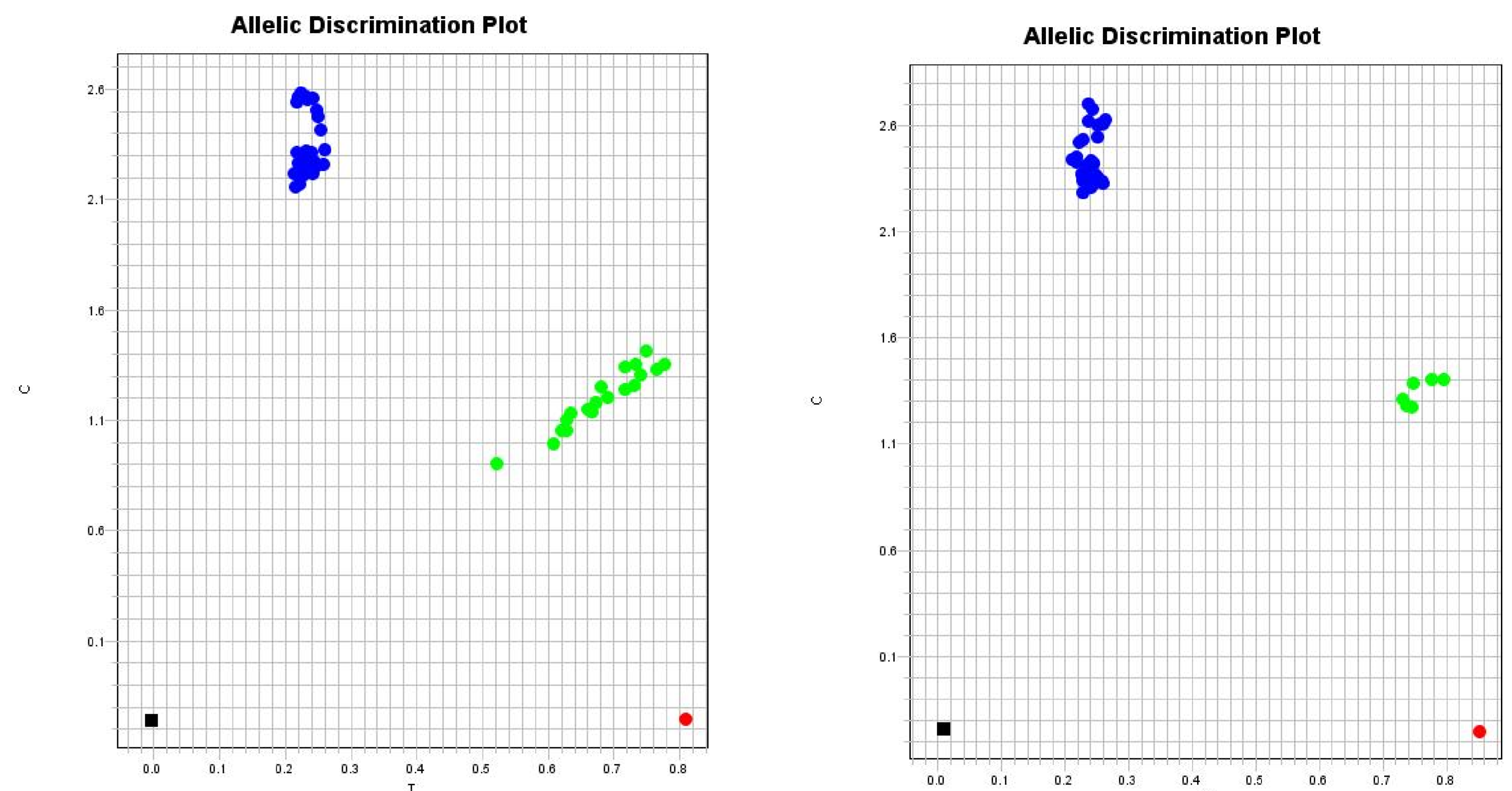


圖1. 運用即時聚合酶連鎖反應技術分析努比亞山羊黏多醣症之正常型、雜合型及有病型分布圖。

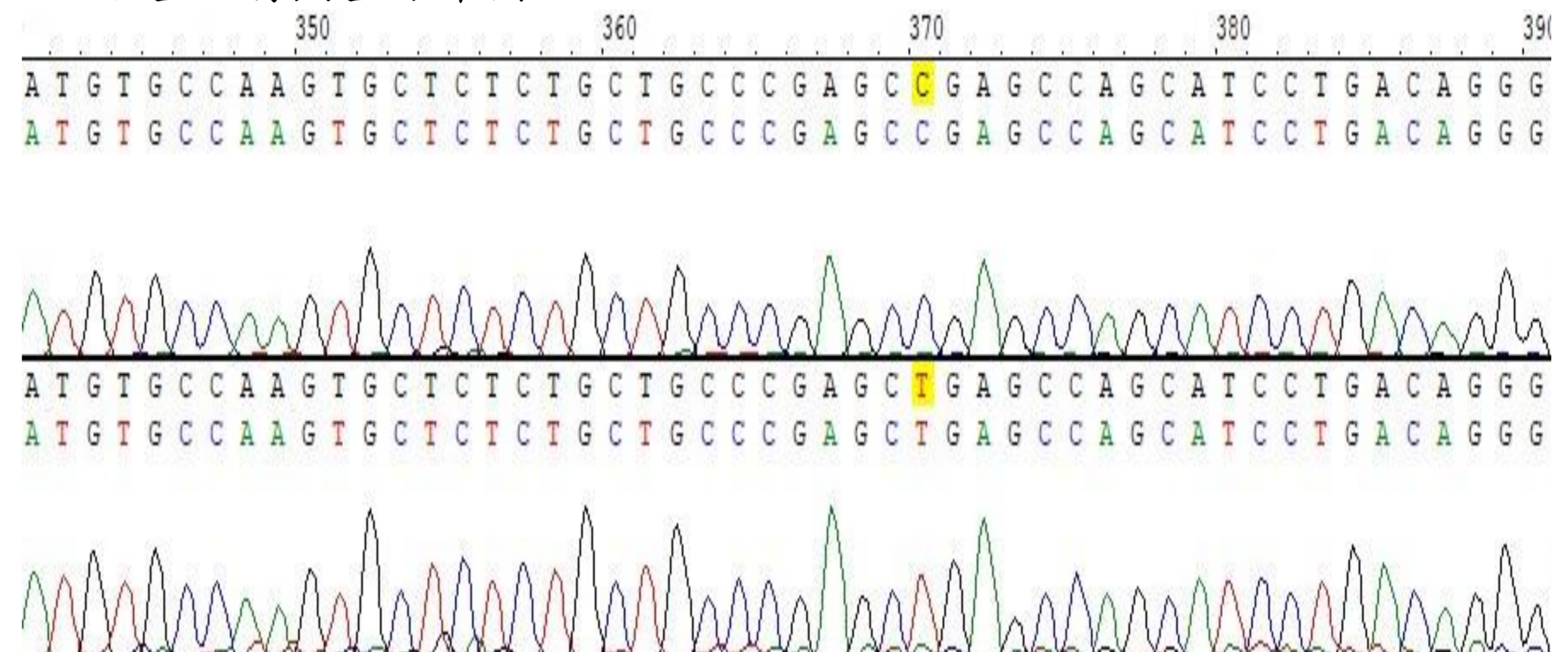


圖2. 運用ABI 3500xL定序儀分析努比亞山羊黏多醣症AA及BB型結果。

表1. 即時聚合酶連鎖反應技術分析養羊場努比亞山羊黏多醣症之基因型。

場別	樣本數	羊黏多醣症 (G6S) 基因型		
		AA	AB	BB
養羊場 1	5	2	1	2
養羊場 2	2	0	2	0
養羊場 3	16	0	16	0
養羊場 4	16	15	1	0
養羊場 5	55	50	5	0
總計	94	67	25	2