

# 基因鑑定與種豬登錄

黃木秋<sup>1\*</sup> 陳依婷<sup>1</sup> 楊國泰<sup>1</sup> 黃章文<sup>1</sup> 吳建平<sup>1</sup> 顏念慈<sup>2</sup> 張直<sup>3</sup>  
朱慶誠<sup>4</sup> 王旭昌<sup>5</sup> 謝明學<sup>5</sup>

<sup>1</sup>國立中興大學畜產學系 <sup>2</sup>農委會畜產試驗所 <sup>3</sup>屏東科技大學畜產系  
<sup>4</sup>行政院農業委員會畜牧處 <sup>5</sup>中央畜產會家畜組

## 前言

雅典奧運如火如荼的進行，跑得更快、耐力更久，是運動員共同的願望。只有兩千多萬人口的澳洲，在奧運上獲獎總數排名第四，僅次於美國、俄國與中國，領先於人口數較多的日、法、德、英等國。英國倫敦大學 UCL 的研究人員，最近發現了控制人類運動表現的基因。澳洲政府已積極資助研究機構檢測與運動員精力、耐力有關的基因，藉此測試肌肉與心臟的強弱，進行基因鑑定，以期找出具有運動潛力的人才，培育成明日之星。種豬登錄、種豬檢定、豬場評鑑及國家核心豬場曾被譽為台灣種豬改良的四維。種豬之重要經濟性狀若能進行基因鑑定並予登錄，相信在豬隻育種上會有相當的價值。

憶起我國在一九八二年八月間，行政院院會通過國家發展資訊科技、生物科技、自動化科技、雷射科技、食品科技、肝炎防治、能源科技、材料科技等八大重點科技方案。其中的資訊科技，由於李國鼎及孫運璿先生極力催生，引進半導體積體電路技術，當年政府投入了二十五億元，最後開創了年逾六千億元之產值，造就了舉世聞名的台灣經濟奇蹟。也是八大重點科技之一的生物科技，由於發展潛力無限與應用範圍很廣，勢將成為二十一世紀的主流科技。隨著生物科技以的驚人速度發展，目前已有五千多種人類的疾病證實與基因遺傳有關，還有愈來愈多的研究發現，癌症或者像阿茲海默氏症、糖尿病、高血壓等中老年疾病，與基因遺傳脫不了關係。利用基因鑑定，預測誰是異常，何時發病，甚至成為常規檢查項目，都已經不是難事。目前美國每年平均做四百萬次疾病的基因鑑定。利用基因鑑定技術，不用排八字、看星座，醫生就能告訴你，患了什麼病，比算命還靈驗。在台灣目前就有專門從事基因檢測這一類服務的公司，已經不足為奇。事實上，基因鑑定技術在畜產方面也有很大的運用空間，例如在豬育種方面，可利用基因鑑定技術檢，檢測相關的重要經濟性狀之遺傳標記，作為種畜早期選汰之指標。以下僅就基因鑑定技術在種豬登錄方面運用的可能性做重點式的闡釋。

## 一、個體鑑定

精液之售價，因種公豬品種/系或育種價之高低而有差異，吾人可利用基因鑑定技術，檢測豬精液DNA指紋，建立豬精液DNA指紋資料庫，供進行個體鑑定之用，可以避免高、低價精液間之誤用，確保種豬登錄之品質。

每個人手指頭的指紋有其特異性，因此可以利用手指頭的指紋，進行個體或親子關係鑑定，提供法院案件裁判之證據人之DNA指紋具有與手指頭的指紋同樣的識別功能 (Jeffreys *et al.*, 1985)。禽、畜的基因組DNA也可以建立指紋，它也與人者一樣具有個體之特異性(Jeffreys and Morton,

1987; Shiau and Huang, 1997; Horng and Huang, 2003; Huang *et al.*, 2003a,b)。同一個體任何細胞之DNA指紋環帶都是一樣的，例如採自同一個體之血液、精液、唾液、尿液、或髮根之細胞DNA，作成之DNA指紋均同。除了同卵雙生之雙胞胎外，不同個體會不同之DNA指紋。此技術亦可用於種公豬個體之鑑定。DNA指紋鑑定的方法有多種，以下為常用的方法：

#### (一) 以重複序列探針建立DNA指紋

家畜、禽基因組DNA中，廣泛存在重複序列，長度約9~64個寡核苷酸對。此類型的DNA片段一前一後反覆重複的縱列於基因組DNA中，縱列的長度約為0.1~20kb (Nakamura *et al.*, 1987)。吾人可將家畜、禽基因組DNA萃取出來，利用限制酶將之切割成長短不同之片段，在洋菜膠體中電泳，使長短不同之DNA片段分開，再將膠體中之DNA轉移至硝化纖維濾紙上，利用重複序列探針與之雜交，經自動放射顯影後，可在X-光片上產生具個體特異之多態性環帶，即可建立DNA指紋(Shiau and Huang, 1997; Ledwith *et al.*, 1990)。

#### (二) 逢機增殖多態性DNA指紋

另一種建立DNA指紋方式是用逢機序列核苷酸單一引子，以基因組DNA為模板，進行聚合酶連鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)增殖基因組DNA，以建立逢機增殖多態性DNA(Random Amplified Polymorphic DNA; RAPD)指紋(Yen *et al.*, 2001; Williams *et al.*, 1990)。此反應的基本原理是使引子附著於模板DNA的兩個以上不同位置，以增殖出不同長度的DNA片段。逢機增殖多態性DNA指紋之建立一般是使用10個核苷酸長的引子。引子通常是逢機序列，至少含有50%的G和C。多態性的形成是來自引子結合位置序列之改變，不同個體間的遺傳組成不同，引子可以煉合處即不相同，因而增殖出的DNA片段也就不同，諸如點突變即會妨礙標的位置與引子之結合，其他諸如倒置、缺失、重複、易位及插入等染色體結構改變皆會影響引子煉合位置(Waugh and Powell, 1992)。此種多態性被當作顯性的遺傳標記，且是依孟德爾定律的方式遺傳(Williams *et al.*, 1990)。

影響逢機增殖多態性DNA指紋泰樣的因素中，引子濃度是一重要的關鍵(Muralidharan and Wakeland, 1993)。引子濃度大約0.1到2.0 $\mu$ M之間是最理想的。在較低的濃度下，以EtBr染色的瓊脂糖膠體中，很難發現低濃度下產生的微量增殖產物，太高引子濃度，會增殖出複雜的環帶而呈現模糊的現象(Williams *et al.*, 1993)。

#### (三) AFLP指紋

將家畜、禽的基因組DNA以限制酶切割後，接上雙股寡核苷酸接合子，藉由與接合子序列完全互補且於3'端攜帶有1~3個篩

選核苷酸之篩選性引子進行兩次以上之 PCR。增殖出之產物以聚丙烯醯胺膠體進行電泳將片段分離，再經自動放射顯影或螢光序列分析儀即可現出具有多態性之 AFLP(amplified fragment length polymorphisms, AFLP)指紋態樣。

AFLP指紋技術產生具差異性之片段數目與長度分佈會受到所選用之限制酶與搭配之接合子以及篩選性引子對於基因組DNA上之切割、接合及增殖作用的影響。*EcoRI* / *MseI*常被用於切割G+C含量較少之基因組 (Janssen *et al.*, 1996)。為了避免兩種接合子發生自接反應，其5'端不需經磷酸化作用。於引子分別加上1、2及3個鹼基，能有效地降低增殖片段數目，再配合兩次之PCR增殖將可減少環帶的數目。

## 二、親子關係鑑定

親子與血緣關係鑑定之方法，過去常使用多態性蛋白質標記，例如紅血球細胞抗原、血清酵素和組織相容性抗原。然而，這些方法所需耗費的人力和時間較多，且所能提供的訊息也很有限，另外常常因為高機率的相似性，常會導致判斷上的誤判以及增加其困難度。DNA指紋具有較多的DNA環帶，是作為親子關係鑑定的有利工具。Williams *et al.* (1990)提出一個以逢機引子利用聚合酶連鎖反應增殖基因組DNA之方法，建立DNA指紋。此法最重要的一點是在分析時不需要有種別特異性的引子，一般常使用的引子即可適用於任何來源之基因組，且此一DNA指紋環帶是循孟德爾法則自親代遺傳至子代，由於子代之遺傳物質父母雙方提供各半，因此子代DNA指紋個環帶不是來自父親，就是來自母親，故可利用之進行親子關係鑑定。本研究室曾利用此一DNA指紋技術鑑定禽畜之親子關係 (Horn and Huang, 1998)。由於粒線體DNA是經由母本傳遞至子代，故本研究室也曾利用SSCP (single strand conformation polymorphism)技術檢測粒線體DNA也可以進行親子鑑定(圖1)。

## 三、品種/品系鑑定

種豬登錄品種或品系之確認有其重要性。吾人可利用DNA指紋技術來鑑定種豬之品種或品系。Lee *et al.* (1994)DNA指紋技術建立牛的DNA指紋圖譜，利用圖譜的比對來進行種別間的鑑定。Gwakisa *et al.*(1994)亦利用RAPD產生之多型性遺傳標記，來比較坦尚尼亞境內三種不同品種的Zebu牛，結果發現可用之於品種鑑定。除此之外，以RAPD產生具特徵性差異之DNA指紋，亦被成功地應用於老鼠各品系之鑑定。本研究室曾利用DNA指紋技術鑑定禽畜之品種 (Huang *et al.*, 2003a)。

## 四、重要經濟性狀遺傳標記之檢測

種豬之重要經濟性狀之遺傳標記如能被篩檢並予登錄，對加速豬隻之遺傳改良將會有莫大的助益。生長、屠體品質與繁殖效率等均為豬隻重要經濟性狀。近年來利用分子遺傳技術探討豬隻重要經濟性狀之遺傳標記獲得相當的成果，目前許多豬隻重要經濟性狀之遺傳標記已被研究，且獲有相當成果。諸如與豬肉質性狀有關之FABP(fatty acid binding protein) (Urban *et al.*, 2002)、CRC(calcium release channel) (Stratil *et al.*,

2002)、RN (rendement Napole) (Moeller *et al.*, 2003)基因；與豬繁殖性狀有關之ESR(estrogen receptor)、PRLR(prolactin receptor)、RBP4(retinol binding protein 4) (Harney *et al.*, 1993)、OPN (osteopontin) (Garlow *et al.*, 2002)基因；可能與豬生長有關之MC4R (melanocortin-4 receptor) ( Kim *et al.*, 2000； Kim *et al.*, 2004) 等基因，不勝枚舉。

隨著基因圖譜及基因定序的完成，人們對於功能性基因學產生極大興趣。功能性基因學主要在研究基因與其所衍生之功能性狀之關係。以期能瞭解動物性狀之遺傳標記，進而改善動物之性狀。限制性片段長度多態性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)、微衛星(microsatellites)多態性、單一核苷酸多態性(single nucleotide polymorphisms, SNPs)等技術，常被用來檢測動物性狀之遺傳標記。前兩者之運用往往受限於單位時間內能分析之樣品數有限，SNPs 技術能適用於大量樣品數的分析。本研究室曾利用 SNPs 技術進行豬肉質有關之心臟型脂肪酸結合蛋白(H-FABP)基因鑑定，並將之與經 PCR 增殖及限制酶切割電泳產生之 RFLP 態樣者做比較，證實利用 SNPs 技術進行心臟型脂肪酸結合蛋白(H-FABP)基因鑑定是可行的(圖 2, 3)。利用基因晶片進行基因檢測可以準確大量的篩檢基因。在人類，肝癌是癌症死亡榜首。台灣 300 萬的 B 肝帶原者中，75%的人最後會演變成肝硬化、甚至是肝癌，定期抽血、照超音波，檢驗準確率只有 7 成，工研院和醫界聯手，積極研發肝癌的基因篩檢晶片。經過 5 年研發，工研院研發基因晶片，只要一滴血，就能知道帶原者會不會轉成肝癌，準確率高達 95%。基因晶片技術，除了可以用來進行基因鑑定外，在育種上也可以用來篩選重要經濟性狀之基因。本研究室曾利用晶片技術來篩選動物之基因(圖 4)。

## 參考文獻

- Garlow, J. P., H. Ka, G. A. Johnson, R. C. Burghardt, L. A. Jaeger and F. W. Bazer. 2002. Analysis of osteopontin at the maternal-placental interface in pigs. *Biol. Reprod.* 66: 718-725.
- Gwakisa, P. S., S. J. Kemp and A. J. Teale. 1994. characterization of Zebu cattle breeds in Tanzania using random amplified polymorphic DNA markers. *Anim. Genet.* 25:89-84.
- Harney, J. P., T. L. Ott, R. D. Geisert and F. W. Bazer. 1993. Retinol-binding protein gene expression in cyclic and pregnant endometrium of pigs, sheep and cattle. *Biol. Reprod.* 49: 1066-1073.
- Hornig, Y. M. and M. C. Huang. 1998. Random amplified polymorphic DNA fingerprinting for parentage identification in the Holstein cattle. *J. Agr. Assoc. China* 183: 88-96.
- Hornig, Y. M. and M. C. Huang. 2003. Male-specific DNA sequences in pigs. *Theriogenology* 59:841-848.
- Huang, M. C., Y. M. Hornig, H. L. Huang and M. J. Chen. 2003a. RAPD Fingerprinting for the Species Identification of Animals. *AJAS* 16:1406-1410.
- Huang, M. C., W. C. Lin, Y. M. Hornig, R. Rouvier and C. W. Huang. 2003b. Female-specific DNA sequences in geese. *Brit. Poultry Sci.* 44:359-364.
- Janssen, P., R. Coopman, G. Huys, J. Swings, M. Bleeker, P. Vos, M. Zabeau and K. Kersters. 1996. Evaluation of the DNA fingerprint method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. *Microbiology* 142:1881-1893.
- Jeffreys, A. J. and D. B. Morton. 1987. DNA fingerprints of dogs and cats. *Anim. Genet.* 18: 1-15.
- Jeffreys, A. J., V. Wilson and S. L. Thein. 1985. Individual-specific "fingerprints" of human DNA. *Nature* 316: 76-79.
- Kim K. S., N. Larsen, T. Short, G. Plastow and M. F. Rothschild. 2000. A missense variant of the porcine melanocortin-4 receptor (MC4R) gene is associated with fatness, growth, and feed intake traits. *Mamm. Genome* 11: 131-5.
- Kim K. S., J. M. Reecy, W. H. Hsu, L. L. Anderson and M. F. Rothschild. 2004. Functional and phylogenetic analyses of a melanocortin-4 receptor mutation in domestic pigs. *Domest Anim Endocrinol.* 26: 75-86.
- Ledwith, B. J., S. Manam, W. W. Nicholls and M. D. Bradley. 1990. Preparation of synthetic tandem repetitive probes for DNA fingerprinting. *BioTechniques* 9: 149-152.
- Lee, C. S., Y. B. Yoo, S. J. Oh, T. Y. Chung and J. C. Ryu. 1994. Meat identification of Korean native cattle (Hanwoo) and cattle breeds from abroad by DNA polymorphic analysis. *Bio/Technology* 36: 222-226.
- Moeller S. J., T. J. Baas, T. D. Leeds, R. S. Emnett and K. M. Irvin. 2003 Rendement Napole gene effects and a comparison of glycolytic potential and DNA genotyping for classification of Rendement Napole status in Hampshire-sired pigs. *J Anim Sci.* Feb;81: 402-10.
- Muralidharan, K. and E. K. Wakeland. 1993. Concentration of primer and template qualitatively affect products in random-amplified polymorphic DNA PCR.

BioTechniques 14 : 362-364.

- Nakamura, Y., M. Leppert, P. O. Connell, R. Wolff, T. Holm, M. Culver, C. Martin, E. Fujimoto, M. Hoff, E. Kumlin and R. White. 1987. Variable number of tandem repeat (VNTR) marker for human gene mapping. *Science* 235: 1616-1622.
- Shiau, J. W and M. C. Huang. 1997. The probe of repeat sequence for DNA fingerprinting in Holstein cattle. *J. Agr. Assoc. China* 177:1-10.
- Stratil A, G. Reiner, L. J. Peelman, R. Davoli, M. Van Poucke, P. Zambonelli and H. Geldermann. 2002. An Alw 26I PCR-RFLP in exon 1 of the porcine SKI oncogene and mapping the gene to the RYR1 (CRC) linkage group on chromosome 6. *Anim Genet.* 33: 377-9.
- Urban T, R. Mikolasova, J. Kuciel, M. Ernst and I. Ingr. 2002. A study of associations of the H-FABP genotypes with fat and meat production of pigs. *J. Appl. Genet.* 43: 505-9.
- Waugh, R. and W. Powell. 1992. Using RAPD markers for crop improvement. *Trends in Biotech.* 10: 186-191.
- Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski and S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535.
- Williams, J. G. K., R. S. Reiter, R. M. Young and P. A. Scolnik. 1993. Genetic mapping of mutation using phenotypic pools and mapped RAPD markers. *Nucleic Acid Res.* 21: 2697-2702.
- Yen, N. T., M. C. Huang and C. Tai. 2001. Genetic variation of RAPD polymorphisms in Taoyuan and Duroc pigs. *J. Anim. Breed. & Genet.* 118: 111-118.

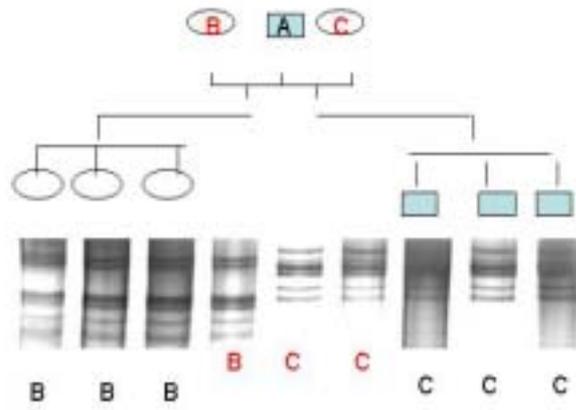
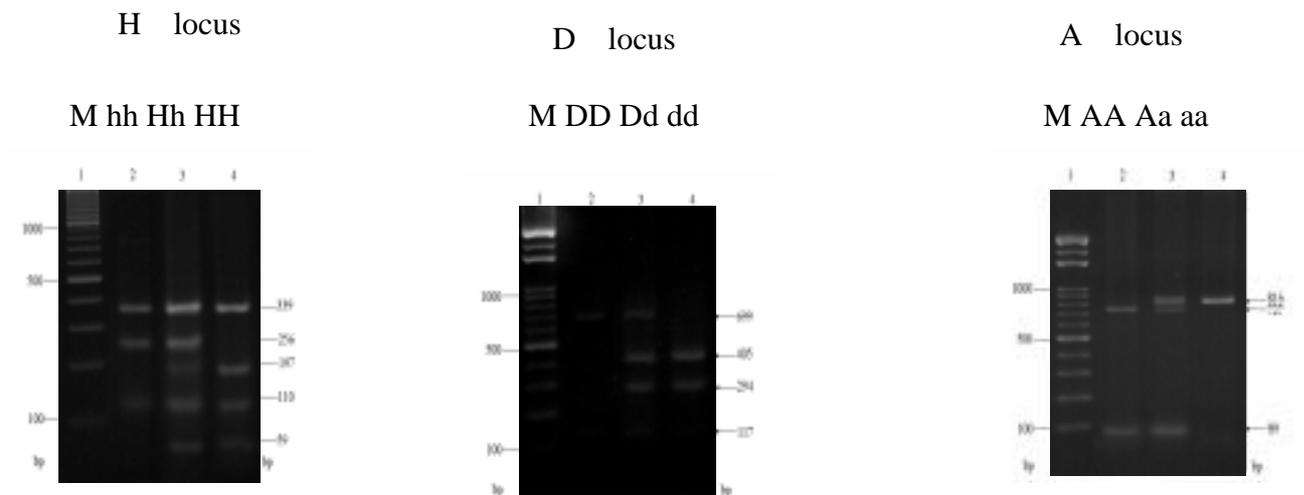


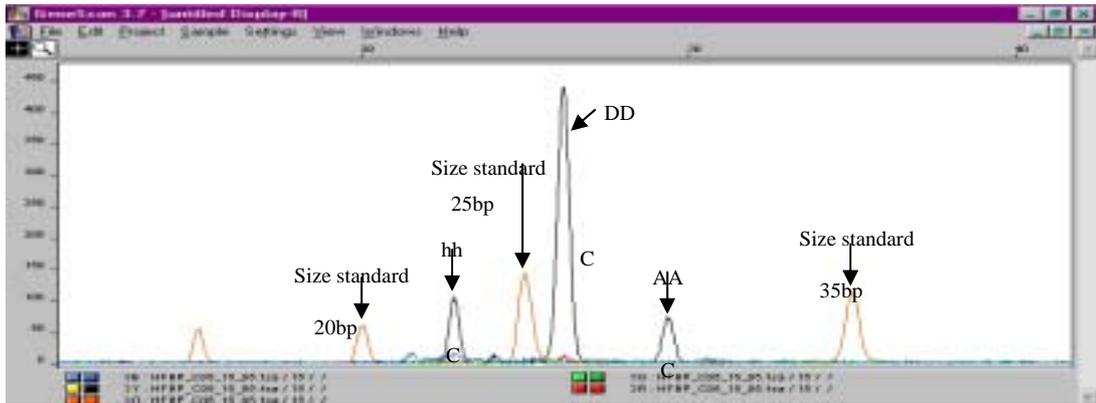
圖 1.利用 SSCP (single strand conformation polymorphism)技術  
 檢測豬隻粒線體 DNA 進行親子鑑定。



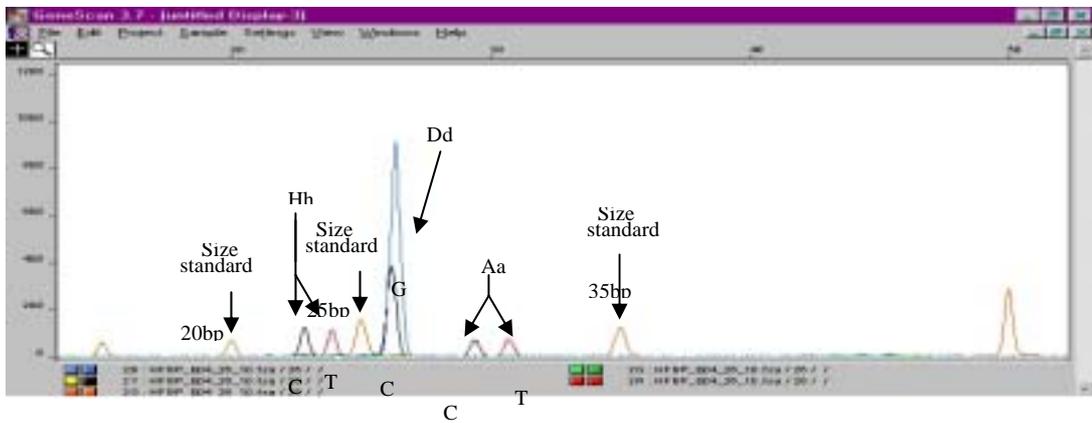
Lane1 : markers , Lane 2 : hhDDAA ; Lane 3 : HhDdAa ; Lane 4 : HHddaa

圖 2.將豬隻基因組 DNA 以 PCR 增殖後用限制酶切割，電泳產生之 RFLP 態樣後，  
進行心臟型脂肪酸結合蛋白(H-FABP)基因鑑定。

1. 基因型組合為 hhDDAA 分析結果：



2. 基因型組合為 HhDdAa 分析結果：



3. 基因型組合為 HHddaa 分析結果：

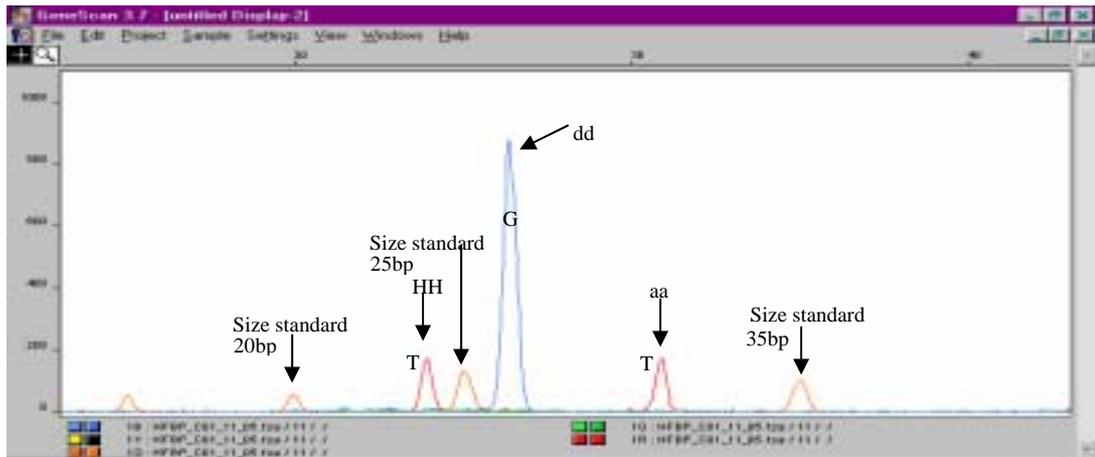


圖 3. 利用 SNPs 技術進行豬肉質有關之心臟型脂肪酸結合蛋白(H-FABP)基因鑑定，並將之與經 PCR 增殖及限制酶切割電泳產生之 RFLP 態樣者做比較，證實利用 SNPs 技術進行心臟型脂肪酸結合蛋白(H-FABP)基因鑑定是可行的。

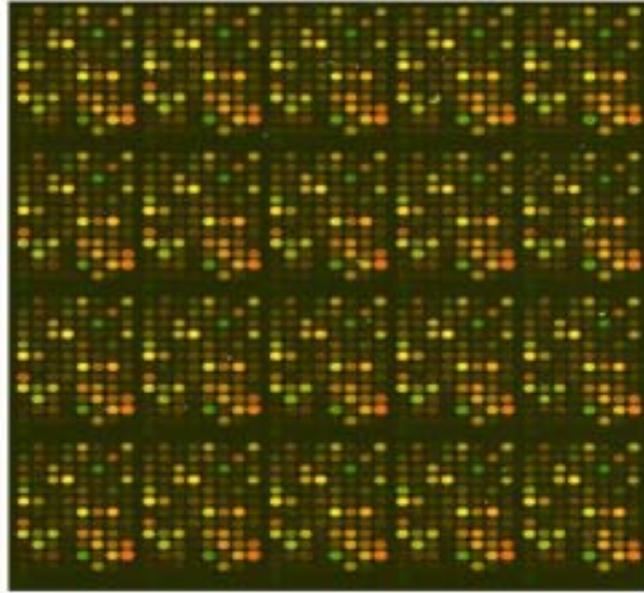


圖 4.基因晶片技術，除了可以用來進行基因鑑定外，在育種上也可以用來篩選重要經濟性狀之基因。