

75-4

台灣牛傳染性鼻氣管炎病毒流行株之 核酸限制酶分析

呂榮修 鄭懋勁

台灣省家畜衛生試驗所

由牛傳染性鼻氣管炎病毒 (Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus, IBRV) 感染細胞直接抽取 DNA, 將本省野外分離株 1986 年 2 株 (IBRV-1973, IBRV-DS), 1987 年 2 株 (IBRV-YL, IBRV-KS), 外國分讓強毒 2 株 (IBRV-US 1, IBRV-US 2), 弱毒株 2 株 (IBRV-JAP, IBRV-US 3) 以 Hind III, Eco RI, Bam HI, Bgl II 與 Pst I 進行核酸限制酶分析, 結果發現 IBRV-YL 與 IBRV-KS 較為類似, 而 IBRV-1973 或 IBRV-DS 與其它毒株相較則稍有不同, 另外 IBRV-JAP 弱毒株之病毒斑點小而生長速度慢, 其分子量與 IBRV-DS 株比較約有 750 bp 之缺失突變 (deletion), 是有潛力之弱毒疫苗株。本試驗未發現傳染性膿胞陰戶腔炎 (Infectious Pustular Vulvovaginitis) 之毒株。

由本省分離之 IBRV-DS 株以超高速梯度離心純化病毒, 並以不同的限制核酸酶切割後電泳, 測得核酸之平均分子量約為 88×10^6 dalton。由感染細胞抽取病毒 DNA 量與由上清液抽取之病毒 DNA 量比較可供電泳之次數, 結果發現感染細胞內之病毒 DNA 至少是上清液中 DNA 量之十倍。

牛傳染性鼻氣管炎 (Infectious Bovine Rhinotracheitis; IBR) 係由牛疱疹性病毒一型 (Bovine Herpesvirus 1; BHV-1) 感染牛隻而引起以呼吸道症狀為主徵之疾病, 急性者亦致死亡。牛病毒中以本病在世界污染最為嚴重, 本省牛隻在早年即有抗體存在⁽²⁾, 但均未有流行。然而至 1986 年本省高雄、

屏東、台南三縣首度發生大流行⁽¹⁾, 雖然傳播甚廣, 但成牛均可耐過恢復。直至 1987 年又因進口牛引發本病在中南部再度大流行, 本次流行則造成相當數量牛隻之死亡。從臨床調查顯示台灣牛隻對兩次流行毒株的感受性不同, 但在過去的研究均證實本病無血清學上的差異^(4,5,6), 故對此微細的差異需要有更精密的

分類與區別方法。本次試驗即採用核酸限制酶 (DNA Restriction Endonuclease) 對本省兩次流行毒株，外國強毒株及弱毒株進行分析比較，同時本試驗亦在建立本病毒之核酸限制酶快速分析系統。

材料與方法

毒株來源與株化：

毒株係本省野外分離株 1986 年 2 株 (IBRV-1973, IBRV-DS), 1987 年 2 株 (IBRV-YL, IBRV-KS), 外國分讓強毒 2 株 (IBRV-US1, IBRV-US2), 弱毒 2 株 (IBRV-JAP, IBRV-US3), 各毒株之來源、性狀、分離部位分別列於表一。各毒株之株化分別以極限稀釋法接種於長滿 MDBK 細胞之 96 孔組織培養盤 (Nunc), 並以含有 0.5% Methyl Cellulose 與 2% 胎牛血清之 MEM 維持, 40 小時後選取形成單一斑點之孔, 如此連續株化 (cloning) 3 次。DNA 之純化：

經過株化之 IBRV, 分別以 5 MOI (Multiplicity of Infection) 接種於 80 cm² 長滿 MDBK 細胞之組織培養瓶, 於 18 小時後, 細胞病變效應達 100% 時, 收取細胞, 依 Studdert 法⁽⁹⁾ 連同細胞與病毒抽取 DNA, 即以含 1% SDS 與 100 μg/ml 之 proteinase K 在 37°C 過夜消化, 再以 phenol, chloroform 順序各抽取 2 次, 最後以 ethanol 沈澱 DNA, 並還原於 TE 緩衝液 (0.01 M Tris, pH 8.0, 0.001 M EDTA)。另外 IBRV-DS 株亦以純化病毒後再抽取 DNA, 以與前者方法比較, 即以同樣的方法接種, 於 18 小時後收取上清液, 以 PEG 6000 濃縮後, 再以連續蔗糖梯度, 35000 rpm 超高速離心 3 小時, 收取密度 1.16 ~ 1.20 g/cm³ 層, DNA 的抽取與前法相同。DNA 之酵素切割與分析：

IBRV 之 DNA 切割分別以限制酶 Hind III, EcoRI, BamHI, Bgl II, Pst I (BRL) 依其說明書用法操作並均使用 5 倍量之限制酶以保證完全切割, 切割過之 DNA 以 0.6% agarose 凝膠在 TAE 緩衝液 (0.04 M Tris-acetate, 0.002 M EDTA) 中進行潛水式

電泳, 電泳為 1.5 V/cm 進行 16 小時或 42 小時, 並以 0.5 μg/ml 之 Ethidium Bromide 染色, 再以 UV 呈色照相。

IBRV 之 DNA 分子量決定：

DNA 之標準分子量採用 Marker III (λ/Hind III + λ/EcoRI digest mixture, NIPPON GENE) 與高分子量 DNA 標準 (BRL), 並以依 Weber⁽¹⁰⁾ 法計 IBRV-DS 株 DNA 之 Hind III, EcoRI, BamHI Bgl II 之切割片段分子量。

結 果

從純化的 IBRV-DS 株以 Hind III, EcoRI, BamHI, Bgl II, Pst I 五種酵素切割 (如圖 1), 得知 Hind III 切割出 15 個片段, EcoRI 切割出 7 個片段, BamHI 切割出 11 個片段, Bgl II 切割出 10 個片段, 而 Pst I 則切出甚多的小片段。在 Hind III 切割之片段中, C, D, F 片段是 1/2 莫耳, 故可見呈色較淡, 而 G, H, I 三個片段大小相差不多, 聚在一起 (共 2 1/2 莫耳) 呈現單一較粗電泳帶, 最小的 O 片段僅 0.36 kb, 已經電泳遠離而不存於圖一。其他 EcoRI, BamHI, Bgl II 切割之片段亦有重疊或 1/2 莫耳之情形可參見表 2。從 Hind III, EcoRI, BamHI, Bgl II 的切割片段來估計 IBRV-DS 株之 DNA 分子量, 測得分別為 89.9 × 10⁶、84.9 × 10⁶、87.5 × 10⁶ × 88.4 × 10⁶ dalton, 平均約為 88 × 10⁶ dalton。

對於本次試驗之 8 株病毒 (如表 1) 分別抽取感染細胞之病毒 DNA, 並以 Hind III, EcoRI, BamHI, Bgl II 切割來分析病毒株之差異 (圖 2、圖 3), 從圖 3 的切割圖譜 (Bgl II) 可明顯的發現 IBRV-JAP 株與本地分離之 IBRV-DS 標準株比較起來, 約有 750bp (C 片段) 之缺失突變 (deletion), 另外此缺失突變從 Hind III, EcoRI, BamHI 的切割圖譜亦可看的出來。其它的比較則發現 IBRV-US1 株與 IBRV-US2 株較為相似, 其他株則有些微的小差異, 此外以核酸限制酶切割的方法來分析 IBRV-JAP 株在實驗室內繼代 1 代、5 代、10 代以 Hind III, EcoRI, BamHI, Bgl II, Pst I 切割之穩定性 (如圖 4) 則發現 1 代

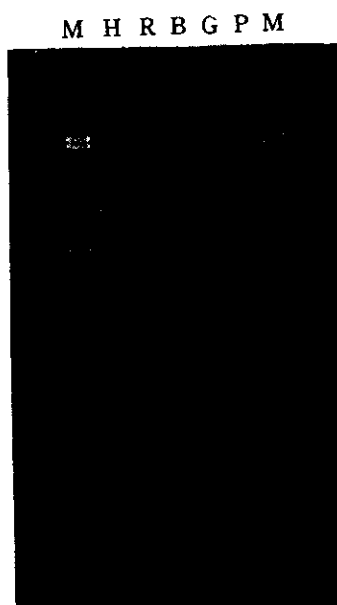


Fig. 1. Restriction endonuclease analysis of IBRV-DS strain purified from supernatant fluid. Lane M molecular weight marker, λ /Hind III and λ /Eco RI digest mixture. DNA samples were digested with Hind III (H), Eco RI (R), Bam HI (B), Bgl II (G) or Pst I (P).

、5代、10代均無變異。

以 IBRV-DS 株的感染細胞抽取病毒 DNA 並與由其上清液抽取病毒 DNA 來比較可供電泳之次數 (如表 3), 結果發現 92% 的病毒 DNA 存於細胞內, 8% 存於上清液中。

討 論

由於傳統的病毒株區別均是靠血清型來判別, 然而在牛傳染性鼻氣管炎與傳染性膿胞陰戶腔炎 (Infectious Pustular Vulvovaginitis) 均為同一血清型病毒所引起牛不同病變與症狀之情形下, 學者亦分別利用核酸限制酶的切割比較, 果然發現本法可供區別^(3, 8), 本試驗亦利用此方法, 但未發現 IPV 毒株, 試驗中的 8 株均為 IBR 之毒株。核酸限制酶分析的另一優點在於病毒的鑑定不須靠標準病毒或標準血清, 而利用核酸限制酶圖譜的比較即可區別病毒, 此尤其是在牛共有六型疱疹病毒特別有用。本次試驗從病毒感染細胞直接抽取 DNA, 並將國外分讓之 2 株弱毒 (IBRV-JAP, IBRV-US3), 2 株強毒 (IBRV-US1, IBRV-US2

Table 1. Characteristics and Origin of IBRV Strains

| No. | strain/year | place of origin | characteristics | site of isolation |
|-----|-------------|-------------------|---------------------------------------|-------------------|
| 1 | JAP/NI* | Japan | attenuated | NI |
| 2 | US1/NI | U.S.A. | virulent | nassal |
| 3 | US2/NI | U.S.A. | virulent | vagina |
| 4 | 1973/86 | Kaohsiung, Taiwan | field strain | nasal |
| 5 | DS/86 | Dahsheh, Taiwan | with respiratory sign field strain | nasal |
| 6 | YL**/87 | Yunlin, Taiwan | with respiratory sign field strain | brain |
| 7 | KS**/87 | Kaohsiung, Taiwan | and cattle died field strain | brain |
| 8 | US3/NI | U.S.A. | and cattle died attenuated | NI |

* NI: No Information.

** Strains isolated from imported cattle in March of 1987.

Table 2. Molecular Weight Determination of IBRV-DS DNA Fragment Produced by Cleavage with Hind III, Eco RI, Bam HI and Bgl II(mol. w. $\times 10^6$ d)

| Fragment | HindIII | Eco RI | Bam HI | Bgl II |
|----------|-----------|--------|-----------|--------|
| A | 14.0 | 32.5 | 19.4(1/2) | 25.0 |
| B | 12.9 | 14.6 | 19.4 | 12.6 |
| C | 10.7(1/2) | 11.0 | 13.4(1/2) | 12.0 |
| E | 9.0 | 8.8 | 11.8 | 8.1 |
| F | 8.2(1/2) | 5.4 | 11.3 | 6.3 |
| G | 7.7 | 2.1 | 10.1 | 5.5 |
| H | 7.7(1/2) | | 7.9 | 4.9 |
| I | 7.7 | | 7.9(1/2) | 1.5 |
| J | 5.8 | | - | |
| K | 5.4 | | | |
| L | 5.0 | | | |
| M | 2.4 | | | |
| N | 1.6 | | | |
| O | - | | | |
| Total | 89.9 | 84.9 | 87.5 | 88.4 |

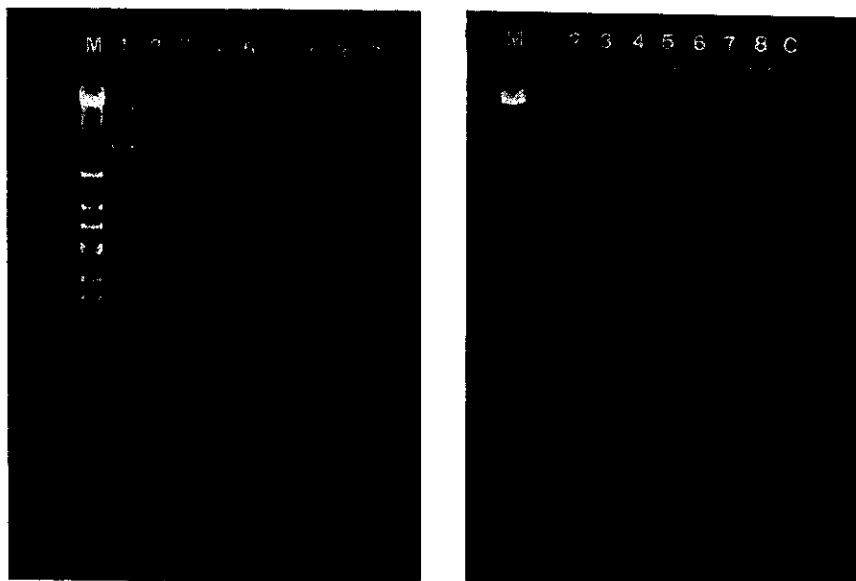


Fig. 2. Hind III (left) and Eco RI (right) restriction endonuclease DNA fingerprints of IBRV as listed in Table 1. Lane M molecular weight marker, λ /Hind III and λ /Eco RI digest mixture; and lane C MDBK cell control. Virus DNA were extracted from infected cell and electrophoresed on a 0.6 per cent agarose gel for 16 hours.

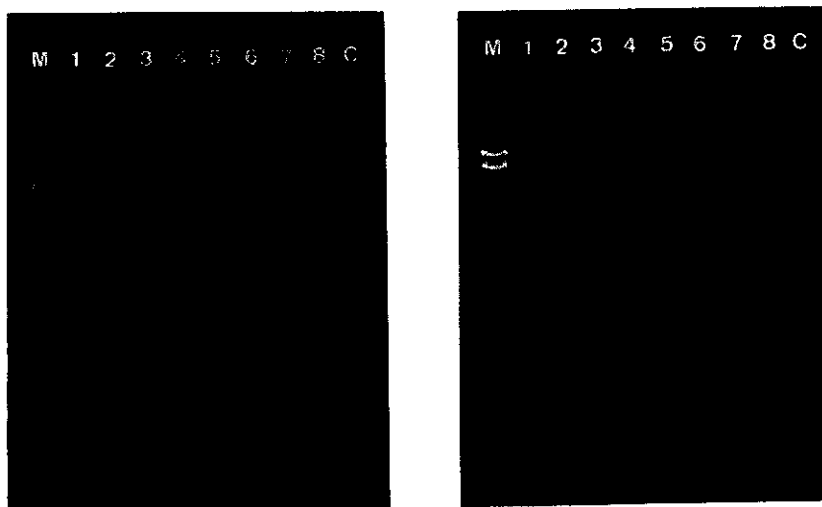


Fig. 3. Bam HI (left) and Bgl II (right) restriction endonuclease DNA fingerprints of IBRV as listed in Table 1. Lane M molecular weight marker, λ /Hind III and λ /Eco RI digest mixture; and lane C MDBK cell control. Virus DNA were extracted from infected cell and electrophoresed on a 0.6 per cent agarose gel for 40 hours.

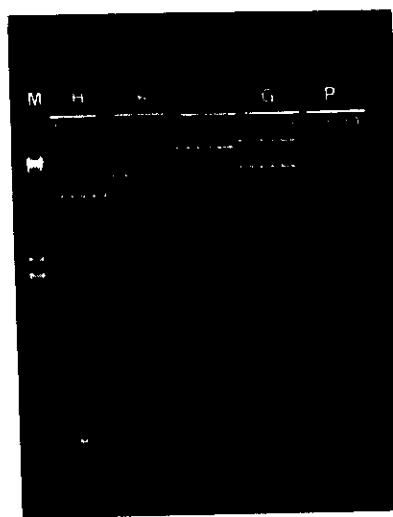


Fig. 4. Restriction endonuclease analysis of IBRV-JAP strain, passaged 1, 5 and 10 times in MDBK cells. Lane M molecular weight marker, λ /Hind III and λ /Eco RI digest mixture. DNA samples were digested with Hind III(H), Eco RI(R), Bam HI(B), Bgl II(G) or Pst I(P) and electrophoresed on a 0.6 per cent agarose gel for 16 hours.

Table 3. Virus DNA Extracted from Infected Cell or Supernatant Fluid for Electrophoresis

| Virus* DNA extracted from | cm of MDBK** used | Times for electrophoresis | Virus DNA concentration(%) |
|---------------------------|-------------------|-----------------------------|----------------------------|
| infected cell | 80 | 800(10/cm ²) | 92 |
| supernatant | 2300 | 2000(0.87/cm ²) | 8 |

* Five MOI of IBRV-DS strain was inoculated for comparison, and virus was harvested after 18 hours.

** Cell concentration was 2.3×10^6 /cm².

)及本省1986年與1987年分離之4株野毒(IBRV-1973, IBRV-DS, IBRV-YL, IBRV-KS)以Hind III, Eco RI, Bam HI, Bgl II 進行核酸限制酶分析,其結果與臨床流行之情形相符合,即1986年與1987年不同的病歷,不同期間的流行株,就有不同的核酸限制酶圖譜,而1987年因進口牛而引起流行之毒株則有相似的核酸限制酶圖譜。

從限制酶圖譜的分析亦同時發現 IBRV-JAP 弱毒疫苗株之基因組(genome)與 IBRV-DS 本省標準株比較約有750bp之缺失突變(deletion),與Mayfield⁽⁷⁾ 報告之圖譜比較知此缺失突變發生在短區(short component)。IBRV-JAP株亦具有生長慢而斑點(plaque)小的特性(未發表),是有潛力弱毒疫苗株。本試驗亦從純化的 IBRV-DS 株以不同的核酸限制酶切割圖譜來測定牛傳染性鼻氣管炎病毒DNA之分子量,測量結果得知約為 88×10^6 dalton,與國外報告相一致⁽⁷⁾,本法亦較電子顯微鏡法或超高速離心法為簡易,是一般實驗室均可進行之方法。

由於純化病毒相當耗時,一般實驗室亦不見得有超高速離心機供以利用,本次實驗的重心是經由不純化病毒直接做核酸限制酶的分析,即直接抽取病毒感染細胞之DNA來分析,從表3的結果顯示每cm²的病毒感染細胞可供為10次分析之用,故估計每一毒株僅須24孔組織培養盤之1孔(約2cm²)即足夠進行相當多的試驗,同時可將此操作納入微量離心管之操作系統,這樣的發展對流行病學的大量操作

是非常有利的。

本次試驗的另一個重點則是探討病毒感染細胞之後,存於上清液與存於細胞中之分佈情形,結果證實細胞內之病毒DNA至少是上清液中的十倍(表3)。在疱疹病毒可分為 α 型(IBRV, PRV), β 型(cytomegalovirus)與 γ 型(MDV, MCFV)。在 IBRV 的情形雖然病毒存於細胞中較多,但上清液中的力價仍然不低,故細胞中的病毒常被忽略,但 γ 型的疱疹病毒則會高度的與細胞結合而不釋放至上清液中,在這種情形下,則有更強烈的理由從細胞來做這方面的研究。

參考文獻

1. 呂榮修,李永林,李水蓮,鄺懋勁,張仙慶,黃士則,林地發,廖永剛,李全 1987,在台灣南部流行之牛傳染性鼻氣管炎(IBR) 病例研究,中華民國獸醫學會76年度會員大會暨學術演講會。
2. 鍾明華,邱朝齊,林榮培,P.Hummel,陳永雄,1977,台灣牛隻病毒性呼吸道疾病研究, I.牛隻微量血清中和抗體調查研究,台灣省畜衛試報,14: 65-72.
3. Engel, M., F. Steck, and R. Wyler 1981. Comparison of the genomes of infectious bovine rhinotrachitis and infectious pustular vulvovaginitis virus strains by restriction endonuclease analysis. Arch. Virol 67: 169-174.

4. Gillespie, J.H. and J.F. Timoney 1982. In "Hagan and Bruner's Infectious Disease of Domestic Animals" 7th ed. PP552-560.
5. Kahrs, R.F. 1977 Infectious bovine rhinotracheitis: A review and update. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 171: 1055-1064.
6. Ludwig, H. 1983. Bovine herpesviruses, p135-214. In B. Roizman (ed.), *The herpesviruses*, vol. 2 Plenum Publish Corp., New York, USA.
7. Mayfield, J.E., P.J. Good. H.J. Vanoort, A.R. Campbell, and D.E. Reed. 1983. Cloning and cleavage site mapping of DNA from bovine herpesvirus 1 (Cooper strain). *J. Virol.* 47: 259-264.
8. Misra, V., L.A. Babiuk, and C.Q. Darcel. 1983. Analysis of bovine herpesvirus type 1 isolates by restriction endonuclease fingerprinting. *Arch. Virol.* 76:341-354.
9. Studdert, M.J. 1983. Restriction endonuclease DNA fingerprinting of respiratory, foetal and perinatal foal isolates of equine herpesvirus type 1. *Arch. Virol.* 77: 249-258.
10. Weber, K. and M. Osborn. 1969. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244: 4406-4412.

RESTRICTION ENDONUCLEASE ANALYSIS OF INFECTIOUS BOVINE RHINOTRACHEITIS VIRUS ISOLATED IN TAIWAN

Y.S. Lu and M.J. Kwang

Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health

SUMMARY

Four local isolates (IBRV-1973, IBRV-DS, IBRV-YL, IBRV-KS), 2 virulent strains (IBRV-US1, IBRV-US2) and 2 attenuated strains (IBRV-JAP, IBRV-US3) of infectious bovine rhinotracheitis virus (IBRV) were propagated in MDBK cells. Nucleic acids extracted from the virus-infected cells were compared by restriction endonuclease (RE; Hind III, Eco RI, Bam HI, and Pst I) digestions, DNA RE patterns between viruses IBRV-YL and IBRV-KS were not distinguishable, however, their RE patterns were different from those of IBRV-DS and IBRV-1973 in which their RE pattern were not identical either. A deletion of approximate 750 bp was found in IBRV-JAP strain when its molecular weight was compared to that of IBRV-DS virus. In addition, no infectious pustular vulvovaginitis virus was obtained in this study.

DNA molecular size of IBRV-DS strain was calculated as 88×10^6 dalton after RE digestion and electrophoresis.

The amount of virus DNA extracted from either infected cells or supernatant fluid was compared by the times that DNA was prepared for electrophoresis. The result revealed that the amount of virus DNA from infected cells was at least 10 times more than that from supernatant fluid.