

應用聚合酶鏈反應檢測台灣牛隻 牛白血病 Proviral DNA

*鄭懋勁 吳建志 葉修如 林政道

劉義雄 楊喜金 林士鈺

台灣省家畜衛生試驗所 動物用藥品檢定分所

摘要 牛白血病病毒 (bovine leukemia virus, BLV) 在本省廣泛分佈，它可感染牛隻的 B 淋巴球，並造成部份牛隻腫瘤，本病毒過去常用凝膠免疫擴散法 (agar gel immunodiffusion, AGID) 或 ELISA 法來檢測抗體，本試驗開發聚合酶鏈反應 (polymerase chain reaction, PCR) 檢測血中單核球內之 BLV DNA，以本法調查台南縣野外牛血 120 頭，PCR 陽性者 52 頭，而 AGID 法調查結果陽性者 34 頭，結果顯示以 PCR 敏感性較高。

關鍵詞：聚合酶鏈反應，牛白血病，台灣

緒 言

牛白血病病毒 (bovine leukemia virus, BLV) 是一種屬於 E 型的 retrovirus，可感染 B 淋巴球並使之變性^[5, 8, 10]。本病毒全世界分佈，在美國有 20~50% 的乳牛及 5~10% 的肉牛是 BLV 血清陽性^[2, 6, 7, 12]。台灣在 1980 年調查本病，乳牛血清陽性有 16.7%，黃牛與水牛為陰性^[13]。據 Blood 等^[4]報告感染牛隻 1/3 會發展成持續性 B 細胞淋巴球增多症和淋巴結腫大，5~10% 的感染牛隻會發展成淋巴瘤或沒有疾病的症狀即死亡。

世界各國對 BLV 感染後之早期診斷均非常重視，它除了影響牛奶產量、屠體損失等外，牛奶與肉品之公共衛生亦引起懷疑^[3, 11]，過去對本病的診斷方法多用凝膠免疫擴散法 (agar gel immunodiffusion, AGID) 或 ELISA 來檢測抗體，現今從核酸診斷技術開發後已有聚合酶鏈反應診斷技術在 DNA 與 RNA 診斷之應用，本次試驗即開發對牛白血病 proviral DNA 之診斷，並與 AGID 方法比較評估。

材料與方法

樣 品

120 頭乳牛係 1997 採自台南縣 6 個牧場，分別採取血清，供為 AGID 檢測用，採抗凝血，供分離白血球並萃取 DNA 供為 PCR 診斷用，陽性 BLV 之 DNA 對照為 BLV 持續細胞 (FLK/BLV) 之 DNA。

凝膠免疫擴散

標準 gp 抗原係由日本農林水產省家畜衛生試驗場提供的 BLV 感染牛診斷用抗原，AGID 法按 Onuma 等^[9]之方法實施，將 Tris 緩衝液 (0.05 M Tris, 8.5% NaCl, 0.01% Na₂S₂O₃, pH 7.2) 配成 0.8% 瓊脂液，操作時以中央一孔 (直徑 4 mm) 置抗原，周圍 6 孔 (與中央孔距 6 mm) 置供檢血清，在飽和濕度之盒中 37℃ 感作 1~3 天判定。

核酸萃取

FLK/BLV 或乳牛白血球之 DNA 之萃取係

*抽印本索取作者
台灣省家畜衛生試驗所

依照鄺^[1]之方法實施，簡要如後：細胞先以 proteinase K-SDS 緩衝液 (0.1 M Tris-HCl pH 9.0, 0.1 M NaCl, 5 mM EDTA, 1 % SDS, 100 µg/ml proteinase K) 溶解後，37 °C 消化過夜，以 phenol 及 chloroform 各萃取一次，以 2 倍量的酒精來沈澱 DNA，將沈澱物溶於少量之 TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA)。

引子的合成

從 DNASTAR 基因庫 (DNASTAR, INC, Madison, WI, USA) 選出 BLV/K02120.SEQ 之基因序列，並以 Oligo V3.4 軟體程式 (National Biosciences, Hamel, MN, USA) 分析選定引子，並以 DNASTAR 分析其 PCR 產物是否有適當的內核酸限制酶切點，以供增幅片段之確認，設計選定的 1 對引子 BLV-P1 / BLV-P2 由 TIB MOLBIOL 公司 (Berlin, Germany) 合成。

聚合酶鏈反應

取一無菌之 0.6 ml PCR 用微量離心管，加入 5 µl 之 DNA 溶液，再加入 45 µl 之 PCR 混合液，使得最終濃度為 BLV-P1 0.25 µg、BLV-P2 0.25 µg、dNTP 各 0.2 mM、10 mM Tris-HCl (pH 8.8)、1.5 mM MgCl₂、50 mM KCl、0.1 % Triton X-100、Dynazyme (Tbr DNA polymerase) 1 U，反應液混合均勻後置於程式控溫器 (MJ Research, PTC-200)，進行第一個反應為 94 °C 3 分鐘將 DNA 變性，第二個反應為 94 °C 變性反應 1 分鐘，54 °C 煉合作用 2 分鐘，72 °C 聚合作用 2 分鐘，第二個反應重覆 30 個循環，最後 72 °C 7 分鐘作用後結束反應。

限制酶切割

Sma I (Gibco BRL, 美國) 內核酸限制酶之切割依照廠商說明使用之。

電泳分析

BLV-P1 / BLV-P2 引子配對在 PCR 反應後，取 10 µl 反應物置於 TAE 緩衝液中之 2 % agarose 上，以 Mupid-2 電泳槽 100 V 潛水式電泳 30 分鐘，並分析結果。

結 果

以 Oligo V3.4 分析 BLV 核酸序列 (-K02120 SEQ) 選出的引子其序列為：BLV-P1，5'-GACCTTACCGCTATCCCTAC-3'；BLV-P2，5'-TTGTGACCGCTGTTCTTCTG-3'，BLV-P1 (20 核苷酸) 從位置 2533 鹼基起始至 BLV-P2 (20 核苷酸) 2847 鹼基為止，PCR 產物長度為 315 bp，位置 2655 鹼基處有 *Sma* I 內核酸限制酶的獨一切點，可切割成 193 bp 與 122 bp 兩個片段，如圖 1。

臨床上以引子 BLV-P1 / BLV-P2 對台南縣 6 個乳牛場共 120 頭乳牛之血液進行 PCR 偵測，結果陽性率從 25 % 至 65 % 不等，總共 52 頭陽性，平均陽性率 43.33 % (如表 1)，以 AGID 法對此 6 個乳牛場檢測，陽性率從 10 % 至 45 % 不等，共 34 頭陽性，平均陽性率 28.33 %。

在所有檢測 120 例乳牛中，比較 PCR 與 AGID 法對 BLV 之測定 (表 2)，結果一致者 88 例 (陽性一致者 27 例，陰性一致者 61 例)，而 PCR 陽性 AGID 陰性者 25 例，AGID 陽性 PCR 陰性者 7 例。

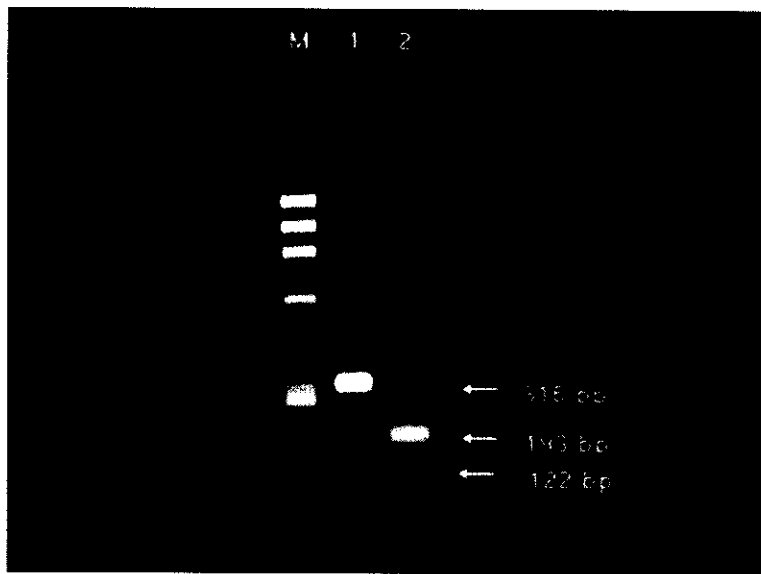


圖 1. 牛白血病之聚合酶鏈反應。M： ϕ X174 / Hae III marker，No.1 係 FLK / BLV 之 DNA 用 BLV-P1 / BLV-P2 引子進行 PCR 得到特異之電泳帶 315 bp，No.2 係 No.1 以 Sma I 切割得到兩條電泳帶。

表 1. 以 Polymerase chain reaction 與 Agar gel immunodiffusion 對台南縣 6 個乳牛場之 Bovine leukemia virus 檢測

乳 牛 場	PCR	AGID
A	11 / 20 (55%)*	8 / 20 (40%)
B	5 / 20 (25%)	2 / 20 (10%)
C	13 / 20 (65%)	9 / 20 (45%)
D	10 / 20 (50%)	6 / 20 (30%)
E	6 / 20 (30%)	4 / 20 (20%)
F	7 / 20 (35%)	5 / 20 (25%)
總 計	52 / 120 (43.33%)	34 / 120 (28.33%)

* 陽性頭數 / 檢查頭數 (%)

表 2. Bovine leukemia virus 用 Polymerase chain reaction 與 Agar gel immunodiffusion 檢測之比較

PCR	AGID		總 計
	+	-	
+	27	25	52
-	7	61	70
總 計	34	86	120

相對敏感性 = $27 / 34 = 79.41\%$

相對特異性 = $61 / 86 = 70.93\%$

一致性 = $(27 + 61) / 120 = 73.33\%$

討 論

牛白血病病毒在世界呈廣泛分佈，本省早在 1980 年即有 16.7% 的陽性率^[13]，本次調查台南縣 6 場 120 頭乳牛，陽性率以 AGID 法為 28.33%，以 PCR 法可達 43.33%，均顯示本省乳牛 BLV 感染陽性率大幅提高。

本次試驗為了開發更快速、更敏感的診斷方法，而從核酸診斷著手，開發聚合酶鏈反應來診斷 BLV 之 proviral DNA，並與 AGID 法比較，在 120 例中，測定 BLV 之 PCR 與 AGID 法結果一致者 88 例，兩者之一致性 (agreement) 達 73.33%，而在 BLV 之 AGID 陽性之 34 例中，PCR 亦為陽者 27 例，使得 PCR 對 AGID 之相對敏感性 (relative sensitivity) 高達 79.41%，遠比 AGID 對 PCR 相對敏感性高。但 AGID 陽性者仍有 7 例未能以 PCR 檢出，此可能是白血球從 1 ml 之抗凝血抽取時因體積少同時容易損失而造成的影響。

雖然短時間內似乎仍無法以 PCR 完全取代 ELISA 或 AGID 此兩種目前 BLV 常用的診斷方法，但本次試驗顯示，PCR 敏感性高，可達到早期診斷的目的，在進出口檢疫亦可發揮相當大的功能。

參 考 文 獻

1. 鄺懋勁。牛傳染性鼻氣管炎病毒分子診斷與分子選殖之研究。國立台灣大學獸醫學研究所博士論文。台北，24-25, 1993
2. Baumgartener LE, Olson C, Miller JM Survey for antibodies to leukemia (C-type) virus in cattle. J. Am. Vet. Med. Assoc. 166 : 249 - 251, 1975
3. Bender AP, Robison LL, Kashmiri SVS, McClain KL, Woods WG, Smithson WA, Heyn R, Finlay J, Schuman LM, Renier C, Gibson RG. No involvement of bovine leukemia virus in childhood acute lymphoblastic leukemia and non-Hodgkin's lymphoma. Cancer Res. 48 : 2919 - 2922, 1988
4. Blood DC, Henderson JA, Radostits OM. Veterinary Medicine, Lea and Febiger, Philadelphia, pp. 609 - 614, 1979
5. Burny A, Bruck C, Chantrenne H, Cleuter Y, Dekegel D, Ghysdael J, Kettmann R, Lellercq M, Leunen J, Mammerickx M, Portetelle D. Bovine leukemia virus : molecular biology and epidemiology. In : G. Klein, (Ed), Viral Oncology,

- Raven Press, New York, pp. 231 – 289, 1980
6. Burrige MJ, Puhr DM, Hennemann JM. Prevalence of bovine leukemia virus in Florida. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 179 : 704 – 707, 1981
 7. House C, House JA, Glover FL. Antibodies to the glycoprotein antigen of bovine leukemia virus in the cattle population of five states. *Cornell Vet.* 67 : 510 – 522, 1977
 8. Kettmann R, Cleuter Y, Mammerickx M, Meunier-Rotival M, Bernard G, Burny A, Chantrenne H. Genomic integration of bovine leukemia provirus: comparison of persistent lymphocytosis with lymph node tumor form of enzootic bovine leukosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 : 2577 – 2581, 1980
 9. Onuma M, Olson C, Baumgartener LE. An ether sensitive antigen associated with bovine leukemia virus infection. *J. Natl. cancer Inst.* 55 : 1155 – 1158, 1975
 10. Sagata N, Yasunaga T, Tsuzuku-Kawamura J, Ohishi K, Ogawa Y, Ikawa Y. Complete nucleotide sequence of the genome of bovine leukemia virus : its evolutionary relationship to other retroviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 : 677 – 681, 1985
 11. Sorensen DK, Beal VC. *Proc. 1979 Bovine Leukosis Symp., USDA, College Park, MD*, pp. 33 – 50, 1979
 12. Thurgood MC, Holmbert CH, Picanso JP. Antibodies to bovine leukemia virus and presence of malignant lymphoma in slaughtered California dairy cattle. *J. Natl. Cancer Inst.* 74 : 711 – 714, 1985
 13. Wong CT, Chang CH, Lin PC. Serological survey on bovine leukemia Virus infection in Taiwan. *J. Chinese Soc. Vet. Sci.* 12 : 7 – 14, 1986

Detection of Bovine Leukemia Proviral DNA in Cattle by the Polymerase Chain Reaction

M. J. Kwang*, C. C. Wu, S. R. Yeh, C. T. Lin,
Y. S. Liu, S. G. Yang and S. Y. Lin

Taiwan Animal Health Research Institute
The Branch Institute of Animal Drugs Inspection

SUMMARY Bovine leukemia virus (BLV) has been isolated from cattles in Taiwan. This virus infects B lymphocyte and causes neoplastic diseases. Normally this virus is detected by agar gel immunodiffusion (AGID) or ELISA assays. We have performed the polymerase chain reaction (PCR) to amplify specific DNA fragments of BLV. Fifty-two out of 120 (43.33 %) cattle were diagnosed positive by PCR, and 34 out of 120 (28.33 %) cattle were diagnosed positive by AGID. PCR method has been demonstrated to be more sensitive than AGID in detective BLV.

Keywords: *Polymerase chain reaction , Bovine leukemia , Taiwan*

*Corresponding author

Taiwan Animal Health Research Institute. Taiwan, R. O. C.