

國立臺灣大學生物資源暨農學院動物科學技術學系

碩士論文

Department of Animal Science

College of Bioresources and Agriculture

National Taiwan University

Master Thesis

利用非侵入式取樣方法分析 BoLA-DRB3.2 基因與乳房  
炎及泌乳性狀之關係

Analysis of relationships between BoLA-DRB3.2 alleles,  
mastitis, and milk traits by noninvasive sampling methods

林俊宏

Jyun-Hong Lin

指導教授：王佩華 博士

Advisor: Pei-Hwa Wang, Ph.D.

中華民國 100 年 7 月

July, 2011

## 致謝

能完成這份論文，誠摯感謝指導教授王佩華 博士的悉心教導與指正。老師於生活上與課業上之關心，亦使學生倍感溫暖。另外感謝口試委員丁詩同 博士與陳靜宜 博士的大力協助，兩位老師於口試期間的指正與論文修改的提點皆使本論文得以更加完整。

感謝系辦公室奕雯學姐與位育學長的耐心與提攜，以及林恩仲 博士給予經驗傳承與分享。若是沒有奕雯學姐的協助，也許我會踏上完全不同的人生道路，而不是選擇研究所。千言萬語也表達不了這份感謝，願自己也能以同樣無私的心情在未來奉獻給社會。

感謝實驗室的怡惠，瑞軒，怡蓁，芳裕學長，佩儀，怡穎，伊聆，雨蒔，瑞婷，你們在實驗上與生活上的協助使實驗室成為一個美好的地方，能與你們走過這麼多的歲月是我的榮幸。另外特別感謝聖耀的協助，很高興我們能在最後關頭互相打氣。感謝農場的鄭位明先生與重威學長，以及農場的技工於樣本採集之協助；感謝分生研與產品加工室於儀器方面的支援與協助。

最後，感謝家人們於碩士班期間在生活上的協助與包容，也特別感謝舍弟於統計資料方面之協助分析。感謝耘勻這些日子來的支持與陪伴，也感謝這幾年一起參加比賽的夥伴國永、大河、浩宇以及佩娟，讓實驗之餘仍有音樂的慰藉。

## 目錄

	頁次
目錄.....	1
圖次.....	2
表次.....	3
中文摘要.....	4
英文摘要.....	6
壹、前言.....	8
貳、文獻檢討.....	10
一、乳用牛之種類.....	10
二、乳房炎之介紹.....	15
三、生乳樣品利用之介紹.....	25
四、牛隻主要組織相容複合體基因之研究.....	31
參、材料與方法.....	37
肆、結果與討論.....	45
伍、結論.....	69
陸、參考文獻.....	70

## 圖次

	頁次
圖 1. 常見之乳用牛隻品種.....	14
圖 2. 以傳統法抽取牛乳 DNA 之流程圖.....	29
圖 3. 小鼠與人類 MHC 基因.....	32
圖 4. 試驗設計流程圖.....	38
圖 5. 自生乳樣本抽取基因組 DNA 流程圖.....	42
圖 6. PCR 產物純化之流程圖.....	43
圖 7. 體細胞數 (SCC) 與乳組成分之關係.....	51
圖 8. 兩種不同商用套組 DNA 之電泳結果比較.....	57



## 表次

	頁次
表 1. 美國估計每年每頭因乳房炎之損失.....	19
表 2. 牛乳體細胞數含量與乳產量損失百分比關係.....	22
表 3. 利用六種不同方法自綿羊乳中抽取 DNA 之比較.....	30
表 4. 易敏感性、一般性以及抗乳房炎群組之乳量與乳組成分比較.....	46
表 5. 乳房炎與生乳品質之關係.....	47
表 6. 未發炎期間與發炎期間之乳量與乳組成分比較.....	48
表 7. 乳量與乳組成分之 Pearson 相關矩陣.....	54
表 8. 乳量迴歸模型.....	55
表 9. 兩種不同商用套組抽取 DNA 之比較.....	57
表 10. 台大農場泌乳牛之 DRB3.2 交替基因型頻率.....	60
表 11. 台大農場之荷蘭牛 DRB3.2 基因型頻率與日本及加拿大之比較.....	61
表 12. 抗乳房炎群組之交替基因型頻率.....	63
表 13. 一般性群組之交替基因型頻率.....	64
表 14. 易敏感性群組之交替基因型頻率.....	64
表 15. 不同交替基因型與乳組成分之關係.....	68

## 摘要

乳產量與生乳組成分之提升常為泌乳牛之主要育種目標，然而長期選拔的過程中多半忽略如抗病性等重要之乳牛健康性狀。舉例而言，乳房炎為泌乳牛最常見且重要之疾病，一旦牛隻感染乳房炎，不僅導致人力成本增加，且因於治療過程中之獸醫師費用、藥物，以及廢棄之生乳等因素導致增加額外之生產成本，更甚者可能造成乳牛提早淘汰。近年之研究發現某些疾病之抗性可藉由免疫與遺傳標記篩選，針對此類基因進一步的研究或可解決因疾病而造成之乳量與組成分損失等課題。

主要組織相容複合體 (major histocompatibility complex) 與哺乳動物之免疫系統息息相關。牛隻主要組織相容複合體被稱為牛隻淋巴球抗原 (bovine lymphocyte antigen, BoLA)，由三個不同區域組成且與抗原呈獻有關；因此，BoLA 基因已於不同疾病免疫與生產性狀之議題中廣泛地被研究。BoLA 基因座上第三個 DR 區域 (DRB3) 已被發現具有相當高度之多態性，尤以第二個外顯子 (exon 2) 之多態性可能與牛隻免疫性狀相關。本試驗收集來自台灣大學試驗農場 23 頭荷蘭牛泌乳牛之生乳樣本取代傳統之血液與組織樣本，以探討利用非侵入式採樣於泌乳牛隻進行研究之可能性。試驗期間同時收集乳牛群性能改進計畫 (Dairy Herd Improvement) 資料以針對體細胞數 (somatic cell counts) 與生乳組成分與 DRB3.2 基因之關係進行討論。牛群依其於試驗期間體細胞數達臨床乳房炎等級之頻率分成三個群組，分別為易感性群組 (100%)、一般性群組 (40 至 80%)，以及抗乳房炎群組 (40%以下)。

本試驗結果顯示於 23 頭試驗牛隻中，有 17 頭個體可成功自乳品樣本中抽取 DNA 並進行 PCR-SBT 分析；其中抗乳房炎群組有 6 頭，一般性群組有 7 頭，易感性群組有 4 頭。於此 17 頭個體中共發現 11 個不同之 DRB3.2 交替基因型，\*1201 與 \*2703 交替基因型僅見於抗乳房炎與一般性群組中，與加拿大東岸之荷蘭牛研究有相似之結果，顯示其為一良好之抗乳房炎交替基因型。\*1501 交替基因型之純合



子僅見於易敏感性群組中，且帶有此純合子之個體其發炎程度均高於其他牛隻，顯示該交替基因型與乳房炎之敏感性相關，建議日後可列為育種選拔之參考。

關鍵字：牛隻淋巴球抗原，DRB3.2，乳房炎，乳牛。



## Abstract

Increasing productivity such as milk yields and milk components is always the main breeding goal for dairy cattle. However, some health traits such as disease resistance have been ignored for a long time. For example, mastitis is an important and world-wide disease in dairy herds and leads to not only add costs, including the expenditures of labors, vet service, drugs, but also the losses from lower production, discarding milk, and culling of cows. Nowadays, it is evident that disease resistance may be genetically determined. Selecting resistance to health problems can reduce the economical losses and increase milk quality, which is important to ranchman and consumers. Consequently, genetic and immunological markers have been widely studied expecting to be used in disease resistance selections.

The major histocompatibility complex (MHC) groups are closely linked to mammalian immune system. For dairy cattle, MHC referred to as the bovine lymphocyte antigen (BoLA) complex, consisting of three classes and being responsible for antigens presentation. Hence, BoLA genes have been examined for various immune issues as well as production traits. The DRB3 locus of BoLA class II is very polymorphic, and exon 2 (DRB3.2) may potentially affect immunity in cattle. In this study, we collected milk samples instead of blood or tissue as the resource of DNA extractions from 23 dairy Holstein cows in NTU Experimental Farm, trying to evaluate the preliminary feasibility of constructing noninvasive sampling methods in dairy herds. Data from Dairy Herd Improvement (DHI) in recently five months were also used to investigate the relationship between somatic cell counts (SCC), milk components, and DRB3.2 alleles. According to the frequency of that SCC reached clinical mastitis we labeled the cows into three classifications, known as resistant group (under 40%), normal (40 to 80%), and sensitive one (100%).



The results showed 17 individuals from 23 dairy cows could be sequenced successfully in PCR-SBT analysis, including six individuals in resistance group, seven in normal, and four in sensitive, respectively. Among these 17 individuals, 11 alleles were found. Alleles \*1201 and \*2703 were only found in resistance and normal group but not in sensitive one, and this result is in accordance with former study. Individual with allele \*1501 homozygous expressed more serious mastitis level and only in sensitive group, which may tend toward inflammation easier. It may be the candidate allele of mastitis in breeding.

Keywords: BoLA, DRB3.2, mastitis, cows.



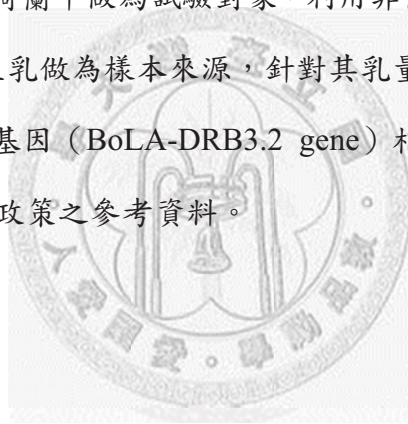
## 壹、前言

台灣乳業之發展已由早期小規模之經營模式轉為企業化型態，然而台灣於 2002 年 1 月 1 日正式加入世界貿易組織（World Trade Organization, WTO）後，使得國內酪農事業面臨更為龐大之市場競爭。2006 年，在同時受到國際原油價格上漲與美國大量使用玉米生產替代能源之情況下，致使酪農飼料成本持續高漲，相對造成獲利空間之損失。在國內乳產量普遍不足之情況下，唯有降低各方成本並嚴密監控生乳品質，始能維持一定之競爭力。乳房炎、繁殖障礙及蹄葉炎並列乳牛三大疾病（陳，2002），除乳量之損失之外，尚造成許多治療上之開銷而提高生產成本。乳房炎之發生亦會導致生乳中體細胞數增加，而體細胞數又為生乳計價之條件之一，因此在欲同時控管生產成本與生乳品質之情況下，如何有效減少乳房炎之發生即為相當重要之課題。

近年來隨著動物福利與人道意識抬頭，早於 1960 年代便已提出保障農場動物之 5F 觀念，即免於饑渴（freedom from hunger and thirst）、免於生理不適（freedom from discomfort）、免於傷害、痛苦與疾病（freedom from pain, injury or disease）、免於恐懼及壓力（freedom from fear and distress），以及表現正常行為模式之自由（freedom to express normal behavior）。為達成強化動物福利之目標，歐盟於 2008 年 11 月公布了實驗動物指令修正指令提案，希望能夠縮減各國於動物福利規範之差異，以及管理境內任何動物實驗之進行；美國動物保護協會之調查亦顯示，即便是對人類醫學極有貢獻之試驗，一旦試驗動物遭受疼痛或死亡，一般民眾對該試驗之接受度將從 83 降至 65%。台灣於 2010 年 1 月 27 日修正動物保護法內容，除包含對各試驗動物與寵物進行操作飼養規範與法條外，其中第三章第 15 條內容為「使用動物進行科學應用，應儘量避免使用活體動物，有使用之必要時，應以最少數目為之，並以使動物產生最少痛苦及傷害之方式為之。」，即在減少試驗動物痛苦之考量下所訂定之。

大多數動物試驗中之 DNA 來源皆為血液或組織等以侵入式採樣 (invasive sampling) 方式所取得，對於動物體皆會造成壓力與恐懼，且操作人員亦需接受訓練始能為之，對於大規模試驗之推廣或可能為不同程度之滯礙。乳用經濟動物之生乳中含有體細胞 (somatic cell)，且擠乳工作又為每日之例行事項之一，如能利用生乳做為試驗中之 DNA 來源，不僅可減少動物所受之緊迫而達到兼顧動物福利之目的，亦可降低採樣過程中因操作失當而造成動物體與試驗人員之風險，並提高生乳於研究中之附加價值。

綜上所述，乳用動物的疾病控管為乳業發展之重要課題，而相關研究資料與試驗方法之建立將有助於減少相對經濟損失與進行各經濟性狀之評估。因此本研究將針對乳房炎控管，以荷蘭牛做為試驗對象，利用非侵入式採樣法 (noninvasive sampling methods) 收集生乳做為樣本來源，針對其乳量、乳組成分、體細胞數與牛隻淋巴球抗原 DRB3.2 基因 (BoLA-DRB3.2 gene) 相關性進行分析，以作為未來建立大規模調查與育種政策之參考資料。



## 貳、文獻檢討

### 一、乳用牛之種類

人類文明中最早之牛隻乳用記錄約始於一萬年前，馴化年代則在新石器時代，較其他家畜如豬隻、山羊，與綿羊為晚。現代牛隻源自乳、肉與役用兼併之古代野牛品種，然因機械化之普及使得役用牛隻已不再復見，是故現今之牛隻皆為乳用、肉用之單一品系，或為乳、肉兼用種（宋，2006）。

乳用牛之品種可概分為普通牛（*Bos Taurus*）與肩峰牛（*Bos Indicus*）兩大類，其中前者又稱為歐洲牛，以優良之生產效率著名，主要豢養區域為北美洲、亞洲與歐洲等地；肩峰牛又稱為印度牛，主要用於山區等自給自足之嚴苛環境。目前世界上常見之乳用品種均為歐洲牛，較為著名之品種為荷蘭牛、瑞士黃牛、娟珊牛、乳用短角牛、愛爾夏牛與更賽牛等。

#### （一）荷蘭牛（Holstein）

荷蘭牛起源於荷蘭與德國北部之乳用品種，其泌乳能力與生產效率皆相當優良。美國於十九世紀初期大量引進源自於德國荷斯登堡之荷蘭牛並加以純化，終在十九世紀末期成立荷蘭牛乳牛登錄協會，以泌乳能力之檢定與登錄並重之模式將其改良，是第一個認定其為單一品種之國家。惟美國之荷蘭牛實源自於德國荷斯登堡（Holsteinburg），故名為荷斯登（Holstein）。1885年，與為求正名而使用荷蘭本土稱謂之 Friesian 牛協會合而為一，正式更名為 Holstein-Friesian 協會（Holstein-Friesian Association of America），將荷蘭牛育成為高生產效率且飼養頭數佔全世界 93% 之第一大品種。（宋，2006）

荷蘭牛（圖 1A）之主要特徵為明顯之黑白花或紅白花毛色，體型碩大且泌乳量高。仔牛之出生重約在 40kg 左右，而成熟之公牛體重可達 1,100 kg 以上；女牛達 360 kg 以上（16 至 18 月齡）即可開始配種，其成熟體重約為 680 kg。我國荷



蘭牛於日據時代即引入台灣地區，但戰後僅少數留存；直至 1960 年後始重新引入荷蘭牛以發展乳牛事業，並於 1977 與 1978 年開始乳牛登錄與乳牛群改良計畫。我國荷蘭牛之平均日產乳量為 20.5 kg 以上，平均乳脂率則約為 3.62 %（陳，2005）。

## （二）瑞士黃牛（Brown Swiss）

瑞士黃牛原產於瑞士東北部之乳肉兼用種，屬短角牛之一。美國於二十世紀初期開始認定瑞士黃牛為一品種，惟一般相信其境內之瑞士黃牛起源於瑞士西南部，為農民由德國引進並改良瑞士牛而來。毛色為灰褐色，體型因地而異且性成熟較晚（20 至 24 個月），是常見乳用牛種中最晚者（Briggs and Briggs, 1980）。瑞士黃牛之公母成熟體重分別在 850 kg 與 550 kg 左右，平均年產乳量和乳脂率則為 4600 kg 和 4.0%（圖 1B）。

## （三）娟珊牛（Jersey）

娟珊牛源自英倫海峽之娟珊島，於 1850 年代成立娟珊牛協會，並於接下來的二十多年間推廣至全英國登錄，現為世界第二大乳牛品種。對氣候和地理環境適應良好且耐粗食，故分布甚廣且可密集式放牧。

娟珊牛（圖 1C）屬小型牛體型，其成熟公牛之體重約為 650 kg，母牛則為 450 kg 左右。若以單位體重之產乳能力評估，單一泌乳期可生產體重 12 倍以上之乳量，其生產效率更高於荷蘭牛；惟在台灣已因和荷蘭牛雜交而無純種之娟珊牛（宋，2006）。為提昇國內乳業競爭力並增加牛乳多元化之利用，農委會於民國 95 年 6 月 23 日修正「種畜禽及種原輸入同意文件審核要點」，正式將娟珊牛列為可輸入的乳牛品種。娟珊牛的牛乳顏色較黃，平均年產乳量為 4800 kg，乳脂率則在 5.0% 以上，與乳蛋白質率都較荷蘭牛為高，是最適合製作起司、奶油、乾酪等乳製品的乳牛品種。

#### (四) 乳用短角牛 (Milking Shorthorn)

乳用短角牛約於十八世紀中起源於英格蘭，乃由短角牛加強乳量之選拔培育而成，為一乳肉兼用品種。公牛性成熟體重為 900 kg 以上，母牛則為 650 kg 以上，特徵為體短、健壯，且可生產皮革 (圖 1D)。美國於十八世紀末首次引進，並於十九世紀進行血統及性能登錄，陸續於 1882 年成立美國短角牛協會，1912 年成立短角牛俱樂部，並於 1948 年成立乳用短角牛協會 (American Milking Shorthorn Society, <http://www.milkingshorthorn.com/breed.html>)。1972 年乳用短角牛正式列為純種乳牛協會之一，現今全美各地均有乳用短角牛之飼養；平均年產乳量為 9000 公斤，乳脂率與乳蛋白率約為 3.0%。

#### (五) 愛爾夏牛 (Ayrshire)

愛爾夏牛於 300 多年前起源自蘇格蘭之愛爾夏郡，發展過程中歷經 Dunlop, Cunningham 與 Ayrshire 等三次更名，最後沿用 Ayrshire 之品種名至今。早期為產乳性能較差之本土小型牛品種，後由該地區之農民以英倫海峽之其他牛種加以雜交並改良，始形成今日之愛爾夏種 (圖 1E)。

愛爾夏牛毛色為黑色或雜有紅褐色之細微斑點，體型中等，對環境及氣候適應性佳，產乳效率及活力亦相當優良，且因其牛乳組成份適合進一步加工製成奶油與乾酪，故當地農民利用甚廣。公牛與女牛之成熟體重約為 850 kg 與 550 kg，平均產乳量 6000 kg，平均乳脂率為 3.9%。美國於十九世紀初期引入該品種，現已遍及全美各地 (Briggs and Briggs, 1980)。

#### (六) 更賽牛 (Guernsey)

更賽牛原產地為法國北岸之更賽島，美國引進後於 1877 年便成立更賽牛協會，其體型中等並具淡褐色與白色相間之毛色，末梢處帶有白斑，鼻部則為乳黃色 (圖



1F)。與大體型之乳牛品種比較，其單位乳量對飼料採食量之比值較高，且以生產高乳脂與高乳蛋白質之牛乳聞名，能適應溫熱之環境氣候、集約式放牧等飼養方式，有較短之產仔間距與較早之初產年齡，故有利於生產效益之提升與降低飼養成本。成熟公牛重約 750 kg，母牛則為 500 kg；平均產乳量為 5600 kg，乳脂率為 4.6%。惟在許多國家皆致力發展體型較大且總產乳量高之荷蘭牛情況下，更塞牛之在養頭數已逐年下降。(張和黃，2005)



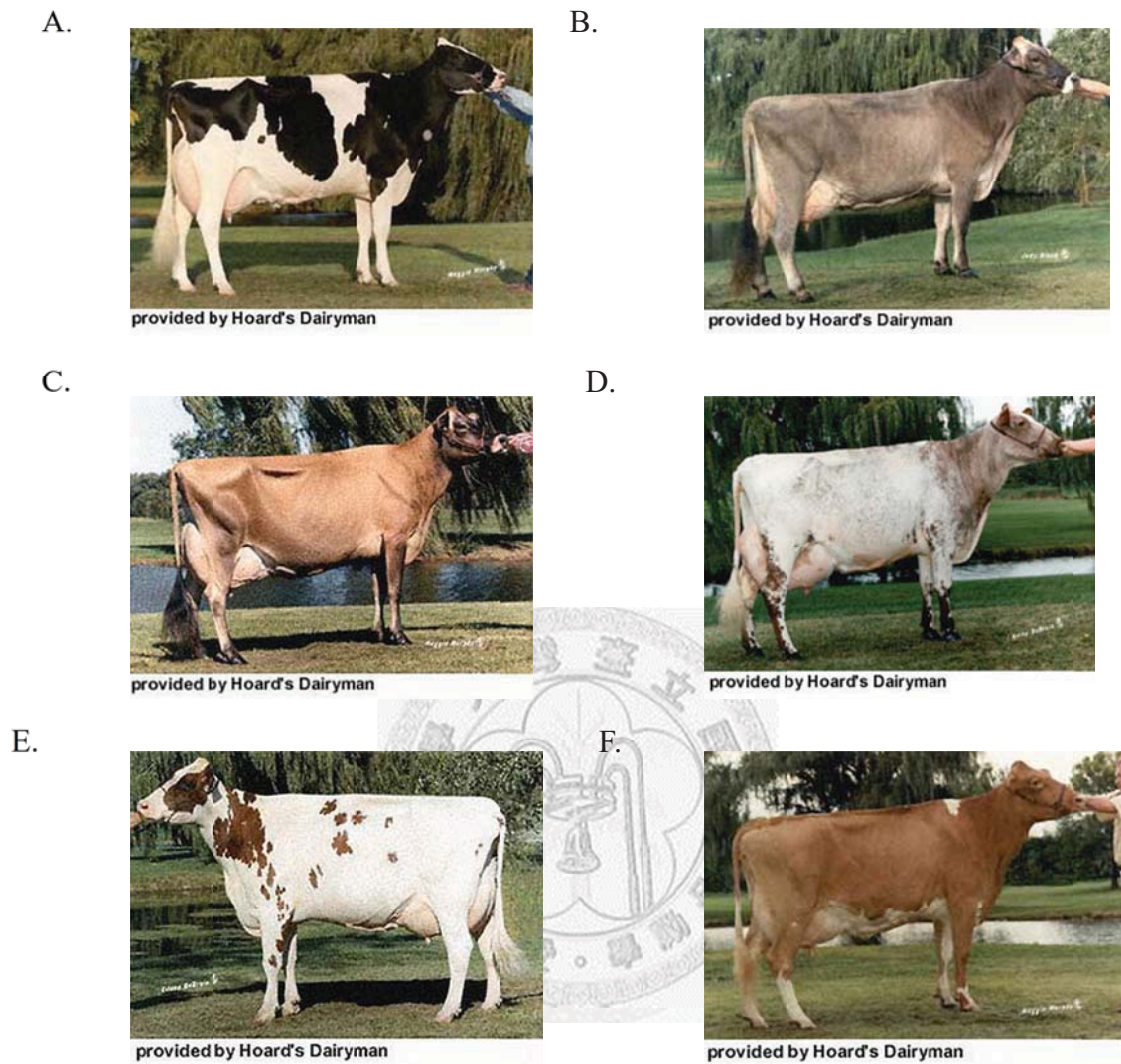


圖 1 常見之乳用牛隻品種：A. 荷蘭牛； B. 瑞士黃牛； C. 娟珊牛； D. 乳用短角牛； E. 愛爾夏牛； F. 更賽牛（張和黃，2005）。

**Figure 1** Common breeds in dairy cows. A. Holstein, B. Brown Swiss, C. Jersey, D. Milking Shorthorn, E. Ayrshire, and F. Guernsey（張和黃，2005）.

## 二、乳房炎之介紹

### (一) 乳房之構造

乳牛之乳房係由四個獨立分房組成，每一分房具有一個乳頭與一獨立乳腺，因此分房間乳汁並不相通。其中左右分房由中懸韌帶所區隔而成，前後分房則僅由一薄膜分隔。乳房內部組織由實質及間質所構成，實質組織具有分泌功能，乳腺、乳汁輸送之管道及乳池等屬之，間質組織則為無泌乳功能之結締組織及脂肪等。乳汁係於泌乳細胞合成，由許多泌乳細胞再構成大小約 50~250  $\mu\text{m}$  之球狀乳泡 (alveoli)，再進一步組成乳腺葉 (lobule)。乳汁貯存於乳胞腔 (lumen)、乳管、乳池及乳頭腔中。左右乳房均有其獨立之動脈血管供應，可不斷提供泌乳細胞合成乳汁時所需之營養 (陳，1998)。

乳房之前端為乳頭，包含乳頭腔 (teat cistern) 及乳頭溝 (teat canal)。乳頭腔與乳頭溝接合處有數層縱向之瓣膜，即為薔薇瓣 (furstenberg's rosette)，主要功能為防禦外來微生物之感染。乳頭溝由平滑肌纖維所環繞，為乳頭腔與外界之唯一通道 (陳，1998)。

### (二) 乳房炎之概述

乳房炎 (mastitis) 為乳牛重要常見疾病，其發生原因複雜，一般係指乳腺因物理創傷、化學藥劑或細菌感染而產生發炎反應，其中又以細菌感染為主。微生物由乳頭進入牛隻體內後，於乳房中停留與生長，進一步透過搾乳設備傳染給其他泌乳牛。牛隻在遭受病原菌感染時，便會因體內免疫系統之防禦機轉而引發炎症反應 (inflammation)，使白血球數目增加，在介白素-8 (interleukin-8, IL-8) 及干擾素 (interferon) 等細胞激素之作用下導致白血球往發炎部位聚集。一旦炎症反應持續進行，發炎部位將在 56 小時內佈滿巨噬細胞 (macrophage) 等單核球，增加發炎部位之防禦作用，並進一步透過主要組織相容複合體 (major histocompatibility complex, MHC) 將抗原呈獻給淋巴球以引發與特定抗原相關之

後天免疫反應 (Benjamini *et al.*, 2003)。由於乳腺具有良好之血液供應以提供合成乳汁之營養，因此於乳房發炎時血液中之單核球便會大量湧入乳腺中，導致感染乳房炎之牛隻生乳中皆可測得較高之體細胞數 (somatic cell counts, SCC)，係因乳腺中白血球進入生乳中所致。

在台灣乳牛族群中，乳房炎之主要致病微生物為無乳鏈球菌 (*Streptococcus agalactiae*)、金黃葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 等兩種革蘭氏陽性菌，以及牛黴漿菌 (*Mycoplasma spp.*) 和大腸桿菌 (*Escherichia Coli*) 等其他病原菌 (邱等, 1972)。若以乳房發炎程度與乳中體細胞數為依據，尚可再進一步分成臨床型乳房炎 (clinical mastitis) 與非臨床型乳房炎 (subclinical mastitis) 兩大類 (陳, 1998)。根據近年針對台灣獸醫師臨床診斷紀錄指出，乳房炎之發生率約為 8.7%，雖未較酮症 (ketosis) 18.1%、創傷性蜂巢胃炎 (traumatic reticulitis, TR) 21.7% 以及第四胃異位 (displacement of abomasum, DA) 15.9% 等發生率來得高，卻為乳牛產後淘汰率最高之疾病 (陳等, 2008)。茲介紹主要病原菌如下：

#### 1、無乳鏈球菌 (*Streptococcus agalactiae*):

無乳鏈球菌為相當常見之乳房炎致病原，主要存在已被感染的乳區，一旦牛舍、擠乳機器或操作人員被感染乳區之乳汁污染後，便會成為傳播病菌的媒介，並於擠乳時傳染至未感染之乳區。因此在擠乳衛生不良之情況下，無乳鏈球菌便可迅速蔓延感染至整個牛群，但大多屬於非臨床性症狀。細菌代謝廢物的堆積會加強炎性反應，進而破壞產乳組織、降低產乳量或終至無乳。雖較少造成嚴重之疾病，但乳房之結痂可能影響次一泌乳期之表現。(Hogan and Smith, 2003)



## 2、金黃葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*):

金黃色葡萄球菌常繁殖並生長於牛隻之乳頭溝 (teat canal)，透過機械或作業員等由擠乳過程中傳染給未受感染之乳區，易在乳頭皮膚傷口及乳頭管增殖後進入乳腺組織，但在母牛身體其他部位亦可存活。感染後會導致乳房導管系統破壞，進一步形成膿泡並產生結痂，即便是施打抗生素亦難以根除，故一般而言金黃葡萄球菌較鏈球菌之傷害更為嚴重，研究顯示平均每頭感染牛隻將降低 15% 之乳產量。感染初期尚可透過治療而恢復，然一旦擴散至整個乳房則將造成無法復原之組織損害 (Hogan and Smith, 2003, 2003)。

## 3、黴漿菌 (*Mycoplasma spp.*)

黴漿菌較前述兩種微生物少見，惟其傳染性極高，可感染任何年齡層之牛隻；若畜群於短時間內曾爆發呼吸系統疾病或關節腫大時，便需格外注意是否已遭受感染。受感染之母牛產乳量會明顯下降，感染初期便會引發水腫且其治療效果不佳。由於黴漿菌會使感染乳房纖維化，造成乳房膿腫或乳腺淋巴結腫大，故將造成該乳分房之永久損失。

## 4、大腸桿菌 (*Eschericia Coli*):

大腸桿菌群為革蘭氏陰性菌，存在於乳牛舍環境中之糞便或各式地板等墊料，主要源自動物排泄物。一般而言，乾乳期間的大腸菌感染比例約為泌乳期的四倍，在乾乳期前兩週與分娩前兩週之感染比例皆會明顯升高。大腸桿菌所引起之症狀為牛隻午後食慾廢絕、發熱、心跳數增加、下痢便、乳房腫脹、硬塊、熱感等，若未及時治療則將造成步行困難，至牛隻已無法站立時將導致死亡。因大腸桿菌引起之症狀明顯且可早期治療，故多為短期感染，大部分不超過一個月，惟所造成之臨床性乳房炎佔總感染病例之 30% 以上 (Hogan and Smith, 2003)。

### (三) 臨床性乳房炎 (clinical mastitis) :

透過肉眼觀察或藉由異常之乳汁極易判定臨床性乳房炎之有無。若乳房外觀顏色有明顯改變、腫脹，抑或觸摸時可感覺組織出現硬化部位，以及乳汁中含有膿塊、血液等凝固物而造成牛乳組成份之改變，皆為臨床性乳房炎之症狀。牛隻於此階段會產生疼痛及不適感。

### (四) 非臨床性乳房炎 (subclinical mastitis) :

非臨床性乳房炎雖無法以肉眼直接判定，但可以透過分離病原菌或計算體細胞數來判定，其感染率為臨床性乳房炎的 15 至 40 倍，為轉變成臨床性乳房炎之潛在因子，並造成乳產量與生乳品質之下降。非臨床性乳房炎長期存在於泌乳組織中且難以診斷，在經濟上為相當程度之損失。根據統計，美國平均每頭乳牛因乳房炎所造成之損失高達 180 美元以上，每年因乳房炎支出則超過兩億美元，如表 1 所示 (Robert *et al.*, 2005)。






表 1 美國估計每年每頭因乳房炎之損失

**Table 1** Evaluations of the every-year loss caused by mastitis per cow in USA

Causes	Loss (\$)	%
Yields reduction	116.10	64
Milk discard	24.44	14
Earlier renewal	13.60	8
Fewer depreciation	9.94	5
Pharmaceuticals	9.68	5
Veterinarians	4.84	3
Manpower	2.42	1
Total	181.02	100

( modified from Robert *et al.*, 2005 )

## (五) 乳房炎之常用檢測方法

### 1、外觀檢查

包括乳牛身體健康情形之觀察與乳房視診及觸診等。乳房檢查應環顧乳房外觀、對稱性與大小是否有外傷或異常現象，並應用手觸診感覺乳房皮膚溫度是否過高、有無疼痛反應，以及乳房組織、乳腺槽與乳頭是否正常，乳房是否有硬塊、腫脹、變形或結痂等明顯症狀等。擠乳前之前乳檢查亦可以了解乳汁顏色及均質度等是否正常。但若為非臨床性乳房炎，則較不易透過外觀檢查及早發現與治療，故較容易被忽略。(莊，2005)

### 2、CMT 檢驗法 (California mastitis test, CMT)

此法用來評估乳中體細胞數的多寡，為現場最常使用之檢驗方法，稱為加州乳房炎試驗 (California Mastitis Test, CMT)。生乳中體細胞乃源自於乳腺組織脫落之上皮細胞及血液中白血球，於正常泌乳期間上皮細胞會自然脫落及進行組織之修補，一旦乳腺組織因創傷或遭受病原菌感染，血中白血球便會湧入乳腺組織中，造成體細胞數急遽增加 (表 2) (Philpot and Nickerson, 1985)。乳中體細胞數若超過每毫升 50 萬個，即可認定該牛隻已遭受感染；但因現場並不具測定體細胞數之儀器設備，故檢驗方式簡便之 CMT 便成為一種間接且實用之評估指標。

### 3、導電度 (electrical conductivity, EC) 之測定

導電度 (Electrical Conductivity, EC) 為液體電阻值之倒數，定義為電流通過  $1\text{cm}^2$  斷面，長度  $1\text{cm}$  之液柱時電阻之倒數。當溫度改變攝氏  $1^\circ\text{C}$  時，導電度值會偏差約 1.9%，因此導電度之量測通常於  $25^\circ\text{C}$  時定溫測定，否則需要校正溫度偏差，並以  $25^\circ\text{C}$  時之校正值表示之 (Nielen *et al.*, 1992)。正常牛乳在  $25^\circ\text{C}$  時其導電度介於  $4.0\sim 5.5\text{mS/cm}$  之間，牛乳中影響導電度值大小最主要為

$\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  和  $\text{Cl}^-$  三種離子之濃度。正常泌乳時，乳腺腔內滲透壓之平衡全賴乳糖與鹽類共同調節之，然而當乳房炎發生時，乳腺上皮細胞受損，使乳糖分泌及鉀離子減少，造成乳腺上皮細胞滲透作用亢進，血液中之鈉離子與氯離子滲入乳腺腔中，彌補滲透壓之不足，致使牛乳導電度發生變化，亦即乳房炎發生時，會導致牛乳中乳糖和  $\text{K}^+$  的濃度降低，而  $\text{Na}^+$  和  $\text{Cl}^-$  離子的濃度增加 (Nielen *et al.*, 1992)。當牛隻感染乳房炎時，乳中之鈉離子與氯離子濃度將會上升，因而造成牛乳之導電度上升；當其導電度超過門檻值 5.6 mS/cm 時，即可判定其患有乳房炎，故可藉由測定導電值進行判定乳房炎之有無。

#### 4、乳中微生物之培養

當牛隻出現臨床性乳房炎時，會先施以廣效性藥劑予以治療，以早晚各一次持續三天為一基礎療程；若乳房炎症狀並未於一至二個療程後有明顯之改善，則可進行微生物培養以判斷是否需採取其他針對性方式加以治療。

#### 5、總乳 (bulk milk) 中體細胞數與生菌數之檢查。

表 2 牛乳體細胞數含量與乳產量損失百分比關係

**Table 2** Relationships between somatic cell counts and loss in milk yields

Somatic cell counts ( $\times 10^4$ /mL)	Milk yields loss (%)
14 ~ 19.5	5
22.5 ~ 38	8
42 ~ 120	9 ~ 18
128 ~ 228	19 ~ 25

( modified from Philpot and Nickerson, 1985 )



## （六）乳房炎之治療與控制

乳房炎從感染母牛將病原菌傳播至未感染牛隻，其傳染媒介主要為擠乳設備。因此，若希望能有效控制傳染性乳房炎，擠乳環境之清潔與設備之維護、操作人員之管理訓練、乾淨之乳房及乳頭並於擠乳後進行浸漬，以及飼料營養與疫苗等，皆可有效降低病原微生物的散播。

### 1、擠乳環境之清潔與設備維護

除擠乳時之機械壓力需穩定以避免造成物理性創傷之外，擠乳前後正確清洗亦相當重要。牛群中若已有臨床性乳房炎之牛隻，應將其擠乳次序調至最後，避免病原菌透過機器傳染至健康之牛隻。此外，保持牛場乾燥清潔並定期消毒亦相當重要。

### 2、操作人員之訓練

除應接受完善之擠乳教育訓練，對設備操作有一定熟悉度外，尚需接受衛生訓練等相關講習，妥善每個擠乳環節，除可避免造成因機械操作不良所引起之牛隻乳房創傷，尚可防止致病原透過操作人員於牛群中交叉感染之可能。

### 3、乳房之清潔與浸漬

擠乳前需徹底清潔牛隻之乳房與乳頭等部位，避免因糞便等環境中髒污滯留於設備中；乳頭於預洗擠棄前乳不用，並藥浴乳頭使其與消毒水接觸 30 秒，再以紙巾擦乾乳頭後套上乳杯，可減少留在乳頭表皮的微生物。此外，於擠乳後之隔離性藥浴浸漬可有效降低因環境中大腸菌所造成之乳房炎感染新病例。乾乳期之連續性乳頭隔離浸漬可有效控制環境引起之乳房炎感染，以 2 至 5 日之療程為佳。然因各廠牌之藥浴使用皆不盡相同，遵循使用說明正確操作始能達到有效之藥浴效果（Hogan and Smith, 2003）。

#### 4、疫苗與飼料營養分

近年來相當高比例之北美乳牛皆餵飼蛋胺酸－鋅，可降低乳內感染發生率、減少乳體細胞數並提高產乳量。利用大腸桿菌攻毒與限制鋅攝取量之試驗結果顯示，泌乳牛補充蛋胺酸－鋅可改善乳管角質素之形成，並可排除乳管內大腸桿菌之感染程度，且可使母牛於攻毒試驗中有較佳之恢復程度（莊，2011）。於乾乳期間施打 J-5 大腸桿菌疫苗之母牛預防注射，可有效降低泌乳早期大腸菌感染所引起之臨床性乳房炎病例之數量與程度；相對而言，飼糧中若缺乏維生素 A、維生素 E、 $\beta$ -胡蘿蔔素，以及微量元素硒、銅和鋅等礦物質，皆會造成環境性乳房炎之發生率增加。若牛隻出現持續之慢性乳房炎，則該考慮進行淘汰（Hogan and Smith, 2003）。





### 三、生乳樣品利用之介紹

#### (一) 生乳乳量與組成分之介紹

##### 1、乳量

乳量為農場中每日最為詳載之數據，透過對乳量之分析可繪製單一泌乳牛之泌乳曲線。透過乳量之詳實記錄可有效淘汰產量低下之乳牛，並可對現有泌乳牛進行產量高低分群投以不同需求之日糧，以達更有效率之管理。

##### 2、乳糖

乳糖約佔乳組成分之 4.67%，其重要性雖不及乳蛋白與乳脂率，唯優酪乳之製成乃透過乳酸菌將乳中之乳糖轉換成乳酸以降低 pH 值，且乳糖不耐受症 (lactose intolerance) 常見於黃種人與非裔黑人，故仍為測定之指標之一。

##### 3、乳脂

台灣荷蘭牛之乳脂率平均約為 3.7%，酪農戶可依牛乳中之乳脂率分析作為粗纖維採食量之監控。增加禾本科與芻料可提高揮發性乙酸而利於提高乳脂率，穀類精料則因較易產生丙酸等脂肪酸故易導致瘤胃發酵異常，造成乳脂率下降。

##### 4、乳蛋白率與尿素氮

乳蛋白與氮之分析主要與泌乳牛能量及蛋白質採食量相關。透過微生物利用飼糧中之粗蛋白進一步分解合成微生物之蛋白質時，氮的利用與熱能呈現正相關之相互平衡狀態；行政院農業委員會畜產試驗所新竹分所為加強 DHI 乳質檢驗功能，自 2002 年 12 月開始提供牛乳尿素氮之數據，可分成過低 (< 11 mg/dl)、正常 (11~17 mg/dl) 及過高 (> 17 mg/dl)。一般而言，牛乳蛋白質率為 3.2% 左右，尿素氮含量則約為 15 mg/dL (李，2003)。

## 5、乳總固形物

市面上之乳廠多有分析無脂固形物之資料，包含乳蛋白質、乳糖、礦物質以及維生素等扣除水分與乳脂之乾物。無乳固形物與乳脂率合併即為牛乳中總固形物。總乳固形物為乾物質採食量之指標，提高乾物質採食量即可相對提高總固形物，一般而言乳中之總固形物約為 12%。若總固形物與乳脂率過低時，可增加禾本科芻料以改善；且乾物質採食量不足時，亦需注意蹄葉炎等疾病以防泌乳量下降。

## 6、生乳體細胞數

DHI 檢驗報告中之總體細胞數為酪農最佳篩選之指標，而總乳體細胞數含量亦為農場間分級之重要依據之一。由於臨床使用之 CMT 檢測法並無法得知單一泌乳牛之體細胞數，此項分析數據便顯得格外重要。一般而言，若單一泌乳牛之體細胞數於每毫升生乳中含量大於 50 萬個，即被列為乳房炎牛隻。

### (二) 非侵入式取樣方法之介紹

在族群遺傳學之研究上，動物往往需要被捕捉或滯留、標記等；而無論是捕捉亦或標記動物，此類處理過程均會對動物體本身造成相當大之緊迫。因此，在野生動物之研究上便開始鼓吹起替代之取樣方法，亦即非侵入式取樣法 (noninvasive sampling methods) (Woodruff, 1993)。

近年來，已發展出相當多元化之非侵入式取樣方法以做為動物體 DNA 之來源，如糞便、羽毛、精液、毛髮，以及生乳等。無論是使用何種非侵入式樣本做為 DNA 來源，其目的皆為希望透過此類樣本以取得良好品質之 DNA，進而取代以血液或組織等侵入式取樣之 DNA 來源。非侵入式樣本已成功地利用於粒線體 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 之 PCR 增幅以用於種別鑑識與種間親緣地理學之研究，唯在細胞核內基因組 DNA 之分析上仍有一定的困難度，如親子鑑定、

性別鑑定，以及個體鑑定等 (Chu *et al.*, 2006)。

## (二) 以生乳做為非侵入式取樣之來源

現今已有許多分子遺傳研究技術與方法利用於動物體生產性能之性狀分析，抑或找尋可能之遺傳性疾病；而在諸多分析技術上，更高品質與足量之 DNA 來源即為首要課題。隨著組織來源不同，亦已發展出不同之取樣方式，而血液及肌肉組織為目前最常使用之基因組 DNA 來源；然而，血液及肌肉組織之取樣對動物體本身會造成一定程度之緊迫，操作人員亦需經過相當的訓練，對動物體或操作人員亦皆有風險。因此，如何透過血液與肌肉組織以外的部位取得基因組 DNA 便為另一項重要之課題。乳用經濟動物每日早晚皆需實施擠乳作業，且生乳中含有一定量之體細胞數，或可做為另一基因組 DNA 之替代來源。以生乳做為非侵入式樣本來源具有實用性高、對動物體緊迫較低，以及成本相對較為低價等優點。此外，由於生乳樣本主要取得來源為牛隻或羊隻等乳用經濟動物，故其生產性狀之記錄相對較為完整而利於大規模之評估比較 (Psifidi *et al.*, 2010)。

## (三) 自生乳樣本抽取 DNA 之介紹

### 1、以傳統法抽取生乳樣本 DNA

有鑒於以血液中白血球做為 DNA 來源較不適用於進行大規模經濟動物性狀評估，Lipkin 等人 (1993) 改良了從精液抽取 DNA 之方式建立一套從牛乳中抽取 DNA 之方法，其流程示意如圖 2。牛乳中所含之體細胞數雖不及羊乳豐富，但每毫升平均含量亦約略為  $10^4$  至  $10^7$  個，視其健康狀況、初產或經產、季節，或泌乳階段而定。牛乳之採集為每日例行工作，且毋需過多之額外人員訓練或協助即可進行，使其於樣本取得上更為彈性。因此，牛乳中所含之體細胞或可成為 DNA 之另一便利之替代來源。

## 2、以商用套組抽取生乳樣本 DNA 之可行性

由於商用套組於 DNA 抽取時提供相當之便利性與快捷性，許多試驗皆開始採用各式商用套組做為 DNA 抽取工具；然而，一般商用套組多專為血液或組織等傳統侵入式樣本所設計，因此如何應用於非侵入式樣本便為其主要課題之一。Psifidi 等人(2010)欲嘗試比較六種不同方式抽取生乳中 DNA 之優劣，其中包含兩組商用套組，以及針對兩組商用套組之操作步驟進行改良，再與傳統之兩種抽取法進行比對，使用來自 5 個不同畜群之 15 隻綿羊做為測試以進行評估，其結果如表 3 所示。表中比較了兩個不同的吸光值比值，電泳分數評比，Real-time PCR 分數之 Ct 值，以及不同方式所需之 DNA 抽取時間及成本，顯示改良後之商用套組操作程序有較傳統法等突出之表現，尤以血液用之套組為佳。由於羊乳中所含之正常體細胞數為  $10^6$  個以上，已足夠做為非侵入式取樣之良好來源。



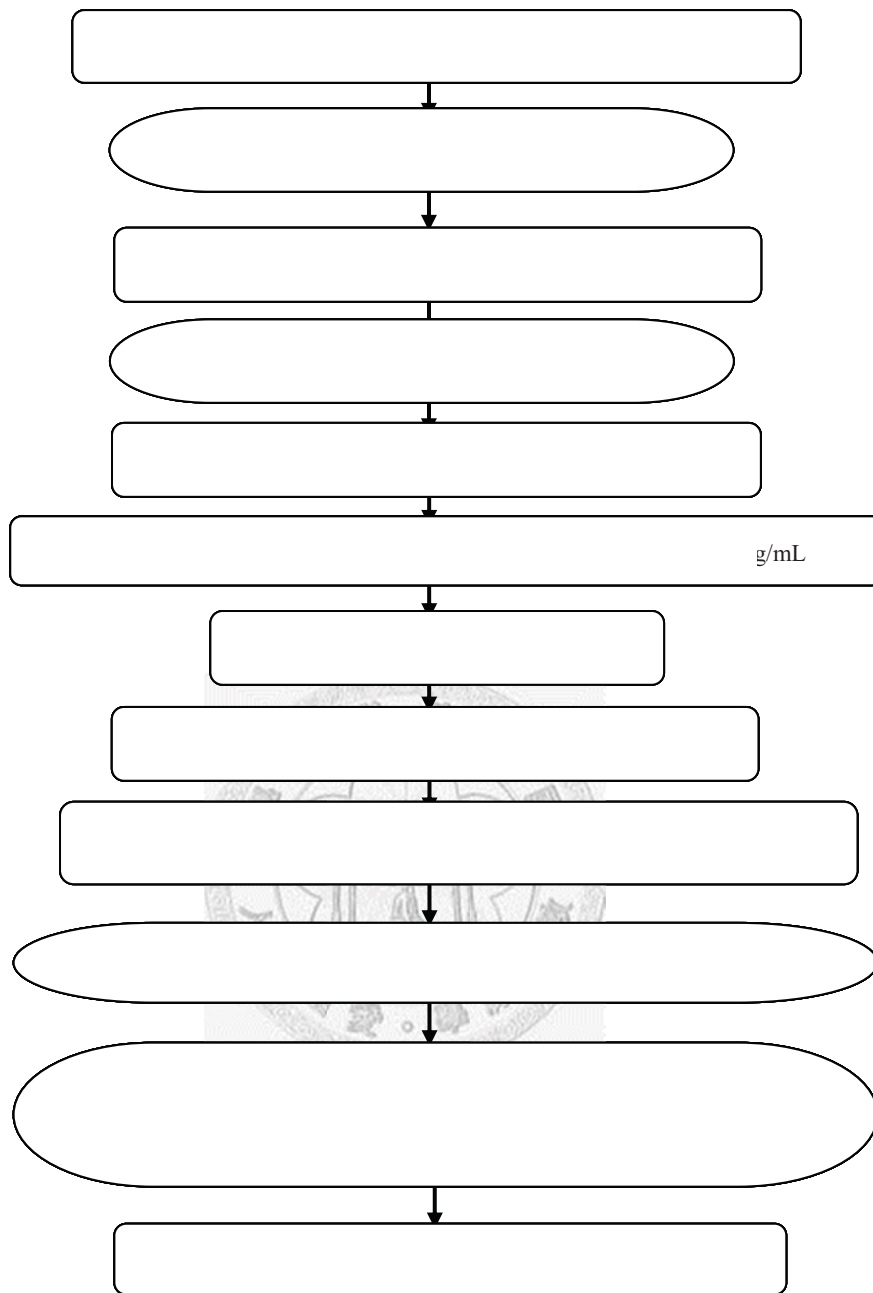


圖 2 以傳統法抽取牛乳 DNA 之流程圖 (Lipkin *et al.*, 1993)。  
 Figure 2 Flow charts of DNA extraction from milk by traditional methods (Lipkin *et al.*, 1993) .

表 3 利用六種不同方法自綿羊乳中抽取 DNA 之比較

Table 3 Comparison of six DNA extraction methods using in ovine milk samples

Extraction method	260/280 nm <sup>a</sup>	260/230 nm <sup>b</sup>	Electrophoresis score	Ct value <sup>c</sup>	Process duration	Cost per sample (€)
Nucleospin® Blood Kit	1.73 (0.03) <sup>d</sup>	1.67 (0.14)	45.0 (10.1)	24.3 (0.40)	1.15 hours	2.7
Nucleospin® Tissue Kit	1.71 (0.03)	1.67 (0.14)	48.0 (9.6)	23.7 (0.41)	1.15 hours	2.9
Modified Blood Kit	1.80 (0.03)	2.10 (0.14)	89.1 (10.0)	22.8 (0.46)	2.15 hours	2.9
Modified Tissue Kit	1.74 (0.04)	1.85 (0.14)	54.5 (10.1)	23.4 (0.41)	2.15 hours	3.1
Phenol-Chloroform	1.55 (0.03)	2.71 (0.14)	28.5 (10.52)	25.0 (0.39)	1.5 days	2.0
In-house protocol	1.43 (0.04)	1.43 (0.18)	11.5 (12.5)	24.1 (0.49)	2.15 hours	1.5

a: Ratio from absorbance at 260 and 280 nm to evaluate proteins contents.

b: Ratio from absorbance at 260 and 230 nm to evaluate salts contents.

c: From real-time PCR.

d: Standard error.

(Modified from Psifidi *et al.*, 2010)



#### 四、牛隻主要組織相容複合體基因之研究

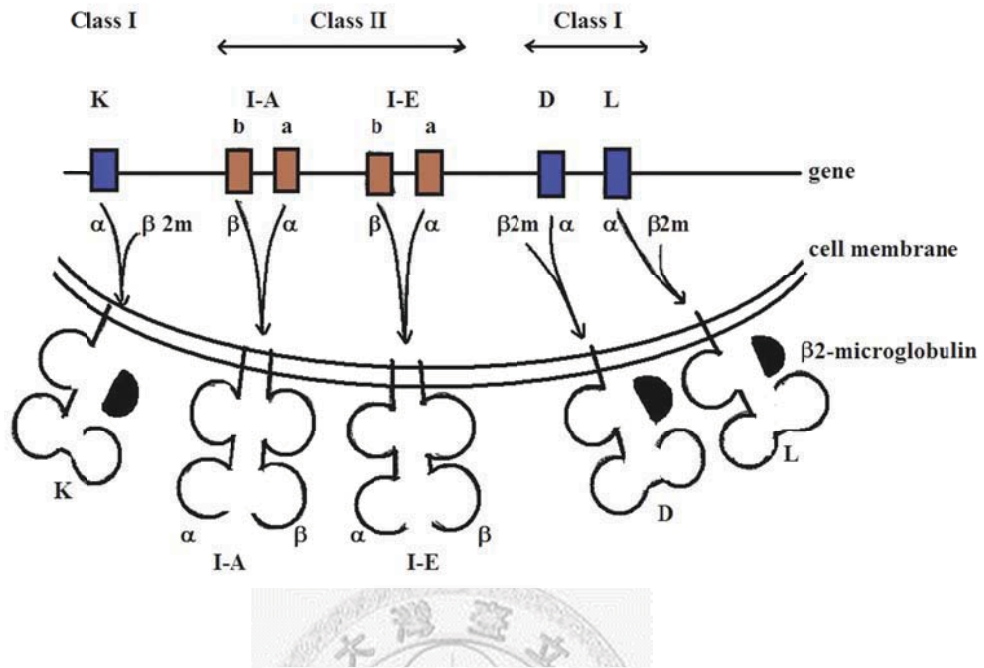
##### (一) 主要組織相容複合體之介紹

##### 1、主要組織相容複合體基因

主要組織相容複合體基因 (major histocompatibility complex genes, MHC genes) 為一種家族性基因 (MHC genes family), 廣泛存在於脊椎動物基因組中, 其功能與免疫系統之抗原呈現相關。MHC 主要分成兩類: 第一類 MHC (MHC class I) 與第二類 MHC (MHC class II)。MHC 最早於 1937 年在小鼠研究中提出 (Benjamini *et al.*, 2003), 被稱之為 H-2 基因 (histocompatibility complex 2) (圖 3A), 之後數十年間其同源基因亦陸續在其他動物中被發現, 其中人類 MHC 基因位於第六號染色體上, 稱為人類白血球抗原 (human leukocyte antigen, HLA) (圖 3B); 在豬隻則位於第七號染色體上, 稱為 SLA 基因 (swine leukocyte antigen, SLA); 在牛隻中位於第 23 號染色體上, 稱為 BoLA 基因 (bovine leukocyte antigen, BoLA)。

MHC 於個體之間具有相當高度之基因多樣性 (genetic polymorphism), 因此任兩個體間之 MHC 表現皆不盡相同, 是故極易造成組織移植時產生快速排斥之現象。此外, 在缺乏誘導因子之情況下, 大部分細胞僅表現第一類 MHC 分子, 少數如 B 淋巴球 (B cells)、胸腺上皮細胞 (thymus epithelial cells)、以及樹狀突細胞 (dendritic cells) 等則同時並持續表現第一類與第二類 MHC 分子。不同於其他免疫球蛋白及 T 淋巴球受體, MHC 基因表現並無交替基因排斥 (allelic exclusion) 之現象, 而是以共顯性 (codominant) 之方式表現, 任一個體皆可同時表現來自父方與母方之 MHC 基因, 無論是第一類或第二類 MHC 基因 (Benjamini *et al.*, 2003)。

A.



B.

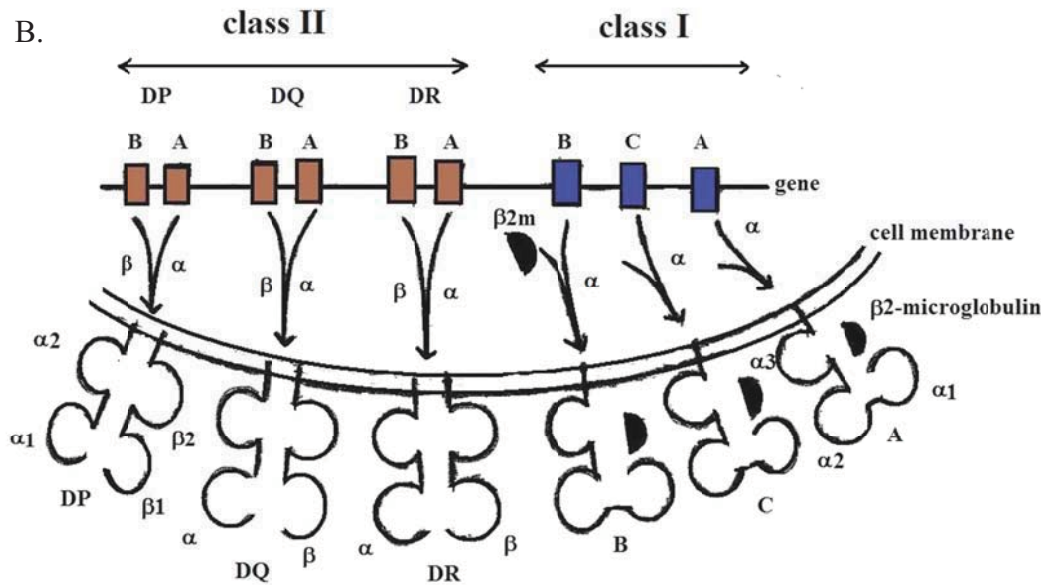


圖 3 小鼠與人類 MHC 基因。A. 小鼠 H-2 基因；B. 人類 HLA 基因 (Benjamini *et al.*, 2003)。

**Figure 3** MHC genes of mice and human. A. mice H-2 gene; human HLA gene (Benjamini *et al.*, 2003) .

## 2、第一類 MHC 之分子結構介紹

第一類 MHC 基因 (MHC class I) 合成一分子量約 43 kDa 之穿膜醣蛋白 (transmembrane glycoprotein)，具有三個胞外區域 (extracellular domain)，分別為 A、B 以及 C 等三個區域；此類蛋白質又會與另一分子量為 12 kDa 之  $\beta 2$  小球蛋白 ( $\beta 2$  microglobulin) 以非共價結合方式存在於細胞表面，兩者複合成具有四個胞外區域之分子 (Takeshima *et al.*, 2008)。

## 3、第二類 MHC 之分子結構介紹

第二類 MHC 基因 (MHC class II) 有三種胞外區域，分別為 DP、DQ、以及 DR；此三個胞外區域皆有  $\alpha$  及  $\beta$  兩種基因，分別可合成分子量約為 35 kDa 與 28 kDa 之穿膜醣蛋白。第二類 MHC 為免疫球蛋白超級家族 (immunoglobulin superfamily) 成員之一，與第一類 MHC 之胺基酸結構皆有高度保留之不變區 (invariant region) 與變異較大之變異區 (variable region)。第一類與第二類之不變區在於結合 T 細胞之特定 CD 分子，如  $CD8^+$  與  $CD4^+$ ；變異區則使其與抗原分子結合時能有較大之彈性，故 T 細胞可與幾乎所有類型之蛋白質抗原結合 (Takeshima *et al.*, 2008)。

## 4、MHC 之功能

一旦遭受病原菌等抗原感染時，免疫系統即會開始啟動防衛機制將之消滅。為能區分細胞是否已遭受感染，以利 T 細胞進行作用，需藉由 MHC 之抗原呈獻功能以完成。此過程牽涉抗原修飾 (antigen processing) 與抗原呈獻 (antigen presentation)，為 MHC 分子於細胞內與抗原之胜肽結合並運送至細胞膜上以供辨識之一連串反應。

當抗原為內生性，即在細胞內合成蛋白酶複合體，會進一步降解為約 8 至 9 個胺基酸長度之短胜肽，並透過 TAP-1 及 TAP-2 運輸蛋白將之送至內質網。

在內質網中，胜肽抗原將選擇性與第一類 MHC 結合，再通過高基氏體後被送至細胞表面與 CD8<sup>+</sup>T 細胞受體進行反應。而抗原若為微生物、蛋白質、或紅血球等外來抗原時，即會經胞噬（phagocytosis）或內吞作用（endocytosis）被攝入巨噬細胞等，並與細胞內之囊泡融合而進一步於此酸性環境下被蛋白酶降解為較短之胜肽鏈。第二類 MHC 在離開內質網後便會與此類短胜肽結合並形成複合體，再進一步將之呈獻至細胞表面與 CD4<sup>+</sup>T 細胞受體作用（Benjamini *et al.*，2003）。

## 5、MHC 分子多樣性

第一類與第二類 MHC 基因之變異區具相當高之多態性，使其表現之蛋白質分子亦表現出類似之高度多態性，而此類遺傳變異被視為使個體能更有利於對抗不同型態之抗原。此外，MHC 基因被視為與特定感染性疾病相關，如人類之 B 型肝炎（hepatitis B）、結核病（tuberculosis）、瘧疾（malaria）、僵直性脊椎炎（ankylosing spondylitis）、與愛滋病（AIDS）等；其他物種如雞隻之馬立克氏病（Marek's disease），和牛隻白血病病毒（bovine leukemia virus, BLV）之病程發展皆與 MHC 基因有關。（Benjamini *et al.*，2003）



## (二) 牛隻主要相容複合體基因

### 1、牛隻淋巴球抗原基因之簡介

在牛隻中，MHC 基因被稱之為牛隻淋巴球抗原 (bovine leukocyte antigen, BoLA) 基因，已被視為牛隻免疫性狀與疾病之重要遺傳候選標記之一，位於第 23 對染色體上。雖然 BoLA 基因於結構上類似於人類之 HLA 基因，但仍有許多相異之處。首先，在第二類 MHC 基因上有一明顯之重新排列現象，導致此段序列於染色體上被分成兩個較小之區域，分別稱為 IIa 區域與 IIb 區域，此段重排序列於牛科動物如綿羊與山羊之 MHC 基因亦已被發現 (Takeshima *et al.*, 2008)。在 IIa 區域中，包含具有主要功能表現之基因片段 DR 與 DQ 基因，影響 CD4<sup>+</sup> 輔助 T 細胞之限制步驟；IIb 區域則包含 DYA、DYB、DMA、DMB、DOA、DOB、TAP1、TAP2、LAP2 以及 LMP7 等基因。

此外，人類之 HLA 基因於第二類 MHC 區域會同時表現兩種以上之 DR 與 DQ 產物，而 BoLA 基因則僅表現一種 DR 基因產物與兩種以上 DQ 產物。在第二類 MHC 基因中，超過半數之基因型具有 DQ 之重覆片段，且此重覆之基因片段皆可表現 (Schwab *et al.*, 2009)。一般而言，牛隻 BoLA 基因片段包含一個 DRA 基因，三個 DRB 基因，一個或兩個 DQA 與 DQB 基因。三個 DRB 基因分別被稱為 DRB1、DRB2，與 DRB3 基因，其中僅 DRB3 基因因多態性高而被視為較重要之基因，尤其是 exon 2 (DRB3.2 基因) 之多態性更為顯著。至今已有許多研究利用不同方式針對 BoLA-DRB3 基因進行探討，如限制片段長度多態性 (restriction fragment length polymorphism, RFLP)、T 細胞型態、蛋白質等電點、血清學研究、單股構形多態性分析 (single-strand conformation polymorphism analysis, SSCP)、特有序列寡核苷酸型態分析 (sequence-specific oligonucleotide analysis, SSO)、變性梯度膠體電泳 (denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)，以及聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR)，分別為結合 RFLP 之 PCR-RFLP 法與結合鹼基定序分型法之 PCR-SBT



(sequence-based typing)。Miltiadou *et al.* 2003 利用巢式聚合酶連鎖反應分析並建立了許多基因型，加上過去其他研究之發現，目前已於 DRB3.2 基因發現超過 110 種基因型，且部分基因型已被證明與牛白血病病毒 (bovine leukemia virus, BLV)、沙蚤病 (dermatophilosis) 與臨床性乳房炎之抗性或易感性相關 (Juliarena *et al.*, 2008; Kulberg *et al.*, 2007; Maillard *et al.*, 1996; Xu *et al.*, 1993; Zanotti *et al.*, 1996)。

## 2、BoLA-DRB3 基因之 PCR 定序分型法原理介紹

為得到較其他方法高之解析度，PCR-SBT 乃直接針對 BoLA-DRB3 基因之 PCR 產物進行定序，以利後續用於對基因型判定要求甚高之遺傳研究，唯其試劑及儀器價格亦相對昂貴。首先，利用聚合酶 (polymerase) 擴增出與模板 DNA 互補之片段，並將 ddNTP 混合於 dNTP 中，透過引子進行擴增；一旦擴增過程中接上 ddNTP 時便會使互補片段無法繼續複製而造成終止，使其 3' 端可終止於任一核苷酸位置，故利用此原理經聚合酶擴增後所得之 PCR 片段，其 3' 端將為 ddATP、ddTTP、ddGTP，以及 ddCTP 等其中之一。透過高解析度之電泳分離不同大小之 PCR 片段後，進一步利用儀器測量已進行不同螢光標定之 ddNTP，最後由定序軟體判讀後整合出完整之模板核苷酸序列。由於定序分析之高解析度特性，故可鑑定特定基因座上等位基因之多態性，或進一步找尋新的基因型態。

本研究之目的為透過非侵入式採樣之方式，利用乳牛之生乳做為 DNA 來源，再經由 PCR-SBT 之分析法針對 BoLA-DRB3.2 基因之多態性進行討論，希冀能建立較為便利之採樣方式以利未來大規模試驗之基礎，並探討不同基因型對於乳量與乳組成分之影響。

## 參、材料與方法

### 一、試驗牛隻與期間

試驗牛隻來源為國立臺灣大學生物資源暨農學院附設農業試驗場（簡稱台大農場），共 23 頭荷蘭牛泌乳牛隻；試驗牛隻與樣本皆於場內進行管理與採集，試驗期間為 2010 年 11 月至 2011 年 3 月。本試驗流程如圖 4 所示。

### 二、牛乳品質檢驗資料收集

於每月 25 日以 DHI 乳樣專用瓶於擠乳過程中透過分流之方式收集各泌乳牛之牛乳全段樣本，並送交新竹分所牛乳檢驗中心以收集 DHI 牛乳品質之資料。其中包含乳量、乳脂率、蛋白質率與尿素氮、乳糖率、總固形物以及體細胞數等測定項目。



#### （一）乳量測定

擠乳結束後直接讀取擠乳機器之測量值。一般而言，乳牛泌乳高峰期約出現於泌乳後 50 日，可藉由此高峰期之表現與持續性進行監控場內乳牛之長期泌乳記錄。

#### （二）乳成分之測定

使用新竹分所之牛乳組成分與體細胞數分析儀檢驗生乳中乳脂肪率、乳蛋白質率、乳糖率、總固形物與體細胞數。其測定流程如下：

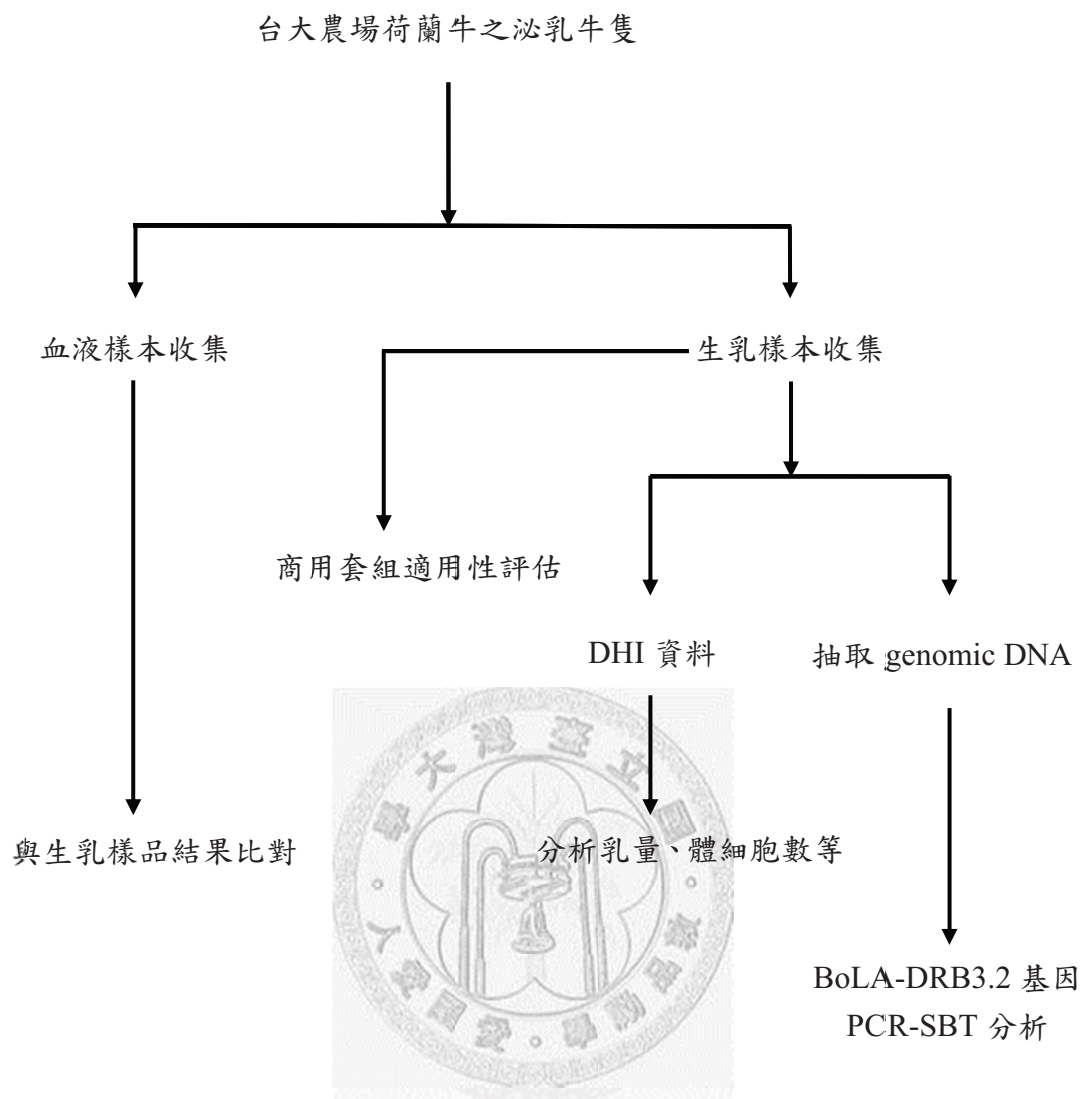


圖 4 試驗設計流程圖

Figure 4 The flow chart of experimental design.

- 1、儀器開機後進行流道清洗，歸零、預熱，並經依次輸入待檢驗酪農戶之代號與樣品數量。
- 2、乳品樣本以酪農戶為單位依次排於輸送架上，並置於 43°C 水浴槽內預熱 10 分鐘。
- 3、打開乳樣之瓶蓋並初步檢查是否有異物之殘留，如毛髮、乳房炎固形物、血斑、糞便等皆需清除。
- 4、將輸送架置於測定位置，由機器透過紅外線自動偵測輸送帶上樣本條碼，隨後吸出樣本以進行組成分分析。

### 三、生乳與血液樣本資料收集

各試驗泌乳牛隻於試驗期間，分別利用非侵入採樣取得之生乳樣本以 PCR-SBT (polymerase chain reaction – sequence based typing) 方式，分析 BoLA-DRB3.2 基因在台大農場荷蘭牛族群之多態性。除非侵入式採樣方法外，另透過尾根採血之方式取得各泌乳牛隻之血液樣本進行分析比對，以做為評估非侵入式採樣結果之對照組。

### 四、商用套組適用性之評估

一般商用套組之設計多專門為血液或組織為樣本來源所設計，本試驗參考 Psifidi et al. (2010) 改良後之血液用商用套組操作程序，選用 Nucleospin® Blood (MN, Germany) 商用套組進行主要試驗之萃取。為評估未來大規模試驗之經濟效益與實用性，與探討不同套組之萃取效果，另外選用 MasterPure™ DNA Purification Kit for Blood Version II (Epicentre®, Wisconsin, USA) 進行試驗比較。

## (一) 基因組 DNA 之抽取

自牛隻左側乳房抽取 40 mL 生乳置入 50 mL 離心管中，在 4°C 經 3000 ×g 離心 10 分鐘後分離出乳脂、上清液、以及沉澱物。將上層乳脂刮除並緩慢倒去上清液後，依圖 5 之流程抽取生乳中體細胞之 DNA。

## (二) 乳牛主要組織相容複合體基因 Exon3.2 片段之多態性分析

### 1、聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR)

Miltiadou *et al.* (2003) 設計多組引子進行巢式聚合酶連鎖反應，而各組亦可單獨使用於不同試驗中；2007 年後，許多研究開始參考並使用其中任單一組引子進行 PCR 增幅，再進行 PCR-SBT 之分析，以減少因非特異性增幅所造成之干擾 (Baxter *et al.*, 2008; Kulberg *et al.*, 2007; Takeshima *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008)。本試驗亦參考 Miltiadou *et al.* (2003) 所設計之引子選用其中一組序列進行擴增，Forward primer (DRB3FWD): 5'-CGC TCC TGT GAY CAG ATC TAT CC-3'; Reverse primer (DRB3REV): 5'-CAC CCC CGC GCT CAC C-3'。將 3 pmol 之正向與反向引子加入裝有 1X reaction buffer (1.5 mM Mg<sup>2+</sup>)、0.25 U Taq DNA polymerase、以及 0.2 mM dNTP 之 0.2 mL PCR 反應試管中。並加入滅菌之去離子水調整至總反應體積為 50 μL。PCR 條件亦參考 Miltiadou *et al.* (2003) 之建議並略加修改，調整為起始溫度 94°C、2.5 分鐘，隨後進入 94°C、30 秒，57°C、30 秒，72°C、1 分鐘之循環，循環次數為 25 次；最後為 72°C、5 分鐘之延展。



## 2、PCR 產物之純化

將已擴增之 exon 2 片段之 PCR 產物以 DNA 產物純化套組 (Gel/ PCR DNA Fragments Extraction Kit, Geneaid, USA) 進行純化，其流程圖如圖 6 所示。由於定序需要較高純度且鹽類含量較低之 PCR 產物，故於回溶時僅能添加 ddH<sub>2</sub>O，而不得添加 TE buffer 或 EDTA 等溶劑；此外，需將最終 PCR 產物依片段大小調整至濃度介於 2 至 50 ng/μL 之範圍。

## 3、PCR 產物之定序

將純化完畢之 PCR 產物送至台灣大學生物技術研究中心 (Center of Biotechnology, NTU) 核酸定序分析核心實驗室進行定序，其中每頭試驗牛隻 DNA 之 PCR 產物均分別採以 5' 至 3' 端之定序方向，以及 3' 至 5' 端之定序方向，以確認其定序結果之正確性。

## 4、BoLA-DRB3.2 基因型之序列比對

所有定序結果建立成 FASTA 系統之檔案後，使用 Chromas v2.23 (Technelysium Pty. Ltd., Taiwan) 分析序列圖形，並以 NCBI-BLASTN 系統與 EMBL-EBI 系統 (European Bioinformatics Institute, Europe) 進行序列比對。首先自 BoLA-DRB3.2 基因型計畫 (<http://www.projects.roslin.ac.uk/bola>) 取得所有基因型之序列資訊，並自 NCBI 基因庫取得牛隻第 23 號染色體之序列資訊；將定序結果利用 BLASTN 系統先於 NCBI 進行序列比對，初步確定媒合至第 23 號染色體上之 BoLA-DRB3.2 基因位置後，再進一步將各序列於 EMBL-EMI 上進行基因型之確認。

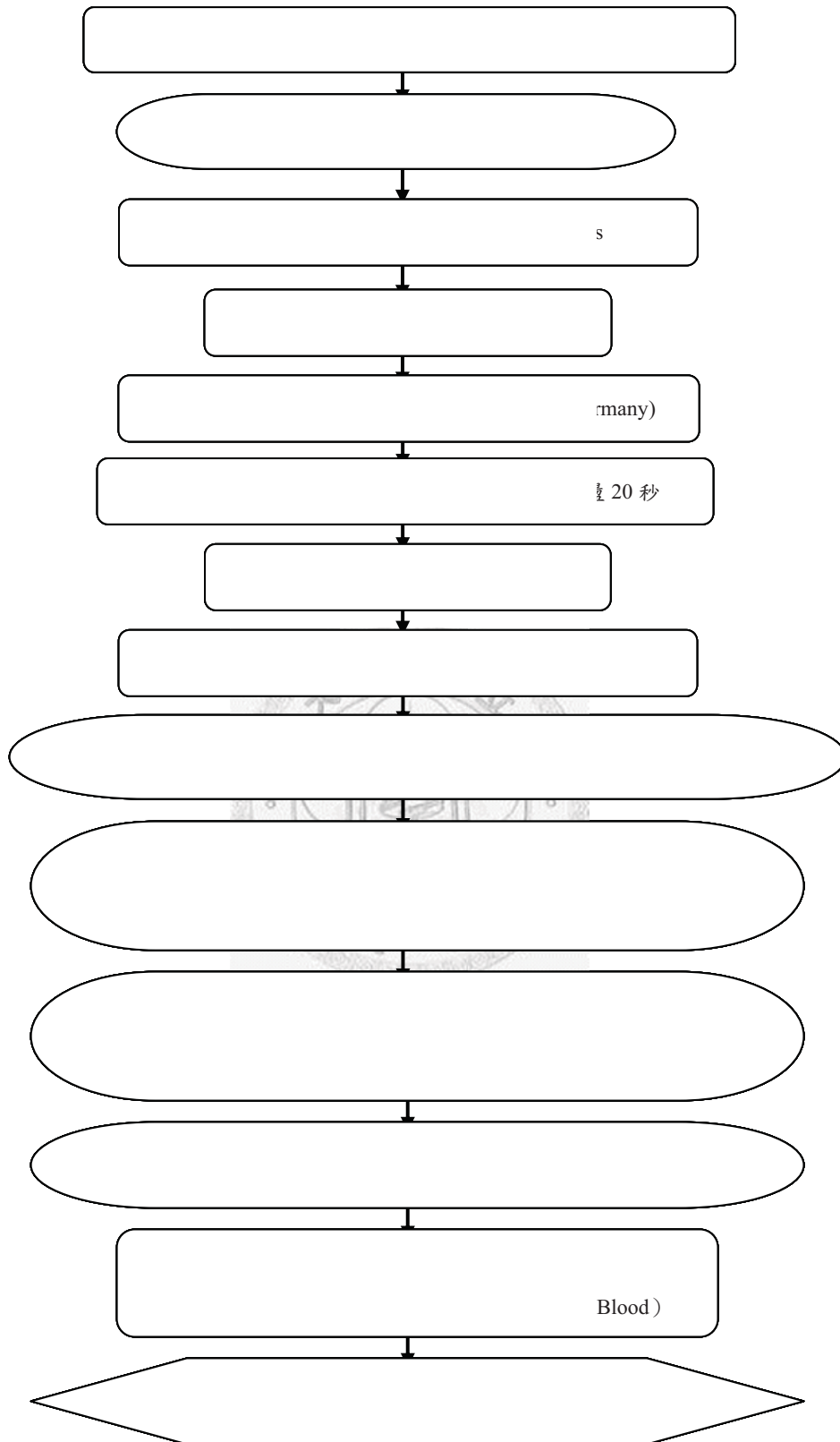


圖 5 自生乳樣本抽取基因組 DNA 流程圖。

Figure 5 Flow chart of genomic DNA extraction from milk samples.



### (三) 資料分析

#### 1、試驗牛隻之群組建立

23 頭試驗泌乳牛隻依其於試驗期間內各月份之體細胞數進行分組，當該月份體細胞數超過每毫升 50 萬個即被 DHI 標示為乳房炎記錄。依其被標示之頻度可分為易感性群組 (sensitive group) (發炎次數 5 次)、一般群組 (normal group) (發炎次數 2 至 4 次)，以及抗乳房炎群組 (resistant group) (發炎次數 0 至 1 次) 共三個群組。

#### 2、資料統計分析

本試驗數據使用統計套裝軟體 IBM SPSS Statistics 19.0.0 (IBM, Chicago, USA) 進行統計分析，並以進階迴歸模組 (regression models) 進行體細胞數與乳組成分、乳量，以及體細胞數之數據分析。乳組成分與乳量之變方分析 (analysis of variation, ANOVA) 之顯著水準定為  $\alpha=0.05$ 。統計模式如下：

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_{ij} + E_{ijk}$$

$Y_{ijk}$ ：模式中各觀測值

$\mu$ ：族群平均

$A_i$ ：第  $i$  個乳房炎效應， $a$ ：乳牛頭數， $i = 1 \sim a$

$B_{ij}$ ：第  $i$  頭乳牛於第  $j$  個胎次效應， $j = 1 \sim a_i$

$E_{ijk}$ ：機差， $E_{ij} \sim (0, \sigma^2)$

## 肆、結果與討論

### 一、乳房炎發病頻率與生乳乳量、乳組成分之關係

#### 1、乳房炎發病頻率之分群結果

根據 2010 年 11 月至 2011 年 3 月份之 DHI 資料，本試驗測試了台灣大學試驗農場共 23 頭荷蘭牛泌乳牛隻，依其被判定為臨床性乳房炎之頻率共分成三組；其中易感性群組有 5 頭，一般群組有 8 頭，抗乳房炎群組有 10 頭。各組顯示為重複數不相等之非均衡資料，並以最小平方均值 (least square mean) 進行分析。



#### 2、不同群組在乳組成分之差異

依據試驗期間所收集之乳組成分資料分別進行變方分析，不同之乳房炎發病頻率群組對於生乳組成分之差異如表 4 所述。根據 Philpot and Nickerson(1985) 所提出之看法 (表 5)，顯示乳牛之乳房炎會造成乳糖減少 5 至 20%，乳脂減少 5% 以上，總固形物減少 3 至 12%，而總蛋白質同時受到酪蛋白減少與免疫球蛋白增加的情況下僅略為改變。因此本次試驗除各群組之乳量與乳組成分之分析外，對於所有試驗牛隻於發病期間與未發病期間之乳量與乳組成分均進行 Student 氏 t-檢定 (Student's t-test) 之雙尾測驗以檢定平均值差異之顯著性，結果比較於表 5 及表 6。茲根據本試驗所收集之乳脂率、乳蛋白率、乳糖率、無脂固形物，以及總固形物等資料與體細胞之關係進行探討如後 (圖 7 A-F)。



表 4 易敏感性、一般性以及抗乳房炎群組之乳量與乳組成分比較<sup>1</sup>

Table 4 Comparison of milk yield and milk components among sensitive, normal, and resistant groups

	Milk yield (kg/day)	Milk fat (%)	Milk protein (%)	Lactose (%)	SNF <sup>2</sup> (%)	TS <sup>3</sup> (%)
Sensitive group (N= 5)	23.54±4.28	3.72±0.20	3.37±0.20	4.44±0.10	8.52±0.25	12.15±0.42
Normal group (N= 8)	19.16±1.68	4.20±0.12	3.23±0.12	4.63±0.07	8.56±0.15	12.74±0.22
Resistant group (N= 10)	25.87±1.35*	4.15±0.22	3.10±0.13	4.97±0.04**	8.77±0.11	12.86±0.32

1. Numbers with asterisk are significant at 95% confidence level, or double asterisk at 99% level.

2. SNF, solid-no-fat.

3. TS, total solid.

All the data show in mean ± SE.

表 5 乳房炎與生乳品質之關係

Table 5 Relationships between mastitis and milk qualities

<b>Milk components</b>	<b>Comparisons with normal milk ( Philpot and Nickerson, 1985 )</b>	<b>Comparisons with normal milk</b>
Lactose	decrease more than 5%	decrease 7.8%
Total protein	minus or plus slightly	not significant
SNF (Solids-not-fat)	decrease about 8%	decrease 3.6%
Total solid	decrease more than 3%	decrease 5.3%
Fat	decrease 5% to 12%	decrease 8.6%

表 6 未發炎期間與發炎期間之乳量與乳組成分比較<sup>1</sup> (N=23)

Table 6 Comparison of milk yield and milk components between inflammation and non-inflammation periods

	Milk yield (kg)	Milk fat (%)	Milk protein (%)	Lactose (%)	SNF <sup>2</sup> (%)	TS <sup>3</sup> (%)
Inflammation period	22.74±1.39	3.83±0.10	3.25±0.06	4.50±0.05	8.45±0.08	12.24±0.14
Non-inflammation period	22.75±0.94	4.19±0.11*	3.19±0.05	4.88±0.03**	8.77±0.05*	12.93±0.12*

1. Numbers with asterisk are significant at 95% confidence level, or double asterisk at 99% level.

2. SNF, solid-no-fat.

3. TS, total solid.

All the data show in mean ± SE.

### (1) 體細胞與乳脂之關係

本次試驗中平均乳脂率為  $4.06 \pm 0.11\%$ ，其中易感性群組之乳脂率為  $3.72 \pm 0.20\%$ ，與一般性群組 ( $4.20 \pm 0.12\%$ ) 以及抗乳房炎群組 ( $4.15 \pm 0.22\%$ ) 皆無顯著差異 ( $P > 0.05$ ) (表 4)。乳脂率與體細胞數呈低度負相關，相關係數為  $-0.18$  (圖 7 A)，顯示乳脂率雖隨著體細胞數之增加而些微下降，但亦無顯著差異。表 6 亦指出未發炎期間之生乳有較高之乳脂率，發炎與未發炎時之乳脂率平均分別為  $3.83 \pm 0.10\%$  ( $P < 0.05$ ) 以及  $4.19 \pm 0.11\%$  ( $P < 0.05$ )。根據本試驗之資料，發炎時期較未發炎時期之乳脂率減少 8.6%。

### (2) 體細胞與乳蛋白之關係

本試驗之平均乳蛋白為  $3.22 \pm 0.08\%$ ，其中易感性群組之乳蛋白率為  $3.37 \pm 0.20\%$ ，與一般群組 ( $3.23 \pm 0.12\%$ ) 以及抗乳房炎群組 ( $3.10 \pm 0.13\%$ ) 無顯著差異 ( $P > 0.05$ )。發炎與未發炎時之乳脂率平均分別為  $3.25 \pm 0.06\%$  ( $P > 0.05$ ) 以及  $3.19 \pm 0.05\%$  ( $P > 0.05$ )，亦無顯著差異存在。圖 7 B 為體細胞數與乳蛋白率之散佈圖，兩者間之相關係數為  $0.11$ ，呈現低度正相關，顯示總蛋白質僅略有增減，故無論是組間比較抑或期間比較均無顯著差異存在。一般而言，乳中的鈣有助於酪蛋白之生成，然而患有乳房炎之牛隻則會因酪蛋白合成破裂而導致鈣含量降低，使生乳之 pH 值從正常值之 6.6 上升至 6.9 以上，同時造成乳中酪蛋白含量降低 (莊，2005)。

### (3) 體細胞數與乳糖之關係

本試驗之平均乳糖率為  $4.69 \pm 0.05\%$ ，其中抗乳房炎群組之乳糖率為  $4.97 \pm 0.04\%$ ，顯著高於一般性群組 ( $4.63 \pm 0.07\%$ ) 與易敏感性群組 ( $4.44 \pm 0.10\%$ ) ( $P < 0.01$ )，但一般性群組與易敏感性群組間在顯著水準  $\alpha = 0.05$  時並無顯著差異 ( $P = 0.10$ )，如表 4 所述。圖 7C 顯示體細胞與乳糖率呈現高度之負相關，相關係數為  $-0.75$ ，表示體細胞數的增加將造成乳糖率顯著下降。在發炎與未發炎期間之分析上，未發炎期間之乳糖率為  $4.88 \pm 0.03\%$ ，顯著高於發炎期間之  $4.50 \pm 0.05\%$  ( $P < 0.01$ )；此乃因體細胞數上升時會造成乳中 N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase 上升，而該酵素活性升高會導致乳糖合成速率降低 (Berning and Shook, 1992)。易敏感性群組之乳糖率較一般與抗乳房炎群組減少 7.1%。

### (4) 體細胞與無脂固形物及總固形物之關係

本試驗之無脂固形物與總固形物之平均分別為  $8.62 \pm 0.09\%$  ( $P > 0.05$ ) 以及  $12.63 \pm 0.18\%$  ( $P > 0.05$ ) (表 4)，三個群組間之無脂固形物與總固形物皆無顯著差異 ( $P > 0.05$ )。發炎期間之無脂固形物與總固形物分別為  $8.45 \pm 0.08\%$  與  $12.24 \pm 0.14\%$ ，皆顯著低於未發炎期間之  $8.77 \pm 0.05\%$  ( $P = 0.01$ ) 以及  $12.93 \pm 0.12\%$  ( $P < 0.001$ )。圖 7D 與 E 分別顯示體細胞與無脂固形物及總固形物之散佈圖，兩者皆與體細胞數呈現低度之負相關，相關係數均為  $-0.30$ 。



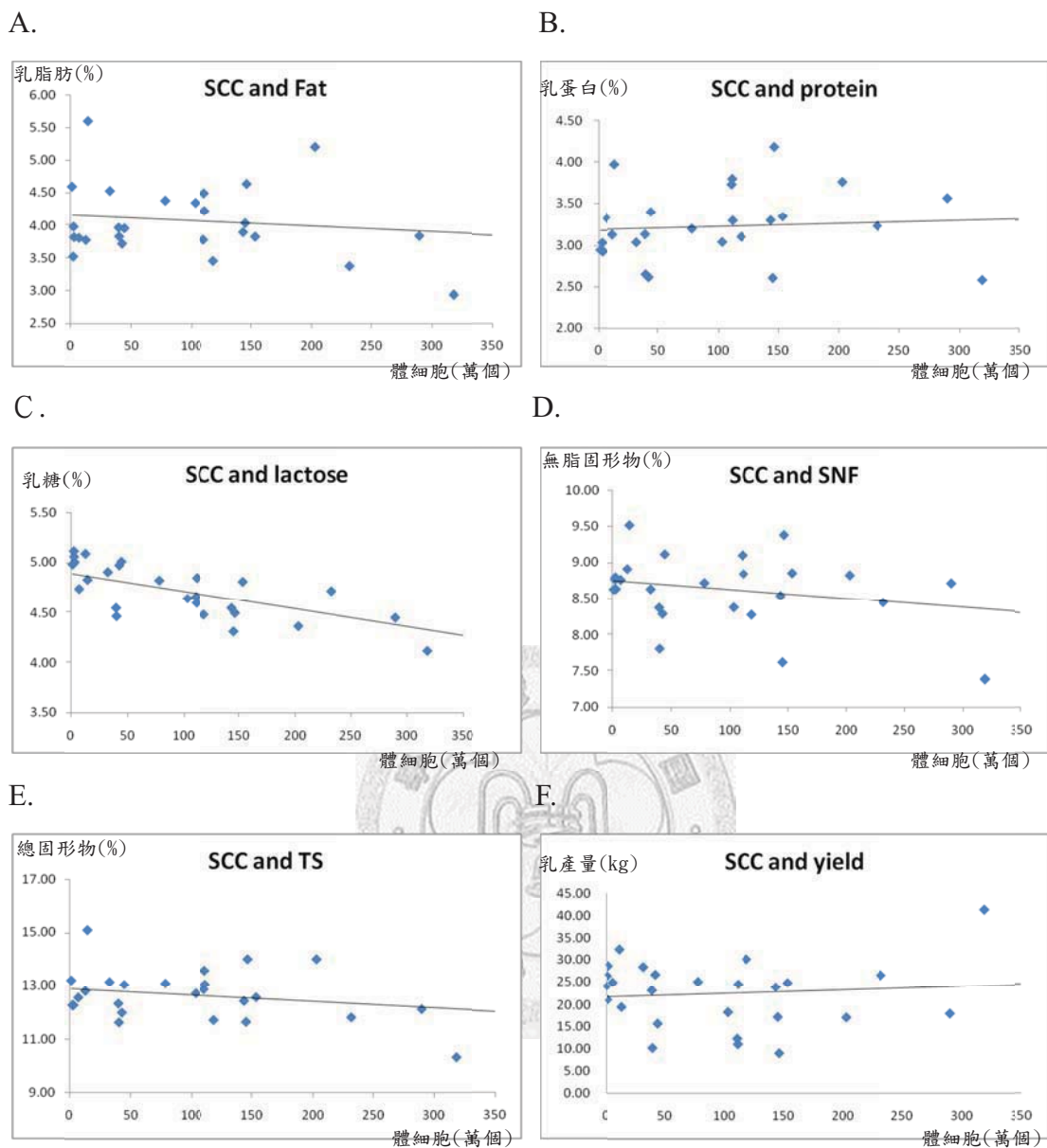


圖 7 體細胞數 (SCC) 與乳組成分之關係。A. 乳脂；B. 乳蛋白；C. 乳糖；  
D. 無脂固形物；E. 總固形物；F. 乳量。

**Figure 7** Relationships between somatic cell counts (SCC) and milk components.

A. fat; B. protein; C. lactose; D. solid-no-fat (SNF); E. total solid (TS); F. Milk yield.

### 3、不同群組於乳量之差異

試驗顯示抗乳房炎群組之平均乳產量  $25.87 \pm 1.35$  kg 顯著高於一般群組  $19.16 \pm 1.68$  kg ( $P < 0.01$ )，但與易感性群組  $23.54 \pm 4.28$  kg 於乳產量上並無顯著差異 ( $P = 0.62$ )；一般群組與易感性群組之間亦無顯著差異存在 ( $P = 0.37$ )，如表 4。根據美國國家乳房炎委員會(National Mastitis Committee, NMC)估計美國每年因乳房炎所造成之直接乳量損失超過 10 億美元，而 Arita(1991)統計日本每年因乳房炎所造成之損失亦高達 69 億日圓，兩者皆證實乳房炎確實直接造成乳量之損失。本試驗中抗乳房炎群組之乳量與易感性群組間無顯著差異存在，發炎期間之平均乳產量為  $22.74 \pm 1.39$ kg，與未發炎期間之平均乳產量 ( $22.74 \pm 0.94$ kg) 亦無顯著差異存在 ( $P = 0.99$ )。推論其可能原因有二：

- (1) 泌乳牛於現場操作時若正接受乳房炎之灌藥治療，該乳分房之生乳將不會透過機器進行搾取，導致機器所測得之乳量已低於該牛之實際泌乳量。
- (2) 感染乳房炎之牛隻其乳產量原應高於實驗觀測量，惟已因感染乳房炎而蒙受乳量損失。由於試驗農場之泌乳牛隻其感染乳房炎之病史並無任何庫存記錄，因此無法確認究竟為何項原因造成觀測值之不顯著性，僅能根據乳組成分之因子對乳量進行分析。為了進一步獲得乳量之估計資訊，將透過各乳組成分建立一可參考之模型如後所述。

表 7 為乳組成分與乳量之相關矩陣。乳中總固形物係由乳脂、乳蛋白質、乳糖與其他無機物所構成，但於相關係數中可發現僅有乳脂與蛋白質和總固形物呈現高度之正相關，其相關係數分別為 0.898 ( $P < 0.001$ ) 與 0.769 ( $P < 0.001$ )，乳糖與總固形物則僅為中度正相關。乳脂與乳蛋白呈現中度正相關，相關係數為 0.574 ( $P = 0.002$ )；反之，乳量與乳脂及乳蛋白皆呈現中度之負相關，其相關係數為 -0.477 ( $P = 0.01$ ) 與 -0.529 ( $P = 0.005$ )。此結果顯示若以總固形物為生乳品質及整體改良方向，選拔高乳脂之牛隻可同時提高其乳蛋白之表現；但若以總產量之提升做為場內之育種目標，因現今生乳之主要計價標準項目為生菌數、體細胞數、乳脂等項目，如何兼顧乳組成分即為一重要之課題。

表 8A. 利用迴歸分析法建立乳量與乳組成之初步分析模型，但因其 R 值 = 0.7，表示該模型僅能解釋乳量變化之 70%，且變方分析結果之 P 值為 0.08，在顯著水準定為  $\alpha = 0.1$  時此模型方能顯著解釋乳量變化。乳脂肪、乳蛋白、乳糖和乳量之變化呈現負相關，但其 P 值為 0.35、0.37，以及 0.60，皆未達顯著水準；故由乳糖與乳蛋白所組成之無脂固形物，以及加入乳脂之總固形物與乳量亦僅呈現不顯著之負相關。在模型解釋力偏低之情況下，決定改以反向逐步迴歸分析法 (backward stepwise regression analysis) 剔除較無解釋力之變數。由於無脂固形物於模型中之 t 值最小，且可由其餘乳組成分所取代分析之，故將之從模型中剔除，並針對 R 值進行調整以避免高估模型解釋力，修正後之模型如表 8B. 所示。剔除無脂固形物後，此修正模型之變方分析結果 F 值在顯著水準  $\alpha = 0.05$  時即具有顯著性 ( $P = 0.04$ )，此時整個迴歸模型已具有足夠之信心水準以解釋乳量之變化。最後因各乳組成分之單位不同，便將各乳組成分之係數予以標準化，以進行不同尺度衡量之綜合評估。根據表 8 之結果，可得乳量之預測模型為：乳量 = 40.014 - 0.834 乳脂率 - 0.737 乳蛋白率 - 0.149 乳糖率 + 0.881 總固形率。

表 7 乳量與乳組成分之 Pearson 相關矩陣

Table 7 Pearson correlation matrix of milk yield and milk components

Correlations							
		Fat	TS	Yield	Protein	Lactose	SNF
Fat	Corr.						
	Sig.						
TS	Corr.	0.898**					
	Sig.	0.000					
Yield	Corr.	-0.477*	-0.480*				
	Sig.	0.012	0.011				
Protein	Corr.	0.574**	0.769**	-0.529**			
	Sig.	0.002	0.000	0.005			
Lactose	Corr.	0.072	0.305	0.105	-0.062		
	Sig.	0.723	0.122	0.602	0.760		
SNF	Corr.	0.557**	0.847**	-0.393*	0.825**	0.500**	
	Sig.	0.003	0.000	0.042	0.000	0.008	

TS, total solid; SNF, solid-no-fat; Corr., Pearson correlation; sig.: asterisk value of Pearson correlation is significantly better at the 95% confidence level than be expected from a random distribution. Double stars indicate significance at the 99% level.

表 8 A.乳量迴歸模型；B. 以反向逐步迴歸法修正後之乳量迴歸模型

Table 8 A. Model of milk yields by regression analysis; B. Modified model of milk yields by backward stepwise regression analysis

A.

**Coefficients<sup>a</sup>**

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	31.586	33.367		.947	.355
	fat	-10.823	11.387	-.808	-.950	.353
	protein	-22.006	24.285	-1.233	-.906	.375
	lactose	-12.503	23.771	-.474	-.526	.604
	SNF	9.691	23.977	.631	.404	.690
	TS	6.413	10.395	.804	.617	.544

a. Dependent Variable: milk yields.



B.

**Coefficients<sup>a</sup>**

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	40.014	25.550		1.566	.132
	fat	-11.172	11.136	-.834	-1.003	.327
	protein	-13.143	10.236	-.737	-1.284	.213
	lactose	-3.939	10.569	-.149	-.373	.713
	TS	7.025	10.087	.881	.696	.493

a. Dependent Variable: milk yields.



## 二、商用套組適用性評估

本試驗共採用 Nucleospin® Blood (MN, Germany)與 MasterPure™ DNA Purification Kit for Blood Version II (Epicentre®, Wisconsin, USA) 兩種不同商用套組進行生乳 DNA 抽取之試驗比較，其結果如表 9。根據 260/280 與 260/230 比值可知，MasterPure™較 Nucleospin®含有較高之蛋白質殘留，且其鹽類殘留濃度亦較高，可能會影響後續 PCR 之結果。圖 8 為 Nucleospin® Blood Kit 與 MasterPure™ DNA Purification Kit 之 PCR 產物電泳圖，顯示出 Nucleospin® Blood Kit 確實有較佳之 PCR 結果，推測其原因有二：

- 1、Nucleospin® Blood Kit 中使用 column 於離心時進行過濾，可得到較佳之 DNA 萃取產物。
- 2、Nucleospin® Blood Kit 於處理過程中加入 protease K，可減少生乳中高蛋白質含量之影響。

然而若將成本列入考量，MasterPure™ DNA Purification Kit 所需費用不高，約為一般商用套組費用 1/3；且其可依樣本容量進行使用量之調整，操作上較具彈性。惟是否可於標準操作流程中額外加入 protease K 處理，以提高其 DNA 萃取之效率，仍待後續試驗進行探討。

表 9 兩種不同商用套組抽取 DNA 之比較

Table 9 Comparison of two different commercial kits in DNA extraction methods

Extraction method	260/280 nm <sup>a</sup>	260/230 nm <sup>b</sup>	Process duration	Cost per sample <sup>c</sup>
Nucleospin <sup>®</sup>	1.72± 0.05	1.71± 0.04	1.5 hours	96
MasterPure <sup>™</sup>	1.43± 0.08	1.39± 0.09	1.5 hours	35

a: Ratio from absorbance at 260 and 280 nm to evaluate proteins contents.

b: Ratio from absorbance at 260 and 230 nm to evaluate salts contents.

c: NT dollars.

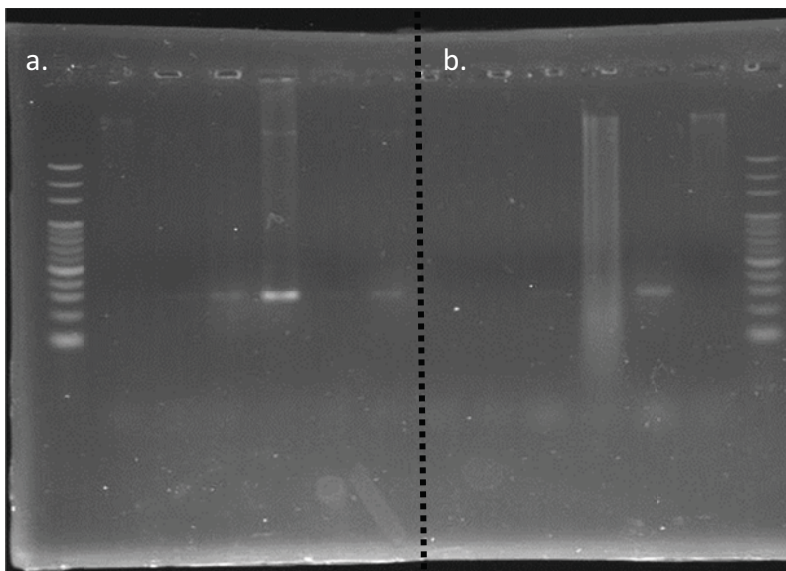


圖 8 兩種不同商用套組 DNA 之電泳結果比較。a. Nucleospin<sup>®</sup>；b. MasterPure<sup>™</sup>

Figure 8 Comparison of two different commercial kits in DNA electrophoresis

results. a. Nucleospin<sup>®</sup>；b. MasterPure<sup>™</sup>

### 三、DRB3.2 基因定序結果

#### 1、DRB3.2 基因之 PCR 產物膠體電泳片段

使用 DRB3FWD 與 DRB3REV 引子進行 PCR 後，於 1% 洋菜膠體進行電泳以初步估計其產物之片段大小，產物片段約為 295 bp。根據 Ledwidge 等人 (2001) 針對 70 頭加拿大荷蘭牛進行多重 PCR 設計所得之結果顯示，DRB3.2 基因之 PCR 片段大小約落在 151 至 395 bp 之間，而 Miltiadou 等人 (2003) 於日本針對 126 頭荷蘭牛與夏洛萊 (Charolais) 雜交後代，以及 17 頭荷蘭牛所做之試驗中得到之 PCR 片段大小則約為 319 bp。雖部分文獻尚針對 PCR 產物進行 RFLP 之分型並加以討論 (Da Mota *et al.*, 2004; Gilliespie *et al.*, 1999; Giovambattista *et al.*, 2001; Pashmi *et al.*, 2009; Razafindraibe *et al.*, 2006; Ripoli *et al.*, 2003)，然而其 DNA 來源皆為血液樣本，所能抽取之 DNA 濃度較高，故膠體上之片段於觀察時亦較為理想。本次試驗考量生乳中所抽取之 DNA 品質與濃度均不及自血液或組織中所取得之 DNA，且電泳片段染色後亮度之一致性較不理想，故不進行 PCR-RFLP 之分型分析，選擇參考近年來常使用之 PCR-SBT 方式進行分析。再者，透過 PCR-RFLP 所分析之片段與使用 PCR-SBT 分析之片段多為重覆命名之序列，因此兩者擇一即可。Ledwidge 等人 (2001) 亦曾提出相似之見解，該團隊建議若 DNA 濃度不足 50ng/μL 時，不適合進行 Multi-primer PCR 與 PCR-RFLP 分析。

#### 2、DRB3.2 基因定序成功率與一致性分析

根據 23 頭試驗牛之 PCR 產物皆定序兩次，於 46 個定序樣本之序列中，共有 32 條序列定序成功，14 條序列定序失敗，定序成功率為 69.6%。易感性群組中 5 頭試驗牛有 4 隻個體定序成功，一般群組 10 頭中有 7 隻個體定序成功，而抗乳房炎群組 8 頭中有 6 隻個體定序成功。各群組之定序成功率無顯著差異 (P

>0.05)，顯示生乳中體細胞數已足以提供定序所需之最低濃度 DNA 之抽取，而不受其含量多寡之影響。但由於成功率仍然不高，故於未來之試驗或可考慮提高生乳樣本之體積，亦或改良抽 DNA 抽取之流程等，以期提高成功率。

定序成功之序列皆與 NCBI 之 GeneBank 資料庫中牛隻 23 號染色體序列比對。試驗牛隻基因序列之平均一致性 (similarity) 為 91.9%，最低之一致性為 88%，最高為 96%。以下討論僅就定序成功之 17 頭個體進行分析。

#### 四、DRB3.2 基因之 PCR-SBT 多態性分析

##### 1、DRB3.2 基因型多態性

17 頭試驗牛隻共發現 11 種不同之交替基因型，如表 10 所示。其中最常見之交替基因型與交替基因型頻率依序為\*0101(31.25%)、\*1401(15.63%)、\*1501(15.63%)，以及\*1101(9.37%)。根據 Schwab 等人(2009)針對加拿大魁北克省之 56 頭荷蘭牛進行之試驗，其基因型頻率最高依序為\*0101(25%)、\*1101(13%)、\*1201(13%)，以及\*1501(11%)；安大略省之荷蘭牛研究除上述四個基因型外，尚有 5 至 10% 之\*1001，\*2703，以及\*0902 交替基因型 (Rupp *et al.*, 2007; Sharif *et al.*, 1999)，這些實驗顯示加拿大東部之荷蘭牛族群之基因結構相當類似。此外，根據 Miyasaka 等人(2011)針對 507 頭日本黑牛與 143 頭日本荷蘭牛之 DRB3.2 基因型進行之研究顯示，日本荷蘭牛 DRB3.2 交替基因型頻率最常見者由高至低分別為\*1501(25.9%)、\*0101(21.3%)、\*1101(11.5%)、\*1001(9.1%)、\*1201(7.0%)，以及 \*2703(6.3%) 等。\*0101 交替基因型於加拿大與日本皆為相當常見之基因型，且被認定為荷蘭牛品種最常見之基因型；本次試驗之交替基因型結構亦相似於前述之結果，\*0101 交替基因型頻率亦為試驗荷蘭牛之最高者，茲比較於表 11。

表 10 台大農場泌乳牛之 DRB3.2 交替基因型頻率

Table 10 The allele frequencies of DRB3.2 gene in NTU Experimental Farm

Allele	n <sup>a</sup>	Allele frequency
*0101	10	<b>0.3125<sup>b</sup></b>
*0201	1	0.0312
*0601	2	0.0625
*1001	2	0.0625
*1101	3	<b>0.0937</b>
*1201	2	0.0625
*1401	5	<b>0.1563</b>
*1501	5	<b>0.1563</b>
*2703	1	0.0312
*3101	2	0.0625
*7301	1	0.0312

a: n = number of alleles.

b: The most frequent alleles are given in bold



表 11 台大農場之荷蘭牛 DRB3.2 基因型頻率與日本及加拿大之比較  
**Table 11** Comparison of DRB3.2 gene allele frequencies in NTU, Japan, and Canada

	Eastern Canada <sup>a</sup> (N= 56)	Japan <sup>b</sup> (N= 143)	NTU (N = 17)
Most frequent alleles	*0101 (25%)	*1501 (25.9%)	*0101 (31.25%)
	*1101 (13%)	*0101 (21.3%)	*1401 (15.63%)
	*1201 (13%)	*1101 (11.5%)	*1501 (15.63%)
	*1501 (11%)	*1001 (9.1%)	*1101 (9.37%)

**a** Rupp *et al.*, 2007; Schwab *et al.*, 2009; Sharif *et al.*, 1999.

**b** Miyasaka *et al.*, 2011.

## 2、抗乳房炎群組之 DRB3.2 基因型分析

於抗乳房炎群組中共發現 8 個交替基因型，分別為\*0101、\*1001、\*1101、\*1201、\*1401、\*1501、\*3101，以及\*7301，為三個群組中多態性最高者，如表 12 所示。\*0101 交替基因型為群組內交替基因型頻率最高者，但因該交替基因型為族群中最常見，亦為荷蘭牛中最常見之交替基因型之一，故無法論定其是否與乳房炎之抗性相關。Pashmi 等人 (2009) 於長期觀測伊朗地區之 262 頭荷蘭牛表現與分析其基因型後發現，\*0101 交替基因型與乳蛋白率之提升有關，\*1101 則與乳脂率之提升有關，而乳脂率與乳蛋白率皆為總固形物之重要指標，應為選拔其餘泌乳交替基因型與性狀時同時被選留之交替基因型。\*1001、\*1101、\*3101 以及\*7301 為抗乳房炎群組中之特有交替基因型，其基因型頻率為 5.9、8.8、5.9 以及 2.9%。

## 3、一般性群組之 DRB3.2 基因型分析

一般性群組中共發現五個交替基因型，分別為\*0101、\*1101、\*1201、\*1401，以及\*2703，如表 13 所示。\*0101 亦為群組中最高者，其交替基因型頻率為 17.6%；其中\*1201 與\*2703 交替基因型於本次試驗中僅出現於抗乳房炎群組與一般群組，而不見於易感性群組。根據本試驗與加拿大東部之荷蘭牛研究顯示，\*1201 與\*2703 或可做為抗乳房炎交替基因型之參考。Schwab 等人 (2009) 於加拿大之研究本欲荷蘭牛之 DRB3.2 基因型於不同程度之新包蟲症 (*Neospora caninum*) 感染情況之影響，雖於該症狀並無顯著差異 ( $P = 0.09$ )，但卻發現\*2703 交替基因型與感染時之症狀減輕及繁殖性能上之預防流產有關；此外，在英國針對 201 頭肉用博蘭牛 (Boran) 牛隻進行泰勒原蟲 (*Theileria parva*) 疫苗施打效用之研究亦有相似之結果，\*2703 交替基因型有顯著較高之疫苗有效性 ( $P = 0.02$ )，推論與其第二類 MHC 對特定  $CD4^+$ T 細胞之抗原呈獻能力有關 (Ballingall *et al.*, 2004)。

表 12 抗乳房炎群組之交替基因型頻率

Table 12 Allele frequencies of resistant group

Allele	n <sup>a</sup>	Frequency (%)
*0101	3	8.8
*1001	2	5.9
*1101	1	2.9
*1201	1	2.9
*1401	1	2.9
*1501	1	2.9
*3101	2	5.9
*7301	1	2.9

a: n = number of alleles.

表 13 一般性群組之交替基因型頻率

Table 13 Allele frequencies of normal group.

Allele	n <sup>a</sup>	Frequency (%)
*0101	6	17.6
*1101	2	5.9
*1201	1	2.9
*1401	4	11.8
*2703	1	2.9

a: n = number of alleles

表 14 易感性群組之交替基因型頻率

Table 14 Allele frequencies of sensitive group.

Allele	n <sup>a</sup>	Frequency (%)
*0101	1	2.9
*0201	1	2.9
*0601	2	5.9
*1501	4	11.8

a: n = number of alleles

#### 4、易敏感性群組之 DRB3.2 基因型分析

易敏感性群組共有四個交替基因型，分別為\*0101、\*0201、\*0601，以及\*1501，如表 14。本群組之交替基因型多態性為三個群組中最低者，其中\*0201與\*0601 交替基因型並未於其他群組中被發現；\*0101 則廣泛存在三個群組之中，唯其交替基因型頻率於各組並不相等。\*1501 為群組內頻率最高之交替基因型（15.8%），根據 Nassiry 等人（2005）於伊朗之 250 頭荷蘭牛進行之調查顯示，其最常見之四個交替基因型分別為\*1202、\*0101、\*0901，以及\*1501。\*0901 於本試驗及加拿大、日本之調查中皆非主要之交替基因型，但\*1501 則常見於荷蘭牛中，尤以日本之 25.9%為最高；因此，\*1501 或可能為荷蘭牛另一廣泛存在之交替基因型。

本試驗發現\*1501 之純合子個體（N = 2）於發炎時有顯著較高之體細胞數（ $P < 0.05$ ）與較嚴重之臨床症狀，平均體細胞皆為每毫升含量 200 萬個以上，且乳汁中有凝塊出現；\*1501 純合子個體亦未於其餘群組中所發現，推測\*1501 亦可能為乳房炎易感性之交替基因型，但僅有純合子會表現出較嚴重之炎性反應。Ballingall 等人（2004）於英國博蘭牛之泰勒原蟲感染試驗中發現，除\*2703 交替基因型具有顯著之疫苗成功率外，\*1501 純合子個體亦有相當顯著之疫苗失敗率（ $P = 0.013$ ），認為\*1503 之純合子基因型可能會降低疾病之抗性。Juliarena 等人（2008）則提出\*2703 可增加對牛白血病病毒（bovine leukemia virus, BLV）之抗性，但\*1501 將增加感染 BLV 之風險。然而 Sharif 等人（1998）於加拿大之荷蘭牛進行乳房炎之相關研究時卻提出相反之看法，認為\*1501 可顯著降低荷蘭牛罹患乳房炎與卵巢囊腫（cystic ovarian）之風險（ $P < 0.05$ ）；另一方面 Martinez 等人（2006）針對 231 頭巴西地區荷蘭牛之研究亦提出，\*1501 於顯著水準  $\alpha = 0.1$  時可有效降低牛壁蝨（*Boophilus microplus*）之感染數量。由於目前 DRB3.2 之多態性已被廣泛研究，但僅有少數文獻針對特定基因型之 CD4<sup>+</sup>T 淋巴球表現進行研究，或僅針對特定之常見交替基因型如\*1101 與\*1201



進行研究 (Norimine *et al.*, 2006)；是否\*1501 之純合子基因型因 CD4<sup>+</sup>T 淋巴球表現不同而造成其對於不同之疾病抗性產生差異，仍需後續進一步研究。因 DRB3.2 基因之功能為調控抗原呈獻之相關路徑，且 CD4<sup>+</sup>T 淋巴球為該路徑之下游，會進一步調控炎性反應之程度；未來如能了解\*1501 對下游 CD4<sup>+</sup>T 淋巴球之影響，或可針對乳房炎之臨床反應有更進一步之研究。

## 五、DRB3.2 基因與乳量及乳組成分之關係

不同 DRB3.2 交替基因型於乳量表現並無顯著差異 ( $P > 0.05$ )，與伊朗地區之荷蘭牛研究有相似之結果 (Pashmi *et al.*, 2009)，故乳量不列入下列討論範圍；其餘之乳組成分與各基因型之關係列於表 15，其中僅討論交替基因型頻率大於 5% 者。

### 1、乳脂率與 DRB3.2 基因型之關係

由表 15 可知，乳脂率表現最高者為\*1401 交替基因型之 4.68%，顯著高於平均乳脂率 ( $P = 0.02$ )；最低者為\*1501 交替基因型之 3.41%，顯著低於平均乳脂率 ( $P = 0.01$ )。由於發炎時之乳脂率會低於未發炎之表現，且\*1501 純合子皆為乳房炎臨床症狀較為嚴重之個體，故有較低之乳脂率表現。過去之部分研究顯示\*1101 交替基因型於泌乳表現上有較高之乳脂率及乳產量 (Dietz *et al.*, 1997; Kulberg *et al.*, 2007; Pashmi *et al.*, 2009; Rupp *et al.*, 2007)，但於本次試驗中並無觀察到\*1101 有較高之乳脂率 ( $P = 0.86$ )，反而以\*1401 有較佳之表現。推測其原因為荷蘭牛之平均乳脂率約為 3.5%，若以此平均而言\*1101 確實有較高之乳脂率表現；但因台大農場之平均乳脂率為 3.91%，高於一般平均乳脂率，故於統計上無顯著差異存在。此外，\*1401 於其他研究中非主要探討之基因型，加上交替基因型頻率較低 ( $< 2\%$ )，故往往僅就頻率較高之交替基因型討論之。

## 2、乳蛋白率與 DRB3.2 基因型之關係

交替基因型\*1401 為乳蛋白率表現最高者，且顯著高於平均乳蛋白率 ( $P = 0.02$ )；\*1001 交替基因型則有顯著較低之乳蛋白率表現 ( $P < 0.01$ )。\*1001 交替基因型對於乳組成分之影響並無於其他文獻討論，且於本試驗中之交替基因型頻率偏低，可能造成較大之誤差。由於乳蛋白率與乳脂率為高度正相關，因此\*1401 交替基因型亦同時表現出高乳脂率與高乳蛋白率。

## 3、乳糖率與 DRB3.2 基因型之關係

交替基因型\*1201 為乳糖率表現最高者，且顯著高於平均乳糖率 ( $P < 0.01$ )。Starkenbug 等人 (1997) 認為\*1201 交替基因型會降低泌乳量，但因泌乳量與乳糖率並無明顯之相關 ( $P = 0.6$ )，因此不影響乳糖之正常表現。除\*1201 交替基因型外，其餘各交替基因型並無顯著差異。

## 4、無脂固形物與總固形物與 DRB3.2 基因型之關係

交替基因型\*0601、\*1001，以及\*1501 牛隻有顯著較低之無脂固形率 ( $P < 0.05$ )，而\*0601 與\*1501 交替基因型因同時受到低乳脂率及低無脂固形率之影響，使其總固形率亦顯著較平均為低 ( $P < 0.05$ )。\*1401 交替基因型之總固形率為最高者，且顯著高於平均總固形率 ( $P = 0.02$ )。由於\*1401 交替基因型於台大試驗農場有相當之交替基因型頻率，且\*0101 交替基因型又為場內交替基因型頻率最高者，此或可解釋台大鮮乳為何有較高之乳脂率與總固形率。然而因\*0101 與\*1401 交替基因型皆與抗乳房炎之性狀無關，且未有顯著較高之乳產量，於育種策略上之考量將為另一課題。再者，由於泌乳量與乳組成分呈現一定程度之負相關，在追求乳品質之同時勢必造成泌乳量之無形損失，抑或提升產量之同時造成乳品質之下降。各場或可視其需求選擇不同之交替基因型以改進場內之性能表現。

表 15 不同交替基因型與乳組成分之關係

**Table 15** Relationships between alleles and milk components

Allele	Fat (%)	Protein (%)	Lactose (%)	SNF (%)	TS (%)
*0101	4.13	3.11	4.79	8.60	12.67
*0601	3.45*	3.10	4.47	8.27**	11.71*
*1001	3.71	2.60**	4.98	8.28**	12.00
*1101	4.04	3.24	4.97	8.91	13.00
*1201	3.73	3.17	5.06**	8.94	12.67
*1401	4.68*	3.64*	4.59	8.93	13.51*
*1501	3.41**	3.04	4.44	8.19**	11.43*
*3101	4.54*	3.03	4.91	8.63	13.17

SNF, solid-no-fat; TS, total solid. Only allele frequencies over 5% are listed. Asterisked value is significantly different at the 95% confidence level than be expected from a random distribution. Double stars indicate significance at the 99% level.

## 伍、結論

以生乳做為非侵入式樣本替代其他 DNA 來源，針對乳量、乳組成分以及基因結構進行探討，雖因牛乳中體細胞數較血液樣本之細胞數低，使其於泌乳牛隻之應用上仍未臻完美，但其便利性與大規模試驗之可行性確有其發展之潛力。

台灣大學試驗農場所飼養之荷蘭牛基因結構與各國之荷蘭牛研究有相似之結果，依其發炎頻率分成易感性群組、一般性群組，以及抗乳房炎群組等三群，在與乳房炎關係之研究中可歸納出下列幾點：

- (1) 不同群組之間之乳量以一般性群組顯著低於易感性群組與抗乳房炎群組，乳糖率則以抗乳房炎群組較高，乳脂率、乳蛋白率等三組之間並無顯著差異。此結果顯示健康之牛隻的確有較良好之乳量與乳組成分之表現，而高產泌乳牛則有較高之風險感乳房炎。
- (2) 不同 DRB3.2 交替基因型對於乳量表現無顯著影響，在乳脂及總固形物則有顯著差異。\*1501 純合子個體與乳房炎之易感性有密切之關係，此交替基因可成為評估荷蘭牛與疾病相關之遺傳標誌，但是否足以評估乳量與乳組成分仍需進一步之探討。
- (3) 以生乳做為侵入式樣本如血液與肌肉組織等之替代來源，於 DNA 品質上仍略嫌不足，於實際應用上尚需加以調整；但因乳樣收集較血液與組織容易，值得未來更進一步之開發。

綜上所述，為建立大規模之泌乳牛研究，必須先開發便利且友善之採樣方式，並建立乳量與乳組成分和體細胞數之關係；故本研究蒐集生乳樣本並進一步拓展其可利用性，除分析乳量及生乳組成分外，尚做為後續研究之 DNA 來源，期提供未來更進一步評估民間泌乳場乳房炎與育種策略之參考。

## 陸、參考文獻

- 宋永義。2006。新編乳牛學。國立編譯館。台北市。
- 李素珍。2003。牛乳尿素氮之應用。酪農天地 54: 49-55。
- 邱朝齊、林光榮、黎南榮、黃士則。1972。台灣省乳牛乳房炎主要病原菌之頻度分佈研究。台灣省畜衛試研報 9: 73-78。
- 莊士德。2005。乳牛乳房炎的防治。酪協 93: 3。
- 莊士德。2011。以大腸桿菌攻毒而罹患乳房炎的牛隻，蛋胺酸-鋅對於其乳管內角質素形成之效果。酪協 143: 43- 48。
- 陳書凱，陳鵬文，莊士德。2008。臺灣乳牛分娩後疾病之調查。台灣獸醫誌 34: 41-48。
- 陳煥南。1998。機械擠乳與乳房炎防治目錄。畜產種原資訊網。新竹。
- 陳榮泰。2005。台灣乳業現況。乳牛品種利用與規劃研討會論文集 5-13。
- 陳鵬文。2002。乳牛的蹄病。酪農天地雜誌 47: 33-37。
- 張秀鑾、黃鈺嘉。2005。乳量乳質優勢乳牛品種簡介。乳牛品種利用及規劃研討會論文集。
- Arita, T. 1991. Mastitis in Cattle. Clinical Diagnosis and Treatment. Tikusan. p1-26. Tokyo.
- Ballingall, K. T., A. Luyai, G. J. Rowlands, J. Sales, A. J. Musoke, S. P. Morzaria, and D. J. McKeever. 2004. Bovine leukocyte antigen major histocompatibility complex class II DRB3\*2703 and DRB3\*1501 alleles are associated with variation in levels of protection against theileria parva challenge following immunization with the sporozoite p67 antigen. Infect. Immun. 72: 2738-2741.
- Baxter, R., N. Hastings, A. Law, and E. J. Glass. 2008. A rapid and robust sequence-based genotyping method for BoLA-DRB3 alleles in large numbers of



- heterozygous cattle. *Anim. Genet.* 39: 561-563.
- Behl, J. D., N. K. Verma, R. Behl, M. Mukesh, and S. P. S. Ahlawat. 2007. Characterization of genetic polymorphism of the bovine lymphocyte antigen DRB3.2 locus in Kankrej cattle (*Bos indicus*). *J. Dairy Sci.* 90: 2997-3001.
- Benjamini, E., R. Coico, and G. Sunshine. 2003. *Immunology: A short course*. 4<sup>th</sup> ed. John Wiley & Sons. Chapter 8: p161-182. USA.
- Berning, L. M., and G. E. Shook. 1992. Prediction of mastitis using milk somatic cell count N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase, and lactose. *J. Dairy Sci.* 75:1840-1848.
- Briggs, H. M., and D. M. Briggs. 1980. *Modern Breeds of Livestock*. 4<sup>th</sup> ed. Macmillan Publishing Co. USA.
- Chu, J. H., Y. S. Lin, and H. Y. Wu. 2006. Applicability of non-invasive sampling in population genetic study of Taiwanese Macaques (*Macaca cyclopis*). *Taiwania* 51: 258-265.
- Da Mota, A. F., M. L. Martinez, and L. L. Coutinho. 2004. Genotyping BoLA-DRB3 alleles in Brazilian Dairy Gir cattle (*Bos indicus*) by temperature-gradient gel electrophoresis (TGGE) and direct sequencing. *Eur. J. Immunogenet.* 31: 31-35.
- Dietz, A. B., J. C. Detilleux, A. E. Freeman, D. H. Kelly, J. R. Stabel, and M. E. Kehrli Jr. 1997a. Genetic association of bovine lymphocyte antigen DRB3 alleles with immunological traits of Holstein cattle. *J. Dairy Sci.* 80: 400-405.
- Dietz, A. B., N. D. Cohen, L. Timms, and M. E. Kehrli Jr. 1997b. Bovine lymphocyte antigen class II alleles as risk factors for high somatic cell counts in milk of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 80: 406-412.
- Gilliespie, B. E., B. M. Jayarao, H. H. Dowlen, and S. P. Oliver. 1999. Analysis and frequency of bovine lymphocyte antigen DRB3.2 alleles in Jersey cows. *J. Dairy Sci.* 82: 2049-2053.

- Giovambattista, G., M. V. Ripoli, P. Peral-Garcia, and J. L. Bouzat. 2001. Indigenous domestic breeds as reservoirs of genetic diversity: the Argentinean Creole cattle. *Anim. Genet.* 32: 240-247.
- Hogan, J. S., and K. L. Smith. 2003. Environmental Streptococcal Mastitis: Facts, Fables, and Fallacies. Proceedings of the National Mastitis Council 42nd Annual Meeting 162-170. USA.
- Juliarena, M. A., M. Poli, L. Sala, C. Ceriani, S. Gutierrez, G. Dolcini, E. M. Rodriguez, B. Marino, C. Rodriguez-Dubra, and E. N. Estaben. 2008. Association of BLV infection profiles with alleles of the BoLA-DRB3.2 gene. *Anim. Genet.* 39: 432-438.
- Kulberg, S., B. Heringstad, O. A. Guttersrud, and I. Olsaker. 2007. Study on the association of BoLA-DRB3.2 alleles with clinical mastitis in Norwegian Red cows. *J. Anim. Breed Genet.* 124: 201-207.
- Ledwidge, S. A., B. A. Mallard, J. P. Gibson, G. B. Jansen, and Z. H. Jiang. 2001. Multi-primer target PCR for rapid identification of bovine *DRB3* alleles. *Anim. Genet.* 32: 219-221.
- Lipkin, E., A. Shalom, H. Khatib, M. Soller, and A. Friedmann. 1993. Milk as a source of deoxyribonucleic acid and as a substrate for the polymerase chain reaction. *J. Dairy Sci.* 76: 2025-2032.
- Maillard, J. C., D. Martinez, and A. Bensaid. 1996. An amino acid sequence coded by the exon 2 of the BoLA DRB3 gene associated with a BoLA class I specificity constitutes a likely genetic marker of resistance to dermatophilosis in Brahman zebu cattle of Martinique (FWI). *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 791:185-197.
- Matrinez, M. L., M. A. Machado, C. S. Nascimento, M. V. G. B. Silva, R. L. Teodoro, J. Furlong, M. C. A. Prata, A. L. Campos, M. F. M. Guimaraes, A. L. S. Azevedo, M.

- F. A. Pires, and R. S. Verneque. 2006. Association of BoLA-DRB3.2 alleles with tick (*Boophilus microplus*) resistance in cattle. *Genet. Mol. Res.* 5: 513-524.
- Miltiadou, D., A. S. Law, and G. C. Russell. 2003. Establishment of a sequence-based typing system for BoLA-DRB3 exon 2. *Tissue Antigens* 62: 55-65.
- Miyasaka, T., S. Takeshima, Y. Matsumoto, N. Kobayashi, T. Matsushashi, Y. Miyazaki, Y. Tanabe, K. Ishibashi, H. Sentsui, and Y. Aida. 2011. The diversity of bovine MHC class II DRB3 and DQA1 alleles in different herds of Japanese Black and Holstein cattle in Japan. *Gene* 472: 42-49.
- Nassiry, M. R., F. E. Shahroodi, J. Mossafer, A. Mohammadi, E. Manshad, S. Ghazanfari, M. R. M. Abadi, and G. E. Sulimova. 2005. Analysis and frequency of Bovine Lymphocyte Antigen (BoLA-DRB3) alleles in Iranian Holstein cattle. *Russ. J. Genet.* 41: 817-822.
- Norimine, J., S. Han, and W. C. Brown. 2006. Quantitation of *Anaplasma marginale* major surface protein (MSP) 1a and MSP2 epitope-specific CD4<sup>+</sup>T lymphocytes using bovine DRB3\*1101 and DRB3\*1201 tetramers. *Immunogenetics* 58: 726-739.
- Oklahoma State University Board of Regents. 2000. *Breeds of Livestock, Cattle Breeds.* USA.
- Pashmi, M., S. Qanbari, S. A. Ghorashi, A. R. Sharifi, and H. Simianer. 2009. Analysis of relationship between bovine lymphocyte antigen DRB3.2 alleles, somatic cell count and milk traits in Iranian Holstein population. *J. Anim. Breed. Genet.* 126: 296-303.
- Philpot, W. N., and S.C. Nickerson. 1985. Mastitis causing factors. In: *Mastitis: counter attack.* Babson Bros. Co., Naperville 1-2.
- Psifidi, A., C. I. Dovas, and G. Banos. 2010. A comparison of six methods for genomic

- DNA extraction suitable for PCR-based genotyping applications using ovine milk samples. *Mol. Cell. Probes* 24: 93-98.
- Razafindraibe, H., M. Raliniaina, J. H. Maillard, and Rakotondravao. 2006. Renitelo cattle dermatophilosis and PCR-RFLP analysis of MHC gene. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1081: 489-491.
- Ripoli, M. V., J. P. Lirón, J. C. De Luca, F. Rojas, F. N. Dulout, and G. Giovambattista. 2004. Gene Frequency Distribution of the BoLA-DRB3 Locus in Saavedreño Creole Dairy Cattle. *Biochem. Genet.* 42: 231-240.
- Robert, J. W., A. M. Powell, M. J. Paape, D. E. Kerr, D. D. Bannerman, V. G. Pursel, K. D. Wells, N. Talbot, and H. W. Hawk. 2005. Genetically enhanced cows resist intramammary *Staphylococcus aureus* infection. *Nat. Biotechnol.* 23: 445-451.
- Rupp, R., A. Hernandez, and B. A. Mallard. 2007. Association of bovine leukocyte antigen (BoLA) DRB3.2 with immune response, mastitis, and production and type traits in Canadian Holsteins. *J. Dairy Sci.* 90: 1029-1038.
- Schwab, A. E., T. G. Geary, P. Baillargeon, A. J. Schwab, and G. Fecteau. 2009. Association of BoLA DRB3 and DQA1 alleles with susceptibility to *Neospora caninum* and reproductive outcome in Quebec Holstein cattle. *Vet. Parasitol.* 165: 136-140.
- Sharif, S., B. A. Mallard, B. N. Wilkie, J. M. Sargeant, H. M. Scott, J. C. Dekkers, and K. E. Leslie. 1999. Associations of the bovine major histocompatibility complex DRB3 (BoLA-DRB3) with production traits in Canadian dairy cattle. *Anim. Genet.* 30: 157-160.
- Starkenburg, R. J., L. B. Hansen, M. E. Kehrly Jr, and H. C. Jones. 1997. Frequencies and effects of alternative DRB3.2 alleles of bovine lymphocyte antigen for Holsteins in milk selection and control lines. *J. Dairy Sci.* 80: 3411-3419.

- Takeshima, S., Y. Matsumoto, J. Chen, T. Yoshida, H. Mukoyama, and Y. Aida. 2008. Evidence for cattle major histocompatibility complex (BoLA) class II DQA1 gene heterozygote advantage against clinical mastitis caused by *Streptococci* and *Escherichia* species. *Tissue Antigens* 72: 525-531.
- Wang, K., D. Sun, and Y. Zhang. 2008. Sequencing of 15 new BoLA-DRB3 alleles. *Int. J. Immunogenet.* 35: 331-332.
- Woodruff, D. S. 1993. Noninvasive genotyping of primates. *Primates* 34: 333-346.
- Xu, A., M. J. van Eijk, C. Park, and H. A. Lewin. 1993. Polymorphism in BoLA-DRB3 exon 2 correlates with resistance to persistent lymphocytosis caused by bovine leukemia virus. *J. Immunol.* 151: 6977-6985.
- Zanotti, M., G. Poli, W. Ponti, M. Polli, M. Rocchi, E. Bolzani, M. Longeri, S. Russo, H. A. Lewin, and M. J. van Eijk. 1996. Association of BoLA class II haplotypes with subclinical progression of bovine leukemia virus infection in Holstein-Friesian cattle. *Anim. Genet.* 27: 337-341.

