

台灣乳牛淋巴球黏力缺失症 基因頻率⁽¹⁾

黃鈺嘉⁽²⁾ 張秀鑾⁽²⁾ 林德育⁽²⁾ 廖仁寶⁽²⁾
陳若菁⁽²⁾ 吳松鎮⁽³⁾ 楊德威⁽⁴⁾ 黃金山⁽⁴⁾
曾青雲⁽⁵⁾ 蕭宗法⁽⁵⁾ 劉秀洲⁽⁵⁾ 劉振發⁽⁶⁾
吳明哲⁽⁶⁾

收件日期：88 年 7 月 22 日；接受日期：88 年 9 月 30 日

摘 要

乳牛遺傳缺陷 CD-18 突變基因是引起牛淋巴球黏力缺失症 (Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency, BLAD) 的隱性基因。CD-18 突變點是第 383 個核苷酸由 A(腺嘌呤) 突變為 G(鳥糞嘌呤)，致遺傳轉譯時胺基酸由甘胺酸取代天門冬酸。台灣的生產用乳牛品種為荷蘭乳牛，自 1997 年 7 月起至 1998 年 10 月止共檢測了五個民間牧場的 1387 頭牛隻(北部兩場及南部三場)，與北部與東部地區參與 DHI 計畫各牧場的 71 頭自留小公牛。牛隻的核內 DNA 萃取自全血血樣。全部 1458 頭牛隻中共測出 98 頭 (6.7%) 雜合型 (BL) 與 1360 頭正常型牛隻 (TL)。71 頭自留小公牛中共檢測出 6 頭雜合型小公牛 (8.5%)，而來自五個場的 1387 頭牛隻共測出 92 頭雜合型 (6.6%)。這五個場的雜合型牛之頻率分別為 2.9% (3/103)，5.4% (19/350)，5.5% (7/127)，5.6% (5/89)與 8.1% (58/718)。本研究調查樣本中未存在有病型 (BLAD) 個體，依本研究的數據可估計現階段台灣牛群中，淋巴球黏力缺失症的雜合性個體 (BL) 的頻率仍在 5% 以上。

關鍵詞：乳牛、牛淋巴球黏力缺失症、聚合酶連鎖反應。

緒 言

乳牛品種特性之改良可藉助數量性狀基因座(Quantitative trait loci, QTL)遺傳標記的輔助選

(1)行政院農業委員會畜產試驗所研究報告 985 號

(2)行政院農業委員會畜產試驗所 育種系

(3)行政院農業委員會畜產試驗所 澎湖中心

(4)行政院農業委員會畜產試驗所 畜牧場

(5)行政院農業委員會畜產試驗所 新竹分所

(6)行政院農業委員會畜產試驗所 生理系

拔方法，來增加數量性狀的選拔強度和準確度(Kappes *et al.*, 1997)。產乳性狀的遺傳標記輔助選拔效率在 Georges *et al.* (1995) 報告已敘述，證實牛群改良計畫需有基因檢測項目。本省乳業以荷蘭牛品種為主，並大量地使用進口的冷凍精液，因此，研發基因檢測技術至為重要，一者可協助酪農戶監控進口的冷凍精液的遺傳品質，二者可指導酪農戶進行特定遺傳型組合之配種繁殖，以避免有害基因的潛在性遺傳。

乳牛胚胎死亡及仔牛死亡的重要原因之一是遺傳缺陷所致，瞭解族群不良基因分布情形，並研擬因應措施來降低不良基因的傳遞速率，是遺傳標記輔助選拔的具體化工作。黃等 (1996) 曾利用美國荷蘭牛登錄協會的公牛群基因檢測結果，追蹤我國過去進口的冷凍精液血胤，發現有 16.04% 的冷凍精液是來自一頭公牛 BELL 的子代和外孫代的公牛所製備的精液。BELL 公牛是一頭攜有會導致牛淋巴球黏力缺失症 (Bovine Leucocyte Adhesion Deficiency, BLAD)，基因座 CD-18 為突變基因的雜合型 (BL) 公牛 (Husten, 1992)。呈現 BLAD 的仔牛之淋巴球上的黏合醣蛋白(Integrines)組成份 β -unit CD18 的一個胺基酸由原有天門冬酸被換成甘胺酸，因此影響到淋巴球黏著於感染物的能力，產生免疫失調現象 (Shuster *et al.*, 1992b)。BLAD 是荷蘭牛常見的致死性體染色體隱性遺傳缺陷 (Kehrli *et al.*, 1990)。具有隱性純合子基因的仔牛常易受到細菌感染致出現下痢、肺炎等徵候，無法治療痊癒，於性成熟前就死亡 (Takahashi *et al.*, 1987; Kehrli *et al.*, 1992; Gilbert *et al.*, 1993; Gerardi, 1996)。牛淋巴球黏力醣蛋白 β -unit CD-18 核苷酸序列經定序後，是一個有 2310 個核苷酸序列和 769 個胺基酸的基因(Shuster *et al.*, 1992a)。當第 128 個胺基酸天門冬酸被甘胺酸取代後，淋巴球黏力發生缺失，而這種胺基酸取代性的突變是導源於第 383 個核苷酸產生 A 到 G 單點突變(Shuster *et al.*, 1992b)。這項單點突變導致原有的 *TaqI* 分切點消失，而產生一個 *HaeIII* 分切點(圖 1)。利用聚合酶連鎖反應技術和限制酶特性，Shuster *et al.* (1992b)可直接檢測牛隻 DNA，並判讀其遺傳型為正常、雜合子或隱性純合子。隱性純合子會產生牛淋巴球黏力缺失症，而被命名為 BLAD 遺傳型，帶有突變基因的雜合子則命為 BL；至於正常型牛隻則因檢測不到突變基因而命名為 TL(Tested free of BLAD)。

美國乳業的乳牛品種以荷蘭乳牛為主，約佔有一千萬頭泌乳母牛總數的 80%。Shuster *et al.* (1992b)發現 1992 年該時期荷蘭品種公牛群中有 14.1% 的公牛和母牛群中有 5.8% 的母牛是 BL 遺傳型，因此，估計出每年有 0.2% 的新生仔牛是 BLAD 遺傳型仔牛，這些 BLAD 仔牛少有活過一歲齡，若有的話，則因體格小和健康欠佳而會影響到其成長後自身的泌乳和繁殖潛能。壹頭 BLAD 仔牛造成美國酪農戶損失美金 300 元左右，因而導致美國乳業年達五百萬美元的仔牛損失。本研究的目的是協助國內酪農戶來檢測在養種牛的 CD-18 基因遺傳型，俾減低這種遺傳缺陷所帶來的經濟損失。因此，本報告乃參照國外已有的 DNA 檢測方法，實際執行限制酶分切 DNA 片段型之鑑別，並把突變基因的 DNA 片段定序，而後經由田間採樣實際檢測評估台灣牛群 CD-18 突變基因的頻度。

材料與方法

I. DNA 之取得

第一階段試驗自尾根採泌乳牛的全血血樣 46 個，以及解凍冷凍精液三支和取得生乳乳樣五個。樣本以 Gentra Systems 公司的 Puregene™ DNA Isolation Kits，依操作說明由血液、精液及乳液萃取 DNA。

第二階段試驗自 1997 年 7 月起至 1998 年 12 月止進行田間採樣，共採了五個民間牧場的 1387 頭牛隻(北部兩場及南部三場，泌乳母牛為主)與來自北部與東部地區參與 DHI 計畫 50 戶

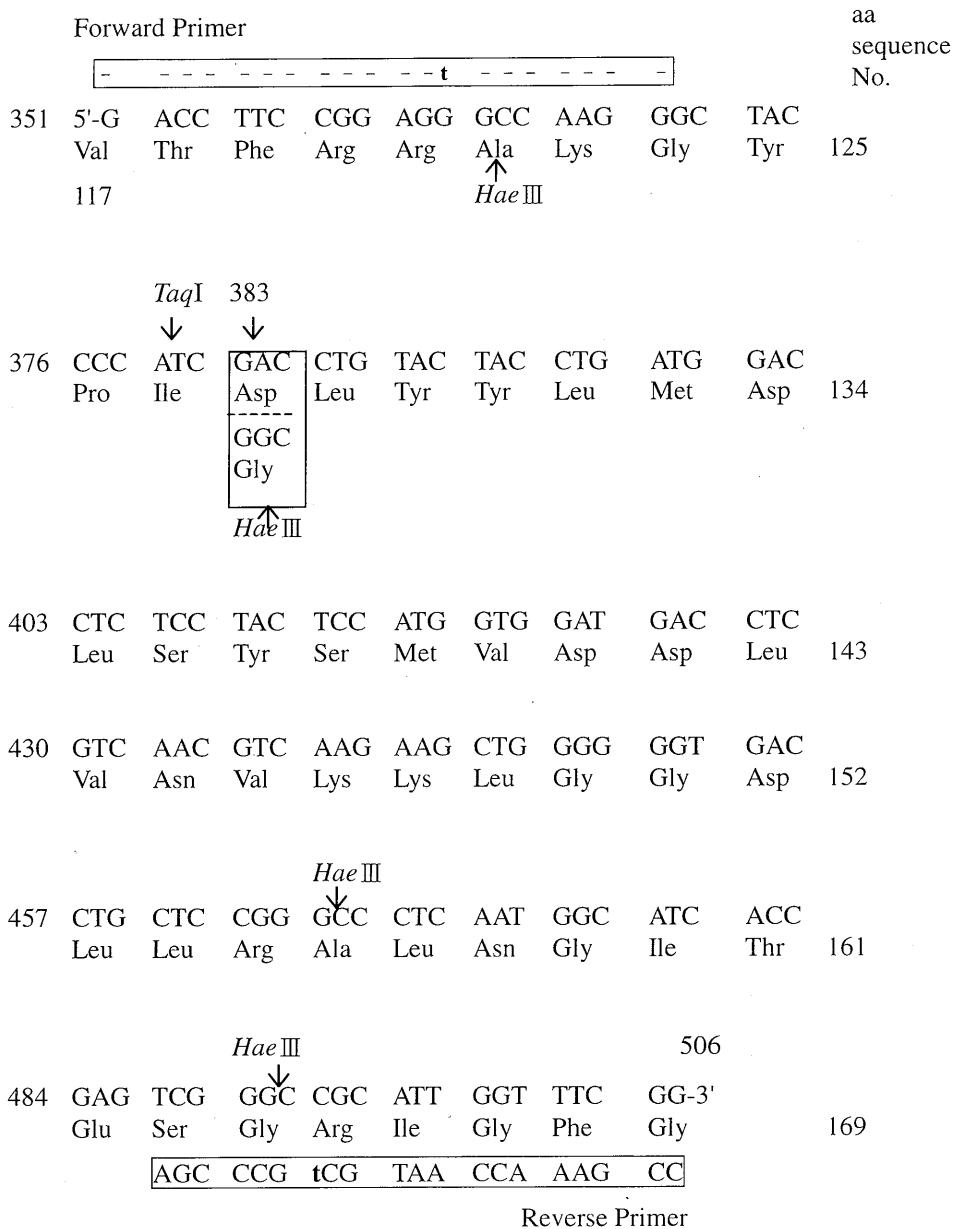


圖 1. 牛 CD-18 cDNA 的部分核苷酸序列(351 → 506)和胺基酸序列。聚合酶連鎖反應的正向引子和反向引子均修正一個核苷酸來消除 *Hae*III 限制酶分切點。CD-18 突變點是第 383 個核苷酸由 A 突變為 G，造成 *Taq*I 分切點消失，但形成一個 *Hae*III 分切點，胺基酸由甘胺酸取代天門冬酸。

Fig. 1. Sequence of the bovine CD18 gene. Forward and reverse primers with a modified nucleotide were used for avoiding the cut site for *Hae*III. An A → G mutation in position 383 is responsible for lacking the *Taq*I cut point of the defect gene, which results in a replacement of amino acid from Asp to Gly.

表 1. 乳牛 CD-18 基因檢測方法及其限制酶分切後的 DNA 片段型

Table 1. Primers and conditions of Polymerase Chain Reaction for CD18 gene and DNA restriction fragment polymorphism

Polymerase Chain Reaction							
Method	Primer ^a	Temperature, seconds	Cycles	DNA, bp	Restriction enzyme	DNA fragments, bp	Genotype
Shuster <i>et al.</i> (1992b)	5'-TCCGAGGGCCAAAGGGCTA- 3'	94°C , 15sec	35	58	<i>TaqI</i>	32, 26	TL
	5'-GAGTAGGAGAGGTCCATCAGGTAGTACAGG- 3'	69°C , 20sec		(nt 356~413) ^b		58, 32, 26	BL
Tammen <i>et al.</i> (1996)					<i>HaeIII</i>	58	BLAD
						49, 9	TL
						49, 30, 19, 9	BL
						30, 19, 9	BLAD
						52, 32, 17	TL
Tammen <i>et al.</i> (1996)	5'-GTCAGGCAGTTGCGTTCAA- 3'	94°C , 30sec	10	101	<i>TaqI</i>	52, 32, 17	BL
	5'-GAGGTCATCCACCACATcGAGT- 3'	56°C , 60sec		(nt 329~429)		84, 52, 32, 17	BL
		72°C , 30sec				84, 17	BLAD
		90°C , 30sec	25		<i>HaeIII</i>	65, 36	TL
		56°C , 60sec				65, 46, 36, 19	BL
Hochman <i>et al.</i> (1996)	5'-GACCTTCCGGAGGtCCAAGG- 3'	72°C , 30sec				46, 36, 19	BLAD
	5'-CCGAAACCAATGtGCCCGA- 3'	94°C , 15sec	35	156	<i>TaqI</i>	126, 30	TL
		52°C , 60sec		(nt 351~506)		156, 126, 30	BL
		72°C , 30sec			<i>HaeIII</i>	156	BLAD
						116, 40	TL
Kriegesmann <i>et al.</i> (1997)	5'-CCTGCATCATATCCACCAG- 3'	94°C , 30sec	33	343	<i>TaqI</i>	116, 83, 40, 33	BL
	5'-GTTTCAGGGGAAGATGGAG- 3'	57°C , 30sec		(nt 190~532)		83, 40, 33	BLAD
		72°C , 30sec				191, 152	TL
		94°C , 30sec	40	156	<i>TaqI</i>	343, 191, 152	BL
		62°C , 30sec		(nt 351~506)		343	BLAD
This trial	5'-GACCTTCCGGAGGtCCAAGG- 3'	94°C , 30sec				126, 30	TL
	5'-CCGAAACCAATGtGCCCGA- 3'	62°C , 30sec		(nt 351~506)		156, 126, 30	BL
		72°C , 30sec			<i>HaeIII</i>	156	BLAD
						116, 40	TL
						116, 83, 40, 33	BL
This trial	5'-CCTGCATCATATCCACCAG- 3'	94°C , 30sec	33	343	<i>TaqI</i>	83, 40, 33	BLAD
	5'-GTTTCAGGGGAAGATGGAG- 3'	58°C , 30sec		(nt 190~532)		191, 152	TL
		72°C , 30sec				343, 191, 152	BL
						343	BLAD

^a Lower case is the modified nucleotide.

^b Position of amplified nucleotide sequences.

牧場的 71 頭自留小公牛的血樣。血樣 DNA 萃取方法與第一階段試驗相同。

II. 聚合酶連鎖反應

樣本經一般生化步驟純化出核內 DNA，以無菌水稀釋成模板 DNA，俾進行 PCR。Tammen 等人於 1993 年起，為篩除 CD-18 突變基因在牛群的頻率，重新設計一組聚合酶連鎖反應的引子套組，產生 101bp 的 DNA 片段，經限制酶分切後的片段型較易判讀 (Tammen *et al.*, 1996)。Hochman *et al.* (1996) 亦重新設計一組引子配合牛胚性別和多項遺傳型之同步鑑定，可得知牛胚的 CD-18 遺傳型為 TL、BL 或 BLAD 者，而在 1997 年 Kriegesmann 等人又另外發表了一組新的引子，希望能再改進判別遺傳型的準確性，以加速此一不良遺傳基因的清除 (表 1)。上述引子本研究均曾採用，並以之檢測台灣牛群的 CD-18 遺傳型頻率，期望能逐步清除 CD-18 突變基因。

反應物添加濃度與添加量如表 2 所示。各滴入兩滴礦物油後，離心一次，使油在上免除蒸發掉的問題。操作步驟在外吹式無菌操作櫃進行。兩組引子核苷酸序列分別為：

1. 增幅出來第 351 至 506 個核苷酸序列用的引子

BLAD1: 5'-GACCTTCCGGAGGTCCAAGG-3' (65.0% GC)

BLAD2: 5'-CCGAAACCAATGCTGCCCGA-3' (60.0% GC)

第一組引子的 PCR 反應條件：

- a. 起動：94℃，5 分。
- b. 循環：94℃，30 秒；62℃，30 秒；72℃，30 秒。共循環 35 次。
- c. 延伸：72℃，5 分。

2. 增幅出來第 190 至 532 個核苷酸序列用的引子

BLAD3: 5'-CCTGCATCATATCCACCAG -3' (52.6% GC)

BLAD4: 5'-GTTTCAGGGGAAGATGGAG -3' (52.6% GC)

第二組引子的 PCR 反應條件：

- a. 起動：94℃，5 分。
- b. 循環：94℃，30 秒；58℃，30 秒；72℃，30 秒。共循環 35 次。
- c. 延伸：72℃，5 分。

表 2. 牛淋巴球黏力缺失症檢測 PCR 反應添加量

Table 2. Ingredients in PCR reaction mixture for Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency (BLAD) test

Ingredient	Concentration	μ L
Taq DNA Polymerase	5 U/ μ L	0.3
Forward primer (BLAD1 or BLAD3)	10 μ M	1.0
Reverse primer (BLAD2 or BLAD4)	10 μ M	1.0
dNTP	25mM	1.0
10x PCR Buffer		2.5
Distilled water		18.2
DNA template	25-40 ng/ μ L	1.0
Total mixture		25.0

III. 限制酶切割：

取 5 μ L 第一組引子 PCR 產物與 1 μ L 限制酶 *Hae*III (Boehringer Mannheim, Germany, 10 U/ μ L)、1 μ L 緩衝液及 3 μ L 無菌去離子水於 37°C 反應 3 小時後進行電泳分析。另外再取 5 μ L PCR 產物與 1 μ L 限制酶 *Taq*I (Boehringer Mannheim, Germany, 10 U/ μ L)、1 μ L 緩衝液及 3 μ L 無菌去離子水於 65°C 反應 3 小時後進行電泳分析第二組引子的 PCR 產物僅進行 *Taq*I 限制酶分切。

IV. 電泳與遺傳型鑑別：

使用 3.0 %瓊脂膠片，以市售 50 base pair ladder(Boehringer Mannheim, Germany)當 DNA 片段大小標梯，於 100 伏特電壓，泳動 60 分鐘後呈相。當 DNA 樣本加入正向引子 5'-GACCTTCCGGAGGTCCAAGG-3' 和反向引子 5'-CCGAAACCAATGCTGCCCCGA-3' 的第一組引子，得到聚合酶連鎖反應 156bp DNA 片段，經限制酶 *Taq*I 分切，正常牛(TL)在 380-TCGA-383 有分切點，故被切成兩個片段 30bp 和 126bp；有病牛(BLAD)則無法分切，僅具 156bp 單片段。雜合型牛(BL)呈現三個片段 156、126 和 30 bp 電泳相。加入正向引子 5'-CCTGCATCATATCCACCAG-3' 和反向引子 5'-GTTTCAGGGGAAGATGGAG-3'，得聚合酶連鎖反應 343bp DNA 片段，經限制酶 *Taq*I 切割後，正常牛(TL)電泳呈相顯現具有 191 和 152 bp 兩個片段。雜合牛(BL)則具有 343、191 和 152 bp 三個片段，有病牛(BLAD)則僅有 343 bp 一個片段。

V. 統計分析：

田間採樣所得樣本，依場別計算不同遺傳型 TL, BL 和 BLAD 頻率。

結果與討論

第一階段所採的牛隻 DNA 樣本分別萃取自全血、血樣血液、精液及乳液。由於乳樣的 DNA 萃取與體細胞數量有關，本試驗使用的萃取套組以 10ml 以上生乳離心後效果最佳。DNA 樣本加入第一組正向引子 351-GACCTTCCGGAGGTCCAAGG-370 和反向引子 506-CCGAAACCAATGCTGCCCCGA-487，於 62°C 煉合及增幅 35 次後，得到聚合酶連鎖反應 156 bp DNA 片段。這 156bp DNA 片段經限制酶 *Taq*I 分切，正常牛在 380-TCGA-383 有分切點，但是突變基因是第 383 個核苷酸由 A 變成 G，導致 *Taq*I 分切點消失，而無法分切，仍具 156bp 片段(圖 2)。因此電泳相列示如下：

正常牛具	126 和 30 bp 兩個片段
雜合牛則具有	156、126 和 30 bp 三個片段
有病牛則會有	156 bp 一個片段

經限制酶 *Hae* III 分切後的電泳相列示如下：

正常牛具	116、40 bp 兩個片段
雜合牛則具有	116、83、40 和 33 bp 四個片段
有病牛則會有	83、40 和 33 bp 三個片段

三支冷凍精液中，檢驗出 LABELL 公牛精液為 BL 雜合型，抽檢的三隻冷凍精液均符合商品上的遺傳型標示，其餘的血樣及乳樣檢測結果與先前該牛群全場採樣送美國 IMMGEN 公司之檢測結果亦吻合。46 隻母牛中共有 6 隻為雜合型。因截取出之 DNA 片段較長，因此其結果比

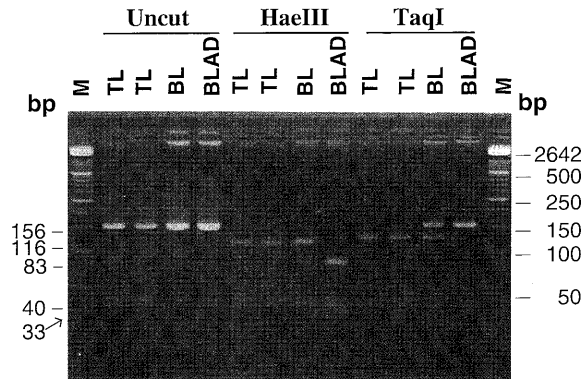


圖 2. 正常牛(TL)、雜合牛(BL)與有病牛(BLAD)以 BLAD1 和 BLAD2 引子組增幅的 156 bp 的未分切片段，與經限制酶 *HaeIII* 或 *TaqI* 分切後的片段之電泳相。Uncut：未分切片段。M：50bp DNA 片段大小標梯。

Fig. 2. Electrophoresis pattern of different genotypes of TL, BL and BLAD after *HaeIII* or *TaqI* restriction digestion of 156 bp with BLAD1 and BLAD2 primers. Uncut: fragment after PCR. M: 50 bp ladder marker.

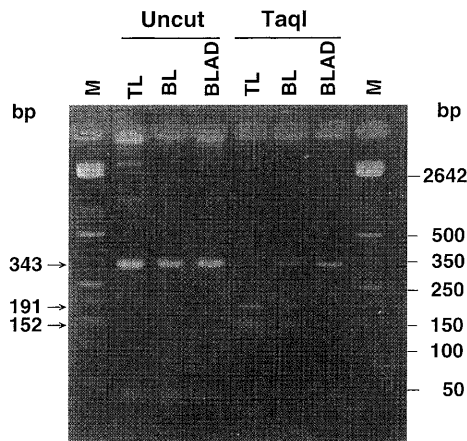


圖 3. 正常牛(TL)、雜合牛(BL)與有病牛(BLAD)以 BLAD3 和 BLAD4 引子組增幅的 343 bp 的未分切片段，與經限制酶 *TaqI* 分切後的片段之電泳相。Uncut：未分切片段。M：50bp DNA 片段大小標梯。

Fig. 3. Electrophoresis pattern of different genotypes of TL, BL and BLAD after *TaqI* restriction digestion of 343 bp with BLAD3 and BLAD4 primers. Uncut: fragment after PCR. M: 50 bp ladder marker.

表 3. 民間乳牛場牛淋巴球黏力缺失症的遺傳頻率

Table 3. Frequencies of genotypes of dairy cattle in private farms for Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency (BLAD) in Taiwan

Herd	Farm and location ¹	Genotype			Frequency of BL
		Normal TL	Carrier BL	Defected BLAD	
Lactating cow	Farm I	100	3	0	3/103= 2.9 %
	Farm II	331	19	0	19/350= 5.4 %
	Farm III	120	7	0	7/127= 5.5 %
	Farm IV	84	5	0	5/ 89= 5.6 %
	Farm V	660	58	0	58/718= 8.1 %
Young bull	North region	52	2	0	6/ 71= 8.5 %
	East region	13	4	0	
Total		1360	98	0	98/1458= 6.7 %

¹Farm I, II and V located in south region of Taiwan, Farm III and IV located in north region of Taiwan

Shuster *et al.* (1992b)所提出之引子，更易於判讀，但仍有少數樣本無法一次清楚判讀上，仍需重覆鑑定。當利用第二組引子可來獲得 343 bp DNA 片段，該 PCR 產物經限制酶 *Taq* I 切割，電泳後呈相(圖 3)列示如下，改善了以肉眼判別的容易度：

正常牛(TL)	具有	191 和 152	bp 兩個片段
雜合牛(BL)	則具有	343、191 和 152	bp 三個片段
有病牛(BLAD)	則會有	343	bp 一個片段

田間採樣分析初期仍以第一組引子進行，共 453 個樣本，部份疑慮的樣本再以第二組引子再行重測，其餘的樣本均以第二組引子進行檢測，表 3 為田間收集的 1458 個樣本頻度分析的結果，71 頭自留小公牛中共檢測出 6 頭雜合型小公牛 (8.5%)，而來自五個場的 1387 頭牛隻(母牛為主)共測出 92 頭雜合型 (6.6%) 其頻率分別為 2.9% (3/103)，5.4% (19/350)，5.5% (7/127)，5.6% (5/89)與 8.1% (58/718)。全部 1458 頭牛隻中共測出 98 頭 (6.7%) 雜合型 (BL) 與 1360 頭正常型牛隻 (TL)。所有樣本中未檢測出任何有病型 (BLAD) 個體。本研究以母、女牛為主體，除非刻意針對三月齡內仔牛採樣，否則不易採到有病型的個體。在畜試所乳牛群進行的雜合型公牛與配雜合型母牛，曾生出一頭有病型的仔牛，但該仔牛出生後一週內即因不明原因而死亡，佐證了此一不良基因確會對乳牛群產生有極大的負面的影響。

過去幾年世界各國所作過牛之淋巴球黏力缺失不同遺傳型的頻率推估調查，雜合型頻度大都在 10% 左右；如丹麥 21.5%(346/1610)雜合型與 0.5%(8/1610)有病型 (Jorgensen *et al.*, 1993)；日本 8.1% 雜合型與 0.2% 有病型 (Nagahata *et al.*, 1997)；美國 13.5% (檢測 830 頭公牛發現 112 頭雜合型公牛, Kehrli *et al.*, 1992)。台灣過去曾進口很多國外的冷凍精液，無形中也帶入了此項不良基因，據黃等(1998)引用美國提供的精液檢測資訊推估雜合型個體 (BL) 的頻度應在 5% 以上，本項調查則利用田間採樣，驗證自進口冷凍精液而來的推估頻度亦有相當的正確性。而本項調查的結果雖然顯示出雜合型頻度低於國外過去的報告，推測主要的原因可能是檢測時間的落差，由

於畜產試驗所近年來推動乳牛不良遺傳基因的清除，雜合型頻度會逐漸隨著冷凍精液的進口管制、淘汰國內自選生產冷凍精液的雜合型公牛與輔導酪農注意自留公牛的系譜與遺傳檢測而逐漸下降。根據美國荷蘭牛協會出版的 1998 年的八月份公牛摘要中，前 100 名內的公牛僅剩一頭牛淋巴球黏力缺失症雜合型存在(Holstein Association USA, 1998)。由 1998 年的美國公牛摘要中，不難看出美國本土已大力的清除雜合型牛。相似的情形亦可發現於其它的乳業發達的國家，如加拿大、荷蘭等。未來為避免國外把有遺傳缺陷的冷凍精液傾銷台灣，我國實施與世界同步的牛群遺傳監控計畫有其必要性。

誌 謝

本試驗經費由農委會 87 科技—牧—13(2)計畫補助，特此致謝。

參考文獻

- 黃鈺嘉、吳松鎮、李世昌、張秀鑾。1996。影響本省乳牛群遺傳疾病之重要公牛族譜。中畜會誌 25(增刊)：57。
- 黃鈺嘉、吳松鎮、曾青雲、李世昌、楊德威、張秀鑾。1998。臺灣荷蘭乳牛不良遺傳基因頻率探討。畜產研究 31(3)：299-304。
- Georges, M., D. Nielsen, M. Mackinnon, A. Mishra, R. Okimoto, A. T. Pasquino, L. S. Sargeant, A. Sorensen, M. R. Steele, X. Zhao, J. E. Womack and I. Hoeschele. 1995. Mapping quantitative trait loci controlling milk production in dairy cattle by exploiting progeny testing. *Genetics* 139: 907-920.
- Gerardi, A. S. 1996. Bovine leukocyte adhesion deficiency: a review of modern disease and its application. *Research in Veterinary Science*. 61:183-186.
- Gilbert, R. O., W. C. Rebhun, C. A. Kim, M. E. Kehrli, M. E. Shuster and M. R. Ackermann. 1993. Clinical manifestations of leukocyte adhesion deficiency in cattle : 14 cases (1977-1991). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 202: 445-449.
- Hochman, D., Y. Zaron, I. Dekel, E. Feldmesser, J. F. Medrano, M. Shani and M. Ron. 1996. Multiple genotype analysis and sexing of IVF bovine embryos. *Theriogenology* 46: 1063-1075.
- Holstein Association USA. 1998. Sire Summaries (1998, August). 1-4.
- Husten, L. 1992. The legacy of Ivanhoe. *Discover*. May(1992): 22-23.
- Jorgensen, C. B., J. S. Agerholm, J. Pedersen and P. D. Thomsen. 1993. Bovine leukocyte adhesion deficiency in Danish Holstein-Friesian cattle 1. PCR screening and allele frequency estimation. *ACTA Veterinaria Scandinavica*. 34: 231-236.
- Kappes, S. M., J. W. Keele, R. T. Stone, R. A. McGraw, T. S. Sonstegard, T. P. L. Smith, N. L. Lopez-Corrales and C. W. Beattie. 1997. A second-generation linkage map of the bovine genome. *Genome Res*. 7: 235-249.
- Kehrli, M. E., F. C. Schmalstieg, D. C. Anderson, M. J. van der Maaten, B. J. Hughes, M. R. Ackermann, C. L. Wilhelmsen, G. B. Brown, M. G. Stevens and C. A. Whetstone. 1990. Molecular definition of the bovine granulocytopenia syndrome: Identification of defi-

- ciency of the Mac-1(CD11b/CD18) glycoprotein. *Am. J. Vet. Res.* 51: 1826-1836.
- Kehrli, M. E., D. E. Shuster and M. R. Ackermann. 1992. Leukocyte adhesion deficiency among Holstein cattle. *Cornell Veterinarian* 82: 103-109.
- Kriegesmann B., S. Jansen, B. G. Baumgartner and B. Brenig. 1997. Partial genomic structure of the bovine CD18 gene and the refinement of test for bovine leukocyte adhesion deficiency. *J. Dairy Sci.* 80:2547-2549.
- Nagahata, H., T. Miura, K. Tagaki, M. Ohtake, H. Noda, T. Yasuda and K. Nioka. 1997. Prevalence and allele frequency estimation of bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD) in Holstein-Friesian cattle in Japan. *J. Vet. Sci.* 59:233-238.
- Shuster, D. E., B. T. Bosworth and M. E. Kehrli. 1992a. Sequence of the bovine CD18-encoding cDNA: comparison with the human and murine glycoproteins. *Gene* 114: 267-271.
- Shuster, D. E., M. E. Kehrli, M. R. Ackermann and R. O. Gilbert. 1992b. Identification and prevalence of a genetic defect that causes leukocyte adhesion deficiency in Holstein cattle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 9225-9229.
- Takahashi, K., K. Miyagawa, S. Abe, T. Kurosawa, M. Sonoda, T. Nakade, H. Nagahata, H. Noda, Y. Chihaya and E. Isogai. 1987. Bovine granulocytopeny syndrome of Holstein-Friesian calves and heifers. *Japanese J. Vet. Sci.* 49: 733-736.
- Tammen, I., H. Klippert, A. Kuczka, A. Treviranus, J. Pohlenz, M. Stober, D. Simon and B. Harlizius. 1996. An improved DNA test for bovine leukocyte adhesion deficiency. *Res. Vet. Sci.* 60: 218-221.

Gene Frequencies of Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency of Holsteins in Taiwan⁽¹⁾

Yu-Chia Huang⁽²⁾, Hsiu-Luan Chang⁽²⁾, Der-Yuh Lin⁽²⁾,
Ren-Bao Liaw⁽²⁾, Jo-Ching Chen⁽²⁾, Song-Cheng Wu⁽³⁾,
Te-Wei Yang⁽⁴⁾, Chin-Shan Huang⁽⁴⁾, Chin-Yun Tseng⁽⁵⁾,
Thung-Fa Shiao⁽⁵⁾, Hsiu-Chou Liu⁽⁵⁾, Jenn-Fa Liou⁽⁶⁾
and Ming-Che Wu⁽⁶⁾

Received July 22, 1999; Accepted Sep. 30, 1999

Abstract

Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency (BLAD) is a genetic defect in dairy cattle. A point mutation (adenine to guanine) in position 383 is responsible for the defect, which results in a replacement of amino acid from aspartic acid to glycine. In Taiwan, Holstein is the only breed for dairy production. From July 1997 to October 1998, blood samples of 1387 cows from five farms (two in the north and three in the south part of Taiwan), and 71 young bulls from 50 farms were collected and DNA extracted for the test. Samples of the young bulls were from north and east part of Taiwan. Six young bulls were detected as carrier (8.5%, 6/71). Ninety-two carriers were found in the five farms (6.6%, 92/1387). The carrier percentages of the five farms were 2.9% (3/103), 5.4% (19/350), 5.5% (7/127), 5.6% (5/89) and 8.1% (58/718) respectively. Total average was 6.7% (98/1458) and no BLAD genotype was found in this investigation. The carrier (BL) percentage of Taiwan was estimated at more than 5%.

Key words : Dairy cattle, Bovine leukocyte adhesion deficiency, Polymerase chain reaction.

(1)Contribution No. 985 From Taiwan Livestock Research Institute, Council of Agriculture

(2)Department of Animal Breeding, COA-TLRI, Hsinhua, Tainan, Taiwan, R.O.C.

(3)Penghu Propagation Center, COA-TLRI, Hsinhua, Tainan, Taiwan, R.O.C.

(4)Animal Farm, COA-TLRI, Hsinhua, Tainan, Taiwan, R.O.C.

(5)Hsin-Chu Branch Institute, COA-TLRI, Hsinhua, Tainan, Taiwan, R.O.C.

(6)Department of Animal Physiology, COA-TLRI, Hsinhua, Tainan, Taiwan, R.O.C.