

St11.mcpub

傳染性支氣管炎病毒 S1 基因之演變及表現

NSC87-2313-B-002-083

王金和

國立台灣大學獸醫學系

106 台北市舟山路 142 號

一、傳染性支氣管炎病毒基因表現

聯絡人: 王金和

106 台北市舟山路 142 號

Tel: 02 23690628

Fax: 02 23631542

Email: Chingho@cc.ntu.edu.tw

摘要 為發展雞傳染性支氣管炎病毒次單位疫苗，本實驗嘗試進行該病毒之 S1 醣蛋白基因的表現，奠定發展的基礎。依據已定序完成的台灣分離株 S1 醣蛋白基因之核苷酸序列，設計三組引子，包含抗原決定位及較保留的區域。首先以這些引子進行 RT-PCR 反應，增幅出片斷大小為 490 bp、539 bp 及 331 bp 的產物，將此產物與載體 pRSET A, B, C 和 pGEX-4T-2 進行接合作用，並經轉化作用至勝任細胞（大腸桿菌）內，再利用 IPTG 誘導細胞內質體表現 S1 基因的蛋白質，結果有兩段基因成功的表現出融和蛋白質，分子量分別約為 27.5 Kd 和 43 Kd 的產物。

關鍵詞：傳染性支氣管炎，S1 基因，表現

緒 言

雞傳染性支氣管炎是雞的重要病毒性疾病，臨床症狀主要為氣管囉音、鼻分泌物、咳嗽、體重減輕、飼料利用率低、腎臟尿酸鹽沈積等 [4]。台灣現行使用的 IB 疫苗以麻州型為主，免疫雞隻後仍持續地發生傳染性支氣管炎，尤其腎病型的病例有增加的現象，可能是疫苗只提供部份的保護作用或者疫苗株的血清型與台灣分離株有所不同所致。為了控制 IB 疾病的發生，發展本土 IB 分離株的疫苗是當務之急，活毒減毒疫苗之減毒時間過長，而 IB 病毒之變異又很快，故以分子生物學技術發展次單位疫苗、DNA 疫苗或重組疫苗是適當之舉，且較合乎時效性。IB 病毒主要有 3 種結構蛋白，核蛋白的功能是與 T 細胞之辨認有關 [1]，棘突醣蛋白的功用為結合宿主細胞的接受器、誘導病毒封套與細胞膜融合及誘發中和抗體（主要是 S1 醣蛋白）[2]。以結構蛋白進行免疫試驗，核蛋白可誘發交叉反應的抗體，而膜醣蛋白誘發抗體的力價較低，且是有限制的交叉反應，S1 醣蛋白可誘發血清特異性和交叉反應的抗體 [8]。因此本實驗選定 S1 醣蛋白基因為目標，利用不同的載體於原核細胞進行蛋白質的表現，並以此作為未來發展疫苗的基礎。

材料與方法

病毒株來源 本試驗使用的病毒株為 A1171 及 A2330，係本實驗室分離所得。A1171 發生於 1992 年 1 月；A2330 發生於 1996 年 2 月，地點皆為桃園某肉雞場。

病毒之分離與增殖 將病材放入研鉢中，加上 10 倍病材體積的 TPB (Tryptose phosphate broth) (Sigma)，每 ml 中含有 Penicillin G 10,000 IU 及 Streptomycin 10 mg，攪拌均勻製成乳劑，在 4 °C 以 3,000 rpm 離心 20 分鐘，收集上清液，置於室溫 30-60 分鐘後，接種於 9-11 日齡雞胚胎尿囊腔中（每顆蛋接種劑量為 0.1 ml）並置於 37 °C 孵蛋箱中。接種後 24 小時以上死亡者，判為陽性，置於 4 °C 冰箱中 4 小時後抽出尿囊液再繼代雞胚胎。

RT-PCR 引子 (Primers)之設計 本實驗引子之設計是依照本室已定序完成之病毒株 A1171 其 S1 醣蛋白基因序列來設計，共有三組。

第一組：

*Bam*HI site

IBVa: 5'-ATG GAT CCT GCA CAA GAT GTT ATT TTG TGT G-3'

IBVb: 5'-AGG AAT TCG CAT AAC AAC AAG TAG CTC TGC-3'

*Eco*RI site

引子長度為 31 及 30 base pairs (bp)，PCR 產物大小約為 490 bp。

第二組：

*Bam*HI site

IBVc1: 5'-ACG GAT CCA CGT AAG TGT AAA GGT GTT TATAG-3'

IBVc2: 5'-CAG AAT TCG CCA TAA CTA ACA TAT GGA CAA C-3'

*Eco*RI site

引子長度為 32 及 31 base pairs (bp)，PCR 產物大小約為 539 bp。

第三組：

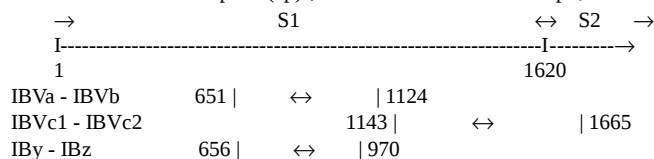
EcoRI site

IBy : 5'-GAG AAT TCA AGA TGT TAT TTT GTG TGA T-3'

IBz : 5'-ACC TCG AGT GAA ATT AGA CTC TTT ATA C-3'

XhoI site

引子長度皆為 28 base pairs (bp), PCR 產物大小約為 331 bp。



IB 病毒 RNA 的萃取 500 μ l 4 M Guanidinium Thiocyanate (GTC) (Sigma), 50 μ l 3M NaOAC (pH 5.2) (Merck), 及 250 μ l 病毒尿囊液混合均勻, 再加入 500 μ l phenol (pH 4.3) (Amresco) 及 150 μ l chloroform-isoamylalcohol (24:1) (Amresco), 充分混合形成白色混濁狀, 置入碎冰中 20 分鐘。以 4 °C 12,000 rpm 離心 15 分鐘, 取上層水層約 700 μ l 至新的離心管, 取等量的 isopropanol (Merck) 均勻混合後置入 -70 °C 15 分鐘。之後在 4 °C 12,000 rpm 離心 15 分鐘, 去除上清液。加入 800 μ l 70% 酒精, 上下顛倒浸洗離心管後, 在 4 °C 12,000 rpm 離心 3 分鐘, 吸取掉 750 μ l 酒精, 12,000 rpm 離心 15 秒後將剩餘酒精吸乾淨。置入真空乾浴器乾燥, 管內 RNA 小團塊 (pellet) 以適量的 0.1% DEPC (Diethylpyrocarbonate) (Sigma) 處理過的 2 次蒸餾水(約 20 μ l)溶解, 70 °C 水浴 3 分鐘完全溶解 RNA 後, 立刻置於碎冰中。

反轉錄聚合酶連鎖反應 (RT-PCR) RT 反應中, 加入 18 μ l 經 DEPC 處理的 2 次蒸餾水 RNA 溶液, 10 μ l AMV-RTase 5x buffer (Promega), 10 μ l 1.25 mM dNTP (Promega), 1 μ l (500 ng) 3' 端的引子 (IBVb; IBVc2; IBz) (海瑪仕), 0.5 μ l 40 unit 的 RNase 抑制劑 (RNase inhibitor) (Promega), 及 0.5 μ l 10 unit 的反轉錄酶 (avian myeloblastosis virus-reverse transcriptase; AMV-RTase) (Promega), 使總體積為 40 μ l。在 42 °C 反應 30 分鐘, 94 °C 5 分鐘不活化, 完成第一股 cDNA 之製作。接著進行 PCR 反應, 取 cDNA 產物 3~5 μ l, 加入 5 μ l 10X thermopol buffer (Biolabs), 10 μ l 1.25 mM dNTP, 500 ng 5' 端及 3' 端的引子各 1 μ l, 0.5 μ l 2 unit 的 Vent (exo-) DNA polymerase (Biolabs), 加 2 次蒸餾水使總體積為 50 μ l。PCR 反應是以 DNA 經過 94 °C 30 秒的變性作用 (denaturation), 55 °C 45 秒的煉合作用 (annealing), 72 °C 1 分鐘的聚合酶延伸作用 (polymerization), 共 35 個循環後再進行聚合作用 72 °C 5 分鐘。

PCR 產物之純化 將 PCR 產物以等體積的 phenol (pH 8) (Amresco) 混合, 震盪均勻, 4 °C 12,000 rpm 離心 5 分鐘, 取上層水層至新的離心管, 再以 phenol/chloroform/isoamylalcohol (25: 24: 1, pH 8) 純化一次, 加入 2 倍體積的純酒精於 -70 °C 沉澱 15 分鐘, 4 °C 12,000 rpm 離心 15 分鐘, 去除上清液。加入 1 ml 70% 酒精, 上下顛倒浸洗離心管後, 4 °C 12,000 rpm 離心 3 分鐘, 吸乾酒精, 真空乾燥, 以適量的 TE buffer (pH 8.0) 溶解 DNA, 65 °C 水浴 10 分鐘完全溶解。

載體 (Vector) 本實驗使用的載體為 pRSET A, B, C (Invitrogen Corp.), 及 pGEX-4T-2 (Pharmacia Biotech), 此兩種載體皆具有一個 multicloning site 可供不同限制酶切割選殖, 適用於原核細胞 (*E. coli*) 內表現。

PCR 產物及載體之切割 純化後的 PCR 產物及載體以 *EcoRI* - *BamHI* 及 *EcoRI* - *XhoI* (Boehringer mannheim) 兩組限制酶進行切割, 取約 20 μ g DNA 分子, 加入 10 μ l 10X 限制酶 buffer, 40 unit 的限制酶 (restriction enzyme) 加 2 次蒸餾水至總體積為 100 μ l, 在 37 °C 水浴下進行反應 1 小時。

瓊脂糖凝膠 (agarose) 電泳 使用合適濃度的 agarose (Gibco BRL, electrophoresis grade), 以 1X TAE buffer 當溶劑, 配製各種濃度適合的 agarose gel, 利用電泳槽 (Mupid-II) (Cosmo), 在 1X TAE buffer 中電泳, 100 伏特 20~30 分鐘。然後把 gel 放入含有 0.5 μ g/ml 的 ethidium bromide 的溶液中, 在室溫下染色 5~10 分鐘。取出 gel 在波長 302 nm 之 UV 燈上觀察及照相, 照相所使用的是 polaroid type 667 相紙。

Band 之洗出 (elution) 經限制酶切割後之產物以濃度合適的 agarose gel 進行電泳, 染色, 在長波長 (366 nm) 之 UV 燈上將有興趣的 band 切割下來, 以三種方式進行 DNA 之回收。1. 透析袋電泳洗出 (Electroelution into Dialysis Bags): 將切割下來的 band 置入透析袋 (MWCO: 12-14,000) 中, 內含適量的 1X TAE buffer, 再置於電泳槽中進行電泳, 以手提式長波長 UV 燈觀察, 待 DNA 分子跑至透析袋邊緣, 反方向再電泳 1 分鐘, 取出袋內 gel, 按摩 (massage) 透析袋, 回收袋內溶液進行純化。2. 低溫融解瓊脂糖凝膠回收 (Recovery of DNA from Low-melting-temperature Agarose Gel): 以低溫融解瓊脂糖凝膠 (Low-melting-temperature Agarose Gel) (A.B.I) 配製成 gel, 於 4 °C 下進行電泳, 染色, 在長波長 (366 nm) 之 UV 燈上將 band 切割下來, 放入離心管中, 加 5 倍量的 TE buffer 於 65 °C 水浴 5 分鐘融解 gel, 再進行純化。3. 瓊脂糖凝膠萃取套組 (QIAquick Gel Extraction Kits): 使用 QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen) 萃取 DNA, 依套組上所述之步驟進行。

載體的去磷酸化作用 (Dephosphorylation) 經 elution 純化後的 pellet 以 90 μ l Tris.Hcl (pH 8.3) 溶解, 加 10 μ l 10X CIP (Calf intestinal alkaline phosphatase) dephosphorylation buffer, 和適當量的 CIP (Biolabs), 在 37 °C 水浴 1 小時, 加 EDTA (pH 8.0) 至最終濃度為 5 mM, 65 °C 1 小時或 75 °C 10 分鐘不活化, 再使用等量 phenol 和 phenol/chloroform (1:1) 各一次進行純化, 上層液加十分之一量的 3M 醋酸鈉 (sodium acetate; pH 7.0) (Sigma) 及 2 倍

量純酒精混合，置-70 °C 沉澱 15 分鐘，4 °C 12,000 rpm 離心 15 分鐘，去除上清液。加入 1 ml 70% 酒精，上下顛倒浸洗離心管後，4 °C 12,000 rpm 離心 3 分鐘，吸乾酒精，真空乾燥，以適量的 TE buffer 溶解 DNA，65 °C 水浴 10 分鐘完全溶解。

接合作用 (Ligation) pRSET A,B,C 載體和第一組、第二組引子形成的 PCR 產物，及 pGEX-4T-2 載體和第三組引子形成的 PCR 產物進行接合作用 (ligation)，反應作用為 1 µl 接合酶 (T4 DNA ligase) (Biolabs)，1 µl 10X ligation buffer，載體和 PCR 產物的量以 1:3 的比例加入，然後加 2 次蒸餾水至總體積為 10 µl，在 16 °C 水浴反應過夜或置室溫 1-2 小時進行反應。

轉化作用 (Transformation) 接合作用後之反應物經由轉化作用進入 competent cells (*E. coli*) 內，pRSET A,B,C 載體使用 BL21 (DE3) competent cells (Novagen) 而 pGEX-4T-2 載體則使用 DH5α competent cells (分讓自本系臨床微生物研究室)。步驟為取 5 µl 的 ligation 反應物均勻分佈在 competent cells 上，冰浴 30 分鐘。於 42 °C 中 heat shock 2 分鐘後冰浴 2 分鐘。取 450 µl SOC medium (Gibco BRL) 加入管中，再置於 37 °C 恆溫振盪器中，以每小時 225 轉進行振盪 40 分鐘，將菌液均勻的 spray 於含 50 µg/ml ampicillin 的 LB (Luria-Bertani) (Difco) plate 上。置 37 °C 培養約 24 小時至長出菌落，挑選出約 20 個菌落於含 50 µg/ml ampicillin 的 LB broth (約 5 ml) 培養。

快速篩選 (Quick Screen) 取培養之菌液 1.5 ml 至離心管，5,000 rpm 離心 5 分鐘，去掉培養液，剩下的菌塊加入 100 µl 的 lysis buffer 攪拌均勻，靜置室溫至少 5 分鐘，然後加入等量的 phenol/chloroform (1:1, pH 8) (Amresco) 溶液，上下反覆搖動 50 次，在 12,000 rpm 下離心 5 分鐘。上清液中之 DNA 即可直接用 0.8 % agarose gel 進行電泳分析。

質體的純化 經快速篩選後，以 miniprep 方式將菌株純化，取 1.5 ml 的菌液，倒入離心管中，在 4 °C 以 5,000 rpm 離心 5 分鐘，除去培養液，以 100 µl 保持於 4 °C 的 solution I 將細胞顆粒懸浮，加 solution II (新鮮配製) 200 µl，上下顛倒混合至水樣化，再加入 150 µl 保持於 4 °C 的 solution III，上下顛倒混合使呈現類似豆花樣後置冰上 3-5 分鐘，在 4 °C 以 12,000 rpm 離心 5 分鐘，取上清液至新的離心管。取 20 µg/ml DNase-free RNase A 於 37 °C 作用 20 分鐘後，以等體積之 phenol/chloroform (1:1, pH 8) (Amresco) 振盪混合均勻，4 °C 12,000 rpm 離心 5 分鐘，取上清液至新的離心管。加入等體積 chloroform/isoamylalcohol (24:1) (Amresco) 振盪混合均勻，在 4 °C 12,000 rpm 離心 5 分鐘，取上清液至新的離心管，加入 2 倍體積之 100% ethanol 置於 -70 °C 10 分鐘，4 °C 12,000 rpm 離心 15 分鐘，吸掉酒精，以 1 ml 70% ethanol 浸洗沉澱顆粒，以 4 °C 12,000 rpm 離心 3 分鐘，吸掉酒精乾浴後，以適量之 TE buffer 溶解 plasmids DNA，65 °C 水浴 10 分鐘完全溶解。

質體之切割及確定 取約 1 µg DNA 分子，加入 1.5 µl 10x RE buffer，及 2 unit 合適的限制酶，加 2 次蒸餾水至總體積為 15 µl，在 37 °C 進行反應 1 小時，最後以 0.8 % agarose gel 進行電泳分析，觀察有無插入片段 (insert) 的存在及質體大小是否正確。

細菌內質體蛋白質的誘導 (Induction) 從 LB plate 上 (含 50 µg/ml ampicillin) 釣一單獨菌落至 2 ml LB broth (含 50 µg/ml ampicillin) 37 °C 旋轉培養 (175 rpm) 16 小時，再取 40 µl 菌液至 2 ml LB broth (含 Amp.)，培養 4 小時後，加入 2 µl 500 mM IPTG (Isopropyl β-D-thiogalactoside) (Biosynth ag) 至最終濃度為 1 mM，繼續旋轉培養 4 小時後，收取菌液。

質體蛋白質電泳 接合於載體上的 S1 基因片段，在細菌經 induction 後可於 SDS-PAGE 電泳中觀察是否有蛋白質的表現。取 1.5 ml 菌液以 13,000 rpm 離心 3 分鐘，去培養液，加 TEN buffer 80 µl 和 sample buffer (4X) 20 µl 混合後，以超音波振盪打碎，於 90 °C 以上水浴煮沸 5 分鐘，冷卻後即可進行電泳，電泳 (100 V) 1-2 小時，取出膠片置染色盒，加入染色液 (staining solution) 染 20 分鐘，倒掉染色液加入脫色液 (destaining solution)，脫色 1 小時以上，乾燥膠片保存。

結 果

部份 S1 醣蛋白基因的增幅 台灣分離株 A1171 以 IBVa 和 IBVb 引子增幅出約 490 bp 的 PCR 產物；以 IBVc1 和 IBVc2 引子增幅出約 539 bp 的 PCR 產物。台灣分離株 A2330 以 IBY 和 IBZ 引子增幅出約 331 bp 的 PCR 產物。

載體和PCR產物的切割 以 IBVa / IBVb 引子及 IBVc1 / IBVc2 引子增幅出的 PCR 產物經限制酶 *EcoRI* 和 *BamHI* 切割；而以 IBY / IBZ 引子增幅出的 PCR 產物經限制酶 *EcoRI* 和 *XhoI* 切割後，三者進行 DNA 回收之步驟及瓊脂糖凝膠電泳分析，結果皆有預期的片段產生。載體 pRSET A, B, C 經限制酶 *EcoRI* 和 *BamHI* 切割及載體 pGEX-4T-2 經限制酶 *EcoRI* 和 *XhoI* 切割後亦進行 DNA 之回收及電泳分析，結果皆有預期的片段產生。

S1 部份基因片段的選殖 經轉化作用後，以快速篩選方式選殖出含有 S1 部份基因片段的菌落並以 miniprep 方式抽取質體，第一組引子產生之質體以限制酶 *BamHI* 切割；第二組引子產生之質體以限制酶 *BamHI* 或 *EcoRI* / *BamHI* 切割；第三組引子產生之質體以限制酶 *EcoRI* 切割，切割後之產物進行電泳分析，結果更進一步確定 S1 部份基因片段之存在及與預期之片段大小相符合。

S1 部份基因的表現 含有 S1 部份基因片段的菌株利用 IPTG 誘導產生該片段的蛋白質，經超音波振盪及煮沸處理後，進行 SDS-PAGE 電泳分析，結果第一組引子包含的基因片段無蛋白質的表現；第二組引子包含的基因片段有蛋白質的表現 (圖 1)，pRSET B 的質體與插入的基因 Frame 相符，如圖的第 2, 4, 5, 7, 8 行皆有明顯的融合蛋白質表現，

分子量約 27.5 kDa, pRSET A & C 的質體與插入基因 Frame 不同, 如圖的第 3, 6, 9 行故無蛋白質的表現。第三組引子包含的基因片段有蛋白質的表現 (圖 2), 第 2, 3, 4 行為 pGEX-4T-2 質體加上 S1 部份基因片段, 有融合蛋白質的表現, 分子量約 43 kDa, 第 5 行為單純的 pGEX-4T-2 質體, 有一分子量約 29 kDa 的蛋白質, 第 6 行為 *E. Coli*; DH5 α 。

討 論

世界各地時有雞傳染性支氣管炎的病例發生, 其原因為疫苗無法提供雞隻有效的保護作用, 以對抗不同血清型 IB 病毒株的攻擊 [5]。例如使用疫苗株 H120 免疫, 對腎病原性毒株之攻擊, 只有部份的保護作用 [14]。台灣現行使用的 IB 疫苗大都屬於麻州型疫苗如 H120, 業者使用疫苗免疫後, 每年依然有病例發生, 本實驗室即從發病雞隻分離出新的病毒株, 剖檢後可見到嚴重的腎臟病變 (尿酸鹽沈積), 可能是現行的疫苗無法有效的提供保護作用或者飼養管理有缺失等問題, 而新毒株的出現可能是因核酸變異形成新的血清型, 導致疫苗株產生的抗體無法中和病毒之抗原決定位。此情形在其它地區亦有發生, 例如在加州分離到一株親腎型的 IB 病毒株 [9] 和在摩洛哥分離到親腸型的變異株等 [7]。所以發展本土的 IB 疫苗是較合乎現階段 IB 疾病的控制。以活毒減毒的方法製造疫苗, 需經多代的雞胚胎繼代, 所花費的時間太長且繼代多次後病毒之免疫原性為何, 仍需評估, 此外因 IB 病毒屬於 RNA 病毒容易造成突變, 導致病毒抗原之變異亦較大, 如此經由胚胎繼代之時間若太長, 是否合乎時宜還有待商榷。隨之而來的有次單位疫苗、DNA 疫苗和重組疫苗的發展因應而生, 以基因工程的方式製造疫苗, 可掌握時間上的優勢, 但其效果如何呢? 就 IB 而言, 有關次單位疫苗和 DNA 疫苗方面的研究未有報告發表, 但有學者使用 non-retroviral vector 攜帶家禽流行性感冒 H7 基因直接免疫雞隻, 攻毒後仍具有保護作用 [6]。關於重組疫苗方面, 有學者將 S 糖蛋白的 cDNA 重組至 Vaccinia 病毒內, 於真核細胞進行表現, 可表現出完整 S 糖蛋白的蛋白質, 另接種老鼠產生的抗體於活體內外的實驗, 可產生 ELISA 抗體及中和 IB 病毒感染力之能力 [16]。本實驗室亦嚐試以分子生物學的技術, 發展次單位疫苗等基因工程的疫苗, 但本次實驗只於原核系統表現出部份 S1 糖蛋白基因的蛋白質。

應用於原核系統表現之載體, 依攜帶的蛋白質或融合的基因 (fusion gene), 大致可分為 phage λ 載體、Lac Z 融合的質體 (plasmids) 與其它序列融合的質體 形成雜交蛋白質可被切割的質體, 另外有一種為沒有基因融合的質體 [13]。質體為了能在原核細胞表現功能性的基因, 其最基本的序列組成必須有一個 promoter、一個 transcription termination site 一個核糖體結合位 (ribosome binding site) 一個 ATG 起始密碼和一個終止密碼。本次實驗使用的載體有 pRSET A, B, C 和 pGEX-4T-2 兩種, 前者為三種不同 in frame 的質體, 皆相差一個鹼基 (base), 於插入功能性基因後只有其中一個質體具有 frame 的作用且可表現出融和蛋白質 (fusion protein), 此融和的蛋白質因前端攜帶有 6 個 His 序列的蛋白質, 可利用管柱 (column) 進行純化。而 pGEX-4T-2 載體亦表現出融和的蛋白質, 也因該融和蛋白質前面帶有 GST (glutathione S-transferase), 可利用 Glutathione Sepharose 4B 進行切割純化, 純化後的產物, 將作為未來使用於活體的試驗。

因 S1 糖蛋白可誘發血清特異性和交叉反應的抗體 [8], 故使用 S1 基因供蛋白質的表現 實驗發現利用尿素處理將 S 糖蛋白的 S1 部分去除, 保留 S2 部分進行雞隻免疫, 不能誘發病毒的中和抗體及 HI 抗體, 對氣管亦無保護作用 [3], 所以選用 S1 糖蛋白基因進行表現。學者以單株抗體並利用標示酵素的競爭性結合方法, 將 S1 糖蛋白定位出 6 個抗原決定位 (epitopes), 其中 S1-A, B, C 相互重疊, 依功能而言 S1-A 至 S1-E 具有病毒中和的能力, 而 S1-F 並無此項能力 [11]。此外利用電腦分析 14 株 IB 病毒株 S1 糖蛋白的二級結構, 有一高度保留的抗原決定位, 位於胺基酸序列第 240 至 255 之間, 依照序列的順序以人工合成 peptide, 可和一單株抗體交互作用, 而此單株抗體又可和數個 IB 病毒株交叉反應, 故認為此抗原決定位對發展具保護及交叉反應的次單位疫苗有潛在的功用 [17]。本次實驗由第三組引子所增幅產生的 PCR 產物, 其序列的位置即包括有部份 S1-A, B, C 重疊的抗原決定位 (此抗原決定位具有中和的能力) 也包括有上述高度保留的序列 (胺基酸序列第 240 至 255)。而由第二組引子所增幅產生的 PCR 產物, 其序列的位置包括部份的 S1-A, B, C 及 S1-F, 也包括 S1 和 S2 之間的裂解訊號及一小部份 S2 的 N 端, 與 S1 其 N 端序列的 1/3 比較, 此兩組 PCR 產物的序列較保留。對發展疫苗而言, 較保留的區域且具有中和反應的抗原決定位是較合適疫苗。此外利用電腦分析以 6 個、7 個或 8 個胺基酸為一組的抗原決定位, 發現在裂解訊號序列的位置, 是一個不錯的抗原決定位。

以病毒的功能性基因於原核系統表現, 因原核細胞轉譯時並無糖基化的作用, 所以表現出的蛋白質, 將與原病毒基因轉譯形成的蛋白質有所不同。實驗發現 IB 病毒顆粒進行去糖基化後, S1 糖蛋白中和抗原的能力會降低 [10], 但在 Semliki Forest virus 的 E2 封套第 114-149 和 216-288 序列, 表現形成的產物, 雖然在 *in vitro* 試驗中無中和作用的反應, 卻於老鼠的試驗中可誘發部份或完全的保護作用 [13]。所以本次實驗表現產生的蛋白質, 雖無糖基化, 但仍可進行活體試驗, 評估其免疫原性為何及攻毒後仍否產生保護作用。

一般的抗原決定位可區分為線狀 (sequential; linear) 或結構性 (conformational) 的抗原決定位 [13], 亦有學者利用 11 種單株抗體決定 IBV Gray 株相關的抗原決定位, 並區分為依賴結構的抗原決定位 (conformation-dependent epitopes) 和不依賴結構的抗原決定位 (conformation-independent epitopes), 前者的功用取決於其二級和三級結構 [15]。一般線狀的抗原決定位大約只包括 10~20 個胺基酸, 如 S2 的胺基酸第 541-558 和第 562-574 的位置即是 [12], 而本次實驗表現基因序列的長度有 331 bp 和 539 bp 長, 也包括部份有中和能力的抗原決定位。推測可能包含線狀的抗原決定位及部份的結構性抗原決定位, 但其蛋白質摺疊 (folding) 的情形可能有所不同。有關實驗步驟及結果方面, 利用 pGEX-4T-2 進行部份 S1 糖蛋白基因的選殖, 選取 3 個菌落 (有基因片段存在) 經 induction 後進行 SDS-PAGE 電泳, 皆有蛋白質的表現, 但由第 3 個菌落產生的蛋白質發現其分子量比前兩個稍大, 可能的原因為何? 需進一步定序確定。

參 考 文 獻

1. Boots AMH, Kusters JG, van der Zeijst BAM, Hensen EJ. The nucleocapsid protein of IBV comprises immunodominant determinants recognized by T-cell. *Adv Exp Med Biol* 276: 189-197, 1990.
2. Cavanagh D, Darbyshire JH, Davis P, Peters RW. Induction of humoral neutralizing and haemagglutination-inhibiting antibody by the spike protein of avian infectious bronchitis virus. *Avian Pathol* 13: 573-583, 1984.
3. Cavanagh D, Davis PJ. Coronavirus IBV: removal of spike glycopolyptide S1 by urea abolishes infectivity and haemagglutination but not attachment to cells. *J Gen Virol* 67: 1443-1448, 1986.
4. Cavanagh D, Naqi SA. Infectious bronchitis. In: Calnek BW ed *Diseases of poultry*, 10th ed. London, Mosby International, 511-526, 1997.
5. Cook JKA. The classification of new serotypes of infectious bronchitis virus isolated from poultry flocks in Britain between 1981 and 1983. *Avian Pathol* 13: 733-741, 1984.
6. Fynan EF, Robinson HL, Webster RG. Use of DNA encoding influenza hemagglutinin as an avian influenza vaccine. *DNA Cell Biol* 12: 785-789, 1993.
7. Houadfi ME, Jones RC. Isolation of avian infectious bronchitis viruses in Morocco including an enterotropic variant. *Vet Rec* 116: 445, 1985.
8. Ignjatovic J, Galli L. Structural proteins of avian infectious virus: role in immunity and protection. *Adv Exp Med Biol* 342: 449-453, 1993.
9. Kinde H, Daft BM, Castro AE, Bickford AA, Gelb J Jr, Reynolds B. Viral pathogenesis of a nephrotropic infectious bronchitis virus isolated from commercial pullets. *Avian Dis* 35: 415-421, 1991.
10. Koch G, Kant A. Binding of antibodies that strongly neutralise infectious bronchitis virus is dependent on the glycosylation of the viral peplomer protein. *Adv Exp Med Biol* 276: 143-150, 1990.
11. Koch G, Kant A, Jane KA, Cavanagh D. Epitopes of neutralizing antibodies are localized within three regions of the S1 spike protein of infectious bronchitis virus. In: Kaleta EF ed. II. International symposium on infectious bronchitis. Rauschholzhausen, Germany, World Veterinary Poultry Association, 154-160, 1991.
12. Kusters JG, Jager EJ, Lenstra JA, Koch G, Posthumus WPA, Melen RH, van der Zeijst BAM. Analysis of an immunodominant region of infectious bronchitis virus. *J Immunol* 143: 2692-2698, 1989.
13. Lenstra JA, Kusters JG, Van Der Zeijst BAM. Mapping of viral epitopes with prokaryotic expression products. *Arch Virol* 110: 1-24, 1990.
14. Meulemans G, Carlier MC, Gonze M, Petit P, Vandenbroeck. Incidence, characterization and prophylaxis of nephropathogenic avian infectious bronchitis viruses. *Vet Record* 120: 205-206, 1987.
15. Parr L, Collisson EW. Epitopes on the spike protein of a nephropathogenic strain of infectious bronchitis virus. *Arch Virol* 133: 369-383, 1993.
16. Tomley FM, Mockett APA, Boursnell MEG, Binns MM, Cook JKA, Brown TDK, Smith GL. Expression of the infectious bronchitis virus spike protein by recombinant vaccinia virus and induction of neutralizing antibodies in vaccinated mice. *J Gen Virol* 68: 2291-2298, 1987.
17. Wang L, Parr RL, King DJ, Collisson EW. A highly conserved epitope on the spike protein of infectious bronchitis virus. *Arch Virol* 140: 2201-2213, 1995.

The Expression of Infectious Bronchitis Virus S1 Gene
Min-Chao WENG and *Ching-Ho WANG

Department of Veterinary Medicine, National Taiwan University, Taipei 106, Taiwan

ABSTRACT In order to develop subunit vaccine of infectious bronchitis virus, parts of S1 glycoprotein were expressed in this experiment. Three sets of primers were designed according to the entire nucleotide sequence of S1 glycoprotein of Taiwan isolate. Products included both hypervariable epitopes and conserved regions. RT-PCR products with 490 bp, 539 bp and 331 bp were amplified by using these primers. The fragments were ligated in pRSET A, B, C or pGEX-4T-2 vectors. Plasmids were introduced into competent cell (*E. coli*) by transformation procedure and the cells were induced by utilizing IPTG for the protein expression of S1 gene. As a result, fusion proteins of two fragments were expression successfully. Molecular weights of products were 27.5 Kd and 43 Kd, respectively.

Keywords: Infectious bronchitis, S1 Gene, Expression

Figure 1. Electrophoresis of expressed S1 fragment (IBVc1-IBVc2, 539 bp of A1171)
Lane 1 : protein molecular weight markers (LMW, 14,000-94,000) Lane 2, 4, 5, 7, 8: pRSET B containing S1 gene fragment. A protein with molecular weight about 27.5 kDa is induced. Lane 3, 9: pRSET A. Lane 6: pRSET C.

Figure 2. Electrophoresis of expressed S1 fragment (IBy-IBz, 331 bp of A1171)
Lane1: protein molecular weight markers (Prestained protein marker, broad range). Lane 2, 3, 4 : pGEX-4T-2 containing S1 fragment y-z). A protein with molecular weight about 43 kDa is induced. Lane 5: pGEX-4T-2. Lane 6: DH5 α .

圖 1 包含 S1 (A1171) 基因片段 (IBVa-IBVb, 539 bp) 的質體之菌株，誘導後之蛋白質電泳圖

Lane 1 : protein molecular weight markers (LMW , 14,000-94,000)。 Lane 2, 4, 5, 7, 8 : 為質體 pRSET B 表現出 S1 基因片段的蛋白質,分子量約 27.5 kDa。 Lane 3, 9 : 為質體 pRSET A 無 S1 基因之表現。 Lane 6 : 為質體 pRSET C 亦無 S1 基因之表現。

圖 2 包含 S1 (A2330) 基因片段 (Iby-IBz, 331 bp) 的質體之菌株，誘導後之蛋白質電泳圖

Lane1:protein molecular weight markers (Prestained protein marker, Broad range)。 Lane 2, 3, 4 : 為質體 (pGEX-4T-2) 表現出 S1 基因片段的蛋白質，分子量約 43 kDa。 Lane 5 : 為質體 (pGEX-4T-2) 而無 S1 基因片段，表現出一分子量約 29 kDa 的蛋白質。 Lane 6 : 為單純的大腸桿菌 (DH5 α)，無表現之蛋白質。

tspubnew

二、傳染性支氣管炎病毒S1基因之演變

王金和

國立台灣大學獸醫學系

台北市

聯絡人：王金和

地址：106台北市舟山路142號

電話：02-2369 0628

傳真：02 2363 1542

E-mail: chingho@cc.ntu.edu.tw

摘 要 利用包含高變異區1之引子 (C2U-C3L) 進行反轉錄聚合酶鏈鎖反應 (RT-PCR) 增幅 1 株 Mass 株病毒及 M48, MII, MA5, 28/86+H/20, H120 等 5 株疫苗毒, 增幅之產物以 *Bso*FI、*Dde*I、*Mbo*II、*Alu*I、*Rsa*I 等 5 種限制酶進行切割, 切割結果皆得到相同限制酶片段多形性 (restriction fragment length polymorphism, RFLP); 其切割片斷數目、大小與在台灣分離到之病毒株不同。因此利用此組引子進行 PCR-RFLP 可快速區別 IBV 的疫苗株與變異株。依序列分析結果知台灣分離株所與國外株不同。因此應用此段引子進行PCR-RFLP是一種區分傳染性支氣管炎疫苗株及野外株的方法。

關鍵字：傳染性支氣管炎，反轉錄聚合酶鏈鎖反應 (RT-PCR)，限制酶片段多形性 (RFLP)，疫苗株

緒 言

雞傳染性支氣管炎 (infectious bronchitis, IB) 在台灣於 1964 年首次由呂等分離確定 [1]。隨後調查本省各地，每年均有病例發生，對養雞業者造成重大損失。該病毒不僅具高傳染力及高致死率，且具高變異性 [5,11,13]，雖業者大都定期使用疫苗以預防本病，但本病仍不斷發生。1964 年所發現之 IB 病例以呼吸道病變為主，且分離到病毒的血清型大部份為麻州型，然而 1969 年之後至 1991 年間有 89% 的 IB 病例為腎炎型，有呼吸道病變者只佔 65.5% [1]。1996 年在我們的研究中發現台灣分離株在 S1 基因之 HVR I 區段核酸序列分析上可分為兩群且不同於麻州群 [16]。因此在台灣無法有效控制 IB 的發生，可能是由於流行毒株與使用疫苗分屬不同血清型之故 [11,15]。但由野外分離之 IB 病毒並不一定是變異株，亦可能為活毒疫苗在雞體內保毒，因此如何區別疫苗株與變異株在診斷上是相當重要，同時，台灣分離株與其他國家的病毒株之間的關係亦值得研究。

在區別疫苗株與變異株，傳統上多半在於血清型的區別，而最普遍採用的方法是病毒中和試驗 [10,11]，在病毒中和試驗亦有以單株抗體方式進行，而這些工作都非常的繁雜且費時。隨著分生技術的日益精進，核酸定序已普遍應用在病毒的研究分析及病毒間的比較上 [5,13,16,17]，然而定序工作必需耗費相當時間在反覆校對上，以確保序列的正確性。因此，如何使診斷方法同時兼具正確性及迅速性，始終是研究者的共同目標。應用反轉錄聚合酶鏈鎖反應 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 及限制酶片段多形性 (restriction fragment length polymorphism, RFLP) 進行 IB 的區別診斷不僅省時省力，且只要有標準毒株之核酸序列即可近行分析，可避免實驗中將病原引入的危險，在 IB 的分類上提供一方便的工具 [2,14]；在 S1 基因接近 5' 端有所謂的高變異區 (hypervariable region, HVR) 可能與病毒的中和反應及保護有關 [3,4,6,12]；我們曾經進行此段的 PCR-RFLP 應用於台灣分離株的分型 [16]，本篇報告在探討我們所設計的引子，在區別疫苗株與變異株的應用價值，以及分析本土分離株與其他國家分離株在此一區段序列變化上的關係性。

材 料 方 法

1. 供試病毒

1 株 IB Mass 毒株由台灣省家畜衛生試驗所分讓 (來源及代數不明)，5 次繼代保存於台灣大學獸醫系禽病研究室。5 株疫苗株由台灣代理商贈送，分別為 M48 (Vineland, USA); MII (Solvay, USA); MA5 (Intervet, Netherlands); 28/86+H120 (未標示), H120 (Vineland, USA)。

2. 病毒增殖

將保存之毒株接種於 9-11 日齡 SPF 雞胚胎之尿囊腔後，48-72 小時後收取尿囊液，經 EM 檢識出病毒顆粒後，分裝保存於 -70 °C 供試驗所需。

3. PCR 引子 (primers)

以電腦軟體 Megalign (Lasergene, DNASTAR Inc., Madison, USA) 之程式進行 22 株 IB 病毒 S1 基因核酸序列比對分析後，在 S1 基因 HVR I 區段 (143 至 320 base) 二側，分別以 114 至 133 base 及 326 至 342 base 之高保留區段為依據設計一對引子 (C2U-C3L)。引子之核酸序列分別為 C2U: 5'-TGG TTG GCA TTT ACA CGG GG-3' 與 C3L: 5'-CAA TGG GTA ACA AAC AC-3' (C2U-C3L) [16]。

4. IB 病毒 RNA 之萃取

所使用之一切儀器、材料、試劑及蒸餾水等均以 0.1% 之 DEPC (diethyl-pyrocaborate) (Sigma) 處理成 RNase free。取 100 μ L 尿囊液加入 1.5 mL 之離心管中，分別加入 600 μ L 4M guanidinium thiocyanate (GTC) (Sigma), 70 μ L 3M NaOAc (pH5.2), 600 μ L phenol-chloroform-isoamylalcohol (25:24:1)，以震盪器充分混合成白色混濁後，再作用約 20 秒，將離心管置入碎冰中 15 分鐘，離心 10,000 $\times g$ 4 20 分鐘；之後，吸取上層水層 (約 700 μ L) 轉至新的離心管中，加入等量 (700 μ L) 的 isopropanol (Merck) 上下搖動 20 下；置於 -20 °C 冰箱內至少 1 小時；離心 10,000 $\times g$ 4 20 分鐘，之後將上層液倒掉，加入 60 μ L 60% 入 60 μ L 60% 酒精，離心 10,000 $\times g$ 4 20 分鐘，然後將管中酒精吸乾留下沈澱顆粒 (病毒 RNA)，置入真空抽氣槽中抽氣 15 分鐘，於進行 RT-PCR 前加入蒸餾水 40 μ L。

5. 反轉錄聚合酶鏈鎖反應(RT-PCR)

本反應採一步完成，其中所加試劑為一支 1.5 mL 之離心管內加入 pfu polymerase 10X buffer 10 μ L (Stratagene), 2.5 mM dNTP 8 μ L (Stratagene), RNasin (40 U/ μ L) (Promega) 0.4 μ L, RTase (AMV) (Promega) (5 U/ μ L) 0.3 μ L, primer3' (C3L, 20 μ M) 1 μ L, primer5' (C2U, 20 μ M) 1 μ L, pfu polymerase (2.5U/ μ L) (Stratagene) 0.8 μ L, 蒸餾水 58.5 μ L, 病毒 RNA 20 μ L, 總體積 100 μ L；其循環溫度為：RT: 42 °C 1小時 (1次)；PCR: 94 °C 30秒、45 °C 1分鐘、72 °C 1分鐘 (35循環)；72 °C 7 分鐘 (1次)，之後 4 °C 保存。

6. 限制酶切割與電泳分析

依據 22 株已發表序列，在 IB 病毒 S1 基因 HVR I 區段核酸序列，以 Megalign 電腦程式比對其核酸序列之關係，以電腦軟體分析酵素切割位選定 *BsoFI*, *DdeI*, *MboII*, *AluI*, *RsaI* 等五種可區別不同血清型之酵素切割 PCR 產物後，以 2.5% metaphor agarose (FMC Bioproducts Inc.) +1% pure agarose (BRL) gel 100 V 進行電泳分析。

7. 比對及分析 HVR I 區段核酸序列

摘錄 22 株 IB 病毒 (H120, KB8523, Connecticut, M41, Beaudette, D3896, D207, D274, D1466, 6/82, UK/123/82, UK/142/86, UK/167/82, UK/918/67, Gary, JMK, PP14, Ark99, SE17, Iowa609, Holte, V1397) HVR I 基因核酸序列資料；其中 21 株來自 GenBank+EMBL Release 87，而 Iowa609 病毒序列則由 Dr. Collisson (Texas A&M University, USA) 之研究室所提供。利用 Megalign (Lasergene, DNASTAR Inc., Madison, USA) 之 Clustal 方法分析此 22 株參考病毒序列與吾人於 1996 年所定序之 12 株台灣分離株 (A1211, A1960, A1953, A1955, A2003, A2054, A1967, A1171, A1980, A2012, A1121, A1916) HVR I 區段核酸序列 (不含引子) 之差異及關係性。

結 果

1. 限制酶之切割情形

1 株 Mass 及 4 株疫苗株以 C2U-C3L 引子皆可增幅出比 220 b.p. Marker 稍高的產物 (圖 1), 但其中 MA5 及 28/86+H120 有雜線 (multiband), 以 *BsoF* I *Dde* I *Mbo* II *Alu* I *Rsa* I 五種酵素切割 PCR 產物所得之片段大小 (圖 2)。以 H120 之核酸序列為例該五種酵素之切割位置如 (圖 3)。所有毒株皆被切成相同結果: *BsoF* I *Dde* I 兩種酵素無法切割 PCR 產物 (圖 2A, 2B), 而 *Mbo* II *Alu* I *Rsa* I 三種酵素分別將其切成 3, 2, 3 等片斷數目 (圖 2C, 2D, 2E); 其中 *Mbo* II 所切割之片斷有兩個極為相近不易由電泳中加以分開 (圖 2C), 此結果與電腦分析 Massachusetts 血清型之切割位完全相符, 各種酵素與片段大小分別為 *BsoF* I: 228 (b.p); *Dde* I: 228; *Mbo* II: 54, 60, 114; *Alu* I: 97, 131; *Rsa* I: 47, 82, 99。此切割型態 (RFLP patterns) 顯然有別於兩群台灣分離株。

2. 核酸序列比對

由分析 12 株台灣分離株與 22 株參考病毒核酸序列及氨基酸序列的差異情形所得之種系發生樹 (Phylogenetic tree), 發現台灣分離株中 A1916 屬於 M 群, 而 I, II 兩群與參考病毒序列 (E, D, A, M 四群) 有顯著差異 (圖 4), 但 I 群與 M 群之種系關係較為接近, 且由氨基酸序列之排列比對結果, 得知各毒株間醃基決定位 (NXS, NXT; X ≠ P) 的分佈情形 (圖 5)。

討 論

傳統上, 研究病毒株之間的關係, 乃以鑑定其血清型, 以判定是否為同一型別或是不同型, 然而型別之間關係的遠近則無法確知; 譬如 Connecticut (Conn.) 株為康州型而 H120 為麻州型, 兩者為不同血清型, 但由基因的角度著眼, 兩者則屬同一基因群。

鑑定血清型別的傳統作法是以病毒中和反應進行, 並以雙向進行試驗後才定型, 這樣的方法不僅繁瑣而且往往因人、因時、因地的不同而結果有所差異, 若以傳統的方法進行不同型別間關係的分析, 其工程之浩大可想而知。反之, 以基因型別的分析來看病毒間的相關性與傳統方法相比較; 基因的定序資料, 可永久的保存不改變或流失, 且可隨時摘取進行比對, 同時在比較所有病毒之間的關係上亦並非難事。

定序的資料之取得隨著科技產品不斷的推陳出新, 使原本繁瑣的工作目前已接近一般應用的階段, 因此著重的不再是方法上的問題, 而在資料的正確性及在確證上所作的工作是否足夠, 本研究以 PCR 及 RFLP 作為開發應用性的鑑定方法, 而以序列分析說明切割型態與群別的關係, 更由序列之分析了解到各毒株間的關係, 這在探究病毒的演化及控制的決策上均提供了重要的訊息。

在 22 株參考病毒序列 S1 基因序列彼此比對, 我們將 22 株參考病毒分成 歐洲、美國、麻州及荷蘭等 4 個基因群, 此結果與 Wang 的分類相同 [17]。以 *BsoF* I *Dde* I *Mbo* II *Alu* I *Rsa* I 五種酵素切割 PCR 產物 (含蓋 HVR I), 之依據乃由 22 株參考序列之 HVR I 區段比對後選擇了 *BsoF* I *Dde* I *Mbo* II *Alu* I *Rsa* I *Hae* III 及 *EcoR* II 等七種可區別十個基因型 (以核酸序列 85% 之相似性為同型之基準) 的限制酶, 而經實驗結果顯示, 以前五種酵素即可區別疫苗株與變異株, 且將麻州株切成與電腦分析之切割位完全相符之片段。28/86+H120 疫苗株所增幅之 PCR 產物無法確知為 28/86 或 H120, 因疫苗中包含此二種毒株, 其 PCR 產物亦形成二條線, 所以無法直接定序。

以往在 IB 的診斷上, 常須面對三個問題: (1) 發生之型別為何; (2) 如何快速區別疫苗株與變異株; (3) 本土發生的 IB 病毒株與其他國家發生之毒株間的關係為何。本實驗則蒐集國內常用的疫苗毒株 H120, MII, MA5, M48 及 28/86+H120 等五家廠商提供之疫苗, 雖不包括康州型疫苗, 但 1996 年吾人已曾分析由省家畜衛生試驗所提供 Conn. 之病毒株 [16], 其酵素切割型態分別為: *BsoF* I: 216(b.p); *Dde* I: 216; *Mbo* II: 114, 102; *Alu* I: 119, 97; *Rsa* I: 169, 47, 與台灣兩群分離株之間亦可加以區別。我們以基因的分法來分析 IB 各毒株間之關係的作法, 不僅可以清楚其間的差異, 同時不難瞭解其某種程度的演化關係。在定序上由於 PCR 直接定序法的快速與簡便使確立不同病毒間基因型別差異, 由於限制酶的切割分析與氨基酸序列的比對, 我們更清楚瞭解病毒株之間的型別關係。由於引子設計於高保留區, 使其可偵測眾多 IB 病毒, 而所增幅的區段為高度變異區, 則提供了病毒間的區別性, 且該區段位於 VN 與 HA 相關的抗原位上, 在疫苗的保護力方面亦有相關。

在序列的比對上, 由圖 5 氨基酸序列之比對結果, 可發現在此一區段中, 大部份病毒序列均含三個醃基決定位 (NXS, NXT; N ≠ P), 但 Conn.、Holte 及台灣分離株 A1171 卻只有 2 個決定位, 而由序列及 RFLP 的分析 (本報告未顯示) 結果顯示在酵素切位上 A1171 與 I 群之其它毒株有明顯差異, 但從核酸序列的分析上 A1171 則屬 I 群之毒株 [16]。在台灣分離株中 A1916 乃無意中由無任何 IB 症狀及病變之雞隻體內分離出, 其在 C2U-C3L 區段序列分析上與 H120 僅 1 個氨基酸之差異, 而酵素切位則相同。由基因樹狀圖結果顯示各群間的差異關係中, 仍不難看出台灣 I 群與麻州群及美洲群與歐洲群間的關係性, 或許這些關係正意味著彼此間的演化情形, 其中台灣 I 群與麻州群最大差異在第 42 至 50 氨基酸之位置上。

雖然本研究著重在開發實際而簡便之診斷技術, 然而在基因的分析上卻引發了有趣的發現: 在高變異的 S1 基因中依然可以找到被保留下來的區域, 這些區域我們雖然不清楚其對該病毒的重要性, 但我們相信病毒的變異仍有其一定的法則, 也就是說仍有其不變之處。在我們的實驗中僅蒐集到疫苗株, 然而引子的設計乃綜合 22 株參考序列之分析結果且在高保留區處設計而成; 因此預期對其他未進行實驗之參考病毒亦具相同之分析價值。各病毒株所比對 HVR I 區段之

基因關係與完整 S1 基因之關係結果相符合 (本報告未顯示), 此結果正

符合 Cavanagh (1988) 認為 HVR I 與血清型之決定位有一致性 [4]。

實驗中進行第二次 PCR 乃為使經一次反應之產物可足夠進行五種酵素切割, 有利於研究之方便性; 為減少反覆增幅的錯誤率, 本實驗所採用之聚合酶均以具校正功能之 pfu polymerase 為反應酵素, 以利切割與定序的正確性。

本實驗方法著重在實用性, 因此在方法上也力求簡便及快速的原則, 目的在使煩瑣的工作能在極短的時間獲得正確可靠的結果, 以利往後在疾病研究上及相關問題的探討。藉此方法我們已初步瞭解到台灣本土 IB 病毒之群別關係 [16], 並建立快速區別疫苗株與野外株的診斷方法, 而對於實際應用層面及病毒間之保護關係, 將更進一步一一去印証。目前台灣所普遍流行之傳染性支氣管炎是由台灣本土變異株所引起 [16], 與 22 株其他國家之 IB 病毒並不相同, 因此不難看出目前被廣泛使用的麻州型與康州型之 IB 疫苗並無法有效控制本省 IB 病例的發生。

參 考 文 獻

1. 呂榮修 謝快樂 蔡向榮 林地發 李永林 台灣雞傳染性支氣管炎之發生與病毒分離 中華獸醫誌 19:119-129, 1993

2. Andreasen JR, Jr, Jackwood MW, Hilt DA. Polymerase chain reaction amplification of the genome of infectious bronchitis virus. *Avian Dis* 35: 216-220, 1991
3. Cavanagh D, Darbyshire JH, Davis P, Peters RW. Induction of humoral neutralising and haemagglutination-inhibiting antibody by the spike protein of avian infectious bronchitis virus. *Avian Pathol* 13: 573-583, 1984
4. Cavanagh D, Davis PJ, Mockett APA. Amino acids within hypervariable region 1 of avian coronavirus IBV (Massachusetts serotype) spike glycoprotein are associated with neutralization epitopes. *Virus Res* 11: 141-150, 1988
5. Cavanagh D, Davis PJ, Cook JKA. Infectious bronchitis virus: evidence for recombination within the Massachusetts serotype. *Avian Pathol* 21: 401-408, 1992
6. Cavanagh D, Davis PJ, Cook JKA, Li D, Kant A, Koch G. Location of the amino acid differences in the S1 spike glycoprotein subunit of closely related serotypes of infectious bronchitis virus. *Avian Pathol* 21: 33-43, 1992
7. Cook JKA. The classification of new serotypes of infectious bronchitis virus isolated from poultry flocks in Britain between 1981 and 1983. *Avian Pathol* 13: 733-741, 1984
8. Cowen BS, Wideman RF, Rothenbacher H, Braune MO. An outbreak of avian urolithiasis on a large commercial egg farm. *Avian Dis* 31(2): 392-396, 1986
9. Cowen BS, Wideman RF, Braune MO, Owen RL. An infectious bronchitis virus isolated from chickens experiencing a urolithiasis outbreak. I. in vitro characterization studies. *Avian Dis* 31: 878-883, 1987
10. Gelb J, Jr. Infectious bronchitis. In: Purchase HG ed A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens. Kendall/Hunt Publ Co, Dubuque, Iowa, 124-127, 1989
11. Gelb J, Jr., Wolff JB, Moran CA. Variant serotype of infectious bronchitis virus isolated from commercial layer and broiler chickens. *Avian Dis* 35: 82-87, 1991
12. Kant A, Koch G, Van Roozelaar DJ, Kusters JG, Poelwijk FAJ, van der Zeijst BAM. Location of antigenic sites defined by neutralizing monoclonal antibodies on the S1 avian infectious bronchitis virus glycopolyptide. *J Gen Virol* 73: 591-596, 1992
13. Kusters JG, Niesters HGM, Lenstra JA, Horzinek MC, van der Zeijst BAM. Phylogeny of antigenic variants of avian coronavirus IBV. *Virology* 169: 217-221, 1989
14. Kwon HM, Jackwood MW, Gelb J, Jr. Differentiation of infectious bronchitis virus serotypes using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *Avian Dis* 37: 194-202, 1993
15. Wang CH, Hsieh MC. Isolation, pathogenicity, and H120 protection efficacy of infectious bronchitis viruses isolated in Taiwan. *Avian Dis* 40:620-625, 1996
16. Wang CH, Tsai CT. Genetic grouping for the isolates of avian infectious bronchitis virus in Taiwan. *Arch Virol* 141: 1677-1688, 1996
17. Wang L, Junker D, Hock L, Ebiary E, Collisson EW. Evolutionary implications of genetic variations in the S1 gene of infectious bronchitis virus. *Virus Res* 34: 327-338, 1994

ABSTRACT

Evolution of infectious bronchitis virus in Taiwan

A primer set, C2U-C3L, containing hypervariable region 1, was selected for amplifying one Mass strains and five vaccine strains, M48, MII, MA5, 28/86+H/20, H120. Their PCR products were digested with 5 restriction enzymes, *BsoFI*, *DdeI*, *MboII*, *AluI*, *RsaI*. The restriction fragment length polymorphism (RFLP) patterns of these strains were the same and different from those obtained from the Taiwan field isolates. However, the two groups (Taiwan I and Taiwan II) of Taiwan isolates were conspicuously divergent with foreign strains by sequence comparison. In conclusion, PCR-RFLP using C2U-C3L primers is a convenient method for differentiation of IBV isolates with vaccine strains.

Keywords: Infectious bornchitis virus, Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), Restriction fragment length polymorphism (RFLP), Vaccine strains

圖 1. IBV 疫苗株 PCR 產物的電泳分析。

1 和 8: GelMarker IMT (50-1000b.p.); 2: Mass; 3: M48; 4: MII; 5: MA5; 6: 28/86+H120; 7: H120

Fig. 1 PCR products of IBV vaccine strains. 1, 8: GelMarker IMT (50-1000b.p.); 2: Mass; 3: M48; 4: MII; 5: MA5; 6: 28/86+H120; 7: H120

Fig. 2. RFLP patterns of Mass strain and five vaccine strains.

1, 8: 20b.p. ladder Marker. 2: Mass; 3: M48; 4: MII; 5: MA5; 6: 28/86+H120; 7: H120 ; 5 restriction enzymes A: *BsoFI* ; B: *DdeI* ; C: *MboII* ; D: *AluI* ; E: *RsaI*. The sizes of each fragmens are *BsoFI*: 228 b.p.; *DdeI*: 228; *MboII*: 54, 64, 110 ; *AluI*: 93, 135 ; *RsaI*: 43, 86, 99.

圖 2. 1 株 Mass 株及 5 種疫苗株限制酶切割形態 (RFLP pattern)。

1 和 8: 20b.p. ladder Marker, 2: Mass; 3: M48; 4: MII; 5: MA5; 6: 28/86+H120; 7: H120 ; 5 種限制酶 A: *BsoFI* ; B: *DdeI* ; C: *MboII* ; D: *AluI* ; E: *RsaI*. 各種酶素切割各毒株之片段大小分別為 *BsoFI*: 228 b.p.; *DdeI*: 228; *MboII*: 54, 64, 110 ; *AluI*: 93, 135 ; *RsaI*: 43, 86, 99.

```

TGGTTGGCATTACATGGGGGTGCGTATGCGGTTGTTAATATTTCTAGTG    50
      M                      R
      ▼                      ▼
AATCTAATAATGCAGGCTCTTCATCTGGGTGTAAGTGTGGTATTATTCAT    100
      M                      A
      ▼                      ▼
GGTGGTCGTGTTGTTAATGCTCTTCTATAGCTATGACGGCACCGTCATC    150
                        R
                        ▼
AGGTATGGCTTGGTCTAGCAGTCAGTTTGTACTGCATACTGTAACCTTT    200

CAGATACTACAGTGTGTTTACACATTG    228
  
```

Fig. 3. The sequence and the restriction sites of different enzymes on the C2U-C3L region of H120 strain. Only three from those five enzymes showw cutting sites, M: *MboII*, R: *RsaI*, A: *AluI*. Recognized sites are indicated by underlines. Cutting sites are

indicated by inverted triangle.

圖 3. 以 H120 核酸序列為例 (摘自GeneBank+EMBL Release 87); C2U-C3L 區段之核酸序列, 5 種限制酶之切位僅 M: *Mbo*II, R: *Rsa*I, A: *Alu*I 3 種有切割位, 劃底線者為其辨認序列, 倒三角標示其切割處。

Fig. 4. Phylogenetic tree of Taiwan isolates and foreign strains of IBV (from GeneBank+EMBL Release 87) based on nucleotide sequences of C2U-C3L region.

圖 4. 台灣分離株與國外標準株序列 (摘自GeneBank+EMBL Release 87) C2U-C3L區段之核酸序列比對所繪製之種系發生樹。

Fig. 5. Comparison of the amino acid sequences of Taiwan isolates and foreign strains on C2U-C3L region. (.) means the same amino acid. (-) means deletion. Glycosylation sites (NXS, NXT; N ≠ P) are underline.

I 圖台 灣 分 離 株 與 國 外 株 序 列 C2U-C3L 區 段 氨 基 酸 序 列 比 較 。 排 列 中 最 上 一 列 為 綜 合 各 株 氨 基 酸 出 現 最 多 之 綜 合 序 列 , 比 對 上 , 與 綜 合 序 列 相 同 之 氨 基 酸 以 (.) 表 示 , 而 (-) 表 該 處 之 氨 基 酸 相 對 被 刪 除 ; 另 在 糖 基 決 定 位 (NXS, NXT; N ≠ P) 處 , 以 底 線 標 示 。