

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫 期中進度報告

## 應用膜蛋白質檢測家禽白血病病毒(1/2)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC93-2313-B-002-103-

執行期間：93年08月01日至94年07月31日

執行單位：國立臺灣大學獸醫學系暨研究所

計畫主持人：王金和

計畫參與人員：陳素貞

報告類型：精簡報告

報告附件：出席國際會議研究心得報告及發表論文

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 94 年 5 月 25 日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫

成果報告  
期中進度報告

應用膜蛋白質檢測家禽白血病病毒(1/2)

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC93 - 2313 - B - 002 - 103 -

執行期間：93年08月01日至94年07月31日

計畫主持人：王金和

共同主持人：無

計畫參與人員： 陳素貞

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告 完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

赴國外出差或研習心得報告一份

赴大陸地區出差或研習心得報告一份

出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份

國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、  
列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

執行單位：台大獸醫學系

中 華 民 國 94 年 05 月 12 日

應用膜蛋白質檢測家禽白血病毒 (1/2) (2004.08.01 至 2005.07.31)  
(93-2313-B-002-103-)

國立臺灣大學獸醫學系暨研究所 王金和

## 摘要

目前無減測家禽白血病 J 亞型抗原的方法被發展出來，因為群特異抗原無法分別內源性與外源性的病毒，為了製造對禽白血病 J 亞型抗原特異單源抗體，我們選取台灣毒株的膜蛋白質的 N 端 (gp85N)，選殖至 pRSET 及一個哺乳動物細胞的表現載體，得到 2 株單源抗體 mAb14 與 mAb22。使用免疫墨點證明 2 個抗體皆可偵測到家禽白血病 J 亞型抗原，但只有 mAb22 可以抓到家禽白血病 J 亞型病毒。以西方墨點、免疫墨點、免疫化學及免疫螢光證明 mAb22 可偵測家禽白血病 J 亞型病毒。因此將此抗體用來進行血漿中家禽白血病 J 亞型抗原或病毒的偵測，結果發現可以測到陽性樣本，然其敏感性及特異性尚待評估。此檢測方法似可以解決控制家禽白血病的癥結所在。

## English Summary

There is a global need to develop a specific antigen detection method for subgroup J avian leukosis virus (ALV-J) since the group-specific antigen detection is unable to distinguish exogenous from endogenous viruses. In order to obtain monoclonal antibodies specific to ALV-J, the N-terminus of the surface unit (gp85N) of the envelope protein from a Taiwanese ALV-J was cloned in pRSET and then in a mammalian expression vector for monoclonal antibody production in mice. After selection from hybridoma cells, two monoclonal antibodies, mAb14 and mAb22 were obtained. Both monoclonal antibodies caught specifically to ALV-J and the expressed gp85 protein from ALV-J but not that from subgroup A avian leukosis virus by immunodot assay. Furthermore, mAb22 was found to catch ALV-J by immunodot, Western blot, immunoperoxidase and immunofluorescent assays. Thus, mAb22 was used for detecting ALV-J antigen or virus in blood. The result shows that this monoclonal antibody could detect positive sample. In conclusion, this monoclonal antibody might be useful for the diagnosis of ALV-J virus or ALV-J-derived antigen.

## 前言

家禽白血病是由家禽白血病毒 (avian leukosis virus, ALV) 所引起的禽鳥腫瘤性疾病。對家禽產業而言，家禽白血病所造成的產能下降、免疫抑制等問題往往導致很嚴重的經濟損失，不過在種雞業者施行家禽白血病毒撲滅計畫後，家禽白血病 A 亞群及 B 亞群病毒已獲得良好的控制 (Payne et al., 1997)。不過至 1988 年，一個新的家禽白血病毒亞群的出現再次衝擊家禽產業 (Payne et al., 1991)。

家禽白血病 J 亞群 (subgroup J avian leukosis virus, ALV-J) 在分類上屬於外源性家禽白血病毒，可以藉由垂直或是水平方式來傳播，經由母雞垂直傳播的小雞往往會導致免疫耐性 (immuno-tolerance)，而持續排毒，感染其他雞隻，除了導致骨髓球性白血病外 (myeloid leukosis, ML) (Payne et al., 1998)，還會造成肉雞生長遲緩，以及影響雞隻的疫苗免疫 (Stedman et al., 1999; Spackman et al., 2003)。

在所有雞隻品系中，以肉雞對家禽白血病 J 亞群病毒 (subgroup J avian leukosis virus, ALV-J) 的感受性最高，且雞隻間水平傳播速度最快 (Fadly et al., 1999)，而使得家禽白血病 J 亞群病毒 (subgroup J avian leukosis virus, ALV-J) 的控制較其他家禽白血病毒困難。另

外 Payne 研究發現來亨雞品系 (Leghorn strains) 對家禽白血病 J 亞群病毒 (subgroup J avian leukosis virus, ALV-J) 較有抗性 (Payne, 1992)。

## 研究目的

家禽白血病的控制主要是從撲滅計畫、飼養管理，以及以人為育種方式培養出對家禽白血病毒有抗性的雞隻著手 (Payne, 1998)。2001 年，黃證實台灣肉種雞場有家禽白血病 J 亞群病毒 (subgroup J avian leukosis virus, ALV-J) 的感染 (黃, 2001)；2002 年，徐嘗試針對台灣土雞進行調查，不過僅證實台灣土雞有家禽白血病 J 亞群病毒 (subgroup J avian leukosis virus, ALV-J) 的感染 (徐, 2002)，因此本研究希望能針對台灣土雞進行血清學調查，以了解家禽白血病 J 亞群病毒 (subgroup J avian leukosis virus, ALV-J) 在台灣土雞族群內的分布情形。此外，在疾病的控制上仍是以撲滅計畫為主，因此找出感染雞隻並加以撲滅是相當重要的，故本研究希望能開發出一抗原捕捉性的酵素連結免疫吸附分析 (ELISA) 來偵測家禽白血病 J 亞群病毒 (subgroup J avian leukosis virus, ALV-J) 抗原，以利疾病診斷之用。

## 文獻探討

家禽白血病 (avian leukosis, AL) 原本只有呈散發性，在養雞界並不造成嚴重的經濟損失，然此種現象因 J 亞群家禽白血病毒 (subgroup J avian leukosis virus, ALV-J) 的出現而完全改變；1988 年英國的 Dr. Payne 分離出一種家禽白血病毒，該病毒無法歸類於當時保存的家禽白血病毒各種亞群 (subgroups A, B, C, D, E, F, G, H, 及 I) 而命名為 J 亞群 (Payne, 1991)。美國也於 1995 始證明本病存在並體認本病的嚴重性 (Fadly, 1998, 1999)，美國 7 大種禽公司的雞源皆受其污染 (Avian farm, 1998)，造成下游雞場的發病。國內發生亦甚嚴重 (Wang, 1995)，於 1997 年 7 月，種雞顯示衰弱、貧血、脫水、產蛋下降，肉雞顯示雞隻體形參差不齊，無法上市，我們由這些雞場分離出 J 病毒，證明本病在台灣存在，台灣 3 個原種雞場之一，因本病而停止出售小雞給下游雞場，損失相當慘重 (Lin, 2000; Wang, 2000)。1999-2000 年本研究室由另外 2 個原種雞場進行一序列的採樣，發現此 2 原種雞場仍受 J 病毒的感染，其下游的種雞場受波及，發生疫情嚴重 (Huang, personal communication)，因此有必要對本病深入研究。

ALV 可被分為外源 (Exogenous) 及內源 (Endogenous) 兩種 (Crittenden, 1979, 1981)，內源性病毒多為基因缺陷病毒，因其所帶 LTR 基因的驅動子 (Promoter) 功能非常弱，所以本身不能複製成完整的病毒，不能引起腫瘤 (Payne, 1997)。內源性病毒包括：1) E 亞群內源性病毒 (subgroup E endogenous viruses, evs)：基因研究最多，包括不表現的內源性病毒，如 ev-1，稱 transcriptionally silent (Boyce-Jacino, 1992)。有些內源性病毒可以表現 envelop glycoproteins 如 ev-3, ev-6。另有一些無缺陷內源性病毒可以製造完整的病毒顆粒，如 ev-2。這些內源性病毒含有相同的 env 基因，此基因與 A 亞群、B 亞群、C 亞群、D 亞群的 env 基因有關，其同度達 85-90%。2) 古代的內源性病毒 (EAVs)：除了 E51 外皆為缺陷病毒，EAV 雖為內源性但與 E 不同，其 SU 基因部份或全部缺損，故不知其為那一亞群 (Benson, 1998b)；。3) ev/J provirus：其基因與 J 病毒有 95% 以上的相同性 (Benson, 1998a; Smith, 1999)，如 EAV-HP。4) avian retrotransposons (ART-CH) (Sacco, 2000)。

ALV 傳播方式有水平與垂直二種。水平主要為直接接觸 (Okazaki, 1980)，傳染的方式多藉著糞便、唾液、皮表等方式。垂直傳染 (先天感染) 因為胚胎感染病毒，出生後雞隻會對病毒產生免疫的耐力，以致於中和抗體無法出現，病雞也會產生病毒血症，所有外源性的病毒亞群皆可經由垂直接觸方式傳染給下一代。

病毒在雞群中可以分成下列幾種方式存在 (Payne, 1997) : V-A- (viremia-, antibody-), V-A+, V+A-, V+A+等。若由親代垂直傳染的小雞會有持續性的病毒血症, 對病毒的感染具有免疫耐性, 造成慢性毒血症, 且持續排毒, 形成場內重要的保毒者 (viremia+, antibody-, virus shedding+, V+A-S+), 易發病。小雞在孵化後接觸胎糞中的高濃度的 ALV-J 的病毒, 也為重要的水平傳染方式, 而且在雞雞感染病毒, 也會造成具有病毒血症確無法產生中和抗體的型式。水平式感染病毒, 也常導致免疫力上升但是不排毒 (V-A+S-)。ALV-J 在蛋雞孵化後感染, 形成 (V-A+S-), 而肉雞孵化後感染則形成 (V+A-S+)。

ALV 病毒感染行成腫瘤可分為兩種形式, 一種為慢速轉變型 (Slowly Transforming ALVs), 病毒基因為完整的, 此類型腫瘤的產生機制是因為病毒感染後, 其基因插入細胞本身的基因, 並利用細胞本身所帶之致癌基因誘起腫瘤, 發生的機率低。另一種為快速轉變型 (Acutely Transforming ALVs), 通常為缺陷病毒, 必須在其他輔佐病毒 (Helper virus) 感染下, 補足其缺陷部位之基因後而誘起腫瘤 (Graf and Beng, 1978; Enrietto and Hayman, 1987; Kung and Liu, 1997)。急性致腫瘤的病毒, 其病毒基因常攜帶 1 – 2 個致癌基因, 且通常在感染後數天即可見腫瘤的產生。而目前對於引起 myloid leukosis (ML) 的 J 亞群病毒所帶的致腫瘤基因尚未明白 (Payne, 1991; Bai, 1995)。

ALV-J 病毒的 env 基因與其他已發表的病毒亞群只有 40 % 相似性, 當時學者將此病毒分離株歸類為亞群 J (Payne, 1991)。env 基因的核酸序列有 3 個變異區 (variable regions), 即 vr 1, vr 2, vr 3, 以及 2 個宿主範圍區 (host range regions) hr1, hr2 (Witter, 1997)。Venugopal 等人分離 12 株與 HPRS-103 有關的分離株, 將 12 個分離株與亞群 J 的血清及 HPRS-103 的抗體做免疫螢光測試 (Immunofluorescence test), 結果發現 12 株分離株之中有 2 株不與亞群 J 的血清反應, 但皆與 HPRS-103 的抗體反應, 若再使用對 HPRS-103 具特異性的 RT-PCR 做進一步的測試, 卻又發現其中 3 株分離株不能被增幅出特異的病毒片段, 經序列分析結果顯示各分離株在基因 hr1 及 hr2 的位置上有許多胺基酸變異, 推測分離株因此造成抗原上的變異 (Venugopal, 1998)。若將它們的 env 基因比對分析, 結果發現每一分離株之間與 HPRS-103 的基因序列皆有少許的變化, 因此推測 12 株分離株之間已有抗原上的改變 (Venugopal, 1998)。近來的研究結果顯示亞群 J 的 env 基因區中的 hr 變異非常快速, 而 vr 的核酸序列變亦同, 因此導致抗原的變異。

HPRS-103 為緩慢型的 ALV 病毒, 其基因群態為 5' LTR-Leader-gag/pol-env- LTR 3' 其 LTR 核酸序列有 90 % 與其他亞群的病毒相同, 而 Leader 與其他亞群不同的是具有兩個 ATG (Coffin, 1992), 而 gag 及 pol 基因與其他亞群的相似性達 96-97%, S-103 所帶的 env 基因與其他亞群的基因具有高度的相異性, 尤其其抗原決定位 gp 85 與亞群 A-E 只有 40 % 相似, 而 gp37 基因與其他亞群比較也只有 65 % (Bai, 1995)。

在美國 Fadly 等人由 4 週齡大的肉雞分離出一株與亞群 J 相關的病毒分離株, 稱為 ADOL-Hc1, 是目前所有的報告中感染 ML 的最小年齡, 其實驗中以中和試驗顯示 HPRS-103 的抗原可被 HPRS-103 及 ADOL-Hc1 兩者的抗體所中和, 但相反的 ADOL-Hc1 只能被本身的抗體中和, 卻無法與 HPRS-103 的或其他亞群的產生中和反應, 因此作者推論 ADOL-Hc1 與 HPRS-103 之間的抗原性雖有相關但卻不同 (Fadly, 1999)。

本實驗室已進行本病的研究 2 年, 由臨床病例之病理、PCR 診斷證明本病非常普遍, 並常與馬立克病同時感染 (圖 1)。在病原鑑定方面, 病毒分離鑑定確診本病的存在 (Wang, 2000)。定期 ELISA 測定證明臨床無病例之 A、B 二原種雞場亦有 B line 受本病毒污染。在分離方面雖受限於 C/E 細胞的匱乏, 仍分離出病毒病, 並將病毒 gp85 基因選殖於 TA

cloning vector 中，完成定序比對證明為 ALV-J，可歸類於 ev/J 群中。2003 年 12 月本室由一白肉雞種雞場分離出病毒比例竟高達 40% (公系 2/5 母系 1/8)；調查抗體方面，白肉種雞陽性率居然高達雞群的 100% (10/10)，土種雞群抗體陽性率高達雞群的 75% (12/16)，由此可見國內養雞產業仍飽受本病威脅，應積極研究及控制。

由於目前國內沒有 subgroup A ALV 之 rav1 株及 subgroup J ALV 之 Hc 1 株 (美國原株)，因此王金和於 2003 年至美國農業研究部 (United State Department of Agriculture, Agriculture Research Service, USDA-ARS) 禽病與腫瘤研究所 (Avian Disease and Oncology Laboratory, ADOL) 做白血病研究 4 個月，選殖 subgroup A ALV (rav1) 及 subgroup J ALV (Hc 1)。選殖的 Hc 1 gp85 SU 及 rav1 gp85 SU 基因已帶回台大禽病室供本計畫比較之用。

## 研究方法

### 細胞培養

DF1 細胞株滿 25 cm<sup>2</sup> 細胞培養瓶時，將培養瓶中變黃變酸的培養液倒掉，以 5 mL PBS 溶液 (GIBCO BRL, CA) 清洗三次，加入 1 mL 0.15% Trypsin 溶液覆滿細胞表面，於 37 °C 培養箱中作用 30 秒，待細胞圓形化可被輕拍下來後即加入含 10% 胎牛血清及廣效性抗生素之 Dulbecco 's Minimum Essential Medium (DMEM, pH 7.0-7.2) 9ml。總體積為 10ml，吸放數次使細胞懸浮液均勻後留下 1/4 到 1/6 的細胞後再加入新鮮的培養液，置於 39 °C，含 5% 二氧化碳的培養箱培養。

### 病毒增殖

將長滿 25 cm<sup>2</sup> 培養瓶的 DF1 細胞以 0.15% Trypsin 消化下來，分裝於 6 孔細胞培養盤。隨後每孔加入 200 μL 的病毒液，加入已回溫且含 10% 胎牛血清及 2 μg/mL DEAE-dextran (Sigma, St. Louis, MO) (Fadly et al., 1998) 之 DMEM 細胞培養液 2 mL，隔天更換不含 DEAE-dextran 並含有 0.1% 胎牛血清 (Hyclone, Logan, Utah) 之 DMEM 細胞培養液，放入 39 °C，含 5% 二氧化碳的培養箱培養。培養 7 到 9 天後收集細胞上清液，再以 RT-PCR 的方式檢測是否有病毒釋出。

若只增殖一株病毒時，可在培養瓶中進行，長滿 25 cm<sup>2</sup> 培養瓶的 DF1 細胞，將培養瓶中變黃變酸的培養液倒掉，以 5 mL PBS 溶液 (GIBCO BRL, CA) 清洗三次，加入 1m 0.15% Trypsin 溶液覆滿細胞表面，於 37 °C 培養箱中作用 30 秒，待細胞圓形化可被輕拍下來後，加入已回溫且含 10% 胎牛血清及 2 μg/mL DEAE-dextran 之 DMEM 細胞培養液 4mL，吸放數次使細胞懸浮液均勻後留下 1/4 到 1/6 的細胞，並加入 1ml 的病毒液，補培養液至 10ml，放入 39 °C，含 5% 二氧化碳的培養箱培養，隔天更換含 10% 胎牛血清及廣效性抗生素之 Dulbecco 's Minimum Essential Medium (DMEM, pH 7.0-7.2)，放入 39 °C，含 5% 二氧化碳的培養箱培養。培養 2~3 天盲目繼代 2 次，收集細胞上清液，再以 RT-PCR 的方式檢測是否有病毒釋出。

### 病毒力價測定

將 DF1 細胞以含 10% 胎牛血清及 2 μg/mL DEAE-dextran 之 DMEM 細胞培養液將細胞濃度調整為 2.5 x 10<sup>5</sup>/mL 後分裝於 24 孔盤，每孔含 1mL 之懸浮細胞，將 10 倍稀釋之病毒液 (10<sup>-1</sup>-10<sup>-6</sup>) 感染細胞，且不同濃度之病毒液各做五重複，隔日將細胞培養液更換為只含 0.1%

胎牛血清之 DMEM 細胞培養液，培養 7-9 天後於每孔中加入 80  $\mu$  L 5% Tween-80，並且將之冷凍解凍二次後，以 ELISA 偵測病毒抗原，再以 Reed & Muench (1938) 方法計算病毒力價 (TCID<sub>50</sub>)。

#### 微量中和試驗

將血清置於 56 30 分鐘，使去活化，使用組織培養液將血清稀釋 5 倍，將 500 或 1000TCID<sub>50</sub> 的病毒液 10 倍稀釋成 10<sup>-1</sup>-10<sup>-6</sup>，加入 96 孔盤，每孔加入 50ul，並留下 3-5 孔作為細胞對照。加入 50ul 的去活化血清，MIX，置於 37 作用 40 分鐘，每孔加入 5x10<sup>6</sup>CEFs 的乾淨細胞，培養 7 天不用換培養液，加入 20  $\mu$  L 5% Tween-80，並且將之冷凍解凍二次後，以 ELISA 偵測病毒抗原 p27。

#### One-Dimensional Electrophoresis Using Nondenaturing Native Electrophoresis

Native Electrophoresis :

材料：血漿 66-15、66-16、66-17、66-18、66-19、66-20、66-21、3157M2  
純化病毒 2921。

以 4X glycine gel buffer(5.01 g glycine 加入 500 ml dH<sub>2</sub>O 溶解，調整 pH 值為 9.5，加水至總體積到 1000 ml)製作含 5% acrylamide 的電泳膠，取一支離心管加入 1.675 ml solution A(30% acrylamide (29% acrylamide + 1% bis-acrylamide) 2.5 ml 4X glycine gel buffer 5.77 ml dd H<sub>2</sub>O、0.005 ml TEMED、0.05 ml 10% APS(10% (W/V) ammonium persulfate)，加完 APS 之後立刻混合均勻並馬上注膠，室溫下靜置 2 小時。取 12  $\mu$ l 的 sample 加入 3  $\mu$ l 的 tracking dye(1 mg bromphenol blue 加入 5 ml ddH<sub>2</sub>O 溶解，再加入 5 ml 甘油混合均勻；bromphenol blue 可當作陰離子系統下的 mobility marker)混合均勻，2921 為純化病毒，取 2  $\mu$ l 加入 10  $\mu$ l DEPC 水稀釋 gp85 蛋白量，再加入 3 $\mu$ l tracking dye 混合均勻。待電泳膠聚合完全後，移除 comb 並以 glycine gel buffer 沖洗 wells，以移除未聚合的 APS。架好直立式電泳槽將 sample load 進 well 中，250 V、15 mA 跑 120 分鐘(MAJOR SCIENCE, MP-250N)。

#### 2. Western Blotting :

準備 western blotter，確定 4 transfer buffer 足夠量，取下 gel，以 semi-wet 方式進行 western blotting，12 V 轉漬 60 分鐘。取 40 ml wash buffer 加入 4 g skim milk 混合均勻製備 blocking buffer，並分裝出 10ml 到兩管離心管中稀釋抗體用，待轉漬結束後取下 NC paper 放入小保鮮盒中，加入剩餘的 blocking buffer，blocking overnight。隔天取出 NC paper 移除 blocking buffer，並以 wash buffer 洗 3 次，每次 10 分鐘；1 抗使用為 1000X mAb22a，取 10  $\mu$ l mAb22a 加入 10 ml blocking buffer 中，混合均勻後倒入保鮮盒中使覆蓋 NC paper，震盪作用 1 小時 移除 1 抗並以 wash buffer 洗 3 次，每次 10 分鐘；2 抗為 1000X goat-anti-mouse HRP conjugate，取 10  $\mu$ l goat-anti-mouse HRP conjugate 加入 10 ml blocking buffer 中，混合均勻後倒入保鮮盒中使覆蓋 NC paper，震盪作用 1 小時 移除 2 抗並以 wash buffer 洗 3 次，每次 10 分鐘，取出 NC paper，稍微風乾後，以 TMB 呈色。

#### Dot immunoassay for gp85 in plasma

將屠宰場取回的雞血液，每 7 個樣本 pool 成一管，因此一場可得 4 管混合樣本進行 DNA extraction 及 PCR，以此方式先大量篩檢雞隻是否有感染 ALV-J。再以 DIA 的方式將

PCR 為陽性的混合樣本找出，並對其中混合的 7 支檢體取其血漿進行 DIA，偵測其血漿中是否有病毒蛋白 gp85。

血漿：66-15、66-16、66-17、66-18、66-19、66-20、66-21、58-15

陽性血漿：3157M2

血漿樣本各取 2.5  $\mu$ l 點至 NC paper 上，靜置 30 分鐘，air dry 完全後放入小保鮮盒中加入 10 ml Gelatin-NET，blocking 1 小時；接著直接加入 2  $\mu$ l mAb22a (一抗使用濃度為 5000X；2  $\mu$ l mAb22a in 10 ml Gelatin-NET)，震盪作用 1 小時；移除 1 抗，以 Wash Buffer 洗 4 次，每次 5 分鐘。2 抗為 2500X goat-anti-mouse HRP conjugate(4  $\mu$ l goat-anti-mouse HRP conjugate in 10ml Gelatin-NET)，震盪作用 1 小時；移除 2 抗，以 Wash Buffer 洗 4 次，每次 5 分鐘。取出 NC paper，稍微風乾後以 TMB 呈色。

## 結果與討論 (含結論與建議)

ALV-J isolate 2921 Virus titers

	Positive	Negative	Cumul pos	Cumul neg	%P
10 <sup>*</sup> -4	5	0	15	0	100
10 <sup>*</sup> -5	5	0	10	0	100
10 <sup>*</sup> -6	4	1	5	1	83.3
10 <sup>*</sup> -7	1	4	1	5	16.7

TCID<sub>50</sub> = 10<sup>\*</sup>-6.5

Native electrophoresis

實驗先進行 15mA 60 分鐘的電泳，預期的蛋白尚在陰極附近，因此以 5% acrylamide gel 進行 15mA 120 分鐘電泳。3157M2 為跑 SDS-PAGE 進行 western blotting 結果為陽性的血漿檢體；66-15~66-21 為 PCR 陽性的血漿檢體。除了 3157M2 其血漿樣本中明顯有預期蛋白 gp85，但 66-15~66-21 血漿樣本轉漬結果不明顯，無法確定是否為非特異性的抗原抗體結合。以 SDS-PAGE 分離血漿蛋白質再進行 western blotting 的結果，除了 3157M2 樣本可在 NC paper 上看到 band 外，其他樣本結果皆無法確定蛋白質存在；而 Native Electrophoresis 分離 gp85，其結果亦只有 3157M2 可得明顯的 band，且此方法較易因受血漿中其他蛋白質的影響，無法像 SDS-PAGE 分離進行 western blotting 的陽性結果，可得較 sharp 的 band；而不論以 SDS-PAGE 或 Native Electrophoresis 分離雞血漿的中 gp85，樣本中都需要有高濃度的 gp85，接下來進行 western blotting 才可得到明確的陽性結果。

Dot immunoassay for gp85



Fig. Dot immunoassay for gp85 in plasma samples

1. 3157M2 為陽性對照，58-15 為陰性對照。
2. 單以 DIA 結果判讀，陽性的血漿有：66-15、66-17、66-18、66-20、66-21、3157M2。

3. 血漿所取的量可減少為 1 ul，防止 sample 量太多暈開，影響結果判讀。
4. DIA 結果可再與 PCR 結果相對照，確定真正的陽性血漿，並評估 DIA 的實驗準確性。

## 行政院國家科學委員會補助國內專家學者出席國際學術會議報告

94 年 5 月 12 日

報 告 人 姓 名	王金和	服 務 機 構 及 職 稱	台大獸醫學系教授
會 議 時 間 地 點	94 年 05 月 24 日至 27 日 Vancouver, Canada	本 會 核 定 補 助 文 號	NSC93-2313-B-002-103
會 議 名 稱	(中文) 第 54 屆西部禽病研討會 (英文) 54th Western Poultry Disease Conference and ACPV Workshop		
發 表 論 文 題 目	(中文) 家禽網狀內皮增生症病毒之分離與鑑定 (英文) ISOLATION AND IDENTIFICATION OF RETICULOENDOTHELIOSIS VIRUSES FROM CHICKENS AND CHICKEN VACCINES		
<p>報告內容應包括下列各項：另附於後頁</p> <p>一、參加會議經過</p> <p>二、與會心得</p> <p>三、考察參觀活動（無是項活動者省略）</p> <p>四、建議</p> <p>五、攜回資料名稱及內容</p> <p>六、其他</p>			

### 一、參加會議經過

於 5 月 23 日由台北出發經 11 小時的飛行，於 5 月 23 日上午 10:00 到達溫哥華，住宿於大會指定的旅館。第一天為 American College of Poultry Veterinarians 的 workshop，主題為 Avian influenza: A constant threat to worldwide poultry。分別由 Dr. Erica Spackman, Dr. Mariano Salem, Dr. Roger Horner, Dr. Michael Lee, Dr. Veronica Leong, Dr. David Swayne, Dr. Armnado Mirande, Dr. Jose Linares, Dr. Stewart Richeie, Dr. Victoria Bowes, Dr. Lloud Spencer, Dr. Derek Janzen 演講各地的禽流感及其控制方式。來自世界各地的學者聚在一起交談，獲得珍貴友誼與專業知識。第二天 The fifty-fourth Western Poultry Disease Conference 大會開始。由各國的禽病學者發表論文。本人被安排在 4 月 26 日上午 8:30 分，當時全場滿座約 200 人，我講完之後的休息時間，有數位學者告訴我 nice talk! 加拿大的 Dr. Spencer 說 nice presentation, 喬治亞大學的 Dr. Guillermo Zavala 問我螢光染色的步驟，當義大利的 Dr. Antonie Zanella 問我問題時他身旁一位年長學者向我說 congratulations! 出國發表時常被稱讚，以此次最多讚美聲。研討會過程我皆全程參，真是獲益良多。

### 二、與會心得

家禽白血病與家禽網狀內皮增生症同屬於反轉錄酶病毒，在台灣地區時常出現臨床病例報告，歷年來一直是本地區重要的雞病之一，造成業界重大損失，此次會議各國亦有相同問題提出。此次研討會給我的啟示，第一、加拿大政府資訊透明，學者沒有隱瞞，如此使他國對其家禽產品具有信心。第二、雖在大城市開會，研討會參與尚很熱烈，會場滿座，討論熱烈。第三、此會議雖為區域性的研討會，但有由世界各國的禽病學者參加，國際氣氛甚濃，為很好的會議。

美國禽病獸醫師協會為國際性的協會，其會員包括全世界的國家，本人即為該協會的國際會員之一。該協會每年於美國西部舉行一次研討會，會員們皆把一年來所做的研究發現及臨床新知提出報告，從事禽病的研究人員齊聚一堂共同研討，與會者皆獲益良多。此年會大多在美國加州開會。今年因配合 Fraser valley 發生禽流感，移師溫哥華。

世界從事家禽白血病與家禽網狀內皮增生症的工作人員不多，有心參加研討會者皆為學有專精者，此為該會議成功之處。時常於報告上發表論文者，於會中可面對面交談，對很多問題可以更深入討論，為開會最大的功能。本人每次皆提出論文，論文發表後。發表論文使從事同種研究的世界級專家了解我們在台所做的研究內容與水準，而願意更深入與我們交換研究經驗。台灣從事禽病研究人員很少，台灣禽病問題繁多，有些問題無法自己解決，需多與國外交流，才可收事半功倍之效。了解國外家禽疾病發生情形有助國內疾病的預防及控制。研究人員走向國際化，對提升我國研究水準有正面的意義。

### 三、參觀考察活動

無

### 四、建議

1. 應多鼓勵國內學者參與此種專題性的研討會，因主題確實較大型研討會，更專精討論。

2. 舉辦研討會不一定要花很多錢請公關公司辦理，熱心的幾個人就可以辦好研討會，不熱心的一推人，全部推給公關公司，反而辦不好。
3. 家禽白血病與家禽網狀內皮增生症問題很多，與會學者都認為將來需投入大量人力研究，國內研究者甚少，應鼓勵國內研究人員多多參與此病情的研究。

#### 五、攜回資料名稱及內容

1. Proceedings of the 54<sup>th</sup> Western Poultry Disease Conference.
2. ACPV workshop: Avian influenza: a constant threat to worldwide poultry.