

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

家禽腺病毒纖毛基因與毒力關係之研究

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫
計畫編號：NSC - 89 - 2313 - B - 002 - 187
執行期間：89年08月01日至90年07月31日

計畫主持人：蔡向榮

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

執行單位：國立台灣大學

中華民國 90 年 10 月 15 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告
家禽腺病毒纖毛基因與毒力關係之研究

計畫編號：NSC 89-2313-B-002-187

執行期限：89年8月1日至90年7月31日

主持人：蔡向榮 台灣大學獸醫學系

計劃參與人員：曾俊憲 林地發 張秀梅 台灣大學獸醫學系

一、中文摘要

以家禽腺病毒 (FAV) 之 CELO 株 penton 之核酸序列所設計之 1 對聚合酶連鎖反應引子，可快速偵測所有 11 株台灣分離株 (TFAV)。依據澳洲分離株 CFA40 之纖毛基因序列設計之 1 對引子，進行纖毛基因之 PCR-RFLP 及序列分析比較 9 株 TFAVs 與 2 株 (CFA3 和 CFA40) 澳洲罹患腺病毒包涵體肝炎分離之 FAV (AFAV) 及 2 株 (FAV 1A 和 FAV 10) 標準株 FAV (SFAVs)，結果 TFAV 可被分成 2 (I 和 II) 大群。雞源 TFAV 與 2 株 AFAVs 同屬第 I 群中之第一小群 (I-1)，而 2 株低病原性之雞源 SFAVs 則屬於第 I 大群中之第二小群 (I-2)。鵠源及鴨源 TFAVs 在纖毛基因之歧異度大，與產蛋下降症病毒 (EDSV) 亦有某種程度上之差異，但與 EDSV 同屬第 II 群。此結果顯示 FAV 纖毛基因可能與 FAVs 對各種動物之病原性有關聯。

關鍵詞：家禽腺病毒、纖毛基因序列、聚合酶連鎖反應

Abstract

We designed a pair of primers based on the sequence of penton of CELO fowl adenovirus (FAV) for polymerase chain reaction (PCR) and found that the PCR can detect all 11 Taiwan strains. Another pair of primers was also designed based on the fiber gene sequence. Utilizing the primers combined with the restriction enzyme profile, the product of PCR from 9 of 11 Taiwan strains were sequenced and compared with each other and the published fiber sequence of CFA3, CFA40, FAV-1A, FAV-10 and EDSV. The data showed that the Taiwan strains could be divided into 2 major groups.

The subgroup-1 in group I composes of all Taiwan strains isolated from chickens and 2 Australia strains, CFA3 and CFA40. Whereas mild pathogenic FAV-1A and FAV-10 was grouped in the subgroup-2 in group I. Strains from pigeons and ducks have significant difference from the FAV isolates from chickens and less different from EDSV. Strains isolated from pigeons and ducks was grouped in the same group, group II. The result also indicate that fiber has some relationship in pathogenicity to different animals in addition to being responsible for variations in virulence in the fowl adenoviruses.

Keywords: Fowl Adenovirus, Fiber Gene Sequence, Polymerase Chain Reaction

二、緣由與目的

許多國家均曾經報告過自臨床上呈現呼吸症狀、包涵體肝炎、包涵體胰臟炎、下痢、產蛋下降等病例分離出家禽腺病毒 (Fowl adenovirus, FAV) [2, 5, 7]。但 FAV 不僅是二次性病原，如在澳洲爆發之腺病毒包涵體肝炎疫情，造成 3 週齡以下之小雞 30% 死亡率 [1]。目前國外分離出之 FAV 強毒分離株均屬於 E 基因型，其他基因型之 FAV 則尚無強毒株出現。

目前 FAV 基因體之 E3 區被懷疑是哺乳動物腺病毒株毒力差異的主因，因為在病毒感染的早期經由 E3 區表現許多並非腺病毒於組織培養時所必須之蛋白質。但家禽腺病毒並未具有相較於人類腺病毒的 E1、E3 和 E4 區，目前懷疑家禽腺病毒強毒與弱毒株之毒力不同，取決於纖毛基因之差異 [6]，FAV-8 之纖毛基因大小約 1.8 Kb，

強毒與弱毒株於纖毛基因中具有一段大小約 1.1 Kb 之高度變異區。本試驗針對上述特性設計供 fiber 基因以 PCR 方式進行增幅之引子，增幅出纖毛這段 1.1 Kb 高變異區之核酸片段，配合核酸序列定序及限制酶片段多型性分析以進一步瞭解不同毒力及不同動物別之 FAV 分離株於 fiber 基因之差異。

三、結果與討論

1. PCR 診斷系統之建立

Penton 基因是 FAV 三種主要抗原中核酸序列最穩定的，因此依據 FAV CELO 株，基因體之 penton 基因序列設計了 FAVP 這對引子，以進行 penton DNA 增幅 (Chiooca et al., 1996)。結果此對引子對於目前自雞、鴨及鵠分離之 FAV，均可增幅大小為 522 bp 之特異性核酸片段，而且並無動物別之差異。此外以 FAVP 這對引子進行 FAV Penton PCR 之敏感性極佳，僅須 100 pg 之 FAV DNA 即可成功增幅出 FAV Penton 之 522 bp 核酸片段。另外將此 11 株 FAV 分離株 FAVP PCR 產物經 DNA 純化、定序後以 BLAST 程式進行序列比對，結果 11 株分離株與 FAVCELO 株之 Penton 基因 DNA 序列符合率高達 95-98%，證實本對引子增幅產物為特異性之 Penton DNA。此外將此段 522 bp 之序列經 Webcutter 2.0 程式 (<http://www.firstmarket.com/cutter/cut2.html>) 分析後選擇適當限制 *Pst* , *Sma* 進行限制切割，結果 11 株分離株與 FAVCELO 株均具有相同之 *Pst* , *Sma* 特異切位，證實 11 株野外分離株與 FAVCELO 株之 Penton 基因 DNA 序列是穩定的。

2. 纖毛基因 PCR 增幅產物限制片段多型性分析 (AFLP)

纖毛為 FAV 強、弱毒株基因差異處，依據 Pallister [6] 報告中之 FAV 強毒株, CFA40 及弱毒株 CFA3 之纖毛序列，設計 FAVF 1/2 這對引子 (1616 bp-2764 bp, total 1,148 bp)，可以將 FAV 強、弱毒株之纖毛基因序

列中差異最大之 1.1 Kb 高度變異區完全增幅出來 (1649 bp-2738 bp, total 1089 bp)，而且僅須 1 ng 之 FAV DNA 即可成功增幅出 1,148 bp 之 FAV 纖毛 DNA。此外並將 CFA3 及 CFA40 之基因序列經 Webcutter 2.0 程式 (<http://www.firstmarket.com/cutter/cut2.html>) 分析後選擇適當限制 進行限制 切割，結果台灣 FAV 分離株不具 *ApaI*、*BamHI*、*DraI*、*EcoRV*、*HaeIII*、*HpaI*、*NdeI*、*NsiI*、*PstI*、*SmaI*、*SspI*、*XbaI*、*XhoI* 等十三種限制酶切位，以 *EcoRI*、*FokI*、*HaeII*、*KpnI*、*MluI*、*NarI*、*SacI*、*SalI*、*Scal*、*StyI*、*XmnI* 等 11 種限制 進行切割，則雞源 FAV 分離株可區分成二大群，其中 TS-C1、2、3、7 及 TS-P1 五株病毒纖毛基因之 PCR 增幅產物限制酶片段多型性比較接近，與其他病毒株之差異較大。由於鴨源分離株雖然已經於鴨初代腎臟中馴化 9 代，但其病毒力價一直無法提高至 10^6 TCID₅₀% 以上，故依 Shinagawa 等 [8] 所述之方法進行病毒基因體 DNA 之萃取時對鴨源分離株一直無法得到大量病毒基因體 DNA，故無法以 FAVF 這對引子對鴨 FAV 分離株增幅出足夠進行纖毛基因限制酶切割之 DNA 量，以致無法以限制酶片段多型性比較之方式對目前自、鴨、鵠子分離之 FAV 纖毛基因進行更詳細之比較與分析。

3. 纖毛基因 PCR 增幅產物核酸序列之比對與分析

將九株 FAV 分離株之纖毛基因 DNA 定序後，將台灣分離株與 FAV 國外分離株及產蛋下降症 (EDS) 之纖毛基因 DNA 序列以 PileUp 多條序列比對程式 (<http://gcg.nhri.org.tw:8002/gcg-bin/seqweb.cgi>)，將這些核酸序列以 global alignment 方式進行比對排列後，以樹狀圖顯示各序列間之相似性。結果所有雞源 FAV 纖毛基因 DNA 序列是比較類似

的，與鴿、鴨分離之 FAV 具有顯著的差距，但台灣之 FAV 分離株中以 TS-C5 與澳洲爆發病毒包涵體肝炎 (IBH) 時之分離株 CFA3、CFA40 最為類似，與其他台灣分離株則具有較大之差異，至於台灣及澳洲分離株與低病原性之 FAV1 及 FAV10 的差距是更明顯的。鴿、鴨分離株則是自成一類，與雞源 FAV 差距極大，但與 EDS 是比較接近。鴿、鴨 FAV 分離株及 EDS 之纖毛基因 DNA 序列與雞源 FAV 具有極大之差異，是另外一群。

將各 FAV 序列以 PileUp 比對時較為相關之 600 bp 長度的核酸序列以 Jukes-Cantor 方法進行演化樹 (Growtree) 程式分析 (<http://gcg.nhri.org.tw:8002/gcg-bin/seqweb.cgi>)，以瞭解九株台灣 FAV 分離株與 4 株國外 FAV 分離株及 1 株 EDS 纖毛基因間之演化關係及避免比對產生誤差，結果與以 PileUp 多條序列比對之結果相似。以演化樹分析之結果顯示，雞源 FAV 之纖毛基因序列與鴿、鴨之 FAV 分離株及 EDS 纖毛基因在演化上有較遠之演化關係。15 條纖毛基因序列以演化樹程式分析後可區分成 2 大群，其中第一大群包括所有國內、外雞源 FAV 分離株。第一大群又可區分 2 小群，其中 FAV 10 (AF007579) 及 FAV 1 (X84724) 之纖毛基因 DNA 序列比較接近，屬第二小群。6 株台灣 FAV 分離株則均與澳洲 CFA3、40 較為類似，屬第一小群。其中 TS-C3、4、5、6、8 均與澳洲 FAV 分離株差距較小。至於 TS-C7 與澳洲 FAV 分離株差距較大，是第二小群中差異較大之病毒株。自鴿和鴨分離之 TS-P1、TS-D1、TS-D2 這 3 株鴿源及與 EDS 纖毛基因於演化上之差距是比較接近，但與其他雞源 FAV 分離株不同群，屬於第二大群(圖 1)。

四、計畫成果自評

本研究結果初步發現家禽腺病毒之纖毛基因在不同病原性毒株間確有差異，值得進一步探討。

五、參考文獻

- [1] Barr, D. A. and P. Scott. Adenovirus and IBH. Proceedings of the Second Pacific Poultry Health Conference, surfers Paradise. Post-graduate Committee in Veterinary Science. University of Sydney. Australia. Proceedings 112. pp, 323-326. 1988.
- [2] Calnek, B. W., H. J. Barnes, L. R. McDougald, and Y. M. saif. Disease of poultry, 10th ed. Iowa State University Press. Ames. Iowa. pp, 607-620. 1997.
- [3] Chiocca, S., R. Kurzbauer, G. Schaffner, A. Baker, V. Mautner, and M. Cotten. The complete DNA sequence and genomic organization of the Avian adenovirus CELO. J. Virol. 70:2939-2949. 1996.
- [4] Erny, K., D. A. Barr, and K. J. Fahey. Molecular characterization of highly virulent fowl adenovirus associated with outbreaks of inclusion body hepatitis. Avian Pathol. 20:507-606. 1991.
- [5] McFerran, J. B., T. J. Connor, and R. M. McCracken. Isolation of adenoviruses and reoviruses from avian species other than domestic fowl. Avian Dis. 20:519-524. 1976.
- [6] Pallister, J. A., J. wright., and M. Sheppard. A single gene encoding the fiber is responsible for variation in virulence in the fowl adenoviruses. J. Virol. 70:5115-5122. 1996.
- [7] Riddell, C., J. V. den Hurk, S. Copeland, and G. Wobeser. Viral tracheitis in gosling in Saskatchewan. Avian Dis 36:158-163. 1992.
- [8] Shinagawa, M., A. Matsuda, T. Ishiyama, H. Goto, and G. Sato. A rapid and simple method for preparation of adenovirus DNA from infected cells. Microbiol. Immunol. 27: 817-822. 1983.

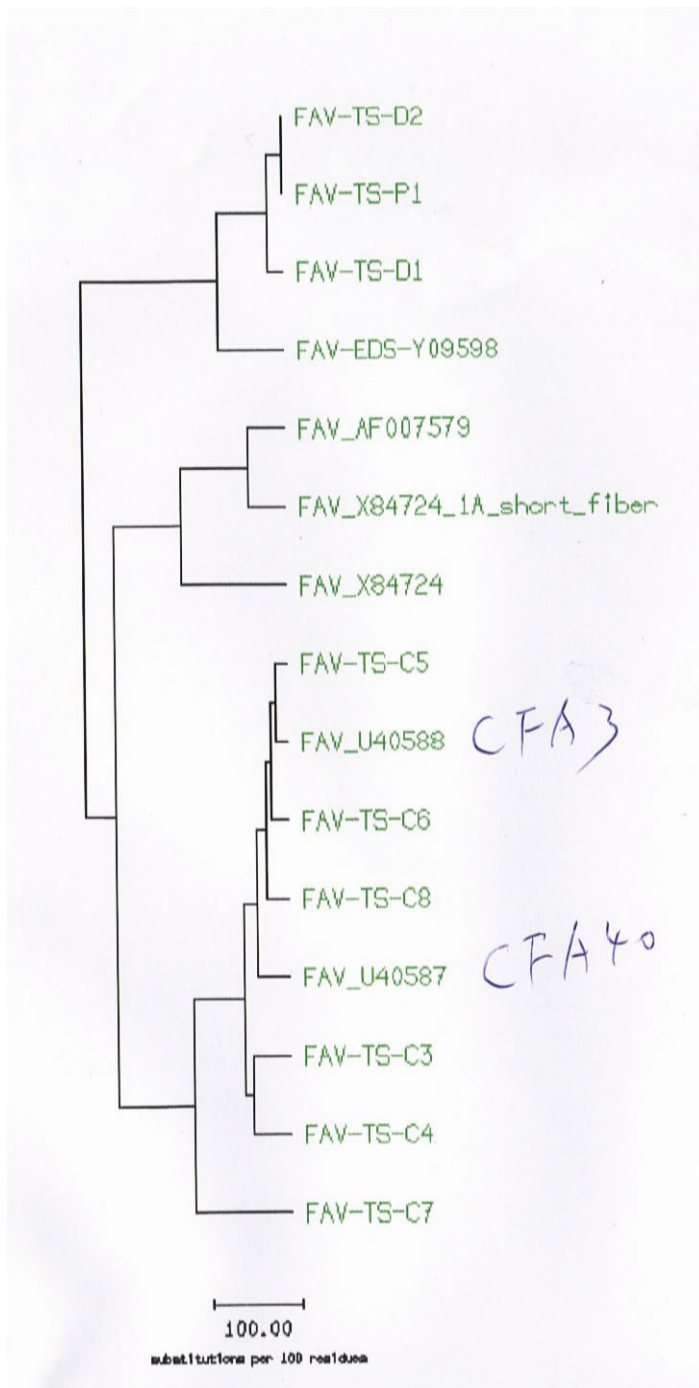


圖 1. 九株台灣家禽腺病毒分離株 (FAV-TS-D1-D2, P1, C3-C7) 之纖毛基因序列與 4 株國外分離株 (FAV-U40587-40588, FAV-X87424, FAV-AF007579) 及產蛋下降症病毒 (FAV-EDS-Y09598) 之纖毛基因序列之基因演化樹狀圖。