

# 產蛋下降症病毒臺灣分離株基因體之限制酶分析

林德田<sup>1\*</sup> 賴秀穗<sup>2</sup> 許天來<sup>1</sup> 林地發<sup>1</sup>  
 楊華章<sup>1</sup> 蘇杰夫<sup>1</sup> 林士鈺<sup>1</sup>

1. 臺灣省家畜衛生試驗所 疫學研究系  
 2. 國立臺灣大學 獸醫學系

**摘要** 臺灣分離產蛋下降症 (Egg drop syndrome, EDS) 病毒 CO 株 DNA 經限制酶 *Sal* I、*Eco*R I、*Bam*HI、*Cla* I、*Xho* I、*Kpn* I、*Hind*III、*Pvu*II、*Pst* I、及 *Sma* I 切割並在 1% 和 2% agarose 下電泳分析，結果顯示出 DNA 切割片段數依序分別為 2 個、4 個、4 個、3 個、4 個、5 個、10 個、11 個、9 個及 4 個。同時利用限制酶切割分析臺灣雞及鴨各 EDS 病毒株 DNA 差異性，結果顯示 7 株病毒 (NO.4、NO.5、NO.7、NO.8、NO.18、CO、JAP-1) 中有 2 株與其他 5 株有顯著的差異，尤其 NO.4 分離株經 *Pst* I、*Sal* I、*Sma* I、*Cla* I 及 *Hind* III 等限制酶切割分析後，均比其他毒株多出一個核酸片段，由此得知 EDS 病毒在鴨與雞分離株之病毒 DNA 在限制酶切割分析上有顯著的差異，另 EDS CO 病毒株限制酶切割圖譜與 JAP-1 病毒則相同。又將 EDS-76 CO 分離株與人類腺病毒第 2 型及家禽腺病毒 NO.9 株進行 *Hind* III 限制酶切割比較分析結果，可發現三種腺病毒的核酸限制酶切割圖譜之核酸片段數與分子大小完全不同。為探討 EDS-76 NO.4 病毒株 DNA 經 *Hind* III 核酸限制酶切割分析所多出一核酸片段之特異性，再利用 Digoxigenin (DIG) 標示 NO.4 與 CO 病毒 DNA，合成核酸探針進行交叉南方轉漬試驗，結果證實二種探針均能檢測出約 3.97 kb 核酸片段。因此，3.97 kb 核酸片段屬於 EDS-76 之基因體 DNA。

**關鍵詞：**產蛋下降症，限制酶

## 緒 言

EDS-76 病毒與其他家禽腺病毒間經血球凝集抑制試驗 (hemagglutination-inhibition test, HI) 可證實具有抗原性的差異性<sup>[4]</sup>，因此 EDS-76 病毒血清型鑑定是以 HI 法為主。由於 EDS-76 病毒株血清型以血清學方法 (HI) 檢測僅有一個血清型，於是許多學者試圖利用核酸限制酶切割之技術來分析其病毒核酸切割片段分子大小<sup>[2]</sup> 及 EDS-76 病毒株間的核酸切割是否有差異，以便提供為病毒分子流行病學之參考，結果發現 EDS-76 病毒株 DNA 切割片段間有差異性的存在<sup>[6]</sup>，尤其發現

EDS-76 Australian 株較 EDS-76 127 分離株 (Isolates 127) 多出一條 0.4 kb 大小核酸切割片段。Zakharchuk 等<sup>[7]</sup> 亦以 8 種限制酶分析 EDS-76 病毒 DNA、牛之腺病毒 DNA 同源性與 EDS-76 之基因圖。

本省於 1982 年發生雞產蛋下降症以來，在免疫預防上僅有適用於產蛋雞的疫苗，並無專屬產蛋鴨使用的疫苗，在本省對於蛋雞防疫相當有效，林與鍾<sup>[1]</sup> 對蛋種雞場之 EDS-76 血清學調查證實血清中 HI 抗體力價高，促使產蛋雞對本病毒之免疫保護效果佳。在蛋鴨對本病之防疫上並無符合鴨免疫注射的疫苗，因此實有必要分析雞

\*抽印本索取者  
 台灣省家畜衛生試驗所

與鴨分離株的病毒 DNA 之差異，並分析鴨與雞分離株在昔日十年間（1985~1996）其病毒在生物演化上可能的轉變，以達對產蛋鴨有效監控與防疫本病之感染。

本省在 1982 年雞群爆發 EDS-76 後經由各部位組織臟器進行病毒分離結果獲得 7 株病毒<sup>[3]</sup>，另外陸續在鴨群分離到 6 株以上的病毒株。因此本試驗為探討臺灣雞鴨分離株間病毒 DNA 限制酶切割分析之差異性，所以取臺灣所分離之 1 株雞分離株及 5 株鴨分離株與 1 株日本株（JAP-1）等進行限制酶切割分析，以探討本病毒 DNA 切割片段之差異，以期增加 EDS-76 臺灣分離病毒株間病毒 DNA 在分子流行病學之資訊，以供本病監控之依據。

## 材料與方法

### 病毒增殖與純化

將各 EDS 病毒分離株（CO, NO.4, NO.5, NO.7, NO.8, NO.18，其中 CO 株為雞分離株，其餘為鴨分離株；所有分離株對雞紅血球具有凝集特性，但對 rat 紅血球並無凝集特性）（ $10^5$  TCID<sub>50</sub> / per mL 病毒液）接種在 10~12 日齡鴨胚胎尿囊腔中（菜鴨蛋），置入 37 °C 孵卵箱中，並在接種病毒 24 小時內淘汰死亡的鴨胚胎，繼續在 37 °C 孵卵箱中觀察 4 天後，移入 4 °C 冰櫃中待 8~10 小時後抽取絨毛膜尿囊液。絨毛膜尿囊液經 3,500 rpm (KUBOTA 5010) 離心 15 分鐘，去除尿囊液中細胞沉渣及收取病毒上清液，再經 25,000 rpm, (himac SCP 85H2, Hitachi) 離心 90 分鐘去除上清液，收取病毒顆粒經 TNE 緩衝溶液（0.01M Tris-HCl, 0.15 M NaCl, 0.001 M EDTA）配製成病毒懸浮（1 : 100）並保存在 - 70 °C 備用。參照 Todd 等法<sup>[6]</sup>進行氯化鈣（CsCl）梯度溶液超高速離心 17 小時後，並收集在 1.33~1.34 浮力密度層之病毒顆粒，再以 TNE 緩衝溶液稀釋及經轉速 25,000 rpm (Hitach, 日本) 離心 90 分鐘，去除上清液及收取病毒顆粒，再以 TNE 緩衝溶液配製病毒懸浮液分裝移置 - 70 °C 備用。

### EDS-76 病毒 DNA 萃取<sup>[6]</sup>

將純化之病毒顆粒使用含 0.5 % sodium dodecyl sulfate (SDS) 及 proteinase K TE 緩衝溶液（10 mM Tri-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0）之細胞溶解液處理，在 37 °C 下感作 2 小時以上，並加入等量 phenol : chloroform : isoamylalcohol (25 : 24 : 1) 溶液，並與病毒液充分倒置數次，再經 12,000 rpm 離心 5 分鐘收取水層部分（water phase），此步驟可重覆 2~3 次。再加入 2 倍量的 100 % ethanol 及 1 / 10 量 3 M sodium acetate 溶液充分混合，移置 - 70 °C 20 分鐘後經轉速 12,000 rpm (TOMY MTX-150) 離心 30 分鐘，倒棄上清液，沉澱物經 70 % ethanol 浸漬洗滌多餘的鹽類，最後以 12,000 rpm 離心 5 分鐘，倒棄上清液及收取 DNA 沉澱物，再以 TE 緩衝溶液或蒸餾水溶解 DNA。經分光比色計（Milton-Roy, Spectronic 1201）檢測定 DNA 量，分裝移置 - 70 °C 下備用。

### 限制酶切割與電泳分析<sup>[5, 6]</sup>

準備與選用各種核酸限制酶包括（*EcoR* I、*Bam* H I、*Kpn* I、*Hind* III、*Pst* I、*Cla* I、*Pvu* II、*Sal* I 及 *Sma* I，將萃取之各病毒 DNA 定量後取其適量 DNA 分別與數種核酸限制酶作用，並分別加入各種限制酶反應液（參閱 Promega 產品操作與成份），其中僅 *Sma* I 限制酶在 25 °C 下作用 4~6 小時以上，其他的限制酶在 37 °C 下作用 2 小時以上。待切割完成分別移置 1 % 和 2 % agarose gel、在電壓 20 伏特歷經 18 小時電氣泳動分析，以比較核酸片段之電泳圖（5，6）。電泳完成後經 0.5 μg / mL 之 ethidium bromide 染色 20~30 分鐘，再經 1 倍 TAE buffer 50X, 242 g Tris-base, 57.1 mL glacial acetic acid, 100 ml 0.5 M EDTA，加蒸餾水至 1000 毫升）脫色 1 小時後，置於波長 300 nm 之 UV transilluminator 中觀察分析 DNA 切割之圖譜與照相紀錄。

### 病毒核酸切割片段數之估算

將已照相之 1 % 和 2 % 瓊膠下病毒核酸切割圖譜比較核酸片段數約略可確認多少核酸片段數。

### 核酸探針製備與南方轉漬<sup>[5]</sup>

參閱取 BM (BOEHRINGER MANNHEIM, 德國) 公司 DIG 標示核酸操作盒, 即取 15  $\mu$ L 之模版 DNA (EDSV DNA, 0.5~3  $\mu$ g, 經 *Hind* III 切割), 在水浴中煮沸 10 分鐘後, 迅即移入冰浴中。在冰浴中分別加入 2  $\mu$ L Hexanucleotide mix; 2  $\mu$ L dNTP mixture; 1  $\mu$ L klenow enzyme。混合均勻後迅速離心 1 分鐘, 並移至於 37  $^{\circ}$ C 中經 60 分鐘以上之作用。加入 2  $\mu$ L 之 0.2 M EDTA (pH 8.0) 溶液中止其反應, 再加入 4 M LiCl 溶液及 75  $\mu$ L 100 % ethanol 混合均勻移置於 -70  $^{\circ}$ C 下 30 分鐘。以 12,000 rpm 離心 30 分鐘, 倒棄上清液, DNA 沉澱塊再以 70 % ethanol 浸漬離心以去除多餘的鹽類。取其 DNA 沉澱塊於減壓低溫濃縮機中乾燥, 最後使用 TE 緩衝溶液溶解 DNA, 移置於 -70  $^{\circ}$ C 中備用。

首先進行試材 DNA 轉移 (此乃將洋菜膠上之 DNA 轉移到 nylon membrane), 即把跑完之電泳之洋菜膠放入含 depurination solution (0.25 M HCl) 的盤子中, 室溫下作用 15 分鐘, 接著放入 denaturation solution (1.5 M NaCl, 0.5 N NaOH) 中, 室溫下作用 30 分鐘, 再放入 neutralization solution (1 M Tris-HCl pH 7.4, 1.5 M NaCl) 中, 室溫下作用 30 分鐘。裁剪與一樣大小之 3 MM 濾紙三張放底層, 接著放膠片再放 nylon membrane, 上面放一疊與膠片一樣大小的衛生紙, 以 10X SSC 為 transfer buffer, 其間須換衛生紙。16 小時後, 取下 nylon membrane 並標上記號, 以 6X SSC 清洗數次, 再放入 UV cross-linker 中, 以  $1.2 \times 10 \mu\text{J} / \text{cm}^2$  的能量照射 nylon membrane, 使固定於 nylon membrane 上。前雜交作用 (prehybridization): 將 Nylon paper 以 2X SSC 潤濕後, 放入含有前雜交液 (0.9 M sodium chloride, 0.09 M sodium citrate, pH 7.0, 6X SSC) 玻璃管中, 置於 65  $^{\circ}$ C 的旋轉烘箱中, 作用 1.5 小時以上。

次之進行雜交作用 (hybridization), 即取 20  $\mu$ L digoxigenin 標示之探針, 沸水中煮 10 分鐘, 立即冰浴 10 分鐘。再以 nylon paper 之面積來算雜交液 (6X SSC, 0.01 M EDTA pH 8.0, 5X Denhardt's solution, 0.1 % (w/v) bovine

serum albumin, 0.5 % SDS, 100  $\mu\text{g} / \text{mL}$  Sheared, denatured salmon sperm DNA) 所加之量 (每 100 平方公分加 5 毫升), 倒掉 prehybridization solution, 將 denature 過的探針加入 hybridization solution 中, 再倒入含 nylon paper 之玻璃管, 65  $^{\circ}$ C 作用 16 小時以上。洗滌 (Washing): 雜交後之 nylon paper, 先以 2X SSC 0.1 % SDS, 於室溫下洗 2 次, 每次 15 分鐘。在 0.1X SSC 0.1 % SDS 於 65  $^{\circ}$ C 中洗兩次, 每次 15 分鐘。填塞 (Blocking): 洗滌後之 nylon paper 先用 buffer I (Maleic acid buffer) 潤溼一下, 再加入 buffer II (0.1 M maleic acid, 0.15 M sodium chloride, 10 % blocking reagent) 中, 於室溫下填塞 30 分鐘。加抗體: 每 15 毫升之 buffer II 中加入 3  $\mu$ L 的 anti-dig. antibody (AP conjugate), 於室溫中作用 30 分鐘。在室溫中用 buffer II 洗滌 nylon paper 兩次, 每次 15 分鐘。再用 buffer I 於室溫中洗滌兩次, 每次 15 分鐘。以 buffer III (0.1 M Tris-HCl, 0.1 M sodium chloride, 50 mM  $\text{MgCl}_2$ ) 浸漬 nylon paper, 再將 nylon paper 放入顯色液中顯色。不要晃動。最後加入 TE solution (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0) 終止其顯色反應。EDS-76 CO 與 NO.4 病毒株病毒 DNA 分別經 *Hind* III 切割後, 再經 DIG 標示以製成核酸探針備用。並可分別進行交叉南方轉漬試驗。

### 結 果

純化 EDS 病毒與 NO.9 之家禽腺病毒經 proteinase K 消化萃取 DNA 後, 將 DNA 溶於 TE 緩衝溶液中, 經光電比色計測  $\text{OD}_{260}$  值確知 DNA 的含量 (1  $\mu\text{g} / \mu\text{l}$ ) 後, 病毒 DNA 分別分裝後置入 -70  $^{\circ}$ C 備用, 並取其適當的 DNA 經 *Hind* III 切割與未切割之 DNA 進行電泳分析以確知 DNA 的純度, 尤其由圖 1 中確知 NO.4 病毒株較其他病毒株之切割 DNA 片段多出一小片段, 其餘 EDS-76 病毒之病毒 DNA 切割片均相同。另外家禽腺病毒 NO.9 DNA 切割片段與 EDS-76 各毒株不同。

將臺灣分離之 EDS-76 病毒 (CO 株) 與家禽腺病毒 (NO.9 株) 及 human adenovirus type 2 DNA 分別以 *Hind* III 限制酶分析, 結果三種

adenovirus DNA 核酸切割片段均有明顯差異，其中 EDS-76 病毒 DNA 有 10 個片段，家禽腺病毒 DNA 則顯現 8 個片段，human adenovirus type 2 有 9 個片段，足見三種腺病毒核酸限制酶切割圖譜均有顯著的差異（圖 2）。

將 EDS-76 CO 病毒株之基因體 DNA 經 *Sal*I 等 10 種核酸限制酶切割分析及以標準分子量之標準曲線比對後，結果獲得限制酶切割片段為 *Eco*R I 有 4 個、*Bam*H I 有 4 個，*Kpn*I 有 5 個，*Hind* III 有 10 個，*Pst*I 有 9 個，*Pvu*II 有 11 個，*Xho*I 有 5 個，*Sal*I 有 2 個，*Sma*I 有 4 個片段及 *Cla*I 為 3 個切割片段（圖 3，表 1）。

為了解由鴨與雞分離之 EDS-76 病毒 DNA 的差異，故選用 *Pst*I、*Sal*I、*Cla*I、*Sma*I、及 *Hind* III 等 5 種核酸限制酶進行 6~7 株 EDS-76 病毒切割圖分析結果如下：(1)由 *Pst*I 限制酶切割分析，NO.4 與其他病毒株有顯著差異多出一個近約 3.7 kb 的 DNA 切割片段（圖 8）。(2)由

*Sal*I 限制酶切割分析結果，CO 與 JAP-1 有相同的限制酶切割圖譜且均切割成二個片段；NO.4、NO.18、NO.8、NO.5 等三株有相同的限制酶切割圖譜且均切割成三個片段；另外與 NO.7 切割成 4 個片段。由此可見，7 株 EDS-76 病毒株經 *Sal*I 限制酶切割可分為三組不同之 DNA 切割圖譜（圖 4）。(3)*Cla*I 限制酶切割分析結果，NO.4、NO.18 與其他 5 株 EDS-76 病毒株不同，NO.4 與 NO.18 均切割成 4 個切割片段，有一個 2.03 Kb 左右的核酸片段，NO.8 有一個 3.02 Kb 左右的核酸，其他病毒株之核酸切割片段僅切成三個（圖 5）。(5)*Sma*I 限制酶切割分析結果，NO.4 限制酶切割與其他 6 株 EDS-76 病株不同，多出 1.97 kb 左右的 DNA 片段，另外 NO.18 較其他病毒株多出 3.02 kb 左右核酸切割片段（圖 6）。在 *Hind* III 切割的 DNA 片段中發現 NO.4 比其他 EDS-76 病毒株多，進行交叉南方轉漬試驗結果證實二種核酸探針均能產生相同的反應（圖 8，圖 9）。

表 1. EDS-76 CO 株病毒 DNA 基因體經 9 種限制酶切割出核酸片段

片段 / 限制酶	<i>Sal</i> I	<i>Eco</i> RI	<i>Bam</i> HI	<i>Cla</i> I	<i>Xho</i> I	<i>Kpn</i> I	<i>Hind</i> III	<i>Pst</i> I	<i>Sma</i> I
A	34.46	19.61	19.62	28.74	25.65	19.58	8.19	9.45	23.13
B	0.55	8.19	12.46	3.23	9.45	9.014	6.46	7.16	8.19
C		7.84	4.17	3.02	1.82	4.08	4.36	4.36	2.60
D		1.19	2.03		0.74	2.41	3.80	4.02	2.28
E							3.13	3.43	
F							1.61	3.34	
G							1.35	2.14	
H							1.32	1.11	
I							1.30	0.71	
J							1.28		

單位：Kilobasc, kb



圖 1. EDS-76 病毒各分離株、家禽腺病毒 (NO.9) 及日本 JAP-1 分離株之病毒 DNA 經 *Hind* III 限制酶切割分析圖。結果顯示 EDS NO.4 株較其他病毒株多出一核酸片段，另 NO.9 病毒株 DNA 切割片段與 EDS 病毒株不相同。

M：由 *Hind* III 切割出的入 DNA 片段

1, 2：EDS-76.CO 株病毒 DNA

5, 6：EDS-76.NO.5 株病毒 DNA

9, 10：EDS-76.NO.8 株病毒 DNA

13~14：家禽腺病毒株 NO.9 DNA

偶數行：經 *Hind* III 切割之病毒 DNA

3, 4：EDS-76.NO.4 株病毒 DNA

7, 8：EDS-76.NO.7 株病毒 DNA

11, 12：日本 JAP-1 株病毒 DNA

奇數行：未經 *Hind* III 切割之病毒 DNA

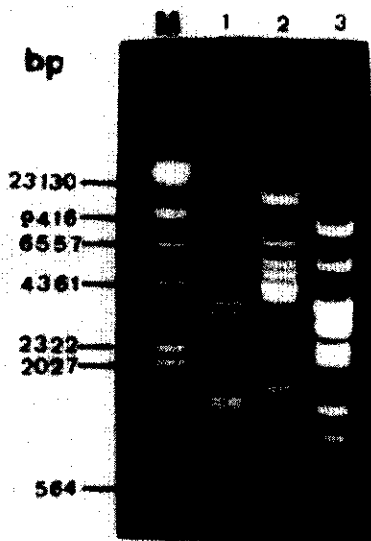


圖 2. EDS-76 病毒 CO 株、家禽腺病毒 NO.9 株與 human adenovirus type 2 病毒之 DNA 經 *Hind* III 限制酶切割與電泳分析。結果顯示三者之限制酶切割圖譜有極大的差異性。

M：由 *Hind* III 切割出的  $\lambda$  DNA 片段。

2. 家禽腺病毒 NO.9 株病毒 DNA。

1. EDS-76 CO 株病毒 DNA。

3. Human adenovirus type 2 病毒 DNA。

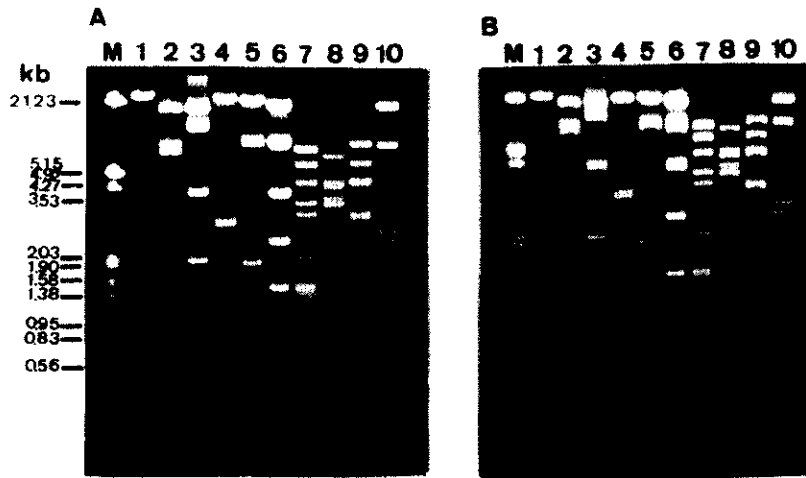


圖 3. EDS-76 CO 株病毒 DNA 經限制酶切割與電泳分析。20 V, 18 小時。顯示 10 種限制酶切割出之病毒 DNA 片段。

M : 由 *EcoRI* / *Hind III* 切割出的  $\lambda$  DNA 片段。

- |                  |                   |                    |                  |
|------------------|-------------------|--------------------|------------------|
| 1 : <i>Sal</i> I | 2 : <i>Eco</i> RI | 3 : <i>Bam</i> HI  | 4. <i>Cla</i> I  |
| 5. <i>Xho</i> I  | 6. <i>Kpn</i> I   | 7. <i>Hind</i> III | 8. <i>Pvu</i> II |
| 9. <i>Pst</i> I  | 10. <i>Sma</i> I  | A : 1 % Agarose    | B : 2 % Agarose  |

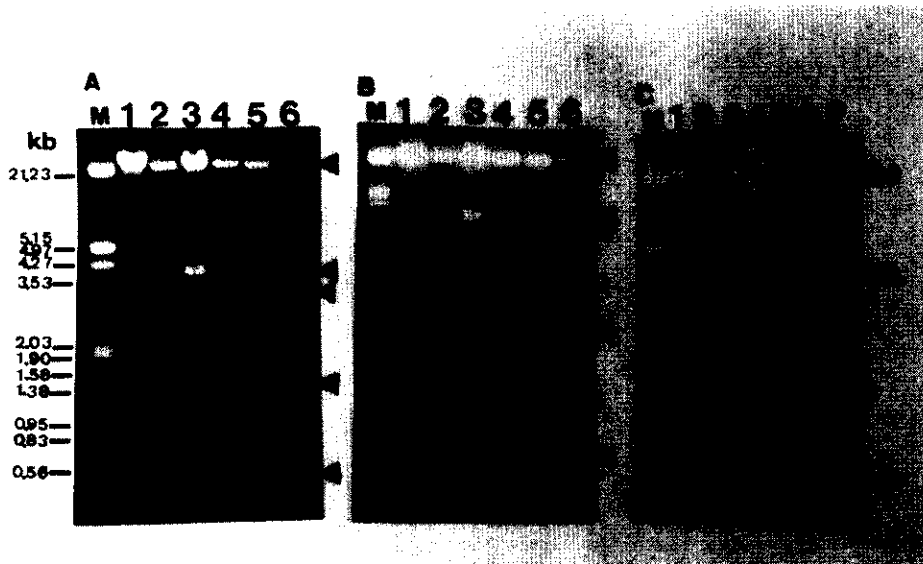


圖 4. EDS-76 各株病毒 DNA 經 *Sal* I 限制酶切割與電泳分析。20 V, 18 小時，1 % agarose (A, C) 和 2 % agarose (B)。顯示 CO 與 JAP-1 有相同 DNA 切割片段；NO.4、NO.5、NO.8 與 NO.18 有相同 DNA 切割片段；NO.7 有 4 個 DNA 切割片段。箭頭所示及 a, b, c 為 DNA 切割片段。

M : 由 *EcoRI* / *Hind III* 切割出的  $\lambda$  DNA 片段

- |                          |                          |
|--------------------------|--------------------------|
| 1 : EDS-76 CO 株病毒 DNA    | 2 : EDS-76 NO.4 株病毒 DNA  |
| 3 : EDS-76 NO.5 株病毒 DNA  | 4 : EDS-76 NO.7 株病毒 DNA  |
| 5 : EDS-76 NO.8 株病毒 DNA  | 6 : EDS-76 NO.18 株病毒 DNA |
| 7 : EDS-76 JAP-1 株病毒 DNA |                          |

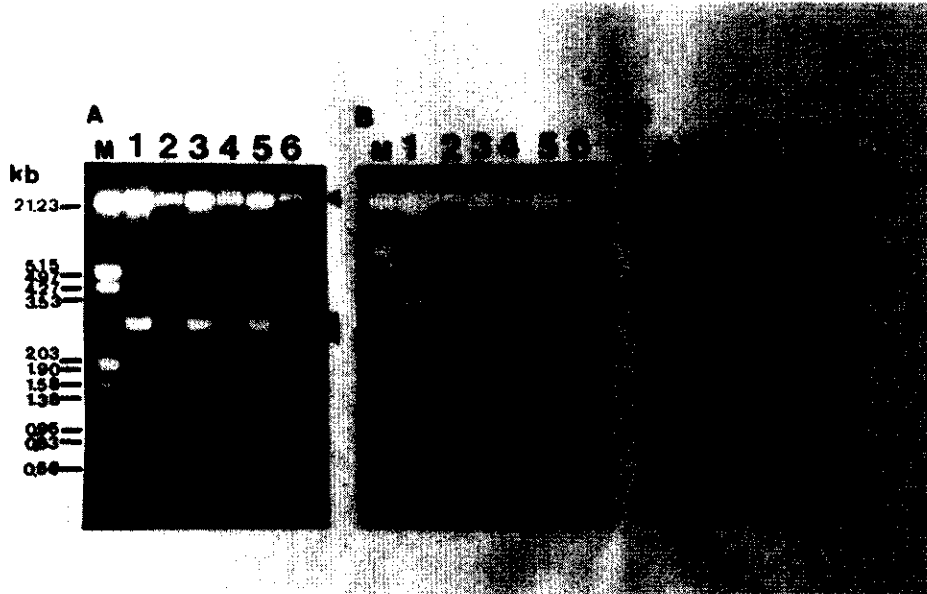


圖 5. EDS-76 病毒 DNA 經 *Cla* I 限制酶切割與電泳分析。20 V, 18 小時, 1% agarose (A, C) 和 2% agarose (B)。顯示 NO.4 病毒株經限制酶切割成 3 個 DNA 核酸片段, 其餘 CO、NO.5、NO.7、NO.8、NO.1 及 JAP-1 皆切割成 2 個核酸片段。箭頭所示及 a, b, c, 為 DNA 切割片段。

M: 由 *Eco*RI/*Hind* III 切割出的  $\lambda$  DNA 片段。

- |                         |                         |
|-------------------------|-------------------------|
| 1: EDS-76 CO 株病毒 DNA    | 2: EDS-76 NO.4 株病毒 DNA  |
| 3: EDS-76 NO.5 株病毒 DNA  | 4: EDS-76 NO.7 株病毒 DNA  |
| 5: EDS-76 NO.8 株病毒 DNA  | 6: EDS-76 NO.18 株病毒 DNA |
| 7: EDS-76 JAP-1 株病毒 DNA |                         |

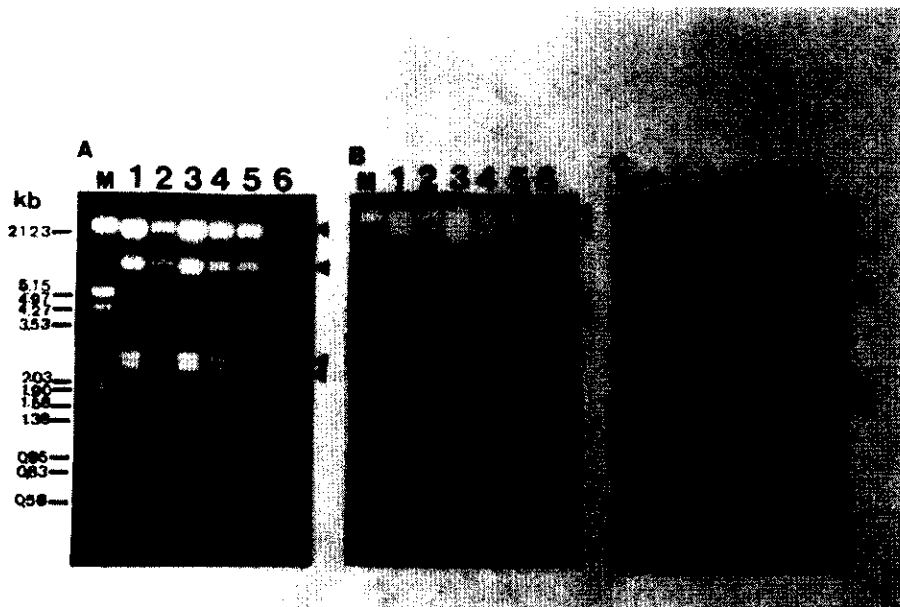


圖 6. EDS-76 病毒 DNA 經 *Sma* I 限制酶切割與電泳分析。20 V, 18 小時, 1% agarose (A, C) 和 2% agarose (B)。顯示 NO.4 病毒株之病毒 DNA 切割片段比其他病毒分離株多出一條大約 2.3 kb 之小片段。箭頭所示及 a, b, c, d 為 DNA 切割片段。

M: 由 *Eco*RI/*Hind* III 切割出的  $\lambda$  DNA 片段。

- |                         |                         |
|-------------------------|-------------------------|
| 1: EDS-76 CO 株病毒 DNA    | 2: EDS-76 NO.4 株病毒 DNA  |
| 3: EDS-76 NO.5 株病毒 DNA  | 4: EDS-76 NO.7 株病毒 DNA  |
| 5: EDS-76 NO.8 株病毒 DNA  | 6: EDS-76 NO.18 株病毒 DNA |
| 7: EDS-76 JAP-1 株病毒 DNA |                         |





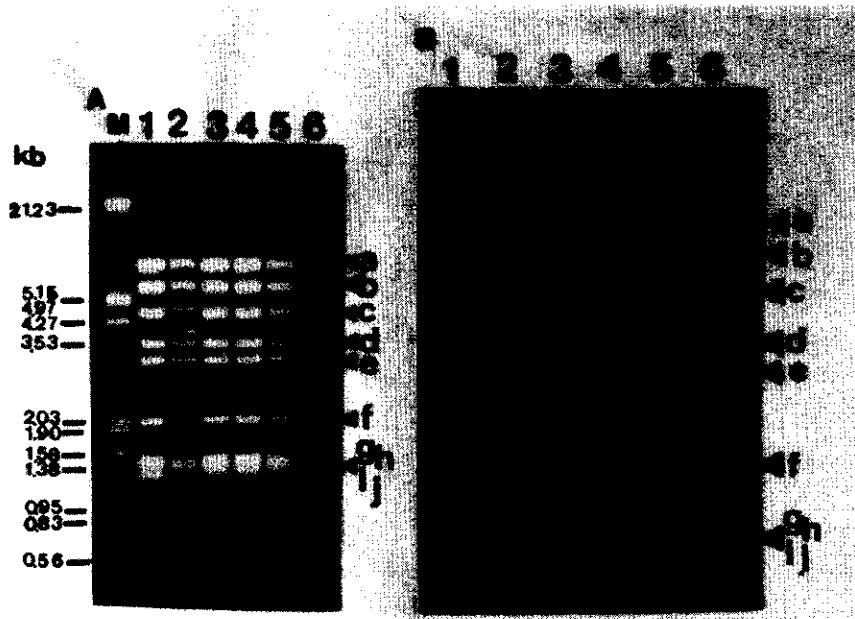


圖 9. EDS-76 各毒株病毒 DNA 經 *Hind* III 限制酶切割後以 NO.4 株 DNA 為探針進行與南方轉漬結果圖。18V, 20 小時, 1% agarose gel。A 圖顯示 NO.4 病毒株之 DNA 切割圖較 CO 病毒株多出 3.97 kb DNA 片段。且 B 圖顯示 3.97 Kb DNA 屬於 EDS-76 病毒之特異性 DNA。箭頭所示為 DNA 切割片段。

M: 由 *Eco*RI / *Hind* III 切割出  $\lambda$  DNA 片段

- 1: EDS-76 CO 株病毒 DNA
- 3: EDS-76 NO.5 株病毒 DNA
- 5: EDS-76 NO.8 株病毒 DNA

- 2: EDS-76 NO.4 株病毒 DNA
- 4: EDS-76 NO.7 株病毒 DNA
- 6: EDS-76 NO.18 株病毒 DNA

A: ethidium bromide 染色

B: 南方轉漬

## 討 論

EDS CO 株、家禽腺病毒 NO.9 與 human adenovirus serotype 2 等三種病毒株之 *Hind* III 限制酶切割分析比較中，很明顯的三者 DNA 圖譜則完全不同，由此可知不同感染宿主的腺病毒之際限制酶切割圖譜則完全不同，且差異很多，因此利用本核酸限制酶切割技術可區別其他家禽腺病毒。尤其 Zsak 和 Kisary<sup>[8]</sup> 利用 *Bam*H I 及 *Hind* III 二種限制酶進行 17 種家禽腺病毒 DNA 切割分析，結果分成 5 群家禽腺病毒。並利用 *Eco*R I、*Bam*HI、*Hind* III、*Bgl* I、*Bgl*III、*Hpa* I 及 *Pst* I 等限制酶切割比較 EDS-76 B8 / 78 病毒

株與 CELO ( Chick embryo lethal orphan ) 家禽腺病毒，結果 EDS-76 DNA 上有 48 個切割點，另 CELO 病毒 DNA 可切割成 61 個核酸片段。因此我們可以證實臺灣分離之 EDS-76 CO 株與家禽腺病毒 NO.9 之 DNA 切割片段完全不同，此與前述利用限制酶切割技術分析 EDS-76 與其他家禽腺病毒 DNA 切割片段之差異相符合。因此由試驗結果確認核酸限制酶切割技術可應用於 EDS-76 與其他家禽腺病毒或哺乳類腺病毒核酸之區別。

本省在 1982 年以來所分離之雞、鴨之 EDS-76 病毒株經筆者應用瓊脂膠免疫沉澱法 ( agar gel immunodiffusion, AGI ) 與 HI 交叉血清學試驗證實同屬一血清學上的反應，因此，直到目前研究 EDS 之病毒株證實僅有一個血清型，因此無法根

據血清學方法來鑑定 EDS-76 病毒株之差異。因此利用限制酶切割技術以分析臺灣分離 EDS 病毒株之差異性結果 EDS-76 病毒 NO.4 之鴨分離株與雞分離株多出一小 DNA 片段。Todd *et al*<sup>[6]</sup> 亦能將英國 9 種 EDS-76 病毒雞分離株與鴨分離株區別出來，另外亦與 Australia 分離株有差異。本試驗結果得知 EDS-76 病毒 NO.4 株與其他鴨、雞 EDS 分離株以核酸的切割圖譜可以明顯的區分，因此由分析臺灣分離株病毒基因體之差異與國外文獻分析報告，確認本核酸限制酶切割技術可鑑別其他 EDS-76 病毒分離株之差異。將臺灣雞分離 EDS-76 病毒 CO 株經多種限制酶切割分析核酸分子片段數與 Todd, *et al*<sup>[6]</sup> 分析 EDS 127 株 (32.60 kb) 及 Kisary 和 Zsak<sup>[2]</sup> 分析之 B8/785 株 (34.2 kb) 相近。

利用限制酶分析 EDS 病毒株 DNA 差異，雖報告文獻不多，但由幾篇報告指出同一地區由雞、鴨分離 EDS-76 病毒株就有差異性存在，因此利用該項限制酶切割技術對 EDS 病毒株差異性之分析有其重要性，本技術不但可應用於 EDS 與其他家禽腺病毒之鑑別，而且亦可區別分析 EDS-76 病毒分離株之差異。

Zakharchuk *et al.*<sup>[7]</sup> 成功利用南方轉漬試驗分析 EDS-76 127 株與牛腺病毒 DNA 具有同源性，由此可知，利用南方轉漬應可分析不同腺病毒 DNA 之間同源性與否。因此由 *Hind* III 限制酶切割分析各病毒株結果之 NO.4 病毒株比其他病毒株多出一 DNA 片段，經 DIG 標示 EDS NO.4 及 CO 株之病毒 DNA 核酸探針交叉南方轉漬證實均能產生 3.97 kb 左右的雜交帶反應，表示是 EDS-76 病毒本身的核酸基因體，並非是污染其他病毒之核酸，此乃 EDS NO.4 之基因體上多一限制酶切割部位。可證實 3.97 kb 之 DNA 片段與 EDS CO 病毒株之 DNA 是屬於同源性。經南方轉漬試驗 EDS 臺灣分離株間均屬於同源性 DNA 序列。

## 參考文獻

1. 林茂勇，鍾怡春。產蛋下降症 (EDS-76) 死毒疫苗在雞免疫之抗體反應及灣雞隻之 EDS 抗體力價調查。臺灣畜牧獸醫學會會報。65 : 55 - 62, 1995.
2. Kisary, J. and Zsak, L. The molecular weight of the egg drop syndrome (EDS) avian adenovirus (strain B8 / 78) DNA estimated by digestion with restriction endonuclease enzyme. Arch. Virol. 65 : 63 - 65, 1980
3. Lu, YS., Lin, DF. Tsai, HJ. Lee, YL. Chui, SY. Lee, C. and Huang, ST. Outbreaks of egg drop syndrome-1976 in Taiwan and isolation of the etiological agent. J. Chin. Soc. Vet. Sci. 11 : 157 - 165, 1985
4. McFerran, JB. and Connor, TJ. Further studies on the classification of fowl adenoviruses. Avian Dis. 21 : 585 - 595, 1978
5. Sambrook, J., Fritsch, EF, Maniatis, T. Molecular cloning : a laboratory manual. 2nd. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
6. Todd, D., McNulty, MS. and Smyth, JA. Differentiation of egg drop syndrome virus isolates by restriction endonuclease analysis of virus DNA. Avian Pathol. 17 : 909 - 919, 1988
7. Zakharchuk, AN., Kruglyak, VA. Akopian, TA. Naroditsky, BS. and Tikchonenko, TI. Physical mapping and homology studies of egg drop syndrome. Arch. Virol. 128 : 171 - 176, 1993
8. Zsak, L. and Kisary, J. Studies on Egg Drop Syndrome and chick embryo lethal orphan (CELO) avian adenovirus DNAs by restriction endonuclease *Bam* HI and *Hind* III. Intervirology 22 : 110 - 114, 1981

## Differentiation of egg drop syndrome virus in Taiwan isolates by restriction endonuclease analysis

Der-Tyan Lin<sup>1\*</sup> Shioh-Suey Lai<sup>2</sup> Tien-Lai Hsu<sup>1</sup> Dih-Fa Lin<sup>1</sup>  
Huar-Jarng Yang<sup>1</sup> Jei-Fu Su<sup>1</sup> Shih-Yuh Lin<sup>1</sup>

1. Taiwan Animal Health Research Institute 376 Chung-Cheng Rd. Tansui, Taipei, 251 Taiwan, ROC
2. Department of Veterinary Medicine, National Taiwan University, 142 Chou-Shan Rd. Taipei, 106. Taiwan, ROC

**SUMMARY** Egg drop syndrome virus ( EDSV ) DNA of a Taiwan chicken isolate, the CO strain, was analysed and cleaved by ten endonucleases, ie., *SalI*, *EcoRI*, *BamHI*, *ClaI*, *XhoI*, *KpnI*, *Hind III*, *PvuII*, *PstI* and *SmaI*. DNA fragments were analyzed and electrophoresed in the 1 % and 2 % agarose. The numbers of fragments were found 2 ( *SalI* ), 4 ( *EcoRI* ), 4 ( *BamHI* ), 3 ( *ClaI* ), 4 ( *XhoI* ), 5 ( *KpnI* ), 10 ( *Hind III* ), 11 ( *PvuII* ), 9 ( *PstI* ), 4 ( *SmaI* ), respectively. Seven EDSV isolates from chicken and ducks ( NO.4, NO.5, NO.7, NO.8, NO.18, CO and JAP-1 ), including six Taiwan isolates and one Japan isolate ( JAP-1 ), were compared by endonuclease analysis of virus DNA. Two of them were showed the distinctive difference from other five isolates, especially the strain NO.4 which having one extra DNA fragment ( 3.97 kb ) with *PstI*, *SalI*, *SmaI*, *ClaI* and *Hind III*. On the other hand, the DNA fragment pattern of the CO strain was showed to be identical to that of the JAP-1 strain. Comparing the DNA fragment patterns treated with *Hind III*, the EDSV CO strain, human adenovirus serotype 2 and avian adenovirus ( No. 9 ) were showed difference. For further study the extra DNA fragment of the CO strain treated by *HindIII*, two digoxigenin-labeled probes from the NO. 4 and CO strain genomic DNA were made. Using both probes, the extra 3.97 Kb DNA fragment in NO. 4 strain were detected by cross southern blotting technique. This indicated that homologous DNA sequence was present between EDS strains of CO and NO.4

**Keywords:** Egg drop syndrome , Restriction endonuclease

---

\*Corresponding author

Taiwan Animal Health Research Institute. Taiwan, R. O. C.