

產蛋下降症病毒臺灣分離株診斷用核酸探針的建立

林德田^{1*} 賴秀穗² 許天來¹ 蘇杰夫¹ 林士鈺¹

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 為建立核酸探針檢測產蛋下降症病毒 (Egg drop syndrome virus, EDSV)，利用 pBlueScript II KS (+/-) 載體進行 EDSV DNA 選殖，獲得 8 個片段的選殖株，其中末端基因片段並未獲得。選用 1.5 kilobase pairs 大小的選殖 DNA 片段做為核酸探針，並經非放射性 Digoxigenin (DIG) 標識，標識的核酸探針進行南方轉漬可以特異性的測出六株 EDS-76 病毒 (CO、NO.4、NO.5、NO.7、NO.8 及 NO.18)，但無法檢測到家禽腺病毒 NO.9 株。利用南方轉漬及核酸雜合試驗可檢測到 100 pg 的 EDS-76 病毒 DNA 及檢測出 EDS 病毒感染 1 至 25 小時鴨胚胎纖維母細胞之病毒 DNA，因此本核酸探針可應用於檢測 EDS 病毒 DNA。

關鍵詞：產蛋下降症，核酸探針

緒 言

EDS-76 在傳統診斷上以病毒分離為主，主要是以鴨鵝胚胎或胚組織細胞培養為主，另外雞胚胎肝細胞亦可供為病毒的分離與增殖^[1]，病毒分離須要耗費較長的時間方能獲得結果。應用血球凝集抑制試驗 (hemagglutination-inhibition test, HI)、酵素連結免疫附法 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)、血清中和試驗 (serum neutralization, SN)、免疫擴散法 (double immunodiffusion, DID) 及間接螢光抗體法 (indirect fluorescent antibody, IFA) 均用來檢測 EDS-76 病毒抗體，雖然這些方法對 EDS-76 抗體的檢出很敏感^[2]，但仍有些缺失如 ELISA 易產生非特異性反應，而 IFA 應用於大量樣品檢測時則需耗費大量人力及物力^[2]。1988 年 Tenover^[7] 已利用核酸探針 (Nucleic acid probes) 檢測臨床病例，Key et al^[6] 利用非放射性標示核酸探針在雞傳染性喉頭氣管炎 (infectious

laryngotracheitis, ILT)，而 Hammermueller 等^[4] 亦利用墨點法 (dot blot method) 偵測 Fowlpox 病毒感染細胞。本核酸探針可取代傳統上必須增殖大量病毒，方能應用於諸如 ELISA 或其他傳統上的需要大量病毒方能診斷之弊，況且 EDS-76 一般在家禽輸卵管之含病毒量較高，若能在感染適期中利用本核酸探針加以檢測則可輔助傳統獸醫學診斷之缺失。

材料與方法

EDS-76 病毒基因體片段選殖

參閱 Promega 公司操作手冊將 XL1-Blue 或備用形質轉形 (transformation) 之菌株培養於 LB / TC 培養基 (LURIA-BERTANI medium, 15 % agarose、12.5 µg / mL tetracycline) 中，於 37 °C 恆溫箱中旋轉式隔日培養 (16~18 小時)，並收取菌株保存及備為形質轉型之宿主細胞。取

*抽印本索取作者
台灣省家畜衛生試驗所

3 μg (10 μL) 之 EDS-76 第 CO 株之 DNA，加入 5 U *Hind* III 限制酶及 10 X 反應液使最終體積為 50 μL 的情況下於 37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 2 小時以上，再加入等量核酸萃取液之 phenol : chloroform : isoamylalcohol (25 : 24 : 1) 萃取 2 次。同時取 1 μg (1 μL) 之 pBlueScript II KS (+ / -) 載體，加入 25 units / 5 μL 之限制酶及 10 X 反應液，在最終體積 50 μL 的情況下於 37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 2 小時以後，再加入 1 unit (1 μL) 之 calf intestinal phosphatase (CIP)，放置於 37 $^{\circ}\text{C}$ 繼續作用 1 小時，以等量核酸萃取液之 phenol : chloroform : isoamylalcohol (25 : 24 : 1) 萃取 2 次。將處理完備之 EDS-76 CO 株 DNA 與載體 DNA 混合後再加入 0.1 倍體積的 3 M sodium acetate 及 2 倍體積的 100 % ethanol 沈澱 DNA，混合均勻後在 -70 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱作用 30 分鐘後，以轉速 12,000 rpm 離心 30 分鐘以沈澱 DNA，再以 70 % 的酒精浸漬一次以去除多餘的鹽類。將沈澱的 DNA 在減壓真空濃縮機上乾燥，而後再將其溶於 ligation buffer 中，並加入 5 U 的 DNA T4 ligase 使其最終體積為 20 μL ，混合均勻後於 12 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中作用 16 小時，以供為轉形 (transformation) 之用。

competent cells 之製備與轉形，參閱^[3]及 Promega 操作手冊，取一個單一 XL1-Blue 菌落，接種於 2 mL LB / TC 培養液 (12.5 μg / mL tetracycline) 置於 37 $^{\circ}\text{C}$ 、150 rpm 旋轉式轉盤中隔夜培養。再取 500 μL 菌液接種到新鮮的 50 mL LB / TC 培養液中，置於 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴振盪培養 2 小時 (此時 OD_{600} 值約在 0.3~0.6 之間，即細菌濃度約在 10^8 cells / ml)。將此細菌增殖完成的 XL1-Blue 在冰浴中 30 分鐘後離心以去除上清液。再將細菌懸浮於 5 mL 之 TSB 緩衝液 (100 mM CaCl_2 ，70 mM MgCl_2 ，40 mM sodium acetate, pH 5.5) 中，置於冰浴上 20 分鐘，再次離心，重新再一次懸浮於 5 mL 之 TSB 緩衝液，置於冰浴中過夜，將細菌小分裝置於 -70 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱，此時可供為 DNA 轉形作用。取 100 μL 之 XL1-Blue competent cells，加入經過 ligation 之 20 μL DNA 混合均勻後置於冰浴上 30 分鐘，再快速置於 42 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 2 分鐘後再放入冰浴中 1 分鐘。已轉形完成細菌加入 0.9 mL LB 培養液，

再置於 37 $^{\circ}\text{C}$ 旋轉式轉盤中培養 1 小時，將此培養液塗在含有 LBA / APTC agar 50 μg / mL ampicillin, 12.5 μg / mL tetracycline) 平板上，每一個直徑 9 cm 長之培養盤塗抹 100 μL 轉形細胞，倒置於 37 $^{\circ}\text{C}$ 隔夜培養，觀察白色菌落之出沒情形。最後篩選白色菌落進行快速選殖^[5]及電泳分析：將轉形後之白色菌落培養在 LBA / APTC 培養盤上，隔日以無菌之牙籤將每格編號的菌刮下，取 100 μL 之 Lysis solution (50 mM Tris-HCl, pH 12.6 : 3 % SDS) 混合均勻，作用至有黏稠 DNA 生成為止，室溫中靜置 5 分鐘，再加入等量之核酸萃取液 phenol : chloroform : isoamylalcohol (25 : 24 : 1) 反轉 50 次以上，以轉速 12,000 rpm 離心 5 分鐘。取上層含質體 DNA 之水層 15 μL ，於 1 % agarose 中，在 100 V 下電泳 30 分鐘，並且以 ethidium bromide 染色照像記錄。

少量質體製備

參閱與修飾 Promega 操作手冊即鈎取單一菌落培養於 5 mL LBA / APTC 培養基 (50 μg / mL ampicillin, 12.5 μg / mL tetracycline)，放置在 37 $^{\circ}\text{C}$ 旋轉式細菌培養盤中，培養 16~18 小時後收取之。取 1.5 毫升菌液放入微量離心管中，離心 12,000 xg，1 分鐘。完全倒乾上清液，使之得到乾燥之菌塊 (pellet)。此菌塊以 100 μL 冰冷溶解緩衝溶液 (ice-cold lysis buffer : 20 mM Tris-HCl, pH 8.0 : 10 mM EDTA : 50 mM glucose) 沖散震盪菌塊。在室溫中靜置 5 分鐘後，再加入 200 μL 新鮮溶液 (0.2 N NaOH, 1 % SDS)，倒置數次使之充份混合後，靜置在冰浴中 5 分鐘。加入 150 μL 冰冷醋酸鉀溶液 (ice-cold potassium acetate, pH 4.8 : 60 mM 5 M potassium acetate, 11.5 mL glacial acetic acid : 28.5 mL H_2O)，倒置數次或輕微震盪 10 秒鐘使之完全混合均勻，再置於冰浴中 5 分鐘。離心 12,000 xg 5 分鐘後，將上清液轉置到新鮮微量離心管中，避免抽取到白色沉澱物。加入適量 DNase-free RNase A 使之最後濃度為 20 μg / mL，靜置在 37 $^{\circ}\text{C}$ 中 20 分鐘。加入等量的 Saturated phenol / chloroform，經 1 分鐘震盪，離心 12,000 xg 5 分鐘。將上層之水層部份轉移至新鮮乾淨之微量

離心管中，再加入以等量的 chloroform : isoamylalcohol (24 : 1) 經 1 分鐘震盪，離心 12,000 xg 5 分鐘。取上層水層部份轉置新鮮微量管中，再加入 2.5 倍量的 100 % 乙醇，充份混合放置在乾冰 5 分鐘或靜置在 -20 °C 隔夜以沉澱 DNA。經 5 分鐘之 12,000 xg 離心，再以冰冷 70 % 乙醇充份浸漬 DNA 之沉澱塊，而後在冷凍乾燥減壓濃縮機中乾燥。最後以 10 µL 滅菌的蒸餾水充份溶解 DNA 沉澱塊（如此約可獲得 1~4 µg DNA 的量）。存放在 -70 °C 備用。取少量進行電泳分析。

電泳膠片中回收核酸片斷

參照 gel extraction kit / 150 (JETSORB)，即切取 100 毫克含 DNA 之膠片，轉置到微量離心管中。加入 300 µL buffer A1 及 10 µL JETSORB 懸浮液。震盪後置於 50 °C 恆溫箱中感作 15 分鐘，每隔 3 分鐘取出充份混合均勻經 12,000 xg 離心 1 分鐘，完全去除上清液，取其沉澱塊。加入 300 µL buffer A1 洗滌或懸浮 pellet，輕微震盪或輕敲使之再懸浮。再加入 300 µL 之 buffer A2 充份洗滌或懸浮 pellet，置入真空中乾燥 JETSORB Pellet。加入 20 µL TE buffer (10 mM Tris / HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) 再懸浮 pellet，靜置在 50 °C 中感作 5 分鐘，可再重覆一次。經 12,000 xg 離心 1 分鐘，將上清液轉置到微量離心管中，即可獲得回收之 DNA。

感染細胞之病毒核酸萃取^[8]

將鴨胚胎纖維細胞培養於表面積 25 cm² 之細胞培養瓶中，放置在 37 °C 培養箱中經 24~36 小時之靜置培養。使用 5~10 TCID₅₀ 的 EDS-76 病毒感染 DEF 細胞 (5~10 TCID₅₀ virus / per DEF cell)，在病毒感染細胞 35~40 小時後出現多數細胞病變 (cytopathic effects, CPE) 時，則倒棄細胞培養液後再加入細胞溶解液 (Lysis buffer, 1 % SDS, 10 mM EDTA, pH 7.5)，移置室溫感作 10 分鐘。將感作完全之細胞溶解液移置塑膠製的離心管中，再移置 37 °C 恆溫箱作用 5 分鐘，作用期間必須倒置翻轉 20 次。繼之加入 0.25 毫升之 5 M NaCl 溶液混合均勻，

並置放在 37 °C 水浴中感作 5 分鐘，再移置冰浴中作用 3 小時或 4 °C 隔夜。最後以 15,000 rpm 離心 15 分鐘，此時可去除大多數細胞的 DNA，並收取上清液。

前述收集之上清液加入等量的飽和 phenol 溶液 (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0, TE buffer) 混合均勻，並放置在室溫中作用 10 分鐘後經 12,000 rpm 離心 10 分鐘，倒棄水層部分 (water phase)，並收集 phenol 層與中間層 (inter phase)。再加入等量的 TE 緩衝溶液混合均勻，經 12,000 rpm 離心 10 分鐘，以去除殘餘之 RNA 與細胞的 DNA。當收取 phenol 層與中間層後加入 1.5 倍量的 100 % Ethanol。置放在 -70 °C 下 20 分鐘後，經 12,000 rpm 離心 20 分鐘，倒棄上清液，並加入 0.25 毫升含 proteinase K 之 TE 消化液 (100 mM NaCl、0.5 % SDS 及 125 µg proteinase K) 在 37 °C 下作用 2 小時以上，直至不溶性物質消失。再經等量核酸萃取液之 phenol : chloroform : isoamylalcohol (25 : 24 : 1) 萃取核酸，及離心收取水層部份。最後加入 100 % ethanol 沉澱與 70 % ethanol 浸漬病毒 DNA。

Digoxigenin 標示核酸探針製備

參照 BM (BOEHRINGER MANNHEIM, 德國) 公司之 Digoxigenin-labeled kit 操作，取 15 µL 之模版 DNA (1.5 kb DNA, 0.5~3 µg)，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 µL Hexanucleotide mix ; 2 µL dNTP mixture ; 1 µL klenow enzyme。混合均勻後迅速離心 1 分鐘，並移至於 37 °C 中 60 分鐘以上作用。加入 2 µL 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 µL 100 % Ethanol 混合均勻移置於 -70 °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 浸漬離心以去除多於的鹽類。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 °C 中備用。

南方轉漬法 (Southern blotting)^[7]

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 (1M Tris-HCl, pH 7.4 ; 1.5 M NaCl) 中，室溫下作用 30 分鐘。裁剪與膠片一樣大小之 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 10 X 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 膜上。進行前雜交作用 (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 °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 μL digoxigenin 標示之探針，沸水中煮 10 分鐘，立即冰浴 10 分鐘。再以 nylon paper 之面積計算雜交液 (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 °C 作用 16 小時以上。洗滌 (washing)：雜交後之 nylon paper，先以 2X SSC (0.1 % SDS)，於室溫下洗兩次，每次 15 分鐘。在 0.1X SSC (0.1 % SDS) 於 65 °C 中洗 2 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

buffer II 中加入 3 μL 的抗 DIG 抗體 (AP conjugate)，於室溫中作用 30 分鐘。洗滌 (washing)：於室溫中，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。顯色：以 buffer III 浸漬 nylon paper，再將 nylon paper 放入顯色液中顯色，不要晃動。加入 TE solution (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0) 終止顯色反應。

結 果

利用 pBlueScript II KS (+ / -) 之載體進行 EDS-76 病毒 DNA 之基因選殖，選殖獲得白色菌落進行快速篩選，結果獲得有插入病毒片段 DNA 之質體，在電泳過程中其位置會比正常未插入之載體高。經快速篩選獲得之插入選殖株，再經 *Hind*III 限制酶切割分析則可得到插入質體之 EDS-76 病毒 DNA 大小選殖片段，經限制酶分析後得到之插入選殖株則達 90 % 以上的比率。在基因選殖過程中，選殖到數十株，再經電泳分析比對大小，EDS-76 病毒 DNA 之 *Hind* III 切割片僅獲得個 DNA 片段，其他二個末端的片段並未選殖獲得 C 與 E 片段 (如圖 1，圖 6)。

取含有插入 1.5 kb 左右之 EDS-76 DNA 片段之質體，進行 *Hind*III 限制酶切割後，利用純化 DNA 之 kit 可獲得約 1.5 kb 的 EDS-76 DNA 片段。1.5 kb 左右 EDS-76 病毒核酸片段經 DIG 標識後可成為核酸探針並進行南方轉漬反應，結果 6 株 EDS-76 臺灣分離株可以特異性產生雜交反應，且此核酸探針不會與家禽腺病毒 NO.9 之病毒 DNA 產生反應，因此本核酸探針可以很特異性與 EDS-76 病毒 DNA 結合 (圖 2)。為檢測核酸探針之敏感性，將病毒 DNA 經極限稀釋，再生經核酸探針檢測結果可以測試到 100 pg 的病毒 DNA 量 (圖 3)。本核酸探針亦可測試病毒感染鴨胚胎纖維芽細胞之病毒 DNA (圖 5)。另外 EDS-76 病毒感染細胞 24 小時及 48 小時後經特殊方法均可萃取出特異性病毒 DNA (圖 4)。

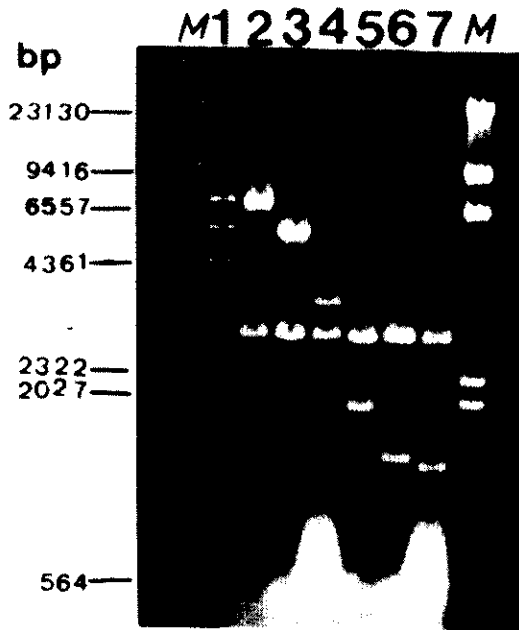


圖 1. EDS-76 CO 株基因庫選殖圖。將 EDS-76 CO 株基因體 DNA 經 *Hind* III 切割後，分段選殖入 pBlueScript II (+/-) vector。結果獲得 6 株不同選殖株。1% agarose, 20 V 電泳 16 小時。
 M: 經由 *Hind* III 切割出 DNA 片段
 1: EDS-76 CO 病毒 DNA 經 *Hind* III 切割出片段
 2~7: EDS-76 CO 病毒 DNA / pBlueScript II KS (+/-) 選殖株經 *Hind* III 切割出片段

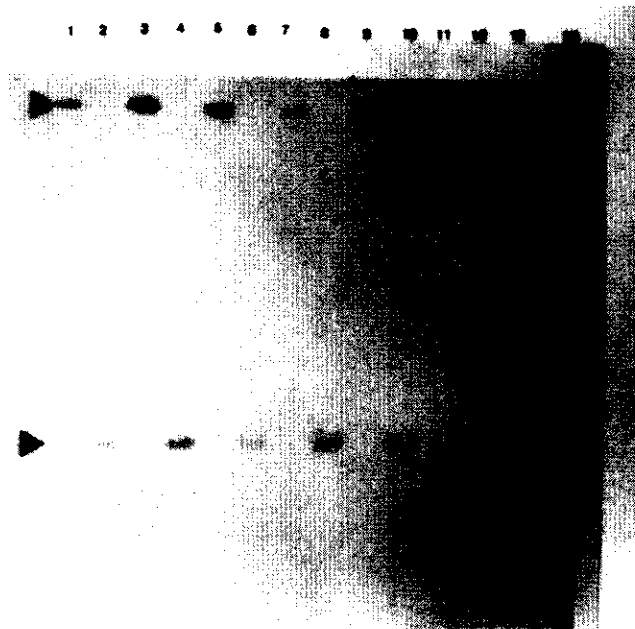


圖 2. 核酸探針特異性檢測。將 EDS-76 CO 株 / pBlueScript II KS (+/-) vector + 1.5 kb DNA 以 DIG 標示後，分別與六株 EDS-76 病毒及 NO.9、ILTV 進行雜交試驗，結果顯示該探針可與 EDS-76 各毒株雜交，而 NO.9 及 ILTV 則否。箭頭所示為特異性 DNA 雜交帶。
 1, 2: EDS-76 CO 病毒 DNA 3, 4: EDS-76 NO.4 病毒 DNA
 5, 6: EDS-76 NO.5 病毒 DNA 7, 8: EDS-76 NO.7 病毒 DNA
 9, 10: EDS-76 NO.8 病毒 DNA 11, 12: EDS-76 NO.18
 13: 家禽腺病毒 (NO.9) DNA 14: 傳染性喉頭支氣管炎病毒 DNA
 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 14: 未經限制酶切割之病毒 DNA
 2, 4, 6, 8, 10, 12: 經限制酶 *Hind* III 切割 DNA

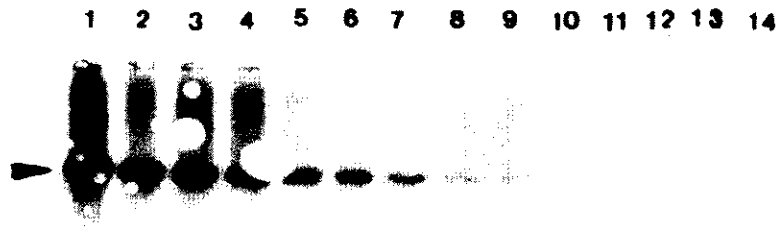


圖 3. 核酸探針敏感性試驗檢測圖。將 200 ng EDS-76 CO 株病毒 DNA 2 倍稀釋後進行南方轉漬分析，結果顯示該探針之敏感性可達 100 pg。
1：200 ng EDS-76 CO 株病毒 DNA
2~14：連續 2 倍稀釋之 EDS-76 CO 株病毒 DNA 量

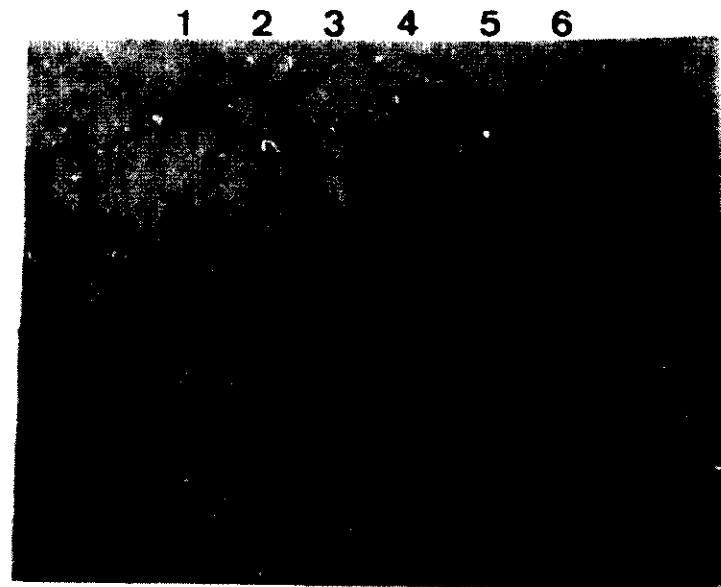


圖 4. 由 EDS 病毒感染 DEF 細胞所萃取病毒核酸之電泳分析與南方轉漬試驗。顯示由病毒感染 DEF 細胞中可以萃取出病毒 DNA 及檢測到特異 EDSV DNA。1% agarose，在 Mupid II 中 100V 電泳 30 分鐘。
1, 2：純化病毒顆粒所萃取病毒基因體。
3, 4, 5, 6：病毒感染 DEF 細胞 24 小時與 48 小時所萃取病毒基因體。
1, 3, 5：經 *Hind* III 限制酶切割
2, 4, 6：未經 *Hind* III 限制酶切割



圖 5. 利用核酸探針檢測 EDS-76 CO 株病毒感染鴨胚胎纖維細胞 1 小時及 16 小時細胞雜交圖。顯示均能檢測到病毒 DNA。箭頭所指是特異性病毒核酸雜交帶。
1~16：依序為 EDS-76 病毒感染鴨胚胎纖維細胞第 1 小時至第 16 小時。

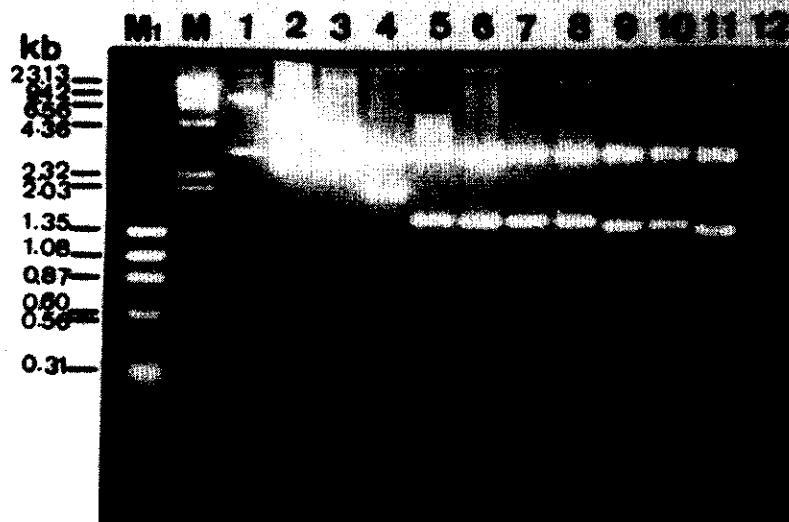


圖 6. EDS-76 病毒 DNA 基因選殖株核酸電泳分析。在 2% agarose, 20V 電壓，經 12 小時電泳分析。顯示 p9A, p14A, p31C 及 p18C 為不同病毒 DNA 片段選殖株，亦證實經基因選殖獲得 8 個病毒 DNA 片段 DNA 選殖株。

M1：由 *Hae* III 切割出 ϕ 174 DNA 片段

M：由 *Hind* III 切割出 λ DNA 片段

1：p15C 2：p2C 3：p26A 4：p21C

5：p57 6：p11C 7：p6C 8：p9A

9：p14A 10：p31C 11：p18C

12：EDS-76CO 株病毒 DNA 經 *Hind* III 切割

討 論

本次 EDS-76 病毒 DNA 經基因選殖過程，僅選殖獲得 8 個病毒核酸片段，另外 2 個末端之 DNA 片段並未獲得選殖株。由於腺病毒 DNA 5' 一端有一個 55 kDa 大小的 protein 分子，於是參照 Zakharchuk 等^[8] 的方式去除末端的蛋白質，再純化此兩末端的基因片段，再以 Klenow enzyme 補齊核酸序列與 pBlueScript II KS (+ / -) 載體進行選殖，經數次均無法成功，可能在酸處理時破壞 DNA 片段，導致無法正常進行基因選殖。

腺病毒感染細胞之核酸萃取，由於病毒核酸 5' 末端有一 55 kDa 的蛋白質，利用病毒 DNA 有此一特性，因此在萃取病毒核酸過程時必須先初步以 phenol (pH 8.0) 萃取，收取其中間層及 phenol 層才能獲得濃度高病毒 DNA，因水層大部分為細胞的 RNA 或大的 DNA，於是在萃取 DNA 過程可以被去除。經 proteinase K 消化後，再以 phenol : chloroform : isoamylalcohol (25 : 24 : 1) 萃取病毒核酸，此時必須取水層方能獲得純度高的病毒基因體，因此本實驗可以利用此法將細胞與病毒 DNA 分開，而達到純化病毒 DNA 之目的。

在核酸探針敏感試驗中，經多次操作試驗均可很特異性的檢測出七株 EDS-76 病毒株，其他對照的家禽腺病毒 NO. 9 株及傳染性喉頭支氣管炎病毒均是陰性反應，由對照組可以看出本核酸探針特異性極佳。且本探針亦均能檢測出細胞感染 EDS-76 病毒後的第 1 時至第 16 小時，由此可確定本核酸探針特異性相當不錯。另外，核酸探針之敏感試驗中可測試到 100 pg 病毒 DNA，由文獻得知 Key et al^[6] 所研製的之 1.1 kb ILTV DNA probe 可以測試到 40 pg 的 ILT 病毒核酸，雖本 1.5 kilobase pairs EDS-76 病毒 DNA probe 僅能測試到 100 pg DNA，但此 EDS-76 DNA probe 敏感性應可用於 EDS-76 病毒 DNA 之檢測。

誌謝 本試驗承蒙行政院農業委員會 (85 科技 1.1-糧-49(40)) 計畫資助下完成，特此致謝。

參考文獻

1. Adair, BM., Curran, WL, and McFerran, JB. Ultrastructural studies of the replication of fowl adenovirus in primary cell cultures. *Avian Pathol* 8 : 133 - 144. 1979
2. Adair, BM., Todd, D. McFerran, JB. and McKillop, E R. Comparative serological studies with egg drop syndrome virus. *Avian Pathol.* 15 : 677 - 685. 1986
3. Chung, CT., Niemela SL. and Miller, R H. One-step preparation of competent *Escherichia coli* : transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.*, 86 : 2172 - 2175. 1989
4. Hammermueller, JD., Krell, P J. Derbyshire, J B. and Eva Nagy. An improved dot-blot method for virus detection in chicken embryo fibroblast cultures. *J. Virol. Methods.* 31 : 47 - 56. 1991
5. Kado, CI. and Liu, ST. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmid. *J. Bacteriol.* 145 : 1365 - 1473. 1981
6. Key, DW., Gouth, BC. Derbyshire, JB. and Eva Nagy, Development and evaluation of a non-isotopically labeled DNA probe for the diagnosis of infectious laryngotracheitis. *Avian Dis.* 38 : 467 - 474. 1994
7. Tenover, FC. Diagnostic deoxyribonucleic acid probes for infectious diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* 1 : 82 - 101. 1988
8. 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

The Establishment on Diagnostic Nucleic Acid Probe for Egg Drop Syndrome Virus in Taiwan Isolates

Der-Tyan Lin^{1*} Shiow-Suey Lai² Tien-Lai Hsu¹

Jei-Fu Su¹ Shih-Yuh Lin¹

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

SUMMARY In order to establish the diagnostic nucleic acid probe for detecting to egg drop syndrome virus (EDSV) DNA, the genome of EDSV CO strain isolated from chicken oviduct was cloned in pBlueScript II KS (+ / -) vector. Eight DNA fragments in EDSV were cloned, but terminal genomic DNA were not. A specific digoxigenin (DIG) - labeled probe was prepared from a 1.5 kilobase-pair-cloned fragment. Six EDSV Taiwan isolates were detected by the nucleic acid probe method, but one avian adenovirus (NO.9 strain) was not. The 100 pg volume of EDSV DNA and infected duck embryonated fibroblast (DEF) cells were surveyed by southern blotting and DNA hybridization. The established DNA probe technique of this study can be used as a detective tool for infection of EDSV.

Keywords: *Egg drop syndrome , Nucleic acid probe*

*Corresponding author

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