

出國報告(出國類別：研究)

赴美研習高病原性家禽流行性感冒  
疫苗種毒篩選新技術之建立

服務機關：行政院農業委員會家畜衛生試驗所

姓名職稱：鄭明珠副研究員

派赴國家：美國

出國期間：96年8月1日至96年8月31日

報告日期：96年10月9日

# 目次

研習目的	第 4 頁
研習地點	第 5 頁
研習過程	第 6 頁
研習內容	第 8 頁
研習期間觀察與心得	第 26 頁
建議事項	第 28 頁

## 研習目的

高病原性家禽流行性感冒病毒對家禽為高傳播性及高致死性，自從 2004 年起高病原性 H5N1 流行性感冒病毒造成許多東南亞國家疫情爆發，不僅家禽造成重大損失，亦有許多人因此感染死亡。雖然台灣不曾有 H5N1 爆發，但鄰近東南亞各國，交通貿易頻繁，基於政策上的考量，疫苗的研發可謂有備無患。反向遺傳技術不僅能快速建立新病毒，更能使新病毒載有適當的抗原與特性。此次研習除了反向遺傳技術(Reverse Genetic technique)，並能實際操作病毒核酸重組之外，另外有幸能額外研習與觀摩 Single Radial Immunodiffusion (SRID) Test，用以標準化疫苗內蛋白含量，裨益於流行性感冒疫苗種毒株的建立與標準化。

## 研習地點

聖茱德兒童研究醫院於 1962 年由好萊塢影星丹尼湯瑪斯建立，在剛開始的十年裡，研究小兒白血病、腫瘤、傳染性疾病及生物醫學以拯救難治之症的兒童。而隨著醫學科技的發展，除上述研究方向之外，更擴展研究範圍到骨髓移植、基因治療、化學治療、腫瘤細胞之生物特性、放射治療、血液疾病、抗藥性、病毒及先天性疾病等兒童相關疾病與治療副作用的研究。現在兒童研究醫院已治療過超過一萬九千名兒童，遍及全美 50 州及全球 70 個國家。目前醫院裡超過 3130 名員工，每天需一百二十一萬元美金以上以維持醫院的運作。然而這些經費沒有一分是自病童及他們的家人得來的，到這個兒童研究醫院的病童及他們的親屬不會因為種族、宗教或是經濟能力而遭到拒絕，病童與家屬於治療期所有醫療及安頓費用，均來自社會的募款或善心捐款。

在兒童研究醫院裡，有許多經過化學治療或是放射治療的罹癌病童，大多不是因為癌症致死，反而因為免疫力的不足造成其他病原感染死亡。流行性感  
冒病毒便是病原之一，由於 Dr. Webster 在流行性感  
冒病毒上研究卓越，他的實驗室更是參考實驗室之一，每年均收到許多來自世界各地的檢體，在流行性感  
冒病毒的特性與致病性研究駕輕就熟。而反向遺傳技術在他的實驗室改良之後，八個質體的系統儼然成為反向遺傳技術之主流。



圖 1. 聖茱德兒童研究醫院建築外觀及 Logo。

## 研習過程

本次赴美研習兩員，一員負責執行科發基金計畫之「合成奈米分與禽流感病毒交互作用之原子力顯微探討與應用」赴美研習反向遺傳技術，一員負責上年度台美農業科技合作計畫與美方合作執行之「高病原性家禽流行性感冒種毒篩選新技術之建立」，經與研習單位討論後，因應我們的研習目的及需求而做了同時研習之安排。於今年(96)7月31日啓程前往美國田納西州孟菲斯的聖茱德兒童研究醫院，研習家禽流行性感冒病毒相關技術，共計31日

此次研習期間承蒙 Dr. Robert Webster 在百忙之中仍願意接受研習，Dr. Yen 於緊湊的行程中抽空熱心接待、安排與悉心指導，一步一步帶領實驗進行以確定實際操作無誤，及研究室同仁在各方面的指教，使得本次研習得以順利達成並收穫豐碩。

日期	研習內容
7月31日	啓程
8月1日	進實驗室會見 Dr. Webster，與認識實驗室同仁。
8月2日	辦理識別證申請與聖茱德兒童研究醫院環境認識及背景介紹。
8月3日 至 8月23日	研習反向遺傳技術
8月24日	鄭明珠副研究員主講「台灣野鳥家禽流行性感冒病毒之監測」(Virological Surveillance of Avian Influenza in Wild Birds in Taiwan)
8月25日 至 8月30日	研習與觀摩 Single Radial Immunodiffusion (SRID) Test 及病毒斑檢測。
8月31日	返程
9月1日	返程

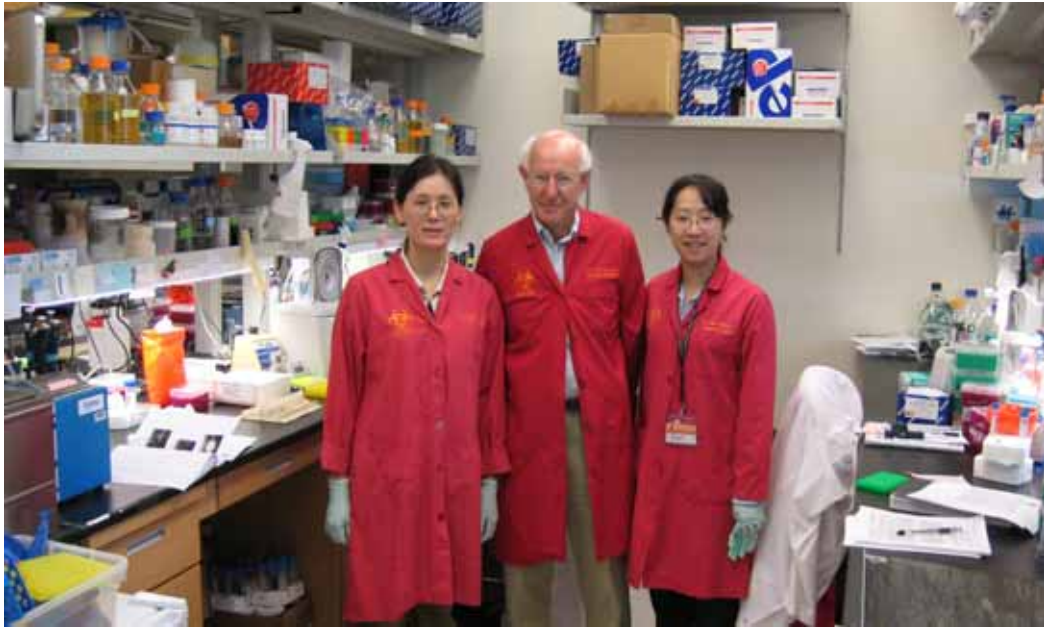


圖 2. 與美國聖茱德兒童研究醫院 Dr. Robert G. Webster 合影。

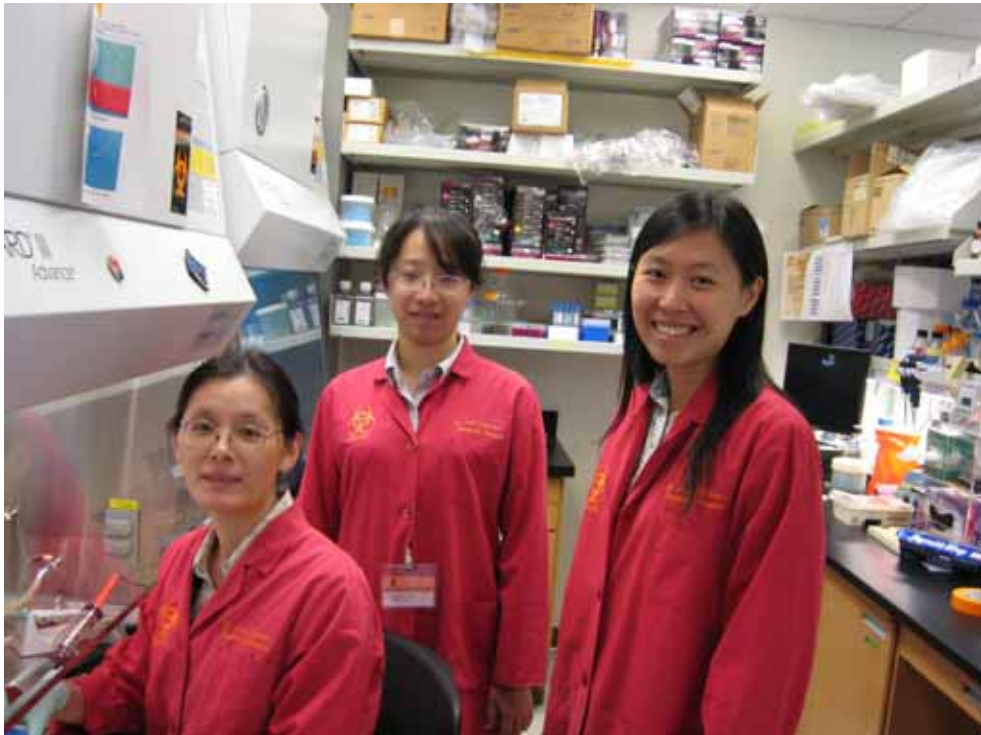


圖 3. 與 Dr. Yen 合影。

## 研習內容

反向遺傳技術對 Dr. Webster 實驗室而言，已是一項純熟且操作方便的技術，過去反向遺傳技術利用 12 個質體的系統，經改良後的質體同時具有 pol I 及 pol II 的 promoter 及 terminator，載體包含人類 pol I 的 promoter 及老鼠的 terminator，並以 BmsBI 限制酵素加以區隔，更外側則是人類巨細胞病毒 pol II promoter 及 poly A 訊息，流感病毒基因片段便建立 pol I 及 pol II 的 promoter 及 terminator 之間。經由 pol I promoter 的作用，細胞株的 RNA polymerase I 會合成病毒的負向 RNA，而 pol II promoter 則是引起細胞正常轉譯功能進而合成病毒的蛋白，使之得以進行病毒正常的功能。因此同一質體可進行病毒 RNA 的複製及病毒聚合酶的合成並只需備製 8 個質體，可使得備製過程與病毒產生更有效率。

在 Dr. Yen 的帶領之下，將她寶貴的經驗及其中的注意事項均不吝指導，尤其是在選殖的步驟最為花時間，然而 Dr. Yen 不厭其煩，甚至假日願意再進到實驗室，教我們一步一步進行實驗，建立屬於家禽專屬的流行性感疫苗種毒株。本次研習在 Dr. Webster 及 Dr. Yen 的安排之下，另外研習 Single Radial Immunodiffusion (SRID) 檢測技術，為人類流行性感疫苗中血球凝集蛋白定量的方式，將對疫苗標準化有很大的幫助。

### RNA 萃取及 RT-PCR

病毒 RNA 以 Qiagen RNeasy mini kit 萃取

1. 100 $\mu$ l 尿囊液加入事先混好 B-mecaptoEtOH (10ul/ml，打開雙硫鍵)的 RLT Buffer 200 $\mu$ l (lysis buffer)。
2. 隨即加入 300 $\mu$ l 70%的酒精。
3. 將總量轉置到 column 裡，以 10000rpm 離心 1 分鐘。
4. 先以 RW1 700 $\mu$ l 清洗，再以 RPE 500 $\mu$ l 洗 2 次，並以 12000rpm 離心 1 分鐘。
5. 最後收取以 30 $\mu$ l RNase free(需置於膜上，並待 1~2 分鐘)所離心的液體。

RT-PCR 反應使用 OneStep RT-PCR kit (Qiagen)

## 配方

水	31 $\mu$ l
5 倍緩衝液	10 $\mu$ l
dNTP (10nM)	2 $\mu$ l
Primer 1 (20pM/ $\mu$ l)	1.5 $\mu$ l
Primer 2 (20pM/ $\mu$ l)	1.5 $\mu$ l
vRNA	2 $\mu$ l
Enzyme mix	2 $\mu$ l
總量	50 $\mu$ l

## 熱循環設定

1. 50°C      50 min
  2. 94°C      10 min
  3. 94°C      30s
  4. 56°C      30s (HA, NP, NA, M, NS) 或 50 30s (PB1, PB2, PA)
  5. 72°C      3 min
- 3~5 重複 35 次
6. 72°C      7 min
  7. 4

RT-PCR 產物各取 2 $\mu$ l 跑 1% agarose gel 電泳，並加跑 Low DNA mass ladder。

## 膠體回收(Gel purification)

- 1.將全部 RT-PCR 產物跑 1% agarose gel 電泳。
- 2.切下正確大小產物的片段。
- 3.置於微量離心管並稱重。
- 4.加入三倍體積 QG buffer，並置於 50 10 分鐘，待其完全溶解。



- 5.加入一倍體積 Isopropanol(確定溶液顏色為黃色)
- 6.將 PCR 產物以每次 750µl 轉置到 column，13000rpm 1 分鐘，重複至所有 PCR 產物通完 spin column 為止。
- 7.以 PE buffer 750 µl 13000rpm 1 分鐘清洗 column，去除離心液。
- 8.再離心一次以乾燥 column。
- 9.將column置於新尖底微量離心管上，加入 50µl dH<sub>2</sub>O(需置於膜上)，並靜置 1~2 分鐘後 13000rpm 離心 1 分鐘。

膠體純化完需各取 2µl 與 Low DNA mass ladder 一同以 1% agarose gel 電泳，並與 Low DNA mass ladder 亮度相比較，以估計純化後核酸之濃度，利於限制酶消化之反應液配製及定序。

### 限制酶消化(Digestion)

膠體純化後的產物 HA 及載體(pHW2000 vector)以 Bsm BI 限制酶消化，配成總量 100µl 的反應液置於 55°C 過夜。

NA 產物則是以 Bsa I 限制酶進行反應，並以 50°C 過夜。

此步驟使用限制酶 Bsm BI 與 Bsa I (Biolab)

配方

10x buffer NEB3	10 µl
PCR 產物	xµl
H <sub>2</sub> O	yµl
Bsm BI	4-6µl
<hr/>	
總量	100µl

10x buffer NEB3	10 µl
PCR 產物	xµl
H <sub>2</sub> O	yµl
Bsa I	5µl

---

總量	100 $\mu$ l
----	-------------

### 核酸純化

消化後的反應液總量 100 $\mu$ l，直接純化。

- 1.加入 500 $\mu$ l PB buffer（五倍體積於產物）。
- 2.轉置於 column，並以 13000 rpm 離心 1 分鐘。
- 3.加入 650 $\mu$ l PE buffer 以 13000 rpm 離心 1 分鐘清洗 column。
- 4.去離心液，再次以 13000 rpm 離心 1 分鐘乾燥 column。
- 5.將column置於新尖底微量離心管上，加入 50 $\mu$ l dH<sub>2</sub>O(需置於膜上)，並靜置 1~2 分鐘後 13000rpm離心 1 分鐘。
- 6.同時與 Low DNA mass ladder 跑電泳，以估計純化後產物之核酸濃度，方便下一步連接酶反應液之配製。

### 核酸連接(Ligation)

依上個步驟所估計之核酸濃度，使一同以限制酶處理過的載體(pHW2000 vector)與產物於反應液裡的核酸比例為 1: 4 或 1: 5，反應液總量為 30 $\mu$ l，置於室溫下過夜（理論上 1 小時可完成反應，但最好有 5 小時以上）。

此步驟需使用 T4-ligase(Invitrogen)

配方

產物	x $\mu$ l
載體	y $\mu$ l
5x buffer	6 $\mu$ l
T4-ligase	1 $\mu$ l
總量	30 $\mu$ l

### 轉置(Transformation)

- 1.取勝任細胞 One Shot Top 10 competent cell(Invitrogen)於冰上解凍。
- 2.取 5 $\mu$ l 連接反應液到勝任細胞中，靜置 30 分鐘。
- 3.置於 42 $^{\circ}$ C 水浴槽中 1 分鐘。
- 4.加入 250 $\mu$ l S.O.C.培養液到勝任細胞中，並置於 37 $^{\circ}$ C 震盪培養箱中 1 小時。
- 5.每反應分為 200 $\mu$ l 及 50 $\mu$ l，分別塗於含 Ampicillin 的瓊脂膠上，並置於 37 $^{\circ}$ C 恆溫培養箱中過夜。
- 6.第二天挑單一菌落至 3 ml 含 Ampicillin 的培養液中，並置於 37 $^{\circ}$ C 震盪培養箱中過夜(至少 8 小時)。

### 質體萃取

此步驟使用 Mini prep kit(Qiagen)，步驟如下：

- 1.取 1 ml 菌液，以 8000 rpm 離心 2 分鐘，上清液丟棄。
- 2.加 250 $\mu$ l P1 buffer，將管底菌塊再度懸浮。
- 3.加 250 $\mu$ l P2 buffer，輕輕搖晃即可。
- 4.加 250 $\mu$ l N3 buffer，需均勻搖晃混合。
- 5.以 11000 rpm 離心 20 分鐘或 13000 rpm 離心 10 分鐘，將白色塊狀物離心到管底。
- 6.上清液置於 column，以 8000 rpm 離心 30 秒。
- 7.以 750 $\mu$ l PE buffer 8000 rpm 離心 30 秒清洗 column，去離心液。
- 8.再次以 8000 rpm 離心 2 分鐘以乾燥 column。
- 9.將column置於新尖底微量離心管上，加入 50 $\mu$ l dH<sub>2</sub>O(需置於膜上)，並靜置 1~2 分鐘後 8000rpm離心 30 秒。
- 10.同時與陽性對照跑電泳，挑選高度與陽性對照一致的質體，進行定序。

### 質體序列比對與篩選

質體定序後與原 RT-PCR 產物進行胺基酸比對，篩選與原產物胺基酸序列一致的質體，再進行質體大量增殖。

## 質體大量增殖

- 1.將含正確序列質體之菌落釣入 100ml 含 Ampicillin 培養液中，並置於 37°C 震盪培養箱中過夜。
- 2.將 100 ml 菌液以 5000 rpm 離心 10 分鐘。
- 3.將 column 事先以 10 ml QBT buffer 濕潤。
- 4.以 10 ml P1 buffer 使菌塊再懸浮。
- 5.加入 10 ml P2 buffer。\* 此步驟不宜劇烈搖晃，亦不能超過 5 分鐘。
- 6.加入 10 ml P3 buffer。\* 此步驟會出現混濁蛋花樣，要均勻混合並靜置 5 分鐘。
- 7.轉置入頭事先塞住具濾膜的針筒。\* 此步驟將蛋白質濾除。
- 8.將濾出液置於 column，待其滴乾。\* 此步驟使 DNA 留在 column 上。
- 9.加入 QC buffer 至 column 快滿，待其滴乾以清洗 column。
- 10.加入 10 ml QF buffer，並用 50 ml 離心管接收濾出液。
- 11.濾出液加入 7 ml Isopropanol，並均勻混合。\* 此步驟使 DNA 沈澱。
- 12.倒入另一前頭套入碟形濾膜的針筒。\* 所有抽吸動作需事先移開濾膜，因為濾膜易破，此步驟可將沈澱的 DNA 留在濾膜上。
- 13.以 1 ml 70%酒精清洗，並打空氣 2 次，以清空及乾燥濾膜，最後將濾口擦淨。
- 14.使用 5 ml 小針筒以 1ml dH<sub>2</sub>O 濾至微量離心管，同樣的液體回倒入針筒再通一次濾膜，最後抽空氣通濾膜使濾膜中的水分完全濾出。
- 15.濾過液以 1:50 稀釋，以檢測 260nm 吸光值瞭解質體濃度，方便轉染時計算質體之使用量。
- 16.濃縮的質體，需再次定序做最後確認。



圖 4.RT-PCR 產物之電泳膠圖。

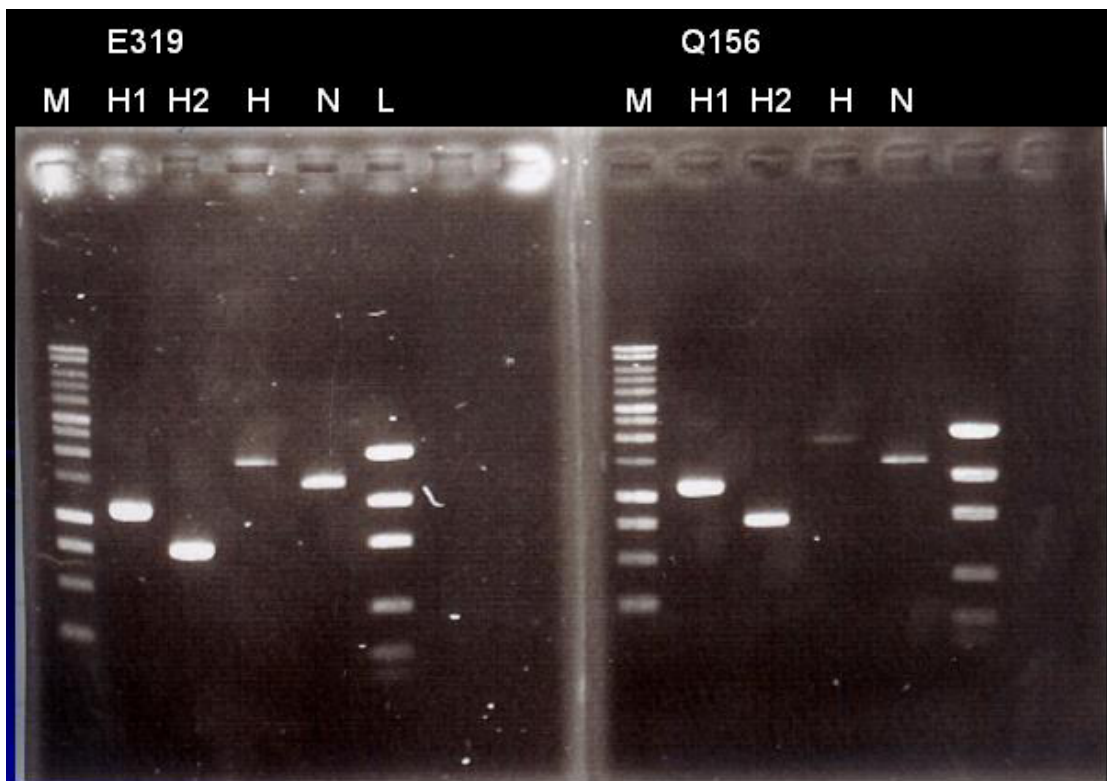


圖 5.RT-PCR 產物經膠體回收核酸後與 Low DNA mass ladder 亮度相較，可評估回收後核酸之濃度。

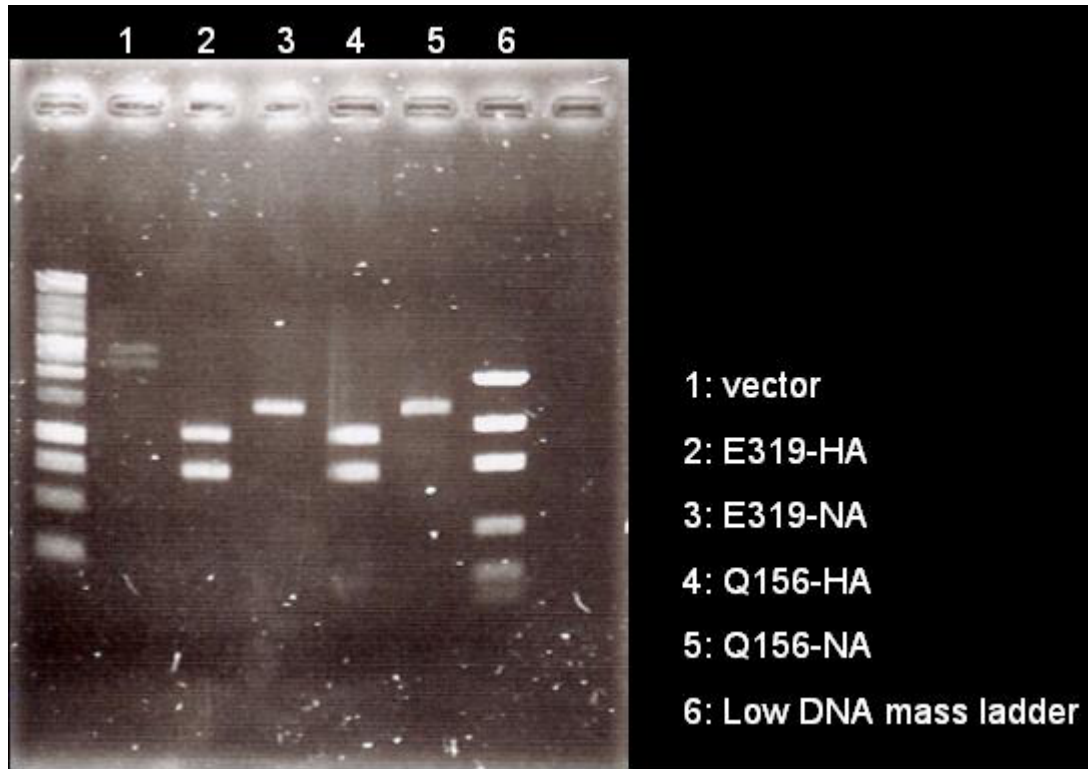


圖 6.經限制酶消化之後，需核酸純化，並與 Low DNA mass ladder 同時跑電泳，以方便調整下一步驟反應液的配製。

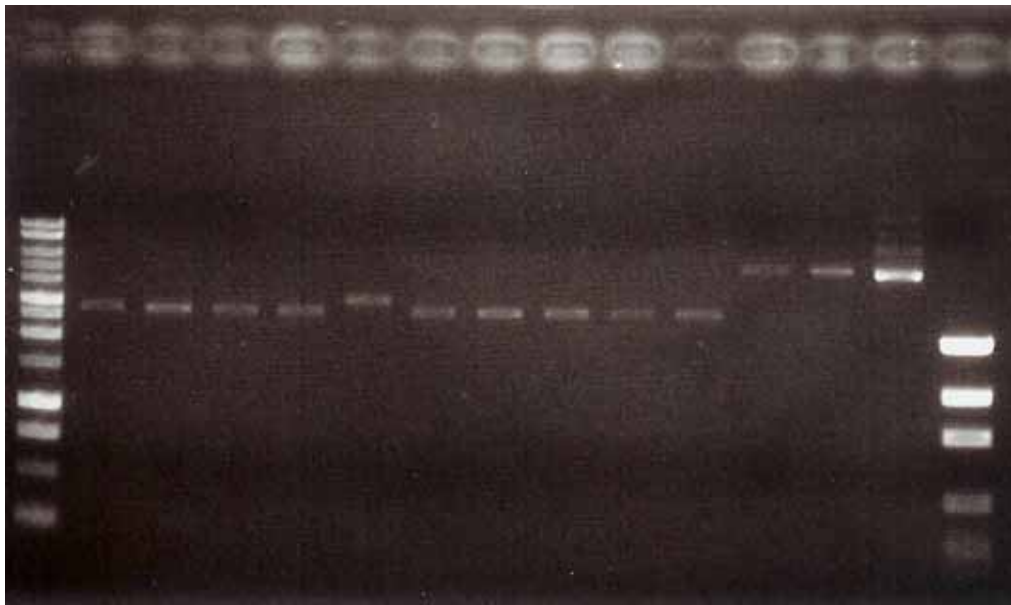


圖 7.質體以 Mini prep kit 萃取之後，挑出與陽性對照相同大小者，將進一步定序。

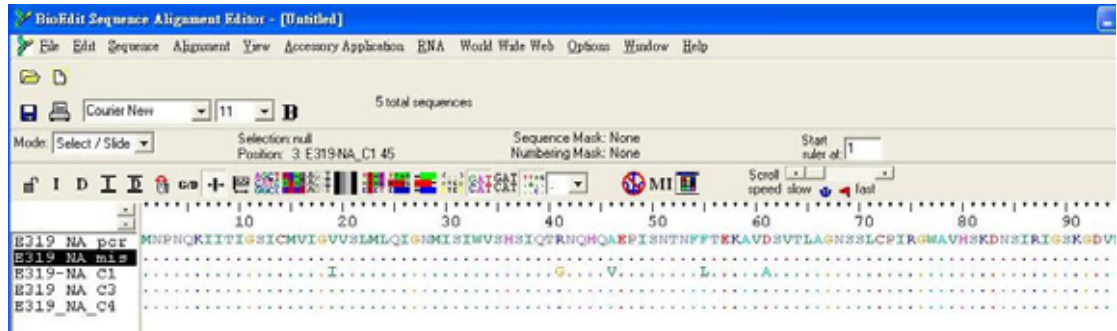


圖 8. 依定序結果，挑選與原 RT-PCR 胺基酸序列相同者。

### 轉染細胞(Trnasfection)

將 pHW2000 質體嵌入之八段流感病毒基因的 DNA 利用 Lipofectamine 轉染至 293T 細胞內，使能產生完整的流感病毒，完整的流感病毒再經感染 MDCK 細胞增殖後收集的病毒液接種雞胚胎蛋以確認病毒具有增殖的完整能力。

材料：

1. MDCK 細胞
2. 293T 細胞
3. PBS-ABC (可以滅菌 PBS 或 OptuMEM 取代)
4. 15 ml Falcon 試管
5. 50 ml Falcon 試管 (操作 6-well 2 盤以上用大的滅菌瓶)
6. 6-well 盤
7. MDCK 生長培養基：MEM+抗生素及抗黴菌素+5% 胎牛血清
8. 293T 生長培養基：OptiMEM+抗生素及抗黴菌素+5% 胎牛血清
9. 轉染培養基：OptiMEM+抗生素及抗黴菌素
10. 流感質體 (dsDNA 濃度含量以 OD<sub>260</sub> 測定)
11. 1.5 ml eppendorf 管
12. 轉染用 YransIT-LT1 [Mirus cat# mir2300]

#### 步驟 1. 轉染用單層細胞製備

利用 MDCK 和 293T 細胞共養方法，293T 細胞易於被轉染而 MDCK 細胞促使病毒生長之特性。但爲了疫苗產製目的也可改用 293T 細胞和 vero 細胞共養。

#### **MDCK：**

1. 以 PBS-ABC 洗 confluent MDCK 細胞 2 次
2. 加 5 ml EDTA-trypsin，在 37°C 感作 15-20 分鐘
3. 加 5 ml 培養基（目地爲抑制 trypsin），收集細胞至 15 ml falcon 試管
4. 低速離心 1500rpm 5 分鐘，將上清液抽掉
5. 再懸浮細胞於 10 ml MDCK 生長培養基內

#### **293T：**

1. 抽掉培養基和死亡細胞
2. 以 PBS-ABC 輕輕洗一次
3. 添加 EDTA-trypsin 1 ml，在 37°C 感作 3 分鐘。加入 9 ml 293T 生長培養基混勻，吸管來回抽吸使細胞懸浮均勻
4. 抽 10ml 到 15 ml falcon 試管

準備轉染用 6-well 盤一盤

1. 1 ml MDCK 細胞懸浮液 + 1 ml 293T 細胞懸浮液 + 18 ml 轉染培養液 均勻混合
2. 每孔加 3 ml，在 37°C 培養 16-18 小時。建議在下午 5 點培養，隔日早上 9-10 點可供轉染使用。細胞最好長 50-70% 適宜轉染。

#### 步驟 2. 轉染

##### 轉染

1. 試管標示
2. 每 plasmid (PB2,PB1,PA,HA,NP,NA,M,NS)取 1 ug 量
3. 加 200 UL 轉染培養基
4. 加 18 ul TransIT-LT1，混合
5. 在室溫感作 45 分鐘



6. 加 800 ul 轉染培養基 (使總量約為 1 ml)
7. 抽調前一天準備的細胞之培養液(確認兩種細胞 50/50 混合, 生長達 50-70%)
8. 小心抽調 monolayer 的培養液, 加入 1 ml 新鮮的轉染培養基潤濕細胞一下, 再小心抽掉。
9. 加入上述準備之轉染 mixture 至 monolayer
10. 37°C 培養 8 小時

培養基換液 (約轉染 8 小時後)

1. 小心輕輕地徐徐地從細胞抽掉轉染 mixture
2. 加入 1 ml 新鮮轉染培養基, 在 37°C 培養 30 小時

添加 TPCK-trypsin (大約轉染後 36-48 小時)

1. 加 1 ml 含 2ug/ml TPCK-trypsin 至細胞 monolayer 培養 48-72 小時, trypsin 會切割新形成病毒的 HA 使他們可續感染 MDCK 細胞。(HA 的切割位若具有多個鹼性氨基酸者, trypsin 就不需要)監視 CPE 的形成, 有時看不到 CPE 形成, 但是用此細胞上液接種雞蛋或再感染 MDCK 細胞卻可回收病毒。
2. 再培養 37°C, 24 小時。

確認感染的流感病毒是否活的

1. 蛋接種法
  - a. 接種 0.1 ml 轉染上液於 10 日齡雞胚胎蛋的尿囊腔, 在 37°C 培養 48 小時
  - b. 蛋在 4°C 冷卻隔夜 (或 -20°C 30 分鐘快速冷卻)
  - c. 測蛋內尿囊液的 HA, 以確定病毒生長。
2. MDCK 細胞法
  - a. 取 1 ml 轉染上液在 1.5 ml eppendorf 管內, 離心 5000x5min
  - b. 抽出 900ul 上液到新的試管(可以 -70°C 冷凍的管子)
  - c. 取 500ul 上液到 MDCK 細胞(12 well 或 6 well 盤)
  - d. 感作 1 小時, 倒掉上液

- e. 加 2 ml/ well MDCK 感染培養基 (1x MEM + 4%BSA+ ABX)和 1ug/ml 的 TPCK-Trypsin 。
- f. 培養於 37°C ， 48 小時並觀察 CPE

## Single Radial Immunodiffusion (SRID) Test:

這個檢測主要是利用抗原與特異性抗體在瓊脂膠裡形成免疫複合物的沈澱來檢測流感病毒血球凝集蛋白的含量，沈澱圈的大小與抗原的濃度成比例。這是世界衛生組織推薦人類用流感疫苗血球凝集蛋白標準化的方法。

血球凝集素為流感病毒的主要抗原及免疫反應決定位，於病毒表面的醣蛋白，呈突棘狀，亦常用來決定病毒的分型。SRID 試驗主要檢測疫苗中不活化全病毒中的血球凝集素的含量。但必需在抗原混合礦物油或其他佐劑之前檢測，因為會影響檢測的正確性。

為了定量 SRID 的結果及血球凝集素，試驗中必須使用濃縮純化的抗原，需與待測樣本為同源病毒。流感的血球凝集素大約佔全病毒蛋白的 30%~38%，最後需稀釋到血球凝集素為 30 $\mu$ g/ml 的濃度以進行試驗。

將分離好的血球凝集蛋白免疫在綿羊或山羊身上可以獲得抗血清。在 SRID 標準備製中抗血清最好來自於同源的病毒，也可以使用其他具 Cross-reaction 且高力價的抗血清。參考血清需經純化濃縮的病毒標準濃度測驗，以確定檢測時抗血清的適當稀釋倍數。適當的抗血清濃度應能與 30 $\mu$ g/ml 濃度的血球凝集素形成 8mm 直徑大小的沈降圈。

## 試劑與器材

1. 已知濃度之標準 HA 抗原
2. 高度免疫之抗 HA 血清
3. 含 0.05% Sodium azide 的 PBS(此檢測裡所有使用到的 PBS 均含有 0.05% Sodium azide)
4. 去染劑—1 公升裡的配方為：

Methonal	450 ml
滅菌水	450 ml
Glacial acetic acid	100 ml
5. SeaKem ME Agarose(Cambrex BioProducts Rockland#50010)
6. 界面活性劑 Zwittergent 3-14(CalBiochem#693017)10%

Zwittergent 3-14 detergent	1g
----------------------------	----

滅菌水 9 ml

7. Coomassie Brilliant Blue R-250(Sigma#20,140-5)0.2%

Coomassie Brilliant Blue R-250 0.5g

去染劑 250ml

8. STE buffer (pH 7.2)

10 mM Tris-CL

10 mM NaCl

1 mM EDTA

9. 瓊脂製膠器材

12 公分見方玻璃片

直徑 4mm 打洞器

基座

12.2 公分 x12.8 公分壓克力蓋—打有以 12.5 公分間隔，直徑 4 mm 的孔洞

製膠模型—外圍為 15 公分見方中央有 10 公分見方的洞

10. 水浴槽(可備煮沸使用及 56°C 兩種)

11. 1.5 ml 微量離心管

12. 直徑 5 公分的培養皿

13. 矽膠黏著劑

14. 微量分注器、吸管輔助器及其適用之滴管

15. 可密閉並且可容納製膠器材之容器

16. 燈箱

17. 具刻度尺的放大鏡(Fisher#12-056)

18. 濾紙及吸水巾或紙巾

抗血清之標準化

抗血清需先決定適當用量，而最適當的用量會與標準抗原濃度(30 $\mu$ g/ml)形成直徑 8 mm 的沈澱圈。血清用量則先以 5 $\mu$ l/ml、10 $\mu$ l/ml、20 $\mu$ l/ml 及 40 $\mu$ l/ml( $\mu$ l 血清 / ml 瓊脂膠)進行沈澱反應。

- 1.以 PBS 泡製 1%瓊脂膠，由於這裡使用的為低熔點瓊脂膠，微波容易造成瓊脂膠的破壞，故需隔水加熱至煮沸，最後置於 56°C 水浴槽備用。
- 2.抗血清以 37°C 解凍，置於冰上備用。
- 3.每種血清用量使用一個直徑 5 公分的培養皿，每培養皿需總量 5 ml 瓊脂膠。  
準備 4 支 15 ml 離心管，將 4 種血清用量所需血清總量先行置於 15 ml 離心管裡，將血清加熱至 56°C 再與 5 ml 同溫之瓊脂膠均勻混合。混勻之瓊脂膠倒入培養皿中，靜置 10-20 分鐘待冷卻。
- 4.以 PBS 稀釋標準抗原至 30 $\mu$ g/ml。
- 5.稀釋好之抗原與界面活性劑以 9:1 混合，於室溫下作用 30 分鐘。
- 6.每培養皿以間隔 1.5 公分打 2 個直徑 4 mm 的洞。
- 7.處理過之抗原（30 $\mu$ g/ml）另外再稀釋 2 倍，製成 15 $\mu$ g/ml 濃度之抗原。
- 8.每培養皿一孔放置 30 $\mu$ g/ml 濃度抗原 15 $\mu$ l，另一孔則放置 15 $\mu$ g/ml 濃度之抗原 15 $\mu$ l。於室溫下靜置待瓊脂膠完全吸收液體，需費時約 30 分鐘。
- 9.瓊脂膠置於可密閉容器裡，內放置潮濕紙巾並密閉，室溫下靜置過夜(至少 18 小時)。
- 10.第二天自容器裡取出瓊脂膠，小心地自培養皿上取下瓊脂膠，轉置於 12 公分見方的玻璃片上，維持膠體的完整與形狀很重要，可取多餘液態瓊脂膠使 4 片膠固定於玻璃片上。
- 11.染色之前需先壓片，盡量移除多餘水分。瓊脂膠表面先放置一張濕潤的濾紙，疊放上大量吸水性佳的紙巾，再放一片玻璃，才放上重物。吸水紙巾愈多，重量愈重，則乾燥速度愈快。一般大於 600 公克的重量，約需費時 45-60 分鐘。
- 12.壓片之後，玻片與瓊脂膠保留一張濾紙，置於 37°C 恆溫培養箱 2-5 小時烘乾。
- 13.完全乾燥之後，置於淺盆中，倒入 Coomassie Blue 染劑染上 10-15 分鐘，染劑需完全覆蓋玻片與瓊脂膠。
- 14.移除染劑，去染劑以每次 5 分鐘，重複 3-6 次的換液，每次換液均需輕晃動，以加速褪染，直到背景染劑退去。
- 15.取出玻片，並風乾。

16.置於燈箱上，以具刻度尺的放大鏡加以測量。30 $\mu\text{g}/\text{ml}$  濃度之抗原所形成沈澱圈直徑正好在 8 mm 的血清用量，則為最適當用量。假使落在 5 $\mu\text{l}/\text{ml}$  與 10 $\mu\text{l}/\text{ml}$  之間，需再加測 6 $\mu\text{l}/\text{ml}$ 、7 $\mu\text{l}/\text{ml}$ 、8 $\mu\text{l}/\text{ml}$  與 9 $\mu\text{l}/\text{ml}$  血清用量，直到找到沈澱圈確實為 8 mm 的用量。

#### 樣本檢測

- 1.以 PBS 泡製 1%瓊脂膠，由於這裡使用的為低熔點瓊脂膠，微波容易造成瓊脂膠的破壞，故需隔水加熱至煮沸，最後置於 56 $^{\circ}\text{C}$  水浴槽備用。
- 2.抗血清以 37 $^{\circ}\text{C}$  解凍，置於冰上備用。
- 3.用矽膠黏著劑將玻璃片與製膠模型黏合，相連的邊緣取少許液態瓊脂膠抹上。
- 4.一片大片瓊脂膠可進行 3 個樣本進行檢測，瓊脂膠中的血清含量由前述步驟決定，瓊脂膠總量需 22 ml，血清與液態瓊脂膠混合之前，血清需預熱至 56 $^{\circ}\text{C}$ ，混勻後再倒入製膠模型中，於室溫下靜置 20 分鐘冷卻。蓋上壓克力蓋，依蓋上的洞，依序打到固態的瓊脂膠上。
- 5.以 PBS 稀釋標準抗原至 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。
- 6.稀釋好之抗原與界面活性劑以 9:1 混合，於室溫下作用 30 分鐘。
- 7.待測樣本與標準抗原 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，分別備製 1x、0.75x、0.5x 及 0.25x 共 4 種稀釋倍數。
- 8.每樣本每稀釋倍數需以每孔 15 $\mu\text{l}$ ，均放置 2 孔。於室溫下靜置待瓊脂膠完全吸收液體，需費時約 30 分鐘。
- 9.瓊脂膠置於可密閉容器裡，內放置潮濕紙巾並密閉，室溫下靜置過夜(至少 18 小時)。
- 10.重複前述 10-15 步驟，將瓊脂膠壓片、烘乾、染色及褪染。
- 11.於燈箱上，以具刻度尺的放大鏡加以測量各樣本各稀釋倍數之沈澱圈直徑。每沈澱圈需量取兩個呈直角相交方向的直徑。
- 12.以每沈澱圈量取的兩個數值相乘為 Y 軸，以不同稀釋倍數為 X 軸，待測樣本及標準抗原各自畫出自己的回歸線。
- 13.標準抗原與待測樣本回歸線之斜率的比例，為彼此抗原含量的比例。因此可計算出待測樣本 HA 抗原之濃度與含量。

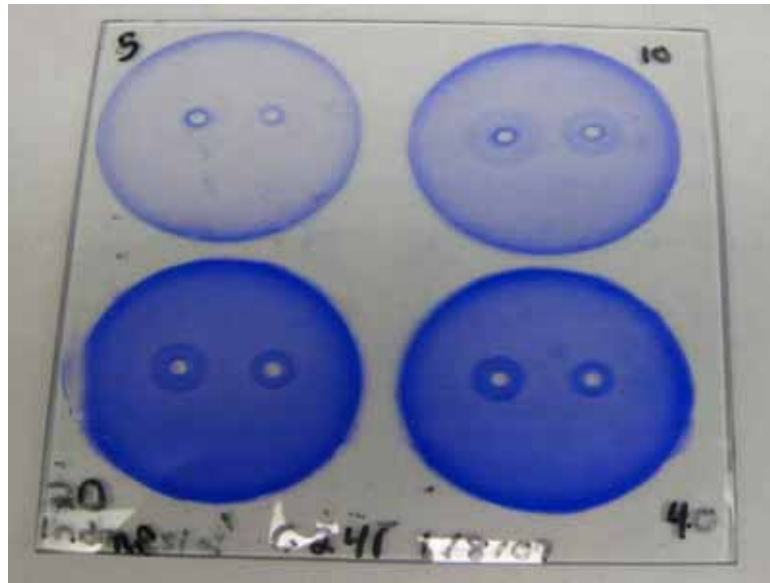


圖 9.血清標準化時的瓊脂膠，可見每片瓊脂膠上均具一大一小的沈澱圈。大圈為放置 30 $\mu$ g/ml 濃度之抗原，小圈則是 15 $\mu$ g/ml 濃度的抗原。

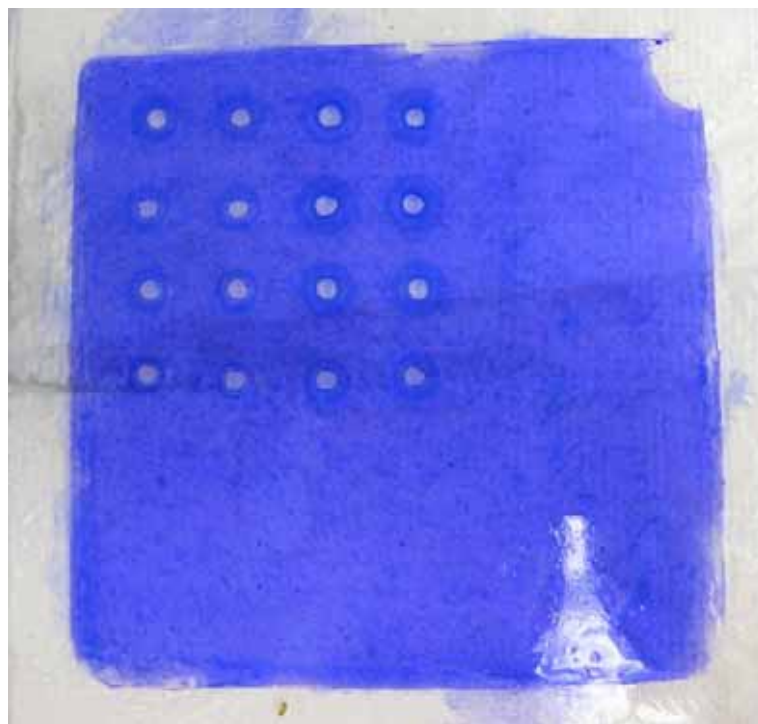


圖 10.大片的瓊脂膠，在此只進行標準抗原(30 $\mu$ g/ml)與 1 個待測樣本的檢測。

Protein	Dilution	Well#	Ring Diameter		Product of Diameters	Slope	Concentration (ug/ml)	
			0 degrees	90 degrees			Compared to Protein Std	
Standard	1.00	1	7.5	7.8	58.5	43.882	30	0.97859207
	1.00	2	8	8	64		30	
30ug/ml	0.75	7	7.2	7.2	51.84	57.71	22.5	0.93509682
	0.75	8	7.2	7.2	51.84		22.5	
	0.50	13	6.4	6.5	41.6		15	
	0.50	14	6.5	6.4	41.6		15	
	0.25	19	5.2	5.2	27.04		7.5	
	0.25	20	5.5	5.3	29.15		7.5	
Sample	1.00	3	9.2	10	92	57.71	39.453534	0.93509682
	1.00	4	9.5	9.7	92.15			
	0.75	9	9	9	81			
	0.75	10	9	9	81			
	0.50	15	8.5	8.3	70.55			
	0.50	16	8.7	8.5	73.95			
	0.25	21	6.8	7	47.6			
	0.25	22	6.6	7	46.2			

圖 11.將量取的所有數值填入表格，框線處為待測樣本最後計算 HA 抗原含量。

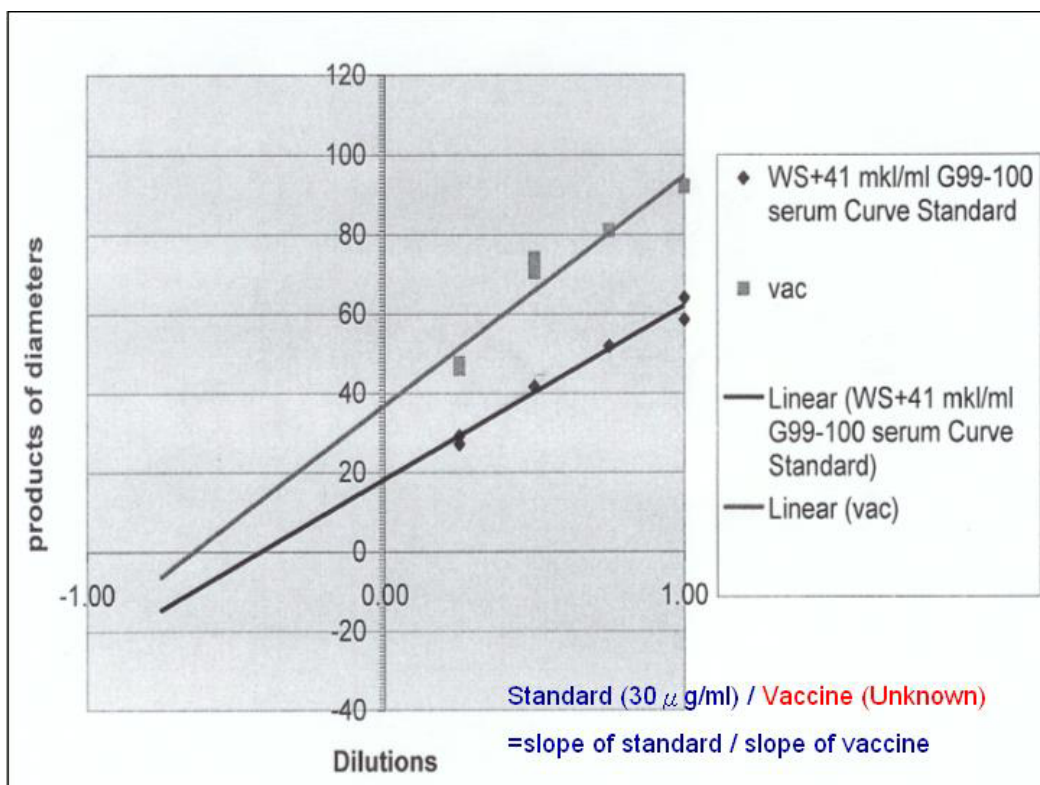


圖 12.兩條回歸線分別代表標準抗原(30 $\mu$ g/ml)及待測樣本，兩者斜率的比例等於兩者抗原含量的比例。



## 研習期間觀察與心得

來到了聖茱德兒童研究醫院，剛走進了醫院大廳，沒有預期醫院會像個小小遊樂園。牆壁上不是只有白色的漆而已，許多色彩豐富的圖案(Fig 13.)，小朋友們天馬行空的作品，以及病童們對自己及病痛有著天真的期許與想像的隻字片語。每天都會經過醫院裡長且曲折的走廊，在這裡雖然可以看到許多光著頭、坐著輪椅的小朋友，但更多的是小朋友坐在可愛的小拉車上，撒嬌地向父母說說笑笑。走廊上的醫護人員也總是微笑著，看不到悲傷，也不常有哭鬧聲，這就是聖茱德兒童研究醫院。

對兒童研究醫院印象最深的就是，當我們得知病童與家屬在治療期間所有醫療費用及食宿都是免費的時候，驚訝的程度彷彿聽到天方夜譚，這才知道整個醫院的營運完全來自善心捐款或募款。創建人 Danny Thomas 原本為影視明星，由於他許下‘沒有任何小孩應該在生命的曙光來臨時凋零’的諾言而建立了聖茱德兒童研究醫院，直到今日他的子女仍秉持著 Danny Thomas 的理想與承諾，為每日一百二十一萬元美金以上的營運經費而努力。

在整個研習過程中，Dr. Yen 熱心地接待、指導實驗步驟，甚至犧牲假日，幫助我們完成質體之建構。研究室裡的同仁也友善地讓出實驗室桌面供我們使用，由於每位研究人員只有一個約 1.5 公尺長的實驗台操作空間，幾乎是一次只能做一件實驗，相較之下我們家畜衛生試驗所的實驗室空間足以讓人嫉妒。同一層樓實驗室的研究人員來自世界各國，如俄國、台灣、韓國、中國等等；也來自不同的領域，如免疫、細胞訊息、分子生物、獸醫等，於流行性感冒病毒參考實驗室裡分別就自己專長發揮。

然而隨著禽流感議題受到重視與關注，因此出現重重限制。Dr. Webster 實驗室為 WHO 參考實驗室，每年協助進行各國送至 WHO 流行性感冒病毒株之監測分析，曾因使用印尼 2004 年禽流感 H5N1 人類分離株進行試驗且發表期刊，而遭到印尼政府抗議，Dr. Webster 除了公開道歉啟事之外，所有未經同意而進行之試驗一率停擺，並且不得擅自發表。除了病毒使用權日漸重視之外，此次研習的反向遺傳技術也因技術的專利問題，Dr. Webster 特此提醒我們用此技術研發之疫苗病毒種毒株不能用於商業用途。

在病毒使用權上雖然受到限制，但流行性感冒病毒仍有許多研究空間及機制有待瞭解，常規的診斷與實驗研究人員的分工，再加上研究人員積極地爭取發表的機會，使得 Dr. Webster 實驗室每年產出兩篇以上發表的期刊，未來更積極地與非洲國家合作，拓展流行性感冒病毒之監測區域。

先前提到 WHO 參考實驗室需協助流行性感冒病毒之監測與分析，收到的病毒裡不免有東南亞高致病性 H5N1 家禽流行性感冒病毒，甚至可能是人類分離株，必需進入具生物安全三級的實驗室才能進行進一步檢測與分析。因此在以雞胚胎蛋進行增殖時，收集過程中為盡量減少氣霧的產生，均在不打開蛋殼的情形下操作及收集病毒尿囊液(Fig 14.)，這一點與我們進行野鳥監測之檢測過程稍有不同。



Fig 13. 聖茱德兒童研究醫院的候診處。



Fig 14. 在不打開蛋殼的情形下抽取尿囊液。

## 建議事項

- 一、簡化安全性實驗生物材料輸出入之申請流程。此次研習，直接以 2 株台灣自走私禽鳥分離的 H5N1 病毒的 HA 及 NA 基因為試材，在美方實驗室進行以反向遺傳技術將流感病毒的 DNA 嵌入 Dr. Webster 實驗室所建構的質體內，完成的嵌入質體準備再送回國內進行後續之試驗以做為高病原性家禽流行性感疫苗種毒參考用預備毒株。因獲遺傳工程技術的研究發展之便，整個運送不需用活病毒病原體，只需輸送 DNA。但是生物材料的輸送上仍需經過輸出及輸入國的同意許可證明，因為申請的時程上耗費不少時間，導致影響研究的預定進度，因此許多研究學者專家為之卻步或未循正常程序辦理。為鼓勵及促進國內從事農業生物科技研究發展，應該對於無危險性的生物材料輸出入申請作業給予簡化之申請流程及縮短審核時間，以便提高申請意願、納入管理及讓國內外研究合作管道更加暢通，提昇國內研究水準。
- 二、強化生物安全三級實驗室之提供使用機能。反向遺傳技術建立之家禽流行性感疫苗種毒株，較傳統疫苗種毒篩選法迅速。此次研習獲得技術，未來將可以應用於國內防疫高病原性禽流感死毒疫苗種毒儲備株。然而完整的疫苗種毒試驗，除了架構好的病毒株之外，仍需要對預選毒株進行後續病毒性病狀、抗原性、免疫效力等活病毒實驗。這些都需要在生物安全第三等級實驗室裡進行，因此為了使研究得以完整進行，建議強化本所生物安全三級實驗室之提供使用機能。
- 三、研究與診斷監測業務專責分工制。在聖茱德研究室裡研究人員的論文發表產製能力非常驚人，研究工作上除了滅菌材料準備及廢棄物處理有專人處理之外，其他有關研究工作的大小事一律親自操作，但是他們仍然花大部份的時間互相討論以及整理及撰寫發表研究報告。研究室主持主管不在乎他們每日上班的時間長短，只在乎研究發表的能力及品質。反觀本所有不錯的研究環境、設施與研究資材，但我們的業務兼併診斷與研究工作，研究著重於思考、規畫實驗進行及原因探索，而診斷監測則是常規的檢測工

作，在有限的研究人力之下，研究工作經常會因被認為重要的診斷病例或監測所阻斷而擱置，導致研究品質與量都會受極大的影響，因此，為了提昇本所研究與診斷監測的成效，兩者適當分工，分享共同成果，將對目前家畜衛生試驗所研究人員需兩者同時兼顧，卻沒多餘時整理研究結果的窘境有所幫助。

五、期望能建立長期國際合作關係。為執行計畫與國外實驗室的聯絡過程中，**Dr. Webster** 對台灣野鳥監測結果相關感興趣，也非常支持我們前去學習新知識新技術，這次鄭明珠副研究員以英文主講「台灣野鳥家禽流行性感冒病毒之監測」（**Virological Surveillance of Avian Influenza in Wild Birds in Taiwan**），引起熱烈的討論，成功進行國際學術與技術交流，建立實驗室技術交流管道與合作平台。