

出國報告（出國類別：研究）

參訪及研習新流感、豬群流感病毒
ELISA 抗體檢測及 H3N2 流感變異株
(H3N2v)抗原檢測方法

服務機關：行政院農業委員會家畜衛生試驗所¹

財團法人台灣動物科技研究所²

姓名職稱：潘居祥副研究員¹、蔡敬屏助理研究員²

派赴國家：美國

出國期間：101 年 11 月 16 日至 101 年 12 月 25 日

報告日期：102 年 3 月 15 日

摘 要

我們在國科會科發基金經費支助下於 2012 年 11 月 16 至 25 日赴美國堪薩斯州立大學獸醫學院研習新流感、豬群流感 ELISA 抗體檢測與 H3N2 流感變異株 (H3N2v) 抗原檢測方法。目前流感病毒 HA 及 NA 抗體檢測大多以紅血球凝集抑制試驗(HI test) 及神經胺酶抑制試驗(NI test)進行，其中 NI test 過程既繁瑣又耗時，本試驗希望發展 ELISA 檢測方式取代傳統的 NI test。針對 NA 基因建構細胞表現質體，以哺乳類細胞表現 H1N1 新流感病毒之 NA 重組蛋白，經純化後製備成 ELISA 抗原盤。將 HI 抗體力價 1280 倍之 H1N1 新流感病毒感染豬血清做 2 倍序列連續稀釋，各稀釋階以 ELISA 抗原盤測試，結果顯示可得到線性化曲線，亦可區別 H1N1 新流感病毒與同源的北美三重組型豬流感病毒誘發產生之抗體。2012 年美國一位婦女因感染 H3N2v 而死亡的個案引起社會大眾恐慌，國內流感專家學者呼籲國內應盡速建立 H3N2v 流感變異株的快速診斷技術，因此本試驗亦研發以 RT-PCR 快速鑑別 H3N2v 之檢測方法。針對 H3N2v 流感病毒變異株之 M、HA 及 NA 基因分別設計特異性引子，在台灣先經初步測試後帶到美國實驗室，以其提供之 H3N2v、新型流感 H1N1、人類季節流感 H3N2 及傳統豬流感病毒進行 RT-PCR 反應。結果顯示，3 對引子特異性高，可以多引子(Multiplex) RT-PCR 方式快速檢測及區別 H3N2v 流感變異株及 H3N2 豬型流感病毒。

目 次

	頁碼
壹、目 的.....	4
貳、研習地點簡介.....	6
參、過 程.....	7
肆、心 得.....	18
伍、建 議 事 項.....	19
陸、致 謝.....	19
柒、圖 表.....	20
捌、附 錄.....	28
玖、參 考 文 獻.....	34

壹、目的

H1N1 新流感病毒含有豬、禽及人流感病毒基因，且 8 段基因已被重組過，屬於一種全新的變種病毒。加拿大於 2009 年首次報導豬隻感染新流感 H1N1 病毒，隨後已有二十多個國家陸續通報豬隻感染新流感 H1N1 病毒案例，國內亦於 2009 年 10 月確診豬隻感染新流感 H1N1 病毒。豬隻已知可同時感染不同動物型別的流感病毒並容易將病毒基因重組，產生毒力更強的變異株，於是世界動物衛生組織及國際糧農組織已呼籲各國衛生與動物防疫主管機關強化豬隻流感監測計畫，並應視之為早期偵測新興流感病毒及防治控制措施中不可或缺的一環。

流感病毒疫情之監控包括病毒偵測與抗體檢測，由於自感染宿主採集之檢體中偵測病毒之時機短暫，常不超過 7 至 10 天，容易低估疫情流行程度與範圍。然而宿主感染病毒後產生之抗體可留存血清中之時間可長達數月，甚至終其一生，因而抗體檢測結果較能反映流感病毒在豬群中流行之完整實況。現有流感病毒之抗體檢測法包括血球凝集抑制試驗(Hemagglutination inhibition test; HI test)、顯微中和抗體檢測(Micro-neutralization; MN)及酵素聯結免疫吸附法(Enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA)等。HI 為偵測流感病毒特異性抗體之常用標準法，操作方法簡單快速，但不容易區別相同血清亞型病毒所產生之抗體。MN 雖然可鑑別差異程度較小之病毒所產生之抗體，但操作程序繁瑣，需時較久，且須使用活病毒，致使無法應用於大量血清檢體鑑別工作上。ELISA 則有不須使用活病毒、操作方法簡單快速，且可應用於大量血清檢體鑑別工作上之優點。

相關文獻指出，於大腸桿菌中表現之 H1N1 新流感病毒血球凝集蛋白(hemagglutinin; HA)第 50 至 274 個胺基酸片段(約25 kDa)可用於 ELISA 抗原盤中，成功偵測人血清中之新流感 H1N1 病毒特異性抗體。目前流感病毒 HA 及神經胺酸酶(Neuraminidase; NA)抗體力價測定大多以 HI test 及神經胺酸酶抑制試驗(Neuraminidase inhibition test; NI test)進行，其中 NI test 過程既繁瑣又耗時，本試驗希望發展 ELISA 檢測方式取代傳統的 NI test。針對 H1N1 新流感病毒 N1 之 NA 基因建構表現質體，以哺乳類細胞表現 NA 重組蛋白，重組蛋白經 Ni-NTA column 純

化後被覆於免疫盤製備成 ELISA 抗原盤，將乾燥之 ELISA 抗原盤帶到美國實驗室以標準血清進行測試，希望能建立 NA 抗體的ELISA 檢測方式。

由於 H1N1 新流感病毒已入侵臺灣豬群，因現有抗體檢測技術基於血球凝集抑制試驗，需要準備多種參考病毒及血球懸浮液，以及適當的操作訓練，且無法區別 H1N1 新流感病毒與本土豬流感 H1 亞型病毒感染，致使難以監測 H1N1 新流感病毒及變異株在豬群中蔓延之真實情形。為滿足操作方便及迅速正確之檢診實務需求與提昇豬群防檢疫效率，本試驗希望能開發新流感與本土豬群流感病毒特異性抗體鑑別方法

美國疾病管制與預防中心(CDC)指出，2010 年美國豬隻首度發現 H3N2 流感變異株 (H3N2 variant influenza virus; H3N2v)，翌年 7 月出現在人體上。由於此株病毒帶有 H1N1 新型流感之 M 基因，顯然比其他流感病毒更易從豬體傳播到人體。由於病例數已從 2011 年 12 例增加到 2012 年 307 例(截至 10 月止)，害怕會演變成人與人之間的傳染，因而造成社會大眾之恐慌。國內流感專家學者亦在報章媒體呼籲國內因盡速建立 H3N2v 流感變異株的快速診斷技術，以有效防範 H3N2v 病毒株入侵台灣。本試驗亦針對此重要議題研發以 RT-PCR 方式快速鑑別 H3N2v 流感變異株之檢測方法，針對 H3N2v 病毒之 M、HA 及 NA 基因分別設計特異性引子，先經初步測試後將此三對引子帶到美國堪薩斯州立大學獸醫學院診斷醫學暨病理生物學系，以其提供之 H3N2v、H1N1 新型流感、人類季節流感及 H3N2 豬流感病毒進行 RT-PCR 引子測試，希望藉由此行建立國內快速檢測 H3N2v 之 RT-PCR 診斷技術。

貳、研習地點簡介

美國堪薩斯州立大學獸醫學院診斷醫學暨病理生物學系(College of Veterinary Medicine, Department of Diagnostic Medicine and Pathobiology)

美國堪薩斯州立大學(Kansas State University)位於堪薩斯州內的曼哈頓(Manhattan)小鎮，該鎮地名與紐約的曼哈頓同名，但人口只有 5 萬人。該校創建於 1863 年，獸醫學院(College of Veterinary Medicine)則設立於 1905 年，目前有解剖與生理學(Anatomy and Physiology)、臨床科學(Clinic Sciences)及診斷醫學暨病理生物學(Diagnostic Medicine and Pathobiology)等 3 個學系。其中診斷醫學暨病理生物學系的教職現有 48 人，教學研究領域涵蓋流行病學、診斷、致病機制、動物與人類之傳染性、寄生性、代謝性及遺傳性疾病預防與控制等，獲得美國農業部(United States Department of Agriculture; USDA)、動植物防檢疫局(Animals and Plants Health Inspection Service; APHIS)、國家衛生院(National Institutes of Health; NIH)、堪薩斯州政府、堪薩斯州立大學及許多醫藥廠商(Fort Dodge, Bayer)或基金會等單位之經費支持。獸醫診斷實驗室(Veterinary Diagnostic Laboratories)則附屬於獸醫學院，擔負開發及傳遞獸醫和動物健康醫療團體所需之正確、新穎與及時的診斷和諮詢服務之任務，且提供優良環境與設施，支持診斷醫學暨病理生物學系(Department of Diagnostic Medicine and Pathobiology)的教學與研究職責，包括臨床病理(含臨床免疫及比較血液學)、微生物、分子診斷、寄生蟲、病理(含免疫組織化學及組織病理)、解剖學、狂犬病、血清學、中毒性學及病毒學等實驗室。此行參訪及研習的對象為該系助理教授馬文軍博士，馬博士在北美豬流感病毒研究領域之成果豐富且深入，近幾年所發表有關豬流感為主題的國際期刊論文即達25篇之多(如附錄一)。

參、過 程

一、行程表

日期	內容
11月16日 (星期五)	往程自桃園國際機場搭乘華航(CI04)出發飛往舊金山國際機場
11月17日 (星期六)	舊金山國際機場轉機飛往德州達拉斯國際機場再轉機飛堪薩斯州曼哈頓(Manhattan)
11月18日 (星期日)	與馬文軍博士討論試驗相關細節
11月19日 (星期一)	會見系主任，馬博士實驗室執行實驗及討論結果
11月20日 (星期二)	馬博士實驗室執行實驗及討論結果，參觀生物安全研究所
11月21日 (星期三)	實驗室執行實驗及討論結果，參訪獸醫診斷實驗室及堪薩斯州立大學獸醫學院診斷醫學暨病理生物系，
11月22日 (星期四)	實驗室執行實驗及討論結果，參訪大動物研究中心
11月23日 (星期五)	實驗室執行實驗及討論結果
11月24日 (星期六)	回程自美國堪薩斯州曼哈頓(Manhattan)出發經達拉斯國際機場轉機飛往洛杉磯國際機場再轉機飛往台灣
11月25日 (星期日)	抵達台灣桃園國際機場

二、研習人員

潘居祥 Pan, Chu-hsiang	行政院農業委員會家畜衛生試驗所副研究員 Associate Researcher, Animal Health Research Institute, Taipei, Taiwan.
蔡敬屏 Tsai, Ching-Ping	財團法人台灣動物科技研究所助理研究員 Animal Technology Institute Taiwan.

三、研習過程

(一) 11月18日(星期日)

堪薩斯州立大學獸醫學院診斷醫學暨病理生物學系

週日前往堪薩斯州立大學獸醫學院診斷醫學暨病理生物學系參觀馬文軍博士

實驗室，並與馬博士討論實驗相關細節。有關流感病毒 H3N2v 之 RT-PCR 檢測，馬博士將提供 13 株已確認過病毒亞型的流感病毒株作為測試標的，此 13 株流感病毒包括 H3N2v 流感病毒變異株、傳統豬流感病毒 H1N1、H1N2 及 H3N2 亞型，H1N1 新流感病毒(pandemic 2009 H1N1)及人類季節流感病毒共 13 株。由於 H3N2v 流感變異株的 M 基因是來自新型流感病毒，馬博士說他們在 Kansas 州當地豬身上新分離一株 H1N2 流感變異(H1N2v)，其 M 基因亦是來自新型流感病毒，此株病毒亦含在 13 株測試病毒株測試行列，他很有興趣看檢測結果。我們介紹了本次試驗引子設計的原理，本次帶去的 4 對引子，其中 3 對是針對 H3N2v 流感病毒變異株 8 段基因中的 M、HA 及 NA 基因核酸序列設計特異性引子。由於 H3N2v 流感變異株的 M 基因是來自 H1N1 新型流感病毒，因此 M 引子設計時即針對 H3N2v 及新型流感病毒 M 基因特殊序列，並避開台灣豬流感病毒及人類季節流感病毒 M 基因的相同序列，以避免交叉反應(Cross reaction)，M 引子 RT-PCR 產物長度為 724 bp。H 引子是針對 H3N2v 及 H3N2 豬型流感病毒之 HA 基因特殊序列設計，不會與人類季節流感 H3N2 病毒產生交叉反應，H 引子之 RT-PCR 產物長度為 262 bp。N 引子是針對 H3N2v 及 H3N2 豬流感病毒之 NA 基因特殊序列設計，不會與人類季節流感 H3N2 及 H2N2 病毒產生交叉反應，N 引子之 RT-PCR 產物長度為 375 bp。至於 U 引子是針對 A 型流感病毒之 NP 基因特殊序列設計，可檢測到所有 A 型流感病毒，不會與 B 型流感病毒產生交叉反應，產物長度為 155 bp。所以當 H3N2v 流感變異株同時以 4 對引子進行 RT-PCR 增幅，預期的結果會是 4 對引子皆呈陽性反應。當豬流感病毒 H3N2 亞型以 4 對引子進行 RT-PCR 增幅，預期得到的結果會是 H、N 及 U 三對引子呈陽性反應，但 M 引子則會呈陰性反應，因為豬流感病毒 H3N2 亞型之 M 基因不同於新型流感病毒之 M 基因，所以不會被增幅。若 H1N1 新型流感病毒以 4 對引子執行 RT-PCR 增幅，預期只有 M 及 U 兩對引子呈陽性反應，而 H 及 N 引子將會呈現陰性反應，因為以 H3 及 N2 基因設計的引子無法增幅 H1N1 病毒的 H1 及 N1 基因。若 H1N2 豬流感病毒以 4 對引子進行 RT-PCR 增幅，預期只有 N 及 U 兩對引子呈陽性反應，而 H 及 M 引子則會呈陰性反應。若 H1N2v 豬流感變異株以 4 對引子執行 RT-PCR 增幅，預期 N、M 及

U 三對引子呈會呈現陽性反應，但 H 引子則會呈陰性反應。因為 H1N2v 變異株的 M 基因與 H3N2v 流感變異株的 M 基因一樣都是來自 H1N1 新型流感病毒的 M 基因，所以會被增幅。至於人類季節流感 H1N1 病毒以 4 對引子進行 RT-PCR 增幅，預期是只有 U 對引子呈陽性反應，但 M、H 及 N 引子則會呈陰性反應，因為 H(H3)及 N(N2) 引子無法增幅 H1N1 病毒的 H1 及 N1 基因。為增加引子測試的可靠性，經討論後決定以較具挑戰性的盲樣測試(Blind test)方式來進行，即測試方將 13 株病毒編列 1 至 13 個號碼，受測者只拿到編號，不知內容物，等到測試完畢後寫出結果後再核對答案是否正確。

有關 NA 抗體檢測方面，我們希望發展 ELISA 檢測方式取代傳統的 NI test。Liu 等(2010) 以大腸桿菌原核細胞表達並純化 H1N1 新流感病毒的 HA1 重組蛋白，成功偵測人血清中之 H1N1 新流感病毒特異性抗體。哺乳類細胞表達屬真核系統，有較佳的轉譯後修飾 (Post-translational modification)，而原核細胞則無此修飾機制。對於重組蛋白表現而言，轉譯後修飾是一個蛋白質被生產出來後到完全成熟前非常重要的一個環節，由於真核細胞中存有這種機制，所以表現出來的重組蛋白會比較接近真實病毒的蛋白抗原，用於 ELISA 檢測將會得到較佳的抗體反應。為能表現與真實病毒結構較接近的重組蛋白，本試驗以高等哺乳類細胞表現 NA 重組蛋白，重組蛋白經 Ni-NTA column 純化後先被覆於免疫盤，經乾燥後製備成 ELISA 抗原盤，帶到美國實驗室以標準血清進行測試。馬博士提供 H1N1 新型流感病毒人工感染之高抗體力價豬血清供測試，希望知道 NA 抗原盤能否檢測 NI 抗體，亦想知道，哺乳類細胞表達 H1N1 新流感病毒的 NA 重組蛋白能否區別 H1N1 新流感病毒及北美型 H1N1 豬流感病毒感染產生之抗體。

另一個試驗是從短胜肽(Oligo-peptide)觀點區別新流感與本土豬群流感病毒特異性抗體。由於現有抗體檢測技術基於血球凝集抑制試驗無法區別新流感 H1N1 病毒與本土型豬流感 H1 亞型病毒感染，致使難以監測 H1N1 新流感病毒及變異株在豬群中蔓延之真實情形。由於新流感病毒 8 段基因中的 NP、HA、PA、PB1、PB2 及 NS 等 6 段基因屬於北美豬型流感病毒種系(lineage)，而 NA 及 M 基因則屬於歐亞豬型流感病毒種系，而台灣的本土型豬流感 H1N1 亞型 8 段基因則是屬於北美豬型

流感病毒種系(lineage)。本試驗先針對 H1N1 新流感病毒與本土型豬群流感病毒 H1N1 之 M 及 NA 基因之核酸序列差異處分別設計短胜肽(Oligopeptide)，並以化學合成法人工合成短胜肽，合成的粉末狀短胜肽以水溶解後，分別以免疫墨點分析法(Immuno-dot-blot assay) 及 Peptide ELISA 法測試新流感陽性豬血清及本土型豬流感陽性豬血清，能與陽性豬血清反應並能區分兩者短胜肽即為首選。將此選取的短胜肽以原核系統表現重組蛋白，重組蛋白經純化後被覆於免疫盤製備成 ELISA 抗原盤，希望測試北美豬型流感陽性豬血清是否能達到區分效果。

介紹完實驗內容後與馬博士討論實驗相關細節，並規劃往後數天的實驗及參觀行程。討論結束後馬博士帶我們參觀建校近 150 年歷史的堪薩斯州立大學校區及設立超過 100 年歷史的獸醫學院，印象最深刻的是與獸醫學院毗鄰的百年廣場(Centennial Plaza)，為紀念獸醫前輩們的豐功偉績，廣場上大理石刻記著百年來對獸醫學院有傑出貢獻的獸醫名人及年代。

(二) 11 月 19 日(星期一)

早上禮貌性的拜訪獸醫學院診斷醫學暨病理生物學系系主任 Dr. Chengappa (圖一)，簡單介紹此行目的，經交換名片，短暫寒暄後接著拜訪 Richtard 教授，Dr. Richtard 是豬流感專家，我們與他談論一些豬流感相關的議題，他對台灣的豬流感流行現況很有興趣，也希望未來與台灣能有合作計畫共同研究豬流感。

拜訪行程結束後進入實驗室執行實驗，首先進行 4 對引子增幅不同流感病毒株之 RT-PCR 測試。馬博士的研究生將 13 株已確認過病毒亞型的流感病毒以盲樣測試方式編列 1 至 13 號。先以商品化的核酸萃取套組抽取病毒 RNA 接著進行 RT-PCR 增幅，本試驗採用單一步驟 RT-PCR 反應(one step RT-PCR reaction)方式，即將反轉錄作用(reverse transcription; RT)與聚合酶鏈反應作用(polymerase chain reaction; PCR)所需的試劑加在同一支反應管內進行增幅，比起傳統 2 步驟 RT-PCR 反應，其優點為操作簡便、節省時間並可減少樣品污染機會。

先將台灣帶去的乾燥引子以 DEPC 處理水溶解適當濃度後分裝備用，13 個樣品中的每一個樣品分別以 H、U、M、N 四對引子進行四管 RT-PCR 增幅，RT-PCR

反應之反應液配製及反應條件設定詳如附錄二。完成 RT-PCR 反應時間約需 2 小時，下午進行 RT-PCR 產物膠體電泳，電泳結果詳如圖二及圖三。結果判讀如下：

樣品 1：N、U 呈現陽性，H、M 呈現陰性，結果判定為 N2 亞型，真正的病毒亞型為 H1N2。樣品 2：N、M、U 呈現陽性，H 呈現陰性判定為 N2 亞型，由於代表新流感病毒的 M 基因出現陽性，判定為 N2 亞型流感病毒變異株，真正的病毒亞型為 H1N2v 流感病毒變異株。樣品 3：H、N、M、U 皆呈現陽性，從 M 基因出現陽性觀點，直接判定為 H3N2v 流感變異株，真正的病毒亞型為 H3N2v 流感變異株。樣品 4：H、N、U 皆呈現陽性，M 呈現陰性，結果判定為豬流感病毒 H3N2 亞型，真正的病毒亞型為 H3N2 豬流感病毒。樣品 5：M、U 皆呈現陽性，H、N 皆呈現陰性，結果判定為非 H3 亦非 N2 亞型，由於代表新流感病毒的 M 基因出現陽性，判斷為 H1N1 新流感病毒，而真正的病毒亞型為 H1N1 新流感病毒。樣品 6：H、N、U 皆呈現陽性，M 呈現陰性，結果判定為豬流感病毒 H3N2 亞型，而真正的病毒亞型為 H3N2 豬流感病毒。樣品 7：H、N、U 皆呈現陽性，M 呈現陰性，結果判定為豬流感病毒 H3N2 亞型，而真正的病毒亞型為 H3N2 豬流感病毒。樣品 8：H、N、U 皆呈現陽性，M 呈現陰性，結果判定為豬流感病毒 H3N2 亞型，而真正的病毒亞型為 H3N2 豬流感病毒。樣品 9：M、U 呈現陽性，H、N 皆呈現陰性，判定為非 H3 亦非 N2 流感病毒，但由於代表新流感病毒的 M 基因出現陽性，故判定為新流感病毒，而真正的病毒亞型為 H1N1 新流感病毒。樣品 10：只有 U 呈現陽性，H、N、M 皆呈現陰性，結果判定為非 H3 亦非 N2 亞型，真正的病毒亞型為人類流感病毒 H1N1 亞型。樣品 11：只有 U 呈現陽性，H、N、M 皆呈現陰性，結果判定為非 H3 亦非 N2 亞型，真正的病毒亞型為豬流感病毒 H1N1 亞型。樣品 12：H、N、U 皆呈現陽性，M 呈現陰性，結果判定為豬流感病毒 H3N2 亞型，而真正的病毒亞型為 H3N2 豬流感病毒。樣品 13：只有 U 皆呈現陽性，H、N、M 皆呈現陰性，結果判定為非 H3 亦非 N2 亞型，真正的病毒亞型為豬流感病毒 H1N1 亞型(詳見表一及表二)。結果顯示，從 RT-PCR 產物直接判定病毒亞型與真正的病毒亞型皆十分吻合，顯示測試引子的特異性很高。馬博士說，樣品 2 為 H1N2v 流感病毒變異株。樣品 3 為 H3N2v 流感病毒變異株，兩株流感病毒變異株在這次的

測試中都有被檢測到，這是很好的檢測結果。

(三) 11 月 20 日(星期二)

為測試 U 引子對於 H3N2v 病毒的敏感度，乃進行敏感性測試。將 150ng/ μ l 的 H3N2v 病毒 RNA 作 10 倍稀釋連續稀釋(從 10^{-1} 至 10^{-8})，每個稀釋階取 5 μ l 進行單一步驟 RT-PCR 反應，經 35 循環後每個稀釋階之 RT-PCR 產物取出 10 μ l 進行膠片電泳。結果顯示，敏感度可達 10^{-5} 倍稀釋(圖四)，換算其 RNA 含量為 1.5 fg/ μ l。台灣田間存在 H3N2 豬流感病毒，但尚未發現 H3N2v 流感變異株，為測試多引子 RT-PCR(Multiplex RT-PCR)增增幅效果，將 H、N、M 三對引子混合後同時增幅 H3N2v 流感變異株及 H3N2 豬流感病毒。結果顯示，H、N、M 三對引子增幅 H3N2v 流感病毒變異株出現 3 條反應條帶(band)分別是 262 bp、375 bp 及 724 bp。但 H、N、M 三對引子增幅 H3N2v 豬流感病毒僅出現 2 條反應條帶(band)分別是 262 bp 及 375 bp (圖四)，所以 M 引子是否出現產物是判定 H3N2v 或 H3N2 的主要關鍵，此結果顯示，H、N、M 三對引子可應用於多引子 RT-PCR 快速檢測。

生物安全研究所(Biosecurity Research Institute; BRI)坐落於堪薩斯州立大學獸醫學院旁邊，該所藩籬圍繞，監視器林立，是個戒備森嚴之地，據說若未經申請在圍牆外對著內部建築物任意拍照，警衛就會出來關切。但只要提出參觀申請且被核准，還是有開放給外賓參觀。先前提出的參觀申請已被核准了，所以我們下午是參觀生物安全研究所，當天是由該所 Pat Roberts Hall 的 Scott Rusk 主任(Director)親自接待我們(圖五)。我們被安排在視聽中心來賓席，Scott Rusk 主任先是歡迎致詞，接著口頭介紹生物安全研究所的任務目標、硬體設施及問題解答，口頭介紹完畢後接著播放該所為外賓準備的簡介短片。生物安全研究所之設立發想於 1999 年由堪薩斯州立大學提出的建造藍圖，2000 年向美國國會爭取經費，2001 年爭取堪薩斯州政府經費，2002 年堪薩斯州立大學設置國家農業生物安全中心(National Agricultural Biosecurity Center)後進行人員及工作目標籌備事宜。該所自 2004 年起開始建造至 2007 年落成後，於 2008 年開始各項研究任務，並獲得鉅額經費支持，且於 2012 年通過第一個 5 年期評估。該研究所設施包括生物安全第三強化等級之實驗室及相關支援設備、各

種準備實驗室、農業生物安全第三等級之動物飼養舍及支援設備、生物安全第三等級動物飼養房、節肢動物防控第三等級之實驗室及養蟲房、生物安全第三等級之食用動物安全保全區及食品加工區、植物與細胞培養環境控制室、以及冷房與冷凍庫等。研究任務涉及動植物與人類病原基礎生物學、疾病偵測快速正確診斷技術開發、疫苗研發測試及評估、食物採收前後病原檢測、食品加工之安全與保全、污染防治之模擬與除污、以及宿主與媒介間疾病傳播等。該所對於動物疾病研究的對象主要以境外疾病為主，包含高病原性禽流感、布氏桿菌症、豬瘟、口蹄疫、藍舌病、裂谷熱及麥熱病(wheat blast)等，其性質類似美國農業部所屬的梅島動物疾病中心(Plum island animal disease center)。據 Scott Rusk 主任說紐約州梅島動物疾病中的設備太老舊了，美國政府已決定搬遷至堪薩斯州，重新蓋新的三級實驗室及動物房，位置就在 BRI 附近。該研究所除了研究工作亦對外界提供各式各樣教育訓練計畫與課程，配備完善教學空間、訓練實驗室及模擬設施，可讓學員接受真實明確的實習經驗。

簡報結束後，Scott Rusk 主任帶我們參觀訓練用生物安全三級實驗室，該實驗室擁有生物安全三級實驗室所需的各種標準配備(圖六)，其任務是訓練國內外研究人員熟悉如何操作生物安全三級實驗。該實驗室地板及牆壁皆被覆 EPOXY，乾淨明亮，可謂一塵不染。該訓練用實驗室可學習到三級生物安全隔離衣的操作，實驗動物隔離器(isolate)的操作，三級生物安全櫃的操作，煙燻消毒器的使用等，凡舉一般生物安全三級實驗室常用的設備皆可在此學習到操作技術。接著 Scott Rusk 主任又帶我們參觀生物安全三級動物房，剛好有一間動物房實驗結束亦打掃乾淨，可讓我們參觀硬體設施，不過進入三級動物房是不能照相。我們通過雙層氣密門進入三級動物房，該動物房地板及牆壁亦皆被覆 EPOXY，乾淨明亮，一如新屋，特別的是聞不到動物排泄物的味道。我好奇的問 Scott Rusk 主任，這間動物房是否是新房尚未飼養過動物，因為都聞不到動物的味道。他說此間動物房實驗結束不久，已經清洗消毒乾淨了。我好奇問他，如何清洗才能如此乾淨，依我在台灣待過生物安全三級動物房的經驗，動物房再怎麼洗，還是有味道存在。他說要用高壓水槍清洗，工人要花很多時間仔細的清洗消毒。此間動物房隔欄方式是採用活動式圍籬，試驗結束後隔欄架可拆方便清洗，空的動物房更容易清洗消毒。接著通過雙層氣密門，進入中央

走道相對污染區再進入解剖房，解剖房擺放著各式解剖工具。Scott Rusk 主任特別帶我們看一台他們自行設計的豬隻保定架，特殊的 V 型槽設計，只要將實驗豬翻轉肚子朝上放上保定架，豬隻即無法動彈，乖乖地任人處置，大大節省豬隻保定人力。解剖房內地面上看到一個直徑約 2 公尺的大鍋蓋，正納悶它的用途，Scott Rusk 主任解釋說那是動物屍體消化槽，地面上看到的是鍋蓋，數公尺深的槽體則埋在地下。BRI 沒有用焚化爐來處理動物屍體，因為那會造成空氣污染，他們利用消化槽以加酸、加鹼方式將屍體融化掉，最後變成液體狀態經處理後排入下水道。Scott Rusk 主任最後帶我們參觀位於動物房上方控制動物房陰壓狀態的負壓機房，該機房挑高 2 至 3 層樓高，他說平常很少帶人來參觀負壓機房，我們很幸運可以來參觀。他簡單介紹負壓機房內的機器設備，每間動物房進、排氣各自獨立，他現場解釋如何控制動物房的進、排氣，他們平常是利用電腦來控制每間負壓動物房的壓差。圖七為 BRI 生物安全三級動物房及負壓機房，由於裡面禁止拍照，此圖翻拍自 BRI 提供給外賓的簡介 DM。參觀行程結束離開 BRI 時，陪同我們的博士後研究員特地向接待員提說，待會出去時我們想在前門照相，可不可以，經口頭允諾後我們才能在前門照相(圖八)。

(四) 11 月 21 日(星期三)

早上進行 ELISA 試驗，取出台灣帶去已披覆(Coating) NA 重組蛋白且乾燥後的抗原盤，此抗原盤披覆 NA 重組蛋白的抗原量為 0.5 ug/孔，將馬博士提供 H1N1 新流感病毒感染豬之標準抗血清(HI 抗體力價為 1280 倍)以含 casein 的 Blocking buffer 作 2 倍連續稀釋(從 2^1 至 2^{16})。每個稀釋階取 100 μ l 一次抗體加入已披覆 NA 重組蛋白之 ELISA 抗原盤，經 1 小時 37°C 反應後以 PBST(含 0.5% Tween 20)清洗三次，甩乾抗原盤。接着加入 100 μ l 兔抗豬標記 HRP 二次抗體於 37°C 反應 30 分鐘，再以 PBS T 清洗三次後甩乾抗原盤，最後加入呈色劑，經 20 分鐘後以 OD405 波長讀取 OD 值，結果顯示，OD 值最高為 2.07，最低為 0.061，將 OD 值轉換成線型圖後可得到線性化曲線(圖九)。

下午利用空檔參觀堪薩斯州立大學獸醫學院及獸醫診斷實驗室，該學院自 1905

年設立迄今已有 108 年，其歷史之悠久相較於美國境內眾多的獸醫學院，也是名列前茅。該學院目前有解剖與生理學、臨床科學及診斷醫學暨病理生物學等 3 個學系。獸醫學院 MOSIER HALL 為 2 層樓建築，一樓左邊為獸醫診斷實驗室(Veterinary diagnostic laboratory)，右邊獸醫教學醫院(Veterinary medical teaching hospital)即是學院附設的家畜醫院，中間為實驗室區，二樓則為研究室及實驗室。獸醫教學醫院門口上方可見到 EMERGENCY 紅色大字向民眾指示方向，參觀獸醫教學醫院時看到在寬廣大廳上有 7 ~ 8 位飼主帶著小動物坐在沙發椅等待就診。左邊一樓的獸醫診斷實驗室主要為農民服務，接收經濟動物(如雞、鴨、羊、豬、牛)的檢體，檢體送來時，一般會先做病理解剖，參觀解剖房時可看天花板上有滑輪軌道，是為大動物解剖吊掛用，解剖台有 9 座可同時處理 9 組檢體(圖十)。當檢體採集完畢後送至診斷實驗室接著進行各項診斷實驗，主要的診斷實驗室位於 2 樓，計有病理學中心(Pathology learning resource center)、組織病理學實驗室(Histopathology LAB)、細菌學實驗室(Bacteriology LAB)、黴菌學實驗室(Mycology LAB)、比較毒物學實驗室(Comparative toxicology LAB)、病毒學實驗室(Virology LAB)、電子顯微鏡實驗室(Electron Microscopy LAB)等。診斷實驗室旁就是研究實驗室，大體上來說，診斷與研究是相互支援，當診斷業務有新發現時即可進一步進行研究，研究的素材可來自診斷上的發現。

(五) 11 月 22 日(星期四)

早上進行 ELISA 試驗，今天主題是以 ELISA 方式從抗體區別 H1N1 新流感與本土豬流感 H1 亞型病毒感染。本次試驗的重組蛋白是來自 H1N1 新流感病毒與 H1N1 本土豬流感病毒之 NA 及 M 基因中具區別效果之短肽核酸序列次選殖到 pET32a 表現質體(plasmid)，將經定序確認之質體轉形至 BL-21(DE3)表現細胞。BL-21 表現出來的重組蛋白皆具水溶性，將水溶性重組蛋白經 NI-NTA column 純化後，以每孔 0.5 ug 蛋白量披覆免疫盤，經乾燥處理後保存備用。將馬博士提供 6 支包含 H1N1 新流感病毒、H1N1 豬流感病毒與 H3N2v 流感變異株之標準抗血清進行 ELISA 抗原盤測試。將標準抗血清 2 倍稀釋後各取 100 μ l 一次抗體加入已披覆重組蛋白之 ELISA 抗原盤，經 1 小時 37°C 反應後以 PBST(含 0.5% Tween 20)清洗三

次，用乾抗原盤。接着加入 100 μ l 兔抗豬標記 HRP 二次抗體於 37°C 反應 30 分鐘，再以 PBST 清洗三次後用乾抗原盤，最後加入呈色劑，經 20 分鐘後以 OD405 波長讀取 OD 值，結果顯示可區別新流感 H1N1 病毒與同源的北美三重組型豬流感病毒誘發產生之抗體。

下午利用空檔參觀大動物研究中心(Large Animal Research Center)，大動物研究中心落成於 2011 年元月，係因美國之國家生物與農業防護設施(National Bio and Agro-Defense Facility; NBAF)將設於堪薩斯州立大學附近，該校的比較醫學團隊(Comparative Medicine Group)隨之改組建設而成。該中心可提供教學與研究用大型動物之飼養及試驗場所，包括狗、豬、牛、綿羊及山羊等動物，以及獸醫學院的各種教學動物群。該中心佔地寬廣，從大門口至動物房相隔數百公尺(圖十一)，動物房週遭廣大空地，可有效阻隔病原微生物外漏，在台灣很難有這樣大片的場地來蓋生物安全第二等級實驗動物房。該中心設施良善，已獲得國際實驗動物照護評估與認證協會(the Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International; AAALAC)認可。我們參觀大動物研究中心主要是參觀生物安全二級病原感染動物房，該中心可操作的病原微生物等級為二級以下，例如豬呼吸與生殖綜合症、豬環狀病毒第二型感染症、豬流感病毒及其他常見病原。感染動物房進行動物試驗時，人員的進出路徑，乾淨區及污染區的場地分配是否適當，會影響試驗結果。馬文軍博士的豬流感病毒相關動物感染試驗即在此進行，門口證貼著一張染動物房相關配置及人員行走路線圖指示現場工作人員，馬博士很用心幫我們解釋進入感染動物房人員行走路線、乾淨區、污染區如何配置才可避開交叉汙染(圖十二)。

(六) 11 月 23 日(星期五)

早上進行 ELISA 試驗。由於美國本土豬型 H1N1 流感病毒之 NA 基因屬於北美豬型流感病毒種系與 H1N1 新流感病毒之 NA 基因所屬的歐亞型不同，因此希望從 NA 重組蛋白的 ELISA 檢測能區別兩者抗體。將披覆 NA 重組蛋白之 ELISA 抗原盤以馬博士提供的 6 支流感陽性豬血清，包含 2 支 H1N1 新流感病毒陽性血清、3 株 H1N1 豬型流感病毒陽性血清及 1 株 H3N2v 流感變異株陽性血清。6 支

陽性血清以 ELISA 方式檢測 N1 之 NA 抗體，結果顯示，2 支 H1N1 新流感病毒感染血清明顯高於其他 3 株 H1N1 流感陽性血清及另 1 株 H3N2v 流感變異株感染血清。

下午由蔡敬屏助理研究員於馬文軍博士實驗室研究團隊之研究討論會議中專題演講「Surveillance of Swine Influenza in Taiwan」，並接受師生問答。馬博士實驗室研究團隊中一位主要研究計畫主持人 Richard 教授對台灣豬流感病毒之獨特性極感興趣，特別是台灣本土豬群中目前流行的病毒基因源自 1980 年代，與周邊鄰近國家皆為 2000 年後的豬流感病毒相當不同，而 1980 年代豬流感病毒長期續留於台灣本土豬群中之原因值得探討，於是提供很多見解與建議。馬文軍博士的一位博士班學生則詢問台灣本土豬群中流感病毒流行狀況與中國豬群之間的關連性，雙方是否互有影響？蔡敬屏助理研究員回覆：由於在解嚴前雙邊長久阻隔，並無互動，自然少有影響，但解嚴後近年來人員與物品往來熱絡，恐有病毒交流風險，唯依台灣現今的監控系統所知資訊，尚無發現來自中國豬群之流感病毒。又鑑於馬文軍博士赴美前來自中國哈爾濱，由其補充說明中國豬群之流感病毒流行現況。馬文軍博士則對台灣豬流感病毒之致病力與傳播性感興趣，建議應積極進行實驗動物感染試驗及病理學評估檢查等後續研究。

肆、心得

- 一、目前豬流感病毒 NA 抗體力價檢測大多以神經胺酶抑制試驗(NI test)進行，而 NI test 過程既繁瑣又耗時，本試驗以哺乳類細胞表現 NA 重組蛋白，重組蛋白經 Ni-NTA column 純化後被覆於免疫盤製備成 ELISA 抗原盤，希望發展 ELISA 檢測方式取代傳統的 NI test。NA 抗原盤以美國實驗室提供之標準血清進行測試結果顯示可得到線性化曲線，未來有希望開發以 ELISA 檢測方式取代傳統的 NI test。
- 二、2012 年美國一位婦女因感染 H3N2v 流感變異株而死亡的個案引起社會大眾恐慌，國內流感專家學者呼籲國內應盡速建立 H3N2v 流感變異株的快速診斷技術。針對此重要議題，本所即時設計以 RT-PCR 方式快速鑑別 H3N2v 之檢測引子，鑒於國內並無 H3N2v 病毒株，很難評估所設計引子對的效能，因此規劃到美國進行實驗。實驗結果顯示成功建立 H3N2v 流感變異株的快速診斷技術，未來應用在國內動物疾病診斷業務，將能快速檢出入侵的 H3N2v 病毒株，減少民眾的恐慌。
- 三、本計畫研發之 ELISA 抗原盤證實可區別新流感 H1N1 病毒與同源的北美三重組型豬流感病毒誘發產生之抗體，未來可應用於田間血清之檢測。
- 四、本次有機會參觀美國生物安全研究所，了解生物安全三級實驗室及動物房的運作情形。實驗室操作人員必須具備生物安全的觀念，並要嚴格遵守三級實驗室內各種操作規範，才能杜絕病原微生物的外漏感染人及動物。
- 五、馬文軍博士實驗室研究團隊中一位主要研究計畫主持人 Richard 教授對於台灣豬流感病毒之獨特性極感興趣，提供很多見解與建議，讓此行收穫良多。

伍、建 議 事 項

- 一、美國堪薩斯州立大學馬文軍博士對於北美豬流感病毒研究廣泛深入，亦收集許多標準抗血清及田間豬血清，日後應繼續加強雙邊學術交流與人員互訪聯繫。
- 二、本次赴美測試 RT-PCR 方式快速鑑別 H3N2v 流感變異株之檢測方法已獲得初步成果，建議能將此技術實際應用於國內動物疾病的診斷業務上。
- 三、獸醫實驗室及動物房常會操作到致病病原及微生物，為杜絕實驗室及動物房病原微生物的外漏污染，建議研究人員平時應加強生物安全訓練。

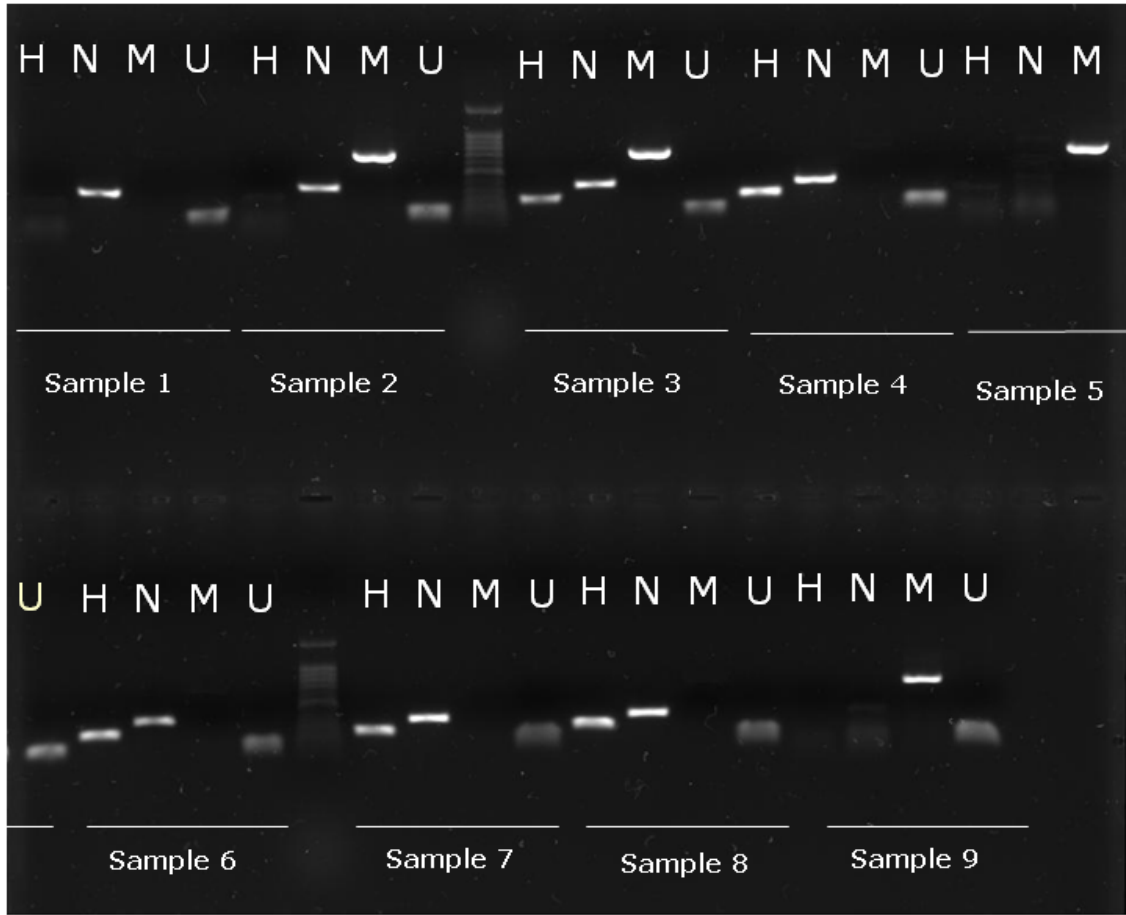
陸、致 謝

首先感謝國科會科發基金經費支助及長官們熱心協助計畫推動與指導，特別感謝美國堪薩斯州立大學獸醫學院診斷醫學暨病理生物學系馬文軍博士慷慨提供受測病毒株及標準血清。再要感謝馬博士的研究團隊及研究生們在 RT-PCR 及 ELISA 試驗上的協助，也要感謝 Richard 教授對台灣豬流感研究上的建議。

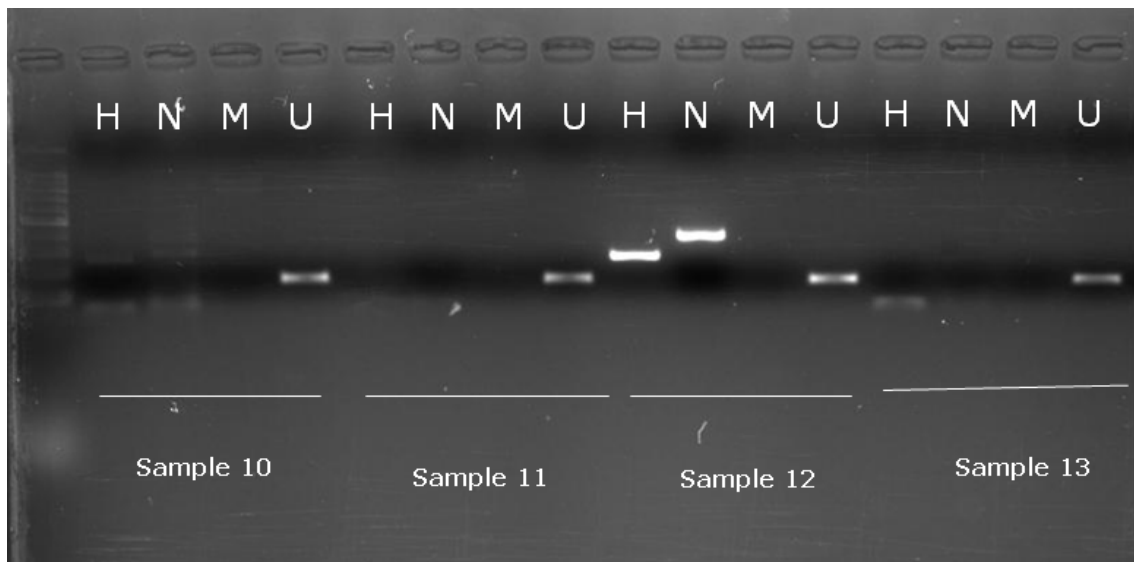
柒、圖 表



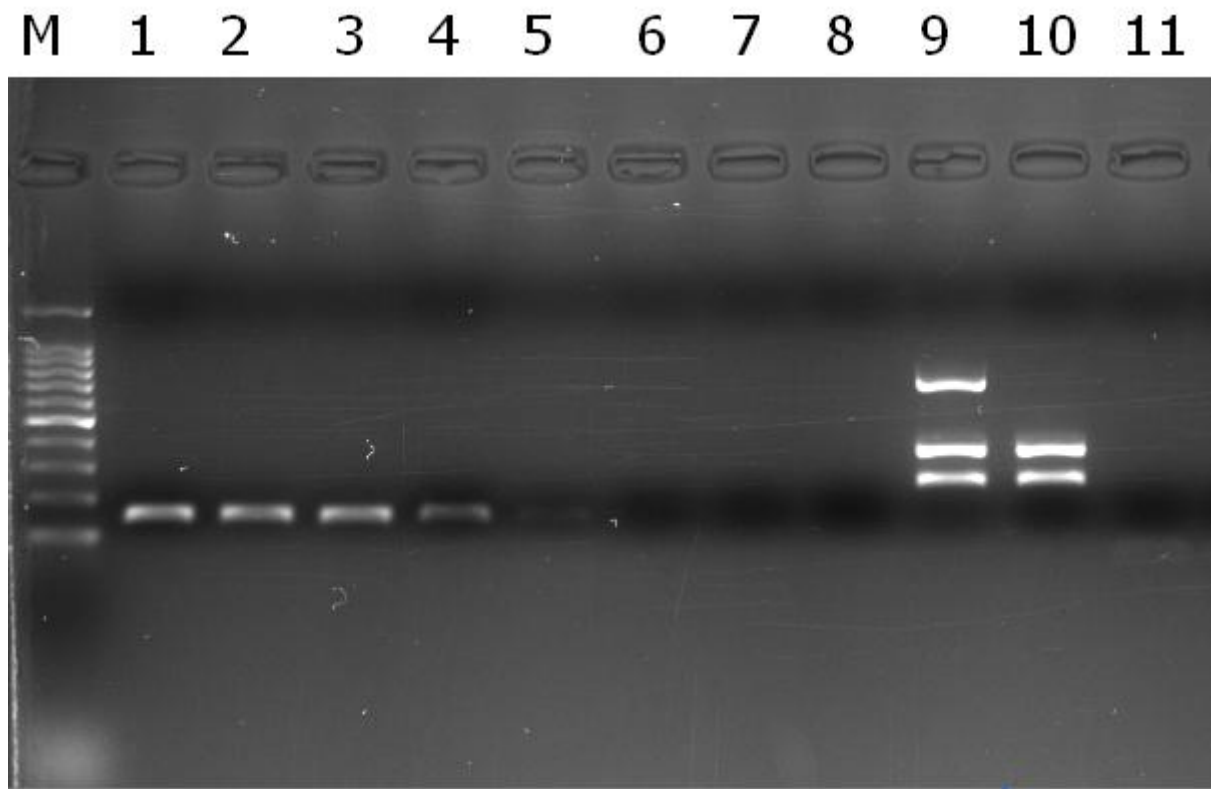
圖一、與獸醫學院診斷醫學暨病理生物學系主任 Dr. Chengappa (左三)及馬文軍博士 (左一)合影。左二：潘居祥副研究員，左四：蔡敬屏助理研究員。



圖二、1 至 9 號盲樣測試樣品之 RT-PCR 增幅結果



圖三、10 至 13 號盲樣測試樣品之 RT-PCR 增幅結果



圖四、U 引子敏感性測試及 H、N、M 多引子 RT-PCR 測試

Line 1: H3N2v 流感變異株 RNA 10^{-1} 稀釋。

Line 2: H3N2v 流感變異株 RNA 10^{-2} 稀釋。

Line 3: H3N2v 流感變異株 RNA 10^{-3} 稀釋。

Line 4: H3N2v 流感變異株 RNA 10^{-4} 稀釋。

Line 5: H3N2v 流感變異株 RNA 10^{-5} 稀釋。

Line 6: H3N2v 流感變異株 RNA 10^{-6} 稀釋。

Line 7: H3N2v 流感變異株 RNA 10^{-7} 稀釋。

Line 8: H3N2v 流感變異株 RNA 10^{-8} 稀釋。

Line 1-8: U 引子敏感性測試

Line 9: H3N2v 流感變異株以 H、N、M 多引子 RT-PCR 測試。

Line 10: H3N2 豬流感病毒以 H、N、M 多引子 RT-PCR 測試。

Line 11: H、N、M 多引子 RT-PCR 測試陰性對照。



圖五、參觀生物安全研究所，並與 Scott Rusk 主任(左一)合影。



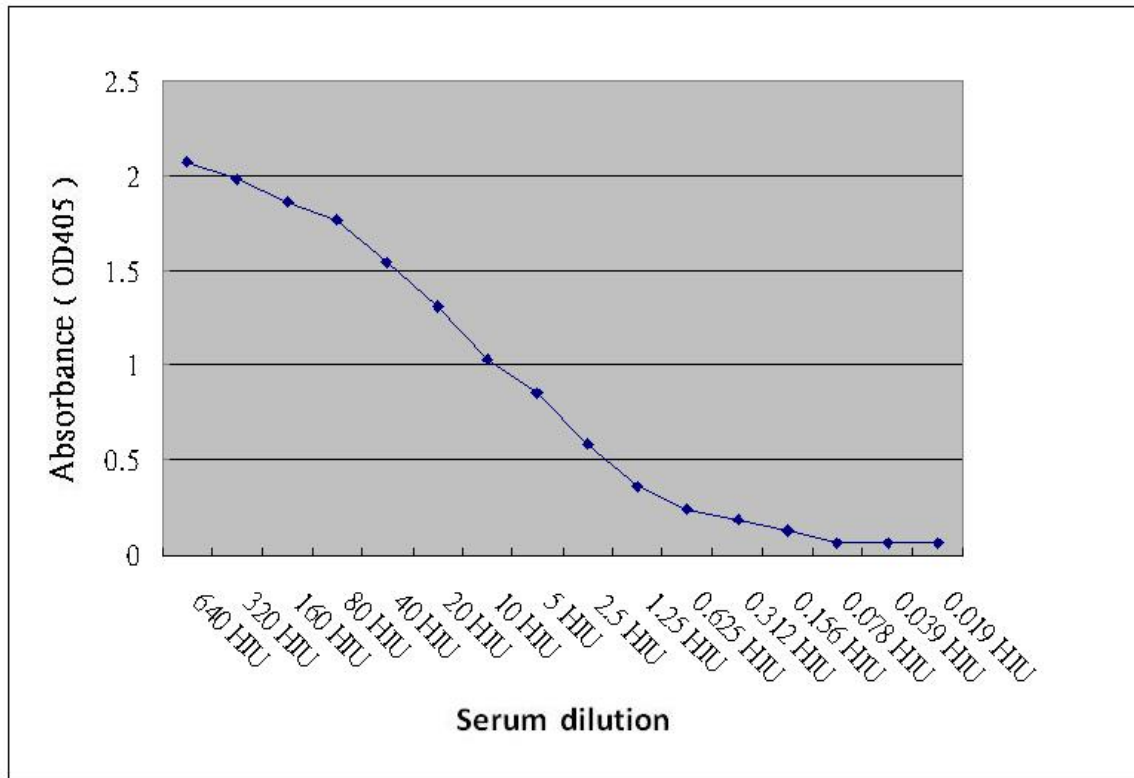
圖六 BRI 訓練用生物安全三級實驗室及生物安全櫃



圖七、BRI 生物安全三級動物房及負壓機房



圖八、參觀生物安全研究所結束後於門前合影



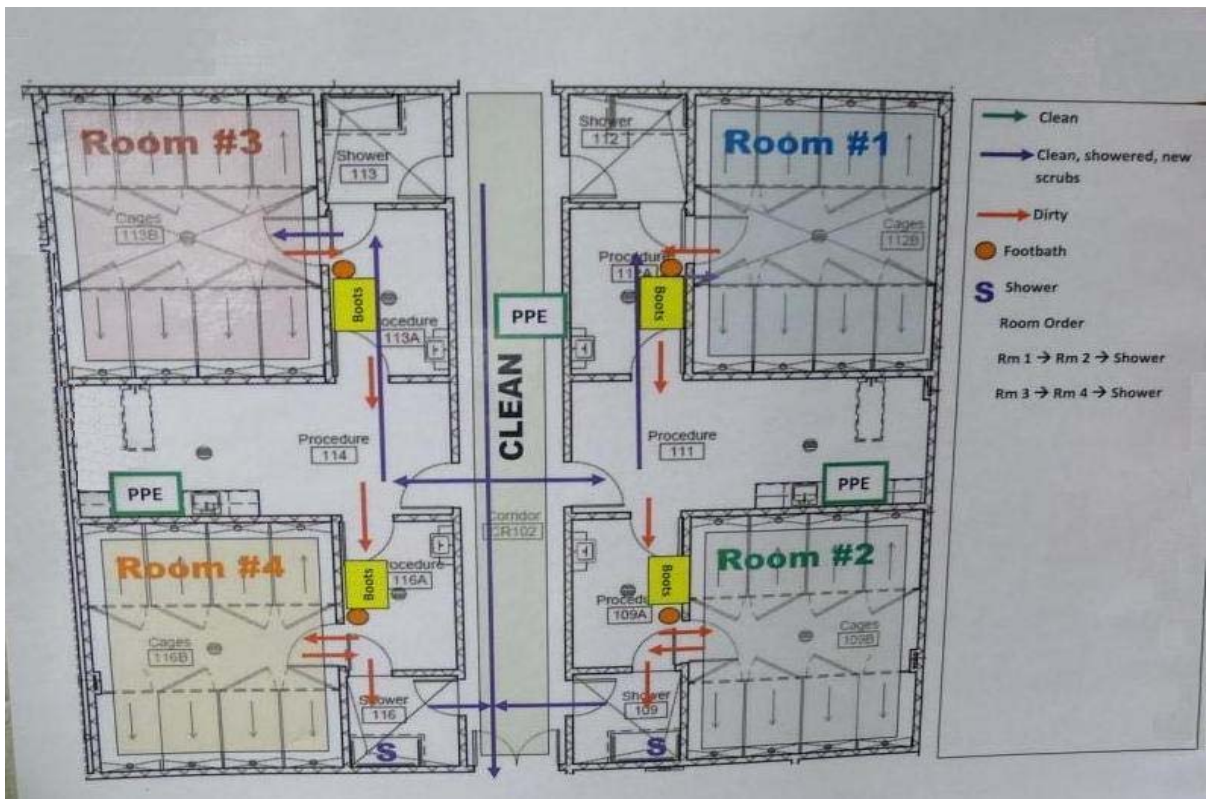
圖九、HA 抗體力價 1280 倍之 H1N1 新流感病毒感染豬血清經 2 倍連續稀釋後以 ELISA 法測試 NA 抗原盤可得線性化曲線



圖十、獸醫診斷實驗室內解剖房



圖十一、參觀校區內大型動物研究中心



圖十二、感染動物房相關配置及人員行走路線圖

表一 RT-PCR 增幅 13 株流感病毒株之測試結果

NO gene	1	2	3	4	5	6	7
H3	-	-	+	+	-	+	+
N2	+	+	+	+	-	+	+
M	-	+	+	-	+	-	-
U	+	+	+	+	+	+	+
亞型 判定	H?N2	H?N2v	H3N2v	H3N2	H?N?	H3N2	H3N2
病毒 亞型	H1N2	H1N2v	H3N2v	H3N2	Pdm (H1N1)	H3N2	H3N2

NO gene	8	9	10	11	12	13
H3	+	-	-	-	+	-
N2	+	-	-	-	+	-
M	-	+	-	-	-	-
U	+	+	+	+	+	+
亞型 判定	H3N2	H?N?	H?N?	H?N?	H3N2	H?N?
病毒 亞型	H3N2	Pdm (H1N1)	H1N1	H1N1	H3N2	H1N1

捌、附 錄

附錄一、馬文軍博士發表國際期刊有關豬流感為主題的論文

1. Van Reeth K, **Ma W**. Swine Influenza Virus Vaccines: To Change or Not to Change-That's the Question. **Curr Top Microbiol Immunol**. 2012 Sep 13. [Epub ahead of print] PMID: 22976350.
2. Jennifer T. Go, Sarah E. Belisle, Nicolas Tchitchek, Terrence M. Tumpey, **Wenjun Ma**, Juergen A. Richt, David Safronetz, Heinz Feldmann and Michael G. Katze. Comparative transcriptomic analysis of acute host responses during 2009 pandemic H1N1 influenza infection in mouse, macaque and swine. **BMC Genomics**. In Press.
3. Qiao C, Liu Q, Bawa B, Shen H, Qi W, Chen Y, Mok C, García-Sastre A, Richt J, **Ma W***. Pathogenicity and transmissibility of reassortant H9 influenza viruses with genes from pandemic H1N1 virus. **J Gen Virol**. 2012 93:2337-45. PMID: 22875253
*corresponding author
4. Vincent AL, **Ma W**, Lager KM, Richt JA, Janke BH, Sandbulte MR, Gauger P, Loving CL, Webby RJ, García-Sastre A. Live attenuated influenza vaccine provides superior protection from heterologous infection in pigs with maternal antibodies without inducing vaccine associated enhanced respiratory disease. **J Virol**. 2012: 86(19): 10597-605. PMID: 22811541.
5. Li X, Qi W, He J, Ning Z, Hu Y, Tian J, Jiao P, Xu C, Chen J, Richt J, **Ma W***, Liao M. Molecular Basis of Efficient Replication and Pathogenicity of H9N2 Avian Influenza Viruses in Mice. **PLoS One**. 2012: 7(6):e40118. PMID: 22768236.
*corresponding author
6. Juergen A Richt, Barry Rockx, **Wenjun Ma**, Friederike Feldmann, David Safronetz, Andrea Marzi, Darwyn Kobasa, James E. Strong, Lisa Kercher, Dan Long, Don Gardner, Douglas Brining, Heinz Feldmann. Recently Emerged Swine Influenza A virus (H2N3) Causes Severe Pneumonia in Cynomolgus Macaques. **PLoS ONE**. 2012:7(7):e39990. PMID: 22808082.

7. **Ma W***, Liu Q, Bawa B, Qiao C, Qi W, Shen H, Chen Y, Ma J, Li X, Webby RJ, Garcia-Sastre A, Richt JA. The NA and M genes of the 2009 pandemic influenza H1N1 virus functionally cooperate to facilitate efficient replication and transmissibility in pigs. **J Gen Virol**. 2012 93:1261-1268. PMID: 22337640.
*corresponding author
8. Qinfang Liu, Jingjiao Ma, Haixia Liu, Wenbao Qi, Joe Anderson, Steven C. Henry, Richard A. Hesse, Jürgen A. Richt, **Wenjun Ma***. Emergence of novel reassortant H3N2 swine influenza viruses with the 2009 pandemic H1N1 genes in the United States. **Archive of Virology**. 2012, 157(3):555-62. PMID:22198410.
*corresponding author
9. Liu Q, Qiao C, Marjuki H, Bawa B, Ma J, Guillosoy S, Webby RJ, Richt JA, **Ma W***. Combination of PB2 271A and SR polymorphism at positions 590/591 is critical for viral replication and virulence of swine influenza virus in cultured cells and in vivo. **J Virol**. 2012, 86(2):1233-7. PMID: 22072752; PMCID: PMC3255826.
*corresponding author
10. **Ma W**, Belisle SE, Mosier D, Li X, Stigger-Rosser E, Liu Q, Qiao C, Elder J, Webby R, Katze MG, Richt JA. 2009 pandemic H1N1 influenza virus causes disease and upregulation of genes related to inflammatory and immune responses, cell death, and lipid metabolism in pigs. **J Virol**. 2011 85(22):11626-37. PMID: 21900171; PMCID: PMC3209293.
11. **Ma W**, Lager KM, Li X, Janke BH, Mosier DA, Painter LE, Ulery ES, Ma J, Lekcharoensuk P, Webby RJ, Richt JA. Pathogenicity of swine influenza viruses possessing an avian or swine-origin PB2 polymerase gene evaluated in mouse and pig models. **Virology**. 2011 Feb 5; 410(1):1-6. PMID: 21074235 PMCID: PMC3033585.
12. **Wenjun Ma**, Richard Oberst, Xi Li, Deborah Clouser, Richard Hesse, Raymond Rowland, Jürgen A. Richt. 2010. Rapid detection of the pandemic H1N1 virus by

- real-time and gel-based RT-PCR assays. **Influenza and other respiratory viruses**. 4(6): 397-403. PMID: 20958934.
13. **Wenjun Ma**, Kelly M. Lager, Porntippa Lekcharoensuk, Eva Ulery, Bruce H. Janke, **Alicia Solórzano**, Richard J. Webby, Adolfo García-Sastre, Jürgen A. Richt. 2010. Viral reassortment and transmission after coinfection of pigs with two subtypes of swine influenza virus. **Journal of General Virology**, 91: 2314-2321. PMID: 20484565; PMCID: PMC3052522.
 14. **Wenjun Ma** and Juergen A. Richt. 2010. Swine influenza vaccines: current status and future perspectives. **Animal Health Research Reviews**, 13: 1-16. PMID: 20462470.
 15. **Wenjun Ma**, Dominique Brenner, Zhongfang Wang, Bianca Dauber, Christina Erhardt, Katrin Hoegner, Susanne Herold, Stephan Ludwig, Thorsten Wolff, Kangzhen Yu, Juergen A. Richt, Oliver Planz and Stephan Pleschka. 2010. The NS-Segment of an H5N1 Highly Pathogenic Avian Influenza Virus (HPAIV) is Sufficient to Alter Replication Efficiency, Cell Tropism and Host Range of an H7N1 HPAIV. **Journal of Virology**, 84 (4): 2122-2133. PMID: 20007264 PMCID: PMC2812369.
 16. **Wenjun Ma** Amy L. Vincent, Kelly M. Lager, Bruce H. Janke, Steven C. Henry, Raymond R. R. Rowland, Richard A. Hesse, Jürgen A. Richt. 2010. Identification and characterization of a highly virulent triple reassortant H1N1 swine influenza virus in the United States. **Virus Genes**, 40: 28-36. PMID: 19862613.
 17. Amy L. Vincent, **Wenjun Ma**, Kelly M. Lager, Marie R. Gramer, Jürgen A. Richt, Bruce H. Janke. 2009. Characterization of a newly emerged genetic cluster of H1N1 and H1N2 swine influenza virus in the United States. **Virus Genes**, 39: 176-185. PMID: 19597980
 18. **Wenjun Ma**, Kelly M. Lager Amy. L. Vincent, Bruce H. Janke, Marie R. Gramer, Jürgen A. Richt. 2009. The role of swine in the generation of novel influenza viruses.

- Zoonoses and Public Health**, 56: 326-337. PMID: 19486316
19. **Wenjun Ma**, Robert E. Kahn, Jürgen A. Richt. 2009. The pig as a mixing vessel for influenza viruses: Human and Veterinary Implications. **Journal of Molecular and Genetic Medicine**, 3(1): 158-166. PMID: 19565018; PMCID: PMC2702078.
 20. Amy L. Vincent, **Wenjun Ma**, Kelly M. Lager, Bruce H. Janke, Jürgen A. Richt. 2008. Swine influenza viruses: A North American Perspective. **Advances in Virus Research**, 72: 127-154. PMID:19081490.
 21. **Wenjun Ma**, Amy L.Vincent, Marie R. Gramer, Christy B. Brockwell, Kelly M. Lager, Bruce H. Janke, Phillip C. Gauger, Devi P. Patnayak, Richard J. Webby, Jürgen A. Richt. 2007. Identification of H2N3 Influenza A viruses from swine in the United States. **Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America (PNAS)**, 104(25): 20949-20954. PMID: 18093945; PMCID: PMC2409247.
 22. Amy L. Vincent, **Wenjun Ma**, Kelly M. Lager, Bruce H. Janke, Richard J. Webby, Adolfo García-Sastre, and Jürgen A. Richt. 2007. Efficacy of intranasal administration of a truncated NS1 modified live virus vaccine to protect against homologous and heterologous swine influenza virus. **Vaccine**, 25(47): 7999-8009. PMID: 17933442.
 23. **Wenjun Ma**, Marie Gramer, Kurt Rossow, Kyoung-Jin Yoon. 2006. Isolation and genetic characterization of new reassortant H3N1 swine influenza virus from pigs in the Midwest United States. **Journal of Virology**, 80(10): 5092-5096. PMID: 16641303.
 24. Amy L. Vincent, Kelly Lager, **Wenjun Ma**, Porntippa Lekcharoensuk, Marie Gramer, Christie Loiacono, Juergen A. Richt. 2006. Evaluation of hemagglutinin subtype 1 swine influenza viruses isolated from the United States. **Veterinary Microbiology**, 118(3-4): 212-22. PMID: 16962262.
 25. Crystal L. Loving, Susan L. Brockmeier, **Wenjun Ma**, Juergen A. Richt, Randy E.

Sacco. 2006. Innate cytokine responses in porcine macrophage populations: evidence for differential recognition of dsDNA. **Journal of Immunology**, 177(12): 8432-9. PMID: 17142740.

附錄二、單一步驟反轉錄聚合酶鏈反應 (One-step RT-PCR)

1. 配製反應液：(每一支反應管包含以下反應試劑)

RT-PCR 反應液配製	$\mu\text{L}/\text{tube}$
兩倍 PCR 反應液	25
20mM Primer (sense)	1
20mM Primer (antisense)	1
AMV (10U/ μL)	0.2
r RNasin (40U/ μL)	0.2
DEPC 處理水	17.6
Template (RNA)	5
反應總體積	50

2 反應條件：

反應液混合均勻後隨即放入熱循環器中，先以 42°C 進行 40 分鐘反轉錄作用後直接進入聚合酶鏈反應，反應條件如下：

42°C 40 分鐘 → 95°C 2 分鐘 (1 循環)

95°C 30 秒 → 55°C 30 秒 → 72°C 30 秒 (35 循環)

72°C 7 分鐘 → 4°C

3 瓊脂膠電泳

(1) 取 2 公克瓊脂膠 (agarose) 加入 100 ml 之 1X TAE 電泳緩衝液配製成 2% 瓊脂膠溶液，以微波爐加熱溶解瓊脂膠直到呈現完全透明狀態。

(2) 置於 55°C 恆溫水槽中，待內外溫度平衡。

(3) 將膠液倒入製膠台中，插入電泳梳 (comb)，待膠液冷卻凝固後出電泳梳。

4 電泳分析。

- (1) PCR 反應產物取出 10 μ L 預先與 2 μ L 之 6 倍染劑混合均勻後注入齒槽洞中，最後一孔加入 5 μ L 之 100bp DNA ladder Marker。
- (2) 將電極選定為 “-” 極到 “+” 極，以 100 伏特電壓泳動約 30 分鐘。
- (3) 電泳完畢後膠片置於 UV 透視燈下觀察及照相。

附錄三、ELISA 相關試劑及操作方法

A. Solutions and Reagents

1. **Coating Buffer:** 10X candor coating buffer PH7.4 use DDW dilution.
2. **1X Phosphate Buffered Saline (PBS):** To prepare 1 L add one PBS Tablet to 1 L DDW. Adjust pH to 7.4.and autoclave.
3. **Wash Buffer:** 1X PBS containing 0.5% Tween-20 (PBST)
4. **Blocking Buffer:** CANDOR Blocking buffer ready to use (casein)
5. **Antibody Dilution Buffer:** CANDOR LowerCross-Buffer ready to use.

B. Protocol

1. Coating 8-well strip microplates with 100 μ l/well, containing 0.5 μ g recombinant protein in coating buffer (pH7.4) by incubating overnight at 4°C.
2. Block plate with 200 μ l/well blocking buffer for 1 hour at 37°C.
3. Prepare appropriate dilution of primary antibody with antibody dilution buffer. Add 100 μ l to wells and incubate at 37°C for 1 hour.
4. Wash three times with PBST wash buffer.
5. Add 100 μ l /well of goat anti-swine IgG labelled with horseradish peroxidase, diluted in antibody dilution buffer, incubate at 37°C for 30 minutes.
6. Wash tree times with wash buffer.
7. Add 100 μ l 1-Step Ultra TMB-ELISA solution and incubate at RT for 20 minutes. Read plate at 405 nm with an ELISA plate reader.

玖、參考文獻

1. Alvarez, M. M., et al. 2010. Specific recognition of influenza A/H1N1/2009 antibodies in human serum: a simple virus-free ELISA method. *PLoS One* 5(4):e10176.
2. Arankalle, V. A., et al. 2009. Utility of Pandemic H1N1 2009 Influenza Virus Recombinant Hemagglutinin Protein-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Serosurveillance. *Clin Vaccine Immunol.* 17(9): 1481–1483.
3. Barbe, F., et al. 2009. Performance of a commercial swine influenza virus H1N1 and H3N2 antibody enzyme-linked immunosorbent assay in pigs experimentally infected with European influenza viruses. *J Vet Diagn Invest* 21:88-96.
4. Garten, R. J., et al. 2009. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science* 329: 197–201. DOI: 10.1126/science.1176225
5. Liu D. et al. 2010. Prokaryotic expression and purification of HA1 and HA2 polypeptides for serological analysis of the 2009 pandemic H1N1 influenza virus. *J Virol Methods.* 2011 Mar;172(1-2):16-21.
6. Liu, Y., et al. 2010. Development and evaluation of an avian influenza, neuraminidase subtype 1, indirect enzyme-linked immunosorbent assay for poultry using the differentiation of infected from vaccinated animals control strategy. *Avian Dis.* 54:613-21.
7. Luo, L., et al. 2013. Expression of recombinant HA1 protein for specific detection of influenza A/H1N1/2009 antibodies in human serum. *Microbiol Immunol.* 2013 Jan; 57(1):77-81.
8. Shasavandia, S., et al. 2011. Development of rHA1-ELISA for specific and sensitive detection of H9 subtype influenza virus. *Journal of Virological Methods* 171: 260–263
9. Weingartl, H. M., et al. 2009. Genetic and Pathobiologic Characterization of Pandemic H1N1 2009 Influenza Viruses from a Naturally Infected Swine Herd. *J Virol* DOI: 10.1128/JVI.02118-0