

國立臺灣大學獸醫專業學院獸醫學研究所



碩士論文

Graduate Institute of Veterinary Medicine

School of Veterinary Medicine

National Taiwan University

Master Thesis

建立反轉錄恆溫環形核酸增幅法偵測

家禽白血病病毒 A 亞群與 J 亞群

Development of reverse-transcription  
loop-mediated isothermal amplification for the detection  
of subgroup A and subgroup J Avian Leukosis Viruses

王柏翔

Po-Hsaing Wang

指導教授：王金和 博士

Advisor: Ching-Ho Wang, Ph.D.

中華民國 102 年 6 月

June, 2013



## 誌謝

時光飛逝，不知不覺中在台大求學也已七個年頭，即將離開這熟悉的母校，步入新的環境，內心充滿期待，但也有不捨。

首先我得感謝指導老師 王金和博士，不厭其煩地細心指導與教誨，提供完善的實驗設備與良好的研究環境，支持我們能專心地往研究方向邁進。感謝老師與師母對我日常生活的關懷與照顧，求學過程中，不僅學到知識，也瞭解做人處事的道理。更要感謝口試委員鄭益謙老師、謝快樂老師、沈瑞鴻老師和張伯俊老師，在百忙之中仍撥冗細心審閱校訂論文並給予許多寶貴的建議，使論文臻於完善，在此萬分感謝。

同時感謝兩年研究所生涯中陪伴我的實驗室大夥們：感謝惠雯學姐實驗技術上的傳授與觀影心得的交流；感謝怡昌學長在實驗態度的帶領與像哥哥般照顧；感謝萌芳學姐實驗上耐心地指導與提醒；感謝祐新學長在我實驗遇到問題時，總會給我建議；感謝淑萍學姐實驗經驗與西語學習心得的分享；感謝阿光在實驗室上的幫忙與照顧，讓我學習很多；感謝庭翔學弟在我實驗上的幫忙與手機知識的分享；感謝欣甫學妹分享許多好吃的點心與餅乾，謝謝禽病室各位的包容與照顧。

另外還要感謝竹林農牧場曾提供暑期實習機會給我，開啟我對獸醫領域發展的一扇大門；感謝魚病室的學長姐與同學，有你們的陪伴，帶給我許多歡笑；感謝國中同學們的聊天打屁，一起放鬆的感覺好開心；感謝高中同學們的加油打氣，互相鼓勵；感謝承智的關心與照顧，謝謝主讓我交到你這好朋友；感謝楊佳玲學姐給我實驗上的建議，能遇到同做 LAMP 的人，真是開心；感謝我的國外友人們（包含 Ray 與 Jasmine），不管是不是在台灣，跟你們在一起總讓我大開眼界；感謝李維晏老師，在英文寫作上的指導以及班上同學的支持與鼓勵；感謝藍聲口琴社的各位社員們，耐心的指導與互相的支持，讓我在研究所課業之餘，能培養新的音樂嗜好與素養。

最後要感謝我的家人，媽媽無私付出與大力支持，讓我能無後顧之憂，盡情地探索這世界，做我想做的事情；哥哥對我的照顧與義不容辭地幫忙，總能解決我的問題；感謝筱雯的陪伴與支持，度過有歡笑有眼淚的時光。此外，感謝各位師長和朋友們曾在不同階段給我的幫助與鼓勵，以此論文獻給所有幫助我與支持我的人們與因篇幅關係而無法寫出的各位，謝謝你們成為我生命中的美好。

2013.08 王柏翔

## 中文摘要



家禽白血病病毒 (Avian leukosis virus, ALV) 為雞隻感染反轉錄病毒之常見病原，能引起雞隻產生腫瘤性疾病，並造成家禽產業嚴重的經濟損失。外源性家禽白血病病毒可被區分成六個亞群 (A-E 和 J)，其中 A 亞群與 J 亞群是台灣最常見的家禽白血病病毒。本研究目的是建立反轉錄恆溫環形核酸增幅法 (RT-LAMP) 偵測家禽白血病病毒 A 亞群與 J 亞群，以達到快速、準確且敏感之應用。

設計 4 條 RT-LAMP 專用特異性引子去偵測家禽白血病病毒 *pol* 基因與 *env* 基因保守區上的 6 段序列，測試不同條件下的 RT-LAMP 反應，找出最適當反應條件，並以不同家禽病原測試 RT-LAMP 之專一性與用已定量 ALV 核酸 RNA 10 倍連續序列稀釋比較 RT-LAMP 與 one-step RT-PCR 偵測 ALV-A 與 ALV-J 之敏感性。

本研究所設計之 RT-LAMP 可正確增幅 ALV-A 與 ALV-J 且不會與其他家禽致病原進行非特異性增幅，也不與不同亞群 ALV 進行增幅，且所發展 RT-LAMP 偵測 ALV 之敏感性也比一步反轉錄聚合酶鍊鎖反應 (one-step RT-PCR) 高 10 倍至 100 倍。此外，於反應後加入核酸染劑 SYBR Green，可方便肉眼判讀反應結果。從本研究實驗結果可推斷，所建立的 RT-LAMP 能快速、敏感且專一地偵測 ALV-A 與 ALV-J，所以 RT-LAMP 確實有其潛力應用於家禽白血病病毒之大規模檢測，並能成為幫助台灣家禽產業清除外源性家禽白血病病毒之檢測工具。

關鍵字：家禽白血病病毒 A 亞群、家禽白血病病毒 J 亞群、反轉錄恆溫環形核酸增幅法、恆溫增幅技術、臨場檢測

## Abstract



### **BACKGROUND:**

Avian leukosis virus (ALV) is the most common observed virus causing avian retroviral infection, which may result in the occurrence of neoplastic disease and high economic losses in poultry industry. Six subgroups (A-E and J) of exogenous ALVs are identified. Subgroup A (ALV-A) and J (ALV-J) are considered the most seen viruses in Taiwan. In this study, a one-step, single-tube reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assay was developed for rapid and sensitive detection of ALVs.

### **METHODS:**

Four primers that can recognize 6 distinct regions on the conserved region of the *pol* and *env* gene of ALV were designed for RT-LAMP assay. The reaction conditions of RT-LAMP were optimized. The specificity of the RT-LAMP were tested with other avian viruses, and the sensitivity of the RT-LAMP for detection of ALV-A and ALV-J were compared with one-step RT-PCR by 10-fold serial dilution of viral RNA as templates.

### **RESULTS:**

The amplifications were very specific to ALV-A and ALV-J, and no cross-reaction was observed with other avian disease viruses. The sensitivity of RT-LAMP assay is 10-fold to 100-fold higher than the one-step reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) under the conditions tested. Addition of a fluorescent dye made it easily be detected in-tube by naked eye.

### **DISCUSSION&CONCLUSION:**

The experimental results indicated that RT-LAMP is a rapid, sensitive, specific and accurate method for the detection of ALVs. This RT-LAMP method is proven to have its potential for rapid ALVs surveillance and may assist in eradication of exogenous ALVs in Taiwan.

Keywords: subgroup A avian leukosis virus (ALV-A), subgroup J avian leukosis virus (ALV-J), reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP), isothermal amplification technology, in-field test

# 目錄



誌謝.....	i
中文摘要.....	ii
Abstract.....	iii
第一章 緒言.....	1
第二章 文獻探討.....	3
第一節 家禽白血病歷史背景與簡介.....	3
第二節 病毒形態與特性.....	3
第三節 病毒結構與功能.....	4
2.3.1. 病毒基因體.....	4
2.3.2. 病毒蛋白質.....	5
第四節 病毒複製.....	6
2.4.1. 形成前病毒 (provirus).....	6
2.4.2. 病毒的轉錄與轉譯.....	6
2.4.3. 病毒核酸重組.....	7
第五節 家禽白血病病毒宿主與亞群分類.....	8
2.5.1. 宿主特異性與病毒亞群.....	8
2.5.2. 病毒抗原與分子特性.....	9
第六節 病毒傳播途徑.....	10
2.6.1. 外源性病毒.....	10
2.6.2. 內源性病毒.....	10
第七節 臨床症狀與病理變化.....	11
2.7.1. 致癌性與潛伏期.....	11
2.7.2. 臨床症狀.....	12
2.7.3. 病理變化.....	13
第八節 免疫.....	13
2.8.1. 主動免疫.....	13
2.8.2. 被動免疫.....	14



第九節 診斷方式.....	14
2.9.1. 病毒分離與病原鑑定.....	14
2.9.2. 病毒核酸偵測.....	15
2.9.3. 血清學抗體抗原檢測.....	15
第十節 流行病學.....	16
2.10.1. 發生率.....	16
2.10.2. 家禽白血病病毒在台灣的研究概況.....	16
2.10.3. 疾病預防與防治.....	17
第十一節 恆溫環形核酸增幅法 ( Loop-mediated isothermal Amplification, LAMP ) .....	19
2.11.1. 恆溫環形核酸增幅法之原理.....	19
2.11.2. LAMP 產物之檢測.....	21
2.11.3. LAMP 與 RT-LAMP 應用與研究現況 .....	21
第三章 材料與方法.....	23
第一節 以 PCR 與 RT-PCR 偵測田間家禽白血病病毒 (ALV) 核酸.....	23
3.1.1. 樣材與來源.....	23
3.1.2. 樣本 DNA 萃取.....	23
3.1.3. 樣本 RNA 萃取.....	23
3.1.4. 反轉錄反應 (RT) .....	24
3.1.5. 聚合酶鏈鎖反應 (PCR) .....	25
3.1.6. 洋菜膠電泳分析.....	25
第二節 純化家禽白血病 J 亞群病毒.....	26
3.2.1. 家禽白血病 J 亞群病毒受汙染確認.....	26
3.2.1.1. 細胞培養.....	26
3.2.1.2. 計算細胞數目.....	27
3.2.1.3. 病毒增殖.....	27
3.2.1.4. 聚合酶鏈鎖反應 (PCR) .....	27
3.2.2. 抗血清處理被汙染病毒液試驗.....	28

3.2.2.1. 中和反應.....	28
第三節 建立反轉錄恆溫環形核酸增幅法 (RT-LAMP) 偵測家禽白血病毒 (ALV) 核酸.....	28
3.3.1. 反轉錄恆溫環形核酸增幅法 (RT-LAMP) 之引子設計.....	29
3.3.1.1. 家禽白血病毒 A 亞群病毒之引子設計.....	29
3.3.1.2. 家禽白血病毒 J 亞群病毒之引子設計.....	29
3.3.2. 反轉錄恆溫環形核酸增幅法 (RT-LAMP) .....	29
3.3.3. 反轉錄恆溫環形核酸增幅法 (RT-LAMP) 產物之分析.....	30
3.3.3.1. 洋菜膠體電泳分析.....	30
3.3.3.2. 焦磷酸鎂(magnesium pyrophosphate)沉澱分析 .....	30
3.3.3.3. SYBR Green I 核酸染劑分析 .....	31
3.3.4. 反轉錄恆溫環形核酸增幅法 (RT-LAMP) 之專一性檢定 (Specificity test) .	31
3.3.4.1. 家禽病原核酸確認.....	31
3.3.4.2. 家禽白血病毒核酸存在於其他家禽病原之確認.....	31
3.3.4.3. 反轉錄恆溫環形核酸增幅法之專一性檢定.....	32
第四節 反轉錄恆溫環形核酸增幅法 (RT-LAMP) 與一步反轉錄聚合酶鏈鎖反應 (one-step RT-PCR) 之偵測比較 .....	32
3.4.1. 設計一步反轉錄聚合酶鏈鎖反應 (one-step RT-PCR) .....	32
3.4.2. 病毒核酸之萃取.....	33
3.4.3. 病毒核酸之定量.....	33
3.4.4. 反轉錄恆溫環形核酸增幅法 (RT-LAMP) 敏感性測試.....	33
3.4.5. 一步反轉錄聚合酶鏈鎖反應 (one-step RT-PCR) 敏感性測試.....	34
3.4.6. 雞隻田間樣本偵測能力比較.....	34
第四章 結果.....	35
第一節 以 PCR 與 RT-PCR 偵測田間家禽白血病毒 (ALV) 核酸.....	35
第二節 純化家禽白血病毒 J 亞群病毒.....	35
4.2.1. 家禽白血病毒 J 亞群病毒之汙染確認.....	35
4.2.2. 抗 ALV-A 之抗血清處理被汙染病毒液 .....	35

第三節 建立反轉錄恆溫環形核酸增幅法 (RT-LAMP) 偵測家禽白血病毒 (ALV) 核酸.....	36
4.3.1. 反轉錄恆溫環形核酸增幅法 (RT-LAMP) 之引子設計.....	36
4.3.1.1. 家禽白血病毒 A 亞群病毒之引子設計.....	36
4.3.1.2. 家禽白血病毒 J 亞群病毒之引子設計.....	37
4.3.2. 反轉錄恆溫環形核酸增幅法 (RT-LAMP) .....	37
4.3.3. 反轉錄恆溫環形核酸增幅法 (RT-LAMP) 產物之分析.....	37
4.3.3.1. 洋菜膠體電泳分析.....	37
4.3.3.2. 焦磷酸鎂(magnesium pyrophosphate)沉澱分析 .....	37
4.3.3.3. SYBR Green I 核酸染劑分析 .....	38
4.3.4. 反轉錄恆溫環形核酸增幅法 (RT-LAMP) 之專一性檢定 (Specificity test) .	38
4.3.4.1. 家禽病原核酸確認.....	38
4.3.4.2. 家禽白血病毒核酸存在於其他家禽病原之確認.....	38
4.3.4.3. 反轉錄恆溫環形核酸增幅法之專一性檢定.....	38
第四節 反轉錄恆溫環形核酸增幅法 (RT-LAMP) 與一步反轉錄聚合酶鏈鎖反應 (one-step RT-PCR) 之偵測比較 .....	39
4.4.1. 反轉錄恆溫環形核酸增幅法 (RT-LAMP) 與一步反轉錄聚合酶鏈鎖反應 (one-step RT-PCR) 敏感性測試 .....	39
4.4.2. 雞隻田間樣本偵測能力比較.....	39
第五章 討論.....	40
第六章 參考文獻.....	65



## 表目錄

表 1. 2011-2013 年送檢種雞之檢體資料.....	46
表 2. PRIMER NAMES, SEQUENCES, AND POSITION FOR LAMP AND PCR DETECTION FOR ALVs.....	47
表 3. PRIMER NAMES, ORIENTATIONS, SEQUENCES, AND AMPLICONS FOR PCR DETECTION OF AIV, NDV, IBV, AND MDV.....	48
表 4. 以 PCR 與 RT-PCR 偵測田間家禽白血病病毒 (ALV) 核酸之結果 .....	49
表 5. 各家禽病原之 RT-PCR 及 RT-LAMP 以偵測家禽白血病病毒特异性引子增幅之結果 .....	50
表 6. RT-LAMP 與 ONE-STEP RT-PCR 雞隻田間樣本偵測能力比較.....	50
表 7. MCNEMAR'S TEST 方程式.....	50

## 圖目錄

圖 1. 反轉錄病毒於細胞內複製過程之簡圖 .....	7
圖 2. 恆溫環形核酸增幅法引子之設計示意圖(PARIDA ET AL., 2008) .....	20
圖 3. 家禽白血病毒 J 亞群(ALV TW-2921)核酸的反轉錄恆溫環形核酸增幅法偵測 家禽白血病毒 A 亞群核酸(RT-LAMP-A) 的陽性反應 .....	51
圖 4. ALV TW-2921 遭 ALV-A 汙染再次確認 .....	51
圖 5. 以抗 ALV-A 之抗血清 (ANTISERUM) 處理被汙染病毒液之結果 .....	52
圖 6. 家禽白血病毒 A 亞群病毒之序列排列 (ALIGNMENT) .....	54
圖 7. 家禽白血病毒 J 亞群病毒之序列排列 (ALIGNMENT) .....	55
圖 8. RT-LAMP FOR ALV-A DETECTION 反應時間與 RNA 模板量之最合適反應條件 測試 (二重複結果) .....	56
圖 9. RT-LAMP FOR ALV-J DETECTION 反應時間與 RNA 模板量之最合適反應條件 測試 (二重複結果) .....	57
圖 10. 洋菜膠體電泳分析反轉錄恆溫環形核酸增幅法產物 .....	58
圖 11. RT-LAMP 反應產物之焦磷酸鎂沉澱 .....	59
圖 12. RT-LAMP 反應後產物加入 SYBR GREEN I .....	59
圖 13. 家禽病原核酸確認 .....	60
圖 14. 反轉錄恆溫環形核酸增幅法偵測 ALV-A 之專一性檢定 .....	61
圖 15. 反轉錄恆溫環形核酸增幅法偵測 ALV-J 專一性檢定 .....	62
圖 16. RT-LAMP-A 與 RT-PCR-A 偵測極限敏感性測試 .....	63
圖 17. RT-LAMP-J 與 RT-PCR-J 偵測極限敏感性測試 .....	64

## 第一章 緒言



家禽白血病 (Avian leukosis) 是由家禽白血病毒 (Avian leukosis virus, ALV) 所引起的家禽腫瘤性疾病，其屬反轉錄病毒科 (*Retroviridae*)， $\alpha$  反轉錄病毒屬 (*Alpharetrovirus*)，其自然宿主為雞 (Payne, 1987)，但也可感染其他禽類，像雉雞、竹雞、鶇鶇、火雞及鴨等鳥禽類。家禽白血病毒 (ALV) 因其病毒封套糖蛋白 (envelop glycoprotein) 抗原性的差異，可被區分成 A 到 J 等 10 種亞群，其中 A、B、C、D、E 及 J 此 6 種亞群可以感染雞隻 (Payne, 1987)，並因病毒傳播方式的不同，更區分成外源性 (exogenous) 家禽白血病毒與內源性 (endogenous) 家禽白血病毒，A、B、C、D 及 J 亞群為外源性家禽白血病毒，可藉由垂直傳播 (vertical infection) 與水平傳播 (horizontal infection) 的方式感染雞隻，具有致病與致腫瘤的特性；E 亞群則為內源性家禽白血病毒，藉由孟德爾遺傳法則 (Mendelian laws) 的方式由親代傳給子代 (Payne and Chubb, 1968)，研究指出儘管雞隻體內存在有多種內源性病毒，但因其無法組成並產生具有感染能力的病毒顆粒，故不會導致雞隻致病與腫瘤產生 (Motta et al., 1975)。

目前在一般商業飼養的雞場中，主要以 A、B 和 J 這三種亞群的家禽白血病毒感染最為普遍，而在家禽白血病造成的腫瘤性疾病中，以 A 亞群引起的淋巴球性白血病 (lymphoid leukosis, LL) 最為常見，發生率可從 1 到 20% 不等 (Payne, 1998b; Fadly and Payne, 2008)。J 亞群病毒則是於 1988 年在英國首度從肉用種雞中分離出來，主要引起骨髓球性白血病 (myeloid leukosis, ML) (Payne et al., 1991; Payne et al., 1992a; Payne et al., 1992b)。台灣最早發生家禽白血病的時間並無詳細記載，推測因當時此疾病發生率與死亡率不高，所以尚未受到重視。1995 年王等人證實台灣有家禽白血病的發生，並於 1997 年確定為 J 亞群病毒感染所造成的骨髓球增生症 (myelocytomatosis)，而證實台灣有家禽白血病 J 亞群病毒的存在 (Wang et al., 1995; Wang and Juan, 2002)，2002 年徐等人也針對台灣土雞進行調查，證實台灣土雞 J 亞群病毒感染的存在 (Thu and Wang, 2003)，2004 年陳等人對台灣部份種用及肉用

土雞場進行家禽白血病之血清學檢測(陳慧真,2004),發現種用土雞場皆呈現 ALV-J 抗體陽性,肉用土雞則有 10-15%抗體陽性率,顯示 ALV-J 普遍存在於台灣土雞群中。

家禽白血病對家禽養殖產業影響甚鉅,除了引起腫瘤造成雞隻死亡之外,亞臨床症狀感染(subclinical infection)包含雞隻產能下降、免疫抑制等問題,造成嚴重的經濟損失。由於目前並無可用於預防家禽白血病的疫苗,此病的防治與控制,著重在雞隻感染種源的篩選與淘汰、現場的飼養管理與藉由現代育種學的方式,挑選出對 ALV 較具有抵抗性之品系(Payne, 1998b)。目前國際上各家種禽公司皆已進行家禽白血病 A、B 及 J 亞群的清除計畫並達到良好的控制效果(Payne et al., 1982; Fadly and Payne, 2008)。

由於因家禽白血病感染造成的腫瘤病灶與馬立克病(Marek's disease, MD)或家禽網狀內皮增生症(reticuloendotheliosis, RE)感染造成的腫瘤病變相似,無法單從組織病理學加以區別,因此診斷上除了臨床症狀、肉眼解剖病變檢查與組織病理學檢查外,尚需病毒分離或以分子生物學檢測,輔助確診(Purchase, 1986; Purchase, 1989; Malkinson et al., 2004),而分子生物學的檢測方法包含以往的 RIF(resistance-inducing factor)(Levine and Nelsen, 1964)、COFAL(complement fixation for avian leucosis)與較現代的酵素免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay)(Smith et al., 1979; Tsukamoto et al., 1985)、免疫螢光法(immunofluorescence assay, IFA)(Pham et al., 1999b)、聚合酶連鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)(Belak and Ballagi-Pordany, 1993; Smith et al., 1998a; Smith et al., 1998b)與反轉錄聚合酶連鎖反應(reverse transcriptase polymerase chain reaction, RT-PCR)(Pham et al., 1999a; Rajabzadeh et al., 2010)等。不過上述之檢測方法皆具有費時、儀器昂貴與技術人員勞力密集(labor-intensive)操作等缺點。本研究之目的為應用較為新穎的核酸增幅技術—反轉錄恆溫環形核酸增幅法(reverse transcription loop-mediated isothermal amplification, RT-LAMP)(Notomi et al., 2000)偵測家禽白血病的感染與臨場上的應用。

## 第二章 文獻探討




### 第一節 家禽白血病歷史背景與簡介

家禽白血病 (Avian leukosis/sarcoma)，起源於 1868 年 Roloff 首次發表家禽淋巴肉瘤病 (lymphosarcomatosis) 之病例報告 (Roloff, 1868)，隨後 Caparini、Butterfield 及 Ellermann 和 Bang 等人也相繼在義大利、美國與丹麥等國家發表相關的病例研究與報告 (Caparini, 1896; Butterfield, 1905; Ellermann and Bang, 1908)。Ellermann 於 1921 年在其著作中將家禽白血病的病理學變化分類成淋巴球性白血病 (lymphatic leukosis)、骨髓球性白血病 (myeloid leukosis) 與發生在血管裡以紅血球系細胞病變為主的血管內淋巴樣白血病 (intravascular lymphoid leukosis) 三大類 (Ellermann, 1921)，至今此家禽白血病分類仍被沿用。1911 年，美國學者 Rous 證實腫瘤可藉由存在其中的某特定物質使其傳播 (Rous, 1911)，因此開啓 1920 到 30 年代期間，各國學者對於家禽白血病傳播學的研究。直到 1947 年，Burmester 等人證實家禽白血病是由病毒所引起的腫瘤性疾病。

家禽白血病病毒 (avian leukosis virus, ALV) 為家禽白血病之病原，可引起多種系統與器官的腫瘤，如紅血球系 (erythroid)、淋巴球系 (lymphoid) 及骨髓球系 (myeloid) 白血病，亦可於其他多種臟器與組織如腎臟、卵巢、脾臟和肝臟等及骨骼和結締組織造成腫瘤 (Crittenden, 1981; Payne and Venugopal, 2000; Fadly and Payne, 2008)。雞隻感染家禽白血病導致腫瘤所引起的死亡率大多介於 1-2% 之間，但也有少數報告中可達 20% (Burstein et al., 1984)。大部分感染雞隻多為亞臨床感染 (subclinical infection)，即雖未出現腫瘤病灶，出現產蛋率下降、免疫力不全等影響飼養管理與生產性能的表現 (Gavora et al., 1980)，此病為家禽養殖產業造成嚴重的經濟損失。

### 第二節 病毒形態與特性

家禽白血病病毒是屬於反轉錄病毒科 (*Retroviridae*)， $\alpha$  反轉錄病毒屬



(alpharetrovirus) 與同在反轉錄病毒科下的另一個  $\gamma$  病毒 (gammaretrovirus) 屬的家禽網狀內皮增生病毒 (avian reticuloendotheliosis virus) 同為家禽病毒性腫瘤重要的致病原之一 (Payne and Venugopal, 2000)。利用負染色電子顯微鏡觀察此病毒形態，其直徑大小介於 80-120nm 之間 (Beard, 1973)，病毒顆粒表面有約 8nm 指狀或球狀突起結構 (Murphy et al., 1995)。依照其外觀形狀、形態生成將其分類成 C 形反轉錄病毒 (type C retrovirus)。病毒封套內有一 20 面體的蛋白鞘蛋白 (capsid protein)，內含病毒之遺傳物質、核鞘蛋白 (nucleoprotein) 及病毒反轉錄酶 (reverse transcriptase) 與嵌合酶 (integrase) 等。

家禽白血病毒多不耐熱，在 37°C 下半衰期 (half-life) 依不同病毒而有所不同，約 100-540 分鐘 (平均約 260 分鐘) (Toyoshima and Vogt, 1969)，經高溫處理可達快速不活化 (heat inactivation)，50°C 下半衰期為 8.5 分鐘，60°C 下則縮減為 0.7 分鐘 (Dougherty, 1961)，若需長期保存病毒且不失去活性，需保存在低於 -60°C 的環境 (Bryan et al., 1954)。除了溫度，家禽白血病毒於 pH5-9 的環境中可保持其穩定性，但 pH 值變動超出此範圍則會立即不活化。相較於新城病 (Newcastle disease) 病毒對紫外光較有抵抗性 (Rubin and Temin, 1959)。

### 第三節 病毒結構與功能

#### 2.3.1. 病毒基因體

ALV 基因體為一雙套的正向單股的 RNA，全長約 7.2 kb，其 RNA 序列 5' 端具有 cap，3' 端有 polyadenylation，由 5' 端至 3' 端的基因體組成依序為 R (repeat sequence)、U5 (unique 5' end)、*gag/pro* (group-specific antigen/protease)、*pol* (polymerase)、*env* (envelope)、U3 (unique 3' end) 及 R，其中 *gag/pro*、*pol* 及 *env* 為結構基因，可分別轉譯出 group-specific antigen/protease、RNA-dependent DNA polymerase (又稱為 reverse transcriptase, RT) 及 envelope glycoprotein。病毒經由反轉錄酶與嵌合酶作用後插入宿主基因體成 provirus，基因體結構此時是分別在 5' 端的 R 序列前增加了 U3 序列及 3' 端的 R 序列後方增加了 U5 序列，因此 provirus 的 5' 端與 3' 端分別都



有完全一致的U3RU5 序列排列，而此序列又稱為LTR (long terminal repeat)，在基因表現調控上具有啟動子 (promoter) 和增強子 (enhancer) 的功能(Goff, 2007; Fadly and Payne, 2008)。

在非缺陷型 (non-defective) 的雞肉瘤病毒 (Rous sarcoma virus, RSV) 的基因體中，*env* 基因後方存在一致癌基因*src*，因此宿主感染RSV 後會快速癌化，屬於急性致癌型病毒 (acute transforming virus) (Enrietto and Hayman, 1987; Wang and Hanafusa, 1988)。除了*src* 之外，在不同的急性致癌病毒中，也可發現多種致癌基因，如*erbA*、*sea*、*myc*、*maf* 等。

### 2.3.2. 病毒蛋白質

病毒的遺傳物質會表現出具有功能的蛋白質，如結構蛋白、封套蛋白與酵素聚合酶。其中病毒顆粒的核心 (virion core) 是由gag/pro 基因所編碼出的5 個非糖基化蛋白質所構成，分別是MA(matrix, p19)、p10、CA(capsid, p27)、NC(nucleoprotein, p12)；CA 為核鞘 (core shell) 中最主要的成分，即家禽白血病病毒主要的群特異性抗原(group-specific antigen, gsa)；NC 參與了RNA 的修飾和包裝；pro基因轉譯出protease (PR, p15) 負責將gag和pol基因轉譯出來的蛋白質前趨物—聚合蛋白質 (polyprotein) 予以修飾切割形成具有功能性的蛋白質(Goff, 2007; Fadly and Payne, 2008)。

pol 基因可轉譯出反轉錄酶(reverse transcriptase, RT)和嵌合酶(integrase, p32)，在病毒複製時，反轉錄酶以病毒RNA 為模板反轉錄出DNA:RNA 雜合體，再進而形成雙股proviral DNA，嵌合酶則可使雙股proviral DNA 片段插入宿主的染色體中。ALV病毒封套包含了兩種由env 基因所轉譯出來的糖基化蛋白質 (glycoprotein)，分別是SU (surface, gp85) 及TM (transmembrane, gp37)。SU 為病毒表面球狀突起結構，是與宿主細胞接受器 (cell receptor) 結合的位置(Barnard et al., 2006b)，也是決定家禽白血病亞群的蛋白抗原；TM 則位於膜中，以雙硫鍵 (disulfide bond) 與突出的SU 結合(Melikyan et al., 2004)。相連的SU 和TM 形成的二聚體 (dimer)，



稱為病毒醣蛋白 (virion glycoprotein, VGP)。

#### 第四節 病毒複製

##### 2.4.1. 形成前病毒 (provirus)

反轉錄病毒的複製過程可用下圖一概略表示。當病毒的封套醣蛋白質與細胞表面特定的接受器結合後，病毒顆粒透過膜融合進入細胞質(Barnard et al., 2006a)，反轉錄酶會先利用病毒的正向單股RNA 反轉錄出負股DNA 而形成DNA:RNA 雜合體，再由反轉錄酶中的RNase-H 移除RNA 片段，並以負股DNA 為模板合成正股DNA，此時所形成之雙股DNA 便會被送進細胞核中。在病毒接觸細胞後，病毒核酸會在120 分鐘內被送入細胞核內(Dales and Hanafusa, 1972)。病毒的嵌合酶會利用LTR 序列，將雙股DNA 隨機插入宿主細胞染色體中的任何位置，被感染的細胞中，可被插入多達20 組病毒DNA。插入後的反轉錄病毒兩端具有完整的LTR，此時稱為provirus。LTR 具有啟動子和增強子的結合位，可調控宿主細胞進行病毒的複製及下游致癌基因的表現(Goff, 2007; Fadly and Payne, 2008)。

##### 2.4.2. 病毒的轉錄與轉譯

反轉錄病毒形成 provirus 後，會啟動位於LTR的啟動子與增強子序列，開始病毒基因的轉錄與轉譯。利用宿主細胞的RNA 聚合酶，以proviral DNA為模板轉錄RNA，包括了全長的viral RNA 和後續轉譯蛋白質所需的mRNA。在感染24 小時後可偵測到新合成的viral RNA(Dales and Hanafusa, 1972; Adkins et al., 1997)。首先mRNA轉譯出gag-pol蛋白質與env蛋白質這兩種蛋白質，而env 蛋白質則會在內質網 (endoplasmic reticulum) 內進行轉譯後醣基化 (glycosylation) 修飾，並在高基氏體 (Golgi apparatus) 中被furin protease切割成SU 和TM兩種次單位。所有的蛋白質產物會透過高基氏體等內膜系統 (endomembrane system) 被運送到細胞膜上，並與反轉錄酶及病毒核酸組裝後，經由出芽 (budding) 方式釋出病毒，完成病毒複製(Goff, 2007; Fadly and Payne, 2008)。



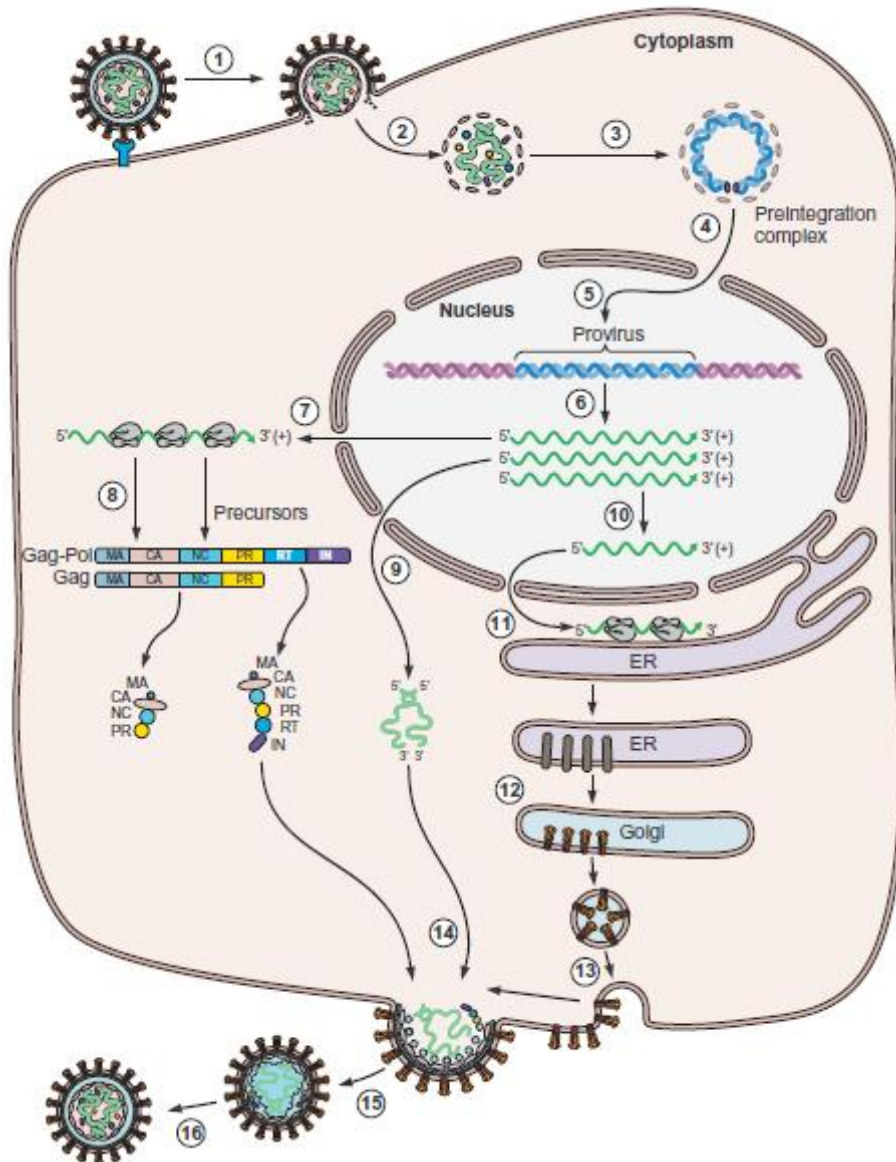



圖 1. 反轉錄病毒於細胞內複製過程之簡圖

當病毒封套糖蛋白與宿主細胞特殊接受器結合後，會將病毒遺傳物質釋入細胞質內，利用病毒反轉錄酶將RNA反轉錄成cDNA並插入宿主細胞之染色體，形成前病毒（provirus），調控細胞進行病毒的複製，在細胞質中進行裝配，最後以出芽方式釋出病毒顆粒(Flint et al., 2008)。

### 2.4.3. 病毒核酸重組

由於反轉錄病毒的基因體為雙套 RNA，再加上複製過程中會經過反轉錄與插




入宿主染色體，因此容易與其他反轉錄病毒發生同源性重組 (homologous recombinant)，或與宿主染色體發生非同源性重組 (non-homologous recombinant) (Hu and Temin, 1990b; Hu and Temin, 1990a; Hertig et al., 1997)。關於家禽白血病毒之重組現象，已有許多研究報告的探討，於1988年在英國自白肉雞分離出來的J亞群ALV(Payne et al., 1991)，目前被認為是由某一外源性ALV的env基因與古老的內源性反轉錄病毒家族(EAV-HP或EV/J)發生重組後，所產生的新的亞群(Smith et al., 1999; Sacco et al., 2004)；此外，Lupiani等人也曾經由商業蛋雞上分離到自然重組的ALV，為具有與J亞群病毒相似的LTR序列，但分類上為B亞群(Lupiani et al., 2006)；於2003年，日本在從蛋雞上分離到ALV中，發現其SU與myeloblastosis-associated virus (AMV)高度相似，但TM卻與內源性病毒類似(Hatai et al., 2008)；而Zavala等人也曾經由市售的馬立克疫苗(Marek's disease vaccine)中分離到三株重組的ALVs，其基因體以內源性病毒為骨幹，僅SU與A亞群相似(Zavala and Cheng, 2006a; Zavala and Cheng, 2006b; Barbosa et al., 2008)。

## 第五節 家禽白血病毒宿主與亞群分類

### 2.5.1. 宿主特異性與病毒亞群

雞隻為外源性家禽白血病毒的自然宿主，除了雉雞 (pheasant)、松雞 (partridge) 和鶉 (quail) 外，未曾有其他禽鳥類分離出家禽白血病毒的報告 (Fadly and Payne, 2008)。但在人工感染的方式下，其他的禽鳥類則可被家禽白血病毒感染，如RSV可接種在雞、雉雞、鶉、鴿子，形成腫瘤病變，胚胎時間感染ALV-C的鴨隻，於孵化後很快就會出現消耗性疾病(Trejbalová et al., 1999; Svoboda et al., 2000; Stepanets et al., 2003)。也有報告指出火雞對ALV-J具有感受性，以人工接種急性致癌型ALV-J strain 966病毒株，可在3到4週內引發火雞的骨髓細胞瘤 (myelocytomatosis) 病變(Venugopal et al., 2000)。雖然曾有過去的文獻中指出人用疫苗有ALV的污染，但目前未有證據顯示ALV會感染人類細胞(Hussain et al., 2003)。

而根據家禽白血病毒之宿主範圍不同、封套糖蛋白質的差異性及病毒干擾



的模式 (viral interference patterns)，可將ALV 區分為A 到J 等十個亞群，其中A、B、C、D、E、J 等六個亞群可自然感染於雞隻，F、G、H、I 則為珍禽類的內源性病毒，其自然宿主分別為雉雞、松雞及鶴鶉(Payne, 1992)。在鑑定病毒亞群上，病毒干擾試驗和宿主範圍模式檢測為最準確的方式，而病毒中和試驗雖可得知病毒的抗原性，但在區分亞群上可信度較低(Payne et al., 1992b; Hunt et al., 1999; Fadly and Payne, 2008)。目前已知 B 亞群和 D 亞群病毒會出現交叉反應 (cross-neutralization) 的情形；且由於J 亞群病毒之gp85 蛋白變異較大，因此部分J 病毒並無法被特定J 病毒所引發之中和抗體所中和(Venugopal et al., 1998; Fadly and Smith, 1999; Fadly, 2000; Fenton et al., 2005)；另外，有報告指出，由特定病毒所誘發的抗血清(antiserum)，其中和相同病毒的能力遠高於中和其他相同亞群的病毒，這顯示了同亞群病毒間的抗原決定位 (antigenic epitopes) 還是有程度不等的變異(Chubb and Biggs, 1968)，特別在 J 亞群中變異最為明顯，而 B 亞群間的變異性則高過 A 亞群(Venugopal et al., 1998; Venugopal, 1999; Wang and Cui, 2006)。

### 2.5.2. 病毒抗原與分子特性

藉由核酸定序分析家禽白血病毒 A-E 亞群env 基因，可發現其中的gp85 片段的全長序列在不同亞群間有五個主要的變異區，分別為高度變異區 (hypervariable region, hr) hr1、hr2 及三個差異較小的變異區 (variable region, vr) vr1、vr2 與vr3(Dorner et al., 1985; Bova et al., 1986; Bova et al., 1988)。研究指出，hr1、hr2 及vr3 為主要決定接受器親和性 (receptor tropism) 的區域，但至今尚未得知各亞群病毒間決定病毒宿主範圍及抗原性的確切位置(Dorner and Coffin, 1986)。而 J 亞群ALV 的gp85 與其他五個亞群差別更大，特別是在hr1、hr2、vr2、vr3的變異更為明顯，且在非變異區之間的序列亦有所不同(Bai et al., 1995a; Bai et al., 1995b)；除此之外，hypervariable region 在不同株的 J 亞群病毒中，此區的變異亦有明顯差別(Benson et al., 1998; Venugopal et al., 1998; Silva et al., 2000; Wang and Cui, 2006)。



## 第六節 病毒傳播途徑

### 2.6.1. 外源性病毒

外源性 ALV 於感染雞之後，可以產生具有感染能力之病毒顆粒，其傳播途徑包括了母雞介蛋感染子代的垂直傳染，以及雞隻間直接或間接接觸的水平傳染 (Cottral et al., 1954; Rubin et al., 1961; Rubin et al., 1962b)。水平傳染是最常見的感染方式，病毒主要經由傷口，或是口、鼻、結膜等黏膜面接觸到含有病毒的糞便和唾液而感染雞隻 (Burmester et al., 1956)。儘管只有少部分的小雞會被垂直感染，但這些雞隻會形成染感源，大部分的雞隻會因為接觸到這些被垂直感染的雞隻而遭到水平感染。有研究指出，由於 ALV 對環境的抵抗力不佳，病毒的傳播並不容易經由雞隻與病雞的間接接觸來達成水平傳染，但報告指出相較於其他亞群，ALV-J 卻有更高的水平傳染力 (Fadly and Smith, 1999; Witter et al., 2000)。

雞隻感染 ALV 後可呈現四種不同的病毒血症 (viremia, V) 與抗體 (antibody, A) 反應模式，分別是 (V-A-)、(V-A+)、(V+A+) 及 (V+A-) (Rubin et al., 1961; Rubin et al., 1962b)。絕大多數的成雞感染後都是 (V-A+) 即家禽白血病毒抗體陽性，病毒檢測為陰性；10% 以下的雞隻為 (V+A-)。大多數 (V+A-) 情形的雞隻，其母雞會經由垂直傳染的方式，把 ALV 傳染給子代 (Rubin et al., 1962b; Payne et al., 1982)，而遭到垂直感染的小雞對 ALV 會對病毒產生免疫耐性 (immune tolerance)，此時血液及組織中會含有大量的病毒，但雞隻卻不會產生對抗 ALV 之抗體，這些 (V+A-) 小雞長大後會成為 (V+A-) 的族群，除了容易產生腫瘤之外，也會持續地排毒成為水平傳播主要的感染源。

### 2.6.2. 內源性病毒

內源性 ALV 大多透過嵌合在生殖細胞 (germ cell) 的 provirus 藉由孟德爾遺傳的方式傳給子代。大多數的內源性病毒因為有部分基因缺失而無法形成具有感染能力的病毒顆粒，但也有報告指出少部分的内源性病毒擁有完整的基因體，可以在

胚胎時期或孵出的小雞體內形成具有感染能力的完整病毒顆粒(Payne et al., 1971; Robinson, 1978; Robinson et al., 1981)。


一般雞隻的基因體中都存在多個不同種類或族系的類家禽反轉錄病毒元素 (avian retrovirus-like elements)，總共分為四類：endogenous viral (*ev*) loci、中等重複元素EAV (endogenous avian virus)、ART-CH (avian retrotransposon from chicken genome) 及高度重複元素CR1 (chicken repeat 1) (Stumph et al., 1984; Dunwiddie et al., 1986; Crittenden, 1991; Boyce-Jacino et al., 1992; Nikiforov and Gudkov, 1994; Sacco et al., 2000; Borisenko and Rynditch, 2004)，這些元素隨著染色體依照孟德爾遺傳法傳給子代，都屬於內源性家禽白血病(Astrin et al., 1980)。*ev* loci 的基因序列屬於E 亞群ALV，普遍存在一般雞隻的基因體(Robinson, 1978; Crittenden, 1981; smith, 1987; Crittenden, 1991)，目前已知有至少21 種*ev* loci。有報告指出，平均每隻雞其基因體約有5 個*ev* loci(Rovigatti and Astrin, 1983)。雖然內源性病毒大多缺乏病原性或引起腫瘤的能力(Motta et al., 1975)，但有報告指出其存在可能會影響雞隻對於外源性ALV 感染的感受性與免疫反應能力(Crittenden et al., 1982; Smith and Fadly, 1988)。

## 第七節 臨床症狀與病理變化

### 2.7.1. 致癌性與潛伏期

ALV 引起的腫瘤與發病時間受到病毒株、感染劑量、感染路徑、曝露於病毒的年齡及宿主是否具有抗性等多重因素相互的影響。雞隻感染ALV但沒產生腫瘤病變是很普遍的。內源性病毒大部分因其基因缺損而無法形成具有感染能力的完整病毒顆粒，所以也不具致癌性。

外源性ALV致腫瘤產生的機制主要有三種方式：(1)transducing retrovirus：病毒攜帶致癌基因，並將致癌基因插入宿主細胞染色體中；(2)cis-activating retrovirus：病毒本身未攜帶致癌基因，而於感染過程插入到宿主細胞致癌基因 (*c-onc* gene) 附近，導致宿主細胞正常基因調節能力失控而癌化；(3)trans-activating retrovirus：



病毒本身攜帶調節蛋白質的基因，因此可以影響宿主細胞的基因表現(Coffin, 1992; Murphy et al., 1999)。此外，依據病毒導致宿主產生腫瘤的快慢，可再把病毒分為快速致癌型病毒 (acute transforming virus) 與慢速致癌型病毒 (slow transforming virus)，快速致癌型病毒是指病毒本身具有致癌基因，感染後，病毒可以直接表現與活化致癌基因，故宿主發生腫瘤的時間會比較短；而慢速致癌型病毒則是本身不具有致癌基因，而是感染過程中間接活化宿主染色體中的致癌基因，故此種病毒引起宿主發生腫瘤的時間比較長(Hayward et al., 1981; Kung and Maihle, 1987; Kung and Liu, 1997)。

當具有感受性的小雞在胚胎發育期間或1-14 日齡時感染了ALV-RPL12 (Burmester et al., 1959)、B15、F42 (Payne and Biggs, 1964)或RAV-1 等標準病毒株後，會在14-30 週齡間引起淋巴球性白血病 (lymphoid leukosis, LL)。LL 通常發生於14 週齡以後的雞隻，其發生率在性成熟時達到最高。另外，ALV 是否帶有致癌基因也會影響引起腫瘤發生的速度，屬於急性致癌型病毒的Strain R，若於實驗高劑量地接種可快速引起腫瘤，並使雞隻在感染後7-12 天內死亡(Graf and Beug, 1978)。

病毒引起之骨髓細胞瘤 (myelocytomatosis) 的潛伏期比紅血胚細胞增生症 (erythroblastosis) 長，但較LL 短。由ALV-J prototype HPRS-103 引起之骨髓細胞瘤，由於並不具有致癌基因，因此其需要較長的潛伏期 (死亡時間的中位數為20 週) (Payne et al., 1992a)；而帶有致癌基因的ALV-J 879 變異株，其潛伏期則僅需9 週；另外，國外曾有4週齡白肉種雞爆發ALV-J 引起之骨髓細胞瘤之田間案例(Fadly and Smith, 1999)。

### 2.7.2. 臨床症狀

家禽白血病所引起的臨床症狀不具有特異性，包括了食慾不佳、虛弱、下痢、脫水、消瘦等。在患有淋巴球性白血病 (lymphoid leukosis, LL) 的病雞，可看到腹部明顯地腫大，且偶爾可見雞冠顯得蒼白、皺縮或發紺；在骨髓胚細胞增生症

(myeloblastosis) 或是紅血球胚細胞增生症的雞隻中，偶爾可見毛囊出血；在骨髓細胞瘤的雞隻中，骨骼部位的myelocytoma會造成頭部、胸部、腿部 (shank) 的突起 (protuberances)，或因為發生在眼眶而造成出血或失明。通常出現臨床症狀後，雞隻會在數週內死亡，而其他受影響的雞隻亦可能在未出現明顯臨床症狀時死亡。

### 2.7.3. 病理變化

ALV造成的組織病理學變化為由淋巴球或是由血球母細胞等大型成熟的淋巴樣細胞所構成，細胞大小相似，不似馬立克病(Marek's disease)的病灶是由大小不一的各種細胞所構成。A亞群ALV主要引起的是淋巴球性白血病 (lymphoid leukosis, LL)，病毒造成B淋巴球細胞病變，故幾乎可見不成熟淋巴球樣細胞浸潤各臟器 (Beard, 1980)。J亞群ALV主要引起骨髓球細胞的癌化，導致骨髓球性白血病 (myeloid leukosis, ML) 的發生 (Payne et al., 1992a)，為細胞質內具有嗜伊紅性顆粒之不成熟骨髓球細胞，通常圍繞在門脈血管四周 (Payne, 1998a)。

## 第八節 免疫

### 2.8.1. 主動免疫

在自然環境下，大部分雞隻感染外源性ALV後，會引發短暫的病毒血症，並逐漸產生高力價抗封套糖蛋白質的中和抗體並且可維持終生 (Rubin et al., 1962b; Solomon et al., 1966)。這些中和抗體可以保護雞隻不受到病毒感染，也可能具有抑制腫瘤產生的效果。當實驗接種4週齡或較大的雞隻，可在1週後偵測到短暫地病毒血症，並在3週或是更久之後偵測到抗ALV的抗體 (Maas et al., 1982)。在孵出後自然感染的雞隻，最早可在9週齡時偵測到抗體，且抗體陽性之雞隻隨著週齡增長而增加，並在14到18週齡時達到高峰，此時約有80% 的雞隻都具有抗ALV的抗體 (Rubin et al., 1962a)。

一般而言，雞隻在越小的年紀感染ALV，其發生病毒血症的期間及產生抗體所需的時間就越長，小雞若因垂直感染ALV，便會對ALV發生免疫耐受性 (immune

tolerance)，而無法產生具有中和能力的抗體，導致雞隻永久性的病毒血症。以實驗接種一日齡小雞，有很高的機率可引發永久性的病毒血症，且會對病毒有免疫耐受性無法產生抗ALV之抗體。小於兩週齡的雞隻感染ALV都有可能產生免疫耐受性，特別是感染J亞群病毒。由於具有免疫耐受性的雞隻體內長期存在高量的病毒，因此相較於可以產生抗體的雞隻更容易產生腫瘤(Lupiani et al., 2000)。

感染ALV之雞隻可以產生抗群特異性抗原 (group-specific antigen) 之抗體，但該抗體對於腫瘤生長並無影響(Roth et al., 1971; Sigel et al., 1971)；至於抗反轉錄酶之抗體，則可同時在已感染或未曾感染ALV之雞隻體內測得(Graevskaya et al., 1982)。

### 2.8.2. 被動免疫

母雞血清中抗ALV之抗體以IgG為主(Meyers and Dougherty, 1972)，可透過卵黃囊 (egg yolk) 由母代傳給子代，提供小雞長達約3到4週之被動免疫的保護，移行抗體存在的時間長短及抗體力價高低則與母雞血清中之抗體力價相關。移行抗體可抵抗ALV的感染、減少小雞發生病毒血症、排毒及發生腫瘤的機會(Witter et al., 1966; Fadly, 1988)。

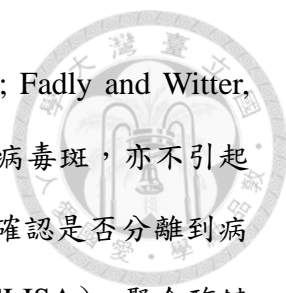
## 第九節 診斷方式

### 2.9.1. 病毒分離與病原鑑定

由於ALV為雞隻常見的病原，透過病毒分離與ALV抗體抗原的檢測，可鑑定與分類新型分離株、確保疫苗安全性、確認有無ALV存在、育種及ALV清除計畫。經常被用來進行病毒分離的材料包括血液、血漿、血清、胎糞、泄殖腔或陰道拭子 (cloacal/vaginal swab)、蛋白、胚胎、腫瘤組織等(Fadly et al., 1981a; Crittenden and Smith, 1984; Fadly and Witter, 1998; Fadly, 2000)。

目前已有多種不同表現型 (phenotype) 的雞胚胎纖維母細胞 (chicken embryo fibroblast, CEF) 可供病毒分離及病原鑑定使用，包括了C/O、C/E、C/AE、C/EJ等，C/O細胞對於A、B、C、D、E、J亞群病毒皆具感受性；而C/E則對E亞群ALV有抵





抗性，因此適合用來分離外源性ALV病毒(Crittenden et al., 1987; Fadly and Witter, 1998; Fadly, 2000)。由於大部分ALV在細胞培養時，並不會產生病毒斑，亦不引起可見之形態學變化，因此必須配合其他分子生物學診斷方法來確認是否分離到病毒，如：酵素連結免疫吸附法（enzyme-linked immunosorbent, ELISA）、聚合酶鏈鎖反應（polymerase chain reaction, PCR）或反轉錄聚合酶鏈鎖反應（reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR）分別偵測群特異性抗原(group-specific antigen, gsa)、proviral DNA或病毒RNA(Fadly and Witter, 1998; Fadly, 2000; Fadly and Payne, 2008)。

### 2.9.2. 病毒核酸偵測

PCR與RT-PCR目前已被廣泛應用於檢測ALV，絕大多數的引子對都是依照*env*基因或LTR序列所設計。目前已有多篇報告發表了可偵測常見的A及J亞群病毒之特異性引子對，可偵測常見的A亞群(Pham et al., 1999a; Lupiani et al., 2000; Ono et al., 2004; Fenton et al., 2005)與J亞群(Smith et al., 1998a; Smith et al., 1998b; Silva et al., 2000; Zavala et al., 2002)；Garcia等人也發展了可以區別外源性和內源性病毒的nested RT-PCR(Garcia et al., 2003)。此外，PCR也曾用來在檢測及鑑定汙染馬立克病疫苗的ALV。

### 2.9.3. 血清學抗體抗原檢測

以血清學方式檢測血清中ALV抗體，來證實是否曾有ALV感染。血漿、血清及卵黃囊（egg yolk）都是適合用來檢測是否含有抗ALV抗體的檢體。目前已有商品化的ELISA診斷套組可偵測抗A/B亞群(Tsukamoto et al., 1985; Smith et al., 1986)及J亞群(Venugopal et al., 1997)之抗體，其所塗鍍的抗原分別是全病毒（RAV-1）及藉由真核表現系統所製備之重組ALV-J的封套糖蛋白質，亦有直接檢測病毒群特異性抗原(gsa)之商品化ELISA診斷套組可供使用。



## 第十節 流行病學

### 2.10.1. 發生率

儘管全球多數種禽公司都已進行ALV 的清除撲滅計畫，但ALV 仍被視為是雞場常見的病毒之一(Fadly and Payne, 2008)。在外源性的ALV 中，以A亞群及新發現的J亞群病毒最為常見，B亞群之報告明顯少於A亞群(Calnek, 1968)；C亞群與D亞群則鮮少有田野間感染的報告(Sandelin and Estola, 1974)。在ALV 導致的腫瘤性疾病中，又以A亞群ALV所引起的淋巴球性白血病最為常見，其發生率約在1-2%之間(Payne, 1998b; Fadly and Payne, 2008)，但偶爾可造成超過20% 的損失。有報告指出，淋巴球性白血病的發生率會因為雞隻感染了傳染性華氏囊病病毒 (infectious bursal disease virus)，使病毒侵害華氏囊而降低，但第二型的馬立克病毒 (Serotype II Marek's disease virus) 則在部分品系的雞隻中會活化ALV的LTR，進而增加ALV引起淋巴球性白血病的機率(Crittenden and Witter, 1978; Fadly and Witter, 1993)。而J亞群ALV主要造成的骨髓細胞瘤 (myelocytomatosis) 在現場為散發性的疾病(Purchase, 1987)，目前已有多个国家發表了由J亞群ALV引起的腫瘤之報告，其死亡率可達1.5% (Wang and Juan, 2002; Bagust et al., 2004; Malkinson et al., 2004; Thapa et al., 2004; Xu et al., 2004)。

### 2.10.2. 家禽白血病病毒在台灣的研究概況

在台灣，家禽白血病的報告最早為1995年Wang等人所發表，證實有雞場發生了高死亡率的骨髓細胞瘤 (myelocytomatosis)，但當時並未分離出病毒(Wang et al., 1995)，直到1997年，台灣一家原種雞場 (grandparent farm) 爆發了J亞群ALV感染且引起重大的經濟損失，並且首次在台灣分離到J亞群ALV (Wang and Juan, 2002)。至2002年，Thu等人亦從台灣土雞中分離到J亞群ALV，證實台灣土雞有J亞群ALV的感染(Thu and Wang, 2003)；而2004年陳曾對部分台灣土雞場進行J亞群ALV之血清學調查，發現J亞群ALV普遍存在於台灣土雞族群中(陳慧真, 2004)。2010年張等人以屠宰場來源之土雞進行血液樣本與血清樣本之ALV檢測，發現A亞群ALV在61

個土雞場中46場分子生物學預期基因盛行率皆大於25%；J亞群ALV則有26場的預期基因盛行率大於25% (Chang et al., 2012)，代表台灣地區的土雞族群皆有A亞群與J亞群ALV的感染。




### 2.10.3. 疾病預防與防治

由於目前並無任何可供預防ALV感染使用之商業疫苗。將ALV由原種雞場 (primary breeding stock) 清除，為控制雞隻感染家禽白血病最有效的方式。目前國際間的白肉雞及蛋雞種禽公司皆已完成了旗下各品系雞隻之A、B、J亞群病毒的清除計畫(Fadly and Payne, 2008)。

ALV清除計畫必須將透過不同病毒檢測方法中陽性反應的母雞淘汰，以避免ALV由母代 (dam) 垂直傳播給子代 (progeny)；此外，從孵化 (hatch)、飼養 (rear) 到維持 (maintain) 必須採隔離且小群 (small group) 之方式，以避免垂直感染後造成大規模地水平傳播。因此，雞胚胎必須由不會傳播病毒的母代取得。目前有三種適合用來選擇母代的方式，分別為：

- (1) 選擇有抗體且不排除之母雞。一般認為擁有抗ALV抗體之母雞較不易排毒，因此小雞也較不易遭到垂直感染，但每隻母雞至少須檢測三個胚胎，以確定其是否有排毒的情況(Hughes et al., 1963)；
- (2) 選擇無抗ALV抗體且不排除之母雞。無抗體之母雞顯示其並未遭到感染，且亦不若有抗體之母雞有可能成為暫時性的排毒者 (intermittent shedder)(Levine and Nelsen, 1964)；
- (3) 選擇無病毒血症之母雞，而不考慮其是否擁有抗體。此為一較簡易的取代方案，但必須經過四代的檢測皆為陰性結果後，才可確定該雞場為無病毒血症之雞場 (free of viremics)，但一些非經由病毒血症之感染並無法藉由此方式來排除 (Zander et al., 1975)。

一般商業雞場之ALV清除得檢驗母雞、雞蛋、胚胎及小雞的感染情況，這包括了檢測蛋白或陰道拭子是否含有外源性ALV及群特异性抗原(gsa)、胚胎或小雞是



否可偵測到ALV等。若母雞有排毒的情況，所產下的蛋之蛋白中通常會同時存在ALV及群特異性抗原(gsa)，若以陰道拭子進行檢測時可能會產生陰性結果。若母雞之陰道拭子或其產下的蛋之蛋白其ALV或群特異性抗原(gsa)的檢測結果為陰性反應，則較不易產出含病毒的胚胎(Spencer et al., 1977)。但在以ELISA檢測蛋白或陰道拭子中的群特異性抗原(gsa)時，可能需要區別其陽性反應是由外源性病毒或內源性病毒所引起之結果(Spencer et al., 1977)。大體來說，由外源性病毒所引起之陽性反應通常會遠高於由內源性病毒所引起之反應，且在蛋白的檢測又較陰道拭子之檢測明顯(Crittenden and Smith, 1984)；此外，利用檢測LTR序列的PCR來區別外源性或內源性病毒也是有效的方式。

因此，ALV的清除計畫包括了：選擇由蛋白或陰道拭子檢測陰性反應之母雞所產下的蛋進行育種(Okazaki et al., 1979; Fadly et al., 1981a; Payne et al., 1982; Crittenden et al., 1984)；採取隔離且小群(25-50)的籠飼(wire-floored cage)孵化，避免人工受精(manual vent sexing)(Fadly et al., 1981b)及共用針頭進行疫苗注射等任何可能造成病毒機械傳播的操作(Fadly and Payne, 2008)；使用血清學或分子生物學等生物檢測方式檢測小雞，並將陽性反應的小雞及與其接觸過的小雞淘汰(Okazaki et al., 1979; Fadly et al., 1981a; Fadly et al., 1981b)；並以隔離方式飼養無ALV污染之小雞(Fadly et al., 1981b; Witter and Fadly, 2001)。

實際上，選擇低排毒率的母雞，配合小雞檢測及隔離飼養，為現場較易採行的方式(Okazaki et al., 1982; Fadly et al., 1983)，若母雞的篩選對疾病的控制無明顯改善，則其感染狀況可能與環境因子較為相關(Fadly et al., 1983)。透過小群孵化及飼養可使飼養者容易辨識及移除感染者，也可預防蛋雞之ALV-A(Fadly et al., 1981b)及肉雞的ALV-J水平感染(Witter and Fadly, 2001)。

儘管遭到垂直感染的同批孵化小雞是主要感染源，剛孵出的小雞對於ALV具有感受性與易產生免疫耐性，但配合多項措施的施行，可降低或消滅ALV之水平感染，譬如孵化室(incubator)、發生室(hatcher)、移動房(boarding house)等各種設備在逐次使用間都必須徹底地清洗和消毒；小雞運輸箱(chick box)不可重複使

用；且每一雞場最好應該飼養同一年齡層的雞群。此外，不同來源的蛋與小雞不應該混合處理，以避免不同雞場交叉汙染的情形(Fadly and Payne, 2008)。

有報告指出，在雞隻於八週齡時給予強毒株之ALV進行免疫，可避免雞隻於蛋中排毒，有助於ALV的清除(Rispens et al., 1976)。但截至目前為止，使用疫苗來清除ALV仍有爭議，且現今仍無任何疫苗商品可供使用。另一方面，基因重組的ALV疫苗在未來可能可以被應用在清除或降低ALV的感染，藉由表現A亞群及J亞群病毒的封套糖蛋白質進行免疫，可能有助於控制水平傳播，但此方式無法提供遭垂直感染之免疫抑制小雞保護，因此並不足以完全清除ALV感染的情況。

## 第十一節 恆溫環形核酸增幅法 ( Loop-mediated isothermal Amplification, LAMP )

### 2.11.1. 恆溫環形核酸增幅法之原理

恆溫環形核酸增幅法是1998年日本榮研公司研發出並於2000年由日本學者Notomi等人所發表的一種新的核酸分子檢測技術(Notomi et al., 2000)。其設計原理可見下圖二，為使用兩組〔內引子組(inner primers)與外引子組(outer primers)，共4條〕或三組〔內引子組、外引子組、環圈引子組(loop primers) (Nagamine et al., 2002)，共6條〕特异性引子於恆溫環境(60-65°C)下去增幅目標序列上的6段或8段不同區域，由於內引子是由2段序列所構成(F1c+F2與B1c+B2)，故在增幅過程中，增幅片段會形成主幹—環圈(stem-loop)的環形結構，故稱為恆溫環形核酸增幅法。

與聚合酶鏈鎖反應(PCR)不同的是，LAMP核酸增幅使用的酵素不是*Taq* polymerase，而是*Bst* DNA polymerase(Aliotta et al., 1996; Spargo et al., 1996)，此酵素可於恆溫下進行核酸增幅與具有核酸雙股取代能力(strand displacement) (Notomi et al., 2000)，省去PCR原理中需於高溫下使核酸解離(denature)成單股的反應與升降溫時間(Nagamine et al., 2001)，一般LAMP反應僅需30-60分鐘



(Parida et al., 2008)。

恆溫環形核酸增幅法其反應原理簡單來說，內引子會先與目標序列結合並延展 (elongation) 形成新的合成股，然後此時外引子會由新的合成股上游端往下延展並取代合成股，被取代與釋放出來的合成股會兩端形成主幹—環圈的啞鈴型結構，並以此為反應起始物，之後內引子會於單股環圈區域反覆進行黏合與延展並同時進行取代，以產生更多的新合成股，由於內引子不斷於單股環圈區域進行黏合與延展，LAMP反應產物為大小不一，具有目標基因的重複顛倒序列 (inverted repeats) 與多個環型 (multiple loop) 的結構。

也如同RT-PCR一樣，於反應中加入反轉錄酶 (reverse transcriptase, RTase)，LAMP也能應用於RNA的檢測(Notomi et al., 2000)，並稱此檢測法為反轉錄恆溫環形核酸增幅法 (reverse transcription loop-mediated isothermal amplification, RT-LAMP)，但比較特別的是，RT-LAMP使用可耐高溫的反轉錄酶 (AMV-RTase) (Fuchs et al., 1999)，以維持其反應恆溫特性與快速檢測之目標。

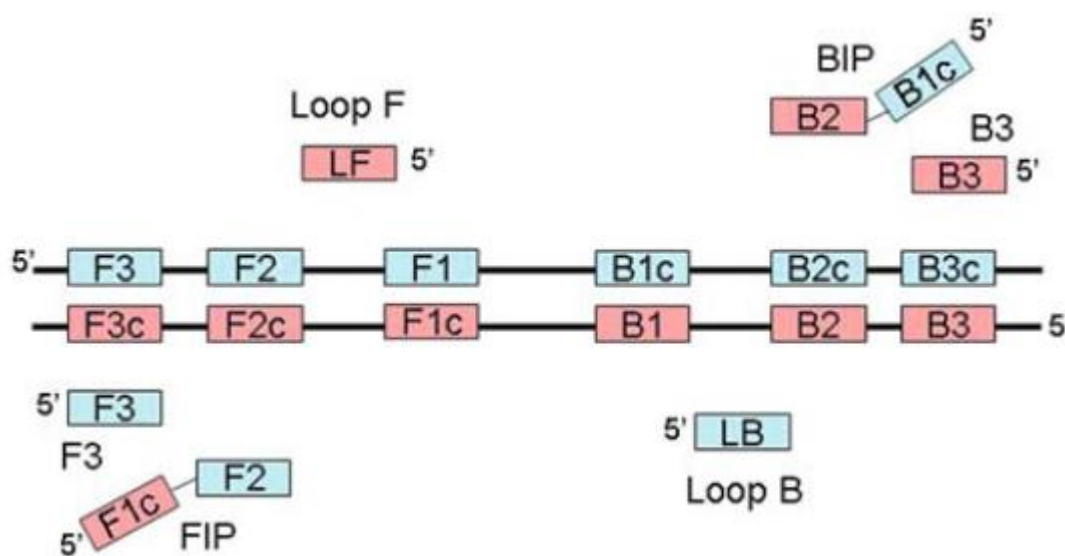


圖 2. 恆溫環形核酸增幅法引子之設計示意圖(Parida et al., 2008)

恆溫環形核酸增幅法引子可為兩組 (內引子組與外引子組) 辨認目標序列上的6段

區域或可為三組(多加環圈引子組)辨認目標序列上的8段區域。內引子組：forward inner primer (FIP) and backward inner primer (BIP)；外引子組：F3 and B3；環圈引子組：loop forward (LF) and loop backward (LB)




### 2.11.2. LAMP產物之檢測

如同一般傳統的核酸增幅法的檢測，LAMP產物可於洋菜膠體電泳法 (agarose gel electrophoresis) 分析，但是因LAMP產物大小不一，其電泳圖形呈現階梯狀 (ladder-pattern) (Notomi et al., 2000)。

除了較費時的洋菜膠體電泳法外，LAMP會於反應過程中，因dNTP與DNA模板結合而產生大量的副產物焦磷酸 (pyrophosphate)，其會與反應液中鎂離子結合而產生白色的焦磷酸鎂 (magnesium pyrophosphate) 沈澱 (Mori et al., 2001)，因此可用肉眼判定LAMP反應結果；由於LAMP反應可大量增幅目標片段，故也可於反應結束後加入核酸螢光染劑或金屬離子染劑，如溴化乙錠 (Ethidium bromide, EtBr)、SYBR Green I、Calcein (Tomita et al., 2008; 陳麗璇, 2011) 等，可於可見光下觀察陽性與陰性反應或以紫外燈照射，觀察激發出之螢光 (Olmsted III and Kearns, 1977; Notomi et al., 2000)；另外，因LAMP會大量產生焦磷酸鎂沈澱與目標DNA片段，故之後也發展出偵測LAMP沈澱混濁度或生成核酸螢光量的定量與半定量檢測法 (Mori et al., 2001; Parida et al., 2004; Parida et al., 2005; Fukuda et al., 2006; Parida et al., 2007; Parida et al., 2008)。

### 2.11.3. LAMP與RT-LAMP應用與研究現況

目前 LAMP 已廣泛應用於各種病原之檢測，如病毒 (Curtis et al., 2008; Iturriza-Gomara et al., 2008; Cardoso et al., 2010; Angamuthu et al., 2012)、細菌 (Iwamoto et al., 2003; Song et al., 2005)、寄生蟲 (Kuboki et al., 2003; Poon et al., 2006; Iseki et al., 2007) 以及黴菌 (Endo et al., 2004)，



若加入反轉錄酶進行反應，則能被應用於多種 RNA 病毒之偵測，其快速診斷之能力，能有效監控疾病之爆發與流行。此外，另有報告發展出多引子恆溫環形核酸增幅法 (multiplex LAMP, mLAMP) 可同時偵測多種病原之存在(Iseki et al., 2007; Shao et al., 2011)，以及亦有學者將 LAMP 技術應用於原位 (*in situ*) 雜交上(Maruyama et al., 2003; Liu et al., 2009)，可直接偵測目標序列於細胞內或檢體上的表現位置，可說 LAMP 發展與應用甚廣。



### 第三章 材料與方法



#### 第一節 以 PCR 與 RT-PCR 偵測田間家禽白血病病毒 (ALV) 核酸

##### 3.1.1. 樣材與來源

樣本來自於 2011-2013 年間蛋用種雞場、肉用種雞場與種土雞場抽全血 (含 EDTA)、血清與泄殖腔拭子送交至本實驗室進行家禽白血病病源檢測之樣本 (表 1)。

##### 3.1.2. 樣本 DNA 萃取

全血樣本先取 10  $\mu\text{L}$  並以 1 $\times$  PBS (Gibco, Grand Island, NY, USA) 溶液做 20 倍稀釋, 每個稀釋全血樣本則取 40  $\mu\text{L}$ , 每 5 個樣本集合成 1 組共 200 $\mu\text{L}$ , 先以集合樣本做 DNA 萃取, 若樣本集合經後述檢驗為家禽白血病病源檢測陽性, 則該組樣本集合陽性檢驗再個別檢驗旗下 5 個稀釋全血樣本, 樣本 DNA 萃取以 QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Germany) 萃取 DNA, 步驟如下: 加入 200 $\mu\text{L}$  稀釋集合全血或單獨稀釋全血到 1.5 mL 的微量離心管, 加入 20  $\mu\text{L}$  之 proteinase K, 加入 20  $\mu\text{L}$  之 AL 液 (A Lysis Buffer), 劇烈震盪 15 秒後放在 56 $^{\circ}\text{C}$  乾浴槽作用 10 分鐘, 待液體呈澄清, 加入 230  $\mu\text{L}$  之絕對酒精加強液體中核酸附著於 silicon membrane 的親和力, 劇烈震盪 15 秒, 簡易離心後將液體吸入 QIAamp spin column, 以 8000 rpm 離心 1 分鐘。將 column 置入新的 2 mL collection tube, 加入 500  $\mu\text{L}$  之 AW1 液 (A Wash 1 buffer), 以 8000 rpm 離心 1 分鐘, 將 column 置入新的 2 mL collection tube, 加入 500  $\mu\text{L}$  之 AW2 液 (A Wash 2 buffer), 以 8000 rpm 離心 1 分鐘。移除下清液, 以 12000 rpm 離心 3 分鐘使殘存酒精揮發。將 column 置入滅菌過的 1.5 mL 微量離心管, 加入 60  $\mu\text{L}$  之 DEPC 水, 靜置 3 到 5 分鐘, 以 8000 rpm 離心 1 分鐘, 最後微量離心管內即為所萃取之 DNA。

##### 3.1.3. 樣本 RNA 萃取



血清樣本與泄殖腔拭子如同上述，先把各編號樣本取 40 $\mu$ L，每 5 個樣本集成 1 組共 200 $\mu$ L，若樣本集合經後述檢驗為家禽白血病毒病源檢測陽性，則該組樣本集合陽性檢驗再個別檢驗旗下 5 個樣本，樣本 RNA 的抽取以 Geneaid Viral Nucleic Acid Extraction Kit II (Geneaid, Taiwan) 做抽取，檢驗病毒 RNA，步驟如下：取 200  $\mu$ L 的檢體液加至 1.5 mL 的微量離心管（若檢體量不足 200  $\mu$ L，則加入 PBS 溶液至 200  $\mu$ L），加入 400  $\mu$ L 的 VB lysis buffer 至微量離心管並以大力混合並放置在室溫下 10 分鐘，加入 450  $\mu$ L 的 AD buffer 至檢體溶解液並大力混合均勻，組裝 VB column 至 2 mL Collection tube，吸取 600  $\mu$ L 的溶解液至 VB column，離心 13200 rpm 4 $^{\circ}$ C 1 分鐘，倒掉 2 mL Collection tube 內的液體並組裝回去，把剩餘的溶解液裝入 VB column，再度離心 13200 rpm 4 $^{\circ}$ C 1 分鐘，丟棄 2 mL Collection tube（含其濾下的溶液），並把 VB column 組裝至新的 2 mL Collection tube，加入 400  $\mu$ L 的 W1 buffer 至 VB column，離心 13200 rpm 4 $^{\circ}$ C 30 秒，倒掉 2 mL Collection tube 內的液體，並組裝回去，加入 600  $\mu$ L 的 Wash buffer 至 VB column 並離心 13200 rpm 4 $^{\circ}$ C 30 秒，倒掉 2 mL Collection tube 內的液體並組裝回去，離心 13200 rpm 4 $^{\circ}$ C 3 分鐘，使管內乾燥，放置已乾燥的 VB column 至 1.5 mL 的微量離心管，加入 50  $\mu$ L 的 DEPC 水至 VB column 的中心處，等待 3 到 5 分鐘後，離心 13200 rpm 4 $^{\circ}$ C 1 分鐘，純化核酸將被洗出至 1.5 mL 的微量離心管

#### 3.1.4. 反轉錄反應 (RT)

準備 200  $\mu$ L PCR 小管，加入 4  $\mu$ L 5 $\times$  first-strand buffer (Invitrogen, California)、4  $\mu$ L 2.5 mM dNTP (Gene Tek BioScience Inc., Taipei)、2  $\mu$ L DTT (Invitrogen, California)、1  $\mu$ L 50  $\mu$ M 反向引子 (明欣生物科技有限公司，台北市)、0.4  $\mu$ L recombinant RNasin ribonuclease inhibitor (40 U/ $\mu$ L; Promega, Wisconsin, USA)、0.1  $\mu$ L Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase (M-MuLV RT; 200 U/ $\mu$ L; Invitrogen, California) 及 3  $\mu$ L 萃取後 RNA，最後加入 DEPC 水，使總反應體積為 20  $\mu$ L。反轉錄的反應步驟為 37 $^{\circ}$ C 作用 50 分鐘，再進行 70 $^{\circ}$ C 10 分



鐘，便可得到 cDNA 產物。檢測 A 亞群及 J 亞群病毒時所使用的特異性引子分別為 PA1/TWA 及 H5/H7 (表 2) (Smith et al., 1998b; Chang et al., 2012)。

### 3.1.5. 聚合酶鏈鎖反應 (PCR)

以 3.1.2 或 3.1.4 所得到的 DNA 或 cDNA 為模板，分別以 PA1/TWA (Chang et al., 2012) 及 H5/H7 (Smith et al., 1998b) 引子對偵測 ALV-A 及 ALV-J 之核酸。取 200  $\mu$ L 的 PCR 小管，分別加入 3  $\mu$ L 2.5 mM dNTP、2.5  $\mu$ L 10x PowerTaq DNA polymerase buffer (Gene Tek's BioScience Inc., Taipei)、0.5  $\mu$ L 50  $\mu$ M 正反向引子 (明欣生物科技股份有限公司, 台北市)、0.5  $\mu$ L Power Taq DNA polymerase (5U/ $\mu$ L; Gene Tek's BioScience Inc., Taipei) 及 3  $\mu$ L DNA 模板，最後再加入 DEPC 水，使總反應體積為 25  $\mu$ L。反應條件為 94 $^{\circ}$ C 5 分鐘，接著進行 94 $^{\circ}$ C 30 秒使雙股模板 DNA 變性 (Denature)、55 $^{\circ}$ C 60 秒使特異性引子與單股模板 DNA 黏合 (Annealing)、72 $^{\circ}$ C 1 分鐘進行延長反應 (Extension) 共重複 35 個循環，最後以 72 $^{\circ}$ C 7 分鐘延長反應後終止反應，ALV-A PCR 產物預期大小為 323 bp (Chang et al., 2012)；ALV-J PCR 產物預期大小為 545 bp (Smith et al., 1998b)。

### 3.1.6. 洋菜膠電泳分析

製作 2% 的洋菜膠：以 agarose gel 粉末 (Promega, Wisconsin, USA) 加入 0.5 $\times$  TAE buffer (40mM Tris-acetate, 1mM EDTA; Amresco, Solon, OH) 中，微波加熱至完全溶解後，待其冷卻至 55 $^{\circ}$ C，倒入鑄膠模，插上樣本梳，置於室溫待其凝固後放入迷你電泳槽中 (Mupid-II, Cosmo BioCo., Tokyo, JP)，將 5  $\mu$ L PCR 產物與 1  $\mu$ L 6 $\times$  DNA loading dye (Genestar, Taiwan) 混合均勻，加入洋菜膠之樣本槽內，並加入 100 bp 之 DNA ladder Marker (GeneTek's BioScience Inc., Taipei) 至樣本槽內，以 100 伏特於 0.5 $\times$  TAE buffer 中進行電泳，待電泳結束後，將膠體以 ethidium bromide (EtBr; Life Technologies, Gaithersburg, MD) 溶液避光染色，再以水適度退染。以波長 254 nm 之 UV 燈臺 (Vilber Lourmat, LA, CA) 確認增幅產物。



## 第二節 純化家禽白血病 J 亞群病毒

### 3.2.1. 家禽白血病 J 亞群病毒受汙染確認

把疑似遭到 A 亞群病毒汙染之家禽白血病 J 亞群病毒上清液與對家禽白血病病毒具有感受性的細胞株 DF-1 進行共培養，再利用對 ALV-A 具有偵測專一性的特異引子對 PA1、TWA 進行 PCR 偵測，確認細胞 DNA 裡有 provirus 的存在，證明家禽白血病 J 亞群病毒上清液有受家禽白血病 A 亞群病毒汙染。

#### 3.2.1.1. 細胞培養

使用無菌操作台內將 4 mL 已回溫的細胞培養液加入 25T flask (Corning life science, NY, USA) 中，培養液 DMEM (Dulbecco's minimum essential medium, pH 7.0-7.2) (Gibco, Grand Island, NY, USA) 事先加入 10% 胎牛血清 (Hyclone, Logan, Utah) 和 1% 廣效性抗生素 (ampicillin, streptomycin, and amphotericin, Biological Industries, Israel)。自液態氮儲存桶取出冷凍的 DF-1 細胞株 (chicken fibroblast cell line developed by Doug Foster; ATCC CRL-12203, American type culture collection, Manassas, VA) (Himly et al., 1998) 冷凍小管，於 37°C 水浴槽中進行快速解凍，以低速離心 (125× g, 5 分鐘) 移除冷凍液並加入 1-2 mL 細胞培養液，於無菌操作台將解凍後細胞加入前述之 flask，使細胞均勻懸浮後，置於 5% 二氧化碳 39°C 之細胞培養箱 (NuAire Inc., Plymouth, MN, USA) 隔夜培養，第二天更換新的細胞培養液。而 DF-1 細胞為貼附型的紡錘狀纖維母細胞，約每 3 到 4 天繼代一次。繼代方式如下：先吸去 flask 內的細胞培養液，再以 5 mL 已滅菌 PBS 溶液潤洗 2 次，再以 1 mL 0.16% Cell Trypsin (Gibco, Grand Island, NY, USA) 使細胞懸浮，以顯微鏡觀察細胞型態呈現圓化時，加入上述配置 5 mL DMEM 培養液 (含 10% 胎牛血清) 中止消化反應，搖晃均勻後吸除懸浮細胞液，留下 0.2 mL 懸浮細胞液，再加入 5 mL DMEM 培養液，輕微搖晃混合均勻後，置於細胞培養箱。



### 3.2.1.2. 計算細胞數目

經過 Cell Trypsin 處理的懸浮細胞液 10 倍稀釋後，加入等體積的 Trypan blue 染色，10  $\mu$ L 混合液加入血球計數盤 (chamber)，於顯微鏡下計算四大方格內之活細胞數量。計算方式：原始懸浮細胞液濃度 (cell/mL) = 四大格活細胞總數  $\div$  4  $\times$  稀釋倍數  $\times 2 \times 10^4$ 。

### 3.2.1.3. 病毒增殖

使用本實驗室受 A 亞群病毒污染之家禽白血病 J 亞群病毒上清液感染 DF-1 細胞，而因家禽白血病病毒為反轉錄病毒，會把病毒核酸反轉錄後嵌入宿主 DNA 以製造具有感染能力的病毒顆粒，故抽取細胞 DNA 進行 ALV 的 PCR 偵測，以確認培養的 DF-1 細胞是否受到病毒感染。而經過確認感染的 DF-1 細胞，以事先加入 10% 胎牛血清 (Hyclone, Logan, Utah) 和 1% 廣效性抗生素 (ampicillin, streptomycin, and amphotericin, Biological Industries, Israel) 的培養液 DMEM (Dulbecco's minimum essential medium, pH 7.0-7.2) (Gibco, Grand Island, NY, USA) 於 flask 中進行培養，每 3 到 4 天繼代一次，收集細胞上清液留待中和試驗使用。

### 3.2.1.4. 聚合酶鏈鎖反應 (PCR)

以對 ALV-A 與 ALV-J 偵測具專一性的特異性引子對 PA1/TWA 與 H5/H7 進行增幅，增幅產物目標大小為 323 bp 與 545 bp。取 200  $\mu$ L 細胞繼代時得到的懸浮細胞液以 QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Germany) 萃取細胞 DNA，進行聚合酶鏈鎖反應，準備 200  $\mu$ L PCR 小管，分別加入 3  $\mu$ L 2.5 mM dNTP、2.5  $\mu$ L 10x PowerTaq DNA polymerase buffer (Gene Tek's BioScience Inc., Taipei)、0.5  $\mu$ L 50  $\mu$ M 正反向引子與反向引子、0.5  $\mu$ L Power Taq DNA polymerase (5U/  $\mu$ L; Gene Tek's BioScience Inc., Taipei) 及 3  $\mu$ L DNA 模板，最後再加入 DEPC 水，使總反應體積為 25  $\mu$ L。反應條件為 94 $^{\circ}$ C 5 分鐘，接著進行 94 $^{\circ}$ C 30 秒使雙股模板 DNA 變性 (Denature)、55 $^{\circ}$ C 60 秒使特異性引子與單股模板 DNA 黏合 (Annealing)、72 $^{\circ}$ C 1 分鐘進行延長



反應 (Extension) 共重複 35 個循環，最後以 72°C 7 分鐘延長反應後終止反應，以洋菜膠體電泳分析增幅產物，若出現目標大小的條帶，即判定存在病毒的感染。

### 3.2.2. 抗血清處理被污染病毒液試驗

將抗 ALV-A 之抗血清 (Charles River) 與被污染之病毒上清液進行中和反應後再加入細胞進行感染，抽取細胞 DNA，再以 PA1/TWA 引子對以 PCR 偵測 ALV-A provirus 的存在，看是否有未被中和掉的 ALV-A 造成細胞感染。如增幅結果為陽性，則代表血清尚未完全中和掉病毒上清液；若增幅結果為陰性，則代表血清完全中和掉 ALV-A，使得細胞並未被 ALV-A 感染。

#### 3.2.2.1. 中和反應

將未受污染的 DF-1 細胞以 0.16% trypsin 處理懸浮起來，以含 10% 胎牛血清和 1% 廣效性抗生素的 DMEM 培養液稀釋至  $6 \times 10^5$  cells/ mL。把細胞液加入至六孔盤，每孔加入 500  $\mu$ L 的懸浮細胞液並再加入 500  $\mu$ L DMEM 培養液。抗 ALV-A 之抗血清以 56°C 30 分鐘非動化處理後以已滅菌 DW 做 2 倍稀釋，將確認受污染的 ALV-J 病毒上清液以已滅菌 DW 做 10 倍序列稀釋，稀釋之血清與稀釋之病毒液各取 100  $\mu$ L 均勻混合並放置於室溫下進行中和反應 1 小時。取經過中和反應後的混合液 100  $\mu$ L 加入至細胞六孔盤，共同培養 3 到 4 天，待細胞長滿後，抽取細胞 DNA，以對 ALV-A 偵測具專一性的特異性引子對 PA1 與 TWA、對 ALV-J 偵測具專一性的特異性引子對 H5 與 H7 進行聚合酶鏈鎖反應 (PCR)，以洋菜膠體電泳分析產物，若只出現增幅 ALV-J 產物之條帶並無增幅 ALV-A 產物之條帶，則代表該孔細胞只受到 ALV-J 感染，再另外繼代至 25T flask 回收細胞上清液即可得到純化的 ALV-J 病毒上清液。

### 第三節 建立反轉錄恆溫環形核酸增幅法 (RT-LAMP) 偵測家禽白血病毒 (ALV) 核酸



### 3.3.1. 反轉錄恆溫環形核酸增幅法 (RT-LAMP) 之引子設計


#### 3.3.1.1. 家禽白血病 A 亞群病毒之引子設計

以先前本研究室已有的家禽白血病 A 亞群病毒株 TW-3577、TW-3593 之 *env* 基因核酸序列 (accession No.: HM582657、HM582658) 與其他從 Genbank 資料庫中已知的家禽白血病 A 亞群病毒株 ALV strain MQNCSU (DQ365814)、avian neurofibrosarcoma virus (AB522906)、ALV strain SDAU09E1 (HM452341)、Rous associated virus type 1 (strain RAV-1) envelope (M19113)、ALV strain LR-9 envelope protein genes (AY350569) 序列以核酸序列編輯軟體 MegAlign (DNASStar Inc., Madison, WI, USA) 使用 Clustal W 法進行序列排列 (alignment), 找出變異性較小的共有序列 (consensus sequence), 再以恆溫環形核酸增幅法 (LAMP) 引子設計軟體 Primer Explore V4 (Eiken Chemical Co., Ltd., Tokyo, Japan) 來設計含外引子 (Outer primes; F3 and B3) 與內引子 (Inner primers; FIP and BIP) 的一套引子對並委託明欣生物科技股份有限公司 (台北市) 進行引子的製作。

#### 3.3.1.2. 家禽白血病 J 亞群病毒之引子設計

先以偵測家禽白血病 J 亞群病毒之 H5/H7 引子對 (Smith et al., 1998b) 增幅本實驗室已有的家禽白血病 J 亞群病毒株 TW-2921 (EF653908) 所得到的核酸片段序列與從 Genbank 資料庫中已知的家禽白血病 J 亞群病毒 HPRS-103 (Z46390) 序列以核酸序列編輯軟體 MegAlign (DNASStar Inc., Madison, WI, USA) 使用 Clustal W 法進行序列排列 (alignment), 找出變異性較小的共有序列 (consensus sequence), 再以恆溫環形核酸增幅法 (LAMP) 引子設計軟體 Primer Explore V4 (Eiken Chemical Co., Ltd., Tokyo, Japan) 來設計含外引子對 (Outer primes, F3 and B3) 與內引子對 (Inner primers, FIP and BIP) 的一套引子對並委託明欣生物科技股份有限公司 (台北市) 進行引子的製作。

### 3.3.2. 反轉錄恆溫環形核酸增幅法 (RT-LAMP)



使用 Loopamp RNA amplification kit (Eiken Chemical Co., Ltd., Tokyo, Japan) 提供反轉錄恆溫環形核酸增幅法所需要的試劑，其配製內容如下：12.5  $\mu\text{L}$  的 reaction mix [ 40 mM Tris-HCl pH8.8、20 mM KCl、16 mM  $\text{MgSO}_4$ 、20 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.2% Tween20、1.6M Betaine、2.8mM each dNTPs ]、1  $\mu\text{L}$  的 enzyme mix (Bst DNA polymerase、AMV-RTase)、1.6 $\mu\text{M}$  的內引子對 (FIP and BIP)、0.2 $\mu\text{M}$  的外引子對 (F3 and B3)、3  $\mu\text{L}$  的核酸溶液，最後加入以 DEPC 處理過的 DW，使總反應體積為 25  $\mu\text{L}$ 。

配製好上述 RT-LAMP 反應後，以不同反應時間與 RNA 模板量測試 RT-LAMP 最佳反應條件，反應時間為：65 $^{\circ}\text{C}$  30 分鐘、65 $^{\circ}\text{C}$  45 分鐘、65 $^{\circ}\text{C}$  60 分鐘；RNA 模板量為 100ng、10ng、1ng，並把上述兩種變因做交叉組合，以找出最適合的反應條件，最後以 80 $^{\circ}\text{C}$  5 分鐘使酵素去活化。以洋菜膠體電泳法確認增幅產物。

### 3.3.3. 反轉錄恆溫環形核酸增幅法 (RT-LAMP) 產物之分析

#### 3.3.3.1. 洋菜膠體電泳分析

製作 2% 的洋菜膠：以 agarose gel 粉末 (Promega, Wisconsin, USA) 加入 0.5 $\times$  TAE buffer (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA; Amresco, Solon, OH) 中，微波加熱至完全溶解後，待其冷卻至 55 $^{\circ}\text{C}$ ，倒入鑄膠模，插上齒梳，置於室溫待其凝固後放入迷你電泳槽中 (Mupid-II, Cosmo BioCo., Tokyo, JP)，將 5  $\mu\text{L}$  RT-LAMP 產物與 1  $\mu\text{L}$  6 $\times$  DNA loading dye (Genestar, Taiwan) 混合均勻，加入洋菜膠之樣本槽內，並加入 100 bp 之 DNA ladder Marker (GeneTeks BioScience Inc., Taipei) 至樣本槽內，以 100 伏特於 0.5 $\times$  TAE buffer 中進行電泳，待追蹤染劑 bromophenol blue 跑至膠體 4/5 處時關閉電源，將膠體以 ethidium bromide (EtBr; Life Technologies, Gaithersburg, MD) 溶液避光染色，再以水適度退染。以波長 254nm 之 UV 燈臺 (Vilber Lourmat, LA, CA) 確認增幅產物。

#### 3.3.3.2. 焦磷酸鎂(magnesium pyrophosphate)沉澱分析





於反應後，離心  $2000\times g$ ，30 秒，觀察每管 RT-LAMP 反應產物之焦磷酸鎂沉澱情形。

### 3.3.3.3. SYBR Green I 核酸染劑分析

每管 RT-LAMP 反應產物加入  $1\ \mu\text{L}$  SYBR Green I dye (GeneMark, Taiwan)，均勻混合後，觀察其顏色變化。

### 3.3.4. 反轉錄恆溫環形核酸增幅法 (RT-LAMP) 之專一性檢定 (Specificity test)

以本實驗為家禽白血病毒所設計之反轉錄恆溫環形核酸增幅法 (RT-LAMP) 增幅本實驗室已有的家禽病原病毒核酸，測其專一性。

#### 3.3.4.1. 家禽病原核酸確認

把本研究室已有的家禽病原病毒，如：家禽流行性感冒病毒 [Influenza A virus A/chicken/Yunlin/3233/04 (H5N2)]、雞傳染性支氣管炎病毒 (Avian infectious bronchitis virus isolate chicken/3575/08)、新城病病毒 (Newcastle Disease virus strain 2860)、禽網狀內皮增生症病毒 (Avian reticuloendotheliosis virus strain goose/3410/06; Accession No.: FJ439119)、馬立克氏病病毒 (Marek's disease virus strain 3823)，以 Geneaid Viral Nucleic Acid Extraction Kit II (Geneaid, Taiwan) 抽取其病毒核酸，以其特異性引子 (表 3) 進行反轉錄聚合酶鏈鎖反應 (RT-PCR) 或聚合酶鏈鎖反應 (PCR)，確認其病毒核酸之存在。

#### 3.3.4.2. 家禽白血病毒核酸存在於其他家禽病原之確認

把上述 3.3.4.1 所抽取的病毒核酸，以其家禽白血病毒特異性引子 H5/H7 與 PA1/TWA(表 2) 進行反轉錄聚合酶鏈鎖反應 (RT-PCR) 或聚合酶鏈鎖反應 (PCR)，確認其病毒核酸是否有家禽白血病毒存在。



### 3.3.4.3. 反轉錄恆溫環形核酸增幅法之專一性檢定

在上述 3.3.4.1. 所抽取的病毒核酸，行上述 3.3.4.2 確認無家禽白血病毒存在後，把各家禽病原病毒核酸以反轉錄恆溫環形核酸增幅法進行增幅，再以洋菜膠體電泳分析之。

## 第四節 反轉錄恆溫環形核酸增幅法 (RT-LAMP) 與一步反轉錄聚合酶鏈鎖反應 (one-step RT-PCR) 之偵測比較

### 3.4.1. 設計一步反轉錄聚合酶鏈鎖反應 (one-step RT-PCR)

為使反轉錄聚合酶鏈鎖反應 (RT-PCR) 所加入的核酸量能與反轉錄恆溫環形核酸增幅法 (RT-LAMP) 所加入的核酸量一致，以得到正確的比較結果，故設計一步反轉錄聚合酶鏈鎖反應 (one-step RT-PCR)，其配製內容如下：

10× Taq DNA polymerase buffer	5 μL
BioTaq polymerase	0.5 μL
M-MLV reverse transcriptase	0.2 μL
Recombinant Ribonuclease Inhibitor	0.3 μL
2.5mM dNTP	6 μL
Forward primer (PA1 for ALV-A/H5 for ALV-J)	1 μL
Backward primer (TWA for ALV-A/H7 for ALV-J)	1 μL
DEPC	30 μL
RNA template	6 μL
<hr/>	
總體積	50 μL

反應條件如下：

37°C (reverse transcription) 45min



94°C	(deactivation of RTase and activation of DNA polymerase)	4min	} 35 個循環
94°C	(denaturation)	30sec	
55°C	(annealing)	30sec	
72°C	(extension)	60sec	
72°C	(reaction completion)	7min	

待反應完全後，以洋菜膠體電泳法分析產物大小。

### 3.4.2. 病毒核酸之萃取

收集本實驗室分離之家禽白血病病毒 A 亞群與 J 亞群之培養液 300  $\mu$ L 至 1.5 mL 之微量離心管內，加入 900  $\mu$ L Trizol solution (Genmedika Biotechnology Corp., Taipei) 後混合均勻，再加入 200  $\mu$ L Chloroform (Merck, Darmstadt, Germany)，劇烈震盪 15 秒後，於 4°C 以 12000 rpm 離心 15 分鐘，離心後可見溶液分為三層，吸取最上層的無色水層 750  $\mu$ L 至新的 1.5 mL 的微量離心管內，再加入等體積的 Isopropanol (Merck, Darmstadt, Germany) 混合均勻，置於 4°C 下靜置 30 分鐘以沉澱 RNA，沈澱完成後再於 4°C 以 12000 rpm 離心 15 分鐘。離心後移除上清液，加入 1000  $\mu$ L 75% 酒精 (Merck, Darmstadt, Germany) 沖洗 RNA 以去除多餘鹽類物質，於 4°C 以 12000 rpm 離心 5 分鐘。離心後移除上清液，真空抽乾 10 分鐘移除殘存酒精後，以 60  $\mu$ L DEPC 水回溶 RNA，並保存於 -20°C。

### 3.4.3. 病毒核酸之定量

將 3.4.2 萃取出之病毒核酸以分光光度計 (Spectrophotometer) 測其濃度，並以 DEPC 水調整核酸液濃度至 10ng/3  $\mu$ L，並以此濃度做 10 倍序列稀釋至濃度 1pg/3  $\mu$ L。

### 3.4.4. 反轉錄恆溫環形核酸增幅法 (RT-LAMP) 敏感性測試

將 3.4.3 經過定量的 10 倍序列稀釋核酸液以反轉錄恆溫環形核酸增幅法 (RT-LAMP) 進行增幅，並以洋菜膠體電泳分析其增幅能力之敏感性。



#### 3.4.5. 一步反轉錄聚合酶鏈鎖反應 (one-step RT-PCR) 敏感性測試

將 3.4.3 經過定量的 10 倍序列稀釋核酸液以第四節所述之一步反轉錄聚合酶鏈鎖反應 (one-step RT-PCR) 進行增幅，並以洋菜膠體電泳分析其增幅能力之敏感性。

#### 3.4.6. 雞隻田間樣本偵測能力比較

使用 2011-2013 年間蛋用種雞場、肉用種雞場與種土雞場採集之血清與泄殖腔拭子樣本，隨機取樣 310 個樣本，並每 5 個樣本集成 1 組 (共 62 組)，抽取其核酸 RNA，以 3.3.2 之 RT-LAMP 與 3.2 之 one-step RT-PCR 偵測其核酸 RNA 是否有 ALV 存在，RT-LAMP-A 與 one-step RT-PCR-A 檢驗相同者、RT-LAMP-J 與 one-step RT-PCR-J 檢驗相同者算入檢驗相同之族群；反之，算入檢驗相異之族群，檢驗結果以統計學方法 McNemar's test 檢定 RT-LAMP 與 one-step RT-PCR 檢驗結果是否有差異性(Sotiriadou and Karanis, 2008)。

## 第四章 結果



### 第一節 以 PCR 與 RT-PCR 偵測田間家禽白血病毒 (ALV) 核酸

於 2011-2013 年間，來自蛋用種雞場、肉用種雞場與種土雞場之送檢樣本，基本每隻雞皆有全血（含 EDTA）、血清與泄殖腔拭子三種形式的樣材，送交至本實驗室後，全血檢體以 PCR 檢測，血清與泄殖腔拭子以 RT-PCR 檢測，檢驗結果整理成表 4。檢驗 17 場中有 5 場發生 ALV-J 感染，陽性率為 29.4%，但並無檢測出 ALV-A 感染，有些後續檢測無法繼續施行，則是因剩餘樣本含量不足所致。


### 第二節 純化家禽白血病毒 J 亞群病毒

#### 4.2.1. 家禽白血病毒 J 亞群病毒之汙染確認

於反轉錄恆溫環形核酸增幅法 (RT-LAMP) 偵測家禽白血病毒 A 亞群 (ALV-A) 核酸之測試過程中，發現家禽白血病毒 J 亞群 (ALV-J) 核酸也出現反轉錄恆溫環形核酸增幅法的陽性反應 (圖 3)，推測本實驗室擁有的家禽白血病毒 J 亞群病毒株 (TW-2921) 有家禽白血病毒 A 亞群的汙染，為了再次確認此汙染的重複性，把疑似遭汙染之家禽白血病毒 J 亞群病毒上清液接種至對家禽白血病毒具有親和力的細胞株 DF-1 進行感染，再利用對 ALV-A 具有偵測專一性的特異引子對 PA1、TWA 進行 PCR 確認細胞裡有家禽白血病毒 A 亞群的 provirus 存在，經由洋菜膠體電泳分析 PCR 產物後證明細胞的確有被家禽白血病毒 A 亞群病毒感染 (圖 4)。

#### 4.2.2. 抗 ALV-A 之抗血清處理被汙染病毒液

將接種回細胞株 DF-1 進行增殖的遭汙染家禽白血病毒 J 亞群病毒上清液回收，並以已滅菌 DW 做 10 倍序列稀釋，並與稀釋之血清均勻混合並放置於室溫下進行中和反應，再把中和反應過的混合液拿回細胞株 DF-1 進行感染，最後抽取細胞核酸進行聚合酶鏈鎖反應 (PCR) 增幅家禽白血病毒基因片段，分析抗體中和試驗



的結果(圖 5)，如圖 5 所示，將病毒上清液序列稀釋後，可以降低病毒顆粒的濃度，再以抗體中和掉家禽白血病病毒 A 亞群的污染，而在 10 倍稀釋與 100 倍稀釋的病毒上清液皆可見家禽白血病病毒 A 亞群增幅的陽性反應，可推知抗家禽白血病病毒 A 亞群的中和抗體不足以完全中和掉家禽白血病病毒 A 亞群的污染，使得家禽白血病病毒 J 亞群的病毒液還有家禽白血病病毒 A 亞群的污染，不過當病毒上清液在 1000 倍稀釋時，則可見只有家禽白血病病毒 J 亞群的陽性增幅反應而沒有家禽白血病病毒 A 亞群的陽性增幅反應，可推知在此稀釋倍數下，稀釋的病毒液中，家禽白血病病毒 A 亞群的病毒顆粒已被抗體完全中和，失去感染進細胞的能力，而只剩家禽白血病病毒 J 亞群的病毒顆粒可以感染進入細胞。經由此中和試驗，得到了純化的家禽白血病 J 亞群病毒株，可使後續實驗得以順利進行。

### 第三節 建立反轉錄恆溫環形核酸增幅法(RT-LAMP)偵測家禽白血病病毒(ALV)核酸

#### 4.3.1. 反轉錄恆溫環形核酸增幅法 (RT-LAMP) 之引子設計

##### 4.3.1.1. 家禽白血病 A 亞群病毒之引子設計

將研究室已有的家禽白血病 A 亞群病毒株 TW-3577、TW-3593 之 *env* 基因核酸序列與其他從 Genbank 資料庫中已知的家禽白血病 A 亞群病毒株 Avian leukosis virus strain MQNCSU、Avian leukosis virus genomic RNA、Avian leukosis virus strain SDAU09E1、Rous associated virus type 1 (strain RAV-1, subgroup A) envelope、Avian leukosis virus LR-9 gag protein, gag/pol polyprotein, and envelope protein genes 經由 Clustal W 法進行序列排列 (alignment)，找出變異性較小的共有序列 (圖 6) 由 LAMP 引子設計軟體 Primer Explore V4 (Eiken Chemical Co., Ltd., Tokyo, Japan) 來設計含外引子 (Outer primes; F3 and B3) 與內引子 (Inner primers; FIP and BIP)，由圖 6 可知核酸序列 5717 至 6017 的變異性較小，故選擇此區段的共有序列用來設計 LAMP 引子(表 2)。



#### 4.3.1.2. 家禽白血病 J 亞群病毒之引子設計

以偵測家禽白血病 J 亞群病毒之 H5/H7 引子對(Smith et al., 1998b)增幅本研究室家禽白血病 J 亞群病毒株 TW-2921 所得到的核酸片段序列與家禽白血病 J 亞群病毒 HPRS-103 序列使用 Clustal W 法進行序列排列 (alignment), 找出變異性較小的共有序列(圖 7), 再以 LAMP 引子設計軟體 Primer Explore V4 (Eiken Chemical Co., Ltd., Tokyo, Japan) 來設計含外引子對 (Outer primes, F3 and B3) 與內引子對 (Inner primers, FIP and BIP) (表 2)。

#### 4.3.2. 反轉錄恆溫環形核酸增幅法 (RT-LAMP)

使用 Loopamp RNA amplification kit (Eiken Chemical Co., Ltd., Tokyo, Japan) 提供反轉錄恆溫環形核酸增幅法所需要的試劑, 並以不同反應時間與 RNA 模板量測試 RT-LAMP 最佳反應條件, 最後以 80°C 5 分鐘使酵素去活化。由圖 8 與圖 9 可知 RT-LAMP for ALV-J detection 於 45 分鐘後, 三種 RNA 模板量 (1ng、10ng、100ng) 皆可被增幅出來; 而 RT-LAMP for ALV-A detection 則是於 60 分鐘後, 三種 RNA 模板量可被增幅出來, 故以反應時 60 分鐘, RNA 模板量 1ng 至 100ng 之間為反轉錄恆溫環形核酸增幅法偵測家禽白血病病毒最合適條件。

#### 4.3.3. 反轉錄恆溫環形核酸增幅法 (RT-LAMP) 產物之分析

##### 4.3.3.1. 洋菜膠體電泳分析

由於和聚合酶鏈鎖反應 (PCR) 的增幅原理不一樣, 反轉錄恆溫環形核酸增幅法所得產物大小不一, 在洋菜膠體電泳分析上是形成階梯形圖案 (ladder pattern), 由圖 10 可見本實驗所設計的反轉錄恆溫環形核酸增幅法引子可以成功增幅家禽白血病 A 亞群與家禽白血病 J 亞群的 RNA, 且並不交叉反應 (cross-reaction)。

##### 4.3.3.2. 焦磷酸鎂(magnesium pyrophosphate)沉澱分析

於反應後, 直接肉眼觀察 RT-LAMP 反應產物之焦磷酸鎂沉澱, 並不明顯, 建

議使用小型離心機，離心 2000×g，30 秒，再觀察沉澱較為容易（圖 11）。



#### 4.3.3.3. SYBR Green I 核酸染劑分析

由圖 12 可見 RT-LAMP 反應產物加入 1  $\mu$ L SYBR Green I dye，均勻混合後，其顏色變化明顯易辨別，於可見光下觀察，陰性反應為淺褐色，陽性反應為青綠色；於紫外燈下觀察，在紫外光的激發下，陽性反應成亮螢光綠色，而陰性反應為暗綠黃色。

#### 4.3.4. 反轉錄恆溫環形核酸增幅法（RT-LAMP）之專一性檢定（Specificity test）

##### 4.3.4.1. 家禽病原核酸確認

由圖 13 可知各病原其病毒核酸，以其特異性引子進行反轉錄聚合酶鏈鎖反應（RT-PCR）或聚合酶鏈鎖反應（PCR），可見其增幅產物，Newcastle disease virus (NDV) 的產物大小為 534 bp、Avian influenza virus (AIV) 產物大小為 330 bp、Infectious bronchitis virus (IBV) 產物大小為 618 bp、Reticuloendotheliosis virus (REV) 產物大小為 642 bp、Marek's disease virus (MDV) 產物大小為 583 bp，確定其病毒核酸是存在的。

##### 4.3.4.2. 家禽白血病毒核酸存在於其他家禽病原之確認

由表 5 可得知，非家禽白血病毒之病原其核酸並無家禽白血病毒存在，即未同時受 ALV 感染或汙染。

##### 4.3.4.3. 反轉錄恆溫環形核酸增幅法之專一性檢定

由表 5、圖 14 與圖 15 可知本實驗所設計的反轉錄恆溫環形核酸增幅法對於家禽白血病毒的偵測具有很高的專一性，並不會與其他家禽病原的核酸增幅，也不與不同亞群的家禽白血病毒進行增幅。



#### 第四節 反轉錄恆溫環形核酸增幅法 (RT-LAMP) 與一步反轉錄聚合酶鏈鎖反應 (one-step RT-PCR) 之偵測比較

##### 4.4.1. 反轉錄恆溫環形核酸增幅法(RT-LAMP)與一步反轉錄聚合酶鏈鎖反應(one-step RT-PCR) 敏感性測試

由圖 16 與圖 17 可知，本實驗所設計之反轉錄恆溫環形核酸增幅法相較於一步反轉錄聚合酶鏈鎖反應有更高的偵測極限，RT-LAMP 偵測 A 亞群的偵測極限為 1 ng，J 亞群為 0.1 ng；而 one-step RT-PCR 的偵測極限分別各為 10 ng，但是要從圖 16 與圖 17 看到 one-step RT-PCR 增幅 10 ng 的產物非常不容易，甚至可以說 one-step RT-PCR 的偵測極限分別各為 100 ng。

##### 4.4.2. 雞隻田間樣本偵測能力比較

以 RT-LAMP 與 one-step RT-PCR 偵測雞隻田間樣本的結果如表 6 所示，RT-LAMP-A 與 one-step RT-PCR-A 檢驗相同者、RT-LAMP-J 與 one-step RT-PCR-J 檢驗相同者算入檢驗相同之族群；反之，算入檢驗相異之族群，以統計學 McNemar's test (表 7) 比較此兩種核酸檢測的偵測能力。 $\chi^2$  值為 1.8，並無超過  $p < 0.05$  的  $\chi^2$  值 3.84，所以 RT-LAMP 與 one-step RT-PCR 的偵測能力無明顯差別。

## 第五章 討論




台灣地區對家禽白血病的研究報告並不多，最早一篇有關家禽白血病的報告為 Wang 等人於 1995 年所發表(Wang et al., 1995)，隨後於 2002 年首次在台灣分離到 J 亞群 ALV，Thu 等人亦證實台灣土雞群有 J 亞群 AL 感染的存在(Thu and Wang, 2003)，2004 年陳曾對部分台灣土雞場進行 J 亞群 ALV 之血清學調查，發現 J 亞群 ALV 普遍存在於台灣土雞族群中(陳慧真, 2004)。

而 J 亞群 ALV 是 1988 年英國 Payne 等人所發現新的家禽白血病亞群，其致病能力與傳染性都比其他的 ALV 亞群強(Payne et al., 1991)，如今已遍及世界各地，對家禽產業造成極大的經濟損失，所以對此疾病的預防，國際間各家蛋種雞與白肉雞種禽公司皆針對此病毒進行清除計畫，藉由偵測與淘汰的方式，建立旗下各品系雞隻的外源性 ALV 清除，不過仍有報告指出部份地區從商業蛋雞分離到病毒之報告(Gingerich et al., 2002; Spencer et al., 2003; Ono et al., 2004)，顯示即使各家種禽公司已進行外源性 ALV 的清除計畫，田間外源性 ALV 野毒株仍然存在並可能造成雞隻的感染。

由於台灣土雞在進行育種與配種的過程中，雜交的情形普遍且混亂，也無針對外源性 ALV 進行完整的清除計畫，因此推測台灣土雞群中感染 ALV 與盛行率應相當高，根據本實驗室過去對台灣土雞進行病毒分離與種雞場血清學調查的結果(Chang et al., 2012)，採集的 5 場土雞場中，有 3 場皆分離到外源性 ALV，而台灣各家蛋用種雞與肉用種雞之血清學調查，發現雖然從國外公司進口之蛋用種雞與肉用種雞已完成外源性 ALV 清除，但是隨著雞隻週齡增加，ALV-A 與 ALV-J 血清抗體陽性率也隨之增加，顯示台灣雞場仍有外源性 ALV 存在，造成雞隻於成長過程中受到感染而使抗體陽性率逐漸上升(許萌芳, 2012)。

此篇研究使用實驗室過去分離出的 ALV TW-3577 與 ALV TW-2921 做為 LAMP 引子設計模板，其中 ALV TW-3577 全基因序列已經定序完成 (accession No.: HM582657)，在序列分析上接近於 A 亞群，與 MAV-1-like virus、FGV (fowl glioma




inducing virus)及 ALV TymS\_90 具有高度相似性。而家禽白血病 *env* 基因中的 gp85 是各亞群產生變異的區域，其中有 5 個主要變異區分別為 vr1、vr2、vr3、hr1、hr2(Bova et al., 1988)，研究指出 hr1、hr2 及 vr3 為主要決定宿主細胞接受器親和性的主要決定區域(Dorner and Coffin, 1986)。

針對 ALV TW-3577 進行 *env* 基因分析，其 gp85 核苷酸與胺基酸序列與 MAV-1、ALV TymS\_90 與 2001 年本實驗室分離出之 ALV TW-2956 最為相似，其中 ALV TW-3577 vr1 與 vr2 的胺基酸序列和 MAV-1、ALV TymS\_90 和 ALV TW-2956 完全相同，在 hr1、hr2、vr3 區域 ALV TW-3577 和 MAV-1、ALV TymS\_90 與 ALV TW-2956 也僅分別有 1 個、2 個和 1 個的胺基酸取代(Chang et al., 2012)，所以序列分析上，TW-3577 的 gp85 序列與國外 ALV-A 病毒株具有高度相似性，但實際上亞群的定義還需合併病毒干擾試驗或宿主範圍檢測才能確定，但依據其 gp85 序列與國外 ALV-A 毒株相似，與本土田間毒株之盛行，適合用來作為 RT-LAMP 檢測 A 亞群 ALV 的引子設計模板。

而本實驗室的 ALV TW-2921 則是 Thu 與 Wang 於 2000 年在父母代種雞場分離出之 ALV-J(Thu and Wang, 2003)，此毒株能造成被感染雞隻產生 myeloid leucosis (ML)，目前已有其 gp85 基因序列之定序 (accession No.: EF653908)，其親緣關係樹之分析，發現 TW-2921 與 ALV-J 的原型毒株 HPRS-103 的 gp85 序列相似度高達 98.3%，故適合作為 RT-LAMP 檢測 J 亞群 ALV 的引子設計模板。

可惜本實驗室擁有的 ALV TW-2921 病毒上清液，在不明原因下，受到 ALV-A 污染，在以往感染細胞後，回收上清液做 PCR 的檢測，都可偵測到 ALV-A 的存在。無法得知是繼代或增殖病毒時，帶入 ALV-A 造成污染，還是原本在病毒分離時就已經有 ALV-A 之存在，但不管起因為何，對後續建立 RT-LAMP 檢測 ALV，需要測定亞群間引子是否相互增幅之專一性時，是一大阻礙，故勢必得純化 ALV-J 當作後續 RT-LAMP 實驗的標準。

為移除 ALV-A 之污染，本研究進行以抗體病毒中和試驗之原理去純化 ALV-J 的實驗，文獻回顧證實反轉病毒在低病毒量的狀況下傳染能力會降低(Baeten et al.,



2011)；有研究指出使用抗 human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) 的單株抗體中和病毒後可以阻止樹突細胞(dendritic cell)與 T 細胞被感染(Frankel et al., 1998)；而 Holmen 等人則是表現出 soluble form Tva cell receptor，為一宿主細胞接受器蛋白質，與 ALV-A 混合作用後，可減少 ALV-A 感染 DF-1 細胞株高達 95-100% 的感染力(Holmen et al., 1999)，故經文獻研究證明減少病毒量與中和病毒感染力是可行的方式後，本實驗也著手進行 ALV-J TW-2921 的純化，經過病毒液的序列稀釋與使用多株抗體中和污染的 ALV-A，最後抽取被感染細胞的核酸，以 PCR 驗證，終於得到只有被 ALV-J 而無 ALV-A 感染的 DF-1 細胞，而後以此細胞進行 ALV-J 的增幅與後續的實驗。

恆溫環形核酸增幅法 (LAMP)，是於 2000 年由日本學者 Notomi 等人首度發表的新式核酸增幅法(Notomi et al., 2000)，此核酸增幅法以快速、精確、敏感所著稱，相較於傳統的聚合酶鏈鎖反應 (PCR)，此法主要有 2 種不同的差別：(1)使用 *Bst* polymerase 進行核酸的增幅，此種酵素可於恆溫環境下工作，並具有核酸雙股的股取代能力，故核酸增幅反應只需在固定的溫度下即可進行。(2)其特異性引子為兩組或三組引子對，可辨認目標序列上的 6 個或 8 個區域，故有相當高的專一性。

而 LAMP 因快速、容易操作的特性也已應用於許多不同病原上的偵測，如：病毒、細菌、黴菌、寄生蟲等(Zhang et al., 2010)。

當然沒有一種檢測方式是沒有缺點的，LAMP 主要有 2 種缺點，需令人多加注意(Tomlinson and Boonham, 2008)。


(1)LAMP 反應容易被污染造成偽陽性，其可能原因為前次 LAMP 反應陽性產物於檢驗過程的操作中逸散到工作環境 (carry-over contamination)，而使得下次配製的 LAMP 反應受到之前的陽性反應污染造成偽陽性結果。而要避免產生偽陽性的方式為保持良好的操作習慣，此即為配製 LAMP 反應與檢驗 LAMP 反應結果最好為分開的工作區域，以減少污染的可能性；另外，也有報告建議於反應前就先加入

反應結果呈色劑，如 Calcein 或 hydroxy naphthol blue (HNB) (Tomita et al., 2008; Goto et al., 2009)，這些都是可與金屬離子螯合的化合物，會依金屬離子於反應中濃度的變化，而有不同的顏色，方便判讀反應之結果，也可減少開合 LAMP 產物反應管可能造成的污染。

(2) 成功設計 LAMP 特殊的引子對並找出合適引子進行增幅不是容易的項目，由於 LAMP 其特殊的增幅原理，需用兩組引子對或三組引子對進行目標序列的增幅，代表所設計之多條引子不能相互產生二級結構，如：primer dimer 或 hairpin，且 LAMP 引子設計有以下要點必須符合：

- i. Tm 值：若目標序列為 GC-rich 序列，其引子 Tm 值平均為 60-65°C；若為 AT-rich 序列，則引子 Tm 值平均為 55-60°C；但整條目標序列其對應的引子 Tm 值必須為  $F1c/B1c > F2/B2 > F3/B3$ 。
- ii. 各引子對之 GC 含量須介於 10-65% 之間，40-60% 更佳，可提高引子黏合之專一性。
- iii. 引子區域 F3/B3 與 F2/B2 其 3' 端需有高穩定度，而 F1c/B1c 其 5' 端需有高穩定度，才能讓 *Bst* 聚合酶成功進行增幅。
- iv. 各引子區域間隔長度：
  - F2 之 5' 端至 B2c 之 3' 端，約 120-180 bp；
  - F2 之 5' 端至 F1 之 5' 端，約 40-60 bp；
  - F3 之 3' 端至 F2 之 5' 端，約 0-20 bp；
  - F1 之 3' 端至 B1c 之 5' 端，約 0-100 bp；總計欲增幅之目標序列其長度不應超過 300 bp。

所幸目前有免費的 LAMP 特異性引子對設計軟體 PrimerExplorer (<http://primerexplorer.jp/>) 可省去不少時間尋找適合設計的序列區，且能得到多組引子對，不過選擇合適的引子對操作，須注意軟體所設計的



引子對還是得使用 NCBI 的 Basic Local Alignment Search Tool( BLAST ) 比對其專一性，且軟體所設計引子對序列不會在模板或共有序列常變異的核苷酸位點做修改，故可適時地把引子序列做修改成退化性引子 ( degenerate primer ) 。

而家禽白血病毒是為 RNA 病毒，本篇研究所設計的反轉錄恆溫環形核酸增幅法 ( RT-LAMP ) 偵測家禽白血病毒 A 亞群與 J 亞群，其原理就是應用 LAMP 加上一反轉錄酶 AMV( Avian Myeloblastosis Virus ) RTase，以達到病毒 RNA 被反轉錄成 cDNA 進行後續核酸的增幅，而為了配合 LAMP 須在 60-65°C 恆溫增幅的特點，反轉錄酶的選擇也是相當重要的課題，一般的反轉錄酶 MMLV ( Murine leukemia virus ) RTase，其反應合適溫度為 37-42°C，並不適合用於 LAMP 反應中，而 Fuchs 等人曾發表可在高溫下進行反轉錄反應的 AMV RTase(Fuchs et al., 1999)，用此反轉錄酶使得 RT-LAMP 的發展可順利進行。

本篇研究所設計的偵測 A 亞群 ALV 的引子對，是經過多株國外 ALV-A 與台灣本土 ALV-A 序列排列後 ( alignment )，以軟體針對較保守的序列區所設計出來，經 NCBI 的 BLAST 比對其專一性，皆為 ALV-A 的比對結果；而偵測 J 亞群 ALV 的引子對，則是以 Smith 等人發表偵測 ALV-J 的特異性引子對 H5/H7 以 PCR 增幅本實驗室 ALV-J 毒株 TW-2921，再拿此增幅序列與 ALV-J 原型株 HPRS-103 序列排列後，由軟體所設計出來，經 NCBI 的 BLAST 比對其專一性，皆為 ALV-J 的比對結果。雖無再另外設計兩條 loop primers，但因 60 分鐘反應增幅時間已達到快速診斷之目標且因 LAMP 引子的設計條件複雜，並不是所想要設計的目標序列皆能得到 loop primers，故本實驗以 4 條 LAMP 的基礎引子為設計考量。

實際以其他家禽常見的病原測其專一性，RT-LAMP 偵測 A 亞群 ALV 與 J 亞群 ALV，皆無非特異性增幅，也不與不同亞群的 ALV 增

幅，可說明本實驗設計之引子專一性高；而在偵測極限的敏感性測試上，也可比較出本實驗設計 RT-LAMP 其偵測極限較 one-step RT-PCR 高出 10-100 倍。

唯在 310 隻共 62 組雞隻田間樣本的偵測能力比較中，以統計學方法 McNemar's test 驗算，RT-LAMP 與 one-step RT-PCR 的偵測性不具有顯著性差別，這樣的結果可能是偵測樣本中實際具有 ALV 陽性雞隻數量不夠多，亦或偵測樣本數量不夠大，還有待後續驗證。

總結來說，本篇研究建立偵測家禽白血病毒 A 亞群與 J 亞群的反轉錄恆溫環形核酸增幅法為專一、敏感、便利且快速之核酸增幅法，這對將來台灣家禽產業進行育種、清除外源性 ALV 計畫或大規模疾病偵測時，不失為一種可利用之偵測方式。

表與圖



表 1. 2011-2013 年送檢種雞之檢體資料

Case No.	Time*	Location	Type	Breed	Sex	Age (Week)	Quantity
3864	08/11	Tainan	Native	Silkie	Male	15	23
3865	09/11	Tainan	Native	Silkie	Male	15	23
3866	09/11	Tainan	Native	Silkie	Female	15	23
3867	09/11	Tainan	Native	Red feather	Male	15	23
3868	10/11	Tainan	Native	Red feather	Male	15	24
3901	02/12	Yunlin	Layer	Hyline	Female	20	20
3902	02/12	Yunlin	Layer	Hyline	Female	20	20
3903	02/12	Yunlin	Layer	Hyline	Female	16	20
3904	02/12	Yunlin	Layer	Hyline	Female	16	20
3905	02/12	Yunlin	Layer	Hyline	Female	N/A	20
3906	02/12	Yunlin	Layer	Hyline	Female	N/A	20
3910	03/12	Tainan	Native	Red feather	Both	31	21
3921	07/12	Tainan	Native	Red feather	Both	16	23
3922	07/12	Tainan	Native	Red feather	Male	26	23
3923	07/12	Taoyuan	Broiler	Hyline	Female	26/42	20/20
3944	11/12	Tainan	Native	Red feather	Female	18	21
3945	11/12	Tainan	Local	Red feather	Female	20	23
3951	01/13	Yunlin	Layer	Hyline	Female	22	120
3954	01/13	Taoyuan	Broiler	Hyline	Female	22	40
3960	02/13	Yunlin	Layer	Hyline	Female	26	80

N/A: Not available

\*: mm/yy



表 2. Primer names, sequences, and position for LAMP and PCR detection for ALVs.

Method	Primer	Sequence (5' to 3')	Position (5' to 3')
RT-LAMP for ALV-A	F3	CGTCAGCCAGCATTACCG	5693-5710 <sup>a</sup>
	B3	CTATCCGCTGTCACTACCGTA	5985-6005 <sup>a</sup>
	FIP	GGTGGCTCATCCCACATAGAGAC	F1c: 5776-5798 <sup>a</sup>
		-TGACAACAGCACCCTCTCA	F2: 5718-5737 <sup>a</sup>
	BIP	GAACTACAGCTGCTAGGCTCCC-	B1c: 5800-5821 <sup>a</sup>
		GCATCCTCCAGTTACACCAG	B2: 5858-5877 <sup>a</sup>
RT-LAMP for ALV-J	F3	AAATCTGTTTGGCCCGTC	5327-5346 <sup>b</sup>
	B3	AGGTGAGCAAGAAGGACTCT	5529-5546 <sup>b</sup>
	FIP	ATTTCCGTTGTCCCAGGGGTG-	F1c: 5393-5414 <sup>b</sup>
		CCAGGTGACCATAACGTTTC	F2: 5353-5370 <sup>b</sup>
	BIP	TAACCTCTCGATGGCAGCAAGG-	B1c: 5452-5472 <sup>b</sup>
		AAGCCACCAGCAACAAGC	B2: 5501-5520 <sup>b</sup>
PCR	PA1	CTACAGCTGTTAGGTTCCAGT	5803-5824 <sup>a</sup>
	TWA	ACYSGRTTTCAGGAAGRCCC	6138-6157 <sup>a</sup>
	H5	GGATGAGGTGACTAAGAAAG	5258-5277 <sup>b</sup>
	H7	CGAACCAAAGGTAACACACG	5783-5802 <sup>b</sup>

a: Position at TW-3577 (HM582657)

b: Position at HPRS-103 (Z46390)

表 3. Primer names, orientations, sequences, and amplicons for PCR detection of AIV, NDV, IBV, and MDV.

Primer	Orientation	Sequence (5' to 3')	Amplicon
AIV-NP2	Forward	CAGRTACTGGGCHATAAGRAC	330
AIV-NP4	Reverse	GCATTGTCTCCGAAGAAATAAG	
NDV-Fap-F	Forward	ATGGGCYCCAGAYCTTCTA	534
NDV-Faq-R	Reverse	CTGCCACTGCTAGTTGTGATAATC	
IBV-NP1-F	Forward	GGTAGYGGYGTTCCTGATAA	618
IBV-NP2-R	Reverse	TCATCTTGTCRTCACCAAAA	
MDV-MR-S	Forward	TGTTCCGGGATCCTCGGTAAGA	583
MDV-MR-AS	Reverse	AGTTGGCTTGTCATGAGCCAG	

表 4. 以 PCR 與 RT-PCR 偵測田間家禽白血病病毒 (ALV) 核酸之結果

ALV-J						
case no.	Result of pool			Result of individual		
	WB	Serum	Swab	WB	Serum	Swab
3864	1-5, 16-20			1, 2, 5, 17, 18		
3865-3866						
3867		11-15	11-15		NT <sup>d</sup>	14, 15
3868			13-18			NT
3869	6-10, 11-15			9, 10, 12		
3903-3906						
3921-3923						
3944						
3945	6-10, 11-15			NT		
3951						
3954						

※陰性檢驗結果以空白表示

a: Whole blood, 全血 (含 EDTA), 以 PCR 檢驗

b: Serum, 血清, 以 RT-PCR 檢驗

c: Swab, 泄殖腔拭子, 以 RT-PCR 檢驗

d: NT: Not tested

表 5. 各家禽病原之 RT-PCR 及 RT-LAMP 以偵測家禽白血病毒特異性引子增幅之結果

Virus <sup>1</sup>	RT-PCR-A <sup>2</sup>	RT-PCR-J <sup>3</sup>	RT-LAMP-A <sup>4</sup>	RT-LAMP-J <sup>5</sup>
NDV	-	-	-	-
AIV	-	-	-	-
IBV	-	-	-	-
REV	-	-	-	-
MDV	-	-	-	-
TW-2921	-	+	-	+
TW-3577	+	-	+	-

1: Newcastle disease virus (NDV), Avian influenza virus (AIV), Infectious bronchitis virus (IBV), Reticuloendotheliosis virus (REV), Marek's disease virus (MDV)

2: RT-PCR for ALV-A detection

3: RT-PCR for ALV-J detection

4: RT-LAMP for ALV-A detection

5: RT-LAMP for ALV-J detection

表 6. RT-LAMP 與 one-step RT-PCR 雞隻田間樣本偵測能力比較

one-step RT-PCR	RT-LAMP	
	Positive	Negative
Positive	4	1
Negative	4	53

表 7. McNemar's test 方程式

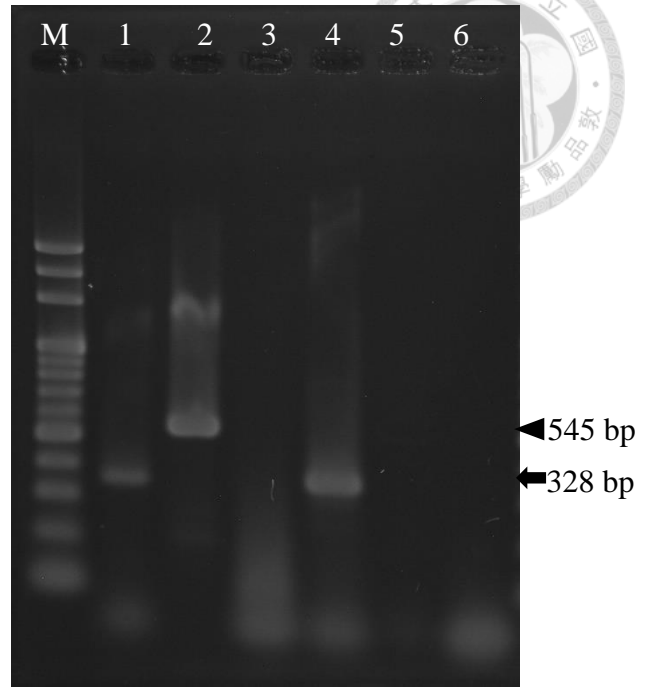
Control	Test	
	Fail	Pass
Fail	a	b
Pass	c	d

$$\text{McNemar's } \chi^2 = \frac{(b-c)^2}{(b+c)}$$



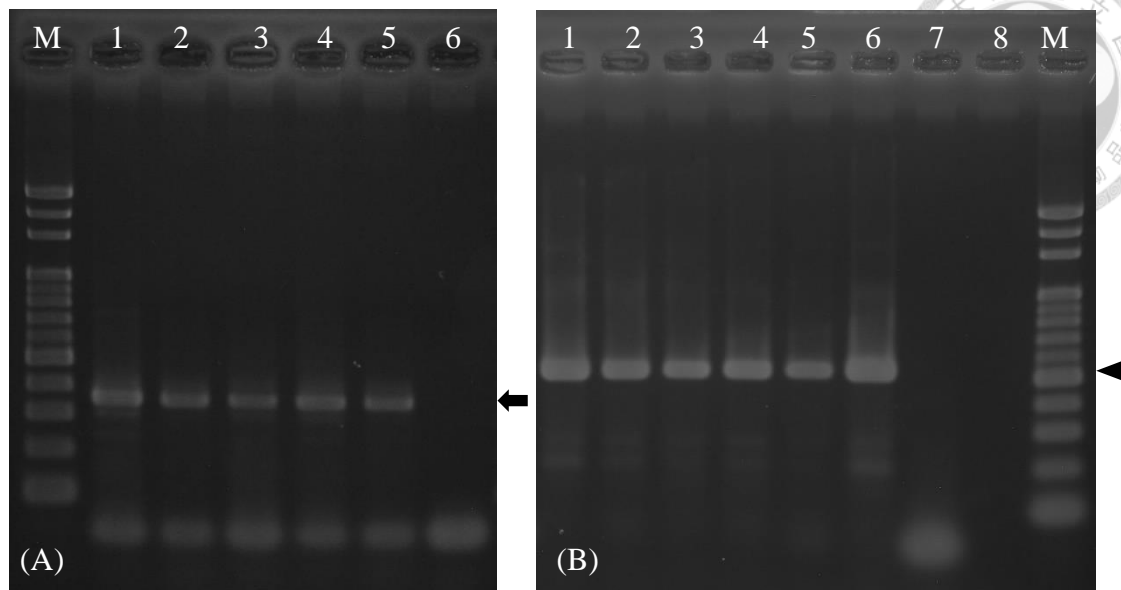
**圖 3. 家禽白血病毒 J 亞群 (ALV TW-2921) 核酸的反轉錄恆溫環形核酸增幅法偵測家禽白血病毒 A 亞群核酸 (RT-LAMP-A) 的陽性反應**

Lane 1: RNA of ALV-A TW-3577,  
Lane 2: RNA of ALV-J TW-2921,  
Lane 3: NC, negative control



**圖 4. ALV TW-2921 遭 ALV-A 汙染再次確認**  
把疑似被汙染的 ALV TW-2921 病毒上清液與 DF-1 cell line 共培養 (co-culture)，再抽取細胞核酸以 PCR 檢驗 ALV 存在。ALV-A 增幅產物以箭頭表示；ALV-J 增幅產物以三角形表示。

M: marker, 100 bp DNA ladder  
Lane 1: amplicon of TW-2921 by PA1/TWA,  
Lane 2: amplicon of TW-2921 by H5/H7,  
Lane 3: negative control by PA1/TWA  
Lane 4: amplicon of TW-3577 by PA1/TWA,  
Lane 5: amplicon of TW-3577 by H5/H7  
Lane 6: negative control by H5/H7



**圖 5. 以抗 ALV-A 之抗血清 (antiserum) 處理被污染病毒液之結果**

(A) 偵測家禽白血病毒 A 亞群之聚合酶鏈鎖反應 (PCR)；(B) 偵測家禽白血病毒 J 亞群之聚合酶鏈鎖反應 (PCR)；Lane 1：病毒上清液稀釋 10 倍；Lane 2：病毒上清液稀釋 100 倍；Lane 3：病毒上清液稀釋 1000 倍；Lane 4：病毒上清液稀釋 10 倍與 2 倍稀釋抗體混合於室溫下反應 1 小時；Lane 5：病毒上清液稀釋 100 倍與 2 倍稀釋抗體混合於室溫下反應 1 小時；Lane 6：病毒上清液稀釋 1000 倍與 2 倍稀釋抗體混合於室溫下反應 1 小時；Lane 7：negative control of PCR with PA1/TWA primers；Lane 8：negative control of PCR with H5/H7 primers；M：marker, 100 bp DNA ladder。由 Lane 6 可見當病毒上清液稀釋 1000 倍與 2 倍稀釋 ALV-A 抗體混合於室溫下反應 1 小時後，接種回 DF-1 細胞株進行感染，再抽取細胞核酸進行聚合酶鏈鎖反應 (PCR)，只可見到 ALV-J 增幅產物，代表原病毒上清液裡的 ALV-A 已被中和，失去進入細胞的感染能力故再次感染之後，只有 ALV-J 感染進入細胞。ALV-A 增幅產物以箭頭表示；ALV-J 增幅產物以三角形表示。




		F1→	
TW-3577	ACCTTGGGAACTGACCGGTTAGTCT	<u>CGTCAGCCAGCATTACCGCGGCC</u>	5717
TW-3593	.....	GA.....	5650
RAV-1	... C . A .	... TGA . T . . . . T . . . . T . . . .	468
MQNCSU	... C . A .	... TGA . T . . . . T . . . . T . . . .	5700
SDAU09E1	..... T .	... GA . T . . . . T . . . . A . . . .	5477
LR-9	... A .	.....	5478
ANFSV	.....	... T .	5706

		F2→	
TW-3577	<u>TGACAACAGCACCAGCTCTCA</u>	CTTATCGAAAGTTTCATGCTTGCTGTAA	5767
TW-3593	..... C .	..... C . .	5700
RAV-1	..... C .	... G . . . . C . . . . AT . A . . . .	518
MQNCSU	..... C .	... G . . . . C . . . . AT . A . . . .	5750
SDAU09E1	.. G . . . . T . . . . C .	... G . . . . C . . . . T . . . .	5527
LR-9	..... C .	... C . . . . C . . . .	5528
ANFSV	..... C .	.....	5756

		F1c←	B1c→	
TW-3577	AGCTGAAT	<u>GTCTCTATGTGGGATGAGCCACCG</u>	<u>GAACTACAGCTGCTAGGC</u>	5817
TW-3593	..... C .	.....	... C . T	5750
RAV-1	... C . . . . T .	... T . . . . . T . . . . . T . . . . T		568
MQNCSU	... C . . . . T .	... T . . . . . T . . . . . T . . . . T		5800
SDAU09E1	.....	... C . . . . T . . . . . T . . . . T		5577
LR-9	.....	... A . . . . . G . . . . . T		5578
ANFSV	.....	.....	... T	5806

TW-3577	<u>TCCCAGTCTCTCCCTAACATTACTAATATTACTCAAATTT</u>	<u>CTGGTGTAAC</u>	5867
TW-3593	.....	... G . . . . G . C . . . . C . . . . G .	5800
RAV-1	.....	... G . C . C . . . . .	618
MQNCSU	.....	... G . C . C . . . . .	5850
SDAU09E1	.....	... G . . . . G . . . . C . . A . . . .	5627
LR-9	.....	... C . . . . C . . . . G . . . . .	5628
ANFSV	.....	... G . . . . .	5856

		B2←	
TW-3577	<u>TGGAGGATGCGT</u>	AGGCTTCAGACCAGGAGGGATCCCCTGGTATCTAGGAT	5917
TW-3593	C . . G . . . . . CT . . . G . C . . CC . GA . C .	TGA . AT . CT . TC . . AT .	5850
RAV-1	C . . G . . . . .	... G . . AA . . . . G . T . . T . . . . . G . . T .	668
MQNCSU	C . . G . . . . .	... G . . AA . . . . G . T . . T . . . . . G . . T .	5900



SDAU09E1	C . G . . . . . CA . . . G . T . . T . . . . . T .	5677
LR-9	. . . . .	5678
ANFSV	C . . . . . G .	5906
TW-3577	GGACTAGACAGGAAGCCACGCGGATCCTCCTTAGACAATCCTCCCTTTCT	5967
TW-3593	. . T . C . . G . C . C . CT . . . A . TGG . . . . . ----- . . . . GCCG . -	5891
RAV-1	. . T . . . . . T . T . . . . . GCC . . . TT . C . .	718
MQNCSU	. . T . . . . . T . T . . . . . GCC . . . TT . C . .	5950
SDAU09E1	. . T . . . . . G . . . . . T . T . . . . . CC . . . TT . C . .	5727
LR-9	. . . . . T . . . . . T . . . C	5728
ANFSV	. . . . . T . . . . . T . . . C	5956
B3 ←		
TW-3577	AATTCCACGGAACCATT <u>TACGGTAGTGACAGCGGATAGACACAATCTTTT</u>	6017
TW-3593	. . C . A . . A . . . G . . . . G . . . . .	5941
RAV-1	. . C . . T . A . . . G . . . . A . G . . . . . G . . . . .	768
MQNCSU	. . C . . T . A . . . G . . . . A . G . . . . . G . . . . .	6000
SDAU09E1	. . A . . . . . G . . G . . . . . G . . . . . G . . . C . . . .	5777
LR-9	. . . . . G . . . . . C . .	5778
ANFSV	. . . . . G . . . . .	6006

**圖 6. 家禽白血病 A 亞群病毒之序列排列 (alignment)**

tw-3577: ALV TW-3577 (HM582657) , position from 5698 to 5937

tw-3593: ALV TW-359 (HM582658)

RAV-1: Rous associated virus type 1 (M19113)

MQNCSU : ALV strain MQNCSU (DQ365814)

SDAU09E1: ALV strain SDAU09E1 (HM452341)

LR-9: ALV strain LR-9 (AY350569)

ANFSV: Avian neurofibrosarcoma virus (AB522906)

Dot indicates the nucleotide identity to the RAV-1 and short line indicates the nucleotide deletion compared with other sequences.



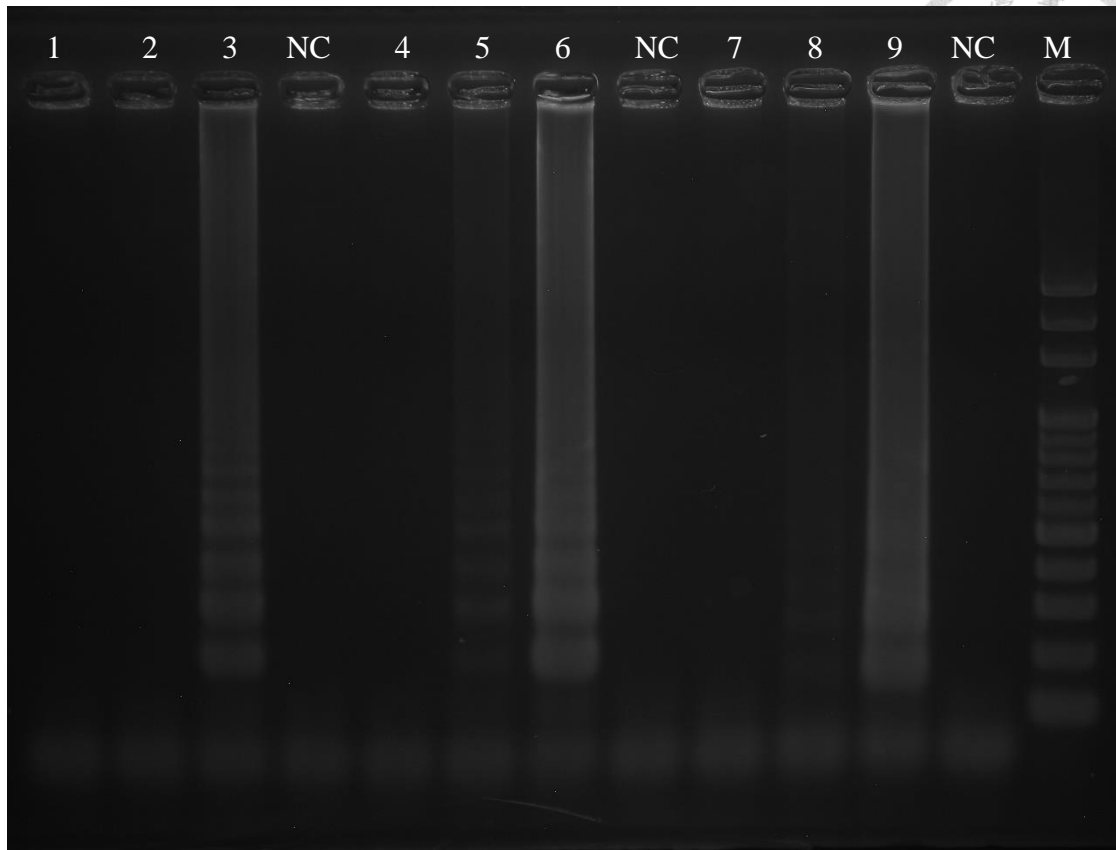


	F1→	
Amplicon of TW-2921	CTGGAA <u>AGGTGAGCAAGAAGGACTCTAAGAAGAAGCCACC</u>	103
ALV-J HPRS103	.... G..... G..	5360
	F2→	
Amplicon of TW-2921	<u>AGCAACAAGCAAGAAAGACCCGGAGAAGACACCCTTGCTG</u>	143
ALV-J HPRS103	.....	5400
	F1c←	
Amplicon of TW-2921	<u>CCATCGAGAGGTTACTTCTTCTTTCAAATGATACTTGTGT</u>	183
ALV-J HPRS103	.....	5440
	B1c→	
Amplicon of TW-2921	GCGGGGTTATT <u>TATTCGGTTGTCCCAGGGGTGGGGGAGT</u>	223
ALV-J HPRS103	... T.....	5480
	B2←	
Amplicon of TW-2921	TCATCTGTTGCAACAACCAG <u>GAAACGTATGGGTCACCTGG</u>	263
ALV-J HPRS103	..... A..... G.....	5520
	B3←	
Amplicon of TW-2921	GCAAATAAG <u>GACGGGCCAAACAGATTTTTGCCTTAGTCTAC</u>	303
ALV-J HPRS103	..... G.....	5560

**圖 7. 家禽白血病 J 亞群病毒之序列排列 (alignment)**

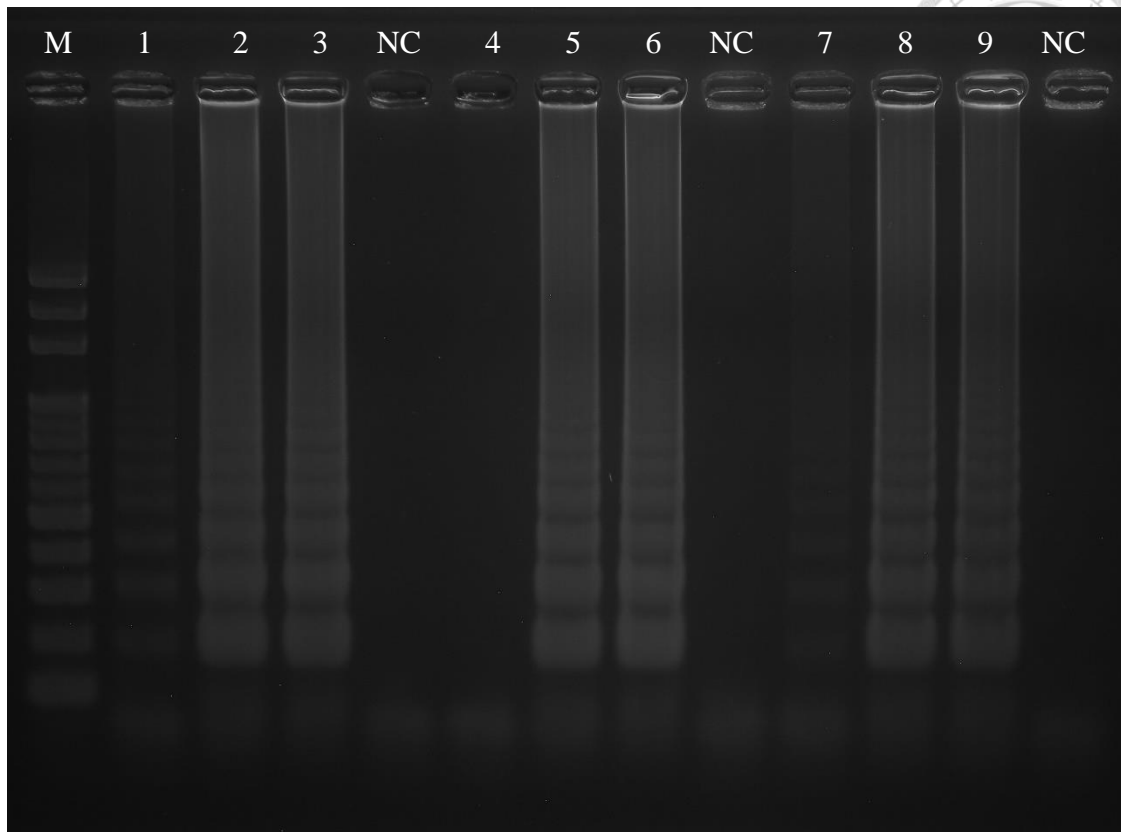
Amplicon of TW-2921: Sequence of TW-2921 amplified by H5/H7 primers

Dot indicates the nucleotide identity to the TW-2921 sequence.



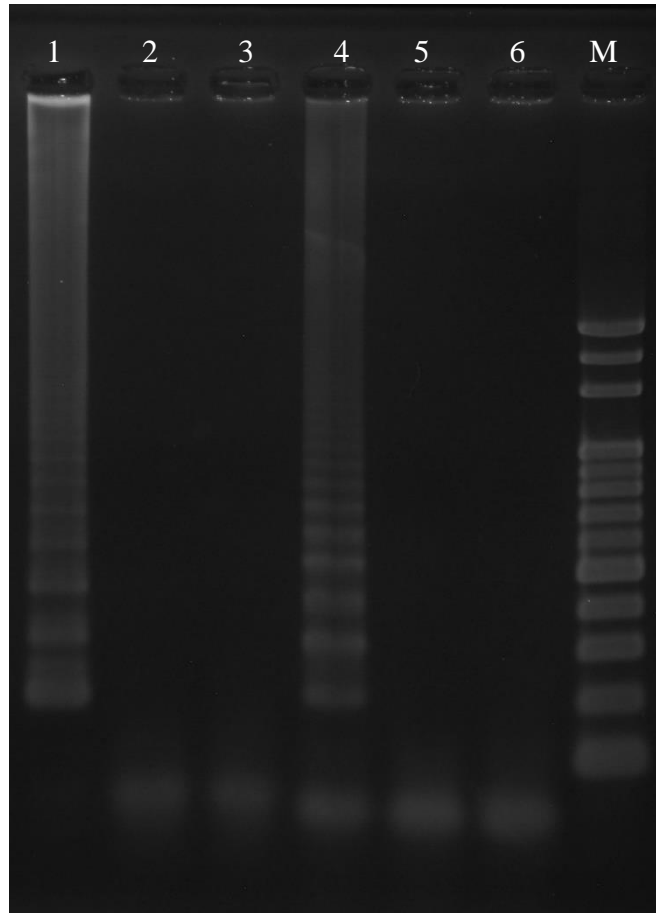
**圖 8. RT-LAMP for ALV-A detection 反應時間與 RNA 模板量之最合適反應條件測試 (二重複結果)**

Lane 1：反應 30 分鐘，RNA 模板量 1 ng；Lane 2：反應 45 分鐘，RNA 模板量 1 ng；Lane 3：反應 60 分鐘，RNA 模板量 1 ng；Lane 4：反應 30 分鐘，RNA 模板量 10 ng；Lane 5：反應 45 分鐘，RNA 模板量 10 ng；Lane 6：反應 60 分鐘，RNA 模板量 10 ng；Lane 7：反應 30 分鐘，RNA 模板量 100 ng；Lane 8：反應 45 分鐘，RNA 模板量 100 ng；Lane 9：反應 60 分鐘，RNA 模板量 100 ng；NC：negative control；M：marker, 100 bp DNA ladder。



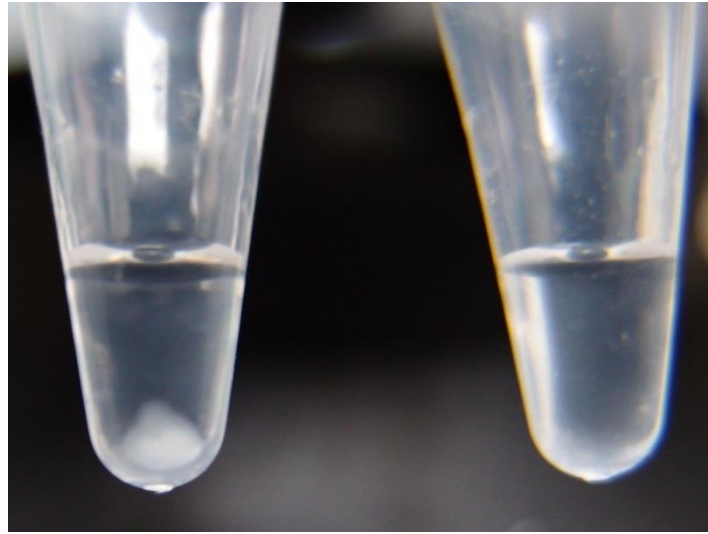
**圖 9. RT-LAMP for ALV-J detection 反應時間與 RNA 模板量之最合適反應條件測試 (二重複結果)**

Lane 1：反應 30 分鐘，RNA 模板量 1 ng；Lane 2：反應 45 分鐘，RNA 模板量 1 ng；Lane 3：反應 60 分鐘，RNA 模板量 1 ng；Lane 4：反應 30 分鐘，RNA 模板量 10 ng；Lane 5：反應 45 分鐘，RNA 模板量 10 ng；Lane 6：反應 60 分鐘，RNA 模板量 10 ng；Lane 7：反應 30 分鐘，RNA 模板量 100 ng；Lane 8：反應 45 分鐘，RNA 模板量 100 ng；Lane 9：反應 60 分鐘，RNA 模板量 100 ng；NC：negative control；M：marker, 100 bp DNA ladder。



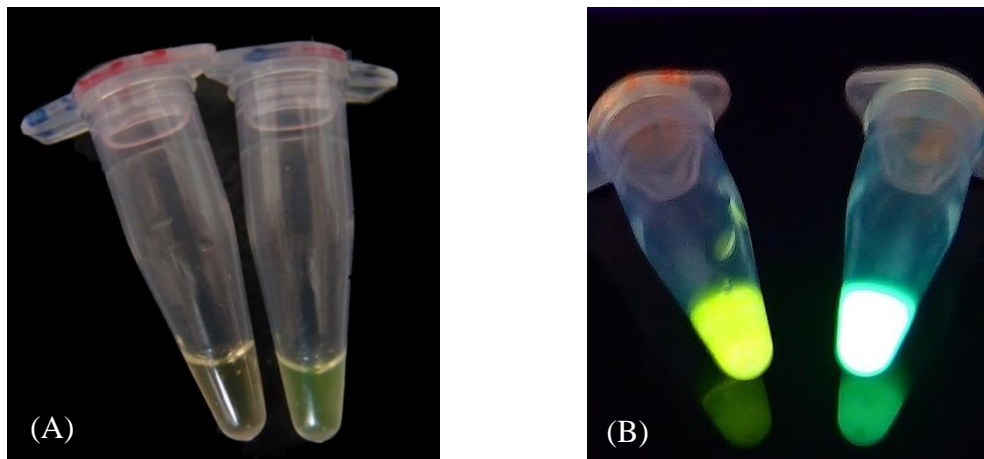
**圖 10. 洋菜膠體電泳分析反轉錄恆溫環形核酸增幅法產物**

Lane 1: amplicon of TW-2921 by RT-LAMP-J, Lane 2: amplicon of TW-3577 by RT-LAMP-J, Lane 3: negative control of RT-LAMP-J, Lane 4: amplicon of TW-3577 by RT-LAMP-A, Lane 5: amplicon of TW-2921 by RT-LAMP-A, Lane 6: negative control of RT-LAMP-A, M : marker, 100 bp DNA ladder ◦



**圖 11. RT-LAMP 反應產物之焦磷酸鎂沉澱**

左邊為 RT-LAMP 陽性反應，離心 2000×g，30 秒後，可見到白色沉澱；右邊為 RT-LAMP 陰性反應，觀察不到任何沉澱。



**圖 12. RT-LAMP 反應後產物加入 SYBR Green I**

(A) 於可見光下觀察 RT-LAMP 反應後產物加入 SYBR Green I 之變化，可見左邊陰性反應為淺褐色，右邊陽性反應為青綠色；(B) 於紫外燈下觀察 RT-LAMP 反應後產物加入 SYBR Green I 之變化，在紫外光的激發下，右邊的陽性反應成亮螢光綠色，而左邊陰性反應為暗綠黃色。

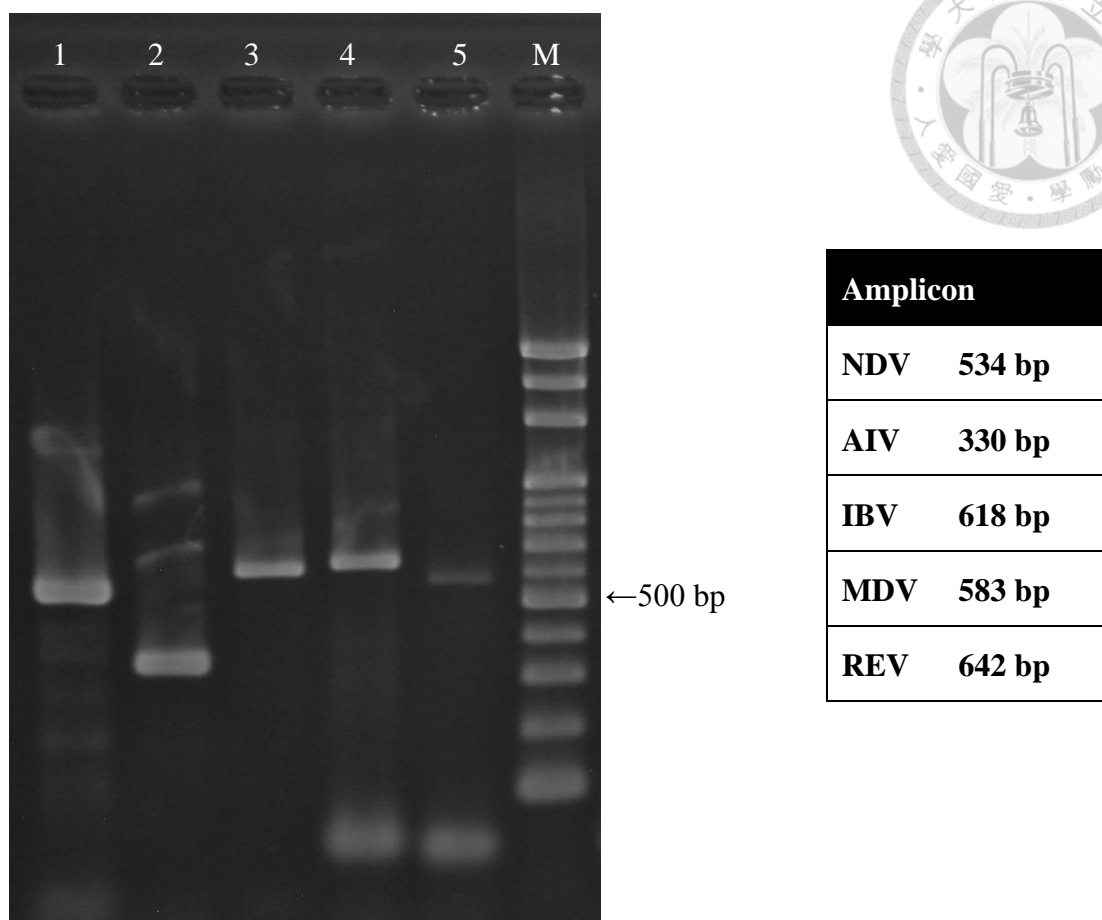
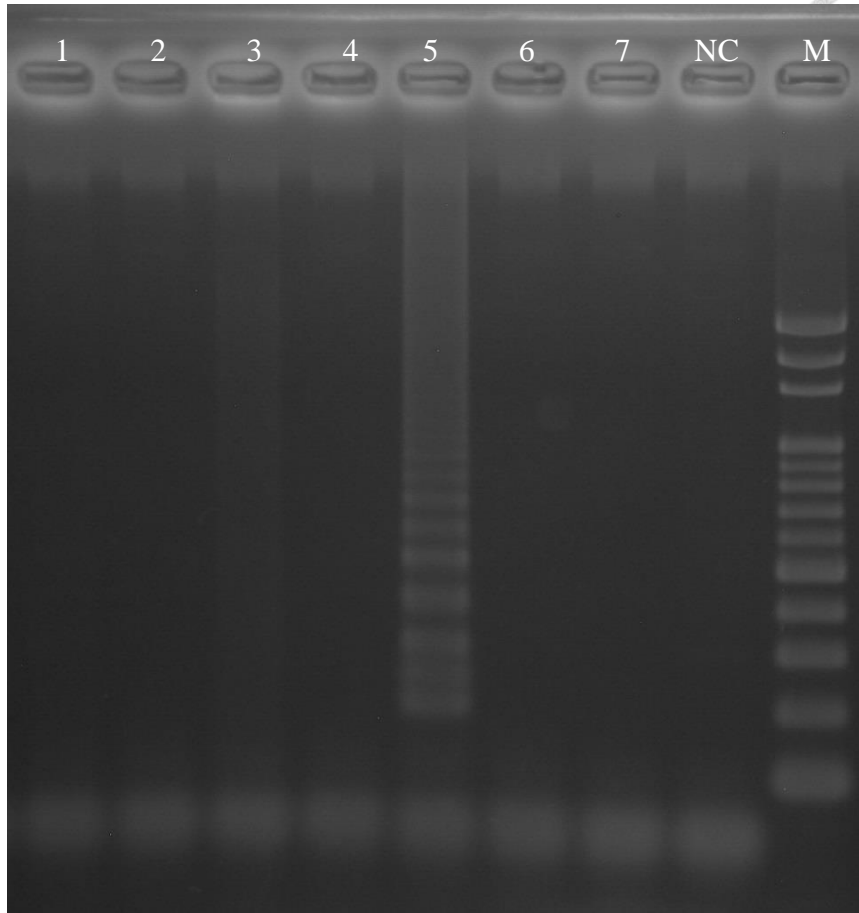


圖 13. 家禽病原核酸確認

Lane 1: Newcastle disease virus (NDV), Lane 2: Avian influenza virus (AIV), Lane 3: Infectious bronchitis virus (IBV), Lane 4: Reticuloendotheliosis virus (REV), Lane 5: Marek's disease virus (MDV), M: marker, 100 bp DNA ladder ; 右邊小表為各病原增幅產物對應的大小。



**圖 14. 反轉錄恆溫環形核酸增幅法偵測 ALV-A 之專一性檢定**

Lane 1: Newcastle disease virus (NDV), Lane 2: Avian influenza virus (AIV), Lane 3: Infectious bronchitis virus (IBV), Lane 4: Reticuloendotheliosis virus (REV), Lane 5: Marek's disease virus (MDV), Lane 5: ALV-A TW-3577, Lane 6: ALV-J TW-2921, Lane 7: DF-1 cell line, NC: negative control, M: marker, 100 bp DNA ladder。

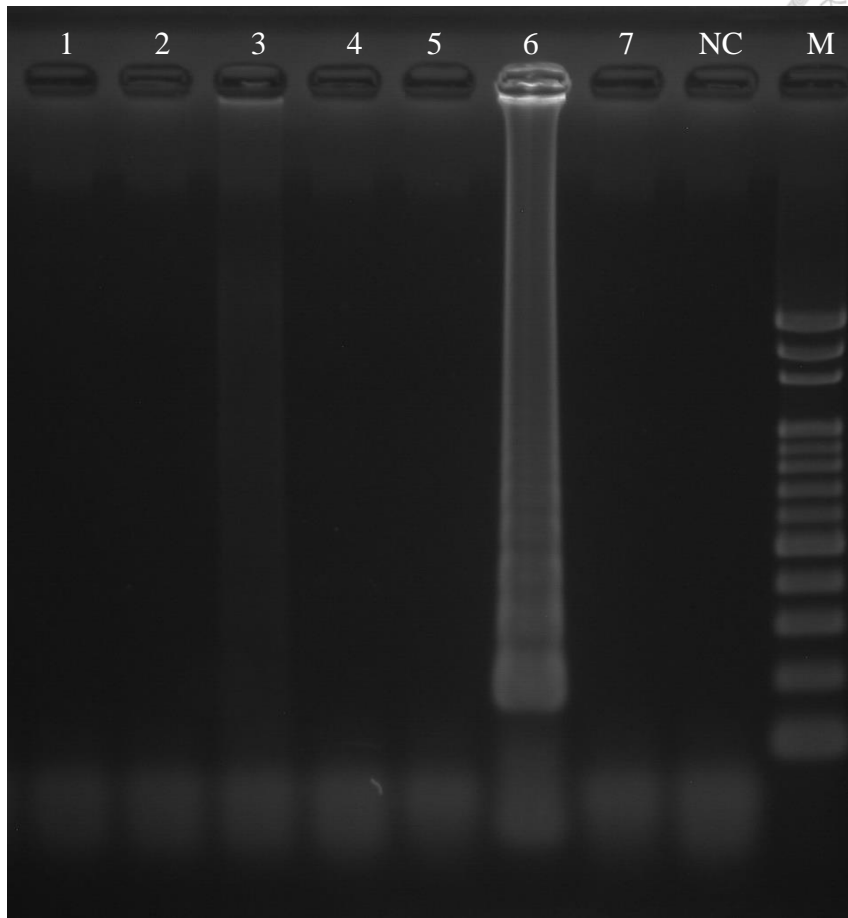
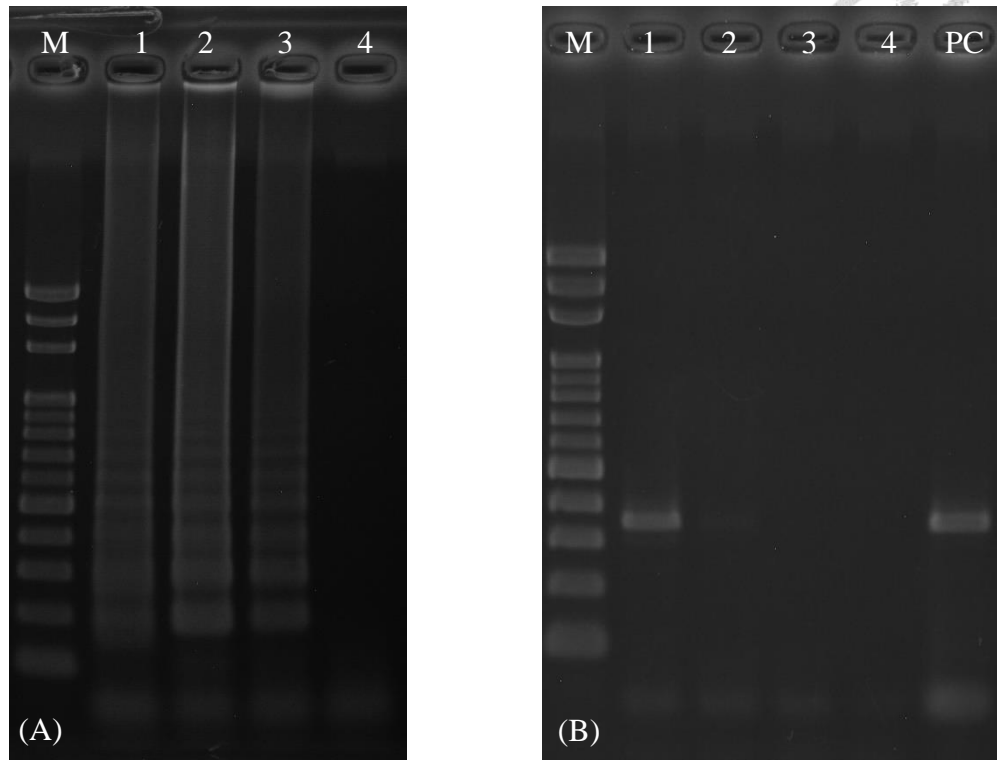


圖 15. 反轉錄恆溫環形核酸增幅法偵測 ALV-J 專一性檢定

Lane 1: Newcastle disease virus (NDV), Lane 2: Avian influenza virus (AIV), Lane 3: Infectious bronchitis virus (IBV), Lane 4: Reticuloendotheliosis virus (REV), Lane 5: Marek's disease virus (MDV), Lane 5: ALV-A TW-3577, Lane 6: ALV-J TW-2921, Lane 7: DF-1 cell line, NC: negative control, M: marker, 100 bp DNA ladder。





**圖 16. RT-LAMP-A 與 RT-PCR-A 偵測極限敏感性測試**

(A) RT-LAMP for ALV-A detection, (B) RT-PCR for ALV-A detection ; Lane 1: 100 ng RNA template, Lane 2: 10 ng RNA template, Lane 3: 1 ng RNA template, Lane 4:  $10^{-1}$  ng RNA template, PC: positive control, M: mark, 100 bp DNA ladder ◦

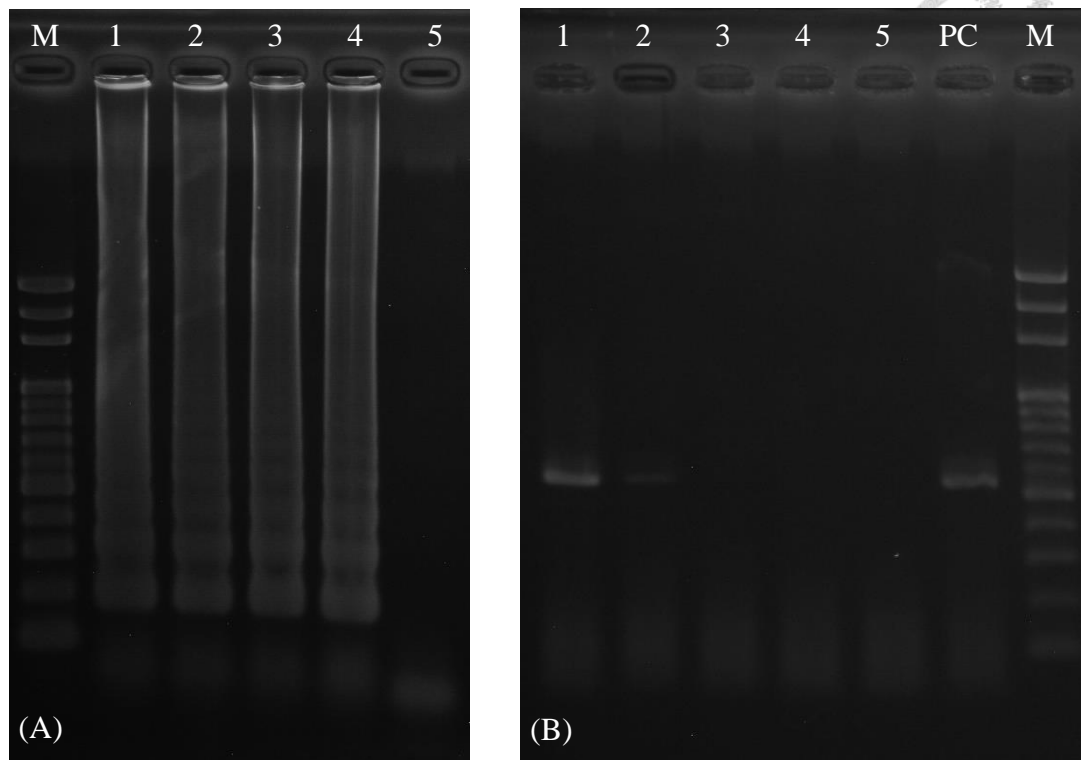
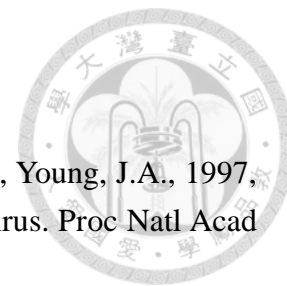


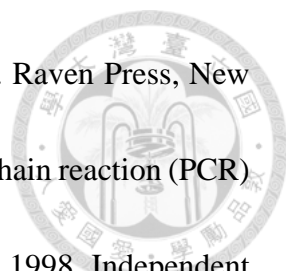
圖 17. RT-LAMP-J 與 RT-PCR-J 偵測極限敏感性測試

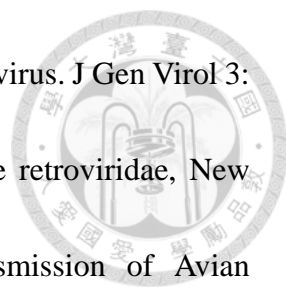
(A) RT-LAMP for ALV-J detection, (B) RT-PCR for ALV-J detection ; Lane 1: 100 ng RNA template, Lane 2: 10 ng RNA template, Lane 3: 1 ng RNA template, Lane 4:  $10^{-1}$  ng RNA template, Lane 5:  $10^{-2}$  ng RNA template, PC: positive control, M: mark, 100 bp DNA ladder ◦

## 第六章 參考文獻



- Adkins, H.B., Brojatsch, J., Naughton, J., Rolls, M.M., Pesola, J.M., Young, J.A., 1997, Identification of a cellular receptor for subgroup E avian leukosis virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 11617-11622.
- Aliotta, J.M., Pelletier, J.J., Ware, J.L., Moran, L.S., Benner, J.S., Kong, H., 1996, Thermostable Bst DNA polymerase I lacks a 3'→5' proofreading exonuclease activity. *Genet Anal* 12: 185-195.
- Angamuthu, R., Baskaran, S., Gopal, D.R., Devarajan, J., Kathaperumal, K., 2012, Rapid detection of the Marek's disease viral genome in chicken feathers by loop-mediated isothermal amplification. *J Clin Microbiol* 50: 961-965.
- Astrin, S.M., Robinson, H.L., Crittenden, L.B., Buss, E.G., Wyban, J., Hayward, W.S., 1980, Ten genetic loci in the chicken that contain structural genes for endogenous avian leukosis viruses. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 44 Pt 2: 1105-1109.
- Baeten, J.M., Kahle, E., Lingappa, J.R., Coombs, R.W., Delany-Moretlwe, S., Nakku-Joloba, E., Mugo, N.R., Wald, A., Corey, L., Donnell, D., Campbell, M.S., Mullins, J.I., Celum, C., 2011, Genital HIV-1 RNA predicts risk of heterosexual HIV-1 transmission. *Sci Transl Med* 3: 77ra29.
- Bagust, T.J., Fenton, S.P., Reddy, M.R., 2004, Detection of subgroup J avian leukosis virus infection in Australian meat-type chickens. *Aust Vet J* 82: 701-706.
- Bai, J., Howes, K., Payne, L.N., Skinner, M.A., 1995a, Sequence of host-range determinants in the env gene of a full-length, infectious proviral clone of exogenous avian leukosis virus HPRS-103 confirms that it represents a new subgroup (designated J). *J Gen Virol* 76: 181-187.
- Bai, J., Payne, L.N., Skinner, M.A., 1995b, HPRS-103 (exogenous avian leukosis virus, subgroup J) has an env gene related to those of endogenous elements EAV-0 and E51 and an E element found previously only in sarcoma viruses. *J Virol* 69: 779-784.
- Barbosa, T., Zavala, G., Cheng, S., 2008, Molecular characterization of three recombinant isolates of avian leukosis virus obtained from contaminated Marek's disease vaccines. *Avian Dis* 52: 245-252.
- Barnard, R.J., Elleder, D., Young, J.A., 2006a, Avian sarcoma and leukosis virus-receptor interactions: from classical genetics to novel insights into virus-cell membrane fusion. *Virology* 344: 25-29.
- Barnard, R.J.O., Elleder, D., Young, J.A.T., 2006b, Avian sarcoma and leukosis virus-receptor interactions: From classical genetics to novel insights into virus-cell membrane fusion. *Virology* 344: 25-29.
- Beard, J.W. 1973, Oncornaviruses. I. The avian tumor viruses. Vol *Ultrastructure of Animal Viruses and Bacteriophages*. Academic Press, New York.

- 
- Beard, J.W. 1980, Biology of avian oncornaviruses. *Viral Oncology*. Raven Press, New York.
- Belak, S., Ballagi-Pordany, A., 1993, Application of the polymerase chain reaction (PCR) in veterinary diagnostic virology. *Vet Res Commun* 17: 55-72.
- Benson, S.J., Ruis, B.L., Garbers, A.L., Fadly, A.M., Conklin, K.F., 1998, Independent isolates of the emerging subgroup J avian leukosis virus derive from a common ancestor. *J Virol* 72: 10301-10304.
- Borisenko, L., Rynditch, A.V., 2004, Complete nucleotide sequences of ALV-related endogenous retroviruses available from the draft chicken genome sequence. *Folia Biol (Praha)* 50: 136-141.
- Bova, C.A., Manfredi, J.P., Swanstrom, R., 1986, env genes of avian retroviruses: nucleotide sequence and molecular recombinants define host range determinants. *Virology* 152: 343-354.
- Bova, C.A., Olsen, J.C., Swanstrom, R., 1988, The avian retrovirus env gene family: molecular analysis of host range and antigenic variants. *J Virol* 62: 75-83.
- Boyce-Jacino, M.T., O'Donoghue, K., Faras, A.J., 1992, Multiple complex families of endogenous retroviruses are highly conserved in the genus Gallus. *J Virol* 66: 4919-4929.
- Bryan, W.R., Moloney, J.B., Calnan, D., 1954, Stable standard preparations of the Rous sarcoma virus preserved by freezing and storage at low temperatures. *J Natl Cancer Inst* 15: 315-329.
- Burmester, B.R., Cunningham, C.H., Cottral, G.E., Belding, R.C., Gentry, R.F., 1956, The transmission of visceral lymphomatosis with live virus Newcastle disease vaccines. *Am J Vet Res* 17: 283-289.
- Burmester, B.R., Gross, M.A., Walter, W.G., Fontes, A.K., 1959, Pathogenicity of a viral strain (RPL12) causing avian visceral lymphomatosis and related neoplasms. II. Hostvirus interrelations affecting response. *J Natl Cancer Inst* 22: 103-127.
- Burstein, H., Gilead, M., Bendheim, U., Kotler, M., 1984, Viral aetiology of haemangiosarcoma outbreaks among layer hens. *Avian Pathol* 13: 715-726.
- Butterfield, E.E., 1905, Aleukaemic lymphadenoid tumors of the hen. *Folia Haematol* 2: 649-657.
- Calnek, B.W., 1968, Lymphoid leukosis virus: a survey of commercial breeding flocks for genetic resistance and incidence of embryo infection. *Avian Dis* 12: 104-111.
- Caparini, U., 1896, Fetati leucemici nei polli. *Clin Vet (Milan)* 19: 433-435.
- Cardoso, T.C., Ferrari, H.F., Bregano, L.C., Silva-Frade, C., Rosa, A.C., Andrade, A.L., 2010, Visual detection of turkey coronavirus RNA in tissues and feces by reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) with hydroxynaphthol blue dye. *Mol Cell Probes* 24: 415-417.
- Chang, S.W., Hsu, M.F., Wang, C.H., 2012, Gene detection, virus isolation and sequence analysis of avian leukosis virus in Taiwan Country chickens. *Avian Dis*, submitted.

- 
- Chubb, R.C., Biggs, P.M., 1968, The neutralization of Rous sarcoma virus. *J Gen Virol* 3: 87-96.
- Coffin, J.M. 1992, Structure and classification of retroviruses. The retroviridae, New York: Plenum: 19-49.
- Cottral, G.E., Burmester, B.R., Waters, N.F., 1954, Egg Transmission of Avian Lymphomatosis. *Poult Sci* 33: 1174-1184.
- Crittenden, L.B., 1981, Exogenous and endogenous leukosis virus genes--a review. *Avian Pathol* 10: 101-112.
- Crittenden, L.B., 1991, Retroviral elements in the genome of the chickens: Implications for poultry genetics and breeding. *Crit Rev Poultry Biol* 3: 73-109.
- Crittenden, L.B., Fadly, A.M., Smith, E.J., 1982, Effect of endogenous leukosis virus genes on response to infection with avian leukosis and reticuloendotheliosis viruses. *Avian Dis* 26: 279-294.
- Crittenden, L.B., McMahon, S., Halpern, M.S., Fadly, A.M., 1987, Embryonic infection with the endogenous avian leukosis virus Rous-associated virus-0 alters responses to exogenous avian leukosis virus infection. *J Virol* 61: 722-725.
- Crittenden, L.B., Smith, E.J., 1984, A comparison of test materials for differentiating avian leukosis virus group-specific antigens of exogenous and endogenous origin. *Avian Dis* 28: 1057-1070.
- Crittenden, L.B., Smith, E.J., Okazaki, W., 1984, Identification of broiler breeders congenitally transmitting avian leukosis virus by enzyme-linked immunosorbent assay. *Poult Sci* 63: 492-496.
- Crittenden, L.B., Witter, R.L., 1978, Studies of flocks with high mortality from lymphoid leukosis. *Avian Dis* 22: 16-23.
- Curtis, K.A., Rudolph, D.L., Owen, S.M., 2008, Rapid detection of HIV-1 by reverse-transcription, loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *J Virol Methods* 151: 264-270.
- Dales, S., Hanafusa, H., 1972, Penetration and intracellular release of the genomes of avian RNA tumor viruses. *Virology* 50: 440-458.
- Dorner, A.J., Coffin, J.M., 1986, Determinants for receptor interaction and cell killing on the avian retrovirus glycoprotein gp85. *Cell* 45: 365-374.
- Dorner, A.J., Stoye, J.P., Coffin, J.M., 1985, Molecular basis of host range variation in avian retroviruses. *J Virol* 53: 32-39.
- Dougherty, R.M., 1961, Heat inactivation of Rous sarcoma virus. *Virology* 14: 371-372.
- Dunwiddie, C.T., Resnick, R., Boyce-Jacino, M., Alegre, J.N., Faras, A.J., 1986, Molecular cloning and characterization of gag-, pol-, and env-related gene sequences in the ev- chicken. *J Virol* 59: 669-675.
- Ellermann, V. 1921, *The Leucosis of Fowls and Leukemia Problems*. Gyldendal, London, United Kingdom.

Ellermann, V., Bang, O., 1908, Experimentelle leukämie bei Hühnern. Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Infektionskr Hyg Abt I Orig 46: 609.

Endo, S., Komori, T., Ricci, G., Sano, A., Yokoyama, K., Ohori, A., Kamei, K., Franco, M., Miyaji, M., Nishimura, K., 2004, Detection of gp43 of *Paracoccidioides brasiliensis* by the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method. FEMS microbiology letters 234: 93-97.

Enrietto, P., Hayman, M. 1987, Structure and virus-associated oncogenes of avian sarcoma and leukaemia viruses. Martinus Nijhoff, Boston, MA.

Fadly, A.M., 1988, Avian leukosis virus (ALV) infection, shedding, and tumors in maternal ALV antibody-positive and -negative chickens exposed to virus at hatching. Avian Dis 32: 89-95.

Fadly, A.M., 2000, Isolation and identification of avian leukosis viruses: a review. Avian Pathol 29: 529-535.

Fadly, A.M., Okazaki, W., Crittenden, L.B., 1983, Avian leukosis virus infection and congenital transmission in lines of chickens resisting selection for reduced shedding. Avian Dis 27: 584-593.

Fadly, A.M., Okazaki, W., Smith, E.J., Crittenden, L.B., 1981a, Relative efficiency of test procedures to detect lymphoid leukosis virus infection. Poultry Sci 60: 2037-2044.

Fadly, A.M., Okazaki, W., Witter, R.L., 1981b, Hatchery-related contact transmission and short-term small-group-rearing as related to lymphoid-leukosis-virus-eradication programs. Avian Dis 25: 667-677.

Fadly, A.M., Payne, L.N. 2008, Leukosis/ Sarcoma group. Diseases of poultry, 12th Edition. Blackwell Publishing Co., Ames, Iowa State.

Fadly, A.M., Smith, E.J., 1999, Isolation and some characteristics of a subgroup J-like avian leukosis virus associated with myeloid leukosis in meat-type chickens in the United States. Avian Dis: 391-400.

Fadly, A.M., Witter, R.L., 1993, Effects of age at infection with serotype 2 Marek's disease virus on enhancement of avian leukosis virus-induced lymphomas. Avian Pathol 22: 565-576.

Fadly, A.M., Witter, R.L. 1998, Oncornaviruses: Leukosis/Sarcoma and Reticuloendotheliosis, 4th Edition. A. A. A. P., Kennett Square, PA.

Fenton, S.P., Reddy, M.R., Bagust, T.J., 2005, Single and concurrent avian leukosis virus infections with avian leukosis virus-J and avian leukosis virus-A in Australian meat-type chickens. Avian Pathol 34: 48-54.

Flint, S.J., Enquist, L.W., Racaniello, V.R., Skalka, A.M. 2008, Molecular Biology. Principles of Virology, 3rd Edition. ASM Press, Washington, D.C. 1: 531.

Frankel, S.S., Steinman, R.M., Michael, N.L., Kim, S.R., Bhardwaj, N., Pope, M., Louder, M.K., Ehrenberg, P.K., Parren, P.W., Burton, D.R., Katinger, H., VanCott, T.C., Robb, M.L., Birx, D.L., Mascola, J.R., 1998, Neutralizing monoclonal antibodies block human

immunodeficiency virus type 1 infection of dendritic cells and transmission to T cells. *J Virol* 72: 9788-9794.

Fuchs, B., Zhang, K., Rock, M.G., Bolander, M.E., Sarkar, G., 1999, High Temperature cDNA Synthesis by AMV Reverse Transcriptase Improves the Specificity of PCR. *Mol Biotechnol* 12: 237-240.

Fukuda, S., Takao, S., Kuwayama, M., Shimazu, Y., Miyazaki, K., 2006, Rapid detection of norovirus from fecal specimens by real-time reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay. *J Clin Microbiol* 44: 1376-1381.

Garcia, M., El-Attrache, J., Riblet, S.M., Lunge, V.R., Fonseca, A.S., Villegas, P., Ikuta, N., 2003, Development and application of reverse transcriptase nested polymerase chain reaction test for the detection of exogenous avian leukosis virus. *Avian Dis* 47: 41-53.

Gavora, J.S., Spencer, J.L., Gowe, R.S., Harris, D.L., 1980, Lymphoid leukosis virus infection: effects on production and mortality and consequences in selection for high egg production. *Poult Sci* 59: 2165-2178.

Gingerich, E., Porter, R.E., Lupiani, B., Fadly, A.M., 2002, Diagnosis of myeloid leukosis induced by a recombinant avian leukosis virus in commercial white leghorn egg laying flocks. *Avian Dis* 46: 745-748.

Goff, S.P. 2007, *Retroviridae: The retroviruses and their replication*, 5th Edition. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.

Goto, M., Honda, E., Ogura, A., Nomoto, A., Hanaki, K., 2009, Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue. *Biotechniques* 46: 167-172.

Graevskaya, N.A., Heider, G., Dementieva, S.P., Ebner, D., 1982, Antibodies to reverse transcriptase of avian oncoviruses in sera of specific-pathogen-free chickens. *Acta Virol* 26: 333-339.

Graf, T., Beug, H., 1978, Avian leukemia viruses: interaction with their target cells in vivo and in vitro. *Biochim Biophys Acta* 516: 269-299.

Hatai, H., Ochiai, K., Nagakura, K., Imanishi, S., Ochi, A., Kozakura, R., Ono, M., Goryo, M., Ohashi, K., Umemura, T., 2008, A recombinant avian leukosis virus associated with fowl glioma in layer chickens in Japan. *Avian Pathol* 37: 127-137.

Hayward, W.S., Neel, B.G., Astrin, S.M., 1981, Activation of a cellular onc gene by promoter insertion in ALV-induced lymphoid leukosis. *Nature* 290: 475-480.

Hertig, C., Coupar, B.E., Gould, A.R., Boyle, D.B., 1997, Field and vaccine strains of fowlpox virus carry integrated sequences from the avian retrovirus, reticuloendotheliosis virus. *Virology* 235: 367-376.

Holmen, S.L., Salter, D.W., Payne, W.S., Dodgson, J.B., Hughes, S.H., Federspiel, M.J., 1999, Soluble forms of the subgroup A avian leukosis virus [ALV(A)] receptor Tva significantly inhibit ALV(A) infection in vitro and in vivo. *J Virol* 73: 10051-10060.

Hu, W.S., Temin, H.M., 1990a, Genetic consequences of packaging two RNA genomes

in one retroviral particle: pseudodiploidy and high rate of genetic recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 1556-1560.

Hu, W.S., Temin, H.M., 1990b, Retroviral recombination and reverse transcription. *Science* 250: 1227-1233.

Hughes, W.F., Watanabe, D.H., Rubin, H., 1963, The Development of a Chicken Flock Apparently Free of Leukosis Virus. *Avian Dis* 7: 154-165.

Hunt, H.D., Lee, L.F., Foster, D., Silva, R.F., Fadly, A.M., 1999, A genetically engineered cell line resistant to subgroup J avian leukosis virus infection (C/J). *Virology* 264: 205-210.

Hussain, A.I., Johnson, J.A., da Silva Freire, M., Heneine, W., 2003, Identification and characterization of avian retroviruses in chicken embryo-derived yellow fever vaccines: investigation of transmission to vaccine recipients. *Journal of virology* 77: 1105-1111.

Iseki, H., Alhassan, A., Ohta, N., Thekisoe, O.M., Yokoyama, N., Inoue, N., Nambota, A., Yasuda, J., Igarashi, I., 2007, Development of a multiplex loop-mediated isothermal amplification (mLAMP) method for the simultaneous detection of bovine *Babesia* parasites. *J Microbiol Meth* 71: 281-287.

Iturriza-Gomara, M., Xerry, J., Gallimore, C.I., Dockery, C., Gray, J., 2008, Evaluation of the Loopamp (loop-mediated isothermal amplification) kit for detecting Norovirus RNA in faecal samples. *J Clin Virol* 42: 389-393.

Iwamoto, T., Sonobe, T., Hayashi, K., 2003, Loop-mediated isothermal amplification for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex, *M. avium*, and *M. intracellulare* in sputum samples. *J Clin Microbiol* 41: 2616-2622.

Kuboki, N., Inoue, N., Sakurai, T., Di Cello, F., Grab, D.J., Suzuki, H., Sugimoto, C., Igarashi, I., 2003, Loop-mediated isothermal amplification for detection of African trypanosomes. *Journal of Clinical Microbiology* 41: 5517-5524.

Kung, H.J., Liu, J.L. 1997, *Retroviral Oncogenesis*. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.

Kung, H.J., Maihle, N.J. 1987, *Molecular Basis of Oncogenesis by Non-Acute Avian Retroviruses*. Avian Leukosis. Boer, G.F. Springer US. 4: 77-99.

Levine, S., Nelsen, D., 1964, RIF Infection in a Commercial Flock of Chickens. *Avian Dis* 8: 358-368.

Liu, Y., Chuang, C.-K., Chen, W.-J., 2009, In situ reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification (in situ RT-LAMP) for detection of Japanese encephalitis viral RNA in host cells. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 46: 49-54.

Lupiani, B., Hunt, H., Silva, R., Fadly, A., 2000, Identification and characterization of recombinant subgroup J avian leukosis viruses (ALV) expressing subgroup A ALV envelope. *Virology* 276: 37-43.

Lupiani, B., Pandiri, A.R., Mays, J., Hunt, H.D., Fadly, A.M., 2006, Molecular and



- biological characterization of a naturally occurring recombinant subgroup B avian leukosis virus with a subgroup J-like long terminal repeat. *Avian Dis* 50: 572-578.
- Maas, H.J., De Boer, G.F., Groenendal, J.E., 1982, Age related resistance to avian leukosis virus. III. Infectious virus, neutralising antibody and tumours in chickens inoculated at various ages. *Avian Pathol* 11: 309-327.
- Malkinson, M., Banet-Noach, C., Davidson, I., Fadly, A.M., Witter, R.L., 2004, Comparison of serological and virological findings from subgroup J avian leukosis virus-infected neoplastic and non-neoplastic flocks in Israel. *Avian Pathol* 33: 281-287.
- Maruyama, F., Kenzaka, T., Yamaguchi, N., Tani, K., Nasu, M., 2003, Detection of bacteria carrying the stx2 gene by in situ loop-mediated isothermal amplification. *Applied and environmental microbiology* 69: 5023-5028.
- Melikyan, G.B., Barnard, R.J., Markosyan, R.M., Young, J.A., Cohen, F.S., 2004, Low pH is required for avian sarcoma and leukosis virus Env-induced hemifusion and fusion pore formation but not for pore growth. *J Virol* 78: 3753-3762.
- Meyers, P., Dougherty, R.M., 1972, Analysis of immunoglobulins in chicken antibody to avian leucosis viruses. *Immunology* 23: 1-6.
- Mori, Y., Nagamine, K., Tomita, N., Notomi, T., 2001, Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochem Biophys Res Commun* 289: 150-154.
- Motta, J.V., Crittenden, L.B., Purchase, H.G., Stone, H.A., Witter, R.L., 1975, Low oncogenic potential of avian endogenous RNA tumor virus infection or expression. *J Natl Cancer Inst* 55: 685-689.
- Murphy, F.A., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Ghabrial, S.A., Jarvis, A.W., Martelli, G.P. 1995, *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Springer-Verlag, New York.
- Murphy, F.A., Gibbs, E.P.J., Horzinek, M.C., Studdert, M.J. 1999, *Retroviridae. Veterinary Virology, 3rd Edition*. Academic Press, San Diego, CA: 177-187, 363-389.
- Nagamine, K., Hase, T., Notomi, T., 2002, Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Mol Cell Probes* 16: 223-229.
- Nagamine, K., Watanabe, K., Ohtsuka, K., Hase, T., Notomi, T., 2001, Loop-mediated isothermal amplification reaction using a nondenatured template. *Clin Chem* 47: 1742-1743.
- Nikiforov, M.A., Gudkov, A.V., 1994, ART-CH: a VL30 in chickens? *J Virol* 68: 846-853.
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., Hase, T., 2000, Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res* 28: E63.
- Okazaki, W., Burmester, B.R., Fadly, A., Chase, W.B., 1979, An evaluation of methods for eradication of avian leukosis virus from a commercial breeder flock. *Avian Dis* 23: 688-697.
- Okazaki, W., Fadly, A.M., Crittenden, L.B., Chase, W.B., 1982, The effectiveness of

selection for reduced avian leukosis virus shedding in different chicken strains. *Avian Dis* 26: 612-617.

Olmsted III, J., Kearns, D.R., 1977, Mechanism of ethidium bromide fluorescence enhancement on binding to nucleic acids. *Biochemistry* 16: 3647-3654.

Ono, M., Tsukamoto, K., Tanimura, N., Haritani, M., Kimura, K.M., Suzuki, G., Okuda, Y., Sato, S., 2004, An epizootic of subcutaneous tumors associated with subgroup A avian leukosis/sarcoma virus in young layer chickens. *Avian Dis* 48: 940-946.

Parida, M., Horioka, K., Ishida, H., Dash, P.K., Saxena, P., Jana, A.M., Islam, M.A., Inoue, S., Hosaka, N., Morita, K., 2005, Rapid detection and differentiation of dengue virus serotypes by a real-time reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay. *J Clin Microbiol* 43: 2895-2903.

Parida, M., Posadas, G., Inoue, S., Hasebe, F., Morita, K., 2004, Real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of West Nile virus. *J Clin Microbiol* 42: 257-263.

Parida, M., Sannarangaiah, S., Dash, P.K., Rao, P.V., Morita, K., 2008, Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. *Rev Med Virol* 18: 407-421.

Parida, M.M., Santhosh, S.R., Dash, P.K., Tripathi, N.K., Lakshmi, V., Mamidi, N., Shrivastva, A., Gupta, N., Saxena, P., Babu, J.P., Rao, P.V., Morita, K., 2007, Rapid and real-time detection of Chikungunya virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay. *J Clin Microbiol* 45: 351-357.

Payne, L.N. 1987, Epizootiology of avian leukosis virus infections. Martinus Nijhoff, Boston.

Payne, L.N. 1992, Biology of avian retroviruses. Plenum Press, New York.

Payne, L.N., 1998a, HPRS-103: A retro virus strikes back. The emergence of subgroup J avian leukosis virus. *Avian Pathol* 27: S36-S45.

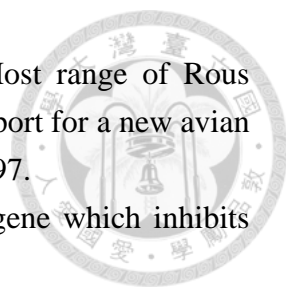
Payne, L.N., 1998b, Retrovirus-Induced Disease in Poultry. *Poult Sci* 77: 1204-1212.

Payne, L.N., Biggs, P.M., 1964, A DIFFERENCE IN SUSCEPTIBILITY TO LYMPHOID LEUKOSIS VIRUS AND ROUS SARCOMA VIRUS BETWEEN CELLS FROM TWO INBRED LINES OF DOMESTIC FOWL. *Nature* 203: 1306-1307.

Payne, L.N., Brown, S.R., Bumstead, N., Howes, K., Frazier, J.A., Thouless, M.E., 1991, A novel subgroup of exogenous avian leukosis virus in chickens. *J Gen Virol* 72: 801-807.

Payne, L.N., Gillespie, A.M., Howes, K., 1992a, Myeloid leukaemogenicity and transmission of the HPRS-103 strain of avian leukosis virus. *Leukemia* 6: 1167-1176.

Payne, L.N., Holmes, A.E., Howes, K., Pattison, M., Pollock, D.L., Walters, D.E., 1982, Further studies on the eradication and epizootiology of lymphoid leukosis virus infection in a commercial strain of chickens. *Avian Pathol* 11: 145-162.

- 
- Payne, L.N., Howes, K., Gillespie, A.M., Smith, L.M., 1992b, Host range of Rous sarcoma virus pseudotype RSV(HPRS-103) in 12 avian species: support for a new avian retrovirus envelope subgroup, designated J. *J Gen Virol* 73: 2995-2997.
- Payne, L.N., Pani, P.K., Weiss, R.A., 1971, A dominant epistatic gene which inhibits cellular susceptibility to RSV(RAV-O). *J Gen Virol* 13: 455-462.
- Payne, L.N., Venugopal, K., 2000, Neoplastic diseases: Marek's disease, avian leukosis and reticuloendotheliosis. *Rev Sci Tech* 19: 544-564.
- Pham, T.D., Spencer, J.L., Johnson, E.S., 1999a, Detection of avian leukosis virus in albumen of chicken eggs using reverse transcription polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 78: 1-11.
- Pham, T.D., Spencer, J.L., Traina-Dorge, V.L., Mullin, D.A., Garry, R.F., Johnson, E.S., 1999b, Detection of exogenous and endogenous avian leukosis virus in commercial chicken eggs using reverse transcription and polymerase chain reaction assay. *Avian Pathol* 28: 385-392.
- Poon, L.L., Wong, B.W., Ma, E.H., Chan, K.H., Chow, L.M., Abeyewickreme, W., Tangpukdee, N., Yuen, K.Y., Guan, Y., Looareesuwan, S., 2006, Sensitive and inexpensive molecular test for falciparum malaria: detecting *Plasmodium falciparum* DNA directly from heat-treated blood by loop-mediated isothermal amplification. *Clinical chemistry* 52: 303-306.
- Purchase, H.G., 1986, Future applications of biotechnology in poultry. *Avian Dis* 30: 47-59.
- Purchase, H.G. 1987, Pathogenesis and pathology of neoplasms caused by avian leukosis viruses. Martinus Nijhoff, Boston.
- Purchase, H.G., 1989, Practical application of nucleic acid techniques to avian disease problems. *Avian Dis* 33: 609-614.
- Rajabzadeh, M., Dadras, H., Mohammadi, A., 2010, Detection of avian leukosis virus subgroups in albumen of commercial and native fowl eggs using RT-PCR in Iran. *Trop Anim Health Prod* 42: 1829-1836.
- Rispens, B.H., de Boer, G.F., Hoogerbrugge, A., van Vioten, J., 1976, A method for the control of lymphoid leukosis in chickens. *J Natl Cancer Inst* 57: 1151-1156.
- Robinson, H.L., 1978, Inheritance and expression of chicken genes that are related to avian leukosis sarcoma virus genes. *Curr Top Microbiol Immunol* 83: 1-36.
- Robinson, H.L., Astrin, S.M., Senior, A.M., Salazar, F.H., 1981, Host Susceptibility to endogenous viruses: defective, glycoprotein-expressing proviruses interfere with infections. *J Virol* 40: 745-751.
- Roloff, F., 1868, The avian leukosis complex-a review. *Vet Rev Annot* 32: 97-120.
- Roth, F.K., Meyers, P., Dougherty, R.M., 1971, The presence of avian leukosis virus group-specific antibodies in chicken sera. *Virology* 45: 265-274.
- Rous, P., 1911, A SARCOMA OF THE FOWL TRANSMISSIBLE BY AN AGENT

SEPARABLE FROM THE TUMOR CELLS. *J Exp Med* 13: 397-411.

Rovigatti, U.G., Astrin, S.M., 1983, Avian endogenous viral genes. *Curr Top Microbiol Immunol* 103: 1-21.

Rubin, H., Cornelius, A., Fanshier, L., 1961, The pattern of congenital transmission of an avian leukosis virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 47: 1058-1069.

Rubin, H., Fanshier, L., Cornelius, A., Hughes, W.F., 1962a, Tolerance and immunity in chickens after congenital and contact infection with an avian leukosis virus. *Virology* 17: 143-156.

Rubin, H., Fanshier, L., Cornelius, A., Hughes, W.F., 1962b, Tolerance and immunity in chickens after congenital and contact infection with an avian leukosis virus. *Virology* 17: 143-156.

Rubin, H., Temin, H.M., 1959, A radiological study of cell-virus interaction in the Rous sarcoma. *Virology* 7: 75-91.

Sacco, M.A., Flannery, D.M., Howes, K., Venugopal, K., 2000, Avian endogenous retrovirus EAV-HP shares regions of identity with avian leukosis virus subgroup J and the avian retrotransposon ART-CH. *J Virol* 74: 1296-1306.

Sacco, M.A., Howes, K., Smith, L.P., Nair, V.K., 2004, Assessing the roles of endogenous retrovirus EAV-HP in avian leukosis virus subgroup J emergence and tolerance. *J Virol* 78: 10525-10535.

Sandelin, K., Estola, T., 1974, Occurrence of different subgroups of avian leukosis virus in Finnish poultry. *Avian Pathol* 3: 159-168.

Shao, Y., Zhu, S., Jin, C., Chen, F., 2011, Development of multiplex loop-mediated isothermal amplification-RFLP (mLAMP-RFLP) to detect *Salmonella* spp. and *Shigella* spp. in milk. *Int J Food Microbiol* 148: 75-79.

Sigel, M.M., Meyers, P., Holden, H.T., 1971, Resistance to Rous sarcoma elicited by immunization with live virus. *Proc Soc Exp Biol Med* 137: 142-146.

Silva, R.F., Fadly, A.M., Hunt, H.D., 2000, Hypervariability in the envelope genes of subgroup J avian leukosis viruses obtained from different farms in the United States. *Virology* 272: 106-111.

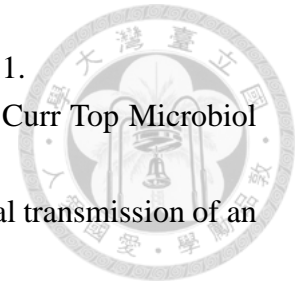
smith, E.J. 1987, Endogenous avian leukosis viruses. Martinus Nijhoff, Boston.

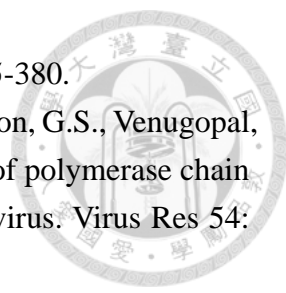
Smith, E.J., Fadly, A., Okazaki, W., 1979, An enzyme-linked immunosorbent assay for detecting avian leukosis-sarcoma viruses. *Avian Dis* 23: 698-707.

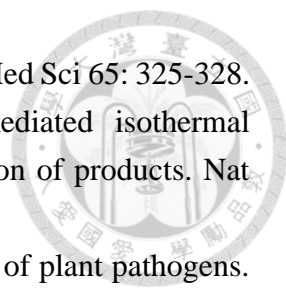
Smith, E.J., Fadly, A.M., 1988, Influence of congenital transmission of endogenous virus-21 on the immune response to avian leukosis virus infection and the incidence of tumors in chickens. *Poult Sci* 67: 1674-1679.

Smith, E.J., Fadly, A.M., Crittenden, L.B., 1986, Observations on an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies against avian leukosis-sarcoma viruses. *Avian Dis* 30: 488-493.

Smith, E.J., Williams, S.M., Fadly, A.M., 1998a, Detection of Avian Leukosis Virus



- 
- Subgroup J Using the Polymerase Chain Reaction. *Avian Dis* 42: 375-380.
- Smith, L.M., Brown, S.R., Howes, K., McLeod, S., Arshad, S.S., Barron, G.S., Venugopal, K., McKay, J.C., Payne, L.N., 1998b, Development and application of polymerase chain reaction (PCR) tests for the detection of subgroup J avian leukosis virus. *Virus Res* 54: 87-98.
- Smith, L.M., Toye, A.A., Howes, K., Bumstead, N., Payne, L.N., Venugopal, K., 1999, Novel endogenous retroviral sequences in the chicken genome closely related to HPRS-103 (subgroup J) avian leukosis virus. *J Gen Virol* 80 ( Pt 1): 261-268.
- Solomon, J.J., Burmester, B.R., Fredrickson, T.N., 1966, Investigations of lymphoid leukosis infection in genetically similar chicken populations. *Avian Dis* 10: 477-483.
- Song, T., Toma, C., Nakasone, N., Iwanaga, M., 2005, Sensitive and rapid detection of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* by a loop-mediated isothermal amplification method. *FEMS Microbiology Letters* 243: 259-263.
- Sotiriadou, I., Karanis, P., 2008, Evaluation of loop-mediated isothermal amplification for detection of *Toxoplasma gondii* in water samples and comparative findings by polymerase chain reaction and immunofluorescence test (IFT). *Diagn Microbiol Infect Dis* 62: 357-365.
- Spargo, C., Fraiser, M., Van Cleve, M., Wright, D., Nycz, C., Spears, P., Walker, G., 1996, Detection of *M. tuberculosis* DNA using Thermophilic Strand Displacement Amplification. *Molecular and cellular probes* 10: 247-256.
- Spencer, J.L., Benkel, B., Chan, M., Nadin-Davis, S., 2003, Evidence for virus closely related to avian myeloblastosis-associated virus type 1 in a commercial stock of chickens. *Avian Pathol* 32: 383-390.
- Spencer, J.L., Crittenden, L.B., Burmester, B.R., Okazaki, W., Witter, R.L., 1977, Lymphoid leukosis: interrelations among virus infections in hens, eggs, embryos, and chicks. *Avian Dis* 21: 331-345.
- Stepanets, V., Vernerová, Z., Vilhelmová, M., Geryk, J., Plachy, J., Hejnar, J., Weichold, F.F., Svoboda, J., 2003, Intraembryonic avian leukosis virus subgroup C (ALV-C) inoculation producing wasting disease in ducks soon after hatching. *Folia Biol (Praha)* 49: 100-109.
- Stumph, W.E., Hodgson, C.P., Tsai, M.J., O'Malley, B.W., 1984, Genomic structure and possible retroviral origin of the chicken CR1 repetitive DNA sequence family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81: 6667-6671.
- Svoboda, J., Hejnar, J., Geryk, J., Elleder, D., Vernerova, Z., 2000, Retroviruses in foreign species and the problem of provirus silencing. *Gene* 261: 181-188.
- Thapa, B.R., Omar, A.R., Arshad, S.S., Hair-Bejo, M., 2004, Detection of avian leukosis virus subgroup J in chicken flocks from Malaysia and their molecular characterization. *Avian Pathol* 33: 359-363.
- Thu, W.L., Wang, C.H., 2003, Phylogenetic analysis of subgroup J avian leucosis virus



from broiler and native chickens in Taiwan during 2000-2002. *J Vet Med Sci* 65: 325-328.

Tomita, N., Mori, Y., Kanda, H., Notomi, T., 2008, Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nat Protoc* 3: 877-882.

Tomlinson, J., Boonham, N., 2008, Potential of LAMP for detection of plant pathogens. *CAB Reviews* 3.

Toyoshima, K., Vogt, P.K., 1969, Temperature sensitive mutants of an avian sarcoma virus. *Virology* 39: 930-931.

Trejbalová, K., Gebhard, K., Vernerová, Z., Dušek, L., Geryk, J., Hejnar, J., Haase, A., Svoboda, J., 1999, Proviral load and expression of avian leukosis viruses of subgroup C in long-term persistently infected heterologous hosts (ducks). *Archives of virology* 144: 1779-1807.

Tsukamoto, K., Kono, Y., Arai, K., Kitahara, H., Takahashi, K., 1985, An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to exogenous avian leukosis virus. *Avian Dis* 29: 1118-1129.

Venugopal, K., 1999, Avian leukosis virus subgroup J: a rapidly evolving group of oncogenic retroviruses. *Res Vet Sci* 67: 113-119.

Venugopal, K., Howes, K., Barron, G.S., Payne, L.N., 1997, Recombinant env-gp85 of HPRS-103 (subgroup J) avian leukosis virus: antigenic characteristics and usefulness as a diagnostic reagent. *Avian Dis* 41: 283-288.

Venugopal, K., Howes, K., Flannery, D.M., Payne, L.N., 2000, Subgroup J avian leukosis virus infection in turkeys: induction of rapid onset tumours by acutely transforming virus strain 966. *Avian Pathol* 29: 319-325.

Venugopal, K., Smith, L.M., Howes, K., Payne, L.N., 1998, Antigenic variants of J subgroup avian leukosis virus: sequence analysis reveals multiple changes in the env gene. *J Gen Virol* 79: 757-766.

Wang, C.H., Juan, Y.W., 2002, Occurrence of subgroup J avian leukosis virus in Taiwan. *Avian Pathol* 31: 435-439.

Wang, C.H., Liu, C.F., Liu, Y.F., Kou, T.F., 1995, High Mortality in a Broiler Flock with Myelocytomatosis. *J Chin Soc Vet Sci* 21: 128-133.

Wang, L.H., Hanafusa, H., 1988, Avian sarcoma viruses. *Virus Res* 9: 159-203.

Wang, Z., Cui, Z., 2006, Evolution of gp85 gene of subgroup J avian leukosis virus under the selective pressure of antibodies. *Sci China C Life Sci* 49: 227-234.

Witter, R.L., Bacon, L.D., Hunt, H.D., Silva, R.E., Fadly, A.M., 2000, Avian leukosis virus subgroup J infection profiles in broiler breeder chickens: association with virus transmission to progeny. *Avian Dis* 44: 913-931.

Witter, R.L., Calnek, B.W., Levine, P.P., 1966, Influence of Naturally Occurring Parental Antibody on Visceral Lymphomatosis Virus Infection in Chickens. *Avian Dis* 10: 43-56.

Witter, R.L., Fadly, A.M., 2001, Reduction of horizontal transmission of avian leukosis

virus subgroup J in broiler breeder chickens hatched and reared in small groups. *Avian Pathol* 30: 641-654.

Xu, B., Dong, W., Yu, C., He, Z., Lv, Y., Sun, Y., Feng, X., Li, N., Lee, L.F., Li, M., 2004, Occurrence of avian leukosis virus subgroup J in commercial layer flocks in China. *Avian Pathol* 33: 13-17.

Zander, D.V., Raymond, R.G., McClary, C.F., Goodwin, K., 1975, Eradication of subgroups A and B lymphoid leukosis virus from commercial poultry breeding flocks. *Avian Dis* 19: 403-423.

Zavala, G., Cheng, S., 2006a, Detection and characterization of avian leukosis virus in Marek's disease vaccines. *Avian Dis* 50: 209-215.

Zavala, G., Cheng, S., 2006b, Experimental infection with avian leukosis virus isolated from Marek's disease vaccines. *Avian Dis* 50: 232-237.

Zavala, G., Jackwood, M.W., Hilt, D.A., 2002, Polymerase chain reaction for detection of avian leukosis virus subgroup J in feather pulp. *Avian Dis* 46: 971-978.

Zhang, X., Liao, M., Jiao, P., Luo, K., Zhang, H., Ren, T., Zhang, G., Xu, C., Xin, C., Cao, W., 2010, Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of subgroup J avian leukosis virus. *J Clin Microbiol* 48: 2116-2121.

許萌芳, 2012, 家禽白血病 A 亞群 gp85 蛋白質表現與抗體檢測之應用. 國立臺灣大學獸醫學研究所碩士論文.

陳慧真, 2004, 台灣土雞家禽白血病 J 亞群之血清學調查與酵素連結免疫吸附分析 (ELISA) 之開發. 國立臺灣大學獸醫學研究所碩士論文.

陳麗璇, 2011, 鈣黃綠素 (Calcein) 於環形核酸增幅法 (LAMP) 之應用評估. 家畜衛試所研報 46: 1-8.