

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

雞副嗜血桿菌(*Haemophilus paragallinarum*)A 型及 C 型菌
株不同致病因子之搜尋

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC94-2313-B-039-001-

執行期間：94 年 08 月 01 日至 95 年 07 月 31 日

執行單位：中國醫藥大學生物科技學系

計畫主持人：徐媛曼

共同主持人：陳翰民

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 95 年 10 月 24 日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫 成果報告
 期中進度報告

雞副嗜血桿菌(*Haemophilus paragallinarum*)A 型及C 型菌株

不同致病因子之搜尋

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC94-2313-B-036-001-

執行期間：94年8月1日至95年7月31日

計畫主持人：徐媛曼

共同主持人：陳翰民

計畫參與人員：

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告 完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國外出差或研習心得報告一份
- 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、
列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

執行單位：中國醫藥大學生物科技學系

中 華 民 國 95 年 10 月 16 日

中文摘要

傳染性可利查(Infectious coryza, IC)，俗稱傳染性鼻炎，是由雞副嗜血桿菌所引起(*Haemophilus paragallinarum*)，本病是一世界性傳染性的雞重要疾病.由於其發病率相當高，且多發生在成長中或產蛋雞群，造成死亡及產蛋率暴跌(10-40%)的嚴重損失，對雞農造成的損失很大。本病僅感染雞，公共衛生上毫無影響，但為台灣細菌性禽病中最為困擾的問題之一。目前非活化性疫苗與抗生素雖廣為使用，但其控制效果仍然有限。由於疫苗製備的過程中，菌株之生長環境與其表面抗原的表現量及種類有密切的關係，因此增加了疫苗製備的困難。也因為此菌的致病機轉仍不清楚，增加診斷此菌血清型的困難。因此，本研究將針對台灣流行的 V-factor-dependent *H. paragallinarum* 血清型 A 及 C 做系統性的比較，得到兩個僅在血清型 A 出現之蛋白質，*hctC* 與 putative transposase；並且在蛋白圖譜的表現上，hemagglutinin antigen 與 OmpA 在含鐵的環境中於兩個血清型中表現量均較高。此項研究工作之完成將可有助於了解 *H. paragallinarum* 的分子機轉，並進一步改善 *H. paragallinarum* 的疫苗效益，不同血清型間的交叉保護作用及更方便的血清型檢測之方式，對 *H. paragallinarum* 在台灣引起之傳染性可利查(Infectious Coryza, IC) 的防治及診斷有實質上的效益。

關鍵詞：雞副嗜血桿菌、傳染性可利查、聚合酶鏈鎖反應基礎之扣除雜交法、二維電泳

英文摘要

Infectious coryza, an acute upper respiratory tract disease of chickens, is caused by the bacterium *Haemophilus paragallinarum*. This disease is of worldwide economic significance and affects both broiler and layer flocks, manifesting primarily as a drop in egg production (10-40%) in layer flocks and retardation of growth. The chicken is the natural host of *H. paragallinarum*, and it is the one of the most serious bacterial infection in poultry. Even though the inactivated vaccines and antibiotics are widely used to treat or prevent an outbreak of this disease, neither of them is effective. The difficulty of perpetrating inactivated vaccines is that many different factors, mainly growth conditions, appear to influence the expression of the antigens of *H. paragallinarum*. The pathogenesis of *H. paragallinarum* is still unclear, therefore, it increases the difficulty of diagnosis which serogroup causes infection in poultry. In this study, we examined Taiwan isolated *H. paragallinarum* serogroups A and C by PCR-based subtractive hybridization method and 2-Dimensional gel electrophoresis. By subtractive hybridization analysis, there were two genes, *hctC* and putative transposase, were specific for serogroup A; by 2-Dimensional gel electrophoresis analysis, hemagglutinin antigen and OmpA expressed more in the iron-limited condition in both serogroups A and C. By doing so, we will be able to increase the efficiency of vaccines and differential diagnosis in infection.

Keywords : *Haemophilus paragallinarum*, infectious coryza, PCR-based subtractive hybridization method, 2-Dimensional gel electrophoresis

文獻探討

傳染性可利查 (Infectious Coryza, IC)，俗稱傳染性鼻炎，是一世界性傳染性的雞重要疾病，但是，其他雞的呼吸道感染症，包括慢性呼吸器病(CRD)，新城病(ND)，傳染性支氣管炎(IB)，傳染性喉頭氣管炎(ILT)，這些疾病臨床症狀與傳染性可利查類似，診斷上極易造成混淆，而且發病率相當高，對雞造成的損失很大，而其中 IC 是唯一感染臉部的鼻道及下窩竇而引起上部呼吸道症狀的疾病，其感染所引起的急性呼吸道疾病，多發生在成長中或產蛋雞群，造成死亡及產蛋率暴跌的嚴重損失 (3)。

傳染性可利查是由雞副嗜血桿菌所引起 (*Haemophilus paragallinarum*)。本病係雞的急性傳染病，感染雞流鼻涕，氣管囉音等呼吸症狀，並有流淚、眼下竇與顏面腫脹及產蛋率驟降為主徵。本病呈世界性分布，在台灣自從 1964 年由呂榮修等確認本病之存在後，每年都有流行。本病對中雞以上雞齡的雞較常發生，如發生在中雞其成長會受阻，同時對蛋雞及種雞會引起長期之產蛋率驟降，甚至死亡，又加以病程之漫長，且常與 CRD 併發又因藥物療效不彰而造成更大損失。病雞之症狀常見流水樣性鼻涕，臉部尤其是眼下竇腫脹，公雞多見肉垂腫脹，眼有結膜炎及流淚，由氣管發出囉音及開口呼吸、食慾減退、臉色蒼白、產蛋率降低、排綠色便。一般病程約 2 週，甚至有 4 週以上者，如與 CRD 伴發者症狀更為複雜。本病主要病變多在鼻腔，眼下竇及氣管粘膜之卡他性炎症，肉眼上在鼻腔眼窩下竇充滿水樣乃至粘稠液，粘膜呈潮紅浮腫性腫脹，下顎部皮下組織有漿液浸潤。顯微病變則以鼻腔、眼窩下竇及氣管有粘膜性及腺性上皮的脫落及增生，粘膜有水腫、充血、異嗜球浸潤。這些病變大概在感染後 7-10 天最嚴重，至 14-21 日後逐漸恢復(3, 21, 22)。本病僅感染雞，公共衛生上毫無影響，但為台灣細菌性禽病中最為困擾的問題之一。目前疫苗與化學藥物或抗生素雖廣為使用，但控制效果仍有存疑，必須再就細菌分離株及致病機轉之相關研究做進一步探討。

H. paragallinarum 的血清型鑑定主要有兩種方式，Page scheme(21)和 Kume scheme(16)。Page scheme 原本是採用平板凝集試驗(a slide agglutination test)來檢測血清型，共測得 A、B、C 三型。但在一連串測試之後發現，用血球凝集抑制試驗(hemagglutination-inhibition technology) 可以較準確的鑑別田野間分離的 *H. paragallinarum* 的 Page serovar (4)。由於一個 Page serovar 做成的非活化疫苗(inactivated vaccines)並不能交叉保護其他二型的 Page serovars，所以 A、B、C 三型屬於不同的 immunovars。Kume scheme 本是以血球凝集抑制試驗將 *H. paragallinarum* 區分為三個 serogroups I, II, 和 III 其中包括七個 serovars (16)。隨後的報告將 Kume scheme 的分類區分為三個與 Page scheme 對應的 serogroup A、B、C，其中並包括了 9 個 serovars (5)。Kume scheme 是一個複雜的血清型鑑定方式，全世界沒有一個實驗室用完整的 Kume scheme 來做血清型鑑定。大致上，*H. paragallinarum* 的血清型為 A、B、C 三型。

近年來在阿根廷和巴西，40%的 Page serovar A 分離株無法用同型的單株抗原檢測 (7)。這表示在這些區域，有為數不少的 Page serovar A 的變異株出現。這些 Page serovar A 的變異可能大到足以顯示免疫學上的不同。而由阿根廷的 serovar B 在基因跟免疫反應方面與其他的 *H. paragallinarum* 分離株均有顯著的不同 (24, 26)。因此這可能是傳統疫苗沒有保護效果的原因，以流行病爆發當地分離的菌型為較適當的疫苗來源。

長久以來，V (nicotinamide adenine dinucleotide；NAD)因子一向被認為為 *H. paragallinarum* 生長必需，但 1989 年在南非開始分離出 V-factor-independent *H. paragallinarum* (20)，而其中大多數都是 Page serovar A (19)。這些 Page serovar A 的

V-factor-independent *H. paragallinarum* 具有很獨特的 DNA fingerprint，表示他們可能是在自然界由單一來源的菌落衍生而成(19)。這樣的變異株出現，也增加了防治、檢驗及疫苗製造的困難。同時，生長的环境，例如培養的時間、接種的菌量、NAD 或氯化鈉的濃度、培養基的酸鹼值，對 *H. paragallinarum* 表面抗原的表現都有影響，而不同分離株對不同生長環境所反應出來的抗原表現特徵也不同(11)。因此，不僅有特殊地區性的分離株增加了防疫檢疫上的困難，同時在製備疫苗時，不同的培養狀況亦影響了疫苗的保護效力。

在台灣流行的菌株仍以 V-factor-dependent *H. paragallinarum* 血清型 A 及 C 為主，本研究室的對野外分離株的毒力測試結果，以血清型 C 為有較強毒力之菌株。在南非分離的菌株有類似的現象，V-factor-dependent *H. paragallinarum* 的野外分離株以血清型 A 及 C 為主，也以血清型 C 為有較強毒力之菌株，但 V-factor-independent *H. paragallinarum* 分離株中以血清型 A 及 C 為主，但血清型 A 及 C 分離株之毒力並沒有顯著差異(9, 10)。到目前為止台灣並沒有發現 V-factor-independent *H. paragallinarum* 的分離株。

H. paragallinarum 的致病機轉到目前為止仍不清楚，近年來曾經被提出討論的有 *hctABC D*，可能負責為 *H. paragallinarum* 運送 capsule polysaccharides 到細胞表面(12)；一個 110-kDa putative RTX protein(17)及 haemagglutinin 蛋白(14)為 antigenic secreted proteins。細部的致病機轉仍有待進一步研究。而大部分有關 *H. paragallinarum* 的論文發表集中在如何改善疫苗效益(8, 13, 15)，不同血清型間的交叉保護作用(25)及更方便的血清型檢測方式(18, 27, 28)，但並無突破性的發展。

目前市面上販售的疫苗以非活化疫苗為主(1, 2, 6, 23)，非活化疫苗也是到目前為止最有效的疫苗，其製備分為兩種：油質疫苗(Oil emulsion vaccines)，這是長效性的疫苗，但對雞群有比較大的緊迫。疫苗施打以後，會造成強烈的局部反應，並會影響產蛋率。儘管如此，一次的接種可以有 80% 的保護力價；氫氧化鋁膠疫苗(Aluminum hydroxide vaccines)，這種疫苗對雞隻有較小的緊迫，而且可以刺激較早期但較弱的免疫反應。與油質疫苗比起來，氫氧化鋁膠疫苗的保護力價與保護的時間較差(3)。而大多數疫苗由 2 種以上的血清型細菌混合而成，包括 A 和 C 型的細菌株，至少含有 10^8 colony-forming units (CFU)/ml 才有效，在 5 週齡及 15 週齡，至少做 2 次的死菌苗，皮下或肌肉接種，以保證其效果。因為 A 及 C 型間無交叉免疫性，疫苗缺少其中之一型就無效。細菌株的抗原性亦影響免疫效果，故提高疫苗的品質在於找出現時所發病的菌株，以作為本土的菌苗的基礎。目前已有許多市售的進口或台灣製造的疫苗正在使用中，雖各有評價，但其效果之好壞很難提出解釋，亦無法肯定進口的疫苗全都就是好的，期待對進口疫苗做個別抗體的測定及攻毒實驗才能有答案。

研究方法

聚合酶鏈鎖反應基礎之扣除雜交法 (PCR-based subtractive hybridization method)

我們將純化台灣分離之 *H. paragallinarum* 血清型 A(A1) 及 C(A9) 之 chromosomal DNA，並以 *RsaI* 切割之後，將此 DNA 片段以 T4 DNA ligase 於 16 °C 環境下進行隔夜反應，接上所設計之兩組不同 adaptors。此後於 70 °C 下將反應後之樣本作用 5 分鐘，以去活化 ligase 作用。並將此已連接 adaptor 之 DNA 產物存放於 -20 °C 備用。經任何處理未連接 adaptor 之 DNA 片段為啟動者 DNA(driver DNA)，而已連接 adaptor 之 DNA 片段為測試者 DNA(Tester DNA)。將啟動者 DNA 與測試者 DNA 以 50 : 1 之比例混和。此混合物在加入適當濃度之雜交緩衝液 (2.5M NaCl/250 mM Hepes, pH 8.3/1 mM EDTA) 後，經 98 °C 下處理 1.5 分鐘

進行裂解(denaturation)，之後並以 65°C 狀況下反應 1.5 小時以利第一次黏合 (first anneal)。在經由第一次黏合反應後，將二組不同的樣本 (第一組為連接 adaptor1，另一組為連接 adaptor2) 加以混合，再加入適量之啟動者 DNA，並於 65°C 環境下配合適當濃度之雜交緩衝液中反應 14 小時。產物以稀釋液 (50mM NaCl/5 mM Hepes, pH 8.3/0.2 mM EDTA) 加以適當稀釋後，最後於 65°C 環境下作用 10 分鐘，並儲存於 -20°C 冰箱。這些 DNA 產物即為不同血清型 *H. paragallinarum* 間之不同 DNA 內容物。利用先前設計出之 adaptor 所設計出 PCR 引子將此 DNA 產物進行 PCR 增幅。並以 CLONTECH 所生產的 PCR-select bacterial genome subtraction kit 進行選殖。所得之 clone 加以定序分析，結果進入 National Center for Biotechnology Information 系統進行 BLAST 程式之搜尋，以找出與此基因片段最相近之基因為何。

南方墨點轉漬法 (Southern Blot)

以 *H. paragallinarum* 血清型 A 減 C (JA-JC) 及 C 減 A (JC-JA) 之刪減基因庫中經 BLAST 比對之較具意義之 DNA 片段為探針 (probe)，使用 Gene Images AlkPhos Direct Labelling and Detection System (Amersham Biosciences, UK) 將探針標的 (label) 上鹼性磷酸酶 (alkaline phosphatase) 後，分別以 A、C 兩血清型之 chromosomal DNA 為模板進行雜合反應以確認其片段是否具血清型特異性。取 serogroup A 及 C 之 chromosomal DNA 各滴 0.01 μg 於 nylon 膜 (Hybond N+, Amersham Biosciences, UK) 上，再利用 UV crosslinker (SPECTROLINE, USA) 將 DNA 固定於膜上；取適量的 AlkPhos Direct hybridization buffer (約 0.125 ml/cm² Hybond N+ 於封口袋中) 混合 0.5M NaCl 與 4% blocking reagent，以 55°C 使 block reagent 完全溶解後，加入 nylon 膜於 55°C 搖晃 15 分鐘，再加入 probe 達終濃度約每 ml 之 buffer 含 5-10 ng 之 probe，以 55°C 隔夜搖晃；將適量之 primary wash buffer (2M Urea, 0.1% (w/v) SDS, 50mM sodium phosphate pH 7.0, 150mM NaCl, 1.0mM MgCl₂, 0.2% (w/v) Blocking reagent) 加熱至 55°C 後，與 nylon 膜於 55°C 輕輕搖晃 10 分鐘兩次，再與 1X secondary wash buffer (20X 之 secondary wash buffer 含 1M Tris base, 2M NaCl, pH 10.0) 於室溫下輕輕搖晃 10 分鐘兩次後，以 CDP-StarTM Detection Reagent (Amersham Biosciences, UK) 進行偵測。

二維電泳 - 第一維電泳

取以 Sample buffer 溶解好的 10¹⁰ 細菌樣品 200 μL，先將樣品放入 holder 中，再輕輕放入 strip gel，確定 strip gel 下無任何氣泡，最後覆蓋上 0.8 mL cover oil，防止 strip 乾掉或 urea 結晶。再使用 IPGphor system，先以 30 V 電壓將 strip rehydration 12 h，使 strip gel 膨潤，再進行設定的 program 如下：電壓 30 V，時間 12 h，Vh 360；電壓 500 V，時間 1 h，Vh 500；電壓 1,000 V，時間 1 h，Vh 1,000；電壓 8,000 V，時間 2 h，Vh 16,000。待 IEF 進行結束後，將 strip 以二次水清洗，以去除 cover oil，若無法立即進行 SDS 電泳分析，先將其放入 -80°C 保存。

二維電泳 - 第二維電泳

若立即進行 SDS 分析，夾出 strip 放入 5 mL SDS 平衡緩衝液 (加入 50 mg DTT)，平衡約 12~15 min 後，再放入 5 mL SDS 平衡緩衝液 (加有 125 mg iodoacetamine) 平衡約 12~15 min，接著進行 SDS 電泳分析。將預先鑄好的 SDS 膠片從冰箱中取出，待其冷卻後再進行電泳檢測，先在膠體上層放入 SDS running buffer，使 strip 較好放入；strip 放入後檢查 strip 和 SDS 膠片中間是否有氣泡，若有氣泡必須趕走，最後吸出 running buffer 以 agar 進行封膠並使 strip 固定。將 agarose 放入微波爐中溶解，吸取約 1 mL agarose 進行封膠，agarose 的溫度不可高於 60°C。將上述處理好的膠體放入電泳槽，固定電壓 200 V 進行電泳約 4 h。

膠體內蛋白酶水解質譜儀蛋白質定序

SDS-PAGE 經 Coomassie Blue 染色 (CBR) 後, 以二次水清洗二次, 每次 2 h。將目標蛋白從膠片割下, 放入離心管中, 濃度需約 100 pmol。置於 100 μ L 10 mM DDT/25 mM ammonium bicarbonate, pH 8.5 緩衝溶液中, 在 37°C 下反應 1 h, 使雙硫鍵還原。10,000 rpm 離心 1 min 以去除 DTT。加入 100 μ L 100 mM iodoacetamide (IAA)/25 mM ammonium bicarbonate, pH 8.5 緩衝溶液, 於室溫避光反應 1 h。10,000 rpm 離心 1 min 以去除 DTT。加入脫色液 (25 mM NH_4HCO_3 , 50% CH_3CN), 於 30°C 反應 15 min, 重複兩次。以二次水清洗兩次, 以去除 CBR, 最後以 SpeedVac 抽乾。加入含有 0.1 μ g trypsin 之酵素緩衝液 10 μ L (25 mM NH_4HCO_3 , 0.5 mM CaCl_2), 水解反應 10 min。加入 100 μ L 酵素緩衝液, 於 37°C 下反應過夜。收集萃取液於離心管, 加入 200 μ L 萃取溶液 (0.1% TFA, 60% CH_3CN)。在 35~40°C 下超音波 30 min, 收集萃取液於離心管中。用 SpeedVac 抽乾, 最後以 20 μ L 甲酸回溶。以 LC/MS/MS 質譜儀直接進行蛋白質序列的分析, 然後與基因體資料庫比對, 可得知此未知蛋白質色點的身分。

結果與討論

以聚合酶鏈鎖反應基礎之扣除雜交法找出台灣的 V-factor-dependent *H. paragallinarum* 血清型 A 及 C 之基因片段差異

本研究以聚合酶鏈鎖反應基礎之扣除雜交法為找出血清型 A 及 C 之基因差異的片段, 並為確認此法所找出之基因片段確實為血清型 A 及 C 所帶有之不同基因片段, 南方墨點轉漬法將可確認其在染色體上的位置, 以確認此法找出之基因片段指在血清型 A 或 C 出現。以台灣分離之 *H. paragallinarum* 血清型 A 及 C 之 chromosomal DNA 製作刪減基因庫 JA-JC (血清型 A 特異之基因庫) 與 JC-JA (血清型 C 特異之基因庫); 各取 96 個菌落經 BLAST 其序列後, 於 JA-JC 刪減基因庫中挑選 7 個 (表一) 及 JC-JA 刪減基因庫中挑選 3 個 (表二) 與致病力相關之 DNA 片段, 利用南方墨點法確認其血清型之特異性。其中兩段於血清型 A 型特有之 DNA 片段, 分別為 *hctC* 與 putative transposase (圖一)。

H. paragallinarum 的致病機轉到目前為止仍不清楚, 近年來曾經被提出討論的有 *hctABCD*, 可能負責為 *H. paragallinarum* 運送莢膜多糖到細胞表面(12); 一個 110 KDa putative RTX (Repeats in toxin) protein (17) 及 haemagglutinin 蛋白(14) 為 antigenic secreted protein。細部的致病機轉仍有待進一步研究。而大部分有關 HP 的論文發表集中在如何改善疫苗效益, 不同血清型間的交叉保護作用及更方便且準確的血清型檢測方式, 但並無突破性的發展。本研究針對台灣流行的依賴 V 因子之 *H. paragallinarum* 血清型 A 型及 C 型做系統性的比較, 以為進一步改善 *H. paragallinarum* 的疫苗效益, 不同血清型間的交叉保護作用及更方便的血清型檢測方式之基石, 本研究即以刪減基因庫的方式, 由 A 型減 C 型之刪減基因庫中得到二段對血清型 A 型特異性之 DNA 片段, 分別為 HctC 及 putative transposase。其中, HctC 與運送莢膜多醣到細胞表面有關, 由於 HP 菌的分型以表面蛋白為主, 因此, HctC 可能與運送 A 型或 C 型特有之莢膜多醣到細胞表面有關, 故此 DNA 片段將極有可能提供更方便且準確的 *H. paragallinarum* 血清型檢測方式。

以二維電泳的方式比較台灣的 V-factor-dependent *H. paragallinarum* serogroup A 及 C 菌株表現蛋白質圖譜的差異

本研究以分析兩型的菌株在二維電泳上表現蛋白的不同, 並針對不同之蛋白質進行序

列分析，以確定差異蛋白之種類。我們亦比較兩型菌株於缺鐵環境下所表現之蛋白質體差異，用以模擬感染動物體內之環境（表三及表四、圖二及三）。

在缺鐵環境中，A 型及 C 型菌體均會表現較多之 molecular chaperone(DnaK)及 cysteine synthase (CysK)。CysK 已經證實在可致病之菌株中表現量較高。此外 fumarate reductase 及 PolII 也受缺鐵影響表現較高。而含鐵的狀況下很意外的發現 HSP70 的表現量增高，而 translation elongation factor Tu，hemagglutinin antigen 與 OmpA 在含鐵的環境中之表現量均較高。

我們將以兩個方向分析血清型 A 及 C 之差異，是否血清型 A 及 C 在基因型上已經顯示其不同，抑或在蛋白質的表現型上顯示差異。此項研究工作之完成將可有助於了解 *H. paragallinarum* 的分子機轉，並進一步改善 *H. paragallinarum* 的疫苗效益，不同血清型間的交叉保護作用及更方便的血清型檢測之方式，對 *H. paragallinarum* 在台灣引起之傳染性可利查(Infectious Coryza, IC) 的防治及診斷有實質上的效益。

表一 JA-JC 刪減基因庫 DNA 序列比對結果

Clone	Protein Description
D11	Putative transposase,
D7	hctC
B9	conserved hypothetical protein
B8	<i>hrpA</i> — ATP-dependent helicase
C6	H-18 putative transposase
B5	<i>recG</i> — ATP-dependent DNA helicase
A1	<i>ugpQ</i> — Glycerophosphoryl diester phosphodiesterase

表二 JC-JA 刪減基因庫 DNA 序列比對結果

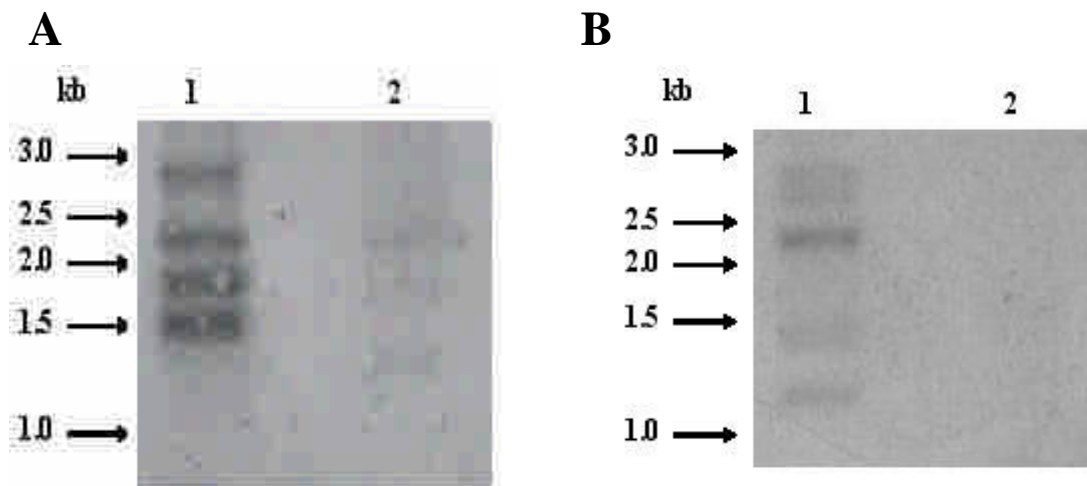
Clone	Protein Description
h1	<i>tyrS</i> — tyrosyl-tRNA synthetase
h4	<i>ccmF</i> — Cytochrome c biogenesis factor
h2	<i>tyrS</i> — tyrosyl-tRNA synthetase

表三 血清型 A 型經正常培養及限鐵培養 (A-) 後之蛋白質以二維電泳經 CBR 染色取下顯示差異之蛋白質點進行 LC/MS/MS 質譜分析之結果

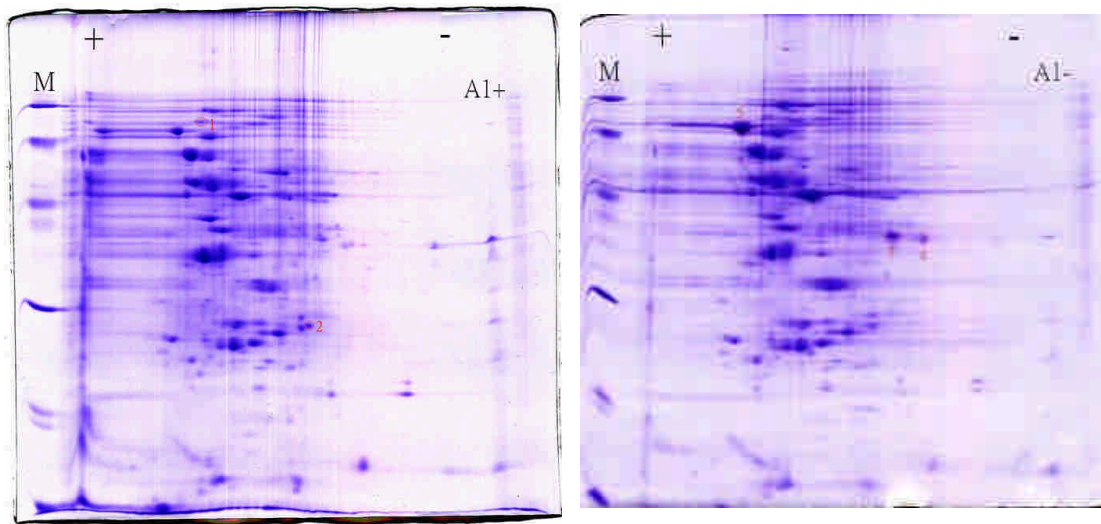
No.	Accession No.	Protein Description	Theoretical	MOWSE score
A-3	gi15603558	CysK [<i>Pasteurella multocida</i> subsp.	33492/6.05	90
A-5	gi23466914	COG0443: Molecular chaperone	68490/4.80	646

表四 血清型 C 型經正常培養 (C+) 及限鐵培養 (C-) 後之蛋白質以二維電泳經 CBR 染色取下列顯示差異之蛋白質點進行 LC/MS/MS 質譜分析之結果

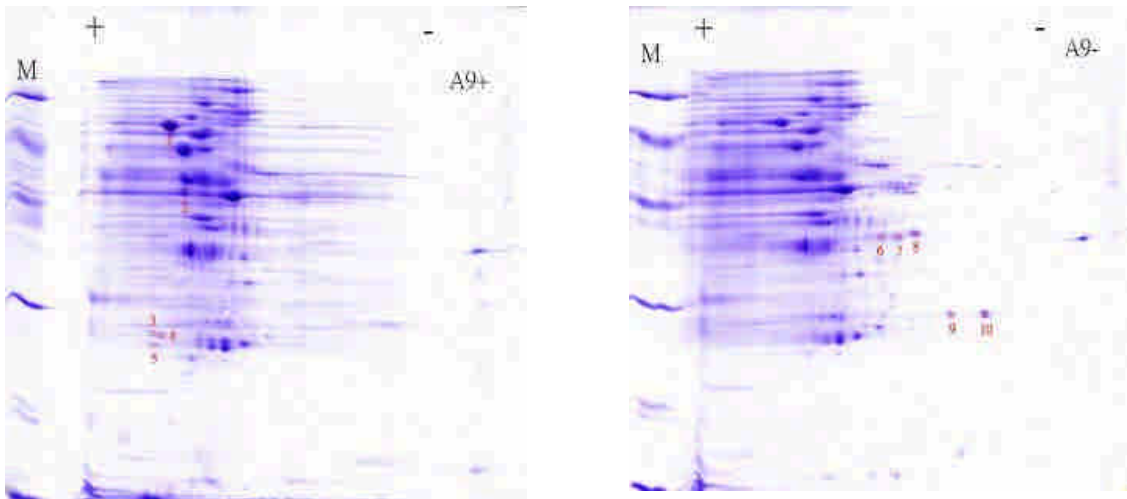
No.	Accession No.	Protein Description	Theoretical	MOWSE score
C+1	gi52424953	DnaK protein [Mannheimia	69481/ 4.81	418
C+2	gi16272575	elongation factor Tu [Haemophilus influenzae	43441/5.26	203
C+3	gi19881365	hemagglutinin antigen [Haemophilus	36785/8.62	129
C+5.1	gi19881365	hemagglutinin antigen [Haemophilus	36785/8.62	157
C+5.2	gi97129	outer membrane protein OmpA homolog - Actinobacillus actinomycetemcomitans	1309/8.64	75
C-6	gi52425825	CysK protein [Mannheimia succiniciproducens	33578/6.47	90
C-7	gi52425825	CysK protein [Mannheimia succiniciproducens	33578/6.47	86
C-8	gi52842262	ABC transport system periplasmic substrate binding protein [Legionella pneumophila	33052/9.02	23



圖一：南方墨點法確認刪減基因庫之結果。結果其兩 DNA 片段均僅辨識血清型 A 型之 chromosome，顯示其具有血清型 A 型特異性。(A) 以 *hctC* 基因之片段為探針，(B) 以 putative transposase 基因之片段為探針。Lane 1：血清型 A 型之 chromosomal DNA，Lane 2：血清型 C 型之 chromosomal DNA。



圖二：血清型 A 型 (A1) 經正常培養 (A1+) 及限鐵培養 (A1-) 後之蛋白質以二維電泳分析經 CBR 染色之結果。



圖三：血清型 C 型 (A9) 經正常培養 (A9+) 及限鐵培養 (A9-) 後之蛋白質以二維電泳分析經 CBR 染色之結果。

參考文獻

1. Blackall, P. J. 1991. An evaluation of the cross-protection afforded by inactivated infectious coryza vaccines. *Aust Vet J* 68:266-7.
2. Blackall, P. J. 1988. Further comparison of adjuvants for an inactivated infectious coryza vaccine. *Avian Dis* 32:831-5.
3. Blackall, P. J. 1999. Infectious coryza: overview of the disease and new diagnostic options. *Clin Microbiol Rev* 12:627-32.
4. Blackall, P. J., L. E. Eaves, and G. Aus. 1990. Serotyping of *Haemophilus paragallinarum* by the Page scheme: comparison of the use of agglutination and

- hemagglutination-inhibition tests. *Avian Dis* 34:643-5.
5. Blackall, P. J., L. E. Eaves, and D. G. Rogers. 1990. Proposal of a new serovar and altered nomenclature for *Haemophilus paragallinarum* in the Kume hemagglutinin scheme. *J Clin Microbiol* 28:1185-7.
 6. Blackall, P. J., L. E. Eaves, D. G. Rogers, and G. Firth. 1992. An evaluation of inactivated infectious coryza vaccines containing a double-emulsion adjuvant system. *Avian Dis* 36:632-6.
 7. Blackall, P. J., E. N. Silva, T. Yamaguchi, and Y. Iritani. 1994. Characterization of isolates of avian haemophili from Brazil. *Avian Dis* 38:269-74.
 8. Bragg, R. R. 2002. Isolation of serovar C-3 *Haemophilus paragallinarum* from Zimbabwe: A further indication of the need for the production of vaccines against infectious coryza containing local isolates of *H. paragallinarum*. *Onderstepoort J Vet Res* 69:129-32.
 9. Bragg, R. R. 2002. Virulence of South African isolates of *Haemophilus paragallinarum*. Part 1: NAD-dependent field isolates. *Onderstepoort J Vet Res* 69:163-9.
 10. Bragg, R. R. 2002. Virulence of South African isolates of *Haemophilus paragallinarum*. Part 2: naturally occurring NAD-independent field isolates. *Onderstepoort J Vet Res* 69:171-5.
 11. Bragg, R. R., L. Coetzee, and J. A. Verschoor. 1997. Effects of growth conditions and incubation times on the expression of antigens of *Haemophilus paragallinarum* which are detected by monoclonal antibodies. *Onderstepoort J Vet Res* 64:57-63.
 12. De Smidt, O., J. Albertyn, R. R. Bragg, and E. Van Heerden. 2004. Genetic organisation of the capsule transport gene region from *Haemophilus paragallinarum*. *Onderstepoort J Vet Res* 71:139-52.
 13. Fukanoki, S., K. Matsumoto, H. Mori, and R. Takeda. 2000. Relationship between antigen release and antibody response of infectious coryza water-in-oil-in-water emulsion vaccines. *Avian Dis* 44:869-73.
 14. Hobb, R. I., H. J. Tseng, J. E. Downes, T. D. Terry, P. J. Blackall, M. Takagi, and M. P. Jennings. 2002. Molecular analysis of a haemagglutinin of *Haemophilus paragallinarum*. *Microbiology* 148:2171-9.
 15. Jacobs, A. A., K. van den Berg, and A. Malo. 2003. Efficacy of a new tetravalent coryza vaccine against emerging variant type B strains. *Avian Pathol* 32:265-9.
 16. Kume, K., A. Sawata, T. Nakai, and M. Matsumoto. 1983. Serological classification of *Haemophilus paragallinarum* with a hemagglutinin system. *J Clin Microbiol* 17:958-64.
 17. Mena-Rojas, E., C. Vazquez Cruz, S. Vaca Pacheco, O. Garcia Gonzalez, V. M. Perez-Marquez, A. Perez-Mendez, J. Ibarra-Caballero, M. de la Garza, E. Zenteno, and E. Negrete-Abascal. 2004. Antigenic secreted proteins from *Haemophilus paragallinarum*. A 110-kDa putative RTX protein. *FEMS Microbiol Lett* 232:83-7.
 18. Mifflin, J. K., X. Chen, R. R. Bragg, J. M. Welgemoed, J. M. Greyling, R. F. Horner,

- and P. J. Blackall. 1999. Confirmation that PCR can be used to identify NAD-dependent and NAD-independent *Haemophilus paragallinarum* isolates. *Onderstepoort J Vet Res* 66:55-7.
19. Miflin, J. K., R. F. Horner, P. J. Blackall, X. Chen, G. C. Bishop, C. J. Morrow, T. Yamaguchi, and Y. Iritani. 1995. Phenotypic and molecular characterization of V-factor (NAD)-independent *haemophilus paragallinarum*. *Avian Dis* 39:304-8.
 20. Mouahid, M., M. Bisgaard, A. J. Morley, R. Mutters, and W. Mannheim. 1992. Occurrence of V-factor (NAD) independent strains of *Haemophilus paragallinarum*. *Vet Microbiol* 31:363-8.
 21. Page, L. A. 1962. *Haemophilus* infections in chickens. 1. Characteristics of 12 *Haemophilus* isolates recovered from diseased chickens. *Am J Vet Res* 23:85-95.
 22. Page, L. A., A. S. Rosenwald, and F. C. Price. 1963. *Haemophilus* infections in chickens. IV. Results of laboratory and field trials of formalinized bacterins for the prevention of disease caused by *Haemophilus gallinarum*. *Avian Dis* 7:239-56.
 23. Reid, G. G., and P. J. Blackall. 1987. Comparison of adjuvants for an inactivated infectious coryza vaccine. *Avian Dis* 31:59-63.
 24. Sandoval, V. E., H. R. Terzolo, and P. J. Blackall. 1994. Complicated infectious coryza outbreaks in Argentina. *Avian Dis* 38:672-8.
 25. Soriano, E. V., M. L. Garduno, G. Tellez, P. F. Rosas, F. Suarez-Guemes, and P. J. Blackall. 2004. Cross-protection study of the nine serovars of *Haemophilus paragallinarum* in the Kume haemagglutinin scheme. *Avian Pathol* 33:506-11.
 26. Terzolo, H. R., F. A. Paolicchi, V. E. Sandoval, P. J. Blackall, T. Yamaguchi, and Y. Iritani. 1993. Characterization of isolates of *Haemophilus paragallinarum* from Argentina. *Avian Dis* 37:310-4.
 27. Zhang, P., P. J. Blackall, T. Yamaguchi, and Y. Iritani. 1999. A monoclonal antibody-blocking enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of serovar-specific antibodies to *Haemophilus paragallinarum*. *Avian Dis* 43:75-82.
 28. Zhang, P., P. J. Blackall, T. Yamaguchi, and Y. Iritani. 2000. Production and evaluation of a panel of monoclonal antibodies against *Haemophilus paragallinarum*. *Vet Microbiol* 76:91-101.