

以即時 RT-PCR 快速檢測牛流行熱病毒

丁履紉*、李敏旭、李淑慧
行政院農業委員會家畜衛生試驗所

摘要

針對牛流行熱 G 糖蛋白基因設計一組引子，應用 SYBR Green I 即時 RT-PCR 快速診斷本病。將牛流行熱病毒 RNA 連續 10 倍稀釋，分別以傳統 RT-PCR、巢式 PCR 與即時 RT-PCR 來檢測，比較三者敏感性差異，結果分別為 100 pg/ μ L、100 fg/ μ L、1 pg/ μ L，以巢式 PCR 敏感性最高，即時 RT-PCR 次之，傳統 RT-PCR 敏感度性最差。模擬病毒血症的血液檢體，以本試驗可以檢測出病毒力價極限為 $10^{4.0}$ TCID₅₀/mL。另外，72 個送檢之疑似病例檢體，分別以上述三種 PCR 方法及病毒分離法來檢測，結果即時 RT-PCR 檢出率與巢式 PCR 同為 19.04% (14/72)，比傳統 RT-PCR 12.8% (8/72) 和分離法 18.06% (13/72) 檢出率為高。以上結果顯示 SYBR green I 即時 PCR 方法的建立，可作為臨床實驗室檢驗牛流行熱的一個新工具。

關鍵字：牛流行熱，即時 RT-PCR，SYBR Green I

緒言

牛流行熱 (bovine ephemeral fever) 又稱暫時熱，病原為桿狀病毒科 (Rhabdoviridae) 的牛流行熱病毒 (BEFV)，經由 Culicoides 庫蠅、Anopheles 蚊和 Culicine 蠅蚊

等昆蟲媒介傳染，流行地區包括非洲、亞洲、中東及大洋洲等地 [3, 4, 5, 16]。主要症狀包括有雙波或多波發熱、顫抖、食慾不佳、眼、鼻有分泌物、流涎、呼吸困難、瘤胃鼓脹、抑鬱、跛足、僵硬及產乳量突然降低等 [8, 14, 15]。亞熱帶地區發生季節約為夏天至早秋，通常 6 個月至 2 歲齡牛隻最易受感染而發病 [17]。牛流行熱病毒的基因體為負股的單股 RNA，具有 5 個結構性蛋白包括核蛋白 (N)、聚合酶相關蛋白 (P)、基質蛋白 (M)、大核糖核酸酶 (L) 和表面糖蛋白 (G) [20]。G 糖蛋白分子量約 81 kDa 為第一型的膜糖蛋白，含有型別特異性和中和性抗原決定位 [6]，能激發牛隻產生保護性免疫

[9]。以中和性單株抗體 (MAbs) 和抗中和性的單株抗體突變株，兩者以交叉競爭性結合試驗，結果可證實 G 糖蛋白上有四個完整的中和抗原決定位分別為 G1、G2、G3 和 G4 [5]。雖然目前似乎全世界僅存在一種牛流行熱血清型，但根據 Cybinski 比對分析許多澳洲分離株和大陸分離株，其認為某些分離株在抗原性的部份還是有一些改變 [7]。7 株台灣牛流行熱分離株的 G 糖蛋白基因片段，進行多序列比對及親緣樹分析，結果顯示可分為兩群，1983 年至 1989 年為一群；1996 年至 2002 為另一基因群 [21]。血清交叉中和試驗結果顯示，1996 至 2001 年的分離株與 1983 年疫苗株應該屬於不同亞型，但仍為同一血清型 [11]。

臺灣曾於 1967 年、1983 至 1984 年、1989 至 1990 年、1996 年、1999 年、2001 年、2002 年和 2004 爆發過 8 次疫情，皆造成相當大的經濟損失 [1, 2, 4, 21, 13]。自 1984 年起使用疫苗免疫政策來防範疾病的發生，1999 年之

*抽印本索取作者
行政院農業委員會家畜衛生試驗所

後的疾病流行形態從週期性爆發大流行轉變成小規模多處或單處散發疫情，但是間歇期漸漸縮短為 2 至 3 年一次[12]。目前本病的診斷方法主要以發熱前期或初期的抗凝血液以 RT-PCR 初步鑑定，並以細胞株盲目繼代分離、哺乳小鼠腦內接種分離等病原檢測方法，或是以配對血清抗體陽轉或各種的血清學試驗[2]。即時定量 PCR (real-time quantitative PCR) 是一種改良自傳統 PCR 的新技術，它利用帶有螢光的探針 (probe) 或是可與 DNA 結合的螢光染劑 (例如 SYBR green I) 在 PCR 的增幅過程中不斷地嵌入產物當中，並以電腦即時地偵測螢光訊號的強度來反映 PCR 產物累積的程度，繼而分析螢光強度與 PCR 循環數的關係，再與已知量的標準 DNA 相比較，將模板中所含的 DNA 進行定性與定量分析 [10,18,19]。本研究的目的便是藉由即時定量 PCR 的方法，以牛流行熱病毒當作模板 RNA，藉此瞭解是否可以應用於臨床檢體，希望達到快速診斷病例的功效，並憑著此法的高感性對病毒的檢出率有所提昇。

材料與方法

病毒株增殖與純化與 RNA 萃取：牛流行熱病毒雲林株 (2001-YL) 是 2001 年發病牛隻之血液所分離，先於幼倉鼠腎臟細胞 (baby hamster kidney cell, BHK-21) 增殖 7 代，收獲後測定力價約為 $10^{7.0}$ TCID₅₀/mL。病毒先以 BHK-21 細胞株大量增殖後，細胞液加入 2.2% NaCl 和 8% PEG-6000 濃縮後，溶於 1/100 原體積之 Tris-HCl, pH 8.0 溶液，加入等量之 Freon 113 處理後，以 14,000 rpm 離心 20 分鐘收集上清液，再以蔗糖梯度超高速離心純化病毒供試驗用[6]。取 200 μ L 經超高速離心純化之病毒液置入樣本微量管中，再以 MagRNA 自動核酸萃取機 (Roche) 自動萃取核酸，操作步驟如儀器操作說明。

即時 RT-PCR 試驗

G 糖蛋白相似性分析及即時 PCR 引子設計：參考目

前已發表在 GenBank 中牛流行熱之序列，以 DNASTAR 軟體分析其核酸相似性，選取基因無變異區段的序列，利用 Lightcycler probe design 軟體，設計 2 組特異性引子用以合成片段的 G 糖蛋白基因，其引子序列如下：順向引子 BEF 1573F 5' -GGTGCAATAGTCACAACG 和 BEF1633F 5' -GGTGCAATAGTCACAACG；逆向引子為 BEF1850R 5' -TCACCGATTGGTTTACTCC 和 BEF1790R 5' -TCACCGATTGGTTTACTCC。設計出引子再以 BLAST 軟體分析其特異性 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)。

試劑方法與反應條件：本研究使用 Roche LightCycler 1.0 之儀器並配合 SuperScript™ III Platinum® SYBR Green One-Step qRT-PCRsuperMix with BSA 試劑。PCR 反應總體積為 20 μ L，內含 6.6 μ L DEPC-H₂O、0.4 μ L MgCl₂ stock solution (最終為 4 mM)、5 μ M 之順向和逆向引子各 2 μ L (最終為 0.5 μ M)、8 μ L 2X SYBR Green Reaction Mix with BSA Lightcycler FastStart DNA Master SYBR Green I reagent 以及 1 μ L 模板 RNA。反應條件為 (1) 反轉錄反應：50°C 3 分鐘 (2) 變性反應：95°C 2 分鐘；(3) 循環反應：95°C 3 秒，60°C 3 秒，72°C 6 秒進行 45 個循環；(4) 配對溫度反應：95°C 0 秒，55°C 10 秒後，以每秒升高 0.1°C 的速率慢慢加溫至 95°C 10 秒；(5) 冷卻反應：40°C 0 秒。反應總時間約 27 分鐘。反應結束後可立刻由電腦分析其 Cp 值 (crossing point) 與 Tm 曲線 (melting curve) 的頂點溫度值判定結果。

RT-PCR 和巢式 (Nested PCR) 檢測方法

試驗所需之引子序列如下：Ggp 442 F 為 5' -GTCCTAATACAACAYAAGCC-3'；Ggp 1045 R 為 5' -CTTGCCAACTTGTTTGTCTCA-3'。取一 0.2 mL 離心管依序加入下項：5 μ L RNA template、61.5 μ L DEPC-DDW、5 μ L 10X prozyme buffer (Protech)、4 μ L dNTP (1.25 mM)、5 μ L 順向引子 (4 μ M)、5 μ L 逆向引子 (4 μ M)、ribonuclease inhibitor (40 U / μ L,

promega)、AMV reverse transcriptase (9 U/ μ L, promega)、0.5 μ L prozyme™ (1U/ μ L) 反應總體積為 50 μ L。循環加熱器設定時間和溫度反應條件為 42°C 40 分鐘、95°C 2 分鐘、95°C 40 秒, 50°C 40 秒, 72°C 40 秒, 總共 35 個循環, 最後 72°C 6 分鐘。合成的 DNA 產物, 可再接著進行巢式 PCR, 其所需之引子序列如下: Ggp 617 F 為 5' -GCAAACATTGGGAATGCATTAC -3' ; Ggp 785 R 為 5' -TATACTCCACCATTCTCCAT -3'。取一 0.2 mL 離心管依序加入下項: 2 μ L RT-PCR 產物、27 μ L DEPC-H₂O、5 μ L 10X prozyme buffer (protech)、5 μ L dNTP (0.5 mM)、5 μ L 順向引子 (4 μ M)、5 μ L 逆向引子 (4 μ M)、0.5 μ L prozyme™ (1U/ μ L) 反應總體積為 50 μ L。循環加熱器設定時間和溫度反應條件為 95°C 2 分鐘、95°C 30 秒, 50°C 30 秒, 72°C 30 秒, 總共 35 個循環, 最後 72°C 6 分鐘。反應總體積為 50 μ L。循環加熱器設定時間和溫度反應條件為 42°C 40 分鐘、95°C 2 分鐘、95°C 40 秒, 50°C 40 秒, 72°C 40 秒, 總共 35 個循環。

即時 RT-PCR 敏感性試驗: 純化的牛流行熱病毒以上述自動萃取儀的方法萃取之病毒 RNA 將濃度調整為 10 ng/ μ L, 將該 RNA 以 10 倍的序列稀釋至 1 fg/ μ L 後, 進行即時 RT-PCR 分析, 利用電腦計算出各稀釋倍數所得之 Cp 值與其所代表之粗估病毒 RNA 量的相關曲線。另外, 牛流行熱病毒液以牛隻抗凝血液連續 10 倍稀釋成 10^{6.0} 至 10^{2.0} TCID₅₀/mL 5 個稀釋階, 模擬病毒血症的血液檢體, 分別萃取總 RNA 後進行即時 RT-PCR 分析, 利用電腦計算出各稀釋倍數所得之 Cp 值與其所代表之粗估病毒 RNA 量的相關曲線。

比較即時 RT-PCR 與其它檢測方法之敏感性及檢出率: BEFV RNA 由 10 ng/ μ L 以 10 倍的序列稀釋至 1 fg/ μ L 後, 分別依上述實驗方法進行傳統 RT-PCR、巢式 RT-PCR、即時 RT-PCR 方法比較不同方法之敏感性。同時, 疑似 BEF 病例之臨床血液或臟器乳劑 72 件, 分別以上述 3 種 RT-PCR 方法和病毒分離法, 比較檢出率之高低。

結果

兩組引子的敏感性比較: 牛流行熱病毒 RNA 以 1573F / 1850R 和 1633F / 1790R 引子進行即時 PCR 分析 (圖 1), 顯示 2 組皆有陽性的螢光訊號產生, 且 T_m 曲線的頂點溫度約在 76.75 ± 0.55°C 的區間, 1573F / 1850R 引子組可以檢測到最低量 1 pg 病毒 RNA, 1633F / 1790R 引子組可以檢測到最低量僅 10 pg 病毒 RNA, 故 1573F / 1850R 引子組敏感性比較高。將即時 PCR 的產物以洋菜膠電泳分析, 也有預期 278 bp 和 158 bp 分子量的 DNA 片段。

即時 RT-PCR 試驗之半定量線性區間: 將一系列 10 倍序列稀釋的病毒 RNA 檢體以 1573F / 1850R 引子進行即時 RT-PCR 分析。顯示 Cp 值介於 14.08 至 27.22 之間, 其線性關係涵蓋 5 個 10 倍稀釋區間, 分析其標準曲線的結果, 以 RNA 濃度與 Cp 值的圖形呈現如圖 2, 本次實驗的 R² 值為 0.96。

對照每一稀釋倍數 RNA 計算後的結果, 得出本方法半定量的準確區間約在 1 pg ~ 10 ng 每一 PCR 反應。引子二聚體 (dimers) 的 T_m 曲線的頂點溫度約在 71.70~72.46°C 的區間, 產物的 T_m 曲線的頂點溫度約在 76.19~77.27°C 的區間 (圖 3), 將 PCR 陽性的產物以洋菜膠電泳分析, 也有預期之 278 bp 的 DNA band, 而產物進一步以定序試驗確認核酸序列無誤。

將牛流行熱病毒 RNA 連序 10 倍稀釋分別以傳統 RT-PCR、巢式 PCR 與即時 RT-PCR 來檢測, 比較其檢測極限差異。結果即時 RT-PCR 偵測病毒極限保守估計為 1 pg/ μ L, 雖較傳統 RT-PCR 敏感性性高出 100 倍, 但比巢式 PCR 敏感性低 10 倍 (如表 1)。分別依上述實驗方法進行牛流行熱病毒液以牛隻抗凝血液連續 10 倍稀釋從 10^{6.0} 至 10^{2.0} TCID₅₀/mL 5 個稀釋階, 模擬病毒血症的血液檢體。分別萃取總 RNA 後進行即時 RT-PCR 分析, 可以檢測到最低量為 10^{4.0} TCID₅₀/mL 病毒 RNA (圖 4)。72 個臨床檢體分別以上述三種 PCR 方法及病毒分

離法來檢測，結果即時 RT-PCR 檢出率與巢式 PCR 相同為 19.04% (14/72)，比傳統 RT-PCR 12.8% (8/72) 和分離法 18.06% (13/72) 檢出率為高。

討論

臨床上應用 PCR 偵測病原核酸的檢測方式已慢慢地被接受與應用，因為無論是死病原或是不易培養之病原只要其基因體仍存在，皆可以被偵測出來，故可以彌補傳統分離方法的不足。而即時定量 PCR 近一年來應用在節肢動物媒介病毒性疾病診斷的文獻陸續報導[10, 19]，此方法優於傳統 PCR 在於它可以電腦即時地分析而省去傳統 PCR 需要再進行洋菜膠電泳的步驟，既省時也可以避免跑電泳時 DNA 的污染，而且利用電腦來分析螢光強度的敏感度比以肉眼判讀洋菜膠上的 DNA 強度高出許多。因此即時 PCR 已慢慢成為未來檢驗技術的新趨勢。

在建立序列稀釋的標準曲線時， 10×10^{-4} ng~ 10×10^{-8} ng 的 5 個 Cp 值具有線性關係，結果顯示可以檢測病毒 RNA 之極限為 10×10^{-8} ng。依據 Stram 等人[14]提出的病毒基因體計算方法來估算，每個 BEFV 基因體之分子量為 $(523 \times 350) / 6.022 \times 10^{23} = 3.04 \times 10^{-19} = 3.04 \times 10^{-10}$ ng。本方法的偵測極限為 10×10^{-8} ng 換算其敏感性約為 300 個基因體。

牛流行熱的診斷方法主要以發熱前期或初期的抗凝血液以傳統 RT-PCR 和巢式 PCR 初步鑑定，再以細胞株盲目繼代分離病毒來確診。72 個臨床檢體分別以上述三種 PCR 方法及病毒分離法來檢測，結果即時 RT-PCR 檢出率與巢式 PCR 相同為 19.04% (14/72)，比傳統 RT-PCR 12.8% (8/72) 和細胞株分離法 18.06% (13/72) 檢出率為高。統計 14 件即時 RT-PCR 陽性檢體的 Cp 值，得出範圍在 21.11~30.10 之間，並以洋菜膠電泳分析每一個判定為陽性的產物後均發現含有 278 bp 的 DNA，故應用 SYBR green I 即時 RT-PCR 的判定標準為 (1) 檢體的 Cp 值小於 30.10 和 (2) Tm 曲

線的頂點值約在 76.19~77.27°C 的區間時，可直接判定為牛流行熱陽性。

利用 Roche LightCycler SYBR Green I 的系統，45 個 PCR 循環加上 Cp 值和 Tm 曲線的鑑定過程在 30 分鐘內就可以得到結果，足足比傳統 RT-PCR 節省了 3 小時以上的時間，不僅於檢體量爆增或是有大流行爆發時可做為快速篩檢之用，並省去等待病毒分離的時間，可以提早將檢驗結果提供給送檢單位參考給予適當防範措施。故 SYBR green I 即時 PCR 方法的建立，可作為臨床實驗室檢驗牛流行熱的一個新工具。

以即時RT-PCR 快速檢測牛流行熱病毒

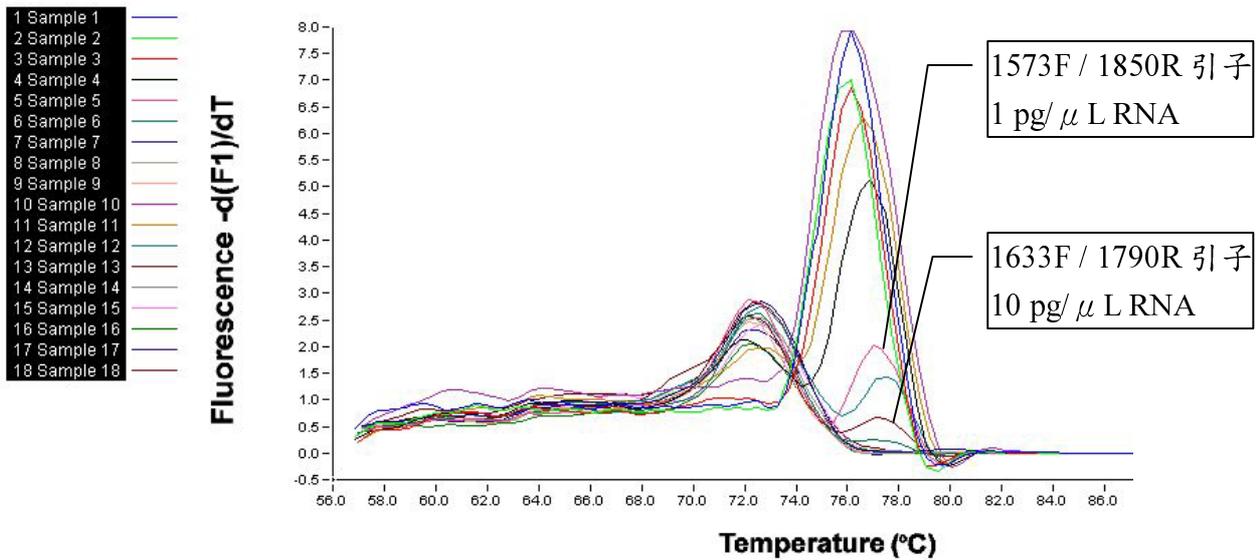


圖 1、兩組引子的即時 RT-PCR 反應結果。Sample 1~9 為 1573F / 1850R 引子檢測病毒 RNA 一系列 10 倍序列稀釋的病毒 RNA (10 ng 至 1 fp)；Sample 10~18 為 1633F / 1790R 引子檢測病毒 RNA 一系列 10 倍序列稀釋的病毒 RNA (10 ng 至 1 fp)

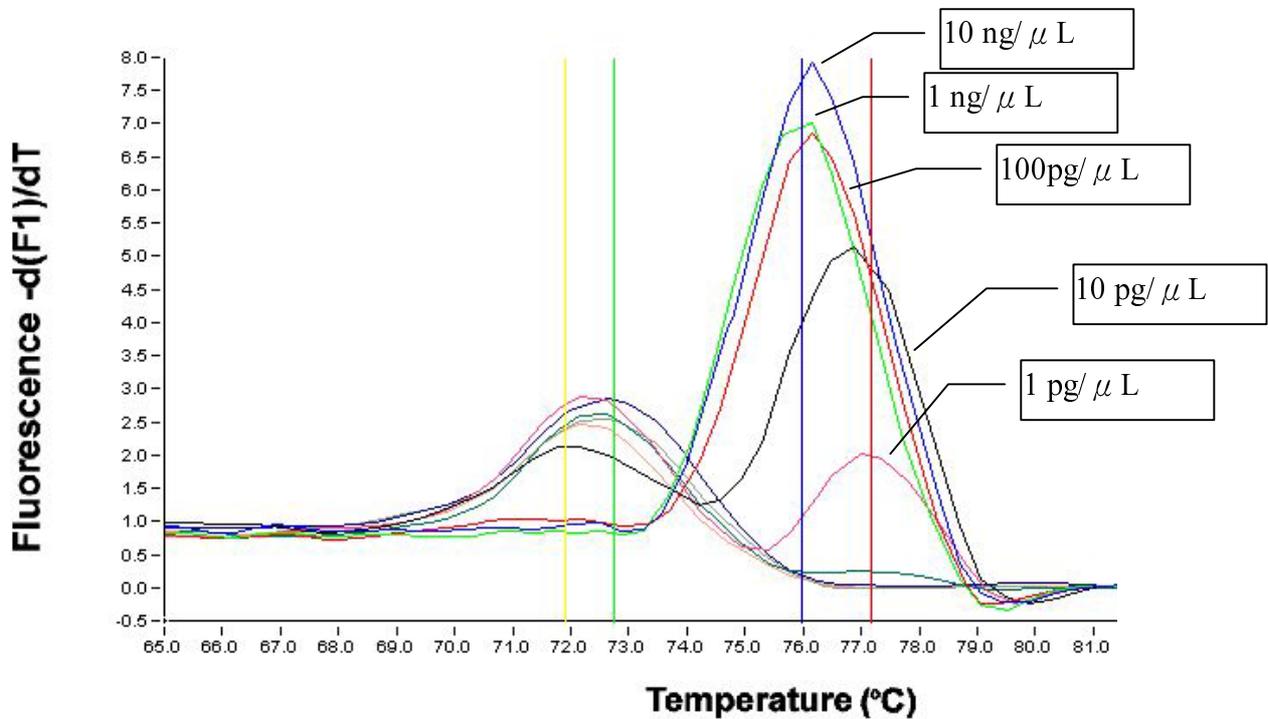


圖 2、牛流行熱病毒 SYBR Green I 定量 RT-PCR 實驗。將病毒 RNA 10 倍序列稀釋 (10 ng 至 1 fp) 以 1573F / 1850R 引子進行即時 RT-PCR，分析其 melting curve 的結果。

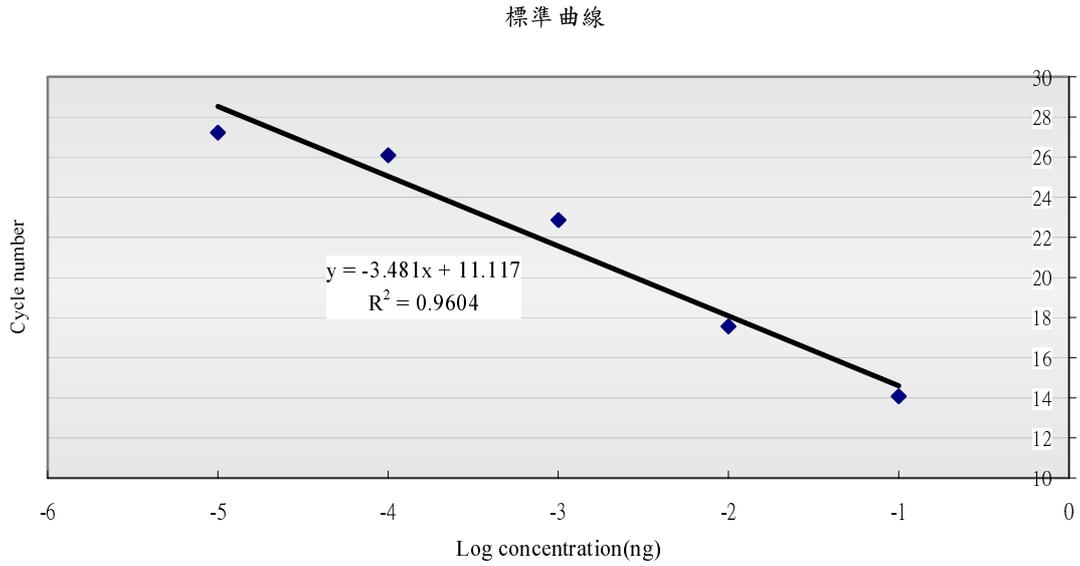


圖 3、牛流行熱病毒 SYBR Green I 定量 RT-PCR 實驗。將病毒 RNA 10 倍序列稀釋 (10 ng 至 1 fp) 以 1573F / 1850R 引子進行即時 RT-PCR 其標準曲線的結果。

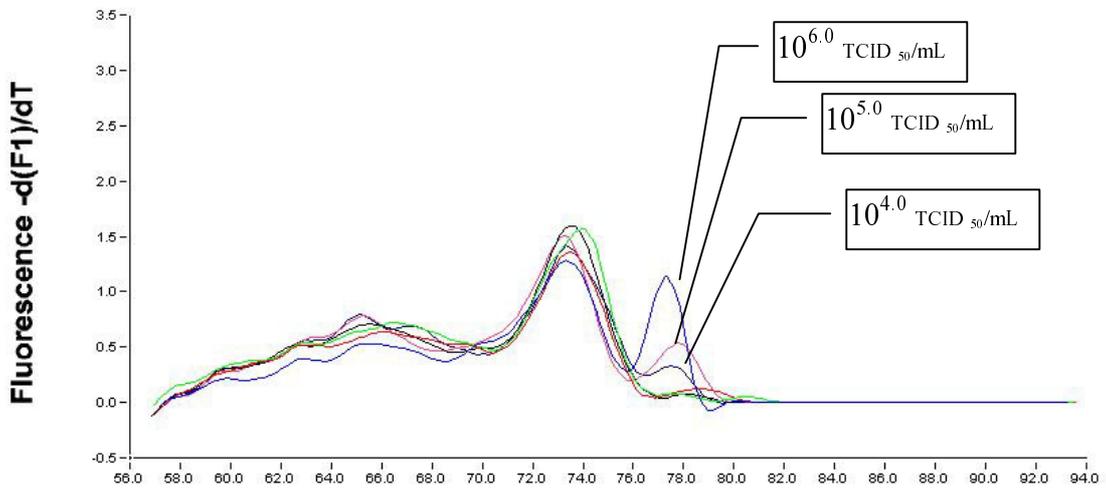


圖 4、模擬病毒血液病毒力價從 10^{6.0} TCID₅₀/mL 10 倍遞減至 10^{2.0} TCID₅₀/mL，分別進行 SYBR Green I RT-PCR 實驗結果。

表1、傳統RT-PCR、巢式RT-PCR與即時RT-PCR檢測極限試驗

BEFV RNA	傳統RT-PCR	巢式RT-PCR	即時RT-PCR
10 ng	+	+	+
1 ng	+	+	+
100 pg	+	+	+
10 pg	-	+	+
1 pg	-	+	+
100 fg	-	+	-
10 fg	-	-	-
1 fg	-	-	-

表2、臨床檢體以傳統RT-PCR、巢式RT-PCR、即時RT-PCR與細胞株分離法之檢出率比較

	傳統RT-PCR	巢式RT-PCR	即時RT-PCR	細胞株分離法
檢出率	12.8%	19.04%	19.04%	18.06%
	(8/72 ^a)	(14/72)	(14/72)	(13/72)

^a：檢體件數

參考文獻

1. 邱仕炎、呂榮修。牛流行熱預防的研究。中華民國獸醫學會雜誌 23：73-79，1987
2. 呂榮修、李永林、黃士則、蔡向榮、廖永剛、林地發、曾俊憲、邱仕炎。1989年發生在臺灣的牛流行熱疫學研究。臺灣畜牧獸醫學會會報 60：51-56，1992
3. Bai W, Jiang C, Davis SS. Preliminary observation on the epidemiology of bovine ephemeral fever in China. Trop Anim Health Prod 23: 22-26, 1991
4. Chiu SY, Lu YS. The epidemiology of bovine ephemeral fever in Taiwan 1984. J Chinese Soc Vet Sci 13: 1-9, 1987
5. Chiu SY, Lu YS. The prophylaxis of bovine ephemeral fever in Taiwan. J. Chinese Soc Vet Sci 13: 189-195, 1987
6. Cybinski DH, Walker PJ, Byrne KA, Zakrzewski H. Mapping of antigenic sites on the bovine ephemeral fever virus glycoprotein using monoclonal antibodies. J Gen Virol 71: 2065-2072, 1990
7. Cybinski DH, Davis SS, Zakrzewski H. Antigenic variation of the bovine ephemeral fever virus glycoprotein. Arch Virol 124: 211-224, 1992
8. Davis SS, Gibson DS, Clark R. The effect of bovine ephemeral fever on milk production. Aust Vet J 61: 128, 1984
9. Grigera PR, Mathieu ME, Wagner RB. Effect of glycosylation on the conformation epitopes of the glycoprotein of vesicular stomatitis virus (New

- Jersey serotype). *Virology* 180: 1-9, 1991
10. Hsieh YC, Chen SH, Chou CS, Hsiao HW, Chen SZ, Lee YF, Liu HJ. Development of a reliable assay protocol for identification of diseases (RAPID)-bioactive amplification with probing (BAP) for detection of bovine ephemeral fever virus. *J Viro Meth* 129: 75-82, 2005
 11. Hsieh YC, Wang SY, Lee YF, Chen SH, Mak P, Chu CY. DNA Sequence Analysis of Glycoprotein G Gene of Bovine Ephemeral Fever Virus and Development of a Double Oil Emulsion Vaccine against Bovine Ephemeral Fever. *J Vet Med Sci* 68: 543-548, 2006
 12. Hsieh YC, Chen SH, Chou CS, Ting LJ, Itakura C, Wang FI. Bovine ephemeral fever in Taiwan (2001-2002). *J Vet Med Sci* 67: 411-416, 2005
 13. Liao YK, Inaba Y, Li NI, Chain CY, Lee SL, Liou PP. Epidemiology of bovine ephemeral fever virus infection in Taiwan. *Microbiol Res* 153: 289-295, 1998
 14. St George TD. Studies on the pathogenesis of bovine ephemeral fever in sentinel cattle. I. Virology and serology. *Vet Microbiol* 10: 493-499, 1985
 15. St George TD, Standfast HA, Thomas P. The Arboviruses: Epidemiology and Eteology Vol. II Chapter 17, CRC Press, Inc. Florida, USA, 71- 86, 1988
 16. St George TD. Effective treatment of bovine ephemeral fever. *Aust Vet J* 75: 221-222, 1997
 17. Timoney JF, Gillespie JH, Scott FW, Barlough JE. Ephemeral fever. In 'Hagan and Bruner's Microbiology and Infectious Diseases of Domestic Animals', 8th ed, Cornell University Press, Ithaca, USA, 851-855. 1994
 18. Stram Y, Kuznetzova L, Guini M, Rogel A, Meiom R, Chai D, Yadin H, Brenner J. Detection and quantitation of akabane and anino viruses by multiplex real-time reverse-transcriptase PCR. *J Viro Meth* 116: 147-154, 2004
 19. Stram Y, Kuznetzova L, Aviad L, Yadin H, Rubinstein-Giuni M. A real-time RT-quantative(q) PCR for the detection of bovine ephemeral fever virus. *J Viro Meth* 130:1-6, 2005
 20. Walker PJ, Byrne KA, Cybinski DH, Doolan DL, Wang Y. Proteins of bovine ephemeral fever virus. *J Gen Virol* 72: 67-74, 1991
 21. Wang FI, Hsu AM, Huang KJ. Bovine ephemeral fever in Taiwan. *J Vet Diagn Invest* 13: 462-467, 2001

A SYBR Green I-Based Real-Time RT-PCR Assay for Bovine Ephemeral Fever Virus

Ting LJ *, Lee MS, Lee SH

Animal Health Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan

Abstract A quantitative one-step SYBR Green I-based reverse-transcriptase (RT)- PCR system was developed for the detection of bovine ephemeral fever virus in samples. The primer pair was designed based on conserved sequences in the G protein and evaluated for clinical diagnosis. A serial of ten-fold dilutions of the viral genome were used as templates for the reaction in which they served as standards to quantitate unknown viral samples. By using this system it was shown that as few as 300 copies of a viral genome could be detected. The diagnostic sensitivity of the real time RT-PCR and conventional RT- PCR, nested PCR and cell culture method in the detection of 72 clinical samples suspected to have BEFV infections were 19.04%, 12.8% (8/72) , 19.04% (14/72) and 18.06% (13/72) , respectively. The results indicated that the assay developed in this study was more sensitive than the conventional RT-PCR and isolation for the detection of BEFV. The novel assay is an excellent diagnostic tool for BEF infection.

Key words : *Bovine ephemeral fever, RealtimeRT-PCR, SYBR Green I*