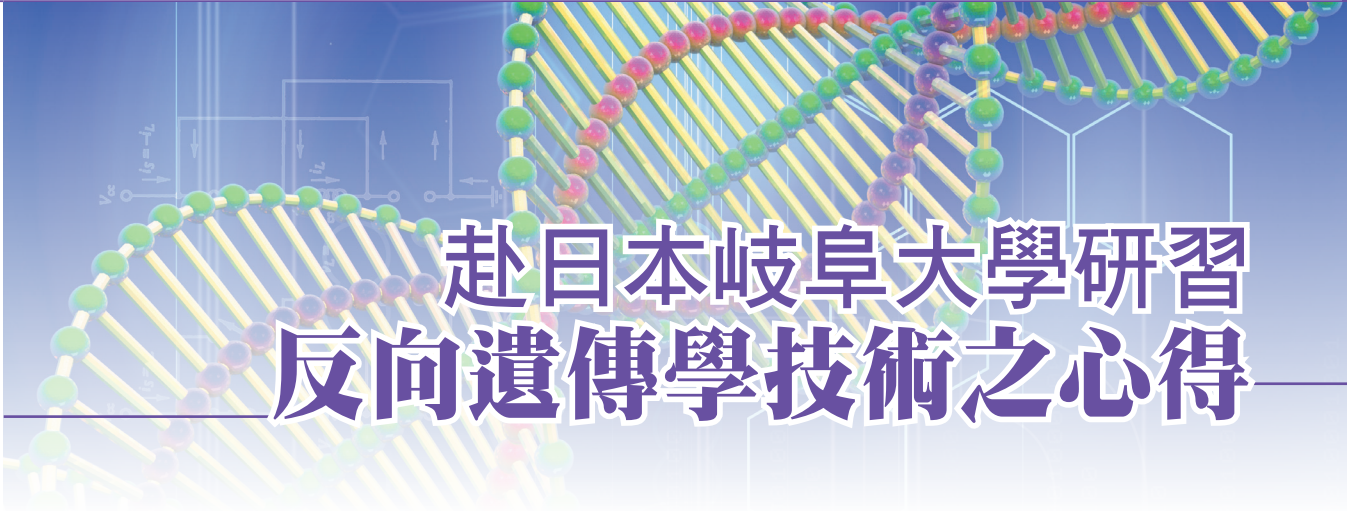




赴日本岐阜大學研習 反向遺傳學技術之心得

許愛萍 本所製劑研究組

前言

反向遺傳學技術 (reverse genetics) 是利用試管內架構可轉錄病毒基因體全長及與表現複製相關之核酸聚合酶質體，令其在細胞內轉錄病毒基因體核酸及表現出核酸聚合酶後，完成病毒複製生活史，而後回收重組病毒。目前反向遺傳學技術被應用在 DNA 病毒、正股及負股的 RNA 病毒，此項技術隨著分子生物學的發展逐漸成熟；應用的領域包含重組弱毒疫苗或載體疫苗的開發，以及運用反向遺傳學技術來探討病毒的主要毒力因子。新城病在疫苗開發上，近年來已走入利用 reverse genetics 的技術來架構重組的新城病病毒以開發新基因型的活毒疫苗，在韓國已上市的新城病疫苗株—KBNP-C4152R2L，即為最明顯的例子。過去 15 年 reverse genetic 技術被應用在許多 nonsegmented negative-strand RNA viruses (NNSV)，進行 NNSV 致病機轉及分子病毒學研究，並且被應用做載體疫苗的開發。在 NNSV 當中，新城病病毒 (Newcastle disease virus) 是廣為應用來做為運送外源性抗原載體的標的病毒，其中主要原因是新城病可藉由黏膜性及非黏膜性路徑投予，以誘發黏膜性及全身性免疫反應。

反向遺傳學技術研習

本所製劑研究組先前經由人工馴化開發第七基因型臺灣新城病疫苗株，該疫苗株將做為骨幹，由於該疫苗株無專利侵犯之疑慮，本所擬利用反向遺傳



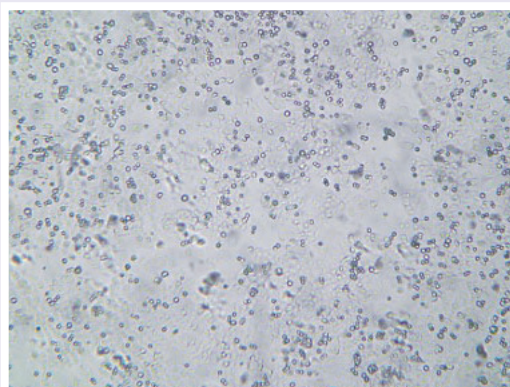
學技術開發新城病載體疫苗，以做為禽類多價疫苗使用。新城病病毒及狂犬病毒皆屬非分段之負股 RNA 病毒，反向遺傳學技術操作手續在此兩株病毒非常類似，另本所亦進行臺灣鼬獾狂犬病病原性試驗，因而有機會前往日本負責狂犬病反向遺傳學技術研究的岐阜大學應用生物科學部的人畜共通感染症學研究室研習，一來強化本所的反向遺傳學技術，二來學習狂犬病相關試驗。該研究室在狂犬病病毒反向遺傳學技術的建立、應用，以及延伸研究已有十餘年之經驗，103 年度獲得「農委會臺日技術合作」計畫經費之補助前往該實驗室進行參訪及研習，首要目標是希望可以達成獲得單股負股 RNA 病毒反向遺傳學技術進行上之實驗設計概念，進一步比較該實驗室與本所製劑研究組實驗室之質體構築技術策略之異同，並且習得轉染所架構的質體後如何成功回收重組病毒；藉由研習可精進本所新城病載體疫苗開發工作。

日本岐阜大學的應用生物科學部的人畜共通感染症學研究室成立已有三十年，目前以輪狀病毒和狂犬病毒等病毒之致病性研究為重點。該實驗室由杉山誠博士及伊藤直人博士負責，他們在狂犬病的研究將近二十年，且在病毒學期刊（*Journal of Virology*）、疫苗期刊（*Vaccine*）發表多篇論文，尤其伊藤直人博士建立一株可穩定表現 T7 RNA 聚合酶的細胞，當利用該細胞進行狂犬病病毒反向遺傳學，而取代攜帶 T7 RNA 聚合酶的 vaccinia virus 之使用具有諸多優點。根據伊藤直人博士的文獻指出，使用攜帶 T7 RNA 聚合酶的 vaccinia virus 可能會有下述缺點，vaccinia virus 的細胞病變會干擾回收病毒的判斷，進而影響病毒回收的效率。另 vaccinia virus 可能造成含有病毒全長基因體的質體和 Helper 質體序列上的重組互換，前述缺點將嚴重影響實驗的判定。況且最後回收的病毒若含有 vaccinia virus 也可能干擾下游的實驗；本實驗室經驗得知，在回收轉染後的重組病毒後需在雞胚胎蛋增幅，此增幅過程中 vaccinia virus 也會隨之被增幅（經由間接免疫螢光染色證實），進而在最終的疫苗產品中也會有 vaccinia virus 的汙染。另伊藤博士也表示，使用他所建立的細胞可以回收到更高的病毒力價，並縮短獲得重組病毒流程中所需要的時間。基於上述理由，伊藤直人博士所建立的技術可穩定表現 T7 RNA 聚合酶的細胞是反向遺傳學平臺上的關鍵技術之一，尤其國際上利用反向遺傳學技術應用在疫苗開發時，對本所疫苗研發有莫大助益。

此外，伊藤直人博士提供本所實驗室在反向遺傳學技術平臺設置上非常多寶貴的意見，例如建立反向遺傳學技術平臺之初，應該在序列上加上一個 marker 序列，如此更利於自反向遺傳學技術系統平臺回收到病毒。

結語

綜之，本次赴日本岐阜大學的應用生物科學部的人畜共通感染症學研究室研習收穫良多。尤其，在理論實踐與實際實驗之配合及應用，建立單股負鏈 RNA 病毒的反向遺傳學平臺技術，應用該平臺技術在載體疫苗開發及病毒毒力因子探討等工作，提升我國動物疫苗產業發展及分子病毒學研究能力，並增進臺日雙方生物技術之交流。赴日期間感謝日本岐阜大學的應用生物科學部的人畜共通感染症學研究室杉山誠博士及伊藤直人博士及其同仁之接待，並感謝農委會經費之補助。



轉染前需繼代之細胞影像。

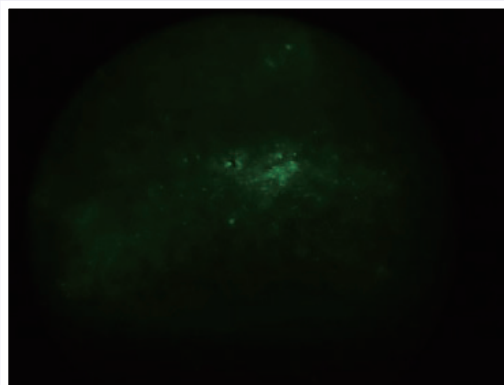


實驗室人員示範核酸轉染手續。





實驗室人員示範病毒力價測定手續。



檢查轉染後第三天所觀察到的螢光影像。



計算重組狂犬病病毒的螢光 foci 力價。



參觀其新設置的 BSL-3 設施—BSL-3 實驗室所設置之排風出口。



參觀其新設置的 BSL-3 設施—生物安全櫃。



參觀其新設置的 BSL-3 設施—獨立之小鼠恆溫恆濕飼養箱。