

# 動物流行性感冒病毒核酸反轉錄即時定量聚合酶鏈反應檢測方法之建立

黃有良、潘居祥、鄭明珠  
行政院農業委員會家畜衛生試驗所

## 緒言

流行性感冒病毒為具有封套之單股 RNA 病毒，其隸屬於 Orthomyxoviridae 之 orthomyxovirus，而依據病毒顆粒之核蛋白（nucleoprotein）與基膜蛋白（matrix protein）可將流行性感冒病毒區分為 A、B 與 C 等三種血清型別，此三種血清型別之流行性感冒病毒可再依據病毒封套表面所突起之血球凝集素（Haemagglutinin；H）與神經胺酸（Neuraminidase；N）區分為不同亞型，目前已知血球凝集素有 1 至 16 等亞型，神經胺酸酶則有 1 至 9 等亞型。由於禽類流行性感冒病毒本身可隨著候鳥進行傳播，目前此病毒以分布至美洲、歐洲、亞洲、澳洲與非洲等地區，且正逐年擴散，而為了提供一個更為快速且敏感之診斷方式，本試驗將利用即時定量聚合酶鏈反應建立數種檢測動物所流行之 A 型流行性感冒病毒。

## 材料與方法

自疫學研究組分讓 H1N1、H2N2、H3N8、H4N6、H5N1、H5N6(WB522)、H5N2(WB830)、H5N2(A30)、H5N2(A)、H5N2(WB830)、H5N2(A8)、H5N3(S)、H5N2(1209)、H6N1(Q9)、H6N1(WB239)、H6N1(V156)、H6N5、H7N7(Asia)、H7N2、H7N3、H7N7(A45)、H8N4、H9N2(S)、H9N3、H10N7、H11、H12N5、H13N6、H14N5、H15N8、IBV、NDV 與 IBDV 等病毒株，使用 TRIzol® Reagent 進行 RNA 萃取，之後分別進行 RT-PCR 與 RRT-PCR 測試。於引子及探針設計方面，分別針對 M、N1、H1、H3、H5、H6 與 H9 基因設計出其特異性之引子對與探針，其中 H5 探針是針對高病原性禽類流行性感冒病毒所設計。反轉錄聚合酶鏈反應（RT-PCR）與單管多引子反轉錄聚合酶鏈反應（MRT-PCR）方面，則是分別將 DNA polymerase、RNase inhibitor、AMV reverse transcriptase、RNA、dNTP 及  $\mu$ M 引子加至反應管內，在以 PCR 機器進行反應。反轉錄即時定量聚合酶鏈反應（RRT-PCR）與單管多引子反轉錄即時定量聚合酶鏈反應(MRRT-PCR)，則是較 RT-PCR 與 MRT-PCR 多加入 TaqMan 探針，其餘均相同。

## 結果與討論

M 基因之 RRT-PCR 可檢測出所有 A 型流行性感冒病毒，而非 A 型流行性感冒病毒之 IBV、NDV 與 IBDV 均呈陰性反應。於敏感性方面，其與 RT-PCR 相同均可檢測至  $10^6$  稀釋倍數之 H5N1 病毒株核酸。於 N1、H1、H3、H6、H9 基因之 RRT-PCR 均不會與其非對應之流行性感冒病毒亞型產生反應，顯示此 RRT-PCR 均具有良好之特異性，另外，H5 基因之 RRT-PCR 是專為高病原型流行性感冒病毒 H5N1 所設計，其 H5 基因之 RRT-PCR 也只有於高病原型流行性感冒病毒 H5N1 才呈現陽性

反應，其於低病原性流行性感冒之 H5 亞型病毒及非 H5 亞型流行性感冒病毒均呈陰性。於敏感性方面，N1、H5、H6 與 H9 之 RRT-PCR 均較 RT-PCR 敏感 10 倍，M、H1 與 H3 之 RRT-PCR 則與 RT-PCR 相同。H5N1 之 MRRT-PCR 包括 M、N1 與 H5 基因之 RRT-PCR，其特異性與單一基因之 RRT-PCR 相同，均不會有非特異性結合。於敏感性方面，其較 RRT-PCR 之敏感性低 10 倍，M、N1 與 H5 基因之 MRRT-PCR 只可分別檢測至  $10^5$ 、 $10^5$  與  $10^4$  稀釋倍數之 H5N1 病毒株核酸，此敏感性與 MRT-PCR 之結果相同。Real-time PCR 是一種具有快速、準確與定量功能之診斷技術，本試驗也利用此技術研發出數種可檢測流行性感冒病毒 M、N1、H1、H3、H5、H6 與 H9 基因之 real-time RT-PCR，其中 M 基因廣泛存在所有流行性感冒病毒且血清型別間具有高度相似性，適用於 A 型流行性感冒病毒之初步篩檢，之後，再應用不同的 H 與 N 基因之 RRT-PCR 進行確診，另外，本試驗也針對高病原性家禽流行性感冒病毒 H5N1 設計一種快速篩檢試劑，其包括可檢測出所有 A 型流行性感冒病毒之 M 基因 RRT-PCR、N1 基因之 RRT-PCR 與可辨識高病原性家禽流行性感冒病毒 H5 基因之 RRT-PCR，而這些 real-time PCR 均具有高度之特異性與敏感性，均可做為動物流行性感冒病毒快速篩檢之用。

表 1、RT-PCR、RRT-PCR、MRT-PCR、MRRT-PCR 於不同基因型別間之敏感性比較

檢測方法	M	N1	H1	H3	H5	H6	H9
RRT-PCR	6*	6	6	3	5	4	3
RT-PCR	6	5	6	3	4	3	2
MRRT-PCR	5	5	NA	NA	4	NA	NA
MRT-PCR	5	5	NA	NA	4	NA	NA

\* 病毒 RNA 之連續 10 倍稀釋倍數