

# 反向遺傳質體之建構

報告人：陳麗璇 助理研究員（疫學研究組）

## 壹、緒言

目前使用之反向遺傳技術為 8 個質體的系統，質體包含人類 pol I 的 promotor 及老鼠的 terminator，並以 Bms BI 限制酵素切割位加以區隔，更外側則是人類巨細胞病毒 pol II promotor 及 poly A 訊息，流感病毒基因片段便建立 pol I 及 pol II 的 promoter 及 terminator 之間。經由 pol I promotor 的作用，細胞株的 RNA polymerase I 會合成病毒的負向 RNA，而 pol II promotor 則是引起細胞正常轉錄轉譯功能進而合成病毒的蛋白，使之得以進行病毒正常的功能。進行 RT-PCR 時，僅需於引子上延伸出相同限制酵素之切割位，完整增幅流行性感感冒病毒片段後，便能以相同限制酵素進行切割與連接，將完整病毒基因序列與質體結合。

## 貳、材料與方法

RNA 核酸萃取：萃取欲進行反向遺傳之病毒 RNA 核酸。RT-PCR：以帶有限制酵素切割位的特異性引子，針對所需核酸片段進行增幅。純化與定序：RT-PCR 產物需將正確的片段自電泳膠切下並加以純化，純化後的產物一方面需定序，以確定未來所選殖的基因序列與原始 RT-PCR 產物序列相同。另一方面產物純化才能繼續進行下一步驟。限制酵素消化與核酸連接：RT-PCR 產物兩端具與載體相同限制酵素切割位，因此經限制酵素消化後，RT-PCR 產物便能與載體以核酸連接酵素結合，形成質體。Transformation：將質體引入勝任細胞裡，以大量增殖質體。將正確大小的質體以定序加以篩選。

## 參、結果與討論

自去年(96)前往美國田納西州孟菲斯的聖茱德兒童研究醫院，研習家禽流行性感感冒病毒反向遺傳技術。返台後利用數個月的時間，收集反向遺傳技術所需之材料與器材，並完全依照研習時質體重組之步驟，以增殖性佳之家禽流行性感感冒病毒中較短的 NS 與 M 基因開始，建構含家禽流感病毒內在基因之質體。此次試驗證明完整地按照步驟進行，確實可以將 NS 與 M 基因與 pHW2000 質體結合。未來將繼續備齊含有家禽流感病毒其餘內在基因之質體，以利於應用國內防疫高病原性禽流感死毒疫苗之種毒儲備。



圖一、挑出較原始載體高的質體，並定序以篩選