

赴美研習反向遺傳技術(Reverse genetics)心得報告

報告人：陳麗璇 助理研究員（疫學研究組）

壹、緒言

反向遺傳技術利用含有流行性感冒病毒八段基因的質體，質體導入細胞內後產生流感病毒。過去反向遺傳技術利用 12 個質體的系統，經改良後的質體同時具有 pol I 及 pol II 的 promoter 及 terminator，載體包含人類 pol I 的 promoter 及老鼠的 terminator，並以 BmsBI 限制酵素加以區隔，更外側則是人類巨細胞病毒 pol II promoter 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 promoter 的作用，細胞株的 RNA polymerase I 會合成病毒的負向 RNA，而 pol II promoter 則是引起細胞正常轉譯功能進而合成病毒的蛋白，特別是病毒自己的聚合酶，使之得以進行病毒正常的功能。因此同一質體可進行病毒 RNA 的複製及病毒聚合酶的合成並只需備製 8 個質體，可使得備製過程與病毒產生更有效率。

貳、材料與方法

本次試驗首先進行反向遺傳之病毒 RNA 核酸萃取，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；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。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。細胞備製與 Transfection：由於 Transfection 需要效果較佳的 293T 細胞及流感病毒較適應的 MDCK 細胞，因此需要兩種細胞混合培養。備妥新流感病毒基因片段所構成之八個質體，使八個質體同時進入 293T 細胞，待新病毒自 293T 釋出後，便能自行感染附近的 MDCK 細胞。雞胚胎蛋增殖：細胞培養液呈現血球凝集陽性者，可以進一步接種於雞胚胎蛋以大量增殖。Single Radial Immunodiffusion (SRID) Test：這個檢測主要是利用抗原與特異性抗體在瓊脂膠裡形成免疫複合物的沈澱來檢測流感病毒血球凝集蛋白的含量，沈澱圈的大小與抗原的濃度成比例。這是世界衛生組織推薦人類用流感疫苗血球凝集蛋白標準化的方法。血球凝集素為流感病毒的主要抗原及免疫反應決定位，於病毒表面的醣蛋白，呈突棘狀，亦常用來決定病毒的分型。SRID 試驗主要檢測疫苗中不活化全病毒中的血球凝集素的含量。但必需在抗原混合礦物油或其他佐劑之前，因為會影響檢測的正確性。為了定量 SRID 的結果及血球

凝集素，試驗中必須使用濃縮純化的抗原，需與待測樣本為同源病毒。流感的血球凝集素大約佔全病毒蛋白的 30%~38%，最後需稀釋到血球凝集素為 30 μ g/ml 的濃度以進行試驗。將分離好的血球凝集蛋白免疫在綿羊或山羊身上可以獲得抗血清。在 SRID 標準備製中抗血清最好來自於同源的病毒，也可以使用其他具 Cross-reaction 且高力價的抗血清。參考血清需經純化濃縮的病毒標準濃度測驗，以確定檢測時抗血清的適當稀釋倍數。適當的抗血清濃度應能與 30 μ g/ml 濃度的血球凝集素形成 8mm 直徑大小的沈降圈。不同標準的抗原濃度與標準的抗血清作用，與所形成沈降圈大小成正比，可繪出一條標準回歸線。未知濃度的樣本亦可繪出一條回歸線，由於抗原濃度與斜率成正比，因此可計算未知樣本的正確濃度。

參、結果與討論

反向遺傳技術是目前流行感冒病毒疫苗種毒建立的重要技術之一，其最大的優點就是在 1 個月的時間內，就能完成流行病毒株之疫苗種毒株。此研習將可建立國內有關禽流感疫苗用種毒株建立之最新技術，提供作為禽流感防疫上更有效的疫苗種毒提供。此次研習承蒙 Dr. Webster 與 Dr. Yen 的熱心接待、安排與悉心指導，增加研習 Single Radial Immunodiffusion (SRID) Test 之行程，用以標準化疫苗內蛋白含量，裨益於流行性感冒疫苗種毒株的建立與標準化。



圖一、與美國聖茱德兒童研究醫院 Dr. Robert G. Webster 合照。