

# 結合恆溫環形核酸增幅法與螢光標示引子

## 區別野外豬瘟病毒株與兔化豬瘟疫苗株

報告人：鄧明中 助理研究員（豬瘟研究組）

### 壹、緒言

豬瘟乃台灣豬隻最重要之惡性傳染病，一旦疫情爆發常導致嚴重之經濟損失。豬瘟病毒是一個小且具有封套的二十面體 RNA 病毒，病毒基因體長度約為 12.3kb。過去利用豬瘟病毒 5' 端非轉譯區及 E2 與 NS5B 蛋白核酸片段的序列比對及親源分析，可將目前世界上之豬瘟病毒區分為三種不同的基因型(genotypes)，分別為 group 1、2 及 3，彼此間相似度約只有 84.5%，不同基因型內又可細分為數個基因亞型(subtypes)。最近 Notomi 等人研發的新型、快速且敏感的核酸增幅技術-恆溫環式核酸增幅法 (Loop-mediated Isothermal Amplification, LAMP)，利用四至六條專一性引子，於 60-65°C 恆溫條件下增幅核酸，對於豬瘟臨床病例之確診有很大的幫助。我國目前仍使用兔化豬瘟疫苗來防疫豬瘟疫情，然台灣田間目前流行的豬瘟病毒株主要以 2.1 基因亞型為主，而防疫使用之兔化豬瘟疫苗則屬於 1.1 基因亞型。因此在臨床檢體的確診無法藉助血清學診斷或者病毒分離來區別野外毒感染或兔化豬瘟疫苗免疫。因此我們希望能結合反轉錄恆溫環式核酸增幅法以及特異性之螢光標示引子，開發出兼具方便快捷、特異性及敏感性之田間豬瘟感染病例核酸區別檢測方法，希望未來對於田間疑似豬瘟爆發病例的診斷與防疫能有較大的幫助。

### 貳、材料與方法

**病毒培養與核酸萃取** 本次實驗共使用兩株豬瘟病毒株，其中豬瘟病毒株包含 LPC 株（屬 1.1 基因亞型）以及一株不同基因型之田間分離株—TD/96/TWN（屬 2.1 a 基因亞型），所有豬瘟病毒皆以豬腎細胞株（PK-15）培養增殖之，隨後再以 MagNA Pure LC instruments 自動核酸萃取儀進行病毒 RNA 之萃取工作。

**引子與鐵克曼探針之設計** 本實驗所有使用於反轉錄恆溫環式核酸增幅法增幅豬瘟病毒 RNA 之專一性引子皆以引子開拓者 V3 軟體 (The primer Explorer V3 software，榮研化學株式會社，Eiken Chemical Co. Ltd.Tokyo, Japan) 進行分析與設計。其中針對野外毒株 (Genotype 2.1 a) 序列所設計之特異 F loop LUX 1 primer 用 FAM (6-FAM, 6-Carboxyfluorescein) 標示，另外針對兔化豬

瘟疫苗株 (Genotype 1.1) 核酸序列所設計之特異 F loop LUX 2 primer 則以 JOE (6-JOE, 6-Carboxy-4',5'-dichloro-2',7'-dimethoxyfluorescein) 進行標示。

**反轉錄恆溫環式核酸增幅法 (RT-LAMP) 與 LUX 螢光標示引子反應** 於 RT-LAMP 與 LUX 螢光標示引子偵測不同基因型豬瘟病毒核酸的試驗中，先加入 2  $\mu$ L 萃取的 RNA 置於 0.2 mL 薄壁反應管中，隨後分別加入 FIP 與 BIP、F loop primer LUX1、F loop primer LUX2 與 B 以及 F3 與 B3、dNTP、10 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、8 mM MgSO<sub>4</sub>、10 mM KCl、20 mM Tris-HCl pH 8.8、50 nM ROX dye，最後加入 8 U DNA polymerase (New England Biolabs, U.S.A.)及 0.625 U AMV 反轉錄酵素 (Roche)。將反應管置入定量 PCR 反應儀 (ABI 7300 system, Applied Biosystems, Foster City, U.S.A.)。反應條件為 63°C 下反應 50 分鐘。

## 參、結果與討論

最近開發的 RT-LAMP 技術應用於診斷臨床病例中的病毒核酸上雖有非常多的優點，但由於無法使用像鐵克曼這類的探針方式進行增幅基因片段的區別。我們希望能利用利用螢光標示引子結合 LUX primer 與 RT-LAMP 來進行豬瘟病毒的區別診斷。經反轉錄恆溫環式核酸增幅法於恆溫 63°C 條件下，以定量 PCR 反應儀偵測其反應螢光，結果顯示，唯有反應管中存有豬瘟野外毒株之核酸樣品，可偵測出 FAM 螢光之訊號，而標示 JOE 螢光之 LUX 引子則無法偵測出任何螢光訊號 (Fig. 1)。若反應管中存在免化豬瘟疫苗株之核酸樣品則結果相反 (Fig. 2)。本實驗結果證實可成功區別不同基因型之豬瘟病毒 RNA，因此，這樣的方法開發成功，對於未來田間病例之檢驗將可大大縮短時間與勞力，有助於豬瘟疫情之控制。本次實驗也針對鐵克曼探針對於不同基因型豬瘟病毒核酸的特異性與敏感性，與 RT-LAMP 加上 LUX primer 所研發之新方法做一比較，RT-LAMP 搭配 LUX primer 在區別野外毒株及免化疫苗株則比鐵克曼探針來的好。加上鐵克曼探針使用上較昂貴，且應用鐵克曼探針進行即時定量-PCR 反應所需的時間較長，因此，在區別野外毒株及免化疫苗株的診斷上結合 RT-LAMP 搭配 LUX primer 會比使用鐵克曼探針來的便捷且經濟，敏感度也更高。本新方法可成功區別豬瘟野外毒株及免化疫苗株之核酸檢體，對於田間豬瘟檢體的能藉由結合螢光標示引子與 RT-LAMP 的新技術來達到快速區別診斷豬瘟病毒核酸的目的，未來田間的一旦爆發豬瘟疫情，將可快速有效地監控及防疫。也希望未來能幫助我國早日達成撲滅豬瘟的目標，更希望能將這樣的新技術推廣及應用於其他病毒之臨床診斷。

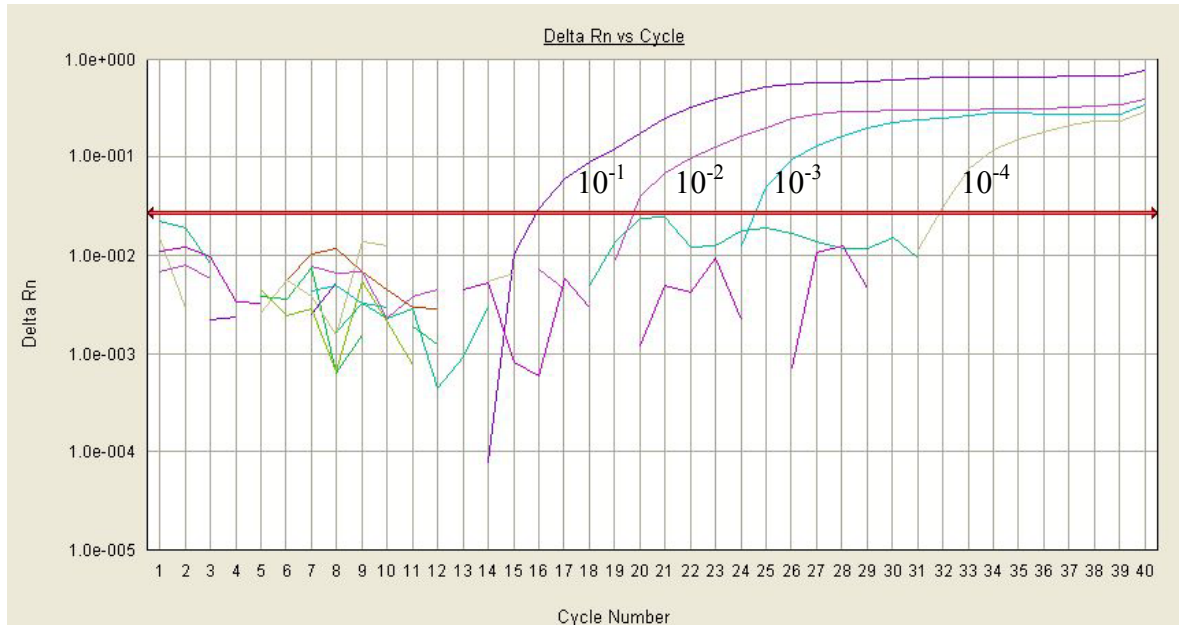


Fig. 1 Lux primer 2.1 labeled with FAM was used to detect the wild strain (TD/96/TWN). Viral RNA templates were tested by 10-fold serial dilutions from  $10^{-1}$  to  $10^{-7}$

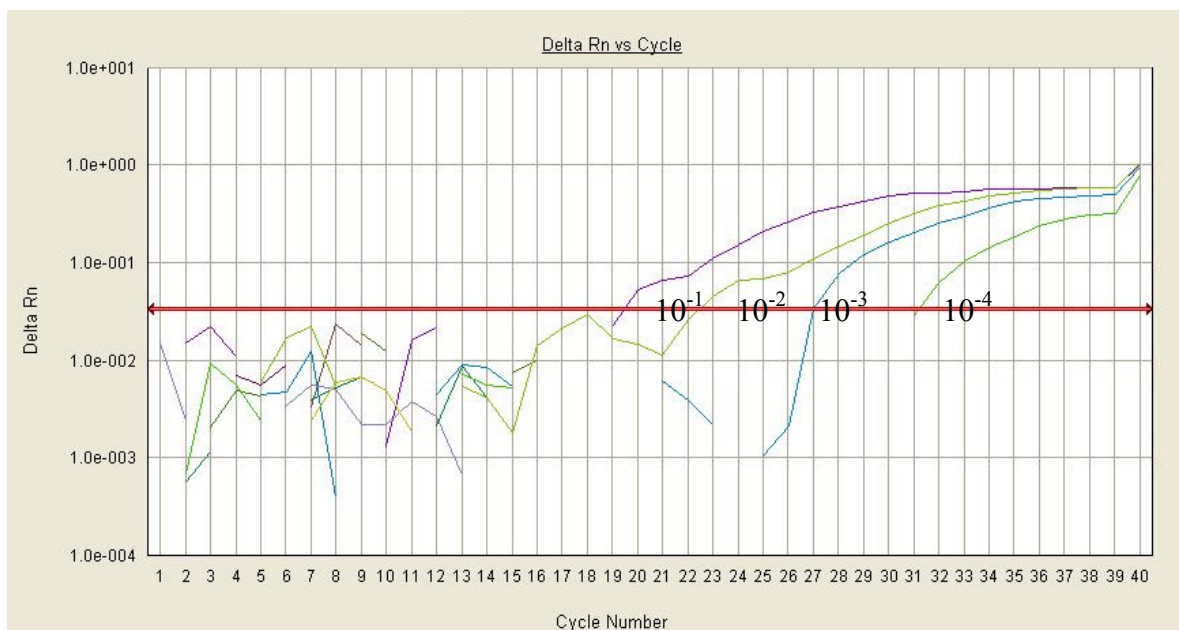


Fig. 2 Lux primer 1.1 labeled with JOE was used for detecting LPC vaccine strain. Viral RNA templates were tested by 10-fold serial dilutions from  $10^{-1}$  to  $10^{-7}$