

家禽流行性感冒病毒之核酸萃取方法比較

報告人：劉玉彬 助理研究員（疫學研究組）

壹、緒言

1997 年香港爆發 H5N1 之高病原性家禽流行性感冒，病毒因感染人且造成部份患者死亡，因而造成國際間對本病之重視。野鳥是流行性感冒重要之帶原者，台灣位於歐亞大陸東亞區候鳥遷徙路線上，每年有成千上萬的水鳥群來台渡冬，這些野鳥在台灣與國際間穿梭。自 1998 年起本所為防範香港高病原性家禽流行性感冒藉由候鳥遷徙傳播入境，著手進行野鳥棲息地排遺之禽流感病毒監測至今。在家禽流行性感冒之診斷技術方面，利用傳統之雞胚胎病毒分離法，雖然仍為相當敏感及可信賴之診斷方法，然而相較於近年廣泛使用之分子生物診斷技術，仍較為麻煩及費時。而在分子生物診斷方法應用於家禽流行性感冒的診斷上，由於野鳥排遺檢體具有禽流感病毒含量不高及成分複雜之特性，對於分子生物檢測技術而言，病毒核酸的萃取為重要之一環，唯有經過良好的病毒核酸萃取及純化才能夠獲得正確之分子生物診斷結果。在本項研究中，我們比較了五種常用之市售核酸萃取套組，包括 TRIzol reagent、RNeasy Mini Kit、MagNA Pure LC、MagNA Pure Compact System 及 MagMAX。並以即時聚合酶鏈反應及反轉錄聚合酶鏈反應之檢驗結果，作為各項檢驗套組實際應用於家禽流行性感冒病毒核酸萃取之比較，以評估常見之市售核酸萃取套組對於野鳥排遺檢體之適用性，作為日後分子生物檢測應用之參考。

貳、材料與方法

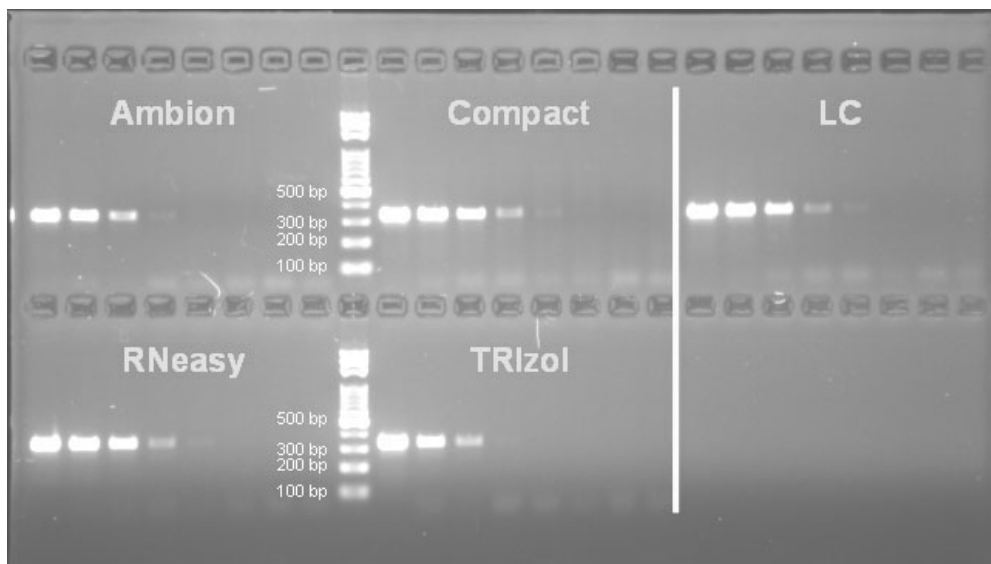
本試驗所使用之家禽流行性感冒病毒為 H7N7 禽流感病毒，該病毒係於 96 年 12 月於台南市四草水鳥保護區之野鳥排遺檢體分離出之病毒株。其切割位之胺基酸序列為 VPEIPKGR*GLF 具兩個鹼性胺基酸，為低病原性禽流感病毒。將此病毒於 9-10 日齡 SPF 雞胚胎蛋之尿囊腔增殖，以進行後續之比較實驗。病毒核酸萃取方法以選取五種常用之市售核酸萃取套組，分別為 TRIzol reagent (Invitrogen)、RNeasy Mini Kit (QIAGEN)、MagNA Pure LC (Roche)、MagNA Pure Compact System (Roche) 及 MagMAX (Applied Biosystems)。五種套組中除 TRIzol 為液相萃取外，其餘四種皆為固相萃取原理，固相萃取之 Silica 於 RNeasy 是充填於玻璃纖維上，MagNA Pure LC、MagNA Pure Compact 及 MagMAX 則塗佈於磁珠上，而 MagNA 之兩套系統均為自動化之萃取。於 Conventional PCR 使用本所例行性檢測用之特異性引子，可增幅禽流感病毒 Nucleoprotein 核酸片段，產物大小為 330 bp。TaqMan Real-Time PCR 使用澳洲 Animal Health Laboratory 的 Dr. Pritchard 所設計之引子及探針，檢測標的為禽流感病毒 Matrix protein 核酸片段。病毒核酸萃取量之比較是將禽流感病毒液以尿囊液作連續之十倍稀釋，以五種不同市售核酸萃取套組對於 10^{-1} ~ 10^{-8} 八種不同濃度之病毒液，進行三重複之萃取實驗。所得到之產物再分別利用 Conventional PCR 及 Real-Time PCR 來進行病毒核酸

定性及定量之檢測。將不含禽流感病毒污染之空白野鳥排遺檢體，分別以不同之市售核酸萃取萃取套組進行萃取，再將所萃取出來之產物，將五種套組之 0~7 μL 萃取液分別加入相同條件及病毒核酸量之 PCR 反應管中，觀測萃取液所含之 PCR 反應抑制劑是否會對 Conventional PCR 及 Real-Time PCR 反應產生抑制效果。

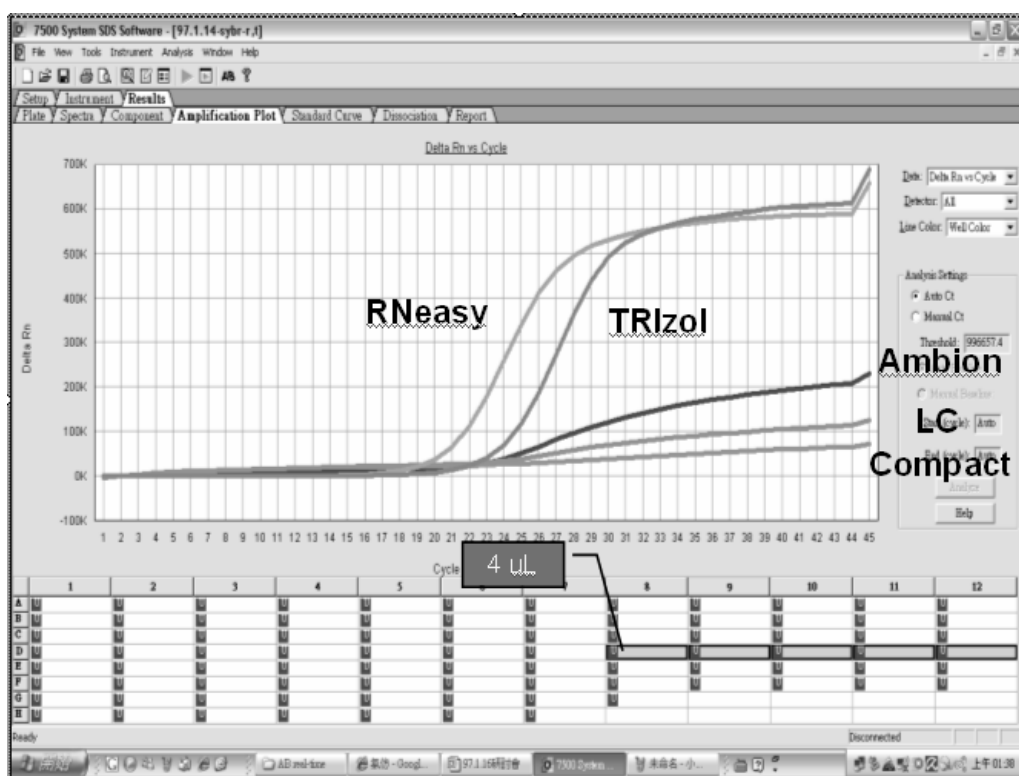
參、結果與討論

在各種萃取方式之檢出核酸量比較上，Conventional PCR 反應中 RNeasy、MagNA Pure Compact、MagNA Pure LC 較 Ambion 好，可檢測出 10^{-5} 倍稀釋濃度之病毒液，Ambion 又較 TRIzol 為好，可檢測出 10^{-4} 倍稀釋濃度之病毒液，TRIzol 只能檢測出 10^{-3} 倍稀釋濃度之病毒液（圖一）。在 TaqMan Real-Time PCR 檢測方面，其偵測極限約可達到 30 pg，依據檢量線之製作，將 10^{-1} ~ 10^{-5} 倍不同濃度病毒液以五種不同套組萃取之核酸產物進行定量，所得之病毒核酸含量結果利用 SAS 統計軟體進行多變數統計分析，結果顯示 RNeasy 顯著高於 Ambion、TRIzol；MagNA Pure LC 顯著高於 TRIzol；RNeasy、MagNA Pure LC、MagNA Pure Compact 三者無統計上之顯著差異；MagNA Pure LC、MagNA Pure Compact、Ambion 三者無顯著差異；MagNA Pure Compact、Ambion、TRIzol 無顯著差異。

在各種萃取方式對於 PCR 反應之抑制方面，取各方法之空白野鳥排遺檢體萃取液 0~7 μL 分別加入含有等量病毒核酸之 PCR 反應中，觀察各種純化萃取方式對於 PCR Inhibitor 之去除效果。不論是在 Conventional PCR 或 Real-Time PCR 反應中，其結果均顯示利用 RNeasy 及 TRIzol 這兩種萃取方式，對於存在檢體中之 PCR 反應抑制劑，其去除效果較利用磁珠原理萃取之 Ambion、MagNA Pure Compact 及 MagNA Pure LC 三個檢測套組為好（圖二）。總結這五種市售核酸萃取套組，RNeasy 具有高的禽流感病毒核酸回收率及良好之去除 PCR 反應抑制劑效果，若使用於少量及病毒含量較低之野鳥排遺檢體，其總體效果較其餘四種核酸萃取套組為好，然而因為 RNeasy 並非自動化之操作系統，所以若是當檢體數量較高時，仍傾向於使用效果亦不錯之 MagNA Pure Compact 及 MagNA Pure LC 系統（表一）。由此實驗中可發現不同之市售核酸萃取套組，分別具有不同之萃取原理及許多不同之特性，所以在病性鑑定或病原監測時，在進行分子生物檢測試驗前，應先衡量標的核酸之性質（ssDNA, dsDNA, total RNA）、病原種類（病毒或細菌等）、檢體類型（臟器或組織、細胞、血液、尿液、喉頭拭子或野鳥排遺等）、萃取重點（著重於萃取之濃度還是純化度）、及後續之檢測應用（Conventional PCR 或 Real-time PCR）等。如此才會有正確之分子生物檢測結果。



圖一、不同萃取套組於 10^{-1} ~ 10^{-8} 八種不同濃度病毒液之萃取物，利用 onventional PCR 增幅後產物之電泳圖。



圖二、加入 4 μ L 不同套組之空白野鳥排遺檢體萃取液後，對於 Real-Time PCR 反應之抑制結果。

表一、五種不同檢測套組之特性比較。

	Ambion	Compact	LC	RNeasy	TRizol
敏感性	中等	中等	中等	佳	差
Clean up	中等	中等	中等	佳	佳
自動	否	是	是	否	否
Consistency	中等	中等	中等	中等	差
Cost	130 元	275 元	200 元	130 元	40 元
其他		需 Compact 儀器	需 LC 儀器	濾膜堵塞問題	需使用毒性物質