

以目視 DNA 晶片同步檢測、分型及區別豬瘟野外毒及疫苗毒

報告人：潘居祥 副研究員（豬瘟研究組）

壹、緒言

豬瘟是由豬瘟病毒引起的一種高度傳染性敗血症，以全身性出血為主徵，感染率與死亡率均高達 95%。台灣在日據時代就有豬瘟發生且相當嚴重，自 1958 年以來全面性使用 LPC 疫苗免疫豬隻，四十多年來實施疫苗免疫結果，雖使豬瘟發生率大為降低，但仍無法消滅田間的豬瘟病毒，至今仍有少數病例發生。Paton 等（2000）將來自全世界各地的豬瘟病毒從核酸層次上分類成三個主要基因群（Group 1, Group 2 及 Group 3），每個基因群又細分為 3 至 4 個亞群（Subgroup），分別為 1.1, 1.2, 1.3; 2.1, 2.2, 2.3; 3.1, 3.2, 3.3, 3.4 等 10 種亞群。潘等（2005）將 1989 至 2003 年間台灣分離之豬瘟野外毒進行親緣演化樹分析及 2004 至 2007 年田間豬瘟野外毒的例行性檢測報告（潘等，2008）發現，1989 至 2007 年間台灣存在四種不同亞型的豬瘟病毒，分別為 2.1 a, 2.1 b, 2.2 及 3.4 等四種亞型，其中 3.4 亞型病毒被歸類為本土型，而 2.1 a, 2.1 b 及 2.2 亞型病毒則被歸類為外來型，外來型 2.1 a 病毒株自 1994 年進入台灣，1996 年以後即取代本土型病毒株並活躍於田間至今，而本土型病毒株盛行於 1990 年代初期，但自 1996 年以後即未曾從田間分離到，目前田間只能分離到外來型 2.1 a 病毒株。最近國外期刊報告，免化豬瘟疫苗毒 C-strain 以肌肉注射方式免疫小豬，可在小豬體內持續檢測到疫苗毒存在之時間達 42 天之久。此結果顯示，實驗室進行豬瘟例行性診斷時，豬瘟野外毒及疫苗毒之區別診斷須特別注意。反轉錄聚合酶鏈反應（Reverse transcription-polymerase chain reaction; RT-PCR）增幅後再進行核酸定序（Sequencing）是目前檢測野外豬瘟並排除疫苗毒干擾實驗室診斷之主要方法。為了同步檢測、分型及區別豬瘟野外毒及疫苗毒因而發展目視 DNA 晶片檢測法。豬瘟病毒特異性引子及探針係依據病毒基因 3 末端轉譯區核酸序列而設計，採用生物素標識引子進行單步驟 RT-PCR 反應，隨後與固定在高分子塑膠晶片上的探針進行雜合反應（Hybridization）。本方法可精確地將豬瘟病毒區分為三種主要基因群，並同時可區別野外毒及疫苗毒。

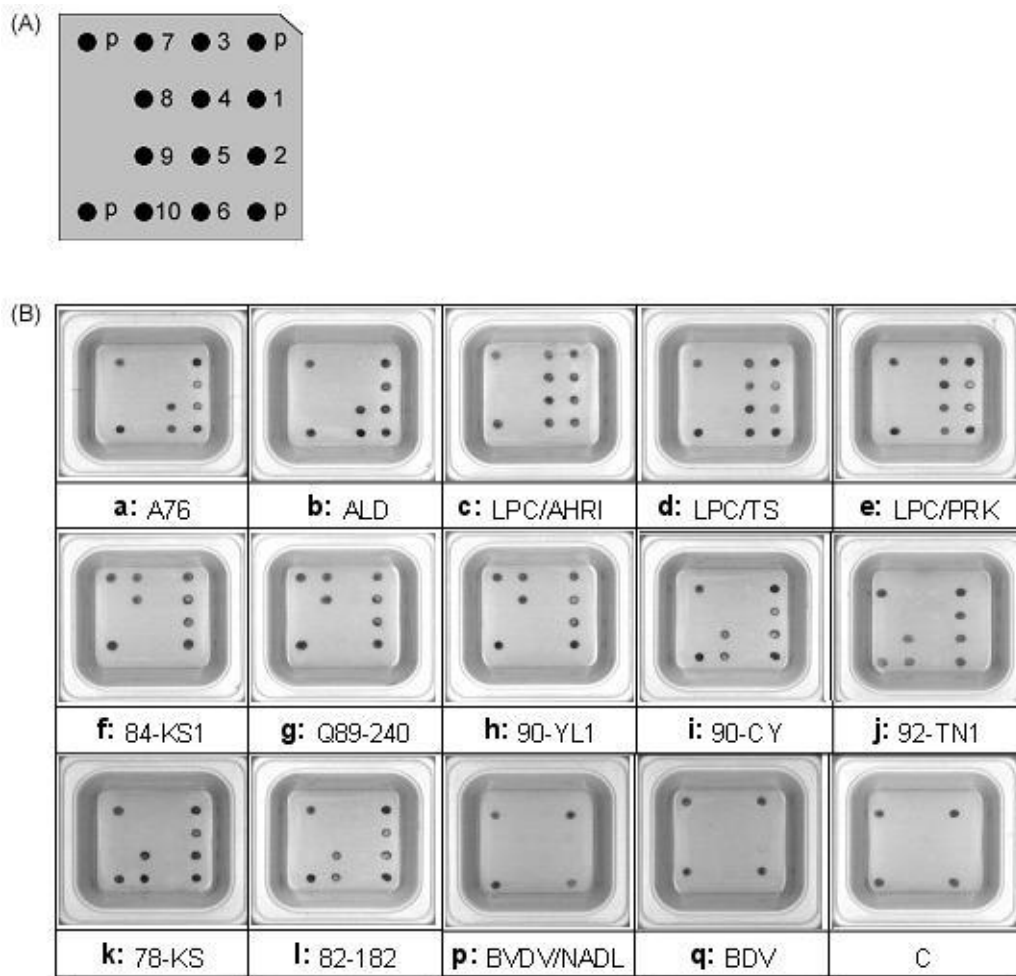
貳、材料與方法

病毒來源包含(1) 40 株田間分離的豬瘟野外毒分別代表 2.1 a, 2.1 b, 2.2 及 3.4 等四種亞型。(2) 豬瘟病毒實驗室參考株 ALD 及 A76 strains。(3) 免化豬瘟疫苗毒為 LPC/AHRI, LPC/TS 及 LPC/PRK 株三種。(4) 牛病毒性下痢病毒（Bovine viral diarrhea virus; BVDV）第一型及第二型（Type 1, 2）。(5) 邊界病毒（Border disease virus; BDV）。引子及探針設計於豬瘟病毒核酸序列 3 末端轉譯區，針對豬瘟病毒三個主要基因群(Group 1, 2, 3)分別設計區別性探針，另針對 LPC 疫苗

毒 3' 末端轉譯區特有 12 個 Poly(T) 插入處設計疫苗毒特異性探針，以達到區別豬瘟野外毒及疫苗毒之目的。生物素標識引子 (Biotin-labeled primer) 以病毒核酸為模板進行 RT-PCR 反應，取其產物與布放在高分子塑膠材質上之專一性探針進行點雜交 (Dot blot hybridization)，經與 Streptavidin conjugate alkaline phosphates 反應後，再以 NBP/BCIP 進行呈色，最後以肉眼判讀結果。核酸萃取及 RT-PCR 所需時間約為 4 小時，探針雜合反應操作時間約為 2 小時。

參、結果與討論

RT-PCR 測試結果，40 株豬瘟野外毒、2 株實驗室參考毒株 (ALD、A76) 及 3 株兔化豬瘟疫苗毒 (LPC/AHRI, LPC/TS 及 LPC/PRK) 皆可被增幅並產生 367 bp 大小之 RT-PCR 產物，牛病毒性下痢病毒第一型、第二型病毒及邊界病毒則不會被增幅，顯示此引子特異性高，只會增幅豬瘟病毒，不會與同屬近親病毒產生交叉反應。DNA 晶片測試結果顯示，40 株豬瘟野外毒皆可精確地被區分為三種主要基因群，其中 Group 2 基因型病毒株有 30 株，Group 3 基因型病毒株有 10 株，ALD strain 及 A76 strain 則屬於 Group 1 基因型，從探針雜合樣式 (patterns) 中很容易與疫苗毒進行區別診斷。三株兔化豬瘟疫苗毒之探針雜合結果顯示 Group 1 特異性探針及疫苗毒特異性皆出現陽性反應點。由於兔化豬瘟疫苗毒是從 Group 1 基因型病毒株 Rova strain 經過 1,050 代家兔體內繼代馴化而成，探針雜合結果發現 Group 1 基因型探針出現陽性反應點，表示 LPC 疫苗毒仍保有 Group 1 基因型的特性。我們針對兔化豬瘟疫苗毒之核酸序列相較於豬瘟野外毒於病毒核酸之 3' 末端轉譯區有一段 12~13 Poly(T) 之插入的特性，從 Poly(T) 位置設計疫苗毒特異性探針，以達到區別豬瘟野外毒及 LPC 疫苗毒之目的。雜合結果顯示，三株兔化豬瘟疫苗毒 (LPC/AHRI, LPC/TS 及 LPC/PRK) 在 Group 1 基因型探針及疫苗毒特異性探針皆會出現陽性反應點，與預期相符，此點很容易與同屬於 Group 1 基因型的 ALD 及 A76 株進行區別。傳統 RT-PCR 法及 DNA 晶片法可檢出豬瘟野外毒最低病毒力價分別為 10^4 及 $1 \text{ TCID}_{50}/\text{mL}$ ，此結果顯示 DNA 晶片相較於 RT-PCR 敏感性高 10 倍。RT-PCR 結合 DNA 探針雜合技術可提高檢測敏感性，可快速鑑定臨床檢體中豬瘟病毒的基因型別，並區別豬瘟野外毒及疫苗毒。全部操作過程包含 RT-PCR 及 2 個小時的探針雜合反應共需 6 小時，明顯比病毒分離或核酸定序所需時間短。



圖一、以目視 DNA 晶片同步檢測、分型及區別豬瘟野外毒及疫苗毒。

(A) 探針布放圖：每一點顯示一條特異性探針所在位置。 1、2：豬瘟病毒通用型探針；3、4：疫苗毒特異性探針；5、6：豬瘟野外毒 Group 1 基因型特異性探針；7、8：豬瘟野外毒 Group 2 基因型特異性探針；9、10：豬瘟野外毒 Group 3 基因型特異性探針；H：探針雜合反應陽性對照。

(B) 豬瘟病毒 RT-PCR 產物與特異性探針雜合結果。 a-b: 豬瘟野外毒 Group 1 基因型; c-e: LPC 疫苗毒 Group 1 基因型; f-h：豬瘟野外毒 Group 2 基因型；i-l：豬瘟野外毒 Group 3 基因型；p：牛病毒性下痢病毒；q：邊界病毒；C：陰性對照。