

計畫編號：MOHW105-CDC-C-315-123502

衛生福利部疾病管制署 105 年署內科技研究計畫

病媒病毒核酸快速等溫檢測技術之開發

年度研究報告

執行機構：疾病管制署檢驗及疫苗研製中心

計畫主持人：舒佩芸

研究人員：林世宏、楊正芬、張淑芬、蘇千玲

執行期間：105 年 1 月 1 日至 105 年 12 月 31 日

* 本研究報告僅供參考，不代表衛生署疾病管制局意見 *

目 錄

	頁 碼
封面	
一、中文摘要	(3)
英文摘要	(4)
二、本文	
(1) 前言	(5-7)
(2) 材料與方法	(8-10)
(3) 結果	(11-12)
(4) 討論	(13)
(5) 結論與建議	(14)
(6) 計畫重要研究成果及具體建議	(15)
(7) 參考文獻	(16-17)
三、表次	(18)
四、圖次	(19-28)
	共 (28) 頁

中文摘要

由於國際間交通往來頻繁、全球溫室效應及氣候變遷等因素，使得新興/再浮現病媒病毒（vector-borne viruses）傳染病在全世界散佈範圍擴大，對人類健康所造成的威脅日益嚴重。近年來如登革熱、茲卡病毒感染症、屈公病、西尼羅熱在全球散播的範圍日益擴大，日本腦炎在亞洲造成嚴重流行，蜱媒腦炎在歐洲及亞洲流行，新種類的布尼亞病毒也在中國大陸、日本、韓國流行等，皆造成公共衛生上很大的危機。台灣位於亞熱帶地區，節肢動物種類繁多，許多種類皆具有傳播病毒的能力，一旦病毒由境外引入，極有可能造成台灣本土的流行，影響民眾的健康。所以有必要建立高靈敏、快速的核酸檢測系統，檢測出各種新興/再浮現病媒病毒傳染病，包括黃病毒屬（Flavivirus）之登革熱、茲卡及日本腦炎病毒等，阿爾發病毒屬（Alphavirus）之屈公病毒等。本研究我們開發屈公病毒及茲卡病毒快速等溫核酸增殖（LAMP 方法）與定量即時 PCR 及定量反轉錄 PCR（qRT-PCR 方法），有利於開發出定點照護（point-of-care）核酸檢測方法，及時幫助傳染病的防治及病人的醫療照顧。

關鍵詞：病媒病毒、屈公病毒、茲卡病毒、快速等溫核酸增殖方法、即時聚合酶連鎖反應

英文摘要

Because of the increasing international traffic, global warming and climate change, infectious disease vectors have expanded their geographical distributions and threaten the health of human population. Vector-borne viral diseases transmitted by blood-feeding arthropods, such as mosquito and tick, are among the most important infectious diseases to emerge in the human population. In recent years, dengue and severe dengue become the world's most widely spread mosquito-borne viral diseases and threatened more than two-thirds of the world's population. West Nile virus dramatically expanded its geographic range in North America. Chikungunya and Zika outbreaks spread quickly on West Pacific Ocean islands, and in Southeast Asia and Caribbean countries. Tick-borne encephalitis emerged in Europe and Asia. Taiwan is located in the subtropical region and has a large number of arthropod species. Among them, many species are potential vectors for vector-borne viral diseases. The introduction of vector-borne virus pathogens into an area where competent vectors already exist, may cause new and devastating outbreaks in the country. Therefore, there is a need for establishment of a laboratory based surveillance and diagnostic system for the effective detection of unknown / emerging vector-borne viral diseases. In this study, we develop the isothermal nucleic acid amplification assays (LAMP) and quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR) for detection of Chikungunya and Zika viruses. Rapid and sensitive diagnostic tools for detection of arboviral infections can help for disease control and case management.

keywords : vector-borne viruses, Chikungunya virus, Zika viruses, ,LAMP,

qRT-PCR

前言

由於國際間交通往來日益頻繁、全球溫室效應及氣候變遷等因素，使得未知/新興病媒病毒（vector-borne viruses）傳染病在全世界散佈範圍擴大，對人類健康所造成的威脅日益嚴重。其中尤以蚊蟲（mosquito）及壁蝨（tick）所媒介的病毒傳染病最為重要。近年來如登革熱、西尼羅熱在全球散播的範圍日益擴大(1-5)，屈公病與茲卡病毒在亞洲、非洲地區及加勒比海地區迅速傳播(6-12)，蜱媒腦炎(Tick-borne encephalitis)在歐洲及亞洲流行(13)，新種的布尼亞病毒(Bunyavirus, Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus; SFTSV) (14) 在中國大陸、日本、韓國流行，皆造成全球公共衛生上很大的危機。台灣位於亞熱帶地區，節肢動物種類繁多，許多種類具有傳播病毒的能力，一旦病毒從境外引入，極有可能造成本土的流行，影響民眾的健康。

節肢動物是動物界中種類及數量最多的一群，種類約占所有動物物種的 85%。目前全球至少有一千種以上的病毒被歸類為病媒病毒，其中經由節肢動物為媒介的病毒有 700 多種，超過 100 多種的病媒病毒，可感染人類。主要分為四類病毒，包括阿爾發病毒屬（Alphavirus），黃病毒屬（Flavivirus）、布尼亞病毒科（Bunyaviridae）及呼腸孤病毒科 (Reoviridae) 的病毒。Alphaviruses 所引起的主要疾病為屈公病（Chikungunya）、羅斯河病毒病（Ross River virus disease）、東方馬腦炎（Eastern Equine encephalitis, EEE）、西方馬腦炎(Western Equine encephalitis, WEE)及委瑞內拉馬腦炎(Venezuelan equine encephalitis, VEE)等；Flaviviruses 引起的主要疾病為登革熱(Dengue)、茲卡疾病(Zika disease)、黃熱病（yellow fever）、日本腦炎（Japanese encephalitis）、西尼羅熱/腦炎（West Nile fever/encephalitis）、聖路易腦炎（St. Louis encephalitis）及蜱媒腦炎（Tick-Borne Encephalitis Virus, TBEV）等；

Bunyaviruses 引起的主要疾病為加利福尼亞腦炎 (California encephalitis, LaCrosse encephalitis)、裂谷熱 (Rift Valley fever)、及克里米亞-剛果出血熱 (Crimean-Congo hemorrhagic fever)、發燒伴血小板減少症候病毒 (Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus; SFTSV), 及漢他病毒引起之出血熱及肺症候群等; Reoviruses 引起的主要疾病為科羅拉多蜱咬熱 (Colorado tick fever virus; CTFV)、Banna virus (BAV) 所引起之腦炎等。

病媒病毒主要分佈於熱帶及亞熱帶地區，病毒傳播循環是藉由節肢動物吸血或叮咬脊椎動物宿主時，將病毒傳播。當動物宿主被感染後，血液中含大量病毒再傳給叮咬或吸血的節肢動物，使節肢動物受感染。台灣位於熱帶及亞熱帶地區，節肢動物的種類及數量繁多，當有病毒出現或入侵時，即會增加傳播及流行的風險。近年來，屈公病毒及茲卡病毒由非洲及亞洲傳播至大洋洲及美洲，引發全球疫情。本研究將利用等溫核酸檢測方法及定量即時 RT-PCR 兩種方法進行屈公病毒及茲卡病毒之偵測，對疑似發燒病患進行檢驗，以及時篩檢出病人，減少病毒之境外移入及本土流行。

等溫核酸檢測方法與傳統的 PCR 反應不同，可在恆溫下進行核酸增殖反應，其優點為可利用簡單且價格低廉的儀器進行檢驗，並可縮短反應的時間，提升檢驗時效。等溫核酸檢測的方法有許多種，較常使用的如 LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) 方法，可使用 Eiken Genome site 所開發的 RT-LAMP 試劑進行反應，RT-LAMP 反應約 60 min, 60C。

定量即時 PCR 及定量反轉錄 PCR (quantitative reverse transcription PCR, qRT-PCR) 已被眾多科學家採用，因為其偵測範圍廣、靈敏度高、準確、專一及快速。qRT-PCR 的發展因為偵測感染病患的病毒或細菌

量、癌症監測、診斷個別基因差異的用藥反應等應用而大幅提高。
qRT-PCR 的方法是基於偵測目標物在反應前及 PCR 後產物的量化關係。相對於終端 PCR 方式 (end-point PCR, 傳統的 PCR 配合凝膠電泳, 在反應後偵測), qRT-PCR 有許多優點, 其結果可以較快取得且穩定, 因採用非常敏感的化學螢光, 使 RT-PCR 反應的靈敏度增加, 而且不需要傳統跑膠的偵測步驟。

材料與方法

本計畫之實施方法為利用 RT-LAMP 及 qRT-PCR 方法開發病媒病毒傳染病之分子診斷方法。

1. **血清檢體及病毒株來源：**血清檢體來源為通報自疾管署之各種病媒病毒感染之血清及全血，及配合機場發燒篩檢系統，對疑似發燒病患進行例行性的篩選採集之血清及全血。全部檢體（血清或全血 3c.c.），以保持低溫之國內快捷郵件寄送或由專人親送方式送達實驗室。而實驗室於收到檢體後立即置於 4°C 冰箱內靜置保存，隨後進行後續之檢驗分析事項。各種病毒之來源為購自 ATCC、由其他實驗室取得或自行分離建立的病毒株 (PRVABC59、IBH30656、PUC57/ZK *Eg* plasmid、CK9700032)。
2. **抽取 RNA：**利用 QIAamp Viral RNA Kit (QIAGEN) 抽取及純化病毒核酸。主要原理為利用裝有矽土-膠膜的離心圓柱，可以選擇性的與核酸結合，再經過數次清洗步驟，進而達到純化的目的。詳細的步驟如下：首先將病人血清檢體加入溶解液，分解蛋白質等雜質，同時將核糖核酸酶去活性，再將處理後的血清加到離心圓柱中，使核糖核酸與矽土膜結合，再經過離心及加入清洗液之重覆步驟清洗離心圓柱，最後以純水將核酸洗脫下來。血清(140 µl)中的 RNA 依據本法萃取，最後將 RNA 溶於 70 µl 純水(Water, containing 0.02% sodium azide)。
3. **引子(Primer)的設計與合成：**依 RT-LAMP 與 qRT-PCR 原理設計病毒專一性引子以檢測茲卡病毒 (ZIKV) 及屈公病毒 (CHIKV) 等重要病媒病毒。
4. **利用定量即時 PCR 及定量反轉錄 PCR 方法偵測茲卡病毒感染：**利用螢光定量 RT-PCR 方法，開發出一套以 SYBR Green 方法為基礎的即時螢光定量 RT-PCR 方法偵測茲卡病毒感染：此偵測系統主要在利用茲卡病毒引子，並應用 SYBR Green 單步驟 qRT-PCR 方法偵測茲卡病毒亞

洲、非洲株病毒與 PUC57/ZK *Eg* plasmid 核酸的含量。與傳統病毒分離方法比較時發現，qRT-PCR 方法在血清中所檢出的陽性率較之傳統病毒分離方法為高。

5. 定量即時 PCR 及定量反轉錄 PCR 反應條件: 12.5 ul, 2X QuantiTect SYBR Green RT-PCR master mix、0.25 ul, QuantiTect RT mix、0.6ul, Primer mix (10 uM)、5ul, Template RNA。RT: 50°C, 30 min、Taq polymerase activation: 95°C, 15 min、Denaturation: 95°C、Annealing: 55°C, 30 sec、Extension: 72°C, 20 sec、77°C, 20 sec, 收集螢光值, 45 Cycle, Melting curve: 95°C, 1 min、68°C → 95°C, 升溫速度 0.2°C /sec, 收集螢光值、25°C, 10 sec。
6. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): LAMP 是一種能夠在恆溫條件下(60-65°C)快速擴增核酸的方法。需設計 4 至 6 個 Primers, 包括兩個 outer、兩個 inner 和兩個 loop primers, 6 primers 需認識 target sequence 上的 8 個位置, Primer 的設計可採用 LAMP 設計軟體 (Net laboratory, Japan, <http://venus.netlaboratory.com>)。Primer 名稱如下: Forward outer primer (F3), backward outer primer (B3), forward inner primer (FIP) and backward inner primer(BIP), forward loop primer (FLP) 及 backward loop primer (BLP)。FIP 包含 F1c 和 F2, BIP 包含 B1c 和 B2, FIP 及 BIP primers 需經 HPLC 純化。FLP 和 BLP primers 包含 complementary to the sequence between F1&F2 and B1&B2 regions。LAMP 擴增反應稱為 strand displacement DNA synthesis, 是由於 Bst DNA polymerase 具有強的 strand displacement activity。在 LAMP 反應過程不需 DNA denaturation 步驟, 故可在恆溫下進行反應。當檢測 RNA 病毒時, LAMP 可加入反轉錄酶 (RT) 稱為 RT-LAMP。
7. RT-LAMP 反應條件: 12ul, 2x reaction Mix、1ul, Enzyme Mix (Bst

and AMV) 、5ul, Primer mix 、5ul, Template RNA 。60°C, 一小時、80°C 5 分鐘、4°C 。

8. RT-LAMP 產物之偵測 : 以 2% 洋菜膠進行電泳及 LA-500 方法偵測產物。

結果

1. **茲卡病毒與屈公病毒 RT-LAMP 系統之引子設計、合成與測試：**

表一所示為茲卡病毒與屈公病毒之設計之引子組。本研究設計出四組不同的 RT-LAMP 引子組，針對屈公病毒與茲卡病毒之偵測。
2. **CHIKV 1-2 (3'UTR)引子組，RT-LAMP 之測試。**
 - a. 檢測 RT-LAMP 專一性反應，所設計之引子組 (Table 1)，利用電泳分析結果，各表現出屈公之 LAMP-DNA 片段，各引子組對日本腦炎、第一型登革病毒及茲卡病毒皆無反應，故設計之引子組具有專一性(Figure 1)。
 - b. 檢測 RT-LAMP 靈敏度，所設計之引子組 (Figure 1)，利用電泳分析結果，表現出屈公病毒之 LAMP-DNA 片段，檢測靈敏度約為 10 pfu/mL(Figure 1)。
3. **ZIKV 1-2(3'UTR)引子組，RT-LAMP 之測試。**
 - a. 檢測 RT-LAMP 專一性反應，所設計之引子組(Table 1)，利用電泳分析結果，表現出茲卡病毒之 LAMP-DNA 片段，各引子組對日本腦炎、第一型登革病毒及屈公病毒皆無反應，故設計之引子有專一性 (Figure 2)。
 - b. 檢測 RT-LAMP 靈敏度，所設計之引子組(Figure 2)，利用電泳分析結果，表現出茲卡病毒之 LAMP-DNA 片段，檢測靈敏度至少可達 100 pfu/mL 以下(Figure 2)。
 - c. 利用 LA-500-LAMP 即時濁度測定儀，ZIKV-1 primer 反應結果 AF(10, 非洲株)於 32 min, AS(10, 亞洲株)於 25 min 被偵測、AF(1000, 非洲株)於 52 min, AS(1000,亞洲株)於 47 min 被偵測、NTC 於 52 min 被偵測。ZIKV-1 primer 加上 Loop 反應

結果 AF(10)於 13 min, AS(10)於 13 min 被偵測、AF(1000)於 22 min, AS(1000)於 21 min 被偵測、NTC 於 36 min 被偵測 (Figure 3,4)。

- d. 利用 LA-500 —LAMP 即時濁度測定儀，ZIKV-2 primer 反應結果 AF(10)於 49 min, AS(10)於 41 min 被偵測、NTC 陰性。ZIKV-1 primer 加上 Loop 反應結果 AF(10)於 26 min, AS(10)於 20 min 被偵測、NTC 陰性 (Figure 5,6)。

4. **ZIKV (Envelope gene)引子組，RT-QPCR 之測試。**

- a. 檢測 RT-QPCR 專一性反應，所設計之 Envelope gene 引子組，利用 MX3000 分析，表現出茲卡病毒之 RT-QPCR- DNA 片段，各引子組對第一、二、三、四型登革病毒、日本腦炎、屈公病、黃病毒及西尼羅病毒皆無反應，故設計之引子具有專一性(Figure7)。
- b. 檢測 RT-QPCR 靈敏度，所設計之 Envelope gene 引子組，利用 MX3000 分析與電泳分析結果，表現出亞洲株 (PRVABC59)、非洲株 (IBH30656)、PUC57/ZK *Eg* plasmid 之 RT-QPCR-DNA 片段，檢測靈敏度可達 8 pfu/mL ($R^2=0.99$, Efficiency=91%)、9 pfu/mL ($R^2=0.99$, Efficiency=101%)與 36 copies /RX ($R^2=0.99$, Efficiency=105%)(Figure 8,9,10)。
- c. T_m 值為 82.5, 82.5, 83.5 (Figure 11,12,9)

討論

本計畫的目標在建立等溫核酸檢測技術，應用於病媒病毒傳染病之偵測。RT-LAMP 與 qRT-PCR 兩種核酸檢測方法，約可在 1~3 小時內完成核酸增殖反應，若配合螢光檢測儀器，則可以即時偵測結果。

未來配合核酸純化方法的開發，將可以發展出高靈敏度、高專一性之 point-of-care 核酸分子快速檢測試劑。本研究開發出茲卡病毒與屈公病毒之 LAMP 檢測方法，具高專一性，靈敏度約在 <10~100 pfu/mL 之間並能快速在 20 分鐘內進行增幅反應。qRT-PCR ZIKV 引子組的靈敏度已可達 1~10 pfu/mL。未來將繼續改良引子、試劑、反應濃度、溫度等，發展核酸增殖反應之最適化條件。考量 Real-Lamp 的檢測在 20 分鐘內即被偵測出來，但偵測靈敏度為 100 pfu/mL。Real-PCR 需要三小時內完成偵測但偵測靈敏度為 8 pfu/mL，但靈敏度較佳，花費也較 Real-PCR 便宜。因 Real-Lamp 具有快篩檢驗效益優勢，未來將應用在傳染病的檢測，做為及時疫情監測與防治策略參考。此外我們也將開發 Alphavirus 及 Bunyavirus 之分子診斷方法，希望及時篩檢出病原體，有效降低傳染病的流行。未來仍應持續對境外移入及本土病毒進行篩檢，使國人免於受傳染病之威脅。

結論與建議

在全球經濟一體化趨勢下，各種新興及再浮現傳染病對人類健康所造成的威脅日益嚴重，病媒性傳染病在世界各地散佈情形正急速增加，建立一套完整的病媒性傳染病監測、快速檢驗與流行病學分析系統，監測台灣地區已知存在及未來可能會侵入的病媒性傳染病是十分重要的。本計畫開發出可偵測茲卡病毒與屈公病毒的兩種等溫核酸檢測方法 (RT-LAMP 與 qRT-PCR)。未來可發展為 point-of-care 核酸分子快速檢測試劑，應用於醫療及監測，一旦發現傳染病，可及時實施防治工作，有效降低傳染病的流行，解決公共衛生上的危機。未來仍應持續監測境外移入及本土傳染病原體，並運用風險管理的概念，以發生可能性高，影響較嚴重的病原體優先開發，使國人免於受傳染病之威脅。

計畫重要研究成果及具體建議

1. 計畫之新發現或新發明

我們開發出病媒病毒(茲卡病毒與屈公病毒)等溫核酸檢測(RT-LAMP與 qRT-PCR)方法。未來可發展為 point-of-care 核酸分子快速檢測試劑，應用於醫療及監測。未來我們也將開發不同病媒病毒等溫核酸檢測方法，可及時篩檢出病原體，有效降低傳染病的擴散及流行。

2. 計畫對民眾具教育宣導之成果

加強衛教宣導、實施病人自我管理、鼓勵醫師通報等防疫措施可及早發現病毒血症期的發燒患者，減少境外移入病毒的引進及本土擴散。對於境外移入的無症狀、無發燒之空窗期患者，因無法得知其感染，無法進行及時篩檢，更需要後續的主動監測與通報系統配合。

3. 計畫對醫藥衛生政策之具體建議

由於國際間交通往來頻繁、全球溫室效應及氣候變遷等因素，各種病媒病毒如登革病毒、屈公病毒、茲卡病毒、蜱媒腦炎病毒、新布尼亞病毒(SFTSV)等在亞、歐及非洲流行，已成為全球公共衛生防疫上的重大問題，應積極加強境外及本土病媒性傳染病之監測。

參考文獻

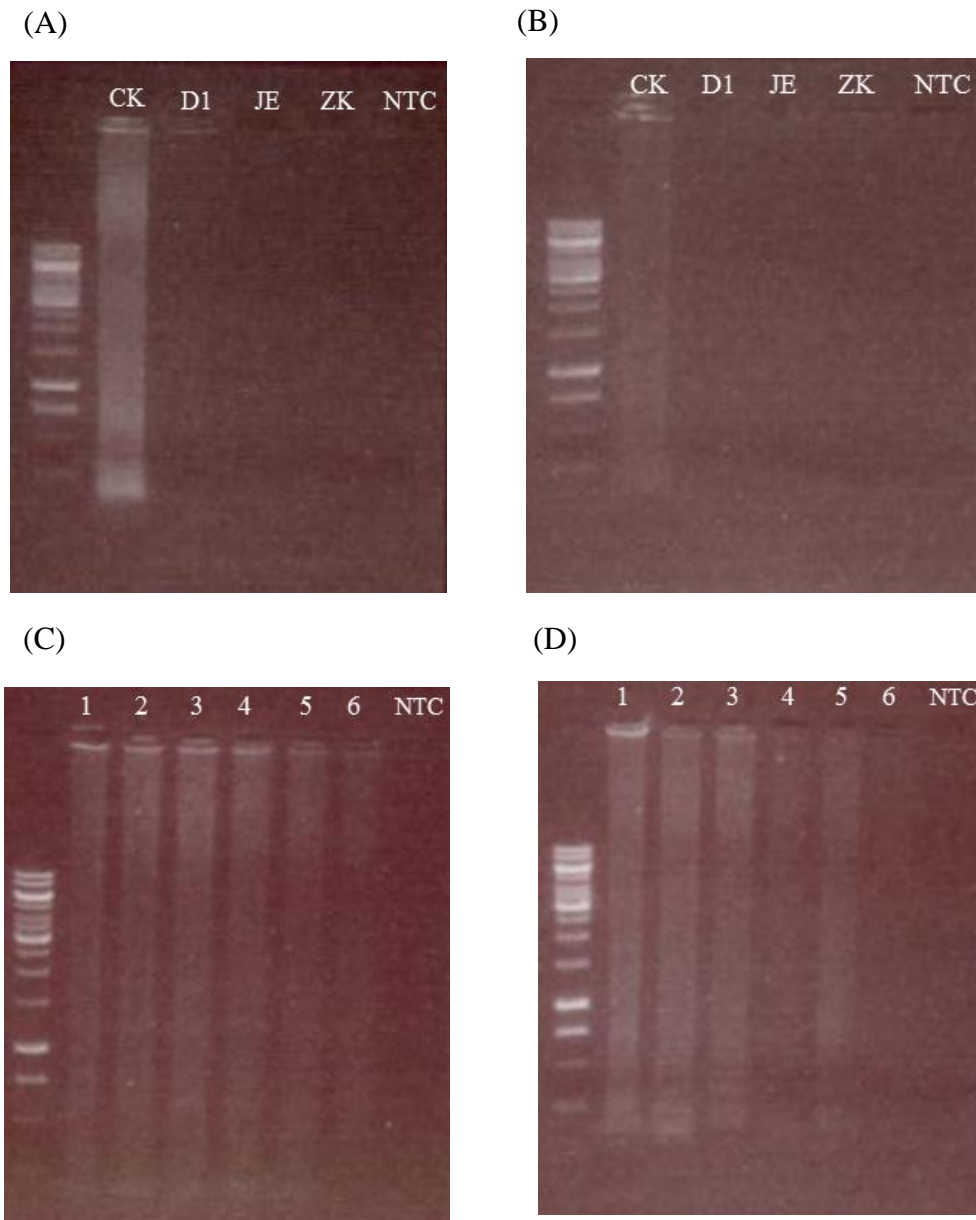
1. Gubler DJ. Human arbovirus infections worldwide. *Ann N Y Acad Sci.* 2001;951:13-24.
2. Gubler DJ. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. *Arch Med Res.* 2002;33(4):330-42. Review
3. Wilson ME, Weld LH, Boggild A, Keystone JS, Kain KC, von Sonnenburg F, Schwartz E; GeoSentinel Surveillance Network. Fever in returned travelers: results from the GeoSentinel Surveillance Network. *Clin Infect Dis.* 2007 Jun 15;44(12):1560-8.
4. Wilson ME, Freedman DO. Etiology of travel-related fever. *Curr Opin Infect Dis.* 2007. 20:449-53. Review.
5. Huang JH, Su CL, Yang CF, Liao TL, Hsu TC, Chang SF, Lin CC, Shu PY. Molecular characterization and phylogenetic analysis of dengue viruses imported into Taiwan during 2008-2010. *Am J Trop Med Hyg.* 2012 Aug;87(2):349-58.
6. Powers AM, Logue CH. Changing patterns of chikungunya virus: re-emergence of a zoonotic arbovirus. *J Gen Virol.*2007; 88:2363-77.
7. Shu PY, Yang CF, Su CL, Chen CY, Chang SF, Tsai KH, Cheng CH, Huang JH. Two imported chikungunya cases, Taiwan. *Emerg Infect Dis.* 2008; 14:1326-7.
8. Huang JH, Yang CF, Su CL, Chang SF, Cheng CH, Yu SK, Lin CC, Shu PY. Imported chikungunya virus strains, Taiwan, 2006-2009. *Emerg Infect Dis.* 2009; 15:1854-6.
9. Cao-Lormeau, V.-M., Roche, C., Teissier, A., Robin, E., Berry, A.-L., Mallet, H.-P., Sall, A. A., and Musso, D. (2014). Zika Virus, French Polynesia, South Pacific, 2013. *Emerging infectious diseases*, 20(6):1085-1086.
10. Campos, G. S., Bandeira, A. C., and Sardi, S. I. (2015). Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil. *Emerging infectious diseases*, 21(10):1885-1886.
11. Huang AS, Shu PY, Yang CH. A new reportable disease is born: Taiwan Centers for Disease Control's response to emerging Zika virus infection. *J Formos Med Assoc.* 2016; 115: 223-225.
12. Haddow AD, Schuh AJ, Yasuda CY, Kasper MR, Heang V, Huy R, Guzman H, Tesh RB, Weaver SC. Genetic characterization of Zika virus strains: geographic expansion of the Asian lineage. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6:e1477.

13. Zhang Y, Si BY, Liu BH, Chang GH, Yang YH, Huo QB, Zheng YC, Zhu QY. Complete genomic characterization of two tick-borne encephalitis viruses isolated from China. *Virus Res.* 2012. 167:310-3.
14. Yu XJ, Liang MF, Zhang SY, Liu Y, Li JD, Sun YL, Zhang L, et al. Fever with thrombocytopenia associated with a novel bunyavirus in China. *N Engl J Med.* 2011. 364:1523-32.

Table 1. RT-LAMP primer sets used for detection of CHIKV and ZIKV.

	CHIKV
CHIKV-1 F3	TGC GAC GCT GAA AAC ACG
CHIKV-1 B3	TTG GCG TCC TTA ACT GTG AC
CHIKV-1 FIP	TGA GCC CTG TAT GCT GAT GCA AGA GCG AAG CAC ATG TGG A
CHIKV-1 BIP	CAG CTA AGC TCC GCG TCC TTG TCG CCG TTT GCA TAG GC
	CHIKV
CHIKV-2 F3	ACA TGC CCA TCT CCA TCG A
CHIKV-2 B3	AGT GAC GGC GTT GGT CAT
CHIKV-2 FIP	ACC TCG CAC GAC ATG TCC GTG GAT GCG GCC TTC ACT AG
CHIKV-2 BIP	GCA CCC ATT CCT CAG ACT TCG GCG AAT GCA CCG CAC ACT T
	ZIKV
ZIKV-1 F3	TGTTGTCAGGCCTGCTAGT
ZIKV-1 B3	TGAAGGGTGGGGAAGGTC
ZIKV-1 FIP	TCGGCCTGACTATAGGCTTGGT-GCTTGGGGAAAGCTGTGC
ZIKV-1 BIP	AAGCCATGCTGCCTGTGAGC-TCTTTTCCCATCCTGCGC
ZIKV-1 FLP	TTCTCCTGGGGGGGTCACAG
ZIKV-1 BLP	CCCTCAGAGGACACTGAGTC
	ZIKV
ZIKV-2 F3	GCAGCACCATTGGAAAAGC
ZIKV-2 B3	ACCACATCAGCAACGTTCC
ZIKV-2 FIP	CCAAAGTCCCAGGCTGTGTCTC-TTTGAAGCCACTGTGAGAGG
ZIKV-2 BIP	TCAACTCATTGGGCAAGGGCA-ACCAGGACATTCCTCCAAAC
ZIKV-2 FLP	TCCATCAAATTTTGGAGCAGC
ZIKV-2 BLP	CAAGACTGCCATTCTCTTGG
	ZIKV
ZIKV-F	GCAACATGGCGGAGGTAAGAT
ZIKV-R	GCTCTYGGTGAATTRGGCGT

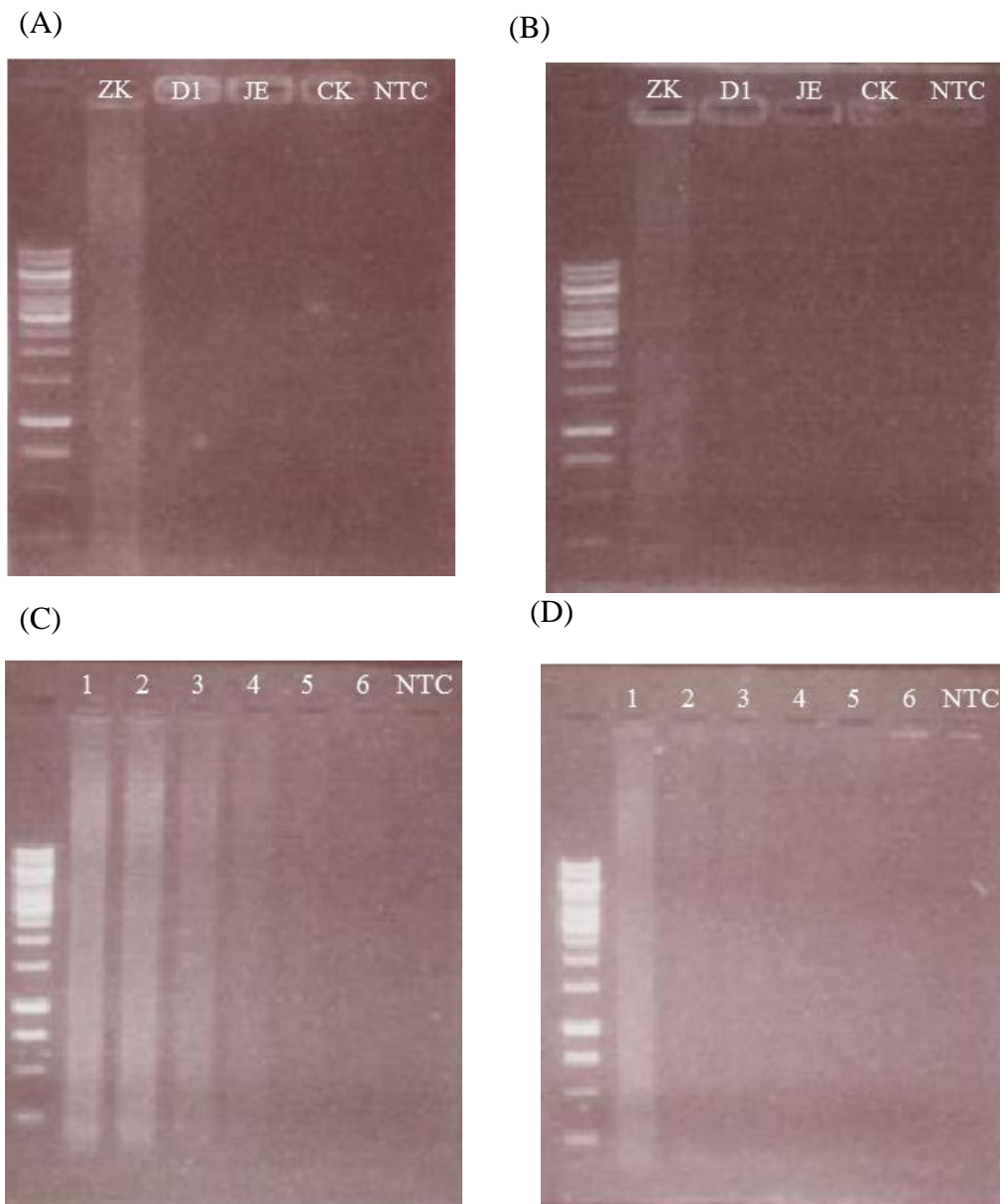
Figure 1. Chikungunya viruses (CHIKV-AS) 引子組，RT-LAMP 之專一性(Specificity)與靈敏度(Sensitivity)測試



(A)、(B) CHIKV-1,2 引子對，以屈公病毒、第一型登革病毒、日本腦炎標準株與茲卡病毒的 RNA 為模板進行 RT-LAMP 反應，總體積為 25 ul。

(C)、(D) CHIKV-1,2 引子對 以屈公病毒進行靈敏度 $10^6 \sim 10^1$ PFU/ml

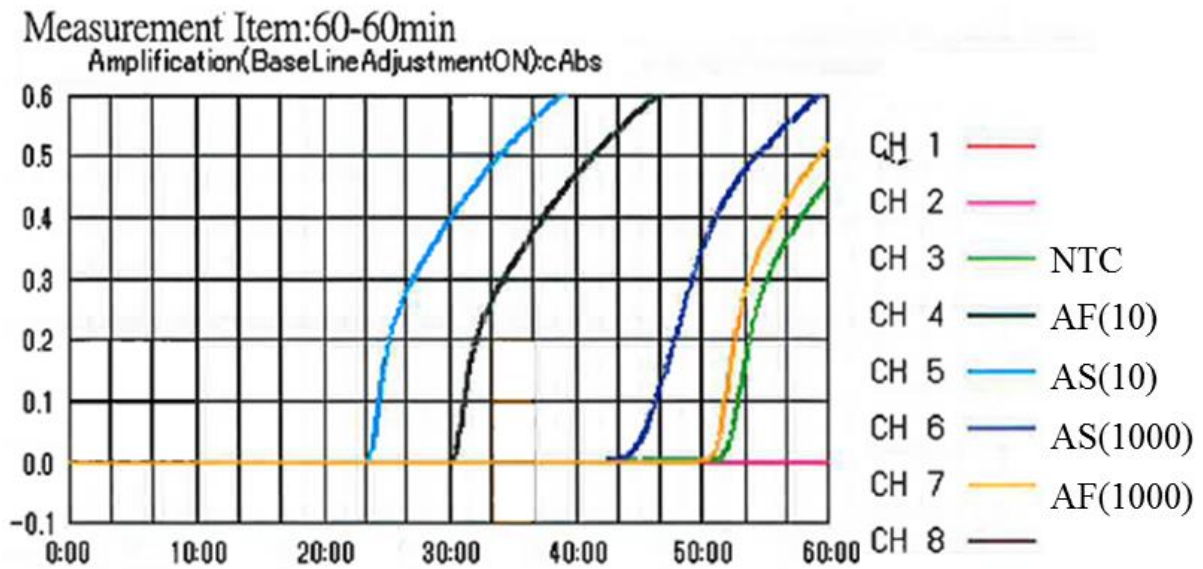
Figure 2. Zika viruses (ZIKV-AS) NS1 gene 引子組，RT-LAMP 之專一性(Specificity)與靈敏度(Sensitivity)測試



(A)、(B)ZIKV-1,2 引子對, 以茲卡病毒、第一型登革病毒、日本腦炎與屈公病毒的 RNA 為模板進行 RT-LAMP 反應，總體積為 25 ul , 50 min 。

(C)、(D))ZIKV -1,2 引子對以茲卡病毒進行靈敏度 $10^6 \sim 10^1$ PFU/ml

Figure 3. 利用 LA-500 — LAMP 即時濁度測定儀，測試 ZIKV-1 primer 反應時間。



*AF(茲卡非洲株)，AS(茲卡亞洲株)，AF(10,1000)-病毒稀釋 10,1000 倍

Figure 4. 利用 LA-500 — LAMP 即時濁度測定儀，測試 ZIKV-1 primer 與 **loop primer** 反應時間。

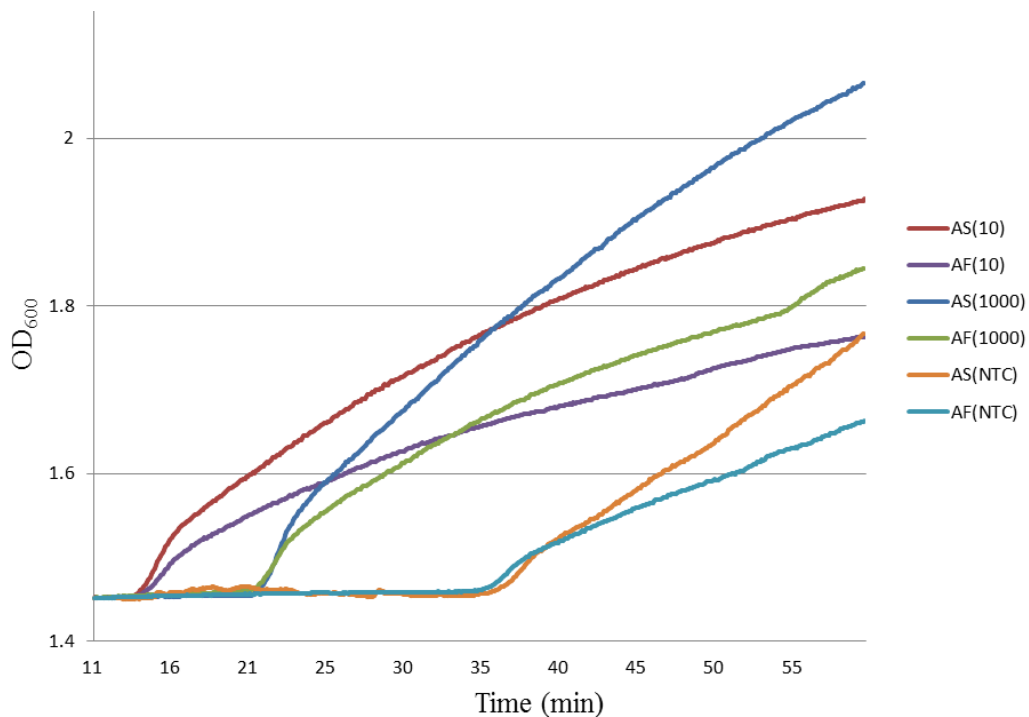
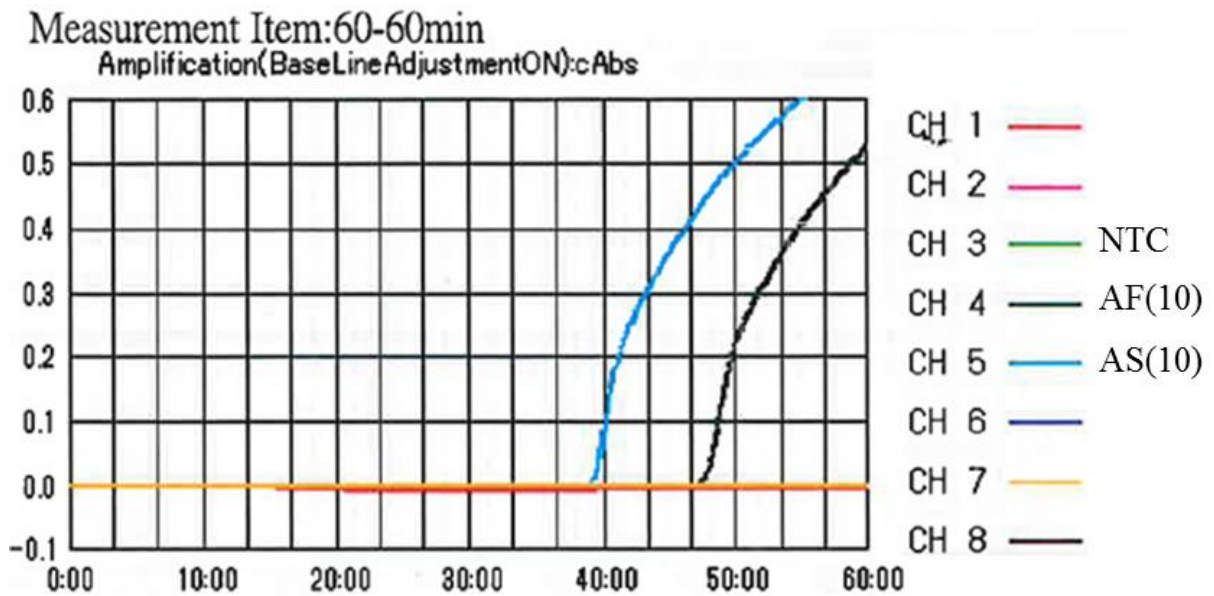


Figure 5. 利用 LA-500 — LAMP 即時濁度測定儀，測試 ZIKV-2 primer 反應時間。



*AF(茲卡非洲株)，AS(茲卡亞洲株)，AF(10)-病毒稀釋 10 倍

Figure 6. 利用 LA-500 — LAMP 即時濁度測定儀，測試 ZIKV-2 primer 與 **loop primer** 反應時間。

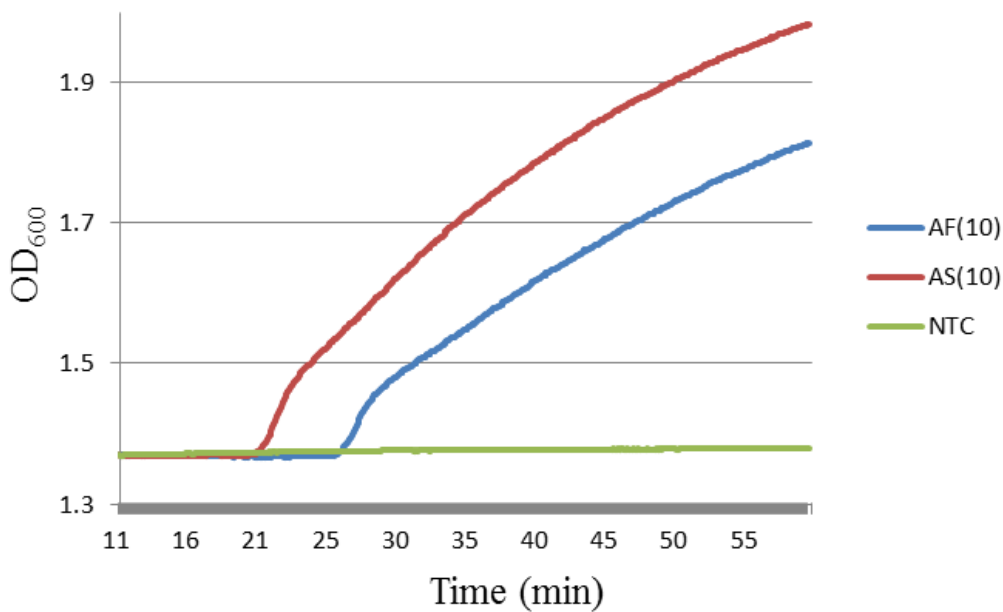


Figure 7. 使用 ZIKV primer set。以 ZIKV plasmid、ZIKV、DENV 1-4 型、CHIKV、JEV、Yellow fever virus 與 West Nile virus RNA 為模板進行 qPCR 反應。

Strain	Detection (ct) with primer pair
ZIKV plasmid	+ (24)
ZIKV	+ (26)
DEN-1 (8700828A)	- (no Ct)
DEN-2 (9200491A)	- (no Ct)
DEN-3 (9200439A)	- (no Ct)
DEN-4 (8700544A)	- (no Ct)
CHIK	- (no Ct)
JEV (JaGAR)	- (no Ct)
Yellow fever virus	- (no Ct)
West Nile virus	- (no Ct)
NTC	- (no Ct)

Plasmid Construct Map

Order ID: 16020203

The gene was cloned in pUC57 by EcoRV.

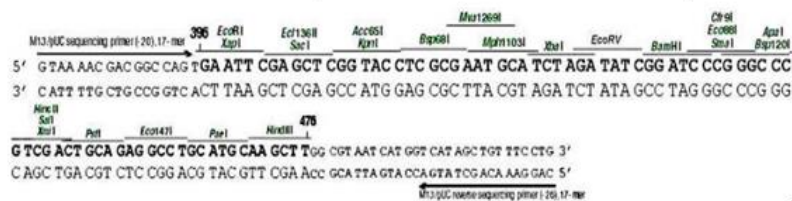
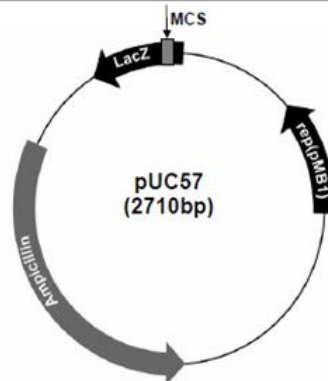
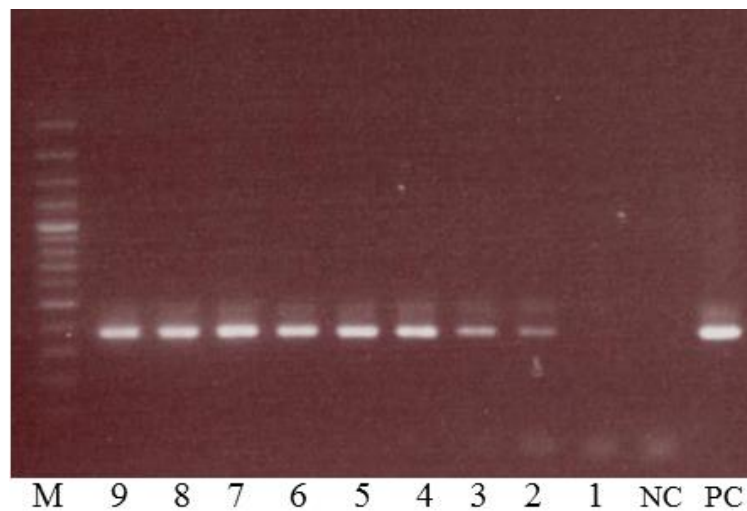
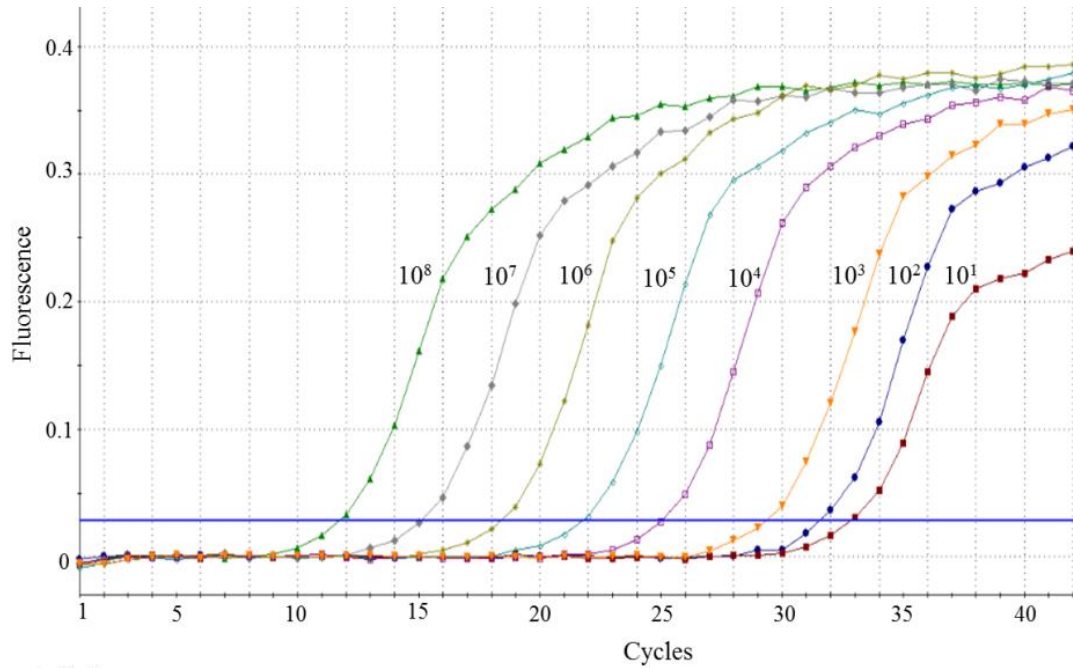
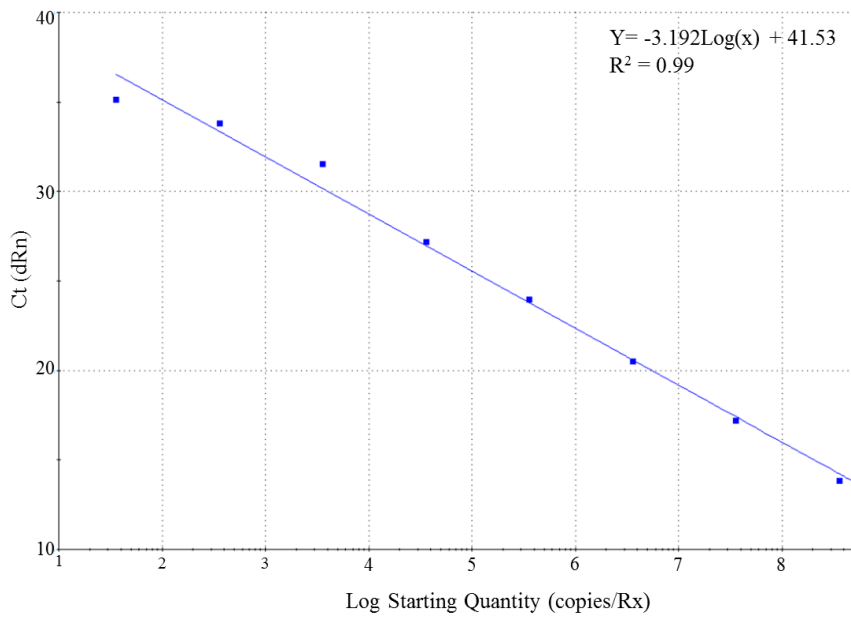


Figure 8. 利用 ZIKV SYBR green real time RT-PCR 進行增幅，將 ZIKV Plasmid 以 $10^8 \sim 10^1$ copies/RX 進行稀釋。

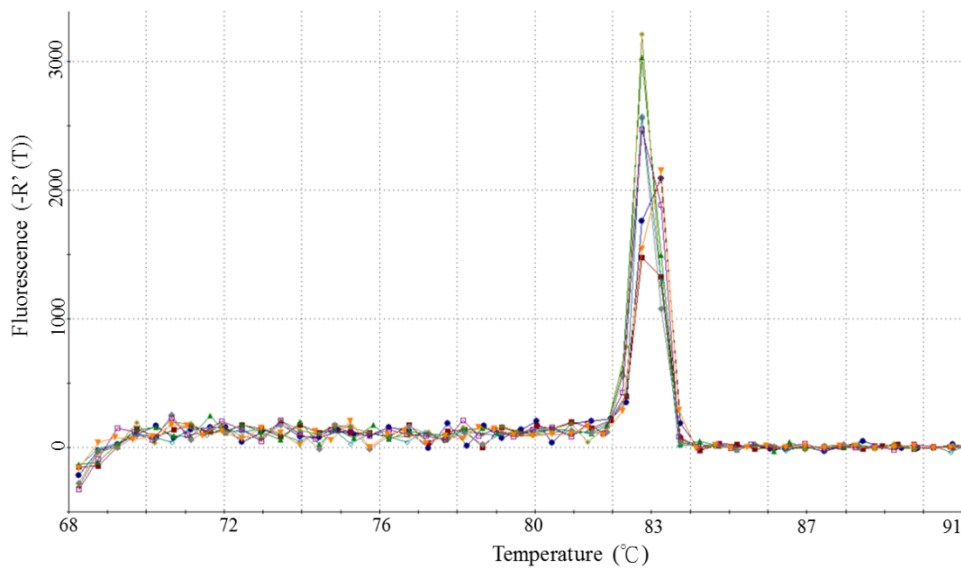


以瓊膠電泳所得的結果，顯示 PCR 產物的大小，且並無明顯的 Primer dimer 產物出現。

Figure 9. 檢測 RT-PCR 靈敏度，所設計 ZIKV 之 E gene 引子組，以 ZIKV Plasmid 進行標準曲線稀釋($10^8 \sim 10^1$)。



利用 MX3000 分析結果，其檢測靈敏度至少可達 3.6×10^1 copies/RX。
 $R^2=0.99$, Efficiency=105%。



螢光定量 RT-PCR 反應產物之 T_m 值為 83.5。

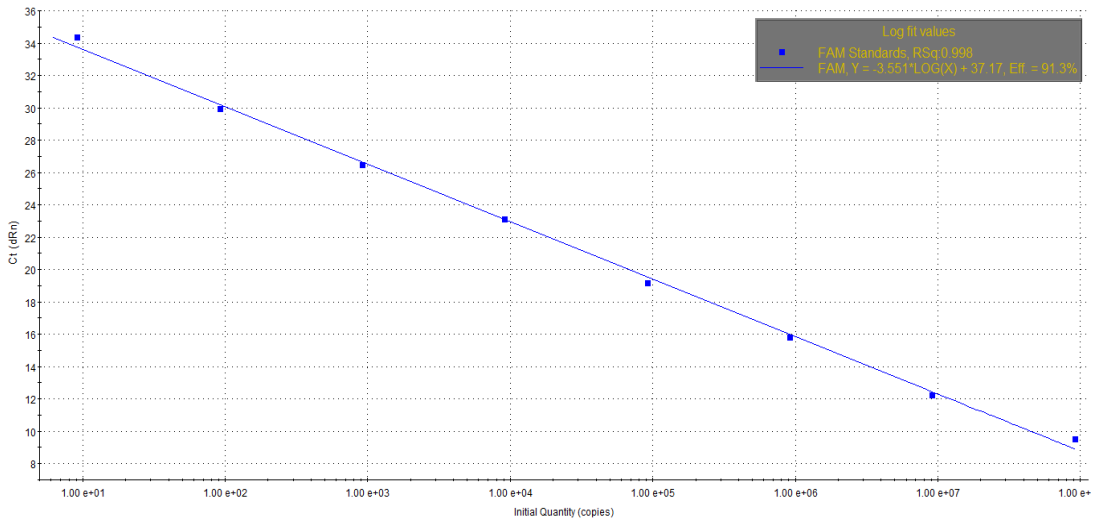
Figure 10. 檢測 RT-PCR 靈敏度，所設計 ZIKV 之 E gene 引子組，以 ZIKV Asia (PRVABC59)進行標準曲線稀釋($10^7 \sim 10^0$)與 ZIKV Africa (IBH30656)進行標準曲線稀釋($10^5 \sim 10^0$)

Asia PRVABC59

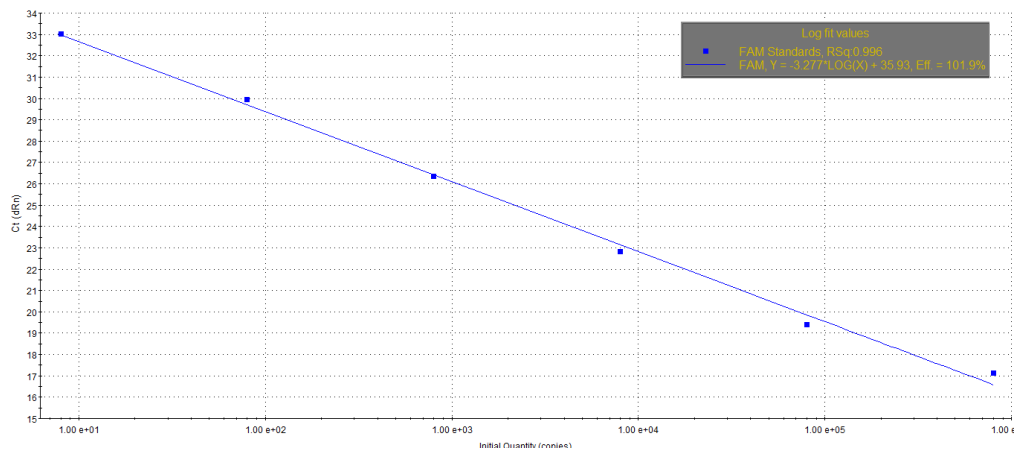
ZIKA128F+378R(400-400nM) Asia TE buffer					
Well	Well Name	R Last	Ct	Final	Tm
A11	9.2×10^7	8181	9.29	+	82.75
B11	9.2×10^6	8028	12.02	+	82.35
C11	9.2×10^5	7676	15.61	+	82.35
D11	9.2×10^4	7976	18.9	+	82.35
E11	9.2×10^3	8148	22.85	+	82.25
F11	9.2×10^2	8043	26.23	+	82.25
G11	9.2×10^1	8341	29.73	+	82.25
H11	9.2×10^0	7762	34.14	+	82.75
G11	NTC	2305	No Ct	-	76.75

Africa IBH30656

ZIKA128F+378R(400-400nM) Afica TE buffer					
Well	Well Name	R Last	Ct	Final	Tm
A10	8×10^5	8446	16.44	+	82.75
B10	8×10^4	7506	18.77	+	82.35
C10	8×10^3	8109	22.04	+	82.35
D10	8×10^2	7161	25.76	+	82.35
E10	8×10^1	7482	29.31	+	82.25
F10	8×10^0	7388	32.38	+	82.25
G10	NTC	2105	No Ct	-	74.75



MX3000 分析結果，其 ZIKV Asia 檢測靈敏度至少可達 9.2 PFU/ml。R²=0.99, Efficiency=91%



MX3000 分析結果，其 ZIKV Africa 檢測靈敏度至少可達 8 PFU/ml。R²=0.99, Efficiency=101%

Figure 11. 利用 ZIKV SYBR green real time RT-PCR 進行增幅，將 ZIKV Asia (PRVABC59)以 $10^7 \sim 10^0$ PFU/ml 進行稀釋。Tm 值為 82.5

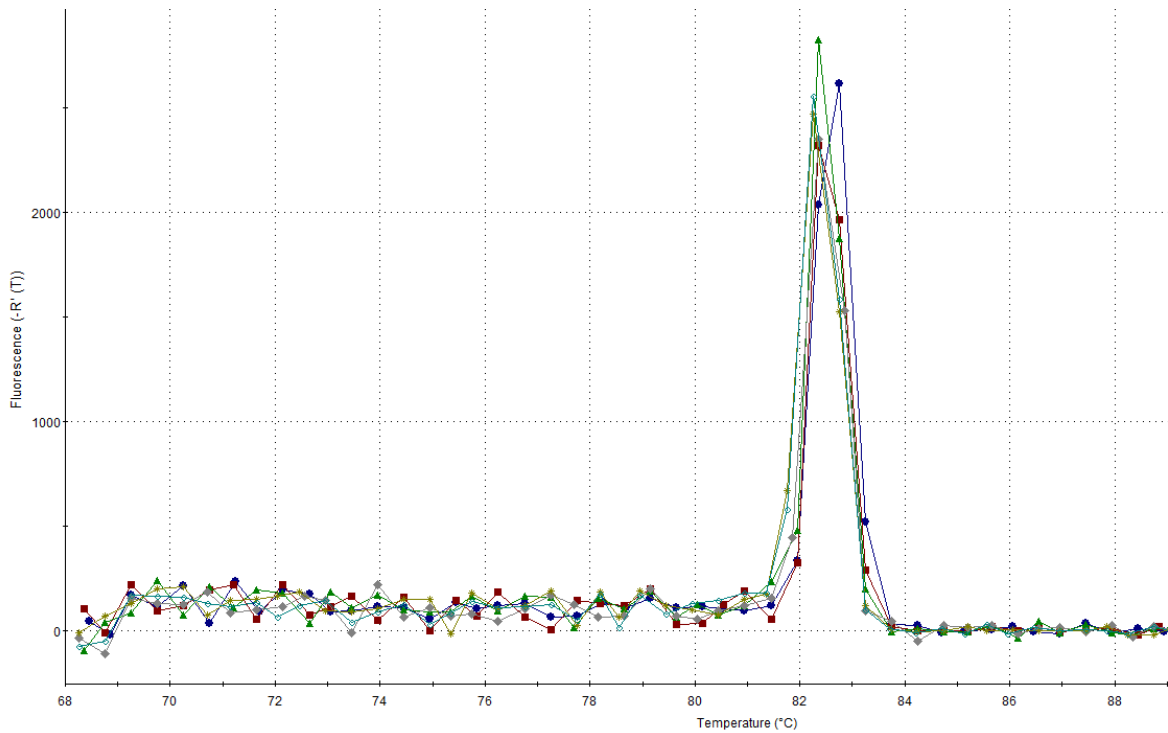
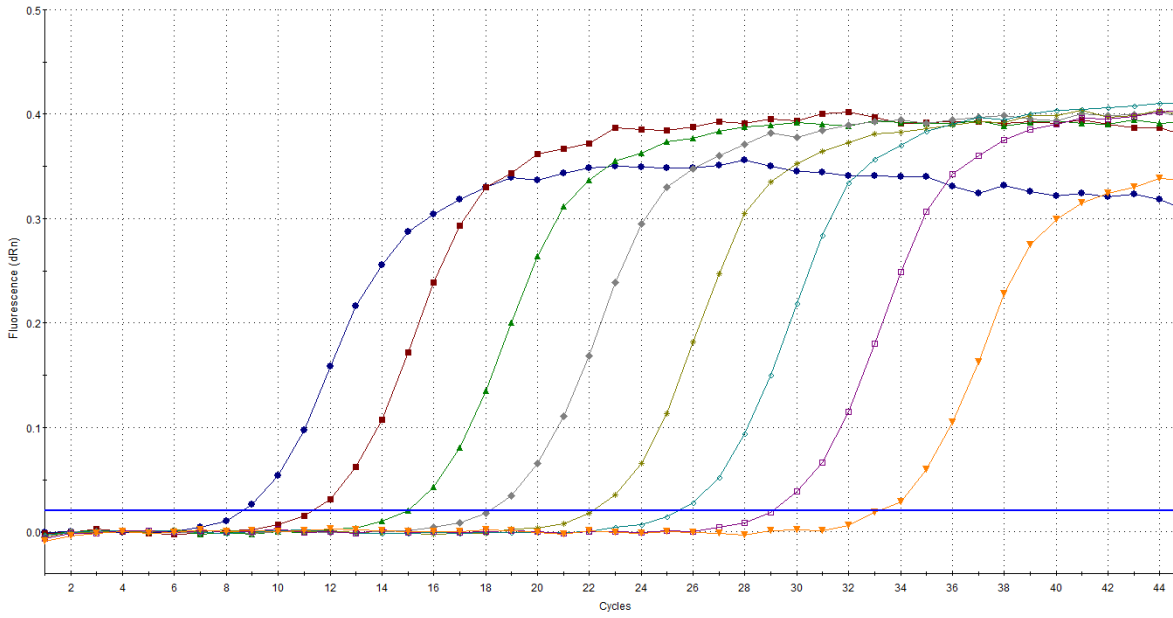


Figure 12. 利用 ZIKV SYBR green real time RT-PCR 進行增幅，將 ZIKV Africa (IBH30656) 以 $10^5 \sim 10^0$ PFU/ml 進行稀釋。T_m 值為 82.5。

