ISSN 1021-3651

SARS 即時定量系統的建立與分析

前　言

西元 2003 年二月在越南河內有一位美國商人因產生非典型肺炎就醫，之後送至香港治療後死亡，接著陸續在香港與越南出現非典型肺炎合併有呼吸道衰竭案例，同時間在中國大陸廣東地區亦發生非典型肺炎之疫情，而台灣地區在 3 月中旬傳出類似個案，其它國家包括加拿大、新加坡、美國等地也先後傳出疫情。世界衛生組織(WHO)爲有效區隔與界定該疫情的特徵，於 3 月 15 日正式將此疾病正名爲「嚴重急性呼吸道症候群」(Severe Acute Respiratory Syndrome, 簡稱爲 SARS)。同年 4 月美國疾病管制局利用電子顯微鏡與病毒培養的方式鑑定出 SARS 病毒爲一種新型冠狀病毒(novel coronavirus)[1]。SARS 病毒的傳染方式可能爲近距離的飛沫與接觸傳染，潛伏期短加上多數人對此病毒無抗體保護，在許多國家以驚人的速度傳播！台灣地區一開始由一位曾到過大陸廣東地區出差旅行的勤姓台商返台後出現 SARS 症狀，之後陸續傳出醫護人員遭感染以及院內感染，造成民眾與社會極大的恐慌！

簡　介

SARS 病毒爲一種新型冠狀病毒 RNA(+)具外膜(envelope)，其核酸全長約爲 29,727bp，G/C content 約爲 41%，其基因組成架構與典型的冠狀病毒相似

爲[5’-replicase (rep) –spike (S) -envelope(E) -membrane (M)-nucleocapsid (N)-3’]，在 rep 區域基因序列與過去所發現的冠狀病毒有非常大的差異，而其它區域基因序列相似度也很低[2]。目前用來診斷 SARS 的實驗室方法包括：反轉錄聚合脢鏈反應(RT-PCR)，即時定量系統(Real-time RT-PCR)，酵素免疫分析法(ELISA)，免疫螢光分析法(IFA)，中和測試(NT)等。由於 SARS 病毒目前已經被衛生署列爲第四類法定傳染病[3]，因此處理 SARS 檢體根據生物安全實驗室隔離設施之規定須於第二級(P2)以上實驗室，若需分離培養 SARS 病毒則需第三級(P3)以上之實驗室。因此，從事 SARS 檢體處理與檢驗分析包括：RT-PCR，Real-time PCR，ELISA 等需於第二級以上實驗室。本局病毒實驗室在 SARS 於台灣發生初期就積極與美國 CDC 作密切聯繫，根據美國 CDC 所給予的資訊建立即時定量 RT-PCR 病原體檢驗診斷系統，用於 SARS 感染初期檢驗分析。

材料方法

檢體種類與處理

由於 SARS 病毒爲造成呼吸道之感染，因此在感染初期肺部的抽取液、痰檢體與咽喉拭子較容易檢驗出病原體，至於血液、尿液、糞便檢體在感染的初期到後期亦可檢驗到病原體的存在[1, 4]。

a.血液檢體：血清或添加抗凝劑如 sodium citrate 或 EDTA 的血漿皆可使用，檢體以 4℃的運送。採集後之檢體，以 2,000 rpm 離心 10 分鐘，以分離出的血清備用。

b.咽喉拭子檢體：咽喉拭子棉棒充分攪拌後於塑膠管壁旋轉擠乾取出。將擠出之液體於 4℃，2100 ×g 離心 15 分鐘。收集上清液裝於管子標示號碼及日期保存於-70℃。

c.糞便檢體：取糞便 1 g，放入 15 ml 離心管中，加入玻璃圓球及 10 ml PBS 調成 10% 懸浮液。於 4℃，2100 ×g 離心 15 分鐘收集上清液分裝於 2～3 支 Cryotube，標示號碼及日期保存於-70℃。

d.痰檢體 ：取痰檢體與 0.9%NaCl(內含 1% N-Acetylcysteine)體積 1: 2 攪拌靜置 30 分鐘後於 4℃，2100 ×g 離心 15 分鐘，收集上清液。

探針與引子的設計

由美國 CDC 所與之探針與引子序列 CDC-1F/ CDC-1R/ CDC1-Probe 與 CDC -2F/ CDC-2R/ CDC2Probe (CDC ; catalog # KT0051) 其中 CDC-1 的引子對是增幅 SARS 病毒的 Pol 區域，CDC-2 引子對是增幅 SARS 病毒的 N 區域[5]。德國生產的 SARS 檢驗試劑套組其引子對所增幅的區域爲 SARS 病毒的 NS (non-structure) 區域。

SARS病毒Standard的建立

以本實驗室所分離到的 SARS 病毒爲模板(template)，CDC-1F/CDC-1R、CDC-2F/CDC-2R 爲引子對利用 RT-PCR 的方法增幅出 81bps 與 78bps 的基因片段，再將此基因片段以分子生物學遺傳工程之方法使用 T4 黏接脢(ligase)，將此增幅基因片段接到 pGEM-T 載體上(pGEM-T Easy Vector ,Promega)，接著以轉殖(Transformation)的方法，將以黏接好的載體送入 JM109 的大腸桿菌(E.coli)中，並利用載體中所帶有的 Ampicillin resistance 基因以抗生素 Ampicillin 來篩選。將篩選出的菌落在 37℃大量增殖後，萃取出載體 DNA，測其 O..D260 值，再將其換算並稀釋成 0.2~2x106 copies/ul。

RNA的萃取

使用QIAGEN公司的QIAmp Viral RNA kit進行RNA的純化。吸取檢體 140 ul加入 560 ul Buffer AVL於室溫下作用 10 分鐘，再加入 560 ul絕對酒精混合完全(vortexing)，上述混合液再通過QIAmp spin column，column以 Buffer AW清洗兩次以後，用 80℃純水(RNase Free)將RNA溶出。製備的病毒RNA可用於反轉錄及聚合酵素鏈鎖反應（Reverse Transcription

Polymerase Chain Reaction）。

定量分析(real-time RT-PCR)

以 ABI 7000 來作分析，首先，取 5ul 的 RNA 加到 TaqMan one-step RT-PCR Master Mix Reagents(SN：4309169) 中，其中引子的濃度爲 400nM，螢光標的的探針濃度爲 200nM，並且加入 TaqMan exogenous internal control (SN：4308323)。反轉錄作用爲 48℃ 30 分鐘，接著爲活化 AmpliTaq DNA 聚合脢 95℃10 分鐘，再進行 PCR 反應 40 個循環：denature 爲 95℃15 秒，annealing-extension 爲 60℃ 1 分鐘，螢光訊號的收集於 annealing-extension 的步驟，並以 ABI Prism SDS 軟體進行分析。

以德國 ARTUS 的檢驗試劑則是配合 Roch LightCycler 來作分析，取 5ul 的 RNA 加到 Coronavirus LC Master mix，內含 Mg2+濃度爲 3.75mM 與 Corona virus internal control (IC) 0.5 ul/reaction，最後 total 的總體積爲 20 ul。反轉錄作用 50℃ 30 分鐘，活化 DNA 聚合脢 95℃10 分鐘，再進行 PCR 反應 50 個循環：denature 爲 95℃2 秒，annealing 爲 55℃12 秒，extension 爲 72℃10 秒螢光訊號的收集於 annealing 的步驟，最後 cooling 步驟 40℃ 30 秒。

RT-PCR分析

使用 QIAGEN one-step RT-PCR Kit (Cat. No. 210212)，加入 5X QIAGEN One-Step RT-PCR buffer、dNTP Mix (10 mM)、5X Q-Solution、enzyme Mix 最後加入引子對 F2/R1 與 5ul Viral RNA（F2：5’–CTAACATG CTTAGGA TAATGG- 3，R1: 5’-CAGGTA AGCGTAAAACTCATC-3’）[6]。其反應的條件爲反轉錄作用 50℃ 30 分鐘，活化 DNA 聚合脢 95℃ 15 分鐘，再進行 PCR 反應 40 個循環：denature 爲 95℃ 30 秒，annealing 爲 55℃ 45 秒，extension 爲 72℃ 1 分鐘[7]。

實驗結果

標準曲線(standard curve)的建立

在定量 RT-PCR 的分析系統中標準曲線的建立是很重要的，本次的標準曲線採用分子選殖(cloning)的方式以 CDC-1F/CDC-1R 與 CDC-2F/CDC-2R 經 RT-PCR 所增幅出的片段分別以 T4 黏接脢(ligase)接到 pGEMT-EASY vector 上，再將其轉送入 E.Coli 中作保存與大量增殖。最後，從 E.Coli 中萃取出載體核酸換算濃度爲 0.2~2x106 copies/ul，在每次反應時加入 5 ul 的體積使標準曲線的濃度範圍 1~107 copies，由於 CDC1 與 CDC2 的引子對與探針組的敏感度與 PCR efficiency 的提高理想情況下可以偵測到一個 copy 的核酸。以 SDS 軟體分析結果時將 Delta Rn 的閥值定在 0.20，螢光訊號高於此閥值的檢體爲陽性，反之爲陰性，而標準曲線在 Delta Rn 的閥值定在 0.20 時，從 1~106copies 濃度產生的螢光訊號，根據此閥值對應出不同的 cycle number 可定義爲 Ct (Cycle threshold)(見圖一、二)濃度高的在較少的 PCR 循環數時其螢光測量值可高於閥值；濃度低時則相反根。據 Ct 值與 Log copies 作出線性圖，通常建議 slope 值接近-3.3，Y-Intercept 值接近 40，Correlation 值(R2)接近 1.0 (見圖一、二)。在評估 CDC1 與 CDC2 兩組定量分析系統從標準曲線中我們可以發現在相同的反應條件與環境下 CDC2 定量分析系統所測到的螢光訊號較強、敏感度較高。在德國試劑組 Artus 中的標準曲線測定範圍爲 10~104 copies，其螢光訊號經過二次微分可得到最佳理想的分析結果，使得 R 值爲 1 (見圖三)。

敏感度(sensitive)分析

利用美國 CDC 所給予已知濃度的 SARS 病毒株來作敏感性評估，以 QIAGEN ViralAmp 的試劑套組萃取 SARS 病毒的 RNA，並將其濃度稀釋成 0.1~106 copies 以 CDC1、CDC2、ARTUS 試劑套組與傳統 RT-PCR 來作分析，結果發現以 CDC1、CDC2 和 ARTUS 試劑套組其敏感度最高可測到 1 copies RNA(表一)，而以 Qiagen one-step RT-PCR 試劑套組作 RT-PCR 增幅並以洋菜膠電泳分析結果發現其敏感度最高可測到 10 copies RNA(圖四)，比一般傳統 RT-PCR 敏感度提高了 100~1000 倍，一般傳統 RT-PCR 在每個反應中其敏感度最高可測到 1000~10000 copies RNA。

臨床檢體分析

從各醫院送來疑似 SARS 感染的檢體同時以 real-time RT-PCR 分析系統 CDC1、CDC2、ARTUS 與 QIAGEN one-step RT-PCR 試劑套組作 RT-PCR 並以洋菜膠電泳分析。此檢驗取了 15 支咽喉拭子(throat swab)檢體作分析結果發現以 real-time RT-PCR 系統分析的結果大多一致(表二)，除了檢體 814 以 CDC-2 的引子、探針組分析出結果爲陽性，其它方法分析結果爲陰性。而以 QIAGEN 的試劑套組作 RT-PCR 增幅並以洋菜膠電泳分析在檢體 768、808 結果爲陰性，但是在 real-time RT-PCR 系統測得爲陽性，由於 QIAGEN 的試劑套組其最大的敏感度可測到 10 copies RNA 因此在低病毒量時會有僞陰性(false negative)的情形出現。

討　論

在這次 SARS 的疫情中即時定量偵測系統發揮相當大的功效，結合 PCR 的技術與螢光訊號的偵測大大的提高抗原偵測的敏感度，尤其是 SARS 病毒在感染初期很難發現，其症狀就像感冒一樣。國外學者從研究發現 SARS 病人在發燒開始後才具有傳染力，因此除了 X 光片的診斷外，發燒、乾咳算是一個指標性的症狀，但是有許多的傳染病都會引起發燒與咳嗽，因此 SARS 疫情使得人心惶惶!

由於在感染初期從患者的肺部沖洗液、咽喉式子、痰就可以偵測到病毒，因此一開始本實驗室使用 IN2/IN4 與 F2/R1 引子對，利用 NEST RT-PCR 的方式來作檢驗分析，因爲此方法需要做到兩次 PCR 較容易產生污染，最後又需以洋菜膠電泳分析敏感度較差，整個流程較耗時間。爲了發展更快速檢驗方法，本實驗室起初利用 ABI primer express 軟體設計出一組引子對與探針，經過測試後結果其最大敏感度只能偵測到 10 RNA copies，之後美國 CDC 給予本實驗室協助設計了三組引子對與探針 CDC1、CDC2 與 CDC3，經過敏感度與

專一性測試發現 CDC1 與 CDC2 效果較好，其敏感度可以偵測到 1 RNA copies 。

根據世界衛生組織的規定 SARS PCR 檢驗陽性的規定爲：(1)至少要在 2 種不同的臨床檢體或是同一種臨床檢體在病程中不同的二天或多日所採取檢驗出陽性。(2)使用原始臨床檢體分別操作二種不同的試驗，或分別重複操作 PCR 檢驗出陽性。在 PCR 的操作流程中，每一批檢體應包含適當的陰性及陽性對照，並產生預期的結果。操作萃取核酸流程時加入陽性與陰性對照，另於操作 PCR 時加入一個水樣對照。本實驗室 PCR 檢驗陽性的判斷也都依循世界衛生組織所定的標準，若是同一種臨床檢體以 CDC1、CDC2、ARTUS 即時定量系統或傳統 RT-PCR 其中兩種系統或方法檢驗出陽性即可判爲陽性；或是同一個病人不同部位的檢體經 real-time RT-CR 或 RT-PCR 都檢驗出陽性即可判爲陽性。但是爲求謹慎 PCR 陽性的個案還是會根據其病症與接觸史來作判定考量。

從實驗的結果可以發現 CDC2 的敏感度較 CDC1 與 ARTUS 爲高，在作臨床檢體測試時便可發現例如檢體 814 在 CDC2 的即時定量系統分析結果爲弱陽性，但在 CDC1 與 ARTUS 則爲陰性，在本實驗室 SARS 檢驗分析中也有時會出現 CDC2 的即時定量系統結果爲陽性但在其它分析系統檢驗結果爲陰性，爲了避免僞陽性的情形建議以另外的檢驗系統作再確認。

在作傳統 RT-PCR 並以洋菜膠電泳分析時發現若以 QIAGEN one-step RT-PCR 試劑套組可以直接以 F2/R1 引子對增幅作 40 個循環數放大，其敏感度可以相當於 nest RT-PCR 可以偵測到 10 copies RNA，若是以 SARS 病毒作序列稀釋以傳統的 RT-PCR 與 QIAGEN one-step RT-PCR 試劑套組作比較，結果發現傳統的 RT-PCR 可以偵測到 10000 copies 敏感度較 QIAGEN one-step RT-PCR 低(data not show)，若要提高敏感度則需作 Nest PCR 反應可提高 1000 倍敏感度測到 10 copies RNA。然而，在 real-time RT-PCR 結果分析時建議將 Delta Rn 的閥值要固定才可減少每次實驗間的誤差，本實驗在結果分析時都

將 Delta Rn 閥值定在 0.20，在標準曲線的 R2 直大於 0.99 而 slope 值接近-3.3 之間，間接定出檢體中 SARS 病毒的 RNA 複製數(copies)。

SARS 的 PCR 試驗其敏感度係視檢體種類及其在病程中取得的時機而定，真正的 SARS 病例可能會在 PCR 檢測中呈僞陰性。因此，如果能採取多個檢體，或採取來自身體不同部位的檢體進行檢測，將可提高檢驗的正確性。由於 SARS 的 RT-PCR 與 real-time RT-PCR 所使用的引子對與探針，都是經軟體設計出來且經過基因序列比對確定其專一性後才用於研究檢驗上使用分析，有時人員技術操作上的問題或環境將造成僞陽性的結果，例如：實驗室污染、操作平臺污染等，因此每個陽性的 PCR 試驗結果均應再做確認。本實驗室操作 RT-PCR 與 real-time RT-PCR 時嚴格遵守 3 個空間(three rooms)的原則，即：PCR 試藥配製、檢體添加、PCR 上機分析，都在 3 個獨立的空間與操作平臺上分析，如此可減少實驗室或操作平臺污染造成僞陽性的結果。

爲了確保實驗結果的準確性與品質，在操作 real-time RT-PCR 分析時會加入陰性與陽性對照組，此外，還同時加入內因性對照組(internal control)(TaqMan exogenous internal control)，以確保每個反應的效率(efficiency)與準確度(accuracy)。例如：在本次的實驗中 CDC-1、CDC-2 的 real-time RT-PCR 分析時加入 TaqMan exogenous internal control 作爲內因性對照組；而 ARTUS 試劑套組在作 real-time RT-PCR 分析時也需加入 HPA-Coronavirus LC IC 作爲內因性對照組。

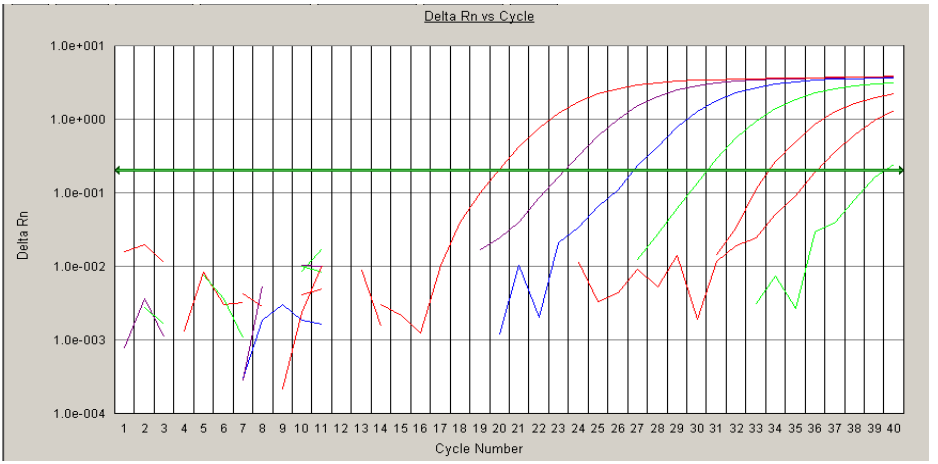
發展以 real-time RT-PCR 的技術運用於臨床檢體中病原體的偵測分析已經成爲一種趨勢，憑藉其快速與高敏感性及高專一性的特性，能夠在第一時間內鑑定出檢體中病原體的種類對於疫情的防治給予很大的幫助，目前國內外許多學者專家也都積極從事 SARS 病毒基礎研究、快速診斷試劑的研發，相信未來 SARS 病毒的新藥與疫苗的研發將指日可待！

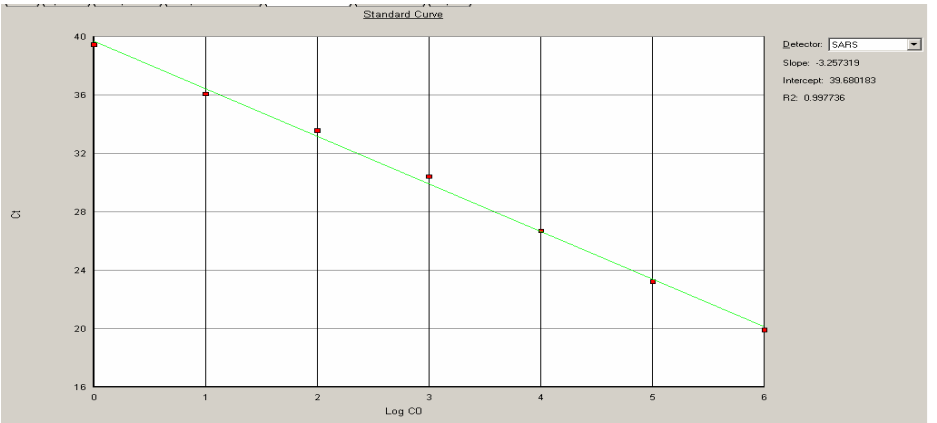
撰稿者：王聖帆、李祥吉、陳豪勇、楊志元
衛生署疾病管制局研究檢驗組

參考文獻

1. Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS, et al. A Novel Coronavirus Associated with Severe Acute Respiratory Syndrome. N Engl J Med 2003.
2. Rota PA, Oberste MS, Monroe SS, et al. Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. Science 2003, 300: 1394-1399.
3. Severe acute respiratory syndrome--Taiwan, 2003. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2003,52:461-466.
4. Eaton L. SARS could still affect the United Kingdom, health secretary warns. Bmj 2003,326:948.
5. Marra MA, Jones SJ, Astell CR, et al. The Genome Sequence of the SARS-Associated Coronavirus. Science 2003.
6. Drosten C, Gunther S, Preiser W, et al. Identification of a Novel Coronavirus in Patients with Severe Acute Respiratory Syndrome. N Engl J Med 2003.
7. Zhou BP, Chen XC, Wang HS, et al. [Identification and molecular cloning and sequence analysis of a novel coronavirus from patients with SARS by RT-PCR]. Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi 2003,17:137-139.

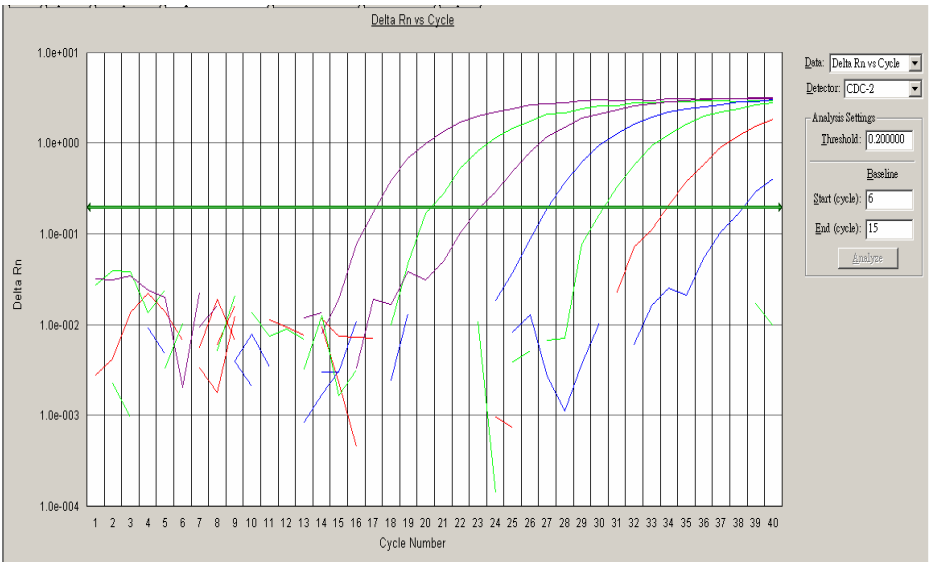
圖一 CDC-1 的即時定量系統標準曲線之建立

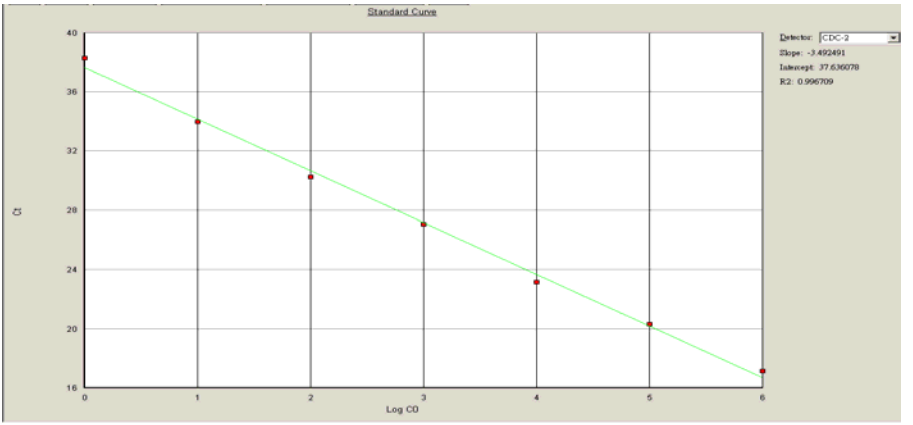




上圖爲標準曲線濃度 106~1 copies 螢光訊號 Delta Rn 與 PCR 反應 cycle number 的結果。下圖爲 Ct 值與 Log Co (concerntration) 所分析之結果，其中 R2 值爲 0.9977，slope 爲-3.257。

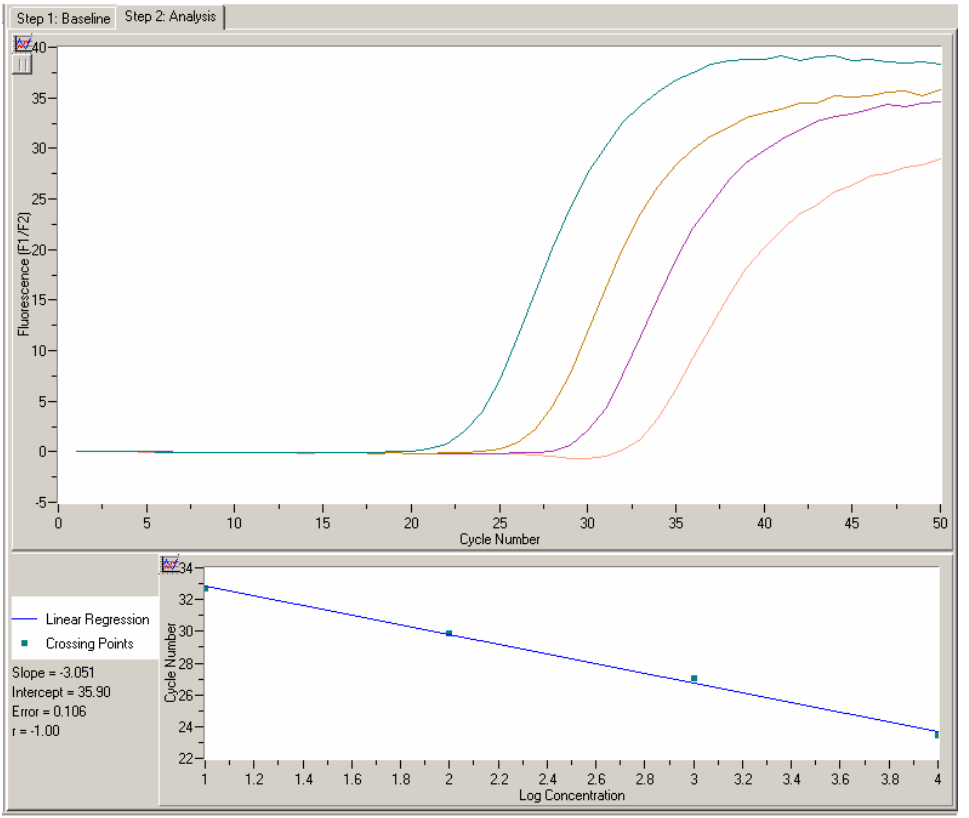
圖二 CDC-2 即時定量系統標準曲線之建立





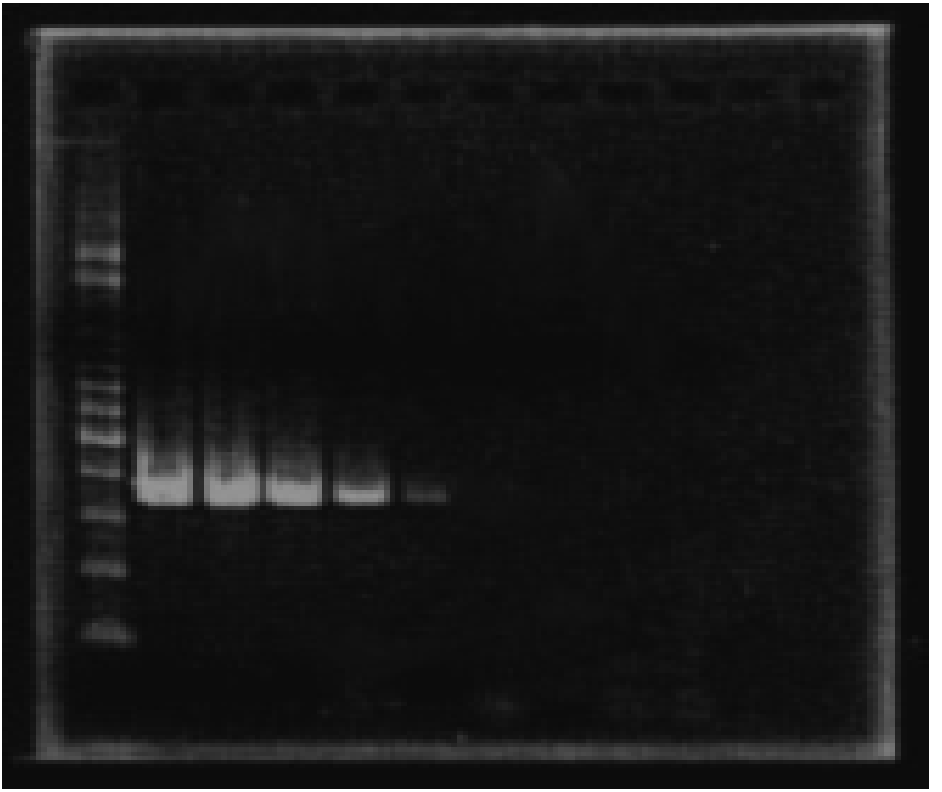
上圖爲標準曲線濃度 106~1 copies 螢光訊號 Delta Rn 與 PCR 反應 cycle number 的結果。下圖爲 Ct 值與 Log Co (concerntration) 所分析之結果，其中 R2 值爲 0.9967，slope 爲-3.4。

圖三 ARTUS 試劑套組標準曲線建立



上圖爲螢光訊號 Fluorescence 與 PCR 反應 cycle number 分析結果，其中標準曲線濃度爲 104 ~10 copies。下圖爲 cycle number 與 Log Concentration 分析結果，r 值爲-1.00 , slope 值爲-3.051。

圖四 SARS 病毒 RT-PCR 增幅並跑洋菜膠電泳之敏感度分析



以 F2/R1 引子對利用 QIAGEN one-step RT-PCR 試劑套組作 RT-PCR 分析，增幅片段長爲 368 bp，其中 lane 1~6 的濃度爲 105 ~1 copies RNA。

表一 real-time RT-PCR 系統與傳統 RT-PCR 敏感度分析

Copies number/ul	CDC-1	CDC-2	ARTUS	RT-PCR
1.00E+06	8.9E+05	1.1E+06	2.7E+06	+
1.00E+05	1.5E+05	1.89E+05	4.01E+05	+
1.00E+04	1.45E+04	2.4E+04	1.79E+04	+
1.00E+03	2.2E+03	3.2E+03	1.01E+03	+
1.00E+02	1.72E+02	1.44E+02	9.56E+01	+
1.00E+01	1.3E+01	1.9E+01	2.2E+01	+
1.00E+00	8E-01	1.1E+00	9.5E-01	-
1.00E-01	-	-	-	-

(其中+爲陽性反應，-爲陰性反應或 undetectable)

表二 臨床檢體分析

Sample No.	620	648	660	678	738	740	768	788
ARTUS kit analysis	-	+	-	-	-	-	+	+
CDC1	-	+	-	-	-	-	+	+
CDC2	-	+	-	-	-	-	+	+
RT-PCR	-	+	-	-	-	-	-	+
Sample No.	806	808	814	818	928	984	1040	NC
ARTUS kit analysis	+	+	-	+	-	+	+	-
CDC1	+	+	-	+	-	+	+	-
CDC2	+	+	+	+	-	+	+	-
RT-PCR	+	-	-	+	-	+	+	-

本分析取疑似 SARS 感染患者咽喉式子臨床檢體共 15 件加上一支陰性對照組，萃取核酸並以 ARTUS、CDC 1、CDC 2 即時定量系統與 QIAGEN one-step RT-PCR 試劑套組作 RT-PCR 之分析比較其中 + 爲陽性反應， - 爲陰性反應或 undetectable。