計畫編號：MOHW104-CDC-C-315-000114

衛生福利部疾病管制署 104 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：疾病管制署研究檢驗及疫苗研製中心

計畫主持人： 舒佩芸

研究人員：林世浤、楊正芬、張淑芬、蘇千玲

執行期間：104 年 1 月 1 日至 104 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	(8-9)
(3)	結果	(10-11)
(4)	討論	(12)
(5)	結論與建議	(13)
(6)	計畫重要研究成果及具體建議	(14)
(7)	參考文獻	(15-16)
三、表次		(17-18)
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、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、日本腦炎病毒等，阿爾發病毒屬（Alphavirus）之屈公病毒等。本研究我們開發登革熱及日本腦炎快速等溫核酸增殖(LAMP 與 RPA)方法，其優點為核酸增殖可在等溫條件下進行，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、登革病毒、日本腦炎病毒、快速等溫核酸增殖方法

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 outbreaks spread quickly on Indian Ocean, West Pacific Ocean islands, and in Southeast Asia and Caribbean countries. Tick-borne encephalitis emerged in Europe and Asia. In addition, a new Phlebovirus (Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus; SFTSV) was detected and caused outbreaks in China, Japan and Korea. 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 had existed, 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 RPA) for detection of dengue and Japanese encephalitis viruses. Rapid and sensitive diagnostic tools for detection of arboviral infections can help for disease control and case management.

keywords：vector-borne viruses, dengue virus, JEV, ,LAMP, RPA

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(1-3)，屈公病在亞洲、非洲地區及加勒比海地區迅速傳播(4-9)，蜱媒腦炎(Tick-borne encephalitis)在歐洲及亞洲流行，新種的布尼亞病毒(Bunyavirus, Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus; SFTSV) (10) 在中國大陸、日本、韓國流行等，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。其中超過 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）、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) (14)、Zika virus(15)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)(10)，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。而台灣位於亞熱帶地區，一旦環境、氣候等因素，發生改變。節肢動物數量開始增加，即會增加地方性傳染病流行的風險，如日本腦炎等。此外非本土流行的病毒一旦從境外引入，若有適當的節肢動物宿主，則極有可能造成本土的流行，影響民眾的健康，如登革熱的流行(11-13)。

RT-PCR 是常用來檢測病毒 RNA 的方法，但其缺點是 PCR 反應進行時需要一個能升降溫度的儀器，而且往往需要較長的時間進行核酸擴增反應。

本研究將利用等溫核酸檢測技術應用於病媒病毒傳染病之偵測，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。在核酸增殖技術方面，傳統 PCR，約需 2-3 小時進行反應，反應結束後需進行 DNA 電泳跑膠確認產物，整個完成時間約要 4 小時。而在 qPCR 上的檢測雖可即時偵測 DNA 增幅反應，也需要 3 小時完成。以 Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) 及 Reverse transcription Recombinase Polymerase Amplification (RT-RPA) 兩種方法，約可在 1 小時內完成檢測，若配合螢光檢測儀器，則可以即

時偵測 DNA 增幅。RT-LAMP 需設計 4 條專一性極高的 primer，其專一性會比傳統 PCR 還高。RT-RPA 之引子設計需要 30-35 bp，其專一性也極高。目前 RT-RPA，並無針對登革病毒(DENV)及日本腦炎病毒(JEV)之設計相關產品。但已有其他相關產品開發完成，且已被廣泛運用在農、漁、食品與人體疾病上，如 loopamp: 肺炎黴漿菌、退伍軍人桿菌、禽流感、冠狀病毒，A 型流感等。由於 RPA 儀器能在 40 分鐘內完成核酸增幅，並即時定性與定量，且儀器方便攜帶(約 3 公斤)，具有在野外及臨床 point-of-care 即時診斷的優點。

材料與方法

本計畫之實施方法為利用 RT-LAMP 及 RT-RPA 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℃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 (H1030440、H1020852、 KH9800235、KH9900929)。
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，同時將核醣核酸脢去活性，再將處理後的血清加到離心圓柱中，使核醣核酸與矽土膜結合，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 原理設計病毒專一性引子以檢測黃病毒屬（Flavivirus）及阿爾發病毒屬（Alphavirus）等重要病媒病毒。
4. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)：LAMP 是一種能夠在恆溫條件下(60-65℃)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。

5. RT-LAMP 反應條件: 12ul, 2x reaction Mix、1ul, Enzyme Mix (Bst and AMV) 、5ul, Primer mix 、5ul, Template RNA。60℃,一小時、80℃5 分鐘、4℃ 。
6. RT-LAMP 產物之偵測 ：以 2%洋菜膠進行電泳及 Fluorescent 方法偵測產物。
7. Recombinase Polymerase Amplification (RT-RPA): RT-RPA 主要是利用三種酶(Recombinase、SSB、Strand-displacing polymerase)進行反應，三種酶的最佳反應溫度為 37℃。Recombinase 與 primer 結合形成 protein-DNA Complex，與雙股 DNA 相互黏合後，進行 DNA 複製。另一股 DNA 與 SSB 結合，整個反應過程進行非常快速，約 20 分鐘內即可完成反應。
8. RT-RPA 反應條件: 29.5 ul, Behydration Buffer、4.2 ul, primer mix、0.6 ul, exo probe、5ul, Template RNA、2.4ul, MgAc。41℃, 20 分鐘。

結果

1. **病媒病毒 RT-LAMP 系統之引子設計、合成與測試：**

   表一所示為登革病毒與日本腦炎病毒之設計之引子組。本研究設計出九組不同的 RT-LAMP 引子組，針對登革病毒 1-4 型與日本腦炎病毒之偵測。

2. **Dengue viruses NS1 (DENV-1~DENV-3)引子組與 3'UTR (DENV-4) 引子組，RT-LAMP 之測試。**

   a. 檢測 RT-LAMP 專一性反應，所設計之 NS1 引子組 (Figure 1) 與 3'UTR 引子組 (Figure 3)，利用電泳分析結果，各表現出第一、二、三、四型登革病毒之 LAMP-DNA 片段，各引子組對日本腦炎及屈公病毒皆無反應，故設計之引子組具有專一性。

   b. 檢測 RT-LAMP 靈敏度，所設計之 NS1 引子組 (Figure 2)與 3'UTR 引子組 (Figure 3)，利用電泳分析結果，表現出第一、二、三、四型登革病毒之 LAMP-DNA 片段，檢測靈敏度約為 10-100 pfu/mL。

3. **Dengue viruses (DENV-1~DENV-4) E gene 引子組，RT-LAMP 之測試。**

   a. 檢測 RT-LAMP 專一性反應，所設計之 E gene 引子組(Figure 4)，利用電泳分析結果，表現出第一、二、三、四型登革病毒之 LAMP-DNA 片段，各引子組對日本腦炎及屈公病毒皆無反應，故設計之引子有專一性。

   b. 檢測 RT-LAMP 靈敏度，所設計之 **E gene** 引子組(Figure 5)，利用電泳分析結果，表現出第一、二、三、四型登革病毒之 LAMP-DNA 片段，檢測靈敏度至少可達 10 pfu/mL 以下。

4. **Dengue viruses (DENV-1~DENV-4) 3'UTR 引子組，RT-LAMP 之測試。**

a. 檢測 RT-LAMP 專一性反應，所設計之 3'UTR 引子組(Figure 6)，利用電泳分析結果，表現出第一、二、三、四型登革病毒之 LAMP-DNA 片段,各引子組對日本腦炎及屈公病毒皆無反應，故設計之引子具有專一性。

b. 檢測 RT-LAMP 靈敏度，所設計之 3'UTR 引子組(Figure 7)，利用電泳分析結果，表現出第一、二、三、四型登革病毒之 LAMP-DNA 片段,檢測靈敏度可達 10-100 pfu/mL。

5. **Japanese Encephalitis virus (JEV) JEV-2 引子組，RT-LAMP 之測試。**

a. 檢測 RT-LAMP 專一性反應，其設計之引子 JEV-1 與 JEV-2 (Figure 8)，利用電泳分析與 Fluorescent dye 偵測結果，表現出 G1 與 G3 型日本腦炎病毒之 LAMP-DNA 片段，各引子組對登革及屈公病毒皆無反應，其設計之具引子有專一性。

b. 檢測 RT-LAMP 靈敏度，所設計之引子 JEV-2 (Figure 9)，利用電泳分析與 Fluorescent dye 偵測結果，表現出 G1 與 G3 型日本腦炎病毒之 LAMP-DNA 片段,檢測靈敏度至少可達 10 pfu/mL 以下。

6. RT-RPA 系統之測試：Dengue virus serotype 1-2, 3'UTR primer set 測試

檢測 RT-RPA 專一性反應，所設計之 3'UTR 引子組(Figure 10)，利用 TwistTM 儀器偵測結果，可檢測出 DENV-1 及 DENV-2。

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 RT-RPA 兩種等溫核酸檢測方法，無須特殊儀器，約可在 1 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。本研究開發出登革病毒與日本腦炎病毒之 LAMP 檢測方法，具高專一性，靈敏度約在<10~100 pfu/mL 之間。有部分引子組的靈敏度已可達 RT-PCR 的靈敏度(0.01~1 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。在核酸增殖技術方面，傳統 RT-PCR，約需 2-3 小時進行反應，反應結束後需進行 DNA 電泳跑膠確認產物，整個完成時間約 4 小時。而在 real-time RT-PCR 的檢測方面，雖可即時偵測 DNA 增幅反應，也需要 3 小時完成。RT-LAMP 及 RT-RPA 兩種方法，均可在 1 小時內完成檢測。本研究將優化快速等溫核酸檢測技術，以期能更縮短檢驗時間。目前已初步完成登革熱與日本腦炎專一性與敏感度的檢測，後續進行反應 buffer 內容物及濃度的調整，完成優化後，則建立試驗標準化程序。本計畫開發之 Dengue virus RT-LAMP 檢測，已完成三組(3’UTR、E gene、NS1) primer sets 的專一性與敏感性測試。今年已完成 20 件登革熱檢體的測試，陽性檢出率有 6 成以上，明年可完成較大量檢體的檢測。

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登革熱與日本腦炎的兩種等溫核酸檢測方法 (RT-LAMP 與 RT-RPA)。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(登革熱與日本腦炎)等溫核酸檢測(RT-LAMP 與 RT-RPA)方法，與傳統的 RT-PCR 反應不同，可在恆溫下進行核酸增殖反應並大幅縮短反應的時間。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、實施病人自主管理、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、Zika 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. Powers AM, Logue CH. Changing patterns of chikungunya virus: re-emergence of a zoonotic arbovirus. J Gen Virol.2007; 88:2363-77.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. Knox J, Cowan RU, Doyle JS, Ligtermoet MK, Archer JS, Burrow JN, et al. Murray Valley encephalitis: a review of clinical features, diagnosis and treatment. Med J Aust. 2012.19;196:322-6. Review.
10. Holbrook MR. Kyasanur forest disease. Antiviral Res. 2012. S0166-3542 (12) 00235-5.
11. Shu PY, Chien LJ, Chang SF, Su CL, Kuo YC, Liao TL, et al. Fever screening at airports and imported dengue. Emerg Infect Dis. 2005; 11:460-2.
12. Shu PY, Su CL, Liao TL, Yang CF, Chang SF, Lin CC, Chang MC, Hu HC, Huang JH. Molecular Characterization of Dengue Viruses Imported into Taiwan during 2003-2007: Geographic Distribution and Genotype Shift. Amer. J. Trop. Med. Hyg. 2009; 80:1039-1046.

13. 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.

14. 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.

15. 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.

Table 1. RT-LAMP primer sets used for detection of dengue virus and JEV.

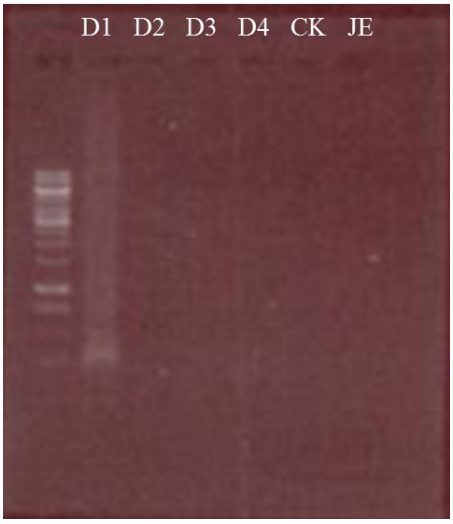
	DENV-1 (NS1)
DV-1 F3	GCGGTGTTTCTTGGACCAT
DV-1 B3	CTGTCCAGGTGTGAACTTCA
DV-1 FIP	TGCCAACTGCGATACACGTCAT-GGATTCTGCTGACATGGCTG
DV-1 BIP	AGGCGGACTCGGGATGTGTA-AGTCACAAAAATGCCGCTTC
DV-1 FLP	ACGTGCTCCTTGAGTTTAATCC
DV-1 BLP	AACTGGAAAGGCAGAGAACTCAAA
	DENV-2 (NS1)
DV-2 F3	CAA ACA GCA GGA CCT TGG
DV-2 B3	ATC CAT CCT CAC CTC TGT
DV-2 FIP	ACA TTC TTC GGT TAC CAC CAC TTT TTG CAA GCT TGA GAT GGA CT
DV-2 BIP	AGA GGG CCT TCT TTA AGA ACA ACT TTT TGG TGG TAG TGT GCA AGA
	DENV-3 (NS1)
DV-3 F3	CCC TCA TAG AGG TGA AAA CC
DV-3 B3	TGA AGT GGT CGTT CCA ATT
DV-3 FIP	GGAATGATCATGTCACTCTCTAGCTTTGCACATGGCCAAAATCA C
DV-3 BIP	AGA GTC TAG CTG GTC CTA TTT CGT TTT TTC CTA AGT GCC AGG GTC
	DENV-4 (3’UTR)
DV-4 F3	GTG GAC CGA CAA AGA CAG
DV-4 B3	GAA AAA AGT CCG GTT GAG
DV-4 FIP	TTCATTTTTCCAGAGATCTGCTCTCTTTTTTTCGAATCGGAAGCTTCGT
DV-4 BIP	AACGAAAAAAGGTGGTTAGACCACTTTTCTTCACCAACCCTTGAGGGGT
DV-4 FLP	GCG AGA GAA ACC GCG TGT C
	DENV (E gene)
DENV 1/3 B3	GTG AGC AAT CCT TTT GAG
DENV 2 B3	TGC AGC ATT CCA AGT GAG
DENV 4 B3	GAA AAA AGT CCG GTT GAG
DENV 1/3 FIP	GGTTATTCATCAGAGATCTGCTCTCTTTTTTTCGAATCGGAAGCTTCGT

DENV 2 FIP	GGTTATTCATCAGAGATCTGCTCTCTTTTATTCTTTGAGGGAGCTAAGC
DENV 4 FIP	TTCATTTTTCCAGAGATCTGCTCTCTTTTTTTCGAATCGGAAGCTTCGT
DENV 1/3 BIP	AACGGAAAAAGACGGGTCAACCGTTTTTCTTTGTCAGCTGTTGCACAGT
DENV 2 BIP	AACGGAAAAAGGCGAGAAATACGCTTTTCTTTGTCAGCTGTTGCACAGT
DENV 4 BIP	AACGAAAAAAGGTGGTTAGACCACTTTTCTTCACCAACCCTTGAGGGGT
DENV 1234 F3	GTG GAC CGA CAA AGA CAG
DENV 1234 Loop	GCG AGA GAA ACC GCG TGT C
	DENV (3'UTR)
DEN 1/3/4 F3	CAAACCGTGCTGCCTGT
DEN 2/ F3	TGAGTAAACTATGCAGCCTGT
DEN 1/2/3 B3	ACCTGTTGATTCAACAGCACC
DEN 4/ B3	ACCTGTTGGATCAACAACACC
DEN 1/2/3 FIP	AGGGGTCTCCTCTAACCRCTAGTCTTTCAAACC-TGGAAGCTGTACGC
DEN 4/ FIP	AGGGGTCTCCTCTAACCRCTAGTCTTTTTTGCCACGGAAGCTGTACGC
DEN 1/2/3 BIP	ACAGCATATTGACGCTGGGARAGACGTTCTGTGCCTGGAATGATGCTG
DEN 4/ BIP	ACAGCATATTGACGCTGGGARAGACGCTCTGTGCCTGGATTGATGTTG
DEN 1/2/3/4 BLP	CAGAGATCCTGCTGTCTC
	JEV-1
JEV-1 F3	CGG CAT GGA GAA ACA GAG AA
JEV-1 B3	CCT TCA GAG CCA GTT TGT CC
JEV-1 FIP	CCT GCC AAC GCT TGA TGG AGG GAA GAG GCA CAT GCC ACA A
JEV-1 BIP	AGC CAT CGT GGT GGA GTA CTC GAG CCT GCA TTT CAG GTG AC
	JEV-2
JEV-2 F3	TGGGAGTGAAGAGGGTAGT
JEV-2 B3	TTTTGCCCCGCTTGTTCA
JEV-2 FIP	TTGGTGGGGGCTAATGCTGAATTCGAGGGCCAGTACGATTTGTG
JEV-2 BIP	GGCCGATGGAGAGCAGTGGAAATTTTCGTCGATGAGTGTTCCAAGT
JEV-2 BIP	TTGAAGAACGTGATAAGAGCCAG
JEV-2 FLP	GTGGCAATGAAACATCT

Figure 1. Dengue viruses (DENV-1~DENV-3) NS1 gene 引子組，

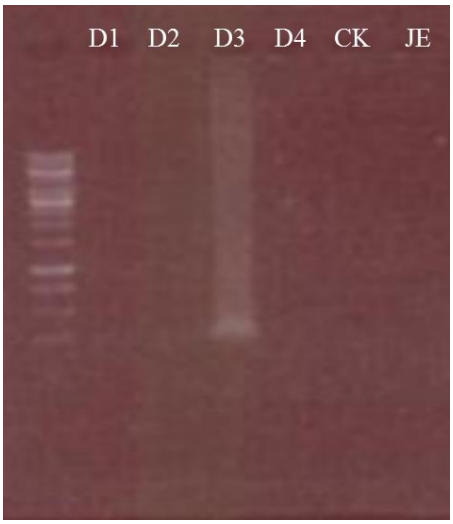
RT-LAMP 之專一性(Specificity)測試

(A)



(B)

(C)



以第一、二、三型登革病毒、屈公病毒(Plasmid)與日本腦炎標準株的 RNA 為模板進行 RT-LAMP 反應。

總體積為 25 ul。

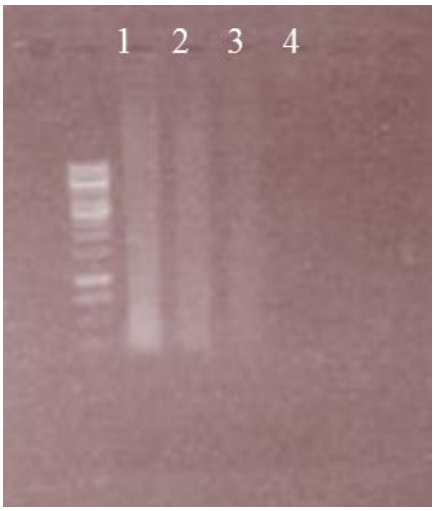
(a) 第一型登革病毒分型引子對 (b) 第二型登革病毒分型引子對
(c) 第三型登革病毒分型引子對

Lane1: D1-第一型登革病毒 RNA ; Lane2: D2-第二型登革病毒 RNA
Lane3: D3-第三型登革病毒 RNA ; Lane4: D4-第四型登革病毒 RNA
Lane5: CK-屈公病毒 Plasmid DNA ; Lane6: JE-日本腦炎病毒 RNA

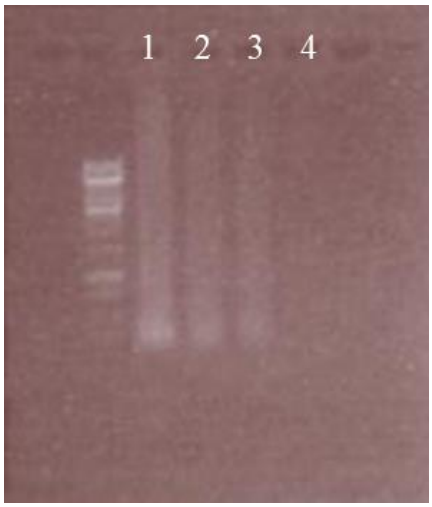
Figure 2. Dengue viruses (DENV-1~DENV-3) NS1 gene 引子組，

RT-LAMP 之靈敏度(Sensitivity)測試

(A)



(B)



(C)

以第一、二、三型登革病毒的 RNA 為模板進行 RT-LAMP 反應。

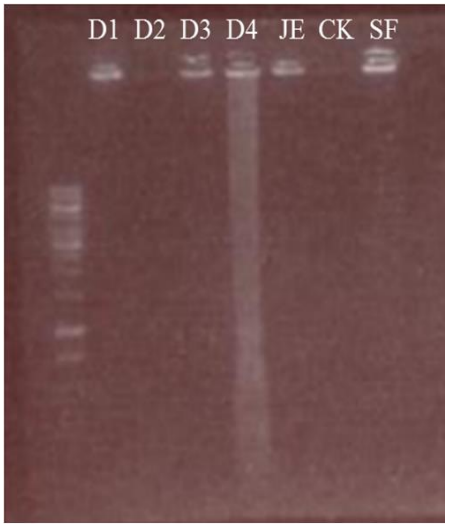
總體積為 25 ul。

(b) 第一型登革病毒分型引子對 (b) 第二型登革病毒分型引子對
(c) 第三型登革病毒分型引子對

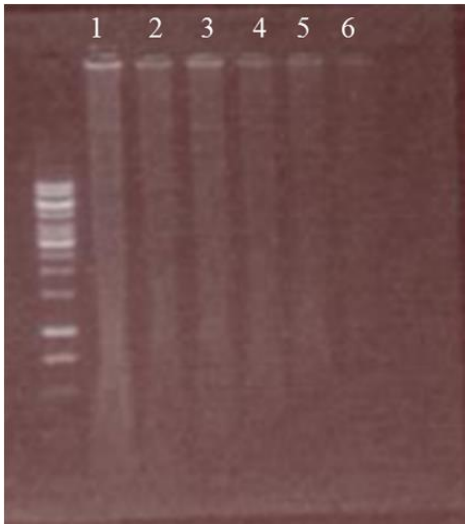
Lane1:登革病毒 RNA 10^4 ; Lane2:登革病毒 RNA 10^3
Lane3:登革病毒 RNA 10^2 ; Lane4:登革病毒 RNA 10^1

Figure 3. Dengue viruses (DENV-4) 3'UTR 引子組，RT-LAMP 之專一性 (Specificity) 及靈敏度(Sensitivity)測試

(A)



(B)



以第一、二、三、四型登革病毒、屈公病毒(Plasmid)與日本腦炎標準株的 RNA 為模板進行 RT-LAMP 反應。

總體積為 25 ul。

(A) 第四型登革病毒分型引子對

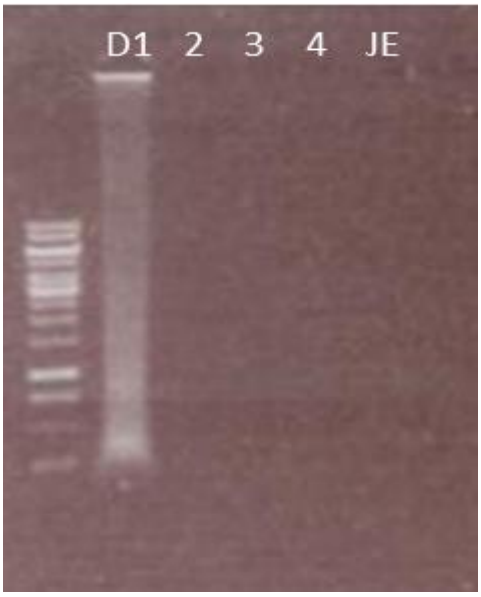
Lane1: D1-第一型登革病毒 RNA ; Lane2: D2-第二型登革病毒 RNA
Lane3: D3-第三型登革病毒 RNA ; Lane4: D4-第四型登革病毒 RNA
Lane5: JE-日本腦炎病毒 RNA ; Lane6: CK-屈公病毒 Plasmid DNA
Lane7: SFTSV- 新布尼亞病毒 Plasmid DNA

(B) 第四型登革病毒分型引子對

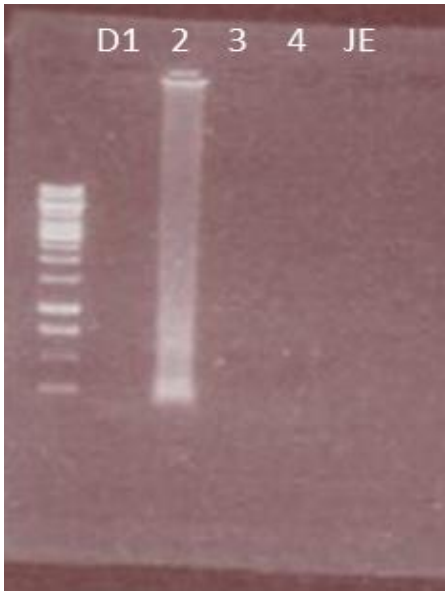
Lane1: 登革病毒 RNA 10^6; Lane2: 登革病毒 RNA 10^5
Lane3: 登革病毒 RNA 10^4; Lane4: 登革病毒 RNA 10^3
Lane5: 登革病毒 RNA 10^2; Lane6: 登革病毒 RNA 10^1

Figure 4. Dengeu viruses (DENV-1~DENV-3) E gene 引子組，RT-LAMP 之專一性(Specificity)測試

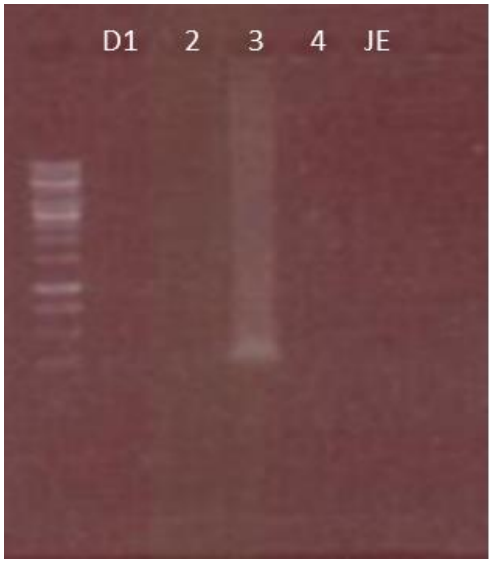
(A)



(B)



(C)



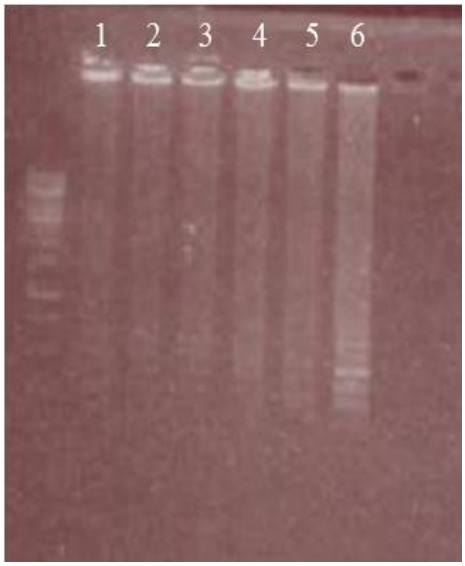
以第一、二、三型登革病毒的 RNA 為模板進行 RT-LAMP 反應。 總體積為 25 ul。

(A) 第一型登革病毒分型引子對 (B) 第二型登革病毒分型引子對
(B) 第三型登革病毒分型引子對

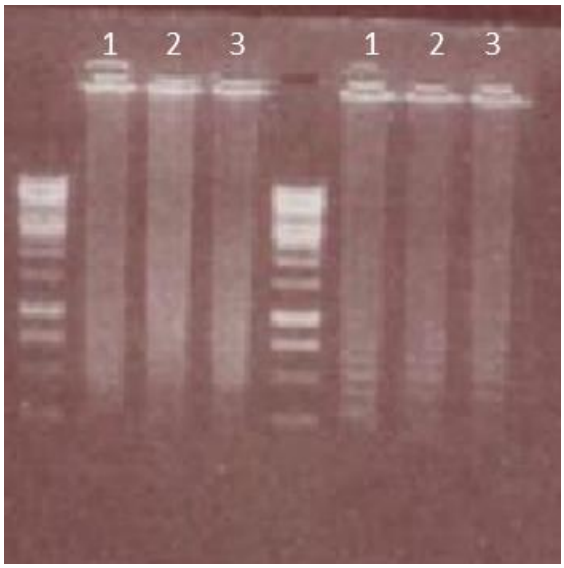
Lane1:登革病毒 RNA ; Lane2:登革病毒 RNA
Lane3:登革病毒 RNA ; Lane4:登革病毒 RNA

Figure 5. Dengeu viruses (DENV-1~DENV-4) E gene 引子組，RT-LAMP 之靈敏度(Sensitivity)測試

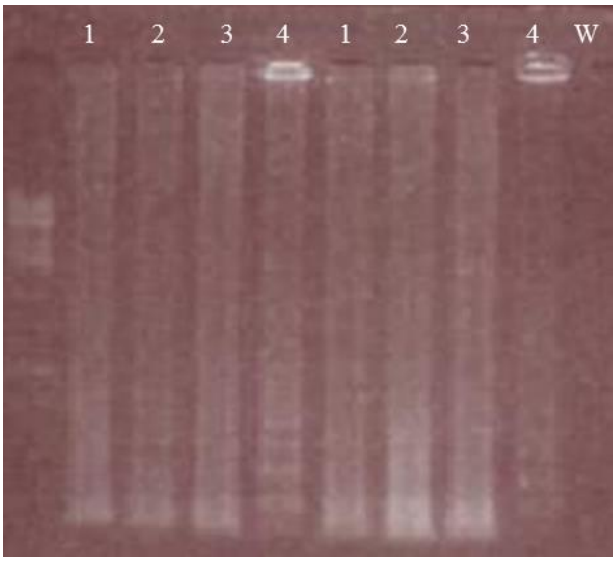
(A)



(B)



(C)



以第一、二、三、四型登革病毒的 RNA 為模板進行 RT-LAMP 反應。總體積為 25 ul。

(A) 第一型登革病毒分型引子對 (B) 第二、三型登革病毒分型引子對
(C) 第四型登革病毒分型引子對

Lane1:登革病毒 RNA 10^6 ; Lane2:登革病毒 RNA 10^5

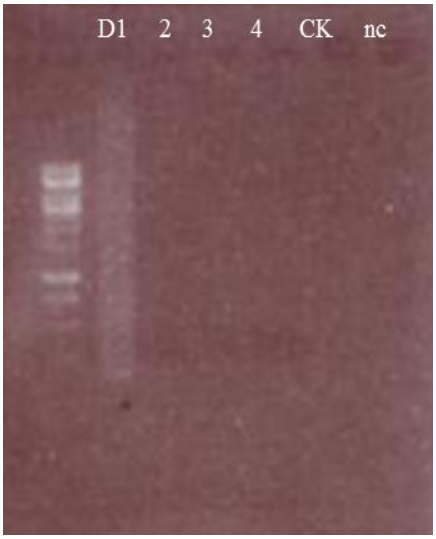
Lane3:登革病毒 RNA 10^4 ; Lane4:登革病毒 RNA 10^3

Lane5:登革病毒 RNA 10^2 ; Lane6:登革病毒 RNA 10^1

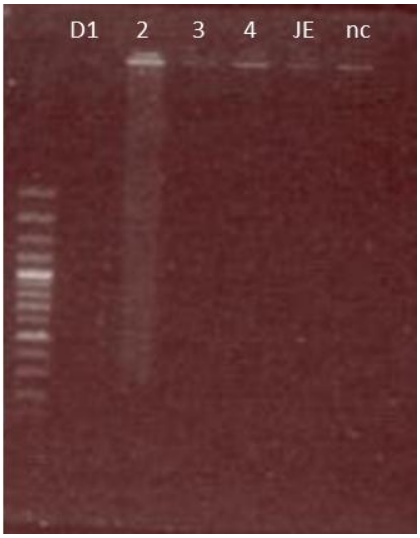
W: water

Figure 6. Dengeu viruses (DENV-1~DENV-4) 3’UTR 引子組，RT-LAMP 之專一性(Specificity)測試

(A)



(B)



(C)

(D)

以第一、二、三型登革病毒的 RNA 為模板進行 RT-LAMP 反應。 總體積為 25 ul。

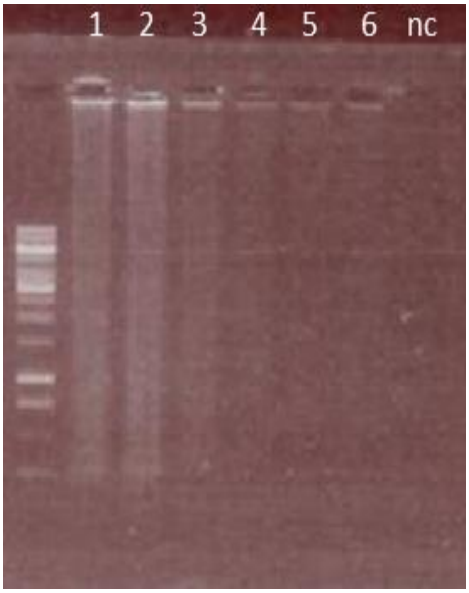
(A) 第一型登革病毒分型引子對 (B) 第二型登革病毒分型引子對
(C) 第三型登革病毒分型引子對 (D) 第四型登革病毒分型引子對

Lane1: 登革病毒 RNA ; Lane2: 登革病毒 RNA
Lane3: 登革病毒 RNA ; Lane4: 登革病毒 RNA

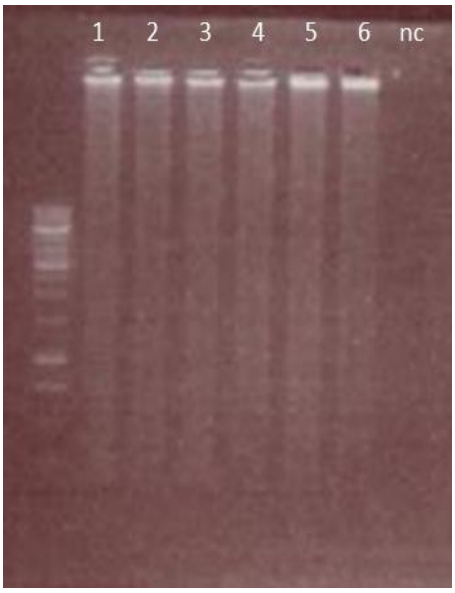
Figure 7. Dengeu viruses (DENV-1~DENV-4) 3’UTR 引子組，RT-LAMP 之靈敏度(Sensitivity)測試

(A)

(B)



(C)



(D)

以第一、二、三、四型登革病毒、屈公病毒(Plasmid)與日本腦炎標準株的 RNA 為模板進行 RT-LAMP 反應。

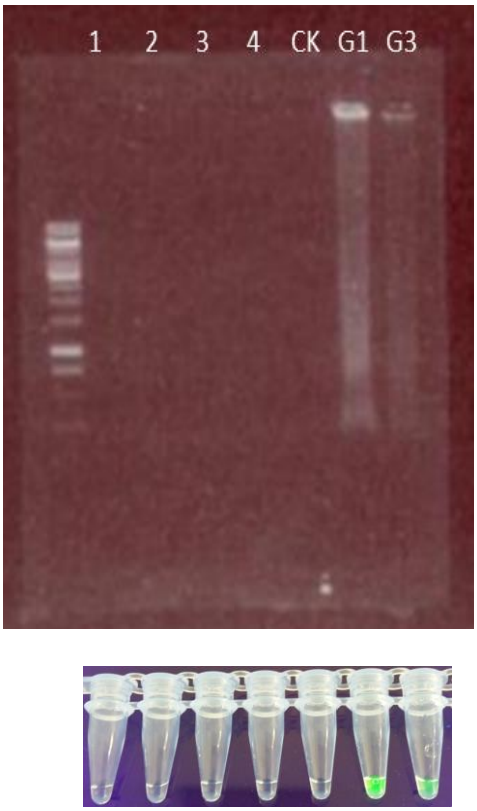
總體積為 25 ul。

(A)第一型登革病毒分型引子對 (B) 第二型登革病毒分型引子對
(C)第三型登革病毒分型引子對

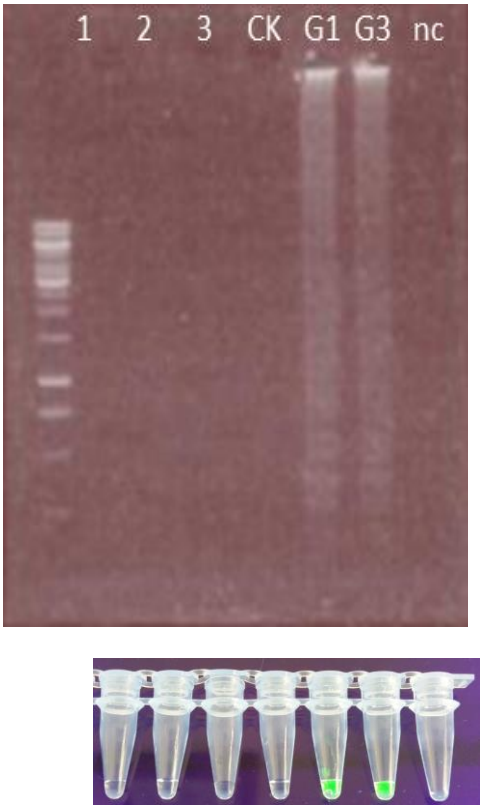
Lane1: 登革病毒 RNA 10^6; Lane2: 登革病毒 RNA 10^5
Lane3: 登革病毒 RNA 10^4; Lane4: 登革病毒 RNA 10^3
Lane5: 登革病毒 RNA 10^2; Lane6: 登革病毒 RNA 10^1

Figure 8. Japanese encephalitis virus (GI, GIII) JEV-1, JEV-2 引子組，RT-LAMP 之專一性(specificity)測試

(A)



(B)



以第 G1、G3 日本腦炎的 RNA 為模板進行 RT-LAMP 反應。總體積為 25 ul。

(A) JEV-1 Primer set, (B) JEV-2 primer set

Lane1:登革病毒(D1) RNA ; Lane2:登革病毒(D2) RNA

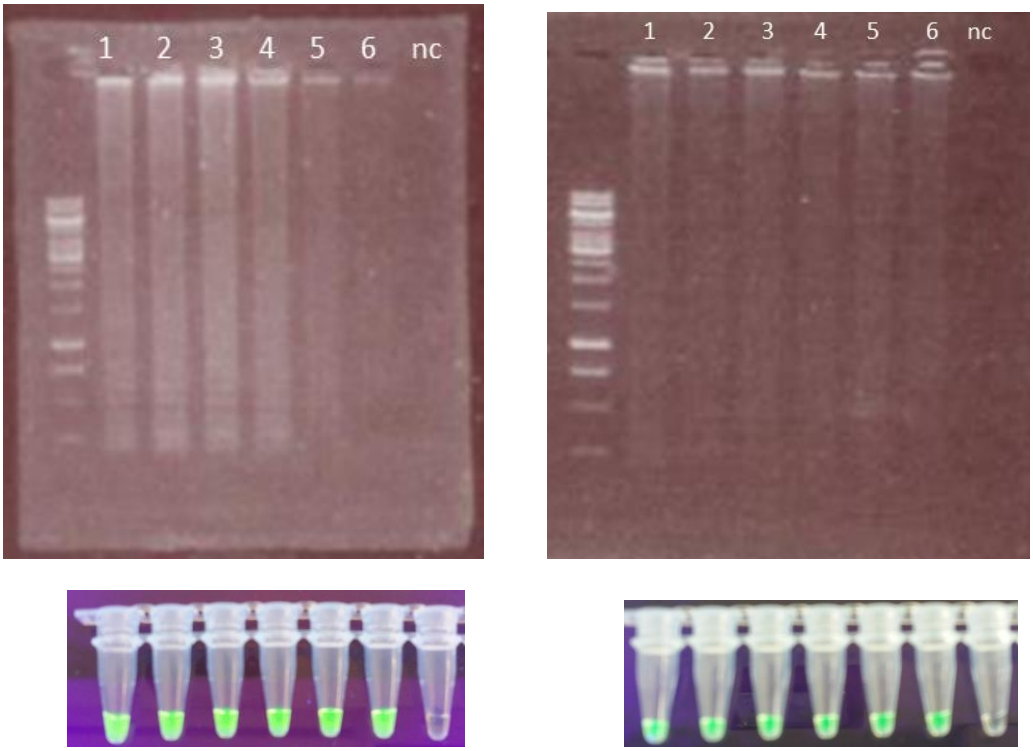
Lane3:登革病毒(D3) RNA ; Lane4: CK-屈公病毒 Plasmid DNA

Lane5:日本腦炎(G1) RNA ; Lane6:日本腦炎(G3) RNA

Lane6: nc (water)

Figure 9. Japanese encephalitis virus (GI, GIII) JEV-2 引子組，RT-LAMP 之靈敏度(sensitivity)測試

(A) (B)



(A) 日本腦炎 JEV-2 引子對 GI JEV 測試

Lane1: 日本腦炎(G1) RNA 10^6; Lane2: 日本腦炎(G1) RNA 10^5
Lane3: 日本腦炎(G1) RNA 10^4; Lane4: 日本腦炎(G1) RNA 10^3
Lane5: 日本腦炎(G1) RNA 10^2; Lane6: 日本腦炎(G1) RNA 10^1

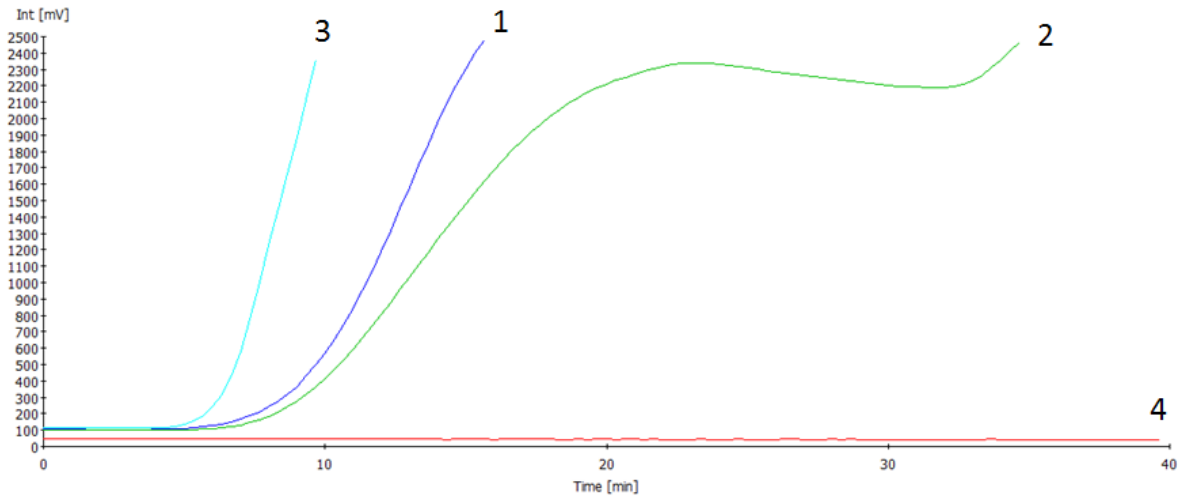
(B) 日本腦炎 JEV-2 引子對 G3 JEV 測試

Lane1: 日本腦炎(G3) RNA 10^6; Lane2: 日本腦炎(G3) RNA 10^5
Lane3: 日本腦炎(G3) RNA 10^4; Lane4: 日本腦炎(G3) RNA 10^3
Lane5: 日本腦炎(G3) RNA 10^2; Lane6: 日本腦炎(G3) RNA 10^1

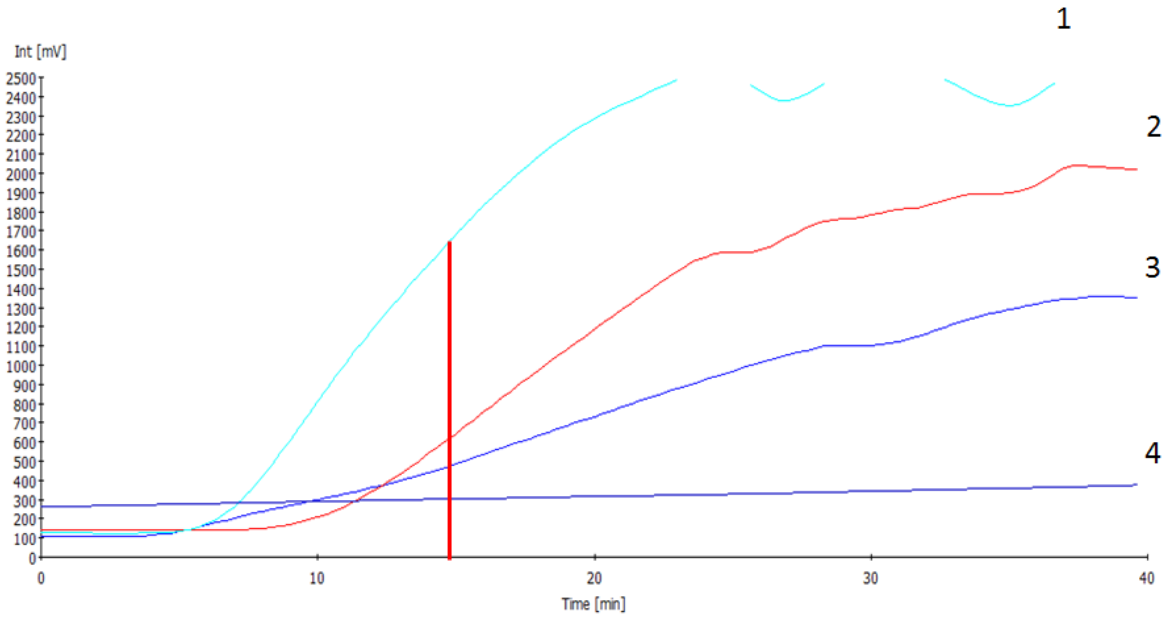
W: water

Figure 10. Dengue viruses (DENV-1~DENV-2) 3'UTR 引子組，RT-RPA 之測試

(A)



(B)



(A) TwistAmp exo +ListeriaM, real-time fluorescent DNA detection kit (李斯特菌)
1 - DNA (4ul), volume (50ul)　2 - DNA (4ul), volume (25ul)
3 - DNA (4ul), volume (25ul)　4 - NC

(B) TwistAmp exo(D1-2) test
1 - ListeriaM-DNA (4ul), volume (50ul)　2 – D1-RNA (4ul), volume (50ul)
3 – D2-RNA (4ul), volume (50ul)　4 - NC