

計畫編號：DOH96-DC-1301

行政院衛生署九十六年度科技研究發展計畫

第四級病毒偵檢（參考實驗室）

研究報告

執行機構：國防醫學院預防醫學研究所

計畫主持人：孫建安

研究人員：郭明德、林富宮、高治華、王又明、楊淳米、
郭賜成、洪耀文、何宜蓉、盧怡君

執行期間：96年1月1日至96年12月31日

本研究報告僅供參考，不代表本署意見

(1) 前言：

近年來國際間新興疾病發生頻仍，加上國與國、人與人之間的接觸日趨繁密，第四級病毒之病原體由流行地區傳到本國成為境外移入病例的可能性也隨著升高，還有目前國際間生物戰劑之研發與恐怖份子使用生物性病原體的陰影下，都大大增加這些高致病、高致死病原體爆發疫情的威脅，實在沒人能保證這類病原體不被使用或爆發。這第四級病毒大都屬於高致死率高傳染性病原體，目前無有效的疫苗或療法，甚至有些病毒可藉由人與人之接觸或經由空氣傳染，一旦爆發將造成國人之恐慌和整個社會經濟的動盪，最貼切的例子就如民國93年爆發的SARS疫情，造成台灣社會、經濟很大的恐慌與損失。為了將這些衝擊威脅降低，發展並備妥一些快速、簡易、敏感、且具特異性的檢驗方法及器材是非常的迫切，平時要了解這些病毒之特性、危害及防護準則，做好偵檢防治之基本工具準備及演練使用方法和支援程序，將有助於這類感染疾病之早期診斷，以期盡快遏止疫情擴散。

當診斷這些第四級或許多新興傳染原跟鑑定一般的病毒一樣需要分離病毒和分子生物技術的鑑定，也需要具有專一性之免疫抗體、抗原反應和電子顯微鏡鏡檢等，不過這些診斷步驟皆需要在具有高程度生物安全等級之實驗室內操作或前處理，以確保操作人員之安全。有鑑於此，在這計畫中我們期盼能運用本單位較嚴謹之設施，協助疾病管制局作些鑑定工作，並互相學習累積建立我國自己的偵檢能力，以便對這方面的疫情能有所助益。

作為一個合約實驗室，在平時即蒐集近年來國際發生新興病毒疫情及本國歷年之疫情報導，研判可能在國內爆發的高致病及高致死性疫情之疾病，並針對這些病毒建立相關之生物資訊；逐年建立起各種

新興病毒之診斷系統。這些診斷系統不外乎病毒分離、分子生物偵檢技術、血清免疫偵檢技術與電子顯微鏡鏡檢技術等。在分子生物偵檢技術主要以 PCR、RT-PCR、real time PCR 等為主，需要依病原設計出專一性的正反引子和 probe；並以病毒或 DNA、RNA 片段作為陽性標準對照組來確認。建立細胞庫作為病毒分離、鏡檢所需。至於血清學檢驗、免疫螢光檢測及病毒抗原和抗體檢查等多重偵檢方法則需要病毒蛋白或抗體作為偵檢之工具，這些病毒蛋白或抗體可以分子生物技術克隆病毒基因、表現純化蛋白和誘導抗體來取得。有些病毒無法取得其標準病毒株者將由文獻中取得足夠之病毒基因序列資料，利用人工合成這些病毒抗原性高的基因片段，再大量表現出可當偵檢抗原用之病毒重組蛋白質及製備偵檢用之多株及單株抗體。因此平常就要將這些偵檢的工具材料（包含引子、DNA 基因片段、組合蛋白、多株和單株抗體、細胞等）逐年建置累積起來。

今年我們除了檢體之檢測外，研發的部分將著重於 B 病毒和玉山專案所指定裂谷熱病毒偵檢系統的建立。獼猴 B 病毒 (*Cercopithecine herpesvirus type 1*) 是一種人畜共通傳染病，屬於 alphaherpesvirus，非常接近人類傳染的 herpes simplex virus type 1 和 type 2 (Boulter, E. A. 1975)。一般獼猴感染呈現無症狀帶原，而人類感染為嚴重的 neuropathogenicity，如果不處理死亡率高達 80%(Holmes et al., 1995)，屬於第四等級的致病原 (Whitley, R.J., and Hilliard, J. K. 2001)。調查在美國加州國家靈長類動物研究中心 (CNPRC; California, USA) 飼養的成年猴子約有 90% 感染 B 病毒或 rhesus cytomegalovirus，在野外捕獲的猴子也有類似的感染率 (Vogel et al., 1994)，因此引起有關動物中心的注意 (Hilliard and Ward, 1999)。在台灣除了生物與生藥科技發展所使用的非人類靈長類動物的需求量日日增加，實驗室工作人

員接觸猿猴的機會增加外，近期報導台灣相關單位針對野生及圈養台灣獼猴進行B病毒感染檢測，結果台灣獼猴感染陽性率高達90%以上，獼猴B病毒有可能成為台灣人畜共通傳染病公衛上之重點之一，除了飼養或實驗用的猴子的危險性外，台灣獼猴屬於保育類動物且目前野生動物保護及野外休閒風氣高漲，尤其在高雄地區猴子數量增加，人、猴接觸機會更加頻繁，相對人感染獼猴B病毒機會大大增加，這些年間高雄地區有好幾個被猴子抓傷的病例，雖未有確定病例但為了防範這病毒也被列入偵檢工作項目之一。

裂谷熱是由裂谷熱病毒（Rift Valley Fever Virus）所引起，它屬於布尼亞病毒科(Bunyaviridae)，沙蠅病毒屬(Phlebovirus)(Bishop et al., 1980)，除了它在2000-2001年從非洲擴展到阿拉伯半島（Jupp et al., 2002; Shoemaker et al., 2002），2006-2007年又在東非爆發外（CDC, 2007），因它能在許多蚊種體內複製來傳播（Turell et al., 1998），所以它具有繼續擴散到其他非疫區的潛力，再者它也被認為具有被作為生物戰劑的潛力（Peters, 2000; Sidwell and Smeeth, 2003; Lim et al., 2005），因而這病毒也被列於玉山專案之項目中，今年我們也把它放在偵檢研發的重點之一。1912年在肯亞即有本病的報告，但一直到了1930年在肯亞裂谷綿羊、牛群發生廣泛流行才受到矚目。最著名的動物裂谷熱疫情發生於1950-1951年間的肯亞，估計約導致10萬隻綿羊的死亡。另外，1977年在埃及亦發現裂谷熱病毒(可能是病畜由蘇丹出口至該地所造成)，並爆發動物和人的大規模流行。西非首次爆發人的裂谷熱流行在1987年，且與塞內加爾河的整建計畫(Senegal River Project)有關；原因在於此計畫導致地勢較低的塞內加爾河地區淹水，改變動物和人之間的交互作用，因此造成裂谷熱病毒傳播至人類。2000年9月，沙烏地阿拉伯和葉門爆發流行，是其首

次在出現在非洲以外的確定案例。2006年11月，肯亞再度傳出爆發裂谷熱疫情，截至2007年1月7日，已有大約75人因此死亡，另外有183人受到感染。2007年1月20日，報告指出疫情已經由肯亞傳至索馬利亞，在當地造成14人死亡(CDC, 2007)。裂谷熱是一種藉由昆蟲或直接接觸病畜傳播所造成的高死亡率之急性病毒感染症。主要感染動物依次為綿羊、牛、水牛、山羊、駱駝及馬驢等，其中綿羊、山羊及牛等家畜感染後會發生高力價病毒血症，屬於增幅動物。病媒方面現有斑蚊屬、瘧蚊屬、沼蚊屬、家蚊屬等25種蚊子被認為是媒介昆蟲。保毒情況尚不清楚，可能經由斑蚊屬蚊蟲介卵傳播，即其卵可自然地垂直感染此病毒；而在雨量豐沛、昆蟲大量孳生的季節造成大流行。人類會因蚊子(或其它可吸血昆蟲)的叮咬而得到裂谷熱。人類亦可能因接觸到病畜的血液或體液而得到此疾病。此種暴露可能起因於屠宰或處理病畜，或接觸到受汙染的肉類或乳品。此外，含有裂谷熱病毒的實驗室樣本，亦可能經由空氣微粒(aerosol)傳播。

今年全部的檢體都被要求檢測B病毒，我們以real-time PCR、病毒分離和dot blot檢測抗體，結果除了一個檢體在real-time PCR為弱陽性外其它的都為陰性，同時為了測試real-time PCR之靈敏度我們也設計合成陽性對照組的DNA片段，結果其靈敏度低到一個分子也可測到，所以在靈敏度是沒問題的，進一步核酸分析這弱陽性的real-time PCR DNA片段確實屬於第一型的B病毒。至於裂谷熱病毒先行收集已發表的核酸和氨基酸序列並作比較分析，再設計real-time RT-PCR用的引子對和探針，並且設計合成陽性對照用的DNA片段，選取、設計、合成及克隆NP基因片段，最後表現和純化此組合蛋白，抗體部分則仍持續在進行中。

(2) 材料與方法：

本計畫所用之血清檢體均為疑似第四級病毒感染之病患檢體。其檢驗流程作業，所必須應用之方法及實驗步驟簡要如下。

我們實驗室的診斷方式(必需至少一項符合)：

(一) 病毒分離、鏡檢：利用細胞來分離病毒，時間約 7-10 天後觀察細胞病變之現象。取此細胞病變之細胞或細胞外液體，經病毒去活化及濃縮體積後，進行電子顯微鏡鏡檢來觀察病毒之外型。

(二) 病毒基因偵測：設計出可增殖各病毒之正反引子，利用反轉錄聚合酵素連鎖反應或 real time PCR 之技術予以判定。

(三) 病毒基因定序分析：將所得到之基因片段給予基因序列分析，將得到之基因序列與病毒基因庫各亞型進行資料比對，確立此致病毒及其病毒亞型。

(四) 血清學檢查：先將血清檢體置於 55°C 半小時之滅菌後才作血清學方面之檢測。獼猴 B 病毒則以 DOT Immunobinding assay 為主 (VRL Laboratories)，比較急性期與恢復期的血清，若恢復期的血清增加 4 倍以上則判讀為陽性。分析裂谷熱病毒之 NP 基因序列為基礎，以人為基因合成之方式，合成長度約為 0.8 Kb 且經電腦軟體分析具有免疫抗原性之病毒核蛋白。利用細菌 (E.coli) 系統大量製備檢測用抗原。製備檢測用病毒抗原進行病人血清 IgM-capture or IgG 特異性抗體之分析，若大於 64 倍即判陽性或取病患之恢復期血清有 4 倍以上之結果判陽性。

(五) 病毒抗原檢查：利用大量製備之檢測用抗原，製備出多源抗體及單株抗體，以免疫轉漬 (Immunoblot) 之方法分析感染之細胞溶解液之病毒抗原。以免疫螢光分析 (Immunofluorescence assay, IFA) 偵測感染之細胞中抗原之出現。

(六) 免疫組織染色 (Immuno-histochemistry, IHC) 分析：利用免疫組織染色分析疑似病毒感染患者的組織細胞偵測病毒抗原之存在。

病毒抗原製備：國內直至目前為止並無第四級病毒感染之病例報告，更因此類病毒受到國際協會的管制無法獲得這些第四級病毒做為參考病毒。所以這些病毒抗原之製備，則需靠人工合成基因之方式獲得（目前人工合成基因之技術已趨成熟）。我們可將此人工合成基因以大腸桿菌或昆蟲表現系統來大量表現病毒蛋白，做為診斷用之病毒抗原。

病毒分離培養：Vero 或其它的細胞以Eagles' minimum essential medium (EMEM，內含10%加熱去活化胎牛血清)在37°C，5%CO₂的條件下培養。該細胞被用來分離多種出血性病毒。細胞接種後，改以2%EMEM做繼代培養。送檢樣本先經過濾除去雜質後，上浮液以EMEM 培養液調整成10%的懸浮液，以100μl 之該懸浮液，於37°C 接種至70%細胞滿的25cm² 的培養瓶，接種2小時後，再加入5ml 2% EMEM培養液，置入37°C，5%CO₂ 培養箱之後，每兩週做一次繼代培養，先吸出上層培養液，以0.25% Trypsine-EDTA處理分離細胞，再混入原吸出之培養液，而後將1/3量置入新的 25 cm²培養瓶，並以2%EMEM 補足至5 ml，另1/3 置於-70°C 凍存，另1/3量留做免疫轉漬檢測用。

血清檢體病毒或細胞培養病毒液DNA或RNA之萃取：使用Quagen廠牌之QIAamp Viral RNA抽取試劑組，依廠牌步驟指示，略述如下。取 140μl血清加入560μl AVL 溶液(註)，室溫靜置10分鐘，再加入560μl絕對酒精，混勻後，10000rpm轉速離心使通過QIAamp Spin Column，續以500μl AW 溶液(註)清洗管柱兩次，最後以80°C之60μl

Rnase-free ddH₂O 沖流出病毒RNA (Homczynski, P et al;1987)。註：廠商未說明AVL及之AW 溶液內含物。病毒DNA則以碘化鈉方法純化 (Ishizawa et al. 1991)，大致上用4.5M 的碘化鈉溶解檢體，再以肝醣融於50% 的異丙醇來沉澱病毒DNA。

即時定量核酸檢驗：快速偵檢時以此法為主，用羅氏公司所出 Light Cycler 為主，試劑採用 Roche 原廠核酸複製劑 3064760 LC RNA amp. Kit SYBR I 96rxn、3018954 LightCycler RNA Master Hybridization Probes Rxn96 及試用 Qiagene 汎用型螢光試劑:#204243 Quantitect SYBR Green RT-PCR Kit 與#204443 Quantitect Probe RT-PCR Kit，反應總體積為 20ul 或 10ul，引子濃度為 250 nM，探針濃度為 200 nM，試驗的反應條件依各種檢測有所不同，如 B 病毒為 DNA 無須 RT 反應，而裂谷熱病毒為 RNA 病毒則先行 RT 反應，其細節將再詳述。

反轉錄-聚合酵素連鎖反應(Reverse Transcription-PCR)：當即時定量核酸檢驗為陽性時，為取得更大段的DNA片段作進一步的核酸序列分析，則以此和下述之方法取得更大段DNA片段。在由細胞培養液或血清檢體萃取出之RNA溶液中，加入上、下端引子(100μl)後，將此混合物於90°C加熱5分鐘，置於冰上3分鐘，短暫離心收集溶液於管底。取20μl此模版/引子溶液於0.2ml離心管中，並加入5μl 10x緩衝液(500 mM KCl, 100mM Tris-HCl, pH8.3, 15 mM MgCl₂, 0.01% (v/v) gelatin)，4μl 2.5 mM dNTPs (BRL)，0.5μl 0.1M DTT (dithiothreitol)，0.5μl 核糖核酸酵素抑制劑(ribonuclease inhibitor, RNAsin, 10U/μl, BRL)，0.5μl SuperScript™ II Reverse Transcriptase (RNase H⁻, 20U/μl, BRL)和0.5μl AmpliTaq DNA polymerase (5U/μl, Perkin Elmer)，以depc無菌水將總體積補至50μl，混合均勻後，於GeneAmp PCR System 9600

(Perkin Elmer) 進行反轉錄-聚合酵素連鎖反應。反應條件依各個反應有所不同。

巢式聚合酵素連鎖反應(Nested-PCR)：巢式聚合酵素連鎖反應則接著在第一對引子增幅得到之病毒核酸中，再設計出第二對引子進行病毒核酸增幅聚合酵素連鎖反應，其目的在增加診斷之專一性及敏感性。反應完成後以瓊脂凝膠進行電泳以分析所得片段。

酵素連結免疫吸附試驗(MAC-ELISA)：首先加100 μ l/well 1:200 goat antihuman IgM抗體於96-well plate，於室溫下靜置4小時，以PBS沖洗各well，再以4%BSA(bovine serum albumin)加入各well，此為blocking step，於37 $^{\circ}$ C放置5分鐘後，以PBS沖洗各well，於各well中加入50 μ l 1:10稀釋之血清，於室溫下靜置2小時，吸取稀釋之血清後以PBS沖洗各well，然後於各well中加入50 μ l定量之病毒濃縮液或純化之病毒抗原，於室溫下靜置2小時，以PBS沖洗各well，於各well中加入25 μ l horseradish peroxidase-conjugated 單株抗體，於37 $^{\circ}$ C反應30分鐘後，以PBS沖洗各well後，各加入100 μ l之ABTS受質，於37 $^{\circ}$ C反應30分鐘後加入停止溶液，再於室溫下靜置2小時，最後以ELISA reader 於405nm波長下讀取吸光值。評估結果時，每一plate都以至少一個已確立感染者血清做為positive control，並以三個未感染血清做為negative control，此三個negative control所得之mean+3SE做為判定之標準，超過此值判為陽性，反之為陰性。

酵素免疫吸附分析法(Enzyme-linked Immunosorbent Assay; ELISA)：將96孔酵素免疫分析盤劃分為上下兩部份，其一加入100 μ l 1：2000稀釋之病毒抗原混合液，另一半加入100 μ l 1：2000稀釋之E6細胞之抗原液以作為對照實驗。將加好抗原之96孔酵素免疫分析盤靜置於4 $^{\circ}$ C，隔夜後即可使用。把置備好的酵素免疫分析盤先以washing

machine以磷酸緩衝液(Phosphate Buffer Saline; PBS, 8mM Na₂HPO₄, 2mM KH₂PO₄, 140mM NaCl, 10mM KCl)洗淨，將待測血清以10%脫脂乳(skimmed milk)以1:100濃度稀釋，分別加入100 μ l 稀釋血清於盤中之對照組於實驗組中。於37°C中作用1小時後，以PBS清洗酵素免疫分析盤，在酵素免疫分析盤中之孔內，各加入100 μ l以1:2000稀釋之第二抗體(Goat anti-Rat IgG-HRP, Cappel)，再置於37°C反應1小時，清洗酵素免疫分析盤後，每孔加入100 μ l之呈色劑(TMB-0.035% H₂O₂, in Citrate-Citrate buffer, pH5.5)置於室溫於黑暗中作用15-20分鐘後，每孔加入50 μ l反應終止溶液(2M H₂SO₄)，以分光光度計OD₄₅₀測其吸光值，作分析比較，將OD₄₅₀值高於負對照平均值加3倍標準差者，視為正反應。

免疫螢光染色(IFA)：將適量經Trypsin-EDTA處理分離下來的細胞，滴至12孔玻片上，置於抽氣櫃中抽乾，而後以-20°C 1:1 之甲醇/丙酮溶劑固定2分鐘，在放入抽氣櫃以揮發甲醇/丙酮固定液。以PBS沖洗各well後，加入初級抗體 (1:100 in PBS)，於37°C反應30分鐘，以PBS重複浸洗3次，每次各5分鐘，再加入FITC標定之次級抗體 (1:100 in PBS)，於37°C反應30分鐘，以PBS 重複浸洗3次，每次各5分鐘，待加入0.5ml之PBS後，以免疫螢光顯微鏡觀察染色結果。

凝膠電泳與轉漬酵素免疫反應：根據 Laemmli(1970)所敘述之 SDS-polyacrylamide electrophoresis 方法，採用 10% separating gel。首先將準備好之病毒液或基因表現之病毒蛋白與等量之 2 X sample buffer 混合，經沸水煮 10 分鐘。將此混合液加入 2.5% stacking gel 之樣品槽中，以固定電壓 100 伏特進行電泳，待指示劑向下移動至距膠體底端 2 公分處，停止電源。參考 Towbin et al(1979)之方法，利用 Semi-Dry Blot 的方式，將凝膠電泳上之病毒蛋白轉漬到與膠體一樣大

小之 NC-膜。轉漬後將 NC-膜剪成一條條長形之膜，進行酵素免疫反應。先以 10%胎牛血清白蛋白(Bovine Serum Albumin,BSA)與 NC-膜做非特異性結合，於 37°C 反應 60 分鐘，再加入稀釋之病人血清，於 37°C 反應 60 分鐘，以 PBS 重複浸洗 3 次，每次各 5 分鐘，再加入 HRP 結合之次級抗體 Goat-antihuman IgG-HRP (1:100 in PBS)，於 37 °C 反應 30 分鐘，以 PBS 重複浸洗 3 次，每次各 5 分鐘，待加入含有 3-Amino-9-EthylCarbazole(AEC)和 H₂O₂ 的溶液後，等待十五分鐘後結果呈現粉紅色至褐色反應，依其蛋白分子大小判定為是否陽性。

表現重組蛋白：將大腸重組基因表現載具之大腸菌培養至 log-phase transformed 經過 IPTG 的刺激 3 小時後，離心、去掉培養液、沈澱的大腸菌體浮懸在 TEN buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0 , 1 mM EDTA 和 50 mM NaCl) 及 1 mg/ml lysozyme 中，保持在 4 °C 40 分鐘，再以超音波打破菌體，加 5 mg/ml DNase I NaCl-Mg 在溶液中 4°C digest DNA 60 min，離心、收沈澱物。沈澱物用 TEN buffer 含 0.1% NP-40 洗兩次後，將沈澱物溶於 GTG buffer (5M Guanidine-HCl, 50 mM Tris-HCl pH 8.0 , and 10% glycerol)，加入 2-mercaptoethanol 至 8 mM 放置於 60°C 30 min，然後以 GTG buffer 稀釋 8 倍並和 Ni-NTA 樹脂混合，用大量的 GTG buffer 洗掉沒附著上的雜質後，再以 GTG buffer 含 0.25 M imidazole elute 出表現蛋白。若需要進一步 renaturation 成 active form of viral protein，則沖出液稀釋至 A₂₈₀<0.200 以下，用 0.5 M guanidine HCl-50 mM Tris HCl pH 8.0 - 1 mM EDTA-1 mM dithiothreitol-20% glycerol 透析，在換為 buffer A (25 mM HEPES pH 7.4-50 mM KCl-0.02% 2-mercaptoethanol-1 mM EDTA- 0.01% Triton X-100-20% glycerol) 4°C 至少 6 小時。

純化各種重組蛋白：由於各種蛋白的特性都不同，所以純化的方法都不一樣，上述所得的 Ni-NTA eluent 可試著用分子量的大小、帶電量的多寡、親脂性的強弱、或有特別的特性來做分離，然後進一步用 ionic exchanger chromatography 來做分離。

抗體的製備：作為抗原的重組蛋白已經過 Ni-NTA column 純化或經一些層析的高純度蛋白當作抗原即可，亦可用經過 renaturation 的 active form of recombinant protein，至於動物以兔子和老鼠為主，而老鼠的動物 model 可進一步試著去生產單株抗體，這些抗體可來做偵檢用。

單株抗體的製備：將高純度的組合蛋白與 complete adjuvant 或 incomplete adjuvant 混合後打入老鼠的脾臟中一次，接續進行腹腔注射數次，最後一次經過 7 天之後，取血確定稀釋 1 萬倍 ELISA 仍有強烈反應後一週，再進行尾靜脈注射，3~5 天後殺老鼠取其脾臟，並在心跳停止前抽其血液，之後將脾臟用 RPMI 乾淨之後，利用研磨的方式將脾臟磨碎取得 B 細胞。利用 RPMI 開始進行 B 細胞和 NS1 細胞多次清洗，之後算其細胞依 3:1 的比例混合進行細胞融合。利用 PEG1500 進行 B 細胞以及 NS1 細胞的融合，融合後再次利用 RPMI 清洗。最後再補滿 RPMI 分到 96 孔盤中，經過一週之後，觀察細胞群落及測試抗體 titer，titer 高的細胞繼續培養繁殖，並作第二次的稀釋確保為單株，且隨著繁殖繼續測試 titer。(Harlow, Ed and Lane, David Antibodies a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory. 1998)

電子顯微鏡鏡檢：病毒的顯微鏡鏡檢，將病毒養在適當的細胞中，繁殖至有 plaque 產生後，收取上清液，以負染色的方式，觀查病毒的顯微構形及科別判定。

(3) 結果：

檢體檢測及 B 病毒偵檢之建立

今年(96年)到目前(11月10日)總共收到了8件血清檢體，全部的檢體都被要求檢測B病毒。我們都先行以 real-time PCR 和病毒分離作檢測，至於 dot blot 檢測抗體則等收到恢復期的血清和急性期的血清一起測試比對判斷抗體是否上升4倍以上。至於B病毒 real-time PCR 偵檢的兩對引子對(一對在US4基因另一對在gB基因上)，US4的這對引子和反應的條件顯示於 Fig.1A，若反應結果至第40cycle 仍沒見到 OD 上升，則判定為陰性。為了要確定 real-time PCR 反映的正確性，我們設計人工合成的陽性對照組 DNA 片段，這合成的陽性對照組用的 DNA 片段比 wild type 的多含了4 bps 為 HindIII 的 cutting site，這是在目前發表的B病毒US4基因的這片段所沒有的可作為辨別是否污染用的，然後將這DNA片段接到TA載體上大量增殖純化定量，以 real-time RT-PCR 來測試，結果如 Fig. 1B.，Fig. 1B 下面的圖為其標準化的曲線圖，從各種不同濃度的陽性對照組可推得這 standard curve，1 個 copy 的 cutoff 值約在 34.4，顯示這檢測方法的靈敏度可達到 1 個 copy。今年 8 個檢體除了 US4 引子對在檢體 048602 呈現弱陽性，cutoff 值出現在 39.47 (Fig. 1 B.)，其他的檢體和檢測方法都為陰性，而其中最右邊粉紅色的 curve 為檢體 048602，這檢體 048602 顯現的 cutoff 值為 39.47 是相當低。在 Fig.1C. 可見到檢體 048602 的 melting point 為 90.3°C，而其它的陽性對照組的 DNA 片段的 melting point 為 89.7°C，檢體 048602 的 melting point 相當高溫所以應該不是引子行成的 dimerization 所造成的偽陽性。再者檢體 048602 的 real-time PCR 產物經 HindIII 酵素切並無反應且其 melting point 與陽性對照組的反應產物有所不同，這 real-time PCR 的結果應

不是由陽性對照組污染導致的偽陽性。然而 real-time PCR 的 cutoff 值出現在 39.47 實在太低讓人去接受，又由於其反應產物只有 120bp，因此沒有嘗試作 nested PCR 或 semi-nested PCR，除了嘗試用其它三對引子結果為陰性外，就這對引子的 5'和 3'端外作引子，嘗試去延長反應產物但都失敗。

最後只好將這 DNA 片段進一步作核酸序列分析顯示於 Fig. 2A 共 126 bps，經核酸序列的比對發現與 AF533768|AF533768.1 Cercopithecine herpesvirus 1 strain E2490 和 AB074432|AB074432.1 Cercopithecine herpesvirus 1 的 US4 基因最接近 (Fig. 2B.)，124bp 只有 1bp 為 gc transversion，顯示這段 DNA 片段最接近第一型的 B 病毒，因我們從未人工合成這段 DNA 片段，至於人工合成的陽性對照組 DNA 片段除了增加 4bp 的 HindIII site 外還有 4bp 與這序列不同，所以應不會由陽性對照組污染造成的偽陽性。

病毒分離則以 vero 細胞與 200 μ l 檢體於 37°C 1 小時 binding 後加 medium 培養 7 天檢視 CPE，結果與陰性對照組一樣時，會再繼續作第二代的病毒分離若仍與陰性對照組一樣時判斷為陰性。

血清學檢測我們用 Dot Immunbinding Assay (VRL Laboratories)的套組，這套組提供陽性抗體作為對照組，當急性期和恢復期的血清測試 dot blot，若無法看出抗體有清楚的上升 4 倍則判定為陰性，這病人的兩次血清測試並無明顯的上升 4 倍因此判為陰性。

以往這計劃裡都投注注意力在其它的出血熱病毒如伊波拉、馬堡、拉薩等一類之病毒，今年我們著力於裂谷熱病毒。首先蒐集有關裂谷熱病毒之生物資訊並比較不同病毒株核酸序列之異同處，較完整的大約有 40 株，於 real-time RT-PCR 選取 G2 基因的部分，引子對和探針的核酸序列顯示於 Fig.3A.，同時我們也設計陽性對照組用的

DNA 片段，它與 wild type 的核酸序列大致相同含有 5 端和 3 端的引子對及探針的區域，唯一不同的地方在將 wild type 中間的粉紅色 gga 改為 cggcc 多加了一個 NOT1 site 共有 96 bps，這是在 wild type 所沒有的，可以在檢測時可區分出是否為陽性對照組的污染。Fig. 4A 顯示在不同濃度的陽性對照組 DNA 片段經 one step real-time RT-PCR 所表現的 amplification curve 和 cutoff 值所繪成的標準曲線圖，1 個 copy 時的 cutoff 值為 34.1 cycle，所以其靈敏度也可測到 1 個 copy，至於 melting point 為 79°C，不過目前沒有確定病例的檢體做比較驗證這是目前最弱的地方。

比較裂谷熱病毒蛋白表現量最高的仍為 nucleocapsid 蛋白，Fig. 5 顯示 40 個病毒株的 NP 氨基酸比較，其間的相似性也非常高，因此我們仍選此蛋白為對象做人工合成 DNA 片段，Fig. 6 的核酸序列經過比對將 BamH1、EcoR1、EcoRV 和 HindIII 的 Restriction sites 在不影響相對氨基酸序列情況下設計把它們除掉，而在 5 端 start codon 前加一個 BamH1 site，在 3 端 stop codon 後加一個 HindIII site，方便克隆進入 pQE80 的載體，以便於做組合蛋白表現，並於組合蛋白的 N 端加上 his tag 而 C 端的 his tag 因 stop codon 而被除去。這 pQE80RVNP 經克隆與選殖後，發現 IPTG 活化這組合蛋白的表現在 inclusion body 和懸浮液中都有，但仍以 inclusion body 為主，因此我們嘗試尋求最佳表現條件並嘗試較大量的生產與純化，Fig. 7 顯示以 5 公升的菌量經 1mM IPTG 活化後 37°C 培養 4 小時後，離心取沉澱物經 lysozyme 打破菌體清洗後，inclusion body 用 8M urea、20 mM Tris pH8.0 buffer 溶解，上清液用 15 ml 的 Ni-NTA 層析管柱純化，純化的條件與描繪圖呈現於 Fig. 7。Fig.8 為各個 fraction 的 SDS PAGE 凝膠並以 coomassie blue 染色，這組合蛋白約含 260 個氨基酸估量分子量約為

30kDa，用西方點墨法以 anti-his antibody 做檢測顯示這蛋白的大小是我們預判的且含有設計的 his tag (data not shown)，所以此蛋白應我們預期的組合蛋白，第一條 lane 為 flow through 似乎亦含不少的 30kDa 蛋白，有可能管柱已經 overloaded，不過為了求教高純度只收 fraction 39~48 (第四個 peak 的地方為 0.2 M imidazole 的 eluent 部分)，約 20 ml 共 10mg，純度可達 90%，回收率不是很高可再繼續改良，目前這些量足夠做後續之實驗。接著我們也嘗試將這個組合蛋白當作抗原，用兔子來刺激生產多源抗體，將來也會嘗試用小白鼠生產單株抗體。

至於以往研發的 Lassa 和 Ebola 病毒組合 NP 蛋白仍繼續作大量生產與純化，作為 ELISA 測試單株抗體之抗原。將高純度的組合蛋白 (0.1mg/每隻老鼠) 與 complete Freund's adjuvant 混合後打入老鼠 (BALB/C) 的脾臟中一次，兩週後改用 incomplete Freund's adjuvant 混合接續進行腹腔注射數次 (大致上為 4 至 5 次)，最後一次經過 7 天之後，取血確定稀釋 1 萬倍在 ELISA assay 下仍有強烈反應

(OD>1.000) 後二週，再進行尾靜脈注射，3~5 天後麻醉老鼠取其脾臟，並在心跳停止前抽其血液之後，將脾臟用 RPMI 乾淨之後，利用研磨的方式將脾臟磨碎丟棄結締組織取得 B 細胞。利用 RPMI 開始進行 B 細胞和 NS1 細胞多次清洗之後，算其細胞依 3:1 的比例混合進行細胞融合。利用 PEG1500 進行 B 細胞以及 NS1 細胞的融合，融合後再次利用 RPMI 清洗。最後再補滿 RPMI 分到 96 孔盤中，約每個脾臟可分得 20 盤，經過一週 HAT medium 挑選之後，觀察細胞群落及測試抗體 titer，titer 高的細胞繼續培養繁殖，這些孔所含的融合細胞仍然不是單株，可選取高 titer 的融合 B 細胞進一步稀釋，試圖取得單株。並作第二次的稀釋確保為單株，且隨著繁殖繼續測試 titer，避免在作繼代繁殖時抗體基因有可能被剔除掉，可用 ELISA 和

western blot 測試單株抗體確認 B cell clones，目前挑兩株高 titer 的單株融合 B 細胞，進一步以腹水做較大量生產目前各約收集 50cc，titer 仍在測試 titer 中，最後這些單株抗體會繼續純化並完成 epitope 的測定，。

(4) 討論：

雖目前有一個檢體顯示非常弱陽性的 B 病毒檢體，但因只有一種檢測方法為陽性時，沒有其它證據強力支持應只能說有可能病毒基因或病毒存在，更重要的事實為這病患去求醫主要的訴求為被猴子抓傷的創傷，並無類似感染 B 病毒的併發症，所以即使能測到很完整的檢測證據如病毒分離，無併發症時也只能提供資料有高度被感染的危險，提醒提早使用抗皰疹的藥物來預防 (Cohen et al. 2002)，仍然不能算為確定的病例。

這三年來我們已經檢測超過 25 個要測 B 病毒的檢體，以上結果大致上可說都為陰性，但據報導台灣相關單位針對野生及圈養台灣獼猴進行 B 病毒感染檢測，結果台灣獼猴感染陽性率高達 90% 以上，為什麼這些被猴子抓傷的病患檢測陽性率如此低？是否有可能因為 B 病毒的基因含較高的 GC 比率，在 PCR 測試較難較容易發生偽陰性，為了回答這問題，我們合成 DNA 片段當成陽性對照組測試 real-time PCR 的敏感度，結果顯示只要引子的核酸序列能與 template 吻合則靈敏度可達一個 copy，引子不會造成 dimerization 等影響到偵測的敏感度，至於這陽性對照 DNA 片段放在正常血清中做同樣方法去萃取 DNA，再測試仍可得到相類似的靈敏度，所以問題應該不在 real-time PCR。第 34 cycle 螢光反應可測得，不同濃度的 copy 可見於 standard curve，若測 melting point 大約都在 89~90°C 附近，由這些結果可知這對引子用於 real-time RT-PCR 檢測其敏感度相當高，若檢體含有核酸序列能吻合應該能被測到。我們也試著加上 DMSO 或 betaine 去避免高 GC 比率但結果仍然一樣。其次因 B 病毒和猴子 rhesus cytomegalovirus (CMV 病毒) 相似性較高，為了要區分我們特別選取 Gg 基因，並合成部分的基因片段，因這基因片段為高 GC 含量不

容易合成，目前我們合成兩段片段無法接合成一整段，分開兩段克隆作蛋白表現都很差，我們仍會繼續去解決這問題。另一方面我們也跟屏科大合作取得約 30 個猴子的拭子，只得到高陽性的猴子 rhesus cytomegalovirus (CMV 病毒)，卻仍無法取得陽性的 B 病毒檢測，是否血清學檢測的結果有可能由猴子 rhesus cytomegalovirus 的 cross react 造成的偽陽性，不過這些都仍待進一步研究去解答，只有繼續和屏科大合作做更多的測試才能下論斷。

在一般偵檢至少要有兩種以上的方法才可確定，為此我們也設計其它對引子在 gG 或 US6 的區域，同時可利用合成的修飾過的 DNA 當作陽性對照組，但是在初步實驗結果顯示其靈敏度都不像 gB 和 US4 這兩對引子好，大約低了二個 log，因此我們仍會繼續找些較好的引子來彌補這些缺點。

其他還有好多疑問仍需要去解答改進，採檢的血清檢體是否較適合做血清學檢測，因為被猴子抓傷時 B 病毒是否馬上進入體內大量繁殖而進入血液，還是藏於 ganglia 裡面？是否應改為傷口的擦拭棉棒，在 Cohen et al. 2002 的文章裡甚至考慮到病人之安危至上，當病患被猴子抓傷時儘速清理傷口等到徹底清洗完再以拭子採檢，避免第一時間拭子採檢時將病毒傳播經由傷口進入體內，若仍由拭子發現有陽性病毒分離或陽性 PCR 結果時，則顯示病人有感染的高危險性需要提早使用抗疱疹的藥物來預防。若有病癥呈現時採檢的檢體則以傷口局部黏膜甚至 CSF 才是真正的對象。

或許我們對這台灣特有種的獼猴互相感染的 B 病毒的研究相當缺乏，進一步的相關生物資訊全無，因此目前只能依照國外發表之生物資訊來設計，在不同種的獼猴宿主是否 DNA 核酸序列會有大的差異，造成所設計的引子無法全然吻合，雖然這可能性不大可是仍然無

法排除這可能性，若要解決這問題，只能就台灣獼猴感染的 B 病毒深入研究才能回答這問題。

因為 real-time PCR 或 RT-PCR 具有快速、高靈敏度又可定量的優點，目前分子生物檢測第一步都改用 real-time PCR 或 RT-PCR，因此在開發裂谷熱病毒的偵檢我們也都開始先行設計 one step real-time RT-PCR，除了由生物資訊選取較 conserved 的地區設計引子對和探針外我們也設計陽性對照組的 DNA 片段，增添了一個 NOT1 site 並多了兩個 bps，可在 melting point 或 restriction enzyme 做為區分判斷是否為對照組的污染，同時在陽性對照組的 DNA 片段以 real-time PCR 反應結果顯示引子對不會干擾造成 dimerization 的情形，這反應的靈敏度可達 1 個 copy，其 cutoff 值為 34.1 cycle 相當理想，不過我們仍需再尋找另外一二對好的引子對做為兩樣以上的證據去確定一個病源，其次我們仍需進一步以 RNA 片段來測試，因為 RT 仍然是一個影響非常重要的一個癥結點，甚至在 RNA 的萃取都要去確認，還有仍需設計一兩個 RT-PCR 或 nested PCR，儲備一個提供較長的反應產物作核酸序列分析用。最後 multiplex 也是在我們的期望中，不過本所現在都用羅式公司的儀器，由羅式公司所提供的 Light Cycler 機型，可以提供三個頻寬，偵測不同的螢光，分別為 SYBR green，LC640 與 LC705，其中 SYBR 較不具專一性，易有干擾的背景值出現，利用探針的測定較為專一，為探針費用較貴且保存不易，若進行多段基因的標示反應，在原廠的螢光選擇上較少，這也是個待解決的障礙。

在裂谷熱病毒的抗原準備工作對象仍是以 nucleocapsid 為主，主要它的量最多在細胞質中合成較沒經過 posttranslational modification，且只有一個 cys 較不容易形成 disulfide bond，比較 40

多株氨基酸序列相當 conserved，因此在偵檢的立足點它是很好的候選者。選擇 pQE80 為載體基於它 N 端和 C 端都有 his tag，fusion protein 的部分非常短不致於因強抗原性抑制所接蛋白的抗原性表現。目前在蛋白表現的量不算低，唯一美中不足的視為純化的回收率嫌低了些，我們會再繼續改進這純化的方法。

往年生產之重組蛋白及其所誘導出的抗體仍繼續在進行中，在抗體表現的效率取決於組合蛋白和 fusion 蛋白本身，當然要考慮抗原性的強弱，太弱時產生的抗體大部分都只認 fusion 蛋白的部分，但若減短 fusion 蛋白部分仍無法提高抗體的形成，唯一的方法就是去嘗試添加 adjuvant，現在使用的 adjuvant 的種類實在很多，只能多去嘗試去 match。

(5) 參考文獻：

- Bishop, D. H., Calisher, C. H., Casals, J., Chumakov, M. P., Gaidamovich, S. Y., Hannoun, C., Lvov, D. K., Marshall, I. D., Oker-Blom, N., Pettersson, R. F., Porterfield, J. S., Russell, P. K., Shope, R. E., Westaway, E. G., 1960. Bunyaviridae. *Intervirology* 14, 125-143.
- Boulter, E. A. 1975. The isolation of monkey B virus (*Herpesvirus simiae*) from the trigeminal ganglia of a healthy seropositive rhesus monkey *J. Biol. Stand.* 3: 279-231.
- Centers for Disease Control and Prevention, 2007. Rift Valley fever outbreak in Kenya, November 2006-January 2007. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 2007,56, 73-76.
- Cohen, J. I., Davenport, D. S., Stewart, J. A., Deitchman, S., Hilliard, J. K., Chapman, L. E., and the B Virus Working Group. 2002. Recommendations for prevention of and therapy for exposure to B virus (*Cercopithecine Herpesvirus 1*) *Clin. Infect. Dis.* 35: 1191-203
- Grant Johnson, Susan Nelson, Martin Petric, and Raymond Tellier Comprehensive PCR-Based Assay for Detection and Species Identification of Human Herpesviruses *J. Clin. Microbiol.* 2000 38: 3274-3279.
- Harlow, Ed and Lane, David *Antibodies a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory. 1998
- Hilliard, J. K. and Ward, J. A., B virus specific-pathogen-free breeding colonies of macaques (*Macaca mulatta*): retrospective study of seven years of testing. *Lab. Anim. Sci.* 1999 49, 144-148.
- Holmes, G. P., Chapman, L. E., Stewart, J. A., Straus, S. E., Hilliard, J. K., Davenport, D. S., and the B Virus Working Group. 1995. Guidelines for the prevention and treatment of B-virus infections in exposed persons. *Clin. Infect. Dis.* 20:421-439.
- Homczynski, P; Sacchi, N (1987) Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162: 156-159.
- Ishizawa, M., Kobayashi, Y., Miyamura, T., and Matsuura, S., 1991. Simple procedure of DNA isolation from human serum. *Nucleic Acids Res.* 19: 5792

- Jupp, P. G., Kemp, A., Grobbelaar, A., Leman, P., Burt, F. J., Alahmed, A. M., Al Mujalli, D., Al Khamess, M., Swanepoel, R., 2002. The 2000 epidemic of rift Valley fever in Saudi Arabia: mosquito vector studies. *Med. Vet. Entomol.* 16, 245-252.
- Kulesh, D. A., Baker, R. O., Loveless, B. M., Norwood, D., Zwiars, S. H., Mucker, E., Hartmann, C., Herrera, R., Miller, D., Christensen, D., Wasieloski, L. P., Huggins, J., and Jahrling, P. B., (2004) Smallpox and pan-Orthopox virus detection by real-time 3'-minor groove binder TaqMan assays on the Roche LightCycler and the Cepheid Smart Cycler platforms *J Clin Virol.* 42. 601-609
- Lim, D. V., Simpson, J. M., Kearns, E. A., Kramer, M. F., 2005. Current and developing technologies for monitoring agents of bioterrorism and biowarfare. *Clin. Microbiol. Rev.* 18,589-607.
- Makoto Hirano, Shin Nakamura, Fusako Mitsunaga, Maki Okada, Shuya Shirahama, and Richard Eberle One-Step PCR To Distinguish B Virus from Related Primate Alphaherpesviruses *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2002 9: 716-719.
- Perelygina, Ludmila; Patrusheva, Irina; Manes, Nina; Wildes, Martin J.; Krug, Peter; Hilliard, Julia K. Quantitative real-time PCR for detection of monkey B virus (Cercopithecine herpesvirus 1) in clinical samples. *J Virol Methods.* 2003 May;109(2):245-51.
- Peters, C. J., 2000. Are hemorrhagic viruses practical agents for biological terrorism? In: Scheld, W. M., Craig, W. A. (Eds.), *Emerging Infections*. ASM Press, Washington, DG, pp.203-211.
- Shoemaker, T., Boulianne, C., Vincent, M. J., Pezzanite, L., Al-Qahtani, M. M., Nichol, S. T., 2002. Genetic analysis of viruses associated with emergence of Rift Valley fever in Saudi Arabia and Yemen 2000-2001. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 1415.
- Sidwell, R. W., Smee, D. F., 2003. Viruses of the Bunya- and Togaviridae families: potential as bioterrorism agents and means of control. *Antiviral Res.* 57, 101-111.
- Towbin H., Staehelin T. and Gordon J., Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 1979 76: 4350-4.
- Turell, M. J., Bailey, C. L., Beaman, J. R., 1998. Vector competence of a Houston Texas strain of *Aedes albopictus* for Rift Valley fever virus. *J. Am. Mosq.*

Control Assoc. 4, 94-98.

Vogel, P., Weigler, B. J., Kerr, H., Hendrickx, a. and Barry, P. A., Seroepidemiologic studies of cytomegalovirus infection in a breeding population of rhesus macaques Lab. Anim. Sci. 1994 44, 25-30

Whitley, R. J., and Hilliard, J. K.,(2001) Cercopithecine herpesvirus (B virus). In fields Virology, 4th edn. vol. 2, pp2835-2848. Edited by P. M. Howley andD.M. Knipe Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins.