

計畫編號：MOHW110-CDC-C-315-114411

衛生福利部疾病管制署 110 年科技研究計畫

計畫名稱：即時人畜共通病原可攜式檢測平台開發

110 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：楊志元

協同主持人：邱乾順

協同主持人：張家靖

研究人員：張家瑜、黃偉倫、范文斌、陳彥蓁、黃羿宣、洪羽屏、梁綉雲、宋惠詠

執行期間：110 年 1 月 1 日至 110 年 12 月 31 日

本研究報告僅供參考，不代表本署意見，如對媒體發布研究成果應事先徵求本署同意

目錄

	頁 碼
目錄	(2)
計畫中文摘要	(3-4)
計畫英文摘要	(5-6)
計畫內容	
一、前言	(7-11)
二、材料與方法	(12-16)
三、結果與討論	(17-18)
四、結論與建議	(29)
五、計畫重要研究成果及具體建議	(30)
六、參考文獻	(31-34)

計 34 頁

中文摘要

腸病毒屬為微小核糖核酸病毒科 (picornaviridae) 含克沙奇(Coxsackievirus)、伊科病毒 Echovirus、Poliovirus 及其他不分型之腸病毒至少有 67 種。腸病毒等病毒感染為亞太地區一種主要且傳染力強的兒科傳染病。大多數腸病毒僅會引起輕度症狀。但仍有部分病毒能夠感染中樞神經系統 (CNS) 並引起神經系統疾病，例如無菌性腦膜炎，腦炎，腦膜炎，神經失調和麻痺。腸病毒除 Polio & EV71(only in Mainland China)外，目前並無適當的疫苗，因此能開發出高靈敏、可分型之腸病毒快速檢測平台，將對腸病毒病患治療與感染預防將極有助益。

且隨著國際往來交流頻繁，大環境的變化使得許多新興傳染病或是過去已銷聲匿跡的傳染病捲土重來，如何在最短的時間內偵測出這些未知感染源，是公衛系統最大的挑戰，傳統病原培養方法受培養時間、培養條件限制，恐無法快速識別病原。本計畫分為兩大部分「即時核酸定序平台」及「貴金屬奈米薄膜技術平台」，嘗試利用不同策略建立從檢體直接偵測病原的即時偵測平台。

「即時核酸定序平台」是運用宏基因組定序 (Metagenomic next-generation sequencing, mNGS) 方法結合奈米孔定序裝置來檢測臨床樣本，新發展的奈米孔測序技術擁有長片段、即時偵測等優勢，搭配簡便的樣本前處理程序及即時定序分析，可專一性地辨認 DNA 或 RNA 的序列來識別病原。但運用 mNGS 方法處理臨床檢體仍有一些問題須克服，如宿主序列占比太高、潛在病原序列所占比例太少及分析工具的選擇。因此本計畫將分四年針對樣本前處理、奈米孔定序及資料分析進行測試評估，並建立標準操作程序。本計畫第一年針對樣本前處理進行測試評估，比較市售商業套組的去除宿主序列效能及萃取的核酸品質，並嘗試建立標準操作程序。

在「貴金屬奈米薄膜技術平台」計畫中，本研究團隊找出針對不同型別腸病毒 VP1 之 DNA 序列進行偵測。本研究針對此一需求，發展一系列以貴金屬(例如金，鉑等)所製成奈米薄膜電化學探針為基礎開發先將針對某型別腸病毒結合之專一 DNA 探針，利用貴金屬表面與 DNA 探針分子形成硫化之鍵結進行固定化，而後結合 DNA 雙股配對專一性結合之關係，進行對檢體之偵測，並利用電化學偵測其阻抗的改變，而精準而快速地得知有何種類型之腸病毒感染。

第一年的計畫中，已分析不同型別腸病毒，病毒體外殼蛋白質 VP1 之差異，並針對 VP1, DNA 差異性部位，並合成不同型別腸病毒之 VP1 之 DNA 探針，並嘗試將 5' 硫基化的 DNA

探針固定於鈱金屬薄膜電極，並作為下年度進行不同型別抗體篩選的準備。預計明(110)年以第一年獲得不同型別腸病毒 VP1 之 DNA 探針為材料，固定化於鈱金屬薄膜製成檢驗電極，以電化學方式對腸病毒進行偵測，此外，完成金屬電極製成程序。並可由此建立即時檢測技術及快速分析流程，協助臨床醫師與檢疫人員執行快速檢測，期能快速發現病原，提升防疫作為，杜絕此一傳染病散佈。此外貴金屬奈米薄膜平台可方便臨床即時使用，並發展我國生技相關產業。

「即時人畜共通病原檢測平台」的建立，提供快速且相對便宜之病原鑑定分類平台，將協助臨床醫師與檢疫人員執行快速檢測，期能快速發現病原，提升防疫作為，杜絕傳染病散佈。

關鍵詞：即時偵測、宏基因組定序、奈米孔測序技術、腸病毒、腸病毒外套蛋白 VP1、生物感測器、電化學檢測、奈米薄膜電極、奈米薄膜電化學探針。

Abstract

Enterovirus is a genera of Picornaviridae family, which contains Coxsackievirus, Echovirus, Poliovirus and other EVs, about 67 species. Enterovirus related infections has been identified a one of the major pediatric infectious diseases in the Asia-Pacific region. Although most enterovirus cause mild symptoms, such as ulcerations at the hand, foot and mouth regions, herpangina, pleurodynia, rashes, and rhinitis in patients, some were found capable in infecting the central nervous system (CNS) and cause neurological diseases such as aseptic meningitis, encephalitis, meningoencephalitis, ataxia and paralysis. However, there is no suitable vaccine for other Enterovirus. Therefore, a rapid, high sensitive, species specific Enterovirus sensing platforms is highly needed and the achievement may benefit to the patients who are been infected and virus outbreak prevention.

With frequent international connection and changes in the general environment, many emerging infectious diseases or infectious diseases that have disappeared in the past have come back. How to detect these unknown sources of infection in the shortest time is the biggest challenge for the public health system. Traditional culture methods is limited by the culture time and culture conditions, and it may not be possible to quickly identify the pathogen. This project "Real-time Zoonotic Pathogen Detection Platform" is divided into two major parts: "Real-time nucleic acid sequencing platform" and "Precious metal nano-film technology platform", trying to use different strategies to establish a real-time detection platform that directly detects pathogens from samples.

"Real-time nucleic acid sequencing platform" uses the metagenomic next-generation sequencing (mNGS) method combined with nanopore sequencing devices to detect clinical samples. The newly developed nanopore sequencing technology has the advantages of long read fragments and real-time detection. With simple sample pre-processing procedures and real-time sequencing analysis, it can specifically sequence DNA or RNA to identify pathogens. However, there are still some problems needed to be overcome when using the mNGS method to process clinical specimens, such as too high proportion of host sequences, too small proportion of potential pathogenic sequences, and choice of analysis tools. Therefore, we will use four years for testing and evaluation of sample pre-processing, nanopore sequencing and data analysis, and establishing standard operating procedures.

In the first year, "Precious metal nano-film technology platform study" tested and evaluated the methods for sample

pretreatment to compare the efficiency of removal of host nucleic acid and the quality of extracted nucleic acids with some commercial kits, and to establish the standard operating procedures. In this project, the different types of VP1 DNA sequences are compared and try to find the low homology DNA region among the different types of enterovirus of VP1 gene. Then, based on results, a series of nano-thin-film (NTF) electrochemical probes made of precious metals (such as, gold, platinum ...etc.) will be developed and it is willing to develop specific DNA probes against a certain type of enterovirus. The thiolate modified DNA probes form a sulfurized bond for immobilization, and binds with the specificity of the DNA base pairing to detect the specimen. It is used electrochemical method to detect the resistance changes. By this way, it will be quickly to recognize the types of enterovirus infection.

Recently year, our research team members will analyze the difference of VP1 among most common enterovirus. The enterovirus VP1 DNA sequences analysis and there found the low homology region of VP1 gene among different types of enterovirus. And preliminarily, building-up the manufacture of palladium-thin-film electrode, then try to immobilize the DNA probe on the electrode. In 2022, by immobilization the DNA probes of enterovirus VP1 genes on the thin-film-electrode developed systematically. At the same time, the functional nano-thin-film electrodes to detect the different type of enterovirus will be developed. In 2023, we will evaluate the reproducibility and reliability of NTF electrochemical probes. We will evaluate the sensitivity and specificity of NTF electrochemical sensor. At the same time, at least 50-100 clinic samples those will be sent to CDC will be tested parallelly. In 2024, a rapid and specific NTF electrochemical sensor platform will be developed. The parameters of the platform will be fine-tuned. At the same time, these techniques will be transferred to cooperated industry partners. The achieve of this real time detection technique, may facilitate the clinic doctors and inspectors to determine the infection viruses type and reduce the pandemic outbreak. The technique of Pd NTF electrochemical sensor platform may facilitate the related industry development.

The establishment of the "Real-time Zoonotic Pathogen Detection Platform" provides a fast and relatively inexpensive pathogen identification and classification platform, which will assist clinicians and quarantine personnel to perform rapid detection, and hopefully can quickly discover pathogens, improve epidemic prevention efforts, and prevent the spread of infectious diseases.

keywords : Real-time detection, Metagenomic next-generation sequencing (mNGS), Nanopore sequencing technology, Enterovirus, VP1, biosensor, electrochemical analysis, nano-film electrochemical probe

一、前言

背景及研究介紹

隨著國際往來交流頻繁，大環境的變化使得許多新興傳染病或是過去已銷聲匿跡的傳染病捲土重來，如何在最短的時間內偵測出這些未知感染源，是公衛系統最大的挑戰，傳統病原培養方法受培養時間、培養條件限制，恐無法快速識別病原來提供訊息供防疫單位即時採取防疫作為，而目前最常被使用的分子診斷技術(Q-PCR/multiplex PCR)及 ICT 快篩試劑，只能針對特定病原進行偵測，一旦有新變異的病原出現，恐在第一時間被忽略，而錯失阻絕病原的機會，然而次世代定序技術的發展及成熟，提供了新的解決方法。

此次新冠疫情更加凸顯邊境防疫的重要性，港埠檢疫為國門防疫的第一道防線，長期欠缺即時且便捷的檢測平台，以早期偵測人畜共通傳染病原。本計畫將建立「即時核酸定序平台」及「貴金屬奈米薄膜技術平台」，開發可即時檢測人畜共通病原的工具。

(一) 即時核酸定序平台

Metagenomic next-generation sequencing (mNGS) 宏基因組次世代定序，為從臨床檢體中廣泛鑑定病原的方法。藉由專一性地識別 DNA 或 RNA 的序列可用來檢測臨床樣本中幾乎所有的潛在病原體(含病毒，細菌，真菌和寄生蟲)。此方法已經成功提供感染症的臨床診斷、群聚爆發監測及病原發現。定序技術蓬勃發展，但二代 Illumina 定序價格昂貴，且讀長太短(~300 bp)，定序時間長等缺點，限制了 mNGS 的應用性，新發展的奈米孔測序(Nanopore sequencing)技術擁有長片段、即時偵測等優勢，國際上曾使用於 Ebola 疫情爆發監測及此次新冠疫情檢測。

(二) 貴金屬奈米薄膜技術平台

腸病毒(Enterovirus)的分布遍佈全球，而目前僅發現人類是唯一宿主以及唯一感染源。經由污染的食物或經由呼吸道(飛沫、咳嗽等)傳染，因此避免腸病毒的感染，以勤洗手為最主要預防的方法。大腸病毒感染之臨床症狀以輕微發燒，也有部分產生咽喉部潰瘍或小水泡。一般說來，若控制發燒與水順的補充，三到五天即可得到緩解進而痊愈。但腸病毒會感染少部分兒童，尤其是五歲以下兒童，腸病毒感染可能會併發重症以及大流行。造成神經系統症狀，如嗜睡、嘔吐、急性肢體麻痺症候群，或行成如他腦炎、腦膜炎症狀。另一現象為心肺系統症，造成氣喘、發紺、或者嚴重造成心肺衰竭。

腸病毒 (Enterovirus) 在分類學是屬於 picornaviridae 微小核糖核酸病毒屬的成員，是由正向核糖酸 (+sRNA) 所構成的病毒體 (Viron)。其核糖核酸基因體大約為 7500 多個鹼基，可藉由感染主後利用宿主的轉錄 (transcription) 及轉譯 (transcription) 酵素系統增殖其病毒體。腸病毒體結構可分為外部殼蛋白 (capsid proteins) 以及內部核糖酸與核酸結合的蛋白質，如 Vpg (viral protein genome-linked) 蛋白，其隨後由病毒編碼的蛋白酶加工成的結構蛋白和非結構蛋白，功能與核酸複製相關。

腸道病毒相關感染已被確定為亞太地區的一種主要兒科傳染病³。儘管大多數腸病毒會引起輕度症狀，例如患者手足口潰瘍，皰疹性咽炎，胸膜炎，皮疹和鼻炎⁴，但發現其中一些病毒能夠感染中樞神經系統 (CNS) 並引起神經系統疾病，例如無菌性腦膜炎，腦炎，腦膜炎，神經失調和麻痺⁵。

在過去的 20 年中，據報導腸病毒相關的感染佔兒童無菌性腦膜炎病例的一半⁶，並在台灣，文萊，保加利亞，柬埔寨，中國，匈牙利，馬來西亞和越南⁷。在腸病毒中，埃可病毒 (E-6 / 7/9/11/13)，腸病毒 71 (EV71) 和柯薩奇病毒 (CV-A6 / 9/16, B1 / 3/5) 被確定為引起病毒的最常見原因腦膜炎和腦膜腦炎⁸⁻¹¹，而病毒性腦炎與 EV71 和柯薩奇病毒^{12,13} 有關。

目前，由於對這些病毒如何侵入中樞神經系統以及疾病進展的後果的認識有限³，因此尚無針對腸道病毒神經感染的有效治療策略。這使得在臨床樣品中快速準確地鑑定這些嗜神經性腸病毒對於早期診斷和管理感染腸病毒的患者至關重要。儘管如此，目前用於腸道病毒診斷的方法，例如基於細胞培養的病毒繁殖/分離/中和研究，聚合酶鏈反應

(PCR) 或實時 PCR (RT-PCR)，往往成本高，時間長-耗費大量精力 (通常需要 4 個小時-10 天才能獲得結果)，並且需要複雜的設備¹⁴⁻¹⁷。鑑於這些，將需要提供對嗜神經性腸病毒的快速，靈敏和選擇性檢測/鑑定的診斷方法。

在當前的研究中，我們開發一種新的基於電化學阻抗譜 (EIS) 的生物傳感平台，該平台符合上述標準，用於快速和選擇性地鑑定嗜神經性腸病毒，尤其是埃耳病毒⁹，EV71 和柯薩奇病毒。基於 EIS 的生物傳感是一種相對較新的技術，它可以在次奈摩耳濃度下快速 (1 小時以下)，靈敏，準確和可靠地檢測基於分子相互作用¹⁸⁻²¹。在過去的十年中，在檢測受體-配體相互作用^{20,22-24}，病毒殼蛋白-宿主細胞表面受體結合^{18,19,25} 和癌症生物標誌物²⁶ 中使用此類技術的情況一直在增加。

為了有效地檢測和鑑定嗜神經性腸病毒，我們提出了鑑定對所選擇的嗜神經性腸病毒的病毒衣殼蛋白具有高親和力的潛在胜肽。通過噬菌體展示技術²⁷的病毒包膜蛋白 VP1²⁸。VP1 先前已被報導為開發針對 EV71 病毒的診斷劑和疫苗的潛在靶蛋白^{29,30}。交叉免疫反應性的展現以及腸病毒和柯薩奇病毒之間 VP1 共有的抗原特性進一步表明了其潛在的標靶蛋白^{31,32}。通過噬菌體展示技術鑑定的胜肽將使用合適的表達系統進行重組表達²⁶。然後將合成的肽包被到鈀納米薄膜 (Pd-NTF) 電極上。之後，塗覆的電極將被連接到 EIS 裝置^{26,33}以形成功能齊全的快速診斷平台。

腸道病毒的 VP1 殼蛋白與固定在 Pd-NTF 電極上的重組胜肽的結合和相互作用將改變電極的電阻特性。EIS 系統可以以阻抗讀數 (Rct) 的形式記錄此類變化，並進一步解釋為評估病毒結合和效價 (通過相互作用標準曲線)。擬議的腸道病毒捕獲-EIS 檢測方法已在我們的初步研究中進行了測試，使用 EV71 抗體包被的奈米金修飾工作電極已成功檢測出低至 1 個拷貝數/ 50 μ l 反應體積的 EV71 - EIS 設置在反應時間的 11 分鐘內³⁴。

我們假設可以通過噬菌體展示技術有效選擇針對嗜神經性腸病毒的結合胜肽，並使用具有增強的理化性質的 EIS 電極 (例如 Pd) 來生成快速，靈敏和選擇性檢測嗜神經性腸病毒的功能平台-NTF 電極具有低熱膨脹係數和最佳表面粗糙度，可用於精細圖案化 (RMS \sim 0.74 nm)³³，並結合了基於捕獲蛋白-EIS 的病毒檢測系統開發方面的內部先驗知識。這樣的平台可以潛在地被翻譯以用於臨床用途，並且尤其對小兒患者帶來益處。

感染腸病毒一般無法由臨床症狀判斷是感染那一種腸病毒血清型別，需要依賴實驗室診斷才能加以確定；實驗室診斷感染腸病毒的方法主要係以腸病毒的分離、培養與鑑定及分子生物學的方式進行檢測。目前本署檢驗及疫苗研製中心實驗室、腸病毒重症認可檢驗機構及病毒性感染症合約實驗室所使用的方法包括反轉錄酵素-聚合酵素鏈鎖反應 (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)、real-time RT-PCR、腸病毒分型分生檢測 (EV71 RT-snPCR)、及病毒分離檢驗等。

病毒分離是鑑定病原體之公認標準檢驗方法，檢體來源包括咽喉拭子或咽喉洗液、糞便或肛門拭子、脊髓液或水泡內滲出液及臟器等臨床檢體。臨床檢體經前處理後，接種至合適之細胞株，以細胞培養來分離病毒。由於腸病毒的类型眾多，所以使用的細胞株亦非常廣泛，常用的細胞如 RD、HeLa、Hep-2 和初代猴腎細胞 (Vero、MK) 及 MRC5 等細胞。腸病毒會使細胞產生細胞病變，再用間接免疫螢光法 (indirect immunofluorescent assay, IFA) 或分子生物學鑑定病毒的血清型別。但病毒培養所耗費時間較長，往往須要繼

代培養後才有結果，而且並非所有腸病毒型別皆有相對應的抗體可供進行免疫螢光法檢測使用。此外不是所有腸病毒皆可以透過細胞培養方式培養出來。

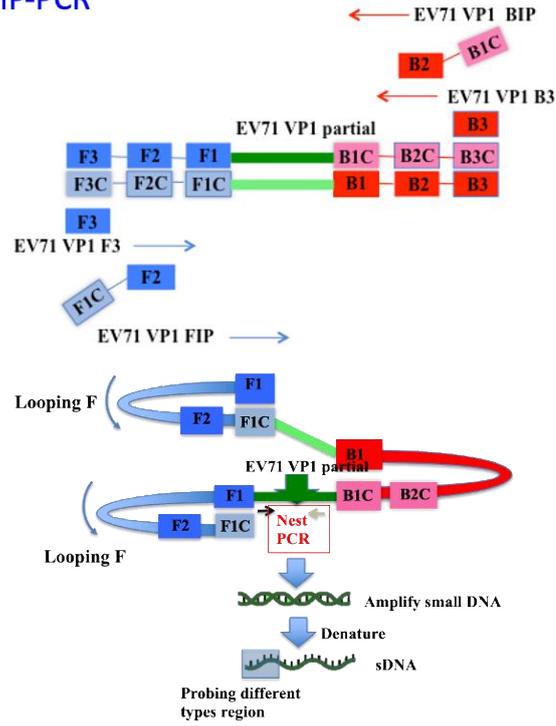
因此，開發靈敏且快速檢測腸病毒感染，不需進行細胞培養，直接從感染的檢體中，利用腸病毒與其專一抗體連並造成電化學阻抗增加之特性。發展以鈮金屬薄膜製成檢驗電極，以達成微量檢體、偵測時間短且靈敏度高、以及準確之檢驗試劑為本研究之最終目的。

研究計畫之目的

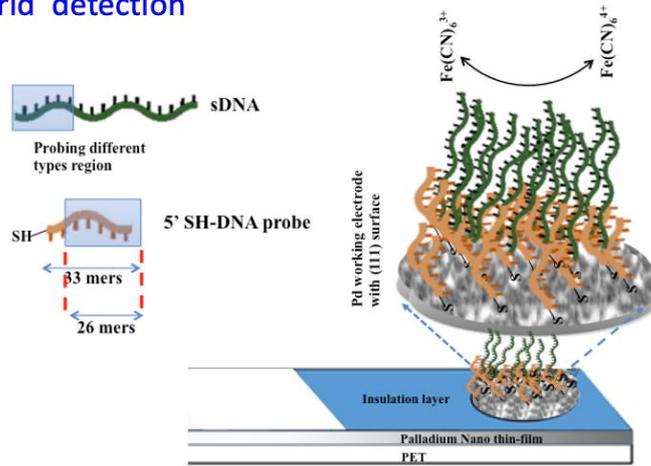
若應用於個人醫療與居家照護之篩選，其產值將有加倍以上之成長，亦對台灣未來生技產業有一定之貢獻。Pd 奈米薄膜電化學探針應用於生物感測，將以捲對捲真空濺鍍方式量產出均勻性高之可撓式奈米級金屬薄膜電極，不僅可用於生物感測，更能擴展此快速且準確度高的驗證方法，如新藥開發、癌蛋白組織抗原之標定。

此外本計畫之成果有助企業技術整合與跨領域結盟，開發新型產品並提升產品技術門檻，由低成本削價競爭策略轉變為高附加價值且對個人化醫療產業之開發極有助益。計畫之目的在研究產業工程科技，並促進計畫的研究發展成果應用於產業，增進產業科技創新與技術提升，以創造經濟利益。

(A) RT-LAMP-PCR



(B) Pd electrode based DNA hybrid detection

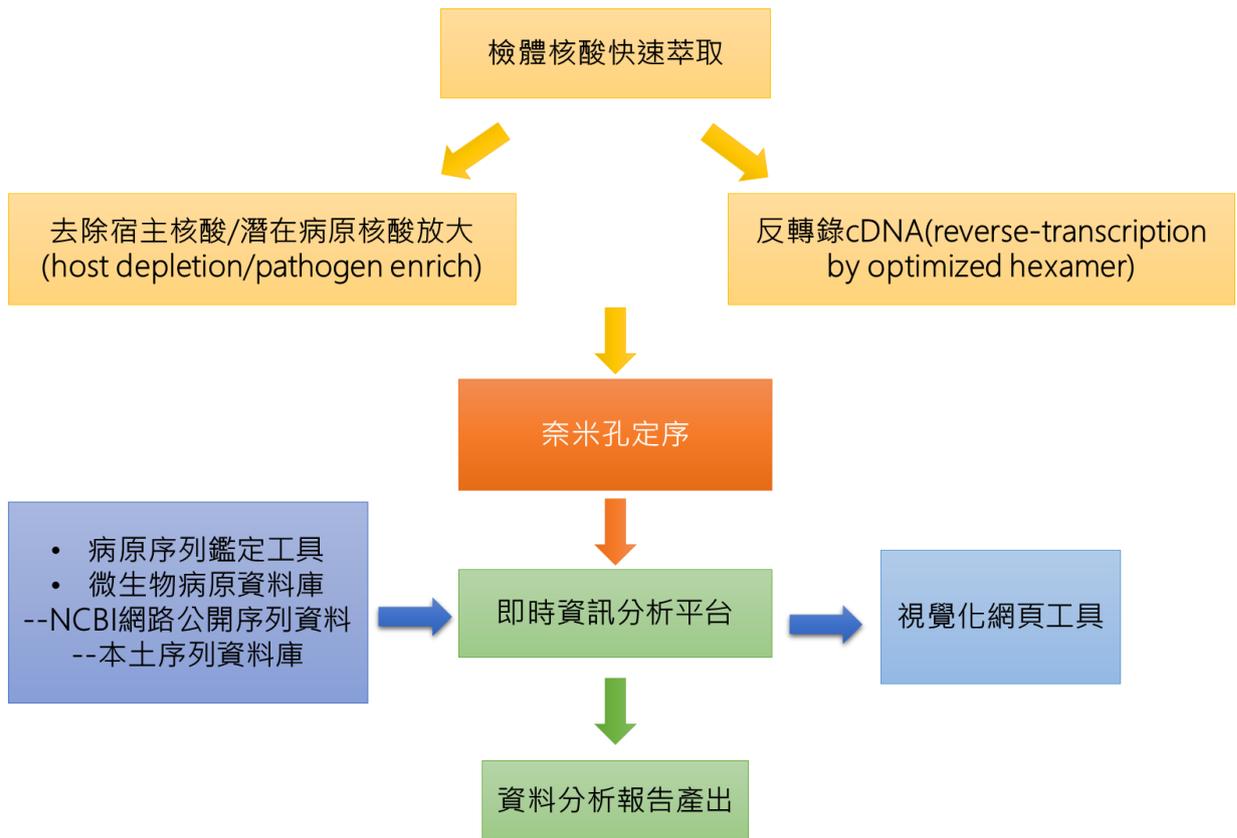


圖一：(A) RT-LAMP-PCR 方式對檢體進行腸病毒 VP1 部分基因片段進行放大。
(B)利用鈰金屬箔膜電極不圖來源檢體放大後的腸病毒 VP1 基因片段進行偵測實驗。

二、材料與方法

(一) 即時核酸定序平台

運用 mNGS (Metagenomic next-generation sequencing) 方法處理臨床檢體仍有一些問題須克服，如宿主序列占比太高、潛在病原序列所占比例太少及分析工具的選擇。因此本計畫將分四年針對樣本前處理、奈米孔定序及資料分析進行測試評估，並建立標準操作程序，相關實施流程彙整如下。



「即時核酸定序平台」實施流程

110年的工作目標為建立及評估不同樣本前處理流程並建立奈米孔定序樣本標準前處理程序

1. 整合快速核酸萃取套組系統應用於奈米孔定序樣本。
2. 利用血液中摻入細菌並分析其核糖體 16S rRNA 所占比例來評估宿主去除與否對檢出敏感性的影響。

(二) 貴金屬奈米薄膜技術平台

鈦金屬薄膜電極之建構

高靈敏度和穩定的鈦奈米晶體薄膜電極，其原理是利用分子間結合產生阻抗測改變之測量。團隊成員張家靖教授先前的研究成果，已將篩選出之腸病毒 71 型 (EV71) 結合胜肽用於鈦奈米晶體薄膜電極進行檢測。檢測 EV71 和 EV71 結合胜肽之間的相互作用，量測造成阻抗的改變。

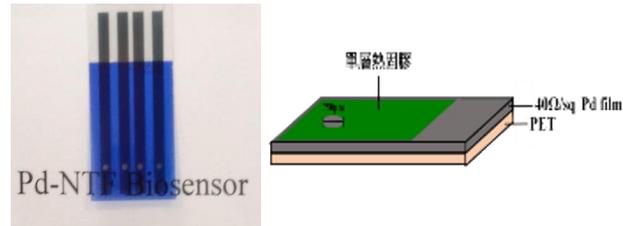
繼根除脊髓灰質炎之後，EV71 已成為腸道病毒 (EV) 中最猛烈的病毒。EV71 在發燒和皮疹發生後的兩到三天內引起神經系統並發症和/或死亡。在臨床採檢的樣品中常因病毒體濃度過低，使 EV71 的檢測難以有效偵測。並且以常規檢測 EV71 的常規方法耗時，無法有效地用於臨床診斷。此外，EV71 型和柯薩奇病毒 A16 (CA16) 在常規檢測中可能發生交叉反應。因此，需要發展一種快速，高度靈敏，且專一的偵測方法。

在我們之前的研究中，我們開發了一種抗 EV71 抗體修飾的奈米金修飾的工作電極，用於電化學阻抗頻譜法中的 EV71 檢測。然而，天然抗 EV71 抗體專一性不佳，且以 HEK-293 細胞中表達的重組抗 EV71 抗體可能具有腺病毒污染的風險。並且，許多人抗體顯示出低穩定性和聚集傾向。為了避免意外的風險並提高抗體的穩定性，利用鈦金屬薄膜可以卷對卷濺鍍的柔性基材，例如超薄玻璃和塑料。柔性基板具有低熱膨脹係數，用於顯示應用所需的特徵圖案。未經拋光的表面粗糙度 (Ra) 約為 0.1-0.2nm，並且在 550nm 處的透射率為 92%。另外，PET 可以卷曲的形式作為基板，並且可以通過卷對卷濺鍍方式進行大量生產。因此，在柔性基板上滾動沉積的金屬薄膜研究正在增加。鈦金屬薄膜電極製程之卷軸機械，與製成後成品之圖示如圖二所示。

(A)



(B)



圖二：(A)鈀金屬薄膜電極卷對卷濺鍍機械圖。(B)製成後之鈀金屬薄膜電極，圖中為四個已完成之鈀金屬薄膜電極，薄膜厚度為 10 奈米，表面電阻為 40 歐姆，並以 PET(polyethylene terephthalate)塑膠基材支撐鈀金屬薄膜 (1,1,1)晶格排列，以利生物分子連接。

阻抗頻譜之功能是用來感測系統的的表面敏感變化。通過在各種頻率上施加較小的外部偏壓，然後檢測對應電流大小來確定阻抗。因此，阻抗頻譜可用來表示物質表面，層或膜的特徵以及交換和擴散過程。它已被廣泛用於揭示腐蝕機理，橫跨膜和膜/溶液界面的電荷傳輸特性以及電極的優化。這是一種無標定的檢測方法。因此，它特別適合於檢測分子表面上的結合事件，尤其是生物分子之間的結合事件。但是，通常需要一個擴增步驟才能在非常低的分析物濃度下獲得確定的感應。但是，由於儀器的發展，檢測的靈敏度迅速提高。最近，已經證明了對 DNA，抗原或抗體和蛋白質-蛋白質相互作用的檢測。

用三電極電池進行經典的電化學測量。這些電極包括工作電極，對電極和參考電極，它們都是在其表面上均發生反應的相互作用分子。通過在工作電極上結合奈米金 (AuNP) 修飾技術，靈敏度可以提高到次飛摩爾 (sub-femto molar)或每次檢測中單分子水平。可以通過增加表面積，減少抗原與抗體相互作用之間的阻抗和空間位阻來增強 EIS 信號的奈米金顆粒可提高 EIS 的敏感性。這些方法表明表面工作電極對於 EIS 測量至關重要。即，如果工作電極對施加的電壓和電場敏感，則靈敏度將提高。因此，在這個項目中，我們的研究團隊將對電極進行改造，使其對外部偏壓盡可能敏感。為了利用電化學檢測的優勢並避免其弊端，在我們以前的研究中，開發了一種新型的鈀濺鍍奈米薄膜一次性電極。它價格便宜，並且奈米晶

體結構可以顯著提高後續使用的功能活性和穩定性。因此，我們將使用這種鈇濺鍍奈米薄膜電極通過電阻抗頻譜（EIS）檢測 EV71 及其結合生勝肽之間的相互作用

實驗材料與方法

實驗使用之蛋白質皆利用大腸桿菌表現。緩衝溶液 PBS 使用之藥品為磷酸氫鈉(Merck)、磷酸二氫鉀(Merck)和氯化鈉 (Merck)。清洗用的溶液 TBST 使用之藥品為三羥甲基氨基甲烷(Merck)、氯化鈉(Merck)、聚山梨醇酯二十(Merck)。電化學實驗使用到的藥品如下：氯化鉀(Merck KGaA, Darmstadt, Germany)、鐵氰化鉀 II (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany)、鐵氰化鉀 III (J.T.Baker, Pennsylvania, U.S.A)。清洗電解槽之清洗液使用之藥品為 Piranha Solution, 95-97% H₂SO₄(Merck KGaA, Darmstadt, Germany)和 H₂O₂(Merck KGaA, Darmstadt, Germany)。十八硫醇(Sigma-Aldrich)。

實驗藥品列表

藥品名稱		公司
Potassium Chloride	KCl	Merck
Potassium hexacyanoferrate(III)	K₃Fe(CN)₆	Sigma-aldrich
Potassium hexacyanoferrate(II)	K₄Fe(CN)₆ · 3H₂O	J.T.Baker
95-97% Sulfur acid	H₂SO₄	Merck
Hydrogen peroxide	H₂O₂	Merck
Dibasic sodium phosphate	Na₂HPO₄	Merck
Potassiumdihydrogen phosphate	KH₂PO₄	Merck
Sodium chloride	NaCl	Merck
Tris(hydroxymethyl)aminomethane	(HOCH₂)₃CNH₂	Merck
Tween 20	C₅₈H₁₁₄O₂₆	Merck
Octadecanethiol	18SH	Sigma-aldrich

金屬電極製程序

鈇金屬電極所需之材料與製成

美國化學協會標準試藥級的六氰合高鐵酸鉀（III）和六氰合高鐵酸鉀（II）購自 J. T. Baker（美國 Phillipsburg NJ 的 Mallinckrodt Baker, Inc.）。用雙蒸餾水（ddH₂O）製備 0.1M KCl 緩衝液。通過固態合成和純化。

(1)鈇奈米晶薄膜的製作

於交通大學張家靖教授的實驗室中，通過卷對卷濺射法在柔性聚對苯二甲酸乙二醇酯

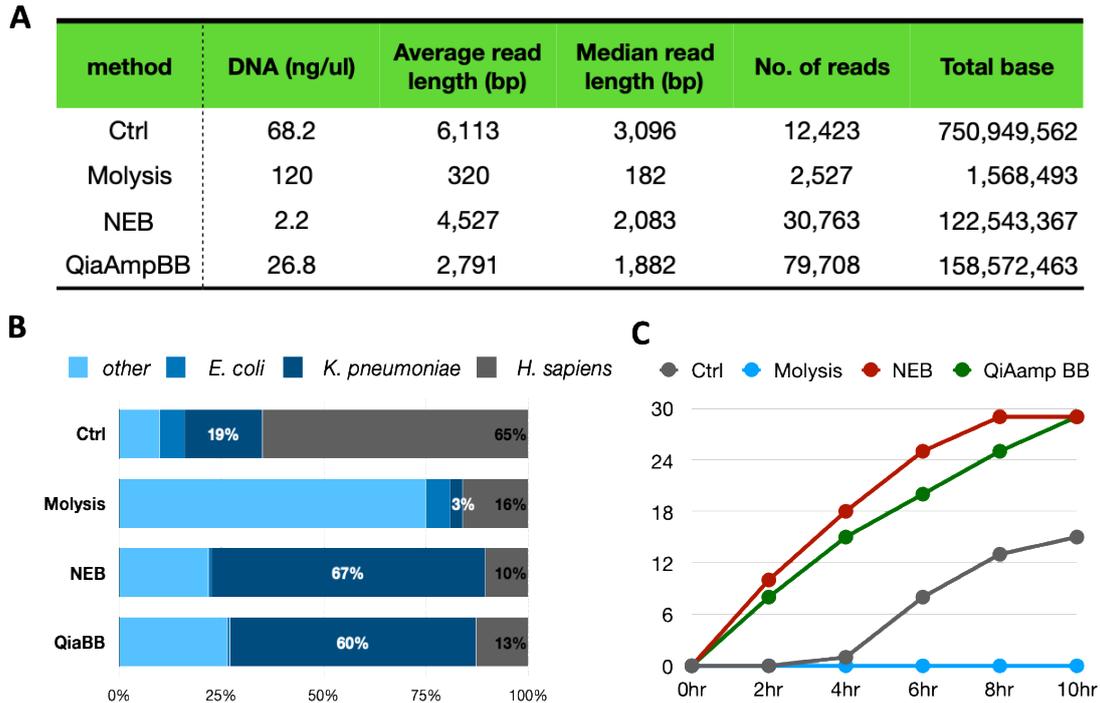
(PET) 基板上的新型奈米晶體 Pd 電極。在沉積過程中，去除保護膜後，通過卷對捲捲筒紙處理系統運輸柔性 PET，然後在溫度受控的沉積鼓上用漿狀 DC 磁控濺射源進行 Pd 沉積，然後將 PET 基底重新捲成一卷，保護膜在芯上。該系統具有將沉積鼓的溫度控制在 40 至 180°C 的能力。通過此設置，我們估計沉積過程中 PET 基材的溫度低於其相變溫度。在這個項目中，我們獲得一種低薄層電阻 $\sim 40\Omega/\square$ 且具有高比率 (1,1,1) 的塗層。在國立交通大學和國立清華大學的精密儀器中心使用 XRD 研究薄膜的晶體結構。掃描範圍是 20° 至 60°，增量為 0.05°/s。入射 X 射線束的固定小角度將為 1°。將在 15 kV 下使用場發射掃描電子顯微鏡 (FE-SEM; Hitachi SU8010) 檢查膜的表面形態和微觀結構

三、結果與討論

(一) 即時核酸定序平台

1. 整合快速核酸萃取套組系統應用於奈米孔定序樣本

能夠縮短定序運行時間是達到即時偵測的關鍵。由於宿主基因組的干擾，萃取後可能導致定序產出的數據中宿主基因組佔大部分，造成目標病原基因組數據不足，也可能產生干擾下游分析的雜訊。因此，我們首先評估目前市售的富集微生物核酸萃取套組，嘗試建立去除宿主核酸的奈米孔定序樣本前處理流程，以達到在最短時間內獲取足夠的微生物基因組數據來進行後續分析。我們在血液培養液中摻入革蘭氏陰性菌之克雷伯氏肺炎桿菌(*K. pneumoniae*)，分別以三種市售富集微生物核酸萃取套組：Molysis™ (Ultra-Deep Microbiome Prep) (Molzym GmbH & Co. KG)、NEBNext® Microbiome DNA enrichment kit (New England Biolabs)、QIAamp® BiOstic® Bacteremia DNA Kit (Qiagen)進行樣本前處理，比較經由奈米孔定序 16 小時後所產生序列的品質與數據量(圖一 A)、分析菌種序列所占比例(圖一 B)及偵測完整抗藥基因所需時間(圖一 C)。結果顯示經 Molysis 處理過後的序列平均長度最短，且無法正確鑑定出菌種及抗藥基因，顯示較為碎裂的序列對於菌種及抗藥基因的鑑定不利。NEB 與 QiaAmpBB 套組處理後的平均序列長度都比較長，經 NEB 處理過後的濃度較低，但在序列比對上有 67% 是屬於摻入的 *K. pneumoniae*，而 QiaAmpBB 方面則是有 60%，而序列數與總鹼基數量兩者則是相當。在比對抗藥基因的速度方面，NEB 及 QiaAmpBB 組別在運行的 8 小時及 10 小時所獲得的序列量可完整偵測到該菌所含的 29 種抗藥基因。



圖一、血液培養液中摻入革蘭氏陰性菌之克雷伯氏肺炎桿菌(*K. pneumoniae*)，經由三種市售的富集微生物核酸萃取套組處理，比較(A)萃取所得核酸濃度、定序後序列數目、核酸長度、及序列總鹼基數量，與(B)宿主及目標微生物之相對比例，和(C)奈米孔定序運行時間與鑑定抗藥基因數量關係圖。

2. 評估利用奈米孔定序技術定序核糖體 rRNA 對菌種的分類效能

傳統上使用 16S rRNA 鑑別菌種，我們利用細菌 DNA 標準品來了解運用奈米孔定序技術定序 rRNA 分類細菌的效能，此標準品購自 ZymoBIOMICS (cata No. D6311)，內含 10 種不同種類的細菌及酵母菌，基因數目呈現等比級數的均勻分布。16S rRNA V3-V4 組別數據為廠商所提供，為以次世代短讀長定序系統分析此產品的菌種分佈情形。其菌種分佈比例結果與原預期之等比分布狀態有著極大的差異，且大部分序列集中於核酸量最多之李斯特菌。而我們所使用之 16S rRNA 全長序列及 16S-ITS-23S rRNA 奈米孔定序，則是在菌種分佈比例上有較忠實的呈現。在 16S 全長序列組別當基因 copy 數量小於 0.015 以下時偵測不到，而 16S-ITS-23S 組別則可分辨至 0.0001 之基因 copy 數。此研究結果顯示，使用完整的 16S-ITS-23S rRNA 奈米孔定序技術，相較於使用短讀長 16S V3-V4 NGS 定序或是全片段之 16S 奈米孔定序，有更高的菌種分辨率及靈敏度 (圖二)。

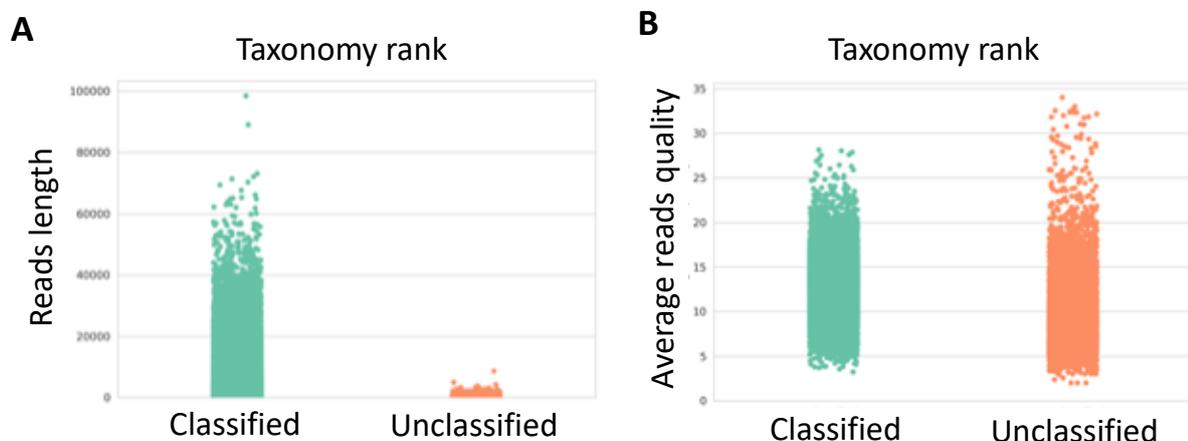
Gram	Taxonomy	Composition(%)			
		Genomic DNA	16S V3-V4	16S Full length	16S-ITS-23S
+	<i>Listeria monocytogenes</i>	89.1	95.9	86	88
-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8.9	2.8	14	11
+	<i>Bacillus subtilis</i>	0.89	1.2	0.2	0.65
Yeast	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0.89	NA	NA	NA
-	<i>Escherichia coli</i>	0.089	0.069	0.04	0.05
-	<i>Salmonella enterica</i>	0.089	0.07	0.04	0.03
+	<i>Lactobacillus fermentum</i>	0.0089	0.12	NA	0.0092
+	<i>Enterococcus faecalis</i>	0.00089	0.00067	NA	0.00061
Yeast	<i>Cryptococcus neoformans</i>	0.00089	NA	NA	NA
+	<i>Staphylococcus aureus</i>	0.000089	0.0001	NA	0.00014

圖二、分別使用短讀長 16S V3-V4 NGS 定序或是全片段之 16S rRNA 及 16S-ITS-23S rRNA 奈米孔定序，比較其內含 10 種菌種標準品之微生物組成菌種分辨率及靈敏度

3. 序列長度與品質對於菌種分類的影響

為了達到最佳的菌種分類效能，我們想知道序列長度的品質及定序深度對於細菌基因組組裝與抗藥基因偵測的影響，以決定如何改進樣本的核酸製備方法。我們利用實驗室先前已完成 Illumina 平台定序及 Nanopore 奈米孔定序之純化菌株的序列資料進行評估。

首先我們採用一株實驗室先前分離純化的 *K. pneumoniae* 菌株進行奈米孔全基因定序的資料分析，比較不同序列長度對菌種比對的影響，結果顯示可進行菌種分類的序列長度皆比無法分類組別長，其中無法分類組別的序列長度皆小於 500bp (圖三 A)，此分析結果顯示序列長度過短會限制菌種之識別分類能力。另一方面，序列的品質對於菌種分類，無論可分類或無法分類的組別其序列品質沒有顯著差異(圖三 B)。因此對於準確辨別菌種，長序列讀長較占優勢。



圖三、序列長度與品質對於菌種分類能力之比較

4. 評估定序深度對於偵測抗藥基因之影響

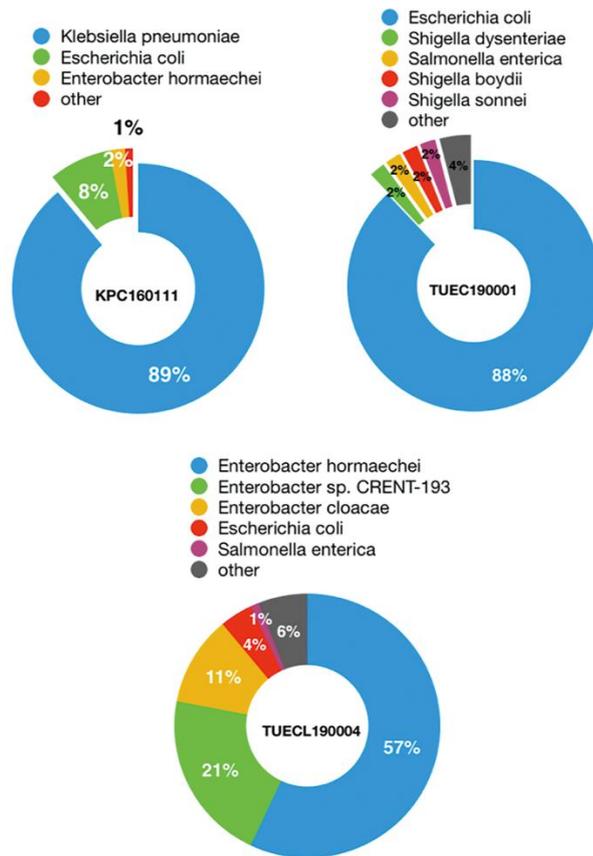
接著挑選了三株實驗室儲存的分離菌株進行評估，這三株菌株已由先前醫院資料及基因圖譜鑑定分別為 *K. pneumoniae* (KPC160111)、*E. coli* (TUEC190001)、*Enterobacter complex* (TUECL190004)。經由醫院的藥物敏感性測試結果顯示，這三株菌株皆屬於抗碳青黴素 (imipenem, meropenem 及 ertapenem)類抗生素細菌(圖四 A)且對於 ampicillin, chloramphenicol, streptomycin, tetracycline 與第二、三、四代頭孢子素抗生素(cephalosporin)皆具有抗性，可以預估其多重抗藥性可能源自於帶有較多的抗藥基因。所以我們將此三株菌株進行定序以評估定序深度對於抗藥基因偵測之影響，定序 24 小時後所獲得之序列利用生物資訊軟體工具 Centrifuge 資料庫鑑定序列之物種序列。結果顯示佔最大比例之菌種序列分別為 KPC160111：*K. pneumoniae* (89%)、TUEC190001：*E. coli*(88%)與先前臨床鑑定(MALD-TOF)結果一致。而 TUECL190004 則是以 *E. hormaechei* (57%)、sp.CRENT-193(21%)、Cloacae(11%)所形成複合序列為主(圖四 B)。確認奈米孔定序與培養結果無差異後，接著比較不同定序深度進行細菌基因體 *de novo* 組裝時對於細菌抗藥基因偵測結果的差異。我們將深度從 1 倍至 50 倍每間隔 10 倍定序深度之序列與使用 Illumina 平台所得到之序列(深度>50 倍)比較其組裝結果的抗藥基因差異。結果顯示當定序深度至少達 20 倍時，可比對到其完整的細菌抗藥基因類別(表一)。為了更進一步驗證此結果，我們選取菌株庫中更多的菌株樣本，其中包含革蘭氏陰性菌(*K. pneumoniae_1&_2*、*E. coli_1*、*S. enterica_1&_2*)及陽性菌(*S. aureus*)進行奈米孔定序所獲得之序列資料進行測試，結果顯示抗藥基因較多的菌株如 *K. pneumoniae_1*，其菌株含有 29 個抗藥基因，定序深度需要達到 20 倍時才能完整偵測其抗藥基因之類別。而菌株本身所含抗藥基因較少，如 *S. enterica_1&_2*，定序深度只要達 10 倍左右即可獲得其完整抗藥基因之資料(圖五)。

A

Antimicrobial susceptibility test results

Class and Antimicrobials	KPC160111	TUEC190001	TUECL190004
Aminoglycoside			
Amikacin	R	S	S
Gentamicin	R	S	S
Beta-lactam			
Ampicillin	R	R	R
Cefazolin	R	R	R
Cefepime	R	R	SDD
Cefotaxime	R	S	R
Ceftazidime	R	R	R
Ceftriaxone	R	R	R
Ertapenem	R	R	R
Imipenem	R	R	R
Meropenem	R	I	R
Piperacillin-Tazobactam	R	R	R
Fluoroquinolone			
Ciprofloxacin	R	R	R
Levofloxacin	R	R	R
Polymyxin			
Colistin	S	S	S
Sulfonamide			
Trimethoprim-Sulfamethoxazole	R	S	S
Tetracyclin			
Tigecycline	N	S	R
Minocine	N	S	R
Cephalosporins			
Cefmetazole	N	R	R

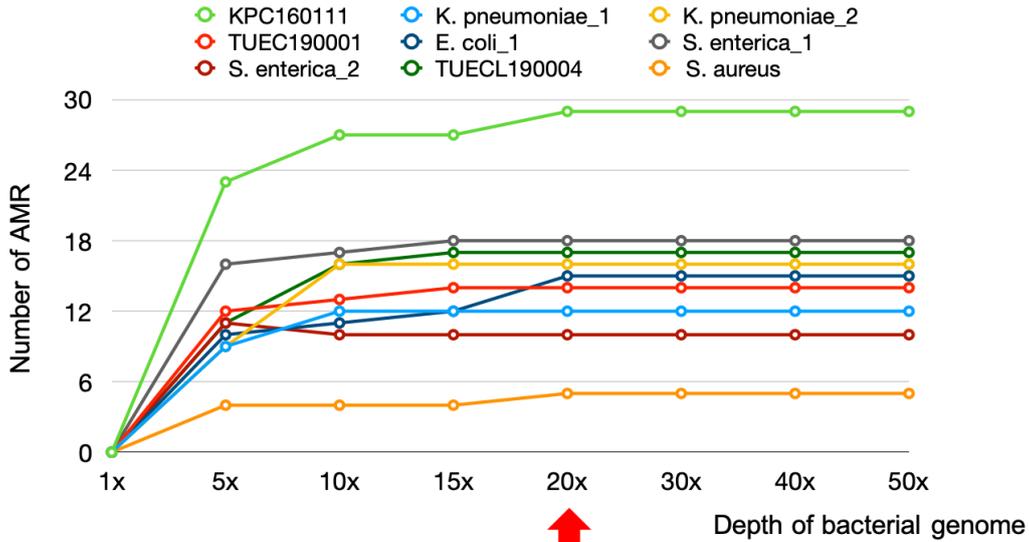
B



圖四、實驗室純化分離菌株¹鑑定結果 (A)醫院藥敏試驗結果：S (susceptible)表示細菌對抗生素敏感、I (intermediate)表示細菌對抗生素中度敏感、R (resistance)表示細菌對抗生素具抗性。(B)分析奈米孔定序後所得序列之菌相比例分佈²，環圈圖顏色分別代表不同物種。

註 1：分別為 KPC160111(*K. pneumoniae*)、TUEC190001 (*E. coli*)、TUECL190004 (*Enterobacter complex*)。

註 2：使用生物資訊軟體工具(Centrifuge)分析其菌種分佈比例。



圖五、分離純化菌株在不同定序深度之資料量所偵測到的抗藥基因數目。不同顏色線條分別代表不同菌株。橫軸：定序深度=資料量/菌株基因體大小。縱軸：抗藥基因數目。

A

	aminoglycoside	beta-lactam
KPC160111_5x	aac(3)-IId, aac(6)-Ib3, aadA17, aph(3'')-Ib, aph(3'')-Ia, aph(6)-IId	blaCMY-2, blaDHA-1, blaOXA-10, blaOXA-48, blaSHV-182, blaTEM-1B
KPC160111_10x	aac(3)-IId, aac(6)-Ib3, aadA1, aadA2, aph(3'')-Ib, aph(6)-IId, rmtB	blaCMY-2, blaCTX-M ⁸ , blaDHA-1, blaOXA-10, blaOXA-48, blaSHV-182, blaTEM-1B, blaTEM-2
KPC160111_20x	aac(3)-IId, aac(6)-Ib3, aadA1, aadA2, aph(3'')-Ib, aph(6)-IId, rmtB	blaCMY-2, blaCTX-M-14, blaCTX-M-65, blaDHA-1, blaKPC-2, blaOXA-10, blaOXA-48, blaSHV-182, blaTEM-1B, blaTEM-2
KPC160111_30x	aac(3)-IId, aac(6)-Ib3, aadA1, aadA2, aph(3'')-Ib, aph(6)-IId, rmtB	blaCMY-2, blaCTX-M-14, blaCTX-M-65, blaDHA-1, blaKPC-2, blaOXA-10, blaOXA-48, blaSHV-182, blaTEM-1B, blaTEM-2
KPC160111_40x	aac(3)-IId, aac(6)-Ib3, aadA1, aadA2, aph(3'')-Ib, aph(6)-IId, rmtB	blaCMY-2, blaCTX-M-14, blaCTX-M-65, blaDHA-1, blaKPC-2, blaOXA-10, blaOXA-48, blaSHV-182, blaTEM-1B, blaTEM-2
KPC160111_50x	aac(3)-IId, aac(6)-Ib3, aadA1, aadA2, aph(3'')-Ib, aph(6)-IId, rmtB	blaCMY-2, blaCTX-M-14, blaCTX-M-65, blaDHA-1, blaKPC-2, blaOXA-10, blaOXA-48, blaSHV-182, blaTEM-1B, blaTEM-2

B

	aminoglycoside	beta-lactam	disinfectant	macrolide	phenicol	sulphonamide	tetracycline	trimethoprim
TUEC190001_5x	aac(3)-IV, aadA1, aph(3'')-Ib, aph(4)-Ia, aph(6)-IId	blaCMY, blaTEM-1B	qacE			sul1, sul2	tet(A)	dfrA1
TUEC190001_10x	aac(3)-IV, aac(3)-IVa, aadA1, aph(3'')-Ib, aph(4)-Ia, aph(6)-IId	blaCMY-2, blaTEM-1B	qacE		floR	sul1, sul2	tet(A)	dfrA1
TUEC190001_20x	aac(3)-IV, aadA1, aph(3'')-Ib, aph(4)-Ia, aph(6)-IId	blaCMY-2, blaTEM-1B	qacE	mdf(A)	floR	sul1, sul2	tet(A)	dfrA1
TUEC190001_30x	aac(3)-IV, aadA1, aph(3'')-Ib, aph(4)-Ia, aph(6)-IId	blaCMY-2, blaTEM-1B	qacE	mdf(A)	floR	sul1, sul2	tet(A)	dfrA1
TUEC190001_40x	aac(3)-IV, aadA1, aph(3'')-Ib, aph(4)-Ia, aph(6)-IId	blaCMY-2, blaTEM-1B	qacE	mdf(A)	floR	sul1, sul2	tet(A)	dfrA1
TUEC190001_50x	aac(3)-IV, aadA1, aph(3'')-Ib, aph(4)-Ia, aph(6)-IId	blaCMY-2, blaTEM-1B	qacE	mdf(A)	floR	sul1, sul2	tet(A)	dfrA1

C

	aminoglycoside	beta-lactam	disinfectant	macrolide	sulphonamide	trimethoprim	colistin	fosfomycin	quinolone
TUECL190004_5x	aph(3'')-Ib, aph(3'')-Ia, aph(6)-IId	blaACT-16, blaOXA-48			sul1	dfrA19	mcr-9		qnrB2
TUECL190004_10x	aac(6)-Ib3, aadA2b, aadA3, aph(3'')-Ib, aph(3'')-Ia, aph(6)-IId	blaACT-16, blaOXA-48, blaSHV-12	qacE	ere(A)	sul1, sul2	dfrA19	mcr-9	fosA	aac(6)-Ib-cr, qnrB2
TUECL190004_20x	aac(6)-Ib3, aadA2b, aadA3, aph(3'')-Ib, aph(3'')-Ia, aph(6)-IId	blaACT-16, blaOXA-48, blaSHV-12	qacE	ere(A)	sul1, sul2	dfrA19	mcr-9	fosA	aac(6)-Ib-cr, qnrB2
TUECL190004_30x	aac(6)-Ib3, aadA2b, aadA3, aph(3'')-Ib, aph(3'')-Ia, aph(6)-IId	blaACT-16, blaOXA-48, blaSHV-12	qacE	ere(A)	sul1, sul2	dfrA19	mcr-9	fosA	aac(6)-Ib-cr, qnrB2
TUECL190004_40x	aac(6)-Ib3, aadA2b, aadA3, aph(3'')-Ib, aph(3'')-Ia, aph(6)-IId	blaACT-16, blaOXA-48, blaSHV-12	qacE	ere(A)	sul1, sul2	dfrA19	mcr-9	fosA	aac(6)-Ib-cr, qnrB2
TUECL190004_50x	aac(6)-Ib3, aadA2b, aadA3, aph(3'')-Ib, aph(3'')-Ia, aph(6)-IId	blaACT-16, blaOXA-48, blaSHV-12	qacE	ere(A)	sul1, sul2	dfrA19	mcr-9	fosA	aac(6)-Ib-cr, qnrB2

表一、實驗室純化分離菌株之定序深度所偵測到的抗藥基因種類差異

註：使用 Center of Genomic Epidemiology (<http://www.genomicepidemiology.org/>) 網站提供之 ResFinder 工具進行抗藥基因預測

(二) 貴金屬奈米薄膜技術平台

本署自 1999 年建立腸病毒病監測系統，每年監測到不同血清型或基因型的腸病毒流行於臺灣，如腸病毒 71 型、D68 型…等。因腸病毒的演化速率快，雖是同一血清型但卻有不同的基因亞型；在不同國家出現相同的基因亞型所造成的流行幅度不完全相同，而在臺灣腸病毒基因亞型轉變可能引起新一波流行。

以 VP1 區域核酸序列做親緣演化分析 2017~2020 年 11 月，由腸病毒重症檢驗及社區腸病毒監測所偵測之 EV-A71 顯示 2017 年主要流行的 EV-A71 基因亞型為 B5 和 C1，首次於臺灣發現 C1 基因亞型，序列比對結果顯示該亞型最接近德國 2015 年流行的病毒株序列。而基因亞型 B5 自 2008 年於臺灣出現後，便以 2~3 年為一個週期持續性地流行(如附表一)。另外，2019 年腸病毒 71 型的 B5 基因亞型之 VP1 序列演化分析與 2018 年 B5 屬於同分群，推論可能由 2018 年彰化株演化而來。

由於今年腸病毒陽性檢出率大幅下降，推測可能因今年新型冠狀病毒疫情影響民眾普遍戴口罩勤洗手。

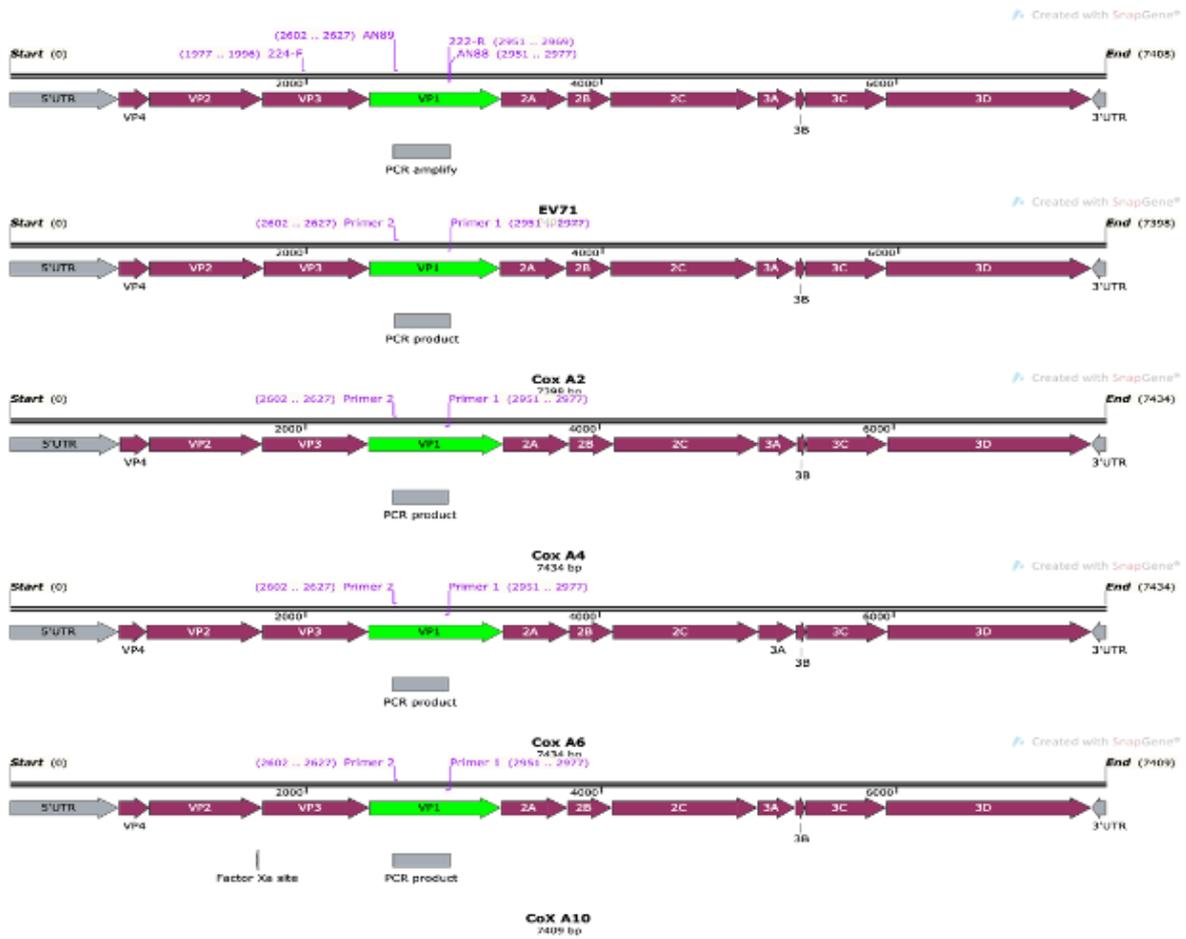
年代	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	
輕症	B4 C4	C4 B4	C4	C5	C5	B5 C4 C5	B5 C4 C5 C2	B5 C4	C4 B5	B5 C2 C4	B5 C4	B5	C4 B5	C4 C2	B5 C4	B5 C4	B5 C4a C1	B5 -	B5 -
	-	C4	C4	C5	C5	B5 C2	B5	C4	C4 B5	B5 C2 C4	B5 C4	-	-	C4	C1 C4 B5	B5 C1	B5 C1 C4a	B5 -	B5 -

表一、歷年腸病毒 EV71 基因亞型分析

1. 分析腸病毒 VP1 之差異

腸病毒在血清型的分型上，可分為腸病毒(EV71),克沙奇 A2 (Cox A2), 克沙奇 A4 (Cox A4), 克沙奇 A6 (Cox A6), 克沙奇 A10 (Cox A10), 克沙奇 A16 (Cox A16)等 6 型，均為單股 +RNA 形式之病毒。外殼蛋白質為 VP1, VP2 及 VP3 三個次單元蛋白質所組成六十面體之結構。在基因體大小的組成及排列順序，均為約 7.5Kb 之大小，各型差異並不大。惟外殼蛋白 VP1 之基因序列個型之間既有一定之差異，因此利用 VP1 序列之差異，作為分型與檢測之基礎，利用其差異的部位，可進行核酸及抗體製備之檢測。目前已完成各型基因組成與各型 VP1

基因序列組成差異之分析，並著手進行不同基因型 VP1 基因型檢測之試驗。以下為目前已完成之腸病毒各型基因的組成，以及各型間 VP1 基因序列差異之比對：



圖三. 腸病毒(EV71),克沙奇 A2 (Cox A2), 克沙奇 A4 (Cox A4), 克沙奇 A6 (Cox A6), 及克沙奇 A10 (Cox A10)等 5 型個基因之組成。VP1~VP3 腸病毒外殼蛋白之組成。

```

CoxA6 1 -----TAGC---GATGAGAACCCGATTGAAACTCGTGTGTGATGAAATAGAAATGAGTTAACGAAGCAAGTGAGAACACTTCA
CoxA8 1 -----ATGCCTCAGACGAGAACACGATTGAGACACGATGTGTCTAAATCGCAATGGGTTGTGAAACTAGTTGGACCAITCTCT
Cox 1 -----GTCCAACGCATCCGATGAAATCTGAAATGAAACTAGGTGTGTAGTCAACAAGAACATGTGTGGAGGAGCTAGCTAAACCACTTCTT
CoxA10 1 -----TCTAACGCTACAGATGAGAACACGATAAGAACGCGGTGTGTGATGAACAGAAATGAGTGTGTGGAGGCGACTAAAGTCAITCTCT
CoXA4 1 GGAGCTTCACTCCACAGCCACGGATGGGAATTCGATTGAGACTGATGTGTGTAACCTCCAATGCTACACGTGAACCCACATGAGCATTTCTT
EV71 1 -----CGTCGAATGCTAGTGATGAGAGTAAAGATTGAGACTCGTGTGTCTTAACTCACATAACACAGCTGAACCCACCCCTGATAGTCTCTT

CoxA6 79 CTCCCGTGCAGGGCTAGTAGGAGTTGTGGTGGT-----GAAAGACTCAGGCACCTAGTCAGGACGGGACACGGGTGTGGCCCATAGATGAGATGG
CoxA8 83 TTCAMGACCAAGGCCCTGGGGAGTGTCAATGT-----GCAMGATGGCCGCACT---CAGAAGGGTGTGAAGTGTGGACATAGATGCAATGG
Cox 88 CTCCCGTGTCTCATAGTGGCAAGCTGGTGC-----AAATCACACAGGGACGGCTGTCTACGGGTTCACCAATGGAAATTTGACAAATAGG
CoxA10 87 CTCACGCTCAGTTTGGTGGGTGTTTCAATCT-----AACTCAGGAGGCACCGATACAAACGGAAATGCAGTGTGGACATTTGACAAATAGG
CoXA4 96 CTCTAGGTCAAGGCCAGGAGGAGTTAGGAGG-----AGATGATACGGGTACTAGTGGCAAGGGAATCTCAAATGGGACATTTGACAAATAGG
EV71 89 CAGCAGAGCAGGCTAGTGGGGAGTAGATCTCTCTTAAAGGSCAC---CACCAATCCGAACGGGATGTCCAACTGGGACATTTGACAAATAGG

CoxA6 168 GCTTGTGTCAACAGCGGCGCAAGTTAGAGCTACTACTTACATGCGCTTGTGACCGTGAATTTACCTTGTGT-----CAATCTCAA---TGACAGC
CoxA8 169 GGTATGTTCAACTCAGGAGGAAATTTGAGATGCTCAGGTACATGAGGTTCAACGCCGAGTTACACTTCGTATC---CAACTCTGC---GGATGGC
Cox 177 GGTATGCGCAGTTGCGGAGGAAACTAGAGATGCTCAGATACATGAGGTTCAATGCTGAATTTACCTTGTGT-----CAACTCTAG---GGCTGG
CoxA10 176 GTTTGTGTCAACTGCGGCGGAAATGTGAGATGCTCAGATACATGAGATCTCAACGGTGAATTTACCTTGTGT-----TACAACAGAAATTTGGCAG
CoXA4 185 GGTATGTTCAACTGCGGCGTAAACTGAGGCACTTACATACATGCGGTTCCAGCAGAGTTTACCTTGTGT-----CAATTTGGA---GAACGGG
EV71 181 GTTATGCGCAGATGCGCAAAAGTGAAGTACTACTACTTATGCGCTTGTGACCGAAGTTTACCTTGTGT-----TGCAACCTTACC---GGAAGG

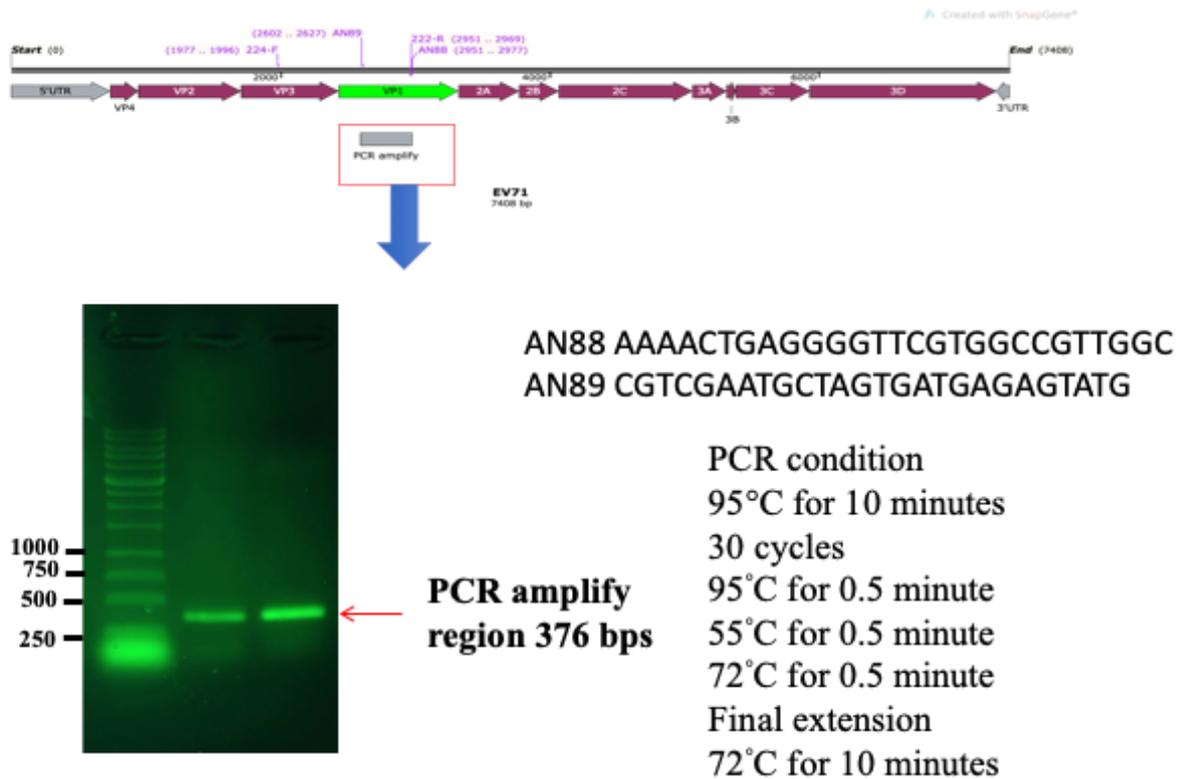
CoxA6 257 ACAACACCCGGC-ATGC ATTCAGTACATGTACGTSCCCCGGGTGGCCCAAACAGACGGTAGGAATTCATATCAATGGCAAAAGCACCA
CoxA8 258 ACAACTCCCAGA-GTGA GTTCAGTACATGTACGTSCCCCGGGTGGCCCAAACCTCAGGAGAGATTTGTTTTCAGTGGCAAAATGCAACCA
Cox 265 GCAGGTGCCGCTAGGG GCTTCAGTACATGTACGTSCCCCGGGTGGCCCAAACAGACGGTAGGAATTCATATCAATGGCAAAAGCACCA
CoxA10 268 GCAAG-GCCATTTA--- GTTACAGTATATGTATGTACCACCGGTTGCCCTAAGCCAACGGGTAGAGATGCTTTTTCAGTGGCAAAAGCACCA
CoXA4 274 CTCACGAATAATAGTG- GATTCAGTACATGTATGTACCACCGGTTGCCCTAAGCCAACGGATGCCGGGATTCATATCAATGGCAAAAGCACCA
EV71 274 TCGTTCACAGC----- GCTTCAGTACATGTATGTACCACCGGTTGCCCTAAGCCAACAGACTCCAGAGCTCTTTTGGCTGGCCAAAGCACCA

CoxA6 351 ACCCTTCATATTC-GCAAAGTTGAGT
CoxA8 352 ACCCATCAGTATTTTGCAAAAT-GAG-
Cox 360 ACCCATCAGTGTTTTGT-----
CoxA10 359 ACCCATCCGTTTTTCGTTAA-----
CoXA4 368 ACCCGTTCAG-----
EV71 364 ACCCTTCAGTTTT-----

```

The region is low homology, and it is suitable the design the small probes to distinguish different type of virus.

圖四. 腸病毒(EV71),克沙奇 A2 (Cox A2), 克沙奇 A4 (Cox A4), 克沙奇 A6 (Cox A6), 克沙奇 A10 (Cox A10), 克沙奇 A16 (CoxA16)—上圖中代號 Cox 等 6 型 VP1 基因比對之差異，而圖中紅匡之部位為各型 VP1 基因差異性最大之部分，也以此部分當作核酸檢測分型的基礎。



圖五.利用圖二中各型 VP1 基因差異性最大部位前後擴增 376 bp 部分，設計和三引子，以核酸聚合酶連鎖反應的方式，放大此 VP1 部分之基因。

2. 選殖 VP1 基因

除上述利用 VP1 基因序列差異進行偵測之外，也將進行 VP1 抗體之篩選，利用抗體抗原專一性結合之特性，對腸病毒進行鑑定。以下為腸病毒 71 型 VP1 基因之選殖：

利用美國國家衛生院基因庫分析目前感染盛行腸病毒的型別，分析不同型別腸病毒，病毒體外殼蛋白質 VP1 之差異，並針對 VP1 蛋白質差異性部位，進行收集，並利用大腸桿菌 (*Escherichia coli*) 為宿主細胞作為表現系統，表現並純化不同型別之 VP1。以下為此計畫所設計表現之 VP1 序列。

Subtype A, C4, C3, B5, B3

GDRVADVISSIGDSVSKALTPALPAPTGPDTQVSSHRLDTGKVPALQAAEIGASSNASDESMIETRCVL
NSHSTAETTLDSFFSRAGLVGEIDLPLKGTTPNGYANWDIDITGYAQMRRKVELFTYMRFDAEFTFVAC
TPTGRVVPQLLQYMFVPPGAPKPSRDSLAWPTATNPSVFKSSDPPAQVSVPFMSPASAYQWFYDGYPTF
GEHKQEKDLEYGACPNMMGTFSVRTVGSSKSEYSLVIRIYMRMKHVRAWIPRPMRNQNYLFKSNPNYA
GDSIKPTGTSRTAITTL

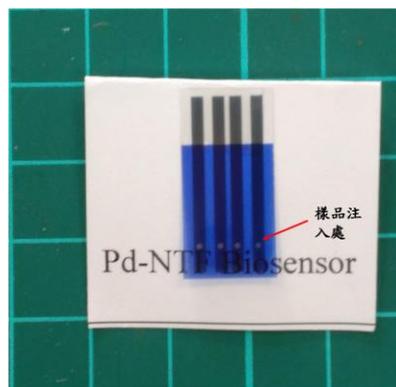
實驗篩選VP1之序列

Subtype C5, C2, C1, B4, B1, B2, B0

LDSFFSRAGLVGEIDLPLEGTTNPNGYANWDIDITGYAQMRRKVELFTYMRFDAEFTFVACTPTGEVVPQ
LLQYMFVPPGAPKPSRESLAWQTATNPSVFKLSDPPAQVSVPFMSPASAYQWFYDGYPTFGEHKQEKD
LEYGACPNMMGTFSVRTVGTSKSKYPLVIRIYMRMKHVRAWVPRPMR

3. 鈦金屬薄膜電極之製成 5'硫醇化 DNA 探針固定鈦薄膜表面

在此實驗中，本團隊已成功完成鈦金屬薄膜電及之製成，其成品大小如圖六所示，四個已完成電極為一組之鈦金屬薄膜電極，薄膜厚度為 10 奈米，表面電阻為 40 歐姆，並以 PET(polyethylene terephthalate)塑膠基材支撐鈦金屬薄膜 (1,1,1)晶格排列。電極尾端有，600 奈米直徑之開口，為樣品測試點。

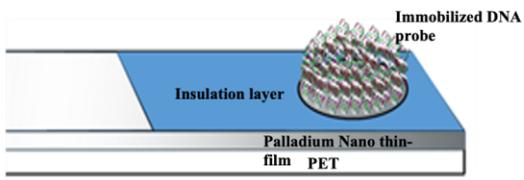


圖六：鈦金屬箔膜實際製成之圖像

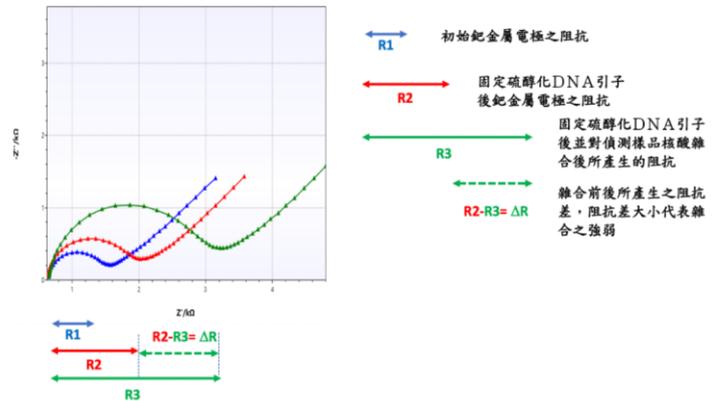
4. 5'硫醇化 DNA 探針固定鈦薄膜表面與 DNA 探針與其配對之 DNA 雜合(hybridization) 造成阻抗之變化

在本試驗中利用已 5'硫醇化 DNA 探針，以鈦金鍵結連接於鈦金屬箔膜電極，如下圖(A)所示。R1 表示初始鈦金屬電極之阻抗，R2 表示固定硫醇化 DNA 引子後鈦金屬電極之阻抗，R3 表示固定硫醇化 DNA 引子後並對偵測樣品核酸雜合後所產生的阻抗， ΔR 表示雜合前後所產生之阻抗差，阻抗差大小代表雜合之強弱。

(A)



(B)



圖七：(A) 鈹金屬箔固定硫醇化之核酸探針示意圖。(B)雜核試驗鈹金屬阻抗變化。R1 表示初始鈹金屬電極之阻抗，R2 表示固定硫醇化DNA引子後鈹金屬電極之阻抗，R3 表示固定硫醇化DNA引子後並對偵測樣品核酸雜合後所產生的阻抗， ΔR 表示雜合前後所產生之阻抗差，阻抗差大小代表雜合之強弱。

四、結論與建議

從檢體中進行樣本核酸萃取後所得目標病原的序列比例越多、宿主基因比例越少且平均讀長越長將能較為精準鑑定病原菌類別，並且若能在定序過程中越快取得至少 20 倍細菌基因體序列資訊量，將能越快偵測其完整的抗藥基因種類以提供臨床診斷。目前市售商業套組昂貴，且樣本核酸萃取後之品質無法達到奈米孔定序平台之樣本要求，產出序列的濃度及長度對於後續菌種及抗藥基因鑑定效能不佳，本計畫後續將以新開發之核酸製備過程來改善上述問題。

五、計畫重要研究成果及具體建議

雖然次世代基因定序的數據輸出量與定序效能越來越強大，能在短時間內精確地分析大量的基因序列資訊，但因為其讀長較短（通常 50~200bp），需要有參考序列或是繁雜的組裝演算（assembling algorithm）才能達到精準的結果。倘若遇到長片段的重複序列，或是全新物種的基因序列，就容易增加 NGS 定序錯誤的機率，因此第三代定序需求也就應運而生。相較於 NGS (Next-generation sequencing) 次世代定序技術每一個定序片段長度僅有 <300 bp、且需要仰賴 PCR 擴增技術放大 DNA 樣本，第三代長讀長定序技術每一個定序片段長度可長達 10 kb 至數 Mb，且樣本不需經過 PCR 擴增放大，會使得細菌基因圖譜之組裝更加容易、排序也更加準確，得到可比對資料的時間也就越短。如同拼圖一般，愈大片愈容易拼湊完成，所花費的時間也就越少。接下來的目標將採用本實驗室新開發核酸製備方法(專利申請中)以改善目前市售套組皆使用 DNAase 去除宿主基因的方法，因殘留的 DNAase 會造成序列碎裂而影響後續菌種及抗藥基因鑑定效能。未來將採用本實驗室新開發核酸製備方法搭配全自動化及高通量之流程以達成整合快速核酸萃取套組系統應用於奈米孔定序樣本之目標。

六、參考文獻：

(一) 即時核酸定序平台

1. Chiu, C. Y. & Miller, S. A. Clinical metagenomics. *Nat Rev Genet* **20**, 341-355, doi:10.1038/s41576-019-0113-7 (2019).
2. Wilson, M. R. *et al.* Clinical Metagenomic Sequencing for Diagnosis of Meningitis and Encephalitis. *N Engl J Med* **380**, 2327-2340, doi:10.1056/NEJMoa1803396 (2019).
3. Simner, P. J., Miller, S. & Carroll, K. C. Understanding the Promises and Hurdles of Metagenomic Next-Generation Sequencing as a Diagnostic Tool for Infectious Diseases. *Clin Infect Dis* **66**, 778-788, doi:10.1093/cid/cix881 (2018).
4. Wilson, M. R. *et al.* Actionable diagnosis of neuroleptospirosis by next-generation sequencing. *N Engl J Med* **370**, 2408-2417, doi:10.1056/NEJMoa1401268 (2014).
5. Gardy, J. L. & Loman, N. J. Towards a genomics-informed, real-time, global pathogen surveillance system. *Nat Rev Genet* **19**, 9-20, doi:10.1038/nrg.2017.88 (2018).
6. Gire, S. K. *et al.* Genomic surveillance elucidates Ebola virus origin and transmission during the 2014 outbreak. *Science* **345**, 1369-1372, doi:10.1126/science.1259657 (2014).
7. Chiu, C. Y. Viral pathogen discovery. *Curr Opin Microbiol* **16**, 468-478, doi:10.1016/j.mib.2013.05.001 (2013).
8. Taxt, A. M., Avershina, E., Frye, S. A., Naseer, U. & Ahmad, R. Rapid identification of pathogens, antibiotic resistance genes and plasmids in blood cultures by nanopore sequencing. *Sci Rep* **10**, 7622, doi:10.1038/s41598-020-64616-x (2020).

(二) 貴金屬奈米薄膜技術平台

1. Chiu, C. Y. & Miller, S. A. Clinical metagenomics. *Nat Rev Genet* **20**, 341-355, doi:10.1038/s41576-019-0113-7 (2019).
2. Wilson, M. R. *et al.* Clinical Metagenomic Sequencing for Diagnosis of Meningitis and Encephalitis. *N Engl J Med* **380**, 2327-2340, doi:10.1056/NEJMoa1803396 (2019).
3. Huang, H.-I. & Shih, S.-R. Neurotropic Enterovirus Infections in the Central Nervous System. *Viruses* **7**, 6051-6066, doi:10.3390/v7112920 (2015).
4. Melnick, J. in *Field's virology* (ed Knipe DM Fields BN, Howley PM, Chandlock RM, Melnick JL, Monah TP, et al.) 655-712 (Lippincott-Raven Publishers, 1996).
5. Gear, J. H. Nonpolio causes of polio-like paralytic syndromes. *Rev Infect Dis* **6** Suppl 2,

- S379-384, doi:10.1093/clinids/6.supplement_2.s379 (1984).
6. Michos, A. G. *et al.* Aseptic meningitis in children: analysis of 506 cases. *PloS one* 2, e674-e674, doi:10.1371/journal.pone.0000674 (2007).
 7. Chang, L.-Y. *et al.* Enterovirus A71 neurologic complications and long-term sequelae. *Journal of Biomedical Science* 26, 57, doi:10.1186/s12929-019-0552-7 (2019).
 8. Berlin, L. E. *et al.* Aseptic meningitis in infants < 2 years of age: diagnosis and etiology. *J Infect Dis* 168, 888-892, doi:10.1093/infdis/168.4.888 (1993).
 9. Danthanarayana, N. *et al.* Acute meningoencephalitis associated with echovirus 9 infection in Sri Lanka, 2009. *J Med Virol* 87, 2033-2039, doi:10.1002/jmv.24267 (2015).
 10. Ryu, W. S. *et al.* Clinical and etiological characteristics of enterovirus 71-related diseases during a recent 2-year period in Korea. *J Clin Microbiol* 48, 2490-2494, doi:10.1128/jcm.02369-09 (2010).
 11. Chen, B.-S., Lee, H.-C., Lee, K.-M., Gong, Y.-N. & Shih, S.-R. Enterovirus and Encephalitis. *Frontiers in Microbiology* 11, doi:10.3389/fmicb.2020.00261 (2020).
 12. Sin, J., Mangale, V., Thienphrapa, W., Gottlieb, R. A. & Feuer, R. Recent progress in understanding coxsackievirus replication, dissemination, and pathogenesis. *Virology* 484, 288-304, doi:10.1016/j.virol.2015.06.006 (2015).
 13. Wang, Y. *et al.* Enterovirus 71 infection in children with hand, foot, and mouth disease in Shanghai, China: epidemiology, clinical feature and diagnosis. *Virology journal* 12, 83-83, doi:10.1186/s12985-015-0308-2 (2015).
 14. Hematian, A. *et al.* Traditional and Modern Cell Culture in Virus Diagnosis. *Osong Public Health Res Perspect* 7, 77-82, doi:10.1016/j.phrp.2015.11.011 (2016).
 15. Jiang, B. *et al.* Diagnosis of hand, foot, and mouth disease caused by EV71 and other enteroviruses by a one-step, single tube, duplex RT-PCR. *Journal of Medical Virology* 84, 1803-1808, doi:10.1002/jmv.23391 (2012).
 16. Tan, E. L., Tak Kwong Chow, V., Quak, S. H., Yeo, W. C. A. & Poh, C. L. Development of multiplex real-time hybridization probe reverse transcriptase polymerase chain reaction for specific detection and differentiation of Enterovirus 71 and Coxsackievirus A16. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 61, 294-301, doi:<https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2008.02.009> (2008).
 17. Jung, Y.-T., Kim, G.-R. & Paik, S.-Y. Molecular biological characterization of enterovirus variant isolated from patients with aseptic meningitis. *Experimental & Molecular Medicine*

- 30, 101-107, doi:10.1038/emm.1998.15 (1998).
18. Tepeli, Y. & Ülkü, A. Electrochemical biosensors for influenza virus a detection: The potential of adaptation of these devices to POC systems. *Sensors and Actuators B: Chemical* 254, 377-384, doi:<https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.07.126> (2018).
 19. Jarocka, U. *et al.* An electrochemical immunosensor based on a 4,4'-thiobisbenzenethiol self-assembled monolayer for the detection of hemagglutinin from avian influenza virus H5N1. *Sensors and Actuators B: Chemical* 228, 25-30, doi:<https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.01.001> (2016).
 20. Rocheville, M., Martin, J., Jerman, J. & Kostenis, E. in *Progress in Molecular Biology and Translational Science* Vol. 115 (ed Terry Kenakin) 123-142 (Academic Press, 2013).
 21. Lisdat, F. & Schafer, D. The use of electrochemical impedance spectroscopy for biosensing. *Anal Bioanal Chem* 391, 1555-1567, doi:10.1007/s00216-008-1970-7 (2008).
 22. Kilic, T., Brunner, V., Audoly, L. & Carrara, S. A novel psychoanalytical approach: An electrochemical ligand-binding assay to screen antipsychotics. *Biosensors and Bioelectronics* 100, 139-147, doi:<https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.08.059> (2018).
 23. Kilic, T., Soler, M., Fahimi-Kashani, N., Altug, H. & Carrara, S. Mining the Potential of Label-Free Biosensors for In Vitro Antipsychotic Drug Screening. *Biosensors (Basel)* 8, 6, doi:10.3390/bios8010006 (2018).
 24. Lundstrom, K. Cell-impedance-based label-free technology for the identification of new drugs. *Expert Opin Drug Discov* 12, 335-343, doi:10.1080/17460441.2017.1297419 (2017).
 25. Santos, A., Bueno, P. R. & Davis, J. J. A dual marker label free electrochemical assay for Flavivirus dengue diagnosis. *Biosensors and Bioelectronics* 100, 519-525, doi:<https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.09.014> (2018).
 26. Chang, C.-Y. *et al.* Surface active flexible palladium nano-thin-film electrode development for biosensing. *Inorganic Chemistry Communications* 107, 107461, doi:<https://doi.org/10.1016/j.inoche.2019.107461> (2019).
 27. Lim, C. C., Woo, P. C. Y. & Lim, T. S. Development of a Phage Display Panning Strategy Utilizing Crude Antigens: Isolation of MERS-CoV Nucleoprotein human antibodies. *Scientific reports* 9, 6088, doi:10.1038/s41598-019-42628-6 (2019).
 28. Zhou, F. *et al.* Molecular characterization of enterovirus 71 and coxsackievirus A16 using the 5' untranslated region and VP1 region. *Journal of medical microbiology* 60, 349-358, doi:10.1099/jmm.0.025056-0 (2011).

29. Shih, S. R. *et al.* Expression of capsid [correction of caspid] protein VP1 for use as antigen for the diagnosis of enterovirus 71 infection. *J Med Virol* 61, 228-234, doi:10.1002/(sici)1096-9071(200006)61:2<228::aid-jmv9>3.0.co;2-r (2000).
30. Wu, C. N. *et al.* Protection against lethal enterovirus 71 infection in newborn mice by passive immunization with subunit VP1 vaccines and inactivated virus. *Vaccine* 20, 895-904, doi:10.1016/s0264-410x(01)00385-1 (2001).
31. Lukashev, A. N. *et al.* Recombination in circulating Human enterovirus B: independent evolution of structural and non-structural genome regions. *J Gen Virol* 86, 3281-3290, doi:10.1099/vir.0.81264-0 (2005).
32. Oberste, M. S., Peñaranda, S., Maher, K. & Pallansch, M. A. Complete genome sequences of all members of the species Human enterovirus A. *J Gen Virol* 85, 1597-1607, doi:10.1099/vir.0.79789-0 (2004).
33. Chang, C. Y. *et al.* Enhanced bioconjugation on sputtered palladium nano-thin-film electrode. *Appl Phys Lett* 114 (2019).
34. Li, H.-Y. *et al.* Rapid and highly sensitive detection of Enterovirus 71 by using nanogold-enhanced electrochemical impedance spectroscopy. *Nanotechnology* 24, 285102, doi:10.1088/0957-4484/24/28/285102 (2013).
35. Simner, P. J., Miller, S. & Carroll, K. C. Understanding the Promises and Hurdles of Metagenomic Next-Generation Sequencing as a Diagnostic Tool for Infectious Diseases. *Clin Infect Dis* 66, 778-788, doi:10.1093/cid/cix881 (2018).
36. Wilson, M. R. *et al.* Actionable diagnosis of neuroleptospirosis by next-generation sequencing. *N Engl J Med* 370, 2408-2417, doi:10.1056/NEJMoa1401268 (2014).
37. Gardy, J. L. & Loman, N. J. Towards a genomics-informed, real-time, global pathogen surveillance system. *Nat Rev Genet* 19, 9-20, doi:10.1038/nrg.2017.88 (2018).
38. Gire, S. K. *et al.* Genomic surveillance elucidates Ebola virus origin and transmission during the 2014 outbreak. *Science* 345, 1369-1372, doi:10.1126/science.1259657 (2014).
39. Chiu, C. Y. Viral pathogen discovery. *Curr Opin Microbiol* 16, 468-478, doi:10.1016/j.mib.2013.05.001 (2013).
40. Piepenburg, O., Williams, C. H., Stemple, D. L. & Armes, N. A. DNA detection using recombination proteins. *PLoS Biol* 4, e204, doi:10.1371/journal.pbio.0040204 (2006).

110 年度科技研究計畫期末執行進度審查意見回復表

計畫名稱：即時人畜共通病原可攜式檢測平台開發 MOHW110-CDC-C-315-114411

計畫主持人：楊志元博士

填報日期：110/12/7

*修正處請在報告中以紅字標示

序 號	審查意見	辦理情形說明	修正處 頁碼
1	符合進度，內容適當有實用價值，具創新及開發潛力。	<u>謝謝委員意見。</u>	無
2	有二項平台，包括(1)檢測多種細菌及其抗藥性基因，若能取得專利技轉而且可提供予定點照護檢驗 (Point of Care Testing, POCT)使用，則可推廣。(2)腸病毒分型可攜式檢測之平台，應用性則仍有討論空間。	<u>謝謝委員意見。待取得專利後將嘗試技轉給廠商，進行POCT相關試劑的後續開發。</u>	無
3	廣泛測試後具有不少應用潛力。	<u>謝謝委員意見。待取得專利後將進行更廣泛的測試。</u>	無
4	以電化學對腸病毒進行偵測。	<u>謝謝委員意見。</u>	無
5			

備註：如有修正期末報告內容，請註明頁碼，並務必於 110 年 12 月 23 日前至 GRB 系統完成資料抽換。