

計畫編號：MOHW103-CDC-C-315-000105

衛生福利部疾病管制署一百零三年度科技研究發展計畫

瘧疾等重要寄生蟲重組蛋白質基因庫建置與快速診斷試劑研發

*Establishment of recombinant protein gene bank for the development of
RDT kits*

研究報告

執行機構：疾病管制署研究檢驗中心

計畫主持人：黃志傑

協同主持人：嵇達德

研究人員：劉浩毓、江政剛

執行期間：103 年 1 月 1 日至 103 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 |
|---------------|---------|
| 封面 | |
| 目錄 | (2) |
| 摘要 | (3) |
| 前言 | (5) |
| 材料與方法 | (7) |
| 結果 | (9) |
| 討論 | (12) |
| 結論與建議 | (13) |
| 計畫重要研究成果及具體建議 | (14) |
| 參考文獻 | (15) |
| 圖表 | (16) |
| | 共 (24)頁 |

中文摘要

許多寄生蟲病如瘧疾等至今仍是非常嚴重的疾病，全球每年約有十億人口感染瘧疾，而死於瘧疾人數逾一百萬人。然而，這些寄生蟲病盛行的國家也常是衛生環境與醫療檢驗資源較為缺乏的地區，使用快速診斷試劑可對瘧疾等疾病進行篩檢與監控，可有效掌握病患加以治療，降低民眾因罹患疾病所造成的傷害。因此，本計劃目的為收集瘧疾等重要寄生蟲的檢體，建置相關重組蛋白質基因庫以研發相關快速診斷試劑，提供國內生技產業試劑研發與評估之使用，提升我國生技產業之能量與國際競爭性。

關鍵詞：快速診斷試劑、瘧疾、寄生蟲病、重組蛋白質基因庫

Abstract

Many parasitic diseases such as malaria are still a very important disease. There are one billion people are infected by malaria and about one million people die worldwide. However, those endemic countries are often the areas which also lack the resources of health environment and medical treatment. The rapid diagnostic test (RDT) kits can be used for the screening and diagnosis of those parasitic diseases in order to have better response to the treatment of the patients and to reduce morbidity rate. Therefore, the aim of the study is to collect important parasite samples and to establish recombinant protein gene bank for the development of RDT kits.

Keyword: Rapid diagnostic test kit, Malaria, parasitic disease, recombinant protein gene bank

前言

瘧疾 (Malaria) 為世界上最重要的傳染病之一，1993 年 WHO 報告指出，全球 40% 人口身處疫區，全球每年約有十億人口感染瘧疾，每年死於瘧疾人數逾二百萬人，所耗社會資源難以算計 [1]。引起人類罹患瘧疾的瘧原蟲有四種：間日瘧原蟲 (*Plasmodium vivax*)、三日瘧原蟲 (*P. malariae*)、惡性瘧原蟲 (*P. falciparum*)、卵形瘧原蟲 (*P. ovale*)，其中以惡性瘧原蟲引起的疾病最嚴重，混合感染亦常見。瘧疾是聯合國世界衛生組織 (World Health Organization, WHO) 及其他相關組織長期致力推動防治的公衛醫療議題，在瘧疾盛行區域有效運用快速診斷試劑對瘧疾進行篩檢與監控，可以有效掌握病患加以治療，以協助當地民眾降低因罹患瘧疾所造成的死亡率與傷害 [2]。雖然，目前國際間已有許多瘧疾快速診斷試劑上市，但由於蟲株種類及地理環境的差異，真正取得 In vitro diagnosis 認證的試劑卻很少，並普遍存有高偽陽性與偽陰性的問題，需要加以改進，才可有效協助瘧疾的防治工作。我國近年來大力推展生物技術產業，許多生技公司在快速診斷試劑的製作技術已有良好的基礎，並希望進一步應用於瘧疾快速診斷試劑的研發。然而，試劑的研發需要有足量且具有蟲株種類及地理環境的差異檢體來加以評估，未來才有可能取得認證得以上市。

阿米巴痢疾 (Amebiasis)全球約有五至六千萬人感染，其中有十萬人死亡 [3]。隱孢子蟲症 (Cryptosporidiosis)是一種重要的食媒性疾病，可引起嚴重的腹瀉疾病，在美國腹瀉疾病中佔了 8% [4]。弓形蟲 (Toxoplasma gondii)與肺囊蟲 (Pneumocystis jirovecii)感染常會引起肺炎，是免疫不全病患最重要及最嚴重的伺機性傳染病之一 [5-8]，不加治療可造成死亡。這些都是重要的寄生蟲，但同樣存在蟲株種類及地理環境的差異，現有的快速診斷試劑也普遍存有高偽陽性與偽陰性的問題，有著許多改進的空間，也是我國生技產業可以切入的地方。因此，同樣需要足量且具有蟲株種類及地理環境的差異檢體來發展。疾病管制署為寄生蟲傳染病的主管機關，瘧疾、阿米巴痢疾、弓形蟲等疾病檢體會送來做確認，因此會有較多檢體且蟲株種類及地理環境的差異較大的檢體。若在適當的規則下，這些檢體將可協助我國發展生技產業，開發瘧疾等各種重要寄生蟲快速診斷試劑。然而，由於寄生蟲多無法進行體外純培養以取得大量的病原體進行後續的試劑開發與評估。因此，本計劃目的為收集瘧疾等重要寄生蟲的檢體，建置相關重組蛋白質基因庫以研發相關快速診斷試劑，提供國內生技產業試劑研發與評估之使用，提升我國生技產業之能量與國際競爭性。

材料與方法

檢體來源

收集近一年台灣間日瘧與惡性瘧感染病患檢體，進行瘧原蟲乳酸脫氫酶 (pLDH)和組氨酸富含蛋白 (pHRP2)的基因選殖、表達重組蛋白質和進行序列和重組蛋白氨基序列差異的分析比較，確認研究方法，並開始建立基因材料庫。

檢體核酸萃取

本研究是使用 QIAamp® DNA blood mini kit (QIAGEN)進行核酸萃取。步驟如下：從含有 5.4 mg K2EDTA/tube 的採血管中，取 200 μ L 檢體，置於 1.5 mL 離心管，並加入 20 μ L Protease。加入 200 μ L Buffer AL，震盪 15 sec，置於 56 °C，10 min。再加入 200 μ L 酒精，震盪 15 sec，吸取全部置入萃取濾管中。以 8,000 rpm 離心 1 min。加 500 μ L Buffer AW1，以 8,000 rpm 離心 1 min，換新收集管。加 500 μ L Buffer AW2，以 14,000 rpm 離心 3 min，換新收集管。以 14,000 rpm 離心 1 min，將收集管換為 1.5 mL 離心管。加 200 μ L Buffer AE，靜置 1 min。以 8,000 rpm 離心 1 min。置於 4 °C 冰箱冷藏保存。

乳酸脫氫酶 (pLDH)與組氨酸富含蛋白 (pHRP2)引子設計

pLDH 和 pHRP2 引子設計：採 PCR 擴增技術，建立基因材料庫。收集 GenBank 中已知的 pLDH & pHRP2 基因序列，進行序列比對，根據 common region 分別設計間日瘧及惡性瘧特異性引子 (表一)。

PCR 產物之選殖及定序

分析核酸序列時，利用 TAKARA SapphireAmp® Fast PCR Master Mix 進行 PCR 反應：5 µl template DNA, Forward 與 Reverse primer 各 2 µl、25 µl Pre-mixture 與 16 µl H₂O，最終體積為 50 µl。94°C 加熱 5 分鐘後，進行 35 個循環，每個循環為 denature 94°C，30 秒；annealing *P. vivax* 為 50°C、*P. falciparum* 為 52°C，30 秒以及 extension 72°C，30 秒。之後進行 72°C，10 分鐘密合。

為提高標的物之 PCR 產物純度，我們利用瓊脂膠體電泳 (Agarose Gel Electrophoresis)與 QIAquick® Gel Extraction Kit (QIAGEN)進行純化。之後利用 T&A® cloning vector Kit (Yeastern biotech)來篩選正確 PCR 產物，並將產物基因序列與 GeneBank 資料庫進行比對。

結果

本研究之主要目標可分為以下四部分：一、選擇適合快速診斷之寄生蟲標的，並完成抗原性評估等生物資訊分析。二、完成引子設計與進行基因轉殖，建立重組蛋白質基因庫。三、建立重組蛋白質生產系統，評估相關生產及效價測試方法。四、轉移生技產業應用之評估。第一與第二部分之結果由本實驗室提供，而第三與第四部份則是由本計畫之合作夥伴：聯華生技股份有限公司進行。

瘧疾快速診斷試劑標的

1. 瘧原蟲乳酸脫氫酶 (*Plasmodium lactate dehydrogenase*, pLDH)

瘧原蟲乳酸脫氫酶僅由活的蟲體產生，於是血液中瘧原蟲乳酸脫氫酶 (pLDH)的濃度含量與體內瘧原蟲呈正相相關。可更進一步用於評估用藥治療成效，目前已逐漸取代原先惡性瘧原蟲組氨酸富含蛋白成為瘧疾抗原快速診斷試劑監測指標蛋白質。

2. 惡性瘧原蟲組氨酸富含蛋白 (*P. falciparum histidine-rich protein 2*, pHRP2)

組氨酸富含蛋白 (pHRP2)是惡性瘧原蟲感染紅血球後釋放至血液

中的一種水溶性細胞外糖蛋白。因此，藉由檢測血液中惡性瘧組氨酸富含蛋白 (Pf pHRP2) 抗原可知悉是否遭受惡性瘧原蟲感染。

根據以上所選擇的兩項標的，我們分別隨機選取臨床已檢驗之不同型別 (惡性瘧原蟲與間日瘧原蟲) 之陽性檢體各兩例，以 PCR 擴增技術放大標的片段，得到目標大小之 DNA 產物 (圖一)。並於瓊脂膠體電泳純化後，將 PCR 產物插入選殖載體 (T&A® cloning vector, Yeastern biotech) 進行基因選殖 (圖二)，以定序確認目標序列是否正確，選出正確的 clones，且同時凍存菌種，儲存並建檔基因資料庫 (表二)。

惡性瘧與間日瘧原蟲之 pLDH 核酸及胺基酸序列差異性比對

為了比較惡性瘧與間日瘧的 pLDH 基因是否有區域性差異，我們分別選擇源自中國與印度的惡性瘧對照組 strain：FCC/HN 與 Jind；而間日瘧我們則是比較源自印度的對照組 strain：Ori-4 與 Krt-2。

根據比對結果我們發現，惡性瘧在不同蟲株間的乳酸脫氫酶基因變異性不大，僅有少數幾個核酸的差異 (圖三)；而在胺基酸序列上亦無顯著差異 (圖四)。另一方面，我們也發現間日瘧不同蟲株間在乳酸脫氫酶基因可能會有不同的變異 (圖五)；且一些核酸的差異也使得胺基酸序列有所改變 (圖六)。

惡性瘧與間日瘧原蟲之 pLDH 蛋白質表達

我們將選殖完成的質體 (Plasmid) 萃取純化後，交由合作夥伴 (聯華生技股份有限公司) 進行蛋白質表現。他們先將惡性瘧與間日瘧原蟲 LDH 基因片段以限制酶切出，接入蛋白質表現載體進行 his tag fusion，並再次定序確認序列。而後以 IPTG 誘導含惡性瘧與間日瘧原蟲 LDH clones 的 *E. coli* 大量表現 LDH-his tag 重組蛋白，並可經親合性管柱純化重組蛋白 (圖七)。

討論

我們發現，惡性瘧與間日瘧在乳酸脫氫酶基因的變異性上有所不同，惡性瘧較無顯著的變化，而間日瘧則有較多的胺基酸變異。但由於分析的檢體數量僅各 10 件，因此仍不能有所定論；且胺基酸序列的變異是否會影響其抗原的呈現，這也需要進一步研究其蛋白質結構才能得知。

由於本計畫屬於和生技公司合作的前導型計畫，由實驗室提供材料與技術，而生技公司方面則是負責規畫生產與市場調查和評估。但由於台灣在瘧疾檢驗的數量不多，勢必要開拓海外市場，而醫材輸出規範繁瑣等等原因，使得生技公司於董事會時決議終止合作。因此，在試劑開發方面也於今年八月後終止研究，並將已完成之基因庫建檔凍存。

結論與建議

根據本次合作經驗，若要與業界合作，則需要多方考慮市場風向、潛在客群以及成本效益等等商業因素，才有辦法達成協議。而由理論科學輸出至工業應用，仍需長時間的磨合與研發，且需要大量人力及物力才能完成，並非一蹴可幾。若要快速發展有效的產品，則可參考近期由新加坡與麻省理工學院所組成的 SMART (Singapore-MIT Alliance for Research & Technology) 團隊，組織大型跨領域團隊，不僅能有不錯的科學研究發表，亦能立刻有產品應用產出 [9-10]。

計畫重要研究成果及具體建議

1.計畫之新發現或新發明

- 惡性瘧與間日瘧在乳酸脫氫酶基因的變異性上有所不同，惡性瘧較無顯著的變化，而間日瘧則有較多的胺基酸變異。

2.計畫對民眾具教育宣導之成果



3.計畫對醫藥衛生政策之具體建議

- 免疫學檢測法可能難以應變區域性蟲株變異。

重要參考文獻

1. Bridges DJ, Winters AM, Hamer DH. Malaria elimination: surveillance and response. *Pathog Glob Health*. 2012. 106(4):224-31.
2. Malaria Rapid diagnostic tests. WHO. <http://www.wpro.who.int/malaria/sites/rdt/>
3. Stanley SL, Jr. Amoebiasis. *Lancet*. 2003. 361(9362):1025-1034.
4. MULTICRITERIA-BASED RANKING FOR RISK MANAGEMENT OF FOODBORNE PARASITES. REPORT OF A JOINT FAO/WHO EXPERT MEETING, 3-7SEPTEMBER, 2012, FAO HEADQUARTERS, ROME, ITALY
5. Hill DE, Chirukandoth S, Dubey JP (2005) Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. *Anim Health Res Rev* 6: 41–61.
6. Montoya JG, Liesenfeld O (2004) Toxoplasmosis. *Lancet* 363: 1965–1976.
7. Stringer JR, Beard CB, Miller RF, Wakefield AE. A new name (*Pneumocystis jirovecii*) for *Pneumocystis* from humans. *Emerg Infect Dis*. 2002;8:891–6.
8. Calderón-Sandubete EJ, Varela-Aguilar JM, Medrano-Ortega FJ, Nieto-Guerrero V, Respaldiza-Salas N, de la Horra-Padilla C, et al. Historical perspective on *Pneumocystis carinii* infection. *Protist*. 2002;153:303–10.
9. Peng WK, Kong TF, Ng CS, Chen L, Huang Y, Bhagat AA, Nguyen NT, Preiser PR, Han J. Micromagnetic resonance relaxometry for rapid label-free malaria diagnosis. *Nat Med*. 2014 Sep;20(9):1069-73.
10. Singapore-MIT Alliance for Research and Technology. <http://smart.mit.edu/home.html>

表一、乳酸脫氫酶 (pLDH)與組氨酸富含蛋白 (pHRP2)引子

Primers Design for Malaria Ag

| Gene | Forward Primer | Reverse Primer | bp |
|----------------------------|-------------------------|-------------------------|--------|
| <i>P. vivax</i> pLDH | atgacgccgaaacccaaaat | aatgagcgccttcaccttt | 948 bp |
| <i>P. falciparum</i> pLDH | atggcaccaaaagcaaaaatcgt | agctaatgccttcattctcttag | 948 bp |
| <i>P. falciparum</i> HRP 2 | atggtttccttctcaaaaaataa | atggcgtaggcaatgtgtg | 927 bp |

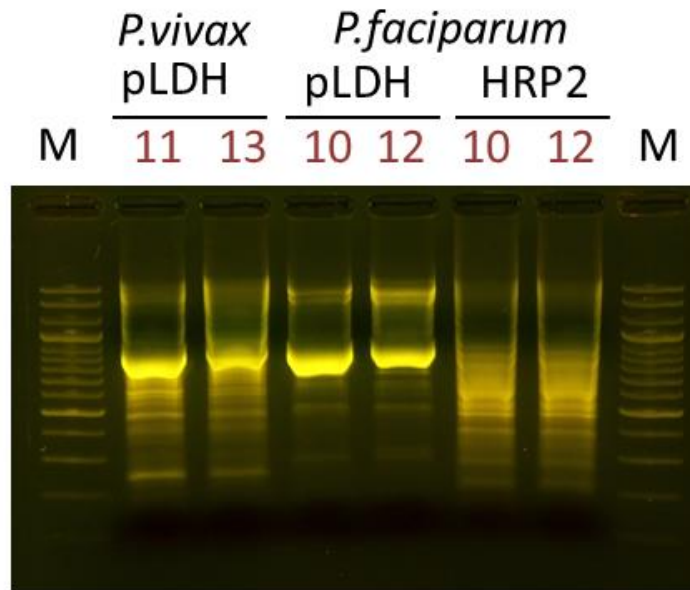
間日瘧原蟲 (*Plasmodium vivax*) 與惡性瘧原蟲 (*P. falciparum*) 標的瘧原蟲乳酸脫氫酶設計之引子；針對惡性瘧原蟲組氨酸富含蛋白設計之引子。

表二、間日瘧原蟲 (*Plasmodium vivax*) 與惡性瘧原蟲 (*P. falciparum*) 之乳酸脫氫酶 (pLDH) 基因庫

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| pTA-Pv-LDH -CN10211 DH5 α Amp. | pTA-Pv-LDH -CN10213 DH5 α Amp. | pTA-Pv-LDH -CN10203 DH5 α Amp. | pTA-Pv-LDH -CN10204 DH5 α Amp. | pTA-Pv-LDH -CN10106 DH5 α Amp. | pTA-Pv-LDH -CN10102 DH5 α Amp. | pTA-Pv-LDH -CN10108 DH5 α Amp. | pTA-Pv-LDH -CN10101 DH5 α Amp. |
| pTA-Pv-LDH -CN10104 DH5 α Amp. | pTA-Pv-LDH -CN10112 DH5 α Amp. | | | | | | |
| pTA-Pf-LDH -CN10210 DH5 α Amp. | pTA-Pf-LDH -CN10212 DH5 α Amp. | pTA-Pf-LDH -CN10201 DH5 α Amp. | pTA-Pf-LDH -CN10202 DH5 α Amp. | pTA-Pf-LDH -CN10206 DH5 α Amp. | pTA-Pf-LDH -CN10207 DH5 α Amp. | pTA-Pf-LDH -CN10103 DH5 α Amp. | pTA-Pf-LDH -CN10109 DH5 α Amp. |
| pTA-Pf-LDH -CN10110 DH5 α Amp. | pTA-Pf-LDH -CN10111 DH5 α Amp. | | | | | | |

篩選基因定序正確之克隆 (clones)，並凍存菌種於 -80°C 冰箱；妥善紀錄儲存位置與定序結果，以利將來蛋白質表達應用。

圖一、PCR 擴增技術放大標的片段



隨機挑選臨床檢體 11 與 13 號為間日瘧原蟲陽性檢體；臨床檢體 10 與 12 號為惡性瘧原蟲。分別針對瘧原蟲乳酸脫氫酶 (land 1-4) 與惡性瘧原蟲組氨酸富含蛋白 (land 5-6)進行 PCR 擴增技術放大。M 為 marker。

圖二、選殖載體

1. Vector map of T&A™ Cloning Vector

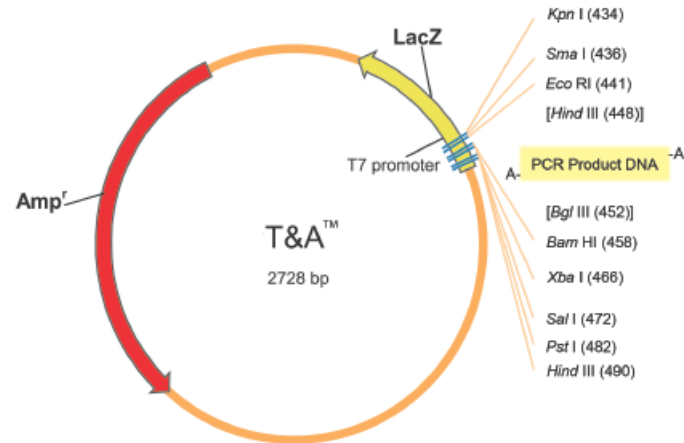
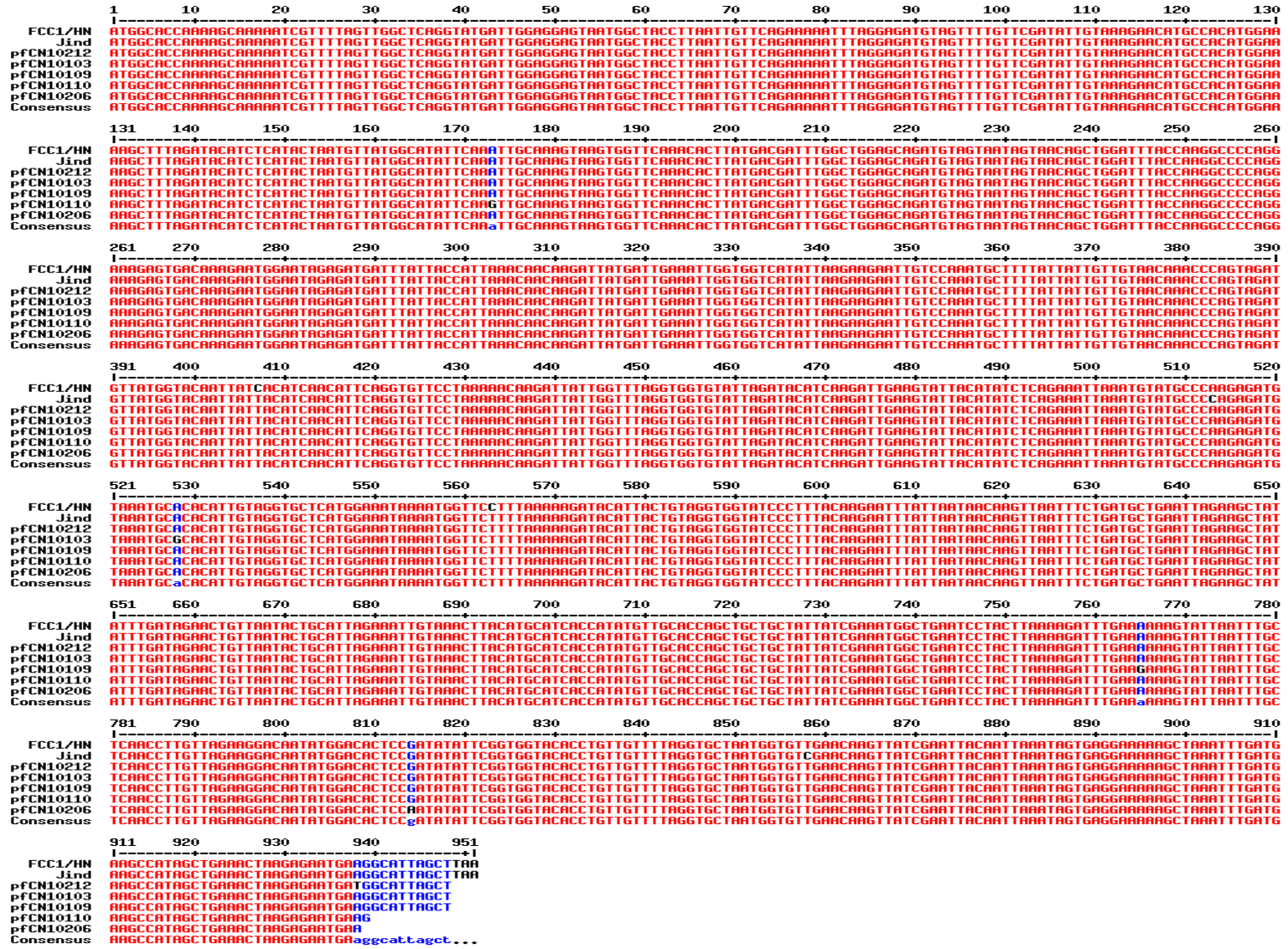


Figure1. Map and sequence reference points of T&A™ Cloning Vector

* Before the insert is incorporated into T&A™ Cloning Vector, there is only one *Hind*III site and no *Bgl*II site present in the multiple cloning region. After the incorporation, the 3'-A overhangs at both end of the insert will complement with the 3' overhanging T at the terminals of the vector and generate one additional *Hind*III site and one new *Bgl*II site. This merit of T&A™ vector makes cloning more economical and convenient.

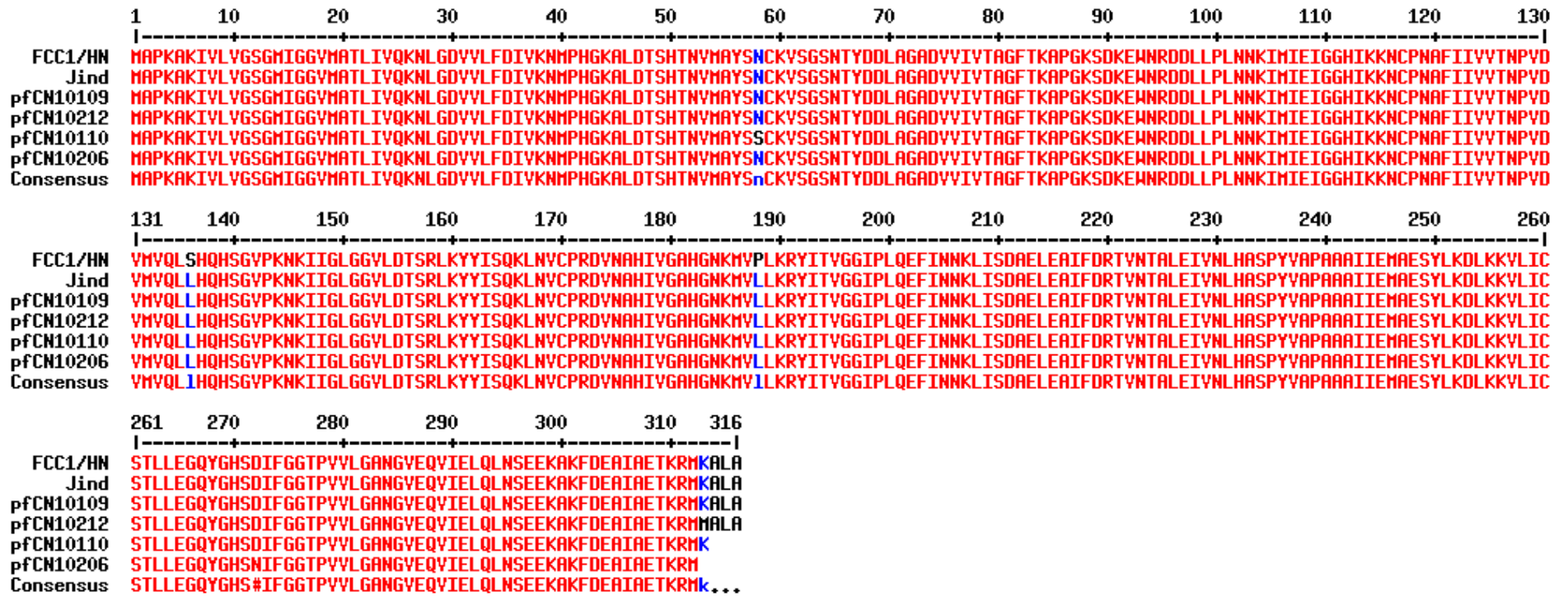
選用之載體 (T&A® cloning vector, Yeastern biotech)進行藍白篩基因選殖。

圖三、惡性瘧原蟲 pLDH 基因序列差異比對



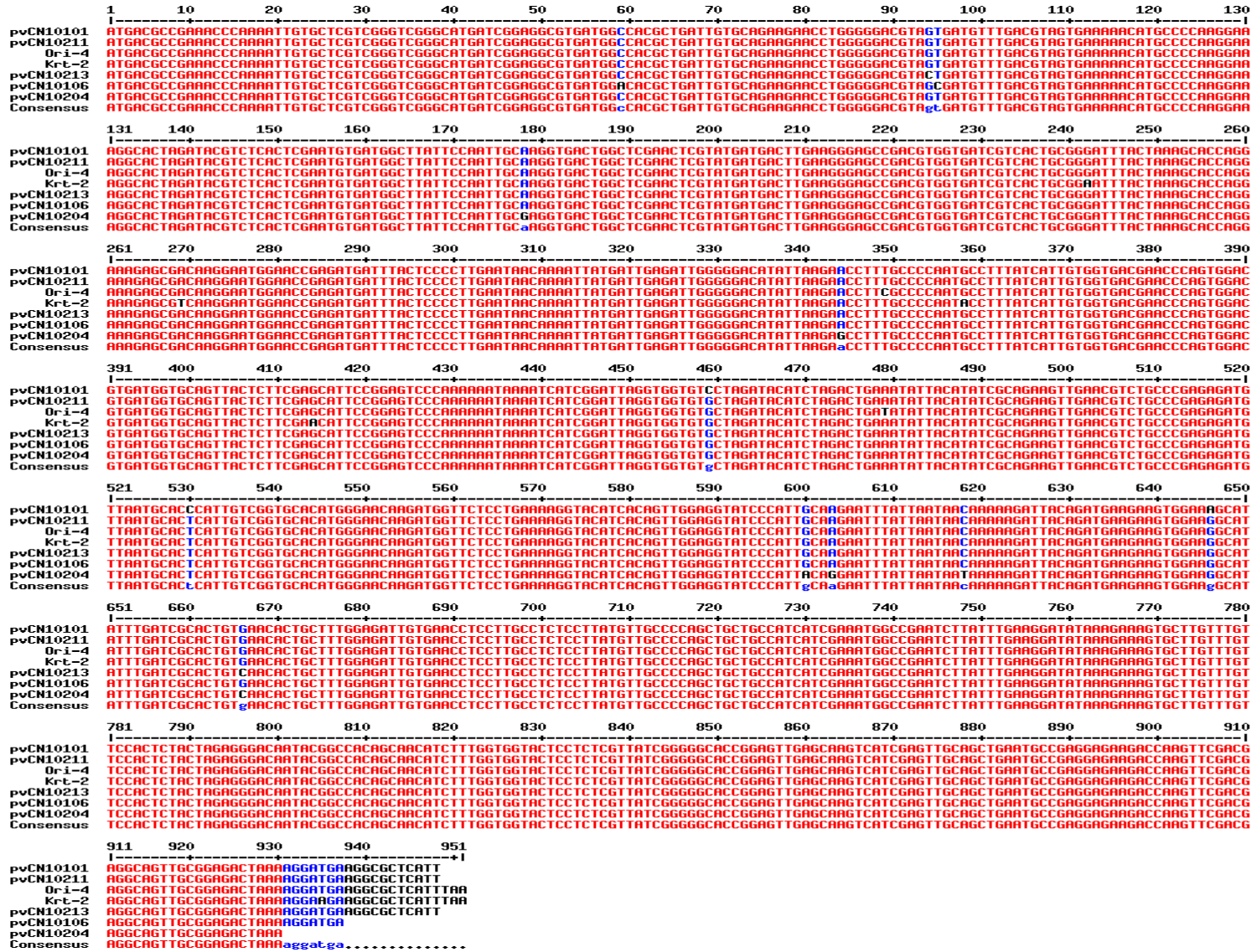
FCC/HN 與 Jind 分別為源自中國和印度的不同蟲株對照組。各蟲株間僅有少數核酸有所差異。

圖四、惡性瘧原蟲 pLDH 胺基酸序列差異比對



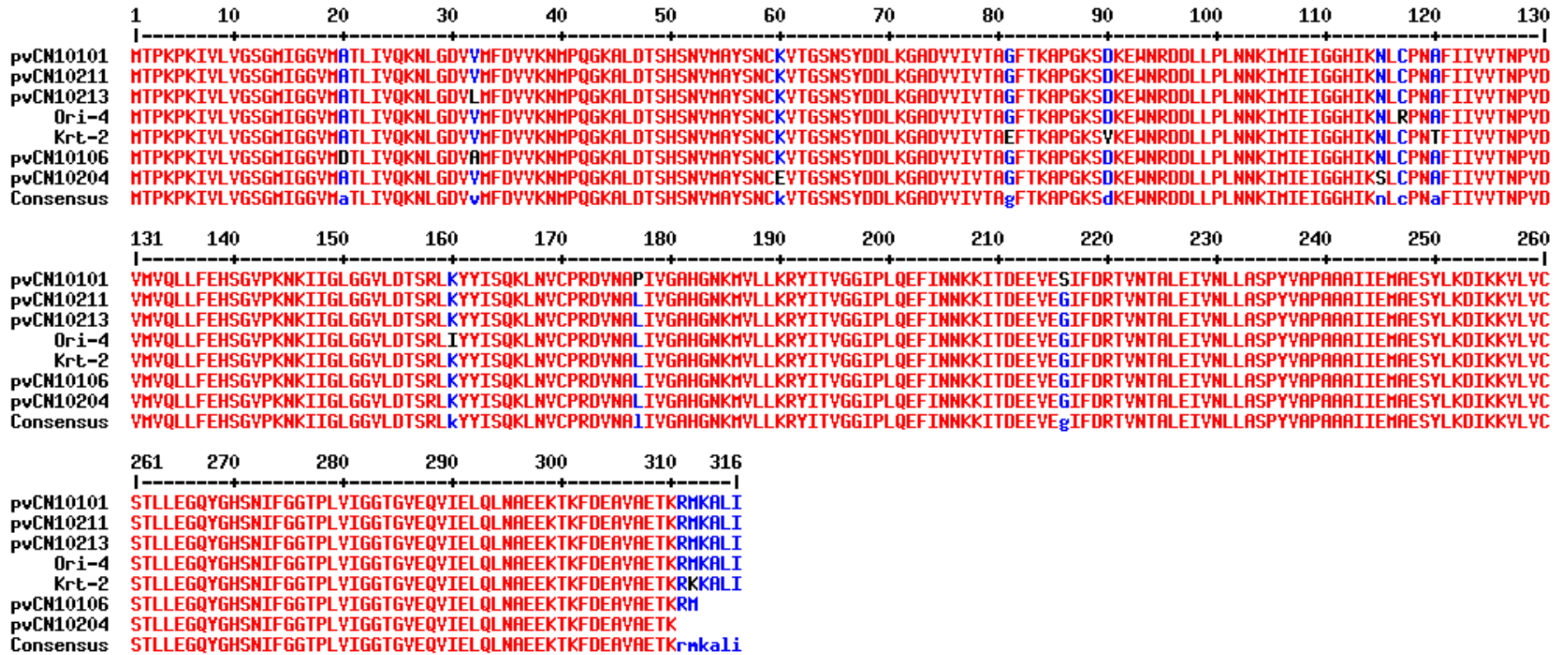
FCC/HN 與 Jind 分別為源自中國和印度的不同蟲株對照組。各蟲株間僅有少數胺基酸有變異。

圖五、間日瘧原蟲 pLDH 基因序列差異比對



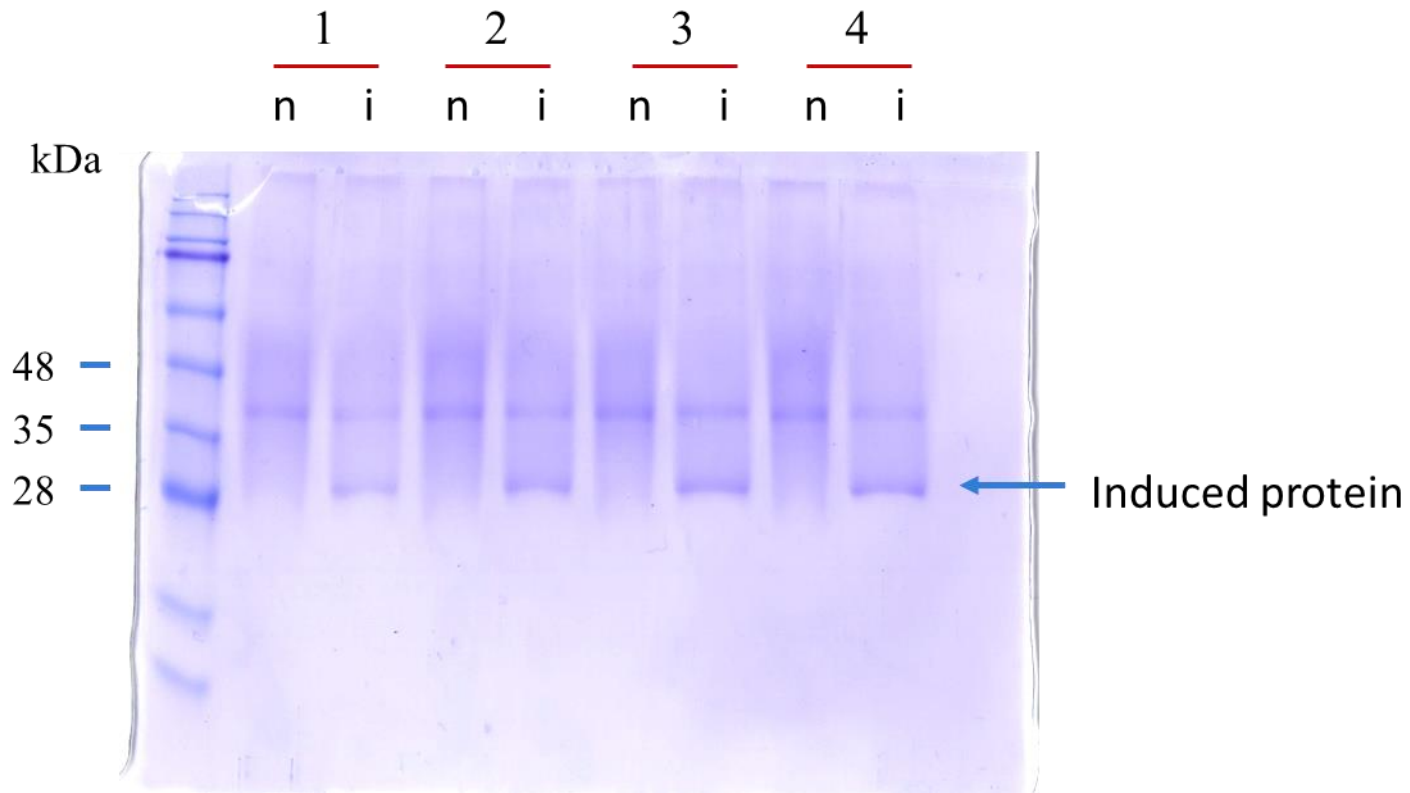
Ori-4 與 Krt-2 分別為源自印度的不同蟲株對照組。各蟲株間有不同的核酸變異。

圖六、間日瘧原蟲 pLDH 胺基酸序列差異比對



Ori-4 與 Krt-2 分別為源自印度的不同蟲株對照組。各蟲株間的胺基酸序列亦有所差異。

圖七、惡性瘧與間日瘧原蟲 LDH clones 的蛋白質表現



將惡性瘧與間日瘧原蟲 LDH 基因片段以限制酶切出，接入蛋白質表現載體進行 his tag fusion，並再次定序確認序列。
n:是沒 IPTG induction；i:是 IPTG induction。