

計畫編號：DOH92-DC-1046

行政院衛生署九十二年度科技研究發展計畫

第四級病毒偵檢方法之建立與發展

研究報告

執行機構：國防大學醫學院預防醫學研究所

計畫主持人：蔣先元

研究人員：郭明德、黃昭菱、王又明、洪耀文、林富宮
、郭賜成、楊淳米、林豐平、林慧足

執行期間：92年1月1日至92年12月31日

* * 本研究報告僅供參考，不代表本署意見 * *

第一部分：SARS 冠狀病毒 RT-PCR 偵檢技術之改良

(一) 前言：

去年 (2003 年) 11 月在中國大陸廣東爆發不明病因之非典型肺炎，後來其症狀被統一稱為嚴重急性呼吸症候群 (SARS) (Severe acute respiratory syndrome) (WHO 2003)，今年 2 月由大陸傳播至香港，接著經由飛機散播到許多國家，直到今年上半年，五個月之間席卷 29 國、八千多人感染、七百七十多死亡病例，其中台灣也是飽受 SARS 摧殘的一個國家，人人都體驗到那種不能確定病毒會從何處出現的恐慌，整個社會、交通、經濟層面都深受它的影響，尤其是醫療系統。目前疫情雖然已經是過去式，但無人能保證不再來臨。

這病原體被確定為一種不屬於任何一型的新型冠狀病毒，命名為 SARS CoV (Corona virus) (Peiris JS et al; 2003、Drosten C et al; 2003、Ksiazek TG et al; 2003、Fouchier RA et al; 2003)，它是一種可藉由飛沫或接觸由人傳染給人致死率約 15 % 的新興病毒。這 SARS CoV 為含有單股正股 RNA 的病毒，它的整個 RNA 基因體的核酸序列也都定序出來了，約長 29.7kb (Rota PA et al; 2003、Marra MA et al; 2003、Ruan YL et al; 2003)，可複製出五個蛋白，分別為 replicase polyprotein (rep, 由 ORF1a 和 ORF1b 複製來的)、spike (S)、envelope(E)、

membrane(M)和 nucleocapid protein(N)。當冠狀病毒感染進入細胞後，病毒 RNA 從病毒顆粒被釋放出來，會依病毒 genomic RNA 複製出 genomic RNA 和幾種不同長度的 subgenomic RNA，這些 subgenomic RNA 都有相同的 3'端，而在合成蛋白時只表現最靠 5'端的基因蛋白(Lai MMC and Holmes KV, 2001、 Siddell SG, 1995、 Gorbalenya AE, 2001、 Thiel V, et al, 2003)。

早期感染 SARS 其症狀跟一般感染流行性感冒或很多疾病的症狀很類似，很不容易單從症狀判斷區分開，因此進一步具有高專一性靈敏的實驗室偵檢方法是很急迫需要的，以減少檢疫隔離的負擔。雖然目前已有些偵檢方法但仍都有缺點，如測血清中的抗體有好幾種方法但都碰到同樣的問題 - - 無法在早期感染時測試用，較靈敏的方法仍以分子生物偵檢方法較佳，如 RT-PCR 和 RRT-PCR(real time RT-PCR)，但是 RT-PCR 之靈敏度稍低一些，至於 RRT-PCR 省時靈敏度很高，不過須要較昂貴的儀器及試劑外，但是它們共同的缺點都為偵檢率仍然不高。

我們在這計劃的第一個部分雖然還是分子生物偵檢的方法，但是我們針對上述的缺點嘗試著去改進，我們在 S(spike)和 N(nucleocapsid)基因上設計幾對引子對，這些引子對可同時運用於 RT-PCR 和 LightCycler，只要 one tube 進行一次 RT-PCR 不需要加上巢式 PCR，

其靈敏度就都可分別達到 10 和 1 個分子的 DNA 或 RNA template,並不因為不同的基因引子對造成不同的 RT-PCR 結果,然而若檢測病人檢體或感染病毒的細胞液,則 N 基因引子對的敏感度高於其它的引子對一個 log,跟病毒進入細胞複製病毒 genomic RNA 和 subgenomic RNA 的理論完全符合,接著我們也設計 RNA competitor,去測試檢體 RNA 中是否有 RT-PCR 抑制劑之存在,並試著去去除 RT-PCR 抑制劑的作用,改進偽陰性發生的機會以提高偵檢率。

(2) 材料與方法：

病毒儲存與病毒培養：病毒種是從一位 79 歲男性在和平醫院感染可能病例的血痰，經 Vero E6 細胞培養分離出來的，這株 SARS CoV 病毒的全部核酸序列也已經過序列分析。病毒以 Vero E6 細胞增殖養於含 15 % 胎牛血清的 Dulbecco's modified Eagle medium 中，在 37 培養 3 天後收取細胞培養液，經 0.2 μ m 濾膜過濾，分裝小試管凍於-70。同時一系列稀釋測 plaque forming 分析來定病毒量。

病毒 RNA 萃取：喉嚨擦拭的檢體加細胞培養液經壓擠出，糞便的檢體則加 PBS，這些檢體都經過離心 12,000rpm 的速度 1 分鐘，上清液再經過 0.45 μ m 濾膜過濾並分裝每一管 140 微升，儲存於-80 或馬上加上分解緩衝液 (lysis buffer)，接著用 Qiagen 病毒 RNA mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany)萃取 RNA,其步驟按照廠商的說明書操作，大致上為將上述的混合液經過離心的小管柱再清洗，以 60 微升的水將 RNA 沖洗出來。至於健康人相對的檢體或感染病毒的細胞液也是以相同的步驟處理，當作陰性或是陽性的標準樣品。

構築 RT-PCR 檢測時用的標準和競爭 DNA template 及

RRT-PCR 檢測時用的內部標準 DNA template：下列的引子被用來當作合成生產各基因的 DNA 片段，這些 N、S 和 1b 的 DNA 片段可用作 RT-PCR 時的標準 DNA template, 如於 polymerase 1b, forward primer:

5'-CTA ACA TGC TTA GGA TAA TGG-3', reverse primer: 5'-CAG
GTA AGC GTA AAA CTC ATC-3'; 於 spike protein, forward primer:
5'-GGC AAG CTG CAA GAC GTT G-3', reverse primer: 5'-CCA GCA
ATG AAG CCG AGC C-3'; 於 nucleocapsid protein, forward primer:
5'-GTA TGG GTT GCA ACT GAG GG-3', reverse primer: 5'-GTG
ACG TTG TAC TGT TTT GTG G-3' , RNA 從感染病毒的細胞液萃取出後 , 進行 RT-PCR , 擴增出來的 1b、 S 和 N 的 DNA 片段純化 , 再
接入載體 pGEM-T Easy (Promega, Madison, Wisconsin, USA) , 進入
Escherichia coli strain JM109 大量增殖 , 步驟按廠商的說明書進行 ,
分別命名為 pSARS-Pol 1b、 pSARS-Sp、 和 pSARS-Np , 至於當作
RT-PCR 時用作內部標準載體 pSARS/Sp-Pol 1b-Np 的構築方法其步驟
如下,從載體 pSARS-Pol 1b 以 *NotI-SpeI* 切下 366 bp 的 DNA 片段和從
載體 pSARS-Sp 以 *SacII-NotI* 切下 836 bp 的 DNA 片段經純化 , 再與
經 *SacII-SpeI* 切過的 pGEM-T Easy vector 連接在一起 , 這產物以
SalI-NsiI 切過後與經 *XhoI-NsiI* 切過的 pSARS-Np 的 DNA 片段約 976
bp 連結在一起 , 成為載體 pSARS/Sp-Pol 1b-Np , 其簡圖如 Fig.1。

至於如何構築含部分 N 基因片段的競爭載體敘述如下 : 用
forward primer, SARS-np3 (5'-GTA TGG GTT GCA ACT GAG GG-3')
和 reverse primer, SARS-np4 (5'-GTG ACG TTG TAC TGT TTT GTG
G-3')引子對以 RT-PCR 夾出部分 N 基因 DNA 片段 , 純化這段 DNA

片段接入 pGEM-T Easy vector , 再 transform 到 *Escherichia coli* strain JM109 大量增殖這載體 , 這載體命名為 pSARS/Np421 (如 Fig. 2) , 競爭載體就在這 pSARS/Np421 載體中插入一段約 80bp 的西尼羅病毒基因片段 , 運用引子 SARS-np4 和 np-wn2 (5'-cca cca aag ctg cgt gcc cga cca tgg gag aag ctc aca atg aca aac gtg ctg acc caC ATT GGC ACC CGC AAT CC-3'小寫英文字母為西尼羅病毒之基因片段),以 pSARS/Np421 載體為 template , PCR 出來的 DNA 片段純化後再作為 template , 以 SARS-np4 和 np-wn1 (5'-GTA TGG GTT GCA ACT GAG GGA GCC TTG AAT ACA CCC AAA GAC Cat cag cga tct ctc cac caa agc tgc gtg ccc gac c-3' , 小寫英文字母為西尼羅病毒之基因片段)為引子做 PCR , 增殖出的 DNA 片段經純化 , 克隆進入 pGEM-T Easy vector , 此載體就是競爭載體 pSARS/Np-WNV493 (圖示於 Fig.3)。

RRT-PCR 檢測時用的內部標準 DNA template 構築方法如下 : 以 pSARS/Np421 為 template , 並以 SARS-np4 和 np-wn3 (5'-CAA ACG TGC TGA CCC ACA TTG GCA CCA ACA TTG CCA AAA GGC TTC-3')為引子做 PCR , 另外一個 PCR 以 pSARS/Np-WNV493 為 template , SARS-np3 和 np-wn4 (5'-GAA GCC TTT TGG CAA TGT TGG TGC CAA TGT GGG TCA GCA CGT TTG-3')作為引子。增殖出來的兩段 DNA 片段再以引子 SARS-np3 和 SARS-np4 做 jumping PCR , 增殖出來的 DNA 片段含 451bp , 比插入 pSARS/Np-WNV493

的 DNA 片段少靠近 3' N 蛋白部分的 50bp, 最後 jumping PCR 增殖出的 DNA 片段再接入 pGEM-T Easy vector, 這載體稱為 pSARS/IC。

這些載體接入 pGEM-T Easy vector 的 DNA 片段部分和接入附近的核酸序列都經過序列分析確定過。這些載體經純化後, 以光譜儀定量, 再作一序列的稀釋。

標準 競爭和內部標準 RNA 的製備: 載體 pSARS/Sp-Pol 1b-Np, pSARS/Np-WNV493 和 pSARS/IC 分別用 *XhoI*, *XhoI*, and *XhoI* 切成線段, 這些線段的 DNA 產物都經過 Qiagen DNA purification kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) 純化並用光譜儀定量, 純化的 DNA 用 T7 RiboMAX large scale RNA production system kit (Promega, Madison, Wisconsin, USA) in vitro 製備 RNA, 製備出來的 RNA 以 RNeasy mini kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) 純化。純化的 RNA 以光譜儀定量, 至於 copy number 則以 RNA 的長度直接換算, 再作一序列稀釋。

RT-PCR: 引子的設計都經過 BLASTn algorithm at the National Center for Biotechnology Information website 的比對, 對 SARS 病毒要求全部相似, 至於不是 SARS 病毒的部分則不許相似。RT-PCR 反應則用 Qiagen one-step RT-PCR kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany), 總體積為 12.5 μ l, 含 2.5 μ l 的 5x 緩衝液和 5x Q 溶液、0.5 μ l 的 10mM dNTP(dATP, dCTP, dGTP 和 dTTP 個別) 0.5 μ l 酵素混合液和 2 μ l RNA

檢體，引子的濃度則依不同的引子對各有其最適當的濃度，這最適當的濃度都經過不同的濃度測試過而決定的。

(三) 結果與討論：

首先我們構築一個載體同時含有聚合酵素 1b、N 和 S 基因片段，如 Fig. 1，因此它可同時當作位於聚合酵素 1b、N 和 S 基因片段內的引子對之 template，不需要分別製備各段 DNA 當作 template。且在比較這些引子對的靈敏度時，它可同時作為共通的 template，所以它的 copy number 都一樣，不會分別製備分別定量或不同的純度造成誤差。再者；它可當作相同的 DNA template 去進行 in vitro transcription，所製備的 RNA 就含這些引子對的 RNA region，相同的它的 copy number 都一樣，不會因分別製備分別定量或不同的純度造成誤差，因此在測試靈敏度時更準確更可靠。

接著我們設計好幾對引子，除了用一些設計引子的程式外，也經過 BLASTn algorithm at the National Center for Biotechnology Information website 的比對，對 SARS 病毒要求全部相似，至於不是 SARS 病毒的部分則不許相似的原則下，選取了兩對引子對位於 N 基因，一對位於 S 基因，至於另一對 (Cor-P-F2 和 Cor-P-R1) 為美國 CDC 設計的大家都普遍使用，它位於聚合酵素 1b 基因，作為比較用，這些引子對的序列排列顯示於 Table 1。Table 1 的下半部為用於 RRT-PCR 時設計的 hybridization probe。

Fig.4 為利用四對引子對和 pSARS/Sp-Pol 1b-Np 載體當作

template 經 PCR 反應跑瓊脂膠的結果, pSARS/Sp-Pol 1b-Np 載體經定量計算 copy number 後做一序列稀釋, 結果可見到這四對引子對在 10 個分子的 DNA template 情況下都可清楚看到陽性反應, 所以這四對引子對對 DNA 的 hybridization、replication 和避免引子 dimerization 的效果都相當好。其實我們也淘汰掉一些不是很好的引子, 選取較好的三對引子對來運用, 因為在做檢測時需要兩樣以上的陽性檢測來證實確定一個病例, 還有為了避免突變發生剛好坐落於引子的區域, 所以我們選取兩對以上的引子對來提供更完整的偵檢。

其次我們將 pSARS/Sp-Pol 1b-Np 載體的圓圈切成線性, 以便進行 in vitro transcription 製備含 Sp-Pol 1b-Np 的 RNA, 製備出來的 Sp-Pol 1b-Np RNA (MB-240) 顯示於 Fig.5 panel A, 它的長度和純度都如我們預料的。這 MB-240 RNA 經定量和換算後做一序列稀釋, 然後進行 RT-PCR, 結果顯示於 Fig. 5 panel B, 顯然地 NP(p268/p269)(SARS-np3/SARS-np4)最好, 其次為 S(SL+/SL-)和 NP(NL+/NL-), 他們的靈敏度都可達到每一個反應只要 1 個分子 template 就可以, 最差的為 1b(Cor-P-F2/Cor-P-R1), 需要每個反應含 10 個分子的 template 以上才可以。這差異是否發生在 reverse transcription 反應上? 仍須進一步去確定。

接著我們測試感染 SARS 病毒的細胞液對 RT-PCR 的影響, 首先

感染 SARS 病毒的細胞液已經經過 plaque forming 的定量，再以一序列的稀釋、0.45 μ m 濾膜過濾、加上分解緩衝液、用 Qiagen 病毒 RNA mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) 萃取 RNA，取定量做 RT-PCR 反應，結果如 Fig. 6，四組引子表現出不同的靈敏度，Cor-P-F2/Cor-P-R1 這組引子很勉強能偵測至每個 RT-PCR 反應含 2×10^{-5} pfu，而其他三對引子對 SL+/SL-、NL+/NL- 和 P268/P269 更靈敏都可測到每個 RT-PCR 反應含 2×10^{-6} pfu 就可以，所以差一個 log 以上。由這結果可估算形成一個具有感染能力的 SARS 病毒顆粒大概製備 10^6 分子含 N 或 S 基因的 RNA，當然這比例應會跟著收取感染 SARS 病毒的細胞液的時間點會有所改變吧！這也需要去證實的，但這結果似乎不能很強有力去支持冠狀病毒 transcrib viral genomic 和 subgenomic RNA 的機轉。

Fig.7 為用可能病人的檢體實際檢測測試這四組引子對靈敏度的結果，由這瓊脂膠的結果可見 NP 基因上的兩組引子對顯示出較多陽性結果，尤其是 NP(NL+/NL-) 這組 6 個檢體 5 個為陽性，至於 1b(Cor-P-F2/Cor-P-R1) 和 (SL+/SL-) 這兩組只看到 patient 2 和 patient 3 為陽性，從這結果很確定的 patient 2 和 patient 3 的檢體為陽性，而因 patient 1 和 patient 5 在兩個不同位置的 N 基因引子結果為陽性，所以也可判斷為陽性，但是 patient 6 只有一個檢驗為陽性所以仍須其它的

偵檢方法來輔助支持，由此可以看到靈敏度的提高可以提高偵檢率。

Patient 4 沒有任何檢驗證據支持其感染 SARS，只能說無法證實檢體中含 SARS CoV 的 RNA。

若是檢體中含有 SARS CoV 的 RNA，上述 RT-PCR 的方法靈敏到甚至 1 個分子都能增殖到可測得，那麼測不到時是否真的就不含 SARS CoV 的 RNA 嗎？實際上還有一種可能性為在反應的混合液中含有 RT-PCR 的抑制物(inhibitor)，為了證實抑制物的存在與否，我們設計了競爭 RNA(competitor RNA)，如 Fig. 2 先構築 pSARS/Np421 載體，它兩端具有 NL+和 NL-引子的 hybridization sites，接著在 pSARS/Np421 載體中間安插一段西尼羅病毒的 DNA 片段長 84bp，如 Fig.3，我們命名為 pSARS/Np-WNV493 載體，接著將這載體以 *XhoI* 切成線段，並用這線性的 pSARS/Np-WNV493 載體以 T7 polymerase 來進行 in vitro transcription 製備 competitor RNA，這 competitor RNA 經純化、定量和稀釋後，加少量定量的 competitor RNA 去進行 RT-PCR，結果顯示於 Fig.8，左半邊 7 條 lanes 與 Fig.6 的 NP(NL+/NL-) 這組結果完全一樣，而 Fig.8，右半邊 7 條實驗條件都一樣只不過多加了 10^3 個分子的 competitor RNA，結果 competitor RNA 被增殖多出一條約 220bp 的 DNA 片段，就像 Fig.8，右半邊的 NC(negative control) 顯示出 220bp 的 DNA 片段，如果有 RT-PCR 的 inhibitor 存在，則這

220bp 的 DNA 片段也跟著被抑制，就如 Fig.8，右半邊 patient 4 那一條 lane，這 220bp 的 DNA 片段看不到，所以更不能斷言這檢體不含 SARS CoV 的 RNA，至於 patient 3 那一條 lane 看不到 220bp 的 DNA 片段，應該是因檢體內 SARS CoV 的 RNA 量較高，competitor RNA 無法競爭得過 SARS CoV 的 RNA，所以 competitor RNA 有 internal control 的角色去分辨 RT-PCR 的 inhibitor 存在與否，然而它具有 RT-PCR target site 所有的特性，因此能完全顯現出來影響的結果，不似 internal control 與 RT-PCR target site 仍有一段差距

接著我們考慮如何去除 RT-PCR inhibitor 的作用，Fig.9 顯示一個檢體加上 competitor RNA(lane 1)，經 RT-PCR 連 220bp 的 DNA 片段也看不到，顯然有 inhibitor 的存在，經稀釋 1/2(lane1/2)抑制作用降低，則兩條 bands 都顯現出來，但是 220bp 的 DNA 片段強很多，因此 SARS CoV 的 RNA 量比 competitor RNA 低很多，繼續稀釋下去，抑制作用降低或不見了，所以可見到 220bp 的 DNA 片段，但是 SARS CoV 的 RNA 量低到無法與 competitor RNA 競爭。因此可用 competitor RNA 去改進偽陰性的存在去提高偵檢率，其它可能要思考如何去增加確保檢體中的病毒 RNA 量，就要考慮如何去取得最適當部位的檢體、最適當的採樣時間點和檢體的保存和運送方法。

目前我們提供 one tube RT-PCR 的方法，不需要昂貴的儀器和試

劑，並能節省實驗操作的繁複，降低污染的可能性。不過因偵檢技術的進展很快，很多人都運用 real time RT-PCR 做較快速能定量的方法來做偵檢，因此我們也將這對 NL+/NL-引子運用到 RRT-PCR 之上，首先設計 internal control 的載體，用 jumping PCR 去除 pSARS/Np-WNV493 靠近 3'端約 50bp，以 in vitro transcription 製備 RNA，另一方面設計 hybridization probe 顯示於 table 1，結果在 RRT-PCR 顯示其靈敏度也很高。

第二部分：伊波拉病毒薩伊和雷斯頓亞型 RT-PCR 偵檢技術之改良

(一) 前言：

1976 年在薩伊和蘇丹同時爆發了嚴重的出血熱疫情(Hemorrhagic Fever)，分別有多於 550 和 430 個死亡病例 (Bowen ETW et al;1997、Johnson KM et al; 1977)；其死亡率分別為 88 % 和 53 % ，後來從這些病人分離出來的病毒就依著薩伊西北部一條小河流的名稱稱為伊波拉病毒 (Ebola virus)。不過研究追蹤回溯至 1972 年，有位傳教士醫生解剖一位疑似黃熱病病人(Johnson KM et al; 1981)，而受到感染，經血清證明其實 1972 年已有伊波拉病例之發生。接著 1979 年蘇丹又爆發疫情(Baron RC et al; 1983、WHO; 1979)，34 人感染 22 人死亡。1990s 年間至今陸陸續續發生好幾次伊波拉疫情如：1994 年在象牙海岸(Formenty P et al;1999)、1994-1996 年在加彭(Volchkov V et al;1997、Georges AJ et al;1999)、1995 年在薩伊 (Muyembe-Tamfum JJ et al;1999)、2000 年在剛果、2002 年 2 月加彭和剛果各有 57 和 21 確定伊波拉感染病例、甚至到今年也有病例確定。

1989 年美國維吉尼亞州雷斯頓(Reston, Virginia)有獸醫師在進口靈長類動物檢疫時，發現幾隻猴子類似出血熱而死亡(Dalgard DW et al; 1992)，並散播至其它的猴子，經病毒分離證實它也是屬於類似伊

波拉病毒的絲狀病毒(*Filoviridae*) (Jahrling PB et al; 1990) , 而命名為雷斯頓病毒(Reston type) , 接著在德州賓州也發現類似的事件(Hayes CG et al; 1992) , 經調查發現這病毒是從菲律賓進口的猴子 , 接著 1992 年義大利也發生同樣的進口猴子感染事件(WHO, 1992, Miranda Me et al; 1999) , 還有 1996 年在菲律賓及 1997 年在美國也爆發猿猴型之伊波拉病毒感染(Rollin PE et al;1999)。

Ebola 病毒屬於生物安全等級第四級之致病源 , 屬於絲狀病毒科 (*Filoviridae*) , 它的形狀類似馬堡出血熱病毒 , 但在血清的分型上是 大不相同的。伊波拉病毒依基因及抗原性質來分至少有四個亞型。原始型為由 1976 年在非洲薩伊分離出來 , 另一型在 1976 年於蘇丹分離出來 , 雷思頓 (Reston) 亞型是於 1989 年由菲律賓運到美國的猿猴身上分離出來 , 於 1994 年象牙海岸 (Côte d'Ivoire) 分離出第四型的新亞型。伊波拉病毒感染後可造成發熱、劇烈頭痛、咽喉痛、肌痛、噁心、嘔吐、全身出血、發病後 6~9 天死亡。潛伏期為 3~20 天。人與人之間具有高傳染性。感染可藉由呼吸道進入、接觸及醫療行為感染(Baron RC et al;1983)。具有高致死率 53~92 % (蘇丹型 53 %、薩伊型 92 %)(Heymann DL et al;1980)。基因序列分析 1995 年於剛果爆發之伊波拉出血熱疫情之伊波拉病毒 , 經比對分析後與二十年前爆發之伊波拉病毒薩伊株非常相近 , 顯示此病毒具保守性 (Rodriguez LL et

al;1999)。而不同時期分離出來之兩株蘇丹株及三株雷思頓株，同亞型間幾乎一樣。然此四個亞型伊波拉出血性病毒之間，則有很大之差異。依其各亞型伊波拉出血性病毒間之基因保守性，我們將分別設計做為診斷之具亞型專一性之正反引子(Leroy EM;2000)。今年本計畫的第二部分成果則著重於改進伊波拉病毒的 RT-PCR 偵檢方法。伊波拉病毒被列為新興的病毒之一，尤其在 1990 年代至今爆發好幾次疫情，其致死率相當高，被列為第四級病毒，雖在 90 年我們由生物資訊分析比較，已經設計幾對引子對去偵檢或分型，除了一次 RT-PCR 外，當病毒量很低時，仍需要再進一步用巢式 PCR 來確認。因此我們改良至以一次的 one tube RT-PCR 即可測到 10 個分子的薩伊或雷斯頓亞型的伊波拉病毒。

(2) 材料與方法：

標準對照組載體之構築及引子之設計：pet32(mb246)是一段利用人工合成 Ebola 之片段約 500bp 與 Zaire 和 Reston strain 去進行核酸比對，此 DNA 片段座落於 Ebola 病毒之位置顯示於 Fig.10，進而去設計 primer p318、p319、p320 和 p321，這些引子的核酸序列顯示於 Table 2，引子的設計都經過 BLASTn algorithm at the National Center for Biotechnology Information website 的比對，對 Ebola 病毒要求全部相似，至於不是 Ebola 病毒的部分則不許相似。接著利用 pet32(mb264) 當 template 以 Zaire 特異引子 p318 和 p319 做出 Zaire strain，所合成出之 Zaire strain 之片段當 template 以 Reston 特異引子 p320 和 p321 做出兩端含有 Reston strain 序列 DNA 片段。

陽性標準對照組 RNA 的製備：載體切成線段，這些線段的 DNA 產物都經過 Qiagen DNA purification kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) 純化並用光譜儀定量，純化的 DNA 用 T7 RiboMAX large scale RNA production system kit (Promega, Madison, Wisconsin, USA) in vitro 製備 RNA，製備出來的 RNA 以 RNeasy mini kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) 純化。純化的 RNA 以光譜儀定量，至於 copy number 則以 RNA 的長度直接換算，再作一序列稀釋。

PCR 和 RT-PCR：RT-PCR 反應則用 Qiagen one-step RT-PCR kit

(Qiagen GmbH, Hilden, Germany) , 總體積為 12.5 μ l , 含 2.5 μ l 的 5x 緩衝液和 5x Q 溶液、 0.5 μ l 的 10mM dNTP(dATP、 dCTP、 dGTP 和 dTTP 個別)、 0.5 μ l 酵素混合液和 2 μ l RNA 檢體 , 引子的濃度則依不同的引子對各有其最適當的濃度 , 這最適當的濃度都經過不同的濃度測試過而決定的。薩伊病毒之 PCR 偵檢以濃度分別為 $10^5\sim 10^0$ copy template , 用 p318+p319 為 primer 來進行 PCR (95 $^{\circ}$ C, 15' \rightarrow 94 $^{\circ}$ C, 30" \rightarrow 55 $^{\circ}$ C, 30" \rightarrow 72 $^{\circ}$ C, 30" \rightarrow 進行 40 cycle 最後進行 72 $^{\circ}$ C, 5' 4) 。至於雷斯頓病毒則以不同濃度之 pet32(mb264)為 template , 用 p320+p321 為 primer 來進行 PCR (95 $^{\circ}$ C, 15' \rightarrow 94 $^{\circ}$ C, 30" \rightarrow 55 $^{\circ}$ C, 30" 30 , 30" 72 , 30" \rightarrow 回到 94 $^{\circ}$ C, 30" \rightarrow 進行 10 cycle \rightarrow 94 $^{\circ}$ C, 30" 55 , 30" 72 , 30" 進行 40cycle 最後進行 72 $^{\circ}$ C, 5' 4) 。

(三) 結果與討論：

於 90 年的研究報告中,我們合成一段約 500bp Ebola N 基因 DNA 片段,也設計了 RT-PCR 偵檢方法,因為靈敏度只能測到約 10^4 copy,所以我們再加上巢式 PCR 以提高靈敏度。今年的工作之一為試著去改進這偵檢方法,建立一個 one tube 的高靈敏度的 RT-PCR 偵檢方法

首先建立一個測試的 Ebola DNA template 載子, pet32(mb246)含一段利用人工合成 Ebola 之片段約 500bp 的載子,此插入的人工合成 DNA 片段座落於 Ebola 病毒位置顯示於 Fig.10。經與 Zaire 和 Reston strain 的生物資訊進行核酸比對分析,進而去設計 primer p318 & p319、p320 和 p321,這些引子的核酸序列顯示於 Table 2,引子的設計都經過 BLASTn algorithm at the National Center for Biotechnology Information website 的比對,對 Ebola 病毒要求全部相似,至於不是 Ebola 病毒的部分則不許相似,也經過引子設計的程式去避免 dimerization 的產生。接著利用 pet32(mb264)當 template 以 Zaire 特異引子 p318 和 p319 做出 Zaire strain template,所合成出之 Zaire strain 之片段當 template 用 Reston strain 引子 p320 和 p321 修飾做出兩端含有 Reston strain 序列 DNA 片段,再加入 vector 做成 Restone 特異性的 DNA template 載子,這兩個載體也可用 *Ned I* 切成線性作為 T7 polymerase 進行 in vitro transcription 製備 RNA template。

首先以不同濃度之載子與 Zaire 和 Reston strain 的引子去進行 PCR，結果可偵測到 10 個分子的 DNA template 如 Fig. 11。同時也尋找最適當的引子濃度，用許多不同濃度的引子測試，結果兩個亞型病毒的 PCR 反應最適當的引子濃度都各為 $0.1 \mu\text{M}$ 。接著我們製備 Zaire 和 Reston strain 的 RNA template，純化、定量及做一序列稀釋，加入各別的引子對作 RT-PCR，結果這兩種 RNA template 都可稀釋到 10 個分子仍能成陽性反應，因此這 one tube RT-PCR 可取代原來三個步驟 RT、PCR 和巢式 PCR 的偵檢方法，且其靈敏度可達到 1 個分子。

結論與建議：

1. 於第一部份我們以建立較完整的分子生物偵檢方法來偵測 SARS CoV RNA，設計了三對引子，其中兩對位於 N 基因，一對位於 S 基因。同時我們也設計了一個載體含部分的 polymerase 1b、S 和 N 基因片段，它可提供準確的 DNA 和 RNA 的 copy number 作為比較靈敏度用。這三對引子在 DNA template 的 PCR 檢測其靈敏度與現在在 RT-PCR 常用位於 polymerase 1b 的引子相當，但在 RNA template 的 RT-PCR 檢測則以 N 基因的兩對引子靈敏度較佳，可測到 1 個分子的 RNA，然而以檢體來測試，則以 NL+/NL- 為最佳，其次為 SARS-np3/SARS-np4，SL+/SL- 也比位於 polymerase 1b 的 Cor-P-F2/Cor-P-R1 來的好。
2. 為了測 RT-PCR inhibitor 對檢測的影響，造成偽陰性的結果，我們設計 competitor RNA 去測試，並且試著去去除 inhibitor 抑制 RT-PCR 的結果，以便避免偽陰性的產生提高偵檢率。
3. 我們也利用相同的 NL+/NL- 引子對應用於 RRT-PCR 之檢測，病設計 hybridization probe 和 competitive internal control，也可得到相當高靈敏度。
4. 於第二部分，我們改進偵檢 Ebola 的 Zaire 和 Restone 兩種亞型病

毒的分子生物偵檢方法，首先製備含它們 N 基因的 DNA 片段的載體作為測試比較用，將原來三個步驟 RT、PCR 和巢式 PCR 簡化改為 one tube RT-PCR，其靈敏度仍可達到 1 個分子。

(6)參考文獻：

- Baron RC, McCormick JB, Zubeir OA (1983) Ebola virus disease in southern Sudan: hospital dissemination and intrafamilial spread. *Bull WHO* 61:997-1003.
- Bowen ETW, Lloyd G, Harris WJ, Platt GS, Baskerville A, Vella EE. (1977) Viral haemorrhagic fever in southern Sudan and Northern Zaire. *Lancet* 1: 571-573.
- Dalgard DW, Hardy RJ, Pearson SL, et al (1992) Combined simian hemorrhagic fever and Ebola virus infection in cynomolgus monkeys. *Lab Animal Sci* 42:152-157.
- Drosten, C, Gunther S, Preiser, W, and 23 other authors (2003) Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* 348, 1967-1976.
- Formenty P, Hatz C, Le Guenno B, Stoll A, Rogenmoser P, Widmer A (1999) Human infection due to Ebola virus, subtype Cote d'Ivoire: clinical and biologic presentation. *J Infect Dis* 179 Suppl 1:S48-53.
- Fouchier RA, Kuiken T, Schutten M, and 7 other authors (2003) Aetiology: Koch's postulates fulfilled for SARS virus. *Nature* 423, 240.
- Georges AJ, Leroy EM, Renaut AA, Benissan CT, Nabias RJ, Ngoc MT, Obiang PI, Lepage JP, Bertherat EJ, Benoni DD, Wickings EJ, Amblard JP, Lansoud-Soukate JM, Milleliri JM, Baize S, Georges-Courbot MC (1999) Ebola hemorrhagic fever outbreaks in Gabon, 1994-1997: epidemiologic and health control issues. *J Infect Dis* 179 Suppl 1:S65-75.
- Gorbalenya AE, (2001) Big nidovirus genome. When count and order of domains matter. *Adv Exp Med Biol* 494:1-17.
- Hayes CG, Burans JP, Ksiazek TG, et al (1992) Outbreak of fatal illness among captive macaques in the Philippines caused by an Ebola-related filovirus. *Am J Trop Med Hyg* 46:664-671.

- Heymann DL, Weisfeld JS, Webb PA, Johnson KM, Cairns T, Berquist H.(1980)
Ebola hemorrhagic fever: Tandala, Zaire,1977-1978. *J Infect Dis* 142:372-376.
- Jahrling PB, Geisbert TW, Dalgard DW, et al (1990) Preliminary report: isolation of
Ebola virus from monkeys imported to USA *Lancet*. 335:502-505.
- Johnson AM, Webb PA, Lange JV, Murphy FA (1977) Isolation and partial
characterization of a new virus causing acute haemorrhagic fever in Zaire. *Lancet*
1:569-571.
- Johnson KM, Scribner CL, McCormick JB (1981) Ecology of Ebola virus: a first clue?
J Infect Dis 143: 749-751.
- Ksiazek TG, Erdman D. Goldsmith CS, and 23 other authors (2003) A novel
coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* 348,
1953-1966.
- Lai MMM, and Holmes KV, (2001) Coronaviridae. The viruses and their replication.
In *Fields Virology*, 4th edn, pp. 1163-1185. Edited by D. M.Knipeand P. M. Howley.
Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins.
- Leroy EM, Baize S, Lu CY, McCormick JB, Georges AJ, Georges-Courbot M,
Lansoud-Soukate J, Fisher-Hoch SP (2000) Diagnosis of Ebola haemorrhagic fever
by RT-PCR in an epidemic setting. *J Med Virol* 60:463-467.
- Marra, MA, Jones, SJ, Astell, CR, and 56 other authors (2003) The genome sequence
of the SARS-associated coronavirus. *Science* 300, 1399-1404.
- Miranda ME, Ksiazek TG, Retuya TJ, Khan AS, Sanchez A, Fulhorst CF, Rollin PE,
Calaor AB, Manalo DL, Roces MC, Dayrit MM, Peters CJ(1999)Epidemiology of
Ebola (subtype Reston) virus in the Philippines, 1996. *J Infect Dis* 179 Suppl
1:S115-119.
- Muyembe-Tamfum JJ, Kipasa M, Kiyungu C, Colebunders R (1999) Ebola outbreak
in Kikwit, Democratic Republic of the Congo: discovery and control measures. *J*

- Infect Dis 179 Suppl 1:S259-262.
- Peiris JS, Lai ST, Poon LL, and 13 other authors (2003) Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet* 361:1319-1325.
- Rodriguez LL, De Roo A, Guimard Y, Trappier SG, Sanchez A, Bressler D, Williams AJ, Rowe AK, Bertolli J, Khan AS, Ksiazek TG, Peters CJ, Nichol ST (1999) Persistence and genetic stability of Ebola virus during the outbreak in Kikwit, Democratic Republic of the Congo, 1995. *J Infect Dis* 179 Suppl 1:S170-176.
- Rollin PE, Williams RJ, Bressler DS, Pearson S, Cottingham M, Pucak G, Sanchez A, Trappier SG, Peters RL, Greer PW, Zaki S, Demarcus T, Hendricks K, Kelley M, Simpson D, Geisbert TW, Jahrling PB, Peters CJ, Ksiazek TG (1999) Ebola (subtype Reston) virus among quarantined nonhuman primates recently imported from the Philippines to the United States. *J Infect Dis* 179 Suppl 1:S108-114.
- Rota, PA, Oberste, MS, Monroe, SS, and 32 other authors (2003) Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *Science* 300,1394-1399.
- Ruan, PA, Wei, CL, Ee, AL, and 17 other authors (2003). Comparative full-length genome sequence analysis of 14 SARS coronavirus isolates and common mutations associated with putative origins of infection. *Lancet* 361, 1779-1785
- Siddell SG, (1995) *The Coronaviridae*. New York: Plenum Press.
- Thiel V, Ivanov KA, Putics A, Hertzog T, Schelle B, Bayer S, and 6 other authors (2003) Mechanisms and enzymes involved in SARS coronavirus genome expression. *J Gen Virol* 84: 2305-2315.
- Volchkov V, Volchkova V, Eckel C, Klenk HD, Bouloy M, LeGuenno B, Feldmann H (1997) Emergence of subtype Zaire Ebola virus in Gabon. *Virology* 232:139-144
- World Health Organization. (1979) Viral haemorrhagic fever surveillance. *Wkly Epidemiol Rec* 54: 342-343

World Health Organization (1992) Viral haemorrhagic fever in imported monkeys.

Wkly Epidemio Rec 67: 142-142.

WHO Coronavirus never before seen in humans is the cause of SARS. April 16, 2003

<http://www.who.int/entity/csr/sarsarchive/2003-04-16/en>