

計畫編號：DOH93-DC-2030

行政院衛生署疾病管制局九十三年度科技研究發展計畫

分析登革熱病毒 RNA 分離方法的品質及病毒量：磁珠法、人工及濾膜法

研究報告

執行機構：第四分局檢驗室

計畫主持人：高振峰

研究人員：曾淑慧、黃暉升、張學文、徐惠琳

執行期間：93 年 01 月 01 日至 93 年 12 月 31 日

本研究報告僅供參考，不代表衛生署疾病管制局意見

目錄

摘要	2
前言	6
材料與方法	8
結果	11
討論	12
結論與建議	13
參考文獻	14
圖表	16

摘要

登革熱 (Dengue fever) 是種急性、蚊子傳染病毒的感染，會導致發燒、肌痛、關節痛、頭痛、紅疹和白血球缺乏症。登革熱病毒 (Dengue virus) 除了會引起上述典型的登革熱外，另外有兩種臨床症狀，稱為登革出血熱 (Dengue hemorrhage fever, DHF) 和登革休克症候群 (Dengue shock syndrome, DSS)，分別會有因為微血管通透性增加而導致出血和休克的症狀。一般相信 DHF 和 DSS 可能是因為不同血清型的登革熱病毒感染所造成的。

要確認是否病人有感染登革熱，臨床實驗室目前有 ELISA 和 PCR 兩種方法來做鑑定。其中 PCR 是偵測病人血液中登革熱病毒的存在與否，而 ELISA 則是用來偵測病人感染登革熱病毒後，體中對抗登革熱病毒的 IgM 及 IgG。PCR 方法在病人初期感染登革熱病毒時，血液中有登革熱病毒就可以快速的偵測出來，具有高靈敏度、高專一性的特性。但是要用 PCR 的方法來偵測病毒，需要先將病人的血液經過前處理，將病毒的 RNA 分離出來，才能夠接著以 PCR 的方法來偵測。如何能夠用迅速、簡便、成本低及獲得大量 RNA 的方法，來分離出登革熱病毒中的 RNA，是使用 PCR 方法能否成功偵測到登革熱病毒的關鍵步驟。這個研究計畫將分析目前實驗室所採用分離登革熱病毒 RNA 的方法和新開發

的磁珠法來作分析，以找出能夠大量處理檢體、快速、自動化、且靈敏度高的分離登革熱 RNA 技術，這對於提升登革熱的檢驗水準會有很大的幫助。

本研究計畫分析了三種不同萃取登革熱病毒 RNA 方法，發現濾膜法有時候會有管柱因為檢體可能蛋白質含量較高，經過酒精處理過後，容易形成沉澱物而阻塞管柱，需要經過離心處理過後，才能進行下一個萃取的步驟，且在每次清洗過管柱後，都需要再用離心處理，較為費人力且可能會有檢體交叉污染的可能性。磁珠法則沒有濾膜法的問題，但其萃取登革熱 RNA 的效果則和濾膜法沒有顯著性的差異。萃取登革熱病毒 RNA 效果最好的是用人工操作，但是無法處理大量的檢體，且不同的人員操作，會有污染的問題及效率的差異。因此建議使用磁珠法來做自動化萃取登革熱病毒 RNA 的方法。

中文關鍵詞(至少三個)：登革熱、RNA 萃取、即時定量 PCR

Abstract:

Dengue fever is an acute infection transmitted by mosquitoes. It will cause fever, muscle pain, joint pain, headache, rash and leucopenia. In addition to the typical dengue fever, there are two clinical syndromes, dengue hemorrhage fever (DHF) and dengue shock syndrome (DSS). Those will result in hemorrhage and shock respectively due to the permeability of vascular increases. The syndromes of DHF and DSS are induced by the infection of different serotype dengue virus. So far, there are four serotypes found, such as DEN-1, DEN-2, DEN-3 and DEN-4. There are two methods, ELISA and PCR, in clinical laboratory to diagnose if patients infected by dengue virus. The PCR method can directly detect dengue virus in blood. The other method of ELISA can detect IgM and IgG antibodies produced by patients after dengue virus infection. However, patients' bloods should be pretreated to extract viral RNA before using PCR method to detect dengue virus. Thus, how to extract dengue virus RNA by a fast, convenient, and cheap method is the important process to be concerned. Therefore, it is very important to compare the methods used in laboratories at present with newly developed method of magnetic bead to find out which method could fast, highly sensitively, and automatically analyze a large amount of samples. This will be very helpful to improve the technique of detecting dengue virus efficiently.

We compared three methods for extracting dengue virus RNA. Column extraction method obstructed the columns when samples were treated with absolute alcohol. Removal of turbid samples in column was complicated and time-consuming. In addition, the steps have high risk of samples contamination. The problems of column extraction method didn't occur in magnetic bead method. However, there are no differences of extracting efficiency between magnetic bead method and column method. The labor work method has the best RNA extracting efficiency, but it can't treat massive samples at a time. Moreover,

contamination and variation of efficiency exist in different technicians. Therefore, we recommend that the magnetic bead can be used for the routine extraction of RNA from large series of serum samples, which can extract dengue virus RNA automatically and fast.

Keyword: dengue 、 RNA extraction 、 quantitative real time PCR

前言

登革病毒 (Dengue virus) 屬於黃病毒科 (Flaviviridae family) 中黃病毒屬 (Flavivirus genus) (2,5) 的登革病毒亞屬。其引發的疾病光譜，從 unapparent infection、mild undifferentiated fever、classical dengue fever 到 severe form 包括 dengue hemorrhagic fever (DHF) (6,8) 與 dengue shock syndrome (DSS)。去年 (2002) 高雄縣市登革熱盛行，其規模與確定病例數均為台灣地區最高。因此為疾病診斷、流行病學、甚至基因體學之研究，開發出高效率、高靈敏度之核酸萃取方法有其重要性。

以濾膜法 (1,10) 分離細菌、病毒、或細胞已行之有年，而分離或純化 DNA、RNA 之濾膜，其孔徑大小一般在 2~20 nm 之間，如果萃取 RNA 的過程中，形成的粒子大小比孔徑大，常會阻塞住孔徑，造成無法以真空法來清洗 membrane，且用機械手臂加入 wash buffer 時，會因為孔洞中的溶液未能用真空法抽乾而有殘留液體在孔洞中，隨後再加入 wash buffer 會使的 buffer 溢出孔洞，並且流到裝有其他檢體的孔洞中，造成檢體間的交互污染。

人工操作萃取 RNA 沒有上述的問題，但是在遇到大量檢體時，人為的誤失機率會上升，且需較多人力來操作，當有疫情爆發時，突然大增的檢體量，會讓檢驗單位面臨應接不暇的窘境。

磁珠法(9,11)是較新的方法，相關的研究報告並不多，這方法沒有濾膜法孔徑阻塞的問題，且可以用機器來執行操作步驟，適合用於處理大量檢體，但其應用在登革熱病毒 RNA 萃取的效果並未被評估過，不清楚其萃取的量及質如何。

前年 (2002) 高雄縣市登革熱盛行，其規模與確定病例數均為台灣地區之新高。因此基於疾病診斷、流行病學、疫苗之研發，甚至基因體學之

研究，找出高效率、高靈敏度之核酸萃取方法有其重要性。因此，本計畫將分析上述三種方法的特質，以找出適合檢驗單位使用的登革熱病毒 RNA 萃取方法。

材料與方法

1. 檢體的收集與分類:

收集由疾病管制局病毒實驗室自 2002~2003 年台灣地區所篩選出登革熱陽性(7)的血清檢體。

2. 病毒 RNA 的萃取

- a. 磁珠法：使用 MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit(Roche)。萃取 RNA 的步驟如下，將 140 ul 血清和 300 ul Lysis/Binding buffer 混合均勻，再加入 100 ul proteinase K 溶液，然後加入 150 ul MGP(magnetic particle)，再分別以 850 ul、450 ul、450 ul 的 wash buffer I、II、III 清洗，最後用 70 ul Elution buffer 將 RNA 萃取出來。
- b. 人工法：取 560 ul 登革熱血清加入 140 ul 的 AVL buffer，混合均勻在室溫下放置 10 分鐘後，加入 560 ul 的絕對酒精，充份混合，隨後移轉到 QIAamp 的 column，離心 6000g(8000rpm)1 分鐘，去除收集管，重複兩次後，加入 500 ul 的 AW1 緩衝液，離心 6000g(8000rpm)1 分鐘，去除收集管，再加入 500 ul 的 AW2 緩衝液，離心 6000g(8000rpm)5 分鐘，去除收集管，加入 70 ul 的 AVL，室溫下放置 1 分鐘，離心 6000g(8000rpm)1 分鐘，收集離心出的液體。
- c. 濾膜法：以 TECAN 機器來執行以下的步驟，取 560 ul 登革熱血清加入 140 ul 的 AVL buffer，混合均勻在室溫下放置 10 分鐘後，將 QIA spin column 放到 QIAvac 6S 上，加入 560 ul 的絕對酒精，充份混合，隨後移轉到 QIA spin column 中，打開真空幫浦，讓液體流過 membrane，重複兩次這步驟，隨後加入 500 ul 的 AW1 緩衝液，再打

開真空幫浦，讓液體流過 membrane，再加入 500 ul 的 AW2 緩衝液，再打開真空幫浦，讓液體流過 membrane，最後，加入 70 ul 的 AVL，室溫下放置 1 分鐘，離心 6000g(8000rpm)1 分鐘，收集離心出的液體。

3. 定量萃取病毒的 RNA(3,4)

以 MERCK MX4000 執行 SYBR Green I real time RT-PCR。primer 序列為 DN-F: CAA TAT GCT GAA ACG CGA GAG AAA 及 DN-R: CCC CAT CTA TTC AGA ATC CCT GCT。將三種方法各自萃取出來的萃取液及 RNA 標準液，各取 10 λ 萃取液加到 40 λ 含有 SYBR I 和 Taq polymerase 的反應溶液中，進行下列反應。反應條件如下，先做 reverse transcription，反應條件為 45°C，30 分鐘，1 cycle；PCR initial activation，95°C，10 分鐘，1 cycle；denature，94°C，20 sec，45 cycles；annealing，55°C，30 sec，45 cycles；extension，72°C，30 sec，45 cycles。在每個 PCR cycle，會加熱到 95°C，觀察 Tm (melting temperature)，以檢查是否為正確的產物。

4. 製作標準液

使用 Den2 F primer :TACGT GGACC GACAA AGAC 及 Den2 R primer: GTCAT TGAAG GAGCG ACAG，以 DEN2 NGC strain 的 RNA 為 template，執行 RT-PCR，反應條件為，1 cycle Reverse transcription，50°C，30 分鐘；1 cycle M-MLV Rtas inactivation and RNA/cDNA/Primer denaturation，94°C，2 分鐘；35 cycle Denaturation，94°C 1 分鐘；35 cycle Annealing，55°C，

1 分鐘；35 cycle Extension，72⁰C，2 分鐘，最後 1 cycle Extension，72⁰C，7 分鐘。PCR 反應複製出登革熱病毒的 C/PrM 基因，將此基因轉植到 pCRII-TOPO(Invitrogen)載體中，經過純化後，以限制酵素 Bgl II 來切，檢查是否有轉植成功，並將轉植成功的載體，做序列分析。

轉植成功的載體使用 in vitro transcription，產生登革熱病毒 C/PreM 的 RNA，跑 agarose gel 來確認產生的 RNA 純度，再將此 RNA 測其吸光值，可以換算出 copy RNA/ml。將高吸光值的 RNA 做序列稀釋，即可產生標準液，將此序列稀釋的標準液去跑 real time PCR，即可得到一標準曲線。

結果

將 PCR 複製產生的登革熱基因 C 和 PrM 轉植到載體中(圖一)，再以轉植成功的載體為模板，執行 *in vitro* transcription，製造出登革熱病毒的 RNA，將這些做出的 RNA 純化後，測量吸光值後即可換算出 RNA 的 copy number。這些算出已知 copy number 的 RNA 經過序列稀釋後即可成為標準液。這些序列稀釋的標準液去做即時定量 PCR 後可得到一標準曲線(圖二)。將檢體和標準液一起執行即時定量 PCR 即可推算出檢體中登革熱病毒的數量。

將收集到的每一個臨床檢體都用磁珠、人工和濾膜等三種方法萃取其
中的登革熱 RNA，然後將從檢體萃取出 RNA 和標準液一起去做即時定
量 PCR，即可得知每個檢體中含有多少登革熱病毒的 RNA copy number。
將三個方法所各自得到的數據使用 SAS 軟體,one-way ANOVA 算出
 $F=10.32, P<0.0001$, 使用平均值檢定, 檢定結果人工和磁珠以及濾膜有顯著差
異, 而磁珠和濾膜並沒有顯著差異(表一)。分析三個方法的再現性，三個方
法並沒有顯著的差異(表二)。

討論

使用濾膜法來萃取檢體中的 RNA，有些檢體經過酒精處理過後，很容易形成沉澱物，造成管柱被阻塞，這時候就需要藉由離心才能使溶液通過管柱，也才能進行下一個萃取的步驟，且被堵塞的管柱在每次清洗過管柱後，都還再需要用離心處理，較為費人力且可能會有檢體交叉污染的可能性。磁珠法則沒有使用濾膜法管柱阻塞的困擾，其萃取登革熱 RNA 的效果和濾膜法沒有顯著性的差異。萃取登革熱病毒 RNA 效果最好的是用人工操作，但是人力無法處理大量的檢體，且不同的人員操作，會有污染的問題及效率的差異。

結論與建議

三種方式萃取 RNA 的成本都差不多，在成本考量及實驗流程自動化的考量下，建議使用磁珠法來做自動化萃取登革熱病毒 RNA 的方法。

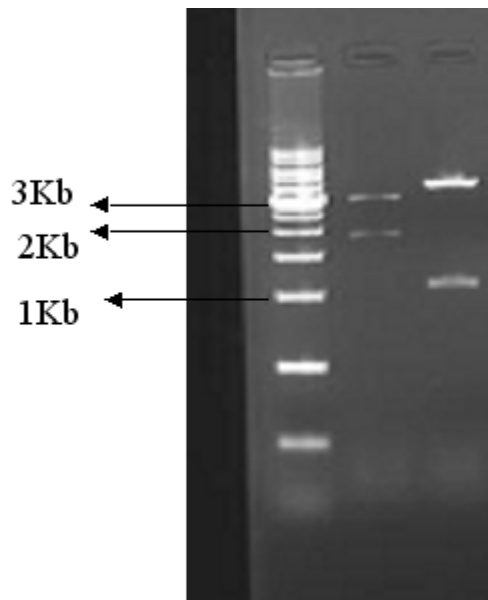
參考文獻

1. K. Searle et al: Acute Parvovirus B 19 Infection in Pregnant Women—An Analysis of Serial Samples by Serological and Semi-Quantitative PCR Techniques. *Infection* 1998 ;26:139-143
2. Kuhn RJ, Zhang W, Rossmann MG, Pletnev SV, Corver J, Lenches E, Jones CT, Mukhopadhyay S, Chipman PR, Strauss EG, Baker TS, Strauss JH: Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell* 2002;108:717-25.
3. Warrilow D, Northill JA, Pyke A, Smith GA: Single rapid TaqMan fluorogenic probe based PCR assay that detects all four dengue serotypes. *J Med Virol* 2002;66:524-8.
4. Yamada K, Takasaki T, Nawa M, Kurane I: Virus isolation as one of the diagnostic methods for dengue virus infection. *J Clin Virol* 2002;24:203-9.
5. Solomon T, Mallewa M: Dengue and other emerging flaviviruses. *J Infect* 2001;42:104-15.
6. Jacobs M: Dengue: emergence as a global public health problem and prospects for control. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2000;94:7-8.
7. Vorndam V, Beltran M: Enzyme-linked immunosorbent assay-format microneutralization test for dengue viruses. *Am J Trop Med Hyg* 2002;66:208-12.

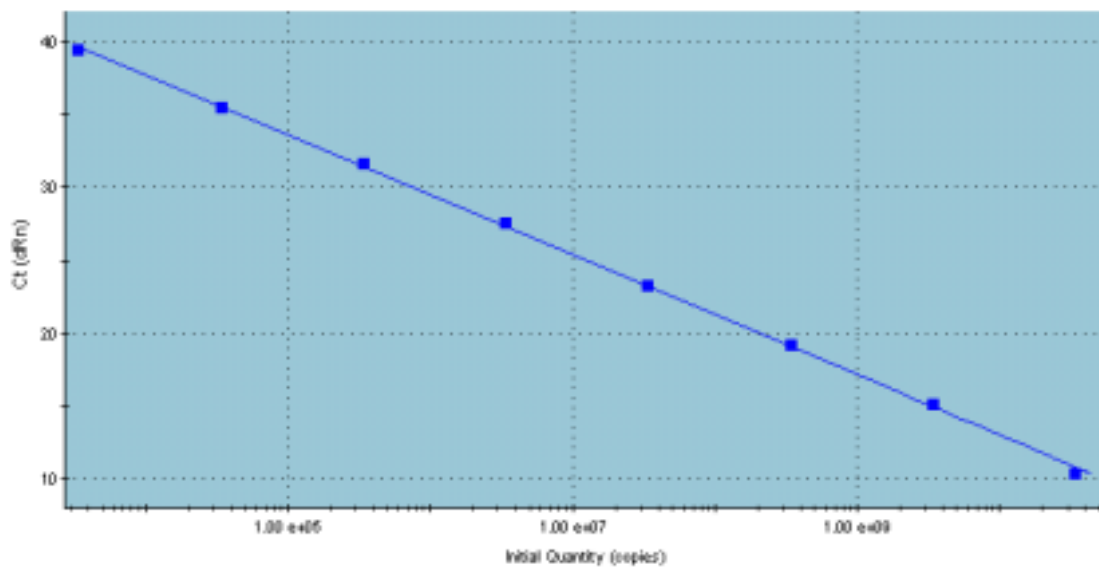
8. Wang WK, Chao DY, Lin SR, King CC, Chang SC: Concurrent infections by two dengue virus serotypes among dengue patients in Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect* 2003;36:89-95.
9. Georgieva J, Milling A, Orfanos CE, Geilen CC: Magnetic bead RT-PCR: establishment of a new method for detecting circulating melanoma cells. *Melanoma Res* 2002;12:309-17.
10. Miyachi H, Masukawa A, Ohshima T, Fusegawa H, Hirose T, Impraim C, Ando Y: Monitoring of inhibitors of enzymatic amplification in polymerase chain reaction and evaluation of efficacy of RNA extraction for the detection of hepatitis C virus using the internal control. *Clin Chem Lab Med* 1998;36:571-5.
11. Levison PR, Badger SE, Dennis J, Hathi P, Davies MJ, Bruce IJ, Schimkat D: Recent developments of magnetic beads for use in nucleic acid purification. *J Chromatogr A* 1998;816:107-11.

圖、表

圖一。轉植登革熱基因到載體後，用限制酶 Bgl II 切，確認登革熱基因是否成功轉植。左邊 lane 為 DNA ladder；中間 lane 為登革熱基因正接到載體中；右邊 lane 為登革熱基因反接到載體中。



圖二。標準曲線。將標準液做十倍序列稀釋後，執行即時定量 PCR 後產生標準曲線。



表一。三種萃取登革熱病毒 RNA 的差異性比較。使用 SAS 軟體,one-way ANOVA 算出 $F=10.32, P<0.0001$, 使用平均值檢定, 檢定人工、磁珠以及濾膜的差異。

方法	人工	磁珠	濾膜
mean±SD (copy number)	34336772±66902948	10749330±28839844	8036719±16986627

表二。三種萃取登革熱病毒 RNA 的再現性比較。

方法	人工	磁珠	濾膜
CV 值	19%	19.03%	19.7%