

建立以即時聚合酶鏈反應技術偵測水禽小病毒

陳燕萍*、李敏旭、李淑慧
行政院農業委員會家畜衛生試驗所

摘要

為建立以即時聚合酶鏈反應偵測水禽小病毒，利用 Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System 配合 SYBR green 方法進行水禽小病毒核酸的偵測，鑑於核酸分子方面分為鵝小病毒與正番鴨小病毒，故試驗中選擇病毒基因保留性較高區域，設計鵝小病毒與正番鴨小病毒專一性之引子，建立以即時聚合酶鏈反應技術偵測水禽小病毒之反應條件，至少可測得至 3 pg 之核酸濃度，較一般 PCR 敏感約 10~100 倍，並建立核酸與循環數之線性關係，可作為核酸標準曲線之參考，進而應用於核酸定量之研究。

關鍵詞：即時聚合酶鏈反應；水禽小病毒；鵝小病毒；正番鴨小病毒

緒言

水禽小病毒感染症 (waterfowl parvovirus infection) 為一高度傳染性與致死性疾病，引起纖維素性與壞死性腸炎，在許多國家都曾發生並造成經濟上的嚴重損失[3]。本病首先被描述於 1956 年發生在中國的鵝隻，1981 年由 Fang 和 Wang 發表[2]，之後並經 Zheng 等確認為鵝小病毒 (goose parvovirus, GPV) 感染[3]。在 1960 年代歐洲地區許多國家先後發生鴨、鵝高死亡率之疾病，直至 1971 年才由 Schettler 證實為小病毒(parvovirus) 感染，1978 年再確認並稱之為鵝小病毒[3]。在台灣，首例鵝小病毒感染症病例於 1983 年被報告[1]；此外，於 1989 年由正番鴨分離到類似鵝小病毒感染症之另一型病毒，稱為正番鴨小病毒 (Muscovy duck parvovirus; MDPV)，MDPV 在宿主性、抗原性及序列上均異於前者。GPV 對鵝及正番鴨均有高病原性，主要病徵為腸炎，感染率及死亡率甚高[3]；MDPV 對鵝隻並無病原性，然所有鴨品系對 MDPV

均有感受性，其特徵為病鴨軟腳及癒後發育不良及短嘴，死亡率也高達 70 % 以上[11]。

水禽小病毒的分離可利用鵝或正番鴨胚胎蛋進行尿囊腔的接種[3]，然鵝或正番鴨有一定之繁殖季節，使其胚胎蛋之取得不易；而本病的監測診斷可利用血清學方法，如 ELISA、膠體沉澱試驗 (agar gel precipitation test) 或中和試驗[4,10]，但是這些方法常無法簡便地進行，且無法達到快速的診斷目的。1980 年代分子生物學的發展提供另一診斷方法，如聚合酶鏈反應 (polymerase chain reaction, PCR) 乃利用偵測病毒專屬的核酸序列達到較為快速的診斷目的[6]。近年更進一步將 PCR 技術與核酸產物熒光的偵測結合在一起，稱為即時聚合酶鏈反應 (real-time PCR)，使得疾病的診斷更為快速且更具敏感性，並可進行其他研究發展[5,8,9]。本計畫即建立以 real-time PCR 偵測水禽小病毒核酸，包括 GPV 與 MDPV，以達到本病之快速診斷。

*抽印本索取作者
行政院農業委員會家畜衛生試驗所

材料與方法

病毒：2002 年於鵝隻分離之 GPV 與 1990 年於正番鴨分離之 MDPV 作為建立 real-time PCR 之陽性核酸對照。收集臨床上水禽小病毒陽性病例之鵝 GPV 病例 3 件與鴨 MDPV 病例 33 件，共 36 件。

病毒核酸之製備：利用 QIAamp DNA Mini Kit 進行病毒核酸之萃取，方法參照產品之操作手冊，此核酸供為 DNA 增幅之模板 (template) 用。以具有 GPV 與 MDPV 特異性之引子，利用 PCR 分別增幅 GPV 與 MDPV 之 DNA 片段，大小分別為約 492 與 362 bp，以 2% 瓊膠 (agarose gel) 進行電泳、切下、純化後重組至 pCR®2.1-TOPO® vector (Invitrogen, California, USA) 中之 cloning site。將重組之質體嵌插至大腸桿菌株中 (Escherichia coli, TOP10, Invitrogen, California, USA)，並於 37°C 培養於含 Ampicillin (100 µg/mL)、0.5 mM IPTG 與 X-gal (80 mg/mL) 之 Luria Broth (LB) 培養基中 18 小時，選取含質體之白色菌落，並以 LB 在 37°C 環境中隔夜增殖培養。以 Mini prep kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) 由菌中純化質體，進行序列分析以確定插入質體之核酸序列。

即時聚合酶鏈反應：依據所設計的引子的參數以及反應結果找出最適合偵測水禽小病毒之即時聚合酶鏈反應 (real-time PCR, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System, ABI PRISM®, Foster City, USA) 條件：50°C 2 分鐘，95°C 10 分鐘，之後再進行 40 個循環之 95°C 15 秒，60°C 1 分鐘。利用 SYBR Green 為螢光進行 real-time PCR，反應液為 SYBR green PCR master mix (250 units AmpliTaq Gold DNA Polymerase, 100 units AmpEase UNG, dNTP mix with dUTP, SYBR green PCR buffer, 25 mM MgCl₂ solution) 25 µL、引子最終濃度為各 300 nM，模板 (template, 即 GPV 或 MDPV 核酸) 1 µL，最後加二次蒸餾水至總體積 50 µL。以 SYBR Green 為螢光之方法中同時進行 dissociation curve 程式，於 real-time PCR 結束後進

行於 20 分鐘期間溫度由 60°C 升高至 95°C，以觀察產物之 T_m 值。反應結束後取 10 µL 之 PCR 產物以 2% 瓊膠進行電泳分離，經 ethidium bromide 染色後於 UV 燈下觀察產物片段大小，以確認結果。

水禽小病毒核酸標準曲線之建立：將所增殖之含插入 GPV 或 MDPV 核酸之質體之大腸桿菌，以 Mini prep kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) 由菌中純化質體後，測其濃度，進行由 10⁰ 至 10⁻⁵ 10 倍連續稀釋，作為 real-time PCR 之模板，以建立 GPV 或 MDPV 核酸之標準曲線。

結果

即時聚合酶鏈反應：依據所設計之引子參數及反應結果找出最適合偵測 GPV 或 MDPV 之 real-time PCR 條件，成功增幅出 PCR 產物片段大小分別約為 492 bp 與 362 bp，將 PCR 陽性的產物以瓊膠電泳分析，也有預期之 DNA 片段，結果如圖 1、圖 2。以 SYBR Green 為螢光方法中同時進行 dissociation curve 程式，結果證實 GPV 或 MDPV 核酸產物具不同之 T_m 值，分別為 81.9°C 與 85.3°C，產物進一步定序確認後也無誤。陰性對照組於 real-time PCR 反應 40 個循環時，螢光強度皆無顯著上升，如圖 1。以臨床水禽小病毒陽性病例之 GPV 與 MDPV 核酸進行檢測，當螢光呈陽性時，所得 PCR 循環數為 12 ~ 35。共檢測 36 件陽性病例，其結果均為陽性。

即時聚合酶鏈反應之敏感度：將所增殖之含插入 GPV 或 MDPV 核酸之質體之大腸桿菌，由菌中純化質體後，經 10 倍連續稀釋，可得核酸濃度分別為 3×10⁻² ~ 3×10⁻⁶ 與 7×10⁻² ~ 7×10⁻⁵ µg/µL，作為即時聚合酶鏈反應之模板，用以進行敏感度測試，顯示在所稀釋之核酸濃度間，均可得一線性關係，所得 GPV 或 MDPV 核酸之線性關係曲線之相關係數分別為 0.999 與 0.997，見圖 3 與圖 4。

討論

Real-time PCR 為一新興技術，但已廣泛應用於分子生物領域，於設計良好之條件下，real-time PCR 的敏感度較傳統 PCR 高。本試驗中所建立之 GPV 或 MDPV 核酸之 real-time PCR 敏感度皆可達到 pg 之為量 DNA，較一般 PCR 方法之敏感度高約 10~100 倍 [6]。實驗中使用 Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System 進行 real-time PCR，可省去了傳統 PCR 之後所必須的瓊膠電泳分析，不但可以節省等待結果的時間，也可降低因跑膠時 DNA 污染而導致誤判的可能性，但整個反應所需時間仍幾近 2 小時，雖較其他機型所需較久時間，如 Roche LightCycler 儀器，進行 40 個循環僅需不到 1 小時之時間，惟其操作過程較為繁雜，且反應條件較難掌握。

在實際應用上，由於鴨對於 GPV 與 MDPV 此兩種病毒均具有高感受性，且臨床症狀均為腸炎，若利用此 real-time PCR 技術依據不同之 T_m 值，可將兩種病毒做快速而明確之區分，而專一性引子所增幅出之不同長度之核酸片段，又可再進行後續之電泳及核酸定序來做確認，因此本診斷技術可實際應用於臨床之診斷。

本研究成功的建立以 real-time PCR 技術偵測 GPV 或 MDPV 核酸，以核酸各稀釋濃度所得之反應循環數之線性關係，亦可作為定量 PCR 之核酸標準曲線。核酸標準曲線之建立，不僅可進行未知濃度核酸之定量，更可提供未來研究之發展基礎。

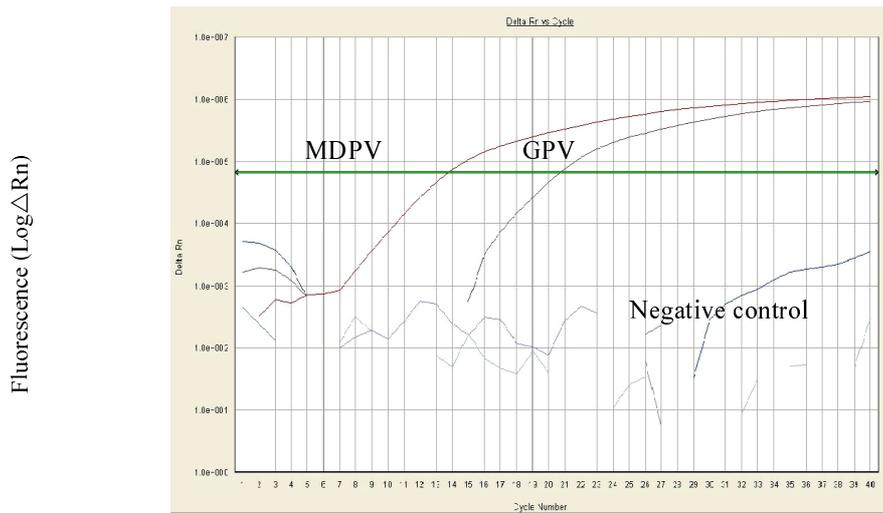


圖 1、以 SYBR Green 為螢光所進行 real-time PCR 之螢光強度與 PCR 循環數作圖，可見陰性對照組於 real-time PCR 反應 40 個循環時，螢光強度並無上升。MDPV 及 GPV 分別為置入質體上之陽性對照。

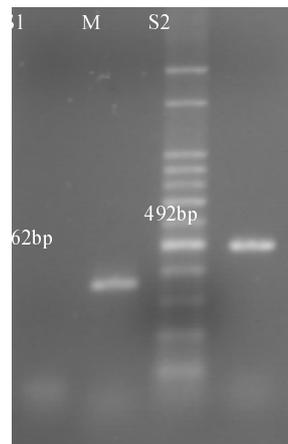


圖 2、以 real-time PCR 偵測 GPV 或 MDPV 核酸所得產物經 2% 瓊膠進行電泳分析，產物片段大小約為 492 bp 與 362 bp。M 為 100bp marker，S2 為 GPV 核酸產物，S1 為 MDPV 核酸產物，NC 為陰性對照。

建立以即時聚合酶鏈反應技術偵測水禽小病毒

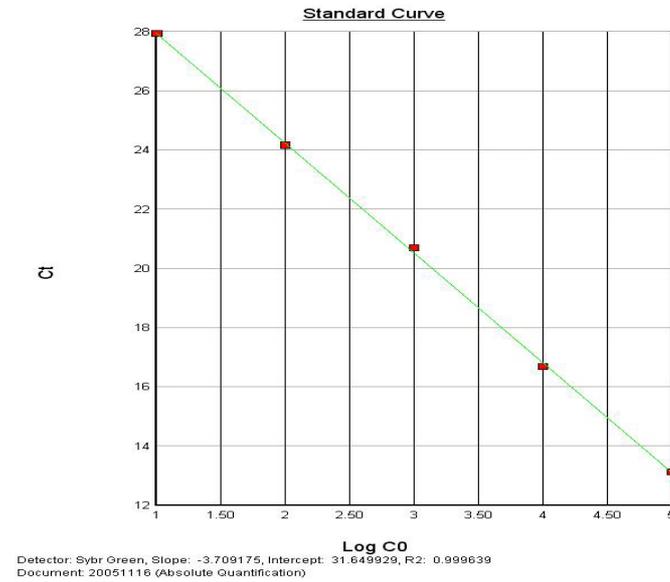
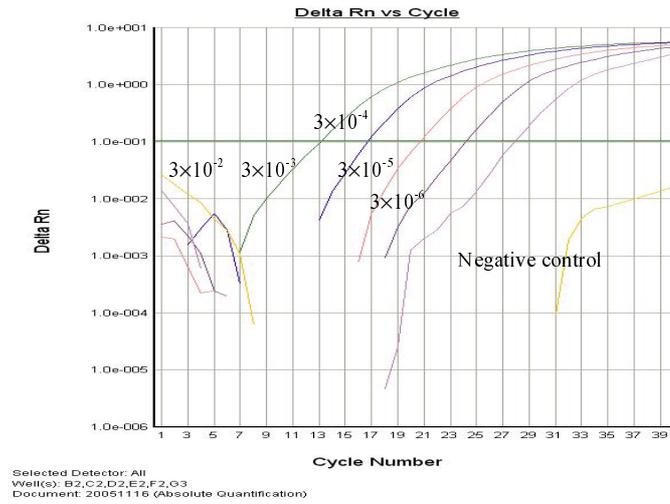


圖 3、以 SYBR Green 為螢光所進行 GPV 之 real-time PCR，上圖為螢光強度與 PCR 循環數作圖，核酸濃度分別為 $3 \times 10^{-2} \sim 3 \times 10^{-6} \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ；下圖為病毒核酸進行 real-time PCR 之線性關係曲線，相關係數為 0.999。

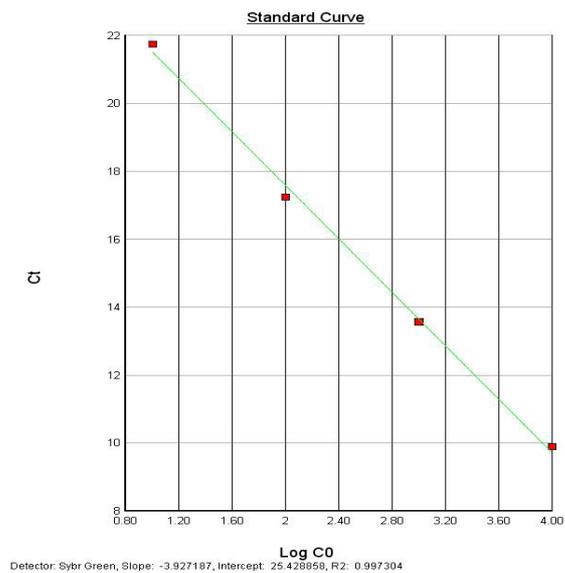
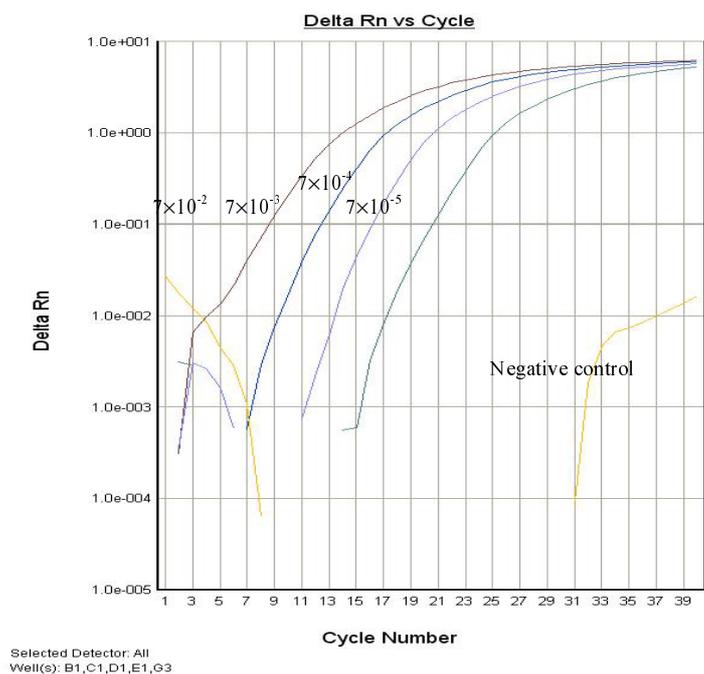


圖 4、以 SYBR Green 為螢光所進行 MDPV 之 real-time PCR，上圖為螢光強度與 PCR 循環數作圖，核酸濃度為 $7 \times 10^{-2} \sim 7 \times 10^{-5} \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ；下圖為病毒核酸進行 real-time PCR 之線性關係曲線，相關係數為，相關係數為 0.997。

參考文獻

1. 張照夫、蔡信雄、尤碧豔。肆虐本省之鵝病毒性腸炎。台灣畜牧獸醫學會會報 42; 37-46, 1983
2. Fang DY and Wang YK. Studies on the etiology and specific control of goose parvovirus infection. *Sci Agric Sin* 4: 1-8, 1981
3. Gough RE. Goose parvovirus infection. In: B.W.Calnek, H.J. Barnes, C. W. Beard, W. M. Reid and H.W. Yoder, Jr. eds. *Diseases of poultry*, 10th ed p777-783. Iowa State University Press. Ames, Iowa. 1997
4. Gough RE, Spackman D, Collins MS. Isolation and characterization of a parvovirus from goslings. *Vet Rec* 108: 399-340, 1981
5. Kim Y, Gharaibeh SM, Stedman NL, Brown TP. Comparison and verification of quantitative competitive reverse transcription polymerase chain reaction (QC-RT-PCR) and real time RT-PCR for avian leukosis virus subgroup J. *J Virol Methods* 102:1-8, 2002
6. Limn CK, Yamada T, Nakamura M. Detection of goose parvovirus genome by polymerase chain reaction: distribution of goose parvovirus in Muscovy ducklings. *Virus Res* 42: 167-172, 1996
7. Mahy BW, Kangro HO. Primary isolation of viruses. In: *Virology methods manual*. P26-32, 1996
8. Markowski-Grimsrud CJ, Miller MM, Schat KA. Development of strain-specific real-time PCR and RT-PCR assays for quantitation of chicken anemia virus. *J Virol Methods* 101: 135-147, 2002
9. Moody A, Sellers S, Bumstead N. Measuring infectious bursal disease virus RNA in blood by multiplex real-time quantitative RT-PCR. *J Virol Methods* 85: 55-64, 2000
10. Takehara K, Hyakutake K, Imamura T, Mutoh K, Yoshimura M. Isolation, identification, and plaque titration of parvovirus from Muscovy ducks in Japan. *Avian Dis* 38: 810-815, 1994
11. Woolcock PR, Jestine V, Shivaprasad HL. Evidence of Muscovy duck parvovirus in Muscovy ducklings in California. *Vet Rec* 146: 68-72, 2000

Detection of Waterfowl Parvovirus with Real-time Polymerase Chain Reaction

Chen YP *, Lee MS, Lee SH

Animal Health Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan

Abstract The purpose of the study was to develop the assay of detection of waterfowl parvovirus with real-time polymerase chain reaction by proceeding with the Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System coupled with SYBR green. Waterfowl parvovirus was subdivided into goose parvovirus and Muscovy duck parvovirus. According to the conserved region of GPV and MDPV respectively, the specific primers were designed for real-time PCR. The constructed real-time PCR assay has a detection limit of 3 pg. The sensitivity was 100-fold higher than common PCR. The developed linear relationship between concentration of nucleic acid and cycle numbers of reaction was could be the base of the standard curve of nucleic acid, and further, it could be applied for quantifying the nucleic acid.

Keywords: Real-time polymerase chain reaction, Waterfowl parvovirus, Goose parvovirus, Muscovy duck parvovirus