

臺灣石斑魚虹彩病毒以即時定量聚合酶連鎖反應檢驗方法之建立

鄭金華、王威鈞

水產試驗所東港生技研究中心

前言

虹彩病毒科 (Iridoviridae) 是一個龐大的雙股 DNA 病毒家族，可分為五個主要屬，分別為虹彩病毒屬 (*Iridovirus*)、綠虹彩病毒屬 (*Chloriridovirus*)、蛙病毒屬 (*Ranavirus*)、淋巴囊腫病毒屬 (*Lymphocystivirus*) 和巨大細胞病毒屬 (*Megalocytivirus*)。每個屬的病毒所感染的宿主種類和範圍皆不同，虹彩病毒屬和綠虹彩病毒屬主要感染宿主為無脊椎動物，其餘則主要感染冷血的脊椎動物。巨大細胞病毒屬係近年內獨立出來的，其中最常見的病毒種為嘉鱻虹彩病毒 (red sea bream iridovirus, RSIV)、傳染性脾臟與腎臟壞死病毒 (infectious spleen and kidney necrosis virus, ISKNV)。過去十幾年來，亞洲地區養殖魚類飽受虹彩病毒的肆虐，除了上述常見的 RSIV 和 ISKNV 外，還鑑定出其他結構類似於 RSIV 的病毒，包括臺灣石斑魚虹彩病毒 (Taiwan grouper iridovirus, TGIV) (Chao et al., 2004)、大菱魷紅體病虹彩病毒 (turbot reddish body iridovirus, TRBIV) (Shi et al., 2004)、條石鯛虹彩病毒 (rock bream iridovirus, RBIV) (Go et al., 2006) 和短鯛虹彩病毒 (dwarf gourami iridovirus, DGIV)。

虹彩病毒的主要外鞘蛋白 (major capsid

protein, MCP) 為一序列上具有高度保留的基因，約佔整個病毒粒子的 45% (Williams et al., 1996)。由於 MCP 基因的高度保留性，使其成為一個研究虹彩病毒親源關係時很好的目標。Caipang et al. (2003) 利用 MCP 基因做為模板，發展出一套 SYBR 系統的 Real-Time PCR 檢驗方法，用來偵測 RSIV。此外，Gias et al. (2011) 發展出可偵測除了 TGIV 之外的 *Megalocytivirus*。Wang et al. (2009) 收集自養殖龍膽、尖吻鱸、平鯛和金錢仔樣本所分離到的虹彩病毒，以 MCP 基因序列進行親緣分析，發現這些病毒與 RSIV 較接近。Huang et al. (2011) 收集 2001—2009 年臺灣地區感染虹彩病毒的魚樣本，將病毒分離後，以同樣具有高度保留性的 MCP 和 ATPase 基因進行親緣分析，同樣也發現臺灣養殖魚類所感染的虹彩病毒和 RSIV 較相近。Leu et al. (2013) 發現 GIV 的致死率較 TGIV 高。TGIV 於 1995 年發現，臨床症狀包括貧血及游泳時呈現原地打轉的狀態，感染後兩個禮拜內的死亡率高達 100%。Chao et al. (2004) 發現 TGIV 的 ATPase 序列和 ISKNV 的 ATPase 序列具有 99.9% 相似度。本研究以 ISKNV 的 ATPase 做為模板，設計出 Real-Time PCR 用的引子和探針，期能完整建構 TGIV 的 Real-Time PCR 檢驗方法。

材料與方法

一、樣品收集

A 和 B 為本所水產養殖組張志堅助理研究員所提供確受虹彩病毒感染之樣品，C–G 樣品皆為本中心飼養的點帶石斑，C–E 樣品為一吋魚苗，F 樣品為卵，G 樣品為精液。

二、PCR 引子之設計

以 Infectious spleen and kidney necrosis virus ATPase gene for adenosine triphosphatase, complete cds (AB669097) 為模板，利用 Primer Express 3.0 (ABI) 軟體設計引子，所設計出來的序列為：TGIVq-F:5'-GCA-TGG-ATA-ACG-CCA-AGA-TGT-3'；TGIVq-R:5'-ATA-CAA-CAC-CTC-AGG-CTG-GC-3'；TGIVq-P:FAM-5'-CAC-GAG-GCC-GTC-ATG-GAC-CTG-TTC-3'-TAMRA。

三、樣品 DNA 之萃取

以 DNA Extraction Kit (購自 GeneReach) 萃取樣品之 DNA。將樣品置於 1.5 ml 的離心管中，加入 600 μ l DTAB 溶液，利用研磨棒將樣品磨碎，於 75°C 乾浴槽中加熱 5 分鐘，冷卻後加入 700 μ l 氯仿，震盪均勻，以 13,000 rpm 離心 5 分鐘。在新的 1.5 ml 離心管中加入 100 μ l CTAB 和 900 μ l ddH₂O，加入離心完成後的上清液，震盪均勻，置於 75°C 乾浴槽中加熱 5 分鐘，冷卻後以 13,000 rpm 離心 10 分鐘。去除上清液，加入 150 μ l Dissolving Solution，震盪均勻，於 75°C 乾浴槽中加熱 5 分鐘，以 13,000 rpm 離心 5 分鐘。收集上清液加入含有 300 μ l 95% 酒精之離心管中，震盪均勻，以 13,000 rpm 離心 5 分鐘，去除上清液。加入 75% 酒精 200 μ l，混合均勻，以

13,000 rpm 離心 5 分鐘後，去除上清液，真空抽乾。加入適量 TE 緩衝液回溶沉澱物，保存於 -20°C 中備用。

四、巢式聚合酶連鎖反應

利用 Chao et al. (2002) 所設計之引子 CY15n 和 RY16n，進行巢式聚合酶連鎖反應 (Nested polymerase chain reaction, Nested PCR)。引子序列如下：CY15n-F (5'-GCC GCA AAT GAG CGA CCT AC-3')、CY15n-R (5'-GCG TGA GCG TCT TCT CGT CC-3')、RY16n-F (5'-GGT ATA TGA GCA AGC GAT GGA C-3') 和 RY16n-R (5'-TGG AGT GCC ATA CAG GAT G-3')。在 PCR 管中加入 12.5 μ l 的 PCR master mix (購自 Promega)、2.5 μ l 的 CY15n-F (10 μ M)、2.5 μ l 的 CY15n-R (10 μ M)、6.5 μ l 的 ddH₂O 和 10 ng 的樣品 DNA，混合均勻後，置入 GeneAmp PCR System 9700 (ABI) 中，反應條件為：94°C、3 分鐘；30 個循環 (94°C、1 分鐘、60°C、1 分鐘、72°C、1 分鐘)；72°C、7 分鐘。完成後取出 1 μ l 的 PCR 產物，加入已含有 12.5 μ l 的 PCR master mix、2.5 μ l 的 RY16n-F (10 μ M)、2.5 μ l 的 RY16n-R (10 μ M)、6.5 μ l 的 ddH₂O 之 PCR 管中，混合均勻，置入 GeneAmp PCR System 9700 (ABI) 中，反應條件為：94°C、3 分鐘；30 個循環 (94°C、1 分鐘；60°C、1 分鐘；72°C、1 分鐘)；72°C、7 分鐘。完成後取出以 1.5% 的 Agarose gel 進行電泳分析，產物大小約 305 bp。

五、病毒標準品之構築

取以 nested PCR 確受 TGIV 病毒感染之樣品 DNA，加入已含有 12.5 μ l 的 PCR master mix (購自 Promega)、2.5 μ l 的 TGIVq-F (10

μM)、2.5 μl 的 TGIVq-R (10 μM)、6.5 μl 的 ddH₂O 之 PCR 管中，反應條件為：95°C、5 分鐘；35 個循環 (95°C、30 秒、60°C、30 秒、72°C、30 秒)；72°C、7 分鐘，以 2% 的 Agarose gel 檢視 PCR 產物。利用 HighYield Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (購自 Yeastern Biotech) 進行 PCR 產物之純化。先將所需 DNA 片段切下約 300 mg 的膠體，加入 500 μl 的 DF buffer，於 55°C 中加熱 15 分鐘至膠體完全溶解，冷卻至室溫後將樣品溶液移置濾膜離心管柱中，以 16,000 g 離心 30 秒，去除過濾液。加入 400 μl 的 W1 Buffer 到濾膜離心管中以 16,000 g 離心 30 秒，去除過濾液。加入 600 μl 的 Wash Buffer 到濾膜離心管中，先靜置 1 分鐘，再以 16,000 g 離心 30 秒，去除過濾液。將濾膜離心管以 16,000 g 離心 5 分鐘，去除剩餘液體。移置濾膜離心管於 1.5 ml 離心管中，加入 50 μl 的 Elution Buffer 或滅菌水於濾膜離心管柱中心部分，靜置 2 分鐘，以 16,000 g 離心 2 分鐘，回收的 PCR 產物移至新的 1.5 ml 離心管中。利用 yT&A Cloning Vector Kit (購自 Yeastern Biotech) 進行接合反應，取 0.5 g 回收的 DNA 於 1.5 ml 離心管中，加入接合反應液混合均勻，室溫靜置 20 分鐘，再放置於 4°C 中 16 小時。取 2 μl 接合反應物與 100 μl 的 ECOS 101 勝任細胞 [DH5 α] (購自 Yeastern Biotech) 混合，取 30 μl 混合菌液塗於含 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ampicillin、LB 培養基上。將培養基於 37°C 中培養 16 小時，挑取單顆菌落至 5 ml 含 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ampicillin LB 培養液，37°C 培養 16 小時，以 10,000 g 離心分離菌體，去除上清液。利用 FavorPrep Plasmid DNA Extraction

Mini Kit (購自 Favorgen) 抽取質體，取 200 μl FAPD1 Buffer 與菌體混合均勻，再加 200 μl FAPD2 Buffer 混合均勻，於室溫下靜置 2 分鐘，再加入 300 μl FAPD3 混合均勻，以 16,000 g 離心 5 分鐘。吸取上清液置入濾膜離心管柱中以 10,000 g 離心 30 秒，去除過濾液，加入 400 μl W1 Buffer 至濾膜離心管柱中，以 10,000 g 離心 30 秒，去除過濾液，加入 600 μl Wash Buffer 至濾膜離心管柱中以 10,000 g 離心 30 秒，去除過濾液。將濾膜離心管再以 10,000 g 離心 3 分鐘，去除剩餘液體，移置濾膜離心管至新離心管中。吸取 50 μl Elution buffer 至濾膜離心管柱濾膜上靜置 2 分鐘，再 10,000 g 離心 1 分鐘後，質體 DNA 移至新離心管中。測定質體 DNA 濃度，換算成 Copy number/ml 即成 TGIV 之標準品。以上述構築之標準品建立 TGIV 標準曲線。將標準品稀釋成 10^8 、 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 、 10^1 等 8 種不同濃度拷貝數，以每個濃度二重覆進行 Real-Time PCR 分析。

六、聚合酶連鎖反應 (PCR)

利用自行設計之引子和探針：TGIVq-F 和 TGIVq-R 和 18S 特異性引子對進行 PCR 反應。在 PCR 管中加入 12.5 μl 的 PCR master mix (購自 Promega)、1 μl 的 TGIVq-F (6 μM)、1 μl 的 TGIVq-R (6 μM)、9.5 μl 的 ddH₂O 和 10 ng 的樣品 DNA，混合均勻後，置入 GeneAmp PCR System 9700 (ABI) 中，反應條件為：94°C、5 分鐘；35 個循環 (94°C、30 秒、60°C、30 秒、72°C、30 秒)；72°C、7 分鐘。完成後取出以 1.5% 的 Agarose gel 進行電泳分析，產物大小為 139 bp 和 186 bp。

七、即時定量聚合酶連鎖反應

利用自行設計之引子和探針：TGIVq-F、TGIVq-R 和 TGIVq-P 進行即時定量聚合酶連鎖反應 (Real-Time PCR)。在 PCR 管中加入 12.5 μ l 的 FastStart Universal Probe Master (ROX) (購自 Roche)、1 μ l 的 TGIVq-F (6 M)、1 μ l 的 TGIVq-R (6 μ M)、1 μ l 的 TGIVq-P (3 μ M)、6 μ l 的 ddH₂O 和 10 ng 的樣品或標準品 DNA，混合均勻後，置入 StepOne Real-Time PCR 機器中，反應條件為：95°C、10 分鐘；40 個循環的 (95°C、15 秒、60°C、1 分鐘)。完成後以 StepOne Software v2.1 軟體進行分析。

八、靈敏度測試

將 10¹ 濃度之標準品分別稀釋至 7.5、5、2.5 和 1 個拷貝數，以每個濃度二重覆的方式進行 Real-Time PCR 分析。

九、WSSV 和 IHNV 病毒 DNA 萃取

取部分本所保存確受白點症病毒 (white spot syndrome virus, WSSV) 和造血組織壞死症病毒 (infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus, IHNV) 感染之白蝦組織樣品，利用上述 DNA 之萃取方法抽取樣品之 DNA，保存於 -20°C 中備用。

結果與討論

欲建立檢測 TGIV 的 Q-PCR 方法，首先必須篩選出確定受 TGIV 感染的樣品，為達成此目的，以 Chao et al. (2002) 的 CY15n 和 RY16n 兩組引子對作為診斷受 TGIV 感染之標準，RY16n 的 PCR 產物為 305 bp，如圖 1 所示，只有樣品 A 和 B 出現約 305 bp 的產物，與 RY16 引子對所產生之產物吻合，樣

品 A 之 PCR 產物較多，表示樣品 A 受 TGIV 感染之情形較嚴重，樣品 C 至 G 皆無 305 bp 之產物，綜合上述結果可知樣品 A 和 B 受 TGIV 感染，其他樣品則無受到 TGIV 感染。



圖 1 以 Nested PCR 篩選受 TGIV 感染之樣品 (A 及 B: 感染 TGIV 之石斑組織; C-E: TGIV-free 石斑幼苗; F: TGIV-free 石斑精液; G: TGIV-free 石斑卵)

篩選出受 TGIV 感染之樣品後，接著設計引子對及探針，但由於 TGIV 之完整病毒序列尚未有文獻報告，且 Chao et al. (2004) 發現 TGIV 的 ATPase 序列和 ISKNV 之序列極為相似，故本實驗中以 ISKNV 的 ATPase 序列為模板，利用 Primer Express 3.0 (ABI) 軟體設計引子對和探針，引子對為 TGIVq-F 和 TGIVq-R，探針為 TGIVq-P。為確認此引子對可辨識 TGIV 感染的樣品，我們先將收集的 7 個樣品以此引子對進行聚合酶連鎖反應。TGIVq-F 和 TGIVq-R 產生的 PCR 產物為 139 bp，只有樣品 A 和 B 出現約 139 bp 之產物，和 TGIVq 引子對所產生的產物大小吻合，樣品 C 至 G 皆無 139 bp 之產物。另外，為排除上述結果是因未萃取出 DNA 所致，將收集之 7 個樣品以 18S 的特異性引子對進行聚合酶連鎖反應，18S 引子對的 PCR 產物為 186 bp，從圖 2 的結果顯示，樣品 A 至 G 皆清楚出現 186 bp 之產物，說明這些樣品中皆有 18S 的存在。證實所設計出之引子對可辨識 TGIV 之感染，接著以 TGIVq 引子對構築 TGIV 病毒之標準品建立 TGIV 標準曲線。將 8 種不同濃度 (10⁸、10⁷、10⁶、10⁵、10⁴、10³、10²、10¹ 拷貝數) 的標準品，以每

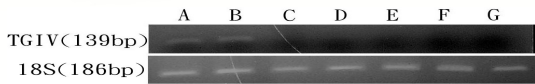


圖 2 以 Real-Time PCR 引子 TGIVq-F 及 TGIVq-R 確認受 TGIV 感染之樣品 (A 及 B: 感染 TGIV 之石斑組織; C-ETGIV-free 石斑幼苗; F: TGIV-free 石斑精液; G: TGIV-free 石斑卵)

個濃度二重覆進行 Real-Time PCR 分析。圖 3A 為增幅曲線、3B 為標準曲線，迴歸曲線公式 $y = -3.5679x + 38.73$ ， R^2 可達到 0.994。

為測試此法之靈敏度，將 4 種不同濃度 (7.5、5、2.5 和 1 個拷貝數) 的標準品，以每個濃度二重覆進行 Real-Time PCR 分析。圖 4A 為增幅曲線、4B 為標準曲線。以 $10^3 - 10^1$ 個拷貝數所呈現的標準曲線 R^2 為 0.996， $10^3 - 7.5$ 個拷貝數所呈現的標準曲線 R^2 為 0.994， $10^3 - 5$ 個拷貝數所呈現的標準曲線 R^2 為 0.984， $10^3 - 2.5$ 個拷貝數所呈現的標準曲線 R^2 為 0.981， $10^3 - 1$ 個拷貝數所呈現的標準曲線 R^2 也為 0.981，迴歸曲線公式 $y = -3.605x + 37.906$ 。當標準曲線濃度低至 5 個拷貝數時， R^2 只有 0.984，低於 0.99，且由

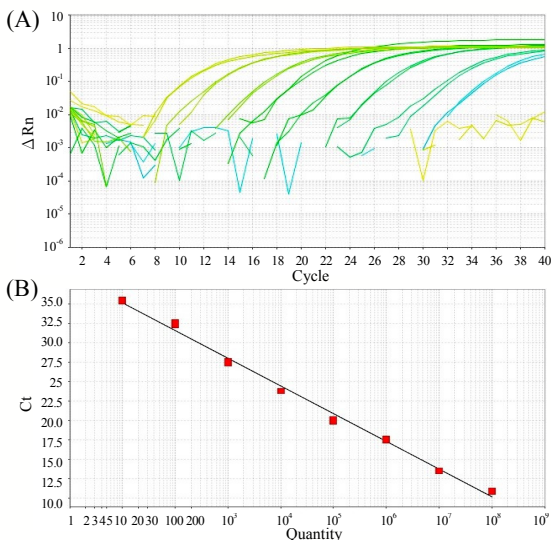


圖 3 以 TGIV-clone standard (plasmid with 139 bp insect) 之增幅曲線(A)和標準曲線(B)

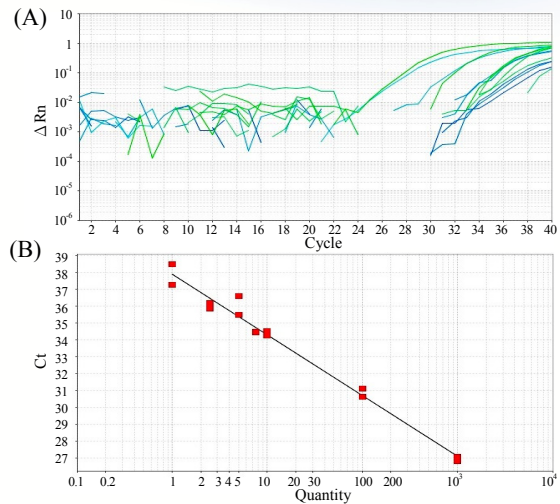


圖 4 以 TGIV-clone standard (plasmid with 139 bp insect) 之增幅曲線(A)和標準曲線(B)

圖 4B 可發現濃度為 5 個拷貝數以下，標準品的點已明顯偏離標準曲線，且二重覆之 Ct 值也明顯有差距，5 個拷貝數之樣品二重覆間其 Ct 值分別為 35.5 和 36.6，相差了 1.1，1 個拷貝數之樣品二重覆間其 Ct 值分別為 37.3 和 38.5，相差了 1.2，綜上結果判斷此法之最低靈敏度為 7.5 個拷貝數。

為測試此方之特異性，我們挑選 WSSV 和 IHNV 二個常見的 DNA 病毒進行測試，加上所收集的 7 個樣品，以每個樣品二重覆進行 Real-Time PCR 分析，藉此觀察此法之特異性。圖 5A 為增幅曲線、5B 則為各樣品之 Ct 值。WSSV 和 IHNV 的 DNA 在此方法其 Ct 值大於 40，判斷為未偵測，表示此法不會辨識此二種病毒之 DNA，具有特異性。7 個樣品中只有樣品 A 和 B 有反應，樣品 A 的 Ct 值為 23 和 24，經由標準曲線分析後之病毒量為 7683.7 和 4470.8 個拷貝數，樣品 B 的 Ct 值為 24.8 和 24.5，經由標準曲線分析後之病毒量為 2962.2 和 3353.5 個拷貝數。樣品 A 所含之 TGIV 病毒量較樣品 B 高，

和圖 1 中 nested PCR 結果吻合，由上述結果證明此法具特異性，只會偵測 TGIV，且可明顯分辨病毒感染嚴重度之高低。

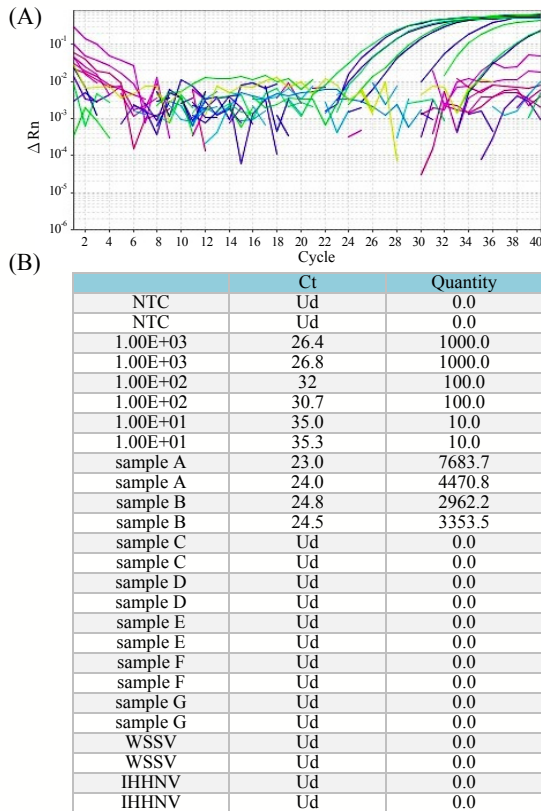


圖 5 以 TGIV-clone standard (plasmid with 139 bp insect) 之增幅曲線(A)和 Ct 值(B) (稀釋濃度分別為 10^3 、 10^2 、 10^1 之石斑魚樣品 A-G 和 WSSV 及 IHHNV)

本實驗中成功利用 Real-Time PCR 建立一個快速且靈敏度高的 TGIV 檢測方法，首先，透過 Chao et al. (2002) 的方法，篩選出被 TGIV 感染之樣品，利用此樣品驗證設計好的 TGIV 引子可辨識 TGIV 感染之樣品，再以感染樣品之 DNA 作為模版，構築 Real-Time PCR 所需之病毒標準品，將標準品稀釋後，建立 TGIV 標準曲線，將標準品濃度稀釋最低至 1 個拷貝數，發現當標準品稀釋至 5 個拷貝數以下時， R^2 值會低於 0.99，不符

合標準曲線要求，且二重覆樣品間 Ct 值明顯有差距，證明此法偵測之最低極限為 7.5 個拷貝數。此外，以其他同為 DNA 病毒之樣品測試此法的特異性，證明只對 TGIV 有特異性，且能夠有效辨別出樣品感染量的差距。

Chao et al., (2002) 首先提出以 Nested PCR 檢驗 TGIV 感染，其方法最低靈敏度為 0.05 fg (femtograms)。Gias et al. (2011) 利用 MCP 基因做為模板，發展出一套利用 SYBR 系統檢驗 megalocytiviruses 方法，可用來檢驗 RSIV 和 ISKNV，其靈敏度為 10 fg，1 fg 等於 10^{-15} g，也就是其靈敏度相當於 10^{-5} ng，本實驗中所建立的方法最低靈敏度為 7.5 個拷貝數，經由換算相當於 10^{-9} ng，因此和上述方法比較，本方法所能偵測的最低靈敏度較低。除此之外 Nested PCR 所需時間也較長，須耗時 2 小時以上，但透過本方法利用 Real-Time PCR，所需時間相對較短，約 1 小時即可完成。

本實驗中之引子對是利用 ATPase 為模板所設計的，ATPase 和 MCP 的序列都具有高度保留性 (Whittington et al., 2010)，此一特點可利用在疫苗開發上。Dang et al. (2008) 利用 MCP 為目標以 RNA 干擾 (RNAi) 的方式抑制 MCP 基因的表現量，在 96 小時後達到 97.1% 的抑制效果，進而破壞 RSIV 的複製。此外也可利用 ATPase 序列的高度保留性，開發出能同時偵測各種 megalocytiviruses 的檢驗方法，所用之引子經 BLAST 比對後，除能辨識 ISKNV 外，RSIV 和 GIV 等病毒的 ATPase 序列也都和此引子對之序列互補，顯示此引子對能同時偵測這些病毒的可能性，但仍需未來進一步的測試。