

出國報告（出國類別：研習）

重組豬瘟病毒製備技術研習

Recombinant classical swine fever virus technology study

服務機關：家畜衛生試驗所

姓名職稱：林育如助理研究員

派赴國家：日本

出國期間：102年11月24日～102年11月30日

報告日期：102年3月3日

目次

一	目的	2
二	行程與工作紀要	3
三	研習機構介紹	4
四	研習內容重點摘要	6
	體外重組 RNA 轉錄	7
	重組 RNA 的細胞轉染作用	8
	重組豬瘟病毒篩選	9
五	心得及建議	11
	附件一	13
	附件二	14
	附件三	15

一、目的

豬瘟(Classical swine fever; Hog cholera)乃台灣豬隻重要之惡性傳染病，是由豬瘟病毒(Classical swine fever virus)所引起之高傳染性與高致死性疾病，一旦爆發疫情常造成畜主之嚴重損失。台灣自1950年代開始使用弱毒株兔化豬瘟病毒(Lapinization Philippine Coronel, LPC)免疫，雖然將疫情由原先的8.13%降低到0.02%，但零星之嚴重爆發一直存在。我們對於豬瘟病毒方面之研究成果包括：(1)田間流行之豬瘟病毒株基因分析；(2)不同基因型豬瘟病毒之毒力研究；(3)不同基因型豬瘟E2糖蛋白分析；(4)豬瘟病毒次單位疫苗之研發。

對於不同基因型病毒對於豬隻之影響，礙於實驗室進行重組豬瘟病毒之技術尚未建立，現階段無法進行更深入之探討。因此向北海道大學Dr.Sakoda實驗室研習重組豬瘟病毒製備技術，本次研修之重點項目，包括有體外重組RNA轉錄，重組RNA的細胞轉染作用及重組豬瘟病毒篩選。期望未來能夠進一步利用重組豬瘟病毒技術，探討不同基因型別豬瘟病毒致病機轉。並將此一技術擴展，以作為新一代重組病毒疫苗研發基礎

二、行程與工作紀要

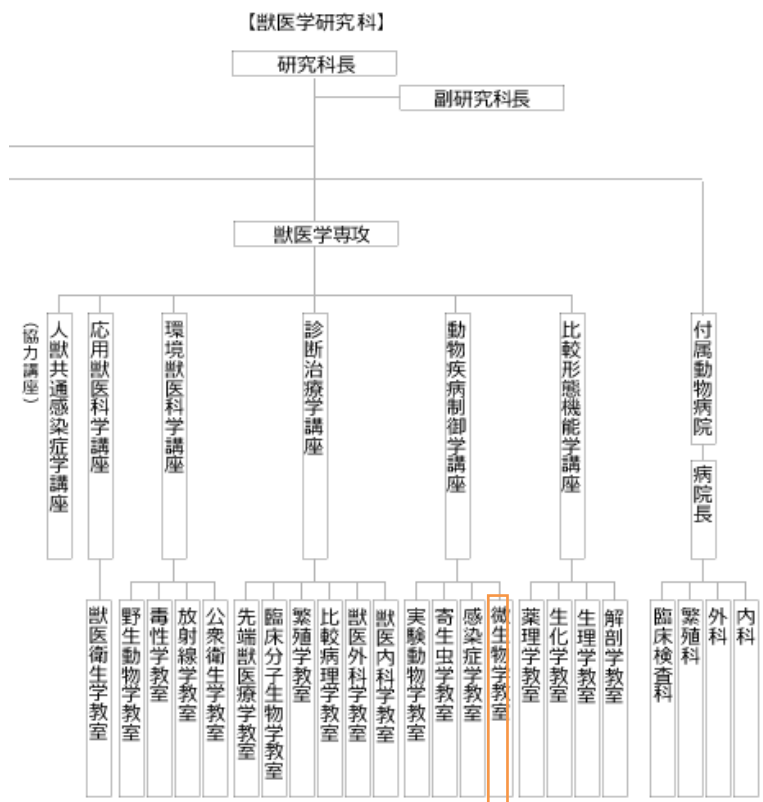
日期	工作記要
11月24日	桃園中正國際機場搭機飛往日本北海道札幌市 (Sapporo, Hokkaido) 新千歲 (New Chitose Airport) 國際機場。
11月25日	重組 RNA 的細胞轉染作用 (I)
11月26日	體外重組 RNA 轉錄 專題報告
11月27日	體外重組RNA轉錄，重組RNA的細胞轉染作用(II)
11月28日	實驗討論
11月29日	重組豬瘟病毒篩選 (免疫染色) 參訪北海道大學人畜共通感染症研究中心
11月30日	札幌新千歲國際機場搭機返國

三、研習機構介紹

北海道大學位於日本北海道札幌市市中心，創立於 1876 年，舊稱為札幌農學院，並於 1947 年改稱為北海道大學。獸醫學研究所 (Graduate school of veterinary medicine)(圖一)共有六個部門，分別有獸醫臨床醫學(veterinary clinical sciences)、疾病控制學(disease control)、生物醫學(biomedical sciences)及環境獸醫學(environmental veterinary sciences)、應用獸醫學(applied veterinary sciences)及獸醫教學醫院(veterinary teaching hospital)。疾病控制部門包括四個研究室，微生物學研究室、傳染病研究室、寄生蟲學研究室及實驗動物學研究室(圖二)。每一研究室原則上有一位教授、一位副教授及一位助理教授。本次前往研習的地點為北海道大學獸醫學研究所疾病控制學系的微生物學研究室，實驗室負責人為特任教授喜田宏(Hiroshi Kida)先生。喜田教授建立的禽流感實驗室，該實驗室為 OIE 認可禽流感參考實驗室之一，喜田教授同時也是現任人畜共通傳染病控制研究中心 (Research Center for Zoonosis Control)主任。該實驗的副教授迫田義博(Yoshihiro Sakoda)先生，研究主題除了禽流感病毒外，尚包含 pestivirus，包括牛病毒性下痢及豬瘟病毒的基因分析與致病機制研究。



圖一、北海道大學獸醫學研究所



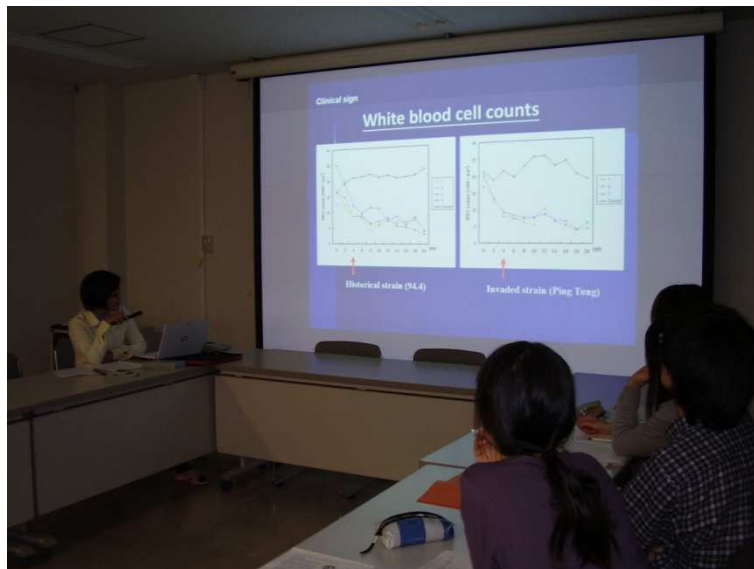
圖二、獸醫學研究所組織

四、研習內容重點

[1] 專題報告及研習內容討論

北海道大學微生物學實驗室共有三位負責人，分別為教授喜田宏（Hiroshi Kida）、副教授迫田義博（Yoshihiro Sakoda）及助理教授岡松正敏（Masatoshi Okamatsu）。本次研習行程由 Dr. Yoshihiro Sakoda 安排，並委由學生安部優里(Yuri Abe)及峯淳貴(Mine Junki) 負責教導相關重組豬瘟病毒製備技術，包括體外重組 RNA 轉錄、重組 RNA 的細胞轉染作用及重組豬瘟病毒篩選等。

為了解未來研究的方向及建立研究交流，促進兩國間學術合作等。Dr. Yoshihiro Sakoda 邀請筆者針對台灣豬瘟疾病發生及病毒株的現況進行專題報告（圖三）。



圖三、筆者於該實驗室進行台灣豬瘟現況專題報告

[2] 體外重組 RNA 轉錄作用

為提高轉錄效率，用於體外重組 RNA 轉錄作用的模板必須先以限制酵素作用後再純化。以 MEGAscript T7 Kit 合成之重組 RNA 也必須利用 Microspin S-400 管柱純化後，才得以進行轉錄作用。以下簡單描述實驗步驟，其他詳細步驟請見附件。

- (1) 利用限制酵素作用於重組病毒載體(Full-length cDNA clone pGPE-)，並進行膠體電泳，以核酸萃取套組(FastGene Gel/PCR extraction Kit, Fast-Gene) 純化核酸以製備模板。
- (2) 以 Phenol/ chloroform 純化核酸，去除蛋白質干擾 (附件一)，將核酸溶於 10ul DEPC H₂O 後以膠體電泳分析，確認核酸。
- (3) 體外重組 RNA 轉錄作用，依核酸轉錄套組(MEGAscript T7 Kit, Life technologies)手冊建議配製反應內容物如下表，置於 37°C 作用 2-4 小時。再加入 MEGAscript T7 Kit 所附之 DNase (0.5ul) 於 37°C 作用 30min，以去除 DNA 模板。

試劑	體積 (μl)
Purified DNA	4
*10x Rxn Buffer	1
*rNTP(A, U, G, C)	1 for each
*Enzyme (T7 RNA polymerase)	1
Total	10

- (4)以 Microspin S-400 管柱(GE Healthcare)，依手冊建議步驟純化轉錄好之 RNA。取部分樣品以膠體電泳分析、定量並保存於-80°C。

[3] 利用電穿孔法(Electroporation method)進行重組 RNA 的細胞轉染作用
(Transfection) (附件二)

將轉錄好的 RNA 以電穿孔法進行轉染作用，細胞以消化液(Trypsin)作用後必須先以磷酸緩衝液沖洗，並且將其置換於含有 CaCl_2 及 MgCl_2 的緩衝液中，加入 RNA，混合後移入電擊用小管。混合 RNA 的細胞以 BioRad 多功能基因轉殖儀(Gene Pulser Xcell) (圖四)，以輸出電壓 200V 及電容 500 μF 條件作用後，將細胞移入培養盤中，於 37°C 含 5% CO_2 的培養箱中培養。



圖四、BioRad 多功能基因轉殖儀(Gene Pulser Xcell)

註；

由於日本目前已經撲滅豬瘟病毒，因此任何與活的豬瘟病毒相關實驗必須於生物安全等級第三級(P3 Level)的實驗室操作。實驗室入口設有管制，必須按壓密碼並登記才能進入。進入實驗室時於緩衝區穿著防護衣，手套及鞋套戴兩層，並配戴口罩，護目鏡等防護措施。離開實驗室時，依序將防護衣、外層手套及外層鞋套丟至實驗室內，取下護目鏡浸泡於消毒水中，其餘於緩衝區脫去後留在實驗室內待下次進入實驗室再行打包滅菌，最後再簽名離開實驗室，洗手及用消毒水漱口。請見流程圖生物安全等級第三級的實驗室操作流程圖(圖五)。



圖五、生物安全等級第三級實驗室進出個人防護穿戴流程

[4] 重組豬瘟病毒篩選

將完成轉染作用的細胞於 37°C 含 5%CO₂ 的培養箱中培養，並於三天後收集上清液(含重組病毒)，必須在生物安全等級第三級實驗室操作。上清液必須以冷凍小管保存於-80°C，培養盤以磷酸緩衝液沖洗後風乾(約五分鐘)後細胞盤於 75°C，烘箱作用一小時以固定細胞。細胞盤以免疫染色(Immnuostaining)(附件三)確認重組豬瘟病毒產生情形。本次試驗結果並未獲得病毒斑，由研究生峯淳貴先生協助將本次病毒上清液再重新感染細胞，並於三天後再次確認，結果可見豬瘟病毒病毒斑(圖六)。



圖六、重組豬瘟病毒病毒斑，右側細胞盤為陰性對照，左側細胞盤為實驗組

[5] 北海道大學人畜共通感染症研究中心生物安全第三等級實驗室參訪：

該中心的建築本體為兩層之建築(圖七)，其中生物安全第三等級實驗室及動物房位於一樓。實驗室與動物房為病原體操作、動物試驗及動物剖檢場所。所有區域進出均有管制，研究人員需利用感應卡及輸入密碼方可進入。並且於動物舍內裝有影像監控系統，使得工作人員可於外部觀察動物及實驗室內情形。且所有實驗室及動物房內部的環境參數，包括溫度、溼度、負壓值等，均可於自動資訊系統內進行監控、紀錄及設定。



圖七、北海道大學人畜共通感染症研究中心

五、心得及建議

本出國計畫目的為研習重組豬瘟病毒製備技術及討論未來研究方向，與臺日雙邊合作及學術交流，以下僅就研習期間觀察提供個人心得參考。

由於本次研習時間較短，在 Dr. Yoshihiro Sakoda 的協助及安排下，將實驗切割成二個部分，並由該實驗室的研究生先進行部分的實驗，因此才得以順利在一周內將重組豬瘟病毒製備技術整個流程完成。

本次參訪過程中，指導教授特別重視實驗目的及討論，因此在實驗開始前特別撥冗讓筆者針對現階段研究報告，並與該實驗室研究生一起討論筆者過去實驗失敗可能原因及未來可能研究發展方向。由於台灣的豬瘟病毒株分成三個基因型，包括早期病毒株(94.4 病毒株)屬於 genotype III，於 1996 年後流行的病毒株(野外毒，96TD 病毒株)屬於 genotype II，及目前使用之活毒疫苗 LPC 病毒株屬於 genotype I。筆者想要探討不同基因型豬瘟病毒株在田間消長的機制，Dr. Yoshihiro Sakoda 表示在禽流感的流行病學中也可見到此一現象，但是很難以實驗驗證，因此建議筆者可以先從單一病毒株的致病機轉開始探討。

本次試驗結果，並未如預期出現重組豬瘟病毒的病毒斑。因此，試驗結束後先與研究生們進行討論，隨後再與指導教授做進一步討論，並擬定可能之改進方案及時間表。我們推測本次試驗結果失敗可能是因為轉錄之 RNA 濃度過低，導致第一代重組病毒力價太低，而無法以免疫液染色偵測到，因此建議再進行第二代病毒增殖。在該實驗室研究生峯淳貴先生的協助下，繼續進行第二代重組豬瘟病毒的增殖。於筆者回國後一周，已經確認該次實驗的第二代重組豬瘟病毒可順利產生。

其他，令筆者印象深刻的部分，包括有每周實驗室討論會也會由學生針對實驗相關論文進行報告及討論，並且將討論做成實驗室記錄，以供大家參考。此外，有許多規定雖然繁瑣，但大家仍然能夠確實執行。實驗室空間雖然小，但是由於大家落實實驗規畫及設備的預約，因此不會有儀器不夠用的問題。實驗室的公共事務，包括清潔打掃，器皿清潔滅菌等，均是由大家一起輪流分攤。

另外，針對豬瘟疾病的控制部分，Dr. Yoshihiro Sakoda 在了解台灣目前沒有豬瘟的疫情發生後，建議我國可以參照該國豬瘟撲滅政策，停用疫苗並搭配 stamping-out 政策。日本同樣在沒有豬瘟疫情後，停用疫苗五到七年後成功將豬瘟病毒撲滅。也因此目前日本任何與活的豬瘟病毒相關實驗必須於生物安全等級第三級(P3 Level)的實驗室操作。

附件一、Phenol/ chloroform 純化核酸

Materials

Phenol/ Chloroform/Isoamyl alcohol (P:C:I =25:24:1)

Chloroform/Isoamyl alcohol (C:I =24:1)

100%Et-OH

75% Et-OH

Sodium acetate

RNase free water (or DEPC treated water)

Methods:

- [1] 取等體積之 P:C:I (Phenol/ Chloroform/Isoamyl alcohol (P:C:I =25:24:1))與純化好之核酸震盪混合均勻，以 14000rpm 室溫離心 5 分鐘。
- [2] 取上清液再以等體積之 P:C:I 作用一次，以 14000rpm 室溫離心 5 分鐘。
- [3] 取上清液，加入等體積之 C:I (Chloroform/Isoamyl alcohol (C:I =24:1)) 震盪混合均勻後，以 14000rpm 室溫離心 5 分鐘。
- [4] 取上清液，加入 1/5 體積之 Sodium acetate 及 5 倍體積之 100%酒精，於室溫下淨置 10 分鐘後，以 14000rpm 於 4°C 下離心 20 分鐘。
- [5] 去掉上清液後加入 200ul75%酒精，以 14000rpm 於 4°C 下離心 5 分鐘並重覆此一步驟一次。
- [6] 倒掉上清液，並使其風乾。
- [7] 核酸最後溶於 10ul DEPC H₂O，並已將體電泳分析，確認核酸。

附件二、以電穿孔法(Electroporation method)進行重組 RNA 的細胞轉染作用 (Transfection)

Materials

- The transcribed RNA (dilute to the concentration of 1 μ g/10 μ l)
- Cell (CPK, SK-L)
- 0.25% Trypsin
- 10% HS MEM-TPB (Trypton phosphate buffer) for cell culture
- 0.2cm Electroporation Cuvette (Bio-Rad, 12346-086)
- Gene Pulser X cell (Bio-Rad)
- 60mm cell culture dish (Thermo Fisher Scientific, 150288)
- PBS(+)(RNase free): add 90 μ l 1M CaCl₂ and 33 μ l 1M MgCl₂ in 50ml 1xPBS

Methods

- [1] Trypsinize monolayers of confluent CPK or SK-L cells.
- [2] Wash the trypsinized cells once by 10% HS MEM-TPB.
- [3] Wash the cells three times with ice-cold PBS(+)
- [4] Resuspend at a density of 2x10⁷ cells per ml in PBS(+)
- [5] Dispense 10% HS MEM-TPB and seed the 7x10⁵ cells in the culture dishes.
- [6] Turn on the Gene pulser and set the condition: the electroporation is carried out by applying once successive pulse at 200V and 500 μ F.
- [7] Add 1 μ g(10 μ l) of the transcribed RNA to 400 μ l of the cell suspension. Mix gently with pipette and immediately and transfer to the cuvette.
- [8] Carry on the electroporation.
- [9] Plate the tranfected cells in the prepared culture dish.
- [10] Incubate the transfected cells at 37 $^{\circ}$ C and 5% CO₂ for 3 days in the P3 rooms.

附件三、Immnuostaining

Materials

1st Ab (anti-NS3 monoclonal Ab)

2nd Ab (anti-mouse HRP conjugated)

Substrate (3-amino-9-ethyl carbazole , AEC)

Methods

- [1] 1st Ab (1000 x) incubate at room temperature for 1 hour.
- [2] Wash 3 times PBS and discard
- [3] 2nd Ab (anti-mouse HRP conjugated, 1000 x) incubate at RT for 1 hour.
- [4] Wash 3 times PBS and discard.
- [5] Add substrate and incubate at 37°C for 15-30 min.