

出國報告(出國類別：研習)

赴日本北海道大學研習構築豬瘟病毒
感染性 cDNA 之技術

服務機關：行政院農業委員會家畜衛生試驗所

姓名職稱：張家宜副研究員

派赴國家：日本

出國期間：103 年 11 月 23 日至 103 年 12 月 6 日

報告日期：103 年 12 月 30 日

內容摘要

豬瘟 (Swine fever; Hog cholera) 為台灣豬隻重要之惡性傳染病，是由豬瘟病毒 (Classical swine fever virus; CSFV) 所引起之高傳染性與高致死性疾病，一旦爆發疫情常造成重大之經濟損失。先前研究發現台灣田間之豬瘟流行株已由外來型病毒完全取代本土型病毒，為進一步深入研究外來型豬瘟病毒與本土型豬瘟病毒之差異，並找出可能造成外來型病毒株取代本土型病毒株之因子，因此需要針對不同基因型之豬瘟病毒進行系統性的基因分析。由於豬瘟病毒基因體屬RNA，研究操作上較為困難，若建構豬瘟病毒完整之cDNA則可對病毒基因進行修改與重組。鑑於建構豬瘟病毒感染性之cDNA與產生重組病毒需要許多核心技術，因此亟需與其他實驗室學習。本次研習單位為日本北海道大學獸醫學研究所迫田義博教授研究室，迫田義博教授研究豬瘟多年，已建立構築豬瘟病毒感染性cDNA所需之相關技術。在兩個禮拜的研習時間規劃上，迫田義博教授共安排兩個研習重點，分別為「豬瘟病毒感染性cDNA獲得感染性病毒之技術」與「構築豬瘟病毒感染性cDNA之技術」。除此之外，希望藉由本次研習與迫田義博教授實驗室合作，可更深入探討研究豬瘟病毒於田間消長之機制，以提升台灣在豬瘟研究之國際能見度，對我國未來申請世界動物衛生組織 (OIE) 豬瘟參考實驗室助益良多。

目 次

壹、目的.....	4
貳、行程安排.....	5
參、研習過程.....	6
肆、研習心得.....	10
伍、建議事項.....	11
附錄.....	13

壹、目的

豬瘟 (Swine fever; Hog cholera) 為台灣豬隻重要之惡性傳染病，是由豬瘟病毒 (Classical swine fever virus; CSFV) 所引起之高傳染性與高致死性疾病，一旦爆發疫情常造成重大之經濟損失。本所的研究結果發現台灣田間之豬瘟流行株已由外來型病毒完全取代本土型病毒，這種田間自然發生病毒替換的現象並不常見。因此我們希望針對不同基因型之豬瘟病毒進行系統性的基因分析，以研究外來型豬瘟病毒與本土型豬瘟病毒之差異，並找出造成外來型病毒株取代本土型病毒株之因子。由於豬瘟病毒基因體屬 RNA，研究操作上較為困難，若取得豬瘟病毒完整之 cDNA 可對病毒基因進行修改與重組，藉以探討每一段病毒基因。目前對豬瘟病毒其致病機轉與毒力特性仍不甚明瞭，這些研究成果將能更深入了解豬瘟病毒的特性，同時對於豬瘟的防疫也有實質的助益。

鑑於建構豬瘟病毒感染性之 cDNA 與產生感染性病毒需要許多核心技術，若能由其他實驗室學習關鍵技術，將能大幅縮短實驗上摸索時間，對於研究計畫之進行將有極大助益。本次研習單位為日本北海道大學獸醫學研究所迫田義博教授微生物學研究室，迫田義博教授研究豬瘟多年，已建立構築豬瘟病毒感染性 cDNA 所需之相關技術並十分願意給予本所技術指導。在研習時間規劃上，迫田義博教授建議至少需兩個禮拜的研習時間，方能完整學習構築豬瘟病毒感染性 cDNA 與獲得感染性病毒之相關技術。除此之外，希望藉由本次研習與迫田義博教授實驗室合作，可更深入探討研究豬瘟病毒於田間消長之機制，以提升台灣在豬瘟研究之國際能見度，對我國未來申請世界動物衛生組織 (OIE) 豬瘟參考實驗室助益良多。

貳、行程安排

本次赴日本北海道大學獸醫學研究所研習構築豬瘟病毒感染性 cDNA 之技術自民國 103 年 11 月 23 日至 103 年 12 月 6 日止共 14 天 (詳如行程表)。

行 程 表

月 日(星期)	內容	地點
11 23 (日)	啓程赴日本札幌市	桃園
11 24 (一)	北海道大學獸醫學研究所微生物學研究室研習 豬瘟病毒感染性 cDNA 獲得感染性病毒之技術	日本札幌市
11 25 (二)	北海道大學獸醫學研究所微生物學研究室研習 豬瘟病毒感染性 cDNA 獲得感染性病毒之技術 實驗室專題研究報告	日本札幌市
11 26 (三)	北海道大學獸醫學研究所微生物學研究室研習 豬瘟病毒感染性 cDNA 獲得感染性病毒之技術	日本札幌市
11 27 (四)	北海道大學獸醫學研究所微生物學研究室研習 豬瘟病毒感染性 cDNA 獲得感染性病毒之技術	日本札幌市
11 28 (五)	北海道大學獸醫學研究所微生物學研究室研習 豬瘟病毒感染性 cDNA 獲得感染性病毒之技術	日本札幌市
11 29 (六)	北海道大學獸醫學研究所微生物學研究室研習 構築豬瘟病毒感染性 cDNA 之技術	日本札幌市
11 30 (日)	北海道大學獸醫學研究所微生物學研究室研習 構築豬瘟病毒感染性 cDNA 之技術	日本札幌市
12 1 (一)	北海道大學獸醫學研究所微生物學研究室研習 豬瘟病毒感染性 cDNA 獲得感染性病毒之技術 構築豬瘟病毒感染性 cDNA 之技術	日本札幌市
12 2 (二)	北海道大學獸醫學研究所微生物學研究室研習 豬瘟病毒感染性 cDNA 獲得感染性病毒之技術 構築豬瘟病毒感染性 cDNA 之技術	日本札幌市
12 3 (三)	北海道大學獸醫學研究所微生物學研究室研習 構築豬瘟病毒感染性 cDNA 之技術	日本札幌市
12 4 (四)	北海道大學獸醫學研究所微生物學研究室研習 構築豬瘟病毒感染性 cDNA 之技術	日本札幌市
12 5 (五)	北海道大學獸醫學研究所微生物學研究室研習 構築豬瘟病毒感染性 cDNA 之技術	日本札幌市
12 6 (六)	回程返抵國門	桃園

參、研習過程

一、北海道大學獸醫學研究所迫田義博教授微生物學研究室介紹

日本北海道大學獸醫學研究所迫田義博教授微生物學研究室為世界動物衛生組織 (World Organization for Animal Health; OIE) 日本禽流感之參考實驗室。研究室成員除迫田義博教授外，還有副教授岡松正敏博士以及講師松野啓太博士，其餘為博士班研究生與大學部學生。迫田義博教授研究室主要研究主題為禽流感與豬瘟，每年皆發表眾多研究論文在國際知名學術期刊，如 Journal of Virology 等，為研究禽流感與豬瘟之國際頂尖實驗室。

至北海道大學獸醫學研究所迫田義博教授研究室研習前，已多次與迫田義博教授及博士班學生討論目前實驗進度與本次研習需求，在兩個禮拜的研習時間規劃上，迫田義博教授共安排兩個研習重點，分別為「豬瘟病毒感染性 cDNA 獲得感染性病毒之技術」與「構築豬瘟病毒感染性 cDNA 之技術」。

二、實驗室專題研究報告

迫田義博教授邀請職於北海道大學獸醫學研究所微生物學研究室進行「台灣豬病之現況與台灣豬瘟之研究」專題研究報告 (圖一)，同時還有來自泰國的交換學生進行「泰國豬生殖與呼吸綜合症之研究」專題研究報告，由於迫田義博教授研究室有來自越南的博士班研究生，因此針對台灣、日本、泰國與越南等亞洲國家的豬病疫情與控制有相當熱烈的討論，迫田義博教授與博士班研究生也針對職的研究提出許多建議。

三、研習「豬瘟病毒感染性 cDNA 獲得感染性病毒之技術」

本次試驗使用迫田義博教授實驗室已建構完成的豬瘟病毒感染性 cDNA 載體，選殖之豬瘟病毒序列為日本疫苗株 GPE⁺。試驗共分成以下幾個

步驟進行：

1. 豬瘟病毒序列全長核酸增幅

針對日本疫苗株 GPE 設計特異性引子，將載體作為模板，利用聚合鏈酶素連鎖反應 (PCR) 進行全長核酸增幅。在 5 端引子的設計上，要加入 T7 promoter 序列，以進行後續之 in vitro transcription。

2. 確認豬瘟病毒全長核酸增幅產物

將豬瘟病毒全長核酸增幅產物進行膠體電泳，以確認產物大小正確。若不為單一產物，而夾雜其他非特異性的產物時，則需要進一步的切膠純化。

3. 純化豬瘟病毒全長核酸增幅產物

將核酸增幅產物進行膠體電泳，對照電泳的 marker，將豬瘟病毒全長核酸 12.3 Kb 大小處的膠切下，使用市售 Gel Extraction 套組純化。

4. *DpnI* 限制酵素切割

使用限制酵素 *DpnI* 作用於豬瘟病毒全長核酸，以去除載體。

5. 純化限制酵素切割產物

使用市售 PCR Extraction 套組純化核酸。之後進一步使用 Phenol:Chloroform:Isoamyl alcohol 純化核酸。

6. 確認豬瘟病毒全長核酸純化後產物

將豬瘟病毒全長核酸純化後之產物進行膠體電泳，以確認產物大小正確。

7. 測量豬瘟病毒全長核酸濃度

將豬瘟病毒全長核酸純化後之產物進行適度稀釋後，使用分光光度計測量並換算 DNA 濃度。

8. In vitro transcription

將純化後已知濃度的豬瘟病毒全長核酸增幅產物，使用市售套組，利用 T7 RNA polymerase 和 T7 promoter 作用，進行 in vitro transcription

反應將 DNA 轉錄為 mRNA，於 37°C 作用 3~4 小時。在試管內合成大量豬瘟病毒全長 RNA。

9. DNase 酵素切割

使用 DNase 酵素作用於豬瘟病毒全長 RNA，以去除 DNA。

10. 純化豬瘟病毒全長 RNA

使用市售套組純化豬瘟病毒全長 RNA。

11. 測量純化後豬瘟病毒全長 RNA 濃度

將純化後豬瘟病毒全長 RNA 產物進行適度稀釋後，使用分光光度計測量並換算 RNA 濃度。

12. 哺乳動物細胞製備

後續轉染試驗使用豬的腎臟細胞，需在進行轉染試驗二至三天前製備細胞，使細胞在轉染試驗當天於細胞培養角瓶長滿成單層細胞。

13. 豬瘟病毒全長 RNA 轉染至哺乳動物細胞

將豬的腎臟細胞利用胰蛋白酵素 (Trypsin) 作用消化後，以含有 CaCl₂ 與 MgCl₂ 的 PBS 緩衝液反覆清洗細胞，利用電穿孔方法將豬瘟病毒全長 RNA 轉染入豬的腎臟細胞。轉染後於 37°C 的 CO₂ 培養箱培養 72 小時。

14. 間接免疫螢光染色以確認感染性之豬瘟病毒顆粒

於轉染後 72 小時收取上清液，將細胞進行間接免疫螢光染色 (indirect immunofluorescent assay; IFA)，將細胞乾燥後，依序加入豬瘟病毒特異性抗體作為一抗，於 37°C 作用 1 小時、wash 後加入標示二抗，於 37°C 作用 1 小時、wash 後加入受質作用，觀察呈色情形。若轉染之豬瘟病毒全長 RNA 具有活性，則會在細胞內形成具感染性之病毒顆粒，即可用肉眼及顯微鏡下觀察到呈色反應 (圖四)。

四、研習「構築豬瘟病毒感染性 cDNA 之技術」

1. 豬瘟病毒 RNA 萃取與純化

利用市售套組萃取與純化豬瘟病毒 RNA genome。

2. 豬瘟病毒 RNA 進行反轉錄反應

針對豬瘟病毒株設計特異性引子，將豬瘟病毒 RNA 作為模板，利用反轉錄反應 (Reverse transcription) 進行全長 cDNA 核酸增幅。

3. 豬瘟病毒序列全長核酸增幅

針對豬瘟病毒株設計特異性引子，將 cDNA 核酸作為模板，利用聚合鏈酵素連鎖反應 (PCR) 進行全長核酸增幅。

4. 確認豬瘟病毒全長核酸增幅產物

將豬瘟病毒全長核酸增幅產物進行膠體電泳，以確認產物大小正確。若不為單一產物，而夾雜其他非特異的產物時，則需要進一步的切膠純化。

5. 純化豬瘟病毒全長核酸增幅產物

將核酸增幅產物進行膠體電泳，對照電泳的 marker，切取含有豬瘟病毒全長核酸 12.3 Kb 的膠體，使用市售 Gel Extraction 套組純化。

6. 豬瘟病毒全長基因選殖於載體

將全長基因選殖於載體內，之後將載體轉殖於細菌內，於 37°C 培養箱培養 16 小時。

7. 篩選出有選殖完整基因之載體

使用市售套組抽取細菌之載體。利用特定之限制酵素切割或進行聚合鏈酵素連鎖反應，篩選出有選殖完整基因載體的菌落。

8. 增殖抽取載體並純化

將篩選到的載體進行增殖培養，使用市售套組純化。

9. 核酸定序建構完成之 cDNA 載體

將已建構完成並大量增殖、純化之載體，進行聚合鏈酵素連鎖反應將全長分段增幅，將其純化後進行定序反應，以確認選殖序列正確無誤。

肆、研習心得

先前日本北海道大學獸醫學研究所迫田義博教授訪台時，有機會向迫田義博教授請益關於我國豬瘟研究與申請世界動物衛生組織 (World Organization for Animal Health; OIE) 參考實驗室相關事宜。迫田義博教授身為日本禽流感 OIE 參考實驗室的負責人，建議為助於我國豬瘟研究之發展與申請 OIE 參考實驗室能順利推動，除了台灣需儘量派員參加豬瘟病毒相關的國際會議外，也亟需在國際知名期刊發表豬瘟病毒相關的研究論文，以提升我國學術研究之國際能見度。由於本所先前研究發現台灣田間之豬瘟流行株已由外來型病毒完全取代本土型病毒的現象，為進一步深入研究外來型豬瘟病毒與本土型豬瘟病毒之差異，並找出可能造成外來型病毒株取代本土型病毒株之因子，因此需要針對不同基因型之豬瘟病毒進行系統性的基因分析。迫田義博教授研究豬瘟多年，已建立構築豬瘟病毒感染性 cDNA 所需之相關技術。在迫田義博教授的幫助下，今年有幸能申請到經費至北海道大學獸醫學研究所研習「豬瘟病毒感染性 cDNA 獲得感染性病毒」與「構築豬瘟病毒感染性 cDNA」之核心技術，將能對台灣的外來型豬瘟病毒與本土型豬瘟病毒作更進一步的研究，瞭解豬瘟病毒其致病機轉與毒力特性，以對豬瘟的防疫有所助益。也同時希望藉由本次研習與迫田義博教授實驗室合作，可更深入探討研究豬瘟病毒於田間消長之機制，以提升台灣在豬瘟研究之國際能見度。除此之外，由於利用豬瘟病毒感染性 cDNA 技術研究豬瘟病毒致病因子的國外實驗室皆為豬瘟學術研究上較為頂尖的實驗室，若我們之後相關之研究成果發表在國際知名學術期刊，將可以與國外豬瘟學術研究上頂尖實驗室之學者專家互動，並與德國豬瘟 OIE 參考實驗室及其他學術單位建立合作交流管道，對於提升台灣在豬瘟研究之國際能見度，與我國未來申請 OIE 豬瘟參考實驗室助益良多。

綜觀全球豬瘟疫情，仍是以亞洲國家為主，美國與加拿大已撲滅豬瘟，而歐洲與亞洲疫情不同之處在於，歐洲國家目前感染豬瘟以野豬為主，並使用口服疫苗控制豬瘟。由於亞洲國家中僅有日本已成功撲滅豬瘟，迫田義博教授希望亞洲各國能及時分享豬瘟之疫情資訊，以達到共同合作撲滅豬瘟之目標。因此迫田義

博教授研究室有來自越南的博士班研究生與泰國的交換學生，希望藉由亞洲國家之間的學術交流，盼望對於未來豬瘟之撲滅有所助益。我國也應加強與亞洲國家之間的學術交流，以能更瞭解豬瘟在亞洲的流行病學與疫苗使用現況，並收集鄰近國家相關豬瘟病毒疫情與流行株之趨勢，以及相關之防疫與診斷措施。甚至進一步嘗試收集周邊國家豬瘟病毒核酸進行檢驗，以測試本所豬瘟檢驗技術之敏感性及特異性，相信對於我國未來豬瘟之撲滅有所助益。

伍、建議事項

- 一、鑑於建構豬瘟病毒感染性之 cDNA 與產生感染性病毒需要許多核心技術，若能由其他實驗室學習關鍵技術，將能大幅縮短實驗上摸索時間，對於研究計畫之進行將有極大助益。除此之外，藉由至國外頂尖實驗室學習豬瘟相關技術，有機會可以與國外專精研究豬瘟病毒之專家學者進一步的互動交流，並可瞭解目前世界各先進實驗室之研究趨勢，進而幫助研究計畫之研提與進展，並建立與國外研究單位與 OIE 參考實驗室之合作交流管道。為助於我國豬瘟研究之發展與申請 OIE 參考實驗室能順利推動，亟需在國際知名期刊發表豬瘟病毒相關的研究論文，以提升我國豬瘟學術研究之國際能見度，因而維繫與國外學術單位之合作交流管道至關重要。有鑑於此，希望政府盡量支持派員參加豬瘟相關的國際會議與研究人員至國外頂尖實驗室研習。
- 二、藉由至國外頂尖實驗室學習豬瘟相關技術，之後相關研究成果如發表在國際知名學術期刊，將可以與國外在豬瘟研究上同領域之學者專家互動，並與德國豬瘟 OIE 參考實驗室及其他學術單位建立合作交流管道，對於我國未來豬瘟研究與申請 OIE 參考實驗室助益良多。為能引發國際對我國豬瘟研究之重視，並提昇我國學術之國際地位與促進國際文教交流，希望未來在與各國豬瘟 OIE 參考實驗室及其他學術單位有進一步研提國際合作計畫時，可獲得政府經費支持，以創造更多國際交流機會。

三、豬瘟是豬瘟病毒引起豬隻重大死亡的重要法定疾病，一旦爆發流行常造成重大的經濟損失，早期台灣一直受到豬瘟的威脅，然LPC兔化豬瘟疫苗使用後，疫情已獲得有效控制。雖然如此，豬瘟仍是威脅台灣以及世界養豬大國之重大危害性疾病。因此，豬瘟的清除必須開始一步步地建立可行之計畫，以期建立我國動物防疫之新里程碑。為求早日達成目標，建議我國應引進同樣使用活毒疫苗卻能成功撲滅豬瘟的日本之經驗，並應加強與亞洲國家之間的交流，以能更瞭解豬瘟在亞洲的流行病學與疫苗使用現況，以及相關之防疫與診斷措施，以著手建立台灣清除豬瘟之計畫。

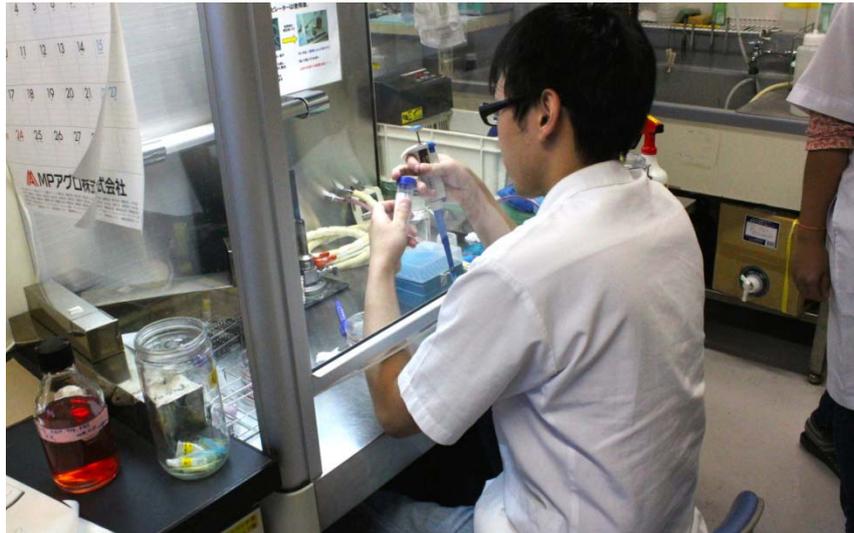
附錄：



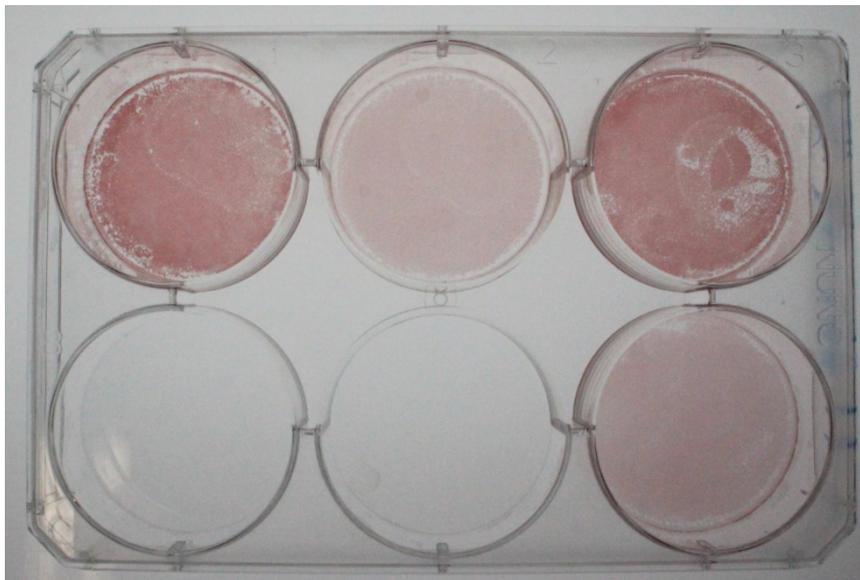
圖一：職於北海道大學獸醫學研究所微生物學研究室進行臺灣豬瘟研究之專題研究報告



圖二：北海道大學獸醫學研究所



圖三：博士班研究生示範如何製備轉染試驗所使用的腎臟細胞



圖四：免疫染色確認感染性之豬瘟病毒顆粒
深紅色細胞表示為陽性反應，淺紅色細胞表示為陰性反應



圖五：職於北海道大學獸醫學研究所微生物學研究室進行構築豬瘟病毒載體之選殖試驗