

運用簡併式引子對檢測病毒 -以Potexvirus為例

農試所植病組 周建銘 鄧汀欽 陳金枝

一、前言

植物病毒病害田間目視診斷除了少數具特殊病徵如嵌紋、輪紋、捲葉及壞疽等病徵可資判斷外，亦可藉由可能之媒介昆蟲輔助研判，但在田間診斷鑑定時，對於病毒科或屬皆無法區分，僅能初步推測可能為病毒感染。一般常用的酵素連結抗體免疫分析(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)進行血清學診斷，也需事先準備可能之抗體並與病組織之病原產生正確的陽性反應才能獲知可能之病毒為何。但當此病毒病害為新發生之病毒病，則需仰賴其他診斷方法才有可能正確診斷鑑定，例如電子顯微鏡法、生物檢定法、簡易光學顯微鏡診斷法、利用分子生物技術等方法進行診斷鑑定等，其中利用分子生物學進行診斷鑑定在近年來不斷地蓬勃發展。尤其植物病毒無法人工培養加上各屬病毒之間序列差異極大，因此針對單一屬病毒保守性序列所設計之簡併式引子對進行聚合酶鏈鎖反應可視為對未知病毒之診斷鑑定的有力工具。許多病毒屬的

簡併式引子對已被開發，並有許多實際應用的例子，例如Hrp5/oligo-dT(14)引子對可檢測Potyvirus屬病毒、Tobamo-1/Tobamo-2引子對可檢測Tobamovirus屬病毒，CPTALL-5/CPTALL-3引子對可檢測Cucumovirus屬病毒，gL3637/gL4510c引子對可檢測Tospovirus屬病毒以及PAL1v1978/PAR1c715引子對可檢測Begomovirus屬病毒等等，利用簡併式引子對進行增幅後檢測除可判斷是否為該屬病毒外，可進一步選殖定序進一步確認為何種病毒甚至是屬於何種系統(Strain)，在實際應用上為相當好用之工具，本文將針對如何設計簡併式引子對及其原理進行說明。

二、簡併式引子對設計及其基本概念

簡併式引子對設計基本概念，係從許多已知之同一種或同一屬病毒序列找尋其中保守性區域，並據以設計簡併式引子對。目前已有相關的免費線上設計軟體可供應用於簡併式引子對設計，例如Hyden、Genefisher、iCODEHOP、Gemi、Primerclade等，也有許多生物資訊套裝軟體可供使用，各種軟體之演

作者：周建銘助理研究員
連絡電話：04-23317513

Arginine (R)、Serine (S)這類可回譯 (Back translation) 為6種遺傳密碼子 (Genetic code) 的胺基酸，相對的，若保守性區域中富含Methionine (M)、Tryptophan (W)、Cysteine (C)、Aspartic acid (D)、Glutamic acid (E)、Phenyl alanine (F)、Histidine (H)、Lysine (K)、Asparagine (N)、Glutamine (Q)、Tyrosine (Y)這類僅具有1至2種遺傳密碼子的胺基酸則應優先選擇，由圖二中可見序列下方分別具有”*”等符號”，”*”代表在此位點上所有胺基酸序列皆一模一樣，因此由圖二中可見在CVX (*Cactus virus X*, 紅龍果病毒X)序列上游第1011個~第1017個胺基酸處具有T(S)YAGCQG七個保守性序列 (Conserved sequence) 亦可稱為Potexvirus的共同序列 (Consensus sequence)，而在下游處第1389個~1395個胺基酸處則有TFDANTE的七個胺基酸的共同序列，上下游序列皆可找到7個相同或相似的胺基酸序列可供設計引子對，且上下游位置差異約384個胺基酸大小，預期產

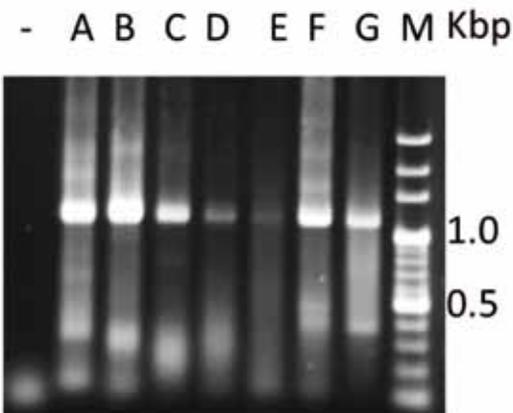
物片段大小約1152個鹼基對，產物大小適中；(4)將所找到的胺基酸共同序列回譯為遺傳密碼子；(5)依照共同序列片段嘗試設計正反向簡併式引子對(表一)。設計簡併式引子除需注意一般設計引子所需注意之Tm值、GC比、引子長度、GC clamp、產物大小等合適條件外，應特別注意引子全長的簡併性高低，及避免在引子的3'端具簡併性。以表一為例，上游共同序列回譯核苷酸序列為WSNTAYGCNGGNTGYCARGGN，共21個鹼基，由於3'端具有許多C或G的核苷酸序列，容易形成GC clamp影響反應，且5'端及3'端皆非單一鹼基，因此將序列調整成SNTAYGCNGGNTGYCARG，經過計算其簡併性為 $2*4*1*1*2*1*1*4*1*1*4*1*1*2*1*1*2*1=1024$ ，引子長度為18個鹼基；下游簡併式引子設計略為複雜，需考慮到反向 (Reverse, 即5'端及3'端顛倒)及互補 (Complement, 例如ATG的互補股為TAC)兩個條件，以表一為例，下游共同序列回譯核苷酸序列

表一、依據Potexvirus屬病毒保守性區域的共同序列回譯核苷酸序列並設計簡併式引子對及計算簡併性

上游共同序列	T(S)	Y	A	G	C	Q	G
回譯核苷酸序列	WSN ^Z	TAY	GCN	GGN	TGY	CAR	GGN
上游簡併式引子	SN	TAY	GCN	GGN	TGY	CAR	G
簡併性	2*4	1*1*2	1*1*4	1*1*4	1*1*2	1*1*2	1
下游共同序列	T	F	D	A	N	T	E
回譯核苷酸序列	ACN	TTY	GAY	GCN	AAV	ACN	GAR
下游簡併式引子(反向互補)	TC	NGT	RTT	NGC	RTC	RAA	NGT
簡併性	1*1	4*1*1	2*1*1	4*1*1	2*1*1	2*1*1	4*1*1

^Z: 核苷酸遵循IUPAC編碼，M=A或C，R=A或G，W=A或T，S=C或G，Y=C或T，K=G或T，V=A或C或G，H=A或C或T，D=A或G或T，B=C或G或T，N=A或T或G或C。

為ACNTTYGCNGCNAAYACNGAR，共21個鹼基，經反向互補調整後，並去掉5'端的非單一鹼基為TCNGTRTTNGCRTRCRAANGT，經過計算其簡併性為 $1*1*4*1*1*2*1*1*4*1*1*2*1*1*2*1*1*4*1*1=512$ ，引子長度為20個鹼基；(6)將初步設計之正反向簡併式引子對以SMS網站 (Sequence Manipulation Suite, http://www.bioinformatics.org/sms2/pcr_products.html) 等免費線上軟體進行PCR電腦模擬 (In silico PCR) 確認是否能順利反應及產物大小是否符合預期；(7)若皆符合預期則可以合成此簡併式引子對後進行實際PCR測試 (圖三)。PCR測試時可能遇到無法順利增幅出目標產物、產物大小不符合預期或產量過低等問題，可以利用調整PCR條件進行測試，例如降低黏合溫度 (Annealing temperature)，提高引子對濃度，增加MgCl₂濃度等都可以增加增幅成功的機會，但同時也會增



圖三、運用本文針對Potexvirus屬病毒所設計之簡併式引子對檢測不同Potexvirus屬病毒，皆可順利增幅出目標1152個鹼基對大小的產物。” - “為負對照組的無菌水、A-G為不同Potexvirus屬病毒。

加非專一性產物產生的機會，因此需要適當的調整測試才能獲得合適的條件，若調整PCR條件後仍未能得到預期產物，則可能需回頭尋找其他共同序列進行簡併式引子對設計，或調整現有的簡併式引子對序列以期能夠順利針對目標病毒屬病毒進行增幅。

三、結語

病毒檢測與鑑定是病毒研究工作相當重要的一環，而選擇何種檢測方法端視鑑定或檢測的目標為何，例如鑑定至何種程度、診斷所需設備經費，檢測方法的易操作性及可靠性等等因素，會決定何種檢測方法適用。但整體而言，檢測方法的走向趨向靈敏、易操作、成本便宜等目標邁進。隨著生物技術的發展，分子檢測技術即具有高靈敏度且易操作的優勢，且相關試劑的價格也越來越便宜，因此病毒分子檢測技術發展也日益蓬勃，而相較於使用病毒專一性引子對的分子檢測方式，運用簡併式引子對檢測病毒就好像運用一把散彈槍，針對目標病毒屬進行射擊，同時射出許許多多不同的引子對所構成之簡併式引子對，相較於專一性引子對的單發射擊，散彈槍式的射擊能夠大幅提升命中率，也增加了未知病毒病害被偵測的機會。目前已有許多種病毒屬的簡併式引子對被開發出來可供病毒研究人員進行運用，且在田間實際檢測時也成為不可或缺的工具，可預期地在未來運用簡併式引子對進行病毒檢測將可實際應用於產業。