

蘭嶼豬內源性反轉錄病毒的檢測⁽¹⁾

章嘉潔⁽²⁾⁽³⁾ 吳昇陽⁽²⁾

收件日期：105 年 7 月 1 日；接受日期：105 年 11 月 11 日

摘 要

本試驗旨在檢測蘭嶼豬豬內源性反轉錄病毒 (porcine endogenous retrovirus, PERV) 存在與表現狀況，採集飼養於臺東種畜繁殖場蘭嶼豬群 38 件的血液樣本，收集分離取得周邊血液單核球細胞 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC)，利用 PCR 檢測 PERV 前病毒核心蛋白基因 (*gag*)、多聚酶基因 (*pol*) 及囊膜基因 (*env*) 之 DNA 片段，另用 RT-PCR 方法檢測 PERV 前病毒 mRNA 序列片段。結果在 38 份 DNA 樣品中均檢測出了 PERV 前病毒組 DNA 的存在；另 RT-PCR 檢測 38 份 RNA 樣品中均有 PERV 前病毒 RNA 的表現。結論檢測蘭嶼豬體內均存在豬內源性反轉錄病毒，且能被轉錄以 mRNA 的形式表現，此結果提供蘭嶼豬建立 PERV 生物安全性評估之試驗基礎。

關鍵詞：豬內源性反轉錄病毒、蘭嶼豬、聚合酶連鎖反應。

緒 言

豬被視為供應人類異種器官移植之重要來源 (Ekser and Cooper, 2010)，自 Patience *et al.* (1997) 等發現豬內源性反轉錄病毒 (porcine endogenous retrovirus, PERV) 在體外可以感染人類細胞，學者研究將豬胰島細胞移植至非肥胖型糖尿病、重症併免疫缺陷 (non-obese diabetes, severe combined immunodeficiency, NOD/SCID) 小鼠體內，試驗結果證實 PERV 可感染小鼠 (van der *et al.*, 2000)，引起對於異種器官移植安全性的受到重視。PERV 遺傳物質為 RNA，透過反轉錄酶的作用下反轉錄合成 DNA，DNA 再嵌入至宿主染色體內 (Löwer *et al.*, 1996) 以永久形式存在豬體內 (Ericsson *et al.*, 2001; Patience *et al.*, 2001)。PERV 基因組全長為 8 kb 左右，5'、3' 兩端為非編碼區，中間為 *gag*、*pol* 及 *env* 三種編碼基因所構成 (Krach *et al.*, 2001)。蘭嶼豬為我國特有小型豬種，畜產試驗所為因應「發展豬隻供作醫學研究之用」的政策 (臺東種畜繁殖場, 1996)，於民國 69 年自蘭嶼引種 4 公 16 母進行種原保存 (李, 1998)，並以蘭嶼豬為基礎種畜群，進行小型豬新品種與新品系的選育與種畜登錄工作 (行政院農業委員會公告, 2007)，規劃適合醫學實驗用豬隻品種，國外許多研究系統性對實驗用豬內源性病毒進行檢測、探討作用機制及鑑定 (Jung *et al.*, 2013; Semaan *et al.*, 2013; Guo *et al.*, 2014; Tang *et al.*, 2015)。本研究對蘭嶼豬中 PERV 的存在與表現情況進行檢測，對於病原安全性評估具重要的意義。

材料與方法

I. 樣品採集

蘭嶼豬飼養於臺東種畜繁殖場，條件為自然溫度、濕度和光照，試驗為 3 至 6 月齡 38 頭豬隻公母各半，採取 3 至 5 mL 全血，於 5 ml Ficoll 濃度梯度 (Ficoll-Paque™ Plus, GH Healthcare, Sweden) 進行分離，離心機 (KN-70, KUBOTA, Japan) 離心條件為 500 xg 30 分鐘，可見血液明顯分層，吸取中間雲霧層細胞，即為周邊血液單核球細胞 (Peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)，將收集的 PBMCs 用 PBS 洗滌，以 500 xG 離心條件進行細胞收集，完成後再洗滌一次，即可用於樣品 DNA 及 RNA 的提取。

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 2537 號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所臺東種畜繁殖場。

(3) 通訊作者，E-mail: janices@mail.tlri.gov.tw。

II. PERV 之 PCR 檢測

(i) DNA 與 RNA 的製備：

DNA 的製備利用 DNA 純化套組 (QIAamp DNA Mini kit, Qiagen, GmbH, Hilden) 依照其操作步驟進行 DNA 之萃取及純化，之後進行 PCR 檢測病毒核苷酸。RNA 的製備利用 RNA 純化套組 (QIAamp RNA Mini kit, Qiagen) 依照其操作步驟進行 RNA 之萃取及純化，RT-PCR 逆轉錄反應在 20 μ L 體系中進行，以 1 μ L PBMC 總 RNA 為模板，1 μ L Oligo dT (Invitrogen, USA) 50 μ M 為引子，添加 1 μ L 10 mM dNTP (Invitrogen, USA) 混合，條件 65°C 5 分鐘，之後加入 4 μ L 5 \times First-Strand buffer、1 μ L 0.1 M DTT (Invitrogen, USA)、1 μ L RNaseOUT™ (Invitrogen, USA) 及 1 μ L SuperScript™ III 反轉錄酶 (Invitrogen, USA) 200 U/ μ L，50°C 1 小時反轉錄酶的作用下反轉錄合成 cDNA。

(ii) 序列引子設計：

根據已發表的檢測 PERV *gag*、*pol* 及 *env* 引子序列 (Akiyoshi *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 2008)，由生工有限公司 (MD Bio, Inc, Taiwan) 進行合成。*gag*、*pol* 及 *env* 基因序列擴增所使用的引子序列如下；其中 *gag* F: 5'-CCC GAT CAG GAG CCC TAT ATC CTT ACG TG-3'；*gag* R: 5'-CGC AGC GGT AAT GTC GCG ATC TCG T-3'，擴增序列片段長度為 361 bp；*pol* F: 5'-GCC CTG TCA AGG AGG TA-3'；*pol* R: 5'-AGT GTG GCT ATC TTA TAG AAA GG-3'，擴增序列片段長度為 150 bp；*env* F: 5'-GCT ACC TCT TCT TGT TGG CTA TGC-3'；*env* R: 5'-CAC CAC CTG TCA TAA CCA GGT ACC-3'，擴增序列片段長度為 265 bp。

(iii) PCR 及電泳：

使用萃取 DNA 做為模板進行 PCR。PCR 反應液含有 2 μ M DNA，10 μ M 的 P₁ 與 P₂ 引子各 1 μ L，*Taq* DNA 聚合酶 (Roche, Germany) 0.4 μ L (5 U/ μ L)，10 \times PCR buffer 5 μ L，10 mM dNTP 1 μ L 及 2 dH₂O 40 μ L，PCR 反應總體積約為 50 μ L。PCR 條件為 94°C 5min；94°C 30 sec，54°C 30 sec 與 72°C 45 sec，循環 30 次最後為 72°C 5 min 擴展，完成 PCR 取 7 μ L 產物並加入 2 μ L 的 6 \times Loading buffer，置入 1% 瓊脂醣膠片內，於 0.5 \times 之 Tris-acetate-EDTA (TAE) 緩衝液中進行電泳，條件為 70 Volt 45 min，電泳後將膠片染色，並於紫外燈箱上觀察紀錄結果。以 COS-7 之細胞株的基因組 DNA 和 cDNA 作為陰性對照，及滅菌去離子水作為空白對照組，COS-7 細胞株購自財團法人食品工業研究所。

III. DNA 序列分析與比對

取 PCR 產物送至核苷酸定序服務公司定序確認，再進行序列測定與分析。完成 DNA 序列分析的資料利用 NCBI 進行 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) 比對，以確認序列並比較網路資料庫中的相似序列。

結果與討論

目前檢測蘭嶼豬 PERV 存在與表現情況結果如表 1 所示，在 38 個 DNA 樣品中均檢測出 PERV *gag*、*pol* 及 *env* (圖 4) 的存在，檢測出比例均達 100%，基因序列測定結果如圖 1 至 3，擴增病毒序列片段與預期片段大小符合，NCBI 進行 BLAST 比對顯示序列完全符合，這證實蘭嶼豬 PBMC DNA 中存在完整的 PERV 病毒序列。對照用相同的引子，以 COS-7 細胞做為 DNA 模板進行 PCR 擴增，皆未檢測出 PERV 病毒序列，結果呈現陰性。另 RT-PCR 檢測 38 個 RNA 樣品中，均有 PERV *gag*、*pol* 及 *env* 基因之 mRNA 序列的表現 (圖 5)，這證實 PERV 不僅存在於蘭嶼豬細胞，而且以 mRNA 形式存在。

表 1. 蘭嶼豬血液樣本 PERV 檢測結果

Table 1. The results of PERV in blood samples of Lanyu pig

Method	No.	<i>gag</i>		<i>pol</i>		<i>env</i>	
		No.	%	No.	%	No.	%
PCR	38	38	100	38	100	38	100
RT-PCR	38	38	100	38	100	38	100

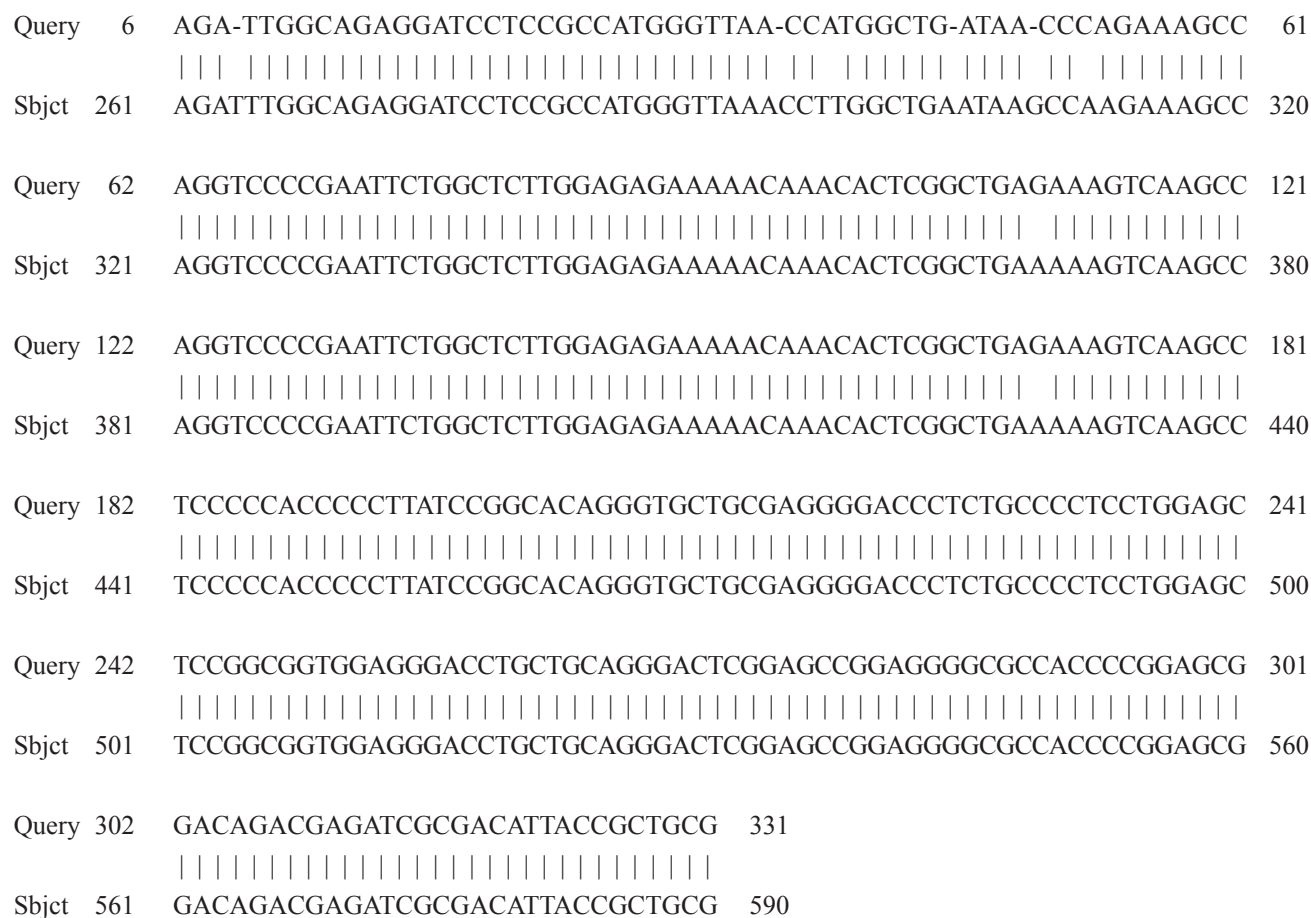


圖 1. 蘭嶼豬 PERV *gag* 基因的序列比對。

Fig. 1. Alignment and comparison of Lanyu pig PERV *gag*-DNA sequences.

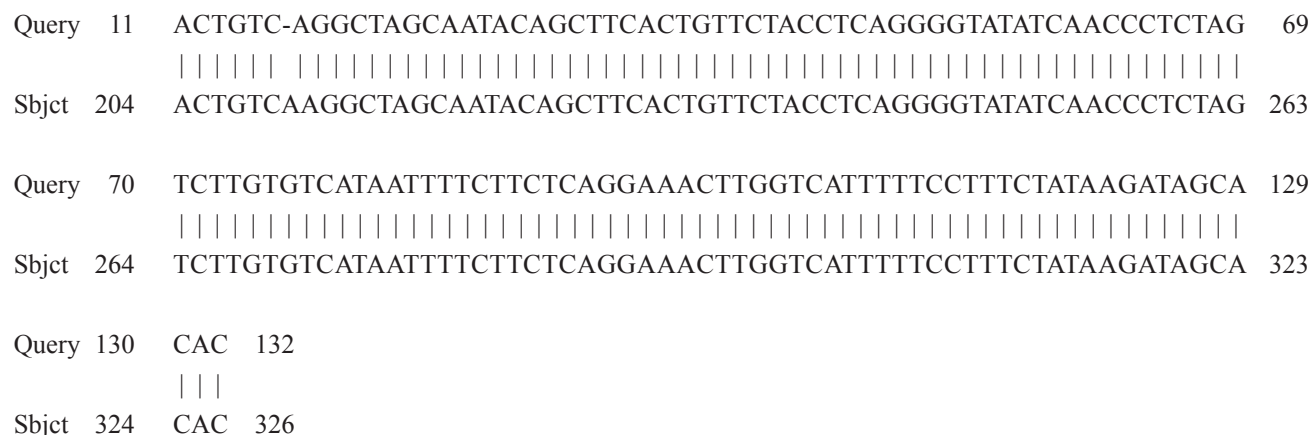


圖 2. 蘭嶼豬 PERV *pol* 基因的序列比對。

Fig. 2. Alignment and comparison of Lanyu pig PERV *pol*-DNA sequences.

```

Query 12  CTTACTATGAGGGA-TGGCT-AAAGAGGGAAATTCAATGTGACAAAAGAACATAGAGACC 69
          |||
Sbjct 682  CTTACTATGAGGGAATGGCTAAAAGAGGGAAATTCAATGTGACAAAAGAACATAGAGACC 741

Query 70  AATGTACATGGGGATCCCAAATAAGCTTACCCTTACTGAGGTCTCTGGAAAGGGCACCT 129
          |||
Sbjct 742  AATGTACATGGGGATCCCAAATAAGCTTACCCTTACTGAGGTCTCTGGAAAGGGCACCT 801

Query 130 GCATAGGAAAGGTTCCCCATCCCACCAACACCTTTGCAACCACACTGAAGCCTTTAATC 189
          |||
Sbjct 802  GCATAGGAAAGGTTCCCCATCCCACCAACACCTTTGCAACCACACTGAAGCCTTTAATC 861

Query 190 AAACCTCTGAAAGTCAATATCTGGTACCTGGTTATGACAGGTGGTG 235
          |||
Sbjct 862  AAACCTCTGAGAGTCAATATCTGGTACCTGGTTATGACAGGTGGTG 907

```

圖 3. 蘭嶼豬 PERV *env* 基因的序列比對。

Fig. 3. Alignment and comparison of Lanyu pig PERV *env*-DNA sequences.

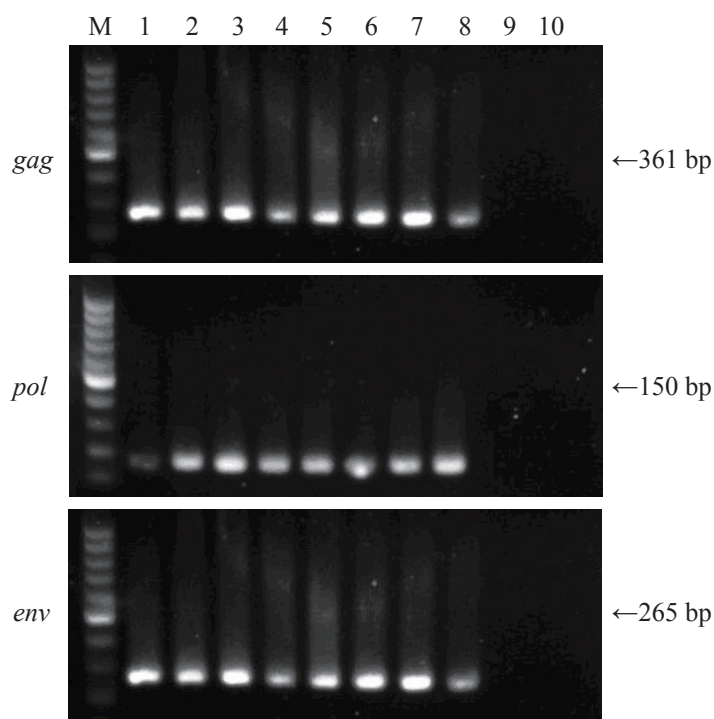


圖 4. PERV PCR 檢測結果。M. 100 bp marker; 1- 8. PBMC-DNA 樣品; 9. COS-7 DNA, 陰性對照; 10. 水, 陰性對照。

Fig. 4. PERV PCR results. M. 100 bp marker. 1-8. sample of PBMC-DNA; 9. negative control of COS-7 DNA; 10. negative control of water.

許多已知病原能使用疫苗、建構清淨生產模式或無特定病原 SPF 管理等方法，來消除嚴重危害的傳染性疾病，但潛在及內源性病毒的感染透過常規方法處理幾乎不能達成清除效果。學者研究中國小型豬不同品系 PERV 存在與表現進行檢測，試驗採樣分別為 78 頭巴馬小型豬品系、12 頭四川白豬品系及 11 頭五指山小型豬品系，DNA 檢測結果均存在 PERV *pol* 基因序列，另 RT-PCR 檢測 RNA 樣品中，也均具有 PERV 特異性 *pol* 基因序列 (Zhang *et al.*, 2003)。何等於 2008 年採集 202 頭五指山小型豬組織檢體，分為心、肝、脾、肺、腎、腦及肌肉等 7 種組織，發現檢測樣品中均含有 *gag*、*pol* 和 *envB* 基因型 (何等, 2008)。另學者研究 300 多份中國小型豬樣本，檢測發現 PERV 普遍存在，其陽性率高達 100%，而且皆具轉錄為 mRNA (鐘及杜, 2012)，研究發現病毒普遍存在豬體內，對豬無害無法去除 (Denner, 2008; Denner *et al.*, 2009; Denner, 2011)。PERV 屬哺乳類 C 型反轉錄病毒，含 *gag*、*pol* 以及 *env* 三種基因，*gag* 基因負責合成病毒的核心蛋白，*pol* 基因提供病毒生活週期所需之蛋白酶，目前檢測方式大

多針對 *gag* 及 *pol* 序列進行擴增，主要原因在不同個體間這些序列片斷較為保守。*env* 基因主要負責編碼囊膜蛋白，學者又依據 *env* 基因上結構差異，將 PERV 再區分為 PERV-A、PERV-B 及 PERV-C 三種亞型 (Tönjes and Niebert, 2003)，文獻亦證實不同豬種所攜帶的 PERV 亞型存在差異，豬種間 PERV 病毒載量並不相同 (Wu *et al.*, 2008; Gola and Mazurek, 2014)。PERV-A 和 PERV-B 於所有豬中均會表現，病毒形式多變會感染人類細胞 (Patience *et al.*, 1997)，第三種亞型 PERV-C 屬親嗜性 (ecotropic) 病毒只感染豬來源之細胞 (Takeuchi *et al.*, 1998)。學者提出 PERV-C 並不存在所有豬種個體 (Gola and Mazurek, 2014)，如 PERV-A 與 PERV-C 進行重組，造成人體感染性會大幅提升 (Bartosch *et al.*, 2004)。五指山小型豬與廣西巴馬小型豬，利用 PCR 及 RT-PCR 方法均檢測出 PERV *gag*、*pol* 及 *env* 基因序列的存在與表現，然 PERV-C 確未被檢測出 (馮，2011)。

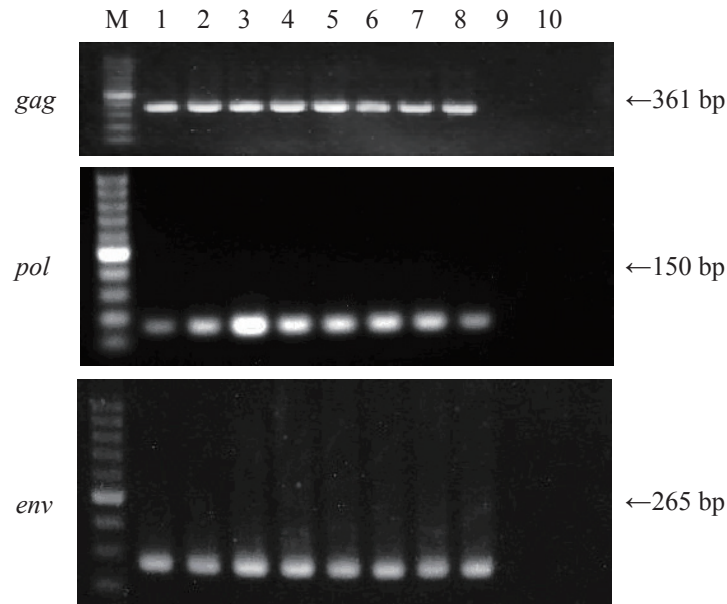


圖 5. PERV RT-PCR 檢測結果。M. 100 bp marker；1- 8. PBMC-RNA 樣品；9. COS-7 RNA，陰性對照；10. 陰性對照。

Fig. 5. PERV RT-PCR results. M. 100 bp marker. 1-8. sample of PBMC-RNA; 9. negative control of COS-7 RNA; 10. negative control of water.

國際異種器官移植協會面對 PERV 的感染風險，建議篩選不具備 PERV-C 基因豬種作為移植來源，防止與 PERV-A 重組，並選擇 PERV-A 和 PERV-B 病毒載量較低之豬隻 (Denner and Tönjes, 2012; Gola and Mazurek, 2014)，後續試驗將持續檢測蘭嶼豬內源性反轉錄病毒亞型調查研究工作，進一步篩選檢測此將有力於蘭嶼豬實驗動物化，同時也將為異種移植提供病原安全性評估參考。本實驗首次對蘭嶼豬中內源性反轉錄病毒的存在與表現情況進行了檢測，結果證實蘭嶼豬存在著 PERV 前病毒序列，且該 PERV 前病毒具進一步轉錄之可能性。

誌 謝

本試驗承農業委員會科技計畫 (103 農科 -2.1.6- 畜 -L1 及 105 農科 -2.5.4- 畜 -L1) 經費補助，試驗期間承蒙臺東種畜繁殖場許聰明、孫明德、黃德昇、陳榮樹、藍立茵及曾恩典等現場同仁之協助，特此誌謝。

參考文獻

- 行政院農業委員會公告。2007。行政院公報。農業環保篇 13：30650-30654。
- 臺東種畜繁殖場。1996。小型豬。臺灣省畜產試驗所臺東種畜繁殖場編印。pp. 1-16。
- 李啟忠、陳文誠、曾晉郎、張秀鑾、吳明哲。1998。蘭嶼豬近親品系之白色斑和棕色斑體色選拔。中國畜牧學會會誌 8：109-113。
- 何凱、歐江濤、黃禮光、王希龍、鐘金城、王峰、鄭心力。2008。內源性逆轉錄病毒在五指山小型豬體內存在狀況

- 的分子微生物學調查。中國獸醫學報。28：68-71。
- 馮書堂。2011。中國實驗用小型豬。中國農業出版社。p. 445。
- 鐘旭、杜峰。2012。豬皮膚成纖維細胞 PERV 體外和體內感染性分析。農業與技術。32：108。
- Akiyoshi, D. E., M. Denaro, H. Zhu, J. L. Greenstein, P. Banerjee and J. A. Fishman. 1998. Identification of a full-length cDNA for an endogenous retrovirus of miniature swine. *J. Virol.* 72: 4503-4507.
- Bartosch, B., D. Stefanidis, R. Myers, R. Weiss, C. Patience and Y. Takeuchi. 2004. Evidence and consequence of porcine endogenous retrovirus recombination. *J. Virol.* 78: 13880-13890.
- Denner, J. 2008. Is porcine endogenous retrovirus (PERV) transmission still relevant? *Transplant. Proc.* 40: 587-589.
- Denner, J., H. J. Schuurman and C. Patience. 2009. The International Xenotransplantation Association consensus statement on conditions for undertaking clinical trials of porcine islet products in type I diabetes. Chapter 5. Strategies to prevent transmission of porcine endogenous retroviruses. *Xenotransplantation* 16: 239-248.
- Denner, J. 2011. Infectious risk in xenotransplantation - what post-transplant screening for the human recipient? *Xenotransplantation* 18: 151-157.
- Denner, J. and R. R. Tönjes. 2012. Infection barriers to successful xenotransplantation focusing on porcine endogenous retroviruses. *Clin. Microbiol. Rev.* 25: 318-343.
- Ekser, B. and D. K. Cooper. 2010. Overcoming the barriers to xenotransplantation: prospects for the future. *Expert. Rev. Clin. Immunol.* 6: 219-230.
- Ericsson, T., B. Oldmixon, J. Blomberg, M. Rosa, C. Patience and G. Andersson. 2001. Identification of novel porcine endogenous betaretrovirus sequences in miniature swine. *J. Virol.* 75: 2765-2770.
- Gola, J. and U. Mazurek. 2014. Detection of porcine endogenous retrovirus in xenotransplantation. *Reprod. Biol.* 14: 68-73.
- Guo, F., X. Xing, W. J. Hawthorne, Q. Dong, B. Ye, J. Zhang, Q. Liang, W. Nie and W. Wang. 2014. Characterization of PERV in a new conserved pig herd as potential donor animals for xenotransplantation in China. *Virol. J.* 4: 212-218.
- Jung, Y. D., H. S. Ha, S. J. Park, K. B. Oh, G. S. Im, T. H. Kim, H. H. Seong and H. S. Kim. 2013. Identification and promoter analysis of PERV LTR subtypes in NIH-miniature pig. *Mol. Cells* 35: 99-105.
- Krach, U., N. Fischer, F. Czauderna and R. R. Tönjes. 2001. Comparison of replication-competent molecular clones of porcine endogenous retrovirus class A and class B derived from pig and human cells. *J. Virol.* 75: 5465-5472.
- Löwer, R., J. Lower and R. Kurth. 1996. The viruses in all of us: characteristics and biological significance of human endogenous retrovirus sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 5177-5184.
- Patience, C., Y. Takeuchi and R. A. Weiss. 1997. Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pigs. *Nat. Med.* 3: 282-286.
- Patience, C., W. M. Switzer, Y. Takeuchi, D. J. Griffiths, M. E. Goward, W. Heneine, J. P. Stoye and R. A. Weiss. 2001. Multiple groups of novel retroviral genomes in pigs and related species. *J. Virol.* 75: 2771-2775.
- Semaan, M., A. Rotem, U. Barkai, S. Bornstein and J. Denner. 2013. Screening pigs for xenotransplantation: prevalence and expression of porcine endogenous retroviruses in Gottingen minipigs. *Xenotransplantation* 20: 148-156.
- Takeuchi, Y., C. Patience, S. Magre, R. A. Weiss, P. T. Banerjee, P. Le Tissier and J. P. Stoye. 1998. Host range and interference studies of three classes of pig endogenous retrovirus. *J. Virol.* 72: 9986-9991.
- Tang, H. B., K. Ouyang, L. Ma, A. Bai, S. Qin, F. Chen, J. Lin, Y. Cao and J. Wu. 2015. Complete genome sequence of a porcine endogenous retrovirus isolated from a Bama Minipig in Guangxi, Southern China. *Genome Announc.* 11: 3.
- Tönjes, R. R., and M. Niebert. 2003. Relative age of proviral porcine endogenous retrovirus sequences in *Sus scrofa* based on the molecular clock hypothesis. *J. Virol.* 77: 12363-12368.
- van der Laan, L. J. W., Lockey, B. C. Griffith, F. S. Frasier, C. A. Wilson, D. E. Onions, B. J. Hering, Z. Long, E. Otto, B. E. Torbett and D. R. Salomon. 2000. Infection by porcine endogenous retrovirus after islet xenotransplantation in SCID mice. *Nature* 407: 90-94.
- Wu, J., Y. Ma, M. Lv., Y. Yang, Y. Guo, X. Yu, K. Tian and J. Zhang. 2008. Large-scale survey of porcine endogenous retrovirus in Chinese miniature pig. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 31: 367-371.
- Zhang, L., H. Bu, Y. Li, J. Cheng, S. Li, and P. Yu. 2003. A primary screening of porcine endogenous retrovirus in some chinese pigs. *Transpl. P.* 35: 540-541.

Detection of porcine endogenous retroviruses in Lanyu pig⁽¹⁾

Chia-Chieh Chang⁽²⁾⁽³⁾ and Sheng-Yang Wu⁽²⁾

Received: Jul. 1, 2016; Accepted: Nov. 11, 2016

Abstract

This study was to investigate the existence and expression of porcine endogenous retrovirus (PERV) in Lanyu pig. The blood of 38 minipigs were collected from Taitung Animal Propagation Station. Peripheral blood mononuclear cell (PBMC) from blood samples were isolated. The existence of core protein gene (*gag*), polymerase gene (*pol*) and capsule membrane gene (*env*) from PERV provirus in DNA sequences were detected by PCR and expression of mRNA sequences of PERV provirus were tested by RT-PCR. The results showed that PERV provirus existed in all 38 DNA samples. Results of RT-PCR showed that PERV provirus expressed in 38 RNA samples. The PERV is existent and can be transcribed in Lanyu pig. This research may be helpful to assess the biosafety of PERV and to provide in experimental basis for Lanyu pigs.

Key words: Porcine endogenous retrovirus, Lanyu pig, Polymerase chain reaction.

(1) Contribution No. 2537 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

(2) Taitung Animal Propagation Station, COA-LRI, Taitung, 954, Taiwan, R.O.C.

(3) Corresponding author, E-mail: janices@mail.tlri.gov.tw.