

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：96116924

※申請日期：96.5.11

※IPC 分類：G01N 33/569

(2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

利用免疫色層分析測試片檢測口蹄疫之方法

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)(簽章)

行政院農業委員會家畜衛生試驗所/ ANIMAL HEALTH RESEARCH
INSTITUTE, COUNCIL OF AGRICULTURE, EXECUTIVE YUAN

指定 為應受送達人

代表人：(中文/英文)(簽章) 趙磐華/ PARN-HWA CHAO

住居所或營業所地址：(中文/英文)

臺北縣淡水鎮中正路 376 號/

376 CHUNG - CHENG RD. TANSUI, TAIPEI, TAIWAN 25158, R. O. C.

國籍：(中文/英文) 中華民國/ TAIWAN(R. O. C.)

電話/傳真/手機：

E-MAIL：

三、發明人：(共 3 人)

姓名：(中文/英文)

1. 陳姿菡/ TSU-HAN CHEN

2. 潘居祥/ CHU-HSIANG PAN

3. 鍾明華/ MING-HWA JONG

國 籍：(中文/英文)

1. 中華民國/ TAIWAN(R. O. C.)
2. 中華民國/ TAIWAN(R. O. C.)
3. 中華民國/ TAIWAN(R. O. C.)

四、聲明事項：

主張專利法第二十二條第二項第一款或第二款規定之事實，
其事實發生日期為： 年 月 日。

申請前已向下列國家(地區)申請專利：

【格式請依：受理國家(地區)、申請日、申請案號 順序註記】

有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

主張專利法第三十條生物材料：

須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

國 籍：(中文/英文)

1. 中華民國/ TAIWAN(R. O. C.)
2. 中華民國/ TAIWAN(R. O. C.)
3. 中華民國/ TAIWAN(R. O. C.)

四、聲明事項：

主張專利法第二十二條第二項第一款或第二款規定之事實，
其事實發生日期為： 年 月 日。

申請前已向下列國家(地區)申請專利：

【格式請依：受理國家(地區)、申請日、申請案號 順序註記】

有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

主張專利法第三十條生物材料：

須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(1)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

S1：步驟；

S2：步驟；

S3：步驟；

S4：步驟；

S5：步驟；

S6：步驟；以及

S6：步驟。

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明是有關於一種臨床免疫學領域及一種檢測對於動物口蹄疫病毒之結構性蛋白及/或非結構性蛋白之抗體，特別是有關提供一種快速、定性、定量、高敏感度及特異性兼具之免疫色層分析檢定之方法。

【先前技術】

口蹄疫 (FMD; foot-and-mouth disease) 為偶蹄類動物之高度傳染性疾病，主要感染的經濟動物如牛、豬和綿羊。口蹄疫常以發燒與嘴、舌頭、鼻孔、腳和乳頭的上皮水泡及腐爛等症狀為特徵。口蹄疫病毒是正股 RNA 病毒在 *Picornaviridae* 科之成員中隸屬於 *Aphthovirus* 屬，為小的無封套病毒，含有 8.5 kbp 基因可轉譯出結構與非結構蛋白 (NSPs)。本病毒含有 7 種血清型，包括 O、A、C、Asia 1、SAT 1、SAT 2 和 SAT 3 等分佈在全世界，而每個血清型無交叉保護作用。此疾病在臨床上仍無法與豬水疱病 (SVD)、豬水泡性口炎 (VS)、豬水泡疹 (VE) 及海獅病毒 (San Miguel sea lion virus) 等作出有效地區別診斷。

在 1997 年，台灣爆發具有毀滅性的口蹄疫，由血清型 O 型病毒引起的 (命名為 O/TAW/97)。此株為非典型的嗜感染豬原型。經試驗研究發現該株之非結構蛋白區 3A 之一段 (即 93-102) 氨基酸缺損，此片段為決定病毒是否能於試管內牛上皮細胞增殖之主要限制生長因素，故此缺損片段之病毒株証實是造成 O/YUN/TAW/97 病毒株在牛隻體內毒力減弱的原因。在 1997 年爆發當時，由於控制和貿易限制等代價而造成國家經濟受到嚴重的影響 (估計總值超過 60 億美元)。另一病毒株，在金門發現自亞臨床感染的動物，病毒基因含有全長的 3A 非結構蛋白轉譯區，証實為牛之強毒株 (O/TAW/2/99)。O/TAW/2/99 口蹄疫病毒為南亞血清 O 型的地理型 (Topotype)，自 1999 年入侵臺灣。當時疾病爆發後，立即採取檢疫措施，且在感染牧場中進行篩除與銷毀感染的動物。而預防性篩檢疑似感染牧場也同時列入防堵措施。例行性疫苗接種廣泛而成功地使用控制 FMD 疫區尤其從鄰近國家經常受到病毒襲擊與威脅。因此近幾十年來密集性的家畜預防接種最

終使疫區國家降低並根除感染發生源，使他們重獲為非口蹄疫的國家。在臺灣執行口蹄疫之撲滅計畫包括全面性疫苗接種及大量非結構蛋白抗體檢測之血清學調查以確定動物未感染野外病毒。

當口蹄疫病毒複製期間，抗體會產生病毒外鞘之結構蛋白和非結構蛋白，而後者與病毒複製有關。全球使用在例行接種之疫苗為全病毒不活化疫苗，即以細胞培養增殖之病毒製成，所有的口蹄疫疫苗在製造生產過程中皆需要純化處理，將 NSP 去除乾淨，因此注射口蹄疫疫苗的動物應只對結構性蛋白質產生抗體。疫苗抗原純化完全可提供兩個目的，第一就是能除去引起過敏反應的蛋白質，第二可除去 NSP 或者降低疫苗中的含量。因此預期抗原純化製備而成的疫苗將不會引發 NSP 抗體的產生。使得研發各種針對檢測非結構蛋白抗體的試劑具有能力以區別自疫苗接種後所感染的動物。相當多的努力著重於發展快速而準確地檢測 NSP 抗體的新方法及技術，且要求診斷技術須符合一致化和標準化。迄今各種檢測 NSPs (2C、3A、3B、3AB、3ABC、3D) 抗體的診斷試驗如乳膠微珠凝集試驗 (latex beads agglutination test)、酵素連結免疫吸附法 (enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA) 已可成功地從疫苗接種的動物中區別檢除感染動物。NSP 有些從重組的 *Escherichia coli* 或者在適當的重組 *Baculovirus* 轉染昆蟲細胞及胜肽合成 (Peptide synthesis) 製造產生。為了降低偽陽性的數目，一種酵素連結免疫電泳轉漬法 (enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay; EITB) 已使用當作確認的試驗方法。EITB 採用的 NSP 有 2B、2C、3A、3B、3ABC 和 3D 等，所有的試驗分析皆必須在實驗室以各種儀器設備及專業技術完成。

我國已於 2003 年 5 月 22 日經世界動物衛生組織 (OIE) 宣佈認定為「疫苗接種之口蹄疫非疫國」，迄今所有偶蹄類家畜全面施打口蹄疫不活化疫苗。由於不活化疫苗不會產生非結構蛋白抗體，而動物自然感染才會產生，故常以目前國內市售的有美國 UBI (3B)、荷蘭 Ceditest (3ABC)、瑞士 Chekit (3ABC) 等三種酵素連結免疫吸附分析 (Enzyme-linked Immunosorbent Assay; ELISA) 套組來檢測血清中非結構蛋白(NSP)抗體作為區別口蹄疫自然感染與疫苗免疫的依據。

本發明利用免疫色層分析測試片檢測口蹄疫之方法，基於為解決目前市售之 ELISA 套組檢測步驟繁瑣與時間過長之問題進行改進，本方法係先行分析口蹄疫病毒之非結構蛋白核酸序列，以 RT-PCR 方法增幅病毒核酸，再由原核系統表現非結構蛋白抗原，應用固相色層分析原理並結合免疫膠體金及材料方法的改良等建構而成，經試驗證實可同時檢測口蹄疫 O、A、C、Asia 1 等四種血清型別，且不會與豬水疱病抗血清產生非特異性反應。只要一滴體液滴在免疫色層分析測試片上即可在 10-20 分鐘快速完成定性檢測，配合手持式 POCT 檢測器於 40-50 分鐘內完成定量檢測已充分具備新穎性。相較於目前市售之 ELISA 套組織檢測時間需 4~5 小時完成，本方法不需搭配貴重桌上型儀器即可快速得知檢測結果，其特異性為 98.8~100% 及敏感性為 93.3~95.6%；傳統市售之三種 ELISA 套組之特異性分別為 A：100%、B：85.3~100%、C：100% 及敏感性為 A：96.7~98.1%、B：97.5~100%、C：45.6~46.7%。相較於目前市面上市售之 ELISA 套組，執行上需要多重步驟、時間耗費且壟長。此外這些檢測要求較長之培養時間導致拖延診斷，由於口蹄疫是高度接觸傳染故時間是重要關鍵，因此任何診斷上之拖延將會導致疫病快速散播至尚未受

感染的動物因而造成更大產量及經濟上之損失。

國內目前仍為世界動物衛生組織（OIE）認定之口蹄疫使用疫苗非疫區，本產品適用於自免疫動物中檢除感染動物之區別診斷方法，可視為未來國內口蹄疫疫苗全面停止施打後步入非疫國時之最佳快速診斷工具。本產品亦可同步開發國外市場，以供作疾病發生場由防疫人員例行性疾病檢診服務之最快速而理想的測試工具。因此本發明具產業利用性及市場性。

茲為使 貴審查委員對本發明之技術特徵及所達到之功效有更進一步之瞭解與認識，謹佐以較佳之實施例及配合詳細之說明如後。

【發明內容】

本發明之一種利用免疫色層分析測試片檢測口蹄疫之方法，其中係載於測試片上建立口蹄疫病毒之非結構蛋白之核酸序列，係以 RT-PCR 方法增幅病毒核酸，經由原核系統進行基因重組載體之構築、轉形作用、表現及量產純化重組蛋白而成。藉此，提供一快速、單一步驟方法以偵測從疑似受感染之動物所採集之液態樣本之抗體及/或抗原。此外，此方法藉以允許從受感染而已注射疫苗之動物中提供快速地保護以判斷是否感染口蹄疫病毒。其優點為操作簡便，不需仰賴儀器，只需一滴體液即可在 10-20 分鐘快速完成定性檢測。本發明之另一目的係將利用免疫色層分析測試片檢測口蹄疫之方法配合手持式 POCT 檢測器視為定量檢測體液中 FMDV NSP 的抗體，可於 40-50 分鐘內完成定量檢測。以 NSP 作為抗原基質，其優點就是可量產出具功能性之可溶性重組蛋白，且安全

無活病毒存在之慮，易於量產純化以獲得高濃度蛋白，進而製程穩定且操作標準化及降低量產成本。因此研發一套具快速、簡便、敏感、安定及特異性兼具準確度之產品，屆時將可於國內停止使用疫苗而成為口蹄疫非疫國時之應用，甚至有機會將口蹄疫病毒非結構蛋白抗體檢測之免疫色層分析測試片推廣至國外市場將是未來發展的新目標，本免疫色層分析測試片適合由國內外疾病發生場之防疫人員使用，尤其是在例行性檢診服務中是項快速而理想之測試方法。

承上所述，本發明方法步驟依序包含：

- (1) 建立口蹄疫 O / TAW / 97 及 O / TAW / 99 病毒非結構蛋白之核酸之序列標的基因；
- (2) 利用 RT-PCR 方法設計特異性引子及製備目標病原之 cDNA 模板與 DNA 純化產物；
- (3) 將步驟(2)重組之基因片段構築表現於 pET 載體上；
- (4) 核酸序列定序確認結果以符合重組標的基因的嵌入試驗；
- (5) 執行轉形作用、重組蛋白質的誘導表現及純化；以及
- (6) 執行重組蛋白質之功能性試驗。

最後，評估免疫色層分析測試片與檢測口蹄疫非結構蛋白抗體之三種 ELISA 套組之比較。

本發明之一種口蹄疫病毒非結構蛋白抗體免疫色層分析測試片於臨床上之檢測應用於定性判定、診斷與定量判定。則本產品之特性已具備以下優點如：(a)靈敏

度、(b)專一性、(c)簡易性、(d)穩定性以及(e)經濟性。

上述優點概述如下：

(a)靈敏度：以陽性體液樣品檢測免疫色層分析測試片可達 10^{-6} 次方稀釋倍數。

(b)專一性：已證實可檢測口蹄疫病毒 O、A、C、Asia1 等血清型試驗。

(c)簡易性：檢測步驟較商品化之 ELISA 試驗套組簡易，反應過程中不需經清洗步驟，只要樣品直接稀釋後即可快速完成檢測，與一般需 4-5 小時完成的 ELISA 試驗套組更為簡便，而本測試片可進行定性及定量分析，定性只需 10-20 分鐘，則定量需 40-50 分鐘完成。定量過程不用搭配昂貴之桌上型儀器，只需配合使用手持式 POCT 檢測器，即可快速獲得測試結果。

(d)穩定性：可於室溫（ 26°C - 30°C ）下保存半年以上。

(e)經濟性：以量產方式降低生產成本。

本發明係為開發一套利用免疫色層分析測試片檢測口蹄疫之方法，即利用遺傳工程等先進技術製成，係基於安全考量的設計原理，而無慮病原再活化之風險，只要一滴體液即可在 10-20 分鐘快速完成定性檢測，另配合以台灣元生生物科技公司研發之手持式口袋型 POCT 檢測器可於 50 分鐘內完成定量檢測。預期國內當口蹄疫疫苗接種停止施行步入非疫區之後，可提供檢疫單位協

助養豬業者迅速得知病豬是否感染病原的檢測方法。除此之外，免疫色層分析測試片也可應用推廣至國外已感染口蹄疫的國家，如此建立一個疾病診斷的新模式，往後甚至可以此研發技術廣泛地應用在其他動物性疾病，以供作國內外疾病發生場所防疫人員例行性疾病檢診服務之最快速而理想的測試工具。

【實施方式】

以下將參照相關圖式，說明依本發明較佳實施例之利用免疫色層分析測試片檢測口蹄疫之方法，為使便於理解，下述實施例中之相同元件係以相同之符號標示來說明。

請參閱第 1 圖係為本發明利用免疫色層分析測試片檢測口蹄疫之方法步驟流程圖：

步驟 S1：自一基因庫（GenBank）之核酸資料庫中搜尋有關口蹄疫 O / TAW / 97 及 O / TAW / 99 病毒非結構蛋白核酸序列之免疫決定位基因作為決定偵測的標的基因。

步驟 S2：利用 RT-PCR 方法將上述該病毒非結構蛋白核酸序列，設計具特異性可增幅口蹄疫病毒非結構蛋白基因區段 cDNA 模板之專一型引子，正股引子(FMDV-3ABC-F)：

5'-CACCGGATCCTGTCGCGAGACTCGCAAG
AGACAGCAG-3'、

反股引子(FMDV-3ABC-R)：

5'-CCCGAATTCGCACGTCTTCCCGTCGAGGA
TGAGCTC -3'，

正股引子(FMDV-3BC-F)：

5'-CACCGGATCCTGTGGACCCTACACC -3'、

反股引子(FMDV-3BC-R)：

5'-CCCGAATTCGCACGTCTTCCCGTCGAG -3'以
合成 DNA 產物。

步驟 S3：分別將標的基因 DNA 核酸序列之片段載入原核表現 pET 載體完成重組質體(pTH525B、pTH294B)之構築。

步驟 S4：藉以 DNA 核酸定序比對確認切割位(*Bam*HI、*Eco*RI)及嵌入片之大小符合預期設計的 DNA 片段(525bp、294bp)等之嵌入試驗。

步驟 S5：執行將已確認 DNA 質體轉形於原核表現系統後，經選殖菌落生長於 LB (Luria-Bertani)細胞培養液產生達至 OD600 為 0.8~1 間的菌量，再加入最終溶度 1mM IPTG (Isopropylthiogalactoside) 於 37 °C 250 rpm 轉速進行誘導表現時，*E.coli* BL21(DE3)中的 DE3 插入基因就可產生 T7 RNA polymerase (係為一種酵素)，此酵素進而啟動 pET 載體上 T7 啟動子表現重組基因。回溶後的重組蛋白以 12 % 蛋白質膠電泳分析 (SDS-PAGE)確認預期的分子量進而量產及以親和性色層分析法 (HisTrap HP affinity chromatography column; Amersham Biosciences) 純化重組蛋白，完成免疫色層分析測試片之製作，將免疫色層分析測試片應用於體液抗體之檢測。

步驟 S6：將重組蛋白質以西方墨點轉漬分析法 (Western blot assay) 可證實功能性蛋白質約 20-40 KDa 會與 O / TAW /97 及 O / TAW / 99 抗血清產生辨識訊號反應。

免疫色層分析測試片檢測結果判斷之說明如下：如請參閱第 2 圖係為本發明利用免疫色層分析測試片之陽性檢測結果顯示圖，圖中，係與一體液作用呈陽性反應，於免疫色層分析測試片 21 中，出現有兩條明顯之帶狀色線出現，一條顯示於測試區 (T) 22，而另一條顯示於對照區 (C)23。

請繼續參閱第 3 圖係為本發明利用免疫色層分析測試片之陰性檢測結果顯示圖，圖中，係與一體液作用呈陰性反應，於免疫色層分析測試片中，僅出現一條明顯之帶狀線出現於對照區 (C)23 中。

最後，評估免疫色層分析測試片與檢測口蹄疫非結構蛋白抗體之三種 ELISA 套組之比較。將上述所製作完成之免疫色層分析測試片與目前商品化之三種 ELISA 試驗套組酵素連結免疫吸附分析套組進行試驗性比較。於本發明之免疫色層分析測試片具有比上述之三種 ELISA 試驗套組快速檢測之優點以及比 ELISA 試驗套組且不需搭配昂貴的儀器，即可很快地知道測試結果。經由體液樣品之測試結果，顯示於表格 1 中可得知，免疫色層分析測試片之反應時間最短，於進行定性檢測只需 10 - 20 分鐘，而定量檢測 40-50 分鐘，若當口蹄疫疫

情再次爆發時，可以減少許多檢測時間以協助疫區控制災情；則免疫色層分析測試片之敏感性可達 93.3 ~ 95.6 % 及特異性可達 98.8 ~ 100 %，均與目前市售之三種 ELISA 試驗套組敏感性與特異幾乎相等相當，且不需搭配桌上型儀器，可供防疫人員於行進中亦可檢測，增加了便利性。最後本發明之免疫色層分析測試片另經試驗証實可同時檢測口蹄疫 O、A、C、Asia 1 等四種血清型別，且不會與豬水疱病抗血清產生非特異性反應。

表格 1

	檢 測 時 間	特異性 ^a	敏感性 ^a	使用儀器
免疫色 層分析 測試片	定性： 10 - 20 分鐘； 定量： 40-50 分鐘；	98.8 ~ 100 %	93.3 ~ 95.6 %	搭配使用 手持型 POCT 檢 測器完成 定量之分 析
ELISA kit-A	4-5 小時	100 %	96.7~98.1 %	搭配桌上 型儀器完 成 ELISA 定量分析
ELISA kit-B	4-5 小時	85.3~100 %	97.5~100 %	搭配桌上 型儀器完 成 ELISA 定量分析
ELISA kit-C	4-5 小時	100%	45.6~46.7 %	搭配桌上 型儀器完 成 ELISA 定量分析

綜

上
所
述
之
,
其

中引子係為 FMDV-3ABC-F 以及 FMDV-3ABC-R；FMDV-3BC-F 以及 FMDV-3BC-R；非結構蛋白係為蛋白 G 及/或蛋白 A；結構及非結構蛋白包含至少一 VP1、VP2、VP3、VP4、Lb、2B、2C、3A、3D、3AB、3BC 或 3ABC；則於利用免疫色層分析測試片檢測口蹄疫之方法中，口蹄疫病毒抗體係特別用於非結構性口蹄疫病毒蛋白包含至少一 Lb、2B、2C、3A、3AB、3BC、3ABC 或 3D。

上述之步驟 S2 反轉錄聚合酶鏈反應 (RT-PCR) 方法詳細過程描述如下：首先病毒核酸的製備，係由細胞培養收集而成的口蹄疫病毒株 (FMDV-O 型株)，取出 100 μ L 置於 1.5 mL 微量管中，再加入 1 mL Trizol 試劑，經震盪 30 秒後置於室溫中 5 分鐘，再加入 0.2 mL 氯仿，經充分混合後於室溫中靜置 3 分鐘，再於溫度 4 $^{\circ}$ C，12,000 轉之轉速進行離心 15 分鐘，萃取經離心分離完後之上清液與等量異丙醇充分混合靜置室溫 10 分鐘。再以溫度 4 $^{\circ}$ C，12,000 rpm 之轉速條件下進行離心 20 分鐘，去除上清液後以真空離心乾燥，乾燥後加入 100 μ L 經 DEPC 處理過之二次蒸餾水即完成。再經由 RT-PCR 方法，將核酸溶液分別裝入 0.5 mL 的微量管中，並加入 10 μ L 之 10 倍 Dynazyme 緩衝液，0.02 微莫耳鹼基 dNTP (dATP、dCTP、dGTP、dTTP 各為 0.5 mM)、8 單位 RNasin、2 單位 AMV 反轉錄酶、1 單位 Supertherm 聚合酶及 0.01 nanomole 引子，最後加入 DEPC 處理水至總體積 50 μ L。混合均勻後置於熱循環機 (Applied Biosystems, Gene Amp PCR system 2400) 中，先以 42 $^{\circ}$ C 進行 40 分鐘，94 $^{\circ}$ C 進行 50 秒之 1 個循環之預熱反轉錄作用，續進行 PCR 反應，條件為 94 $^{\circ}$ C 變性 30 秒，55 $^{\circ}$ C 煉合 30 秒，68 $^{\circ}$ C 延展 1 分鐘，進行 35 個循環，72 $^{\circ}$ C 7 分鐘直到降溫至 4 $^{\circ}$ C 為止。則上述之 RT-PCR 產物全部以 2% 的瓊脂膠片 (Agarose gel) 電泳進行分析。

已上所述僅為舉例性，而非為限制性者。任何未脫離本發明之精神與範疇，而對其進行之等效修改或變更，均應包含於後附之申請專利範圍中。

【圖式簡單說明】

第 1 圖係為本發明利用免疫色層分析測試片檢測口蹄疫之方法步驟流程圖；

第 2 圖係為本發明利用免疫色層分析測試片檢測口蹄疫之方法之陽性檢測結果顯示圖；

第 3 圖係為本發明利用免疫色層分析測試片檢測口蹄疫之方法之陰性檢測結果顯示圖；以及

表格 1 係為本發明利用免疫色層分析測試片與商品化之三種 ELISA 試驗套組檢測結果比較圖表。

【主要元件符號說明】

S1：步驟；

S2：步驟；

S3：步驟；

S4：步驟；

S5：步驟；

S6：步驟；

S6：步驟；

21：免疫色層分析測試片；

22：測試區 (T)；以及

23：對照區 (C)。

五、中文發明摘要：

本發明係揭露一種利用免疫色層分析測試片 (Chromatographic strip ; pen-side strip) 檢測口蹄疫之方法，此方法係先行建立口蹄疫病毒之非結構蛋白核酸序列，以反轉錄聚合酶鏈反應 (Reverse transcription-polymerase chain reaction ; RT-PCR) 方法增幅病毒核酸，經由原核系統進行基因重組載體之構築、轉形作用、表現及量產純化重組蛋白而成。則此利用免疫色層分析測試片檢測口蹄疫之方法，是利用免疫色層分析原理設計而成，其優點為操作簡便，不需仰賴儀器，只要一滴體液即可在 10-20 分鐘快速完成定性檢測，且亦可配合手持式就地醫護檢測器 (Point of care testing ; POCT) 於 40-50 分鐘內完成定量檢測。

六、英文發明摘要：

十、申請專利範圍：

- 1、一種利用免疫色層分析測試片檢測口蹄疫之方法，其中該方法係利用口蹄疫病毒之非結構蛋白核酸序列設計引子，以 RT-PCR 方法增幅病毒核酸，經由原核系統進行基因重組載體之構築、轉形作用、表現及量產純化重組蛋白而成，該免疫色層分析測試片滴入一滴體液可快速完成定性檢測及搭配手持式 POCT 檢測器完成定量檢測，該方法包含以下步驟：
 - (S1) 自一基因庫之核酸資料庫中搜尋有關口蹄疫 O / TAW / 97 及 O / TAW / 99 病毒非結構蛋白核酸序列之免疫決定位基因作為決定偵測的標的基因；
 - (S2) 利用 RT-PCR 方法將上述該病毒非結構蛋白核酸序列，設計具特異性可增幅口蹄疫病毒非結構蛋白基因區段 cDNA 模板之專一型引子，用以合成 DNA 產物；
 - (S3) 分別將標的基因 DNA 核酸序列之片段載入原核表現載體完成重組質體之構築；
 - (S4) 藉以 DNA 核酸定序比對確認切割位及嵌入片段之大小符合預期設計的 DNA 片段等之嵌入試驗；
 - (S5) 執行將已確認 DNA 質體轉形於原核表現系統後，經最終濃度 1mM IPTG 誘導表現，並利用蛋白質膠電泳分析 (SDS-PAGE assay) 樣品以確認預期的分子量進而量產及利用親和性色層純化分析法 (HisTrap-HP) 純化重組蛋白，完成製作該免疫色層分析測試片，以偵測體液抗體；以及
 - (S6) 將重組蛋白質利用西方墨點轉漬分析法 (Western blot assay) 可證實功能性蛋白質約 20~40 KDa 會與 O / TAW / 97 及 O / TAW / 99 抗血清產生辨識訊號反應。
- 2、如申請專利範圍第 1 項所述之利用免疫色層分析測試片檢測口蹄疫之方法，其中該方法係以免疫色層分析方法為設計原理。
- 3、如申請專利範圍第 1 項所述之利用免疫色層分析測試片檢測口

蹄疫之方法，其中該專一型引子係為正股引子
FMDV-3ABC-F、FMDV-3BC-F。

- 4、如申請專利範圍第3項所述之利用免疫色層分析測試片檢測口蹄疫之方法，其中該：

FMDV-3ABC-F 係為

5'-CACCGGATCCTGTCGCGAGACTCGCAAGAGACAGCAG-3'、

FMDV-3BC-F 係為

5'-CACCGGATCCTGTGGACCCTACACC-3'。

- 5、如申請專利範圍第1項所述之利用免疫色層分析測試片檢測口蹄疫之方法，其中該專一型引子係為反股引子 FMDV-3ABC-R、FMDV-3BC-R。

- 6、如申請專利範圍第5項所述之利用免疫色層分析測試片檢測口蹄疫之方法，其中該：

FMDV-3ABC-R 係為

5'-CCCGAATTCGCACGTCTTCCCGTCGAGGATGAGCTC-3'、

FMDV-3BC-R 係為

5'-CCCGAATTCGCACGTCTTCCCGTCGAG-3'。

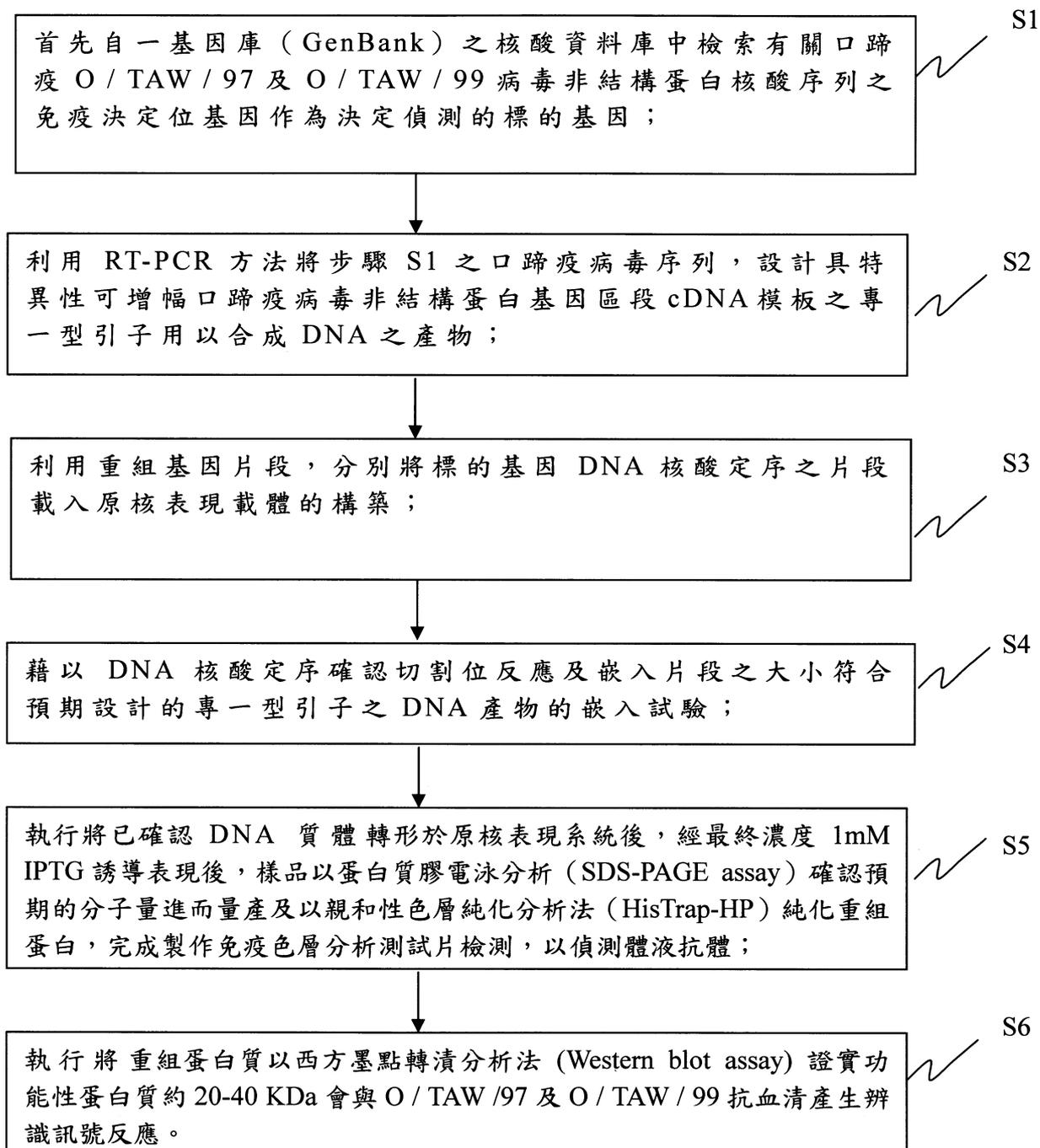
- 7、如申請專利範圍第1項所述之利用免疫色層分析測試片檢測口蹄疫之方法，其中該結構及非結構蛋白係包含至少一 VP1、VP2、VP3、VP4、Lb、2B、2C、3A、3D、3AB、3BC 或 3ABC。

- 8、如申請專利範圍第1項所述之利用免疫色層分析測試片檢測口蹄疫之方法，其中該非結構蛋白係為蛋白 G 及/或蛋白 A。

- 9、如申請專利範圍第1項所述之利用免疫色層分析測試片檢測口蹄疫之方法，其中該口蹄疫病毒抗體係特別用於非結構性口蹄疫病毒蛋白包含至少一 Lb、2B、2C、3A、3AB、3BC、3ABC 或 3D。

- 10、如申請專利範圍第 1 項所述之利用免疫色層分析測試片檢測口蹄疫之方法，其中該測試片係可同時檢測口蹄疫病毒 O、A、C、Asia1 四種血清型別。
- 11、如申請專利範圍第 1 項所述之利用免疫色層分析測試片檢測口蹄疫之方法，其中該體液可為一全血或一血清。
- 12、如申請專利範圍第 1 項所述之利用免疫色層分析測試片檢測口蹄疫之方法，其中該免疫色層分析測試片可 10-20 分中完成定性檢測。
- 13、如申請專利範圍第 1 項所述之利用免疫色層分析測試片檢測口蹄疫之方法，其中該手持式 POCT 檢測器可 40-50 分中完成定量檢測。

十一、圖式：



第 1 圖

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(1)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

S1：步驟；

S2：步驟；

S3：步驟；

S4：步驟；

S5：步驟；

S6：步驟；以及

S6：步驟。

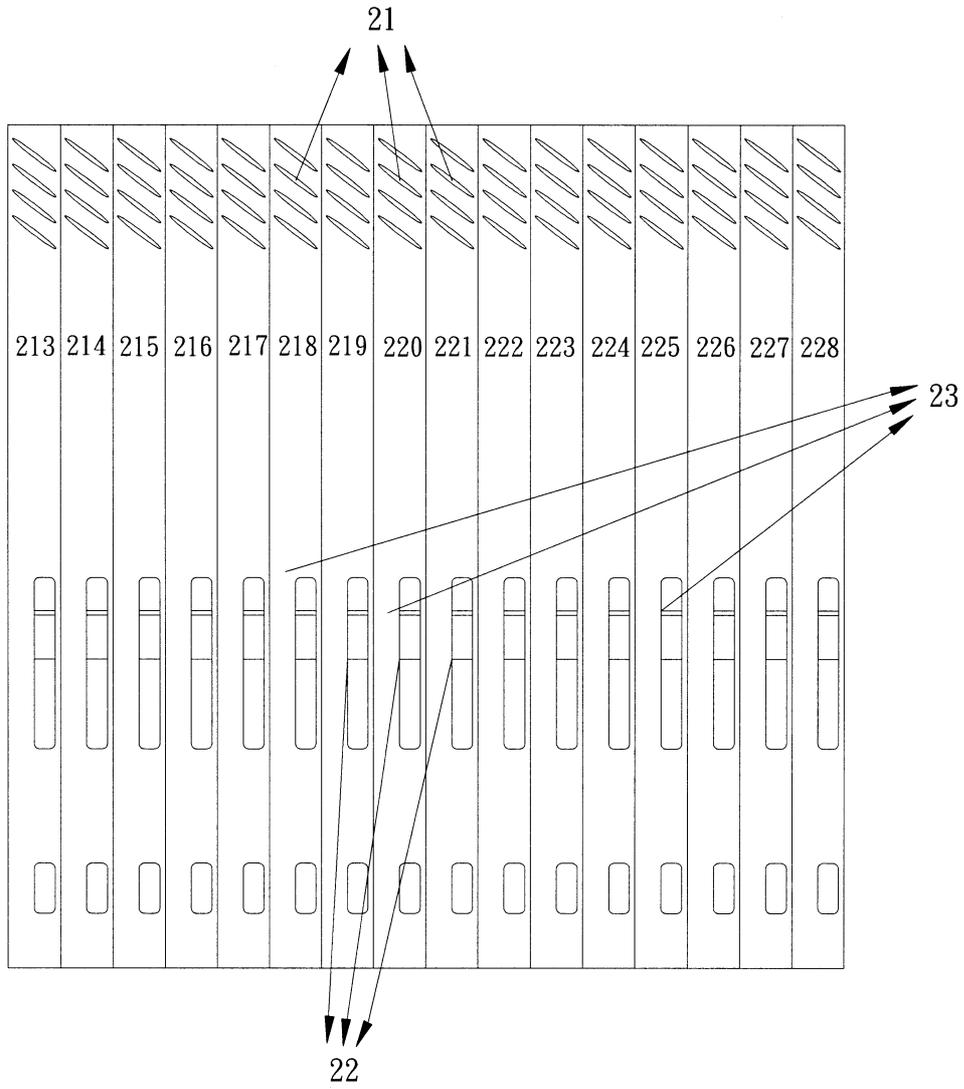
八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

九、發明說明：

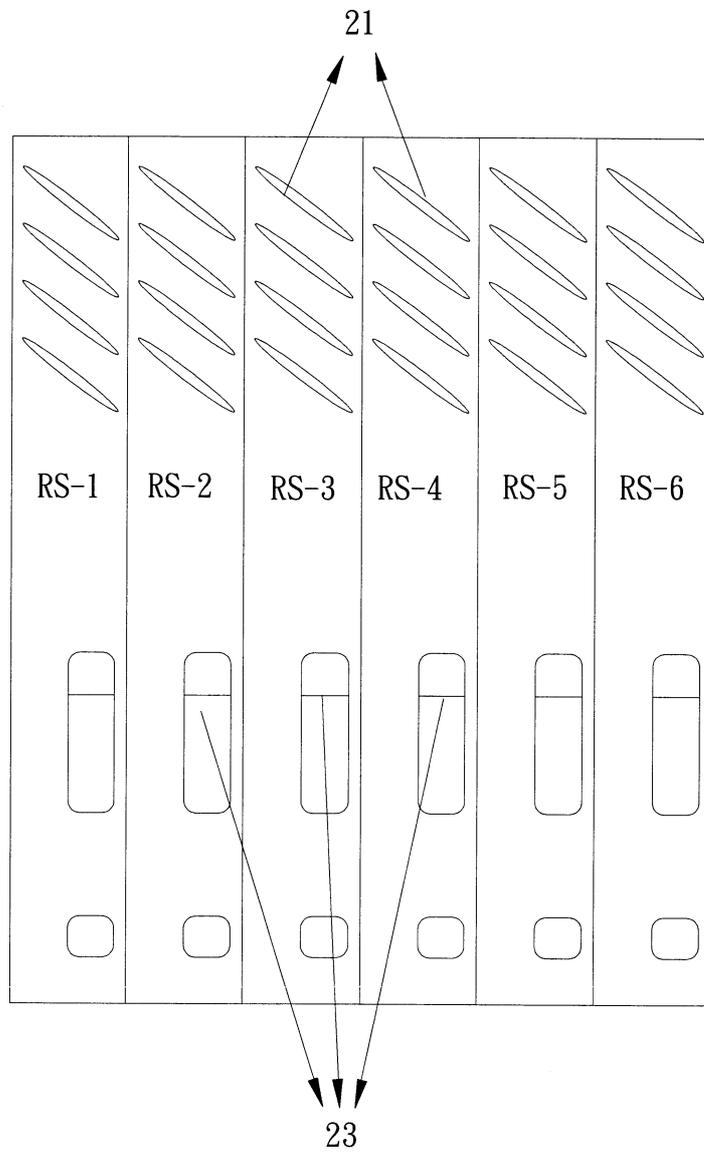
【發明所屬之技術領域】

本發明是有關於一種臨床免疫學領域及一種檢測對於動物口蹄疫病毒之結構性蛋白及/或非結構性蛋白之抗體，特別是有關提供一種快速、定性、定量、高敏感度及特異性兼具之免疫色層分析檢定之方法。

196年7月 補充



第 2 圖



第 3 圖