

應用恆溫環形核酸增幅法 (Loop-mediated Isothermal Amplification, LAMP) 偵測家禽流行性感冒病毒核酸

報告人：李敏旭 副研究員 (疫學研究組)

壹、緒言

核酸增幅技術已成為生命科學研究領域最重要的工具之一，一般較熟知常用的聚合酶鏈反應 (PCR) 為藉由溫度的變化來進行雙股基因的裂解、鍊合及延展以達到基因的增幅，但此技術的專利權卻也限制了其應用的廣泛性，所以為了避開 PCR 的專利及開發出更簡便的其他核酸增幅技術方法，目前已發展出如依賴核酸序列擴增法 (Nucleic acid sequence-based amplification, NASBA)、自主序列複製系統 (self-sustained sequence replication, 3SR)、鏈替代擴增法 (strand displacement amplification, SDA) 等。2000 年日本 Notomi 等人研發出恆溫環形核酸增幅法 (LAMP)，由於操作簡單，使用儀器僅需溫度可達 60-65°C 恆溫的水浴槽或乾熱板 (heat block)，因此適合應用於田間篩檢或大規模檢疫篩檢工作用。

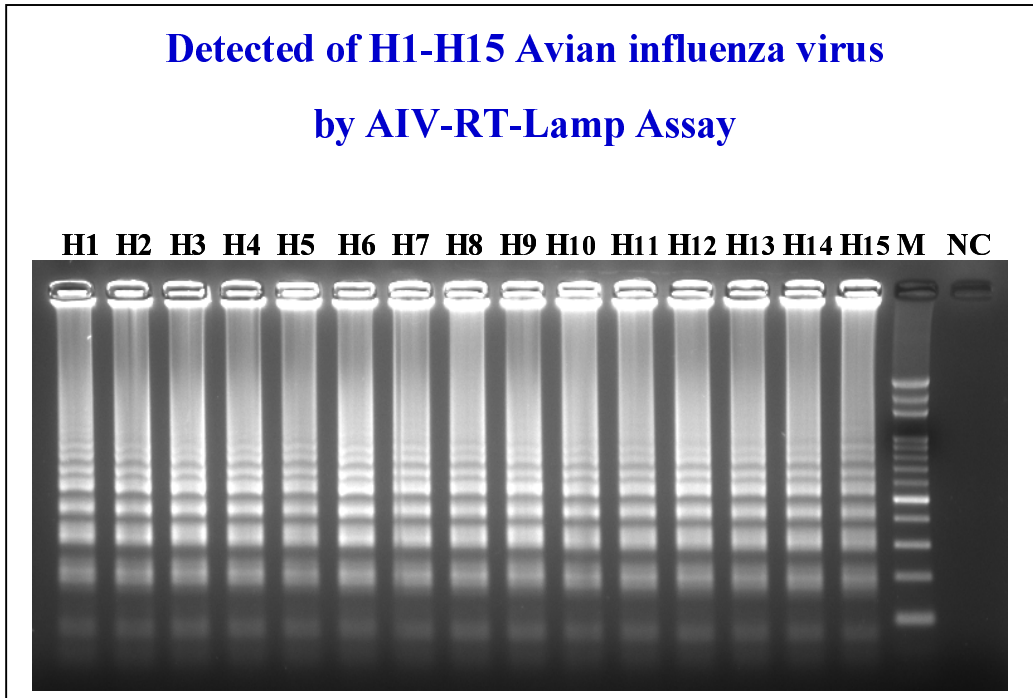
貳、材料與方法

病毒來源為包含 H1-H15 & N1-N9 亞型家禽流行性感冒病毒株，病毒以 9-11 日齡無特定病原 (specific pathogenic free, SPF) 胚胎蛋增殖，並利用電子顯微鏡及特異性引子進行 PCR 確認病毒。針對家禽流行性感冒病毒設計一組共通性引子 (包含 F3、FIP & B3、BIP) 供作檢測之用，引子濃度 F3 & B3 為 5 pmol、FIP & BIP 為 40 pmol，反應總體積為 25 μ l，反應溫度控制由循環溫控儀 (Thermocycler, Hybaid) 完成恆溫環形核酸增幅之反應條件 (65°C 60 分)，特異性產物並以定序確認反應之正確性。

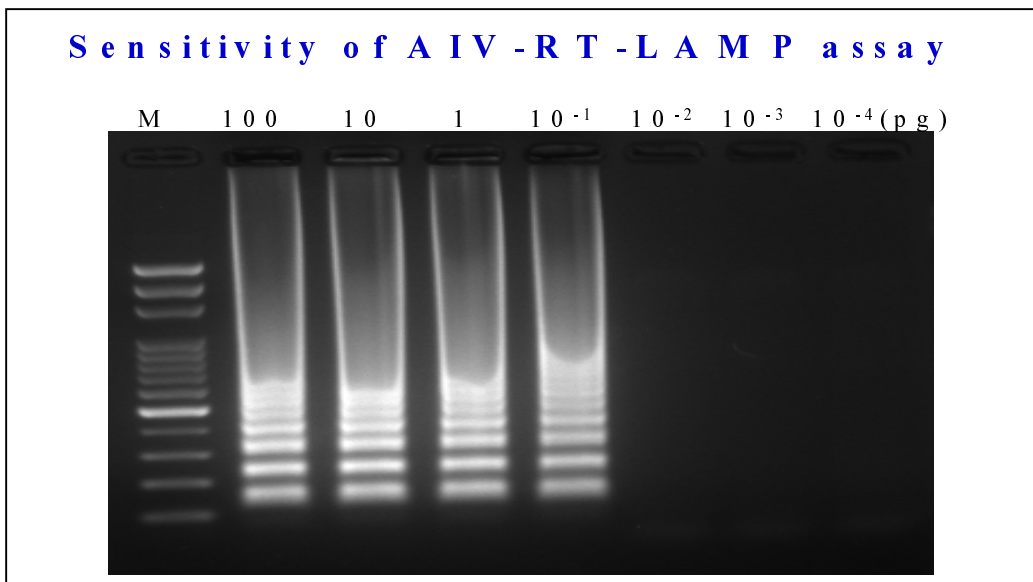
參、結果與討論

我們以各種亞型家禽流行性感冒病毒核酸進行恆溫環形核酸增幅特異性基因，結果可以得到全部的家禽流行性感冒病毒核酸均可被增幅出來，顯示本試驗中所設計之引子組具有很好之通用性，而應用在其他家禽常見的病毒如新城病病毒、家禽支氣管炎病毒、傳染性華氏囊炎病毒、家禽里奧病毒、腫頭症候群病毒、馬立克病毒及雞痘病毒等核酸都不會被增幅出產物，顯示此組引子的特異性甚佳，另外在檢測的敏感性試驗中，以萃取好的家禽流行型性感冒病毒核酸經測定其核酸濃度後，以 10 倍稀釋法多階稀釋後個別濃度進行恆溫環形核酸增幅反應，結果顯示此反應法的敏感性可達到 $10^{-1} \sim 10^{-2}$ pg，比較一般的傳統 RT-PCR 具有 $10^{-1} \sim 1$ pg 敏感性而言其靈敏度更佳，且稍靈敏於 Real-time RT-PCR，但較差於巢式 PCR 靈敏度。恆溫環形核酸增幅法的應用性因為設備簡單且判讀容易，加上

本反應法有十分靈敏的檢測性，很適合被發展當作田間病例檢測平台以及病例爆發時大量樣本篩檢使用之技術，而本試驗為目前第一個針對所有亞型家禽流行性感冒病毒設計通用性引子組進行恆溫環形核酸增幅法檢測。



圖一、以 PT-Lamp 偵測 H1-H15 亞型家禽流行性感冒病毒核酸



圖二、測試以 PT-Lamp 檢測家禽流行性感冒病毒核酸量