

# 水產生物病毒檢測利器－恆溫環形核酸增幅技術

李佳芳、葉信利

水產試驗所海水繁養殖研究中心

台灣養殖產業常受到病毒性疾病的影響造成嚴重經濟損失，為減少病毒感染，疾病的預防及監測相當重要。常見的病毒檢測方式有聚合酵素鏈鎖反應 (PCR)、酵素連結免疫吸附法 (ELISA)、電子顯微鏡觀察等，雖然可以有效及精確的偵測病毒感染，但都僅能在實驗室中，透過昂貴的儀器設備與試劑進行，耗費時間長且需仰賴專業人員方能完成，在現場應用上有諸多限制。

Notomi 等於 2008 年研發出新的 DNA 擴增方式－恆溫環形核酸增幅法 (loop-mediated isothermal amplification, LAMP)，具有快速、高專一性及高敏感度之特點，僅需於 60–65°C 恆溫下反應 1 小時即可偵測病毒，操作簡單且不需昂貴的設備，適合應用於養殖現場。LAMP 所用之聚合酶為具核酸股置換活性的 *Bst* DNA 聚合酶，在標的 DNA 片段選取 6 個區域，設計成 2 對專一性的內引子及外引子，藉由聚合酶作用，擴增標的 DNA 片段，可專一性的偵測特定病毒。因內引子之特殊設計，擴增產物會由許多莖-環結構的 DNA 連結，可經由副產物焦磷酸鎂所形成之白色沉澱物或加入螢光染劑，快速以肉眼觀察結果，目前已應用於許多水產生物，包括蝦類的傳染性表皮與造血組織壞死症病毒 (IHNV)、陶拉病毒 (TSV)、黃頭病毒 (YHV) 及白點病毒 (WSSV)；在魚類則有嘉鱘虹彩病毒 (RSIV)、鯉魚春季毒血症病

毒 (SVCV)。此外也用於引起鰻魚愛德華氏症的 *Edwardsiella tarda* 及藻種檢測上。

LAMP 檢測技術操作容易、快速、便宜、高專一性及高敏感度，且不需昂貴儀器設備及專業技術人員，方便養殖現場應用，因此可及早偵測水產生物是否感染病毒，避免引入帶病毒之魚蝦，並可在養殖期間做好監控措施，減少病毒爆發及疫情擴散。

PCR 檢測與 LAMP 檢測比較表

	PCR檢測	LAMP檢測
DNA聚合酶	<i>Taq</i> DNA聚合酶	<i>Bst</i> DNA聚合酶
雙股DNA分離方式	藉由 PCR 反應機，以高溫(92-95°C)分離	聚合酶具有核酸股置換活性，合成新的 DNA 股時會將已合成之核酸股分離
作用溫度	72°C	60-65°C
引子設計	選取標的 DNA 的2個區域，設計1對引子	選取標的 DNA 的6個區域，設計2對引子(內引子及外引子)
反應時間	1-1.5小時	1-1.5小時
結果觀察	經凝膠電泳後以溴化乙錠染色，藉由紫外線照射觀察	經由副產物焦磷酸鎂所形成之白色沉澱物或加入螢光染劑以肉眼觀察
靈敏度		比1次PCR高。如樣品為 DNA 病毒者靈敏度比2次PCR高
所需設備	PCR反應機	恆溫加熱器
設備費用	貴	便宜
技術人員	需要	不需要