

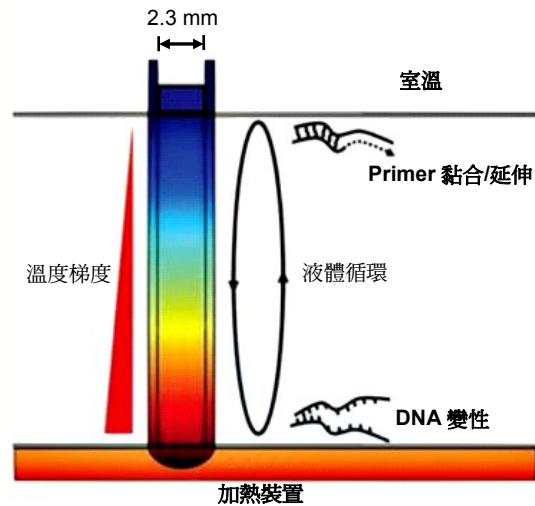
對流式聚合酶連鎖反應及其檢測設備之簡介

鄭元割、鄭金華、陳紫嫻

水產試驗所東港生技研究中心

聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 是指在不同溫度下，DNA 經過變性、黏合與延伸三個階段，並經多次循環後，大量擴增出特定的 DNA 序列 (amplicon)。而對流式聚合酶連鎖反應 (convective PCR, cPCR) 則是一種較為新穎的 PCR 操作方法。有別於傳統 PCR，在 cPCR 的整個反應過程中，其加熱裝置不需要不斷改變溫度即可達到擴增 DNA 數量的效果。本方法事實上是為瑞利－貝納爾對流 (Rayleigh-Bénard convection) 的應用。瑞利－貝納爾對流是指封閉液體經由底部加熱時所產生的熱對流形式，底層受熱部分的液體因密度變小而產生浮力向上移動，進而使得上層溫度較低的液體往下沉降。而其在高一低的兩個溫度之間形成循環水流特性，被認為適合應用於需要溫度變化循環的化學反應 (如圖)。Krishnan et al. (2002) 依此原理，在壓克力方塊上下分別設置高溫 (97°C) 與低溫 (61°C) 環境，並於方塊中的圓柱狀孔槽中進行 cPCR，成功得到經過擴增的 DNA 片段，其結果與傳統 PCR 設備在相同條件下所得之結果相似。

爾後，便開始有學者以 cPCR 的概念進行設備開發。cPCR 的加熱溫度是固定的，無需一直改變，因此設備可趨於簡化，成本也



對流式聚合酶連鎖反應作用原理 (Chou et al., 2011)

得以降低。此外，亦大幅減少消耗的電力及等待的時間，整個 PCR 操作過程從原本的 2.5 小時左右縮短至 30 分鐘 (Krishnan et al., 2004)。更有甚者，在內徑在 1 mm 以下的塑膠管中進行封閉迴圈 (closed-loop) 的 PCR，不僅可確保所有反應物都具有相同流動軌跡，精確掌握反應物在各溫度區的時間，同時亦可減少使用的反應物體積 (Agrawal et al., 2007; Chen et al., 2004; Krishnan et al., 2004)。

Chou et al. (2011) 的設計只以單一熱源加熱，藉由液體在環境中自然降溫而形成的溫度梯度，在玻璃毛細管中進行 cPCR。只使

用了一組加熱裝置，並且無須特製反應孔槽，整體而言又降低了製造成本與使用門檻。

然而，這樣的設備在環境溫度達到一定程度時，cPCR 的過程會開始受到影響而產生不穩定的結果 (Chou et al., 2011)。Chang et al. (2012) 亦指出，暴露於空氣中的毛細管，裝載的液體容易受周遭環境影響而產生溫度波動。隨著室溫不同與空氣流動，溫度變化幅度可達到 10℃。這樣的溫度波動可能會對管內液體的對流產生干擾，而影響 cPCR 效果。因此，Chang et al. (2012) 在加熱裝置和毛細管周圍裝上了隔熱裝置以隔絕環境和反應液體之間的熱能傳遞，藉此穩定毛細管中的液體對流，即稱為隔絕式恆溫聚合酶連鎖反應 (insulated isothermal PCR, iiPCR)。此設備在保有 cPCR 優點 (反應時間短、靈敏度佳) 的同時，於不同溫度或有風的環境下也皆能穩定作用。

由於 cPCR 中一個循環所需要的時間非常短暫，只有約 25 秒鐘，因此欲擴增的 DNA 序列 (amplicon) 雙股螺旋結構，在變性 (denature) 以及與引子 (primer) 的序列和黏合 (annealing) 的作用溫度配合與否極為關鍵，皆需要特別設計，一些傳統 PCR 可以使用並成功擴增的 primer 可能沒辦法成功應用於 cPCR (Chou et al., 2011; Tsai et al., 2012a)。除此之外，iiPCR 相較 cPCR 更容易出現非專一性產物 (non-specific product, NSP)。為了避免 NSPs 產生偽陽性結果而影響判斷，Tsai et al. (2012b) 便將 TaqMan 探針 (probe) 應用於 iiPCR，在其設備中增加螢光偵測系統，依據 PCR 前後反應物的螢光

量比值來判定目標基因有無。結果顯示該設備靈敏度為 100%、準確度則可達 96.7%，並與傳統 PCR、即時聚合酶連鎖反應 (real-time PCR) 的結果相似，說明該設備可作為一個良好的基因檢測工具。甚至在反應物成本差不多的情況下，該設備可比 real-time PCR 節省約 3 倍的操作時間 (Tsai et al., 2012b) (如表)。

iiPCR 與其他種 PCR 方法之比較

	iiPCR	real-time PCR	傳統 PCR
時間 (分)	35-40	60-120	150-180
花費 (美元/反應)	1-1.5	1-1.5	0.5-1

設備中若再增加光學系統，可使其偵測到不同波長的螢光，如此一來，多重 (multiplex) iiPCR 便得以進行，除了目標基因外可以再偵測內部控制組 (internal control)，以確保 PCR 結果的真實性 (Tsai et al., 2014)。

操作簡易、反應時間短是該技術最大的優點，對於只在乎「目標基因的有無」的人來說是極為便利的。目前，iiPCR 設備已商業化 (Tsai et al., 2014)，該設備已能成功檢測數種蝦類病毒基因，如白點症病毒 (WSSV)、傳染性皮下及造血組織壞死症病毒 (IHHNV)、傳染性肌肉壞死病毒 (IMNV) 等 (Tsai et al., 2012a, b; Tsai et al., 2014)。其他蝦類、魚類疾病檢測試劑亦開發上市。除此之外，設計成可攜帶、不插電之樣式也有利於養殖現場使用。因此，iiPCR 技術對於養殖產業在疾病檢測方面能有正向的輔助效果。