

鈣黃綠素 (Calcein) 於環形核酸增幅法 (LAMP) 之應用評估

陳麗璇*

行政院農業委員會家畜衛生試驗所

摘要 環形核酸增幅法 (Loop-mediated Isothermal Amplification, LAMP) 已被廣泛應用於疾病檢測，若於反應前添加鈣黃綠素，可藉由顏色變化區別陰陽性反應，本研究目的為比較不同濃度之鈣黃綠素運用於環形核酸增幅法之效果，結果顯示 $25 \mu\text{M}$ calcein- $500 \mu\text{M}$ MnCl_2 、 $50 \mu\text{M}$ calcein- $500 \mu\text{M}$ MnCl_2 與 $75 \mu\text{M}$ calcein- $500 \mu\text{M}$ MnCl_2 三組搭配均利於肉眼直接辨識。若要同時滿足即時濁度檢測儀 (Real-time turbidity) 及即時螢光核酸定量儀 (Real-time quantitative PCR) 的需求，則以 $25 \mu\text{M}$ calcein- $500 \mu\text{M}$ MnCl_2 較為適合。

關鍵字：鈣黃綠素、環形核酸增幅法

前言

LAMP為Loop-mediated Isothermal Amplification的縮寫，為Notomi等人於2000年所提出的新式增幅法[8]，擁有特異性高、效率佳及快速的優點，可辨認目標基因的6段序列以及恆溫進行增幅核酸，可在一小時內使得數個模板的目標基因增幅至 10^9 ，由於反應過程中大量合成核酸，所產生的副產物焦磷酸根會與反應試劑中的鎂離子產生不可溶的沈澱物[7]，因此可藉由肉眼可辨的混濁直接判別反應結果。2004年即時偵測濁度儀器的上市，更利於LAMP反應的分析[6]。LAMP反應的技術已經陸續應用於疾病的檢測，不論DNA或RNA的病原，像是犬小病毒[1]、流行性感胃的H5N1病毒[2,3,5]、西尼羅熱[9]或錦鯉疱疹病毒[10]等重大動物疾病的檢測，甚至可以進一步以限制酶切割法輔助應用為multiplex LAMP，同時檢測2種不同種別的焦蟲病原[4]。由於以往LAMP反應之DNA產物可高達 $10\text{-}20\mu\text{g}/25\mu\text{L}$ ，為一般聚合酶鏈反應 ($0.2\mu\text{g}/25\mu\text{L}$) 的50-100倍，因此可於反應結束後加入螢光染料SYBR Green I，以輔助肉眼判讀。

2008年Tomita利用一種鎂離子指示劑-鈣黃綠

素 (Calcein)，可於反應前即加入試劑中，以利於反應結束時直接以顏色判別陽陰性。原理為先以錳離子抑制鈣黃綠素的螢光，當反應進行呈陽性反應時，代表有大量的焦磷酸根的產生。而焦磷酸根會與鈣黃綠素競爭錳離子，並同樣形成不可溶的沈澱物。鈣黃綠素失去錳離子的抑制效果之後，便會接受鎂離子並在365 nm紫外光激發之下散發出螢光，所釋放出之螢光約510 nm的波長，由原本的橘紅色轉為蘋果綠[11]。因此本研究將同時應用於即時濁度檢測儀、分光光譜儀 (spectrophotometer) 及即時螢光核酸定量儀來偵測，以獲得更可靠及敏感性之實驗結果，來評估鈣黃綠素的應用效果。

材料與方法

Tomita等人[11]使用鈣黃綠素與氯化錳的濃度分別為 $25\mu\text{M}$ 及 $500\mu\text{M}$ ，為了瞭解鈣黃綠素與氯化錳最適合之濃度，以及促使肉眼可輕易判別，因此以LAMP的反應試劑為基礎 [含Tris-HCl (pH 8.8) 20nM 、KCl 10mM 、 MgSO_4 8mM 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10mM 、0.1% Tween20、Betaine 0.8M 以及dNTPs

*抽印本索取作者
行政院農業委員會家畜衛生試驗所

1.4mM]，配製25 μ M、50 μ M、75 μ M、100 μ M的鈣黃綠素與500 μ M、750 μ M、1000 μ M、1250 μ M、1500 μ M的氯化錳做排列組合，共得20組排列組合，並以分光光譜儀檢測每種組合在不同濃度的焦磷酸鉀之下其濁度的變化，以模擬反應進行中，核酸合成作用發生時出現的焦磷酸根。最後挑出焦磷酸根濃度愈高，濁度變化愈大愈高的組合，表示這樣搭配之下的鈣黃綠素及氯化錳對濁度形成的影響力最小。

上述篩選出的搭配組合，再進行實際檢測同時應用於即時螢光基因定量儀及即時濁度檢測儀，本實驗以不同濃度 *Coxiella burnetii* 之陽性對照以LAMP方式檢測，即時螢光核酸定量儀 (Roche LightCycler 2.0，波長設定530nm) 及即時濁度檢測儀均進行65 $^{\circ}$ C 60分鐘連續偵測。

結果

鈣黃綠素與氯化錳不同濃度組合共20組，經分光光譜儀檢測每種組合在不同濃度的焦磷酸鉀之下其濁度的變化，以25 μ M calcein-500 μ M MnCl₂、50 μ M calcein-500 μ M MnCl₂ 與 75 μ M calcein-500 μ M MnCl₂三組的濁度變化最大，如表1粗體字標示者。

上述三組均以Roche之LightCycler 2.0即時螢光核酸定量儀測試，結果發現50 μ M calcein-500 μ M MnCl₂與75 μ M calcein-500 μ M MnCl₂兩組之起始螢光值較高，容易超出儀器螢光檢測上限，比較不利於判別，因此以25 μ M calcein-500 μ M MnCl₂的組合做為後續試驗的添加標準，如圖1。取出試管可以直接肉眼判別蘋果綠者為陽性反應，橘紅色者為陰性反應，如圖2。

25 μ M calcein-500 μ M MnCl₂的組合再經即時濁度檢測儀檢測，結果顯示LAMP反應添加鈣黃綠素之後，仍然可以即時檢測濁度以判別反應的陽陰性，如圖3，而反應過程中累積濁度曲線顯示濁度最高可達0.6到1.1之間 (圖4)。

討論

添加螢光物質的環形核酸增幅法，利用環形核酸增幅反應的進行不需反覆升溫降溫，在田間或設備不足的地方，可利用簡單的恆溫設備進行，不僅可將核酸之檢測縮短為45-60分鐘，目標基因也能自個位數放大到10⁹。本研究利用鈣黃綠素的添加，期使肉眼判別更加容易。

以此研究結果來看，鈣黃綠素濃度愈高者，顏色較為明顯，也有較大的色差供肉眼辨識，因此25 μ M以上的鈣黃綠素，才有足夠的呈色供肉眼辨識。而25 μ M calcein-500 μ M MnCl₂、50 μ M calcein-500 μ M MnCl₂與75 μ M calcein-500 μ M MnCl₂三組均能滿足肉眼辨識的條件，亦適合使用於田間或設備不足的場所。

若是希望單一濃度能同時適用於即時濁度檢測儀及即時螢光基因定量儀，則仍以文獻所使用的25 μ M calcein-500 μ M MnCl₂較為適當[11]，也較不影響反應之進行。然而鈣黃綠素添加之後，有2點仍須加注意，首先反應陽轉的時間與正常LAMP反應比較，會呈現延後的現象 (圖3)，可能與焦磷酸根需要時間與鈣黃綠素競爭錳離子的緣故；再來便是濁度的曲線不似正常LAMP反應平滑，並有提早沉降的現象，以致曲線於反應末期下降 (圖4)，最後的濁度反而不似正常LAMP反應整齊 (圖3)，此異常可能與錳離子之原子量為54較原子量為24的鎂離子來得重有關，而焦磷酸根與較重錳離子結合後，無法像焦磷酸鎂在液體中維持懸浮。

傳統型環形核酸增幅法若需達到即時檢測的功能，則需添購即時濁度器，在鈣黃綠素的添加之後，可適用於目前實驗室裡Roche LightCycler即時螢光基因定量儀，同樣可以達到即時監測的功能，將它應用於即時螢光檢測儀器 (僅限於能連續螢光偵測的機型)，亦能提升昂貴儀器之使用率。本研究結果指出添加鈣黃綠素之後的環形核酸增幅法更容易以肉眼判別，具有潛力成為臨床的快速診斷技術。

鈣黃綠素 (Calcein) 於環形核酸增幅法 (LAMP) 之應用評估

表 1、不同濃度排列組合之鈣黃綠素 (Calcein) 與氯化錳 (MnCl₂) 於不同濃度的焦磷酸鉀 (PP) 之下其濁度的變化

Calcein (μM)	MnCl ₂ (μM)	Pyrophosphate (μM)					
		0	500	750	1000	1250	1500
25	500	0.011	0.111	0.256	0.34	0.469	0.59
	750	0.021	0.187	0.278	0.341	0.344	0.346
	1000	0.05	0.171	0.161	0.164	0.236	0.273
	1250	0.02	0.125	0.137	0.261	0.137	0.214
	1500	0.093	0.122	0.116	0.131	0.201	0.224
50	500	0.021	0.233	0.344	0.443	0.58	0.647
	750	0.017	0.207	0.294	0.344	0.505	0.404
	1000	0.03	0.179	0.205	0.241	0.251	0.242
	1250	0.008	0.142	0.182	0.175	0.219	0.244
	1500	0.029	0.1	0.116	0.149	0.176	0.233
75	500	0.02	0.206	0.274	0.328	0.485	0.635
	750	0.091	0.199	0.332	0.455	0.493	0.549
	1000	0.039	0.184	0.276	0.297	0.333	0.385
	1250	0.035	0.132	0.119	0.179	0.175	0.243
	1500	0.019	0.115	0.095	0.152	0.217	0.262
100	500	0.028	0.183	0.313	0.434	0.441	0.4
	750	0.026	0.201	0.297	0.36	0.446	0.356
	1000	0.012	0.184	0.229	0.22	0.226	0.273
	1250	0.036	0.157	0.132	0.244	0.172	0.249
	1500	0.026	0.125	0.128	0.156	0.195	0.215

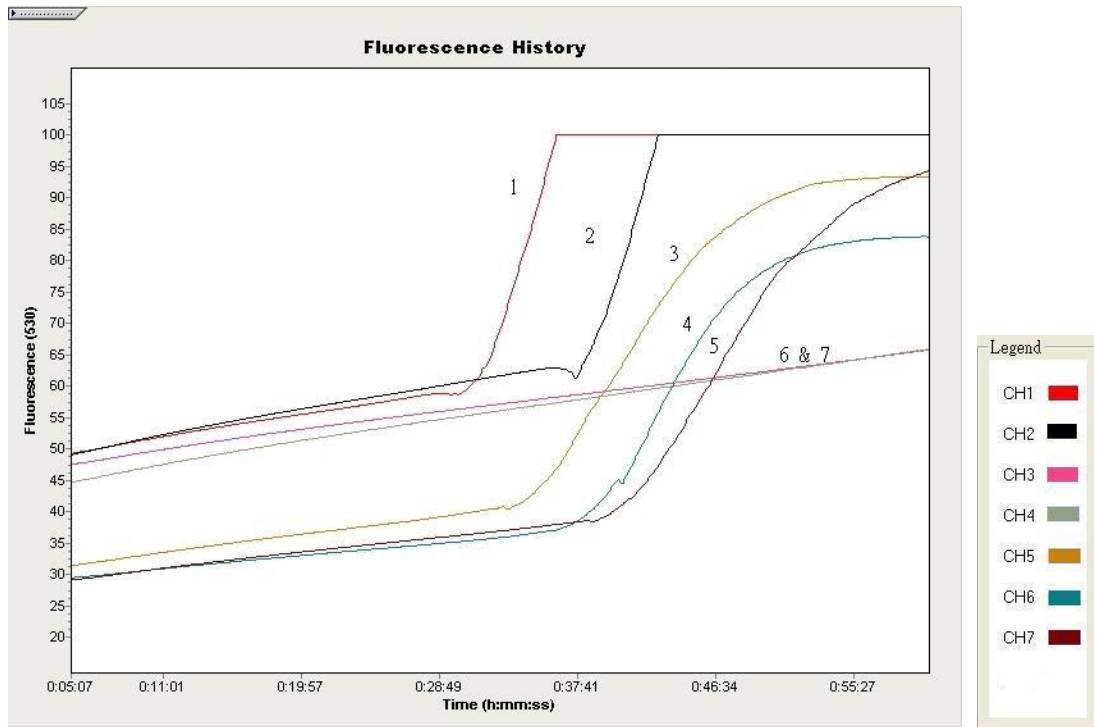


圖 1、LAMP 反應液含 25 μM 鈣黃綠素及 500 μM 氯化錳，實際應用於 Roche 之 LightCycler 2.0 即時螢光檢測儀器。1-6：每反應含 500，200，50，20，5 及 2 模板。7：陰性對照。

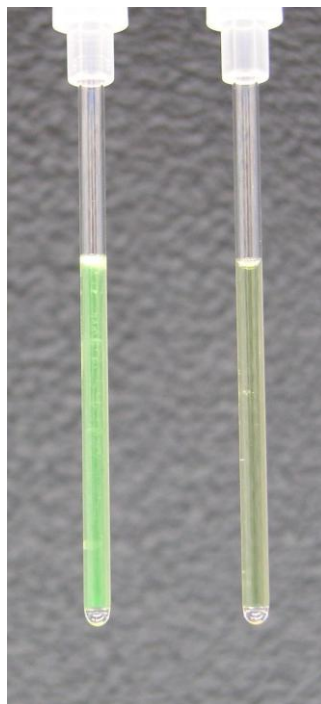


圖 2、添加鈣黃綠素的 LAMP 反應結束後，可直接肉眼判別，左方呈現蘋果綠的試管為陽性，右方呈現橘紅色的試管為陰性。

鈣黃綠素 (Calcein) 於環形核酸增幅法 (LAMP) 之應用評估

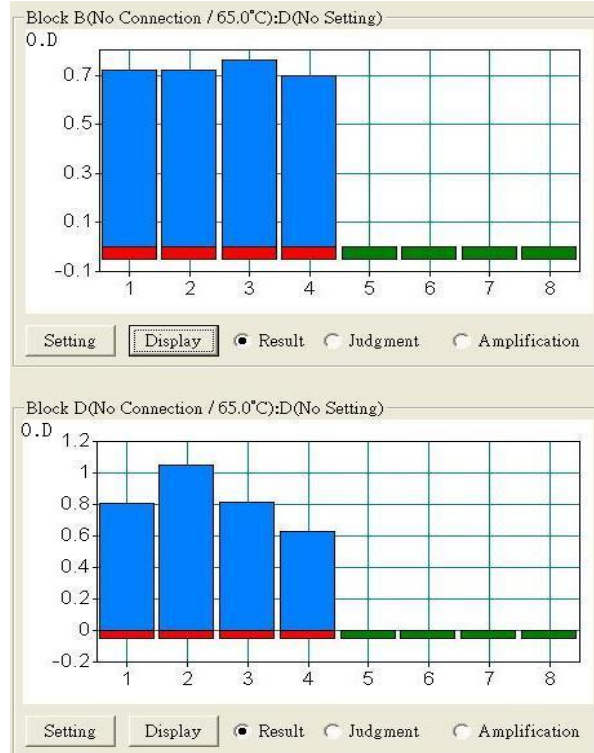


圖 3、即時濁度檢測儀之結果。上圖為原始 LAMP 反應，下圖為添加鈣黃綠素的反應結果。1-6：每反應含 2×10^4 ， 2×10^3 ， 2×10^2 ，20，2 及 0.2 模板。7, 8：陰性對照。

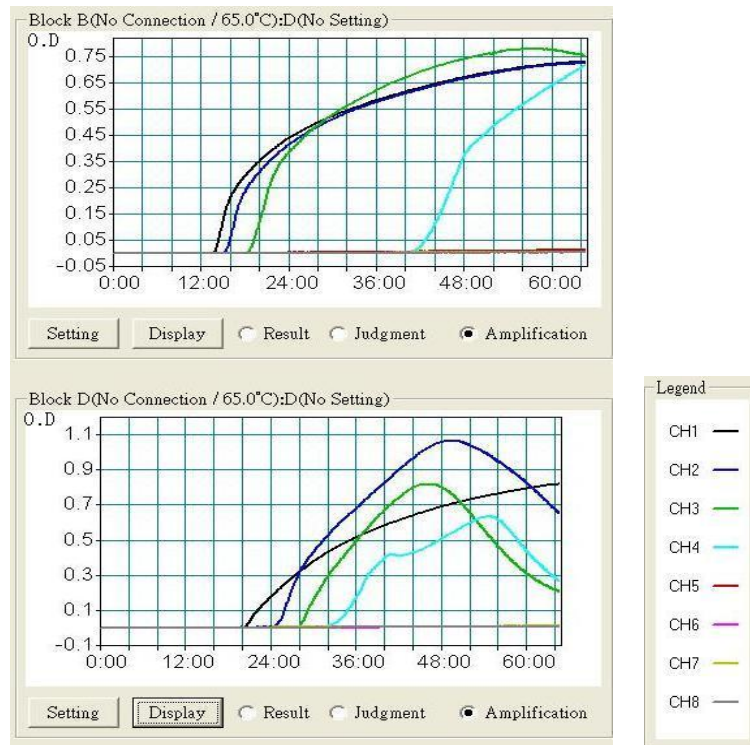


圖 4、即時濁度檢測儀之累積濁度曲線。上圖為原始 LAMP 反應，下圖為添加鈣黃綠素的反應結果。1-6：每反應含 2×10^4 ， 2×10^3 ， 2×10^2 ，20，2 及 0.2 模板。7, 8：陰性對照。

參考文獻

1. Cho HS, Kang JI, Park NY. Detection of canine parvovirus in fecal samples using loop-mediated isothermal amplification. *J Vet Diagn Invest* 18: 81-84, 2006.
2. Imai M, Ninomiya A, Minekawa H, Notomi T, Ishizaki T, Tashiro M, Odagiri T. Development of H5-RT-LAMP (loop-mediated isothermal amplification) system for rapid diagnosis of H5 avian influenza virus infection. *Vaccine* 24: 6679-6682, 2006.
3. Imai M, Ninomiya A, Minekawa H, Notomi T, Ishizaki T, Van Tu P, Tien NT, Tashiro M, Odagiri T. Rapid diagnosis of H5N1 avian influenza virus infection by newly developed influenza H5 hemagglutinin gene-specific loop-mediated isothermal amplification method. *Virology Methods* 141: 173-80, 2007.
4. Iseki H, Alhassan A, Ohta N, Thekiso OMM, Yokoyama N, Inoue N, Nambota A, Yasuda J, Igarashi I. Development of a multiplex loop-mediated isothermal amplification (mLAMP) method for the simultaneous detection of bovine Babesia parasites. *J Microbiol Methods* 71: 281-287, 2007.
5. Jayawardena S, Cheung CY, Barr I, Chan H, Guan Y, Peiris JSM, Poon LLM. Loop-mediated isothermal amplification for influenza A (H5N1) virus. *Emerg Infect Dis* 13: 899-901, 2007.
6. Mori Y, Kitao M, Tomita N, Notomi T. Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA. *J Biochem Biophys Methods* 59: 145-157, 2004.
7. Mori Y, Nagamine K, Tomita N, Tsugunori N. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochem Biophys Res Commun* 289: 150-154, 2001.
8. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res* 28: e63, 2000.
9. Parida M, Posadas G, Inoue S, Hasebe F, Morita K. Real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of West Nile virus. *J Clin Microbiol* 42: 257-63, 2004.
10. Soliman H & El-Matbouli M. An inexpensive and rapid diagnostic method of Koi Herpesvirus (KHV) infection by loop-mediated isothermal amplification. *Virology* 2: 83, 2005.
11. Tomita N, Mori Y, Kanda H, Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nat Protoc* 3: 877-882, 2008.

Application of Calcein in Loop-Mediated Isothermal Amplification Reaction

LH Chen *

Animal Health Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan

Abstract Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) has been extensively applied in the field diagnosis of infectious disease. It is convenient due to the fact that results can be rapidly generated and manually visualized. Adding calcein to the reaction mixture prior to start can enhance detection by visible color change. In this study, all of 25 μM calcein-500 μM MnCl_2 , 50 μM calcein-500 μM MnCl_2 and 75 μM calcein-500 μM MnCl_2 have been found to be suitable for visible colorimetric detection. The LAMP reaction recipe containing 25 μM calcein-500 μM MnCl_2 was found to be ideal for usage in both real-time turbidity and real-time quantitative PCR tests.

Keywords: *Calcein, LAMP*

