

計畫編號：DOH96-DC-2007

行政院衛生署疾病管制局 96 年度科技研究發展計畫

發展 **Microsphere-Based Technology** 同時偵測多元病毒性傳染病之核酸抗原或抗体

## 研究報告

執行機構：行政院衛生署疾病管制局 研究檢驗中心

計畫主持人：楊志元

研究人員：吳芳姿、鄭嘉如、羅佩真

執行期間：96 年 1 月 1 日至 96 年 12 月 31 日

\* 本研究報告僅供參考，不代表衛生署疾病管制局意見 \*

# 目 錄

封 面	頁 碼
摘要.....	3
壹、前言.....	5
貳、材料與方法.....	9
參、結果.....	17
肆、討論.....	19
伍、結論與建議.....	21
陸、參考文獻.....	22
柒、圖、表.....	25
圖一、腸病毒七十一型各型別 alignment 比較圖.....	25
圖二、腸病毒七十一型核酸引子對及探針與 Prototype(gi1171120)BrCr 相對 位置圖.....	28
表一、腸病毒七十一型核酸引子對及探針序列.....	29
表二、Norovirus and Rotavirus FlexMAP primer and probe set.....	29
表三、Luminex Bead detection system primer and probe sets.....	30
表四、腸病毒七十一型核酸探針檢測結果.....	30
表五、利用 FlexMAP 檢測 Rotavirns 及 Norovirus 分析結果.....	31

## 摘要

計畫摘要：請摘述本計畫之目的與實施方法及關鍵詞

關鍵詞：Luminex、核酸檢測、抗原抗體檢測

目前實驗室在檢測檢體時是否有特定病原體時，是利用病原體培養、分離；serological assay 去檢測我們所懷疑之病原體之抗原或抗體的存在；或以 PCR 去檢測疑似病原體的核酸 DNA/RNA，但是往往通報感染個案之病原體檢驗尚無結果，檢體便已經耗盡，無法繼續針對其它疑似病原體進行檢測；如果以病原體培養、分離固然是最佳的黃金準則，但卻曠時彌久，且眾多病毒性病原體目前無適當細胞株可供培養，如 HBV、HCV、Norovirus；此外不同病原體之檢驗，如果是由不同實驗室來進行，人力調度也會造成困擾。所以如果能利用單管多重檢測標的物之檢驗方法，應能解決目前所遭受到困境與難題。同時在時效上也比一般 multiplex 檢測來的有利而迅速，Luminex xMAP 應用雙螢光系統，可在單管反應中，針對單一檢體，同時進行多達 100 項檢驗項目。技術平台可分為三個主要部份 1. Part I: Microbeads Specific 2. Part II: Target Specific 3. Part III: Two Lasers Detection。同時針測不同病原體之抗體(antibody)或抗原(antigen)反應或者不同病原體之核苷酸(DNA or RNA)，如此不僅可以解決檢體量不足夠的問題，同時也將縮短檢驗時間與試劑成本，因此本計畫之目的不僅在利用

Luminex xMAP 技術，也將評估其專一性或靈敏性以了解在何種情況下，如疫調集體爆發不明原因傳染病或單一個案未明原因之檢測，篩選或確認等，可做為最佳之利器。

## 壹、前言

Microsphere-Based Technology 奈米液相偵測技術，由於檢測反應均在液態中完成，也稱為液相晶片(liquichip)。其檢測法原理敘述如下：以聚苯乙烯(polystyrene)所製作的微珠，包覆不同比例的紅光及紅外光發色劑，而產生100種不同比例顏色之微珠，每顆微珠之大小約5.6 微米(microns)，這些微珠可依不同研究目的如免疫分析、核酸研究、酵素分析、受體和配體識別分析等，而標定上特定抗體、核酸探針與各種受體探針，為了區分不同的探針，用於標記探針的微珠都帶有一個獨特的色彩編號。待測樣本須以先以顯色劑標定，並將標定探針之微珠與待測物在96 孔微盤中進行反應。利用機器自動將反應液吸起並通過一微細管所構築之檢測通道，每次僅允許一個微珠通過檢測通道，檢測通道中設有二道雷射光，一道為紅色，一道為綠色。紅色雷射激發微珠基質中的顏色，並根據微珠中不同色彩編號及分類；綠色雷射則激發待測樣本中之顏色，當待測樣本與特定微珠之探針 吸附在一起時，二道雷射所激發的光皆可被偵測到。而若樣本中不含該標的物，則僅有微珠中的激發光可被偵測到。透過機器與電腦自動統計分析二道雷射所激發之微珠種類與數量，從而判定待測樣本中有幾種測試目標物在其中，在單一反應管內可放進100 種不同偵測病原體的染色微粒球，利用分析記錄軟、硬體即可得知反應管內所欲偵測之結果。

Microsphere-Based Technology 檢測技術具有下列幾項特性，也是其優勢：

(1) 反應快速、靈敏度高：反應環境均在液相中完成，即標定探針之微珠與待測樣本均於溶液中反應，其彼此間碰撞機率與速度相對於以往標定探針處為固相、待測樣本為液相的反應模式。探針與樣品之目標物的碰撞機會理論上可增加四倍以上，實際上則可增加十倍。此可大幅縮短反應時間，並有效提昇反應靈敏度。

(2) 可同時檢測多種目標物，所需成本較低：本技術具有同時檢測多種病原或目標物如同生物晶片之功能，但所使用之機器設備卻遠較於DNA 晶片所需購置微陣列點陣儀低廉。

(3) 可多元化分析，應用性較廣：使用相同的儀器設備可針對不同之研究目的在微珠上標定上DNA 探針、抗體探針或各種受體探針等從而進行不同的分析，不若DNA 晶片之微陣列點陣儀般僅能使用DNA 探針而較受限制。

腸病毒七十一型 (Enterovirus 71, EV71) 首度被發現是在1969 年美國加州由一腦炎嬰兒之糞便檢體中分離出，隨即在美國本土、保加利亞、日本、香港、馬來西亞、台灣及澳洲等地區陸續被分離出，且引起不同程度規模的流行。腸病毒七十一型與克沙奇病毒A16 在臨床症狀表現上非常相近 (Coxsackie virus, CA16)，同樣都會造成手口足症 (HFMD)，但腸病毒七十一型易造成急性神經症狀 (acute neurologic disease)。腸病

毒屬於小RNA 病毒科 (Picornaviridae)，為正單股核糖核酸 (plus sense, single stranded RNA) 病毒，此病毒顆粒很小，其直徑約20-30nm，不具有外套膜 (nonenveloped)，正二十面體之結構。

腸病毒七十一型的基因體全長約7.5 kb，從5' 端至3' 端的順序分別為：5' -NCR、P0(VP4、VP2)、VP3、VP1、2A(protease)、3D(RNA polymerase) 及3 端poly-A。5' -NCR 約有750 個核苷酸，在基因之演化上為高度保守區域，VP4 和病毒RNA 的穩定性有關，VP1-3 是和細胞接受器的結合及抗體結合有關，其中VP1 不僅是中和抗體主要作用之區域，亦是基因序列中變化較大之區域，並可與其他不同腸病毒之血清型進行區分。目前常用來作腸病毒七十一型檢測或基因型別分析的區域在5' 端高保守未轉譯區 (5'-untranslated region, UTR)、VP1 與VP4 區域。

傳統腸病毒檢測，將臨床檢體接種至RD細胞後，若產生細胞病變 (CPE)，表示可能有病毒之感染，須進一步利用間接免疫螢光法 (IFA) 來鑑定是由何種類型之腸病毒所造成之感染，可是因為腸病毒種類繁多，無法全部測試，會消耗太多時間，所以一般的策略皆是利用現有少數型別的Pool anti-serum區分Polio、Echo、CA、CB，待確定是那一組Pool Anti-serum 後，再去細分可能的個別血清型，目前本實驗室檢測時，在Pool anti-serum 內，多數為台灣較常出現的腸病毒型別抗血清，以IFA來區分感染的腸病毒

血清型別，相當耗費時間，因此本計劃第一階段，利用CODEHOPE RT-PCR先增殖檢體中的腸病毒核酸，並挑選2006年較常見之CA2，2005年之CB3與比較容易造成重症之EV71、CA16，分別設計探針，以同時區分這幾類型腸病毒之感染，第二階段將加入其它常見之腸病毒型別探針，如2005年之CA5、CA6，2006年之CB2等。



## 貳、材料與方法

### 一、檢體來源

全國醫學中心與教學醫院門診病患與住院病人，以及全國各醫師診所 若病患之症狀符合我國 “ 疑似病例 ” 及 “ 通報病例 ” 之定義者皆可採檢。 疑似病例患者檢體以低溫運送至疾病管制局研究檢驗組腸道及新興病毒實驗室，進行病毒鑑定 。血清檢體由疾病管制局研究檢驗中心生材科收集與保存。

### 二、檢體種類與處理

a.血液檢體：血清或添加抗凝劑如 sodium citrate 或 EDTA 的血漿皆可使用，檢體以 4°C 的運送。採集後之檢體，以 2,000 rpm 離心 10 分鐘，以分離出的血清備用。

b.糞便檢體：取糞便 1 g，放入 15 ml 離心管中，加入玻璃圓球及 10 ml PBS 調成 10% 懸浮液。於 4°C，2100 xg 離心 15 分鐘收集上清液分裝於 2~3 支冷凍小管，標示號碼及日期保存於-70°C。

### 三、RNA 的萃取

使用 QIAGEN 公司的 QIAmp Viral RNA kit 進行 RNA 的純化。吸取檢體 140 ul 加入 560 ul Buffer AVL 於室溫下作用 10 分鐘，再加入 560 ul 絕對酒精混合完全(vortexing)，上述混合液再通過 QIAmp spin column，column 以 Buffer AW 清洗兩次以後，用 80°C 純水(Rnase Free)將 RNA 溶出。製備的病毒 RNA 可用於

反轉錄及聚合酵素鏈鎖反應 (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)。

四、以核酸為基礎偵測多重標的物

(一) General PCR primer 設計及各種型別探針設計

利用 DNA Star 或 Allele ID 軟體，將所有腸病毒型別比對，找出能複製出所有型別 PCR 引子，再將引子 5' 端標定 Biotin；此時再利用各型別複製的 DNA 片段序列，設計能分型的 25 – 40 探針，再將探針 5' 端以胺基 (Amine) 標定，以利與 BioPlex beads 上之胺基脫水鍵結。(Bio-Rad BioPlex Amine Coupling 及 BioPlex COOH Beads)。

(二) 微珠使用前處理

1. Beads vortex and sonication 各 30sec。
2. 取 100 uL beads(約  $1.25 \times 10^6$  beads)。
3. 14000g, 2min, 去除上清液。
4. 加 100 uL beads wash buffer(PBS), vortex 30 sec, sonication 30 sec。
5. 14000g, 2min, 去除上清液。
6. 重複 step.4。
7. 14000g, 2min, 去除 50 uL 上清液。
8. 加入 2 uL oligo(0.2 nmole), vortex。

9. 配 10 mg/ml EDC (10mg EDC dissolve in 1ml d<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O)。
10. 加入 2.5 uL 的 10mg/ml EDC, vortex。
11. 避光並且在室溫 shake 30 min。
12. 重複 step.9~11。
13. 加入 1ml 0.02% Tween-20, mix。
14. 14000g, 2min, 除上清液。
15. 加入 1ml 0.1% SDS, vortex。
16. 14000g, 2min, 除上清液。
17. 加入 125 uL TE buffer, 混合均勻並儲存於 4°C。

### (三) 核酸探針鍵結

1. 以超音波震盪方式均勻混勻磁珠(30分中)，並以vortex均勻混合，在移置1.5ml eppendorf。
2. 並以 10,000rpm，4min。
3. 移去上清液並且加入 200ul 1.5XTMAC buffer，均勻混合。
4. 重複2及3步驟2次，並洗滌三次(每次洗滌後的上清液約25ul)。
5. 加入 1.5 倍 TMAC buffer 75ul(總體積約 100ul)。
6. 最後鍵結完成 beads 濃度約:  $2.5 \times 10^6$  顆 /ml, 並儲存至 4°C。

### (四) 腸病毒 71 型探針設計與檢測

本研究對於腸病毒 71 型核酸檢測，以國人常見的 B4、C2 及 C4 型別

VP1 序列設計探針，引子及探針設計利用病毒 VP1 序列 alignment 結果如圖一，引子及探針序列如表一，與 prototype BrCr 序列相對位置如圖二。

#### (1) RT-PCR 反應

1. 分別取 EV71/B4, EV71/C2, EV71/C4 各 5 ul
2. 再依序分別加入 2X RT buffer 12.5 ul
3. RT 酵素 0.5ul
4. 及 Rnase out 0.2ul
5. Random hexamer 1ul
6. 最後加入 DEPC water 5.8ul，待 mix 混合均勻，再分別取出 20ul 加入樣本中
7. 反應條件：42°C, 50min；95°C, 10min

#### (2) PCR 反應

1. 取出 2 倍 PCR buffer 25ul 加入混合管中
2. 再依序加入 Forward Primer 及 Reverse Primer 各 5ul
3. 加入 Taq polymerase 0.4ul
4. 最後加入 DEPC 水 12.6ul
5. 待混合均勻後，由混合管中取出 48ul 混合液分別加入 CDNA 樣本
6. 反應條件：94°C, 5min；(94°C, 30sec；48°C, 30 sec；72°C, 1 min) x 40

cycles ; 72°C, 7 min .

### (3) 雜合反應 Hybridization

1. 分別取EV71\_B4, EV71\_C2, EV71\_C4 各10  $\lambda$  的stock coupled beads
2. 分別加入490  $\lambda$  1.5X TMAC.
3. 從step.2 各取25  $\lambda$  (5000 beads)至同一管中.
4. 14000g, 2min, 去除上清液.
5. 加入25  $\lambda$  1.5X TMAC, 使之懸浮.
6. 加入12.5  $\lambda$  PCR product, mix.
7. 用PCR machine, 加熱到95°C, 5min, 降溫到37°C, 35min.
8. 2000 rpm, 3min, 去除上清液.
9. 加入75  $\lambda$  1X TMAC, 2000 rpm, 3min, 除上清液.
10. 用1X TMAC 稀釋1mg/ml Streptavidin-R-phycoerythrin 成4  $\mu$  g/ml
11. 分別加入75 4  $\mu$  g/ml Streptavidin-R-phycoerythrin.
12. 避光並且在37°C shake 30 min.
13. 將其transfer 至Luminex 測量的well 中, 於37°C 進行螢光的分析.

## 五、以抗體檢測腸病毒七十一型

### (一) Beads Activation Protocols

- 1.將Bio-Rad BioPlex Amine Coupling kit 拿至室溫回溫.
- 2.以速度6 或7 vortex No.46 COOH beads ( $1.25 \times 10^7$ /ml) 30sec, sonication 30 sec.\*若beads 有aggregation 的現象, 繼續sonicate 直到beads 不會聚集為止.
- 3.各取100  $\lambda$  ( $1.25 \times 10^6$ 顆beads)分別裝入四管1.5ml tube 中, 14000g 離心4min, 移除上清液.
- 4.分別加入100  $\lambda$  bead wash buffer, vortex 10 sec, sonication 10 sec, 14000g 離心4 min, 移除上清液.
- 5.分別加入80  $\lambda$  bead activation buffer, vortex 30 sec, sonication 30 sec,先避光.
- 6.泡製EDC(50mg/ml)和S-NHS(50mg/ml), 分別加入10  $\lambda$  S-NHS 後馬上再加入10  $\lambda$  EDC, 以高速vortex 30 sec, 避光並且在室溫shake 20 min.
- 7.分別加入150  $\lambda$  PBS(pH7.4), 高速vortex 10 sec, 14000g 離心4 min, 移除上清液.
8. 重複step.7
9. 分別加入100  $\lambda$  PBS(pH7.4), 中速vortex 30 sec, sonication 15 sec.

## (二) Protein Coupling Protocols

- 1.分別加入EV71 monoclonal antibody  $1 \mu\text{g}$ ,  $5 \mu\text{g}$ ,  $25 \mu\text{g}$ ,  $125 \mu\text{g}$  至四管 activated beads 中, 加入PBS(pH7.4)使四管的最終體積皆為500  $\lambda$ , 避光且在

室溫shake 2 hrs.

2. 14000g 離心4min, 移除上清液.
3. 分別用500  $\lambda$  PBS(pH7.4)清洗beads, 14000g 離心4 min, 移除上清液(不要sonication).
4. 分別加入250  $\lambda$  blocking buffer, 以中速vortex 15 sec, 避光並且在室溫shake 30min.
5. 14000g 離心4min, 移除上清液.
6. 分別用500  $\lambda$  storage buffer 清洗beads, 16000g 離心6 min, 移除上清液.
- 7.分別用250  $\lambda$  storage buffer resuspend coupled beads. (conc.5000 beads/ $\lambda$ )
8. 避光儲存於4°C.

### (三) Protein Coupling Validation

- 1.Label 五管1.5ml tube, 分別為四管Test tube(mAb 1  $\mu$ g, 5  $\mu$ g, 25  $\mu$ g, 125  $\mu$ g) 及一管Negative control.
- 2.以中速vortex coupled beads 15 sec, 分別取2  $\lambda$  不同mAb 濃度的coupled beads(10000顆)至各管中,(Negative control 是加2  $\lambda$  125  $\mu$ g mAb coupled beads)
- 3.用staining buffer 稀釋1000  $\mu$ g/ml Goat anti-Mouse IgG conjugated Biotin 成2  $\mu$ g/ml.
- 4.分別加入50  $\lambda$  的2  $\mu$ g/ml Goat anti-Mouse IgG conjugated Biotin 於 四管

Test tube 中,Negative Control 則是加50  $\lambda$  的staining buffer, 避光且在室溫shake 30 min.

6. 14000g 離心4min, 移除上清液.

7.用staining buffer 稀釋1000  $\mu$  g/ml Streptavidin-R-phycoerythrin 成2  $\mu$  g/ml.

8.分別加入50  $\lambda$  的2  $\mu$  g/ml Streptavidin-R-phycoerythrin 於四管Test tube 中,

Negative Control 則是加50  $\lambda$  的staining buffer, 避光並且在室溫靜置10 min

9.14000g 離心4min, 移除上清液.

10.分別加入70  $\lambda$  storage buffer resuspend beads, 並用中速 vortex 15 sec.

11. 將其分別transfer 至Luminex 測量的well 中, 進行螢光的分析。



## 參、結果

本階段首先以造成急性腹瀉之病毒性病原體為主體，發展此一檢驗技術，經過前半年之熟悉與操作練習後，目前已經先鎖定 Norovirus、Rotavirus 及 Enterovirus 71 為目標，前二種病原體是國人罹患病毒性急性腹瀉最主要之原因，而 Enterovirus serotype 71 為引起小孩腸病毒重症的主要致病原，所設計之 primer sets 及 probes 之序列如下表一~三。表二為 FlexMAP 微株系統，該系統在微株上已經先鍵結 10mer 核苷酸序列，共有 100 種可以選擇，在選擇微株時必須先將預檢測序列片段與微株上之核苷酸序列比對，以找尋適合之微株，使用 FlexMAP 微株系統之優點在於微株上已經先鍵結 10mer 核苷酸序列，因此可以避免實驗鍵結 home-made probe 效果不佳之問題，並且可以利用目前實驗現有的 primer/probe 系統直接應用，缺點在於應用於多重病原檢測時，微株上已經先鍵結 10mer 核苷酸序列部分會有 crossreaction 情形。表三為 Luminex Bead 系統，為不同程度紅色微株，共 100 種選擇，實驗必須設計 home-made probe，並在 5'端以 Amino 修飾鍵結，並將 probe 鍵結於微株上。

本研究中在 Enterovirus serotype 71 核酸檢測利用 Luminex Bead 系統，以國人常見的 B4、C2 及 C4 型別序列設計 probe，分別與微株 122、128 及 61 號鍵結，檢測用樣品使用 B4、C2 及 C4 型之 plasmid 及三種型之臨床

檢體，結果如表四。以 P1、 P2、 P3 、P1d 、P2d 、P3d 五組探針偵測 EV71-B4、 EV71-C2、 EV71-C4、 CA16(control 組)4 種基因型病毒。測試後發現 P1 探針無法區分出 EV71-B4 及 EV71-C4、P3 探針無法分辨出 EV71 三種型別並且與 CA16 反應、P1d 其表現的數值過低無法區分、P2d 無法區分 EV71-B4 及 CA16、P3d 其表現出的數值明顯過低，其中只有 P2 探針可區分出 4 種病毒，並且不與 CA16(control 組)產生交叉反應。

在 Rotavirus 及 Norovirus GI、Norovirus GII 核酸檢測利用 FlexMAP 微株系統，經過序列比對後分別選擇 59、30、28 號檢測 Rotavirus 及 Norovirus GI、Norovirus GII 之 PCR 產物。檢測用樣品使用 rota、noroGI 及 noroGII 之 plsmid 及三種型之臨床檢體病毒核酸反轉錄之 cDNA，反應結果如表五。

## 肆、討論

本實驗主要是以 Microsphere-Based Technology 方法，區分 3 種不同型別 EV71 及 CA16 病毒，首先參考 NCBI EV71 的 VP1 序列 alignment 所設計，另外挑取選殖後的 EV71 病毒株進行分析，並利用核酸雜合反應及抗體塞選測試選殖出 5 組探針。使用 5 種探針分別進行測試，其中 P2 探針較其他四組所顯示出的結果最令人滿意，能明顯分辨出 EV71 三種型別 並且不與 CA16 產生反應。

免疫診斷技術產品將會逐漸取代臨床化學技術產品，成為診斷試劑發展的主流。由於臨床化學為利用有機化學及分析化學方法來檢測生物體各種生化物質，以瞭解疾病的原因，較常見的檢查項目可分為蛋白質、醣類、脂質、血清酵素和電解質等五大項。一般係依據生物種類及年齡設定正常值範圍，再就各項檢測結果去綜合診斷所罹染之疾病。因臨床化學技術產品檢測所獲得之結果係為相對值，所能提供診斷證據屬較間接性，若免疫診斷技術品所獲結果為是否有特定病原之特異性抗體、抗原或特定蛋白質來的直接及強有力，故免疫診斷技術產品之市場日益增大將是必然之趨勢。

檢測診斷技術產品朝兩極化發展，一是高度專業密集且自動化之儀器診斷，可大量樣本同時檢測，或同時檢測多種病原或目標病原之技術與設

備，如生物晶片；另一是簡單、快速、便於普及應用之快速診斷，如驗孕片試劑。

Microsphere-Based Technology 檢測技術具有下列幾項特性，也是其優勢：(1) 反應快速、靈敏度高：反應環境均在液相中完成，即標定探針之微珠與待測樣本均於溶液中反應，其彼此間碰撞機率與速度相對於以往標定探針處為固相、待測樣本為液相的反應模式。探針與樣品之目標物的碰撞機會理論上可增加四倍以上，實際上則可增加十倍。此可大幅縮短反應時間，並有效提昇反應靈敏度。

(2) 可同時檢測多種目標物，所需成本較低：本技術具有同時檢測多種病原或目標物如同生物晶片之功能，但所使用之機器設備卻遠較於 DNA 晶片所需購置微陣列點陣儀低廉。

(3) 可多元化分析，應用性較廣：使用相同的儀器設備可針對不同之研究目的在微珠上標定上 DNA 探針、抗體探針或各種受體探針等從而進行不同的分析，不若 DNA 晶片之微陣列點陣儀般僅能使用 DNA 探針而較受限制。

## 伍、結論與建議

初步結果發現原先選擇腸病毒 VP3-VP1 區間，CODEHOPE RT-PCR 增殖產物設計不同探針檢測各類型腸病毒，因增殖產物僅 320bp 左右，探針設計相當困難，已目前設計反應結果，多數呈現交叉反應，因此，在設計區間必須另找其他片段。

## 陸、参考文献

1. Whitehead GS, Walker JK, Berman KG, Foster WM, Schwartz DA, Allergen-induced airway disease is mouse strain dependent. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 285 (2003): L32-L4.
2. Abreu I, Laroche P, Bastos A, Issert V, Cruz M, Nero P, Fonseca JE, Branco J, Machado Caetano JA, Multiplexed Immunoassay for Detection of Rheumatoid Factors by FIDISTM Technology. *Ann N Y Acad Sci*, 1050 (2005):357-63.
3. Gires O, Munz M, Schaffrik M, Kieu C, Rauch J, Ahlemann M, Eberle D, Mack B, Wollenberg B, Lang S, Hofmann T, Hammerschmidt W, Zeidler R, Profile identification of disease-associated humoral antigens using AMIDA, a novel proteomics-based technology. *CELLULAR AND MOLECULAR LIFE SCIENCES*, 61(2004):1198-207.
4. Buliard A, Fortenfant F, Ghillani-Dalbin P, Musset L, Oksman F, Olsson NO, Analysis of nine autoantibodies associated with systemic autoimmune diseases using the Luminex technology. Results of a multicenter study. *Ann Biol Clin (Paris)*. , 63(2005):51-8.
5. Carson RT, Vignali DAA, Simultaneous quantitation of 15 cytokines using a multiplexed flow cytometric assay. *Journal of Immunological Methods*, 227 (1999): 41-52.
6. Hindson BJ, McBride MT, Makarewicz AJ, Henderer BD, Setlur US, Smith SM, Gutierrez DM, Metz TR, Nasarabadi SL, Venkateswaran KS, Farrow SW, Colston BW Jr, Dzenitis JM, Autonomous detection of aerosolized biological agents by multiplexed immunoassay with polymerase chain reaction confirmation. *Anal Chem*, 77(2005):284-9.
7. Wilson WJ, Erler AM, Nasarabadi SL, Skowronski EW, Imbro PM, A multiplexed PCR-coupled liquid bead array for the simultaneous detection of four biothreat agents. *Molecular and Cellular Probes*, 19 (2005): 137-144.
8. Biagini RE, Sammons DL, Smith JP, MacKenzie BA, Striley CA, Robertson SA, Snawder JE, Quinn CP, 2005, Simultaneous measurement of specific serum IgG responses to five select agents. *Anal Bioanal Chem.*, 382(2005):1027-34

9. Barad O, Meiri E, Avniel A, Aharonov R, Barzilai A, Bentwich I, Einav U, Gilad S, Hurban P, Karov Y, Lobenhofer EK, Sharon E, Shibolet Y, Shtutman M, Bentwich Z, Einat P, MicroRNA expression detected by oligonucleotide microarrays: system establishment and expression profiling in human tissues. *GENOME RESEARCH*, 14(2004):2486-94.
10. Hadd AG, Laosinchai-Wolf W, Novak CR, Badgett MR, Isgur LA, Goldrick M, Walkerpeach CR, Microsphere Bead Arrays and Sequence Validation of 5/7/9T Genotypes for Multiplex Screening of Cystic Fibrosis Polymorphisms. *Journal of Molecular Diagnostics*, 6(2004): 348-355.
11. Hurley JD, Engle LJ, Davis JT, Welsh AM, Landers JE, A simple, bead-based approach for multi-SNP molecular haplotyping. *Nucleic Acids Research*, 32 (2005): e186.
12. Dias D, Van Doren J, Schlottmann S, Kelly S, Puchalski D, Ruiz W, Boerckel P, Kessler J, Antonello JM, Green T, Brown M, Smith J, Chirmule N, Barr E, Jansen KU, Esser MT, 2005, Optimization and validation of a multiplexed luminex assay to quantify antibodies to neutralizing epitopes on human papillomaviruses 6, 11, 16, and 18. *Clin Diagn Lab Immunol*, 12 (2005):959-69.
13. Johnson AJ, Noga AJ, Kosoy O, Lanciotti RS, Johnson AA, Biggerstaff BJ, Duplex microsphere-based immunoassay for detection of anti-west nile virus and anti-st. Louis encephalitis virus immunoglobulin m antibodies. *Clin Diagn Lab Immunol*, 12 (2005):566-74.
14. Khan IH, Kendall LV, Ziman M, Wong S, Mendoza S, Fahey J, Griffey SM, Barthold SW, Luciw PA, Simultaneous serodetection of 10 highly prevalent mouse infectious pathogens in a single reaction by multiplex analysis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 12 (2005): 513-519.
15. Lukacs Z, Dietrich A, Ganschow R, Kohlschutter A, Kruithof R, Simultaneous determination of HIV antibodies, hepatitis C antibodies, and hepatitis B antigens in dried blood spots--a feasibility study using a multi-analyte immunoassay. *Clin Chem Lab Med*, 43 (2005):141-5.
16. Schmitt M, Bravo IG, Snijders PJ, Gissmann L, Pawlita M, Waterboer T, Bead-based multiplex genotyping of human papillomaviruses. *J Clin Microbiol.*, 44(2006):504-12.
17. Lash GE, Scaife PJ, Innes BA, Otun HA, Robson SC, Searle RF, Bulmer

JN, Comparison of three multiplex cytokine analysis systems: Luminex, SearchLighttrade mark and FAST Quant(R). *J Immunol Methods.*, 309(2006):205-8.

18. Amos JA, Bridge-Cook P, Poniek V, Jarvis MR, A universal array-based multiplexed test for cystic fibrosis carrier screening. *Expert Rev Mol Diagn.*, 6(2006):15-22.

19. Das S, Brown TM, Kellar KL, Holloway BP, Morrison CJ, DNA probes for the rapid identification of medically important *Candida* species using a multianalyte profiling system. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 46(2006):244-50.

20. Prince HE, Lape-Nixon M, Matud J, Evaluation of a Tetraplex Microsphere Assay for *Bordetella pertussis* Antibodies. *Clin Vaccine Immunol.*, 13(2006):266-70.

21. 張世忠、廖永剛 疫病檢測診斷技術產品與其市場

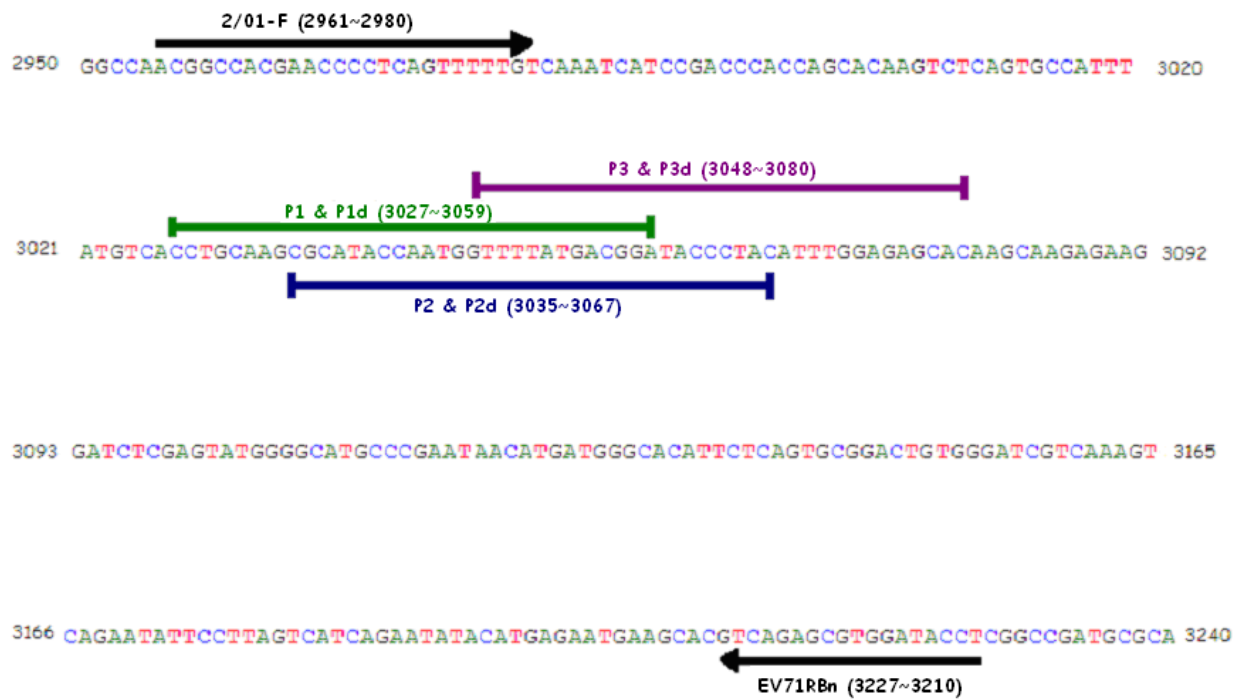




	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240
BrCr-CA-70-A (A)			R		D	D	P	SS				
2000005-VP1 (B4)	RKVELFTYMR	FDARETFVAC	TPTGGVVFQL	LQIMFVPPGA	EKPEESRESLA	WQTATNESVF	VKLTDPQAV	SVPFMSPPASA	YQWFYDGIPT	FGEHKQERDL	EYQACPNMM	GTFSVRTVGS
2000007-VP1 (B4)			Q									
2000076R4-F (B4)			E									
2002042-R5-VP1-B4 (B4)												
20010477-VP1 (B4)			E									
20010480-VP1 (B4)			E									
20020117-SR4-VP1-B4 (B4)			Q									
20020119-SR4-VP1-B4 (B4)			A									
98011263R5-F (B4)												
AFP2001009R1-VP1 (B4)			E	HN								
AFP2001474R1-VP1 (B4)			E									
AFP2001529-VP1 (B4)												
AFP2003163-VP1 (B4)			E									
AFP2003194-VP1 (B4)			Q									
E99194-VP1 (B4)			E									
E99214-VP1 (B4)												
E99216-VP1 (B4)			Q									
E99217-VP1 (B4)					F							
E99218-VP1 (B4)			E									
E99254-VP1 (B4)			E									
E990216-VP1 (B4)			Q									
E2000092-VP1 (B4)			E									
E2000094-VP1 (B4)			E									
E2003033-VP1 (B4)			E									
E20001220-VP1 (B4)			E						C			
2006-VI061482-VP1 (C5?)			E		D			S				T
2006-VI061551-VP1 (C5?)			E		D			S				T
E2006125-VP1 (C5?)			E		D			S				T
20040104-R4-VP1-C4 (C4)			Q		D			S				T
20040912-R2-VP1-C4 (C4)			E		D			S				T
20041623-R1-VP1-C4 (C4)			E		D			S				T
20050304-R2-VP1-C4 (C4)			E		D			S				T
20051501-F (C4)			E		D			S				T
20051509-F (C4)			E		D			S				T
98111207-R7V2T1-VP1-C2 (C					D			S				T
98111341R5-VP1 (C4)					D			S				T
200510989-F (C4)			E		D			S				T
E98014-VP1 (C2)			E		D			S				T
E98046-VP1 (C2)			E		D			S				T
E98083-VP1 (C2)			E		D			S				T
E98551T1R1-VP1 (C2)			E		D			S				T
E98683-VP1 (C2)			E		D			S				T
E98815R5-VP1 (C2)			Q		D			S				T
E99005R3-VP1 (C2)					D			S				T
E981085-VP1 (C2)			E		D			S				T
E981086-VP1 (C2)			E		D			S				T
E2004879-F (C4)			E		D			S				T
E20051733-VP1 (C4)			E		D			S				T
NCKU9822 (C2)			E		D			S				T
pinf7-54A-Taiwan VP1 (C2)		N	I		E			D				T
Tainan-4643-98-VP1-C2 (C2)			E		D			S				T
Tainan-5746-98-VP1-C2 (C2)			E		D			S				T
Tainan-6092-98-VP1-C2 (C2)			E		D			S				T
TW-2086-98 (C2)			E		D			S				T
617-46			E		D			S				T
Clustal Consensus	*****	**	*;***	*****	**	* *****	*	*****	***	*;*	*	*****



圖二、腸病毒七十一型核酸引子對及探針與 Prototype(gi1171120)BrCr 相對位置圖



PCR amplicon size : 267 bp

表一、腸病毒七十一型核酸引子對及探針序列

Primer/Probe	Sequence	Position*
Forward (2/01-F)	5'-ACGAACCCCTCAGTTTTTGT-3'	2961~2980
Reverse(EV71RB)	5' Bio-AGGTATCCACGCCCTGAC-3'	3227~3210
P1	5' AmMC12-CCTGCGAGCGCCTATCAATGGTTT TATGACGGG-3'	3027~3059
P2	5' AmMC12-GCCTATCAATGGTTTTATGACGGGT ATCCCACA-3'	3035~3067
P3	5' AmMC12-TTTTATGACGGGTATCCCACATTTCG GTGAACAC-3'	3048~3080
P1d	5' AmMC12-CCYGCGAGCGCYTAYCARTGGTTT TAYGACGGG-3'	3027~3059
P2d	5' AmMC12-CGCTAYCARTGGTTTTAYGACGG GTAYCCCAC-3'	3035~3067
P3d	5' AmMC12-TTTTAYGACGGGTAYCCCACRTTY GGTGAACAC-3'	3048~3080

表二、Norovirus and Rotavirus FlexMAP primer and probe set

Noro primer/probe	
G1-SKF	CTG CCC GAA TTY GTA AAT GA
G1-SKR	CCA ACC CAR CCA TTR TAC A
G2-SKF	CNT GGG AGG GCG ATC GCA A
G2-SKR	CCR CCN GCA TRH CCR TTR TAC AT
Rota primer/probe	
Beg9	GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCCGTCTGG
VP7-1	ACTGATCCTGTTGGCCATCCTT

表三、Luminex Bead detection system primer and probe sets

<b>Rotavirus</b>	(5'-3')
Rota NVP3-F	ACCATCTACACATGACCCTC
Rota NVP3-Rb	Biotin-GGTCACATAACGCCCC
Rota-probe(a)	Amino link-ATGAGCACAATAGTTAAAAGCTAACACTGTCAA
<b>Enterovirus</b>	
EV71_B4a	Amino link-ACACGATGCGTTCTTA
EV71_C2a	Amino link- CACGGTGTGTTCTTAA
EV71_C4a	Amino link- CACGCTGTGTTCTTAA
EV71_F2b	CRCTYCARGCTGCTGAAATTG
EV71_R4	Biotin-CGTAACCKGTTATGTCTATRTCCCA

表四、腸病毒七十一型核酸探針檢測結果

Probe	Sample	Blank	EV71-B4	EV71-C2	EV71-C4	CA16
	Data					
P1	F1	52.50	129.50	384.50	156.00	43.50
	F1-B1		77.00	332.00	103.50	-9.00
	(F1-B1)/B1		1.47	6.32	1.97	-0.17
P2	F1	60.50	260.50	672.50	344.00	52.50
	F1-B1		200.00	612.00	283.50	-8.00
	(F1-B1)/B1		<b>3.31</b>	<b>10.12</b>	<b>4.69</b>	<b>-0.13</b>
P3	F1	48.50	56.50	89.00	69.00	59.50
	F1-B1		8.00	40.50	20.50	11.00
	(F1-B1)/B1		0.16	0.84	0.42	0.23
P1d	F1	44.50	63.00	77.50	53.00	44.00
	F1-B1		18.50	33.00	8.50	-0.50
	(F1-B1)/B1		0.42	0.74	0.19	-0.01
P2d	F1	44.00	37.50	63.50	53.00	37.00
	F1-B1		-6.50	19.50	9.00	-7.00
	(F1-B1)/B1		-0.15	0.44	0.20	-0.16
P3d	F1	31.50	44.50	65.00	43.00	30.00
	F1-B1		13.00	33.50	11.50	-1.50
	(F1-B1)/B1		0.41	1.06	0.37	-0.05

表五、利用 FlexMAP 檢測 Rotavirns 及 Norovirus 分析結果

Program	Luminex 100 IS					
Build	2.2					
Date	2006/12/6 04:51:57 PM					
Samples	7Min Events		0			
Results						
Data Type:	Median					
Location	Sample	G1(30)	G2(28)	rota(59)	Total Events	Notes
	1rota-plasmid	924	63.5	<b>17806.5</b>	405	2500beads
	2rota-cDNA	383	33.5	<b>18549.5</b>	363	
	3G1-plasmid	<b>22631</b>	83.5	263	378	
	4G1-cDNA	<b>16971</b>	52	62	368	
	5G2-plasmid	62	<b>19443</b>	62	346	
	6G2-cDNA	38.5	<b>14975</b>	63	366	
	7Neg	30	17	19.5	447	
Data Type:	Count					
Location	Sample	G1(30)	G2(28)	rota(59)	Total Events	Notes
	1rota-plasmid	101	172	132	405	2500beads
	2rota-cDNA	103	140	120	363	
	3G1-plasmid	110	143	125	378	
	4G1-cDNA	105	159	104	368	
	5G2-plasmid	126	118	102	346	
	6G2-cDNA	108	157	101	366	
	7Neg	130	181	136	447	