

計畫編號：DOH95-DC-2038

行政院衛生署疾病管制局九十五年度科技研究計畫

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、王昱竺、鄭嘉如、羅佩真

執行期間：95年1月1日至95年12月31日

目 錄

封 面	頁 碼
摘要	3
壹、前言	4
貳、材料與方法	6
參、結果	12
肆、討論	14
伍、結論與建議	16
陸、參考文獻	17
柒、圖、表	20

摘要

關鍵字：luminex 、 xMAP、 antigen antibody、 nucleic acid

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 monoplex 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，因此本計劃之目的不僅在利用 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

目前研檢中心所收之檢體來源大致有下面幾類:

(1) 法定傳染病通報個案;(2) 症候群通報;(3) 群聚感染事件;(4) 不明原因發燒(機場)。如果檢體來源為(1)法定傳染病通報個案者,大多數會指明須要做那些病原體之檢測,所以不會有太大之問題,當然也是有為數眾多之指定檢測呈陰性反應;而(2)症候群通報個案則可能會有多種病原體須要檢測,尤其是送驗單位沒有明確指出那些病原體是屬於高度疑似病原體時,實驗室便得傷腦筋在此情況下須先做那些測試項目,例如急性黃疸症候群之個案可能由 A、B、C、E 肝及 EBV、瘧疾、勾端螺旋體所造成,同樣的(3)群聚感染事件往往也是有多種疑似病原體且個案數又很多時,時常會顧此失彼,因此多重目標檢驗方法,如果靈敏度、專一性都足夠時,將不失為一個可先做為初期篩選之平台,等到有初步結果時,可再進一步以 monoplex 檢測方法來加以驗證。

而檢驗方式除了傳統病原體之分離、培養外,皆以 Real time PCR、PCR、ELISA 或 IFA 等方式針對不同病原體做單一標的 (Single Target) 偵測,以 Real time PCR 為例,往往為確認感染源,需逐一用不同的核酸引子及探針一一篩選,因此檢體需求量及時效性皆無法符合現況的需求,此計畫乃利用 Suspension array 技術,希望能建立一套多功能、高輸出量、多重偵測、即時分型且高靈敏度的檢測平台。

Luminex xMAP 是利用 Red 與 Infrared 螢光劑,二者以不同比例之混合充填進入 5.6 micron 之微粒球內(microsphere),由於不同比例可被 Laser 光激發不同的波長,目前至少可創造出高達 100 種不同比例之混合。這些每種不同色澤之微粒球皆可以與不同的檢測 assay 結合在一起,用簡單的化學連結法便可將抗原、抗體或核苷酸序列、受器、ligand 等與這些 microsphere 結合,所在單一反應管內可放進 100 種不同偵測目標物的染色微粒球,然後再以 flow cytometry 之技術讓這些微粒球一個一個排列使其通過 Detection Chamber,再以紅色雷射光激發微粒球內不同比例染劑,同時以綠色雷射光激發連結在微粒球上所結合上去分析用 assay agent,利用分析記錄軟、硬體即可得知反應管內所欲偵測

之多種目標物的結果，目前這項技術已被廣泛運用於 Allergy Testing(1)、Autoimmune(2,4)、Cancer Marker(3)、Cytokine (5,17)、Enviroment/BioDefense (6,7,8)、Gene Expression (9)、Genetic Disease (10,18)、Genotyping (11,16,19) 及 Infectious Disease (12,13,14,15,16,20)。例如：發燒的試劑套組，即利用此技術只需單一反應，就可得知造成發燒的病原為何；因此 Luminex xMAP 之運用是多方面，對於傳染病病原體之診斷 (12,13,14,15,16,20) 與生物防恐戰劑 (6,7,8) 之偵測皆有其實際使用情形，雖然它依然是非主流之檢驗平台，許多傳染病病原體目標物之檢驗也仍尚待開發，因此我們更需努力開發出適用於本實驗室之檢測項目，如此才能應付日漸增加之檢驗項目以及無法精確研判、或縮小範圍至何種病原體時之窘境，而且實驗室並沒有無限之資源，無論是金錢、人力、檢體可供揮霍，因此如能成功建立此套檢驗技術平台將可提昇檢驗之效能，及時提供防疫之參考。

貳、材料與方法

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，本計畫所使用的血清檢體及詳細背景資料向研究檢驗中心生材科申請借調。

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. 咽喉拭子檢體：咽喉拭子棉棒充分攪拌後於塑膠管壁旋轉擠乾取出。將擠出之液體於 4°C，2100 xg 離心 15 分鐘。收集上清液裝於管子標示號碼及日期保存於-70°C。
- c. 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。
- c. 痰檢體：取痰檢體與 0.9% NaCl(內含 1% N-Acetylcysteine)體積 1: 2 攪拌靜置 30 分鐘後於 4°C，2100 xg 離心 15 分鐘，收集上清液。

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)。

A. 以核酸為基礎偵測方式

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)

PCR 反應測試

利用 Bio-Rad 多重標的偵測專用試劑 1708849 iQ Multiplex Powermix 及 iCycler Gradient PCR 只需單一反應即可獲得 PCR 反應之 PCR efficiency, sensitivity and dynamic range。

腸病毒 71 型核酸檢測法

* <probe-bead coupling>

1. 原 Beads vortex and sonication 各 30sec.
2. 取 100 λ beads(1.25×10^6 beads).
3. 14000g, 2min, 去除上清液.
4. 加 100 λ 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 λ 上清液.
8. 加入 2 λ oligo(0.2 nmole), vortex.
9. 配 10 mg/ml EDC (10mg EDC dissolve in 1ml d_2H_2O).
10. 加入 2.5 λ 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 λ 1.5X TMAC, 混合均勻並儲存於 4°C.

*<Hybridization Protocol>

1. 分別取 EV71_B4, EV71_C2, EV71_C4 各 10 λ 的 stock coupled beads (#122,#128,#061) .
2. 分別加入 490 λ 1.5X TMAC.
3. 從 step.2 各取 25 λ (5000 beads)至同一管中.
4. 14000g, 2min, 去除上清液.
5. 加入 25 λ 1.5X TMAC, 使之懸浮.
6. 加入 12.5 λ 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 λ 1X TMAC, 2000 rpm, 3min, 除上清液.
10. 用 1X TMAC 稀釋 1mg/ml Streptavidin-R-phycoerythrin 成 4 μ g/ml
11. 分別加入 75 4 μ 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.

輪狀病毒及諾羅病毒 GI 型 GII 型核酸檢測法

<Flex-Beads Preparation>

1. Flex-beads sonicate for 30", vortex, then all transfer to 1.5ml eppendorf.
 2. 10,000rpm, 4min.
 3. Remove the supernatant & add 200ul 1.5XTMAC buffer, then vortex.
 4. Repeat step2), 3) twice (totally wash three times)
(Each residue the supernatant 25ul).
 5. Add 1.5XTMAC buffer 75ul(total 100ul).
- >Final Flex-beads concentration: **2.5*10⁶/ml**, storage at 4⁰C.

<PCR-reaction >

1. After virus RNA extraction, RNA reverse transcribed to cDNA by RT reaction.
2. Then add reagents & cDNA/Plasmid by the table:
- 3 After nested PCR , check the product by gel electrophoresis.

<Hybridization>

1. Add PCR product 10ul, Flex-beads 2ul, and 1.5X TMAC buffer 18ul(each reaction), mix thoroughly.
2. By PCR machine: 96°C 5'(denature)
→37°C 30'(hybridization)
→37°C stand
3. 2,000rpm, 3min.
4. Remove the supernatant & add 75ul 1XTMAC buffer, mix.
5. 2,000rpm, 3min, remove the supernatant.
6. Add 75ul 1XTMAC with 5ug/ml streptavidin-R-phycoerythrin by the table:
7. React at 37°C for 15 min.
8. Mix, then analysis by Luminex 100IS machine.

B. 以抗體為偵測腸病毒 71 型方式

<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 (1.25×10^7 /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 λ (1.25×10^6 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 λ 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 λ 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 λ S-NHS 後馬上再加入 10 λ EDC, 以高速 vortex 30 sec, 避光並且在室溫 shake 20 min.
7. 分別加入 150 λ 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 λ PBS(pH7.4), 中速 vortex 30 sec, sonication 15 sec.

〈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 $500\ \lambda$, 避光並且在室溫 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 30 min.
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 顆 beads/ λ)
8. 避光儲存於 4°C .

〈Protein Coupling Validation〉

1. Label 五管 1.5ml tube, 分別為四管 Test tube(mAb $1\ \mu\text{g}$, $5\ \mu\text{g}$, $25\ \mu\text{g}$, $125\ \mu\text{g}$) 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 $2\ \lambda$ $125\ \mu\text{g}$ mAb coupled beads)
3. 用 staining buffer 稀釋 $1000\ \mu\text{g/ml}$ Goat anti-Mouse IgG conjugated Biotin 成 $2\ \mu\text{g/ml}$.
4. 分別加入 $50\ \lambda$ 的 $2\ \mu\text{g/ml}$ Goat anti-Mouse IgG conjugated Biotin 於四管 Test tube 中, Negative Control 則是加 $50\ \lambda$ 的 staining buffer, 避光並且在室溫 shake 30 min.
6. 14000g 離心 4min, 移除上清液.
7. 用 staining buffer 稀釋 $1000\ \mu\text{g/ml}$ Streptavidin-R-phycoerythrin 成 $2\ \mu\text{g/ml}$.
8. 分別加入 $50\ \lambda$ 的 $2\ \mu\text{g/ml}$ 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 μ l 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

本研究今年重點放在研究方法設立，包括核酸檢測系統及抗原抗體檢測系統兩大部分。

A. 以核酸為基礎偵測方式

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 之序列如下表一及表二。表一為 FlexMAP 微株系統，該系統在微株上已經先鍵結 10mer 核甘酸序列，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甘酸序列比對，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 核甘酸序列，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 核甘酸序列部分會有 crossreaction 情形。表二為 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 plsmid 及三種型之臨床檢體，結果如表三。

本研究中在 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，反應結果如表三。

B. 以抗體為偵測腸病毒 71 型方式

設計原理希望利用 monoclonal EV71 Ab 鍵結於微株上，之後利用此鍵結微株抓取檢體中之 71 型腸病毒，最後以 EV71 polyclonal Ab 作為第二抗體，呈色反應。目前可以購買到的 monoclonal EV71 Ab 為 prototype EV71，而本實驗室所有的 EV71 polyclonal Ab 是以台灣分離株注射兔子後取得的抗體。目前能夠購買到的 monoclonal EV71 Ab 與台灣目前流行的 EV71 經中和試驗後，titer 相當低，顯示產生抗體決定位與 prototype 已產生極大改變，因此本研究將於明年度以台灣地區之 EV71 分離株，製造 monoclonal Ab。

抗體鍵結效果測試：分別以 1 μ g、5 μ g、25 μ g、125 μ g monoclonal EV71 Ab 與微株鍵結，加入 Goat anti-Mouse IgG conjugated Biotin 測試 mAb 與微株鍵結，在抗體與微株鍵結反應結果如圖一及表四。最佳的 mAb 鍵結濃度為 5 μ g~25 μ g。

肆、討論

在本研究中已成功的利用 FlexMAP 微株系統，在單管反應中同時檢測 Rotavirus 及 Norovirus GI、Norovirus GII 之 PCR 產物，未來將以症狀相近之病原檢測為目標。利用 Luminex Bead 核酸系統檢測 Enterovirus serotype 71，在本實驗中無法利用目前所設計的 B4、C2 及 C4 三種血清型 probe 分別分析，但是與微株鍵結反應是可行的，在本研究下一年度將分別設計 EV71 degenerate probe 及再找尋其他適合 B4、C2 及 C4 三種血清型 probe 位點。

EV71 Bead-Ab Coupling Efficiency 試驗中，因目前可以購買得到的 EV71 mAb 為 prototype EV71 type mAb，此 mAb 與目前台灣分離之 EV71 型病毒進行中和試驗效果不甚理想。實驗僅有台灣株 EV71 之 polyclonal Ab，如果要利用 Bead-EV71mAb 檢測臨床檢體時，必須要先利用台灣分離株打老鼠取得本土型之 mAb。在本實驗中確定 Bead coating mAb 鍵結效果不錯，並建議最適合 mAb 鍵結濃度為 5 μ g~25 μ g。

以 Luminex Bead 或 FlexMAP 檢測系統的優點在於

1.縮短檢測時間

因為此一方法係是單一反應管內可同時檢測 100 個不同之標物，而毋須一個一個測試以後才可得知結果，故將縮短得到檢驗結果之時間。

2.節省檢體量

Monoplex 檢測一項，便須耗掉一部份檢體，有時個案之檢體量不足時，往往只測試幾項項目後便已耗盡檢體，無法繼續追根究底或者存查。一旦此一技術平台建立後，單一檢體量體積之耗費將可改善且充份利用。

3.降低成本

由於單一反應管同時檢測多種目標物，因此試劑成本與人力須求將大幅減省而達到

節省成本，不浪費資源之目的。

本局之檢驗系以防疫為主要目標對於突發疫情以及不明原因之群聚感染事件，尤為首要任務，因此如能迅速釐清疫情將有助於防疫之須求，達到防堵擴散之目的。

伍、結論與建議

初步結果證明，Luminex Bead 或 FlexMAP 檢測系統未來應可應用於症狀檢體之初步篩檢。

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.

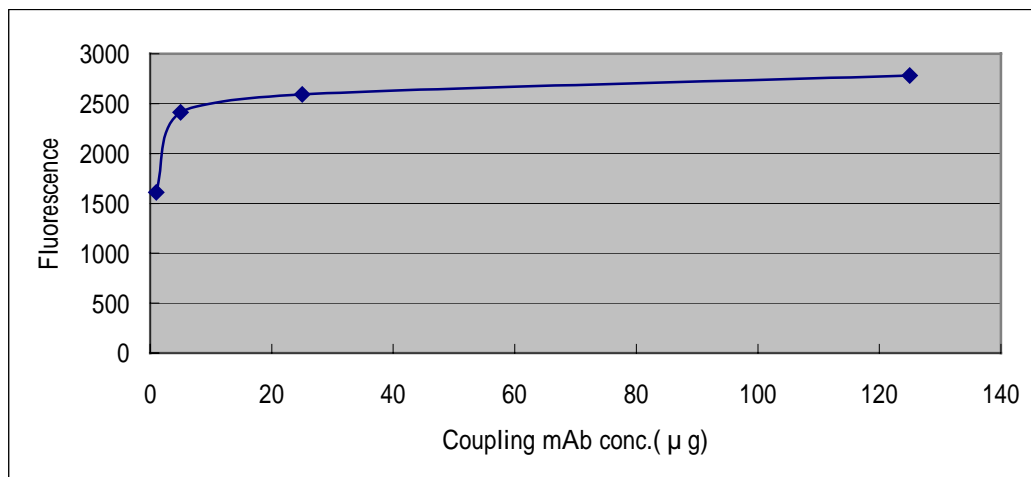
18. Amos JA, Bridge-Cook P, Ponek V, Jarvis MR, A universal array-based multiplexed test for cystic fibrosis carrier screening. *Expert Rev Mol Diagn.*, 6(2006):15-22.

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.

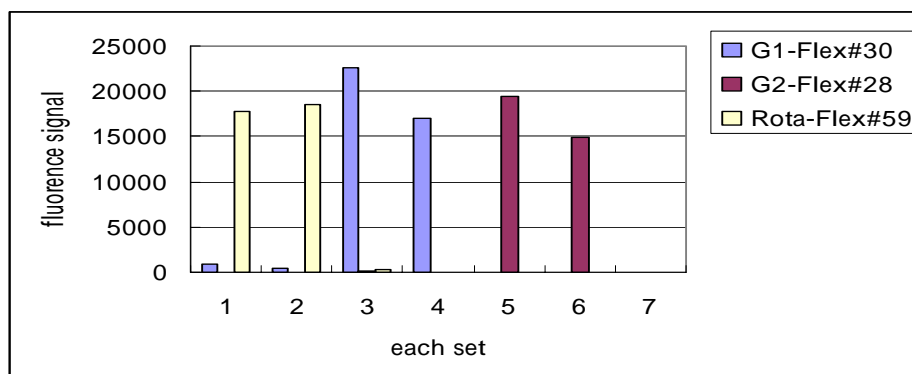
20. Prince HE, Lape-Nixon M, Matud J, Evaluation of a Tetraplex Microsphere Assay for *Bordetella pertussis* Antibodies. *Clin Vaccine Immunol.*, 13(2006):266-70.

柒、圖、表

圖一、EV71 Bead-Ab Coupling Efficiency test



圖二、利用 FlexMAP 檢測輪狀病毒及諾羅病毒



表一、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	ACTGATCCTGTTGGCCATCCTTT

表二、Luminex Bead detection system primer and probe sets

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

表三、 Enterovirus serotype 71 Beads-Oligonucleotide Reaction Result

	EV71_B4 (#122)			EV71_C2 (#128)			EV71_C4 (#061)		
	Test 1	Test 2	Mean	Test 1	Test 2	Mean	Test 1	Test 2	Mean
B4 plasmid	177	149	163	148	142.5	145.25	34	33	33.5
C2 plasmid	117.5	121	119.25	179	216	197.5	32	37	34.5
C4 plasmid	83	99	91	193.5	167.5	180.5	43	51	47
B4 sample	129	138	133.5	115.5	105	110.25	42	26	34
C2 sample	61.5	61	61.25	88	114	101	26	25	25.5
C4 sample	78	63	70.5	112	92	102	44	35	39.5
NTC	4	2	3	4	4	4	6.5	4	5.25
NTC	2	1	1.5	2	1	1.5	5	4	4.5

表四、 EV71 Bead-Ab Coupling Efficiency test

Coupling mAb conc.(μg)	Test 1	Test 2	Mean
1	1597.5	1622.5	1610
5	2335	2492.5	2413.75
25	2603.5	2582	2592.75
125	2769.5	2793.5	2781.5

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	17806.5	405	2500beads
	2rota-cDNA	383	33.5	18549.5	363	
	3G1-plasmid	22631	83.5	263	378	
	4G1-cDNA	16971	52	62	368	
	5G2-plasmid	62	19443	62	346	
	6G2-cDNA	38.5	14975	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	