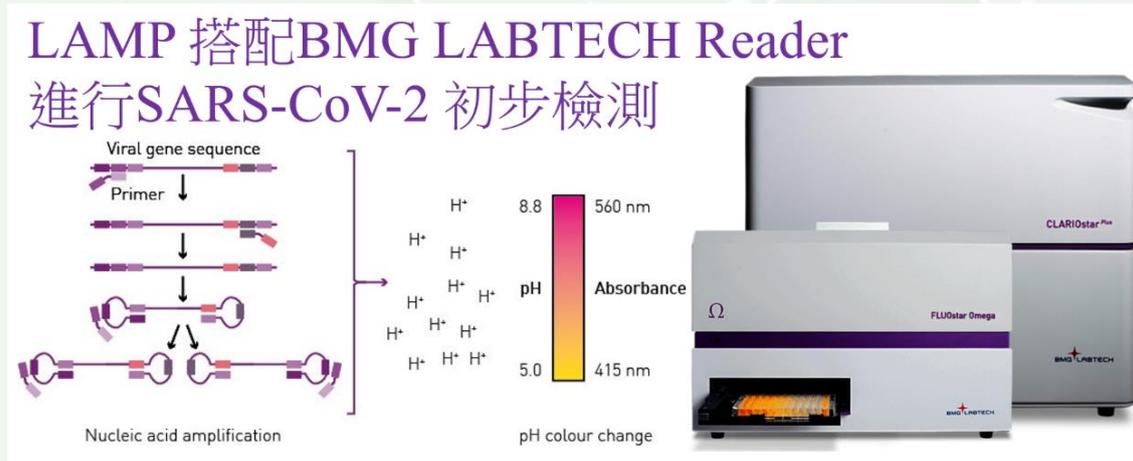


LAMP 搭配 BMG LABTECH Reader 進行 SARS-CoV-2 初步檢測



COVID-19 疫情全球性爆發，除了研發新型冠狀病毒(SARS-COV-2)抗病毒藥物及疫苗，在短時間內篩檢出受感染的患者或無症狀感染者對於疫情控管來說更加重要，因此，國際社會努力創建和擴展可用的檢試方法。最近新型體外核酸擴增技術，逆轉錄環介導的等溫擴增(RT-LAMP)，有望提供了一種快速診斷方法。

恆溫環狀擴增法 (Loop-Mediated Isothermal Amplification;LAMP) 為一恆溫、具環狀形式的擴增法。RT-LAMP 檢測通過識別幾個不同的序列目標 RNA 以高選擇性對其進行擴增，使其靈敏度和特異性相當於傳統 PCR 方法。有別於傳統 PCR 所使用的 Taq 聚合酶，LAMP 檢測使用 Bst 聚合酶。而這聚合酶在 65 °C 具高 DNA strand 置換能力，因此 LAMP 檢測可在 65 °C 恆溫條件下進行。由於減少了一系列溫度循環所，檢測時間減少到大約 30-60 分鐘。

反應終止後，由於在 LAMP 檢測中，Bst 聚合酶和三對 primers 識別目標核酸序列的不同位置，當目標核酸被放大後會釋放氫離子，因此可以利用 magnesium pyrophosphate 沈澱的方式，或利用 SYBR Green 螢光顯色來判定結果。除此之外，由於在 LAMP 檢測會使 pH 值改變，因此還可利用 pH-sensitive dye 產生之顏色改變，透過 microplate reader 進行檢測。[圖 1]

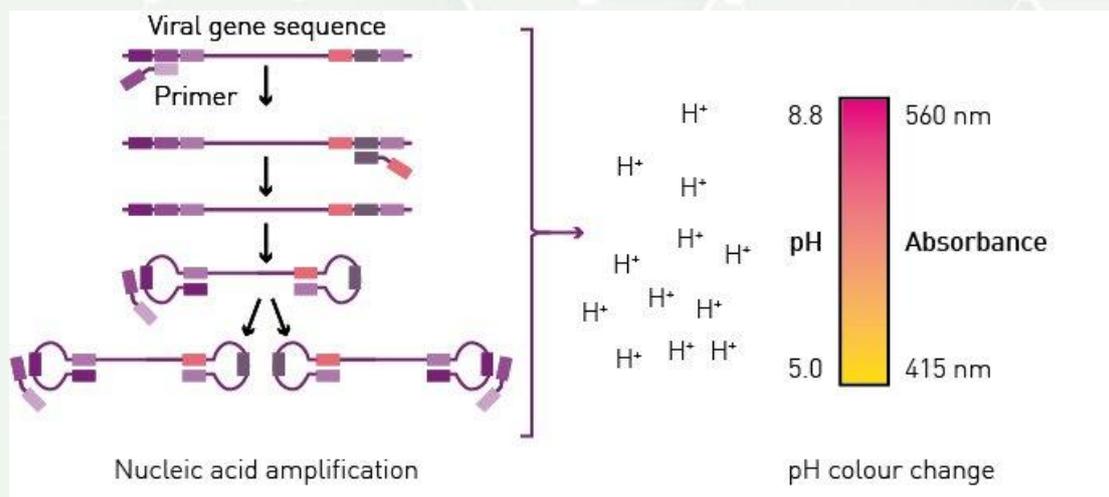


圖 1：逆轉錄環介導的等溫擴增 (RT-LAMP)測定原理

FLUOstar Omega 預熱至 65 °C 2.5 小時然後使用以下設定進行 LAMP 檢測[表 1]：

Optic settings	Absorbance, plate mode kinetic	
	Spectrometer	415 nm
General settings (fastest)	Number of flashes	22
	Settling time	0.0 s
Kinetic settings	Number of cycles	27
	Cycle time	133 s
Incubation	65 °C	
Shaking	Double orbital, 600 rpm for 30 s before cycle 1, 6 and 11	

表 1：LAMP 檢測設定方法

當目標核酸被放大後會釋放氫離子，樣品會由粉紅色到黃色，因此隨時間發生顯著變化，560 nm 處的明顯吸收峰減弱，而 420 nm 處出現一個小吸收峰。因此利用 OD415 nm 和 OD560 nm 之間的差異 (ΔOD) 來分析時間內 pH-sensitive dye 之顏色變化。

在 LAMP 檢測開始後，positive control 的 ΔOD 觀察到有顯著增加在約 18 分鐘。雖然 negative control 的 ΔOD 也出現增加，但是在更晚的時間，這是因為 negative control 非特異性假擴增而導致的。[圖 2]

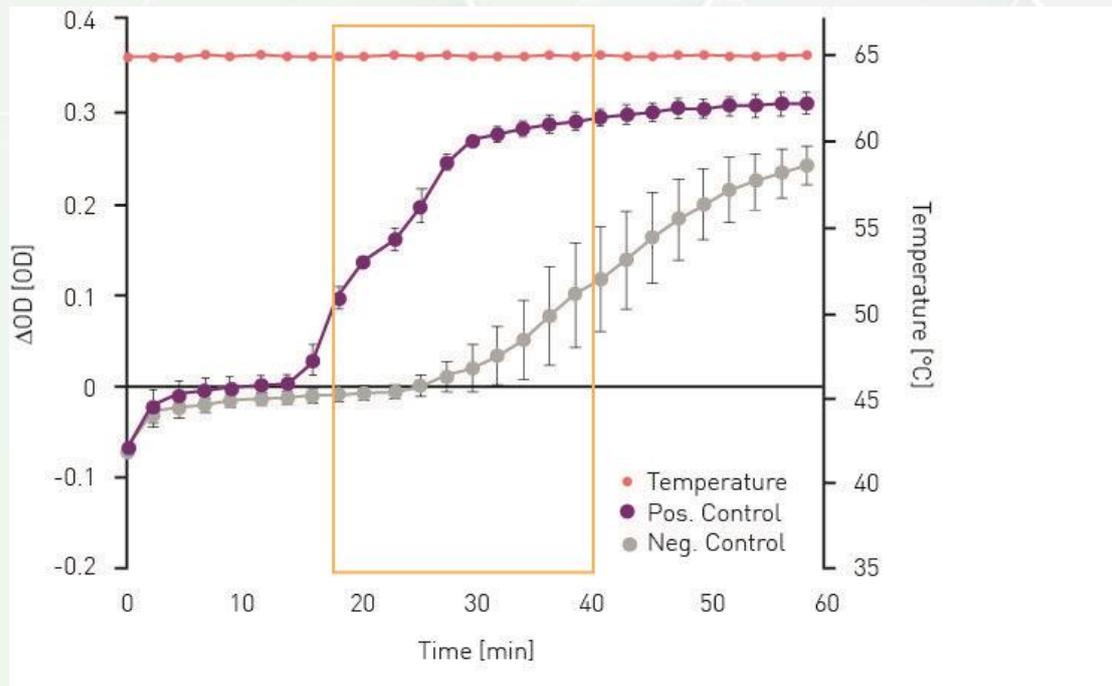


圖 2： SARS-CoV-2 LAMP 60 分鐘動力學測量，數據為 ΔOD (415 nm-560 nm)，測量範圍標記為橙色，n=4.

根據 ΔOD 的時間的變化來作判斷結果外，也可以使用 BMG LABTECH 提供的分析軟件-MARS 計算 positive control 曲線和 negative control 曲線分別達到最大斜率的時間(time-to-maximum-slope)找出最佳反應及判斷時間。Positive control 大約 19 分鐘後達到最大斜率，而 negative control 需要大約 39 分鐘才達到最大斜率 [圖 3]，表示 negative control 在 39 分鐘開始出現非特異性假擴增，因此在比較 Positive control 與 negative control 的數據時需使用的範圍為反應開始後 19-39 分鐘。

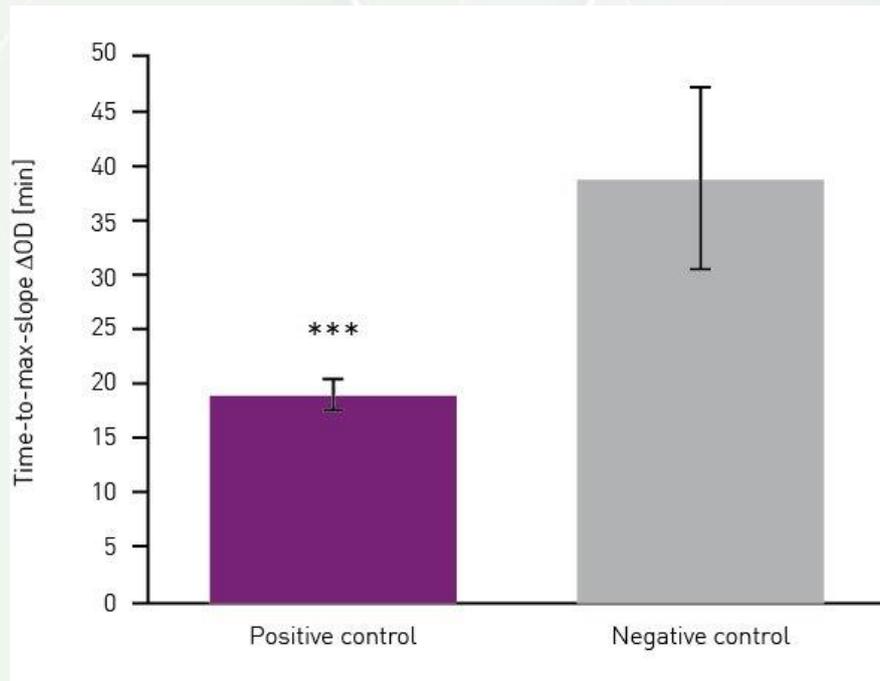


圖 3：Positive control 曲線和 Negative control 曲線達到最大斜率的時間(time-to-maximum-slope)。
n=4, p<0.001.

RT-LAMP 檢測配搭 BMG LABTECH 的 Omega 系列可作為一種快速診斷方法並提供了一個機會，可以在高通量下工作，提高診斷能力，因此非常適合進行即時檢測，如適用於移動檢測中心、急診科、住宅和機場等地方進行快篩。

原廠文章連結：Ann-Cathrin Volz et al. LAMP assay for detecting SARS-CoV-2 RNA using an absorbance-based colorimetric readout(2021) <https://reurl.cc/GbXqiy>