

## 第八章 聚合酶鏈鎖反應 (Polymerase chain reaction, 簡稱 PCR)

### 一、PCR 的歷史

PCR 的發展可以說是從 DNA 聚合酶的發現緣起。DNA 聚合酶最早於 1955 年發現(DNA polymerase I)，而較具有實驗價值及可行性的 Klenow fragment 則是於 70 年代的初期由 Dr. H. Klenow 在 *E. coli* 中所發現，但由於這個酵素是一種易被熱所破壞之酵素，因此不符合一連串的高溫連鎖反應所需[Saiki *et al.*, 1985b]。現今所使用的酵素(簡稱 *Taq* polymerase)，則是於 1976 年從熱泉(Hot spring)中的細菌 *Thermus aquaticus* 分離出來的[Chien *et al.*, 1976]。它的特性就在於能耐高溫，可適應一連串的加熱反應，是一個很理想的酵素，但它被廣泛運用則於 80 年代之後。PCR 的原始雛形概念是類似基因修復複製(DNA repair replication)，它是於 1971 年由 Dr. Kjell Kleppe 提出[Kleppe *et al.*, 1971]。他發表第一個單純且短暫性基因複製(類似 PCR 前兩個周期反應)的實驗。而現今所發展出來的 PCR 則於 1983 由 Dr. Kary B. Mullis 發展出的，Dr. Mullis 當年服務於一家物科技研究公司(Perkin-Elmer Cetus Corporation)。目前這家公司在 PCR 的相關儀器及原料上佔有很大的市場。Dr. Mullis 並於 1985 年與 Saiki 等人正式發表了第一篇相關的論文[Saiki *et al.*, 1985a]。

但 1985 年 Mullis 最先發表的 PCR 論文中所使用的 DNA 聚合酶是先前提過由大腸桿菌中萃取純化的 DNA 聚合酶-Klenow fragment，由於這個酵素是一種易被熱所破壞之酵素，所以於每一次複製把模板 DNA 加熱分開成單股後，就得加一次 DNA 聚合酶。但是若想把複製次數增加到二十至三十次時，上述方法變得繁瑣不堪，且因試管中變性的 DNA 聚合酶逐次增多，會妨礙 DNA 的產量。還好，中國人的發現改變了兩難困境。現任教於陽明大學神經科學研究所的錢嘉韻教授，早在 1976 年留美時即已報告了一項新發現：由美國黃石公園溫泉所分離出的某種細胞 (*Thermus aquaticus*, YT-1)，其 DNA 聚合酶具有耐高溫的特性。該篇論文還詳述了此 DNA 聚合酶的純化步驟，以及此酵素的相關特性。例如，複製 DNA 的最適溫度(高達 80°C)、最適 pH 值、二價鎂離子 ( $Mg^{2+}$ ) 的必要性，以及此酵素有別於 *E. coli* 的 DNA 聚合酶，並不具有外 3' 5' exonuclease 之效等等。此篇論文後來被 Mullis 所在 Cetus 公司工作的 PCR 發展小組所應用。以 *Thermus aquaticus* 的 DNA 聚合酶，即 *Taq* DNA polymerase，取代了先前所用的 *E. Coli* 的 Klenow fragment。這項改變使得 PCR 反應得以自動化，只需在第一個複製循環時加一次 *Taq* DNA 聚合酶，即可連續複製三十個循環以上，所得 DNA 片段的特異性比用 *E. Coli* 的酵素要好得多。整個反應可使微量的 DNA 模板於二至三小時內，在一根試管中複製百萬倍以上。如此一來，PCR 變得既省力、省時又省錢。Cetus 公司的研究小組於 1988 年重新整合 PCR 過程，發表了改用 *Taq* DNA 聚合酶後的 PCR 方法及其應用之潛力[Saiki *et al.*, 1988]。

此後，PCR 的運用一日千里，相關的論文發表質量可以說是令眾多其它研究方法難以望其項背。在 1989 年，Science 期刊將 PCR 中的 DNA 聚合酶命名為當年的風雲分子 (Molecule of the year)，而 PCR 本身則列為年度的重要科學發明產物。當然，它的發明者 Dr. Mullis 更在 1993 年獲得諾貝爾化學獎。

## 二、PCR 的原理

### A. 何謂 PCR

簡單的說，PCR 就是利用酵素對特定基因做體外或試管內 (In Vitro) 的大量合成。基本上它是利用 DNA 聚合酶進行專一性的連鎖複製。目前常用的技術，可以將一段基因複製為原來的一百億至一千億倍。

### B. PCR 的要件

基本上 PCR 須具備四要素：1. 要被複製的 DNA 模板(Template)；2. 界定複製範圍兩端的引子(Primers)；3. DNA 聚合酶(*Taq* Polymearse)；4. 合成的原料及緩衝液。

PCR 的反應包括三個主要步驟，分別是 1) 變性(Denaturation)；2) 引子的黏合(Annealing of primers)；3) 引子的延長(Extension of primers)。(圖 8-1)

變性是將 DNA 加熱變性，使雙股變為單股，做為複製的模板(Template)。很多 PCR 之所以會失敗很有可能是因為模版的不完全變性(Incomplete denaturation)，典型的變性條件是 95°C 30 秒或是 97°C 15 秒，對於 G+C 較多的目標產物則須較高的變性溫度。不完全變性會使二股 DNA 突然黏合回雙股，而使 PCR 產量減少。但若是變性步驟的時間太長或溫度太高則會造成不必要的酵素活性喪失。

而黏合則是令引子(Primers)於一定的溫度下附著於模板 DNA 兩端，引子黏合所需的時間和溫度決定於引子的組成、長度和濃度，較適合的黏合溫度為低於引子  $T_m$  值 5°C。黏合溫度提高可以減少不正確的引子黏合，並且可以減少引子 3' 端的錯誤延長(Misextension)。所以剛開始的幾個循環若是將黏合溫度提高將有助於反應的專一性。

最後則是延長，在 DNA 聚合酶(e.g. *Taq* polymerase)的作用下進行引子的延長及另一股的合成(Extension of primers)。一般延長的反應溫度為 72°C，在 72°C 下視其反應中緩衝液、pH 值、鹽的濃度、DNA 模版的特性的不同，每秒

DNA 合成酵素可延長 35-100 個核苷酸，一般在 72°C 下合成 2 kb 需要 1 分鐘。

在經過一次的 PCR 循環後可以得到 2 倍的產物，所以在經過 N 次的循環就可得到  $2^N$  的目標產物。至於需經過幾次的循環則視原始的目標 DNA 的濃度而定。而 PCR 最常犯的錯誤就是過多的循環，引述 Kary Mullis 所說的一句話「如果你需要超過 40 個循環來增幅單一複製之基因，那你的 PCR 一定有某些嚴重問題」(“If you have to go more than 40 cycles to amplify a single-copy gene, there is something seriously wrong with your PCR”)，太多的循環會使得非特異性的產物增加，當然若是循環數太少則會使產量降低 [Innis and Gelfand, 1990]。

反應中每一種成份都是 PCR 反應成敗的關鍵。酵素濃度建議每 100  $\mu$ l 的反應中使用 1-2.5 units 的 *Taq* polymerase [Lawyer *et al.*, 1989]，當然酵素濃度還要視目標模板或引子而改變，若是酵素濃度太高會使非特異性產物增加，若是酵素濃度太低則是得到的目標產物量不足。去氧核糖三磷酸 (Deoxynucleotide triphosphates, dNTPs) 為反應中合成 DNA 的原料，dNTPs 必須儲存於 pH 7.0 的溶液中，反應中 dNTPs 中每一種的濃度為 20-200  $\mu$ M 可以得到最佳的產量、特異性與忠實性之間的平衡，而且低濃度的 dNTPs 可以減少在錯誤的反應 [Innis *et al.*, 1988]，理論上 dNTPs 每一種 20  $\mu$ M 就足夠合成 2.6  $\mu$ g 的 DNA 或是 10 pmol 的 400 bp DNA [Innis and Gelfand, 1990]。反應中鎂離子的濃度會影響引子的黏合、雙股模板變性的溫度、產物的特異性、引子之間的二聚 (Primer-dimer)、酵素的活性與忠實性。*Taq* polymerase 需要鎂離子來幫助其與模板、引子、dNTPs 的結合，因此，PCR 中需要有 0.5-2.5 mM 的鎂離子，但是必須注意鎂離子的濃度會受到 dNTPs 或是 DNA 溶液中 EDTA 或是其它螯合物的影響 [Innis and Gelfand, 1990]。引子為界定複製範圍的兩端，一般引子的反應濃度介於 0.1-0.5  $\mu$ M 較佳，濃度過高的引子可能會促進非特異性產物產生，並且可能造成人為的 primer-dimer，而這些都會與預期產物競爭酵素、dNTPs、引子，使預期產物產量下降。一般設計引子時有一些簡單的規則，典型引子長度在 18-28 核苷酸、G+C 占全部 50-60%、 $T_m$  值介於 55-80°C 之間，二端引子  $T_m$  值不宜相差太多。還有二引子的 3' 端必須避免為互補序列，否則會促進 primer-dimer。在 G+C 較多的序列中，引子的 3' 端需避免連續的 G 或 C (三個以上)，否則會促進 mispriming。而且在引子中需避免迴文的出現。如果還是無法作用，試著換一對引子。若是以上情況都無法解決問題，那有可能是因為 DNA 模版有二級結構 [Innis and Gelfand, 1990]。

PCR 在進行到最後數個循環，原本呈指數上升的產物會開始呈現停滯稱為停滯現象 (Plateau effect)。會影響 PCR 的停滯現象因子有很多：(1) 反應物 (dNTPs 或 primer) 的利用；(2) 作用物 (dNTPs 或 酵素) 的穩定性；(3) 終產物抑制 (Pyrophosphate, duplex DNA)；(4) 非特異性產物或 primer-dimer 競爭反應

物；(5)產物高於  $10^{-8}$  M 特異性產物會重黏合(Reannealing)；(6)產物濃度變高時 DNA 的不完全變性。到達停滯後會有一個很重要的結果就是非特異性產物會繼續增幅，所以循環的數目最好掌控在避免非特異性的增加之內 [Innis and Gelfand, 1990]。

### 三、臨床應用

PCR 除了是一個診斷工具外，更重要的是它有廣泛的運用。PCR 本身可直接用來鑑定特定基因的存在與否，也可以用來偵測基因是否有異常(Gene mutation, deletion, and rearrangement...)。例如，在醫學上對遺傳疾病或腫瘤癌症的診斷及預後的評估。舉例來說，PCR 可以應用到癌症的診斷和治療效果的偵測，例如白血病患者骨髓移植後可以使用 PCR 測定到微量殘留或復發的白血病細胞。且因為 PCR 測定特異性的 DNA 序列，因此遺傳疾病來自基因的變異可以測定出來，目前已使用在 cystic fibrosis, muscular dystrophy, sickle cell anemia。在感染性的疾病上，某些病毒，細菌，寄生蟲，黴菌可以用 PCR 診斷，從臨床檢體，血液，尿液，脊髓液，體液都可以快速的偵測到病原體的存在。舉例來說，帶狀皰疹的早期病徵是在受帶狀皰疹病毒影響的神經所及範圍出現疼痛。這種疼痛常從神經深部發生，有人不以為意，卻也有人痛不欲生，視神經發炎的程度而定。若早期服用抗病毒藥物，有時甚至不會長出水泡；但若在疹子出現三天後才開始服用，其藥效就較差，雖仍有機會減輕疼痛。早期服用這種特效藥，也可以縮短將來皰疹後遺神經痛的時間。所以若能在發疹子之前即檢驗出受到帶狀皰疹感染，及早用藥，可減輕病情且降低其併發之後遺症。它也可成為一個生產線進而大量複製特定的基因進行基因密碼的讀取(DNA sequencing)及其它的運用。舉凡對生物標本及法醫學上的樣本鑑定，從單一毛髮、一隻精蟲或一滴血液、唾液來找出兇手。也可以做 DNA 指紋(Fingerprints)比對幫助親子關係的鑑定。PCR 更可以用於器官移植組織相容性 HLA 的分析。另外在演化上的分析，經由 PCR 的運用也產生重大的進展。近來，在生物醫學的研究上，特別是細胞間訊息的傳遞分子，諸如介白質(Interleukines)及各種生長因子(Growth factors)基因的表現都可用 PCR 來進行質與量的分析。而在獸醫領域中，PCR 也是許多實驗室診斷疾病的重要工具，特別是傳染性疾病偵測方面，例如新城病 [Ali and Reynolds, 2000; Jestin and Jestin, 1991; Wang *et al.*, 2001]、家禽流型性感冒 [Horimoto and Kawaoka, 1995; Lee *et al.*, 2001; Munch *et al.*, 2001; Starick *et al.*, 2000]、家禽傳染性支氣管炎 [Falcone *et al.*, 1997; Keeler, Jr. *et al.*, 1998; Kingham *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 1991; Wang and Tsai, 1996]、家禽傳染性喉頭氣管炎 [Alexander and Nagy, 1997; Clavijo and Nagy, 1997; Humberd *et al.*, 2002; Poulsen *et al.*, 1991b; Scholz *et al.*, 1994; Vogtlin *et al.*, 1999; Williams *et al.*, 1992]、豬瘟 [Harding *et al.*, 1996; Stadejek *et al.*,

1995; Harding *et al.*, 1994]、犬溫熱[Frisk *et al.*, 1999; Shin *et al.*, 1995]、犬小病毒[Hirasawa *et al.*, 1995]…等。

總之，人類在邁入廿一世紀中即將出現若干的突破，生物醫學便是其中重要的一項。在過去三、四十年來，像 PCR 這樣影響深遠的技術實在很難找到。它的震撼，除了眾多的得獎外(包括諾貝爾獎)，更在於它的可塑性、修飾性及全方位的運用。未來的生物醫學領域中，它也必定繼續扮演舉足輕重的角色。

## PCR 操作及產物分析

### 一、實驗目的：

本實驗之目的為了解 DNA 聚合酶連鎖反應過程以及如何判斷其產物之正確性熟悉操作方法與步驟及應用。

### 二、實驗試劑及材料：

#### A. RNA 萃取：

1. 病毒液：新城病病毒(Newcastle disease virus, NDV)尿囊液
2. TRIzol® reagent
3. 氯仿(chloroform)
4. 異丙醇(isopropanyl alcohol)
5. 75%乙醇(ethyl alcohol)
6. DEPC (Diethyl pyrocarbonate) (BDH) treated distilled water

#### B. DNA 萃取：

1. 病毒液：傳染性喉頭氣管炎病毒(infectious laryngotracheitis virus, ILTV)疫苗液
2. 10x 消化緩衝液(Digestion buffer)：100 mM Tris-HCl pH7.8, 50mM EDTA, 5% SDS
3. 蛋白酶 K(proteinase K) 20 mg/ml
4. Phenol: Chloroform: Isoamyl alcohol (25:24:1)
5. 3 M 醋酸鈉(sodium acetate)
6. 100%乙醇
7. 75%乙醇
8. sterilized distilled water

C. RT 操作：

1. RNA 樣品：由"RNA 萃取"實驗萃取所得之 RNA。
2. 與病毒 RNA 序列相反之引子
3. 5x first buffer (Gibco BRL)
4. 0.1M Dithiothreitol (DTT) (Gibco BRL)
5. dNTPs：含有 dATP, dTTP, dCTP, dGTP，原液各為 2.5 mM。(Viogene)
6. 酵素：M-MLV reverse transcriptase (Gibco BRL)
7. DEPC treated distilled water

D. PCR 操作：

1. DNA Sample：由"DNA 萃取"以及"RT 反應後的 cDNA"實驗萃取所得之 DNA。
2. dNTPs：含有 dATP, dTTP, dCTP, dGTP，原液各為 2.5 mM。(Viogene)
3. 引子對：本實驗中 NDV 病毒核酸之引子對為 ALLs/ALLe (序列如下表一)；ILTV 病毒核酸之引子對為 TK#1/TK#2 (序列如下表 1)。
4. 酵素：Taq DNA polymerase
5. 緩衝液：Reaction buffer 10X
6. 水：sterilized distilled water

E. PCR 產物分析(電泳分析)：

1. 洋菜凝膠膠片：Agarose gel
2. 緩衝液：0.5x TBE buffer
3. PCR 產物
4. DNA 追蹤劑：loading dye
5. 100 bp DNA Ladder (100  $\mu$ g/ml, GeneTeks BioScience)
6. 染色劑：Ethidium bromide

三、儀器設備：

A. RNA 萃取：

1. 1000 $\mu$ l, 200 $\mu$ l, 20 $\mu$ l 微量滴管
2. 高速離心機 (圖 8-2)
3. 2ml 微量離心管
4. 1.5ml 微量離心管
5. -20°C 冰箱
6. 分光光度計：GeneQuant II (Pharmacia, Sweden) (圖 8-3)

B. DNA 萃取：

1. 1000p, 200p, 20p 微量滴管
2. 乾浴器 (圖 8-4) 或水浴槽
3. 高速離心機
4. 1.5ml 微量離心管
5. -20°C 冰箱
6. 分光光度計

C. RT 操作：

1. 20p, 10p 微量滴管
2. PCR 機
3. 桌上型離心機
4. 0.65ml 微量離心管

D. PCR 操作：

1. 100p, 20p, 10p 微量滴管
2. PCR 機 (圖 8-5)
3. 桌上型離心機
4. 0.2ml 微量離心管

E. PCR 產物分析(電泳分析)：

1. 水平電泳槽：Mupid-II (圖 8-6)
2. 配製膠片(gel)：1.6% agarose 大片膠一片

(1) 製膠用品：製膠槽、Comb、trap (圖 8-7)

(2) 微波爐

(3) 泡膠瓶

3. 石臘膜 (Paraffin film): 一小條
4. UV 觀測箱 (圖 8-8)
5. 數位照相機 (圖 8-8)

四. 實驗步驟：

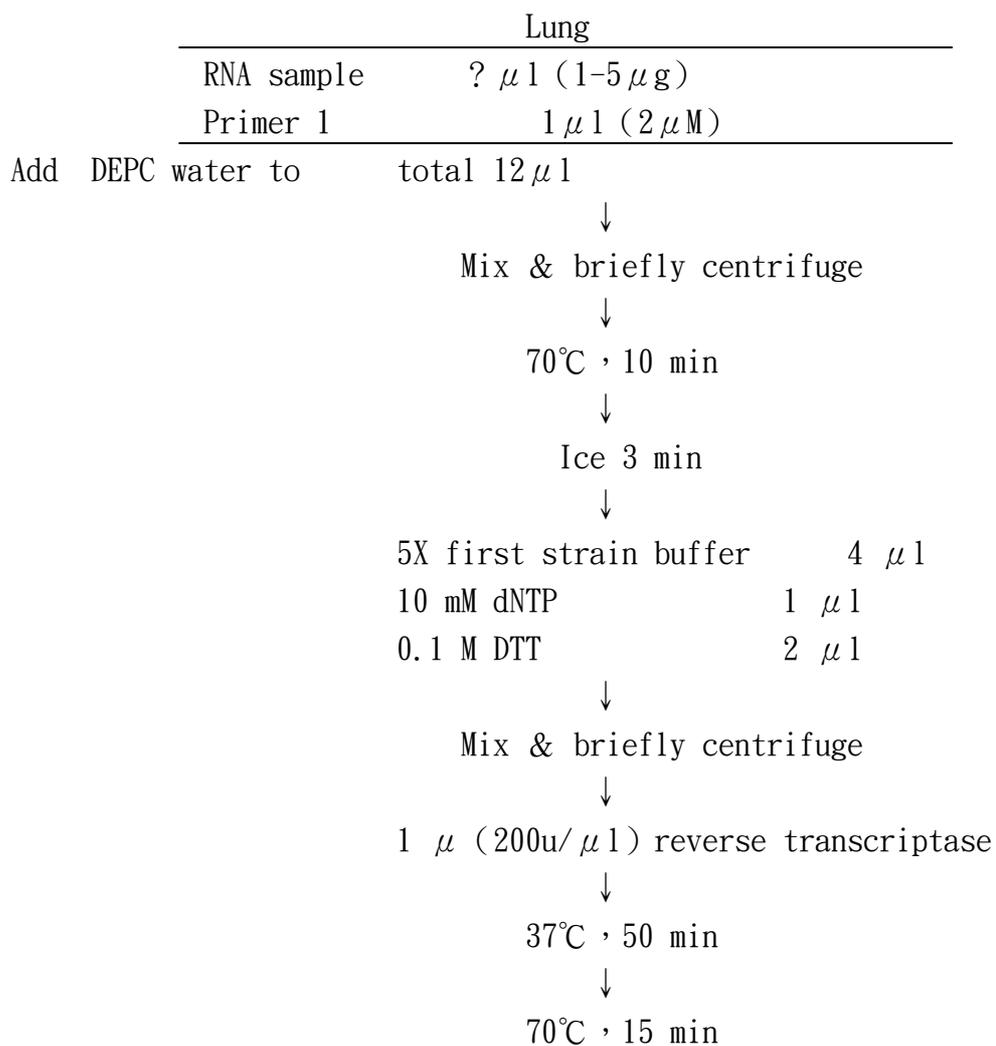
A. RNA 萃取：

1. 取 500  $\mu$ l 病毒液置於 2.0 ml 之微量離心管，加入 1 ml TRIzol® reagent，劇烈震盪後靜置室溫 5 分鐘。
2. 加入 200  $\mu$ l 的 chloroform 混和均勻，於室溫下靜置 2-3 分鐘。
3. 以 4°C 離心 12000 xg 10 分鐘。
4. 將上面的水層移至另一新的微量離心管，加入等量之 isopropanol，混和均勻後置於 -20°C 10 分鐘。
5. 以 4°C 離心 12000 xg 15 分鐘。
6. 移去上清液，加入 75% ethanol，溫和反轉數次。
7. 以 4°C 離心 12000 xg 15 分鐘。
8. 移去上清液，再以真空抽氣將 RNA 沈澱物風乾。
9. 待乾燥後加入 20  $\mu$ l RNase free DEPC 水將 RNA 沈澱物溶解。
10. 以分光光度計測定 RNA 濃度，並根據  $A_{260}/A_{280}$  比例判斷 RNA 萃取之品質好壞，一般最佳為 1.8。

#### B. DNA 萃取：

1. 取 450  $\mu$ l 病毒液置於微量離心管，加入 10x Digestion buffer 50  $\mu$ l。
2. 加入 proteinase K (20mg/ml, Viogene) 1.25  $\mu$ l 使之最終濃度為 50  $\mu$ g/ml。
3. 均勻混和後於乾浴槽以 56°C 作用 2 小時。
4. 於乾浴槽以 94°C 作用 10 分鐘將 proteinase K 不活化。
5. 加入等量之 Phenol: Chloroform: Isoamyl alcohol (25:24:1) (USB, LifeScience) 後劇烈震盪，於室溫下靜置 3 分鐘。
6. 以 4°C 離心 12000 xg 10 分鐘。
7. 抽取上清液至一新的微量離心管，重複上述 5-6 步驟至上清液完全清澈為止。
8. 抽取上清液至一新的微量離心管，加入 1/10 體積之 3 M sodium acetate (Merck)，溫和混和均勻再加入 2 倍體積之 100% ethanol，溫和混和均勻後置於 -20°C 10 分鐘。
9. 以 4°C 離心 12000 xg 15 分鐘。
10. 移去上清液，加入 75% ethanol，溫和反轉數次。
11. 以 4°C 離心 12000 xg 5 分鐘。
12. 移去上清液，再以真空抽氣將 DNA 沈澱物風乾。
13. 待乾燥後加入 20  $\mu$ l 滅菌去離子水將 DNA 沈澱物溶解。
14. 以分光光度計測定 RNA 濃度，並根據  $A_{260}/A_{280}$  比例判斷 RNA 萃取之品質好壞，一般最佳為 2.0。

#### C. RT 操作：



D. PCR 操作：

1. NDV

	Positive control	Sample	Negative control (Water)
模板 (cDNA)	3.0	3.0	3.0
引子 ALLs	0.5	0.5	0.5
引子 ALLe	0.5	0.5	0.5
dNTP	0.5	0.5	0.5
10x PCR buffer	3.0	3.0	3.0
Water	22.0	22.0	22.0

Taq DNA polymerase	0.5	0.5	0.5
Total	30	30	30

## 2. ILTV

	Positive control (已確定為陽性之 DNA)	Sample (自己萃取之 DNA)	Negative control (Water)
模板 (cDNA)	3.0	3.0	3.0
引子 ALLs	0.5	0.5	0.5
引子 ALLe	0.5	0.5	0.5
dNTP	0.5	0.5	0.5
10x PCR buffer	3.0	3.0	3.0
Water	22.0	22.0	22.0
Taq DNA polymerase	0.5	0.5	0.5
Total	30	30	30

### E. PCR 產物分析(電泳分析)：

1. 製膠：稱取 Agarose 0.4g，倒入已含 25ml TBE buffer 之 100mL 之泡膠瓶中，加保鮮膜後以微波爐加熱，持續加熱至完全透明。製膠槽擺置平穩，插入 Comb。(圖 8-9)
2. 倒膠：取出室溫冷卻至約 70 度(尚很燙手背)，加入 1.25  $\mu$ l ethidium bromide (10 mg/ml)，倒入前述製膠槽，若有氣泡以吸管吸除。
3. 取出 Comb：已完全冷卻(轉為乳白色)，垂直取出 Comb，將凝膠移至含 0.5 mg/ml ethidium bromide 的 0.5x TBE buffer 之電泳槽。
4. 點樣品：取 Paraffin film 一小條，在上面先各點數滴約 2 之 loading dye，再取 PCR 產物 10  $\mu$ l，分別與 loading dye 混合(上下吸取數次)，再加入到膠體之樣品格(well)內。取 5  $\mu$ l 標準 DNA Ladder 加入到膠體之樣品格(well)內。
5. 電泳分離：蓋緊電泳槽蓋，插緊電源供應器及插座，調 100V 並設定從，按“On”分析，電泳 20-30 分鐘後斷電取膠。
6. 觀察：將膠片取出置於 UV 觀測箱觀察照相。
7. 預期結果將如圖 8-10 所示。

參考文獻：

Alexander HS, Nagy E. 1997. Polymerase chain reaction to detect infectious laryngotracheitis virus in conjunctival swabs from experimentally infected chickens. *Avian Dis* 41: 646-653.

Ali A, Reynolds DL. 2000. A multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction assay for Newcastle disease virus and avian pneumovirus (Colorado strain). *Avian Dis* 44: 938-943.

Chien A, Edgar DB, Trela JM. 1976. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J Bacteriol* 127: 1550-1557.

Clavijs A, Nagy E. 1997. Differentiation of infectious laryngotracheitis virus strains by polymerase chain reaction. *Avian Dis* 41: 241-246.

Falcone E, D'Amore E, Di Trani L, Sili A, Tollis M. 1997. Rapid diagnosis of avian infectious bronchitis virus by the polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 64: 125-130.

Frisk AL, Konig M, Moritz A, Baumgartner W. 1999. Detection of canine distemper virus nucleoprotein RNA by reverse transcription-PCR using serum, whole blood, and cerebrospinal fluid from dogs with distemper. *J Clin Microbiol* 37: 3634-3643.

Harding M, Lutze-Wallace C, Prud'Homme I, Zhong X, Rola J. 1994. Reverse transcriptase-PCR assay for detection of hog cholera virus. *J Clin Microbiol* 32: 2600-2602.

Harding MJ, Prud'Homme I, Gradil CM, Heckert RA, Riva J, McLaurin R, Dulac GC, Vydellingum S. 1996. Evaluation of nucleic acid amplification methods for the detection of hog cholera virus. *J Vet Diagn Invest* 8: 414-419.

Hirasawa T, Yono K, Mikazuki K. 1995. Differentiation of wild- and vaccine-type canine parvoviruses by PCR and restriction-enzyme analysis. *Zentralbl Veterinarmed B* 42: 601-610.

Humberd J, Garcia M, Riblet SM, Resurreccion RS, Brown TP. 2002. Detection of infectious laryngotracheitis virus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues by nested polymerase chain reaction. *Avian Dis* 46: 64-74.

Horimoto T, Kawaoka Y. 1995. Direct reverse transcriptase PCR to determine virulence potential of influenza A viruses in birds. *J Clin Microbiol* 33: 748-751.

Keeler CL, Jr., Reed KL, Nix WA, Gelb J, Jr. 1998. Serotype identification of avian infectious bronchitis virus by RT-PCR of the peplomer (S-1) gene. *Avian Dis* 42: 275-284.

Kingham BF, Keeler CL, Jr., Nix WA, Ladman BS, Gelb J, Jr. 2000. Identification of avian infectious bronchitis virus by direct automated cycle sequencing of the S-1 gene. *Avian Dis* 44: 325-335.

Kleppe K, Ohtsuka E, Kleppe R, Molineux I, Khorana HG. 1971. Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. *J Mol Biol* 56: 341-361.

Innis MA, Gelfand DH. 1990. Optimization of PCRs. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, editors. *PCR protocol*. San Diego: Academic Press, pp. 3-12.

Innis MA, Myambo KB, Gelfand DH, Brow MA. 1988. DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 9436-9440.

Jestin V, Jestin A. 1991. Detection of Newcastle disease virus RNA in infected allantoic fluids by in vitro enzymatic amplification (PCR). *Arch Virol* 118: 151-161.

Lawyer FC, Stoffel S, Saiki RK, Myambo K, Drummond R, Gelfand DH. 1989. Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the DNA polymerase gene from *Thermus aquaticus*. *J Biol Chem* 264: 6427-6437.

Lee MS, Chang PC, Shien JH, Cheng MC, Shieh HK. 2001. Identification and subtyping of avian influenza viruses by reverse transcription-PCR. *J Virol Methods* 97: 13-22.

Lin Z, Kato A, Kudou Y, Ueda S. 1991. A new typing method for the avian infectious bronchitis virus using polymerase chain reaction and restriction enzyme fragment length polymorphism. *Arch Virol* 116: 19-31.

Munch M, Nielsen LP, Handberg KJ, Jorgensen PH. 2001. Detection and subtyping (H5 and H7) of avian type A influenza virus by reverse

transcription-PCR and PCR-ELISA. *Arch Virol* 146: 87-97.

Poulsen DJ, Burton CR, O'Brian JJ, Rabin SJ, Keeler CL, Jr. 1991b. Identification of the infectious laryngotracheitis virus glycoprotein gB gene by the polymerase chain reaction. *Virus Genes* 5: 335-347.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. 1985a. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. 1985b. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354.

Scholz E, Porter RE, Guo P. 1994. Differential diagnosis of infectious laryngotracheitis from other avian respiratory diseases by a simplified PCR procedure. *J Virol Methods* 50: 313-321.

Shin Y, Mori T, Okita M, Gemma T, Kai C, Mikami T. 1995. Detection of canine distemper virus nucleocapsid protein gene in canine peripheral blood mononuclear cells by RT-PCR. *J Vet Med Sci* 57: 439-445.

Stadejek T, Pejsak Z, Kwinkowski M, Okruszek A, Winiarczyk S. 1995. Reverse transcription combined with polymerase chain reaction as a detection method for pestiviral infections. *Rev Sci Tech* 14: 811-818.

Starick E, Romer-Oberdorfer A, Werner O. 2000. Type- and subtype-specific RT-PCR assays for avian influenza A viruses (AIV). *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 47: 295-301.

Vogtlin A, Bruckner L, Ottiger HP. 1999. Use of polymerase chain reaction (PCR) for the detection of vaccine contamination by infectious laryngotracheitis virus. *Vaccine* 17: 2501-2506.

Wang CH, Tsai CT. 1996. Genetic grouping for the isolates of avian infectious bronchitis virus in Taiwan. *Arch Virol* 141: 1677-1688.

Wang Z, Vreede FT, Mitchell JO, Viljoen GJ. 2001. Rapid detection and differentiation of Newcastle disease virus isolates by a triple one-step RT-PCR. Onderstepoort J Vet Res 68: 131-134.

Williams RA, Bennett M, Bradbury JM, Gaskell RM, Jones RC, Jordan FT. 1992. Demonstration of sites of latency of infectious laryngotracheitis virus using the polymerase chain reaction. J Gen Virol 73: 2415-2420.

表一：NDV 與 ILTV 寡核苷酸引子序列。

Virus	Primer	Sequence (5' →3' )	Target gene	Reference
NDV	ALLs	(+) TGGAYGGCAGGCCTCTTGC	F	[Wang <i>et al.</i> , 2001]
	ALLe	(- ) GGAGGATGTTGGCRGCATT		
ILTV	TK#1	(+) CGTGGCTTCACCAGCAA	TK	[Scholz <i>et al.</i> , 1994]
	TK#2	(- ) CGAGTAAGTAATAGGCT		

(+)表正向引子；(-)表負向引子。

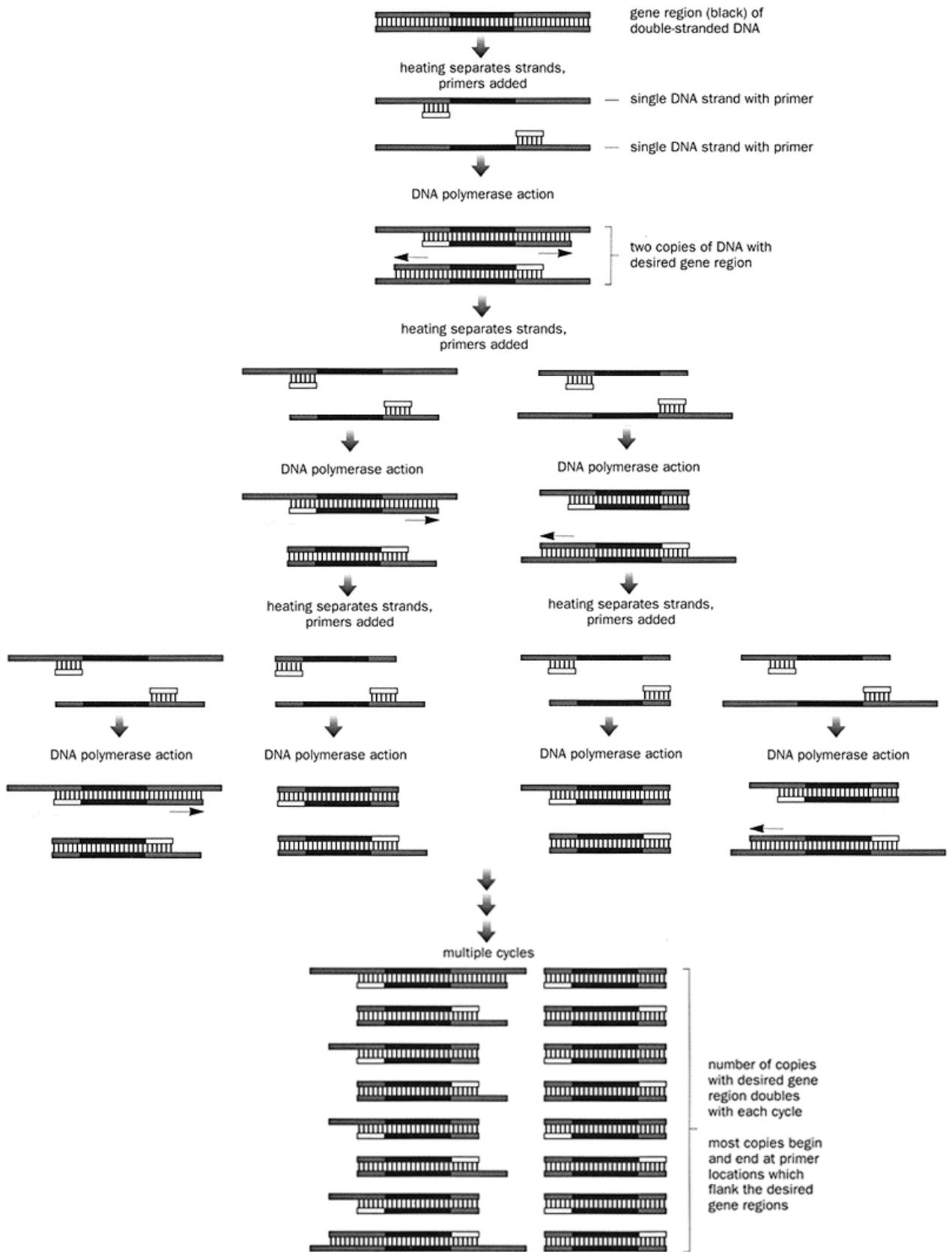


圖 8-1：PCR 的反應之原理



圖 8-2：高速離心機



圖 8-3：分光光度計



圖 8-4：乾浴器



圖 8-5：PCR 機



圖 8-6：水平電泳槽



圖 8-7：製膠用品（由上至下分別為 trap、製膠槽、Comb



圖 8-8：數位照相機與 UV 觀測箱



圖 8-9：架設製膠設備

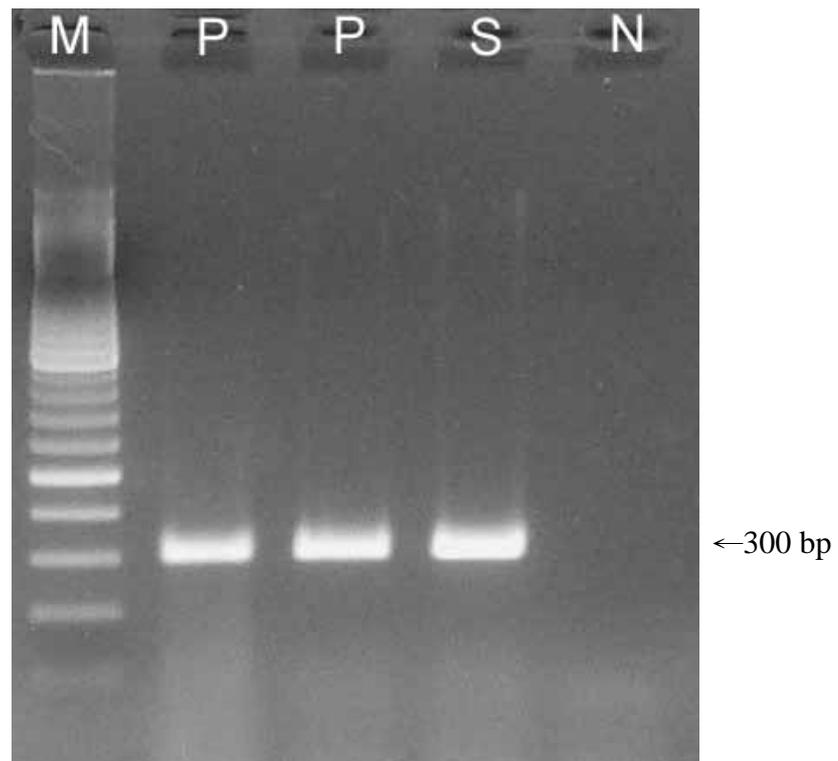
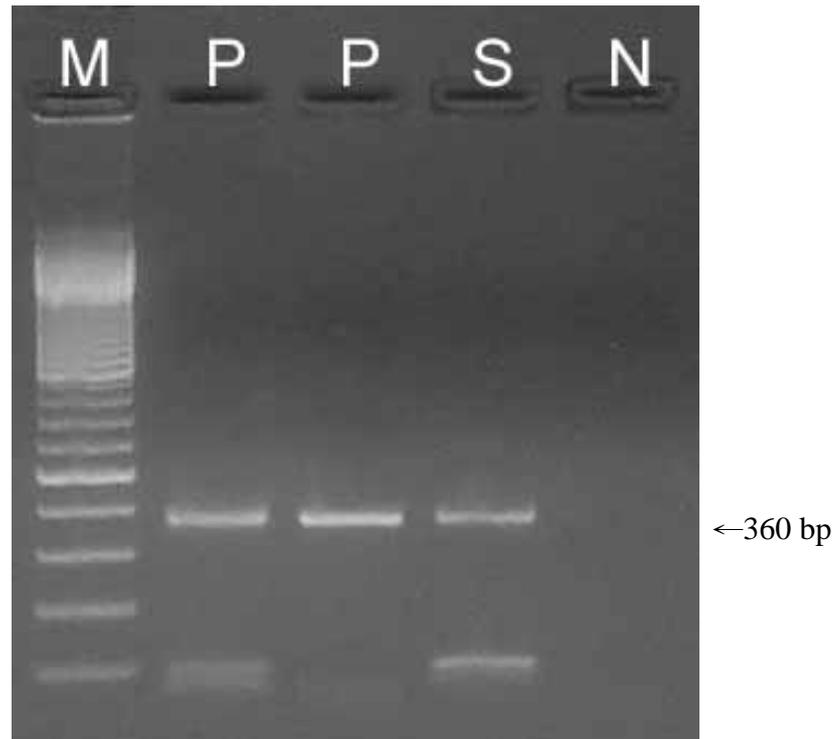


圖 8-10：NDV（上圖）與 ILTV（下圖）電泳分析圖。  
P：陽性對照；S：樣品；N：陰性對照。