

# 台灣常見水產病原菌檢測晶片之開發

張錦宜、林金榮

水產試驗所水產養殖組

## 前言

以傳統方法診斷細菌性魚病必需先將疑似病原菌分離培養出來，再根據菌種之生理生化特性加以鑑定。此法曠日費時，一般標準鑑定流程需時約一周，若遇特別難培養的細菌（如 *Streptococcus* spp.）或生長速度極慢的菌種（如 *Nocardia* spp.），則所費時間更數倍於此；此外，不同菌種之鑑定策略與花費時間更是大相逕庭。因此，傳統微生物方法對魚病防治而言往往只能盡亡羊補牢之力，養殖業者常因等不及診斷結果就先行盲目用藥，導致藥物之濫用、錯用，可能因此而蒙受更大的損失。

目前利用 16S rDNA 鑑定細菌之技術已臻成熟，此技術鑑定率極高，全球共享之基因庫龐大完整，且不受菌種變異的影響。本研究團隊於 94 年以此一鑑定系統為基礎，針對臺灣常見的魚病細菌，開發出 PCR 快速診斷套組之雛型，唯其終端判讀步驟稍嫌繁瑣，一次可同時檢測的病原菌數量受到限制，在未來推廣上可能形成障礙，故進一步結合台灣蓬勃發展的塑化材料及電子產業，將上述套組改良為使用更人性化、可檢測項目更多、檢測速度更快的生物晶片，俾利擴大研發成果的產業效益。

## 台灣常見水產病原菌

經廣泛檢索國內文獻、試驗報告、疫病簡訊及推廣文集，蒐集台灣迄今發現之水產病原菌共 25 株（表 1）作為本研究之背景資料庫；並選定其中的 *Aeromonas hydrophila*、*Aeromonas salmonicida*、*Aeromonas sobria*、*Edwardsiella tarda*、*Enterococcus faecalis*、*Enterococcus faecium*、*Lactococcus garvieae*、*Listonella anguillarum*、*Flavobacterium columnaris*、*Photobacterium damsela* subsp. *damsela*、*Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Pseudomonas anguilliseptica*、*Staphylococcus epidermidis*、*Streptococcus iniae* 等 15 株台灣常見的水產病原菌作為本生物晶片之檢測對象。

## 細菌總 DNA 的萃取

細菌在 Marine broth (Difco) 或 TSB (Difco) 中培養到指數成長期，取 2 mL 菌液以 12,000 g 離心 2 分鐘，再以 saline EDTA (0.15 M NaCl, 0.1 M EDTA, pH 8.0) 清洗一次，重新將懸浮菌塊溶於 500  $\mu$ L 含 0.1 mg lysozyme 的 PBS 中，並加入 2  $\mu$ L, 20 mg/mL

表 1 本研究使用的水產病原菌 (生物晶片可檢定之菌株以紅色字體表示)

| Organism                                              | Strain    | Designation | Incubation temperature / time |
|-------------------------------------------------------|-----------|-------------|-------------------------------|
| <i>Aeromonas hydrophila</i>                           | BCRC13018 | ATCC7966    | 30°C / 24 h                   |
| <i>Aeromonas salmonicida</i>                          | MT423     | ATCC        | 26°C / 24 h                   |
| <i>Aeromonas sobria</i>                               | BCRC13066 | ATCC43979   | 30°C / 24 h                   |
| <i>Edwardsiella tarda</i>                             | BCRC10670 | ATCC15947   | 37°C / 24 h                   |
| <i>Enterococcus faecalis</i>                          | BCRC10066 | ATCC19433   | 37°C / 24 h                   |
| <i>Enterococcus faecium</i>                           | BCRC10067 | ATCC19434   | 37°C / 24 h                   |
| <i>Escherichia coli</i>                               | BCRC51731 |             | 37°C / 24 h                   |
| <i>Flavobacterium columnaris</i>                      |           | ATCC23463   | 26°C / 24 h                   |
| <i>Lactococcus garvieae</i>                           | MT2055    | ATCC        | 37°C / 24 h                   |
| <i>Listonella anguillarum</i>                         | BCRC12908 | ATCC19264   | 18°C / 48 h                   |
| <i>Mycobacterium fortuitum</i>                        | BCRC15320 | ATCC19709   | 37°C / 24 h                   |
| <i>Mycobacterium tuberculosis</i>                     | BCRC10709 | ATCC25177   | 37°C / 24 h                   |
| <i>Nocardia farcinica</i>                             | BCRC13364 | ATCC3308    | 26°C / 24 h                   |
| <i>Nocardia seriolae</i>                              | BCRC13745 | ATCC43993   | 26°C / 24 h                   |
| <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>damsela</i>   | BCRC12906 | ATCC33539   | 26°C / 24 h                   |
| <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> | BCRC17065 | ATCC51736   | 26°C / 24 h                   |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>                         | BCRC10944 | ATCC10145   | 37°C / 24 h                   |
| <i>Pseudomonas anguilliseptica</i>                    |           | ATCC33660   | 20°C / 48 h                   |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i>                     | BCRC11030 | ATCC12228   | 37°C / 24 h                   |
| <i>Streptococcus iniae</i>                            | BCRC14744 | ATCC29178   | 37°C / 24 h                   |
| <i>Vibrio alginolyticus</i>                           | BCRC12829 | ATCC17749   | 37°C / 24 h                   |
| <i>Vibrio harveyi</i>                                 | BCRC12907 | ATCC14126   | 26°C / 24 h                   |
| <i>Vibrio parahaemolyticus</i>                        | BCRC12865 | ATCC27969   | 25°C / 24 h                   |
| <i>Vibrio salmonicida</i>                             | BCRC12844 | ATCC43839   | 15°C / 48 h                   |
| <i>Vibrio vulnificus</i>                              | TG617     |             | 37°C / 24 h                   |

的 proteinase K，在 37°C 靜置 45 分鐘，繼而加入 40  $\mu$ L、25% (w/v) 的 SDS，在 60°C 作用 10 分鐘，最後以 545  $\mu$ L phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25 : 24 : 1) 萃取總 DNA，萃取液經 12,000 g 離心 2 分鐘後分層，收集 DNA 存在的水層，加入等體積 3 M 之 sodium acetate，再以二倍體積的乙醇將 DNA 沉澱下來。DNA 以 70% 的乙醇清洗後溶於 TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) 中，調整濃度至 0.25 mg/mL 備用。

## 16S rDNA 之擴增與顯色基質之併入

利用核酸聚合酶鏈鎖反應 (PCR) 將各細菌之 16S rDNA 進行擴增，並藉由此一擴增過程，將顯色基質生物素 (biotin) 併入每一擴增 DNA 片段的 5' 端。PCR 溶液組合為每 50  $\mu$ L 體積中含 1  $\mu$ L 之 DNA Taq 酶、2  $\mu$ L 之 DNA 模版、2  $\mu$ L 之生物素順向引子 16S\_F (biotin-agagtttgatcatggctcag)、2  $\mu$ L 之生物素

反向引子 S\_R (biotin-ggttaccttggtacgactt)、2  $\mu$ L 之 dNTP、5  $\mu$ L 之 PCR 緩衝液、36  $\mu$ L 之蒸餾水。PCR 反應條件為初始 94°C、2 分鐘；接著 35 個循環之 94°C、2 分鐘，46°C、1 分鐘 30 秒，72°C、2 分鐘；最後再以 72°C 延伸 2 分鐘。

## 16S rDNA 探針設計

利用電腦程式 probe selector，從水產常見病原菌的 16S rDNA 序列中，找出各自具專一性的片段，片段大小 30 mer，並經由電腦運算出雜合能量，俾將雜合溫度設定在相似的範圍。另一方面，則以人工選殖方式自行設計 DNA 探針，並實際試做晶片，以測試這些探針的鑑別能力。

## 生物晶片置備

以核酸固定器將 DNA 探針固定於高分子 PVC 材質之晶片，並以不同之反應溫度、時間、清洗強度，探討其最適之雜合條件。利用影像擷取系統自動將結果掃描記錄，進行電腦分析比對，同時探討顯色判讀之色差閾值。

## 生物晶片之專一性測試

將各 DNA 探針在分子 PVC 材質晶片上順序排列成微矩陣 (microarray)，並逐一與 25 株台灣水產常見病原菌進行雜合反應。結果顯示，每一 DNA 探針都只能專一性地結合相對應菌種的 16S rDNA 片段 (圖 1)。另

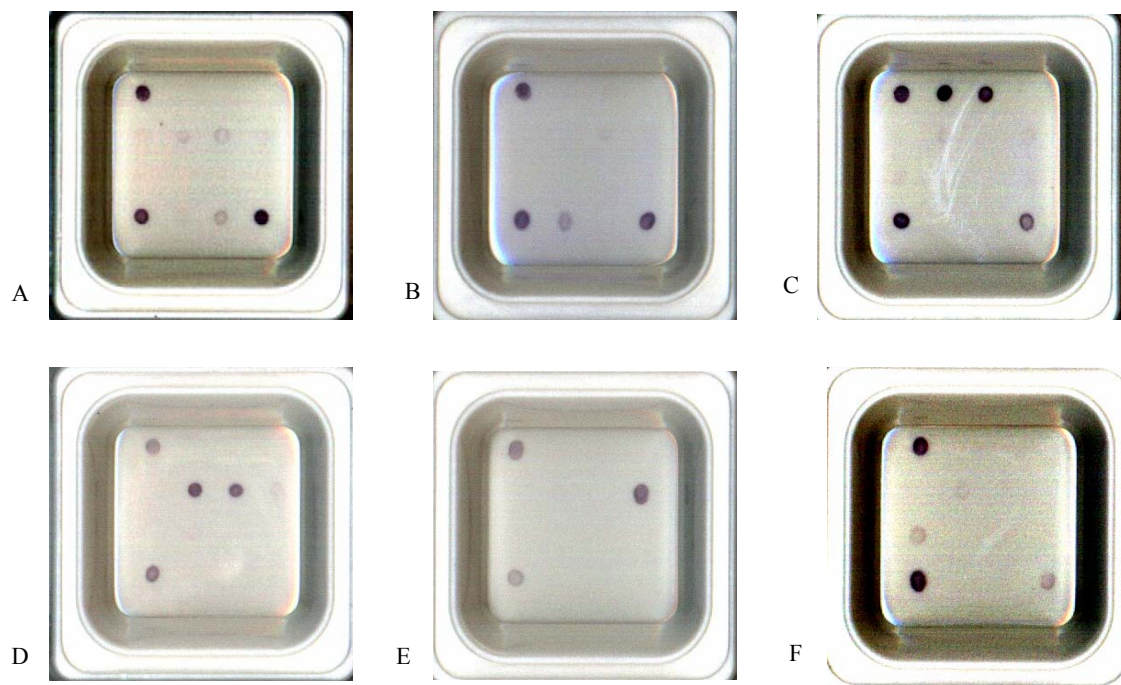


圖 1 各菌株 16S rDNA 擴增片段與生物晶片上相對應位置的 DNA 探針顯現專一性的結合位點。A: *A. hydrophila*; B: *A. salmonicida*; C: *E. tarda*; D: *L. garvieae*; E: *P. aeruginosa* 及 F: *P. damsela*。各晶片之左上角、左下角及右下角為正反應對照組，右上角為負反應對照組

以 25 株不同菌種的基因組 DNA 混合液為 DNA 模版，進行 PCR 反應，再與本生物晶片反應，也都能在相對應位置顯現相同的結果 (圖 2)。

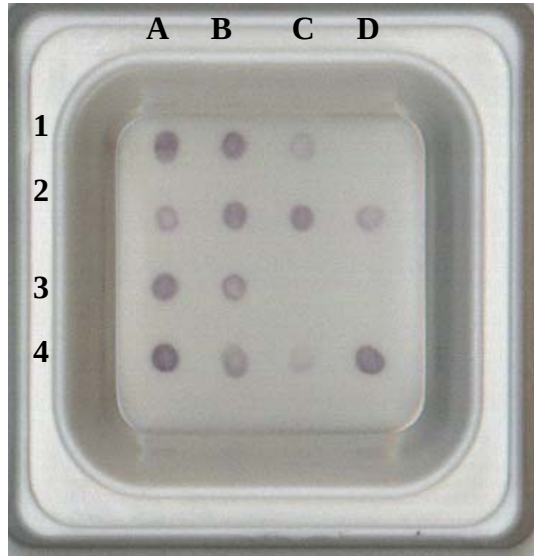


圖 2 不同菌種之 16S rDNA 在本晶片上的結合位點。A1, A4 & D4: positive control; D1: negative control; C4: *A. hydrophila*; B4: *A. salmonicida*; B1 & C1: *E. tarda*; B2 & C2: *L. garvieae*; A3: *P. damsela*; D2: *P. aeruginosa*; A2: *S. iniae*

## 生物晶片之靈敏度測試

針對標的菌株，以連續稀釋調整成不同濃度的菌液，經 12,000 g 離心 5 分鐘，將沉澱物重新懸浮於 1 mL PBS 中，加入 0.1 mg lysozyme 作用 10 分鐘，加熱煮沸 10 分鐘，再以 12,000 g 離心 10 分鐘，取上清液 2  $\mu$ L 作為 DNA 模版，進行上述晶片檢測程序，逐一測得本晶片對各菌株所能偵測的最小濃度 (表 2)。結果顯示本系統的檢測極限介於 340—2,500 CFU/mL，符合第一線魚病診斷之需求。

表 2 本晶片對各菌株的檢測靈敏度

| Organism                                              | Detection limit CFU/mL |
|-------------------------------------------------------|------------------------|
| <i>Aeromonas hydrophila</i>                           | 900                    |
| <i>Aeromonas salmonicida</i>                          | 1320                   |
| <i>Aeromonas sobria</i>                               | 1050                   |
| <i>Edwardsiella tarda</i>                             | 680                    |
| <i>Enterococcus faecalis</i>                          | 720                    |
| <i>Enterococcus faecium</i>                           | 770                    |
| <i>Flavobacterium columnaris</i>                      | 2500                   |
| <i>Lactococcus garvieae</i>                           | 860                    |
| <i>Listonella anguillarum</i>                         | 550                    |
| <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>damsela</i>   | 1600                   |
| <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> | 2200                   |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>                         | 340                    |
| <i>Pseudomonas anguilliseptica</i>                    | 990                    |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i>                     | 1100                   |
| <i>Streptococcus iniae</i>                            | 1450                   |

## 結論

本試驗根據各菌株 16S rDNA 的特異序列，設計出 *Aeromonas hydrophila* 等 15 種台灣常見魚病細菌的專一性 DNA 探針，利用這些探針，結合 PCR 技術、PVC 高分子材質核酸固定技術及生物素代謝顯色技術，開發出能一次檢測多株細菌的生物晶片系統。使用此系統不需分離細菌，可將原本至少需時 3 天的細菌鑑定工作，大幅縮短至 6 小時內完成。此外，因為利用 16S rDNA 為設計藍本，可將細菌含量不高的樣本以 16S rDNA 通用型引子對做一次 PCR 擴增，如此即能大幅提高檢驗的靈敏度，更因為不需使用到有致癌危險的電泳瓊脂染劑，對養殖業者與魚病第一線檢驗技術人員而言，均是一種友善且快速方便之工具。