

台灣常見細菌性魚病之 PCR 快速診斷套組之研發

張錦宜
水產養殖組

依照傳統微生物方法，從檢體中分離、純化、培養以至鑑定種類，需時至少一周，而且針對不同的菌種，其所需的檢定策略與時間更是大相逕庭。如，檢測 *Piscirickettsia salmonis* 須有特定的細胞株；檢測 *Renibacterium salmoninarum* 除需使用特定的培養基，鑑定更耗時長達 12 週。

近年來，以 16S rDNA 技術鑑定細菌之系統已臻成熟，此系統鑑定所需時間短、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，因此可作為檢測細菌的有利工具。目前針對特定菌種，已有學者使用 16S rDNA PCR 技術作為檢測工具，惟鎖定一群特定病原菌，可同時檢測不同樣本的整合型檢測套組，仍有待開發。

本計畫針對 *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda*, *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, *Streptococcus iniae* 及 *Vibrio alginolyticus* 等五種台灣最常見的魚病細菌，

開發出一套簡易、快速且靈敏性極高之細菌性魚病診斷套組。利用特異性引子及適當的聚合酶鏈鎖反應 (PCR) 條件，可分別將 *S. iniae*, *V. alginolyticus*, *A. hydrophila*, *P. damsela* subsp. *piscicida* 及 *E. tarda* 專一性地擴增出分子大小依序為 1459 bp、946 bp、818 bp、453 bp 及 303 bp 的 PCR 產物，產物大小的差異利用電泳技術即可以肉眼分辨，無需再進行定序比對 (圖 1)。本套組可進行多重引子 PCR 反應，同時檢驗此 5 種病原菌是否在同一樣本中 (圖 2)。

在專一性測試方面，以 18 株水產常見病原菌進行多重引子 PCR 反應，結果顯示使用本套組並無交叉反應之雜訊出現。本套組最大的優點為使用簡便，不需分離培養細菌，可大幅縮短診斷時間至 3–6 小時以內，將可協助第一線魚病防治人員在池魚發病初期的黃金時間內，擬定最適當的防治措施。未來結合微矩陣技術更可發展成一組適用於檢測台灣水產重要病原菌的生物晶片。

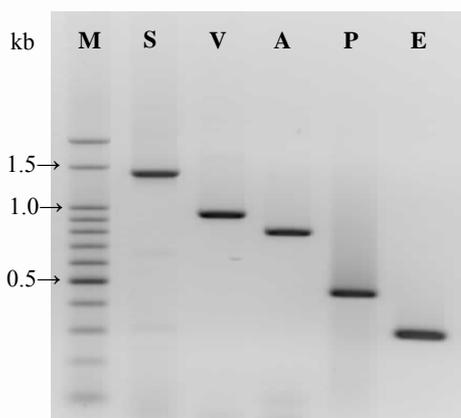


圖 1 專一性引子與相對應之病原菌進行 PCR 反應產物之電泳分析。S: *Streptococcus iniae*, V: *Vibrio alginolyticus*, A: *Aeromonas hydrophila*, P: *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, E: *Edwardsiella tarda*

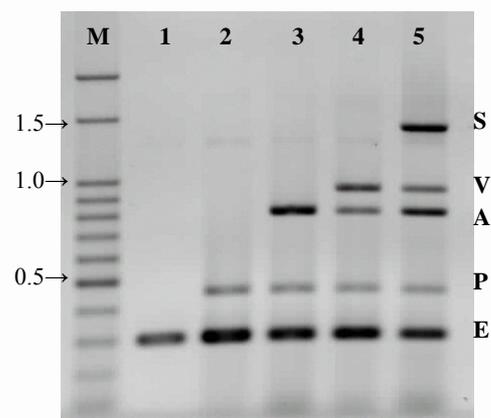


圖 2 多重引子與各種病原菌組合進行 PCR 反應產物之電泳分析。可同時檢測 1-5 種病原菌。E: *Edwardsiella tarda*, P: *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, A: *Aeromonas hydrophila*, V: *Vibrio alginolyticus*, S: *Streptococcus iniae*