

台灣常見水產病原菌檢測晶片之開發

張錦宜、林金榮
水產養殖組

過去診斷細菌性魚病的先決條件，是必需先將疑似致病菌種分離培養，再根據菌種之生化特性加以鑑定。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，對魚病防治而言，往往只能盡亡羊補牢之力，而且菌種生化特性會隨環境變異，使用傳統方法亦常有誤診之情形發生。

目前利用 16S rDNA 鑑定細菌之技術已臻成熟，此系統鑑定率極高，全球共享之基因庫龐大完整，且不受菌種變異的影響。本組於 2005 年以此一鑑定系統為基礎，針對台灣常見魚病細菌，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有限，未來在推廣上可能形成障礙，故擬結合台灣蓬勃發展的電子感應、塑化材料及生物技術產業，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，擴大研發成果的產業效益。

本試驗根據各菌株 16S rDNA 的特異序

列，設計出 15 種台灣常見魚病細菌，包括 *Aeromonas hydrophila*、*A. salmonicida*、*A. sobria*、*Edwardsiella tarda*、*Enterococcus faecalis*、*E. faecium*、*Lactococcus garvieae*、*Listonella anguillarum*、*Flavobacterium columnaris*、*Photobacterium damsela* subsp. *damsela*、*P. damsela* subsp. *piscicida*、*Pseudomonas aeruginosa*、*P. anguilliseptica*、*Staphylococcus epidermidis* 及 *Streptococcus iniae* 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，可將原本至少需時三天的細菌鑑定工作，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，如此可大幅增加檢驗的靈敏度，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。

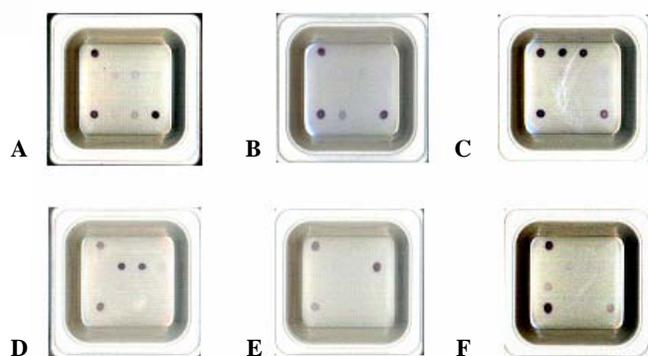


圖 1 各菌株 16S rDNA 擴增片段與生物晶片上相對應位置的 DNA 探針顯現專一性的結合位點。(A) *A. hydrophila*; (B) *A. salmonicida*; (C) *E. tarda*; (D) *L. garvieae*; (E) *P. aeruginosa*; (F) *P. damsela* 各晶片之左上角、左下角及右下角為正反應對照組，右上角為負反應對照組

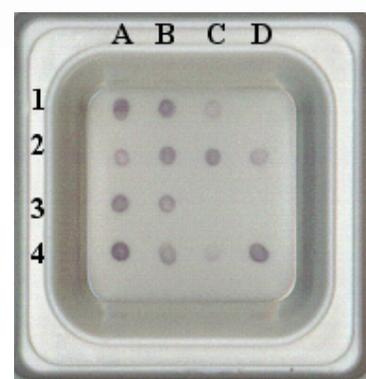


圖 2 不同菌種之 16S rDNA 在本晶片上的結合位點。A1, A4 & D4: positive control; D1: negative control; C4: *A. hydrophila*; B4: *A. salmonicida*; B1 & C1: *E. tarda*; B2 & C2: *L. garvieae*; A3: *P. damsela*; D2: *P. aeruginosa*; A2: *S. iniae*