

台灣常見水產病原菌之 PCR 快速診斷套組之研發

張錦宜、吳嘉哲、洪珮馨、戴宇鴻、林金榮

水產試驗所水產養殖組

前言

依照傳統微生物方法，從檢體中分離、純化、培養至鑑定細菌種類，需時至少一周 (Koneman et al., 1988)，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 (Fyrer and Hedrick, 2003)；檢測 *Renibacterium salmoninarum* 需使用特定的培養基且鑑定更耗時 12 周之久 (Benediktsdottir et al., 1991)。近年來，以 16S rDNA 技術鑑定細菌之系統已臻成熟，此系統作業所需時間短、鑑定率高、全球共享之基因庫龐大完整且不受菌種變異的影響 (Jeffery et al., 1999)，因此可作為檢測細菌的有力工具。目前雖有學者針對特定菌種設計專一性引子 (primer) 進行檢測研究，如 *Vibrio anguillarum* (Martínez-Picado et al., 1996)，*Aeromonas salmonicida*，*Flavobacterium psychrophilum*，*Yersinia ruckeri* (Cerro et al., 2002)，*Photobacterium damsela* (Osorio et al., 1999)，*Flexibacter maritimus* (Bader and Shotts, 1998)，*Renibacterium salmoninarum* (Rhodes et al., 1998) 及 *Nocardia seriolae* (Kono et al., 2002) 等，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。

本研究以細菌鑑定系統為基礎，針對台

灣常見魚病細菌之不同的 16S rDNA 片斷，設計專一性引子 (primers)，利用聚合酶鏈鎖反應 (PCR) 為工具，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，其最大優點為使用簡便，操作者不需接受繁瑣的微生物訓練即可正確使用，而且不需分離培養細菌，大幅縮短診斷時間至 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。

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，根據疾病發生面積、發生頻率及死亡率，等計算出台灣近五年來水產病原菌的影響指數 (表 1)，前五名依序為 *Streptococcus iniae*、*Aeromonas hydrophila*、*Edwardsiella tarda*、*Vibrio alginolyticus* 及 *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*。本研究即選定上述五株台灣常見水產病原菌作為 PCR 快速診斷套組之檢測對象。

細菌總 DNA 的萃取

細菌在適當培養基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,

表1 台灣常見水產病原菌的影響重要性評估

Pathogen	感染面積 (ha/year)	死亡率 (%)	感染頻率 (time/year)	重要性 排序
<i>Aeromonas hydrophila</i>	20.84	7.39	29	2
<i>Cytophaga</i> spp.	2.77	2.91	5.7	9
<i>Edwardsiella tarda</i>	6.51	4.88	12.3	3
<i>Enterococcus</i> spp.	4.22	3.68	6	6
<i>Flavobacterium</i> spp.	0.8	5	4.3	8
<i>Nocardia</i> spp.	4.29	4.61	4.7	6
<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	6.10	4.76	6.5	5
<i>Streptococcus iniae</i>	25.66	8.43	33.7	1
<i>Vibrio alginolyticus</i>	3.4	5.76	6.7	4

pH 8.0) 清洗一次，重新將懸浮菌塊溶於 500 μ L 含 0.1 mg lysozyme 的 PBS 中，並加入 2 μ L, 20 mg/mL 的 proteinase K，在 37°C 靜置 45 分鐘，繼而加入 40 μ L, 25% (w/v) 的 SDS 在 60°C 作用 10 分鐘，最後以 545 μ 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。

細菌 16S rDNA 基因序列測定

細菌 16S rDNA 以通用引子 (16S_F: 5'-AGAGTTTGTATCATGGCTCAG-3' 及 16S_R: 5'-GGTACCTTGTTACGACTT-3') 經 PCR 方式擴增。PCR 反應體積為 50 μ L，包括：0.5 μ L Taq DNA 聚合酶 (5 U/ μ L, Promega)，5 μ L 之 10 $\times$ PCR 緩衝液，2 μ L 之 10 mM dNTP 混和液，2 μ L 之 10 mM MgCl₂，2 μ L 之 16S_F 引子，2 μ L 之 16S_R 引子，2 μ L 前述萃取之細菌總 DNA 及 34.5 μ L 之純水。反應條件為

94°C，2 分鐘；接續 35 個循環之 94°C，2 分鐘、46°C，1 分鐘 30 秒、72°C，2 分鐘；最後以 72°C 延伸 2 分鐘。PCR 產物經 QIA quick PCR 純化套組純化後，連接到 pGEM-T easy 載體並轉化到 *E. coli* 上，以 M-13_F (5'-TGTAACACGGCCAGT-3') 及 M-13_R (5'-TCACACAGGAAACAGCTATGAC-3') 為引子進行分子選殖，隨機篩選 3 個插入片段大小與 16S_F/16S_R 擴充片段相仿 (約 1.5 k) 的菌株進行 DNA 定序，定序結果利用 BLAST 程式與 GenBank 資料庫的基因進行比對，作為專一性引子序列設計之依據。

16s rDNA 專一性引子序列設計

將上述五菌株之 16S rDNA 片段以 GAP 程式進行相似度分析 (圖 1)，再比較各菌株之可變動區序列，選取特異性高且長度超過 18 bp 的序列片段，設計出各菌株專一的引子對。以 *S. iniae*, *V. alginolyticus*, *A. hydrophila*, *P. damsela* subsp. *piscicida*, *E. tarda* 的基因體 DNA 為模版，與其相對應的引子對進行 PCR 反應，能依序擴增出分子大小為 1459 bp, 946 bp, 818 bp, 453 bp 及 303 bp 的 PCR 產物 (圖 2A)，這些 DNA 片段經回收後進行 DNA 定序，確認均屬各該菌株之 16S rDNA 序列。

專一性驗證

將此五對引子逐一與 16 株台灣水產常見病原菌進行 PCR 反應，結果顯示每一引子對都只能專一地擴增出相對應菌種的 16S rDNA 片段 (表 2)，另以 16 株不同菌種的基因組 DNA 混合液為 DNA 模版，進行 PCR 反應，也顯著地擴增出預期大小的 DNA 片段，交叉反應的雜訊非常微弱 (圖 2B)。

V CTGGAACCTT--GGGAACGATAACGGCGTTGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGG-AAATTGCCCTGATGTGGGGGA
P CTGAACCTTCGGGGAACGTTAAGGGCGGC...CG.....T.CC.G.-A.TA.G..CTGAT.T.....
E ---AAGCTT----GCTTTCTCCGCTGAC...CG.....T.TC.G.-G.TC.G..TGATG.A.....
A -T--AGCTT----GCTACTTTTCCGCGC...CG.....T.CC.G.-A.AT.G..CAGTC.A.....
S ----GCTT-----GCACTAAT-CCAAA...TT.....C.CG.A..TA.CC.A..TCATA.C.....

V TAACCATTGGAACGATGGCTAATACCGCATAAGCTA--CGGGCCAAAGAGGGGGACCTTCGGG-----CCTCTCGCG
PTAT.....ATA.....AATCTCTTCGGAGCAAA.AGGGGG.CC.TCGGG-----CCTCTCG.G
E TAACTACTGGAACCGGTA.....AACGTCGCAAGACCAAAGTGGGGGACCTTCGGG-----CCTCATGCC
A TAACAGTTGGAACGACT.....ACGCCCTA-CGGGGGAAAGCAGGGGACCTTCGGG-----CCTTGCGCG
S TAACTATTGGAACGATA.....GACACTAGAGTACACATGTACTTAATTTAAAGGAGCAATTGCTTCACT

V TCAGGATATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGGGCTACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGG
P TCAG...TAG..CAGG.G.G.....T..T.....T.....A...A...C.C...T.GT.....
E ATCA...GAA..CAGA.G.G.....A..A.....T.....T.....G...C.C...T.GT.....
A ATTG...ATG..CAGG.G.G.....A..T.....T.....A...G...C.C...T.GT.....
S ATGA...GGA..TGC.G.T.T.....A..T.....C.....A...G...A.A...C.AC.....

V AGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGTCGTGAGGAA-GGTAGTGTA
P .CC...TGC...C.T.....TG.....CC...G.T.....CA..T.CAGTAGG..G...-G.TAGTGTA
E .GC...TGC...CAT.....TA.....CC...G.T.....TA..T.CAGTAGG..G...-GGTGTGCGT
A .CC...TGC...CAT.....TG.....CC...G.T.....CA..T.CAGCGAG..G...-AGGTTGATG
S .GT...CCG...AAC.....AG.....TT...A.C.....CT..G.TGTTAGA..A...CGGTAATGGG

V GTTAATAGCTGCATTATTTGACGTTAGCGACAGAAGAAGCACCAGGCTAATCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGG
P GT.AAC.CCTGCACTATT...T..CCTACAG.AG...CAC.....C.....G...
E GT.AAT.GCACGTGCAAT...T..CCTACAG.AG...CAC.....C.....G...
A CC.AAT.CGTATCAACTG...T..CTCGCAG.AG...CAC.....C.....G...
S AG.GGA.AATCCATTACG...G..ACTAACC.GA...GGA.....A.....T...

V GTGCGAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAAGCCCGGGGCTCA
P GTG.G.....AAT.....C.....CAT.....C..CCTGT...CA..T..G...GC.CGG...T.
E GTG.A.....AAT.....C.....CAC.....C..TTTGT...TG..T..G...TC.CCG...T.
A GTG.A.....AAT.....C.....CAC.....C..TTGGA...TA..T..G...GC.CCG...C.
S TCT.G.....GTC.....T.....AGC.....C..TTCTA...CT..A..A...GG.AGT...C.

V AGAGATCTGAAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTTGACAGATACTGACACTCAGATGCGAAAGCGTGGGGAGCAA
P ...G..C..A...T...A.....G...CCC...A.AAAG...G..C..ATG.....
E ...G..C..G...T...G.....G...CTC...A.GAAG...G..C..GTG.....
A ...G..C..G...T...G.....G...CCC...A.AAAG...G..C..GTG.....
S ...T..A..G...C...G.....A...TCT...T.TGTA...G..G..GCT.....

V ACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCTACTTGGAGGTTGTGGCCTT-GAGCCGTGGCTTTTCGGA
PC.....TCTAC.T..A.GTT.TGG.C.-GA.CCG.GGC.TT..G.
ET.....TCGAT.T..A.GTT.TGC.C.-GA.GCG.GGC.TC..A.
AC.....TCGAT.T..A.GCT.TGT.C.-GA.ACG.GGC.TC..G.
SC.....AGTGC.A..T.TTA.GCC.T..CCG.GGC.TAG.GC..C.

V GCTAACGCGTTAAGTAGACCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAACCTCAAATGAATTACGGGGGCCCGCACAAAG
PG...GTAGA.....GT...A..A.....T.....
EG...ATCGA.....GC...G..A.....T.....
AG...ATCGA.....GC...G..A.....T.....
SA...GCACT.....AC...G..G.....G.....

V CGGTGGAGCATGTGGTTAATTTCGAGGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACT-TTCCAGAGATG
PT.....TACT.....CCAGAGA.GC-TTGA.....T
ET.....TACT.....CCAGCGA.TC-CTGT.....A
AT.....TGGC.....GTCTGGA.TC-CTGC.....G
SA.....AGGT.....CCCTCTG.CCGTCCT.....A

V -GATTGGTGCTTCGGGAACCTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCC
P C.AGTGTGC.....ACTCTG.G.....C.....C.....T...A.....
E C.GGAGTGC.....ACGCTG.G.....C.....C.....T...A.....
A C.GGAGTGC.....ATCAGA.C.....C.....C.....G.....
S -.GATTTTC.....CAGAGG.G.....G.....T.....C...G.....

V GCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTGTTTGCCAGCGAGTAATGTCGGGAACTCCAGGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAG
PT.A.CC..GT...G.ACT.CGG.T...A...C.GG...G..G.....C...
ET.A.CC..TG...G.GGT.CG-.CC...A...A.AG.....A..G.....T...
AC.G.CC..TG...G.ACG.AAT.GT...A...A.GG...G..G.....C...
SC.A.TG..AG...T.A--.TAA.TT...C...T.GC.....G..A.....C...

```

V   GAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATACAGAGGGCA
P   .....C.....G.....G.....C.AGTA.....CATA....GA.G.CA
E   .....T.....G.....G.....C.AGTA.....CGTA....AA.A.AA
A   .....T.....G.....G.....C.GCCA.....CGCG....GA.G.CT
S   .....T.....A.....C.....T.ACCT.....TTGG....AC.A.TC

V   GCCAACTTGCAGAGTGAGCGAATCCCAAAAGTGCCTCGTAGTCC--ATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCG
P   ..A.GACC.C..GGTGG...GA.T.C.AG...TATG..GT...C.GG..C.G..T.....A..C.G.....
E   ..G.CCTC.C..GAGCA...GG.C.T.AT...TACG..GT...C.GG..T.G..T.....A..C.A.....
A   ..A.GCTA.C..TAGTG...GA.T.C.AA...CGCG..GT...C.GG..C.G..T.....A..C.G.....
S   ..A.GCCG.T..CGGCA...TA.T.T.TT...CCAA..TC...T.GG..T.T..G.....C..A.A.....

V   GAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGG
P   .....TGG.....A.T.CCA.....T.G.
E   .....TGG.....A.T.CCA.....T.G.
A   .....CAA.....A.T.TTG.....T.G.
S   .....CGG.....C.C.CCG.....C.A.

V   AGTGGGCTGCAAAAGAGTAGGTAGTTTCAACTACGGGAGGACAGCCTACCACTTTGTGGT-----
P   ...GG.CTG..CCA....A.A.AGCT.A.C..TCGG.AG.GC-GTTTA.C.CGG..T.GTTTCATGACTGGGGTGAAGTC
E   ...GG.TTG..AAA....A.G.AGCT.A.C..TCGG.AG.GC-GCTTA.C.CTT..T.AGTAACAAGGTAGCCCTAGTT
A   ...GG.TTG..CCA....A.A.AGCT.A.C..TCGG.AG.GC-GTTTA.C.CGG..T.ATTCATGACTGGGGTGAAGTC
S   ...TT.TAA..CCC....C.G.GAGG.A.C..TTTA.GA.CCAGCCGC.T.AGG..G.ATAGATGATTGGGGTGAAGTC

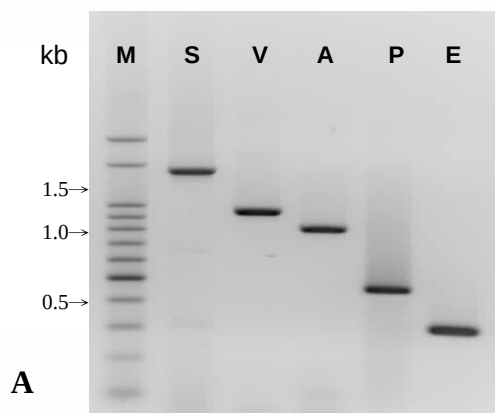
V   ----- 1482
P   GGGAACTGCGGTTGGATCACCCTCCTT 1547
E   CATGACTGGGGTG----- 1466
A   GTAACAAGGTAA----- 1502
S   GTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGCTGCGGCTGGATCACC 1536

```

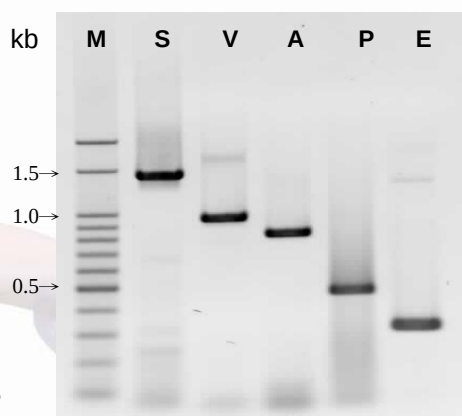
圖 1 五種病原菌 *Vibrio alginolyticus* (V), *Photobacterium damsela* subsp. *Piscicida* (P), *Edwardsiella tarda* (E), *Aeromonas hydrophila* (A) and *Streptococcus iniae* (S) 的 16S rDNA 序列相似性列陣，相同位置的核苷酸以點(.)表示，缺漏位置以破折號(-)顯示。

表 2 不同菌株對各引子對的 PCR 反應專一性評估

Species	Source	A_F1/R1	E_F1/R1	P_F1/R1	S_F1/R1	V_F1/R1
<i>Aeromonas hydrophila</i>	BCRC13018	+	—	—	—	—
<i>Aeromonas sobria</i>	BCRC 13066	—	—	—	—	—
<i>Edwardsiella tarda</i>	BCRC 10670	—	+	—	—	—
<i>Enterococcus faecalis</i>	BCRC 10066	—	—	—	—	—
<i>Escherichia coli</i>	BCRC 51731	—	—	—	—	—
<i>Listonella anguillarum</i>	BCRC 12908	—	—	—	—	—
<i>Nocardia asteroides</i>	BCRC 13364	—	—	—	—	—
<i>Nocardia seriolae</i>	BCRC 13745	—	—	—	—	—
<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>Damsela</i>	BCRC 12906	—	—	—	—	—
<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	BCRC 17065	—	—	+	—	—
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	BCRC 11030	—	—	—	—	—
<i>Streptococcus iniae</i>	BCRC 14744	—	—	—	+	—
<i>Vibrio alginolyticus</i>	BCRC 12829	—	—	—	—	+
<i>Vibrio harveyi</i>	BCRC 12907	—	—	—	—	—
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	BCRC 12865	—	—	—	—	—
<i>Vibrio salmonicida</i>	BCRC 12844	—	—	—	—	—



A



B

圖 2 專一性引子與相對應之病原菌(A)及 16 種病原菌總 DNA 混合液(B)進行 PCR 反應產物之電泳分析。*Streptococcus iniae* (Lane S), *Vibrio alginolyticus* (Lane V), *Aeromonas hydrophila* (Lane A), *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (Lane P) *Edwardsiella tarda* (Lane E) 的 PCR 產物大小依序為 1459 bp, 946 bp, 818 bp, 453 bp 及 303 bp。Lane M 為分子量大小標誌

多重引子 PCR 反應

PCR 混合液中同時加入五種專一性引子對，與混有不同菌株基因體 DNA 的樣本進行多重引子 PCR 反應，結果顯示 (圖 3)，不論是單一菌種或多株菌種混合樣本，均能同時以一次 PCR 反應檢測出來，而且不會互相干擾。

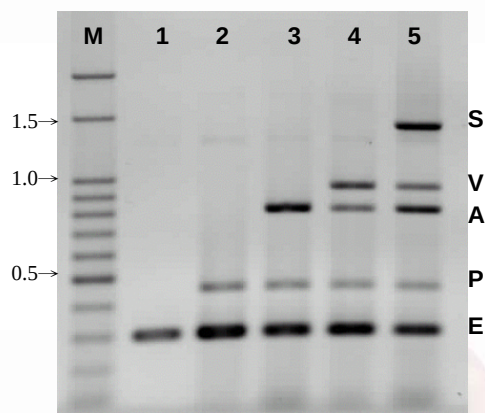


圖 3 多重引子與各種病原菌組合進行 PCR 反應產物之電泳分析。Lane M 為分子量大小標誌；Lane 1：只有 E 的基因組 DNA；Lane 2：有 E 與 P 的基因組 DNA 混合液；Lane 3：有 E、P 與 A 的基因組 DNA 混合液；Lane 4：有 E、P、A 與 V 的基因組 DNA 混合液；Lane 5：有 E、P、A、V 與 S 的基因組 DNA 混合液 (E: *Edwardsiella tarda*, P: *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, A: *Aeromonas hydrophila*, V: *Vibrio alginolyticus*, S: *Streptococcus iniae*)

結論

本試驗根據各菌株 16S rDNA 的特異序列，設計出五種台灣常見魚病細菌 *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda*, *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, *Streptococcus iniae* 及 *Vibrio alginolyticus* 的專一性引子對，利用這些引子，結合多重引子 PCR 技術，可以在一次 PCR 反應中同時檢驗樣本是否含有上述五種細菌，而且 PCR 的產物在電泳膠上明顯易辨，不需再藉由 DNA 定序比對確認菌種，將原本至少需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，並可依此成果開發出可一次檢測更多細菌的生物晶片。