

# 鏈球菌及發光桿菌之 RPA-LF 快速 檢測試紙之研發

朱惠真、廖哲宏

水產試驗所水產養殖組

## 前言

發光桿菌及鏈球菌是眾多淡、海水魚類的主要病原。發光桿菌屬中，目前具有較強致病性的有 *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* (簡稱 PDSD) 及 *P. damsela* subsp. *piscicida* (簡稱 PDSP) 兩種。PDSD 會感染人類及海水魚，曾經對大菱魷 (*Scophthalmus maximus*)、金頭鯛 (*Sparus aurata*)、歐洲海鱸 (*Dicentrarchus labrax*)、虹鱒 (*Oncorhynchus mykiss*) 造成感染 (Mateus et al., 2018)。PDSP 在 1969 年時，曾在日本的養殖黃尾鱈 (*Seriola quinqueradiata*) 及香魚 (*Plecoglossus altivelis*) 幼魚爆發嚴重感染；1970—2000 年間，美國、日本及挪威的養殖大西洋油鯪 (*Brevoortia tyrannus*)、烏魚 (*Mugil cephalus*)、條紋鱸 (*Morone saxatilis*)、黑鯛 (*Acanthopagrus schlegelii*)、鞍帶石斑 (*Epinephelus lanceolatus*) 及臺灣的海鱸 (*Rachycentron canadum*) 亦因感染本菌，陸續爆發大量死亡。

基因學相關研究證實，PDSD 的某些菌種品系 (strain) 會攜帶質體 pPHDD1，此質體會分泌 damselysin toxin (Dly) 及 pore-forming toxin phobalysin (Phly C) 等 2 種毒素，前者會使神經磷脂去活性，後者則可形成細胞孔洞造成宿主細胞死亡 (Matanza

and Carlos, 2018)。PDSP 的致病菌種則是攜帶有質體 pPHDD10，它會產生一種胞外毒素蛋白 (exotoxin) AIP56 (apoptosis inducing protein of 56kDa)，造成宿主的巨噬細胞以及嗜中性球產生細胞自殺，進而影響其免疫能力而導致宿主死亡 (Tasi et al., 2015)。

鏈菌屬中，最常見的病原為 *Streptococcus agalactiae* (簡稱 SA)，它屬於 B 群鏈球菌 (Group B *Streptococcus*, GBS)，普遍存在於養殖池水中，可以產生外毒素，對動物細胞具有高度的致死率。2007 年及 2011 年，中國廣東及廣西吳郭魚因為感染此菌爆發大規模的死亡，損失高達上億人民幣。*S. iniae* (簡稱 SI) 為另一常見的鏈球菌，其對牙鯪 (*Paralichthys olivaceus*) 具有高度敏感性，致死率可達 50% 以上；對於吳郭魚 (*Oreochromis* spp.)、尖吻鱸 (*Lates calcarifer*) 及虹鱒也具有很高的毒性，2015 年時對日本、中國及南韓的養殖業構成威脅 (Kim et al., 2015)。此外，SI 也是人類的機會性致病菌，會造成蜂窩性組織炎、敗血症、腦膜炎及肺炎 (Kim et al., 2017)。

鑒於上述四種病原菌對於養殖生物的危害，本研究嘗試開發一組重组聚合酶擴增側流試紙 (recombinase polymerase amplification lateral flow strip, RPA-LF Strips)，希望能提供養殖現場快速方便的進行疾病檢測。

## 原型試紙開發

### 一、PCR 擴增反應檢測

本研究利用發光桿菌 (PDSO、PDSP) 及鏈球菌的引子 (表 1) 進行聚合酶擴增反應，結果發現在相同條件下可以區別 PDSO、PDSP 以及 SI、SA，其擴增片段為 887、670、794 及 616 bp (圖 1)。使用本實驗室 43 株常見菌株進行 PCR 擴增反應檢測，結果顯示本三組引子皆呈現高度專一性而無偽陽性出

表 1 PDSO、PDSP、SI 及 SA 引子設計

序列名稱	5 端至 3 端序列
PDSP(forward)	TCATTGAACTTTCCTCTGCAGTATC
PDSP(reverse)	GAGTATGGTTTAGTGGATGTTCC
PDSO(forward)	TCCGGAATAGGTAAGCGGG
PDSO(reverse)	CTTGAATATCCATCTCATCTGC
Strep(forward)	TGAGGTAACCTTTTAGGAGC
Strep(reverse)	AATCGCTTTTGCTTCTC

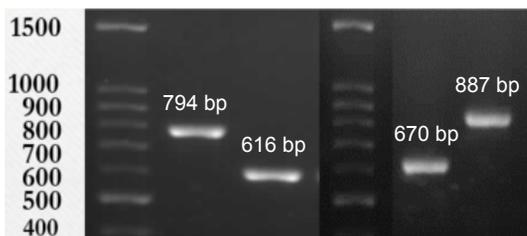


圖 1 以發光桿菌及鏈球菌專一性片段擴增結果  
Lane1: SI; Lane2: SA; Lane3: PDSP; Lane4: PDSO

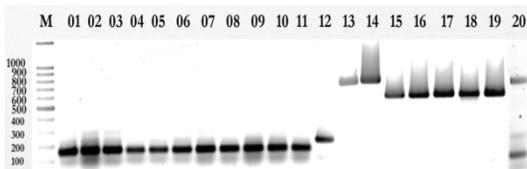


圖 2 RPA 擴增反應結果

Lane01-11: PDSO (擴增片段 150 bp); Lane12: PDSP (擴增片段 250 bp); Lane13-14: SI (擴增片段 800 bp); Lane15-19: SA (擴增片段 600 bp); Lane20: (PDSO+PDSP+SI+SA)

現。將所擴增的片段進行定序，而後設計出 RPA 引子，將其片段大小設定為 200–250 bp，並進行專一性的檢測，經擴增後 PSDP、PDSO、SI 及 SA 的專一性片段大小分別為 250、150、600 及 800 bp，再以其進行進行多重聚合酶鏈式反應 (Multiplex Polymerase Chain Reaction, mPCR) 之設計，結果顯示在同一個 PCR 條件下可同時偵測 PDSO、PDSP 及 SI (圖 2)。有關 mPCR 之研究，Al (2004) 及 Zhang (2014) 分別利用 SI、*S. difficilis*、*S. parauberis* 及 *Lactococcus garvieae* 與 *A. veronir*、*E. tarda*、SA 建立 mPCR；2020 年則有 Park 針對牙齦的病原菌 *E. tarda*、*S. parauberis* 及 SI 進行 mPCR 的建立，然截至目前為止，尚無任何研究可同時偵測 PDSO、PDSP 及 SI 等三種菌並建立它的 mPCR 檢驗。本項技術之開發，對 PDSO、PDSP 及 SI 具敏感之經濟性養殖魚種如石斑魚、海鱸、午仔魚、比目魚、海鱸及吳郭魚等之疾病檢測均有很大的助益。

### 二、靈敏度及專一性測試

將專一性片段進行質體構築，將本構築質體列為標準品質體，並進行定量，調整濃度範圍為 25–0.0001 ng，進行常規 PCR 擴增反應及 RPA-LF 試驗，結果顯示 PDSO、PDSP、SA 及 SI 在常規 PCR 可以檢測到的極限值分別為 0.1、1、0.01 及 0.1 ng 的質體標準品，而 RPA-LF 試紙可以檢測極限值分別為 0.1、1、0.01 及 15 ng 的質體標準品 (圖 3、4)；之後利用本實驗所建立的方法檢測多種病原基因，進行特異性檢測。結果顯示，除了本實驗之四種標的細菌在檢測點有特異性顯色點之外，*Aeromonas hydrophila*、

*Edwardsiella tarda*、*Vibrio alginolyticus*、*V. harveyi*、*V. parahaemolyticus*、*V. aestuarianus*、*Staphylococcus epidermidis* 等均沒有特異性顯色表現，顯示本研究所建立的 RPA-LF 具有高靈敏度以及特異性 (圖 5、6)。

### 三、快篩試紙的條件測試

在最佳反應時間測定部分，依據文獻選擇 5—25 分鐘的反應時間範圍進行 RPA 反應，PDSP 待測標準品在 10、15、20 及 25 分鐘皆有顯色點出現，PDSD 待測標準品在 15 及 20 分鐘有顯色點出現，於反應 25 分鐘時出現雜訊，SA 待測標準品在 5、10、15、20 及 25 分鐘皆有顯色點出現，而 SI 待測標準品時僅在 10、15 及 20 分鐘有顯色點出現，為求反應條件一致化，因此快篩試紙 RPA 反

應時間皆選擇 15 分鐘 (圖 4)。最佳反應溫度測試則選擇 33—42℃ 的溫度進行 RPA 反應，PDSP 待測標準品在 37、38、39 及 40℃ 皆有顯色點出現，41 及 42℃ 反應出現雜訊，PDSD 待測標準品時在 33、35、37 及 38℃ 皆有顯色點出現，39、40、41 及 42℃ 反應出現雜訊，SA 待測標準品在 35、36、37、38 及 39℃ 皆有顯色點出現，而 SI 待測標準品在 35、36、37 及 38℃ 皆有顯色點出現，因此快篩試紙反應溫度選擇 36℃ 為基準點 (圖 4)。

根據 (梁, 2016; Du et al., 2018; 王, 2019; 于等, 2019; Wang J. et al., 2020) 等報告指出，針對於乙型腦炎、李斯特菌、黃金葡萄球菌、布魯氏菌及副溶血弧菌所開發出之不同型重組聚合酶擴增側流試紙，其靈敏度落於 0.1 ng 至 300 fg 目標質體 DNA，最

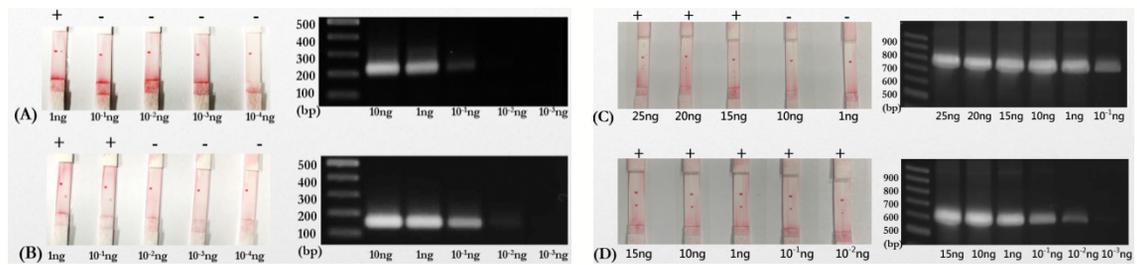


圖 3 靈敏度測試

A：PDSP-RPA-LF 靈敏度為標準品 1 ng；B：PDSD-RPA-LF 靈敏度為標準品 0.1 ng；C：SI-RPA-LF 靈敏度為標準品 15 ng；D：SA-RPA-LF 靈敏度為標準品 0.01 ng

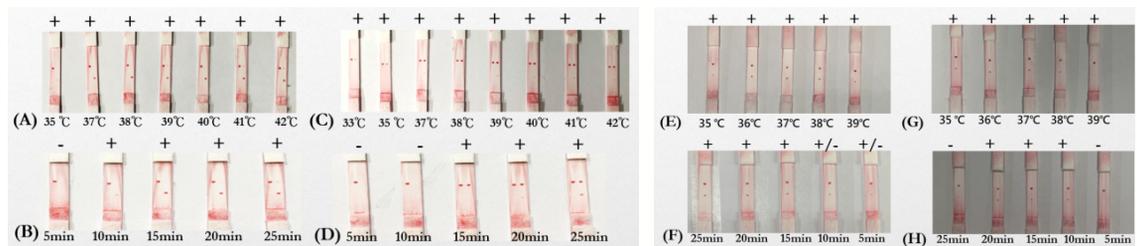


圖 4 RPA-LF 試紙條件測試

A、B：PDSD-RPA-LF 最適溫度為 36℃；C、D：PDSP-RPA-LF 最適溫度為 36℃；E、F：SI-RPA-LF 最適溫度為 36℃；G、H：SA-RPA-LF 最適溫度為 36℃；所有試紙之最佳反應溫度為 15 分鐘

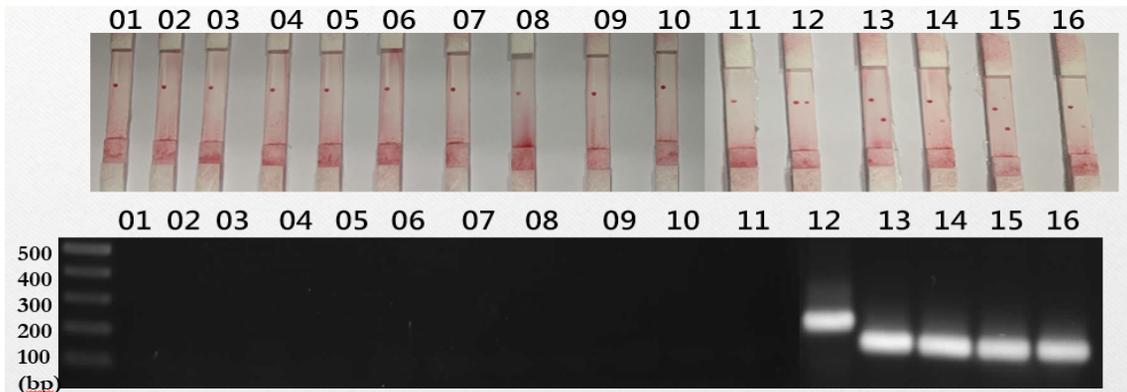


圖 5 發光桿菌 RPA-LF 之專一性測試

偵測菌種為 01-16 分別為 *S. iniae*、*S. iniae*、*S. iniae*、*A. hydrophila*、*E. tarda*、*V. alginolyticus*、*V. harveyi*、*V. parahaemolyticus*、*V. aestuarianus*、*S. epidermidis*、*S. agalactiae*、*P. damsela* subsp. *piscicida*、*P. damsela* subsp. *damsela*、*P. damsela* subsp. *damsela*、*P. damsela* subsp. *damsela*、*P. damsela* subsp. *damsela*

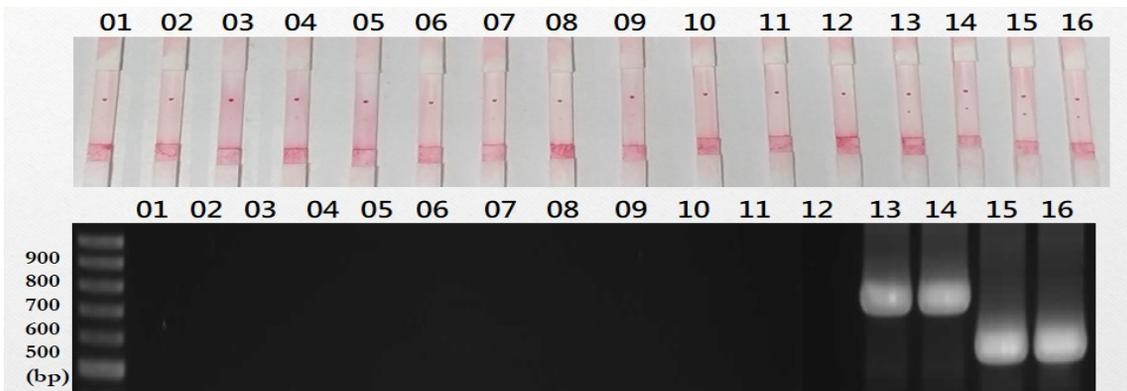


圖 6 鏈球菌 RPA-LF 之專一性測試

偵測菌種為 01-16 分別為 *A. hydrophila*、*E. tarda*、*V. alginolyticus*、*V. parahaemolyticus*、*V. harveyi*、*S. epidermidis*、*V. aestuarianus*、*P. damsela* subsp. *damsela*、*P. damsela* subsp. *damsela*、*P. damsela* subsp. *damsela*、*P. damsela* subsp. *damsela*、*P. damsela* subsp. *piscicida*、*S. iniae*、*S. iniae*、*S. agalactiae*、*S. agalactiae*

TECHNOLOGY

適 RPA 反應時間皆在 39°C，反應溫度落在 10–15 分鐘，本研究所開發出的快篩試紙能在 36–37°C 完成 RPA 擴增反應，在養殖現場檢測時僅以手握就能進行反應而不需要其他的儀器設備，具有養殖現場應用的優勢。

### 結語

因為極端氣候使海水異常升溫，海水養

殖魚種亦面臨到疾病好發的情況。午仔魚為臺灣南部重要的養殖海水魚種之一，但由於養殖密度過高，造成水質不良，導致感染各類病原而爆發疫病，尤以鏈球菌、弧菌及產氣性單孢菌危害最烈。本研究之快篩試紙可以應用於午仔魚的魚苗篩選，可增加漁民 10–15% 的收成。除午仔魚外，其他經濟魚種在疾病的篩選上亦可以應用，可減少藥物的使用，確保人民的食用安全。