

臺灣常見水產病原菌檢測晶片之開發



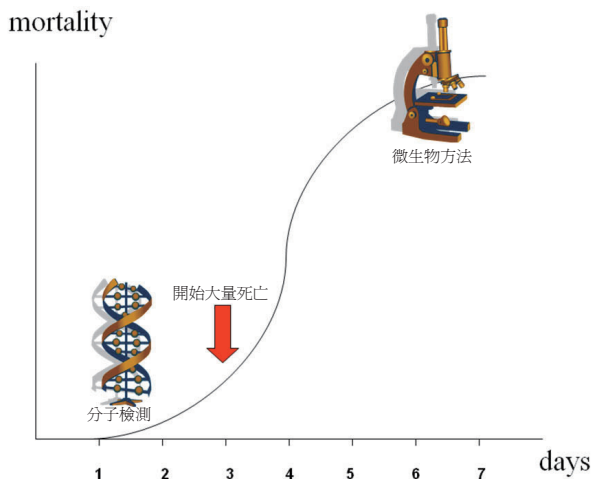
撰文/張錦宜

前言

對第一線魚病防治專家而言，疾病的診斷是一項嚴苛的時間競賽。成千上萬的魚蓄養在空間有限的魚池中，發病初期，通常只有極少數（數尾至十數尾）體質不佳的魚會先出現症狀，但是在短短三天之內，池魚死亡的數量會呈現指數成長般快速增加（如圖一），如果不能及時施以適當的處理，七、八成的魚就會在短短一周內大量死亡。大部分的養殖業者因為朝夕與魚隻相處，能夠在很早期就察覺池魚的異常，然而錯失黃金 72 小時緊急處理的關鍵，往往就是病原診斷所耗去的時間。以傳統微生物

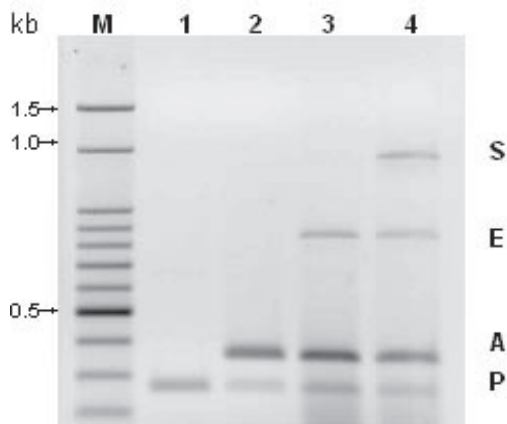
方法診斷細菌性魚病必需先將疑似病原菌分離培養出來，再根據菌種之生理生化特性加以鑑定。此法曠日費時，一般標準鑑定流程需時約一周，若遇特別難培養的細菌（如 *Streptococcus* spp.）或生長速度極慢的菌種（如 *Nocardia* spp.），則所費時間更數倍於此；此外，針對不同的菌種，其所需的鑑定策略與時間花費更是大相逕庭。因此，傳統微生物方法對魚病防治而言，往往只能盡亡羊補牢之力，養殖業者常因等不及診斷結果就先行盲目用藥，導致藥物之濫用、錯用，甚至可能因此而蒙受更大的損失。

現今利用 16S rRNA 基因序列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，針對臺灣常見魚病細菌，開發出 PCR 快速診斷套組之雛型（圖二），唯其終端判讀步驟稍嫌繁瑣（需以電泳分離、UV 照相系統判讀），一次可同時檢測的病原菌數量受到限制（multiplex PCR 最多一次放入 7 組特異性引子（primer）），在未來推廣上可能形成障礙，故更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、可用肉眼判讀、檢測速度更快的生物晶片，期能擴大研發成果的產業效益。



通常池魚會在發病3天後開始大量死亡，新型分子檢測在1-2天內即可檢知病原，而傳統微生物方法卻需要7天才能確診。

圖一 魚病發生期程與死亡數量關係圖



Lane M：分子量大小標誌；
Lane 1：只有P的基因組DNA；
Lane 2：有A與P的基因組DNA混合液；
Lane 3：有E、A與P的基因組DNA混合液；
Lane 4：有S、E、A與P的基因組DNA混合液；
(E: *Edwardsiella tarda*, P: *Photobacterium damsela*, A: *Aeromonas hydrophila*, S: *Streptococcus iniae*)。

圖二 多重引子與各種病原菌組合進行PCR反應產物之電泳分析

臺灣常見水產病原菌

經廣泛檢索國內文獻、試驗報告、疫病簡訊及推廣文集，將台灣曾發現過之水產病原菌共 25 株（表一）蒐集成為本研究之背景資料庫。並選定 *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* 共 15 株台灣常見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) 培養基中培養到指數成長期，取 2 ml 菌液以 12,000g 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 μ l 含 0.1 mg lysozyme 的 PBS 中，並加入 2 μ l, 20 mg/ml 的蛋白酶 K (proteinase K)，在 37 $^{\circ}$ C 靜置 45 分鐘，繼而加入 40 μ l, 25% (w/v) 的 SDS (Sodium dodecyl sulfate) 在 60 $^{\circ}$ C 作用 10 分鐘。最後，以 545 μ l 的 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 之醋酸鈉 (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 rRNA 基因序列進行擴增，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 μ l 體積中含 1 μ l 之 DNA Taq 酶、2 μ l 之 DNA 模版、2 μ l 之生物素順向引子 16S_F (biotin-agagtttgatcatggctcag)、2 μ l 之生物素反向引子 16S_R (biotin-ggttaccttgttacgact)、2 μ l 之 dNTP、5 μ l 之 PCR 緩衝液、36 μ l 之蒸餾水。PCR 反應條件為初始 94 $^{\circ}$ C，2 分鐘；接著 35 個循環之 94 $^{\circ}$ C，1 分鐘 30 秒、46 $^{\circ}$ C，1 分鐘 30 秒、72 $^{\circ}$ C，1 分鐘 30 秒；最後再以 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 分鐘。

16S rDNA探針設計

利用中央研究院資訊科學研究所研發之軟體 Unique Probe Selector (<http://array.iis.sinica.edu.tw/ups/>)，從水產常見病原菌的 16S rRNA 基因序列中，找出各自具專一性的片段，片段大小約 30 mer，並經由電腦運算出雜合能量 ($\Delta G^{\circ}(\text{total}) = \sum_i n_i \Delta G^{\circ}(i) + \Delta G^{\circ}(\text{init w/term G-C}) + \Delta G^{\circ}(\text{init w/term A-T}) + G^{\circ}(\text{sym}), T_M = \Delta H^{\circ} / (\Delta S^{\circ} + R \ln C_T)$, $R = 100 - \Delta(T_m) + \Delta G^{\circ}_{\text{forward}}(3' - 5') + \Delta G^{\circ}_{\text{reverse}}(3' - 5') + \text{hairpin score} + \text{dimer score}$)，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，並實際試做晶片測試這些探針的鑑別能力。

生物晶片置備

使用晶宇生技公司生產之 DR. Chip DIY Kit™，以手動點片機 (DR. Fast Spot™) 將 DNA 探

針固定於高分子 PVC 材質之晶片，並以 UV cross-linker 0.8J/cm², 10 min 固定，最後以蒸餾水及無水酒精清洗、烘乾後，在室溫下可保存一年。

表一 本研究所使用的水產病原菌

| 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 |

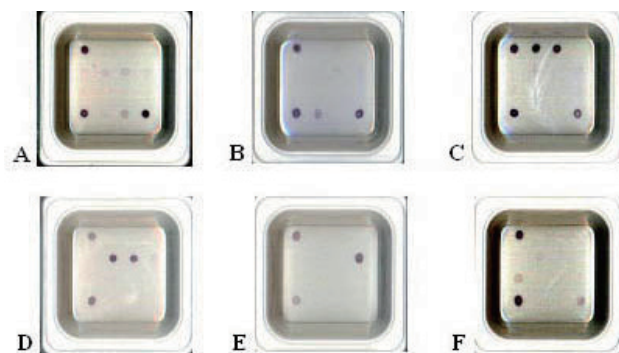
本研究開發之生物晶片可檢定的菌株以粗黑體表示

雜合反應

以不同之反應體積、溫度、時間、清洗強度交叉比對出最適之雜合條件，並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，以探討顯色判讀之色差閾值。與探針結合的 DNA 片段，經清洗後仍黏附在晶片上，這些 DNA 片段在利用 PCR 增殖時均在尾端接上了 biotin，因此可利用 biotin-NBT/BCIP 顯色技術，在 DNA 雜合處顯現藍色點漬（圖三）。點漬色差閾值可由前置實驗決定，當掃描影像的點漬灰階值大於設定的閾值，則電腦判讀為正反應；若點漬灰階值小於所設定的閾值，則電腦判讀為負反應。結果顯示，以 20 μ l 的樣本，在 55 $^{\circ}$ C 作用 60 分鐘，並將訊號值與背景值的色差閾值定為 10，可得最佳之雜合及判讀效果。

生物晶片之專一性測試

將各 DNA 探針在聚合物 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（圖三）。另以 25 株不同菌種的基因組 DNA



(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。

圖三 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

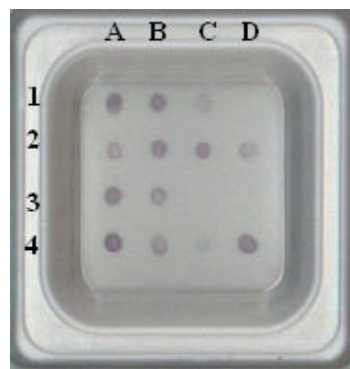
混合液為 DNA 模版，進行 PCR 反應，再與本生物晶片反應，也都能在相對應位置顯現相同的結果（圖四）。

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 12,000g 離心 5 分鐘，將沉澱物重新懸浮於 1ml PBS 中，加入 0.1mg lysozyme 作用 10 分鐘，加熱煮沸 10 分鐘，再以 12,000g 離心 10 分鐘，取上清液 2 μ l 作為 DNA 模板，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（表二）。結果顯示本系統的檢測極限介於 340 CFU/ml~2,500 CFU/ml，符合第一線魚病診斷之需求。

客製化程式設計 v.s. 自動化判讀鑑定

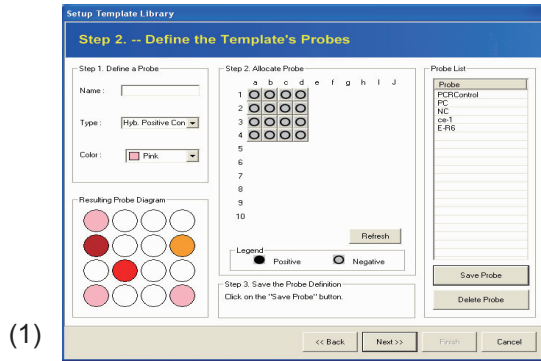
影像讀取及分析軟體 DR. AiM Reader 2.0 (晶宇生技公司)，具備友善的客製化設計功能，使用者可自行設定探針位置（圖五-1），藉此定義不同病原菌利用本晶片檢測後顯現的模板特徵 (template feature)，每一個模板特徵專一性地對應一株病原菌（圖五-2），接著將反應完成的晶片掃描成影像



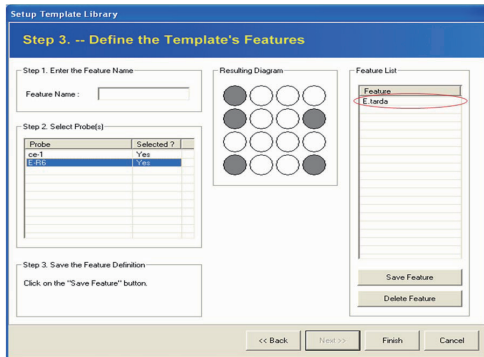
A1, A4 & D4: positive control ; D1: negative control ; C4: *A. hydrophila* ; B4: *A. salmonicida* ; B1 & C1: *E. tarda* ; B2 & C2: *L. garvieae* ; A3: *P. damsela* ; D2: *P. aeruginosa* ; A2: *S. iniae* .

圖四 不同菌種之 16S rDNA 在本晶片上的結合位點

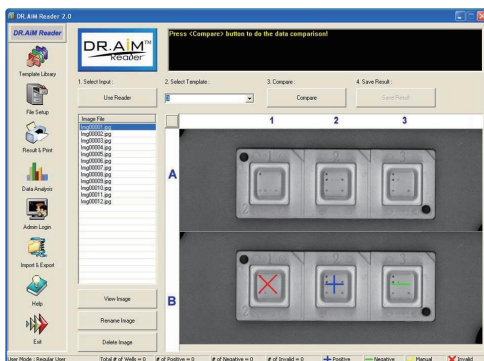
檔，程式的影像分析功能能立即判斷客製化的資料庫中是否有相同的模板特徵（圖五-3），並完成自動菌種判定（圖五-4）。



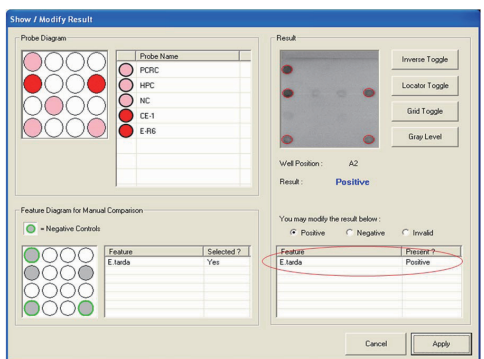
(1)



(2)



(3)



(4)

表二 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 subsp. damsela</i> | 1600 |
| <i>Photobacterium damsela subsp. piscicida</i> | 2200 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 340 |
| <i>Pseudomonas anguilliseptica</i> | 990 |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 1100 |
| <i>Streptococcus iniae</i> | 1450 |

- 設定探針位置，粉紅色為positive control，紅色為negative control，棕色及橘色則為*E. tarda*專一性探針所在的位置。
- 定義此5點相對位置為本資料庫中*E. tarda*專屬的模板特徵。
- 檢測反應完成的晶片掃描成影像檔(A)後，影像處理軟體會先分析顯色點漬的分佈是否為可判讀的圖像（如B所示，位於中間的晶片檢測結果為可判讀圖像），若肉眼觀察結果與掃描判讀結果有出入，本步驟可改為手動輸入。
- 電腦自動檢索資料庫後，判定本次檢測結果為*E. tarda*。

圖五 台灣常見水產病原菌檢測晶片客製化資料庫建立(以 *E. tarda* 檢測晶片為說明例)



檢測專題

活體背景值干擾試驗v.s.人工感染試驗

取 1 mg 吳郭魚腎臟均質於 2 ml PBS 中，逐一加入 25 株台灣水產常見病原菌，再依序進行樣本總 DNA 萃取、16S rDNA 擴增及雜合反應，結果顯示含有寄主組織的檢體並不會影響本晶片檢測的專一性及靈敏度。此外，本研究以腹腔注射的方式進行人工感染試驗，每一尾魚注射量為 10^5 CFU，共測試了 4 種台灣常見水產病原菌 (*Aeromonas*

hydrophila、*Edwardsiella tarda*、*Photobacterium damsela* subsp. *damsela* 及 *Streptococcus iniae*)，結果本晶片亦能自人工感染魚的腎臟檢體檢出相對應的水產病原菌，檢測結果與使用傳統微生物方法者均相符。

台灣常見水產病原菌晶片之標準檢測流程

以下依序列出利用病原晶片檢測水產病原菌之流程，與所需花費的時間 (表三)。

表三 水產病原菌晶片之標準檢測流程

| 工作項目 | 實施方法 | 所需時間 |
|-------------|---|---------|
| 樣本總DNA萃取 | 1. 取 2 ml 樣本(養殖池水或 1 mg 檢體均質於 2 ml PBS 中) 以 12000g 離心 5 分鐘。 | 5 min |
| | 2. 移去上清液(若目視無沉澱物則小心移去上層液 1950 μ l)，將沉澱物重新懸浮於 1ml PBS 中，加入 0.1mg lysozyme 作用 10 分鐘。 | 10 min |
| | 3. 加熱煮沸 10 分鐘，再以 12000g 離心 10 分鐘。 | 20 min |
| | 4. 取上清液 2 μ l 作為 DNA 模板。 | |
| 16S rDNA 擴增 | PCR 反應條件 94°C, 2 分鐘; 94°C, 1 分鐘 30 秒、46°C, 1 分鐘 30 秒、72°C, 1 分鐘 30 秒(35 cycles); 72°C, 2 分鐘。 | 210 min |
| 雜合反應 | 1. 取 20 μ l PCR 反應產物，加入 200 μ l DR. Hyb™ Buffer，水煮 5 min 後立即冰鎮 5 min。 | 10 min |
| | 2. 雜合反應 55°C, 60 min。 | 60 min |
| 呈色反應 | 1. 移去雜合液，加入 250 μ l Wash Buffer 清洗 2 次。 | 5 min |
| | 2. 加入 200 μ l Blocking Reagent，靜置 30 min。 | 30 min |
| | 3. 移去 Blocking Reagent，加入 250 μ l Wash Buffer 清洗 2 次。 | 5 min |
| | 4. 加入 200 μ l Detection Buffer，黑暗中靜置 10 min。 | 10 min |
| | 5. 移去 Detection Buffer，水洗後烘乾。 | 5 min |
| 自動判讀 | 反應後的晶片置於 DR. AiM™ Reader 影像讀取儀，自動判讀，完成檢測。 | 5 min |
| 全程所需時間 | | 約 6 小時 |



結論

本試驗根據各菌株 16S rRNA 的特異序列，設計出 15 種台灣常見魚病細菌 *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* 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，可將原本至少需時七天的細菌鑑定工作，大幅縮短至 6 小時內完成。此外，因為利用 16S rRNA 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。 AgBIO

張錦宜 行政院農業委員會水產試驗所水產養殖組 副研究員

參考文獻

1. del Cerro, A., Marquez, I. and Guijarro, J. A. (2002) *Simultaneous detection of Aeromonas salmonicida, Flavobacterium psychrophilum, and Yersinia ruckeri, three major fish pathogens, by multiplex PCR*. Appl. Environ. Microbiol. 68(10): 5177-5180.
2. Jeffery, S., Booth, J. and Myint, S. (1999) *Molecular Diagnosis*. BIOS Scientific Publishers Ltd, UK, pp79-82.
3. Kono, T., Ooyama, T., Chen, S.C. and Sakai, M. (2002) *Sequencing of 16S-23S rRNA internal transcribed spacer and its application in the identification of Nocardia seriolae by polymerase chain reaction*. Aquacult. Res. 33(14): 1195-1197.
4. Martínez-Picado, J., Alsina, M., Blanch, A.R., Cerda, M. and Jofre, J. (1996) *Species-specific detection of Vibrio anguillarum in marine aquaculture environments by selective culture and DNA hybridization*. Appl. Environ. Microbiol. 62(2): 443-449.
5. Osorio, C.R., Collins, M.D., Toranzo, A.E., Barja, J.L. and Romalde, J.L. (1999) *16S rRNA gene sequence analysis of Photobacterium damsela and nested PCR method for rapid detection of the causative agent of fish pasteurellosis*. Appl. Environ. Microbiol. 65(7): 2942-2946.
6. Wang, L.-C., Pan, C.-H., Severinghaus, L.L., Liu, L.-Y., Chen, C.-T., Pu, C.-E., Huang, D., Lir, J.-T., Chin, S.-C., Cheng, M.-C., Lee, S.-H. and Wang, C.-H. (2008) *Simultaneous detection and differentiation of Newcastle disease and avian influenza viruses using oligonucleotide microarrays*. Vet Microbiol. 127(3-4): 217-26.
7. Wang, L.-C., Severinghaus, L.L., Chen, C.-T., Liu, L.-Y., Pan, C.-H., Huang, D., Lee, H.-Y., Lir, J.-T., Chin, S.-C., Pu, C.-E. and Wang, C.-H. (2008) *Sex identification of owls (family Strigidae) using oligonucleotide microarrays*. J Hered. 99(2):187-92.