

養殖魚類重要病毒之分子檢測技術研發與應用

撰文/吳鴻程·洪健睿

前言

台灣四面環海，又有洋流通過，帶來豐沛的魚種，早期以捕撈漁業為主，後因環境生態遭破壞，海洋資源枯竭，捕撈漁業的魚獲量一直停滯不前，無法滿足消費者的需求，進而開發養殖漁業。台灣水產養殖擁有三百多年歷史，以虱目魚歷史最悠久，其他魚種亦漸漸養殖成功，養殖技術亦逐年增進，且有多種魚類之養殖技術已達成「完全養殖」。也就是在人工操作下，從卵育苗至幼魚、成魚，並進一步讓種魚人工交配產卵，進而量化繁殖魚苗。以草蝦為例，台灣早期草蝦完全養殖，大量草蝦輸出日本，賺取外匯，創造水產養殖界的奇蹟。草蝦為了提高單位產量，選用高密度養殖，在民國 77 年爆發魚蝦病，使產量下降三分之二以上，台灣草蝦王國，一蹶不起，再也沒有回春的機會，而病毒是造成養殖蝦大量死亡的主要病原體（鄭，2007），單一高經濟物種，只因病毒性疾病無法控制，而造成無法恢復產能，失去了商業競爭性。當經濟全球化後，台灣養殖漁業亦面臨 WTO 的衝擊，而石斑及海鱺是具有國際競爭力的魚種。兩者皆是現今亞太地區重要的高經濟海水養殖魚類，具肉鮮美特性，深具市場發展潛力，故吸引大量人才及資金相繼投入養殖，帶動海水養殖魚類產業的快速發展，也為台灣水產養殖業帶來莫大的經濟效益。石斑的養殖隨著科技的發展，不同的養殖技術與開發，使分

工模式逐漸形成，目前石斑養殖方式主要分為三階段，第一階段為卵至白身，第二階段為白身至 2 吋魚苗，第三階段則為 2 吋魚苗至成魚，養殖業者依據各自優勢進行特定繁殖作業，以達到垂直分工模式，使魚苗生產量能夠維持穩定，因應內外銷市場需求。魚苗與稚魚的育成多為室內集約式高密度養殖，因此造成石斑魚病害感染情形相當嚴重。草蝦因病毒無法控制而造成養殖失利之前車之鑑，歷歷在目，病毒性危害若無法及時防疫，產業將無法永續經營。目前臺灣石斑養殖的病毒性病害以神經壞死病毒 (nervous necrosis virus, NNV) 和虹彩病毒 (iridovirus) 為最嚴重影響，影響魚苗的存活率，總育苗率低於 1%。神經壞死病毒引起的最高死亡率，常發生在石斑魚卵孵化後十幾天到吋苗期間，約 80-100%，有些種類的石斑魚苗，例如龍膽石斑，至兩三吋苗的時候仍有七成的死亡率。病毒感染對於台灣推動成為亞太水產種苗中心，生產並外銷優質魚苗無疑是一大瓶頸。因此防治與環控對策的開發是目前重要的議題，早於民國 93 年 8 月即由行政院農業委員會動植物防疫檢疫局提供經費委請該會之家畜衛生試驗所執行「輸出水產動物疫病監測計畫」，長期監測養殖場病毒危害情況，期能瞭解全國海水魚病毒的感染實況，提早採取必要的防疫或檢疫的措施，防堵疫病的蔓延，造成更大的經濟損失。水產養殖業者欲偵測種魚、魚卵、稚魚、成魚、飼料及培育環境是否潛含病毒，政府相關單位監測養殖場

病毒危害情況時，皆需要有可信的檢測方法，目前實驗技術日新月異，新穎快速的方法不斷進化，檢測診斷之準確性也大幅度提升。以下整理與摘要說明檢測魚類病毒的方法原理及目前研發的實況。

魚類重要病毒之分子檢測技術

對未知病源體的首次鑑定，通常要依柯霍法測 (Koch's postulates)，培養及純化病源體，若依此法則歷程，所需時間太長，難用於疫情的監控。當疾病病源體確定後，後續的診斷方法已經由科技方法創新，大幅度縮短操作分析時間。在眾多的診斷方法中，病毒引發魚類疫病之診斷鑑定，主要是鑑別病毒的蛋白質或是遺傳物質 (DNA 或 RNA)，檢測技術可分為：血清學檢測技術及分子生物學檢測技術兩類。

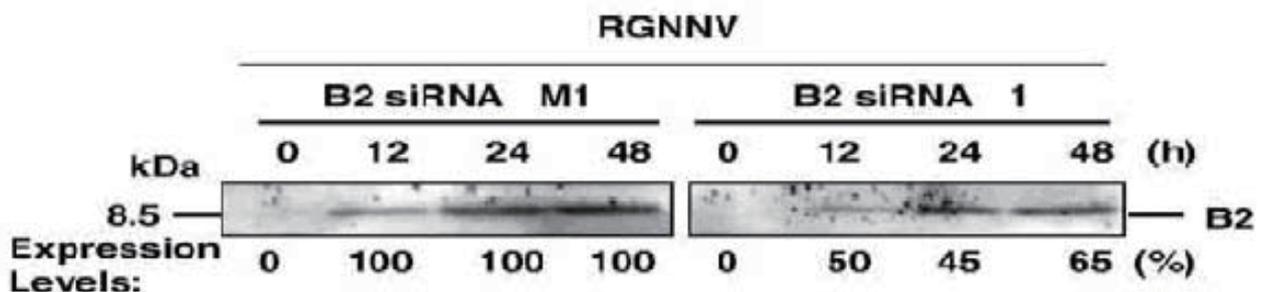
(一) 血清學檢測技術

主要是以病毒的蛋白質為抗原，以免疫學的原理，產生可辨識病毒蛋白質的抗體，此類技術亦稱為免疫檢測技術。通常以病毒的結構性蛋白質為抗原，可測定檢體中是否有病毒存在。若要檢測病毒在檢體中是否處於活躍的複製期，常以非結構性蛋白質為抗原。如，神經壞死症病毒的 B2 蛋白質 (Su, 2009；圖一所示)。血清學檢測技術的關鍵性條件，是生產具有特異性抗體，尤其是單株抗體，可增強檢測技術的敏感性及準確性，目前在 NNV 已有豐碩的研究成果 (Shieh, 2005)。

當抗體和抗原結合後，為了放大結合訊號利於判讀，其標示的方法，常用的方法為膠金標註法 (colloidal gold-labeled)、酵素連結免疫吸附法 (enzyme-link immunosorbent assay, ELISA) 等兩大類，及較新穎的免疫磁減量檢測系統。相關說明如下：

1. 快速檢測試劑套組(one-step diagnosis kit)

此試劑主要是根據膠金標註，同時配合免疫層析法，所研發出來的快速診斷法，目前市售之驗孕棒均以此技術製作而成。膠金標註的原理係利用氯金酸 (HAuCl₄) 在還原劑作用下，可聚合成一定大小的金顆粒，形成帶負電的疏水膠溶液，在靜電作用下形成穩定的膠體狀態，故稱為膠金。由於膠金顆粒表面所攜帶負電荷對於蛋白質表面所帶之正電荷具有相當強之吸附能力，可形成非共價結合。當膠金標記物與相對應之蛋白質在結合處大量聚集時，肉眼即可見紅褐色或紫色斑點，因而可用於定性或半定量的快速免疫檢測方法中。免疫層析法是先將抗體固定在硝化纖維膜上 (或是其他材質)，使其無法移動而成為固定相，測試時將硝化纖維膜一端浸入液態待測樣品內，以毛細作用力，將液體吸往固定的抗體區，配合膠金標註的呈色機制，當有抗體和抗原大量結合時，可在標示區顯示顏色，達成快速檢測診斷之目的。此試劑具有簡單、快速、專一又便宜的優點，適合專業及非專業人士操作，且方便於養殖現場使用 (齊, 2006)。睿嘉生技公司獲得經

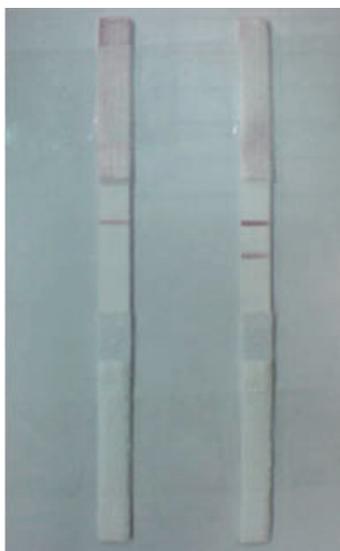


圖一 神經壞死症病毒B2蛋白質抗體之辨識能力(Su, 2009)

濟部工業局「農業生技產業化技術推廣計畫」之補助，執行「石斑魚神經壞死病毒及虹彩病毒檢驗試劑之開發」，研發了石斑魚神經壞死病毒單一步驟快速檢驗試劑、石斑魚虹彩病毒單一步驟快速檢驗試劑，此二項產品於2008年已開始在台灣販售。



圖二 睿嘉生技公司研發之神經壞死病毒快速檢驗試劑（林，2008）。



圖三 快速檢測試劑套組檢驗結果（經濟部工業局，2008）。

2. 酵素鍵結免疫吸附法(ELISA)

此測定方法是將酵素以化學鍵結方式標記於抗體或抗原上，當相對應之抗體或抗原結合後，形成有酵素標記之免疫複合物，一旦免疫複合物上之酵素遇到相對應之酵素基質，則可將無色之酵素基質催化成有色之產物，放大免疫複合物的訊息，再依據顏色深淺或有無，進行定量或定性分析。分析時，使用已經固定在96孔盤上的抗體或抗原，形成固定項，加入待測樣品，經結合形成免疫複合物，用水沖洗未能結合的物質，再加入相對的酵素標記抗體或抗原，水洗後加入酵素基質呈色。市售之ELISA試劑套組通常會具備三種基本試劑材料，包括固相的抗原或抗體、酵素標記之抗原或抗體、酵素基質。依據應用性、樣本之性狀及檢測所需具備之條件，目前設計出各種不同之檢測方法，包括雙抗體三明治法、間接免疫吸附法、競爭法、阻斷法或捕獲法等。ELISA因一次可進行多樣本的分析，適合定量分析，由於實驗結果需要特殊判讀機，常用於實驗室內，不適用於養殖現場使用。

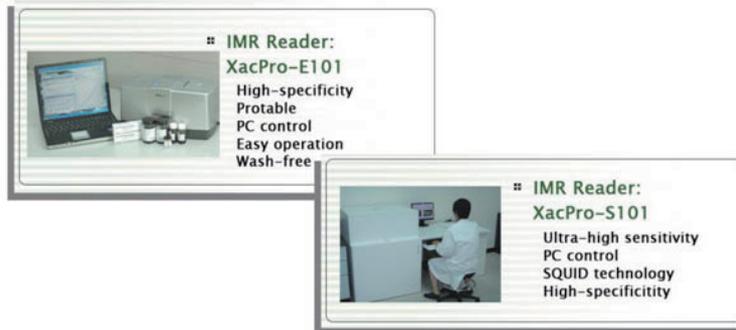
3. MagQu的免疫磁減量檢測系統

此系統是將抗體以共價鍵方式結合在MagQu磁量生技公司出品的磁珠上，當磁珠上抗體與



圖四 睿嘉生技公司研發之神經壞死病毒ELISA試劑（經濟部工業局，2008）。

病毒結合後，造成個別磁珠聚集，減少磁珠在磁場的旋轉量，稱為免疫磁減量 (ImmunoMagnetic Reduction, IMR)，IMR 測定儀中可將微弱的磁訊號轉變為可量測的電壓訊息，具相當高的靈敏度。中研院吳金洌特聘研究員與海洋大學呂明偉助理教授，以魚類的神經壞死症病毒 (NNV)，透過磁珠轉動速度來偵測 NNV 病毒量，可以偵測 10^2 TCID₅₀/ml 以下的病毒量，顯示此技術具有高度檢測靈敏性。此外，進行專一性試驗，此平台進行胰臟壞死症病毒及虹彩病毒等兩種病毒檢測，所得之檢測值皆低於背景值，顯示本技術平台具有可信賴的檢測專一性。磁量生技公司目前研發可攜性的測定儀，期能用於養殖現場。



圖五 免疫磁減量測定儀（磁量生技公司）

（二）分子生物學檢測技術

在魚體初期感染或是健康帶源魚體內，病毒之遺傳物質 DNA 或 RNA 的含量不多，不易檢測。1983 年 Kary B. Mullis 博士發明了聚合酶鏈反應 (Polymerase chain reaction, PCR) 技術，開啟了分子生物學的新領域。PCR 技術之必備要件包括核酸模版、引子、耐高溫之 DNA 聚合酶、四種合成鹼基之去氧核糖核苷三磷酸，在可設定溫度循環參數之反應儀中，透過高溫將雙股 DNA 變性成單股，而後降溫讓人工合成之引子得以與模版單股 DNA 上可配對之鹼基結合，而後再提升至適合 DNA 聚合

酶催化之溫度，催化依模版 DNA 序列合成互補性 DNA。若病毒之遺傳物質為 RNA，必須先經過反轉錄 (reverse transcription, RT) 使 RNA 變成 cDNA (complement DNA)，才進行 PCR 反應。由於聚合酶鏈反應技術操作簡便、敏感度很高，PCR 儀器便迅速普及於一般實驗室，是目前最常用於診斷動物疾病的技術。若要定量病原體含量，通常會配合膠體電泳分析，但合適的 PCR 循環次數卻不易決定。近期以 PCR 技術為基礎，已發展出快速精準的即時定量 PCR (Real-time PCR) 及恆溫圈環形核酸增幅法 (loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 等。

1. 即時定量 PCR

即時定量 PCR 是利用與 DNA 結合的特殊螢光染料，當 PCR 擴增 DNA 時，DNA 會與螢光染料結合，增強螢光強度。經由測定螢光強度，可即時判定 DNA 含量，整個 PCR 反應過程中，可完整紀錄 DNA 含量的變化，有別於傳統 PCR 將 DNA 增幅放大後，將 DNA 標定螢光物質，再進行電泳分析並偵測螢光值，進而定量。以即時定量 PCR 測定石斑魚神經壞死病毒，其偵測靈敏度高於傳統 PCR 十倍以上 (莊, 2004)。即時定量 PCR 的靈敏度高，只要設計專一性核酸引子，在定量方面，其準確性及時效性有很好的表現，但需要特殊儀器且較難攜帶，常用於一般實驗室，不適合野外、魚場使用。

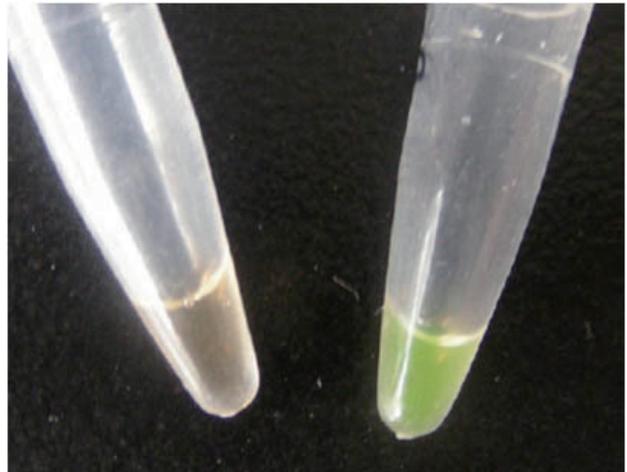
2. 微流體即時定量 PCR

PCR 儀器，主要是提供可調式的溫度控制。若要改善即時定量 PCR 儀器之可攜帶性，首要條件就是縮小儀器。台灣電子資訊產業在全球能獨據鰲頭，所依據的就是發達的微機電系統。微機電系統技術是一種包括光、機、電、材料、控制、化學、生醫等多重科技整合的技術，利用此製造技術可使產品因微小化而提高其性能、品質、可靠度及附加價值，同時可降低製造成本。成功大學陳宗嶽副教授及李國賓特聘教授共同合作，以微機電製程技術，開發出微型微流體檢測晶片技術，該項技術並已經

技轉承虹科技公司。此系統包含微型溫控模組與微流體輸送模組。前者由於感測器及加熱器都整合在 PCR 晶片的內部，晶片得以快速且準確執行溫度的循環控制，後者整合蠕動式微型氣動幫浦與微管道，提供了生物相容性高及可拋棄性。以微流體晶片系統對神經壞死病毒之 RNA 片段進行偵測，偵測極限最低濃度可達到每微升 10 個病毒 RNA，若增加螢光偵測模組之偵測極限，以目前研究雛型儀器最低濃度可達到每微升為 1,000 個病毒 RNA，此項技術，除可將儀器微型化，亦增加系統攜帶性(李，2008)。

3. 恆溫圈環形核酸增幅法(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)

Notomi 在 2000 年研發出只需一個反應溫度之核酸擴增技術 LAMP，並取得該項技術的專利。LAMP 具有快速、高專一性及高敏感度之特點，僅需於 60-65°C 恆溫下反應 35 分鐘至 1 小時即可偵測病毒，操作簡單且不需昂貴的設備，適合應用於養殖現場。LAMP 所用之 DNA 聚合酶為具核酸設置換活性的 Bst DNA 聚合酶，在標的 DNA 片段選取 6 個區域，設計成 2 對專一性的內引子及外引子，藉由聚合酶作用，擴增標的 DNA 片段，可專一性的偵測特定病毒。因內引子之特殊設計，擴增產物會由許多莖-環結構的 DNA 連結，在 LAMP 反應中，三磷酸去氧核苷酸 (dNTP) 在進行 DNA 的合成時，會釋放出磷酸根離子和反應緩衝液內鎂離子，形成白色焦磷酸鎂沉澱，可經由副產物焦磷酸鎂所形成之白色沉澱物或將 DNA 產物以螢光劑染色，快速以肉眼觀察結果。在 RNA 病毒方面，需配合可在高溫反應的反轉錄酶 (AMV RTase)。LAMP 檢測技術，不同於 PCR，只需一種操作溫度，不需要有升溫及降溫的動作，因此反應時程也比傳統 PCR 快，方便養殖現場應用，因此可及早偵測水產生物是否感染病毒，避免引入帶病毒之魚種，並可在養殖期間做好監控措施，減少病毒爆發及疫情擴散。但 LAMP 引子設計複雜且限制多，是急需突破之瓶



左：控制組，沒有DNA產物；
右：實驗組，以目視可觀察到綠色螢光。

圖六 LAMP技術擴增DNA產物結合螢光染劑
(Xu, 2009)

頸。目前已應用於許多水產生物，包括石斑魚神經壞死症病毒檢測 (Xu, 2009)。

魚類病毒之分子檢測技術研發方向

魚類病毒之分子檢測技術，主要是利用酵素免疫、化學呈色發光及分子生物學。而檢測試劑需要下列的要求：(1) 準確性：精準及特異性的檢測出標的物質；(2) 敏感性：能在標的物質非常稀少情況驗出；(3) 穩定性：檢驗試劑在長時間存放不易變質；(4) 簡易性：儀器簡便，易於攜帶；(5) 經濟性：價格便宜，養殖業者能負擔，便於大量篩選樣本。目前的檢測試劑仍無法完全符合上述條件，但若能針對某些使用者的需求加以研發，仍大有可為。針對使用對象的需求，可將檢測試劑研發分為二個方向：

(一) 養殖現場使用之簡易型

養殖環境的檢測是防疫的第一線，最好是有生產履歷性的全面檢測，也是最需要快速檢驗的關鍵地方。但養殖現場中沒有研究設備，所以檢測試劑之使用要簡單、快速、便宜、不需要專業檢驗人員，

可隨時隨地檢測，試劑保存容易者為佳。漁業的檢測通常需要在現場檢測或者立即得到檢測結果，現場使用常以快速檢測試劑套組為主，而快速檢測試劑套組主要利用免疫技術結合膠金標誌，目視即可判斷結果，然而檢體通常並非純物質，所含的夾雜物質易造成非特異性結合之偽反應，使準確性下降，最好能使用單株抗體以提高專一性，所以研發的重點包括如何生產便宜的單株抗體。免疫磁減量檢測系統，不需用水洗為其特色，若測定儀體積能小型化，則更方便於養殖現場使用。LAMP 技術雖然只需要單一溫度設備，亦能應用於養殖現場，但是 DNA 聚合酶的穩定性、多對引子對的設計及螢光染料的價格等，仍有需要改進的空間，目前仍在先導期實驗中。微流體即時定量 PCR，以微流體晶片結合螢光偵測模組，將即時定量 PCR 儀器縮小為可攜帶型，增加其便利性。由於微流體即時定量 PCR 與 LAMP 的檢測標的物皆為 DNA 或 RNA，因此須開發簡易且效果佳之純化套組以搭配使用。

（二）實驗室使用

政府、學校、民間研發單位，有專精的檢驗人員及設備，除了可用上述養殖現場使用之簡易型檢驗試劑外，ELISA 及即時定量 PCR，因有儀器輔助，故其可檢測之種類相當多，且可用於標的物定量，擴大其使用範圍及精確性。由於遺傳工程、基因重組及單源抗體等技術的不斷研究與發展，使得研發期程大幅縮短，實驗室使用產品推陳出新更為迅速。

魚類病毒分子檢測技術之應用範圍

石斑及海鱸是台灣具有國際競爭力之魚種，國內已有大量人才及資金相繼投入養殖，為臺灣水產養殖業帶來莫大的經濟效益。由於石斑魚在魚苗養殖階段，常遭受神經壞死病毒為害，而在成魚則面臨虹彩病毒感染之威脅。當台灣朝亞太種苗中心發展，應建立生產優質無病毒魚苗技術，除了在飼育管理外，開發飼料添加物，將促進生長或用來治療及控制疾病的產品添加入飼料，提升魚抵抗疾病的能力；

在環境管理面，則徹底執行養殖場的衛生管理，例如養殖場環境、孵化池和水源消毒等，可以避免病源侵入養殖場的機會（周，2008）。除此之外病毒檢測亦是重要一環，茲將病毒檢測技術應用性分列如下：

1. 篩選無病毒種魚

以 PCR 進行病毒檢測，去除帶原之種魚，這是生產優質無病毒魚苗的第一步，源頭無法控管，將無法帶動無病毒魚苗。

2. 篩出病毒帶原魚

台灣養殖的石斑魚普遍有 NNV 帶原的現象，帶原現象不只存在於發過病的殘活魚，也存在看似健康的魚體內。持續性感染魚可以釋放具感染性的 NNV 至飼養環境中，會造成 NNV 在環境中的散佈。當魚篩出為病毒帶原魚者，應將殘活魚銷毀，以防疫情擴大。

3. 飼育及環境管理之病毒監控

無病毒飼料及環境的維持是養殖上的一大重點，亦是開發現場使用病毒檢測套組的主要使用對象，因為養殖業者需要進行長期且多項目之監控。

4. 疫病的快速鑑定

當疫病大流行時，病源體鑑定的準確性及時效性相當重要，有效的魚病檢測系統能快速決定藥物治療策略，或將無法治療的病體銷毀，避免疫情擴大。

5. 檢疫制度的建立

由疫區運送往非疫區的種苗必須嚴格要求提出檢疫證明，藉以防止種苗運送所造成之傳播。檢疫證明須由政府可信任之檢驗單位提出。

6. 生產履歷的建立

紀錄種魚、稚魚、成魚等各階段之完整生產過程及病毒監控結果，除了可做為優質無病毒魚苗的證明外，更可提供消費者最安全的水產品。

結論

水產養殖業要立足臺灣，放眼世界。在 WTO 前題下，經濟已呈現全球化，台灣水產養殖應由勞力密集及高度依賴水及土地資源的傳統養殖，進化到以資訊、知識、技術密集的種苗產業。以種苗為另一個出發點，建立「優質」水產品的形象，以確保台灣與國際上其他國家水產品之產品區隔，迅速發展成為亞太種苗中心。政府依此目標，建立相關政策，由產官學共同參與、推動及落實。在疾病防治方面，由上游學術機構合力研究病因、病源檢測鑑定方法，再技轉民間生產。配合民間推廣單位，

如：水產種苗協會，推進科技及產業結合，輔導產業養殖環境改善，辦理魚苗品質認證制度，提昇整體產品競爭力。魚苗生產業者，可利用快篩試劑進行魚苗健康之自我監控，建立生產履歷；政府衛生試驗單位，則執行水產動物疾病監測工作，長期監測養殖場病毒危害情況，瞭解養殖魚病毒的感染實況。由上而下整合研究科技，由內而外保證魚苗優質、無病毒，如此水產養殖產業將能永續發展。

AgBIO

吳鴻程 嘉南藥理科技大學 食品科技系 助理教授
洪健睿 國立成功大學 生物科技研究所 副教授

參考文獻

1. Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N. and Hase, T. (2000) *Loop-mediated isothermal amplification of DNA*. *Nucleic Acids Research*. 28(12):E63.
2. Shieh, J. R. and Chi, S. C. (2005) *Production of monoclonal antibodies against grouper nervous necrosis virus (GNNV) and development of an antigen capture. ELISA*. 63(1):53-60.
3. Su, Y. C., Wu, J. L. and Hong, J. R. (2009) *Betanodavirus non-structural protein B2: A novel necrotic death factor that induces mitochondria-mediated cell death in fish cells*. *Virology* 385:143 - 154.
4. Xu, H. D., et al., (2009) *Detection of red-spotted grouper nervous necrosis virus by loop-mediated isothermal amplification*. *J. Virol. Methods* doi:10.1016/j.jviromet.2009.09.009.
5. 李思賢 (2008) 微流體系統應用於養殖漁業之快速病原偵測。國立成功大學奈米科技暨微系統工程研究所碩士論文。
6. 周信佑 (2008) 石斑魚健康種苗之建立與疫苗開發策略。農業生技產業季刊，第十五期，頁47-50。
7. 林文綺 (2008) 創新檢驗技術，泓泳養殖新樂園。農業生技產業化技術推廣計畫創新專刊，頁34-43。
8. 莊蕙菁 (2005) 石斑魚神經壞死症病毒特性及檢測方法之研究。國立成功大學生物科技研究所碩士論文。
9. 張世忠、廖永剛 (2006) 淺談動物疫病檢測診斷技術產品與其市場。農業生技產業季刊，第六期，頁34-45。
10. 齊肖琪 (2006) 魚類神經壞死症病毒快速檢測試劑。水產種苗(FBA)，98:1-5。
11. 經濟部工業局 (2008) 睿嘉生物科技股份有限公司石斑魚神經壞死病毒及虹彩病毒檢驗試劑之開發，94-97年度計畫成果彙編專刊，頁26-28。
12. 鄭金華 (2007) 無特定病原(SPF)白蝦繁殖模式之開發與產業應用。農業生技產業季刊，第十期，頁48-58。