

PCR 技術在植物防疫檢疫害蟲鑑定上之應用

葉文斌

高雄醫學大學生物系

台灣加入世界貿易組織後，會有大量的農產品從各國輸入，隨附其上的害蟲也有可能入侵，成為台灣農作的新害蟲，未有原產天敵的生態環境下，極有可能造成農業上的重大危害。檢疫的工作遂成為保障國內農業生態的重要關卡。通常，害蟲檢疫均以成蟲之形態特徵為主，然而檢疫到的害蟲有很多是屬於幼蟲期或蛹期，無法明確鑑定到種，必須藉由分子形質的開發，有效探討幼期或蛹期之形態形質無法解決的分類及鑑定的部分問題。在眾多的分生技術當中，如何應用適當的技術達到快速檢疫的目的，是很重要的選擇。

PCR 相關之檢疫方法

綜合目前的相關報告及參考書籍，應用於分類及鑑定的分子形質大致有下列諸項：

- 一、 逢機擴增多形性去氧核糖核酸 (Random amplified polymorphic DNA, 簡稱 RAPD)：此方法為 Williams 等人於 1990 年所開發，運用 PCR 的技術逢機放大 DNA 序列。於此方法中，引子黏附到 DNA 模板的強度有強弱之別，複製的產物量也因而不同，且由於引子的長度較短 (一般為 10 個鹼基)，黏附的位置較多，可複製出不同大小的 DNA 片段。反應的產物經電泳分析所呈現的圖形差異，即可鑑定其類緣歸屬。
- 二、 Multiplex-PCR：此方法應用了 PCR 反應中引子的專一性，於反應物中置入多組引子，同時偵測兩種以上的 PCR 產物，也可同時分析多個具不同特性的樣品。此方法的應用性相當廣泛，針對多個混合樣品，其上游或下游可用廣效性的引子，而相對的另一股引子則分別採用混合樣品內各自專一的引子，藉由複製產物的不同大小，鑑定混合樣品的分類歸屬。
- 三、 PCR-AFLP：此一方法需要經過兩次的 PCR 複製，DNA 純化之後，先用酵素切割，切割後的 DNA 先黏合上酵素切位的 adaptor (使 DNA

兩端含有 adaptor 及部分切割酵素的序列), 黏合後的 DNA 當作模板, 用 adaptor 及部分切割酵素的序列及 3'端多加一個或兩個鹼基當作引子進行複製; 第一次的 PCR 產物回收當作模板進行第二次 PCR 反應, 第一次 PCR 反應時的引子末端再加入 1 到 2 個鹼基作為此次反應的引子。將所得的產物進行 polyacryamide 電泳的分離分析。在此方法當中, adaptor 的序列約 10 個鹼基, 酵素切位約 4 個鹼基, 再加上額外加入的 2-4 個鹼基, 因此引子的長度多於 16 個, 幾乎可以算是專一性引子。因此, adaptor 的序列必須選擇好(可先用 RAPD 的方式篩選), 才可得到較好的複製結果。

四、 衛星 DNA (Satellite DNA): 衛星 DNA 是一組重複序列所組成的 DNA, 例 GCTGCTGCTGCTGCTGCT, 亦可用 $(GCT)_n$ 表示, GCT 是組內的單位; 而 AAAAAAAAAAAAAAAAAA 的組成中, A、AA、AAA 或 AAAA 何者是 DNA 組內的單位則較不明顯。這類遺傳組成在生物染色體據有不小的比例, 雖然其功能未知, 學者們亦不確定其對生物的功能不會有影響。此類遺傳組成大致上可分為兩類, 一類是微衛星 DNA (microsatellite DNA), 如上例, 其單位長度為 2 bp ~ 6 bp; 另一是迷你衛星 DNA (minisatellite DNA), 其組成單位較長, 一般為 10 bp ~ 60 bp, 此 10 bp ~ 60 bp 重複數次而形成的 DNA 序列均可稱之, 例 $(GATCAGTCTCGA)_n$, GATCAGTCTCGA 為序列組內的重複單位。

五、 限制酵素圖譜 (Restriction fragment length polymorphism, 簡稱 RFLP): 限制酵素 (Restriction enzyme) 具有專一性能夠辨認某些特定的雙股 DNA 序列 (一般是 4 ~ 6 bp) 將其切斷。例如 *EcoRI* 限制酵素辨認出 DNA 序列內有 GAATTC 的鹼基排列時, 便會將其切斷為 G 及 AATTC 兩段。生物個體的 DNA 序列內應該會有很多 *EcoRI* 的辨認位置。在適當的反應條件下, DNA 序列即會被切成大大小小的片段, 這些片段電泳分析後, 即可得限制酵素圖 (restriction map)。比對不同個體、族群或種之間的限制酵素圖, 即所謂的 RFLP。圖譜相似度愈高者其類緣即愈接近, 可做為同族群或同種與否的判定依據。在應用上, 可運用 PCR 的方法複製出 1~2 kb 的 DNA 片段, 再以酵素切割, 得到限制酵素圖譜, 即所謂的 PCR-RFLP。

六、 DNA 序列: DNA 序列已是探討生物系統學的主要方法, 無論是個體、族群、種及高階分類單元間的差異及類緣, 均可運用 DNA 序列的差異分析。選擇適當的 DNA 片段定序, 即可分析各個分類單

元的歸屬及類緣。例如，高階分類單元可選用較保守 (conserved) 的基因分析，常用的基因有 12S rDNA、16S rDNA 及 18S rDNA 等；近緣種類則可選用較不保守的基因分析，常用的基因有粒線體內的各個基因，像 ND1-ND6、COI、COII 及染色體上的 ITS1 及 ITS2 等。

- 七、PCR-Microarray：目前，尚未有大量的資料運用此方法於害蟲的快速鑑定。要應用此一方法達到快速鑑定的目標，須先建立害蟲的完整資料庫，各個檢疫害蟲的族群，其專屬的 DNA 序列須先行開發建立，即 probe 須先開發完成。將害蟲的 DNA 運用 PCR 方法複製，再與已建立完整之 microarray 相雜合，分析雜合的結果鑑定害蟲的歸屬。

開發合適的分子特徵，達到快速鑑定的目的

在快速鑑定的前提下，所有的反應步驟及流程均必須注意時間長短的問題。從 DNA 的純化、PCR 的反應到產物的分析定序，均要使其時間最短化，這樣才能符合快速鑑定的要求。然而，目前的檢疫對象廣泛，且應用在快速鑑定時所採用的分子特徵不盡相同，遂使得各類害蟲檢疫所花費的時間不一。雖然如此，由於生命現象的遺傳物質均是 DNA 或 RNA，使得分子特徵具有了共同性，無論是病毒、古細菌、真細菌、原生生物、真菌或動植物，其遺傳物質純化之後，都是具同樣特性的分子特徵。因此，在快速鑑定上均採用了類似的分生技術及原理。

一般，得到昆蟲的分子特徵用於快速鑑定須經幾個步驟；1. DNA 或 RNA 的純化；2. PCR 反應；3. 電泳確認；4. PCR 產物回收；5a. PCR 產物切割分析或 5b. 定序分析。採用的步驟愈多，所花費的時間即愈長久，愈不符合快速鑑定的要求；另外，每一個步驟也有不同的操作方式可以完成，花費的時間也不相同，約略分析如下：

1. DNA 或 RNA 的純化：此步驟可再細分成標本研磨及 DNA 分離，其中 DNA 的分離可簡略分成兩種方式，傳統的純化方式，採用酚、氯仿分離蛋白質及雜質，需半天到一天的時間；採商用試劑所花費的時間約 3-6 小時即可。
2. PCR 反應：此步驟可再細分成反應物之操作及機器之運轉時間。PCR 反應操作所費時間與操作者的熟練度及樣品數有關，但通常差異不大。機器之運轉所費時間變異較大，PCR 機器升降溫的速度及反應的循環次數

是影響最大的參數。舉一例做參考；95°C-45 秒，52°C-45 秒，72°C-60 秒，真正的反應時間為 150 秒 (2.5 分鐘)，升降溫的時間 1 至 2 分鐘；因此一個循環的反應，快者 3.5 分鐘，慢者須 4.5 分鐘。循環次數自 25-40 均有人採用，最快的反應時間為 87.5(25x3.5)分，最慢者為 180(40x4.5)分，兩者的反應時間可以差到 1.5 小時。甚至於有些 PCR 機器，不需經過升降溫，所花費的時間可縮至 1 小時左右。

3. 電泳確認：此步驟所費時間的變異較小，較可能產生差異的變因在染色的方式。電泳時間約 30 分鐘，染色時間 30 分鐘；若將電泳膠含 EtBr 的方式行電泳反應，可省去 30 分鐘的染色時間。另外，有些方法，像 AFLP 及 Microsatellite 的分析須採 polyacryamide 之電泳方式，含顯影的時間，需 24 小時。
4. PCR 產物的回收：目前多已採用商用試劑，花費時間 30-60 分鐘。但若 PCR 產物不是很單一，則需電泳分離再回收，需多費 60 分鐘的時間。
5. PCR 產物再分析：(a) PCR 產物經酵素切割再電泳分析(PCR-RFLP)，酵素切割時間約 1 小時，電泳分析為 0.5 到 1 小時；所費時間 1.5 至 2 小時；(b) PCR 產物之定序分析，此一步驟所費的時間最為長久，自行操作定序，也需一天的時間，委託相關實驗室或廠商則需 2~3 天的時間。若加上序列比對的時間 6 小時，定序分析最快需 1.5 日，慢者達 4 日，因此，較不符合快速鑑定之目的。

將各反應步驟所費時間約略整理於表一，最快的鑑定方法可在當天完成，慢者需到 2 天，但若是採用定序的方法，最快也需 3 個工作天；而各個鑑定方法需採用的實驗步驟則列於表二。雖然目前的檢疫對象很廣泛，涵蓋了所有具生命現象的樣品，但是在分子遺傳的層面上，都是屬於分子特徵的分析。在檢疫站，只要設立一個專屬的分子實驗室，即可含括所有檢疫樣品的操作，所得到的資料再與學者專家事先建立的分子資料庫相比對，即可得知該檢體是否為檢疫對象。

表一、各個實驗步驟所費之時間 (以小時為單位)；步驟之代號參考內文

步驟	1	2	3	4	5a*	Total
快	3-6	1.5	0.5	0.5-1	1.5	7-10.5
慢	12-24	3	1	1.5-2	2	19.5-32

*若採用 5b 之定序分析，此一步驟快者需 1.5 日，慢者需達 4 日。

表二、應用 PCR 鑑定作物害蟲相關方法所採用之實驗步驟；代號參考內文

步驟	方法	RAPD	Multiplex	AFLP	Microsatellite	RFLP	定序
1		○	○	○	○	○	○
2		○	○	○*	○	○	○
3		○	○	○**	○**	○	○
4						○	○
5a						○	
5b							○

*此一方法的 PCR 反應須執行兩次。

**應用 polyarramide 膠片分離 PCR 產物，所需時間約 6 小時(使用螢光引子)或 24 小時。

