

聚合酶連鎖反應(PCR) 在農業生物技術上之應用簡介

謝奉家 高穗生

前 言

核化連鎖反應的威力早在 1940 年代日本廣島上空便向世人展現過，並在反應爐中成為帶動核科學的原動力。如今生物界的 DNA 聚合酶連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction, 簡稱 PCR) 則在其 40 年後重新登場，在試管中幫助世人了解生命的奧秘。

PCR 是美國 Cetus 公司的 Kary Mullis 於 1983 年間所發明的一項新技術，它可以在很短的時間內，準確地在試管中將某一段特定的核酸序列進行量的放大，而使得原先可能才只有幾個 pg (picogram, 10^{-12} gram) 的 DNA，增加至 μg (microgram, 10^{-6} gram)，甚至到 mg (milligram, 10^{-3} gram)，此時不論是偵測或選殖 DNA 都較為容易。簡單而言，PCR 的原理，其實就是大家所熟悉的 DNA 聚合反應 (DNA polymerization)，它只是反覆地進行 DNA 的合成：從兩股 DNA 的變性 (denaturation)，引子的煉合 (annealing of primer)，及引子的延伸作用 (primer extension)，如此週而復始，就造成了產物以 2^n 的速率急速地增加；這也是為什麼 PCR 技術具有如此強大威力的原因。

正因為它能變少為多，PCR 自問世以來，已成為現代分子生物學的一個有用工具與重要里程碑，解決了不少從前很難解決或甚至不能解決的問題。Mullis 亦於 1993 年因此獲得諾貝爾化學獎。PCR 的應用範圍極廣，包括臨床醫學、遺傳疾病診斷、病毒感染偵測、農業改良、食品檢驗、法醫鑑定犯罪、環境科學與分子演化學等方面。15 年來隨著儀器及檢測方法的推陳出新，PCR 的應用幾乎無所不在。尤其在農業上的應用亦非常廣泛，從細菌、真菌、病毒之分析鑑定，植物病蟲害之防治，生物性農藥之發展，到種林植物育種，應用之巧妙似乎只受到想像力的限制。本篇將對 PCR 發展背景及在農業生物技術之應用作一簡單的介紹。

PCR 發展背景

1944 年 Avery 首先發現 DNA 帶有生物遺傳訊息且在生命科學扮演重要角色。幾十年來，分子生物學的進展突飛猛進，尤其從 1984 年 PCR 問世至

今，PCR 已從純粹研究技術轉化為 DNA 分析工具的利器。PCR 技術其實是非常簡單而直接，它的原理係仿照自然界 DNA 合成的步驟，只是加以自動化而已。基本上，這個技術主要包含三個步驟：DNA 變性，引子煉合與引子延伸作用，如是三個步驟完成一循環，再反覆進行 20~35 次。

生物體內控制 DNA 複製的條件相當複雜，所需的反應分子極多。DNA 每經複製一次後即由單股 DNA 歸回雙股 DNA，此時相對應之鹼基便以 A = T, G C 氫鍵結合而無法分開並導致不能繼續複製。若要將雙股 DNA 再變回單股，則需細胞核內的解股 (unwind) 酵素及單股 DNA 維持蛋白 (ssDNA-binding protein) 來達成。但在體外試管中，因無需顧慮高溫會使細胞致死，故可直接用高溫 (90 以上) 來使雙股之模板 (template) DNA 變為單股，惟此時仍需顧慮所用之 DNA 聚合酶會因高溫變性而失效，無法重覆利用。因為這個原因，試管複製 DNA 陷入兩難；不加熱，模板 DNA 無法變成單股，若加熱了，DNA 聚合酶又會變性。因此，1985 年 Mullis 最先報告的 PCR 論文中所提供的方法是：於每一次複製將模板 DNA 加熱分開成單股後就加一次新鮮 DNA 聚合酶，當時用的是由大腸桿菌 (*Escherichia coli.*) 中萃取純化之 DNA 聚合酶 (Mullis et al., 1985)。但是若想將複製次數增加至 20~30 次時，上述方法會變得繁瑣不堪，且因試管中變性之 DNA 聚合酶亦逐次增多，會妨礙 DNA 產品之產量。

但中國人的先前發現改變了上述兩難困境，現任教於明陽大學的錢嘉韻教授，早在 1976 年留美時即已報告了一項新發現 (Chien et al., 1976)：某種由美國黃石公園熱水溫泉所分離出的嗜熱細菌 (*Thermus aquaticus*, YT-1, Taq)，其 DNA 聚合酶具有耐高溫之特性。該篇論文後來被 Mullis 所在 Cetus 公司工作之 PCR 發展小組於 1988 年所採用，以嗜熱細菌之 DNA 聚合酶取代了先前所用之 *E. coli.* DNA 聚合酶。這項改變使得 PCR 反應，只需在第一個複製循環 (cycle) 加過一次 Taq DNA 聚合酶，即可連續複製 30 個循環以上，所得 DNA 片段保持異性比用 *E. coli.* 的酵素要好得多 (Saiki et al., 1988)。整個反應可使微量的 DNA 模板在 2~3 小時內，在一根試管中複製百萬倍以上。如此一來，PCR 變得既省力 (不需專人每二分鐘加一次酵素，要加 30 次)、省時又省錢 (酵素的用量為先前的 1/30)。尤其有了溫度循環機 (thermal cycler)，利用設計好的軟體，將 DNA 複製所需反應溫度升降之反覆動作達到自動化的地步，則更是簡化了所有的工作。

PCR 之應用

由於 PCR 技術的成功，使得傳統用以量化 DNA 的方法，例如 DNA 的選殖，細菌的培養與抽取質體 DNA 以用來大量純化某一特定 DNA 片段等之繁

複工作，現在均不復絕對需要。常常以 PCR 方法增幅(amplify)出來的產物即已非常乾淨，不需要進一步的純化；甚且可直接用以 DNA 選殖或做 DNA 定序。

以 PCR 為基礎的分析方法相當多，在此無法一一列舉，僅針對幾項常見代表性種類略加說明如下：

限制片段多樣性分析(Restriction Fragment Length Polymorphism, 簡稱 RFLP)，通常經過 PCR 增幅的 DNA 片段，以洋菜膠(1.8%~3%)進行電泳，再用螢光劑溴化乙錠(ethidium bromide)染色，照相，看看增幅 DNA 片段是否合於要求，RFLP 則再使用核醣限制酶如 EcoR、BamH 等，進行切割而判定(PCR-RFLP)。

隨機擴增 DNA 片段多態性(Random Amplified Polymorphic DNA，簡稱 RAPD)分析法，係利用 PCR 以隨機序列寡核 酸為引子(約 10 個核 酸)，以少量 DNA 為模板，隨機複製出多態性的 DNA 片段。由於此一隨機寡核 酸可以與模板 DNA 上許多區域產生接合，不同個體間的遺傳組成不同，隨機引子可以接合處不盡相同，因此複製出來的 DNA 片段也就不同，形成多態性遺傳標記，這些 DNA 多態性可作為品系、品種鑑定、個體間變異之指標及建立多種生物之基因圖譜。

另外反轉錄聚合酶連鎖反應(Reverse Transcription-PCR，簡稱 RT-PCR)，則是利用 RNA 來製備大量的 DNA。利用 RT-PCR 可以將 mRNA 經反轉錄後放大，用作探針(probe)或資料庫(library)。它也可以將 mRNA 定量，比較某基因在不同細胞的表現。此外，亦可作選殖(cloning)用。

多年來的發展，PCR 已廣泛應用於 DNA 序列分析、定點突變(site-directed mutagenesis)、重組基因的選殖與聯態性分析等等。

定點突變之應用

分子生物學提供定點突變(site-directed mutagenesis)的技術(Saiki et al., 1988)，原則上可以將已知基因上任何位置的核 酸替換、刪除或加入，對於分析基因、蛋白質之結構與功能關係非常有用。與傳統生體(in vivo)突變方法相較，利用 PCR 可使定點突變的操作更迅速且得心應手，在數小時之內即可產生大量的突變質體(plasmid)供研究所需(Adamec et al., 1999)。

目前以 PCR 為基礎的定點突變技術已廣泛應用於細菌、真菌與植物等之酵素蛋白質功能探討(Nadin et al., 1998; Cherry et al., 1999)。

細菌特定基因之鑑定與選殖

利用蘇力菌(*Bacillus thuringiensis*)製成生物殺蟲劑，防治農業害蟲的歷史已超過 30 年(Feitlson,1993)，該菌因具高度專一性，少量施用即能達到防治目的，且對非目標的生物影響甚微之優點，是目前市售微生物殺蟲劑中，最常見之種類。蘇力菌的分佈範圍很廣，可以自罹病昆蟲和其棲所，倉儲產品，土壤及某些落葉和針葉樹的葉片上分離出來。為能獲得毒性強、殺蟲範圍廣的品系，長久以來一直需耗費大量人力與時間來分離與鑑定為數眾多的蘇力菌株，但藉由 PCR 來進行篩選工作，顯然較血清型的鑑定、核酸雜交(DNA hybridization)、酵素聯結免疫吸附劑鑑定法(ELISA)與昆蟲生物活性測試等傳統方法來得省時省力。

PCR 可利用來鑑定和選殖蘇力菌新穎(novel)殺蟲結晶基因，因 PCR 可迅速決定一標的(target)的 DNA 序列是否存在(Saiki et al.,1988)，此法非常靈敏，少量的 DNA 即可分析，尤其在很短的時間可分析大量的樣品。

Carozzi et al.(1991)設計出能分辨出 cry1, cry3 和 cry4 基因的引子，這些基因分別對鱗翅目、鞘翅目和雙翅目有殺蟲效果，且經由 PCR 所預測蘇力菌品系之殺蟲效果與生物鑑定結果相符合。Kalman et al.(1993)並設計 8 個 forward 引子和 2 個 reverse 引子，用以鑑定 cry1 基因 Bourque et al.(1993)設計 5 個引子並利用多層次 PCR (multiplex PCR) 來快速鑑定與分類蘇力菌品系。但上述各項 PCR 之主要缺點在於限制只能偵測已知核酸序列的蘇力菌品系，所以 Kuo and Chak(1996)利用限制片段多樣性分析法來分析 PCR 所增幅的 DNA 被核酸限制酶切割後之圖譜，鑑定蘇力菌 cry-type 新穎基因。而 Frutos et al.(1997)則以 exclusive PCR (E-PCR) 之二步驟設計來突破限制，成功應用於 cry1 新穎基因的偵測工作。

利用 PCR 與重組 DNA 技術可進行蘇力菌的品系改善(Crickmore, 1990)，本所亦有成功案例(曾,1997)。此外，PCR 尚可結合遺傳工程技術將蘇力菌的殺蟲基因轉殖到菸草、番茄(Perlak et al.,1991)、馬鈴薯(Vaeck et al.,1989)、甘藍(張,1997)等作物上，使其成為具有殺蟲活性之轉殖作物。國內的中興大學陳良築教授已成功將蘇力菌的殺蟲基因經由腫瘤農桿菌轉入菸草染色體中(陳,1993)，並具有相當殺蟲效果(高,1993)。

真菌菌株間之親緣關係鑑定

達爾文 DNA 片段多態性分析法，為一快速、簡便、效率高之生物品系分類與鑑別方法(Williams,1990)，此項線象性分析技術已廣泛應用於不同種細菌基因組之辨別(Welsh et al.,1990; Stetten et al.,1998)，並運用於真菌菌株間之親緣關係鑑定。利用 PCR-RFLP、RAPD-PCR 及部份 16S rRNA 基因定序分析，有助了解菌種之差異性並進行菌種鑑定及基因庫之建

立。

病毒的鑑定

病毒種類的鑑定與實驗室診斷方法的改進，對疾病的診療和病毒流行病學都有參考的價值。以往用免疫方法鑑定細胞培養增殖的病毒，常常費時甚久，不合乎快速鑑定診斷的要求。如今利用 PCR 可使特定的病毒基因在 2-4 小時增幅達百萬倍以上，而易於測知，並提供新的快速、靈敏的病毒檢驗方法。

昆蟲病毒中的柎狀病毒(baculovirus)，由於對特定寄主有極高的致病力與專一性，對人、畜及天敵均無害，適合做為生物性殺蟲劑，因此利用噴灑柎狀病毒來防治農業害蟲成功的例子相當多。核多角體病毒(nuclear polyhedrosis virus, NPV)屬於柎狀病毒，對鱗翅目、雙翅目、膜翅目及鞘翅目等農業害蟲有致死力。目前已成功利用病毒多角體蛋白質基因高保守序列之引子組(polh primer)，對核多角體病毒核殼進行 PCR，以增幅多角體蛋白質基因做為感染核多角體病毒之診斷依據(Leu, 1996)。

尤其 PCR-RFLP 分析方法不僅可利用於昆蟲核多角體病毒之偵測與鑑定，亦可應用於流行疫病學之研究。

動植物育種與分類

動物的體外受精及胚胎操作技術快速發展以來，在胚胎時期如何準確的決定性別已成為一個很重要的課題。雖然藉著血液學方面之分析可以得到答案，但無疑的，PCR 提供了一個更簡捷的方法。例如在動物染色體 Y 上有 ZFY 基因，在染色體 X 上則有另一構造相似之 ZFX 基因，二者間有部份極為相似之 DNA 序列。設計適當之引子，可有效區分 ZFY 與 ZFX(Acsen et al., 1990)。利用 PCR 得到人、牛、羊等動物雌雄兩性的相關 DNA，經過 RFLP 可以區分兩性之差異，比如說牛的 ZFY 上有一個 Pst 切位而 ZFX 則無。這類研究之成果已運用到牛隻育種。為了提高乳品產量，在乳牛育種時很需要在胚胎移植前確定性別，以免徒勞無功。此外，同樣的技術亦可用於人類，以排除一些與性別有關的遺傳性疾病。

植物經由遺傳工程改變基因，以合成其它具有新特性之蛋白質，此種藉由基因轉殖改善農作物，是植物保護的目標之一。基因轉殖的研究會受到支持的原因主要為：一、可產生傳統育種所無法育成的有用性狀，二、矯正作物缺陷的效率比傳統育種高，三、在作物改良後，使投資者更有機會獲取商業利益；目前的研究已經證實了第一項優點，許多基因轉殖技術

都能成功的使性狀變致改良，例如抗病毒、抗蟲、抗除草劑、抗採後萎凋，以及一些經分子層次修飾後，變得更有利用價值的貯藏性物質，當然這些例子中，有些新產生的性狀是傳統育種的基因庫中所欠缺的(Birch, 1997)。

在農作物研究領域，如何確認植物品種的差異，亦是項重要課題。近年 PCR 技術已用來解決傳統植物形態分類比較之缺點，因為 PCR 不但可提高解析力，資料亦能客觀分析，而且在植物任何發育階段都可測試，節省大量人力物力 (Morell et al., 1995)。

在植物育種方面，番茄已利用 RAPD 方法選殖出抗病基因 (Martin et al., 1991)。在家畜與家禽方面，牛 (Kantanen et al., 1995)、馬 (Bailey et al., 1994)、羊 (Kantanen et al., 1995) 與雞 (Plotsky et al., 1995; 劉, 1999) 已應用 RAPD 分析遺傳變異與基因定位等研究。

結 論

PCR 技術已由本所生物藥劑系成功的應用於本土生物性農藥之發展，至目前為止，包括運用在臺灣本土性蘇力菌新穎殺蟲基因之鑑定與選殖 (高等, 1996; 曾, 1997)，白殭菌菌株間之親緣關係鑑定 (高等, 1999)，玉米穗蟲、甜菜夜蛾、斜紋夜蛾的核多角體病毒鑑定 (段等, 1998; 靳等, 1999) 等多項植物病蟲害防治之研究計畫，並獲致相當成果。

值得注意與了解的是，PCR 雖有其優點亦有其缺點。PCR 的優點：可大量增補檢品中 DNA，以彌補樣品不足的顧慮，需要樣品量可大為減少；檢驗時程可大為縮短，數小時內，即可完成檢驗。PCR 的缺點：因 PCR 需將檢品中之 DNA 大量增幅，微量污染即可能造成檢驗失敗或誤判，如偽陽性 (false positive)，因此在取樣與檢驗時，必需絕對避免污染。

綜上所述，PCR 在分子生物的領域確實帶來不少的震撼和影響；更重要的是它大大地加速了我們研究的腳步。因此，對 PCR 的了解，除可提高靈敏度及降低工作的困難性之外，將有助於我們更加有效率、正確而妥善應用此項技術並促進農業生物防治發展。

總之，PCR 在農業生物防治之應用實例，多得不勝枚舉，期待吾人能有效地利用本地微生物資源開發嶄新的微生物農劑或基因轉殖作物，以更有效地進行害蟲綜合防治，造福農民，嘉惠消費者。