

農業用微生物資材之基因型鑑定技術開發 —脈衝式電泳法

文 / 農業藥物毒物試驗所 謝奉家

壹.前言

生物農藥中的微生物農藥包含細菌、真菌、昆蟲病毒及原生動物等。國內已有2株枯草桿菌 (*Bacillus subtilis*) (菌株編號分別為Y1336與WG6-14) 取得農藥許可證並有7項枯草桿菌農藥成品上市。行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所(藥毒所)、高雄區農業改良場、苗栗區農業改良場、臺中區農業改良場及中興大學與高雄師範大學等單位,近年來亦篩選獲得不少株枯草桿菌或液化澱粉芽孢桿菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*), 預計未來2年將陸續商品化。

有關鑑定技術目前農業研究單位與大專院校只能到「菌種」(species)層級,未能準確鑑定到「菌株」(strains或isolates)層級,未來仍欠缺對屬於相同菌種但不同菌株的驗證技術。各縣市政府農業局或檢調單位,每年會不定期抽查市面微生物農藥產品送交藥毒所檢測,若能建立鑑定到「菌株」層級的技術與標準程序,將可以明確區分是否有偽藥或摻雜已知商品菌株的案件,協助提升微生物農藥之智慧財產保護及產品市場管理的專業證據強度。藥毒所已於2014年初步應用脈衝式電泳

分析方法(Pulsed field gel electrophoresis, PFGE)建立菌株鑑定技術,將繼續積極爭取經費進行設備升級與方法評估,預計未來成果可做為微生物農藥管理與抽驗市售微生物(細菌、真菌與昆蟲病毒等)商品的重要查驗佐證技術參考。

貳.脈衝式電泳分析方法的前人研究概況

脈衝式膠體電泳(PFGE)技術是20世紀80年代中期所發展出來的分子分型(molecular typing)或基因型鑑定(genotype classification)技術。同種的不同個體必須利用分型法來加以分型。分型法需要高度的鑑別能力,可清楚區分出不相關的菌株,例如來自相同來源但不同地區者。脈衝式膠體電泳分析方法的基本原理是藉週期性改變電場,而使包埋在瓊脂凝膠中的DNA分子的泳動方向做相應改變,可以分離大小從10kb到10Mb的DNA分子。脈衝式電泳分析方法,一般是一次可分析10個樣品,但未來可升級同時分析40樣品或以上,縮短案件平均鑑定時間,提升鑑定效率。根據文獻報告,脈衝式電泳分析技術被認為是最具區別效力的分子



分型法，許多研究顯示使用脈衝式電泳分析方法具有較佳的擴充性（可利用600種以上不同的限制酵素restriction enzyme來擴充）、公信力（國內的疾病管制署與歐美衛生單位皆已採用做為流行病學的佐證）、分型效力、穩定性及再現性（reproducibility），尤其酵素切割的種類與條件屬於關鍵技術，國內應該開始規劃建立系列性的農用微生物DNA圖譜資料庫。

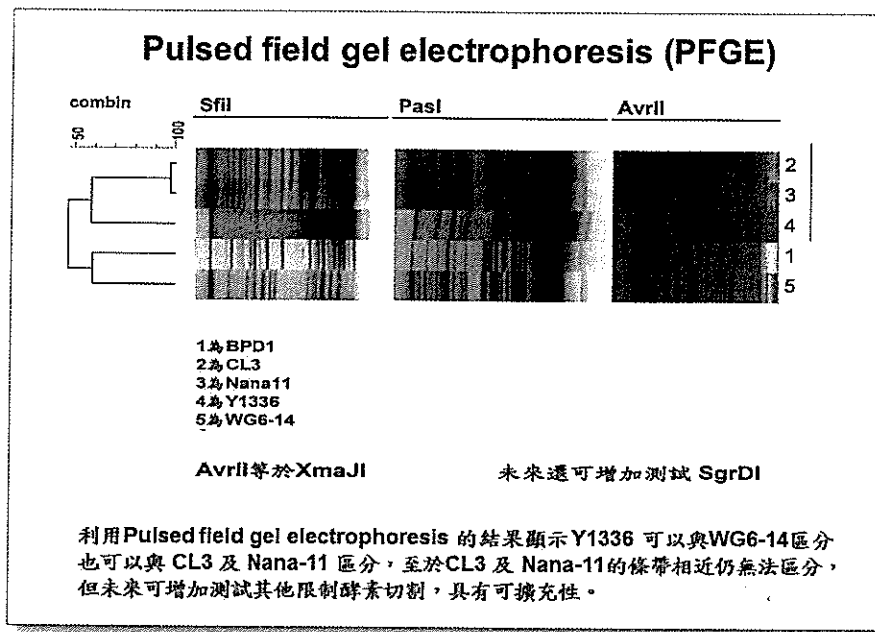
美國疾病管制局食因性（foodborne）病原菌實驗室的分子分型即時監測網（The PulseNet USA），採用脈衝式電泳技術建立各菌株的核酸指紋圖譜，並比對從各州的食物中毒患者和疑似污染食物所分離菌株的核酸指紋圖譜，可以分析核酸指紋圖譜系是否為同源的分子型。1995年美國疾病管制局及美國公共衛生實驗室學會（Association of Public Health Laboratories；APHL）的研究人員共同合作，建立對腸出血性大腸桿菌O157:H7脈衝式電泳技術的標準作業程序，並由華盛頓州、德州、麻薩諸塞州和明尼蘇達州等四州衛生廳公共衛生實驗室執行，此即為食因性病原菌實驗室分子分型計畫的雛型。1996年擴展到有10間公共衛生實驗室參與此項計畫，至2000年便已成為國家級計畫（PulseNet USA），除了美國疾病管制局及各州政府公共衛生實驗室參與外，尚包括美國農業部的食品安全及檢驗實驗室、美國農業部的獸醫中心及美國食品藥物檢驗局的實驗室。PulseNet的運作模式是區域負責實驗室（如華盛頓州公共衛生實驗室），將負責區內的所有實驗室分離到的菌株集中，經由脈衝式電泳後可以獲得DNA指紋圖譜，實驗室技術人員再將DNA指紋圖譜利用電子郵件傳送到疾病管制局的資料庫中心，資料庫中心有專人負責進行比對分

析，若發現有相同圖譜之菌株，立即通知各州公共衛生單位進行調查，疾病管制局流行病學專家也會視需要性，趕往當地協助調查。

脈衝式電泳分析方法為國際承認的方法，由美國疾病管制局主導，PulseNet International全球已有80個國家參與，包括：奧地利、比利時、保加利亞、塞浦路斯、捷克、丹麥、英格蘭、蘇格蘭、愛爾蘭、芬蘭、法國、德國、希臘、匈牙利、冰島、義大利、盧森堡、挪威、波蘭、葡萄牙、西班牙、羅馬尼亞、瑞士、瑞典、荷蘭、香港、中國大陸、韓國、日本、印度、澳洲、紐西蘭、馬來西亞、菲律賓、泰國、越南、孟加拉、巴西、阿根廷、玻利維亞、智利、哥倫比亞、哥斯大黎加、墨西哥、尼加拉瓜、巴拉圭、秘魯、烏拉圭、委內瑞拉和臺灣等。

參.建立農用微生物的基因型鑑定技術

國內衛生福利部疾病管制署、衛生福利部食品藥物管理署、國家衛生研究院、榮民總醫院及行政院農業委員會家畜衛生試驗所等單位，已購置脈衝式電泳分析設備。衛生疾病管制領域使用率已經很普遍，惟國內農業單位目前尚未積極運用脈衝式電泳分析技術在生物農藥與微生物肥料的微生物鑑定。生物農藥與微生物肥料相關菌種在strains或isolates的菌株區分鑑定技術遇到瓶頸，例如枯草桿菌或液化澱粉芽孢桿菌等，雖然有些菌株研發人宣稱找到某些菌株的特定基因片段，但細菌或真菌在strains或isolates的基因層次鑑定技術上，大多缺乏「標準化」與「可重複性高」的方法。為了提升與評估脈衝式電泳分析技術在農業用菌種管理上的應用性及智慧財產保護能力，藥毒所已於2014年初步應用脈衝式電泳分析方



▲脈衝式電泳分析的圖譜案例

法建立菌株鑑定技術（圖），顯示細菌之染色體經酵素切割與電泳之後所產生的DNA指紋圖譜（PFGE patterns），可作為分析菌株間親源關係之依據，分離株的基因體切割圖譜也可進一步有效應用於相似性或同源性的比較。

肆. 結語與未來展望

國內的疾病管制署與歐美衛生單位皆已採用脈衝式電泳分析技術做為流行病學的佐證，本技術不僅適用於細菌，未來也可用於真菌與昆蟲病毒等，但國內尚無農業研究機構利用脈衝式電泳進行微生物農藥的鑑定評估。一般而言，即使微生物發生繼代的變異或產品發酵程序的差異，導致生物活性物質的質量產生變化等，只要原因來自於基因層次的變異，都可以利用脈衝式電泳技術甚至全基因體序列（whole genome sequences）進行分辨。但若是培養配方或條件的差異造成生物活性物質改變，則必須增加使用其它分析技術（蛋白質

體學或代謝體學）進行分辨。延伸應用脈衝式電泳分析技術在農用微生物領域，有機會如同本會茶業改良場建立茶葉原產地檢驗技術，未雨綢繆，提前建立國內領先的檢測技術，協助解決未來可能發生的市場產品爭議與農政管理瓶頸。藥毒所技術開發團隊的近期目標為建立生物農藥菌株的鑑定評估標準程序，進一步確認精準度後，公告檢驗方法，明確區分市售枯草桿菌、藥毒所所技轉菌株、其他研發機構技轉的枯草桿菌或液化澱粉芽孢桿菌等不同菌株；中期目標為明確區分真菌（例如白癩菌、木黴菌）與昆蟲病毒類的微生物製劑；長期目標為提升民眾對於政府檢測技術的信心，增加廠商投入研發與產業化的意願，並杜絕菌株盜用、侵權及仿冒，增進國內生物農藥與微生物肥料管理效能。④