

# 生物晶片在防疫檢疫害蟲鑑定上之應用

路光暉

國立中興大學 昆蟲學系

## 前言

檢疫害蟲的鑑定，過去多僅採用形態鑑定，藉由鑑別形態上特有的性徵構造，以判別害蟲的種類。雖然此法仍為昆蟲鑑定的主要且根本的方法，但為求貨品快速通關之效，逐漸地，檢疫害蟲的鑑定也需求取”快速”。由於形態鑑定屬專門技術，非一般工作人員能夠勝任，再者有時區別特徵的異同並不容易，要求其快速，有時實非易事。近年來國內部份昆蟲學者，在行政院農業委員會動植物防疫檢疫局支助下，開發了許多鑑定檢疫害蟲種類的 DNA 標誌 (DNA marker)，可以利用簡單的 PCR 方式快速檢測出害蟲種類，如蝸蟬(1)、潛蠅(2)、介殼蟲(3, 4)、薊馬(5)、蠹蛾(6)和果實蠅(7)等等。如果開發的引子 (primer) 正確的話，利用簡單的 PCR 反應確實可以達到「快速鑑定」的目的，但是若檢測結果並非該等引子所能區辨的蟲種時，則必須再試其他種 PCR 引子，如此重複則會增加許多時間，甚或仍無法獲致確定的鑑定結果。克服此一缺失的方法，則在於開發能一次篩檢多種蟲種的方法，而生物晶片 (biochip) 應具有此方面的應用潛能。

## 生物晶片的種類與基本原理

「生物晶片」一詞源於 1980 年代，主要是應用生物分子於電腦晶片上，但事實上它和半導體所使用的矽晶片是完全不同的。目前大家所討論的生物晶片是將生物材料，如 DNA 或蛋白質，藉由機械以陣列 (array) 形式密集點佈在固體材質 (例如載玻片) 上，由於玻片上的點陣列密度通常都非常的高，也因此常將之稱為微陣列 (microarray)。Microarray 技術可同步快速地進行大量生化感測與反應，可用以檢測蛋白質、核酸或組織等生物或醫學檢體，現已被廣泛應用在基因體學 (genomics)、藥劑開發 (drug discovery) 和毒理學 (toxicology) 等相關的研究與應用。

生物晶片的種類發展上可分為 cDNA 晶片 (complementary DNA chip)、寡核苷酸晶片 (oligonucleotide chip)、蛋白質晶片 (protein chip) 和

微實驗室晶片 (lab-on-a-chip) 等。其中又以 cDNA 與寡核苷酸晶片發展較為精進，這兩種通稱為 DNA 晶片 (DNA chip)，本文即以此為例介紹它的原理與未來在害蟲診斷鑑定上的應用；由於 RNA 在晶片分析上的概念及方法與 DNA 略有不同，也非害蟲檢定上所欲應用者，因此本文將之忽略不談。

DNA 晶片應用上所依據的原理，基本上就是藉助 DNA 兩互補股 (complementary strands) 之間會相互配對黏合的特性；再加上，此 DNA 兩互補股間的結合具有序列專一性，因此可藉此判別彼此之間的相關性。應用 DNA 晶片做檢測工作之 DNA，主要可分為兩部分：一、點佈在晶片上的 DNA：通常我們將它稱之為探針 DNA (probe DNA)，它是利用不同方法將已知序列的單股 DNA 序列合成或固定在晶片上(8, 9)；二、受檢測之檢體 DNA：通常將其稱之為標的 DNA (target DNA)。

當進行 DNA 晶片分析時，多數其況下會先將 target DNA 在萃取之後，進行 PCR 增幅反應，一方面藉以增加 DNA 的數目以增加敏感度，另一方面則在於藉以步驟將 target DNA 標定上螢光或其他呈色反應物，使之在與 probe DNA 結合後，可以藉呈色觀察其結合的位置，亦由此判定 target DNA 為何。

若欲進一步了解有關 DNA 晶片的原理與應用，可參考 Lockhart 等人 (1996)、Gerhold 等人(1999)、Lipshutz 等人(1999)、Southern 等人(1999)、Epstein 與 Butow (2000) 和 Tillib 與 Mirzabekov (2001) 等之論述(10-15)。

## 生物晶片應用於檢疫害蟲診斷鑑定上之構想

為何會使用 DNA 晶片於檢疫害蟲的診斷鑑定上呢？主要是希望藉助於 DNA 晶片可以一次同時篩檢多種不同種類的害蟲，或許更容易判定害蟲的種類。如同前言中所述，利用 PCR 反應已是目前積極開發的快速鑑定方法，但此法有其限制，現就以筆者所開發的蘋果蠹蛾 (*Cydia pomonella*) 專一性引子為例說明之。民國 91 年 11 月防檢局高雄分局自美國進口的蘋果中檢出疑似蘋果蠹蛾的鱗翅目幼蟲，經利用 PCR 鑑定結果顯示該檢體 DNA 均可經 PCR 增幅出與對照 DNA (蘋果蠹蛾) 相同的 DNA 條帶 (圖一 A)，同時亦經形態鑑定，最後將其判定其為蘋果蠹蛾(6)；反之，假如 PCR 反應無法增幅出與對照 DNA 相同條帶時 (如圖一 B；93 年 9 月防檢局基隆分局與高雄分局自進口油桃中檢出)，則此結果僅能告知此檢體並非蘋果蠹蛾。至於是哪種蟲呢？單從此 PCR 結果，並無以知曉。

但是，若能將不同檢疫害蟲的特定 DNA 標誌，製備成具有”種”專一性探針並點佈在同一個 DNA 晶片，或許可以彌補上述之不足。如圖二中所示，若將不同的 DNA 探針點佈在不同的「縱行」(如圖二 A~G)，而將同一種蟲體不同標誌 DNA 之探針點佈在不同的「橫列」(如圖二 1~5)。當檢體 DNA (即 target DNA) 與之進行雜合後，經清洗未結合 DNA 與呈色反應之後，可藉由顯色的位置判讀檢體應為何種害蟲。例如圖二左下圖之結果顯示，target DNA 僅與 A 之 probe DNA 結合，故而可判定檢體為 A 害蟲；同樣地，右下圖則可判定為 E 害蟲。

由於現今的 DNA 晶片製作技術，可以在一片小小的玻片上點佈上成千上萬點的不同探針 DNA，因此如果我們能夠得到大多數檢疫害蟲的 DNA 標誌，將可輕易地將這些標誌製備於同一個 DNA 晶片上，也就是說將可以經由一次的反應，即可篩檢大多數列名的害蟲種類而判讀得結果。同時，DNA 晶片具有快速、精確和敏感度高等特性，再加上所需檢體 DNA 樣本極少的優點。基於此，筆者認為 DNA 晶片未來應極適宜應用於檢疫害蟲的”快速”診斷鑑定。

## 結語

在醫學上，DNA 晶片用於檢驗基因突變或是組織癌化等 DNA 變化的技術愈來愈成熟，且也逐漸地有商品化的晶片製造可供利用；本文撰寫期間，筆者曾搜尋許多參考文獻，多屬與醫學有關。至於有關生物種類鑑定上的應用，則多數將之用於微生物種類的鑑別(16-18)。雖也有學者應用 DNA 晶片技術於昆蟲研究上，但均是著重於生理與基因表現調控之相關研究；截至目前為止，並未見任何一篇將 DNA 晶片技術應用於昆蟲鑑定上的報告。其原因為何？是不是此法不適用？抑或是有許多問題尚未解決呢？這些問題則仍有待釐清。

## 誌謝

本研究獲行政院農業委員會動植物防疫檢疫局經費補助(93 農科-1.9.1-檢-B2)，謹誌謝忱。

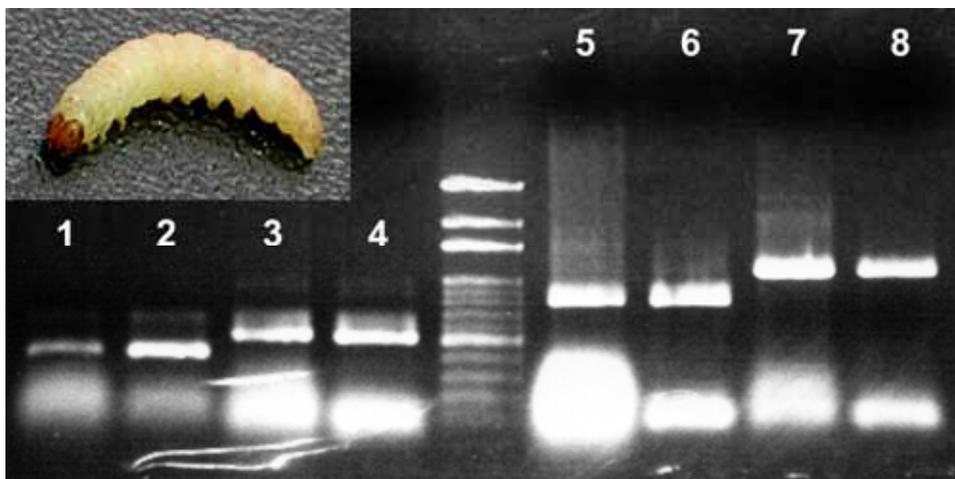
## 參考文獻

1. Yeh, W.-B., Ho, C.-L., Hui, C.-F. & Ho, C.-C. (2000) *Chinese J. Entomol.* **20**, 335-345 (in Chinese).
2. Chiu, Y.-C., Wu, W.-J., Shiao, S.-F. & Shih, C.-J. (2000) *Chinese J. Entomol.* **20**, 293-309 (in Chinese).
3. Chiu, Y.-C., Wu, W.-J. & Shih, C.-J. (2001) *Formosan Entomol.* **21**, 365-375 (in Chinese).
4. Chiu, Y.-C., Wu, W.-J., Wong, C.-Y., Chen, S.-P. & Shih, C.-J. (2004) *Formosan Entomol.* **24**, 159-171 (in Chinese).
5. Lin, J.-S. & Yeh, W.-B. (2003) *Formosan Entomol.* **23**, 353-366 (in Chinese).
6. Lu, K.-H., Chang, S.-C., Hsu, J.-Y. & Yang, J.-T. (2003) *Plant Prot. Bull.* **45**, 359-364 (in Chinese).
7. Lu, K.-H., Chang, C.-M., Chen, C.-Y. & Chen, Y.-J. (2002) *Plant Prot. Bull.* **44**, 255-265 (in Chinese).
8. Pease, A. C., Solas, D., Sullivan, E. J., Cronin, M. T., Holmes, C. P. & Fodor, P. A. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 5022-5026.
9. Schena, M., Shalon, D., Davis, R. W. & Brown, P. O. (1995) *Science* **270**, 467-470.
10. Lockhart, D. J., Dong, H., Byrne, M. C., Follettie, M. T., Gallo, M. V., Chee, M. S., Mittmann, M., Wang, C., Kobayashi, M., Horton, H. & Brown, E. L. (1996) *Nat. Biotechnol.* **14**, 1675-1680.
11. Epstein, C. B. & Butow, R. A. (2000) *Curr. Opin. Biotechnol.* **11**, 36-41.
12. Gerhold, D., Rushmore, T. & Caskey, C. T. (1999) *Trends Biochem. Sci.* **24**, 168-173.
13. Lipshutz, R. J., Fodor, S. P. A., Gingeras, T. R. & Lockhart, D. J. (1999) *Nat. Genet. Suppl.* **21**, 20-24.
14. Southern, E., Mir, K. & Shchepinov, M. (1999) *Nat. Genet. Suppl.* **21**, 5-9.
15. Tillib, S. V. & Mirzabekov, A. D. (2001) *Curr. Opin. Biotechnol.* **12**, 53-58.
16. Al-Khaldi, S. F., Villanueva, D. & Chizhikov, V. (2003) *Int. J. Food Microbiol.* **91**, 289-296.
17. Call, D. R., Brockman, F. J. & Chandler, D. P. (2001) *Int. J. Food Microbiol.*

**67**, 71-80.

18. Chizhikov, V., Rasooly, A., Chumakov, K. & Levy, D. D. (2001) *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 3258-3263.

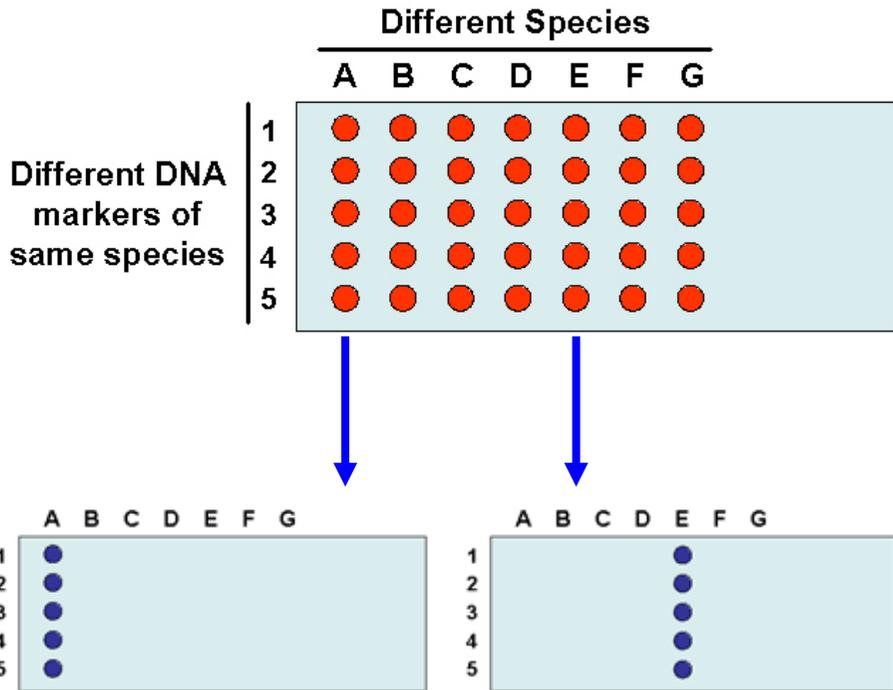
(A)



(B)



圖一、利用蘋果蠹蛾 (*Cydia pomonella*) 專一性引子檢測疑似蘋果蠹蛾蟲體之 PCR 圖譜。(A) 進口蘋果檢出之蟲體 (左上角)，經 PCR 增幅後均可放大與對照組 (蘋果蠹蛾) 相同大小的 DNA 條帶；(B) 採自進口油桃之蟲體 (左上角)，經 PCR 增幅後未見與對照組相同之 DNA 條帶。圖中之 1、3、5 與 7 為蘋果蠹蛾 DNA 增幅結果，2、4、6 與 8 為檢體 DNA 增幅結果。



圖二、害蟲診斷鑑定 DNA 晶片示意圖。上圖：各圓點代表被點佈在玻片上的特定 DNA 探針 (probe)，A~G 分別代表不同害蟲種類，而 1~5 表示同種害蟲之不同 DNA 標誌 (DNA marker)。下圖顯示兩個檢測結果的例子，若受檢測的檢體 DNA (即標的 DNA，target DNA) 與探針 DNA 雜合及顯色之後，呈色反應若僅呈現於 A (下左)，則判定為 A 種害蟲；若呈現於 E (下右)，則為 E 種害蟲，依此類推。