

## 蘋果蠹蛾 PCR 檢驗試劑組之介紹

路光暉\* 陳熾后 吳明城

國立中興大學 昆蟲學系

(\*E-mail: [khlu@dragon.nchu.edu.tw](mailto:khlu@dragon.nchu.edu.tw))

### 前 言

由於國際貿易的發達與客運的頻繁，境外害蟲隨之移入的機會亦隨之提高。我國自加入世界貿易組織（World Trade Organization; WTO）以來，與國際間的農產品貿易逐年急遽上升，更形增加外來害蟲隨著各式進口農產品而入侵的機會。為有效加強與提高防檢疫的工作效能，如何快速鑑定農作物及其產品中所夾雜的害蟲種類，儼然已成為一重要課題。

檢疫害蟲之鑑定，長久以來，多是依據昆蟲的外部形態特徵。由於昆蟲外部形態特徵大多需由有經驗的鑑識人員加以判定，對於港口與機場的檢疫人員是一項困難的工作。有時農產品中被發現的害蟲僅剩一些殘肢碎片，缺乏足夠的外部特徵可供種類鑑定；亦或是，當檢疫害蟲為卵、幼蟲或蛹等較難由外觀鑑定的時期，往往會使種類鑑定工作更為困難，有時甚至需將其飼育至成蟲方得以鑑定，一旦如此便喪失了檢疫的時效，容易造成貿易的紛爭與損失。為了掌握檢疫時效及確保貨品的經濟利益，必須開發出速度快、準確性高、操作簡易，而且適用於各個生長階段及不同蟲體部位的鑑定技術。為了講求效率與準確性，利用分子生物學技術，尋求以 DNA 層面來鑑定害蟲種類的方法已行然形成。

自 89 年起，在動植物防疫檢疫局經費補助下，本研究室開始從事利用分子生物學技術開發快速鑑定檢疫害蟲之相關研究，而於 91 年開始執行利用 PCR 快速鑑定蘋果蠹蛾（*Cydia pomonella*）之技術開發，期間以逢機增幅核酸多形性－聚合酶連鎖反應（random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction, RAPD）為基礎，開發與篩選具種專一性（species-specific）之 PCR 引子對；經多次的選汰，最後開發得五組對蘋果蠹蛾具有專一性之引子對。此五對引子首次於 92 年底被實際應用於鑑定檢出自美國進口蘋果之檢體，經由形態鑑定與本 PCR 引子增幅反應，確認為蘋果蠹蛾（Lu et al., 2003）。爾後，本 PCR 檢測方法即被正式與形態鑑定方法共同應用於蘋果蠹蛾的鑑定工作上。截至目前（96 年）為止，本研究室已接受防檢局送交進行 PCR 鑑定的鱗翅目害蟲檢體之總件數為 78 件，其

中有 13 件經本 PCR 快速鑑定方式被確認為蘋果蠹蛾，也因此先後禁止包括美國、紐西蘭與智利等三個國家的蘋果進口，對於防堵蘋果蠹蛾的入侵成效顯著。

如上所述，本研究室已可利用 PCR 方法快速檢測蘋果蠹蛾，然而在時效上卻因必須將檢體從檢疫單位（如基隆或高雄兩大主要水果進口港）派專人或以快遞送至本研究室（台中），方能執行 DNA 鑑定工作；此兩地間遞送所耗費的時間卻成為「快速鑑定」的主要瓶頸，根本解決遞送時間耽擱之道，即是在各檢疫單位現場進行 PCR 檢測。因此，本研究室進一步將此檢測方法開發成試劑套組，將所需反應試劑預先混合，並建立標準操作步驟，以提供一套簡便、穩定與精確的反應試劑組，以方便現場檢疫人員使用，藉以克服鑑定時程上的延宕，爭取其時效性。

目前國內各檢疫分局或港口檢疫站均已設立實驗室，備有進行 PCR 反應所需之基本設備，且部分檢疫人員亦具操作能力，足以自行使用本試劑組。本文內容主要在介紹本試劑組的組成與操作方法，並提供現場檢疫人員操作之標準流程，以作為使用上的參考依據。

## PCR 檢驗試劑組之組成與使用

### （一） 試劑套組的組成

本試劑組是委託生技公司代工，藉助其無塵防菌設備配製生產各 PCR 反應試劑，並將整組真空密封包裝於鋁箔袋內，防止污染以確保其品質（圖一左）。每一套組內含以 PCR 檢驗一隻蟲體所需之所有試劑，共 17 個小試管；除一管內裝 Taq 聚合酶（管蓋上印有 Tq 者）外，其餘 16 管均內含 25  $\mu$ l PCR 反應之基本試劑（如核苷酸、緩衝液、PCR 引子等）（圖一右），供檢測蟲體與對照用。如圖一右所示，圖之右上方有一蓋面標示 C 者，試液中內含一組通用引子（universal primer），此引子對任何蟲體 DNA 均具增幅效果，亦即無論害蟲種類只要存在 DNA 樣本即可被增幅特定 DNA 片段，藉以監測檢體 DNA 品質是否良好。其餘 15 管又再分三組，每組 5 管，各試管蓋上所標示的數字 1~5，分別代表內含本研究室一直沿用於鑑定蘋果蠹蛾之五組不同的專一性引子，數字相同之試管內含相同的引子對。T 組內不含任何模板 DNA，係供分析樣本 DNA 之用，使用者只需加入檢體 DNA 即可；P 組內含蘋果蠹蛾標準模板 DNA，供作正對照組，亦即若檢體 DNA 若為蘋果蠹蛾，則其所增幅得之 DNA 片段大小均會與其相對應之正對照 DNA



圖一、蘋果蠹蛾 PCR 檢驗試劑組。試劑組之外觀與內容物（左）；PCR 試劑組之反應試劑管（右）。右圖試管蓋上的標示分別為：T1~5（白色管）為五組不同之樣本測試組；P1~5（藍色管）為五組相對應的正對照組；N1~5（黃色管）為五組相對應的負對照組；C（粉紅管）為內對照組。

片段大小相同，據此以判斷檢體是否為蘋果蠹蛾；至於 N 組試劑內則不含任何模板 DNA，用於做為負對照組，若其被增幅出 DNA 片段，表示本組試劑可能已受到外來 DNA 污染，當判定所得結果時應特別小心，最好是重做。

## （二） 試劑套組之操作流程

使用本試劑組鑑定檢體是否為蘋果蠹蛾時，僅需取出所有試劑試管，依照附在試劑組中之操作手冊（圖二）按步驟操作即可。此操作手冊中所敘述的各項 PCR 操作步驟均係經本研究室實際測試後制定的，具有相當的穩定性，不致因操作者與設備的不同而產生明顯的差異；但使用上仍有下列事項需要注意的—

1. 由於本試劑組並未含 DNA 萃取試劑，因此進行鑑定時必須先使用一般常用的 DNA 萃取方法純化檢體 DNA，接著再依說明書內建議量進行 PCR 反應。
2. 由於本反應試劑中並未內含 Taq 聚合酶，各試管必須另行加入定量的 Taq。在操作此過程（圖二 步驟 2.2.4）必須盡量避免 DNA 的汙染，以免影響結果，故建議先將 Taq 加入最怕汙染的負對照組（N 組），之後再加入樣本測試組（T 組），因為正對照組中以含有蘋果蠹蛾標準模板 DNA，最需避免造成另兩組的汙染而產生偽正反應的結果，因此最後再將 Taq 加入此組。

## （三） 結果分析與判讀

## 蘋果蠹蛾 (*Cydia pomonella*) 分生檢測試劑套組 操作手冊

產品內容(本產品僅供鑑定蘋果蠹蛾使用)

\*測試組 PCR 反應液 (No. T1~5: 白色管)

\*陰性對照 PCR 反應液 (No. N1~5: 黃色管)

\*陽性對照 PCR 反應液 (No. P1~5: 藍色管)

\*Taq polymerase (綠色管)

\*內對照組 (No. C: 粉紅色管)

### 1. 需自備之設備與試劑

#### 1.1. 設備:

微量分注器 (micropipette; 2、20、200 及 1000 µl 等)、微量離心機、分光光譜儀 (可見光/紫外光)、PCR 試管架、聚合酶連鎖反應器、水平式電泳槽、紫外線燈箱、電泳照相系統。

#### 1.2. 試劑:

萃取檢體 DNA 試劑套組、micropipette tips、Loading dye、5X TBE 電泳緩衝液、100 bp DNA Markers 及溴化乙錠 (ethidium bromide; EtBr)。

### 2. 步驟與方法

#### 2.1. 萃取檢體 DNA

##### 2.1.1. 視檢體大小, 取適量組織抽取基因體 DNA (genomic DNA)。

註: 若屬老熟幼蟲, 取胸足與腹足間之第 4-5 體節即可, 剩餘蟲體可保存於酒精中, 做形態鑑定之用; 若蟲體為幼齡蟲 (如 1-3 齡蟲) 時, 則建議採用全蟲。

##### 2.1.2. 純化檢體基因體 DNA, 以 OD<sub>260</sub> 值估算 DNA 濃度。

#### 2.2. PCR 檢測試劑組之操作步驟

##### 2.2.1. 除 Taq polymerase (綠色管) 需置於冰上外, 將其他試管置於室溫下, 待其回溫。

★注意事項: 各反應試劑回溫後, 震盪均勻離心後, 再使用。

##### 2.2.2. 按圖一所示, 將下列反應試管依序排列於試管架。

\*測試樣本組 (No. T1~5: 白色管): 分析樣本 DNA, 進行種類鑑定。

\*陽性對照組 (No. P1~5: 藍色管): 確認試劑反應功能正常。

\*陰性對照組 (No. N1~5: 黃色管): 確認反應試劑無受污染。

\*內對照組 (No. C: 粉紅色管): 分析檢體 DNA 萃取成效。

##### 2.2.3. 將萃取檢體 DNA 2 µl (~100 ng), 依序分別加入 No. T1~5 及 C 反應管中, 以微量分注器將反應液混合均勻, 再離心。

##### 2.2.4. 每管分別加入 0.2 µl Taq polymerase (綠色管), 蓋上蓋子, 置冰上。

注意: 先將之加入 No. N1~5, 再加入 No. T1~5, 最後才加入 No. P1~5

與 No. C, 以避免污染。

##### 2.2.5. 將反應管依序分別置於聚合酶連鎖反應器中, 按下列設定反應條件:

94°C 5 分鐘	}	35 cycles
94°C 30 秒		
60°C 45 秒		
72°C 1 分鐘		
72°C 5 分鐘	→	4°C

### 3. 結果分析與判讀

#### 3.1.1. 取 5 µl 增幅後的反應液與 1 µl Loading dye 充分混合, 注入 1% agarose gel well 內, 以 100V 電壓進行膠體電泳, 約 25 分鐘後取出膠體染色。

#### 3.1.2. 膠體以 EtBr 染色後, 於紫外光燈箱內觀察, 照相記錄並保存結果。

#### 3.1.3. 結果判讀 (請參考圖二):

1. 標準結果如下表所示, 測試品 DNA 片段與陽性對照組分子量大小一致者, 表示為蘋果蠹蛾。

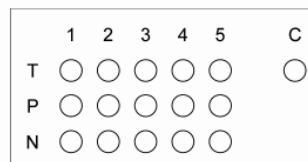
2. 陽性對照組未出現專一性 DNA 片段者, 表示偽陰性結果。

3. 陰性對照組出現專一性 DNA 片段者, 表示偽陽性結果。

(+): 表示分子量大小相同; (-): 表示分子量大小不同

	P1	P2	P3	P4	P5
T1	+	-	-	-	-
T2	-	+	-	-	-
T3	-	-	+	-	-
T4	-	-	-	+	-
T5	-	-	-	-	+

分子量大小: P1/T2: 400 bp P2/T2: 550 bp P3/T3: 800 bp  
P4/T4: 1120 bp P5/T5: 950 bp C: 630 bp



圖一、PCR 試管排列參考示意圖。

T: 檢體測試組 P: 陽性對照組

N: 陰性對照組 C: 內對照組。



圖二、PCR 鑑定結果之電泳圖譜。T1~5: 檢體 DNA 之 PCR 增幅結果; P1~5: 5 組蘋果蠹蛾 DNA 之 PCR 增幅結果; M: DNA markers。

### 圖二、蘋果蠹蛾 PCR 鑑定試劑組之操作手冊。

檢體的檢測依操作手冊所述完成後, 即可上機進行 PCR 增幅反應, 趁

此空檔可以製作瓊脂電泳膠片(濃度為1~1.5%)。當PCR完成之後,以電泳分離DNA片段,之後將電泳膠片經溴化乙錠(ethidium bromide, EtBr)染色,退染後即可在紫外光燈下觀察所得結果及照相存證。結果的判定,可參考圖二中之附圖二,分別比對T組各反應是否在P組中出現大小相同之相對應DNA片段,若五組均明顯地出現大小相同之DNA片段,即可判定該檢體為蘋果蠹蛾;反之,若檢體均未出現相對應之DNA片段(有時五組中亦會部份出現)時,我們則判定它不是蘋果蠹蛾。

## 結 語

關於本試劑組的開發,目前雖已成形,且經過實際測試的結果相當穩定,但我們仍繼續進行改良,希望使之在使用上更為方便。例如,目前我們正在尋找適合的Taq聚合酶,可將之與其他試劑一起預先混合,如此在使用上就僅需將檢體DNA分別加入五組樣本測試試管(T組)中,即可進行PCR反應,這不但可進一步簡化操作步驟,更能縮短時程。另一方面,我們未來亦將會尋求更形簡化的檢體DNA萃取方法,用最快速的方法抽取DNA後即可進行PCR反應,若此方法可行,則本檢測試劑組將真正達到快速的效果,若是檢疫人員自行在所屬單位進行檢測,預計自攔截到檢體到得到鑑定結果,整個時程可以縮短到3個小時以內,可確實達到快速鑑定的效果。

## 參考文獻

- Lu, K. H., S. C. Chang, C. Y. Hsu, and J. T. Yang. 2003. A combination of traditional and modern techniques for insect identification— using the codling moth, *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae), as an example. *Plant Prot. Bull.* 45: 359-364. (in Chinese)

— 蘋果蠹蛾 PCR 檢驗試劑組 —