

美和科技大學

106 年度教師專題研究計畫 結案報告

總計畫名稱：新型基因分析技術應用在偵測台灣淡水藍綠菌產毒
及產臭功能性基因之研究

計畫編號：MH-106 – DBT - 003

計畫期間：106.01.01.~106.12.31.

計畫主持人：顏宏愷

共同主持人：無

研究助理：無

經費總額：伍萬元整

經費來源：106 年度教育部獎補助款

(一) 計畫中文摘要

水源水質的優養化常伴隨著藻類及藍綠細菌的增生，造成藻類毒素與臭味物質濃度的增加，進而影響水廠供水的品質與消費者用水的安全性，故準確、快速且實用之分子生物技術，具有高度之研究開發價值。多重即時基因及反轉錄基因高解析度熔解分析技術(multiplex HRMA 及 multiplex RT-HRMA)具有快速、準確監測基因序列之優勢，但是在應用於藻類監測上，國際上則研究甚少、且尚缺乏水源實場監測應用。本研究中，成功應用多重即時基因高解析度熔解分析技術(multiplex HRMA)，針對台灣水體常見產毒及產臭藻種之功能性基因序列，最適化多重熔點指紋圖譜分析技術，除結合完整的基因庫解析環境水體中所有之目標功能性基因序列外，亦將其多重引子設計應用於多重即時反轉錄基因高解析度熔解分析技術(multiplex RT-HRMA)中。故研究期間除完成建立台灣本土性主要產毒及產臭藻株之功能性基因序列熔點指紋圖譜資料庫，針對五個主要官能性基因序列(*mcy*、*cyr*、*rpo*、geosmin synthetase gene 及 2-MIB synthetase gene)設計具特異性及專一性之引子並進行驗證外，並將所發展之多重即時基因及反轉錄基因高解析度熔解分析技術(multiplex HRMA 及 multiplex RT-HRMA)應用於相關飲用水水庫水源現地監測中，完成了技術建置與技術現地應用、驗證之最終研究目的。

關鍵詞：多重即時基因高解析度熔解分析技術、多重即時反轉錄基因高解析度熔解分析技術、藻類產毒功能性基因、藻類產臭功能性基因

(二) 計畫英文摘要

Eutrophication of reservoir water often results in proliferation of algae and cyanobacteria, causing the increase of cyanobacteria associated odorants and toxins in source water and thus affecting the quality of drinking water. To ensure the beneficial use of source water, detection of the toxin and odorant-producing cyanobacteria is therefore very important. A quick, accurate, and practical molecular biology technique to detect the gene sequences responsible for the production of targeted toxins and odorants may greatly improve the estimation of the formation potential of toxins and odorants in the source water. In this study, a multiplex high resolution melting analysis (HRMA) method is developed and applied in monitoring the functional gene sequences responsible for the production of common toxins and odorants present in Taiwan's drinking water sources. Primers are first to be designed to detect the functional genes in toxin- and odorant-producing cyanobacteria present in Taiwan's fresh water bodies. The primer sets have been tested and verified individually with cultured strains isolated in Taiwan. Then, the primer sets will be examined in a multiplex system to obtain the optimal parameters for the amplification and denaturation of target gene sequences. Six major functional gene segments commonly observed in Taiwan's reservoirs is also analyzed with ARB software for cyanobacterial database. The DNA and cDNA sequences database of the six major functional gene segments have been integrated with the HRMA technique for creating comprehensive gene fingerprint database. Finally, the two systems also have been integrated and applied to the on-site monitoring of toxigenic and odorous cyanobacteria in several eutrophic reservoirs of Kinman Island and Matsu Island in Taiwan.

Key words: multiplex HRMA, multiplex RT-HRMA, toxin-producing genes, odorant-producing genes

1. 前言：

近年來全球環境的劇烈變遷，導致地處亞熱帶的台灣地區，水庫或湖泊中產生嚴重的水質優養化問題。環保署於 2002 年起，開始調查水庫優養化程度(TWEPA, 2002-2013)，其統計結果顯示，我國本島 25 座與外、離島 28 座共計 53 座水庫中，約有一半以上水庫曾經發生優養化的現象，其中外、離島的水庫水質優養程度更是嚴重，依據 TWEPA(2013 年)所公佈的結果顯示，28 座外、離島水庫中，1 座水庫水位過低停止採樣外，26 座水庫水質呈現優氧化的程度，僅 1 座水庫水質呈現普養狀態，顯示台灣地區水庫水質普遍優養化程度皆非常地嚴重。在優養化的淡水水體中，藍綠藻(或稱藍綠細菌，cyanobacteria)大量生長，常是水體中主要的優勢藻種，其中又以產毒藻種及產臭藻種的出現，最令水庫及供水管理相關單位困擾，較常見的產毒藻種有：微囊藻(*Microcystis sp.*)、柱孢藻(*Cylindrospermopsis sp.*)及魚腥藻(*Anabaena sp.*)等，主要產生：微囊藻毒素(microcystins)、柱孢藻毒素(cylindrospermopsin)及魚腥藻毒素(anatoxin-a)。常見的產臭藻種有：束絲藻(*Aphanizomenon sp.*)、膠髮藻(*Gloeotrichia sp.*)、鞘絲藻(*Lyngbya sp.*)及顫藻(*Oscillatoria sp.*)等，主要產生：2-MIB (2-methylisoborneol)及 geosmin (rans-1,10-dimethyl-trans-9decalol)。產毒及產臭藻類之存在，不僅造成水處理困難，且影響了飲用水安全與舒適，使得民眾對於飲用水之品質產生了疑慮。

為瞭解藻類及其代謝物質對水質的影響，許多管理單位皆有定期的監測計畫，或與學術單位合作進行相關議題的研究。例如：環保署於民國 2005 年 2 月針對台灣地區與外島地區以民生用水為目的之水庫及其淨水廠，展開為期 3 年的大規模普查(EPA-94-U1U1-02-101, EPA-95-U1U1-02-101, EPA-96-U1U1-02-101)，確認了台灣地區水庫水源中的確存在著藻類毒素問題，隨著相關環境因子的變動，某些季節中水中藻類毒素濃度甚至會超過 WHO 所規範的濃度標準(microcystin-LR 小於 1 $\mu\text{g/L}$)，外島地區問題更為嚴重，相同季節中平均微囊藻毒素濃度約為台灣地區的 5 至 8 倍，柱孢藻毒素濃度更超過百倍。因而訂立了『水庫藻毒處理作業程序』(環署水字第 0990071126 號文)相關管理規範，並要求各民生用水水庫需依此程序進行自主性管理。而經濟部水利署亦於 2009 年 07 月開始，針對水源產毒藻類與有害微生物監控與管理技術進行兩年的研發與應用(MOEAWRA0990094)，除一般藻類毒素化學分析外(HPLC、LC/MS)，並成功開發並驗證現地快速監(檢)測技術，包括：分子生物技術之快速 DNA 萃取及產毒功能性基因濃度即時定量系統與光學分析技術之活體螢光即時偵測系統等，針對具產毒及產臭潛勢的藻種，進行現地快速監測的目的。現此技術於 2014 年經專利化後並授權技轉廠商，將技術與設備推展至台灣地區以外的國家進行銷售與服務，經濟部水利署持續應用(2014 年)此移動式實驗室平台進行轄下水體之例行性水質監測工作。

前述用來進行常規監測水源中產毒藻類的分子生物技術為即時基因定量聚合酶鏈鎖反應技術(qPCR)。qPCR 技術具準確性高及分析時間較短的優勢，且申請人完成多重即時基因定量聚合酶鏈鎖反應技術(multiplex qPCR)之驗證後，加大了現地監測目標功能性基因技術之應用性，現已可針對五個主要產毒及產臭功能性基因片段(mcy、cyr、rpo、geosmin synthetase gene 及 2-MIB synthetase gene)進行現地同時監測其 DNA 濃度及 cDNA 濃度，真正瞭解真實狀況下之藻類毒素及藻類臭味物質存在及將釋出之潛勢。但研究中發現，每一個水庫其環境條件與地理位置皆不相同，常常發現水庫中藻類基因池中之基因型不盡相同，導致在現地監測的過程中，需花費較多之人力與物力來建立或修正每一座水庫之目標功能性基因資料庫，雖然先前所設計之各式通用型 multiplex qPCR 引子與探針可適用於不同水體當中進行監測的工作，但若遇到封閉型水庫中之藻類基因池基因型或野生型基因序列，未收納於當初用來設計通用型 multiplex qPCR 引子與探針之資料庫時，也許在環境水體之監測上恐有漏網之虞，而在技術研究發展的過程中，是否已將水庫中所有產生藻類毒素與藻類臭味物質之藻種或目標官能性基因或藻類毒素物質或藻類臭味物質等涵蓋所有欲監測之目標種類等，為我們關注的問題。每次欲提高 multiplex qPCR 引子與探針監測序列之涵蓋性，常常需要進行目標功能性基因片段資料庫之更新動作，所耗費之時間與成本相當地可觀，如何開發一個成本較低、分析時間更短、準確性更高、可與現有之現地監測技術串連或並聯使用、針對野生型目標功能性基因序列分析之涵蓋面廣、或可用於現地與基因資料庫比對圖譜直接進行藻種或基因序列鑑定等之技術，成為本研究計畫之重點與目標。

2. 研究方法、步驟

本研究目的為：建立最適化之多重即時基因及反轉錄基因高解析度熔解分析技術(multiplex HRMA: multiplex high resolution melting analysis; multiplex RT-HRMA: multiplex reverse transcription high resolution melting analysis)，搭配應用基因及反轉錄基因之目標功能性基因片段資料庫，完成 multiplex HRMA 及 multiplex RT-HRMA 現地監測技術，除開發相關功能性基因指紋圖譜即時供現地即時監測工作進行時比對外，更進一步與移動式平台之監測技術(如: multiplex qPCR、multiplex RT-qPCR 等)並聯且標準化操作步驟，並擇具代表性水庫進行相關研發技術之測試工作。研究期間若發現未知之藻類毒素或藻類臭味物質功能性基因片段，將進一步利用化學分析技術針對所對應之藻類毒素型式或藻類臭味物質進行定性與定量的分析工作，並設計專一性引子與探針，納入 multiplex qPCR 及 multiplex RT-qPCR 系統中進行現地的即時監測工作，期能達到快速、多目標、全面性且真實地反應水體中淡水藻類產毒或產臭當下狀況之研究目的。

3. 研究結果與討論

本計畫之研究成果與討論，分項列述如下：

3.1 目標官能性基因引子對設計與專一性測試

為使得檢測方法能更標準化及增加嚴謹性，首先為應用於 multiplex HRMA 及 multiplex RT-HRMA 之引子進行專一性測試，所選擇的官能性基因片段有：*mcy*、16s rRNA、*cyr*、*rpo*、*pks*、geosmin synthetase gene 及 2-MIB synthetase gene。其中，*mcy* 基因片段測試了 *mcy B* 及 *mcy J* 兩區間引子，*cyr* 基因片段測試 A 區間引子，*rpo* 基因片段測試了 *rpo C* 及 *rpo Ana* 兩區間引子，geosmin synthetase gene 選擇 geosmin 合成酶催化 FPP 進行環化作用序列區間引子與 2-MIB synthetase gene 選擇 2-MIB 合成酶 GPP 催化 DMPP 及 IPP 進行環化作用序列區間引子等，進行引子專一性測試。依官能性基因資料庫進行設計之特異性引子對共 153 對，合成後利用標準藻株之 DNA 及 cDNA 測試其與目標官能性基因之專一性，最後選擇超過 30 對引子對進行 multiplex HRMA 及 multiplex RT-HRMA 技術的建置(如表 2)。首先測試 multiplex HRMA 之雙重官能性基因片段引子對之專一性測試，經過引子對的配對，共配對出 33 對單一之引子對，分別為：*mcy J* 基因片段 3 對引子對、*mcy B* 基因片段 1 對引子對、16s rRNA 基因片段 1 對引子對、*cyr A* 基因片段 5 對引子對、*rpo C* 基因片段 5 對引子對、*rpo* 基因片段 3 對引子對、*pks* 基因片段 1 對引子對、geosmin synthetase gene 基因片段 10 對引子對及 2-MIB synthetase gene 基因片段 4 對引子對等，測試結果如表 3 所示：*mcy J* 基因片段中 3 對引子對中，編號 i 與編號 ii 及編號 iii 具專一性反應；*mcy J* 基因片段中 3 對引子對皆與 *mcy B* 基因引子對反應具專一性反應，但與 *cyr A* 基因片段 5 對引子對反應則皆會形成二聚體(primer dimer)或其它產物，不具專一性；*mcy J* 基因片段中編號 i 及編號 ii 引子對分別與 *rpo C* 基因片段中編號 xiii、編號 xiv 及編號 xv 具專一性反應，其他則不具專一性；*mcy J* 基因片段中編號 i 及編號 ii 引子對分別與 *rpo* 基因片段中編號 xvi 及編號 xvii、編號 xviii 具專一性反應，其他則不具專一性，在與 *pks* 基因片段引子對反應中僅編號 iii 引子對不具專一性反應，其他則具專一性反應，而與 geosmin synthetase gene 基因片段之引子對，反應大多不具專一性，僅編號 i 與編號 xx 引子對反應具專一性，而在 2-MIB synthetase gene 基因片段之引子對亦發生相似情形，僅編號 i 與編號 xxxiii 引子對反應具專一性，顯示 geosmin synthetase gene 基因片段、2-MIB synthetase gene 基因片段引子對與 *mcy J* 片段引子對在 PCR 反應中，具專一性反應之配對選擇性較少，但兩組引子對所反應出之最高熔解溫度則分的較開，如圖 5 及圖 6 所示，*mcy J* 基因片段編號 i 引子對之最高熔解溫度為 77.60°C 而 2-MIB synthetase gene 基因片段編號 xxxiii 引子對之最高熔解溫度則為 86.37°C，最高熔解溫度相差了 8.77°C，若為單獨僅檢測 *mcy* 基因片段及 2-MIB synthetase gene 基因片段，則兩組引子對為首選。

mcy B 基因片段引子對與 16s rRNA 基因片段引子對具專一性反應，與 *cyr A* 基因片段 5 對引子對皆不具專一性反應；*mcy B* 基因片段引子對與 *rpo C* 基因片段 5 對引子對中僅與編號 xii 引對不具專一性反應外，其餘反應皆具專一性；*mcy B* 基因片段引子對與 *rpo* 基因片段 3 對引子對中僅與

編號 xvii 引子對不具專一性反應外，其餘反應皆具專一性，與 *pks* 基因片段引子對具專一性反應；*mcvB* 基因片段引子對與 *geosmin synthetase gene* 基因片段、*2-MIB synthetase gene* 基因片段引子對專一性反應恰完全相反，在 *geosmin synthetase gene* 基因片段引子對僅編號 xx 引子對與其有專一性反應，餘者皆無，而與 *2-MIB synthetase gene* 基因片段引子對皆有專一性反應。16s rRNA 基因片段引子對與 *cyrA* 基因片段 5 對引子對中，編號 xi 引子對及編號 xiii 引子對與其反應具專一性外，其餘引子對無專一性反應；16s rRNA 基因片段引子對與 *rpo* 基因片段引子對反應，僅編號 xvi 引子對反應具專一性外，其餘引子對無專一性反應。*cyrA* 基因片段引子對與同一基因區間引子對較有專一性反應，與 *rpoC* 基因片段引子對反應，編號 vi 引子對及編號 x 引子對同為僅與編號 xiii 引子對具專一性反應、編號 vii 引子對則與編號 xii 引子對及編號 xiii 引子對具專一性反應、編號 viii 引子對與編號 ix 引子對同樣與編號 xiii 引子對及編號 xiv 引子對及編號 xv 引子對具專一性反應；*cyrA* 基因片段引子對與 *rpo* 基因片段引子對反應，僅編號 vi 引子對與編號 xviii 引子對以及編號 viii 引子對與編號 xvi 引子對具專一性反應，其餘則無；*cyrA* 基因片段引子對與 *pks* 基因片段編號 xix 引子對反應，則編號 vi 引子對、編號 viii 引子對及編號 ix 引子對具專一性反應；*cyrA* 基因片段引子對與 *geosmin synthetase gene* 基因片段引子對反應，具專一性反應之引子對配對有：編號 viii 引子對與編號 xx、xxi、xxii 引子對、編號 ix、x 引子對與編號 xx 引子對；*cyrA* 基因片段引子對與 *2-MIB synthetase gene* 基因片段引子對反應，具專一性反應之引子對配對有：編號 vi 引子對與編號 xxx 引子對、編號 viii 引子對與編號 xxi 引子對、編號 x 引子對與編號 xxxii 引子對。在 *rpoC* 基因片段引子對測試方面，與 *rpoAna* 基因片段有專一性反應的引子對配對有：編號 xii 引子對編號 xvi 引子對反應、編號 xiii 引子對編號 xvi 引子對反應、編號 xiv 引子對編號 xvi 引子對反應、編號 xiv 引子對編號 xvii 引子對反應、編號 xv 引子對編號 xviii 引子對反應；與 *pks* 基因片段有專一性反應的引子對配對有：編號 xi 引子對編號 xix 引子對反應、編號 xiii 引子對編號 xix 引子對反應、編號 xiv 引子對編號 xix 引子對反應及編號 xv 引子對編號 xix 引子對反應；與 *geosmin synthetase gene* 基因片段有專一性反應的引子對配對有：編號 xi 引子對編號 xxii 引子對反應、編號 xi 引子對編號 xxvii 引子對反應、編號 xiii 引子對編號 xxix 引子對反應、編號 xiv 引子對編號 xxix 引子對反應、編號 xv 引子對編號 xx 引子對反應、編號 xv 引子對編號 xxi 引子對反應及編號 xv 引子對編號 xxii 引子對反應；與 *2-MIB synthetase gene* 基因片段有專一性反應的引子對配對有：編號 xv 引子對編號 xxxi 引子對反應、編號 xi 引子對編號 xxxii 引子對反應、編號 xiii 引子對編號 xxxii 引子對反應、編號 xiii 引子對編號 xxxiii 引子對反應及編號 xiv 引子對編號 xxxiii 引子對反應。在 *rpoAna* 基因片段引子對測試方面，與 *pks* 基因片段有專一性反應的引子對配對有：編號 xix 引子對編號 xxv 引子對反應、編號 xix 引子對編號 xxxi 引子對反應及編號 xix 引子對編號 xxxiii 引子對反應。與 *pks* 基因片段有專一性反應的引子對配對有：編號 xix 引子對編號 xxv 引子對反應、編號 xix 引子對編號 xxxi 引子對反應及編號 xix 引子對編號 xxxiii 引子對反應。在 *geosmin synthetase gene* 基因片段引子對測試方面，與 *2-MIB synthetase gene* 基因片段有專一性反應的引子對配對有：編號 xx 引子對編號 xxx 引子對反應、編號 xxi 引子對編號 xxxiii 引子對反應及編號 xxv 引子對編號 xxxi 引子對反應。

在 multiplex RT-HRMA 之雙重官能性基因片段引子對之專一性測試方面，藉由 multiplex HRMA 所反應之引子對，進行標準藻株 cDNA 專一性測試，結果整理如表 4 所示，發現與雙重 DNA 官能性基因片段引子對測試結果(表 3)有些許的不同，佔所有測試反應數(528 次反應)之 3.60%(19 次反應)，其中與 DNA 官能性基因片段引子對測試結果相反的[原 DNA(專一性)，後 cDNA(非專一性)]佔 1.71%(9 次反應)及[原 DNA(非專一性)，後 cDNA(專一性)]佔 1.89%(10 次反應)，其中 cDNA 官能性基因片段引子對測試結果轉換成專一性反應的引子對有：編號 ii 引子對編號 v 引子對反應、編號 ii 引子對編號 viii 引子對反應、編號 viii 引子對編號 xiv 引子對反應、編號 viii 引子對編號 xv 引子對反應、編號 xi 引子對編號 xvi 引子對反應、編號 xii 引子對編號 xix 引子對反應、編號 xiii 引子對編號 xxx 引子對反應、編號 xiii 引子對編號 xxxi 引子對反應、編號 xvi 引子對編號 xxi 引子對反應、編號 xvi 引子對編號 xxxii 引子對反應；與 cDNA 官能性基因片段引子對測試結果轉換成非專一性反應的引子對有：編號 vii 引子對編號 xiii 引子對反應、編號 viii 引子對編號 xiii 引子對反應、編號 viii 引子對編號 xxi 引子對反應、編號 viii 引子對編號 xxii 引子對反應、編號 viii 引子對編號 xxxi 引子對反應、編號 x 引子對編號 xxxii 引子

對反應、編號 xxv 引子對編號 xxxi 引子對反應。結果顯示，在所監測的官能性基因片段中，引子對所複製出 DNA 片段中含有或不含有內含子，則會影響 multiplex HRMA 及 multiplex RT-HRMA 反應中所選用引子對之專一性。因此，重新針對各目標官能性基因片段及其所設計之引子對，檢視所設計之基因區間是否含內含子或各引子對所複製的基因區間所含內含子的數量，並參閱表 3 與表 4 的測試結果，選出六組監測不同官能性基因片段之引子對，分別為：*mcvB* 基因片段之編號 iv 引子對、16s rRNA 基因片段之編號 v 引子對、*rpoC* 基因片段之編號 xiii 引子對、*rpoAna* 基因片段之編號 xvi 引子對、*pks* 基因片段之編號 xix 引子對、2-MIB synthetase gene 基因片段之編號 xxxiii 引子對等進行下一步三重引子對之 multiplex HRMA 及 multiplex RT-HRMA 測試工作。為確保測試過程中的嚴謹度與準確性，針對六組引子對利用各標準藻株之 DNA 及 cDNA 及最佳之 multiplex HRMA 及 multiplex RT-HRMA 反應參數，先進行各別引子對單一 HRMA 之測試工作，各分析圖譜疊合後整理如圖 7，可以發現六組引子對之最高熔解溫度(Tm)[圖 7 (a)]分別為：75.70°C(*mcvB*)、85.86°C(16s rRNA)、77.21°C(*rpoC*)、77.12°C(*rpoAna*)、82.29°C(*pks*)及 86.38°C(2-MIB synthetase gene)，且熔解溫度曲線相當平滑，而在各別引子對單一 RT-HRMA 之測試結果方面[圖 7 (b)]，六組引子對之最高熔解溫度(Tm)分別為：75.80°C(*mcvB*)、85.80°C(16s rRNA)、77.20°C(*rpoC*)、76.82°C(*rpoAna*)、82.50°C(*pks*)及 86.31°C(2-MIB synthetase gene)。比較 HRMA 及 RT-HRMA 最高熔解溫度(Tm)發現，兩者最大的熔解溫度(Tm)差異發生在監測 *rpoAna* 基因片段的引子對上(差異百分比為 0.39%)，其次為監測 *pks* 基因片段的引子對上(差異百分比為 0.26%)及監測 *mcvB* 基因片段的引子對上(差異百分比為 0.13%)，再次之為監測 2-MIB synthetase gene 基因片段的引子對上(差異百分比為 0.08%)及監測 16s rRNA 基因片段的引子對上(差異百分比為 0.07%)，差異最小的是監測 *rpoC* 基因片段的引子對上(差異百分比為 0.01%)，顯示監測不同的遺傳物質(DNA 或 cDNA)，因特性不同或片段中有無具內含子或反應液是否具反應抑制物等因素，皆會造成目標基因片段熔解溫度之差異，但差異皆控制在 0.5%之內，反應具極佳之專一性。

應用所選取之六組引子對進行 multiplex HRMA 及 multiplex RT-HRMA 之三重官能性基因片段引子對之專一性測試，結果整理如表 5 所示，三重引子對對其所對應之官能性基因片段，具專一性反應的僅有兩組反應，第一組為：*mcvB*~*pks*~2-MIB synthetase gene (編號 iv 引子對~編號 xix 引子對~編號 xxxiii 引子對)，第二組為：16s rRNA~*rpoC*~*rpoAna* (編號 v 引子對~編號 xiii 引子對~編號 xvi 引子對)，最高熔解溫度分析圖及熔解溫度曲線圖整理如圖 8。圖 8 (a)及圖 8 (b)分別為 multiplex HRMA 第一組及第二組引子對配對之反應分析圖譜，圖 8 (c)及圖 8 (d)分別為其熔解溫度曲線分析圖，而圖 8 (e)及圖 8 (f)為 multiplex RT-HRMA 第一組及第二組引子對配對之反應分析圖譜，圖 8 (g)及圖 8 (h)分別為其熔解溫度曲線分析圖，之反應分析圖譜。在 multiplex HRMA 圖譜中顯示，第一組引子對配對中，各別之最高熔解溫度(Tm)(表 6)在重複 5 次的實驗設計下，分別為：75.70°C(*mcvB*)、82.30°C(*pks*)及 86.37°C(2-MIB)，且各別之標準偏差皆在正負 0.05 °C 的範圍內，而第二組引子對配對中，各別之最高熔解溫度(Tm)同樣在重複 5 次的實驗設計下，分別為：85.87°C(16s rRNA)、77.20°C(*rpoC*)及 77.10°C(*rpoAna*)，且各別之標準偏差皆在正負 0.05 °C 的範圍內；在 multiplex RT-HRMA 圖譜中顯示，第一組引子對配對中，各別之最高熔解溫度(Tm)(表 6)在重複 5 次的實驗設計下，分別為：75.83°C(*mcvB*)、82.48°C(*pks*)及 86.30°C(2-MIB)，且各別之標準偏差皆在正負 0.05 °C 的範圍內，而第二組引子對配對中，各別之最高熔解溫度(Tm)同樣在重複 5 次的實驗設計下，分別為：85.78°C(16s rRNA)、77.23°C(*rpoC*)及 76.75°C(*rpoAna*)，且各別之標準偏差皆在正負 0.05 °C 的範圍內。對照 multiplex HRMA 及 multiplex RT-HRMA 兩圖譜間之差異，可以發現：雖然應用同樣之引子對來監測同樣目標之基因片段區間，但因遺傳物質特性的不同(DNA, cDNA)，同樣基因片段依然有最高熔解溫度的差異，最大的熔解溫度差異為 *rpoAna* 基因片段編號 xvi 引子對(0.46%)，其次為 *pks* 基因片段編號 xix 引子對(0.22%)及 *mcvB* 基因片段編號 iv 引子對(0.17%)，其餘基因片段引子對之差異皆低於或等於 0.10% [*rpoC* 基因片段編號 xiii 引子對(0.04%)、2-MIB 基因片段編號 xxxiii 引子對(0.08%)、16s rRNA 基因片段編號 v 引子對(0.10%)]，由於 HRMA 技術熔解溫度準確度可達 0.1°C 範圍，故在目標基因片段的監測上不同的遺傳物質將是一個影響該技術應用之一個重要變因。

4 結論與建議

本年度之研究發現，所發展之多重即時及多重反轉錄即時基因高解析度熔解分析技術 (multiplex HRMA、multiplex RT-HRMA) 已可成功地應用於現地偵測淡水中，藍綠菌之相關產毒及產臭官能性基因片段，藉由各產毒及產臭功能性基因片段的資料庫建立，已成功地將資料庫內資訊，轉化為設計專一性引子對的有利資源，經過不斷的測試與驗證，建立多組且可於現地使用的引子對，並最佳化 multiplex HRMA 及 multiplex RT-HRMA 兩系統在即時基因定量儀器 (qPCR) 之操作參數與標準化操作步驟。研究中，除精進現地萃取純化藻類遺傳物質 (DNA 及 RNA) 的前處理技術外，亦配合多重即時及多重反轉錄及時基因定量技術 (multiplex qPCR 及 multiplex RT-qPCR) 進行相關 HRMA 技術的驗證與現地的環境樣品監測，結果發現：金門及馬祖所採樣之 40 個樣品中，大部分樣品之目標官能性基因與其基因濃度具有相關性，這說明了本研究所發展的技術的確具現地應用的潛力。由於在研究中發現，若基因庫所收集之目標官能性基因片段序列不足時，除降低所設計引子對代表性外，亦無法真正代表環境中真實基因池之物種序列組成，所以未來的研究中，將持續擴充基因資料庫外，在兩大系統中 (multiplex HRMA、multiplex qPCR 系統及 multiplex RT-HRMA、multiplex RT-qPCR 系統) 將與資料庫連動，更動所對應之專一性引子對及探針，經由標準化的系統建置流程，真正了解藻類產毒與產臭官能性基因片段或藻種與所產生的代謝物質或化學物質間或環境因子間之相關性，為相關管理單位或水質處理單位提供管理與決策的有效依據。

5 文獻

1. Andree, K.B., Fernáandez-Tejedor, M., Elandaloussi, L.M., Quijano-Scheggia, S., Sampedro, N., Garce's, E., Camp, J., Dioge`ne1, J. (2011). Quantitative PCR Coupled with Melt Curve Analysis for Detection of Selected *Pseudo-nitzschia* spp. (Bacillariophyceae) from the Northwestern Mediterranean Sea, *Applied and Environmental Microbiology*, 77(5), 1651-1659.
2. Antonella, P. and Luca, G. (2013). The quantitative real-time PCR applications in the monitoring of marine harmful algal bloom (HAB) species, *Environmental Science and Pollution Research*, 20, 6851-6862.
3. Brown, M.D., Torroni, A., Reckord, C.L., Wallace, D.C. (1995). Phylogenetic analysis of Leber's hereditary optic neuropathy mitochondrial DNA's indicates multiple independent occurrences of the common mutations, *Human Mutation*, 6, 311-325.
4. Cui, G., Ding, H., Xu, Y., Li, B., Wang, D.W. (2013). Applications of the method of high resolution melting analysis for diagnosis of Leber's disease and the three primary mutation spectrum of LHON in the Han Chinese population, *Gene*, 512, 108-112.
5. Cui, G, Zhang, L., Xu, Y., Cianflone, K., Ding, H., Wang, D.W. (2013). Development of a high resolution melting method for genotyping of risk HLA-DQA1 and PLA2R1 alleles and ethnic distribution of these risk alleles, *Gene*, 125-130.
6. Eiler, A., Drakare, S., Bertilsson, S., Pernthaler, J., Peura, S., Rofner, C., Simek, K., Yang, Y., Znachor, P., Lindstro`m, E.S. (2013). Unveiling distribution patterns of freshwater phytoplankton by a next generation sequencing based approach, *PLOS One*, 8(1), 1-10.
7. Guillard, T., Champs, C., Moret, H., Bertrand, X., Scheftel, J.M., Cambau, E. (2012). High-resolution melting analysis for rapid characterization of *qnr* alleles in clinical isolates and detection of two novel alleles, *qnrB25* and *qnrB42*, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(11), 2638-2639.
8. Jueterbock, A., Kollias, S., Smolina, I., Fernandes, J.M.O., Coyer, J.A., Olsen, J.L., Hoarau, G. (2014). Thermal stress resistance of the brown alga *Fucus serratus* along the North-Atlantic coast: Acclimatization potential to climate change, *Marine Genomics*, 13, 27-36.

9. Kuster, C.J. and Von Elert, E. (2012). High-resolution melting analysis: a genotyping tool for population studies on *Daphnia*, *Molecular Ecology Resources*, 12, 1048-1057.
10. Ludwig, M. and Bryant, D.A. (2011). Transcription profiling of the model cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7002 by Next-Gen (SOLiD™) sequencing of cDNA, *Frontiers in Microbiology*, 2(41), 1-23.
11. Lei, H., Chen, G., Wang, Y., Ding, Q., Wei, D. (2014). Sll0528, a Site-2-Protease, Is Critically Involved in Cold, Salt and Hyperosmotic Stress Acclimation of Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803, *International Journal of Molecular Sciences*, 15, 22678-22693.
12. Mardis, E.R. (2008). The impact of next-generation sequencing technology on genetics, 24(3), 133-141.
13. Mardis, E.R. (2008). Next-generation DNA sequencing methods, *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 9, 387-402.
14. Minucci, A., Canu G., Gentile, L., Zuppi, C., Giardina B., Capoluongo, E. (2013). Small amplicons high resolution melting analysis (SA-HRMA) allows successful genotyping of acid phosphatase 1 (ACP1) polymorphisms in the Italian population, *Clinica Chimica Acta*, 416, 86-91.
15. Nygard, A.B., Jørgensen, C.B., Cirera, S., Fredholm, M. (2007). Selection of reference genes for gene expression studies in pig tissues using SYBR green qPCR, *BMC Molecular Biology*, 8(67), 1-6.
16. Ronaghi, M., Karamohamed, S., Pettersson, B., Uhlen, M., and Nyren, P. (1996). Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release, *Analytical Biochemistry*, 242, 84-89.
17. Roach (2007). Genome Sequencer System – Amplicon Sequencing, Application Note No.5.
18. Reed, G.H., Kent, J.O., Wittwer, C.T. (2007). High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics, *Pharmacogenomics*, 8(6), 597-608.
19. Ricchi, M., Cammi, G., Garbarino, C.A., Buzzini, P., Belletti, G.L., Arrigoni, N. (2010). A rapid real-time PCR/DNA resolution melting method to identify *Prototheca* species, *Journal of Applied Microbiology*, 110(1), 27-34.
20. Sobukawa, H., Ibaraki, M., Kano, R., Ito, T., Suzuki, K., Kamata, H., Hasegawa, A. (2013). Rapid molecular typing of *Prototheca zopfii* by high resolution melting real-time PCR (PCR-HRM), *Medical Mycology Journal*, 54(4), 341-344.
21. Sakaridis, I., Ganopoulos, I., Argiriou, A., Tsaftaris, A. (2013). A fast and accurate method for controlling the correct labeling of products containing buffalo meat using High Resolution Melting (HRM) analysis, *Meat Science*, 94, 84-88.
22. Vossen, R.H.A.M., Aten, E., Roos, A., Dunnen, J.T. (2009). High-resolution melting analysis (HRMA)—more than just sequence variant screening, *Human Mutation*, 30, 1-7.
23. Wittwer, C.T., Reed, G.H., Gundry, C.N., Vandersteen, J.G., Pryor, R.J. (2003). High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen, *Clinical Chemistry*, 49(6), 853-860.
24. Zambounis, A., Gaquerel, E., Strittmatter, M., Salaün, J.P., Potin, P., Küpper, F.C. (2012). Prostaglandin A₂ triggers a strong oxidative burst in *Laminaria*: a novel defense inducer in brown algae? , *Algae*, 27(1), 21-32.
25. Zheng, H.Q., Chiang-Hsieh, Y.F., Chien, C.H., Justin Hsu, B.K., Liu, T.L., Nathan Chen, C.N., Chang, W.C. (2014). AlgaePath: comprehensive analysis of metabolic pathways using transcript abundance data from next-generation sequencing in green algae, *BMC Genomics*, 15, 196-207.