

建立 qPCR 快速鑑定進口鰻魚物種技術

蕭聖代、莊世昌、林以芯
海洋漁業組

鰻魚為亞洲重要的食用水產品，近年因白鰻的資源枯竭，進口商為了減低成本及開拓市場，常以海鰻來魚目混珠。冷凍進口之鰻魚常為去頭去尾的肉塊、肉片或已調理的半成品，無法由外觀判別種類，以致近年來關務署常協請本所以 DNA 鑑定進口鰻魚之種類，但 DNA 鑑定需耗時 5-7 天。

Real-time PCR 又稱 Quantitative real time polymerase chain reaction (簡稱 RT-PCR 或 qPCR)，其概念是在進行 PCR 反應的過程中，加入特定螢光染劑，推算聚合酶連鎖反應後進行即時相對定量分析，能準確地偵測產物的微量變化。另可利用 TaqMan 的雜合探針 (hybridization probe)，進行基因型分析，透過檢測每次循環的螢光強度對 PCR 進程進行即時檢測。由於 qPCR 具有操作簡便，靈敏度高，重複性好等優點，因此發展非常迅速，從而螢光定量 PCR 獲得廣泛應用。故本計畫針對日本鰻鱺 (*Anguilla japonica*)、美洲鰻鱺 (*A. rostrata*)、歐洲鰻鱺 (*A. Anguilla*)、繁星糯鰻 (*Conger myriaster*)、灰海鰻 (*Muraenesox cinereus*)、似原鶴海鰻 (*Congressox talabonoides*) 等 6 種常見進口鰻魚為標的，並設計各物種其專一之 qPCR 引子及 TaqMan 探針 (表 1)，各組引子所增幅之片大小介於 63-125bp。各反應可由螢光表現量來辨別種類

(圖 1)，另為縮短鑑定時間，整併設計為 2 組 Multiplex qPCR 反應套組檢測，第一套為日本鰻鱺、似原鶴海鰻、美洲鰻鱺；第二套為繁星糯鰻、歐洲鰻鱺、灰海鰻。依據本計畫設計之 2 組 Multiplex qPCR 進行樣本盲測，以常見進口鰻魚為標的，鑑別率可達 100%，樣品檢測最低濃度約 20 ng/ul，所需鑑定時間約 1 個工作天，較過往 DNA 定序鑑定可節省時程約 4 天。然而全球氣候變遷及過漁等因素，造成各國主要撈捕之鰻魚種類數量下滑，加工業者為了減低成本及開拓市場，也逐漸引進較非常見之魚種取代，因此未來仍需持續建置相關鰻魚物種之資料庫與 Multiplex qPCR 反應套組，以利協助關務署等單位進行物種鑑定。

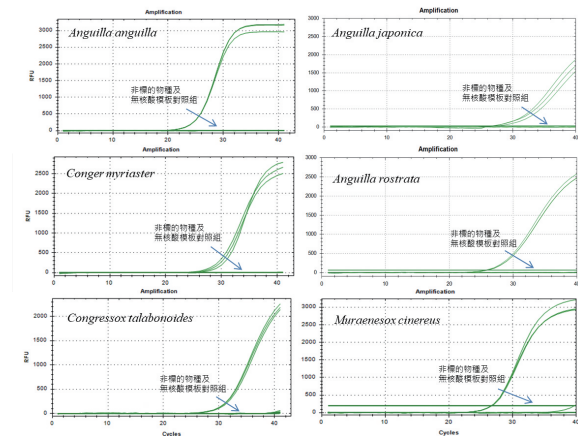


圖 1 使用專一性探針引子經 qPCR 在特定魚種螢光表現反應

表 1 用於常見進口鰻魚種類鑑定之 qPCR 核酸引子序列、探針序列及螢光標示

Name	Primer & Probe	5' labeled	Sequence	3' labeled	1X Conc.(nM)	Amplicon (bp)	Ref. sequence
A.Aq-COX1	A.Aq-COX1-F	---	CT***TAGC***CT	---	400	63	KJ564264.1
	A.Aq-COX1-R	---	GGGTGATATACAGTTCAG	---	400		
	A.Aq-COX1-HEX-P	HEX	TA***C***TG	BHQ1	200		
A.Ro-COX1	A.Ro-COX1-F	---	GC***ACA***ATT***TA	---	400	107	KJ564217.1
	A.Ro-COX1-R	---	CGGGAAGAAGGTTAGGTTTACT	---	400		
	A.Ro-COX1-ROX-P	ROX	AG***C***A	MGB	200		
A.Ja-COX1	A.Ja-COX1-F	---	AT***CA***CT***AC	---	400	70	MH050933.1
	A.Ja-COX1-R	---	ACAGGATTACGGCTGTGAGA	---	400		
	A.Ja-COX1-FAM-P	FAM	CC***TC***TC***TT	BHQ1	200		
C.Ta-COX1	C.Ta-COX1-F	---	CC***TA***AT***CG	---	400	96	MK777079.1
	C.Ta-COX1-R	---	GCCTGCTTCAACTATTGAGGA	---	400		
	C.Ta-COX1-HEX-P	HEX	AC***C***TT	MGB	200		
C.My-COX1	C.My-COX1-F	---	CA***G***T***CG	---	400	91	MW788427.1
	C.My-COX1-R	---	GCITCAACTCCAGATGAGGTT	---	400		
	C.My-COX1-FAM-P	FAM	AG***GA***AC	MGB	200		
M.Ci-COX1	M.Ci-COX1-F	---	GC***T***A***CA	---	400	125	MT571331.1
	M.Ci-COX1-R	---	GGAGTATGATATTGATTGCG	---	400		
	M.Ci-COX1-ROX-P	ROX	AC***C***AT	MGB	200		