

張湧泉¹，簡茂盛²，賴仲義¹，劉正義²

¹行政院農業委員會水產試驗所 鹿港分所

²國立中興大學 獸醫病理學研究所

(1999 年 9 月 26 日接受)



應用隨機增幅多型性去氧核糖核酸 (RAPD) 及聚合酶連鎖反應-限制酶切割片段多型性 (PCR-RFLP) 方法，鑑別日本鰻 *Anguilla japonica*、美洲鰻 *A. rostrata* 與歐洲鰻 *A. anguilla*

摘要

本試驗成功地分別應用 RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) 及 PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction- Restriction Fragment Length Polymorphism) 方法，鑑別高親緣性之日本鰻 *Anguilla japonica*、美洲鰻 *A. rostrata* 與歐洲鰻 *A. anguilla*。

分別增幅此 3 種鰻魚粒線體 DNA 中，具高度保留性之部分 Cytochrome *b* 基因，其核酸序列長度為 410 bp，而將此高度保留性基因片段分別定序後，分析核酸長度為 374 bp 之共識序列，結果美洲鰻與歐洲鰻核酸序列之百分比相似性 (Percent similarity) 最高，達 97.6，而日本鰻與美洲鰻或歐洲鰻間之核酸序列百分比相似性均為 92.0；顯示美洲鰻與歐洲鰻之親緣關係最為接近。

關鍵詞：鰻魚品種鑑別，隨機增幅多型性去氧核糖核酸，聚合酶連鎖反應-限制酶切割片段多型性

台灣地區自 1957 年起，開始嘗試產業化之日本鰻 *Anguilla japonica* 養殖，由於蓬勃發展且經濟價值高，很快地成為水產養殖業重要之一環⁽¹⁾。鰻屬 (*Anguilla*) 是降海迴游性 (Catadromous) 魚類，天然環境中之成熟鰻需降海產卵，而孵化之柳葉鰻 (*Leptocephalus*) 變態成鰻線 (Elver) 後溯回沿岸河口，進而上游至河川。然而至目前為止，人工養殖所需之鰻線尚無法以人工繁殖方式取得，必須從沿岸河口捕撈，因此，鰻線天然資源量之多寡成為決定鰻魚養殖業是否能正常營運之一大重要因素。

鰻屬在分類上有 18 種⁽²⁾，目前已知有養殖價值者即為日本鰻、歐洲鰻及美洲鰻。此 3 種鰻魚彼此間之親緣關係強，較不易從體表特徵判定種別 (尤其是鰻線期)；其中，由於日本鰻最可口且最易養成，其鰻線與成鰻之單價及消費市場需求量也就最高。多年來，為防止購買到低價之美洲鰻或歐洲鰻鰻線，養殖漁民主要是以 0.46 ppm 丁烯酸 (Ciodrin) 藥浴 1 小時之方式，判定出存活者為日本鰻鰻線，另 2 種鰻線則無法

存活；或利用脊椎骨數目之不同區分此 3 種鰻魚。惟上述方式在學術上有爭議^(3,4)，實應發展出科學性更高之鑑定方法。

近年來，生物科技之發展迅速，一些分子生物技術如 RAPD、RFLP、PCR-RFLP 及 AFLP 等已被應用於許多親緣關係之鑑定上，

本試驗嘗試分別以 RAPD 及 PCR-RFLP 技術，就分子基因層次鑑別此 3 種親緣關係強且不易從外觀區別之鰻魚，並比較其在實際應用上之優、缺點。

在 RAPD 方面，本試驗是選取單一隨機引子 (Single random primer) 分別增幅 3 種鰻魚 Total genomic DNA 之片段，利用所出現之種特異性 (Species-specific) 電泳標記 (Marker) 鑑定種別。

真核生物之 total genomic DNA 包括位於細胞核之核 DNA (Nuclear DNA) 及位於細胞質粒線體間質 (Matrix) 之粒線體 DNA (Mitochondrial DNA; 簡稱 mtDNA)。MtDNA 之分子型式較單純，不像核 DNA 常有複雜之插入序列 (Introns) 及重複序列

張湧泉，簡茂盛，賴仲義，劉正義 (1999) 應用隨機增幅多型性去氧核糖核酸 (RAPD) 及聚合酶連鎖反應-限制酶切割片段多型性 (PCR-RFLP) 方法，鑑別日本鰻 *Anguilla japonica*、美洲鰻 *A. rostrata* 與歐洲鰻 *A. anguilla*。水產研究, 7(1&2): 11-24.

(Repetitive sequences)⁽⁵⁾。MtDNA 因位於細胞質內，所以其基因不會重組，另外，mtDNA 之突變速率約為核 DNA 之 10 倍，即使是因演化而剛分開不久之品種，其種間之核酸置換 (Nucleotide substitution) 數量也會快速地累積，所以是很好的親緣系統樹研究 (Phylogenetic studies)⁽⁶⁾ 材料。其中，mtDNA 之 Cytochrome *b* gene 含有從種內 (Intraspecific) 至屬間 (Intergeneric) 之親緣系統訊息⁽⁷⁾。

在 PCR-RFLP 方面，本試驗先增幅各種鰻魚 cytochrome *b* gene 之高度保留區 (Highly conserved region) 同一位置之片段後，選定限制酶 (Restriction enzyme) 予以進一步地切割 (或者無法切割) 成不同之片段，藉以鑑別不同之品種；另外，找出其共識序列 (Consensus sequences) 並繪出親緣系統樹 (Phylogenetic tree)。

材料與方法

一、試驗魚之採樣

日本鰻 *Anguilla japonica* 取自水產試驗所鹿港分所及彰化縣鹿港鎮養殖戶之養殖鰻，歐洲鰻 *A. anguilla* 與美洲鰻 *A. rostrata* 分別取自水產試驗所鹿港分所之歐洲鰻養殖池與美洲鰻養殖池。以上 3 種鰻魚均為成鰻，體長 51~70 公分。鱧鰻 *A. marmorata* 則購自台中市北屯市場，為漁民自彰化溪流捕獲之野生種，體長為 49 公分，僅作為親緣分析之對照用。

二、試驗魚 Total genomic DNA 之萃取

(一) 全血 Total genomic DNA: 萃取步驟主要依據 Harris 等人⁽⁸⁾之方法並作部份修飾。

1. 於鰻魚肛門正後方約 2 公分處⁽⁹⁾，垂直插入套在無菌塑膠針筒 (容量為 2.5ml) 上之無菌 23 號針頭，自其尾靜脈抽取 0.2 ml 左右之全血，注入已含適量 (約 0.2 mg) EDTA 之 Eppendorf 內，輕微翻轉與混合後，於 3,300 × g、室溫下離心 10 分，倒掉上清液，加入 1ml 冰溫之 SPBS，翻轉與混合後離心 (條件同上)，倒掉上清液，加入 1 ml high TE buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.0; 40 mM EDTA)，再翻轉與混合後離心 (條件同上)，倒掉上清液，加入 1.5 ml lysis buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.0; 40 mM EDTA; 0.2 % SDS; 0.2 mg/ml proteinase K)，於 56°C 水浴過夜 (約

12 小時)。

2. 接著將其分裝至 Eppendorf 內，加入等體積之 phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1) 溶液，劇烈搖晃、混合後，於 1,2000 × g、室溫下離心 5 分，以寬口 Tip 取上清液，置於新 Eppendorf 內，加入等體積之 Chloroform/isoamyl alcohol (24:1) 溶液，劇烈搖晃與混合後，於室溫下離心 5 分 (條件同上)，以寬口 Tip 取上清液置於新 Eppendorf 內，加入其 1/10 體積之 3 M ammonium acetate 及 2 倍總體積之冰溫絕對酒精 (100 %)，輕微翻轉數次後，於 1,2000 × g、室溫下離心 20 分，吸除酒精並加入室溫酒精 (70 %) 1 ml 後，於 1,2000 × g、室溫下離心 15 分，吸除酒精、自然乾燥 10 分後，加入 100 μl low TE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA)，置於 4°C 冷藏。

(二) 肌肉細胞 Total genomic DNA: 萃取步驟主要依據 Taggart 等人⁽¹⁰⁾之方法並作部份修飾。

1. 秤取 100 mg 之骨骼肌置於 eppendorf 內。
2. 加入 150 μl, 0.5 M EDTA; 375 μl, 0.5 % sarcosyl 及 10μl proteinase K 溶液 (20 mg/ml)。混合後，置於 37°C 培養箱內過夜 (約 12 小時)。
3. 同 (一) 之 2。

三、DNA 濃度之測定

將萃取之 Total genomic DNA 抽取 1μl 稀釋 100 倍後，使用 Genequant II 核酸分析儀 (Pharmacia Biotech) 測定於 O.D. 260 nm 下之吸光值並計算出其濃度。

四、RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) 試驗

(一) 隨機引子 (Random primers) 之種類—購自 Operon 公司與 Protech 公司之 10-mers kits，包括 AB1 ~ AB20、E1 ~ E20、J1~J20 (Operon) 及 RAPD primer set 1~40 (簡稱 P1 ~ P40) (Protech)，計 100 種隨機引子。

(二) PCR—主要乃依據 Bielawski 等人⁽¹¹⁾之方法並作部份修飾。

1. 增幅反應液：以 20 ng Total genomic DNA (註：AB17 primer 組於最後階段使用 60 ng，以增加增幅產物在電泳圖上之強度) 作為增幅模版 (Template)、1 ×

PCR buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.3 ; 50 mM KCl ; 1.5 mM MgCl₂ ; 0.001 % (w/v) gelatin) 、250 μ M dNTPs 、2 U Taq DNA polymerase 、0.6 μ M primer , 用滅菌逆滲透水補足成 50 μ l ; 陰性對照組則不添加模版 DNA 。

2. 增幅條件：每一回合反應依序為變性 (Denaturation) : 94°C - 30 秒、煉合 (Annealing) : 36°C - 30 秒、延長 (Extension) : 72°C - 2 分, 計 45 回合, 最後一次反應則於 72°C 作用 7 分。所使用之 PCR 反應機型為 GeneAmpPCR®system 2400 (Perkin Elmer)。增幅產物 (Amplicons) 置於 4°C 冷藏備用。

(三) 電泳分析 (Agarose gel electrophoresis) — 增幅產物用 2% agarose gel 進行電泳分析。電泳設備為 Mupid-2 Minigel (Cosmo Bio Co, LTD), 電壓 100 V, 緩衝液為 0.5 xTAE (Tris-Acetate-EDTA)。將 10 μ l 增幅產物與 2 μ l 6 x loading buffer 混合均勻後, 注入膠片孔, DNA ladder marker 為 200 bp。電泳膠片於 Ethidium bromide (0.05 mg/ml) 溶液染色 30 秒後, 置於逆滲透水中脫色 30 分。

(四) 判讀 — 電泳膠片用 Alphaimager 2000 (Alpha-Innotech) 顯像、紀錄並作分析。

五、PCR-RFLP 試驗

先增幅鰻魚粒線體 DNA 具高度保留性 (Highly conserved)、核酸長度為 410 bp 之部分 Cytochrome *b* 基因⁽¹²⁾。增幅片段經核酸定序、分析後, 以限制酶 *Hinf* I 進行切割。

(一) 引子之設計

Forward primer : 5' ATGGCAAACCTACGAAAAAC 3'。

Reverse primer : 5' TGTCTCATGGAAGTACATA 3'。

(二) PCR 條件

1. 增幅反應液：包括 20 ng total genomic DNA、2 種 primer 各為 0.6 μ M, 其它與前述 RAPD 部份相同。

2. 增幅條件：每一回合反應依序為變性：94°C - 30 秒、煉合：60°C - 30 秒、延長：72°C - 30 秒, 計 35 回合, 最後一次反應則於 72°C 作用 7 分。PCR 反應機型及增幅產物之貯藏方式與前述 RAPD 部份相同。

(三) 進行與前述 RAPD 試驗一樣之電泳分析與判讀, 不過 DNA ladder marker 為 100 bp。

(四) 增幅之各種鰻魚 410 bp 基因片段核酸序列之比較與分析

將所增幅之 Cytochrome *b* 基因片段經定序 (明欣生物科技公司) 後, 再將所定出之共識序列相互比較各種鰻魚彼此間之鹼基置換 (Base substitution) 數量與比率, 同時計算鹼基置換中轉換 (Transition) 及顛換 (Transversion) 之數量。另外, 用 Lasergene (DNASTAR, Inc.) 分析軟體 MEGALIGN 單元之 Jotun Hein method 比較共識序列之百分比相似性 (Percent similarity) 並繪出親緣系統樹 (phylogenetic tree)。

(五) 增幅之各種鰻魚 410 bp 基因片段以限制酶 *Hinf* I 切割。先測定增幅產物之 DNA 濃度後, 直接將 4 μ g 左右之增幅產物與 1 μ l 之 *Hinf* I (New England Biolabs) 及相關緩衝液與滅菌逆滲透水等混合於 Eppendorf, 置於培養箱 (37°C) 反應 1 小時後, 再依前述方法進行電泳分析與判讀。

結果

一、RAPD 試驗

所試驗之 100 種隨機引子中, 有 7 種引子 (AB14、AB17、AB18、P4、P16、P17、P18) 對日本鰻、美洲鰻與歐洲鰻之 Total genomic DNA (前置實驗各採樣 1 尾受測鰻魚) 可以產生較明顯之 RAPD 增幅標記 (Markers)。不過只有 AB17 及 P17 (Table 1) 所產生之 Markers 再現性良好且有日本鰻、美洲鰻與歐洲鰻間之種特異性 (Species-specific) Marker (s) 呈現。

Table 1. Random primers used to generate the species-specific RAPD markers for discrimination of *Anguilla japonica*, *A. rostrata* and *A. anguilla*.

Primer	Sequence (5'-3')	G + C (%)
AB17	TCGCATCCAG	60
P17	CCTGGGCCTC	80

其中, AB 17 引子組之 Template DNA 使用量為 60 ng, 所增幅 RAPD markers 之核酸長度主要約介於 400—1600 bp 之間, 種特異性 Markers 則約介於 400—800 bp 之間, 可以用來鑑別日本鰻—美洲鰻與

美洲鰻—歐洲鰻 (Fig. 1)。另外，P 17 引子組之 Template DNA 使用量為 20 ng，增幅 RAPD markers 之核酸長度主要約介於 350 – 1,200 bp 之間，種特異

性 Markers 則約介於 600 - 800 bp 之間，可以用來鑑別日本鰻 - 美洲鰻、美洲鰻 - 歐洲鰻與日本鰻—歐洲鰻 (Fig. 2)。

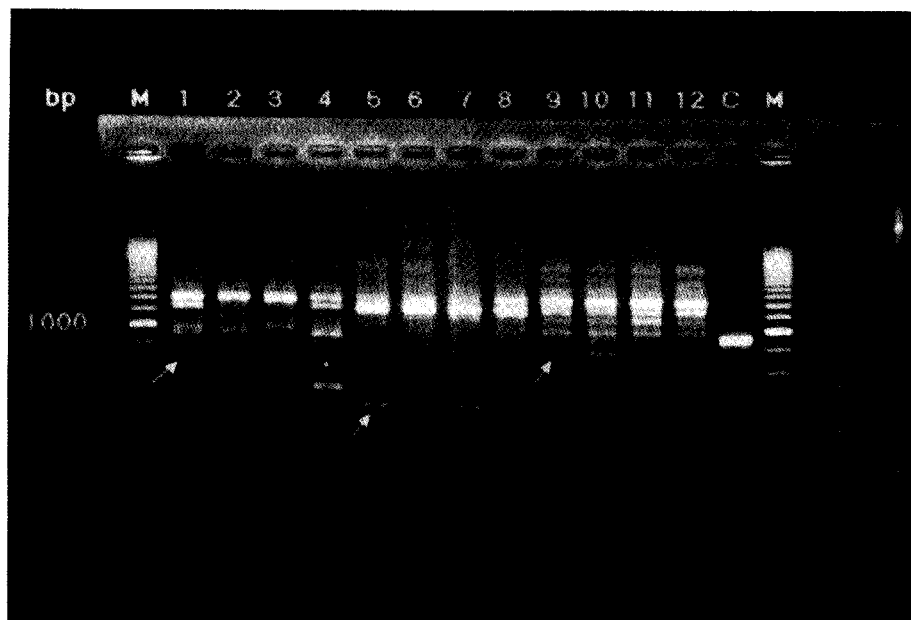


Fig. 1. RAPD banding patterns of amplified genomic DNA (in whole blood, with exception of 4, 8, 12 in skeletal muscle), obtained from the eels, using primer AB17. Arrows indicating the species-specific markers. Lane 1~4: *A. japonica*; 5~8: *A. rostrata*; 9~12: *A. anguilla*; C: control; M: 200 bp DNA ladder marker.

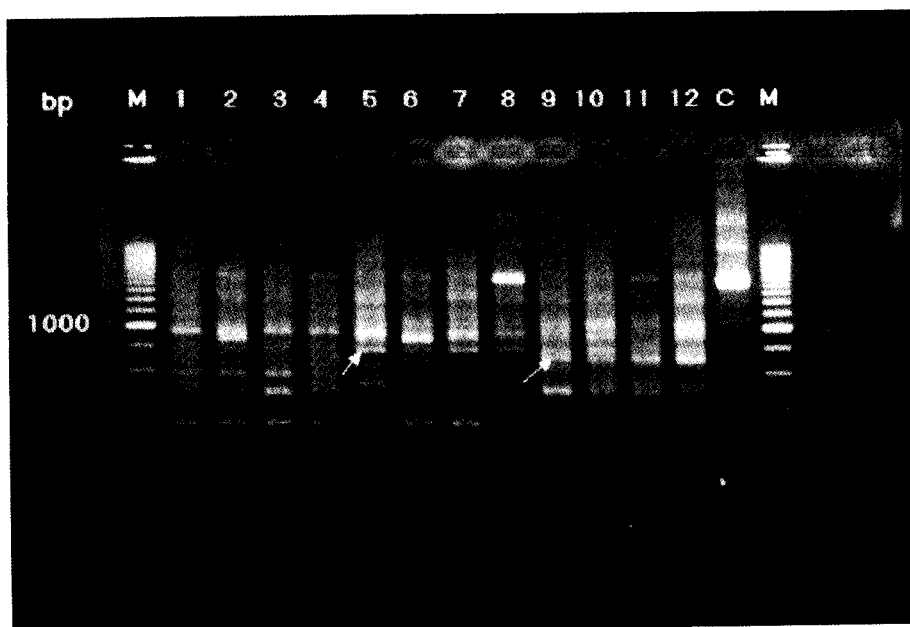


Fig. 2. RAPD banding patterns of amplified genomic DNA (in whole blood, with exception of 4, 8, 12 in skeletal muscle), obtained from the eels, using primer P17. Arrows indicating the species-specific markers. Lane 1~4: *A. japonica*; 5~8: *A. rostrata*; 9~12: *A. anguilla*; C: control; M: 200 bp DNA ladder marker.

二、PCR-RFLP 試驗

從分別自日本鰻、美洲鰻、歐洲鰻與鱸鰻肌肉抽取之 Total genomic DNA，增幅到各種鰻魚粒線體 DNA cytochrome *b* gene 具高度保留性之 410 bp 片段，長度約 500 bp 之片段為非特異性產物 (Fig. 3)。其中，鱸鰻組僅供建立親緣系統樹 (Phylogenetic tree) 之對照用。從各種鰻魚所增幅到之前述 DNA 片段經核酸定序後，分別得到 377 ~ 382 bp 不等之序列，經序列

比對後，得到共識序列為 374 bp (Fig. 4)。

就限制酶 *Hinf* I 而言，日本鰻於共識序列之 198 bp 附近有 1 個切割位 (Cut site)，美洲鰻與歐洲鰻均無此切割位，另外，於共識序列之 315 bp 附近，日本鰻與美洲鰻均各有 1 個切割位，歐洲鰻則無；即：日本鰻之此高度保留區片段計有 2 個切割位，可分成 3 段，美洲鰻有 1 個切割位，可分成 2 段，歐洲鰻則無切割位，保持原狀 (Fig. 4)，可藉此現象區別日本鰻、美洲鰻與歐洲鰻 (Fig. 5)。

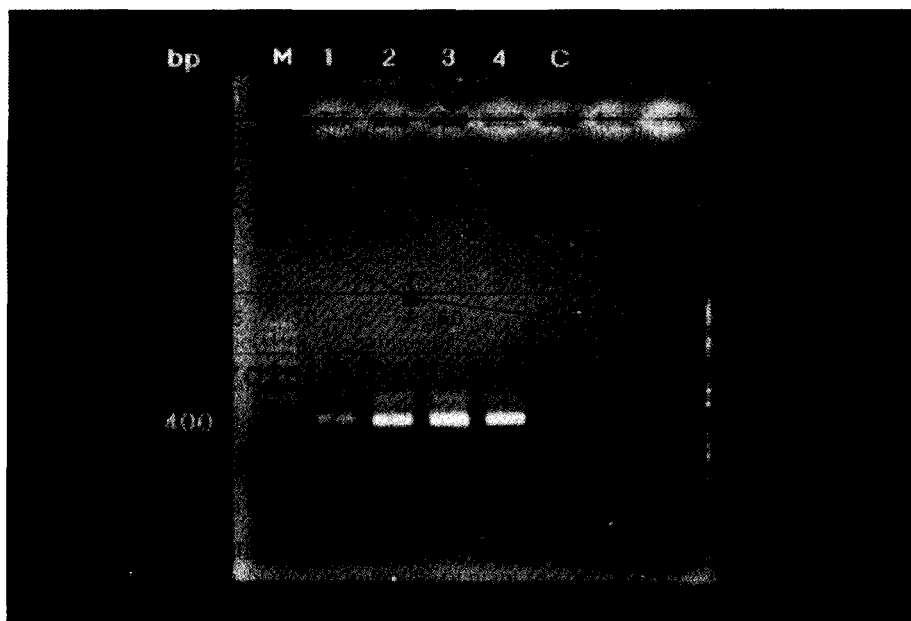


Fig. 3. Amplified a 410 bp segment of mitochondrial cytochrome *b* gene (in skeletal muscle) from the eels. Lane 1: *A. japonica*; lane 2: *A. rostrata*; lane 3: *A. anguilla*; lane 4: *A. marmorata* (just for comparison). C: control. M: 100 bp DNA ladder marker.

三、親緣關係 (Phylogenetic relationship)

分析各種鰻魚 374 bp 共識序列之組成，結果顯示美洲鰻與歐洲鰻間之鹼基置換 (Base substitution) 數量最少，只有 9 對，置換率為 0.0241，相對於美洲鰻與歐洲鰻，日本鰻反而與鱸鰻之親緣較相近，鹼基置換數為 19 對，置換率為 0.0508 (Table 2)。

在各對之鹼基置換中，轉換 (Transition; 嘌呤間或嘧啶間之置換) 之現象都比顛換 (Transversion; 嘌呤、嘧啶間或嘧啶、嘌呤間之置換) 高出許多 (Table 3)。

另外，從 374 bp 共識序列中，計算出日本鰻與鱸鰻鰻核酸序列之百分比相似性 (Percent similarity) 為

94.9，美洲鰻與歐洲鰻則高達 97.6 (Table 4)；在親緣系統樹之分析上 (Fig. 6)，日本鰻與鱸鰻在同一群 (Group)，美洲鰻與歐洲鰻則形成另一群。Fig. 6 用尼羅魚 *Oreochromis nilotica* 之相對共識序列 (引用自 NCBI GenBank database No.AB018989) 作為 Outgroup 所建立之系統樹，可以凸顯出日本鰻、美洲鰻、歐洲鰻與鱸鰻之高度親緣關係。

討論

本試驗所採樣之鰻魚皆為成鰻，事實上就成鰻而言，日本鰻之頭型較細長，眼珠較小，易於將其與美

洲鰻及歐洲鰻作區隔。不過美洲鰻與歐洲鰻就不易區別了（雖然一般而言美洲鰻之身軀較短），成鰻來自水產試驗所鹿港分所之美洲鰻池與歐洲鰻池，當初為自水產試驗所基隆總所分養，據瞭解其係分批從美國

（美洲鰻）與丹麥（歐洲鰻）引進。另外，鱸鰻鰻線尾部有大量黑色素沉積且成長後之身軀佈滿黑色斑點，其外表特徵易於與日本鰻、美洲鰻與歐洲鰻區別，所以在本試驗中僅選擇做為另一對照組進行親緣分析。

1

<i>A. japonica</i>	AAAAATTGCT	AACGATGCCC	TAGTGGATCT	ACCAACCCCA	TCCAACATTT
<i>A. rostrata</i>		T			T
<i>A. anguilla</i>					T
<i>A. marmorata</i>				C	

51

<i>A. japonica</i>	CAGCATGATG	AAATTTTGGC	TCTCTCCTAG	GACTATGCCT	TATTTGCGAA
<i>A. rostrata</i>			T	T	T A
<i>A. anguilla</i>			T	T	T A
<i>A. marmorata</i>				T	C A

101

<i>A. japonica</i>	ATCCTTACAG	GATTATTCTT	AGCAATACAC	TACACATCAG	ACATTTCAAC
<i>A. rostrata</i>		C	C	T T	C
<i>A. anguilla</i>		C	C	T T	C
<i>A. marmorata</i>		C	C		C

151

Hinf I

<i>A. japonica</i>	TGCCTTTTCC	TCAGTAGCCC	ACATCTGCCG	AGACGTTAAT	TATGGATGAT
<i>A. rostrata</i>	C	T		C C	
<i>A. anguilla</i>	C	T		C C	C
<i>A. marmorata</i>					

201

<i>A. japonica</i>	TCATCCGAAA	TTTACATGCA	AACGGGGGCT	CCTTCTTCTT	TATCTGCCTC
<i>A. rostrata</i>	A T C CC		T	A	A
<i>A. anguilla</i>	A T C CC		T	A	A
<i>A. marmorata</i>	A C C		A		T T

(continued)

Fig. 4. 374 bp consensus sequence of the 410 bp segment of mitochondrial cytochrome *b* gene (in skeletal muscle) from the eels. Bases underlined are recognition sequences (5'--G^ANTC--3', N=A, T, C or G) for *Hinf* I.

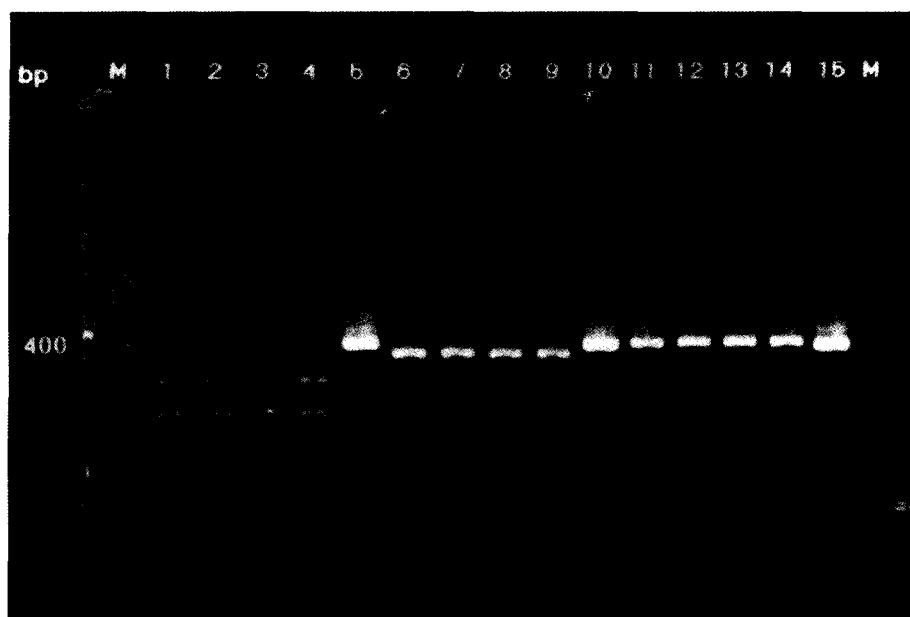


Fig. 5. Cleavage, with *Hinf* I, of the 410 bp segment of mitochondrial cytochrome *b* gene (in whole blood, with exception of 4,9,14 in skeletal muscle) from the eels. Lanes 1~5: *A. japonica*; 6~10: *A. rostrata*; 11~15: *A. anguilla*., lanes 5,10,15: control. M: 100 bp DNA ladder marker.

Table 2. Pairwise differences in number of variable sites of the 374 bp consensus sequences. *A. marmorata* just for comparison.

	<i>A. japonica</i>	<i>A. rostrata</i>	<i>A. anguilla</i>	<i>A. marmorata</i>
<i>A. japonica</i>		0.0802	0.0802	0.0508
<i>A. rostrata</i>	30		0.0241	0.0695
<i>A. anguilla</i>	30	9		0.0802
<i>A. marmorata</i>	19	26	30	

Above diagonal: mean distance

Below diagonal: absolute distance

Table 3. Pairwise differences in number of transitions and transversions of the 374 bp consensus sequences. *A. marmorata* just for comparison.

	<i>A. japonica</i>	<i>A. rostrata</i>	<i>A. anguilla</i>	<i>A. marmorata</i>
<i>A. japonica</i>		23	22	14
<i>A. rostrata</i>	7		8	22
<i>A. anguilla</i>	8	1		25
<i>A. marmorata</i>	5	4	5	

Above diagonal: transition

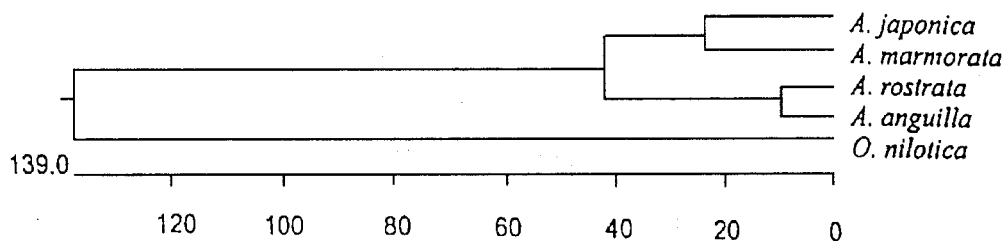
Below diagonal: transversion

Table 4. Pair distances of the 374 bp consensus sequences. *A. marmorata* just for comparison.

	<i>A. japonica</i>	<i>A. rostrata</i>	<i>A. anguilla</i>	<i>A. marmorata</i>
<i>A. japonica</i>		92.0	92.0	94.9
<i>A. rostrata</i>	8.6		97.6	93.1
<i>A. anguilla</i>	8.6	2.5		92.0
<i>A. marmorata</i>	5.3	7.4	8.6	

Above diagonal: percent similarity

Below diagonal: percent divergence

**Fig. 6.** Phylogenetic tree (phenogram) made from the 374 bp consensus sequences in the 410 bp segment of mitochondrial cytochrome *b* gene from the fishes. *Oreochromis nilotica* as the outgroup.

本試驗應用 RAPD 技術成功地鑑別台灣地區目前所養殖之 3 種鰻魚 - 日本鰻、美洲鰻與歐洲鰻；Takagi 等人⁽¹³⁾用 RAPD 技術鑑別日本鰻、澳洲鰻 *Anguilla australis* 及雙色鰻 *A. bicolor*。顧名思義，RAPD 技術係以隨機引子隨意地嘗試與 total genomic DNA 之可能互補序列煉合，可進而增幅到某些核酸長度不一之 DNA 片段產物，因為模版 DNA 不同時，所增幅到之產物也就不盡相同，而會產生多型性 (Polymorphic) 現象。再從此些產物尋找是否有可用來分辨種別之 Marker (s)。欲分辨之物種如果在演化地位上相近，一般而言其核酸序列就較相似，親緣關係也較密切，在理論上也就較不易找出適當之隨機引子及具種別特異性之 Marker (s)。本試驗共計使用 100 種隨機引子，最後才找出 2 種引子可藉以鑑別此 3 種鰻魚，可見其親緣之相近。有些引子雖可以對此 3 種鰻魚之 Total genomic DNA 增幅到一些 Markers，不過其卻都是種間所共有之單型性 (Monomorphic) markers⁽¹⁴⁾，無法用以鑑別此 3 種鰻魚，但或可做為與其它不同魚種之區別標準。

本試驗所採用之 RAPD 增幅條件係參考 Bielawski 等人⁽¹¹⁾所發表之論文。其試驗生物有條紋鱸 (Striped bass)、雉 (Pheasant)、南美洲老鼠 (South American mouse) 及青蛙 (Frog) 等，均有良好之試驗結果，其並建議可應用在一般脊椎動物之種別鑑定上。

RAPD 技術在操作上常見的問題是增幅產物在電泳圖上有時候會呈現明暗、深淺不一之現象^(14,15)。模版 DNA 最好是瞬間地 (Instantaneously) 加入增幅反應液中，Tip 不要在液中浸太久，以免因毛細管作用使一部份模版 DNA 被回收⁽¹⁶⁾，影響實驗結果。

另外，*Taq* DNA polymerase 有可能會污染到外因性 DNA，一些研究者認為其並非來自 *Escherichia coli* 或 *Thermus aquaticus*，而是偏向於 *Corynebacterium variabilis*、*Arthrobacter globiformis* 及 *Mycobacterium hiberniae* 等細菌之部份核酸序列⁽¹⁷⁾。本試驗所使用之 *Taq* DNA polymerase 係以 *Escherichia coli* 表現載體大量生產，由對照組有 bands 甚至 smears 出現之情況，可瞭解其某些 DNA polymerase 亦有可能曾被污染，不過並未影響到試驗組之判讀。

RAPD 與傳統 PCR 不相同之另一項特點是由於其煉合溫度低，允許引子與模版 DNA 錯配 (Mismatch) 之

情況發生，造成所使用之單一隨機引子可以特異地或非特異地與模版 DNA 結合⁽¹⁸⁾，在此條件下，於 Agarose gel 電泳圖同一位置出現、核酸長度相同之 Bands 極有可能並不一定是同一基因片段，其核酸序列可能不一樣⁽¹⁵⁾。但是無論如何，RAPD 技術可以在受測 DNA 未知任何核酸序列之情況下，能快速呈現種特異性 Marker (s) 為此分析方法之最大優點⁽¹⁸⁾，畢竟，若只是比較種別間之 DNA 片段產物在電泳圖上之表現，RAPD 方法最具能同時兼顧方便性與精確性。不過在進行比較時，除了種特異性 Marker (s) 外，最好也注意到電泳圖上是否有每次皆能出現該種生物特有之特異性 Pattern，以避免偽陽性造成之誤判。

如果用 RAPD 電泳圖資料分析物種之遺傳變異與親緣關係，所使用之計算式必須將每個 Sample 之全部 RAPD markers 一一列出，比較各個 Marker 之存在與否。由於 Markers 之明暗、深淺不一，其出現是真的多型性 (True polymorphism) 或人為因素 (Artifactual variation) 經常無法區別⁽¹⁸⁾，計算結果之準確度也就較低。所以本試驗使用 PCR-RFLP 技術建立親緣關係。

傳統 RFLP 技術於實驗上所需要之 DNA 量較多，約 2~10 μ g，且有時需用放射性同位素加以偵測⁽¹⁹⁾，至於 PCR-RFLP 技術則是先以 PCR 技術大量增幅所需之 DNA 後，才進行 RFLP 之分析，故其 DNA 之原始需求量較少，僅為若干個 Nanogram (ng)，又不必利用到放射性同位素，在採樣上與執行上比傳統之 RFLP 方法既方便又安全。

在 PCR-RFLP 方面，本試驗參考 Aoyama 等人⁽¹²⁾所定出之 8 種鰻魚 (包括日本鰻、美洲鰻、歐洲鰻與鱸鰻等) 粒線體 DNA Cytochrome *b* gene 高度保留區共識序列 (410 bp)，設計 1 對 Primers，增幅產物經定序得到之共識序列為 374 bp；至於 Aoyama 等人所使用之 primers 則是修飾自 Kocher 等人⁽⁷⁾所發表之保留性 (Conserved) Primers，此對保留性 Primers 之增幅產物核酸長度僅 307 bp。

應用 DNASTAR lasergene 軟體之 MAPDRAW 單元可得知本試驗中，日本鰻、美洲鰻與歐洲鰻之 374 bp 共識序列若以 *Cvi*I、*Cvi*K、*Hinf*I 或 *Mnl*I 等限制酶切割，所產生之片段會因切割位之不同呈現數量與大小不完全相同之片段，可藉以鑑別此 3 種鰻魚。另外，所增幅日本鰻、美洲鰻與歐洲鰻之 410 bp 片段扣除 374 bp 共識序列後，剩餘之 36 bp 核酸序列中並無 *Hinf*I 限制酶之切割位⁽⁴⁾。本試驗僅使用 *Hinf*I 限

制酶，事實上，用 *Hinf* I 限制酶切割所增幅之 Cytochrome *b* gene 部份片段，藉以分辨鰻魚品種之報告已有多起^(4,20,21)，雖然其所切割之核酸長度不盡相同。

各種鰻魚間之鹼基置換數均以轉換比顛換高出甚多，其中以美洲鰻與歐洲鰻間之置換數為最少，其在親緣系統樹自成一類 (Group)，而日本鰻與鱸鰻另成一類，此現象與 Aoyama 等人⁽¹²⁾ 所建立之親緣系統樹類似，不過其所使用之分析軟體為 Phylip，與本試驗所使用之軟體不同。而 Bastrop 等人⁽²¹⁾ 以粒線體之 16S rDNA 部份片段建立一些鰻魚之親緣系統樹，結果顯示美洲鰻與歐洲鰻也是同一類，但是鱸鰻則被認為是最古老之祖先，由其分衍出日本鰻與其它種別之鰻魚。

若將取樣自清華大學生命科學系曾晴賢副教授等人登錄在 NCBI GenBank 上關於日本鰻、美洲鰻、歐洲鰻與鱸鰻 Cytochrome *b* 基因核酸序列 (1,140 bp) 與 Aoyama 等人⁽¹²⁾ 所發表之核酸序列 (410 bp)，兩者與本試驗相對應之 374 bp 共識序列分別同樣以

DNASTAR lasergene 軟體 MEGALIGN 單元之 Jotun Hein Method 建立其親緣系統樹，依序分別為 Fig. 7 (a) 及 Fig. 7 (b)，並與本試驗之結果 (Fig. 6) 互相比較，可以發現彼此間均不相同。其差異性可能與鰻魚採樣個體、地點與核酸序列分析法之不同有關。不過，若將上述 3 組 374 bp 共識序列一起建立親緣系統樹 (Fig. 8)，顯示美洲鰻與歐洲鰻分在同一類，日本鰻與鱸鰻則形成另一類。

在 374 bp 共識序列之百分比相似性方面 (Table 5)，可以看到 3 組鰻魚之日本鰻或歐洲鰻於同種鰻魚彼此間之百分比相似性均在 99.5 以上。相似性比較小的是美洲鰻第 2 組與第 3 組間之 98.7，尤其是本試驗之鱸鰻與其它 2 組間之 95.7 與 95.2，原因也許是鱸鰻個體間之遺傳變異較大或是本試驗之鱸鰻為與日本鰻之雜交種。不過仔細觀察 3 組鱸鰻之核酸序列，可以發現若是同樣以本試驗之 410 bp 核酸長度用限制酶 *Hinf* I 切割，結果都是只有一個相同之切割位。另外，3 組內或 3 組間之美洲鰻及歐洲鰻，彼此間之百分比相似性在 97.1~97.9 之間，相當穩定。

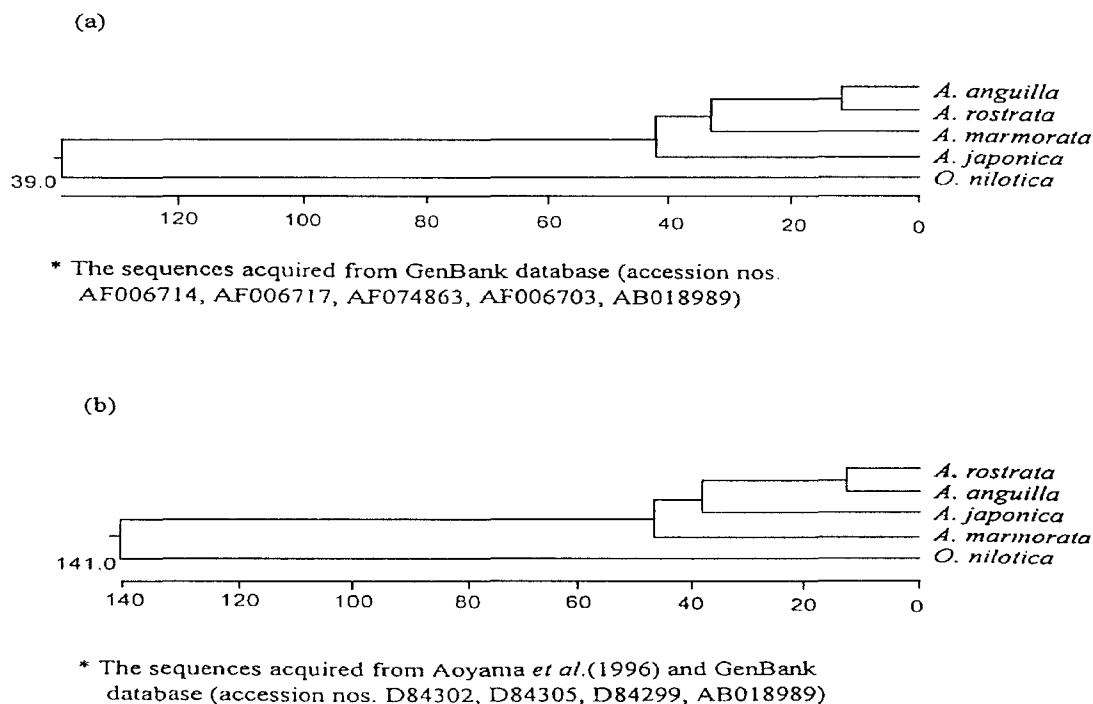


Fig. 7. Phylogenetic tree (phenogram) made from the 374 bp consensus sequences, in mitochondrial cytochrome *b* gene of the fishes. *Oreochromis nilotica* as the outgroup.

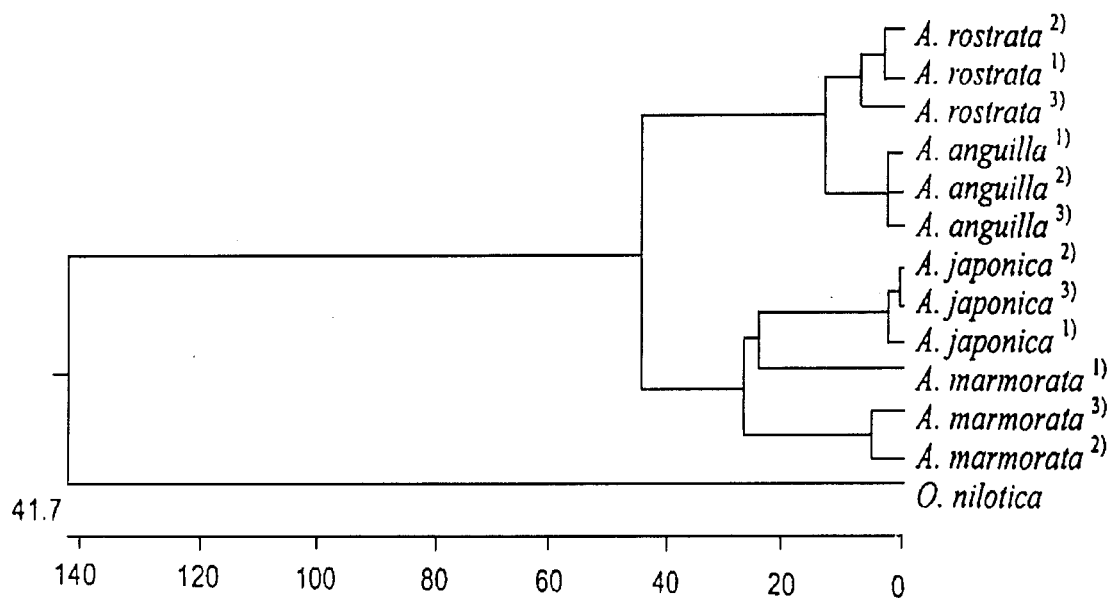


Fig. 8. Phylogenetic tree (phenogram) made from the same 374 bp consensus sequences, data ¹⁾ from Fig. 6, ²⁾ from Fig. 7 (a) and ³⁾ from Fig. 7 (b), in mitochondrial cytochrome *b* gene of the fishes. *Oreochromis nilotica* as the outgroup.

Table 5. Pair distances of the 374 bp consensus sequences. *A. marmorata* just for comparison, data the same as in Fig. 8. *Oreochromis nilotica* as the outgroup.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
1		92.0	92.0	97.6	76.8	91.5	99.5	97.1	92.3	97.3	91.7	99.7	91.7	1 <i>A. anguilla</i> ¹⁾
2	8.6		94.9	92.0	77.1	99.5	92.0	92.0	94.1	92.3	93.6	92.3	99.7	2 <i>A. japonica</i> ¹⁾
3	8.6	5.3		93.1	77.9	94.9	92.0	93.1	95.7	92.8	95.2	92.3	94.7	3 <i>A. marmorata</i> ¹⁾
4	2.5	8.6	7.4		76.5	91.5	97.6	99.5	92.5	99.2	92.0	97.9	91.7	4 <i>A. rostrata</i> ¹⁾
5	27.8	27.4	26.3	28.2		77.6	76.8	77.1	77.9	76.3	78.4	76.8	77.3	5 <i>O. nilotica</i>
6	9.2	0.5	5.3	9.2	26.6		91.5	91.5	94.1	91.7	93.6	91.7	99.7	6 <i>A. japonica</i> ²⁾
7	0.5	8.6	8.6	2.5	27.8	9.2		97.1	92.3	97.3	92.3	99.7	91.7	7 <i>A. anguilla</i> ²⁾
8	3.0	8.6	7.4	0.5	27.4	9.2	3.0		92.5	98.7	92.0	97.3	91.7	8 <i>A. rostrata</i> ²⁾
9	8.3	6.1	4.4	8.0	26.3	6.1	8.3	8.0		92.3	98.9	92.5	93.9	9 <i>A. marmorata</i> ²⁾
10	2.7	8.3	7.7	0.8	28.7	8.9	2.7	1.3	8.3		91.7	97.6	92.0	10 <i>A. rostrata</i> ³⁾
11	8.9	6.7	5.0	8.6	25.5	6.7	8.3	8.6	1.1	8.9		92.0	93.3	11 <i>A. marmorata</i> ³⁾
12	0.3	8.2	8.3	2.2	27.8	8.9	0.3	2.7	8.0	2.4	8.6		92.0	12 <i>A. anguilla</i> ³⁾
13	8.9	0.3	5.6	8.9	27.0	0.3	8.9	8.9	6.4	8.6	7.0	8.6		13 <i>A. japonica</i> ³⁾
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	

Above diagonal: percent similarity

Below diagonal: percent divergence.

PCR-RFLP 技術之執行過程與結果相當穩定，不會如 RAPD 一樣產生明暗不一之 Markers。比較麻煩的是 PCR-RFLP 之增幅產物必須先經過定序後，才能知道可以用何種限制酶切割。另外，操作 RAPD 與 PCR-RFLP 所需之時間也不相同，就本試驗而言，其差異點在於 RAPD 之 PCR 時間約為 4 小時 30 分，而 PCR-RFLP 之 PCR 時間約 2 小時，再加上限制酶切割時間約 1 小時，計約 3 小時。不過 PCR-RFLP 第 1 次操作時（就欲分析之同種生物而言）必須先知其核酸序列，故需先行定序，在建立方法上所需時間較為繁複，惟一旦經建立後可縮短其時間。

總之，RAPD 與 PCR-RFLP 技術均可以用來鑑別日本鰻、美洲鰻與歐洲鰻，不過後者之表現較穩定、所需時間較少又可以快速地進一步瞭解親緣關係，實為應用上之優先選擇。

謝辭

感謝水產試驗所及中興大學獸醫學院夥伴對本試驗之協助與提出寶貴意見，也感謝本文稿審查人員與編輯人員之高見與協助。

參考文獻

1. 廖一久，廖學耕，曾萬年，郭慶老 (1999) 水試 1 號によるレプトケファルスの調査. 月刊海洋, 號外, **18**: 27-33.
2. 松井 魁 (1972) 鰻學 (生物學的研究篇). 恆星社厚生閣, 日本, p. 13.
3. Avise, J. C., G. S. Helfman, N. C. Saunders. and L. S. Hales (1986) Mitochondrial DNA differentiation in North Atlantic eels: population genetic consequences of an unusual life history pattern. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, **83**: 4350-4354.
4. Wakao, T., Y. Hikida, T. Tsuneyoshi, S. Kaji, H. Kubota and T. Kubota (1999) A simple DNA analysis for identifying eel species by using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism method (in Japanese). Nippon Suisan Gakkaishi, **65** (3): 391-399.
5. Wilson, A. C., R. L. Cann, S. M. Carr, M. George, U. B. Gyllenstein, K. M. H. Bychowski, R. G. Higuchi, S. R. Palumbi, E. M. Prager, R. D. Sage and M. Stoneking (1985) Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. Biological Journal of the Linnean society, **26**: 376-400.
6. Watson, J. D., M. Gilman, J. Witkowski and M. Zoller (1992) Recombinant DNA, 2nd ed. Scientific American Books, New York, p. 446.
7. Kocher, T. D., W. K. Thomas, A. Meyer, S. V. Edwards, S. Paabo, F. X. Villablanca and A. C. Wilson (1989) Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **86**: 6196-6200.
8. Harris, A. S., S. Bieger, R. W. Doyle and J. M. Wright (1991) DNA fingerprinting of tilapia, *Oreochromis niloticus*, and its application to aquaculture genetics. Aquaculture, **92**: 157-163.
9. 沈明成 (1987) 鰻魚 *Pleistophora anguillarum* 之孢子性狀及感染途徑探討. 國立中興大學獸醫學研究所 碩士論文, p.14.
10. Taggart, J. B., R. A. Hynes, P. A. Prodöhl and A. Ferguson (1992) A simplified protocol for total DNA isolation from salmonid fishes. Journal of fish biology, **40**: 963-965.
11. Bielawski, J. P., K. Noack, and D. E. Pumo (1995) Reproducible amplification of RAPD markers from vertebrate DNA. BioTechniques, **18** (5): 856-860.
12. Aoyama, J., T. Kobayashi and K. Tsukamoto (1996) Phylogeny of eels suggested by mitochondrial DNA sequences (in Japanese). Nippon Suisan Gakkaishi, **62** (3): 370-375.
13. Takagi, M. and N. Taniguchi (1995) Random amplified polymorphic DNA (RAPD) for identification of three species of *Anguilla*, *A. japonica*, *A. australis* and *A. bicolor*. Fisheries Science, **61** (5): 884-885.
14. Dinesh, K. R., T. M. Lim, W. K. Chan and V. P. E. Phang (1996) Genetic variation inferred from RAPD fingerprinting in three species of tilapia. Aquaculture International, **4**: 19-30.
15. Venugopal, G., S. Mohapatra, D. Salo and S. Mohapatra (1993) Multiple mismatch annealing: Basis for random amplified polymorphic DNA fingerprinting. Biochemical and biophysical

- research communications, **197** (3): 1382-1387.
16. Power, E. G. M. (1996) RAPD typing in microbiology-a technical review. *Journal of hospital infection*, **34**: 247-265.
17. Hughes, M. S., L. A. Beck and R. A. Skuce (1994) Identification and elimination of DNA sequences in *Taq* DNA polymerase. *Journal of clinical microbiology*, **32** (8): 2007-2008.
18. Tyler, K. D., G. Wang, S. D. Tyler and W. M. Johnson (1997) Factors affecting reliability and reproducibility of amplification-based DNA fingerprinting of representative bacterial pathogens. *Journal of clinical microbiology*, **35** (2): 339-346.
19. Williams, J. G. K., M. K. Hanafey, J. A. Rafalski and S. V. Tingey (1993) Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. *Methods in Enzymol.*, **51**: 704-740.
20. Tagliavini J., I. J. Harrison, and G. Gandolfi (1995) Discrimination between *Anguilla anguilla* and *A. rostrata* by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis. *Journal of fish biology*, **47**: 741-743.
21. Bastrop, R., B. Strehlow, K. Jurss and C. Sturmbauer (2000) A new molecular phylogenetic hypothesis for the evolution of freshwater eels. *Molecular phylogenetics and evolution*, **14**(2): 250-258.

Yuan-Chuan Chang¹, Maw-Sheng Chien², Jong-Yih Lai¹
and Cheng-I Liu²

¹ Lukang Branch, Taiwan Fisheries Research Institute, Committee of
Agriculture, Executive Yuan, 106 Hai-Pu, Lukang 505, Taiwan.

² Graduate Institute of Veterinary Pathology, National ChungHsing
University, 250 Kuo-Kuang Rd, Taichung 402, Taiwan.

(Accepted 26 September 1999)



Identification of *Anguilla japonica*, *A. rostrata* and *A. anguilla* by RAPD and PCR-RFLP Techniques

Abstract

Three related freshwater eels *Anguilla japonica*, *A. rostrata* and *A. anguilla* were discriminated by RAPD (random amplified polymorphic DNA) and PCR-RFLP (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism) techniques.

A 410 bp highly conserved segment of mitochondrial cytochrome *b* gene was amplified, respectively, and phylogenetic relationship was analyzed according to the 374 bp consensus sequences of cytochrome *b* gene. The results showed that *A. rostrata* and *A. anguilla* were most closely related, with the highest 97.6 of percent similarity, while between *A. japonica* and *A. rostrata* or between *A. japonica* and *A. anguilla* was with the same percent similarity, 92.0.

Key words: Identification of eel species, RAPD, PCR-RFLP