

建立臺灣原生種塘蝨魚種原之 微衛星 DNA 分析技術

黃家富·彭弘光

竹北分所

臺灣本土原有之淡水經濟養殖魚種如：塘蝨魚(*Clarias fuscus*)、鰱魚(*Channa maculata*)、鯰魚(*Parasilurus asotus*)及鰕魚(*Carassius carassius*)等，因該等魚類之體型較小或成長較緩而不受養殖業者青睞，加上求新、求變及追求經濟效益等因素，遂自國外引進同屬之大型魚種養殖。但因人為之雜交育種，導致養殖魚種之品系混亂，再加上各地溝渠、河川之污染及農藥的濫用，導致臺灣本土原有之淡水經濟養殖魚種瀕臨絕種。

近年來由於生態保育與環境監測日益受到重視，種原之多樣性研究與保種日趨重要。微衛星 DNA 分析技術係由基因層次來檢定物種之多樣性與親緣關係，較之傳統分類更精確，

更符合自然分類之要求。本報告介紹本分所以微衛星(Microsatellite) DNA 作為鑑定標記(Identified marker)，進行親緣關係、基因流動等研究及種原分類探討之現況。

首先運用限制內切酶將塘蝨魚染色體 DNA 剪切，並與質體接合，再轉殖到大腸桿菌(*E. coli*)中培養，成功的篩選到 1632 株轉殖成功的 *E. coli* 菌株，運用點墨分析(dot blot)獲得 64 株具(GT)_n DNA 片段之菌株，再經南方氏雜合(Southern Hybridization)檢定分析，結果證明 64 株菌中，有 29 株具明顯的呈色反應，選取 25 株菌株進行 DNA 序列分析；由 24 種不同的微衛星 DNA 序列初步定出 24 組引子(primers)，如圖 1、表 1 所示。

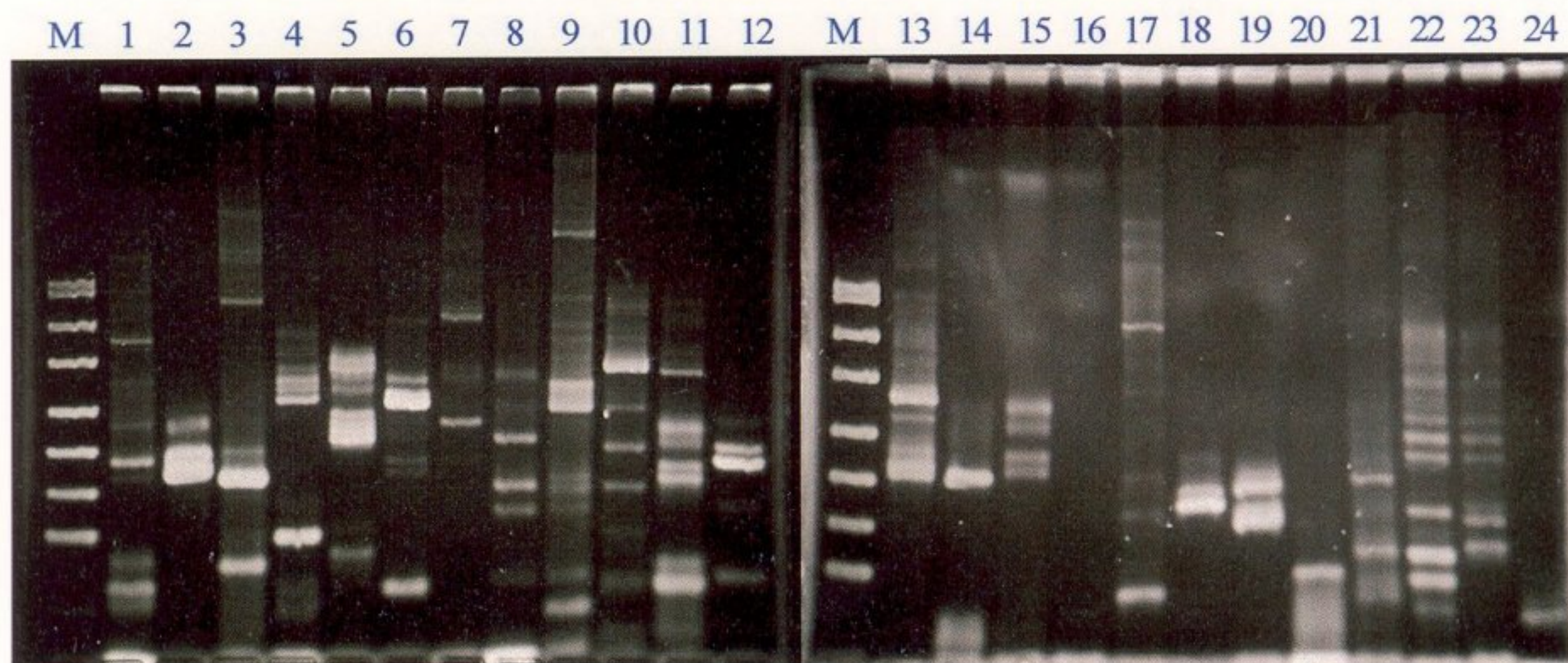


圖 1 Amplification Profiles of Microsatellite DNA for artificial propagation catfish, with 24 different primers
M:Marker (pUC19/Msp I) Lane 1:Primer *Cfu-1*, Lane 2:primer *Cfu-2*, Lane 3:primer *Cfu-3*, Lane 4:primer *Cfu-4*,
Lane 5:primer *Cfu-5*, Lane 6:primer *Cfu-6*, Lane 7:primer *Cfu-7*, Lane 8:primer *Cfu-8*, Lane 9:primer *Cfu-9*, Lane
10:primer *Cfu-10*, Lane 11:primer *Cfu-11*, Lane 12:primer *Cfu-12*, Lane 13:primer *Cfu-13*, Lane 14:primer *Cfu-14*,
Lane 15:primer *Cfu-15*, Lane 16:primer *Cfu-16*, Lane 17:primer *Cfu-17*, Lane 18:primer *Cfu-18*, Lane 19:primer
Cfu-19, Lane 20:primer *Cfu-20*, Lane 21:primer *Cfu-21*, Lane 22:primer *Cfu-22*, Lane 23:primer *Cfu-23*, Lane
24:primer *Cfu-24*

由微衛星 DNA 序列研究結果與非洲塘蝨魚(*C. gariepinus*)比較獲得更多之形式，而相同形式的序列主要為(GT)_n、(GT)_nN_n(GT)_n及(GA)_nN_n(GT)_n等三種。該等序列與 NCBI 資料庫中之 dbSTS 的資料比對，其均尚無相同的序列存在。但由於目前有許多微衛星 DNA 的

STS 序列尚未在資料庫中註冊，故該等引子序列是否可成為 STS 序列功能，仍有待更多的資料來比對。該等引子可供塘蝨魚族群分析之用，對該魚種種原庫之建立，提供了新的資訊與方法，期望此技術能對臺灣現生種魚類多樣性研究提供符合研究潮流之需。

表 1 Primer Sequence of Microsatellite (GT)_n Sequence Tagged Sites (STS) for catfish, *Clarias fuscus*

locus	Repeat array	Primer Sequences of Microsatellite STS site (‘5 – ‘3)	Annealing Temperature (°C)
Cfu-1	(GT) ₁₅ (GA) ₁₅	F: CATGAGTGAGAAAGCCATAG R: CTACCCTTGCAGGTCCGCAC	50
Cfu-2	(CA) ₂₇	F: ACCACCAGCACTGCCCAAAG R: GCTGGTCACGGCATGAAGCC	56
Cfu-3	(GT) ₉ N ₄ (GT) ₁₉	F: GGCTTCATGCCGTGACCAGC R: CAGTTCAGTGTGCCTGCA	60
Cfu-4	(GT) ₂₈ N ₃ (GA) ₁₂	F: TGCAGGCACACTGAACTGT R: CGTCACGGAGACAAATGATG	52
Cfu-5	(GT) ₂₀	F: CTCAGTGAGCCAGTGAACAC R: GAGTACAGGACATCAATGAC	60
Cfu-6	(GT) ₃₈	F: CTACTGCTCGCTGTGAATGC R: GATCCAGGAGAAGCAGGAGA	56
Cfu-7	(AAG) ₁₂	F: TCCCATTTCCTCCCAAGA R: CAAGGGCNAGGGCAACTCCT	56
Cfu-8	(GT) ₉ N ₂ (GT) ₁₁	F: ATCCAAGAGCCAAAGCCAG R: AGGAGGTGAGCAGAGACCCA	48
Cfu-9	(CA) ₉ N ₂ (CA) ₇ N ₁₄ (CA) ₅ (T A) ₂₃ (CA) ₁₁	F: GATAGCACAGGCATACTGTA R: GTGGAGGTGTGGAGATGG	52
Cfu-10	(CA) ₁₆ N ₂ (CT) ₅ (CA) ₄	F: CATCTTTCAGGCTTTAGAGC R: GCTCAGCAGTATTTGAGTG	56
Cfu-11	(GT) ₃₅	F: ACCACAGCTGTGGCTTCCCA R: CTAGCTCCTCCCCTCTGGC	50
Cfu-12	(GT) ₁₀	F: GTGACCCATGTGGGGAATGA R: TCTGAGATGTCACATAGGCC	50
Cfu-13	(GA) ₁₁ N _n (GT) ₁₄	F: TCCAGACCATGCTGCTCCCTT R: GTGGATCCCTCAATACAC	54
Cfu-14	(GT) ₂₈	F: GATCATGTGACAGAAAGACG R: TTGTCTGGGCGGGTGTAT	54
Cfu-15	(CA) ₉ (CGCA) ₃ (CA) ₅ (CGC A) ₂ (CA) ₉	F: TGGAGGAACAACGCAGGAAC R: GAGGGTCCTCCATTCTTGCT	56
Cfu-16	(GT) ₁₃	F: AGCAAGGAATGGAGGACCCT R: GCATGGCTTTGGACTGTGCT	52
Cfu-17	(GT) ₃₉	F: TAGACGTCCATCAAGTGCAG R: CGTGCCGCTTTCCAACTGCT	52
Cfu-18	(GT) ₁₂	F: TCACATGGTGTGACAGACAGCA R: TACACCCATATGAGCGCAC	56
Cfu-19	(GT) ₁₃	F: TAGACTTCCTGATGTCTGG R: TAGCTACGGTTCTACCTGTAC	56
Cfu-20	(GA) ₈ (GT) ₂₅	F: TGTTGTGATCCTCATGGGCCTC R: GCTCCGTTTCACTCTGCAGCG	50
Cfu-21	(CA) ₃₄	F: GCCCTGATAACCTTCTCGCT R: TGGATCAGTGTGTGTG	54
Cfu-22	(TCTCC) ₂ (GC) ₅ (AC) ₂₃	F: GTCAGGAGTGGGAGAGGGGA R: CACGTCCAGTCCTGCGACAC	56
Cfu-23	(GT) ₁₆	F: CTGCTTTTAGATCTCCCCCTC R: ATTCACCATCGTGATCTGAG	54
Cfu-24	(GT) ₁₂	F: CTGATGAGTCTCACTAACAAGTG R: TGCTGCGCGTCGATCACTT	50

F: Forward, R: Reverse