

國立台灣海洋大學

食品科學研究所

碩士學位論文



指導教授：黃登福 博士

利用粒線體 DNA 之細胞色素 *b* 基因以  
PCR-RFLP 方法探討台灣鮪魚及其  
加工品在魚種辨識上之應用

Application of PCR-RFLP Analysis of  
Mitochondrial Cytochrome *b* Gene on  
Identification of Species for Raw Material and  
Canned Products of *Thunnus* Tuna Species

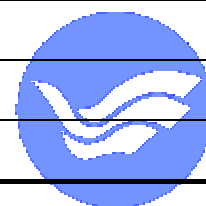
研究生：林文風 撰

中華民國九十二年六月



## 名詞縮寫對照表

AOAC	Association of Official Analysis Chemists
APOE	Apolipoprotein E
ATP	Adenosine triphosphate
bp	Base pair
DNA	Deoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylenediamine tetracetic acid
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EtBr	Ethidium bromide
EtOH	Ethanol
GCG System	Genetics Computer Group System
HPLC	High-performance liquid chromatography
IEF	Isoelectric focusing
LDH	Lactate dehydrogenase
MDH	Malate dehydrogenase
mtDNA	Mitochondrial DNA
NADH	Reduced nicotinamide adenine dinucleotide
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PCR	Polymerase chain reaction
RAPD	Random amplified polymorphic DNA
RE	Restriction enzyme / Restriction endonuclease
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
RNA	Ribonucleic acid
RRNA	Ribosomal RNA
SDS	Sodium dodecyl sulphate
SSCP	Single stranded conformational polymorphism
TBE	Tris-borate-EDTA
TE	Tris-EDTA
TRNA	Transfer RNA



## 摘要

鮪魚為國內重要的遠洋漁獲物，台灣常見魚種有黑鮪 (*Thunnus thynnus*; bluefin tuna)、長鰭鮪 (*T. alalunga*; albacore)、黃鰭鮪 (*T. albacares*; yellowfin tuna) 及大目鮪 (*T. obesus*; bigeye tuna) 等四種。鮪魚屬高經濟價值之魚類，魚種不同，價格差異很大；黑鮪的賣價最高，是鮪類經濟價值最高的魚種，其他平價之鮪魚生魚片大多為淺色肉之黃鰭鮪與大目鮪；而傳統鮪罐加工則以賣相較佳的白色肉長鰭鮪為主。為建立台灣常見遠洋鮪魚魚種新鮮原料之基因鑑定，本實驗將應用基因技術中 PCR-RFLP (polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism)，配合直接定序法 (sequencing)，分析鮪魚魚種之基因圖譜；進而開發出利用基因探針快速辨別冷凍、新鮮及加工罐藏品之方法。

在海域族群的差異性方面，除 *T. thynnus* 之採樣侷限於北太平洋及北大西洋外，其餘三魚種之檢體均來自不同漁獲區，橫跨北半球三大洋，實驗得知 *T. obesus* 經 PCR 增幅之粒線體 DNA 中 cytochrome *b* gene 358 bp 片段與其他魚種相異度 (divergence) 相差最大，有最高 4.235% 的差異；而 *T. thynnus* 與 *T. alalunga* 相異度最小，相似度達 98.687% 至 99.674%。經由序列分析四種鮪魚差異後，選得特異性切位限制 包括 *Bsp*1286 I、*Hinc* II 及 *Rsa* I，經 *Bsp*1286 I 作用後可將 *T. thynnus* 序列片段切割成 283 bp 與 75 bp 兩段，對其他魚種則無反應切位；*Hinc* II 作用後除對 *T. obesus* 沒反應外，對其他三魚種皆有共同的作用位置，分解成 198 bp、150 bp 與 10 bp 三段；而 *Rsa* I 對 *T. albacares* 與 *T. obesus* 序列之切位相同，可切割成 284 bp 與 74 bp 兩段；對 *T. thynnus* 切成 256 bp 與 102 bp 兩段；而對 *T. alalunga* 則切割成 256 bp、74 bp 及 28 bp 三段，經由三組限制作用並交叉比對，在 DNA 電泳圖上可快速、確實的對四個鮪屬魚種作出區分。此外亦分析市售鮪魚生魚片種類，發現業者並無以

低價鮪魚冒充高價黑鮪腹肉生魚片之情形。

加工品部分針對不同需求設計了 7 組引子對作 PCR 增幅反應，並注入不同調味液，分別以 121 °C /15 min 與 115 °C /30 min 模擬罐頭的幾種加工條件。然而 DNA 降解情形嚴重，只有 CbBRs126L/H 與 CbHi146L/H 兩組引子對順利增幅出 PCR 產物，分別為 126 bp 與 146 bp 的小片段目標序列，之後同樣以 *Bsp*1286 I、*Hinc* II 及 *Rsa* I 三組限制 將模擬加工品作切位的交叉分析，可在電泳圖上成功判讀四魚種特殊的片段多型性。繼而檢驗台灣市售 10 件鮪罐產品，除 2 件產品無法順利增幅目標序列外，其他 8 件產品原料魚種分別驗出為 6 件黃鰭鮪與 2 件長鰭鮪，對國內肉類加工品之仿偽鑑定技術提供具體的學術參考依據。



## Abstract

Tuna is an important pelagic capture in Taiwan, the familiar species in Taiwan are bluefin tuna (*Thunnus thynnus*), albacore (*T. alalunga*), bigeye tuna (*T. obesus*) and yellowfin tuna (*T. albacares*). Tuna is a higher-price fish, and different species of tuna are quite different in cost. Bluefin tuna is the highest-price *Thunnus* species, and other raw fillets in the market are usually light meat, like bigeye tuna and yellowfin tuna. Traditionally, the raw material of canned tuna species is mainly white meat albacore. In order to establish the gene identification of fresh meat of familiar tuna species in Taiwan, in this study we used the directed sequencing and the polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) technology to determine the genetic variation of four *Thunnus* species. Then we developed gene probes to identify the species of frozen, fresh and canned tuna meat.

In the part of the diversity of sea areas and groups, *T. thynnus* was obtained from northern Pacific Ocean and northern Atlantic Ocean, and other three species were from northern Pacific Ocean, northern Atlantic Ocean and Indian Ocean. Judging from the data of this study, the 358 bp fragment of the mitochondrial cytochrome *b* gene in *T. obesus* was mostly different from other species, there was the highest divergence (4.235%). And the highest similarity was between *T. thynnus* and *T. alalunga* (98.687% 99.674%). After analyzing the difference of sequence in four *Thunnus* species, we chose three restriction enzymes with specific cutting sites, including *Bsp*1286 I, *Hinc* II and *Rsa* I. The restriction enzyme *Bsp*1286 I cleaved the 358 bp fragment to 283 bp and 75 bp in *T. thynnus*, and there was no any cutting site in other three species. *Hinc* II could cleave the 358 bp fragments of *T. thynnus*, *T.*

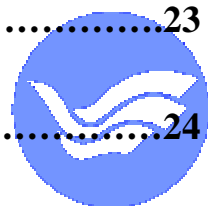
*alalunga* and *T. albacares* to separate into 198 bp, 150 bp and 10 bp, but there was no cutting site in *T. obesus*. And then, *Rsa* I cleaved tuna fishes both *T. thynnus* and *T. alalunga* into fragments of 256 bp and 102 bp, it was different from the fragments of 284 bp and 74 bp in *T. albacares* and *T. obesus*. The polymorphic pattern in the DNA electrophoretic gel could identify four fresh *Thunnus* species precisely and quickly. Furthermore, we analyzed the 12 raw fillets of tuna sold in the market and found that there was no case to personate high-price *T. thynnus* by other tuna species.

In the part of canned product, we designed 7 pairs of primer for PCR amplifying. We added different sauces into tuna meat and then heated at 121 °C for 15 min and 115 °C for 30 min to simulate the process of canning. However, the DNA was degraded seriously, there were only two pairs of primer CbBRs126L/H and CbHi146L/H could successfully amplify the PCR products, short fragments of 126 bp and 146 bp, respectively. Then we used three restriction enzymes *Bsp*1286 I, *Hinc* II and *Rsa* I to analyze the cutting sites of processed products and could differentiate the diversity between four species by the DNA electrophoretic map. Last, we analyzed 10 commercial canned products sold in the market, except 2 samples were failure in amplifying the target sequence, other 8 samples including 6 cases of *T. albacares* and 2 cases of *T. alalunga* were determined successfully. Therefore, this study could provide useful and academic technique, in identifying the species of processed tuna meats.

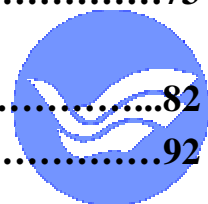


# 目 錄

名詞縮寫對照表.....	
中文摘要.....	
英文摘要.....	
<b>第一章、 文獻整理</b>	
<b>一、 鮪屬 ( <i>Thunnus</i> ) 魚種之分類與漁場分布</b>	
(一) 鮪屬魚種之分類.....	2
(二) 鮪屬魚種之漁場分布.....	2
<b>二、 我國遠洋鮪魚業及鮪罐加工之概況</b>	
(一) 我國遠洋鮪魚業之發展.....	5
(二) 鮪罐加工之概況.....	5
<b>三、 一般鑑定魚種之方法</b>	
(一) 以外觀特徵來判別魚種.....	7
(二) 以蛋白質分析方法來鑑定魚種.....	8
<b>四、 利用 mtDNA 鑑定物種</b>	
(一) mtDNA 之介紹.....	11
(二) 以 mtDNA 鑑定物種之優點.....	11
(三) mtDNA 中 cytochrome <i>b</i> gene 之介紹.....	12
<b>五、 應用分子生物技術—PCR 技術鑑別魚種</b>	
(一) RAPD.....	14
(二) PCR-SSCP.....	15
<b>六、 PCR-RFLP 技術於基因型態之分析</b>	
(一) PCR-RFLP 於物種分類上之應用.....	17
(二) PCR-RFLP 於醫學上之應用.....	18
(三) PCR-RFLP 於加工食品上之應用.....	19
<b>第二章、 台灣常見鮪屬魚種 cytochrome <i>b</i> gene 序列分析及 PCR-RFLP 鑑定技術之建立</b>	
<b>一、 前言.....</b>	<b>23</b>
<b>二、 材料與方法</b>	
(一) 實驗材料.....	24
(二) 實驗方法	



1.粗萃 DNA.....	24
2.選擇引子 ( primer ) .....	26
3.mtDNA 中 cytochrome <i>b</i> gene 片段的大量增幅.....	27
4.PCR 產物 cytochrome <i>b</i> gene 片段之定序.....	30
5.Cytochrome <i>b</i> gene 片段資料分析.....	30
6.限制 分析 PCR 產物.....	31
<b>三、 結果</b>	
(一) 冷凍鮪魚之 DNA 粗萃.....	33
(二) Cytochrome <i>b</i> gene 序列片段之比較及分析.....	33
(三) 限制 切位分析.....	35
(四) 市售鮪魚生魚片之魚種檢測.....	36
<b>四、 討論</b>	
(一) mtDNA 中 cytochrome <i>b</i> gene 之序列特性.....	37
(二) 利用 PCR-RFLP 技術分析 cytochrome <i>b</i> gene 以鑑定魚種... 圖表.....	38 40
 <b>第三章、 用 PCR-RFLP 技術分析鮪罐之加工條件及作為市售鮪罐 魚種之鑑定</b>	
一、 前言.....	61
二、 材料與方法	
(一) 實驗材料.....	62
(二) 實驗方法.....	62
三、 結果	
(一) 加工條件對 DNA 粗萃之影響.....	65
(二) 選擇引子之適用性.....	65
(三) PCR-RFLP 鑑種技術之建立.....	66
(四) 市售鮪罐加工品之魚種檢測.....	67
四、 討論	
(一) 加工條件影響 DNA 之降解情形.....	69
(二) 以 PCR-RFLP 檢測加工產品原料來源之可行性.....	71
圖表.....	73
 參考文獻.....	82
附錄.....	92





# 第一章、 文獻整理



# 一、 鮪屬 ( *Thunnus* ) 魚種之分類與漁場分布

## (一) 鮪屬魚種之分類

鮪魚在生物分類學上屬硬骨魚綱 ( Class Osteichthyes ) 鱸目 ( Perciformes ) 鯖亞目 ( Scombroidei ) 鯖科 ( Scombridae ) 鮪屬 ( *Thunnus* ), 又稱金槍魚 ( 沈, 1993 )。

目前世界上已知的鮪屬魚種共七種 ( species ) 與一亞種 ( sub-species ), 包括 :

1. *Thunnus thynnus* ( bluefin tuna ; 黑鮪 )
2. *T. maccoyii* ( southern bluefin tuna ; 南方黑鮪 )
3. *T. alalunga* ( albacore ; 長鰭鮪 )
4. *T. albacares* ( yellowfin tuna ; 黃鰭鮪 )
5. *T. obesus* ( bigeye tuna ; 大目鮪 )
6. *T. tonggol* ( longtail tuna ; 小黃鰭鮪 )
7. *T. atlanticus* ( blackfin tuna )
8. *T. thynnus orientalis* ( Atlantic northern bluefin tuna ; 為 *T. thynnus* 之亞種 )

( Collette and Nauen, 1983 ; 沈, 1993 )

台灣常見的遠洋漁獲鮪屬魚種主要有黑鮪 ( *T. thynnus* )、長鰭鮪 ( *T. alalunga* )、黃鰭鮪 ( *T. albacares* ) 及大目鮪 ( *T. obesus* ) 等四種 ( Fig. 1-1 ) ( 沈, 1993 ; 傅, 2000 ; Haward and Bergin, 2000 )。

## (二) 鮪屬魚種之魚場分布

黑鮪 ( *T. thynnus* ) 俗名黑甕串、金槍魚，主要分布北半球的溫帶海域，包括大西洋 ( 含地中海 ) 及北太平洋海域，在印度洋及南半球非常罕見，屬高度洄游魚種；其亞種 *T. t. orientalis* 產量甚少，同樣分布於北半球大西洋及太平洋海域。我國遠洋鮪釣漁船每年在地中海均有黑鮪捕撈之配額，每年的三月至五月為主要漁季，而太平洋黑鮪則在每年四月至七月間迴游經過台灣東部海域，為我國小

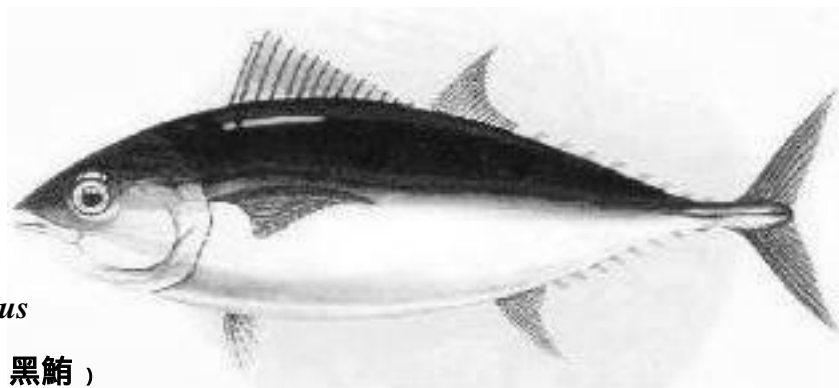
型延繩釣季節性作業之高經濟魚種（沈, 1993；胡, 2000；Takeyama et al., 2001）。南方黑鮪（*T. maccoyii*）俗名油串、印度鮪，主要分布於南半球，三大洋南緯 30-50 度間之溫帶水域，屬高度洄游魚種，最適水溫約在 10-15 之間；產量少，目前所知之產卵場僅在爪哇、印尼南部與澳洲西北部海域（Carter et al., 1998；胡, 2000）。

長鰭鮪（*T. alalunga*）俗名白肉串，廣泛分布於太平洋、大西洋及印度洋三大洋之熱帶、溫帶海域，北緯可達 45-50 度間，南緯可達 30-40 度間之海域，只有赤道南北緯 10 度間較少發現其蹤跡；其棲息之溫度範圍在 10-28 之間，最適水溫為 10-20 之冷水域（沈, 1993；胡, 2000）。黃鰭鮪（*T. albacares*）俗名串仔，亦廣泛分布於三大洋之熱帶、亞熱帶海域，約為南、北緯 40 度間之海域；其棲息的溫度範圍在 18-31 之間，最適水溫為 19-26，主要棲息於水溫躍層以淺，夜間比白天更接近表層（Niwa et al., 2003；胡, 2000）。

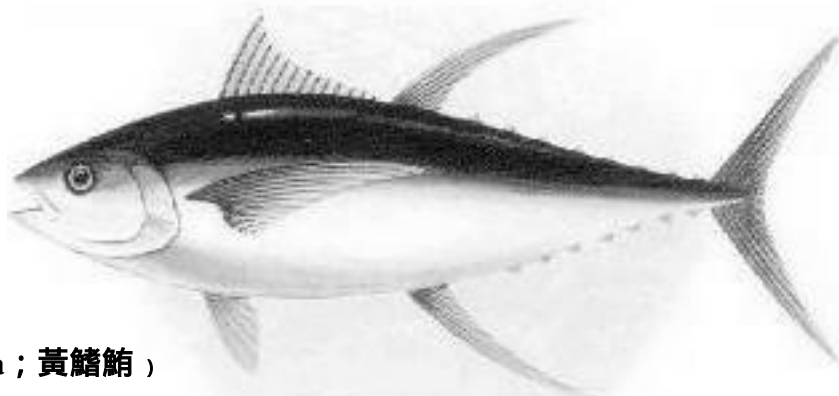
大目鮪（*T. obesus*）俗名大目串、短鮪，其分布海域大致與黃鰭鮪相同，分布於三大洋之熱帶、亞熱帶海域，約為南、北緯 40 度間，其最適水溫範圍在 10-15 之間（胡, 2000；Appleyard et al., 2002）。長鰭鮪、黃鰭鮪及大目鮪三鮪種之分布遍及全球各海域，是最常見捕獲之魚種；而 blackfin tuna（*T. atlanticus*）與小黃鰭鮪（*T. tonggol*）的分部則各自侷限於大西洋及太平洋-印度洋間的有限海域，因次全球捕獲量甚少（Takeyama et al., 2001）。



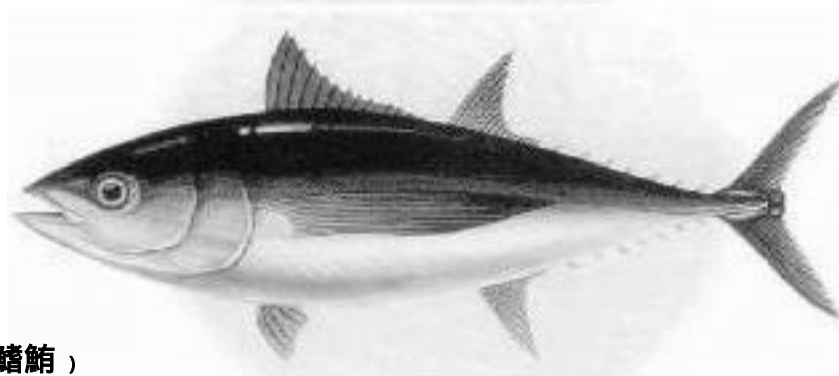
A. *Thunnus thynnus*  
( bluefin tuna ; 黑鮪 )



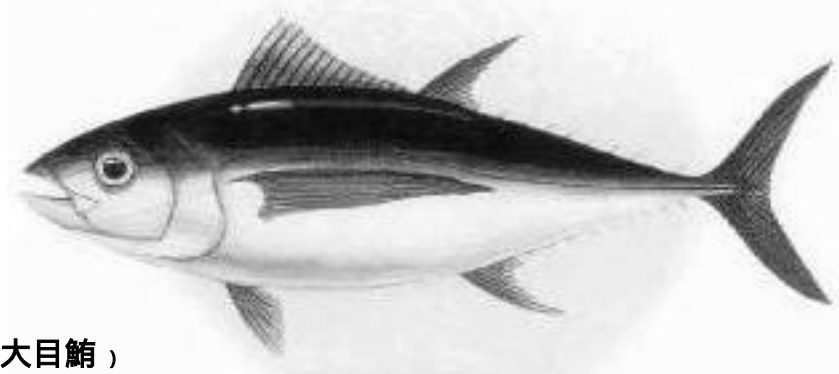
B. *T. albacares*  
( yellowfin tuna ; 黃鰭鮪 )



C. *T. alalunga*  
( albacore ; 長鰭鮪 )



D. *T. obesus*  
( bigeye tuna ; 大目鮪 )



**Fig. 1-1. Four familiar *thunnus* species in Taiwan.**



## 二、 我國遠洋鮪漁業及鮪罐加工之概況

### (一) 我國遠洋鮪漁業之發展

我國鮪漁業發展歷史悠久，始於民國出年，初期發展以沿近海漁場資源為主，而真正發展遠洋鮪漁業是從民國四十年代開始，在配合國家整體發展遠洋漁業之政策指導下，我國的遠洋鮪漁業才開始邁向國際舞台。近五十年來，台灣在產官學界的合作下，使漁產量迅速成長；1950 年至 1996 年間，全球漁產量成長 6 倍，而同期間台灣的漁產量從十萬餘公噸成長到一百三十餘萬公噸，足足成長了 13 倍，其中又以遠洋漁業成長幅度最大，達 40 倍之多；在產量結構方面，1998 年以遠洋漁業產量為最高，達 62% (Haward and Bergin, 2000 )。

鮪魚為我國主要的大宗海洋漁產品，每年的漁獲量高居各類漁業生產的第一、二位，過去 30 年平均年成長率為 8%，佔漁業總產量歷年都維持在 10-20% 之間，在產值方面，同期間鮪魚產值比重維持在 13-30% 之間；由此可之鮪魚在整個漁業生產所佔的比重，可以說是舉足輕重。鮪魚生產供貨主要來自遠洋鮪釣漁業，大多在國外基地卸貨，直接在當地製成鮪魚罐頭，或以生鮮型態販售。其高價位鮪魚大部份以超低溫搬運船運送至日本銷售，少部分的鮪魚在我國遠洋漁船回國整補時，運回台灣供應國內市場；國內生鮮鮪魚的供給，沿近海鮪釣漁船與遠洋漁船各約佔半數。沿近海鮪釣漁船的基地以東港為首，所捕撈的鮪魚經分級後，等級佳的大多空運至日本作成生魚片，供應消費 (張, 1997；Haward and Bergin, 2000 )。

### (二) 鮪罐加工之概況

台灣製造的罐頭食品，除了蔬菜罐頭外，就以水產罐頭的生產量最多。水產罐頭的原料有鮪魚、鯖魚、沙丁魚、鰹魚等，種類甚多，其中外銷又以鮪魚罐頭為主，約佔 95%。市面上鮪魚罐頭種類繁多，主要分為油漬罐及水煮罐兩大類，此外亦有蔬菜調味罐等特

殊風味加工品（馬, 1981）。

鮪罐原料主要魚種為長鰭鮪，由長鰭鮪為原料製成者為白肉鮪魚（white meat tuna），在市場上賣價最高；其他原料如黃鰭鮪與大目鮪的製品則稱為淺色肉質鮪魚（light meat tuna）。依肉型及裝填的形狀可分為固態裝罐（solid pack，只取大塊肉）、碎肉（flake，細碎肉）、長片肉（chunk，以一口吃能食入的大小為主體）。水煮罐的注入液以清水為主，添加以少許食鹽及調味料，亦可添加入一定比例的蔬菜湯；油漬罐則注入調味過的大豆油或橄欖油等，於 95℃ 左右趁熱加入；另外特殊調味的蔬菜罐則是添加青豆、玉米、胡蘿蔔等蔬菜後以少量的蕃茄汁及食鹽調味（賴與金, 1991）。

鮪魚罐頭的製造，將原料魚內臟除去後直接以 100-105℃ 的蒸氣蒸煮，此蒸熟（steaming）操作的目的是使蛋白質變性，將肉質固定，以利於往後的作業，防止製品肉組織潰散以及汁液產生混濁，且使酵素失活，防止製造過程中品質降低。清淨（cleaning）操作為將皮、鱗、骨、血合肉及變色部分等去除之作業，清淨後再經切斷、肉裝填，依製品種類之不同，注入調味液，後經密封、殺菌、冷卻，即得鮪罐製品。一般製造程序如下：

冷凍鮪魚	解凍	清洗	去除頭尾部	去除內臟	洗淨
蒸煮	冷卻	分割	清淨	切斷	肉裝填
注液	脫氣、密封	殺菌	冷卻	製品	

殺菌條件依低酸性食品操作，必須以 100℃ 以上的加壓殺菌，普通使用 115℃ 左右，鮪魚二號罐（內容積約 209 ml）需時 30 分鐘左右（賴與金, 1991；賴等, 1992）。



### 三、 一般鑑定魚種之方法

過去對於動物種屬鑑定所使用之方法，多以外表型態觀察特徵以及骨骼架構等傳統型態學來作為判定根據。而隨著生物化學科技日漸發達，逐漸發展以抗原抗體反應、蛋白質電泳等技術來鑑別親緣關係以及作物種的判定及歸類 ( Wolf et al., 1999 ; Partis et al., 2000 )。

#### (一) 以外觀特徵來判別魚種

鯖科 ( Scombridae ) 魚類體呈紡錘形，尾鰭發育完善且尾柄強壯，兩側有隆起稜；第一背鰭前有溝可收納硬棘，胸鰭上位，吻不為劍狀突出。鮪屬 ( *Thunnus* ) 魚種體表完全被鱗，胸甲發達，胸甲及側線上之鱗片較大，側線平直不成波浪狀，兩頷齒細小 ( 沈, 1993 )。

黑鮪 ( *T. thynnus* ; bluefin tuna ) 為體型最大之鮪類，體長最大可達 300 cm，體重達 680 kg；胸鰭較頭部為短，僅約延伸至背鰭第 11 棘下方，體背黑綠色而腹面為銀白色，第二背鰭灰色有黃邊，背鰭之離鰭為黃色，其餘各鰭皆為灰色；黑鮪與南方黑鮪 ( *T. maccoyii* ; southern bluefin tuna ) 外型上主要之差別為南方黑鮪之胸鰭較長，且尾部之隆起稜為黃色 ( 沈, 1993 ; Carter et al., 1998 ; 傅, 2000 )。

長鰭鮪 ( *T. alalunga* ; albacore ) 胸鰭特長且超過臀鰭是最明顯的特徵，體背藍綠色而腹面銀白色，胸鰭黑色而其餘各鰭皆為灰色。黃鰭鮪 ( *T. albacares* ; yellowfin tuna ) 第二背鰭、臀鰭及各離鰭均為鮮黃色為最明顯的特徵，第二背鰭及臀鰭均呈長鐮刀型且較胸鰭為長；體背黑色而腹面銀白色，體長最大可達 200 cm、體重 170 kg 以上，一般約體長 150 cm ( 沈, 1993 ; 傅, 2000 )。

大目鮪 ( *T. obesus* ; bigeye tuna ) 頭高眼大為其最明顯的特徵，其眼大於吻長的一半，胸鰭長而尖，各離鰭鮮黃色而具黑邊，其餘



各鰭皆呈灰色；體背綠黑色而腹面銀白色，體長最大可達 200 cm、體重 200 kg 以上。小黃鰭鮪 (*T. tonggol*; longtail tuna) 尾部較區幹部為長；胸鰭長三角形，僅略短於頭長，其先端達第二背鰭起點；體背為黑綠色，體側中央部份顏色較淡，腹面銀灰色；體腹側方約有 5 至 10 縱列之銀白點(沈, 1993; 傅, 2000; Appleyard et al., 2002)。

上述鮪魚種類雖在外觀上可明確區分其差異，但除大型魚市販售的現宰鮪魚，一般市面上所售之生鮮鮪魚肉、生魚片及各類鮪魚製加工品，魚體均經過切割或加工處理，無法以外觀型態加以分類，因此實應發展科學性更高之分類檢測方法。

## (二) 以蛋白質分析方法來鑑定魚種

1993 年 Sotelo 等學者歸納出針對新鮮及魚肉加工製品之魚種鑑別方法，其中包括 IEF (isoelectric focusing)、HPLC (high-performance liquid chromatography)、SDS-PAGE (sodium dodecyl sulphate- polyacrylamide gel electrophoresis)、ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 等方法，可以辨別新鮮及不同加工程度之魚種中肌漿蛋白及水溶性蛋白之電泳圖，明確顯現物種的親緣關係 (Table 1-1)。

AOAC 在 1997 年已接受多種電泳分析法作為魚種鑑定用，例如 starch gel-zone electrophoresis、acrylamide disc electrophoresis、thin-layer polyacrylamide gel chromatography、cellulose acetate strip IEF 等方法。此外新鮮魚貝類之種別鑑定，可使用水溶性蛋白之 IEF 及 SDS-PAGE 電泳圖來辨別 (Rehbein et al., 1995; Mackie, 1997a)。Hashimoto 等 (1984) 則指出使用水溶性蛋白質之 SDS 電泳圖可辨別數種新鮮河魴魚種；其次 IEF 和 SDS-PAGE 結合而成的 2-D electrophoresis (2-dimentional electrophoresis) 亦成功地被用來鑑定新鮮魚種 (Crockford and Johnston, 1995)。



1972 年 Taniguchi 等分別從日本鰻與歐洲鰻之肌肉與肝臟萃取出蛋白質、乳酸脫氫 ( lactate dehydrogenase ; LDH ) 蘋果酸脫氫 ( malate dehydrogenase ; MDH ) 與酯解 後作電泳分析，在此兩種鰻魚上可以得到不同的結果。Taniguchi 等 1979 年更利用 LDH 與 MDH 之電泳圖，成功的鑑別日本鰻、歐洲鰻、美洲鰻。

Hung 等 ( 1995 ) 提出 ELISA 可作為鯛魚魚種之鑑別用；1999 年 Etiennet 等亦連結歐洲數個實驗群，證實利用 IEF 及 SDS-PAGE 分析魚肉蛋白之電泳圖，可作為新鮮和加工水產品之魚種鑑別用，顯示利用魚肉蛋白開發蛋白質電泳和免疫檢測法可作為新鮮魚類及加工品之魚種鑑別。

然而 Mackie ( 1997b ) 時卻指出，當新鮮原料之肌肉組織經過高溫加熱烹煮，其蛋白質會產生不可逆的變性( irreversibly denature ) 而無法以之作為物種判定的依據；Mackie 認為以蛋白為檢測基礎的抗原抗體分析法，在組織經過烹煮之後即無法檢測，而 SDS-PAGE、urea-PAGE 及 IEF 電泳在普通烹煮 ( cook ) 的情形下，可能可當作檢測依據，但若是經過高溫高壓加工的罐頭製品，則完全無法檢測出蛋白組成的差異。



**Table 1-1. Methodology used for identification of fish products**

<b>Fishery product</b>	<b>Methodology</b>	<b>Compound analysis</b>
Raw products	<b>Electrophoresis</b> IEF SDS-PAGE	Sarcoplasmic proteins Sarcoplasmic and myofibrillar proteins
	<b>Immunological method</b> Double diffusion ELISA	Sarcoplasmic proteins Sarcoplasmic proteins
	<b>Molecular biological method</b> mtDNA Amplification and sequencing	Cytochrome <i>b</i> gene
	<b>Chromatography</b> HPLC	Sarcoplasmic proteins
Smoked products	<b>Electrophoresis</b> SDS-PAGE IEF	Heat-stable proteins Heat-stable proteins
Cooked and canned products	<b>Electrophoresis</b> SDS-PAGE SDS-PAGE Urea-PAGE IEF	SDS-soluble proteins Myosin light chains 6M urea soluble proteins CNBr peptides of muscle proteins
	<b>Molecular biological method</b> Dot-blot	Nuclear DNA
	<b>Immunological method</b> EIA ELISA	Thermostable muscle antigens Muscle proteins

( Sotelo et al., 1993 )



## 四、 利用 mtDNA 鑑定物種

由於分子生物技術的進步與發展，利用粒線體 DNA (mitochondrial DNA ; mtDNA) 序列之變異度來研究物種起源的研究甚多 (Tzeng et al., 1992)。mtDNA 所包含的遺傳訊息能詳實的顯現出物種的遺傳結構，因此常被族群遺傳和演化學家用來分析物種的親源關係及不同物種間的差異性。

### (一) mtDNA 之介紹

動物體內之遺傳物質可區分成兩類，大部分的遺傳物質包含在細胞核內，即所謂的 genomic DNA，而另有一小部份核酸物質存在於核外的粒線體胞器內，稱之為粒線體 DNA。mtDNA 本身擁有一套獨立的遺傳物質，結構大小與遺傳特性有別於 genomic DNA；而 mtDNA 之組成型態較為單純，不像 genomic DNA 常有複雜的 intron 或 repetitive sequences (Gray, 1989)。

多細胞動物的 mtDNA 是由數種基因組合而成，不同物種間的 mtDNA 有不同大小結構及產物種類，大部分脊椎動物 DNA 之長度為 16-20 kb；包括 D-loop 基因、2 個 ribosomal RNA 基因(12S rRNA 與 16S rRNA)、22 個 transfer RNA 基因、13 個蛋白質基因(包括 7 個 NADH dehydrogenase 之次單位體、2 個 ATP synthetase、3 個 cytochrome oxidase 之次單元體及 cytochrome *b* gene)(Fig. 1-2) (Tzeng et al., 1992)。

### (二) 以 mtDNA 鑑定物種之優點

mtDNA 為母系遺傳，由 mtDNA 轉錄之 RNA 與繼而轉譯之蛋白質大都留在粒線體內，減數分裂時並沒有參與 DNA 重組，故不受有性生殖干擾。此外 mtDNA 本身缺乏修補機制，複製過程比較容易發生突變，故演化速度比 genomic DNA 快 1-10 倍，因此突變會記錄之前的演化歷史，可推斷物種起源的年代、回溯演化過程

( Brown, 1986 )。

歸納利用 mtDNA 來鑑定物種有之優點如下：1. 遍存於真核生物中，容易純化分離。2. 基因構造簡單易分析。3. 演化變異單純，主要是鹼基的取代。4. 基因傳遞過程無重組，為直線式。5. 能提供一組特徵，以推斷親源關係。6. 演化快速，適合血緣相近的生物分析；其種間核酸置換數量會快速累積，所以能建立物種之親源關係樹分析 ( phylogenetic analysis ) ( Wilson et al., 1985 ; Wolf et al., 1999 )。

### (三) mtDNA 中 cytochrome *b* gene 之介紹

細胞色素 *b* 基因 ( cytochrome *b* gene ) 為 mtDNA 上的一個基因體，位於 transfer RNA<sup>Glu</sup> 及 transfer RNA<sup>Thr</sup> 兩基因之間，其結構功能之研究較 mtDNA 上的其他基因體完整。研究指出 cytochrome *b* gene 在電子傳遞 ( electron transfer ) 作用中含有兩個氧化還原中心 Q<sub>o</sub> 與 Q<sub>i</sub>，並認為在某幾個位置的胺基酸結構及排列順序不會改變，可作為確認定序結果之參考 ( Southern et al., 1988 )。

Cytochrome *b* gene 為 mtDNA 中少數編碼 ( encode ) 蛋白質密碼之基因，其胺基酸序列相當穩定，但由於遺傳密碼之退化作用，使得基因在親近的種屬間仍有些微的差異性，利用這項特性以 cytochrome *b* gene 之片段分辨種屬間的差異，可獲得親源系統分析的訊息，其在脊椎動物的物種關聯上已被廣泛的研究 ( Moritz et al., 1987 ; Antoinette and Greg, 2001 ; Hsieh et al., 2001 )。

而由於細胞中 DNA 的製備過程中可以獲得大量的 mtDNA，因此再以 PCR ( polymerase chain reaction ) 方法增幅 cytochrome *b* gene 時再現性較高，效果較好 ( Unseld et al., 1995 )，許多學者即利用此特點設計引子 ( primer ) 來針對物種的相關性作研究，並進而在生物學、食品學、醫學等不同的領域發展應用 ( Tagliavini et al., 1995 ; Ram et al., 1996 ; Rehbein et al., 1997 ; Carrera et al., 1998 ; Cespedes

et al., 1999 ; Matsunaga et al., 1999 ; Russell et al, 2000 ; Calvo et al, 2001 ; Sezaki et al., 2001 )



**Fig. 1-2. Structure of mitochondrial DNA.**

( Tzeng et al, 1992 )



## 五、 應用分子生物技術—PCR 技術鑑別魚種

近年來由於分子生物技術的快速發展，使得 DNA 指紋於物種鑑定上的應用更顯重要。DNA 在遺傳學上的多型性可由聚合 連鎖反應 ( polymerase chain reaction ; PCR ) 技術加以重組放大，此技術擴大了人們對核酸分子探討的視野，只要極微量的 DNA 即可深入了解，甚至求得 DNA 序列的組成。PCR 仿造自然界生物體 DNA 合成步驟，利用專一性的引子 ( primer ) 經過不同的溫度，循環 denaturation、annealing of primer 及 primer extention 三個步驟，以 DNA 聚合 ( DNA polymerase ) 增殖某段特定的核酸序列，此技術僅需數小時便可將基因序列擴增百萬倍，大大提昇基因分析檢測的能力。

### (一) RAPD ( random amplified polymorphic DNA )

Williams 等 ( 1990 ) 提出 RAPD 之原理是利用一條只有十幾個鹼基的短引子，在 PCR 反應中任意複製出 DNA 片段，而在反應結束的電泳圖上會出現許多不同長度的 PCR 產物，稱為 RAPD-PCR 指紋 ( RAPD-PCR fingerprint )。RAPD 鑑定法應用時不須先建立個體的基因組 DNA 序列，最為簡便，但其易受樣品品質的影響、且再現性差，目前最少被應用於魚種鑑定。

針對新鮮的鱈魚肌肉、肝臟、冷凍肌肉和四種不同品牌的鱈魚製魚子醬及加工鱈魚卵，使用 M-01 primer 進行 RAPD 的分析，Elvevoll 等 ( 1996 ) 發現此組 primer 對魚體不同部位的專一性及加工程度的不同對 RAPD 檢測之敏感度有明顯差異性。

1998 年 Saitoh 設計出四種不同的短鏈 primer 針對白令海及 Noto-shima 沿海的鱈魚作 RAPD 分析，每組 primer 分別以兩個不同海域的個體抽出 DNA 當作模板 ( template )，在 #6 及 #7 兩組 primer 可發現兩海域魚種的差異性；其中同一個體產生的差異性，可能是 template DNA 斷裂所造成。Saitoh 進一步以 primer #6 進行 RAPD

放大，發現可以找出特異性片段當作 marker，區分出白令海及日本沿海的鱈魚。Saitoh 評估，以 RAPD marker 研究同種動物間因地理分布而造成的遺傳差異為可行的方法，但仍須克服樣品因新鮮程度而造成的 DNA 斷裂問題。

## (二) PCR-SSCP

PCR-SSCP (PCR-single stranded conformational polymorphism) 是先以 PCR 複製產物後，將雙股 DNA 加熱變性，利用單股 DNA 在非變性狀態下，會因鹼基配對而摺疊成特定的二次結構 (secondary conformation)，來區分不同組成的序列，此法相當靈敏，可偵測到 85-90% 的點突變 (林, 1998)。

1997 年 Rehbein 等針對四種鱈魚及兩種鮭魚作 PCR-SSCP 分析，放大一段 123 bp 的 cytochrome *b* gene 片段後高溫變性，以電泳分析後可明顯區分六種樣品的差異性，但無法清楚辨別魚種間親緣關係。Rehbein 等 1997 年亦嘗試利用 PCR-SSCP 的方式來鑑定不同地區採集的 15 個鱈魚魚子醬 (sturgeon caviar) 樣品，先以 FB 349/496 primer 放大一段 148 bp 的 cytochrome *b* gene 片段，再以 SSCP 分析後鑑別出 beluga、sevruga 及 osietra 三種鱈魚，其中 beluga 鱈魚直接經 PCR 分析不需 SSCP 法即可區分出其差異性，進而檢測出其中有一來自中國的樣品應為 beluga 鱈魚，而非標示的 osietra 鱈魚。Rehbein 等接著再針對各種罐頭魚肉作分析，以兩組 primer (59-3/59-5 與 FB 349/496) 對不同的罐頭魚肉作測試，發覺因加工溫度過高而造成 DNA 裂解嚴重，以 59-3/59-5 primer 較為適用；繼而對不同加工條件的沙丁魚、青魚、鱈魚罐頭進行 SSCP 分析，成功的區分出 3 種不同的罐頭加工魚種與其他 7 種新鮮魚種；學者認為此法也可應用於不同種屬間親緣的關係判定。

Cespedes 等 1999 年則針對四種新鮮比目魚作分析，經 PCR 放大 cytochrome *b* gene 中 201 bp 片段，再以 SSCP 法作電泳分析此段

序列的多型性,可區分出四個魚種的差異性;學者認為以 PCR-SSCP 方式鑑定魚種準確率高,但須小心控制實驗條件以減少誤差。

除了上述 RAPD、PCR-SSCP 兩種以 PCR 衍生出之鑑種方法外,目前學術界最廣泛應用的 PCR 研究為搭配限制 操作之 PCR-RFLP 分析法,詳細研究情形如下一節所述。





## 六、 PCR-RFLP 技術於基因型態之分析

PCR-RFLP ( polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism ) 的基本概念是先經由 PCR 技術複製放大一段特定的 DNA 序列，以定序法 ( sequencing ) 排列出此段序列密碼的順序，再由限制 圖譜 ( restriction map ) 分析此段序列的特異切位，並找出適合的限制 ( restriction enzyme ; restriction endonuclease ; RE )，利用其對序列作用區域的專一性來切割此段序列。最後在 DNA 電泳圖上分析，藉由片段的多樣性來判讀比對不同來源基因序列的差異性 ( Jones, 1991 ) ( Fig. 1-3 )。以 PCR-RFLP 建立快速的檢測方法，具有相當高的準確性及可靠性，適合應用於生物親源關係的鑑定或醫學上基因變異的分析。

### (一) PCR-RFLP 於物種分類上之應用

Ishida 等 ( 2000 ) 調查 35 具死亡時間及環境不同之人類屍體，以 PCR-RFLP 分析其毛髮與指甲之 ABO 血型基因型 ( genotypes )，並與其表現型 ( phenotypes ) 相互對照，發現其中有兩個案例無法吻合，推斷是個體死後抗原改變造成的表現型誤差；實驗結果顯示溼度、溫度等外在環境的條件與時間長短與 DNA 裂解的情形並無相對關係。此外在指甲的分析幾乎皆可檢測出其基因型，但毛髮的檢測成功率則很低，原因為毛髮中所含的黑色素 ( melanin ) 為一 PCR 反應抑制劑，會嚴重影響實驗結果 ( Nozawa et al., 1999 )。

為了區分 sole ( *Solea solea* ) 及 Greenland halibut ( *Reinhardtius hippoglossoides* ) 兩種親源相近的比目魚，Cespedes 等 ( 2000 ) 利用其 12S rRNA gene 作 PCR 增殖，放大出一段 321 bp 的片段，之後再以 *Aci* I 及 *Mwo* I 兩組限制 作切位分析，發現 *Aci* I 可以將 sole 切割成 249 bp 及 72 bp，另外可以將 Greenland halibut 切割成 202 bp、72 bp 及 47 bp 三段；而 *Mwo* I 則可分別將 sole 切成 151 bp、101 bp、42 bp 及 27 bp 四段，並把 Greenland halibut 切成 130 bp、128 bp

及 63 bp 三段，區分出兩魚種差異。

2003 年 Niwa 等學者利用粒線體 DNA 之差異性以 RFLP 來分析黃鰭鮪 (*T. albacares*) 產卵、孵化在生態學上的差異性，1996 年至 2000 年間分別在 38 個不同個體所產的卵細胞 DNA 中發現到 27 種不同的基因型 (genotype)，其中的 18 個基因型可建立單一的個體鑑定。研究中發現在一年內週期的採樣中幾乎皆會發現相同基因型態的魚苗，也就是孵化自同一母體產下的卵；因此可以推論各母體在合適的水溫及足夠的食物容許環境下，大多會延長產卵週期，並在週期間逐日產卵。

## (二) PCR-RFLP 於醫學上之應用

Lumini 等 (1996) 認為以生物技術 PCR-RFLP 作為微生物物種之鑑定方法，較傳統的生物學、生態學及型態學分類更為精確且快速。

Gasser 與 Chilton (1995) 為檢測會寄宿於人類、狗或其他動物，引起包蟲病 (echinococcosis) 或囊蟲病 (cysticercosis) 的七種不同種屬的絲狀條蟲 (taeniid cestode)，以 PCR-RFLP 方式，利用 *Alu* I、*Cfo* I、*Msp* I 與 *Rsa* I 四組限制 針對 ITS2 ribosomal DNA 做鑑種分析。跑電泳發現自不同來源寄主組織上所分離出同種之隔離群 (isolate)，檢驗結果均與預期結果一致；可有效用於偵測這些危害人類健康及引發獸疾、污染肉品來源的寄生蟲。

1998 年 Sato 等利用 *Mnl* I、*Hae* III、*Cfo* I 及 *Hpa* II 四組限制 對放線菌屬 (*Actinomyces*) 不同菌種之 16S ribosomal DNA 作 PCR-RFLP 分析，實驗結果發現四種限制 必須分開操作才可比對不同種別之差異性，且電泳結果不甚清楚。2002 年 Ruby 等設計一組新的 primer，同樣針對 16S ribosomal DNA 進行 PCR，增殖一較長之序列片段，經實驗證明此段序列只需經一種限制 *Mnl* I 反應即可大致辨別 13 個菌株的差異性。Ruby 等認為此一鑑定方法的建

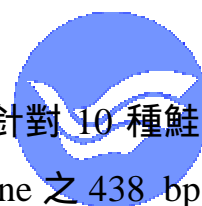
立，可方便檢測附著於牙齒表面的放線菌來源，並可進一步在臨床上分析其種類與齲齒、牙週病間的關係，探討其種類在母子生育間的病源傳遞是否有絕對關連。

Kurihara 等 (1999) 為檢測長鏈的 DNA 片段，發展了利用 PCR-RFLP 與 SSCP (single stranded conformational polymorphism) 結合而成之 PCR-RF-SSCP 技術來分析日本第二型糖尿病患者粒線體 DNA 突變的情形。其利用 *Hha* I 與 *Hinc* II 兩組限制 來分析切位，再以 SSCP 電泳結果判讀 DNA 鹼基變異的位置，發現七個日本人常見的突變區域，而其中第二型糖尿病患之粒線體 DNA 突變機率較健康日本人的對照組明顯高出很多，因此推測粒線體 DNA 的突變是引起此遺傳疾病之主因。

Wu 等 (2000) 以 PCR-RFLP 電泳結果經電腦分析比對所衍生出的定量評估 (quantitative assessment) 方法來分析脂蛋白 apolipoprotein E (APOE)，利用限制 *Hha* I 作用過之電泳圖上五條序列片段 (91 bp、83 bp、72 bp、48 bp 與 35 bp) 相對量的多寡，來鑑定 APOE 三組對偶基因 (alleles) 衍生出的 2/2、2/3、3/3、3/4、2/4 與 4/4 六種基因型。此統計方法之建立，可提高傳統 PCR-RFLP 檢測的可信度及靈敏度，例如 2/3 型與 3/3 型在電泳圖上看到的結果皆有 91 bp、83 bp、48 bp 與 35 bp，無法明確辨識其差異，但經定量比對之後可發現 3/3 型中的 83 bp 片段的量非常微量而可以忽略不採計；同理 4/4 型中 91 bp 與 83 bp 皆未達有意義的相對量，表示其判讀片段應只有 72 bp、48 bp 與 35 bp。此實驗檢測 APOE 基因型除了可預測心血管疾病的發生率，亦可作為阿茲海默症 (Alzheimer disease) 的危害評估。

### (三) PCR-RFLP 於加工食品上之應用

為了檢視燻鮭魚的加工情形，Russell 等 (2000) 針對 10 種鮭魚魚種，利用 PCR-RFLP 技術先增幅 cytochrome *b* gene 之 438 bp

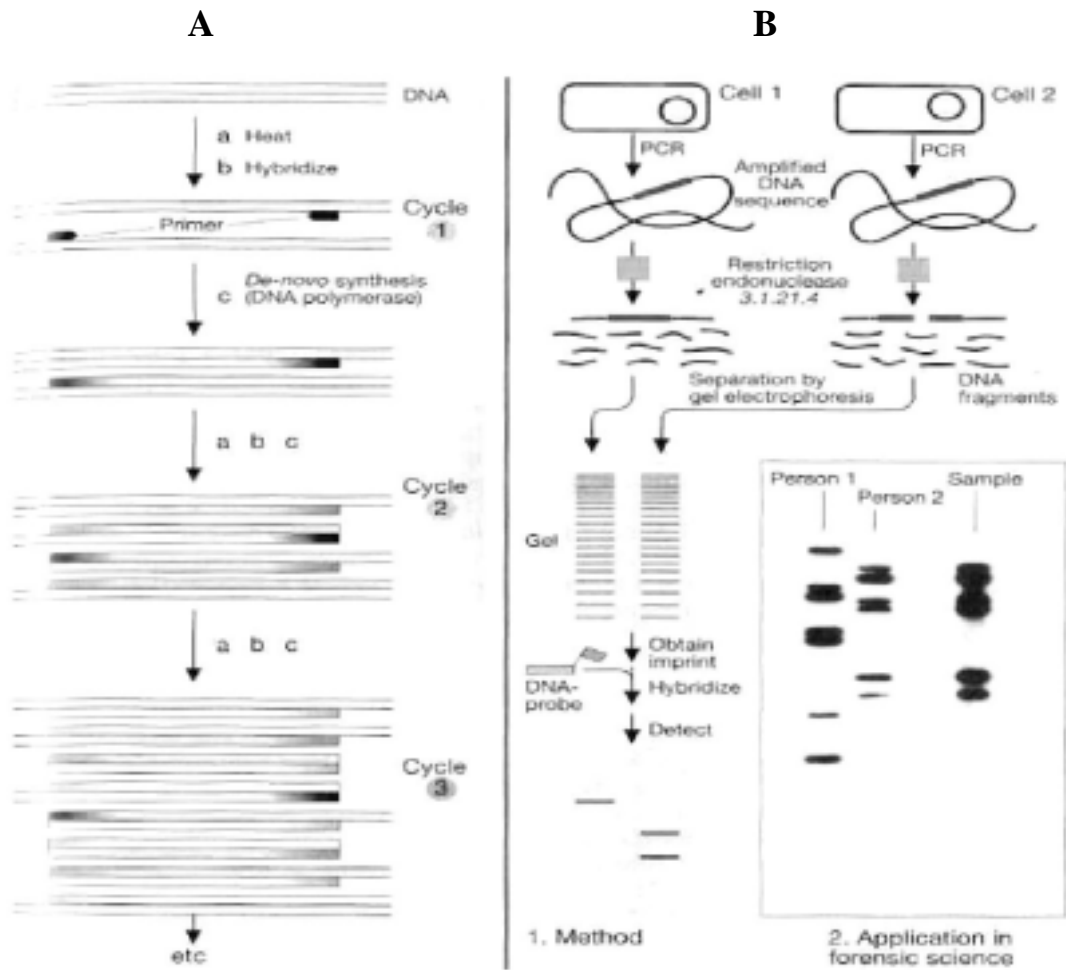


部分片段，再經由 6 種限制 切割後呈現不同之片段多型性，得以判定其中 8 種煙燻加工鮭魚魚種間差異性，而有另外兩 *Salvelinus alpinus* 與 *S. fontinalis* 魚種則因切位一致，無法判別差異，學者說明可再進一步研究 mtDNA 其他區域來作區分。

為發展快速鑑定造成中毒香魚片魚種之方法，本實驗室嘗試利用 PCR 技術及直接定序分析新鮮、冷凍、烹煮過之紅鰭多紀鮭及橫紋多紀鮭，和其加工製品之香魚片中粒線體 DNA 之 cytochrome *b* gene 部分片段，鑑別此序列之差異度。在新鮮狀態、冷凍狀態及烹煮過之紅鰭多紀鮭其三種狀態之此段序列並無差異，橫紋多紀鮭和其製作之香魚片的此段序列亦無差異，則可藉由限制 *EcoR* V、*BstZ* I、*Aat* II 切位來判別，此技術可鑑定經過不同加工過程之紅鰭多紀鮭和橫紋多紀鮭魚肉，且限制 切位之分析較直接定序提供了快速且廉價之鑑別方法（謝, 2001）。

之後實驗室亦建立以 PCR-RFLP 方法來鑑定台灣四種養殖鰻及分析鰻魚加工品，檢驗之 PCR 產物為片段 362 bp 的 mtDNA cytochrome *b* gene，發覺四種鰻魚各有其獨特的基因型態，且在各種加工條件下序列並無差異性，而以 RFLP 技術進行限制 切位分析，利用限制 *Hinf* I 切割後在日本鰻有兩個切位，歐洲鰻沒有切位，美洲鰻則有一個切位；另外限制 *Ase* I 切割後在美洲鰻有一個切位，而歐洲鰻和日本鰻沒有切位；*Sty* I 分析後在日本鰻有一個切位，歐洲鰻和美洲鰻則沒有切位；限制 *Sau96* I 則可用來鑑別親源較遠的灰海鰻。利用上述四種限制 切位之不同，可有效的鑑別出四種不同的新鮮鰻魚及市售蒲燒鰻、鰻串等加工品（任, 2002）。





**Fig. 1-3. A. Polymerase chain reaction (PCR). B. Analysis of RFLP.**

( Koolman and Rohn, 1996 )



**第二章、 台灣常見鮪魚屬魚種 cytochrome *b*  
gene 序列分析及 PCR-RFLP 鑑種技術  
之建立**



## 一、 前言

鮪魚為國內重要的遠洋漁獲物，常見魚種有黑鮪 ( *Thunnus thynnus* ; bluefin tuna )、長鰭鮪 ( *T. alalunga* ; albacore )、黃鰭鮪 ( *T. albacares* ; yellowfin tuna ) 及大目鮪 ( *T. obesus* ; bigeye tuna ) 等 ( 沈, 1993 ; 傅, 2000 ; Haward and Bergin, 2000 )。台灣超低溫延繩釣船主要漁獲對象為大目鮪、黃鰭鮪，大多輸往日本生魚片市場；傳統鮪延繩釣則以供應鮪罐頭廠製罐的原料長鰭鮪為主；而黑鮪及南方黑鮪等高經濟價值之鮪類更讓漁民視為珍寶 ( 張, 1997 ; 胡, 2000 )。

鮪魚屬於高經濟價值之魚類，但因魚種不同，不同魚種之間價格差異很大。為建立台灣常見遠洋鮪魚魚種新鮮原料之基因鑑定，本實驗將應用基因技術中聚合 連鎖反應法 – 限制 作用片段長度多型性分析技術 ( polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism ; PCR-RFLP )，配合直接定序法 ( sequencing )，針對鮪屬四種鮪魚作探討、分析，以建立鮪魚魚種之 cytochrome *b* gene 之部份基因圖譜；進而開發出利用基因探針快速辨別冷凍及新鮮魚種之方法。





## 二、 材料與方法

### (一) 實驗材料

國內樣品方面包括黑鮪 (*Thunnus thynnus*)、長鰭鮪 (*T. alalunga*)、黃鰭鮪 (*T. albacares*) 及大目鮪 (*T. obesus*)，採樣地點包括東港及高雄港。樣品以刺刀採樣兩次以上之尾肉，每次約 3-5 g，凍結或凍藏後送回實驗室。

國外樣品包括長鰭鮪 (*T. alalunga*)、黃鰭鮪 (*T. albacares*) 及大目鮪 (*T. obesus*)，採樣地點包括新加坡、曼谷、模里西斯及開普敦等遠洋漁獲基地，委託當地從業人員採集尾肉塊約 50 g，以凍結方式運送回實驗室；國內外漁獲區包含太平洋（東港、曼谷）、大西洋（東港、開普敦）及印度洋（新加坡、模里西斯）等三大洋。樣品自採樣區帶回實驗室後立即取部分肌肉進行 mtDNA 粗萃，剩餘部分存放於-20 冷凍儲存 1-3 個月供作冷凍及加工實驗材料使用。

除採集已知物種別之檢體供建立基因技術 PCR-RFLP 鑑種分析外，亦自包括基隆碧砂漁港漁市、高雄五甲漁市及東港華僑市場等漁市場之生魚片攤販，購得超低溫冷凍之平價鮪魚生魚片及高價的黑鮪腹肉生魚片，檢測市售生鮮鮪魚有無假冒（以其他種較低價之鮪魚冒充黑鮪）之情形，並做為本基因鑑種技術實際應用之測試依據。

### (二) 實驗方法

#### 1. 粗萃 DNA

抽取 crude DNA (包括 genomic DNA 及 mitochondrial DNA) 依照 DeSalle 與 Birstein (1996) 及 Kocher 等 (1996) 之粗萃 DNA 實驗方法稍作修改，詳細流程如下：

- (1) 將約 0.1 g 鮪魚肌肉組織置入無菌之 1.5 ml Eppendorf 微量離心管 (microcentrifuge tube)，加上 0.5 ml 分解緩衝液 (digestion buffer)，其配方包括：



- A. 0.05 ml 之 Tris-HCl ( 50 mM、 pH 8.0 )
- B. 0.05 ml 之 SDS ( 1% )
- C. 0.05 ml 之 NaCl ( 0.2 M )
- D. 0.05 ml 之 EDTA ( 0.1 M、 pH 8.0 )
- E. 0.05 ml 之 proteinase K ( 5 mg/ml )
- F. 0.25 ml 之無菌二次蒸餾水

以殺菌剪刀切碎、研磨成均勻之萃取反應液。

- (2) 將微量離心管置入 55 恆溫水浴槽 ( water bath ) 中輕微搖動反應 2 至 4 小時，利用 proteinase K 分解組織中蛋白質，並以 SDS 破壞細胞膜、細胞核核膜及粒線體外膜。
- (3) 取出後加入 0.5 ml、 pH 8.0 之酚飽和溶液 ( phenol )，輕微翻轉混勻，使酚層和水層充分反應後，以 15,000 g、 4 之高速低溫離心機 ( Hitachi T15AP, Hitachi Co., Tokio ) 離心 10 分鐘，可觀測到上層為澄清水溶液，下層為有機溶劑，而中間介面懸浮的白色雜質則為分離出之蛋白質及脂質。以寬口 tip 抽取上層澄清之水溶液約 0.5 ml，置入另一微量離心管。
- (4) 重複 (3) 之步驟，抽取上澄液約 0.5 ml 置入 1.5 ml 微量離心管，接著加入 0.5 ml 的酚氯仿及異丙醇混和溶劑 ( phenol-chloroform ; phenol : chloroform : isoamyl alcohol = 25 : 24 : 1 )，以 15,000 g、 4 之高速離心 10 分鐘，抽取上澄液約 0.5 ml 置入微量離心管。
- (5) 為了達到更好的效果，重複上述 (4)、(5) 步驟 2-3 次，且最後一次多加入 0.5 ml 之 phenol-chloroform。這樣的步驟主要是溶去蛋白質、脂質及多醣類，留下較純的 DNA。
- (6) 最後的萃取液加入 1.0 ml、 99.5% 之乙醇 ( ethanol ; EtOH ) 溶液，混合後置於 -20 冰箱中進行 1 至 2 小時沉澱反應。此一步驟是利用核酸物質 DNA 在低溫之 EtOH 溶液中溶解度變差，因此可觀測到白色懸浮的絲狀 DNA。

- (7) 自冰箱取出後以 15,000 g、4 高速低溫離心 20 分鐘，抽去上清液 EtOH 後，保留底部半透明狀之黏稠沉澱物。
- (8) 再加入 200  $\mu$ l 之 70% 乙醇溶液，將沉澱物輕彈使其離開離心管管壁，並稍作震盪，利用 30% 之 H<sub>2</sub>O 去除鹽分、70% 之 EtOH 溶出 phenol 及 chloroform 溶劑。接著以 15,000 g、4 離心 10 分鐘再抽乾上清液，留下沉澱物，打開離心管管口倒置乾燥，或以真空抽氣加速乙醇之揮發。
- (9) 待其乾燥，加入 50  $\mu$ l 至 100  $\mu$ l 不等之二次無菌蒸餾水，溶解 DNA 沉澱物，混合均勻並稍微離心，集中管壁上的剩餘液，儲存於-20 備用。
- (10) 為確定產品品質，需利用 DNA 電泳 ( DNA electrophoresis ) 觀察結果，電泳方法如下：
  - A. 取約 5  $\mu$ l 的 DNA 粗萃取液，混合 1  $\mu$ l 之 loading dye，載入 0.8% 的瓊脂凝膠 ( agarose gel ) 膠電泳片 ( 以 0.8% 的 agarose 溶入 0.5X TBE buffer，其中 TBE buffer 則包含 0.089 M 的 Tris、0.089 M 的 boric acid 以及 0.002 M、pH 8.0 的 EDTA )。
  - B. 在 TBE buffer 溶液的環境下，以 100 伏特電壓電泳約 30 至 40 分鐘。
  - C. 將此膠電泳片置入濃度 10  $\mu$ g/ml 的溴化乙錠 ( ethidium bromide ; EtBr ) 溶液中染色約 20 分鐘，取出後以清水退染 10-20 分鐘，
  - D. 以紫外燈照相系統 ( Hitachi Image VDS System, Hitachi Co., Tokyo ) 照相並存檔，以確定粗萃 DNA 之片段大小和濃度。

## 2. 選擇引子 ( primer )

本實驗選擇粒線體 DNA ( mitochondrial DNA ; mtDNA ) 中細胞色素 *b* 基因 ( cytochrome *b* gene ) 區，利用 PCR 方法檢測各種引



子為四種鮪魚基因 DNA 定序之用，並建立其差異性。

第一組引子對為 L14841 及 H15149 ( Table 2-2 )，使用 Kocher 等 ( 1989 ) 針對硬骨魚綱 ( Class Osteichthyes ) 之 mtDNA 序列裡 cytochrome *b* gene 中高度保留區所設計的引子，其可複製大部分硬骨魚類之 cytochrome *b* gene 片段，應用較廣，經此 primer 增幅之片段可利用於分辨硬古魚綱以下的種屬差異性。

第二組引子對 cytBL 與 cytBH ( Table 2-3 ) 則是依照 Bartlett 與 Davidson ( 1991 ) 針對鮪鯉類魚種 mtDNA 中 cytochrome *b* gene 所設計之引子，對鮪屬魚種之基因有較好的結合性。

### 3. mtDNA 中 cytochrome *b* gene 片段的大量增幅

#### (1) PCR 反應

粒線體 DNA 中 cytochrome *b* gene 片段之大量增幅 ( amplify ) 係使用聚合 連鎖反應 ( PCR ; polymerase chain reaction ) 技術，其條件依據 Innis 與 Gelfand ( 1990 ) 建議的 DNA 增幅之標準反應條件及其他資料 ( Kocher et al., 1989 ; Williams et al., 1989 ; Bartlett and Davidson, 1991 )，再依照本實驗中使用的引子測試條件，實際操作後予以調整。

PCR 增幅反應的總體積為 50  $\mu$ l 或 100  $\mu$ l，其中包含有：

- A. 粗萃 mtDNA 約 50-500  $\mu$ M 作為複製用模板 ( template )
- B. 兩條引子各約 25 至 100 pmol
- C. 200  $\mu$ M 的 dNTPs ( 包含 dATP、dTTP、dGTP 與 dCTP )
- D. 0.5 至 2.0  $\mu$ l 的 Taq DNA polymerase ( Promega Co., Wisconsin, USA )
- E. PCR 反應 buffer ( 包含 20 mM 之 Tris-HCl、15 mM 之  $MgCl_2$ 、1% Triton X-100、0.1 mM 之 EDTA、1 mM 之 DDT 與 50% 之 Glycerol )



本實驗所採用的 PCR 反應溶液詳細使用量如 Table 2-4 所示。  
接著送入溫度循環機：GeneAmp PCR System 2400 ( Perkin-Elmer, Foster, CA ), 理論之反應條件如下：

- A. 起始 denaturation 步驟：95 5-10 分鐘，利用高溫打斷核酸之間氫鍵的鍵結，打開雙股 DNA( 即 denaturation 作用 )
- B. 20 至 40 次不等之熱循環反應，包括三個溫度循環反應，增幅特異 DNA 片段：
  - a. 95 1-2 分鐘，使雙股 DNA 變性 ( denature ) 打開。
  - b. 約 45 至 55 1-2 分鐘，依引子條件測試並找尋適合之反應溫度，在此溫度下使 template DNA 與引子煉合 ( annealing )
  - c. 72 1-2 分鐘，此溫度使引子之後的 dNTP 繼續接合成新的互補序列，即延伸反應 ( extension )
- C. 最後 extension 步驟：72 5-10 分鐘。

反應結束後即可將 PCR 產物 ( PCR product ) 取出，凍藏於-20 備用。本實驗所採用兩組引子的 PCR 反應，主要測試條件為熱循環反應中的第二步 annealing 之溫度，經測試 46 、 48 、 50 、 52 、 54 及 56 之後找到最適反應溫度，反應條件如 Table 2-5 所示。

## (2) PCR 產物之電泳分析

- A. 取約 3  $\mu$ l 之 PCR 產物與 1  $\mu$ l 之 loading dye 混合後，載入 1.2% 的瓊脂凝膠 ( agarose gel ) 膠電泳片 ( 以 0.8% 的 agarose 溶入 0.5X TBE buffer ); 並同時載入 100 bp DNA ladder ( Bio 100, Promega Co., USA ) 作標記 ( marker )
- B. 在 TBE buffer 溶液的環境下，以 100 伏特電壓電泳約 30 至 40 分鐘。
- C. 將膠電泳片置入濃度 10  $\mu$ g/ml 的溴化乙錠 ( ethidium

bromide ; EtBr ) 溶液中染色約 20 分鐘，取出後以清水退染 10-20 分鐘，以紫外燈照相系統照相並存檔。

- D. 檢視 PCR 產物與 marker 標記之亮帶 ( band ) 相對位置，判定增幅之片段大小是否正確，並以亮帶之螢光亮度大致判定 DNA 含量。若片段大小與預估結果相符，且無其他亮帶或雜訊產生，則代表增幅成功，可繼續進行下一純化步驟。

### (3) PCR 產物之純化

PCR 產物之純化 ( purification ) 目的在除去未作用完之物質，如 dNTPs、MgCl<sub>2</sub>、template DNA 等，使 PCR 產物定序反應進行時不會造成干擾，其步驟如下：

- A. PCR 產物載入 2.0% 之 agarose gel 以，在 TBE buffer 溶液的環境下以 50 伏特電壓透析電泳約 1 個半小時 電泳後的膠片置入濃度約 10  $\mu$ g/ml EtBr 溶液中約 20 分鐘，取出後以清水退染 10-20 分鐘，
- B. 先以紫外燈照相系統存檔後，置於紫外燈下將亮帶位置之膠塊切割下。
- C. 切割下的膠塊加入 5 倍體積 Tris-EDTA buffer ( TE buffer ) 於 65  $^{\circ}$ C 下作用 5 分鐘使其溶解，再加入約 1 倍體積之 phenol，輕微翻轉混勻後以 15,000 g、4  $^{\circ}$ C 離心 10 分鐘，抽取上澄液。上澄液再次加入等倍體積之 phenol 混勻後如上述離心方式離心抽取上澄液，再加入等倍體積之 phenol-chloroform，同樣地離心後抽取上澄液。
- D. 所得上澄液加入 0.1 倍體積 3 M 之醋酸鈉( sodium acetate, pH 5.2 ) 和 2 倍體積以上之 99.5% 乙醇 ( ethanol ) 溶液，在 -20  $^{\circ}$ C 低溫下進行 1-3 小時之沉澱反應，再經過 15,000 g、4  $^{\circ}$ C 高速離心 20 分鐘，所得之沉澱物溶於 20  $\mu$ l 之二次無

菌蒸餾水中，並以 2  $\mu$ l 進行電泳測試作再確認。

#### 4. PCR 產物 cytochrome *b* gene 片段之定序

純化過之 PCR 產物送至明欣生物科技有限公司 ( Mission Biotech, Taipei, Taiwan ) 進行定序 ( sequencing ), 利用以 Sanger's Method ( Dideoxy Method ) 修正之自動定序法 ( automatic sequencing method ), 以四種螢光劑標定, 並以電腦自動判讀; 使用之定序系統 Sequencer 為 ABI PRISM 377-96 DNA Sequencer ( Perkin-Elmer, CA, USA ); Reagent 為 ABI PRISM Bigdye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit ( PE Applied Biosystem, CA, USA )。

#### 5. Cytochrome *b* gene 片段資料分析

定序後所得兩段互補序列經由國家衛生研究院提供之巨分子分析服務系統 ( Genetics Computer Group System, 2000 ; GCG System, 2000 ) 中, 以 Web 介面執行程式之 SeqWeb 進行分析比對。

先比對同一 PCR 產物中兩條互補序列相對互補之正確性, 之後再就兩組不同引子增幅之 cytochrome *b* gene 之區域片段進行交叉比對。使用之比對 ( comparison ) 程式包括 BestFit 及 Gap, BestFit 是用來尋找兩段序列間之最佳排列區域 ( local alignment ), 只列出相連的最相似部分 ( 即無 gap 產生 ), 而 Gap 則用來尋找兩條序列整體的最佳排列方式 ( globe alignment ), 幾乎將兩條序列從頭到尾完全並列分析, 會在序列間插入許多 gap ( 蘇, 2001 )。

若兩序列互補完全, 接著確認兩端引子之位置, 扣除兩端引子重疊 ( overlap ) 之片段, 所得中間片段即為增幅後比對所需之序列; 將此片段輸入 GCG 系統中之核酸資料庫 ( 此資料庫為以 GeneBank 為主, 再補上 EMBL 的部份資料, 集合而成的完整核酸資料庫 ) 進行比對。

目前較常使用的資料庫搜尋方法 ( algorithm ), 可大略分為



Smith-Waterman( S Search ) FastA 與 BLAST 三種, Smith-Waterman 是最先發展出來的 algorithm, 其靈敏度最高, 但計算量最大, 所花的時間也最長; 而後發展的 FastA 速度較 Smith-Waterman 快, 靈敏度略差; 速度最快的是 BLAST, 但靈敏度在三者中是最差的; 而除了 BLAST 以外, 亦有 NetBLAST, 其和 BLAST 唯一的不同是 NetBLAST 將序列直接送到美國 NCBI 去執行 BLAST, 再將結果傳送回來, 這樣便可以直接在 SeqWeb 下執行 NCBI 的 BLAST 程式, 比對最新的資料庫 ( Shaper et al., 1996 ; 楊, 2000 )。雖然 BLAST 並非最靈敏的搜尋方法, 但因搜尋速度較快, 是現在最為廣泛利用之序列搜尋方法, 本實驗中序列比對也以此方法為主。

經 BLAST 搜尋後找出 GeneBank 內與所求片段最相近之 20 條序列, 並分析序列間之相似率 ( percent similarity ), 判定所求之核酸片段與資料庫內之物種是否相符, 進而搜尋限制 圖譜 ( restriction map ) 並依需求分析作用切位及尋找合適之限制 。

## 6. 限制 分析 PCR 產物

限制 ( restriction enzyme ; restriction endonuclease ) 是一種專一性很高的酵素, 其對雙股核酸序列具有切割 ( cut ) 的作用, 作用之方式為切斷核酸序列中 3'-5'-phosphodiester bond。不同限制 針對作用的序列皆不同, 即不同限制 能識別並切割出不同的限制座 ( restriction site ), 在生物技術上是一種很重要的應用工具 ( Christensen et al., 1995 ; Janusz et al., 2001 )。利用限制 對 DNA 進行切割作用參照黃等 ( 2001 ) 之操作步驟經修改流程如下:

- (1) 分別取純化所得之 PCR 產物 ( 即 cytochrome *b* gene 片段 ) 約 1-10  $\mu$ g ( 視純化出之片段濃度而定 ), 置入 1.5 ml 之 eppendorf 微量離心管, 並加入所選擇之限制 ( Promega Co., USA ) 10X buffer、10X 牛血清 ( BSA ) 及二次無菌蒸餾水, 使總反應體積定容至 20  $\mu$ l ( Table 2-6 )。



- (2) 以限制 適合之溫度水浴 1-2 小時。
- (3) 取出後混合 1  $\mu$ l loading dye , 注入 2.0%之 agarose gel 電泳膠片 , 在 TBE buffer 內以 100 伏特電壓跑電泳約 1 小時 , 取出此膠片置入濃度 10  $\mu$ g/ml 之 EtBr 溶液中染色 20 分鐘 , 取出後以清水退染 10-20 分鐘 , 再以紫外燈照相系統照相並存檔。



### 三、 結果

#### (一) 冷凍鮪魚之 DNA 粗萃

本實驗所採用之國內常見之四鮪魚種 *T. thynnus* (黑鮪)、*T. alalunga* (長鰭鮪)、*T. albacares* (黃鰭鮪) 及 *T. obesus* (大目鮪) 肌肉組織皆於超低溫狀態下自漁獲區凍藏運回，經 DNA 粗萃後電泳觀測各樣品品質，得知其 DNA 序列保持完整，皆在 20,000 bp 以上，可視為等同於新鮮魚肉之檢體 (Fig. 2-1A)。而自遠洋漁獲基地輾轉運回台灣之 *T. alalunga*、*T. albacares* 及 *T. obesus* 三魚種經 DNA 粗萃後，則發現電泳圖上部分出現模糊 (smear) 的情形 (Fig. 2-1B)，判斷在長途轉運的過程中可能因溫度控制保存條件較差，而使檢體之 DNA 產生降解作用 (degradation)。

粗萃所得之樣品 DNA 包括 genomic DNA (即染色體 DNA) 及 mitochondrial DNA，經所選擇之特異性引子進行 PCR 增幅後，可得到 mitochondrial DNA 中高度保留之部份 cytochrome *b* gene，供序列之比對分析及 PCR-RFLP 鑑種技術之建立。

#### (二) Cytochrome *b* gene 序列片段之比較及分析

經 L14841 / H15149 與 cytBL / cytBH 兩組引子 PCR 增幅之 mtDNA 中 cytochrome *b* gene 片段，電泳圖分析後確認其分別為 376 bp 與 358 bp 片段 (Fig. 2-2)，經定序 (sequencing) 後 (4 魚種樣品兩段互補電腦序列圖如 Appendix 1-4 所示)，以 *T. thynnus* 為基準，利用 GCG 系統比對兩組引子所增幅之序列區域差異，發現兩組引子所增幅之片段實為同一段 cytochrome *b* gene，扣除兩端引子後之中間序列皆為 307 bp (Fig. 2-3)；而又 cytBL / cytBH 這組 primer 在 PCR 溫度循環反應時條件控制較 L14841 / H15149 容易，因此之後此部份實驗之 primer 使用皆以 cytBL / cytBH 為主。

在海域族群的差異性方面，除 *T. thynnus* 之採樣侷限於北太平洋及北大西洋外，其餘三魚種之檢體均來自不同漁獲區，橫跨北半

球三大洋；每一魚種於各海域之序列分析個體數皆在一尾以上。各魚種之 PCR 產物在定序後，即進入 GCG 系統中進行 GeneBank 之資料庫搜尋 ( database searching )，並相互進行比對 ( comparison )，結果如下：

1. *T. thynnus* ( 黑鮪 )：自北太平洋與北大西洋採得共計 4 份樣品經定序之後，相互比對無任何差異性，即片段相似度 ( percent similarity ) 達 100%；而其在 GeneBank 內搜尋得到的結果確認為 *T. thynnus*，相似度亦高達 100% ( Fig. 2-4 )。
2. *T. alalunga* ( 長鰭鮪 )：自印度洋採得之 3 件樣品序列經比對分析後發現 1 個鹼基對 ( base pair ) 的差異，相似度 99.674%，而與北太平洋之樣品 ( 1 件 ) 相比對，其中 1 件完全相同，相似度達 100%。北大西洋 2 件樣品與 GeneBank 比對 ( 282 bp 片段 ) 完全相同，而與印度洋比對後之相似度分別為 99.674% 與 99.349%，與北太平洋之相似度亦高達 99.674%，只有 1 個鹼基對的差異 ( Fig. 2-5 )。
3. *T. albacares* ( 黃鰭鮪 )：來自北太平洋 2 件、北大西洋 1 件及印度洋 2 件共計 5 件樣品，經定序後比對相似度皆高達 100%，而進入 GeneBank 搜尋出一段 281 bp 的 *T. albacares* cytochrome *b* gene 序列則有 3 個鹼基的差異，相似度為 98.932% ( Fig. 2-6 )。
4. *T. obesus* ( 大目鮪 )：北大西洋 2 件樣品經相互比對後序列完全相同，印度洋 2 件樣品間相互比對亦完全相同。將北大西洋序列與印度洋相比對，有 2 個鹼基的差異，即相似度 99.349%；而北大西洋與北太平洋之樣品 ( 1 件 ) 比對後僅有 1 個鹼基的差異，相似度 99.674%；印度洋與北太平洋比對也只有 1 個鹼基差異。而自 GeneBank 搜尋出之一段 285 bp 之 *T. obesus* cytochrome *b* gene 片段與北太平洋樣品有 2 鹼基差異，與北大西洋亦有 2 鹼基之差異，與印度洋相比則有 3 個鹼基差異，相似度為 98.947% ( Fig. 2-7 )。

四魚種交叉比對此段共識序列 ( consensus sequence ) ( Fig. 2-8 ), 得知 *T. obesus* 與其他魚種相異度 ( divergence ) 相差最大, 最高有 13 個鹼基, 即 4.235% 的差異; 而 *T. thynnus* 與 *T. alalunga* 相異度最小, 只有 1 至 4 個鹼基的差異, 相似度達 98.687% 至 99.674%; 物種間及物種內兩兩相互比對之相似度及相異度百分比如 Table 2-7 所示, 其種內差異在 0 至 0.997% 間, 而物種間之差異則在 0.325% 至 4.235% 間。

經由此 cytochrome *b* gene 片段輸入 GCG 系統所分析建構而成之系統演化樹 ( phylogenetic trees ), 可大略觀察到 *T. thynnus* 與 *T. alalunga* 兩物種的高度親緣關係, 而 *T. albacares* 之演化則介於 *T. alalunga* 與 *T. obesus* 間 ( Fig. 2-9 )。

### (三) 限制 切位分析

經由序列分析四種鮪魚粒線體 DNA 中 cytochrome *b* gene 之 307 bp 片段差異後, 分別將四魚種之序列片段輸入 GCG 系統中搜尋其限制 圖譜 ( restriction map ) ( Appendix 5 8 ), 將四魚種交叉比對, 扣除少數種內差異之鹼基對, 針對四物種間相異鹼基對作為限制 選擇之標準; 所選得之特異性切位限制 包括 *Bsp*1286 I、*Hinc* II 及 *Rsa* I, 其分別作用位置及最適反應溫度如 Table 2-8 所示。

限制 *Bsp*1286 I 主要用來區隔 *T. thynnus* 與其他三魚種之差異; 在 *T. thynnus* 此段 358 bp 之序列 ( 包含 primer 複合之區域 ) 上, 作用於第 75 與 76 個鹼基間, 切割成 283 bp 與 75 bp 兩段, 而對另外三魚種則無作用 ( Fig. 2-10A )。

*Hinc* II 則用以區分 *T. obesus* 與其他三魚種之差異; 其在 *T. obesus* 之序列上沒有作用切位, 反應後仍保持 358 bp, 而對 *T. thynnus*、*T. alalunga* 與 *T. albacares* 序列則在第 198 與 199、第 208 及 209 個鹼基間有作用切位, 可將此三魚種之 358 bp 序列切割成 198 bp、150 bp 及 10 bp 三段 ( Fig. 2-10B )。

*Rsa* I 對 *T. albacares* 與 *T. obesus* 序列之切位相同，皆在第 74 及 75 個鹼基間，可切割成 284 bp 與 74 bp 兩段；對 *T. thynnus* 之切位則在第 102 及 103 個鹼基間，切成 256 bp 與 102 bp 兩段；而對 *T. alalunga* 之切位有兩個，在第 74、75 及第 102、103 個鹼基間，可將之切割成 256 bp、74 bp 及 28 bp 三段 ( Fig. 2-10C )。

三組限制 對四魚種分別作用後之片段大小整理於 Table 2-9，而其在 358 bp 共識序列上之作用區域則如 Fig. 2-11 所示；經此三組限制 作用，可確實的對四個鮪屬魚種作出區分。

#### (四) 市售鮪魚生魚片之魚種檢測

分別自屏東東港華僑市場購得鮪魚生魚片樣品 2 件、黑鮪腹肉生魚片 2 件；基隆碧砂漁港漁市購得鮪魚生魚片 2 件、黑鮪生魚片 2 件；高雄五甲漁市同樣購得鮪魚生魚片 2 件、黑鮪腹肉生魚片 2 件，共計鮪魚生魚片樣品 6 件，黑鮪生魚片樣品 6 件。

利用建立之 PCR-RFLP 鑑種技術對此 6 件鮪魚樣品進行檢測，經三組限制 多型性作用後之電泳結果如 Fig. 2-12 中 sample 1 ~ 6 所示，分析得知除 sample 2 及 sample 5 ( 分別購自華僑市場與五甲漁市 ) 為大目鮪 ( *T. obesus* ) 外，其他 4 件樣品皆為黃鰭鮪 ( *T. albacares* )。而對 6 件黑鮪樣品所作之檢驗電泳結果如 Fig. 2-12 中 sample 7 ~ 12 所示，6 件樣品證實皆為黑鮪 ( *T. thynnus* )，顯示業者並無以低價鮪魚種冒充高價黑鮪之情形。



## 四、 討論

### (一) mtDNA 中 cytochrome *b* gene 之序列特性

由國家衛生研究院提供之巨分子分析服務系統 (GCG System, 2000) 進入 GeneBank 進行交叉比對, 並搜尋資料庫內 20 組相關基因片段, 選擇最接近的一段基因確認魚種, 並與實驗序列進行探討。358 bp 基因片段中同物種種內變異在 1 至 3 個鹼基對內, 而物種間的變異則在 1 至 13 個鹼基對間, 最高相異度只有 4.235%; 即無論是同種不同族群或同屬間不同種的序列相似度都非常高, 應證了 mitochondrial DNA 中之 cytochrome *b* gene 區域由母系遺傳變異度低的保守性 (Brown, 1986)。

核酸序列造成變異的種類有鹼基的插入 (addition)、缺少 (deletion) 取代 (substitution) 及重排 (rearrangement) 等 (Nelson and Cox, 2000), 經本實驗序列比對, 並無間隙 (gap) 產生之情形, 亦即各魚種間之此段核酸片段上沒有 addition 或 deletion 的變異發生; 而鹼基大多為單一變異, 沒有連續鹼基變異的情形, 因此推測也沒有 rearrangement 的情形發生, 應該只有單一鹼基的 substitution 變異; 此也應證了在 mitochondrial DNA cytochrome *b* gene 上氧化還原中心蛋白的功能性, 大部分位置的胺基酸結構及排列順序不會改變, 只有少數鹼基會因遺傳演化而產生取代 (substitution) 的情形 (Southern et al., 1988; Hsieh et al., 2001)。

經由本實驗研究之片段序列粗略分析出的系統演化樹 (phylogenetic trees) (Fig. 2-9), 與 Alvarado 等在 1997 年對鮪類魚種種系發展關係 (phylogenetic relationships) 的研究中, 依據 mitochondrial DNA 之控制區 (control region) 內 450 bp 長度之基因序列片段分析所繪製出的系統演化樹相對照, 有相當程度的一致性。其中 *T. thynnus* 與 *T. alalunga* 的親緣關係非常相近, *T. albacares* 及 *T. obesus* 則較接近, 在演化上足見四組魚種不同程度的親緣關係。而在 Alvarado 等的研究中可發現 control region 基因的變異度較



大，同物種在不同海域族群即有明顯差異，不同物種間則最高有達 159 個鹼基位置的差異；其與本研究中的 cytochrome *b* gene 雖皆為 mitochondrial DNA 上不同位置之基因區，在演化過程中變異程度卻有明顯的不同；推論 cytochrome *b* gene 的低變異度較適合用來作物種的鑑定分析，而 control region 個體間的高變異度，則適合用作同物種內族群演化與地域性差異之分析。

## (二) 利用 PCR-RFLP 技術分析 cytochrome *b* gene 以鑑定魚種

Mitochondrial DNA 中之 cytochrome *b* gene 區的高保留性及其在演化上序列變異的相關性，近年來多作為分子生物學上物種分類的依據標準 (Antoinette and Greg, 2001)。以直接定序法分析 cytochrome *b* gene 序列的差異性雖然最為精準，但較為耗時且成本昂貴，並且無法對大量檢體作快速的分析；因而為開發快速、簡便區分物種的方法，學者遂嘗試以增幅基因序列片段的 PCR 技術，搭配限制 作用造成片段多型性的 RFLP 技術來作物種鑑定 (Jones, 1991)。然 PCR-RFLP 技術之開發，仍須先對偵測的基因片段作序列分析，確定限制 作用區域及切割片段大小，進而建立固定特異的 PCR-RFLP 鑑種模式，方便未來檢測分析的研究。

Hsieh 等 (2001) 認為種屬的辨別方法不能侷限於型態特徵，因而針對台灣即將絕種的保育類動物麝貓 (gem-faced civet)、獼猴 (macaque)、穿山甲 (pangolin) 及貓、牛、狗、豬、羊等人類馴養動物，以 PCR 方法增幅 cytochrome *b* gene 之部份 402 bp 片段，並以限制 進行分析，發現獼猴、貓、豬在種內及種間之異質 (heteroplasmy) 現象，推測是因母系遺傳之個體鹼基序列差異造成，進而研究基因排列之相異度，在同種動物間約為 0.25% 2.74%；與本實驗同種間 0 0.997% 的低變異度相較高出許多，推論鮪屬魚種之 cytochrome *b* gene 區域之保守性在演化上可能較哺乳類動物高。



同為硬骨魚綱（Osteichthyes）魚類物種以 PCR-RFLP 分析 cytochrome *b* gene 之研究方面，1995 年 Tagliavini 等曾針對兩種大西洋鰻 *Anguilla rostrata* 及 *A. anguilla* 的 cytochrome *b* gene 中一段 350 bp 片段進行 PCR-RFLP 分析，其選用的限制 *Hinf* I 在 *A. rostrata* 的 PCR 產物中有一切位，可將此片段分成 280 bp 及 70 bp，而對 *A. anguilla* 則無切位，實驗結果經由電泳圖可清楚區分兩種鰻魚的差異。而為研究鯖魚屬中無法以外部形態判定的 *Scomber japonicus* 與 *S. australasicus* 兩魚種，Sezaki 等(2001)更嘗試以 PCR 技術增幅整個 cytochrome *b* gene 序列，全長約 1,140 bp，針對兩魚種共 13 組個體，作親緣關係與核酸變異度相關性之分析，並再設計複製 320 bp 片段之引子，利用限制 *Mva* 與 *Mbo* I 切割產生之片段多型性，可以實際應用於天然海域浮游魚卵之特異種判定。由上述研究結果，可以推斷 PCR-RFLP 技術對於 cytochrome *b* gene 之分析，確實可以應用於同屬間親源相近物種之區分；本研究以三組限制 對台灣常見 *Thunnus* 鮪屬魚種 cytochrome *b* gene 中 358 bp 片段作用，在電泳圖上可明顯的區分出四魚種；對於新鮮、冷凍、甚至於 DNA 產生降解情形之鮪魚肌肉組織，皆可進行快速有效的 PCR-RFLP 鑑種分析，針對市售遠洋生鮮鮪魚的魚種辨識，可作為進一步應用的參考依據。



**Table 2-1. Places of capture and sea area of 20 samples of *Thunnus* species in this study**

<b>Species</b>	<b>Individual</b>	<b>Place of capture</b>	<b>Sea area</b>
<i>T. thynnus</i>	2	Kaohsiung	Northern Pacific Ocean
	1	Tungkang	
	1	Tungkang	Northern Atlantic Ocean
<i>T. alalunga</i>	1	Tungkang	Northern Pacific Ocean
	2	Cape Town	Northern Atlantic Ocean
	2	Singapore	Indian Ocean
	1	Mauritius	
<i>T. albacares</i>	1	Tungkang	Northern Pacific Ocean
	1	Bangkok	
	1	Tungkang	Northern Atlantic Ocean
	2	Mauritius	Indian Ocean
<i>T. obesus</i>	2	Tungkang	Northern Pacific Ocean
	1	Tungkang	Northern Atlantic Ocean
	2	Singapore	Indian Ocean



**Table 2-2. Sequences of primer L14841 and H15149**

<b>Primer</b>	<b>Sequence</b>
L14841	5'-AAA AAG CTT CCA TCC AAC ATC TCA GCA TGA TGA AA-3' ( 35-mer )
H15149	5'-AAA CTG CAG CCC CTC AGA ATG ATA TTT GTC CTC A-3' ( 34-mer )

( Kocher et al., 1989 )

**Table 2-3. Sequences of primer cytBL and cytBH**

<b>Primer</b>	<b>Sequence</b>
CytBL	5'-CCA TCC AAC ATC TCA GCA TGA TGA AA-3' ( 26-mer )
CytBH	5'-CCC CTC AGA ATG ATA TTT GTC CTC A-3' ( 25-mer )

( Bartlett and Davidson, 1991 )



**Table 2-4. PCR amplification reaction in a volume of 50  $\mu$ l in this study**

<b>Reagents</b>	<b>Concentration</b>	<b>Volume ( <math>\mu</math>l )</b>
Template DNA	50 $\mu$ M	3
L strand primer	25 $\mu$ M	1
H strand primer	25 $\mu$ M	1
DNTPs	100 $\mu$ M	2
Taq DNA polymerase	5 U / $\mu$ l	1
10X PCR buffer		7
Sterile, deionized water		35
<b>Total volume</b>		<b>50</b>



**Table 2-5. Temperature of 35 cycles PCR amplification reaction in this study**

Step	Time ( min )	Temperature	
		L14841 / H15149	CytBL / cytBH
<b>1.</b> Denaturation	10	95	95
<b>2.</b> A. Denaturation	1	95	95
B. Annealing	1	<b>50</b>	<b>52</b>
C. Extension	1	72	72
<b>3.</b> Extension	10	72	72



**Table 2-6. Restriction enzymes digest in a volume of 20  $\mu$ l in this study**

<b>Reagents</b>	<b>Concentration</b>	<b>Volume ( <math>\mu</math>l )</b>
PCR product ( DNA )	0.05-0.2 $\mu$ g / $\mu$ l	5
Restriction enzyme	10 $\mu$ g / $\mu$ l	0.5
RE 10X buffer		2
Acetylated BSA	10 $\mu$ g / $\mu$ l	0.2
Sterile, deionized water		12.3
<b>Total volume</b>		<b>20</b>



**Table 2-7. Percent pair distances of the 307 bp consensus fragments of the cytochrome *b* gene of four *Thunnus* species**

<i>T. thynnus</i> (Bluefin tuna)	<i>T. alalunga</i> (Albacore)	<i>T. albacare</i> (Yellowfin tuna)	<i>T. obesus</i> (Bigeye tuna)	Similarity ( % )
100	98.697 99.674	97.394 98.371	95.765 97.068	<i>T. thynnus</i>
	99.023 100	97.394 99.023	95.765 97.720	<i>T. alalunga</i>
		99.023 100	96.091 98.371	<i>T. albacare</i>
			99.023 100	<i>T. obesus</i>
<i>T. thynnus</i>	0			
<i>T. alalunga</i>	0.325 1.303	0 0.977		
<i>T. albacare</i>	1.629 2.606	0.977 2.606	0 0.977	
<i>T. obesus</i>	2.932 4.235	2.280 4.235	1.629 3.909	0 0.977
<b>Divergence ( % )</b>	<i>T. thynnus</i> (Bluefin tuna)	<i>T. alalunga</i> (Albacore)	<i>T. albacare</i> (Yellowfin tuna)	<i>T. obesus</i> (Bigeye tuna)





**Table 2-8. Recognition sequence and optimal assay temperature of three restriction enzymes in this study**

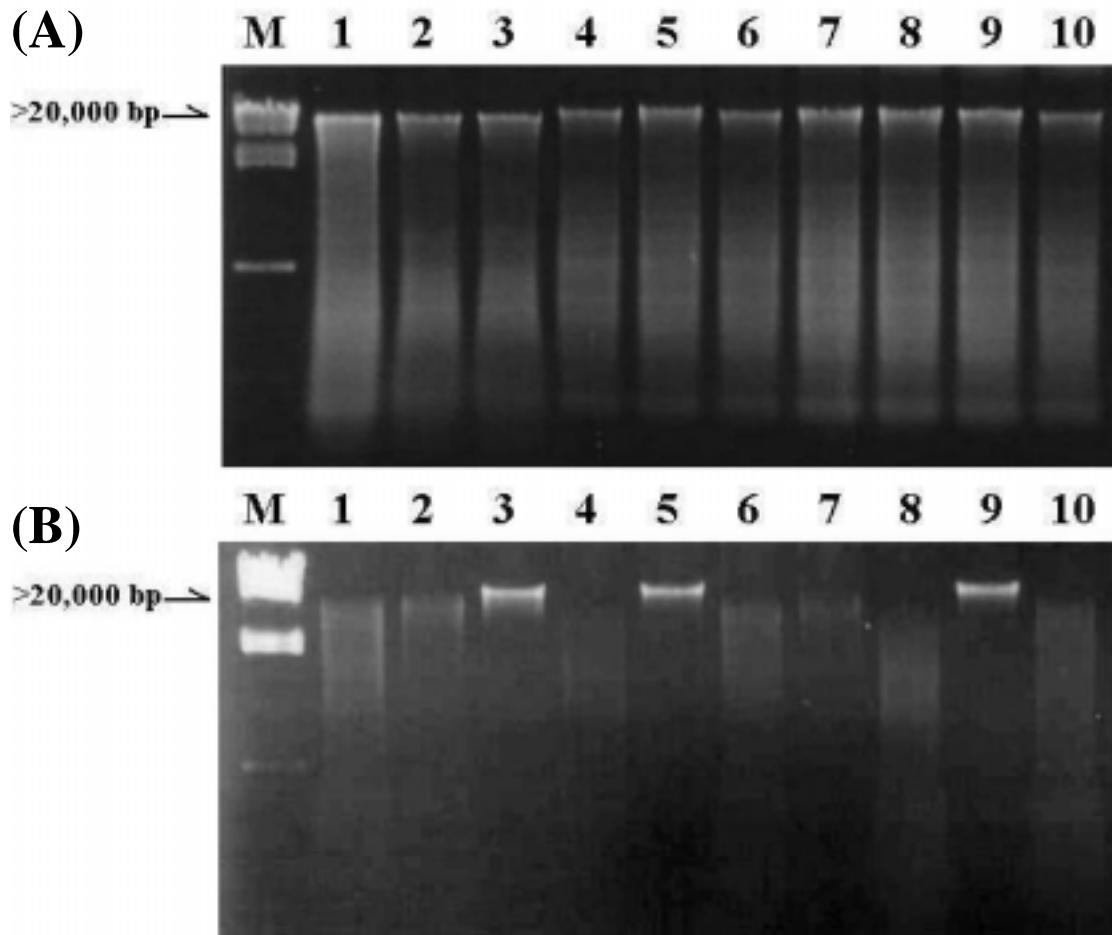
<b>Restriction enzyme</b>	<b>Recognition sequence</b>	<b>Assay temperature</b>
<b><i>Bsp</i>1286 I</b>	5'-G(G/A/T)GC(C/A/T) C-3' 3'-C (C/T/A)CG(G/T/A)G-5'	37
<b><i>Hinc</i> II</b>	5'-GT(T/C) (A/G)AC-3' 3'-CA(A/G) (T/C)TG-5'	37
<b><i>Rsa</i> I</b>	5'-GT AC-3' 3'-CA TG-5'	37



**Table 2-9. Fragments length of the 358 bp cytochrome *b* gene of four *Thunnus* species digested with three restriction enzymes**

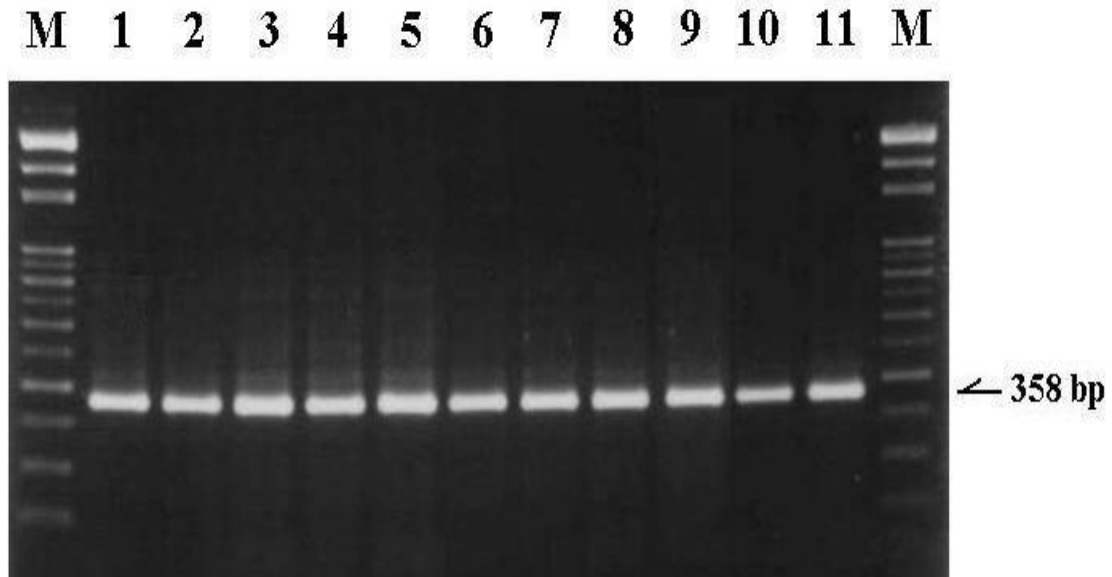
<i>Thunnus</i>	Restriction enzyme		
	<i>Bsp</i> 1286 I	<i>Hinc</i> II	<i>Rsa</i> I
<i>T. thynnus</i>	283 + 75 bp	198 + 150 + 10 bp	256 + 102 bp
<i>T. alalunga</i>	358 bp	198 + 150 + 10 bp	256 + 74 + 28 bp
<i>T. obesus</i>	358 bp	358 bp	284 + 74 bp
<i>T. albacares</i>	358 bp	198 + 150 + 10 bp	284 + 74 bp





**Fig. 2-1. Electrophoretic analysis of crude DNA extracted of (A) 10 frozen tuna samples from Kaohsiung and Tungkang and (B) 10 frozen tuna samples from Singapore, Bangkok, Mauritius and Cape Town. M = Lambda DNA marker.**





**Fig. 2-2. Electrophoretic analysis of PCR products amplified with cytBL / cytBH. Samples in lane are as follows: 1. *Thunnus thynnus* from Pacific Ocean; 2. *T. thynnus* from Atlantic Ocean; 3. *T. alalunga* from Pacific Ocean; 4. *T. alalunga* from Atlantic Ocean; 5. *T. alalunga* from Indian Ocean; 6. *T. albacares* from Pacific Ocean; 7. *T. albacares* from Atlantic Ocean; 8. *T. albacares* from Indian Ocean; 9. *T. obesus* from Pacific Ocean; 10. *T. obesus* from Atlantic Ocean; 11. *T. obesus* from Indian Ocean; M = 100 bp ladder.**



1-50

**L/H** AAACTGCAGC CCCTCAGAAT GATATTTGTC CTCAGGGAAG GACGTAGCCA  
**cytB** C CCCTCAGAAT GATATTTGTC CTCAGGGAAG GACGTAGCCA

51-100

**L/H** ACGAAGGCGG TCATCATAAC TAGAAGTAGG AGCACTACTC CGATGTTTCA  
**cytB** ACGAAGGCGG TCATCATAAC TAGAAGTAGG AGCACTACTC CGATGTTTCA

101-150

**L/H** TGTTTCTTTG TACAGGTAAG AGCCGTAGTA AAGGCCTCGG CCGATGTGGA  
**cytB** TGTTTCTTTG TACAGGTAAG AGCCGTAGTA AAGGCCTCGG CCGATGTGGA

151-200

**L/H** AGTAGATGCA GATAAAGAAG AAAGAGGCCCGTTCGCGTG GAGGTTCCGG  
**cytB** AGTAGATGCA GATAAAGAAG AAAGAGGCCCGTTCGCGTG GAGGTTCCGG

201-250

**L/H** ATGAGTCAAC CGAAGTTGAC ATCTCGGCAA ATGTGGGCTA CTGAGGCGAA  
**cytB** ATGAGTCAAC CGAAGTTGAC ATCTCGGCAA ATGTGGGCTA CTGAGGCGAA

251-300

**L/H** GGCTGATTCG ACATCAGGGG TATAGTGTAT TGCGAGGAAT AGTCCTGTAA  
**cytB** GGCTGATTCG ACATCAGGGG TATAGTGTAT TGCGAGGAAT AGTCCTGTAA

301-350

**L/H** GGATTTGAGA AATAAGGCAA AGGCCAAGTA GTGAGCCAAA GTTTCATCAT  
**cytB** GGATTTGAGA AATAAGGCAA AGGCCAAGTA GTGAGCCAAA GTTTCATCAT

351-376

**L/H** GCTGAGATGT TGGATGGAAG CTTTTT  
**cytB** GCTGAGATGT TGGATGG

**Fig. 2-3. Comparing to two sequences of the cytochrome *b* gene of *T. thynnus* amplified with primers L14841 / H15149 (L/H) and cytBL / cytBH (cytB). Regions of primer are shown with under line.**



1-50

**N. Pac. O.** GGGAAGGACG TAGCCAACGA AGGCGGTCAT CATAACTAGA AGTAGGAGCA

**N. Atl. O.** GGGAAGGACG TAGCCAACGA AGGCGGTCAT CATAACTAGA AGTAGGAGCA

**GeneBank** GGGAAGGACG TAGCCAACGA AGGCGGTCAT CATAACTAGA AGTAGGAGCA

51-100

**N. Pac. O.** CTACTIONCGAT GTTTCATGTT TCTTTGTACA GGTAAGAGCC GTAGTAAAGG

**N. Atl. O.** CTACTIONCGAT GTTTCATGTT TCTTTGTACA GGTAAGAGCC GTAGTAAAGG

**GeneBank** CTACTIONCGAT GTTTCATGTT TCTTTGTACA GGTAAGAGCC GTAGTAAAGG

101-150

**N. Pac. O.** CCTCGGCCGA TGTGGAAGTA GATGCAGATA AAGAAGAAAG AGGCCCCCGTT

**N. Atl. O.** CCTCGGCCGA TGTGGAAGTA GATGCAGATA AAGAAGAAAG AGGCCCCCGTT

**GeneBank** CCTCGGCCGA TGTGGAAGTA GATGCAGATA AAGAAGAAAG AGGCCCCCGTT

151-200

**N. Pac. O.** TGCCTGGAGG TTCCGGATGA GTCAACCGAA GTTGACATCT CGGCAAATGT

**N. Atl. O.** TGCCTGGAGG TTCCGGATGA GTCAACCGAA GTTGACATCT CGGCAAATGT

**GeneBank** TGCCTGGAGG TTCCGGATGA GTCAACCGAA GTTGACATCT CGGCAAATGT

201-250

**N. Pac. O.** GGGCTACTGA GCGGAAGGCT GATTTCGACAT CAGGGGTATA GTGTATTGCG

**N. Atl. O.** GGGCTACTGA GCGGAAGGCT GATTTCGACAT CAGGGGTATA GTGTATTGCG

**GeneBank** GGGCTACTGA GCGGAAGGCT GATTTCGACAT CAGGGGTATA GTGTATTGCG

251-300

**N. Pac. O.** AGGAATAGTC CTGTAAGGAT TTGAGAAATA AGGCAAAGGC CAAGTAGTGA

**N. Atl. O.** AGGAATAGTC CTGTAAGGAT TTGAGAAATA AGGCAAAGGC CAAGTAGTGA

**GeneBank** AGGAATAGTC CTGTAAGGAT TTGAGAAATA AGGCAAAGGC CAAGTAGTGA

301-307

**N. Pac. O.** GCCAAAG

**N. Atl. O.** GCCAAAG

**GeneBank** GCCAAAG

**Fig. 2-4. 307 bp fragments of the cytochrome *b* gene of *T. thynnus* from Northern Pacific Ocean (N. Pac. O.), Northern Atlantic Ocean (N. Atl. O.) and GeneBank.**



1-50

Seq. 1 GGGAAAGGACG TAGCCAACGA AGGCGGTCAT CATAACTAGA AGTAGGAGTA

Seq. 2 GGGAAAGGACG TAGCCAACGA AGGCGGTCAT CATAACTAGA AGTAGGAGTA

Seq. 3 GGGAAAGGACG TAGCCAACGA AGGCGGTCAT CATAACTAGA AGTAGGAGTA

Seq. 4 AGCCAACGA AGGCGGTCAT CATAACTAGA AGTAGGAGTA

51-100

Seq. 1 C TACTCCGAT GTTTCATGTT TCTTTGTACA GGTAAGAGCC GTAGTAAAGG

Seq. 2 C TACTCCGAT GTTTCATGTT TCTTTGTACA GGTAAGAGCC GTAGTAAAGA

Seq. 3 C TACTCCAAT GTTTCATGTT TCTTTGTACA GGTAAGAGCC GTAGTAAAGG

Seq. 4 C TACTCCGAT GTTTCATGTT TCTTTGTACA GGTAAGAGCC GTAGTAAAGG

101-150

Seq. 1 CCTCGGCCGA TGTGGAAGTA GATGCAGATA AAGAAGAAAG AGGCCCCGTT

Seq. 2 CCTCGGCCGA TGTGGAAGTA GATGCAGATA AAGAAGAAAG AGGCCCCGTT

Seq. 3 CCTCGGCCGA TGTGGAAGTA GATGCAGATA AAGAAGAAAG AGGCCCCGTT

Seq. 4 CCTCGGCCGA TGTGGAAGTA GATGCAGATA AAGAAGAAAG AGGCCCCGTT

151-200

Seq. 1 T GCGTGGAGG TTCCGGATGA GTCAACCGAA GTTGACATCT CGGCAAATGT

Seq. 2 T GCGTGGAGG TTCCGGATGA GTCAACCGAA GTTGACATCT CGGCAAATGT

Seq. 3 T GCGTGGAGG TTCCGGATGA GTCAACCGAA GTTGACATCT CGGCAAATGT

Seq. 4 T GCGTGGAGG TTCCGGATGA GTCAACCGAA GTTGACATCT CGGCAAATGT

201-250

Seq. 1 GGGCTACTGA GGCGAAGGCT GATTCGACAT CAGGGGTATATA GTGTATTGCG

Seq. 2 GGGCTACTGA GGCGAAGGCT GATTCGACAT CAGGGGTATATA GTGTATTGCG

Seq. 3 GGGCTACTGA GGCGAAGGCT GATTCGACAT CAGGGGTGTATA GTGTATTGCG

Seq. 4 GGGCTACTGA GGCGAAGGCT GATTCGACAT CAGGGGTGTATA GTGTATTGCG

251-300

Seq. 1 AGGAATAGTC CTGTAAGGAT TTGAGAAATA AGGCAAAGGC CAAGTAGTGA

Seq. 2 AGGAATAGTC CTGTAAGGAT TTGAGAAATA AGGCAAAGGC CAAGTAGTGA

Seq. 3 AGGAATAGTC CTGTAAGGAT TTGAGAAATA AGGCAAAGGC CAAGTAGTGA

Seq. 4 AGGAATAGTC CTGTAAGGAT TTGAGAAATA AGGCAAAGGC CAAGTAGTGA

301-307

Seq. 1 GCCAAAG

Seq. 2 GCCAAAG

Seq. 3 GCCAAAG

Seq. 4 GCC

**Fig. 2-5. 307 bp fragments of the cytochrome *b* gene of *T. alalunga*. Seq. 1: two samples from Indian Ocean and one from Pacific Ocean; Seq. 2: one sample from Indian Ocean; Seq. 3: two samples from Atlantic Ocean; Seq. 4: searching from GeneBank. The different bases are shown with underline.**





1-50

Seq. 1 GGGAAAGGACG TAGCCAACGA AGGCGGTCAT CATAACTAGG AGTAGGAGTA

Seq. 2 GGGAAAGGACG TAGCCAACGA AGGCGGTCAT CATAACTAGG AGTAGGAGTA

Seq. 3 GGGAAAGGACG TAGCCAACGA AGGCGGTCAT CATAACTAGG AGTAGGAGTA

Seq. 4 GGGAAAGAACG TAGCCAACGA AGGCGGTCAT CATAACTAGG AGTAGGAGTA

51-100

Seq. 1 C TACTCCGAT GTTTCATGTT TCCTTGTATA GGTAAGAGCC GTAGTAAAGT

Seq. 2 C TACTCCGAT GTTTCATGTT TCCTTGTATA GGTAAGAGCC GTAGTAAAGT

Seq. 3 C TACTCCGAT GTTTCATGTT TCCTTGTATA GGTAAGAGCC GTAGTAAAGT

Seq. 4 C TACTCCGAT GTTTCATGTT TCCTTGTATA GGTAAGAGCC GTAGTAAAGG

101-150

Seq. 1 CCTCGGCCGA TGTGGAAGTA GATGCAGATA AAGAAGAAAG AGGCCCCGTT

Seq. 2 CCTCGGCCGA TGTGGAAGTA GATGCAGATA AAGAAGAAAG AGGCCCCGTT

Seq. 3 CCTCGGCCGA TGTGGAAGTA GATGCAGATA AAGAAGAAAG AGGCCCCGTT

Seq. 4 CCTCGGCCGA TGTGGAAGTA GATGCAGATA AAGAAGAAGG AGGCCCCGTT

151-200

Seq. 1 T GCGTGGAGG TTCCGGATGA GTCAACCGAA GTTGACATCT CGGCAAATGT

Seq. 2 T GCGTGGAGG TTCCGGATGA GTCAACCGAA GTTGACATCT CGGCAAATGT

Seq. 3 T GCGTGGAGG TTCCGGATGA GTCAACCGAA GTTGACATCT CGGCAAATGT

Seq. 4 T GCGTGGAGG TTCCGGATGA GTCAACCGAA GTTGACATCT CGGCAAATGT

201-250

Seq. 1 GGGCTACTGA GGCGAAGGCT GATTCGACAT CAGGGGTGTA GTGTATTGCG

Seq. 2 GGGCTACTGA GGCGAAGGCT GATTCGACAT CAGGGGTGTA GTGTATTGCG

Seq. 3 GGGCTACTGA GGCGAAGGCT GATTCGACAT CAGGGGTGTA GTGTATTGCG

Seq. 4 GGGCTACTGA GGCGAAGGCT GATTCGACAT CAGGGGTGTA GTGTATTGCG

251-300

Seq. 1 AGGAATAGTC CTGTAAGGAT TTGAGAAATA AGGCAAAGGC CAAGTAGTGA

Seq. 2 AGGAATAGTC CTGTAAGGAT TTGAGAAATA AGGCAAAGGC CAAGTAGTGA

Seq. 3 AGGAATAGTC CTGTAAGGAT TTGAGAAATA AGGCAAAGGC CAAGTAGTGA

Seq. 4 AGGAATAGTC CTGTAAGGAT TTGAGAAATA A

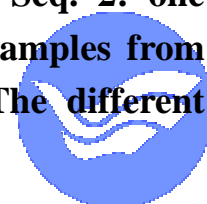
301-307

Seq. 1 GCCAAAG

Seq. 2 GCCAAAG

Seq. 3 GCCAAAG

**Fig. 2-6. 307 bp fragments of the cytochrome *b* gene of *T. albacares*. Seq. 1: two samples from Northern Pacific Ocean; Seq. 2: one sample from Northern Atlantic Ocean; Seq. 3: two samples from Indian Ocean; Seq. 4: searching from GeneBank. The different bases are shown with underline.**



1-50

Seq. 1 GGGAAAGGACG TAGCCGACGA AGGCGGTCAT CATAACTAGG AGTAGTAGTA

Seq. 2 GGGAAAGGACG TAGCCGACGA AGGCGGTCAT CATAACTAGG AGTAGTAGTA

Seq. 3 GGGAAAGGACG TAGCCGACGA AGGCGGTCAT CATAACTAGG AGTAGTAGTA

Seq. 4 GGGAAAGGACG TAGCCGACGA AGGCGGTCAT CATAACTAGG AGTAGGAGTA

51-100

Seq. 1 C TACTCCGAT GTTTCATGTT TCTTTGTATA GGTAAGAGCC GTAGTAAAGT

Seq. 2 C TACTCCGAT GTTTCATGTT TCTTTGTATA GGTAAGAGCC GTAGTAAAGT

Seq. 3 C TACTCCGAT ATTTCATGTT TCTTTGTATA GGTAAGAGCC GTAGTAAAGT

Seq. 4 C TACTCCGAT GTTTCATGTT TCTTTGTATA GGTAAGAGCC GTAGTAAAGT

101-150

Seq. 1 C C TCGGCCGA TGTGGAAGTA GATACAGATA AAGAAGAAAG AGGCCCCGTT

Seq. 2 C C TCGGCCGA TGTGGAAGTA GATACAGATA AAGAAGAAAG AGGCCCCGTT

Seq. 3 C C TCGGCCGA TGTGGAAGTA GATACAGATA AAGAAGAAAG AGGCCCCGTT

Seq. 4 C C TCGGCCGA TGTGGAAGTA GATACAGATA AAGAAGAAAG AGGCCCCGTT

151-200

Seq. 1 T GCGTGGAGG TTCCGGATGA GTCACCCGAA ATTGACATCT CGGCAAATGT

Seq. 2 T GCGTGGAGG TTCCGGATGA GTCACCCGAA ATTAACATCT CGGCAAATGT

Seq. 3 T GCGTGGAGG TTCCGGATGA GTCACCCGAA ATTGACATCT CGGCAAATGT

Seq. 4 T GCGTGGAGG TTTCGGATGA GTCACCCGAA ATTGACATCT CGGCAAATGT

201-250

Seq. 1 G G G C T A C T G A G G C G A A G G C T G A T T C G A C A T C A G G G G T G T A G T G T A T T G C G

Seq. 2 G G G C T A C T G A G G C G A A G G C T G A T T C G A C A T C A G G G G T G T A G T G T A T T G C G

Seq. 3 G G G C T A C T G A G G C G A A G G C T G A T T C G A C A T C A G G G G T G T A G T G T A T T G C G

Seq. 4 G G G C T A C T G A G G C G A A G G C T G A T T C G A C A T C A G G G G T G T A G T G T A T T G C G

251-300

Seq. 1 A G G A A T A G T C T G T A A G G A T T T G A G A A A T A A G G C A A A G G C C A A G T A G T G A

Seq. 2 A G G A A T A G T C T G T A A G G A T T T G A G A A A T A A G G C A A A G G C C A A G T A G T G A

Seq. 3 A G G A A T A G T C T G T A A G G A T T T G A G A A A T A A G G C A A A G G C C A A G T A G T G A

Seq. 4 A G G A A T A G T C T G T A A G G A T T T G A G A A A T A A G G C

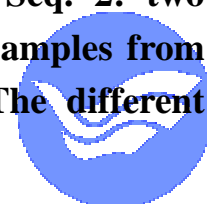
301-307

Seq. 1 G C C A A A G

Seq. 2 G C C A A A G

Seq. 3 G C C A A A G

**Fig. 2-7. 307 bp fragments of the cytochrome *b* gene of *T. obesus*. Seq. 1: one sample from Northern Pacific Ocean; Seq. 2: two samples from Northern Atlantic Ocean; Seq. 3: two samples from Indian Ocean; Seq. 4: searching from GeneBank. The different bases are shown with underline.**



1-50

*T. thy.* GGGAAAGGACG TAGCCAACGA AGGCGGTCAT CATAACTAGA AGTAGGAGCA

*T. ala.* GGGAAAGGACG TAGCCAACGA AGGCGGTCAT CATAACTAGA AGTAGGAGTA

*T. alb.* GGGAAAGNACG TAGCCAACGA AGGCGGTCAT CATAACTAGG AGTAGGAGTA

*T. obe.* GGGAAAGGACG TAGCCGACGA AGGCGGTCAT CATAACTAGG AGTAGNAGTA

51-100

*T. thy.* C TACTCCGAT GTTTCATGTT TCTTTGTACA GGTAAGAGCC GTAGTAAAGG

*T. ala.* C TACTCCNAT GTTTCATGTT TCTTTGTACA GGTAAGAGCC GTAGTAAAGN

*T. alb.* C TACTCCGAT GTTTCATGTT TCCTTGTATA GGTAAGAGCC GTAGTAAAGN

*T. obe.* C TACTCCGAT NTTTCATGTT TCTTTGTATA GGTAAGAGCC GTAGTAAAGT

101-150

*T. thy.* CCTCGGCCGA TGTGGAAGTA GATGCAGATA AAGAAGAAAG AGGCCCCGTT

*T. ala.* CCTCGGCCGA TGTGGAAGTA GATGCAGATA AAGAAGAAAG AGGCCCCGTT

*T. alb.* CCTCGGCCGA TGTGGAAGTA GATGCAGATA AAGAAGAANG AGGCCCCGTT

*T. obe.* CCTCGGCCGA TGTGGAAGTA GATACAGATA AAGAAGAAAG AGGCCCCGTT

151-200

*T. thy.* TGCGTGGAGG TTCCGGATGA GTCAACCGAA GTTGACATCT CGGCAAATGT

*T. ala.* TGCGTGGAGG TTCCGGATGA GTCAACCGAA GTTGACATCT CGGCAAATGT

*T. alb.* TGCGTGGAGG TTCCGGATGA GTCAACCGAA GTTGACATCT CGGCAAATGT

*T. obe.* TGCGTGGAGG TTNCGGATGA GTCACCCGAA ATTNACATCT CGGCAAATGT

201-250

*T. thy.* GGGCTACTGA GGCGAAGGCT GATTCGACAT CAGGGGTATA GTGTATTGCG

*T. ala.* GGGCTACTGA GGCGAAGGCT GATTCGACAT CAGGGGTNTA GTGTATTGCG

*T. alb.* GGGCTACTGA GGCGAAGGCT GATTCGACAT CAGGGGTGTA GTGTATTGCG

*T. obe.* GGGCTACTGA GGCGAAGGCT GATTCGACAT CAGGGGTGTA GTGTATTGCG

251-300

*T. thy.* AGGAATAGTC CTGTAAGGAT TTGAGAAATA AGGCAAAGGC CAAGTAGTGA

*T. ala.* AGGAATAGTC CTGTAAGGAT TTGAGAAATA AGGCAAAGGC CAAGTAGTGA

*T. alb.* AGGAATAGTC CTGTAAGGAT TTGAGAAATA AGGCAAAGGC CAAGTAGTGA

*T. obe.* AGGAATAGTC CTGTAAGGAT TTGAGAAATA AGGCAAAGGC CAAGTAGTGA

301-307

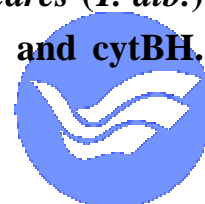
*T. thy.* GCCAAAG

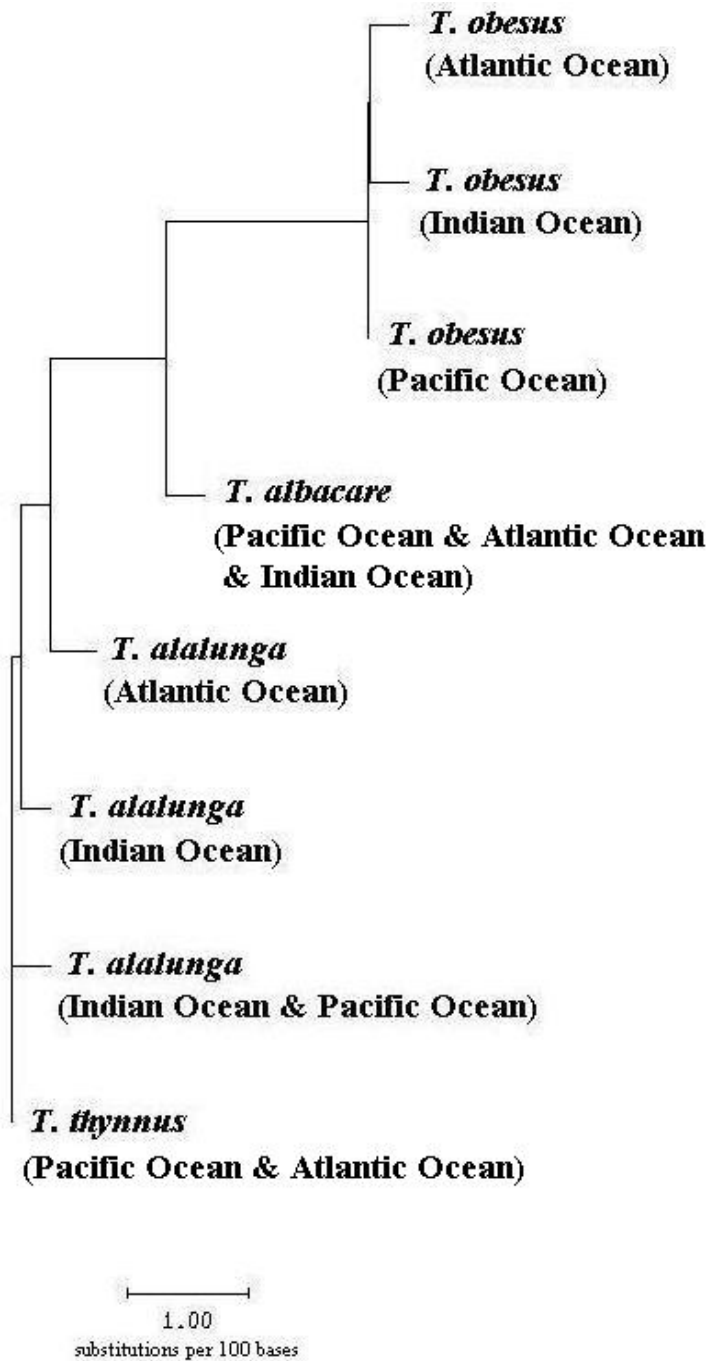
*T. ala.* GCCAAAG

*T. alb.* GCCAAAG

*T. obe.* GCCAAAG

**Fig. 2-8. 307 bp consensus fragments of the cytochrome *b* gene of *Thunnus thynnus* (*T. thy.*), *T. alalunga* (*T. ala.*), *T. albacares* (*T. alb.*) and *T. obesus* (*T. obe.*) amplified with primers cytBL and cytBH. The different bases are shown with underline.**

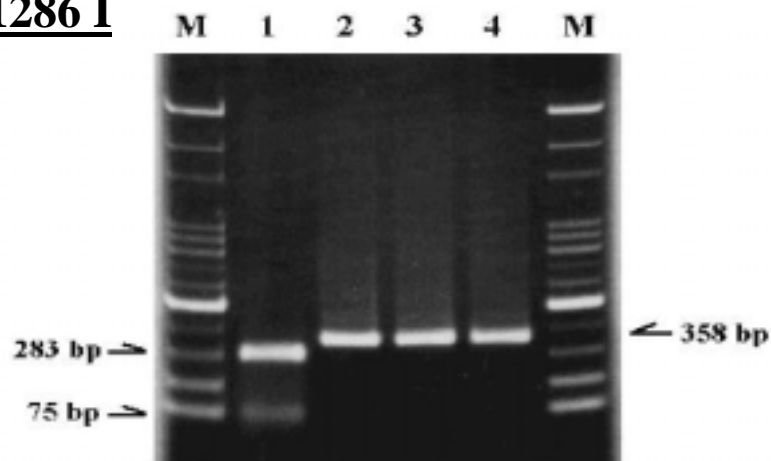




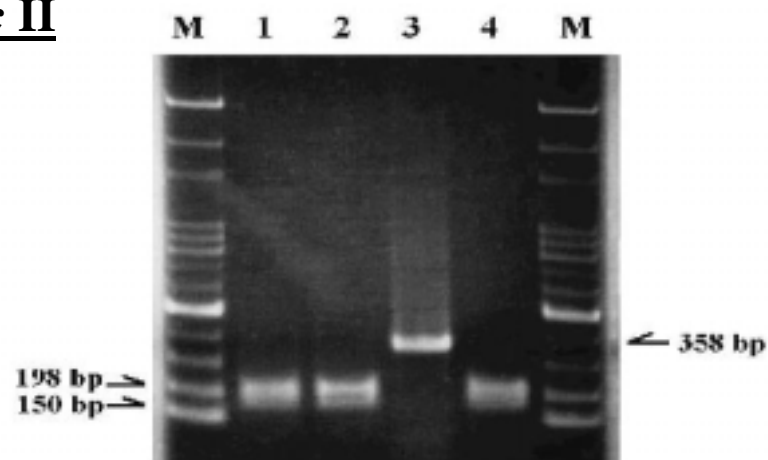
**Fig. 2-9. Phylogenetic trees of proposed evolutionary status of four *Thunnus* species based on partial mitochondrial cytochrome *b* gene sequences.**



(A) Bsp1286 I



(B) Hinc II



(C) Rsa I

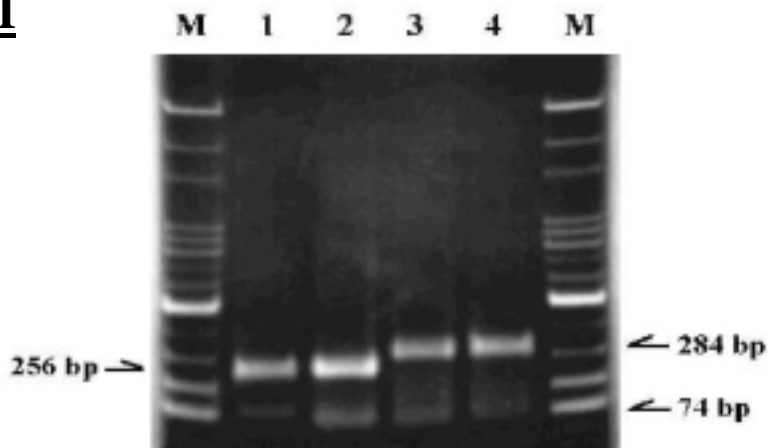


Fig. 2-10. Electrophoretic analysis of 358 bp cytochrome *b* gene PCR products of four *Thunnus* species digested with (A) *Bsp1286 I*, (B) *Hinc II* and (C) *Rsa I*. Samples in lane are as follows: 1. *Thunnus thynnus*; 2. *T. alalunga*; 3. *T. obesus*; 4. *T. albacore*; M= 100 bp ladder.

1-50

*T. thy.* CCCCTCAGAA TGATATTTGT CCTCAGGGAA GGACGTAGCC AACGAAGGCG  
*T. ala.* CCCCTCAGAA TGATATTTGT CCTCAGGGAA GGACGTAGCC AACGAAGGCG  
*T. obe.* CCCCTCAGAA TGATATTTGT CCTCAGGGAA GGACGTAGCC GACGAAGGCG  
*T. alb.* CCCCTCAGAA TGATATTTGT CCTCAGGGAA GNACGTAGCC AACGAAGGCG

51-100

**Bsp1286 I**

*T. thy.* GTCATCATAA CTAGAAGTAG GAGCACTACT CCGATGTTTC ATGTTTCTTT  
*T. ala.* GTCATCATAA CTAGAAGTAG GAGTACTACT CCNATGTTTC ATGTTTCTTT  
*T. obe.* GTCATCATAA CTAGGAGTAG NAGTACTACT CCGATNTTTC ATGTTTCTTT  
*T. alb.* GTCATCATAA CTAGGAGTAG GAGTACTACT CCGATGTTTC ATGTTTCCTT

101-150

**Rsa I**

**Rsa I**

*T. thy.* GTACAGGTAA GAGCCGTAGT AAAGGCCTCG GCCGATGTGG AAGTAGATGC  
*T. ala.* GTACAGGTAA GAGCCGTAGT AAAGNCCTCG GCCGATGTGG AAGTAGATGC  
*T. obe.* GTATAGGTAA GAGCCGTAGT AAAGTCCTCG GCCGATGTGG AAGTAGATAC  
*T. alb.* GTATAGGTAA GAGCCGTAGT AAAGNCCTCG GCCGATGTGG AAGTAGATGC

151-200

**Hinc II**

*T. thy.* AGATAAAGAA GAAAGAGGCC CCGTTTGCCT GGAGGTTCCG GATGAGTCAA  
*T. ala.* AGATAAAGAA GAAAGAGGCC CCGTTTGCCT GGAGGTTCCG GATGAGTCAA  
*T. obe.* AGATAAAGAA GAAAGAGGCC CCGTTTGCCT GGAGGTTNCG GATGAGTCAC  
*T. alb.* AGATAAAGAA GAANGAGGCC CCGTTTGCCT GGAGGTTCCG GATGAGTCAA

201-250

**Hinc II**

*T. thy.* CCGAAGTTGA CATCTCGGCA AATGTGGGCT ACTGAGGCGA AGGCTGATTC  
*T. ala.* CCGAAGTTGA CATCTCGGCA AATGTGGGCT ACTGAGGCGA AGGCTGATTC  
*T. obe.* CCGAAATTNA CATCTCGGCA AATGTGGGCT ACTGAGGCGA AGGCTGATTC  
*T. alb.* CCGAAGTTGA CATCTCGGCA AATGTGGGCT ACTGAGGCGA AGGCTGATTC

251-300

*T. thy.* GACATCAGGG GTATAGTGTA TTGCGAGGAA TAGTCCTGTA AGGATTTGAG  
*T. ala.* GACATCAGGG GTNTAGTGTA TTGCGAGGAA TAGTCCTGTA AGGATTTGAG  
*T. obe.* GACATCAGGG GTGTAGTGTA TTGCGAGGAA TAGTCCTGTA AGGATTTGAG  
*T. alb.* GACATCAGGG GTGTAGTGTA TTGCGAGGAA TAGTCCTGTA AGGATTTGAG

301-350

*T. thy.* AAATAAGGCA AAGGCCAAGT AGTGAGCCAA AGTTTCATCA TGCTGAGATG  
*T. ala.* AAATAAGGCA AAGGCCAAGT AGTGAGCCAA AGTTTCATCA TGCTGAGATG  
*T. obe.* AAATAAGGCA AAGGCCAAGT AGTGAGCCAA AGTTTCATCA TGCTGAGATG  
*T. alb.* AAATAAGGCA AAGGCCAAGT AGTGAGCCAA AGTTTCATCA TGCTGAGATG

351-358

*T. thy.* TTGGATGG

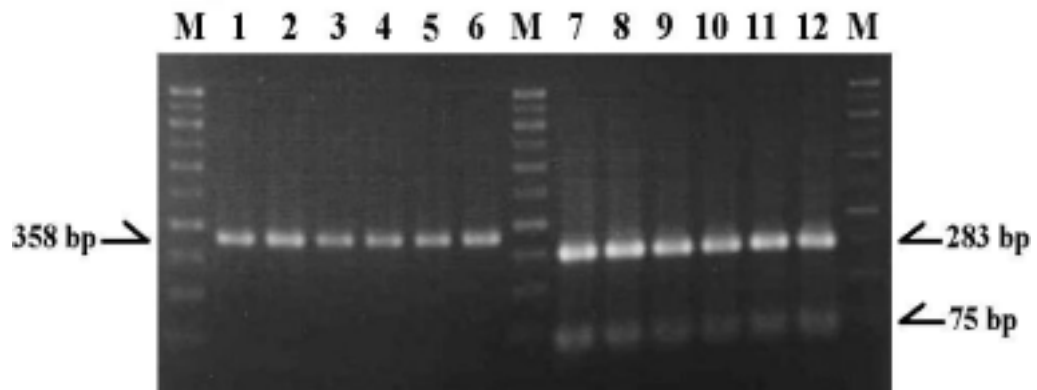
*T. ala.* TTGGATGG

*T. obe.* TTGGATGG

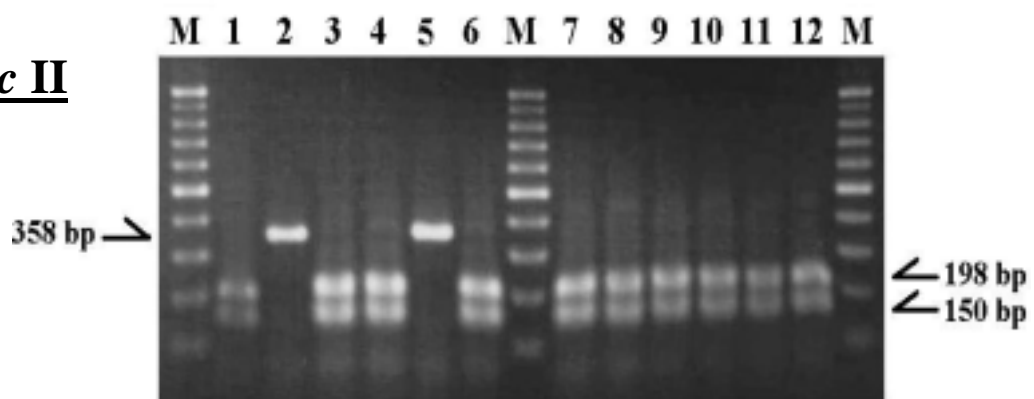
*T. alb.* TTGGATGG

**Fig. 2-11. Restriction sites of *Bsp1286 I*, *Rsa I* and *Hinc II* of the 358 bp cytochrome *b* gene fragments of *Thunnus thynnus* (*T. thy.*), *T. alalunga* (*T. ala.*), *T. albacares* (*T. alb.*) and *T. obesus* (*T. obe.*). The restriction sites are shown with underline.**

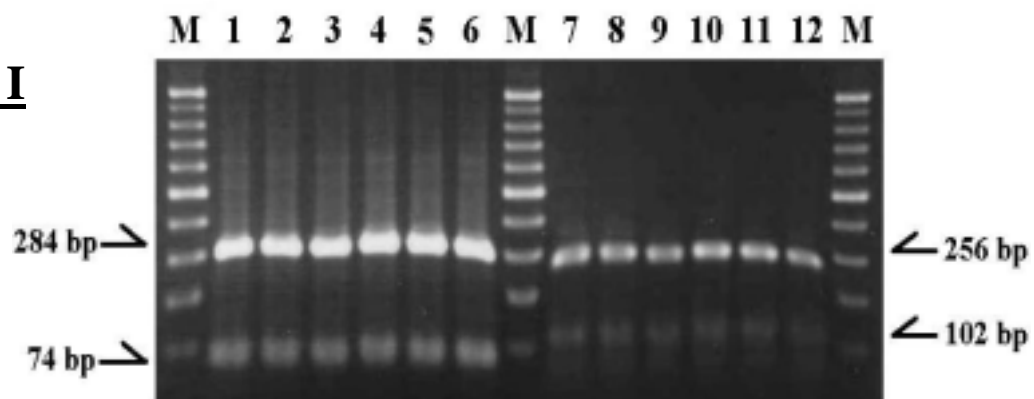
(A)  
*Bsp1286 I*



(B)  
*Hinc II*



(C)  
*Rsa I*



**Fig. 2-12. Restriction profiles of the 358 bp cytochrome *b* gene PCR products digested with (A) *Bsp1286 I*, (B) *Hinc II* and (C) *Rsa I*. Samples in lane are 12 fresh samples obtained from three different markets in Taiwan; M = 100 bp ladder.**





### **第三章、 利用 PCR-RFLP 技術分析鮪罐之加工條件及作為市售鮪罐魚種之鑑定**



## 一、 前言

台灣鮪罐原料主要魚種為長鰭鮪，由長鰭鮪為原料去除血合肉製成的白肉鮪魚罐頭，在國內或外銷市場上均較黃鰭鮪與大目鮪製成的淺色肉質鮪罐受歡迎，其成本也較高；此外國內鮪魚罐頭製品以鯉魚或鯖魚冒充原料製造的情形亦時有所聞。

此部分研究欲利用 PCR-RFLP 方法分析不同加工條件下之鮪魚罐頭，探討溫度變化、加熱時間長短及調味注入液之不同，造成鮪魚粒線體 DNA 中 cytochrome *b* gene 裂解程度之差異性；進而針對裂解程度不同的核酸序列片段，設計適合的引子，建立快速的罐頭鮪魚魚種基因探針之檢測方法。此外並蒐集市面上不同品牌之鮪魚罐裝產品，分析市售鮪罐魚種；對台灣鮪魚罐頭製品之標示及管理，提供具體參考之依據。



## 二、 材料與方法

### (一) 實驗材料

加工條件探討部分採用第二章所述國內外所採集之凍藏備用樣品，包括黑鮪 (*Thunnus thynnus*)、長鰭鮪 (*T. alalunga*)、黃鰭鮪 (*T. albacares*) 及大目鮪 (*T. obesus*) 等四魚種。

市售鮪罐加工品方面則自台灣地區不同超市及賣場，採集市面所販售不同品牌之各類鮪罐類水產加工品，包括油漬塊狀鮪魚罐頭 2 件、油漬鮪魚片罐頭 2 件、水煮鮪魚罐頭 3 件及與香筍鮪魚罐頭 3 件共計 10 件樣品。

### (二) 實驗方法

#### 1. 原料前處理

- (1) 收集市面鮪魚罐頭加工品檢體，紀錄各項標示後凍藏於-20 備用。
- (2) 生鮮冷凍檢體比照鮪罐加工方式，模擬不同加工條件處理，再將處理後製品供作材料用，處理流程如下：

冷凍鮪魚肉，取約 100 g    解凍    蒸煮 ( 100 °C /10 min )  
冷卻    加入調味液 ( a、 b、 c )    以殺菌釜高溫高壓  
滅菌 ( 121 °C /15 min or 115 °C /30 min )    冷卻    模擬製  
品，凍藏於-20 °C 備用

調味注入液：a. 油漬罐：沙拉油與少許食鹽

b. 水煮罐：水與少許食鹽

c. 調味罐：水、少量蕃茄汁及少許食鹽

#### 2. 粗萃 DNA：實驗方法如第二章所述。



### 3. 設計引子 ( primer )

鮪魚加工製品檢測之引子須針對加工條件，依偵測序列粒線體 DNA 中的 cytochrome *b* gene 造成之裂解程度來予以設計。先以第二章所採用之 L14841 及 H15149 ( Kocher et al., 1989 ) cytBL 及 cytBH ( Bartlett and Davidson, 1991 ) 兩組 primer 來作測試，發覺偵測序列之裂解情況嚴重，皆無法增殖出 PCR 產物；因此依照第二章對新鮮鮪魚肉分析出之 358 bp 片段序列，重新比對四種鮪魚之鹼基排列差異，利用 GCG 系統提供之 primer selection 功能，依需求設計新的引子對，其個別資料如下：

#### (1) CYTBP2L/H：

針對四魚種差異性所設計，其增幅區域包含 *Bsp*1286 I、*Hinc* II 及 *Rsa* I 三組限制 的特異性切位，以 PCR 反應所增幅之片段大小為 207 bp，較 cytBL/H 增幅的 358 bp 片段小 ( Table 3-1 )。

#### (2) cbBF01L/H、cbAB01L/H、cbYF01L/H 及 cbBY01L/H：

此四組引子對是分別針對四魚種的鹼基特異性區域所設計，也就是引子本身與 template DNA 煉合 ( annealing ) 反應的區域即包含四魚種特異的鹼基序列；以此推論，若檢測魚種無此特異性鹼基排列，則此組引子對便無法與之煉合並增幅出 PCR 產物，即欲利用引子在 PCR 反應時對目標序列煉合的專一性來做魚種辨別。

cbBF01L/H 是針對 *T. thynnus* 的特異性所設計，其可增幅出 165 bp 的短鏈序列片段；cbAB01L/H 是針對 *T. alalunga* 所設計，可增幅出 146 bp 之短鏈片段；cbYF01L/H 則是針對 *T. albacare* 所設計，可增幅出 158 bp 之片段；而 cbBY01L/H 是針對 *T. obesus* 所設計，可增幅 118 bp 之短鏈序列。四組引子對的設計如 Table 3-2 所示。

#### (3) CbBRs126L/H 與 CbHi146L/H：

此兩組引子是針對三組限制 切位區所設計，小於 cytBL/H 所增幅的 358 bp 與 CYTBP2L/H 所增幅的 207 bp；CbBRs126L/H 這組引子對可增幅 126 bp 的小片段，其包含 *Bsp*1286 I 與 *Rsa* I 兩組限制

的作用序列區；CbHi146L/H 則可增幅 146 bp 的小片段，包含限制 *Hinc* II 的作用區域。兩組引子對之設計如 Table 3-3 所示。

4. DNA 片段的大量增幅：實驗方法如第二章所述。
5. PCR 產物之純化與定序：實驗方法如第二章所述。
6. 限制（restriction enzyme）分析 PCR 產物：實驗方法如第二章所述。



### 三、 結果

#### (一) 加工條件對 DNA 粗萃之影響

以 *T. alalunga* 肌肉組織經 115 高壓加熱處理 30 分鐘及 121 加熱 15 分鐘分別模擬油漬罐、水煮罐與調味罐，將模擬樣品進行 DNA 粗萃之結果如 Fig. 3-1 所示，得知所有樣品 DNA 片段裂解 (degradation) 情形嚴重，全部低於 300 bp，且大部分集中在 200 bp 以下；而由粗萃的電泳結果無法判別不同溫度、時間及調味注入液對 DNA 裂解有無差異，需進一步以不同引子進行 PCR 增幅反應來作確認。

#### (二) 選擇引子之適用性

先以 cytBL / cytBH 及 L14841 / H15149 兩組引子對來作測試，以第二章所測得的最適條件進行 PCR 增幅，在電泳圖上觀察不到任何增幅出之片段；接著設計 CYTBP2L/H 增幅 207 bp 之 cytochrome *b* gene 部分片段，在電泳圖上觀察到增幅效果非常差，除經 115 、 30 min 處理之水煮罐及番茄汁調味罐稍微可以觀測到亮帶外，其他樣品皆無任何 PCR 產物，因此判定 CYTBP2L/H 不適用於加工品之鑑定。有鑑上述增幅 376 bp、 358 bp 及 207 bp 之引子對皆不適用於模擬加工之產品，表示加工產物之 DNA 斷裂得非常嚴重，推測皆斷裂成 200 bp 以下之片段，因此需設計能增幅更小片段的引子對來加以測試。

首先依照引子對在 PCR 增幅反應時對目標序列煉合 (annealing) 的專一性，設計了 cbBF01L/H、cbAB01L/H、cbYF01L/H 及 cbBY01L/H 四組引子對，分別針對四魚種的鹼基特異性區域設計，即四組引子與 template DNA 煉合反應的區域即包含四魚種特異的鹼基序列。預期結果是檢測目標物時，cbBF01L/H 只能對 *T. thynnus* 增幅出 165 bp 的短鏈序列片段，而對其他三魚種則無增幅反應；同理 cbAB01L/H 只能針對 *T. alalunga* 增幅出 146 bp 片段；

cbYF01L/H 針對 *T. albacare* 增幅 158 bp 之片段；cbBY01L/H 則只針對 *T. obesus* 增幅 118 bp 之序列片段。實際操作之後，在電泳圖上發現四組引子對序列煉合的專一性不夠，亦即應該只能增幅單一魚種的 primer 結果對其他三魚種皆有 PCR 產物出現 ( Fig. 3-2 )，而且在某些樣品的分析上不只單一亮帶 ( one band )，出現很多條亮帶的雜訊，證實這四組引子不適合用來作引子煉合的魚種檢測，仍須回歸到以限制 作檢測關鍵的 RFLP 法，對鹼基序列識別的專一性程度較高。

上述四組引子對雖不能成功用來鑑別魚種，但大多可增幅出待測長度 ( 分別為 118 bp、146 bp、158 bp 及 165 bp ) 的 DNA 片段，證實罐頭加工品之 DNA 降解程度約斷裂至一百多個鹼基對左右；因此接著回到以限制 分析的方法，設計出 CbBRs126L/H 與 CbHi146L/H 兩組引子進行 PCR 增幅反應分析，大致上，除油漬罐的增幅反應稍差外，皆可增幅出 PCR 產物 126 bp 與 146 bp 的目標序列 ( Fig. 3-3 )，因此針對這兩個 cytochrome *b* gene 的小片段 DNA，將四魚種作限制 切位的交叉分析。

七組設計之引子對之 Tm 值 ( melting temperature ) 及經實驗測試出之最適煉合 ( annealing ) 溫度如 Table 3-4 所示。

### (三) PCR-RFLP 鑑種技術之建立

分析經 PCR 反應以 CbBRs126L/H 增幅四魚種之 126 bp cytochrome *b* gene 共識序列及 CbHi146L/H 增幅之 146 bp 共識序列片段，作 RFLP 圖譜建立，使用的三組限制 即為第二章所選用之 *Bsp*1286 I、*Rsa* I 及 *Hinc* II。

*Bsp*1286 I 在 *T. thynnus* 經 CbBRs126L/H 增幅之 126 bp 片段上第 74 與 75 個鹼基之間作用，而對另外三魚種沒有作用切位；*Rsa* I 在 *T. alalunga* 之 126 bp 片段上第 74、75 鹼基間及第 98、99 鹼基間有兩個切位，*T. albacares* 與 *T. obesus* 只有在第 74、75 鹼基間有一

個切位，而 *T. thynnus* 則在第 102 與 103 個鹼基間有一個切位 ( Fig. 3-4A )；在 CbHi146L/H 增幅之 146 bp 共識序列分析 *Hinc* II 切位，除了 *T. obesus* 沒有作用位置外，在 *T. thynnus*、*T. albacares* 與 *T. albacares* 上皆有兩個切位，分別在第 66、67 個鹼基間及第 76、77 個鹼基間 ( Fig. 3-4B )。

經實驗結果在電泳圖上造成的片段多樣性如 Fig 3-5 所示，*Bsp*1286 I 對四魚種作用後將 *T. thynnus* 之 126 bp 長度序列成 75 bp 與 51 bp 兩段，與其他沒有反應仍維持 126 bp 序列長度之魚種可明顯做出區分 ( Fig. 3-5A )。 *Hinc* II 作用之後除 *T. obesus* 沒有作用切位仍維持 146 bp 外，另外三魚種皆被切割成 70 bp、66 bp 與 10 bp，在電泳圖上集中在 70 bp 與 66 bp 之長度附近，亦可與 *T. obesus* 的 146 bp 作出區分 ( Fig. 3-5B )。最後以 *Rsa* I 分析之結果 *T. thynnus* 之 126 bp 片段切割成 102 bp 與 24 bp 兩段，其 102 bp 長度在電泳圖上最高；*T. alalunga* 切割成 74 bp、28 bp 與 24 bp 三段，其 24 bp 與 28 bp 兩小片段會集中成一小亮帶，與 *T. albacares* 與 *T. obesus* 作用後 74 bp 與 52 bp 兩片段集中的大區域亮帶可做出區分 ( Fig. 3-5C )。整體歸納 *Bsp*1286 I 可區隔出 *T. thynnus*，*Hinc* II 可區隔出 *T. obesus*，而 *Rsa* I 則可把 *T. alalunga* 與 *T. albacares* 作出區分；三組限制 可確實鑑別出四個不同 *Thunnus* 魚種高溫模擬加工品。

#### (四) 市售鮪罐加工品之魚種檢測

在市面上購得之 10 種鮪魚罐頭產品經建立之 PCR-RFLP 技術分析結果如 Fig. 3-6 所示，1-3 為同一 A 廠牌之油漬罐、水煮罐與香筍鮪魚 ( 調味罐 )；4-6 為 B 廠牌之油漬罐、水煮罐與香筍鮪魚；7、8 為 C 廠牌之油漬鮪魚片與水煮罐；9 為 D 廠牌之香筍鮪魚，10 則為 E 廠牌之油漬鮪魚片。

第 4 及第 9 個樣品在 PCR 反應階段即無法增幅出所需之片段，判斷可能因加工溫度及時間條件不同或魚肉切割過小 ( 鮪魚片 )，造



成 DNA 降解情形較其他產品嚴重；亦有可能廠商以其它鰹類魚種當作原料製造，以致設計之專一性 primer 無法煉合增幅。其他 8 件樣品經由 *Bsp*1286 I 作用後皆無切位，表示原料魚種皆非 *T. thynnus* (Fig. 3-6A)；而以 *Hinc* II 作用後 146 bp 片段皆分解到 100 bp 以下，判斷為 70 bp 與 66 bp 兩片段，證實原料魚種皆不是 *T. obesus* (Fig. 3-6B)；最後以 *Rsa* I 分析，第 7 及第 8 兩產品（同一廠牌）在下方出現小片段，不同於其他魚種 74 bp 與 52 bp 之量帶訊息，判定原料為 *T. alalunga*，除此之外其他原料魚種皆為 *T. albacares* (Fig. 3-6C)。經實驗推論台灣市售之鮪罐大多以黃鰹鮪為原料來源，且少有以其他魚種（鰹魚類）充當原料之情形，其他可能當作鮪罐原料魚種之基因鑑種技術，有待未來更進一步的研究。



## 四、 討論

### (一) 加工條件影響 DNA 之降解情形

造成 DNA 核酸序列降解的因素包括高溫、酸鹼 pH 值改變、紫外光、輻射及自由基的影響等 (Garrett and Grisham, 1999)。大部分肉類加工品加熱程度皆超過 100℃，DNA 破壞的因子除了高溫的直接影響外，過多的油脂成分在加熱過程中，可能因氧化而產生自由基對核酸序列撞擊造成破壞，亦可能因為調味料或其他原料的添加、微生物作用發酵造成 pH 值改變，進而對 DNA 造成破壞。

在加工方法方面，不同加工條件對 DNA 降解可能有不同程度之影響。Carrera 等 (1998) 對大西洋鮭魚 (*Salmo salar*) 與彩虹鱒魚 (*Oncorhynchus mykiss*) 的新鮮魚肉作 PCR-RFLP 鑑定，以 *cytb1/b2* primer 將 cytochrome *b* gene 以 PCR 增幅出 359 bp 片段，接著分析序列，使用 *EcoR V*、*Hinf I* 與 *Taq I* 三組限制酶來進行 RFLP 分析，以 *EcoR V* 及 *Taq I* 切割後可清楚區分鮭魚與鱒魚，而 *Hinf I* 因在兩魚種的切位相同，無法判別差異，建立方法後，學者分別對 *S. salar* 與 *O. mykiss* 的煙燻加工品作 PCR-RFLP 鑑定，發現可成功增幅出 2 魚種的 359 bp 片段；而在任 (2002) 對蒲燒鰻加工品的 PCR-RFLP 鑑定研究中，增幅 cytochrome *b* gene 片段序列，以 *Hinf I*、*Ase I*、*Sty I* 及 *Sau96 I* 四組限制酶對四個鰻屬魚種作檢測，發覺皆可觀測到 362 bp 的 PCR 產物，進而在市售產品的檢測也可成功鑑別出魚種；另外在針對有毒河豚製成之烘烤的香魚片研究中 (Hwang et al, 2002)，學者也成功將烘烤的魚肉加工品進行 PCR-RFLP 分析。由上述實驗發現，以煙燻、烘烤或燒烤之加工過程，對肌肉組織中 DNA 之破壞不如罐頭食品嚴重，尤其燻製品的加工條件溫度大都不到 100℃ (吳與邱, 1996)，此外推論可能是在煙燻或燒烤的加工過程中，無大量水分或油脂等介質直接浸泡傳遞熱能，水分子或油脂氧化產生的自由基作用大多侷限於加工品表層，因而對內部組織影響不如表面嚴重，DNA 裂解的情形也較輕微。

本研究模擬 115 及 121 溫度的加工條件實際檢測後結果發現,以最初增幅新鮮及冷凍魚肉的 *cytBL/H* 引子對皆無法增幅出 358 bp 的序列片段,改設計的 *CYTBP2L/H* 增幅較短片段 207 bp 效果也不佳,只對 115 加熱的水煮罐及調味罐可增幅出模糊之 PCR 產物,而之後設計增幅 100 多 bp 長度的幾組引子對,則皆可成功增幅目標序列;顯示 DNA 的斷裂程度會因高溫加熱而改變,以 121 的高溫加工後片段皆會裂解至 200 bp 以下。

在一針對煮熟 (100 ) 河豚肝臟鑑種的研究中 (Hsieh et al, 2002), 成功以 PCR 增幅出四種河豚魚種 *cytochrome b* gene 376 bp 片段序列,並以 RFLP 技術對有毒及無毒河豚種作出鑑別;而另一對牛、豬、雞、綿羊、山羊及馬等六種常見的畜產肉品原料的研究, Matsunaga 等 (1999) 先分析肉品原料粒線體 DNA 裡 *cytochrome b* gene 序列,針對不同物種序列的差異性設計出 6 組引子對,分別可以 PCR 增幅出 274 bp (牛) 398 bp (豬) 227 bp (雞) 331 bp (綿羊) 157 bp (山羊) 及 439 bp (馬),接著以 100 及 120 兩種溫度各烹煮 30 分鐘後增幅目標序列片段,發現經 100 處理之六物種檢體皆可在電泳圖上判讀到明顯的單一量帶,而 120 處理的樣品則較模糊,增幅片段較大的馬肉 (439 bp) 及豬肉 (398 bp) 序列則完全沒有 PCR 產物,顯示 120 的加熱條件對 DNA 降解影響較 100 嚴重許多。

比較上述研究與本實驗結果大致相同,同樣以烹煮的方式,隨著溫度升高確實會對 DNA 降解產生不同程度的影響。然而加熱過程中熱傳導的介質,也就是填充在加工品中的液體也有可能對 DNA 造成不同程度的降解,如本研究中模擬罐頭產品的部分,水煮罐與調味罐在 115 加熱下仍可以 *CYTBP2L/H* 增幅 207 bp 的 PCR 產物,同樣 115 加熱的油漬罐則不行;而市售鮪罐產品的檢測結果,兩件無法增幅出 126 bp 及 146 bp 序列,降解情形嚴重的產品皆為油漬罐(一為油漬鮪魚片,另一為油漬的香筍鮪魚片調味罐),雖然各

樣品之廠牌加工過程有所不同，無法直接比較，但仍可作為調味液添加對 DNA 影響之參考。

## (二) 以 PCR-RFLP 檢測加工產品原料來源之可行性

在此部份研究中最初採用的 cytBL/H 及 CYTBP2L/H 兩組引子對皆無法順利增幅加工原料組織 DNA 片段後，曾嘗試利用 primer 對模板序列煉合的專一性設計 cbBF01L/H cbAB01L/H cbYF01L/H 及 cbBY01L/H 四組引子對，實驗結果專一性很差，不但沒能在單一魚種上增幅出特異性片段，甚至在電泳圖上出現了多條亮帶的情形；判斷四魚種在種間的鹼基差異度甚小可能是主要原因，primer 與模板 DNA 煉合時若只有少數一兩個鹼基密碼( codon )無法吻合，仍可能忽略過而與之反應，進而增幅出序列片段。相較於 primer 較差的辨識力，以限制 作少數特異性鹼基密碼的分析，專一性及可靠度皆高很多，Wolf 等學者( 1999 ) 曾就 25 個不同物種，共 80 個獨立個體作 cytochrome *b* gene 片段序列的 RFLP 分析，並認為以 PCR-RFLP 技術作為物種鑑定，是非常可靠且再現性高的方法。

Ram 等( 1996 )對鮪魚及鯉魚研究 mtDNA 中 cytochrome *b* gene 的 region R335 及 region R211，作限制 切位分析，純化後分析罐頭加工過的魚肉 DNA 之狀態，發現 DNA 裂解程度非常嚴重，因而選擇一組 TUNA 334F/395R primer 來 PCR 增殖一 123 bp 的小片段，只可驗出部分鮪罐樣品；此外以四種限制 進行 RFLP 分析兩個 region，只能大致分辨出巴鯉( *Euthynnus affinis* ) 與其他魚種的差異，學者認為應該再另外尋找更適合的片段來作分析。

本研究所設計的 CbBRs126L/H 與 CbHi146L/L 兩組引子對，所增幅 126 bp 與 146 bp 之小片段序列雖在模擬加工實驗中皆可成功驗出 PCR 產物，在市售產品卻有小部分無法成功增幅；且以 RFLP 限制 反應時因片段過小，在洋菜膠( agarose gel ) 電泳圖上無法清楚的區分出每一獨立片段，長度大小相近的片段會分不開，而長度

過小的片段則會有幾乎觀測不到的情形；雖然結果在判讀上仍能分辨出不同魚種序列的片段多型性，但無法清楚呈現每一片段實為缺點，亦可能增加判讀上的困難度。參照 Ram 等學者對鮪罐加工品的研究，可推斷以 PCR-RFLP 當作罐藏品之鑑種核酸探針的確有一定的困難度及條件限制；然而本實驗之研究對大部分的鮪罐產品的檢測，大致上皆能夠達到分析原料物種的目的，對國內肉類加工品之仿偽鑑定技術仍提供了具體的學術依據。

除了單一原料鑑種以外，檢驗參雜其他原料的加工食品亦可作為未來研究方向。Matsunaga 等（1999）為檢視生鮮肉類及肉類加工品是否有參雜較廉價豬肉以及標示不符之問題，曾以牛肉：豬肉比例分別為 100：0、88：12、75：25、50：50、25：75、12：88 及 0：100 來作特異片段的 PCR 增幅分析，在電泳圖上可以明顯的看出不同比例原料，在片段亮度相對上的差異；而 Calvo 等（2001）亦曾以 PCR 法增幅 171 bp 之短鏈 cytochrome *b* gene 片段，分別以 20、25、30 個不同的溫度循環數目條件，搭配限制 偵測生鮮肉類及不同肉類加工品中的豬肉含量（分別測試 1%、0.1%、0.01%、0.005%），發現增幅 20 個溫度循環數目即可偵測到 1% 的豬肉參雜在牛肉之中的含量。以此法檢驗市售產品是否符合標示，在短時間內即能得知結果，且具高度的偵測敏感性，可作為未來水產罐頭加工品有無參雜其他廉價魚種，及相對含量多寡研究之參考。



**Table 3-1. Sequences of primer CYTBP2L and CYTBP2H**

<b>Primer</b>	<b>Sequence</b>
CYTBP2L	5'-AAG GAC GTA GCC AAC GAA G-3' ( 19-mer )
CYTBP2H	5'-TCA GTA GCC CAC ATT TGC C-3' ( 19-mer )

**Table 3-2. Sequences of primer cbBF01L/H, cbAB01L/H, cbYF01L/H and cbBY01L/H**

<b>Primer</b>	<b>Sequence</b>
cbBF01L	5'-TCA GTA GCC CAC ATT TGC C-3' ( 19-mer )
CbBF01H	5'-GAG CAC TAC TCC GAT GTT TC-3' ( 20-mer )
cbAB01L	5'-ATC AGC CTT CGC CTC AGT AG-3' ( 20-mer )
cbAB01H	5'-ACA GGT AAG AGC CGT AGT AAA G-3' ( 22-mer )
cbYF01L	5'-TCA GTA GCC CAC ATT TGC C-3' ( 19-mer )
cbYF01H	5'-ACT CCG ATG TTT CAT GTT TCC-3' ( 21-mer )
cbBY01L	5'-ATC AGC CTT CGC CTC AGT AG-3' ( 20-mer )
CbBY01H	5'-GCC GAT GTG GAA GTA GAT ACA G-3' ( 22-mer )



**Table 3-3. Sequences of primer CbBRs126L/H and CbHi146L/H**

<b>Primer</b>	<b>Sequence</b>
CbBRs126L	5'-GCC TTT ACT ACG GCT CTT AC-3' ( 20-mer )
CbBRs126H	5'-CCC CTC AGA ATG ATA TTT GTC C-3' ( 22-mer )
CbHi146L	5'-CCT CGC AAT ACA CTA TAC CCC-3' ( 21-mer )
CbHi146H	5'-CGA TGT GGAAGT AGA TGC AG-3' ( 20-mer )

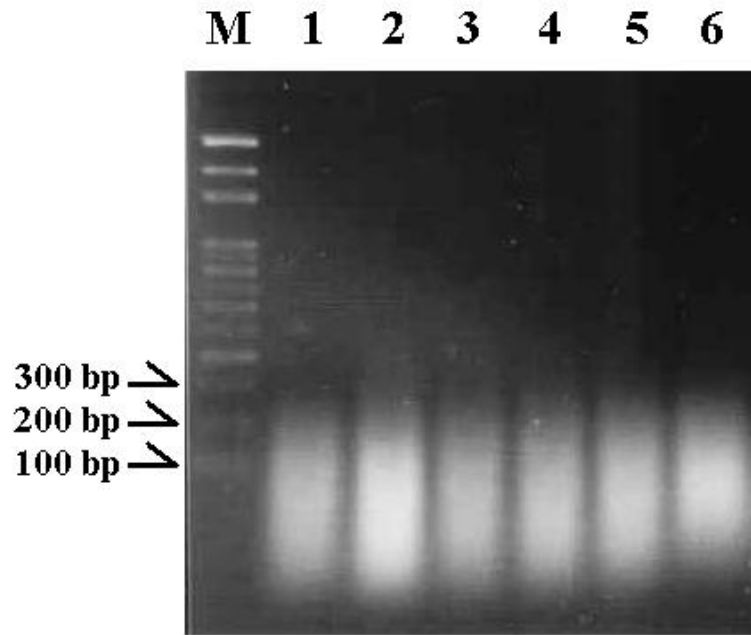


**Table 3-4. T<sub>m</sub> value and optimal annealing temperature of 7 pairs of primers in this study**

<b>Primer</b>	<b>T<sub>m</sub> value</b>	<b>Annealing temperature</b>
CYTBP2L	56.1	51
CYTBP2H	55.6	
cbBF01L	56.1	53
cbBF01H	53.7	
cbAB01L	57.4	51
cbAB01H	55.1	
cbYF01L	56.1	52
cbYF01H	54.4	
cbBY01L	57.4	51
cbBY01H	56.0	
CbBRs126L	53.5	52
CbBRs126H	54.2	
CbHi146L	55.6	51
CbHi146H	53.8	

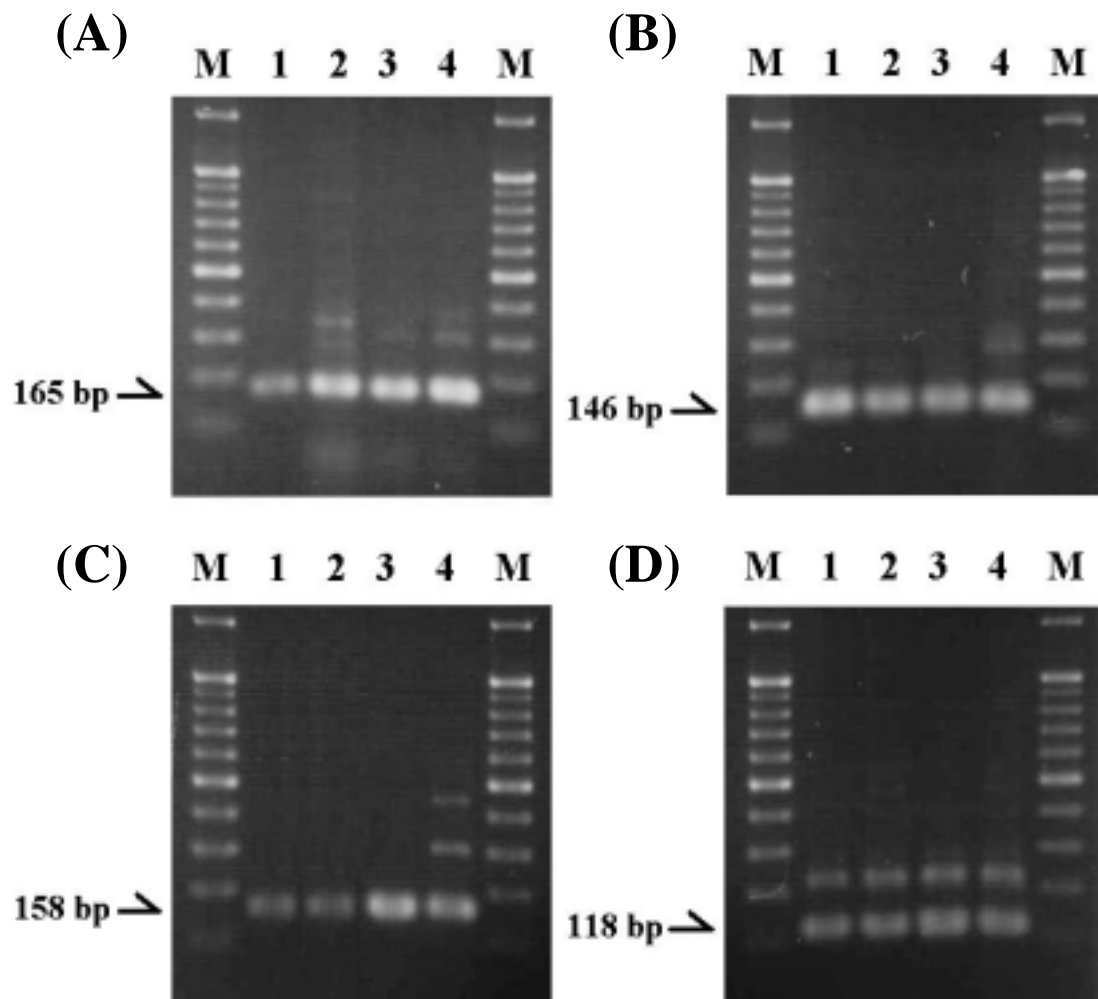






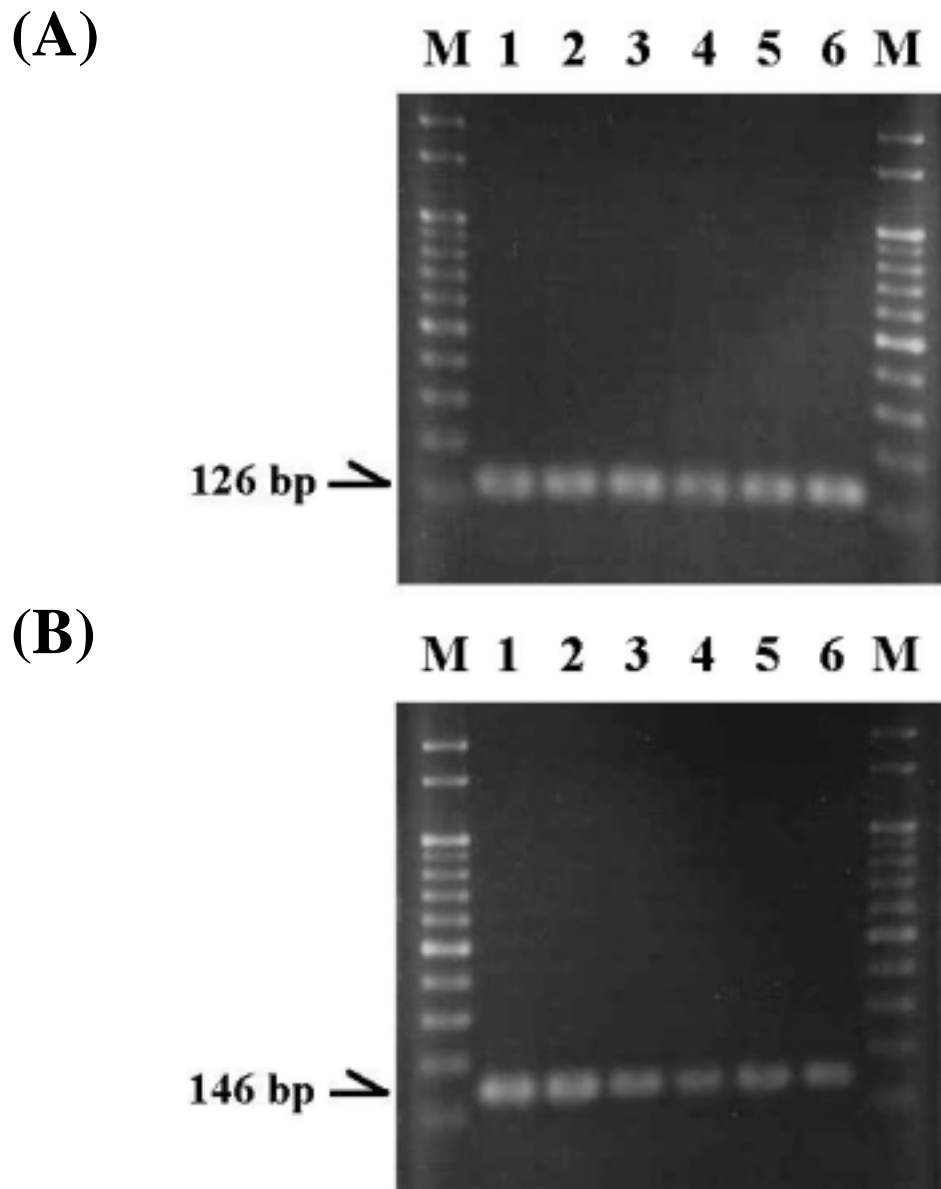
**Fig. 3-1. Electrophoretic analysis of crude DNA. Samples in lane are all *Thunnus alalunga* processed as follows: 1. 115 °C /30 min in water; 2. 115 °C /30 min in tomato juice; 3. 115 °C /30 min in soybean oil; 4. 121 °C /15 min in water; 5. 121 °C /15 min in tomato juice; 6. 121 °C /15 min in soybean oil; M = 100 bp ladder.**





**Fig. 3-2.** Electrophoretic analysis of PCR products of four *Thunnus* species amplified with primers (A) cbBF01L/H, (B) cbAB01L/H, (C) cbYF01L/H and (D) cbBY01L/H. Samples in lane are as follows: 1. *Thunnus thynnus*; 2. *T. alalunga*; 3. *T. obesus*; 4. *T. albacare*; M = 100 bp ladder.





**Fig. 3-3. Electrophoretic analysis of PCR products amplified with (A) CbBRs126L/H and (B) CbHi146L/H. Samples in lane are all *Thunnus alalunga* processed as follows: 1. 115 °C /30 min in water; 2. 115 °C /30 min in tomato juice; 3. 115 °C /30 min in soybean oil; 4. 121 °C /15 min in water; 5. 121 °C /15 min in tomato juice; 6. 121 °C /15 min in soybean oil; M = 100 bp ladder.**



(A)

1-50

*T. thy.* CCCCTCAGAA TGATATTTGT CCTCAGGGAA GGACGTAGCC AACGAAGGCG  
*T. ala.* CCCCTCAGAA TGATATTTGT CCTCAGGGAA GGACGTAGCC AACGAAGGCG  
*T. obe.* CCCCTCAGAA TGATATTTGT CCTCAGGGAA GGACGTAGCC GACGAAGGCG  
*T. alb.* CCCCTCAGAA TGATATTTGT CCTCAGGGAA GNACGTAGCC AACGAAGGCG

51-100

**Bsp1286 I**

*T. thy.* GTCATCATAA CTAGAAGTAG GAGCACTACT CCGATGTTTC ATGTTTCTTT  
*T. ala.* GTCATCATAA CTAGAAGTAG GAGTACTACT CCNATGTTTC ATGTTTCTTT  
*T. obe.* GTCATCATAA CTAGGAGTAG NAGTACTACT CCGATNTTTC ATGTTTCTTT  
*T. alb.* GTCATCATAA CTAGGAGTAG GAGTACTACT CCGATGTTTC ATGTTTCTTT

101-126

**Rsa I**

**Rsa I**

*T. thy.* GTACAGGTAA GAGCCGTAGT AAAGGC  
*T. ala.* GTACAGGTAA GAGCCGTAGT AAAGNC  
*T. obe.* GTATAGGTAA GAGCCGTAGT AAAGTC  
*T. alb.* GTATAGGTAA GAGCCGTAGT AAAGNC

(B)

1-50

*T. thy.* CGATGTGGAA GTAGATGCAG ATAAAGAAGA AAGAGGCCCC GTTTGCGTGG  
*T. ala.* CGATGTGGAA GTAGATGCAG ATAAAGAAGA AAGAGGCCCC GTTTGCGTGG  
*T. obe.* CGATGTGGAA GTAGATGCAG ATAAAGAAGA AAGAGGCCCC GTTTGCGTGG  
*T. alb.* CGATGTGGAA GTAGATGCAG ATAAAGAAGA ANGAGGCCCC GTTTGCGTGG

51-100

**Hinc II**

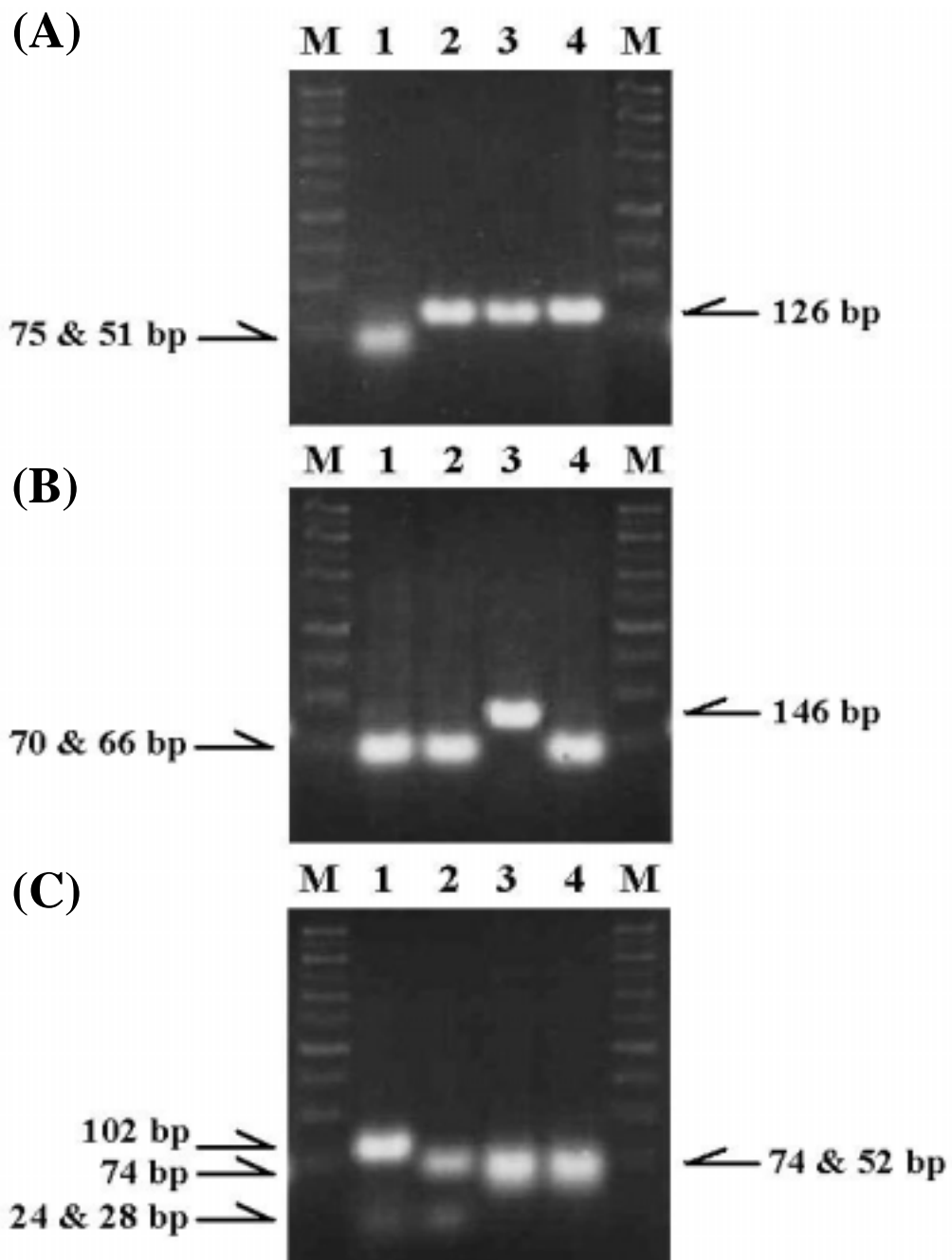
**Hinc II**

*T. thy.* AGGTTCCGGA TGAGGTCAACC GAAGGTTGACA TCTCGGCAAA TGTGGGCTAC  
*T. ala.* AGGTTCCGGA TGAGGTCAACC GAAGGTTGACA TCTCGGCAAA TGTGGGCTAC  
*T. obe.* AGGTTNCGGA TGAGTCACCC GAAATTNACA TCTCGGCAAA TGTGGGCTAC  
*T. alb.* AGGTTCCGGA TGAGGTCAACC GAAGGTTGACA TCTCGGCAAA TGTGGGCTAC

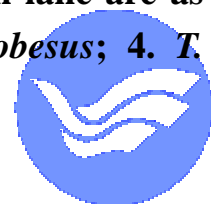
101-146

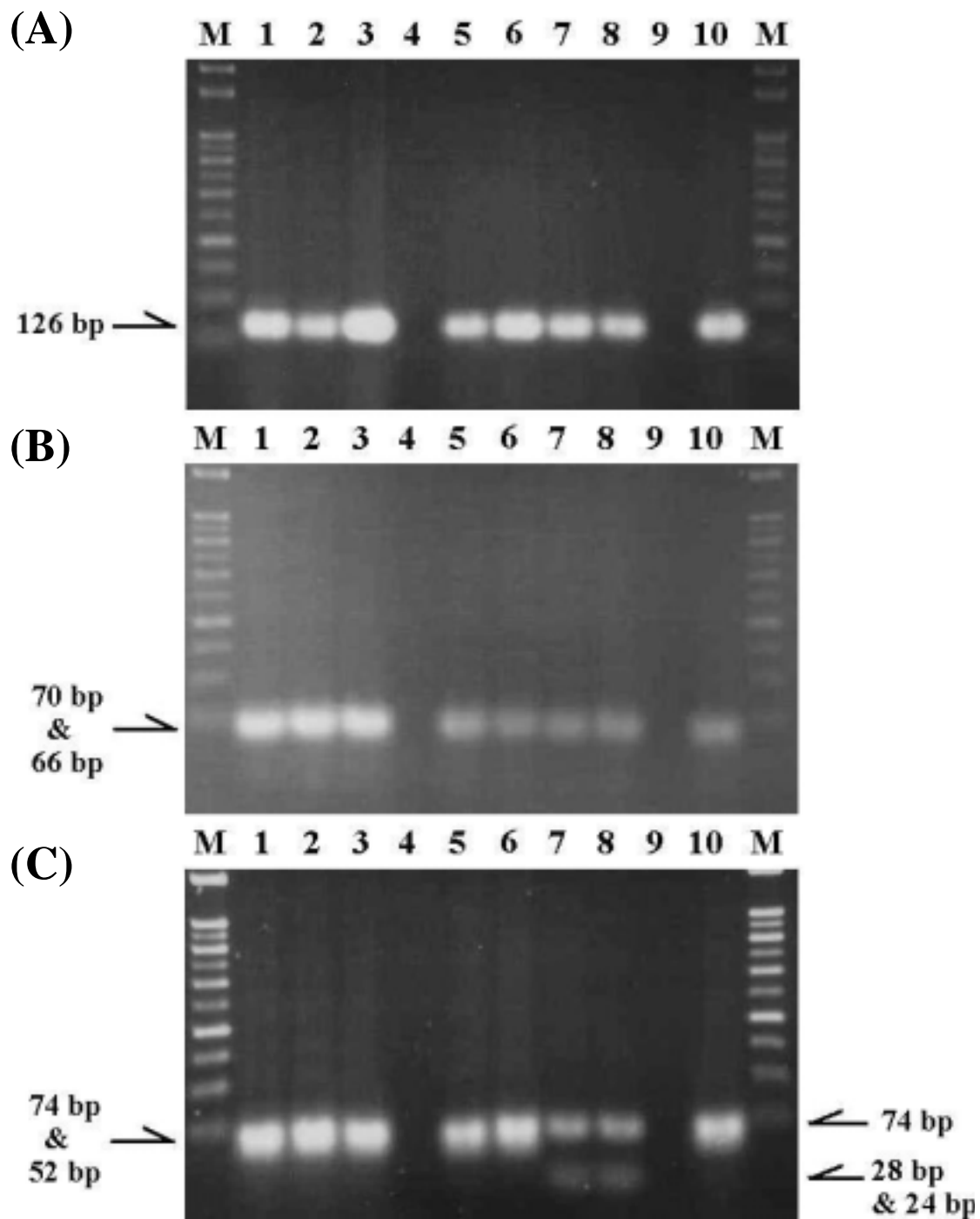
*T. thy.* TGAGGCGAAG GCTGATTCGA CATCAGGGGT ATAGTGTATT GCGAGG  
*T. ala.* TGAGGCGAAG GCTGATTCGA CATCAGGGGT NTAGTGTATT GCGAGG  
*T. obe.* TGAGGCGAAG GCTGATTCGA CATCAGGGGT GTAGTGTATT GCGAGG  
*T. alb.* TGAGGCGAAG GCTGATTCGA CATCAGGGGT GTAGTGTATT GCGAGG

**Fig. 3-4. (A) Restriction sites of the 126 bp cytochrome *b* gene fragments of *Thunnus thynnus* (*T. thy.*), *T. alalunga* (*T. ala.*), *T. albacares* (*T. alb.*) and *T. obesus* (*T. obe.*) amplified with CbBRs126L/H. (B) Restriction sites of the 146 bp cytochrome *b* gene fragments of four *Thunnus* species amplified with CbHi146L/H. The restriction sites are shown with underline.**



**Fig. 3-5. Electrophoretic analysis of 126 bp cytochrome *b* gene PCR products of four *Thunnus* species digested with (A) *Bsp*1286 I, (C) *Rsa* I and of the 146 bp cytochrome *b* gene PCR products of four *Thunnus* species digested with (B) *Hinc* II. Samples in lane are as follows: 1. *Thunnus thynnus*; 2. *T. alalunga*; 3. *T. obesus*; 4. *T. albacare*; M = 100 bp ladder.**





**Fig. 3-6. Restriction profiles of the 126 bp cytochrome *b* gene PCR products digested with (A) *Bsp*1286 I, (C) *Rsa* I and of the 146 bp cytochrome *b* gene PCR products digested with (B) *Hinc* II. Samples in lane are 10 tuna canned products in the market in Taiwan; M = 100 bp ladder.**



## 參考文獻

- 任曉晶。2002。養殖鰻及其加工品之魚種基因鑑定法探討。國立台灣海洋大學食品科學研究所碩士論文。基隆。
- 吳清熊、邱思魁。1996。水產食品學。國立編譯館。台北。
- 沈世傑。1993。鯖亞目，鯖科。台灣魚類誌，pp. 554-559。國立台灣大學動物學系。台北。
- 林榮輝。1998。進階版生物技術，pp. 246-250。臺大醫院出版。台北。
- 胡興華。2000。台灣漁業發展與作業漁場 - 鮪漁業篇。鮪魚年鑑，pp. 1-27。台灣區遠洋鮪漁船魚類輸出業同業公會。台北。
- 馬保之。1981。水產品罐頭。罐頭食品大全，pp. 696-732。食品工業發展研究所。新竹。
- 張鶴霖。1997。台北市生鮮鮪魚市場區隔化之研究。國立台灣海洋大學漁業經濟研究所碩士論文。基隆。
- 傅新輔。2000。鮪漁業常見之漁獲對象。鮪魚年鑑，pp. 215-226。台灣區遠洋鮪漁船魚類輸出業同業公會。台北。
- 黃鵬林、王愛玉、劉瑞芬、莊榮輝。2001。生物技術核心實驗。生物技術方法，卷一。國立台灣大學生物技術研究中心。台北。
- 楊永正。2000。巨分子序列分析研習會講義。國家衛生研究院。台北。
- 賴滋漢、金安兒、柯文慶。1992。食品加工學方法篇，pp. 306-309。精華出版社。台中。
- 賴滋漢、金安兒。1991。水產罐頭。食品加工學製品篇。精華出版社。台中。
- 謝喻文。2001。利用細胞色素*b* 基因之 PCR 技術和基因序列作為紅鰹多紀鮪和橫紋多紀鮪原料及其加工品之魚種鑑定。國立台灣海洋大學食品科學研究所碩士論文。基隆。

蘇文慧。2001。巨分子序列分析基礎課程講義。國家衛生研究院。  
台北。

**Alvarado, B. J. R., Naseri, I. and Ely, B. 1997.** Orthodox and unorthodox phylogenetic relationships among tunas revealed by the nucleotide sequence analysis of the mitochondrial DNA control region. *Journal of Fish Biology* 50: 540-554.

**Antointte, J. P. and Greg, S. S. 2001.** Molecular phylogeny of the Chipmunks inferred from mitochondrial cytochrome *b* and cytochrome oxidase II gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 20 (3): 335–350.

**AOAC. 1997.** Official Methods of Analysis. In *Association of Official Analysis Chemists*, 16 Edition. Washington, DC.

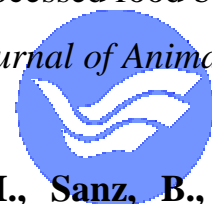
**Appleyard, S. A., Ward, R. D. and Grewe, P. M. 2002.** Genetic stock structure of bigeye tuna in the Indian Ocean using mitochondrial DNA and microsatellites. *Journal of Fish Biology* 60: 767-770.

**Bartlett, S. E. and Davidson, W. S. 1991.** Identification of *Thunnus* tuna species by the polymerase chain reaction and direct sequence analysis of their mitochondrial cytochrome *b* gene. *Canadian Journal Fisheries Aquatic Science* 48: 309-317.

**Brown, W. G., Gadaleeta, G., Pepe, G., Saccone, C. and Sbisà, E. 1986.** Structural conservation and variation in the D-loop containing region of vertebrate mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Biology* 192: 503-511.

**Calvo, J. H., Zaragoza, P. and Osta, R. 2001.** A quick and more sensitive method to identify pork in processed and unprocessed food by PCR amplification of a new specific DNA fragment. *Journal of Animal Science* 79: 2108-2112.

**Carrera, E., Garcia, T., Cespedes, A., Gonzalez, I., Sanz, B.,**





- Hernandez, P. E. and Martin, R. 1998.** Identification of Atlantic salmon (*salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by using polymerase chain reaction amplification and restriction analysis of the mitochondrial cytochrome *b* gene. *Journal of Food Protection* 61 (4): 482-486.
- Carter, C. G., Seeto, G. S., Smart, A., Clarke, S. and Barneveld, R.J. 1998.** Correlates of growth in farmed juvenile southern bluefin tuna *Thunnus maccoyii* (Castelnau). *Aquaculture* 161: 107-119.
- Cespedes, A., Garcia, T., Carrera, E., Gonzalez, I., Fernandez, A., Hernandez, P. and Martin, R. 1999.** Application of polymerase chain reaction - single strand conformational polymorphism (PCR-SSCP) to identification of flatfish species. *Journal of AOAC International* 82 (4): 903-907.
- Cespedes, A., Garcia, T., Carrera, E., Gonzalez, I., Fernandez, A., Asensio, L., Hernandez, P. and Martin, R. 2000.** Genetic differentiation between sole (*Solea solea*) and Greenland halibut (*Reinhardtius hippoglossoides*) by PCR-RFLP analysis of a 12S rRNA gene fragment. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80: 29-32.
- Christensen, J. J., Peter, G. S. and Brita, B. 1995.** *Moraxella* (*Branhamella*) *catarrhalis*: Restriction enzyme analysis typing with *Hinf* I, *Hae* III and *Pst* I. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 12: 43-46.
- Collette, B. B. and Nauen, C. I. 1983.** An annotated and illustrated catalogue of tunas, mackerels, bonitos and related species know to date. Scombrids of the world. In *FAO Species Catalogue, Volume 2*. Food and Agriculture Organization of USA.
- Crockford, T. and Johnston, I. 1995.** Isolation of unstable myosins

- and the analysis of light chains by capillary electrophoresis. *Analysis of Biochemistry* 231: 20-26.
- Desalle, R. and Birstein, V. J. 1996.** PCR identification of black caviar. *Nature* 361: 197-198.
- Elvevoll, E. O., Sorensen, N. K., Osterud, B., Ofstad, R. and Martinez, I. 1996.** Processing of marine foods. *Meat Science* 43 (8): 265-275.
- Etienne, M., Fleurence, J., Rehbin, H., Kundiger, R., Yman, I. M., Frem, M., Craig, A., Mackie, I. M., Jessen, F., Smelt, A. and Lutén, J. 1999.** A standardized method of identification of raw and heat-processed fish by urea isoelectric focusing: A collaborative study. *Electrophoresis* 20: 1923-1933.
- Garrett, R. H. and Grisham, C. M. 1999.** *Biochemistry*, 2<sup>nd</sup> Edition. Saunders College Publishing. USA.
- Gasser, R. B. and Chilton, N. B. 1995.** Characterisation of *taeniid cestode* species by PCR-RFLP of ITS2 ribosomal DNA. *Acta Tropica* 59: 31-40.
- Gray, W. M. 1989.** Origin and evolution of mitochondrial DNA. *Annual Review of Cell Biology* 5: 25-50.
- Hashimoto, K., Watabe, S., Nakagawa, T. and sorita, K. 1984.** Electrophoretic identification of three subspecies of the genus *Lagocephalus* pufferfish. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 50: 115-118.
- Haward, M. and Bergin, A. 2000.** Taiwan's distant water tuna fisheries. *Marine Policy* 24: 33-43.
- Hsieh, H. M., Chiang, H. L., Tsai, L. C., Lai, S. Y., Huang, N. E., Linacre, A. and Lee, J. C. 2001.** Cytochrome *b* gene for species identification of the conservation animals. *Forensic Science*

*International* 122: 7-18.

**Hsieh, Y. W., Shiu, Y. C., Cheng, C. A., Chen, S. K. and Hwang, D. F. 2002.** Identification of toxin and fish species in cooked fish liver implicated in food poisoning. *Journal of Food Science* 67 (3): 948-952.

**Hung, T. S., Marshall, M. R. and Wei, C. I. 1995.** Identification of red snapper (*Lutjanus campechanus*) using electrophoretic techniques. *Journal of Food Science* 60: 279-283.

**Hwang, D. F., Hsieh, Y. W., Shiu, Y. C., Chen, S. K. and Cheng, C. A. 2002.** Identification of tetrodotoxin and fish species in a dried dressed fish fillet implicated in food poisoning. *Journal of Food Protection* 65 (2): 389-392.

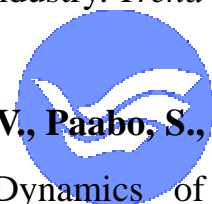
**Innis, M. A. and Gelfand, D. H. 1990.** Optimization of PCR. In *PCR Protocols - A Guide to Methods and Applications*. pp.3-12. Academic Press Inc., New York.

**Ishida, K., Zhu, B. -L., Sakoda, S., Quan, L., Oritani, S., Fujita, M. Q. and Maeda, H. 2000.** Significance of DNA analysis for determination of ABO blood groups from hair and nail of decomposed human remain: a comparison with phenotyping by the absorption-elution method. *Legal Medicine* 2000 (2): 212-215.

**Janusz, M., Bujnicki, M. R. and Leszek, R. 2001.** Polyphyletic evolution of type II restriction enzymes revisited: two independent sources of second-hand folds revealed. *Trends in Biochemical Sciences* 26 (1): 9-11.

**Jones, J. L. 1991.** DNA probes: Application in the food industry. *Trend Food Science Technology* 2: 28-32.

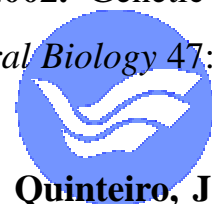
**Kocher, T. D., Thomas, W. K., Meyer, A., Edwards, S. V., Paabo, S., Villablanca, F. X. and Wilson, A. C. 1989.** Dynamics of



- mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 86: 6196-6200.
- Koolman, J. and Rohn, K. -H. 1996.** *Color Atlas of Biochemistry*. pp. 237-241. Thieme Medical Publishers Inc., New York.
- Kurihara, A., Tawata, M., Ikegishi, Y., Aida, K. and Onaya, T. 1999.** The procedure of polymerase chain reaction – restriction fragment – single strand conformation polymorphism analysis by *Hha* I / *Hinc* II to detect mitochondrial DNA mutations. *Life Sciences* 64 (14): 1223-1230.
- Lumini, E., Bosco, M. and Fernandez, M. P. 1996.** PCR-RFLP and total DNA homology revealed three related genomic species among broad-host-range *Frankia* strains. *FEMS Microbiology Ecology* 21: 303-311.
- Mackie, I. M. 1997a.** Identify fish. In *Food Authenticity*. pp. 140-170. Blackie Academic and Professional. London.
- Mackie, I. M. 1997b.** Methods of identifying species of raw and processed fish. In *Fish Processing Technology*, 2<sup>nd</sup> Edition. pp. 160-199. Blackie Academic and Professional, London.
- Matsunaga, T., Chikuni, K., Tanabe, R., Muroya, S., Shibata, K., Yamada, J. and Shinmura, Y. 1999.** A quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay. *Meat Science* 51: 143-148.
- Moritz, C., Dowling, T. E. and Brown, W. M. 1987.** Evolution of animal mitochondrial DNA: Relevance for population biology and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18: 262-269.
- Nelson, D. L. and Cox, M. M. 1990.** DNA repair. In *Lehninger Principles of Biochemistry*, Third Edition. pp. 949-958. Worth

Publishers, New York.

- Niwa, Y., Nakazawa, A., Margulies, D., Scholey, V. P., Wexler, J. B. and Chow, S. 2003.** Genetic monitoring for spawning ecology of captive yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) using mitochondrial DNA variation. *Aquaculture* 218: 387-395.
- Nozawa, H., Yamamoto, T., Uchihi, R., Yoshimoto, T., Tamaki, K., Hayashi, S., Ozawa, T. and Katsumata. 1999.** Purification of nuclear DNA from single hair shafts for DNA analysis in forensic sciences. *Legal Medicine* 1999 (1): 61-67.
- Partis, L., Croan, D., Guo, Z., Clark, R., Coldham, T. and Murty, J. 2000.** Evaluation of a DNA fingerprinting method for determining the species origin of meats. *Meat Science* 54 (4): 369-376.
- Ram, L. J., Ram, M. L. and Baidoun, F. F. 1996.** Authentication of canned tuna and bonito by sequence and restriction site analysis of polymerase chain reaction products of mitochondrial DNA. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 44: 2460-2467.
- Rehbein, H., Etienne, M., Jerome, M., Hattula, T., Knudsen, B., Jessen, F., Lutten, J. B., Bouquet, W., Mackie, I. M., Ritchie, A. H., Martin, R. and Mendes, R. 1995.** Influence of variation in methodology on reliability of the isoelectric focusing method of fish species identification. *Food Chemistry* 52: 193-197.
- Rehbein, H., Kress, G. and Schmidt, T. 1997.** Application of PCR-SSCP to species identification of fishery products. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 74: 35-41.
- Ruby, J. D., Li, Y., Luo, Y. and Caufield, P. W. 2002.** Genetic characterization of the oral *Actinomyces*. *Archives of Oral Biology* 47: 457-463.
- Russell, V. J., Hold, G. L., Pryde, S. E., Rehbein, H., Quinteiro, J.,**



- Rey, -M. M., Sotelo, C. G., Santos, A. T. and Rosa, C. 2000.** Use of restriction fragment length polymorphism to distinguish between salmon species. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 48: 2184-2188.
- Saitoh, K. 1998.** Genetic variation and local differentiation in the Pacific cod *Gadus macrocephalus* around Japan revealed by mt RNA and RAPD markers. *Fisheries Science* 64 (5): 673-679.
- Sato, T., Matsuyama, J., Takahashi, N., Sato, M., Johnson, J., Schachtele, C. and Hoshino, E. 1998.** Differentiation of oral *Actinomyces* species by 16S ribosomal DNA polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism. *Archives of Oral Biology* 43: 247-252.
- Sezaki, K., Kuboshima, Y., Mitani, I., Fukui, A. and Watabe, S. 2001.** Identification of chub and spotted mackerels with mitochondrial cytochrome *b* gene and its application to respective pelagic eggs fixed with formalin. *Nippon Suisan Gakkaishi* 67 (2): 17-22.
- Shaper, E. G., Robinson, M., Yee, D., Candlin, J. D., Mines, R. and Hunkapiller, T. 1996.** Sensitivity and selectivity in protein similarity searches: A comparison of Smith-Waterman in hardware to BLAST and FastA. *Genomics* 38 (2): 179-191.
- Sotelo, C. G., Pineiro, C., Gallardo, J. M. and Perez-Martin, R. I. 1993.** Fish species identification in seafood products. *Trends in Food Science and Technology* 4: 395-401.
- Southern, S., Peter, J. S. and Andrew, E. D. 1988.** Molecular characterization of cloned mitochondrial genome. *Journal of Molecular Evolution* 28: 32-42.
- Tagliavini, J., Harrison, I. J. and Gandolfi, G. 1995.** Discrimination



between *Anguilla anguilla* and *A. rostrata* by polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism analysis. *Journal of Fish Biology* 47: 741-743.

**Takeyama, H., Chow, S., Tsuzuki, H. and Matsunaga, T. 2001.** Mitochondrial DNA sequence variation within and between tuna *Thunnus* species and its application to species identification. *Journal of Fish Biology* 58: 1646-1657.

**Taniguchi, N., and Toshio, M. 1979.** Identification of European, American, and Japanese eels by lactate dehydrogenase and malate dehydrogenase isozyme patterns. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 45 (1): 37-41.

**Taniguchi, N., Takahashi, J. and Konishi, Y. 1972.** Studies on a biochemical method for identification of the European and Japanese freshwater eel. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 38 (6): 627-631.

**Tzeng, C. S., Hui, C. F., Shen, S. C. and Huang, P. C. 1992.** The complete nucleotide sequence of the *Crossostoma lacustre* mitochondrial genome: Conservation and variations among vertebrates. *Nucleic Acids Research* 20 (18): 4853-4858.

**Unsel, M., Beyermann, B., Brandt, P. and Hiesel, R. 1995.** Identification of the species origin of highly processed meat products by mitochondrial DNA sequences. *PCR Methods Application* 4: 241-243.

**Williams, J. F. 1989.** Optimization strategies for the polymerase chain reaction. *BioTechniques* 7 (7): 762-767.

**Williams, J. G., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. and Tingey, S. V. 1990.** DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18:

531-535.

**Wilson, A. C., Cann, R. L., Carr, S. M., George, M., Gyllensten, U. B., Higuchi, R. G., Palumbi, S. R., Prager, E. M., Sage, R. D. and Stoneking, M. 1985.** Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biological Journal of the Linnean Society* 26: 375-400.

**Wolf, C., Rentsch, J. and Hubner, P. 1999.** PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA: A reliable method for species identification. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 47 (4): 1350-1355.

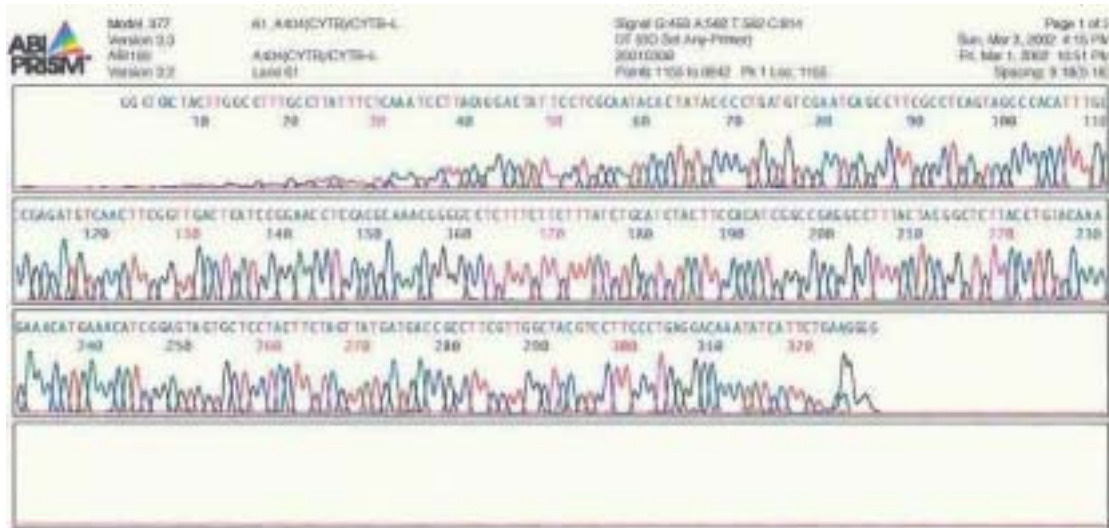
**Wu, Y. -Y., Delgado, R., Costello, R., Sunderland, T., Dukoff, R. and Csako, G. 2000.** Quantitative assessment of apolipoprotein E genotypes by image analysis of PCR-RFLP fragments. *Clinica Chimica Acta* 293: 213-221.



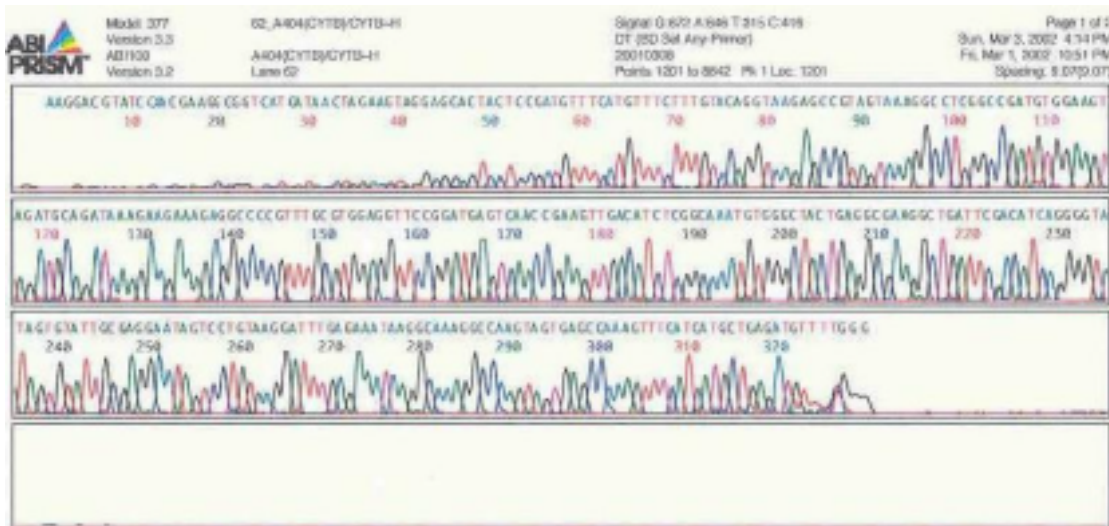


# Appendix 1. Automatic sequencing information of *T. thynnus* in this study

## A. L strand



## B. H strand



## Appendix 2. Automatic sequencing information of *T. alalunga* in this study ( Northern Pacific Ocean )

### A. L strand



### B. H strand







## Appendix 4. Automatic sequencing information of *T. obesus* in this study ( Northern Pacific Ocean )

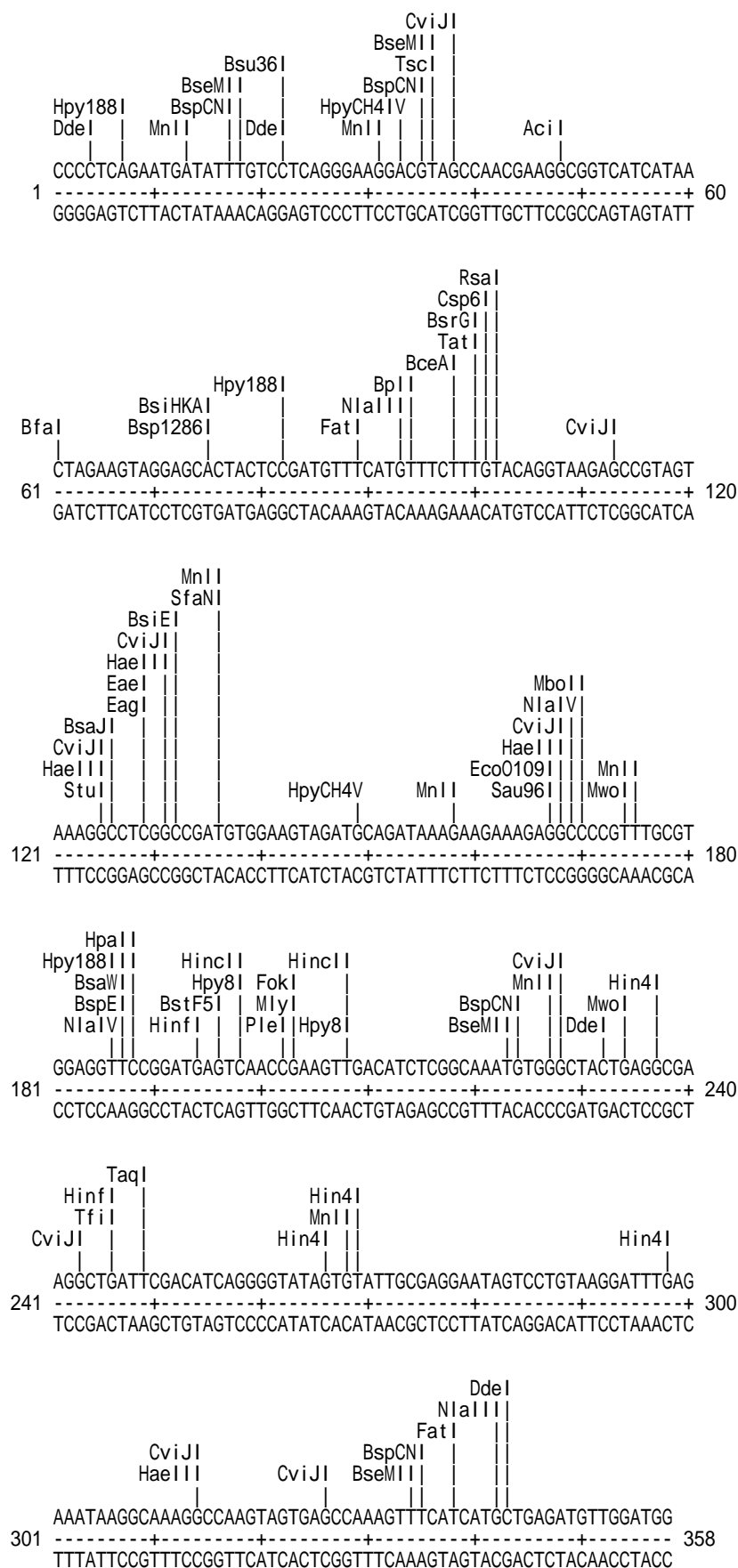
### A. L strand



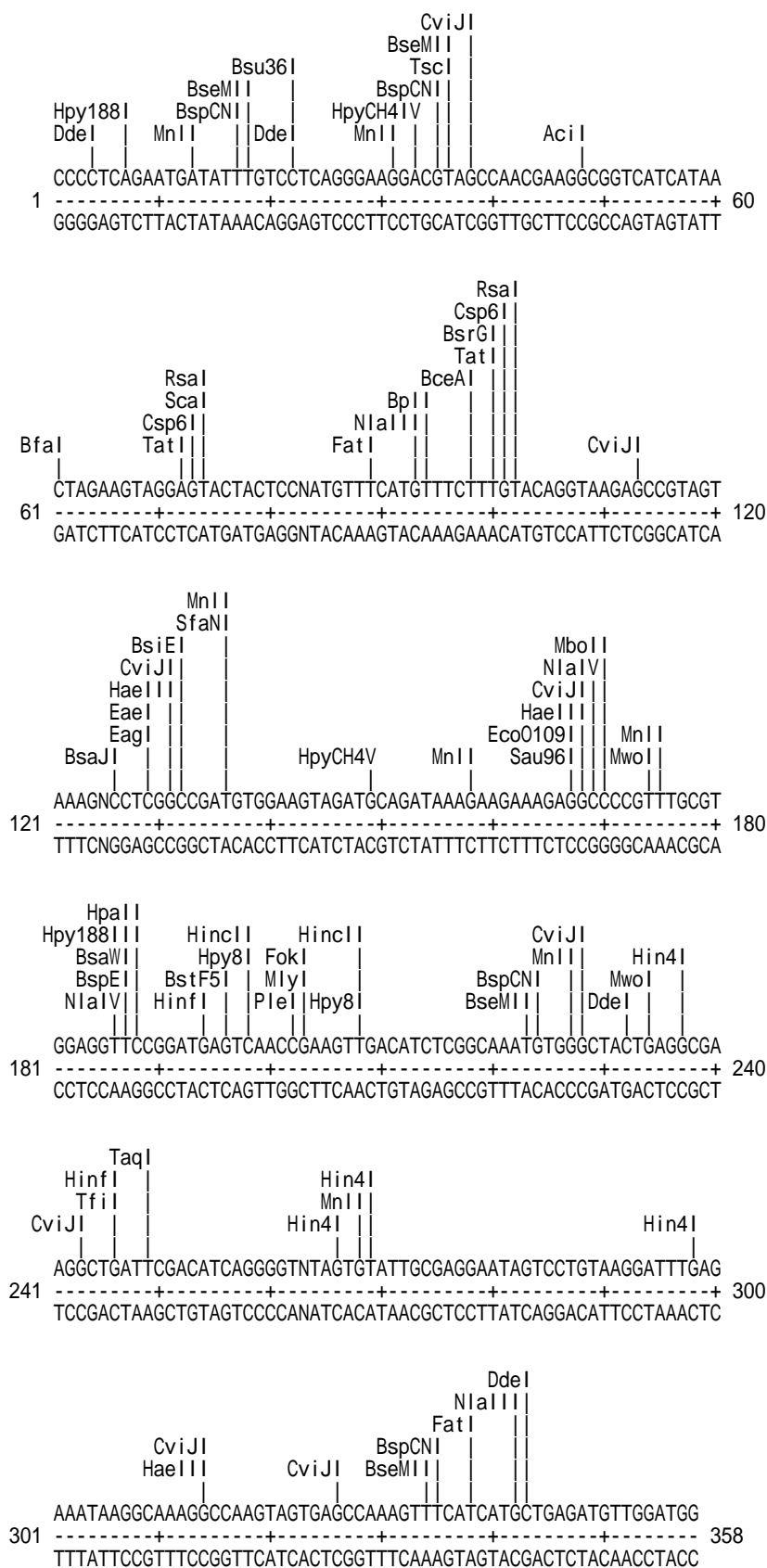
### B. H strand



## Appendix 5. Restriction map of the 358 bp fragment of *T. thynnus*



## Appendix 6. Restriction map of the 358 bp fragment of *T. alalunga*





## Appendix 8. Restriction map of the 358 bp fragment of *T. obesus*

