

烏魚系群鑑定快速檢測試紙之研發

劉恩良、楊順德

水產試驗所淡水養殖研究中心

前言

烏魚在臺灣沿近海漁業與養殖業具有高度經濟價值，素有烏金之稱。根據漁業年報資料顯示，2000—2010 年臺灣烏魚養殖面積約有 500—1,300 餘公頃。近 20 年來臺灣養殖烏魚產量每年約 1,500—2,700 公噸，而野生烏魚因氣候變遷與鄰國競捕因素產量約只有數百到 1,500 餘公噸。臺灣鄰近西北太平洋海域烏魚有三大系群（溫帶型 NWP1、黑潮型 NWP2、熱帶型 NWP3），主要活動在各自對應水溫的生態海域，受華南、華北沿岸和黑潮三大洋流系統的影響。NWP2 物種的範圍似乎與黑潮洋流的環流模式相應，黑潮洋流將溫暖的熱帶海水從呂宋海峽向東北方向輸送，經過臺灣的東西海岸，最後到達日本海。黑潮對該地區的其他洋流系統有重大影響。從南海向北流入臺灣海峽的華南洋流帶來了溫暖的海水，與從黃海和東海南下的華北沿岸洋流的冷水混合。NWP3 的分布範圍似乎遵循華南海流的暖水區，而 NWP1 的分布範圍則僅限於華北沿岸海流的冷水區，該海流在冬季向南流動（伴隨東北季風）。海洋洋流系統和魚類分布之間如此密切的關係可能反映了溫度偏好，因為黑潮洋流和中國沿岸洋流之間的差異可達 6—11°C。黑潮全年保持溫暖（23—26°C），而中國沿岸流的溫度變化很大，從 3 月的 12°C 到 9 月的 20°C（沈

等，2011）。過去的研究顯示，在烏魚養殖過程中，3 齡時收獲的 NWP1 雌魚通常具有較低的性腺指數（gonadosomatic index, GSI），並且不存在發育中卵巢。NWP2 雌魚無論是 2 齡或 3 齡，通常都具有較高的 GSI，並顯示出不同的卵巢大小，在相同水產養殖條件下，NWP3 雌魚的體重和卵巢重量明顯大於 NWP2 雌魚。因此，儘管 NWP2 雌魚產生具有經濟價值的卵巢，但是 NWP3 雌魚比 NWP2 雌魚更有產生較大卵巢之潛力（Chien et al., 2015, 2018）而臺灣目前養殖烏魚苗的來源皆為野生撈捕本所於 2021 年起啟動「提升臺灣烏魚耐候韌性養殖之分子鑑定技術應用」研究計畫，目標在篩選高結子率的烏魚系群，為未來人工魚苗生產建立種魚的基礎，另外也為因應氣候變遷所造成烏魚苗系群來源之不確定性，藉由分子生物鑑定技術益助烏魚養殖產業之基盤韌性，減少因異常氣候對產業之衝擊。計畫起初 2 年，我們完成臺灣南北養殖場採集養殖成烏共 1,000 尾之樣品，經 DNA 分析結果顯示 98% 為黑潮型（NWP2），1% 強為溫帶型（NWP1），1% 弱為熱帶型（NWP3），意味臺灣養殖烏魚的系群大多為黑潮型，第 3 年完成建立試紙型臺灣烏魚系群 NWP1 與 NWP3 鑑定套組技術。

此一鑑定技術係結合重組聚合酶擴增（recombinase polymerase amplification, RPA）反應與流動相反應試紙條之偵測方法而成的

檢測技術 (圖 1)。重組酶聚合酶擴增主要依賴能結合單鏈核酸 (oligonucleotides) 的重組酶、單鏈 DNA 結合蛋白 (SSB) 和鏈置換 DNA 聚合酶等三種酶。這三種酶的混合物在常溫下也有活性，最佳反應溫度在 37–42°C。一般在 10–20 分鐘內獲得可檢出擴增產物。

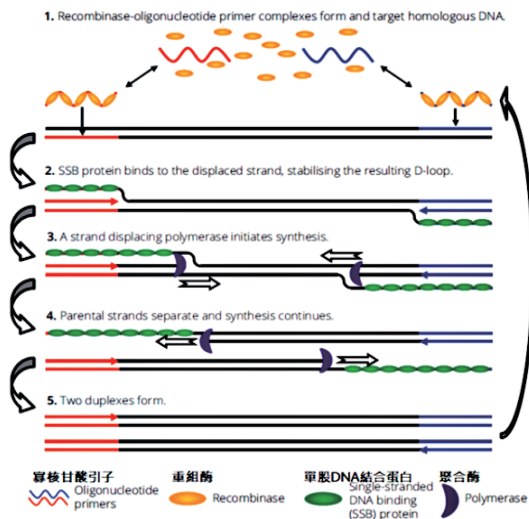


圖 1 RPA 反應循環原理

重組酶 (recombinase) 與引子形成重組鍊狀結構，並透過置換將其插入 DNA 雙螺旋的互補位點以形成 D 環。單股 DNA 結合 (SSB) 蛋白可穩定雙螺旋結構和 D 環的打開。重組酶拆卸並允許鏈置換聚合酶進入，沿著目標序列延伸引子的 3' 端。當針對相反引子重複此序列時，會發生指數倍率之擴增，無需加熱變性或降溫反應 (摘譯自 Stringer O. W. et al., 2018)

原型試紙開發

一、PCR 擴增反應檢測

根據臺灣周邊海域三系群烏魚之粒線體基因組，設計符合具專一性的引子，以聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 產物確認 (表 1、圖 2)，再依照 RPA 引子特性修飾引子序列，原則如下：(1) 長度在 30–35 鹼基對；(2) GC 佔比為 30–70%；(3) 引子

序列避免產生次級結構。經 PCR 反應產物確認後再進行流動相反應試紙呈色反應 (圖 3)。

表 1 NWP1 與 NWP3 專一性引子之起始序列

引子名稱	5' > 3' 端序列
NWP1sp1F	TCC CCT AGT AAC CTC ACT GG
NWP1sp1R	TAG TCA GAC TAG TCA GAG TA
NWP3sp1F	GCT TGA TAA TAC ATA TAT GC
NWP3sp3R	GTA ATT ATC TCT GGA ATA GGG GC

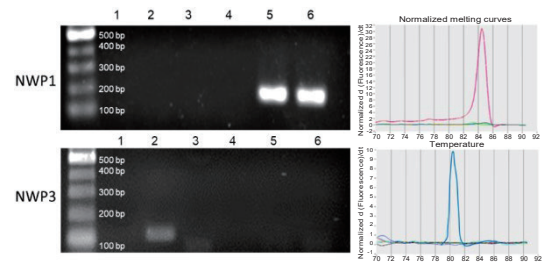


圖 2 烏魚 NWP1 與 NWP3 引子專一性確認
利用 DNA 半解離溫度 (T_m) 的特性判斷，單一的 PCR 產物只有一個螢光吸收峰 (右圖)。1、3、4 為 NWP2 DNAs, 2 為 NWP3 DNA, 5、6 為 NWP1 DNAs。左圖洋菜膠電泳圖與右圖 PCR 產物半解離溫度皆顯示此 NWP1 與 NWP3 引子具專一性

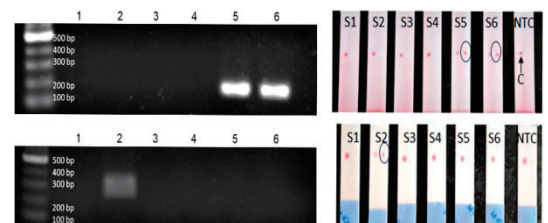


圖 3 烏魚 NWP1 與 NWP3 鑑定試紙測試
1、3、4 為 NWP2 DNAs, 2 為 NWP3 DNA, 5、6 為 NWP1 DNAs。左圖為洋菜膠電泳圖；右圖為試紙呈色結果。樣品檢測訊號以圓圈標示，試紙呈色結果與 PCR 產物電泳圖結果一致。C：試紙品管點；NTC：no template control

使用 Lucigen 公司的 Quick ExtractDNA Extraction Solution 作為抽取烏魚 DNA 的試劑，將適當之烏魚尾鰭組織置入 ExtractDNA 溶液中，充分混合震盪後，在 65°C 下反應，再充分混合震盪，隨即在 98°C 下反應 2 分鐘。此一 DNA 溶液在 -20°C 下可保存 1 週。RPA 試劑組 (GenProNex Biomedical Inc.) 內

含有：(1) INA 乾燥酵素 (isothermal nucleic acid amplification (INA) enzyme)；(2)回溶劑 Re-dissolved buffer；(3)二價鎂離子溶液；(4)陽性標準品；(5)陽性引子。實驗步驟：(1)微量離心管中混合 forward primer、reverser primer、H₂O 回溶劑。(2)將以上混合液加入 INA 乾燥酵素中，並以桌上型震盪器均勻震盪以確定完全溶解。(3)每管產品再加入二價鎂離子溶液。(4)將 DNA 檢體加入反應混合液中。(5)以簡易桌上型離心機稍離心取出混合均勻後，再次離心後先置於冰上。(6)放入已預熱 37–40°C 恆溫器中，反應 20 分鐘。

二、快篩試紙原型建立

本試驗係使用流動相反應試紙條之偵測系統 (GenProNex Biomedical Inc.)。流動相中含有鏈黴親和素 (streptavidin) 粒子，可偵測核酸分子標記有第一標幟物為生物素 (biotin)；第二標幟物為 FITC 或 TAMARA 或 DIG 以偵測標的核酸。5–10 分鐘偵測反應時間內，以目視判讀結果。將恆溫核酸擴增完成之產物，加入稀釋緩衝充分混合，每管再放入核酸擴增試紙條，靜待 10 分鐘。

RPA 和一般 PCR 都是用於放大擴增 DNA 分子的生物學技術，但它們在原理和應用上存在一些差異如：(1)放大原理：PCR 依賴於一種耐高溫的 DNA 聚合酶，通常是 Taq 聚合酶，來放大 DNA。反應包括變性、黏合和延伸的週期。RPA 使用重組酶來促進 DNA 分子的置換，並使用聚合酶來擴展 DNA 鏈。與 PCR 不同，RPA 不需要高溫進行變性，並在較低且更穩定的溫度下進行。(2)溫度要求：PCR 需要通過高溫變性 (通常在 94–98°C) 和較低溫度的黏合 (通常在 50–

65°C) 週期進行。RPA 在較低且恆定的溫度下運行，通常在 37–42°C 之間，這使其更適合於現場應用和臨床檢測。(3)放大速度：由於每個放大週期中需要進行溫度循環，PCR 通常需要較長的時間。RPA 通常更快，因為放大在單一旦恆定的溫度下進行。這使 RPA 更適合快速檢測和臨床應用。(4)設備和複雜性：PCR 機器需要精確的溫度控制和循環，這可能使設備更加複雜和昂貴。RPA 反應可以使用更簡單的設備進行，這使其更容易在現場使用和應用。(5)特異性：PCR 以高特異性聞名，但引物設計對於避免非特異性放大至關重要。RPA 也提供高特異性，並且重組酶有助於形成特異性 DNA 複合物，減少非特異性放大的可能性。(6)放大產物：PCR 通常產生雙鏈 DNA 產物。RPA 可利用單鏈 DNA 標識，使其適用於下游應用，如側流分析。雖然 PCR 和 RPA 都用於 DNA 放大，但 RPA 在速度、溫度要求和設備簡單性方面具有優勢。PCR 仍然是一種廣泛使用在實驗室環境中成熟的技術，而 RPA 因其在現場應用和臨床檢測中的適用性而越來越普遍。

結語

傳統的動物組織 DNA 的檢測含樣品核酸萃取、PCR 反應與洋菜交電泳分析需耗時半個工作天以上，本計畫所開發之烏魚系群鑑定快速檢測試紙，可於 1 小時內完成烏魚系群的鑑定工作，大幅縮短檢測時間，將有助於未來烏魚養殖魚苗來源篩選效率和人工繁殖施作前親魚系群的確認，使烏魚養殖產業面臨氣候變遷挑戰時更具韌性與永續性。