

## 第四章 石斑魚的生物技術應用

黃意菱、王廷瑜、徐浩軒、陳怡安、陳永茂、陳宗嶽  
國立成功大學生物科技研究所、農業生物技術研究中心

### 一、前言

漁業是台灣重要的初級產業，在戰後迅速發展起來，漁產量由 1952 年 12 萬公噸，增加到 2009 年 108.9 萬餘公噸，產值亦由新台幣 5 億餘元增加到近 850 - 1,000 億元。台灣漁業在經過多年之努力，發展十分快速，但因過去均以生產為目標，任由業者自由發展之策略，造成漁業資源環境及管理上很大的傷害，尤其近年來全球糧食需求增加、環境惡化、污染嚴重、地球暖化氣候變遷、海洋資源過度利用等，讓漁業產量面臨瓶頸；也由於海洋資源枯竭造成捕撈漁獲量逐年遞減，使得養殖漁業已漸漸成為主要的漁產來源 (楊等人, 2009)。台灣地處於亞熱帶區域，為漁業發展提供了優良條件，根據食品與農業組織的官方報告，台灣出口的漁產由 1997 年的 56 萬公噸成長至 2006 年的 64 萬公噸，在十年內已成為全世界最重要的漁產供應國家之一。台灣在全球漁產量排名位居十六，養殖漁業包括淡水魚塢養殖、鹹水魚塢養殖及淺海養殖海等，年產量約 30 - 32 萬噸，價值 250 億元；養殖海水魚部分主要有虱目魚、石斑魚、海鱺等，根據聯合國糧農組織資料顯示，在 2004 年中石斑魚是台灣第 4 大養殖魚種，而全球石斑魚養殖漁業因侷限於亞洲地區，因此被養殖界公認為亞太地區最重要之經濟魚種 (洪等人, 2011)。

### 二、石斑魚簡介

石斑魚類 (*Epinephelus* spp.)，分類上屬於硬骨魚綱 (Osteichthyes)、鱸形目 (Perciformes)、鮨科 (Serranidae)，石斑魚屬 (*Epinephelus*)，俗稱過魚、格仔魚、鱸貓等。在熱帶及亞熱帶海域，種類繁多全世界約有 400 種，喜生活在近岸岩礁分布的海域。台灣目前所發現的記錄為 3 亞科 29 屬 110 種 (洪等人, 2011)，此魚由於肉質細嫩豐美，自古以來就被視為桌上佳餚，也因其生活習性，過去無法以先進的科學技術增加漁獲量。由於市場價值高，所以目前許多東南亞國家如新加坡、印尼、馬來西亞、菲律賓也都盛行養殖石斑魚，因此相當迅速的成為主要養殖魚類台灣因為掌握重要的養殖技術，產量達 17,000 公噸，佔全球養殖產量的 23%，僅次於中國的 44,000 公噸 (洪等人, 2011)，因此台灣在亞洲石斑魚水產養殖科技上為中國及東南亞國家之中心，石斑魚養殖戶也是技術傳播中國及東南亞國家之橋樑。

養殖石斑魚苗在以往皆須經由捕撈取得，再養殖成大魚出售。多年來在台灣養殖業者不斷嘗試及研究改進之下，台灣於 1982 年首度有人以注射荷爾蒙的方式，成功繁殖瑪拉巴石斑魚，自此開啓了台灣石斑魚的完全養殖時代，在飼養管理及種苗生產

上，目前在世界上居於領先的地位，最大的養殖產地為台灣南部的嘉南及高屏沿海。台灣目前主要養殖點帶石斑 (*E. coioides*)、瑪拉巴石斑 (*E. malabaricus*)、和鞍帶石斑 (*E. lanceolatus*)、金錢斑 (*E. tukula*) 等為主 (莊等人, 2006)。一般石斑魚養殖至少需 12 – 14 個月才可達上市體型，但養成率都不高，僅達放養魚卵的 0.3%。除了早期稚魚易遭受病毒及細菌感染而死亡外，養殖期間的天候因素、水質污染問題、餌料生物的選擇與管理方面都會增加業者的風險。因此如何藉由生物科技協助提高養殖魚類的養成速度、縮短上市的時間、降低飼料轉換率、提高抗病力等減低養殖期間可能發生的風險，是值得努力研究的課題。

### 三、生物技術在石斑魚產業的應用

由於石斑魚養殖產業疾病問題嚴重，神經壞死病毒造成全球漁業養殖的嚴重損失，因此近年來各國不斷思考如何防疫此病害的威脅；另外在現今所可以利用的糧食資源也漸趨短缺，主要作物價格不斷上漲，提升單一面積生產量以及增加附加營養價值或節省成本是世界糧食生產的重要趨勢。因此在目前，生物科技於石斑魚養殖上主要可應用於三個方向：(1) 透過良好的養殖健康管理及健全的防疫制度，研發出具有良好靈敏性、高專一性的病原檢測技術，做為疫病早期快速檢測工具 (陳與陳, 2006)；(2) 發展分子基因標誌，應用於基因輔助篩選 (marker-assisted selection, MAS) 育種技術上，以篩選出具較佳抗病力、孵育率或成長力等特

性之石斑魚優質種苗 (陳與陳, 2009)；(3) 改進石斑魚養殖技術，提升石斑魚養殖效率，藉由生物技術來提高養殖魚類的養成速度、縮短上市的時間或降低飼料成本 (簡, 2007；陳, 2009) 等，養殖出優質石斑魚，提升台灣石斑魚產業競爭力。

因此下面將就石斑病原檢測、基因標誌分子檢測、及提升石斑魚養殖效率等生物技術方法，應用在解決石斑產業上的貢獻進行說明。

### 四、養殖健康管理－石斑魚病原檢測

環視整個石斑魚水產養殖產業結構，自 1990 年起，全球漁業養殖廣受病原體的侵害，高死亡率是養殖業目前尚待突破之瓶頸，也造成台灣石斑魚養殖產業嚴重的經濟損失。石斑魚養殖特別是種苗養殖為我國重要水產養殖產業，養殖方式主要分為三階段，第一階段為卵至白身，第二階段為白身至 2 吋魚苗，第三階段則為 2 吋魚苗至成魚，魚苗與稚魚的育成多為室內集約式養殖，之後則移至魚塢或海上箱網繼續繁殖，但由於地狹人稠，不論陸上魚塢或海上箱網，多半採取高密度飼養，因此造成石斑魚病害傳播情形相當嚴重。目前台灣石斑魚養殖的病毒性病害以神經壞死病毒 (nervous necrosis virus) 和虹彩病毒 (iridovirus) 為最嚴重，感染往往造成石斑魚苗大量死亡，也嚴重威脅台灣養殖產業 (Chi et al., 1997; Chi et al., 2001)，能否及早發現與解決魚病問題已成為台灣養殖漁業是否能永續發展的關鍵，而現

今常用之檢測方法或曠日廢時或無法早期檢測，造成防疫或檢疫的漏洞。因此開發出可做為池邊或防疫現場早期魚病原快速檢測的方法，以預防各種病原體感染（包含病毒與細菌）或減低各種病原體感染對於我國石斑魚種苗產業生產及輸出之衝擊與經濟損失，為一重要產業發展課題。

目前用以檢測石斑魚是否受到神經壞死病毒感染的方法有：以光學顯微鏡觀察魚的腦部、脊索或視網膜，但是不易觀察；利用電子顯微鏡、血清學方法及分子生物學方法偵測魚體內是否有病毒顆粒、病毒抗原或其核酸存在或是偵測魚血清或體液中是否有抗神經壞死病毒抗體存在，如以重組的病毒鞘蛋白進行 ELISA 檢測 (Husgag et al., 2001)；對病毒進行細胞培養，目前可用的細胞株有可適用於所有基因型病毒的 SSN-1 和可適用於石斑魚神經壞死病毒的 GF-1 (Chi et al., 1999)。最常用來檢測的方法是以免疫學方法偵測魚隻組織中是否有神經壞死病毒抗原存在 (Arimoto et al., 1992)；以及利用 RT-PCR 方法，針對神經壞死病毒的 RNA2 進行 RT-PCR，但是這些方法都有使用之侷限性與靈敏度的限制。

因此利用對於神經壞死病毒生物資訊的建構與瞭解 (陳與陳, 2006)，已經成功發展出螢光即時 PCR 檢測技術，其偵測極限可達到 190 病毒 copies，和傳統 RT-PCR 比較，其靈敏度高過十倍 (Kuo et al., 2011)。藉由此技術，能進行神經壞死病毒組織分布的定量，更進一步了解神經壞死病毒的相關資訊。另外也成功發展出即時病原檢測技術，藉由 PCR 和結合多重引子的方法，經由一次反應

即可同時檢測三種病原與一種石斑魚抗病毒蛋白 (歐, 2006)，並且自 2001 年開始學界也與中華民國水產種苗協會合作，協助種苗業者進行病毒檢測工作，收集台灣南部地區石斑魚種苗檢體，進行多病原的池畔田間病毒鑑定及檢測，以了解台灣石斑魚生長感染情況，作為防治參考。

對於我國水產種苗產業，疾病快速的檢測及確認對於進出口的檢疫工作扮演著重要的角色，因此良好的病原檢測系統，將可提供檢疫工作一大利器，而多病原檢測技術也可以與機電工程整合，因為微機電系統技術的發達，創造了微流體晶片的無限可能，微流體晶片的特點是將檢測程序所需利用的種種元件，都集中在同一晶片上製作，再藉由外加電壓所產生的電滲流，或利用微小化幫浦或離心力等方式，驅動樣品或試劑在各元件間相連的微管道中移動，以完成檢測 (歐, 2006)。這種一體成型的多功能晶片，也稱之為 lab-on-chip，「實驗室平台晶片」(Wang et al., 2011)。利用微流體方式整合實驗室系統於單一晶片為近年來極受重視的新型技術；其特別之處為把毛細管電泳技術結合至系統晶片上，提高其靈敏度與減少樣本之需求，而利用微流體晶片進行生物醫學檢測或分析具有降低人工操作的實驗誤差、提高系統穩定性、降低耗能及樣品用量、降低能力和節省時間等優點；在目前微流體晶片技術在生物醫學方面應用的主要領域包括基因表現分析、疾病診斷、藥物篩選、基因定序、蛋白質分析等相關應用。在過去的研究中也顯示，利用微流體晶片做聚合酶鏈鎖反應偵測基因表現 (陳等人，

2004) 或偵測病毒 (歐, 2006) 都具有高靈敏度。目前成功大學正在將多病原檢測技術進一步與整合型微流體晶片進行技術結合：以原來做病原檢測時所病原的專一引子對，結合整合型微流體晶片，開發可檢測神經壞死病毒 (GNNV)、虹彩病毒 (iridovirus)、弧菌 (*Vibrio* spp.)、與抗病毒蛋白 Mx 的石斑魚多病原微流體晶片。也因為整合型微流體之毛細管電泳是以雷射系統偵測產物，更可有效提高其靈敏度，提高偵測之極限約一般 RT-PCR 方法的靈敏十倍，因此可利用來做為早期檢測的工具，以及早做出因應。整合型微流體晶片由於體積小、可攜性高、便於池邊或防疫現場進行檢測之工作，實用價值極高，在結合應用之技術平台後更能產生快速及便利之平台，對於檢測技術之提升將具有極大助益，幫助水產養殖產更快速、有效地預防病原體的感染，進而降低產業之損失。

## 五、基因輔助育種－基因標誌分子檢測

石斑魚在孵育率上有極高的不穩定性，並且自卵孵化到吋苗的這段期間內，小魚又經常會受到神經壞死病毒的感染，而造成極高的死亡率，有時甚至高達 100%，造成養殖業者的極大損失。為迅速重建台灣成為亞太種苗中心，在環視整個石斑魚水產養殖產業結構，死亡率的控制及優質石斑魚種苗的獲得是養殖業亟待突破之瓶頸，若能利用分子基因指標進行品種篩選，篩選出石斑魚優質種魚，並以其作為基礎開發出具較佳抗

病力、孵育率或成長力 (Chen et al., 2006; Chen et al., 2007; Chen et al., 2008; Chen et al., 2010) 之石斑魚優質種苗，將是改善石斑魚種苗競爭力及發展石斑魚種苗產業中，開發關鍵技術維持世界第一的重要關鍵環節。

在許多模式生物基因體計畫完成後，建立了基因體學的相關技術，從基因體學的最新技術，配合基因體資訊的建立，所建構出的研究資訊，對於目標基因之尋找上提供了快速篩選的突破契機與快速捷徑。在日本、歐洲等先進國家在其冷水魚種之養殖已開始利用基因體分析及分子標誌進行品種篩選與防治疾病，如日本 Okamoto 教授團隊已成功利用分子標誌輔助育種技術成功於培育出抗病比目魚品系 (Okamoto et al., 2003)，因此基因體分析及分子標誌篩選技術如能應用於石斑魚類，不但可以有效減少抗生素的使用量，且能有效預防疾病，並提高生長發育效益。

目前台灣所養殖之暖水魚種，除環境與病原和寒帶國家有相當的差異外，其基因體資訊亦大為不同 (陳與陳, 2006)，為研發出適用於暖水魚種的分子標誌篩選技術，過去台灣投注相當心力，並已經在石斑魚分子基因標誌上獲得初步成果。未來希望將基因體分析及分子標誌篩選技術應用於優質石斑種魚與種苗的篩選上，以生產出優質石斑種苗及建立特殊功能品系。另一方面，為有效區分台灣石斑魚養殖族群，確保台灣自有品系，因此利用分子標誌建立石斑魚生物條碼技術來確保台灣優質石斑魚品系之優勢，進而建立品牌競爭優勢 (圖 4-1)，將是台灣力

爭成爲亞太種苗中心不可或缺的一環。希望能達到提供免疫成效之追蹤並可增進施用疫苗之成效，同時也可提供優質石斑種苗育成之選育標準，進而培育出具有較佳抗病或成長力之優良石斑魚品系，以長期且普遍性的解決與克服疾病所造成之危害。

目前石斑魚已經成功篩選出抗病力、成長力、與逆境功能標識 (Chen et al., 2006; Chen et al., 2007; Chen et al., 2008; Chen et al., 2010)，成功大學也開發完成石斑魚基因標誌多重檢測方法，並且也與廠商進行計畫合作，進行石斑種魚分子育種篩選工

作，將篩選出具特殊功能的種魚作爲基礎，以做爲未來開發出具較佳養成速度、較低飼料轉換率、較高抗病力、抗逆境、抗寒力等特質之優質石斑魚種苗品系，進一步長期且普遍性的解決石斑魚種苗的活存率問題，而這樣的基因標識技術對於進一步用於提升石斑魚優質種苗的生產及發展尖端石斑魚種苗產業，具有極大的助益，能提升台灣石斑魚種苗產業整體競爭優勢，進而建立台灣種苗品牌形象，以推動台灣成爲亞太種苗中心 (洪等人，2011)。

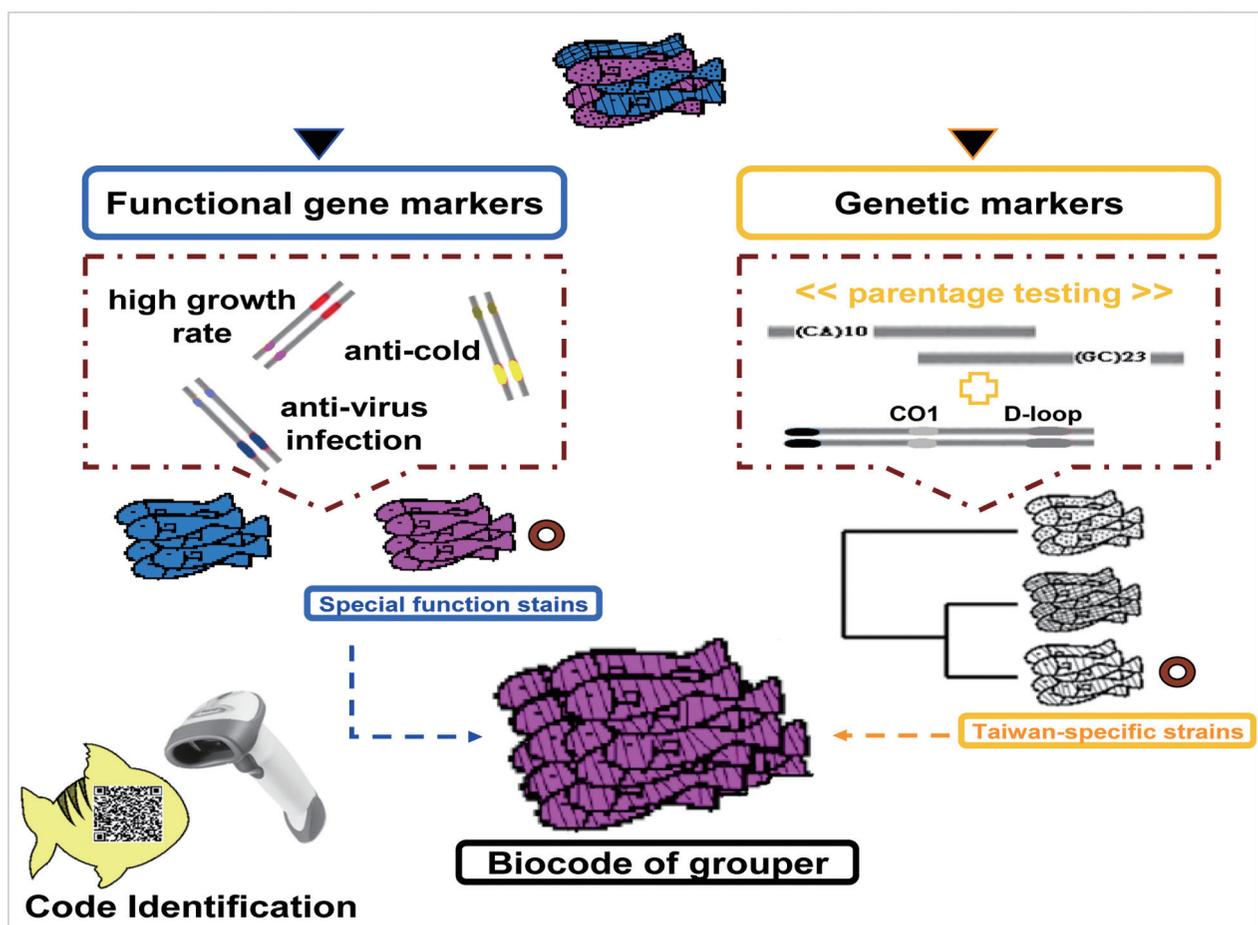


圖 4-1 分子標誌育種篩選石斑魚建立品系

利用基因體分析及分子標誌篩選技術，可篩選出優質石斑魚種魚與種苗，以生產出優質石斑魚種苗及建立特殊功能品系；也能利用分子標誌建立石斑魚生物條碼技術，有效區分台灣石斑魚養殖族群台灣自有品系，確保台灣優質石斑魚品系之優勢，進而建立品牌競爭優勢。

## 六、改進石斑魚養殖技術－提升石斑魚養殖效率

現今氣候變遷、世界人口成長、糧食作物轉作生質柴油，以及新世界或新興市場的需求等，主要作物價格不斷上漲，而可利用的糧食資源也漸趨短缺，提升單一面積生產量以及增加附加營養價值是世界糧食生產的重要趨勢。在漁業方面，石斑魚養殖技術的改進是養殖業有待突破的瓶頸之一，能如何增進魚隻的經濟價值也是長久以來漁民所想達到的目標。如果能藉由生物技術來養殖出優質石斑魚，提升台灣石斑魚產業競爭力，也是目前相當值得努力的方向。

目前也已找到了石斑魚中的和生長相關的基因－肌肉生長抑制基因 (Chen et al., 2007)，在其他物種上，當肌肉生長抑制基因失去功能時，無法扮演負向調控因子的角色，會造成肌肉倍增的表現型出現。如在新英格蘭醫學期刊中所發表的：在人類物種身上的首次案例，肌肉生長抑制基因功能喪失，導致這個小孩體型異常的壯碩，肌肉是同齡小孩的兩倍 (Schuelke et al., 2004)；也有學者利用 RNA 干擾技術在魚體上進行肌肉生長抑制基因降解，發現魚體有較大的表現型，細項觀測其體重及肌肉纖維的剖面分析，發現皆有增加的趨勢 (Acosta et al., 2005)，此降低內生性肌肉抑制基因之方法，不只可用於人類醫療，若應用於經濟魚種將可提高經濟魚種之養成效率。

目前在石斑魚上，利用免疫抑制技術 (圖 4-2)，藉由模仿抗原入侵細胞時啟動的免疫機制引起魚體的體液性免疫反應，

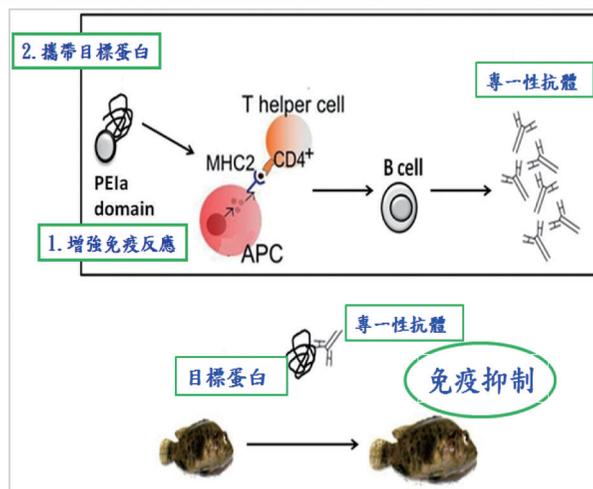


圖 4-2 免疫剔除技術可能誘發的機制圖

利用重組目標蛋白引起點帶石斑魚體內體液性免疫反應，產生高量專一性的抗體。專一性的抗體可與魚體內的內生性專一蛋白進行結合，使其喪失生理功能。

綠膿桿菌外毒素 A 可將與其融合之蛋白質經胞飲作用傳送至溶酶體中 (Chen et al., 1999)，該處為 MHC class II 分子與抗原進行結合的位置，巨噬細胞經過 MHC class II 分子於細胞表面呈現抗原標記，轉變為抗原呈現細胞，可刺激輔助 T 細胞形成，更進一步刺激 B 細胞活化產生免疫反應，促使魚體產生對抗內生性肌肉抑制蛋白之抗體，進而降低魚體內內生性之肌肉生長抑制蛋白的產生。研究中也已證明在石斑魚上，能夠促進魚肉生產量達到肌肉倍增效果 (圖 4-3) 並有較低的飼料轉換率 (簡，2007；陳，2009)；成功在石斑魚上建立一個具有較高生長力及較低成本花費的有力技術。另外脂肪也是魚類生長所必需的一類營養物質，在魚類生命代謝過程中參與多種生理功能，是魚類最佳的能量來源，在石斑魚上也已找出另一個與生長相關基因，並利用免疫抑制技術初步證實和脂肪生合成可能有關聯 (黃，2010)；因此若能利用此特性而達到調節魚

肉的脂肪含量，在養殖漁業上將會具有很高的應用價值。

免疫抑制平台技術除了可以有效縮短石斑魚養殖時間，使其儘早上市，藉以降低養殖期間的成本以及可能所面臨之風險外的優點（簡，2007；陳，2009；黃，2010）；此生物技術是從蛋白質的層次進行抑制，並非基因改造食物，在研發成飼料成分餵食石斑魚後，大眾在食用時也比較不會有安全上的疑慮，魚貨出口或上市也不會受到基因改造食物相關法規的諸多限制，對於提高石斑魚養殖效率指日可待。

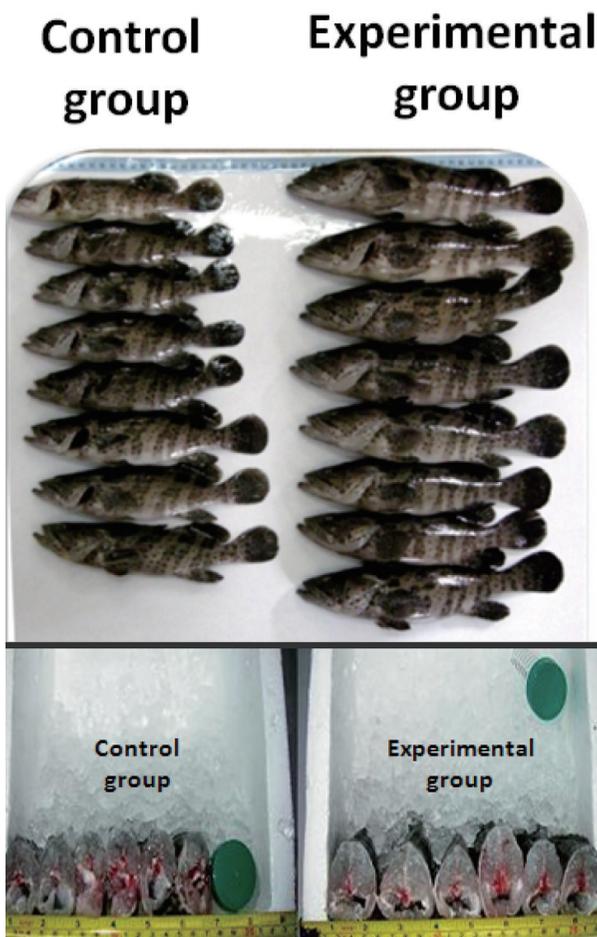


圖 4-3 石斑魚免疫抑制肌肉生長抑制基因後變化情形

在實驗組石斑魚上，具有肌肉倍增情形，可以加速養殖效率，在養殖漁業上具有很高的應用價值。

## 七、結語

食用石斑魚的國家有 50% 以上的是在亞洲，主要是中國、印尼和台灣（洪等人，2011）。亞洲人的飲食觀念中，活魚代表新鮮且品質佳，石斑魚是高等經濟價值的魚種且需求總是超過產出，若能藉由生物技術方法之利用，可以在未來檢測、養殖上有所突破與持續的發展，將可協助台灣石斑魚養殖產業「安全」及「優質」水產品的形象定位發展，建立強而有力的國際競爭優勢，達到石斑魚養殖產量倍增目標，並提升石斑魚種苗繁養殖的多樣性，以維持繁養殖技術世界第一，引導國際石斑魚養殖產業發展，倍增現有石斑魚產量，以取代海洋野生石斑魚供應市場，建立環保國家形象，達成亞太石斑魚種苗生產產業永續經營發展的終極目標，其價值非僅單純量化數字可以評估的。

## 八、參考文獻

1. 洪玉靖、黃劭凌、陳永茂、陳宗嶽 (2011) 石斑魚繁養殖倍增策略分析。水產種苗, 153: 5-24。
2. 莊蕙菁 (2005) 石斑魚神經壞死症病毒特性及檢測方法之研究。國立成功大學生物科技研究所碩士論文。
3. 莊蕙菁、歐明昌、陳永茂、粘茂偉、陳宗嶽 (2006) 利用生物技術克服病毒對石斑種苗生產的影響。優質種苗與水產養殖, 83-96。
4. 陳永茂、陳宗嶽 (2009) 石斑魚種苗養殖。台灣水產, 4(2): 12-17。
5. 陳宗嶽、陳永茂 (2006) 神經壞死病毒 (Nervous Necrosis Virus) 的生物資訊蒐集與利用。水產種苗, 100: 15-17。
6. 陳宛兒 (2009) 點帶石斑魚肌肉生長抑制基因之功能分析及分子調控。國立成功大學生物科技研究所碩士論文。
7. 黃意菱 (2010) 石斑魚活體內外之 SPARC 蛋白功能分析。國立成功大學生物科技研究所碩士

- 論文。
8. 楊玉婷、陳葦苧、陳政忻 (2009) 石斑魚產業概況及趨勢。農業生技產業季刊, 19: 24-29。
  9. 歐明昌 (2006) 石斑魚神經壞死病毒特性及檢測方法之研究。國立成功大學生物科技研究所碩士論文。
  10. 簡正修 (2007) 點帶石斑魚肌肉倍增基因功能分析與其基因啟動子之調節。國立成功大學生物科技研究所碩士論文。
  11. Acosta, J., Y. Carpio, I. Borroto, O. González and M. P. Estrada (2005) Myostatin gene silenced by RNAi show a zebrafish giant phenotype. *J. Biotechnol.*, 119: 324-331.
  12. Arimoto, M., K. Mushiake, Y. Mizuta, K. Muroga and I. Furusawa (1992) Detection of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Fish Pathol.*, 27: 191-195.
  13. Chen, T.Y., C. P. Lin, C. C. Loa, T. L. Chen, H. F. Shang, J. Hwang and C. F. Hui (1999) A Nontoxic *Pseudomonas* Exotoxin A Induces Active Immunity and Passively Protective Antibody against *Pseudomonas* Exotoxin A Intoxication. *J. Biomed. Sci.*, 6: 357-363.
  14. Chen, Y. M., C. E. Kuo, T. Y. Wang, P. S. Shie, W. C. Wang, S. L. Huang, T. J. Tsai., P. P. Chen, J. C. Chen and T. Y. Chen (2010) Cloning of an Orange-spotted Grouper *Epinephelus coioides* Heat Shock Protein 90AB (HSP90AB) and Characterization of Its Expression in Response to Nodavirus. *Fish Shellfish Immunol.*, 28: 895-904.
  15. Chen, Y. M., C. Y. Wei, C. H. Chien, H. W. Chang, S. I. Huang, H. L. Yang and T. Y. Chen (2007) Myostatin Gene Organization and Nodavirus-influenced Expression in Orange-spotted Grouper (*Epinephelus coioides*). *Comp. Biochem. Physiol. D, Genomics Proteomics*, 2: 215-227.
  16. Chen, Y. M., Y. L. Su, H. Y. Lin J, H. L. Yang and T. Y. Chen (2006) Cloning of an Orange-spotted Grouper (*Epinephelus coioides*) Mx cDNA and Characterisation of Its Expression in Response to Nodavirus. *Fish Shellfish Immunol.*, 20: 58-71.
  17. Chen, Y. M., Y. L. Su, P. S. Shie, H. Y. Lin J, H. L. Yang and T. Y. Chen (2008) Grouper Mx Confers Resistance to Nodavirus and Interacts with Coat Protein. *Dev. Comp. Immunol.*, 32: 825-836.
  18. Chi S. C., B. J. Lo and S. C. Lin (2001) Characterization of grouper nervous necrosis virus(GNNV). *J Fish Dis.*, 24: 3-13.
  19. Chi, S. C., C. F. Lo, P. S. Chang, S. E. Peng, G. H. Kou and S. N. Chen (1997) Mass mortality associated with viral nervous necrosis (VNN) in two species of hatchery-reared grouper, *Epinephelus fuscogutatus* and *Epinephelus akaara* (Temminck & Schlegel). *J Fish Dis.*, 20: 185-193.
  20. Husgag, S., S. Grotmol, B. K. Hjeltnes, O. M. Rodseth and E. Biering (2001) Immune response to a recombinant capsid protein of striped jack nervous necrosis virus in turbot *Scophthalmus maximus* and Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*, and evaluation of a vaccine against SJNNV. *Dis Aquat Organ.*, 45: 33-44.
  21. Kuo, H. C., T. Y. Wang, P. P. Chen, Y. M. Chen, H. C. Chuang and T. Y. Chen (2011) Real-time Quantitative Polymerase Chain Assay for Monitoring of Nervous Necrosis Virus Infection in Grouper Aquaculture. *J. Clin. Microbiol.*, 49: 1090-1096.
  22. Lien, K. Y., S. H. Lee, T. J. Tasi, T. Y. Chen and G. B. Lee (2009) A Microfluidic-based System Using Reverse Transcription Polymerase Chain Reactions for Rapid Detection of Aquaculture Diseases. *Microfluid. Nanafluid*, 7: 795-806.
  23. Munday, B. L., J. Kwang and N. Moody (2002) Betanodavirus infections of teleost fish: a review. *J Fish Dis.*, 25: 127-142.
  24. Ou, M. C., Y. M. Chen, M. F. Jeng, C. J. Chu, H. L. Yang and T. Y. Chen (2007) Identification of Critical Residues in Nervous Necrosis Virus B2 for dsRNA-binding and RNAi-inhibiting Activity through by Bioinformatic Analysis and Mutagenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 361: 634-640.
  25. Schuelke, M., K. R. Wagner, L. E. Stolz, C. HÜbner, T. Riebel, W. Kömen, T. Braun, F. T. James and S. J. Lee (2004) Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child. *N. Engl. J. Med.*, 350: 2682-2688.
  26. Wang, C. H., K. Y. Lien, T. Y. Wang, T. Y. Chen and G. B. Lee (2011) An Integrated Microfluidic Loop-mediated-isothermal-amplification System for Rapid Sample Pre-treatment and Detection of Viruses. *Biosen. Bioelectro.*, 26: 2045-2052.