

開發何氏棘鰍 RAPD 核苷酸指紋鑑定技術

黃家富、劉富光

淡水繁養殖研究中心竹北試驗場

台灣地處於亞熱帶，島內多山，造成河川短而急促，但仍擁有七十餘種之初級性淡水魚（純淡水生活魚類）。何氏棘鰍 (*S. hollandi*) 主要分布於台灣南部及東部之中大型溪流，如曾文溪、高屏溪、卑南溪、秀姑巒溪、花蓮溪等；該屬魚類具有廣溫、雜食性、個體大、生長快、肉質細嫩、無肌間細刺，是一種優良的新興養殖品種。何氏棘鰍目前被列為台灣特有種及稀少魚類。全球同屬之魚種共有 8 種，其中有些學者認為喀氏倒棘鰍 (*S. caldwelli*) 與何氏棘鰍為同種異名，故開發建立專一性極高之 RAPD 或微衛星 DNA 引子來證實，並作為種原及不同來源之快速鑑定；期能運用分子生物技術來建立台灣本土性及特有生物的核苷酸指紋基因庫，確立水產種原庫及建立種原之永續利用。

分子遺傳研究資料如同形態形質資料，是為一種資訊，而現今核苷酸指紋係由基因層次來檢定物種之多態性與親源關係，摒棄傳統分類之主觀因素，更符合族群自然分類要求。現行核苷酸指紋分析以(1)隨機擴增多形性 DNA(RAPD) (2)微衛星 DNA (Microsatellite DNA) (3) AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) 等方法。

而 RAPD 技術是 Williams et al.和 Welsh et al. 領導的兩個科研小組在 1990 年幾乎同時獨立創立的一種 DNA 多形性的檢測技術。它是建立在聚合酶連鎖反應 (PCR) 技術基礎上的 DNA 分析法，此技術原理係在無需取得相關的檢測 DNA 序列情況下，利用不同的隨機排列的 10 個鹼基 (bp) 寡核苷酸單鏈為隨機引子 (Random primer)，對研究生物的基因組 DNA 作模板 (Template) 進行 PCR 擴增反應，然後依 PCR 反應產物 (DNA 片段) 的多形性來進行遺傳分析。故短短的 10 年間裡已被廣泛應用於細菌及動、植物群體遺傳學、遺傳育種及生物系統分類與進化研究等諸多方面。因此本計畫擬應用客觀、迅速之 RAPD 核苷酸指紋分析方法，作為檢測分析。

本研究係利用 200 組商業化之 RAPD 引子來篩選適當引子，作為分析研究用。結果有 26 組 RAPD 引子在選定標準魚 DNA 上之隨機擴增 DNA 片段具重複性、專一性的模式，其寡核苷酸序列 G+C 含量分析均高於 60%，可作為何氏棘鰍的 RAPD 標記。對 24 種不同生物作比較，結果擴增產物為完全不相同之模式；其中 NAPS #416 與 #588 對何氏棘鰍產生獨特、唯一的標記 (unique marker)。

表 1 26 組隨機擴增 DNA 片段引子 (RAPD primer) 之核苷酸序列與聚合酶連鎖反應條件

Primer No.	Primer sequence	G+C content (%)	Annealing Temp. (°C)	dNTP conc. (mM)	Mg++ conc. (mM)	DNA conc. (ug/ul)
406	5'-GCC ACC TCC T	70	52	15	1.5	0.5
412	5'-TGC GCC GGT G	80	52			
416	5'-GTG TTT CCG G	60	50			
421	5'-ACG GCC CAC C	80	56			
425	5'-CGT CGG GCC T	80	56			

428	5'-GGC TGC GGT A	70	50
438	5'-AGA CGG CCG G	80	56
439	5'-GCC CCT TGA C	70	52
456	5'-GCG GAG GTC C	80	54
457	5'-CGA CGC CCT G	80	52
460	5'-ACT GAC CGG C	70	52
472	5'-AGG CGT GCA A	60	50
492	5'-GTG ACT GCT C	60	50
508	5'-CGG GGC GGA A	80	50
517	5'-GGT CGC AGC T	70	52
521	5'-CCG CCC CAC T	80	52
536	5'-GCC CCT CGT C	80	54
543	5'-CGC TTC GGG T	70	52
563	5'-CGC CGC TCC T	80	52
570	5'-GGC CGC TAA T	60	52
571	5'-GCG CGG CAC T	80	56
585	5'-CCC GCG AGT C	80	54
588	5'-CAG AGG TTG G	60	50
592	5'-GGG CGA GTG C	80	56
595	5'-GTC ACC GCG C	80	52
600	5'-GAA GAA CCG C	60	50

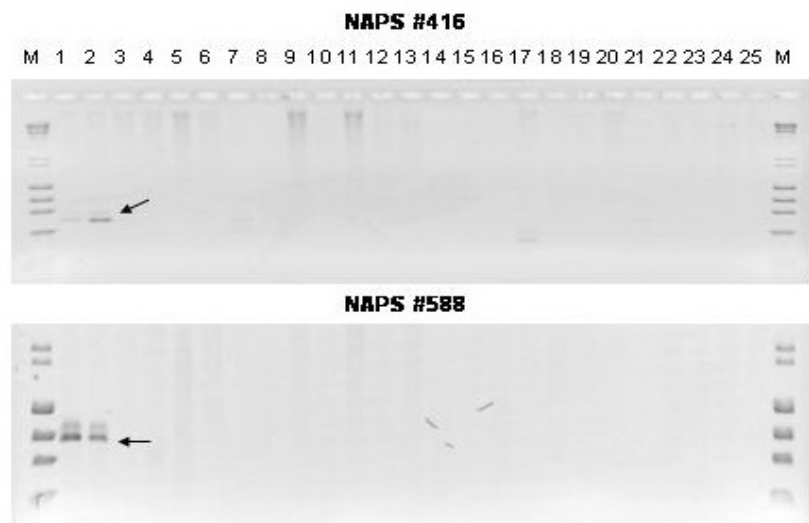


圖 1 RAPD 引子 NAPS#416 與 NAPS#588 對 24 種不同生物之隨機擴增 DNA 片段之多形性比較

M: marker (λ DNA/*Hind*III + ϕ X174 DNA/*Hae*III); 1.何氏棘鮃 (花蓮縣); 2.何氏棘鮃 (台東縣); 3.台灣鏟頰魚; 4.台灣馬口魚; 5.平頰鱚; 6.粗首鱚; 7.斑馬魚; 8.青鱗魚; 9.草魚; 10.紅鰱鮠; 11.鯽魚; 12.吳郭魚; 13.塘虱魚; 14.香魚; 15.白鰻; 16.黑鯛; 17.烏魚; 18.匙指蝦類; 19.澳洲螯蝦; 20.水中青蛙; 21.果蠅; 22.雞; 23.壁虎; 24.C57BL6J strain 老鼠; 25.WISPER strain 老鼠。1.4 % agarose gel。PCR 反應條件以 RAPD 引子的最適條件進行反應。