

何氏棘鯪微衛星 DNA 專一性特定序列位點(STS)之建立

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。何氏棘鯪 (*Spinibarbus hollandi*) 列為台灣特有種，經調查發現其已屬稀少魚類。何氏棘鯪原主要分布於台灣南部及東部之中大型溪流，如高屏溪、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。全球同屬之魚種共有 8 種，其中有些學者認為喀氏倒棘鯪 (*S. caldwelli*) 與何氏棘鯪為同種異名，故開發建立專一性極高之微衛星 DNA 引子來證實，並作為種原之鑑定；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。

過去的 20 年，魚類族群分析以同功異構酶 (isozyme) 為主，但其靈敏度 (sensitive) 較差，尤其對族群地理分布研究上，形成研究瓶頸。在真核生物基因序列中，含有許多隨機重複的序列組合 (tandemly repeated sequences)，稱之微衛星 DNA (microsatellite DNA)；它是由 2-6 個核苷酸重複形成，也可由不同形式的重複所組成，而微衛星 DNA 重複的次數被證明具有高度的變異性，可被用來作為族群多樣性與親緣關係等之研究。由全球生物資訊庫-

NCBI 或 EMBL 等發現，除人類、老鼠、斑馬魚外，其它生物如小麥、玉米、果蠅、蚊子等昆蟲，兔子、牛、馬、羊等哺乳動物、其它魚類等等的微衛星 DNA 研究資料，均逐日遽增，故微衛星 DNA 研究已成為族群研究重要的指標與技術。

本中心應用微衛星 DNA 作為核苷酸指紋鑑定研究；運用內切性限制酶將何氏棘鯪染色體 DNA 剪切，並與質體接合，再轉形到大腸桿菌 (*E. coli*) 中培養，成功地選殖到 2063 株白色 *E. coli* 菌株，運用點墨雜合 (dot blot) 檢定，結果僅 113 株可能具有微衛星 DNA 片段之菌株。再經南方氏雜合 (southern hybridization) 檢定分析，結果僅有 59 株具明顯的呈色反應，選取 35 株明顯呈色反應之菌株進行 DNA 序列分析；結果轉殖染色體 DNA 片段分子量約在 300-2045 bp，其轉殖成功率僅 2.81%。檢送 DNA 序列定序，獲得 20 組明顯的微衛星 DNA 序列。其中 microsatellite DNA 有 (GT)_n、(CT)_n、(CT)_n(GT)_n、(TAAA)_n、(GT)_n(AT)_n、(CG)_n(CA)_n(CG)_n、(TG)_nCA(TA)_n(TC)_n(TG)_n、(TC)_n(TG)_n、(CAA)_n(CA)_n(AT)_n 等多種形式；目前完成 17 組之最適條件之探討，建立種原專一性特定序列位點之開發，此工具可作為種原庫資訊與參考。

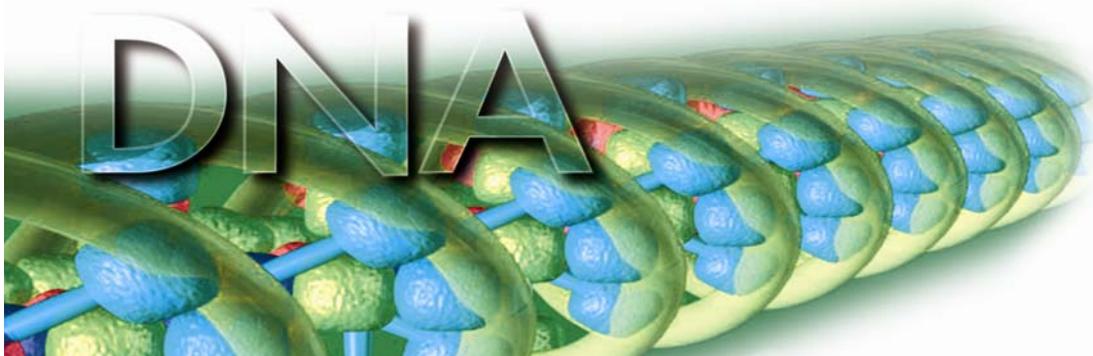


表 1 何氏棘鮃 (*Spinibarbus hollandi*) 17 組的微衛星 DNA 特定序列位點 (STS) 引子之核苷酸序列

基因座	微衛星型態	微衛星 DNA 特定序列位點之引子序列 (5'→3')	煉合反應溫度 (°C)
<i>Spd-4</i>	(CT)n(GT)n	F : ACAGGCAGAGGGCGATAGAGAG R : TAACTGCGGCGTTTGTAAGG	60
<i>Spd-5</i>	(GT)n	F : TATCACTGGGACACTGCTGA R : ATTAAGATGGCAACTGAGGC	58
<i>Spd-7</i>	(TAAA)n	F : CAATCTAAGTGGCTGAGGAG R : CAGCAGATGGGAAAGTAGTG	50
<i>Spd-8</i>	(GT)n	F : GTGTCTAAAGCCTGGTGC R : GACCCTAAAATAAAGTGTTACC	52
<i>Spd-11</i>	(CT)n	F : TCACCTTGCGATAATCCACA R : CTAAGCCCTTTACCTCAACC	50
<i>Spd-14</i>	(GT)n(AT)n	F : ATTGAGGGCAAGGAGTGAC R : AGATGCAGCCTTGATGAGC	60
<i>Spd-15</i>	(GT)n	F : ACTGGGACACTGCTGAAG R : TAAGATGGCAACTGAGGC	54
<i>Spd-17</i>	(CA)n	F : GTGTTGGGATAACCAGCAGT R : TGAATTTGTCCTCCACCTGA	54
<i>Spd-23</i>	(CT)n	F : CGGCCTAAAATTAGCATCTC R : GCCCTTTGGAAGTACAGTCT	46
<i>Spd-24</i>	(GT)n	F : GTATTGGGTAGGATGAGGGA R : GTTTGAAATGACACGAGGGT	50
<i>Spd-30</i>	(TG)n(TA)n	F : ATTGGTGGCTGACTAAATAC R : CATTCTTCCTGTTCTTCATA	54
<i>Spd-34</i>	(CA)n	F : ACTGCTGCACCAATGTTC R : CTGAGCGTCTGACTTCGT	58
<i>Spd-35</i>	(CG)n(CA)n(CG)n	F : GCTTCACCAGGATAAAGTAG R : GCAGGTTGAGATGGTAGG	56
<i>Spd-39</i>	(TG)nCA(TA) ₂ (TC)n(TG)n	F : CTCAATGTCTACGGTGGTTA R : CGTGGTAATGCCATAGTTAT	50
<i>Spd-42</i>	(TC)n(TG)n	F : AGAACATTTTCGGTTTGCC R : GAACGCATCTGATCGTGTA	54
<i>Spd-54</i>	(TG)n(AG)n	F : ACCCTACAGCGCACAGAG R : TTGGGTCCTGGATGTTGT	56
<i>Spd-56</i>	(CAA)n(CA)n(AT)n	F : AATATGAGGGCATCTGTG R : AAGGGTCTCAAGTCTGTT	50

F: 正向股 R: 反向股

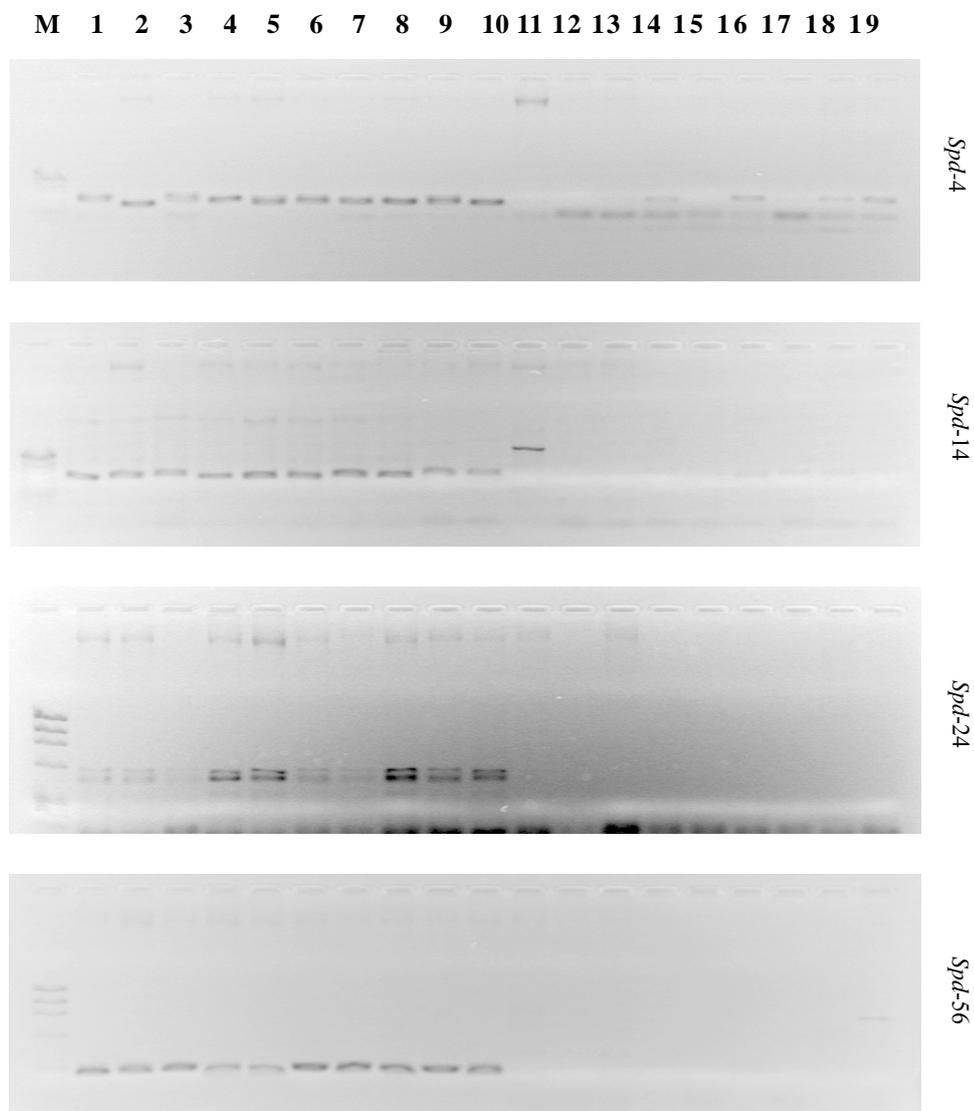


圖 1 微衛星 DNA 引子 *Spd-4*、*Spd-14*、*Spd-24* 和 *Spd-56* 對不同生物之 PCR 擴增片段的比較

M : marker

1-10 : 何氏棘鰍 (*Spinibarbus hollandi*) ; 11 : 草魚 (*Ctenopharyngodon idellus*) ; 12 : 台灣鯽魚 (*Carassius molitorella*) ; 13 : 吳郭魚 (*Oreochromis* spp.) ; 14 : 斑馬魚 (*Brachydanio rerio*) ; 15 : 青鱗魚 (*Oryzias latipes*) ; 16 : 澳洲螯蝦 (*Cherax quadricarinatus*) ; 17 : 水蚤 (*Daphnia* spp.) ; 18 : 雞 (*Gallus* spp.) ; 19 : 老鼠 (C57BL6J strain)

1.5% agarose gel。loading volume : 1-10 為 6 μL，11-19 為 12 μL。