

利用PCR-RFLP進行文蛤物種鑑別初探

謝淑秋、王俊堯、黃致中、葉信利

水產試驗所海水繁養殖研究中心

前言

簾蛤科 (Veneridae) 文蛤屬 (*Meretrix*) 貝類為我國重要的經濟性雙殼貝類，原產地主要分布於臺灣、中國、日本群島、南韓半島、東南亞及印度洋西岸，多棲息於泥沙底之淺灘、河口濕地及潮間帶等地區。臺灣文蛤養殖歷史悠久，曾有報導指出現存於淡水河之 *Meretrix lusoria* 並非臺灣原生種，而是1925年從日本引進至淡水河口海域放養，而散布至西南沿海各河口岸附近的半淡鹹水區，並逐漸成為我國西南沿海主要的貝類養殖物種，其中尤以彰化及雲林一帶最具規模 (Chen, 1990; 邵和邱, 2003)。*Meretrix* spp. 屬於經濟性食用貝類，早期研究多著重於文蛤養殖培育、環境污染及貝類毒性等，近年來因養殖環境日趨惡化，養殖品種種質衰退、抗逆能力下降，導致需耗費較長時間才能收

獲上市，且養殖期間 (尤其是3、6、9月) 容易發生大量死亡現象。為此，產官學界除了探討引起突發的大量死亡因素外，本所亦積極進行文蛤品系育種研究，希望能培育出生長快速、抗逆境性強之品系，以解決文蛤養殖問題。目前臺灣現存常見文蛤種類包括 *M. lusoria*、*M. meretrix*、*M. lamarckii* 及 *M. petechialis*、*M. lyrata*，為了產業的永續發展，必須先行鑑別品種，確立保種及育種的正確性。

遺傳分子生物學技術提供更科學且準確的判別方法，解決了 *Meretrix* spp. 物種在形態分類上的限制。分子標誌 (molecular marker) 系統包括：隨機增幅多型性 DNA (rapid amplification polymorphic DNA analysis, RAPD)、擴增片段長度多型性 (amplification fragment length polymorphism, AFLP)、限制片段長度多型性 (restriction

臺灣現存常見文蛤

學名	中名
<i>Meretrix lusoria</i> (Roeding, 1798)	文蛤、麗文蛤
<i>Meretrix meretrix</i> (Linnaeus, 1758)	臺灣文蛤
<i>Meretrix lamarckii</i> Deshayes, 1853	韓國文蛤、斧文蛤、拉馬克文蛤
<i>Meretrix petechialis</i> Lamarck, 1818	中華文蛤
<i>Meretrix lyrata</i> (Sowerby, 1851)	皺肋文蛤

註：資料整理自臺灣貝類資料庫

fragment length polymorphism, RFLP) 及聚合酶連鎖反應限制片段長度多型性 (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP) 等，廣泛地應用於貝類的遺傳結構與親緣關係之研究。

本試驗利用 PCR-RFLP 分子標誌技術，分析粒線體基因組中的 COI 基因片段，進行文蛤品種之鑑別，期能有助於文蛤保種育種及雜交品系之建立。

材料與方法

一、文蛤樣品採集

試驗用樣品包括本中心臺西試驗場培育之 *M. meretrix* 和 *M. lusoria* 及高雄蚵仔寮地區培育之 *M. lamarckii* (圖 1)。

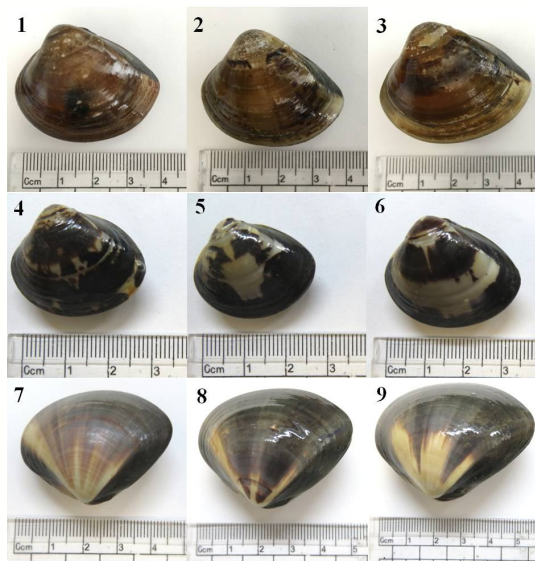


圖 1 採集之文蛤樣本 (1-3 : *M. meretrix*; 4-6 : *M. lusoria*; 7-9 : *M. lamarckii*)

二、DNA 萃取

剪取各樣本適量之斧足組織，使用全自動核酸萃取儀 (SLA-16, TANBead) 及核酸萃取試劑組 (TANBead® Nucleic Acid Extraction kit, Taiwan) 萃取 genomic DNA，以超微量分光光度計 (NanoDrop 2000, Thermo) 進行核酸濃度測定，確定其品質及 DNA 含量 (ng/μl)，保存於 -60℃ 冰箱。

三、PCR-RFLP 分析

(一) PCR

以聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 儀器 (Veriti™ 96 well Thermal cycler; Applied Biosystems)，增幅粒線體基因體組中 COI 基因片段 (約 700 bp)，每管反應物成分為：genomic DNA (100 ng)、10 μM primer Forward/Reverse 各 1 μl (Folmer et al., 1994)、Taq 2X Master mix RED (1.5 mM MgCl₂) 12.5 μl 及以二次滅菌水 (MQ H₂O) 補足反應總體積為 25 μl，增幅反應條件為：變性 (denaturation) 94℃、2 分鐘，接著進行 30 個循環的變性 94℃、30 秒、黏合 (annealing) 50℃、30 秒及延長 (extension) 72℃、1 分鐘，再以 72℃ 延長 7 分鐘，最後以 1.5% 瓊脂膠體於 100 V 電壓下進行電泳分析，確認 PCR 產物的片段大小且為單一產物，經純化後送至基龍米克斯生物科技進行定序動作，確認所選殖之基因。

(二) RFLP

選擇可判別 *M. meretrix*、*M. lusoria* 及 *M. lamarckii* 之限制酵素 (AseI 和 HicII) (Yamakawa & ImaiH, 2013)，利用限制酵素對不同物種 COI 基因片段所產生之截切位點及數量進行分析。酵素截切每管反應物為：PCR

產物 3–5 μl 、限制酵素 0.5 μl 、10 X buffer 2.5 μl 及以二次滅菌水 (MQ H_2O) 補足反應總體積為 25 μl ，置於 37°C 乾浴槽 1 小時後，取 15 μl 反應產物，以 1.5% 瓊脂膠體於 100 V 電壓下進行電泳分析。

結果與討論

將 PCR 成功增幅之 *M. meretrix*、*M. lusoria* 及 *M. lamarckii* 三種文蛤基因片段定序結果，與國家生物技術資訊中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 基因資料庫進行選殖基因核苷酸序列比對，確認 PCR 所增幅之片段為粒線體 DNA COI 基因，其片段大小分別為 *M. meretrix* 646 bp、*M. lusoria* 666 bp 及 *M. lamarckii* 686 bp (圖 2)；選擇 *AseI* 和 *HincII* 兩種限制酵素進行 COI 基因片段截切，均具一個限制酵素切位，在電泳膠片上呈現 2 條不同長度之亮帶 (圖 3 及圖 4)。其中，*M. lamarckii* 以 *HincII* 限制酵素截切後，具有兩個切點會產生三個片段，當中的一個片段小於 80 bp，因長度太短，於電泳膠片上所呈現之條帶亮度非常微弱，幾乎無法判別，即便如此，根據 *AseI* 和 *HincII* 兩種限制酵素截切經電泳分析所產生之切位及片段大小的差異，即可區分 *M. meretrix*、*M. lusoria* 及 *M. lamarckii* 三種文蛤。

本試驗利用 PCR-RFLP 分子標誌技術，初步分析粒線體基因組中的 COI 基因片段，經限制酵素截切，能簡易且快速的鑑別文蛤品種，期能有助於文蛤種原之管理和文蛤苗品種鑑別，以及未來文蛤保種育種及雜交品系之建立。

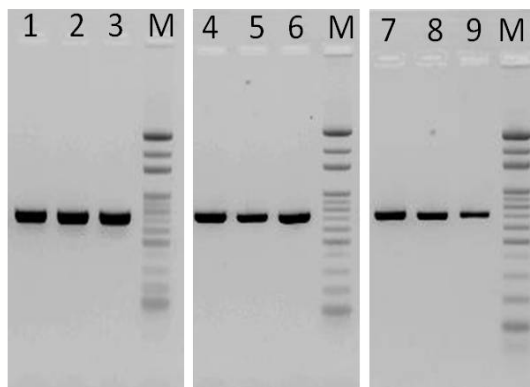


圖 2 COI 基因片段電泳圖 (1-3 : *M. meretrix*; 4-6 : *M. lusoria*; 7-9 : *M. lamarckii*; M : 100 bp DNA ladder marker)

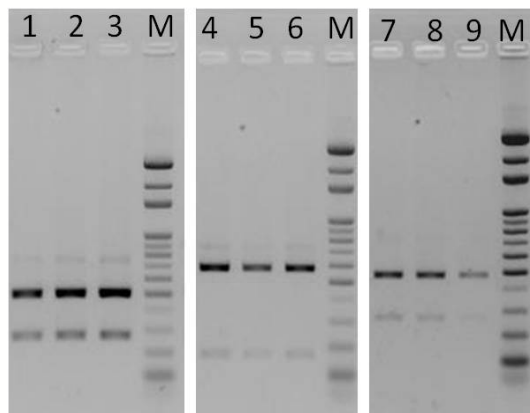


圖 3 COI 基因片段以 *AseI* 限制酵素截切之電泳圖 (1-3 : *M. meretrix*; 4-6 : *M. lusoria*; 7-9 : *M. lamarckii*; M : 100 bp DNA ladder marker)

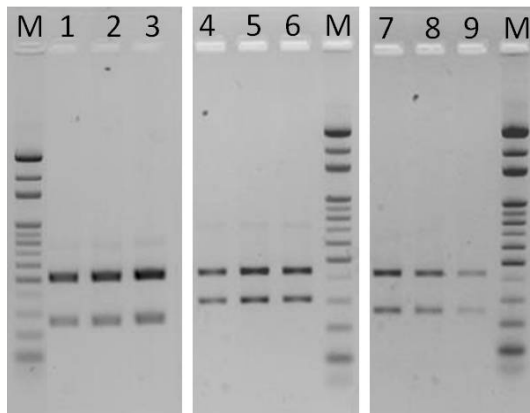


圖 4 COI 基因片段以 *HincII* 限制酵素截切之電泳圖 (1-3 : *M. meretrix*; 4-6 : *M. lusoria*; 7-9 : *M. lamarckii*; M : 100 bp DNA ladder marker)