

鑑定羅氏沼蝦雌雄個體之專一性標記

利淑如、葉怡均、蘇皇銘、林如謙、蘇義哲、吳豐成
水產試驗所東港生技研究中心



前言

羅氏沼蝦 (*Macrobrachium rosenbergii*) 是一種重要的十足目物種，在亞洲和西太平洋廣泛養殖 (Bonami and Widada, 2011)。在羅氏沼蝦中，因生長速率的兩態性，導致收穫時雄性和雌性體重顯著不同，其中性別之間的體重差異可能歸因於生理或行為特徵，其賦予了單性化養殖的顯著優勢 (姜等, 2019)，若能以全雄性養殖，進而可以產生更大的平均大小、產量和淨效益，而全雌性養殖能產生最高的平均活存率、均勻的生長、較低的飼料轉化率和羅氏沼蝦的適度生長 (Nair et al., 2006; Levy et al., 2017)。長期以來性別決定一直受到生物學研究領域科學家的廣泛關注，在雌性有兩條“異型”的性染色體 (Z/W)，此 W 染色體上會攜帶抑制雄性發育的基因，而雄性個體則是“同型”的性染色體組合 (Z/Z)，其性別由卵子中所帶有的性染色體來決定。性別決定的機制主要包括三種類型：環境性別決定 (environmental sex determination, ESD) (Morjan, 2003; Kato et al., 2011)、遺傳性別決定 (genetic sex determination, GSD) (Green et al., 2016) 和遺傳－環境性別決定 (genetic-environmental sex determination, GSD-ESD) (Baroiller et al., 1995; Deveson et al., 2017)。性別決定因子分

別影響了整個發育過程相關的轉錄 (transcription)、修飾 (modification)、剪切 (splicing)、轉譯 (translation) 而最後產生不同的蛋白，這些蛋白產物再調控而產生不同的表現性，由此而產生了生殖性別的差異。因此，了解性別決定的分子機制對於開發改進羅氏沼蝦性別操縱的新技術具有重要意義。

材料與方法

一、動物材料

羅氏沼蝦為購自屏東佳冬養殖戶，並選取成蝦階段的雄、雌性各 3 隻作為試驗材料 (圖 1)。

二、動物核酸萃取

從具有已知表型性別的雄、雌各 3 隻不同的羅氏沼蝦個體中提取基因組 DNA 用於驗證性別染色體特異性標記。取自泳足肌肉組織採取樣品約 20 mg 浸泡於含 200 μ l 酒精 (95%) 之 1.5 ml 微量離心管中，並保存於 -20°C 冷凍櫃中，待組織脫水後，再使用 GT100 genomic DNA mini kit (旭基科技公司, Geneaid) 萃取羅氏沼蝦基因體 DNA，其萃取的步驟依序為，使用研磨棒轉壓離心管將組織呈扁平碎狀，加入 200 μ l GT buffer 至離心管中，以研磨均質化樣品組織，後加入

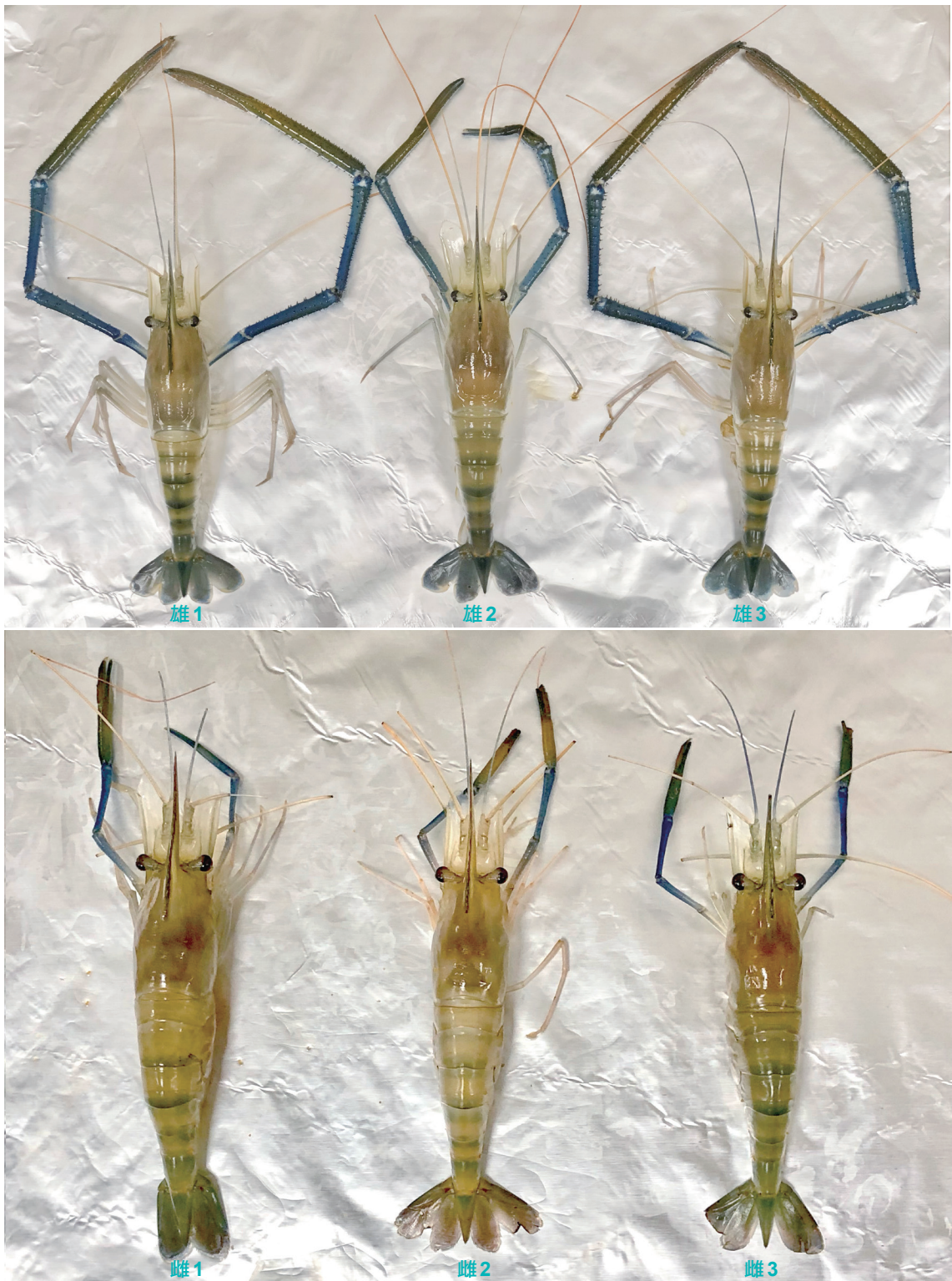


圖1 羅氏沼蝦之3隻雄性(上圖)和3隻雌性(下圖)個體

20 μ l 蛋白酶 K (proteinase K) 至樣本混合液中，劇烈搖晃並於 60°C 靜置 30 分鐘，加入 200 μ l GBT buffer 劇烈搖晃 5 秒，於 60°C 下靜置至少 20 分鐘，確保混合液呈現澄清狀態，接著加入 200 μ l 絕對酒精至混合液中，隨即劇烈搖晃 10 秒混勻後，將混合液轉至 GS column，並於 15,000 $\times$ g 離心 2 分鐘，再將 400 μ l W1 buffer 加入 GS column，於 15,000 $\times$ g 離心 30 秒後移除下清液，將 600 μ l Wash buffer 加入 GS column，於 15,000 $\times$ g 離心 30 秒移除下清液，空轉於 15,000 $\times$ g 離心 3 分鐘使其乾燥，將 GS column 移置乾淨的 1.5 ml 微量離心管，並加入 100 μ l 預熱 60°C 後的 elution buffer，靜置至少 5 分鐘，確保 elution buffer 被完全吸收，於 15,000 $\times$ g 離心 30 秒，溶析出核酸 DNA，並將 DNA 儲存於 -20°C 中備用。

三、引子來源與聚合酶連鎖反應

根據 Liu 等 (2022) 所設計鑑別羅氏沼蝦之雌雄染色體特異性標記引子 (圖 2) 為 ZW-F: CAGGTGGTGACAAATCAGAAG; ZW-R: AGACATCCCTTGGCTGTTG。W 染色體特異性標記引子 W-F: GATTTTGCCATCCCAGTTGC; W-R: GACCCTGATGCCAAAGTCCA。Z 染色體特異性標記引子為 Z-F: CGGACTTTAGCATCAGGGTA; Z-R: AATGAATTTGCTTTCCACTATT。聚合酶連鎖反應的每個樣品總體積為 25 μ l，內含有 0.5 μ l DNA 模板 (10 ng/ μ l)、12.5 μ l 2X Thermo Hot Starr PCR (伯昂公司, JMR-THS5)、每種引物 1 μ l (10 μ M/L) 和 10 μ l 無菌蒸餾水，樣品經混合後於 GeneAmp PCR System 9700

(Applied Biosystem, USA) 進行 DNA 複製，其聚合酶連鎖反應步驟依序為：94°C 反應 10 分鐘，接著以 94°C 反應 30 秒、60°C 反應 30 秒及 72°C 反應 30 秒，將上述三步驟重覆 35 個循環，最後以 72°C 反應 10 分鐘，接續將核酸產物利用 1.5% 電泳膠體分析，並將膠體置入照膠系統照相得到片段大小。

結果和討論

姜等 (2019) 提到，羅氏沼蝦在外觀生長性能方面出現性別兩態性，也就是在同齡雌、雄蝦生長速度和個體的大小相差甚遠，即在同等養殖條件下，雌蝦生長速度較雄蝦慢 50—70%，性成熟後的雄蝦個體平均體重約是雌蝦的 2 倍 (俞, 2013)，導致羅氏沼蝦在大量生產時受到限制，因此，若能使用性別控制技術建立羅氏沼蝦單性化育苗，培育全雄/全雌羅氏沼蝦，繼而能提高養殖收穫產量。

達成羅氏沼蝦單性化養殖的前提，相對要明確找到性別決定和性別分化的分子機制及其關鍵基因，其單性化養殖發展現狀，認為全雄/全雌羅氏沼蝦育種的關鍵技術是偽雌 (ZW 為雄性) 或超雌蝦 (WW 雌性) 製備。過去的標記只能放大雌性的 W 染色體特異性片段 (Jiang & Qiu, 2013; Ventura et al., 2011)，由本研究以已知表型之羅氏沼蝦雄、雌性各 3 隻個體，參照 Liu 等 (2022) 方法利用 Z/W 染色體特異性標記引子來識別並進行檢測，結果表示能夠擴增 W 和 Z 染色體特異性片段，在 3 隻雌性個體中產生了一條短的雌性特異性 655-bp 條帶 (female-W) 和一條

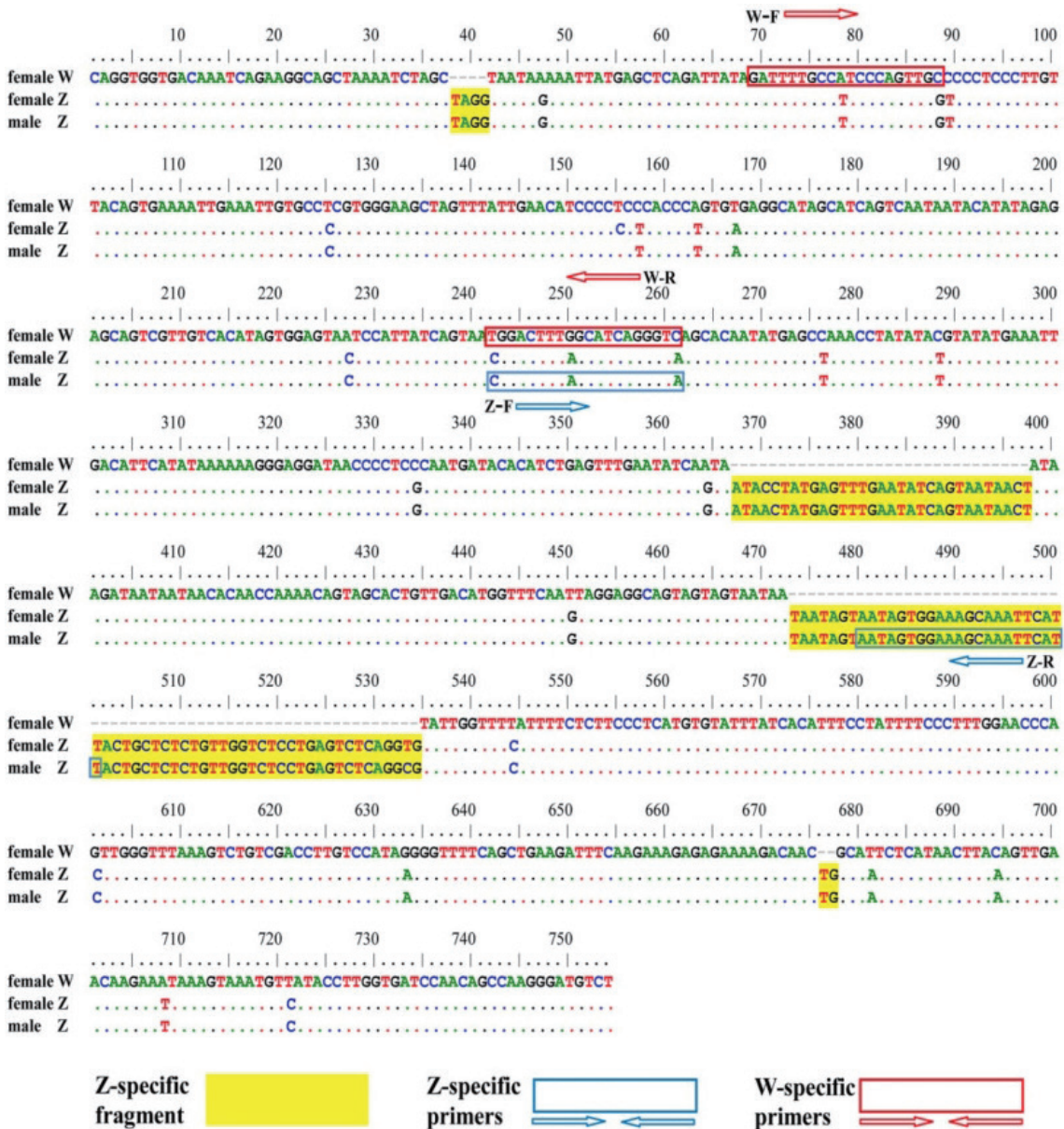


圖 2 羅氏沼蝦雌性 W、雌性 Z 和雄性 Z 之核苷酸序列 (Liu et al., 2022)

長的雄、雌共有的 754-bp 條帶 (female-Z)，而 3 隻雄性個體只產生一條長的 754-bp 條帶 (male-Z) (圖 3)；使用 W 染色體特異性標記和 Z 染色體特異性標記來鑑別雄、雌染色體特異性片段，W 染色體特異性標記在 192-bp

片段可以在雌性中擴增，而雄性中未檢測到條帶；Z 染色體特異性標記在雄、雌中皆可檢測到 259-bp 片段 (圖 4)，因此，Z/W 染色體特異性標記可以在沒有內源性參照基因 (如 β -actin, GAPDH, 18s-rRNA 等) 的情況下

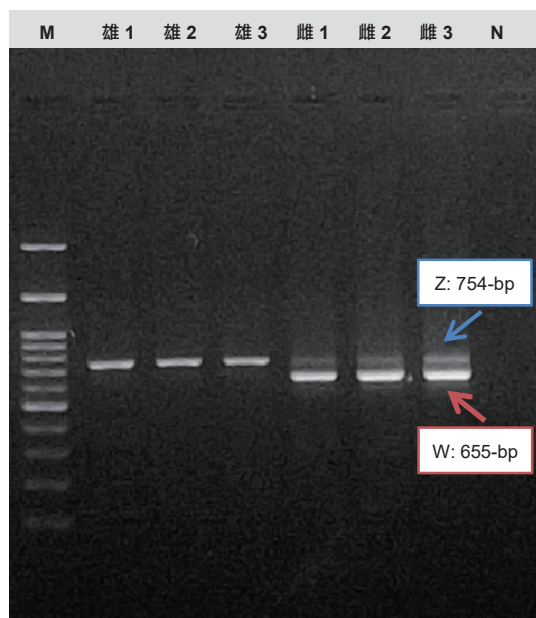


圖 3 使用 ZW 性別特異性標記對佳冬 F₁ 羅氏沼蝦之各 3 隻雄性、3 隻雌性個體進行聚合酶連鎖反應 (M = DNA marker; N = negative control)

更準確地識別性別。此外，儘管來自不同個體的 Z/W 序列可能因幾個突變鹼基而不同，

但 Z 和 W 染色體片段中存在許多單核苷酸多態性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 位點。SNP 可以發生在基因編碼區、基因非編碼區和基因間區等任何位置，會使生物物種之間染色體基因組的產生生物多樣性，造成物種間的個體差異。

結語

開發性別分化和性別決定相關基因研究是實現羅氏沼蝦單性化養殖及提高其產量的前提工作，而這些 Z/W 染色體特異性標記將可用於鑑定羅氏沼蝦的性染色體，闡明性別決定和分化的機制，未來擬進一步進行 SNP 位點基因型與重要經濟性狀之關聯分析，評估產業應用之可行性。此外，將有助於促進羅氏沼蝦性別控制技術的進一步發展，並大幅提升羅氏沼蝦水產養殖產業的經濟效益。

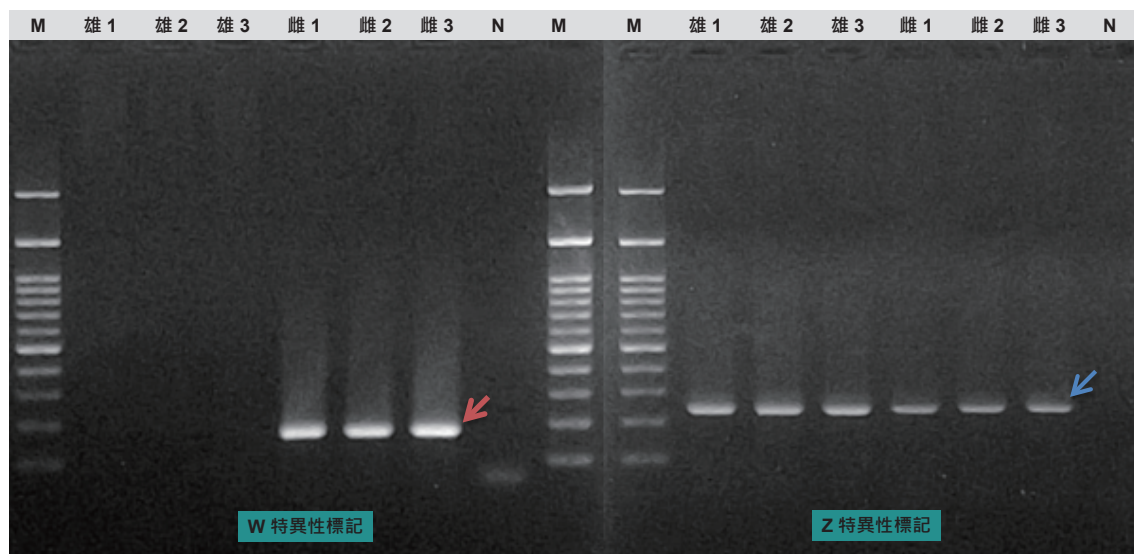


圖 4 使用 W 特異性標記和 Z 特異性標記來鑑別雄 1-3、雌 1-3 染色體特異性片段 (W 特異性標記在 192-bp 片段可以在雌性中擴增，而雄性中未檢測到條帶；Z 特異性標記在雄、雌中皆可檢測到 259-bp 片段，M = DNA marker; N = negative control)