

以基因體辨別

有毒魚種



加工製品會因加工或加熱導致外觀特徵的去除，使原料物種的判別變得困難，這一困擾可利用基因體辨識來解決。

■謝承紘 黃登福

鑑別物種的方法，早期是以骨骼學、肌肉學、歧支分類學、生活史特徵，甚至鱗特徵、鱗片、腸形等來區分魚種的親緣關係。隨著生物科技的進步，蛋白質及基因技術已廣泛應用在分類學的研究上，準確性也受到高度肯定。

鑑別物種的方法

棲息在水中的動物物種甚多，其中鑑定有毒的也不少。把這些有毒的水中動物記錄分類，對確保民眾的安全有正面效果，一旦中毒，也可以快速提供正確的魚種和致毒物質，對治療很有幫助。鑑別物種的方法，早期是以骨骼學、肌肉學、歧支

分類學、生活史特徵，甚至鱗特徵、鱗片、腸形等來區分魚種的親緣關係。隨著生物科技的進步，蛋白質及基因技術已廣泛應用在分類學的研究上，準確性也受到高度肯定。

蛋白質分類技術有硫酸十二酯鈉－聚丙稀醯胺凝膠電泳法、二維電泳法等。至於基因分類方法，有聚合酶連鎖反應－隨機放大多型性核苷酸法、直接定序分析比對法、聚合酶連鎖反應－限制片段長度多型性法等，都經常使用於新物種種別的鑑定。

加工製品會因加工或加熱導致外觀特徵的去除，使原料物種的判別變得困難，這一



圖片來源：洪培盛

加工製品原料物種的鑑別，目前已可藉由基因體辨識來完成。

困擾可利用基因體辨識來解決。因為核酸在加熱過程中會發生裂解，但利用瓊脂凝膠電泳法分析裂解後核酸圖譜和種別特異性引子 (primer) 的增幅作用，以增幅極短基因片段，這方法在原料魚種鑑別上甚為普遍。

基因體的遺傳性質

大家也許都聽過「基因」這個名詞，它是遺傳特徵的基本單位。基因是由核苷酸構成的，而基因裡更蘊含著建構生物個體的遺傳訊息。就如電腦以「0」與「1」做為機器語言的密碼，在生物世界裡，是以A、T、G、C這4個英文字母的密碼，把遺傳訊息儲存在長鏈的核苷酸分子裡。然後，細胞再透過「轉譯機器」根據A、T、G、C的遺傳密碼製造出特定結構的蛋白質，以便執行複雜的生理功能。

當細胞進行分裂繁殖時，會把這套密碼忠實地複製一份，分別藏到子代細胞裡，而可以繼續執行任務。決定核苷酸裡遺傳訊息的密碼，就這樣一代一代地保留下來。

近年來由於基因技術的快速發展，許多分類學家不斷嘗試應用這種新穎技術於物種的分辨上。由聚合酶連鎖反應—隨機放大多型性核苷酸法、直接定序分析比對法，進而到目前最普遍使用的聚合酶連鎖反應—限制片段長度多型性法，分析方式由複雜逐漸趨於簡單化、快速化，也使得基因技術在物種的分類上有更重要的貢獻。同時也創造出另一項應用，即食品原料物種的鑑定。

原先以傳統方法鑑定經加工後的魚肉製品有許多困難，學者就藉由「粒線體核苷酸」的基因密碼分析其序列差異，以了解原料物種的來源，因此建立了一套物種鑑定的新方法。

基因是由核苷酸構成的。建構生物個體遺傳訊息的密碼，就儲存在長鏈的核苷酸分子裡。當細胞進行分裂繁殖時，會把這套密碼忠實地複製一份，分別藏到子代細胞裡，繼續執行任務。決定核苷酸裡遺傳訊息的密碼，就這樣一代一代地保留下來。



克氏兔頭鮠

懷氏兔頭鮠

月尾兔頭鮠

香魚片的主要原料是無毒魚種的克氏兔頭鮠（或稱黑鯖河鮠）及懷氏兔頭鮠（或稱白鯖河鮠），但這兩種河鮠易與劇毒魚種月尾兔頭鮠（或稱栗色河鮠、毒鯖河鮠）混淆，選別時不得不慎重。其次，河鮠毒的毒性通常以肝臟、卵巢等內臟器官較強，若處理魚肉時造成內臟污染或解凍不良時，都會造成魚肉片含有劇毒的河鮠毒。



原先以傳統方法鑑定經加工後的魚肉製品有許多困難，學者就藉由「粒線體核苷酸」的基因密碼分析其序列差異，以了解原料物種的來源，因此建立了一套物種鑑定的新方法。

擴增部分基因體辨別物種

聚合酶連鎖反應（polymerase chain reaction, PCR）是現在分子生物領域中最廣泛使用的基本技術。PCR的理論於1970年代提出，但是當時基因定序技術尚未建立，因此這項構想很快就被遺忘了。15年後，再次被人提出，這次科學家把它實際化，並正式命名它。

PCR是利用少量的核苷酸原料在體外大量增幅，其數量可達 2^n 倍。這項技術對於刑事案件證物的鑑定、生物多樣性、稀有動物的保育，以及物種的分析和鑑定有很大的幫助。因為在刑事現場或生物身上只能採集到微量的核苷酸樣本，如頭髮、體液等，但利用PCR放大就很容易進行下一步的分析、定序等鑑定步驟。

要進行PCR之前，必須知道待增幅區域兩端的序列，以設計一對引子。PCR可分做3個步驟。第一步是變性，以加熱的方式把含有標的片段（也就是想做增幅的區域）的DNA模板雙股核苷酸分開，一般要把雙股核苷酸完全分開須加熱至攝氏95度。

第二步是引子黏合。這階段要降低溫度，使引子能黏合至單股模板核苷酸的互補序列上。由於每一種引子和模板核苷酸黏合所需的溫度不同，而且有許多因素會影響PCR的結果，因此須先測試出一個信號最強、雜訊最少的黏合溫度，一般大約是攝氏五、六十度。

第三步是延展或稱聚合作用。核苷酸聚合酶可從引子3'端進行聚合反應，合成新的雙股核苷酸，一般核苷酸聚合酶的最佳反應溫度（也就是延展溫度）是攝氏72度。

以這3個步驟為一個循環，接下來再重複這3個步驟進行另一個循環，一般一個PCR要執行25至30個循環。這增幅方式是以等比級數增加片段的數量，因此理論上只需要進行25個循環，產生的標的片段核苷酸就可達原來的 2^{25} 倍。

實際案例

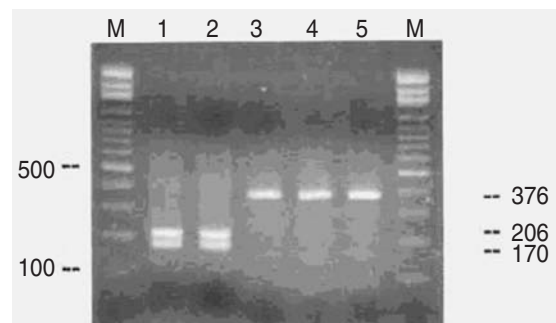
衛生署、漁業署長期以來就以各類宣導方式，加強加工業者和民眾對於河魴魚種的辨識能力及正確的使用方式，但誤食、誤用或濫用有毒河魴魚種做為香魚片原料的情形仍時有所聞，也經常造成嚴重中毒的悲劇。

2000年1月，彰化5名民眾食用不明魚種的魚湯後，出現嘴部麻木、四肢麻痺、昏迷、嘔吐、呼吸困難等疑似河魴毒中毒的症狀。其中兩人情況較嚴重，經治療1周後才康復，其檢體證實含有河魴毒。同年次月，另5名民眾食用香魚片後出現疑似中毒症狀，其殘餘檢體也含有河魴毒。2001年4月，高雄一名民眾食用烏魚子後出現疑似河魴毒中毒症狀，經送醫治療約1周後才康復，殘餘烏魚子檢體經檢測含有河魴毒。

上述3件中中毒案例，都曾利用粒線體部分細胞色素b基因的序列分析及限制酶切位鑑定其魚種。

在2000年1月的案例中，烹煮過的檢體經粗萃核苷酸後，利用設計好的引子組增幅部分細胞色素b基因序列並定序，與衛生局提供疑似遭誤食的草河魴新鮮魚肉比對，顯示烹煮過殘餘的河魴肝檢體與衛生局提供草河魴的部分細胞色素b基因序列完全相同，而與虎河魴（無毒）、瀧紋河魴（含猛毒）及毒鯖河魴（含猛毒）的序列呈現明顯的差異。

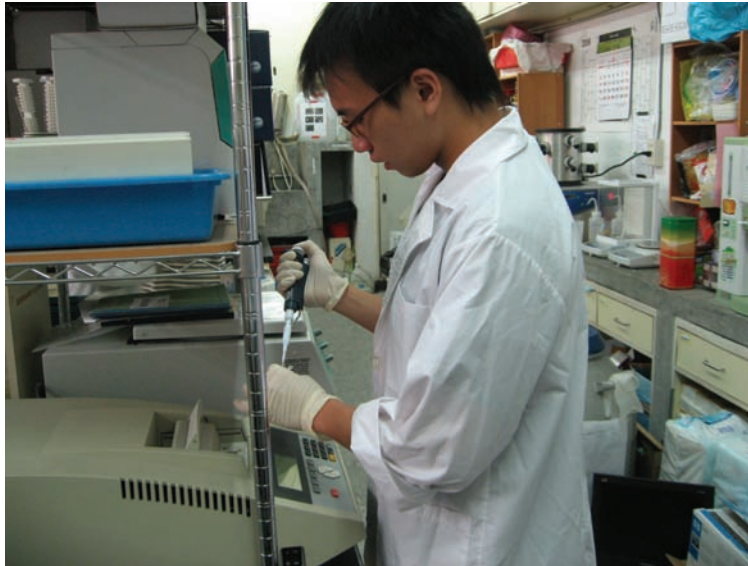
另以限制酶（具專一性，可以辨認特定位置）分解中毒案例殘餘檢體與草河魴的增幅DNA，都呈現同樣限制切位，產生兩片段247個鹼基對和129個鹼基對，因此



肌肉樣品的PCR膠片圖，M—分子量標準品、1—香魚片、2—草河魴肌肉、3—虎河魴肌肉、4—瀧紋河魴肌肉及5—毒鯖河魴肌肉。

聚合酶連鎖反應（PCR）是利用少量的核苷酸原料在體外大量增幅，由於在刑事現場或生物身上通常只能採集到微量的核苷酸樣本，如頭髮、體液等，利用 PCR 放大就很容易進行下一步的分析、定序等鑑定步驟。

以基因體辨別有毒魚種，可提供非常準確的科學證據。隨著科技的進步，鑑定的方法也會越趨純熟、簡單及快速。



證實彰化民眾誤食的魚種確實是含河魴毒的草河魴。

第2個中毒案例的殘餘香魚片，以同一組引子組增幅殘餘檢體中部分376個鹼基對的細胞色素*b*基因序列後，顯示中毒殘餘香魚片的序列與毒鯖河魴的完全相同。再經由限制酶確認後，證實其原料

魚種是毒鯖河魴，具同樣限制切位，而與虎河魴、瀧紋河魴及草河魴有所差異。

第3個中毒案例中的殘餘檢體，經與毒鯖河魴、黑鯖河魴、白鯖河魴、草河魴、虎河魴和瀧紋河魴的部分細胞色素*b*基因比對，顯示殘餘假烏魚子檢體的序列與毒鯖河魴的完全相同，而與其他5種河魴的序列呈現明顯差異。且經由限制酶確認後，證實假烏魚子的原料實際上是毒鯖河魴。

烏魚子的加工一般都是反覆加鹽日曬，然而反覆地加鹽容易造成檢測時核苷酸萃取的困難。所幸這次中毒檢體假烏魚子加熱處理可能較少，其核苷酸仍有少量完整，且大部分核苷酸片段大於300個鹼基對，因此順利證實它是毒鯖河魴的魚卵。

以基因體辨別有毒魚種，確實可提供非常準確的科學證據。隨著科技的進步，鑑定的方法也會越趨純熟、簡單及快速。只要基礎基因圖譜的數據資料建立完備，未來可能走向更快速的生物晶片分析，這種技術會是下一階段鑑定技術的主流。 □

謝承紘

亞洲大學保健營養生技學系

黃登福

台灣海洋大學食品科學系