

# 鱈屬魚類Real-time PCR快速鑑別檢驗方法之建立

關 嶸 張源鑫 黃昱裴 崔秀煒 林澤揚 王博譽 曾素香 王德原

食品藥物管理署研究檢驗組

## 摘 要

水產品經切片或加工後辨識不易，易發生業者以低價魚種混充高價魚賺取價差之詐欺事件，為解決水產品容易誤判之現象，本研究著重於鱈屬(*Gadus spp.*)魚種鑑別檢驗，包括大西洋鱈(*Gadus morhua*)、太平洋鱈(*Gadus macrocephalus*)、格陵蘭鱈(*Gadus ogac*)、黃線狹鱈(*Gadus chalcogramma*)開發分子生物快速檢驗方法。以魚類粒線體cytochrome b基因經過多重序列比對，建立專一性引子對及探針，並以即時聚合酶連鎖反應(real-time PCR)進行特異性及靈敏度測試，與120個台灣市售魚種進行測試，確認本方法對鱈屬魚種具有專一性，針對不同濃度的鱈屬魚肉DNA，本方法靈敏度可達1 pg DNA，相較於透過比對PCR產物序列的生物條碼鑑種方法，本方法單次反應可檢驗4個鱈屬物種，包含DNA萃取與real-time PCR鑑定過程可於4天內完成，本研究開發之鱈屬快速鑑別檢驗方法，可實際應用於鱈屬魚類產品之快速檢驗，維護民眾權益，為國人消費飲食把關。

**關鍵詞：**鱈屬、魚類物種鑑定、即時PCR

## 前 言

根據歐盟2013年的調查，易造假食物中魚類排行第二<sup>(1)(2)</sup>。另外根據美國海洋保護組織(OCENA)於2016年在全球55個國家的市場調查，於25000個市售檢體中超過20%水產品標示不實，這些標示不實水產品中有58 %對消費者有健康上的風險<sup>(3-4)</sup>。水產品為了保存需要先經過工廠加工，消費者購買時魚已經被切成魚片，或是製作成加工品，例如魚排、魚丸、魚鬆等，消費者很難藉由口感、色澤來分辨吃到的魚種，在美國及加拿大曾發生部分廠商以吳郭魚冒充石斑魚做成魚片販售<sup>(5)</sup>，台灣也曾發生以淡水鯰魚當作魴魚販賣<sup>(6)</sup>、以比目魚混充鱈魚販售之水產品攙偽事件<sup>(7)</sup>。

鱈魚(Cod)在生物學上是鱈屬(*Gadus spp.*)的通稱，鱈屬又被稱為真鱈魚“true cod”，鱈屬共有4個物種，包括大西洋鱈(*Gadus morhua*)、太平洋鱈(*Gadus macrocephalus*)、格陵蘭鱈(*Gadus ogac*)、黃線狹鱈(*Gadus chalcogrammus*)<sup>(9)</sup>，在歐洲，大西洋鱈非常普遍且在商業上占重要角色，其食用的歷史已經超過一千年，大西洋鱈肉白且魚腥味淡，魚肉脂肪含量低，研究顯示長期食用鱈魚可降低心血管疾病之風險，因鱈魚肉含有高量omega-3 fatty acids、EPA及DHA，一週食用兩次鱈魚可有效降低體內三酸甘油酯含量，並可抑制阿茲海默症的發生<sup>(10)</sup>。隨著鱈屬魚種產量下降以及捕撈數量限額導致價格攀升，鱈魚(cod)這個名詞的定義含糊，分類學認定鱈魚

定義為鱈屬(*Gadus* spp.)、國際商業上認定鱈魚定義為鱈形目，各國尚無一致的認定標準，分類學定義的鱈屬與目前國際商業上定義的鱈形目差別甚大，近年市面上開始出現以鱈型目之外口感相近的物種代替鱈魚的現象，比如鰈形目(Pleuronectiformes)之馬舌鰈、鱸形目(Perciformes)之油魚，同樣標示鱈魚販賣，民國104年本署即曾查獲以低眼巨鯰製作鱈魚排之攙偽事件<sup>(11)</sup>。同樣情況在中國亦同，根據Xiong等學者在2015年於上海及南京的市面上進行市調，有57.7 %標示鱈魚的物種並非鱈形目之魚種<sup>(12)</sup>，其中包括鱸形目、鰈形目、甚至是有部分物種含有劇毒的鮰形目也被當作鱈魚販賣。鑒於市面上對於鱈魚標示上的不一致，105年7月本署公佈自106年起，鱈形目之物種方得標示為「鱈魚」<sup>(13)</sup>，而非屬鱈魚物種之「圓鰈、扁鰈」最易被誤標示，應標示其通俗名稱或與魚種名稱併列標示，鰈形目物種包括庸鰈、狹鱗庸鰈、馬舌鰈等物種應標示扁鰈(大比目魚)，鱸形目物種的小鱗犬牙南極魚及鱸頭犬牙南極魚應標示圓鰈(智利海鱸)，使消費者能正確選購。

一般而言，區分魚種大多由外觀的特徵來判斷，分類上以骨骼學、肌肉學、分類學、生活史特徵，或以鰭、鱗片、腸道結構的特徵來達到魚種之區分。但此方法常導致以不同分類法分類卻產生不同結果，且應用於魚加工品判別魚種時，隨著加工過程外部特徵的消失，需要使用進一步的方法透過遺傳物質DNA來達到鑑別<sup>(14-16)</sup>。本研究以cytochrome b 基因片段來鑑定魚種，其為粒線體DNA上的一個基因，長約1.2Kb，其為細胞電子傳遞鏈的重要基因，另外此基因也被生物界視為物種鑑定與探索親緣關係演化的重要區域<sup>(17)</sup>。cytochrome b 序列在親近的種屬間仍有些微差異性，可利用這項特性分辨種屬間的差異<sup>(18)</sup>。本研究針對台灣市面常見之鱈屬物種(大西洋鱈、太平洋鱈、格陵蘭鱈、黃線狹鱈)建立一套專一性快

速鑑別檢驗方法，此方法兼具操作簡便、快速與高檢測靈敏度，能有效應用於市售鱈魚及相關加工品的鑑別檢驗，保障國人消費權益。

## 材料與方法

### 一、魚類參考物種

本研究比對之魚種於魚類批發市場及賣場價購，鱈屬魚種包括大西洋鱈、太平洋鱈、格陵蘭鱈、黃線狹鱈，及非鱈屬鱈形目魚種包括藍尖尾無鬚鱈、黑線鱈、綠青鱈及台灣市售魚種共120個物種，以魚類COI生物條碼引子(表一)將COI序列PCR增幅後定序，再上傳至NCBI物種資料庫比對序列確認物種，並在Cyt b設計引子將不同魚種歧異性較大位置的序列定序，當作設計專一性引子及探針的參考序列。

### 二、DNA抽取、純化套組

- (一)DNeasy Blood & Tissue Kits (Qiagen, Hilden, Germany)
- (二)DNeasy mericon Food Kit (Qiagen, Hilden, Germany)

### 三、儀器設備

- (一)PCR反應器(Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems, USA)及(Applied Biosystems ProFlex PCR System, Applied Biosystems, USA)
- (二)即時PCR反應器(LightCycler, Roche Applied Science, Germany)
- (三)自動DNA序列定序儀(3100-Avant Genetic Analyzer, Applied Biosystems, USA)
- (四)微量定量用分光光度計(NanoDrop ND-1000, NanoDrop Technologies, USA)
- (五)研磨機(Retsch MM400, Retsch, Germany)
- (六)高速微量低溫離心機(KUBOTA-3740, KUBOTA Corporation, Japan)

表一、本研究使用之引子與探針

物種 引子/探針	序列 5'-3'	標的基因	bp	Ref.
魚類共通				
COI-L	CACGACGTTGTAAAACGACTCAA CYAATCAYAAAGATATYGGCAC	Mitochondrial COI	695	(19)
COI-H	GGATAACAATTTACACAGGACT TCYGGGTGRCCRAARAATCA			
<u>Gadus spp. 鱈屬</u>				
Gadus15974-F	TGTAAACATAACCGGACTTTCCT	Mitochondrial Cyt b	234	(20)
Gadus16230-R	GACGCTCTGCACTGCTGAAATG			
Gadus16173-P	FAM-ACCCGTAGCCCATAGAAA GAACGCCCGGC -TAMRA			

(七)迷你型膠體電泳設備(Mupid-2, Advance, Japan)

(八)膠體電泳影像系統(AlphaImager HP System, ProteinSimple, USA)

#### 四、用以測試專一性之魚種

總共有120個魚種DNA用以進行本方法之測試。

(1)鱈形目鱈屬魚種：大西洋鱈(*Gadus morhua*)、格陵蘭鱈(*Gadus ogac*)、太平洋鱈(*Gadus macrocephalus*)、黃線狹鱈(*Gadus chalcogrammus*)；(2)鱈形目非鱈屬魚種：藍尖尾無鬚鱈(*Macruronus novaezelandiae*)、黑線鱈(*Melanogrammus aeglefinus*)、綠青鱈(*Pollachius virens*)；(3)其他魚種：鯉(*Cyprinus carpio carpio*)、黑皮旗魚(*Makaira nigricans*)、虱目魚(*Chanos chanos*)、香魚(*Plecoglossus altivelis*)、午仔(*Eleutheronema tetradactylum*)、黃魚(*Larimichthys crocea*)、大西洋鮭(*Salmo salar*)、狗母魚(*Saurida undosquamis*)、花腹鯖(*Scomber australasicus*)等共113個常見市售魚種。

#### 五、PCR引子、探針及反應試劑

本研究根據NCBI資料庫DNA序列資料，

以BioEdit軟體進行比對及設計即時PCR物種特異性引子及TaqMan探針，如表一，並委託Bioneer (Daejeon, South Korea)合成。探針5'端採用6-carboxy-fluorescein(6-FAM)標記，3'端採用6-carboxytetramethyl-rhodamine (6-TAMRA)標記。即時PCR反應試劑套組為LightCycler-FastStart DNA Master Hybridization Probes (Roche Applied Science, Germany)。

#### 六、即時PCR溶液之配製

以無菌純水適當稀釋檢體DNA原液、引子及探針備用。取即時PCR反應管，依表二之條件配製反應溶液，依序加入反應試劑、稀釋過之引子及探針，混合均勻後，分裝15  $\mu$ L於即時PCR反應管中，再各別加入檢體DNA溶液5  $\mu$ L。配製完成檢體DNA、反應試劑、稀釋過之引子及探針後，將即時PCR反應管置於離心機中，以200  $\times$  g之轉速離心，移入即時PCR反應器。依表三之反應溫度及時間條件進行即時PCR反應。

#### 結果與討論

高價水產品如鱈屬魚種因產量稀少，且水產品往往因切片或加工過程使得消費者難以用

表二、即時PCR反應溶液之配製條件

Real-time PCR – Roche LightCycler	
反應溶液	反應體積 (μL)
5 μM引子F	1.5
5 μM引子R	1.5
3.3 μM探針P	1.5
LightCycler-FastStart Master Hybridization Probes	2.0
25 mM MgCl <sub>2</sub> 溶液	2.4
模版DNA	5.0
無菌純水	6.1
總體積	20.0

外觀進行分辨，進而讓不肖廠商以較低價之魚種混攪謀取暴利。近年由於分子生物技術之進步，本署致力於分子檢測技術之發展，已成功開發出可鑑別食品中鱈屬魚種之即時PCR方法，能夠在魚片及魚排等加工食品進行檢測，能快速的鑑別鱈屬魚種成分。

### 一、魚種鑑別與鱈屬魚種之檢驗

本研究針對鱈屬魚種(太平洋鱈、大西洋鱈、黃線狹鱈、格陵蘭鱈)特異性區域的Cyt b基因位置設計一引子對(表一)，使用NCBI資料庫下載鱈屬魚種的Cyt b序列，將得到的所有Cyt b序列進行排列(Alignment)，先設計兩端之專一性引子，以目前蒐集之120個市售魚種DNA測試專一性，經過膠體電泳確認只有鱈屬魚種DNA產生明顯的PCR產物條帶，鱈屬以外的物種無PCR增幅產物。鱈屬專一性引子的PCR增幅產物234 bp (圖一、表一)，並設計real-time PCR專一性探針，以此引子探針對與120個已蒐集市售魚種進行real-time PCR反應，本方法僅對4個鱈形目鱈屬魚種表現螢光曲線，而已蒐集之3個鱈形目非鱈屬魚種及其他113個魚類物種均未表現螢光曲線(圖二)，另將本研究之引子探針對序列以NCBI Blast進行

表三、即時PCR反應條件

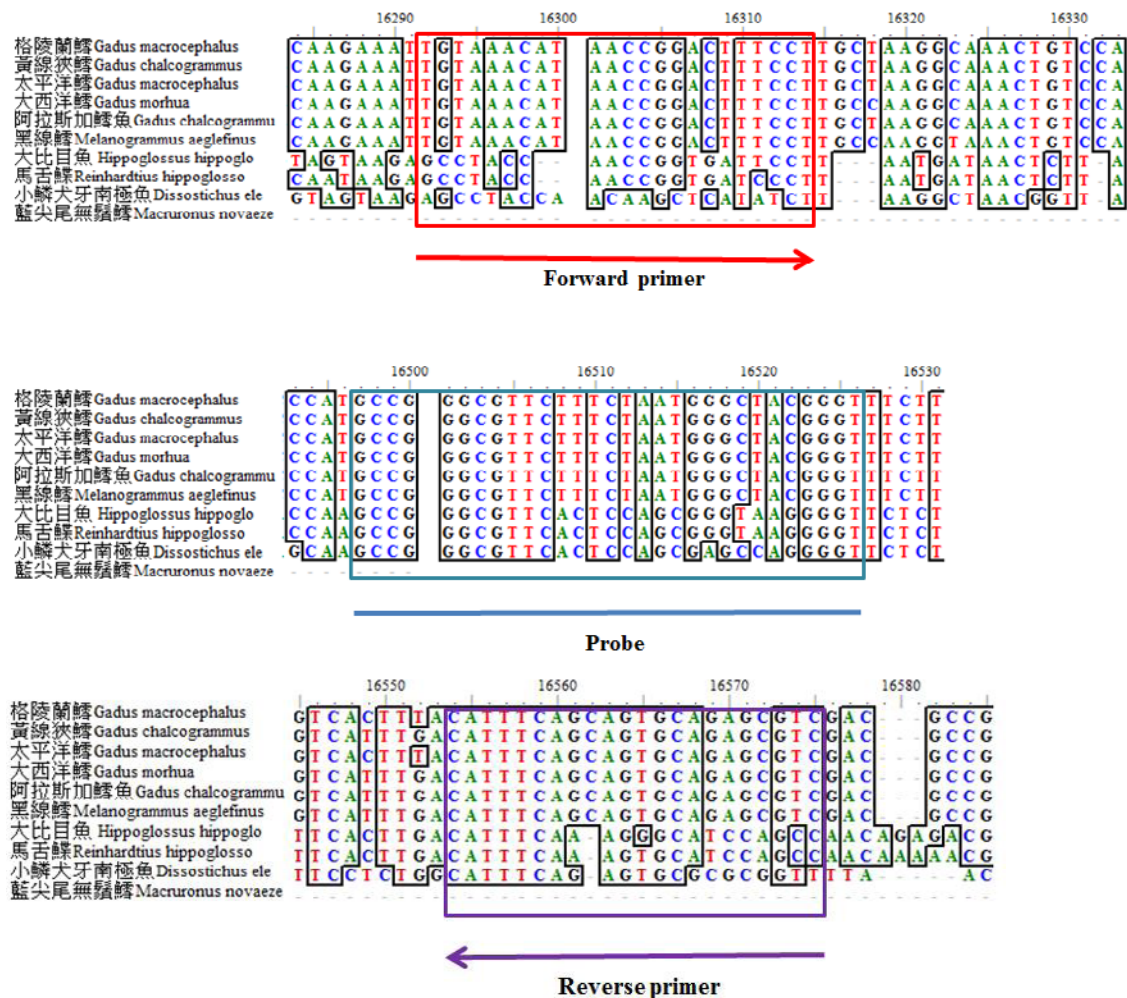
步驟	溫度	時間	循環數
最初變性	95°C	10 min	
變性	95°C	5 sec	
黏接	60°C	25 sec	45
延展	72°C	8 sec	
冷卻	35°C	45 sec	

資料庫比對，只有鱈屬魚種粒線體擁有相同序列之基因片段，確認本方法之引子探針對具有專一性。

### 二、即時PCR引子及探針之檢測濃度測試

為測試本研究引子及TaqMan探針的最低檢測濃度，將蒐集之鱈屬檢體經冷凍乾燥後磨成粉末，以DNeasy mericon Food Kit (Qiagen, Hilden, Germany)，抽取鱈屬魚肉組織DNA，經過微量定量分光光度計(NanoDrop ND-1000, NanoDrop Technologies, USA)測定其濃度為20 ng/μL，將其定為100%，以10倍序列稀釋分別配製10、1、0.1、0.01及0.001%濃度之DNA，以鱈屬引子對與TaqMan探針進行real-time PCR試驗，測試結果，0.001%仍能有良好的螢光曲線反應(圖三)，其TaqMan探針偵測極限可達十萬分之一，因即時PCR溶液配製需加入5 μL之DNA，經過稀釋之濃度計算可算出本檢驗方法之DNA偵測極限為1 pg。本引子對具有較低之偵測極限，鱈屬DNA濃度低的檢體仍可驗出，高度加工之檢體因為高溫或高壓加工過程導致DNA斷裂，因本方法偵測極限低，高度加工及鱈屬成分含量較低檢體可應用此方法進行檢驗，使用本real-time PCR方法可精簡反應時間，原本使用之生物條碼鑑種程序(PCR反應、膠體電泳、定序、比對)需要額外3天，使用此real-time PCR方法可省去上述之反應步驟，包含DNA萃取與real-time PCR鑑定過





圖一、鱈屬魚種設計之專一性引子探針對位置(粒線體Cyt b 基因序列)

程可於4天內完成，符合簡便、快速及實用之需求。

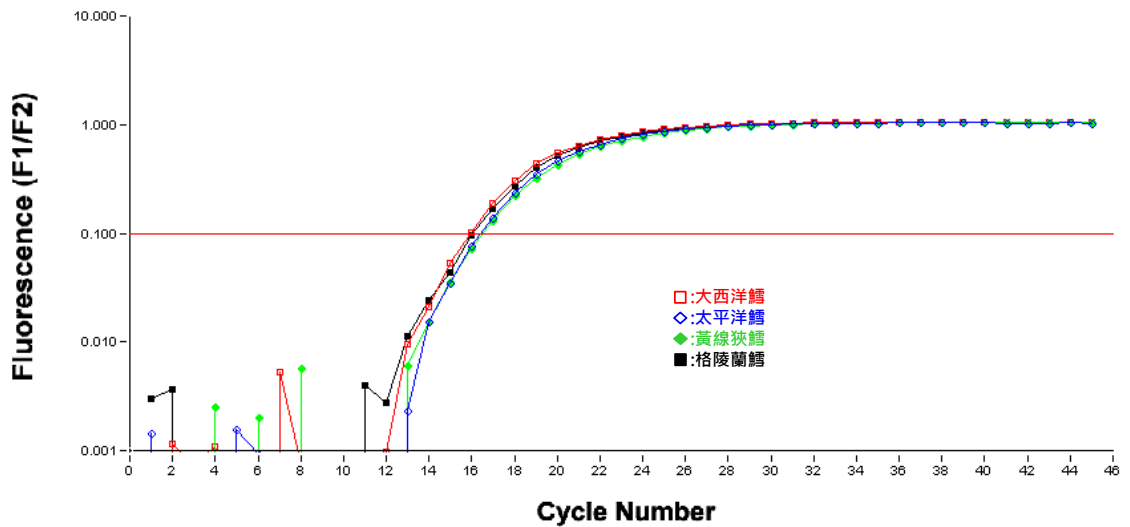
### 三、方法適用性測試

為驗證本研究開發之鑑別檢驗方法之適用性，故購買市售鱈魚產品共15件進行分析，產品購買於美式賣場、網路通路以及市面上便當店，以本研究開發的鱈屬real-time PCR檢驗方法進行檢測，結果顯示，11件市售標示為鱈魚的商品其real-time PCR檢驗結果為鱈屬

成分陽性，4件鱈屬成分陰性，續經過COI定序比對，確認其中3件為馬舌鰈(*Reinhardtius hippoglossoides*)、1件為棘鱗蛇鯖(*Ruvettus pretiosus*)。結果顯示本研究開發之鱈屬real-time PCR檢驗方法確實可應用於市售鱈屬產品的魚種檢驗。

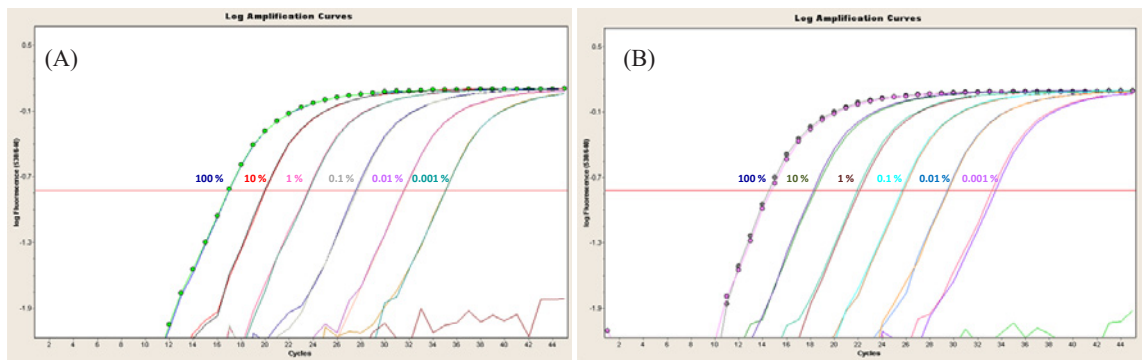
### 四、檢驗方法之公開

本研究已撰寫「食品中動物性成分檢驗方



圖二、鱈屬引子對及TaqMan 探針以real-time PCR 測試專一性

註：測試物種為資料庫所蒐集之120個魚種，正反應對照組為四個鱈屬魚種(大西洋鱈、太平洋鱈、格陵蘭鱈、黃線狹鱈)，其餘魚種皆未產生螢光曲線



圖三、(A)格陵蘭鱈與(B)黃線狹鱈以鱈屬檢測用TaqMan探針測試之靈敏度測試

註：DNA模板濃度稀釋至0.001 %仍能有良好的螢光曲線反應(粒線體Cyt b基因)，100 %之DNA濃度為20 ng/ $\mu$ L，經過稀釋至0.001%濃度，取5  $\mu$ L進行反應可產生螢光曲線，可回推本方法之偵測極限為1 pg/ $\mu$ L

法-鱈屬魚類之定性檢驗」，並公開於食藥署官網。

### 參考文獻

1. European Parliament. 2013. On the food crisis, fraud in the food chain and the control thereof (2013/2009(INI)) Committee on the Environment, Public Health and Food Safety.
2. Nicole Lou. 2015. Bait and Switch: The Fraud Crisis in the Seafood Industry. [<https://www.theatlantic.com/business/archive/2015/03/bait-and-switch/388126/>].
3. Jacquet J.L. and Pauly D. 2008. Trade secrets:

- Renaming and mislabeling of seafood. *Marine Policy*. 32(3): 309-318.
4. Fleur N.S. 2016. Catfished by a Catfish: 1 in 5 Seafood Samples Is Fake, Report Finds. [https://www.nytimes.com/2016/09/08/science/seafood-samples-mislabelling.html].
  5. Meccausland P. 2016. If you eat fish, you're probably getting ripped off. [https://www.motherjones.com/environment/2016/07/tracking-seafood-fraud-fish-gulf-wild-snapper-grouper-tilapia/].
  6. 食品藥物管理署。2015。魴魚產品真真假假，業者應正確標示品名。[https://www.mohw.gov.tw/cp-2636-21178-1.html]。
  7. 廖運志。2019。鱈魚不是鱈魚？多利魚也不是多利魚？所以你到底吃了什麼魚？[https://www.natgeomedia.com/science/article/content-8380.html]。
  8. Ruxton C.H.S., Reed S.C., Millington K.J. and Simpson M. J. A. 2004. The health benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids: a review of the evidence. *J. Hum Nutr Diet*. 17 (5): 449-459.
  9. Namikoshi A., Takashima Y., Iguchi J., and *et al.* 2011. Species identification of Alaska pollock, *Gadus* spp. and *Micromesistius* spp. in cod roe products using a PCR-based method. *Fish Sci*. 77: 671-678.
  10. Kandola A. 2019. What to know about cod. [https://www.medicalnewstoday.com/articles/324741].
  11. 潘子祁。2015。鯰魚低價假鱈魚，添加「發劑」賺暴利？[https://www.newsmarket.com.tw/blog/79256/]。
  12. Xiong X., Guardone L., Giusti A., and *et al.*, 2016. DNA barcoding reveals chaotic labeling and misrepresentation of cod (鱈, Xue) products sold on the Chinese market. *Food control*. 60: 519-532.
  13. 衛生福利部新聞。2016。鱈魚、圓鱈、扁鱈不一樣，您買對了嗎？[https://www.mohw.gov.tw/cp-2629-18965-1.html]。
  14. Rossen D.E. 1984. Zeiform as primitive Plectognath fishes. *Am. Mus. Novit*. 2782: 1-45.
  15. Tyler J. C. 1980. Osteology, phylogeny and higher classification of the fishes of the order Plectognathi (Tetraodoniformes). NOAA. Tech. Rep., NMFS Circ. 434: 1-422.
  16. Winterbottom R. and Tyler J. C. 1983. Phylogenetic relationships of Aracanin genera of boxfishes (Ostraciade: Tetraodoniformes). *Copeia* 4: 902-917.
  17. Taanman J.W. 1999. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochim Biophys Acta Bioenergetics*. 2: 103-123.
  18. Linacre A. and Lee J.C. 2016. Species Determination: The Role and Use of the Cytochrome b Gene. *Methods Mol. Biol* 1420: 287-296.
  19. Cawthorn D.M., Steinman H.A. and Witthuhn R.C. 2012. DNA barcoding reveals a high incidence of fish species misrepresentation and substitution on the South African market. *Food Res. Int*. 46: 30-40.
  20. 黃昱裴、張源鑫、崔秀煒、林澤揚等。2016。食品攙偽及物種鑑別之研究。衛生福利部食品藥物管理署105年度研究成果報告。研究計畫編號：MOHW108-FDA-F-315-000724-1。

## Rapid Identification of Cod (*Gadus* spp.) in Food using Real-time PCR

JUNG KUAN, YUAN-XIN CHANG, YU-PEI HUANG, HSIU-WEI TSUEI,  
CHE-YANG LIN, PO-YU WANG, SU-HSIANG TSENG  
AND DER-YUAN WANG

Division of Research and Analysis, TFDA

### ABSTRACT

Seafood mislabeling related to economic fraud or trade dispute frequently occurs all over the world. The processing step such as slicing of aquatic products may lead to substitutions of species deliberately, which results in increased difficulties of species identification. It is necessary to develop methods that permit the accurate identification or called authentication of the species present in all types of processed fish products. This study aimed at the prevention of fish product mislabelling, a rapid method of identification utilizing real-time PCR was developed for cod (*Gadus* spp.), including *Gadus morhua*, *Gadus macrocephalus*, *Gadus ogac* and *Gadus chalcogramma*. The primers and Taqman probes were designed specifically to the gene encoding cytochrome b (Cyt b) as barcode marker. Specificity was confirmed by testing 120 fish species frequently presented in the markets of Taiwan. The detection limit was as low as 1 pg of DNA. These data showed our real-time PCR method provided a rapid, sensitive and reliable detection tool for accurate identification of cod products, allowing the detection of fraudulent and unintentional mislabeling of this species.

Key words: *Gadus* spp., fish species identification, real-time PCR