

扁鱈(大比目魚)real-time PCR快速鑑別檢驗方法之建立

關嶸 袁嘉穗 鄭蓓淋 張源鑫 崔秀煒 林澤揚 高雅敏 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外觀特徵消失，易發生業者以攙偽、假冒、標示不實等方式牟利，以較低價魚種混充高價魚賺取價差，這類詐欺事件在全球屢見不鮮，本研究針對扁鱈(俗稱大比目魚)魚種鑑別檢驗，扁鱈物種為鰈形目之庸鰈(*Hippoglossus hippoglossus*)、狹鱗庸鰈(*Hippoglossus stenolepis*)及馬舌鰈(*Reinhardtius hippoglossoides*)，對於上述三個物種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125個台灣市售魚種進行測試，確認本方法對扁鱈魚種具有專一性，對於不同濃度的扁鱈魚肉DNA，本方法靈敏度可達10 pg/μL，本研究開發之扁鱈快速鑑別檢驗方法，可實際應用於扁鱈(大比目魚)相關水產品快速檢驗，保護國人消費飲食權益。

關鍵詞：扁鱈、大比目魚、魚類物種鑑定、即時聚合酶連鎖反應

前言

根據富比世於2019年的專欄指出，魚類為最容易發生食品詐欺的食品之一⁽¹⁾。歐盟2013年的調查，易造假食物中魚類排行第二⁽²⁾

另外根據美國海洋保護組織(OCEANA)於2014年在55個國家抽樣調查，於449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⁽³⁾⁽⁴⁾。魚類捕撈後為了保存需要先經過工廠加工切片，或是製作成加工品，例如魚排、魚丸、魚鬆等，產品於消費者購買時已經失去原貌，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⁽⁵⁾，台灣也曾發生以淡水鯰魚

當作魴魚販賣⁽⁶⁾、油魚混充鱈魚⁽⁷⁾以及比目魚混充鱈魚販售之水產品攙偽事件⁽⁸⁾。

比目魚為鰈形目(Pleuronectiformes)魚類的通稱，為卵圓形扁平底棲魚類⁽⁹⁾，其特徵為身體扁平寬闊，雙眼位於身體同一側，有眼的一面有體色，另一面為腹面顏色較淺，其背鰭幾乎是由頭部延伸到尾鰭⁽¹⁰⁾，鰈形目共有800多個物種，分布於熱帶至寒帶中等深度大陸棚海域，亦有少數淡水物種⁽¹¹⁾，比目魚休息時平臥於海底部分身體埋入泥沙中，其背面顏色會與環境融為一體形成保護色，可避免被天敵發現⁽¹²⁾，小型比目魚以甲殼類為主食，大比目魚除了甲殼類也可捕食其他底棲魚類及十足目生物等。比目魚的體型各異，小型的比目魚僅長約4.5公分(2克)，體型最大的庸鰈

(*Hippoglossus hippoglossus*)可長達2.5公尺，重325公斤⁽¹³⁾，

大比目魚(Halibut)為一個俗名，在台灣又被稱為扁鱈，包含三個物種，庸鱈(*Hippoglossus hippoglossus*, Atlantic halibut)、狹鱗庸鱈(*Hippoglossus stenolepis*, Pacific halibut)、馬舌鱈(*Reinhardtius hippoglossoides*, Greenland halibut)⁽¹⁴⁾，台灣市面上販售之大比目魚物種以馬舌鱈為主⁽¹⁵⁾。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」⁽¹⁶⁾，而非屬鱈魚物種之「圓鱈、扁鱈」最易被誤標示，應標示其通俗名稱或與魚種名稱併列標示，鱈形目物種包括庸鱈、狹鱗庸鱈、馬舌鱈等應標示為扁鱈(大比目魚)，使消費者能正確選購。

傳統分類學在魚種區分上仰賴外觀的特徵，以骨骼學、肌肉學、分類學、生活史特徵，或以鱗、鱗片、腸道結構的特徵來達到魚種之區分。但此方法常導致同物種以不同特徵分類結果不一致，不同分類學者對分類之定義及界定看法不同，造成同物異名之爭議產生，傳統分類學應用在加工品鑑別魚種時，因加工過程外部特徵消失，需要使用進一步的方法透過遺傳物質DNA來達到鑑別⁽¹⁷⁻¹⁹⁾。本研究以

cytochrome b (Cyt b)基因片段來鑑定魚種，位於粒線體DNA，長約1.2 Kb，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⁽²⁰⁾。Cyt b序列在親近的種屬間仍有些微差異性，可利用這項特性區分種屬間的差異⁽²¹⁾。本研究針對台灣市面上常見之大比目魚(扁鱈)物種(庸鱈屬、馬舌鱈屬)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，能有效應用於市售相關加工品的鑑別檢驗，捍衛國人消費權益。

材料與方法

一、魚類參考物種

本研究比對之魚種於水產批發市場及賣場價購，鱈型目大比目魚物種包括庸鱈、狹鱗庸鱈、馬舌鱈，及其他鱈型目魚種包括美洲劍齒鱈、大口鱈、寬體舌鰨、檸檬斑鯨，易與扁鱈混淆之鱈屬魚種及台灣市售魚種共125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，將序列上傳至NCBI物種資料庫比對確認物種，並在Cyt b設計共通引子將不同魚種歧異性較大位置的序列定序，作為

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	(22)
COI-H	GGATAACAATTTACACAGGACT TCYGGGTGRCCRAARAATCA			
<i>Hippoglossus and Reinhardtius</i> spp.				
扁鱈(大比目魚)				
Hippo -F	CTTCACACCAACAACCCAACTCTCCC	Mitochondrial Cyt b		
Hippo -R	GAAGGAAGAGGACCACCGTTGTAA		298	(23)
Hippo -P	FAM-CACAGCAGGCCACCTCCTTATT CAACTCATT -TAMRA			

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)微量定量用分光光度計(NanoPhotometer UV/Vis Spectrophotometers, Implen, USA)
- (四)研磨機(Retsch MM400, Retsch, Germany)
- (五)高速微量低溫離心機(KUBOTA-3740, KUBOTA Corporation, Japan)
- (六)迷你型膠體電泳設備(Mupid-2, Advance, Japan)
- (七)膠體電泳影像系統(GelDoc Go System, Bio-Rad, USA)

四、專一性測試用之魚種

總共有125個魚種DNA用以進行本方法之測試。

- (一)鱈形目大比目魚：庸鱈(*Hippoglossus hippoglossus*)、狹鱗庸鱈(*Hippoglossus stenolepis*)、馬舌鱈(*Reinhardtius hippoglossoides*)。
- (二)鱈形目其餘物種：美洲劍齒鱈(*Atheresthes stomias*)、大口鱈(*Psettodes erumei*)、檸檬斑 (*Pseudorhombus cinnamoneus*)、寬體舌鰨(*Cynoglossus robustus*)。
- (三)鱈形目魚種：大西洋鱈(*Gadus morhua*)、格陵蘭鱈(*Gadus ogac*)、太平洋鱈

(*Gadus macrocephalus*)、黃線狹鱈(*Gadus chalcogrammus*)、藍尖尾無鬚鱈(*Macruronus novaezelandiae*)、黑線鱈(*Melanogrammus aeglefinus*)、綠青鱈(*Pollachius virens*)。

- (四)其他市售魚種：鯉(*Cyprinus 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111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溶液之配製與反應條件

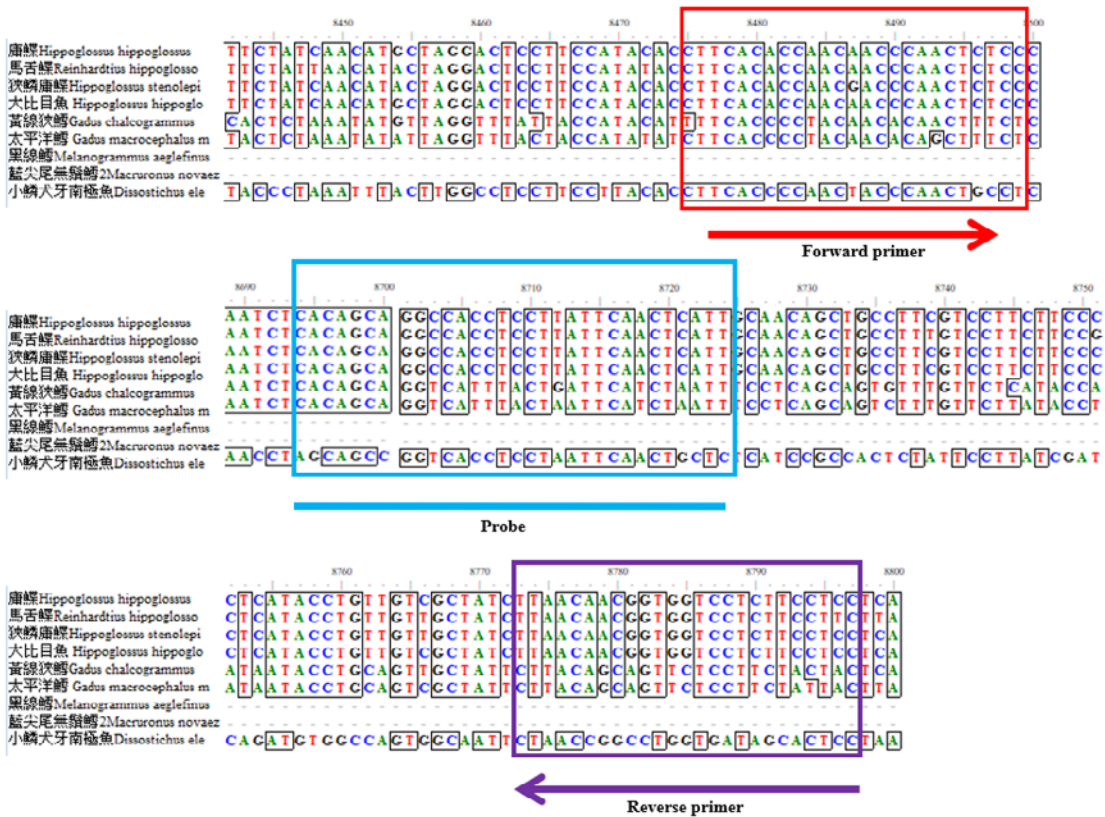
以無菌純水適當稀釋檢體DNA原液、引子及探針備用，即時PCR反應溶液20 μ L，包含5 μ M Hippo-F引子1.5 μ L、5 μ M Hippo-R引子1.5 μ L、3.3 μ M Hippo-P探針1.5 μ L、LightCycler-FastStart Master Hybridization Probes 2.0 μ L、25 Mm MgCl₂溶液2.4 μ L、無菌純水6.1 μ L及檢體DNA溶液5 μ L。即時PCR反應條件為95°C反應10分鐘(最初變性)、45個增幅反應循環(變性95°C 5秒、黏接60°C 25秒、延展72°C 8秒)、35°C冷卻45秒。

結果與討論

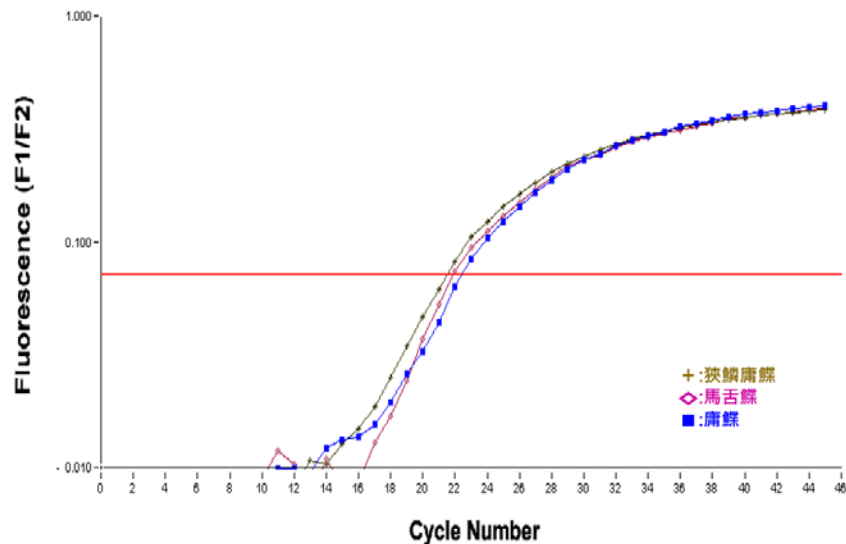
水產品因切片或加工過程使得消費者難以憑外觀進行分辨，不肖廠商以較低價魚種混攪賺取價差謀取暴利，因外觀特徵相近，台灣市面上鱈魚、扁鱈、油魚、圓鱈四種物種分類及標示易發生混淆。近年由於分子生物技術之進步，本署致力於分子檢測技術之發展，已成功開發出可鑑別食品中扁鱈(大比目魚)之即時PCR方法，能夠在魚片及魚排等加工食品進行檢測，快速的鑑別扁鱈魚種成分。

一、魚種鑑別與扁鱈(大比目魚)之魚種檢驗

本研究選定扁鱈(大比目魚) (庸鱈屬、馬舌鱈屬) Cyt b基因特異性位置設計一引子對(表一)，使用NCBI資料庫下載目標物種之粒線體全基因序列，進行多重序列比對(ClustalW Multiple Alignment)，先設計合成兩端之專一性引子，以目前蒐集之125個市售魚種DNA測試專一性，經過膠體電泳確認只有扁鱈魚種(庸鱈、狹鱈庸鱈、馬舌鱈)產生單一清晰的PCR產物條帶，扁鱈以外的物種無PCR增幅產物。此引子的PCR增幅產物298 bp(圖一、表一)，於兩端引子對所夾之中央區域扁鱈特異位置設計專一性探針，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3個扁鱈魚種表現螢光曲線(圖二)，



圖一、扁鱈(大比目魚)專一性引子探針對位置(粒線體 Cyt b基因序列)



圖二、扁鱈(大比目魚)引子對及TaqMan 探針之real-time PCR專一性測試

註：測試物種為本研究所蒐集之125個魚種，正反應對照組為三個扁鱈魚種(狹鱈庸鱈、庸鱈、馬舌鱈)，其餘魚種皆未產生螢光曲線。

另將本研究之引子探針對序列以NCBI Blast進行資料庫比對，只有扁鱈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。

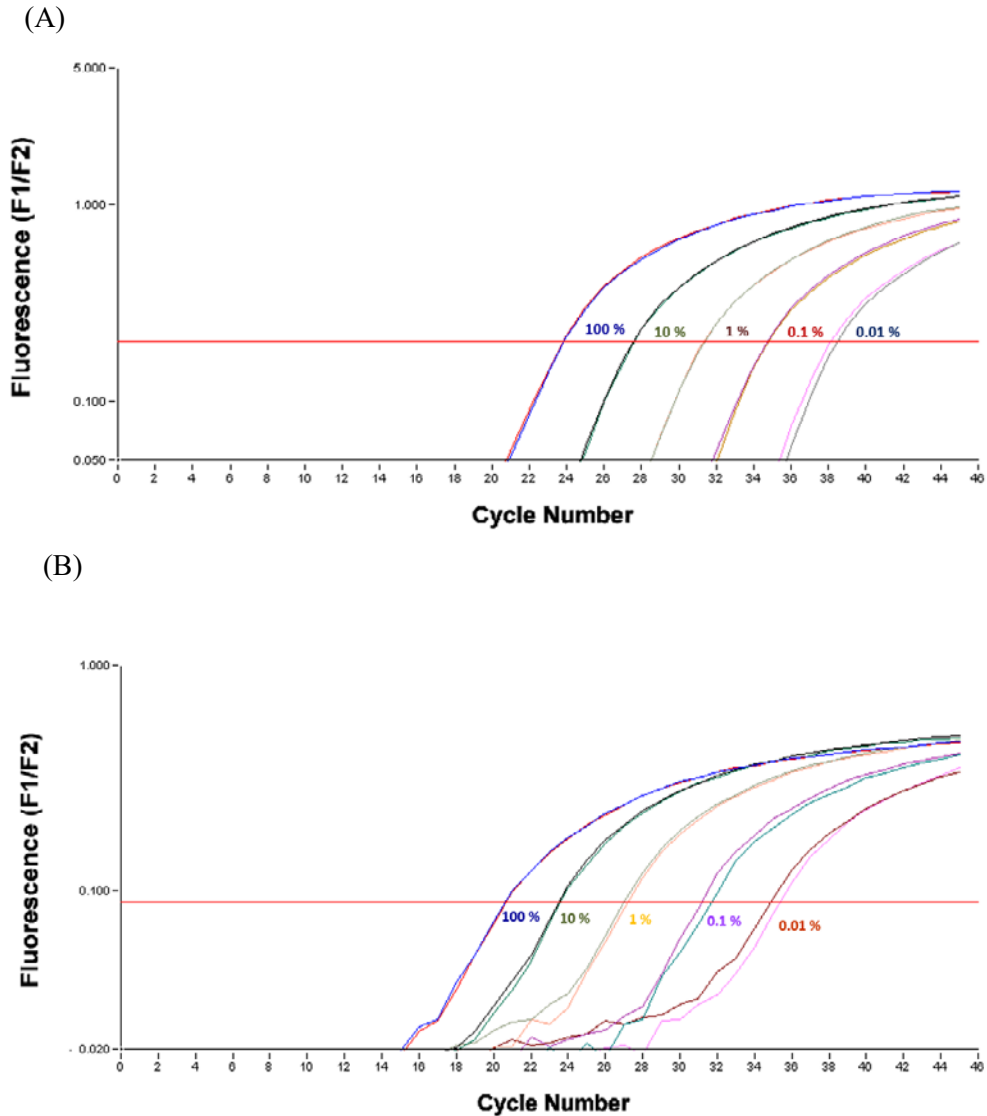
二、即時PCR引子及探針之檢測濃度測試

為測試本研究引子及TaqMan探針的最低檢測濃度，將蒐集之扁鱈檢體經冷凍乾燥後磨成粉末，以DNeasy mericon Food Kit (Qiagen, Hilden, Germany)，抽取魚肉組織DNA，經過微量定量分光光度計(NanoPhotometer UV/Vis Spectrophotometers, Implen, USA)定量其濃度至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%濃度之DNA，以扁鱈引子對與TaqMan探針進行real-time PCR試驗，測試結果，0.01%仍能有良好的螢光曲線反應(圖三)，其TaqMan探針偵測極限可達萬分之一，因即時PCR溶液配製需加入5 μL之DNA，經過稀釋後濃度，可計算出本檢

驗方法之DNA偵測極限為10 pg/μL。本引子探針對具有極低之偵測極限，高度加工之檢體因為加工過程中高溫或高壓導致DNA斷裂，本方法偵測極限低，高度加工及扁鱈成分含量較低檢體皆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方法可省略上述之反應步驟，相較於傳統PCR方法更簡便、快速及實用。

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，故購買市售扁鱈產品共8件及鱈屬產品共11件進行分析測試，產品於大賣場與網路通路價購，以本研究開發的扁鱈real-time PCR檢驗方法進行檢測，結果顯示，8件市售標示為扁鱈(大比目魚)的商品之real-time PCR檢驗結果皆為扁鱈成分陽性，另11件鱈屬產品之檢驗結



圖三、(A)馬舌(B)庸鱗以扁鱈(大比目魚)專一性TaqMan探針測試之靈敏度測試

註：DNA模板濃度稀釋至0.01%仍能有良好的螢光曲線反應(粒線體 Cyt b基因)，100%之DNA濃度定量至 $20 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ，經過稀釋10倍至0.01%濃度，取 $5 \mu\text{l}$ 進行反應皆可產生螢光曲線，計算方法之偵測極限為 $10 \text{ pg}/\mu\text{L}$ 。

果皆為扁鱈成分陰性。此結果確認本研究開發之扁鱈real-time PCR檢驗方法可應用於市售鱈魚相關產品的魚種檢驗。

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法-扁鱈(大比目魚)之定性檢驗」，並公開於食藥署官網。

參考文獻

- Olmsted, L. 2019. 5 fake foods and food scams you need to avoid. [<https://www.forbes.com/sites/larryolmsted/2019/02/17/5-fake-foods-and-food-scams-you-need-to-avoid/?sh=480378982f26>].
- European Parliament. 2014. Food crisis, fraud in the food chain and the control thereof (2013/2091(INI)). Off. J. Eur. Union C 482: 22-30.
- Lou, N. 2015. Bait and switch: The fraud crisis in the seafood industry. [<https://www.theatlantic.com/business/archive/2015/03/bait-and-switch/388126/>].
- Cranor, D. 2016. 1 in 5 seafood samples mislabeled worldwide, finds new oceana report. [<https://usa.oceana.org/press-releases/1-5-seafood-samples-mislabeled-worldwide-finds-new-oceana-report/>].
- Mccausland, 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/>].
- 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>]。
- 郭匡超。2016。油魚混充鱈魚寒舍艾麗酒店挨批。 [<https://www.chinatimes.com/realtimenews/20160513002010-260405?chdtv>]。
- 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>]。
- Towers, L. 2015. A quick guide to farming halibut fish. [<https://thefishsite.com/articles/a-quick-guide-to-farming-halibut-fish>].
- Gutherz, E.J. 2021. Britannica: pleuronectiform fish order [<https://www.britannica.com/animal/pleuronectiform>].
- Campbell, M.A., Chanet, B., Chen, J.N. and *et al.* 2018. Origins and relationships of the Pleuronectoidei: Molecular and morphological analysis of living and fossil taxa. Zool. Scr. 48(5): 640-656.
- Vestfals, C.D., Ciannelli, L. and Hoff, G.R. 2016. Changes in habitat utilization of slope-spawning flatfish across a bathymetric gradient. ICES J. Mar. Sci. 73(7): 1875-1889.
- Andrew, C.J. and Chapleau, F. 1998. Monophyly and intrarelationships of the family Pleuronectidae (Pleuronectiformes), with a revised classification. Fish. Bull. (Wash. D. C.). 96(4): 686-726.
- Mjelle, K.A., Karlsen, B.O., Jørgensen, T.E. and *et al.* 2008. Halibut mitochondrial genomes contain extensive heteroplasmic tandem repeat arrays involved in DNA recombination. BMC Genom. 9(1): 10.
- 葉信明。2007。這不是肯德基!!你吃的是正港的鱈魚嗎? [<https://www.tfri.gov.tw/friweb/frinews/enews0014/s1.html>]。
- 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>]。
- Rosen, D.E. 1984. Zeiform as primitive Plectognath fishes. Am. Mus. Novit. 2782: 1-45.
- Tyler, J.C. 1980. Osteology, phylogeny and higher classification of the fishes of the order Plectognathi (Tetraodoniformes). NOAA Tech. Rep. NMFS CIRC. 434: 403-412.
- Winterbottom, R. and Tyler, J.C. 1983. Phylogenetic relationships of Aracanin genera of boxfishes (Ostraciade: Tetraodoniformes). Copeia. 4: 902-917.

20. Taanman, J.W. 1999. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochim. Biophys. Acta* 1410(2): 103-123.
21. Linacre, A. and Lee, J.C. 2016. Species determination: the role and use of the cytochrome b gene. *Methods Mol. Biol.* 1420: 287-296.
22. 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(1): 30-40.
23. 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(MOHW108-FDA-F-315-000724-1)。

Rapid Identification of Halibut (*Hippoglossus* spp. and *Reinhardtius* spp.) Using Real-time PCR

JUNG KUAN, CHIA-SUI YUAN, PEI-LIN CHENG, YUAN-XIN CHANG,
HSIU-WEI TSUEI, CHE-YANG LIN, YA-MIN KAO, 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. Processing and slicing which results in increased difficulties of species identification may lead to mislabeling and substitutions of species deliberately. This study aimed at the prevention of fish product mislabeling, and a rapid method of identification utilizing real-time PCR was developed for halibut (*Hippoglossus* spp. and *Reinhardtius* spp.), including *Hippoglossus hippoglossus*, *Hippoglossus stenolepis*, and *Reinhardtius hippoglossoides*. The primers and Taqman probes were designed specifically to the gene encoding cytochrome b (Cyt b). Specificity was confirmed by testing 125 fish species frequently found in the markets of Taiwan. The detection limit was as low as 10 pg/ μ L of DNA. These data showed the real-time PCR method provided a rapid, sensitive and reliable detection tool for accurate identification of halibut products, allowing the detection of fraudulent and unintentional mislabeling of these species.

Key words: halibut, *Hippoglossus* spp., *Reinhardtius* spp., fish species identification, real-time PCR