

牡蠣物種之鑑別檢驗方法

Method of Test for Oyster Species Identification

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於生鮮或冷凍之葡萄牙牡蠣(*Magallana angulata*)及太平洋牡蠣(*Magallana gigas*)物種之鑑別檢驗。

2. 檢驗方法：檢體經DNA萃取後，以聚合酶鏈反應(polymerase chain reaction, PCR)分析之方法。

2.1. 工作環境：工作平台需寬敞、潔淨、光線良好。檢體前處理、檢體DNA抽取、PCR試劑配製及檢驗過程皆需有區隔空間，避免交叉污染。

2.2. 裝置

2.2.1. 聚合酶鏈反應器：Applied Biosystems Veriti Pro Thermal Cycler或Biometra Trio Thermocycler，或同級品。

2.2.2. 電泳槽：供DNA電泳用。

2.2.3. 照相裝置：供拍攝電泳膠片用。

2.2.4. 紫外燈箱：具波長254 nm、312 nm及365 nm紫外燈。

2.2.5. 乾燥裝置：供DNA乾燥用。

2.2.6. 高壓滅菌釜：可達121°C以上者。

2.2.7. 加熱振盪器：可設定溫度在室溫至100°C之間，具振盪功能。

2.2.8. 微量離心機：供微量離心管離心用，可達20000 ×g。

2.2.9. 超微量分光光度計：具波長260 nm、280 nm。

2.2.10. 冷凍設備：具冷藏及凍結功能。

2.2.11. 試管振盪器。

2.2.12. 天平：最大稱重量為2000 g，靈敏度為0.1 g；最大稱重量為100 g，靈敏度為1 mg。

2.3. 試藥

2.3.1. DNA抽取用試劑：乙醇(96~100%)採分子生物分析級；適用於動物DNA抽取之市售套組。

2.3.2. PCR用引子

2.3.2.1. 鑑別試驗用引子^(註1)

2.3.2.1.1. 動物類(標的基因：粒線體16S ribosomal RNA，供作內部對照基因)

引子F：16Sar-L, 5'-CGCCTGTTATCAAAACAT-3'

引子R：16Sbr-H, 5'-CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3'

PCR增幅產物大小500~650 bp。

2.3.2.1.2. 葡萄牙牡蠣*Magallana angulata* (標的基因：粒線體DNA

ND2基因及tRNA-Arg)

引子F：MAF, 5'-CAACAAATCACATTACGGCTG-3'

引子R：MAR, 5'-GCCACCTAACAGCAACAATTG-3'

PCR增幅產物大小373 bp。

2.3.2.1.3. 太平洋牡蠣*Magallana gigas* (標的基因：粒線體DNA tRNA-Gly)

引子F：MGF, 5'-TAAGTGAATAAGGCCAGG-3'

引子R：MGR, 5'-ACCCAACCTATTGCACTC-3'

PCR增幅產物大小574 bp。

註1：合成之引子拆封後，以無菌純水稀釋為濃度10 pmol/ μ L，分裝後置於-20°C貯存備用。

2.3.2.2. PCR Master Mix (適用 Applied Biosystems Veriti Pro Thermal Cycler或Biometra Trio Thermocycler，或同級品)

內含PCR所需去氧核糖核苷三磷酸、聚合酶等，使用時添加引子及待測檢體DNA。

2.3.3. 電泳用試藥：溴化乙銨(ethidium bromide)、瓊膠(agarose)及1倍TBE緩衝液(Tris-borate-EDTA buffer)均採分子生物分析級。DNA分子量標記物質(DNA molecular weight marker：100-bp DNA Ladder)及6倍載入膠片緩衝液。

2.3.4. 對照用物質：葡萄牙牡蠣及太平洋牡蠣。

2.4. 器具及材料^(註2)

2.4.1. 吸管：10 μ L、20 μ L、100 μ L、200 μ L及1000 μ L。

2.4.2. 吸管尖：10 μ L、20 μ L、200 μ L及1000 μ L。

2.4.3. 電泳膠片製作盤。

2.4.4. 離心管：1.5 mL。

2.4.5. PCR反應管：200 μ L。

2.4.6. 三角玻璃瓶：500 mL。

2.4.7. 燒杯：5000 mL。

註2：使用之塑膠或玻璃器皿均為無DNase污染。

2.5. 試劑之配製

2.5.1. 1.5%膠片之製作

稱取瓊膠1.5 g，加入1倍TBE緩衝液100 mL，加熱攪拌至瓊膠完全溶解。適當冷卻後，倒入電泳膠片製作盤，並置入適當之尺梳，待膠片凝固後，即可使用。

2.5.2. 膠片染液之配製^(註3)

稱取溴化乙錠0.1 g，加去離子水10 mL溶解，作為原液。使用時取適量原液，以去離子水稀釋至1 μg/mL。

註3：溴化乙錠為致癌物質，配製時應注意安全。

2.5.3. PCR溶液之配製^(註4)

10 μM MAF引子F.....	1.0 μL
10 μM MAR引子R.....	1.0 μL
10 μM MGF引子F.....	1.0 μL
10 μM MGR引子R.....	1.0 μL
2倍PCR Master Mix.....	12.5 μL
檢體DNA溶液(總量10 ng).....	1.0 μL
無菌去離子水.....	7.5 μL
總體積.....	25.0 μL

註4：PCR溶液應置於冰浴中配製。

2.6. 檢體DNA之製備

2.6.1. 檢體之處理

將檢體直接剪取閉殼肌部位，約3 mm × 3 mm大小(重量約0.004~0.009 g)，放入1.5 mL離心管內。

2.6.2. DNA之萃取

採用適用於動物DNA抽取之市售套組，依套組操作說明步驟抽取DNA。抽取之DNA溶液收集至已滅菌之1.5 mL離心管，作為檢體DNA原液。依2.6.3節測定DNA濃度後，置於-20°C冷凍保存。

2.6.3. DNA濃度測定及純度判斷

取適量之檢體DNA原液，以無菌去離子水做適當倍數之稀釋，分別測定260 nm及280 nm之吸光值(O.D.)。以波長260 nm吸光值乘50 ng/μL及稀釋倍數，即為檢體DNA原液濃度。DNA溶液純度則以O.D.260/O.D.280比值作判斷，其比值應介於1.7~2.0。

2.7. PCR鑑別試驗

2.7.1. PCR操作步驟

以無菌去離子水適當稀釋檢體DNA原液及引子備用。取已滅菌離心管，依照2.5.3節配製PCR 溶液於PCR反應管中，以200 ×g瞬間離心後，移入PCR反應器，依下列條件進行反應^(註5)。結束後，取出PCR增幅產物，進行電泳分析。同時另製作正反應及負反應對照組。

步驟	溫度	時間
1.最初變性	95°C	5 min

2.變性	95°C	10 sec
3.黏接	52°C	5 sec
4.延展	72°C	20 sec

步驟2至步驟4，共進行30個循環反應。

註5：上述反應條件分析不適時，可依所使用之儀器，設定適合之反應條件。

2.7.2. 膠片電泳分析

取適量之6倍載入膠片緩衝液，與PCR增幅產物混合均勻，注入1.5%膠片孔中，以100或135伏特電壓進行電泳。另取DNA分子量標記物質進行電泳，作為PCR增幅產物大小之判別與計算依據。將經電泳後之膠片置入膠片染液中進行染色約15分鐘，續置入水中漂洗及褪染，再置於紫外燈箱中，於波長365 nm下觀察是否有明顯之DNA螢光帶，並判讀結果。同時另測試正反應及負反應對照組。

2.7.3. 鑑別結果

檢體DNA之PCR增幅產物電泳結果，須與正反應對照組及DNA分子量標記物質之電泳結果進行相互比對。當檢體DNA與正反應對照組二者皆出現PCR增幅產物，且經由DNA分子量標記物質估算PCR增幅產物大小為373 bp者，即判定該檢體為葡萄牙牡蠣；若由DNA分子量標記物質估算PCR增幅產物大小為574 bp者，即判定該檢體為太平洋牡蠣。

附註：檢體DNA之製備將影響測試結果，檢體DNA應進行內部對照基因測試。

參考文獻

1. Melo, M. A. D., da Silva, A. R. B., Beasley, C. R. and Tagliaro, C. H. 2013. Multiplex species-specific PCR identification of native and non-native oysters (*Crassostrea*) in Brazil: a useful tool for application in oyster culture and stock management. *Aquac. Int.* 21: 1325-1332.
2. Hare, M. P., Palumbi, S. R. and Butman, C. A. 2000. Single-step species identification of bivalve larvae using multiplex polymerase chain reaction. *Mar. Biol.* 137: 953-961.
3. Hsiao, S. T., Chuang, S. C., Chen, K. S., Ho, P. H., Wu, C. L. and Chen, C. A. 2016. DNA barcoding reveals that the common cupped oyster in Taiwan is the Portuguese oyster *Crassostrea angulate* (Ostreoidea; Ostreidae), not *C. gigas*. *Sci. Rep.* 6: 34057.