

## 一、摘要：

關鍵詞: 狗母、系群判定、粒線體 DNA

東海漁場為我國拖網漁業之傳統作業漁場，與中國大陸、韓國及日本等國長期共同利用該海域之資源。為因應未來東海漁業資源共同管理的趨勢，並善盡維護漁業資源合理永續利用之責任，以確保我國在東海漁場拖網漁業作業權益，對東海漁場重要經濟魚種資源力學特徵之研究實為當前重要之課題。

狗母是東海底拖網漁業中最主要漁獲物之一，其資源量指標之豐欠應可作為東海底魚群聚資源量之重要指標。為深入瞭解東海漁場產狗母之系群結構加以解析。八十八年度之工作目標已完成一年度的作業船標本魚的收集，但為求標本魚數量的增大，將持續委託作業船協助標本的採集。實驗組織的選取以魚體背部細胞組織，引子的設計經過實驗的測試決定採用 PB 及 P3 兩組引子以取得特定 DNA 片段以供探討其中的變異，進而對其系群結構作深入的探討。

## 英文摘要：

Keywords: Lizard fish, Stock identification, mt DNA

The fishing ground of the East China Sea is the historical fishing ground for Taiwanese trawlers, and the fishery resources has been exploited by Taiwan, Mainland China, South Korea and Japan for a long time. For the management of fishery resources in future and ensuring the sustainable use of stocks, it's an important work to studying the population dynamic of the economical species from the East China Sea.

Lizard fish(*Saurida tumbil*) is one of the most abundant catches of Taiwan trawl fisheries. The fish is widely distributed in the East China Sea, and it's abundance may be infer to the index of the biomass of demersal fish resources of the East China Sea. To understand the characteristic of population dynamic of lizard fish in the East China Sea, firstly, we proceed the stock identification and it's distribution. Using the specimens gathered from the Taiwanese fishing boat in 1998 and 1999, the identification of lizard fish(*Saurida tumbil*) stock with the analysis of morphometric data and sequence of mitochondria DNA(mtDNA) will be conducted this year. The corresponding locations of the two primers in mtDNA (PB and P3) used in PCR are shown in Figure 3.

## 二、前言：

東海漁場為台灣、大陸、韓國及日本等國拖網漁業長期共同利用之歷史性傳統漁場。近年來，各國相繼宣告 200 浬經濟海域後，中國、韓國及日本等國已相繼完成雙邊漁業談判，並訂出共同管理暫訂水域之共識。為因應未來東海漁場漁業資源共同管理時代的來臨，並確保我國漁民應有的漁業權益，加強東海漁場漁業資源之評估研究，實為刻不容緩之重要課題。

根據台灣地區底魚漁業漁場別漁獲統計年報資料顯示東海海域的底棲魚類相豐富且種類複雜，其中蛇鯔魚類(Saurida)，俗稱狗母，為底施網漁業之主要漁獲物之一。狗母魚種主要包括錦鱗蜥魚(Saurida tumbil)、正蜥魚(Saurida undosquamis)及長蜥魚(Saurida elongata)等，其中以錦鱗蜥魚為東海狗母資源中之大部份(Hamada, 1986)。

過去有關東海陸棚產錦鱗蜥魚之研究包括有生殖生態(Yamada et al., 1969)、攝食(Yamada et al., 1966)、再生產能力(Saishu and Ikemoto, 1970)及年齡成長(Yeh et al., 1977)等。有關係群結構之資訊則有(Yeh and Liu, 1973)，以形態測定學之方法加以分析。

系群結構的分析為資源評估之基礎，有關判定系群結構之方法有漁獲統計資料法、形態形質法、標識放流法和遺傳及生物化學法等。其中遺傳生化法，其優點是所求得之結果極為穩定，故自 1970 年代起即被廣泛應用於魚類等相關研究(Smith et al., 1990)。近年來，更因聚合酶連鎖反應(Polymerase Chain Reaction, PCR)之自動化，使得粒線體去氧核糖核酸(mitochondrial DNA; mt DNA)的序列分析更成為族群結構或系群判別研究的重要方法之一。因此本研究之目的係以粒線體 DNA 序列分析方法及形質法綜合探討東海漁區錦鱗蜥魚之系群結構以作為往後資源評估之參考。

### 三、材料及方法：

#### 1. 樣本之收集：

本計畫之執行，標本魚的主要來源為委託標本船直接由漁船海上作業時所採取，唯漁船之作業常有其季節性與區域性，因此為取得涵蓋範圍能夠具有代表性的標本魚，在第一年計劃，甚至第二年計畫中將持續委託標本船，以尋求更廣範圍的標本魚來源。第一年計劃中，共委託六艘遠洋單拖漁船執行標本收集之工作。

粒線體 DNA 核甘酸定序法所需之樣本，是於 1998 年 10 月至 1999 年 8 月分別由委託之漁船於海上作業時所採得，採集從北緯 30 度至北緯 21 度，東經 118 度至 128 度間共得 13 個採樣點。各得 5 至 10 尾標本魚，將所得之標本置於-70 冰箱中冷凍備用。各採樣點之採樣時間、位置、代碼及標本數如 Table. 1 所示。

#### 2. 粒線體 DNA 之粗製萃取

萃取 crude DNA 的方法, 主要以參考 Hillis and Moritz(1990)之步驟為主，再依實驗情形加以稍許改變以期有良好的實驗表現。本研究所使用粹取粒線體 DNA 之步驟如下:

- a. 取狗母魚的肌肉組織(約 100~200mg)，切碎後置入組織研磨器 中，再加入 900  $\mu$ l 之 digestion buffer(10mg/ml DTT, 10mM Tris-Hcl pH 8.0, 2mM EDTA)，將肌肉組織慢慢研磨至溶液變成均質(Kocher et al., 1989)。
- b. 將研磨所得之均質液移裝於 2ml 之離心管(eppendorf tube)，加入 50  $\mu$ l 的 10mg/ml proteinase K 及 50  $\mu$ l 的 20%SDS，再置於 50~55 之恒溫水槽(water bath)中，待均質液澄清，每隔一小時混合一次，使反應充分進行，反應至少 2~4 小時。
- c. 加入 1ml 之飽和酚溶液(pH 8.0)，振盪(vortex)30 秒，使飽和酚溶液與研磨液充分混合後，在室溫下以 12500rpm 離心 10 分鐘，抽取 1ml 之上層澄清液

至另一 2ml 之離心管中。

d. 重複 c 之步驟，但僅抽取 0.8~0.9ml 之上層澄清液，置於 2ml 之離心管中。

e. 加入 1ml 之酚、氯仿及異戊醇混合液(phenol :chloroform :isoamyl alcohol= 25:24:1)，振盪 30 秒後於室溫下以 12500rpm 離心 10 分鐘，抽取上層液 0.6ml 裝於 2ml 之新離心管中。

f. 加入 1ml 之氯仿和異戊醇混合液(chloroform : isoamyl alcohol = 24:1)，振盪 30 秒，於室溫下以 12500rpm 離心 10 分鐘，抽取 0.5ml 上層液裝於 2ml 之新離心管中。

g. 加入 50  $\mu$ l 之醋酸鈉溶液(3M sodium acetate, pH 5.2)及 1.375ml 的酒精 (95~99% ethanol)，手搖 3 分鐘後置於-70 之冰凍櫃 30 分鐘至 1 小時。

h. 取出溶液，以冷凍離心機在 4 12500 rpm 下，離心 30 分鐘。

i. 抽出離心管中之液體，留下白色沉澱物或半透明物，再加入 1ml 之 70% 乙醇，振盪以讓沉澱物脫離管壁後，在室溫下以 12500rpm 離心 10 分鐘。

j. 再抽出離心管中之液體，所留下白色沉澱物或半透明物，再以真空乾燥機 (speed vacum dryer)乾燥至管內之沉澱物變成白色、完全乾為止。

k. 乾燥後之 DNA(其內包含有染色體 RNA 和粒體 DNA)加入 100  $\mu$ l 之滅菌水後置於-20 冰箱中備用。

### 3. 粒線體去氧核糖核酸(mitochondrial DNA ; mtDNA)之製備

在本實驗中，特定的粒體去氧核糖核酸片段是利用聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction ; PCR)及 PCR 產物純化兩步驟來製備，用以提供 DNA 定序反應時使用。

#### (1) 聚合酶連鎖反應(Polymerase Chain Reaction ; PCR) :

聚合酶連鎖反應之條件，乃參考 PCR protocols(Innis et al., 1989)，所提供的 DNA 增幅(amplification)之相關反應及其他資料(Williams,1987 ; Sambrook et al., 1989)，經過多次的實際操作，逐次修改而成。聚合酶連鎖反應所有的步

驟都在容積為 0.2ml 或 0.5ml 的微量離心管中完成。每管的反應溶液總積為 50  $\mu$ l 或 100  $\mu$ l。反應溶液中包括有 50m M KCl , 10m M Tris-HCl(pH=8.3) , 1.5mM MgCl<sub>2</sub> , 0.1% gelatin(已經製備成 10X buffer , 保存於-20 冰箱中) , 200  $\mu$  M dNTP(即分別含有相同 200  $\mu$  M 濃度的 dATP、dGTP、dTTP、dCTP) 並加上所需增幅一對引子(primers , 圖 3) , 適量的 crude DNA 作為模板(template)溶於無菌水中,再加入 Super Tag 聚合酶(Tag: *Thermus aquaticus*, HT Bio-technology LTD) , 並以約 60  $\mu$ l 的 paraffin oil 覆蓋溶液表面, 以避免反應過程溶液受熱而蒸發。將整管置於溫度循環控制儀(thermal cycler: PTC-100 , MJR Inc) , 進行以下的流程:

Step1: 94 , 2 mins. 預熱。

Step2: 94 , 1min. 將 dsDNA 雙股變性解開(denaturation)。

Step3: 45 , 1 min 10 sec. 使互補股片段與引子煉合(annealing) 。

Step4: 72 , 2 mins.此時 Super Tag 聚合酶進行反應, 在引子 3'端的延伸聚合反應(extension)。重覆進行 Step2~Step4,共 35 個循環。最後加熱 72 ,10 mins 。如此便可製造出許多所需增幅的特定 DNA 片段。

PCR 產物可由 1.2%的洋菜膠片(agarose gel) , 在 TBE buffer 中進行電泳, 以判斷反應物的片段長度及產量。電泳反應條件為電壓 100V , 約半小時後, 將洋菜膠片置於 0.005%溴化乙錠(ethidium bromide ; EtBr)溶液中染色一小時。最後將洋菜膠片置紫外光下拍照解析, 並與標識 DNA(DNA markers ; 1kb ladder or /HindIII)比較。若此增幅反應成功, 則可在約 1.5kb 的位置上發現已增幅的大量特定粒線體 DNA 片段所形成的 PCR 產物。

## (2)引子之設計 :

本研究的引子設計是為了定序出粒線體 DNA 中變異較大的控制區(control region) , 設計實驗所需的引子時要注意的事項有 : (a)引子長度通常為 18-25 個鹼基長。 (b)在所設計的引子序列中 GC 含量約在 40-60% 。 (c)同一反應中

的引子序列不可互補，以免造成自相黏合的情況(d)引子黏合溫度盡量不要相差 5 以上(e)注意模板中所有可能和引子互補的區域，設計時避免含有這些區域(f)如果引子變性了，則至少在 3'個鹼基上存在才可能使反應進行。考慮以上的注意事項，我們選擇使用 P3、PB、PB2、PV、P-phe 及 PT 六組引子做測試，結果我們決定使用 PB 及 P3 作為引子，且以 PB 及 P3 兩組引子所定序出的部分 D-loop 基因片段，為本研究所要探討的主要變異區域。P3 引子位於重股(heavy strand)的 tRNA<sup>pro</sup> 基因上，引子 PB 位於輕股(light strand)的 12S rRNA 基因上，引子 PB2 位於重股的 12S rRNA 基因上，引子 PV 則是位於輕股的 tRNA<sup>val</sup> 基因上，引子 PV 則是位於輕股的 tRNA<sup>phe</sup> 基因上，PT 引子位於重股(heavy strand)的 tRNA<sup>pro</sup> 基因上。引子的位置與序列見圖 2。

#### 四、結果與討論：

##### 樣本採集：

本年度共委託六艘遠洋單拖漁船作為標本船以協助標本魚的採集，其各分屬於台灣各地區漁會計有基隆、宜蘭及高雄等地之作業船其作業漁區亦有所不同。所委託的作業船的有關資料列於 Table.2。標本魚的採集以船上作業同時採集為主，並同時記錄經緯度及採樣日期，採樣的時間自 87 年 10 月至 88 年 8 月分別由委託之漁船於海上作業時所採得，採集從北緯 30 度至北緯 21 度，東經 118 度至 128 度間共得 13 個採樣點。各得 5 至 10 尾標本魚，將所得之標本置於-70 冰箱中冷凍備用。各採樣點之採樣時間、位置、代碼及標本數如 Table. 1 所示。採樣點的相關位置於圖 1。因配合船上作業，故標本採得不易，所以在第二年度計畫將持續委託漁船協助標本採集，並尋求更多漁船協助，以利標本魚的取得。

##### 引子的設計：

粒線體去氧核糖核酸(mitochondrial DNA；mt DNA 見圖 2)相對於細胞核 DNA 來說具有較高的突變率，演化的速度較快，為研究族群結構的良好材料。近年來生物科技的進步，使得粒線體去氧核糖核酸(mitochondrial

DNA ; mt DNA)的序列分析成為族群結構或系群判別研究的重要方法之一，PCR 的技術大量的被引用在此類研究中，使得引子的設計更顯重要，使用適當的引子可以更明確得到所需的 DNA 片段，供作序列變異的探討，選擇引子時，可參考相關文獻來設計引子，使用多種不同序列位置的引子，經由實驗決定最適合的引子。我們決定使用 PB 及 P3 作為引子，P3 引子位於重股(heavy strand)的 tRNA<sup>pro</sup> 基因上，引子 PB 位於輕股(light strand)的 12S rRNA 基因上其序列為：PB：5'- AGTGGGGTATCTAATCCCAG - 3'；P3：5'- AACTTCCATCCTCAACTCCCAAAGC - 3'，且以 PB 及 P3 兩組引子所定序出的部分 D-loop 基因片段，為本研究所要探討的主要變異區域，引子的相關位置見圖 3。

## 參考文獻：

Saishu, K., and R. Ikemoto (1970). Reproductive curve of the lizard fish, *Saurida tumbil* (BLOCH), of the East China Sea group. *Bull. Seikai Reg. Fish. Res. Lab.*, 38:41-59.

Smith, P. J., A. Jamieson and A. J. Birley (1990). Electrophoretic studies and the stock concept in marine teleosts. *J. Cons. Int. Explor. Mer.*, 47:231-245.

Yamada, U. (1969). Spawning and maturity of the lizard fish, *Saurida tumbil* (BLOCH), in the East China Sea. *Bull. Seikai Reg. Fish. Res. Lab.*, 36:21-37.

Yamada, U., M. Tagawa, and H. Mako (1965). Alterations of the maturity affected by population density of the lizard-fish, *Saurida tumbil* (BLOCH), in the East China Sea. *Bull. Seikai Reg. Fish. Res. Lab.*, 33:1-12.

Yamada, U., M. Tagawa, and H. Mako (1966). On the feeding activity of the lizard-fish, *Saurida tumbil* (BLOCH), in the East China Sea. *Bull. Seikai Reg. Fish. Res. Lab.*, 34:11-25.

Yeh, S. Y., H. L. Lai, and H. C. Liu (1977). Age and growth of lizard fish, *Saurida tumbil* (BLOCH), in the East China Sea and the Gulf of Tonkin. *Acta Oceanographica Taiwanica*, 7:134-145.

Yeh, S. Y., and H. C. Liu (1973). Comparative morphometric and meristic studies of lizard fish (*Saurida tumbil*) from the South and the East China Sea. *J. fish. Soc. Taiwan*, 2(2):59-74.



Table.1：標本詳細列表

代碼	採樣地點	標本數	採樣日期
A	金門	8	87.10.21
B	高雄蚵仔寮	3	87.11.12
C	119°10'30" E 22°43' N	13	88.02.22
D	118°36' E 22°39' N	10	88.03.01
E	126°40' E 29°10' N	11	88.03.17
F	122°30' E 27°50' N	10	88.01.05
G	126°58' E 29°28' N	14	87.12.23
H	122°30' E 26°25' N	10	88.04.12
I	118°20' E 22°32' N	8	88.03.08
J	127°15' E 29°38' N	5	87.12.22
K	126°54' E 29°20'2" N	6	87.12.23
L	123°1' E 26°20' N	7	88.04.03
M	宜蘭大溪	12	88.08.16
		共 117 隻	

Table.2：標本船相關資料

船長姓名	船名	所屬漁會
莊信雄	特宏興 261 號	宜蘭蘇澳
林坤池	神逢漁 212 號	宜蘭蘇澳
劉榮山	何合昇 36 號	基隆
黃楨忠	源興 88 號	基隆
周香春	寶興 1 號	基隆
楊船長	昇雄興號	高雄

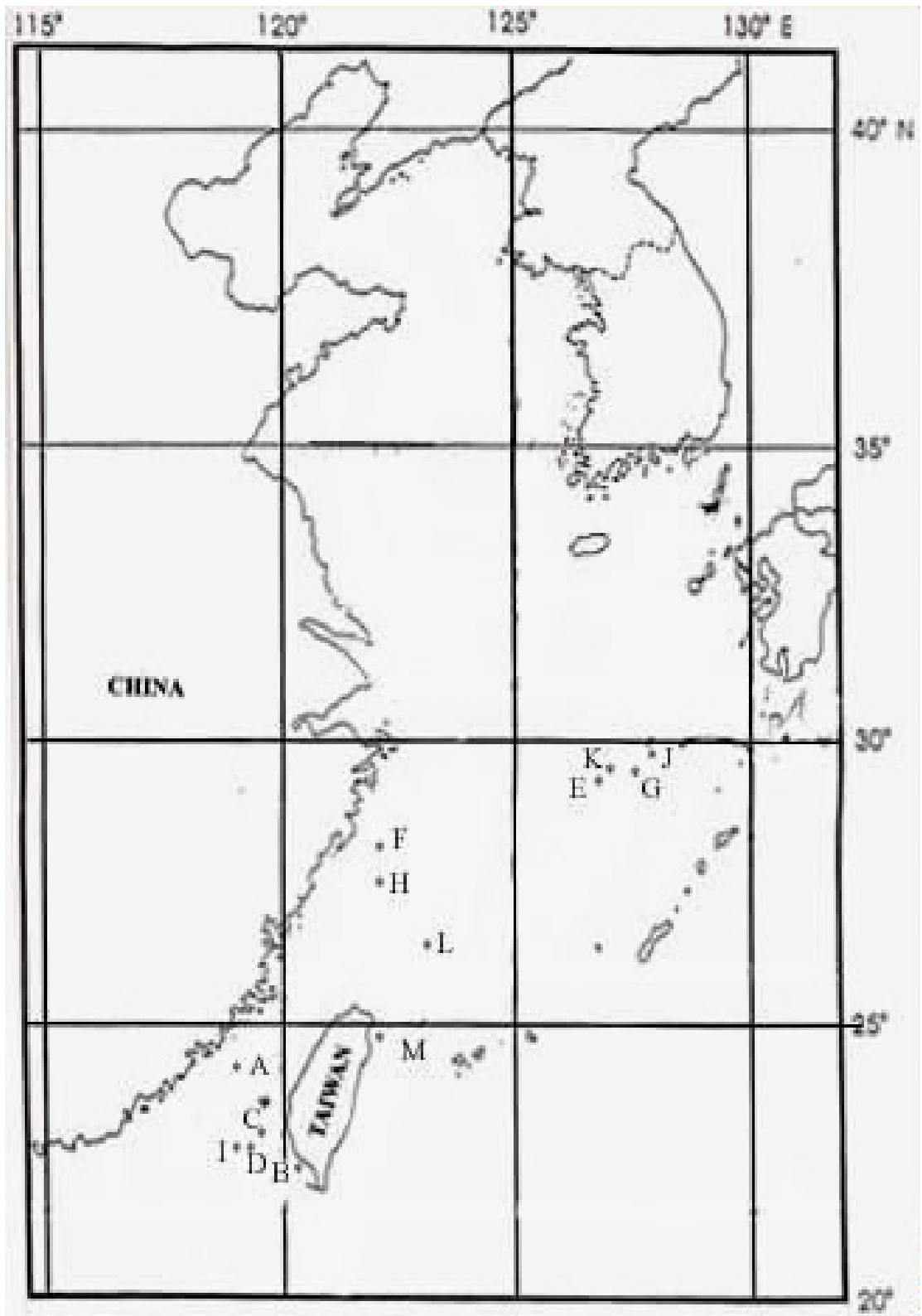


圖 1：各採樣點的相關位置

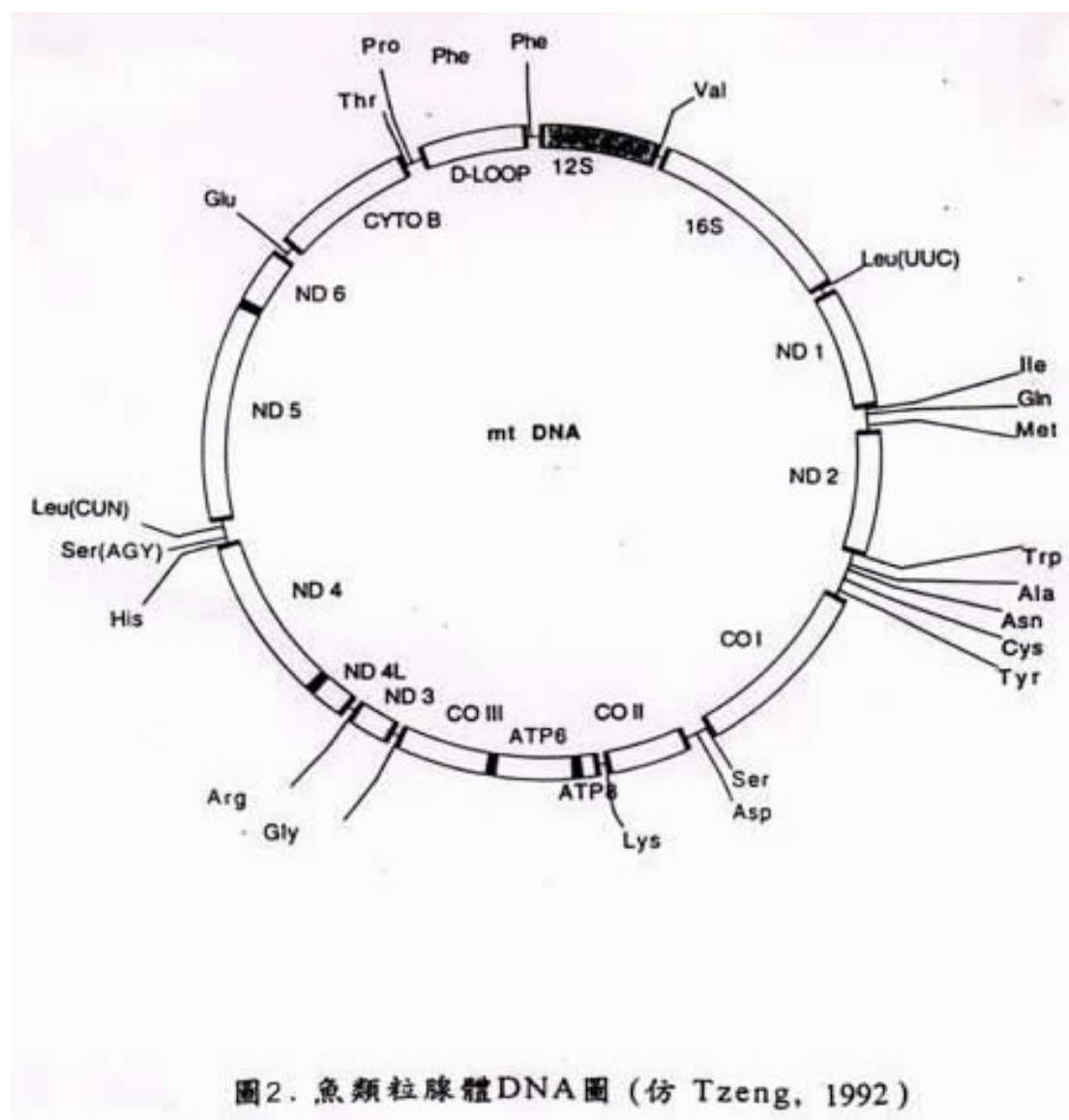
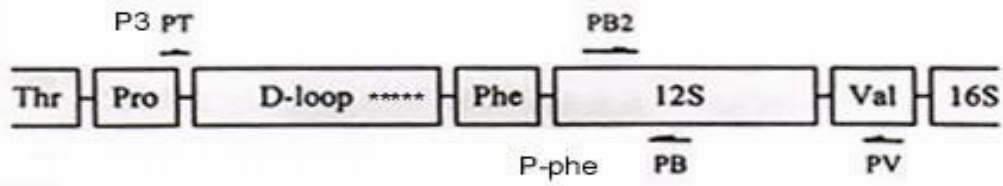


圖2. 魚類粒腺體DNA圖 (仿 Tzeng, 1992)



P3 : H Strand, 5' – AACTT CCATC CTCAA CTCCC AAAGC – 3'

PT : H Strand, 5' – CTTAC TATCA ACTCC CAAAG C – 3'

PB2 : H Strand, 5' –CAAGT TGACA GACAA CGGCG – 3'

PB : H Strand, 5' –AGTGG GGTAT CTAAT CCCAG – 3'

PV : H Strand, 5' –GCACG GATGT CTTCT CGGTG – 3'

P-phe : H Strand, 5' –GCTTT AGTTA AGCTA CG – 3'

圖 3.聚合酶連鎖反應及定序反應所使用的引子及其位置