

行政院國家科學委員會補助  
大專學生研究計畫研究成果報告

\* \*\*\*\*\*  
\* 計 畫  
\* : 以一維電泳和二維電泳鑑定台灣常見的鮪魚魚種  
\* 名 稱  
\* \*\*\*\*\*

執行計畫學生： 范姜群皓  
學生計畫編號： NSC 101-2815-C-041-006-B  
研究期間： 101年07月01日至102年02月28日止，計8個月  
指導教授： 呂雅蕙

處理方式： 本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

執行單位： 嘉南藥理科技大學生活應用與保健系

中華民國 102年03月31日

行政院國家科學委員會補助  
大專學生研究計畫研究成果報告

\*\*\*\*\*

計畫名稱:

以一維電泳和二維電泳鑑定台灣常見的鮪魚魚種

\*\*\*\*\*

執行計畫學生： 范姜群皓、林品瀚

學生計畫編號： NSC 101-2815-C-041-006-B

研究期間：101年7月1日至102年2月底止，計8個月

指導教授： 呂雅蕙 助理教授

處理方式(請勾選)：立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權，一年二年

後可公開查詢

執行單位：嘉南藥理科技大學生活應用與保健系

中華民國 102 年 3 月 28 日

行政院國家科學委員會補助  
大專學生參與專題研究計畫成果報告書

以一維電泳和二維電泳鑑定  
台灣常見的鮪魚魚種

Species Identification of Common  
Tuna by one-dimensional  
electrophoresis and two-dimensional  
electrophoresis

大專生：范姜群皓、林品翰

指導教授：呂雅蕙助理教授

Advisor：Ya-Hui Lu

中華民國 102 年 3 月

# 目錄

壹、 前言.....	1
貳、 文獻整理.....	3
一、 鮪魚的特性、發展與利用	
二、 研究背景	
(一)鮪屬魚類之簡介.....	4
(二)	
1. 黑鮪 ( <i>T. thynnus</i> ).....	5
2. 南方黑鮪 ( <i>T. maccoyii</i> ).....	5
3. 長鰭鮪 ( <i>T. alaunga</i> ).....	5
4. 黃鰭鮪 ( <i>T. albacares</i> ).....	6
5. 大目鮪 ( <i>T. obesus</i> ).....	6
(三)國內捕撈鮪魚情形.....	7
(四)鮪魚主要利用情形.....	7
三、 常見鑑定魚種技術之介紹	
(一)以外觀特徵判定魚種.....	8
(二)以基因分析法鑑定魚種.....	9
1. 直接定序法.....	9
2. 聚合酶連鎖反應-限制片段長度多型性.....	10
3. 多重引子-聚合酶連鎖反.....	10

4. 擴增片段長度多形性分析技術.....	10
(三)以蛋白質分析法鑑定魚種.....	11
1. 十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺膠體電泳.....	11
2. 等電點聚焦電泳法.....	12
3. 二維電泳法.....	14
4. 質譜法.....	15
四、 魚肉肌肉萃取蛋白質與魚種鑑定之關聯性	
(一)肌漿蛋白.....	15
(二)肌原纖維蛋白.....	16
1. 肌凝蛋白.....	16
2. 原肌凝蛋白.....	17
參、 實驗設計圖 .....	18
肆、 材料與方法.....	19
第一章、 基因分析鑑定	
一、 材料.....	19
二、 化學試劑.....	19
三、 實驗方法.....	20
(一)粗萃 DNA.....	20
(二)PCR 產物之電泳分析.....	22

(三)PCR 產物 cytochrome b gene 之定序.....	23
第二章、 蛋白質萃取與電泳分析	
一、 材料.....	24
二、 化學試劑.....	24
三、 實驗方法.....	26
(一)鮪魚肌肉蛋白之萃取.....	26
(二)蛋白質濃度定量.....	28
(三)蛋白質電泳.....	28
伍、 初步結果與討論	
一、 基因實驗.....	39
二、 蛋白質分析.....	39
(一)SDS-PAGE.....	40
(二)UREA-IEF.....	41
陸、 未來研究方向.....	43
柒、 參考文獻.....	53

# 壹、前言

鮪魚為鯖科鮪屬在全世界計 2 亞科 15 屬 51 種 (Nelson, 2006)，臺灣紀錄 1 亞科 11 屬 22 種 (Shen et al., 1993；邵,2009)。主要分布於世界各處的溫帶海域中，體呈紡錘型，全長一公尺到三公尺，尾鰭發育完整，尾柄細瘦且強而有力，尾鰭呈彎月型，兩側有隆起的稜脊，尾部有離鰭 (江, 2005；丁, 2003)。是屬於深海漁獲，且具有高的經濟價值。其中在臺灣常見的魚種有黑鮪 (*T. thynnus*)、長鰭鮪 (*T. alalunga*)、黃鰭鮪(*T. albacores*) 及大目鮪 (*T. obesus*)...等四種 (沈, 1993；傅, 2000；Haward and Bergin, 2000...)。

鮪魚是高度迴游性的物種，壽命可達十數年，為海中大型掠食性動物，而鮪魚身為海洋食物鍊上層的「消費者」。肉食性，以小魚、糠蝦類、魷魚類小動物為食，會隨著季節變化，乘著暖流做大回流之特性，為非常重要的迴游性經濟食用魚種 (江, 2005)。我國遠洋鮪釣船在地中海捕獲黑鮪魚，在每年的三月至五月為主要的魚季，而太平洋黑鮪在每年的四月到七月間，洄游至臺灣的東部。國內鮪魚漁業中，延繩釣的方法最為常見，大規模的捕捉釣線可長達數十公里以上，釣鉤多達上千個 (歐, 1981)。

相關政府與觀光局，將屏東的東港結合了黑鮪文化季的特殊活動，使得鮪魚的知名度大幅提升，促成了相關產業的發展，同業的相互競爭，造成鮪魚過度的捕撈，導致鮪魚的產量逐漸下降。漁業署統計在 2001 年國內鮪魚產量為 264,867 公噸 (漁業署, 2001)。而在 2010 年國內鮪魚產量明顯減少為 172,818 公噸 (漁業署, 2010)。近幾年由於遠洋鮪魚配額遭到調降，以及沿近海域鮪魚捕獲量減少，造成魚貨供應量時多時少；另一方面，由於燃油價格高漲，導致長時間作業之鮪魚船成本增加，然而在去年鮪魚供應量減少。黑鮪魚價格上漲，鮪魚價格從 2001 年每公斤 398 元 (漁業署, 2001)，2007 年鮪魚價格漲到每公斤 484 元 (漁業署, 2007)，使得鮪魚市場的價格勢必面臨更激烈的競爭(鄭, 2006)。推測可能會有在銷售過程中參假、偽造等詐欺事件發生，使用價位較低的魚種，來充當價位較高的魚種來販售，以混淆消費者購買，藉此謀取利潤。



## 貳、文獻整理

### 一、 鮪魚的特性、發展與利用

鮪魚在世界上屬於高經濟魚種，在世界各地扮演著重要的貿易角色 (Tiziana Pepe et al., 2009)。隨著科技的進步，魚船的大型化、捕獲的設備及超低溫冷藏設備的進步。我國發展鮪魚漁業以歷史悠久，初期發展主要以附近沿海的海域為主，漁產量迅速成長，在配合國家整體發展遠洋漁業之政策下，我國的遠洋漁業才開始邁向國際；1950 年至 1996 年間，全球魚產量成長六倍，而同期間台灣的漁產量從十萬餘公噸成長一百三十餘萬公噸，成長十三倍；1998 年以遠洋漁業產量，達 62% (Haward and Bergin, 2000；曾,2010)。鮪魚在整體漁獲產值極為重要，為我國重要之經濟魚種。鮪魚生產供貨主要來自於遠洋鮪釣漁業，大多在國外卸貨直接在當地加工製成鮪魚產品，或以生鮮的型態做販售。鮪魚肉質鮮美，營養價值高，屬於高級海鮮魚種，鮪魚的體型比一般的魚明顯大上好幾倍，市面上常以生魚片、罐頭或事其他加工產品的方式做販售，由於在販售的過程中會將其特徵去除，也無法以肌肉或外觀顏色等辨識魚種，且魚肉也經過切割的處理，在辨識上

更佳的困難。另外，鮪罐的加工應用一直廣受消費者喜愛。由於消費者無法直接以外觀特徵區別鮪魚種，因此市面上鮪魚切片或包裝加工產品其真正來源魚種不得而知。由此可知，在市面上販售的生魚片是沒有辦法從觀察魚肉來分辨，往往容易造成使用單價較低的魚種，來代替單價較高魚種，來謀取中的差價。

## 二、 研究背景

### (一) 鮪屬魚類之簡介:

鮪魚在生物分類學上屬硬骨魚綱 (Class Osteichthyes)；鱸目 (Perciformes)；鯖亞目 (Scombroidei)；鯖科 (Scombridae)；鮪屬 (*Thunnus*)；又稱金槍魚 (沈, 1993)。

目前世界上已知的鮪屬魚種共七種 (species) 與一亞種 (sub-species)...，包括:

1. *Thunnus orientalis* (pacific bluefin tuna；黑鮪)
2. *Thunnus thynnus* (atlantic bluefin tuna；北方黑鮪)
3. *T. maccoyii* (southern bluefin tuna；南方黑鮪)...
4. *T. alalunga* (albacore；長鰭鮪)
5. *T. albacores* (yellowfin tuna；黃鰭鮪)
6. *T. obesus* (bigeye tuna；大目鮪)
7. *T. tonggol* (longtail tuna；小黃鰭鮪)...

8. *T. thynnus orientalis* (Atlantic northern bluefin tuna ; 為 *T. thynnus* 之亞種)(Collette and Nauen, 1983 ; 沈, 1993) 。台灣常見的遠洋漁獲鮪屬魚種主要有黑鮪 (*T.thynnus*) ; 長鰭鮪 (*T.Alalunga*) ; 黃鰭鮪 (*T.albacores*) 及大目鮪 (*T.obesus*)等四種(沈, 1993 ; 傅, 2000 ; Haward and Bergin, 2000) 。

1. 黑鮪 (*T. thynnus*) 俗稱黑甕串、金槍魚，主要分布於北半球的溫帶海域，包括大西洋 (含地中海)、及北太平洋在印度洋及南半球非常得少見，屬於高度洄游魚種，為我國小型延繩釣季節性作業之高經濟魚種 (沈, 1993 ; 胡, 2000 ; Takeyama et al., 2001) 。且為體型最大之鮪魚，體長最大可達 300cm，體重達 680 kg ; 胸鰭比頭部短，僅約延伸至背鰭第 11 棘下方，體背為黑綠色而腹面為銀白色，第二背鰭灰色有黃邊，背鰭之離鰭為黃色，其餘背鰭皆為灰色。

2. 南方黑鮪 (*T. maccoyii*) 俗稱油串、印度鮪，主要分布於南半球，三大洋南緯 30-50 度間之溫帶水域，屬高度洄游魚種，最適水溫約在 10-15°C 間 (Carter et al., 1988 ; 胡, 2000) ; 外型與黑鮪相近，主要差別在於南方黑鮪之胸鰭較長，且尾部之隆起稜為黃色 (沈, 1993 ; Carter et al., 1998 ; 傅, 2000)

3. 長鰭鮪 (*T. alaunga*) 俗名白肉串，廣泛的分布於大西洋、

太平洋及印度洋三大洋之熱帶、溫帶海域，北緯可達 45-50 度間，南緯可達 30-40 度間之海域，在赤道南北緯 10 度間較少發現其蹤跡，最適水溫為 10-20°C 之冷水域 (沈, 1993；胡, 2000)。胸鰭特長且超過臀鰭是最明顯的特徵，體背藍綠色而腹面銀白色，胸鰭為黑色而其餘背鰭皆為灰色 (沈, 1993；傅, 2000)。

4. 黃鰭鮪 (*T. albacares*) 俗名串仔，亦廣泛分布於三大洋之熱帶、亞熱帶海域，約為南北緯 40 度間之海域，最適水溫為 19-26°C，主要棲息於水溫躍層以淺，夜間比白天更接近表層 (Niwa et al., 2003; 胡, 2000)。第二背鰭、臀鰭及各離鰭皆為鮮黃色為明顯特徵，第二背鰭及臀鰭呈長鐮刀型且較胸鰭為長；體背黑色而腹面銀白色，體長最大可達 200cm、體重 170 kg 以上，一般體長約 150 cm (沈, 1993；傅, 2000)。

5. 大目鮪 (*T. obesus*) 俗名大目串、短鮪，其分布海域大致上與黃鰭鮪相同，分布於三大洋之熱帶、亞熱帶海域，約為南北緯 40 度間之海域，其最適水溫範圍 10-15 °C 之間 (胡, 2000；appleyard et al., 2002)。頭高眼大為明顯特徵，其眼大於吻長的一半，胸鰭長而尖，各離鰭鮮黃色而具黑邊，其於各鰭皆為灰色，體背綠黑色而腹面銀白色，體長最大可達 200cm、體重 200 kg 以上。長鰭鮪、黃鰭鮪及大目鮪三種鮪普遍分布全球各海域，是

最為常見捕獲的魚種。

## (二) 國內捕撈鮪魚情形

台灣常見的鮪魚有黃鰭鮪、大目鮪及長鰭鮪等，是我國產量最多的三種，且在每年的四月到六月間可看到黑鮪（丁，2003）。黑鮪魚的魚汛期主要在每年的四月至七月，漁獲以黑潮所經之縣市為主，如：屏東縣東港、台東縣的成功、宜蘭縣的南方澳等。國內主要捕獲鮪魚的方法為延繩釣法。而捕獲的鮪魚其高價位的部分，以超低溫搬運船送至日本銷售，少部分鮪魚在我國遠洋漁船回國時，運回台灣供應國內市場；國內生鮮鮪魚的供應，以沿近海鮪釣漁船與遠洋漁船各約占一半（林，2003）。

## (三) 鮪魚主要利用情形

鮪魚在漁業經濟中具有很高的價值，且含有豐富的蛋白質，鮪魚肉一般成分中水分 74%、蛋白質 24.3%、脂肪 0.4%（香，2007）。鮪魚去除的內臟，可加工做為魚露產品（Dissaraphong, Benjakul, Visessanguan, & Kishimura, 2006）。另外鮪魚的頭也被使用做為魚油的原料，包含大量的  $\omega$ -3 脂肪酸（Chantachum, Benjakul, & Sriwirat, 2000）。在國內將捕獲回來的鮪魚做分級篩選，等級較高的部分送至日本製成生魚片（張，1997；Haward and Bergin, 2000）。由於鮪魚體型大，適合製成生魚片、加工產品、

鮪魚糖、鮪魚肉鬆等熱加工產品。鮪魚罐頭主要以長鰭鮪為主，由長鰭鮪製成白肉罐頭 (white meat tuna)，在市場販售價格高；其他如黃鰭鮪、大目鮪製成淺色肉質的鮪魚罐頭 (light meat tuna)。依肉型及裝填的形狀可分為固態裝罐 (solid pack，只取大塊肉)、碎肉 (flake，細碎肉)、長片肉 (chunk，以一口可食用的大小為主體)。鮪魚罐頭的製造，將原料魚去除內臟直接以 100~105°C 的蒸氣加熱蒸煮，此蒸熟 (steaming) 主要目的是使蛋白質變性，會使肉質固定，有助於往後的作業，防止製品肉組織潰散以及產生汁液的混濁，且使酵素失去活性，防止製造過程中品質下低。洗淨 (cleaning) 此步驟為將皮、鱗、骨、血和肉及變色部分去除，清洗後再經切斷、填裝，依製品種類不同，注入調味液，經密封、殺菌、冷卻，即可得到鮪魚罐頭。(林, 2003)。

### 三、常見鑑定魚種技術之介紹

#### (一) 以外觀特徵判定魚種

一般鑑定魚種大多由外觀的特徵來判斷，而分類學上學者會以骨骼學、肌肉學、歧支分類學、生活史特徵或是以鰭、鱗片以及腸型特徵等來區分魚種 (Tyler, 1980; Rosen, 1984; Winterbottom, 1970)。這些皆以外觀型態為依據，但也常常因考量性質的不同，分析出的結果也有所不同。且在親緣關係並非密切的生物群中，

可能會因生活在相同或是相似的環境中，而使無親緣關係的動物產生相似的外在型態，但是這些外在特徵並不能成為分類的依據 (Morton, 1979)。鮪魚雖然可以從外觀的特徵來分辨，但除了大型魚市場販售的現宰鮪魚，一般市面上所販售的生魚片、罐頭等加工產品，魚體經過切割或是加工處理，無法以外觀來判定魚種，因此必須使用其他方法做更進一步的鑑定 (林, 2003)。

## (二) 以基因分析法鑑定魚種

以外觀來檢測魚產品是有限的，隨者基因技術的進步，分類學家將鑑定漸漸轉移至穩定不易變易的 DNA 上。以 DNA 為基礎的方法是最有效的方法之一，由於它是非常精確的工具，可以運用在生活中不同的水產品種類，事實上它幾乎可以鑑定全部的樣品，包含剪下來的鰭、灌頭、乾組織 (Viñas & Tudela, 2009)。而其使用基因技術多建立在以聚合酶連鎖反應上 (Polymerase chain reaction, PCR) 方法來增幅基因片段，目前的基因鑑定分析法其目標以多以粒線體 (Mitochondria) 所含之 DNA 為主，常使用基因分析方法如下：

### 1. 直接定序法 (Direct sequence analysis)

直接定序法是為要了解物種間的演化關係及變異度，而直接對增幅出的 PCR 產物進行序列分析比對，由於是直接使用

DNA 定序解碼，因此其準確性高 (Stepien et al., 1993 ; Broughton and Dowling,1994)。在魚種鑑定的部分，亦有學者將此方法使用於沙丁魚 (Jerome et al., 2003)。

## 2. 聚合酶連鎖反應-限制片段長度多型性 (PCR-restriction fragment length polymorphism,PCR-RFLP)

PCR-RFLP 為目前最常被用來鑑定魚種的方法，其原理是將 DNA 經過特異性基因引子增幅過後，將得到的 DNA 片段以限制酶切割，造成不同片段的大小，藉此區分魚種，為簡易、準確與快速之方法，不過所需要的基礎資料多，需先建立基因資料庫以尋找合適的限制酶來區分魚種 (Jaime et al., 1998)。此方法也被廣為利用做為魚肉之魚種鑑定 (Sebastio et al., 2001 ; Comesana et al., 2003 ; Karaiskou et al., 2003)。

## 3. 多重引子-聚合酶連鎖反應 (Multiplex-PCR)

多重引子 PCR 是同時混和多組的特異性引子在試驗管中，在以 PCR 增幅出目標樣品的基因片段，再以差異性片段長度為依據，判別所檢測樣品種類，為一種針對不同目標檢體設計，不同目標基因片段長度的特異性基因引子。此方法為一種快速且簡單的鑑別方法，這種方法目前廣泛的利用在微生物、肉品及基因改造食品，做為快速檢測的方法 (陳, 2007a)。

## 4. 擴增片段長度多形性分析技術 (Amplified fragment length



polymorphism, AFLP)

結合 RFLP 與 AFLP，可更精準的提供族群分布的差異或親本與雜交種間的差異性 (Beismann et al., 1997)。此技術最大的特點就是在轉接子 (Adapter)，這兩個轉接子可分別在雙酵素切割後加以黏接。雖然 AFLP 技術具有高的穩定性及重複性等優點，但是缺點是技術繁瑣且成本費用較高 (陳, 2007)

### (三) 以蛋白質分析法鑑定魚種

在做鑑定方面，除了一般的外觀判定及基因分析法外，蛋白質抗體-抗原反應來鑑定魚種的親緣關係，此方法廣泛的被使用來鑑定，可供分析辨別新鮮及不同加工程度之魚種中肌漿蛋白及水溶性蛋白質，以利用其親緣關係分析。已有學者綜合歸納一些針對新鮮及加工過之魚製品的魚種鑑定方法 (Mackie, 1990; Sotelo, 1993)，其中包括有：

#### 1. 十二烷基硫酸鈉聚丙稀醯胺膠體電泳 (Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)

SDS-PAGE 為最普遍的蛋白質分析方法，做為鑑定魚種的方法 (Hashimoto et al., 1984; Scobbie and Mackie, 1988)。其原理是利用電荷效應級分子篩效應，並在樣品中加入 SDS，可以使樣品蛋白質中具有等量的負電荷，使蛋白質展開呈線性，因此影響蛋白質泳動的因素只剩下蛋白質分子量的大小，對於不同分子量之

蛋白質樣品可提供液高解析度且有效率的分析，並可以做為蛋白質定性之用。Chen and Hwang (2002) 分析七種台灣常見河豚之蛋白質 SDS-PAGE 圖譜以作為河豚魚種的鑑別方式，結果顯示分子量大於 30 kDa 之的蛋白質並無明顯特異的亮帶，特別是低於 30 kDa 之蛋白質則有特異性亮帶的存在，顯示以肌原纖維蛋白質之小分子量種特異性蛋白含量較多。不過對於相近的魚種，電泳結果則會相似較無鑑別性，必須配合其他方法進行分析 (Mackie et al., 2000)。

另外，以 Coomassie blue 和銀染進行復染，結果顯示其亮帶的呈現效果較單獨使用 Coomassie blue 好，因此學者建議在進行 SDS-PAGE 電泳分析時以復染的方是染色，有助於結果的判讀 (林, 2012)。

## 2. 等電點聚焦電泳法 (Isoelectric focusing electrophoresis, IEF)

等電點聚焦電泳法是用來分離帶電量不同之蛋白質分子或胜肽分子，其原理是利用不同的蛋白質所具有之等電點不同，蛋白質在酸鹼梯度的膠片上泳動，以電壓使待測分子在此環境中泳動在泳動過程中帶測分子會不斷改變帶電量，當其靜電荷等於零時，表示到達該等電點 (Isoelectric point)，會停止移動而分離的效果 (Chiou and Wu, 1999 ; Etienne et al., 1999 ; Hashimoto et al.,

1984；Wei et al., 1990)。對於生鮮水產品之魚種鑑定的蛋白質電泳部分，IEF 是一套已完整建立之技術，可用來監控辨識水產品之真偽 (AOAC, 1995；Mackie, 1997；Rehbein, 1990)。對於魚種鑑定則是利用肌肉中之水溶性肌漿蛋白質之等電點不同進行分析比對，以鑑別魚種 (林, 2012)。

以加熱的方式會導致蛋白質變性及蛋白質溶解度下降 (Yowell and Furkly, 1986)，因加熱導致蛋白質變性而溶解度下降，使用 Urea 來增加蛋白質的溶解，蛋白質溶解度有助於電泳分析 (An et al., 1989)。因此鑑別魚肉加工製品可使用 urea-IEF 的方法來加以辨別其他魚種 (Huang et al., 1990；Lundstrom, 1980；Plowman and Herbert, 1992；Rehbein, 1990)。Rehbein et al. (1995) 則是針對歐洲八國共十一種不同魚種進行 IEF 鑑定分析，結果顯示此十一種不同魚種各有其獨特之種特異圖譜，且在等電點較小之蛋白質部分差異較為明顯。Plowman and Herbert (1992) 則是探討加熱對於低等電點之蛋白質 (pH 2.5-7) 之蛋白質的影響，結果顯示在加熱處理後，對蛋白質會造成凝結、溶解等影響。而 Mackie et al. (2000) 利用 Urea-IEF 及 SDS-PAGE 的方法應用在鮭魚及鰻魚等常見魚類燻製品的鑑別上，顯示此二種方法對於魚種皆有良好的鑑別性。

### 3. 二維電泳法 (Two-dimensional electrophoresis, 2-DE)

二維電泳法是結合了等電點聚焦電泳 IEF 與 SDS-PAGE 兩種方法，首先透過 IEF 依照等電點不同來分離蛋白質，接著在將 IEF 膠條進行 SDS-PAGE，分離同 pI 值但不同分子量的蛋白質，故此方法具有相當高的分離性。Pineiro et al. (1999) 利用 2-DE 分析八種西班牙鱈科魚類之水溶性蛋白質圖譜，而在一維電泳 IEF 中方能清楚區分此八種鱈科魚類，而學者推測 pI 值小於 4.6 屬於熱穩定性蛋白質，可用在魚產品加工鑑定上，再以第二維 SDS-PAGE 分離後，經軟體掃描分析後顯示，更能顯示其魚種間的圖譜差異，尤其在 pI 小於 4.6 的這些熱穩定酸性蛋白質差異較為明顯。Chen et al. (2004) 利用二維電泳分析七種不同的河魨魚種所得的二維電泳圖譜之結果，觀察到這七種河魨在低 pH 值 3.5-7.0 以及低分子量 7.4-45.0 kDa 之間會有不同的電泳圖譜出現，能夠順利鑑別出這七種不同的河魨。López et al., (2002) 以二維電泳，分析三種不同的貽貝，所得的二維電泳圖譜結果，發現這三種貽貝在 pH 3-10 有電泳圖譜出現，能夠順利鑑別出三種不同貽貝。Etienne et al. (1999) 亦聯合歐洲數個實驗群組，證實利用 IEF 以及 SDS-PAGE 分析魚肉蛋白之電泳圖，可確實應用於新鮮以及加工魚種之鑑別，顯示出利用魚肉蛋白之蛋

白質電泳以及免疫偵測法，應用於魚種鑑定之可行性。

#### 4. 質譜法 (Mass spectrometry, MS)

質譜儀離子源，可將含有蛋白質的水溶液樣本注入毛細管，並在金屬細管與相對電極間加數千伏特的電位差，就能產生電噴灑現象。溶液中的帶電離子或高級性分子在大氣壓力下經由電噴灑的過程轉換為氣象離子，再利用質量分析器量測質荷比 ( $m/z$ )，計算出分析的分子質量。分析蛋白質的胺基酸序列，因為蛋白質是由二十種胺基酸分子以不同數目及排序聚合而成，分析時先用蛋白質分解酵素 (如胰蛋白酶 trypsin) 處理蛋白質樣品，使蛋白質被剪切為一群獨特的、大小不同、質量不一的多胜肽片段，這些多胜肽片段就如同指紋一樣，具有獨特性，重複的機會非常小。因此每一個基因所轉譯出來的蛋白質，及其被胰蛋白酶切割形成多胜肽片段的質量與數量，皆可利用生物資訊學所發展出的分析軟體加以預測，測出該蛋白質的完整胺基酸序列 (郭, 2012)。

#### 四、 魚肉肌肉萃取蛋白質與魚種鑑定之關聯性

##### (一) 肌漿蛋白

肌漿蛋白是屬於水溶性蛋白質，存在於 Sarcoplasm 內，可用純水或離子強度小於 0.1 M 鹽溶液萃取出蛋白質，其含有與醣解作用有關之酵素群、磷酸轉位酵素、蛋白質水解酵素、肌紅

蛋白質等，目前至少有 100 種已知的蛋白質為水溶性蛋白質 (Asghar et al., 1984)。SDS-PAGE 可用來分類魚類之水溶性蛋白質抽取物，依不同分子量的密度百分比組成可瞭解不同魚種之特性。其中較特別的是 35 kDa、40 kDa 及 43 kDa 三者之密度變化，因魚種不同而差異較大 (Nakagawa et al., 1998a)。再將此三種蛋白質以 Sephadex G-150 進行膠過濾分類時，則發現 43 kDa 可能為 Creatine kinase，40 kDa 可能是 Aldolase，35 kDa 可能是 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Nakagawa et al., 1998)。

## (二) 肌原纖維蛋白

肌原纖維蛋白可擔當特殊伸縮機能之蛋白質，能夠被高離子強度之鹽液抽出溶，故屬於鹽溶性蛋白質，在魚肉中佔總肌肉蛋白質之 60-75% 重量，是影響水產加工製品之重要因子 (Asghar et al., 1984；Niwa et al., 1985)。若依其生理功能可分成兩大類：收縮蛋白質 (Contractile proteins)，例如構成粗纖維 (Thick filament) 之肌凝蛋白 (Myosin) 和構成細纖維 (Thin filament) 之肌動蛋白 (Actin)；而主要調節蛋白質 (Regulatory proteins)，例如原肌凝蛋白 (Tropomyosin, TM) 和肌鈣蛋白 (Troponin, TN)，與魚種鑑定較為相關之肌原纖維蛋白質為：

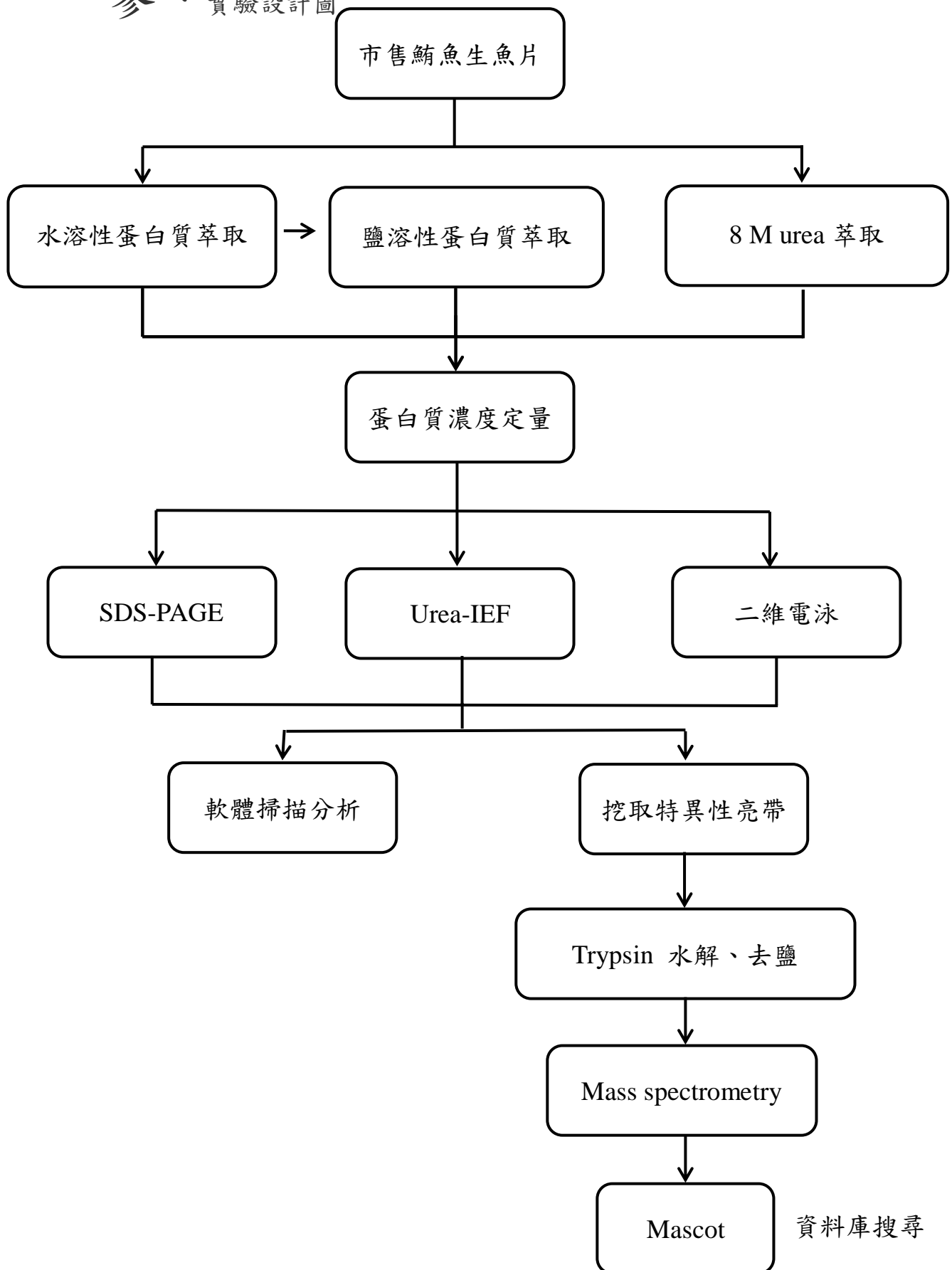
### 1. 肌凝蛋白

其量約佔全肌原纖維蛋白質之一半，分子量為 450-500 kDa (Asghar et al., 1984)，有兩條分子量約 200 kDa 之重鏈 (Heavy chain) 及分子量約為 20 kDa 之四條輕鏈 (Light chain) 所組成 (Matsuura and Arai, 1987; Chen et al., 1988)。其輕鏈之分子量和組成不但因動物種類的不同而有所差異，即使為同一種動物之不同器官也有所差異，而且其分子量和組成即使經加熱或凍結也不會有所變化，因此可利用此特性作為魚種之鑑定用 (Ojima and Nishita, 1987)。

## 2. 原肌凝蛋白

陸上動物之原肌凝蛋白為一非常細長之蛋白質分子，約佔總肌原纖維蛋白質的 5%，分子量為 65-73 kDa (Asghar et al., 1984)，具有兩條 Polypeptides，分別為  $\alpha$  型和  $\beta$  型。但魚類之 TM 大部份皆只含有一條 Polypeptide，屬於  $\alpha\alpha$  型，分子量約 34 kDa (Ojima, 1989)。原肌凝蛋白之熱安定性相當高，於 100°C 熱水中加熱 10 分鐘仍很安定，因此可利用 SDS-PAGE 之技術來鑑別加熱過之加工品原料魚種 (Suzuki, 1981)。

參、實驗設計圖





# 肆、材料與方法

## 第一章、基因分析鑑定

### 一、材料

本實驗所採用之鮪魚魚種為：黃鰭鮪(*T. Albacares* ; yellowfin tuna)、大目鮪 (*T. Obesus* ; bigeye tuna)、南方黑鮪 (*T.maccoyii* ; Southan bluefin tuna ) 及黑鮪 (*Thunnus thynnus* ; Bluefin tuna ) , 樣品採樣至基隆仁愛市場、桃園、屏東東港魚市場採得部份魚肉，另亦從臺北生魚片專賣店取得樣品，採樣時間均為 101 年 7 月，樣品取得後以冰藏方式帶回實驗室，並存放於 -20 °C 冰箱中。

### 二、化學試藥

1. Lysis buffer : Tris-HCl (0.5M , Ph8.0)、SDS(10%)、NaCl ( 2M ) 、 EDTA ( 0.1M , Ph8.0) 和二次蒸餾水及 proteinase K(10 µg/ml)
2. Chemagic DNA Tissue 10 Kit :  
Magnetic beads  
Wash buffer 3  
Wash buffer 4  
Wash buffer 5  
Elution buffer 6
3. Primer : H 15149 ad 、 L newset-1
4. PCR buffer : ( 包含 20mM Tris-HCl 、 15mM MgCl<sub>2</sub> 、 1% TritonX-100 、 0.1mM EDTA 、 50% Glycerol)
5. Dntp (包含 dATP 、 dTTP 、 dGTP 和 dGTP)

6. 5U 的 Pro Taq polymerase
7. 2 % 、3 % agarose gel
8. MW marker. Bio 100 bp 及 50 bp 之 marker
9. 0.5X TBE buffer

### 三、 實驗方法

#### (一)粗萃 DNA

抽取 DNA (包含 genomic DNA 及 mitochondril DNA) 依照 DeSalle and Birstein (1996) 之方法做修改：

1. 將魚肉以滅菌過的小剪刀剪約 0.1 g 放入微量離心管 (eppendorf) 加入 150  $\mu$ l Lysis buffer (包含 Tris-HCl (0.5M , Ph8.0) 0.1mL、SDS(10%) 0.1 mL、NaCl ( 2M ) 0.1 mL 、EDTA ( 0.1M , Ph8.0 ) 0.1 mL 和二次蒸餾水 0.5 mL ) 及 proteinase K 。
2. 將微量離心管置入 51  $^{\circ}$ C 恆溫乾浴震盪器中反應至試管中魚肉完全分解，時間約 1 小時，分解後以 15,000 rpm 離心 10 分鐘 取上清液備用。
3. 放入 KingFisher 中萃取 1 小時，取 H 格中的 DNA 萃取液 100  $\mu$ l 於微量離心管備用。
4. 引子(primer)選擇

本實驗所使用 primer 為 L newset-1 與 H 15149 ad。

## 5. 聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR)

PCR 增幅反應於總體積 50  $\mu$ l 的反應液內進行，包含萃取之 DNA template、引子對 (F + R primer pairs)、200  $\mu$ M dNTPs、5  $\mu$ l 的 Pro Taq DNA polymerase (Promega, Wisconsin, USA)、PCR buffer (包含 20mM Tris-HCl、15mM MgCl<sub>2</sub>、1% TritonX-100、0.1mM EDTA、50% Glycerol)。試劑添加完後送入溫度循環機

GeneAmp PCR System 2400：

Reagent	Concentration	Volume( $\mu$ l )
Template DNA	50 $\mu$ M	4
Primer L newset	25 $\mu$ M	1
Primer H 15149 ad	25 $\mu$ M	1
DNDPs	100 $\mu$ M	2
Taq DNA polymerase	5 U / $\mu$ l	1
10 X PCR buffer		7
Deionized water		34
Total Volume		50

A. 起始 denaturation 步驟：以 95 °C 加熱 10 分鐘，利用高溫

打斷核酸之間氫鍵的鍵結，使 DNA 雙股完全打開成單股。

B. 熱循環反應 35 次，包括 3 個溫度循環反應：

(A) 95 °C，1 分鐘，此步驟使雙股 template DNA 變性打開 (denaturation)。

(B) 約 50 °C 至 54 °C，1 分鐘，此步驟使 template

mtDNA 與引子黏合 (annealing)。

(C) 72 °C，1 分鐘，此步驟使 DNA polymerase 進行延伸反應 (extension)。

C. 最後 extension 步驟：72 °C，10 分鐘。反應結束後即可將 PCR 產物 (PCR product) 取出，於 -20 °C 凍藏。

## (二)PCR 產物之電泳分析

1. PCR 產物以電泳方式測試，以 0.5X TBE buffer 配置 2% agarose gel，其中 TBE buffer 包含 0.089 M Tris、0.089 M boric acid 及 0.002 M EDTA (pH8.0)，加熱使 agarose 完全溶解，加入 Healthview DNA 染劑 (GenScript, Piscataway, USA) 並混合均勻 (1 $\mu$ L Healthview : 50 mL agarose gel)，將混合溶液倒入製膠器待其冷卻凝膠。
2. 取 100 bp DNA Ladder 作為標記 marker，再取 5  $\mu$ l PCR 產物與 1 $\mu$ l 之 loading dye 混合。
3. 在 0.5 X TBE buffer 的環境下，以 100 V 進行電泳 40 分鐘。
4. 電泳後，以紫外燈照相系統觀察結果、照相並存檔，卻認 PCR 產物是否增幅成功。
5. 觀察 PCR 產物 與 marker 標記之亮帶 (band) 相對位置，

檢視增幅片段大小是否正確，以及增幅片段是否專一。

### (三)PCR 產物 cytochrome b gene 之定序

PCR 產物送至國立臺灣海洋大學水產試驗中心或明欣生物科技有限公司（臺北，臺灣）進行定序，前者使用之定序儀機型為 ABI 3130 Genetic and Analyzer，所使用試劑為 Bigdye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit；後者使用之定序儀機型為 ABI PRISM 337-96 DNA Sequencer (Perkin-Elmer, CA, USA,)，所使用試劑為 ABI PRISM Bigdye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Applied Biosystem, CA, USA)。

### (四)建構部份 Cyt b 基因序列

利用引子 H 15149ad (5'-GCNCCTCARAATGAYATTTGTCCTCA-3') & Lnewset1 (5'-CTTCCTACCCCCTCAAACATTTCHGCMTGRTGAAA-3') 增幅 4 種鮪魚種之 Cyt b 基因部份片段 (368bp) 定序後的序列經過 Vector NTI Advance 9.0 軟體分析比對所增幅的序列。去除定序結果的引子序列，得到 Cyt b 序列 (307bp)，建構出其序列，最後將所建構之序列上傳至 NCBI 之 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) 功能進行分析比對，搜尋相似度達 99% 以上之 Cyt b 基因序列，以確定該序列之物種。由結果 (圖一) 顯示該引子對 H 15149ad & Lnewset1 可增幅 4 種鮪魚種之

Cyt b 基因，並經過資料庫搜尋確定 編號 B 為黑鮪 (*T. thynnus*)、編號 E 為大目鮪 (*T. obesus*)、編號 S 為南方黑鮪 (*T. maccoyii*)，編號 Y 為黃鰹鮪 (*T. albacares*)。

## 第二章、蛋白質萃取與電泳分析

### 一、材料

本實驗所採用之鮪魚魚種為：黃鰹鮪(*T. Albacares*；yellowfin tuna)、大目鮪 (*T. Obesus*；bigeye tuna)、南方黑鮪 (*T.maccoyii*；Southan bluefin tuna ) 及黑鮪 (*Thunnus orientals*；pacific bluefin tuna)，樣品採樣至基隆仁愛市場、桃園、屏東東港魚市場採得部份魚肉，另亦從臺北生魚片專賣店取得樣品，採樣時間均為 101 年 7 月，樣品取得後以冰藏方式帶回實驗室，並存放於 -20°C 冰箱中。

### 二、化學試藥

#### (一)蛋白質萃取試藥

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、EDTA、KCl 購自 Merck (Darmstadt,Germany)；Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)、Sodium azide 購自 Sigma (St. Louis, USA)；與 DTT 購自 GE Healthcare (Uppsala,Sweden)。

## (二)蛋白質定量試藥

Albumin standard 購自 Thermo (Rockford, USA) ; Bio-Rad protein assay 購自 Bio-Rad (CA, USA) 。

## (三)SDS-PAGE 試藥

SDS 、 Amminonium persulfate (APS) 、 TEMED 、 Tris base (Hydroxymethyl-aminomethane) 、 Glycerol 、 Bromophenol blue 與 -mercaptoethanol 購自 GE Healthcare (Uppsala,Sweden) ; Glycine 與 40% Acrylamide (37.5:1) 購自 Bioman (Burlington, Canada) ; HCl 購自 Merck (Darmstadt, Germany) 。

## (四)Urea-IEF 電泳試藥

Urea 、 Amminonium persulfate (APS) 、 TEMED 、 Glycerol 、 與 Acetic acid 購自 GE Healthcare (Uppsala,Sweden) ; Bio-Lyte 3/10 Ampholyte 、 Bio-Lyte 3/5 Ampholyte 購自 Bio-Raid (CA, USA) ,  $H_3PO_4$  、 NaOH 與 acetone 購自 Merck (Darmstadt, Germany); 40% Acrylamide (37.5:1) 購自 Bioman (Burlington, Canada) ; Albumin standard 購自 Thermo (Rockford, USA) 。

## (五)SDS-PAGE 電泳膠片染色試劑

RAPID stain 購自 Bioman (Burlington, Canada) 。

## (六)Urea-IEF 膠片固定

Methanol、CuSO<sub>4</sub>、Trichloroacetic acid (TCA)、Ethanol 購自 Merck (Darmstadt, Germany)；Coomasie brilliant blue G-250 購自 Bio-Raid (CA, USA)。

### 三、 實驗方法

#### (一) 鮪魚肌肉蛋白之萃取

##### 1. 水溶性肌肉蛋白質萃取

參考 Hashimoto et al. (1979) 之方法加以修改，依各種蛋白質之不同溶解性，可利用不同溶劑萃取出不同的魚肉組成蛋白。首先，取 1.0g 的魚肉至 15ml 試管，在加入 4 倍體積的中性低離子強度緩衝溶液 (I = 0.05 phosphate buffer, Ph7.5) 包含 15.6mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、3.5mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、10mM EDTA、0.01%(w/v) Sodium azide 與 0.1 mM PMSF (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.21 g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.476 g、EDTA 3.722 g、Sodium azide 0.1 g 與 PMSF 0.0174 g, 1L)，後三種藥品為微生物抑制劑及蛋白水解酶抑制劑。接著加均質珠至試管中接著利用 Fast Prep<sup>®</sup>-24 (均質機) 設定轉速 6m/s，均質一分鐘後，利用低速離心機以 3,000 rpm 離心 20 分鐘，收集上清液，至微量試管 (eppendorf)，重複上述步驟一次，將 eppendorf 以 10,000 rpm 離心 20 分鐘，抽取上清液和併為水溶性肌漿蛋白萃取液。

##### 2. 鹽溶性肌肉蛋白質萃取



取水溶性肌漿蛋白之殘留物，在加入 4 倍體積的中性高離子強度緩衝溶液 (I = 0.50 KCl- phosphate buffer,pH7.5)包含 0.45 M KCl、15.6mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、3.5mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、10mM EDTA 與 0.01%(w/v)Sodium azide (KCl) 33.56 g、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.21 g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.476 g、EDTA 3.722 g、PMSF 0.0174 g 與 0.01% (w/v) (Sodium azide 0.1 g,1L),接著利用 Fast Prep<sup>®</sup>-24 (均質機) 設定轉速 6m/s，均質一分鐘後，利用低速離心機以 3,000 rpm 離心 20 分鐘，收集上清液，至微量試管 (eppendorf)，重複上述步驟一次，將 eppendorf 以 10,000 rpm 離心 20 分鐘，抽取上清液和併為鹽溶性肌漿蛋白萃取液。

### 3. 鮪魚肌肉蛋白 Urea 之萃取

參考並修改 Etienne et al. (1991) 之 Urea 萃取方法，取 0.5g 魚肉加入 15ml 試管中，加入均質珠，再加入 4 倍體積的 Urea 萃取液 (Ph 8.0) 即 8M Urea、0.1M DTT、20mM Tris-HCl、10mM EDTA、0.01% Sodium azide、0.1mM PMSF (Urea 480.48 g、DTT 0.0154 g、Tris-HCl 2.422 g、EDTA 3.72 g、Sodium azide 0.1 g、PMSF 0.0174 g, 1L)。接著利用 Fast Prep<sup>®</sup>-24 (均質機) 設定轉速 6m/s 均質一分鐘後，利用低速離心機以 3,000 rpm 離心 20 分鐘，收集上清液，靜置 30 分鐘，再以 10,000 rpm 離心 20 分鐘，抽

取上清液為 Urea 蛋白萃取自液。

## (二) 蛋白質濃度定量

依據 Bradford 的方法，將胎牛血清白蛋白 (Bovine serum albumin, BSA) 作為標準樣品，並求得標準曲線 (Standard curve)。先以 Microassay 的方法，將蛋白質標準品做序列稀釋，而樣品視標準品情況稀釋，取 10  $\mu$ l 的蛋白質標準品與稀釋後的樣品於 96 well 測定培養盤中 (三重複)，加入 200  $\mu$ l 稀釋 3 倍的 Dye-reagent，混合震盪 5 分鐘，測定 595nm 吸光值，依據標準曲線求出蛋白質濃度。

## (三) 蛋白質電泳

### 1. SDS-PAGE

以 12% separating gel 進行 SDS-PAGE 電泳分析。

#### (1) Stock solutions 之配製

- A. Separating gel bufer : 1.5M Tris-HCl buffer (pH 8.8) 取 18.15g Tris base (Hydroxymethy-aminomethane) 及 1g SDS 以二次蒸餾水溶解後，再以 6N HCl 調至 pH8.8，定容至 100 mL，放於 4°C 冰箱冷藏備用。

- B. Stacking gel bufer : 0.5M Tris-HCl bufer(pH 6.8) 取 6 g Tris base 及 1g SDS 以二次蒸餾水溶解後，以 6N HCl 調至 pH 6.8 並定容至 100 mL，放於 4°C 冰箱冷藏備用。
- C. 40 % Acrylamide-bisacrylamid 溶液，放於 4 °C 冰箱冷藏備用。
- D. 10 % (w/v)Ammonium persulfate (APS) 取 0.1 g APS 溶於 1mL 二次蒸餾水，使用時製備。
- E. TEMED : N,N,N ,N -Tetra-methyl-ethylenediamine 溶液，放於 4°C 冰箱冷藏備用。
- F. Sample buffer (pH 6.8)混合去離子水 (3.8mL)、0.5M Tris-HCl (1.0 mL)、Glycerol (0.8 mL)、10% SDS (1.6 mL)、 $\beta$ -mercaptoethanol (0.4 mL) 和 1 % (w/v) Bromophenol blue (0.4 mL)，總體積 8.0 mL，放於 4°C 冰箱冷藏備用。
- G. 10x Running buffer (pH 8.3) 取 30.3g Tris、144 g Glycine 及 10 g SDS，以二次蒸餾水溶解後，再以 6N HCl 調至 pH 8.3，並定容至 1L，放於室溫備用，於使用時稀釋 10 倍。

(2) 膠體配製

組裝製膠器型號 Mini-Protean Tetra Cell 購自 Bio-Rad Co. (CA, USA)。

### A. Separating gel

依下表添加 Separating gel 的各種溶液，而 APS 與 TEMED 最後才添加，以 Pipetman 抽取溶液緩緩注入玻璃板中，接著於液面上加一層純水或酒精使膠片平整待其聚合凝膠，當水層與膠體出現明顯界面時，表示凝膠完畢。(下表所標示的量為一片膠，兩片需將其量乘二，四片量需乘三)。

### B. Stacking gel

將製膠器倒扣以瀝乾水層，再以下表添加 Stacking gel 各種溶液，製備膠體混合溶液，APS 與 TEMED 最後才添加，以 Pipetman 取溶液緩緩注入玻璃板中已凝固膠體上方，並插入齒梳待其凝膠。

	Separating gel (ml)		Stacking gel (ml)
	12 %	15 %	5 %
Stock solution	2.5	2.5	—
Separating gel bufer	—	—	2.5
Deionized water	4.4	3.65	6.15
40 % Acrylamide	3.0	3.75	1.25
10 % APS	0.1	0.1	0.05
TEMED	0.005	0.005	0.005
Total volume	10.0		10.0

### (3) 樣品製備與操作方法

取 15 $\mu$ l 的樣品與等量的 Sample buffer 混合，放於乾浴槽

95 °C 加熱 5 分鐘，冷卻後利用樣品計算達到 20 $\mu$ g 的蛋白質量，並將所需的樣品量小心注入膠片樣品槽中，並以 Protien molecular-weight maker 當分子量之標準品，其分子量為 170 KD、130 KD、95 KD、72 KD、55 KD、43 KD、34 KD、26 KD、17 KD 及 10 KD (Thermo,Rockfod, USA)。通過電壓 100V，泳動 1-2 小時，當 Bromophenol blue 泳動至膠體邊緣時停止電泳，並取出膠片，進行 Coomassie brilliant blue 染色。

#### (4) 染色與退染

將膠片從玻璃片中取出，置於乾淨的塑膠盒中，接著在盒中倒入染色劑（混合 0.1% Coomassie brilliant blue R-250、20% methanol 與 7% acetic acid），以約 50rpm 緩慢震盪染色約 10~30 分鐘，接著去除染劑，加入退染劑（20% methanol 與 7% acetic acid）緩慢震盪去除背景 3-5 小時，在背景呈透明無色以照相系統 E-Box-Vx2 (Vilber Lourmat, Eberhadzell,Germany) 照相並以軟體 Ecapt (Vilber Lourmat, Eberhadzell,Germany)。

## 2. Urea-IEF 電泳

### (1) Urea-IEF 膠體配置

參考 Righetti et al. (1998) 的方法加以修改。

### (2) Stocking solution 之配製

A. 30% Acrylamide

取 40 % Acrylamide 30ml 與二次蒸餾水 10ml 混合。

B. 10 % (w/v) Ammonium persulfate (APS) 取 0.1 g APS 加入二

次蒸餾水定容至 1mL，使用時製備。

C. 25 % Glycerol

取 25ml Glycerol 以二次蒸餾水定容至 100mL。

D. TEMED : N,N,N ,N -Tetra-methyl-ethylenediamine 溶液，

放於 4 °C 度冰箱冷藏備用。

E. 50x Upper electrophoresis buffer (1M NaOH)

稱取 4.0 g NaOH，以二次蒸餾水定容至 100mL，並於室

溫下保存，使用時取 7mL 定容至 350 mL。

F. 100x Lower electrophoresis buffer (1M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)

取 11.5 g 的 H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (85 %)，以二次蒸餾水定容至 100ml，

並於室溫下保存，使用時取 8mL 定容至 800 mL。

(3) 膠體配製

Formulation	Urea-IEF gel (mL)
Ph3-10 OR 5-7	100
30% Acrylamide	2.0
Deionized water	5.4
Urea	6.0
Ampholyte 3-10 OR 5-7	0.3
10 % APS	0.1
TEMED	0.005
Total volume	13.805

組裝製膠器 Mini-Protean Tetra Cell 後，依上表將各溶液混合配置 Urea-IEF gel 溶液，而 APS 與 TEMED 最後加入，以 Pipetman 抽取混合溶液緩緩注入玻璃板中，隨即插入齒梳待其凝膠 (30 分鐘以上)。

#### (4) 樣品製備與電泳方法

將鮪魚肌肉的水溶性蛋白、鹽溶性蛋白與 Urea 可溶蛋白(萃取法同實驗方法(一)鮪魚肌肉蛋白萃取)加入 3 倍體積之冰冷 Acetone 於 -20 度沉澱 1 小時去鹽，以 10,000 rpm 10 分鐘離心，去除 Acetone，在重複以冰冷 Acetone 清洗兩次，以 10,000 rpm 10 分鐘離心，接著使其揮發沉澱，以 8M Urea 回溶，以 Bradford 法定量。

組裝電泳槽，檢查內外槽是否緊密接合，避免外漏，在內槽注滿預先配製的 Upper buffer (20mM NaOH)，而外槽加入預先配製的 Lower buffer (10 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)，再將等電點標準注入 1 μl。等電標準品如下：Cytochrome C : 9.6 (pI) ; Lentil lectin: 7.80, 8.00, 8.20, ; Human hemoglobin C: 7.5 ; Human hemoglobin A: 7.1 ; Equine myoglobin: 6.0 ; β-lactoglobulin B: 5.1 ; Phycocyanin: 4.45, 4.65, 4.75, (Bio-Rad, CA,USA)。接著將先前計算好的樣品量(蛋白濃度 40μg) 小心注入電泳槽中。以 50 V 預跑 10 分鐘，再逐漸

升壓的方式提高電壓，100 V 跑 10 分鐘、150 V 跑 10 分鐘、200 V 3 小時，最後 400 V 泳動 30 分鐘，整個電泳過程置於室溫下進行。

#### (5) 膠片固定、染色及退染

電泳結束後，將膠片放入先前配置好的固定液中 (10 % TCA、10 % Methanol) ，固定 1 小時，1 小時後將固定液稀釋 10 倍固定膠片 12 小時 overnight，接著將膠片置於含有染劑 (混合 0.1 % CuSO<sub>4</sub>、0.05 % Coomassie brilliant blue G-250、10 % Methanol 與 7 % Acetic acid) 的塑膠盒中，以約 50rpm 緩慢震盪染色約 1 小時，接著去除染劑，加入退染劑 (混合 20 % methanol 與 7 % acetic acid) 緩慢震盪至背景為透明即可，再以照相系統 E-Box-Vx2 (Vilber Lourmat, Eberhadzell,Germany) 照相並以軟體 Ecapt (Vilber Lourmat, Eberhadzell,Germany) 。



# 伍、結果與討論

## 一、 基因實驗

本實驗進行魚種鑑定的樣品包括 4 種臺灣常見的鮪魚，分別為黃鰭鮪、大目鮪、南方黑鮪以及黑鮪。以參考文獻上之引子 L newswt 1 / H 15149 ad 進行 PCR 增幅反應，成功增幅出片段基因，經過資料庫序列比對多種樣品，得知樣品南方黑鮪以及黑鮪與資料庫中的序列相似度高達 100 %，得知店家並沒有以其他低價鮪魚來冒充經濟價值較高的黑鮪魚，而在黃鰭鮪及大目鮪方面、可以發現這兩種鮪魚種從魚肉的顏色上是很難以去區分的，一般市面上的店家也無法準確的辨別出黃鰭鮪及大目鮪的差別。

## 二、 蛋白質分析

### (一)SDS-PAGE

本實驗進行 SDS-PAGE 蛋白質魚種鑑定的樣品包括 4 種臺灣常見的鮪魚，分別為黃鰭鮪、大目鮪、南方黑鮪魚以及黑鮪。以參考文獻上之蛋白質萃取法，先觀察生鮮肌肉水溶性蛋白、鹽溶性蛋白及 8 M Urea 萃取蛋白的蛋白質量約為水溶性 2.63-4.22 mg/mL、鹽溶性 3.82-5.53 mg/mL、Urea 萃取 4.48-7.71 mg/mL。在以 SDS-PAGE 電泳建立 4 種鮪魚魚種之

水溶性蛋白、鹽溶性蛋白及 8 M Urea 萃取蛋白的 SDS-PAGE 圖譜資料，並加以利用 SDS-PAGE 圖譜進行魚種鑑定。

## 1. SDS-PAGE 水溶性萃取

在水溶性萃取蛋白的 SDS-PAGE 圖譜中，可以看到 4 種鮪魚魚種的蛋白質圖譜相似，但可以發現在分子量 72 kDa 黑鮪較其他魚種有特異性的蛋白質亮帶，水溶性萃取蛋白在 SDS-PAGE 鑑定模式下僅能分辨出黑鮪，鑑定效果相當有限。

在鹽溶性萃取蛋白的 SDS-PAGE 圖譜中，可以看到 4 種鮪魚魚種的蛋白質圖譜相似，但可以看到在分子量 72 kDa 的部份大目鮪和黃鰭鮪相較於其他兩種鮪魚有特異性亮帶的存在，另外在分子量 43 kDa 方面可以看到黃鰭鮪也有特異性亮帶的出現，以現行圖表來看 SDS-PAGE 鹽溶性蛋白萃取能分辨出大目鮪和黃鰭鮪，其效果有限。

## 2. SDS-PAGE Urea 萃取

在 8 M Urea 萃取蛋白的 SDS-PAGE 圖譜中，可以看到 4 種鮪魚魚種的蛋白質圖譜相似，但可以看到在分子量 170 kDa 的部份，黑鮪和黃鰭鮪與其他兩種鮪魚有特異性亮帶，另外黃鰭鮪在分子量 26 kDa 的部份也有特異性亮帶，Urea 萃

取蛋白在 SDS-PAGE 鑑定模式下能分辨出黑鮪和黃鰭鮪，其鑑定效果有限。

### 3. SDS-PAGE 綜合討論

在看過 SDS-PAGE 三種萃取法的電泳圖譜後，可以看到其鑑定效果都相當有限，在黃鰭鮪的部份在三種萃取法上與其他魚種都有些微的不同，而大目鮪的部份在鹽溶性上有差異性，另外在黑鮪的部份在 Urea 萃取上可以看到差異，南方黑鮪的部份在三種蛋白質萃取法上與其它魚種並沒有看到特異性亮帶的出現，在 SDS-PAGE 電泳方面很難在同一種萃取法上鑑定多樣魚種，在鑑定的效果上相當有限，在 SDS-PAGE 電泳圖譜上可以看到在分子量方面還有集中的蛋白質，之後的實驗可以嘗試提高 Acrylamide 在膠片中的比例，讓高分子量的蛋白質加以區分，增加鑑定魚種的可能性，而在低分子量的方面在 SDS 上呈現的不明顯，在往後的實驗上可以嘗試提高樣品的蛋白質濃度以增加鑑定魚種的可能性。

#### (二)UREA-IEF

本實驗進行 Urea-IEF 蛋白質魚種鑑定的樣品包括 4 種臺灣常見的鮪魚，分別為黃鰭鮪、大目鮪、南方黑鮪魚以及黑鮪。以參考文獻上之蛋白質萃取法，再以 Urea-IEF 電泳進行分析，

實驗利用蛋白質等電點的不同來辨別其有無特異性蛋白質，從初步 IEF 圖譜中可以看到蛋白質的呈現不是相當的清楚，表示可能有許多其它的因素影響蛋白質，之後的實驗將嘗試提高樣品的蛋白質濃度或以其它溶劑回溶以增加圖譜的可看性，進一步增加鑑定魚種的可能性。

## 陸、未來研究方向

本實驗初步結果發現 SDS-PAGE 在鑑定魚種上其效果有限，在 Urea-IEF 方面有許多問題待解決，未來方向朝以下幾點實行：

1. 突破 Urea-IEF 問題，建立蛋白質鑑種技術。
2. 以二維電泳分析蛋白質並進一步了解特異性蛋白質分子量與等電點資料。
3. 探討罐頭製熱加工條件下種別特異性蛋白質熱穩定性。
4. 提供市售鮪魚種之電泳圖譜資料庫。

表一之一 本實驗鮪魚魚種樣品

Table 1、Summary of Tuna in this study

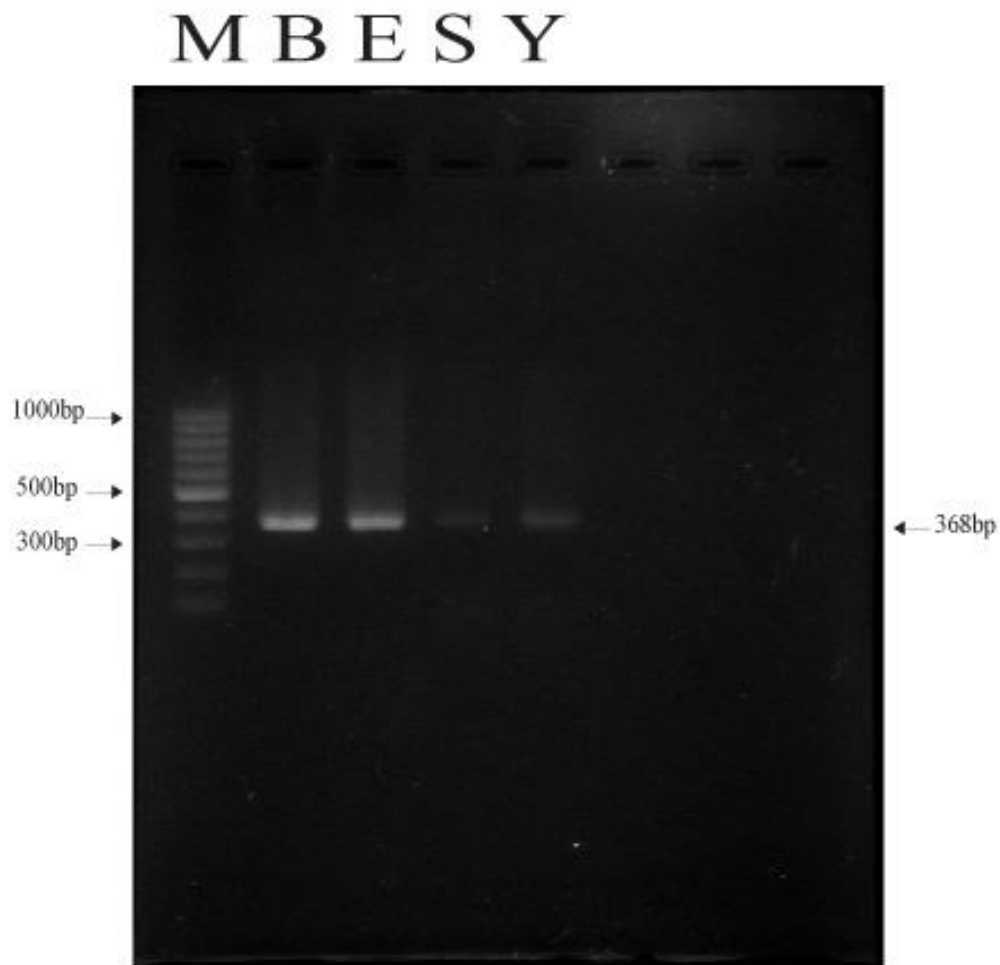
Species	NO. Of fish	Date of collection	Site of collection
<i>Thunnus thynnus</i>	B	2012.07.03	Taipei
<i>T. Obesus</i>	E	2012.08.03	Keelung
<i>T.maccoyii</i>	S	2012.07.03	Taipei
<i>T. Albacares</i>	Y	2012.07.03	Taoyuan
		2012.07.04	Taipei
		2012.07.29	Pingtung
		2012.07.29	Taoyuan

表一之二 4種鮪魚魚肉蛋白質濃度 (mg/mL)

**Table 1-2** The concentration (mg/mL) of muscle protein extracted from 4 tuna

<b>sample*</b>	<b>Sarcoplasmic protien</b>	<b>myofibrillar protein</b>	<b>urea extracted protein</b>
<b>B</b>	5.68±1.64	5.65±1.63	7.43±1.21
<b>E</b>	3.59±0.38	6.72±1.01	4.21±0.70
<b>S</b>	3.01±0.11	4.87±0.84	5.33±1.44
<b>Y</b>	2.95±0.21	5.07±0.81	4.24±1.63

\*B, *Thunnus thynnus* ; E, *T. Obesus* ; S, *T.maccoyii* ; Y, *T. Albacares*.



圖一、以引子 H 15149ad 和 Lnewset 1 所增幅出 4 種鮪魚

**Fig.1** Electrophoretic analysis of PCR products amplified with mitochondrial cytochrome *b* DNA (H 15149ad/Lnewset) on 2% agarose gel. Sample in lane are as follow : M: MW marker. Bio 100 bp ladder. Tuna species B, *Thunnus orientalis*; E, *Thunnus obesus*; S, *Thunnus maccoyii*; Y, *Thunnus albacores*.



表一之三 4種鮪魚的肌漿蛋白質之組成百分比

**Table 1-3** Composition percentage of sarcoplasmic protein from 4 tuna species following Coomassie blue staining and densitometry determination

MW (kD)	B	E	S	Y
<b>246.1</b>	5.95±	5.43±	6.92±	7.31±
<b>136.5</b>	4.44±	4.41±	6.43±	6.28±
<b>84.3</b>	5.8±	8.01±	8.21±	10.25±
<b>68.7</b>	1.48±			
<b>64.4</b>	1.81±	1.88±	4.83±	2.18±
<b>57.2</b>	4.48±	4.84±	6.67±	7.59±
<b>46.1</b>	6.72±	6.77±	9.17±	8.61±
<b>39.6</b>	5.11±	6.03±	8.49±	9.24±
<b>36.2</b>	5.27±	6.17±	7.61±	6.87±
<b>32.1</b>	11.32±	11.19±	14.02±	13.89±
<b>25.5</b>	2.46±	2.95±		
<b>23.9</b>	4.88±	5.01±	3.75±	4.04±
<b>21.8</b>	12.01±	9.31±	6.49±	6.7±
<b>14.6</b>	28.24±	28.03±	17.41±	17±

\*See the footnote of Table 1-2. The confidence interval is between 10-170 kD.

表一之四 4種鮪魚的肌原纖維蛋白質之組成百分比

**Table 1-4** Composition percentage of myofibrillar protein from 4 tuna species following Coomassie blue staining and densitometry determination

MW (kD)	B	E	S	Y
<b>274.2</b>	4.84±	4.83±	4.31±	4.07±
<b>186.9</b>	2.97±	5.11±	2.97±	5.04±
<b>158.6</b>			1.98±	
<b>124.9</b>	4.16±	2.69±	1.9±	3.47±
<b>94.1</b>			3.53±	2.9±
<b>86.4</b>	10.15±	5.08±	6.94±	2.66±
<b>71.2</b>		3.69±		4.05±
<b>59.8</b>	2.65±	5.08±	5.08±	4.36±
<b>57.5</b>	1.64±	1.61±	1.99±	1.25±
<b>49.8</b>	4.15±	5.16±	4.86±	5.67±
<b>45.1</b>				3.03±
<b>41.5</b>	8.11±	8.96±	8.58±	6.36±
<b>38.4</b>	2.89±	6.57±	5.69±	3.76±
<b>37.0</b>	3.21±			1.54±
<b>34.2</b>	7.21±	7.11±	7.47±	7.41±
<b>30.6</b>	4.94±	4.51±	3.98±	4.54±
<b>26.4</b>		3.06±		3.15±
<b>24.5</b>	6.17±	3.33±	7.19±	3.38±
<b>23.4</b>	2.88±	2.13±	4.88±	5.99±
<b>22.3</b>	3.04±			
<b>19.7</b>	5.11±	7.95±	6.1±	4.46±
<b>18.8</b>	6.61±	6.45±	5.52±	6.34±
<b>17.7</b>	8.27±	8.78±	10.47±	9.82±
<b>13.8</b>	10.89±	7.8±	6.43±	6.64±

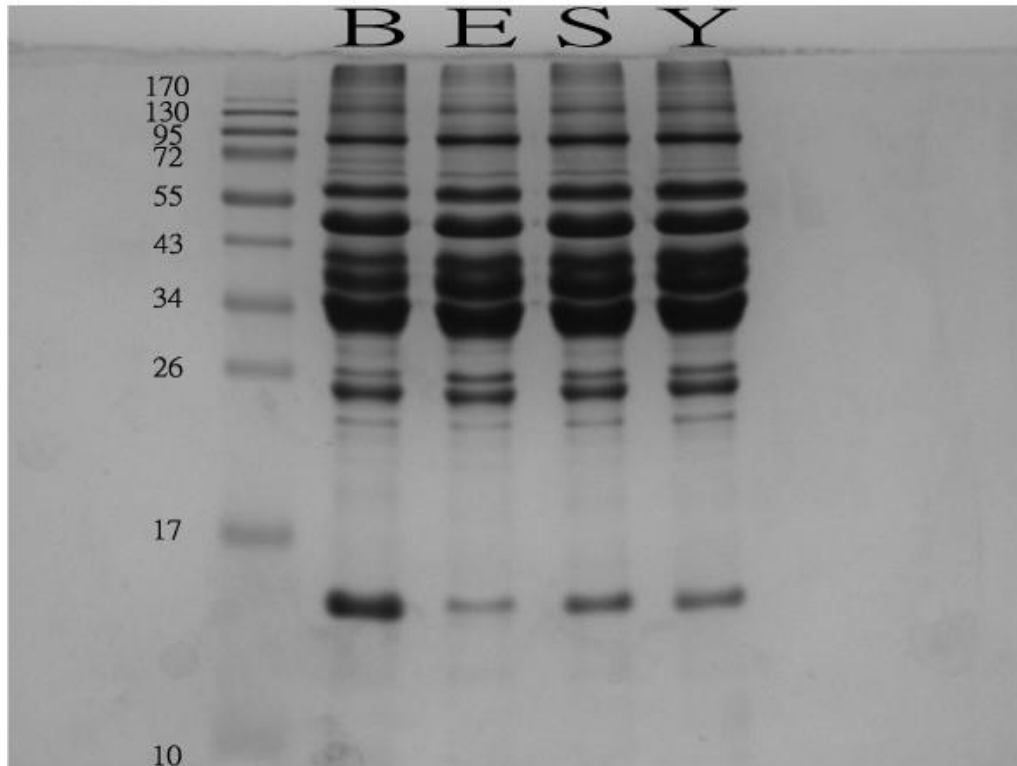
\*See the footnote of Table 1-2. The confidence interval is between 10-170 kD.

表一之五 4種鮪魚的 8M urea 萃取蛋白質之組成百分比

**Table 1-5** Composition percentage of 8M urea extracted protein from 4 tuna species following Coomassie blue staining and densitometry determination

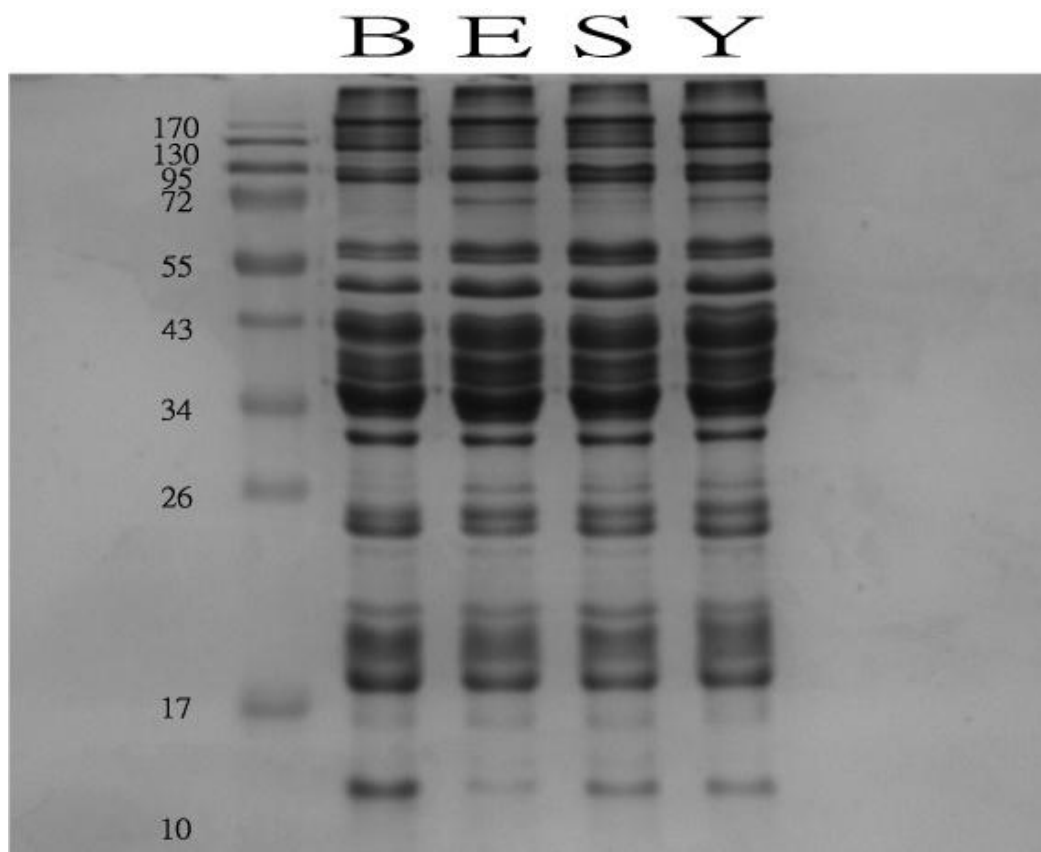
MW (kD)	B	E	S	Y
<b>255.6</b>	2.82±	4.02±	3.45±	4.67±
<b>195.6</b>	2.96±	2.11±	2.04±	2.91±
<b>171.1</b>		2.17±	2.02±	
<b>124.3</b>	10.84±	4.92±	3.16±	1.99±
<b>114.1</b>				1.97±
<b>94.1</b>		5.88±	8.08±	4.53±
<b>69.3</b>				2.14±
<b>66.4</b>				2.45±
<b>60.2</b>	2.74±	4.65±	3.95±	3.81±
<b>45.9</b>	7.44±	7.17±	7.82±	5.23±
<b>41.2</b>	5.94±			1.88±
<b>39.3</b>		7.57±	7.35±	5.12±
<b>35.9</b>	5.43±	5.96±	6.35±	5.4±
<b>32.0</b>	9.33±	10.25±	8.91±	4.57±
<b>29.8</b>				4.42±
<b>26.2</b>	2.45±			1.94±
<b>24.6</b>		3.36±	4.31±	3.06±
<b>23.1</b>	10.18±	5.69±	3.43±	2.29±
<b>21.6</b>		3.25±	2.38±	3.48±
<b>20.6</b>	6.08±		1.62±	2.96±
<b>19.0</b>		3.9±	6.17±	3.85±
<b>18.4</b>	3.09±	3.01±	3.39±	2.83±
<b>17.1</b>	9.04±	10.01±	9.1±	10.2±
<b>14.3</b>	21.57±	15.99±	16.37±	18.19±

\*See the footnote of Table 1-2. The confidence interval is between 10-170 kD.



圖二、4 種鮪魚的水溶性萃取蛋白質之 SDS-PAGE 圖譜

**Fig.2** SDS-PAGE pattern of sarcoplasmic protein extracted with phosphate buffer from 4 *Thunnus* species with Coomassie blue staining. M, protein standards; B, *Thunnus orientalis*; E, *Thunnus obesus*; S, *Thunnus maccoyii*; Y, *Thunnus albacores*.



圖三、4 種鮪魚的鹽溶性萃取蛋白質之 SDS-PAGE 圖譜

**Fig.3** SDS-PAGE pattern of myofibrillar protein extracted with phosphate buffer from 4 *Thunnus* species with Coomassie blue staining. M, protein standards; B, *Thunnus orientalis*; E, *Thunnus obesus*; S, *Thunnus maccoyii*; Y, *Thunnus albacores*.



圖四、4種鮪魚的 Urea 萃取蛋白質之 SDS-PAGE 圖譜

**SDS-PAGE** pattern of urea protein extracted with phosphate buffer from 4 *Thunnus* species with Coomassie blue staining. M, protein standards; B, *Thunnus orientalis*; E, *Thunnus obesus*; S, *Thunnus maccoyii*; Y, *Thunnus albacores*.

## 柒、參考文獻

- 丁任法。(2003)。黃鰭鮪及潮鯛生魚片貯藏中鮮度及風味品質之變化。國立臺灣海洋大學食品科學碩士論文。基隆。
- 江爾蓁。(2005)。台灣產烏魚、油魚及鮪魚的魚卵脂質成分比較分析。國立臺灣海洋大學食品科學碩士論文。基隆。
- 沈世傑。(1993)。鯖亞目，鯖科。台灣魚類誌，pp. 554-559。國立台灣大學動物學系。台北。
- 林文風。(2003)。利用粒線體 DNA 之細胞色素 b 基因以 PCR-RFLP 方法探討台灣鮪魚及其加工品在魚種辨識上之應用。國立臺灣海洋大學食品科學碩士論文。基隆。
- 林哲宇。(2012)。以蛋白質電泳技術來鑑定飛魚和魚卵之魚種。國立臺灣海洋大學食品科學碩士論文。基隆。
- 香川 芳子。(2007)。五訂日本食品標準成份表
- 邵廣昭。(2009)。臺灣魚類資料庫。中央研究院，生物多樣性研究中心魚類生態與進化研究室。
- 張鶴霖。(1997)。台北市生鮮鮪魚市場區隔化之研究。國立臺灣海洋大學漁業經濟研究所碩士論文。基隆。
- 胡興華。(2000)。台灣漁業發展與作業漁場—鮪漁業篇。鮪魚年鑑，pp. 1-27。台灣區遠洋鮪漁船魚類輸出業同業公會。台北。

- 陳南宏。(2007)。笛鯛科魚類之毒性分析及其魚種蛋白質電泳技術鑑定方法之探討。國立臺灣海洋大學食品學系碩士論文。
- 曾益洋。(2010)。魷魚與鮪魚鮮度品質和腐敗指數之探討。國立臺灣海洋大學食品科學碩士論文。基隆。
- 傅新輔。(2000)。鮪漁業常見之捕獲對象。鮪魚年鑑, pp. 215-226。台灣區遠洋鮪魚漁船魚類輸出業同業公會。台北。
- 漁業署。(2001)。台灣地區漁業年報。農委會漁業署印行。
- 漁業署。(2007)。台灣地區漁業年報。農委會漁業署印行。
- 漁業署。(2010)。台灣地區漁業年報。農委會漁業署印行。
- 歐錫祺。(1981)。水產學。徐氏基金會。台北。
- 郭書豪。(2012)。利用二維電泳結合串聯式質譜儀研究酸性、微酸性電解水對腸炎弧菌之殺菌機制。國立臺灣海洋大學食品科學碩士論文。基隆。
- 鄭登耀。(2006)。台灣生鮮鮪魚網路行銷之研究。國立臺灣海洋大學應用經濟研究所碩士論文。基隆。
- AOAC. (1995).** Fish and other marine products. Official methods of analysis (Vol. 2). Virginia: Association of Official Analytical Chemists.
- An, H., Wei, C. I., Zhao, J., Marshall, M. R. and Lee, C. M. (1989).** Electrophoretic identification of fish species used in surimi products. *Journal of Food Science*, 54: 253-257.
- Appleyard, S. A., Ward, R. D. and Grewe, P. M. (2002).** Genetic stock structure of bigeye tuna in the Indian Ocean using



mitochondrial DNA and microsatellites. *Journal of Fish Biology* 60: 767-770.

- Asghar, A., Samejima, K. and Yasui, T. (1984).** Functionality of muscle protein in gelation mechanism of structured meat products. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 22: 27-43.
- Beismann, H., Barker, H., Karp, A. and Speck, T. (1997).** AFLP analysis sheds light on distribution of two *Salix* species and their hybrid along a natural gradient. *Molecular Ecology*, 6: 989-993.
- Bollag, D. M., Rozycki, D. M. and Edelstein, S. J. (1996).** Isoelectric focusing and two dimensional gel electrophoresis. *Protein Methods*, 2nd. Ed by Rozycki, D. M. and Edelstein, S. J., Wiley-Liss, New York. 173-193.
- Broughton, R. E. and Dowling, T. M. (1994).** Length variation in mitochondrial DNA of the minnow *Cyprinella spilopterus*. *Genetics*, 138: 179-190.
- Carter, C. G., Seeto, G. S., Smart, A., Clarke, S. and Barneveld, R.J. (1998).** Correlates of growth in farmed juvenile southern bluefin tuna *Thunnus maccoyii* (Castelnau). *Aquaculture* 161: 107-119.
- Comesana, A. S., Abella, P. and Sanjuan, A. (2003).** Molecular identification of five commercial flatfish species by PCR - RFLP analysis of a 12S RNA gene fragment. *Journal Science Food Agriculture*, 83: 752-759.
- Collette, B. B. and Nauen, C. I. (1983).** An annotated and illustrated catalogue of tunas, mackerels, bonitos, and related species known to date. Scombrids of the world. In FOA Species Catalogue, Volume 2. Food and Agriculture Organization of USA.
- Chantachum, S., Benjakul, S., & Sriwirat, N. (2000).** Separation and quality of fish oil from precooked and non-precooked tuna heads. *Food Chemistry*, 69, 289–294.
- Chen, C. S., Hwang, D. C. and Jiang, S. T. (1988).** Purification and characterization of milkfish myosin. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 54: 1423-1427.
- Chen, T. Y. and Hwang, D. F. (2002).** Electrophoretic identification of muscle proteins in 7 puffer species. *Journal of Food Science*, 67: 936-942.

- Chen, T. Y., Shiau, C. Y., Wei, C. I. and Hwang, D. F. (2004).** Preliminary study on puffer fish proteome-species identification of puffer fish by two-dimensional electrophoresis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 2236-2241.
- Chiou, S. H. and Wu, S. H. (1999).** Evaluation of commonly used electrophoretic methods for the analysis of proteins and peptides and their application to biotechnology. *Analytica Chimica Acta*, 383: 47-60.
- Dissaraphong, S., Benjakul, S., Visessanguan, W., & Kishimura, H. (2006).** The influence of storage conditions of tuna viscera before fermentation on the chemical, physical and microbiological changes in fish sauce during fermentation. *Bioresource Technology*, 97, 2032–2040.
- Etienne, M., Jerome, M., Fleurence, J., Rehbein, H., Kundiger, R., Yman, I. M., Ferm, M., Craig, A., Mackie, I. M., Jessen, F., Smelt, A. and Luten, J. (1999).** A standardized method of identification of raw and heat-processed fish by urea isoelectric focusing: A collaborative study. *Electrophoresis*, 20: 1923-1933.
- Etienne, M., Fleurence, J., Rehbin, H., Kundiger, R., Yman, I. M., Frem, M., Craig, A., Mackie, I. M., Jessen, F., Smelt, A. and Luten, J. (1999).** A standardized method of identification of raw and heat-processed fish by urea isoelectric focusing: A collaborative study.
- Hashimoto, K., Watabe, S., Kono, M. and Shiro, K. (1979).** Muscle protein composition of sardine and mackerel. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 45: 1435-1441.
- Hashimoto, K., Watabe, S., Nakagawa, T. and Sorita, K. (1984).** Electrophoretic identification of three subspecies of the genus *Lagocephalus* pufferfish. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 50: 115-118.
- Haward, M. and Bergin, A. (2000).** Taiwan's distant water tuna fisheries. *Marine Policy* 24: 33-43
- Hashimoto, K., Watabe, S., Nakagawa, T. and Sorita, K. (1984).** Electrophoretic identification of three subspecies of the genus *Lagocephalus* pufferfish. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 50: 115-118.
- Huang, T. S., Chen, J. S., Marshall, M. R. and Wei, C. I. (1990).** Quantification of shrimp in shrimp-surimi mixtures using urea

gel isoelectric focusing. *Journal of Food Science*, 55: 1206-1209.

**Jaime, R., Bremer, A., Zhang, L., Bulak, J. S. and Ely, B. (1998).** A polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) assay for the discrimination of mitochondrial DNA from the Florida and northern subspecies of largemouth bass. *American Fisheries Society*, 127: 507-511.

**Jerome, M., Lemaire, C., Bautista, J. M., Fleurence, J. and Etienne, M. (2003).** Molecular phylogeny and species identification of sardines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 43-50.

**Karaiskou, N., Apostolidis, A. P., Triantafyllidis, A., Kouvatzi, A. and Triantaphyllidis, C. (2003).** Genetic identification and phylogeny of three species of the genus *Trachurus* based on mitochondrial DNA analysis. *Marine Biotechnology*, 5: 493-504.

**Lundstrom, R. C. (1980).** Fish species identification by thin layer polyacrylamide gel isoelectric focusing: Collaborative study. *Journal of Association of Official Analytical Chemists*, 63: 69-73.

**López, J.L.; Marina, A.; Álvarez, G. & Vázquez, Jesús. (2002).** Application of proteomics for fast identification of species-specific peptides from marine species. *Proteomics*, Vol. 2, No. 12, (Dec 2002), pp. 1658-65, ISSN 1615-9853.

**Mackie, I. M. (1990).** Identifying species of fish. *Analytical Proceedings*, 27 : 89-92.

**Mackie, I. M. (1997).** Methods of identifying species of raw and processed fish. *Fish Processing Technology*. 2nd Ed by Hall, G. M., Blackie Academic and Professional, London, 160-199.

**Mackie, I. M., Craig, A., Etienne, M., Jerome, M., Fleurence, J., Jessen, F., Smelt, A., Kruijt, A., Yman, M. I., Ferm, M., Martinez, I., Martin, R. P., Pineiro, C., Rehbein, H. and Kundiger, R. (2000).** Species identification of smoked and gravad fish products by sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis, urea isoelectric focusing and native isoelectric focusing: A collaborative study. *Food Chemistry*, 71: 1-7.

- Morton, J. E. (1979).** Molluscs. Hutchinson, Co., London. pp. 264.
- Matsuura, M. and Arai, K. (1987).** Preparation properties of myosin native thick filaments from fish dorsal muscle. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 53: 1073-1082.
- Nakagawa, T., Watabe, S. and Hashimoto, K. (1988).** Identification of three major components in fish sarcoplasmic proteins. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 54: 999-1004.
- Niwa, Y., Nakazawa, A., Margulies, D., Scholey, V. P., Wexler, J. B. and Chow, S. (2003).** Genetic monitoring for spawning ecology of captive yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) using mitochondrial DNA variation. *Aquaculture* 218: 387-395.
- Ojima, T. and Nishita, K. (1987).** Dissociation of regulatory light chains from hybrid myosin. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 53: 93-98.
- Ojima, T. (1989).** Troponin and tropomyosin. *Comparative Biochemistry of Muscular Protein in Aquatic Animals* Ed by Arai, K., Koseisai-Koseigaku, Tokyo, 51-61.
- Pineiro, C., Barros-Velazquez, J., Sotelo, C. G., and Gallardo, J. M. (1999).** The use of two-dimensional electrophoresis in the characterization of the water-soluble protein fraction of commercial flat fish species. *Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung A*, 208: 342-348.
- Plowman, J. E. and Herbert, B. R. (1992).** Identification of the species of origin of cooked fish by isoelectric focusing. *LWT-Food Science and Technology*, 25: 224-227.
- Rehbein, H. (1990).** Electrophoretic techniques for species identification of fishery products. *Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung*, 191: 1-10.
- Rehbein, H., Etienne, M., Jerome, M., Hattula, T., Knudsen, L. B., Jessen, F., Luten, J. B., Bouquet, W., Mackie, I. M., Ritchie, A. H., Martin, R. and Mendes, R. (1995).** Influence of variation in methodology on the reliability of the isoelectric focusing method of fish species identification. *Food Chemistry*, 52: 193-197.
- Righetti, P. G., Bossi, A. and Gelfi, C. (1998).** Title. In : *Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach*. 3rd ed.(Ed.

- by Hames, B. D., and Rickwood, D.), IRL Press, Oxford. pp. 13-33, 127-187.
- Rosen, D. E. (1984).** Zeiform as primitive plectognath fishes. *American Museum Novitates*, 2782: 1-45.
- Scobbie, A. E. and Mackie, I. M. (1988).** The use of sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis in fish species identification-A procedure suitable for cooked and raw fish. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 44: 343-351.
- Sebastio, P., Zanelli, P. and Neri, T. M. (2001).** Identification of anchovy (*Engraulis encrasicolus* L.) and gilt sardine (*Sardinella aurita*) by polymerase chain reaction, sequence of their mitochondrial cytochrome b gene, and restriction analysis of polymerase chain reaction products in semipreserves. *Journal of Food Science*, 49: 1194-1199.
- Sotelo, C. G., Pineiro, C., Gallardo, J. M. and Perez-Martin, R. I. (1993).** Fish species identification in seafood products. *Trends in Food Science and Technology*, 4: 395-401.
- Stepien, C. A., Dixon, M. T. and Hillis, D. M. (1993).** Evolutionary relationships of the Blennioid fishes families Clinidae, Labrisomidae and Chaenopsidae: Congruence between DNA sequence and allozyme data. *Bulletin of Marine Science*, 52: 496-515.
- Suzuki, T. (1981).** *Fish and Krill Proteins: Processing Technology.* Applied Science Publishers Ltd., London.
- Tyler, J. C. (1980).** Osteology, phylogeny, and higher classification of the fishes of the order Plectognathi (Tetraodontiformes). NOAA Technical Report NMFS Circular, 434: 1-422.
- Takeyama, H., Chow, S., Tsuzuki, H. and Matsunaga, T. (2001).** Mitochondrial DNA sequence variation within and between tuna *Thunnus* species and its application to species identification. *Journal of Fish Biology* 58: 1646-1657.
- Tiziana Pepe<sup>1</sup>, Marina Ceruso<sup>1</sup>, Andrea Carpentieri<sup>2</sup>, Iole Ventrone<sup>1</sup>, Angela Amoresano<sup>2</sup>, Aniello Anastasio<sup>1</sup> and Maria Luisa Cortesi,(2009).** Differentiation of Four Tuna Species by Two-Dimensional Electrophoresis and Mass Spectrometric Analysis and Maria Luisa Cortesi.
- Viñas, J. & Tudela, S. (2009).** A validated methodology for genetic

identification of tuna species (genus *Thunnus*). PLoS One. Vol. 4, No. 10, (Oct 2009), pp. 7606, ISSN 1932- 6203

**Wei, C. I., An, H., Chen, J. S. and Marshall, M. R. (1990).** Use of a modified urea gel isoelectric focusing method for species identification of raw or boiled white, pink, and rock shrimp. *Journal of Food Biochemistry*, 14: 91-102.

**WinterBottom, R. (1970).** Evolution of the pelvic fin ray musculature of some Triacanthoid fishes (Plectognathi). *Copeia*, 3: 453-456.

**Yowell, K. and Flurkey, W. (1986).** Effect of freezing and microwave heating on proteins from codfish fillets: Analysis by SDS polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of Food Science*, 51: 508-509.