

行政院國家科學委員會補助
大專學生參與專題研究計畫研究成果報告

* *****
* 計畫名稱：以 SDS-PAGE 電泳搭配串聯質譜技術鑑定台灣常見的石斑魚種 *
* *****

執行計畫學生： 劉蕙菱
學生計畫編號： NSC 100-2815-C-041-013-B
研究期間： 100 年 07 月 01 日至 101 年 02 月 28 日止，計 8 個月
指導教授： 呂雅蕙

處理方式： 本計畫可公開查詢

執行單位： 嘉南藥理科技大學生活應用與保健系

中華民國 101 年 03 月 31 日

國科會100年度大專學生參與專題研究計畫報告

以SDS-PAGE電泳搭配串聯質譜技術鑑定台灣常見的石斑魚種

二、研究計畫內容：

(一) 摘要

背景：

石斑魚為世界各國溫暖海域沿岸的重要高經濟食用魚種，尤其在東南亞國家如中國大陸、香港、日本、菲律賓及台灣等。市面上常以切塊方式販售，而且近幾年國內成功開發且穩定養殖更高經濟價值的石斑魚種。由於消費者無法直接以外觀特徵區別石斑魚種，因此市面上石斑魚切片或包裝產品其真正來源魚種不得而知？

特定目標：

本研究計畫主要涵蓋台灣常見石斑魚種之種別特異性蛋白質之身分鑑定對魚種鑑定可行性之探討。

實驗設計與方法：

以蛋白質一維電泳 (SDS-PAGE) 建立新鮮石斑魚體的生物指紋圖譜 (protein fingerprint)，進一步以清蒸和煎炒等不同熱加工程度來探討蛋白質加熱變性對蛋白質魚種鑑定的影響。

結果：

此計畫成果可幫助釐清台灣市售石斑魚其來源魚種是否摻雜低經濟價值魚種疑慮，我們已採集龍膽石斑 (G)、褐石斑 (K)、虎斑 (B)、瑪拉巴 (M) 及點帶石斑 (C)，分別抽取水溶性、鹽溶性和尿素可溶性蛋白質，進一步以SDS-PAGE分析鑑定個別石斑魚種之種別特異性蛋白質，提供政府機關或食品加工業者一個快速且簡易可行的科學鑑種方法之參考。

(二) 研究動機與研究問題

石斑魚是台灣養殖漁業中重要的高經濟魚種，台灣目前的紀錄有3亞科29屬117種。石斑魚肉質鮮美，營養價值高，屬於高級海鮮魚種，廣被消費者喜愛；但是石斑魚種通常體型較大，市面上常以切塊方式販售，由於其外觀特徵在處理過程中被去除，無法以肌肉或外觀顏色等辨識魚種。而且近幾年國內養殖技術大幅提昇，更高經濟價值的石斑魚種被成功開發且穩定養殖，諸如龍膽石斑、珍珠龍膽石斑和東星石斑魚等。由於消費者無法直接以外觀特徵區別石斑魚種，因此市面上石斑魚切片或包裝產品其真正來源魚種不得而知？因此，本研究計畫擬以蛋白質電泳(SDS-PAGE)技術搭配串聯式質譜儀 (tandem mass spectrometry) 技術建立新鮮魚體的生物指紋圖譜 (protein fingerprint)，進一步以清蒸和煎炒等熱加工條件探討蛋白質加熱變性對蛋白質魚種鑑定的影響。

本計畫結果在市場應用上，可建立市面上石斑魚之魚種標示的真偽性比率以及開發快速且簡易可行的科學分析方法供縣市衛生局或漁會等對口單位參考。在基礎科學研究層面，可建立石斑魚種之種別特異性蛋白質的分子質量資料。

(三) 文獻回顧與探討

1. 鮨科魚類之簡介

鮨科 (Serranidae) 魚類俗稱石斑魚，在高階魚類分類系統中屬於動物界 (Animal)，脊索動物門 (Chordata)，輻鰭魚綱 (Actinopterygii)，鱸形目 (Perciformes)，鱸亞目 (Percoidei)，其廣泛分佈於全世界熱帶及亞熱帶海域，為珊瑚礁區的肉食性魚類，大部分為海水產，少數為淡水產。鮨科多半屬日行性魚類，由於種數甚多，具相當複雜之生態層性，且大多屬底棲性之魚種，具區域性及擬態行為。絕大多數以魚類、蝦、蟹、端足類等為食，是兇猛的掠食者。石斑魚屬廣鹽性魚類，鹽度適應範圍在 1.1~4.1%，最適水溫約 22~28°C，當水溫下降至 15°C 以下時，則停止攝食靜止不動，由於此時魚體抵抗力差，最忌驚動且易患病死亡。鮨科魚種體色鮮豔多變化，且具有雌雄雙色及雌變雄之轉變等現象 (Brusle and Brusle, 1975)。為世界各國暖海域沿岸的重要食用魚，亦是臺灣養殖漁業中重要之高經濟價值魚種。全世界鮨科歸類為 3 亞科，粗估約 81 屬，516 種，臺灣目前記錄有 3 亞科 29 屬 117 種 (邵，2009)。以下將針對臺灣常食用及可能蘊藏熱帶性海魚毒素之石斑魚類簡述之。

- (一) 駝背鱸 (*Cromileptes altivelis*)
- (二) 青星九刺鮨 (*Cephalopholis miniata*)
- (三) 鞍帶石斑 (*Epinephelus lanceolatus*)
- (四) 瑪拉巴石斑 (*E. malabaricus*)
- (五) 鱸滑石斑魚 (*E. tauvina*)
- (六) 玳瑁石斑魚 (*E. quoyanus*)
- (七) 花斑刺鰓鰭 (*Plectropomus leopardus*)
- (八) 星鱸 (*Variola louti*)
- (九) 白緣星鱸 (*V. albimarginata*)

2. 一般鑑定魚種的方法

2.1 外觀特徵

一般區分魚種大多先以外觀特徵來判別，而在傳統分類學上則是以骨骼學、肌肉學、歧支分類學、生活史特徵、或是以鰭之特徵、鱗片以及腸形等來區分 (Tyler, 1980; Rosen, 1984)，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)。另外，外觀特徵也常常因為一些外在因素的改變 (例如：不同貯存、加工條件等) 和不同鑑定者的主觀判斷，而增加以外觀型態鑑定的困難度。

2.2 以蛋白質分析方法鑑定魚種

由 Sotelo *et al.* (1993) 和 Mackie (1990, 1997a) 綜合歸納出一些針對新鮮以及加工過後之魚種鑑定方法，其中包括有二維電泳法 (two-dimensional electrophoresis; 2-DE)、酵素免疫分析法 (enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA)、高效能液相層析 (high performance liquid chromatography; HPLC)、等電點對焦電泳 (isoelectric focusing; IEF)、硫酸十二酯鈉 - 聚丙醯胺凝膠電泳 (sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis; SDS PAGE) 等方法，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，以利用於親緣關係的分析。AOAC 在 1977 年已接受多種電泳分析法作為魚種鑑定的依據。Rehbein (1995) 以及 Mackie *et al.* (1997b) 指出，水溶性蛋白之 IEF 及 SDS-PAGE 之電泳分析結果可用於新鮮魚貝類上的種別鑑定。而在 Chen and Hwang (2002) 之研究中則指出，利用 SDS-PAGE 方法分析 7 種臺灣常見之河魴魚種，結果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。其次

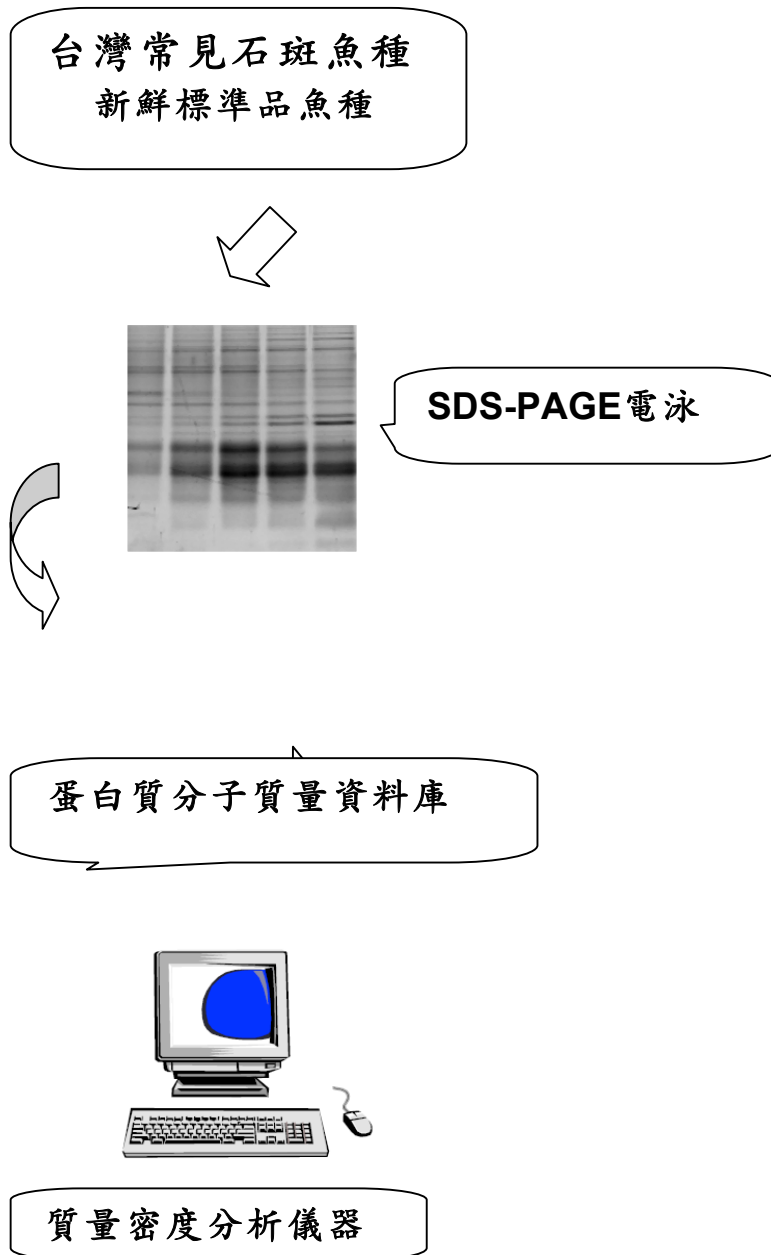
SDS-PAGE 與 IEF 結合而成的 2-DE 亦成功地應用於新鮮魚種的鑑定 (Crockford and Johnston, 1995)。Hung *et al.* (1995) 提出利用 ELISA 可作為鯛魚魚種的鑑別，Etienne *et al.* (1999) 亦聯合歐洲數個實驗群組，證實利用 IEF 以及 SDS-PAGE 分析魚肉蛋白之電泳圖，可確實應用於新鮮以及加工魚種之鑑別，顯示出利用魚肉蛋白之蛋白質電泳以及免疫偵測法應用於魚種鑑定之可行性。

2.3 利用 PCR 技術鑑定物種

現今基因技術的使用大多是以聚合 鏈鎖反應 (polymerase chain reaction; PCR) 為基礎，將目標序列進行大量增幅後，再進一步分析。常見的基因分析方法有直接基因定序法 (direct DNA sequencing) (Stepien *et al.*, 1993)、擴增片段長度多態性分析技術 (amplified fragment length polymorphism; AFLP) (Beismann *et al.*, 1997)、單股結構多樣性 (single strand conformation polymorphism; SSCP) (Rehbein *et al.*, 2005)、隨機放大多型性 DNA (random amplified polymorphic DNA; RAPD) (Mackie *et al.*, 1999)、限制 切割片段長度多型性 (restriction fragment length polymorphism; RFLP) (Chakraborty *et al.*, 2005) 以及多重引子聚合 鏈鎖反應 (multiplex-PCR; m-PCR) (Matsunaga *et al.*, 1999) 等，目前的基因鑑定分析方法其目標多以粒線體 (mitochondria, mt) 所含之 DNA 為主。

(四) 研究方法及步驟

1. 研究構想暨流程圖



2. 魚體檢體收集

石斑魚類標準品從台灣海洋大學水生動物中心購買，包含龍膽石斑 (G)、褐石斑 (K)、虎斑 (B)、瑪拉巴 (M) 及點帶石斑 (C)。

3. 蛋白質抽取和濃度測定

蛋白質抽取擬以不同鹽類濃度抽取石斑魚之水溶性和鹽溶性蛋白質，並以變性劑抽取變性劑可溶性蛋白質，以組織均質機或研磨機抽取。

蛋白質濃度以Bio-Rad Coomassie Protein dye測定。

4. SDS-PAGE電泳

SDS-PAGE膠片所使用的玻璃需確認無污垢或灰塵殘留。依想要觀察的分子量選擇製作濃度梯度或單一濃度的膠。此次實驗使用12%單一濃度的膠，如下混合各物質，可製作2片膠的量：

Acryamide/Bis-acryamide (37.5:1) 40% solution	3.0 ml
1.5M/pH 8.8 Tris-HCl	2.5 ml
H ₂ O	4.5 ml

混合於燒杯後以幫浦抽氣排除可能的氣泡，之後加入40 μ l 10% Ammonium persulfate (APS)、4 μ l TEMED，充份混合後即可注入鑄膠槽 (Bio-Rad, USA)。架設完成後，將鑄膠溶液仔細注入鑄膠槽中，避免氣泡產生。於上層加入0.2 ml的95%酒精，靜置於室溫1小時以上待膠凝固。分別將蛋白質標準品與樣品注入膠體後，先以每片膠10 mA的電流量跑10分鐘，再改以每片膠25 mA跑完。

5. 膠片染色

將完成電泳的二維膠片泡入純水中洗去電泳緩衝液，再換至固定緩衝液 (7% acetic acid, 10% methanol)中，緩慢搖晃1小時，以純水洗去固定緩衝液後加入染劑Coomassie blue，染色30 min，依染劑效能調整。完成後以固定緩衝液進行退染約1小時，之後將膠片掃描或照相進行影像處理。

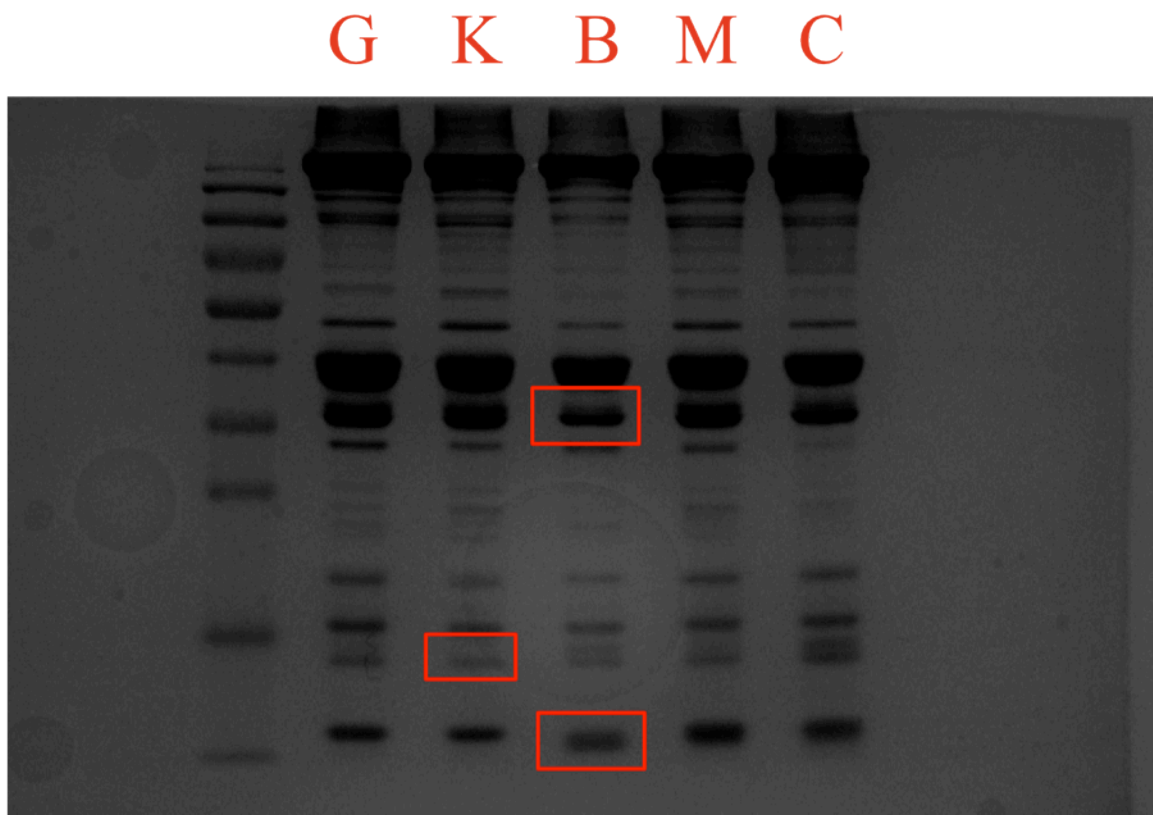
6. 蛋白質圖譜比對

將膠片掃描後的檔案，以Image Master 2D Platinum進行蛋白質電泳帶選定及比對，挑選表現量差異大於1.5倍的蛋白質進行後續鑑定。

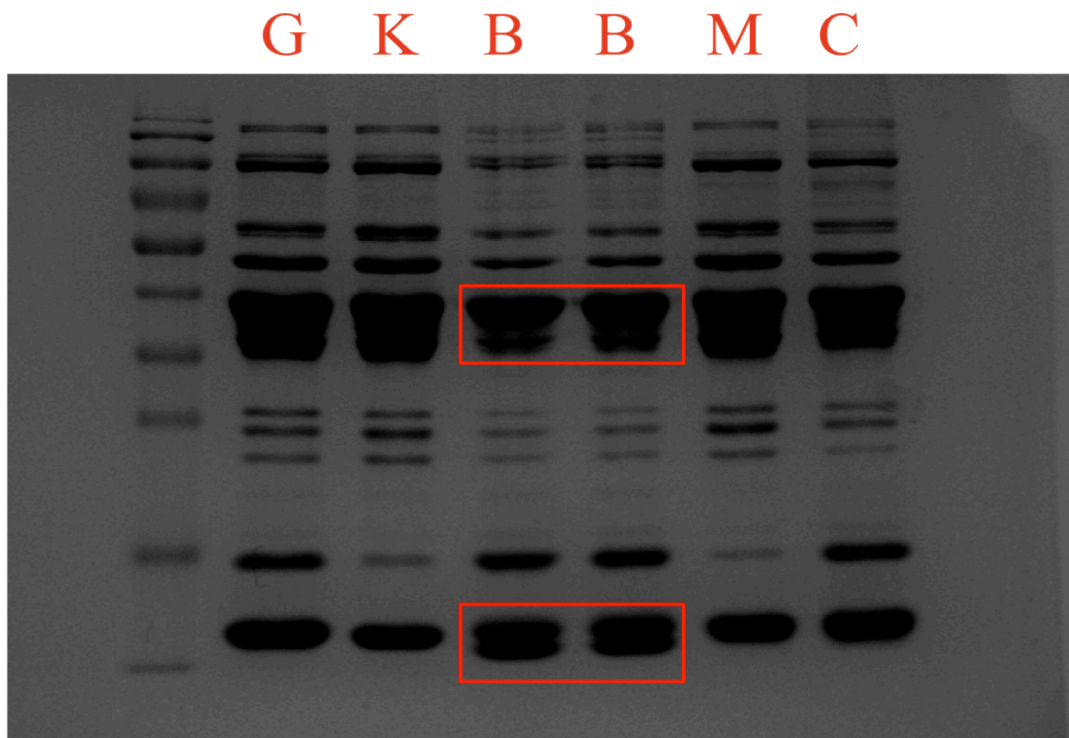
(五) 初步結果

1. 建立台灣常見石斑魚種之快速簡易蛋白質電泳鑑種技術
2. 了解不同石斑魚種之種別特異性蛋白質
3. 提供未來市售石斑魚種之真實來源魚種現況調查資料
4. 提供未來質譜儀鑑定之石斑魚種別特異性蛋白質

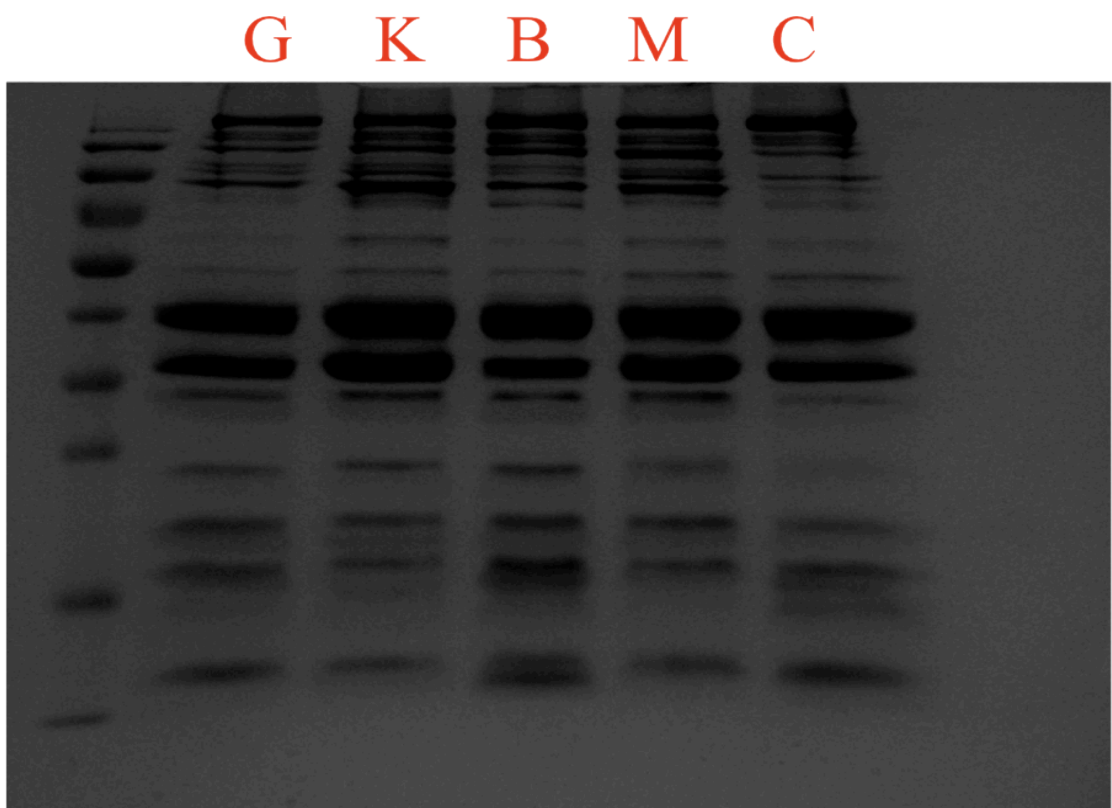
(六) 實驗結果



圖一：尿素可溶性蛋白質。包含龍膽石斑 (G)、褐石斑 (K)、虎斑 (B)、瑪拉巴 (M) 及點帶石斑 (C)。



圖二：水溶性蛋白質。包含龍膽石斑 (G)、褐石斑 (K)、虎斑 (B)、瑪拉巴 (M) 及點帶石斑 (C)。



圖三：鹽溶性蛋白質。包含龍膽石斑 (G)、褐石斑 (K)、虎斑 (B)、瑪拉巴 (M) 及點帶石斑 (C)。

(七) 參考文獻

- 邵廣昭，2009。臺灣魚類資料庫網路電子版。 <http://fishdb.sinica.edu.tw>。
- 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.
- Brusle, J. and Brusle, S. 1975. Ovarian and testicular intersexuality in two protogynous Mediterranean groupers, *Epinephelus aeneus* and *Epinephelus guaza*. In: *Intersexuality in the Animal Kingdom*. (ed. By R. Reinboth). Springer, Berlin. pp. 222-227.
- Chakraborty, A., Aranishi, F. and Iwatsuki, Y. 2005. Molecular identification of hairtail species (Pisces: Trichiuridae) based on PCR-RFLP analysis of the mitochondrial 16S rRNA gene. *Journal of Applied Genetics* 46: 381-385.
- Chen, T. Y. and Hwang, D. F. 2002. Electrophoretic identification of muscle proteins in 7 puffer species. *Journal of Food Science* 67: 936-942.
- Crockford, T. and Johnston, I. 1995. Isolation of unstable myosins and the analysis of light chains by capillary electrophoresis. *Analysis of Biochemistry* 231: 20-26.
- 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.
- Hung, T. S., Marshall, M. R. and Wei, C. I. 1995. Identification of red snapper (*Lutjanus campechanus*) using electrophoretic techniques. *Journal of Food Science* 60: 279-283.
- Mackie, I. M. 1990. Identifying species of fish. *Analytical Proceedings* 27: 89-92.
- Mackie, I. M. 1997a. *Food Authenticity*. Blackie Academic and Professional. London. pp. 140-170.
- Mackie, I. M. 1997b. *Fish Processing Technology*, 2nd ed. Blackie Academic and Professional. London. pp. 160-199.
- Mackie, I. M., Pryde, S. E., Gonzales-Sotelo, C., Medina, I., Perez-Martin, R., Quinteiro, J., Rey-Mendez, M. and Rehbein, H. 1999. Challenges in the identification of species of canned fish. *Trends in Food Science and Technology* 10: 9-14.
- Matsunaga T., Chikuni K., Tanabe R., Muroya S., Shibata K., Yamada J. and Shinmura Y. 1999. A quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay. *Meat Science* 51: 143-148.
- Morton, J. E. 1979. *Molluscs*. Hutchinson, Co., London. pp. 264.
- Rehbein, H. 2005. Identification of the fish species of raw or cold-smoked salmon and salmon caviar by single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis. *European Food Research and Technology* 220:625-632.
- Rehbein, H., Etienne, M., Jerome, M., Hattula, T., Knudsen, 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 reliability of the isoelectric focusing method of fish species identification. *Food Chemistry* 52: 193-197.

- Rosen, D. E. 1984. Zeiform as primitive Plectognath fishes. *American Museum Novitates* 2782: 1-45.
- Sotelo, C. G., Pineiro, C., Gallardo, J. M. and Perez-Martin, R. I. 1993. Fish species identification in seafood products. *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.
- Tyler, J. C. 1980. Osteology, phylogeny and higher classification of the fishes of the order Plectognathi (Tetraodontiformes). NOAA Technical Report NMFS Circulars 434: 1-422.

o