食品藥物研究年報. 11：64-75 2020
Ann. Rept. Food Drug Res. 11：64-75 2020

基因改造鮭魚轉殖品項AquAdvantage定性檢驗方法之建立

周璟伯　關嶸　邱詩婷　陳育志　王鈺婷　林澤揚　王博譽　曾素香　王德原

食品藥物管理署 研究檢驗組

摘　要

基因改造(下稱基改)鮭魚轉殖品項AquAdvantage為美國麻州AquaBounty Technologies生技公司在1989年研發，美國食品藥物管理署(US Food and Drug Administration, US FDA)於2015年11月核准通過上市，成為史上首例核准上市的基改動物食品。其主要是將大洋鱈魚(ocean pout)的抗凍蛋白基因啟動子(antifreeze protein 5' promoter region, AFP5')、終結子(antifreeze protein 3' termination region, AFP3')，以及國王鮭生長激素基因(Chinook salmon growth hormone, GHc)，轉殖入大西洋鮭魚(Atlantic salmon)，所得到的AquAdvantage基改鮭魚即使在寒冷氣候中依然能製造生長激素，克服天然大西洋鮭魚在冬天生長遲緩的問題。本研究參考相關文獻，建立其5'端轉殖品項特異性(event-specific)、3'端轉殖品項特異性之PCR檢驗方法，並將上述PCR標的片段與國王鮭GHc基因片段、大西洋鮭魚細胞色素b基因(Cytochrome b, Cyt-b)特異性片段共同構築成參考質體pAAS-GMF。由於基改鮭魚在我國尚未許可，為開發基改鮭魚檢驗方法並瞭解市場情形，爰針對4件市售鮭魚檢體進行PCR測試，所得結果其基改成分皆呈現陰性反應。未來食藥署將持續關注該基改鮭魚之動向，落實食藥署對於基改食品之管理。

關鍵詞：基因改造、鮭魚、AquAdvantage、PCR

前　言

台灣市面上販售的鮭魚主要為兩大類，分為大西洋鮭屬(*Salmo* spp.)及太平洋鮭屬(*Oncorhynchus* spp.)，大西洋鮭魚多為養殖，大部分進口自挪威、智利，因魚肉色澤較紅，在台灣多半用於製作生魚片，最常見的品種為大西洋鮭(*S. salar*)；太平洋鮭屬總共有10個物種，大多為野生捕撈，台灣市面見到的太平洋鮭大多進口自日本、美國阿拉斯加，常見的太平洋鮭品種為銀鮭(*O. kisutch*)、國王鮭(*O. tshawytscha*)、狗鮭(*O. keta*)、櫻鮭(*O. masou*)等，市面上通常以野生鮭魚作標示；虹鱒(*O. mykiss*)常見於台灣山區，現今多以養殖場進行養殖。根據研究統計，全台鮭魚需求平均一年進口量高達約1,658萬公斤，在目前進口水產品佔最大宗[1]。

而過去已有諸多文獻指出，利用生長激素(growth hormone, GH)進行刺激、基因轉殖、馴養或育種等方式，可以顯著提高魚類的生長曲線[2-6]。而利用基因轉殖的方式來表達GH基因，對於泥鰍(*Misgurnus mizolepis*)

和銀鮭(*O. kisutch*, Coho salmon)等魚種，其體形甚至可增加到35至37倍之多[2,7-12]。基因改造(下稱基改)鮭魚轉殖品項AquAdvantage為美國麻州AquaBounty Technologies生技公司在1989年研發[13]，美國食品藥物管理署(US Food and Drug Administration, US FDA)於2015年11月核准通過上市，成為史上首件核准上市的基改鮭魚，也是史上首件核准上市的基改動物食品[14]。其主要是利用大洋鱈魚(ocean pout)的抗凍基因啟動子(antifreeze protein 5' promoter region, AFP5')、終結子(antifreeze protein 3' termination region, AFP3')來表達國王鮭的生長激素基因(Chinook salmon growth hormone, GHc)。將其轉殖入大西洋鮭魚(Atlantic salmon)的受精卵，所得到基改鮭魚AquAdvantage即使在寒冷氣候中依然能製造生長激素，克服天然大西洋鮭魚在冬天生長遲緩的問題，使養殖時間從一般鮭魚養殖的3年縮短到16至18個月即可上市販售[13,15,16]。此外，該基改鮭魚會利用雌核發育(gynogenesis)技術，以人工控制造成全雌性三倍體不孕化，防範其不慎逃脫所造成的生態衝擊[16,17]。

依據我國食品安全衛生管理法第21條規定，食品中所含之基改食品原料非經中央主管機關健康風險評估審查，並查驗登記發給許可文件，不得供作食品原料。目前基改鮭魚AquAdvantage尚未申請基改食品查驗登記，故基改鮭魚不可輸入我國供作食品或食品原料。本研究內容為配合行政管理需求，進行基改鮭魚轉殖品項AquAdvantage定性檢驗方法之開發。

材料與方法

一、市售鮭魚檢體、鮭屬魚種標準品及其他魚種對照樣品

本研究市售鮭魚檢體委託食藥署北區管理中心採樣取得，分別為科克蘭阿拉斯加野生紅鮭魚(檢體編號: 105-PSA-01A、105-PSA-01B)、SALMOLUX煙燻鮭魚片(檢體編號: 105-PSA-02)、科克蘭煙燻野生紅鮭魚(檢體編號: 105-PSA-03)、大西洋鮭魚(檢體編號: 105-PSA-04)。比對物種於台北魚類批發市場及好市多美式賣場購買，鮭屬魚種包括大西洋鮭(*S. salar*)、國王鮭(*O. tshawytscha*)、銀鮭(*O. kisutch*)、虹鱒(*O. mykiss*)、狗鮭(*O. keta*)、紅鮭(*O. nerka*)等六種。其他魚種分別為日本的鯛(*Zeus faber*)、豆仔魚(*Chelon haematocheilus*)、灰色真鯊(*Carcharhinus obscurus*)、雀鯛(*Pomacanthus semicirculatus*)、紅尾冬(*Pterocaesio digramma*)、春子魚(*Johnius dussumieri*)、菜刀魚(*Mene maculate*)、紅目鰱(*Priacanthus macracanthus*)、鬼頭刀(*Coryphaena hippurus*)、剝皮魚(*Thamnaconus tessellatus*)、黃雞魚(*Parapristipoma trilineatum*)、太湖新銀魚(*Neosalanx taihuensis*)、白口(*Pennahia argentata*)、金線魚(*Nemipterus virgatus*)、鮸魚(*Aristichthys nobilis*)、異鱗蛇鯖(*Lepidocybium flavobrunneum*)、鸚哥魚(*Anampses caeruleopunctatus*)、黑喉(*Atrobucca nibe*)、皇帝魚(*Psettodes erumei*)、小鰭鐮齒魚(*Harpadon nehereus*)、馬鞭魚(*Fistularia petimba*)、刺鯧(*Psenopsis anomala*)、白北魚(*Sarda orientalis*)、四破(*Decapterus macrosoma*)、白毛(*Kyphosus vaigiensis*)、鮫鰡(*Lophius litulon*)、匙吻鱘(*Polyodon spathula*)、杜父魚(*Leviprora inops*)、竹筴魚(*Trachurus japonicus*)、皮特凱恩鬚唇飛魚(*Cheilopogon pitcairnensis*)、寬體舌鰨(*Cynoglossus robustus*)、赤鯨(*Dentex tumifrons*)、棘黑角魚(*Chelidonichthys spinosus*)、鮸仔魚(*Chrysochir aureus*)、花身副麗魚(*Parachromis managuensis*)、布氏金梭魚(*Sphyraena putnamae*)、紅鰭(*Plectropomus*

leopardus)、石狗公(*Sebastiscus marmoratus*)、馬舌鰈(*Reinhardtius hippoglossoides*)、銀鯧(*Pampus argenteus*)、鯖魚(*Scomber australasicus*)、格陵蘭鱈(*Gadus ogac*)、黃線狹鱈(*G. chalcogrammus*)、黑皮旗魚(*Makaira nigricans*)、黃鰭鮪(*Thunnus albacares*)、虱目魚(*Chanos chanos*)、吳郭魚(*Oreochromis mossambicus*)、黃魚(*Larimichthys crocea*)、午仔魚(*Eleutheronema tetradactylum*)、花身雞魚(*Terapon jarbua*)、丁香魚(*Spratelloides gracilis*)、煙鰮(*Aethaloperca rogaa*)、柳葉魚(*Mallotus villosus*)、秋刀魚(*Cololabis saira*)、馬頭魚(*Branchiostegus japonicus*)等共55個魚種。

二、DNA抽取、純化套組

DNA抽取及純化套組(DNeasy Blood & Tissue Kits, Qiagen, Germany)。(所有操作步驟皆參照廠商提供之使用手冊)

三、儀器設備

㈠PCR反應器(GeneAmp PCR System 9700, Thermo Fisher Scientific, USA)

㈡微量定量用分光光度計(NanoDrop ND-1000, NanoDrop Technologies, USA)

㈢研磨機(Retsch MM400, Retsch, Germany)

㈣高速微量低溫離心機(Kubota-3740, Kubota Corporation, Japan)

㈤迷你型膠體電泳設備(Mupid-2, Advance, Japan)

㈥膠體電泳影像系統(AlphaImager HP System, ProteinSimple, USA)

四、引子對合成及PCR反應試劑

本研究使用之引子對(表三)除參考文獻外，均使用軟體(LightCycler Probe Design Software 2.0, Roche Applied Science, Germany)設計，並委託TIB Molbiol (Berlin, Germany)合成。PCR反應試劑(Blend Taq Plus, TOYOBO, Japan)。

五、參考質體建構及反應試劑

基改鮭魚參考質體委託基龍米克斯生物科技公司(Genomics, Taiwan)以全基因合成的方式將標的區域片段共同構築於pUC57載體上，經42℃水浴反應45秒將其送入勝任細胞(ECOS 101, Yeastern Biotech, Taiwan)，再以培養基(S-Gal™/LB Agar Blend, Sigma, USA)進行選殖，並將挑取之菌株委託基龍米克斯生物科技公司定序。確認序列無誤後，以質體純化套組(QIAprep Spin Miniprep Kit, Qiagen GmbH, Germany) 將質體純化回收，保存於-30°C冰箱。

六、聚合酶鏈鎖反應(Polymerase Chain Reaction, PCR)

將混合好之PCR反應溶液置入PCR反應器進行反應，反應後之產物注入1.5%之洋菜膠膠體(Agarose, Amresco, USA)，以迷你型膠體電泳設備進行電泳，膠體經染劑(Ethidium Bromide, Amresco, USA)染色後置入清水中退染30分鐘，再以膠體電泳影像系統觀察結果。PCR反應溶液及反應條件如表一、表二。

結果與討論

表一、PCR反應溶液之配製條件

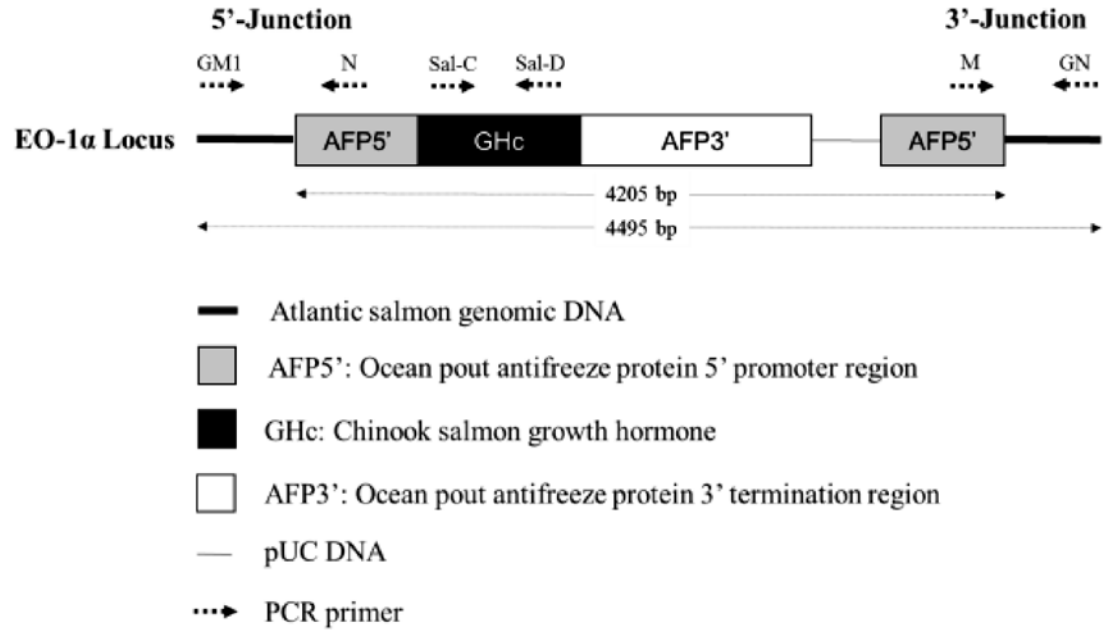
反應溶液	反應體積 (μL)
Blend Taq-Plus (2.5 U/μL)	0.5
10倍Blend Taq -Plus PCR buffer緩衝溶液	5.0
2 mM dNTPs	5.0
5 μM 正股引子	2.0
5 μM 反股引子	2.0
模版DNA	5.0
無菌純水	30.5
總體積	50.0

表二、PCR反應條件

步驟	溫度	時間	循環數
最初變性	94°C	5 min	
變性	94°C	30 sec	
黏接	60°C	30 sec	35
延展	72°C	90 sec	
最終延展	72°C	7 min	
冷卻	4°C	∞	

一、基改鮭魚AquAdvantage殖入基因組及跨接區域之分析

基改鮭魚AquAdvantage殖入基因組(EO-1α)片段之組成[15,16,18]，從5'端至3'端依序為大西洋鮭魚基因體序列(Atlantic salmon genomic DNA) -大洋鱈魚抗凍基因啟動子(AFP5') -國王鮭生長激素基因(GHc) -大洋鱈魚抗凍基因終結子(AFP3') -pUC載體序列(pUC DNA) -AFP5'-大西洋鮭魚基因體序列，殖入基因組全長共4205 bp；而包含5'端及3'端跨接區域(junction region)總共4495 bp (圖一)。依據序列分析的結果，我們也可以確認鑑別用引子對GM1/N其標的為Atlantic salmon genomic DNA-AFP5'之5'端跨接區域，為第一組轉殖品項特異性引子對，PCR增幅產物片段大小為572 bp (圖一、表三)；引子對M/GN其標的為AFP5'-Atlantic salmon genomic DNA之3'端跨接區域，為第二組轉殖品項特異性引子對，PCR增幅產物片段大小為351 bp (圖一、表三)。此外，引子對Sal-C/Sal-D其標的為鮭魚內生性GH基因，PCR增幅產物片段大小則依據是否為基改鮭魚而有所差異。一般非基改鮭魚之內生性GH基因包含了一段內含子(intron)之非編



圖一、基改鮭魚轉殖品項AquAdvantage殖入基因組分析
(參考Aqua Bounty Technologies, Inc. 2010. Environmental assessment for AquAdvantage salmon. Figure 3修改)

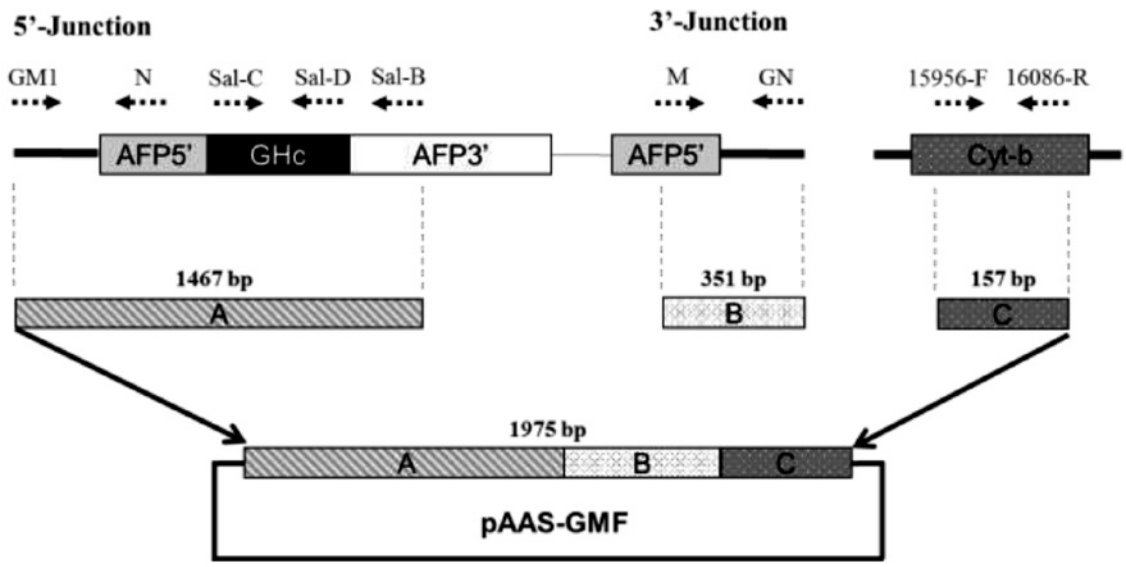
表三、本研究使用之引子對序列表

引子名稱	引子序列(5'-3')	標的基因	增幅產物大小(bp)	參考文獻
Sal-C	TCTgCTgATgCCAgTCTTACT	salmon growth hormone/ sense	NonGM: 344 GM: 199 + 344	(18)
Sal-D	ACAgAAgTCCAgCAggAATAT	salmon growth hormone/ antisense		(18)
GM-1	gTTgTACTgCTgATgCCTCTg	salmon genome/sense	572	(15, 16)
N	gAggACTTAACCggCATATCC	AFP5'/ antisense		(15, 16)
M	gAgACCAgCTgATCTAgACAg	AFP3'/ sense	351	(15, 16)
GN	AgTCTgTgAggTATCAgCAgg	salmon genome/ antisense		(15, 16)
GM-1	gTTgTACTgCTgATgCCTCTg	salmon genome/ sense	1467	(15, 16)
Sal-B	ATCTCAACAgTCTCCACAggT	AFP3'/ antisense		(18, 19)
15956-F	TgCCACAgTACTCCATCTTCTATTTT	Mitochondrial Cytochrome b/ sense	157	本研究
16086-R	AgCTAAggATgTTAggCCAAgTAgTAT	Mitochondrial Cytochrome b/ antisense		本研究
COI-L	CACgACgTTgTAAAACgACTCAACY AATCAYAAAgATATYggCAC	Mitochondrial CO1/ sense	695	(22)
COI-H	ggATAACAATTTCACACAggACTTC YgggTgRCCRAARAATCA	Mitochondrial CO1/ antisense		(22)

碼DNA片段，其得到之PCR增幅產物片段大小為344 bp；而基改鮭魚AquAdvantage除了內生性GH基因外，另外還殖入了一段去掉內含子之GHc基因，故所得到之PCR增幅產物片段大小分別為344 bp及199 bp (圖一、表三)。故本研究使用之鮭魚內生性GH基因檢測兼具內部對照比對與基改鑑別。

二、基改鮭魚AquAdvantage參考質體pAAS-GMF之建構

由於食藥署目前尚未取得基改鮭魚AquAdvantage之標準品，故本研究利用全基因合成之方式建構其參考質體，以利後續實驗進行。我們以基改鮭魚AquAdvantage之殖入基因組為模板，將標的區域A、B、C之序列，委由基龍米克斯生物科技公司以全基因合成的方式共同構築於載體上，即可得到參考質體pAAS-GMF (圖二)。標的區域A為引子對GM1/Sal-B之PCR增幅片段，PCR增幅產物片段大小為1467 bp；標的區域B為引子對M/GN之PCR增幅片段，PCR增幅產物片段大小為351 bp；標的區域C為食藥署自行開發引子對15956-F/16086-R之PCR增幅片段，PCR增幅產物片段大小為157 bp (圖二、表三)。標的區域A全片段包含了基改鮭魚AquAdvantage殖入基因之5'端跨接區域、完整的GHc基因以及部分的AFP3'片段；標的區域B則包含了基改鮭魚AquAdvantage殖入基因之3'端跨接區域；標的區域C主要包含一段大西洋鮭魚特異性的細胞色素b基因(Cytochrome b, Cyt-b)，可專一的鑑別出大西洋鮭魚。Cyt-b基因為位於粒線體上的一個基因體，長度約1.2 Kb，主要為參與細胞電子傳遞鏈的相關角色。此外，其也常被用來作為物種鑑定與探索親緣關係演化的重要區域[19]。Cyt-b基因序列在親近的種屬間仍有些微差異性，故可利用這項特性鑑別種屬間的差



圖二、基改鮭魚轉殖品項AquAdvantage參考質體之建構

異[20]。

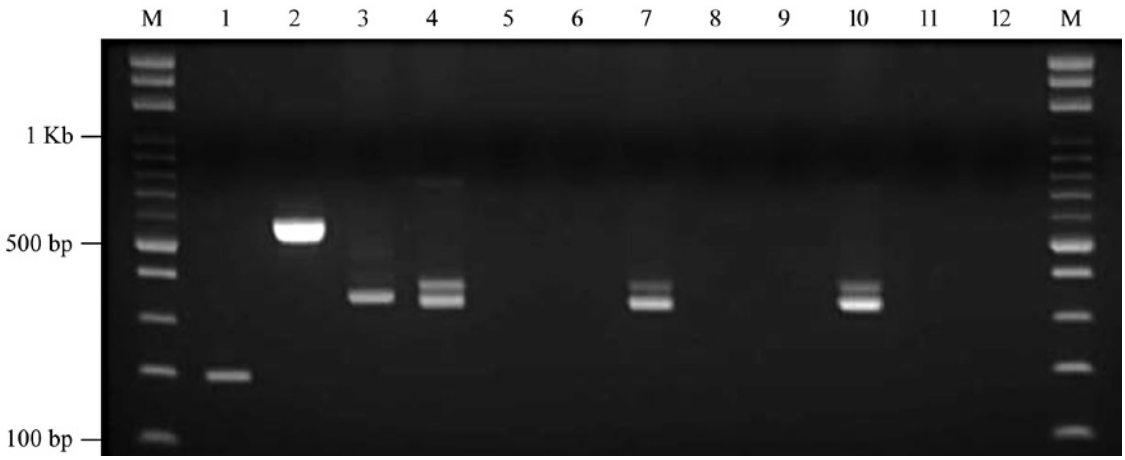
三、基改鮭魚AquAdvantage鑑別方法測試與市場調查監測

以鮭魚內生性GH基因特異性引子對Sal-C/Sal-D，以及基改鮭魚AquAdvantage 5'端轉殖品項特異性引子對GM1/N、3'端轉殖品項特異性引子對M/GN針對參考質體pAAS-GMF進行PCR，分別得到了199 bp、572 bp、351 bp之PCR增幅片段(圖三至圖六)。而所有的PCR增幅片段皆符合預期大小，故參考質體pAAS-GMF可以替代基改鮭魚AquAdvantage標準品來作為陽性對照組。參考質體pAAS-GMF直接針對去掉內含子之GHc基因進行合成，因此不會得到鮭魚內生性GH基因344 bp之PCR增幅片段。此外，我們以大西洋鮭作為非基改鮭魚陰性對照組，PCR結果顯示只有鮭魚內生性GH基因特異性方法為陽性反應，PCR增幅片段為344 bp。而基改鮭魚AquAdvantage 5'端轉殖品項特異性方法及3'端轉殖品項特異性方法皆為陰性反應(圖三至圖六)。

本研究採樣取得之市售鮭魚檢體共4件，其中科克蘭阿拉斯加野生紅鮭魚因包裝內包含2片魚肉，故給予兩組檢體編號(105-PSA-01A、105-PSA-01B)，其餘3件檢體皆為單片包裝，故各給予一組檢體編號(105-PSA-02、105-PSA-03、105-PSA-04)。將上述市售鮭魚檢體進行PCR測試，實驗結果同為非基改鮭魚之陰性對照組，只有鮭魚內生性GH基因特異性方法為陽性反應，PCR增幅片段為344 bp(圖三至圖六)。基改鮭魚AquAdvantage 5'端轉殖品項特異性方法及3'端轉殖品項特異性方法則皆為陰性反應(圖三至圖六)。結果顯示，4件市售鮭魚檢體皆未檢測出基改之成分。

四、鮭魚內生性GH基因之PCR專一性確效測試

過去已有文獻使用鮭魚內生性GH基因作為鑑別鮭屬魚種之標的基因[21]，為了確認本研究鮭魚內生性GH基因特異性方法是否能專一

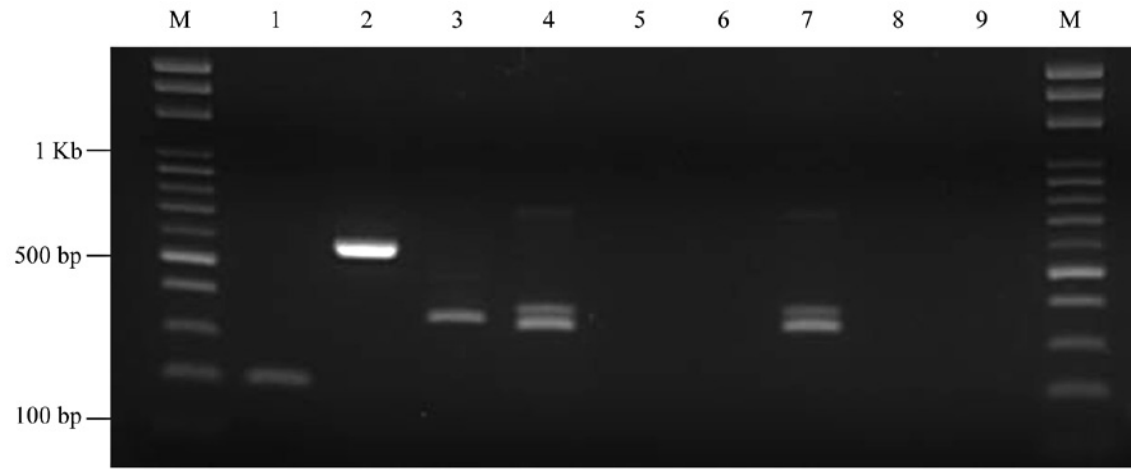


圖三、鮭魚檢體105-PSA-01A、105-PSA-01B之PCR測試結果

註：以鮭魚內生性GH基因特異性引子對Sal-C/Sal-D、基改鮭魚AquAdvantage 5’端轉殖品項特異性引子對GM1/N、以及基改鮭魚AquAdvantage 3’端轉殖品項特異性引子對 M/GN進行PCR之反應結果。

M:　100 bp marker
lane 1:　參考質體pAAS-GMF (引子對: Sal-C/Sal-D, 199 bp)
lane 2:　參考質體pAAS-GMF (引子對: GM1/N, 572 bp)
lane 3:　參考質體pAAS-GMF (引子對: M/GN, 351 bp)
lane 4:　非基改鮭魚(引子對: Sal-C/Sal-D, 344 bp)
lane 5:　非基改鮭魚 引子對: GM1/N, 572 bp)
lane 6:　非基改鮭魚(引子對: M/GN, 351 bp)
lane 7:　鮭魚檢體105-PSA-01A (引子對: Sal-C/Sal-D, 344 bp)
lane 8:　鮭魚檢體105-PSA-01A (引子對: GM1/N, 572 bp)
lane 9:　鮭魚檢體105-PSA-01A (引子對: M/GN, 351 bp)
lane 10:　鮭魚檢體105-PSA-01B (引子對: Sal-C/Sal-D, 344 bp)
lane 11:　鮭魚檢體105-PSA-01B (引子對: GM1/N, 572 bp)
lane 12:　鮭魚檢體105-PSA-01B (引子對: M/GN, 351 bp)

的鑑別出鮭屬魚種，我們選用了6種鮭屬魚種標準品以及55種其他魚種進行PCR測試。6種鮭屬魚種標準品及55種其他魚種對照樣品先以共通COI生物條碼引子對COI-L/COI-H (表三)進行PCR，將COI序列PCR增幅後再送交定序，定序結果上傳NCBI物種資料庫比對序列後即可確認物種。鮭屬魚種包括大西洋鮭、國王鮭、銀鮭、虹鱒、狗鮭、紅鮭等六種。55種其他魚種則包括日本的鯛、豆仔魚、灰色真鯊、雀鯛、紅尾冬、春子魚、菜刀魚、紅目鰱、鬼頭刀、剝皮魚、黃雞魚、太湖新銀魚、白口、金線魚、鮸魚、異鱗蛇鯖、鸚哥魚、黑喉、皇帝魚、小鰭鐮齒魚、馬鞭魚、刺鯧、白北魚、四破、白毛、鮫鰊、匙吻鱘、杜父魚、竹筴魚、皮特凱恩鬚唇飛魚、寬體舌鰨、赤鯨、棘黑角魚、鮸仔魚、花身副麗魚、布氏金梭魚、紅鰶、石狗公、馬舌鰈、銀鯧、鯖魚、格陵蘭鱈、黃線狹鱈、黑皮旗魚、黃鰭鮪、虱目魚、吳郭魚、黃魚、午仔魚、花身雞魚、丁香魚、煙鰮、柳葉魚、秋刀魚、馬頭魚。以鮭魚內生性GH基因特異性引子對Sal-C/Sal-D針對上述魚種進行PCR測試，結果顯示6種鮭屬魚種皆為陽性反應，55種其他魚種則皆為陰性反應(圖七)，顯示該方法可專一的鑑別出鮭屬



圖四、鮭魚檢體105-PSA-02之PCR測試結果

註：以鮭魚內生性GH基因特異性引子對Sal-C/Sal-D、基改鮭魚AquAdvantage 5’ 端轉殖品項特異性引子對GM1/N、以及基改鮭魚AquAdvantage 3’ 端轉殖品項特異性引子對 M/GN進行PCR之反應結果。

M: 100 bp marker

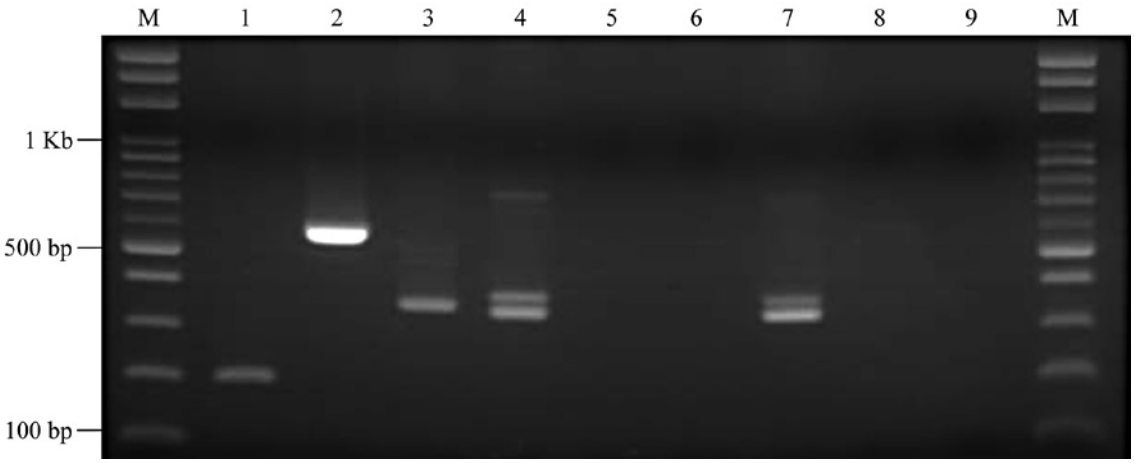
lane 1: 參考質體pAAS-GMF (引子對: Sal-C/Sal-D, 199 bp); lane 2: 參考質體pAAS-GMF (引子對: GM1/N, 572 bp)

lane 3: 參考質體pAAS-GMF (引子對: M/GN, 351 bp); lane 4: 非基改鮭魚(引子對: Sal-C/Sal-D, 344 bp)

lane 5: 非基改鮭魚(引子對: GM1/N, 572 bp); lane 6: 非基改鮭魚(引子對: M/GN, 351 bp)

lane 7: 鮭魚檢體105-PSA-02 (引子對: Sal-C/Sal-D, 344 bp); lane 8: 鮭魚檢體105-PSA-02 (引子對: GM1/N, 572 bp)

lane 9: 鮭魚檢體105-PSA-02 (引子對: M/GN, 351 bp)



圖五、鮭魚檢體105-PSA-03之PCR測試結果

註：以鮭魚內生性GH基因特異性引子對Sal-C/Sal-D、基改鮭魚AquAdvantage 5’ 端轉殖品項特異性引子對GM1/N、以及基改鮭魚AquAdvantage 3’ 端轉殖品項特異性引子對 M/GN進行PCR之反應結果。

M: 100 bp marker

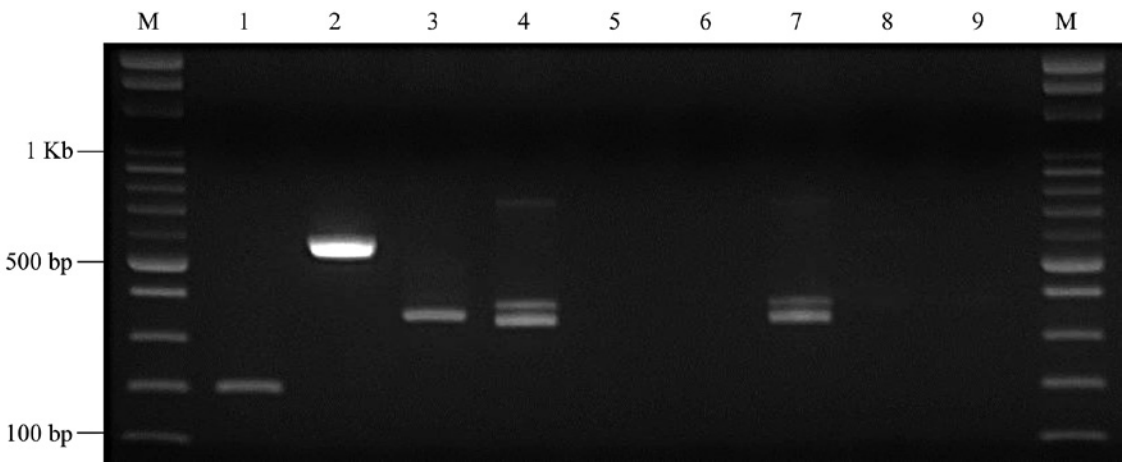
lane 1: 參考質體pAAS-GMF (引子對: Sal-C/Sal-D, 199 bp); lane 2: 參考質體pAAS-GMF (引子對: GM1/N, 572 bp)

lane 3: 參考質體pAAS-GMF (引子對: M/GN, 351 bp); lane 4: 非基改鮭魚(引子對: Sal-C/Sal-D, 344 bp)

lane 5: 非基改鮭魚(引子對: GM1/N, 572 bp); lane 6: 非基改鮭魚(引子對: M/GN, 351 bp)

lane 7: 鮭魚檢體105-PSA-03 (引子對: Sal-C/Sal-D, 344 bp); lane 8: 鮭魚檢體105-PSA-03 (引子對: GM1/N, 572 bp)

lane 9: 鮭魚檢體105-PSA-03 (引子對: M/GN, 351 bp)



圖六、鮭魚檢體105-PSA-04之PCR測試結果

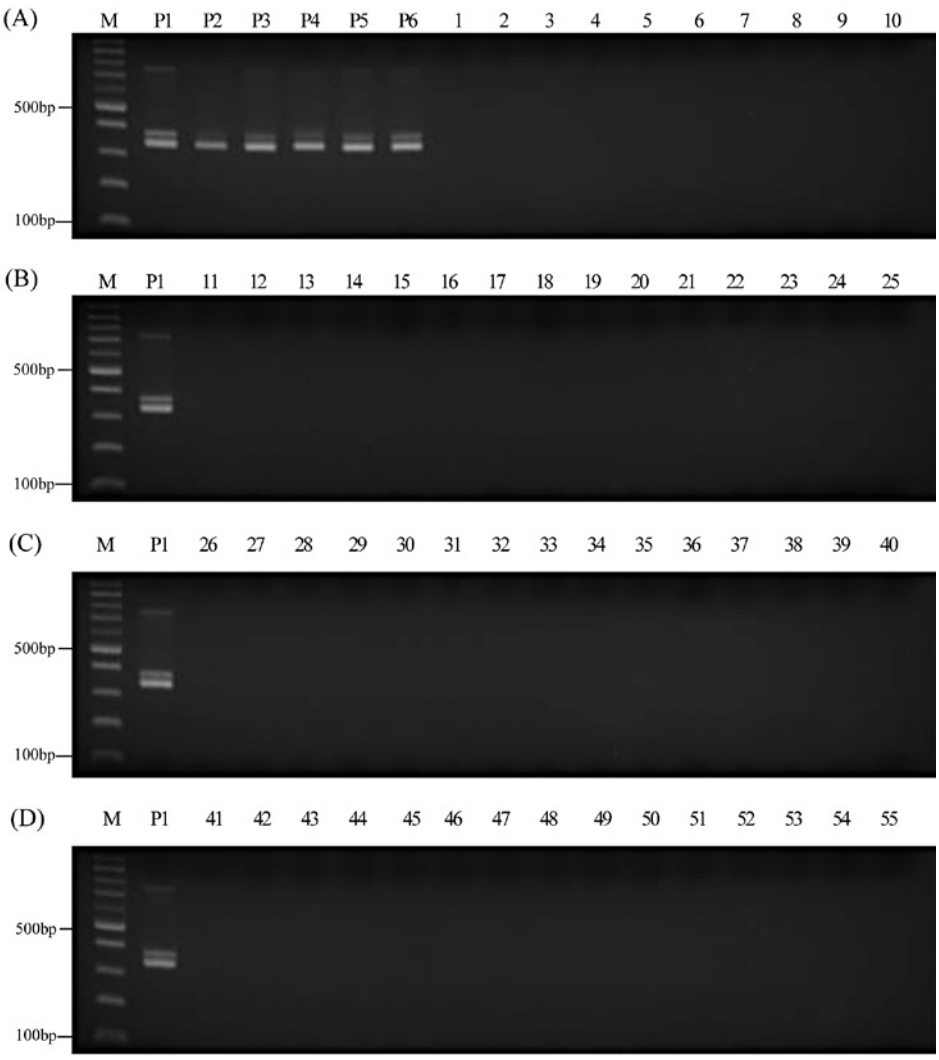
註：以鮭魚內生性GH基因特異性引子對Sal-C/Sal-D、基改鮭魚AquAdvantage 5’端轉殖品項特異性引子對GM1/N、以及基改鮭魚AquAdvantage 3’端轉殖品項特異性引子對M/GN進行PCR之反應結果。
M: 100 bp marker
lane 1: 參考質體pAAS-GMF (引子對: Sal-C/Sal-D, 199 bp); lane 2: 參考質體pAAS-GMF (引子對: GM1/N, 572 bp)
lane 3: 參考質體pAAS-GMF (引子對: M/GN, 351 bp); lane 4: 非基改鮭魚(引子對: Sal-C/Sal-D, 344 bp)
lane 5: 非基改鮭魚(引子對: GM1/N, 572 bp); lane 6: 非基改鮭魚(引子對: M/GN, 351 bp)
lane 7: 鮭魚檢體105-PSA-04 (引子對: Sal-C/Sal-D, 344 bp); lane 8: 鮭魚檢體105-PSA-04 (引子對: GM1/N, 572 bp)
lane 9: 鮭魚檢體105-PSA-04 (引子對: M/GN, 351 bp)

魚種。

綜合上述結果，本研究成功建構了基改鮭魚AquAdvantage之參考質體，並完成其5’端轉殖品項特異性、3’端轉殖品項特異性及鮭魚內生性GH基因特異性方法之PCR測試，預期可鑑別基改鮭魚AquAdvantage，待未來獲得基改鮭魚AquAdvantage標準品進行方法確認，後續將關注該基改鮭魚商品化發展，以落實基改食品之管理。

參考文獻

1. 郭金泉。2013。日本產鮭魚的生態習性及其可持續利用。臺灣博物季刊，第二期，118(32): 72-81。
2. Devlin, R.H., Yesaki, T.Y., Biagi, C.A. and *et al*. 1994. Extraordinary salmon growth. Nature. 371: 209-210.
3. Donaldson, E.M., Fagerlund, U.H.M., Higgs, D.A. and McBride, J.R. 1979. Hormonal enhancement of growth. In: Hoar, W.S., Randall, D.J., Brett, J.R. (Eds.), Fish Physiology, Bioenergetics and Growth. Vol.8: pp. 455-597. Academic, New York.
4. Gjedrem, T. 2000. Genetic improvement of cold-water fish species. Aquacult. Res. 31: 25-33.
5. Tymchuk, W.E., Biagi, C., Withler, R.E. and Devlin, R.H. 2006. Impact of domestication on growth and behavior of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Trans. Am. Fish Soc. 135: 442-455.
6. Tymchuk, W.E. and Devlin, R.H. 2005. Growth differences among first and second generation hybrids of domesticated and wild



圖七、鮭魚內生性GH基因之PCR專一性確效測試

註：以鮭魚內生性GH基因特異性引子對Sal-C/Sal-D對於各類魚種進行PCR之反應結果。M: 100 bp marker、lane P1: 大西洋鮭、lane P2: 國王鮭、lane P3: 銀鮭、lane P4: 虹鱒、lane P5: 狗鮭、lane P6: 紅鮭、lane 1: 日本的鯛、lane 2: 豆仔魚、lane 3: 灰色真鯊、lane 4: 雀鯛、lane 5: 紅尾冬、lane 6: 春子魚、lane 7: 菜刀魚、lane 8: 紅目鰱、lane 9: 鬼頭刀、lane 10: 剝皮魚、lane 11: 黃雞魚、lane 12: 太湖新銀魚、lane 13: 白口、lane 14: 金線魚、lane 15: 鮸魚、lane 16: 異鱗蛇鯖、lane 17: 鸚哥魚、lane 18: 黑喉、lane 19: 皇帝魚、lane 20: 小鰭鑌齒魚、lane 21: 馬鞭魚、lane 22: 刺鯧、lane 23: 白北魚、lane 24: 四破、lane 25: 白毛、lane 26: 鮫鰊、lane 27: 匙吻鱘、lane 28: 杜父魚、lane 29: 竹筴魚、lane 30: 皮特凱恩鬚唇飛魚、lane 31: 寬體舌鰨、lane 32: 赤鯨、lane 33: 棘黑角魚、lane 34: 鮸仔魚、lane 35: 花身副麗魚、lane 36: 布氏金梭魚、lane 37: 紅鰷、lane 38: 石狗公、lane 39: 馬舌鰈、lane 40: 銀鯧、lane 41: 鯖魚、lane 42: 格陵蘭鱈、lane 43: 黃線狹鱈、lane 44: 黑皮旗魚、lane 45 : 黃鰭鮪、lane 46: 虱目魚、lane 47: 吳郭魚、lane 48: 黃魚、lane 49: 午仔魚、lane 50: 花身雞魚、lane 51: 丁香魚、lane 52: 煙鰮、lane 53: 柳葉魚、lane 54: 秋刀魚、lane 55: 馬頭魚

rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture. 245: 295-300.
7. Nam, Y.K., Noh, J.K., Cho, Y.S. and *et al*. 2001. Dramatically accelerated growth and extraordinary gigantism of transgenic mud loach *Misgurnus mizolepis*. Transgenic Res. 10: 353-362.
8. Rahman, M.A. and Maclean, N. 1999. Growth performance of transgenic tilapia containing an exogenous piscine growth hormone gene. Aquaculture. 173: 333-346.
9. Devlin, R.H., Biagi, C.A., Yesaki, T.Y. and *et al*. 2001. Growth of domesticated transgenic fish. Nature. 409: 781-782.
10. Du, S.J., Gong, Z.Y., Fletcher, G.L. and *et al*. 1992. Growth enhancement in transgenic Atlantic salmon by use of an "all fish" chimeric growth hormone gene construct. Biotechnology. 10: 176-181.
11. Martinez, R., Estrada, M.P., Berlanga, J. and *et al*. 1996. Growth enhancement in transgenic tilapia by ectopic expression of tilapia growth hormone. Mol. Mar. Biol. Biotechnol. 5: 62-70.
12. Pitkanen, T.I., Krasnov, A., Teerijoki, H. and Moelsae, H. 1999. Transfer of growth hormone (GH) transgenes into Arctic charr (*Salvelinus alpinus L.*) I. Growth response to various GH constructs. Genet. Anal. Biomol. Eng. 15: 91-98.
13. Devlin, R.H., Yesaki, T.Y., Donaldson, E.M. and *et al*. 1995. Production of germline transgenic Pacific salmonids with dramatically increased growth performance. Canadian J. of Fisheries and Aquatic. Sci. 52(7): 1376-1384.
14. Dennis, B. 2015. The FDA just approved the nation's first genetically engineered animal: A salmon that grows twice as fast. The Washington Post.
15. Yaskowiak, E.S., Shears, M.A., Agarwal-Mawal, A. and Fletcher, G.L. 2006. Characterization and multi-generational stability of the growth hormone transgene (EO-1α) responsible for enhanced growth rates in Atlantic salmon. Transgenic Res. 15: 465-480.
16. Aqua Bounty Technologies, Inc. 2010. Environmental assessment for AquAdvantage salmon.[https://cban.ca/wp-content/uploads/AAS_EA-redacted.pdf].
17. Bodnar, A. 2010. Risk assessment and mitigation of AquAdvantage salmon.[https://www.aquabounty.com/wp-content/uploads/2014/02/Risk_Assessment_Mitigation_of_AAS-Oct2010.pdf].
18. European Patent Office. 2001. Publication number: EP 0 578 653 B1. [https://data.epo.org/publication-server/rest/v1.0/publication-dates/20010718/patents/EP0578653NWB1/document.pdf].
19. Taanman, J.W. 1999. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. Biochim. Biophys. Acta. 1410(2): 103-123.
20. Linacre, A. and Lee, J.C. 2005. Species determination: the role and use of the cytochrome b gene. Methods Mol. Biol. 297: 45-52.
21. Hafsa, A.B., Nabi, N., Zellama, M.S. and *et al*. 2016. A new specific reference gene based on growth hormone gene (GH1) used for detection and relative quantification of AquAdvantage GM salmon (*Salmo salar* L.) in food products. Food Chem. 190: 1040-1045.
22. US Food and Drug Administration. 2011. Single Laboratory Validated Method for DNA-Barcoding for the Species Identification of Fish.[https://www.fda.gov/food/

dna-based-seafood-identification/single-laboratory-validated-method-dna-barcoding-species-identification-fish].

Development of PCR Detection Methods On Genetically Modified Salmon: AquAdvantage

JING-BO CHOU, JUNG KUAN, SZU-TING CHIU, YU-CHIH CHEN, YU-TING WANG, CHE-YANG LIN, PO-YU WANG, SU-HSIANG TSENG AND DER-YUAN WANG

Division of Research and Analysis, TFDA

ABSTRACT

Genetically modified (GM) AquAdvantage salmon was developed by AquaBounty Technologies Biotech in Massachusetts, USA in 1989. The US Food and Drug Administration (US FDA) approved its listing in November 2015, and it became the first GM animal approved for marketing in history. The insertion genes transformed into Atlantic salmon was mainly combined with the ocean pout antifreeze protein 5' promoter region (AFP5'), 3' termination region (AFP3') and the Chinook salmon growth hormone gene (GHc). The resulting AquAdvantage salmon was able to produce growth hormone even in cold climates, and overcome slow growth problem in winter. In this study, the 5' and 3' event-specific PCR methods for AquAdvantage salmon detection were established. The PCR target fragments above were constructed on a plasmid together with the GHc gene fragments and a cytochrome b gene (Cyt-b) fragment from Atlantic salmon to obtain a reference plasmid pAAS-GMF. GM salmon was not approved in Taiwan, it was necessary to develop detection methods and conduct market surveillance. A survey contained 4 salmon samples obtained for Taiwan market was conducted. The PCR test results showed that GM components in all samples were negative. In the future, attention should be continually paid in to GM salmon to implement the management of GM food.

Key words: genetically modified, salmon, AquAdvantage, PCR