食品藥物研究年報. 16：83-91 2025
Ann. Rept. Food Drug Res. 16：83-91 2025

月旦知識庫

日本鰻快速鑑別檢驗方法之建立

關　嶸　鄭蓓淋　張源鑫　崔秀煒　林澤揚　許家銓　林美智　曾素香

衛生福利部食品藥物管理署研究檢驗組

摘　要

日本鰻(*Anguilla japonica*)在臺灣被廣泛養殖，惟養殖所需鰻苗仰賴天然撈捕，近年來野生日本鰻資源數量銳減，導致成鰻銷售價格上漲，而同為鰻鱺屬(*Anguilla* spp.)之鱸鰻(*Anguilla marmorata*)及太平洋雙色鰻鱺(*Anguilla bicolor pacifica*)亦在臺灣被大量養殖，另外除鰻鱺屬鰻魚外亦有繁星糯鰻(*Conger myriaster*)等，皆可用於製作鰻魚料理。不同鰻魚物種經加工後外觀相似難以分辨，鰻魚雖能以生物DNA條碼定序方法進行物種鑑別，但若檢體經高度加工或混加不同物種則不易檢驗，本研究針對日本鰻建立即時聚合酶連鎖反應(real-time PCR)專一性檢驗方法，利用粒線體全基因序列進行比對分析，選定cytochrome b (Cyt b)設計專一性引子及探針，以蒐集之135個魚種DNA進行real-time PCR專一性測試，結果僅目標物種產生專一性陽性增幅反應；經測試最低檢測濃度可達0.001% (1.5 pg DNA)，為確認本方法適用性，以17件市售鰻魚檢體進行測試，有15件檢體結果為日本鰻呈陽性反應，而2件陰性反應檢體分別為美洲鰻鱺(*Anguilla rostrata*)及繁星糯鰻，本方法可應用於日本鰻之快速檢驗，把關國人消費權益。

關鍵詞：日本鰻、物種鑑別、即時聚合酶連鎖反應

前　言

近年因為食安事件之發生，社會大眾開始注重食品相關議題，根據歐洲刑警組織於2023年進行的OPSON計畫，其針對歐洲境內食品造假及食品詐欺進行的調查，海鮮製品被列為主要發生風險項目之一[1,2]。Minderoo Foundation於2023年澳洲(魚販、餐廳、超市)抽驗672個市售水產品，以粒線體CO1基因定序進行檢驗，發現其中69件(11%)水產品標示不實[3,4]，隨著貿易全球化，水產品透過跨國貿易及零售過程到達消費者手上，配送與貿易過程環節愈複雜，也愈增加標示不實的發生機會；市面上販賣的水產品大多先經過工廠加工做成魚片，也有部分將魚肉製成加工品銷售，比如魚排、魚丸、魚鬆等，消費者很難藉由口感、色澤來分辨吃到的魚種[5]。食品攙偽行為明確被法律禁止，食品安全衛生管理法第28條規定食品、食品添加物，其標示、宣傳或廣告，不得有不實、誇張或易生誤解之情形[6]。

鰻魚為亞洲重要的養殖魚種，漁民於河口捕撈幼鰻在魚塭養殖，成鰻大多輸往日本[7]，鰻魚在日本習俗及料理佔有重要角色，每年夏季「土用の丑の日」被日本人暱稱為鰻魚日[8]，當天日本人都有吃鰻魚飯之習俗。廣義的鰻魚(eel)指條鰭魚綱中鰻形目(Anguilliformes)下物

月旦知識庫

種之總稱共有19科147屬約600種生物[9]，當中僅鰻鱺屬(*Anguilla* spp.)物種被大量養殖，最具代表性的為日本鰻(*A. japonica*)。鰻鱺屬物種生活史複雜，和鮭魚的溯河洄游產卵相反，鰻鱺屬物種為降河洄游[10]，日本鰻產卵地位在太平洋馬里亞納群島西方海域[11,12]：孵化後成為柳葉鰻，隨北赤道洋流與黑潮經過六個月漂流過程[13]，當漂流至大陸棚時，鰻魚體型轉變為流線型，被稱作玻璃鰻，鰻魚沿河口上溯到河川中上游定棲，成長為腹部帶黃白色的黃鰻[14]，再經過4~6年成長性成熟稱為銀鰻，待秋末與初冬河川水位大漲時順流下海，降海後銀鰻不再進食，經數月洄游回到馬里亞納海域產卵後結束一生。1990年代臺灣的日本鰻年產量可達到5萬噸以上，曾被譽為「鰻魚王國」，但由於棲地惡化、過度捕撈、河川水質污染、沿海濕地消失、大量興建水壩與攔砂壩，順利長大並成功迴游產卵的鰻魚數量減少，現今的日本鰻資源量已不到當時的5-10%，且每年以平均5%的速度消失[15]。但市場上日本鰻需求仍大，臺灣許多養殖業者陸續引入其他鰻鱺屬種類養殖，包括美洲鰻鱺(*A. rostrata*)、澳洲寬鰭鰻(*A. reinhardtii*)、鱸鰻(又稱花鰻鱺，*A. marmorata*)、太平洋雙色鰻(*A. bicolor pacifica*)、印尼雙色鰻(*A. bicolor bicolor*)、莫三比克鰻(*A. mossambica*)，目前臺灣鰻魚養殖以日本鰻佔大宗[16]，但日本鰻苗捕撈量與價格落差大，在日本鰻捕撈量不足時，太平洋雙色鰻、鱸鰻及美洲鰻鱺有可能取代日本鰻而被大量養殖，但不同鰻鱺屬物種間存在市售價格差異，且外觀型態類似，消費者難以分辨。

本研究蒐集不同市售魚種檢體並萃取DNA，使用美國FDA公布的DNA barcode引子對[17]進行PCR反應，將CO1序列擴增並且定序，將得到的序列與NCBI資料庫上物種進行鑑種比對，對照型態特徵進一步確認，則可用以進行本方法專一性測試。傳統PCR檢測時間較長，本研究針對日本鰻建立real-time PCR鑑別檢驗方法，使用本方法可省去電泳及定序過程，在較短時間得到檢驗結果，較傳統PCR鑑種具更簡便快速達到物種鑑定。此方法兼具操作簡便、快速與高檢測靈敏度，能應用於鰻魚市售產品之檢驗，把關國人消費權益。

材料與方法

一、魚類參考物種

比對物種於臺北魚類批發市場及大賣場等購買，包括日本鰻、繁星糯鰻、鱸鰻、雙色鰻、盲鰻、百吉海鰻、口孵非鯽屬(吳郭魚)、虱目魚等共135個物種，以美國FDA發表之魚類CO1生物條碼引子將CO1序列PCR增幅後定序，並至NCBI資料庫比對序列確認物種。後續蒐集目標魚種粒線體whole genome序列，以BioEdit軟體(v7.2) 多重序列比對(ClustalW Multiple Alignment)，找出日本鰻保守位置區間(conserved region)，且此位置為其他魚種歧異性較大的序列位置，作為設計專一性引子及探針的參考序列。

二、DNA抽取、純化套組

㈠DNeasy® Blood & Tissue Kits (Qiagen, Hilden, Germany)。

㈡DNeasy® mericon Food Kit (Qiagen, Hilden, Germany)。

三、儀器設備

㈠PCR反應器 (Applied Biosystems ProFlex PCR System, Applied Biosystems, USA)。

㈡即時PCR反應器 (Applied Biosystems QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System, Applied Biosystems, USA)。

㈢微量定量用分光光度計 (NP80 Nanophotometer, Implen, Germany)。

㈣研磨機 (Retsch MM400, Retsch, Germany)。

月旦知識庫

㈤高速微量低溫離心機 (KUBOTA 3740, KUBOTA Corporation, Japan)。
㈥迷你型膠體電泳設備 (Mupid-2, Advance, Japan)。
㈦膠體電泳影像系統 (GelDoc Go Gel Imaging System, Bio-Rad, USA)。

四、專一性測試用之魚種

總共有135個魚種DNA用以進行本方法之測試。

㈠鰻鱺屬：日本鰻(*A. japonica*)、鱸鰻(又稱花鰻鱺，*A. marmorata*)、太平洋雙色鰻鱺(*A. bicolor pacifica*)、美洲鰻鱺(*A. rostrata*)。
㈡鰻形目非鰻鱺屬物種：繁星糯鰻(*Conger myriaster*)、百吉海鰻(*Muraenesox bagio*)、黃蛇鰻(*Ophichthus zophochir*)。
㈢其他市售魚種：鯉(*Cyprinus carpio carpio*)、黑皮旗魚(*Makaira nigricans*)、虱目魚(*Chanos chanos*)、香魚(*Plecoglossus altivelis*)、四指馬 (*Eleutheronema tetradactylum*)、黃魚(*Larimichthys crocea*)、大西洋鮭(*Salmo salar*)、狗母魚(*Saurida undosquamis*)、花腹鯖(*Scomber australasicus*)等128個常見魚種。

五、PCR引子、探針及反應試劑

本研究根據NCBI資料庫DNA序列資料，以BioEdit軟體(v7.2)進行比對及設計即時PCR物種特異性引子及TaqMan探針，如表一，並委託Bioneer (Daejeon, South Korea)合成。探針5’端採用6-carboxy-fluorescein (6-FAM)標記，3’端採用6-carboxytetramethyl-rhodamine(6-TAMRA)標記。即時PCR反應試劑套組為TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA)。

六、即時PCR溶液之配製與反應條件

以無菌純水適當稀釋檢體DNA原液、引子及探針備用，即時PCR反應溶液25 µL，包含5 µM Forward引子1.25 µL、5 µM Reverse引子1.25 µL、3.3 µM TaqMan探針1.7 µL、TaqMan Universal PCR Master Mix 12.5 µL、無菌去離子水3.3 µL及檢體DNA溶液5 µL。即時PCR反應條件為50°C反應2分鐘(熱活化)、95°C反應10分鐘(最初變性)、45個增幅反應循

表一、本研究使用之引子與探針

名稱	序列 (5’-3’)	標的基因(粒線體)	產物大小	參考文獻
魚類共通引子			695 bp	17
CO1-L	CACGACGTTGTAAAACGACTCAACYAATCAYAAAGATATYGGCAC	Cytochrome c oxidase subunit 1 (CO1)		
CO1-H	GGATAACAATTTCACACAGGACTTCYGGGTGRCCRAARAATCA			
日本鰻引子			125 bp	本研究
japonica-14544-F	CTATGCCTTATTTCGCAAATCCTT	Cytochrome b		
japonica-14717-R	TAGGTAGAGGCAGATAAAGAAGAAG	(Cytb)		
日本鰻探針				
japonica-14673-P	FAM-AATTTCGGATGAATCATCCATAATTAACGTCTCGGCAG-TAMRA			

月旦知識庫

環(變性95°C 15秒、黏接及延展60°C 1分鐘)。

七、用於最低檢測濃度測試之DNA溶液配製

將蒐集之日本鰻魚肉經冷凍乾燥後磨成粉末，以DNeasy mericon

Food Kit抽取魚肉組織DNA，經過微量定量分光光度計測量DNA濃度為30 ng/µL，續以去離子水10倍序列稀釋分別配製成10%、1%、0.1%、0.01%及0.001%之DNA濃度，用於測試本方法的最低檢測濃度。

八、市售鰻魚產品檢測

本研究至賣場、網路通路、超市、便利商店及壽司專賣店採樣鰻魚檢體共17件(表二)，包括蒲燒鰻、生鮮鰻魚切片等，用於測試本方法之適用性。

結果與討論

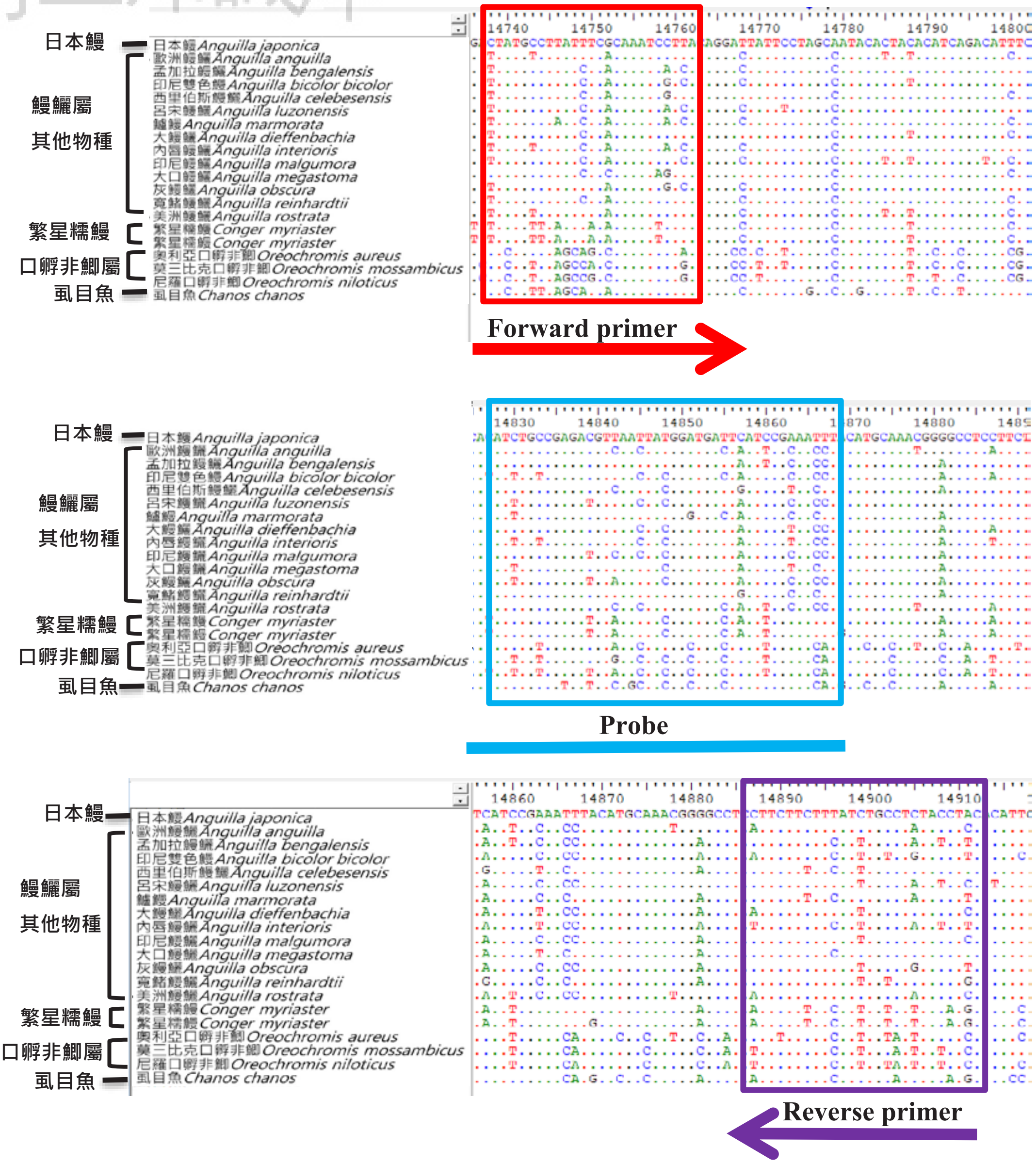
一、日本鰻之方法測試

本研究選定日本鰻粒線體cytochrome b (Cyt b)基因位置設計專一性引子及探針，Cyt b基因約1,100 bp，使用NCBI資料庫下載目標物種之粒線體全基因序列，進行多重序列比對(ClustalW Multiple Alignment)，設計專一性引子對，及兩端引子所夾之中央區域特異位置設計專一性探針(表一、圖一)，其PCR產物大小為125 bp，以此引子及探針進行自行蒐集135個常見市售魚種之real-time PCR反應，結果顯示僅日本鰻產生螢光增幅曲線 (圖二)，日本鰻以外之魚種皆無陽性增幅反應，無偽陽性之產生，確認本方法之引子及探針具有專一性。

表二、市售鰻魚產品測試結果

編號	品名	來源	成分標示	日本鰻鑑別	定序結果
1	日式白燒鰻	網路通路	鰻魚	陽性	日本鰻
2	日式蒲燒鰻	網路通路	鰻魚	陽性	日本鰻
3	鰻遊蒲燒鰻	網路通路	白鰻	陽性	日本鰻
4	蒲燒鰻魚	網路通路	鰻魚	陰性	美洲鰻鱺
5	鰻魚玉子燒	超市	白鰻	陽性	日本鰻
6	鰻魚壽司	超市	鰻魚	陽性	日本鰻
7	鰻魚米堡	網路通路	鰻魚	陽性	日本鰻
8	鰻魚丼	超市	鰻魚	陽性	日本鰻
9	真空蒲燒大鰻魚	超市	日本鰻	陽性	日本鰻
10	御選蒲燒鰻	便利商店	鰻魚	陽性	日本鰻
11	日本鰻魚片	網路通路	白鰻	陽性	日本鰻
12	生鰻魚片	網路通路	白鰻	陽性	日本鰻
13	切片蒲燒鰻	網路通路	鰻魚	陽性	日本鰻
14	臻品一口吃鰻魚	網路通路	鰻魚	陽性	日本鰻
15	蒲燒鰻魚片蓋飯	壽司專賣店	鰻魚	陰性	繁星糯鰻
16	特上厚切鰻魚壽司	壽司專賣店	鰻魚	陽性	日本鰻
17	極上鰻魚	壽司專賣店	鰻魚	陽性	日本鰻

月旦知識庫

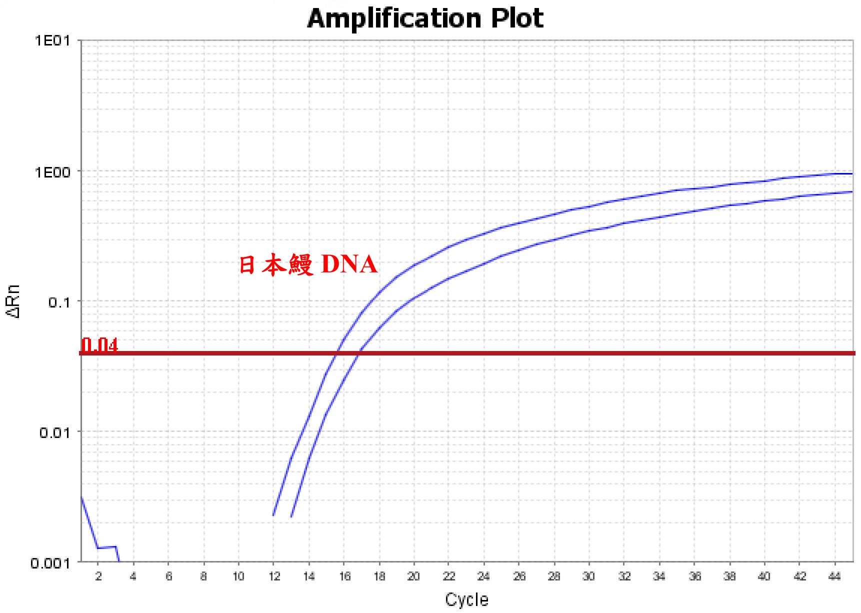


圖一、日本鰻專一性引子及探針序列比對位置(粒線體Cyt b基因序列)

二、即時PCR引子及探針之檢測濃度測試

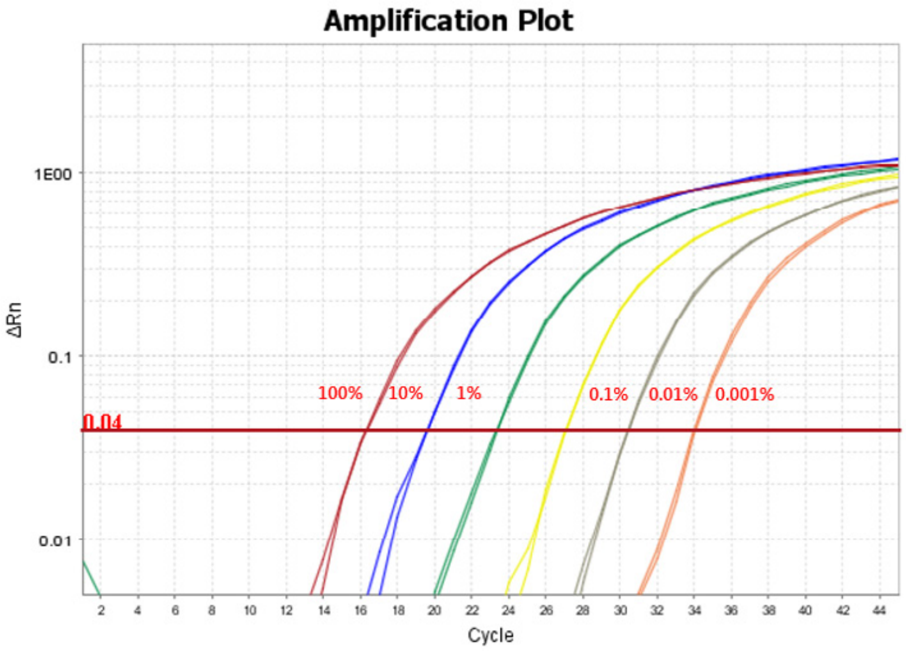
以本研究開發之日本鰻引子及探針進行real-time PCR試驗，結果顯示稀釋至0.001%仍能有良好的螢光增幅曲線反應(圖三)，其最低檢測濃度約1.5 pg/μL。部分市售檢體經過高溫烹煮等加工過程導致DNA斷裂，這類高度加工及DNA含量較低之檢體，目前測試結果皆可應用此方法進行檢驗。使用本real-time PCR方法可精簡反應時間，能在較短時間得到檢驗

月旦知識庫



圖二、日本鰻引子及探針之real-time PCR專一性測試

註：測試物種為本研究所蒐集之135個魚物種，正反應對照組為日本鰻，其餘魚種皆未產生螢光曲線。



圖三、日本鰻專一性引子及探針之最低檢測濃度

月旦知識庫

結果，較使用傳統PCR鑑種過程(PCR反應、膠體電泳、定序、比對)節省約3天時間，更簡便快速達到物種鑑定。

三、方法適用性測試

為驗證開發方法之適用性，本研究至各賣場及網路通路價購鰻魚檢體，包括蒲燒鰻與生鮮鰻魚切片等，總共17件，以本研究開發之real-time PCR方法進行檢驗，其中15件檢體為日本鰻陽性反應(表二)，將檢體以魚類CO1生物條碼引子定序比對確認15件陽性檢體皆為日本鰻；2件日本鰻陰性反應檢體經定序比對後分別為美洲鰻鱺(同為鰻鱺屬但並非日本鰻)，及繁星糯鰻(非鰻鱺屬)，上述測試皆未產生偽陽性。

四、本方法之應用

臺灣市面上用於食用之鰻魚物種外觀特徵相近，常見的包括日本鰻、鱸鰻、雙色鰻、繁星糯鰻，因切片或加工過程使得消費者難以憑外觀進行分辨，不同物種價差大，存在讓不法商家混充賺取暴利的機會。本研究開發可鑑別日本鰻之即時PCR方法，能應用在魚片及魚排等加工食品進行檢測，快速的鑑別魚種成分，保障國人消費權益。

參考文獻

1. EUR 30 million worth of seizures in first OPSON Europe. 2023. EUROPOL. [https://www.europol.europa.eu/media-press/newsroom/news/eur-30-million-worth-of-seizures-in-first-opson-europe]
2. €30 Million Worth of Illicit Food Products Seized in EU, Many Relabeled Expired Goods. 2023. FOOD SAFETY Magazine.
3. Cundy, M.E., Santana-Garcon, J., McLennan, A.G. Ayad, M.E. *et al*. 2023. Seafood label quality and mislabelling rates hamper consumer choices for sustainability in Australia. Sci. Rep. 13: 10146.
4. DNA testing shows seafood mislabelling rife around Australia, prompting calls for stricter regulations. 2023. EmmaWynne. [https://www.abc.net.au/news/2023-08-04/fishy-labelling-confuses- consumers-mind-eroo-study/102689544]
5. Fish fraud: What’s on the menu often isn’t what’s on your plate. 2019. Jen Christensen. CNN Health. [https://edition.cnn.com/2019/03/07/health/fish-mislabeling-investigation-oceana/index.html]
6. 「標示不實」還是「攙偽假冒」的隱形界線在哪？2016。石滬天食力foodnext。[https://www.foodnext.net/news/newstrack/paper/4470321983]
7. Eel Remains High-Priced Luxury in Japan Despite Some Recovery in Supply. 2023. Nippon.com. [https://www.nippon.com/en/japan-data/h01725/]
8. 暑い夏を乗り切る　土用の丑の日の伝統食「うなぎ」。2022。The power of Shun。[https://shun-gate.com/power/power_99/]
9. Ho, H.C., Macosker, J.E., Smith D.G. and Shao, K.T. 2015. Introduction to the systematics and biodiversity of eels (orders Anguilliformes and Saccopharyngiformes) of Taiwan. Zootaxa. 4060 (1): 005-018.
10. 林芷晴。2023。臺灣地區日本鰻 (*Anguilla japonica*) 鰻苗捕撈管理政策之研究。國立臺灣大學漁業科學研究所碩士學位論文。
11. Katsumi Tsukamoto. 1992. Discovery of the spawning area for Japanese eel. Nature. 356: 789-791.

月旦知識庫

12. 韓玉山。2013。白金傳奇-鰻魚產卵場大搜查。蘭博電子報，第96期。
13. Hakoyama, H., Faulks, L., Rousseau, Y., Kodama, S. *et al.* 2023. Japanese Eel, *Anguilla japonica*. Fisheries Agency of Japan & Japan Fisheries Research and Education Agency.
14. Hsu, H.Y., Wu, K.J. and Han, Y.S. 2023. Detecting Japanese Eels (*Anguilla japonica*) and Revealing Their Distribution in Taiwanese Rivers by Environmental DNA Analysis. Fishes. 8: 483.
15. 鄭禧、莊焌楷、林書煒。2023。鰻苗去哪了？「鰻魚王國」資源保衛戰。世新大學小世界。[http://shuj.shu.edu.tw/blog/2023/12/18/鰻苗去哪了？-「鰻魚王國」資源保衛戰/]
16. 薛皖之。2012。臺灣日本鰻與鱸鰻養殖之成本效益分析。國立臺灣大學漁業科學研究所碩士學位論文。
17. Cawthorn, D.M., Steinman, H.A. and Witthuhn, R.C. 2012. DNA barcoding reveals a high incidence of fish species misrepresentation and substitution on the South African market. Food Res. Int. 46(1): 30-40.

月旦知識庫

Rapid Identification of Japanese Eel (Anguilla japonica) in Food Using Real-time PCR

JUNG KUAN, PEI-LIN CHENG, YUAN-XIN CHANG, HSIU-WEI TSUEI, CHE-YANG LIN, CHA-CHUAN HSU, MEI-CHIH LIN AND SU-HSIANG TSENG

Division of Research and Analysis, TFDA, MOHW

ABSTRACT

Japanese eel (*Anguilla japonica*) is widely cultured in Taiwan, while the supply of eel fry relies on capture from the wild. In recent years, the population of Japanese eel has declined, and it caused the increase in the price of mature eel. Other *Anguilla* ssp. species such as marbled eel (*Anguilla marmorata*) and Indian shortfin eel (*Anguilla bicolor*), also have potential for extensive aquaculture in Taiwan. While Conger eel (*Conger myriaster*) is also used to make eel dishes. Processing results in increased difficulties of species identification and may lead to mislabeling and substitutions of species. DNA barcoding technique has been used for eel species identification. However, it becomes challenging when samples are highly processed or contain mixed species. This study developed a Japanese eel specific real-time PCR method. The primers and probes were designed specifically to the gene encoding cytochrome b (Cyt b). Specificity was tested and confirmed by using 135 fish species commonly found in the markets of Taiwan. Only the target species showed positive amplification signal. The detection limit was as low as 0.001% at 1.5 pg of DNA. We collected 17 commercial eel samples and tested accordingly. 15 samples tested positive for Japanese eel, and two negative samples were confirmed as American eel (*Anguilla rostrata*) and Conger eel (*Conger myriaster*). This method provided a rapid, sensitive and reliable detection tool for the identification of Japanese eel products, allowing the detection of fraudulent and unintentional mislabeling of these species.

Key words: Japanese eel, species identification, real-time PCR