


貳、材料與方法

(一) 樣本的採集與來源

日本絨螯蟹喜歡棲息在乾淨的河川中，並於年末時開始降海產卵，為捕捉樣本的最佳時機。但近年由於工業以及人類活動對於環境的破壞，有些河川中的日本絨螯蟹數量已經相當的稀少，非常難捕獲。因此盡可能的於台灣現存尚有日本絨螯蟹的棲地進行捕捉採集的工作。另一方面亦由國立海洋大學與南投特有生物中心獲得標本。

(二) 野外採集方法



於台灣西部地區至東北地區選定幾個主要流域進行日本絨螯蟹（*E. japonica*）的採集。每個樣站視流域情況放置蝦籠誘捕。一般放置五個蝦籠，蝦籠口朝下游。每個蝦籠的大小均相同，皆為口徑 16 公分，長約 37 公分的筒形構造。蝦籠內放置俗稱為炸彈魚的鯉魚或是秋刀魚為餌料。蝦籠的放置需經過一個夜晚，才較易抓到絨螯蟹，一般是第一天傍晚放置好蝦籠，於次日上午回收蝦籠，蝦籠放置時間約 14~18 小時。

(三) 標本的處理

野外採集到的日本絨螯蟹標本，先將其置於冰箱中，直至絨螯蟹的活動力下降後，再將標本轉浸泡至 75% 的酒精中保存。如此作法，可以避免絨螯蟹因直接浸泡酒精受到外界環境太大的緊迫造成螯足自割的現

象。浸漬於 75%酒精的過程中，絨螯蟹會釋出體內的一些色素物質，必須定期更換酒精，以確保標本保存的完善。

(四) 分子生物技術的實驗步驟

(A) 粗 DNA 萃取

利用 BioKit 公司所製的組織及細胞 DNA 純化套件萃取 DNA，其萃取步驟如下：

- (1) 用燒紅之解剖剪刀剪取蟹足肌肉約 100mg，置入 1.5ml 的離心管中。
- (2) 將所取得之肌肉組織用真空抽氣乾燥 1 分鐘。
- (3) 加入 200 μ l 之 Lysis buffer，並用剪刀將肌肉組織剪碎。
- (4) 加入 15 μ l 的 Proteinase K，並上下輕晃使溶液混合均勻。
- (5) 將離心管放入 56°C 的恆溫水槽 2~3hr，直至組織完全分解。
- (6) 加入 200 μ l 的 DNA Binding solution，並上下輕晃使溶液混合均勻，此時溶液轉為透明。
- (7) 將離心管放入 70°C 恆溫水槽 15 分鐘。
- (8) 加入 200 μ l 之 100%酒精，上下輕晃使溶液混合均勻後，於 13,000 rpm 離心 2 分鐘。
- (9) 抽取經離心分層後的上清液至 Spin column 內，並連同 Collection tube 以 13,000g 離心 2 分鐘後，倒掉 Collection tube 中的濾液。
- (10) 再加入 600 μ l 的 Wash buffer 清洗位於 Spin column 內濾芯上的 DNA 兩次，兩次的清洗皆以 13,000g 離心 2 分鐘，並倒掉 Collection tube 中的濾液。
- (11) 洗滌 DNA 兩次後，倒掉 Collection tube 中的濾液，再以 13,000g

離心 4 分鐘。

(12) 將 Collection tube 丟棄，並將 Spin column 放於一新的 1.5ml 離心管中。

(13) 將 Spin column 和新的 1.5ml 離心管一起放於 56°C 加熱器上，並將 Spin column 蓋子打開，放置 5 分鐘，使殘留於 Spin column 濾芯的酒精揮發。

(14) 加入事先加溫的 Elution solution(60~70°C)100 μ l，並靜置 2 分鐘，使 Elution solution 有足夠的時間與 Spin column 濾芯中的 DNA 進行反應。

(15) 以 13,000g 之離心速度將附有 Spin column 的 1.5ml 離心管離心 3 分鐘。

(16) 將所得的 DNA Solution 置於-20°C 冰箱中保存。

(B) PCR 聚合酶連鎖反應

粗萃取的 DNA 以 PCR 對於 Mitochondrial DNA cytochrome oxidase subunit I (COI) 片段增幅，以供定序使用。

(1) 所使用的 Primer 如下 (Lee *et al.*, 2004)：

Primer LCO1490：5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3'

Primer HCO2198：5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3'

Primer COIf-R：5'-CGT CGT GGT ATG CCD TTT ARW CCT A-3'

主要擬增幅 COI 片段中 LCO 與 HCO 兩 Primer 所夾出的片段。此片段長約為 709 bp。

(2) PCR 的反應條件如下：

(a) 在總體積 50 μ L 的反應溶液中加入以下組成：0.5 μ L DNA 萃取液、5 μ M Primer 各 1 μ L、10 μ L PCR Master Mix，並加入 37.5 μ L

dd-Water 至總體積為 50 μ L。

(b) 在 PCR 儀中進行 PCR 反應，反應步驟如下：

(i) 先在 94°C 下 3 分鐘使雙股 DNA 完全分開。

(ii) 接下來進行 35 次增幅循環，每個循環為：94°C/40 秒 (Denature)、50°C/40 秒使 DNA 與引子黏合 (Annealing)、72°C/60 秒進行 DNA 複製延伸 (Extension) 反應。

(iii) 最後以 72°C 延伸反應作用 10 分鐘，使延伸反應完全，得最終 PCR 產物。

(C) 電泳染色

取 5 μ L 的 PCR 產物與 1 μ L 的 DNA 染劑混合，並以 Gen-100 DNA ladder 做為分子量標記，在 2%瓊脂膠以 110V 電壓電泳 20 分鐘，之後以溴化乙啶(EtBr)染色 20 分鐘、再以蒸餾水退染 10 分鐘，之後在紫外線下觀察照相。成功增幅的 PCR 產物，在其分子量(約 700bp)對照的長度上，會有一明顯的亮帶。

(D) DNA 定序

(1) DNA 的純化

(a) 將經由 PCR 增幅所得的產物 160 μ L 轉移至一新 1.5ml 的離心管中。

(b) 加入和 PCR 增幅產物等量的 Binding buffer 160 μ L，並將溶液混合均勻。

(c) 將 1.5ml 離心管中的溶液移至 Spin column 中，並與 Collection tube 以 13,000g 離心 2 分鐘，倒棄 Collection tube 中的液體。

(d) 加入 600 μ L 的 Washing buffer，以 13,000g 離心 1 分鐘，倒棄 Collection tube 中的液體，並重複此步驟兩次。

- (e) 續上步驟，再將 Spin column 和 Collection tube 以 13,000g 離心五分鐘後，將 Collection tube 丟棄，並將上部的 Spin column 至於一新的 1.5ml 離心管中。
- (f) 將 Spin column 與 1.5ml 離心管於 56°C 開蓋恆溫五分鐘，使 Spin column 中的酒精揮發完全。
- (g) 加入 56°C 的 Elution solution 30 μ L，並於 56°C 恆溫 2 分鐘，再以 13,000g 離心五分鐘。
- (h) 將離心後所得的 DNA 溶液置於-20°C 中保存

(2) DNA 的定序反應

- (a) 在總體積 10 μ L 的反應溶液中加入以下組成：20ng 純化後的 DNA、3pmol Primer 1 μ L、1 μ L Big Dye，加入滅菌水至總體積為 10 μ L。
- (b)PCR 反應步驟：
 - (i) 先在 96°C 下 4 分鐘使雙股 DNA 完全分開。
 - (ii) 接下來進行 28 次增幅循環，每個循環為：96°C/15 秒 (Denature)、50°C/15 秒使 DNA 與引子黏合 (Annealing)、60°C/4 分進行 DNA 複製延伸 (Extension) 反應。
 - (iii) 反應後所得產物於-20°C 之環境下保存，保存期限為一天。

(3) 酒精沉澱

- (a) 先將 DNA 定序反應後的產物 10 μ L 移至 0.6ml 的離心管中。
- (b) 於 0.6ml 的離心管中加入 25 μ L 99%的酒精和 1 μ L 3M pH5.6 的 NaOAc。
- (c) 將上述溶液混合均勻後於無光環境下靜置 15 分鐘。
- (d) 將溶液以 13,000g 離心 20 分鐘，離心後移去上清液。

- (e) 在加入 250 μ L 75%的酒精。
 - (f) 再於 13,000g 離心 5 分鐘，並在次移去上清液。
 - (g) 將移去上清液的 0.6ml 離心管於真空的環境下抽氣乾燥 10 分鐘。
 - (h) 將乾燥後的樣本送件定序。
- (4) 將經酒精沉澱乾燥後之 DNA 送件定序分析
- (5) DNA 定序所使用的儀器為 ABI-PRISM 3100-*Avant* Genetic Analyzer

(五) 資料分析

(A) 親緣關係之重建

經由定序後分析所得的 COI 序列先以 DNAStar4.0 中的 SeqMan 將定序後的結果整理出來，再將整理好的序列以 Clustal X 1.81 開啟檔案，將序列做 Alignment，並將檔案另存為可被 MEGA 3.1 讀取的格式。以 MEGA 3.1 軟體 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 3.1) (Kumar *et al.*, 2001) 中 Distances 下的 Compute pairwise 計算出兩兩序列間的遺傳距離。以 Kimura (1980) 所建立的雙參數模式 (Two - parameter model) 之方法計算鹼基替代率及遺傳距離，完成日本絨螯蟹 (*E. japonica*) 的 Neighbor - joining 分析 (Saitou and Nei, 1987) 。於 Neighbor - joining (NJ) Tree 中每個 Group 之可信度利用不加權、並 2000 次重複 Bootstrapping 取樣 (Felsenstein, 1985) 分析檢測； Bootstrap 值大於 0.7 則相當於統計學上 95 % 信賴度 (Hillis and Bull, 1993) 。

Neighbor – joining (NJ) Tree 之建構，始於一星狀樹 (Star tree)，並假設其沒有任何群聚的分類單元，若是對於星狀樹各分支的距離 (Branch length) 做一加總的估算，其值為 S_0 會比經由運算後所求得最終的 NJ Tree 各分支距離做加總的估算值 S_F 來得大。而 NJ Tree 之理論基礎就是將各種可能的樹狀圖分枝距離進行加總的估算，並求得最小加總值的樹狀圖 (Nei and Kumar, 2000)。

Minimum Spanning Network 關係圖 (Excoffier *et al.*, 1992; Excoffier, 1993) 的建構，以 NJ Tree 為藍圖，並藉由 MEGA 3.1 軟體先估計所有樣本的 Pairwise 值後再將此數值利用 MINSNET (Excoffier *et al.*, 1994) 軟體運算各 Haplotype 間的相互關係，藉以追溯各不同基因型間的親源關係與演化歷史 (洪，2002)。

(B) 族群內 COI 序列的變異與多態性估算

估算族群內的遺傳組成多型性分別使用了兩種指數：(1) 單倍基因型多樣性指數 (Haplotype diversity)，(2) 核苷酸多樣性指數 (Nucleotide diversity)。單倍基因型多樣性指數是用於估計由任意選取族群內兩相異樣本，其單倍基因型發生不同的機率，僅考量族群內各基因型所佔的頻度；於此，基因型多樣性指數以 h 表示 (Nei, 1987)。基因型多樣性之運算式如下：

$$h = n (1 - \sum_{i=1}^k P_i^2) / (n - 1)$$

又 n 表示樣本數， P_i 表示第 i 型的頻率， k 是基因型的個數 (黃，2003)。

核苷酸多樣性指數，除了考量族群內各基因型所佔的頻度外，進一

步考量了核苷酸組成的差異。核苷酸多樣性指數則代表了隨機選取的兩條序列中，平均每個位點核苷酸不同的比例，由於運算的方式不同，核苷酸變異指數有兩個數值 π (Nei and Tajima, 1983) 與 θ (Jukes and Cantor, 1969)。核苷酸多樣性指數 π 之運算式如下：

$$\pi = n (\sum_{ij} P_i P_j d_{ij}) / (n - 1)$$

又 n 表示序列數， P_i 表示第 i 個序列的頻率， P_j 表示第 j 個序列的頻率， d_{ij} 則表示第 i 個 DNA 序列到第 j 個 DNA 序列的差異 (黃，2003)。

在這篇研究中單倍基因型多樣性指數, h 和核苷酸多樣性指數, π 與 θ 均是以 DnaSP version 4.0 進行分析而得。

(C) 中性檢定



經由 DnaSP version 4.0 演算核苷酸多樣性指數 π 與 θ 後可以進一步估算核苷酸多型性期望值 $\theta(s)$ 和 $\theta(\pi)$ ，而 $\theta(s)$ 和 $\theta(\pi)$ 將可用於進一步檢測中性突變的假設，如中性檢定 (Neutrality test) 中的 Tajima's D test (Tajima, 1989) 與 Fu and Li's D test (Fu and Li, 1993)。

Tajima's D test 是根據 Tajima (1989) 所提出的中性檢定，用於檢定在族群內 DNA 的狀態下其遺傳的變異與 DNA 之多型性之關係。其關係式如下：

$$D = [\pi - (K / a_n)] / \sqrt{ \text{Var} [\pi - (K / a_n)] }$$

其中 π 為族群間兩兩序列之核酸變異的平均值， a 為 DNA 變異的總數， n 為一族群內序列的總數， $K / a_n = \theta = 4Nu$ ， N 表示有

效的族群大小， u 表示每條 DNA 在每個世代中突變的機率。經由運算後，比較 D 值與 0。 D 值若為正，表示族群面臨 possible balancing selection 或是族群正在分化 (population subdivision)；若為負則是則表示最近遭受 directional selection。經演算後得到的 $P < 0.05$ 表示有顯著差異，並顯示族群間有擴散的現象，若是 $0.1 > P > 0.05$ 雖然沒有顯著的差異，但族群間仍存在有較弱的擴散現象 (許，2005)。

Fu and Li's D test 是另外一種演算的方式，根據 Fu and Li (1993) 所提出，依據族譜中變異的分布進行假設檢定的依據，及較老的變異會發生在族譜中較內的分支 (Internal branches)，而較新的變異則會在族譜較外的分枝 (External branches) 被發現，利用比較內分枝與外分枝的變異總數所做的檢定。其關係式如下：

$$D = (\eta - a_n \eta_e) / \sqrt{(u_D \eta + v_D \eta^2)}$$

η 表示所有樣本序列突變的總合， η_e 表示外分枝樣本序列突變的總合， u_D 與 v_D 於 Fu and Li (1993, Table 1) 之表中可以查知。Fu and Li's D test 亦是一種將計算所得的數值與零相比較的中性檢定，其分析的方式如同 Tajima's D test，因此利用 Fu and Li's D test 運算也可得知族群是否有擴散的現象 (Schmidt and Pool, 2002)。

(D) 族群間核苷酸差異與淨差異估算

利用估算族群間核苷酸的差異程度，可以進一步的了解族群間的遺傳差異。核苷酸的差異的估算以 D_A 與 D_{xy} 為主，其中 D_A 為核苷酸淨歧異度，其值表示族群間每個位點核苷酸被取代的淨平均數，

而 D_{xy} 為核苷酸歧異度，表示在族群間每的位點核酸被取代的平均數。根據 Nei 與 Miller (1990) 提出 D_A 與 D_{xy} 有以下的關係式：

$$D_A = D_{xy} - (D_x + D_y) / 2$$

其中 D_x 與 D_y 分別表示在 x 與 y 的族群中之 π 值。

(E) 族群遺傳分化程度之估算

F_{st} 為族群間遺傳分化數值，可利用 DnaSP version 4.0 (Rozas and Rozas, 1999) 可進行分析。日本絨螯蟹的遺傳變異，究竟如何分布在族群內以及族群間，是一個遺傳結構上的問題。族群間若無顯著的遺傳上的差異，則屬於無分化的結構，反之則為有分化的結構。 F_{st} 運算的關係式如下：

$$F_{st} = 1 - H_w / H_b$$

其中 H_w 表示於相同的族群中，序列之間變異的平均值； H_b 為在兩不同的族群間，序列之間變異的平均值 (Hudson *et al*, 1992)。根據 Wright (1978) 的意見，遺傳分化指數 F_{st} 其值若在 0 ~ 0.05 間表族群間幾乎無分化，值為 0.05 ~ 0.15 間為中度分化，若值為 0.15 ~ 0.25 間則屬於高度分化。

基因流傳 (Gene flow) 亦是影響遺傳結構的一個因子，基因流傳愈順暢，則遺傳分化的程度將愈低。根據 Wright (1951) 之島與模型 (Island model) 中指出基因流傳值 (Nm) 與 F_{st} 值有以下的關係式：

$$F_{st} \approx 1 / (1 + 2Nm)$$

式中 N 表示某區域族群的大小， m 代表某一代中移入對偶基因的平均比率 (Average migration rate) (林, 1998)。經由 Hudson (1992) 再次修正，使 Nm 值的演算適用於 DNA 的序列，並將 (Nm) 與 F_{st}

值之關係式修正如下：

$$Nm = H_w / 2 (H_b - H_w)$$

H_w 表示於相同的族群中，序列之間變異的平均值； H_b 為在兩不同的族群間，序列之間變異的平均值。Wright (1931) 認為族群間的基因流傳指數 Nm 值若大於1，則能發揮其使遺傳構造均質化的功能，亦即使主要族群免於發生地區性的次要族群分化；反之，若 Nm 值小於1，則表示基因流傳受到部份阻礙，次要族群間隨即蘊藏了遺傳分化的潛能。

除了 F_{st} 之運算， N_{st} 也是用於運算族群間遺傳分化。根據 Lynch 與 Crease (1990) 建議，利用有限的樣本數去推算不同族群的變異可以使用此一數值。 N_{st} 值用於比較不同族群內基因的平均遺傳距離與相同族群內基因之平均遺傳距離的關係。其關係式如下：

$$N_{st} = V_b / (V_w + V_b)$$

其中 V_w 表示族群內變異， V_b 表示族群間的變異。估算 N_{st} ，其值會介於 0 至 1 之間，若值為 0，則表示族群沒有分化現象；值為 1，則表示族群間完全的分化 (Lynch and Crease, 1990)。 N_{st} 與 Nm 之間亦有正比的關係存在，利用 N_{st} 亦可估算 Nm 值。

於此論文中利用 N_{st} 與 F_{st} 分析遺傳分化的數值，利用此二數值可運算出 2 個不同的 Nm 值。為了避免混淆，將 N_{st} 所運算出的 Nm 值以 $Nm(N_{st})$ 表示， F_{st} 所運算出的 Nm 值以 $Nm(F_{st})$ 表示。

(F) 族群間與地理區間遺傳變異程度估算

族群間與地理區間遺傳變異程度則利用 Arlequin Ver. 2000 (Excoffier *et al.*, 1992) 套裝軟體以分子變異分析 (AMOVA) 方式分析。檢定其族群結構中的遺傳變異是發生在各地理區之間還是地理區內的族群間或是族群內。

(G) 分子鐘與族群間遷移率的估算

利用 IM 的套裝軟件可以進行兩族群的遷移率與分隔時間點的估算，其理論基礎是根據 Hey 與 Nielsen (2004) 所提出的。兩族群間兩兩的遷移率是根據定序出來的 DNA 序列，先估算族群內的有效族群量，而後根據兩兩族群的有效族群比較差異後，再由兩族群之間的基因交流程度進行兩族群遷移率的估算。而分子鐘理念的前提是，DNA 序列每 Base pair 每百萬年的變異速度是一定的，經由族群的有效族群量的估算後，再輸入文獻中所提供的 DNA 變異速率，進行估算 Coalescent 的分隔時間點。