

食品中動物性成分檢驗方法—定性篩選檢驗
Method of Test for Animal-Derived Ingredients in Foods—
Qualitative Screening Test

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於食品中動物性成分之定性篩選檢驗。
2. 檢驗方法：檢體經 DNA 萃取後，以即時聚合酶鏈反應 (real-time polymerase chain reaction, real-time PCR) 之方法。
 - 2.1. 工作環境：工作平台需寬敞、潔淨、光線良好。檢體前處理、檢體 DNA 抽取、real-time PCR 試劑配製及檢驗過程皆需有區隔空間，避免交叉污染。Real-time PCR 試劑之配製應於無菌操作台內進行。
 - 2.2. 裝置^(註1)
 - 2.2.1. 即時聚合酶鏈反應器：ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System 或 Roche LightCycler，或同級品。
 - 2.2.2. 冷凍乾燥裝置：溫度可達 -40°C 以下，真空度可達 133 mBar 以下，供檢體乾燥用。
 - 2.2.3. 振盪型粉碎機：Retsch MM200，或同級品。
 - 2.2.4. 真空乾燥裝置：供 DNA 乾燥用。
 - 2.2.5. 高壓滅菌釜。
 - 2.2.6. 無菌操作台。
 - 2.2.7. 加熱振盪器：具 55°C 溫控及振盪功能。
 - 2.2.8. 微量冷凍離心機(Micro refrigerated centrifuge)：可達 $20000 \times g$ ，並具 4°C 溫控功能。
 - 2.2.9. 離心機：供各式微量離心管離心用。
 - 2.2.10. 分光光度計：具波長 260 nm、280 nm。
 - 2.2.11. 冷凍設備：具冷藏及凍結功能。
 - 2.2.12. 旋渦混合器(Vortex mixer)。
 - 2.2.13. 酸鹼度測定儀(pH meter)。
 - 2.2.14. 水浴裝置：溫差 $\pm 1^{\circ}\text{C}$ 以內者。
 - 2.2.15. 天平：最大稱重量為 2000 g，靈敏度為 0.1 g；最大稱重量為 100 g，靈敏度為 1 mg。

註 1：本方法所使用或提及之產品品牌不代表為同類產品中最好者；反之，未使用或提及之產品品牌亦不代表為同類產品中較差者。

2.3. 試藥

2.3.1. DNA 抽取用試藥：乙醇(96-100%)採分子生物分析級試藥；適用於動物 DNA 抽取之市售套組。

2.3.2. Real-time PCR 用^(註2)

2.3.2.1. 鑑別試驗用引子及探針

2.3.2.1.1. 動物類(標的基因：16S ribosomal RNA)^(註3)

引子 F：SF, 5'-AAGACGAGAAGACCCTRTGGARCTTTA-3'

引子 R：SR, 5'-GATTGCGCTGTTATCCCTAGGGTA-3'

探針 P：SP, 5'-(FAM)-TTYGGTTGGGGTGACCTCGGRGT-(TAMRA)-3'

PCR 增幅產物大小 234-265 bp

2.3.2.1.2. 動物類(哺乳類、家禽類及魚類，標的基因：12S ribosomal RNA)^(註3)

引子 F：12SF, 5'- CAAACTGGGATTAGATACCCCACTA -3'

引子 R：12SR, 5'- ATCGRTTMTAGAACAGGCTCCTCTA
G -3'

探針 P：12SP, 5'-(FAM)-CACCGCCAAGTCCTTTGRGTTT
TARGC -(TAMRA)-3'

PCR 增幅產物大小 154-160 bp

2.3.2.1.3. 哺乳類及家禽類(標的基因：myostatin)

引子 F：MYF, 5'-TTGTGCAAATCCTGAGACTCAT-3'

引子 R：MYR, 5'-ATACCAGTGCCTGGGTTCAT-3'

探針 P：MYP, 5'-(FAM)CCCATGAAAGACGGTACAAGG
TATACTG-(TAMRA)-3'

PCR 增幅產物大小 97 bp

2.3.2.1.4. 魚類(標的基因：16S ribosomal RNA)

引子 F：FSF, 5'-CGCAAGGGAAAGCTGAAAGAGA-3'

引子 R：FSR, 5'-TCGGTAGGTTTGTCACCTCTACTC-3'

探針 P：FSP, 5'-(FAM)-TCCCCTCTTTTGCCACAGAG
ACGG-(TAMRA)-3'

PCR 增幅產物大小 234 bp

註2：1. 合成之引子及探針，拆封後，以無菌去離子水稀釋成適當濃度，分裝後置於-20°C貯存備用，另探針需避光保存。探針 5'端採用 6-carboxy-fluorescein (FAM)標記，3'端採用 6-carboxytetramethyl-

rhodamine (TAMRA)標記。

2. 動物類基因引子及探針之序列中，R 為混合鹼基代碼(A/G)，表示同時含 A 及 G；Y 為混合鹼基代碼(C/T)，表示同時含 C 及 T；M 為混合鹼基代碼(A/C)，表示同時含 A 及 C。

註 3：動物類篩選檢驗可選用 16S ribosomal RNA 或 12S ribosomal RNA 基因之引子及探針，惟食品中含蛋成分之篩選檢驗，建議使用動物類 12S ribosomal RNA 基因之引子及探針。

2.3.2.2. TaqMan Universal PCR Master Mix (適用於 ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System)

本試劑內含 real-time PCR 所需去氧核糖核苷三磷酸、聚合酶等，使用時添加引子、探針及待測檢體 DNA。

2.3.2.3. LightCycler[®] FastStart DNA Master HybProbe (適用於 Roche LightCycler)

本試劑內含 real-time PCR 所需去氧核糖核苷三磷酸、聚合酶等，且內附 25 mM 氯化鎂溶液，使用時添加引子、探針及待測檢體 DNA。

2.3.3. 對照用物質：肉類、血液及其組織器官等皆可，或使用衛生福利部食品藥物管理署提供編號 S202 及 S203 之參考質體作為對照用物質。

2.4. 器具及材料^(註4)

- 2.4.1. 吸管(Pipette)：10 μ L、20 μ L、100 μ L、200 μ L 及 1000 μ L。
- 2.4.2. 吸管尖頭(Pipette tips)：10 μ L、20 μ L、200 μ L 及 1000 μ L。
- 2.4.3. 離心管：200 μ L、600 μ L、1.5 mL 及 2 mL。
- 2.4.4. PCR 反應管：200 μ L。
- 2.4.5. PCR 玻璃毛細管：Roche LightCycler 專用。
- 2.4.6. 玻璃或塑膠瓶：50 mL、100 mL、250 mL、500 mL、1000 mL 及 2000 mL。
- 2.4.7. 塑膠離心管：50 mL。

註 4：使用之塑膠或玻璃器皿均為無 DNase 污染。

2.5. Real-time PCR 溶液之配製^(註5)

- 2.5.1. ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System 鑑別試驗用
5 μ M 引子 F..... 1.25 μ L

| | |
|---------------------------------------|--------------|
| 5 μ M 引子 R | 1.25 μ L |
| 3.3 μ M 探針 P..... | 1.7 μ L |
| TaqMan Universal PCR Master Mix | 12.5 μ L |
| 檢體 DNA 溶液(總量 100 ng) | 5.0 μ L |
| 無菌去離子水..... | 3.3 μ L |
| 總體積..... | 25.0 μ L |

2.5.2. Roche LightCycler 鑑別試驗用

| | |
|--|--------------|
| 5 μ M 引子 F..... | 1.5 μ L |
| 5 μ M 引子 R | 1.5 μ L |
| 3.3 μ M 探針 P..... | 1.5 μ L |
| LightCycler [®] FastStart DNA Master HybProbe | 2.0 μ L |
| 25 mM 氯化鎂溶液 | 2.4 μ L |
| 檢體 DNA 溶液(總量 100 ng) | 5.0 μ L |
| 無菌去離子水..... | 6.1 μ L |
| 總體積..... | 20.0 μ L |

註 5：Real-time PCR 溶液應置於冰浴中配製。

2.6. 檢體 DNA 之製備

2.6.1. 檢體之處理^(註 6)

乾燥檢體直接以粉碎機研磨成細粉。溼狀檢體經冷凍乾燥處理後，再以粉碎機研磨成細粉。檢體需貯存於乾燥及冷凍環境中。

註 6：1. 研磨檢體時應於區隔之空間進行，避免交叉污染。

2. 溼狀檢體之乾燥時間可視乾燥程度調整。

2.6.2. DNA 之抽取

採用適用於動物 DNA 抽取之市售套組，依套組操作說明步驟抽取 DNA。抽取之 DNA 溶液收集至已滅菌之 1.5 mL 離心管，作為檢體 DNA 原液。依 2.6.3. 節測定 DNA 濃度後，置於 -20°C 冷凍保存。

2.6.3. DNA 濃度測定及純度判斷

取適量之檢體 DNA 原液，以無菌去離子水做適當倍數之稀釋，分別測定 260 nm 及 280 nm 之吸光值(O.D.)。以波長 260 nm 吸光值乘 50 ng/ μ L 及稀釋倍數，即為檢體 DNA 原液濃度。DNA 溶液純度則以 O.D.₂₆₀/O.D.₂₈₀ 比值作判斷，其比值應介於 1.7~2.0。

2.7. Real-time PCR 鑑別試驗

2.7.1. Real-time PCR 操作步驟

2.7.1.1. Real-time PCR – ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System

以無菌去離子水適當稀釋檢體 DNA 原液、引子及探針備用。取 PCR 反應管，依照 2.5.1.節配製 PCR 溶液，依序加入 TaqMan Universal PCR Master Mix、稀釋過之引子及探針，混合均勻後，分裝 20 μ L 入 PCR 反應管中，各別加入檢體 DNA 溶液 5 μ L，再將 PCR 反應管置於離心機中，以 200 \times g 瞬間離心，移入 real-time PCR 反應器，依下列條件進行反應。同時另製作正反應及負反應對照組。

| 步驟 | 溫度 | 時間 |
|--------------------------|------|--------|
| 1. 熱活化 | 50°C | 2 min |
| 2. 最初變性 | 95°C | 10 min |
| 3. 變性 | 95°C | 15 sec |
| 4. 黏接、延展 | 60°C | 1 min |
| 步驟 3 至步驟 4，共進行 45 個循環反應。 | | |
| 5. 冷卻 | 35°C | 45 sec |

2.7.1.2. Real-time PCR – Roche LightCycler

以無菌去離子水適當稀釋檢體 DNA 原液、引子及探針備用。取 PCR 反應管，依照 2.5.2.節配製 PCR 溶液，依序加入 LightCycler[®] FastStart DNA Master HybProbe、25 mM 氯化鎂溶液、稀釋過之引子及探針，混合均勻後，分裝 15 μ L 於玻璃毛細管中，各別加入檢體 DNA 溶液 5 μ L，再將毛細管置於離心機中，以 800 \times g 瞬間離心，移入 real-time PCR 反應器，依下列條件進行反應。同時另製作正反應及負反應對照組。

| 步驟 | 溫度 | 時間 |
|--------------------------|------|--------|
| 1. 最初變性 | 95°C | 10 min |
| 2. 變性 | 95°C | 5 sec |
| 3. 黏接 | 60°C | 25 sec |
| 4. 延展 | 72°C | 8 sec |
| 步驟 2 至步驟 4，共進行 45 個循環反應。 | | |
| 5. 冷卻 | 35°C | 45 sec |

2.7.2. Real-time PCR 螢光分析

檢體 DNA 經 real-time PCR 反應後，直接從 real-time PCR 反應器上之螢幕觀察探針所產生之螢光增幅曲線，即可判讀反應結果。同時另測試正反應及負反應對照組。

2.7.3. 確認

2.7.3.1. 測試動物類基因(16S ribosomal RNA)：

檢體 DNA 之 real-time PCR 增幅產物螢光分析圖與正反應對照組螢光分析圖進行相互比對，當檢體 DNA 與正反應對照組之 real-time PCR 螢光分析圖均出現經由探針所產生之螢光增幅曲線，即確認該 real-time PCR 增幅產物為動物物種之基因片段，可確認該檢體中含有動物性成分。

2.7.3.2. 測試動物類基因(12S ribosomal RNA)：

檢體 DNA 之 real-time PCR 增幅產物螢光分析圖與正反應對照組螢光分析圖進行相互比對，當檢體 DNA 與正反應對照組之 real-time PCR 螢光分析圖均出現經由探針所產生之螢光增幅曲線，即確認該 real-time PCR 增幅產物為哺乳類、家禽類或魚類之基因片段，可確認該檢體中含有哺乳類、家禽類或魚類成分。

2.7.3.3. 測試哺乳類及家禽類基因：

檢體 DNA 之 real-time PCR 增幅產物螢光分析圖與正反應對照組螢光分析圖進行相互比對，當檢體 DNA 與正反應對照組之 real-time PCR 螢光分析圖均出現經由探針所產生之螢光增幅曲線，即確認該 real-time PCR 增幅產物為哺乳類或家禽類之基因片段，可確認該檢體中含有哺乳類或家禽類成分。

2.7.3.4. 測試魚類基因：

檢體 DNA 之 real-time PCR 增幅產物螢光分析圖與正反應對照組螢光分析圖進行相互比對，當檢體 DNA 與正反應對照

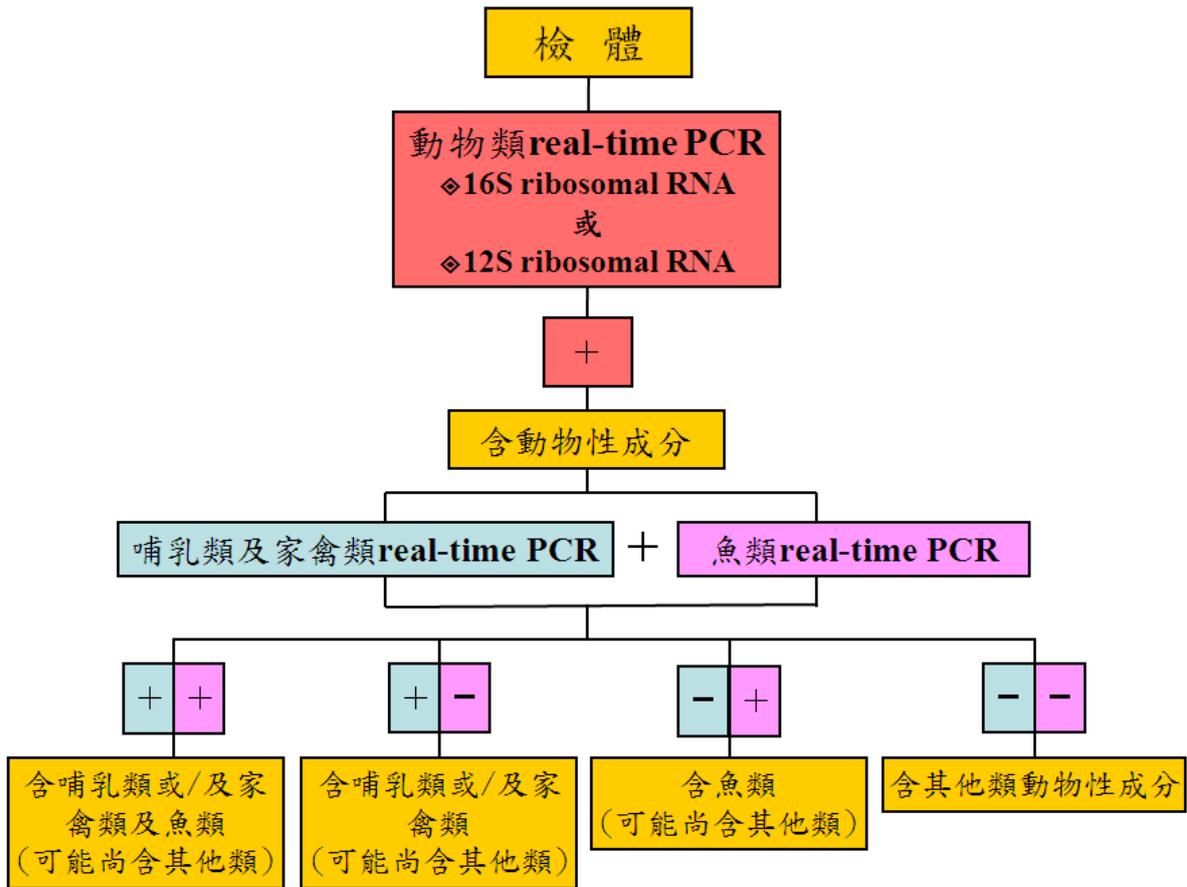
組之 real-time PCR 螢光分析圖均出現經由探針所產生之螢光增幅曲線，即確認該 real-time PCR 增幅產物為魚類之基因片段，可確認該檢體中含有魚類成分。

2.7.4. 判定(附圖)

- 2.7.4.1. 以 real-time PCR 測試為動物類負反應，表示不含動物性成分。
- 2.7.4.2. 以 real-time PCR 測試為動物類正反應，及以 real-time PCR 測試亦為哺乳類及家禽類正反應，且以 real-time PCR 測試亦為魚類正反應，表示含哺乳類或/及家禽類及魚類動物性成分，及可能尚含其他類動物性成分。
- 2.7.4.3. 以 real-time PCR 測試為動物類正反應，及以 real-time PCR 測試亦為哺乳類及家禽類正反應，且以 real-time PCR 測試為魚類負反應，表示含哺乳類或/及家禽類動物性成分，及可能尚含其他類動物性成分。
- 2.7.4.4. 以 real-time PCR 測試為動物類正反應，及以 real-time PCR 測試為哺乳類及家禽類負反應，且以 real-time PCR 測試為魚類正反應，表示含魚類動物性成分，及可能尚含其他類動物性成分。
- 2.7.4.5. 以 real-time PCR 測試為動物類正反應，及以 real-time PCR 測試為哺乳類及家禽類負反應，且以 real-time PCR 測試為魚類負反應，表示含其他類動物性成分。

附註：1. 本檢驗方法最低檢測濃度為 0.1% (以乾重計)。

2. 檢體 DNA 之製備將影響測試結果，如有影響測試結果之因素時，應自行探討。
3. 本方法反應條件分析不適時，可依所使用之儀器，設定適合之反應條件。
4. 本檢驗方法之測試範圍係指能夠抽取出 DNA 者之食品，經過高度加工造成 DNA 過度裂解之食品不適用於本檢驗方法。



附圖、食品中動物性成分之定性篩選檢驗流程