

食品中動物性成分檢驗-豬成分之定性檢驗修正 總說明

為加強食品中動物性、植物性成分之管理，並依據食品衛生管理法第三十八條規定：「各級主管機關執行食品、食品添加物、食品容器或包裝及食品用洗潔劑之檢驗，其檢驗方法，由中央主管機關定之」，爰擬具「食品中動物性成分檢驗-豬成分之定性檢驗」，其修正要點如下：

- 一、修正英文標題。
- 二、刪除 PCR 試驗相關內容，包含裝置、試藥、器具及材料、試劑之配製及鑑別試驗。
- 三、修正鑑別試驗用引子及探針。
- 四、修正對照用物質。

食品中動物性成分檢驗-豬成分之定性檢驗修正 對照表

修正規定	現行規定	說明
食品中動物性成分檢驗方法—豬成分之定性檢驗 Method of Test for Animal-Derived Ingredients in Foods—Qualitative Test of Swine Ingredient 1.適用範圍：本檢驗方法適用於食品中<u>豬成分之定性檢驗</u>。 2.檢驗方法：<u>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。</u> 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、<u>real-time PCR 試劑配製及檢驗過程</u>皆需有區隔空間，避免交叉污染。<u>Real-time PCR 試劑之配製應於無菌操作台內進行。</u> 2.2.裝置^(註 1) 2.2.1.<u>即時聚合酶鏈反應器：ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System 或 Roche LightCycler，或同級品。</u> 2.2.2.冷凍乾燥裝置：溫度可達 -40℃ 以下，真空度可達 133 mBar 以下，供檢體乾燥用。 2.2.3.<u>振盪型粉碎機：Retsch MM200，或同級品。</u> 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℃ 溫控及振盪功能。 2.2.8.<u>微量冷凍離心機(Micro refrigerated centrifuge)：可達 20000 × g，並具 4℃ 溫控功能。</u> 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。	食品中動物性成分檢驗方法—豬成分之定性檢驗 Method of Test for Animal-Derived Ingredients in Foods—Qualitative Test of Swine Ingredients 1.適用範圍：本檢驗方法適用於食品中<u>豬肉、豬心、豬肝等組織器官、豬血或其他製品之定性檢驗。</u> 2.檢驗方法：聚合酶鏈反應(Polymerase chain reaction, PCR)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、PCR 試劑配製及<u>PCR 等實驗過程</u>皆需有區隔空間，避免交叉污染。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.分光光度計：具波長 260 nm、280 nm。 2.2.2.旋渦混合器(Vortex mixer)。 2.2.3.真空乾燥裝置：供 DNA 乾燥用。 2.2.4.加熱振盪器：具 55℃ 溫控及振盪功能。 2.2.5.微量冷凍離心機：可達 20000 × g，並具 4℃ 溫控功能。 2.2.6.離心機：供各式微量離心管離心用。 2.2.7.聚合酶鏈反應器：ABI PRISM 9700 Sequence Detector，或同級品。 2.2.8.即時聚合酶鏈反應器^(註 2)：ABI PRISM 7700 Sequence Detector 或 Roche LightCycler，或同級品。 2.2.9.電泳槽：供 DNA 電泳用。 2.2.10.振盪型粉碎機。 2.2.11.照相裝置：供拍攝電泳膠片用。 2.2.12.紫外燈箱：具波長 312 nm、365	一、修正英文標題。 二、刪除 PCR 試驗相關內容，包含裝置、試藥、器具及材料、試劑之配製及鑑別試驗。 三、修正鑑別試驗用引子及探針。 四、修正對照用物質。 五、增列附註二及三。 六、增修訂部分文字。

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. <u>Real-time PCR 用</u>^(註 2) 2.3.2.1. 鑑別試驗用引子及探針 2.3.2.1.1. 哺乳類、家禽類及魚類(標的基因：<u>12S ribosomal RNA</u>，供作內部對照基因) 引子 F： <u>12SF, 5'-CAAACCTGGGATTAGATACCCCACTA-3'</u> 引子 R： <u>12SR, 5'-ATCGRTTMTAGAACAGGCT</u>	<u>nm 紫外燈。</u> 2.2.13. 冷凍設備：具冷藏及凍結功能。 2.2.14. 高壓滅菌釜。 2.2.15. <u>pH</u> 測定儀。 2.2.16. 水浴裝置：溫差在$\pm 1.0^{\circ}\text{C}$以內者。 2.2.17. 天平：最大秤重量為 2000 g，靈敏度為 0.1 g；最大秤重量為 100 g，靈敏度為 1 mg。 2.2.18. 無菌操作台。 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。 <u>註 2: 確認試驗用。</u> 2.3. 試藥 2.3.1. DNA 抽取用：<u>RNase、乙醇(96~100%)</u>均採分子生物分析級試藥，<u>DNeasy[®]Tissue</u> 套組。 2.3.2. 聚合酶鏈反應(PCR)用 <u>2.3.2.1. 鑑別試驗用引子</u>^(註 3) 2.3.2.1.1. 哺乳類及家禽類(標的基因：<u>myostatin</u>，供作內部對照基因) 引子 F：<u>MYF</u>， <u>5'-TTGTGCAAATCCTGAGACTCAT-3'</u> 引子 R：<u>MYR</u>， <u>5'-ATACCAGTGCCTGGGTTCAT-3'</u> PCR 增幅產物大小 97 bp 2.3.2.1.2. 豬(標的基因：<u>growth hormone</u>) 引子 F：<u>SWF</u>， <u>5'-TCAGTTTACTACCTGATAGCATCT-3'</u> 引子 R：<u>SWR</u>， <u>5'-GGGTGGTGGAGAGGGGTGAATT-3'</u> PCR 增幅產物大小 108 bp 2.3.2.2. <u>確認試驗用引子及探針</u>^(註 4) 2.3.2.2.1. 哺乳類及家禽類(標的基因：<u>myostatin</u>，供作內部對照基因) 引子 F：<u>MYF</u>， <u>5'-TTGTGCAAATCCTGAGACTCAT-3'</u> 引子 R：<u>MYR</u>， <u>5'-ATACCAGTGCCTGGGTTCAT-3'</u> 探針 P：<u>MYP</u>，	
---	--	--

<u>CCTCTAG-3'</u> 探針 P： <u>12SP,5'-(FAM)-CACCGCCAAGTCCTT</u> <u>TGRGTTTTARGC-(TAMRA)-3'</u> PCR 增幅產物大小 <u>155 bp</u> 2.3.2.1.2. 豬(標的基因：<u>12S ribosomal RNA</u>) 引子 F： <u>P12F,5'-GGAACAATAGTAAGCACAA</u> <u>TCATAGC-3'</u> 引子 R： <u>P12R,5'-CATAAAACTTTCGTGTGG</u> <u>TGGA-3'</u> 探針 P： <u>P12P,5'-(FAM)-CATGTAGAAAATGT</u> <u>AGCCCATTTCTTTCCA-(TAMRA)-3'</u> PCR 增幅產物大小 <u>121 bp</u> 註 2: 1. <u>合成之引子及探針</u>，拆封後，以無菌去離子水稀釋成適當濃度，分裝後置於-20℃貯存備用，另探針需避光保存。探針 5'端採用 <u>6-carboxy-fluorescein (FAM)標記</u>，3'端採用 <u>6-carboxytetramethyl-rhodamine (TAMRA)標記</u>。 2. <u>內部對照基因引子及探針之序列</u>中，R 為混合鹼基代碼(A/G)，表示同時含 A 及 G；M 為混合鹼基代碼(A/C)，表示同時含 A 及 C。 2.3.2.2. <u>TaqMan Universal PCR Master Mix(適用於 ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System)</u> 本試劑內含 <u>real-time PCR</u> 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. <u>LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe (適用於 Roche LightCycler)</u> 本試劑內含 <u>real-time PCR</u> 所需去氧核	<u>5'-(FAM)-CCCATGAAAGACGGTACA</u> <u>AGGTATACTG-(TAMRA)-3'</u> PCR 增幅產物大小 <u>97 bp</u> 2.3.2.2.2. 豬(標的基因：<u>growth hormone</u>) 引子 F：<u>SWF</u>， <u>5'-TCAGTTTACTCACCTGATAGC</u> <u>ATCT-3'</u> 引子 R：<u>SWR</u>， <u>5'-GGGTGGTGGAGAGGGGTGAATT-</u> <u>3'</u> 探針 P：<u>SWP</u>， <u>5'-(FAM)-CCTCAATACTCCAGAACC</u> <u>CCTCATTTTCCTC-(TAMRA)-3'</u> PCR 增幅產物大小 <u>108 bp</u> 註 3:<u>合成之引子</u>，拆封後，以無菌純水稀釋成適當濃度，分裝後置於-20℃貯存備用。 註 4:<u>合成之探針</u>，拆封後，以無菌純水稀釋成適當濃度，分裝後置於-20℃貯存備用，探針需避光保存。 2.3.2.3. <u>去氧核苷三磷酸(deoxyribonucleotide triphosphate, dNTP)</u> 含去氧腺苷三磷酸(<u>deoxyadenosine triphosphate, dATP</u>)，去氧胞苷三磷酸(<u>deoxycytidine triphosphate, dCTP</u>)，去氧鳥糞嘌呤苷三磷酸(<u>deoxyguanosine triphosphate, dGTP</u>)及去氧胸苷三磷酸(<u>deoxythymidine triphosphate, dTTP</u>)各 <u>2.5 mM 之溶液</u>。 2.3.2.4. <u>聚合酶</u> <u>Taq DNA polymerase (2 U/μL)</u>，或同級品。 2.3.2.5. <u>TaqMan Universal PCR Master Mix(確認試驗用，適用於 ABI PRISM 7700)</u> 內含 PCR 所需去氧核苷三磷酸、聚合酶等試劑，使用者僅需自行添加引子、探針及待測檢體 DNA 即可。 2.3.2.6. <u>LightCycler-FastStart DNA Master Hybridization Probes (確認試驗用，適用於 Roche LightCycler)</u>	
---	---	--

糖核苷三磷酸、聚合酶等，<u>且內附 25 mM 氯化鎂溶液</u>，使用時添加引子、探針及待測檢體 DNA。 2.3.3. 對照用物質：豬肉或使用衛生福利部食品藥物管理署提供編號 S201 之參考質體作為對照用物質。 2.4. 器具及材料^(註 3) 2.4.1. 吸管(Pipette)：10 µL、20 µL、100 µL、200 µL 及 1000 µL。 2.4.2. 吸管尖頭(Pipette tips)：10 µL、20 µL、200 µL 及 1000 µL。 2.4.3. 離心管：200 µL、600 µL、1.5 mL 及 2 mL。 2.4.4. PCR 反應管：200 µL。 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 3: 使用之塑膠或玻璃器皿均為無 DNase 污染。 2.5. <u>Real-time PCR 溶液之配製</u>^(註 4)	內含 PCR 所需去氧核苷三磷酸、聚合酶等試劑，使用者僅需自行添加引子、探針及待測檢體 DNA 即可。 2.3.3. <u>電泳用試藥：溴化乙錠(ethidium bromide)、瓊膠(agarose)、溴酚藍(bromophenol blue)、二甲苯藍(xylene cyanol FF)、乙二胺四乙酸二鈉(ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt, Na₂-EDTA)、三羥甲基氨基甲烷(tris(hydroxymethyl) aminomethane (Tris))、甘油、硼酸</u>，均採分子生物分析級試藥。DNA 分子量標記物質(DNA molecular weight marker)：100-bp DNA Ladder Marker。 2.3.4. 對照用物質：豬肉、豬血及其組織器官等皆可，或使用行政院衛生署藥物食品檢驗局提供編號 pIDM1 之參考質體作為對照用物質。 2.4. 器具及材料^(註 5) 2.4.1. 吸管(Pipette)：10 µL、20 µL、100 µL、200 µL 及 1000 µL。 2.4.2. <u>電泳膠片製作盤。</u> 2.4.3. 吸管尖頭(Pipette tips)：10 µL、20 µL、200 µL 及 1000 µL。 2.4.4. 離心管：200 µL、600 µL、1.5 mL 及 2 mL。 2.4.5. PCR 反應管：200 µL 及 500 µL。 2.4.6. PCR 玻璃毛細管^(註 6)：Roche LightCycler 專用。 2.4.7. 玻璃或塑膠瓶：50 mL、100 mL、250 mL、500 mL、1000 mL 及 2000 mL。 2.4.8. 塑膠離心管：50 mL。 2.4.9. <u>過濾膜：孔徑為 0.45 µm，材質為 nitro-cellulose。</u> 註 5: 使用之塑膠或玻璃器皿均為無 DNase 污染。 註 6: <u>儀器使用 Roche LightCycler 時，才需使用。</u> 2.5. <u>試劑之配製</u> 2.5.1. 5 倍 TBE (Tris-borate-EDTA) 緩	
---	---	--

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 4: 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 5)

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 5:

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。

2.5.5.3. Roche LightCycler 確認試驗用

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 Hybridization Probes	2.0 μ L
25 mM MgCl ₂ 溶液	2.4 μ L
模版 DNA (總量 40 ng)	5.0 μ L
無菌純水	6.1 μ L
總體積	25.0 μ L

註 7: 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

檢體為乾燥肉乾或粉(碎)狀者，可直接以粉碎機研磨成細粉。檢體為溼狀肉塊或肉加工品，經冷凍乾燥處理後，再以粉碎機研磨成細粉備用。檢體需貯存於乾燥及冷藏或冷凍環境中。

2.6.2. DNA 之抽取

採用 DNeasy[®]Tissue 套組及內附試劑、材料(ATL 試劑、proteinase K 試劑、AL 試劑、離心管柱(DNeasy spin column)、收集管、AW1、AW2 與 AE 試劑)，亦可採用其他市售套組。

2.6.2.1. 稱取檢體約 25 mg^(註 8)，置入 2 mL 離心管。

2.6.2.2. 加入 ATL 試劑 180 μ L 以及 proteinase K 20 μ L，以振盪器混合均勻。

2.6.2.3. 於 55°C 振盪反應直到檢體溶解。

2.6.2.4. 加入 AL 試劑 200 μ L，以振盪器混合均勻。

2.6.2.5. 水浴 70°C，10 分鐘。

2.6.2.6. 加入乙醇(96~100%) 200 μ L，以振盪器混合均勻。

2.6.2.7. 取混合液注入吸附管柱，以 $\geq 6000 \times g$ (8000 rpm) 離心 1 分鐘，並將收集管及濾液丟棄。

2.6.2.8. 將吸附管柱套入新的收集管，

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/μL 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。	注入 AW1 試劑 500 μL 到吸附管柱，以$\geq 6000 \times g$ (8000 rpm) 離心 1 分鐘後，將收集管及濾液丟棄。 2.6.2.9. 將吸附管柱套入新的收集管，注入 AW2 試劑 500 μL 到吸附管柱，以 $20000 \times g$ (14000 rpm) 離心 3 分鐘後，將收集管及濾液丟棄。 2.6.2.10. 將吸附管柱套入新的 1.5 mL 離心管。 2.6.2.11. 加入 AE 試劑 100 μL 至吸附管柱，於室溫下靜置 1 分鐘後，再以$\geq 6000 \times g$ (8000 rpm) 離心 1 分鐘。 2.6.2.12. 再加入 AE 試劑 100 μL，於室溫下靜置 1 分鐘後，再以$\geq 6,000 \times g$ (8,000 rpm) 離心 1 分鐘。 2.6.2.13. 將溶出液(約 200μL)收集至已滅菌之 1.5 mL 離心管，為萃取 DNA 原液。 2.6.2.14. 依 2.6.3.2. 節測量 DNA 濃度並記錄後，置於-20℃冷凍保存。 註 8: 抽取脾臟等含細胞數量眾多的組織 DNA，秤取量不可超過 10 mg。抽取肝臟或腎臟等含豐富 RNA 的組織 DNA，於步驟 2.6.2.4. 之後加入 RNase (100 mg/mL) 4μL，混合均勻後於室溫下靜置 2 分鐘。 2.6.3. DNA 濃度測定及純度判斷 <u>2.6.3.1. 檢體 DNA 溶液於使用前自冷凍庫中取出，於室溫下進行溶解。</u> <u>2.6.3.2. 取適當量之 DNA 溶液以無菌純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 O.D.₂₆₀ 乘以 50 ng/μL 即為 DNA 溶液之濃度。計算 O.D.₂₆₀ / O.D.₂₈₀ 比值，其比值應介於 1.7~2.0 間。</u> <u>2.7. 鑑別試驗^(註 9)</u> <u>2.7.1. PCR 操作步驟</u> <u>以無菌純水適當稀釋 DNA 溶液、引子</u>	
--	---	--

備用。取PCR反應管，並依照2.5.5.1.節配製PCR溶液，依序加入純水、10倍PCR緩衝液、dNTP、引子、DNA polymerase及DNA溶液，混合均勻後，將反應管置於離心機瞬間離心，使混合液聚積於反應管之底部。移入PCR反應器，依據引子類別並參照2.7.2.節設定反應條件，進行反應，結束後，取出PCR增幅產物，進行電泳分析。

2.7.2. PCR 條件

步驟	溫度	時間
1. 最初變性	95°C	5 min
2. 變性	95°C	30 sec
3. 黏接		
測試豬基因	60°C	30 sec
測試哺乳類及家禽類基因	54°C	30sec
4. 延展	72°C	30 sec
步驟2至步驟4，共進行40個循環反應		
5. 最終延展	72°C	7 min

2.7.3. 膠片電泳分析

取適量之6倍載入膠片緩衝溶液，分別與無菌純水(空白組)及PCR增幅產物混合均勻，注入2%膠片孔中，以50或100伏特電壓進行電泳。同時，必須取DNA分子量標記物質進行電泳，作為PCR增幅產物大小之判別與計算依據。經電泳後之膠片置入膠片染液中進行染色約15分鐘，續置入水中漂洗及褪染，再置於紫外燈箱上，以波長365nm之紫外光照射觀察是否有明顯之DNA螢光帶，並判讀結果。每次實驗必須同時測試正反應及負反應對照組。

2.7.4. 鑑別

檢體DNA之PCR增幅產物電泳結果，須與正反應對照組及DNA分子量標記物質之電泳結果進行相互比對，當檢體DNA與正反應對照組DNA二者皆出現PCR增幅產物，且經由DNA分子量標記物質估算PCR增幅產物大小為108bp者，即判定該檢體含有豬物種成分。

註 9:PCR定性試驗結果之判讀係以PCR增幅產物大小判定，當測試結果判讀困難時，建議進行確認試

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，

驗。檢體 DNA 之抽取與製備，其純度將直接影響後續 PCR 測試結果，建議抽取之檢體 DNA 可先進行內部對照基因 PCR 測試，以確定是否含有 DNA 及其純度。本 PCR 定性反應條件係採 ABI PRISM 9700 設定之，若使用其他機型，應自行檢討反應條件。

2.8. 確認試驗：本實驗視需要而操作之。

2.8.1. PCR 操作步驟

2.8.1.1. 即時聚合酶鏈反應(Real-time PCR)—ABI PRISM 7700 Sequence Detector

以無菌純水適當稀釋檢體 DNA 溶液、引子及探針備用。取適量無菌純水，並依照 2.5.5.2.節配製 PCR 溶液，依序加入 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，再各別加入稀釋過之檢體 DNA 溶液 5 μ L，最後將 PCR 反應管置於離心機中，以 200 $\times$ g (1500 rpm)瞬間離心，移入即時聚合酶鏈反應器，依下列條件進行反應。每次實驗皆須製作負反應及正反應對照組。

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		
測試豬基因	60°C	1 min
測試哺乳類及家禽類基因	54°C	1min
步驟 3 至步驟 4，共進行 45 個循環反應。		
5. 冷卻	35°C	45 sec

2.8.1.2. 即時聚合酶鏈反應(Real-time PCR)—Roche LightCycler

以無菌純水適當稀釋檢體 DNA 溶液、引子及探針備用。取適量無菌純水，並依照 2.5.5.3.節配製 PCR 溶液，依序加入 LightCycler-FastStart DNA Master Hybridization Probes、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，再各別加入稀釋過之檢體 DNA 5 μ L，最後將毛細管置於離心機

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

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 增幅產物為豬之基因片段，可確認該檢體中含有豬成分。

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，檢體 DNA 應進行內部對照基因測試。
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 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。

中，以 $800 \times g$ (3000 rpm) 瞬間離心，移入即時聚合酶鏈反應器，依下列條件進行反應。每次實驗皆須製作負反應及正反應對照組。

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		
<u>測試豬基因</u>	60°C	25 sec
<u>測試哺乳類及家禽類基因</u>	54°C	25sec
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

2.8.2. 即時聚合酶鏈反應螢光分析

檢體 DNA 經即時聚合酶鏈反應後，直接從即時聚合酶鏈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。每次實驗必須同時測試正反應及負反應對照組。

2.8.3. 確認

檢體 DNA 之 PCR 增幅產物螢光分析結果須與正反應對照組螢光分析結果進行相互比對，當檢體 DNA 與正反應對照組之 PCR 螢光分析結果，皆出現經由探針所產生之螢光增幅曲線，即確認該 PCR 增幅產物為該測試豬物種之基因片段，可確認該檢體中含有豬物種成分。

註：

1. 本 PCR 定性檢驗方法 之最低檢測濃度為 0.1% (以乾重計)。
2. 本檢驗方法之測試範圍係指能夠抽取 DNA 者之食品，經過高度加工或不含 DNA 之食品不適用於本檢驗方法。