

食品中動物性成分檢驗方法-牛成分之定性檢驗

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方法－牛成分之定性檢驗」，其修正要點如下：

- 一、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。
- 二、修正鑑別試驗用引子及探針。
- 三、修正對照用物質。
- 四、增列附註二及三。

食品中動物性成分檢驗方法-牛成分之定性檢驗

修正對照表

修正規定	現行規定	說明
1. 適用範圍：本檢驗方法適用於食品中牛成分之定性檢驗。 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</u> 試劑配製及<u>檢驗過程</u>皆需有區隔空間，避免交叉污染。<u>Real-time PCR</u> 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℃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℃ 溫控及振盪功能。 2.2.8. 微量冷凍離心機(Micro refrigerated centrifuge)：可達 20000 × g，並具 4℃ 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。	1. 適用範圍：本檢驗方法適用於食品中牛肉、牛心、牛肝等組織器官、牛血、牛乳及其製品之定性檢驗。 2. 檢驗方法：<u>聚合酶鏈反應 (polymerase chain reaction, PCR) 方法及即時聚合酶鏈反應 (real-time polymerase chain reaction, RT-PCR) 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、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. <u>聚合酶鏈反應器：ABI PRISM 9700 Sequence Detector，或同級品。</u> 2.2.2. 即時聚合酶鏈反應器^(註 2)：ABI PRISM 7700 Sequence Detector 或 Roche LightCycler，或同級品。 2.2.3. 真空冷凍乾燥裝置：溫度可達-40℃以下，真空度可達 133 mBar 以下，供檢體乾燥用。 2.2.4. 振盪型粉碎機：Retsch MM200，或同級品。 2.2.5. 真空乾燥裝置：供 DNA 乾燥用。 2.2.6. 高壓滅菌釜。 2.2.7. 無菌操作台。 2.2.8. 加熱振盪器：具 55℃ 溫控及振盪功能。 2.2.9. 微量冷凍離心機 (Micro refrigerated centrifuge)：可達 20000 × g，並具 4℃ 溫控功能。 2.2.10. 離心機：供各式微量離心管離心用。 2.2.11. 分光光度計：具波長 260 nm、280 nm。 2.2.12. 冷凍設備：具冷藏及凍結功能。	一、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。 二、修正鑑別試驗用引子及探針。 三、修正對照用物質。 四、增列附註二及三。 五、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</u> 用^(註 2) 2.3.2.1. <u>鑑別試驗用引子及探針</u> 2.3.2.1.1. <u>哺乳類、家禽類及魚類(標的基因：12S ribosomal RNA，供作內部對照基因)</u> 引子 F： <u>12SF, 5'-CAAAGTGGGATTAGATACC CCACTA-3'</u> 引子 R：	2.2.13. 旋渦混合器(Vortex mixer)。 2.2.14. 電泳槽：供 DNA 電泳用。 2.2.15. 照相裝置：供拍攝電泳膠片用。 2.2.16. 紫外燈箱：具波長 302 nm、365 nm 紫外燈。 2.2.17. pH 測定儀。 2.2.18. 水浴裝置：溫差$\pm 1^{\circ}\text{C}$以內者。 2.2.19. 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。 註 2: <u>確認試驗用。</u> 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. PCR 用^(註 3) 2.3.2.1.1. <u>鑑別試驗用引子哺乳類及家禽類(標的基因：myostatin，供作內部對照基因)</u> <u>引子 F：MYF，</u> <u>5'-TTGTGCAAATCCTGAGACTCAT-3'</u> <u>引子 R：MYR，</u> <u>5'-ATACCAGTGCCTGGGTTCAT-3'</u> <u>PCR 增幅產物大小 97 bp</u> 2.3.2.1.2. <u>牛(標的基因：12S ribosomal RNA)</u> <u>引子 F：BF，</u> <u>5'-ACATTCTCTACCCAAGAGAATCA AGC-3'</u> <u>引子 R：BR，</u> <u>5'-TCCTCTCATGTAGCTAGTGCGTTT A-3'</u> <u>PCR 增幅產物大小 193 bp</u> 2.3.2.2. <u>確認試驗用引子及探針</u> 2.3.2.2.1. <u>哺乳類及家禽類(標的基因：myostatin，供作內部對照基因)</u> 引子 F：<u>MYF，</u> <u>5'-TTGTGCAAATCCTGAGACTCAT-3'</u> 引子 R：<u>MYR，</u> <u>5'-ATACCAGTGCCTGGGTTCAT-3'</u>	
---	---	--

<u>12SR,5'-ATCGRTTMTAGAACAGGCTCCTCTAG-3'</u> 探針 P： <u>12SP,5'-(FAM)-CACCGCCAAGTCCTT TGRGTTT TARGC-(TAMRA)-3'</u> PCR 增幅產物大小 <u>155 bp</u> 2.3.2.1.2. 牛(標的基因：12S ribosomal RNA) 引子 F：BF， 5'-ACATTCTCTACCCAAGAGAATCA AGC-3' 引子 R：BR， 5'-TCCTCTCATGTAGCTAGTGCGTTT A-3' 探針 P：BP， 5'-(FAM)-CCCTCCTCAAATAGATTCA GTG CATCTAACCCT-(TAMRA)-3' PCR 增幅產物大小 <u>193 bp</u> 註 2： 1. 合成之引子及探針，拆封後，以無菌<u>去離子水</u>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 6-carboxy-fluorescein (FAM)標記，3'端採用 6-carboxytetramethyl-rhodamine (TAMRA)標記。 2. <u>內部對照基因</u>引子及探針之序列中，<u>R</u>為混合鹼基代碼(<u>A/G</u>)，表示同時含 <u>A</u> 及 <u>G</u>；<u>M</u>為混合鹼基代碼(<u>A/C</u>)，表示同時含 A 及 <u>C</u>。	探針 P：<u>MYP</u>， <u>5'-(FAM)-CCCATGAAAGACGGTACA AGGTATACTG-(TAMRA)-3'</u> PCR 增幅產物大小 <u>97 bp</u> 2.3.2.2. 牛(標的基因：12S ribosomal RNA) 引子 F：BF， 5'-ACATTCTCTACCCAAGAGAATCA AGC-3' 引子 R：BR， 5'-TCCTCTCATGTAGCTAGTGCGTTT A-3' 探針 P：BP， 5'-(FAM)-CCCTCCTCAAATAGATTCA GTG CATCTAACCCT-(TAMRA)-3' PCR 增幅產物大小 <u>193 bp</u> 註 3： 1. 合成之引子及探針，拆封後，以無菌<u>純水</u>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 6-carboxy-fluorescein (FAM)標記，3'端採用 6-carboxytetramethyl-rhodamine (TAMRA)標記。 2. <u>植物共通性基因</u>引子及探針之序列中，<u>Y</u>為混合鹼基代碼(<u>C/T</u>)，表示同時含 <u>C</u> 及 <u>T</u>；<u>R</u>為混合鹼基代碼(<u>A/G</u>)，表示同時含 A 及 <u>G</u>。 <u>2.3.2.3.去氧核糖核苷三磷酸</u> <u>(deoxyribonucleoside triphosphate, dNTP 溶液</u> <u>含去氧腺苷三磷酸 (deoxyadenosine triphosphate, dATP)，去氧胞苷三磷酸 (deoxycytidine triphosphate, dCTP)，去氧鳥糞嘌呤核苷三磷酸 (deoxyguanosine triphosphate, dGTP) 及去氧胸苷三磷酸 (deoxythymidine triphosphate, dTTP) 各 2.5 mM 之溶液。</u> <u>2.3.2.4.聚合酶</u> <u>Taq DNA polymerase (2 U/μL)，或同級品。</u>	
--	--	--

2.3.2.2. TaqMan Universal PCR Master Mix (適用於 ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System) 本試劑內含 <u>real-time</u> 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 <u>real-time</u> 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：牛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。	2.3.2.5. TaqMan Universal PCR Master Mix (確認試驗用，適用於 ABI PRISM 7700) 本試劑內含 <u>RT-PCR</u> 所需去氧核糖核苷三磷酸、聚合酶等，使用時僅需自行添加引子、探針及待測檢體 DNA 即可。 2.3.2.6. LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe (確認試驗用，適用於 Roche LightCycler) 本試劑內含 <u>RT-PCR</u> 所需去氧核糖核苷三磷酸、聚合酶等，使用時僅需自行添加氯化鎂溶液、引子、探針及待測檢體 DNA 即可。 2.3.3. 電泳用：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))、甘油及硼酸，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：牛肉、牛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4) 2.4.1. 吸管(Pipette)：10 µL、20 µL、100 µL、200 µL 及 1000 µL。 2.4.2. 電泳膠片製作盤。 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5)：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。	
--	---	--

註 3：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 4)

2.4.8. 塑膠離心管：50 mL。

2.4.9. 過濾膜：孔徑為 0.45 μm ，材質為 nitro-cellulose。

註 4：使用之塑膠或玻璃器皿均為無 DNase 污染。

註 5：儀器使用 Roche LightCycler 時，才需使用。

2.5. 試劑之配製

2.5.1. 5 倍 TBE(Tris-borate-EDTA)緩衝溶液

稱取三羥甲基氨基甲烷 54 g、硼酸 27.5 g 及 0.5 M pH 8.0 EDTA 溶液 20 mL，加水溶解使成 1000 mL，供作 5 倍 TBE 緩衝溶液。臨用前以水稀釋為 0.5 倍。

2.5.2. 2%膠片

稱取瓊膠 2 g，加入 0.5 倍 TBE 緩衝溶液 100 mL，加熱攪拌至瓊膠完全溶解，適當冷卻後，倒入電泳膠片製作盤，並置入適當之尺梳，待膠片凝固後，即可使用。

2.5.3. 6 倍載入膠片緩衝溶液(6 $\times$ gel loading buffer)

稱取溴酚藍 25 g、二甲苯藍 0.25 g 及量取甘油 30 mL，加入無菌純水使成 100 mL，並置於 4°C 冰箱貯存備用。

2.5.4. 膠片染液

稱取溴化乙錠 0.1 g，加水 10 mL 溶解，供作原液(含溴化乙錠 10 mg/mL)，使用前需以水稀釋成含溴化乙錠 1 $\mu\text{g/mL}$ 。溴化乙錠為致癌物質，配製時應注意安全。

2.5.5. PCR 溶液 ^(註 6)

2.5.5.1. 鑑別試驗用

10 倍 PCR 緩衝溶液(含 15 mM MgCl_2)	2.5 μL
<i>Taq</i> DNA polymerase (2 U/ μL)	1.0 μL
2.5 mM dNTP	4.0 μL
10 μM 引子 F	1.0 μL
10 μM 引子 R	1.0 μL
檢體 DNA 溶液(總量 100 ng)	5.0 μL
無菌純水	10.5 μL
總體積	25.0 μL

2.5.1. ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System 鑑別試驗用

2.5.5.2. ABI PRISM 7700 Sequence Detector 確認試驗用

5 µM 引子 F	1.25 µL
5 µM 引子 R	1.25 µL
3.3 µM 探針 P	1.7 µL
TaqMan Universal PCR Master Mix	12.5 µL
檢體 DNA 溶液(總量 100 ng)	5.0 µL
無菌去離子水	3.3 µL
總體積	25.0 µL

2.5.2. Roche LightCycler 鑑別試驗用

5 µM 引子 F	1.5 µL
5 µM 引子 R	1.5 µL
3.3 µM 探針 P	1.5 µL
LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe	2.0 µL
25 mM 氯化鎂溶液	2.4 µL
檢體 DNA 溶液(總量 100 ng)	5.0 µL
無菌去離子水	6.1 µL
總體積	20.0 µL

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。

2.6.3. 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

5 µM 引子 F	1.25 µL
5 µM 引子 R	1.25 µL
3.3 µM 探針 P	1.7 µL
TaqMan Universal PCR Master Mix	12.5 µL
檢體 DNA 溶液(總量 100 ng)	5.0 µL
無菌純水	3.3 µL
總體積	25.0 µL

2.5.5.3. Roche LightCycler 確認試驗用

5 µM 引子 F	1.5 µL
5 µM 引子 R	1.5 µL
3.3 µM 探針 P	1.5 µL
LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe	2.0 µL
25 mM 氯化鎂溶液	2.4 µL
檢體 DNA 溶液(總量 100 ng)	5.0 µL
無菌純水	6.1 µL
總體積	20.0 µL

註 6: 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 7)

檢體為乾燥者，可直接以粉碎機研磨成細粉。檢體為溼狀者，經真空冷凍乾燥處理後，再以粉碎機研磨成細粉備用。檢體需貯存於乾燥及冷凍環境中。

註 7:

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

2.6.2.1. 採用適用於動物 DNA 抽取之市售套組，並依套組操作說明步驟抽取 DNA。

2.6.2.2. 抽取之 DNA 溶液收集至已滅菌之 1.5 mL 離心管，為檢體 DNA 原液

2.6.2.3. 依 2.6.3.節測定 DNA 濃度並記錄後，置於-20°C 冷凍保存。

2.6.3. DNA 濃度測定及純度判斷

取適當量之檢體 DNA 原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.)。計算 DNA 濃度係以波長 260 nm 吸光值乘 50

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。

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 間。

2.7. 鑑別試驗^(註8)

2.7.1. PCR 操作步驟

以無菌純水適當稀釋檢體 DNA 原液、引子備用。取 PCR 反應管，並依照 2.5.5.1. 節配製 PCR 溶液，依序加入無菌純水、10 倍 PCR 緩衝溶液、dNTP、引子、DNA polymerase 及檢體 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，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		
測試牛基因	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，再以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 需同時進行內部對照基因及牛標的基因之 PCR 測試。檢體 DNA 之 PCR 增幅產物電泳結果，須與正反應對

2.7. <u>Real-time PCR 鑑別試驗</u> 2.7.1. <u>Real-time PCR 操作步驟</u> 2.7.1.1. <u>Real-time PCR – ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System</u> 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 μL 入 PCR 反應管中，各別加入檢體 DNA 溶液 5 μL，再將 PCR 反應管置於離心機中，以 200 $\times$ g 瞬間離心，移入 <u>real-time PCR 反應器</u>，依下列條件進行反應。<u>同時另製作正反應及負反應對照組</u>。 <table border="1"> <thead> <tr> <th>步驟</th><th>溫度</th><th>時間</th></tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1. 熱活化</td><td>50°C</td><td>2 min</td></tr> <tr> <td>2. 最初變性</td><td>95°C</td><td>10 min</td></tr> <tr> <td>3. 變性</td><td>95°C</td><td>15 sec</td></tr> <tr> <td>4. 黏接、延展</td><td>60°C</td><td>1 min</td></tr> <tr> <td colspan="3">步驟 3 至步驟 4，共進行 45 個循環反應。</td></tr> <tr> <td>5. 冷卻</td><td>35°C</td><td>45 sec</td></tr> </tbody> </table> 2.7.1.2. <u>Real-time PCR – Roche</u>	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	<u>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，經由 DNA 分子量標記物質估算 PCR 增幅產物大小為 193 bp 者，即判定該檢體含有牛成分。</u> <u>註 8:</u> 1. PCR 鑑別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，建議進行確認試驗。 2. 檢體 DNA 之純度將直接影響後續 PCR 測試結果，檢體 DNA 進行內部對照基因 PCR 測試，可確定是否含有 DNA 及其純度。 3. 本 PCR 定性反應條件係採 ABI PRISM 9700 設定之，當使用其他機型時，應自行探討反應條件。 2.8. <u>確認試驗：本實驗視需要而操作之。</u> 2.8.1. <u>RT-PCR 操作步驟</u> 2.8.1.1. <u>RT-PCR – ABI PRISM 7700 Sequence Detector</u> 以無菌純水適當稀釋檢體 DNA 原液、引子及探針備用。取 PCR 反應管，並依照 2.5.5.2.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 μL 入 PCR 反應管中，再各別加入檢體 DNA 溶液 5 μL，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 <u>RT-PCR 反應器</u>，依下列條件進行反應。<u>每次實驗皆須製作正反應及負反應對照組。</u> <table border="1"> <thead> <tr> <th>步驟</th><th>溫度</th><th>時間</th></tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1. 熱活化</td><td>50°C</td><td>2 min</td></tr> <tr> <td>2. 最初變性</td><td>95°C</td><td>10 min</td></tr> <tr> <td>3. 變性</td><td>95°C</td><td>15 sec</td></tr> <tr> <td>4. 黏接、延展</td><td></td><td></td></tr> <tr> <td><u>測試牛基因</u></td><td>60°C</td><td>1 min</td></tr> <tr> <td><u>測試哺乳類及家禽類基因</u></td><td>54°C</td><td>1 min</td></tr> <tr> <td colspan="3">步驟 3 至步驟 4，共進行 45 個循環反應。</td></tr> <tr> <td>5. 冷卻</td><td>35°C</td><td>45 sec</td></tr> </tbody> </table> 2.8.1.2. <u>RT-PCR – Roche LightCycler</u>	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			<u>測試牛基因</u>	60°C	1 min	<u>測試哺乳類及家禽類基因</u>	54°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	
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																																																
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																																																		
<u>測試牛基因</u>	60°C	1 min																																																
<u>測試哺乳類及家禽類基因</u>	54°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																																																

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

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 增幅產物為牛之基因片段，可確認該檢體中含有牛成分。

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

以無菌純水適當稀釋檢體 DNA 原液、引子及探針備用。取 PCR 反應管，並依照 2.5.5.3.節配製 PCR 溶液，依序加入 LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe、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，再各別加入檢體 DNA 溶液 5 μ L，最後將毛細管置於離心機中，以 $800 \times g$ (3000 rpm)瞬間離心，移入 RT-PCR 反應器，依下列條件進行反應。每次實驗皆須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		
<u>測試牛基因</u>	60°C	25 sec
<u>測試哺乳類及家禽</u>	54°C	25 sec
<u>類基因</u>		
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. RT-PCR 螢光分析

檢體 DNA 經 RT-PCR 反應後，直接從 RT-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。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 增幅產物螢光分析圖須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 PCR 螢光分析圖，皆出現經由探針所產生之螢光增幅曲線，即確認該 PCR 增幅產物為牛之基因片段，可確認該檢體中含有牛成分。

附註：

1. 本檢驗方法最低檢測濃度為 0.1%(以乾重計)。

<u>使用之儀器，設定適合之反應條件。</u> 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。 5. 素食食品檢驗結果呈現微量牛成分陽性反應，建議可採用市售酪蛋白等蛋白質檢測套組，確認是否係添加乳清蛋白相關成分所致。	2. 本檢驗方法之測試範圍係指能夠抽取出 DNA 者之食品，經過高度加工或<u>不含</u> DNA 之食品不適用於本檢驗方法。 3. 素食食品檢驗結果呈現微量牛成分陽性反應，建議可採用市售酪蛋白等蛋白質檢測套組，確認是否係添加乳清蛋白相關成分所致。	
--	---	--