

食品中動物性成分檢驗-雞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-雞成分之定性檢驗」，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-雞成分之定性檢驗修正 對照表

修正規定	現行規定	說明
<p>1. 適用範圍：本檢驗方法適用於食品中雞成分之定性檢驗。</p> <p>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></p> <p>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> 試劑配製及檢驗過程皆需有區隔空間，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。</p> <p>2.2. 裝置^(註1)</p> <p>2.2.1. 即時聚合酶鏈反應器：<u>ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System</u> 或 Roche LightCycler，或同級品。</p> <p>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。</p> <p>2.2.3. 振盪型粉碎機：<u>Retsch MM200</u>，或同級品。</p> <p>2.2.4. 真空乾燥裝置：供 DNA 乾燥用。</p> <p>2.2.5. 高壓滅菌釜。</p> <p>2.2.6. 無菌操作台。</p> <p>2.2.7. 加熱振盪器：具 55℃ 溫控及振盪功能。</p> <p>2.2.8. 微量冷凍離心機(<u>Micro refrigerated centrifuge</u>)：可達 20000 × g，並具 4℃ 溫控功能。</p> <p>2.2.9. 離心機：供各式微量離心管離心用。</p> <p>2.2.10. 分光光度計：具波長 260 nm、280 nm。</p> <p>2.2.11. 冷凍設備：具冷藏及凍結功能。</p> <p>2.2.12. 旋渦混合器(Vortex mixer)。</p> <p>2.2.13. <u>酸鹼度測定儀(pH meter)</u>。</p> <p>2.2.14. 水浴裝置：溫差±1℃以內者。</p> <p>2.2.15. 天平：最大稱重量為 2000 g，靈</p>	<p>1. 適用範圍：本檢驗方法適用於食品中<u>雞肉、雞心、雞肝、雞血、雞蛋</u>等成分之定性檢驗。</p> <p>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></p> <p>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</u> 等實驗過程皆需有區隔空間，避免交叉污染。PCR 試劑之配製應於無菌操作台內進行。</p> <p>2.2. 裝置^(註1)</p> <p>2.2.1. 分光光度計：具波長 260 nm、280 nm。</p> <p>2.2.2. 旋渦混合器(Vortex mixer)。</p> <p>2.2.3. 真空乾燥裝置：供 DNA 乾燥用。</p> <p>2.2.4. <u>真空冷凍乾燥裝置</u>：溫度可達-40℃以下，真空度可達 133 mBar 以下，供檢體乾燥用。</p> <p>2.2.5. 加熱振盪器：具 55℃ 溫控及振盪功能。</p> <p>2.2.6. 微量冷凍離心機：可達 20000 × g，並具 4℃ 溫控功能。</p> <p>2.2.7. 離心機：供各式微量離心管離心用。</p> <p>2.2.8. <u>聚合酶鏈反應器：ABI PRISM 9700 Sequence Detector</u>，或同級品。</p> <p>2.2.9. 即時聚合酶鏈反應器^(註2)：<u>ABI PRISM 7700 Sequence Detector</u> 或 Roche LightCycler，或同級品。</p> <p>2.2.10. <u>電泳槽</u>：供 DNA 電泳用。</p> <p>2.2.11. 振盪型粉碎機。</p> <p>2.2.12. <u>照相裝置</u>：供拍攝電泳膠片用。</p> <p>2.2.13. <u>紫外燈箱</u>：具波長 312 nm、365 nm 紫外燈。</p> <p>2.2.14. 冷凍設備：具冷藏及凍結功能。</p>	<p>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。</p> <p>二、修正鑑別試驗用引子及探針。</p> <p>三、修正對照用物質。</p> <p>四、增列附註二及三。</p> <p>五、增修訂部分文字。</p>

<p>敏度為 0.1 g；最大稱重量為 100 g，靈敏度為 1 mg。</p> <p>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。</p> <p>2.3. 試藥</p> <p>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。</p> <p>2.3.2. <u>Real-time PCR</u> 用^(註2)</p> <p>2.3.2.1. 鑑別試驗用引子及探針</p> <p>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)</p>	<p>2.2.15. 高壓滅菌釜。</p> <p>2.2.16. pH 測定儀。</p> <p>2.2.17. 水浴裝置：溫差±1.0°C 以內者。</p> <p>2.2.18. 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。</p> <p>2.2.19. 無菌操作台。</p> <p>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。</p> <p>註 2：確認試驗用。</p> <p>2.3. 試藥</p> <p>2.3.1. DNA 抽取用：<u>RNase</u>、乙醇(96~100%)均採分子生物分析級試藥，<u>DNeasy[®]Tissue</u> 套組。</p> <p>2.3.2. PCR 用</p> <p>2.3.2.1. 鑑別試驗用引子^(註3)</p> <p>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)</p> <p>引子 F： <u>MYF,5'-TTGTGCAAATCCTGAGACTCAT-3'</u></p> <p>引子 R： <u>MYR,5'-ATACCAGTGCCTGGGTTTCAT-3'</u></p> <p>PCR 增幅產物大小 97 bp</p> <p>2.3.2.1.2. 雞(標的基因：<u>growth hormone</u>)：雞之測試用</p> <p>引子 F： <u>CGHF,5'-TAACTTTTGTAAGCGGACACTCAT-3'</u></p> <p>引子 R： <u>CGHR,5'-GCATTACCTGCGCTGTGGC-3'</u></p> <p>PCR 增幅產物大小 118 bp</p> <p>2.3.2.1.3. 雞(標的基因：<u>12S rRNA</u>)：雞或雞蛋之測試用</p> <p>引子 F： <u>CHIF,5'-GAGTGGCCACATGTTATCTGC-3'</u></p> <p>引子 R： <u>CHIR,5'-TAATCGTTGAGGCTAAGATGG-3'</u></p> <p>PCR 增幅產物大小 108 bp</p> <p>2.3.2.2. 確認試驗用引子及探針^(註4)</p> <p>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)</p>	
---	---	--

<p>引子 F： <u>12SF,5'-CAAACCTGGGATTAGATACCCCACTA-3'</u></p> <p>引子 R： <u>12SR,5'-ATCGRTTMTAGAACAGGCTCCTCTAG-3'</u></p> <p>探針 P： <u>12SP,5'-(FAM)-CACCGCCAAGTCCTTTGRGTTTARGC-(TAMRA)-3'</u></p> <p>PCR 增幅產物大小 <u>155 bp</u></p> <p>2.3.2.1.2. 雞(標的基因：growth hormone)：雞之<u>鑑別用</u></p> <p>引子 F： CGHF,5'-TAACTTTTGTAAGCGGACACTCAT-3'</p> <p>引子 R： CGHR,5'-GCATTACCTGCGCTGTGGC-3'</p> <p>探針 P： CGHP,5'-(FAM)-CCTTCAGGCTTGACAGTGACCTCCAG-(TAMRA)-3'</p> <p>PCR 增幅產物大小 <u>118 bp</u></p> <p>2.1.2.1.3. 雞(標的基因：12S rRNA)：雞或雞蛋之<u>鑑別用</u></p> <p>引子 F： CHIF,5'-GAGTGGCCACATGTTATCTGC-3'</p> <p>引子 R： CHIR,5'-TAATCGTTGAGGCTAAGATGG-3'</p> <p>探針 P： CHIP,5'-(FAM)-AGCCTAAGATCCACCTAAACCCAACCCA-(TAMRA)-3'</p> <p>PCR 增幅產物大小 <u>108 bp</u></p> <p>註 2： 1. <u>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。</u></p> <p>2. <u>內部對照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；M 為混合鹼基代碼(A/C)，表示同時含 A 及 C。</u></p>	<p>引子 F： <u>MYF,5'-TTGTGCAAATCCTGAGACTCAT-3'</u></p> <p>引子 R： <u>MYR,5'-ATACCAGTGCCTGGGTTTCAT-3'</u></p> <p>探針 P： <u>MYP,5'-(FAM)-CCCATGAAAGACGGTACAAGGTATACTG-(TAMRA)-3'</u></p> <p>PCR 增幅產物大小 <u>97 bp</u></p> <p>2.3.2.2.2. 雞(標的基因：growth hormone)：雞之<u>測試用</u></p> <p>引子 F： CGHF,5'-TAACTTTTGTAAGCGGACACTCAT-3'</p> <p>引子 R： CGHR,5'-GCATTACCTGCGCTGTGGC-3'</p> <p>探針 P： CGHP,5'-(FAM)-CCTTCAGGCTTGACAGTGACCTCCAG-(TAMRA)-3'</p> <p>PCR 增幅產物大小 <u>118 bp</u></p> <p>2.3.2.2.3. 雞(標的基因：12S rRNA)：雞或雞蛋之<u>測試用</u></p> <p>引子 F： CHIF,5'-GAGTGGCCACATGTTATCTGC-3'</p> <p>引子 R： CHIR,5'-TAATCGTTGAGGCTAAGATGG-3'</p> <p>探針 P： CHIP,5'-(FAM)-AGCCTAAGATCCACCTAAACCCAACCCA-(TAMRA)-3'</p> <p>PCR 增幅產物大小 <u>108 bp</u></p> <p>註 3：<u>合成之引子，拆封後，以無菌純水稀釋成適當濃度，分裝後置於-20°C 貯存備用。</u></p> <p>註 4：<u>合成之探針，拆封後，以無菌純水稀釋成適當濃度，分裝後置於-20°C 貯存備用，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。</u></p> <p>2.3.2.3. <u>去氧核苷三磷酸 (deoxyribonucleoside triphosphate, dNTP)</u> <u>含去氧腺苷三磷酸 (deoxyadenosine triphosphate, dATP)，去氧胞苷三磷酸 (deoxycytidine triphosphate, dCTP)，去氧鳥糞嘌呤三磷酸 (deoxyguanosine</u></p>	
---	---	--

<p>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。</p> <p>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> 所需去氧核糖核苷三磷酸、聚合酶等，且內附 <u>25 mM 氯化鎂溶液</u>，使用時添加引子、探針及待測檢體 DNA。</p> <p>2.3.3. <u>對照用物質：雞肉或使用衛生福利部食品藥物管理署提供編號 S202 之參考質體作為對照用物質。</u></p> <p>2.4. 器具及材料^(註 3)</p> <p>2.4.1. <u>吸管(Pipette)：10 μL、20 μL、100 μL、200 μL 及 1000 μL。</u></p> <p>2.4.2. <u>吸管尖頭(Pipette tips)：10 μL、20 μL、200 μL 及 1000 μL。</u></p> <p>2.4.3. <u>離心管：200 μL、600 μL、1.5 mL 及 2 mL。</u></p> <p>2.4.4. <u>PCR 反應管：200 μL。</u></p>	<p><u>triphosphate, dGTP)及去氧胸苷三磷酸(deoxythymidine triphosphate, dTTP)各 2.5 mM 之溶液。</u></p> <p>2.3.2.4. <u>聚合酶 Taq DNA polymerase (2U/μL)。</u></p> <p>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 所需去氧核糖三磷酸、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。</p> <p>2.3.2.6. <u>LightCycler_ FastStart DNA Master Hybridization Probes (確認試驗用，適用於 Roche LightCycler)</u> 內含 PCR 所需去氧核糖三磷酸、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。</p> <p>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，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。</u></p> <p>2.3.4. <u>對照用物質：雞肉、雞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 pIDM2 之參考質體作為對照用物質。</u></p> <p>2.4. 器具及材料^(註 4)</p> <p>2.4.1. <u>吸管(Pipette)：10 μL、20 μL、100 μL、200 μL 及 1000 μL。</u></p> <p>2.4.2. <u>電泳膠片製作盤。</u></p> <p>2.4.3. <u>吸管尖頭(Pipette tips)：10 μL、20 μL、200 μL 及 1000 μL。</u></p> <p>2.4.4. <u>離心管：200 μL、600 μL、1.5 mL 及 2 mL。</u></p>	
---	---	--

- 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. Real-time PCR 溶液之配製^(註4)

- 2.4.5. PCR 反應管：200 μ L 及 500 μ L。
- 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。
- 2.4.8. 塑膠離心管：50 mL。
- 2.4.9. 過濾膜：孔徑為 0.45 μ m，材質為 nitro-cellulose。

註 5：使用之塑膠或玻璃器皿均為無 DNase 污染。

註 6：儀器使用 RocheLightCycler[®] 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 0.5M 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 $^{\circ}$ 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 μ 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7)

2.5.5.1. 鑑別試驗用

<u>10 倍 PCR 緩衝溶液(含 15 mM MgCl₂)</u>	<u>2.5 μL</u>
<u>Taq DNA polymerase (2 U/μL)</u>	<u>1.0 μL</u>
<u>2.5 mM dNTP</u>	<u>4.0 μL</u>
<u>10 μM 引子 F</u>	<u>1.0 μL</u>

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

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

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

2.5.5.2. 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 Hybridization	2.0 μL
25 mM MgCl ₂	2.4 μL
模版 DNA 溶液(總量 100 ng)	5.0 μL
無菌純水	6.1 μL
總體積	20.0 μL

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者，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

凍保存。

mL 離心管。

- 2.6.2.2. 加入 ATL 試劑 180 μ L 以及 proteinase K 20 μ L，以旋渦混合器混合均勻。
- 2.6.2.3. 於 55 $^{\circ}$ C 振盪反應直到檢體溶解。
- 2.6.2.4. 加入 AL 試劑 200 μ L，以旋渦混合器混合均勻。
- 2.6.2.5. 水浴 70 $^{\circ}$ C，10 分鐘。
- 2.6.2.6. 加入乙醇(96~100%) 200 μ L，以旋渦混合器混合均勻。
- 2.6.2.7. 取混合液注入離心管柱，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. 將離心管柱套入新的收集管，注入 AW1 試劑 500 μ L 到離心管柱，以 $\geq 6,000 \times g$ (8,000 rpm)離心 1 分鐘後，將收集管及濾液丟棄。
- 2.6.2.9. 將離心管柱套入新的收集管，注入 AW2 試劑 500 μ L 到離心管柱，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. 將離心管柱套入新的 1.5 mL 離心管。
- 2.6.2.11. 加入 AE 試劑 100 μ L 至離心管柱，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。
- 2.6.2.12. 將溶出液(約 200 μ L)收集至已滅菌之 1.5 mL 離心管，為萃取 DNA 原液。
- 2.6.2.13. 依 2.6.3.2.節測量 DNA 濃度並記錄後，置於-20 $^{\circ}$ C 冷凍保存。
- 註 8:抽取脾臟等含細胞數量眾多的組織 DNA，稱取量不可超過 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) 4 μ L，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

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

2.6.3. DNA 濃度測定及純度判斷

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。

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。

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.)。計算 DNA 濃度係以 O.D.₂₆₀ 吸光值乘 50 ng/μL 即為 DNA 溶液濃度。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9)

2.7.1. PCR 操作步驟

以無菌純水適當稀釋 DNA 溶液、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		
測試雞基因	60°C	30 sec
測試哺乳類及家禽類基因	54°C	30 sec
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

2.7.4.1. 雞之測試：

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 118 bp 者，即判定該檢體含有雞成分。

2.7.4.2. 雞或雞蛋之測試：

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 108 bp 者，即判定該檢體含有雞成分或雞蛋成分。

註 9：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。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，當使用其他機型時，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. RT-PCR 操作步驟

2.8.1.1. RT-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 (1,500 rpm) 瞬間離心，移入 RT-PCR 反應器，依下列條件

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 µL 於玻璃毛細管中，各別加入檢體 DNA 溶液 5 µL，再將毛細管置於離心機中，以 800 × 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. 雞之測試：

檢體 DNA 之 real-time PCR 增幅產物螢

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		
<u>測試雞基因</u>	60°C	1 min
<u>測試哺乳類及家禽類基因</u>	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. RT-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 µL 於玻璃毛細管中，再各別加入稀釋過之檢體 DNA 5 µL，最後將毛細管置於離心機中，以 800 × g (3,000 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>測試雞基因</u>	60°C	25sec
<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. 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

2.8.3.1. 雞之測試：

檢體 DNA 之 PCR 增幅產物螢光分析圖

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 增幅產物為雞之基因片段，可確認該檢體中含有雞成分。

2.7.3.2. 雞或雞蛋之測試：

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 增幅產物為雞或雞蛋之基因片段，可確認該檢體中含有雞或雞蛋成分。

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。

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 增幅產物為該測試雞之基因片段，可確認該檢體中含有雞成分。

2.8.3.2. 雞或雞蛋之測試：

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 增幅產物為雞或雞蛋之基因片段，可確認該檢體中含有雞成分或雞蛋成分。

附註：

1. 本檢驗方法最低檢測濃度為 0.1%(以乾重計)。
2. 本檢驗方法之測試範圍係指能夠抽取出 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。