ISSN 0255-6162 GPN 2006900031

藥物食品簡訊 月刊

全球關懷 第 287 期
日期：民國 93 年 11 月 20 日

發行人：孫慈悌 出版者：行政院衛生署藥物食品檢驗局 地址：臺北市南港區昆陽街 161-2 號
電話：（02）26531318 網址：http://www.nlfd.gov.tw

本局「基因改造食品檢驗系統之建立」

獲得行政院傑出研究獎特優獎第一名

92 年度行政院傑出研究獎獲獎報告於 93 年 10 月 13 日上午 8 時 20 分假行政院大禮堂舉行頒獎典禮，本局 92 年度計畫研究報告「基因改造食品檢驗系統之建立」獲得特優獎第一名，該計畫由第五組之 GMO 小組人員執行，是日獲獎人員莫不歡欣鼓舞，前往參加頒獎典禮及領取獎牌及獎金。行政院研考會自 62 年度起即辦理各機關研究發展優良報告綜合評獎，至 79 年度始改稱為「行政院傑出研究獎」，鼓勵行政院各級機關從事研究發展工作。評選作業方式係以行政院所屬各機關該年度函送研考會備查之研究計畫項目為限，經機關自行評選，擇優推薦，續送行政院研考會組設評審委員會，歷經初評、分組複評及總複評等 3 階段作業，最後經評審委員會議慎重評審後決議選出獲獎報告。92 年度共有 3310 篇研究報告，經 27 個機關各自評審推薦其中 69 篇優良研究報告參加評獎，經激烈競爭與慎重評審，最後計有 21 篇獲獎，包括特優獎 2 篇，優等獎 7 篇及甲等獎 12 篇。衛生署自 79 年度「行政院傑出研究獎」創設以來，今年首次獲得特優獎，本局研究報告能夠代表衛生署，過關斬將，拔得頭籌，充分肯定本局同仁之努力與研究精神，亦如署長於頒獎當日之鼓勵：你們是衛生署的驕傲。

謹就本研究報告內容介紹如下：

基因改造食品檢驗系統之建立

研究人員：施養志 闕麗卿 林旭陽 林澤揚 吳宗熹 謝佩君 陳育志
吳孟鄉 崔秀煒 李信興 林世昱 李衛宗 陳曉錚 李春賢

一、研究緣起與目的

近年來，全球基因改造技術急遽進展，尤以許多抗病蟲害、耐除草劑之基因改造作物已成功開發，並已大量推廣於田間栽培。至 92 年全球允許上市之基因改造產品已餘 90 種。台灣目前市面出現之基因改造產品以進口基因改造大豆及玉米為主，至於國產基因改造產品尚未核准量產。本署負責國內基因改造食品查驗登記與標示，標示制度採自願與強制標示並行，自願標示於 90 年實施，強制標示則於 92 年起依產品加工程度分三年三階段施行。至 92 年共有 11 件國外基因改造產品向衛生署辦理查驗登記。本署藥物食品檢驗局負責基因改造食品之查驗登記鑑別檢驗、檢驗方法開發及市場監測調查等業務。有鑑於此，本研究擬配合本局任務需求，建立一符合國際規範之基因改造食品檢驗系統，內容涵蓋檢驗方法開發、評估、測試與推展，如實驗室間共同試驗(collaborative study)及精準度測試等，另，包括市場及港口監測調查、資料庫之建立，同時建置基因改造食品網站及發行平面出版品、申請參考質體與檢驗方法專利等多項工作。本研究計畫納入「農業生物科技挑戰 2008 國發計畫」。

二、研究方法與過程

(一) 檢驗方法開發：包括參考物質之取得、殖入基因之定序及比對分析、定性或定量 PCR 引子與探針之設計與測試、參考質體之構築、內標比之決定及定量參考標準物質之測試等。

(二) 檢驗方法之評估、測試與推展：

1. 舉辦國內基因改造大豆及玉米檢驗方法實驗室間共同試驗(collaborative study)。
2. 參加 92 年由美國 USDA/GIPSA 舉辦之國際性基因改造玉米及大豆定量精準度試驗。
3. 參加日本「農林水產省獨立行政法人食品總和研究所」舉辦之基因改造大豆及玉米定量檢驗方法實驗室間共同試驗。

(三) 市場監測調查：共計 408 件，包括大豆及玉米等產品 263 件，木瓜、蕃茄及馬鈴薯等產品 145 件。

(四) 港口監測調查：抽驗八船裝載進口玉米貨輪之玉米粒檢體，共計 18 件。

(五) 殖入基因資料庫之建立：分析與建立基因改造大豆及玉米共 12 種轉殖品系之殖入基因資料庫。

(六)建置基因改造食品網站及發行平面出版品三種, 以加強宣導及民眾教育。

(七)申請參考質體與檢驗方法專利一件。

三、研究發現與建議

(一) 研究發現

1.開發基因改造食品檢驗方法－共計十種，(本局技術性突破，開發出二種基因改造玉米轉殖品系專一性檢驗方法)。

包括基因改造玉米定性三種(MON863、DBT418 及 DLL25)、定量三種(MON863、NK603 及 TC1507)及轉殖品系專一性(event-specific)二種(T25 及 TC1507)；基因改造木瓜定性一種及基因改造大豆轉殖品系專一性一種(RRS)。

2.參考質體之構築、確認與測試－共計八種

構築供定性及定量檢測用之基因改造玉米及基因改造大豆參考質體，包括：

(1)第一套單一參考質體六種：涵蓋二種檢測用基因片段。

(2)第二套多重參考質體一種：涵蓋九種檢測用基因片段：35S、Event176、MON810、GA21、Bt11、T25、NK603、TC1507及HMG。

(3)第三套多重參考質體一種：涵蓋五種檢測用基因片段：35S、MON863、NK603、TC1507及HMG。

前述構築之參考質體並完成確認與品系測試，測試之 real-time PCR 機型包括 ABI7000 及 ABI7700 二種。

3.自行構築參考質體，解決缺乏標準物質問題。

構築之參考質體可作為定性或定量參考標準物質，解決缺乏標準物質問題。同時，該參考質體擬公開提供給相關單位。

4.申請專利一件「玉米檢測用之參考質體及方法」。

5.評估、測試與推展檢驗方法

(1)舉辦國內基因改造大豆及玉米檢驗方法實驗室間共同試驗(collaborative study)，自 92 年 4 月至 7 月止分 3 階段，針對本局實驗室 91 年度自行研發之基因改造大豆 1 種及玉米 5 種轉殖品系之定性與定量檢驗方法，由台灣大學、經濟部標準檢驗局、食品工業發展研究所等 8 間實驗室參加，以測試及評估方法之準確性。

(2)採用本研究發展方法參加美國農部GIPSA舉辦之三次國際性精準度定量測試，結果皆獲得優良成績，充分肯定本方法之適用性。

(3)參加日本「農林水產省獨立行政法人食品總和研究所」舉辦之基因改造大豆及玉米定量檢驗方法實驗室間共同試驗。

6.基因改造大豆及玉米之市場監測調查(92 年)，推測玉米原料廠商開始實施源頭管制。

92 年下半年針對市售含黃豆、玉米食品是否標示有「非基因改造」、「基因改造」或未特別標示者進行調查，在所調查之 230 件產品中標示有「非基因改造」之產品有 191 件、標示有「基因改造」者有 15 件，及未特別標示者有 24 件。結果發現共有 101 件產品標示不符合規定，其中最常遇到之情形為將與基因改造無關之產品標示為「非基因改造」(50 件)，以及日文標示未翻譯成中文(38 件)。不符合規定之原因詳細分析如下：

(1)應標示而未標示(12 件)：依據衛生署 90.2.22 公布之基因改造黃豆及基因改造玉米為原料之食品標示規定，以基因改造黃豆及基因改造玉米為原料，且該等原料佔最終產品總重量百分之五以上之食品，應標示「基因改造」或「含基因改造」字樣。

(2)標示非基因改造但屬易生誤解(50 件)：係為目前尚無商業化該等基因改造產品，有誤導消費者之疑，同時亦不屬事實呈述，如標示「非基因改造咖啡」、「非基因改造葡萄」等。

(3)未以中文標示非基因改造(38 件)：雖有標示日文「遺傳子組換」等文字，但未譯成中文。因日本對基因改造食品之自願標示規定與我國相同，因此日文未作翻譯之行為與消費者保護法第 24 條規定輸入商品標示不得較原產地標示簡略不符。

至於最後一件不符合規定之原因是該玉米粒產品並非基因改造而業者誤標示為基因改造。此外，尚有部分產品之標示文字不完全正確，譬如業者標示「非基因」或「無基因」，雖然屬於一般口語，但由於生物都具有基因，故應加上「改造」兩字才屬正確之表達方式。衛生署已將上述不符合規定產品分別函請各縣市衛生局進行稽查與輔導，並已於 2 月 19 日於藥物食品檢驗局舉辦「基因改造食品標示與管理說明會」，分別就「基因改造食品之管理法規」、「違規標示實例與說明」等主題進行說明，與廠商業者及衛生局同仁進行問題討論與溝通，以期加速落實基因改造食品標示制度。

7.基因改造木瓜、蕃茄及馬鈴薯之市場監測調查(92年)，檢出未經查驗登記核可之基因改造木瓜。

92年8至11月間抽驗市售木瓜、蕃茄、馬鈴薯及其加工產品145件，檢出7件生鮮木瓜果實屬基因改造木瓜。

8.基因改造玉米之港口監測調查

92 年 10 月至 12 月間針對進口之裝載玉米貨輪進行採樣調查，證實自美國輸入台灣之玉米原料可檢出十種轉殖品系基因改造玉米，其中以 MON810 品系為主，NK603 品系次之，已停產之轉殖品系 DBT418 及 Event176 仍可檢出，而於 92 年在美國開始商業化試

種之新品系 MON863 及 TC1507 出現在 92 年 10－12 月間進口到台灣之玉米原料中，同時亦發現進口玉米原料可檢出 MON810×NK603 混合型(stacked trait hybrid)轉殖品系基因改造玉米。

(二) 研究建議

1. 自行設計之定量 PCR 引子、探針與構築之參考質體，擬提供相關單位或業界參考，並擬訂國內基因改造食品檢驗方法。

GMO 涉及智慧財產，發展檢驗方法最困難二點為參考品之取得不易及殖入基因資訊不足，本研究擬提供發展出方法與參考標準質體供相關單位或業界參考，並擬訂國內基因改造食品檢驗方法。

2. 積極推展與公開已建立之基因改造食品相關檢驗方法，並以此基礎，推展至其他類別檢驗方法。

持續舉辦藥檢局已開發出之 GMO 檢驗方法實驗室間共同試驗(collaborative study)，確定檢驗方法之可行性。同時，本局 GMO 檢驗方法建立之國內實驗室間共同試驗模式，應可擴及至其他類別檢驗方法。

3. 持續參加國際性精準度測試及 collaborative study，提昇技術能力。

藥檢局除積極推展自行開發方法，應繼續參加國際性精準度測試及 collaborative study，提昇技術能力，而且參加國際性精準度測試可同時初步測試藥檢局自行研發方法之適用性。

4. 持續進行基因改造食品之市場監測調查，並辦理基因改造食品標示與管理說明會，與食品業者及民眾進行溝通與交流。

配合基因改造食品強制標示制度施行，持續進行基因改造食品之市場監測調查，包括標示與檢驗二部份，而檢驗則同時涵蓋定性與定量二種，定性檢驗針對未向我國衛生署申請查驗登記之基因改造食品，尤其特別著重安全性有疑慮之產品，如星連基因改造玉米(StarLink)。定量檢驗為針對已通過我國查驗登記之品項。最後調查結果擬提報衛生管理單位，進行後續處理。

5. 基因改造食品新工作領域之擴展。

工作領域除涵蓋原有基因改造食品檢驗方法之開發項目，擬探討混合型品系及基因晶片等檢驗方法之開發，並擴及至食品安全議題等相關研究。

6. 持續新檢驗方法之開發。

新轉殖品系 GMO 每年皆有新產品商業化核准量產，就基因改造玉米一項，至目前累積轉殖品系已餘 20 種，惟仍持續增加中。同時，未來其他 GMO，包括國內外，如稻米、小麥等亦將陸續出現，因此必須持續新檢驗方法之開發。

7. 基因改造食品之源頭管制。

GMO 產品種類繁多，如玉米有 21 種，加上混合型(stacked trait hybrid)品系問題及 GMO 產品之殖入基因序列資訊不足等，以上諸點皆構成檢測上之困難，建議基因改造食品之管理應採源頭管制。

8. **持續建構政府檢驗實驗室技術能力，以作為台灣國際經貿談判之技術支援，並加強國際間合作。**

本研究開發之參考質體，於 92 年台美諮商會議中，美國農業部 GIPSA 人員對此參考質體深感興趣。另，本局藉由參加國際性基因改造食品精準度測試之成績，讓美國瞭解台灣之技術能力。

9. **建立符合國際規範之 GMO 檢驗實驗室。**

本局 GMO 檢驗實驗室在過去二年間，陸續有國內外相關機構要求參觀訪問，包括韓國、大陸、香港及美國等公私機構，因此本局應積極尋求經費支援，規劃設立一符合國際規範之 GMO 檢驗實驗室。

10. **建立之檢驗方法與參考質體應持續進行專利申請，並尋求商業化之可行性，以增加政府財源。**

11. **持續增修基因改造食品網站內容及發行平面出版品，以加強宣導及教育民眾。**

超市包裝場蔬果殘留農藥監測結果出爐

超級市場及量販店所陳售之蔬果農藥殘留問題，向為消費者及衛生單位所關切。為監測超級市場及量販店是否建立進貨檢驗之自主管理措施，本局特別安排於五月十三日、八月十九日及十月二十七日進行三次超市包裝場蔬果殘留農藥監測。針對北、中、南、東四區共 44 家蔬果包裝場，抽樣蔬菜類 93 件，水果類 13 件，連夜不眠不休進行蔬果殘留農藥檢驗，結果於十月二十七日執行第三次監測之蔬果中有 1 件空心菜檢體檢出農藥亞素靈（monocrotophos）0.40 ppm，與規定不符，其餘 105 件蔬果均符合規定。

蔬果農藥殘留問題，上市前由農政單位作田間農藥殘留監測，上市後則由各衛生局在傳統市場及超級市場抽樣檢驗。歷年各衛生局每年約抽樣 1300 餘件，送至本局檢驗，其合格率大約為 99%。此種例行之全面抽驗，耗費甚多之檢驗資源。大都會區居民至超級市場及量販店購買包裝蔬果之機會大增，而其貨源皆來自包裝場，基於源頭管制之原則，並加強業者自主管理之責任，本局在原有之農藥殘留檢驗工作之外，再特別安排針對超市包裝場，進行蔬果殘留農藥監測之工作計畫。

今年三月起，由各衛生局及農政單位所組成之稽查小組至其轄區超市包裝場了解業者自主檢驗情形，進行稽查輔導，促使業者落實

自主管理，並將包裝場品管等級分成三級，進貨蔬果已作自主檢驗者為第一級，進貨蔬果未作自主檢驗，但有認證標誌者為第二級，進貨蔬果未作自主檢驗亦未經認證者為第三級。執行監測時，稽查小組至其轄區超市包裝場以第三級之業者為優先採樣對象，並於當天下午五時前送達本局，本局檢驗人員連夜趕工，於次日清晨八時前完成檢驗，隨即將結果以傳真方式分送相關之縣市稽查小組、包裝場及超級市場。不合格之蔬果，已上架者須立即下架，未上架者則不得上架，包裝場未出貨者則不得出貨，同時稽查小組人員會分赴包裝場、超級市場及產地，監督下架、停止販售之情形，並對不願配合之業者，依食品衛生管理法第三十五條罰則處以 3 萬元之罰鍰，以促使超級市場及量販店業者提高警覺，確實做好保護消費者健康之工作。

本年度於五月十三日、八月十九日及十月二十七日進行三次監測，至 44 家包裝場，抽驗蔬果檢體 106 件，包括蔬菜類 93 件及水果類 13 件，檢驗結果有 1 件小葉菜類與規定不符，其餘蔬果均與規定相符。經檢驗結果與規定不符之空心菜檢體檢出農藥亞素靈 0.40 ppm，依規定該農藥不得使用於空心菜，該檢體係由屏東縣衛生局採自陳林娥包裝場（屏東縣新園鄉五房村五房路 403 巷 40 號），其所供應之超級市場為高雄市紅歡大賣場（高雄市小港區）。檢驗結果已傳真方式分送屏東縣稽查小組、包裝場及超級市場，同時稽查小組人員分赴包裝場、超級市場及產地，監督下架、停止販售，並依法處辦。陳林娥包裝場係屬第三級優先採樣對象，顯示仍有部分超市包裝場未落實自主管理，今後衛生單位將聯合農業單位，更加強對第三級包裝場稽查輔導，進而抽驗監測，促使業者提升水準。

實驗室認証對食品衛生檢驗複驗案件之加持

林淑娟　　台中縣衛生局

台中縣衛生局（以下簡稱本局）在 91 年的年節食品抽驗中，檢驗出某廠商之魷魚絲產品（密封且包裝完整）含超量防腐劑－己二烯酸（含量 1.05g/kg，規定量 0.05g/kg），檢驗結果發佈後，業者依食品衛生管理法規定申請複驗。以下簡要介紹處理之經過供同仁卓參。

本局檢驗課之食品中防腐劑檢驗項目之認證，早經中華民國檢驗室認證體系（CNLA）於 90 年 12 月現場評鑑，而於 91 年 2 月 1 日通過認證。故在 91 年的年節食品抽驗當中，檢驗過程均依照品質手冊規定實施，其中包括有空白、重複、添加、查核等品質管制檢驗項目。由於該廠商質疑本局檢驗結果，於 91 年 2 月 22 日申請複驗函中指出：該公司、該批號產品製程及產品出廠時檢驗皆符合規定，且該公司在配方中並未添加苯甲酸，己二烯酸也未超出規定量 0.05g/kg，對此懷疑有誤測樣品之嫌，或是操作時儀器本身之誤差所致。該公司據此依據食品衛生法第二十九條之一，請求複驗該檢體，其複驗費用由該公司支付。

本局於收到申請函後，即受理複驗。依據 90、1、9 衛署食字第 0900002652 號公告（CNS 10949 N 6190）檢驗方法，就剩餘檢體進行複驗，並依品保規定同時作空白、重複、添加、查核等檢驗。檢驗結果，品管項目皆符合管制範圍，而己二烯酸檢出量為 1.03g/kg、苯甲酸為 0.03g/kg。本局將檢驗結果函覆該廠商，同時並以電話解釋本局之品管規定及該檢體之檢驗流程。

由此案例可知，在執行公權力時，如有公信力來做後盾，對保障民眾健康之檢驗受肯定，品質將更有保證。這也是本局積極申請檢驗認證之目的。因此，本局今（93）年再增加並通過硼砂、亞硝酸鹽、過氧化氫認證。

食品中動物性成分－豬、牛、羊、鹿、馬或袋鼠之定性檢驗

闕麗卿

開發食品攙僞之鑑別檢驗方法主要是因應各種需求，如近年來因爲狂牛症繼歐洲發生之後，亦陸陸續續於世界其他各地相繼爆發，如日本、加拿大、美國等國。因此，目前發展出很多鑑別牛物種之檢驗方法，以應用於日常檢驗所需，如飼料是否含牛骨粉、牛肉等。其次，因宗教理由，如回教徒之檢測肉品中是否含豬肉成分，素食者及宗教人士用以檢驗食品是否含肉類成分。食品攙僞之另一主要動機爲不肖業者或人士爲謀取暴利，利用一般民眾選便宜的心態，將低價格食品混充加入高價格食品出售，以獲取較大利潤。例如在日本發生的松板公牛肉攙入價格昂貴的松板母牛肉，高品質越光米被廠商混雜或甚至以便宜的米冒充，及歐洲鴨肝冒充鵝肝、冷凍魚排之混假等案例。在國內，日前法務部調查局發佈完成野生動物基因圖庫，意外發現市售冷凍牛肉混充袋鼠肉及海龜肉，另外，亦曾經利用粒線體 DNA 序列分析技術，檢測出市售牛肉乾中有以豬肉混充之情形，或以馬肉、鴕鳥肉頂替之現象，而且國內過去亦曾多次發生香魚片中毒事件，皆必須靠檢驗以保護消費者，並提供食品標示是否屬實之參考。除此之外，防止保育類動物之走私與保護，同樣也必須依賴物種鑑別檢驗，以作爲判別之依據。

一般而言，以往鑑別物種之方法主要是運用外表型態學、蛋白質方法：如單向蛋白質電泳、免疫血清學抗原抗體試驗、及化學方法：如高效液相層析(HPLC)等分析方法進行，然而動物檢體因加工等過程而蛋白質產生變性，除無法依外形鑑別外，鑑別物種更是困難。近幾年來由於分子生物技術之進步，只要能從微量檢體抽取出 DNA，即能有效運用 DNA 爲基礎之相關檢測技術，解決上述問題。以 DNA 爲基礎之方法包括幾種，如 DNA hybridization、PCR product sequencing：如鮪魚之鑑別，PCR-restriction

fragment length polymorphism (PCR-RFLP)：如豬、牛及羊之鑑別及河豚、冷凍魚排之鑑別，species-specific primers PCR：如豬、牛、羊、雞及馬之鑑別，PCR-SSCP：如魚之鑑別， random amplified polymorphic DNA (RAPDs)：如蚌類及家禽類之鑑別，real-time PCR：如運用 TaqMan 探針系統之 real-time PCR 以檢測牛肉製品，基因晶片等，其中 real-time PCR 是最近幾年才發展之新技術，發表文獻不多，而 PCR product sequencing 及 PCR-RFLP 方法是目前最常用之方法。

從前述鑑別檢驗方法之簡便、快速及實用需求考慮，本局第五組 GMO 小組自 92 年 8 月起，進行食品中動物性成分 PCR 及 real-time PCR 檢驗方法之開發，以快速鑑別肉品物種－牛、豬、馬、羊、鹿及袋鼠。茲將本檢驗方法之適用範圍、原理及步驟詳述如下：

壹、食品中動物性成分檢驗方法—豬成分之定性檢驗

一、 適用範圍：本檢驗方法適用於食品中豬肉、豬心、豬肝等組織器官、豬血或其他製品之定性檢驗。

二、 原理：聚合酶鏈反應(Polymerase chain reaction, PCR)。

三、 檢驗方法

(一) 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 PCR 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。

(二) 裝置[註 1)]

1. 分光光度計：具波長 260 nm、280 nm。
2. 旋渦混合器(Vortex mixer)。
3. 真空乾燥裝置：供 DNA 乾燥用。
4. 加熱振盪器：具 55℃溫控及振盪功能。
5. 微量冷凍離心機：可達 20,000 × g ，並具 4℃溫控功能。
6. 離心機：供各式離心管離心用。
7. 聚合酶鏈反應器：ABI PRISM 9700 Sequence Detector，或同級品。
8. 即時聚合酶鏈反應器[註 2)]：ABI PRISM 7700 Sequence Detector 或~~、~~Roche LightCycler，或同級品。
9. 電泳槽：供 DNA 電泳用。
10. 振盪型粉碎機。
11. 照相裝置：供拍攝電泳膠片用。
12. 紫外燈箱：具波長 312 nm、365 nm 紫外燈。
13. 冷凍設備：具冷藏及凍結功能。
14. 高壓滅菌釜。
15. pH 測定儀。
16. 水浴裝置：溫差~~在+≦~~1.0℃以內者。

17. 天平：最大秤重量爲 2,000 g，靈敏度爲 0.1 g；最大秤重量爲 100 g，靈敏度爲 1 mg。
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爲同類產品中最好者；反之，未使用或提及之產品品牌亦不代表爲同類產品中較差者。

註 2： 確認試驗用。

(三) 試藥

1. DNA 抽取用：RNase、乙醇 (96-100%)均採分子生物分析級試藥，DNeasy®Tissue 套組。
2. 聚合酶鏈反應(PCR)用
   (1) 鑑別試驗用引子(註 3)
      i 哺乳類及家禽類 (標的基因：myostatin，供作內部對照基因)
      引子 F：MYF，5′-TTGTGCAAATCCTGAGACTCAT-3′
      引子 R：MYR，5′-ATACCAGTGCCTGGGTTCAT-3′
      PCR 增幅產物大小 97 bp

      ii 豬 (標的基因：growth hormone)
      引子 F：SWF，5′-TCAGTTTACACTCACCTGATAGCATCT-3′
      引子 R：SWR，5′- GGGTGGTGGAGAGGGGTGAATT-3′
      PCR 增幅產物大小 108 bp

   (2) 確認試驗用引子及探針(註 4)
      i 哺乳類及家禽類 (標的基因：myostatin，供作內部對照基因)
      引子 F：MYF，5′-TTGTGCAAATCCTGAGACTCAT-3′
      引子 R：MYR，5′-ATACCAGTGCCTGGGTTCAT-3′
      探針 P：MYP，5′-(FAM)-CCCATGAAAGACGGTACAAGGTATACTG-(TAMRA)-3′
      PCR 增幅產物大小 97 bp

      ii 豬 (標的基因：growth hormone)
      引子 F：SWF，5′-TCAGTTTACACTCACCTGATAGCATCT-3′
      引子 R：SWR，5′- GGGTGGTGGAGAGGGGTGAATT-3′
      探針 P：SWP，5′-(FAM)-CCTCAATACTCCAGAACCCCTCATTTTCCTC-(TAMRA)-3′
      PCR 增幅產物大小 108 bp

註 3： 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℃貯存備用。

註 4： 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℃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。

(3) 去氧核苷三磷酸 (deoxyribonucleotside triphosphate, dNTP)
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。

(4) 聚合酶
Taq DNA polymerase (2 U/μL)，或同級品。

(5) TaqMan Universal PCR Master Mix (確認試驗用，適用於 ABI PRISM 7700)
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。

(6) LightCycler-FastStart DNA Master Hybridization Probes (確認試驗用，適用於 Roche LightCycler)
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。

3. 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)、乙二銨四乙酸二鈉(ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt, Na_2-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。

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 之參考質體作爲對照用物質。

(四) 器具及材料[註 5)]

1. 吸管(Pipette)：10 μL、20 μL、100 μL、200 μL 及 1000 μL。
2. 電泳膠片製作盤。
3. 吸管尖頭(Pipette tips)：10 μL、20 μL、200 μL 及 1000 μL。
4. 離心管：200 μL 、600 μL、1.5 mL 及 2 mL 。
5. PCR 反應管：200 μL 及 500 μL。

6. PCR 玻璃毛細管(註 6)：Roche LightCycler 專用。
7. 玻璃或塑膠瓶：50 mL、100 mL、250 mL、500 mL、1000 mL 及 2000 mL。
8. 塑膠離心管：50 mL。
9. 過濾膜：孔徑爲 0.45 μm，材質爲 nitro-cellulose。

註 5： 使用之塑膠或玻璃器皿均爲無 DNase 污染。

註 6： 儀器使用 Roche LightCycler 時，才需使用。

(五) 試劑之配製

1. 5 倍 TBE (Tris-borate-EDTA) 緩衝溶液

   稱取三羥甲基氨基甲烷 54.0 g、硼酸 27.5 g 及 0.5 M pH 8.0 EDTA 溶液 20~~.0~~ mL，加水溶解後定容至 1000 mL，供作 5 倍 TBE 緩衝溶液。臨用前以水稀釋爲 0.5 倍。

2. 2%膠片

   稱取瓊膠 2.0 g，加入 0.5 倍 TBE 緩衝溶液 100~~.0~~ 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。

3. 6 倍載入膠片緩衝溶液(6 × gel loading buffer)

   稱取溴酚藍 25.0 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℃冰箱貯存備用。

4. 膠片染液

   稱取溴化乙錠 0.1 g，加水 10~~.0~~ 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 μg/mL。溴化乙錠爲致癌物質，配製時應注意安全。

5. PCR 溶液(註 7)

(1) 鑑別試驗用

10 倍 PCR 緩衝溶液 (含 15 mM $MgCl_2$) 2.5

Taq DNA polymerase (2 U/μL) 1.0

2.5 mM dNTP 4.0

10 μM 引子 F 1.0

10 μM 引子 R 1.0

模版 DNA 溶液 (總量 100 ng) 5.0

無菌純水.....10.5

總體積……..……..……....25.0 μL

(2) ABI PRISM 7700 Sequence Detector 確認試驗用

5 μM 引子 F.....1.25

5 μM 引子 R.....1.25

3.3 μM 探針 P.....1.7

TaqMan Universal PCR Master Mix.....12.5

模版 DNA 溶液 (總量 100 ng) 5.0

無菌純水.....….3.3

總體積……..

25.0 μL

(3) Roche LightCycler 確認試驗用

5 μM 引子 F.....1.5

5 μM 引子 R.....1.5

3.3 μM 探針 P.....1.5

LightCycler-FastStart DNA Master Hybridization Probes 2.0

25 mM $MgCl_2$ 溶液.....2.4

模版 DNA 溶液 (總量 100 ng) 5.0

無菌純水.....….6.1

總體積……..……..…….. 20.0 μL

註 7： PCR 溶液應置於冰浴中配製。

(六) 檢體 DNA 之製備

1. 檢體之處理

檢體爲乾燥肉乾或粉(碎)狀者，可直接以粉碎機研磨成細粉。檢體爲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. 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。

(1) 稱取檢體約 25 mg (註 8)，置入 2 mL 離心管。
(2) 加入 ATL 試劑 180 µL 以及 proteinase K 20 µL，以旋渦混合器混合均勻。
(3) 於 55℃振盪反應直到檢體溶解。
(4) 加入 AL 試劑 200 µL，以旋渦混合器混合均勻。
(5) 水浴 70℃，10 分鐘。
(6) 加入乙醇(96-100%) 200 µL，以旋渦混合器混合均勻。
(7) 取混合液注入離心管柱，以≥6,000 × g (8,000 rpm) 離心 1 分鐘，並將收集管及濾液丟棄。
(8) 將離心管柱套入新的收集管，注入 AW1 試劑 500 µL 到離心管柱，以≥6,000 × g (8,000 rpm) 離心 1 分鐘後，將收集管及濾液丟棄。
(9) 將離心管柱套入新的收集管，注入 AW2 試劑 500 µL 到離心管柱，以 20,000 × g (14,000 rpm) 離心 3 分鐘後，將收集管及濾液丟棄。
(10) 將離心管柱套入新的 1.5 mL 離心管。
(11) 加入 AE 試劑 100 µL 至離心管柱，於室溫下靜置 1 分鐘後，再以≥6,000 × g (8,000 rpm) 離心 1 分鐘。
(12) 再加入 AE 試劑 100 µL，於室溫下靜置 1 分鐘後，再以≥6,000 × g (8,000 rpm) 離心 1 分鐘。
(13) 將溶出液（約 200 μL）收集至已滅菌之 1.5 mL 離心管，爲萃取 DNA 原液。
(14) 依(六)3.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，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(六).2.(4).之後加入 RNase (100 mg/mL) 4 μL，混合均勻後於室溫下靜置 2 分鐘。

3. DNA 濃度測定及純度判斷

(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。

(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 即爲 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。

(七) 鑑別試驗[註9)]

1. PCR 操作步驟

~~依照 2.5.5.1. 節配製定性 PCR 溶液，先~~以無菌純水適當稀釋 DNA 溶液、引子備用。取 PCR 反應管，並依照(五)5.1. 節配製 PCR 溶液，依序加入無菌純水、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(七)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. PCR 條件

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

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，作爲 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 365 nm 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。

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 增幅產物大小爲 108 bp 者~~無誤~~，即判定該檢體含有豬動物性成分。

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。

(八) 確認試驗：本實驗視需要而操作之。

1. PCR 操作步驟

(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(五)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 μL 入 PCR 反應管中，再各別加入稀釋過之檢體 DNA 溶液 5 μL，最後將 PCR 反應管置於離心機中，以 200 × g (1,500 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	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) 即時聚合酶鏈反應(Real-time PCR)－Roche LightCycler

~~依照 2.5.5.2.節配製 PCR 溶液，即先~~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(五)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		
測試豬基因	60℃	25 sec
測試哺乳類及家禽類基因	54℃	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. 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。

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 增幅產物爲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爲 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。

貳、食品中動物性成分檢驗方法—牛成分之定性檢驗

一、 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、牛乳或其他製品之定性檢驗。

二、 原理：聚合酶鏈反應 (Polymerase chain reaction, PCR)。

三、 檢驗方法(除使用之引子及探針不同於前述食品中動物性成分檢驗方法—豬成分之定性檢驗，其他皆比照該前述方法)。

牛鑑別試驗用引子(標的基因：12S ribosomal RNA)：

牛引子 F：BF，5′-ACATTCTCTACCCAAGAGAATCAAGC-3′

引子 R：BR，5′-TCCTCTCATGTAGCTAGTGCGTTTA-3′

PCR 增幅產物大小 193 bp

牛確認試驗用引子及探針(標的基因：12S ribosomal RNA)：

引子 F：BF，5′-ACATTCTCTACCCAAGAGAATCAAGC-3′

引子 R：BR，5′-TCCTCTCATGTAGCTAGTGCGTTTA-3′

探針 P：BP，

5′-(FAM)-CCCTCCTCAAATAGATTCAGTGCATCTAACCCT-(TAMRA)-3′

PCR 增幅產物大小 193 bp

參、食品中動物性成分檢驗方法—羊成分之定性檢驗

一、 適用範圍：本檢驗方法適用於食品中羊肉、羊肚、羊肝等組織器官、羊血、羊乳或其他製品之定性檢驗。

二、 原理：聚合酶鏈反應 (Polymerase chain reaction, PCR)。

三、 檢驗方法(除使用之引子及探針不同於前述食品中動物性成分檢驗方法—豬成分之定性檢驗，其他皆比照該前述方法)。

羊鑑別試驗用引子(標的基因：satellite)：

引子 F：SGF，5′-CCTCTCCAGTGCTGACTTGGA-3′

引子 R：SGR，5′-AAGCATGACATTGCTGCTAAGTTC-3′

PCR 增幅產物大小 123 bp

羊確認試驗用引子及探針(標的基因：satellite)：

引子 F：SGF，5′-CCTCTCCAGTGCTGACTTGGA-3′

引子 R：SGR，5′-AAGCATGACATTGCTGCTAAGTTC-3′

探針 P：SGP，5′-(FAM)-CACGTGCATGCCCCCTCTCGA-(TAMRA)-3′

PCR 增幅產物大小 123 bp

肆、食品中動物性成分檢驗方法—馬成分之定性檢驗

一、 適用範圍：本檢驗方法適用於食品中馬肉、馬心、馬肝等組織器官、馬血或其他製品之定性檢驗。

二、 原理：聚合酶鏈反應 (Polymerase chain reaction, PCR)。

三、 檢驗方法(除使用之引子及探針不同於前述食品中動物性成分檢驗方法—豬成分之定性檢驗，其他皆比照該前述方法)。

馬鑑別試驗用引子(標的基因：12S ribosomal RNA)：

引子 F：HosF1，5′-GTTATCCAAGTACACCTTCCGGTAT-3′

引子 R：HosR1，5′-CGTCACCCTCCTTAAATATCACAAA-3′

PCR 增幅產物大小 114 bp

馬確認試驗用引子及探針(標的基因：12S ribosomal RNA)：

引子 F：HosF2，5′-GATGGAGAGAAATGGGCTACATTTT-3′

引子 R：HosR2，5′-ACTGCTAAATCCTCCTTTAGTCTCCAG-3′

探針 P：HosP，5′-(FAM)-ACCCTAAGAACAAGAACTTTAACCC GGACGA-(TAMRA)-3′

PCR 增幅產物大小 99 bp

伍、食品中動物性成分檢驗方法—鹿成分之定性檢驗

一、 適用範圍：本檢驗方法適用於食品中鹿肉、鹿心、鹿肝等組織器官、鹿血、鹿乳或其他製品之定性檢驗。

二、 原理：聚合酶鏈反應 (Polymerase chain reaction, PCR)。

三、 檢驗方法(除使用之引子及探針不同於前述食品中動物性成分檢驗方法—豬成分之定性檢驗，其他皆比照該前述方法)。

鹿鑑別試驗用引子(標的基因：mitochondrial cytochrome b)：

引子 F：DeerF，5′-CATTTATTATCGCAGCACTCGCT-3′

引子 R：DeerR，5′-AGGTCTGGTACGAATAATACTAGTGAT-3′

PCR 增幅產物大小 190 bp

鹿確認試驗用引子及探針(標的基因：mitochondrial cytochrome b)：

引子 F：DeerF，5′-CATTTATTATCGCAGCACTCGCT-3′

引子 R：DeerR，5′-AGGTCTGGTACGAATAATACTAGTGAT-3′

探針 P：DeerP，5′-(FAM)-CCACTTACTCTTCCTCCACGAAACAGGA-(TAMRA)-3′

PCR 增幅產物大小 190 bp

陸、食品中動物性成分檢驗方法—袋鼠成分之定性檢驗

一、 適用範圍：本檢驗方法適用於食品中袋鼠肉、袋鼠心、袋鼠肝等組織器官、袋鼠血或其他製品之定性檢驗。

二、 原理：聚合酶鏈反應 (Polymerase chain reaction, PCR)。

三、 檢驗方法(除使用之引子及探針不同於前述食品中動物性成分檢驗方法—豬成分之定性檢驗，其他皆比照該前述方法)。

袋鼠鑑別試驗用引子(標的基因：12S ribosomal RNA)：

引子 F：KanF，5′-GAGCTTAATTGAAACAGGCA-3′

引子 R：KanR，5′-ACTTTTCTCCTCTTTTGTATTCC-3′

PCR 增幅產物大小 106 bp

袋鼠確認試驗用引子及探針(標的基因：12S ribosomal RNA)：

引子 F：KanF，5′-GAGCTTAATTGAAACAGGCA-3′

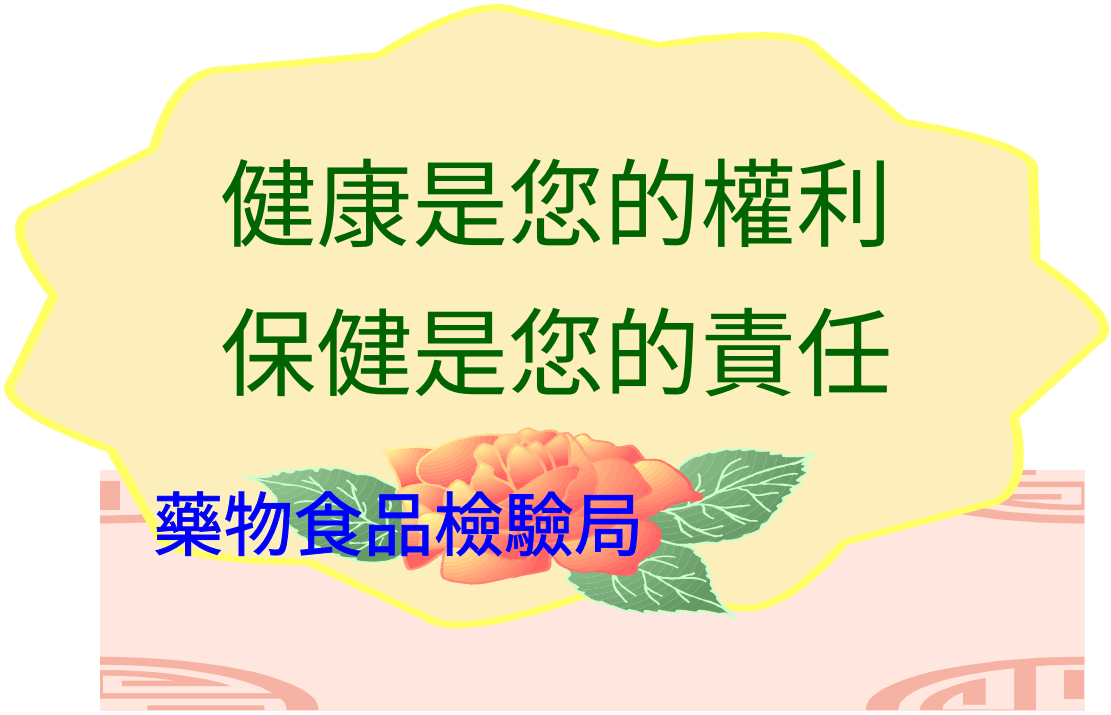
引子 R：KanR，5′-ACTTTTCTCCTCTTTTGTATTCC-3′

探針 P：KanP，5′-(FAM)-TCCTCGACAAAACCTTAC-(TAMRA)-3′

PCR 增幅產物大小 106 bp

參考文獻

1. 闕麗卿，陳育志，李春賢，崔秀煒，李信興，張源鑫，吳宗熹，施養志。2003。以同步聚合酵素鏈反應法(TaqMan 螢光探針系統)快速鑑別豬、牛、羊、馬、鹿、袋鼠肉製品及其市售產品調查。行政院衛生署九十二年度自行研究計畫報告。計畫編號: DOH92-FD-2076。
2. Meyer, R. Candrian, U. and Luthy, J. 1993. Detection of pork in heated meat products by the polymerase chain reaction. J. AOAC Int. 77:617-622.
3. Laube, I., Butschke, A., Zagon, J., Spiegelberg, A., Schauzu, M., Bögl, K. W., Kroh, L. W. and Broll, H. 2002. Detection method to identify beef in foods by the TaqMan™ –technology. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforsch. Gesundheitsschutz. pp.1-25.
4. Chikuni, K., Tabata,T., Kosugiyama, M., Monma M. and Saito, M. 1994. Polymerase chain reaction assay for detection of sheep and goat meats. Meat science. 37:337-345.



十月份大事記

10 月 1 日　舉辦 GMP 稽查人員教育訓練，邀請澳洲 TGA 退休衛生官員 Mr. Paul Humphrey 蒞局授課及實務訓練，為期四天，計 30 人參訓。
邀請荷蘭 Dr. Calux 公司代表蒞局，就有關食品中戴奧辛之生物檢測技術，訓練戴奧辛小組人員。

10 月 6 日　邀集製藥業相關公協會開會討論『藥物製造業者檢查辦法』、『藥物優良製造證明書申請辦法』及『藥物製造工廠設廠標準』等三草案。

10 月 13 日　本局執行之「基因改造食品檢驗系統之建立」計畫，榮獲九十二年度行政院傑出研究獎科技類特優獎。

10月 14 日　邀請和風談判專家東吳大學政治系劉必榮教授蒞局，講授有關『談判技巧』課程，計 70 人參加。

薦任技士許家銓、王德原、周清邦及莊珮君等四員執行『建立國家藥物檢驗實驗室之 SARS 防治醫藥品查驗評估體系』計畫，赴美國參加第 47 屆美國生物安全會議及研習生物安全課程，為期八天。

10 月 16 日　技士吳珍瑗赴澳洲坎培拉參加「2004 年澳洲藥品局仿冒藥品之管制及法律規範」研討會。

10 月 27 日　發布「超市包裝場蔬果殘留農藥檢測結果」新聞。

10 月 29 日　舉辦九十三年主管人員業務研討會。