食品中動物性成分檢驗方法－圓鱈(犬牙南極魚屬)之定性檢驗

Method of Test for Animal-Derived Ingredients in Foods－
Qualitative Test of *Dissostichus* spp.

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於食品中圓鱈魚類，包含犬牙南極魚屬之小鱗犬牙南極魚(*Dissostichus eleginoides*)及鱗頭犬牙南極魚(*Dissostichus mawsoni*)成分之定性檢驗。

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℃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。
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±1℃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. 魚類(標的基因：16S ribosomal RNA，供作內部對照基因)

引子F：FSF,5′-CGCAAGGGAAAGCTGAAAGAGA-3′

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

探針P：FSP,5′-(FAM)-TCCCACTCTTTTGCCACAGAGACGG-(TAMRA)-3′

PCR增幅產物大小234 bp

2.3.2.1.2. 圓鱈(標的基因：Mitochondrial Cytochrome b)

引子F：DissoF,5′-TACTAGCTTCTTCAGGTGTAGAAGCC-3′

引子R：DissoR,5′-GCACCTAAGATGGAAGAAATGCC-3′

探針P：DissoP,5′-(FAM)-TCTCTGGAAACTTAGCCCACGCAGGTGCAT-(TAMRA)-3′

PCR增幅產物大小100 bp

註2： 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。

2.3.2.2. 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：圓鱈魚類組織。

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. Real-time PCR溶液之配製(註4)

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℃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/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。

2.7. 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 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 ×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℃	2 min
2. 最初變性	95℃	10 min
3. 變性	95℃	15 sec
4. 黏接、延展	60℃	1 min
步驟3至步驟4，共進行45個循環反應。		
5. 冷卻	35℃	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℃	10 min
2. 變性	95℃	5 sec
3. 黏接	60℃	25 sec
4. 延展	72℃	8 sec
步驟2至步驟4，共進行45個循環反應。		
5. 冷卻	35℃	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增幅產物為圓鱈之基因片段，可確認該檢體中含有圓鱈成分。

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。

參考文獻

1. Cawthorn, D. M., Steinman, H. A. and Witthuhn, R. C. 2012. DNA barcoding reveals a high incidence of fish species misrepresentation and substitution on the South African market. Food Res. Int. 46: 30-40.

2. Velasco, A., Sánchez, A., Martínez, I., Santaclara, F. J., Pérez-Martín, R. I. and Sotelo, C. G. 2013. Development of a real-time PCR method for the identification of Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*). Food Chem. 141: 2006-2010.