

食品中動物性成分檢驗方法－扁鰾(庸鰾屬及馬舌鰾屬)之定性檢驗
Method of Test for Animal-Derived Ingredients in Foods－
Qualitative Test of *Hippoglossus* and *Reinhardtius* spp.

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於食品中扁鰾魚類，包含庸鰾屬之庸鰾 (*Hippoglossus hippoglossus*)、狹鱗庸鰾 (*Hippoglossus stenolepis*) 及馬舌鰾屬之馬舌鰾 (*Reinhardtius hippoglossoides*)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°C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°C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°C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°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. 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'-TCGGTAGGTTTGTACCTCTACTC-3'

探針P：FSP,5'-(FAM)-TCCCCTCTTTTGCCACAGAGACGG-(TAMRA)-3'

PCR增幅產物大小234 bp

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

引子F：Hippo F,5'-CTTCACACCAACAACCCAACCTCTCCC-3'

引子R：Hippo R,5'-GAAGGAAGAGGACCACCGTTGTTAA-3'

探針P：Hippo P,5'-(FAM)-CACAGCAGGCCACCTCCTTATTCA
ACTCATT-(TAMRA)-3'

PCR增幅產物大小 298 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：扁鰻魚類組織。

2.4. 器具及材料^(註3)

- 2.4.1. 吸管(Pipette)：10 μ L、20 μ L、100 μ L、200 μ L及1000 μ L。
- 2.4.2. 吸管尖頭(Pipette tips)：10 μ L、20 μ L、200 μ L及1000 μ L。
- 2.4.3. 離心管：200 μ L、600 μ L、1.5 mL及2 mL。
- 2.4.4. PCR反應管：200 μ L。
- 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 μ M引子F.....	1.25 μ L
5 μ M引子R.....	1.25 μ L
3.3 μ M探針P.....	1.7 μ L
TaqMan Universal PCR Master Mix	12.5 μ L
檢體DNA溶液(總量100 ng)	5.0 μ L
無菌去離子水.....	3.3 μ L
總體積.....	25.0 μ L

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℃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°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

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增幅產物為扁鱈之基因片段，可確認該檢體中含有扁鱈成分。

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.