

菇類檢驗方法—橘黃裸傘之檢驗 Method of Test for Mushroom- Test of Big Laughing Gym

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於橘黃裸傘之檢驗。
2. 檢驗方法：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。

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 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。

2.2. 裝置^(註 1)

- 2.2.1. 分光光度計：具波長 260 nm、280 nm。
- 2.2.2. 旋渦混合器(Vortex mixer)。
- 2.2.3. 真空乾燥裝置：供 DNA 乾燥用。
- 2.2.4. 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。
- 2.2.5. 加熱振盪器：具 65℃ 溫控及振盪功能。
- 2.2.6. 微量冷凍離心機：可達 20000 × g，並具 4℃ 溫控功能。
- 2.2.7. 離心機：供各式微量離心管離心用。
- 2.2.8. 聚合酶鏈反應器：ABI PRISM 9700 Sequence Detector，或同級品。
- 2.2.9. 即時聚合酶鏈反應器^(註 2)：ABI PRISM 7700 Sequence Detector 或 Roche LightCycler，或同級品。
- 2.2.10. 電泳槽：供 DNA 電泳用。
- 2.2.11. 振盪型粉碎機：Retsch MM200，或同級品。
- 2.2.12. 照相裝置：供拍攝電泳膠片用。
- 2.2.13. 紫外燈箱：具波長 312 nm、365 nm 紫外燈。
- 2.2.14. 冷凍設備：具冷藏及凍結功能。
- 2.2.15. 高壓滅菌釜。
- 2.2.16. pH 測定儀。
- 2.2.17. 水浴裝置：溫差±1℃ 以內者。
- 2.2.18. 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。
- 2.2.19. 無菌操作台。

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：確認試驗用。

2.3. 試藥

- 2.3.1. DNA 抽取用：RNase A、乙醇(96-100%)均採分子生物分析級試藥；DNeasy® Plant Mini 套組及內附試劑(RNase A、AP1、AP2、AP3/E、AW 與 AE)、離心管柱(DNeasy spin column)與收集管。亦可採用其他市售套組。

2.3.2. PCR 用^(註 3)

2.3.2.1. 鑑別試驗用引子

2.3.2.1.1. 共通性基因 (標的基因：ribosomal RNA，供作內部對照基因)

引子 F：18S-F, 5'-GTCCCTGCCCTTTGTACA-3'

引子 R：26S-R, 5'-CGCCGTTACTAGGGGAATCCT-3'

PCR 增幅產物大小 600~800 bp

2.3.2.1.2. 橘黃裸傘 (標的基因：internal transcribed spacer, ITS)

引子 F：GY-F, 5'-TTCTAATGGTCTGGATTGGGGGTC-3'

引子 R：GY-R, 5'-CGCATCCCATTAAAGCAGACAT-3'

PCR 增幅產物大小 131 bp

2.3.2.2. 確認試驗用引子及探針

橘黃裸傘 (標的基因：internal transcribed spacer, ITS)

引子 F：GY-F, 5'-TTCTAATGGTCTGGATTGGGGGTC-3'

引子 R：GY-R, 5'-CGCATCCCATTAAAGCAGACAT-3'

探針 P：GY-P, 5'-(FAM)-ACCGGCTAATACATTAAAGGGGAGCGAT-(TAMRA)-3'

PCR 增幅產物大小 131 bp

註 3：合成之引子及探針，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，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。

2.3.2.3. 去氧核糖核苷三磷酸(deoxyribonucleoside triphosphate, dNTP)

含去氧腺苷三磷酸(deoxyadenosine triphosphate, dATP)，去氧胞苷三磷酸(deoxycytidine triphosphate, dCTP)，去氧鳥糞嘌呤三磷酸(deoxyguanosine triphosphate, dGTP)及去氧胸苷三磷酸(deoxythymidine triphosphate, dTTP)各 2.5 mM 之溶液。

2.3.2.4. 聚合酶

Taq DNA polymerase (2 U/μL)。

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

內含 PCR 所需去氧核糖核苷三磷酸、聚合酶等試劑，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 Hybridization Probes (確認試驗用，適用於 Roche LightCycler)

內含 PCR 所需去氧核糖核苷三磷酸、聚合酶等試劑，使用時僅需自行添加引子、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、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：橘黃裸傘之組織，或使用行政院衛生署藥物食品檢驗局提供編號 pIDU2 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 μ L、20 μ L、100 μ L、200 μ L 及 1000 μ L。

2.4.2. 電泳膠片製作盤。

2.4.3. 吸管尖頭(Pipette tips)：10 μ L、20 μ L、200 μ L 及 1000 μ L。

2.4.4. 離心管：200 μ L、600 μ L、1.5 mL 及 2 mL。

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 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，加水溶解後定容至 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 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6)

2.5.5.1. 鑑別試驗用

10 倍 PCR 緩衝溶液 (含 15 mM MgCl ₂)	2.5 μ L
Taq DNA polymerase (2 U/ μ L)	1.0 μ L
2.5 mM dNTP	4.0 μ L

10 μ M 引子 F	1.0 μ L
10 μ M 引子 R	1.0 μ L
檢體 DNA 溶液 (總量 100 ng)	5.0 μ L
無菌純水	10.5 μ L
總體積	25.0 μ L

2.5.5.2. ABI PRISM 7700 Sequence Detector 確認試驗用

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
無菌純水	3.3 μ L
總體積	25.0 μ L

2.5.5.3. Roche LightCycler 確認試驗用

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 Hybridization Probes	2.0 μ L
25 mM $MgCl_2$ 溶液	2.4 μ L
檢體 DNA 溶液 (總量 100 ng)	5.0 μ L
無菌純水	6.1 μ L
總體積	20.0 μ L

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)

檢體為乾燥菇類者，可直接以粉碎機研磨成細粉。檢體為溼狀者，須先以真空冷凍乾燥裝置乾燥 36 小時後再以粉碎機研磨成細粉。本項檢體之處理亦可以液態氮凍結後研磨成細粉。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

採用 DNeasy[®] Plant Mini 套組。

2.6.2.1. 稱取檢體約 25 mg，置入 2 mL 離心管。

2.6.2.2. 加入經 65°C 預熱之 AP1 試劑 400 μ L 及 RNase A 試劑 4 μ L，以旋渦混合器混合均勻。

2.6.2.3. 於 65°C 振盪反應至少 15 分鐘。

2.6.2.4. 加入 AP2 試劑 130 μ L，以旋渦混合器混合均勻，置於冰浴 5 分鐘。

2.6.2.5. 將反應液注入收集管柱，以 20000 $\times$ g 離心 2 分鐘。

2.6.2.6. 將濾液移至另一 2 mL 離心管，若有沉澱物，避免將之移至離心管中。

- 2.6.2.7. 加入 1.5 倍濾液體積之 AP3/E 試劑，以微量吸管混合均勻。
- 2.6.2.8. 取反應液 650 μL 注入離心管柱，以 $6000 \times g$ 以上之轉速離心 1 分鐘。
- 2.6.2.9. 重複上述步驟至全部之反應液完全經由離心管柱過濾吸附。
- 2.6.2.10. 將離心管柱套入新的收集管，注入 AW 試劑 500 μL ，以 $6000 \times g$ 以上之轉速離心 1 分鐘，將濾液丟棄。
- 2.6.2.11. 重複上述步驟一次，並以 $20000 \times g$ 離心 2 分鐘，將離心管柱內之 AW 試劑完全排乾。
- 2.6.2.12. 將離心管柱套入新的離心管，加入經 65°C 預熱之 AE 試劑 100 μL ，於室溫下靜置 5 分鐘後，以 $10000 \times g$ 離心 1 分鐘，再重複此溶出步驟一次。
- 2.6.2.13. 將溶出液（約 200 μL ）收集至已滅菌之 1.5 mL 離心管，為萃取 DNA 原液。
- 2.6.2.14. 依 2.6.3.2. 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

- 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。
- 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 8)

2.7.1. PCR 操作步驟

以無菌純水適當稀釋檢體 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		
測試共通性基因及橘黃裸傘基因	55°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 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。

2.7.4. 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 增幅產物大小為 131 bp 者，即判定該檢體含有橘黃裸傘。

註 8：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 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，再各別加入檢體 DNA 溶液 5 μ L，最後將 PCR 反應管置於離心機中，以 200 $\times$ g (1500 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. 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		
測試橘黃裸傘基因	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

2.8.1.2. 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、MgCl₂ 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，再各別加入檢體 DNA 溶液 5 µL，最後將毛細管置於離心機中，以 800 × g (3000 rpm) 瞬間離心，移入 RT-PCR 反應器，依下列條件進行反應。每次實驗皆須製作負反應及正反應對照組。

步驟	溫度	時間
1. 最初變性	95°C	7 min
2. 變性	95°C	7 sec
3. 黏接		
測試橘黃裸傘基因	60°C	8 sec
4. 延展	72°C	15 sec
步驟 2 至步驟 4，共進行 45 個循環反應。		
5. 冷卻	40°C	40 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 增幅產物為橘黃裸傘之基因片段，可確認該檢體中含有橘黃裸傘。

- 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。