

食品中動物性成分檢驗方法—羊乳製品中含牛乳成分之定量檢驗
Method of Test for Animal-Derived Ingredients in Foods-
Quantitative Test of Cow Milk in Processed Goat Milk Products

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於羊乳製品中含有牛乳成分之定量檢驗。
2. 檢驗方法：即時聚合酶鏈反應法 (real-time polymerase chain reaction, RT-PCR)。
 - 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、RT-PCR 試劑配製及 RT-PCR 等實驗過程皆需有區隔空間，避免交叉污染。RT-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：具溫控及振盪功能。
 - 2.2.6. 微量冷凍離心機(Micro refrigerated centrifuge)：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. 即時聚合酶鏈反應器：ABI PRISM 7700 Sequence Detector 或 Roche LightCycler。
 - 2.2.9. 振盪型粉碎機：Retsch MM200，或同級品。
 - 2.2.10. 冷凍設備：具冷藏及凍結功能。
 - 2.2.11. 高壓滅菌釜。
 - 2.2.12. pH 測定儀。
 - 2.2.13. 水浴裝置：溫差±1℃ 以內者。
 - 2.2.14. 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。
 - 2.2.15. 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，未使用或未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：RNase A、乙醇 (96-100%)均採分子生物分析級試藥；DNeasy[®] Blood & Tissue 套組及內附試劑(ATL、proteinase K、AL、AW1、AW2 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. RT-PCR 用^(註 2)

2.3.2.1. 定量試驗用引子及探針

- 2.3.2.1.1. 哺乳類、家禽類及魚類(標的基因：12S ribosomal RNA，供作內部對照基因)

引子 F : 12SF, 5'- CAAACTGGGATTAGATACCCCACTA -3'

引子 R : 12SR, 5'- ATCGRTTMTAGAACAGGCTCCTCTAG -3'

探針 P : 12SP, 5'-(FAM)- CACCGCCAAGTCCTTTGRGTTTTARGC -
(TAMRA)-3'

羊及牛 : PCR 增幅產物大小 155 bp

2.3.2.1.2. 牛 (標的基因 : 12S ribosomal RNA)

引子 F : BF, 5'- ACATTCTCTACACCAAGAGAATCAAGC -3'

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

探針 P : BP, 5'-(FAM)- CCCTCCTCAAATAGATTCAAGTGCATCTAACCCT -
(TAMRA)-3'

PCR 增幅產物大小 193 bp

註 2 : 1. 合成之引子與探針，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。

2. 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。

2.3.2.2. TaqMan Universal PCR Master Mix (適用於 ABI PRISM 7700)

本試劑內含 RT-PCR 所需去氧核糖核苷三磷酸、聚合酶等，使用時僅需自行添加引子、探針及待測檢體 DNA 即可。

2.3.2.3 LightCycler-FastStart DNA Master Hybridization Probes (適用於 Roche LightCycler)

本試劑內含 RT-PCR 所需去氧核糖核苷三磷酸、聚合酶等，使用時僅需自行添加氯化鎂溶液、引子、探針及待測檢體 DNA 即可。

2.3.3. 對照用物質：羊乳及牛乳。

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. RT-PCR 反應管：定量用，200 µL。

2.4.5. PCR 玻璃毛細管：Roche LightCycler 專用。

2.4.6. 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. 試劑之配製

2.5.1. RT-PCR 溶液^(註4)

2.5.1.1. ABI PRISM 7700 Sequence Detector 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

模版 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

2.5.1.2. Roche LightCycler 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 氯化鎂溶液.....	2.4 μ L
模版 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 4：RT-PCR 溶液應置於冰浴中配製。估算一般 RT-PCR 溶液之配製總量時，需超過所需量的 10%。

2.6. 標準曲線之製作^(註 5)

2.6.1. 取羊乳及牛乳對照用物質，冷凍乾燥並以粉碎機研磨成細粉後，配製羊乳中含牛乳 100%、50%、25%、10%、1% (w/w) 等 5 種牛乳濃度之對照用物質，續抽取其 DNA，分裝並置於-20 °C 冷凍保存，供作標準曲線之製作。

2.6.2. 取 2.6.1 節所抽取之 5 種牛乳濃度對照用物質之 DNA 溶液，以內部對照基因引子與探針，及以牛特異性基因引子與探針分別進行 RT-PCR 反應，可分別求得各牛乳濃度對照用物質之內部對照基因 Ct 值 (threshold cycle value) 與牛特異性基因 Ct 值，並求取各別 Ct 值之平均值，將各濃度對照用物質之牛特異性基因 Ct 值平均值減去內部對照基因 Ct 值平均值後所得之數值 Δ Ct 為縱軸，以 5 種牛乳對照用物質濃度之對數值為橫軸，進行線性回歸分析並製作標準曲線。

註 5：各濃度對照用物質需進行三重複試驗，惟三重複分析結果出現偏離現象時，應將該偏離之數據捨棄，但必須每個濃度皆有代表數據存在，始可列入標準曲線之線性回歸分析。

2.7. 檢體 DNA 之製備

2.7.1. 檢體之處理

檢體為乾燥或粉(碎)狀者，可直接以粉碎機研磨成細粉。檢體為溼狀者，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。

2.7.2. DNA 之抽取

採用 DNeasy® Blood & Tissue 套組。

2.7.2.1. 取檢體 25 mg，精確稱定，置入 2 mL 離心管。

2.7.2.2. 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。

2.7.2.3. 於 56°C 振盪反應直到檢體溶解。

2.7.2.4. 加入 AL 試劑 200 μ L，以旋渦混合器混合均勻。

- 2.7.2.5. 加入乙醇(96-100%) 200 μ L，以旋渦混合器混合均勻。
- 2.7.2.6. 取混合液注入離心管柱，以 $\geq 6000 \times g$ (8000 rpm) 離心 1 分鐘，棄收集管及濾液。
- 2.7.2.7. 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 $\geq 6000 \times g$ (8000 rpm) 離心 1 分鐘後，棄收集管及濾液。
- 2.7.2.8. 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 $20,000 \times g$ (14000 rpm) 離心 3 分鐘後，棄收集管及濾液。
- 2.7.2.9. 將離心管柱套入新的 1.5 mL 離心管。
- 2.7.2.10. 加入 AE 試劑 100 μ L 至離心管柱，於室溫下靜置 1 分鐘後，以 $\geq 6000 \times g$ (8000 rpm) 離心 1 分鐘，再重複此溶出步驟一次。
- 2.7.2.11. 將溶出液（約 200 μ L）收集至已滅菌之 1.5 mL 離心管，為萃取檢體 DNA 原液。
- 2.7.2.12. 依 2.7.3.2. 節測量 DNA 濃度並記錄後，置於 -20°C 冷凍保存。

2.7.3. DNA 濃度測定及純度判斷

- 2.7.3.1. 檢體 DNA 原液於使用前自冷凍庫中取出，於室溫下進行溶解。
- 2.7.3.2. 取適當量之 DNA 原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 濃度係以波長 260 nm 吸光值乘 50 ng/ μ L 及稀釋倍數，即為 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 間。

2.8. 定量試驗^(註6)

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 原液、引子及探針備用。取適量無菌純水，並依照 2.5.1.1. 節配製 RT-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 RT-PCR 反應管中，再各別加入檢體 DNA 溶液 5 μ L，最後將 RT-PCR 反應管置於離心機中，以 $230 \times g$ (1500 rpm) 瞬間離心，移入 RT-PCR 反應器，依下列條件進行反應。每次實驗皆須製作標準曲線、正反應及負反應對照組^(註7)。

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

2.8.1.2. RT-PCR—Roche LightCycler

以無菌純水適當稀釋檢體 DNA 原液、引子及探針備用。取適量無菌純水，並依照 2.5.1.2.節配製 PCR 溶液，依序加入 LightCycler-FastStart DNA Master Hybridization Probes、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，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 830 × g (3000 rpm) 瞬間離心，移入 RT-PCR 反應器，依下列條件進行反應。每次實驗皆須製作標準曲線、正反應及負反應對照組^(註 7)。

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

註 6：檢體 DNA 之抽取與製備，其純度將直接影響後續 RT-PCR 測試結果，建議檢體 DNA 溶液可先進行內部對照基因 RT-PCR 測試，以確定是否含有 DNA 及其純度。

註 7：正反應對照組係指有添加對照用物質 DNA 之反應，而負反應對照組係指無添加對照用物質 DNA 之反應。

2.8.2. 計算

羊乳製品經 RT-PCR 分析後，分別計算牛特異性基因之 Ct 值與內部對照基因之 Ct 值，並求取各別 Ct 值之平均值，再依 2.6 節製作之標準曲線，以下列公式計算，求出羊乳製品中牛乳成分之含量(%)。

$$\text{羊乳製品中牛乳成分含量(\%)} = 10^{\left(\frac{\Delta \text{Ct} - B}{A}\right)} \times \frac{1}{100}$$

△Ct：牛特異性基因之 Ct 值平均值減去內部對照基因之 Ct 值平均值。

A：標準曲線斜率。

B：標準曲線 Y 軸之截距。

附註：1. ABI PRISM 7700 臨界值線【Threshold line (Th)】之設定建議：

RT-PCR 反應完成後，點選 "Analysis" 後點選 "Analyze"，進入 "Amplification plot" 視窗，續點選 "OK" 關閉此視窗。再次點選 "Analysis" 後點選 "Amplification plot"，進入 "Amplification plot" 視窗，於 "Use Threshold" 項目中輸入 0.032，點選 "Update Calculations"，即完成 Threshold line 位置之設定，並依此估算各檢體之 Ct 值。("Mult.*Stddev" 及 "Omit Threshold" 及 "Baseline" 之設定值，則採用系統內定值，無須更動。)

2. 本檢驗方法之最低檢測濃度為 1% (以乾重計)。

3. 本 RT-PCR 反應條件係採 ABI PRISM 7700 及 Roche LightCycler 設定之，當使用其他機型時，應自行檢討反應條件。
4. 本檢驗方法之測試範圍係指乳類檢體中僅含羊及牛成分，且能夠抽取出 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。