

食品中動物性成分檢驗方法一定性篩選檢驗修正草案總說明

為加強食品中動物性、植物性成分之管理，並依據食品衛生管理法第三十八條規定：「各級主管機關執行食品、食品添加物、食品容器或包裝及食品用洗潔劑之檢驗，其檢驗方法，由中央主管機關定之」，爰擬具「食品中動物性成分檢驗方法一定性篩選檢驗」草案，其修正要點如下：

- 一、刪除 PCR 試驗相關內容，包含裝置、試藥、器具及材料、試劑之配製及鑑別試驗。
- 二、修正鑑別試驗用引子及探針。
- 三、修正對照用物質。
- 四、修正附圖。
- 五、增列附註二及三。

食品中動物性成分檢驗方法一定性篩選檢驗修正 草案對照表

修正規定	現行規定	說明
<p>1.適用範圍：本檢驗方法適用於食品中動物性成分之定性篩選檢驗。</p> <p>2.檢驗方法：<u>檢體經 DNA 萃取後，以即時聚合酶鏈反應 (real-time polymerase chain reaction, <u>real-time PCR</u>)之方法。</u></p> <p>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、<u>real-time PCR</u> 試劑配製及檢驗過程皆需有區隔空間，避免交叉污染。<u>Real-time PCR</u> 試劑之配製應於無菌操作台內進行。</p> <p>2.2. 裝置^(註1)</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>2.2.3.振盪型粉碎機：Retsch MM200，或同級品。</p> <p>2.2.4. 真空乾燥裝置：供 DNA 乾燥用。</p> <p>2.2.5.高壓滅菌釜。</p> <p>2.2.6.無菌操作台。</p> <p>2.2.7.加熱振盪器：具 55°C 溫控及振盪功能。</p> <p>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。</p> <p>2.2.9.離心機：供各式<u>微量</u>離心管離心用。</p> <p>2.2.10.分光光度計：具波長 260 nm、280 nm。</p> <p>2.2.11.冷凍設備：具冷藏及凍結功能。</p>	<p>1.適用範圍：本檢驗方法適用於食品中動物性成分之定性篩選檢驗。</p> <p>2.檢驗方法：<u>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, <u>RT-PCR</u>)方法。</u></p> <p>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 <u>PCR</u> 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。</p> <p>2.2. 裝置^(註1)</p> <p>2.2.1.分光光度計：具波長 260 nm、280 nm。</p> <p>2.2.2.旋渦混合器(Vortex mixer)。</p> <p>2.2.3.真空乾燥裝置：供 DNA 乾燥用。</p> <p>2.2.4.真空冷凍乾燥裝置：溫度可達 -40°C 以下，真空度可達 133 mBar 以下，供檢體乾燥用。</p> <p>2.2.5.加熱振盪器：具 55°C 溫控及振盪功能。</p> <p>2.2.6.微量冷凍離心機：可達 20000 × g，並具 4°C 溫控功能。</p> <p>2.2.7.離心機：供各式離心管離心用。</p> <p>2.2.8 聚合酶鏈反應器：ABI PRISM 9700 Sequence Detector，或同級品。</p> <p>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。</p> <p>2.2.10.電泳槽：供 DNA 電泳用。</p> <p>2.2.11.振盪型粉碎機：Retsch MM200，或同級品。</p>	<p>一、刪除 PCR 試驗相關內容，包含裝置、試藥、器具及材料、試劑之配製及鑑別試驗。</p> <p>二、修正鑑別試驗用引子及探針。</p> <p>三、修正對照用物質。</p> <p>四、修正附圖。</p> <p>五、增列附註二及三。</p> <p>六、增修訂部分文字。</p>

<p>2.2.12.旋渦混合器(Vortex mixer)。</p> <p>2.2.13.酸鹼度測定儀(pH meter)。</p> <p>2.2.14.水浴裝置：溫差±1℃以內者。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>2.3.試藥</p> <p>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。</p> <p>2.3.2. <u>Real-time PCR 用</u>^(註 2)</p>	<p>2.2.12.照相裝置：供拍攝電泳膠片用。</p> <p>2.2.13.紫外燈箱：具波長 312 nm、365 nm 紫外燈。</p> <p>2.2.14.冷凍設備：具冷藏及凍結功能。</p> <p>2.2.15.高壓滅菌釜。</p> <p>2.2.16. pH 測定儀。</p> <p>2.2.17.水浴裝置：溫差在±1℃以內者。</p> <p>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。</p> <p>2.2.19. 無菌操作台。</p> <p>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。</p> <p><u>註 2:確認試驗用。</u></p> <p>2.3.試藥</p> <p>2.3.1. DNA 抽取用：<u>RNase</u>、乙醇(96~100%)均採分子生物分析級試藥，<u>DNeasy[®] Tissue</u> 套組。</p> <p>2.3.2. PCR 用</p> <p>2.3.2.1. <u>鑑別試驗用引子</u>^(註 3)</p> <p>2.3.2.1.1.動物類(標的基因：<u>16S ribosomal RNA</u>)</p> <p>引子 F： <u>SF,5'-AAGACGAGAAGACCCT(A/G)TGGA(A/G)CTTTA-3'</u></p> <p>引子 R： <u>SR,5'-GATTGCGCTGTTATCCCTAGGGTA-3'</u></p> <p>PCR 增幅產物大小 234~265 bp</p> <p>2.3.2.1.2.哺乳類及家禽類(標的基因：<u>myostatin</u>)</p> <p>引子 F： <u>MYF,5'-TTGTGCAAATCCTGAGACTCAT-3'</u></p> <p>引子 R： <u>MYR,5'-ATACCAGTGCCTGGGTTCAT-3'</u></p>	
--	---	--

<p>2.3.2.1. 鑑別試驗用引子及探針</p> <p>2.3.2.1.1. 動物類(標的基因：16S ribosomal RNA)^(註3)</p> <p>引子 F： SF,5'-AAGACGAGAAGACCCT<u>RTGGARCTTTA</u>-3'</p> <p>引子 R： SR,5'-GATTGCGCTGTTATCCCTAGGGTA-3'</p> <p>探針 P： SP,5'-(FAM)-TTYGGTTGGGGTGACCTCGGR<u>GT</u>-(TAMRA)-3'</p> <p>PCR 增幅產物大小 234-265 bp</p> <p>2.3.2.1.2. 動物類(哺乳類、家禽類及魚類，標的基因：12S ribosomal RNA)^(註3)</p> <p>引子 F： <u>12SF,5'-CAAAGTGGGATTAGATACCCCACTA</u>-3'</p> <p>探針 P： <u>12SP,5'-(FAM)-CACCGCCAAGTCCTTTGRGTTTTARGC</u>-(TAMRA)-3'</p> <p>PCR 增幅產物大小 154-160 bp</p> <p>2.3.2.1.3. 哺乳類及家禽類(標的基因：myostatin)</p> <p>引子 F： MYF,5'-TTGTGCAAATCCTGAGACTCAT-3'</p> <p>引子 R： MYR,5'-ATACCAGTGCCTGGGTTCAT-3'</p> <p>探針 P： MYP,5'-(FAM)CCCATGAAAGACGGTACAAGGTATACTG-(TAMR</p>	<p>PCR 增幅產物大小 97 bp</p> <p>2.3.2.1.3. 魚類(標的基因：16S ribosomal RNA)</p> <p>引子 F： <u>FSF,5'-CGCAAGGGAAAGCTGAAGAGA</u>-3'</p> <p>引子 R： <u>FSR,5'-TCGGTAGGTTTGTCACCTCTACTC</u>-3'</p> <p>PCR 增幅產物大小 234 bp</p> <p>2.3.2.2. 確認試驗用引子及探針^(註4)</p> <p>2.3.2.2.1. 動物類(標的基因：16S ribosomal RNA)</p> <p>引子 F： SF,5'-AAGACGAGAAGACCCT(A/G)TGGA(A/G)CTTTA-3'</p> <p>引子 R： SR,5'-GATTGCGCTGTTATCCCTAGGGTA-3'</p> <p>探針 P： SP,5'-(FAM)-TT(C/T)GGTTGGGTGACCTCGG(A/G)GT-(TAMRA)-3'</p> <p>PCR 增幅產物大小 234~265 bp</p> <p>2.3.2.2.2. 哺乳類及家禽類(標的基因：myostatin)</p> <p>引子 F： MYF,5'-TTGTGCAAATCCTGAGACTCAT-3'</p> <p>引子 R： MYR,5'-ATACCAGTGCCTGGGTTCAT-3'</p> <p>探針 P： MYP,5'-(FAM)-CCCATGAAAGACGGTACAAGGTATACTG-(TAM</p>	
--	---	--

<p>A)-3' PCR 增幅產物大小 97 bp 2.3.2.1.4. 魚類(標的基因：16S ribosomal RNA) 引子 F： FSF,5'-CGCAAGGGAAAGCTGA AAGAGA-3' 引子 R： FSR,5'-TCGGTAGGTTTGTCCACC TCTACTC-3' 探針 P： FSP,5'-(FAM)-TCCCCTCTTTTG CCACAGAGACGG-(TAMRA)-3' PCR 增幅產物大小 234 bp</p> <p>註 2：1.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℃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.動物類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；Y 為混合鹼基代碼(C/T)，表示同時含 C 及 T；M 為混合鹼基代碼(A/C)，表示同時含 A 及 C。</p> <p>註 3：<u>動物類篩選檢驗可選用 16S ribosomal RNA 或 12S ribosomal RNA 基因之引子及探針，惟食品中含蛋成分之篩選檢驗，建議使用動物類 12S ribosomal RNA 基因之引子及探針。</u></p> <p>2.3.2.2. TaqMan Universal PCR Master Mix (適用於 ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System) 本試劑內含 <u>real-time</u> PCR 所需去氧核糖核苷三磷酸、聚合酶等，</p>	<p>RA)-3' PCR 增幅產物大小 97 bp 2.3.2.2.3. 魚類(標的基因：16S ribosomal RNA) 引子 F： FSF,5'-CGCAAGGGAAAGCTGA AAGAGA-3' 引子 R： FSR,5'-TCGGTAGGTTTGTCCACC CTCTACTC-3' 探針 P： FSP,5'-(FAM)-TCCCCTCTTTTG CCACAGAGACGG-(TAMRA)-3' PCR 增幅產物大小 234 bp</p> <p>註 3：<u>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。</u></p> <p>註 4：<u>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。</u></p> <p>2.3.2.3. <u>去氧核糖核苷三磷酸 (deoxyribonucleoside triphosphate, dNTP)</u> 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。</p> <p>2.3.2.4. 聚合酶 <u>Taq DNA polymerase (2 U/μL)。</u></p> <p>2.3.2.5. TaqMan Universal PCR Master Mix (<u>確認試驗用，適用於 ABI PRISM 7700</u>)</p> <p>內含 PCR 所需去氧核糖核苷三磷酸、聚合酶等試劑，使用者僅需</p>	
---	---	--

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：肉類、血液及其組織器官等皆可，或使用衛生福利部食品藥物管理署提供編號 S202 及 S203 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 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

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，使用者僅需自行添加引子、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：肉類、血液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 pIDM2 及 pIDM3 之參考質體作為對照用物質。

2.4. 器具及材料^(註5)

2.4.1. 吸管(Pipette)：10 μL、20 μL、100 μL、200 μL 及 1000 μL。

2.4.2. 電泳膠片製作盤。

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

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

2.4.5. PCR 反應管：200 μL 及 500 μL。

2.4.6. PCR 玻璃毛細管^(註6)：Roche LightCycler 專用。

<p>mL、250 mL、500 mL、1000 mL 及 2000 mL。</p> <p>2.4.7. 塑膠離心管：50 mL。</p> <p>2.4.8. 過濾膜：孔徑為 0.45 μm，nitrocellulose 材質。</p> <p>註 4：使用之塑膠或玻璃器皿均為無 DNase 污染。</p> <p>2.5. <u>Real-time PCR 溶液之配製</u>^(註 5)</p>	<p>2.4.7. 玻璃或塑膠瓶：50 mL、100 mL、250 mL、500 mL、1000 mL 及 2000 mL。</p> <p>2.4.8. 塑膠離心管：50 mL。</p> <p>2.4.9. 過濾膜：孔徑為 0.45 μm，材質為 nitro-cellulose。</p> <p>註 5：使用之塑膠或玻璃器皿均為無 DNase 污染。</p> <p>註 6：儀器使用 Roche LightCycler 時，才需使用。</p> <p>2.5. <u>試劑之配製</u></p> <p>2.5.1. <u>5 倍 TBE (Tris-borate-EDTA) 緩衝溶液</u> 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。</p> <p>2.5.2. <u>2% 膠片</u> 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。</p> <p>2.5.3. <u>6 倍載入膠片緩衝溶液(6 × gel loading buffer)</u> 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。</p> <p>2.5.4. <u>膠片染液</u> 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$。溴化乙錠為致癌物質，配製時應注意安全。</p> <p>2.5.5. <u>PCR 溶液</u>^(註 7)</p> <p>2.5.5.1. <u>鑑別試驗用</u></p> <table border="1" data-bbox="735 1760 1198 2042"> <tr> <td>10 倍 PCR 緩衝溶液 (含 15 mM MgCl_2)</td> <td>2.5 μL</td> </tr> <tr> <td><i>Taq</i> DNA polymerase (2 U/μL)</td> <td>1.0 μL</td> </tr> <tr> <td>2.5 mM dNTP</td> <td>4.0 μL</td> </tr> <tr> <td>10 μM 引子 F</td> <td>1.0 μL</td> </tr> <tr> <td>10 μM 引子 R</td> <td>1.0 μL</td> </tr> </table>	10 倍 PCR 緩衝溶液 (含 15 mM MgCl_2)	2.5 μL	<i>Taq</i> DNA polymerase (2 U/ μL)	1.0 μL	2.5 mM dNTP	4.0 μL	10 μM 引子 F	1.0 μL	10 μM 引子 R	1.0 μL	
10 倍 PCR 緩衝溶液 (含 15 mM MgCl_2)	2.5 μL											
<i>Taq</i> DNA polymerase (2 U/ μL)	1.0 μL											
2.5 mM dNTP	4.0 μL											
10 μM 引子 F	1.0 μL											
10 μM 引子 R	1.0 μL											

	<table border="1"> <tr> <td>模版 DNA 溶液(總量 100 ng)</td> <td>5.0 μL</td> </tr> <tr> <td>無菌純水</td> <td>10.5 μL</td> </tr> <tr> <td>總體積</td> <td>25.0 μL</td> </tr> </table>	模版 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																												
模版 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																																		
<p>2.5.1. ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System 鑑別試驗用</p>	<p>2.5.5.2. ABI PRISM 7700 Sequence Detector 確認試驗用</p>																																		
<table border="1"> <tr> <td>5 μM 引子 F</td> <td>1.25 μL</td> </tr> <tr> <td>5 μM 引子 R</td> <td>1.25 μL</td> </tr> <tr> <td>3.3 μM 探針 P</td> <td>1.7 μL</td> </tr> <tr> <td>TaqMan Universal PCR Master Mix</td> <td>12.5 μL</td> </tr> <tr> <td>檢體 DNA 溶液(總量 100 ng)</td> <td>5.0 μL</td> </tr> <tr> <td>無菌去離子水</td> <td>3.3 μL</td> </tr> <tr> <td>總體積</td> <td>25.0 μL</td> </tr> </table>	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	<table border="1"> <tr> <td>5 μM 引子 F</td> <td>1.25 μL</td> </tr> <tr> <td>5 μM 引子 R</td> <td>1.25 μL</td> </tr> <tr> <td>3.3 μM 探針 P</td> <td>1.7 μL</td> </tr> <tr> <td>TaqMan Universal PCR Master Mix</td> <td>12.5 μL</td> </tr> <tr> <td>模版 DNA 溶液(總量 100 ng)</td> <td>5.0 μL</td> </tr> <tr> <td>無菌純水</td> <td>3.3 μL</td> </tr> <tr> <td>總體積</td> <td>25.0 μL</td> </tr> </table>	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	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						
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																																		
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																																		
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																																		
<p>2.5.2. Roche LightCycler 鑑別試驗用</p>	<p>2.5.5.3. Roche LightCycler 鑑別試驗用</p>																																		
<table border="1"> <tr> <td>5 μM 引子 F</td> <td>1.5 μL</td> </tr> <tr> <td>5 μM 引子 R</td> <td>1.5 μL</td> </tr> <tr> <td>3.3 μM 探針 P</td> <td>1.5 μL</td> </tr> <tr> <td>LightCycler[®] FastStart DNA Master HybProbe</td> <td>2.0 μL</td> </tr> <tr> <td>25 mM 氯化鎂溶液</td> <td>2.4 μL</td> </tr> <tr> <td>檢體 DNA 溶液(總量 100 ng)</td> <td>5.0 μL</td> </tr> <tr> <td>無菌去離子水</td> <td>6.1 μL</td> </tr> <tr> <td>總體積</td> <td>20.0 μL</td> </tr> </table>	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	<table border="1"> <tr> <td>5 μM 引子 F</td> <td>1.5 μL</td> </tr> <tr> <td>5 μM 引子 R</td> <td>1.5 μL</td> </tr> <tr> <td>3.3 μM 探針 P</td> <td>1.5 μL</td> </tr> <tr> <td>LightCycler-FastStart DNA Master Hybridization Probes</td> <td>2.0 μL</td> </tr> <tr> <td>25 mM MgCl₂ 溶液</td> <td>2.4 μL</td> </tr> <tr> <td>模版 DNA 溶液(總量 100 ng)</td> <td>5.0 μL</td> </tr> <tr> <td>無菌純水</td> <td>6.1 μL</td> </tr> <tr> <td>總體積</td> <td>20.0 μL</td> </tr> </table>	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	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		
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																																		
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																																		
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																																		
<p>註 5：Real-time PCR 溶液應置於冰浴中配製。</p>	<p>註 7：PCR 溶液應置於冰浴中配製。</p>																																		
<p>2.6. 檢體 DNA 之製備</p>	<p>2.6. 檢體 DNA 之製備</p>																																		
<p>2.6.1. 檢體之處理^(註 6)</p>	<p>2.6.1. 檢體之處理</p>																																		
<p>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。</p>	<p>檢體為乾燥肉乾或粉(碎)狀者，可直接以粉碎機研磨成細粉。檢體為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</p>																																		
<p>註 6：</p>	<p>冷藏或冷凍環境中。</p>																																		
<p>1. 研磨檢體時應於區隔之空間進行，避免交叉污染。</p>																																			
<p>2. 溼狀檢體之乾燥時間可視乾燥程度調整。</p>																																			
<p>2.6.2. DNA 之抽取</p>	<p>2.6.2. DNA 之抽取</p>																																		
<p>採用適用於動物 DNA 抽取之市售</p>	<p>採用 DNeasy[®] Tissue 套組及內附試劑、材料(ATL 試劑、proteinase</p>																																		

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°C 冷凍保存。

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。

2.6.2.1.稱取檢體約 25 mg^(註 8)，置入 2 mL 離心管。

2.6.2.2.加入 ATL 試劑 180 μL 以及 proteinase K 20 μL，以旋渦混合器混合均勻。

2.6.2.3.於 55°C 振盪反應直到檢體溶解。

2.6.2.4.加入 AL 試劑 200 μL，以旋渦混合器混合均勻。

2.6.2.5.水浴 70°C，10 分鐘。

2.6.2.6.加入乙醇(96~100%) 200 μL，以旋渦混合器混合均勻。

2.6.2.7.取混合液注入離心管柱，以 $\geq 6000 \times g$ (8000 rpm) 離心 1 分鐘，並將收集管及濾液丟棄。

2.6.2.8.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 $\geq 6000 \times g$ (8000 rpm) 離心 1 分鐘後，將收集管及濾液丟棄。

2.6.2.9.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 $20000 \times g$ (14000 rpm) 離心 3 分鐘後，將收集管及濾液丟棄。

2.6.2.10.將離心管柱套入新的 1.5 mL 離心管。

2.6.2.11.加入 AE 試劑 100 μL 至離心管柱，於室溫下靜置 1 分鐘後，再以 $\geq 6000 \times g$ (8000 rpm) 離心 1 分鐘，再重複此溶出步驟一次。

2.6.2.12.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。

2.6.2.13.依 2.6.3.2 節測量 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

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。

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 2.6.2.4 之後加入 RNase (100 mg/mL) 4 μL，混合均勻後於室溫下靜置 2 分鐘。

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 9)

2.7.1. PCR 操作步驟

以無菌純水適當稀釋 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 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 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		
測試動物類基因	60°C	30 sec

<u>測試哺乳類及 家禽類基因</u>	<u>54°C</u>	<u>30 sec</u>
<u>測試魚類基因</u>	<u>60°C</u>	<u>30 sec</u>
<u>4. 延展</u>	<u>72°C</u>	<u>30 sec</u>
<u>步驟 2 至步驟 4，共進行 40 個循環反應。</u>		
<u>5. 最終延展</u>	<u>72°C</u>	<u>7 min</u>

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

2.7.4.1. 測試動物類基因：

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 增幅產物大小介於 234~265 bp 者^(註 10)，即判定該檢體含有動物性成分。

2.7.4.2. 測試哺乳類及家禽類基因：

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 97 bp 者，即判定該檢體含有哺乳類或家禽類動物性成分。

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		

2.7.4.3. 測試魚類基因：
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 234 bp 者，即判定該檢體含有魚類動物性成分。

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。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。
 註 10：動物類基因之 PCR 增幅產物大小介於 234~265 bp 者，皆為正反應。

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 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 (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		
測試動物類基	60°C	1 min

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

因		
測試哺乳類及 家禽類基因	60°C	1 min
測試魚類基因	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、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 (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	10 min
2. 變性	95°C	5 sec
3. 黏接		
測試動物類基因	60°C	25 sec
測試哺乳類及 家禽類基因	54°C	25 sec
測試魚類基因	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

2.8.2. RT-PCR 螢光分析

檢體 DNA 經 RT-PCR 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

2.7.3.1. 測試動物類基因 (16S ribosomal RNA) :

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 增幅產物為動物物種之基因片段，可確認該檢體中含有動物性成分。

2.7.3.2. 測試動物類基因 (12S ribosomal RNA) :

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 增幅產物為哺乳類、家禽類或魚類之基因片段，可確認該檢體中含有哺乳類、家禽類或魚類成分。

2.7.3.3. 測試哺乳類及家禽類基因：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 增幅產物為哺乳類或家禽類之基因片段，可確認該檢體中含有哺乳類或家禽類成分。

2.7.3.4. 測試魚類基因：

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 增幅產物為魚類之基因片段，可確認該檢體中含有魚類成分。

2.8.3.1. 測試動物類基因：

檢體 DNA 之 RT-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 RT-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 RT-PCR 增幅產物為動物物種之基因片段，可確認該檢體中含有動物性成分。

2.8.3.2. 測試哺乳類及家禽類基因：檢體 DNA 之 RT-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 RT-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 RT-PCR 增幅產物為哺乳類或家禽類動物物種之基因片段，可確認該檢體中含有哺乳類或家禽類動物性成分。

2.8.3.3. 測試魚類基因：

檢體 DNA 之 RT-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 RT-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 RT-PCR 增幅產物為魚類動物物種之基因片段，可確認該檢體中含有魚類動物性成分。

2.7.4.判定(附圖)

2.7.4.1.以 real-time PCR 測試為動物類負反應，表示不含動物性成分。

2.7.4.2.以 real-time PCR 測試為動物類正反應，及以 real-time PCR 測試亦為哺乳類及家禽類正反應，且以 real-time PCR 測試亦為魚類正反應，表示含哺乳類或/及家禽類及魚類動物性成分，及可能尚含其他類動物性成分。

2.7.4.3.以 real-time PCR 測試為動物類正反應，及以 real-time PCR 測試亦為哺乳類及家禽類正反應，且以 real-time PCR 測試為魚類負反應，表示含哺乳類或/及家禽類動物性成分，及可能尚含其他類動物性成分。

2.7.4.4.以 real-time PCR 測試為動物類正反應，及以 real-time PCR 測試為哺乳類及家禽類負反應，且以 real-time PCR 測試為魚類正反應，表示含魚類動物性成分，及可能尚含其他類動物性成分。

2.7.4.5.以 real-time PCR 測試為動物類正反應，及以 real-time PCR 測試為哺乳類及家禽類負反應，且以 real-time PCR 測試為魚類負反應，表示含其他類動物性成分。

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，如有影響測試結果之因素時，應自行探討。
- 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

2.8.4.判定(附圖)

1. 以 PCR 或 RT-PCR 測試為動物類負反應，表示不含動物性成分。

2. 以 PCR 或 RT-PCR 測試為動物類正反應，及以 PCR 或 RT-PCR 測試亦為哺乳類及家禽類正反應，且以 PCR 或 RT-PCR 測試亦為魚類正反應，表示含哺乳類或/及家禽類及魚類動物性成分，及可能尚含其他類動物性成分。

3. 以 PCR 或 RT-PCR 測試為動物類正反應，及以 PCR 或 RT-PCR 測試亦為哺乳類及家禽類正反應，且以 PCR 或 RT-PCR 測試為魚類負反應，表示含哺乳類或/及家禽類動物性成分，及可能尚含其他類動物性成分。

4. 以 PCR 或 RT-PCR 測試為動物類正反應，及以 PCR 或 RT-PCR 測試為哺乳類及家禽類負反應，且以 PCR 或 RT-PCR 測試為魚類正反應，表示含魚類動物性成分，及可能尚含其他類動物性成分。

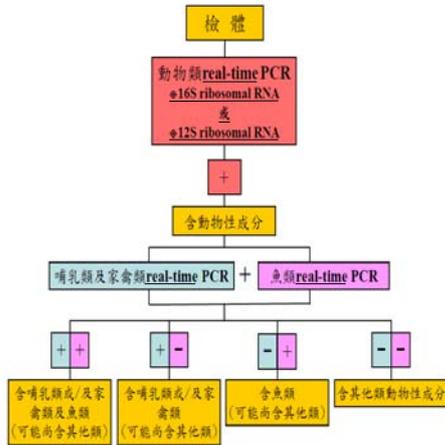
5. 以 PCR 或 RT-PCR 測試為動物類正反應，及以 PCR 或 RT-PCR 測試為哺乳類及家禽類負反應，且以 PCR 或 RT-PCR 測試為魚類負反應，表示含其他類動物性成分。

備註：

1. 本檢驗方法最低檢測濃度為 0.1%(以乾重計)。

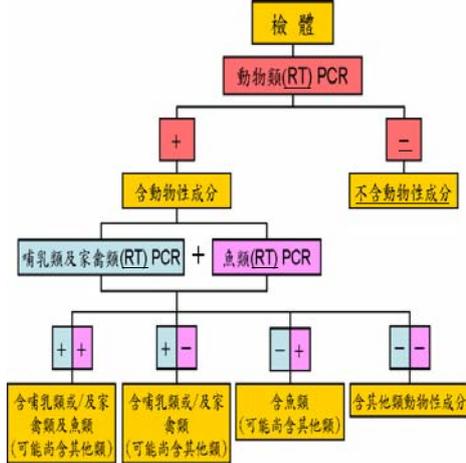
應條件。

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。



附圖 食品中動物性成分之定性篩選檢驗流程

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。



附圖 食品中動物性成分之定性篩選檢驗流程

食品中動物性成分檢驗-金絲燕成分之定性檢驗 修正草案總說明

為加強食品中動物性、植物性成分之管理，並依據食品衛生管理法第三十八條規定：「各級主管機關執行食品、食品添加物、食品容器或包裝及食品用洗潔劑之檢驗，其檢驗方法，由中央主管機關定之」，爰擬具「食品中植物性成分檢驗-金絲燕成分之定性檢驗」草案，其修正要點如下：

- 一、刪除 PCR 試驗相關內容，包含裝置、試藥、器具及材料、試劑之配製及鑑別試驗。
- 二、修正對照用物質。
- 三、增列附註二及三。

食品中動物性成分檢驗-金絲燕成分之定性檢驗

修正草案對照表

修正規定	現行規定	說明
<p>1. 適用範圍：本檢驗方法適用於燕窩製品之定性檢驗。</p> <p>2. 檢驗方法：<u>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。</u></p> <p>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、<u>real-time PCR</u> 試劑配製及檢驗過程皆需有區隔空間，避免交叉污染。<u>Real-time PCR</u> 試劑之配製應於無菌操作台內進行。</p> <p>2.2. 裝置^(註1)</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>2.2.3. 振盪型粉碎機：Retsch MM200，或同級品。</p> <p>2.2.4. 真空乾燥裝置：供 DNA 乾燥用。</p> <p>2.2.5. 高壓滅菌釜。</p> <p>2.2.6. 無菌操作台。</p> <p>2.2.7. 加熱振盪器：具 55℃ 溫控及振盪功能。</p> <p>2.2.8. 微量冷凍離心機(Micro refrigerated centrifuge)：可達 20000 × g，並具 4℃ 溫控功能。</p> <p>2.2.9. 離心機：供各式微量離心管離心用。</p> <p>2.2.10. 分光光度計：具波長 260 nm、280 nm。</p> <p>2.2.11. 冷凍設備：具冷藏及凍結功能。</p> <p>2.2.12. 旋渦混合器(Vortex mixer)。</p> <p>2.2.13. 酸鹼度測定儀(pH meter)。</p> <p>2.2.14. 水浴裝置：溫差±1℃以內者。</p> <p>2.2.15. 天平：最大稱重量為 2000 g，靈</p>	<p>1. 適用範圍：本檢驗方法適用於燕窩製品之定性檢驗。</p> <p>2. 檢驗方法：<u>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。</u></p> <p>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 <u>PCR</u> 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。</p> <p>2.2. 裝置^(註1)</p> <p>2.2.1. <u>聚合酶鏈反應器：ABI PRISM 9700 Sequence Detector，或同級品。</u></p> <p>2.2.2. 即時聚合酶鏈反應器^(註2)：ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System 或 Roche LightCycler，或同級品。</p> <p>2.2.3. 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。</p> <p>2.2.4. 振盪型粉碎機：Retsch MM200，或同級品。</p> <p>2.2.5. 真空乾燥裝置：供 DNA 乾燥用。</p> <p>2.2.6. 高壓滅菌釜。</p> <p>2.2.7. 無菌操作台。</p> <p>2.2.8. 加熱振盪器：具 55℃ 溫控及振盪功能。</p> <p>2.2.9. 微量冷凍離心機(Micro refrigerated centrifuge)：可達 20000 × g，並具 4℃ 溫控功能。</p> <p>2.2.10. 離心機：供各式微量離心管離心用。</p> <p>2.2.11. 分光光度計：具波長 260 nm、280 nm。</p> <p>2.2.12. 冷凍設備：具冷藏及凍結功能。</p>	<p>一、刪除 PCR 試驗相關內容，包含裝置、試藥、器具及材料、試劑之配製及鑑別試驗。</p> <p>二、修正對照用物質。</p> <p>三、增列附註二及三。</p> <p>四、增修訂部分文字。</p>

<p>敏度為 0.1 g；最大稱重量為 100 g，靈敏度為 1 mg。</p> <p>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。</p> <p>2.3. 試藥</p> <p>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。</p> <p>2.3.2. <u>Real-time PCR</u> 用^(註 2)</p> <p>2.3.2.1. 鑑別試驗用引子及探針</p> <p>2.3.2.1.1. <u>哺乳類、家禽類及魚類</u>(標的基因：12S ribosomal RNA，供作內部對照基因)</p> <p>引子 F： 12SF,5'-CAAACCTGGGATTAGATACC</p>	<p>2.2.13. <u>旋渦混合器(Vortex mixer)</u>。</p> <p>2.2.14. <u>電泳槽</u>：供 DNA 電泳用。</p> <p>2.2.15. <u>照相裝置</u>：供拍攝電泳膠片用。</p> <p>2.2.16. <u>紫外燈箱</u>：具波長 302 nm、365 nm 紫外燈。</p> <p>2.2.17. <u>酸鹼度測定儀(pH meter)</u>。</p> <p>2.2.18. <u>水浴裝置</u>：溫差±1℃以內者。</p> <p>2.2.19. <u>天平</u>：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。</p> <p>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。</p> <p>註 2：<u>確認試驗用</u>。</p> <p>2.3. 試藥</p> <p>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。</p> <p>2.3.2. PCR 用^(註 3)</p> <p>2.3.2.1. 鑑別試驗用引子^(註 3)</p> <p>2.3.2.1.1. <u>動物類</u>(標的基因：12S ribosomal RNA，供作內部對照基因)</p> <p>引子 F： 12SF,5'-CAAACCTGGGATTAGATACC CCACTA-3'</p> <p>引子 R： 12SR,5'-ATCGRTTMTAGAACAGGCT CCTCTAG-3'</p> <p><u>PCR 增幅產物大小 155 bp</u></p> <p>2.3.2.1.2. <u>金絲燕</u>(標的基因：12S ribosomal RNA)</p> <p>引子 F： SwiF,5'-GTCGCCAGTTCACCTCCCC-3'</p> <p>引子 R： SwiR,5'-GRTTTCATAYCTCTTTCCGT GRTT-3'</p> <p><u>PCR 增幅產物大小 144 bp</u></p> <p>2.3.2.2. <u>確認試驗用引子及探針</u></p> <p>2.3.2.2.1. <u>動物類</u>(標的基因：12S ribosomal RNA，供作內部對照基因)</p> <p>引子 F： 12SF,5'-CAAACCTGGGATTAGATACC</p>	
---	---	--

<p>CCACTA-3' 引子 R : 12SR,5'-ATCGRTTMTAGAACAGGCT CCTCTAG-3' 探針 P : 12SP,5'-(FAM)-CACCGCCAAGTCCTT TGRGTTTTARGC-(TAMRA)-3' PCR 增幅產物大小 155 bp 2.3.2.1.2. 金絲燕(標的基因 : 12S ribosomal RNA) 引子 F : SwiF,5'-GTCGCCAGTTCACCTCCCC-3' 引子 R : SwiR,5'-GRTTTCATAYCTCTTTCCGT GRTT-3' 探針 P : SwiP,5'-(FAM)-CCYACCCGCTAACA AGACAGGTCAAGGTAT-(TAMRA)-3' PCR 增幅產物大小 144 bp 註 2 : 1. 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. 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。 3. 金絲燕標的基因引子及探針之序列 中，Y 為混合鹼基代碼(C/T)，表示同 時含 C 及 T；R 為混合鹼基代碼 (A/G)，表示同時含 A 及 G。</p>	<p>CCACTA-3' 引子 R : 12SR,5'-ATCGRTTMTAGAACAGGCT CCTCTAG-3' 探針 P : 12SP,5'-(FAM)-CACCGCCAAGTCCTT TGRGTTTTARGC -(TAMRA)-3' PCR 增幅產物大小 155 bp 2.3.2.2.2. 金絲燕(標的基因 : 12S ribosomal RNA) 引子 F : SwiF,5'-GTCGCCAGTTCACCTCCCC-3' 引子 R : SwiR,5'-GRTTTCATAYCTCTTTCCGT GRTT-3' 探針 P : SwiP,5'-(FAM)-CCYACCCGCTAACA AGACAGGTCAAGGTAT-(TAMRA)-3' PCR 增幅產物大小 144 bp 註 3 : 1. 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. 動物類內部對照基因引子及探針之 序列中，Y 為混合鹼基代碼(C/T)， 表示同時含 C 及 T；R 為混合鹼基代 碼(A/G)，表示同時含 A 及 G。 2.3.2.3. 去氧核苷三磷酸 (<u>deoxyribonucleoside triphosphate, dNTP</u>) 含去氧腺苷三磷酸 (deoxyadenosine triphosphate, dATP)，去氧胞苷三磷酸 (deoxycytidine triphosphate, dCTP)，去 氧鳥糞嘧啶三磷酸(deoxyguanosine triphosphate, dGTP)及去氧胸苷三磷酸 (deoxythymidine triphosphate, dTTP)各 2.5 mM 之溶液。</p>	
--	--	--

<p>2.3.2.2. TaqMan Universal PCR Master Mix (適用於 ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System)</p> <p>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。</p> <p>2.3.2.3. LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe (適用於 Roche LightCycler)</p> <p>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。</p> <p>2.3.3. 對照用物質：金絲燕之組織或使用衛生福利部食品藥物管理署提供編號 pIDS1 之參考質體作為對照用物質。</p> <p>2.4. 器具及材料^(註3)</p> <p>2.4.1. 吸管(Pipette)：10 μL、20 μL、100 μL、200 μL 及 1000 μL。</p> <p>2.4.2. 吸管尖頭(Pipette tips)：10 μL、20 μL、200 μL 及 1000 μL。</p> <p>2.4.3. 離心管：200 μL、600 μL、1.5 mL 及 2 mL。</p> <p>2.4.4. PCR 反應管：200 μL。</p> <p>2.4.5. PCR 玻璃毛細管：Roche LightCycler 專用。</p> <p>2.4.6. 玻璃或塑膠瓶：50 mL、100 mL、</p>	<p>2.3.2.4. 聚合酶 <u>Taq DNA polymerase (2U/μL)。</u></p> <p>2.3.2.5. TaqMan Universal PCR Master Mix (<u>確認試驗用</u>)，適用於 ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System)</p> <p>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。</p> <p>2.3.2.6. LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe (<u>確認試驗用</u>)，適用於 Roche LightCycler)</p> <p>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。</p> <p>2.3.3. 電泳用試藥：<u>溴化乙錠(ethidium bromide)</u>、<u>瓊膠(agarose)</u>、<u>溴酚藍(bromophenol blue)</u>、<u>二甲苯藍(xylene cyanol FF)</u>、<u>乙二胺四乙酸二鈉(ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt, Na₂-EDTA)</u>、<u>三羥甲基氨基甲烷(tris(hydroxymethyl) aminomethane (Tris))</u>、<u>甘油</u>、<u>硼酸</u>，均採<u>分子生物分析級試藥</u>。<u>DNA 分子量標記物質 (DNA molecular weight marker)：100-bp DNA Ladder Marker。</u></p> <p>2.3.4. 對照用物質：金絲燕之組織或使用行政院衛生署食品藥物管理局提供編號 pIDS1 之參考質體作為對照用物質。</p> <p>2.4. 器具及材料^(註4)</p> <p>2.4.1. 吸管(Pipette)：10 μL、20 μL、100 μL、200 μL 及 1000 μL。</p> <p>2.4.2. <u>電泳膠片製作盤。</u></p> <p>2.4.3. 吸管尖頭(Pipette tips)：10 μL、20 μL、200 μL 及 1000 μL。</p> <p>2.4.4. 離心管：200 μL、600 μL、1.5 mL 及 2 mL。</p> <p>2.4.5. PCR 反應管：200 μL <u>及 500 μL。</u></p> <p>2.4.6. PCR 玻璃毛細管：Roche LightCycler 專用。</p>	
--	--	--

250 mL、500 mL、1000 mL 及 2000 mL。

2.4.7. 塑膠離心管：50 mL。

2.4.8. 過濾膜：孔徑為 0.45 μm ，nitrocellulose 材質。

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)

2.4.7. 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：孔徑為 0.45 μm ，材質為 nitrocellulose。

註 4：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. 0.5M 乙二胺四乙酸(EDTA)溶液
稱取乙二胺四乙酸二鈉 186.1 g，加去離子水 800 mL 溶解，再加入氫氧化鈉 20 g 以調整 pH 值至 8.0，並加去離子水使成 1000 mL。

2.5.2. 0.5 倍 TBE (Tris-borate-EDTA)

緩衝溶液

稱取三羥甲基氨基甲烷 54 g 及硼酸 27.5 g，加入 0.5M EDTA 溶液 20 mL，再加水溶解使成 1000 mL，供作 5 倍 TBE 緩衝溶液，或使用市售 5 倍 TBE 緩衝溶液。臨用時以去離子水將 5 倍 TBE 緩衝溶液稀釋為 0.5 倍，作為 0.5 倍 TBE 緩衝溶液。

2.5.3. 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。

2.5.4. 6 倍載入膠片緩衝溶液(6 × gel loading buffer)

稱取溴酚藍 25 g 及二甲苯藍 0.25 g，加入甘油 30 mL，再加入無菌去離子水使成 100 mL，置於 4°C 冰箱貯存備用。

2.5.5. 膠片染液

稱取溴化乙錠 0.1 g，加水 10 mL 溶解，供作原液(10 mg/mL)，使用前以水稀釋成溴化乙錠 1 $\mu\text{g/mL}$ 。溴化乙錠為致癌物質，配製時應注意安全。

2.5.6. PCR 溶液^(註5)

2.5.6.1. 鑑別試驗用

10 倍含 15 mM 氯化鎂 PCR 緩衝溶液	2.5 μL
Taq DNA polymerase (2 U/ μL)	1.0 μL

2.5 mM dNTP	4.0 µL
10 µM 引子 F	1.0 µL
10 µM 引子 R	1.0 µL
檢體 DNA 溶液(總量 100 ng)	5.0 µL
無菌去離子水	10.5 µL
總體積	25.0 µL

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

採用適用於植物 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

2.5.6.2. ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System 確認試驗用

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

2.5.6.3. Roche LightCycler 確認試驗用

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 Hybridization	2.0 µL
25 mM 氯化鎂	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 5: 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 6)

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 6:

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°C 冷

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。

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. 鑑別試驗^(註 7)

2.7.1. PCR 操作步驟

以無菌去離子水適當稀釋檢體 DNA 原液及引子備用。取 PCR 反應管，依照 2.5.6.1. 節配製 PCR 溶液，依序加入無菌去離子水、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，依 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	60°C	30 sec
4. 延展	72°C	30 sec
步驟 2 至步驟 4，共進行 35 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，分別與無菌去離子水(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。同時另取 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。電泳後之膠片置入膠片染液中進行染色約 15 分鐘，置入水中漂洗及褪染，再以紫外光照射觀察是否有明顯之 DNA 螢光帶，並判讀結果。同時另測試正反應及負反應對照組。

2.7.4. 鑑別

檢體 DNA 需同時進行內部對照基因及金絲燕標的基因之 PCR 測試。檢體

DNA 之 PCR 增幅產物電泳結果，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 均出現 PCR 增幅產物，經由 DNA 分子量標記物質估算 PCR 增幅產物大小為 144 bp 者，即判定該檢體含有金絲燕成分。

註 7：

1. 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，應進行確認試驗。

2. 檢體 DNA 之純度將影響 PCR 測試結果，檢體 DNA 進行內部對照基因 PCR 測試，可確定是否含有 DNA 及其純度。

3. 本 PCR 定性反應條件係採 ABI PRISM 9700 設定之，當使用其他機型時，應自行探討反應條件。

2.8. 確認試驗：本實驗視需要而操作之。

2.8.1. Real-time PCR 操作步驟

2.8.1.1. 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 2.5.6.2. 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 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	1min
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. 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，

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 增幅產物為金絲燕之基因片段，可確認該檢體中含有金絲燕成分。

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。

依照 2.5.6.3.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

2.8.2. 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 螢光分析圖均出現經由探針所產生之螢光增幅曲線，即確認該 PCR 增幅產物為金絲燕之基因片段，可確認該檢體中含有金絲燕成分。

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。

食品中植物性成分檢驗-花生成分之定性檢驗修正草案總說明

為加強食品中動物性、植物性成分之管理，並依據食品衛生管理法第三十八條規定：「各級主管機關執行食品、食品添加物、食品容器或包裝及食品用洗潔劑之檢驗，其檢驗方法，由中央主管機關定之」，爰擬具「食品中植物性成分檢驗-花生成分之定性檢驗」草案，其修正要點如下：

- 一、刪除 PCR 試驗相關內容，包含裝置、試藥、器具及材料、試劑之配製及鑑別試驗。
- 二、修正對照用物質。
- 三、增列附註二及三。

食品中植物性成分檢驗-花生成分之定性檢驗修

正草案對照表

修正規定	現行規定	說明
<p>1. 適用範圍：本檢驗方法適用於食品中花生成分之定性檢驗。</p> <p>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。</p> <p>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、<u>real-time</u> PCR 試劑配製及檢驗過程皆需有區隔空間，避免交叉污染。<u>Real-time</u> PCR 試劑之配製應於無菌操作台內進行。</p> <p>2.2. 裝置^(註 1)</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>2.2.3. 振盪型粉碎機：Retsch MM200，或同級品。</p> <p>2.2.4. 真空乾燥裝置：供 DNA 乾燥用。</p> <p>2.2.5. 高壓滅菌釜。</p> <p>2.2.6. 無菌操作台。</p> <p>2.2.7. 加熱振盪器：具 55°C 溫控及振盪功能。</p> <p>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。</p> <p>2.2.9. 離心機：供各式微量離心管離心用。</p> <p>2.2.10. 分光光度計：具波長 260 nm、280 nm。</p> <p>2.2.11. 冷凍設備：具冷藏及凍結功能。</p>	<p>1. 適用範圍：本檢驗方法適用於食品中花生製品之定性檢驗。</p> <p>2. 檢驗方法：檢體經 DNA 萃取後，以<u>聚合酶鏈反應 (polymerase chain reaction, PCR)</u>及即時聚合酶鏈反應 (real-time polymerase chain reaction, real-time PCR) 之方法。</p> <p>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 <u>PCR</u> 等檢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。</p> <p>2.2. 裝置^(註 1)</p> <p>2.2.1. <u>聚合酶鏈反應器：ABI PRISM 9700 Sequence Detector，或同級品。</u></p> <p>2.2.2. 即時聚合酶鏈反應器^(註 2)：ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System 或 Roche LightCycler，或同級品。</p> <p>2.2.3. 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。</p> <p>2.2.4. 振盪型粉碎機：Retsch MM200，或同級品。</p> <p>2.2.5. 真空乾燥裝置：供 DNA 乾燥用。</p> <p>2.2.6. 高壓滅菌釜。</p> <p>2.2.7. 無菌操作台。</p> <p>2.2.8. 加熱振盪器：具 55°C 溫控及振盪功能。</p> <p>2.2.9. 微量冷凍離心機 (Micro refrigerated centrifuge)：可達 20000 × g，並具 4°C 溫控功能。</p> <p>2.2.10. 離心機：供各式微量離心管離心用。</p> <p>2.2.11. 分光光度計：具波長 260 nm、280 nm。</p> <p>2.2.12. 冷凍設備：具冷藏及凍結功能。</p>	<p>一、刪除 PCR 試驗相關內容，包含裝置、試藥、器具及材料、試劑之配製及鑑別試驗。</p> <p>二、修正對照用物質。</p> <p>三、增列附註二及三。</p> <p>四、增修訂部分文字。</p>

<p>2.2.12.旋渦混合器(Vortex mixer)。</p> <p>2.2.13.酸鹼度測定儀(pH meter)。</p> <p>2.2.14.水浴裝置：溫差±1°C以內者。</p> <p>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。</p> <p>註 1: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。</p> <p>2.3.試藥</p> <p>2.3.1. DNA 抽取用試藥：乙醇(96-100%) 採分子生物分析級試藥；適用於植物 DNA 抽取之市售套組。</p> <p>2.3.2.<u>Real-time PCR</u> 用^(註2)</p> <p>2.3.2.1. 鑑別試驗用引子及探針</p> <p>2.3.2.1.1. 植物共通性基因(標的基因：5.8S ribosomal RNA，供作內部對照基因)</p> <p>引子 F：</p>	<p>2.2.13.旋渦混合器(Vortex mixer)。</p> <p>2.2.14.電泳槽：供 DNA 電泳用。</p> <p>2.2.15.照相裝置：供拍攝電泳膠片用。</p> <p>2.2.16.紫外燈箱：具波長 302 nm、365 nm 紫外燈。</p> <p>2.2.17.酸鹼度測定儀(pH meter)。</p> <p>2.2.18.水浴裝置：溫差±1°C以內者。</p> <p>2.2.19.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。</p> <p>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。</p> <p>註 2: <u>確認試驗用</u>。</p> <p>2.3. 試藥</p> <p>2.3.1. DNA 抽取用試藥：乙醇(96-100%) 採分子生物分析級試藥；適用於植物 DNA 抽取之市售套組。</p> <p>2.3.2. PCR 用^(註3)</p> <p>2.3.2.1. 鑑別試驗用引子</p> <p>2.3.2.1.1. 植物共通性基因 (標的基因：5.8S ribosomal RNA，供作內部對照基因)</p> <p>引子 F：</p> <p>5.8SF,5'-ACTCTCGGCAACGGATATC TYG-3'</p> <p>引子 R：</p> <p>5.8SR,5'-GGCGCAACTTGCGTTCAAA R-3'</p> <p>PCR 增幅產物大小 116 bp</p> <p>2.3.2.1.2. 花生 (標的基因：internal transcribed spacer 1, ITS1)</p> <p>引子 F：</p> <p>PF,5'-GAGTCCACAAACACCCGAGG-3'</p> <p>引子 R：</p> <p>PR,5'-AGTCGTTCTTAACTCTTGTGG TCA-3'</p> <p>PCR 增幅產物大小 181 bp</p> <p>2.3.2.2. <u>確認試驗用引子及探針</u></p> <p>2.3.2.2.1. 植物共通性基因(標的基因：5.8S ribosomal RNA，供作內部對照基因)</p> <p>引子 F：</p>	
---	--	--

<p>5.8SF,5'-ACTCTCGGCAACGGATATC TYG-3' 引子 R : 5.8SR,5'-GGCGCAACTTGCGTTCAAA R-3' 探針 P : 5.8SP,5'-(FAM)-TCGATGGTTCRCGGG ATT CTGCAATTCA - (TAMRA)-3' PCR 增幅產物大小 116 bp 2.3.2.1.2. 花生(標的基因 : internal transcribed spacer 1, ITS1) 引子 F : PF,5'-GAGTCCACAAACACCCGAGG-3' 引子 R : PR,5'-AGTCGTTCTTAACTCTTGTGG TCA-3' 探針 P : <u>PP,5'-(FAM)-CCCGTCTCAAACAAGA ACAA AACCC - (TAMRA)-3'</u> PCR 增幅產物大小 181 bp 註 2: 1. 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. 植物類內部對照基因引子及探針之序列中，Y 為混合鹼基代碼(C/T)，表示同時含 C 及 T;R 為混合鹼基代碼(A/G)，表示同時含 A 及 G。</p>	<p>5.8SF,5'-ACTCTCGGCAACGGATATC TYG-3' 引子 R : 5.8SR,5'-GGCGCAACTTGCGTTCAAA R-3' 探針 P : 5.8SP,5'-(FAM)-TCGATGGTTCRCGGG ATTCTGCAATTCA-(TAMRA)-3' PCR 增幅產物大小 116 bp 2.3.2.2. 花生(標的基因 : internal transcribed spacer 1, ITS1) 引子 F : PF,5'-GAGTCCACAAACACCCGAGG-3' 引子 R : PR,5'-AGTCGTTCTTAACTCTTGTGG TCA-3' 探針 P : <u>BP,5'-(FAM)-ATCCTGTCGTGCGGTTG CGTTCTCC-(TAMRA)-3'</u> PCR 增幅產物大小 181 bp 註 3: 1. 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. 植物類內部對照基因引子及探針之序列中，Y 為混合鹼基代碼(C/T)，表示同時含 C 及 T;R 為混合鹼基代碼(A/G)，表示同時含 A 及 G。 2.3.2.3. 去氧核糖核苷三磷酸 (Deoxyribonucleoside triphosphate, dNTP)溶液 <u>含去氧腺苷三磷酸 (deoxyadenosine triphosphate, dATP)、去氧胞苷三磷酸 (deoxycytidine triphosphate, dCTP)、去氧鳥糞嘌呤核苷三磷酸 (deoxyguanosine triphosphate, dGTP)及去氧胸苷三磷酸 (deoxythymidine triphosphate, dTTP)各 2.5 mM 之溶液。</u> 2.3.2.4. 聚合酶</p>	
--	---	--

<p>2.3.2.2. <u>TaqMan Universal PCR Master Mix (適用於 ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System)</u> 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。</p> <p>2.3.2.3. <u>LightCycler[®] FastStart DNA Master HybProbe (適用於 Roche LightCycler)</u> 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。</p> <p>2.3.3. 對照用物質：花生。</p> <p>2.4. 器具及材料^(註 3)</p> <p>2.4.1. 吸管(Pipette)：10 μL、20 μL、100 μL、200 μL 及 1000 μL。</p> <p>2.4.2. 吸管尖頭(Pipette tips)：10 μL、20 μL、200 μL 及 1000 μL。</p> <p>2.4.3. 離心管：200 μL、600 μL、1.5 mL 及 2 mL。</p> <p>2.4.4. PCR 反應管：200 μL。</p> <p>2.4.5. PCR 玻璃毛細管：Roche LightCycler 專用。</p> <p>2.4.6. 玻璃或塑膠瓶：50 mL、100 mL、250 mL、500 mL、1000 mL 及 2000 mL。</p>	<p><u>Taq DNA polymerase (2 U/μL)</u>，內附 10 倍含 15 mM 氯化鎂之 PCR 緩衝溶液，或同級品。</p> <p>2.3.2.5. <u>TaqMan Universal PCR Master Mix (確認試驗用，適用於 ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System)</u> 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。</p> <p>2.3.2.6. <u>LightCycler[®] FastStart DNA Master HybProbe (確認試驗用，適用於 Roche LightCycler)</u> 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。</p> <p>2.3.3. <u>電泳用：溴化乙錠(ethidium bromide)、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)、氫氧化鈉及硼酸採試藥級。瓊膠(agarose)及甘油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。</u></p> <p>2.3.4. 對照用物質：花生</p> <p>2.4. 器具及材料^(註 4)</p> <p>2.4.1. 吸管(Pipette)：10 μL、20 μL、100 μL、200 μL 及 1000 μL。</p> <p>2.4.2. <u>電泳膠片製作盤。</u></p> <p>2.4.3. 吸管尖頭(Pipette tips)：10 μL、20 μL、200 μL 及 1000 μL。</p> <p>2.4.4. 離心管：200 μL、600 μL、1.5 mL 及 2 mL。</p> <p>2.4.5. PCR 反應管：200 μL 及 500 μL。</p> <p>2.4.6. PCR 玻璃毛細管：Roche LightCycler 專用。</p> <p>2.4.7. 玻璃或塑膠瓶：50 mL、100 mL、250 mL、500 mL、1000 mL 及 2000</p>	
--	---	--

2.4.7. 塑膠離心管：50 mL。

2.4.8. 過濾：孔徑為 0.45 μm ，nitrocellulose 材質。

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)

mL。

2.4.8. 塑膠離心管：50 mL。

2.4.9. 濾膜：孔徑為 0.45 μm ，材質為 nitrocellulose。

註 4：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. 0.5M 乙二胺四乙酸 (EDTA) 溶液
稱取乙二胺四乙酸二鈉 186.1 g，加去離子水 800 mL 溶解，再加入氫氧化鈉 20 g 以調整 pH 值至 8.0，並加去離子水使成 1000 mL。

2.5.2. 0.5 倍 TBE (Tris-borate-EDTA) 緩衝溶液

稱取三羥甲基氨基甲烷 54 g 及硼酸 27.5 g，加入 0.5M EDTA 溶液 20 mL，再加水溶解使成 1000 mL，供作 5 倍 TBE 緩衝溶液，或使用市售 5 倍 TBE 緩衝溶液。臨用時以去離子水將 5 倍 TBE 緩衝溶液稀釋為 0.5 倍，作為 0.5 倍 TBE 緩衝溶液。

2.5.3. 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。

2.5.4. 6 倍載入膠片緩衝溶液 (6 \times gel loading buffer)

稱取溴酚藍 25 g 及二甲苯藍 0.25 g，加入甘油 30 mL，再加入無菌去離子水使成 100 mL，置於 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱貯存備用。

2.5.5. 膠片染液

稱取溴化乙錠 0.1 g，加水 10 mL 溶解，供作原液 (10 mg/mL)，使用前以水稀釋成 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。溴化乙錠為致癌物質，配製時應注意安全。

2.5.6. PCR 溶液^(註5)

2.5.6.1. 鑑別試驗用

<u>10 倍含 15 mM 氯化鎂之 PCR 緩衝溶液</u>	<u>2.5 μL</u>
<u>Taq DNA polymerase (2 U/μL)</u>	<u>1.0 μL</u>
<u>2.5 mM dNTP</u>	<u>4.0 μL</u>
<u>10 μM 引子 F</u>	<u>1.0 μL</u>

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

採用適用於植物 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°C 冷凍保存。

10 μM 引子 R	1.0 μL
檢體 DNA 溶液(總量 100 ng)	5.0 μL
無菌去離子水	10.5 μL
總體積	25.0 μL

2.5.6.2. ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System 確認試驗用

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

2.5.6.3. Roche LightCycler 確認試驗用

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 5: 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 6)

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 6:

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

採用適用於植物 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°C 冷凍保存。

2.6.3. DNA 濃度測定及純度判斷

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。

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. 鑑別試驗^(註7)

2.7.1. PCR 操作步驟

以無菌去離子水適當稀釋檢體 DNA 原液及引子備用。取 PCR 反應管，依照 2.5.6.1.節配製 PCR 溶液，依序加入無菌去離子水、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，依 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	60°C	30 sec
4. 延展	72°C	30 sec
步驟 2 至步驟 4，共進行 35 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，分別與無菌去離子水(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。同時另取 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。電泳後之膠片置入膠片染液中進行染色約 15 分鐘，置入水中漂洗及褪染，再以紫外光照射觀察是否有明顯之 DNA 螢光帶，並判讀結果。同時另測試正反應及負反應對照組。

2.7.4. 鑑別

檢體 DNA 需同時進行內部對照基因及花生標的基因之 PCR 測試。檢體 DNA 之 PCR 增幅產物電泳結果，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 均出現 PCR 增幅產物，經由 DNA 分子量標記物質估算 PCR 增幅產物大小為 181 bp 者，即判定該檢體含有花生成分。

註 7：

1. 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，應進行確認試驗。
2. 檢體 DNA 之純度將影響 PCR 測試結果，檢體 DNA 進行內部對照基因 PCR 測試，可確定是否含有 DNA 及其純度。
3. 本 PCR 定性反應條件係採 ABI PRISM 9700 設定之，當使用其他機型時，應自行探討反應條件。

2.8. 確認試驗：本試驗視需要而操作之。

2.8.1. Real-time PCR 操作步驟

2.8.1.1. 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 2.5.6.2. 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 μL 於 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

2.8.1.2. 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 2.5.6.3. 節配製 PCR 溶液，依序加入 LightCycler® FastStart DNA

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 μ L 於玻璃毛細管中，各別加入檢體 DNA 溶液 5 μ L，再將毛細管置於離心機中，以 800 \times 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 增幅產物為花生之基因片段，可確認該檢體中含有花生成分。

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。

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 μ L 於玻璃毛細管中，各別加入檢體 DNA 溶液 5 μ L，再將毛細管置於離心機中，以 800 \times 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

2.8.2. 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。

2.8.3. 確認

檢體 DNA 之 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 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 PCR 增幅產物為花生之基因片段，可確認該檢體中含有花生成分。

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。

食品中植物性成分檢驗-洋蔥成分之定性檢驗修正草案總說明

為加強食品中動物性、植物性成分之管理，並依據食品衛生管理法第三十八條規定：「各級主管機關執行食品、食品添加物、食品容器或包裝及食品用洗潔劑之檢驗，其檢驗方法，由中央主管機關定之」，爰擬具「食品中植物性成分檢驗-洋蔥成分之定性檢驗」草案，其修正要點如下：

- 一、中英文標題修正。
- 二、刪除 PCR 試驗相關內容，包含裝置、試藥、器具及材料、試劑之配製及鑑別試驗。
- 三、修正對照用物質。
- 四、增列附註二及三。

食品中植物性成分檢驗-洋蔥成分之定性檢驗修正草案對照表

修正規定	現行規定	說明
<p>食品中植物性成分檢驗方法—洋蔥成分之<u>定性</u>檢驗</p> <p>Method of Test for Plant-Derived Ingredients in Foods—<u>Qualitative</u> Test of Onion Ingredient</p> <p>1. 適用範圍：本檢驗方法適用於食品中洋蔥成分之定性檢驗。</p> <p>2. 檢驗方法：<u>檢體經 DNA 萃取後，以即時聚合酶鏈反應 (real-time polymerase chain reaction, <u>real-time PCR</u>) 之方法。</u></p> <p>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、<u>real-time PCR</u> 試劑配製及<u>檢驗過程</u>皆需有區隔空間，避免交叉污染。<u>Real-time PCR</u> 試劑之配製應於無菌操作台內進行。</p> <p>2.2. 裝置^(註1)</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>2.2.3. 振盪型粉碎機：Retsch MM200，或同級品。</p> <p>2.2.4. 真空乾燥裝置：供 DNA 乾燥用。</p> <p>2.2.5. 高壓滅菌釜。</p> <p>2.2.6. 無菌操作台。</p> <p>2.2.7. 加熱振盪器：具 55°C 溫控及振盪功能。</p> <p>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。</p> <p>2.2.9. 離心機：供各式微量離心管離心用。</p>	<p>食品中植物性成分檢驗方法—洋蔥成分之檢驗</p> <p>Method of Test for Plant-Derived Ingredients in Foods—Test of Onion Ingredient</p> <p>1. 適用範圍：本檢驗方法適用於食品中洋蔥成分之定性檢驗。</p> <p>2. 檢驗方法：<u>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。</u></p> <p>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 <u>PCR 等實驗過程</u>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。</p> <p>2.2. 裝置^(註1)</p> <p>2.2.1. <u>聚合酶鏈反應器：ABI PRISM[®] 9700 Sequence Detector，或同級品。</u></p> <p>2.2.2. <u>即時聚合酶鏈反應器^(註2)：ABI PRISM[®] 7700 Sequence Detector 或 Roche LightCycler[®]，或同級品。</u></p> <p>2.2.3. <u>真空冷凍乾燥裝置：溫度可達 -40°C 以下，真空度可達 133 mBar 以下，供檢體乾燥用。</u></p> <p>2.2.4. 振盪型粉碎機：Retsch MM200，或同級品。</p> <p>2.2.5. 真空乾燥裝置：供 DNA 乾燥用。</p> <p>2.2.6. 高壓滅菌釜。</p> <p>2.2.7. 無菌操作台。</p> <p>2.2.8. 加熱振盪器：具 55°C 溫控及振盪功能。</p> <p>2.2.9. 微量冷凍離心機 (Micro refrigerated centrifuge)：可達 20000 × g，並具 4°C 溫控功能。</p> <p>2.2.10. 離心機：供各式微量離心管離心用。</p>	<p>一、中英文標題修正。</p> <p>二、刪除 PCR 試驗相關內容，包含裝置、試藥、器具及材料、試劑之配製及鑑別試驗。</p> <p>三、修正對照用物質。</p> <p>四、增列附註二及三。</p> <p>五、增修訂部分文字。</p>

<p>2.2.10.分光光度計：具波長 260 nm、280 nm。</p> <p>2.2.11.冷凍設備：具冷藏及凍結功能。</p> <p>2.2.12.旋渦混合器(Vortex mixer)。</p> <p>2.2.13.酸鹼度測定儀(pH meter)。</p> <p>2.2.14.水浴裝置：溫差±1℃以內者。</p> <p>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。</p> <p>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。</p>	<p>2.2.11.分光光度計：具波長 260 nm、280 nm。</p> <p>2.2.12.冷凍設備：具冷藏及凍結功能。</p> <p>2.2.13.旋渦混合器(Vortex mixer)。</p> <p>2.2.14.電泳槽：供 DNA 電泳用。</p> <p>2.2.15.照相裝置：供拍攝電泳膠片用。</p> <p>2.2.16.紫外燈箱：具波長 302 nm、365 nm 紫外燈。</p> <p>2.2.17.pH 測定儀。</p> <p>2.2.18.水浴裝置：溫差±1℃以內者。</p> <p>2.2.19.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。</p> <p>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。</p> <p>註 2：確認試驗用。</p>	
<p>2.3. 試藥</p> <p>2.3.1.DNA 抽取用試藥：乙醇(96-100%)採分子生物分析級試藥；適用於植物 DNA 抽取之市售套組。</p> <p>2.3.2.<u>Real-time PCR</u> 用^(註 2)</p>	<p>2.3. 試藥</p> <p>2.3.1.DNA 抽取用試藥：乙醇(96~100%)採分子生物分析級試藥；適用於植物 DNA 抽取之市售套組。</p> <p>2.3.2.PCR 用^(註 3)</p> <p>2.3.2.1.鑑別試驗用引子</p> <p>2.3.2.1.1. 植物共通性基因(標的基因：<u>ribosomal RNA</u>，供作內部對照基因) 引子 F： <u>5.8SF,5'-ACTCTCGGCAACGGATATC TYG-3'</u> 引子 R： <u>5.8SR,5'-GGCGCAACTTGCGTTCAA AR-3'</u> PCR 增幅產物大小 116 bp</p> <p>2.3.2.1.2. 蔥及洋蔥 (標的基因：<u>internal transcribed spacer, ITS</u>) 引子 F： <u>AFaF,5'-ACATACTGTGAGTGATGGC GGATGTGGAG-3'</u> 引子 R： <u>AFaR,5'-TTCGCCGCGCGTAGACCTA ACGACA-3'</u> PCR 增幅產物大小 99 bp</p> <p>2.3.2.1.3. 洋蔥(標的基因：<u>cytoplasmic specific DNA</u>) 引子 F：</p>	

<p>2.3.2.1. 鑑別試驗用引子及探針</p> <p>2.3.2.1.1. 植物共通性基因(標的基因：<u>5.8S</u> ribosomal RNA，供作內部對照基因)</p> <p>引子 F： 5.8SF,5'-ACTCTCGGCAACGGATATC TYG -3'</p> <p>引子 R： 5.8SR,5'-GGCGCAACTTGCGTTCAAA R-3'</p> <p>探針 P： 5.8SP,5'-(FAM)-TCGATGGTTCRCGGG ATTCTGCAATTCA-(TAMRA)-3'</p> <p>PCR 增幅產物大小 116 bp</p> <p>2.3.2.1.2. 蔥及洋蔥 (標的基因：internal transcribed spacer, ITS)</p> <p>引子 F： AFaF,5'ACATACTGTGAGTGATGGCG GATGT GGAG-3'</p> <p>引子 R： AFaR,5'-TTCGCCGCGCGTAGACCTA ACGACA-3'</p> <p>探針 P： AFaP,5'-(FAM)-TTGACCCTCCGTGCC TTAATTGT-(TAMRA)-3'</p> <p>PCR 增幅產物大小 99 bp</p> <p>2.3.2.1.3. 洋蔥(標的基因：cytoplasmic specific DNA)</p> <p>引子 F： ONIF,5'-TCTAGATGTCGCATCAGTG GAATCC-3'</p> <p>引子 R： ONIR,5'-CGTGACAACCTCCTCTTCC-3'</p> <p>探針 P： ONIP,5'-(FAM)-TGCAGGCTCAGGCG CTG-(TAMRA)-3'</p> <p>PCR 增幅產物大小 174 bp</p> <p>註 2： 1. 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</p>	<p><u>ONIF,5'-TCTAGATGTCGCATCAGTG GAATCC-3'</u></p> <p><u>引子 R：</u></p> <p><u>ONIR,5'-CGTGACAACCTCCTCTTCC-3'</u></p> <p><u>PCR 增幅產物大小 174 bp</u></p> <p>2.3.2.2. 確認試驗用引子及探針</p> <p>2.3.2.2.1. 植物共通性基因(標的基因：<u>ribosomal RNA</u>，供作內部對照基因)</p> <p>引子 F： 5.8SF,5'-ACTCTCGGCAACGGATATC TYG-3'</p> <p>引子 R： 5.8SR,5'-GGCGCAACTTGCGTTCAAA R-3'</p> <p>探針 P： 5.8SP,5'-(FAM)-TCGATGGTTCRCGGG ATTCTGCAATTCA-(TAMRA)-3'</p> <p>PCR 增幅產物大小 116 bp</p> <p>2.3.2.2.2. 蔥及洋蔥(標的基因：internal transcribed spacer, ITS)</p> <p>引子 F： AFaF,5'-ACATACTGTGAGTGATGGCG GATGTGGAG-3'</p> <p>引子 R： AFaR,5'-TTCGCCGCGCGTAGACCTA ACGACA-3'</p> <p>探針 P： AFaP,5'-(FAM)-TTGACCCTCCGTGCC TTAATTGT-(TAMRA)-3'</p> <p>PCR 增幅產物大小 99 bp</p> <p>2.3.2.2.3. 洋蔥(標的基因：cytoplasmic specific DNA)</p> <p>引子 F： ONIF,5'-TCTAGATGTCGCATCAGTG GAATCC-3'</p> <p>引子 R： ONIR,5'-CGTGACAACCTCCTCTTCC-3'</p> <p>探針 P： ONIP,5'-(FAM)-TGCAGGCTCAGGCG CTG-(TAMRA)-3'</p> <p>PCR 增幅產物大小 174 bp</p> <p>註 3： 1. 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</p>	
---	---	--

<p>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。</p> <p>2. <u>植物類內部對照</u>基因引子及探針之序列中，Y為混合鹼基代碼(C/T)，表示同時含C及T；R為混合鹼基代碼(A/G)，表示同時含A及G。</p> <p>2.3.2.2. <u>TaqMan Universal PCR Master Mix (適用於ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System)</u> 本試劑內含 <u>real-time</u> 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。</p> <p>2.3.2.3. <u>LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe (適用於Roche LightCycler)</u> 本試劑內含 <u>real-time</u> PCR 所需去氧核糖核苷三磷酸、聚合酶等，且內附 <u>25 mM 氯化鎂溶液</u>，使用時添加引子、探針及待測檢體DNA。</p>	<p>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。</p> <p>2. <u>植物共通性</u>基因引子及探針之序列中，Y為混合鹼基代碼(C/T)，表示同時含C及T；R為混合鹼基代碼(A/G)，表示同時含A及G。</p> <p>2.3.2.3. <u>去氧核糖核苷三磷酸 (deoxyribonucleoside triphosphate, dNTP) 溶液</u> 含去氧腺苷三磷酸 (deoxyadenosine triphosphate, dATP)，去氧胞苷三磷酸 (deoxycytidine triphosphate, dCTP)，去氧鳥糞嘌呤核苷三磷酸 (deoxyguanosine triphosphate, dGTP) 及去氧胸苷三磷酸 (deoxythymidine triphosphate, dTTP) 各 <u>2.5 mM 之溶液</u>。</p> <p>2.3.2.4. <u>聚合酶</u> <u>Taq DNA polymerase (2U/μL)</u>，或同級品。</p> <p>2.3.2.5. <u>TaqMan Universal PCR Master Mix (確認試驗用，適用於ABI PRISM® 7700)</u> 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。</p> <p>2.3.2.6. <u>LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe (確認試驗用，適用於Roche LightCycler®)</u> 本試劑內含 <u>RT-PCR</u> 所需去氧核糖核苷三磷酸、聚合酶等，使用時僅需自行添加 <u>氯化鎂溶液</u>、引子、探針及待測檢體DNA即可。</p> <p>2.3.3. <u>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)</u></p>	
--	--	--

<p>2.3.3. 對照用物質：蔥之組織，或使用衛生福利部食品藥物管理署提供編號 <u>S205</u> 之參考質體作為對照用物質。</p> <p>2.4. 器具及材料^(註3)</p> <p>2.4.1. 吸管(Pipette)：10 μL、20 μL、100 μL、200 μL 及 1000 μL。</p> <p>2.4.2. 吸管尖頭(Pipette tips)：10 μL、20 μL、200 μL 及 1000 μL。</p> <p>2.4.3. 離心管：200 μL、600 μL、1.5 mL 及 2 mL。</p> <p>2.4.4. PCR 反應管：200 μL。</p> <p>2.4.5. PCR 玻璃毛細管：Roche LightCycler 專用。</p> <p>2.4.6. 玻璃或塑膠瓶：50 mL、100 mL、250 mL、500 mL、1000 mL 及 2000 mL。</p> <p>2.4.7. 塑膠離心管：50 mL。</p> <p>2.4.8. 過濾：孔徑為 0.45 μm，nitrocellulose 材質。</p> <p>註 3：使用之塑膠或玻璃器皿均為無 DNase 污染。</p> <p>2.5. <u>Real-time PCR 溶液之配製</u>^(註4)</p>	<p>(Tris))、甘油及硼酸，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。</p> <p>2.3.4. 對照用物質：蔥之組織，或使用行政院衛生署藥物食品檢驗局提供編號 <u>pIDP2</u> 之參考質體作為對照用物質。</p> <p>2.4. 器具及材料^(註4)</p> <p>2.4.1. 吸管(Pipette)：10 μL、20 μL、100 μL、200 μL 及 1000 μL。</p> <p>2.4.2. <u>電泳膠片製作盤。</u></p> <p>2.4.3. 吸管尖頭(Pipette tips)：10 μL、20 μL、200 μL 及 1000 μL。</p> <p>2.4.4. 離心管：200 μL、600 μL、1.5 mL 及 2 mL。</p> <p>2.4.5. PCR 反應管：200 μL 及 500 μL。</p> <p>2.4.6. PCR 玻璃毛細管^(註5)：Roche LightCycler® 專用。</p> <p>2.4.7. 玻璃或塑膠瓶：50 mL、100 mL、250 mL、500 mL、1000 mL 及 2000 mL。</p> <p>2.4.8. 塑膠離心管：50 mL。</p> <p>2.4.9. 過濾膜：孔徑為 0.45 μm，材質為 nitro-cellulose。</p> <p>註 4：使用之塑膠或玻璃器皿均為無 DNase 污染。</p> <p>註 5：<u>儀器使用 Roche LightCycler® 時，才需使用。</u></p> <p>2.5. <u>試劑之配製</u></p> <p>2.5.1. <u>5 倍 TBE (Tris-borate-EDTA) 緩衝溶液</u> <u>稱取三羥甲基氨基甲烷 54 g、硼酸 27.5 g 及 0.5M pH 8.0 EDTA 溶液 20 mL，加水溶解使成 1000 mL，供作 5 倍 TBE 緩衝溶液。臨用前以水稀釋為 0.5 倍。</u></p> <p>2.5.2. <u>2% 膠片</u> <u>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。</u></p> <p>2.5.3. <u>6 倍載入膠片緩衝溶液(6 × gel</u></p>	
---	---	--

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 µg/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 氯化鎂)	2.5 µL
Taq DNA polymerase (2 U/µL)	1.0 µL
2.5 mM dNTP	4.0 µL
10 µM 引子 F	1.0 µL
10 µM 引子 R	1.0 µL
檢體 DNA 溶液(總量 100 ng)	5.0 µL
無菌純水	10.5 µL
總體積	25.0 µL

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

2.5.5.2. ABI PRISM[®] 7700 Sequence Detector 確認試驗用

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
無菌純水	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

2.5.5.3. Roche LightCycler[®] 確認試驗用

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
無菌純水	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

採用適用於植物 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°C 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。

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)

檢體為乾燥者，可直接以粉碎機研磨成細粉。檢體為溼狀者，經真空冷凍乾燥處理後，再以粉碎機研磨成細粉備用。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

2.6.2.1. 採用適用於植物 DNA 抽取之市售套組，並依套組操作說明步驟抽取 DNA。

2.6.2.2. 抽取之 DNA 溶液收集至已滅菌之 1.5 mL 離心管，為檢體 DNA 原液。

2.6.2.3. 依 2.6.3. 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

取適當量之檢體 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/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 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 原液、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

<u>步驟</u>	<u>溫度</u>	<u>時間</u>
<u>1. 最初變性</u>	<u>95°C</u>	<u>5 min</u>
<u>2. 變性</u>	<u>95°C</u>	<u>30 sec</u>
<u>3. 黏接</u>		
<u>測試內部對照基 因、蔥及洋蔥標的 基因、蔥標的基因</u>	<u>60°C</u>	<u>30 sec</u>
<u>4. 延展</u>	<u>72°C</u>	<u>30 sec</u>
<u>步驟 2 至步驟 4，共進行 40 個循環反應。</u>		
<u>5. 最終延展</u>	<u>72°C</u>	<u>7 min</u>

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，再以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 需同時進行內部對照基因、蔥及洋蔥標的基因、蔥標的基因之 PCR 測試。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，經由 DNA 分子量標記物質估算內部對照基因 PCR 增幅產物大小為 116 bp，蔥及洋蔥標的基因 PCR 增幅產物大小為 99 bp，且洋蔥標的基因 PCR 增幅產物大小為 172 bp 者，即判定該檢體含有洋蔥成分。

註 8：

1. 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。
2. 檢體 DNA 之純度將直接影響後續

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 μ L 入 PCR 反應管中，各別加入檢體 DNA 溶液 5 μ L，再將 PCR 反應管置於離心機中，以 200 \times 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 μ L 於玻璃毛細管中，各別加入檢體 DNA 溶液 5 μ L，再將毛細管置於離心機中，以 800 \times 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。

PCR 測試結果，檢體 DNA 進行內部對照基因 PCR 測試，可確定是否含有 DNA 及其純度。

3. 本 PCR 定性反應條件係採 ABI PRISM® 9700 設定之，當使用其他機型時，應自行探討反應條件。

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 原液、引子及探針備用。取 PCR 反應管，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

測試內部對照基因、蔥及洋蔥標的基因、蔥標的基因

步驟 3 至步驟 4，共進行 45 個循環反應。

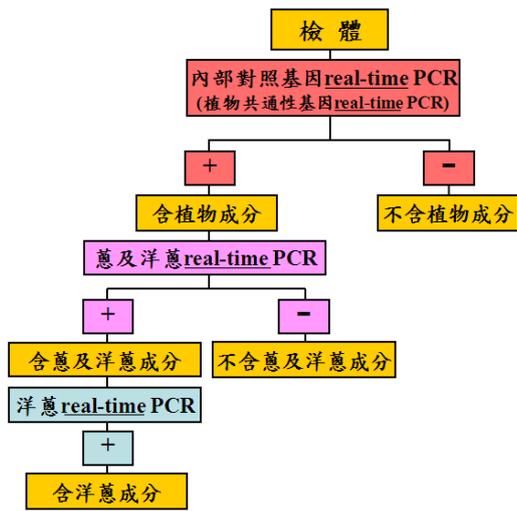
5. 冷卻	35°C	45 sec
-------	------	--------

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 PCR 反應管，並依照 2.5.5.3.節配製 PCR 溶液，依序加入 LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe、氯化鎂溶液、稀釋過之引子及探針，混合均勻後，分裝 15 μ L 於玻璃毛細管中，再各別加入檢體 DNA 溶液 5 μ L，最後將毛細管置於離心機中，以 800 \times g (3000 rpm) 瞬間離心，移入 RT-PCR 反應器，依下列條件進行反應。每次實驗皆須製作正反應及負反應對照組。

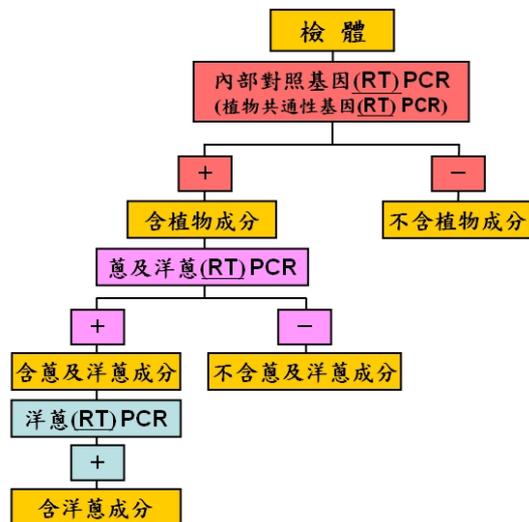
步驟	溫度	時間	步驟	溫度	時間
1. 最初變性	95°C	10 min	1. 最初變性	95°C	10 min
2. 變性	95°C	5 sec	2. 變性	95°C	5 sec
3. 黏接	60°C	25 sec	3. 黏接	60°C	25 sec
4. 延展	72°C	8 sec	測試內部對照基因、蔥及洋蔥標的基因、蔥標的基因	60°C	25 sec
步驟 2 至步驟 4, 共進行 45 個循環反應。			4. 延展	72°C	8 sec
5. 冷卻	35°C	45 sec	步驟 2 至步驟 4, 共進行 45 個循環反應。		
			5. 冷卻	35°C	45 sec
<p>2.7.2. <u>Real-time PCR</u> 螢光分析</p> <p>檢體 DNA 經 <u>real-time PCR</u> 反應後，直接從 <u>real-time PCR</u> 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。</p>			<p>2.8.2. <u>RT-PCR</u> 螢光分析</p> <p>檢體 DNA 經 <u>RT-PCR</u> 反應後，直接從 <u>RT-PCR</u> 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。</p>		
<p>2.7.3. 確認</p> <p>檢體 DNA 需同時進行內部對照基因、蔥及洋蔥標的基因、蔥標的基因之 <u>RT-PCR</u> 測試。檢體 DNA 之 <u>real-time PCR</u> 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 <u>real-time PCR</u> 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 <u>real-time PCR</u> 增幅產物為洋蔥之基因片段，可確認該檢體中含有洋蔥成分。</p>			<p>2.8.3. 確認</p> <p>檢體 DNA 需同時進行內部對照基因、蔥及洋蔥標的基因、蔥標的基因之 <u>RT-PCR</u> 測試。檢體 DNA 之 <u>PCR</u> 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 <u>PCR</u> 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 <u>PCR</u> 增幅產物為洋蔥之基因片段，可確認該檢體中含有洋蔥成分。</p>		
<p>2.7.4. 判定 (附圖)</p>			<p>2.8.4. 判定 (附圖)</p>		
<p>2.7.4.1. 以 <u>real-time PCR</u> 測試為內部對照基因負反應，表示不含植物成分。</p>			<p>1. 以 <u>PCR</u> 或 <u>RT-PCR</u> 測試為內部對照基因負反應，表示不含植物成分。</p>		
<p>2.7.4.2. 以 <u>real-time PCR</u> 測試為內部對照基因正反應，續以 <u>real-time PCR</u> 測試為蔥及洋蔥正反應，且洋蔥基因測試為正反應，即表示含有洋蔥成分。</p>			<p>2. 以 <u>PCR</u> 或 <u>RT-PCR</u> 測試為內部對照基因正反應，續以 <u>PCR</u> 或 <u>RT-PCR</u> 測試為蔥及洋蔥正反應，且洋蔥基因測試為正反應，即表示含有洋蔥成分。</p>		
<p>附註：</p> <p>1. 本檢驗方法最低檢測濃度為 0.1% (以乾重計)。</p> <p>2. 檢體 DNA 之製備將影響測試結果，<u>檢體 DNA 應進行內部對照基因測試。</u></p> <p>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。</p> <p>4. 本檢驗方法之測試範圍係指能夠抽取</p>			<p>附註：</p> <p>1. 本檢驗方法最低檢測濃度為 0.1% (以乾重計)。</p> <p>2. 本檢驗方法之測試範圍係指能夠抽</p>		

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。



附圖 食品中洋蔥成分之定性檢驗流程

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。



附圖 食品中洋蔥成分之定性檢驗流程

食品中植物性成分檢驗-蔥成分之定性檢驗修正 草案總說明

為加強食品中動物性、植物性成分之管理，並依據食品衛生管理法第三十八條規定：「各級主管機關執行食品、食品添加物、食品容器或包裝及食品用洗潔劑之檢驗，其檢驗方法，由中央主管機關定之」，爰擬具「食品中植物性成分檢驗-蔥成分之定性檢驗」草案，其修正要點如下：

- 一、中英文標題修正。
- 二、刪除 PCR 試驗相關內容，包含裝置、試藥、器具及材料、試劑之配製及鑑別試驗。
- 三、修正對照用物質。
- 四、增列附註二及三。

食品中植物性成分檢驗-蔥成分之定性檢驗修正 草案對照表

修正規定	現行規定	說明
<p>食品中植物性成分檢驗方法—蔥成分之定性檢驗</p> <p>Method of Test for Plant-Derived Ingredients in Foods—<u>Qualitative</u> Test of Green Onion Ingredient</p> <p>1.適用範圍：本檢驗方法適用於食品中蔥成分之定性檢驗。</p> <p>2.檢驗方法：<u>檢體經 DNA 萃取後，以即時聚合酶鏈反應(real-time polymerase chain reaction, <u>real-time PCR</u>)之方法。</u></p> <p>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、<u>real-timePCR</u> 試劑配製及檢驗過程皆需有區隔空間，避免交叉污染。<u>Real-time PCR</u> 試劑之配製應於無菌操作台內進行。</p> <p>2.2. 裝置^(註1)</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>2.2.3. 振盪型粉碎機：Retsch MM200，或同級品。</p> <p>2.2.4. 真空乾燥裝置：供 DNA 乾燥用。</p> <p>2.2.5. 高壓滅菌釜。</p> <p>2.2.6. 無菌操作台。</p> <p>2.2.7. 加熱振盪器：具 55℃ 溫控及振盪功能。</p> <p>2.2.8. 微量冷凍離心機(Micro refrigerated centrifuge)：可達 20000 × g，並具 4℃ 溫控功能。</p> <p>2.2.9. 離心機：供各式微量離心管離心</p>	<p>食品中植物性成分檢驗方法—蔥成分之檢驗</p> <p>Method of Test for Plant-Derived Ingredients in Foods — Test of Green Onion Ingredient</p> <p>1.適用範圍：本檢驗方法適用於食品中蔥成分之定性檢驗。</p> <p>2.檢驗方法：<u>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, <u>RT-PCR</u>) 方法。</u></p> <p>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 <u>PCR</u> 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。</p> <p>2.2. 裝置^(註1)</p> <p>2.2.1. <u>聚合酶鏈反應器：ABI PRISM[®] 9700 Sequence Detector，或同級品。</u></p> <p>2.2.2. <u>即時聚合酶鏈反應器^(註2)：ABI PRISM[®] 7700 Sequence Detector 或 Roche LightCycler[®]，或同級品。</u></p> <p>2.2.3. <u>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。</u></p> <p>2.2.4. 振盪型粉碎機：Retsch MM200，或同級品。</p> <p>2.2.5. 真空乾燥裝置：供 DNA 乾燥用。</p> <p>2.2.6. 高壓滅菌釜。</p> <p>2.2.7. 無菌操作台。</p> <p>2.2.8. 加熱振盪器：具 55℃ 溫控及振盪功能。</p> <p>2.2.9. 微量冷凍離心機(Micro refrigerated centrifuge)：可達 20000 × g，並具 4℃ 溫控功能。</p> <p>2.2.10. 離心機：供各式微量離心管離心</p>	<p>一、中英文標題修正。</p> <p>二、刪除 PCR 試驗相關內容，包含裝置、試藥、器具及材料、試劑之配製及鑑別試驗。</p> <p>三、修正對照用物質。</p> <p>四、增列附註二及三。</p> <p>五、增修訂部分文字。</p>

<p>用。</p> <p>2.2.10. 分光光度計：具波長 260 nm、280 nm。</p> <p>2.2.11. 冷凍設備：具冷藏及凍結功能。</p> <p>2.2.12. 旋渦混合器(Vortex mixer)。</p> <p>2.2.13. 酸鹼度測定儀(pH meter)。</p> <p>2.2.14. 水浴裝置：溫差±1°C 以內者。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>2.3. 試藥</p> <p>2.3.1. DNA 抽取用試藥：乙醇(96-100%) 採分子生物分析級試藥；適用於植物 DNA 抽取之市售套組。</p> <p>2.3.2. <u>Real-time PCR</u> 用^(註2)</p>	<p>2.2.11. 分光光度計：具波長 260 nm、280 nm。</p> <p>2.2.12. 冷凍設備：具冷藏及凍結功能。</p> <p>2.2.13. 旋渦混合器(Vortex mixer)。</p> <p>2.2.14. 電泳槽：供 DNA 電泳用。</p> <p>2.2.15. 照相裝置：供拍攝電泳膠片用。</p> <p>2.2.16. 紫外燈箱：具波長 302 nm、365 nm 紫外燈。</p> <p>2.2.17. pH 測定儀。</p> <p>2.2.18. 水浴裝置：溫差±1°C 以內者。</p> <p>2.2.19. 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。</p> <p>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。</p> <p>註 2：確認試驗用。</p> <p>2.3. 試藥</p> <p>2.3.1. DNA 抽取用試藥：乙醇(96~100%) 採分子生物分析級試藥；適用於植物 DNA 抽取之市售套組。</p> <p>2.3.2. PCR 用^(註3)</p> <p>2.3.2.1. 鑑別試驗用引子</p> <p>2.3.2.1.1. 植物共通性基因(標的基因： <u>ribosomal RNA, 供作內部對照基因</u>)</p> <p>引子 F： <u>5.8SF, 5'-ACTCTCGGCAACGGATATCTYG-3'</u></p> <p>引子 R： <u>5.8SR, 5'-GGCGCAACTTGCGTTCAAAR-3'</u></p> <p>PCR 增幅產物大小 116 bp</p> <p>2.3.2.1.2. 蔥及洋蔥(標的基因：<u>internal transcribed spacer, ITS</u>)</p> <p>引子 F： <u>AFaF, 5'-ACATACTGTGAGTGATGGCGGATGTGGAG-3'</u></p> <p>引子 R： <u>AFaR, 5'-TTCGCCGCGCGTAGACCTAACGACA-3'</u></p> <p>PCR 增幅產物大小 99 bp</p> <p>2.3.2.1.3. 蔥(標的基因：<u>highly repeated sequence</u>)</p> <p>引子 F： <u>GROF, 5'-CGGTGCAAGGTGGAACATTCGTCCA-3'</u></p>	
---	---	--

<p>2.3.2.1. 鑑別試驗用引子及探針</p> <p>2.3.2.1.1. 植物共通性基因(標的基因：<u>5.8S</u> ribosomal RNA，供作內部對照基因)</p> <p>引子 F： 5.8SF, 5'-ACTCTCGGCAACGGATATCTYG -3'</p> <p>引子 R： 5.8SR, 5'-GGCGCAACTTGCGTTCAAAR-3'</p> <p>探針 P： 5.8SP, 5'-(FAM)-TCGATGGTTCRCGGG ATTCTGCAATTCA-(TAMRA)-3'</p> <p>PCR 增幅產物大小 116 bp</p> <p>2.3.2.1.2. 蔥及洋蔥(標的基因：internal transcribed spacer, ITS)</p> <p>引子 F： AFaF, 5'ACATACTGTGAGTGATGGCG GATGT GGAG-3'</p> <p>引子 R： AFaR, 5'-TTCGCCGCGCGTAGACCTAACGACA-3'</p> <p>探針 P： AFaP, 5' -(FAM)-TTGACCCTCCGTGCTTAATT GT-(TAMRA)-3'</p> <p>PCR 增幅產物大小 99 bp</p> <p>2.3.2.1.3. 蔥(標的基因：highly repeated sequence)</p> <p>引子 F： GROF, 5'-CGGTGCAAGGTGGAACAT TCGTCCA-3'</p> <p>引子 R： GROR, 5'-TTACCATCCCTGGACGGTGTG-3'</p> <p>探針 P： GROP, 5'-(FAM)-AAGACGAAACAGC GCCGTGC GA-(TAMRA)-3'</p> <p>PCR 增幅產物大小 117 bp</p> <p>註 2： 1. 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℃貯存備用，另探針需避光保</p>	<p>引子 R： <u>GROR, 5'-TTACCATCCCTGGACGGTGTG-3'</u></p> <p>PCR 增幅產物大小 117 bp</p> <p>2.3.2.2. 確認試驗用引子及探針</p> <p>2.3.2.2.1. 植物共通性基因(標的基因：ribosomal RNA，供作內部對照基因)</p> <p>引子 F： 5.8SF, 5'-ACTCTCGGCAACGGATATCTYG-3'</p> <p>引子 R： 5.8SR, 5'-GGCGCAACTTGCGTTCAAAR-3'</p> <p>探針 P： 5.8SP, 5'-(FAM)-TCGATGGTTCRCGGG ATTCTGCAATTCA-(TAMRA)-3'</p> <p>PCR 增幅產物大小 116 bp</p> <p>2.3.2.2.2. 蔥及洋蔥(標的基因：internal transcribed spacer, ITS)</p> <p>引子 F： AFaF, 5'-ACATACTGTGAGTGATGGCG GATGTGGAG-3'</p> <p>引子 R： AFaR, 5'-TTCGCCGCGCGTAGACCTAACGACA-3'</p> <p>探針 P： AFaP, 5'-(FAM)-TTGACCCTCCGTGCTTAATTGT-(TAMRA)-3'</p> <p>PCR 增幅產物大小 99 bp</p> <p>2.3.2.2.3. 蔥(標的基因：highly repeated sequence)</p> <p>引子 F： GROF, 5'-CGGTGCAAGGTGGAACAT TCGTCCA-3'</p> <p>引子 R： GROR, 5'-TTACCATCCCTGGACGGTGTG-3'</p> <p>探針 P： GROP, 5'-(FAM)-AAGACGAAACAGC CCGTGCGA-(TAMRA)-3'</p> <p>PCR 增幅產物大小 117 bp</p> <p>註 3： 1. 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</p>	
--	--	--

<p>存。探針 5'端採用 6-carboxy-fluorescein (FAM)標記，3'端採用 6-carboxytetramethyl-rhodamine (TAMRA)標記。</p> <p>2. 植物類內部對照基因引子及探針之序列中，Y 為混合鹼基代碼(C/T)，表示同時含 C 及 T；R 為混合鹼基代碼(A/G)，表示同時含 A 及 G。</p> <p>2.3.2.2. TaqMan Universal PCR Master Mix (適用於 ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System)</p> <p>本試劑內含 <u>real-time</u> 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。</p> <p>2.3.2.3. LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe (適用於 Roche LightCycler)</p> <p>本試劑內含 <u>real-time</u> 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。</p>	<p>6-carboxy-fluorescein (FAM)標記，3'端採用 6-carboxytetramethyl-rhodamine (TAMRA)標記。</p> <p>2. 植物<u>共通性</u>基因引子及探針之序列中，Y 為混合鹼基代碼(C/T)，表示同時含 C 及 T；R 為混合鹼基代碼(A/G)，表示同時含 A 及 G。</p> <p>2.3.2.3. <u>去氧核糖核苷三磷酸 (deoxyribonucleoside triphosphate, dNTP)溶液</u></p> <p>含去氧腺苷三磷酸 (deoxyadenosine triphosphate, dATP)，去氧胞苷三磷酸 (deoxycytidine triphosphate, dCTP)，去氧鳥糞嘌呤核苷三磷酸 (deoxyguanosine triphosphate, dGTP)及去氧胸苷三磷酸 (deoxythymidine triphosphate, dTTP)各 2.5 mM 之溶液。</p> <p>2.3.2.4. <u>聚合酶</u></p> <p><u>Taq DNA polymerase (2U/μL)</u>，或同級品。</p> <p>2.3.2.5. <u>TaqMan Universal PCR Master Mix (確認試驗用，適用於 ABI PRISM® 7700)</u></p> <p>本試劑內含 <u>RT-PCR</u> 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。</p> <p>2.3.2.6. <u>LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe (確認試驗用，適用於 Roche LightCycler®)</u></p> <p>本試劑內含 <u>RT-PCR</u> 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。</p> <p>2.3.3. <u>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))、甘油及硼酸，均採分子生物分析級試藥。DNA 分子量標記物質 (DNA molecular weight</u></p>	
---	---	--

<p>2.3.3. 對照用物質：蔥之組織，或使用衛生福利部食品藥物管理署提供編號 <u>S205</u> 之參考質體作為對照用物質。</p> <p>2.4. 器具及材料^(註3)</p> <p>2.4.1. 吸管(Pipette)：10 μL、20 μL、100 μL、200 μL 及 1000 μL。</p> <p>2.4.2. 吸管尖頭(Pipette tips)：10 μL、20 μL、200 μL 及 1000 μL。</p> <p>2.4.3. 離心管：200 μL、600 μL、1.5 mL 及 2 mL。</p> <p>2.4.4. PCR 反應管：200 μL。</p> <p>2.4.5. PCR 玻璃毛細管：Roche LightCycler 專用。</p> <p>2.4.6. 玻璃或塑膠瓶：50 mL、100 mL、250 mL、500 mL、1000 mL 及 2000 mL。</p> <p>2.4.7. 塑膠離心管：50 mL。</p> <p>2.4.8. 過濾：孔徑為 0.45 μm，nitrocellulose 材質。</p> <p>註 3：使用之塑膠或玻璃器皿均為無 DNase 污染。</p> <p>2.5. <u>Real-time PCR 溶液之配製</u>^(註4)</p>	<p><u>marker</u>)：100-bp DNA ladder marker。</p> <p>2.3.4. 對照用物質：蔥之組織，或使用行政院衛生署藥物食品檢驗局提供編號 <u>pIDP2</u> 之參考質體作為對照用物質。</p> <p>2.4. 器具及材料^(註4)</p> <p>2.4.1. 吸管(Pipette)：10 μL、20 μL、100 μL、200 μL 及 1000 μL。</p> <p>2.4.2. <u>電泳膠片製作盤。</u></p> <p>2.4.3. 吸管尖頭(Pipette tips)：10 μL、20 μL、200 μL 及 1000 μL。</p> <p>2.4.4. 離心管：200 μL、600 μL、1.5 mL 及 2 mL。</p> <p>2.4.5. PCR 反應管：200 μL 及 500 μL。</p> <p>2.4.6. PCR 玻璃毛細管^(註5)：Roche LightCycler[®] 專用。</p> <p>2.4.7. 玻璃或塑膠瓶：50 mL、100 mL、250 mL、500 mL、1000 mL 及 2000 mL。</p> <p>2.4.8. 塑膠離心管：50 mL。</p> <p>2.4.9. 過濾膜：孔徑為 0.45 μm，材質為 nitro-cellulose。</p> <p>註 4：使用之塑膠或玻璃器皿均為無 DNase 污染。</p> <p>註 5：儀器使用 Roche LightCycler[®] 時，才需使用。</p> <p>2.5. <u>試劑之配製</u></p> <p>2.5.1. <u>5 倍 TBE (Tris-borate-EDTA) 緩衝溶液</u> 稱取三羥甲基氨基甲烷 54 g、硼酸 27.5 g 及 0.5M pH 8.0 EDTA 溶液 20 mL，加水溶解使成 1000 mL，供作 5 倍 TBE 緩衝溶液。臨用前以水稀釋為 0.5 倍。</p> <p>2.5.2. <u>2% 膠片</u> 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。</p> <p>2.5.3. <u>6 倍載入膠片緩衝溶液(6 × gel loading buffer)</u> 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</p>	
---	---	--

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 µg/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 氯化鎂)	2.5 µL
Taq DNA polymerase (2 U/µL)	1.0 µL
2.5 mM dNTP	4.0 µL
10 µM 引子 F	1.0 µL
10 µM 引子 R	1.0 µL
檢體 DNA 溶液(總量 100 ng)	5.0 µL
無菌純水	10.5 µL
總體積	25.0 µL

2.5.5.2. ABI PRISM[®] 7700 Sequence Detector 確認試驗用

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
無菌純水	3.3 µL
總體積	25.0 µL

2.5.5.3. Roche LightCycler[®] 確認試驗用

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
無菌純水	6.1 µL
總體積	20.0 µL

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

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)

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

採用適用於植物 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°C 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。

檢體為乾燥者，可直接以粉碎機研磨成細粉。檢體為溼狀者，經真空冷凍乾燥處理後，再以粉碎機研磨成細粉備用。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

2.6.2.1. 採用適用於植物 DNA 抽取之市售套組，並依套組操作說明步驟抽取 DNA。

2.6.2.2. 抽取之 DNA 溶液收集至已滅菌之 1.5 mL 離心管，為檢體 DNA 原液。

2.6.2.3. 依 2.6.3. 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

取適當量之檢體 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/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 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 原液、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		

測試內部對照基 60°C 30 sec

因、蔥及洋蔥標的

基因、蔥標的基因

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，再以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 需同時進行內部對照基因、蔥及洋蔥標的基因、蔥標的基因之 PCR 測試。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，經由 DNA 分子量標記物質估算內部對照基因 PCR 增幅產物大小為 116 bp，蔥及洋蔥標的基因 PCR 增幅產物大小為 99 bp，且蔥標的基因 PCR 增幅產物大小為 118 bp 者，即判定該檢體含有蔥成分。

註 8：

1. 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。
2. 檢體 DNA 之純度將直接影響後續 PCR 測試結果，檢體 DNA 進行內部對照基因 PCR 測試，可確定是否含有 DNA 及其純度。
3. 本 PCR 定性反應條件係採 ABI PRISM[®] 9700 設定之，當使用其他機型時，應自行探討反應條件。

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

2.7. 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

2.8.1.1. 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 PCR 反應管，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 μL 入 PCR 反應管中，再各別加入檢體 DNA 溶液 5 μL，最後將 PCR 反應管置於離心機中，以 200 × 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。

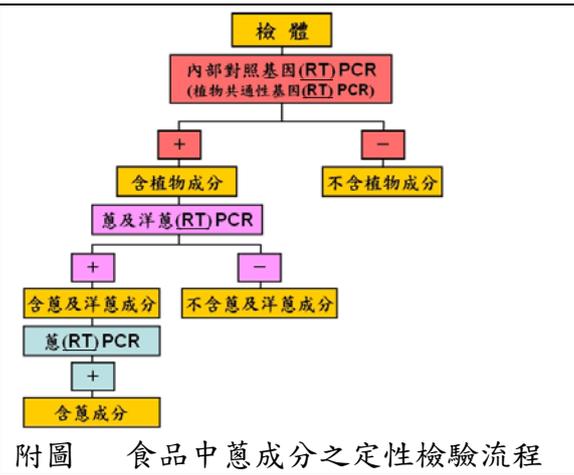
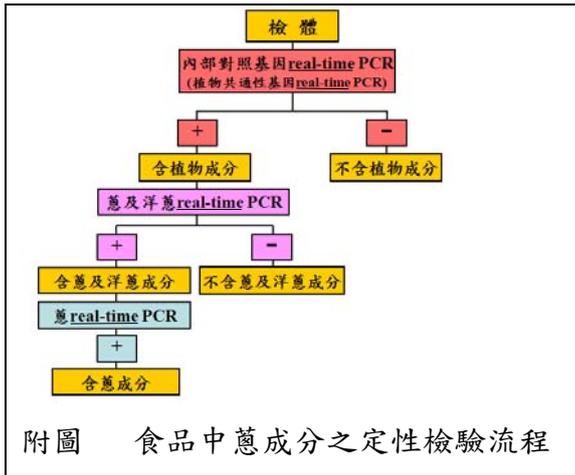
步驟	溫度	時間
1. 熱活化	50°C	2 min
2. 最初變性	95°C	10 min
3. 變性	95°C	15 sec
4. 黏接、延展		
<u>測試內部對照基</u>	60°C	1 min
<u>因、蔥及洋蔥標的</u>		
<u>基因、蔥標的基因</u>		
步驟 3 至步驟 4，共進行 45 個循環反應。		
5. 冷卻	35°C	45 sec

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 PCR 反應管，並依照 2.5.5.3.節配製 PCR 溶液，依序加入 LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe、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 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		
<u>測試內部對照基</u>	60°C	25 sec
<u>因、蔥及洋蔥標的</u>		
<u>基因、蔥標的基因</u>		
4. 延展	72°C	8 sec

<p>2.7.2. <u>Real-time PCR</u> 螢光分析 檢體 DNA 經 <u>real-time PCR</u> 反應後，直接從 <u>real-time PCR</u> 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。</p> <p>2.7.3. 確認 檢體 DNA 需同時進行內部對照基因、蔥及洋蔥標的基因、蔥標的基因之 <u>RT-PCR</u> 測試。檢體 DNA 之 <u>real-time PCR</u> 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 <u>real-time PCR</u> 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 <u>real-time PCR</u> 增幅產物為蔥之基因片段，可確認該檢體中含有蔥成分。</p> <p>2.7.4. 判定(附圖)</p> <p>2.7.4.1. 以 <u>real-time PCR</u> 測試為內部對照基因負反應，表示不含植物成分。</p> <p>2.7.4.2. 以 <u>real-time PCR</u> 測試為內部對照基因正反應，續以 <u>real-time PCR</u> 測試為蔥及洋蔥正反應，且蔥基因測試為正反應，即表示含有蔥成分。</p> <p>附註： 1. 本檢驗方法最低檢測濃度為 0.1%(以乾重計)。 2. <u>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。</u> 3. <u>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。</u> 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。</p>	<p>步驟 2 至步驟 4，共進行 45 個循環反應。</p> <table border="1" data-bbox="699 230 1236 275"> <tr> <td>5. 冷卻</td> <td>35°C</td> <td>45 sec</td> </tr> </table> <p>2.8.2. <u>RT-PCR</u> 螢光分析 檢體 DNA 經 <u>RT-PCR</u> 反應後，直接從 <u>RT-PCR</u> 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。<u>每次實驗必須同時測試正反應及負反應對照組。</u></p> <p>2.8.3. 確認 檢體 DNA 需同時進行內部對照基因、蔥及洋蔥標的基因、蔥標的基因之 <u>RT-PCR</u> 測試。檢體 DNA 之 <u>PCR</u> 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 <u>PCR</u> 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 <u>PCR</u> 增幅產物為蔥之基因片段，可確認該檢體中含有蔥成分。</p> <p>2.8.4. 判定(附圖)</p> <p>1. 以 <u>PCR 或 RT-PCR</u> 測試為內部對照基因負反應，表示不含植物成分。</p> <p>2. 以 <u>PCR 或 RT-PCR</u> 測試為內部對照基因正反應，續以 <u>PCR 或 RT-PCR</u> 測試為蔥及洋蔥正反應，且蔥基因測試為正反應，即表示含有蔥成分。</p> <p>附註： 1. 本檢驗方法最低檢測濃度為 0.1%(以乾重計)。</p> <p>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<u>不含 DNA</u> 之食品不適用於本檢驗方法。</p>	5. 冷卻	35°C	45 sec	
5. 冷卻	35°C	45 sec			



食品中植物性成分檢驗-蕎成分之定性檢驗修正 草案總說明

為加強食品中動物性、植物性成分之管理，並依據食品衛生管理法第三十八條規定：「各級主管機關執行食品、食品添加物、食品容器或包裝及食品用洗潔劑之檢驗，其檢驗方法，由中央主管機關定之」，爰擬具「食品中植物性成分檢驗-蕎成分之定性檢驗」草案，其修正要點如下：

- 一、中英文標題修正。
- 二、刪除 PCR 試驗相關內容，包含裝置、試藥、器具及材料、試劑之配製及鑑別試驗。
- 三、修正對照用物質。
- 四、增列附註二及三。

食品中植物性成分檢驗-蕎麥成分之定性檢驗修正 草案對照表

修正規定	現行規定	說明
<p>食品中植物性成分檢驗方法—蕎麥成分之<u>定性</u>檢驗</p> <p>Method of Test for Plant-Derived Ingredients in Foods—<u>Qualitative</u> Test of Chinese Onion Ingredient</p> <p>1.適用範圍：本檢驗方法適用於食品中蕎麥成分之定性檢驗。</p> <p>2.檢驗方法：<u>檢體經 DNA 萃取後，以即時聚合酶鏈反應 (real-time polymerase chain reaction, <u>real-time PCR</u>) 之方法。</u></p> <p>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、<u>real-time PCR</u> 試劑配製及檢驗過程皆需有區隔空間，避免交叉污染。<u>Real-time PCR</u> 試劑之配製應於無菌操作台內進行。</p> <p>2.2. 裝置^(註1)</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>2.2.3. 振盪型粉碎機：Retsch MM200，或同級品。</p> <p>2.2.4. 真空乾燥裝置：供 DNA 乾燥用。</p> <p>2.2.5. 高壓滅菌釜。</p> <p>2.2.6. 無菌操作台。</p> <p>2.2.7. 加熱振盪器：具 55°C 溫控及振盪功能。</p> <p>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。</p> <p>2.2.9. 離心機：供各式微量離心管離心用。</p>	<p>食品中植物性成分檢驗方法—蕎麥成分之檢驗</p> <p>Method of Test for Plant-Derived Ingredients in Foods—Test of Chinese Onion Ingredient</p> <p>1.適用範圍：本檢驗方法適用於食品中蕎麥成分之定性檢驗。</p> <p>2.檢驗方法：<u>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, <u>RT-PCR</u>) 方法。</u></p> <p>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 <u>PCR</u> 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。</p> <p>2.2. 裝置^(註1)</p> <p>2.2.1. 聚合酶鏈反應器：ABI PRISM[®] 9700 Sequence Detector，或同級品。</p> <p>2.2.2. 即時聚合酶鏈反應器^(註2)：ABI PRISM[®] 7700 Sequence Detector 或 Roche LightCycler[®]，或同級品。</p> <p>2.2.3. <u>真空</u>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。</p> <p>2.2.4. 振盪型粉碎機：Retsch MM200，或同級品。</p> <p>2.2.5. 真空乾燥裝置：供 DNA 乾燥用。</p> <p>2.2.6. 高壓滅菌釜。</p> <p>2.2.7. 無菌操作台。</p> <p>2.2.8. 加熱振盪器：具 55°C 溫控及振盪功能。</p> <p>2.2.9. 微量冷凍離心機 (Micro refrigerated centrifuge)：可達 20000 × g，並具 4°C 溫控功能。</p> <p>2.2.10. 離心機：供各式微量離心管離心用。</p> <p>2.2.11. 分光光度計：具波長 260 nm、280</p>	<p>一、中英文標題修正。</p> <p>二、刪除 PCR 試驗相關內容，包含裝置、試藥、器具及材料、試劑之配製及鑑別試驗。</p> <p>三、修正對照用物質。</p> <p>四、增列附註二及三。</p> <p>五、增修訂部分文字。</p>

<p>2.2.10. 分光光度計：具波長 260 nm、280 nm。</p> <p>2.2.11. 冷凍設備：具冷藏及凍結功能。</p> <p>2.2.12. 旋渦混合器(Vortex mixer)。</p> <p>2.2.13. 酸鹼度測定儀(pH meter)。</p> <p>2.2.14. 水浴裝置：溫差±1°C 以內者。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>2.3. 試藥</p> <p>2.3.1. DNA 抽取用試藥：乙醇(96-100%)採分子生物分析級試藥；適用於植物 DNA 抽取之市售套組。</p> <p>2.3.2. <u>Real-time PCR</u> 用^(註2)</p> <p>2.3.2.1. 鑑別試驗用引子及探</p> <p>2.3.2.1.1. 植物共通性基因(標的基因：<u>5.8S ribosomal RNA</u>，供作內部對照基因)</p> <p>引子 F：</p>	<p>nm。</p> <p>2.2.12. 冷凍設備：具冷藏及凍結功能。</p> <p>2.2.13. 旋渦混合器(Vortex mixer)。</p> <p>2.2.14. 電泳槽：供 DNA 電泳用。</p> <p>2.2.15. 照相裝置：供拍攝電泳膠片用。</p> <p>2.2.16. 紫外燈箱：具波長 302 nm、365 nm 紫外燈。</p> <p>2.2.17. pH 測定儀。</p> <p>2.2.18. 水浴裝置：溫差±1 °C 以內者。</p> <p>2.2.19. 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。</p> <p>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。</p> <p>註 2：確認試驗用。</p> <p>2.3. 試藥</p> <p>2.3.1. DNA 抽取用試藥：乙醇(96~100%)採分子生物分析級試藥；適用於植物 DNA 抽取之市售套組。</p> <p>2.3.2. PCR 用^(註3)</p> <p>2.3.2.1. 鑑別試驗用引子</p> <p>2.3.2.1.1. 植物共通性基因 (標的基因：<u>ribosomal RNA</u>，供作內部對照基因)</p> <p>引子 F： <u>5.8SF,5'-ACTCTCGGCAACGGATATCTYG-3'</u></p> <p>引子 R： <u>5.8SR,5'-GGCGCAACTTGCGTTCAAAR-3'</u></p> <p>PCR 增幅產物大小 116 bp</p> <p>2.3.2.1.2. 蕃(標的基因：<u>internal transcribed spacer, ITS</u>)</p> <p>引子 F： <u>AcF,5'-CGACAAACGTATCGTGGG-3'</u></p> <p>引子 R： <u>AcR,5'-TCGATACACCATTGCGCCG-3'</u></p> <p>PCR 增幅產物大小 117 bp</p> <p>2.3.2.2. 確認試驗用引子及探針</p> <p>2.3.2.2.1. 植物共通性基因(標的基因：<u>ribosomal RNA</u>，供作內部對照基因)</p> <p>引子 F：</p>	
--	--	--

<p>5.8SF,5'-ACTCTCGGCAACGGATATC TYG-3' 引子 R : 5.8SR,5'-GGCGCAACTTGCGTTCAAA R-3' 探針 P : 5.8SP,5'-(FAM)-TCGATGGTTCRCGGG ATT CTGCAATTCA - (TAMRA)-3' PCR 增幅產物大小 116 bp 2.3.2.1.2. 蕎(標的基因 : internal transcribed spacer, ITS) 引子 F : AcF,5'-CGACAAACGTATCGTGGG-3' 引子 R : AcR,5'-TCGATACACCATTGCGCCG-3' 探針 P : AcP,5'-(FAM)-TAGTTGTGCGGTTGG TTTAAG TGAATG-(TAMRA)-3' PCR 增幅產物大小 117 bp 註 2 : 1. 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. 植物類內部對照基因引子及探針之序列中，Y 為混合鹼基代碼(C/T)，表示同時含 C 及 T；R 為混合鹼基代碼(A/G)，表示同時含 A 及 G。</p>	<p>5.8SF,5'-ACTCTCGGCAACGGATATC TYG-3' 引子 R : 5.8SR,5'-GGCGCAACTTGCGTTCAAA R-3' 探針 P : 5.8SP,5'-(FAM)-TCGATGGTTCRCGGG ATT CTGCAATTCA - (TAMRA)-3' PCR 增幅產物大小 116 bp 2.3.2.1.2. 蕎(標的基因 : internal transcribed spacer, ITS) 引子 F : AcF,5'-CGACAAACGTATCGTGGG-3' 引子 R : AcR,5'-TCGATACACCATTGCGCCG-3' 探針 P : AcP,5'-(FAM)-TAGTTGTGCGGTTGG TTTAAG TGAATG-(TAMRA)-3' PCR 增幅產物大小 117 bp 註 3 : 1. 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°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. 植物共通性基因引子及探針之序列中，Y 為混合鹼基代碼(C/T)，表示同時含 C 及 T；R 為混合鹼基代碼(A/G)，表示同時含 A 及 G。 2.3.2.3.去氧核糖核苷三磷酸 (deoxyribonucleoside triphosphate, dNTP) 溶液 含去氧腺苷三磷酸 (deoxyadenosine triphosphate, dATP)，去氧胞苷三磷酸 (deoxycytidine triphosphate, dCTP)，去氧鳥糞嘌呤核苷三磷酸 (deoxyguanosine triphosphate, dGTP) 及去氧胸苷三磷酸 (deoxythymidine triphosphate, dTTP) 各 2.5 mM 之溶液。 2.3.2.4.聚合酶 Taq DNA polymerase (2U/μL)，或同級品。</p>	
---	---	--

<p>2.3.2.2. TaqMan Universal PCR Master Mix(適用於 ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System)</p> <p>本試劑內含 <u>real-time</u> 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。</p> <p>2.3.2.3. LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe(適用於 Roche LightCycler)</p> <p>本試劑內含 <u>real-time</u> PCR 所需去氧核糖核苷三磷酸、聚合酶等，<u>且內附 25 mM 氯化鎂溶液</u>，使用時添加引子、探針及待測檢體 DNA。</p> <p>2.3.3. 對照用物質：蕎之組織，或使用衛生福利部食品藥物管理署提供編號 <u>S205</u> 之參考質體作為對照用物質。</p> <p>2.4. 器具及材料^(註 3)</p> <p>2.4.1. 吸管(Pipette)：10 μL、20 μL、100 μL、200 μL 及 1000 μL。</p> <p>2.4.2. 吸管尖頭(Pipette tips)：10 μL、20 μL、200 μL 及 1000 μL。</p> <p>2.4.3. 離心管：200 μL、600 μL、1.5 mL 及 2 mL。</p> <p>2.4.4. PCR 反應管：200 μL。</p> <p>2.4.5. PCR 玻璃毛細管：Roche LightCycler 專用。</p> <p>2.4.6. 玻璃或塑膠瓶：50 mL、100 mL、250 mL、500 mL、1000 mL 及 2000 mL。</p>	<p>2.3.2.5. TaqMan Universal PCR Master Mix(<u>確認試驗用</u>，適用於 ABI PRISM® 7700)</p> <p>本試劑內含 <u>RT-PCR</u> 所需去氧核糖核苷三磷酸、聚合酶等，使用時<u>僅需自行添加引子、探針及待測檢體 DNA 即可</u>。</p> <p>2.3.2.6. LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe (<u>確認試驗用</u>，適用於 Roche LightCycler®)</p> <p>本試劑內含 <u>RT-PCR</u> 所需去氧核糖核苷三磷酸、聚合酶等，使用時<u>僅需自行添加氯化鎂溶液、引子、探針及待測檢體 DNA 即可</u>。</p> <p>2.3.3. 電泳用：<u>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))、甘油及硼酸，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。</u></p> <p>2.3.4. 對照用物質：蕎之組織，或使用行政院衛生署藥物食品檢驗局提供編號 <u>pIDP2</u> 之參考質體作為對照用物質。</p> <p>2.4. 器具及材料^(註 4)</p> <p>2.4.1. 吸管(Pipette)：10 μL、20 μL、100 μL、200 μL 及 1000 μL。</p> <p>2.4.2. 電泳膠片製作盤。</p> <p>2.4.3. 吸管尖頭(Pipette tips)：10 μL、20 μL、200 μL 及 1000 μL。</p> <p>2.4.4. 離心管：200 μL、600 μL、1.5 mL 及 2 mL。</p> <p>2.4.5. PCR 反應管：200 μL <u>及 500 μL</u>。</p> <p>2.4.6. PCR 玻璃毛細管^(註 5)：Roche LightCycler® 專用。</p> <p>2.4.7. 玻璃或塑膠瓶：50 mL、100 mL、250 mL、500 mL、1000 mL 及 2000 mL。</p>	
---	---	--

2.4.7. 塑膠離心管：50 mL。

2.4.8. 過濾：孔徑為 0.45 μm，nitrocellulose 材質。

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)

2.4.8. 塑膠離心管：50 mL。

2.4.9. 過濾膜：孔徑為 0.45 μm，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 0.5M pH 8.0 EDTA 溶液 20 mL，加水溶解使成 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 × 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 μg/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 氯化鎂)	2.5 μL
Taq DNA polymerase (2 U/μL)	1.0 μL
2.5 mM dNTP	4.0 μL
10 μM 引子 F	1.0 μL
10 μM 引子 R	1.0 μL
檢體 DNA 溶液(總量 100 ng)	5.0 μL
無菌純水	10.5 μL
總體積	25.0 μL

2.5.1. ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System 鑑別試驗用

2.5.5.2. ABI PRISM® 7700 Sequence Detector 確認試驗用

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

採用適用於植物 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°C 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

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
無菌純水	3.3 μL
總體積	25.0 μL

2.5.5.3. Roche LightCycler® 確認試驗用

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
無菌純水	6.1 μL
總體積	20.0 μL

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)

檢體為乾燥者，可直接以粉碎機研磨成細粉。檢體為溼狀者，經真空冷凍乾燥處理後，再以粉碎機研磨成細粉備用。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

2.6.2.1. 採用適用於植物 DNA 抽取之市售套組，並依套組操作說明步驟抽取 DNA。

2.6.2.2. 抽取之 DNA 溶液收集至已滅菌之 1.5 mL 離心管，為檢體 DNA 原液。

2.6.2.3. 依 2.6.3. 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

取適當量之檢體 DNA 原液以無菌純水

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。

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/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 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 原液、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		
測試內部對照基因 及蕎標的基因	60°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，再以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 需同時進行內部對照基因及

蕎標的基因之 PCR 測試。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，經由 DNA 分子量標記物質估算內部對照基因 PCR 增幅產物大小為 116 bp，且蕎標的基因 PCR 增幅產物大小為 117 bp 者，即判定該檢體含有蕎成分。

註 8：

1. 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。
2. 檢體 DNA 之純度將直接影響後續 PCR 測試結果，檢體 DNA 進行內部對照基因 PCR 測試，可確定是否含有 DNA 及其純度。
3. 本 PCR 定性反應條件係採 ABI PRISM[®] 9700 設定之，當使用其他機型時，應自行探討反應條件。

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 原液、引子及探針備用。取 PCR 反應管，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 µL 入 PCR 反應管中，再各別加入檢體 DNA 溶液 5 µL，最後將 PCR 反應管置於離心機中，以 200 × 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		
<u>測試內部對照基因及蕎標的基因</u>	60°C	1 min

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 增幅產物為蓄之基因片段，可確認該檢體中含有蓄成分。

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

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 PCR 反應管，並依照 2.5.5.3.節配製 PCR 溶液，依序加入 LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe、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 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		
測試內部對照基因及蓄標的基因	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

2.8.2. 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 增幅產物為蓄之基因片段，可確認該檢體中含有蓄成分。

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出 DNA 者之食品，經過高度加工

<p><u>試。</u></p> <p>3. <u>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。</u></p> <p>4. <u>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。</u></p>	<p><u>或不含 DNA 之食品不適用於本檢驗方法。</u></p>	
---	-------------------------------------	--

食品中植物性成分檢驗-非成分之定性檢驗修正 草案總說明

為加強食品中動物性、植物性成分之管理，並依據食品衛生管理法第三十八條規定：「各級主管機關執行食品、食品添加物、食品容器或包裝及食品用洗潔劑之檢驗，其檢驗方法，由中央主管機關定之」，爰擬具「食品中植物性成分檢驗-非成分之定性檢驗」草案，其修正要點如下：

- 一、中英文標題修正。
- 二、刪除 PCR 試驗相關內容，包含裝置、試藥、器具及材料、試劑之配製及鑑別試驗。
- 三、修正對照用物質。
- 四、增列附註二及三。

食品中植物性成分檢驗-韭成分之定性檢驗修正 草案對照表

修正規定	現行規定	說明
<p>食品中植物性成分檢驗方法—韭成分之定性檢驗</p> <p>Method of Test for Plant-Derived Ingredients in Foods—<u>Qualitative</u> Test of Leek Ingredient</p> <p>1.適用範圍：本檢驗方法適用於食品中韭成分之定性檢驗。</p> <p>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。</p> <p>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、<u>real-time</u> PCR 試劑配製及檢驗過程皆需有區隔空間，避免交叉污染。<u>Real-time</u> PCR 試劑之配製應於無菌操作台內進行。</p> <p>2.2. 裝置^(註1)</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>2.2.3. 振盪型粉碎機：Retsch MM200，或同級品。</p> <p>2.2.4. 真空乾燥裝置：供 DNA 乾燥用。</p> <p>2.2.5. 高壓滅菌釜。</p> <p>2.2.6. 無菌操作台。</p> <p>2.2.7. 加熱振盪器：具 55℃ 溫控及振盪功能。</p> <p>2.2.8. 微量冷凍離心機(Micro refrigerated centrifuge)：可達 20000 × g，並具 4℃ 溫控功能。</p> <p>2.2.9. 離心機：供各式微量離心管離心</p>	<p>食品中植物性成分檢驗方法—韭成分之檢驗</p> <p>Method of Test for Plant-Derived Ingredients in Foods—Test of Leek Ingredient</p> <p>1.適用範圍：本檢驗方法適用於食品中韭成分之定性檢驗。</p> <p>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。</p> <p>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 <u>PCR</u> 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。</p> <p>2.2. 裝置^(註1)</p> <p>2.2.1. 聚合酶鏈反應器：ABI PRISM[®] 9700 Sequence Detector，或同級品。</p> <p>2.2.2. 即時聚合酶鏈反應器^(註2)：ABI PRISM[®] 7700 Sequence Detector 或 Roche LightCycler[®]，或同級品。</p> <p>2.2.3. 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。</p> <p>2.2.4. 振盪型粉碎機：Retsch MM200，或同級品。</p> <p>2.2.5. 真空乾燥裝置：供 DNA 乾燥用。</p> <p>2.2.6. 高壓滅菌釜。</p> <p>2.2.7. 無菌操作台。</p> <p>2.2.8. 加熱振盪器：具 55℃ 溫控及振盪功能。</p> <p>2.2.9. 微量冷凍離心機(Micro refrigerated centrifuge)：可達 20000 × g，並具 4℃ 溫控功能。</p> <p>2.2.10. 離心機：供各式微量離心管離心用。</p>	<p>一、中英文標題修正。</p> <p>二、刪除 PCR 試驗相關內容，包含裝置、試藥、器具及材料、試劑之配製及鑑別試驗。</p> <p>三、修正對照用物質。</p> <p>四、增列附註二及三。</p> <p>五、增修訂部分文字。</p>

<p>用。</p> <p>2.2.10. 分光光度計：具波長 260 nm、280 nm。</p> <p>2.2.11. 冷凍設備：具冷藏及凍結功能。</p> <p>2.2.12. 旋渦混合器(Vortex mixer)。</p> <p>2.2.13. 酸鹼度測定儀(pH meter)。</p> <p>2.2.14. 水浴裝置：溫差±1℃以內者。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>2.3. 試藥</p> <p>2.3.1. DNA 抽取用試藥：乙醇(96_100%)採分子生物分析級試藥；適用於植物 DNA 抽取之市售套組。</p> <p>2.3.2. <u>Real-time PCR</u> 用^(註 2)</p> <p>2.3.2.1. <u>鑑別試驗用引子及探針</u></p>	<p>2.2.11. 分光光度計：具波長 260 nm、280 nm。</p> <p>2.2.12. 冷凍設備：具冷藏及凍結功能。</p> <p>2.2.13. 旋渦混合器(Vortex mixer)。</p> <p>2.2.14. 電泳槽：供 DNA 電泳用。</p> <p>2.2.15. 照相裝置：供拍攝電泳膠片用。</p> <p>2.2.16. 紫外燈箱：具波長 302 nm、365 nm 紫外燈。</p> <p>2.2.17. pH 測定儀。</p> <p>2.2.18. 水浴裝置：溫差±1℃以內者。</p> <p>2.2.19. 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。</p> <p>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。</p> <p>註 2：確認試驗用。</p> <p>2.3. 試藥</p> <p>2.3.1. DNA 抽取用試藥：乙醇(96~100%)採分子生物分析級試藥；適用於植物 DNA 抽取之市售套組。</p> <p>2.3.2. PCR 用^(註 3)</p> <p>2.3.2.1. <u>鑑別試驗用引子</u></p> <p>2.3.2.1.1. 植物共通性基因(標的基因：<u>ribosomal RNA</u>，供作內部對照基因)</p> <p>引子 F： <u>5.8SF,5'-ACTCTCGGCAACGGATATC TYG-3'</u></p> <p>引子 R： <u>5.8SR,5'-GGCGCAACTTGCGTTCAA AR-3'</u></p> <p>PCR 增幅產物大小 116 bp</p> <p>2.3.2.1.2. 韭(標的基因：<u>internal transcribed spacer, ITS</u>)</p> <p>引子 F： <u>AtF,5'-CACGTCATTCTAAACATCCAT C-3'</u></p> <p>引子 R： <u>AtR,5'-TTGTACGCAGTTAGAGATCG CG-3'</u></p> <p>PCR 增幅產物大小 170 bp</p> <p>2.3.2.2. <u>確認試驗用引子及探針</u></p> <p>2.3.2.2.1. 植物共通性基因(標的基因：</p>	
---	--	--

<p>2.3.2.1.1. 植物共通性基因(標的基因：<u>5.8S</u> ribosomal RNA，供作內部對照基因)</p> <p>引子 F： 5.8SF,5'-ACTCTCGGCAACGGATATC TYG -3'</p> <p>引子 R： 5.8SR,5'-GGCGCAACTTGCGTTCAA R-3'</p> <p>探針 P： 5.8SP,5'-(FAM)-TCGATGGTTCRCGGG ATTCTGCAATTCA - (TAMRA)-3'</p> <p>PCR 增幅產物大小 116 bp</p> <p>2.3.2.1.2. 韭(標的基因：internal transcribed spacer, ITS)</p> <p>引子 F： AtF,5'-CACGTCATTCTAAACATCCA TC-3'</p> <p>引子 R： AtR,5'-TTGTACGCAGTTAGAGATCG CG-3'</p> <p>探針 P： AtP,5'-(FAM)-TTGAGGTGCGGTTGG TTTA AGTGAT-(TAMRA)-3'</p> <p>PCR 增幅產物大小 170 bp</p> <p>註 2：</p> <p>1. 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。</p> <p>2. 植物類內部對照基因引子及探針之序列中，Y 為混合鹼基代碼(C/T)，表示同時含 C 及 T；R 為混合鹼基代碼(A/G)，表示同時含 A 及 G。</p>	<p>ribosomal RNA，供作內部對照基因)</p> <p>引子 F： 5.8SF,5'-ACTCTCGGCAACGGATATC TYG-3'</p> <p>引子 R： 5.8SR,5'-GGCGCAACTTGCGTTCAA AR-3'</p> <p>探針 P： 5.8SP,5'-(FAM)-TCGATGGTTCRCGGG ATTCTGCAATTCA-(TAMRA)-3'</p> <p>PCR 增幅產物大小 116 bp</p> <p>2.3.2.2. 韭(標的基因：internal transcribed spacer, ITS)</p> <p>引子 F： AtF,5'-CACGTCATTCTAAACATCCA TC-3'</p> <p>引子 R： AtR,5'-TTGTACGCAGTTAGAGATCG CG-3'</p> <p>探針 P： AtP,5'-(FAM)-TTGAGGTGCGGTTGG TTTAAGTGAT-(TAMRA)-3'</p> <p>PCR 增幅產物大小 170 bp</p> <p>註 3：</p> <p>1. 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°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。</p> <p>2. 植物<u>共通性</u>基因引子及探針之序列中，Y 為混合鹼基代碼(C/T)，表示同時含 C 及 T；R 為混合鹼基代碼(A/G)，表示同時含 A 及 G。</p> <p>2.3.2.3. <u>去氧核糖核苷三磷酸</u> (deoxyribonucleoside triphosphate, dNTP) 溶液</p> <p>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</p>	
---	--	--

<p>2.3.2.2. <u>TaqMan Universal PCR Master Mix(適用於 ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System)</u> 本試劑內含 <u>real-time</u> 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。</p> <p>2.3.2.3. <u>LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe(適用於 Roche LightCycler)</u> 本試劑內含 <u>real-time</u> PCR 所需去氧核糖核苷三磷酸、聚合酶等，<u>且內附 25 mM 氯化鎂溶液</u>，使用時添加引子、探針及待測檢體 DNA。</p> <p>2.3.3.對照用物質：韭之組織，或使用衛生福利部食品藥物管理署提供編號 <u>S205</u>之參考質體作為對照用物質。</p> <p>2.4. 器具及材料^(註 3)</p> <p>2.4.1.吸管(Pipette)：10 μL、20 μL、100 μL、200 μL 及 1000 μL。</p> <p>2.4.2.吸管尖頭(Pipette tips)：10 μL、20 μL、200 μL 及 1000 μL。</p> <p>2.4.3.離心管：200 μL、600 μL、1.5 mL 及 2 mL。</p> <p>2.4.4.PCR 反應管：200 μL。</p>	<p><u>(deoxythymidine triphosphate, dTTP)各 2.5 mM 之溶液。</u></p> <p>2.3.2.4.聚合酶 <u>Taq DNA polymerase (2U/μL)</u>，或同級品。</p> <p>2.3.2.5. <u>TaqMan Universal PCR Master Mix(確認試驗用，適用於 ABI PRISM® 7700)</u> 本試劑內含 <u>RT-PCR</u> 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。</p> <p>2.3.2.6. <u>LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe(確認試驗用，適用於 Roche LightCycler®)</u> 本試劑內含 <u>RT-PCR</u> 所需去氧核糖核苷三磷酸、聚合酶等，使用時僅需自行添加<u>氯化鎂溶液</u>、引子、探針及待測檢體 DNA 即可。</p> <p>2.3.3. 電泳用：<u>溴化乙錠(ethidium bromide)</u>、<u>瓊膠(agarose)</u>、<u>溴酚藍(bromophenol blue)</u>、<u>二甲苯藍(xylene cyanol FF)</u>、<u>乙二胺四乙酸二鈉(ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt, Na₂-EDTA)</u>、<u>三羥甲基氨基甲烷(tris(hydroxymethyl) aminomethane (Tris))</u>、<u>甘油及硼酸</u>，均採分子生物分析級試藥。DNA 分子量標記物質(DNA molecular weight marker)：<u>100-bp DNA ladder marker</u>。</p> <p>2.3.4. 對照用物質：韭之組織，或使用行政院衛生署藥物食品檢驗局提供編號 <u>pIDP2</u>之參考質體作為對照用物質。</p> <p>2.4. 器具及材料^(註 4)</p> <p>2.4.1.吸管(Pipette)：10 μL、20 μL、100 μL、200 μL 及 1000 μL。</p> <p>2.4.2.電泳膠片製作盤。</p> <p>2.4.3.吸管尖頭(Pipette tips)：10 μL、20 μL、200 μL 及 1000 μL。</p> <p>2.4.4.離心管：200 μL、600 μL、1.5 mL 及 2 mL。</p>	
--	--	--

- 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。
- 2.4.8.過濾：孔徑為 0.45 μm ，nitrocellulose 材質。

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)

- 2.4.5.PCR 反應管：200 μL 及 500 μL 。
- 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 μm ，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 0.5M pH 8.0 EDTA 溶液 20 mL，加水溶解使成 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 × 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。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 氯化鎂)	2.5 μL
Taq DNA polymerase (2 U/ μL)	1.0 μL
2.5 mM dNTP	4.0 μL
10 μM 引子 F	1.0 μL
10 μM 引子 R	1.0 μL

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

採用適用於植物 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

檢體 DNA 溶液(總量 100 ng)	5.0 μL
無菌純水	10.5 μL
總體積	25.0 μL

2.5.5.2. ABI PRISM® 7700 Sequence Detector 確認試驗用

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
無菌純水	3.3 μL
總體積	25.0 μL

2.5.5.3. Roche LightCycler® 確認試驗用

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
無菌純水	6.1 μL
總體積	20.0 μL

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)

檢體為乾燥者，可直接以粉碎機研磨成細粉。檢體為溼狀者，經真空冷凍乾燥處理後，再以粉碎機研磨成細粉備用。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

2.6.2.1. 採用適用於植物 DNA 抽取之市售套組，並依套組操作說明步驟抽取 DNA。

2.6.2.2. 抽取之 DNA 溶液收集至已滅

2.6.3.節測定 DNA 濃度後，置於-20°C 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。

菌之 1.5 mL 離心管，為檢體 DNA 原液。

2.6.2.3.依 2.6.3.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

取適當量之檢體 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/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 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 原液、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		
測試內部對照基因及蒜標的基因	60°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，再以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 需同時進行內部對照基因及非標的基因之 PCR 測試。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，經由 DNA 分子量標記物質估算內部對照基因 PCR 增幅產物大小為 116 bp，且非標的基因 PCR 增幅產物大小為 170 bp 者，即判定該檢體含有非成分。

註 8：

1. 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。
2. 檢體 DNA 之純度將直接影響後續 PCR 測試結果，檢體 DNA 進行內部對照基因 PCR 測試，可確定是否含有 DNA 及其純度。
3. 本 PCR 定性反應條件係採 ABI PRISM[®] 9700 設定之，當使用其他機型時，應自行探討反應條件。

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 原液、引子及探針備用。取 PCR 反應管，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 µL 入 PCR 反應管中，再各別加入檢體 DNA 溶液 5 µL，最後將 PCR 反應管置於離心機中，以 200 × g (1500 rpm) 瞬間離心，移入 RT-PCR 反應器，依下列條件進行反應。每次實驗皆須製作正反應及負反應對照組。

步驟	溫度	時間
----	----	----

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 增幅產物為非之基因片段，可確認該檢體中含有非成分。

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
<u>測試內部對照基因及蒜標的基因</u>		
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 PCR 反應管，並依照 2.5.5.3.節配製 PCR 溶液，依序加入 LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe、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 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
<u>測試內部對照基因及蒜標的基因</u>		
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

2.8.2. 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 增幅產物為非之基因片段，可確認該檢體中含有非成分。

<p>附註：</p> <ol style="list-style-type: none">1. 本檢驗方法最低檢測濃度為0.1%(以乾重計)。2. <u>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。</u>3. <u>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。</u>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。	<p>附註：</p> <ol style="list-style-type: none">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<u>不含 DNA</u>之食品不適用於本檢驗方法。	
---	---	--

食品中植物性成分檢驗-蒜成分之定性檢驗修正 草案總說明

為加強食品中動物性、植物性成分之管理，並依據食品衛生管理法第三十八條規定：「各級主管機關執行食品、食品添加物、食品容器或包裝及食品用洗潔劑之檢驗，其檢驗方法，由中央主管機關定之」，爰擬具「食品中植物性成分檢驗-蒜成分之定性檢驗」草案，其修正要點如下：

- 一、中英文標題修正。
- 二、刪除 PCR 試驗相關內容，包含裝置、試藥、器具及材料、試劑之配製及鑑別試驗。
- 三、修正對照用物質。
- 四、增列附註二及三。

食品中植物性成分檢驗-蒜成分之定性檢驗修正 草案對照表

修正規定	現行規定	說明
<p>食品中植物性成分檢驗方法—蒜成分之定性檢驗</p> <p>Method of Test for Plant-Derived Ingredients in Foods—<u>Qualitative</u> Test of Garlic Ingredient</p> <p>1.適用範圍：本檢驗方法適用於食品中蒜成分之定性檢驗。</p> <p>2.檢驗方法：<u>檢體經 DNA 萃取後，以即時聚合酶鏈反應(real-time polymerase chain reaction, <u>real-time PCR</u>)之方法。</u></p> <p>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、<u>real-time PCR</u> 試劑配製及檢驗過程皆需有區隔空間，避免交叉污染。<u>Real-time PCR</u> 試劑之配製應於無菌操作台內進行。</p> <p>2.2. 裝置^(註1)</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>2.2.3. 振盪型粉碎機：Retsch MM200，或同級品。</p> <p>2.2.4. 真空乾燥裝置：供 DNA 乾燥用。</p> <p>2.2.5. 高壓滅菌釜。</p> <p>2.2.6. 無菌操作台。</p> <p>2.2.7. 加熱振盪器：具 55℃ 溫控及振盪功能。</p> <p>2.2.8. 微量冷凍離心機(Micro refrigerated centrifuge)：可達 20000 × g，並具 4℃ 溫控功能。</p> <p>2.2.9. 離心機：供各式微量離心管離心用。</p>	<p>食品中植物性成分檢驗方法—蒜成分之檢驗</p> <p>Method of Test for Plant-Derived Ingredients in Foods—Test of Garlic Ingredient</p> <p>1.適用範圍：本檢驗方法適用於食品中蒜成分之定性檢驗。</p> <p>2.檢驗方法：<u>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, <u>RT-PCR</u>)方法。</u></p> <p>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 <u>PCR</u> 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。</p> <p>2.2. 裝置^(註1)</p> <p>2.2.1. <u>聚合酶鏈反應器：ABI PRISM[®] 9700 Sequence Detector，或同級品。</u></p> <p>2.2.2. <u>即時聚合酶鏈反應器^(註2)：ABI PRISM[®] 7700 Sequence Detector 或 Roche LightCycler[®]，或同級品。</u></p> <p>2.2.3. <u>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。</u></p> <p>2.2.4. 振盪型粉碎機：Retsch MM200，或同級品。</p> <p>2.2.5. 真空乾燥裝置：供 DNA 乾燥用。</p> <p>2.2.6. 高壓滅菌釜。</p> <p>2.2.7. 無菌操作台。</p> <p>2.2.8. 加熱振盪器：具 55℃ 溫控及振盪功能。</p> <p>2.2.9. 微量冷凍離心機(Micro refrigerated centrifuge)：可達 20000 × g，並具 4℃ 溫控功能。</p> <p>2.2.10. 離心機：供各式微量離心管離心用。</p> <p>2.2.11. 分光光度計：具波長 260 nm、280</p>	<p>一、中英文標題修正。</p> <p>二、刪除 PCR 試驗相關內容，包含裝置、試藥、器具及材料、試劑之配製及鑑別試驗。</p> <p>三、修正對照用物質。</p> <p>四、增列附註二及三。</p> <p>五、增修訂部分文字。</p>

<p>2.2.10. 分光光度計：具波長 260 nm、280 nm。</p> <p>2.2.11. 冷凍設備：具冷藏及凍結功能。</p> <p>2.2.12. 旋渦混合器(Vortex mixer)。</p> <p>2.2.13. 酸鹼度測定儀(pH meter)。</p> <p>2.2.14. 水浴裝置：溫差±1℃以內者。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>2.3. 試藥</p> <p>2.3.1. DNA 抽取用試藥：乙醇(96-100%)採分子生物分析級試藥；適用於植物 DNA 抽取之市售套組。</p> <p>2.3.2. <u>Real-time PCR</u> 用^(註2)</p> <p>2.3.2.1. 鑑別試驗用引子及探針</p> <p>2.3.2.1.1. 植物共通性基因(標的基因)：</p>	<p>nm。</p> <p>2.2.12. 冷凍設備：具冷藏及凍結功能。</p> <p>2.2.13. 旋渦混合器(Vortex mixer)。</p> <p>2.2.14. 電泳槽：供 DNA 電泳用。</p> <p>2.2.15. 照相裝置：供拍攝電泳膠片用。</p> <p>2.2.16. 紫外燈箱：具波長 302 nm、365 nm 紫外燈。</p> <p>2.2.17. pH 測定儀。</p> <p>2.2.18. 水浴裝置：溫差±1℃以內者。</p> <p>2.2.19. 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。</p> <p>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。</p> <p>註 2：確認試驗用。</p> <p>2.3. 試藥</p> <p>2.3.1. DNA 抽取用試藥：乙醇(96-100%)採分子生物分析級試藥；適用於植物 DNA 抽取之市售套組。</p> <p>2.3.2. PCR 用^(註3)</p> <p>2.3.2.1. 鑑別試驗用引子</p> <p>2.3.2.1.1. 植物共通性基因 (標的基因：ribosomal RNA，供作內部對照基因)</p> <p>引子 F： <u>5.8SF, 5'-ACTCTCGGCAACGGATATCTYG-3'</u></p> <p>引子 R： <u>5.8SR, 5'-GGCGCAACTTGCGTTCAAAR-3'</u></p> <p>PCR 增幅產物大小 116 bp</p> <p>2.3.2.1.2. 蒜(標的基因：internal transcribed spacer, ITS)</p> <p>引子 F： <u>AsF, 5'-CGACGAGTGCATTTTGGGTTATGATG-3'</u></p> <p>引子 R： <u>AsR, 5'-CATCGTGCGTTAACTCGACACACCAT-3'</u></p> <p>PCR 增幅產物大小 130 bp</p> <p>2.3.2.2. 確認試驗用引子及探針</p> <p>2.3.2.2.1. 植物共通性基因 (標的基因：ribosomal RNA，供作內</p>	
--	---	--

<p><u>5.8S ribosomal RNA</u>，供作內部對照基因)</p> <p>引子 F： 5.8SF,5'-ACTCTCGGCAACGGATATC TYG -3' 引子 R： 5.8SR,5'-GGCGCAACTTGCGTTCAAA R-3' 探針 P： 5.8SP,5'-(FAM)-TCGATGGTTCRCGGG ATTCTGCAATTCA-(TAMRA)-3' PCR 增幅產物大小 116 bp</p> <p>2.3.2.1.2. 蒜(標的基因：internal transcribed spacer, ITS)</p> <p>引子 F： AsF,5'-CGACGAGTGCATTTTGGGTT ATGATG-3' 引子 R： AsR,5'-CATCGTGCGTTAACTCGACA CACCAT-3' 探針 P： AsP,5'-(FAM)-ATGGAGAATGACCTT CCGTGCTT-(TAMRA)-3' PCR 增幅產物大小 130 bp</p> <p>註 2： 1. 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. 植物類內部對照基因引子及探針之序列中，Y 為混合鹼基代碼(C/T)，表示同時含 C 及 T；R 為混合鹼基代碼(A/G)，表示同時含 A 及 G。</p>	<p>部對照基因)</p> <p>引子 F： 5.8SF,5'-ACTCTCGGCAACGGATATC TYG-3' 引子 R： 5.8SR,5'-GGCGCAACTTGCGTTCAAA R-3' 探針 P： 5.8SP,5'-(FAM)-TCGATGGTTCRCGGG ATTCTGCAATTCA-(TAMRA)-3' PCR 增幅產物大小 116 bp</p> <p>2.3.2.2. 蒜(標的基因：internal transcribed spacer, ITS)</p> <p>引子 F： AsF,5'-CGACGAGTGCATTTTGGGTT ATGATG-3' 引子 R： AsR,5'-CATCGTGCGTTAACTCGACA CACCAT-3' 探針 P： AsP,5'-(FAM)-ATGGAGAATGACCTT CCGTGCTT-(TAMRA)-3' PCR 增幅產物大小 130 bp</p> <p>註 3： 1. 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°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. 植物共通性基因引子及探針之序列中，Y 為混合鹼基代碼(C/T)，表示同時含 C 及 T；R 為混合鹼基代碼(A/G)，表示同時含 A 及 G。</p> <p>2.3.2.3. <u>去氧核糖核苷三磷酸 (deoxyribonucleoside triphosphate, dNTP)溶液</u> 含去氧腺苷三磷酸 (deoxyadenosine triphosphate, dATP)，去氧胞苷三磷酸 (deoxycytidine triphosphate, dCTP)，去氧鳥糞嘌呤核苷三磷酸 (deoxyguanosine triphosphate, dGTP)及去氧胸苷三磷酸 (deoxythymidine triphosphate, dTTP)各</p>	
---	--	--

<p>2.3.2.2. <u>TaqMan Universal PCR Master Mix (適用於 ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System)</u> 本試劑內含 <u>real-time PCR</u> 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。</p> <p>2.3.2.3. <u>LightCycler[®] FastStart DNA Master HybProbe (適用於 Roche LightCycler)</u> 本試劑內含 <u>real-time PCR</u> 所需去氧核糖核苷三磷酸、聚合酶等，且內附 <u>25 mM 氯化鎂溶液</u>，使用時添加引子、探針及待測檢體 DNA。</p> <p>2.3.3. 對照用物質：蒜組織，或使用衛生福利部食品藥物管理署提供編號 <u>S205</u> 之參考質體作為對照用物質。</p> <p>2.4. 器具及材料^(註3)</p> <p>2.4.1. 吸管(Pipette)：10 μL、20 μL、100 μL、200 μL 及 1000 μL。</p> <p>2.4.2. 吸管尖頭(Pipette tips)：10 μL、20 μL、200 μL 及 1000 μL。</p> <p>2.4.3. 離心管：200 μL、600 μL、1.5 mL 及 2 mL。</p> <p>2.4.4. PCR 反應管：200 μL。</p> <p>2.4.5. PCR 玻璃毛細管：Roche LightCycler 專用。</p> <p>2.4.6. 玻璃或塑膠瓶：50 mL、100 mL、</p>	<p><u>2.5 mM 之溶液。</u></p> <p>2.3.2.4. <u>聚合酶</u> <u>Taq DNA polymerase (2U/μL)</u>，或同級品。</p> <p>2.3.2.5. <u>TaqMan Universal PCR Master Mix (確認試驗用，適用於 ABI PRISM[®] 7700)</u> 本試劑內含 <u>RT-PCR</u> 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。</p> <p>2.3.2.6. <u>LightCycler[®] FastStart DNA Master HybProbe (確認試驗用，適用於 Roche LightCycler[®])</u> 本試劑內含 <u>RT-PCR</u> 所需去氧核糖核苷三磷酸、聚合酶等，使用時僅需自行添加<u>氯化鎂溶液</u>、引子、探針及待測檢體 DNA 即可。</p> <p>2.3.3. 電泳用：<u>溴化乙錠(ethidium bromide)</u>、<u>瓊膠(agarose)</u>、<u>溴酚藍(bromophenol blue)</u>、<u>二甲苯藍(xylene cyanol FF)</u>、<u>乙二胺四乙酸二鈉(ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt, Na₂-EDTA)</u>、<u>三羥甲基氨基甲烷(tris (hydroxymethyl) aminomethane (Tris))</u>、<u>甘油及硼酸</u>，均採分子生物分析級試藥。<u>DNA 分子量標記物質(DNA molecular weight marker)</u>：100-bp DNA ladder marker。</p> <p>2.3.4. 對照用物質：蒜之組織，或使用行政院衛生署藥物食品檢驗局提供編號 <u>pIDP2</u> 之參考質體作為對照用物質。</p> <p>2.4. 器具及材料^(註4)</p> <p>2.4.1. 吸管(Pipette)：10 μL、20 μL、100 μL、200 μL 及 1000 μL。</p> <p>2.4.2. <u>電泳膠片製作盤。</u></p> <p>2.4.3. 吸管尖頭(Pipette tips)：10 μL、20 μL、200 μL 及 1000 μL。</p> <p>2.4.4. 離心管：200 μL、600 μL、1.5 mL 及 2 mL。</p> <p>2.4.5. PCR 反應管：200 μL 及 500 μL。</p> <p>2.4.6. PCR 玻璃毛細管^(註5)：Roche LightCycler[®] 專用。</p>	
--	--	--

250 mL、500 mL、1000 mL 及 2000 mL。

2.4.7. 塑膠離心管：50 mL。

2.4.8. 過濾：孔徑為 0.45 μm ，nitrocellulose 材質。

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)

2.4.7. 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 μm ，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 0.5M pH 8.0 EDTA 溶液 20 mL，加水溶解使成 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 × 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 $\mu\text{g/mL}$ 。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 氯化鎂)	2.5 μL
Taq DNA polymerase (2 U/ μL)	1.0 μL
2.5 mM dNTP	4.0 μL
10 μM 引子 F	1.0 μL
10 μM 引子 R	1.0 μL
檢體 DNA 溶液(總量 100 ng)	5.0 μL

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

採用適用於植物 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°C 冷凍保存。

無菌純水	10.5 μL
總體積	25.0 μL

2.5.5.2. ABI PRISM® 7700 Sequence Detector 確認試驗用

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
無菌純水	3.3 μL
總體積	25.0 μL

2.5.5.3. Roche LightCycler® 確認試驗用

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
無菌純水	6.1 μL
總體積	20.0 μL

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)

檢體為乾燥者，可直接以粉碎機研磨成細粉。檢體為溼狀者，經真空冷凍乾燥處理後，再以粉碎機研磨成細粉備用。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

2.6.2.1. 採用適用於植物 DNA 抽取之市售套組，並依套組操作說明步驟抽取 DNA。

2.6.2.2. 抽取之 DNA 溶液收集至已滅菌之 1.5 mL 離心管，為檢體 DNA 原液。

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。

2.6.2.3.依 2.6.3.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

取適當量之檢體 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/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 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 原液、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		
測試內部對照基因 及蒜標的基因	60°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，再以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 需同時進行內部對照基因、蔥及洋蔥標的基因、蔥標的基因之 PCR 測試。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，經由 DNA 分子量標記物質估算內部對照基因 PCR 增幅產物大小為 116 bp，蒜標的基因 PCR 增幅產物大小為 130 bp，即判定該檢體含有蒜成分。

註 8：

1. 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。
2. 檢體 DNA 之純度將直接影響後續 PCR 測試結果，檢體 DNA 進行內部對照基因 PCR 測試，可確定是否含有 DNA 及其純度。
3. 本 PCR 定性反應條件係採 ABI PRISM® 9700 設定之，當使用其他機型時，應自行探討反應條件。

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 原液、引子及探針備用。取 PCR 反應管，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 µL 入 PCR 反應管中，再各別加入檢體 DNA 溶液 5 µL，最後將 PCR 反應管置於離心機中，以 200 × 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

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 增幅產物為蒜之基因片段，可確認該檢體中含有蒜成分。

3. 變性	95°C	15 sec
4. 黏接、延展		
<u>測試內部對照基因</u>	60°C	1 min
<u>及蒜標的基因</u>		
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 PCR 反應管，並依照 2.5.5.3.節配製 PCR 溶液，依序加入 LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe、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 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		
<u>測試內部對照基因</u>	60°C	25 sec
<u>及蒜標的基因</u>		

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
-------	------	--------

2.8.2. 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 增幅產物為蒜之基因片段，可確認該檢體中含有蒜成分。

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。

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。

食品中動物性成分檢驗-牛成分之定性檢驗修正 草案總說明

為加強食品中動物性、植物性成分之管理，並依據食品衛生管理法第三十八條規定：「各級主管機關執行食品、食品添加物、食品容器或包裝及食品用洗潔劑之檢驗，其檢驗方法，由中央主管機關定之」，爰擬具「食品中動物性成分檢驗-牛成分之定性檢驗」草案，其修正要點如下：

- 一、刪除 PCR 試驗相關內容，包含裝置、試藥、器具及材料、試劑之配製及鑑別試驗。
- 二、修正鑑別試驗用引子及探針。
- 三、修正對照用物質。
- 四、增列附註二及三。

食品中動物性成分檢驗-牛成分之定性檢驗修正

草案對照表

修正規定	現行規定	說明
<p>1. 適用範圍：本檢驗方法適用於食品中牛成分之定性檢驗。</p> <p>2. 檢驗方法：<u>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。</u></p> <p>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、<u>real-time PCR 試劑配製及檢驗過程</u>皆需有區隔空間，避免交叉污染。<u>Real-time PCR 試劑之配製</u>應於無菌操作台內進行。</p> <p>2.2. 裝置^(註 1)</p> <p>2.2.1. 即時聚合酶鏈反應器：<u>ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System</u> 或 Roche LightCycler，或同級品。</p> <p>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。</p> <p>2.2.3. 振盪型粉碎機：Retsch MM200，或同級品。</p> <p>2.2.4. 真空乾燥裝置：供 DNA 乾燥用。</p> <p>2.2.5. 高壓滅菌釜。</p> <p>2.2.6. 無菌操作台。</p> <p>2.2.7. 加熱振盪器：具 55°C 溫控及振盪功能。</p> <p>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。</p> <p>2.2.9. 離心機：供各式微量離心管離心用。</p> <p>2.2.10. 分光光度計：具波長 260 nm、280 nm。</p>	<p>1. 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、牛乳及其製品之定性檢驗。</p> <p>2. 檢驗方法：<u>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。</u></p> <p>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 <u>PCR 等實驗過程</u>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。</p> <p>2.2. 裝置^(註 1)</p> <p>2.2.1. <u>聚合酶鏈反應器：ABI PRISM 9700 Sequence Detector，或同級品。</u></p> <p>2.2.2. 即時聚合酶鏈反應器^(註 2)：<u>ABI PRISM 7700 Sequence Detector</u> 或 Roche LightCycler，或同級品。</p> <p>2.2.3. 真空冷凍乾燥裝置：溫度可達 -40°C 以下，真空度可達 133 mBar 以下，供檢體乾燥用。</p> <p>2.2.4. 振盪型粉碎機：Retsch MM200，或同級品。</p> <p>2.2.5. 真空乾燥裝置：供 DNA 乾燥用。</p> <p>2.2.6. 高壓滅菌釜。</p> <p>2.2.7. 無菌操作台。</p> <p>2.2.8. 加熱振盪器：具 55°C 溫控及振盪功能。</p> <p>2.2.9. 微量冷凍離心機 (Micro refrigerated centrifuge)：可達 20000 × g，並具 4°C 溫控功能。</p> <p>2.2.10. 離心機：供各式微量離心管離心用。</p> <p>2.2.11. 分光光度計：具波長 260 nm、280 nm。</p> <p>2.2.12. 冷凍設備：具冷藏及凍結功能。</p>	<p>一、刪除 PCR 試驗相關內容，包含裝置、試藥、器具及材料、試劑之配製及鑑別試驗。</p> <p>二、修正鑑別試驗用引子及探針。</p> <p>三、修正對照用物質。</p> <p>四、增列附註二及三。</p> <p>五、增修訂部分文字。</p>

<p>2.2.11. 冷凍設備：具冷藏及凍結功能。</p> <p>2.2.12. 旋渦混合器(Vortex mixer)。</p> <p>2.2.13. 酸鹼度測定儀(pH meter)。</p> <p>2.2.14. 水浴裝置：溫差±1℃以內者。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>2.3. 試藥</p> <p>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。</p> <p>2.3.2. <u>Real-time PCR</u> 用^(註2)</p> <p>2.3.2.1. 鑑別試驗用引子及探針</p> <p>2.3.2.1.1. 哺乳類、家禽類及魚類(標的基因：<u>12S ribosomal RNA</u>，供作內部對照基因)</p> <p>引子 F： <u>12SF, 5'-CAAAGTGGGATTAGATACCCCACTA-3'</u></p> <p>引子 R：</p>	<p>2.2.13. 旋渦混合器(Vortex mixer)。</p> <p>2.2.14. 電泳槽：供 DNA 電泳用。</p> <p>2.2.15. 照相裝置：供拍攝電泳膠片用。</p> <p>2.2.16. 紫外燈箱：具波長 302 nm、365 nm 紫外燈。</p> <p>2.2.17. pH 測定儀。</p> <p>2.2.18. 水浴裝置：溫差±1℃以內者。</p> <p>2.2.19. 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。</p> <p>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。</p> <p>註 2: 確認試驗用。</p> <p>2.3. 試藥</p> <p>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。</p> <p>2.3.2. PCR 用^(註3)</p> <p>2.3.2.1.1. 鑑別試驗用引子哺乳類及家禽類(標的基因：<u>myostatin</u>，供作內部對照基因)</p> <p>引子 F：<u>MYF</u>， <u>5'-TTGTGCAAATCCTGAGACTCAT-3'</u></p> <p>引子 R：<u>MYR</u>， <u>5'-ATACCAGTGCCTGGGTTTCAT-3'</u></p> <p>PCR 增幅產物大小 97 bp</p> <p>2.3.2.1.2. 牛(標的基因：<u>12S ribosomal RNA</u>)</p> <p>引子 F：<u>BF</u>， <u>5'-ACATTCTCTACCCAAGAGAATCAAGC-3'</u></p> <p>引子 R：<u>BR</u>， <u>5'-TCCTCTCATGTAGCTAGTGCGTTTA-3'</u></p> <p>PCR 增幅產物大小 193 bp</p> <p>2.3.2.2. 確認試驗用引子及探針</p> <p>2.3.2.2.1. 哺乳類及家禽類(標的基因：<u>myostatin</u>，供作內部對照基因)</p> <p>引子 F：<u>MYF</u>， <u>5'-TTGTGCAAATCCTGAGACTCAT-3'</u></p> <p>引子 R：<u>MYR</u>， <u>5'-ATACCAGTGCCTGGGTTTCAT-3'</u></p>	
---	---	--

<p><u>12SR,5'-ATCGRTTMTAGAACAGGCT CCTCTAG-3'</u> 探針 P： <u>12SP,5'-(FAM)-CACCGCCAAGTCCTT TGRGTTT TARGC-(TAMRA)-3'</u> PCR 增幅產物大小 <u>155 bp</u></p> <p>2.3.2.1.2. 牛(標的基因：12S ribosomal RNA) 引子 F：BF， 5'-ACATTCTCTACCCAAGAGAATCA AGC-3' 引子 R：BR， 5'-TCCTCTCATGTAGCTAGTGCGTTT A-3' 探針 P：BP， 5'-(FAM)-CCCTCCTCAAATAGATTCA GTG CATCTAACCCCT-(TAMRA)-3' PCR 增幅產物大小 <u>193 bp</u> 註 2：</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 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. 內部對照基因引子及探針之序列中，<u>R</u> 為混合鹼基代碼(<u>A/G</u>)，表示同時含 <u>A</u> 及 <u>G</u>；<u>M</u> 為混合鹼基代碼(<u>A/C</u>)，表示同時含 A 及 <u>C</u>。 	<p>探針 P：<u>MYP</u>， <u>5'-(FAM)-CCCATGAAAGACGGTACA AGGTATACTG-(TAMRA)-3'</u> PCR 增幅產物大小 <u>97 bp</u></p> <p>2.3.2.2. 牛(標的基因：12S ribosomal RNA) 引子 F：BF， 5'-ACATTCTCTACCCAAGAGAATCA AGC-3' 引子 R：BR， 5'-TCCTCTCATGTAGCTAGTGCGTTT A-3' 探針 P：BP， 5'-(FAM)-CCCTCCTCAAATAGATTCA GTG CATCTAACCCCT-(TAMRA)-3' PCR 增幅產物大小 <u>193 bp</u> 註 3：</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 合成之引子及探針，拆封後，以無菌<u>純水</u>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. 植物共通性基因引子及探針之序列中，<u>Y</u> 為混合鹼基代碼(<u>C/T</u>)，表示同時含 <u>C</u> 及 <u>T</u>；<u>R</u> 為混合鹼基代碼(<u>A/G</u>)，表示同時含 A 及 <u>G</u>。 <p>2.3.2.3. <u>去氧核糖核苷三磷酸 (deoxyribonucleoside triphosphate, dNTP 溶液</u> 含去氧腺苷三磷酸 (deoxyadenosine triphosphate, dATP)，去氧胞苷三磷酸 (deoxycytidine triphosphate, dCTP)，去氧鳥糞嘌呤核苷三磷酸 (deoxyguanosine triphosphate, dGTP) 及去氧胸苷三磷酸 (deoxythymidine triphosphate, dTTP) 各 <u>2.5 mM 之溶液。</u></p> <p>2.3.2.4. <u>聚合酶</u> <u>Taq DNA polymerase (2 U/μL)</u>，或同級品。</p>	
---	--	--

<p>2.3.2.2. <u>TaqMan Universal PCR Master Mix (適用於 ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System)</u> 本試劑內含 <u>real-time</u> 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。</p> <p>2.3.2.3. <u>LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe (適用於 Roche LightCycler)</u> 本試劑內含 <u>real-time</u> 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。</p> <p>2.3.3. <u>對照用物質：牛肉或使用衛生福利部食品藥物管理署提供編號 S201 之參考質體作為對照用物質。</u></p> <p>2.4. 器具及材料^(註3)</p> <p>2.4.1. <u>吸管(Pipette)：10 µL、20 µL、100 µL、200 µL 及 1000 µL。</u></p> <p>2.4.2. <u>吸管尖頭(Pipette tips)：10 µL、20 µL、200 µL 及 1000 µL。</u></p> <p>2.4.3. <u>離心管：200 µL、600 µL、1.5 mL 及 2 mL。</u></p> <p>2.4.4. <u>PCR 反應管：200 µL。</u></p> <p>2.4.5. <u>PCR 玻璃毛細管：Roche LightCycler 專用。</u></p> <p>2.4.6. <u>玻璃或塑膠瓶：50 mL、100 mL、250 mL、500 mL、1000 mL 及 2000 mL。</u></p> <p>2.4.7. <u>塑膠離心管：50 mL。</u></p>	<p>2.3.2.5. <u>TaqMan Universal PCR Master Mix (確認試驗用，適用於 ABI PRISM 7700)</u> 本試劑內含 <u>RT-PCR</u> 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。</p> <p>2.3.2.6. <u>LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe (確認試驗用，適用於 Roche LightCycler)</u> 本試劑內含 <u>RT-PCR</u> 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。</p> <p>2.3.3. <u>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))、甘油及硼酸，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。</u></p> <p>2.3.4. <u>對照用物質：牛肉、牛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 之參考質體作為對照用物質。</u></p> <p>2.4. 器具及材料^(註4)</p> <p>2.4.1. <u>吸管(Pipette)：10 µL、20 µL、100 µL、200 µL 及 1000 µL。</u></p> <p>2.4.2. <u>電泳膠片製作盤。</u></p> <p>2.4.3. <u>吸管尖頭(Pipette tips)：10 µL、20 µL、200 µL 及 1000 µL。</u></p> <p>2.4.4. <u>離心管：200 µL、600 µL、1.5 mL 及 2 mL。</u></p> <p>2.4.5. <u>PCR 反應管：200 µL 及 500 µL。</u></p> <p>2.4.6. <u>PCR 玻璃毛細管^(註5)：Roche LightCycler 專用。</u></p> <p>2.4.7. <u>玻璃或塑膠瓶：50 mL、100 mL、250 mL、500 mL、1000 mL 及 2000 mL。</u></p>	
--	--	--

2.4.8. 過濾膜：孔徑為 0.45 μm ，nitrocellulose 材質。

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)

2.4.8. 塑膠離心管：50 mL。

2.4.9. 過濾膜：孔徑為 0.45 μm ，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，加水溶解使成 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 $^{\circ}\text{C}$ 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 $\mu\text{g/mL}$ 。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

<u>10 倍 PCR 緩衝溶液(含 15 mM MgCl_2)</u>	<u>2.5 μL</u>
<u>Taq DNA polymerase (2 U/μL)</u>	<u>1.0 μL</u>
<u>2.5 mM dNTP</u>	<u>4.0 μL</u>
<u>10 μM 引子 F</u>	<u>1.0 μL</u>
<u>10 μM 引子 R</u>	<u>1.0 μL</u>
<u>檢體 DNA 溶液(總量 100 ng)</u>	<u>5.0 μL</u>
<u>無菌純水</u>	<u>10.5 μL</u>
<u>總體積</u>	<u>25.0 μL</u>

2.5.1. ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System 鑑別試驗用

2.5.5.2. ABI PRISM 7700 Sequence Detector 確認試驗用

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°C 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

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
無菌純水	3.3 μL
總體積	25.0 μL

2.5.5.3. Roche LightCycler 確認試驗用

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
無菌純水	6.1 μL
總體積	20.0 μL

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)

檢體為乾燥者，可直接以粉碎機研磨成細粉。檢體為溼狀者，經真空冷凍乾燥處理後，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

2.6.2.1. 採用適用於動物 DNA 抽取之市售套組，並依套組操作說明步驟抽取 DNA。

2.6.2.2. 抽取之 DNA 溶液收集至已滅菌之 1.5 mL 離心管，為檢體 DNA 原液

2.6.2.3. 依 2.6.3.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

取適當量之檢體 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

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。

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 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 原液、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		
測試牛基因	60°C	30 sec
測試哺乳類及家禽類基因	54°C	30sec
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，再以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 需同時進行內部對照基因及牛標的基因之 PCR 測試。檢體 DNA 之 PCR 增幅產物電泳結果，須與正反應對

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 μ L 入 PCR 反應管中，各別加入檢體 DNA 溶液 5 μ L，再將 PCR 反應管置於離心機中，以 200 \times 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

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，經由 DNA 分子量標記物質估算 PCR 增幅產物大小為 193 bp 者，即判定該檢體含有牛成分。

註 8:

1. 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。

2. 檢體 DNA 之純度將直接影響後續 PCR 測試結果，檢體 DNA 進行內部對照基因 PCR 測試，可確定是否含有 DNA 及其純度。

3. 本 PCR 定性反應條件係採 ABI PRISM 9700 設定之，當使用其他機型時，應自行探討反應條件。

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 原液、引子及探針備用。取 PCR 反應管，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		
測試牛基因	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
-------	------	--------

2.8.1.2. RT-PCR – Roche LightCycler

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 μ L 於玻璃毛細管中，各別加入檢體 DNA 溶液 5 μ L，再將毛細管置於離心機中，以 800 \times 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 增幅產物為牛之基因片段，可確認該檢體中含有牛成分。

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

以無菌純水適當稀釋檢體 DNA 原液、引子及探針備用。取 PCR 反應管，並依照 2.5.5.3.節配製 PCR 溶液，依序加入 LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe、氯化鎂溶液、稀釋過之引子及探針，混合均勻後，分裝 15 μ L 於玻璃毛細管中，再各別加入檢體 DNA 溶液 5 μ L，最後將毛細管置於離心機中，以 800 \times 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		
<u>測試牛基因</u>	60°C	25 sec
<u>測試哺乳類及家禽</u>	54°C	25 sec
<u>類基因</u>		
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

2.8.2. 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 增幅產物為牛之基因片段，可確認該檢體中含有牛成分。

附註：

1. 本檢驗方法最低檢測濃度為 0.1%(以乾重計)。

<p><u>使用之儀器，設定適合之反應條件。</u></p> <p>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。</p> <p>5. 素食食品檢驗結果呈現微量牛成分陽性反應，建議可採用市售酪蛋白等蛋白質檢測套組，確認是否係添加乳清蛋白相關成分所致。</p>	<p>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。</p> <p>3. 素食食品檢驗結果呈現微量牛成分陽性反應，建議可採用市售酪蛋白等蛋白質檢測套組，確認是否係添加乳清蛋白相關成分所致。</p>	
--	--	--

食品中動物性成分檢驗-雞成分之定性檢驗修正 草案總說明

為加強食品中動物性、植物性成分之管理，並依據食品衛生管理法第三十八條規定：「各級主管機關執行食品、食品添加物、食品容器或包裝及食品用洗潔劑之檢驗，其檢驗方法，由中央主管機關定之」，爰擬具「食品中動物性成分檢驗-雞成分之定性檢驗」草案，其修正要點如下：

- 一、刪除 PCR 試驗相關內容，包含裝置、試藥、器具及材料、試劑之配製及鑑別試驗。
- 二、修正鑑別試驗用引子及探針。
- 三、修正對照用物質。
- 四、增列附註二及三。

食品中動物性成分檢驗-雞成分之定性檢驗修正 草案對照表

修正規定	現行規定	說明
<p>1. 適用範圍：本檢驗方法適用於食品中雞成分之定性檢驗。</p> <p>2. 檢驗方法：<u>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。</u></p> <p>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、<u>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。</u></p> <p>2.2. 裝置^(註1)</p> <p>2.2.1. 即時聚合酶鏈反應器：<u>ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System 或 Roche LightCycler，或同級品。</u></p> <p>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。</p> <p>2.2.3. 振盪型粉碎機：<u>Retsch MM200，或同級品。</u></p> <p>2.2.4. 真空乾燥裝置：供 DNA 乾燥用。</p> <p>2.2.5. 高壓滅菌釜。</p> <p>2.2.6. 無菌操作台。</p> <p>2.2.7. 加熱振盪器：具 55℃ 溫控及振盪功能。</p> <p>2.2.8. 微量冷凍離心機(Micro refrigerated centrifuge)：可達 20000 × g，並具 4℃ 溫控功能。</p> <p>2.2.9. 離心機：供各式微量離心管離心用。</p> <p>2.2.10. 分光光度計：具波長 260 nm、280 nm。</p> <p>2.2.11. 冷凍設備：具冷藏及凍結功能。</p> <p>2.2.12. 旋渦混合器(Vortex mixer)。</p> <p>2.2.13. 酸鹼度測定儀(pH meter)。</p> <p>2.2.14. 水浴裝置：溫差±1℃以內者。</p> <p>2.2.15. 天平：最大稱重量為 2000 g，靈</p>	<p>1. 適用範圍：本檢驗方法適用於食品中<u>雞肉、雞心、雞肝、雞血、雞蛋</u>等成分之定性檢驗。</p> <p>2. 檢驗方法：<u>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。</u></p> <p>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 <u>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。</u></p> <p>2.2. 裝置^(註1)</p> <p>2.2.1. 分光光度計：具波長 260 nm、280 nm。</p> <p>2.2.2. 旋渦混合器(Vortex mixer)。</p> <p>2.2.3. 真空乾燥裝置：供 DNA 乾燥用。</p> <p>2.2.4. <u>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。</u></p> <p>2.2.5. 加熱振盪器：具 55℃ 溫控及振盪功能。</p> <p>2.2.6. 微量冷凍離心機：可達 20000 × g，並具 4℃ 溫控功能。</p> <p>2.2.7. 離心機：供各式微量離心管離心用。</p> <p>2.2.8. 聚合酶鏈反應器：<u>ABI PRISM 9700 Sequence Detector，或同級品。</u></p> <p>2.2.9. 即時聚合酶鏈反應器^(註2)：ABI PRISM <u>7700 Sequence Detector 或 Roche LightCycler，或同級品。</u></p> <p>2.2.10. 電泳槽：供 DNA 電泳用。</p> <p>2.2.11. 振盪型粉碎機。</p> <p>2.2.12. 照相裝置：供拍攝電泳膠片用。</p> <p>2.2.13. 紫外燈箱：具波長 312 nm、365 nm 紫外燈。</p> <p>2.2.14. 冷凍設備：具冷藏及凍結功能。</p>	<p>一、刪除 PCR 試驗相關內容，包含裝置、試藥、器具及材料、試劑之配製及鑑別試驗。</p> <p>二、修正鑑別試驗用引子及探針。</p> <p>三、修正對照用物質。</p> <p>四、增列附註二及三。</p> <p>五、增修訂部分文字。</p>

<p>敏度為 0.1 g；最大稱重量為 100 g，靈敏度為 1 mg。</p> <p>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。</p> <p>2.3. 試藥</p> <p>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。</p> <p>2.3.2. <u>Real-time PCR</u> 用^(註2)</p> <p>2.3.2.1. 鑑別試驗用引子及探針</p> <p>2.3.2.1.1. 哺乳類、家禽類及魚類(標的基因：<u>12S ribosomal RNA</u>，供作內部對照基因)</p>	<p>2.2.15. 高壓滅菌釜。</p> <p>2.2.16. pH 測定儀。</p> <p>2.2.17. 水浴裝置：溫差±1.0°C 以內者。</p> <p>2.2.18. 天平：最大秤重量為 2000 g，靈敏度為 0.1 g；最大秤重量為 100 g，靈敏度為 1 mg。</p> <p>2.2.19. 無菌操作台。</p> <p>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。</p> <p>註 2：確認試驗用。</p> <p>2.3. 試藥</p> <p>2.3.1. DNA 抽取用：<u>RNase</u>、乙醇(96~100%)均採分子生物分析級試藥，<u>DNeasy[®]Tissue</u> 套組。</p> <p>2.3.2. PCR 用</p> <p>2.3.2.1. 鑑別試驗用引子^(註3)</p> <p>2.3.2.1.1. 哺乳類及家禽類(標的基因：<u>myostatin</u>，供作內部對照基因)</p> <p>引子 F： <u>MYF,5'-TTGTGCAAATCCTGAGACTCAT-3'</u></p> <p>引子 R： <u>MYR,5'-ATACCAGTGCCTGGGTTTCAT-3'</u></p> <p>PCR 增幅產物大小 97 bp</p> <p>2.3.2.1.2. 雞(標的基因：<u>growth hormone</u>)：雞之測試用</p> <p>引子 F： <u>CGHF,5'-TAACTTTTGTAAGCGGACTCAT-3'</u></p> <p>引子 R： <u>CGHR,5'-GCATTACCTGCGCTGTGGC-3'</u></p> <p>PCR 增幅產物大小 118 bp</p> <p>2.3.2.1.3. 雞(標的基因：<u>12S rRNA</u>)：雞或雞蛋之測試用</p> <p>引子 F： <u>CHIF,5'-GAGTGGCCACATGTTATCTGC-3'</u></p> <p>引子 R： <u>CHIR,5'-TAATCGTTGAGGCTAAGATGG-3'</u></p> <p>PCR 增幅產物大小 108 bp</p> <p>2.3.2.2. 確認試驗用引子及探針^(註4)</p> <p>2.3.2.2.1. 哺乳類及家禽類(標的基因：<u>myostatin</u>，供作內部對照基因)</p>	
---	---	--

<p>引子 F： <u>12SF,5'-CAAACCTGGGATTAGATACCCCACTA-3'</u></p> <p>引子 R： <u>12SR,5'-ATCGRTTMTAGAACAGGCTCCTCTAG-3'</u></p> <p>探針 P： <u>12SP,5'-(FAM)-CACCGCCAAGTCCTTTGRGTTTARGC-(TAMRA)-3'</u></p> <p>PCR 增幅產物大小 <u>155 bp</u></p> <p>2.3.2.1.2. 雞(標的基因：growth hormone)：雞之<u>鑑別用</u></p> <p>引子 F： CGHF,5'-TAACTTTTGTAAGCGGACACTCAT-3'</p> <p>引子 R： CGHR,5'-GCATTACCTGCGCTGTGGC-3'</p> <p>探針 P： CGHP,5'-(FAM)-CCTTCAGGCTTGACAGTGACCTCCAG-(TAMRA)-3'</p> <p>PCR 增幅產物大小 <u>118 bp</u></p> <p>2.1.2.1.3. 雞(標的基因：12S rRNA)：雞或雞蛋之<u>鑑別用</u></p> <p>引子 F： CHIF,5'-GAGTGGCCACATGTTATCTGC-3'</p> <p>引子 R： CHIR,5'-TAATCGTTGAGGCTAAGATGG-3'</p> <p>探針 P： CHIP,5'-(FAM)-AGCCTAAGATCCACCTAAACCCAACCCA-(TAMRA)-3'</p> <p>PCR 增幅產物大小 <u>108 bp</u></p> <p>註 2： 1. <u>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。</u></p> <p>2. <u>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。</u></p>	<p>引子 F： <u>MYF,5'-TTGTGCAAATCCTGAGACTCAT-3'</u></p> <p>引子 R： <u>MYR,5'-ATACCAGTGCCTGGGTTTCAT-3'</u></p> <p>探針 P： <u>MYP,5'-(FAM)-CCCATGAAAGACGGTACAA GGTATACTG-(TAMRA)-3'</u></p> <p>PCR 增幅產物大小 <u>97 bp</u></p> <p>2.3.2.2.2. 雞(標的基因：growth hormone)：雞之<u>測試用</u></p> <p>引子 F： CGHF,5'-TAACTTTTGTAAGCGGACACTCAT-3'</p> <p>引子 R： CGHR,5'-GCATTACCTGCGCTGTGGC-3'</p> <p>探針 P： CGHP,5'-(FAM)-CCTTCAGGCTTGACAGTGACCTCCAG-(TAMRA)-3'</p> <p>PCR 增幅產物大小 <u>118 bp</u></p> <p>2.3.2.2.3. 雞(標的基因：12S rRNA)：雞或雞蛋之<u>測試用</u></p> <p>引子 F： CHIF,5'-GAGTGGCCACATGTTATCTGC-3'</p> <p>引子 R： CHIR,5'-TAATCGTTGAGGCTAAGATGG-3'</p> <p>探針 P： CHIP,5'-(FAM)-AGCCTAAGATCCACCTAAACCCAACCCA-(TAMRA)-3'</p> <p>PCR 增幅產物大小 <u>108 bp</u></p> <p>註 3：<u>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°C 貯存備用。</u></p> <p>註 4：<u>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°C 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。</u></p> <p>2.3.2.3. <u>去氧核苷三磷酸 (deoxyribonucleoside triphosphate, dNTP)</u> <u>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</u></p>	
---	--	--

<p>2.3.2.2. <u>TaqMan Universal PCR Master Mix (適用於 ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System)</u> 本試劑內含 <u>real-time PCR</u> 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。</p> <p>2.3.2.3. <u>LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe (適用於 Roche LightCycler)</u> 本試劑內含 <u>real-time PCR</u> 所需去氧核糖核苷三磷酸、聚合酶等，且內附 <u>25 mM 氯化鎂溶液</u>，使用時添加引子、探針及待測檢體 DNA。</p> <p>2.3.3. <u>對照用物質：雞肉或使用衛生福利部食品藥物管理署提供編號 S202 之參考質體作為對照用物質。</u></p> <p>2.4. 器具及材料^(註 3)</p> <p>2.4.1. <u>吸管(Pipette)：10 μL、20 μL、100 μL、200 μL 及 1000 μL。</u></p> <p>2.4.2. <u>吸管尖頭(Pipette tips)：10 μL、20 μL、200 μL 及 1000 μL。</u></p> <p>2.4.3. <u>離心管：200 μL、600 μL、1.5 mL 及 2 mL。</u></p> <p>2.4.4. <u>PCR 反應管：200 μL。</u></p>	<p><u>triphosphate, dGTP)及去氧胸苷三磷酸(deoxythymidine triphosphate, dTTP)各 2.5 mM 之溶液。</u></p> <p>2.3.2.4. <u>聚合酶 Taq DNA polymerase (2U/μL)。</u></p> <p>2.3.2.5. <u>TaqMan Universal PCR Master Mix (確認試驗用，適用於 ABI PRISM 7700)</u> 內含 PCR 所需去氧核糖三磷酸、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。</p> <p>2.3.2.6. <u>LightCycler_ FastStart DNA Master Hybridization Probes (確認試驗用，適用於 Roche LightCycler)</u> 內含 PCR 所需去氧核糖三磷酸、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。</p> <p>2.3.3. <u>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。</u></p> <p>2.3.4. <u>對照用物質：雞肉、雞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 pIDM2 之參考質體作為對照用物質。</u></p> <p>2.4. 器具及材料^(註 4)</p> <p>2.4.1. <u>吸管(Pipette)：10 μL、20 μL、100 μL、200 μL 及 1000 μL。</u></p> <p>2.4.2. <u>電泳膠片製作盤。</u></p> <p>2.4.3. <u>吸管尖頭(Pipette tips)：10 μL、20 μL、200 μL 及 1000 μL。</u></p> <p>2.4.4. <u>離心管：200 μL、600 μL、1.5 mL 及 2 mL。</u></p>	
---	---	--

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。

2.4.8. 過濾：孔徑為 0.45 μm ，nitrocellulose 材質。

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)

2.4.5. PCR 反應管：200 μL 及 500 μL 。

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 μm ，材質為 nitro-cellulose。

註 5：使用之塑膠或玻璃器皿均為無 DNase 污染。

註 6：儀器使用 RocheLightCycler[®] 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 0.5M pH 8.0 EDTA 溶液 20 mL，加水溶解使成 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 $^{\circ}\text{C}$ 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。溴化乙錠為致癌物質，配製時應注意安全。

2.5.5. PCR 溶液^(註 7)

2.5.5.1. 鑑別試驗用

<u>10 倍 PCR 緩衝溶液(含 15 mM MgCl_2)</u>	<u>2.5 μL</u>
<u>Taq DNA polymerase (2 U/μL)</u>	<u>1.0 μL</u>
<u>2.5 mM dNTP</u>	<u>4.0 μL</u>
<u>10 μM 引子 F</u>	<u>1.0 μL</u>

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°C 冷

10 μM 引子 R	1.0 μL
檢體 DNA 溶液(總量 100 ng)	5.0 μL
無菌純水	10.5 μL
總體積	25.0 μL

2.5.5.2. ABI PRISM 7700 Sequence Detector 確認試驗用

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
無菌純水	3.3 μL
總體積	25.0 μL

2.5.5.3. Roche LightCycler 確認試驗用

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 Hybridization	2.0 μL
25 mM MgCl ₂	2.4 μL
模版 DNA 溶液(總量 100 ng)	5.0 μL
無菌純水	6.1 μL
總體積	20.0 μL

註 7: 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

檢體為乾燥肉乾或粉碎狀者，可直接以粉碎機研磨成細粉。檢體為溼狀肉塊或肉加工者，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。

2.6.2. 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。

2.6.2.1. 稱取檢體約 25 mg^(註 8)，置入 2

凍保存。

mL 離心管。

2.6.2.2. 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。

2.6.2.3. 於 55 $^{\circ}$ C 振盪反應直到檢體溶解。

2.6.2.4. 加入 AL 試劑 200 μ L，以旋渦混合器混合均勻。

2.6.2.5. 水浴 70 $^{\circ}$ C，10 分鐘。

2.6.2.6. 加入乙醇(96~100%) 200 μ L，以旋渦混合器混合均勻。

2.6.2.7. 取混合液注入離心管柱，以 $\geq 6000 \times g$ (8000 rpm) 離心 1 分鐘，並將收集管及濾液丟棄。

2.6.2.8. 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 $\geq 6,000 \times g$ (8,000 rpm) 離心 1 分鐘後，將收集管及濾液丟棄。

2.6.2.9. 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 $20000 \times g$ (14000 rpm) 離心 3 分鐘後，將收集管及濾液丟棄。

2.6.2.10. 將離心管柱套入新的 1.5 mL 離心管。

2.6.2.11. 加入 AE 試劑 100 μ L 至離心管柱，於室溫下靜置 1 分鐘後，再以 $\geq 6,000 \times g$ (8,000 rpm) 離心 1 分鐘。

2.6.2.12. 將溶出液(約 200 μ L) 收集至已滅菌之 1.5 mL 離心管，為萃取 DNA 原液。

2.6.2.13. 依 2.6.3.2 節測量 DNA 濃度並記錄後，置於 -20 $^{\circ}$ C 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 2.6.2.4 之後加入 RNase (100 mg/mL) 4 μ L，混合均勻後於室溫下靜置 2 分鐘。

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. 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。

2.6.3.2. 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9)

2.7.1. PCR 操作步驟

以無菌純水適當稀釋 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		
測試雞基因	60°C	30 sec
測試哺乳類及家禽類基因	54°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 365nm 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

2.7.4.1. 雞之測試：

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 118 bp 者，即判定該檢體含有雞成分。

2.7.4.2. 雞或雞蛋之測試：

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 108 bp 者，即判定該檢體含有雞成分或雞蛋成分。

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。

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 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 RT-PCR 反應器，依下列條件

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

2.7.3.1. 雞之測試：

檢體 DNA 之 real-time PCR 增幅產物螢

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		
<u>測試雞基因</u>	60°C	1 min
<u>測試哺乳類及家禽類基因</u>	54°C	1min

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、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 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	10 min
2. 變性	95°C	5 sec
3. 黏接		
<u>測試雞基因</u>	60°C	25sec
<u>測試哺乳類及家禽類基因</u>	54°C	25sec

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
-------	------	--------

2.8.2. 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

2.8.3.1. 雞之測試：

檢體 DNA 之 PCR 增幅產物螢光分析圖

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 增幅產物為雞之基因片段，可確認該檢體中含有雞成分。

2.7.3.2. 雞或雞蛋之測試：

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 增幅產物為雞或雞蛋之基因片段，可確認該檢體中含有雞或雞蛋成分。

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。

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 增幅產物為該測試雞之基因片段，可確認該檢體中含有雞成分。

2.8.3.2. 雞或雞蛋之測試：

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 增幅產物為雞或雞蛋之基因片段，可確認該檢體中含有雞成分或雞蛋成分。

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。

食品中動物性成分檢驗-豬成分之定性檢驗修正 草案總說明

為加強食品中動物性、植物性成分之管理，並依據食品衛生管理法第三十八條規定：「各級主管機關執行食品、食品添加物、食品容器或包裝及食品用洗潔劑之檢驗，其檢驗方法，由中央主管機關定之」，爰擬具「食品中動物性成分檢驗-豬成分之定性檢驗」草案，其修正要點如下：

- 一、修正英文標題。
- 二、刪除 PCR 試驗相關內容，包含裝置、試藥、器具及材料、試劑之配製及鑑別試驗。
- 三、修正鑑別試驗用引子及探針。
- 四、修正對照用物質。

食品中動物性成分檢驗-豬成分之定性檢驗修正 草案對照表

修正規定	現行規定	說明
<p>食品中動物性成分檢驗方法—豬成分之定性檢驗</p> <p>Method of Test for Animal-Derived Ingredients in Foods—Qualitative Test of Swine Ingredient</p> <p>1.適用範圍：本檢驗方法適用於食品中豬成分之定性檢驗。</p> <p>2.檢驗方法：<u>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。</u></p> <p>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、<u>real-time PCR 試劑配製及檢驗過程</u>皆需有區隔空間，避免交叉污染。<u>Real-time PCR 試劑之配製應於無菌操作台內進行。</u></p> <p>2.2.裝置^(註1)</p> <p>2.2.1.即時聚合酶鏈反應器：<u>ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System 或 Roche LightCycler，或同級品。</u></p> <p>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。</p> <p>2.2.3.振盪型粉碎機：<u>Retsch MM200，或同級品。</u></p> <p>2.2.4.真空乾燥裝置：供 DNA 乾燥用。</p> <p>2.2.5.高壓滅菌釜。</p> <p>2.2.6.無菌操作台。</p> <p>2.2.7.加熱振盪器：具 55°C 溫控及振盪功能。</p> <p>2.2.8.微量冷凍離心機(<u>Micro refrigerated centrifuge</u>)：可達 20000 × g，並具 4°C 溫控功能。</p> <p>2.2.9.離心機：供各式微量離心管離心用。</p> <p>2.2.10.分光光度計：具波長 260 nm、280 nm。</p>	<p>食品中動物性成分檢驗方法—豬成分之定性檢驗</p> <p>Method of Test for Animal-Derived Ingredients in Foods—Qualitative Test of Swine Ingredients</p> <p>1.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、<u>豬血或其他製品之定性檢驗。</u></p> <p>2.檢驗方法：聚合酶鏈反應(Polymerase chain reaction, PCR)方法。</p> <p>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 <u>PCR 等實驗過程</u>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。</p> <p>2.2.裝置^(註1)</p> <p>2.2.1.分光光度計：具波長 260 nm、280 nm。</p> <p>2.2.2.旋渦混合器(Vortex mixer)。</p> <p>2.2.3.真空乾燥裝置：供 DNA 乾燥用。</p> <p>2.2.4.加熱振盪器：具 55°C 溫控及振盪功能。</p> <p>2.2.5.微量冷凍離心機：可達 20000 × g，並具 4°C 溫控功能。</p> <p>2.2.6.離心機：供各式微量離心管離心用。</p> <p>2.2.7.聚合酶鏈反應器：<u>ABI PRISM 9700 Sequence Detector，或同級品。</u></p> <p>2.2.8.即時聚合酶鏈反應器^(註2)：<u>ABI PRISM 7700 Sequence Detector 或 Roche LightCycler，或同級品。</u></p> <p>2.2.9.電泳槽：供 DNA 電泳用。</p> <p>2.2.10.振盪型粉碎機。</p> <p>2.2.11.照相裝置：供拍攝電泳膠片用。</p> <p>2.2.12.紫外燈箱：具波長 312 nm、365</p>	<p>一、修正英文標題。</p> <p>二、刪除 PCR 試驗相關內容，包含裝置、試藥、器具及材料、試劑之配製及鑑別試驗。</p> <p>三、修正鑑別試驗用引子及探針。</p> <p>四、修正對照用物質。</p> <p>五、增列附註二及三。</p> <p>六、增修訂部分文字。</p>

<p>2.2.11. 冷凍設備：具冷藏及凍結功能。</p> <p>2.2.12. 旋渦混合器(Vortex mixer)。</p> <p>2.2.13. 酸鹼度測定儀(pH meter)。</p> <p>2.2.14. 水浴裝置：溫差±1°C以內者。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>2.3. 試藥</p> <p>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。</p> <p>2.3.2. Real-time PCR 用^(註2)</p> <p>2.3.2.1. 鑑別試驗用引子及探針</p> <p>2.3.2.1.1. 哺乳類、家禽類及魚類(標的基因：<u>12S ribosomal RNA</u>，供作內部對照基因)</p> <p>引子 F： <u>12SF, 5'-CAAACCTGGGATTAGATACCC CACTA-3'</u></p> <p>引子 R： <u>12SR, 5'-ATCGRTTMTAGAACAGGCT</u></p>	<p><u>nm 紫外燈。</u></p> <p>2.2.13. 冷凍設備：具冷藏及凍結功能。</p> <p>2.2.14. 高壓滅菌釜。</p> <p>2.2.15. pH 測定儀。</p> <p>2.2.16. 水浴裝置：溫差在±1.0°C以內者。</p> <p>2.2.17. 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。</p> <p>2.2.18. 無菌操作台。</p> <p>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。</p> <p>註 2: 確認試驗用。</p> <p>2.3. 試藥</p> <p>2.3.1. DNA 抽取用：<u>RNase、乙醇(96~100%)</u>均採分子生物分析級試藥，<u>DNeasy® Tissue</u>套組。</p> <p>2.3.2. 聚合酶鏈反應(PCR)用</p> <p>2.3.2.1. 鑑別試驗用引子^(註3)</p> <p>2.3.2.1.1. 哺乳類及家禽類(標的基因：<u>myostatin</u>，供作內部對照基因)</p> <p>引子 F：<u>MYF</u>， <u>5'-TTGTGCAAATCCTGAGACTCAT-3'</u></p> <p>引子 R：<u>MYR</u>， <u>5'-ATACCAGTGCCTGGGTTCAT-3'</u></p> <p>PCR 增幅產物大小 97 bp</p> <p>2.3.2.1.2. 豬(標的基因：<u>growth hormone</u>)</p> <p>引子 F：<u>SWF</u>， <u>5'-TCAGTTTACTCACCTGATAGC ATCT-3'</u></p> <p>引子 R：<u>SWR</u>， <u>5'-GGGTGGTGGAGAGGGGTGAATT-3'</u></p> <p>PCR 增幅產物大小 108 bp</p> <p>2.3.2.2. 確認試驗用引子及探針^(註4)</p> <p>2.3.2.2.1. 哺乳類及家禽類(標的基因：<u>myostatin</u>，供作內部對照基因)</p> <p>引子 F：<u>MYF</u>， <u>5'-TTGTGCAAATCCTGAGACTCAT-3'</u></p> <p>引子 R：<u>MYR</u>， <u>5'-ATACCAGTGCCTGGGTTCAT-3'</u></p> <p>探針 P：<u>MYP</u>，</p>	
--	---	--

<p><u>CCTCTAG-3'</u> 探針 P： <u>12SP,5'-(FAM)-CACCGCCAAGTCCTT</u> <u>TGRGTTTTARGC-(TAMRA)-3'</u> PCR 增幅產物大小 <u>155 bp</u></p> <p>2.3.2.1.2. 豬(標的基因：<u>12S ribosomal RNA</u>) 引子 F： <u>P12F,5'-GGAACAATAGTAAGCACAA</u> <u>TCATAGC-3'</u> 引子 R： <u>P12R,5'-CATAAAAACCTTTCGTGTGG</u> <u>TGGA-3'</u> 探針 P： <u>P12P,5'-(FAM)-CATGTAGAAAATGT</u> <u>AGCCCATTTCTTTCCA-(TAMRA)-3'</u> PCR 增幅產物大小 <u>121 bp</u></p> <p>註 2: 1. <u>合成之引子及探針</u>，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 <u>6-carboxy-fluorescein (FAM)標記</u>，3'端採用 <u>6-carboxytetramethyl-rhodamine (TAMRA)標記</u>。</p> <p>2. <u>內部對照基因引子及探針之序列</u>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。</p> <p>2.3.2.2. <u>TaqMan Universal PCR Master Mix(適用於 ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System)</u> 本試劑內含 <u>real-time PCR</u> 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。</p> <p>2.3.2.3. <u>LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe (適用於 Roche LightCycler)</u> 本試劑內含 <u>real-time PCR</u> 所需去氧核</p>	<p><u>5'-(FAM)-CCCATGAAAGACGGTACA</u> <u>AGGTATACTG-(TAMRA)-3'</u> PCR 增幅產物大小 <u>97 bp</u></p> <p>2.3.2.2.2. 豬(標的基因：<u>growth hormone</u>) 引子 F：<u>SWF</u>， <u>5'-TCAGTTTACTCACCCTGATAGC</u> <u>ATCT-3'</u> 引子 R：<u>SWR</u>， <u>5'-GGGTGGTGGAGAGGGGTGAATT-</u> <u>3'</u> 探針 P：<u>SWP</u>， <u>5'-(FAM)-CCTCAATACTCCAGAACC</u> <u>CCTCATTTTCCTC-(TAMRA)-3'</u> PCR 增幅產物大小 <u>108 bp</u></p> <p>註 3:<u>合成之引子</u>，拆封後，以無菌純水稀釋成適當濃度，分裝後置於-20°C 貯存備用。</p> <p>註 4:<u>合成之探針</u>，拆封後，以無菌純水稀釋成適當濃度，分裝後置於-20°C 貯存備用，探針需避光保存。</p> <p>2.3.2.3. <u>去氧核苷三磷酸(deoxyribonucleotide triphosphate, dNTP)</u> <u>含去氧腺苷三磷酸(deoxyadenosine triphosphate, dATP)</u>，<u>去氧胞苷三磷酸(deoxycytidine triphosphate, dCTP)</u>，<u>去氧鳥糞嘌呤核苷三磷酸(deoxyguanosine triphosphate, dGTP)</u>及<u>去氧胸苷三磷酸(deoxythymidine triphosphate, dTTP)</u>各 <u>2.5 mM 之溶液</u>。</p> <p>2.3.2.4. <u>聚合酶</u> <u>Taq DNA polymerase (2 U/μL)</u>，<u>或同級品</u>。</p> <p>2.3.2.5. <u>TaqMan Universal PCR Master Mix(確認試驗用，適用於 ABI PRISM 7700)</u> 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。</p> <p>2.3.2.6. <u>LightCycler-FastStart DNA Master Hybridization Probes (確認試驗用，適用於 Roche LightCycler)</u></p>
---	---

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：豬肉或使用衛生福利部食品藥物管理署提供編號 S201 之參考質體作為對照用物質。

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。

2.4.8. 過濾膜：孔徑為 0.45 μm，nitrocellulose 材質。

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)

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。

2.3.3. 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：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 之參考質體作為對照用物質。

2.4. 器具及材料^(註 5)

2.4.1. 吸管(Pipette)：10 μL、20 μL、100 μL、200 μL 及 1000 μL。

2.4.2. 電泳膠片製作盤。

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

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

2.4.5. PCR 反應管：200 μL 及 500 μL。

2.4.6. PCR 玻璃毛細管^(註 6)：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 μm，材質為 nitro-cellulose。

註 5: 使用之塑膠或玻璃器皿均為無 DNase 污染。

註 6: 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 54.0 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 2.0 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 × 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 µg/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 7)

2.5.5.1 鑑別試驗用

<u>10 倍 PCR 緩衝溶液(含 15 mM MgCl₂)</u>	<u>2.5 µL</u>
<u>Taq DNA polymerase (2 U/µL)</u>	<u>1.0 µL</u>
<u>2.5 mM dNTP</u>	<u>4.0 µL</u>
<u>10 µM 引子 F</u>	<u>1.0 µL</u>
<u>10 µM 引子 R</u>	<u>1.0 µL</u>
<u>模版 DNA (總量 100 ng)</u>	<u>5.0 µL</u>
<u>無菌純水</u>	<u>10.5 µL</u>
<u>總體積</u>	<u>25.0 µL</u>

2.5.5.2. ABI PRISM 7700 Sequence Detector 確認試驗用

<u>5 µM 引子 F</u>	<u>1.25 µL</u>
<u>5 µM 引子 R</u>	<u>1.25 µL</u>
<u>3.3 µM 探針 P</u>	<u>1.7 µL</u>
<u>TaqMan Universal PCR Master Mix</u>	<u>12.5 µL</u>
<u>模版 DNA (總量 100 ng)</u>	<u>5.0 µL</u>
<u>無菌純水</u>	<u>3.3 µL</u>
<u>總體積</u>	<u>25.0 µL</u>

2.5.1. ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System 鑑別試驗用

<u>5 µM 引子 F</u>	<u>1.25 µL</u>
<u>5 µM 引子 R</u>	<u>1.25 µL</u>
<u>3.3 µM 探針 P</u>	<u>1.7 µL</u>
<u>TaqMan Universal PCR Master Mix</u>	<u>12.5 µL</u>
<u>檢體 DNA 溶液(總量 100 ng)</u>	<u>5.0 µL</u>
<u>無菌去離子水</u>	<u>3.3 µL</u>
<u>總體積</u>	<u>25.0 µL</u>

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°C 冷凍保存。

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
模版 DNA (總量 40 ng)	5.0 μ L
無菌純水	6.1 μ L
總體積	25.0 μ L

註 7: 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

檢體為乾燥肉乾或粉(碎)狀者，可直接以粉碎機研磨成細粉。檢體為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。

2.6.2. 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。

2.6.2.1. 稱取檢體約 25 mg^(註 8)，置入 2 mL 離心管。

2.6.2.2. 加入 ATL 試劑 180 μ L 以及 proteinase K 20 μ L，以振盪器混合均勻。

2.6.2.3. 於 55°C 振盪反應直到檢體溶解。

2.6.2.4. 加入 AL 試劑 200 μ L，以振盪器混合均勻。

2.6.2.5. 水浴 70°C，10 分鐘。

2.6.2.6. 加入乙醇(96~100%) 200 μ L，以振盪器混合均勻。

2.6.2.7. 取混合液注入吸附管柱，以 $\geq 6000 \times g$ (8000 rpm) 離心 1 分鐘，並將收集管及濾液丟棄。

2.6.2.8. 將吸附管柱套入新的收集管，

<p>2.6.3. DNA 濃度測定及純度判斷</p> <p>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。</p>	<p>注入 AW1 試劑 500 μL 到吸附管柱，以 $\geq 6000 \times g$ (8000 rpm) 離心 1 分鐘後，將收集管及濾液丟棄。</p> <p>2.6.2.9. 將吸附管柱套入新的收集管，注入 AW2 試劑 500 μL 到吸附管柱，以 $20000 \times g$ (14000 rpm) 離心 3 分鐘後，將收集管及濾液丟棄。</p> <p>2.6.2.10. 將吸附管柱套入新的 1.5 mL 離心管。</p> <p>2.6.2.11. 加入 AE 試劑 100 μL 至吸附管柱，於室溫下靜置 1 分鐘後，再以 $\geq 6000 \times g$ (8000 rpm) 離心 1 分鐘。</p> <p>2.6.2.12. 再加入 AE 試劑 100 μL，於室溫下靜置 1 分鐘後，再以 $\geq 6,000 \times g$ (8,000 rpm) 離心 1 分鐘。</p> <p>2.6.2.13. 將溶出液(約 200μL)收集至已滅菌之 1.5 mL 離心管，為萃取 DNA 原液。</p> <p>2.6.2.14. 依 2.6.3.2. 節測量 DNA 濃度並記錄後，置於 $-20^{\circ}C$ 冷凍保存。</p> <p>註 8: 抽取脾臟等含細胞數量眾多的組織 DNA，秤取量不可超過 10 mg。抽取肝臟或腎臟等含豐富 RNA 的組織 DNA，於步驟 2.6.2.4. 之後加入 RNase (100 mg/mL) 4μL，混合均勻後於室溫下靜置 2 分鐘。</p> <p>2.6.3. DNA 濃度測定及純度判斷</p> <p>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。</p> <p>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.)。以 $O.D._{260}$ 乘以 50 ng/μL 即為 DNA 溶液之濃度。計算 $O.D._{260} / O.D._{280}$ 比值，其比值應介於 1.7~2.0 間。</p> <p>2.7. 鑑別試驗^(註 9)</p> <p>2.7.1. PCR 操作步驟</p> <p>以無菌純水適當稀釋 DNA 溶液、引子</p>	
---	--	--

備用。取 PCR 反應管，並依照 2.5.5.1. 節配製 PCR 溶液，依序加入純水、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 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		
<u>測試豬基因</u>	60°C	30 sec
<u>測試哺乳類及家禽類基因</u>	54°C	30sec
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 108 bp 者，即判定該檢體含有豬物種成分。

註 9: PCR 定性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，若使用其他機型，應自行檢討反應條件。

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 μ L 入 PCR 反應管中，各別加入檢體 DNA 溶液 5 μ L，再將 PCR 反應管置於離心機中，以 200 \times 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 μ L 於玻璃毛細管中，各別加入檢體 DNA 溶液 5 μ L，再將毛細管置於離心機中，

2.8. 確認試驗：本實驗視需要而操作之。

2.8.1. PCR 操作步驟

2.8.1.1. 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 2.5.5.2.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 μ L 入 PCR 反應管中，再各別加入稀釋過之檢體 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	60°C	1 min
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

2.8.1.2. 即時聚合酶鏈反應(Real-time 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、稀釋過之引子及探針，混合均勻後，分裝 15 μ L 於玻璃毛細管中，再各別加入稀釋過之檢體 DNA 5 μ L，最後將毛細管置於離心機

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 增幅產物為豬之基因片段，可確認該檢體中含有豬成分。

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。

中，以 800 × g (3000 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°C	25 sec
測試哺乳類及家禽類基因	54°C	25sec
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

2.8.2. 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。

2.8.3. 確認

檢體 DNA 之 PCR 增幅產物螢光分析結果須與正反應對照組螢光分析結果進行相互比對，當檢體 DNA 與正反應對照組之 PCR 螢光分析結果，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。