

# 食品中植物性成分檢驗-蔥成分之定性檢驗修正 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」，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 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<sup>(註1)</sup></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<sup>(註1)</sup></p> <p>2.2.1. <u>聚合酶鏈反應器：ABI PRISM<sup>®</sup> 9700 Sequence Detector，或同級品。</u></p> <p>2.2.2. <u>即時聚合酶鏈反應器<sup>(註2)</sup>：ABI PRISM<sup>®</sup> 7700 Sequence Detector 或 Roche LightCycler<sup>®</sup>，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<sup>(註2)</sup></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<sup>(註3)</sup></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： GROR, 5'-TTACCATCCCTGGACGGTGTG-3'</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 <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>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 <u>2.5 mM 之溶液。</u></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. 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，使用時僅需自行添加引子、探針及待測檢體 DNA <u>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，使用時僅需自行添加<u>氯化鎂溶液</u>、引子、探針及待測檢體 DNA <u>即可。</u></p> <p>2.3.3. <u>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, Na<sub>2</sub>-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</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<sup>(註3)</sup></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>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><sup>(註4)</sup></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<sup>(註4)</sup></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<sup>(註5)</sup>：Roche LightCycler<sup>®</sup> 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. <u>過濾膜：孔徑為 0.45 μm，材質為 nitro-cellulose。</u></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<sup>®</sup> 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>  <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 loading buffer)</u>  <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</u></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<sup>(註 6)</sup>

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<sup>®</sup> 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<sup>®</sup> 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 <sup>®</sup> 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<sup>(註 7)</sup>

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 <sup>®</sup> 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<sup>(註 5)</sup>

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<sup>(註 8)</sup>

##### 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		





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  $\mu$ L 入 PCR 反應管中，各別加入檢體 DNA 溶液 5  $\mu$ 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<sup>®</sup> 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  $\mu$ L 於玻璃毛細管中，各別加入檢體 DNA 溶液 5  $\mu$ 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

2.8.1.1. RT-PCR – ABI PRISM<sup>®</sup> 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  $\mu$ L 入 PCR 反應管中，再各別加入檢體 DNA 溶液 5  $\mu$ 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		
<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<sup>®</sup>

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<sup>®</sup> 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  $\mu$ L 於玻璃毛細管中，再各別加入檢體 DNA 溶液 5  $\mu$ 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



