

食品中動物性成分檢驗方法—蟹成分之定性檢驗
Method of Test for Animal-Derived Ingredients in Foods—
Qualitative Test of Crab Ingredient

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於食品中蟹類成分之定性檢驗。
2. 檢驗方法：檢體經 DNA 萃取後，以即時聚合酶鏈反應 (real-time polymerase chain reaction, real-time PCR) 之方法。
 - 2.1. 工作環境：工作平台需寬敞、潔淨、光線良好。檢體前處理、檢體 DNA 抽取、real-time PCR 試劑配製及檢驗過程皆需有區隔空間，避免交叉污染。Real-time PCR 試劑之配製應於無菌操作台內進行。
 - 2.2. 裝置^(註1)
 - 2.2.1. 即時聚合酶鏈反應器：ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System 或 Roche LightCycler，或同級品。
 - 2.2.2. 冷凍乾燥裝置：溫度可達 -40°C 以下，真空度可達 133 mBar 以下，供檢體乾燥用。
 - 2.2.3. 振盪型粉碎機：Retsch MM200，或同級品。
 - 2.2.4. 真空乾燥裝置：供 DNA 乾燥用。
 - 2.2.5. 高壓滅菌釜。
 - 2.2.6. 無菌操作台。
 - 2.2.7. 加熱振盪器：具 55°C 溫控及振盪功能。
 - 2.2.8. 微量冷凍離心機(Micro refrigerated centrifuge)：可達 $20000 \times g$ ，並具 4°C 溫控功能。
 - 2.2.9. 離心機：供各式微量離心管離心用。
 - 2.2.10. 分光光度計：具波長 260 nm、280 nm。
 - 2.2.11. 冷凍設備：具冷藏及凍結功能。
 - 2.2.12. 旋渦混合器(Vortex mixer)。
 - 2.2.13. 酸鹼度測定儀(pH meter)。
 - 2.2.14. 水浴裝置：溫差 $\pm 1^{\circ}\text{C}$ 以內者。
 - 2.2.15. 天平：最大稱重量為 2000 g，靈敏度為 0.1 g；最大稱重量為 100 g，靈敏度為 1 mg。

註 1：本方法所使用或提及之產品品牌不代表為同類產品中最好者；反之，未使用或提及之產品品牌亦不代表為同類產品中較差者。

2.3. 試藥

- 2.3.1. DNA 抽取用試藥：乙醇(96-100%)採分子生物分析級試藥；適用

於動物 DNA 抽取之市售套組。

2.3.2. Real-time PCR 用^(註 2)

2.3.2.1. 鑑別試驗用引子及探針

2.3.2.1.1. 動物類 (標的基因：18S ribosomal RNA，供作內部對照基因)

引子 F：18SF, 5'- CTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAG
- 3'

引子 R：18SR, 5'- AGAACGGCCATGCACCACC -3'

探針 P：18SP, 5'-(FAM)- TGGAGCCTGCGGCTTAATTTGA
CTCAAC -(TAMRA)-3'

PCR 增幅產物大小 158 bp

2.3.2.1.2. 蟹 (標的基因：16S ribosomal RNA)

引子 F：C-F, 5'- CTTTAGGGATAACAGCGTTATTTHT -3'

引子 R：C-R, 5'- AGGTCGAACAGACTYTCAYTTATAG -3'

探針 P：C-P, 5'- (FAM)-AGTTTGCGACCTCGATGTTGAAT
TAAACTGATC -(TAMRA)-3'

PCR 增幅產物大小 121 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. 蟹標的基因引子及探針之序列中，H 為混合鹼基代碼(T/A/C)，表示同時含 T、A 及 C；Y 為混合鹼基代碼(C/T)，表示同時含 C 及 T。

2.3.2.2. TaqMan Universal PCR Master Mix (適用於 ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System)

本試劑內含 real-time PCR 所需去氧核糖核苷三磷酸、聚合酶等，使用時添加引子、探針及待測檢體 DNA。

2.3.2.3. LightCycler[®] FastStart DNA Master HybProbe (適用於 Roche LightCycler)

本試劑內含 real-time PCR 所需去氧核糖核苷三磷酸、聚合酶等，且內附 25 mM 氯化鎂溶液，使用時添加引子、探針及待測檢體 DNA。

2.3.3. 對照用物質：蟹肉。

2.4. 器具及材料^(註3)

- 2.4.1. 吸管(Pipette)：10 μ L、20 μ L、100 μ L、200 μ L 及 1000 μ L。
- 2.4.2. 吸管尖頭(Pipette tips)：10 μ L、20 μ L、200 μ L 及 1000 μ L。
- 2.4.3. 離心管：200 μ L、600 μ L、1.5 mL 及 2 mL。
- 2.4.4. PCR 反應管：200 μ L。
- 2.4.5. PCR 玻璃毛細管：Roche LightCycler 專用。
- 2.4.6. 玻璃或塑膠瓶：50 mL、100 mL、250 mL、500 mL、1000 mL 及 2000 mL。
- 2.4.7. 塑膠離心管：50 mL。
- 2.4.8. 過濾：孔徑為 0.45 μ m，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)

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

5 μ M 引子 F.....	1.25 μ L
5 μ M 引子 R	1.25 μ L
3.3 μ M 探針 P.....	1.7 μ L
TaqMan Universal PCR Master Mix	12.5 μ L
檢體 DNA 溶液(總量 100 ng)	5.0 μ L
無菌去離子水.....	3.3 μ L
總體積.....	25.0 μ L

2.5.2. Roche LightCycler 鑑別試驗用

5 μ M 引子 F.....	1.5 μ L
5 μ M 引子 R	1.5 μ L
3.3 μ M 探針 P.....	1.5 μ L
LightCycler [®] FastStart DNA Master HybProbe	2.0 μ L
25 mM 氯化鎂溶液	2.4 μ L
檢體 DNA 溶液(總量 100 ng)	5.0 μ L
無菌去離子水.....	6.1 μ L
總體積.....	20.0 μ L

註 4：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 260 nm 吸光值乘 50 ng/μL 及稀釋倍數，即為檢體 DNA 原液濃度。DNA 溶液純度則以 O.D.₂₆₀/O.D.₂₈₀ 比值作判斷，其比值應介於 1.7~2.0。

2.7. Real-time PCR 鑑別試驗

2.7.1. Real-time PCR 操作步驟

2.7.1.1. Real-time PCR—ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System

以無菌去離子水適當稀釋檢體 DNA 原液、引子及探針備用。取 PCR 反應管，依照 2.5.1.節配製 PCR 溶液，依序加入 TaqMan Universal PCR Master Mix、稀釋過之引子及探針，混合均勻後，分裝 20 μL 入 PCR 反應管中，各別加入檢體 DNA 溶液 5 μL，再將 PCR 反應管置於離心機中，以 200 × g 瞬間離心，移入 real-time PCR 反應器，依下列條件進行反應。同時另製作正反應及負反應對照組。

步驟	溫度	時間
1. 熱活化	50°C	2 min
2. 最初變性	95°C	10 min
3. 變性	95°C	15 sec
4. 黏接、延展	60°C	1 min
步驟 3 至步驟 4，共進行 45 個循環反應。		
5. 冷卻	35°C	45 sec

2.7.1.2. Real-time PCR—Roche LightCycler

以無菌去離子水適當稀釋檢體 DNA 原液、引子及探針備用。取 PCR 反應管，依照 2.5.2.節配製 PCR 溶液，依序加入 LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe、25 mM 氯化鎂溶液、稀釋過之引子及探針，混合均勻後，分裝 15 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 增幅產物為蟹之基因片段，可確認該檢體中含有蟹成分。

- 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。