

食品中動物性成分檢驗方法—鹿肉製品中含豬肉成分之定量檢驗
Method of Test for Animal-Derived Ingredients in Foods-
Quantitative Test of Pork in Processed Venison Products

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於鹿肉製品中含有豬肉成分之定量檢驗。
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 real-time-PCR 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。
 - 2.2. 裝置^(註 1)
 - 2.2.1. 即時聚合酶鏈反應器：ABI PRISM[®] 7700 Sequence Detection System、ABI PRISM[®] 7900 Sequence Detection System、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：具溫控及振盪功能。
 - 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。
 - 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(-20°C)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±1°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及型號不代表為同類產品中最好者；反之，未使用或未提及之產品品牌及型號亦不代表為同類產品中較差者。

2.3. 試藥

2.3.1. DNA 抽取用：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. 定量試驗用引子及探針

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

引子 F：12SF, 5'- CAAACTGGGATTAGATACCCCACT
A -3'

引子 R：12SR, 5'- ATCGRTTMTAGAACAGGCTCCTCTA
G -3'

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

鹿：PCR 增幅產物大小 154 bp

豬：PCR 增幅產物大小 154 bp

2.3.2.1.2. 豬 (標的基因：12S ribosomal RNA)

引子 F：P12F, 5'- GGAACAATAGTAAGCACAATCATAG
C -3'

引子 R：P12R, 5'- CATAAAAAC TTTCGTGTGGTGGGA-3'

探針 P：P12P, 5'-(FAM)-CATGTAGAAAATGTAGCCCAT
TTCTTTCCA -(TAMRA)-3'

PCR 增幅產物大小 121 bp

註 2：1. 合成之引子與探針，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，探針需避光保存。探針 5'端採用 6-carboxy-fluorescein (FAM)標記，3'端採用 6-carboxytetramethyl-rhodamine (TAMRA)標記。

2. 內部對照基因引子及探針之序列中，R 為混合鹼基代碼(A/G)，表示同時含 A 及 G；M 為混合鹼基代碼(A/C)，表示同時含 A 及 C。

2.3.2.2. TaqMan Universal PCR Master Mix (適用於 ABI PRISM[®] 7700 及 ABI PRISM[®] 7900)

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 25mM 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：鹿肉及豬肉。

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(Eppendorf tube)：200 μ L、600 μ L、1.5 mL 及 2 mL。
 2.4.4. Real-time PCR 反應管：定量用，200 μ L。
 2.4.5. PCR 玻璃毛細管：Roche LightCycler 專用。
 2.4.6. 塑膠離心管：50 mL。

註3：使用之塑膠或玻璃器皿均為無 DNase 污染。

2.5. Real-time PCR 溶液^(註4)之配製2.5.1. ABI PRISM[®] 7700 Sequence Detector 及 ABI PRISM[®] 7900 Sequence Detector 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[®] 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。估算一般 real-time PCR 溶液之配製總量時，需超過所需量的10%。

2.6. 標準曲線之製作^(註5)

2.6.1. 取鹿肉及豬肉對照用物質，冷凍乾燥並以粉碎機研磨成細粉後，配製鹿肉中含豬肉50、25、10、5及1% (w/w) 5種豬肉濃度之對照用物質，再抽取其DNA，分裝並置於-20℃冷凍保存，供標準曲線之製作用。

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

註5：各濃度對照用物質需進行三重複試驗，分析結果出現偏離現象時，應將偏離之數據捨棄，以各濃度之代表數據列入標準曲線之線性回歸分析。

2.7. 檢體DNA之製備

2.7.1. 檢體之處理

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藏或冷凍環境中。

2.7.2. 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2.7.3.節測定DNA濃度後，置於-20℃冷凍保存。

2.7.3. DNA濃度測定及純度判斷

檢體DNA原液於使用前自冷凍庫中取出，於室溫下進行溶解。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/ μ L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。

2.8. 定量試驗^(註6)

2.8.1. Real-time PCR 操作步驟

2.8.1.1. Real-time PCR – ABI PRISM[®] 7700 Sequence Detector

ABI PRISM[®] 7900 Sequence Detector

以無菌去離子水適當稀釋檢體 DNA 原液、引子及探針備用。取 real-time PCR 反應管，依照 2.5.1.1.節配製 real-time 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 real-time PCR 反應盤中，各別加入檢體 DNA 溶液 5 μL，再將反應盤置於離心機中，以 230 ×g 瞬間離心，移入 real-time PCR 反應器，依下列條件進行反應。同時另製作標準曲線、正反應及負反應對照組^(註7)。

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

2.8.1.2. 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 real-time PCR 反應管，並依照 2.5.1.2.節配製 real-time 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 PCR 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 830 × g 瞬間離心，移入 real-time PCR 反應器，依下列條件進行反應。同時另製作標準曲線、正反應及負反應對照組^(註7)。

步驟	溫度	時間
1. 最初變性	95°C	10 min
2. 變性	95°C	5 sec
3. 黏接	60°C	25 sec
4. 延展	72°C	8 sec
步驟 2 至步驟 4，共進行 45 個循環反應。		
5. 冷卻	35°C	45 sec

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

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

2.8.2. 計算

鹿肉製品經 real-time PCR 分析後，分別計算豬特異性基因之 Ct 值與內部對照基因之 Ct 值，並求取各別 Ct 值之平均值，依下列計算式，求出鹿肉製品中豬肉成分之含量(%)。

$$\text{鹿肉製品中豬肉成分含量}(\%) = 10^{\left(\frac{\Delta\text{Ct}-\text{B}}{\text{A}}\right)} \times \frac{1}{100}$$

ΔCt ：豬特異性基因之 Ct 值平均值減去內部對照基因之 Ct 值平均值。

A：標準曲線斜率。

B：標準曲線 Y 軸之截距。

附註：1. 本檢驗方法之最低檢測濃度為 1% (以乾重計)。

2. 本 real-time PCR 反應條件係採 ABI PRISM[®] 7700、ABI PRISM[®] 7900 及 Roche LightCycler[®] 設定之，當使用其他機型時，應自行探討反應條件。

3. 本檢驗方法之測試範圍係指食品中動物性成分僅含鹿肉及豬肉，且能夠抽取出 DNA 者之食品，經過高度加工或不含 DNA 之食品不適用於本檢驗方法。