

食品中真菌成分檢驗方法—牛樟芝成分之檢驗(草案)

Method of Test for Fungus Ingredients in Foods—

Test of *Antrodia cinnamomea* Ingredient

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於食品中真菌牛樟芝子實體或菌絲體成分之檢驗。
2. 檢驗方法：檢體經 DNA 萃取後，以聚合酶鏈反應(polymerase chain reaction, PCR) 及即時聚合酶鏈反應 (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、PCR 試劑配製及 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. 聚合酶鏈反應器：ABI PRISM[®] 9700 Sequence Detector，或同級品。
 - 2.2.2. 即時聚合酶鏈反應器^(註 2)：Roche LightCycler[®]，或同級品。
 - 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。
 - 2.2.4. 振盪型粉碎機：Retsch MM200，或同級品。
 - 2.2.5. 真空乾燥裝置：供 DNA 乾燥用。
 - 2.2.6. 高壓滅菌釜。
 - 2.2.7. 無菌操作台。
 - 2.2.8. 加熱振盪器：具溫控及振盪功能。
 - 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。
 - 2.2.10. 離心機：供各式微量離心管離心用。
 - 2.2.11. 分光光度計：具波長 260 nm、280 nm。
 - 2.2.12. 冷凍設備：具冷藏及凍結功能。
 - 2.2.13. 旋渦混合器(Vortex mixer)。
 - 2.2.14. 電泳槽：供 DNA 電泳用。
 - 2.2.15. 照相裝置：供拍攝電泳膠片用。
 - 2.2.16. 紫外燈箱：具波長 302 nm、365 nm 紫外燈。
 - 2.2.17. 酸鹼度測定儀(pH meter)。
 - 2.2.18. 水浴裝置：溫差±1°C 以內者。

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。

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。

註 2：確認試驗用。

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；適用於植物 DNA 抽取之市售套組。

2.3.2. PCR 用^(註 3)

2.3.2.1. 鑑別試驗用引子

2.3.2.1.1. 真菌共通性基因(標的基因：18S ribosomal RNA，供作內部對照基因)

引子 F：18S-F1,5'-CTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAG-3'

引子 R：18S-R1,5'-AGAACGGCCATGCACCACC-3'

PCR 增幅產物大小 158 bp

2.3.2.1.2. 牛樟芝(標的基因：internal transcribed spacer 2, ITS2)

引子 F：ACF,5'- GGCTTGGATTTGGAGGGTTA -3'

引子 R：ACR,5'- ATTAGAAGCCGATCCCACCT -3'

PCR 增幅產物大小 123 bp

2.3.2.2. 確認試驗用引子及探針

2.3.2.2.1. 真菌共通性基因(標的基因：18S ribosomal RNA，供作內部對照基因)

引子 F：18S-F1,5'-CTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAG-3'

引子 R：18S-R1,5'-AGAACGGCCATGCACCACC-3'

探針 P：18S-P1, 5'- (FAM)- TGGAGCCTGCGGCTTAATTTG
ACTCAAC - (TAMRA)-3'

PCR 增幅產物大小 158 bp

2.3.2.2.2. 牛樟芝(標的基因：internal transcribed spacer 2, ITS2)

引子 F：ACF,5'- GGCTTGGATTTGGAGGGTTA -3'

引子 R：ACR,5'- ATTAGAAGCCGATCCCACCT -3'

探針 P：ACP,5'-(FAM)-TGACTATCACACCGATAAGGTCAA
TCCACAAG - (TAMRA)-3'

PCR 增幅產物大小 123 bp

註 3：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。

2.3.2.3. 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 (2 U/ μ L)，內附 10 倍含 15 mM 氯化鎂之 PCR 緩衝溶液，或同級品

2.3.2.5. LightCycler[®] FastStart DNA Master HybProbe (確認試驗用，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. 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。

2.3.4. 對照用物質：牛樟芝子實體或菌絲體，或使用行政院衛生署食品藥物管理局提供編號pIDF3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 μ L、20 μ L、100 μ L、200 μ L 及 1000 μ L。
- 2.4.2. 電泳膠片製作盤。
- 2.4.3. 吸管尖頭(Pipette tips)：10 μ L、20 μ L、200 μ L 及 1000 μ L。
- 2.4.4. 離心管：200 μ L、600 μ L、1.5 mL 及 2 mL。
- 2.4.5. PCR 反應管：200 μ L 及 500 μ L。
- 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. 濾膜：孔徑為 0.4 μ m，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、二甲苯藍 0.25 g 及量取甘油 30 mL，加入無菌去離子水使成 100 mL，並置於 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)，使用前需以水稀釋成 1 μ 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 氯化鎂之 PCR 緩衝溶液	2.5 μ L
<i>Taq</i> DNA polymerase (2 U/ μ L)	1.0 μ L
2.5 mM dNTP	4.0 μ L
10 μ M 引子 F	1.0 μ L
10 μ M 引子 R	1.0 μ L
檢體 DNA 溶液 (總量 100 ng)	5.0 μ L
無菌去離子水	10.5 μ L
總體積	25.0 μ L

2.5.6.2. 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 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 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

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。

2.7. 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牛樟芝標的基因之 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 123 bp 者，即判定該檢體含有牛樟芝成分。

- 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

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 2.5.6.2. 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

2.8.2. 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 增幅產物為牛樟芝之基因片段，可確認該檢體中含有牛樟芝成分。

- 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。