

食品中動物性成分檢驗方法－羊成分之定性檢驗
Method of Test for Animal-Derived Ingredients in Foods -
Qualitative Test of Sheep/Goat Ingredient

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於食品中羊成分之定性檢驗。
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)分析之方法。
 - 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
 - 2.2.1. 即時聚合酶鏈反應器：Thermo Fisher Scientific QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR System (QS12K)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：可達121°C以上者。
 - 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：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：具冷藏及凍結功能。
 - 2.2.12. 旋渦混合器。
 - 2.2.13. 酸鹼度測定儀。
 - 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。
 - 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1)

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：12S ribosomal RNA，供作內部對照基因)

引子F：12SF, 5'-CAAACCTGGGATTAGATACCCCACTA-3'

引子R：12SR, 5'-ATCGRTTMTAGAACAGGCTCCTCTAG-3'

探針P：12SP, 5'-(FAM)-CACCGCCAAGTCCTTTGRGTTTTAR
GC-(TAMRA)-3'

PCR增幅產物大小154 bp

2.3.2.1.2. 羊(標的基因：satellite)

引子F：SGF, 5'-CCTCTCCAGTGCTGACTTGGA-3'

引子R：SGR, 5'-AAGCATGACATTGCTGCTAAGTTC-3'

探針P：SGP, 5'-(FAM)-CACGTGCATGCCCCCTCTCGA
-(TAMRA)-3'

PCR增幅產物大小123 bp

註1：1. 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。

2.3.2.2. TaqMan Universal PCR Master Mix (適用於Thermo Fisher Scientific QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR 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：山羊或綿羊組織。

2.4. 器具及材料^(註2)

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

2.4.2. 吸管尖(Pipette tips)：10 µL、20 µL、100 µL、200 µL及1000 µL。

- 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。

註2：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3)

2.5.1. Thermo Fisher Scientific QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR 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3：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4)

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4：1. 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/ 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. Real-time PCR鑑別試驗

2.7.1. Real-time PCR操作步驟^(註5)

2.7.1.1. Real-time PCR – Thermo Fisher Scientific QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR 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。

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

註5：上述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。

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增幅產物為之基因片段，可確認該檢體中含有羊成分。

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. 本檢驗方法之適用範圍係指能夠抽取出DNA者之食品，惟經過高度加工造成DNA過度裂解之食品並不適用。

參考文獻

1. Chikuni, K., Tabata, T., Kosugiyama, M., Monma, M. and Saito, M. 1994. Polymerase chain reaction assay for detection of sheep and goat meats. *Meat Sci.*, 37: 337-345.
2. López-Calleja, I., González, I., Fajardo, V., Martín, I., Hernández, P. E., García, T. and Martín, R. 2007. Quantitative detection of goats' milk in sheep's milk by real-time PCR. *Food Control* 18: 1466-1473.