

食品中動物性成分檢驗方法－甲殼類之定性檢驗
Method of Test for Animal-Derived Ingredients in Foods -
Qualitative Test of Crustacean

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於食品中甲殼類(蝦及蟹)成分之物種定性檢驗。
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：Applied Biosystems QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System，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 MM400，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：乙醇(96-100%)採分子生物分析級；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：18S ribosomal RNA，供作內部對照基因)

引子F：18SF，5'-CTGAAACTTAAAGGAATTGACGG
AAG-3'

引子R：18SR，5'-AGAACGGCCATGCACCACC-3'

探針P：18SP，5'-(FAM)-TGGAGCCTGCGGCTTAATT
TGACTCAAC-(TAMRA)-3'

PCR增幅產物大小158 bp

2.3.2.1.2. 甲殼類(標的基因：16S ribosomal RNA gene)

引子F：Crust F，5'-GGGACGATAAGACCCTATAAAA-3'

引子R：Crust R，5'-TTAATTCAACATCGAGGTCGCA
A-3'

探針P：Crust P，5'-(FAM)-AAGTTACTTTAGGGATA
ACAGCGTAAT-(TAMRA)-3'

PCR增幅產物大小266 bp

註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。

2.3.2.2. TaqMan Fast Advanced Master Mix (適用於 Applied Biosystems QuantStudio™ 5 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。

2.3.3. 對照用物質：蝦類及蟹類組織。

2.4. 器具及材料^(註2)

2.4.1. 微量吸管：10 µL、20 µL、100 µL、200 µL及1000 µL。

2.4.2. 吸管尖頭：10 µL、20 µL、200 µL及1000 µL。

2.4.3. 離心管：200 µL、600 µL、1.5 mL、2 mL及50 mL。

2.4.4. Real-time PCR反應管：200 µL。

2.4.5. 玻璃或塑膠瓶：50 mL、100 mL、250 mL、500 mL、1000 mL
及2000 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)

| | |
|--------------------------------------|---------|
| 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 Fast Advanced 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 |

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：研磨檢體時應於區隔之空間進行，避免交叉污染。

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

以無菌去離子水適當稀釋檢體DNA原液、引子及探針備用。取已滅菌離心管，依照2.5.節配製PCR溶液於real-time PCR反應管中，以200 ×g瞬間離心後，移入real-time PCR反應器，依下列條件進行反應^(註5)。同時另製作正反應及負反應對照組。

| 步驟 | 溫度(°C) | 時間(sec) |
|---------|--------|---------|
| 1. 最初變性 | 95 | 20 |
| 2. 變性 | 95 | 15 |

3. 黏接、延展

60

60

步驟2至步驟3，共進行40個循環反應。

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增幅產物為甲殼類之基因片段，可確認該檢體中含有甲殼類成分。

- 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過度裂解或不含DNA之食品並不適用。

參考文獻

1. Herrero, B., Vieites, J. M. and Espiñeira, M. 2012. Fast real-time PCR for the detection of crustacean allergen in foods. *J. Agric. Food Chem.* 60:1893-1897.
2. Eischeid, A. C., Kim, B. H. and Kasko, S. M. 2013. Two quantitative real-time PCR assays for the detection of penaeid shrimp and blue crab, crustacean shellfish allergens. *J. Agric. Food Chem.* 61: 5669-5674.