

食品中動物性成分檢驗方法一定性篩選檢驗修正 總說明

為加強食品中動物性、植物性成分之管理，並依據食品衛生管理法第三十八條規定：「各級主管機關執行食品、食品添加物、食品容器或包裝及食品用洗潔劑之檢驗，其檢驗方法，由中央主管機關定之」，爰擬具「食品中動物性成分檢驗方法一定性篩選檢驗」，其修正要點如下：

- 一、刪除 PCR 試驗相關內容，包含裝置、試藥、器具及材料、試劑之配製及鑑別試驗。
- 二、修正鑑別試驗用引子及探針。
- 三、修正對照用物質。
- 四、修正附圖。
- 五、增列附註二及三。

食品中動物性成分檢驗方法一定性篩選檢驗修正 對照表

修正規定	現行規定	說明
<p>1.適用範圍：本檢驗方法適用於食品中動物性成分之定性篩選檢驗。</p> <p>2.檢驗方法：<u>檢體經 DNA 萃取後，以即時聚合酶鏈反應 (real-time polymerase chain reaction, <u>real-time PCR</u>)之方法。</u></p> <p>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、<u>real-time PCR</u> 試劑配製及檢驗過程皆需有區隔空間，避免交叉污染。<u>Real-time PCR</u> 試劑之配製應於無菌操作台內進行。</p> <p>2.2. 裝置^(註1)</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>2.2.3.振盪型粉碎機：Retsch MM200，或同級品。</p> <p>2.2.4. 真空乾燥裝置：供 DNA 乾燥用。</p> <p>2.2.5.高壓滅菌釜。</p> <p>2.2.6.無菌操作台。</p> <p>2.2.7.加熱振盪器：具 55°C 溫控及振盪功能。</p> <p>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。</p> <p>2.2.9.離心機：供各式<u>微量</u>離心管離心用。</p> <p>2.2.10.分光光度計：具波長 260 nm、280 nm。</p> <p>2.2.11.冷凍設備：具冷藏及凍結功能。</p>	<p>1.適用範圍：本檢驗方法適用於食品中動物性成分之定性篩選檢驗。</p> <p>2.檢驗方法：<u>聚合酶鏈反應 (polymerase chain reaction, PCR) 方法及即時聚合酶鏈反應 (real-time polymerase chain reaction, <u>RT-PCR</u>)方法。</u></p> <p>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 <u>PCR</u> 等實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。</p> <p>2.2. 裝置^(註1)</p> <p>2.2.1.分光光度計：具波長 260 nm、280 nm。</p> <p>2.2.2.旋渦混合器(Vortex mixer)。</p> <p>2.2.3.真空乾燥裝置：供 DNA 乾燥用。</p> <p>2.2.4.真空冷凍乾燥裝置：溫度可達 -40°C 以下，真空度可達 133 mBar 以下，供檢體乾燥用。</p> <p>2.2.5.加熱振盪器：具 55°C 溫控及振盪功能。</p> <p>2.2.6.微量冷凍離心機：可達 20000 × g，並具 4°C 溫控功能。</p> <p>2.2.7.離心機：供各式離心管離心用。</p> <p>2.2.8 聚合酶鏈反應器：ABI PRISM 9700 Sequence Detector，或同級品。</p> <p>2.2.9.即時聚合酶鏈反應器^(註2)：ABI PRISM 7700 Sequence Detector 或 Roche LightCycler，或同級品。</p> <p>2.2.10.電泳槽：供 DNA 電泳用。</p> <p>2.2.11.振盪型粉碎機：Retsch MM200，或同級品。</p>	<p>一、刪除 PCR 試驗相關內容，包含裝置、試藥、器具及材料、試劑之配製及鑑別試驗。</p> <p>二、修正鑑別試驗用引子及探針。</p> <p>三、修正對照用物質。</p> <p>四、修正附圖。</p> <p>五、增列附註二及三。</p> <p>六、增修訂部分文字。</p>

<p>2.2.12.旋渦混合器(Vortex mixer)。</p> <p>2.2.13.酸鹼度測定儀(pH meter)。</p> <p>2.2.14.水浴裝置：溫差±1℃以內者。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>2.3.試藥</p> <p>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。</p> <p>2.3.2. <u>Real-time PCR</u> 用^(註 2)</p>	<p>2.2.12.照相裝置：供拍攝電泳膠片用。</p> <p>2.2.13.紫外燈箱：具波長 312 nm、365 nm 紫外燈。</p> <p>2.2.14.冷凍設備：具冷藏及凍結功能。</p> <p>2.2.15.高壓滅菌釜。</p> <p>2.2.16. pH 測定儀。</p> <p>2.2.17.水浴裝置：溫差在±1℃以內者。</p> <p>2.2.18.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。</p> <p>2.2.19. 無菌操作台。</p> <p>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。</p> <p>註 2:確認試驗用。</p> <p>2.3.試藥</p> <p>2.3.1. DNA 抽取用：RNase、乙醇(96~100%)均採分子生物分析級試藥，DNeasy[®] Tissue 套組。</p> <p>2.3.2. PCR 用</p> <p>2.3.2.1. 鑑別試驗用引子^(註 3)</p> <p>2.3.2.1.1.動物類(標的基因：16S ribosomal RNA)</p> <p>引子 F： <u>SF,5'-AAGACGAGAAGACCCT(A/G)TGGA(A/G)CTTTA-3'</u></p> <p>引子 R： <u>SR,5'-GATTGCGCTGTTATCCCTAGGGTA-3'</u></p> <p>PCR 增幅產物大小 234~265 bp</p> <p>2.3.2.1.2.哺乳類及家禽類(標的基因：myostatin)</p> <p>引子 F： <u>MYF,5'-TTGTGCAAATCCTGAGACTCAT-3'</u></p> <p>引子 R： <u>MYR,5'-ATACCAGTGCCTGGGTTCAT-3'</u></p>	
--	---	--

<p>2.3.2.1. 鑑別試驗用引子及探針</p> <p>2.3.2.1.1. 動物類(標的基因：16S ribosomal RNA)^(註3)</p> <p>引子 F： SF,5'-AAGACGAGAAGACCCT<u>RTGGARCTTTA</u>-3'</p> <p>引子 R： SR,5'-GATTGCGCTGTTATCCCTAGGGTA-3'</p> <p>探針 P： SP,5'-(FAM)-TTYGGTTGGGGTGACCTCGGR<u>GT</u>-(TAMRA)-3'</p> <p>PCR 增幅產物大小 234-265 bp</p> <p>2.3.2.1.2. 動物類(哺乳類、家禽類及魚類，標的基因：12S ribosomal RNA)^(註3)</p> <p>引子 F： <u>12SF,5'-CAAAGTGGGATTAGATACCCCACTA</u>-3'</p> <p>探針 P： <u>12SP,5'-(FAM)-CACCGCCAAGTCCTTTGRGTTTTARGC</u>-(TAMRA)-3'</p> <p>PCR 增幅產物大小 154-160 bp</p> <p>2.3.2.1.3. 哺乳類及家禽類(標的基因：myostatin)</p> <p>引子 F： MYF,5'-TTGTGCAAATCCTGAGACTCAT-3'</p> <p>引子 R： MYR,5'-ATACCAGTGCCTGGGTTCAT-3'</p> <p>探針 P： MYP,5'-(FAM)CCCATGAAAGACGGTACAAGGTATACTG-(TAMR</p>	<p>PCR 增幅產物大小 97 bp</p> <p>2.3.2.1.3. 魚類(標的基因：16S ribosomal RNA)</p> <p>引子 F： <u>FSF,5'-CGCAAGGGAAAGCTGAAGAGA</u>-3'</p> <p>引子 R： <u>FSR,5'-TCGGTAGGTTTGTCACCTCTACTC</u>-3'</p> <p>PCR 增幅產物大小 234 bp</p> <p>2.3.2.2. 確認試驗用引子及探針^(註4)</p> <p>2.3.2.2.1. 動物類(標的基因：16S ribosomal RNA)</p> <p>引子 F： SF,5'-AAGACGAGAAGACCCT(A/G)TGGA(A/G)CTTTA-3'</p> <p>引子 R： SR,5'-GATTGCGCTGTTATCCCTAGGGTA-3'</p> <p>探針 P： SP,5'-(FAM)-TT(C/T)GGTTGGGTGACCTCGG(A/G)GT-(TAMRA)-3'</p> <p>PCR 增幅產物大小 234~265 bp</p> <p>2.3.2.2.2. 哺乳類及家禽類(標的基因：myostatin)</p> <p>引子 F： MYF,5'-TTGTGCAAATCCTGAGACTCAT-3'</p> <p>引子 R： MYR,5'-ATACCAGTGCCTGGGTTCAT-3'</p> <p>探針 P： MYP,5'-(FAM)-CCCATGAAAGACGGTACAAGGTATACTG-(TAM</p>	
--	---	--

<p>A)-3' PCR 增幅產物大小 97 bp 2.3.2.1.4. 魚類(標的基因：16S ribosomal RNA) 引子 F： FSF,5'-CGCAAGGGAAAGCTGA AAGAGA-3' 引子 R： FSR,5'-TCGGTAGGTTTGTCCACC TCTACTC-3' 探針 P： FSP,5'-(FAM)-TCCCCTCTTTTG CCACAGAGACGG-(TAMRA)-3' PCR 增幅產物大小 234 bp</p> <p>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℃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.動物類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；Y 為混合鹼基代碼(C/T)，表示同時含 C 及 T；M 為混合鹼基代碼(A/C)，表示同時含 A 及 C。</p> <p>註 3：<u>動物類篩選檢驗可選用 16S ribosomal RNA 或 12S ribosomal RNA 基因之引子及探針，惟食品中含蛋成分之篩選檢驗，建議使用動物類 12S ribosomal RNA 基因之引子及探針。</u></p> <p>2.3.2.2. TaqMan Universal PCR Master Mix (適用於 ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System) 本試劑內含 <u>real-time</u> PCR 所需去氧核糖核苷三磷酸、聚合酶等，</p>	<p>RA)-3' PCR 增幅產物大小 97 bp 2.3.2.2.3. 魚類(標的基因：16S ribosomal RNA) 引子 F： FSF,5'-CGCAAGGGAAAGCTGA AAGAGA-3' 引子 R： FSR,5'-TCGGTAGGTTTGTCCACC CTCTACTC-3' 探針 P： FSP,5'-(FAM)-TCCCCTCTTTTG CCACAGAGACGG-(TAMRA)-3' PCR 增幅產物大小 234 bp</p> <p>註 3：<u>合成之引子，拆封後，以無菌純水稀釋成適當濃度，分裝後置於-20℃貯存備用。</u></p> <p>註 4：<u>合成之探針，拆封後，以無菌純水稀釋成適當濃度，分裝後置於-20℃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。</u></p> <p>2.3.2.3. <u>去氧核糖核苷三磷酸 (deoxyribonucleoside triphosphate, dNTP)</u> 含去氧腺苷三磷酸 (deoxyadenosine triphosphate, dATP)，去氧胞苷三磷酸 (deoxycytidine triphosphate, dCTP)，去氧鳥糞嘧啶三磷酸 (deoxyguanosine triphosphate, dGTP)及去氧胸苷三磷酸 (deoxythymidine triphosphate, dTTP)各 2.5 mM 之溶液。</p> <p>2.3.2.4. 聚合酶 <u>Taq DNA polymerase (2 U/μL)。</u></p> <p>2.3.2.5. TaqMan Universal PCR Master Mix (<u>確認試驗用</u>，適用於 ABI PRISM 7700)</p> <p>內含 PCR 所需去氧核糖核苷三磷酸、聚合酶等試劑，使用者僅需</p>	
---	---	--

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：肉類、血液及其組織器官等皆可，或使用衛生福利部食品藥物管理署提供編號 S202 及 S203 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 μL、20 μL、100 μL、200 μL 及 1000 μL。

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

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

2.4.4. PCR 反應管：200 μL。

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

自行添加引子、探針及待測檢體 DNA 即可。

2.3.2.6. LightCycler-FastStart DNA Master Hybridization Probes (確認試驗用，適用於 Roche LightCycler)

內含 PCR 所需去氧核糖核苷三磷酸、聚合酶等試劑，使用者僅需自行添加引子、探針及待測檢體 DNA 即可。

2.3.3. 電泳用：溴化乙錠(ethidium bromide)、瓊膠(agarose)、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))、甘油、硼酸，均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：肉類、血液及其組織器官等皆可，或使用行政院衛生署藥物食品檢驗局提供編號 pIDM2 及 pIDM3 之參考質體作為對照用物質。

2.4. 器具及材料^(註5)

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

2.4.2. 電泳膠片製作盤。

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

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

2.4.5. PCR 反應管：200 μL 及 500 μL。

2.4.6. PCR 玻璃毛細管^(註6)：Roche LightCycler 專用。

<p>mL、250 mL、500 mL、1000 mL 及 2000 mL。</p> <p>2.4.7. 塑膠離心管：50 mL。</p> <p>註 4：使用之塑膠或玻璃器皿均為無 DNase 污染。</p> <p>2.5. <u>Real-time PCR 溶液之配製</u>^(註 5)</p>	<p>2.4.7. 玻璃或塑膠瓶：50 mL、100 mL、250 mL、500 mL、1000 mL 及 2000 mL。</p> <p>2.4.8. 塑膠離心管：50 mL。</p> <p>2.4.9. 過濾膜：孔徑為 0.45 μm，材質為 nitro-cellulose。</p> <p>註 5：使用之塑膠或玻璃器皿均為無 DNase 污染。</p> <p>註 6：儀器使用 Roche LightCycler 時，才需使用。</p> <p>2.5. <u>試劑之配製</u></p> <p>2.5.1. <u>5 倍 TBE (Tris-borate-EDTA) 緩衝溶液</u> 稱取三羥甲基氨基甲烷 54 g、硼酸 27.5 g 及 0.5 M pH 8.0 EDTA 溶液 20 mL，加水溶解後定容至 1000 mL，供作 5 倍 TBE 緩衝溶液。臨用前以水稀釋為 0.5 倍。</p> <p>2.5.2. <u>2% 膠片</u> 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。</p> <p>2.5.3. <u>6 倍載入膠片緩衝溶液(6 × gel loading buffer)</u> 稱取溴酚藍 25 g、二甲苯藍 0.25 g 及量取甘油 30 mL，加入無菌純水使成 100 mL，並置於 4°C 冰箱貯存備用。</p> <p>2.5.4. <u>膠片染液</u> 稱取溴化乙錠 0.1 g，加水 10 mL 溶解，供作原液(含溴化乙錠 10 mg/mL)，使用前需以水稀釋成含溴化乙錠 1 μg/mL。溴化乙錠為致癌物質，配製時應注意安全。</p> <p>2.5.5. <u>PCR 溶液</u>^(註 7)</p> <p>2.5.5.1. <u>鑑別試驗用</u></p> <table border="1" data-bbox="735 1760 1198 2040"> <tr> <td>10 倍 PCR 緩衝溶液 (含 15 mM MgCl₂)</td> <td>2.5 μL</td> </tr> <tr> <td>Taq DNA polymerase (2 U/μL)</td> <td>1.0 μL</td> </tr> <tr> <td>2.5 mM dNTP</td> <td>4.0 μL</td> </tr> <tr> <td>10 μM 引子 F</td> <td>1.0 μL</td> </tr> <tr> <td>10 μM 引子 R</td> <td>1.0 μL</td> </tr> </table>	10 倍 PCR 緩衝溶液 (含 15 mM MgCl ₂)	2.5 μL	Taq DNA polymerase (2 U/μL)	1.0 μL	2.5 mM dNTP	4.0 μL	10 μM 引子 F	1.0 μL	10 μM 引子 R	1.0 μL	
10 倍 PCR 緩衝溶液 (含 15 mM MgCl ₂)	2.5 μL											
Taq DNA polymerase (2 U/μL)	1.0 μL											
2.5 mM dNTP	4.0 μL											
10 μM 引子 F	1.0 μL											
10 μM 引子 R	1.0 μL											

	<table border="1"> <tr> <td>模版 DNA 溶液(總量 100 ng)</td> <td>5.0 μL</td> </tr> <tr> <td>無菌純水</td> <td>10.5 μL</td> </tr> <tr> <td>總體積</td> <td>25.0 μL</td> </tr> </table>	模版 DNA 溶液(總量 100 ng)	5.0 μ L	無菌純水	10.5 μ L	總體積	25.0 μ L																												
模版 DNA 溶液(總量 100 ng)	5.0 μ L																																		
無菌純水	10.5 μ L																																		
總體積	25.0 μ L																																		
<p>2.5.1. ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System 鑑別試驗用</p>	<p>2.5.5.2. ABI PRISM 7700 Sequence Detector 確認試驗用</p>																																		
<table border="1"> <tr> <td>5 μM 引子 F</td> <td>1.25 μL</td> </tr> <tr> <td>5 μM 引子 R</td> <td>1.25 μL</td> </tr> <tr> <td>3.3 μM 探針 P</td> <td>1.7 μL</td> </tr> <tr> <td>TaqMan Universal PCR Master Mix</td> <td>12.5 μL</td> </tr> <tr> <td>檢體 DNA 溶液(總量 100 ng)</td> <td>5.0 μL</td> </tr> <tr> <td>無菌去離子水</td> <td>3.3 μL</td> </tr> <tr> <td>總體積</td> <td>25.0 μL</td> </tr> </table>	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	<table border="1"> <tr> <td>5 μM 引子 F</td> <td>1.25 μL</td> </tr> <tr> <td>5 μM 引子 R</td> <td>1.25 μL</td> </tr> <tr> <td>3.3 μM 探針 P</td> <td>1.7 μL</td> </tr> <tr> <td>TaqMan Universal PCR Master Mix</td> <td>12.5 μL</td> </tr> <tr> <td>模版 DNA 溶液(總量 100 ng)</td> <td>5.0 μL</td> </tr> <tr> <td>無菌純水</td> <td>3.3 μL</td> </tr> <tr> <td>總體積</td> <td>25.0 μL</td> </tr> </table>	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	模版 DNA 溶液(總量 100 ng)	5.0 μ L	無菌純水	3.3 μ L	總體積	25.0 μ L						
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																																		
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																																		
模版 DNA 溶液(總量 100 ng)	5.0 μ L																																		
無菌純水	3.3 μ L																																		
總體積	25.0 μ L																																		
<p>2.5.2. Roche LightCycler 鑑別試驗用</p>	<p>2.5.5.3. Roche LightCycler 鑑別試驗用</p>																																		
<table border="1"> <tr> <td>5 μM 引子 F</td> <td>1.5 μL</td> </tr> <tr> <td>5 μM 引子 R</td> <td>1.5 μL</td> </tr> <tr> <td>3.3 μM 探針 P</td> <td>1.5 μL</td> </tr> <tr> <td>LightCycler[®] FastStart DNA Master HybProbe</td> <td>2.0 μL</td> </tr> <tr> <td>25 mM 氯化鎂溶液</td> <td>2.4 μL</td> </tr> <tr> <td>檢體 DNA 溶液(總量 100 ng)</td> <td>5.0 μL</td> </tr> <tr> <td>無菌去離子水</td> <td>6.1 μL</td> </tr> <tr> <td>總體積</td> <td>20.0 μL</td> </tr> </table>	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	<table border="1"> <tr> <td>5 μM 引子 F</td> <td>1.5 μL</td> </tr> <tr> <td>5 μM 引子 R</td> <td>1.5 μL</td> </tr> <tr> <td>3.3 μM 探針 P</td> <td>1.5 μL</td> </tr> <tr> <td>LightCycler-FastStart DNA Master Hybridization Probes</td> <td>2.0 μL</td> </tr> <tr> <td>25 mM MgCl₂ 溶液</td> <td>2.4 μL</td> </tr> <tr> <td>模版 DNA 溶液(總量 100 ng)</td> <td>5.0 μL</td> </tr> <tr> <td>無菌純水</td> <td>6.1 μL</td> </tr> <tr> <td>總體積</td> <td>20.0 μL</td> </tr> </table>	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 Hybridization Probes	2.0 μ L	25 mM MgCl ₂ 溶液	2.4 μ L	模版 DNA 溶液(總量 100 ng)	5.0 μ L	無菌純水	6.1 μ L	總體積	20.0 μ L		
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																																		
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 Hybridization Probes	2.0 μ L																																		
25 mM MgCl ₂ 溶液	2.4 μ L																																		
模版 DNA 溶液(總量 100 ng)	5.0 μ L																																		
無菌純水	6.1 μ L																																		
總體積	20.0 μ L																																		
<p>註 5：Real-time PCR 溶液應置於冰浴中配製。</p>	<p>註 7：PCR 溶液應置於冰浴中配製。</p>																																		
<p>2.6. 檢體 DNA 之製備</p>	<p>2.6. 檢體 DNA 之製備</p>																																		
<p>2.6.1. 檢體之處理^(註 6)</p>	<p>2.6.1. 檢體之處理</p>																																		
<p>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。</p>	<p>檢體為乾燥肉乾或粉(碎)狀者，可直接以粉碎機研磨成細粉。檢體為溼狀肉塊或肉加工品，經冷凍乾燥處理後，再以粉碎機研磨成細粉備用。檢體需貯存於乾燥及冷藏或冷凍環境中。</p>																																		
<p>註 6：</p>																																			
<p>1. 研磨檢體時應於區隔之空間進行，避免交叉污染。</p>																																			
<p>2. 溼狀檢體之乾燥時間可視乾燥程度調整。</p>																																			
<p>2.6.2. DNA 之抽取</p>	<p>2.6.2. DNA 之抽取</p>																																		
<p>採用適用於動物 DNA 抽取之市售</p>	<p>採用 DNeasy[®] Tissue 套組及內附試劑、材料(ATL 試劑、proteinase</p>																																		

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。

K 試劑、AL 試劑、離心管柱 (DNeasy spin column)、收集管、AW1、AW2 與 AE 試劑)，亦可採用其他市售套組。

2.6.2.1.稱取檢體約 25 mg^(註 8)，置入 2 mL 離心管。

2.6.2.2.加入 ATL 試劑 180 μL 以及 proteinase K 20 μL，以旋渦混合器混合均勻。

2.6.2.3.於 55°C 振盪反應直到檢體溶解。

2.6.2.4.加入 AL 試劑 200 μL，以旋渦混合器混合均勻。

2.6.2.5.水浴 70°C，10 分鐘。

2.6.2.6.加入乙醇(96~100%) 200 μL，以旋渦混合器混合均勻。

2.6.2.7.取混合液注入離心管柱，以 $\geq 6000 \times g$ (8000 rpm) 離心 1 分鐘，並將收集管及濾液丟棄。

2.6.2.8.將離心管柱套入新的收集管，注入 AW1 試劑 500 μL 到離心管柱，以 $\geq 6000 \times g$ (8000 rpm) 離心 1 分鐘後，將收集管及濾液丟棄。

2.6.2.9.將離心管柱套入新的收集管，注入 AW2 試劑 500 μL 到離心管柱，以 $20000 \times g$ (14000 rpm) 離心 3 分鐘後，將收集管及濾液丟棄。

2.6.2.10.將離心管柱套入新的 1.5 mL 離心管。

2.6.2.11.加入 AE 試劑 100 μL 至離心管柱，於室溫下靜置 1 分鐘後，再以 $\geq 6000 \times g$ (8000 rpm) 離心 1 分鐘，再重複此溶出步驟一次。

2.6.2.12.將溶出液(約 200 μL)收集至已滅菌之 1.5 mL 離心管，為萃取 DNA 原液。

2.6.2.13.依 2.6.3.2 節測量 DNA 濃度並記錄後，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。

註 8：抽取脾臟等含細胞數量眾多的組織 DNA，稱取量不可超過 10 mg。抽取肝臟或腎臟等含豐富 RNA 的組織 DNA，於步驟 2.6.2.4 之後加入 RNase (100 mg/mL) 4 μL，混合均勻後於室溫下靜置 2 分鐘。

2.6.3. DNA 濃度測定及純度判斷

2.6.3.1. 檢體 DNA 溶液於使用前自冷凍庫中取出，於室溫下進行溶解。

2.6.3.2. 取適當量之 DNA 溶液以無菌純水做適當倍數之稀釋，分別測定 260 nm 及 280 nm 之吸光值(O.D.)。計算 DNA 濃度係以 O.D.₂₆₀ 吸光值乘 50 ng/μL 即為 DNA 溶液濃度。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 間。

2.7. 鑑別試驗^(註 9)

2.7.1. PCR 操作步驟

以無菌純水適當稀釋 DNA 溶液、引子備用。取 PCR 反應管，並依照 2.5.5.1 節配製 PCR 溶液，依序加入無菌純水、10 倍 PCR 緩衝溶液、dNTP、引子、DNA polymerase 及 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，依據引子類別並參照 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		
測試動物類基因	60°C	30 sec

<u>測試哺乳類及 家禽類基因</u>	<u>54°C</u>	<u>30 sec</u>
<u>測試魚類基因</u>	<u>60°C</u>	<u>30 sec</u>
<u>4. 延展</u>	<u>72°C</u>	<u>30 sec</u>
<u>步驟 2 至步驟 4，共進行 40 個循環反應。</u>		
<u>5. 最終延展</u>	<u>72°C</u>	<u>7 min</u>

2.7.3. 膠片電泳分析

取適量之 6 倍載入膠片緩衝溶液，分別與無菌純水(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，必須取 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。經電泳後之膠片置入膠片染液中進行染色約 15 分鐘，續置入水中漂洗及褪染，再置於紫外燈箱上，以波長 365 nm 之紫外光照射觀察是否有明顯之 DNA 螢光帶，並判讀結果。每次實驗必須同時測試正反應及負反應對照組。

2.7.4. 鑑別

2.7.4.1. 測試動物類基因：

檢體 DNA 之 PCR 增幅產物電泳結果，須與正反應對照組及 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 二者皆出現 PCR 增幅產物，且經由 DNA 分子量標記物質估算 PCR 增幅產物大小介於 234~265 bp 者^(註 10)，即判定該檢體含有動物性成分。

2.7.4.2. 測試哺乳類及家禽類基因：

檢體 DNA 之 PCR 增幅產物電泳結果，須與正反應對照組及 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 二者皆出現 PCR 增幅產物，且經由 DNA 分子量標記物質估算 PCR 增幅產物大小為 97 bp 者，即判定該檢體含有哺乳類或家禽類動物性成分。

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		

2.7.4.3. 測試魚類基因：
檢體 DNA 之 PCR 增幅產物電泳結果，須與正反應對照組及 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 二者皆出現 PCR 增幅產物，且經由 DNA 分子量標記物質估算 PCR 增幅產物大小為 234 bp 者，即判定該檢體含有魚類動物性成分。

註 9：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，建議進行確認試驗。本 PCR 定性反應條件係採 ABI PRISM 9700 設定之，當使用其他機型時，應自行檢討反應條件。
 註 10：動物類基因之 PCR 增幅產物大小介於 234~265 bp 者，皆為正反應。

2.8. 確認試驗：本實驗視需要而操作之。
 2.8.1. RT-PCR 操作步驟
 2.8.1.1. RT-PCR – ABI PRISM 7700 Sequence Detector
 以無菌純水適當稀釋檢體 DNA 溶液、引子及探針備用。取適量無菌純水，並依照 2.5.5.2.節配製 PCR 溶液，依序加入 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，再各別加入稀釋過之檢體 DNA 溶液 5 μL，最後將 PCR 反應管置於離心機中，以 200 × g (1500 rpm) 瞬間離心，移入 RT-PCR 反應器，依下列條件進行反應。每次實驗皆須製作負反應及正反應對照組。

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		
測試動物類基	60°C	1 min

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 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

2.7.2. 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

因		
測試哺乳類及 家禽類基因	60°C	1 min
測試魚類基因	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. RT-PCR – Roche LightCycler

以無菌純水適當稀釋檢體 DNA 溶液、引子及探針備用。取適量無菌純水，並依照 2.5.5.3.節配製 PCR 溶液，依序加入 LightCycler-FastStart DNA Master Hybridization Probes、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，再各別加入稀釋過之檢體 DNA 5 μL，最後將毛細管置於離心機中，以 800 × g (3000 rpm) 瞬間離心，移入 RT-PCR 反應器，依下列條件進行反應。每次實驗皆須製作負反應及正反應對照組。

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		
測試動物類基因	60°C	25 sec
測試哺乳類及 家禽類基因	54°C	25 sec
測試魚類基因	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. RT-PCR 螢光分析

檢體 DNA 經 RT-PCR 後，直接從 RT-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。每次實驗必須同時測試正反應及負反應對照組。

2.8.3. 確認

2.7.3.1. 測試動物類基因(16S ribosomal RNA)：

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 增幅產物為動物物種之基因片段，可確認該檢體中含有動物性成分。

2.7.3.2. 測試動物類基因(12S ribosomal RNA)：

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 增幅產物為哺乳類、家禽類或魚類之基因片段，可確認該檢體中含有哺乳類、家禽類或魚類成分。

2.7.3.3. 測試哺乳類及家禽類基因：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 增幅產物為哺乳類或家禽類之基因片段，可確認該檢體中含有哺乳類或家禽類成分。

2.7.3.4. 測試魚類基因：

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 增幅產物為魚類之基因片段，可確認該檢體中含有魚類成分。

2.8.3.1. 測試動物類基因：

檢體 DNA 之 RT-PCR 增幅產物螢光分析圖須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 RT-PCR 螢光分析圖，皆出現經由探針所產生之螢光增幅曲線，即確認該 RT-PCR 增幅產物為動物物種之基因片段，可確認該檢體中含有動物性成分。

2.8.3.2. 測試哺乳類及家禽類基因：檢體 DNA 之 RT-PCR 增幅產物螢光分析圖須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 RT-PCR 螢光分析圖，皆出現經由探針所產生之螢光增幅曲線，即確認該 RT-PCR 增幅產物為哺乳類或家禽類動物物種之基因片段，可確認該檢體中含有哺乳類或家禽類動物性成分。

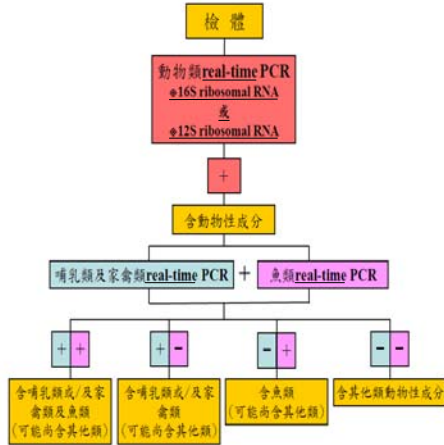
2.8.3.3. 測試魚類基因：

檢體 DNA 之 RT-PCR 增幅產物螢光分析圖須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 RT-PCR 螢光分析圖，皆出現經由探針所產生之螢光增幅曲線，即確認該 RT-PCR 增幅產物為魚類動物物種之基因片段，可確認該檢體中含有魚類動物性成分。

<p>2.7.4.判定(附圖)</p> <p>2.7.4.1.以 <u>real-time PCR</u> 測試為動物類負反應，表示不含動物性成分。</p> <p>2.7.4.2.以 <u>real-time PCR</u> 測試為動物類正反應，及以 <u>real-time PCR</u> 測試亦為哺乳類及家禽類正反應，且以 <u>real-time PCR</u> 測試亦為魚類正反應，表示含哺乳類或/及家禽類及魚類動物性成分，及可能尚含其他類動物性成分。</p> <p>2.7.4.3.以 <u>real-time PCR</u> 測試為動物類正反應，及以 <u>real-time PCR</u> 測試亦為哺乳類及家禽類正反應，且以 <u>real-time PCR</u> 測試為魚類負反應，表示含哺乳類或/及家禽類動物性成分，及可能尚含其他類動物性成分。</p> <p>2.7.4.4.以 <u>real-time PCR</u> 測試為動物類正反應，及以 <u>real-time PCR</u> 測試為哺乳類及家禽類負反應，且以 <u>real-time PCR</u> 測試為魚類正反應，表示含魚類動物性成分，及可能尚含其他類動物性成分。</p> <p>2.7.4.5.以 <u>real-time PCR</u> 測試為動物類正反應，及以 <u>real-time PCR</u> 測試為哺乳類及家禽類負反應，且以 <u>real-time PCR</u> 測試為魚類負反應，表示含其他類動物性成分。</p> <p>附註：</p> <ol style="list-style-type: none"> 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，如有影響測試結果之因素時，應自行探討。 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 	<p>2.8.4.判定(附圖)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 以 <u>PCR 或 RT-PCR</u> 測試為動物類負反應，表示不含動物性成分。 2. 以 <u>PCR 或 RT-PCR</u> 測試為動物類正反應，及以 <u>PCR 或 RT-PCR</u> 測試亦為哺乳類及家禽類正反應，且以 <u>PCR 或 RT-PCR</u> 測試亦為魚類正反應，表示含哺乳類或/及家禽類及魚類動物性成分，及可能尚含其他類動物性成分。 3. 以 <u>PCR 或 RT-PCR</u> 測試為動物類正反應，及以 <u>PCR 或 RT-PCR</u> 測試亦為哺乳類及家禽類正反應，且以 <u>PCR 或 RT-PCR</u> 測試為魚類負反應，表示含哺乳類或/及家禽類動物性成分，及可能尚含其他類動物性成分。 4. 以 <u>PCR 或 RT-PCR</u> 測試為動物類正反應，及以 <u>PCR 或 RT-PCR</u> 測試為哺乳類及家禽類負反應，且以 <u>PCR 或 RT-PCR</u> 測試為魚類正反應，表示含魚類動物性成分，及可能尚含其他類動物性成分。 5. 以 <u>PCR 或 RT-PCR</u> 測試為動物類正反應，及以 <u>PCR 或 RT-PCR</u> 測試為哺乳類及家禽類負反應，且以 <u>PCR 或 RT-PCR</u> 測試為魚類負反應，表示含其他類動物性成分。 <p>備註：</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 本檢驗方法最低檢測濃度為 0.1%(以乾重計)。 	
--	---	--

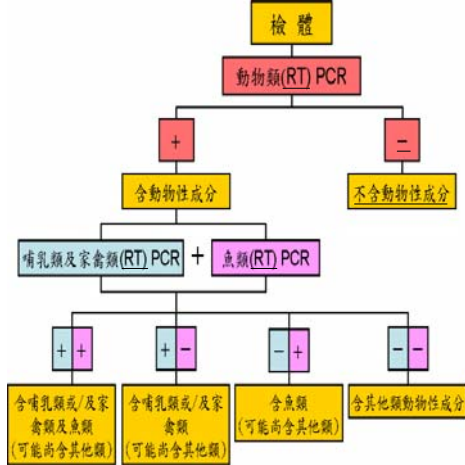
應條件。

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。



附圖 食品中動物性成分之定性篩選檢驗流程

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。



附圖 食品中動物性成分之定性篩選檢驗流程