

食品中動物性成分檢驗-金絲燕成分之定性檢驗

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「食品中植物性成分檢驗-金絲燕成分之定性檢驗」，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、修正對照用物質。
- 三、增列附註二及三。

食品中動物性成分檢驗-金絲燕成分之定性檢驗

修正對照表

修正規定	現行規定	說明
1. 適用範圍：本檢驗方法適用於燕窩製品之定性檢驗。 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> 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。 2.2. 裝置^(註 1) 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。 2.2.2. 冷凍乾燥裝置：溫度可達-40℃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 55℃ 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℃ 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(Vortex mixer)。 2.2.13. 酸鹼度測定儀(pH meter)。 2.2.14. 水浴裝置：溫差±1℃以內者。 2.2.15. 天平：最大稱重量為 2000 g，靈	1. 適用範圍：本檢驗方法適用於燕窩製品之定性檢驗。 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> 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 等實驗過程</u>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. <u>聚合酶鏈反應器：ABI PRISM 9700 Sequence Detector，或同級品。</u> 2.2.2. 即時聚合酶鏈反應器^(註 2)：ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System 或 Roche LightCycler，或同級品。 2.2.3. 冷凍乾燥裝置：溫度可達-40℃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 55℃ 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℃ 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。	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、修正對照用物質。 三、增列附註二及三。 四、增修訂部分文字。

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。 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.<u>Real-time PCR</u> 用^(註 2) 2.3.2.1.鑑別試驗用引子及探針 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'-CAAACCTGGGATTAGATACC	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℃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；適用於動物 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^(註 3) 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'-CAAACCTGGGATTAGATACC CCACTA-3' 引子 R： 12SR,5'-ATCGRTTMTAGAACAGGCT CCTCTAG-3' PCR 增幅產物大小 155 bp 2.3.2.1.2. 金絲燕(標的基因：12S ribosomal RNA) 引子 F： SwiF,5'-GTCGCCAGTTCACCTCCCC-3' 引子 R： SwiR,5'-GRTTTCATAYCTCTTTCCGT GRTT-3' PCR 增幅產物大小 144 bp 2.3.2.2.確認試驗用引子及探針 2.3.2.2.1. 動物類(標的基因：12S ribosomal RNA，供作內部對照基因) 引子 F： 12SF,5'-CAAACCTGGGATTAGATACC	
---	---	--

CCACTA-3' 引子 R : 12SR,5'-ATCGRTTMTAGAACAGGCT CCTCTAG-3' 探針 P : 12SP,5'-(FAM)-CACCGCCAAGTCCTT TGRGTTTTARGC-(TAMRA)-3' PCR 增幅產物大小 155 bp 2.3.2.1.2. 金絲燕(標的基因 : 12S ribosomal RNA) 引子 F : SwiF,5'-GTCGCCAGTTCACCTCCCC-3' 引子 R : SwiR,5'-GRTTTCATAYCTCTTTCCGT GRTT-3' 探針 P : SwiP,5'-(FAM)-CCYACCCGCTAACA AGACAGGTCAAGGTAT-(TAMRA)-3' PCR 增幅產物大小 144 bp 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. 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。 3. 金絲燕標的基因引子及探針之序列 中，Y 為混合鹼基代碼(C/T)，表示同 時含 C 及 T；R 為混合鹼基代碼 (A/G)，表示同時含 A 及 G。	CCACTA-3' 引子 R : 12SR,5'-ATCGRTTMTAGAACAGGCT CCTCTAG-3' 探針 P : 12SP,5'-(FAM)-CACCGCCAAGTCCTT TGRGTTTTARGC -(TAMRA)-3' PCR 增幅產物大小 155 bp 2.3.2.2.2. 金絲燕(標的基因 : 12S ribosomal RNA) 引子 F : SwiF,5'-GTCGCCAGTTCACCTCCCC-3' 引子 R : SwiR,5'-GRTTTCATAYCTCTTTCCGT GRTT-3' 探針 P : SwiP,5'-(FAM)-CCYACCCGCTAACA AGACAGGTCAAGGTAT-(TAMRA)-3' PCR 增幅產物大小 144 bp 註 3 : 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. 動物類內部對照基因引子及探針之 序列中，Y 為混合鹼基代碼(C/T)， 表示同時含 C 及 T；R 為混合鹼基代 碼(A/G)，表示同時含 A 及 G。 2.3.2.3. 去氧核苷三磷酸 (deoxyribonucleoside triphosphate, dNTP) 含去氧腺苷三磷酸(deoxyadenosine triphosphate, dATP)，去氧胞苷三磷酸 (deoxycytidine triphosphate, dCTP)，去 氧鳥糞嘌呤核苷三磷酸(deoxyguanosine triphosphate, dGTP)及去氧胸苷三磷酸 (deoxythymidine triphosphate, dTTP)各 2.5 mM 之溶液。	
--	--	--

2.3.2.2. TaqMan Universal PCR Master Mix (適用於 ABI PRISM 7900HT Sequence Detection 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：金絲燕之組織或使用衛生福利部食品藥物管理署提供編號 pIDS1 之參考質體作為對照用物質。 2.4. 器具及材料^(註 3) 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 mL、	2.3.2.4. 聚合酶 <u>Taq DNA polymerase (2U/µL)。</u> 2.3.2.5. TaqMan Universal PCR Master Mix (確認試驗用，適用於 ABI PRISM 7900HT Sequence Detection 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。 2.3.2.6. 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. 電泳用試藥：<u>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。</u> 2.3.4. 對照用物質：金絲燕之組織或使用行政院衛生署食品藥物管理局提供編號 pIDS1 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. <u>電泳膠片製作盤。</u> 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 <u>及 500 µL。</u> 2.4.6. PCR 玻璃毛細管：Roche LightCycler 專用。	
---	---	--

250 mL、500 mL、1000 mL 及 2000 mL。	2.4.7. 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。	2.4.8. 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。	2.4.9. 過濾：孔徑為 0.45 μm，材質為 <u>nitrocellulose</u> 。				
2.5. <u>Real-time PCR 溶液之配製</u> ^(註 4)	註 4：使用之塑膠或玻璃器皿均為無 DNase 污染。				
	2.5. <u>試劑之配製</u>				
	2.5.1. <u>0.5M 乙二胺四乙酸(EDTA)溶液</u> 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. <u>0.5 倍 TBE (Tris-borate-EDTA) 緩衝溶液</u> 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. <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。				
	2.5.4. <u>6 倍載入膠片緩衝溶液(6 × gel loading buffer)</u> 稱取溴酚藍 25 g 及二甲苯藍 0.25 g，加入甘油 30 mL，再加入無菌去離子水使成 100 mL，置於 4℃ 冰箱貯存備用。				
	2.5.5. <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(10 mg/mL)，使用前以水稀釋成溴化乙錠 1 μg/mL。溴化乙錠為致癌物質，配製時應注意安全。				
	2.5.6. <u>PCR 溶液</u> ^(註 5)				
	2.5.6.1. <u>鑑別試驗用</u>				
	<table><tr><td>10 倍含 15 mM 氯化鎂 PCR 緩衝溶液</td><td>2.5 μL</td></tr><tr><td>Taq DNA polymerase (2 U/μL)</td><td>1.0 μL</td></tr></table>	10 倍含 15 mM 氯化鎂 PCR 緩衝溶液	2.5 μL	Taq DNA polymerase (2 U/μL)	1.0 μL
10 倍含 15 mM 氯化鎂 PCR 緩衝溶液	2.5 μL				
Taq DNA polymerase (2 U/μL)	1.0 μL				

	<table><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><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>10.5 μL</td></tr><tr><td>總體積</td><td>25.0 μL</td></tr></table>	2.5 mM dNTP	4.0 μL	10 μM 引子 F	1.0 μL	10 μM 引子 R	1.0 μL	檢體 DNA 溶液(總量 100 ng)	5.0 μL	無菌去離子水	10.5 μL	總體積	25.0 μL																					
2.5 mM dNTP	4.0 μL																																	
10 μM 引子 F	1.0 μL																																	
10 μM 引子 R	1.0 μL																																	
檢體 DNA 溶液(總量 100 ng)	5.0 μL																																	
無菌去離子水	10.5 μL																																	
總體積	25.0 μL																																	
2.5.1. ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System 鑑別試驗用	2.5.6.2. ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System 確認試驗用																																	
<table><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 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 Universal PCR 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	<table><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 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 Universal PCR 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					
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 Universal PCR 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																																	
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 Universal PCR 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																																	
2.5.2. Roche LightCycler 鑑別試驗用	2.5.6.3. Roche LightCycler 確認試驗用																																	
<table><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 μM 引子 F	1.5 μL	5 μM 引子 R	1.5 μL	3.3 μM 探針 P	1.5 μL	LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe	2.0 μL	25 mM 氯化鎂溶液	2.4 μL	檢體 DNA 溶液(總量 100 ng)	5.0 μL	無菌去離子水	6.1 μL	總體積	20.0 μL	<table><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</td><td>2.0 μL</td></tr><tr><td>25 mM 氯化鎂</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 μM 引子 F	1.5 μL	5 μM 引子 R	1.5 μL	3.3 μM 探針 P	1.5 μL	LightCycler® FastStart DNA Master Hybridization	2.0 μL	25 mM 氯化鎂	2.4 μL	檢體 DNA 溶液(總量 100 ng)	5.0 μL	無菌去離子水	6.1 μL	總體積	20.0 μL	
5 μM 引子 F	1.5 μL																																	
5 μM 引子 R	1.5 μL																																	
3.3 μM 探針 P	1.5 μL																																	
LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe	2.0 μL																																	
25 mM 氯化鎂溶液	2.4 μL																																	
檢體 DNA 溶液(總量 100 ng)	5.0 μL																																	
無菌去離子水	6.1 μL																																	
總體積	20.0 μL																																	
5 μM 引子 F	1.5 μL																																	
5 μM 引子 R	1.5 μL																																	
3.3 μM 探針 P	1.5 μL																																	
LightCycler® FastStart DNA Master Hybridization	2.0 μL																																	
25 mM 氯化鎂	2.4 μL																																	
檢體 DNA 溶液(總量 100 ng)	5.0 μL																																	
無菌去離子水	6.1 μL																																	
總體積	20.0 μL																																	
註 4：Real-time PCR 溶液應置於冰浴中配製。	註 5：PCR 溶液應置於冰浴中配製。																																	
2.6. 檢體 DNA 之製備	2.6. 檢體 DNA 之製備																																	
2.6.1.檢體之處理 ^(註 5)	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。	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 5：	註 6：																																	
1. 研磨檢體時應於區隔之空間進行，避免交叉污染。	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. 溼狀檢體之乾燥時間可視乾燥程度調整。																																	
2.6.2.DNA 之抽取	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	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℃冷																																	

2.6.3.節測定 DNA 濃度後，置於-20℃ 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。

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. 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℃	5 min
2. 變性	95℃	30 sec
3. 黏接	60℃	30 sec
4. 延展	72℃	30 sec
步驟 2 至步驟 4，共進行 35 個循環反應		
5. 最終延展	72℃	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金絲燕標的基因之 PCR 測試。檢體

2.7. <u>Real-time PCR 鑑別試驗</u> 2.7.1. <u>Real-time PCR 操作步驟</u> 2.7.1.1. <u>Real-time PCR—ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System</u> 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 $\times$ 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。 <table border="1"> <thead> <tr> <th>步驟</th><th>溫度</th><th>時間</th></tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1. 熱活化</td><td>50°C</td><td>2 min</td></tr> <tr> <td>2. 最初變性</td><td>95°C</td><td>10 min</td></tr> <tr> <td>3. 變性</td><td>95°C</td><td>15 sec</td></tr> <tr> <td>4. 黏接、延展</td><td>60°C</td><td>1 min</td></tr> <tr> <td colspan="3">步驟 3 至步驟 4，共進行 45 個循環反應。</td></tr> <tr> <td>5. 冷卻</td><td>35°C</td><td>45 sec</td></tr> </tbody> </table> 2.7.1.2. <u>Real-time PCR—Roche LightCycler</u> 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，	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	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 144 bp 者，即判定該檢體含有金絲燕成分。 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. <u>確認試驗：本實驗視需要而操作之。</u> 2.8.1. <u>Real-time PCR 操作步驟</u> 2.8.1.1. <u>Real-time PCR—ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System</u> 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 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 $\times$ 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。 <table border="1"> <thead> <tr> <th>步驟</th><th>溫度</th><th>時間</th></tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1. 熱活化</td><td>50°C</td><td>2 min</td></tr> <tr> <td>2. 最初變性</td><td>95°C</td><td>10 min</td></tr> <tr> <td>3. 變性</td><td>95°C</td><td>15 sec</td></tr> <tr> <td>4. 黏接、延展</td><td>60°C</td><td>1min</td></tr> <tr> <td colspan="3">步驟 3 至步驟 4，共進行 45 個循環反應。</td></tr> <tr> <td>5. 冷卻</td><td>35°C</td><td>45 sec</td></tr> </tbody> </table> 2.8.1.2. <u>Real-time PCR—Roche LightCycler</u> 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，	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	1min	步驟 3 至步驟 4，共進行 45 個循環反應。			5. 冷卻	35°C	45 sec	
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																																										
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	1min																																										
步驟 3 至步驟 4，共進行 45 個循環反應。																																												
5. 冷卻	35°C	45 sec																																										

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

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 增幅產物為金絲燕之基因片段，可確認該檢體中含有金絲燕成分。

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。

依照 2.5.6.3.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. RT-PCR 螢光分析

檢體 DNA 經 RT-PCR 反應後，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

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 增幅產物為金絲燕之基因片段，可確認該檢體中含有金絲燕成分。

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。