

食品中動物性成分檢驗方法－虱目魚成分之定性檢驗

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於食品中虱目魚之組織或其製品之定性檢驗。
2. 檢驗方法：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，RT-PCR）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。
 - 2.2. 裝置^{（註1）}
 - 2.2.1. 分光光度計：具波長260 nm、280 nm。
 - 2.2.2. 旋渦混合器（Vortex mixer）。
 - 2.2.3. 真空乾燥裝置：供DNA乾燥用。
 - 2.2.4. 真空冷凍乾燥裝置：溫度可達-40℃以下，真空度可達133 mBar以下，供檢體乾燥用。
 - 2.2.5. 加熱振盪器：具55℃溫控及振盪功能。
 - 2.2.6. 微量冷凍離心機：可達20,000 × g，並具4℃溫控功能。
 - 2.2.7. 離心機：供各式微量離心管離心用。
 - 2.2.8. 聚合酶鏈反應器：ABI PRISM 9700 Sequence Detector，或同級品。
 - 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。
 - 2.2.10. 電泳槽：供DNA電泳用。
 - 2.2.11. 振盪型粉碎機：Retsch MM200，或同級品。
 - 2.2.12. 照相裝置：供拍攝電泳膠片用。
 - 2.2.13. 紫外燈箱：具波長312 nm、365 nm紫外燈。
 - 2.2.14. 冷凍設備：具冷藏及凍結功能。
 - 2.2.15. 高壓滅菌釜。
 - 2.2.16. pH測定儀。
 - 2.2.17. 水浴裝置：溫差±1℃以內者。
 - 2.2.18. 天平：最大秤重量為2,000 g，靈敏度為0.1 g；最大秤重量為100 g，靈敏度為1 mg。
 - 2.2.19. 無菌操作台。

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：RNase、乙醇（96-100%）均採分子生物分析級試藥，DNeasy® Blood & Tissue套組。

2.3.2. PCR用

2.3.2.1. 鑑別試驗用引子^(註3)

2.3.2.1.1. 魚類（標的基因：16S ribosomal RNA，供作內部對照基因）

引子F：FishF, 5'-CGCAAGGGAAAGCTGAAAGAGA-3'

引子R：FishR, 5'-TCGGTAGGTTTGTACCTCTACTC-3'

PCR增幅產物大小234 bp

2.3.2.1.2. 虱目魚（標的基因：16S ribosomal RNA）

引子F：CHANF, 5'-GCTACTCCGAGACAGCCTAAGAA-3'

引子R：CHANR, 5'-AGTGGCACATCGGTGACTGGA-3'

PCR增幅產物大小175 bp

2.3.2.2. 確認試驗用引子及探針^(註4)

2.3.2.2.1. 魚類（標的基因：16S ribosomal RNA，供作內部對照基因）

引子F：FishF, 5'-CGCAAGGGAAAGCTGAAAGAGA-3'

引子R：FishR, 5'-TCGGTAGGTTTGTACCTCTACTC-3'

探針P：FishP, 5'-(FAM)-TACCTTTTGCATCATGATTTAGCCAG-(TAMRA)-3'

PCR增幅產物大小234 bp

2.3.2.2.2. 虱目魚（標的基因：16S ribosomal RNA）

引子F：CHANF, 5'-GCTACTCCGAGACAGCCTAAGAA-3'

引子R：CHANR, 5'-AGTGGCACATCGGTGACTGGA-3'

探針P：CHANP, 5'-(FAM)-TACCGAAGTTAGTGATAGCTGGTTGCCCGA-(TAMRA)-3'

PCR增幅產物大小175 bp

註3：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°C 貯存備用。

註4：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°C 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。

2.3.2.3. 去氧核糖核苷三磷酸 (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)，或同級品。

2.3.2.5. TaqMan Universal PCR Master Mix (確認試驗用，適用於ABI PRISM 7700)

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。

2.3.2.6. 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：虱目魚之組織，或使用行政院衛生署藥物食品檢驗局提供編號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 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6)：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. 過濾膜：孔徑為0.45 μm，材質為nitro-cellulose。

註5：使用之塑膠或玻璃器皿均為無DNase污染。

註6：儀器使用Roche LightCycler時，才需使用。

2.5. 試劑之配製

2.5.1. 5倍TBE (Tris-borate-EDTA) 緩衝溶液

稱取三羥甲基氨基甲烷54.0 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。

2.5.2. 2%膠片

稱取瓊膠2g，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。

2.5.3. 6倍載入膠片緩衝溶液 (6 × gel loading buffer)

稱取溴酚藍25 g、二甲苯藍0.25 g及量取甘油30 mL，加入無菌純水使成100 mL，並置於4°C冰箱貯存備用。

2.5.4. 膠片染液

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。

2.5.5. PCR溶液^(註7)

2.5.5.1. 鑑別試驗用

10倍PCR緩衝溶液 (含15 mM MgCl ₂)	2.5 μL
<i>Taq</i> 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
模版DNA溶液 (總量100 ng)	5.0 μL

無菌純水	10.5 μL
總體積	25.0 μL

2.5.5.2. ABI PRISM 7700 Sequence Detector 確認試驗用

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
模版DNA溶液（總量100 ng）	5.0 μL
無菌純水	3.3 μL
總體積	25.0 μL

2.5.5.3. Roche LightCycler 確認試驗用

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 Probes	2.0 μL
25 mM MgCl ₂ 溶液	2.4 μL
模版DNA溶液（總量100 ng）	5.0 μL
無菌純水	6.1 μL
總體積	20.0 μL

註7：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8)

檢體為乾燥肉乾或粉（碎）狀者，可直接以粉碎機研磨成細粉。檢體為溼狀肉塊或其加工品，經真空冷凍乾燥處理後，再以粉碎機研磨成細粉備用。檢體需貯存於乾燥及冷凍環境中。

註8：1、粉碎機建議採用振盪型粉碎機為宜。

2、研磨檢體時應於區隔之空間進行，避免交叉污染。

3、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DNeasy® Blood & Tissue套組及內附試劑、材料（ATL試劑、proteinase 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9）}，置入2 mL離心管。

2.6.2.2. 加入ATL試劑180 μ L以及proteinase K 20 μ L，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 μ L，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 μ L，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 $\geq 6,000 \times g$ （8,000 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 μ L到離心管柱，以 $\geq 6,000 \times g$ （8,000 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 μ L到離心管柱，以 $20,000 \times g$ （14,000 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 μ L至離心管柱，於室溫下靜置1分鐘後，再以 $\geq 6,000 \times g$ （8,000 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 μ L）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節測定DNA濃度並記錄後，置於-20°C冷凍保存。

註9：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 μ L，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10)

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，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 測試魚類及虱目魚基因	60°C	30 sec
4、延展	72°C	30 sec
步驟2至步驟4，共進行40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

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175 bp者，即判定該檢體含有虱目魚成分。

註10：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。檢體DNA之抽取與製備，其純度將直接影響後續PCR測試結果，建議抽取之檢體DNA可先進行內部對照基因PCR測試，以確定是否含有DNA及其純度。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。

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 μ L入PCR反應管中，再各別加入稀釋過之檢體DNA溶液5 μ L，最後將PCR反應管置於離心機中，以200 \times g (1,500 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 測試魚類及虱目魚基因	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 μ L於玻璃毛細管中，再各別加入稀釋過之檢體DNA 5 μ L，最後將毛細管置於離心機中，以800 \times g (3,000 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 測試魚類及虱目魚基因	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PCR增幅產物為虱目魚之基因片段，可確認該檢體中含有虱目魚成分。

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。