

食品中動物性成分檢驗方法－毒鯖河豚成分之定性檢驗

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於食品中毒鯖河豚組織之定性檢驗。
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°C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°C溫控及振盪功能。
 - 2.2.6. 微量冷凍離心機（Micro refrigerated centrifuge）：可達20000 × g，並具4°C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302 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°C以內者。
 - 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。
 - 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 A、乙醇（96-100%）均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

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. 毒鯖河豚（標的基因：16S ribosomal RNA）

引子F：PUFF, 5'-GGCTTCTTACCTCCCAAAGACC-3'

引子R：PUFR, 5'-CTTTTAGGCCACCTAAACACAAA-3'

PCR增幅產物大小156 bp

2.3.2.2. 確認試驗用引子及探針

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. 毒鯖河豚（標的基因：16S ribosomal RNA）

引子F：PUFF, 5'-GGCTTCTTACCTCCCAAAGACC-3'

引子R：PUFR, 5'-CTTTTAGGCCACCTAAACACAAA-3'

探針P： PUF_P, 5'-(FAM)-CACAGGAGGGTAAGGATCATAAACAACCAAG-(TAMRA)-3'

PCR增幅產物大小156 bp

註3：合成之引子及探針，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，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。

2.3.2.3. 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。

2.3.2.4. 聚合酶

Taq DNA polymerase (2U/μL)。

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

本試劑內含RT-PCR所需去氧核糖核苷三磷酸、聚合酶等，使用時僅需自行添加引子、探針及待測檢體DNA即可。

2.3.2.6. LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe (確認試驗用，適用於Roche LightCycler)

本試劑內含RT-PCR所需去氧核糖核苷三磷酸、聚合酶等，使用時僅需自行添加氯化鎂溶液、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：毒鯖河豚之組織，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4)

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 μ L及500 μ L。
- 2.4.6. PCR玻璃毛細管^(註5)：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 μ m，材質為nitro-cellulose。

註4：使用之塑膠或玻璃器皿均為無DNase污染。

註5：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 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。

2.5.3. 6倍載入膠片緩衝溶液 (6 \times 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 $^{\circ}$ 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 μ g/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6)

2.5.5.1. 鑑別試驗用

10倍PCR緩衝溶液 (含15 mM 氯化鎂)	2.5 μ L
<i>Taq</i> DNA polymerase (2 U/ μ L)	1.0 μ L
2.5 mM dNTP	4.0 μ L
10 μ M 引子F	1.0 μ L
10 μ M 引子R.....	1.0 μ L

檢體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
檢體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 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
無菌純水	6.1 μL
總體積	20.0 μL

註6：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7)

檢體為乾燥肉乾或粉（碎）狀者，可直接以粉碎機研磨成細粉。檢體為溼狀者，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7：1. 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

2.6.2.1. 採用適用於動物DNA抽取之市售套組抽取DNA。

2.6.2.2. DNA溶出液收集至已滅菌之1.5 mL離心管，為萃取檢體DNA原液。

2.6.2.3. 依2.6.3.節測定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

取適當量之DNA原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濃度係以波長260 nm吸光值乘50 ng/ μ L及稀釋倍數，即為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間。

2.7. 鑑別試驗（註8）

2.7.1. PCR操作步驟

以無菌純水適當稀釋檢體DNA原液、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，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 測試魚類及毒鯖河豚基因	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，再以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需同時進行內部對照基因及毒鯖河豚基因之PCR測試。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內部對照基因PCR增幅產物大小為234 bp，且毒鯖河豚基因PCR增幅產物大小為156 bp者，即判定該檢體含有毒鯖河豚成分。

註8：1. 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，建議進行確認試驗。

2. 檢體DNA之純度將直接影響後續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原液、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TaqMan Universal PCR Master Mix、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 (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		
測試魚類及毒鯖河豚基因	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原液、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 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，再各別加入檢體DNA溶液5 μ L，最後將毛細管置於離心機中，以800 \times g (3000 rpm) 瞬間離心，移入RT-PCR反應器，依下列條件進行反應。每次實驗皆須製作正反應及負反應對照組。

步驟	溫度	時間
1、最初變性	95°C	7 min

2、變性	95°C	7 sec
3、黏接 測試魚類及毒鯖河豚基因	60°C	8 sec
4、延展	72°C	15 sec
	步驟 2 至步驟 4，共進行45個循環反應。	
5、冷卻	40°C	40 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增幅產物為毒鯖河豚之基因片段，可確認該檢體中含有毒鯖河豚成分。

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。