

## 食品中動物性成分檢驗方法－貓成分之定性檢驗

101年3月2日署授食字第1011900805號公告訂定

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於貓肉、貓血及其組織之定性檢驗。
2. 檢驗方法：檢體經DNA萃取後，以聚合酶鏈反應（polymerase chain reaction, PCR）及即時聚合酶鏈反應（real-time polymerase chain reaction, real-time PCR）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、PCR試劑配製及PCR等檢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<sup>(註1)</sup>
    - 2.2.1. 聚合酶鏈反應器：ABI PRISM 9700 Sequence Detector，或同級品。
    - 2.2.2. 即時聚合酶鏈反應器<sup>(註2)</sup>：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°C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°C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°C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。
    - 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°C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<sup>(註3)</sup>

2.3.2.1. 鑑別試驗用引子

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

引子F：SF, 5'-AAGACGAGAAGACCCT(A/G)TGGA(A/G)CTTTA-3'

引子R：SR, 5'- GATTGCGCTGTTATCCCTAGGGTA-3'

PCR增幅產物大小256 bp

2.3.2.1.2. 貓（標的基因：short interspersed elements, SINEs）

引子F：FeF, 5'- AGTCGGTTAAGCGTCTGACTTT-3'

引子R：FeR, 5'- CTCCAGGCTCTGAGCTGTCA-3'

PCR增幅產物大小98 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：16S ribosomal RNA，供作內部對照基因）

引子F：SF, 5'-AAGACGAGAAGACCCTRTGGAR CTTTA-3'

引子R：SR, 5'- GATTGCGCTGTTATCCCTAGGGTA-3'

探針P：SP, 5'-(FAM)-TTYGGTTGGGGTGACCTCGG RGT-(TAMRA)-3'

PCR增幅產物大小256 bp

2.3.2.2.2. 貓（標的基因：short interspersed elements, SINEs）

引子F：FeF, 5'- AGTCGGTTAAGCGTCTGACTTT-3'

引子R：FeR, 5'- CTCCAGGCTCTGAGCTGTCA-3'

探針P：FeP, 5'-(FAM)- TCACAGTTCGTGAGTTCGAGC CCCAC -(TAMRA)-3'

PCR增幅產物大小 98 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. 去氧核糖核苷三磷酸 (Deoxyribonucleoside triphosphate, dNTP) 溶液

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 (2 U/μL)，內附10倍含15 mM 氯化鎂之PCR緩衝溶液，或同級品

#### 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 Light Cyclor)

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：溴化乙錠 (ethidium bromide)、溴酚藍 (bromophenol blue)、二甲苯藍 (xylene cyanol FF)、乙二胺四乙酸二鈉 (ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt, Na<sub>2</sub>-EDTA)、三羥甲基氨基甲烷 (tris(hydroxymethyl)aminomethane, Tris)、氫氧化鈉及硼酸採試藥級。瓊膠 (agarose) 及甘油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：貓肉、貓血或其組織。

### 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 μL及500 μL。

2.4.6. PCR玻璃毛細管：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. 濾膜：孔徑為0.45  $\mu\text{m}$ ，材質為nitrocellulose。

註4：使用之塑膠或玻璃器皿均為無DNase污染。

## 2.5. 試劑之配製

### 2.5.1. 0.5M 乙二胺四乙酸 (EDTA) 溶液

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. 0.5倍TBE (Tris-borate-EDTA) 緩衝溶液

稱取三羥甲基氨基甲烷54 g及硼酸27.5 g，加入0.5 M 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. 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。

### 2.5.4. 6倍載入膠片緩衝溶液 (6 $\times$ gel loading buffer)

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°C冰箱貯存備用。

### 2.5.5. 膠片染液

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1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。溴化乙錠為致癌物質，配製時應注意安全。

### 2.5.6. PCR溶液<sup>(註5)</sup>

#### 2.5.6.1. 鑑別試驗用

10倍含15 mM 氯化鎂之PCR緩衝溶液.....	2.5 $\mu\text{L}$
<i>Taq</i> DNA polymerase (2 U/ $\mu\text{L}$ ).....	1.0 $\mu\text{L}$
2.5 mM dNTP .....	4.0 $\mu\text{L}$
10 $\mu\text{M}$ 引子F .....	1.0 $\mu\text{L}$
10 $\mu\text{M}$ 引子R .....	1.0 $\mu\text{L}$
檢體DNA溶液 (總量100 ng) .....	5.0 $\mu\text{L}$
無菌去離子水.....	10.5 $\mu\text{L}$
總體積.....	25.0 $\mu\text{L}$

#### 2.5.6.2. ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System 確認試驗用

5 $\mu$ M 引子F .....	1.25 $\mu$ L
5 $\mu$ M 引子R .....	1.25 $\mu$ L
3.3 $\mu$ M 探針P .....	1.7 $\mu$ L
TaqMan Universal PCR Master Mix .....	12.5 $\mu$ L
檢體DNA溶液（總量100 ng） .....	5.0 $\mu$ L
無菌去離子水 .....	3.3 $\mu$ L
總體積 .....	25.0 $\mu$ L

#### 2.5.6.3. Roche LightCycler 確認試驗用

5 $\mu$ M 引子F .....	1.5 $\mu$ L
5 $\mu$ M 引子R .....	1.5 $\mu$ L
3.3 $\mu$ M 探針P .....	1.5 $\mu$ L
LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe .....	2.0 $\mu$ L
25 mM 氯化鎂溶液 .....	2.4 $\mu$ L
檢體DNA溶液（總量100 ng） .....	5.0 $\mu$ L
無菌去離子水 .....	6.1 $\mu$ L
總體積 .....	20.0 $\mu$ L

註5：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<sup>(註6)</sup>

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6：1. 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

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.<sub>260</sub>/O.D.<sub>280</sub> 比值作判斷，其比值應介於1.7~2.0。

## 2.7. 鑑別試驗<sup>(註7)</sup>

### 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°C	5 min
2. 變性	95°C	30 sec
3. 黏接	60°C	30 sec
4. 延展	72°C	30 sec
步驟2至步驟4，共進行35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貓標的基因之PCR測試。檢體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98 bp者，即判定該檢體含有貓成分。

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. 確認試驗：本試驗視需要而操作之。

### 2.8.1. Real-time PCR操作步驟

#### 2.8.1.1. 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2.5.6.2.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  $\mu$ L入PCR反應管中，各別加入檢體DNA溶液 5  $\mu$ L，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。

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

#### 2.8.1.2. 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2.5.6.3.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  $\mu$ L於玻璃毛細管中，各別加入檢體DNA溶液 5  $\mu$ L，再將毛細管置於離心機中，以800  $\times$  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。

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. 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。

#### 2.8.3. 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增幅產物為貓之基因片段，可確認該檢體中含有貓成分。

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。

