

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於食品中花生成分之定性檢驗。
2. 檢驗方法：檢體經 DNA 萃取後，以即時聚合酶鏈反應（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、real-time PCR 試劑配製及檢驗過程皆需有區隔空間，避免交叉污染。Real-time 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. 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；適用於植物 DNA 抽取之市售套組。
 - 2.3.2. Real-time PCR 用^(註2)
 - 2.3.2.1. 鑑別試驗用引子及探針
 - 2.3.2.1.1. 植物共通性基因（標的基因：5.8S ribosomal RNA，供作內部對照基因）
引子 F：5.8SF, 5'-ACTCTCGGCAACGGATATCTYG-3'

引子 R : 5.8SR, 5'- GGCGCAACTTGCGTTCAAAR-3'

探針 P : 5.8S P, 5'- (FAM)-TCGATGGTTCRCGGGATT CTGCAATTCA -
(TAMRA)-3'

PCR 增幅產物大小 116 bp

2.3.2.1.2. 花生 (標的基因 : internal transcribed spacer 1, ITS1)

引子 F : PF, 5'- GAGTCCACAAACACCCGAGG -3'

引子 R : PR, 5'- AGTCGTTCTTAACTCTTGTGGTCA -3'

探針 P : PP, 5'- (FAM)- CCCGTCTCAAACAAGAACAA AACCC -
(TAMRA)-3'

PCR 增幅產物大小 181 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°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. 植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。

2.3.2.2. 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 : 花生。

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、250 mL、500 mL、1000 mL 及 2000 mL。

2.4.7. 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。

2.5. Real-time PCR 溶液之配製^(註4)

2.5.1. ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System 鑑別試驗用

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

2.5.2. Roche LightCycler 鑑別試驗用

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

註 4：Real-time 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5)

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 5：1. 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 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/ μ L 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. 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 $200 \times g$ 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

2.7.1.2. 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 $800 \times g$ 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

2.7.2. 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 增幅產物為花生之基因片段，可確認該檢體中含有花生成分。

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。