

食品中動物性成分檢驗方法—羊成分之定性檢驗 修正總說明

為加強食品中動物性、植物性成分之管理，並依據食品安全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、食品器具、食品容器或包裝及食品用洗潔劑之檢驗，其檢驗方法，經食品檢驗方法諮議會諮議，由中央主管機關定之」，爰修正「食品中動物性成分檢驗方法—羊成分之定性檢驗」，其修正要點如下：

- 一、修正英文名稱。
- 二、刪除一般 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等。
- 三、修正「裝置」中「即時聚合酶鏈反應器」。
- 四、修正「鑑別試驗用引子及探針」。
- 五、修正「對照用物質」。
- 六、修正「檢體 DNA 之製備」中「DNA 之抽取」。
- 七、「確認試驗」修正為「Real-time PCR 鑑別試驗」。
- 八、修正附註及增列參考文獻。
- 九、增修訂部分文字。

食品中動物性成分檢驗方法－羊成分之定性檢驗 修正對照表

修正名稱	現行名稱	說明
Method of Test for Animal-Derived Ingredients in Foods - Qualitative Test of Sheep/Goat Ingredient	Method of Test for Animal-Derived Ingredients in Foods - Qualitative Test of Ovine Ingredients	修正英文名稱。
修正規定	現行規定	說明
<p>1. 適用範圍：本檢驗方法適用於食品中羊成分之定性檢驗。</p> <p>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)分析之方法。</p> <p>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。</p> <p>2.2. 裝置</p> <p>2.2.1. 即時聚合酶鏈反應器：Thermo Fisher Scientific QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR System (QS12K) 或Roche LightCycler，或同級品。</p> <p>2.2.2. 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。</p> <p>2.2.3. 振盪型粉碎機：Retsch MM200，或同級品。</p> <p>2.2.4. 真空乾燥裝置：供DNA乾燥用。</p> <p>2.2.5. 高壓滅菌釜：可達121°C以上者。</p> <p>2.2.6. 無菌操作台。</p> <p>2.2.7. 加熱振盪器：具55°C溫控及振盪功能。</p> <p>2.2.8. 微量冷凍離心機：可達20000×g，並具4°C溫控功能。</p> <p>2.2.9. 離心機：供各式微量離心管離心用。</p> <p>2.2.10. 分光光度計：具波長260 nm、280 nm。</p> <p>2.2.11. 冷凍設備：具冷藏及凍結功能。</p> <p>2.2.12. 旋渦混合器。</p> <p>2.2.13. 酸鹼度測定儀。</p>	<p>1. 適用範圍：本檢驗方法適用於食品中羊肉、羊肚、羊肝等組織器官、羊血、羊乳或其他製品之定性檢驗。</p> <p>2. 檢驗方法：聚合酶鏈反應 (Polymerase chain reaction, PCR)方法。</p> <p>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。</p> <p>2.2. 裝置^(註1)</p> <p>2.2.1. 分光光度計：具波長260 nm、280 nm。</p> <p>2.2.2. 旋渦混合器(Vortex mixer)。</p> <p>2.2.3. 真空乾燥裝置：供DNA乾燥用。</p> <p>2.2.4. 加熱振盪器：具55°C溫控及振盪功能。</p> <p>2.2.5. 微量冷凍離心機：可達20,000×g，並具4°C溫控功能。</p> <p>2.2.6. 離心機：供各式微量離心管離心用。</p> <p>2.2.7. 聚合酶鏈反應器：ABI PRISM 9700 Sequence Detector，或同級品。</p> <p>2.2.8. 即時聚合酶鏈反應器^(註2)：ABI PRISM 7700 Sequence Detector或Roche LightCycler，或同級品。</p> <p>2.2.9. 電泳槽：供DNA電泳用。</p> <p>2.2.10. 振盪型粉碎機。</p> <p>2.2.11. 照相裝置：供拍攝電泳膠片用。</p> <p>2.2.12. 紫外燈箱：具波長312 nm、365 nm紫外燈。</p> <p>2.2.13. 冷凍設備：具冷藏及凍結功能。</p> <p>2.2.14. 高壓滅菌釜。</p> <p>2.2.15. pH測定儀。</p> <p>2.2.16. 水浴裝置：溫差±1.0°C以內者。</p> <p>2.2.17. 天平：最大秤重量為2,000 g，</p>	<p>一、刪除一般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等。</p> <p>二、修正「裝置」中「即時聚合酶鏈反應器」。</p> <p>三、修正「鑑別試驗用引子及探針」。</p> <p>四、修正「對照用物質」。</p> <p>五、修正「檢體DNA之製備」中「DNA之抽取」。</p> <p>六、「確認試驗」修正為「Real-time PCR鑑別試驗」。</p> <p>七、修正附註及增列參考文獻。</p> <p>八、增修訂部分文字。</p>

<p>2.2.14. 水浴裝置：溫差±1°C以內者。</p> <p>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。</p> <p>2.3. 試藥</p> <p>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。</p> <p>2.3.2. Real-time PCR用^(註1)</p> <p>2.3.2.1. 鑑別試驗用引子及探針</p> <p>2.3.2.1.1. 動物類(標的基因：12S ribosomal RNA，供作內部對照基因)</p> <p>引子F：12SF, 5'-CAAACCTGGGATTAGATACCCCACTA-3'</p> <p>引子R：12SR, 5'-ATCGRTTMTAGAACAGGCTCCTCTAG-3'</p> <p>探針P：12SP, 5'-(FAM)-CACCGCCAAATCCTTTGRGTTTTARGC-(TAMRA)-3'</p> <p>PCR增幅產物大小154 bp</p> <p>2.3.2.1.2. 羊(標的基因：satellite)</p> <p>引子F：SGF, 5'-CCTCTCCAGTGCTGACTTGGA-3'</p> <p>引子R：SGR, 5'-AAGCATGACATTGCTGCTAAGTTC-3'</p> <p>探針P：SGP, 5'-(FAM)-CACGTGCATGCCCTCTCGA-(TAMRA)-3'</p> <p>PCR增幅產物大小123 bp</p> <p>註1：</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>2.3.2.2. TaqMan Universal PCR Master Mix (適用於Thermo Fisher Scientific QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR System)</p> <p>本試劑內含real-time PCR所需去氧核</p>	<p>靈敏度為0.1 g；最大稱重量為100 g，靈敏度為1 mg。</p> <p>2.2.18. 無菌操作台。</p> <p>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。</p> <p>註2：確認試驗用。</p> <p>2.3. 試藥</p> <p>2.3.1. DNA抽取用：RNase、乙醇(96-100%)均採分子生物分析級試藥，DNeasy®Tissue套組。</p> <p>2.3.2. 聚合酶鏈反應(PCR)用</p> <p>2.3.2.1. 鑑別試驗用引子^(註3)</p> <p>2.3.2.1.1. 哺乳類及家禽類(標的基因：myostatin，供作內部對照基因)</p> <p>引子F：MYF, 5'-TTGTGCAAATCCTGAGACTCAT-3'</p> <p>引子R：MYR, 5'-ATACCAGTGCCTGGTTCAT-3'</p> <p>PCR增幅產物大小97 bp</p> <p>2.3.2.1.2. 羊(標的基因：satellite)</p> <p>引子F：SGF, 5'-CCTCTCCAGTGCTGACTTGGA-3'</p> <p>引子R：SGR, 5'-AAGCATGACATTGCTGCTAAGTTC-3'</p> <p>PCR增幅產物大小123 bp</p> <p>2.3.2.2. 確認試驗用引子及探針^(註4)</p> <p>2.3.2.2.1. 哺乳類及家禽類(標的基因：myostatin，供作內部對照基因)</p> <p>引子F：MYF, 5'-TTGTGCAAATCCTGAGACTCAT-3'</p> <p>引子R：MYR, 5'-ATACCAGTGCCTGGTTCAT-3'</p> <p>探針P：MYP, 5'-(FAM)-CCCATGAAAACGCGTACAAGGTATACTG-(TAMRA)-3'</p> <p>PCR增幅產物大小97 bp</p> <p>2.3.2.2.2. 羊(標的基因：satellite)</p> <p>引子F：SGF, 5'-CCTCTCCAGTGCTGACTTGGA-3'</p> <p>引子R：SGR, 5'-AAGCATGACATTGCTGCTAAGTTC-3'</p> <p>探針P：SGP, 5'-(FAM)-CACGTGCATGCCCTCTCGA-(TAMRA)-3'</p>	
--	---	--

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：山羊或綿羊組織。

2.4. 器具及材料^(註2)

2.4.1. 吸管(Pipette)：10 µL、20 µL、100 µL、200 µL及1000 µL。

2.4.2. 吸管尖(Pipette tips)：10 µL、20 µL、100 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2：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3)

2.5.1. Thermo Fisher Scientific QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR System鑑別試驗用

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
無菌去離子水	3.3 µL
總體積	25.0 µL

2.5.2. Roche LightCycler鑑別試驗用

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

PCR增幅產物大小 123 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/µL)，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. 電泳用試藥：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

無菌去離子水	6.1 μ L	marker)：100-bp DNA Ladder Marker。	
總體積	20.0 μ L	2.3.4. 對照用物質： <u>羊肉、羊血、羊乳及其組織器官等皆可，或使用行政院衛生署藥物食品檢驗局提供編號pIDM1之參考質體作為對照用物質。</u>	
註3： <u>Real-time PCR</u> 溶液應置於冰浴中配製。		2.4. 器具及材料 ^(註5)	
2.6. 檢體DNA之製備		2.4.1. 吸管(Pipette)：10 μ L、20 μ L、100 μ L、200 μ L及1000 μ L。	
2.6.1. 檢體之處理 ^(註4)		2.4.2. 電泳膠片製作盤。	
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。		2.4.3. 吸管尖頭(Pipette tips)：10 μ L、20 μ L、200 μ L及1000 μ L。	
註4：		2.4.4. 離心管：200 μ L、600 μ L、1.5 mL及2 mL。	
1. 研磨檢體時應於區隔之空間進行， <u>避免交叉污染。</u>		2.4.5. PCR反應管：200 μ L及500 μ L。	
2. 溼狀檢體之乾燥時間可視乾燥程度調整。		2.4.6. PCR玻璃毛細管 ^(註6) ：Roche LightCycler專用。	
2.6.2. DNA之抽取		2.4.7. 玻璃或塑膠瓶：50 mL、100 mL、250 mL、500 mL、1000 mL及2000 mL。	
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。		2.4.8 塑膠離心管：50 mL。	
2.6.3. DNA濃度測定及純度判斷		2.4.9. 過濾膜：孔徑為0.45 μ m，材質為nitro-cellulose。	
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。		註5：使用之塑膠或玻璃器皿均為無DNase污染。	
2.7. Real-time PCR鑑別試驗		註6：儀器使用Roche LightCycler時，才需使用。	
2.7.1. Real-time PCR操作步驟 ^(註5)		2.5. 試劑之配製	
2.7.1.1. Real-time PCR—Thermo Fisher Scientific QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR System		2.5.1. 5倍TBE (Tris-borate-EDTA)緩衝溶液	
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 μ L入PCR反應管中，各別加入檢體DNA溶液5 μ 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		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2.0 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25.0 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。	

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。

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 ×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

註5：上述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。

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增幅產物為之基因片段，可確認該檢體中含有羊成分。

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
Taq 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

檢體為乾燥肉乾或粉(碎)狀者，可直接以粉碎機研磨成細粉。檢體為溼狀肉塊或肉加工品，經冷凍乾燥處理後，再以粉碎機研磨成細粉備用。檢體需貯存於

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. 本檢驗方法之適用範圍係指能夠抽取出DNA者之食品，惟經過高度加工造成DNA過度裂解之食品並不適用。

參考文獻

1. Chikuni, K., Tabata, T., Kosugiyama, M., Monma, M. and Saito, M. 1994. Polymerase chain reaction assay for detection of sheep and goat meats. Meat Sci., 37: 337-345.
2. López-Calleja, I., González, I., Fajardo, V., Martín, I., Hernández, P. E., García, T. and Martín, R. 2007. Quantitative detection of goats' milk in sheep's milk by real-time PCR. Food Control 18: 1466-1473.

乾燥及冷藏或冷凍環境中。

2.6.2. DNA之抽取

採用DNeasy®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8)，置入2 mL離心管。

2.6.2.2. 加入ATL試劑180 µL以及proteinase K 20 µL，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 µL，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 µL，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≥ 6,000 ×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 µL到離心管柱，以≥ 6,000 ×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 µL到離心管柱，以20,000 ×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 µL至離心管柱，於室溫下靜置1分鐘後，再以≥ 6,000 ×g (8,000 rpm)離心1分鐘。

2.6.2.12. 再加入AE試劑100 µL，於室溫下靜置1分鐘後，再以≥ 6,000 ×g (8,000 rpm)離心1分鐘。

2.6.2.13. 將溶出液(約200 µL)收集至已滅菌之1.5 mL離心管，為萃取DNA原液。

2.6.2.14. 依2.6.3.2.節測量DNA濃度並記錄後，置於-20°C冷凍保存。

註8：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/ μ L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。

2.7. 鑑別試驗^(註9)

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，依據引子類別並參照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

<u>步驟</u>	<u>溫度</u>	<u>時間</u>
<u>1.最初變性</u>	<u>95°C</u>	<u>5 min</u>
<u>2.變性</u>	<u>95°C</u>	<u>30 sec</u>
<u>3.黏接</u>		
<u>測試羊基因</u>	<u>60°C</u>	<u>30 sec</u>
<u>測試哺乳類及家禽類基因</u>	<u>54°C</u>	<u>30 sec</u>
<u>4.延展</u>	<u>72°C</u>	<u>30 sec</u>

步驟2至步驟4，共進行40個循環反應。

<u>5.最終延展</u>	<u>72°C</u>	<u>7 min</u>
---------------	-------------	--------------

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123 bp者，即判定該檢體含有羊動物性成分。

註9：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. PCR操作步驟

2.8.1.1. 即時聚合酶鏈反應(Real-time 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 μL入PCR反應管中，再各別加入稀釋過之檢體DNA溶液5 μL，最後將PCR反應管置於離心機中，以200 ×g (1,500 rpm)瞬間離心，移入即時聚合酶鏈反應器，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。

<u>步驟</u>	<u>溫度</u>	<u>時間</u>
<u>1.熱活化</u>	<u>50°C</u>	<u>2 min</u>

2.最初變性	95°C	10 min
--------	------	--------

3.變性	95°C	15 sec
------	------	--------

4.黏接、延展

測試羊基因	60°C	1 min
-------	------	-------

測試哺乳類及家	54°C	1 min
---------	------	-------

禽類基因

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. 即時聚合酶鏈反應(Real-time 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 μL於玻璃毛細管中，再各別加入稀釋過之檢體DNA 5 μL，最後將毛細管置於離心機中，以800 ×g (3,000 rpm)瞬間離心，移入即時聚合酶鏈反應器，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

測試羊基因	60°C	25 sec
-------	------	--------

測試哺乳類及家	54°C	25 sec
---------	------	--------

禽類基因

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. 即時聚合酶鏈反應螢光分析

檢體DNA經即時聚合酶鏈反應後，直接從即時聚合酶鏈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

產物為該測試羊物種之基因片段，可確認該檢體中含有羊物種成分。

附註：

1. 本PCR定性檢驗方法之最低檢測濃度為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。