



【發明摘要】

【中文發明名稱】 檢測芒果過敏原之方法

【英文發明名稱】 METHOD OF DETECTING MANGO ALLERGEN

【中文】

本發明提供一種檢測芒果過敏原之方法，其包含：萃取待測物之 DNA；將該待測物之 DNA 與一第一引子及一第二引子進行聚合酶鏈鎖反應以放大一芒果過敏原 *man i1* 基因；以及檢測經放大的該芒果過敏原 *man i1* 基因。本發明的方法能夠廣泛應用於食品過敏原檢測，以避免對該食物過敏者誤食該食物。

【英文】

A method of detecting mango allergen comprises: extracting a DNA of a sample; performing real time PCR with the DNA of the sample and a first primer and a second primer to amplify a mango allergen *man i1* gene; and detecting the amplified mango allergen *man i1* gene. Applying the method of the present application to allergen detection of foods may avoid a person who is allergic to the food for mistaking

【指定代表圖】 第1圖

【代表圖之符號簡單說明】 S1~S3:步驟。

【特徵化學式】 無。

【發明說明書】

【中文發明名稱】 檢測芒果過敏原之方法

【英文發明名稱】 METHOD OF DETECTING MANGO ALLERGEN

【技術領域】

【0001】 本發明係關於一種檢測方法，特別是一種檢測芒果過敏原之方法。

【先前技術】

【0002】 近年來，許多人在接觸到過敏原時會發生過敏性休克(anaphylactic)反應，生活中常見的過敏原有花粉、花生、甲殼動物、魚類、雞蛋、牛奶、小麥及水果等。隨著食物過敏的患病率逐年上升，全球有5%的成人與8%的孩童受到過敏的影響。在目前研究中，對於海鮮、芒果及牛奶的過敏是在台灣最常見的食物過敏。其中芒果是一種具有甜味、多汁且富含營養的水果，因此常被製造成果汁、果醬、果凍及冰淇淋等食品。也因為芒果的美味及營養，這些產品深受消費者及食物供應商的喜愛。然而，特別是在亞洲地區，芒果是造成許多食物過敏反應的過敏原。因此，亟需要關注芒果過敏的議題。

【0003】 芒果過敏係由直接暴露於芒果過敏原而引發。兩個主要的芒果過敏原為Man I 1及Man I 2，而次要的芒果過敏原為Man I 3。芒果過敏的症狀分成以下兩種：即發性過敏(immediate hypersensitivity)及延遲反應(delayed hypersensitivity)。前者意為過敏反應以重度過敏(anaphylaxis)、血管性水腫(angioedema)、紅斑(erythema)、蕁麻疹(urticaria)以及喘鳴(wheezing)為主，在幾

分鐘內發生。後者過敏反應以接觸性皮炎(contact dermatitis)、眼周邊水腫(periorbital edema)、濕疹性紅疹(eczematous rash)及嘴唇周圍水疱(blister)的形成為主，在2至6小時內發生。然而，過敏並無有效的治療方法，主要的解決方法在於避免個體接觸到過敏原。有必要在食品上清楚標示過敏原。儘管食品上清楚標示過敏原，在共同使用生產線上仍有從在食物製造過程中交叉污染的風險。因此仍有需要開發一種快速且敏感的方法，以鑑定或量化食物中的過敏原。

【0004】 目前過敏原偵測方法一般可以分為兩部分：以蛋白質為基礎的方法以及以DNA為基礎的方法。以蛋白質為基礎的方法包含LC-MS/MS及諸如酵素免疫吸附試驗(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)與側流式免疫分析法(lateral flow immunoassay, LFA)的免疫分析，其具有高敏感度及省時的優點，但需要藉由高技術能力來執行。另一個缺陷是蛋白質的特性，蛋白質不耐熱且相較於DNA更易於降解。抗原編碼序列檢測係由基於放大特定DNA序列的方式以DNA為基礎的方法偵測，例如終端聚合酶連鎖反應(end-point polymerase chain reaction)及即時聚合酶連鎖反應(real-time polymerase chain reaction, qPCR)。PCR是用於偵測目標DNA序列的存在，而qPCR係將PCR與螢光訊號結合以隨時間定量特定DNA序列。即時聚合酶連鎖反應應用於如抗原、致病原及病毒等不同標的。在目前的研究中，Herrero等人使用LNA探針偵測甲殼動物，偵測極限(LOD)為1.25pg。López-Calleja等人使用Taqman探針偵測花生過敏源Ara h2及花生的內轉錄間隔區(internal transcribed spacer, ITS)，測定濃度分別為10 ppm及0.1 ppm。

【0005】 核酸的萃取對於分子生物研究至關重要，在進行qPCR分析時，除了引子及探針的敏感性及特異性之外，分析的結果也取決於DNA的品質。高品質的DNA能夠增加分析的敏感性，並避免qPCR受到抑制。食物中含有許多如蛋

白質、脂質、多醣及多酚類等化合物，這些都有可能嚴重影響到qPCR的結果。在放大DNA之前需要使用適當的方法來移除這些干擾物質。

【0006】 用於植物常見的DNA萃取方法包含以溴化十六烷基三甲銨(Cetyltrimethylammonium bromide, CTAB)為基礎的方法、十二烷基硫酸鈉(Sodium dodecyl sulfate, SDS)法、聚乙烯吡咯酮(polyvinyl-pyrrolidone, PVP)法以及商業套組。經修飾的CTAB法耗時且需要使用如氯仿及酚類等有害的有機溶劑來將DNA從蛋白質分離，但其具有DNA濃度及品質高的優點。SDS及PVP法也用於在DNA萃取期間移除蛋白質、多酚類化合物及多醣類，且通常與有機溶劑結合使用以純化DNA。商業套組通常以矽基基質或磁珠為基礎，如Wizard DNA extraction kit、DNeasy and Wizard kit、QIAamp DNA stool minikit以及NucleoSpin food kit等。商業套組通常較CTAB、PVP及SDS方法快速。然而，其受限於樣品尺寸(例如，20至200 mg)、每一樣品的萃取昂貴且並不適用於每一種食物。

【0007】 因此，仍有需要開發一種同時具有DNA濃度及品質高且敏感性及專一性高的方法檢測方法。

【發明內容】

【0008】 本發明的目的在於開發一種即時聚合酶鏈鎖反應，用以偵測食物中編碼DNA芒果主要的過敏原-man i1之序列。此外，也研究出用於從以植物為基礎的食品中萃取DNA的最佳方法，以得到用於後續qPCR之產率及品質兼具的DNA。本發明的方法能夠廣泛應用於食品過敏原檢測，以避免對該食物過敏者誤食該食物而發生過敏反應的情形，在產業上更具有利用價值。

【0009】 根據本發明之目的，本發明提供一種檢測芒果過敏原之方法，其包含：萃取得測物之DNA；將待測物之DNA與第一引子及第二引子進行即時定量聚合酶鏈鎖反應以放大芒果過敏原man i1基因；以及檢測經放大的該芒果過敏原man i1基因。

【0010】 較佳地，該待測物之DNA的萃取係使用CTAB-PVP法或CTAB-SDS法。

【0011】 較佳地，該方法係選自非專一性化學標定即時聚合酶鏈鎖反應(SYBR Green qPCR)或專一性化學標定即時聚合酶鏈鎖反應(Taqman qPCR)。

【0012】 較佳地，該第一引子及該第二引子的長度為20至30個核苷酸。

【0013】 較佳地，該第一引子為SEQ ID NO:1。

【0014】 較佳地，該第二引子為SEQ ID NO:2。

【0015】 較佳地，該聚合酶鏈鎖反應為即時定量聚合酶鏈鎖反應。

【0016】 較佳地，該聚合酶鏈鎖反應中的引子濃度為300至400 nM。

【0017】 較佳地，該聚合酶鏈鎖反應中的黏合溫度為60至65°C。

【0018】 較佳地，該Taqman qPCR中的探針為SEQ ID NO:7。

【0019】 較佳地，該Taqman qPCR中的探針濃度為150-300 nM。

【0020】 承上所述，本發明之檢測芒果過敏原之方法有下述優點：

【0021】 (1)本發明的方法能夠檢測出待測物中的芒果成分，具體而言，本發明的方法能夠精準檢測出芒果的主要過敏原man i1。

【0022】 (2)本發明的方法在待測物為綜合果汁等食品混合物時，也能檢測出其中芒果的主要過敏原man i1，當產品標示不實或是使用相同生產線造成交叉

汙染時，也能夠經由本發明的方法偵測到過敏原的存在，避免對芒果過敏者誤食而發生過敏反應。

【圖式簡單說明】

【0023】 以下搭配圖式，對於本發明進行進一步說明：

第1圖為本發明之檢測方法的流程圖。

第2圖為本發明之概念的流程圖。

第3圖為引子選擇的示意圖。第3圖的(a)呈現出分析敏感性(DNA濃度：33、100、330、1000、3300以及10000 pg/ μ l)；第3圖的(b)呈現出針對13種水果及蔬菜的分析特異性。

第4圖為說明Ct值高低與樣品中目標量之關係的示意圖。

第5圖為DNA萃取方法選擇的示意圖。第5圖的(a)呈現出兩種DNA萃取方法的DNA品質參數(濃度為260/280以及260/230)；第5圖的(b)呈現出在不同稀釋因數下CTAB-SDS與CTAB-PVP之DNA萃取方法的qPCR結果。

第6圖為說明SYBR Green與Taqman probe之化學標定技術的示意圖。

第7圖為說明Tm值的示意圖。

第8圖為本發明之一實施例中qPCR條件之最佳化的示意圖。第8圖的(a)呈現出黏合溫度的選擇；第8圖的(b)呈現出引子濃度的選擇。

第9圖為本發明之一實施例中分析表現的示意圖。第9圖的(a)呈現出芒果基因體DNA之序列稀釋的校正曲線(濃度為33、100、330、1000、3300以及10000 pg/ μ l)；第9圖的(b)呈現出在鳳梨汁中芒果果肉添加的校正曲線(濃度為0.005、0.01、0.05、0.1、0.5、1、10以及50%)。

第10圖為本發明之另一實施例中qPCR條件之最佳化的示意圖。第10圖的(a)呈現出黏合溫度的選擇；第10圖的(b)呈現出引子濃度的選擇；第10圖的(c)呈現出探針濃度的選擇。

第11圖為本發明之另一實施例中分析表現的示意圖。第11圖的(a)呈現出芒果基因體DNA之序列稀釋的校正曲線(濃度為33、100、330、1000、3300以及10000 pg/μl)；第11圖的(b)呈現出在鳳梨汁中芒果果肉添加的校正曲線(濃度為0.005、0.01、0.05、0.1、0.5、1、10以及50%)。

第12圖為檢測10種果汁樣品之5.8S rRNA及ITS2的結果。

【實施方式】

【0024】使所屬技術領域具有通常知識者理解本發明之檢測芒果過敏原之方法的技術特徵、具體實施方式及效益，下文中將搭配實施例更詳細地進行說明。

【0025】參照第1圖為本發明之檢測方法的流程圖，本發明之檢測芒果過敏原的方法包含：步驟S1：萃取代測物之DNA；步驟S2：將待測物之DNA與引子進行即時定量聚合酶鏈鎖反應以放大芒果過敏原man i1基因以及步驟S3：檢測經放大的該芒果過敏原man i1基因，以鑑別待測物中是否有過敏源man i1的存在。

【0026】為了開發一種檢測芒果過敏原的方法，本發明之概念參照第2圖所示，從DNA萃取、將萃取到的DNA進行PCR確認，以進行後續qPCR分析的條件與方法皆經過一連串的實驗調整參數，以獲得最佳的檢測方法。具體而言，本發明的方法具有特定的DNA萃取方法、qPCR之引子之濃度選擇、化學標定法與反應溫度等。

【0027】 在本發明中，100%芒果汁為將愛文芒果(Irwin mango)果肉倒入攪拌機中攪拌至均質而得，經萃取的芒果基因體DNA用於優化即時聚合酶鏈鎖反應條件。

【0028】 引子的選擇詳述如下。根據芒果主要的抗原Man i1編碼DNA序列設計3對引子對用以放大DNA片段，並計算引子對的特異性(表1)。為避免假陰性(false-negative)結果，依照97年12月17日署授食字第0971800480號公告訂定食品中植物性成分的檢驗方法(芒果成分之定性檢驗)，所有經萃取的DNA以保守植物基因5.8 S核醣體RNA(5.8S rRNA)作為內部對照基因進行檢驗，而內轉錄間隔區2(internal transcribed spacer region 2，ITS 2)則作為標的基因被用來偵測芒果成分的存在。

【0029】 表1

引子	序列 (5'→3')	擴增子長度 (bp)
i4e5	Forward: TCCTTACCGTTGGTATTGAATTAGAAT	72
	Reverse: GGGCCGAAATAACAACCTTCTT	
	probe: FAM - TGTTGTTTCAGGGTGGTGC - TAMRA	
e5i5	Forward: TGGAATTGTTGAGGGTCTTATGAC	68
	Reverse: GCACCCATGTAGCCAATAGCTT	
e6i6	Forward: GCCGCATCCTTCAACATCA	68
	Reverse: ATCAACCAACCAATCGCACAT	
5.8S rRNA	Forward: ACTCTCGGCAACGGATATCTYG	116
	Reverse: GGCGCAACTTGCGTTCAAAR	
ITS2	Forward: TCTGAGTTCTCGGTGACGCTTTC	116
	Reverse: CCGGTCTCTAGGGTCGAAGAGC	

【0030】 開發qPCR分析有兩個值得注意的關鍵點：(1)引子的敏感性及特異性以及(2)DNA的品質。本發明根據芒果man i1編碼DNA序列設計三組引子對，其包含引子i4e5、e5i5以及e6i6。為了測試這些引子的敏感性，使用各種濃

度的芒果DNA (33至10000 pg/ μ l)進行qPCR，結果示於第3圖的(a)及表2中。參照第4圖之說明， C_T 值為循環閾值，表示螢光訊號超過閾值所需的循環數(即，超出背景濃度所需的循環數)，一般而言， C_T 值越小，模板DNA的起始複製數越多，也就是樣品中有較多的目標存在。根據表2及第3圖的(a)所示之結果，指出在這些引子當中並沒有明顯差異，即這些引子具有相似的敏感性。

【0031】 表2

引子	迴歸分析	R^2	效率(efficiency)
i4e5	$y = -3.1889x + 40.67$	0.9952	105.87%
e5i5	$y = -3.122x + 40.383$	0.9863	109.08%
e6i6	$y = -3.4191x + 41.513$	0.9951	96.10%

【0032】 另外，為了測試這些引子的特異性，以13種蔬菜及水果(芒果、木瓜、番茄、葡萄、香蕉、西瓜、芹菜、梨、胡蘿蔔、水蜜桃、蘋果、鳳梨及芭樂)對這些引子的特異性進行測試，結果示於第3圖的(b)中。根據 $\Delta C_T = C_{T(\text{sample})} - C_{T(\text{blank})}$ 指出當 ΔC_T 高時，表示該引子對測試樣品有非特異性訊號。第3圖的(b)中所示之結果指出，由於i4e5對其他13種測試的蔬菜及水果提供相較於另外兩組引子低的 ΔC_T ，i4e5相較於其他引子更具有特異性。因此，本發明選擇將引子i4e5用於後續的實驗。

【0033】 DNA的萃取可以使用CTAB-PVP法或CTAB-SDS法。其中，CTAB-PVP法係根據Pafundo等人所使用的方式進行一些修改。首先，將1或2 mL樣品離心(13000 g，10分鐘)並移除上清液。加入500 μ L萃取緩衝液(2% CTAB、Tris 0.1 M、20 mM EDTA、1.4 M NaCl、1% PVP)，並使用5M NaCl將鹽濃度調整至2 M。以65°C培養30分鐘之後將樣品在13000 g、20°C的條件下離心10分鐘。

以PCIA溶液(苯酚：氯仿：異戊醇=25：24：1)萃取上清液並離心(13000 g、20°C、10分鐘)。進一步以CIA溶液(氯仿：異戊醇=24：1)萃取上清液並離心(13000 g、20°C、10分鐘)。然後在上清液中加入1.5 µL RNase(20 mg/mL)並在37°C下培養30分鐘。加入2體積的100%乙醇之後，將樣品儲存於-20°C隔夜以沉澱DNA之後離心(13000 g、4°C、10分鐘)。將沈澱物(pellet)以70%乙醇清洗兩次並以真空乾燥離心機乾燥。DNA之品質使用NanoDrop 2000 (thermo fisher scientific)評估。經萃取的DNA直到使用前均在-20°C下儲存。

【0034】 CTAB-SDS法的DNA萃取方法係以經修飾的CTAB法為基礎並進行一些修改。首先，將1或2 mL樣品離心(13000 g，10分鐘)並移除上清液。加入400 µL TES 緩衝液並在60°C下培養1小時。接著，使用5 M NaCl將鹽濃度調整至1.4 M，以及加入10% CTAB至最終濃度等於2% CTAB並在65°C下培養30分鐘。以13000 g、20°C的條件下離心10分鐘之後，以等體積的PCIA溶液(苯酚：氯仿：異戊醇=25：24：1)萃取上清液並離心(13000 g、20°C、10分鐘)。進一步以等體積的CIA溶液(氯仿：異戊醇=24：1)萃取上清液並離心(13000 g、20°C、10分鐘)。然後在上清液中加入1.5 µL RNase(20 mg/mL)並在37°C下培養30分鐘。加入2體積的100%乙醇以隔夜沉澱DNA之後，將樣品離心(13000 g、4°C、10分鐘)，然後以70%乙醇清洗沈澱物兩次並以真空乾燥離心機乾燥。DNA之品質使用NanoDrop 2000 (thermo fisher scientific)評估。經萃取的DNA直到使用前均在-20°C下儲存。

【0035】 根據上述方法，DNA品質主要取決於DNA萃取方法。因此，為了比較CTAB-SDS法與CTAB-PVP法，本發明對DNA濃度計算參數。具體而言，核酸的純度主要是評估260/280比值及260/230比值。結果示於表3及第5圖。

CTAB-PVP法的DNA濃度高於CTAB-SDS法的DNA濃度，但如第5圖的(a)所示，在260/280比值及260/230比值上這兩種方法並沒有明顯差異。進一步地，將藉由這兩種方法萃取的DNA樣品進行序列稀釋(10x、20x、50x、100x、250x)以建立其對應的劑量曲線。如第5圖的(b)所示，結果指出由CTAB-SDS法萃取的樣品相較於由CTAB-PVP萃取的樣品呈現出較佳的線性。因此，選擇使用CTAB-SDS法進行後續實驗。

【0036】 表3

方法	迴歸分析	R ²
CTAB-PVP	$y = 3.2294x + 23.138$	0.9698
CTAB-SDS	$y = 2.2979x + 25.22$	0.8746

【0037】 qPCR依其標定螢光物又分成非專一性化學標定(SYBR Green)與專一性化學標定(TaqMan probe)，參照第6圖之說明，SYBR Green螢光染劑會嵌入雙股DNA的minor groove中，隨著PCR的過程中在每一個循環結束時偵測螢光強弱，即可得知PCR產物的含量。人工合成的TaqMan probe為一種在兩端標記不同螢光物質的寡核苷酸(例如第6圖中的F及Q)，當F及Q的距離太近時會遮蔽彼此的螢光，而在DNA複製之前無法偵測到螢光，然而當DNA進行複製時，水解的過程使兩種螢光物質分開而可以測得螢光，螢光越強代表PCR產物越多。

【0038】 在本發明的一實施例中，使用SYBR Green進行化學標定，其中最佳的引子組係與72 bp的擴增子用於放大man i1編碼DNA片段。由Genomics(台灣)合成正向引子(5'-TCCTTA CCGTTGGTATTGAATTAGAAT-3')及反向引子(5'-AAGAAGGTTGTTATTT CGGCCC -3')。反應混合物(20 μL)含有10 μL Fast SYBR™ Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific, USA)、每個引子各400 nM、

2 μ L基因體DNA以及蒸餾水。以ABI StepOne™ Real-time PCR System (Applied Biosystems, Life Technologies Holding Pte Ltd., Singapore)放大及偵測目標DNA，且最佳的qPCR條件為：在95°C 20秒下進行起始變性、在95°C 3秒及62°C 30秒之間進行40個循環。對於每一個樣品，在60至95°C的溫度下以0.3°C的間隔進行連續的解鏈曲線分析以驗證擴增子的特異性。

【0039】為了開發qPCR分析，也需要最佳化qPCR條件。參照第7圖之說明， T_m 值表示DNA的解鏈溫度，具體指的是將雙股DNA加熱使其結構降解成單股DNA的變性過程中，紫外吸收值達到最大值的50%時的溫度。

【0040】本發明的qPCR之黏合溫度的分析結果示於表4及第8圖的(a)，本實施例使用58°C、60°C、62°C以及64°C的黏合溫度並比較其效率，其中在黏合溫度為62°C時具有102.7%的效率，也就是說本實施例最佳的退火溫度為62°C。

【0041】表4

退火溫度(°C)	迴歸分析	R^2	效率(efficiency)%
58	$y = -3.3535x + 43.412$	0.9869	98.6
60	$y = -3.8808x + 44.525$	0.999	81.0
62	$y = -3.3466x + 41.916$	0.9883	102.7
64	$y = -3.3964x + 43.02$	0.9746	96.98

【0042】在引子濃度之選擇的分析中，結果示於表5及在第8圖的(b)，本實施例使用200 nM、400 nM以及600 nM的引子濃度並比較其效率，其中以引子qPCR為400 nM時具有103.4%的效率最佳，也就是說本實施例最佳的引子濃度為400 nM。

【0043】表5

引子濃度(nM)	迴歸分析	R ²	效率(efficiency)%
200	y= -3.5129x+43.24	0.9978	92.6
400	y= -3.2882x+41.648	0.9752	103.4
600	y= -3.7026x+42.886	0.9912	86.2

【0044】 因此，根據上述結果，本實施例使用62°C之黏合(annealing)溫度及400 nM之引子濃度。為了測試本實施例之方法的敏感性，分別將本實施例的方法用於測試經稀釋的芒果DNA及摻有鳳梨汁的芒果(0.001-50%)。根據第4圖所示的結果，第9圖的(a)指出對於經稀釋的DNA之線性範圍為33-10000 pg/μL，且偵測極限(LOD) 33 pg/μL。另一方面，第9圖的(b)指出檢測鳳梨汁中之芒果果肉的線性範圍為0.005%-50%，且偵測極限0.005%(50 ppm)。

【0045】 在本發明的另一實施例中，使用TaqMan probe進行化學標定，在最佳化qPCR條件中，黏合溫度的分析使用58°C、60°C、62°C以及64°C的黏合溫度並比較其效率，結果示於表6及第10圖的(a)，其中在黏合溫度為58°C時，無法檢測到最低濃度DNA(10 pg/mL)，故先捨去。一般qPCR的效率(efficiency)建議選擇落於90-110%，故針對剩下3個黏合溫度，唯有60°C時具有90.12%的效率，落在此範圍中，也就是說本實施例最佳的黏合溫度為60°C。

【0046】 表6

退火溫度(°C)	迴歸分析	R ²	效率(efficiency)%
58	y= -3.3147x+44.58	0.9837	100.30
60	y= -3.5838x+44.314	0.9948	90.12
62	y= -3.5958x+44.217	0.9833	89.72
64	y= -2.7184x+48.894	0.8914	133.27

【0047】 在引子濃度之選擇的分析中，結果示於表7及在第10圖的(b)，本實施例中使用200 nM、400 nM以及600 nM的引子濃度並比較其效率，其中引子濃度為200 nM時其效率為111.27%超出建議範圍，而引子濃度為400 nM及600 nM皆在建議範圍中。相對引子濃度600 nM，引子濃度400 nM具有較高的R²值0.9948，代表具較好之線性趨勢，也就是說本實施例最佳的引子濃度為400 nM。

【0048】 表7

引子濃度(nM)	迴歸分析	R ²	效率(efficiency)%
200	y= -3.0785x+42.611	0.9837	111.27
400	y= -3.5835x+44.314	0.9948	90.13
600	y= -3.118x+42.982	0.9709	109.28

【0049】 此外，參照第10圖的(c)擴增曲線圖之結果，在cycle數為40時，螢光訊號(ΔRn值)隨探針濃度上升而上升，但探針濃度250nM與300nM無顯著差異，為節省成本，故本實施例選擇250 nM之探針濃度進行後續分析。

【0050】 因此，根據上述結果，本實施例使用60°C之黏合(annealing)溫度、250 nM之探針濃度以及400 nM之引子濃度。為了測試本實施例之方法的敏感性，分別將本發明的方法用於測試經稀釋的芒果DNA及摻有鳳梨汁的芒果(0.001-50%)。根據第4圖所示的結果，第11圖的(a)指出對於經稀釋的DNA之線性範圍為10-10000 pg/μL，且偵測極限(LOD)為10 pg/μL。另一方面，第11圖的(b)指出檢測鳳梨汁中之芒果果肉的線性範圍為0.005%-50%，且偵測極限0.005%(50 ppm)。

【0051】 實際測試10種果汁樣品結果如下表8及第12圖所示，本發明的方法能夠從含有芒果的樣品1至4中檢測出芒果成分，樣品5中雖也含有芒果成分，

然而其果汁含量小於10%且果汁中又僅有7%的芒果汁，研判樣品5的芒果汁含量過低，已超出本發明之方法的檢測極限。另一方面，在無芒果成分的樣品6至10中則未檢測出芒果成分，由此可見本發明的方法能夠準確從各種果汁樣品中檢測出其是否含有芒果成分。

【0052】 表8

樣品	果汁含量	成分	5.8S rRNA	ITS2	SYBR	Taqman
					Green	
					Man i1	Man i1
1	100%	芒果、蘋果、 鳳梨、檸檬	+	+	+	+
2	100%	芒果、蘋果	+	+	+	+
3	100%	50%蔬菜 50%果汁(含芒果)	+	+	+	+
4	37%	芒果	+	+	+	+
5	<10%	7%芒果、蘋果	+	+	-	-
6	100%	橘子	+	-	-	-
7	100%	50%蔬菜 50%果汁(無芒果)	+	-	-	-
8	37%	芭樂、檸檬	+	-	-	-
9	30%	蔬菜、水果	+	-	-	-
10	100%	鳳梨	+	+	-	-

【0053】 綜上所述，本發明開發一種用於偵測食物中主要的芒果過敏原 Man i1 的 qPCR 分析。在本發明中，經比較後選擇使用 CTAB-SDS 作為 DNA 萃取方法。然後使用 13 種蔬菜及水果測試三組引子的特異性，由於 i4e5 僅與西瓜、芹菜及鳳梨有輕微反應，可視為其與芒果具有最佳的特異性而選擇使用引子 i4e5 作為本發明之方法所使用的引子。進一步地，藉由偵測芒果基因體 DNA 及鳳梨果汁中的芒果果肉來評估本發明所開發之 qPCR 方法的敏感性。在經稀釋的芒果基因體 DNA 的檢測中，SYBR Green qPCR 的檢測極限為為 33 pg/μL 且線性範圍為 33-10000 pg/μL；而 Taqman qPCR 的檢測極限為 10 pg/μL 且線性範圍為 10-10000 pg/μL。在鳳梨果汁中的芒果果肉之測試中，兩個方法的檢測極限皆為為 0.005% (50 ppm)，且線性範圍皆為 0.005%-50%。因此，本發明所開發的方法具有可用於特異性檢測加工食品中芒果過敏原 DNA 的殘留之潛力。

【0054】 以上所述僅為舉例性，而非為限制性者。任何未脫離本發明之精神與範疇，而對其進行之等效修改或變更，均應包含於申請專利範圍中。

【符號說明】

【0055】 S1~S3: 步驟。

序列表

<110> 國立中興大學

<120> 檢測芒果過敏原之方法

<160> 7

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 正向引子

<400> 1

tcctaccgt tggattgaa ttagaat

27

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反向引子

<400> 2

gggccgaaat aacaaccttc tt

22

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 正向引子

<400> 3

tggaattgt gaggtctta tgac

24

<210> 4

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反向引子

<400> 4

gcacccatgt agccaatagc tt

22

<210> 5

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 正向引子

<400> 5

gccgcatcct tcaacatca

19

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反向引子

<400> 6

atcaaccaac caatcgaca t

21

<210> 7

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 探針

<400> 7

fam - tgttggtcag ggtggtgc - tamra

18

【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種檢測芒果過敏原之方法，其包含：

萃取一待測物之 DNA；

將該待測物之 DNA 與一第一引子及一第二引子進行聚合酶鏈鎖反應以放大一芒果過敏原 man i1 基因；以及

檢測經放大的該芒果過敏原 man i1 基因。

【請求項2】 如請求項 1 所述之方法，其中該方法係選自非專一性化學標定即時聚合酶鏈鎖反應(SYBR Green qPCR)或專一性化學標定即時聚合酶鏈鎖反應(Taqman qPCR)。

【請求項3】 如請求項 1 所述之方法，其中該待測物之 DNA 的萃取係使用 CTAB-PVP 法或 CTAB-SDS 法。

【請求項4】 如請求項 1 所述之方法，其中該第一引子及該第二引子的長度為 25 至 30 個核苷酸。

【請求項5】 如請求項 1 所述之方法，其中該第一引子為 SEQ ID NO:1。

【請求項6】 如請求項 1 所述之方法，其中該第二引子為 SEQ ID NO:2。

【請求項7】 如請求項 1 所述之方法，其中該聚合酶鏈鎖反應為即時定量聚合酶鏈鎖反應。

【請求項8】 如請求項 1 所述之方法，其中該聚合酶鏈鎖反應中的引子濃度為 300 至 400 nM。

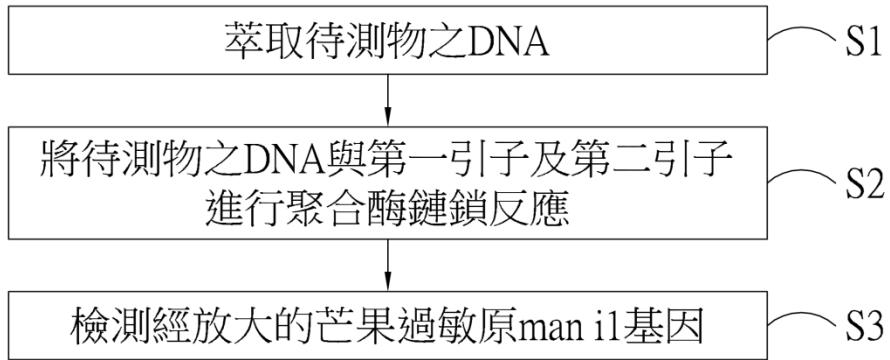
【請求項9】 如請求項 1 所述之方法，其中該聚合酶鏈鎖反應中的黏合溫度為 60 至 65°C。

【請求項10】 如請求項 2 所述之方法，其中 Taqman qPCR 中的探針為 SEQ

ID NO:7。

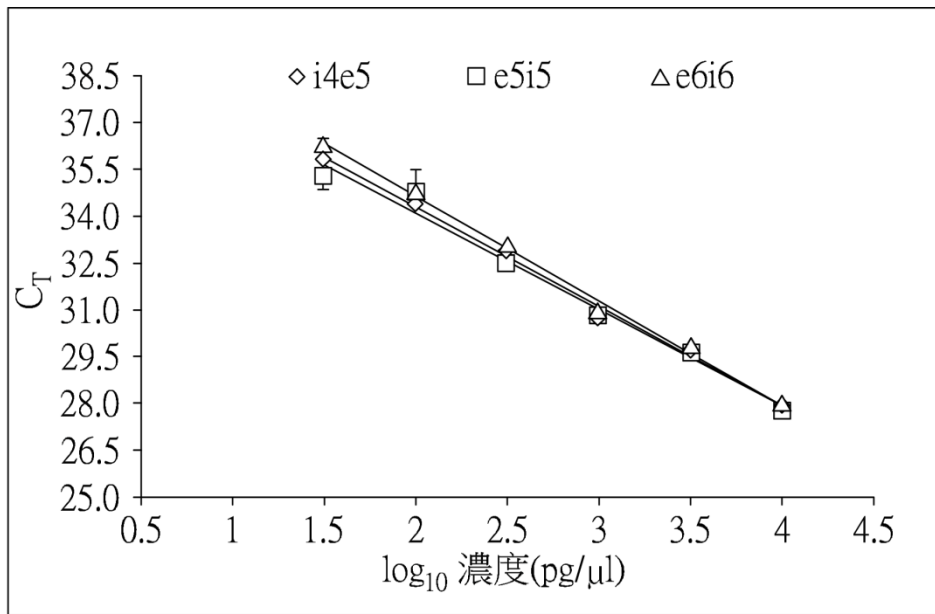
【請求項11】 如請求項 10 所述之方法，其中 Taqman qPCR 中的探針濃度為 150-300 nM。

【發明圖式】

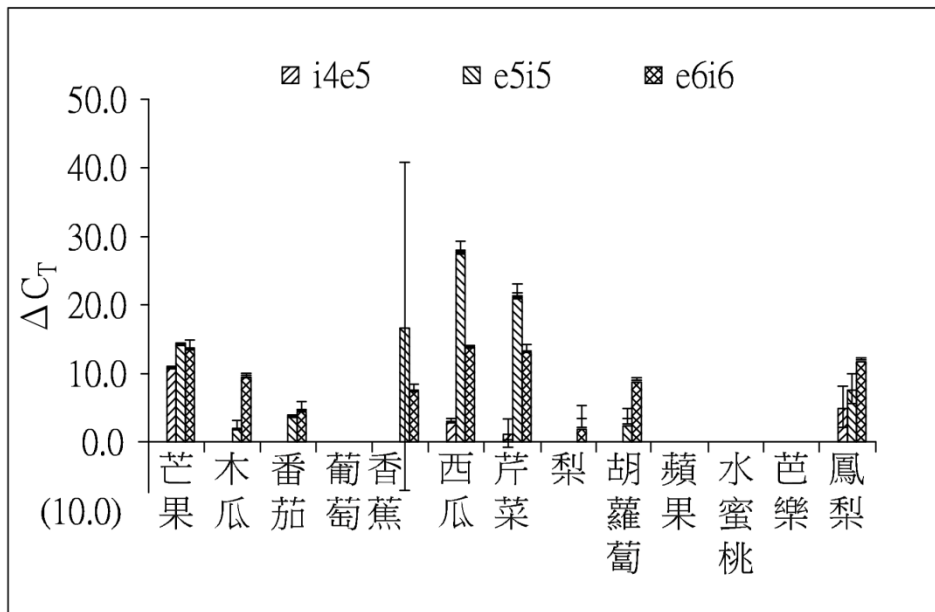


第 1 圖

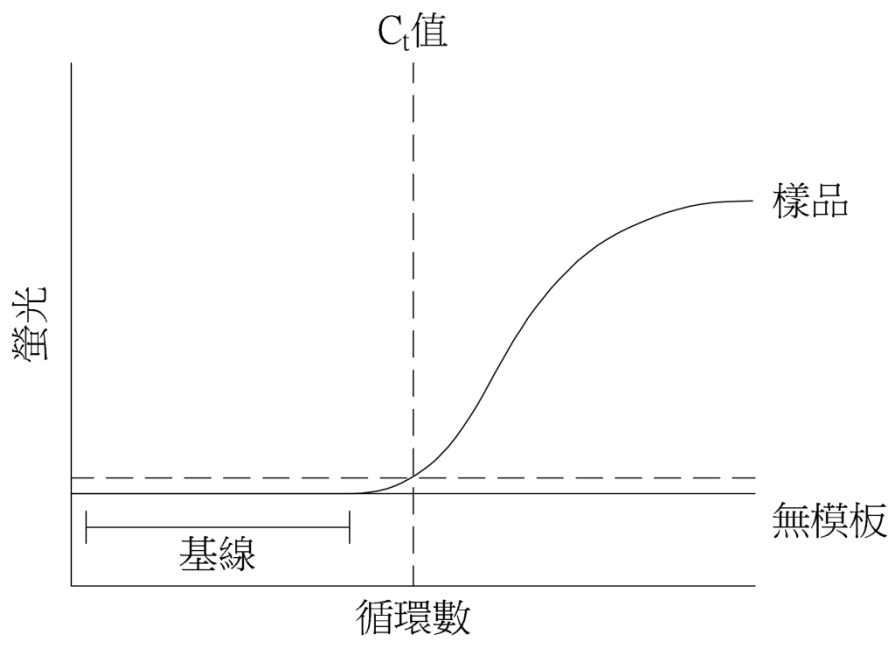
(a)



(b)

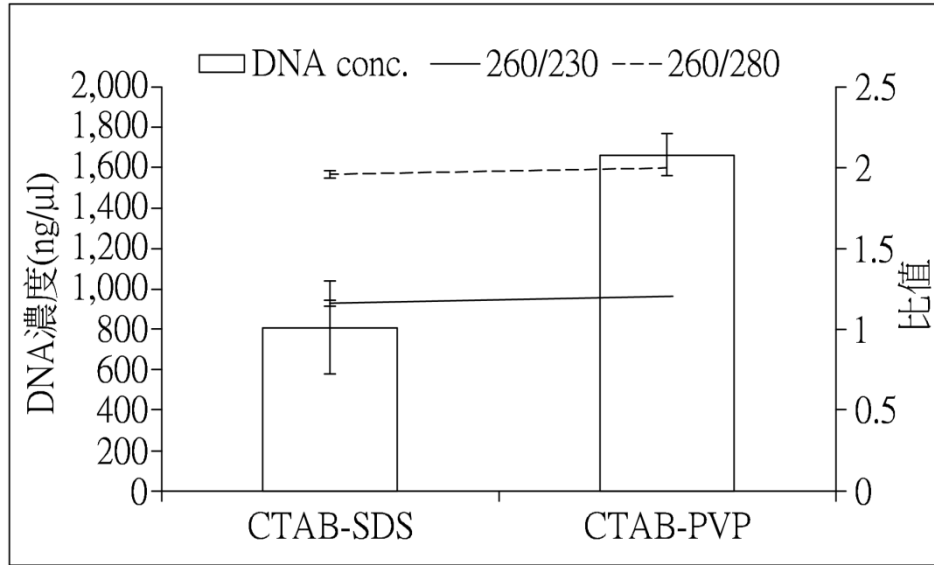


第 3 圖

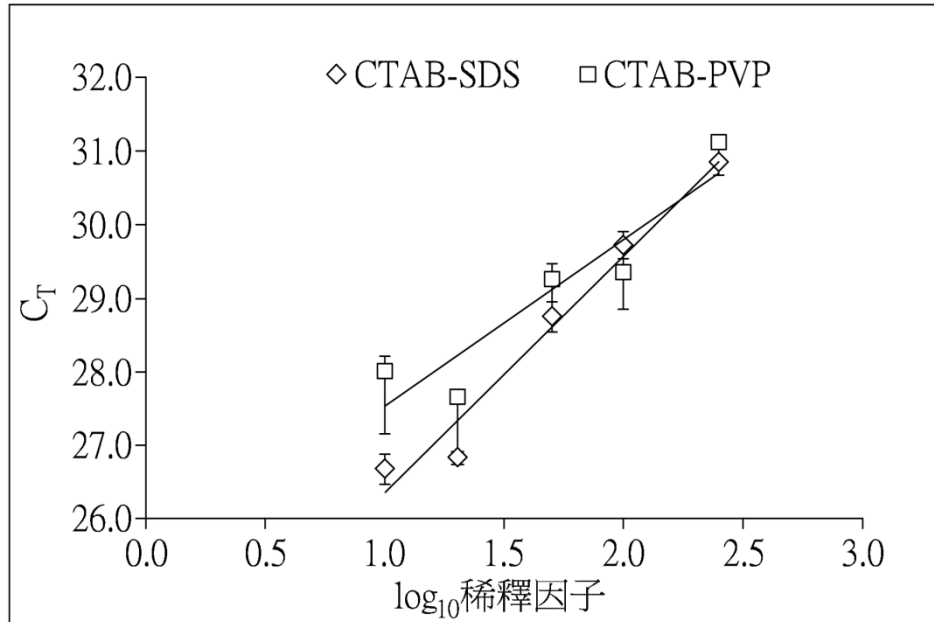


第 4 圖

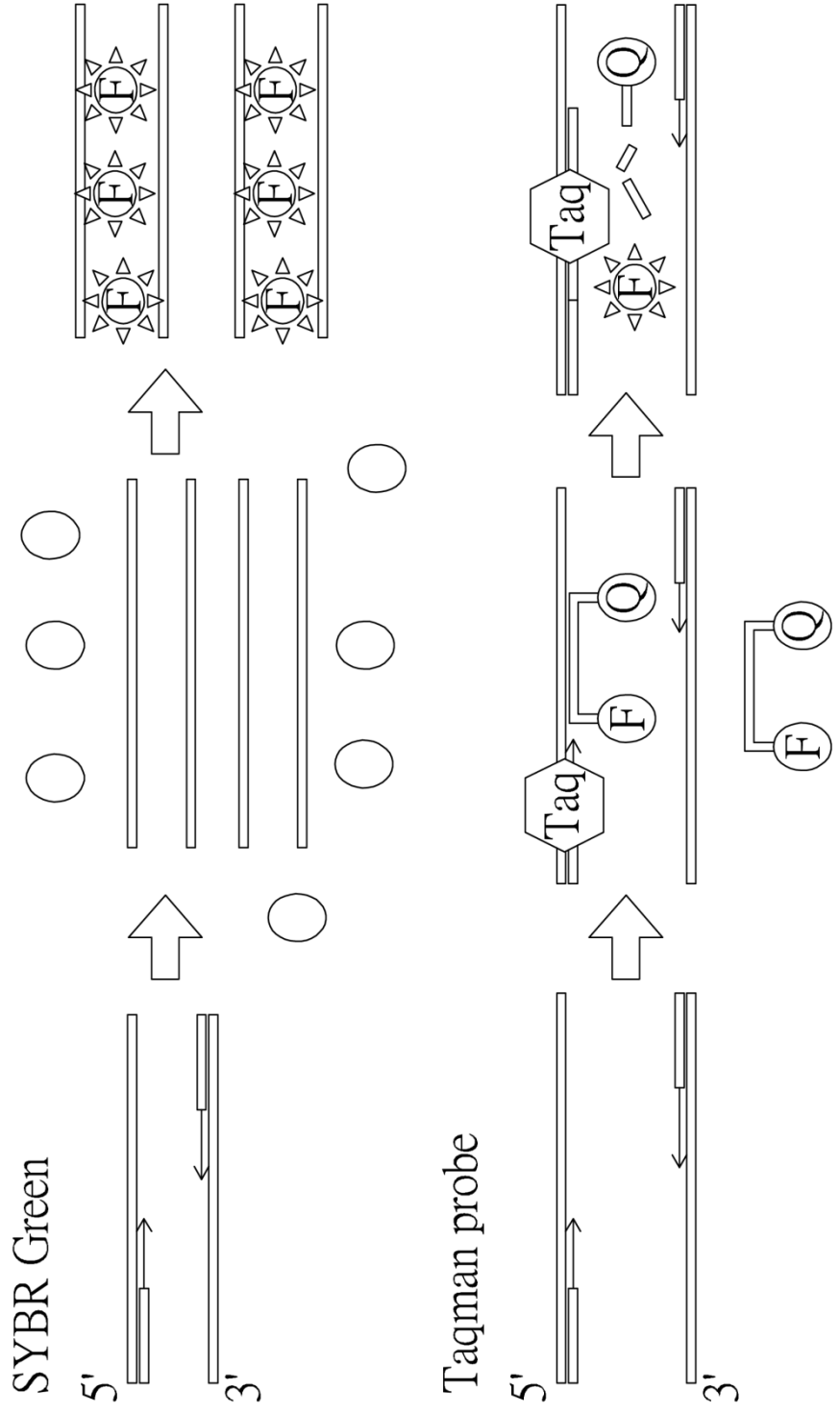
(a)



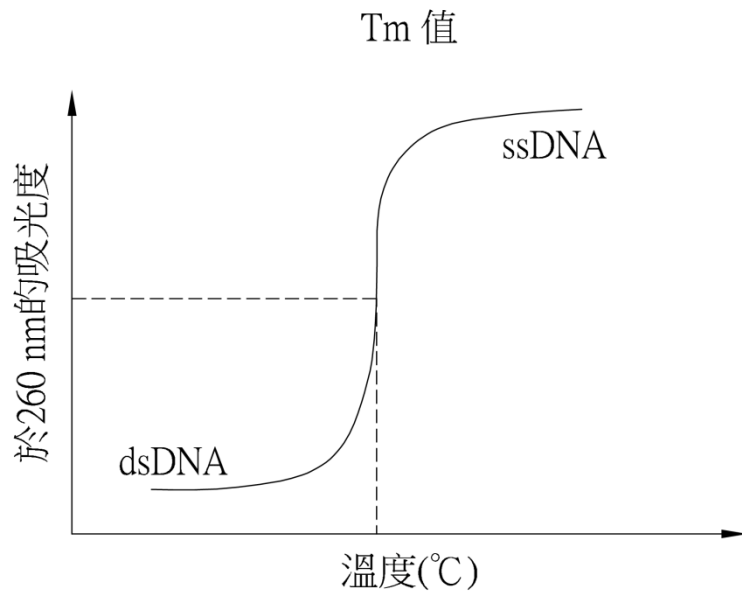
(b)



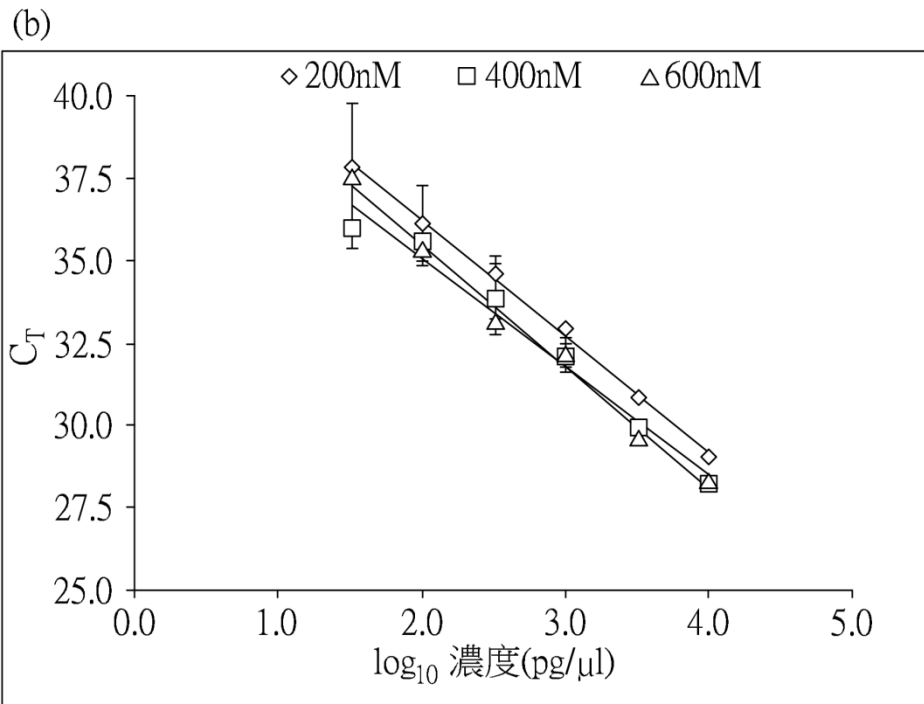
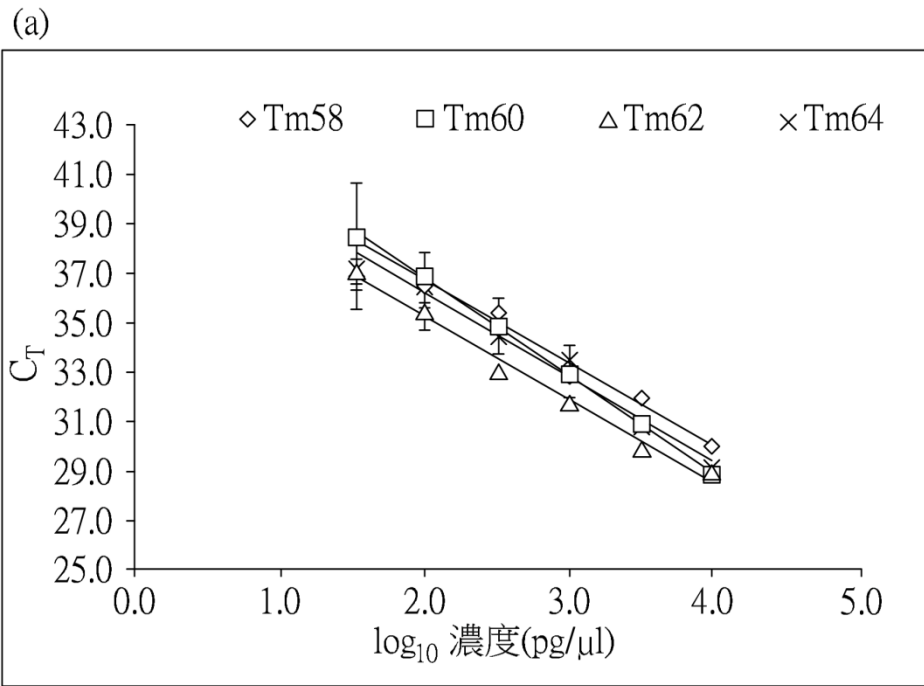
第 5 圖



第 6 圖

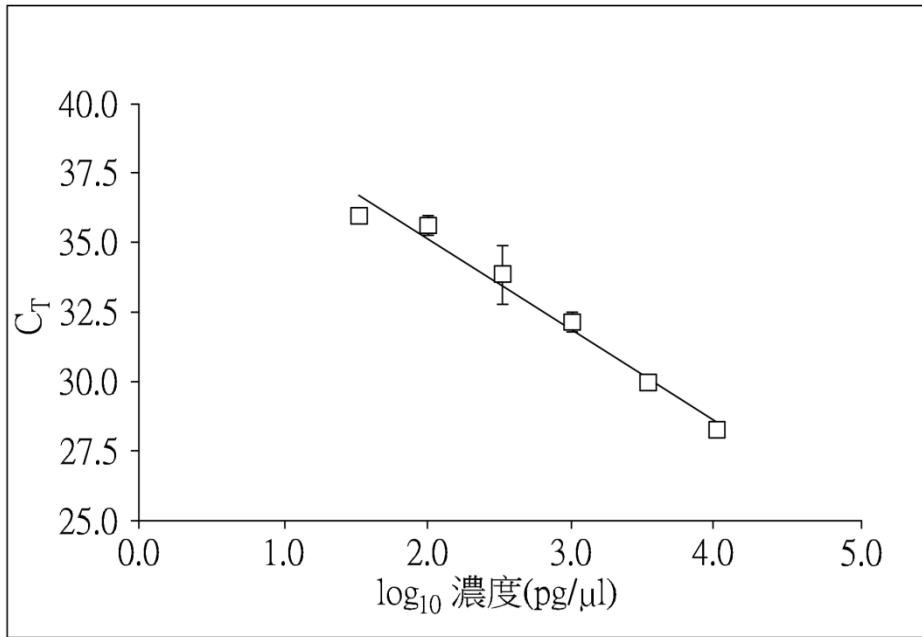


第 7 圖

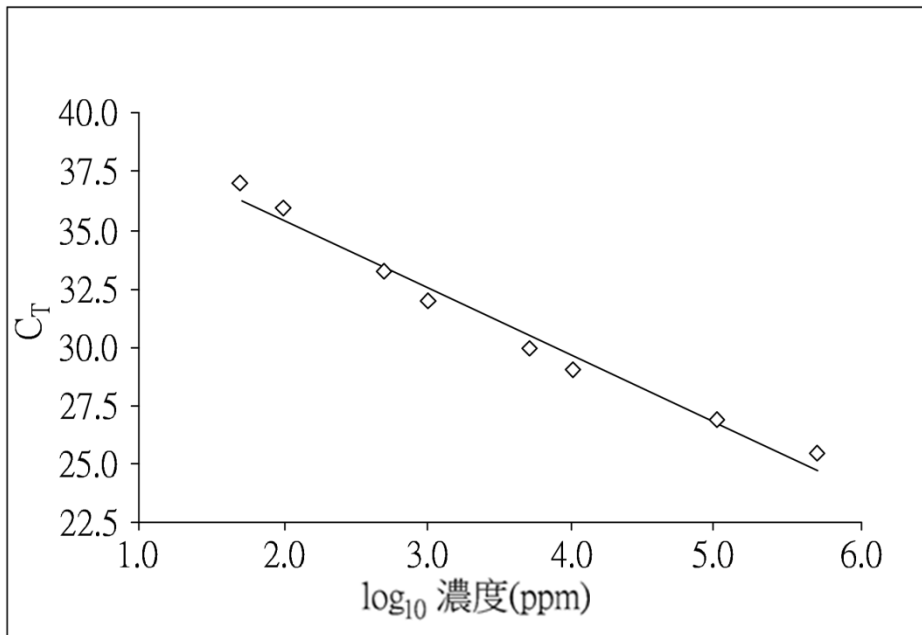


第 8 圖

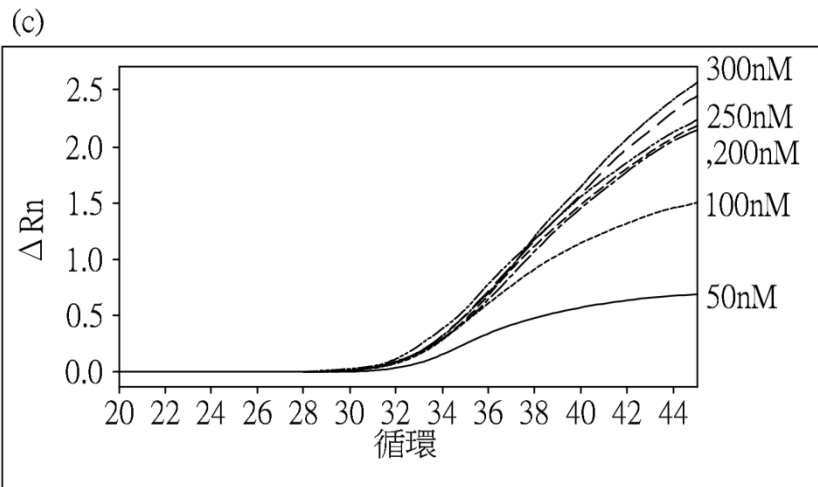
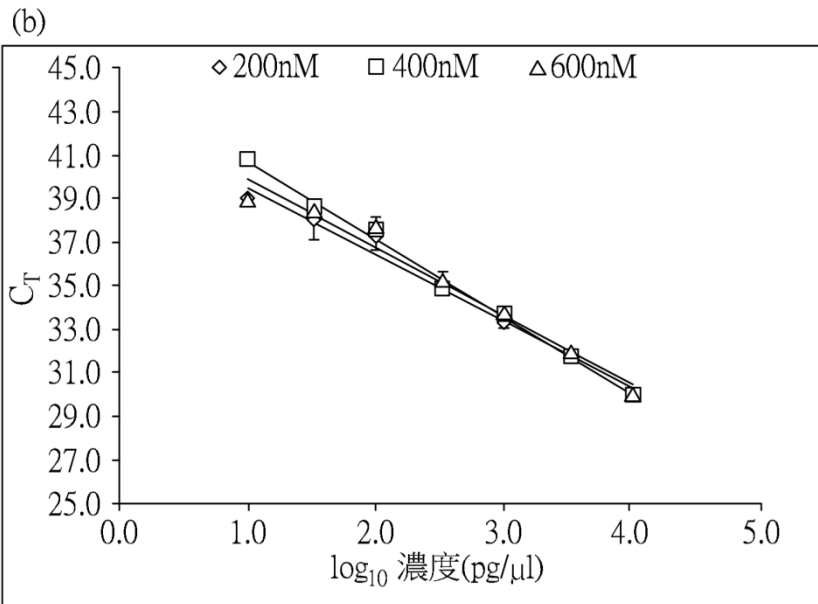
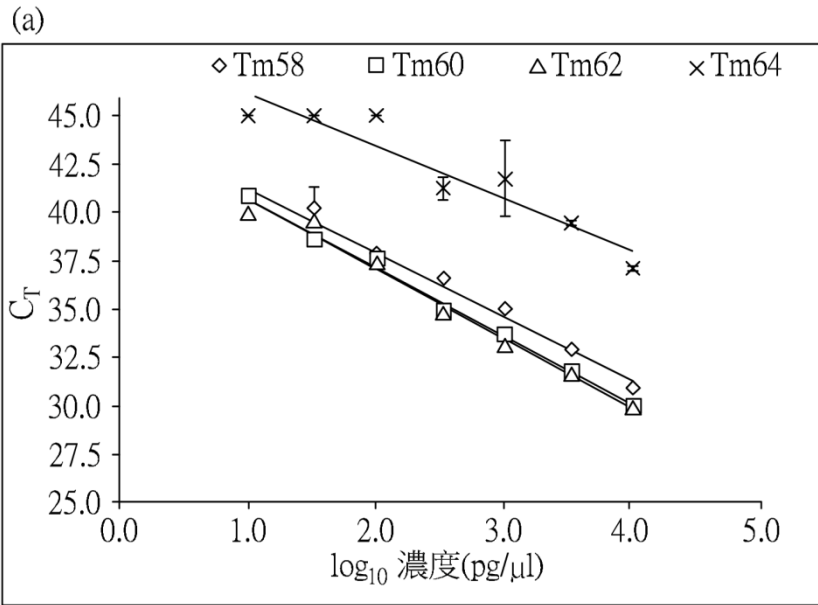
(a)



(b)

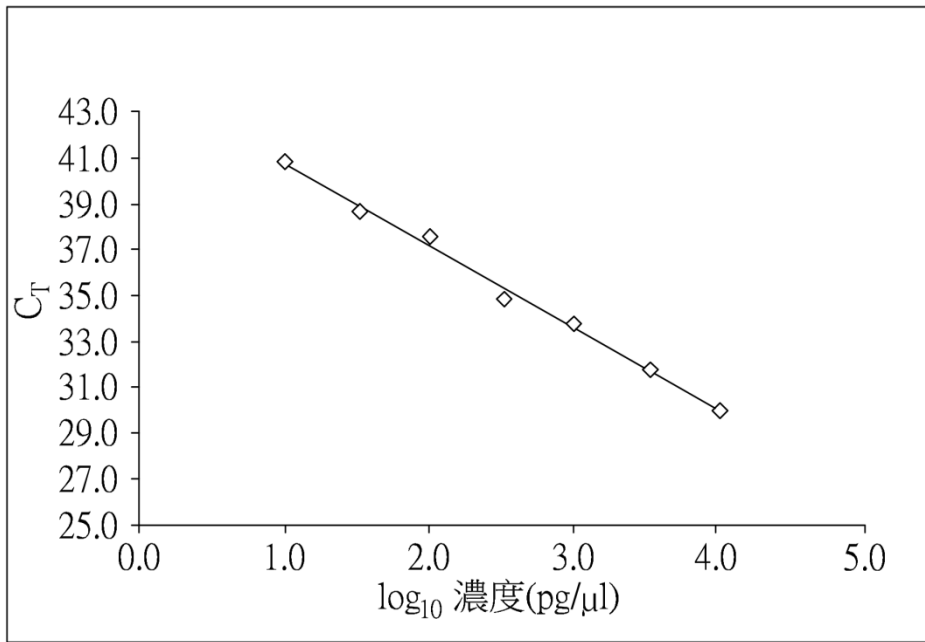


第 9 圖

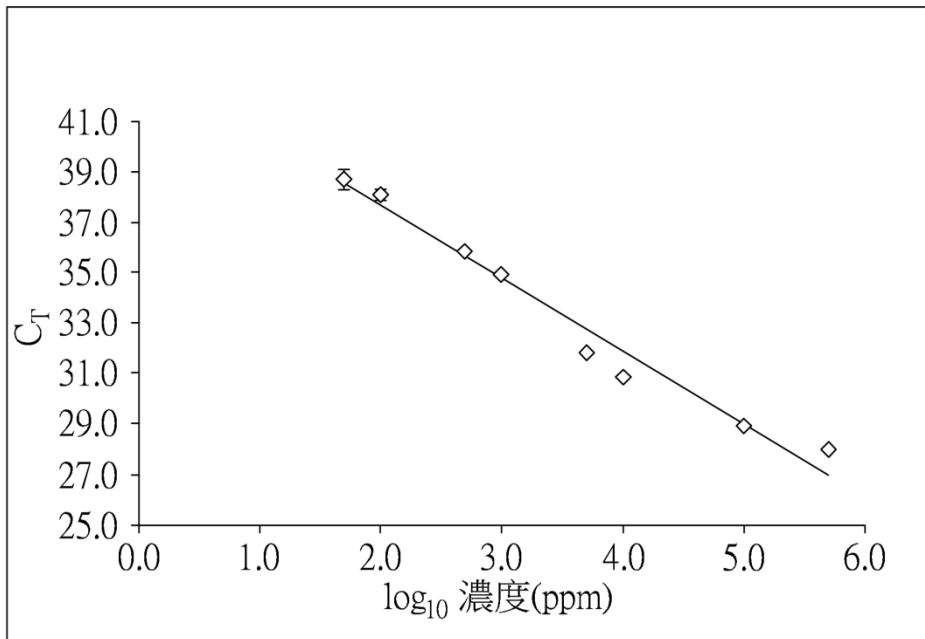


第 10 圖

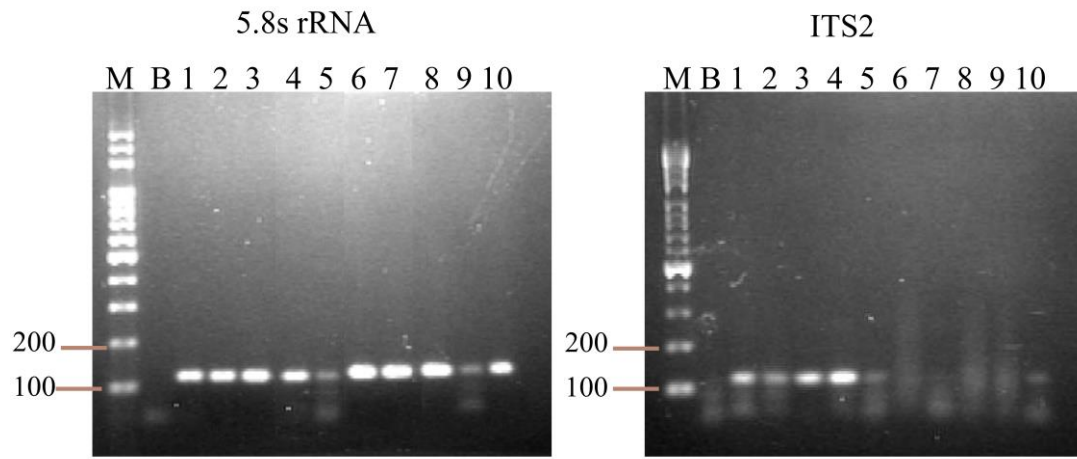
(a)



(b)



第 11 圖



第 12 圖