

食品微生物之檢驗方法－乳酸菌－嗜酸乳酸桿菌之檢驗

Methods of Test for Food Microorganisms – Test of Lactic Acid Bacteria – *Lactobacillus acidophilus*

1. 適用範圍：本方法適用於食品中嗜酸乳酸桿菌 (*Lactobacillus acidophilus*) 之菌種鑑別。
2. 檢驗方法：將分離純化後之菌株，經 DNA 萃取後，以即時聚合酶鏈反應 (real-time polymerase chain reaction, real-time PCR) 鑑別菌種之方法。
 - 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 real-time PCR 等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：Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System，或同級品。
 - 2.2.2. 高壓滅菌釜。
 - 2.2.3. 無菌操作台。
 - 2.2.4. 加熱振盪器：具溫控及振盪功能。
 - 2.2.5. 微量冷凍離心機 (Micro refrigerated centrifuge)：可達 20000 × g，並具 4°C 溫控功能。
 - 2.2.6. 離心機：供各式微量離心管離心用。
 - 2.2.7. 分光光度計：具波長 260 nm、280 nm。
 - 2.2.8. 冷凍設備：具冷藏及凍結 (-20°C) 功能。
 - 2.2.9. 旋渦混合器 (Vortex mixer)。
 - 2.2.10. 酸鹼度測定儀 (pH meter)。
 - 2.2.11. 水浴裝置：溫差 ±1°C 以內者。
 - 2.2.12. 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，未使用或未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：適用於革蘭氏陽性細菌 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

Lactobacillus acidophilus (標的基因: *tuf*)

引子 F：5'-GGAAGCTCAAGACCAAATCATG-3'

引子 R：5'-CTTCTTCAAACATAAACTTGTG-3'

探針 P：5'-(FAM)-TCAACACCACGAAGCAATACACCAAC
G-(BHQ1)-3'

Real-time PCR 增幅產物大小 397

註 2：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 Black Hole Quencher- 1 (BHQ1)標記。

2.3.2.2. TaqMan® Fast Reagents Starter Kit (適用於 Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR 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。

2.3.3. 對照用物質：*Lactobacillus acidophilus* 參考菌株或其 DNA。

2.4. 器具及材料^(註3)

2.4.1. 微量吸管(Micropipette)：10 µL、20 µL、100 µL、200 µL 及 1000 µL。

2.4.2. 吸管尖頭(Pipette tip)：可滅菌。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. Real-time PCR 反應管：100 µL。

2.4.5. Real-time PCR 反應盤：具 96 個反應孔，適用於 Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System。

2.4.6. 玻璃或塑膠瓶：50 mL、100 mL、250 mL、500 mL、1000 mL 及 2000 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^(註4)之配製

Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System 鑑別試驗用

5 μ M 引子 F	1.0 μ L
5 μ M 引子 R.....	1.0 μ L
3.3 μ M 探針 P	1.0 μ L
TaqMan® Fast Reagents Starter Kit.....	10.0 μ L
檢體 DNA 溶液(50 ng/ μ L).....	5.0 μ L
無菌去離子水	2.0 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 溶液之製備

2.6.1. 分離菌株之 DNA 溶液製備

2.6.1.1. 直接煮沸法

取一接種環之分離菌株，置入含有無菌去離子水 1 mL 之已滅菌 1.5 mL 離心管中，震盪混合均勻，煮沸 10 分鐘，取出離心管，待冷卻後以 15000 \times g 離心 3 分鐘，吸取上清液至另一已滅菌 1.5 mL 離心管，作為檢體 DNA 原液，置於 -20°C 冷凍保存。

2.6.1.2. 抽取 DNA 法

採用適用於革蘭氏陽性細菌 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，置於 -20°C 冷凍保存。

2.6.2. 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. 鑑別試驗^(註 5)

2.7.1. Real-time PCR 操作步驟

以無菌去離子水適當稀釋檢體 DNA 原液、引子及探針備用。取已滅菌之 1.5 mL 離心管，依照 2.5.節配製 real-time PCR 溶液，依序加入 TaqMan® Fast Reagents Starter Kit、稀釋過之引子及探

針，混合均勻後，分裝 15 μ L 入 real-time PCR 反應盤的反應孔中，各別加入檢體 DNA 溶液 5 μ L，再將 real-time PCR 反應盤置於離心機中，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(°C)	時間(sec)
1. 最初變性	95	20
2. 變性	95	3
3. 黏接、延展	62	30

步驟 2 至步驟 3，共進行 40 個循環反應。

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 *Lactobacillus acidophilus* 之基因片段，可確認該檢體中含有 *Lactobacillus acidophilus*。

註 5：本 real-time PCR 定性反應條件係採 Applied Biosystems 7500 設定之，當使用其他機型時，應自行探討反應條件。

參考文獻

1. Sheu, S. J., Hwang, W. Z., Chen, H. C., Chiang, Y. C. and Tsen, H. Y. 2009. Development and use of tuf gene-based primers for the multiplex PCR detection of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* group, *Lactobacillus delbrueckii*, and *Bifidobacterium longum* in commercial dairy products. J. Food Prot. 72: 93-100.
2. Sheu, S. J., Hwang, W. Z., Chiang, Y. C., Lin, W. H., Chen, H. C. and Tsen, H. Y. 2010. Use of Tuf gene-based primers for the PCR detection of probiotic *Bifidobacterium* species and enumeration of bifidobacteria in fermented milk by cultural and quantitative real-time PCR methods. J. Food Sci. 75: M521-527.