

食品微生物之檢驗方法－乳酸菌－副乾酪乳酸桿菌之檢驗
Methods of Test for Food Microorganisms—Test of Lactic Acid Bacteria—
Lactobacillus paracasei

1. 適用範圍：本方法適用於食品中副乾酪乳酸桿菌 (*Lactobacillus paracasei*) 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 $20000 \times g$ ，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 $\pm 1^{\circ}\text{C}$ 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 paracasei (標的基因: dnaK)

引子 F：LparacaseiF, 5'-CAGACACAGATCAGCTTG-3'

引子 R：LparacaseiR, 5'-AACTTGGCATCCTTCAAA-3'

探針 P：LparacaseiP,

5'-(FAM)-AAGACCAAGATCCCAGTCGAAA-(BHQplus)-3'

Real-time PCR 增幅產物大小 155 bp

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 plus (BHQplus)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 paracasei* 標準菌株或其 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	時間
1. 最初變性	95°C	20 sec
2. 變性	95°C	3 sec
3. 黏接、延展	63°C	30sec
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 paracasei* 之基因片段，可確認該檢體中含有 *Lactobacillus paracasei*。

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. Huang, C. H. and Lee, F. L. 2011. The dnaK gene as a molecular marker for the classification and discrimination of the *Lactobacillus casei* group. Anton. Leeuw. 99: 319-327.
2. Huang, C. H., Chang, M. T., Huang, M. C. and Lee, F. L. 2011. Application of the SNaPshot minisequencing assay to species identification in the *Lactobacillus casei* group. Mol. Cell. Probes 25: 153-157.