

食品微生物之檢驗方法－氣單胞菌之檢驗

Methods of Test for Food Microorganisms - Test of *Aeromonas* spp.

第一部：氣單胞菌之分離、計數及鑑別

1. 適用範圍：本方法適用於食品中氣單胞菌之檢驗。
2. 檢驗方法：檢體經系列稀釋後以選擇性培養基培養及計數之方法。
 - 2.1. 工作環境：工作平臺須寬敞、潔淨、光線良好，操作平臺光度為100呎燭光以上，密閉室內換氣良好，儘可能沒有灰塵及流動空氣，每15分鐘落菌數不得超過15 CFU/培養皿。
 - 2.2. 器具及材料
 - 2.2.1. 生物安全操作櫃(Biological safety cabinet, BSC)：第二等級(classII)(含)以上者。
 - 2.2.2. 乾熱滅菌器：能維持內部溫度在 $170 \pm 10^{\circ}\text{C}$ 者。
 - 2.2.3. 高壓滅菌釜：可達到 121°C 以上者。
 - 2.2.4. 冰箱：能維持 $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 者。
 - 2.2.5. 冷凍櫃：能維持 $-20 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 者。
 - 2.2.6. 加熱器。
 - 2.2.7. 顯微鏡：能放大至1000倍以上之一般光學顯微鏡。
 - 2.2.8. 天平：可稱量到2000 g，靈敏度為0.1 g；可稱量到100 g，靈敏度為1 mg。
 - 2.2.9. 培養箱：能維持內部溫差在 $\pm 1.0^{\circ}\text{C}$ 以內者。
 - 2.2.10. 攪拌均質器或鐵胃：適用於無菌操作者。
 - 2.2.11. 旋渦混合器。
 - 2.2.12. 水浴：能維持水溫溫差在 $\pm 1^{\circ}\text{C}$ 以內者。
 - 2.2.13. 酸鹼度測定儀。
 - 2.2.14. 吸管輔助器或微量分注器。
 - 2.2.15. 曲玻棒：可滅菌者，直徑3~4 mm，塗抹區域45-55 mm。
 - 2.2.16. 微量吸管：已滅菌，可量取20 μL 以上者。
 - 2.2.17. 接種針及接種環(直徑約3 mm)：鎳鉻合金，鉑鉍或鉻線材質，或可拋棄式者。
 - 2.2.18. 吸管或吸管尖：已滅菌，1 mL吸管應有0.01 mL之刻度；5 mL及10 mL吸管應有0.1 mL之刻度。
 - 2.2.19. 試管：13 × 100 mm、16 × 150 mm試管或其他適用者。
 - 2.2.20. 培養皿：已滅菌，內徑約90 mm，深度約15 mm，底皿之內外面應平坦，無氣泡、刮痕或其他缺點。

- 2.2.21. 稀釋用容器：無菌袋或有 1000 mL、500 mL、99 mL 或 90 mL 標記附蓋(栓)之可滅菌廣口瓶。
- 2.2.22. 杜蘭發酵管(Durham fermentation tube)：外徑 9 × 22 mm 或其他適用者。
- 2.2.23. 研鉢及杵。
- 2.2.24. 藥勺、剪刀、小刀、鑷子：可滅菌或可拋棄式者。
- 2.2.25. 無菌濾膜：孔徑 0.22 μm 或以下之親水性濾膜。
- 2.2.26. 載玻片及蓋玻片：適用於染色及鏡檢者。
- 2.2.27. 濾紙及褐色試藥瓶。
- 2.2.28. 蠟筆或麥克筆：塗寫、劃記載玻片時使用。
- 2.2.29. 小圓片濾紙：可滅菌者，直徑約 6 mm。
- 2.2.30. 試藥：
氯化鈉、葡萄糖(glucose)、蔗糖、乳糖、D-甘露糖醇(D-mannitol)、可溶性澱粉、安匹西林(ampicillin)、L-精胺酸(L-arginine)、硫代硫酸鈉、牛膽汁(oxgall)、檸檬酸鐵、硫酸亞鐵、酚紅、L-鳥胺酸(L-ornithine)、肌酸(creatine)、粟糖苷(esculin)、結晶紫(crystal violet)、草酸銨(ammonium oxalate)、沙黃 O (safranin O)、溴甲酚紫(bromocresol purple)、 α -萘酚(α -naphthol)、磷酸氫二鈉(Na_2HPO_4)、磷酸二氫鉀(KH_2PO_4)、磷酸氫二鉀(K_2HPO_4)、氫氧化鉀、碘化鉀、*N,N,N',N'*-四甲基對苯二胺鹽酸鹽(*N,N,N',N'*-tetramethyl-*p*-phenylenediamine dihydrochloride)、氫氧化鈉、95% 乙醇、無水乙醇、O/129 (2,4-diamino-6,7-diisopropyl-pteridine)、O/129- PO_4 (2,4-diamino-6,7-diisopropyl-pteridine phosphate salt)、30% 過氧化氫溶液、碘、礦物油(mineral oil)、液態石臘油(paraffin oil)、聚山梨醇酯 80 (polysorbate 80, Tween 80)等均採用化學試藥級。蛋白胨(peptone)、胨蛋白胨(proteose peptone)、酵母抽出物(yeast extract)、植物蛋白胨(phytone peptone)、胰化酪蛋白胨(trypticase peptone)、洋菜(agar)、牛肉抽出物(beef extract)採用微生物級。
- 2.2.31. 試劑
- 2.2.31.1. 氧化酶試劑(Oxidase reagent)
取四甲基對苯二胺鹽酸鹽 1 g，溶於蒸餾水使成 100 mL，貯存於褐色瓶，冷藏備用。
- 2.2.31.2. 3% 過氧化氫溶液(Hydrogen peroxide solution)

取30%過氧化氫溶液1 mL，加蒸餾水使成10 mL，使用時新鮮配製。

2.2.31.3. 歐普氏試劑(Voges-Proskauer test reagents, VP reagent)

溶液A：取 α -萘酚5 g溶於無水乙醇100 mL。

溶液B：取氫氧化鉀40 g溶於蒸餾水使成100 mL。

2.2.31.4. 礦物油或液態石臘油

取礦物油或液態石臘油20~50 mL，裝入附蓋容器中約1/2滿，以121°C滅菌30分鐘。

2.2.31.5. O/129紙錠(O/129 disks)

製備含O/129 150 μ g紙錠，係將溶解於無菌蒸餾水的O/129 (15 mg/mL)或O/129-PO₄ (20.8 mg/mL)溶液，取10 μ L加入已滅菌之小圓片濾紙。含O/129 10 μ g紙錠者則取溶解於無菌蒸餾水的O/129 (1.0 mg/mL)溶液10 μ L加入已滅菌之小圓片濾紙，於無菌陰暗處自然風乾，並貯存於無菌褐色瓶冷藏備用，儲存期限1年。

2.2.31.6. 革蘭氏染色液(Gram stain solution)^(註)

2.2.31.6.1. 哈克氏(Hucker's) 結晶紫液(初染劑)

溶液A：取結晶紫2 g溶於95%乙醇20 mL。

溶液B：取草酸銨0.8 g溶於蒸餾水80 mL。

將溶液A與溶液B混合，靜置24小時後以濾紙過濾，取濾液作為初染劑。

2.2.31.6.2. 革蘭氏碘液(媒染劑)

取碘化鉀2 g及碘1 g置於研鉢，研磨5~10秒，加蒸餾水1 mL研磨，次加蒸餾水5 mL研磨，再加蒸餾水10 mL，研磨至碘化鉀和碘完全溶於蒸餾水中，將此溶液注入褐色試藥瓶，再以適量蒸餾水洗滌研鉢及杵，以此洗液併入，加蒸餾水使成300 mL。

2.2.31.6.3. 哈克氏複染液(複染劑)

取沙黃O 2.5 g溶於95%乙醇100 mL，供作複染原液。使用時，取原液10 mL加入蒸餾水90 mL，作為複染液。

註：革蘭氏染色液因放久可能失效，因此購買成品時，要注意其保存期限；自行配製者，應檢查其染色效果。

2.2.32. 稀釋液

2.2.32.1. 磷酸鹽緩衝液(Butterfield's phosphate-buffered dilution water)：取磷酸二氫鉀34 g溶於蒸餾水500 mL，以1 N氫氧化鈉溶液調整pH值為7.2，再加蒸餾水使成1000 mL，以121°C滅菌15分鐘，作為原液

冷藏備用。使用時，取原液1.25 mL加入蒸餾水至1000 mL，分裝於稀釋用容器，以121°C滅菌15分鐘。

- 2.2.32.2. 蛋白胨緩衝液(Buffered peptone water)：取蛋白胨10 g、氯化鈉5 g、磷酸氫二鈉3.5 g及磷酸二氫鉀1.5 g，溶於蒸餾水使成1000 mL，分裝於稀釋用容器，以121°C滅菌15分鐘，最終pH值為7.2 ± 0.2。

2.2.33. 培養基

- 2.2.33.1. 澱粉酚紅安匹西林培養基(Starch phenol red ampicillin agar, SPA)

胨蛋白胨(proteose peptone)	10.0 g
牛肉抽出物(beef extract)	1.0 g
洋菜(agar)	15.0 g
酚紅(phenol red)	0.025 g
氯化鈉(NaCl)	5.0 g
可溶性澱粉(soluble starch)	20.0 g
蒸餾水	1000 mL

加熱攪拌溶解後，以121°C滅菌15分鐘，最終pH值為7.4 ± 0.2，待冷卻至50°C時加入經無菌濾膜過濾除菌之安匹西林，最終濃度為10 µg/mL。

- 2.2.33.2. 三糖鐵培養基(Triple sugar iron agar, TSI)

牛肉抽出物(beef extract)	3.0 g
酵母抽出物(yeast extract)	3.0 g
蛋白胨(peptone)	15.0 g
胨蛋白胨(proteose peptone)	5.0 g
氯化鈉(NaCl)	5.0 g
乳糖(lactose)	10.0 g
蔗糖(sucrose)	10.0 g
葡萄糖(glucose)	1.0 g
硫酸亞鐵(FeSO ₄)	0.2 g
硫代硫酸鈉(Na ₂ S ₂ O ₃)	0.3 g
酚紅(phenol red)	0.024 g
洋菜(agar)	12.0 g
蒸餾水	1000 mL

加熱攪拌溶解後，分取適量注入試管至1/3滿，以121°C滅菌15分

鐘，最終pH值為 7.4 ± 0.2 ，滅菌後作成斜面培養基，斜面長度約4~5公分，斜面底部之深度約2~3公分。

2.2.33.3. 胰化酪蛋白大豆培養基(Trypticase soy agar, TSA)

植物蛋白朊(phytone peptone)	5.0 g
胰化酪蛋白朊(trypticase peptone)	15.0 g
氯化鈉(NaCl)	5.0 g
洋菜(agar)	15.0 g
蒸餾水	1000 mL

加熱攪拌溶解後，分取適量注入試管或三角瓶，以 121°C 滅菌15分鐘，最終pH值為 7.3 ± 0.2 。

2.2.33.4. 脫羧酶基礎培養液(Decarboxylase basal medium)

蛋白朊(peptone)	5.0 g
酵母抽出物(yeast extract)	3.0 g
葡萄糖(glucose)	1.0 g
溴甲酚紫(bromocresol purple)	0.02 g
蒸餾水	1000 mL

加熱攪拌溶解後，取L-精胺酸5 g溶解於上述之培養液，分取適量注入試管，以 121°C 滅菌10分鐘，最終pH值為 6.5 ± 0.2 ，配製成脫羧酶培養液。含L-鳥胺酸之脫羧酶培養液配製方法亦同。

2.2.33.5. 膽粟糖苷培養基(Bile esculin agar)

牛肉抽出物(beef extract)	3.0 g
蛋白朊(peptone)	5.0 g
牛膽汁(oxgall)	40.0 g
粟糖苷(esculin)	1.0 g
檸檬酸鐵(ferric citrate)	0.5 g
洋菜(agar)	15.0 g
蒸餾水	1000 mL

加熱攪拌溶解後，分取適量注入試管，以 121°C 滅菌15分鐘，最終pH值為 6.6 ± 0.2 ，作成斜面培養基。

2.2.33.6. 甘露糖醇發酵培養液(Mannitol fermentation broth)

牛肉抽出物(beef extract)	1.0 g
蛋白朊(peptone)	10.0 g
D-甘露糖醇(D-mannitol)	5.0 g

酚紅(phenol red) 0.018 g

氯化鈉(NaCl) 5.0 g

蒸餾水 1000 mL

加熱攪拌溶解後，以121°C滅菌15分鐘，最終pH值為7.4 ± 0.2。

2.2.33.7. 運動性試驗培養基(Motility test medium)

牛肉抽出物(beef extract) 3.0 g

蛋白胨(peptone) 10.0 g

洋菜(agar) 4.0 g

氯化鈉(NaCl) 5.0 g

蒸餾水 1000 mL

加熱溶解後，分取約8 mL注入附有螺旋蓋試管，以121°C滅菌15分鐘，最終pH值為7.4 ± 0.2。

2.2.33.8. MR-VP培養液(MR-VP broth)

葡萄糖(glucose) 5.0 g

蛋白胨(peptone) 7.0 g

磷酸氫二鉀(K₂HPO₄) 5.0 g

蒸餾水 1000 mL

溶解後，分取約5 mL注入試管，以118~121°C滅菌15分鐘，最終pH值為6.9 ± 0.2。

2.2.33.9. 葡萄糖溴甲酚紫培養液(Glucose bromocresol purple broth)

葡萄糖(glucose) 10.0 g

蛋白胨(peptone) 7.0 g

牛肉提取物(beef extract) 3.0 g

溴甲酚紫(bromocresol purple) 0.04 g

氯化鈉(NaCl) 5.0 g

蒸餾水 1000 mL

加熱溶解後，分取約5 mL注入裝有杜蘭發酵管之試管，以121°C滅菌10分鐘，最終pH值為7.0 ± 0.2。

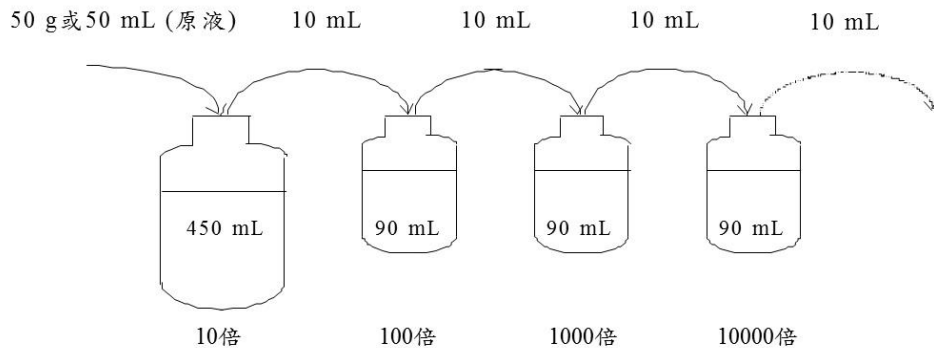
2.3. 檢液之調製

2.3.1. 固態檢體：檢體切碎混合均勻後，稱取50 g，加入稀釋液450 mL，混合均勻，作為10倍稀釋檢液。

2.3.2. 粉狀、粒狀或其他易於粉碎之檢體：使用已滅菌之藥勺或其他用具將檢體粉碎後，混合均勻，稱取50 g，加入稀釋液450 mL，混合均勻，

作為10倍稀釋檢液。

- 2.3.3. 液態檢體：將檢體振搖均勻混合，取50 mL，作為原液，加入稀釋液450 mL，混合均勻，作為10倍稀釋檢液。
- 2.3.4. 冷凍檢體：須解凍者，如冷凍魚貝類、畜禽肉、水產煉製品、蔬果、水餃等，應於冷藏之溫度下解凍(如2~5°C，18小時內即可解凍完全)；亦可使用較高溫度快速解凍(置於45°C以下之水浴中，可在15分鐘內解凍之檢體適用之)。解凍時應經常搖動檢體，以加速解凍。俟檢體解凍後，再予以切碎並混合均勻。不須解凍者，如食用冰塊、冰棒等冰類製品，應速先行使成適當小塊；再依2.3.1.節，製成10倍稀釋檢液。如檢驗工作無法立即進行，應將檢體貯存於-20°C。
- 2.3.5. 凝態及濃稠液態檢體：如布丁、煉乳、海苔醬等，經攪拌均勻後，稱取50 g，加入稀釋液450 mL，混合均勻，作為10倍稀釋檢液。
- 2.3.6. 系列稀釋檢液：使用已滅菌之吸管，吸取上述之10倍稀釋檢液10 mL加入稀釋液90 mL中，依序作成一系列適當之100倍、1000倍、10000倍等稀釋檢液，其稀釋方法如下圖所示。



- 2.3.7. 塗抹物(Swab)檢體：將塗抹棒之頭部置於已滅菌試管，以無菌操作折(剪)斷塗抹物木柄添加蛋白胨緩衝液5 mL後，將試管蓋旋緊，於10秒內來回叩擊手心使其劇烈振盪(振盪幅度需達15公分) 50次，或以旋渦混合器充分振盪至塗抹物頭部之棉絮鬆開，取溶出液供做檢液。

- 註：1. 除肉製品使用蛋白胨緩衝液外，其他檢體以磷酸鹽緩衝液作為稀釋液。
2. 檢體總量不足50 g (mL)時，應依檢體量，添加適量之稀釋液，作成10倍稀釋檢液。
3. 處理含油脂量多，不易勻散及易起泡沫之檢體時，應加入適量已

滅菌之乳化劑(如Tween 80，使其於檢液中濃度為1%)，並充分振搖，使之乳化。

2.4. 鑑別試驗

2.4.1. 分離培養

2.4.1.1. 取2.3.節之稀釋檢液及(或)原液充分搖動，混合均勻後各吸取0.1 mL，分別置入澱粉酚紅安匹西林培養基(SPA)平板，每一檢液至少做2重複，以塗抹曲玻棒均勻塗抹乾後，於28°C倒置培養18~24小時，觀察所形成菌落之形態，必要時，應再行純化。氣單胞菌在SPA培養基上的可疑菌落顏色為黃色，外緣呈平整形，在SPA培養基背景為黃色。

2.4.1.2. 純菌株(Pure culture)：自2.4.1.1節之培養基上鉤取可疑菌落，劃線於TSA培養基，於28°C倒置培養18~24小時，鉤取單一菌落進行氧化酶試驗。氧化酶試驗呈正反應者，利用斜面劃線及穿刺法接種於TSI斜面培養基，於28°C培養24小時後開始觀察直至48±2小時。可疑之氣單胞菌在TSI斜面培養基之斜面呈紅色(鹼性)或黃色(酸性)，底部呈黃色(酸性)，有或無氣體，無硫化氫產生。符合上述結果之純化菌株進行生化特性試驗。

2.4.2. 鑑定試驗

2.4.2.1. 革蘭氏染色(Gram stain)

- (1) 鉤取菌體：加適量0.85%生理食鹽水於載玻片上，以接種針(或環)鉤取適量菌株，均勻塗抹成薄抹片，風乾後迅速通過火焰3~4次微熱固定，勿直接火烤。
- (2) 初染：將已固定之抹片，用哈克氏結晶紫液染1分鐘，水洗。
- (3) 媒染：加革蘭氏碘液作用1分鐘，水洗。
- (4) 脫色：用95%乙醇洗至不再有紫色褪出時，再水洗，此步驟僅約30秒，惟視抹片之厚薄而定。
- (5) 複染：用哈克氏複染液複染30秒，水洗。
- (6) 風乾。
- (7) 鏡檢：呈現深紫色者為革蘭氏陽性菌，呈現淡紅色者為革蘭氏陰性菌。氣單胞菌為革蘭氏陰性，菌體呈彎曲或直短棒狀。

2.4.2.2. 觸酶試驗(Catalase test)

自TSA培養基上鉤菌塗抹於載玻片，加3%過氧化氫溶液0.5 mL，如產生氣泡者為正反應，否則為負反應。氣單胞菌應為正反應。

2.4.2.3. 氧化酶試驗(Oxidase test)

自TSA培養基以接種環或無菌牙籤，刮取少量細菌(避免使用鎳鉻製品)，塗抹於含有氧化酶試劑濕潤濾紙上，正反應會慢慢有深紫色出現(10秒內)，否則為負反應，氣單胞菌應為正反應。

2.4.2.4. 運動性試驗(Motility test)

自TSA培養基上鉤取可疑菌株，穿刺接種於運動性試驗培養基，自表面中央點至深度1.2公分處。於35°C培養24小時，並繼續觀察至48±2小時。當測試菌沿穿刺線呈放射線狀生長者為正反應，否則為負反應，氣單胞菌為正反應。

2.4.2.5. 精胺酸脫羧酶試驗(Arginine decarboxylase test)

由TSA培養基上鉤菌接種於精胺酸脫羧酶培養液，接種後注入已滅菌之液態石蠟油或礦物油覆蓋表面高約1~2 cm，需鬆蓋，於35°C培養48小時。精胺酸脫羧酶培養液呈紫色或紅紫色為正反應，呈黃色者為負反應，氣單胞菌應為正反應。

2.4.2.6. 鳥胺酸脫羧酶試驗(Ornithine decarboxylase test)

自TSA培養基上鉤菌接種於鳥胺酸脫羧酶培養液，接種後注入已滅菌之液態石蠟油或礦物油覆蓋表面高約1~2 cm，需鬆蓋，於35°C培養48小時。鳥胺酸脫羧酶培養液呈紫色或紅紫色為正反應，呈黃色者為負反應，氣單胞菌應為負反應。

2.4.2.7. O/129敏感性試驗(O/129 sensitivity test)

使用含O/129 10 µg和150 µg紙錠置於已接菌之TSA培養基上，經35°C培養18~24小時。在紙錠周圍可生長者為具有耐受性的正反應，氣單胞菌應對含O/129 10 µg及150 µg兩者皆具耐受性。

2.4.2.8. 甘露糖醇發酵試驗(Mannitol fermentation test)

自TSA培養基上鉤菌接種於甘露糖醇發酵培養液，於35°C培養18~24小時後觀察，呈現黃色者為正反應，紅或粉紅者為負反應。氣單胞菌應為正反應。

2.4.2.9. 粟糖苷水解試驗(Esculin hydrolysis test)

自TSA培養基上鉤菌接種於膽粟糖苷培養基斜面，於35°C培養48小時。培養基呈現黑色者為正反應，否則為負反應。氣單胞菌可能為正或負反應。

2.4.2.10. 歐普氏試驗(VP test)

自TSA培養基上鉤菌接種於MR-VP培養液，於35°C培養48小時。

取培養液1 mL至另一已滅菌試管，加入歐普氏試劑溶液A 0.6 mL及溶液B 0.2 mL後，再加入少許肌酸，輕輕搖勻，4小時後觀察，呈現紅色者為正反應，否則為負反應。氣單胞菌為正或負反應。

2.4.2.11. 葡萄糖發酵試驗(Glucose fermentation test)

自TSA培養基上鉤菌接種於置有杜蘭發酵管的葡萄糖溴甲酚紫培養液，於35°C培養48小時。培養液由紫色變為黃色者，為正反應，否則為負反應，氣單胞菌為正或負反應。杜蘭發酵管內有氣體者為正反應，否則為負反應，氣單胞菌為正或負反應。

2.5. 判定

2.5.1. 氣單胞菌陽性者，應符合表一及表二所列之結果

表一、氣單胞菌之生化反應

試驗或基質		正反應	負反應	氣單胞菌反應 ⁽¹⁾
三糖鐵培養基試驗	斜面	黃色	紅色	d
	底部	黃色	紅色	+
	產氣	培養基斷裂或裂縫	培養基完整	d
	硫化氫	黑色	非黑色	-
運動性試驗		沿穿刺線有放射狀線	沿穿刺線無放射狀線	+ ⁽²⁾
氧化酶試驗		紫色	無色	+
觸酶試驗		產生氣泡	不產生氣泡	+
甘露糖醇發酵試驗		黃色	紅色	+
葡萄糖發酵試驗		黃色	紫色	d
精胺酸脫羧酶試驗		紫色或紅紫色	黃色	+
粟糖苷水解試驗		黑色	淺棕色	d
鳥胺酸脫羧酶試驗		紫色或紅紫色	黃色	-
革蘭氏染色		陽性(深紫色)	陰性(淡紅色)	-
歐普氏試驗		紅色	原色	d
O/129敏感性試驗	10 µg	生長	不生長	+
	150 µg	生長	不生長	+

(1)：「+」：典型氣單胞菌正反應者。「-」：典型氣單胞菌負反應者。「d」：因不同氣單胞菌種可能為正反應或負反應。

(2)：除*A. media*及*A. salmonicida*為負反應外，其他為正反應。

表二、常見氣單胞菌 *A. hydrophila*、*A. sobria* 及 *A. caviae* 之生化反應

試驗 ⁽¹⁾	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. sobria</i>	<i>A. caviae</i>
歐普氏試驗	+	+	-
粟糖苷水解試驗	+	-	+
葡萄糖發酵產氣	+	+	-

(1) 「+」：典型氣單胞菌正反應者；「-」：典型氣單胞菌負反應者。

- 2.6. 如使用經確效認可之市售培養基、生化檢測套組或生化試驗鑑定系統，其檢驗結果有爭議時，以本檢驗方法為準。

第二部：氣單胞菌之real-time PCR檢測

1. 適用範圍：本方法適用於氣單胞菌菌種標的基因(*gyrB*)與*Aeromonas hydrophila*之溶血素基因(*ahh1*)、*Aeromonas sobria*的耐熱性毒素(*asa1*)及*Aeromonas caviae*之標的基因(*dnaJ*)之鑑別。
2. 檢驗方法：檢體之增菌液或經分離純化後之菌株，經DNA萃取後，以即時聚合酶鏈反應(real-time polymerase chain reaction, real-time PCR)進行鑑別之方法。

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試劑之配製應於生物安全操作櫃內進行。

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：可達到121°C以上者。
- 2.2.3. 生物安全操作櫃(Biological safety cabinet, BSC)：第二等級(class II)(含)以上者。
- 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：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. 冷藏冷凍設備：具冷藏及凍結(-20°C)功能。
- 2.2.9. 旋渦混合器。
- 2.2.10. 酸鹼度測定儀。
- 2.2.11. 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：適用於革蘭氏陰性細菌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

2.3.2.1.1. *Aeromonas* spp. (標的基因：*gyrB* gene)

引子F：5'-TTGCCGTTATCTCCGTCAAGG-3'

引子R：5'-GGCCGCATCGATGATCTTG-3'

探針P：5'-(6FAM)-AAGTTCTCCTCCCAGACCAAGGACAA-
(BHQ1)-3'

PCR增幅產物大小124 bp

2.3.2.1.2. *Aeromonas hydrophila*：Extracellular hemolysin, AHH1 (標的基因
ahh1 gene)

引子F：5'-GCCGAGCGCCCAGAAGGTGAGTT-3'

引子R：5'-GAGCGGCTGGATGCGGTTGT-3'

探針P：5'-(6FAM)-TCTGGGGCATGGGCTACGAC-(BHQ1)-3'

PCR增幅產物大小130 bp

2.3.2.1.3. *Aeromonas sobria*：Heat-stable cytotoxic enterotoxin, *asa1* (標的基
因：*asa1* gene)

引子F：5'-TAAAGGGAAATAATGACGGCG-3'

引子R：5'-GGCTGTAGGTATCGGTTTTTCG-3'

探針P：5'-(6FAM)-AGCAGGTGGTGGTGACCCTGAAG-
(BHQ1)-3'

PCR增幅產物大小249 bp

2.3.2.1.4. *Aeromonas caviae*：Chaperone, DnaJ (標的基因：*dnaJ* gene)

引子F：5'-GCCCTGCCCCCACTGTCA-3'

引子R：5'-CCCGGTATCGACCCCG-3'

探針P：5'-(6FAM)-CTTGGTCTTCTGGTAACGCCCTT-
(BHQ1)-3'

PCR增幅產物大小127 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，
分裝後於-20°C冷凍保存，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：氣單胞菌參考菌株或其DNA。

2.4. 器具及材料^(註3)

- 2.4.1. 微量吸管：2 μL 、10 μL 、20 μL 、100 μL 、200 μL 及1000 μL 。
 - 2.4.2. 吸管尖：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)

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

5 μM 引子F.....	2.0 μL
5 μM 引子R.....	2.0 μL
5 μM 探針.....	1.5 μL
TaqMan® Fast Reagents Starter Kit.....	12.5 μL
檢體DNA溶液.....	5.0 μL
無菌去離子水.....	2.0 μL
總體積.....	25.0 μL

註4：Real-time PCR溶液應於冰浴中配製。

2.6. 檢體DNA溶液之製備

2.6.1. 檢體稀釋檢液之DNA溶液製備

自第一部2.4.1.節之稀釋檢液，吸取菌液1 mL，置入已滅菌之1.5 mL離心管，以15000 $\times\text{g}$ 離心3分鐘，去除上清液。

2.6.1.1. 直接煮沸法

將沉澱物加入無菌去離子水1 mL，振盪混合均勻，以15000 $\times\text{g}$ 離心3分鐘，去除上清液，續將沉澱物加入無菌去離子水1 mL，振盪混合均勻，置入加熱振盪器中煮沸10分鐘，取出離心管，作為檢體DNA原液，於-20°C冷凍保存。

2.6.1.2. 抽取DNA法

採用適用於革蘭氏陰性細菌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，於-20°C冷凍保存。

2.6.2. 分離菌株之DNA溶液製備

自培養基上鈎鈎取一接種環的菌量，置入含有無菌去離子水1 mL之已滅菌1.5 mL離心管，振盪混合均勻，煮沸10分鐘，取出離心管，待冷卻後以15000 ×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，於-20°C冷凍保存。亦可依2.6.1.2.節進行檢體DNA原液之製備。

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/μL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20 μL入real-time PCR反應盤的反應孔，各別加入檢體DNA溶液5 μL，再將real-time PCR反應盤以200 ×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。

2.7.1.1. 氣單胞菌菌種鑑別反應條件

步驟	溫度(°C)	時間(sec)
1. 熱活化	95	20
2. 最初變性	95	3
3. 黏接、延展	60	30

步驟2至步驟3，共進行45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增幅產物為標的基因片段，當標的基因 $gyrB$ 為正反應，可確認菌種為氣單胞菌屬；當標的基因 $ahhI$ 為正反應，可確認菌種為*Aeromonas hydrophila*；當標的基因 $asaI$ 為正反應，可確認菌種為*Aeromonas sobria*；當標的基因 $dnaJ$ 為正反應，可確認菌種為*Aeromonas caviae*。

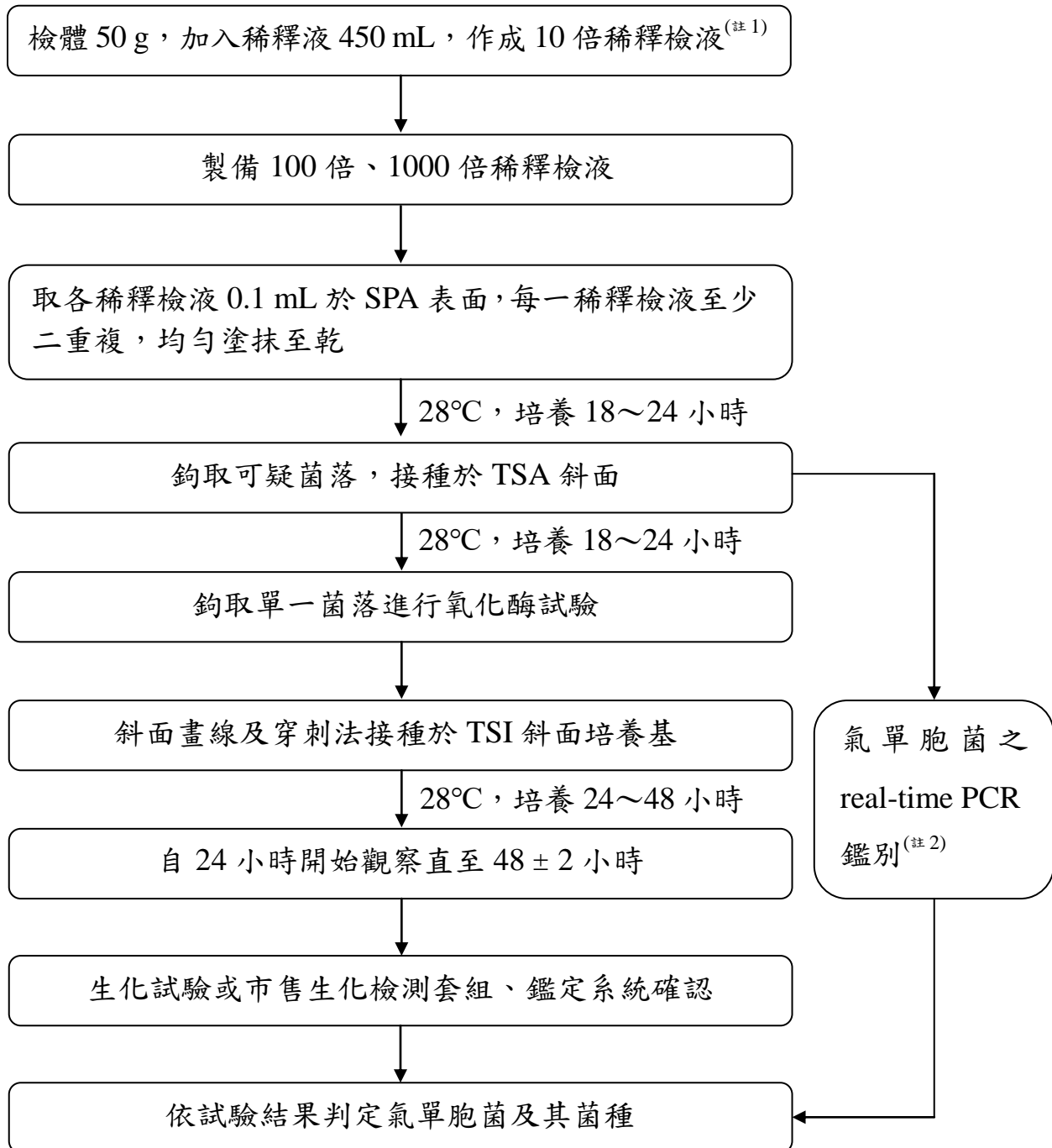
註5：本Real-time PCR反應條件係採Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System設定之，當使用其他機型時，應自行探討反應條件。

附註：第二部氣單胞菌之real-time PCR檢驗可視需要執行。

參考文獻

1. Wang, G., Clark, C. G., Liu, C., Pucknell, C., Munro, C. K., Kruk, T. M. A. C., Caldeira, R., Woodward, D. L. and Rodgers, F. G. 2003. Detection and characterization of the hemolysin genes in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* by multiplex PCR. J. Clin. Microbiol. 41: 1048-1054.
2. Sen, K. and Rodgers, M. 2004. Distribution of six virulence factors in *Aeromonas* species isolated from US drinking water utilities: a PCR identification. J. Appl. Microbiol. 97: 1077-1086.

檢驗流程圖



註1：除肉製品使用蛋白胨緩衝液外，其他檢體通常以磷酸鹽緩衝液作為稀釋液。

註2：可依檢體含菌量情況自行探討接續之 real-time PCR 之步驟及增菌時間，以達快速鑑別目的。