

食品微生物之檢驗方法－乳酸菌－保加利亞乳酸桿菌之檢驗
Methods of Test for Food Microorganisms - Test of Lactic Acid Bacteria－
Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus*

1. 適用範圍：本方法適用於食品中保加利亞乳酸桿菌(*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*)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
 - 2.2.1. 即時聚合酶鏈反應器：Applied Biosystems ViiA7 Real-Time PCR System，或同級品。
 - 2.2.2. 高壓滅菌釜：可達121°C以上者。
 - 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：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。
 - 2.2.10. 酸鹼度測定儀。
 - 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。
 - 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1)
 - 2.3.2.1.1. 鑑別試驗用引子及探針
Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus* (標的基因:ABC transporter)
引子F：5'-GTATCATCTTTTACCATAAGCAAGG-3'

引子R：5'-AGACGAAACAAATGCTGAC-3'

探針P：5'-(FAM)-TACTGTCCGCGTATTTGGAAGGCAGGC-(BHQ1)-3'

Real-time PCR增幅產物大小162 bp

註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Black Hole Quencher-1 (BHQ1)標記。

2.3.2.2. KAPA KK4701 Probe fast qPCR kit (適用於Applied Biosystems ViiA7 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 delbrueckii* subsp. *bulgaricus*參考菌株或其DNA。

2.4. 器具及材料^(註2)

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(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2：使用之塑膠或玻璃器皿應均為無DNase污染。

2.5. Real-time PCR溶液^(註3)之配製

Applied Biosystems ViiA7 Real-Time PCR System鑑別試驗用

5 µM引子F..... 1.0 µL

5 µM引子R..... 1.0 µL

3.3 µM探針P..... 1.0 µL

KAPA KK4701 Probe fast qPCR kit..... 10.0 µL

檢體DNA溶液(50 ng/µL)..... 3.0 µL

無菌去離子水..... 4.0 µL

總體積..... 20.0 µL

註3：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. 分離菌株之DNA溶液製備

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

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KAPA KK4701 Probe fast qPCR kit、稀釋過之引子及探針，混合均勻後，分裝17 μ L入real-time PCR反應盤的反應孔中，各別加入檢體DNA溶液3 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^(註4)。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	64	30

步驟2至步驟3，共進行40個循環反應。

註4：上述測定條件分析不適時，可依所用之儀器設定適合之測定條件。

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*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 之基因片段，可確認該檢體中含有*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*。

參考文獻

Kafsi, H. E., Binesse, J., Loux, V., Buratti, J., Boudebbouze, S., Dervyn, R., Kennedy, S., Galleron, N., Quinquis, B., Batto, J. M., Moumen, B., Maguin, E. and van de Guchte, M. 2014. *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* and ssp. *bulgaricus*: a chronicle of evolution in action. BMC Genomics 15: 407.
[<http://www.biomedcentral.com/1471-2164/15/407>]