食品微生物之檢驗方法－乳酸菌－乳酸乳球菌之檢驗

Methods of Test for Food Microorganisms - Test of Lactic Acid Bacteria－*Lactococcus lactis*

1. 適用範圍：本方法適用於食品中乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)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 QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR System，或同級品。

2.2.2. 高壓滅菌釜：可達121℃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℃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℃)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℃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. 鑑別試驗用引子及探針

Lactococcus lactis (標的基因:16S rRNA)

引子F：5′-CTGTTGGTAGAGAAGAACGTAGGT-3′

引子R：5′-CAAGTCTACCAGTTTCCAATGCAT-3′

探針P：5′-(FAM)-AAGCTCATC(ZEN)AAGTGACGGTAACTACC-(IBFQ)-3′

Real-time PCR增幅產物大小219 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℃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Iowa Black FQ (IBFQ)標記，另於探針中加入第二個螢光遮蔽子(ZEN)，以增強遮蔽效果及訊號偵測。

2.3.2.2. TaqMan Universal PCR Master Mix (適用於Applied Biosystems QuantStudio™ 12K Flex 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：*Lactococcus lactis*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 QuantStudio™ 12K Flex 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 QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR System鑑別試驗用

5 µM引子F	1.25 µL
5 µM引子R	1.25 µL
3.3 µM探針P	1.70 µL
TaqMan Universal PCR Master Mix	12.5 µL
檢體DNA溶液(10 ng/µL)	5.0 µL
無菌去離子水	3.3 µL
總體積	25.0 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/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

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。取已滅菌之離心管，依照2.5.節配製real-time PCR溶液，並注入real-time PCR反應盤的反應孔中，再將real-time PCR反應盤置於離心機中，以200 ×g瞬間離心後，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	600
2. 變性	95	15
3. 黏接、延展	62	60
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*Lactococcus lactis*之基因片段，可確認該檢

體中含有*Lactococcus lactis*。

參考文獻

Pu, Z. Y., Dobos, M., Limsowtin, G. K. and Powell, I. B. 2002. Integrated polymerase chain reaction-based procedures for the detection and identification of species and subspecies of the Gram-positive bacterial genus *Lactococcus*. J. Appl. Microbiol. 93: 353-361.