



月旦知識庫

益生菌 *Lactobacillus gasseri* real-time PCR快速鑑定方法

楊侑丞 姜凱仁 王閔正 王鈺婷
林澤揚 黃守潔 曾素香 王德原

衛生福利部 食品藥物管理署 研究檢驗組

摘 要

Lactobacillus gasseri (*L. gasseri*)已發現其能抑制致病菌及食物腐敗、具抗發炎特性、調節腸道環境等功能，常見於市售保健食品。然而許多文獻亦指出益生菌產品常有標示不清或成分不符的狀況，傳統生化檢驗方法耗時且有精準度不足之缺點，故為提升檢驗效率及精準度，本研究應用即時聚合酶鏈反應(real-time PCR)技術，建立*L. gasseri*之專一性快速鑑定方法。以ITS-23S rRNA基因設計引子探針組，並以91株參考菌株進行測試，結果顯示設計之引子及探針僅對目標參考菌株有專一性反應，且菌量低至約10 CFU/mL仍可偵測到螢光訊號，本研究開發之*L. gasseri* real-time PCR方法可提供*L. gasseri*之快速鑑定。

關鍵詞：*Lactobacillus gasseri*、益生菌、即時聚合酶鏈反應、快速鑑定法

前 言

益生菌(Probiotics)一詞為Lilly及Stillwell⁽¹⁾於1965年提出，經許多學者提出不同定義，Parker⁽²⁾在1974年定義Probiotics為能促進宿主腸道菌相平衡的微生物或物質，而Fuller⁽³⁾於1989年所提出之定義認為Probiotics為活的微生物，能夠促進宿主腸內微生物菌相平衡，且對宿主具有正面效益。因此適時適量補充益生菌，可維持消化道內微生物相平衡、預防腸胃道疾病及調整免疫機能等。由於益生菌微生物有不同功能，達到最佳狀態可能是由幾株不同種類的益生菌組合所致。益生菌為有益於宿主健康的活菌體或其成分，目前已廣泛應用於人類食品與動物飼料上。益生菌使用的微生物菌

種很多，以細菌所佔的比例最多，其他部分為酵母菌等真菌，而乳酸菌是現今最常應用於食品中的益生菌。乳酸菌除了具有「一般公認安全」(Generally recognized as safe, GRAS)可安全食用的特點，近年來許多臨床研究指出乳酸菌具有許多健康功效。

研究^(4,5)發現益生菌失去活性或死菌仍具有調整宿主免疫功能及降低病原菌感染之能力，因此益生菌被認為含括對宿主健康有益的微生物及其細胞組成物質。2001年聯合國糧食農業組織(FAO)與世界衛生組織(WHO)專家會議解釋益生菌為「透過攝取適當的量，對食用者的身體健康能發揮有效作用的活性微生物⁽⁶⁾」。根據Sanders及Veld⁽⁷⁾的研究指出，每日至少需補充 $10^9 \sim 10^{10}$ CFU益生菌數，對促進健康才有



顯著效果。因此益生菌的定性與定量格外的重要。FAO與WHO在2002年除了定義益生菌一詞外，亦提出益生菌產品的最低需求標準指南，包括菌種鑑定、潛力菌株之體外篩選、安全考量、動物或人體試驗、健康訴求與產品標示等⁽⁴⁾。

然而許多文獻亦指出益生菌產品常有標示不清或成分不符的狀況。Canganella、Theunisse、Valéri及Geert等人⁽⁷⁻¹³⁾的研究曾指出某些商品之實際益生菌菌株種類與標示不符；Temmerman⁽¹²⁾檢測30種乾燥乳菌粉產品及25種乳製品，結果顯示乳酸菌粉產品中有47%之實際菌株種類或含量與標示不符，乳製品中也有40%與標示不符。Hamilton-Miller⁽¹³⁾等人檢測52種含益生菌之產品，結果有67%產品之實際菌株種類或含量與標示不符。Aureli Paolo⁽¹⁴⁾等人調查市售的72項產品，結果有87%標示不符。依據這些調查結果，可見常有以益生菌之名的偽劣產品充斥著市場，為確保產品之功效性及消費者權益，鑑定市售益生菌產品中實際乳酸菌種類及含量與標示之符合性為重要課題。因此本研究著重在建立益生菌菌種 (Species) 之快速鑑別方法，針對市售產品常使用的益生菌為研究標的。

Lactobacillus gasseri (*L. gasseri*) 為人體腸胃道菌群常見的菌種之一⁽¹⁵⁾，已發現該菌種對致病菌及食物腐敗菌具有廣泛的抑制活性^(16,17)。研究顯示在小鼠模型中，*L. gasseri* 表現之超氧化物分解酶 (Superoxide dismutase, SOD) 具有抗發炎的特性⁽¹⁸⁾；對於腸道環境與功能的調節作用⁽¹⁹⁾，則能有效減少第二型糖尿病小鼠血糖值與體重⁽²⁰⁾；以及對胃潰瘍具保護作用⁽²¹⁾。

有關乳酸菌菌種鑑別，因細菌rRNA基因序列具高度保守性之特點，設計菌種專一性引子進行聚合酶連鎖反應，可作為菌種分類之依據，達到快速鑑定之目的。傳統上，16S rRNA基因的高度保留性被視為

Lactobacillus 各菌種間演化關係的分子標誌之一⁽²²⁾。Markiewicz及Biedrzycka⁽²³⁾亦根據益生菌之16S rRNA及16S-23S rRNA基因序列設計引子進行聚合酶鏈反應，用於鑑定在發酵乳飲料中的益生菌。然而，rRNA基因序列無法有效鑑定親緣關係相當接近的菌種，例如鑑別 *Lactobacillus casei* group 乳酸菌。因此，選擇其他具有高度鑑別力的Housekeeping基因或專一性蛋白的編碼基因是必需的^(24,25)。在本研究中，依據 *L. gasseri* 之Internal transcribed spacer (ITS)-23S rRNA序列設計專一性引子探針組，來作為益生菌分子鑑定的工具⁽²⁶⁾，說明如下：

內轉錄間隔 (Internal transcribed spacer, ITS) 是位於染色體中小亞單元rRNA 及大亞單元rRNA 基因或多順反子 (Polycistronic) RNA前驅中相應轉錄區域之間的間隔DNA。在細菌及古細菌只有一個ITS，位於16S和23S rRNA基因之間；真核生物則有兩個ITS，分別位於18S與5.8S rRNA基因之間 (ITS1) 及5.8S與28S rRNA基因之間 (ITS2)。

核糖體RNA (ribosomal RNA, rRNA) 是生物細胞中主要的核糖核酸之一，為一種具有催化能力的核糖酶，但其單獨存在時無法如其他核糖核酸發揮作用，僅在與多種核糖體蛋白質共同構成核糖體 (一種無膜細胞器) 後才能執行其功能。23S及28S rRNA在轉譯過程作為肽醣轉移酶催化多肽 (包括蛋白質) 中胺基酸之間的肽鍵形成。rRNA是單鏈RNA，通過摺疊形成了廣泛的雙鏈區域。rRNA是所有細胞中都會表達的基因，即所有擁有細胞結構的生物都擁有rRNA。因此可以通過rRNA的基因進行定序對某種生物進行分類與鑑定，估算相關種群之物种差異度。

材料與方法

一、材料

(一) 參考菌株



Lactobacillus spp. 56 株 (包含 5 種 *L. gasseri*)、*Ligilactobacillus* spp. 3 株、*Levilactobacillus* spp. 1 株、*Lacticaseibacillus* spp. 4 株、*Limosilactobacillus* spp. 2 株、*Lentilactobacillus* spp. 1 株、*Lactiplantibacillus* spp. 4 株、*Bifidobacterium* spp. 8 株、*Enterococcus* spp. 2 株、*Streptococcus* spp. 2 株、*Lactococcus* spp. 4 株、*Pediococcus* spp. 1 株、*Bacillus* spp. 2 株及 *Clostridium* spp. 1 株，共 91 株參考菌株，菌株皆購自財團法

人食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心 (Bioresource Collection and Research Center, 表一)。

(二) 培養基

MRA Broth、MRS Agar (MRSA)、Brain Heart Infusion Agar、Nutrient Agar、Peptone 及 YPD Medium (Difco Laboratories Inc., USA)。TOS- MUP 選擇性培養基 (Millipore, USA)。以上所有配製步驟皆參照廠商提供之指引。

(三) 化學試藥

1. Ethidium bromide、Agarose 及 5X TBE

表一、測試菌株

Species	Strain (BCRC) ^a	^b Real-time PCR
<i>Lactobacillus acidophilus</i> (11)	10695 ^T 、14064、14065、14079、16092、16099、17008、17009、17481、17486、80064	-
<i>Lactobacillus amylovorus</i>	11648 ^T	-
<i>Lactobacillus gasseri</i> (5)	14619 ^T 、17614、17615、17616、80332	+
<i>Lactobacillus crispatus</i>	14618 ^T	-
<i>Lactobacillus helveticus</i>	12936 ^T	-
<i>Lactobacillus jensenii</i>	12939 ^T	-
<i>Lactobacillus johnsonii</i> (5)	17474 ^T 、14004、14037、17010、17753	-
<i>Lactobacillus taiwanensis</i>	17755 ^T	-
<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> subsp. <i>Kefiranofaciens</i>	16059 ^T	-
<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefirgranum</i>	80410 ^T	-
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> (10)	10696 ^T 、12297、14007、14008、14010、14069、14071、14075、14090、14091	-
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>	12195 ^T	-
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>jakobsenii</i>	80766 ^T	-
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>sunkii</i>	80765 ^T	-
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> (15)	11051、12256 ^T 、14032、14078、16067、17983、10699、11049、14003、14033、14034、16055、16056、16057、16058	-
<i>Ligilactobacillus animalis</i>	14617 ^T	-
<i>Ligilactobacillus salivarius</i> subsp. <i>salicinus</i> (2)	12574 ^T 、14759 ^T	-
<i>Levilactobacillus brevis</i>	12187 ^T	-
<i>Lacticaseibacillus casei</i>	10697 ^T	-



表一、(續)

Species	Strain (BCRC) ^a	^b Real-time PCR
<i>Lactocaseibacillus zeae</i>	17647	-
<i>Lactocaseibacillus paracasei</i>	12248 ^T	-
<i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i>	10940 ^T	-
<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	12190 ^T	-
<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	14625 ^T	-
<i>Lentilactobacillus kefir</i>	14011 ^T	-
<i>Lactiplantibacillus argenteratensis</i>	12327	-
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	10069 ^T	-
<i>Lactiplantibacillus paraplantarum</i>	17178 ^T	-
<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	11053 ^T	-
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	14606 ^T	-
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>animalis</i>	14668 ^T	-
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	17394 ^T	-
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	14615 ^T	-
<i>Bifidobacterium breve</i>	11846 ^T	-
<i>Bifidobacterium longum</i>	14634	-
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i>	14602 ^T	-
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i>	11847 ^T	-
<i>Enterococcus faecium</i>	10067 ^T	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	10066 ^T	-
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	12312 ^T	-
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	12586 ^T	-
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>hordniae</i>	80474 ^T	-
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>tructae</i>	80475 ^T	-
<i>Bacillus coagulans</i> (<i>Lactobacillus sporogenes</i>)	11592	-
<i>Bacillus subtilis</i>	15411	-
<i>Clostridium butyricum</i>	80431	-
<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>	13869 ^T	-
<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>salivarius</i>	17388 ^T	-
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	12843 ^T	-

^a BCRC : Bioresource Collection and Research Center.

^b Real-time PCR : 除 *L. gasseri* , 其餘菌種之測試菌株反應結果均為陰性。

buffer (Amresco, USA)

2. 100 bp DNA ladder (紫外光, Taiwan)。

3. KAPA Taq ReadyMix PCR kit (KAPA

Biosystems, USA)。

4. KAPA PROBE FAST qPCR Master Mix (2X) Rox Low (KAPA



Biosystems, USA)。

(四) 使用之DNA萃取套組

DNA萃取採用DNeasy® Blood & Tissue Kit商業套組。所有萃取DNA操作步驟皆參照廠商提供之使用手冊。

(五) 儀器設備

1. 殺菌釜：TOMY SX-700 (Tomy Digital Biology, Japan)。
2. 厭氧缸(Mitsubishi, Japan)。
3. 厭氧包(bioMérieux, France)。
4. 培養箱：Sanyo MIR-262 (Sanyo, Japan)。
5. 電泳膠片影像擷取系統：ImageMaster VDS (Pharmacia Biotech, Sweden)。
6. DNA電泳槽：Mupid-2 (Advance, Japan)。
7. 高速冷凍離心機：Kubota 3740 (Kubota, Japan)。
8. 漩渦混合器：VORTEX-GENIE2 (Scientific Industries, USA)。
9. 微量定量用分光光度計：NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, USA)。
10. 即時聚合酶鏈反應器：QuantStudio™ 12K Flex real-time PCR System及QuantStudio™ 5 real-time PCR System (Applied Biosystems, USA)。
11. 引子與探針設計軟體：LightCycler Probe Design (Roche, Switzerland)。

二、方法

(一) 益生菌活化與培養

將冷凍保存之參考菌株由-80℃冷凍庫中取出，並儘快取出適量菌液，選擇適宜培養基於特定溫度、對氧氣不同需求之環境中培養。

1. *Lactobacillus* spp.、*Ligilactobacillus* spp.、*Levilactobacillus* spp.

、*Lacticaseibacillus* spp.、*Limosilactobacillus* spp.、*Lentilactobacillus* spp.、*Lactiplantibacillus* spp.、*Streptococcus* spp.、*Pediococcus* spp.、*Clostridium* spp.及*Enterococcus* spp.

取回溶菌液100 µL，並以L棒均勻塗抹至MRSA培養基上，於37℃厭氧環境中培養24~48小時後備用。

2. *Bifidobacterium* spp.

取回溶菌液100 µL，並以L棒均勻塗抹至TOS-MUP選擇性培養基上，於37℃厭氧環境中培養24~48小時後備用。

3. *Lactococcus* spp.

取回溶菌液100 µL，並以L棒均勻塗抹至Brain Heart Infusion Agar (BHI)培養基上，於37℃厭氧環境中培養24~48小時後備用。

4. *Bacillus* spp.

取回溶菌液100 µL，並以L棒均勻塗抹至Nutrient Agar培養基上，於37℃厭氧環境中培養24~48小時後備用。

(二) 參考菌株之染色體DNA製備

益生菌參考菌株之染色體DNA抽取係利用DNeasy® Blood & Tissue Kit商業套組進行製備。將受試菌株接種於適宜培養液中培養，取懸浮菌液200 µL，加至1.5 mL離心管中，以5,000 ×g離心10分鐘後移去上清液，加入套組中提供之酵素溶解溶液(Enzymatic lysis buffer) 180 µL，並使菌體均勻懸浮，於37℃培養至少30分鐘。再加入蛋白分解酶K (Proteinase K) 25 µL及緩衝液AL (Buffer AL) 200µL均勻混合後，於56℃培養30分鐘。反應完成後加入96~100%乙醇200 µL，並充分振盪混合。將混合均勻後的液體加入DNeasy Mini spin column中，並置入2 mL collection tube中以收集廢液，以6,000 ×g離心1分鐘，將



分離出的液體丟棄。將DNeasy Mini spin column置入新的2 mL collection tube，加入緩衝液AW1 (Buffer AW1) 500 μ L，以6,000 $\times$ g離心1分鐘，將分離出的液體丟棄。再將DNeasy Mini spin column置入新的2 mL collection tube中，並加入緩衝液AW2 (Buffer AW2) 500 μ L，以20,000 $\times$ g離心3分鐘，將分離出的液體與collection tube丟棄。將DNeasy Mini spin column置入乾淨的1.5 mL微量離心管中，並加緩衝液AE (Buffer AE) 200 μ L於DNeasy membrane上，於室溫反應約1分鐘，再以6,000 $\times$ g離心1分鐘。離心後所得的液體即為純化後的DNA。保存於4°C備用，或保存於-20°C。

(三)即時聚合酶連鎖反應

1. 引子及探針組

根據在NCBI GenBank資料庫 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)中益生菌的基因序列，搭配LightCycler Probe Design軟體設計引子與探針，並將引子序列以Nucleotide Blast及Clustal W進行資料庫多重序列比對，剔除與其他菌種相同的序列後，篩選出專一性高的序列，作為菌種鑑定用之引子與探針。本研究設計之引子與TaqMan探針如表二，探針5'端採用6-carboxy-fluorescein (FAM)標記，3'端採用Black Hole Quencher-1 (BHQ1)標記。即時PCR反應試劑套組為KAPA PROBE FAST qPCR Master Mix (2X) Rox Low kit (Roche Applied Science, Germany)。

2. 即時聚合酶連鎖反應

以無菌純水適當稀釋模板DNA樣品、引子及探針備用。real-time PCR反應溶液20 μ L，包含5 μ M 前置引子1.0 μ L、5 μ M後置引子 1.0 μ L、3.3 μ M探針1.0 μ L、KAPA PROBE FAST qPCR kit 10.0

μ L、10 ng/ μ L模板DNA 3.0 μ L以及無菌純水4.0 μ L。real-time PCR反應條件為95°C反應20秒(初變性)、40個增幅循環反應(變性95°C反應3秒、黏接與延展60°C反應30秒)。

(四)靈敏度測試

以*L. gasseri*典型菌株(Type strain) BCRC14619^T進行靈敏度測試，自MRSA培養基挑取單一菌落至4 mL MRS培養液，於37°C厭氧環境中培養24小時，以傾注平板法(Pour-plate method)⁽²⁸⁾估算1 mL菌液所含菌數；另吸取1 mL菌液並以DNeasy® Blood & Tissue Kit商業套組萃取 *L. gasseri*典型菌株BCRC14619^T之DNA，經過微量定量分光光度計定量其濃度至10 ng/ μ L。以DNA 30 ng (經換算約為10⁸ CFU/mL)定為100%，以10倍序列稀釋分別配製10%、1%、0.1%、0.01%、0.001%、0.0001%、0.00001%濃度之DNA，以*L. gasseri*專一性引子對與TaqMan探針進行real-time PCR，各稀釋倍率之螢光增幅曲線與臨界值線($\Delta R_n=0.1$)相交處在Ct值36之前者即為陽性反應。

結果與討論

一、*Lactobacillus gasseri*專一性引子與探針組設計

本研究針對市售產品所標示之常見益生菌，以*L. gasseri*為標的，搜尋相關文獻⁽²⁶⁾。現今real-time PCR所使用之螢光染劑多為SYBR green以及Taqman探針，2017年Lai C.及其團隊⁽²⁶⁾使用SYBR green方式來鑑定*L. gasseri*，由於SYBR green以非專一性結合雙股DNA，需再以dissociation curve以確認結果之專一性，因此以專一性結合目標序列的Taqman探針在檢測特異性(specificity)上較為優勢，另PCR 檢測效率取決於引子組和擴增

表二、*L. gasseri*之專一性引子與探針組

Name	Primer/Probe	Sequence (5'-3')	Specificity	Amplicon
<i>L. gasseri</i>	LG-F	AGTTCACCTGCGTCTTCCTTCA	ITS-23S rRNA	127 bp
	LG-R	GACGAACCACGAAAGGCTTC		
	LG-P	CAGCTCTTGATAATACCTCS ^b CGGT ^a		

^a探針於5'端及3'端分別以6-carboxy-fluorescein (FAM)及Black Hole Quencher[®]-1 (BHQ-1)標記

^bS：為混合G/C兩種鹼基

子(amplicon)大小的特異性，其中大小150 bp左右的擴增子具最佳的擴增效果，因此本研究以參考文獻⁽²⁶⁾為基礎，針對ITS-23S rRNA基因設計菌種(Species)專一性引子及Taqman探針組：先以PCR增幅產物並定序，以確認適合設計探針之區域，發現*L. gasseri*不同菌株間存在單一核苷酸變異(SNP)，故在探針序列第20個鹼基設計G/C混合鹼基，以提升real-time PCR增幅效率。所得前置引子(LG-F)為5'-AGTTCACCTGCGTCTTCCTTCA-3'，後置引子(LG-R)為5'-GACGAACCACGAAAGGCTTC-3'，探針(LG-P)為5'-CAGCTCTTGATAATACCTCSCGGT-3'，增幅片段大小為127 bp，如表二所示。

二、real-time PCR專一性測試

以設計所得之*L. gasseri*專一性引子與探針組對91株參考菌株(包含14個益生菌屬(genus)及49個菌種)之染色體DNA進行菌種專一性real-time PCR測試，於real-time PCR系統中進行反應，以螢光增幅曲線與臨界值線($\Delta Rn = 0.1$)相交處在Ct值36之前者即為陽性反應。測試結果顯示：在91株參考菌株中，只有5株*L. gasseri*的參考菌株(BCRC14619^T、BCRC17614、BCRC17615、BCRC17616及BCRC80332)有螢光增幅訊號，其他參考菌株則均無反應，如圖一。此結果顯示在本研究中所設計的引子及探針組具有*L. gasseri*菌種專一性。

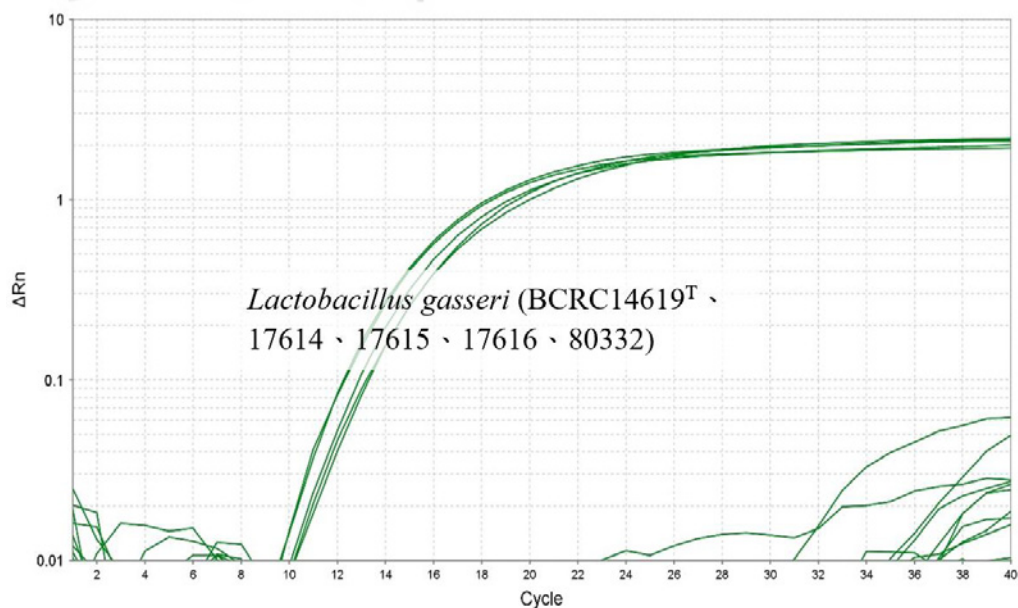
在過往文獻^(26,27)中，對於*L. gasseri*的鑑定有專一性不佳的問題，例如2014年Balashov S.及其團隊⁽²⁷⁾利用*L. gasseri*中的*tuf*基因片段進行設計引子探針組，採用的方式與本研究同樣為Taqman探針，然而其專一性試驗表明，在*Lactobacillus johnsonii*存在時會有交叉反應，導致鑑定結果失準，而本研究測試包含*Lactobacillus johnsonii*等91株菌株後，僅有*L. gasseri*呈陽性反應，在專一性上明顯較優。與相關文獻^(26,27)比較，本研究專一性測試使用更多的菌株包括14種不同的菌屬，測試範圍涵蓋目前國內市售益生菌產品常見以及國內可供使用的菌種，經多種測試後驗證本研究所設計之鑑定方法，與過往文獻中的方法相比，所能適用的範圍更大，專一性也更佳。

三、real-time PCR偵測靈敏度測試結果

30 ng DNA樣品各稀釋倍數測試結果顯示如圖二， 10^7 倍稀釋之樣品仍能有良好的螢光曲線反應，Ct值仍在陽性反應範圍之內，測試結果經計算，確認本研究所設計之TaqMan探針偵測極限(Limit of detection, LOD)最低可至10 CFU/mL。

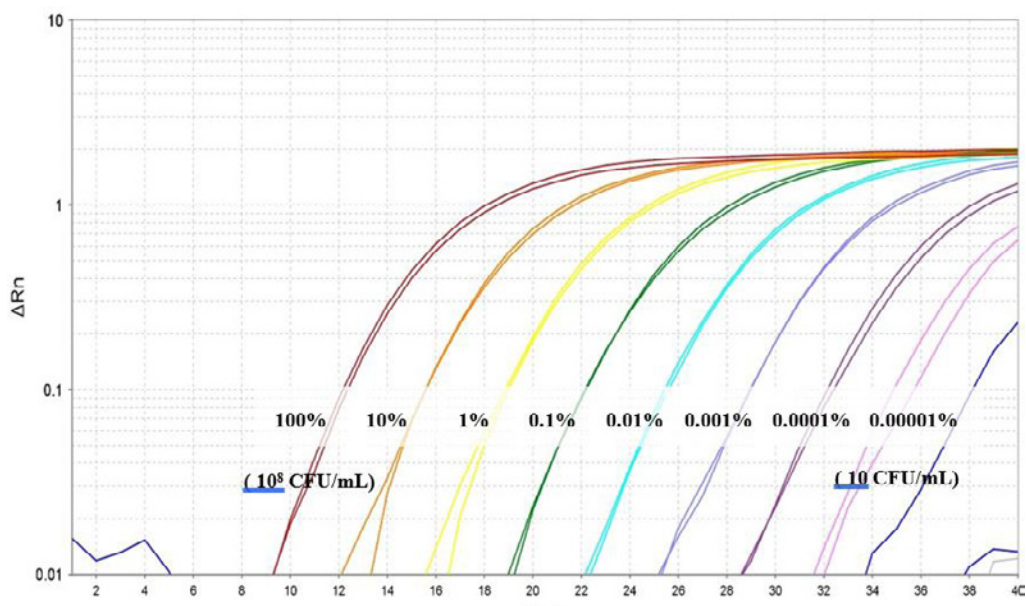
結 論

經由實驗結果證明本方法可應用於*L. gasseri*益生菌菌種之檢測。市售益生菌產品大都為複合活性益生菌，加上各產品的基質類別複雜，包括醃酵乳、鮮奶、奶粉、膠囊、菌



圖一、*Lactobacillus gasseri*之real-time PCR專一性試驗

測試91株益生菌菌株，僅其中5株*Lactobacillus gasseri* (BCRC14619^T、17614、17615、17616、80332)有螢光擴增反應



圖二、*Lactobacillus gasseri* BCRC 14619^T之real-time PCR靈敏度試驗

粉、錠狀等，所以一般傳統鑑定方式，均需事先進行乳酸菌培養與篩選分離，再藉由鏡檢、生化或分子生物學鑑定方法，才能鑑定出檢體中各種乳酸菌之菌種與菌數，整個檢驗流程約需花費3~6天。因此，本研究除了完成經由即時聚合酶鏈反應鑑定益生菌菌種之外，爾後亦會持續以市售益生菌產品進行檢驗比對，並開發高穩定性、高靈敏性、高專一性，快速鑑定及定量益生菌的檢驗方法，以提高正確性與縮短檢驗時程。

參考文獻

1. Lilly, D.M. and Stillwell, R.H. 1965. Probiotics: Growth-promoting factors produced by microorganisms. *Science* 147(3659): 747-748.
2. Parker, R.B. 1974. Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Anim. Nutr. Health* 29: 4-8.
3. Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* 66(5): 365-378.
4. Hosono, A., Lee, J., Ametani, A., Natsume, M. and *et al.* 1997. Characterization of a water-soluble polysaccharide fraction with immunopotentiating activity from *Bifidobacterium adolescentis* M101-4. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 61(2): 312-316.
5. Kitazawa, H., Itoh, T., Tomioka, Y., Mizugaki, M. and *et al.* 1996. Induction of IFN-gamma and IL-1 alpha production in macrophages stimulated with phosphopolysaccharide produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. *Int. J. Food Microbiol.* 31(1-3): 99-106.
6. FAO and WHO. 2002. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food.
7. Sanders, M.E. and Huis in't Veld, J.H. 1999. Bringing a probiotic-containing functional food to the market: microbiological, product, regulatory and labeling issues. *Antonie van Leeuwenhoek* 76(1-4): 293-315.
8. Canganella, F., Paganini, S., Ovidi, M., Vettraino, A.M. and *et al.* 1997. A microbiology investigation on probiotic pharmaceutical products used for human health. *Microbiol. Res.* 152(2): 171-179.
9. Coeuret, V., Gueguen, M. and Vernoux, J. P. 2004. Numbers and strains of lactobacilli in some probiotic products. *Int. J. Food Microbiol.* 97(2): 147-156.
10. Huys, G., Vancanneyt, M., D'Haene, K., and Vankerckhoven, V. 2006. Accuracy of species identity of commercial bacterial cultures intended for probiotic or nutritional use. *Res. Microbiol.* 157(9): 803-810.
11. Theunissen, J., Britz, T.J., Torriani, S. and Witthuhn, R. 2005. Identification of probiotic microorganisms in South African products using PCR-based DGGE analysis. *Int. J. Food Microbiol.* 98(1): 11-21.
12. Temmerman, R., Pot, B., Huys, G. and Swings, J. 2003. Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. *Int. J. Food Microbiol.* 81(1): 1-10.
13. Hamilton-Miller, J.M., Shah, S. and Winkler, J.T. 1999. Public health issues arising from microbiological and labelling quality of foods and supplements containing probiotic microorganisms. *Public Health Nutr.* 2(2): 223-229.
14. Aureli, P., Fiore, A., Scalfaro, C. and Casale, M. 2010. National survey outcomes on commercial probiotic food supplements in Italy. *Int. J. Food Microbiol.* 137(2-3): 265-273.

15. Walter, J. 2008. Ecological role of lactobacilli in the gastrointestinal track: implications for fundamental and biomedical research. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 4985-4996.
16. Itoh, T., Fujimoto, Y., Kawai, Y., Toba, T. and *et al.* 1995. Inhibition of food-borne pathogenic bacteria by bacteriocins from *Lactobacillus gasseri*. *Lett. Appl. Microbiol.* 21: 137-141.
17. Nishiyama, K., Seto, Y., Yoshioka, K., Kakuda, T. and *et al.* 2014. *Lactobacillus gasseri* SBT2055 reduces infection by and colonization of *Campylobacter jejuni*. *PLoS One* 9: e108827.
18. Carroll, I.M., Andrus, J.M., Bruno-Barcena, J.M., Klaenhammer, T.R. and *et al.* 2007. Anti-inflammatory properties of *Lactobacillus gasseri* expressing manganese superoxide dismutase using the interleukin 10-deficient mouse model of colitis. *Am. J. Physiol.-Gastrointest Liver Physiol.* 293: G729-738.
19. Sugawara, T., Sawada, D., Ishida, Y., Aihara, K. and *et al.* 2016. Regulatory effect of paraprobiotic *Lactobacillus Gasseri* cp2305 on gut environment and function. *Microb. Ecol. Health Dis.* 27(30259): 1-11.
20. Yun, S.I., Park, H.O. and Kang, J.H. 2009. Effect of *Lactobacillus gasseri* BNR17 on blood glucose levels and body weight in a mouse model of type 2 diabetes. *J. Appl. Microbiol.* 107: 1681-1686.
21. Uchida, M., Shimizu, K. and Kurakazu, K. 2010. Yogurt containing *Lactobacillus gasseri* OLL 2716 (LG21 yogurt) accelerated the healing of acetic acid-induced gastric ulcer in rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74: 1891-18944.
22. Tannock, G.W. 1999. Identification of lactobacilli and bifidobacteria. *Curr. Issues Mol. Biol.* 1(1-2): 53-64.
23. Markiewicz, L. and Biedrzycka, E. 2005. Identification of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species with PCR applied to quality control of fermented dairy beverages. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 14: 359-365.
24. Santos, S.R. and Ochman, H. 2004. Identification and phylogenetic sorting of bacterial lineages with universally conserved genes and proteins. *Environ. Microbiol.* 6(7): 754-759.
25. El Kafsi, H., Binesse, J., Loux, V., Buratti, J. and *et al.* 2014. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* and subsp. *bulgaricus*: a chronicle of evolution in action. *BMC Genomics* 15(1): 407.
26. Lai, C.H., Wu, S.R., Pang, J.C., Ramireddy, L. and *et al.* 2017. Designing primers and evaluation of the efficiency of propidium monoazide - Quantitative polymerase chain reaction for counting the viable cells of *Lactobacillus gasseri* and *Lactobacillus salivarius*. *J. Food Drug Anal.* 25(3): 533-542.
27. Balashov, S.V., Mordechai, E., Adelson, M.E., Sobel, J.D., and Gyax, S.E. 2014. Multiplex quantitative polymerase chain reaction assay for the identification and quantitation of major vaginal *Lactobacilli*. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 78(4), 321-327.
28. 衛生福利部。2013。食品微生物之檢驗方法－乳酸菌之檢驗。102 年 9 月 6 日部授食字第 1021950329 號公告修正。[<http://www.fda.gov.tw/TC/siteList.aspx?sid=103&scid=178&pn=3>]



月旦知識庫

Rapid Identification of *Lactobacillus gasseri* using real-time PCR

YU-CHENG YANG, KAI-REN JIANG, MIN-ZHENG WANG,
YU-TING WANG, CHE-YANG LIN, SHOU-CHIEH HUANG,
SU-HSIANG TSENG AND DER-YUAN WANG

Division of Research and Analysis, TFDA, MOHW

ABSTRACT

Lactobacillus gasseri is known for its ability to inhibit pathogenic bacteria and food spoilage, as well as for its anti-inflammatory properties and role in regulating intestinal environments. This bacterium is commonly present in retailed dietary supplements. However, numerous studies have highlighted the lack of clarity in labeling and discrepancies in the ingredients of these products. Traditional biochemical test methods are both time-consuming and imprecise. Therefore, in order to improve the efficiency and accuracy, this study aims at developing a rapid identification method for *L. gasseri* using real-time PCR. Primer-probe sets that target the ITS-23S rRNA genetic region of *L. gasseri* were designed and evaluated with 91 reference strains. The results demonstrated that the designed primers and probes were specific to the target reference strains of *L. gasseri*, and fluorescent signals could be detected even at bacterial concentrations as low as approximately 10 CFU/mL. The data showed the capability of this method a rapid and accurate technique for *L. gasseri* detection.

Key words: *Lactobacillus gasseri*, Probiotics, real-time PCR, Rapid Identification