

我有喝到哪一類型的乳酸菌？

應用 PCR 技術檢驗醱酵飲料中乳酸菌的種類

樊琳* 李淑華**

*國立屏東師範學院 自然科學教育學系

**屏東縣里港國中 生物科

一、前言

乳酸菌在人體腸道內屬於「有益菌」，能合成維生素 B 群和維生素 K，並能幫助食物代謝、增強免疫力及促進營養。如果讓腸內有益菌維持較大的優勢，就可以維持人體的健康（丘志威等，民 86；李福臨，民 89；鄭金寶，民 89）。因此，乳酸菌長久以來一直被應用在食品方面，近年來國內更是興起一股乳酸菌製品的風潮，商品的種類繁多令人目不暇給，不同菌種的乳酸菌製品標榜著對人體有不同的益處，消費者在購買時也能有更多的選擇。但是，這些產品內是否真有其標榜特別添加的活菌菌種呢？為了解市面上乳酸菌製品的菌種成分是否真如其標示，我們在課堂上用一個簡單的生技實驗——藉由 PCR 技術檢驗市售的乳酸菌商品中所標榜的有益菌種的種類！

聚合酶連鎖反應（Polymerase Chain Reaction, PCR）是一種可在短時間內將特定基因片段加以培養使得基因數量大量增加的技術，此種技術被廣泛的應用在許多領域上，如親子關係鑑定、鑑定犯罪現場遺留下來可能含有微量 DNA 的血跡、毛髮、皮膚等、偵測被病毒感染的細胞（如 HIV）、檢驗

生物演化上物種彼此間的關係、多種生物的基因組鹼基序列的定序……等方面。2003 年在中、港、台爆發的嚴重急性呼吸道症候群（Severe Acute Respiratory Syndrome, SARS），也是利用此相關技術建立 SARS 病毒基因高敏感度之檢測方法。而我們在課程中則選用生活中較易取得的菌種來源——乳酸菌商品，作為 PCR 實驗課程檢驗的材料。

雖然現在已知的乳酸菌已達兩百多種，但依據國際上的定義：商品化的優酪乳中一定要使用 *Lactobacillus bulgaricus* 和 *Streptococcus thermophilus* 這兩種菌種（引用自菌種的故事 <http://gly.ek21.com/GLY/DOR-1/PAGE/05.HTM>）。此外，可由各廠商自行再添加對人體有益的菌種。如市售商品中標榜含有 A 菌即為 *Lactobacillus acidophilus*，B 菌即為 *Bifidobacteria*（或稱 *Bifidus*），C 菌 *Lactobacillus casei*，以及 LGG 即為 *Lactobacillus rhamnosus GG* 等。這些菌種都屬於對人體有益的益生菌（Probiotics）。依國家 CNS 規定，優酪乳中每毫升應含一千萬個以上的活性發酵菌（鄭金寶，民 89）。在含有乳酸菌的飲料中，優格和優酪乳成份中含有非脂肪乳固形物 8% 以上，為濃稠發酵

乳；而乳酸菌飲料成份中含有非脂肪乳固形物 2%以上，乳脂肪 0.5%以下。因為含非脂肪乳固形物和乳脂肪都最少的乳酸菌飲料，可以在離心收集菌種時減少非脂肪乳固形物的混雜量，離心後清洗菌種的處理上也會較容易，因此本實驗在收集菌種時以乳酸菌飲料為採樣的樣本。由乳酸菌飲料中收集清洗後之菌液樣本，可直接打破溶解以進行 PCR，處理手續上非常簡便。五十毫升飲料收集之菌液（半瓶養樂多），即足夠數十次反應使用，取材十分容易。

本實驗參考市售的乳酸菌飲料商品中所標示的菌種，選出四種常用的菌種做為檢驗目標。一種為國際定義必含的 *Streptococcus thermophilus*（T 菌），和在多家品牌中常發現的三種菌種 *Lactobacillus acidophilus*（A 菌）、*Bifidus*（B 菌）和 *Lactobacillus casei*（C 菌）。根據資料顯示（Schleifer et al., 1995; Tilsala-Timisjärvi et al., 1997; Song et al., 2000），發現乳酸菌菌種在 16S rDNA 上含有大部分相同序列的基因片段和少部份相異序列基因片段。我們挑選四種檢驗菌種均有的共同片段，設計成實驗引子對 5'和 3'兩端的位置，做為檢驗四種乳酸菌的共同依據。再依據各菌種相異的片段，選出各菌種各自獨立的 5'端引子的位置，配合原先 3'端的引子，做為四種菌種個別檢驗的依據（附錄一）。

本實驗依照特定 DNA 的位置做增量放大作用，即進行 PCR（聚合酶連鎖反應）。此段微量特定的 DNA 序列經由 PCR 實驗放大預估約 2^{30} 倍後，收集 PCR 產物做電泳分析。根

據四種菌種共同的 DNA 片段和個別的 DNA 片段的 PCR 產物的大小，判斷出各片段在電泳膠片上的相對位置，就可做為我們檢驗市售乳酸菌飲料中是否含有所選定的四種乳酸菌菌種的依據。

二、實驗原理：

DNA 是由兩股互相反向平行的多核苷酸鏈所形成的雙股螺旋狀的構造。每股多核苷酸鏈以糖—磷酸為兩股的骨架，兩股內部則以四種含氮鹼基做互補性鹼基配對（complementary base pairing），即 A（adenine，腺嘌呤）配對 T（thymine，胸腺嘧啶），而 G（guanine，鳥糞嘌呤）配對 C（cytosine，胞嘧啶），且每股多核苷酸鏈的鹼基有一定的排列次序，稱為鹼基序列（base sequence）。因此只要我們知道雙股的 DNA 多核苷酸鏈其中一股的鹼基序列，就可利用互補性鹼基配對的方法，知道另一股核苷酸鏈的鹼基序列。而細胞內的 DNA 在進行複製時，就是利用這樣的原理：

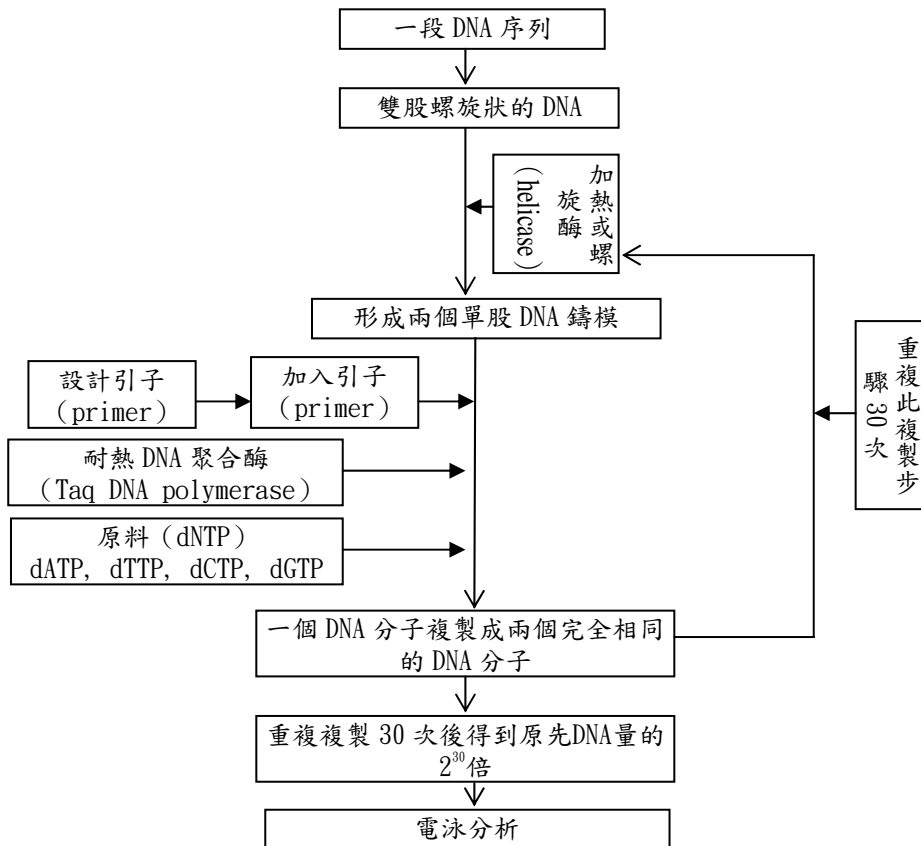
首先，會先利用螺旋酶（helicase）將雙股多核苷酸鏈分開，再以原先的雙股多核苷酸鏈為模板，利用 primase 結合到單股鑄模上的第一個起始序列，形成一小段 RNA primer（RNA 引子），再依互補性鹼基配對的原則，用 DNA 聚合酶（DNA polymerase）將一個個的核苷酸放置在模板上，做含氮鹼基互補配對延長的工作，如此一個 DNA 分子就複製成兩個完全相同的 DNA 分子。因為在新的雙股 DNA 分子中，其中一股是新的，另一股是舊的，這種複製方式我們將之

稱為半保留性 (semiconservative)。

必須注意的是，在我們要進行的 PCR 實驗中，我們不是用原本細胞中的 RNA 引子進行工作，而是要事先設定想要複製放大的特定序列 DNA 片段，依照此片段前後 5'端和 3'端的 DNA 序列，設計出一對大約 20 個已知鹼基序列的 DNA 引子來替代原先細胞中 RNA 引子的工作，做為複製特定基因 DNA 片段工作的起始處 (Kim, 2000)。

PCR的原理是非常簡單的，在本次實驗中，一開始先利用PCR熱循環機的高溫將雙股DNA分開形成單股的多核苷酸鏈；當溫度降低時，預先設計的一對引子對就會依照互補性鹼基配對的原則，5'端和 3'端的引子就可以和單股DNA上的特定段做最初起始點

的互補結合，然後耐熱聚合酶即可將原料中混合的核苷酸 (dNTP) 和此特定段單股DNA模板上的含氮鹼基繼續做互補配對延長的動作，進而複製出兩個完全一樣的特定雙股DNA片段，如此就完成第一次複製新的雙股DNA分子的工作。之後再利用高溫將第一次複製出來的雙股DNA分子再分開，就變成兩個單股的模板，重複配對、延長的動作，完成兩個複製新的雙股DNA分子。每重複一次就可增加兩倍雙股DNA片段的量，重複相同的步驟 30 次，就可得到放大增量 2^{30} 倍的特定雙股DNA片段的量。實驗流程圖如下：



三、實驗器材：

1、市售乳酸菌飲料：

(1) 優沛蕾益菌多（簡稱益菌多）：

500 g/瓶。每瓶含一百億個以上活性乳酸菌。產品標示含有 A 菌（*Acidophilus*）、B 菌（*Bifidus*）、C 菌（*Casei*）。

(2) 活益比菲多（簡稱比菲多）：

1000 g/瓶。產品標示為 HO-EATTM Bifido，原料含有活性乳酸菌（未標明含有的菌種名稱）。

(3) 統一好菌多多（簡稱好菌多多）：

500 g/瓶。產品標示每 CC 含 1200 萬個以上活性乳酸菌（未標明含有的菌種名稱）。

(4) 養樂多活菌發酵乳（簡稱養樂多）：

100 g/瓶。產品標示每瓶含有一百億個以上的養樂多代田菌。

(5) 亦可嘗試其他種類，如亞當、健健美等。

2、乳酸菌清洗、溶解液（Lysozyme buffer）：

(1) Tris-HCl（pH 7.2）：50 mM

(2) EDTA：1 mM

(3) NaCl：50 mM。

(4) 若要溶解乳酸菌的菌壁，則 200 μ l 清洗液中要加入 4 mg lysozyme 形成乳酸菌溶解液。

3、Genomic DNA Purification Kit（Cat:BTC04-50）：BERTEC ENTERPRISE CO., LTD.（伯昂公司）生產。

4、離心機：HITACHI HIMAG CENTRIFUGE SCR20BB，使用 RPR20-2 7 號的離心管。

5、恆溫槽。

6、PCR 熱循環。

7、電泳設備。

8、五種乳酸菌 DNA primer：訂購自 Genemed Synthesis, Inc.。

9、1kb DNA ladder：GIBCOBRL[®] Cat. No. 15615-016, Lot No. MAB732 1.0 μ g/ μ l。

10、Agarose：GIBCOBRL 公司出產。

11、染色劑：溴化醯液（Ethidium Bromide）

12、紫外光照相系統。

四、實驗步驟：

1、找出乳酸菌的基因序列

由文獻資料和市售乳酸菌商品決定出四種乳酸菌的菌種，利用 NCBI 中的 Nucleotide 資料庫（<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Nucleotide>），搜尋出 *Acidophilus*、*Bifido*、*Lactobacillus casei* 和 *Streptococcus thermophilus* 四種乳酸菌位於 16S rDNA 的核酸序列。但是市售乳酸菌飲料中並無明確的菌種品系名稱，而在 NCBI 網路內的參考資料為菌種品系的序列資料，因此選定序列段最長的菌種資料，並且事先假定與我們所需

要檢測的菌種基因序列差異不大。

利用網路 GCG pileup 程式，將上述四種乳酸菌中相似的基因序列進行比對，並由圖中自行找出五種可供實驗的 primer 序列（如附錄一）。但是商品中並未標示正確的菌種品系，因此我們先假定由 NCBI 中找到的菌種是我們所需的相似菌種品系。並請同學能由討論方式探討以下問題：

（1）這五種實驗的 primer 序列是否會受到其他非此四種乳酸菌的影響？（2）各組 primers 所夾出的基因序列為何？經過討論後再利用基因定序來做結果的確認。

2、引子的設計

引子是特別設計的一段核苷酸序列，用來擴增放大特定的 DNA 序列，乃 PCR 反應成功與否之關鍵（Kim, 2000）。因此，設計引子時須注意下列事項：

- (1) 引子需具有專一性，長度約 18~25 個核苷酸較適合。
- (2) 引子 3' 端的核苷酸最好設計成 G, C, GC, 或 CG 以增加鏈合的親和性。
- (3) 避免重複相同的核苷酸，尤其是 G 不可連續 3 個；G+C 的含量最好能佔 50% 以上。
- (4) 引子的 T_m （熔點溫度）需大於 45°C；且引子鏈合（annealing）的溫度需適當，否則溫度太高則無產物出現，溫度太低則非專一性的產物會很多而影響實驗。
- (5) 引子的結構需避免出現 dimer 或髮夾狀的二級結構造成無法配對接合的情形發生（Scheppeler, 2000）。

依照上述原則，可讓同學在實驗中親自嘗試或模擬不同引子會出現之假想結果。

3、收集乳酸菌飲料中的菌種

同學可事先調查市售商品中，哪一類的商品較易收集到實驗所需的乳酸菌，並事先模擬收集的方式，評估處理的過程中所需要使用的器材，和收集的原則，最後決定出一種最容易操作且可以收集到較純的乳酸菌的商品。大約五十毫升之飲料，即含有足夠的菌數可供實驗。收集菌液之方法，主要依據離心原理，將菌體沉澱，再用適當緩衝溶液，將雜質清洗數次即可。

4、乳酸菌 DNA 的純化

收集足夠量的乳酸菌後，就要準備將細胞內的 DNA 萃取純化出來。乳酸菌屬於革蘭氏陽性的細菌，外層有細胞壁包圍，因此需要先破壞掉細胞壁，才能讓裡面的 DNA 溶解到外面來。細菌的細胞壁成份為肽聚糖，與一般植物的纖維素細胞壁組成不同，因此該選擇何種類型的分解酶，學生可多做思考。

因為是使用套裝材料（Genomic DNA Purification Kit, 伯昂公司製造）來做萃取，廠商都已準備好所需的試劑，因此同學須了解萃取純化的基本原則，小心謹慎的操作即可純化出乳酸菌的 DNA。

5、進行 PCR

實驗步驟：

- (1) 將每種乳酸菌飲料中萃取出來的 DNA 抽取液分成五管，分別加入各待測菌種的 primers。
- (2) 在 PCR 的反應中，每管使用 5 μ l 的 10x PCR 專用緩衝液，4 μ l 2.5 mM 的 dNTP 混合液（每種濃度為 2.5 mM），1 μ l 抽取

的乳酸菌 DNA 模板，5'端及 3'端的 primer (50 pmol/ μ l) 各 1 μ l，並加入 1.5 單位的耐熱聚合酵素 (TaKaRa Taq)，最後用水將整個反應體積補到 50 μ l，放到 PCR 熱循環機中進行反應。

- (3)反應的時間與溫度分別是：最初雙股 DNA 模板分離 (initial denaturing) 94°C，4 min、模板與引子鏈合 (annealing) 52°C，1 min、聚合酶延長反應 (extension) 72°C，1 min、每次重新循環時 DNA 模板分離 (denaturing) 94°C，1 min。
- (4)用上述條件重複 30 次，最終延長 (final extension) 72°C，5 min。這樣就可以得到放大 DNA 濃度的產物。
- (5)將此產物置於 4°C 下貯存供日後檢驗所需。本實驗進行約需 2~2.5 小時。

注意事項：

- (1)步驟中所需的溶液濃度均是從母液 (stock) 取出合併在一起使用，因此如何配置實驗所需的正確濃度，往往是決定實驗成功與否的第一步。
- (2)同學在操作過程中須要很小心。DNA 分子容易被環境中存在的酵素給分解，所以學生需養成實驗前先將實驗桌面擦拭乾淨，實驗進行中小心各器材之間不被互相污染等良好實驗習慣。又因為實驗中使用的試劑都很微量和昂貴，一不小心都有可能造成結果誤判和時間與材料的浪費，學生由此可學習正確與切實的設備操作之重要性。

6、電泳

將 PCR 產物用 2% agarose gel 做水平電

泳分離，直到含藍色染料 (bromophenol blue) 的樣本約移至電泳膠片四分之三處停止。將電泳膠片取下用溴化醯液 (ethidium bromide) 染色 5 分鐘，並視背景強度以蒸餾水進行退染，然後用紫外光照相系統照相。

7、五種選定的實驗 primer 序列比對

由四種選定菌種的 DNA 序列中，確定共同的實驗引子對 (LAB 5'端和 LAB 3'端) 的 DNA 序列，和個別菌種自己特定 5'端的引子序列；再利用 GCG pileup 程式比對出 *Acidophilus*、*Bifido*、*Lactobacillus casei* 和 *Streptococcus thermophilus* 四種乳酸菌位於 16S rDNA 上相似核酸序列的排列位置，依序列數目大小推知電泳膠片上出現的 DNA 條帶位置，是屬於哪一個實驗菌種引子對所夾出 PCR 產物。

五、結論：

本實驗設計的主要目的，是讓學生在課堂中了解 PCR 原理後，能更進一步地由實際操作的過程中，了解 PCR 技術以及應用於生活中的實例；並由實驗過程中學會使用電泳檢驗與進行 primer 序列比對的技術。此外，也希望學生在實際操作過程中，學習在實驗室中應有的良好習慣，建立同學在進行 PCR 實驗時所要注意的概念，並能聯想 PCR 技術在其他方面利用的價值，以達到學以致用、觸類旁通的學習效果。

本實驗經由屏東師院自然科學教育學系大三學生分組實際操作後發現，實驗步驟操作容易，依照實驗程序操作都可以在電泳膠片上得到清楚的 PCR 產物，實驗成功率很

高。附圖為兩片學生分組實驗電泳膠片的結果。圖二為選用實驗建議材料活益比菲多乳酸菌飲料的電泳檢驗結果，圖一則為學生自行找尋的材料亞當乳酸菌飲料的電泳檢驗結果。

由電泳檢驗的結果發現，實驗的乳酸菌飲料中均有發現我們設計的檢驗菌種的共同片段，即標示 LAB 5' 端和 LAB 3' 端的 primer 所得的 PCR 產物，而挑選出來的四種常用的檢驗菌種 T 菌、A 菌、B 菌和 C 菌，則為廠商自行添加的菌種，不一定會在所有的乳酸菌飲料中都會出現。實驗後由學生畫出實驗相關概念圖中也發現，學生大都能清楚的表現出與 PCR 相關的概念描述（附錄二），並能正確連結相關的觀念。

由實驗設計的過程中，學生須先行搜尋相關的資料配合實驗設計所需，並統整相關的知識概念，比只由書本中得到的片段知識訊息，更為完整且全面，更能實現「由做中學」的精神。

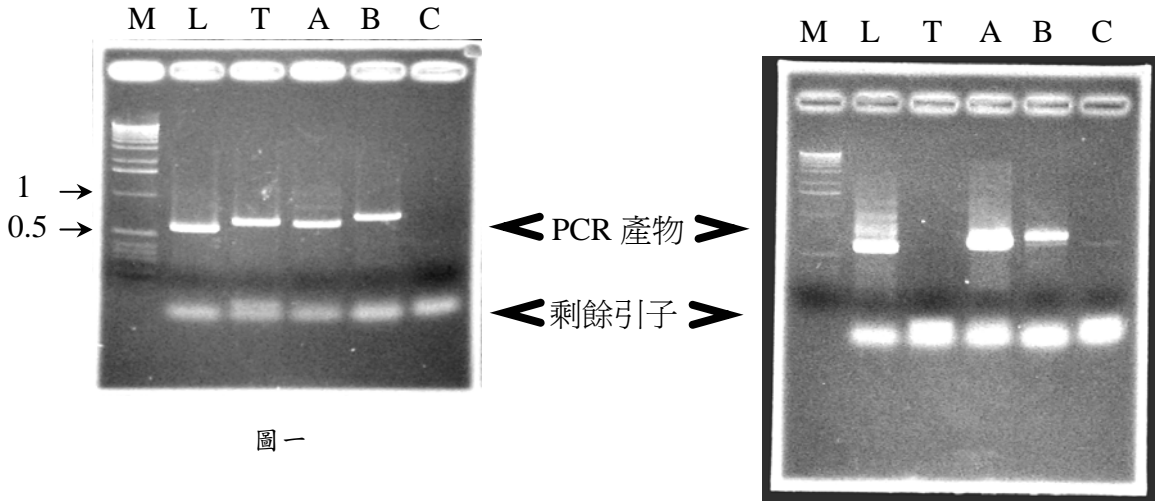
致謝

本研究所需經費部分由國科會計畫（89-2511-S-153-007）補助，特此致謝。

參考資料

1. 丘志威等（民 86）：雙叉桿菌在人體內的活性與功能。輔仁民生學誌，3 卷，1 期，131-142 頁。
2. 李福臨（民 89）：乳酸菌分類之研究近況。科學與方法，32 卷，8 期，36-42 頁。
3. 鄭金寶（民 89）：認識優酪乳。空大學訊，89 · 3 · 16：121-122 頁。
4. Schleifer, K.-H., Ehrmann, M., Beimfohr, C., Brockmann, E., Ludwig W., & Amann, R., (1995). Application of molecular methods for the classification and identification of lactic acid bacteria. *Intl. Dairy Journal* 5: 1081-1094.
5. Tilsala-Timisjärvi, A. & Alatosava, T. (1997). Development of oligonucleotide primers from the 16S-23S rRNA intergenic sequences for identifying different dairy and probiotic lactic acid bacteria by PCR. *Intl. J. Food Microbiol.* 35, 49-56.
6. Song, Y.-L. Kato, N., Liu, C.-X., Matsumiya, Y., Kato, H., & Watanabe, K. (2000). Rapid identification of 11 human intestinal lactobacillus species by multiplex PCR assays using group- and species-specific primers derived from the 16S-23S rRNA intergenic spacer region and its flanking 23S rRNA. *FEMS Microbiol Lett.* 187, 167-173.
7. Kim, T. D. (2000). PCR primer design: an inquiry-based introduction to bioinformatics on the World Wide Web. *Biochemistry and Molecular Biology Education.* 28, 274-276.
8. Scheppler, J. A., Cassin, P. E., Gambier, R. M. *Biotechnology explorations : applying the fundamentals*, Washington DC, ASM Press, pp 241-243, 2000.

我有喝到哪一類型的乳酸菌？應用 PCR 技術檢驗醱酵飲料中乳酸菌的種類



圖一

圖二

圖一：亞當乳酸菌飲料所含菌種之 DNA，經 PCR 處理後，電泳膠片分析結果。自左而右依序為：M -- 1kb ladder marker; L -- LAB 5' 端和 LAB 3' 端的 primer 所得的 PCR 產物; T -- *Streptococcus thermophilus* specific primer 所得之 PCR 產物; A -- *Lactobacillus acidophilus* specific primer 所得之 PCR 產物; B -- *Bifidobacteria* specific primer 所得之 PCR 產物; C -- *Lactobacillus casei* specific primer 所得之 PCR 產物（無產物，可推測亞當中無此菌種存在）。箭頭所指處為 1 kb 及 0.5kb 之位置。

圖二：活益比菲多乳酸菌飲料所含菌種之 DNA，經 PCR 處理後，電泳膠片分析結果。圖中標示如圖一，但可發現活益比菲多 PCR 結果得不到 *Streptococcus thermophilus* 產物，可推測活益比菲多中 *Streptococcus thermophilus* 可能不存在。而 *Lactobacillus casei* 之 PCR 產物亦微，可能為 primer 非專一性之黏合所致。

個別差異 5'端

acido tcacaatgg acgaaagtct gatggagcaa cgccgctga gtgaagaagg ttttcggatc gtaaagctct gttgttggg aagaaggata gaggtagt.a
 bifid tcacaatgg gcgcaagcct gatgcagcga cgccgctga gggatggagg ctttcgggtt gtaaacctct tttgttggg_agcaa.....
 casei tcacaatgg acgaaagtct gatggagcaa cgccgctga gtgaagaagg ttttcggatc gtaaacctct gttgttggg aagaatgat_ctgatagt.a
 therm tggcaatgg gggcaaccct gaccgagcaa cgccgctga ctgaagaagg ttttcggatc gtaaagctct gttgtaagtc_aagaacgggt_gtgcaggtgg

LAB 5'端

100

acido actggccttt atttgacgtt aatcaaccag aaagtcacgg ctaactacgt gccacgagcc gcggtataac_gtaggtggcn agcgttgctc ggatttattg
 bifid ...gcttc_gggtgagtg acctttcgaa taagcgccg ctaactacgt gccacgagcc gcggtataac_gtagggcgca agcgttatcc ggatttattg
 casei actgatcagg tagtgacgtt atccaaccag aaagtcacgg ctaactacgt gccacgagcc gcggtataac_gtaggtggca agcgttgctc ggatttattg
 therm aaagttcaca cagtgcaggt agcttaccag aaagggacgg ctaactacgt gccacgagcc gcggtataac_gtaggtcccg agcgttgctc ggatttattg

200

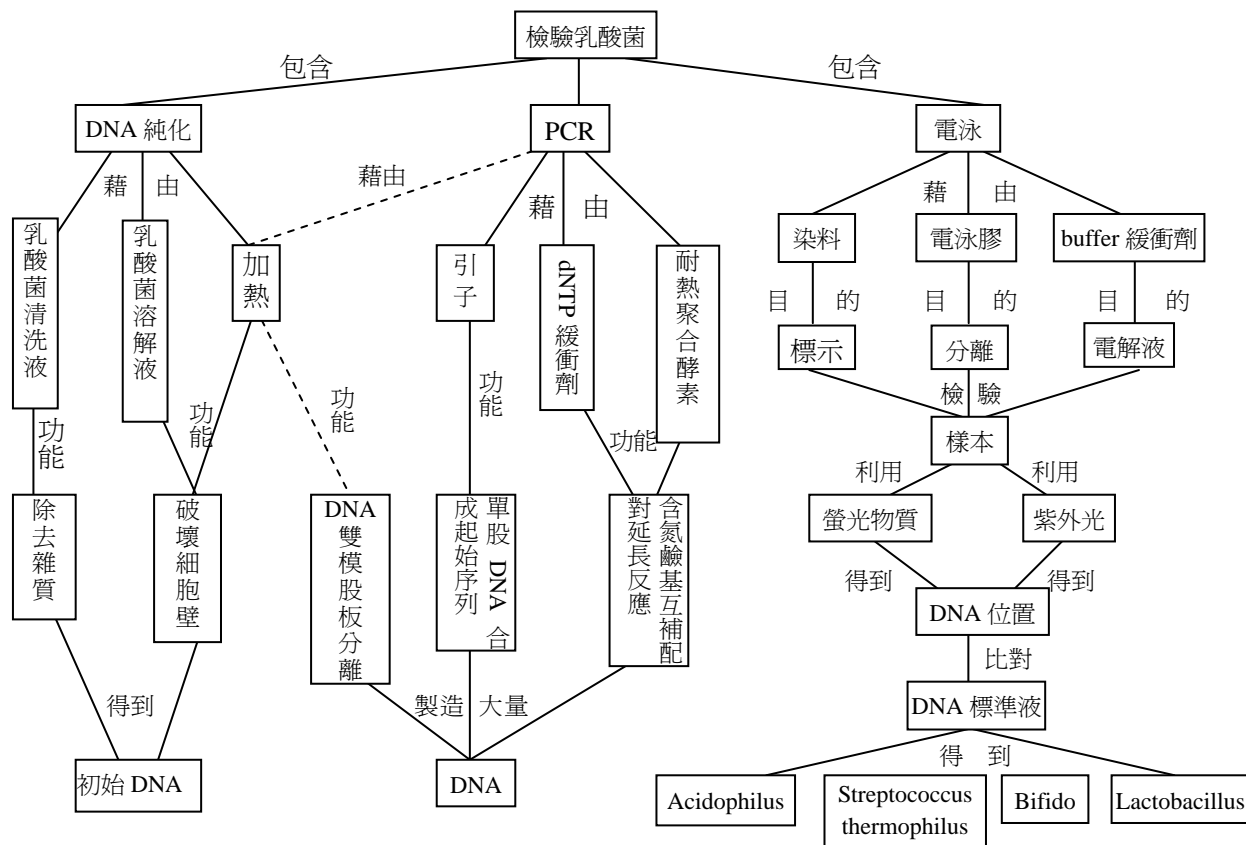
~~~~~

LAB 3'端

acido gtcagctcgt gtcgtgagat gttgggttaa gtcccgaac gagtgcacc cttgtcatta gttgccagc. .attaagttg ggcactctaa tgagactgcc  
 bifid gtcagctcgt gtcgtgagat gttgggttaa gtcccgaac gagtgcacc ctcgcccgtt gttgccagca cgttatgggtg ggaactcaag ggggaccgcc  
 casei gtcagctcgt gtcgtgagat gttgggttaa gtcccgaac gagtgcacc cttattacta gttgccagc. .atttagttg ggcactctag tgagactgcc  
 therm gtcagctcgt gtcgtgagat gttgggttaa gtcccgaac gagtgcacc cctattgtta gttgccatc. .attcagttg ggcactctag cgagactgcc

800

附錄一：利用 GCG pileup 程式比對出 *Lactobacillus acidophilus*、*Bifidobacteria*、*Lactobacillus casei* 和 *Streptococcus thermophilus* 四種乳酸菌位於 16S rDNA 上部份相似核酸序列的相對位置。圖中 acido 表 *Lactobacillus acidophilus* (A 菌)；bifid 表 *Bifidobacteria* (B 菌)；casei 表 *Lactobacillus casei* (C 菌)；therm 表 *Streptococcus thermophilus* (T 菌)。序列位置底線為直線的是四種乳酸菌共同的引子 LAB 5'端和 LAB 3'端處；序列位置底線為波浪狀的則為四種乳酸菌各自引子的 5'端處。中央折線表示省略之序列。



附錄二：學生畫出來的實驗概念圖。

(上承第 69 頁)

以有各種形式，基本的結構可以以教學活動進行之流程為藍本，例如可以有：安置性評量、引起動機、發展活動、綜合活動、成就測驗等。

本文中嘗試以「生物與環境」模組統整自然與生活科技之各分科概念，由於以生物為主軸，因此其深度及廣度以生物科教師能勝任教學為主。無論教材如何呈現，分科或合科，統整或只是連結，學生在運用其所學

得的知識或能力來解決其生活所遭遇之問題時，必然是統整所有所知所學以解決其問題，不會限制只用某一科之知識或能力。因此，統整的工作，學生在學習及成長的過程中是始終在進行的。學生在腦海中的認知基模也並未刻意分割，因此在課程發展的過程中，各學習領域中各分科之內容及比重仍需要教師依其學校之教育目標及學校要發展之特色作專業之判斷。