嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

研究題目：發展並應用高特異性 alcohol dehydrogenase gene (type III) primer 快速檢測醋酸菌

計畫編號：CNFS95-04

執行期限：95 年 01 月 01 日至 95 年 12 月 31 日

主持人：食品科技系　王淑珍

中華民國 96 年 3 月 6 日

一、摘要：

本研究利用已發表之 AAB (acetic acid bacteria) type III *adh* sequence 設計 primer ADH III L187 / ADH III R500 與 AAB 之 reference strains 進行 PCR 反應，可產生 313 bp 的 PCR 產物。其他如 *Bacillus cereus*， *Yersinia enterocolitica*、*Salmonella enterica* subsp.、*Lactobacillus amylovorus*、*Pseudomonas aeruginosa* 及 *E.coli* 等非醋酸菌之菌株，則無任何 PCR 產物生成。此外，本實驗共篩選出 75 株疑似醋酸菌，經 ADH III L187 / ADH III R500 增幅後，可產生 313 bp PCR 產物有 41 株，進一步應用 Trcek *et al.*發表之 alcohol dehydrogenase gene (type I) primer 檢測 AAB。結果顯示所分析之 AAB 菌株皆為 *Acetobacter* spp. ，由此顯示 ADH III L187 / ADH III R500 primer 對於醋酸菌具有高特異性。

二、前言：

AAB 目前可分為 8 屬：*Acetobacter, Gluconobacter, Gluconacetobacter, Acidomonas, Asaia, Kozakia, Swaminathamia* 及 *Saccharibacter*。由於 AAB 含 insertion element，能行自然突變的頻率很高，故利用外觀型態來鑑定 AAB 屬於何種 species 是很困難的，既不正確又浪費時間。基於此，利用分子檢測法，鑑定特定 DNA 序列及其特徵，可以快速且正確的鑑定微生物，分子檢測法亦可用來鑑定無法分離或培養的微生物。利用 alcohol dehydrogenase gene (type I) primer，以 PCR 方法發展鑑定所有 AAB 及特定的 *Acetobacter aceti* 菌株；利用 PCR 增幅 16S rDNA 及 16S-23S rDNA intergenic spacer，並以 restriction fragment length polymorphism (RFLP)來分析鑑定 AAB；利用 RFLP-PCR 增幅 16S rDNA，Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC-PCR)及 Repetitive Extragenic Palindromic (REP-PCR)…等。文獻報告中所提的方法，以 RFLP 確認 AAB，首先需建立不同 species AAB 的 16S rDNA 或 16S-23S intergenic spacer 之 RFLP，再與分離之 AAB RFLP 對照及確認，過程繁雜且一株菌可能同時屬於不同的 species。基於此本研究首先擬發展 PCR 方法鑑定 AAB，並以 16S rDNA sequence 作為確認，本方法確立後可快速鑑定 AAB，作為工業上酒類發酵的流程控制，防止 AAB 的污染及工業上快速篩選生產用的 AAB。

三、材料與方法：

（一）實驗材料

1. 材料：AAB 分離自 sugar cane fermentation liquor 及 fruits vinegar
2. 菌種：本研究所使用 reference strains 為 acetic acid bacteria 標準菌株其他非 AAB 菌株，菌種來源購置食品工業研究所及台中中興大學。

（二）Primers 設計：

本實驗主要是利用已發表之 *Acetobacter syzygii* (acc. no. AB264314）type III *adh* sequence 設計對於 AAB 具有高特異性之 primer（ADH III L187 / ADH III R500 ），進行 AAB 的 PCR 反應。

（三）PCR 反應：

將 10μl 的菌體 DNA 加入含有 dNTP、standard PCR-buffer、無菌水、primers、DNA-Polymerase 的混合液中，置入 PCR machine 進行擴大反應，以 94℃ 1 分鐘，52℃(Nuni ADH fw / Nuni ADH rev)、55℃(ADH III L187 / ADH III R500)、64 ℃（16Sd / 16Sr）1 分鐘 和 72℃ 2 分鐘，反應 35 個循環。

四、結果與討論：

1. alcohol dehydrogenase gene type III (*adh* III) primer 特異性：

將 *adh* III 基因(acc. no. AB264314)與其它菌株 adh 基因進行比對，得到 primer ADH III L187 / ADH III R500，其 PCR 產物為 313 bp，將此 primer 與 4 株 acetic acid bacteria (AAB)標準菌株進行 PCR 反應，所測試 4 株標準菌株皆得到 313 bp 之 PCR 產物 (Fig.1)，進一步與其他非 AAB 之菌株進行 PCR 反應如 *Bacillus cereus*、*Yersinia enterocolitica*、*Salmonella enterica* subsp、*Lactobacillus amylovorus*、*Pseudomonas aeruginosa* 及 *E.coli* 等菌株，則無任何 PCR 產物生成(Fig.2)。由上述結果顯示 primer ADH III L187 / ADH III R500 對 AAB 具有高度特異性。

2. *adh* III primer 特異性之確認：

經鑑別性培養基 RAE broth 及 RAE agar 培養，共分離 75 株疑似 AAB 菌株，將分離之 75 株疑似 AAB 菌株以 ADH III L187 / ADH III R500 增幅進行 PCR 反應，可產生 313 bp PCR 產物有 41 株(Fig.3, Table 1)，而進一步將 41 株疑似 AAB 菌株，利用 Trcek *et al.* 發表之 AAB 特異性 primer Nuni ADH fw / Nuni ADH rev 增幅，確認 primer ADH III L187 / ADH III R500 之特異性，在所測試 41 株菌株中經 primer Nuni ADH fw / Nuni ADH rev 增幅，皆產生 376 bp 之 PCR 產物（Table 1）。由結果顯示以 primer ADH III L187 / ADH III R500 檢測，PCR 產物只有在 313 bp 之菌株才是 AAB。可用來初步確認 primer ADH III L187 / ADH III R500 對 AAB 之特異性。

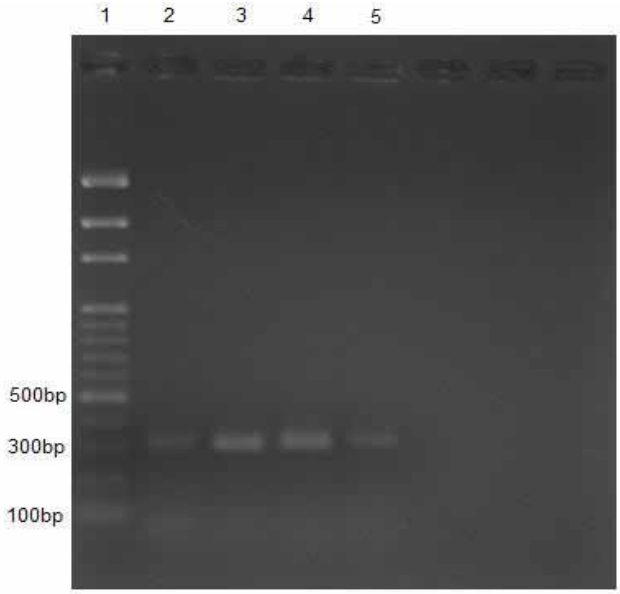

Figure 1. Detection of acetic acid bacteria using primer ADH III L187 / ADH III R500. Lane1- 100bp DNA ladder；Lane2：*Acetobacter aceti* （BCRC 12324）；Lane3： *Acetobacter orleanensis* (BCRC11568)；Lane4：*Gluconacetobacter xylinus* subsp（BCRC11682）；Lane5：*Gluconacetobacter xylinus* subsp. （BCRC14101）

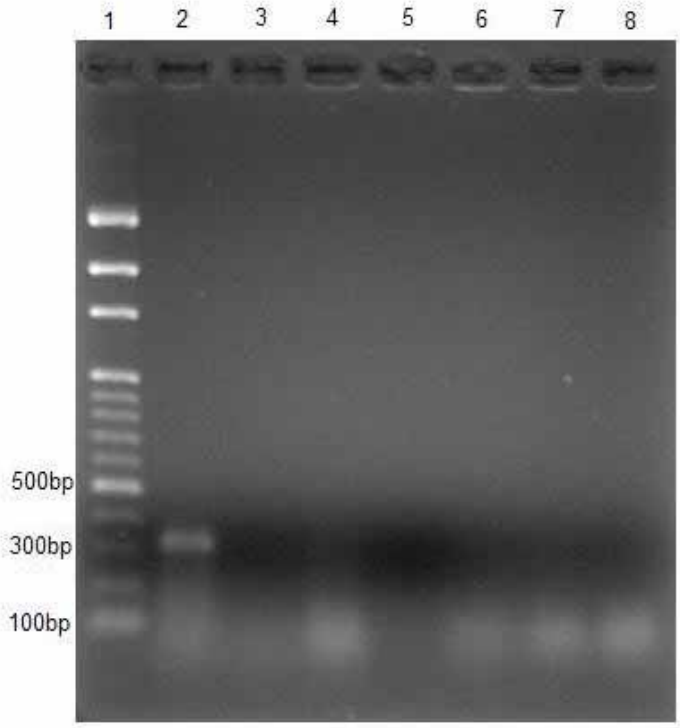

Figure 2.Specificity of primer ADH III L187 / ADH III R500 for the detection of non-acetic acid bacteria. Lane1- 100bp DNA ladder；Lane2：*Acetobacter aceti* （BCRC 12324）；Lane3：*Bacillus cereus*（BCRC12812）；Lane4：*Yersinia enterocolitica*（BCRC10807）；Lane5：*Salmonella enterica* subsp. （BCRC10744）；Lane6：*Lactobacillus amylovorus*（BCRC11648）；Lane7：*E.coli*（UM4247）；Lane8：*Pseudomonas aeruginosa*（BCRC10261）

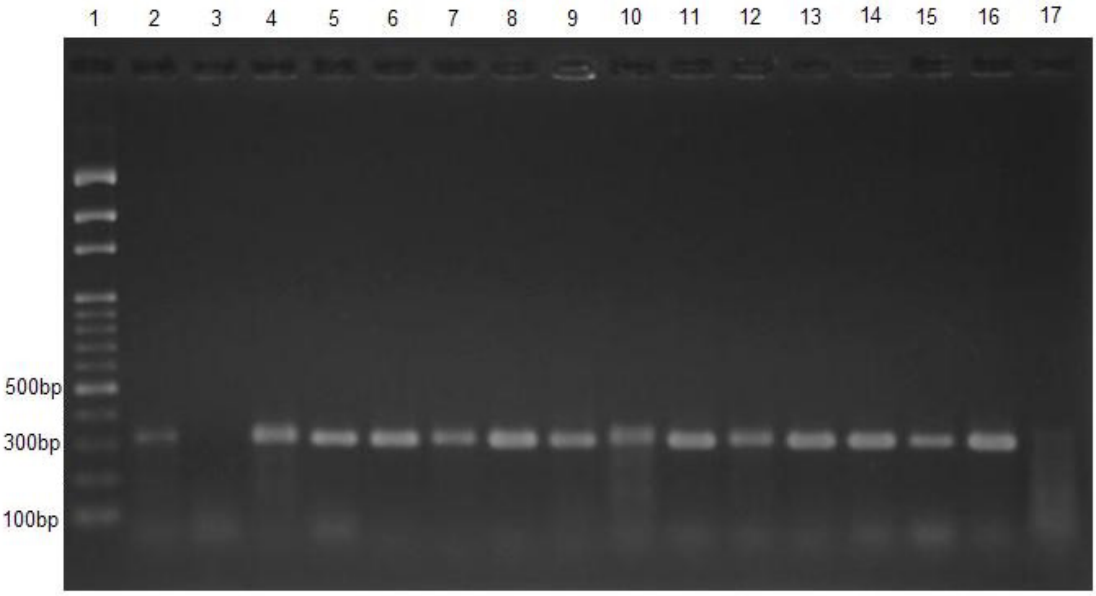

Figure 3. Detection of isolates of acetic acid bacteria with primer ADH III L187 / ADH III R500

Lane1：100bp DNA ladder；Lane2：*Acetobacter aceti*（BCRC 12324）；Lane3：*E.coli*（UM4247）；Lane4：AAB101；Lane5：AAB145；Lane6：AAB148；Lane7：AAB275；Lane8：AAB305；Lane9：AAB331；Lane10：AAB333；Lane11：AAB368；Lane12：AAB504；Lane13：AAB601；Lane14：AAB609；Lane15：AAB704；Lane16：AAB964；Lane17：AAB370

Table 1、Bacteria strains used in this study and results tested with primer ADH III L187 / ADH III R500 and Nuni ADH fw / Nuni ADH rev

Strains	Primer ADH III	Primer Nuni ADH	Strains	Primer ADH III	Primer Nuni ADH
BCRC14101	＋	＋	AAB331	＋	＋
BCRC11568	＋	＋	AAB332	－	－
BCRC12324	＋	＋	AAB333	＋	＋
BCRC11682	＋	＋	AAB361	－	－
AAB101	＋	＋	AAB363	－	－
AAB102	＋	＋	AAB365	－	－
AAB103	＋	＋	AAB366	＋	＋
AAB111	＋	＋	AAB367	－	－
AAB112	＋	＋	AAB368	＋	＋
AAB113	＋	＋	AAB401	－	－
AAB114	＋	＋	AAB402	－	－

Continue

AAB140	＋	＋	AAB404	－	－
AAB141	＋	＋	AAB409	－	－
AAB142	＋	＋	AAB410	－	－
AAB143	＋	＋	AAB411	－	－
AAB144	＋	＋	AAB501	－	－
AAB145	＋	＋	AAB502	－	－
AAB146	＋	＋	AAB503	－	－
AAB147	＋	＋	AAB511	－	－
AAB148	＋	＋	AAB512	＋	＋
AAB201	－	－	AAB513	－	－
AAB202	－	－	AAB601	＋	＋
AAB203	＋	＋	AAB602	＋	＋
AAB204	－	－	AAB603	＋	＋
AAB205	－	－	AAB605	＋	＋
AAB252	－	－	AAB606	＋	＋
AAB254	－	－	AAB609	＋	＋
AAB261	－	－	AAB701	－	－
AAB263	－	－	AAB702	－	－
AAB264	－	－	AAB703	－	－
AAB272	＋	＋	AAB704	＋	＋
AAB275	＋	＋	AAB801	－	－
AAB301	－	－	AAB802	－	－
AAB302	－	－	AAB911	－	－
AAB303	＋	＋	AAB912	－	－
AAB305	＋	＋	AAB922	＋	＋
AAB306	＋	＋	AAB960	－	－
AAB307	－	－	AAB962	－	－
AAB311	－	－	AAB964	＋	＋
AAB330	＋	＋			

Number of total strains:75

Number of Isolates of Acetic acid bacteria: 41

五、結論：

綜合上述結果確認了本實驗所設計之 primer ADH III L187 / ADH III R500 對 AAB 具有高度的特異性。在於本方法確立後，便可快速的鑑定 AAB，做為工業上酒類發酵的流程控制，並有效地防止 AAB 的污染或使用在工業上快速篩選生產用之 AAB 菌株