

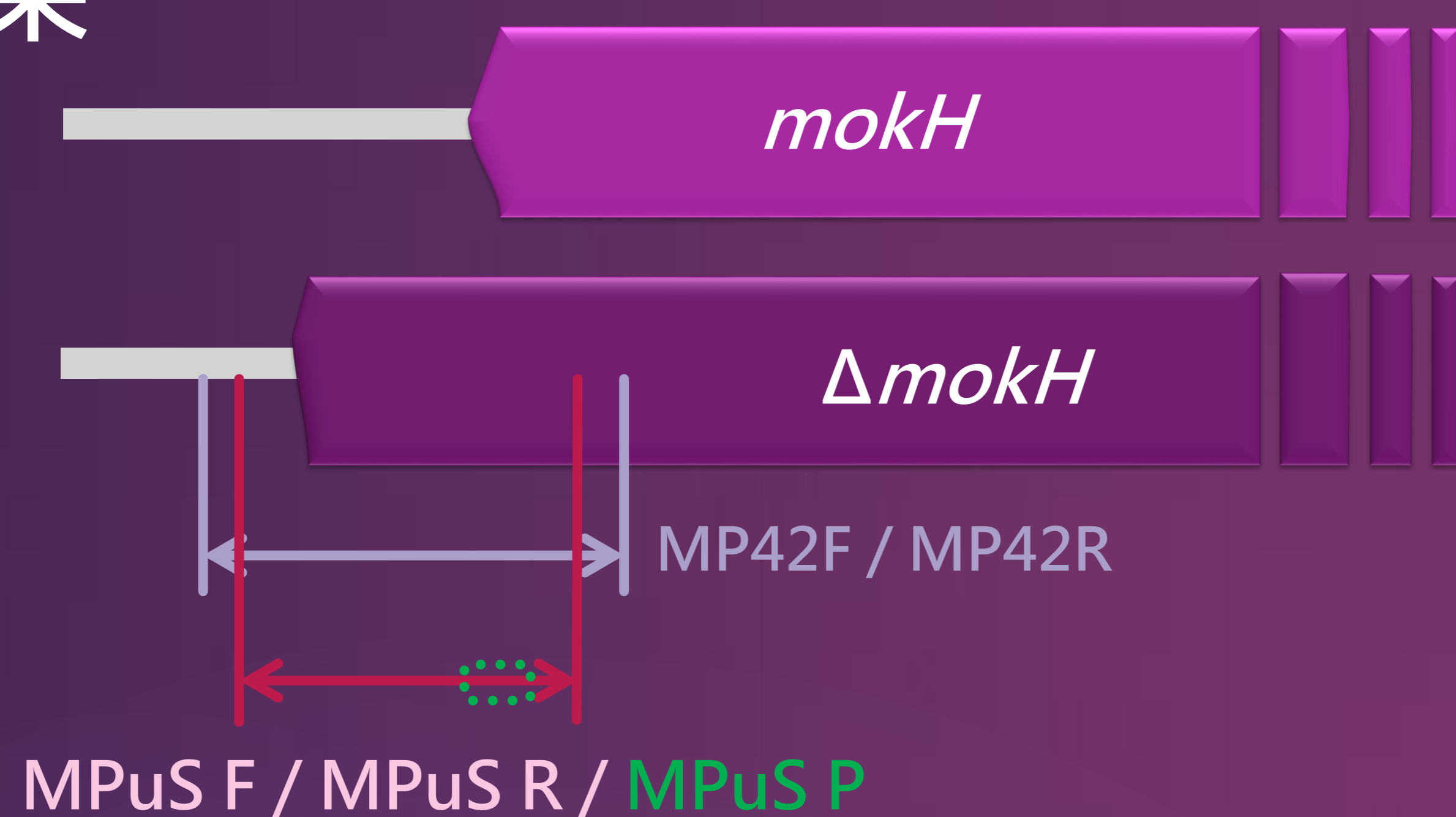
紅麴菌 *Monascus purpureus* 菌種專一性即時定量聚合酶鏈反應方法開發

Development of *Monascus purpureus* species-specific real-time quantitative polymerase chain reaction method

摘要

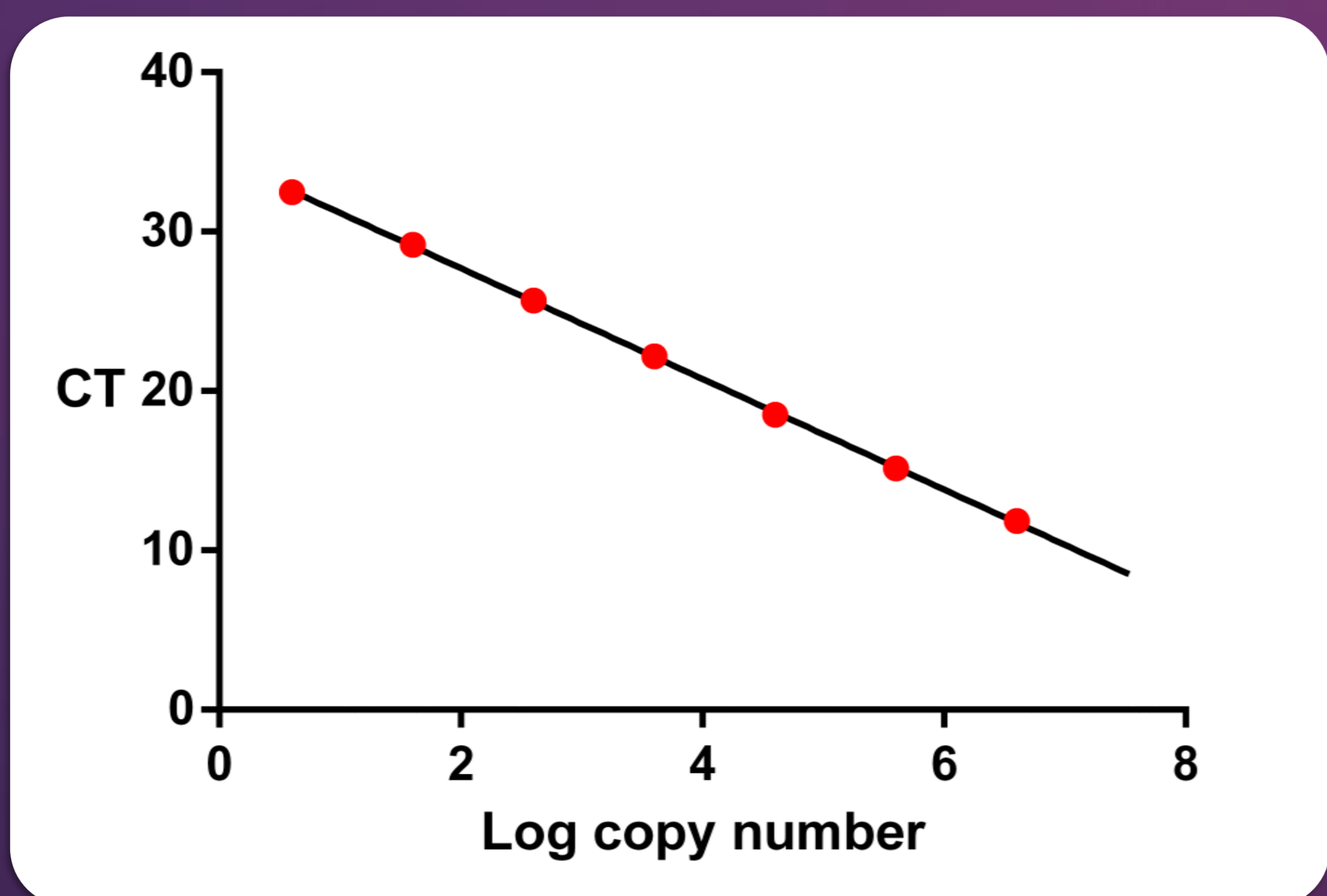
紅麴菌是已使用數千年的食品發酵菌種，在許多中國古籍中有其功效及應用的紀載。隨著紅麴菌的功效不斷實證，紅麴菌已成為當今最熱門的保健食品素材。雖然紅麴保健產品持續蓬勃發展，但由於對紅麴菌種缺乏有效的鑑別檢測方法，亦無從分辨摻偽，形成潛在的食安管理漏洞。本研究發現— *M. purpureus* 中的退化 *mokH* 基因序列 ($\Delta mokH$) 具有菌種專一性，因此針對 $\Delta mokH$ 一序列設計 *M. purpureus* 菌種專一性引子。本研究建立 *M. purpureus* 菌種專一性即時定量聚合酶鏈反應 (real-time qPCR) 檢測方法，初步結果顯示本研究所建立的種專一性 qPCR 分析方法在 $4 \times 10^0 - 4 \times 10^6$ copies 的線性範圍內具有良好線性 ($R^2 > 0.99$)，定量與偵測極限皆可接近理論極限 (4 copies)。除了具有菌種專一性之外，本研究設計的引子於初步測試中亦成功定性偵測紅麴產品中的菌種。本研究希望藉由 real-time qPCR 的偵測範圍廣、靈敏度高、準確、專一及快速等優點，能有效鑑別鑑測紅麴產品中的菌種，並進一步分辨摻偽。

結果



圖一、引子對 MP42 及 MPuS 在 $\Delta mokH$ 序列上的相對位置。由於 SYBR Green 系統較易受到干擾 (MP42)，因此設計了第二組 TaqMan 系統用引子/探針組 (MPuS)。綠色部分為 TaqMan probe。

MP42 F: 5' -ATCGCTTCTATATACAGGATTCGGG-3'
 MP42 R: 5' -TCTATTTCCCTTGGGAAACGAGAT-3'
 MPuS F: 5' -CCTGGGAGGGGTCGTATTCA-3'
 MPuS R: 5' -CCCCAAGTGCTCGATCCTTT-3'
 MPuS P: 5' -FAM-GATTGTGTGGTCAATGGGG-BHQ1-3'



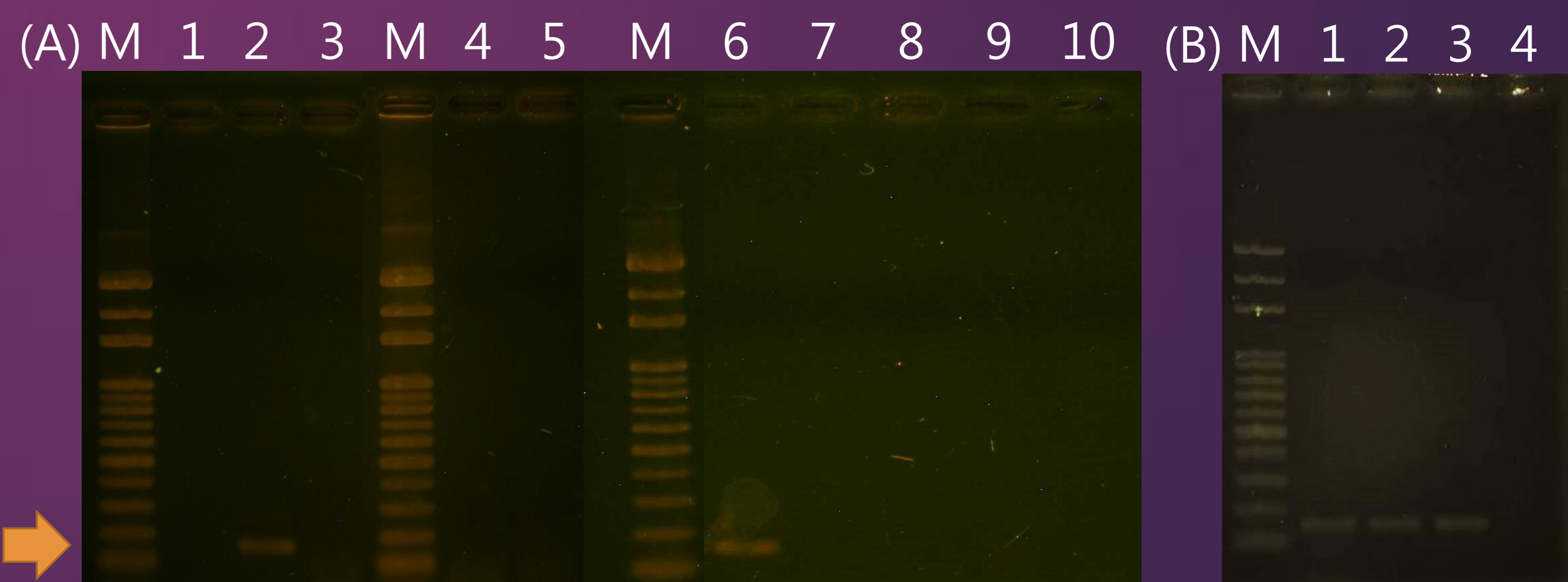
圖三、以質體 pJM-MP42 建立的 SYBR Green 標準曲線 (引子對 MP42)。質體標準品範圍 $4 \times 10^0 - 4 \times 10^6$ copies。 $R^2 = 0.997$ 。PCR efficiency 94.13%。

表一、*M. purpureus* 種專一性 qPCR 的再現性與重複性測試結果。

pJM-MP42 copy number	Mean C_T	RSD _r ^a , %	RSD _R ^b , %
4000000	12.67	1.76 ± 1.23	9.72
400000	15.99	2.70 ± 1.27	7.94
40000	19.63	1.82 ± 1.12	5.68
4000	23.56	2.02 ± 1.40	5.94
400	27.37	1.47 ± 1.71	6.25
40	31.19	1.52 ± 1.91	6.12
4	34.73	1.11 ± 1.97	5.68

試驗數據由三次獨立試驗所得，每個獨立試驗均為三重複。本研究所建立的定量方法線性範圍為 $4 \times 10^0 - 4 \times 10^6$ copies，定量與偵測極限均為 4 copies*。

a: 重複性-單次試驗中三重複 C_T 值的變異係數。
 b: 再現性-三次獨立試驗中三個 mean C_T 值的變異係數。
 *: 根據 CODEX 所定義食品分析方法的定量需求，定量分析方法的線性範圍內 RSD_r 與 RSD_R 須小於 25%，在此範圍內最低濃度即為該分析方法的定量極限 (limit of quantification, LOQ) 與偵測極限 (limit of detection, LOD)。



圖四、引子對 MPuS 的菌種專一性與真實樣品 (紅麴米) 測試。(A) 菌種專一性測試。M: 100 bp marker。1: *M. barkeri* BCRC 33309^T。2: *M. kaoliang* BCRC 31506^T。3: *M. sanguineus* BCRC 33446^T。4: *M. lunisporas* BCRC 33640^T。5: *M. argentinesis* BCRC 33998^T。6: *M. purpureus* BCRC 31542^T。7: *M. pallens* BCRC 33641^T。8: *M. floricandus* BCRC 33310^T。9: *M. pilosus* BCRC31502^T。10: *M. ruber* 31532^T。(B) 紅麴米樣品測試。1: *M. purpureus* BCRC 31542^T (正控制組)。2: 紅麴米樣品一。3: 紅麴米樣品二。4: 空白對照組。