

宜蘭大學生物資源學刊(2005)

第 1 期第 9~15 頁

# 利用聚合酶鏈鎖反應-限制片段長度多型性 (PCR-RFLP) 技術探討核糖體 DNA 及內轉錄間隔區 (ITS 1-5.8 S-ITS 2) 用於區分紅麴菌種之可行性

林世斌\* 張嘉珮

國立宜蘭大學食品科學系

## 摘要

本研究利用聚合酶鏈鎖反應-限制片段長度多型性 (PCR-RFLP) 技術，探討紅麴菌核糖體 DNA，用於區別紅麴菌屬內種間、種內群體的可行性。針對紅麴菌屬(*Monascus*)九株菌體之 DNA，以真菌 rDNA 的 PCR 擴增通用引子，有效的擴增 5.8S rDNA 與其兩端之內轉錄間隔區 (internal transcribed spacer ; ITS)，區域長度為 540-630 bp。利用七種核酸內切酵素 *Hae*III、*Dra* I、*Hind*III、*Eco*R I、*Bam*HI、*Cfo* I、*Hinf*I 進行 ITS1-5.8S rDNA -ITS2 區域之剪切。結果顯示 *Bam*HI、*Dra* I 及 *Hind*III 均無切位，故無任何鑑別效果。然而除了 *M. floridanus* 明顯不同外，其他酵素在 *M. purpureus*、*M. sanguineus*、*M. albus*、*M. ruber*、*M. pilosus* 及 *M. kaoliang* 所產生的片段形式皆相似，是以無法有效鑑別紅麴菌的屬內種間。除此之外，*M. floridanus* 在馬鈴薯葡萄糖培養基 (PDA) 上的菌落顏色 (橄欖綠) 亦與其他紅麴菌種 (紅色或白色) 極不相同，因此推論該菌種似乎不適分類於 *Monascus* 中。

**關鍵詞：**紅麴菌屬，5.8S 核糖體 DNA，聚合酶鏈鎖反應-限制片段長度多型性，核糖體內轉錄間隔區

The Study on the Use of Ribosomal DNA and Internal Transcribed Spacer (ITS1-5.8S-ITS2 ) in Identifying *Monascus spp.* with the PCR-RFLP Technique

## Shih-Bin Lin\* Jia-Pei Chang

Department of Food Science, National Ilan University

### Abstract

This study is to realize the possibility by using ribosomal RNA gene to distinguish between *Monascus* spp. and between *Monascus purpureus* strains through the polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (RFLP) technique. The 5.8S rDNA and laterally flanked internal transcribed spacer (ITS) were successfully amplified by PCR from nine *Monascus* spp. with the universal primer and were between 540-630 bp in length. The PCR products were then cut by each of the seven restriction enzymes: *Hae*III, *Dra*I, *Hind*III, *Eco*RI, *Bam*HI, *Cfo*I, *Hin*I, to obtain their RFLP profiles. The results demonstrated that *Hae*III, *Dra*I and *Hind*III did not provide any cut and have no differential power. The RFLP profile obtained from *M. purpureus*, *M. sanguineus*, *M. albus*, *M. ruber*, *M. pilosus* and *M. kaolian* were similar except *M. floridanus* and so that these enzymes did not effectively provide differential power among *Monascus* spp. Besides, the colony color of *M. floridanus* grown on potato dextrose agar (PDA) was so different from the color, red or white, obtained from the other *Monascus* spp. used in this study. It seemed not probable to classify the *M. floridanus* into *Monascus* genus.

**Key words:** *Monascus*, 5.8S rDNA, PCR-RFLP, ITS, fungal identification

\* Corresponding author E-mail: sblin@niu.edu.tw

### 前言

紅麴為中國長久以來所使用之食用菌種，一般常用來製作紅糟肉及紅麴酒等。早在一千年前的北宋初期文物如陶谷雜錄、唐五代的《清異錄》已提及「紅麴煮肉」；元朝以後，紅麴的使用更為普遍，許多調理食物的書和藥典上均有紅麴的記載；到了明朝，李時珍所著的《本草綱目》（1590年）中即記載「紅麴主治消食活血、健脾燥胃；治赤白痢，下水穀。釀酒破血行藥勢，殺山嵐瘴氣，治打撲傷損，治女人血氣痛及產後惡血不盡」。而台灣以紅麴作為食用及藥用，一般認為是從明末清初開始（蘇，2001）。目前亦有研究指出紅麴菌含膽固醇合成抑制劑 monacolin K (Albert, 1988)，可抑制膽固醇生成；Kohama et al.(1987)發現紅麴有降低血壓之功能。

紅麴菌屬(*Monascus*)的名稱肇始於法國學者 Van Tieghem 於 1884 年命名從馬鈴薯中分離出之菌株(林，2001)。紅麴菌廣存於土壤、澱粉、新鮮牧

草、河川表面沉澱物及松樹根組織中 (Went, 1985)，可在有性生殖期產生子囊果 (Cleistotheceum)。本屬菌株的特徵是菌絲為無色、褐色或紅色，具有橫隔(septa)，且末端會產生一個大型的有性厚壁子(ascocarp)。在分類上紅麴菌屬於真菌界(Fungi)、子囊菌門(Ascomycota)、子囊菌綱(Ascomycetes)、散囊菌目(Eurotiales)、紅麴菌科(Monascaceae) (林，1983)。

美國學者 Young 根據形態與生理的差異，將紅麴菌屬分成五個不同品種，並認為 *M. heterosporus* 和 *M. ruber* 應屬同一種(林，2001)。Hawksworth and Pitt (1983) 則根據紅麴菌在洋菜固態培養基上的生長速度、菌叢顏色及子囊果與分生孢子的大小、顏色，認為紅麴菌應只分成 *M. ruber*、*M. purpureus* 和 *M. pilosus* 等三種。總言之，早期紅麴菌的分類是基於分離源、培養形態、發酵特性及色素產生等特徵來命名(林，1994)，而較常見的紅麴菌共有七種(*Monascus pilosus*、*Monascus purpureus*、*Monascus ruber*、*Monascus floridanus*、*Monascus pallens*、*Monascus*

*sanguineus*、*Monascus anka*) (Kohama et al., 1987)，但由於其分類的依據難以統一，故在菌種的鑑定上有一定的困難。近年來有許多的新興科學和技術的發展，尤其是分子生物技術的興起使真菌的分類學獲得更大的推進，例如，利用生物 DNA 中 G+C% 含量測定是最早用於真菌分類學研究的分子生物學技術，目前在酵母菌的應用較為成功；另外還有核酸雜交技術、rDNA 限制片段長度多型性分析 (RFLP)、序列分析等。其中 rDNA-RFLP，是利用生物進化進程中，DNA 序列發生插入、缺失或突變，從而改變了限制核酸內切酶識別位置的特性，區別菌種或品系。因此同種生物不同個體的 DNA 分子用同一種限制酶剪切時，會產生不同長度的片段，在凝膠電泳時呈現不同的帶型。RFLP 研究的對象原則上只要內切酶選擇適當，對所有真菌均能顯示任何分類水平上的多形性和特異性，常用於種以下的分類。RFLP 技術方法簡便，影響因素少，穩定性高。這種方法存在的缺點是用限制酶剪切整個基因組 DNA，產生的酶切圖譜往往伴有濃重的背景，使特徵性酶切條帶在這一背景下較難辨認。另外，限制酶切圖譜中特徵性的條帶，主要是基因組 DNA 中具有高度重複序列的 rDNA 的酶切片段或粒線體 DNA。其中 rDNA 在真核細胞中，為一群呈縱線排列的重複性基因族(repeat gene families)，位於染色體的核仁組成區域(nucleolar organizer region) (蔡等，1999)。真菌核糖體的基因包括 4 種：28S rDNA、5S rDNA、18S rDNA 和 5.8S rDNA。它們在染色體上頭尾相連、串聯排列，相互之間由間隔區域分隔。其中包括位於 5.8S rDNA 兩端在演化過程中變異快速的內轉錄間隔區 (internal transcribed spacer, ITS)。在 rDNA 之序列結構中，18S、5.8S、28SrRNA 基因區中之序列，於不同物種間相當一致，但在 ITS 的區域中，不同物種間之長度及序列常有很大之變異，即使在種內、族群中或個體內，rDNA 也受 ITS 的影響而造成具有長度異質性 (length heterogeneity) (蔡等，1999)。

本研究即要利用 PCR-RFLP 技術，了解紅麴菌 rDNA 之 ITS1-5.8S-TTS2 區段用於區別紅麴菌屬內

種間或種內群體的可行性。

## 材料與方法

### 一、菌種之準備

菌種購自新竹食品工業研究所生物資源保存研究中心，包括紅麴菌屬 九株：*M. purpureus* (BCRC31501)、*M. purpureus* (BC RC 31530)、*M. purpureus* (BCRC 31500)、*M. sanguineus* (BCRC 33446)、*M. albus* (BCRC 33372)、*M. ruber* (BCRC 31523)、*M. floridanus* (BCRC 33310)、*M. pilosus* (BCRC 31502)、及 *M. kaoliang* (BCRC 31506)；米麴菌兩株包括 *Aspergillus oryzae* var. *oryzae* BCRC 30118 及 BCRC 30120。先於 30°C 馬鈴薯葡萄糖培養液(potato dextrose broth；PDB)中進行活化，再塗抹於馬鈴薯葡萄糖洋菜培養基(potato dextrose agar；PDA)之平板上，置於 30°C 培養箱中培養 2-3 天進行繼代並保存於 PDA 斜面上。

擴大培養上述已預先活化之菌種於 100 ml PDB 中，在 30°C 下搖瓶培養 2-3 天，並以抽器過濾方式收集菌體樣本，存於 -80°C 冷凍櫃中，供萃取 DNA 之用。

### 二、DNA 之抽取

DNA 的抽取方法乃參考並作部份修飾 Aristeo 等人(1999)的方法。將紅麴菌菌體置於 1.5 ml 離心管，加入 200  $\mu$ l Blue Buffer (含 2% Triton X-100，1% SDS，100 mM NaCl，10 mM Tris (pH8.0) 1 mM EDTA) 再添加酚、氯仿及 isoamyl alcohol (25:24:1) 以去除多醣及蛋白質物質。加入約 0.3 g 預先以 HCl 清洗處理的玻璃珠，於震盪器上震盪 3 分鐘後快速離心 3 分鐘。回收上層之澄清液約 180  $\mu$ l 於新的離心管中，最後分別以 100% 及 70% 的酒精沉澱並清洗 DNA，並於抽氣櫃中進行風乾獲得 DNA，將此 DNA 回溶於 100  $\mu$ l 之 ddH<sub>2</sub>O 中，存於 -80°C 冷凍櫃中備用。

### 三、聚合酶鏈鎖反應

利用真菌 rDNA 之 PCR 擴增通用引子，正向

引子 ITS1 : 5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG3' ) 及反向引子 ITS2(5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') 進行聚合酶鏈鎖反應。本試驗以 Perkin-Elmer 公司的 Gene Amp PCR System 2400 (USA) 熱循環器 (PCR thermocycler) 進行 PCR 的增幅。PCR 的反應內容物及濃度如下：加入 1 unit 的 *Taq* DNA polymerase、0.1 mM dNTP、緩衝溶液 (reaction buffer (含 1.5 mM Mg<sup>2+</sup>)) 0.4 μM 的正向引子 (ITS1) 與反向引子 (ITS2) 最後加入 ddH<sub>2</sub>O 使總體積為 50 μl, 置於 0.6 ml 的微量離心管, 再於溶液表面加入 10 μl 的礦物油, 最後再加入預先於溫度控制器加熱 (94°C) 變性之紅麴菌 DNA 抽取液 1 μl (約含 2 ng DNA) PCR 反應條件 (Granchi et al.1999) 為：94°C 反應 3 分鐘使 DNA 分開成單股, 然後進行 35 個循環的 94°C/20sec、53°C/20sec、72°C/1min, 最後再進行 72°C/5min 的修補延伸。將 PCR 擴增之產物利用 2% Agarose 瓊膠於 TBE 緩衝液中電泳分離, 並於 0.5 μg/mL EtBr 中染色, 退染後置於紫外燈箱上觀察並拍照。

#### 四、限制內切酵素反應

選擇七種購自 Promega(USA)公司的酵素：*Hae* III、*Dra*I、*Hind*III、*Eco*RI、*Bam*HI、*Cfo*I、*Hin*FI, 將 PCR 產物作單酵素剪切處理。反應總體積為 20 μl: 含 DNA 片段 14 μl(約含 35 ng DNA) 2 μl 的 10 倍緩衝溶液、1 μg BSA、2.5 unit 的限制內切酵

素, 其餘體積用 ddH<sub>2</sub>O 補足, 並置於 0.6 ml 之離心中, 於 37°C 恆溫水浴槽中反應三小時後, 同樣利用 2% Agarose 瓊膠於 TBE 緩衝液中電泳分離, 並於 0.5 μg/mL EtBr 中染色, 退染後拍照。DNA 片段長度乃利用 UVIDocMW(UVI Tech, USA)軟體進行分析。

## 結果與討論

### 一、菌種生長特性

本研究觀察九株紅麴菌屬菌體生長形態, 發現紅麴菌成長較慢且不一致, 最快約需 7 天的時間才能長滿直徑為 9 cm 的培養皿, 而 *M. purpureus* (BCRC 31500)、*M. sanguineus* (BCRC33446) 及 *M. floridanus* (BCRC 33310) 之成長則顯更遲緩, 需要更長時間 (表 1) 另外特別針對紅麴菌屬生長於 PDA 培養基上進行拍照, 在菌絲顏色上, 除 *M. floridanus* 為橄欖綠色, *M. ruber* 為白色外, 其餘皆為偏橘紅色為主。在菌種特徵上: *M. pilosus* 及 *M. kaoliang* 菌落的周邊呈橘紅或淡紅色外, 菌落中心則為白色; 另外 *M. ruber* 在菌落上有明顯的輻射紋路 (圖 1)。而 *M. purpureus* (BCRC31501)、*M. purpureus* (BCRC 31530) 及 *M. purpureus* (BCRC 31500) 雖為同種, 除了在生長的速率上有顯著不同外, 菌落的顏色也從粉橘色到橘褐色而有顯著差別。

表 1 本研究中所使用之菌種來源及培養特徵

Table 1 The sources and the cultural characteristics of the fungal strains used in this study

Species	Strains	Growth characteristics	
		Color	Size (7days)
<i>M. purpureus</i>	BCRC 31501	粉橘色	3.5cm
<i>M. purpureus</i>	BCRC 31530	橘紅色	3.2 cm
<i>M. purpureus</i>	BCRC 31500	橘褐色	1.8 cm
<i>M. sanguineus</i>	BCRC 33446	紅褐色	1.9 cm
<i>M. albus</i>	BCRC 33372	粉紅色	4.2 cm
<i>M. ruber</i>	BCRC 31523	白色	5.3 cm
<i>M. floridanus</i>	BCRC 33310	橄欖綠	1.5 cm
<i>M. pilosus</i>	BCRC 31502	周邊橘紅中央泛白色	4.8 cm
<i>M. kaoliang</i>	BCRC 31506	周邊淡紅中央泛白色	3.3 cm

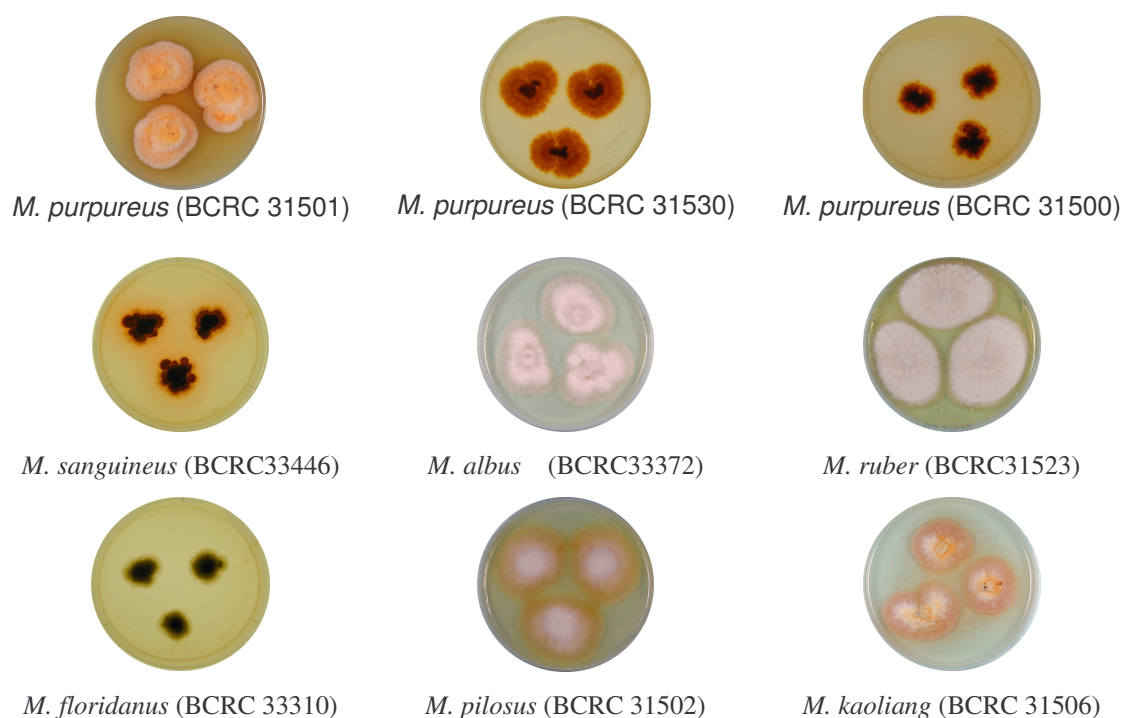


圖 1 紅麴菌屬九株分別生長於 PDA 平板上培養七天之菌落情形

Fig. 1 The colonies of nine *Monascus* spp. grown for seven days on PDA plates

## 二、PCR-RFLP 分析

利用分子技術進行快速鑑定，所選擇之 DNA 分子標誌應該具有以下特性：(a)同種間穩定性高，而不同種間具有明顯的差異性；(b)有通用引子可以複製該段 DNA；(c)該段 DNA 有很多的拷貝 (copies)，利用 PCR 技術可以很容易的擴增取得。本實驗參考 White 等人(1990)之方法，利用真菌 rDNA 的 PCR 擴增通用引子 ITS1 及 ITS2，進行 PCR 反應，擴增受測菌株 rDNA 之 ITS1-5.8S rDNA -ITS2 片段 (圖 2) 除了 9 株紅麴菌株外，另加入兩株與紅麴同為散囊菌目 (Eurotiales) 的 *Aspergillus oryzae* var. *oryzae* 作為比較。結果發現除了 *M. floricidanus* 的 PCR 產物有 578 bp 外，其他紅麴菌株之 PCR 產物長度約介於 540-553 bp，而 *Aspergillus oryzae* var. *oryzae* 則與紅麴有接近的結果，約介於 544-560 bp (表 2)。PCR-RFLP 的實驗乃參考 Granchi 等人(1999)的設計，分別以 *Hae*III、*Dra*I、*Hind*III、*Eco*RI、*Bam*HI、*Cfo*I、*Hin*I 七種限制內切酵素進行 PCR 產物的切

割，該酵素群乃用於酵母菌分類之用。由於紅麴菌與酵母菌同屬子囊菌綱，因此援用之。結果發現，*Bam*HI、*Dra*I 及 *Hind*III 對十一株菌的 ITS1-5.8S rDNA-ITS2 區域均無切位，故無任何鑑別效果。在針對 *M. purpureus* (BCRC31501)、*M. purpureus* (BCRC 31530)、*M. purpureus* (BCRC 31500) 三同種不同品系之菌株而言，七種限制內切酵素分別作用後所產生的限制圖譜均類似，所以這些酵素並無法針對同種內的不同品系加以鑑別；此外，本實驗用以對照的兩株 *Aspergillus oryzae* var. *oryzae* 的 PCR-RFLP 圖譜也得到同樣的結果。*M. floricidanus* 的限制圖譜在片段的大小上呈現：*Hind*III (60、101、281 bp)、*Eco*RI (261、317 bp)、*Cfo*I (75、224、279 bp) 及 *Hin*I (270、300 bp)，這個結果和其他的紅麴菌屬產生了明顯的差異，由於 *M. floricidanus* 在菌落的生長特性、顏色(橄欖綠)及 PCR 產物的長度與其他紅麴菌屬落差甚大，因此推判該菌並不適於分類於紅麴菌屬中。而

其他的紅麴菌屬所產生的片段數目和大小在限制圖譜上皆為相似，所以針對屬內種間似亦無法提供良好的鑑定效果。然而，比較分屬同為散囊菌目但不同科的 *Monascus* 及 *Aspergillus* 發現，其限制圖譜所產生的片段數目和大小皆有明顯的差異，可見用

於科間之鑑別應具有其可行性。

本實驗採用的電泳設備提供之解析度不足以區分 1-2bp 之長度差異。因此可能導致經酵素處理所產生的 DNA 片段之長度總和與未處理前之原長度不符的狀況。加上部份產物 DNA 片斷之長度相

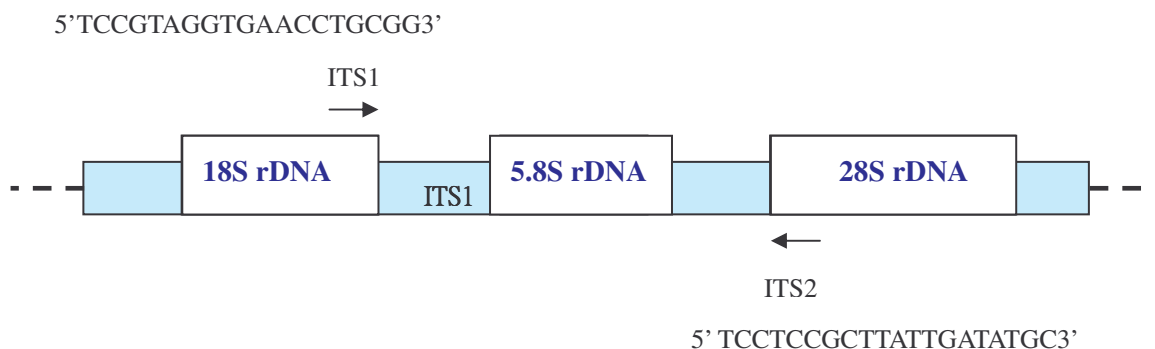


圖 2 黴菌 18S、5.8S、28S rRNA 基因之序列位置及本實驗所使用之 PCR primers (ITS1/ITS2) 之位置

Fig. 2 The serial gene location of 18S, 5.8S, and 28S rRNA genes and the PCR primers (ITS1/ITS2) used in this study

表 2 本研究所使用之菌種之 PCR-RFLP 分析

Table 2 The PCR-RFLP profiles of fungal strains used in this study

Strains	PCR product	<i>Hae</i> III	<i>Dra</i> I	<i>Hind</i> III	<i>Eco</i> R I	<i>Bam</i> HI	<i>Cfo</i> I	<i>Hin</i> fI
<i>M. purpureus</i> (BCRC31501)	540	73 82 261	540	540	233 307	540	69 141 202	242 290
<i>M. purpureus</i> (BCRC31530)	546	73 87 261	546	546	234 312	546	70 146 202	243 295
<i>M. purpureus</i> (BCRC31500)	552	73 93 261	552	552	234 318	552	70 152 202	243 301
<i>M. sanguineus</i>	553	73 103 261	553	553	231 322	553	67 156 202	240 305
<i>M. albus</i>	550	73 94 261	550	550	231 319	550	67 153 202	240 302
<i>M. ruber</i>	547	73 91 261	547	547	231 316	547	67 150 202	240 299
<i>M. floridanus</i>	578	60 101 281	578	578	261 317	578	75 224 279	270 300
<i>M. pilosus</i>	546	73 89 261	546	546	232 314	546	68 148 202	241 297
<i>M. kaoliang</i>	549	73 91 261	549	549	233 316	549	69 150 202	242 299
<i>A. oryzae</i> var. <i>oryzae</i> (BCRC 30118)	560	68 95 290	560	560	254 306	560	89 108 179 184	263 289
<i>A. oryzae</i> var. <i>oryzae</i> (BCRC 30120)	560	68 95 290	560	560	254 306	560	89 108 179 184	263 289

Unit: base pair (bp)

近導致無法區分，或小碎片 DNA 分子可能泳出 Agarose 瓊膠等狀況，更可導致明顯誤差，但結果並不至於影響結論。

## 結 論

本研究利用 PCR-RFLP 技術，以 rDNA 之 ITS1-5.8S rDNA-ITS2 區域為研究之對象，使用的限制酶所產生的圖譜雖於同種內之群體具有高度之同質性，但於不同種間亦未具有明顯的差異性，故無法作為屬內種間或種內群體之鑑定方法。然而紅麴菌屬中的 *M. floridanus* (BCRC33310) 所產生的限制圖譜在片段的大小上和其他的紅麴菌產生了明顯的差異，且菌落顏色亦明顯異於其他紅麴菌，藉此推判 *M. floridanus* 似乎不適於分類於紅麴菌屬中。未來可進一步將 PCR 產物進行定序，再利用 Restriction Map 將其中的差異性加以區隔，再進一步選擇合適的限制酶予以鑑定，也可選擇其他的分類基因作為紅麴菌鑑定的分子標誌。

## 謝 誌

本計畫承蒙國科會計畫 (NSC 932622-E-197-001-CC3) 經費協助，並感謝花蓮農業改良場羅李煙課長協助收集紅麴菌菌株樣本，使本研究能順利完成。

## 參考文獻

林讚鋒。1983。紅麴菌的鑑定及實用分類法，製酒科技專論彙論 5: 104 -113

林讚峰。1994。紅麴菌的特性及應用。生物產業 5: 29-35。

林讚峰。2001。紅麴的神奇療效。pp. 91 -98。世茂出版社，台北。

蔡奇助、白佳惠、蔡素蕙、黃勝忠。1999。烏來杜鵑 5.8SrRNA 基因與內轉錄間隔區之選殖與分析」。台中區農業改良場研究彙報 63: 1 -11。

蘇志遠。2001。奇妙的紅麴。pp. 16 -33。元氣齋出版社，台北。

Albert, A.W. 1988. Discovery, biochemistry and biology of lovastatin. Am. J. Card. 62:10-15.

Aristea V, E. K. Manousos, S. George, S. Marianna, M.-Z. Angeliki, J. L. Nicholas. 1999. Identification of medically significant fungal genera by polymerase chain reaction followed by restriction enzyme analysis. FEMS Immunol. and Med. Microbiol. 23: 303-312.

Granchi, L., M.Bosco, A.Messini, and M.Vincenzini. 1999. Rapid detection and quantification of yeast species during spontaneous wine fermentation by PCR-RFLP analysis of the rDNA ITS region. J. Appl. Microbiol. 87: 949-956.

Hawksworth, D.L. and J. I. Pitt. 1983. A new taxonomy for *Monascus* species based on cultural and microscopical characters. Aust. J. Botany 31: 51-56.

Kohama, Y., S. Matsumoto, T. Mimura, N. Tanabe, A. Inada, and T. Nakanishi. 1987. Isolation and identification of hypotensive principles in red mold rice. Chem Pharm Bull (Tokyo) 35: 2484-2489.

Went, F.A.F.C. 1895. *Monascus purpureus* le champignon de l'ang-quac une nouvelle thélébolée. Ann. Sci. Nat. Bot. Ser. 8: 1-18.

White, T. J., T. Bruns, S. Lee, and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. pp. 315-322. Innis, M. A., D. H. Gelgand, J. J. Sninsky, and T. J. White eds. Academic Press, San Diego, CA.

94 年 03 月 30 日投稿

95 年 01 月 04 日接受