



財團法人 食品工業發展研究所

生物資源保存及研究簡訊

第24卷第1期

中華民國100年3月發行

補助單位：經濟部技術處 / 執行單位：財團法人食品工業發展研究所

本期內容

中心新聞 1

- ◎經經濟部技術處審查小組蒞臨本所實地審查科技專案計畫「生物資源之創新加值與開發應用四年計畫」全程(96-99年度)執行成果
- ◎本所與美國藥典委員會共同舉辦「USP 用戶論壇與美國藥典微生物試驗解說」

研發成果 2

- ◎發掘本土微生物，開創產業新素材
- ◎微生物鑑定技術：基因序列分析和DNA指紋圖譜
- ◎微生物菌種鑑定服務：服務項目和服務說明

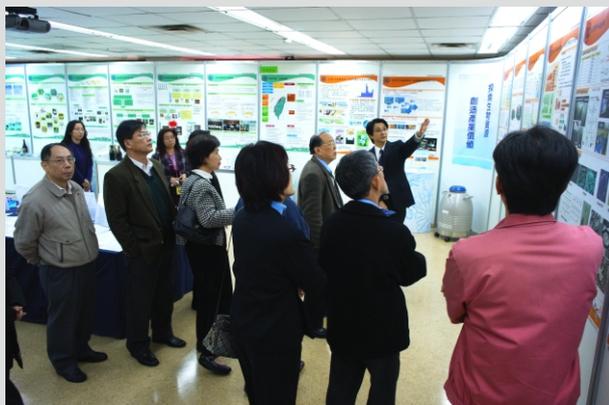
知識專欄 9

- ◎DNA定序技術之進展

經濟部技術處審查小組蒞臨本所實地審查科技專案計畫「生物資源之創新加值與開發應用四年計畫」 全程(96-99年度)執行成果



▲ 審查小組委員實地訪查本所生資中心執行經濟部科技專案計畫之技術研發成果及相關成品展示。(圖：生資中心 謝松源 研究員提供)



▲ 經濟部科技專案計畫全程實地查證，由計畫主持人本所廖啓成副所長簡報計畫執行成果並做現場展示說明。(圖：生資中心 謝松源 研究員提供)

今年3月16日經濟部技術處長官及審查小組蒞臨本所生物資源保存及研究中心(以下簡稱生資中心)進行實地審查，查訪經濟部技術處補助之科技專案計畫「生物資源之創新加值與開發應用四年計畫」全程(96-99年度)執行成果。審查小組由林榮耀院士擔任主審，審查委員包括尹福秀博士、孫璐西教授、周正俊教授及施明哲主任，審查會議由技術處劉淑櫻科長主持，在本所陳樹功所長致詞歡迎後，由計畫主持人本所廖啓成副所長簡報全程計畫執行成果，並實地訪視生資中心技術產品研發之成果展示與保存庫房等各項核心設施。

生資中心全程(96-99年度)計畫目標以「探索生物資源，創造產業價值」為願景，提供我國生技產業發展所需之多樣化生物資源與技術以促進我國生技產業之蓬勃發展。利用本土多樣性生物資源及核心設施與技術所累積的能量為基礎，結合創新加值

的思維執行「生物資源之創新加值與開發應用四年計畫」。全程四年之研發成果總收入估計畫決算金額16.6%，對外提供各類生物資源約2萬批次，接受各界委託近3千件，技術移轉32件，中小企業及時輔導33案，推動4案之產業研發聯盟，並於99年度獲得經濟部技術處頒發「傳統產業加值貢獻獎」。各項成果將在本年度的「生物資源保存及研究簡訊」季刊做一系列的報導。

(文：生資中心 王俐婷 研究員)

本所與美國藥典委員會共同舉辦 「USP用戶論壇與美國藥典微生物試驗解說」



▲ 美國藥典行銷總監Barbara Hubert(中)、美國藥典亞洲與拉丁美洲區行銷經理 Paul Cowan(右一)；友和貿易公司鄭淑玲經理(右二)；中華區資深經理操洪欣(左一)與本所生資中心研究員朱兆秀博士(左二)於研習會後合影。

(圖：友和貿易公司 鄭淑玲經理 提供)

隨著醫藥產品出口規模的擴大，尤其是進入法規市場的步伐加快，企業對國際品質要求的關注不斷增加。微生物檢測是醫藥產品品質控制之重要項目，經ICH-藥典討論組織(ICH-PDG)協調後，USP(美國藥典)、EP(歐洲藥典)與JP(日本藥典)等對微生物檢測的要求基本上達成一致。

為了使製藥、生技等相關企業能充分了解改版後之美國藥典在微生物檢測項目的最新規定，及評估可能對企業產生的影響，本所、美國藥典委員會及友和貿易公司共同舉辦「USP用戶論壇與美國藥典微生物試驗解說」，於台北及台中各舉辦一場為期兩天的研習課程。

美國藥典行銷總監 Barbara Hubert 與亞洲、拉丁美洲區行銷經理 Paul Cowan、中華區資深質量經理與培訓專家盧政、操洪欣及行銷經理張淑芬等人，就美國藥典從概述、更新、各論的價值以及標準物質做詳盡介紹，並說明藥典中對微生物檢測相關通則、微生物測試方法驗證以及滅菌內容的要求，此外生資中心袁國芳主任、朱文深副主任及朱兆秀研究員也分別介紹「生資中心微生物資源與服務」及「美國藥典微生物檢測實務經驗分享」，此次研習將會對本國生技製藥相關業者在符合美國藥典的法規要求上，完善醫藥品之品質分析與管理。

(文：生資中心 朱兆秀研究員)

發掘本土微生物，開創 產業新素材

生資中心／研究員
謝松源、劉桂郁

微生物資源廣泛應用於農業、食品、醫藥、能源、環保等範疇，為重要的生物資源，位處於亞熱帶的台灣，擁有獨特的地理與氣候，孕育豐富的微生物群聚，資源多樣性的特色透過生物科技將可轉化為可觀的商業價值，本所生資中心自成立至今已建構微生物資源之長期保存與系統化管理的平台，並逐步建立與國際同步之分類鑑定技術，多年來持續提供產學研各界豐富且高品質之微生物資源及資訊。

生資中心於96年至99年，在公開寄存的服務系統，共完成1,538株多樣化微生物之收集保存，新增120屬714種之細菌、放線菌、酵母菌、絲狀真菌、菇類、質體/宿主、基因庫等；在專案寄存的服務系統，生資中心共完成9,789株微生物之收集保存，包括：醫用微生物、*Monascus* 真菌變異株以及本土微生物資源(酵母菌、接合菌、皮殼菌、蘭根共生菌、不完全菌、光合細菌、發酵食品微生物、特殊環境微生物等)；其中，本所探索分離之本土特殊環境微生物及發酵食品微生物，透過篩選評估，以具有差異化之產業合作模式，將本土微生物資源的價值落實於產品研發(圖1)。

此外生資中心更運用多年來累積之核心技術對本土菌株進行歸群，對於新穎性的微生物進一步利用形態觀察、生理生化試驗、細胞組成化學分析、DNA定序與DNA雜交等技術，進行系統分類學的研究，96年至99年生資中心共發現十個微生物新種，並且分別依據「國際細菌命名法規」及「國際植物命名法規」命名發表(表1)，這些新穎性的微生物資源彰顯了台灣微生物資源的多樣性；預期在產業利用方面，新穎性的微生物資源將可提供創新的素材，發展差異化的產品，強化本土產業的競爭優勢。

未來生資中心將擴大微生物資源的加值與服務，在公開菌株方面，本年度將推出紅麴菌種、牛樟芝及酒類菌種等主題式生物資源；在專案保

存菌株方面，將運用系統分類學分析，進行主題式資源規劃並建立菌種應用潛力之資訊，加值本土微生物菌種，活絡資源之提供、探索與應用。未來也將持續結合發酵庫的建構與分子篩選平台做進一步的加值，以創造本土微生物資源的經濟價值，達到本土資源永續利用的目的。

表1、96年至99年生資中心發表新種之期刊論文

學名	期刊; 卷數; 頁數; 年份
<i>Penicillium albobiverticillium</i>	Fung. Sci. 25, 25 (2010)
<i>Pseudomonas taiwanensis</i>	Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 60, 2094 (2010)
<i>Herbidospira yilanensis</i>	Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 60, 1168 (2010)
<i>Herbidospira daliensis</i>	Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 60, 1168 (2010)
<i>Pseudozyma pruni</i>	Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59, 1813 (2009)
<i>Actinomadura miaoliensis</i>	Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59, 517 (2009)
<i>Lactobacillus taiwanensis</i>	Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59, 2064 (2009)
<i>Paenibacillus taichungensis</i>	Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 58, 2640 (2008)
<i>Paenibacillus taiwanensis</i>	Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57, 1351 (2007)
<i>Rhizopus lycococcus</i>	Mycol. Res. 111, 196 (2007)



圖1、本土微生物資源之加值利用

編者修訂啓示

本簡訊第83期第2頁研發成果中陳述成果之傳統食品現代化製程圖示中(如右圖)，部分圖片(烏魚子乾燥製程之改善及製備石榴醋之可行性評估)引用網路資料，特此說明補正

傳統食品現代化製程



微生物鑑定技術： 基因序列分析和DNA指紋圖譜

生資中心／研究員
王俐婷

生物資源保存及研究中心的微生物委託鑑定業務主要是以協助產學研界準確鑑別生物資源之正確菌種學名為第一要務。早期微生物是藉由形態、生長特徵和生理生化等特性進行菌種學名之分類和研判，近年來因生物化學及分子生物學等科技的進步發展，使得微生物學名不斷的分離與整合，造成目前菌種學名正確性和混淆之問題層出不窮發生。以市售螺旋藻生產菌 *Spirulina platensis* 為例，早期以形態特徵進行分類和命名，後來輔以16S rRNA基因序列的親緣演化分析，顯示 *Spirulina platensis* 應該更正為 *Arthrospira platensis*⁽¹⁾。此外一般傳統分類方法耗時費力，對於區分類緣關係相近的菌種(closely related species)頗為困難，輔以化學分類法與分子生物分類法的應用有助於釐清傳統分類方法無法判斷之菌種以及種內(interspecies)和種間(intraspecies)菌株之間的關係，可使分類鑑定工作更加準確可靠，並賦與分類上之正確地位。目前微生物分類鑑定方法的國際發展趨勢有共識的朝向三個方向發展：一是尋找與生理代謝有關的功能基因(protein-coding genes)，以基因序列分析協助菌種分類鑑定；二是持續發展DNA指紋圖譜技術，以DNA電泳圖譜達到快速或正確

鑑定至種間或種內之菌株；三是研究開發生物晶片或DNA arrays的方法作為新種研判的一種依據。有鑑於此，生物資源保存及研究中心多年來致力於尋找具種間分類意義的基因序列並建立DNA指紋圖譜技術，實際應用於協助產學研界解決菌種學名混淆之問題，並將成果發表於國際知名期刊，研發成果整理於表1。

直接由核酸序列來分析不同微生物物種之間的差異，是近年來最被採用的分類鑑定及檢測方法，然而所有基因組的核酸序列相當龐大，因此目標基因的選擇就顯得非常重要。核糖體RNA是蛋白質合成的必要場所，普遍存在於所有生物體內，序列具有共通性和高保守性，但部份序列會因物種不同而有所差異，是微生物類緣分析及分類鑑定的有力工具。生資中心選擇核糖體RNA中沒有特定功能、演化速率快、具相當程度變異性的內轉錄區(internal transcribed spacer, ITS)基因片段進行序列分析比對並輔以傳統分類方法，可有效協助牛樟芝等菇菌與其他相關產品(如膠囊)之檢測。以ITS序列設計酸麵團(sourdough yeast)中常見酵母菌之種專一性引子，可準確鑑定 *Issatchenkia orientalis* (*Candida krusei*)、*Candida humilis*、*Kazachstania*

exigua (*Candida holmii*)、*Pichia anomala* 和 *Pichia subpelliculosa*⁽²⁾。但是有些微生物菌種不僅形態特徵和生理生化特性相似，連核糖體RNA基因序列也有很高的相似性(高達98%以上)。為了彌補核糖體RNA基因序列區分能力的不足，探索和選擇功能基因、持家基因(house-keeping genes)或侵襲基因(invasion genes)以建立新的分類系統是必須的。這些基因普遍存在於生物體內，不易產生水平轉位作用(horizontal gene transfer)，不易受特殊生長環境影響發生突變，序列相似性和DNA-DNA相似性呈現直線關係，可實際呈現微生物種間與種內的關係，達到快速且正確鑑別菌種學名的目的。

?-微管蛋白(?-tubulin)普遍存在於真核細胞，是構成細胞分裂紡錘體之微管體(microtubules)的主要組成份。?-微管蛋白基因序列在真核微生物之間的演化資訊比核糖體RNA基因高達3.5倍，而被廣泛應用於探討真核生物族群間或族群內的演化關係。生資中心利用?-微管蛋白基因序列分析和微生物表徵，可協助產業用紅麴菌正確學名之研判。釀酒、烘焙工業用酵母菌 *Saccharomyces cerevisiae* 和類似菌種 (*Saccharomyces bayanus*、*Saccharomyces cariocanus*、*Saccharomyces kudriavzevii*、*Saccharomyces mikatae*、*Saccharomyces paradoxus*、*Saccharomyces pastorianus*) 大都屬於 *Saccharomyces sensu stricto* complex(嚴格意義之 *Saccharomyces* 菌群)。這7種酵母菌彼此之間的核糖體RNA基

因序列相似性和微生物表徵極為類似而難以傳統方法鑑別。生資中心開發?-微管蛋白基因之序列分析和限制性片段長度多態性 (restriction fragment

length polymorphism, RFLP) 鑑別 *Saccharomyces* 菌群, 序列相似性平均為 90%, 基因限制酶圖譜具有種特定性, 研發技術可快速且準確判斷

Saccharomyces sensu stricto complex 內菌種之學名⁽⁹⁾。此外, 利用隨機放大多型性去氧核糖核酸分析 (random amplified polymorphic DNA; RAPD) 鑑別

表1、適用於不同微生物菌群之基因和其分類鑑定技術

基因名稱	分類鑑定技術	微生物菌群	相關菌種
rDNA ITS	基因序列分析	牛樟芝等菇菌	
rDNA ITS	種專一性 PCR ⁽²⁾	酸麵團酵母菌	<i>Issatchenkia orientalis</i> (<i>Candida krusei</i>)、 <i>Candida humilis</i> 、 <i>Kazachstania exigua</i> (<i>Candida holmii</i>)、 <i>Pichia anomala</i> 和 <i>Pichia subpelliculosa</i>
β -tubulin	基因序列分析	紅麴菌 (<i>Monascus</i> 屬)	
β -tubulin	基因序列分析 ⁽³⁾ RFLP ⁽³⁾	<i>Saccharomyces sensu stricto</i> complex(嚴格意義之 <i>Saccharomyces</i> 菌群)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (釀酒、烘焙工業用酵母菌)、 <i>Saccharomyces bayanus</i> 、 <i>Saccharomyces cariocanus</i> 、 <i>Saccharomyces kudriavzevii</i> 、 <i>Saccharomyces mikatae</i> 、 <i>Saccharomyces paradoxus</i> 、 <i>Saccharomyces pastorianus</i>
	種專一性 PCR ⁽⁴⁾	<i>Saccharomyces</i> 菌群	同上列
<i>gyrB</i>	基因序列分析 ⁽⁵⁾	枯草桿菌群 (<i>Bacillus subtilis</i> group)	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> (保健食品納豆菌)、 <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> 、 <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i> 、 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> 、 <i>Bacillus atrophaeus</i> 、 <i>Bacillus licheniformis</i> 、 <i>Bacillus mojavensis</i> 、 <i>Bacillus sonorensis</i> 、 <i>Bacillus tequilensis</i> 、 <i>Bacillus vallismortis</i>
<i>gyrB</i>	基因序列分析 ⁽⁸⁾	嗜乳酸桿菌群 (<i>Lactobacillus acidophilus</i> group)	<i>Lactobacillus acidophilus</i> (市售乳酸菌 A 菌)、 <i>Lactobacillus amylovorus</i> 、 <i>Lactobacillus amylolyticus</i> 、 <i>Lactobacillus crispatus</i> 、 <i>Lactobacillus gallinarum</i> 、 <i>Lactobacillus gasseri</i> 、 <i>Lactobacillus helveticus</i> 、 <i>Lactobacillus iners</i> 、 <i>Lactobacillus jensenii</i> 、 <i>Lactobacillus johnsonii</i> 、 <i>Lactobacillus kitasatonis</i>
<i>dnaK</i>	基因序列分析 ⁽⁹⁾ RFLP ⁽⁹⁾	乾酪乳酸桿菌群 (<i>Lactobacillus casei</i> group)	<i>Lactobacillus casei</i> (市售乳酸菌 C 菌)、 <i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> 、 <i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i> 、 <i>Lactobacillus rhamnosus</i> 、 <i>Lactobacillus zeae</i>
	種專一性 PCR ⁽¹¹⁾	乾酪乳酸桿菌群	同上列
<i>dnaK</i>	基因序列分析 ⁽¹⁰⁾ RFLP ⁽¹⁰⁾	植物乳酸桿菌群 (<i>Lactobacillus plantarum</i> group)	<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>Plantarum</i> (植物乳酸桿菌)、 <i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>argentoratensis</i> 、 <i>Lactobacillus fabifermentans</i> 、 <i>Lactobacillus paraplanarum</i> 、 <i>Lactobacillus pentosus</i>
	RAPD ⁽¹⁰⁾	植物乳酸桿菌群	同上列

⁽¹⁾ 為研發成果發表於國際知名期刊。

Saccharomyces 菌群，利用 RAPD 核酸引子 (OPT-18) 找到 *Saccharomyces sensu stricto* complex 相關菌種特有之專一性片段和 *S. bayanus* 之種專一性片段，可協助 *Saccharomyces sensu stricto* complex 菌種學名之鑑別⁽⁴⁾。

枯草桿菌 (*Bacillus subtilis*) 相關菌種深具產業應用潛力，保健食品納豆菌為有效發表學名 *Bacillus subtilis* 菌種之一。*Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* 和 *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*、*Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum*、*Bacillus amyloliquefaciens*、*Bacillus atrophaeus*、*Bacillus licheniformis*、*Bacillus mojavenis*、*Bacillus sonorensis*、*Bacillus tequilensis*、*Bacillus vallismortis* 等 10 個菌種形成類源關係非常相近的枯草桿菌群 (*Bacillus subtilis* group)，這些菌種的 16S rRNA 基因序列相似性高 (98.1 至 99.8%)，對糖類的代謝和生理生化反應等表現型特徵極為相似而難以鑑別。DNA 解旋酶 (DNA gyrase) 為第二型 DNA 拓撲異構酶 (DNA topoisomerase)，參與 DNA 的複製，轉錄，重組和修補等生化反應，藉由催化 DNA 磷酸二酯鏈 (phosphodiester linkage) 的斷裂和再連結來調控 DNA 的超螺旋性 (supercoiling)，普遍存在於細菌體內。DNA 解旋酶由兩個次單元體，GyrB 和 GyrA 所組成，分別由 *gyrB* 和 *gyrA* 基因所轉錄。生資中心開發 *gyrB* 基因序列分析法鑑別枯草桿菌群相關菌種，序列相似性介於

75.4 至 95.0%，可快速且正確鑑定枯草桿菌群內菌種之學名⁽⁵⁾，並有助於釐清枯草桿菌群內相關菌種之分類地位^(6,7)。

Lactobacillus acidophilus (嗜乳酸桿菌，俗稱乳酸菌 A 菌) 和 *Lactobacillus casei* (乾酪乳酸菌，俗稱乳酸菌 C 菌) 是市售優酪乳產品中常被提起且應用性甚廣的益生菌。嗜乳酸桿菌、乾酪乳酸菌分別和其相關菌種的 16S rRNA 基因序列相似性高 (大於 98% 以上)，形態和糖類發酵反應等微生物表徵相似而形成類源關係極為相近的嗜乳酸桿菌群 (*Lactobacillus acidophilus* group) 和乾酪乳酸菌群 (*Lactobacillus casei* group)。嗜乳酸桿菌和 *Lactobacillus amylovorus*、*Lactobacillus amylolyticus*、*Lactobacillus crispatus*、*Lactobacillus gallinarum*、*Lactobacillus gasseri*、*Lactobacillus helveticus*、*Lactobacillus iners*、*Lactobacillus jensenii*、*Lactobacillus johnsonii*、*Lactobacillus kitasatonis* 等 11 個菌種形成嗜乳酸桿菌群。乾酪乳酸菌和 *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*、*Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans*、*Lactobacillus rhamnosus*、*Lactobacillus zae* 等 5 個菌種形成乾酪乳酸菌群。這些乳酸菌不易鑑別，常造成相關乳酸菌產品之產業應用、產品管理、專利申請和菌種檢測上的困擾。生資中心開發 *gyrB* 基因序列分析法鑑別嗜乳酸桿菌群之相關菌種，彼此之間的 *gyrB* 基因序列相似性

小於 90%，有助於釐清嗜乳酸桿菌群內相關菌種之分類地位和新種之研判⁽⁸⁾，達到快速且正確鑑定嗜乳酸桿菌群內菌種之學名，研發成果實際協助產業界瞭解其開發產品所使用之乳酸菌學名的正確性。雖然 *gyrB* 基因序列對演化極為相近之菌群的區分能力比 16S rRNA 顯著，但並非適用於所有菌群例如乾酪乳酸桿菌群，以及常被應用在醃酵肉製品和優酪乳產品的植物乳酸桿菌群 (*Lactobacillus plantarum* group)。 *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* (植物乳酸桿菌) 和 *Lactobacillus plantarum* subsp. *argenteratensis*、*Lactobacillus fabifermentans*、*Lactobacillus parapantarum*、*Lactobacillus pentosus* 等 5 個菌種形成植物乳酸桿菌群。*dnaK* 為蛋白質編碼基因，能編碼 HSP70 蛋白質。HSP70 屬於輔助蛋白 (molecular chaperone)，能將細胞中未摺疊的蛋白質重新進行摺疊，以維持蛋白質結構的穩定和生理功能，廣泛存在於各種生物，如細菌、真菌或哺乳動物等。生資中心開發 *dnaK* 基因之序列分析法和 RFLP 鑑別乾酪乳酸桿菌群和植物乳酸桿菌群之相關菌種，這些菌種彼此之間的 *dnaK* 基因序列相似性皆小於 90%，*dnaK* 基因之 *ApoI*-RFLP 具有乾酪乳酸桿菌群內菌種之種特定性圖譜⁽⁹⁾，*Tsp509I*-RFLP 具有植物乳酸桿菌群內菌種之種特定性圖譜⁽¹⁰⁾，可協助快速且準確鑑別乾酪乳酸桿菌群和植物乳酸桿菌群內菌種之學名，研發成果實際協助產業界解決誤用菌種學名的爭議。此外，利用 RAPD

核酸引子(OPT-1)可得到植物乳酸桿菌群內菌種之種特定性圖譜⁽¹⁰⁾；從不同 RAPD 核酸引子中找到 *L. paracasei* subsp. *tolerans*、*L. rhamnosus* 和 *L. zae* 之種專一性片段，序列長度分別為 179、102 和 451 bp，可作為此三種菌種學名快速鑑別的方法⁽¹¹⁾。

參考文獻

- 1.A. Wilmotte, M. Herdman, in *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2nd ed. Volume one. (Springer, New York, 2001) pp. 487493.
- 2.C.H. Huang, F.L. Lee, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 26, 1087(2010).
- 3.C.H. Huang, F.L. Lee, C.J. Tai, *Antonie van Leeuwenhoek.* 95, 135(2009).
4. C.H. Huang, F.L. Lee, C.J. Tai, *J. Microbiol. Meth.* 75, 531(2008).
5. L.T. Wang, F.L. Lee, C.J. Tai, H. Kasai, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 1846(2007).
- 6.L.T. Wang, F.L. Lee, C.J. Tai, A. Yokota, H.P. Kuo, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 1663(2007).
7. L.T. Wang, F.L. Lee, C.J. Tai, H.P. Kuo, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58, 671(2008).
- 8.L.T. Wang, H.P. Kuo, Y.C. Wu, C.J. Tai, F.L. Lee, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59, 2064(2009).
- 9.C.H. Huang, F.L. Lee, *Antonie van Leeuwenhoek.* 99, 319(2011).
- 10.C.H. Huang, F.L. Lee, J.S. Liou, *Antonie van Leeuwenhoek.* 97, 289(2010).
- 11.C.H. Huang, F.L. Lee, *J. Sci. Food Agric.* 89, 1831(2009).

微生物菌種鑑定服務： 服務項目和服務說明

生資中心／研究員
劉桂郁、王俐婷

由研究開發、專利申請到產品之生產品管，正確的菌種學名對於微生物的產業化應用是極為重要的一環。生資中心運用多年來累積之菌種分類鑑定核心技術包括形態觀察、生理生化試驗、細胞組成化學分析、DNA 定序與 DNA 雜交等，對產學研各界提供微生物之學

名鑑定服務，服務項目與服務說明如表一。相關事宜及收費標準請上網查詢 http://www.bcrc.firdi.org.tw/c04_profile.do，或電洽李小姐，電話：03-5223191分機 511；唐先生，電話：03-5223191分機 512。

表1、生資中心菌種鑑定服務

服務項目	服務說明
菌種學名鑑定	
細菌學名鑑定	本服務根據16S rDNA(或其他具有區分性之DNA片段)序列分析，配合形態特徵、化學分析及生理生化特性加以鑑定，提供顧客正確之菌種學名。
放線菌學名鑑定	本服務根據16S rDNA序列分析，配合形態特徵、化學分析及生理生化特性加以鑑定，提供顧客正確之菌種學名。
酵母菌學名鑑定	本服務根據26S rDNA序列分析，配合形態學特徵及生理生化試驗加以鑑定，提供顧客正確之菌種學名。
菇類學名鑑定	本服務根據ITS(或其他具有區分性之DNA片段)序列分析，配合菌種之菌落及顯微構造形態學特徵加以鑑定，提供顧客正確之菌種學名。
絲狀真菌學名鑑定	本服務根據ITS(或其他具有區分性之DNA片段)序列分析，配合菌種之菌落及顯微構造形態學特徵加以鑑定，提供顧客正確之菌種學名。
基因序列分析	
rDNA序列分析	1.核糖體RNA是蛋白質合成的必要場所，普遍存在於所有生物體內，序列具有共通性及高度保守性，但部份序列會因不同微生物物種而有所差異，使核糖體RNA基因序列分析成為研究微生物分類鑑定的有力工具。 2.本服務將提供鑑定菌株之rDNA序列。

服務項目	服務說明
基因序列分析	
β -tubulin基因序列分析鑑別 <i>Saccharomyces</i> 菌群	<ol style="list-style-type: none"> 1. β-tubulin基因屬於持家基因(house-keeping gene)，提供之演化訊息為18S rDNA之3.5倍，非常適用於近似種之分類鑑定。 2. 本服務利用β-tubulin基因序列分析法鑑定嚴格意義之<i>Saccharomyces</i>菌群(<i>Saccharomyces sensu stricto</i> complex)相關菌種，提供顧客正確之菌種學名和β-tubulin基因序列。 3. 嚴格意義之<i>Saccharomyces</i>菌群相關菌種： <ul style="list-style-type: none"> (1)<i>Saccharomyces bayanus</i> (5)<i>Saccharomyces cariocanus</i> (2)<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (6)<i>Saccharomyces kudriavzevii</i> (3)<i>Saccharomyces pastorianus</i> (7)<i>Saccharomyces mikatae</i> (4)<i>Saccharomyces paradoxus</i> (8)<i>Saccharomyces arboricolus</i>
<i>gyrB</i> 基因序列分析 鑑別枯草桿菌群	<ol style="list-style-type: none"> 1. <i>gyrB</i>基因屬於持家基因(house-keeping gene)，是參與DNA複製、轉錄、重組及修補等生化反應之DNA解旋酶的轉錄基因。 2. 本服務利用<i>gyrB</i>基因序列分析法鑑定枯草桿菌群(<i>Bacillus subtilis</i> group)之相關菌種，提供顧客正確之菌種學名和<i>gyrB</i>基因序列。 3. 枯草桿菌群之相關菌種: <ul style="list-style-type: none"> (1)<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> (6)<i>Bacillus atrophaeus</i> (2)<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> (7)<i>Bacillus mojaviensis</i> (3)<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i> (8)<i>Bacillus vallismortis</i> (4)<i>Bacillus licheniformis</i> (9)<i>Bacillus sonorensis</i> (5)<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (10)<i>Bacillus tequilensis</i>
DNA組成和相似性分析	
DNA hybridization	<ol style="list-style-type: none"> 1. DNA hybridization分析可提供微生物種內(intraspecies)和種間(interspecies)菌株彼此之間的DNA-DNA相似性，以協助釐清利用基因序列分析法和微生物表徵等傳統分類法判斷之菌種學名和分類位置，使微生物之分類鑑定更為準確。 2. 本服務依據鑑定菌株的DNA G+C含量，以Photobiotin標幟Microplate方法測定鑑定菌株彼此之間的DNA-DNA相似性。
DNA G+C content	本服務抽取鑑定菌株的染色體DNA，經酵素水解後，以HPLC方法測定染色體DNA的G+C含量。
細胞組成化學分析	
脂肪酸組成分析	<ol style="list-style-type: none"> 1. 脂肪酸廣泛地存在於生物細胞中，是細胞脂質中最重要的成份，種類十分複雜。每種微生物都具有特殊的脂肪酸圖譜，可作為分類與鑑定上的依據。 2. 本中心所使用之脂肪酸鑑定系統為美國Microbiol ID, Inc. (簡稱為MIDI)開發的方法。此系統主要是利用氣相層析儀分析微生物之脂肪酸組成，若有需要，也可與資料庫中的參考菌株作比對。
微生物鑑定套組分析	
Biolog 鑑定套組分析	<ol style="list-style-type: none"> 1. Biolog 鑑定套組為傳統微生物生理生化試驗法之微小化快速檢測商業產品，由美國MicroStation System公司開發的方法。此系統主要藉由細菌代謝碳源與化學物質後的呈色反應，利用分光光度計進行判讀，每種細菌於代謝後會產生特定圖譜。 2. 此套組共有兩種微孔盤 (GenIII與AN)可供顧客選擇。選擇依據為顧客待鑑定菌株屬於好氧培養者選擇Gen III，若屬於厭氧培養者則選擇AN。 3. 根據顧客指定之鑑定套組進行操作，試驗結果與Biolog菌種資料庫比對，比對後會提供與資料庫最接近之菌種學名以供參考。
API 鑑定套組分析	<ol style="list-style-type: none"> 1. API鑑定套組為傳統微生物生理生化試驗法之微小化快速檢測商業產品，由法國bioMerieux公司開發的方法。此系統之鑑定套組種類繁多(如API 50CHL針對乳酸菌進行試驗、API 50CHB針對<i>Bacillus</i>屬細菌進行試驗、API 20NE針對革蘭氏陰性非腸道菌進行試驗、API 20 Strep針對鏈球菌進行試驗...等)，不同菌種需選擇不同鑑定套組進行試驗。 2. 根據顧客指定之鑑定套組進行操作，試驗結果與API菌種資料庫比對，比對後會提供與資料庫最接近之菌種學名以供參考。
Vitek 鑑定套組分析	<ol style="list-style-type: none"> 1. Vitek鑑定套組為傳統微生物生理生化試驗法之微小化快速檢測商業產品，由法國bioMerieux公司開發的方法。此系統主要藉由微生物代謝碳源、氮源、化學物質或抗生素後產生的濁度或顏色變化，利用分光光度計進行判讀。不同菌種需選擇不同套組進行試驗(革蘭氏陽性菌選擇GP、革蘭氏陰性菌選擇GN、厭氧菌選擇ANC、酵母菌選擇YST...等)。 2. 根據顧客指定之鑑定套組進行操作，試驗結果與Vitek菌種資料庫比對，比對後會提供與資料庫最接近之菌種學名以供參考。

DNA定序技術之進展

生資中心／研究員
劉意如

I. 前言

DNA定序技術最早由 Maxim和 Gilbert [1]以及 Sanger等人[2]於1977年發表。高效率的同步定序方法，能夠使大規模的基因組定序成爲可能，也造就了人類基因組定序的完成[3-5]。隨著定序技術慢慢朝向每一個體以1000美元即可訂出整個基因組的理想邁進[6]，屆時大規模同步定序技術會在一般臨床實驗室中成爲一項常規的檢驗項目。大規模同步定序技術可以同時分析數百個基因位點是否產生突變、掃描全基因組的新的突變位置，以及以序列爲基礎的檢測方式去找尋對人類產生危害的新的致病病原微生物。此外，同步定序技術能擴大資訊與知識的收集與研究，包括對臨床上之藥理學、癌症遺傳學、表觀遺傳學和其他複雜的生物學。本篇文章將介紹目前經常在實驗室中進行的定序技術，以及新一代、已商品化的定序技術，並簡介目前正在發展中的定序技術。

II. 第一代定序技術之演進

Sanger Sequencing

西元1977年 Sanger等人提出的利用電泳分離DNA片段大

小之定序法，其原理即在於PCR反應試劑中的4種鹼基，分別加入已經過放射性同位素標記的雙去氧核苷酸(ddNTP)材料，可於合成過程中隨機中止聚合反應，造成不同大小的DNA片段。透過電泳分析和顯影後，可依據不同放射線之電泳帶位置讀出待測DNA的序列[2]。同年，Gilbert等人發展出使用特定化學試劑而非放射性同位素作爲標記的定序方法，在PCR反應過程中以化學方法切斷待測DNA片段，以利後續進行電泳分析[1]。由於放射性同位素在使用上限制較多，因此在Sanger法的基礎上，出現了以螢光標記代替放射性同位素的標記方法，並且逐步出開發自動定序儀器[7]，發展出毛細管電泳技術，使得單位時間內的定序數量大幅提高[8]。目前以Sanger法作單次定序之序列讀長可達近1千個鹼基，序列準確度達99.999%，讀取1 Mb的成本約爲500美金[9]。

III. 第二代定序技術之演進

由於定序用之化學標記分子日趨多樣化、定序化學合成方法之改良與自動化工程技術之突破，已可大幅減少定序試劑之用量、同步進行多個樣本之定序反應，能有效縮短並減少定序反應所需時間與成本。第二代之DNA定序策略先從解

讀各小片段的基因序列開始，再運用生物資訊軟體協助進行片段接合，達成整個基因組定序的目標。因此，首先透過物理截斷或化學酶切的方法將待定序的基因序列切成小片段，接上轉接序列(adaptor)，以PCR的方式快速增幅待測基因片段。目前有兩種增殖方法可供選擇，例如加入微磁珠(micro-bead)並配合乳式聚合酶鏈鎖反應(emulsion PCR)或直接採用橋式聚酶鏈鎖反應(bridge PCR)，以快速增幅待測基因片段。然後結合光學偵測等技術以不同定序原理的方法，迅速解讀大量的DNA序列[9]。受限於第二代定序技術的讀取長度較短，比較適合用於對已知序列的基因組進行重新定序，因此對全新的基因組進行定序時，還需結合第一代的定序技術輔助。目前以商品化的第二代定序技術，主要特色爲同步化的定序平台可以大規模的進行定序反應，其定序數量與資料量遠比第一代定序技術還要龐大。以下將簡單介紹三個已商品化的同步定序平台其技術原理。

1. Illumina

Illumina公司的基因組分析儀(Illumina Genome Analyzer)利用「在合成中定序」的概念進行DNA定序[10-11]，每條序列讀長約爲75 bp，目前在一個批次的程序中，可以讀取約17 Gb(gigabase)的DNA序列，整個流程約需要7天，每Mb所需成本約6美元，其中包括反應消耗試劑、人力、儀器成本即儲存資料所需的成本[12]。序列準確度約99.5%。該公司於2009年，推出之儀器(GA II x)並採用對讀定序方法(paired-end)，使得此技術平台的定序讀取長度達2×76 bp，每次反應耗時8天，能

產生20 Gb定序結果，錯誤率降低到僅約1%。目前最新儀器為2010年推出之HiSeq 2000定序儀[13]，平均讀長為 2×100 bp，每次反應耗時約10天，可產生高達200 Gb序列資料量，每天產生的最大序列資料量達25 GB。在單次反應中，可以讀取並產生兩個單獨的人類基因組序列之30倍覆蓋率的資料量，每個人基因組費用低於10,000美元。或是單次反應中，以每個樣品不到200美元的成本，定出200個基因表達譜(gene expression profiles)。定序流程簡單敘述如圖1所示，簡單說明為：先將待測DNA打斷後，篩選DNA大小範圍在200-500 bp的小片段，於兩端接上轉接序列(adaptor sequence)之後，置入表面帶有互補轉接序列的晶片，透過橋式聚合酶鏈鎖反應(bridge PCR)進行增幅。待測DNA定序時會先與特殊引子進行互補並透過接合酶接合。接合後偵測並紀錄引子3'末端之螢光標記。之後以去磷酸酶去掉未配對序列，再切除螢光分子。更換引子後重複上述步驟，即可定序出DNA序列。目前，此技術平台結合對讀定序方法(mate-paired)，定序讀取長度已可達 2×50 bp，單

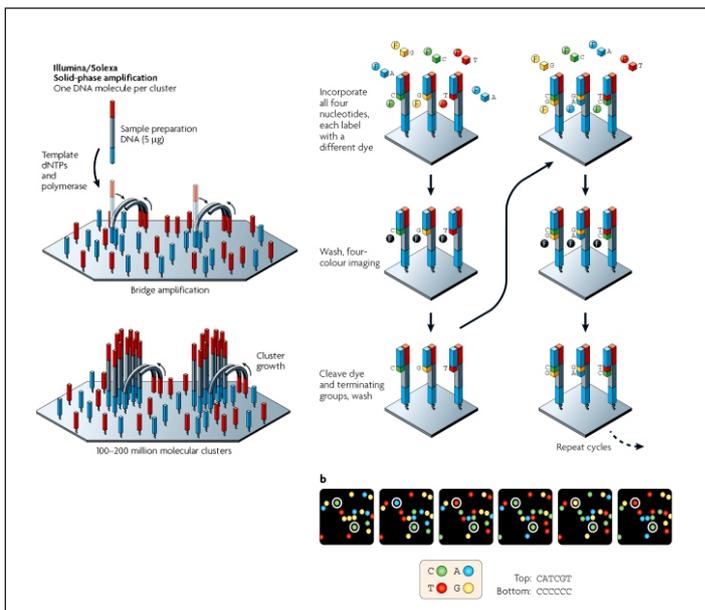


圖1、Illumina定序技術原理示意圖

移除鹼基上的螢光分子，如此反覆進行鹼基合成、影像擷取、螢光標記移除、試劑置換等步驟，快速讀取大量之定序資料，最後以序列軟體系統分析配對出完整之DNA序列。

2. Applied Biosystems

Applied Biosystems公司推出的 Applied Biosystems SOLiD™，是從2006年併購 Agencourt Personal Genomics公司，取得以使用接合酶(Ligase)作為定序策略的技術平台衍生而來的。定序原理如圖2所示，簡述如下：待測DNA打斷成小片段後，於兩端接上轉接序列，再將這些DNA黏合至直徑 $1 \mu m$ 的微珠表面上，透過乳式聚合酶鏈鎖反應(emulsion PCR)進行增幅。待測DNA定序時會先與特殊引子進行互補並透過接合酶接合。接合後偵測並紀錄引子3'末端之螢光標記。之後以去磷酸酶去掉未配對序列，再切除螢光分子。更換引子後重複上述步驟，即可定序出DNA序列。目前，此技術平台結合對讀定序方法(mate-paired)，定序讀取長度已可達 2×50 bp，單

次反應耗時約6-7天，可產生10-15 Gb的定序結果，其準確率可達99.94%以上，每Mb約花費5.8美金[9]。最新出品的儀器 SOLiD™ 4hq System讀取長度達 2×75 bp，單次反應可產生300 Gb的定序結果，準確率可達99.99%以上[14]。

3. Roche/454

Roche公司與454生命科學公司於2005年合併，推出GS-FLX定序儀。其讀長為400 bp，單次反應時間為10小時，可產生約400~600 Mb的資料量，準確率可達99.5%以上[15]，平均每1 Mb花費84.4美金[12]。其定序反應原理是透過Pyrosequencing (焦磷酸定序)技

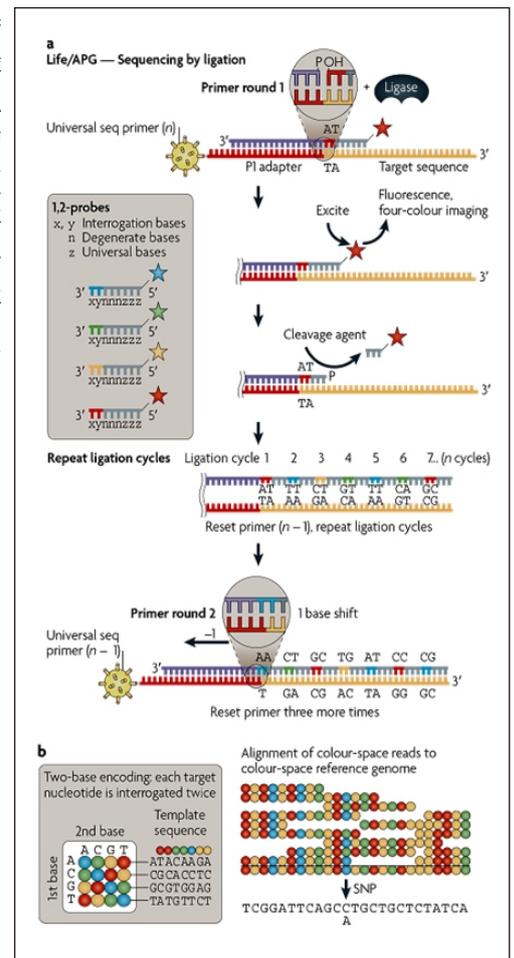


圖2、Applied Biosystems SOLiD™ 定序技術原理示意圖

術，利用幾種生化反應之組合來測定。其運作原理為：待測DNA打斷成300-800 bp的小片段，並於兩端接上轉接序列。加入表面帶有互補轉接序列的28 μm 微磁珠，並以乳式聚合酶鏈鎖反應進行增幅，使每一個DNA片段增加約1百萬倍。再將此微磁珠，置入在底部佈滿直徑44 μm 小孔之可感光偵測的微孔盤中，使得一個微孔僅能容納一個微磁珠。之後進行焦磷酸定序法[16]，即依序加入帶有四個不同鹼基的去氧核苷酸(dNTP)材料，利用聚合酶進行DNA合成，過程中會產生的焦磷酸基團(PPi)，藉由ATP 硫酸化酶(ATP sulfurylase)將PPi轉換成ATP，ATP促使螢光素酶(luciferase)放出冷光(bioluminescence)。此放出的冷光強度經冷光儀(illuminometer)偵測後，轉讀出DNA序列，剩餘未反應的去氧核苷酸材料，再以雙磷酸酶(apyrase)分解，重複上述反應步驟。最後以資訊軟體系統分析配對出完整之核酸序列[16-17]。

IV. 第三代定序技術之演進

為了挑戰在西元2014年時，可以僅以1千美元的價格讀取一個個人的基因組序列計畫，第三代DNA定序策略朝向更為簡化的方式進行定序，隨著奈米科技的發展，針對單一分子進行即時定序，以期能以更低的檢測成本，快速大量直接讀取DNA序列，使得將來個人基因定序更為普及、應用更加廣泛[6, 9, 16]。目前有許多公司正投入研發第三代DNA定序技術平台，以下介紹三家目前技術較為成熟的公司其所發展之技術：Helicos公司的

Helicos單分子定序儀、Pacific Biosciences公司的SMRT技術和Oxford Nanolabs Ltd.公司目前正在研發的奈米孔單分子定序技術。

1. Helicos

Helicos公司所開發出的DNA定序方法為一種能針對單一分子進行即時DNA定序的方法，於2009年正式銷售其商品化儀器設備。其定序原理如下：此定序方法可以免除上述定序技術需要使用PCR增幅的問題。待測DNA樣品隨機打斷成約200 bp之小片段，於各小片段之基因序列末端加上多個腺嘌呤去氧核苷酸(poly-A)。另外於玻璃基材的檢測晶片上，隨機固定許多胸腺嘧啶去氧核苷酸(poly-T)的寡核苷酸分子。將小片段模板DNA以末段序列互補的方式與檢測晶片上的寡核苷酸分子進行雜合，之後逐一加入具螢光分子標記的去氧核苷酸與DNA聚合酶等試劑，進行DNA合成。經過反覆的合成、偵測、螢光分子移除等步驟，即可進行大量序列即時讀取[9, 18]。此技術定序讀取長度約25-55 bp，每個循環約需要8天時間，能產生21-35 Gb的定序結果。此技術可以產生對讀序列(paired-end reads)增加序列組合

時的正確性。

2. Pacific Biosciences

Pacific Biosciences公司所開發出的定序技術，也是針對單一分子進行即時DNA定序的方法，該公司成立於2004年成立，於2010年推出商品化儀器設備[19]。其DNA定序原理如圖3所示，簡述如下，透過奈米製程技術，在玻璃基材上蝕刻具有千餘個零模波導(zero-mode waveguides, ZMW)孔結構的光波導式感測晶片，每個ZMW孔直徑僅有10 nm，深度約100 nm。此技術的核心原理在於此結構底部固定單一個聚合酶分子，利用奈米結構下之光波導之光學特性，激發光源僅能穿透底部20-30 nm處，因此當模板DNA使用可移除螢光分子的去氧核苷酸材料進行聚合反應，可被偵測到不同的光學特性，以達成即時偵測並大幅減低背景螢光訊號干擾之目的。因此，此方法可增加序列讀取長度，讀取大量序列，簡化後續資訊軟體系統的處理程序，降低配對錯誤的發生率[20]。

3. Oxford Nanolabs

Oxford Nanolabs Ltd.其定序技術亦為針對單一分子進行即時DNA定序的方法。目前仍處於開發階段，尚未有商品化之

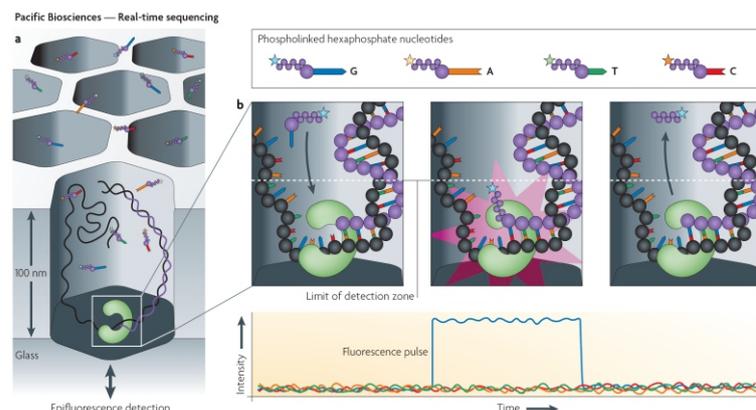


圖3、Pacific Biosciences 定序技術技術原理示意圖

產品。其DNA定序原理為此平台技術在於建立一個具有許多奈米孔的感測晶片，此奈米孔由人工合成的脂質雙層以及經過修飾的蛋白質所組成。此蛋白質上另外還聯結核酸外切酶(exonuclease)，當待測模板DNA經過此酵素作用時，每一個核苷酸將依序被切下。不同鹼基的核苷酸通過此奈米孔時，可引起不同強度的電流擾動，進而達成DNA定序之目的，準確度達99.8%。此技術優點在於不需要進行核酸增幅、因此無須化學分子標定物與聚合酶，亦不需要精密光學量測儀器量測螢光，即可對單一分子做定序，此外也可擴大應用於蛋白質、化學聚合物或其他小分子物質之辨識[21]。

V. 第四代定序技術之演進

第四代定序技術傾向於直接對DNA分子作定序，過程中不需要任何轉接序列與DNA分子增殖，純粹只需要DNA分子即可進行定序。目前發展以IBM/Roche DNA 電晶體定序技術為代表，但此技術尚在實驗室研究階段，仍有許多技術瓶頸需要突破。IBM的定序方法是一種名為「DNA電晶體」(DNA transistor)的技術[22]，此技術的核心在於擁有一種類似於奈米級的電鉗，在電場牽引

DNA鏈通過奈米孔的過程中，這種結構將反復中斷DNA鏈的移動。DNA鏈的電荷為負，而奈米孔洞的直徑僅為3奈米，僅相當於普通人頭頭髮直徑的八萬分之一。該技術利用電場吸引帶負電的DNA穿過晶片上之奈米孔洞，控制電場開與關，時間間隔為一毫秒，在停止拖動DNA的時刻讀取電場的變化，每種base對電場產生的擾動不同可訂出序列。因此在一片晶片上包含數百萬個奈米孔洞，每次都可以同步對大量DNA進行測序。IBM希望建立一套設備，能夠在數小時內對個體的基因組進行測序，每一批次最多將測量30億個核酸。期待將價格降低到1000美元以下，甚至有可能降至100美元的水平。

VI. 結論與展望

期待人類基因體定序能夠低成本且快速的進行，此將有助於疾病診斷、預防和新藥研發，加速進入個人化的基因醫學時代。此外，在其他生物體之研究，高效率的定序技術也有助於研究與開發，無論是在基礎研究或是應用科學方面。因此，期待不久的將來，更新穎的定序技術可以為人類生活、環境保護等方面帶來更多的益處。

參考文獻

1. Maxam, A. and W. Gilbert, PANS, 1977. 74(2): p. 560.
2. Sanger, F., S. Nicklen, and A. Coulson, PANS, 1977. 74(12): p. 5463.
3. Korbel, J., et al., Science, 2007. 318(5849): p. 420.
4. Kidd, J., et al., Nature, 2008. 453(7191): p. 56-64.
5. Wheeler, D., et al., Nature, 2008. 452(7189): p. 872-876.
6. Siva, N., Nature biotechnology, 2008. 26(3): p. 256.
7. Melamede, R., *Automatable process for sequencing nucleotide*. 1989, US Patent 4863849
8. Heiger, D., A. Cohen, and B. Karger, J. Chromatography A, 1990. 516(1): p. 33-48.
9. Shendure, J. and H. Ji, Nature biotechnology, 2008. 26(10): p. 1135-1145.
10. Fedurco, M., et al., Nucleic acids research, 2006. 34(3): p. e22.
11. Bentley, D., et al., Nature, 2008. 456(7218): p. 53-59.
12. Mardis, E., Trends in Genetics, 2008. 24(3): p. 133-141.
13. <http://www.illumina.com/>
14. <http://www.appliedbiosystems.com>
15. Ten Bosch, J. and W. Grody, J. Mol. Diag, 2008. 10(6): p. 484.
16. Tucker, T., M. Marra, and J. Friedman, Am J Hum Genetics, 2009. 85(2): p. 142-154.
17. Holt, R. and S. Jones, Genome research, 2008. 18(6): p. 839.
18. <http://www.helicosbio.com/>
19. <http://www.pacificbiosciences.com>
20. Levene, M., et al., Science, 2003. 299(5607): p. 682.
21. <http://www.nanoporetech.com/>
22. Polonsky, S., S. Rossnagel, and G. Stolovitzky, Appl Phys Lett, 2007. 91: p. 153103.

生物資源保存及研究簡訊 第85期

發行者：財團法人食品工業發展研究所

發行人：陳樹功所長

主編：陳倩琪

編輯：王俐婷、黃麗娜、陳美惠、廖麗娟

本著作權依補助契約歸屬財團法人食品工業發展研究所

地址：新竹市食品路331號

電話：(03)5223191-6

傳真：(03)5224171-2

承印：彥光打字印刷商行

電話：(03)5301116

ISSN:1021-7932

GPN:2009001214

中華郵政新竹誌字第0030號

交寄登記證登記為雜誌交寄

