

參、文獻回顧

一、乳酸菌基本介紹

乳酸菌 (Lactic acid bacteria)，泛指一群具共通特性之革蘭氏陽性菌，此等特性包括：無孢子之產生、一般情況下不產生過氧化氫酶及細胞色素、能利用環境中的碳水化合物進行發酵作用、發酵作用之最終產物主要為乳酸 (Axelsson, 2004)。乳酸菌於自然界中廣泛存在於溶氧性低、具豐富可溶性碳水化合物及蛋白質分解產物之環境中，且生長及代謝過程通常缺乏過氧化氫酶之參與，故常可於牛乳、乳製品、發酵飲料、發酵食品、發酵貯料、人及動物體腸道、口腔與黏膜等環境中被發現。乳酸菌之最大特色是以代謝醣類來進行發酵作用，而此代謝之路徑與發酵之最終產物，可區分為同型發酵 (homolactic fermentation) 與異型發酵 (heterolactic fermentation) 兩大類。同型發酵是經由醣解作用將分解出的丙酮酸還原成乳酸；而異型發酵之最終產物除乳酸外，亦可透過 6-phosphogluconate 與 phosphoketolase 之代謝路徑產生乙醇、醋酸及二氧化碳等其它化合物 (Axelsson, 2004)。

乳酸菌種類繁多，其分類至今仍存有爭議，然而，以實際之食品微生物應用技術之觀點而言，理論上可將乳酸菌區分為氣球菌屬 (*Aerococcus*)、肉食桿菌屬 (*Carnobacterium*)、腸球菌屬 (*Enterococcus*)、乳酸桿菌屬 (*Lactobacillus*)、乳酸球菌屬

(*Lactococcus*)、明串球菌屬(*Leuconostoc*)、酒球菌屬(*Oenococcus*)、片球菌屬(*Pediococcus*)、鏈球菌屬(*Streptococcus*)、四聯球菌屬(*Tetragenococcus*)、漫遊球菌屬(*Vagococcus*)、魏斯氏菌屬(*Weissella*)及雙歧桿菌屬(*Bifidobacterium*)等十三個屬(Axelsson, 2004)。

乳酸菌屬之分類大致上乃根據其型態學、葡萄糖發酵模式、不同溫度下之生長情形、產出之乳酸結構、高鹽濃度下之生長能力，以及抗酸鹼之耐受性等生化特性來做界定。近年來，由於分子生物學之發達，科學家已嘗試利用新的方法與工具，對乳酸菌進行分類及定種，以取代傳統微生物學生理及生化特行之分析。現今最常被研究人員使用的分類與定種之技術，包括使用 16S 核糖體核糖核酸(16S rRNA)基因定序、聚合酶連鎖反應指紋辨識技術(PCR-based fingerprinting)以及可溶性蛋白樣本圖譜分析(soluble protein patterns)。利用上述之技術與方法所鑑定及辨識出之乳酸菌，其分類屬性相較於傳統法能更具準確性，且較符合生物學上之系統發生關聯性(phylogenetic relationships)(Axelsson, 2004)。

乳酸菌廣泛且普遍存在於人類生存之環境周遭，且人類使用乳酸菌作為發酵食品及食物保存已有幾千年之歷史，包括動物乳品、穀物、蔬菜、水果及魚肉類等原料之發酵與貯藏。自 Lister 於西元 1873

年從酸乳 (sour milk) 中鑑定出第一株乳酸菌以降，乳酸菌在食品工業發展歷程中持續不斷演進，時至今日，由乳酸菌所產製之相關食品與飲料，除提供人類飲食營養上的易保存性與多樣化外，也同時對於人類及動物有健康上的貢獻。依照世界衛生組織 (World Health Organization; WHO) 及聯合國糧食及農業組織 (Food and Agriculture Organization of the United Nations; FAO) 的定義，“在給予宿主適量之補充而能帶來助益之活體微生物”，皆可稱作益生菌 (probiotic) (FAO and WHO, 2001)。此外，研究人員於文獻中也曾提出類似益生菌之基本定義，“攝入一定數量之微生物後，扣除身體固有之基礎營養素，而能獲得額外之保健功效”，此等微生物即可稱為益生菌 (Guarner and Schaafsma, 1998; Klaenhammer, 2000; Tannock, 2002; Ljungh and Wadström, 2006)。

一般常見之益生菌，主要是指乳酸菌和少數酵母菌，其中乳酸桿菌 (Lactobacilli) 及雙歧桿菌 (Bifidobacteria) 更可視為益生菌之代表 (Klein *et al.*, 1998; Kullen and Klaenhammer, 2000)，表 1 (Guarner *et al.*, 2008) 中所列舉出之菌種，乃已開發為商業產品之益生菌菌種，大致上也偏屬於此二類菌屬。文獻中常提及益生菌之保健功效，包括能抑制腸道內病原體之生長，來維持腸道菌相平衡、稀釋並中和腸道內由食物產生之突變劑、藉由刺激活化免疫系統來達到緩解過敏症狀

(Tannock, 2002; Ljungh and Wadström, 2006; Peluso *et al.*, 2007)、改善乳糖不耐症之代謝障礙及提高乳糖利用率 (Saltzman *et al.*, 1999)、預防癌症和抑制腫瘤生長，以及降低血清中之膽固醇 (Kullen and Klaenhammer, 2000; Wollowski *et al.*, 2001; Tannock, 2002; Ljungh and Wadström, 2006)。由於乳酸桿菌在益生菌保健功效上所扮演之角色日趨重要，研究人員已針對部分乳酸桿菌菌種進行基因工程上的分析與改良，除了理出既有之基因功能於菌種在保健機能上之影響外，更欲以基因工程技術對此等菌種進行基因改良，以達增強其應用價值與潛力 (Kullen and Klaenhammer, 2000)。以目前基因工程技術所改良之乳酸菌種具下列之優點：(1) 能藉由增加乳酸菌抗噬菌體之能力，以改善發酵製程穩定性；(2) 透過醣類代謝基因之研究，以改變發酵途徑，可增進發酵效率與縮短製程；(3) 導入抑菌素基因，可取代食品添加物中防腐劑之使用；(4) 可透過菌種基因之突變篩選，以去除不良性狀；(5) 導入抗原基因片段，可研發乳酸菌口服疫苗；(6) 導入代醣合成基因，如山梨糖醇合成酶，可生產代糖 (林, 2010)。

二、乳酸菌內源性質體

質體 (plasmid) 乃為獨立於染色體DNA外，而能單獨進行複製之環狀雙股DNA，主要存在於原核生物當中，也有極少數在如酵母菌等低階真核生物當中被發現。質體與乳酸菌之關係可於文獻中追溯

自西元1972年，McKay等人首先觀察到，乳酸鏈球菌（*Streptococcus lactis*）自發性喪失利用乳糖進行發酵作用之能力，並指出此現象可能與質體DNA的參與有關（McKay *et al.*, 1972）。隨後，Chassy及其研究團隊於乳酸桿菌內首次發現內源性質體之存在，並進一步證實，質體DNA分子上帶有乳酸桿菌代謝相關之基因（Chassy *et al.*, 1976; Chassy *et al.*, 1978），此一系列之研究強化了質體在乳酸菌基因遺傳上之重要性。

近數十年來，許多乳酸菌質體在科學研究上相繼被發現，其分子大小（介於1.5至600kb之間）、複製數量（copy number）與所含基因種類皆隨宿主菌種之差異而呈現非常大之變異。大部分被研究過的乳酸菌質體，主要分列在四大菌屬當中，包括乳酸球菌屬、乳酸桿菌屬、雙歧桿菌屬，以及鏈球菌屬當中之嗜熱鏈球菌（*Streptococcus thermophilus*）。乳酸球菌屬中以乳酸乳球菌（*Lactococcus lactis*）為主要研究對象，其包含四個亞種，分別為*L. lactis subsp. cremoris*、*L. lactis subsp. lactis*、*L. lactis subsp. hordniae*和*L. lactis subsp. diacetylactis*。乳酸球菌內源性質體所帶有之基因功能，通常與食品發酵工業上之應用較為緊密。乳酸桿菌被研究及應用的菌種種類最廣，包含*L. acidophilus*、*L. plantarum*、*L. rhamnosus*、*L. casei*、*L. pentosus*、*L. fermentum*、*L. reuteri*、*L. helveticus*、*L. hilgardii*、*L. delbrueckii*

bulgaricus、*L. curvatus*、*L. delbrueckii*、*L. sakei*、*L. delbrueckii lactis*。

乳酸桿菌的應用，橫跨大部份之發酵食品與健康食品。此類菌中所發現之內源性質體，其細胞內質體個數較少，但在各菌種間種類繁多，質體大小介於1.2至150 kb之間。雙歧桿菌乃腸道內之原生菌種，其存在之多寡，對宿主之健康扮演相當重要之角色。雙歧桿菌屬當中之內源性質體，主要發現自*B. longum*、*B. globosum*、*B. breve*、*B. asteroides*以及*B. pseudocatenulatum* 此等菌體中，其中以*B. longum*當中之質體被發現最多。嗜熱鏈球菌為鏈球菌屬當中唯一能使用於食品發酵之菌種，其所帶有之內源性質體比例不高，此菌主要被使用在發酵乳製品的初步發酵過程 (Shareck *et al.*, 2004；林，2010)。

雖然大部分乳酸菌內源性質體皆能獨立於染色體DNA之外而自行複製，但某些質體卻必須依靠宿主染色體DNA所表現之蛋白質輔助，方能執行複製與轉錄 (Shareck *et al.*, 2004)。研究發現，乳酸菌內源性質體常具備重要之生理功能基因，如蛋白質水解酵素系統 (Kok, 1990)、黏液之產生、醣類與碳水化合物之代謝、胺基酸代謝、抑菌素 (bacteriocin) 之生成 (Pouwels and Leer, 1993)、表現抗抗生素基因 (Vescovo *et al.*, 1982; West and Warner, 1985) 以及噬菌體抗性與DNA接合轉移 (conjugal transfer) 等 (McKay and Baldwin, 1984; Sanders *et al.* 1986)。然而，除上述能表現各種功能性狀的內源性質

體之外，仍有許多被新發現的乳酸菌內源性質體，其本身並不具有明顯之基因性狀，此等質體的存在與否，對宿主本身之生理功能也不具顯著影響，此一類型質體即被定義為無性狀質體（cryptic plasmid），而在乳酸桿菌當中常發現此類質體之存在（Shareck *et al.*, 2004）。

質體與乳酸菌宿主之間的相互依存，受到許多因子調控，包括質體對宿主之相容性（compatibility）、質體DNA分子之結構穩定性（structural stability）、質體於宿主繼代分裂過程中之分離穩定性（segregational stability），以及質體在個體宿主細胞內之複製數量（copy number）。由於質體之複製模式，直接或間接關係到上述之影響因子，而複製模式之型態與機制，受到質體之複製單元（replicon）的調控，故了解複製單元的序列特性及複製模式，能更進一步評估質體之應用潛力（Shareck *et al.*, 2004）。

三、質體複製單元與複製模式

質體能存在於宿主當中之最小需求，便是維持其最簡化之複製功能，而質體能否複製則取決於複製單元（replicon）此一DNA片段區域。質體的複製單元片段長度很少會超過3 kb，單元組成主要包含三個部分：（1）複製源（replication origin; *ori*）；（2）參與調控複製起始的調控蛋白基因（*cop* 基因/*inc* 基因）；（3）複製過程所必

需的複製蛋白 Rep 基因 (Shareck *et al.*, 2004)。

依據質體複製過程之單股 DNA 中間產物形成與否，可區分為兩種複製系統，分別為 θ 型複製模式 (theta replication) 及滾動環狀複製模式 (rolling-circle replication; RCR) (Morelli *et al.*, 2004)。以 θ 型模式複製之質體常發現於革蘭氏陰性菌，少數為革蘭氏陽性菌，如 pAM β 1、pRJF1 以及 pWVO2 等 (Clewel *et al.*, 1974; Hefford *et al.*, 1993; Kiewiet *et al.*, 1993)。由於此類型質體於複製過程當中，其中間產物在電子顯微鏡觀察下，形似希臘文符號“ θ ”，故而得名 (del Solar *et al.*, 1998)。此等質體於複製過程中，不會形成單股 DNA 中間產物，具較低之質體複製數量，質體分離穩定性較高。 θ 型複製模式於複製起始階段，依據複製起始蛋白 Rep 的參與與否，又可分為兩種複製機制。第一種 θ 型複製機制以 ColE1 之 *ori* 為例，其複製機制不需 Rep 之參與。首先自 ColE1 之 *ori* 起始區上游 555 bp 位置，由 RNA 聚合酶 (RNA polymerase) 轉錄出一條約 700 bp 之引子前驅物 (primer precursor)，亦即 RNA II，RNA II 之 3' 端與複製起始區鄰近之 DNA 模板形成雜合體，此雜和體會受到 RNase H 辨識，並於複製起始區內五處腺嘌呤 (adenine) 位置進行切割，而形成成熟之引子。透過此引子之黏合，再結合第一型 DNA 聚合酶 (DNA polymerase I) 作用而進行 DNA 複製 (圖 1) (Actis *et al.*, 1999)。第二種 θ 型複製機制則需 Rep 之參與，

以pSC101質體之ori為例，通常此類質體的ori起始區具有某些特殊序列片段，包括A-T rich區域、鄰近A-T rich區域之直接重複序列（direct repeat sequence; interon）、宿主起始蛋白整合因子（integration host factors; IHF）鍵結區（IHF-binding site）以及宿主DnaA起始蛋白（host DnaA initiator protein）鍵結區（DnaA box）。複製起始階段，Rep（在pSC101質體當中為RepA）會鍵結在interon序列結構上，而宿主DnaA起始蛋白隨後與DnaA box結合，緊接著，IHF會在Rep與DnaA之間的A-T rich區域（IHF-binding site）結合，造成A-T rich區域DNA結構改變，相繼吸引其它宿主起始蛋白因子參與，促使前驅起始複合體（preinitiation complex）形成，進而啟動質體DNA進行複製（圖 2）（del Solar *et al*, 1998）。

以 RCR 模式複製之質體，常發現於革蘭氏陽性菌，少數為革蘭氏陰性菌。此等質體大小介於1.3到10 kb之間，複製過程中會形成單股DNA中間產物，具較高之質體複製數量，質體分離穩定性較低。此類質體複製單元內，主要具有雙股複製源起始點（double strand origin; DSO）、複製起始蛋白基因（replication initiation protein; Rep）、複製調控基因以及一至二個單股複製源起始點（single-strand origin; SSO）。DSO乃RCR複製模式之必須元件，SSO之存在則會影響質體複製數量及穩定度（Khan, 1997）。複製起始階段，Rep首先於雙股複

製源起始點位置上作用，形成單股缺口，並在第三型DNA聚合酶（DNA polymerase III）以及其它複製調控蛋白參與下，以負股（negative strand）為模板先進行領先股（leading strand）之合成，同時取代並釋出正股（positive strand）之單股DNA，待領先股DNA合成完畢，其餘複製調控蛋白再參與正股單股DNA之雙股互補合成（圖3）（del Solar *et al.*, 1998）。pT181質體之複製源起始區乃為典型之RCR模式代表，此區域具有三段倒置重複序列（inverted repeat），包括A-T rich區域、缺口切割處（nick site）以及複製起始蛋白鍵結位（Rep binding site）之序列構造。複製起始階段，複製起始蛋白C（RepC）形成同雙聚體（homodimer），而結合在複製起始蛋白鍵結位上，使結合區之DNA形成不規則彎曲，並改變RepC之結構，此時A-T rich區域會加速解開雙股DNA。當缺口切割處產生後，複製元件聚合體（replisome）便會在此處形成，於複製調控蛋白參與下進行DNA複製（圖4）（Actis *et al.*, 1999）。

由於RCR模式複製之質體於複製過程中，會產生單股DNA分子之中間產物，而此等產物因結構脆弱，易於環境中被降解，導致質體產生片段缺失以及產量流失。且於細胞分裂過程中，此類質體易產生分離不穩定性，使宿主於繼代過程中無法持續保留質體。故當利用RCR模式複製之質體選殖較大片段之DNA序列時，會遭遇複製上之

困難度 (Kiewiet *et al.*, 1993)。然而，根據過去之研究顯示，大部分被開發出之乳酸菌質體，其複製是經由RCR機制進行 (Shareck *et al.*, 2004)，且被廣泛使用於乳酸菌之相關研究實驗，特別是根據以 pWVO1 或 pSH71 之質體複製源所構築之衍生質體，如 pGK13 及 pNZ12。此等質體無論於革蘭氏陰性或陽性菌內，皆能呈現廣宿主性與高質體複製數量，但卻常在選殖過程中接入大於 8 kb 之 DNA 片段後，而呈現結構上之不穩定性 (Pérez-Arellano *et al.*, 2001)。

質體複製數量 (copy number) 可定義為，“單一個細胞內所帶有之質體數量” (Leipold *et al.*, 1994)。大致上可分為低複製量 (1 至 10 個質體/細胞)、中複製量 (10 至 20 個質體/細胞) 與高複製量 (數百個質體/細胞) (Mayer *et al.*, 1995)。一個質體的複製頻率，相當於此質體之複製數量 (Friehs, 2004)，質體的複製模式會調控其複製頻率。故質體複製模式之不同，或複製單元序列片段上調控基因之不同，會導致質體複製數量差異之產生。通常以 RCR 為複製模式之質體，其複製頻率高於以 θ 型為複製模式之質體，因而其複製數量也相之較大。文獻提及，正常之 pBR322 其質體複製源乃呈現中複製量；而當 pBR322 複製源片段上游區之 RNA I 基因發生單一點突變 (single point mutation)，則會造成高複製量之表現 (Boros *et al.*, 1984)。基因劑量 (gene dosage) 旨在描述能使蛋白質表現之基因數量。而大部分

情況下，單一質體上之單一基因通常只具有一個基因劑量，故，一般研究上，若以質體作為蛋白質表現載體，則其蛋白質表現量會與質體複製數量成正比（French and Ward, 1996; Friehs, 2004）。

質體進行轉型作用而進入宿主後，常發生質體不相容性之問題，此狀況大部分乃肇因於內源性質體之存在，而產生之排斥現象。乳酸菌在自然情況下，會出現攜帶有一個以上之內源性質體之可能，而扣除此一情況，具有相似複製模式之兩種不同質體，同時存在於相同宿主內時，由於會同時競爭宿主內參與DNA複製所必需之蛋白質元件（Pouwels and Leer, 1993），且宿主內之限制修飾系統（restriction-modification system），對外源性DNA片段具有強烈之抑制作用（Hashiba *et al.*, 1990），故最終只能留下一種質體於宿主內。文獻指出，研究人員曾將兩種具不同複製模式之質體，針對同一種乳酸桿菌宿主進行共轉型（cotransformation），而達到宿主相容性（Pérez-Arellano *et al.*, 2001）。然而，宿主內源性質體之分子大小，可能與轉型之外源性質體相似，進而造成分析上之困擾。因此，欲建立具效能之乳酸桿菌基因工程系統，較適合以不含內源性質體之菌株，做為基因工程操作之宿主。

四、乳酸菌載體之開發

基因工程在科學研究及工業生產應用上，常將許多質體，作為蛋

白質表現系統當中之重組蛋白表現載體 (expression vector)。欲使乳酸桿菌宿主能表現具應用潛力之標的基因，利用 DNA 重組技術構築乳酸桿菌表現載體乃一關鍵步驟。研究人員首先希望可於乳酸桿菌內，構築能被操控之載體，故亟欲自各菌種內尋找具應用價值之質體，並將其開發為可靠且穩定之選殖載體 (cloning vector)。近年來，由於廣宿主性 (broad-host-range) 質體之發現，以及DNA電轉型技術之成熟發展，基因工程分析與基因轉植技術，已大量應用在乳酸桿菌之蛋白質表現系統上 (Kullen and Klaenhammer, 2000)。

一個可靠的選殖載體必須要具備 (1) 至少一個 ori 片段；(2) 能於轉型宿主當中被辨識出之篩選標記 (selection marker)；(3) 一至一個以上之單一限制內切酶切點；(4) 分子量小、複製數量多，以及 (5) 高分離穩定性與結構穩定性 (Shareck *et al.*, 2004)。科學研究上，已被開發出之乳酸桿菌選殖載體，依其質體上複製單元之演進差異，可列分為三等級 (Kullen and Klaenhammer, 2000)。第一級：帶有一個RCR模式複製單元之廣宿性載體；第二級：搭配大腸桿菌與革蘭氏陽性菌之兩種 ori ，所構築出之載體；第三級：使用乳酸桿菌無性狀質體為骨架，結合革蘭氏陰性菌之 ori 與篩選標記基因片段，所構築出之載體。第一級的代表性載體為pGK12，其乃根據乳酸球菌廣宿性質體pWVO1所設計之衍生載體，同時帶有抗紅黴

素與抗氣黴素之篩選標記基因，可使用大腸桿菌、枯草桿菌 (*Bacillus subtilis*) (Kok *et al.*, 1984) 以及數種乳酸桿菌 (*L. acidophilus*、*L. gasseri*、*L. johnsonii*、*L. plantarum*、*L. casei*、*L. fermentum*以及*L. reuteri*) 作為宿主 (Luchansky *et al.*, 1988)。第二級之載體被設計帶有兩種 ori ，透過不同之 ori 調控，能共同於大腸桿菌及革蘭氏陽性菌內進行複製，最廣泛被使用之代表性載體為pSA3 (Dao and Ferretti, 1985)，能使用*L. johnsonii*、*L. gasseri*以及*L. helveticus*作為宿主，且具備特殊用途之選殖與整合 (integration) 載體功能 (Bhowmik *et al.*, 1993; Walker and Klaenhammer, 1994; Kullen and Klaenhammer, 2000)。除pSA3外，以革蘭氏陽性菌廣宿性質體pAM β 1 (Clewel *et al.*, 1974; Leblanc and Lee, 1984) 之複製單元，結合大腸桿菌質體p15A之 ori (O'Sullivan and Klaenhammer, 1993)，所共同構築之乳酸桿菌選殖載體，也屬於應用較廣之範例，包括pTRKL/H與pIL252/3 (Simon and Chopin, 1988)，其分別為具低與高之質體複製數量之乳酸桿菌選殖載體。由於其中pAM β 1之複製單元屬 θ 型複製模式，且宿主性廣，故能於各乳酸桿菌菌種間，提供結構上相對穩定之重組DNA質體 (Kullen and Klaenhammer, 2000; Pérez-Arellano *et al.*, 2001)。第三級載體開發較廣且雜，主要是選擇將不同之篩選標記基因，與革蘭氏陰性菌 ori ，共同接入乳

酸桿菌無性狀質體內，而獲得種類繁多之乳酸桿菌選殖載體（Luchansky *et al.*, 1988; Pouwels and Leer, 1993; Sano *et al.*, 1997; Kullen and Klaenhammer, 2000; Shareck *et al.*, 2004）。乳酸桿菌載體發展至今，除上述三種等級載體外，有許多具單一廣宿性複製單元之內源性質體，也自各原始宿主菌種當中被發現，例如pPSC20與pPSC22、pLC2、pGT633、pA1以及pLA106等（Kullen and Klaenhammer, 2000），此類質體在只具單一複製單元情況下，而能使用大腸桿菌與枯草桿菌等其它異源菌種作為宿主。相較於前述利用多複製單元或*ori*所構築之載體，單一廣宿性複製單元之內源性質體所構築之載體，因複製機制與*ori*序列皆較單純，故在基因修飾與遺傳分析上，能提供更高且穩定之應用價值（Kullen and Klaenhammer, 2000）。在*L. reuteri*、*L. crispatus*與*L. plantarum*三種乳酸桿菌當中，發現所存在之質體宿主性相當窄，此類質體通常只能應用在原始宿主，亦或是親屬性較近之菌種（Ahrne *et al.*, 1992; Pouwels and Leer, 1993; Sørvig *et al.*, 2005）；但文獻中提及，由於宿主性較窄之質體，其較可避免透過DNA互換，而將基因轉移給其它菌種，穩定度及安全性也相對提高，故此等質體適用於構築食品或疫苗等級之表現載體（Pouwels and Leer, 1993; Kullen and Klaenhammer, 2000）。

前述之載體系統，大部分皆利用所開發出之選殖載體，進一步構築為蛋白質之表現載體，故研究人員通常較關注載體於宿主內之結構穩定性，以及菌種繼代過程之分離穩定性。結構穩定性亦即，質體DNA在進行複製過程中，其所呈現之DNA物理性結構狀態。而分離穩定性則代表，當質體DNA透過菌體分裂過程，經複製後而隨機分配於新生子代菌體之保留能力。當構築之表現載體其兩者穩定性皆提高，則此蛋白質表現系統之穩定性也相對提高。綜上所述，以質體獨立複製之型態，進行基因表現之載體，可稱為複製型表現載體，而一個複製型表現載體，當在沒有篩選抗生素的壓力下，大部分會產生低分離穩定性，此載體系統將逐漸失去功能性基因之表現量（林，2010）。因此，針對食品等級之表現系統而言，整合性載體（integration vector）較具有基因遺傳上之穩定性、安全性（無使用抗生素篩選基因之後續顧忌）與方便性（Rossi *et al.*, 2008）。整合性載體通常能藉由三種方式，將載體上之標的基因片段，整合入宿主之染色體DNA當中，包括：轉位插入（transposition）、特定位點重組（site specific recombination）以及同源重組（homologous recombination）技術，其中同源重組技術使用較廣，主要是利用載體帶有與宿主染色體DNA具相似性序列，將標的基因或序列片段以互換方式嵌入宿主染色體DNA內。此技術常應用於插入性突變（insertional mutagenesis）、基因

破壞 (gene disruption)、基因擴增 (amplification) 以及基因取代 (replacement) (Kullen and Klaenhammer, 2000)。科學文獻上，除一般基因表現載體之外，已被開發出具特殊功能性之載體，還包括啟動子篩選載體 (promoter screening vector) (Bojovic *et al.*, 1991)、轉錄終結序列篩選載體 (transcription terminator screening vector) (van der Vossen *et al.*, 1985) 以及分泌性表現載體 (secretion vector) (Jeong *et al.*, 2006) 等。

五、乳酸桿菌穿梭選殖載體之構築

乳酸菌載體在試驗操作上，皆具有重要之共通特性，其中大部分載體帶有廣宿主性，能穿梭於兩種或兩種以上之菌種間，而依然保有 DNA 複製能力，此等穿梭載體 (shuttle vector) 之優點在於可先於大腸桿菌或具高複製數量之宿主內先行增殖，經大量純化後再做進一步應用。欲構築大腸桿菌與乳酸桿菌相容性穿梭選殖載體 (shuttle cloning vector)，其必須能於大腸桿菌與乳酸桿菌內兼具複製能力。由於大部分乳酸桿菌單一廣宿性 *ori* 屬於 RCR 複製模式，而大腸桿菌質體之 *ori* 通常不適用於革蘭氏陽性菌，故研究上很少以單一 *ori* 做為穿梭載體構築之使用。大腸桿菌質體 pUC19 帶有具高複製數量之 pMB1 *ori* (Yanisch *et al.*, 1985)，為 θ 型複製模式，結構穩定且

使用廣泛，可勝任選殖大片段之 DNA 序列，故 pMB1 *ori* 可當作穿梭載體上之大腸桿菌宿主 *ori*。文獻指出，源自腸糞球菌 (*Enterococcus faecalis*) 之革蘭氏陽性菌廣宿性質體 pAM β 1，能於多種乳酸桿菌內進行複製 (Tannock, 1987)，其 *ori* 乃為 θ 型複製模式，結構上較 RCR 複製模式之質體為穩定，也能勝任選殖大片段之 DNA 序列，轉型入宿主後仍維持較高之分離穩定性，且重組質體之複製數量可達 30-50 個(質體數量/細胞)，故 pAM β 1 之複製單元片段，適合用作乳酸桿菌穿梭選殖載體之構築 (Pérez-Arellano *et al.*, 2001)。此外，由於乳酸桿菌選殖載體具食品等級之應用潛力，為避免日後選殖之表現基因發生菌種間轉移現象，可選擇宿主性較窄之載體 *ori*，來限制表現載體之潛在宿主種類，以降低構築於載體上之基因轉移機率。Sørvig 等人之研究團隊於 2005 年所發表之植物乳桿菌 (*Lactobacillus plantarum*) 內源性質體 p256，已成功被構築為多功能表現載體。p256 之 *ori* 為 θ 型複製模式，宿主性窄，且於選殖入 7 至 8 kb 之大片段 DNA 序列後，仍能保持高結構穩定性與高分離穩定性，故此質體之 *ori*，也適用於乳酸桿菌穿梭選殖載體之構築 (Sørvig *et al.*, 2005)。

六、異源性基因表現

乳酸桿菌的基因工程技術之操作，乃是利用載體，將標的基因導入乳酸桿菌宿主中，藉此提升乳酸桿菌產出的附加價值。當被使用

的標的基因，乃源自非宿主本身固有之基因，則此類基因稱為異源性基因 (heterologous genes)。使用乳酸桿菌表現載體來生產蛋白質產物，載體上必需擁有能驅動標的基因轉錄之啟動子 (promoter)，然而當乳酸桿菌宿主在表現特定異源性基因時，基因上游之原始啟動子，並非都能被宿主所使用。文獻曾提及，在乳酸桿菌發酵過程的某些特定情況下，研究人員會使用誘導性啟動子 (inducible promoter) 來構築誘導型載體。誘導型載體能透過諸如：以乳糖分子 (*lac* promoter)、氯化鈉 (*gadC* promoter)、溫度控制 (*tec* phage promoter)、pH值 (P170 promoter) 以及噬菌體感染 (Φ 31 promoter) 等誘導方式，針對個別啟動子進行誘發 (Shareck *et al.*, 2004)。另有其它文獻提出，利用乳酸菌所分泌之抑菌素來做為誘導物，包括Pavan *et al.* (2000) 在植物乳桿菌當中，使用乳酸球菌抑菌素 *nisin*，來誘發 *nisRK* 調節基因啟動子，以表現下游序列所構築之 TTFC 抗原蛋白；Axelsson *et al.* (2003) 以植物乳桿菌與清酒乳桿菌 (*Lactobacillus sakei*) 為宿主，使用清酒乳桿菌抑菌素 sakacin A，誘發抑菌素 *sapA* 基因啟動子，表現 β -葡萄糖苷酸酶 (β -glucuronidase; *gusA*) 報導基因。誘導性啟動子之表現系統，較適用於高單位量蛋白質之產製，尤其以針對發酵過程中，特定時間點內其特定發酵產物之生產。然而，在其它應用部分，如人體黏膜系統與消化道菌叢之蛋白質原位產製，抑或是當需要進行

穩定態基因表現時，則不適用誘導性基因表現系統，而需改以菌種本身內源性啟動子做為應用 (Rud *et al.*, 2005)。根據 McCracken *et al.* (2000) 的研究報告指出，使用聚合酶鏈鎖反應所擴增出之嗜酸桿菌表層蛋白A (surface layer protein A; *slpA*) 啟動子片段，將此片段接入帶有 *gusA* 報導基因之穿梭載體 pNZ272 (乳酸桿菌/大腸桿菌穿梭載體)，構築為啟動子操縱載體 pNZslp，轉型入三種乳酸桿菌宿主當中 (*L. rhamnosus* GG, *L. fermentum* BR11 以及 *L. plantarum* BR3)。

與其它啟動子載體組別相較，帶有 *slpA* 啟動子之載體，其 *gusA* 轉錄活性在三種乳酸桿菌當中皆最高，尤其以 *L. plantarum* BR3 為宿主之操縱組，能獲得超過一百倍以上之轉錄活性。此一結果顯示，*slpA* 啟動子在上述三種乳酸桿菌當中，啟動子DNA的結構能有效地與RNA聚合酶進行結合，而促進轉錄作用。故在構築乳酸桿菌表現載體系統時，*slpA* 啟動子具備較強之異源性基因表現潛力 (McCracken *et al.*, 2000)。

本研究之目的旨在尋找可利用之乳酸桿菌內源性質體，並透過選殖此內源性質體之複製源起始區 (region of replication origin)，用以構築能勝任於乳酸桿菌當中進行異源性基因表現之穿梭表現載體。

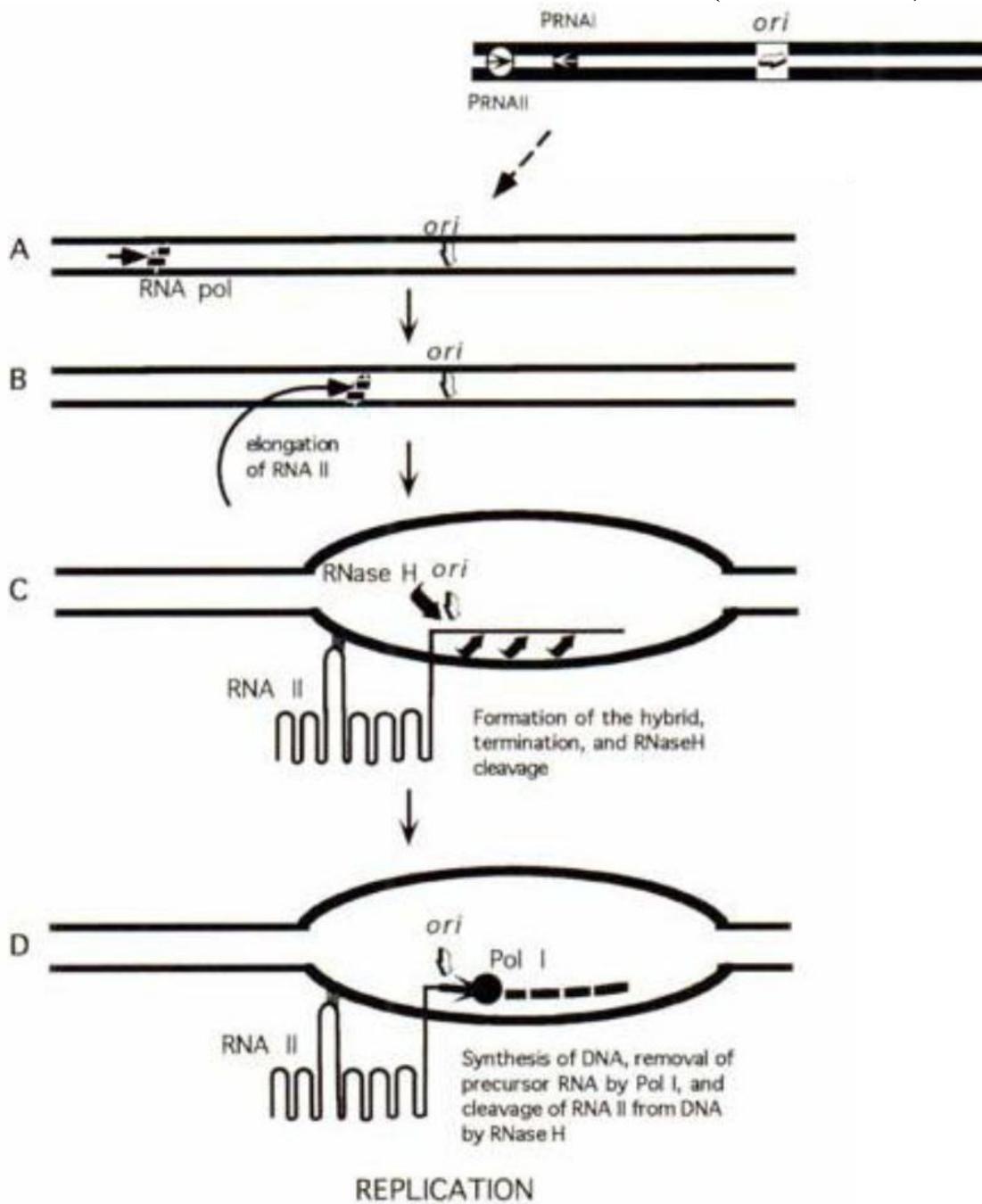
表 1 商業產品之益生菌菌種

Table 1 Examples of probiotic strains in products

Strain (alternative designations)	Brand name	Producer
<i>Bifidobacterium animali</i> DN 173 010	Activia	Danone/Dannon
<i>Bifidobacterium animali</i> subsp. <i>lactis</i> Bb-12		Chr. Hansen
<i>Bifidobacterium breve</i> Yakult	Bifiene	Yakult
<i>Bifidobacterium infantis</i> 35624	Align	Procter and Gamble
<i>Bifidobacterium lactis</i> HN019 (DR10)	Howaru Bifido	Danisco
<i>Bifidobacterium longum</i> BB536		Morinaga Milk Industry
<i>Enterococcus</i> LAB SF 68	Bioflorin	Cerbios-Pharma
<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917	Mutaflor	Ardeypharm
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5		Chr. Hansen
<i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM		Danisco
<i>Lactobacillus casei</i> DN-114 001	Actimel, DanActive	Danone/Dannon
<i>Lactobacillus casei</i> CRL431		Chr. Hansen
<i>Lactobacillus casei</i> F19	Cultura	Arla Foods
<i>Lactobacillus casei</i> Shirota	Yakult	Yakult
<i>Lactobacillus johnsonii</i> La1 (Lj1)	LC1	Nestlé
<i>Lactococcus lactis</i> L1A	Norrmejerier	
<i>Lactobacillus plantarum</i> 299V	GoodBelly, ProViva	NextFoods Probi
<i>Lactobacillus reuteri</i> ATCC 55730	Reuteri	BioGaia Biologics
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 53013 (LGG)	Vifit and others	Valio
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LB21	Verum	Norrmejerier
<i>Lactobacillus salivarius</i> UCC118		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (<i>boulardii</i>) Iyo	DiarSafe, Ultralevure, and others	Wren Laboratory, Biocodex, and others
<i>Lactobacillus acidophilus</i> CL1285 and <i>Lactobacillus casei</i> Lbc80r*	Bio K+	Bio K+ International
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GR-1 and <i>Lactobacillus reuteri</i> RC-14*	FemDophilus	Chr. Hansen
<i>Streptococcus thermophilus</i> , four <i>Lactobacillus</i> spp., and three <i>Bifidobacterium</i> spp. strains*	VSL #3	Sigma-Tau Pharmaceuticals, Inc.
<i>Lactobacillus acidophilus</i> CUL60 and <i>Bifidobacterium bifidum</i> CUL 20*		
<i>Lactobacillus helveticus</i> R0052 and	A'Biotica and others	Institute Rosell

*: Tested as mixture

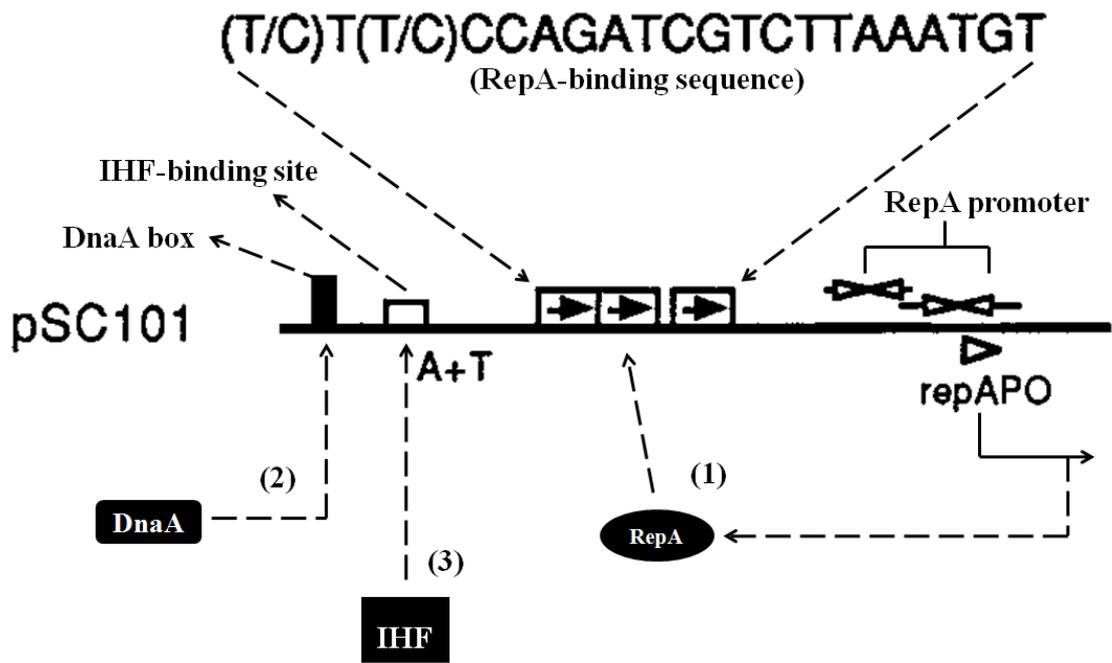
(Guarner *et al.*, 2008)



(Actis *et al.*, 1999)

圖1 ColE1之複製起始機制。

Fig. 1. Mechanism for replication initiation of ColE1.



(del Solar *et al*, 1998)

圖 2 pSC101 之複製起始機制。

Fig. 2. Mechanism for replication initiation of pSC101.

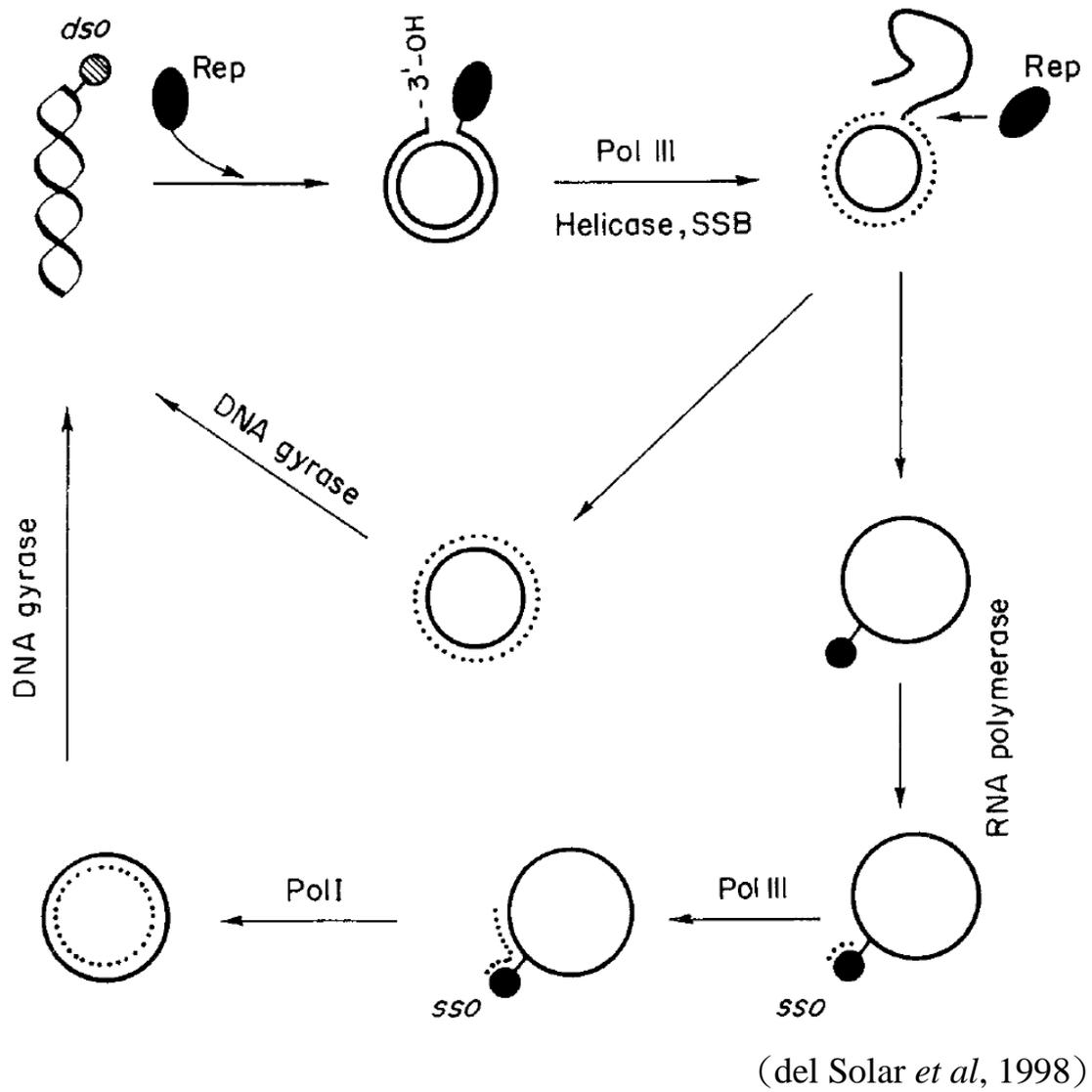
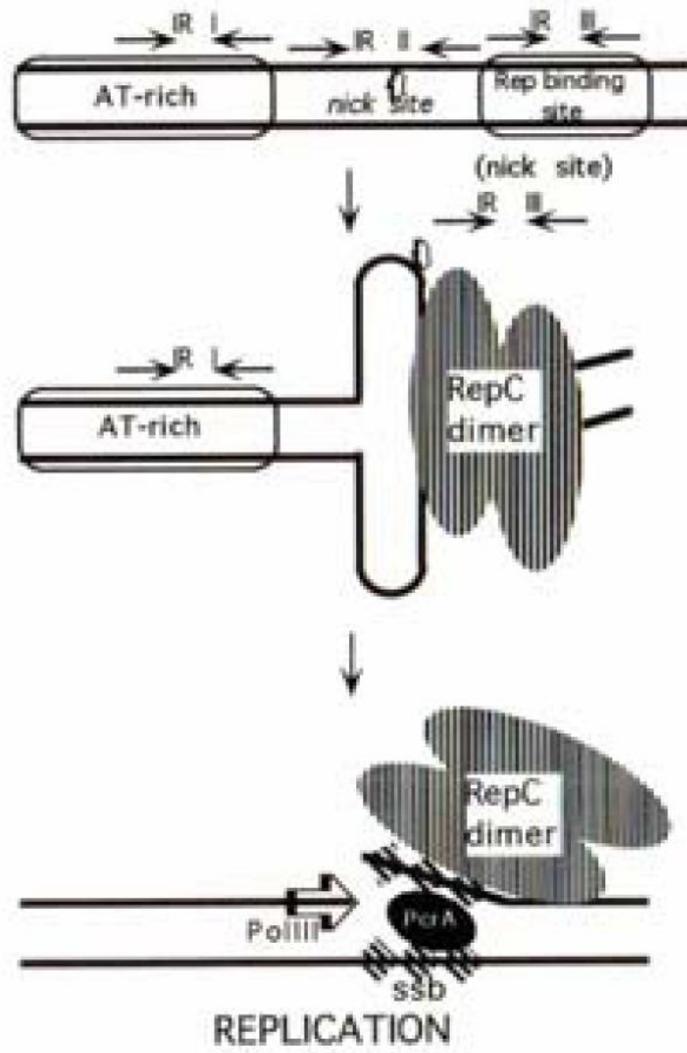


圖 3 滾動環狀複製模式。

Fig. 3. Model for the replication of RC plasmids.



(Actis *et al.*, 1999)

圖4 pT181之複製起始機制。

Fig. 4. Mechanism for replication initiation of pT181.