



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201402811 A

(43)公開日：中華民國 103 (2014) 年 01 月 16 日

(21)申請案號：102116824

(22)申請日：中華民國 102 (2013) 年 05 月 13 日

(51)Int. Cl. : C12N1/20 (2006.01)

C12N1/38 (2006.01)

(30)優先權：2012/05/14 歐洲專利局

12305531.1

(71)申請人：賽諾菲公司 (法國) SANOFI (FR)

法國

(72)發明人：溫克 喬基姆 WINK, JOACHIM (DE)；巴托斯奇克 史蒂芬 BARTOSCHEK, STEFAN (DE)；巴策爾 安卓易斯 BATZER, ANDREAS (DE)；雷納德 史蒂芬妮 RENARD, STEPHANE (FR)

(74)代理人：林秋琴；陳彥希；何愛文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：15 項 圖式數：12 共 59 頁

(54)名稱

用以活化微生物中沉默基因的方法

PROCESS FOR ACTIVATION OF SILENT GENES IN A MICROORGANISM

(57)摘要

本發明係關於藉由將誘導劑與受體微生物共培養，用以活化微生物中沉默基因之方法。此誘導劑係選自化學誘導劑，選自滅活的微生物細胞及/或培養過該微生物細胞之失活的培養基之微生物誘導劑，及/或培養基誘導劑。本發明進一步係關於藉由將誘導劑與受體微生物共培養來篩選誘導劑之方法及篩選受體微生物之方法。此等方法可用於偵測醫藥品，例如抗生素。再者，係申請包括誘導劑之用於培養微生物的培養基。



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201402811 A

(43)公開日：中華民國 103 (2014) 年 01 月 16 日

(21)申請案號：102116824

(22)申請日：中華民國 102 (2013) 年 05 月 13 日

(51)Int. Cl. : C12N1/20 (2006.01)

C12N1/38 (2006.01)

(30)優先權：2012/05/14 歐洲專利局

12305531.1

(71)申請人：賽諾菲公司 (法國) SANOFI (FR)

法國

(72)發明人：溫克 喬基姆 WINK, JOACHIM (DE)；巴托斯奇克 史蒂芬 BARTOSCHEK, STEFAN (DE)；巴策爾 安卓易斯 BATZER, ANDREAS (DE)；雷納德 史蒂芬妮 RENARD, STEPHANE (FR)

(74)代理人：林秋琴；陳彥希；何愛文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：15 項 圖式數：12 共 59 頁

(54)名稱

用以活化微生物中沉默基因的方法

PROCESS FOR ACTIVATION OF SILENT GENES IN A MICROORGANISM

(57)摘要

本發明係關於藉由將誘導劑與受體微生物共培養，用以活化微生物中沉默基因之方法。此誘導劑係選自化學誘導劑，選自滅活的微生物細胞及/或培養過該微生物細胞之失活的培養基之微生物誘導劑，及/或培養基誘導劑。本發明進一步係關於藉由將誘導劑與受體微生物共培養來篩選誘導劑之方法及篩選受體微生物之方法。此等方法可用於偵測醫藥品，例如抗生素。再者，係申請包括誘導劑之用於培養微生物的培養基。

發明摘要

※ 申請案號：102116824

※ 申請日：102 5 13

※IPC 分類：012N 1/20 (2006.01)
C12N 1/38 (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

用以活化微生物中沉默基因的方法

PROCESS FOR ACTIVATION OF SILENT GENES IN A
MICROORGANISM

【中文】

本發明係關於藉由將誘導劑與受體微生物共培養，用以活化微生物中沉默基因之方法。此誘導劑係選自化學誘導劑，選自滅活的微生物細胞及/或培養過該微生物細胞之失活的培養基之微生物誘導劑，及/或培養基誘導劑。本發明進一步係關於藉由將誘導劑與受體微生物共培養來篩選誘導劑之方法及篩選受體微生物之方法。此等方法可用於偵測醫藥品，例如抗生素。再者，係申請包括誘導劑之用於培養微生物的培養基。

【英文】

The present invention relates to a method for the activation of silent genes in microorganisms by co-cultivation of an inducer and a recipient microorganism. The inducer is selected from a chemical inducer, a microorganism inducer which is selected from a killed microorganism cell and/or inactivated culture medium in which said microorganism cell had been cultured and/or medium inducer. The present invention furthermore relates to a method of screening for an inducer and to a method of screening for a recipient microorganism by co-cultivation of an inducer and a recipient organism. The methods are useful for the detection of medicaments such as antibiotics. Moreover, media for culturing microorganisms comprising an inducer are claimed.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：無

【本代表圖之符號簡單說明】：無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

無

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

用以活化微生物中沉默基因的方法

PROCESS FOR ACTIVATION OF SILENT GENES IN A
MICROORGANISM

【技術領域】

【0001】 本發明係關於藉由將誘導劑與受體微生物共培養而活化微生物中沉默基因。本發明進一步係關於藉由將誘導劑與受體微生物共培養來篩選誘導劑之方法及篩選受體微生物之方法。此等方法可用於偵測醫藥品，例如抗生素。再者，係申請包括誘導劑之用於培養微生物的培養基。

【先前技術】

【0002】 天然產品在以藥物為基礎的現代各種疾病之治療中扮演著重要角色。來自微生物之天然產品因此為新穎藥物之重要來源。當於標準的實驗室條件下培養微生物時，許多珍貴的藥物似乎被忽略。此可能係因許多生物合成基因仍為沉默的且僅在特定的條件下被活化。

【0003】 於化學或物理壓力條件下活化沉默基因，在本項技術中已有描述。一用於活化沉默基因之此條件係藉由將不同的微生物共培養。共培養可幫助鑑別和開發新的生物技術物質。Watanabe 等人(1982)藉由使用真菌紅麵包黴菌(*Neurospora crassa*)、米麴菌(*Aspergillus oryzae*)和漢超根黴菌(*Rhizopus hangchao*)作為試驗微生物進行共培養，分離出新的抗生素生產菌。除此之外，Meyer 和 Stahl (2003)提出巨麴黴(*Aspergillus giganteus*)與各種微生物之共培養改變抗真菌蛋白(afp)表現。尖孢簾孢菌(*Fusarium oxysporum*)的存在觸發了 afp 轉錄，而巨麴黴和黑麴菌(*Aspergillus niger*)之聯合培養則抑制 afp 轉錄。Schroeckh 等人(2009)顯示，經由將真菌構巢麴菌(*Aspergillus nidulans*)與收集的 58 種放射菌共培養，沉默的真菌生物合成基因(在一般的培養條件下不會表現)可能被活化。彼等發現細菌與真菌菌絲

體之直接相互作用為活化沉默的真菌生物合成基因所需。Bader 等人之評論文章中(2010)概述了本項技術中在微生物共培養發酵上的發現。在共培養發酵中，不同微生物間的相互作用扮演著重要角色。細胞生長可能提高或抑制或物質的產生例如乙醇、氫、乳酸等可能增加。在 Scherlach 和 Hertweck 的評論中(2009)提供一觸發生物合成途徑用以產生隱秘的天然產物之策略的概觀。An 等人(2006)提出綠膿桿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)和農桿菌(*Agrobacterium tumefaciens*)之共培養用以鑑別多種類微生物結合下之分子機制。其發現，綠膿桿菌具有優於農桿菌之生長率優勢。此顯示群體感應調節的功能和表面運動性對綠膿桿菌為重要的微生物競爭因子。

【0004】 以微生物藉由標準的培養方法之新藥物的研究已達到其極限，其由完整的基因體之定序可看出。在基因體中發現有比於標準條件下使用標準培養基表現者更多的編碼二級代謝物之基因。於標準條件下使用標準培養基的細菌生長留下許多未偵測的蛋白且彼等蛋白用於醫藥目的之適用性仍不可知。此項先進技術之缺點可藉由使用引發編碼二級代謝物之沉默基因表現的細菌增殖條件來解決。對於新穎的生物活性二級代謝物，特別是抗生素(例如抗多重抗藥性病原菌)之治療領域仍非常重要。再者，需要一種可用於高通量分析之讓沉默基因活化的方法，供鑑別新的抗生素或藥物。此項問題係藉由本發明以申請專利範圍之項目而解決。

【發明內容】

【0005】 當微生物與其他微生物相互作用時，大多數的情況都需要沉默基因。基於此，本發明已開發一種在試管中模擬此等相互作用之方法。就此，將受體微生物於滅活的微生物或微生物之失活的培養上清液的存在下培養，使受體微生物可與其自然接觸。藉由在滅活的微生物或失活的培養上清液的存在下培養受體微生物，沉默基因之活化係藉由細胞間的直接接觸及/或藉由信使化合物之作用媒介。

【0006】 在第一方面，本發明係關於活化沉默基因之方法，其包括將受體微生物和活化受體微生物中沉默基因的誘導劑共培養，其中該誘導劑係選自化學誘導劑及/或選自滅活的微生物細胞及/或培養過該微生物細胞

之失活培養基的微生物誘導劑。

【0007】 在第二方面，本發明係關於篩選活化受體微生物中沉默基因之誘導劑的方法，此方法包括

- (a) 在候選誘導劑的存在下培養受體微生物，及
- (b) 若受體微生物中的沉默基因被活化，則決定此候選誘導劑成為誘導劑，其中此候選誘導劑係選自候選化學誘導劑及/或選自死亡微生物細胞及/或培養此微生物細胞之失活培養基的候選微生物誘導劑。

【0008】 在第三方面，本發明係關於一種方法，其包括

- (a) 在活化受體微生物中的沉默基因之誘導劑的存在下培養候選受體微生物，及
 - (b) 若受體微生物中的沉默基因被活化，則決定此候選受體微生物成為受體微生物，
- 其中此誘導劑係選自化學誘導劑及/或選自滅活的微生物細胞及/或培養此微生物細胞之失活培養基的微生物誘導劑。

【0009】 本發明之第二和第三方面可當作為本發明第一方面之特定實施例

【0010】 術語「受體微生物」係指包括在本發明中的任何微生物。微生物為包括單一細胞(單細胞)或細胞群集之微型生物。微生物為非常多樣的。其包括細菌、真菌、古菌和原生生物；微型植物(綠藻)；及動物例如浮游生物(plankton)和渦蟲(planarian)。此微生物藉由活化沉默基因而能對「誘導劑」的存在產生反應。在一較佳的實施例中，術語受體微生物係指藉由活化沉默基因而能對「誘導劑」的存在產生反應之細菌和真菌。「候選受體微生物」為無論知道是否其中有可藉由誘導劑加以活化的沉默基因，但就此進行試驗之受體微生物。本發明係提供鑑別候選受體微生物作為受體微生物之方法。

【0011】 適合或候選受體微生物之選擇可依照微生物的各種特性來進行，其可為型態學、化學分類(根據其生化組成、基因資料或蛋白模式的MALDI-TOF 分析之顯見的差異和相似度，企圖分類和鑑別微生物)。此選擇亦可藉由將微生物，就其作為受體微生物之能力試驗，於培養基中與另

外的微生物共培養來進行，例如病原微生物或土壤微生物，特別是，醋酸桿菌(*Acetobacter*)、放線桿菌(*Actinobacillus*)、馬杜拉放線菌(*Actinomadura*)、放線菌(*Actinomyces*)、遊動放線菌(*Actinoplanes*)、產氣單胞菌(*Aeromonas*)、產鹼桿菌(*Alcaligenes*)、交替單胞菌(*Alteromonas*)、擬無枝酸菌(*Amycolatopsis*)、節桿菌(*Arthrobacter*)、金桿菌(*Aureobacterium*)、芽孢桿菌(*Bacillus*)、類桿菌(*Bacteroides*)、比菲德氏菌(*Bifidobacterium*)、(Borella)、短桿菌(*Brevibacterium*)、伯克霍爾德菌(*Burkholderia*)、彎曲桿菌(*Campylobacter*)、纖維單胞菌(*Cellulomonas*)、棒形桿菌(*Clavibacter*)、梭狀芽孢桿菌(*Clostridium*)、棒狀桿菌(*Corynebacterium*)、腸桿菌(*Enterobacter*)、腸球菌(*Enterococcus*)、埃希氏菌(*Escherichia*)、真桿菌(*Eubacterium*)、黃桿菌(*Flavobacterium*)、梭桿菌(*Fusobacterium*)、嗜血桿菌(*Haemophilus*)、螺桿菌(*Helicobacter*)、克雷伯氏(*Klebsiella*)、乳桿菌(*Lactobacillus*)、退伍軍人桿菌(*Legionella*)、微桿菌(*Microbacterium*)、微球菌(*Micrococcus*)、小單胞菌屬(*Micromonospora*)、莫拉菌(*Moraxella*)、分枝桿菌(*Mycobacterium*)、黴漿菌(*Mycoplasma*)、粘球菌(*Myxococcus*)、奈瑟菌(*Neisseria*)、諾卡氏菌(*Nocardia*)、巴斯德氏菌(*Pasteurella*)、光桿菌(*Photobacterium*)、多囊菌(*Polyangium*)、丙酸桿菌(*Propionibacterium*)、變形菌(*Preteus*)、假單胞菌(*Pseudomonas*)、紅球菌(*Rhodococcus*)、沙門氏菌(*Salmonella*)、新月形單胞菌(*Selenomonas*)、沙雷氏菌(*Serratia*)、志賀氏菌(*Shigella*)、鞘氨醇單胞菌(*Sphingomonas*)、葡萄球菌(*Staphylococcus*)、鏈球菌(*Streptococcus*)、鏈黴菌(*Streptomyces*)、高溫放線菌(*Thermoactinomyces*)、密螺旋體(*Treponema*)、塚村氏菌(*Tsukamurella*)、弧菌(*Vibrio*)、黃單胞菌(*Xanthomonas*)、致病桿菌(*Xenorhabdus*)或耶爾森氏菌(*Yersinia*)屬的病原性或土壤細菌，或子囊菌(*Ascomycota*)、擔子菌(*Basidiomycota*)、卵菌(*Oomycota*)、接合菌(*Zygomycota*)或酵母菌之真菌，並藉由研究此試驗的微生物，相對於使用相同培養基然而無其他微生物之對照組，在表現型上是否出現變化，來作選擇。

【0012】 介質輔助雷射脫附/離子化(MALDI)為一種用於質譜之軟離子化技術，可進行生物分子(生物多聚物例如 DNA、蛋白、胜肽和糖類)及大的有機分子(例如多聚物、樹狀聚合物及其他大分子)之分析，當以更習用

的離子化方法離子化時，其傾向為碎片和片段。MALDI 為一種二步驟之方法。首先，以 UV 雷射光引發脫附作用。基質材料大量吸收雷射光，導致基質材料的上層(~微米)脫落。在脫落期間所產生的熱噴流含有許多種類：中性和離子化基質分子、質子化和去質子化的基質分子、基質叢和奈米液滴。第二步驟為質子化(更精確質子化或去質子化)。分析物分子之質子化(去質子化)係在熱噴流中發生。某些脫落的類別參與分析物分子之質子化(去質子化)。與 MALDI 一起使用之最廣泛質譜類型為 TOF (飛行時間質譜)，主要係由於其質量範圍大。TOF 測量程序理想上亦適合 MALDI 離子化法，因為脈衝雷射係採個別發射而非連續操作來作業。MALDI-TOF 儀器配有一使用磁場反射離子之離子鏡，藉此使離子飛行路徑加倍並增加解析度。

【0013】 「誘導劑」如文中所定義，其係能啟動使沉默基因活化，然後轉錄和轉譯成蛋白之事件。在一較佳的實施例中，沉默基因的活化產生受體微生物之表現型可見的調變。誘導劑可直接活化沉默基因，例如藉由直接活化啟動子，或可間接活化沉默基因，例如藉由活化其他作用在啟動子上的因子。「候選誘導劑」為可能的誘導劑，但不知道其是否能活化受體微生物中的沉默基因，但就該功能進行試驗。本發明係提供鑑別候選誘導劑作為誘導劑之方法。

【0014】 術語「沉默基因」如文中所用係指包括處於非編碼狀態和不會編碼多肽之基因。其為表現型上沉默的 DNA 序列在個別的生命週期期間一般不會表現，但能活化。在一本發明之較佳的實施例中，若微生物係在標準的培養基中培養，則沉默基因仍為沉默的且未被活化，該培養係用於製造第二代謝物，含有複合物 C 和 N 來源，如黃豆粉、燕麥片、澱粉和蛋白朊。沉默基因可藉由於標準的培養基中加入一或數種誘導劑，特別是濃縮物、混合物或調配物，加以活化。此一沉默基因誘導劑可(其中包括)小的有機化合物、生物分子(核苷酸或衍生物、核酸或衍生物、蛋白、碳水化合物或衍生物、多糖類、醫藥化合物、另外的微生物之解離物或其他生物物質，包括組織或器官、失活或活的微生物)。術語「沉默基因」如文中所用係指包括處於非編碼狀態和不會編碼多肽之基因。其為表現型上沉默的 DNA 序列在個別的生命週期期間一般不會表現，但能活化。沉默基因可藉

由任何種類的物理力例如不同於標準條件之溫度或壓力，或由威脅生命的化合物例如毒素或重金屬所引發的任何種類的化學力，加以活化。

【0015】 術語「活化沉默基因」如文中所用係指包括處理沉默基因及轉錄其 DNA 之方法。此方法通常需要許多配合的方法。因此，此基因必須暴露於轉錄因子，其然後必須堆積在特別化的序列上與稱為增強子和啟動子區域之基因相鄰，然後吸引 RNA 聚合酶(催化信使 RNA 合成的酵素)，然後可連接及準備讀取該基因序列。

【0016】 在本發明第四方面，沉默基因之活化造成受體微生物表現型改變，例如代謝物製造之改變、生長改變、形態改變及/或行為改變。術語「表現型」如文中所用係代表受體微生物之特性或特點，例如其形態學、發育、生化或生理性質或行為，其可藉由技術程序而看出。術語表現型不僅包括在微生物的外觀可看出的，例如生長、形態學或行為之特性或特點，亦包括隱藏的特性或特點，其若觀察微生物時無法看出，但可使其被看出。此等特性或特點包括化學物質，例如代謝物之量存在或不存在或改變。表現型的改變包括進一步微生物外觀上看得見的改變，例如微生物之生長增加或減少，形態學或行為，例如運動之改變。因此，在本發明一較佳的實施例中，如本發明中所包括，其指出受體微生物和誘導劑之相互作用及因而活化沉默基因之表現型，係指代謝物之量，據此代謝物的量可增加或減少。一此種代謝物可為 ATP(三磷酸腺苷)。較佳地，代謝物之量，例如參與細胞之建構性路徑的代謝物，如由受體微生物所產生的 ATP，因誘導劑之活性而減低。若此代謝物為二次代謝物，則此等代謝物通常不是由受體菌株所製造，而是因受體微生物與誘導劑接觸而產生。在此情況下，表現型的改變造成代謝物量的增加。其他如本發明所包括的表現型係指生長，據此受體微生物的生長可增進或抑制形態學或行為。熟習本項技術者應了解，降低代謝物例如 ATP 之量，可藉由抑制生長來達成。

【0017】 因此，在本發明內文中，誘導劑使受體微生物之表現型發生改變。誘導劑可能造成代謝物之量的改變。誘導劑可能造成代謝物之量降低，例如參與細胞之建構性路徑的代謝物，例如 ATP。誘導劑可能造成二次代謝物之量增加，例如代謝物通常不是由受體菌株所產生，而是因受體

微生物與誘導劑接觸而產生。在本發明內文中之誘導劑亦為改變，較佳地抑制受體微生物的生長，改變受體微生物之形態學或行為的誘導劑。

【0018】 誘導劑對受體微生物的效應可直接測定。因此，表現型之改變係直接以受體微生物來測定，例如直接測定受體微生物之代謝物的量、生長、形態學或行為。誘導劑對受體微生物的效應可間接測定，例如藉由測定受誘導的受體微生物對分析菌株之效應。分析菌株、分析微生物或分析細胞，如文中所相互使用，為用於偵測受體微生物中的沉默基因是否被誘導劑誘導之菌株。因此，將經誘導的受體微生物之細胞、受體微生物和誘導劑之共培養基的上清液或上清液的萃取物與分析菌株培養並研究其對分析菌株的效應。細胞和上清液係以本項技術中已知的方法，例如離心、過濾、絮凝及/或沉澱所製備。萃取物係衍生自上清液或可為上清液(極性萃取物)或可以本項技術中已知的方法，包括蒸發、真空濃縮、凍乾、反萃取、溶質沉澱和透析，較佳地凍乾(非極性萃取物)藉由將上清液濃縮來製備。萃取物可再溶解於水性或有機溶液中。可能地，再溶解的濃縮液可吸附於樹脂，較佳地離子交換樹脂例如 HP 20 及溶離。純化係藉由先進的層析系統，例如 HPLC 來完成(揭示於，例如：HPLC richtig optimiert; ed: Stavros Kromidas; Wiley 2006)。較佳地，係使用萃取物。更佳地，係使用非極性萃取物。誘導劑是否使受體微生物中的沉默基因活化，此等效應可藉由測定分析菌株中表現型的改變來測定。分析菌株中表現型的改變可能係由於受體菌株中一或多種代謝物製造之改變，此一或多種代謝物使分析菌株之表現型發生改變。隨分析菌株改變及本發明中所研究之表現型的種類係與有關的受體微生物相同，亦即代謝物之量的改變、生長改變、形態學改變或行為改變。請參照前面的章節。因此，較佳的表現型為代謝物改變，更佳地，ATP 之量改變，及又更佳地，分析菌株內的 ATP 量減少。分析菌株可為任何得以偵測誘發的受體微生物細胞效應之微生物、上清液或其萃取物，較佳地分析菌株為埃希氏菌屬、葡萄球菌屬、假單胞菌屬或念珠菌屬(Candida)，更佳地，大腸桿菌、金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、綠膿桿菌或白色念珠菌(*Candida albicans*)，及最佳地大腸桿菌 ATCC 35218、金黃色葡萄球菌 ATCC 33592、綠膿桿菌 ATCC 27853 或白色念珠菌 ATCC

753。

【0019】 抑制分析菌株有關代謝物之產率或生長，在本發明中亦稱為誘導劑之「抑制活性」或誘導劑之分析菌株的「對抗活性」或同類術語。這些菌株可從美國典型菌種保存中心(American Type Culture Collection)公開取得。

【0020】 術語「抑制」、「抑制活性」和「對抗活性」或同類術語係指，相較於在缺乏誘導劑下之相同代謝物的產生或生長，係抑制分析菌株之代謝物例如 ATP 之產生或生長至少 5%，至少 10%，至少 20%，至少 30%，至少 40%，至少 50%，至少 60%，至少 80%，至少 90%或 100%。在一較佳的實施例中，係抑制分析菌株之代謝物產生或生長至少 30%，更佳地至少 40%及最佳地至少 50%。術語「選擇性抑制」、「選擇性抑制活性」或「選擇性對抗活性」或同類術語係表示誘導劑抑制特定分析菌株之代謝物產生或生長，而其對另外的分析菌種不具有抑制活性。在本發明內文中，術語「選擇性抑制活性」或「選擇性對抗活性」可指誘導劑抑制大腸桿菌 ATCC 35218、金黃色葡萄球菌 ATCC 33592、綠膿桿菌 ATCC 27853 或白色念珠菌 ATCC 753 之代謝物產生或生長，而其他菌株的生長不會受到抑制。在一較佳的實施例中術語「抑制」、「抑制活性」或「對抗活性」、「選擇性抑制」、「選擇性抑制活性」或「選擇性對抗活性」或同類術語係指抑制 ATP 產生。

【0021】 代謝物為代謝之中間物或產物。初級代謝物係直接涉及一般生長、發育和繁殖。酒精為一初級產物之實例。二次代謝物不會直接涉及這些過程，但通常具有重要的生態功能。不同於初級代謝物，缺乏二次代謝物不會造成立即的死亡，但對生物體之存活力、生育力或美學上有長期傷害，或可能根本無明顯改變。二次代謝物常在抗食植行為(herbivory)之植物防禦和其他物種間防禦上扮演重要角色。人類使用二次代謝物作為醫藥、調味劑和消遣性毒品。二次代謝物可以其生物合成來源為基礎來分類。這些類別包括生物鹼、萜類、類固醇、糖苷、硫化葡萄糖苷、啡啡類、聚酮類、脂肪酸合成酶產物、非核糖體勝肽和核糖體勝肽。其量的改變係顯示沉默基因活化且因此其偵測可用於本發明方法中之代謝物，其特徵為例如生化分析之額外的輸出(例如，質譜圖中額外的波峰)或生物試驗系統中額

外的活性(例如，細菌、真菌或腫瘤組織之生長抑制)。

【0022】 用以偵測受體細胞或分析細胞在對誘導劑之反應中所產生的代謝物之各種分析，已為本項技術所知。在一較佳的實施例中，誘導劑之活性係藉由測量分析菌株所產生的 ATP 之量來偵測。此項可以任何本項技術中用於測量 ATP 之已知的方法來進行。一種此方法係使用 BacTiter-Glo™ 分析。BacTiter-Glo™ 微生物細胞存活力分析為一以存在的 ATP 的量為基礎，測定培養中存活細菌細胞之數目的同相方法。ATP 為具代謝活性細胞之指標。BacTiter-Glo™ 分析係設計用於多孔盤之模式。此同相分析過程係包括將一單一試劑(BacTiter-Glo™ 試劑)直接加到培養基的細菌細胞中測量發光(DeLuca 和 McElroy W.D. (1978), McElroy 和 DeLuca (1983)。

【0023】 另一種偵測代謝物之方法為以 GC(氣相層析)、HPLC (高效液相層析)(LC-MS)或 CE(毛細管電泳)分離後進行質譜。術語「質譜」係指使用離子化來源從樣本在表上產生氣相離子並以質譜偵測此氣相離子。在質譜中，「表觀分子量」係指偵測離子之分子量(以道爾頓表示)-對-電荷比值 m/z 。

【0024】 傳統上，偵測正常或預期的代謝物係在 LC/MS 數據上藉由產生對應藥物代謝物之預期的質子化分子之萃取或重建的離子層析圖來進行。在液相層析-質譜中(LC-MS, 或另一種選擇 HPLC-MS)，係將液相層析(或 HPLC)之物理分離能力與質譜之質量分析能力結合。LC-MS 為一用於許多具有非常高度敏感性和選擇性應用之效力大的技術。一般而言其應用係朝向在其他化合物的存在下(複合混合物)之一般性化合物的偵測和可能鑑別。有許多不同的質量分析儀可用於 LC/MS 中，例如單節四極、三節四極、離子阱、TOF (飛行時間)及四極-飛行時間(Q-TOF)。在最近十年間，已開發出使用規則模式的運算法產生一可能的代謝物質量列表之產物離子掃描技術，並就共同代謝物之快速篩選持續改良。此技術係應用一審視模式來尋找列於採集法上的代謝物。偵測預期的代謝物和採集其產物離子光譜二者可以單一 LC/MS 分析來完成。隨著從生物轉化之知識所發展的廣泛代謝物資料庫之可取得性，列表-依賴的產物離子掃描已非常成功的篩選預計的產

物，特別是在活體外的代謝物。

【0025】 偵測複合生物基質中的非共通產物更具挑戰性，且通常係使用先驅離子(PI)或中性丟失(NL)掃描技術於三節四極質譜上進行。偵測接合物(例如葡萄糖醛酸和硫酸鹽)通常可以 NL 分析來完成，因為這些接合物在撞擊引發解離的條件下，常常經歷共同的裂解而產生特定的中性碎片。PI 掃描亦可用於尋找帶有共同產物離子之代謝物，其可從母藥產物離子之模式來預測。就 PI 或 NL 分析，然而一種或一些預期的中性或帶電的碎片必須以 LC/MS/MS 採集法來定義。不會產生預期碎片之代謝物將不會被偵測。

【0026】 代謝物鑑別的工作藉由最近發展的高解析 LC/MS 技術(例如，飛行時間(ToF)和傅立葉轉換(FT)質譜)已大大的推進，使其以最小的不確定性而得以決定分子式和產物離子化學式。此外，對於預期代謝物之列表依賴的 MS/MS 數據採集之特異性已改善。同樣地，具有改良的質量解析之三節四極質譜在 NL 和 PI 分析上已提供改良的選擇性。高解析質譜和其他類型的 LC/MS 儀器之組合已建議用於代謝物鑑別，其給予三節四極、離子阱和高解析質譜之互補能力。

【0027】 高壓液相層析-大氣壓離子化質譜(LC-API-MS)為從異生物質代謝中分離、偵測和鑑別產物之有效方法。市面新離子方法之導入例如該等以大氣壓離子化(API)技術為基礎者及液相層析-質譜之組合(LC-MS)，其在醫藥研究上目前已成為不可或缺的技術。因為其敏感性和選擇性，三階段四極和離子阱質譜目前係用於此目的。API-TOF 質譜由於其提升的全掃描敏感性、掃描速度、改良的解析度和測量質子化分子及碎片離子精確質量之能力，亦非常引人注目。

【0028】 此外，存在或可發展的質譜指紋庫能根據其碎片模式來鑑別代謝物。

【0029】 以表面為基礎之質量分析在過去十年已再度被提起，其中新的 MS 技術係集中在增加敏感度、減低背景和降低樣本製備。直接從生物流體和組織分析代謝物之能力持續挑戰目前的 MS 技術，主要係因為這些含有數千至數萬代謝物之樣本的複雜性所強加的限制。其中針對此項挑戰所開發之技術為奈米結構啟動 MS (NIMS)，一種不需要應用基質之脫附/離

子化方法，並藉此幫助小分子(亦即代謝物)鑑別。亦使用 MALDI，然而，應用 MALDI 基質可以<1000 Da 加入明顯的背景，其使低-質量範圍(亦即代謝物)的分析複雜化。此外，所產生的基質晶體限制了可在組織造影中達到的空間解析度。因為這些限制，已有數種其他無基質的脫附/離子化方法應用於生物流體和組織之分析。二次離子質譜(SIMS)為用於分析生物樣本之代謝物的第一無基質的脫附/離子化法之一。SIMS 係使用高能量原離子束脫附並從表面產生二次離子。SIMS 主要的優點為高空間解析度(小至 50 nm)，為 MS 組織造影之強力特質。然而，SIMS 尚未能立即用於生物流體和組織之分析，因位其敏感度限制在>500 Da 及高能量原離子束所產生的分析物碎片。脫附電噴灑離子化(DESI)為一用於分析生物樣本之無基質技術，其係使用帶電的溶劑噴灑從表面脫附離子。DESI 之優點為不需要特別的表面且分析係在周圍壓力於採集期間完全讓樣本通過下進行。DESI 的限制為空間解析，因為「集中在」帶電的溶劑噴灑有困難。然而，最近開發稱為雷射剝蝕 ESI (LAESI)為一規避此限制之有前景的方法。

【0030】 另外廣泛用於偵測代謝物之方法為核磁共振(NMR)光譜。NMR 為不需依賴分離分析物之唯一的偵測技術，且樣本因此可回收做另外的分析。所有種類的小分子代謝物可同時測量。因此，NMR 接近於萬用偵測器。NMR 主要的優點為高分析再現性和樣本製備簡單。NMR 為一種物理現象，其中磁場中的磁核係吸收電磁輻射並重發射。此能量係在一特定的共振頻率，其乃依磁場強度和原子同位素之磁性而定。NMR 可以觀察原子核之特定量子力學磁性。許多科學技術係利用 NMR 現象，透過 NMR 光譜來研究分子物理學、晶體和非晶體物質。

【0031】 雖然 NMR 和 MS 為最廣泛使用的技術，但是其他偵測的方法包括離子-遷移率光譜、電化學偵測(結合 HPLC)和放射性標記(當與薄層層析組合時)。

【0032】 其他用於偵測代謝物之方法有免疫法例如酵素-連接免疫吸附分析(ELISA)，或相當類似的方法，酵素免疫分析(EIA)，用以偵測存在液體樣本或濕性樣本中的物質。進行 ELISA 包括至少一種對特定抗原具專一性之抗體。將帶有未知量抗原之樣本固定在一固體載體上，非專一性(經由

吸附至表面)或專一性(經由對此相同抗原具專一性之另外的抗體捕捉，於「三明治」ELISA 中)。抗原固定後，加入偵測抗體，與抗原形成複合物。偵測抗體可與酵素共價連結，或其本身可以第二抗體來偵測。在各步驟之間，典型地係以溫和的清潔溶液清洗測定盤，以移除任何蛋白或未專一結合之抗體。在最終的清洗步驟後，將測定盤加入酵素性基質使其發展產生可見的訊號，該訊號係指出樣本中抗原的量。ELISA 典型地係包括發色報導子和產生某些種類可見顏色變化之基質，用以指出抗原或分析物之存在。類 ELISA-技術係利用螢光、電化學發光和即時 PCR 報導子製造可量化的訊號。這些新的報導子可具有各種不同的優點，包括較高的敏感性和多工性。

【0033】 在 EIA 中，偵測並非使用第二標定抗體來進行，然而，係使用標定的競爭抗原，造成分析物和競爭物對抗體上的結合位置之競爭。

【0034】 偵測包括使用專一性抗體。此等抗體已為本項技術所知且可取得(例如從市面上購得)，或可使用以製備形式的抗原使動物免疫之建立完全的技術來提升。可取得各種試劑用以幫助抗體產生和純化，以及有各種公司專攻抗體製造服務。依照所欲進行的應用，在提供初級抗體時需要不同的純化程度和專一性類型。僅舉出一些參數，抗體可為單株或多株，以抗血清或親和性純化溶液來提供。

【0035】 辨識目標代謝物之抗體係稱為「初級抗體」。若此抗體係以一標籤標定，則直接偵測此代謝物為可能的。通常，然而，並不直接標定初級抗體進行直接偵測。取而代之的，係在第二步驟給予經可偵測標籤標定之「二級抗體」來探測與目標抗原結合之初級抗體。因此，係間接偵測代謝物。另一種形式的間接偵測包括使用經親和性標籤例如生物素標定的初級或二級抗體。然後經可偵測酵素或螢光標定的第二(或第三)探針，例如鏈黴親和素，可用於探測生物素標籤，產生可偵測的訊號。有數種這些探測和偵測策略之變化存在。然而，各自係依專一性探針(例如初級抗體)之存在是直接或間接與某種可測量的標籤(例如，因與其基質反應而其活性可產生有色產物之酵素)相關連而定。

【0036】 通常，在分析方法中係需要不帶有可偵測標籤之初級抗體和某種第二抗體(間接)偵測法。然而，若需要，幾乎任何的抗體皆可以生物素、HRP 酵素或其中一種螢光團來標定。大部份的初級抗體係在小鼠、兔子或數種其他物種之一中製造。幾乎所有的這些抗體為 IgG 類的抗體。因此，就製造商生產和供應立即可用、經標定的第二抗體供用於大部份的應用和偵測系統，係相當容易和經濟的。即便如此，有數百種純度、IgG-和物種專一性和偵測標籤不同之選擇可取用。第二抗體之選擇係依照於其中培養初級抗體的動物物種(宿主物種)而定。例如，若初級抗體為小鼠單株抗體，則第二抗體必須為從小鼠以外的宿主所得來之抗-小鼠抗體。

【0037】 微生物之生長可藉由任何用於本項技術之方法來分析，藉此此類之評估係依照所選的受體或分析微生物而定。就微生物例如細菌，生長可以二種不同的參數來測量：細胞質量的改變和細胞數目的改變。測量細胞質量的方法包括直接和間接技術二者，並包括離心後直接物理上測量乾重、濕重或細胞體積，直接化學測量細胞的某些化學組份，例如總 N、總蛋白或總 DNA 含量，間接測量化學活性，例如 O₂ 產生或消耗速率、CO₂ 產生或消耗速率、ATP 產生等等，以及應用各種儀器測定細胞懸浮液所散射的光量之濁度測量。細胞懸浮液之濁度或光密度係與細胞質量或細胞數直接相關。測量細胞數的方法包括直接計數，其包括存活的細胞計數，目測或儀器，以及間接的存活細胞計數。使用稱為計數室之特定的載玻片可直接以顯微鏡計數。死亡的細胞和活細胞無法區別。僅濃懸浮液可計數(每毫升>10⁷ 個細胞)。電子計數室係計算數目和測量細胞的大小分布。間接的存活細胞計數，亦稱為平板計數，包括將培養的樣本平植(散播)在營養瓊脂表面。此樣本或細胞懸浮液可以無毒的稀釋劑(例如水或食鹽水)稀釋，之後平植。若植入適合的培養基，則各存活的單位會生長並形成菌落。可計算之各菌落係稱為一個菌落形成單位(cfu)而 cfu 的數目係與樣本中細菌的存活數目有關。測定白色念珠菌生長可(其中包括)藉由萃取的甘露聚糖量以酵素-連接的免疫吸附分析來評估，該方法顯示與真菌生物質量(乾重)具良好相關性。白色念珠菌生長之特性測定亦可與芽管或厚膜孢子或糖同化作用有關。測量微生物生長之較佳的方法為藉由測量代謝物例如 ATP 之產生，

其為生長率之一間接測量法。

【0038】 對於偵測受體微生物或分析菌株生長之抑制作用，係測定 IC₅₀ 值。IC₅₀ 為抑制 50%之試驗生物生長所需的化合物濃度。IC₅₀ 可藉由任何本項技術中已知的方法來測定。因此，IC₅₀ 值可以 BacTiter-Glo™微生物細胞存活力分析藉由測量抑制濃度，或藉由測量細胞濁度和使用程式如 XLfit 和對應的方程式來測定。

【0039】 形態學改變為一種直接觀察的試驗並可(其中包括)藉由觀看受體微生物或分析菌株來測定。

【0040】 行為改變可為一直接的目測試驗，例如運動改變並可(其中包括)藉由觀看受體微生物或分析菌株來測定。

【0041】 與參照物或對照組作比較，可測定受體微生物中沉默基因的活化。參照組或對照組為試驗方法之一部分，因為其可消除或減低不欲的影響(例如背景訊號)。對照的實驗係用來研究一變數對特定系統的效應。在對照實驗中，一組樣本已經(或咸信係經)修飾，而其他組的樣本為預期未顯示變化(負對照)或預期顯現確定的變化(正對照)。對照組可用一個與試驗物質共同進行之試驗或於此試驗條件下來測定。其可在測定此試驗化合物或試驗條件之效應之前或之後來測定，或其可為一已知的值。可能的對照實驗可為其中使用與試驗實驗相同條件之實驗，然而，係使用可變的化合物而不是對照分析之對應的物質。參照物或對照培養基可為用於培養微生物且不含有候選誘導劑或誘導劑之培養基。因此，此培養不會活化受體微生物中的沉默基因。在另外的實施例中，對照培養基可包括能活化沉默基因之組份，然而，該組份在本發明之理解中不為誘導劑，其對本發明為適當的。例如，在不知道此組份活化沉默基因下，此組份可存在於培養基中。或此組份已知可活化沉默基因，然而其可能為培養受體微生物所必須。然而，此組份之活性就本發明之目的仍為不相關的，如就測定誘導劑活性，對照培養基因缺乏誘導劑而不同於共培養的培養基，而此組份係存在對照培養基和共培養的培養基二者中。在本發明第一和第二方面的內文中，適合的對照培養基可為不含活化沉默基因之組份的培養基。在另外的實施例中，由於活化沉默基因組份之存在，對照培養基活化了沉默基因。然而，

因為此組份係存在於對照培養基以及試驗培養基中，任何沉默基因活化之差異可追溯回到額外添加至對照培養基中的誘導劑。對照培養基係與用於試驗法中的培養基相同，然而，不包括誘導劑或候選誘導劑。在包括候選誘導劑之相同培養基中沉默基因之活化顯示該候選誘導劑為有效的誘導劑。在本發明第三方面的內文中，對照培養基為其中候選受體微生物能生長之培養基。試驗培養基為與對照培養基相同之培養基。於試驗培養基加入一誘導劑，使得試驗培養另外包括誘導劑，其為一已知的誘導劑或其為例如根據文中所提供的方法，並以各種候選受體微生物進行篩選所鑑別之誘導劑。其中沉默基因係由於添加的誘導劑存在而活化的候選受體微生物則為該誘導劑之受體微生物。在一實施例中，對照培養基本身不會活化沉默基因。在另外的實施例中，對照培養基由於活化沉默基因之組份存在而活化了沉默基因。然而，此組份係存在於對照培養基以及試驗培養基中，任何活化沉默基因之差異可追溯回到額外添加至對照培養基中的誘導劑。可採用任何標準培養基作為對照培養基，只要其不含有誘導劑或候選誘導劑，例如 Müller-Hinton 培養基(30%牛肉浸液；1.75%酪蛋白水解物；0.15%澱粉；pH 調整至中性於 25°C；百分比量為重量/重量(w/w))、供酵母菌生長之沙氏(Sabouraud)培養基(10g/l 多聚蛋白胨或新蛋白胨；40 g/l 葡萄糖；最終 pH 約 5.8)或土壤細菌之營養培養液(0.5%蛋白胨, 0.3%牛肉萃取物/酵母萃取物及 0.5% NaCl, 最終 pH 6.8 於 25°C)。其他的對照培養基為培養基 5254、培養基 5294、培養基 5567 或培養基 5429。培養基 5254 之組成如下(量係以 w/w 百分比表示)：葡萄糖 1.50，黃豆粉 1.50，玉米漿 0.50，CaCO₃ 0.20，NaCl 0.50。此培養基係於 121°C 殺菌 20 分鐘。在殺菌前 pH 值為 7.00。培養基 5294 之組成如下(量係以 w/w 百分比表示)：可溶性澱粉 1.00，葡萄糖 1.00，99%甘油 1.00，玉米漿 0.25，蛋白胨 0.50，酵母萃取物 0.20，CaCO₃ 0.30，NaCl 0.10。此培養基係於 121°C 殺菌 20 分鐘。在殺菌前 pH 值為 7.20。培養基 5567 之組成如下(量係以 w/w 百分比表示)：燕麥 2.00，Spur 5314 0.25，瓊脂 1.80。此培養基係於 121°C 殺菌 30 分鐘。在殺菌前 pH 值為 7.80 而殺菌後為 7.20。培養基 5429 之組成如下(量係以 w/w 百分比表示)：葡萄糖 0.40，酵母萃取物 0.40，麥芽萃取物 1.00，CaCO₃ 0.20。此培養基係於

121°C 殺菌 20 分鐘。在殺菌前 pH 值係以 KOH 調整至 7.20。其他選擇的培養基有 R.M. Atlas 中所描述之培養基：Handbook of Microbiological Media；London：CRC Press 2004；ISBN 0849318181 以及 Arnold Demain 和 Julian Davies 之 Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology, American Society for Microbiology, 1999。標準的培養基為任何本項技術中用於培養細菌和真菌之已知的標準培養基，其包括複合物 N-及/或 C-來源例如黃豆粉、蛋白朮、玉米漿等。培養基 5254、培養基 5294、培養基 5567 和培養基 5429 為標準培養基。

【0042】 如文中所用供生長或培養受體微生物之生長培養基或培養培養基為一設計用於支持微生物生長之液體或固體培養基。生長培養基類型間之重要區別為確定(亦稱為合成)與不確定(亦稱為基礎或複合)培養基。確定培養基將具有所有成份之已知量。就微生物而言，其係由提供微量元素和微生物所需的維生素以及特別是確定的碳源和氮源所組成。最基本的培養基為該等含有供菌落生長之可能的最小養份，一般無胺基酸存在且通常為微生物學家和遺傳學家用來培養「野生型」微生物。選擇性培養基僅用來培養所選的微生物。鑑別培養基或指示劑培養基係於相同的培養基區別一微生物類型與另一種微生物。此類的培養基係使用微生物於添加到培養基中特定營養素或指示劑(例如中性紅、酚紅、伊紅或伸甲基藍)之存在下生長的生化特性，用以明顯地指出微生物之確定的特性。加強培養基含有支撐廣泛各類微生物生長所需的營養素。所有的這些培養基係包含在本發明內，只要所選的微生物可生長在其上。

【0043】 原則上，能讓所用的受體微生物生長之任何培養基可選用供共培養。受體微生物之共培養係在固體或液體培養基中進行。在一較佳實施例中，共培養係在水性溶液中進行，其中該培養基包括讓受體微生物生長所需的組份。熟習技術者據此知道或能鑑別該等微生物生長所必須的組份。共培養係在 2 至 10 之 pH 下進行，依受體微生物而定，較佳地 4 至 8 之 pH 及更佳地 6 至 8 之 pH。視需要，樣本可於適合受體微生物生長的溫度培養，較佳地於介於 0 至 50°C 之溫度，更佳地介於 10 至 40°C 之溫度，甚佳地介於 20 至 40°C 之溫度，最佳地 30°C。典型地，反應持續時間係介

於 10 至 250 小時，較佳地 30 至 200 小時及更佳地 45 至 170 小時。反應時間係依所用的微生物而定。有利和最適切的反應時間可由熟習本項技術者容易地決定。

【0044】 培養基應包括微生物生長所必需的任何營養素。必需營養素包括可同化的碳源、可同化的氮源和礦物質，且若需要，生長因子。

【0045】 可使用一系列的碳水化合物作為可同化碳源，只要其能被微生物所用。可用的碳源有葡萄糖、蔗糖、乳糖、糊精、澱粉、糖蜜或糖醇例如甘油、甘露醇或山梨醇。較佳的碳水化合物來源為蔗糖。碳水化合物較佳地係以 5 至 30 g/l 之量存在，更佳地 10 至 25 g/l 之量，最佳地 12 至 20 g/l 之量。

【0046】 作為可同化氮源，可使用例如硝酸鹽、無機或有機銨鹽、尿素和胺基酸之物質，或更複雜的物質例如蛋白，如酪蛋白、乳白蛋白、麵筋或其水解物或大豆粉、魚粉、肉萃取物、酵母萃取物、酒糟殘液、玉米漿或玉米浸漬固體。氮源總計較佳地係以 5 至 30 g/l 之量存在，更佳地 10 至 25 g/l 之量，最佳地 12 至 20 g/l 之量。

【0047】 作為礦物質，可使用的有鹼金屬或鹼土金屬鹽類，例如鹼金屬或鹼土金屬鹽類氯化物、碳酸鹽、磷酸鹽或硫酸鹽。鹼金屬或鹼土金屬之實例有鈉、鈣、鋅、鈷、鐵、銅和鎂之鹽類。此等鹽類較佳地總計係以 5 至 25 g/l 之量存在。

【0048】 若為微生物生長所必須，可包括其他因子。熟習技術者了解或應能闡明哪些因子係用於培養所選的微生物。

【0049】 典型的培養基包括用於病原細菌之 Mueller Hinton 培養液，用於酵母菌和真菌之沙氏培養基，以及用於土壤細菌的營養培養液，培養基 5254，培養基 5294，培養基 5567 或培養基 5429 或如 R.M. Atlas 中所描述之培養基：Handbook of Microbiological Media; London : CRC Press 2004 ; ISBN 0849318181 及 Arnold Demain 和 Julian Davies 之 Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology, American Society for Microbiology, 1999。

【0050】 有關受體微生物之生長或培養培養基和培養條件亦適用於分析菌株。

【0051】 上文所指之生長或培養培養基為在非誘導條件下可用於培養受體微生物之培養基。在本發明所包括的方法中，係將誘導劑或候選誘導劑加到此培養基中使受體微生物之沉默基因活化。誘導劑之量係依照誘導劑和受體微生物而定。熟習技術者應能決定使沉默基因活化的誘導劑之量。若誘導劑為一其中培養過誘導劑微生物之失活的培養基，則受體微生物之培養係在失活的培養基中進行。於誘導劑的存在下培養受體微生物在文中係指共培養。

【0052】 共培養可以微量來進行，例如於 10 μ l 至 1200 μ l 之量的微量滴定盤中，或以 5 ml 至 500 ml 之量的震盪燒瓶規模，或以至少 50 l 之量的生物反應器規模。因此量的範圍係在數微升至數千公升，例如 10 μ l 至 1,000,000 公升。

【0053】 在本發明一實施例中，此誘導劑為化學誘導劑。術語「化學誘導劑」係關於適合活化沉默基因之任何化學物質。化學誘導劑可由下列組成之群中選出：核酸、胜肽或蛋白、胺基酸、有機或無機鹽、代謝物或低分子量化合物(LMW)。LMW 為定義上不為聚合物且不為蛋白、胜肽抗體、多糖類或核酸之分子。非常小的寡聚物通常係視為小分子，例如二核苷酸、胜肽和雙糖。LMW 包括藥物、初級和二次代謝物例如生物鹼、糖苷、脂質、類黃酮、非核糖體胜肽、啡啡、酚、聚酮、萜烯類或四吡咯。其具有低於 2000 Da 之分子量及更佳地低於 800 Da。此等 LMW 可以高通量程序由資料庫開始來鑑別。資料庫或收集物可從市面上購得。化學誘導劑在一較佳的實施例中為 CoCl_2 、 SrCl_2 、 NaHSeO_3 、 CdCl_2 、 AsI_3 、 NiCl_2 、 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 、 NaN_3 。

【0054】 化學誘導劑可單獨用於活化沉默基因。另外，一、二、三或多種其他化學誘導劑之組合物可用於活化沉默基因。化學誘導劑係以適合活化受體微生物中沉默基因之濃度存在於共培養的培養基中，例如以抑制受體或較佳的分析菌株中之代謝物如 ATP 產生來表現。適合的濃度係依照化學誘導劑和受體微生物而定。熟習技術者應能決定化學誘導劑能活化沉默基因之濃度。抑制程度係如上所示。化學誘導劑較佳地係以 0.001 至 1 mg/l 之範圍來使用，更佳地 0.001 至 0.1 mg/l 之範圍及又更佳地 0.001 至 0.05 mg/l

培養基之範圍。若誘導劑本身為液體，例如 DMSO，則濃度較佳地係在 0.1 µl/ml 至 1000 µl/ml 之範圍內，更佳地 1 µl/ml 至 100 µl/ml，以及又更佳地 10 µl/ml 至 50 µl/ml 培養基。

【0055】 在另外的實施例中，誘導劑為微生物誘導劑，其係選自滅活的微生物及/或其中培養過該微生物之失活的培養基。微生物誘導劑係衍生自任何微生物，只要誘導劑能活化受體微生物中的沉默基因。微生物可為細菌或真菌。細菌或真菌可選自醋酸桿菌屬、放線桿菌屬、馬杜拉放線菌屬、放線菌屬、遊動放線菌屬、產氣單胞菌屬、產鹼桿菌屬、交替單胞菌屬、擬無枝酸菌屬、節桿菌屬、金桿菌屬、芽孢桿菌屬、類桿菌屬、比菲德氏菌屬、伯雷拉菌屬、短桿菌屬、伯克霍爾德菌屬、彎曲桿菌屬、纖維單胞菌屬、棒形桿菌屬、梭狀芽孢桿菌屬、棒狀桿菌屬、腸桿菌屬、腸球菌屬、埃希氏菌屬、真桿菌屬、黃桿菌屬、梭桿菌屬、嗜血桿菌屬、螺桿菌屬、克雷伯氏屬、乳桿菌屬、退伍軍人桿菌屬、微桿菌屬、微球菌屬、小單胞菌屬、莫拉菌屬、分枝桿菌屬、黴漿菌屬、粘球菌屬、奈瑟菌屬、諾卡氏菌屬、巴斯德氏菌屬、光桿菌屬、多囊菌屬、丙酸桿菌屬、變形菌屬、假單胞菌屬、紅球菌屬、沙門氏菌屬、新月形單胞菌屬、沙雷氏菌屬、志賀氏菌屬、鞘氨醇單胞菌屬、葡萄球菌屬、鏈球菌屬、鏈黴菌屬、高溫放線菌屬、密螺旋體屬、塚村氏菌屬、弧菌屬、黃單胞菌屬、致病桿菌屬或耶爾森氏菌屬，或子囊菌屬、擔子菌屬、卵菌屬、接合菌屬或酵母菌。在這些微生物，埃希氏菌屬、葡萄球菌屬、假單胞菌屬或念珠菌屬為較佳。培養該微生物，得到選自滅活的微生物或失活的培養基之誘導劑。培養係依照微生物的種類而定。培養特定微生物之條件已為熟習本項技術者所知。原則上，該等條件為如上文所指，有關非誘導條件下培養的受體微生物之條件。在一較佳的實施例中，用於培養微生物之培養基為 Müller-Hinton 培養基、沙氏培養基或營養培養液。Müller-Hinton 培養基特佳的係用於培養埃希氏菌屬的誘導劑菌株，例如大腸桿菌，例如大腸桿菌 ATCC 35218，葡萄球菌屬的菌株，例如金黃色葡萄球菌 ATCC 33592，假單胞菌屬的菌株，例如綠膿桿菌，例如綠膿桿菌 ATCC 27853 或念珠菌屬的菌株，例如白色念珠菌，例如白色念珠菌 ATCC 753。用於培養大腸桿菌之典型的培養基

之實例為本項技術已知的培養基，例如 LB 培養基或 L-培養液，其典型地每公升含有 10 g 的胰化蛋白胨和 5 g 的酵母萃取物，且可在每公升 0.5 g 至 10 g 之鹽濃度中變化。用於培養金黃色葡萄球菌之典型的培養基為營養培養液或營養瓊脂。綠膿桿菌營養需求非常簡單。常常看到其係於蒸餾水中生長，此為其最小營養需求之證據。在實驗室中，用於生長綠膿桿菌之典型的培養基係由醋酸鹽作為碳源及硫酸銨作為氮源所組成。有機生長因子並不需要，且其可使用 75 種以上的有機化合物來生長。用於培養白色念珠菌之示例的培養基有 PDA(馬鈴薯葡萄糖瓊脂)或 FSA(真菌選擇瓊脂)。

【0056】 培養後，以任何本項技術中已知的方法來分離微生物細胞，產生微生物細胞及培養基。這些方法可為離心、過濾、絮凝及/或沉澱。

【0057】 培養的微生物細胞可以物理及/或化學方法來滅活。物理方法係以熱例如乾熱、濕熱(殺菌釜)、廷德耳氏滅菌法或巴斯德殺菌法或以放射線。熱供應之種類、溫度和時間長度係依用作誘導劑之微生物而定。一般而言，乾熱比濕熱效力低。例如肉毒桿菌(*Clostridium botulinum*)的孢子係在飽和蒸汽下以 120°C 於 5 分鐘內滅活，而鼓風乾燥箱則需於 160°C 花費 2 小時殺死此細菌之孢子。典型的鼓風乾燥箱殺菌法應為 160°C 下 2 小時，但依照微生物、培養基和其他項，可應用其他方法。就風乾殺菌，典型地係於 121°C 施用 15 分鐘。廷德耳氏滅菌法為將培養基煮沸 10 分鐘並冷卻。放射線可包括 260 nm 的紫外光。其造成 DNA 中嘧啶二聚物，導致細胞的基因損傷及最後死亡。X-光具有有效的殺菌性質，但不可預測。 γ -放射線可以合理的效力穿透目標。用於滅活誘導液微生物之化學物質可任何適合殺死微生物之物質，例如酚類及其衍生物，醇類例如甲醇、乙醇或液丙醇，鹵素例如氯或碘，醛類例如戊二醛和甲醛，四級銨化合物例如氯化十六烷基三甲銨或氯化二甲基十二烷基苄銨、氯仿、環氧乙烷、重金屬離子例如銅、鋅、汞或砷，及染劑例如吡啶染劑或溴化乙錠。進行此項之方法已為熟習本項技術者所知並包括過濾、離心和清洗法。本發明所包括之殺死微生物的較佳方法為以濕熱，較佳地以 121°C 進行 20 分鐘及 1 巴(bar)超壓。殺死細胞可在培養基中或可在將細胞從培養基分離後。化學物質可以適當的濃度加入培養基中以達成殺死微生物細胞，或可在從培養基分離後以適

當的溶液加入細胞中。在殺死細胞後，將化學物質與滅活的微生物細胞分離，以免傷害受體微生物。將細胞加入受體微生物的生長培養基中進行共培養。因此，誘導劑或供體細胞可於震盪中的燒瓶中培養，將 4 ml 的培養物轉置於 24 孔盤的小瓶中，可將此盤離心，上清液可轉置於新盤上且二盤可經殺菌和冷凍乾燥。然後可加入 4 ml 的新鮮培養基及預培養的受體，將此盤培養 1 至 7 天並可製備萃取物。

【0058】 再者，亦可用作本發明目的之誘導劑為該誘導劑微生物曾於其中培養並已使其失活之培養基。此培養基可為固體或水性培養基，據此水性培養基為較佳。如上述培養後，以任何本項技術中已知的方法將誘導劑微生物從培養基分離出。之後將剩餘的培養基以本項技術中已知的方法使其失活，包括，如上述，加熱為較佳的失活方法。較佳地，培養基係以濕熱使其失活，更佳地於 121°C 進行 20 分鐘及 1 巴的超壓。

【0059】 微生物誘導劑可用與稍後用於誘導受體微生物之相同量的培養基預培養。藉此誘導劑可能分泌至培養基中或可能由死亡的微生物所分泌或可能從解體的微生物釋放出。預培養的微生物細胞及/或碎片事後可移出，留下其中培養過該誘導劑微生物之培養基。

【0060】 失活的培養基可用作新的培養基，於其中可加入營養素，以便使受體微生物生長。此等營養素係如上所述。另外，失活的培養基可加至其包括任何適合讓受體微生物生長之物質的新培養基中。熟習技術者因此能調整新的培養基和失活的培養基使其得以讓受體微生物生長及活化其中的沉默基因，如，例如由失活培養基之抑制活性所表現。

【0061】 在另外的實施例中，培養基中的溶質係經濃縮及失活。藉由移除溶劑而濃縮培養基可以任何本項技術中已知的方法來進行，包括蒸發、真空濃縮、凍乾、反萃取、溶質沉澱和透析(溶劑交換)。移除溶劑的目的為保留溶質及濃縮溶質。本發明所包括之較佳的濃縮方法為凍乾。據此，有關施予濃縮或失活步驟之順序並無限制。在一實施例中，溶質可先濃縮及之後失活或溶質可先失活及然後濃縮。

【0062】 在蒸發中可使用二種方法來移除溶劑，一種為沸騰(施予熱或真空)而另一種為於溶劑上導入氣流(惰性)。在後者方法中，此氣體基本

上係藉由將其溶解於氣流中從液相來萃取溶劑。此為氣相層析之原理。在真空濃縮裝置中，真空幫浦係與一密閉、低速離心機連接，當運轉時，藉由迫使液體往下進入試管防止衝撞。然後此系統可在高真空度係運轉，加速溶劑移除。與真空濃縮相類似，凍乾過程多一個將樣本溫度降至溶液冷凍點之步驟並藉由昇華移除溶劑。冷凍步驟可在相同的製備步驟中進行或藉由施予真空來進行，其在移除氣體之步驟中，亦移除熱。一般溶液通常係在施予真空前冷凍。反萃取亦可用於溶劑移除。反萃取係如同萃取以相同的方式進行，但是其係萃取非選擇的項目來取代萃取所選擇的項目。例如，水性緩衝液中小量的溶質可藉由加入無水正丁醇來濃縮。水和醇可混溶，而溶質不會，使得水的總流量進入丁醇相中，其使得剩餘的(原來的)水性緩衝液中溶質的濃度較高。在透析中，係使用半透膜從溶液中移除小的溶質和溶劑。經由半透膜之離心濃縮和以質量作用透析溶劑為藉由透析濃縮溶質之進一步的透析法。在二者之情況下，帶有控制孔徑之膜讓低分子量溶質和溶劑通過此膜，而留下較大的分子。離心濃縮機係使用離心力迫使溶液通過此膜，而透析係利用擴散。溶劑可藉由對含大分子量化合物的濃縮溶液或對混溶於透析溶劑之固相中的物質透析來移除。沉澱為在化學反應期間之溶液的固體濃縮。若反應產物不可溶於反應溶劑中，則可發生沉澱。因此，當其形成時則沉澱出。沉澱可容易地以過濾、傾析或離心來分離。

【0063】 在本發明一較佳的實施例中，誘導劑微生物係藉由離心從培養基中分離出，上清液係以凍乾濃縮，凍乾的產物係於培養基中重建用於共培養且帶有重建的凍乾產物之培養基係以加熱失活，較佳地於 121°C 進行 20 分鐘及 1 巴超壓。

【0064】 另外，誘導劑微生物和其中培養過誘導劑微生物之培養基並未分離，而一般係以適合殺死微生物的方法使其失活及使培養基失活。另一種選擇，係分別將微生物殺死和使培養基失活，並組合使用作為微生物誘導劑。

【0065】 在一另外的實施例中，誘導劑可為一或一種以上的誘導劑，例如一種以上的化學誘導劑，例如二或三種化學誘導劑，或一化學誘導劑

可與微生物誘導劑組合，或滅活的微生物誘導劑可與一失活的微生物培養基組合。任何可能的組合係包括在文中，只要將受體微生物中的沉默基因活化即可。

【0066】 將受體微生物與誘導劑於共培養之培養基中在上述之條件下一起共培養。因此，如文中所指，共培養之培養基為讓受體微生物於非誘導條件下生長並包括文中所指之誘導劑的培養基。

【0067】 在本發明第五方面，受體微生物係選自放線菌(actinobacteria)、黏細菌(myxobacteria)、桿菌(bacilli)或真菌。

【0068】 放線菌為一群帶有高含量鳥嘌呤和半胱胺酸之革蘭氏陰性菌。其可為陸生地或水生的。放線菌為其中一種優勢的細菌門類。放線菌包括一些最常見的土壤生、淡水生和海水生的細菌，在有機物質，例如纖維素和幾丁質之分解上扮演著重要角色，且因此在有機質週轉和碳循環中扮演重要部分。其補給土壤養份之供應且為腐殖質形成的重要部分。其他的放線菌係棲息於植物和動物中，包括一些病原，例如分枝桿菌、棒狀桿菌、諾卡氏菌、紅球菌和一些鏈黴菌類。放線菌係以二次代謝物生產者著稱且因此具高的藥學和商業利益。抗生素之一實例為分線菌素，然而，有數百種天然生成的抗生素已在這些陸生微生物中發現，特別是來自鏈黴菌屬。大多數醫藥和經濟性顯著的放線菌係位於放線菌亞綱、放線菌目。在許多這些菌造成人類疾病的同時，鏈黴菌為一值得注意的抗生素來源。

【0069】 黏細菌(「黏液菌」)為一群主要生活於土壤中的細菌。相對於其他細菌，黏細菌具有非常大的基因體，例如 9 百萬-1 千萬個核苷酸。黏細菌係包括在變形菌門之 δ 群中，一大類群之革蘭氏陰性型。黏細菌可藉由滑動活動性移動。其典型地係群體行進，含有許多藉由細胞間分子訊號聚在一起之細胞。此細胞的緊密集中可能是必須的，以便於提供用於消化食物之高濃度的胞外酵素。黏細菌製造許多生物醫學上和工業上有用的化學物質，例如抗生素，並將這些化學物質輸送到細胞外。由纖維堆囊菌(*Sorangium cellulosum*)所分泌的代謝物稱為埃博黴素(epothilone)已被注意到具有抗腫瘤活性。此項已導致模擬其活性的類似物之開發。一種此類似物，稱為易莎平(Ixabepilone)為一用於治療轉移乳癌之核准的化療劑。

【0070】 桿菌為革蘭氏陽性、桿狀細菌屬。桿菌類可為絕對需氧或兼性厭氧。普遍存在於自然界，桿菌包括自由生活和病原菌類。在有壓力的環境條件下，細胞產生可蟄伏停留一段較長時間的橢圓形內孢子。這些特徵為此屬之最初定義，但並非所有此等種類皆密切相關，且許多已移至其他屬。許多桿菌類能分泌大量的酵素。液化澱粉芽孢桿菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)為天然抗生素蛋白 barnase(一種核糖核酸酶)，用於澱粉水解之 α 澱粉酶，枯草桿菌蛋白酶係用作清潔劑，而 BamH1 限制酵素係用於 DNA 研究。

【0071】 真菌為大群族真核生物之一成員，其包括微生物例如酵母菌和黴菌。這些生物體係分類為真菌門，與植物、動物和細菌分開。一主要的差異為真菌細胞具有包含幾丁質之細胞壁，不像植物的細胞壁含有纖維素。這些及其他的差異顯示真菌形成相關生物之單一群族，稱為真菌門(真真菌或真菌綱)。許多種類產生的代謝物為藥理上活性藥物之主要來源。特別重要的為抗生素，包括盤尼西林(*penicillins*)，一種 β -內醯胺抗生素之結構上相關的群類，其係由小肽所合成。雖然天然生成的盤尼西林例如盤尼西林 G [由產黃青黴菌(*Penicillium chrysogenum*)所產生]具有相對狹譜的生物活性，但廣大範圍的其他盤尼西林可藉由天然盤尼西林之化學修飾來製造。現代的盤尼西林為半合成化合物，最初係從發酵培養所得來，然後針對特定所欲的性質作結構上的改變。由真菌所製造的其他抗生素包括環孢素(*cyclosporin*)，常用作為移植手術期間之免疫抑制劑，及梭鏈孢酸(*fusidic acid*)，用於幫助控制具甲氧西林抗藥性(*methicillin-resistant*)之金黃色葡萄球菌的感染。這些抗生素對於治療細菌性疾病，例如結核病、梅毒、麻瘋病有廣泛的用途。在自然界中，真菌或細菌來源之抗生素似乎扮演雙重角色：在高濃度時其係在物種豐富的環境，例如根圈中作為與其他微生物競爭的化學防禦，而在低濃度時係作為物種類和物種間訊號傳遞之群體感應分子。其他由真菌所產生的藥物包括自灰黃青黴菌(*Penicillium griseofulvum*)分離出的灰黃黴素(*griseofulvin*)，係用於治療真菌感染，以及他汀類(*HMG-CoA* 還原酶抑制劑)，係用於抑制膽固醇合成。真菌中所發現的他汀類之實例包括來自桔青黴(*Penicillium citrinum*)之美伐他汀(*mevastatin*)和來

自土麴黴(*Aspergillus terreus*)之洛伐他汀(lovastatin)。

【0072】 在本發明第六方面，化學誘導劑係選自砷、鉛、鎘、鈷、硒、鎳、鋇和氮化物之無機鹽及/或 DMSO。此等鹽類之較佳的實施例有 AsI_3 、 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 、 CdCl_2 、 CoCl_2 、 NaN_3 、 NaHSeO_3 、 NiCl_2 及/或 SrCl_2 。更佳地，鹽類，例如該等如所指定係以 1 至 5 $\mu\text{g/ml}$ 之各鹽濃度存在，最佳地濃度為 1.6 $\mu\text{g/ml}$ AsI_3 、3.3 $\mu\text{g/ml}$ AsI_3 、1.6 $\mu\text{g/ml}$ $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 、3.3 $\mu\text{g/ml}$ $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 、1.6 $\mu\text{g/ml}$ CdCl_2 、3.3 $\mu\text{g/ml}$ CdCl_2 、1.6 $\mu\text{g/ml}$ CoCl_2 、3.3 $\mu\text{g/ml}$ CoCl_2 、1.6 $\mu\text{g/ml}$ NaN_3 、3.3 $\mu\text{g/ml}$ NaN_3 、1.6 $\mu\text{g/ml}$ NaHSeO_3 、3.3 $\mu\text{g/ml}$ NaHSeO_3 、1.6 $\mu\text{g/ml}$ NiCl_2 、3.3 $\mu\text{g/ml}$ NiCl_2 及/或 1.6 $\mu\text{g/ml}$ SrCl_2 、3.3 $\mu\text{g/ml}$ SrCl_2 。DMSO 較佳地係以 1 至 100 $\mu\text{l/ml}$ 之濃度存在，更佳地 10 至 50 $\mu\text{l/ml}$ ，最佳地 10 $\mu\text{l/ml}$ DMSO、30 $\mu\text{l/ml}$ DMSO 或 50 $\mu\text{l/ml}$ DMSO。

【0073】 在本發明第七方面，微生物誘導劑為病原性微生物或土壤微生物。病原性或感染性微生物一般係包括在其動物或植物宿主中造成疾病之微生物，例如病毒、細菌、病原性蛋白顆粒(prion)或真菌。土壤污染具有最久或最持續供藏匿病原微生物之潛在性。土壤微生物為存在土壤中之微生物。在土壤中有數千種不同的細菌和數千種不同的真菌及原生動物，形成土壤微生物。就本發明之目的，係包括所有的這些微生物。包括在本發明中之較佳的病原性或土壤微生物為病原性或土壤細菌，更佳地係選自醋酸桿菌屬、放線桿菌屬、馬杜拉放線菌屬、放線菌屬、遊動放線菌屬、產氣單胞菌屬、產鹼桿菌屬、交替單胞菌屬、擬無枝酸菌屬、節桿菌屬、金桿菌屬、芽孢桿菌屬、類桿菌屬、比菲德氏菌屬、伯雷拉菌屬、短桿菌屬、伯克霍爾德菌屬、彎曲桿菌屬、纖維單胞菌屬、棒形桿菌屬、梭狀芽孢桿菌屬、棒狀桿菌屬、腸桿菌屬、腸球菌屬、埃希氏菌屬、真桿菌屬、黃桿菌屬、梭桿菌屬、嗜血桿菌屬、螺桿菌屬、克雷伯氏屬、乳桿菌屬、退伍軍人桿菌屬、微桿菌屬、微球菌屬、小單胞菌屬、莫拉菌屬、分枝桿菌屬、黴漿菌屬、粘球菌屬、奈瑟菌屬、諾卡氏菌屬、巴斯德氏菌屬、光桿菌屬、多囊菌屬、丙酸桿菌屬、變形菌屬、假單胞菌屬、紅球菌屬、沙門氏菌屬、新月形單胞菌屬、沙雷氏菌屬、志賀氏菌屬、鞘氨醇單胞菌屬、葡萄球菌屬、鏈球菌屬、鏈黴菌屬、高溫放線菌屬、密螺旋體屬、塚村氏

菌屬、弧菌屬、黃單胞菌屬、致病桿菌屬或耶爾森氏菌屬，或病原性或土壤真菌，更佳地為子囊菌、擔子菌、卵菌、接合菌或酵母菌。又更佳的為埃希氏菌屬、葡萄球菌屬、假單胞菌屬或念珠菌屬之病原性或土壤微生物，又更佳的種類為大腸桿菌、金黃色葡萄球菌、綠膿桿菌或白色念珠菌，及最佳的為大腸桿菌 ATCC 35218、金黃色葡萄球菌 ATCC 33592、綠膿桿菌 ATCC 27853 或白色念珠菌 ATCC 753。

【0074】 白色念珠菌為二倍體真菌，其生長係如同酵母菌和絲狀細胞二者，並為人類中伺機性口腔和陰道感染之致病病原。白色念珠菌為共生性且為正常腸道菌群之一組成，其包括生活在人類嘴巴中和胃腸道中的微生物。白色念珠菌存活在 80% 的人類族群中而不會造成有害的效應。

【0075】 大腸桿菌(*E. coli*)為革蘭氏陰性、兼性厭氧和非芽孢的桿狀細菌。其可存活於廣泛的各種物質上。大腸桿菌在無氧的狀態下係使用混合酸發酵，產生乳酸、琥珀酸、乙醇、乙酸和二氧化碳。大腸桿菌之最適生長係在 37°C 但某些實驗室菌株可在至高 49°C 的溫度繁殖。生長可藉由有氧和無氧呼吸來驅動，使用大量各種氧化還原對，包括丙酮酸、甲酸、氫和胺基酸之氧化，以及例如氧、硝酸鹽、二甲基亞碲和三甲基胺 N-氧化物之物質的還原。大腸桿菌為研究最多的微生物之一。其係由數個事實所致。第一項為此細菌在所有基礎碳源上非常容易生長(在有氧和無氧二者之條件下)，第二項為大腸桿菌基因體已完全定序。再者，認為已觀察 80% 以上的基因之代謝功能。第三項為大腸桿菌非常常用於生物工程研究和生物技術產業。

【0076】 金黃色葡萄球菌(*S. aureus*)為一兼性厭氧的革蘭氏陽性球菌。其常發現為皮膚和鼻道上正常皮膚菌群之一部分。預估 20% 的人類族群為金黃色葡萄球菌之長期攜帶者。金黃色葡萄球菌為造成葡萄球菌感染之最常見的葡萄球菌種。

【0077】 綠膿桿菌(*P. aeruginosa*)為具有單極運動性之革蘭氏陰性、好氧、桿狀細菌。一種伺機性人類病原，綠膿桿菌亦為伺機性植物病原。其最適的生長溫度為 37°C，且其能在如 42°C 的高溫生長。此菌普遍存在土壤和水中。經由細胞-細胞通訊或群體感應(QS)由產生稱為自體誘導物之小分

子，可發生基因表現之調節。QS 係以控制許多毒性因子之表現著稱。讓細菌快速適應周遭變化之基因調控的另外形式係經由環境訊號傳遞。最近的研究已發現厭氧生活可顯著地衝擊 QS 之主要的調控環。此種 QS 和厭氧生活間的重要關聯對於此生物體之毒性因子的產生具有重大衝擊。

【0078】 在本發明第八方面，此方法為一高通量篩選方法。高通量篩選(HTS)為用於科學實驗特別是用於藥物開發及生物和化學相關領域之方法。使用例如機器人、數據處理和控制軟體、液體處理裝置和敏感性偵測器，高通量篩選能讓研究者快速進行數千及甚至數百萬的生化、基因或藥理學試驗。經由此方法可快速地鑑別調節特定生物分子路徑之活性化合物、抗體或基因。通常，HTS 係使用自動化對一候選化合物之資料庫，例如 LMW 化合物庫，來進行篩選分析。典型的 HTS 篩選庫或「層」可含有 100,000 至 2,000,000 個以上的化合物。

【0079】 在大多數情況下，HTS 之主要試驗容器為多孔盤或微量滴定盤。用於 HTS 之現代的微量滴定盤一般係具有 96、384、1536 或 3456 孔。這些全部為 96 的倍數，其反映原始的 96 孔微量盤帶有 8 x 129 mm 距寬的孔槽。大部份的孔槽含有實驗上有用的事物，通常為二甲基亞砜(DMSO)和一些其他的化合物，其中後者在整盤的各孔槽中為不同的。其他孔槽可為空的，希望用作為視需要的實驗對照。

【0080】 研究者將測定盤的各孔槽填入一些希望實驗據此進行的生物實體用以製備一分析。在本案例中，係填入包括微生物和誘導劑之試驗系統。在某些培養時間過後，讓誘導劑與為生物在孔槽中反應(或無法反應)，以手動或以機械進行整盤所有孔槽之測量。一專用的自動分析機器可在孔槽上進行許多實驗(例如於其上照射偏極光並測量反射度，其可為微生物生長之指標)。在此情況中，機器可將各實驗結果以數值之表格輸出，其中各數字係對應從單一孔槽中所得到的值。高容量的分析機械可在數分鐘的期間內像這樣測量數十盤，非常快速地產生數千個實驗數據點。

【0081】 在本發明第九方面，如上所示的方法可用於找尋醫藥品。

【0082】 在本發明第十方面，該醫藥品為抗生素。

【0083】 有關活化沉默基因之如上所述的方法，篩選誘導劑或篩選受體微生物可用於偵測醫藥品，較佳地抗生素。在一實施例中，受體微生物和滅活的誘導劑微生物或培養過該微生物之失活的培養基上清液的共培養，可用於此等目的。以微生物誘導劑活化沉默基因得以在造成沉默基因活化的滅活微生物表面上或在失活的上清液中鑑別化合物。此等化合物可能為開發醫藥品之候選化合物。只要此等微生物抑制受體微生物的生長，則此等化合物可能為開發抗生素之候選化合物。再者，受體微生物和滅活的微生物誘導劑間的機械接觸可能導致沉默基因活化，例如藉由活化代謝路徑之訊號傳遞聯集，造成啟動子活化，使表現型改變，例如抑制生長。此滅活的微生物或涉及微生物間接觸的化合物可能可用於開發醫藥品。化學誘導劑亦可能開發成醫藥品，特別是抗生素。再者，由受體微生物回應如文中所定義之誘導劑而產生的化合物可能為開發醫藥品之候選化合物。偵測如文中所定義之誘導劑對受體微生物之效應可以間接的方式來進行，其中誘導的受體微生物之細胞或上清液或其萃取物係以分析菌株培養並測定分析菌株中表現型的改變。分析菌株表現型的改變係以一或多種細胞、上清液或其萃取物所包含的成份來進行。使表現型產生改變之上清液或萃取物，或上清液或萃取物或細胞內的化合物，可能進一步開發成醫藥品。

【0084】 對於醫藥品製造，鑑別的目標或其醫藥上可接受鹽必須為醫藥劑型，一般係由成份之混合物所組成，例如醫藥上可接受載劑或佐劑物質組合以提供所欲的特性。

【0085】 調配物包括至少一種適合的醫藥上可接受載劑或佐劑物質。此等物質之實例有去離子水、等張食鹽水、林格氏液(Ringer's solution)、緩衝液、有機或無機酸和鹼以及其鹽類、氯化鈉、碳酸氫鈉、檸檬酸鈉或磷酸二鈣、甘醇類例如丙二醇，酯類例如油酸乙酯和月桂酸乙酯、糖類例如葡萄糖、蔗糖和乳糖、澱粉類例如玉米澱粉和馬鈴薯澱粉、增溶劑和乳化劑例如乙醇、異丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苯甲醇、苯甲酸苯甲酯、丙二醇、1,3-丁二醇、二甲基甲醯胺、油類例如花生油、棉籽油、玉米油、蓖麻油、合成的脂肪酸酯例如油酸乙酯、肉荳蔻酸異丙酯、聚合佐劑例如明膠、聚葡萄糖、纖維素及其衍生物、白蛋白、有機溶劑、錯合劑例如檸檬

酸鹽和尿素、安定劑例如蛋白酶或核酸酶抑制劑，較佳地抑肽酶(aprotinin)、胺基己酸或抑胃肽 A(pepstatin A)、防腐劑例如苯甲醇、氧化抑制劑例如亞硫酸鈉、蠟和安定劑例如 EDTA。調色劑、釋放劑、塗覆劑、甜味劑、調味劑和芳香劑、防腐劑及抗氧化劑亦可存在組成物中。生理緩衝溶液較佳地係具有約 6.0-8.0 之 pH，特別是約 6.8-7.8 之 pH，特別是約 7.4 之 pH，及/或約 200 400 毫滲量/升，較佳地約 290 310 毫滲量/升之滲透壓。醫藥品的 pH 一般係使用適合的有機或無機緩衝液，例如，較佳地使用磷酸緩衝液、tris 緩衝液(叁(羥甲基)胺基甲烷)、HEPES 緩衝液([4(2 羥乙基)哌咻基]乙磺酸)或 MOPS 緩衝液(3 嗎啉基-1 丙磺酸)來調整。個別緩衝液之選擇一般係依照所欲的緩衝液莫耳濃度而定。磷酸緩衝液係適合，例如用於注射和輸注溶液。調配醫藥品的的方法以及適合的醫藥上可接受載劑或佐劑物質已為熟習本項技術者所熟知。醫藥上可接受載劑或佐劑物質係根據主要的劑型和鑑別的化合物來選擇。

【0086】 醫藥品可製造供口服、鼻內、直腸、非經腸、陰道、局部或陰道給藥。非經腸給藥包括皮下、皮內、肌肉內、靜脈內或腹膜內給藥。

【0087】 醫藥品可調配成各種劑型，包括供口服給藥之固體劑型，例如膠囊、錠劑、片劑、散劑和顆粒，供口服給藥之液體劑型，例如醫藥上可接受的乳液、微乳液、溶液、懸浮液、糖漿和酏劑，可注射製備物例如無菌可注射水性或油性懸浮液，供直腸或陰道給藥之組成物，較佳地栓劑，以及供局部或經皮給藥之劑型，例如軟膏、糊劑、乳霜、乳液、凝膠、散劑、溶液、噴霧、吸入劑或貼片。

【0088】 對任何特定病患之特定的治療有效劑量將依照各種因素而定，包括經鑑定化合物之活性、劑型、病患的年齡、體重和性別、治療地持續時間及醫療技術中熟知的類似因素。

【0089】 以本發明方法所鑑定的化合物之每日總劑量，以單一或分開的劑量投予人類或其他動物，可為，例如從約 0.01 至約 50 mg/kg 體重或更佳地從約 0.1 至約 25 mg/kg 體重之量。單一劑量組成物可含有此量或其約數以補足每日劑量。一般而言，根據本發明之治療療法係包括每天以單一或多劑量將從約 10 mg 至約 1000 mg 的本發明化合物投予需要此治療之病

患。

【0090】 在第十一方面，本發明係關於用於培養受體微生物，包括活化受體微生物中沉默基因之誘導劑的培養基，其中該誘導劑係選自化學誘導劑及/或微生物誘導劑，而微生物誘導劑係由滅活的微生物細胞及/或培養過該微生物之失活的培養基選出。

【0091】 本發明其他方面係定義有關活化沉默基因之培養基。在此方面，請參照如上所示有關本發明方法之定義。

【圖式簡單說明】

【0092】

圖 1：長條圖係顯示出現>50%抗四種分析菌株之一的活性之萃取物百分比(大腸桿菌 ATCC 35218 = EC，金黃色葡萄球菌 ATCC 33592 = SA，綠膿桿菌 ATCC 27853 = PA 而白色念珠菌 ATCC 753 = CA)。

圖 2：長條圖係顯示出現選擇性>50%抗四種分析菌株之一的活性之萃取物百分比(大腸桿菌 ATCC 35218 = EC，金黃色葡萄球菌 ATCC 33592 = SA，綠膿桿菌 ATCC 27853 = PA 而白色念珠菌 ATCC 753 = CA)。

【0093】 圖 3：長條圖係顯示出現>50%抗分析菌株大腸桿菌 ATCC 35218 活性之不同培養條件萃取物的百分比。MI=放線菌株係於其中加入不同微生物誘導劑之培養基中培養，CI=放線菌株係於其中加入不同化學誘導劑之培養基中培養，STD=放線菌株係於培養基中培養。

圖 4：長條圖係顯示出現>50%抗分析菌株大腸桿菌 ATCC 35218 活性之不同微生物/化學誘導劑和萃取物培養基的百分比。MI1=金黃色葡萄球菌 ATCC 33592 細胞培養之上清液，MI2=大腸桿菌 ATCC 35218 細胞培養之上清液，MI3 =綠膿桿菌 ATCC 27853 細胞培養之上清液，MI4 =白色念珠菌 ATCC 753 細胞培養之上清液，MI5 =金黃色葡萄球菌 ATCC 33592 的細胞，MI6 =大腸桿菌 ATCC 35218 的細胞，MI7 =綠膿桿菌 ATCC 27853 的細胞，MI8=白色念珠菌 ATCC 753 的細胞，CI1=1.6 $\mu\text{g/ml}$ Asl3，CI2=3.3 $\mu\text{g/ml}$ Asl3，CI3=1.6 $\mu\text{g/ml}$ Pb(NO₃)₂，CI4=3.3 $\mu\text{g/ml}$ Pb(NO₃)₂，CI5=1.6 $\mu\text{g/ml}$ CdCl₂，CI6=3.3 $\mu\text{g/ml}$ CdCl₂，CI7=1.6 $\mu\text{g/ml}$ CoCl₂，CI8=3.3 $\mu\text{g/ml}$ CoCl₂，

CI9=1.6 $\mu\text{g/ml}$ NaN_3 , CI10=3.3 $\mu\text{g/ml}$ NaN_3 , CI11=1.6 $\mu\text{g/ml}$ NaHSeO_3 , CI12=3.3 $\mu\text{g/ml}$ NaHSeO_3 , CI13=1.6 $\mu\text{g/ml}$ NiCl_2 , CI14=3.3 $\mu\text{g/ml}$ NiCl_2 , CI15=1.6 $\mu\text{g /ml}$ SrCl_2 , CI16=3.3 $\mu\text{g/ml}$ SrCl_2 , CI17=10 $\mu\text{l/ml}$ DMSO , CI18=30 $\mu\text{l/ml}$ DMSO , CI19=50 $\mu\text{l/ml}$ DMSO , CI20=0 $\mu\text{l/ml}$ DMSO (control) , STD1=5254 培養基 , STD2=5294 培養基 , STD3=5567 培養基 , STD4=5429 培養基。

圖 5：長條圖係顯示出現>50%抗分析菌株綠膿桿菌 ATCC 27853 活性之不同培養條件萃取物的百分比。MI=放線菌株係於其中加入不同微生物誘導劑之培養基中培養，CI=放線菌株係於其中加入不同化學誘導劑之培養基中培養，STD=放線菌株係於培養基中培養。

圖 6：長條圖係顯示出現>50%抗分析菌株綠膿桿菌 ATCC 27853 活性之不同微生物/化學誘導劑和萃取物培養基的百分比。MI1=金黃色葡萄球菌 ATCC 33592 細胞培養之上清液，MI2=大腸桿菌 ATCC 35218 細胞培養之上清液，MI3=綠膿桿菌 ATCC 27853 細胞培養之上清液，MI4=白色念珠菌 ATCC 753 細胞培養之上清液，MI5=金黃色葡萄球菌 ATCC 33592 的細胞，MI6=大腸桿菌 ATCC 35218 的細胞，MI7=綠膿桿菌 ATCC 27853 的細胞，MI8=白色念珠菌 ATCC 753 的細胞，CI1=1.6 $\mu\text{g/ml}$ AsI_3 , CI2=3.3 $\mu\text{g/ml}$ AsI_3 , CI3=1.6 $\mu\text{g/ml}$ $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, CI4=3.3 $\mu\text{g/ml}$ $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, CI5=1.6 $\mu\text{g/ml}$ CdCl_2 , CI6=3.3 $\mu\text{g/ml}$ CdCl_2 , CI7=1.6 $\mu\text{g/ml}$ CoCl_2 , CI8=3.3 $\mu\text{g/ml}$ CoCl_2 , CI9=1.6 $\mu\text{g/ml}$ NaN_3 , CI10=3.3 $\mu\text{g/ml}$ NaN_3 , CI11=1.6 $\mu\text{g/ml}$ NaHSeO_3 , CI12=3.3 $\mu\text{g/ml}$ NaHSeO_3 , CI13=1.6 $\mu\text{g/ml}$ NiCl_2 , CI14=3.3 $\mu\text{g/ml}$ NiCl_2 , CI15=1.6 $\mu\text{g /ml}$ SrCl_2 , CI16=3.3 $\mu\text{g/ml}$ SrCl_2 , CI17=10 $\mu\text{l/ml}$ DMSO , CI18=30 $\mu\text{l/ml}$ DMSO , CI19=50 $\mu\text{l/ml}$ DMSO , CI20=0 $\mu\text{l/ml}$ DMSO (對照組) , STD1=5254 培養基 , STD2=5294 培養基 , STD3=5567 培養基 , STD4=5429 培養基。

圖 7：長條圖係顯示出現>50%抗分析菌株金黃色葡萄球菌 ATCC 33592 活性之不同培養條件萃取物的百分比。MI=放線菌株係於其中加入不同微生物誘導劑之培養基中培養，CI=放線菌株係於其中加入不同化學誘導劑之培養基中培養，STD=放線菌株係於培養基中培養。

圖 8：長條圖係顯示出現>50%抗分析菌株金黃色葡萄球菌 ATCC 33592 活性之不同微生物/化學誘導劑和萃取物培養基的百分比。MI1=金黃色葡萄球菌 ATCC 33592 細胞培養之上清液，MI2=大腸桿菌 ATCC 35218 細胞培養之上清液，MI3=綠膿桿菌 ATCC 27853 細胞培養之上清液，MI4=白色念珠菌 ATCC 753 細胞培養之上清液，MI5=金黃色葡萄球菌 ATCC 33592 的細胞，MI6=大腸桿菌 ATCC 35218 的細胞，MI7=綠膿桿菌 ATCC 27853 的細胞，MI8=白色念珠菌 ATCC 753 的細胞，CI1=1.6 $\mu\text{g/ml}$ Asl3，CI2=3.3 $\mu\text{g/ml}$ Asl3，CI3=1.6 $\mu\text{g/ml}$ Pb(NO₃)₂，CI4=3.3 $\mu\text{g/ml}$ Pb(NO₃)₂，CI5=1.6 $\mu\text{g/ml}$ CdCl₂，CI6=3.3 $\mu\text{g/ml}$ CdCl₂，CI7=1.6 $\mu\text{g/ml}$ CoCl₂，CI8=3.3 $\mu\text{g/ml}$ CoCl₂，CI9=1.6 $\mu\text{g/ml}$ NaN₃，CI10=3.3 $\mu\text{g/ml}$ NaN₃，CI11=1.6 $\mu\text{g/ml}$ NaHSeO₃，CI12=3.3 $\mu\text{g/ml}$ NaHSeO₃，CI13=1.6 $\mu\text{g/ml}$ NiCl₂，CI14=3.3 $\mu\text{g/ml}$ NiCl₂，CI15=1.6 μg /ml SrCl₂，CI16=3.3 $\mu\text{g/ml}$ SrCl₂，CI17=10 $\mu\text{l/ml}$ DMSO，CI18=30 $\mu\text{l/ml}$ DMSO，CI19=50 $\mu\text{l/ml}$ DMSO，CI20=0 $\mu\text{l/ml}$ DMSO(對照組)，STD1=5254 培養基，STD2=5294 培養基，STD3=5567 培養基，STD4=5429 培養基。

圖 9：長條圖係顯示出現>50%抗分析菌株白色念珠菌 ATCC 753 活性之不同培養條件萃取物的百分比。MI=放線菌株係於其中加入不同微生物誘導劑之培養基中培養，CI=放線菌株係於其中加入不同化學誘導劑之培養基中培養，STD=放線菌株係於培養基中培養。

圖 10：長條圖係顯示出現>50%抗分析菌株白色念珠菌 ATCC 753 活性之不同微生物/化學誘導劑和萃取物培養基的百分比。MI1=金黃色葡萄球菌 ATCC 33592 細胞培養之上清液，MI2=大腸桿菌 ATCC 35218 細胞培養之上清液，MI3=綠膿桿菌 ATCC 27853 細胞培養之上清液，MI4=白色念珠菌 ATCC 753 細胞培養之上清液，MI5=金黃色葡萄球菌 ATCC 33592 的細胞，MI6=大腸桿菌 ATCC 35218 的細胞，MI7=綠膿桿菌 ATCC 27853 的細胞，MI8=白色念珠菌 ATCC 753 的細胞，CI1=1.6 $\mu\text{g/ml}$ Asl3，CI2=3.3 $\mu\text{g/ml}$ Asl3，CI3=1.6 $\mu\text{g/ml}$ Pb(NO₃)₂，CI4=3.3 $\mu\text{g/ml}$ Pb(NO₃)₂，CI5=1.6 $\mu\text{g/ml}$ CdCl₂，CI6=3.3 $\mu\text{g/ml}$ CdCl₂，CI7=1.6 $\mu\text{g/ml}$ CoCl₂，CI8=3.3 $\mu\text{g/ml}$ CoCl₂，CI9=1.6 $\mu\text{g/ml}$ NaN₃，CI10=3.3 $\mu\text{g/ml}$ NaN₃，CI11=1.6 $\mu\text{g/ml}$ NaHSeO₃，

CI12=3.3 $\mu\text{g/ml}$ NaHSeO₃ , CI13=1.6 $\mu\text{g/ml}$ NiCl₂ , CI14=3.3 $\mu\text{g/ml}$ NiCl₂ , CI15=1.6 $\mu\text{g/ml}$ SrCl₂ , CI16=3.3 $\mu\text{g/ml}$ SrCl₂ , CI17=10 $\mu\text{l/ml}$ DMSO , CI18=30 $\mu\text{l/ml}$ DMSO , CI19=50 $\mu\text{l/ml}$ DMSO , CI20=0 $\mu\text{l/ml}$ DMSO(對照組) , STD1=5254 培養基 , STD2=5294 培養基 , STD3=5567 培養基 , STD4=5429 培養基。

圖 11：係顯示由受體菌株 HAG012128 與誘導劑菌株綠膿桿菌 ATCC 27853 共培養，製備萃取物，HPLC 將萃取物分離成 79 個溶離份，再收集及再試驗後，所得到的 79 個溶離份之抗分析菌株白色念珠菌 ATCC 753 的抑制圖。

圖 12：係顯示由 HPLC-MS 得來之正電 MS-痕量，表示由 HAG012128 菌株所產生的誘導產物二活菌素(dinactin)(於 13.5min)和三活菌素(trinactin)(於 16.5min)。圖 12 A 係顯示對照組反應之層析圖(標準培養基 5294)而圖 12 B 係顯示共培養實驗的層析圖，其中 HAG012128 菌株係以誘導劑菌株綠膿桿菌 ATCC 27853 培養。就建立層析圖，係使用整個共培養實驗之萃取物。

【實施方式】

實例

實例 1：製備含微生物誘導劑之 24-孔盤(盤 1 和 2)

【0094】 微生物誘導劑菌株金黃色葡萄球菌 ATCC 33592、大腸桿菌 ATCC 35218 和綠膿桿菌 ATCC 27853 係於裝有 100 ml 無菌 Müller Hinton 培養基(30%牛肉浸液；75%酪蛋白水解物；0.15 澱粉；pH 調整至中性，於攝氏 25 度；百分比量為重量/重量(w/w))之無菌 300 ml 錐形燒瓶中培養。微生物誘導劑菌株白色念珠菌 ATCC 75 係於裝有 100 ml 無菌 5083 培養基之無菌 300 ml 錐形燒瓶中培養。培養時間為於 37°C 和 180 rpm 下 24 小時。培養後，將 4 ml 的微生物誘導劑細胞培養吸量至 24-深孔盤中(盤 2，細胞)。隨即將填完的 24-深孔盤以 3500 rpm 離心 10 分鐘並藉由使用與之前相同的吸量流程將各孔中 4 ml 的上清液加到新的 24-深孔盤(盤 1，上清液)。將填完的 24-深孔盤蓋上透氣箔膜並儲存於-80°C。隔天將此盤於-80°C 和 0.05

毫巴真空下冷凍乾燥至少 48 小時。冷凍乾燥後，將 24-深孔盤填入 5294 培養基(各孔 4 ml)並蓋上 24-深孔三明治蓋。以此形式將填完的 24-深孔盤於 121°C 及 1 巴超壓下熱壓處理 20 分鐘。

實例 2：萃取物活性和選擇性

1.帶有>50%抗其中一種分析菌株活性之萃取物

【0095】 藉由將放線菌菌株(The Prokaryotes : A Handbook on the Biology of Bacteria (v. 1-7), Martin Dworkin (編輯), Stanley Falkow (編輯), Eugene Rosenberg (編輯), Karl-Heinz Schleifer (編輯), Erko Stackebrandt (編輯), Springer Verlag, 2006 ; Stackebrandt 等人(1997))於 32 種不同培養條件(20 種不同的化學誘導劑，其中包括 AsI_3 、 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 、 CdCl_2 、 CoCl_2 、 NaN_3 、 NaHSeO_3 、 NiCl_2 及/或 SrCl_2 及/或 DMSO；誘導劑和受體細胞於 5294 培養基中共培養)，8 種不同的微生物誘導劑(大腸桿菌 ATCC 35218、金黃色葡萄球菌 ATCC 33592、綠膿桿菌 ATCC 27853 和白色念珠菌 ATCC 753 為細胞(誘導劑細胞與受體細胞於 5294 培養基中共培養)及其上清液(受體細胞於上清液中共培養))及 4 種不同的培養基(5254、5294、5567 和 5429 培養基)培養，產生 6912 萃取物(極性和非極性)。極性萃取物係由培養基的上清液所衍生。非極性萃取物係藉由將上清液冷凍乾燥，再溶解於甲醇-水中，吸附至樹脂如 HP 20 上並以甲醇溶離所產生。在這些 6912 萃取物中，3376 顯現額外的抗一或數種分析菌株之活性，該等分析菌株為大腸桿菌 ATCC 35218、金黃色葡萄球菌 ATCC 33592、綠膿桿菌 ATCC 27853 和白色念珠菌 ATCC 753。誘導劑之活性係藉由使用 BacTiter-Glo™ 分析來偵測。藉由此生物學篩選，所產生的萃取物中 50.4%顯現>50%抗分析菌株金黃色葡萄球菌 ATCC 33592 之活性，19.1%顯現>50%抗分析菌株大腸桿菌 ATCC 35218 之活性，17.2%顯現>50%抗分析菌株綠膿桿菌 ATCC 27853 之活性及 13.3%顯現>50%抗分析菌株白色念珠菌 ATCC 753 之活性(參見圖 1)。

2.萃取物之選擇型

【0096】 圖 2 係顯示藉由生物學分析有多少的萃取物出現>50%抗四

種分析菌株之一的活性(大腸桿菌 ATCC 35218、金黃色葡萄球菌 ATCC 33592、綠膿桿菌 ATCC 27853 和白色念珠菌 ATCC 753)，其係具有選擇性對抗這些分析菌株之活性(這些菌株可購自美國典型菌種保存中心)。84.4%的萃取物顯現>50%抗分析菌株金黃色葡萄球菌 ATCC 33592 活性係具有選擇性對抗此分析菌株之活性。9.2%的萃取物顯現>50%抗分析菌株大腸桿菌 ATCC 35218 活性係具有選擇性對抗此分析菌株之活性。5.4%的萃取物顯現>50%抗分析菌株白色念珠菌 ATCC 753 活性，係具有選擇性對抗此分析菌株之活性，及 1.0%的萃取物顯現>50%抗分析菌株綠膿桿菌 ATCC 27853 活性係具有選擇性對抗此分析菌株之活性(參見圖 2)。

3.顯現>50%抗大腸桿菌 ATCC 35218 活性的萃取物之培養條件

【0097】 在這些顯現>50%抗分析菌株大腸桿菌 ATCC 35218 活性之萃取物中，50.3%係以其中加入不同的化學誘導劑之培養基所產生。40.7%係藉由使用其中加入不同的微生物誘導劑之培養基所產生，而 9.0%係以標準培養基所產生(參見圖 3)。

【0098】 圖 4 係顯示具高於 50%抗分析菌株大腸桿菌 ATCC 35218 活性之萃取物均勻地分布在所有應用微生物/化學誘導劑之培養基和標準培養基中，但微生物誘導劑具有最高影響。最有效之所用的微生物誘導劑係在金黃色葡萄球菌 ATCC 33592 細胞培養之上清液的案例中(MI1)，其中 6.6%萃取物顯現>50%抗分析菌株大腸桿菌 ATCC 35218 之活性，及大腸桿菌 ATCC 35218 細胞培養之上清液(MI2)，其中 6.5%萃取物顯現>50%抗分析菌株大腸桿菌 ATCC 35218 之活性。最有希望的化學誘導劑為 DMSO (50µl/ml; CI19)，其中 3.6%萃取物顯現>50%抗分析菌株大腸桿菌 ATCC 35218 之活性，而 NaHSeO₃ (3.3 µg/ml; CI12)其中 3.3%萃取物顯現>50%抗分析菌株大腸桿菌 ATCC 35218 之活性。最有效的標準培養基為 5294 培養基(STD2)，其中 2.8%萃取物顯現>50%抗分析菌株大腸桿菌 ATCC 35218 之活性(參見圖 4)。

4.顯現>50%抗綠膿桿菌 ATCC 27853 活性的萃取物之培養條件

【0099】 在這些顯現>50%抗分析菌株綠膿桿菌 ATCC27853 活性之萃取物中，51.5%係使用其中加入不同的化學誘導劑之培養基所產生。38.7%係藉由使用其中加入不同的微生物誘導劑之培養基所產生，而 9.8%係以標準培養基所產生(參見圖 5)。

【0100】 圖 6 係顯示具高於 50%抗分析菌株綠膿桿菌 ATCC 27853 活性之萃取物或多或少同樣地係以應用不同的微生物/化學誘導劑之培養基和標準培養基所產生，但微生物誘導劑具有最高影響。最有效的微生物誘導劑係在金黃色葡萄球菌 ATCC 33592 細胞培養之上清液的案例中(MI1)，其中 5.9%萃取物顯現>50%抗分析菌株綠膿桿菌 ATCC 27853 之活性，及白色念珠菌 ATCC 753 細胞培養之上清液/細胞(MI4, MI8)，各具有 5.7%萃取物顯現>50%抗分析菌株綠膿桿菌 ATCC 27853 之活性。最有希望的化學誘導劑為 CoCl_2 (3.3 $\mu\text{g/ml}$; CI8)和 SrCl_2 (3.3 $\mu\text{g/ml}$; CI16)，各具有 3.8%萃取物顯現>50%抗分析菌株綠膿桿菌 ATCC 27853 之活性。最有效的培養基為 5429 培養基(STD4)，其中 2.8%萃取物顯現>50%抗分析菌株綠膿桿菌 ATCC 27853 之活性(參見圖 6)。

5.顯現>50%抗金黃色葡萄球菌 ATCC 33592 活性的萃取物之培養條件

【0101】 在這些顯現>50%抗分析菌株金黃色葡萄球菌 ATCC 33592 活性之萃取物中，56.2%係藉由使用其中加入不同的化學誘導劑之培養基所產生。27.9%係以其中加入不同的微生物誘導劑之培養基所產生，而 15.9%係以標準培養基所產生(參見圖 7)。

【0102】 圖 8 係顯示具高於 50%抗分析菌株金黃色葡萄球菌 ATCC 33592 活性之萃取物或多或少同樣地係以應用不同的微生物/化學誘導劑之培養基和標準培養基所產生。最有效的微生物誘導劑係在金黃色葡萄球菌 ATCC 33592細胞培養之上清液的案例中(MI1)及白色念珠菌 ATCC 753細胞培養之細胞(MI8)，各具有 3.9%萃取物顯現>50%抗分析菌株金黃色葡萄球菌 ATCC 33592 之活性。最有希望的化學誘導劑為 CoCl_2 (3.3 $\mu\text{g/ml}$; CI8)，其中 3.6%萃取物顯現>50%抗分析菌株金黃色葡萄球菌 ATCC 33592 之活性而 SrCl_2 (3.3 $\mu\text{g/ml}$; CI16)具有 3.5%萃取物顯現>50%抗分析菌株金黃色葡萄

球菌 ATCC 33592 之活性。最有效的培養基為 5567 培養基(STD3)，其中 3.7% 萃取物顯現>50%抗分析菌株綠膿桿菌 ATCC 27853 之活性(參見圖 8)。

6. 顯現>50%抗白色念珠菌 ATCC 753 活性的萃取物之培養條件

【0103】 在這些顯現>50%抗分析菌株白色念珠菌 ATCC 753 活性之萃取物中，54.5%係藉由使用其中加入不同的化學誘導劑之培養基所產生。30.4%係以其中加入不同的微生物誘導劑之培養基所產生，而 15.1%係以標準培養基所產生(參見圖 9)。

【0104】 圖 10 係顯示具高於 50%抗分析菌株白色念珠菌 ATCC 753 活性之萃取物或多或少同樣地係以應用不同的微生物/化學誘導劑之培養基和標準培養基所產生。最有效的微生物誘導劑係在大腸桿菌 ATCC 35218 細胞培養之上清液的案例中(MI2)，其中 4.4%萃取物顯現>50%抗分析菌株白色念珠菌 ATCC 753 之活性。綠膿桿菌 ATCC 27853 細胞培養之上清液(MI3)和綠膿桿菌 ATCC 27853 細胞培養之細胞(MI7)，各具有 4.1%萃取物顯現>50%抗分析菌株白色念珠菌 ATCC 753 之活性。最有希望的化學誘導劑為 NiCl_2 (3.3 $\mu\text{g/ml}$; CI14)，其中 3.7%萃取物顯現>50%抗分析菌株白色念珠菌 ATCC 753 之活性而 SrCl_2 (1.6 $\mu\text{g/ml}$; CI15)以及 DMSO(10 $\mu\text{l/ml}$; CI17)各具有 3.5%萃取物顯現>50%抗分析菌株白色念珠菌 ATCC 753 之活性。最有效的培養基為 5254 培養基(STD1)，其中 4.1%萃取物顯現>50%抗分析菌株白色念珠菌 ATCC 753 之活性(參見圖 10)。

7. 以受體菌株於共培養條件下產生代謝物

【0105】 將受體菌株 HAG012128，一種屬於放線菌之菌株，使用不同的化學和微生物感應劑於各種感應條件下發酵。得到上清液。得到二種萃取物，將其中之一進一步檢驗。特言之，HAG012128 菌株係於標準的條件下於其中已加入綠膿桿菌 ATCC 27853 之細胞作為誘導劑的標準培養基中(培養基 5294)發酵。製備非極性萃取物。將萃取物以 2 μl 之 10-倍濃度使用 2.6 μm Kinetex RP18 100 x 2.1 mm 管柱(Phenomenex)注射在 Agilent 1200 RRLC-系統上並以 15 min 內 0.6 ml/min 10%至 100%的已腈/水之梯度溶離。

每 15 秒收集溶離份，得到 79 個溶離份。以正電 ESI-TOF(Agilent G6220A) 記錄 1:1 分裂的溶離液之偵測。將 HAG012128 於標準條件下在標準培養基中(培養基 5294)發酵，作為對照組。

【0106】 圖 11 係顯示在 HPLC-分離，再收集和再試驗後，分析菌株白色念珠菌 ATCC 753 (y-軸)對 79 個溶離份(x-軸)之抑制圖。溶離份 21 至 23，51 至 61 及 62 至 74 產生了對照分析中沒有產生的物質，且該物質強力地抑制了分析菌株。

【0107】 圖 12 係顯示正電 MS-痕量之 TIC 圖，其顯示引發的放線菌產物二活菌素(於 13.5 min)和三活菌素(於 16.5 min)。圖 12 A 係顯示對照組(培養基 5294)而圖 12 B 係顯示共培養實驗。就產生圖 12 之層析圖，係使用整個共培養分析之萃取物。

【0108】 結果顯示微生物誘導劑對於分析的放射菌菌株之二次代謝物產生(例如 ATP 產生)具有可觀的效應。就聚焦在顯示高度抗二種革蘭氏陰性分析菌株活性之萃取物的產生，大腸桿菌 ATCC 35218 和綠膿桿菌 ATCC 27853，特別是金黃色葡萄球菌 ATCC 33592、大腸桿菌 ATCC 35218、綠膿桿菌 ATCC 27853 和白色念珠菌 ATCC 753 細胞培養之上清液，以及金黃色葡萄球菌 ATCC 33592、綠膿桿菌 ATCC 27853 和白色念珠菌 ATCC 753 之細胞顯現非常良好的結果。其產生介於 4.0 至 5.9%的萃取物具有>50%抗革蘭氏陰性分析菌株活性。大腸桿菌 ATCC 35218 細胞作為微生物誘導劑顯現所產生的萃取物中 2.4 至 2.9%具有>50%抗革蘭氏陰性分析菌株活性，以高的抗革蘭氏陰性分析菌株活性對二次代謝物之產生影響低。

【0109】 最有效的微生物誘導劑，其產生顯現高度的抗革蘭氏陽性分析菌株金黃色葡萄球菌 ATCC 33592 活性之萃取物，為金黃色葡萄球菌 ATCC 33592 細胞培養之上清液和白色念珠菌 ATCC 753 之細胞，其中 3.8 至 3.9%萃取物顯現>50%抗此分析菌株之活性。綠膿桿菌 ATCC 27853 之上清液顯現最低的抗革蘭氏陽性分析菌株活性。

【0110】 就聚焦在顯示高度抗分析菌株白色念珠菌 ATCC 753 活性之萃取物的產生，最佳效用係藉由應用大腸桿菌 ATCC 35218、綠膿桿菌 ATCC 27853 和白色念珠菌 ATCC 753 細胞培養之上清液，以及金黃色葡萄

球菌 ATCC 33592 和白色念珠菌 ATCC 753 細胞作為微生物誘導劑來測定。其產生 3.7 至 4.4% 萃取物顯現 >50% 抗分析菌株白色念珠菌 ATCC 753 之活性。以高度抗分析菌株白色念珠菌 ATCC 753 活性對產生二次代謝物之最低效應係利用大腸桿菌 ATCC 35218 和白色念珠菌 ATCC 753 作為微生物誘導劑來測定。其產生 1.6 至 2.5% 萃取物顯現 >50% 抗此分析菌株之活性。

【0111】 直到今天，有關應用金黃色葡萄球菌 ATCC 33592、大腸桿菌 ATCC 35218、綠膿桿菌 ATCC 27853 和白色念珠菌 ATCC 753 作為微生物誘導劑並無直接相當的實驗結果公開。上述實驗顯示這些滅活形式的微生物或其中培養過這些微生物的培養基之上清液作為活化沉默基因之誘導劑的有效性，藉此造成受體微生物之生長抑制。

參考文獻

- An D.等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2006, 103, 3828-3833
- Bader J.等人, Journal of Applied Microbiology, 2010, 109, 371-387
- DeLuca M.A.和 McElroy W.D., Methods Enzymology, 1978, 57, 3-15
- McElroy W.D.和 DeLuca M.A., J. Applied Biochemistry, 1983, 5, 197-209
- Meyer V.和 Stahl U., J. Basic. Microbiol., 2003, 43, 68-74
- Scherlach K.和 Hertweck C., Org. Biomol. Chem., 2009, 7, 1753-1760
- Schroeckh V.等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2009, 106, 14558-14563
- Stackebrandt E.等人, International Journal of Systematic Bacteriology, 1997, 47, 479-491
- Watanabe T.等人, The Journal of Antibiotics, 1982, XXXV, 1148-1155
- The Prokaryotes : A Handbook on the Biology of Bacteria (v. 1-7) Martin Dworkin (Editor), Stanley Falkow (Editor), Eugene Rosenberg (Editor), Karl-Heinz Schleifer (Editor), Erko Stackebrandt (Editor) Springer Verlag, 2006;
- Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology by Arnold Demain and Julian Davies, American Society for Microbiology, 1999.)
- R.M. Atlas : Handbook of Microbiological Media; London : CRC Press 2004; ISBN 0849318181

201402811

HPLC richtig optimiert Ein Handbuch für Praktiker; ed : Stavros Kromidas;
Wiley-VHC Verlag GmbH & Co KGaA, Weinheim2006

申請專利範圍

1. 一種活化沉默基因之方法，係包括將受體微生物與活化受體微生物中沉默基因之誘導劑共培養，其中該誘導劑係選自化學誘導劑及/或選自滅活的微生物細胞及/或培養過該微生物細胞之失活培養基的微生物誘導劑。
2. 如請求項第 1 項之方法，係用於篩選活化受體微生物中沉默基因之誘導劑，該方法包括
 - (a) 在候選誘導劑的存在下培養受體微生物，及
 - (b) 若受體微生物中的沉默基因被活化，則決定此候選誘導劑成為誘導劑，其中該候選誘導劑係選自候選化學誘導劑及/或選自滅活的微生物細胞及/或培養過該微生物細胞之失活培養基的候選微生物誘導劑。
3. 如請求項第 1 項之方法，係用於篩選受體微生物，該方法包括
 - (a) 在活化受體微生物中的沉默基因之誘導劑的存在下培養候選受體微生物，及
 - (b) 若受體微生物中的沉默基因被活化，則決定此候選受體微生物成為受體微生物，其中該誘導劑係選自化學誘導劑及/或選自滅活的微生物細胞及/或培養過該微生物細胞之失活培養基的微生物誘導劑。
4. 如請求項第 1 至 3 項中任一項之方法，其中沉默基因的活化造成受體微生物表現形改變，例如代謝物產生改變、生長改變及/或型態學改變。
5. 如請求項第 1 至 4 項中任一項之方法，其中該受體微生物為選自放線菌、黏細菌、桿菌或真菌之微生物。
6. 如請求項第 1 至 5 項中任一項之方法，其中該化學誘導劑係選自砷、鉛、鎘、鈷、硒、鎳、鋇和氮化物之無機鹽，較佳地 AsI_3 、 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 、 CdCl_2 、 CoCl_2 、 NaN_3 、 NaHSeO_3 、 NiCl_2 及/或 SrCl_2 ，及/或 DMSO。
7. 如請求項第 1 至 6 項中任一項之方法，其中該微生物誘導劑係選自病原性微生物或土壤微生物，較佳地為病原性或土壤微生物，更佳地係選自醋酸桿菌屬、放線桿菌屬、馬杜拉放線菌屬、放線菌屬、遊動放線菌屬、產氣單胞菌屬、產鹼桿菌屬、交替單胞菌屬、擬無枝酸菌屬、節桿菌屬、

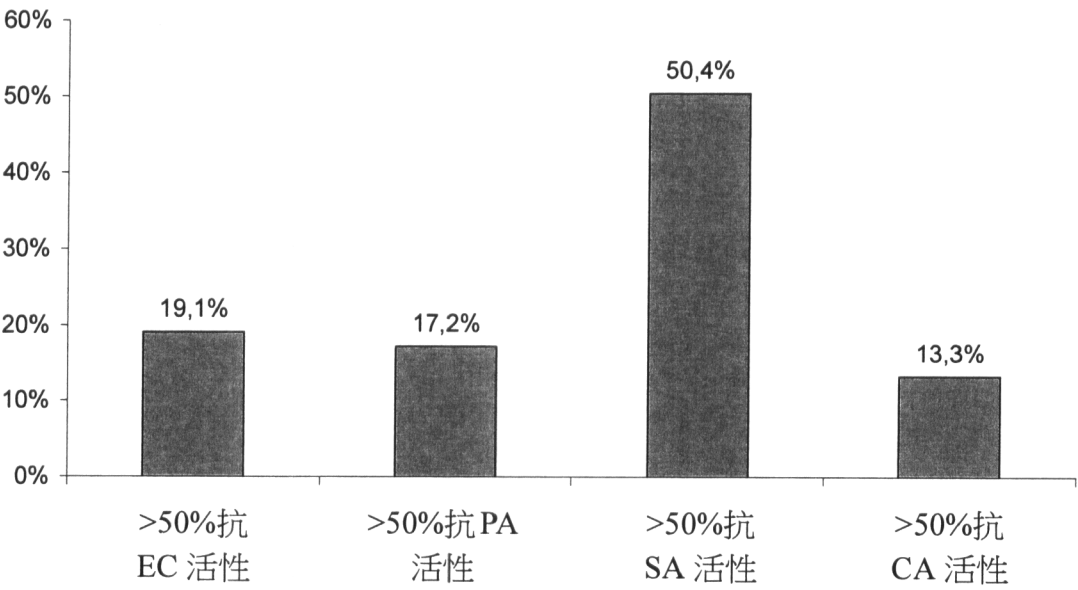
金桿菌屬、桿菌屬、類桿菌屬、比菲德氏菌屬、伯雷拉菌屬、短桿菌屬、伯克霍爾德菌屬、彎曲桿菌屬、纖維單胞菌屬、棒形桿菌屬、梭狀芽孢桿菌屬、棒狀桿菌屬、腸桿菌屬、腸球菌屬、埃希氏菌屬、真桿菌屬、黃桿菌屬、梭桿菌屬、嗜血桿菌屬、螺桿菌屬、克雷伯氏屬、乳桿菌屬、退伍軍人桿菌屬、微桿菌屬、微球菌屬、小單胞菌屬、莫拉菌屬、分枝桿菌屬、黴漿菌屬、粘球菌屬、奈瑟菌屬、諾卡氏菌屬、巴斯德氏菌屬、光桿菌屬、多囊菌屬、丙酸桿菌屬、變形菌屬、假單胞菌屬、紅球菌屬、沙門氏菌屬、新月形單胞菌屬、沙雷氏菌屬、志賀氏菌屬、鞘氨醇單胞菌屬、葡萄球菌屬、鏈球菌屬、鏈黴菌屬、高溫放線菌屬、密螺旋體屬、塚村氏菌屬、弧菌屬、黃單胞菌屬、致病桿菌屬或耶爾森氏菌屬，或病原性或土壤真菌，更佳地為子囊菌、擔子菌、卵菌、接合菌或酵母菌，又更佳地為大腸桿菌 ATCC 35218、金黃色葡萄球菌 ATCC 33592、綠膿桿菌 ATCC 27853 或白色念珠菌 ATCC 753。

8. 如請求項第 1 至 7 項中任一項之方法，其中該方法為一高通量法。
9. 如請求項第 1 至 8 項中任一項之方法，係用於開發醫藥品。
10. 如請求項第 9 項之方法，係用於開發抗生素。
11. 一種用於培養受體微生物之培養基，係包括一活化受體微生物中沉默基因之誘導劑，其中該誘導劑係選自化學誘導劑及/或選自滅活的微生物細胞及/或其中培養過該微生物細胞之失活培養基的微生物誘導劑。
12. 如請求項第 11 項之培養基，其中沉默基因的活化造成受體微生物表現型改變，例如代謝物產生改變、生長改變及/或型態學改變。
13. 如請求項第 11 或 12 項之培養基，其中該受體微生物為選自放線菌、黏細菌、桿菌或真菌之微生物。
14. 如請求項第 11 至 13 項中任一項之培養基，其中該化學誘導劑係選自砷、鉛、鎘、鈷、硒、鎳、鋇和氮化物之無機鹽，較佳地 AsI_3 、 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 、 CdCl_2 、 CoCl_2 、 NaN_3 、 NaHSeO_3 、 NiCl_2 及/或 SrCl_2 ，及/或 DMSO。
15. 如請求項第 11 至 14 項中任一項之培養基，其中該微生物誘導劑係選自病原性微生物或土壤微生物，較佳地病原性或土壤細菌，更佳地係選自醋酸桿菌屬、放線桿菌屬、馬杜拉放線菌屬、放線菌屬、遊動放線菌屬、

產氣單胞菌屬、產鹼桿菌屬、交替單胞菌屬、擬無枝酸菌屬、節桿菌屬、金桿菌屬、桿菌屬、類桿菌屬、比菲德氏菌屬、伯雷拉菌屬、短桿菌屬、伯克霍爾德菌屬、彎曲桿菌屬、纖維單胞菌屬、棒形桿菌屬、梭狀芽孢桿菌屬、棒狀桿菌屬、腸桿菌屬、腸球菌屬、埃希氏菌屬、真桿菌屬、黃桿菌屬、梭桿菌屬、嗜血桿菌屬、螺桿菌屬、克雷伯氏屬、乳桿菌屬、退伍軍人桿菌屬、微桿菌屬、微球菌屬、小單胞菌屬、莫拉菌屬、分枝桿菌屬、黴漿菌屬、粘球菌屬、奈瑟菌屬、諾卡氏菌屬、巴斯德氏菌屬、光桿菌屬、多囊菌屬、丙酸桿菌屬、變形菌屬、假單胞菌屬、紅球菌屬、沙門氏菌屬、新月形單胞菌屬、沙雷氏菌屬、志賀氏菌屬、鞘氨醇單胞菌屬、葡萄球菌屬、鏈球菌屬、鏈黴菌屬、高溫放線菌屬、密螺旋體屬、塚村氏菌屬、弧菌屬、黃單胞菌屬、致病桿菌屬或耶爾森氏菌屬，或病原性或土壤真菌，更佳地為子囊菌、擔子菌、卵菌、接合菌或酵母菌，又更佳地為大腸桿菌 ATCC 35218、金黃色葡萄球菌 ATCC 33592、綠膿桿菌 ATCC 27853 或白色念珠菌 ATCC 753。

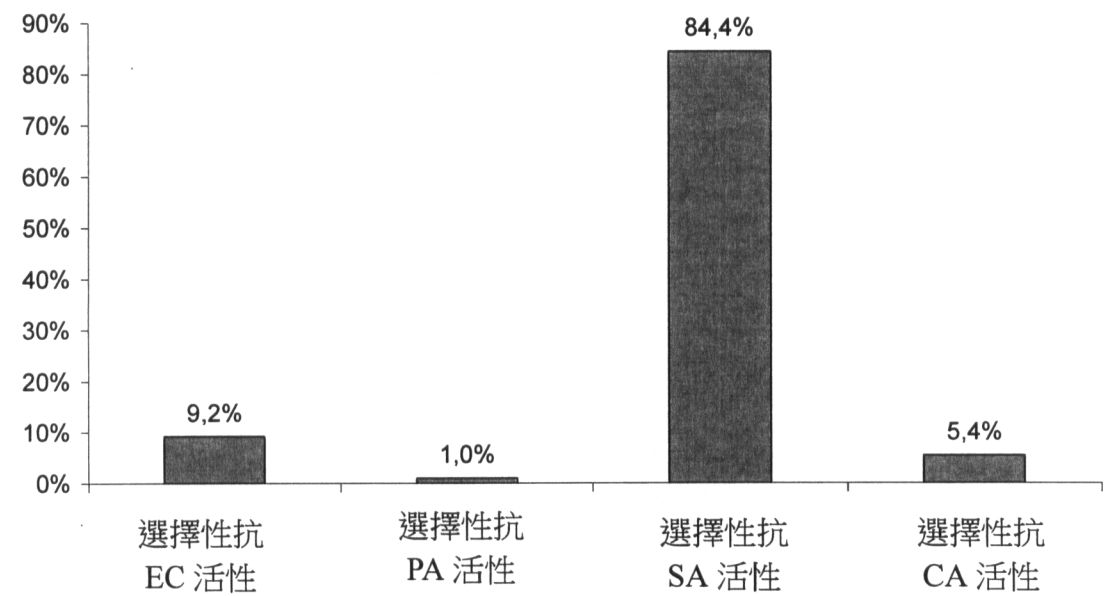
圖式

圖 1



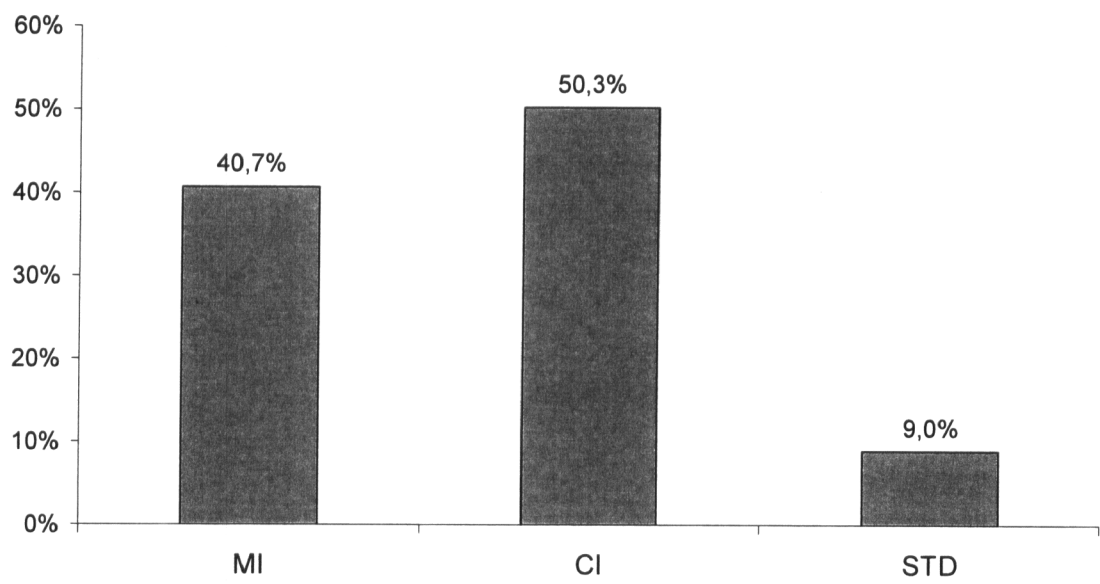
>50%抗 EC 活性	19.1%
>50%抗 PA 活性	17.2%
>50%抗 SA 活性	50.4%
>50%抗 CA 活性	13.3%

圖 2



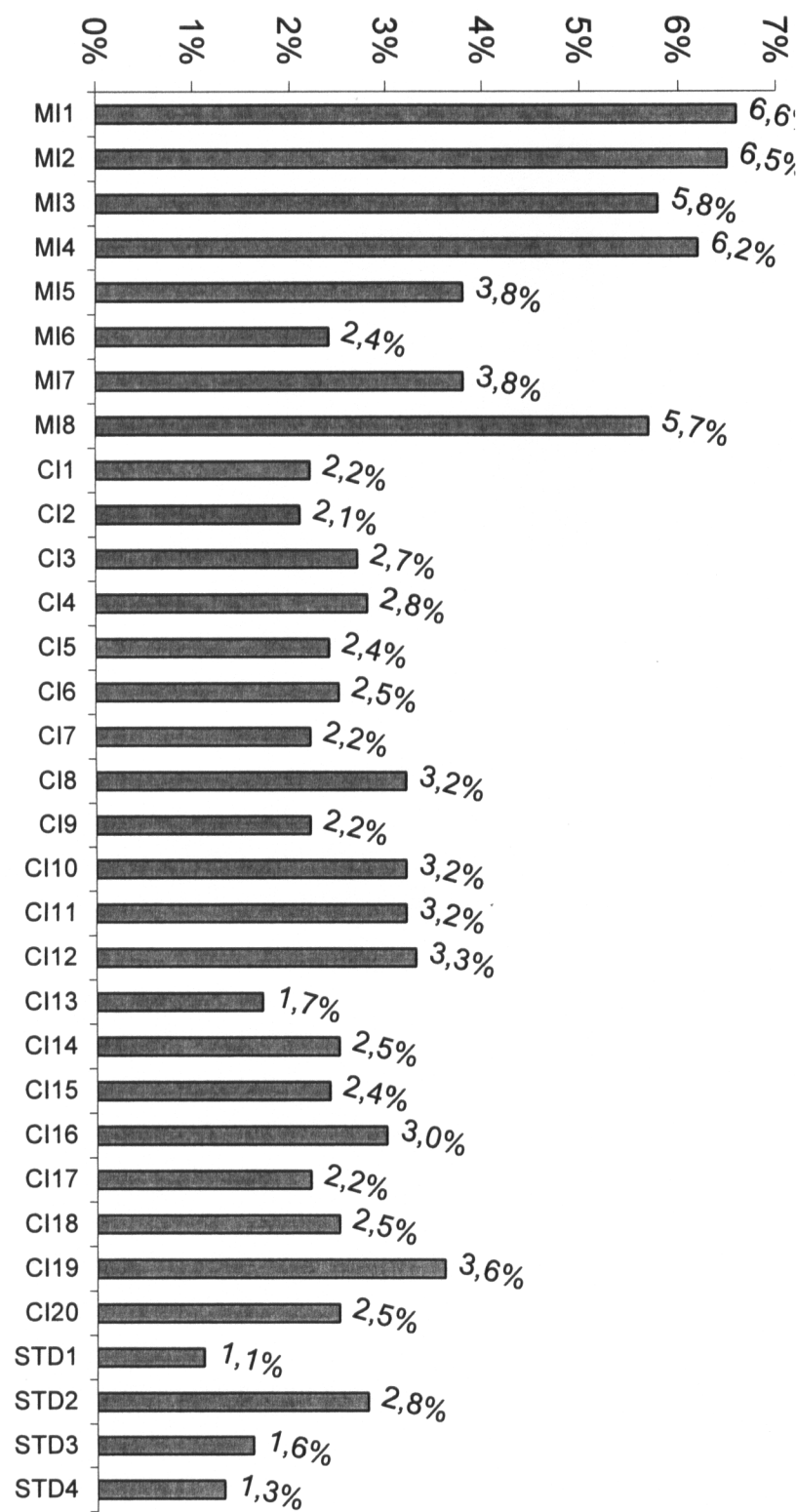
選擇性抗 EC 活性	9.2%
選擇性抗 PA 活性	1.0%
選擇性抗 SA 活性	84.8%
選擇性抗 CA 活性	5.4%

圖 3



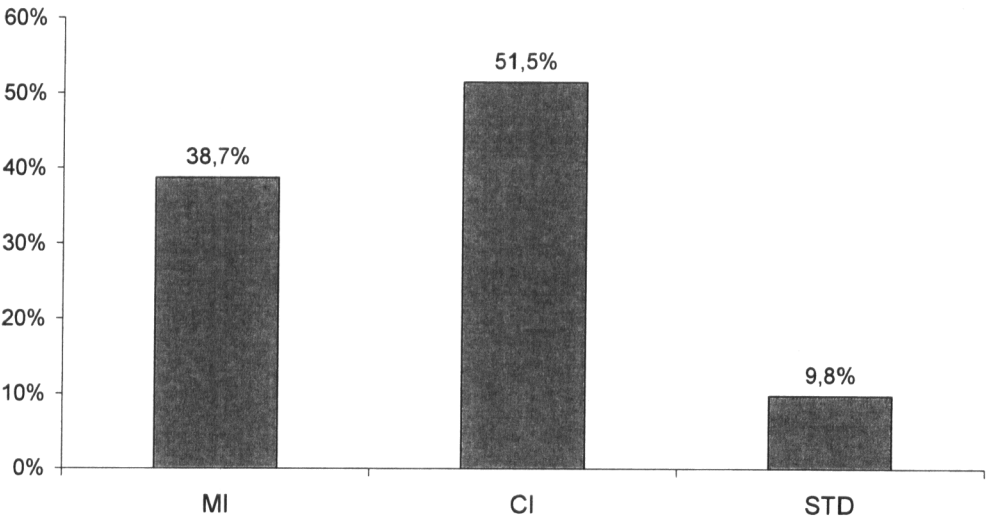
MI	40.7%
CI	50.3%
STD	9.0%

圖 4



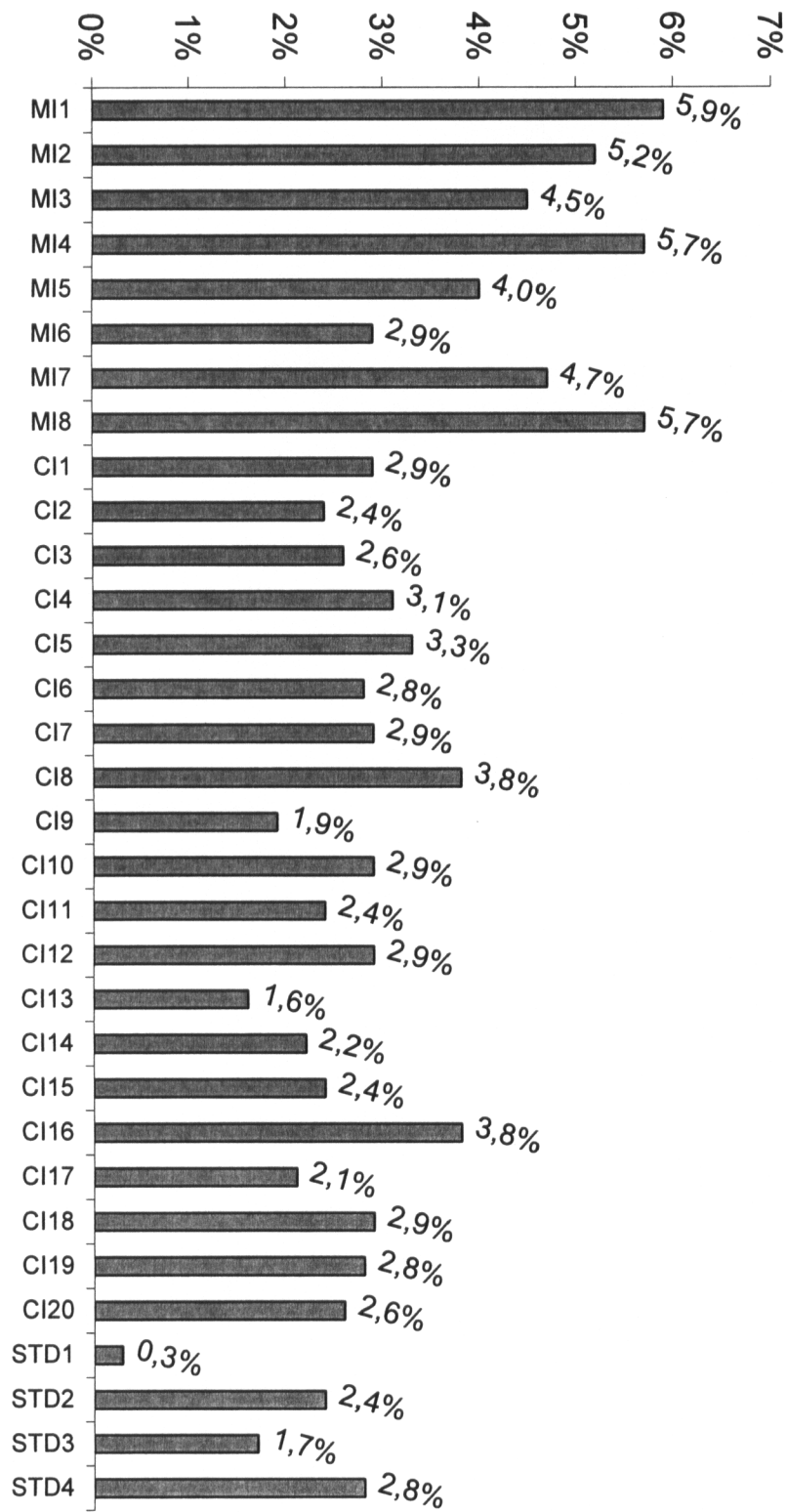
MI1	6.6%
MI2	6.5%
MI3	5.8%
MI4	6.2%
MI5	3.8%
MI6	2.4%
MI7	3.8%
MI8	5.7%
CI1	2.2%
CI2	2.1%
CI3	2.7%
CI4	2.8%
CI5	2.4%
CI6	2.5%
CI7	2.2%
CI8	3.2%
CI9	2.2%
CI10	3.2%
CI11	3.2%
CI12	3.3%
CI13	1.7%
CI14	2.5%
CI15	2.4%
CI16	3.0%
CI17	2.2%
CI18	2.5%
CI19	3.6%
CI20	2.5%
STD1	1.1%
STD2	2.8%
STD3	1.6%
STD4	1.3%

圖 5



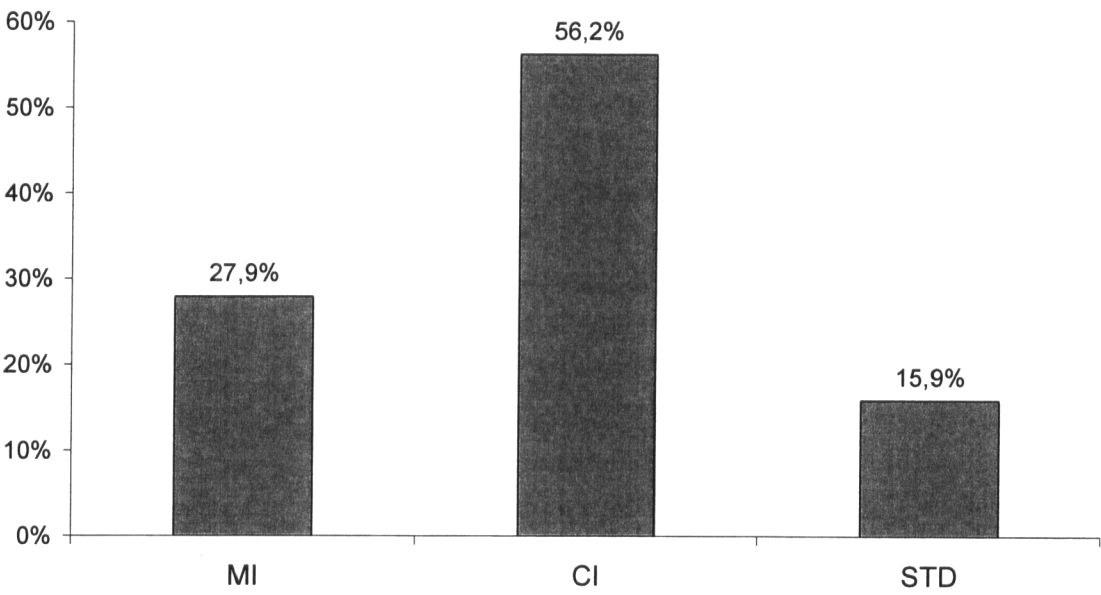
MI	38.7%
CI	51.5%
STD	9.8%

圖 6



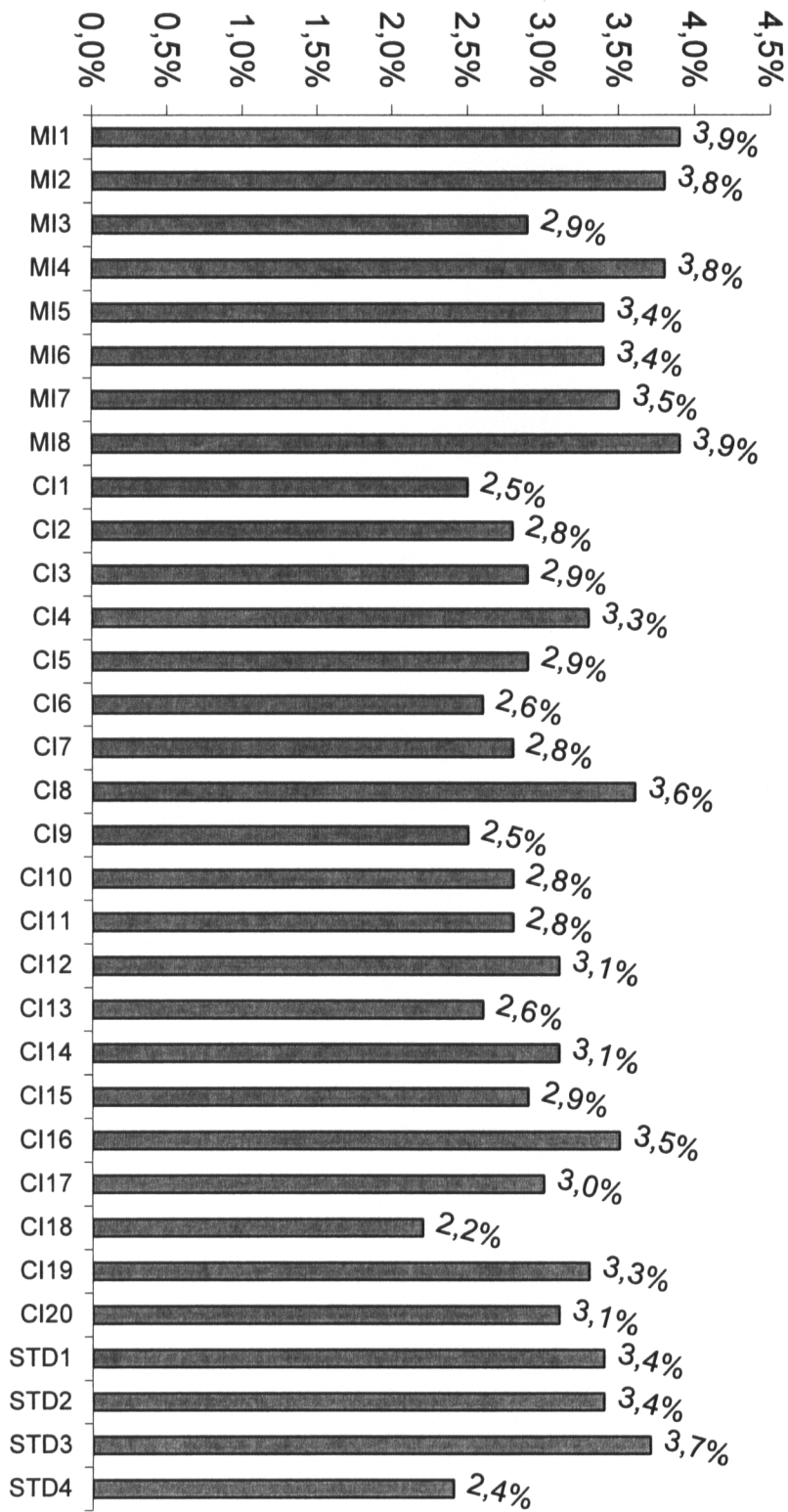
MI1	5.9%
MI2	5.2%
MI3	4.5%
MI4	5.7%
MI5	4.0%
MI6	2.9%
MI7	4.7%
MI8	5.7%
CI1	2.9%
CI2	2.4%
CI3	2.6%
CI4	3.1%
CI5	3.3%
CI6	2.8%
CI7	2.9%
CI8	3.8%
CI9	1.9%
CI10	2.9%
CI11	2.4%
CI12	2.9%
CI13	1.6%
CI14	2.2%
CI15	2.4%
CI16	3.8%
CI17	2.1%
CI18	2.9%
CI19	2.8%
CI20	2.6%
STD1	0.3%
STD2	2.4%
STD3	1.7%
STD4	2.8%

圖 7



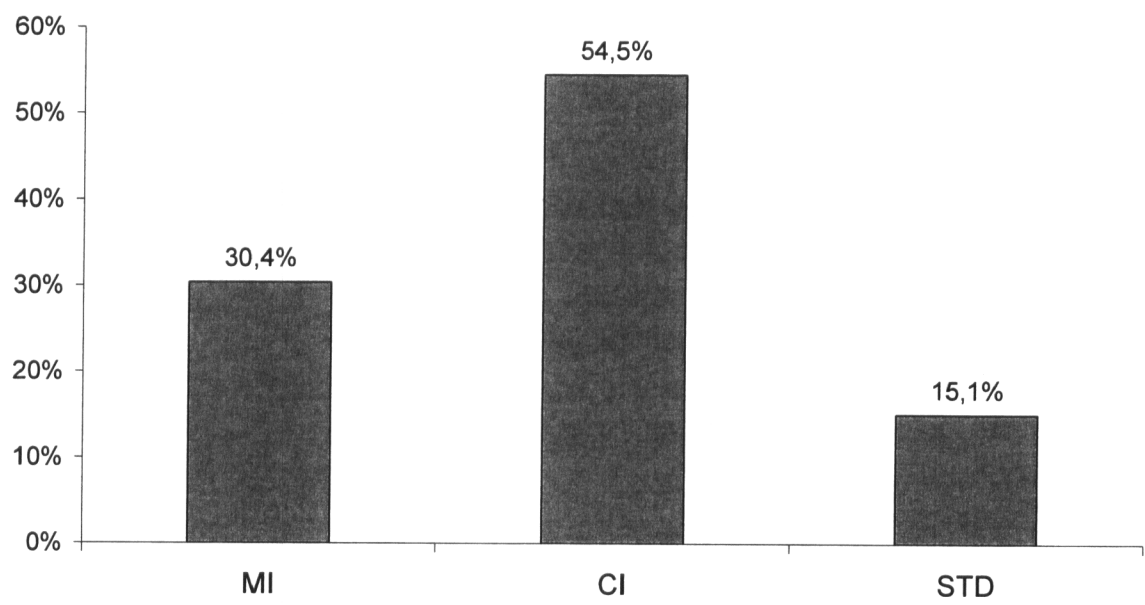
MI	27.9%
CI	56.2%
STD	15.9%

圖 8



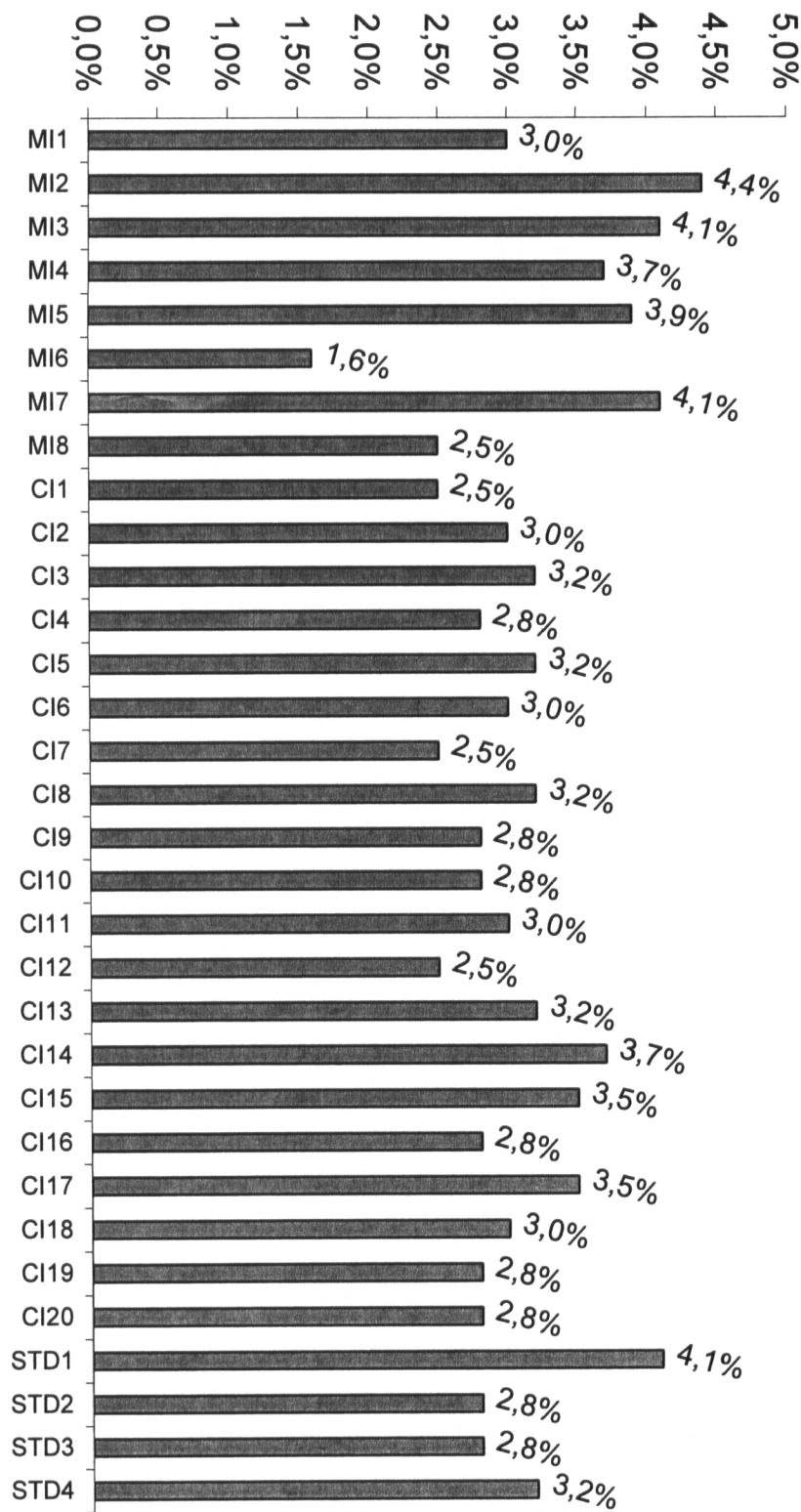
MI1	3.9%
MI2	3.8%
MI3	2.9%
MI4	3.8%
MI5	3.4%
MI6	3.4%
MI7	3.5%
MI8	3.9%
CI1	2.5%
CI2	2.8%
CI3	2.9%
CI4	3.3%
CI5	2.9%
CI6	2.6%
CI7	2.8%
CI8	3.6%
CI9	2.5%
CI10	2.8%
CI11	2.8%
CI12	3.1%
CI13	2.6%
CI14	3.1%
CI15	2.9%
CI16	3.5%
CI17	3.0%
CI18	2.2%
CI19	3.3%
CI20	3.1%
STD1	3.4%
STD2	3.4%
STD3	3.7%
STD4	2.4%

圖 9



MI	30.4%
CI	54.5%
STD	15.1%

圖 10



MI1	3.0%
MI2	4.4%
MI3	4.1%
MI4	3.7%
MI5	3.9%
MI6	1.6%
MI7	4.1%
MI8	2.5%
CI1	2.5%
CI2	3.0%
CI3	3.2%
CI4	2.8%
CI5	3.2%
CI6	3.0%
CI7	2.5%
CI8	3.2%
CI9	2.8%
CI10	2.8%
CI11	3.0%
CI12	2.5%
CI13	3.2%
CI14	3.7%
CI15	3.5%
CI16	2.8%
CI17	3.5%
CI18	3.0%
CI19	2.8%
CI20	2.8%
STD1	4.1%
STD2	2.8%
STD3	2.8%
STD4	3.2%

圖 11

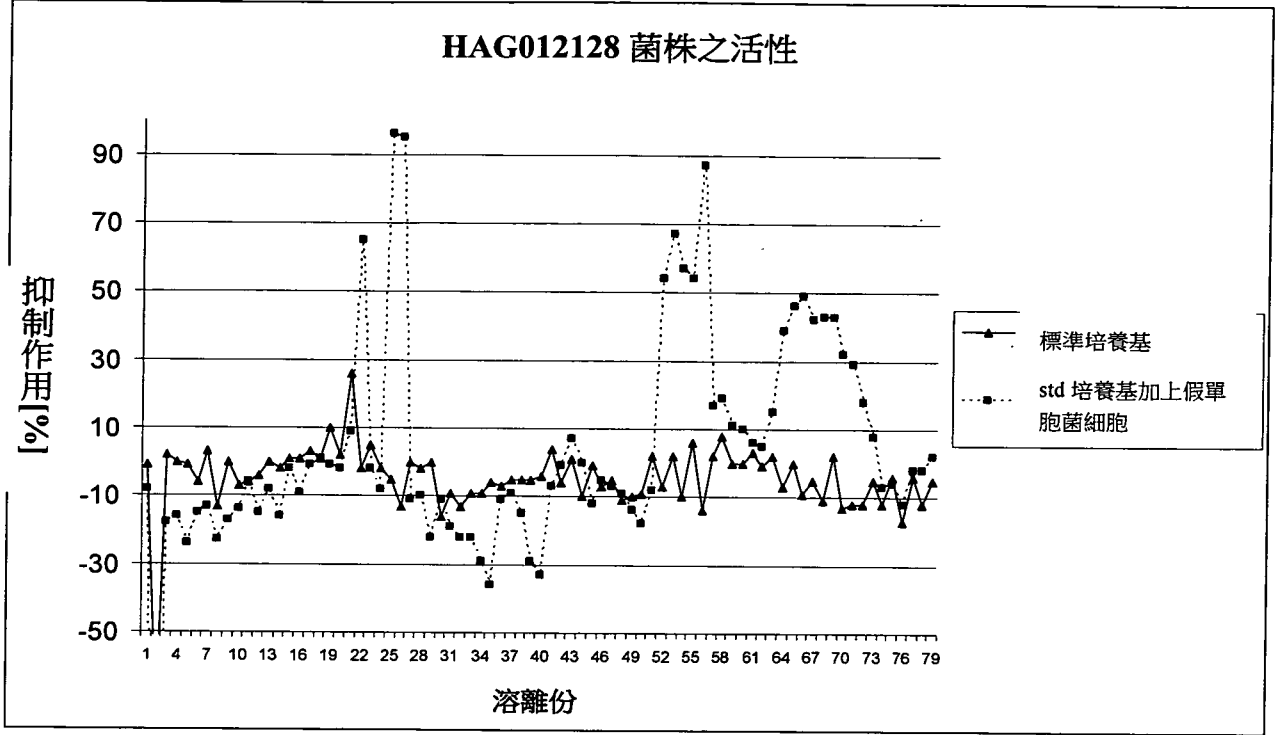
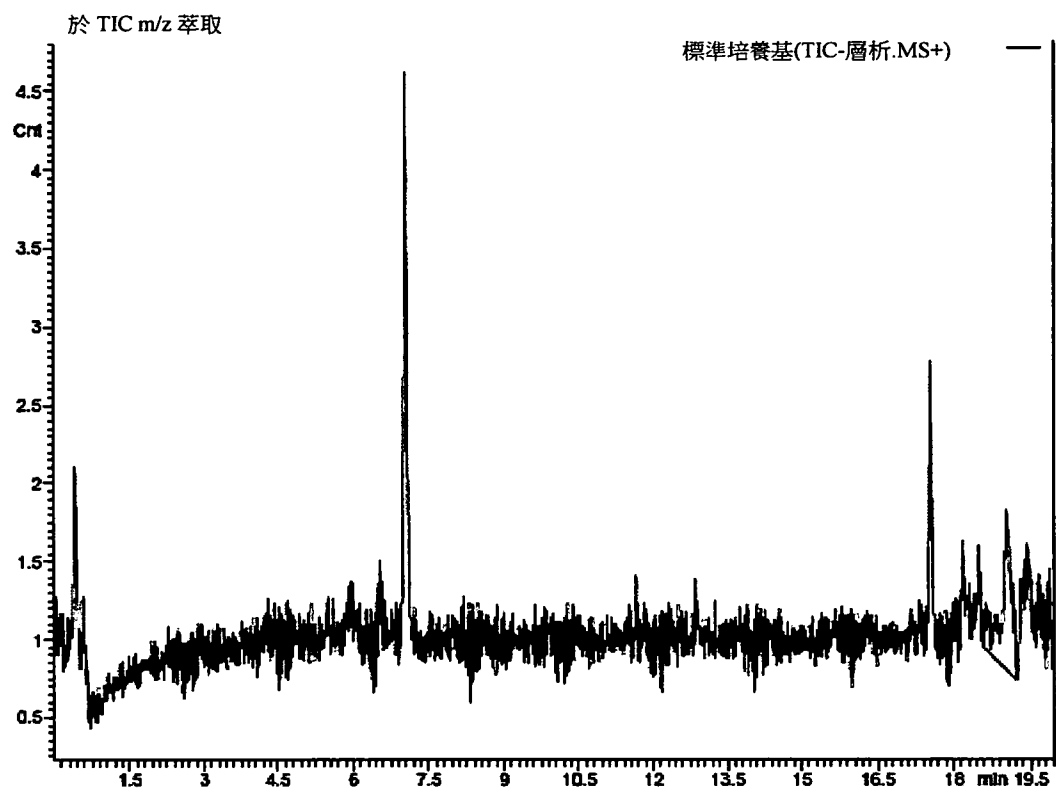


圖 12

A



B

