

國立臺灣師範大學化學系

Department of Chemistry, National Taiwan Normal University

碩士論文

Master Thesis

微生物金離子感測器與

利用生物素酵素與其受體胜肽成像微生物中的蛋白質

Microbial Sensor for the Detection of Gold and

Imaging Microbial Proteins with Biotin Ligase and Biotin

Acceptor Peptide

指導教授：葉怡均 博士

Advisor: Yi-Chun Yeh, Ph.D.

研究生：曾學瑋 撰

Graduate Student: Hsueh-Wei Tseng

中華民國一百零三年七月

July, 2014

謝誌

當我得知直升輔大落榜時，心情伴隨著冷颼颼的東北季風，一陣一陣褪去我對化學的熱情，打算直接從軍去時，感謝輔大的老師們，在我推甄失利之後還不停地給我鼓勵，尤其是我的指導教授高華生老師以及老師陳元璋，幫助我在短時間內重振信心，選擇挑戰自我，經過幾番挫折及努力後，出乎意料地考上了國立臺灣師範大學。

選擇就讀台師大後，沒想到也是一番波折，光是等備取就等到快要開學之外，還因為一時找不到指導教授而覺得驚慌失措，所幸最後葉怡均老師願意給我機會，讓我終於可以進入研究室開始我的研究生生活。在台師大的兩年，我不斷思索著未來，也經歷了一段時間的迷惘之後，終於找到自己想要努力去挑戰的目標及積極規劃的方向，真的非常感謝葉怡均老師的指導以及栽培，雖然數學不好常常計算錯誤配藥配錯、精神不好常常睡到快中午才來、不夠專注常常實驗前置作業做錯或是不夠認真準備書報討論和投影片，老師您還是願意花很多時間跟精神來指導我，尤其是英文和報告期刊的部分，我也在短時間內得到了很大的提升及進步，這對我在往後的幫助可是受用無窮！最後也謝謝您的肯定，肯定我的潛力，而且很幸運地在碩士兩年內完成老師賦予的題目並且成功發表了一篇期刊，此外也給我很多機會去挑戰自己，發掘自己的創造力，培養出能夠自己設計並規劃一個完整的實驗題目。如果當時進來台師大不是在老師您底下工作和學習，可能無法想像一個從高中到大學班上排名幾乎都吊車尾的人，在研究所兩年經過老師您的訓練和自己的堅持及努力不懈之後，竟然可以獲得斐陶斐的榮譽會員，這對我無疑是一個最大的肯定。這兩年的研究生成就，真的非常謝謝葉怡均老師，一切都是您的栽培，我才有今天的成就！而且我也對自己的目標和方向有更多的信心，在未來還會有很多需要老師指導和幫忙的地方，希望老師到時還願意幫助我。

特別感謝陳家俊老師和黃文彰老師，在我們實驗室還尚未完成的時候，樂意提供空間、藥品和器材給我們使用，讓我們終於可以開始做一點實驗，不至於開學後都沒有進度。

特別感謝林文偉老師，給了我很多建議和鼓勵，讓我原本迷惘的人生有了一個新的方向，而且也願意幫助我且支持我對於未來努力的方向和目標，在重新整理心情之後，繼續完成兩年的碩士班學位。

感謝陳頌方老師，願意讓我使用您研究室的資源，使得我學習更多實驗技巧，且最重要的是幫助我完成研究成果，最後也謝謝老師願意花時間來當我的口試委員，除了給我很多研究上的建議之外，也讓我能夠在研究上有新的想法，而嘗試設計出一個新的研究，最後感謝老師給我的鼓勵和肯定。

感謝台灣大學的黃筱鈞老師，讓我可以去您的研究室使用資源，幫助我完成我的研究成果，此外也謝謝您願意抽空特地來台師大當我的口試委員，最後還要感謝老師給我的鼓勵和肯定。

感謝師大化學系的助教們，謝謝你們都非常有耐心的教導我們並且協助我們很多行政上的事物。

感謝蔡宜蓉同學，在研究所這兩年彼此互相幫忙並鼓勵，讓我們都可以順利完成碩士班兩年的學位，也非常感謝妳常常聽我訴苦或是給我很多建議，希望未來也可以常常聯絡互相關照。

感謝 C407 研究室的所有成員，尤其是學弟歐陽淳宇常常幫我糾正英文和報告的投影片，真是個囂張的學弟，不過卻意外的熱心和謹慎，未來實驗室就靠你了；學弟馬士元感謝你在實驗上常幫忙我，且還幫忙校正我的論文，雖然你有時在研究上的態度不夠嚴謹，希望未來能夠更專注在研究上並且幫助老師帶領之後進來的學弟妹們做研究；學妹兼大學同學的楊子瑩，希望在未來的一年，你能夠在這裡學習到更多，尤其是不求甚解和積極主動的態度，加油囉！另外，學弟顏家禾、林子寬和學妹陳珮璇、黃

好君，感謝你們也替學長姐們分擔實驗，也期許你們未來能更努力，為自己找到一個明確的目標而努力！

感謝 A413 研究室的學長們，尤其是政宏學長，感謝每次去實驗室找你幫忙時，你都會不辭辛勞的幫助我們，不管是小事或是大事，都謝謝學長的幫忙！

感謝 C404 研究室的所有成員，尤其是美麗的邱芷葳學姊和戴佩琳學姊，因為我是葉怡均老師第一屆的學生，所以有很多實驗上的問題或是對學校行政不熟悉都沒學長姊可以問，只好拜託妳們並透過妳們的幫忙，真的非常感謝妳們，不只人美還心地善良，只能怪我慧根不夠做事情比較笨拙，還要學姐們細心的指導；另外感謝同屆的同學們宋祖儀、劉昀昇、徐羽薇和林佳穎，除了時常彼此鼓勵並且互相幫忙之外，還偶爾一起吃飯、舉辦一些小活動和討論實驗，特別是林佳穎同學，在我陷於趕論文的深淵時，非常熱心的伸出援手幫助我，替我解決了很多問題，非常感謝！雖然是對面的鄰居，但感覺卻像都是同一間實驗室的成員一樣，真的非常感謝大家的付出和幫助！

感謝 D301 研究室的各位，尤其是學長達達和小砲，還有學姊筱茹和孟潔，感謝你們也把我當葉家人一樣一起照顧，雖然我不是老葉家（是小葉家）的成員，但你們還是常常找我參與你們研究室的活動，也會撥空幫我解決書報討論的問題或是考試的問題，真的非常感謝！另外，還有感謝同屆的同學們彼此互相鼓勵和支持！

感謝 C104 研究室的各位，尤其是學長蔡長誌，雖然常常嘴裡不饒人，但還是會特別照顧學弟我；感謝同學們，雖然常常跑去你們實驗室鬧，不過你們還是很願意接納我，除此之外，我們還分享彼此領域的知識並一起學習和成長。

感謝 D303C 研究室兩位美麗的學姊林亭君和王育暄，常常也會跑去你們家問問題或是聊聊天，學姊們也都很有耐心地回答，並常常約我一起吃

飯或是同樂，真的很感謝你們對我的照顧。

感謝在師大的輔大幫學長姐們、同學們和學弟妹們。果然是輔大人！想當初考上師大還一片迷惘的時候，在師大研究所的輔大學長姐們都很熱心地幫我介紹師大研究所各個領域的老師，並且親自帶我去研究室參觀，真的非常感謝學長姐們的幫忙；輔大的同學們，當時我們一起從輔大畢業、一起努力考上師大後，今天我們順利的要一起從師大研究所畢業了。兩年來，我們不時的一起吃飯、聊天和幫忙，即使面對了挫折，開玩笑歸開玩笑，還是會給點鼓勵，希望我們未來還能時常聯絡；來師大的輔大學弟妹們，希望未來也能幫助下一屆或是下下屆來自輔大的學弟妹們，我們要貫徹服務的精神，並且互相幫忙和鼓勵！

感謝師大化研所系籃的大家，沒想到整天蹲在研究室之餘，還有額外的時間能夠運動，但除了運動之外，我們還一起去比賽，雖然最後沒有抱到任何一座獎杯回來，但至少當時比賽奮鬥的過程現在回想起來，還是意猶未盡阿！希望未來化研所的學弟們，能夠繼續為師大出去比賽，並透過籃球認識更多熱愛運動的化學人，以後運動不孤單，期許系籃的各位都是能文能武的人。

感謝宅男宅女團和輔大主持王固定班底，不時對我關心和打氣，研究所這兩年除了工作之外，最常的就是跟你們揪團去郊遊或是打桌遊放鬆心情；聊聊彼此的未來及目標並且互相給予建議和鼓勵，真的非常感動有一群亦師亦友的好朋友們，從你們身上得到了很多也學到了很多！

感謝在師大研究所這兩年來，常常陪在我身邊一起成長一起鬧的朋友們郭修甫、蔡譯緯、許永勝、陳全斌、洪子喬、詹侑得，謝謝你們不管是在我最失落或是最開心的時候，總是馬上來關心我甚至直接跑來找我，並且陪我分擔壓力或是分享喜悅；總是願意互相扶持並且有樂同享、有難同當，真的非常感謝我身邊有這樣一群知心的朋友們，希望不管未來我們身在何處，都能夠繼續保持聯絡，並且互相關心、勉勵彼此！

最後，真的非常感謝一路陪著並栽培我長大的家人，尤其是一直辛苦養育我的爸爸和媽媽，我知道這趟學習的路上，我一直很叛逆，也一直很有自己的想法，不過最後還是被您們給說服踏入了理工科，這一路上真的受了很多挫折和失敗，還好很幸運地挺了過來，也從中學習到了很多樂趣及經驗，好不容易有了一個明確的目標，雖然一開始您們不太支持，但是我知道您們其實只是擔心我。到了最後，我算是成功了一半，並且證明了我是有能力可以去挑戰這個夢想的！也謝謝爸爸媽媽的諒解與最後的支持！我會繼續努力並直到圓滿達成我的夢想！

目錄

目錄.....	I
圖表目錄.....	V
摘要.....	IX
Abstract.....	X
I. 微生物重金屬感測器	1
第一章 緒論.....	1
1.1 生物感測器 (biosensor).....	1
1.2 微生物與重金屬	2
1.2.1 生物礦化作用 (biomineralization).....	2
1.2.2 微生物對金屬的耐受性	2
1.2.3 MerR 家族的轉錄調節因子 (transcriptional regulator of MerR family)...	4
1.3 金金屬微生物感測器 (microbial sensor of gold).....	6
1.4 微生物宿主	7
1.5 研究動機.....	9
1.6 研究目標	10
第二章 實驗藥品與器材	11
2.1 實驗儀器	11
2.2 實驗藥品	12
第三章 實驗方法	14

3.1 微生物感測器的設計	14
3.1.1 質體設計	14
3.1.2 質體基因工程 (cloning).....	15
3.2 實驗步驟	21
3.2.1 專一性 (specificity)	21
3.2.2 干擾性 (interference).....	22
3.2.3 耐受性 (tolerance)	22
3.2.4 靈敏度 (sensitivity)	23
3.2.5 最低偵測極限 (limit of detection, LOD).....	23
第四章 實驗結果與討論	24
4.1 微生物金離子感測器之篩選	24
4.1.1 質體 <i>PcupA/R-cupR-rfp</i> 和宿主組合之金離子篩選.....	24
4.1.2 質體 <i>cupR(rev)-PcupA/R-PcupC-rfp</i> 和宿主組合之金離子篩選.....	33
4.2 微生物金離子感測器中 CupR 調控蛋白對金離子的感測	42
4.3 微生物金離子感測器之重金屬環境干擾及選擇性.....	45
4.3.1 質體 <i>cupR(rev)-PcupA/R-PcupC-rfp</i> 和 <i>C. metallidurans</i> 宿主組合之微生物金離子感測器對其他重金屬的干擾探討	45
4.3.2 質體 <i>cupR(rev)-PcupA/R-PcupC-rfp</i> 和 <i>R. eutropha</i> 宿主組合之微生物金離子感測器對其他重金屬的干擾探討	48
4.4 微生物金離子感測器之螢光強度與金離子濃度關係.....	52
4.4.1 質體 <i>PcupA/R-cupR-rfp</i> 和 <i>C. metallidurans</i> 宿主組合之金離子濃度探討	52
4.4.2 質體 <i>cupR(rev)-PcupA/R-PcupC-rfp</i> 和 <i>C. metallidurans</i> 和 <i>R. eutropha</i> 宿主組合之金離子濃度探討	53
4.5 微生物 <i>R. eutropha</i> 金離子感測器改良	61

4.5.1 質體 <i>cupR(rev)-PcupA/R-PcupC-rfp-cupC</i> 和 <i>R. eutropha</i> 宿主之組合	61
4.5.2 質體加入 <i>cupA</i> 和 <i>cupC</i> 的不同組合並與 <i>R. eutropha</i> 宿主組成感測器	63
4.6 螢光顯微鏡下的微生物金離子感測器效率	67
第五章 結論	69
II. 微生物蛋白質顯像技術	71
第六章 緒論	71
6.1 生物顯像技術 (biological imaging)	71
6.2 生物素化作用 (biotinylation)	73
6.3 目標蛋白質 (target proteins)	74
6.3.1 細胞表面的目標蛋白質	74
6.3.2 蛋白質與蛋白質之間的作用 (Protein-protein interaction)	77
6.4 研究動機	80
6.5 研究目標	81
第七章 實驗藥品與器材	82
7.1 實驗儀器	82
7.2 實驗藥品	83
第八章 實驗方法	86
8.1 質體設計和基因工程 (cloning)	86
8.1.1 質體設計	86
8.1.2 質體基因工程 (cloning)	87
8.2 蛋白質純化 (protein purification)	91

8.2.1 蛋白質標記 (His-Tag).....	91
8.2.2 十二烷基硫酸鈉聚丙烯酰胺凝膠電泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophore, SDS-PAGE).....	93
8.2.3 蛋白質純化	96
8.2.4 蛋白質濃度測定 (Bradford protein assay)	97
8.2.5 鎳樹脂回收 (recovery of Ni-NTA resin).....	98
8.3 微生物蛋白質標記 (microbial proteins labeling).....	99
第九章 實驗結果與討論	101
9.1 微生物外膜蛋白質標記.....	101
9.2 微生物體內蛋白質與蛋白質間的交互作用觀察.....	103
第十章 結論.....	106
參考文獻.....	107

圖表目錄

Fig. 1-1 鏈黴菌 (<i>Streptomyces lividans</i>) 染色體中對汞的調節基因組 <i>mer</i> ^{4b} 。	3
.....	3
Fig. 1-2 <i>mer</i> 調節基因系統啟動子機制。	3
Fig. 1-3 <i>S. typhimurium</i> 染色體中的 <i>gol</i> 調節基因組。	4
Fig. 1-4 <i>C. metallidurans</i> 染色體中，對金的調節基因組 <i>cup</i> 系統示意圖 ⁷ 。	5
.....	5
Fig. 1-5 比較 CueR (<i>E. coli</i>)、GolS (<i>S. typhimurium</i>) 和 CupR (<i>C. metallidurans</i>) 的 C 端金屬結合根的辨識序列 ⁷ 。	5
Fig. 1-6 設計質體後轉化到大腸桿菌 (<i>E. coli</i>) 做微生物金離子感測器。...	6
Fig. 1-7 利用微生物金離子感測器檢測金的濃度並藉由紅色螢光蛋白 (red fluorescence protein, RFP) 當作輸出圖 ¹⁰ 。	7
Fig. 3-1 質體設計	14
Fig. 3-2 微生物金離子感測器的反應機制 ¹¹ 。	15
Table 3-1 引子的名稱和序列。	16
Fig. 3-3 接合作用的示意圖。	20
Fig. 4-1 各加入四種不同金屬並分別為 0、50、100 M 的濃度於 <i>E. coli</i> DH10B 的培養液中。	25
Fig. 4-2 各加入四種不同金屬並分別為 0、50、100 M 的濃度於 <i>C. metallidurans</i> CH34 的培養液中。	27
Fig. 4-3 各加入四種不同金屬並分別為 0、50、100 M 的濃度於 <i>R. eutropha</i> H16 的培養液中。	29
Fig. 4-4 各加入四種不同金屬並分別為 0、50、100 M 的濃度在於 12 小時之後比較三個不同微生物宿主的專一性。	31
Fig. 4-5 各加入四種不同金屬並分別為 0、50、100 M 的濃度於 24 小時	

之後比較三個不同微生物宿主的專一性。.....	32
Fig. 4-6 各加入四種不同金屬並分別為 0、50、100 M 的濃度於 <i>E. coli</i> DH10B 的培養液中。.....	34
Fig. 4-7 各加入四種不同金屬並分別為 0、50、100 M 的濃度於 <i>C. metallidurans</i> CH34 的培養液中。.....	36
Fig. 4-8 各加入四種不同金屬並分別為 0、50、100 M 的濃度於 <i>R. eutropha</i> H16 的培養液中。.....	38
Fig. 4-9 各加入四種不同金屬並分別為 0、50、100 M 的濃度於 12 小時之後比較兩個不同微生物宿主的專一性。.....	39
Fig. 4-10 各加入四種不同金屬並分別為 0、50、100 M 的濃度於 24 小時之後比較兩個不同微生物宿主的專一性。.....	40
Fig. 4-11 由肉眼判觀察顏色的變化。.....	41
Fig. 4-12 將設計好的質體刪除 <i>cupR</i> 基因，只保留啟動子和紅色螢光蛋白 ¹¹ 。.....	42
Fig. 4-13 將刪除 <i>cupR</i> 基因的質體與原本的質體作比較。.....	43
Fig. 4-14 微生物 <i>C. metallidurans</i> 感測器在各重金屬的專一性檢測 ¹¹ 。.....	45
Fig. 4-15 微生物 <i>C. metallidurans</i> 感測器在各種重金屬的干擾檢測。.....	47
Fig. 4-16 微生物 <i>R. eutropha</i> 感測器在各重金屬的專一性檢測 ¹¹ 。.....	48
Fig. 4-17 微生物 <i>R. eutropha</i> 感測器各加 50 M 重金屬作干擾性檢測。.....	50
Fig. 4-18 <i>C. metallidurans</i> 和 <i>PcupA/R-cupR-rfp</i> 的質體基因組感測器劑量反應曲線。.....	52
Fig. 4-19 <i>C. metallidurans</i> 和 <i>cupR(rev)-PcupA/R-PcupC-rfp</i> 的質體基因組感測器劑量反應曲線。.....	53
Fig. 4-20 <i>R. eutropha</i> 和 <i>cupR(rev)-PcupA/R-PcupC-rfp</i> 的質體基因組感測器	

劑量反應曲線。.....	54
Fig. 4-21 <i>C. metallidurans</i> 當作宿主的感測器在低濃度的金離子中檢測。.....	55
Fig. 4-22 <i>R. eutropha</i> 當作宿主的感測器在低濃度的金離子中檢測。.....	55
Fig. 4-23 <i>C. metallidurans</i> 當作宿主的感測器在金離子濃度中的檢測。... ..	56
Fig. 4-24 <i>C. metallidurans</i> 當作宿主的感測器偵測金離子。.....	57
Fig. 4-25 <i>R. eutropha</i> 當作宿主的感測器在金離子濃度中的檢測。.....	58
Fig. 4-26 <i>R. eutropha</i> 當作宿主的感測器偵測金離子。.....	59
Fig. 4-27 <i>R. eutropha</i> 和 <i>cupR(rev)-PcupA/R-PcupC-rfp-cupC</i> 的質體基因組感測器。.....	62
Fig. 4-28 <i>R. eutropha</i> 和 <i>cupR(rev)-PcupA/R-PcupC-rfp-cupC</i> 的質體基因組感測器高低濃度檢量線。.....	63
Fig. 4-29 不同的質體設計。.....	64
Fig. 4-30 不同質體的 <i>R. eutropha</i> 的感測器比較。.....	65
Fig. 4-31 比較四組不同質體的 <i>R. eutropha</i> 感測器，其每單位螢光強度及針對高濃度的金離子耐受性。.....	66
Fig. 4-32 <i>C. metallidurans</i> 感測器在有金離子的情況下產生螢光的效率。.....	67
Fig. 4-33 <i>R. eutropha</i> 感測器在有金離子的情況下產生螢光的效率。.....	68
Fig. 4-33 <i>R. eutropha</i> 感測器 (含有 <i>cupC</i> 基因的質體) 在有金離子的情況下產生螢光的效率。.....	68
Fig. 6-1 列舉五種常用的標記方法：.....	72
Fig. 6-2 運用 biotinylation 的方法做標記的示意圖。.....	73
Fig. 6-3 兩圖皆是同一個區域的 HeLa (Helen Lane) 細胞圖，並標記細胞的表面蛋白質。.....	74
Fig. 6-4 FhuA 蛋白質用 biotinylation 標記的示意圖。.....	76
Fig. 6-5 蛋白質 A 與蛋白質 B 間的交互作用，分別接上 BirA 酵素和對其	

具有專一性的胜肽做 biotinylation 標記並檢視 ¹⁹ 。	77
Fig. 6-6 螢光顯微鏡下觀察 HEK 細胞中的 FKBP/FRB 兩個蛋白質間的交互作用。	78
Fig. 6-7 蛋白質 FtsZ 與 ZapA 交互作用透過 biotinylation 標記的示意圖。	79
Fig. 8-1 質體的設計。	86
Fig. 8-2 FhuA 蛋白質用 biotinylation 標記的模型圖。	87
Fig. 8-3 蛋白質 FtsZ 與 ZapA 交互作用透過 biotinylation 標記的模型圖。	87
Table 8-1 引子的名稱和序列。	88
Fig. 9-1 利用顯微鏡觀察大腸桿菌外膜 FhuA 蛋白質接上紅色螢光蛋白。	101
Fig. 9-2 利用顯微鏡觀察大腸桿菌外膜 FhuA-BAP 在加入 BirA 酵素、ATP 和生物素螢光衍生物之後的情況。	102
Fig. 9-3 利用顯微鏡觀察大腸桿菌體內 FtsZ 蛋白質接上紅色螢光蛋白。	103
Fig. 9-4 利用顯微鏡觀察大腸桿菌 FtsZ-BAP/ZapA-BirA 在加入生物素螢光衍生物之後的情況。	104

摘要

第一部分，我們運用基因工程技術設計出一組針對金離子有專一性且選擇性良好的微生物感測器。本實驗是採用耐金屬貪銅菌 (*Cupriavidus metallidurans*)對金的調節基因組 *cup* 系列的基因作為感測器的元件，並透過基因工程技術以紅色螢光蛋白 (RFP)當作輸出訊號，用來檢測金屬。我們將其應用於耐金屬貪銅菌 (*Cupriavidus metallidurans*)和青枯桿菌 (*Ralstonia eutropha*)這兩種對環境適應力較強的土壤菌，一起探討這兩種微生物感測器的專一性、耐受性和選擇性。由於傳統的儀器檢驗需要高成本、高人力又耗時，可利用微生物感測器做簡單的操作，而且低成本又省時的特性，在簡單的檢測及定量時，可以提供另一種替代的分析工具。

第二部分，我們運用生物素化作用 (biotinylation)標記法來觀察微生物的蛋白質。螢光蛋白標記雖然是現在最普遍且高專一性的方法，但螢光蛋白普遍都較大，會影響或干擾目標蛋白質的運動；生物素化作用標記則是運用一段可結合生物素的胜肽 (biotin acceptor peptide, BAP)經過生物素的酵素 (biotin ligase, BirA)催化，就可以與生物素 (biotin)結合，專一性高且都是小分子，接下來就是比較兩個方法的效果。此系統原本應用於哺乳類動物細胞的蛋白質研究，而本實驗將其技術應用於微生物的蛋白質標記，不只是觀察單一的蛋白質，也可以觀察蛋白質與蛋白質之間的交互作用 (protein-protein interactions, PPIs)，拓展對於微生物的顯像技術和應用方法的選擇。

關鍵字：微生物感測器、耐金屬貪銅菌、金的調節基因組 *cup*、青枯桿菌、生物素化作用標記法、可結合生物素的胜肽、生物素的酵素、生物素

Abstract

The part I of this thesis presents a fluorescence-based microbial sensor for the detection of heavy metal ions as a novel analytical tool for environmental applications. Our results demonstrate the effectiveness of whole-cell biosensor in the selective detection of gold ions. *Cupriavidus metallidurans* has a gold-resistance system controlled by *cup* regulon that has a gold-specific sensory protein CupR, a transcriptional regulator of MerR family. Two heavy-metal tolerant proteobacteria, *Cupriavidus metallidurans* and *Ralstonia eutropha*, were examined and showed great specificity. This work highlights the potential of employing engineered microbial strains as robust analytical tools.

And, the part II describes a simple way to label proteins of microbes with biotinylation. The fusion of a fluorescent protein to target proteins has high specificity, but its size potentially disrupts trafficking and may cause misfolding. So we used an enzyme, biotin ligase (BirA) from *E. coli*, and a 15-amino acid peptide, biotin acceptor peptide (BAP), to achieve the high specificity and rapid labeling. Besides, BAP is a small tag and has less potential to disrupt target proteins. Microbial surface proteins tagged with BAP are biotinylated by biotin ligase. The other hand, this methodology also can label protein-protein interactions (PPIs) in cell. One protein of interest is fused to BirA, while another protein is fused to BAP substrate. Aside from mammalian cells, this work has demonstrated the adaptability of this technique to microbial system.

Keyword: fluorescence-based microbial sensor, *Cupriavidus metallidurans*,

gold-resistance system controlled by *cup* regulon, *Ralstonia eutropha*,
biotinylation, biotin acceptor peptide (BAP), biotin ligase (BirA), biotin

I.微生物重金屬感測器

第一章 緒論

1.1 生物感測器 (biosensor)

在分析化學中,最重要的部分是對物質成分的分析,可用來量測藥品、化合物質與其他分子。現在主要都是以傳統分析儀器來進行分析,雖然優點是高準確率,但需要高成本、高人力及較長的時間進行量測。近幾年生物感測器不斷的被開發,其最獨特的地方就是利用生物體當作元件,在分析目標物時,具備高專一性、高靈敏度或高選擇性,尤其是低成本和可以即時輸出 (real-time output)的特性最吸引人,而在生物感測器的種類中,又依照不同的生物元件有不同的感測器,比如:酵素、抗體、蛋白質...等。

生物感測器主要分為蛋白質為主的感測器 (Protein based biosensor)和整個微生物細胞為主的感測器 (whole-cell based biosensor)兩大類¹。蛋白質為主的感測器包含了酵素 (Enzymes)感測器、蛋白質 (Purified Protein)感測器 (不涉及酵素的作用)和抗體 (Antibodies)感測器,這些感測器都具有高靈敏度和高專一性,在使用上也相當廣泛,但其純化過程較麻煩且產率也不高,需花費較多時間跟成本。相較於蛋白質為主的感測器,微生物細胞為主的感測器 (whole-cell based biosensor)是利用整個微生物細胞作為感測器,不需要純化只需要利用簡單的基因改造工程,將調節基因 (regulatory gene)、啟動子 (promoter)和表達基因 (reporter gene)結合的質體輸送到微生物體內。其在檢測時操作容易,雖然專一性和靈敏度會依不同調節基因產生的調節蛋白而對待測物的辨識度及結合能力有所不同,但大致上都具有很好的靈敏度及專一性,還有低成本和省時的優點²。

1.2 微生物與重金屬

1.2.1 生物礦化作用 (biomineralization)

金屬在自然界的循環中，微生物扮演著主要的其中一環，因為有些金屬離子是微生物必需的營養，所以微生物本身發展出一套代謝的機制，透過其基因組產生的蛋白質來管理體內的金屬平衡，將多餘的金屬排出體外，進而形成生物礦化作用 (biomineralization)³。如革蘭氏陰性菌 (Gram-negative) 中的耐金屬貪銅菌 (*Cupriavidus metallidurans*)，其含有許多抵抗金屬的機制，可以透過抵抗基因組的調節來減少金屬在微生物體內累積而造成毒性增加，因此在自然界礦產豐富的地區，此類的細菌被大量的發現於這些礦物上。

1.2.2 微生物對金屬的耐受性

當微生物暴露在污染的環境下，其本身會啟動一些防禦機制保護自己。生物膜 (biofilm) 則是其中一種由微生物自身產生的多醣體所形成的保護機制，而微生物會被多醣體包圍，故大量的微生物因此聚集並附著在同一個地方，透過此方式可以使微生物更容易應變外在的環境且更容易存活。另外一種保護機制則是調節因子的系統，透過轉錄調節因子 (transcriptional regulator) 感應外來的侵入物，進而啟動整個系統的抵禦外來物，幫助微生物調節並減少體內的毒化物量，最後利用膜內外蛋白將毒物排出，使微生物能夠存活於惡劣的環境。

早期發現某些微生物能夠存活在重金屬的環境下，深入研究後，這些微生物是將重金屬離子還原成原子來降低重金屬毒性，其中 *mer* 的基因調節系統是最早被發現的基因調節系統，其可以讓汞離子被微生物還原成汞原子 (Fig. 1-1)⁴。之後，科學家更深入的研究 *mer* 基因調節系統的反應代

謝機制，在 *mer* 基因調節系統中，是當 MerR 調節蛋白結合汞離子時，其錯合物會與啟動子結合，透過此方式控制並表現其他的基因組產生蛋白 (Fig. 1-2)。

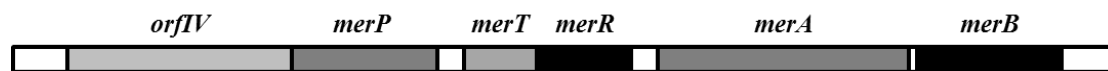


Fig. 1-1 鏈黴菌 (*Streptomyces lividans*) 染色體中對汞的調節基因組 *mer*^{4b}。

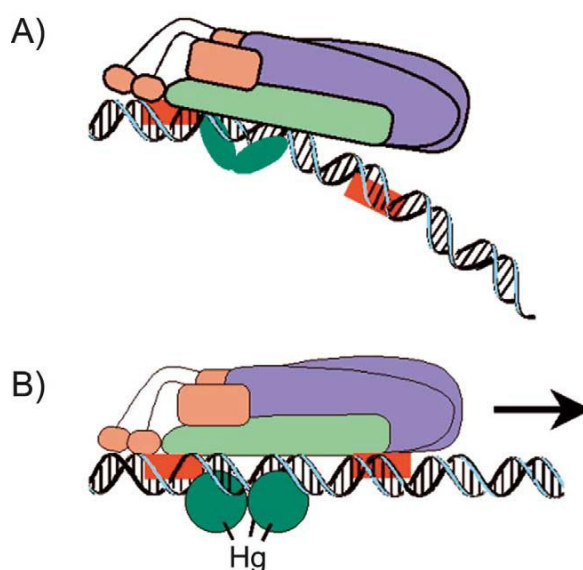


Fig. 1-2 *mer* 調節基因系統啟動子機制。

(A) 在沒有汞的環境中，MerR 蛋白以二聚體的形式和啟動子結合，不利於 RNA 聚合酶的附著，故後續基因的轉錄受到抑制。(B) 當環境中含有汞離子時，MerR 蛋白則會與汞離子結合，並影響其與啟動子的結合，使 RNA 聚合酶得以作用^{4a}。

除了汞之外，其他重金屬的調節因子和機制也陸續被發現，如鋅、鎘、銅、鉛...等，而不同重金屬分別有各自的調節因子，這些轉錄調節因子都被稱為 MerR 家族，因為這一類的蛋白質有相似的 N 端 DNA 結合的螺旋結構 (N-terminal DNA-binding helix-turn-helix) 和多種訊號辨識的 C 端⁵，

在 MerR 家族中，N 端都有類似的胺基酸序列與啟動子的結合形式有關；C 端則是都有一段類似的胺基酸金屬結合根 (metal binding root, MBL)，每種調節因子會與因應的金屬而有些微不同。

1.2.3 MerR 家族的轉錄調節因子 (transcriptional regulator of MerR family)

微生物除了對汞有 MerR 調節蛋白之外，還有對鋅的調節蛋白 ZntR、對銅的調節蛋白 CueR 和對鉛的調節蛋白 PbrR，這些都是在 MerR 之後陸續被發現轉錄調節因子，並且都被歸類為 MerR 家族的一員，近期也有很多新的轉錄調節因子被陸續發現，而其中最讓人感興趣的就是微生物對金的調節系統了。

2007 年 Fernando C. Soncini⁶發表了一個新的 MerR 家族成員 GolS，被發現於鼠傷寒沙門氏菌 (*Salmonella typhimurium*) 的調節基因組 *gol* (Fig. 1-3)，而 GolS 調節蛋白可以調控並表現 *gol* 基因組的三組基因，分別為 *golT*、*golB* 和 *golS* 本身。

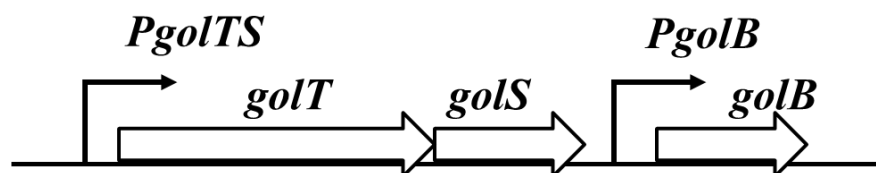


Fig. 1-3 *S. typhimurium* 染色體中的 *gol* 調節基因組。

除了鼠傷寒沙門氏菌 (*Salmonella typhimurium*) 含有 *gol* 調節金的基因組之外，耐金屬貪銅菌 (*Cupriavidus metallidurans*) 也有相似功能的基因組。除此之外，*C. metallidurans* 包含了多種重金屬抵抗基因組，使其能夠存活在含有重金屬污染的沉積物或是土壤中，所以在前面提到的生物礦化作用 (biomineralization) 中，此微生物扮演著重要的角色。2009 年 Chuan He⁷ 針對 *C. metallidurans* 調節金的基因組的研究，發表了調節基因組 *cup* 系統，

其基因組產生的調節蛋白 CupR 可以調控三組基因，分別為 *cupC* (可製造運輸並排解重金屬的蛋白 CupC)、*cupA* (可製造輸送重金屬的膜上蛋白 CupA)和 *cupR* 自己 (Fig. 1-4)⁷。另外，作者挑了來自三種不同微生物中的調節蛋白做基因序列的比較與檢視，分別為 *C. metallidurans* 對金離子的調節蛋白 CupR、*S. typhimurium* 對金離子的調節蛋白 GolS 和 *E. coli* 對銅離子的調節蛋白 CueR，這三種皆為 MerR 家族的調節蛋白 (Fig. 1-5)⁷。透過 Fig. 1-5 可以發現，三種不同的調控蛋白都有一段類似的金屬結合根 (metal binding root, MBL)，因為這些調控蛋白都是利用半胱氨酸 (cysteine) 上的硫基與金離子結合 (CueR 跟銅結合)，金屬於軟性金屬 (soft metal)，而金離子為軟性路易斯酸 (soft Lewis acid)，故能與軟性路易斯鹼 (soft Lewis base) 的硫基形成穩定的錯合物⁸。

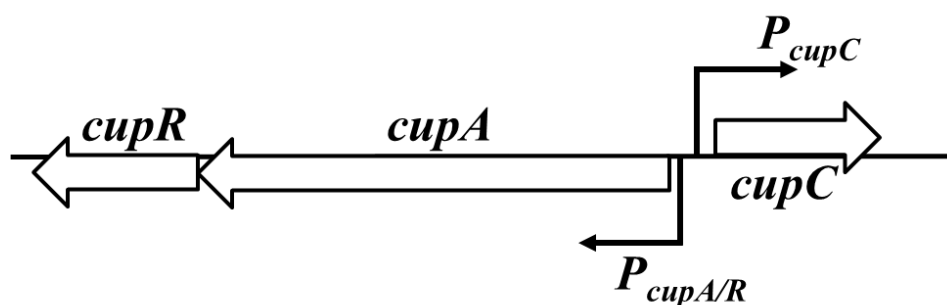


Fig. 1-4 *C. metallidurans* 染色體中，對金的調節基因組 *cup* 系統示意圖⁷。

	* MBL *
CueR	SCP G DD S AD C PIIENLS.....G.....
GolS	CCAGDALPD C PILHTLGQPDDSEPEARTGAVLRRPRRHGLAKR
CupR	ACTGDDRPD C PILSDMARAD. SE. D.....RPACHH
	112 120

Fig. 1-5 比較 CueR (*E. coli*)、GolS (*S. typhimurium*)和 CupR (*C. metallidurans*)的 C 端金屬結合根的辨識序列⁷。

1.3 金金屬微生物感測器 (microbial sensor of gold)

微生物基因工程的進步，讓微生物感測器可以取代一些毒化物的分析方法，目前這類的生物感測器已經被用來偵測幾個重金屬，包括汞、鉻、砷、鉛、鎳、鈷、鋅、金和銅。在微生物中，它們利用金屬反應轉錄的調節蛋白 (metal-responsive transcriptional regulator protein) 來控制體內的金屬離子濃度。MerR 家族的蛋白質則是最常見的一系列金屬調節蛋白，其中包括 CueR 為針對銅金離子的調節蛋白；MerR 為針對汞離子和 GolS 為針對金離子的調節蛋白等⁹。

2008 年，Peng R. Chen 和 Jing Zhao¹⁰ 利用此系統發展出針對重金屬金離子的微生物感測器 (Fig. 1-6A)，並利用紅色螢光蛋白 (red fluorescence protein, RFP) 當作訊號輸出 (output)，即可檢測螢光的強度並佐證此微生物感測器對金的敏感度以及專一性 (Fig. 1-6B)。

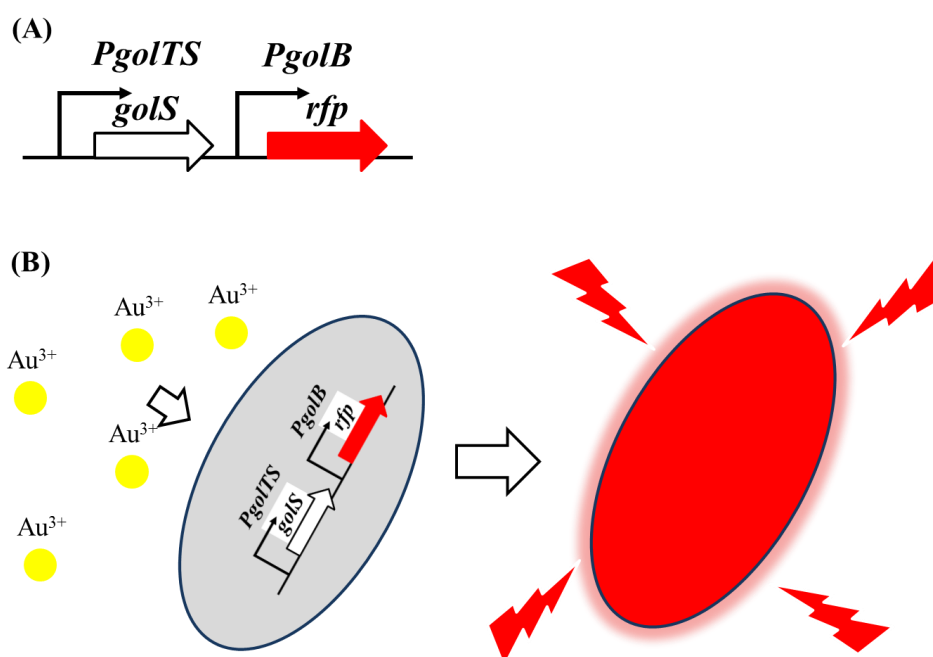


Fig. 1-6 設計質體後轉化到大腸桿菌 (*E. coli*) 做微生物金離子感測器。

(A) 參考 *S. typhimurium* 的 gol 調節基因組並利用基因工程的技術重新設計一個微生物感測器，在基因的下流植入紅色螢光蛋白的基因組當作訊號輸出後移植到大腸桿菌 (*E. coli*)。 (B) 為微生物金離子感測器示意圖¹⁰。

1.4 微生物宿主

發展微生物感測器，最重要的就是微生物本身，該使用哪一種微生物當作宿主？前面提到微生物金離子感測器的微生物宿主是選用大腸桿菌 (*Escherichia coli*)，因為大腸桿菌繁殖速度較快，只花半天的時間就可以觀察到結果，但是大腸桿菌本身對於金的毒性耐受性不是很好，所以 2008 年，Peng R. Chen 和 Jing Zhao¹⁰ 發展出來的重金屬金離子微生物感測器的金離子濃度只能到 20 μ M (Fig. 1-7)。

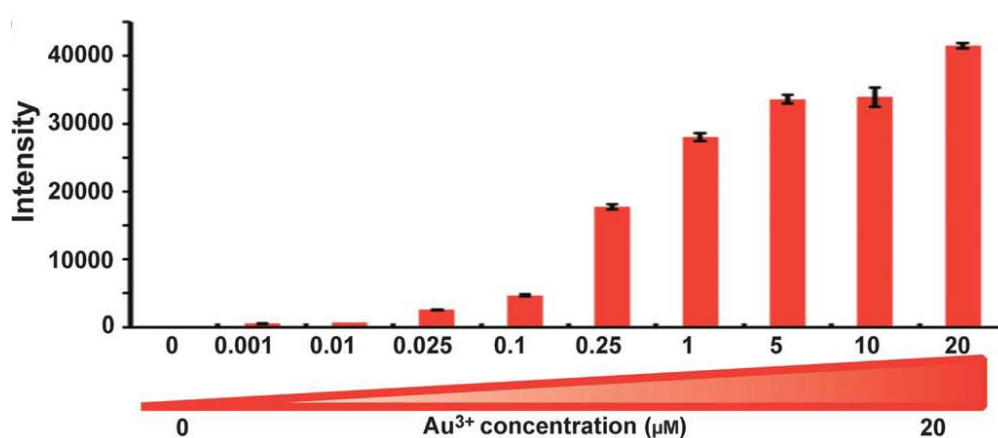


Fig. 1-7 利用微生物金離子感測器檢測金的濃度並藉由紅色螢光蛋白 (red fluorescence protein, RFP) 當作輸出圖¹⁰。

本實驗會採用除了大腸桿菌外，還會另外使用兩種微生物當作宿主，分別為耐金屬貧銅菌 (*Cupriavidus metallidurans*) 和青枯桿菌 (*Ralstonia eutropha*)。 *C. metallidurans* CH34 本身為一種土壤菌，此種微生物可以存活在較惡劣的環境中，尤其本身含有對金金屬耐受性的機制，可以提高對金的檢測濃度； *R. eutropha* H16 也是一種土壤菌且生物需求較簡單、繁殖快速與不具致病性，若應用在生物感測器上，無須擔心對操作人員健康上的危害，在之前的生物科技研究上也長期受到關注，如生物塑膠和生質能源的研究。用此兩種微生物當作宿主，在未來的應用上可以有較多選擇，

且對金的選擇性和靈敏性都相當好¹¹。

1.5 研究動機

一直以來，分析化學主要都是以傳統分析儀器來進行分析，但是這類的儀器不只是需要專業的人員操作，還需花費較多人力資源且過程費時，成本也相對較高，雖然有較高的準確率。近幾年，很多低成本、低人力且可即時觀測結果的生物感測器正在蓬勃的發展，而且這些生物感測器又有高專一性、高選擇性和高靈敏度優點，這些特性都是讓科學家不斷去鑽研並開發更精密的生物感測器的理由，希望未來在檢定一些簡單的有機物、重金屬或是毒化物時，能夠快速且便宜的篩檢。

重金屬一直是被環保所關注的議題，因為大多數的重金屬都是劇毒的，而且不管是自然界中存在的或是人為所製造的，重金屬一直存在於我們生活中，只要含量過多，就會造成生物體立即性的毒害。因此，管控重金屬儼然成為一個重要且緊急的一門技術，如果能夠透過結合微生物感測器技術，達到高效率且即時檢測的效果，便可以即時觀測並保護環境。

除了環保議題之外，可以將其應用在一些貴重金屬的探測，例如金這類高價值的原料；在工業上，亦能利用微生物感測器做為檢測金在沉澱物或是廢液中的含量，相較於利用傳統的分析法，成本跟時間就相對都節省不少，回收金的成本整也可以降低。

綜合上述，生物感測器（微生物感測器）相較於一般傳統的分析儀器，具有低成本且可即時觀測的優勢，使用上可以比傳統的儀器更方便，此外微生物感測器有高靈敏度和高專一性，可以明確地檢測出單一目標物。因此，發展微生物感測器是一個具有應用潛力的方向，不僅可以促進環境保育，還可以應用於工業用途！

1.6 研究目標

微生物感測器的重要，從前面的章節就不斷的被討論，尤其是針對貴重金屬的檢測方面，希望有更多元的發展，所以本實驗會與前面文獻中發展出來的重金屬金離子感測器類似，不過不同於前面文獻所使用針對金離子的感測系統，是源自於鼠傷寒沙門氏菌 (*Salmonella typhimurium*)對金的調節基因組 *gol* (Fig. 1-3)，本實驗是採用耐金屬貪銅菌 (*Cupriavidus metallidurans*)對金的調節基因組 *cup* (Fig. 1-4)作為重金屬金離子感測器。接著就是將此系統仿造 Fig. 1-6 或是設計成其他的模式的質體，接著將其植入微生物體內，並且運用於檢測金離子的濃度。

這次實驗會用三種不同的微生物作為宿主，分別為大腸桿菌 (*E. coli*)、耐金屬貪銅菌 (*C. metallidurans*)和青枯桿菌 (*R. eutropha*)，並針對各個微生物金離子感測器的專一性、靈敏度 (最低濃度檢測極限)、選擇性 (干擾性實驗)和耐受度做一連串深入的研究並探討。

第二章 實驗藥品與器材

2.1 實驗儀器

名稱 (中文)	名稱 (英文)	廠牌
高速冷凍多用途離心機	Centrifuge(Refrigerated)	Hettich
數位顯示型乾浴器	Dry Bath	Basic Life
離心機	High-Performance Micro-Centrifuge	WiseStir
螢光數位影像照膠系統	Image Analysis System	SmartGel™
低溫迴轉式振盪培育箱	Low Temperature Orbital Shaking Incubator	YIHDER
電泳槽	Mini Horizontal Gel Electrophoresis System	Major Science
多功能盤式分析系統	Multi-Mode Microplate Reader	BioTek
光學顯微鏡	Optical Microscope	ZEISS
恆溫迴轉式振盪培育箱	Orbital Shaking Incubator	Firstek
酸鹼度測試儀	pH Meter	CLEAN
四位數分析天平	Uni Bloc Electronic Balance	Shimadzu
二位數精密天平	Uni Bloc Electronic Balance	Shimadzu
熱循環儀主機	Thermal Cycler	Arktik™
多功能試管振盪器	Vortex	Scientific Industries
精密恆溫水槽	Water Bath	Firstek

2.2 實驗藥品

名稱 (中文)	名稱 (英文)	廠牌
瓊脂	AGAR	Zymeset
瓊脂糖	Agarose	Zymeset
氯化銅	Copper(II) chloride, anhydrous	Acros Organics
二甲基砜	Dimethyl sulfoxide (DMSO)	AMRESCO
溴化乙啶	Ethidium bromide (EtBr)	AMRESCO
乙烯二胺四醋酸二鈉	Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate (EDTA)	Fluka Chemie (Sigma)
甘油	Glycerol	Zymeset
硫酸健大黴素	Gentamycin sulfate	Zymeset
三水合四氯金酸	Hydrogen tetrachloroaurate(III) trihydrate	Acros Organics
三氯化鐵	Iron(III) chloride	Acros Organics
硫酸卡那黴素	Kanamycin sulfate	Zymeset
LB 培養基	LB Broth Miller (Lysogeny Broth or Luria-Bertani Medium)	Zymeset
六水合硫酸鎳	Nickel(II) sulfate hexahydrate	Acros Organics
磷酸鹽緩衝液	10X PBS Buffer	BasicLife Bioscience

(Phosphate buffered
saline)

硝酸銀

Silver(I) nitrate

Acros Organics

二氯化鋅

Zinc(II) Chloride

Acros Organics

第三章 實驗方法

3.1 微生物感測器的設計

3.1.1 質體設計

前述提到，我們可以仿製 Peng R. Chen 和 Jing Zhao¹⁰ 所設計出來的質體 (Fig.1-6A)，也可以參考耐金屬貪銅菌 (*Cupriavidus metallidurans*) 對金的調節基因組 *cup* (Fig. 1-4) 的排序，設計出以下兩種質體 (Fig. 3-1)。

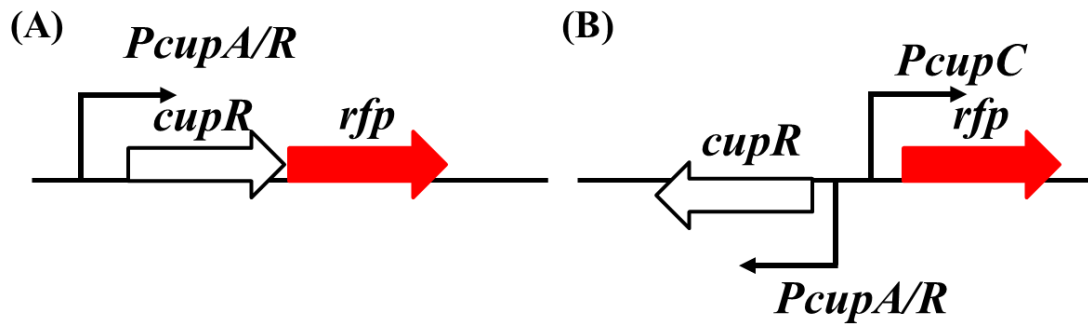


Fig. 3-1 質體設計

(A)仿製前面重金屬金離子微生物感測器的模型，並用紅色螢光蛋白當作訊號輸出。(B)仿製原生菌種耐金屬貪銅菌 (*Cupriavidus metallidurans*) 對金的調節基因組 *cup* 的排序所設計出來的重金屬金離子微生物感測器，並用紅色螢光蛋白當作訊號輸出。

透過 Fig. 3-1 的兩個圖，可以推測此微生物金離子感測器的機制。CupR 為轉錄活化因子 (transcriptional activator)，經由 *cupR* 調節基因轉錄轉譯出來的蛋白質，其形態會以二聚體的形式存在 (Fig. 3-2)。當 CupR 蛋白碰到金離子時，其蛋白質上的金屬結合根 (metal binding loop) 會和金離子配位而形成錯合物，然後會以錯合物的形式跟啟動子結合，造成了啟動子的結構改變而促使聚合酶開始轉錄 (可參考 Fig. 1-2B)，開始產生紅色螢光蛋白

(RFP)，再透過 Multi-Mode Microplate Reader 作螢光強度的分析。

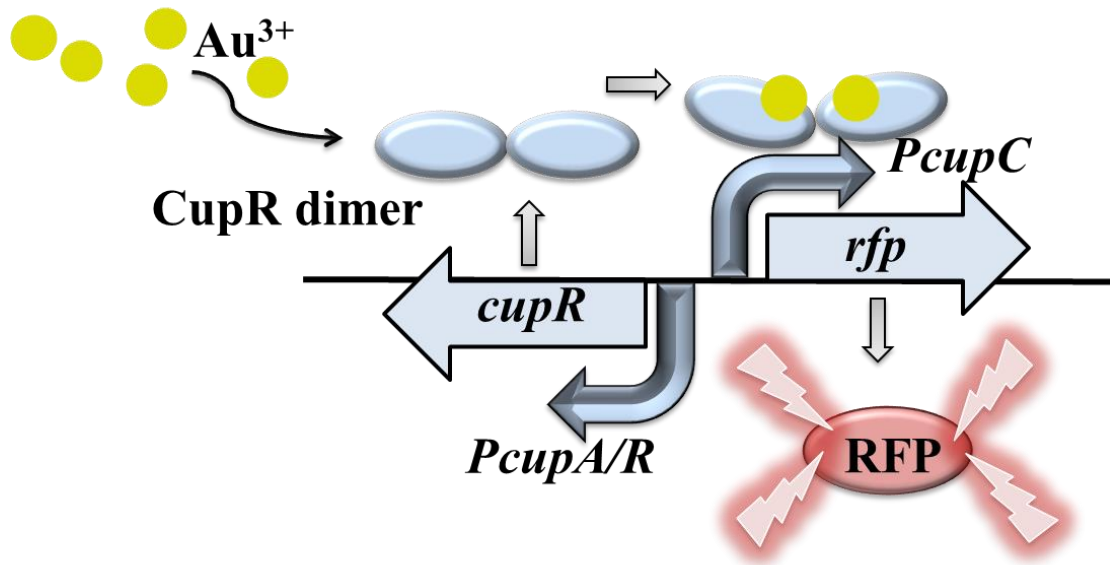


Fig. 3-2 微生物金離子感測器的反應機制¹¹。

3.1.2 質體基因工程 (cloning)

首先，將設計好的質體開始以基因工程的方式，將每個部份的基因組合起來，其過程會經過選育、篩選、定序最後儲存。

A. 選育

1. 引子 (primer)

透過網路尋找要 cloning 的目標物基因，並將其基因序列取前端 (5 端) 和後端 (3 端) 設計成 20~30 bp 長的引子 (primer) 後，再委外以人工方式合成。

以下 **Table 3-1** 為本實驗用到的引子：

Primers	Sequence
rfp_NdeI fw	TTTTCATATGgcgagtagcgaagacgttatcaaaga
rfp_BamHI rv	TTTTGGATCCttaagcaccggtggagtg
cupR_EcoRI fw	TTTTGAATTCtagtgatggcaggccggcg
cupR_BglII rv	TTTTAGATCTattagtgatggcaggccggcg
PcupR_EcoRI fw	TTTGAATTCaatccttgacctccaatggtgtaaggttcacagtgc agttgtcgcgctccgctcagattccacgactccgatgaacatcggaga agccgcgg
PcupR_BglII rv	TTTTAGATCTtgcgctgctgactcaacaaat
cupR(rev)_EcoRV fw	TTTGATATCtagtgatggcaggccggg
cupR(rev)_EcoRI rv	TTTGAATTCatgaacatcggagaagccgcgg
PcupCR_EcoRI fw	TTTTGAATTCggagtcgtggaatctgagcgacg
PcupCR_BglII rv	TTTTAGATCTggtgatgactcctgttggttgatcg
cupC_BamHI fw	TTTTGGATCCttaagaaggagatatacatatgatccagttccaagt cgaagg
cupC_XhoI rv	TTTTCTCGAGtcagcttgccgacttgaccg
cupA_BamHI fw	TTTTGGATCCttaagaaggagatataatgacctcctgccgat ctctc
cupA_BamHI rv	TTTTGGATCCttaaatcattgcgttacctccttggtgcc

Table 3-1 引子的名稱和序列。

2. 基因片段 (insert)

透過 PCR 儀器進行聚合酶連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction)，其中引子 (primer) 結合目標基因片段的前端及後端，引導 DNA 聚合酶開

始 DNA 的合成，並且能快速又大量的得到目標基因片段。

接著使用洋菜膠配置膠體，做膠電泳分析來分離 DNA 片段大小（在這裡是要確認 PCR 之後的目標基因片段是否有成功），最後透過 DNA 比對尺 (Ladder) 找出目標基因片段後，將其分離並純化。

膠電泳分析之後切下來的膠體，使用 Geneaid™ Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit 將含有目標基因片段的膠體純化並最後加入純水 (ddH₂O) 回收目標基因片段，可將其保存於 4°C or -20°C 的環境。

3. 載體 (vector)

取一個含有質體的大腸桿菌 (含有 Kanamycin 的基因)，將其長於培養液 Luria-Bertani medium (LB medium) 6mL 並加入 1% 的 Kanamycin (Kan)，再將其培養於 37°C 的培養箱並以 250 rpm 轉速培養隔夜。

隔日，使用 Presto™ Mini Plasmid Kit 純化菌液的質體，最後總共加入 30μL 的純水 (ddH₂O) 得到質體並保存於 4°C or -20°C 的環境。

4. 裁減 (digestion)

第二型限制內切酶 (Type II restriction enzyme) 會辨認目標基因中的特定序列，並水解核苷酸之間的磷酸二酯鍵，產生平整或是粘性端切口。

將上述載體和 PCR 出來的目標基因片段，於 37°C 的培養箱以相同的限制酶裁減約 2~4 小時後，再使用 Geneaid™ Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit 純化出載體及目標基因片段，最後可得到有相同的缺口的載體和目標基因片段，緊接著進行連接酶作用反應 (ligation)。

5. 連接作用 (ligation)

使用連接酶 (ligase)將裁切好的載體和目標基因片段一起反應並置於室溫約 1~2 小時，使載體和目標基因片段可以結合，形成新的完整質體。

6. 轉化 (transformation)

透過轉化作用可以將質體植入微生物體內，使微生物獲得額外的遺傳物質。將剛剛接合作用完的質體，利用轉化作用，將其植入大腸桿菌體內，在塗上含有 Kanamycin 抗生素的培養基上，置於 37°C 的培養箱培養至隔夜。

B. 篩選 (screen)

經由轉化作用得到質體的微生物，會先經過 Kanamycin 抗生素的篩選後，才會生成一個一個的菌落 (colony)，但為了更精準地確認此菌落的微生物是否含有完整的質體，我們會再透過載體和目標基因片段的各擇一端引子來做 PCR 及膠電泳分析，透過這樣的檢查，可以更加確定實驗的完成。

C. 定序

將篩選過後的菌落或是將其質體抽出後，將其和可以包含目標基因片段的引子 (前端或是後端皆可)送至生技公司進行定序，再將定序後的結果作比對，查看否是是接合正確的質體。

D. 儲存 (glycerol stock)

整個實驗完成後，將正確的菌落長於培養液中並包含 1% 的 Kanamycin (Kan)，培養於 37°C 的培養箱並以 250 rpm 的轉速培養隔夜。

隔日，取 700 μ L 的菌液並混合 300 μ L 的甘油 (glycerol)於保存管中，在儲存於-80°C 中。甘油的在低溫中能避免水結冰，使得微生物不會死亡，

而且低溫可降低細胞活性，延長保存的時間。

E. 接合作用 (conjugation)

將完成的質體，透過轉化作用到大腸桿菌的另外一種菌株 *E. coli* S17，此菌株的細菌表面含有線毛（性菌毛，pilus），透過此線毛與其他菌的膜結合，菌與菌之間建立了一道細胞質的橋樑，可將自身所帶的質體基因透過此橋樑傳到另外一個菌的質內 (**Fig. 3-3**)。當其他菌透過此方法得到新的質體基因時，也可以獲得質體的功能（如抗藥性或蛋白質表現等）。

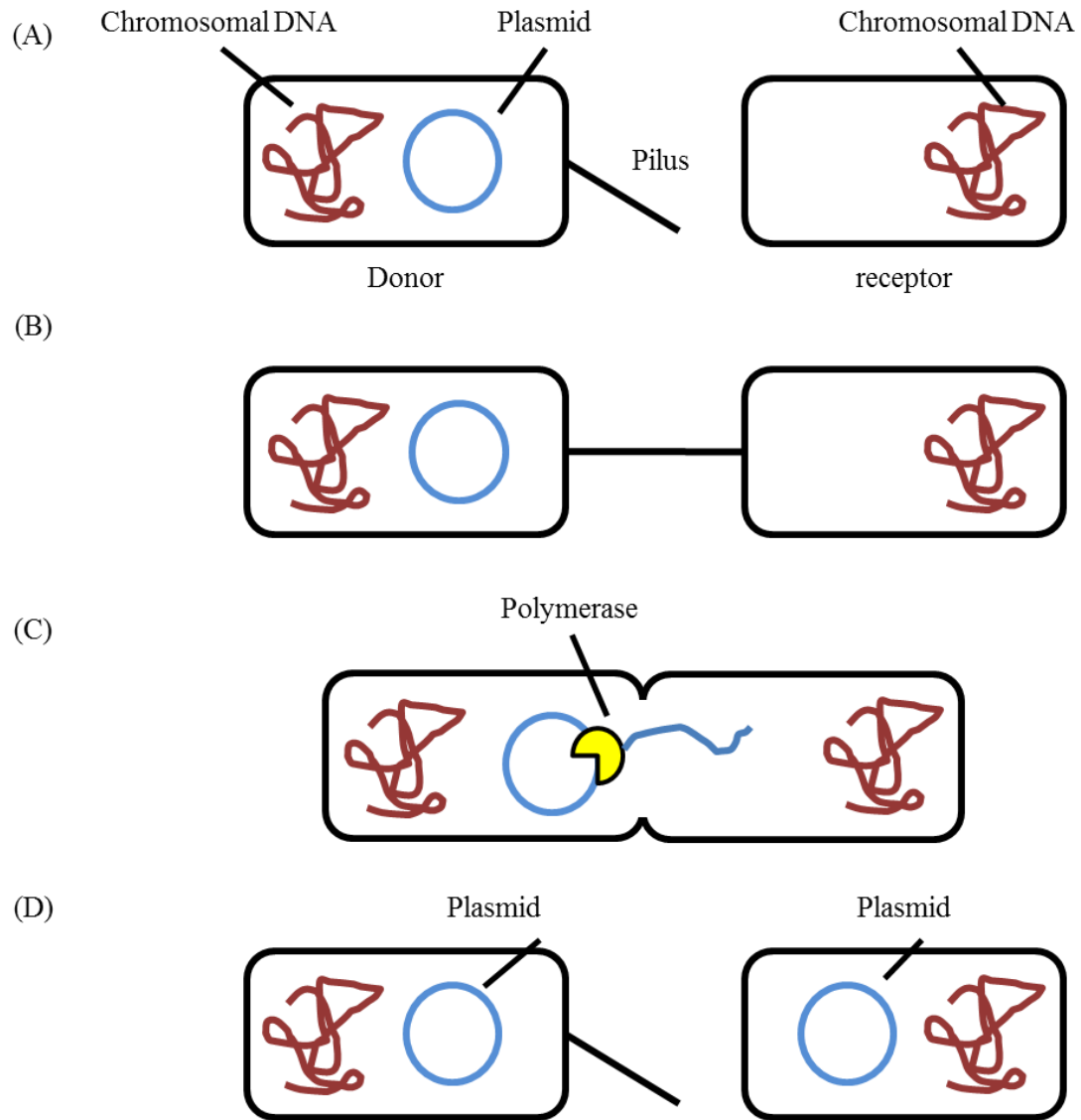


Fig. 3-3 接合作用的示意圖。

(A)一個帶有質體的細菌 *E. coli* S17 菌株為提供者，而另外一個細菌 (*C. metallidurans* 或 *R. eutropha*)則為接受者。(B)線毛開始與另一個細菌的膜結合。(C)兩菌之間建立了直通細胞質的橋樑，並透過聚合酶開始複製質體並轉移到接受者。(D)最後兩個菌都擁有質體。

3.2 實驗步驟

每當要做一系列的檢測實驗時，必須先將儲存在 -80°C 的菌拿出來，並用接種棒或是微量滴管尖 (tip)取一點劃在培養皿上 (含有抗生素)，最後放入 37°C 的培養箱裡到隔天。

隔日，再從培養皿上取一個菌落，培養於 3mL 的培養液中 (LB)並加 1%的抗生素 Kanamycin (若是 *C. metallidurans* 或 *R. eutropha* 則加抗生素 Kanamycin 和 Gentamycin)，接著培養於 37°C 的培養箱並以 250 rpm 的轉速培養至隔夜。

隔天，取原本的菌液 2% 加到新的且含有抗生素的培養液中，此過程為稀釋 (dilution)，依照不同實驗的需求稀釋不同數量的試管，並透過 Multi-Mode Microplate Reader 檢測生長的 OD 值 (波長 600nm 的吸收度，可做為微生物生長指標)，大腸桿菌約在 4 小時 OD600 為 0.4~0.6 之間 (若是 *C. metallidurans* 或 *R. eutropha* 則是 6 小時)。

3.2.1 專一性 (specificity)

此實驗目的為了佐證微生物感測器的系統是否只針對金離子有專一性。將放到隔天的待測菌液稀釋後，放入 37°C 的培養箱並以 250 rpm 培養 4 小時 (若是 *C. metallidurans* 或 *R. eutropha* 則是 6 小時)後，加入待測物金屬離子 (inducer)。

本實驗共有 0、50 和 100 μM 的 Au^{3+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ni^{2+} 及 Fe^{3+} ，各試管加入待測金屬離子之後，再培養於 37°C 的培養箱並以 250 rpm 培養 24 小時。之後觀察紅色螢光的強度與金屬的關係，並用 Multi-Mode Microplate Reader 檢測螢光的強度以及生長的 OD 值，分別比較各個金屬鹽類與微生物感測器所發出的螢光關係。

3.2.2 干擾性 (interference)

此實驗目的是為了佐證微生物感測器的系統在環境中不同的金屬離子干擾下，對金離子有無選擇性 (selective) 和專一性。將放到隔天的待測菌液稀釋後，放入 37°C 的培養箱並以 250 rpm 培養 4 小時 (若是 *C. metallidurans* 或 *R. eutropha* 則是 6 小時) 後，加入待測物金屬離子 (inducer)。

本實驗共有 4 個不同濃度的 Au^{3+} 溶液 (0、0.1、0.5 和 25 μM)，並在各個濃度中分別加入其他重金屬離子 (50 μM 的 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ni^{2+} 及 Fe^{3+})，分別有 Au^{3+} 、 $\text{Au}^{3+} + \text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Au}^{3+} + \text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Au}^{3+} + \text{Ni}^{2+}$ 、 $\text{Au}^{3+} + \text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Au}^{3+} + \text{Ag}^{+}$ 和 Au^{3+} 加所有的重金屬離子，再培養於 37°C 的培養箱並以 250 rpm 培養 24 小時，用 Multi-Mode Microplate Reader 檢測螢光的強度以及生長的 OD_{600} ，接著將螢光的強度除以 OD_{600} 值的比率相互比較，觀察是否在含有其他金屬離子下會干擾微生物感測器的準確性和專一性以判別此微生物感測器的選擇性是否良好。

3.2.3 耐受性 (tolerance)

此實驗可以佐證微生物感測器的系統對於高濃度金離子的偵測極限。將放到隔天的待測菌液稀釋後，放入 37°C 的培養箱並以 250 rpm 培養 4 小時 (若是 *C. metallidurans* 或 *R. eutropha* 則是 6 小時) 後，加入待測物金離子 (inducer)。

這次實驗主要是以 Au^{3+} 的濃度由小到大來測試微生物感測器的系統可以偵測的最高濃度極限，也就是微生物可以存活於含有多少金離子濃度的環境下不會死亡，另外測量紅色螢光蛋白的強度可以到多高。依照不同濃度的 Au^{3+} (0~200 μM) 稀釋於培養液中，再培養於 37°C 的培養箱並以 250 rpm 培養 24 小時，用 Multi-Mode Microplate Reader 檢測螢光的強度以及

生長的 OD_{600} ，再將螢光的強度除以 OD_{600} 值的比率檢視劑量反應 (dose-response) 曲線的關係，觀察微生物感測器的效率和最大檢測的範圍。

3.2.4 靈敏度 (sensitivity)

此實驗目的是為了佐證微生物感測器的系統對於低濃度金離子的偵測極限。將放到隔天的待測菌液稀釋後，放入 37°C 的培養箱並以 250 rpm 培養 4 小時 (若是 *C. metallidurans* 或 *R. eutropha* 則是 6 小時) 後，加入待測物金離子 (inducer)。

本實驗主要是以趨近於零的 Au^{3+} 濃度並檢視微生物感測器的系統可以偵測的最低濃度極限，依照不同濃度的 Au^{3+} ($0\sim 1\mu\text{M}$) 稀釋於培養液中，再培養於 37°C 的培養箱並以 250 rpm 培養 24 小時，用 Multi-Mode Microplate Reader 檢測螢光的強度以及生長的 OD_{600} 值，再將螢光的強度除以 OD_{600} 值的比率作劑量反應曲線的圖，再從中找出線性並用線性回歸 (linear regression) 的數值來佐證此微生物感測器的準確率，此外還可利用公式求出最低濃度極限。

3.2.5 最低偵測極限 (limit of detection, LOD)

為了探討微生物金離子感測器偵測金離子濃度的靈敏度，我們會利用最低偵測極限 (limit of detection, LOD) 來找出感測器的最小值，並使用公式 $\text{LOD} = K \times \text{SD} / S$ 來計算； $K = 3$ (依據 IUPAC 建議， $K = 3$ 其準確率高於 90%)，SD 為空白試劑的標準差值，S 則為校正曲線的斜率。

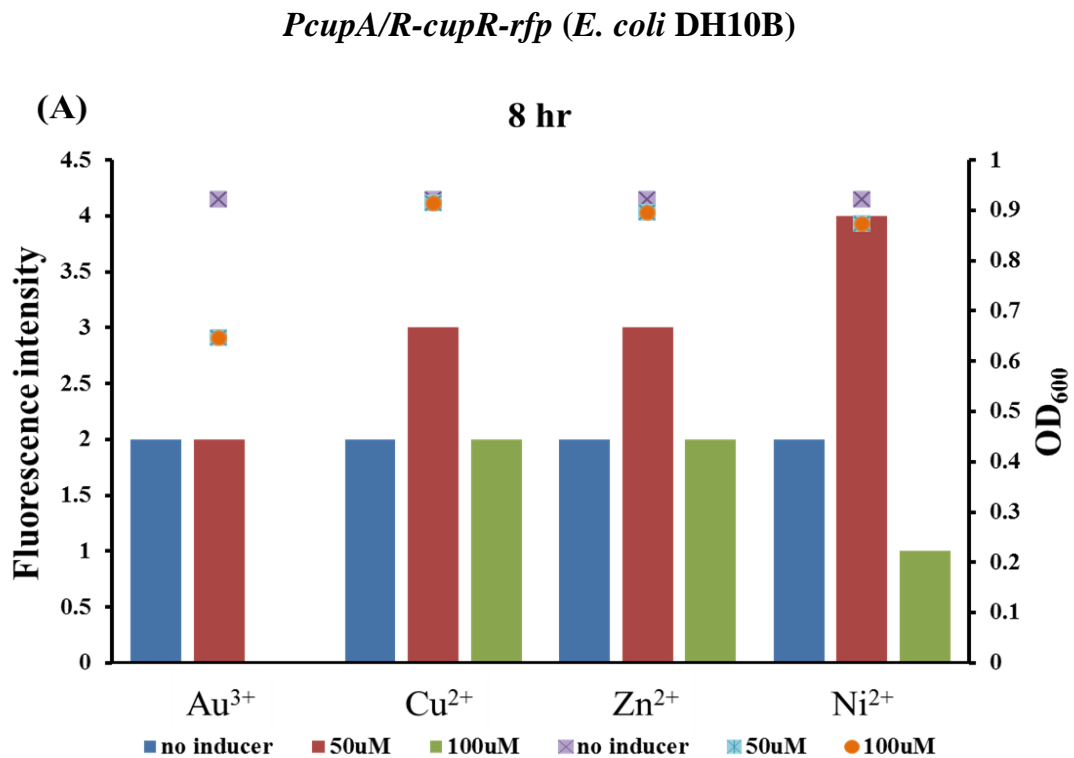
第四章 實驗結果與討論

4.1 微生物金離子感測器之篩選

利用微生物金離子感測器對金離子的專一性，找出最佳的條件。首先，先找出效果最明顯的時間，也就是螢光強度跟生長的OD值最好的時間點，接著區分出效果較明顯的質體基因組配上宿主的組合，最後再用 Multi-Mode Microplate Reader 檢測螢光的強度以及生長的 OD₆₀₀ 值，並作圖比較出較適合做為微生物金離子感測器的組合。

4.1.1 質體 *PcupA/R-cupR-rfp* 和宿主組合之金離子篩選

組合一：Fig. 3-1 (A) 的質體配上不同宿主之組合 (*E. coli*、*C. metallidurans* 和 *R. eutropha*)。



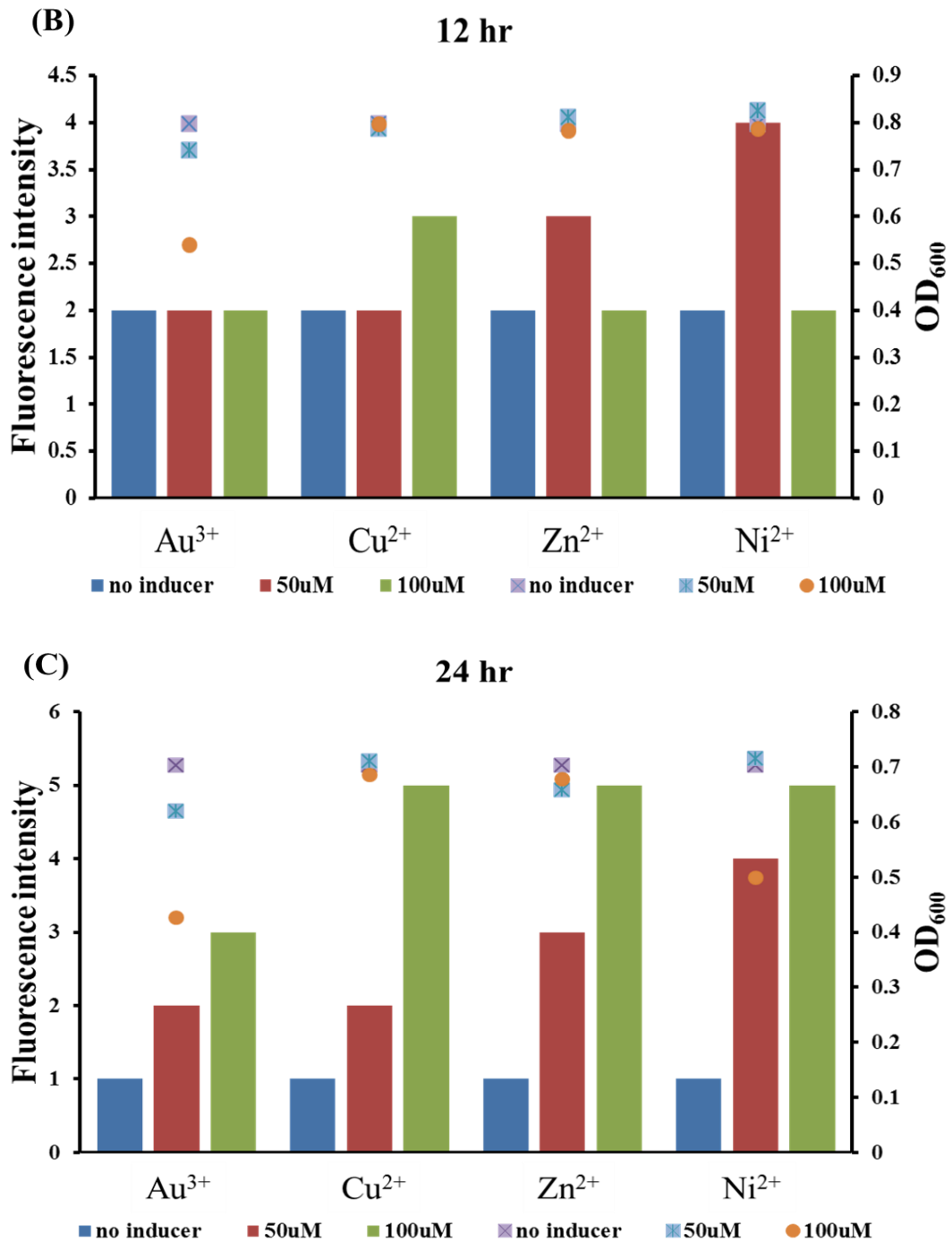
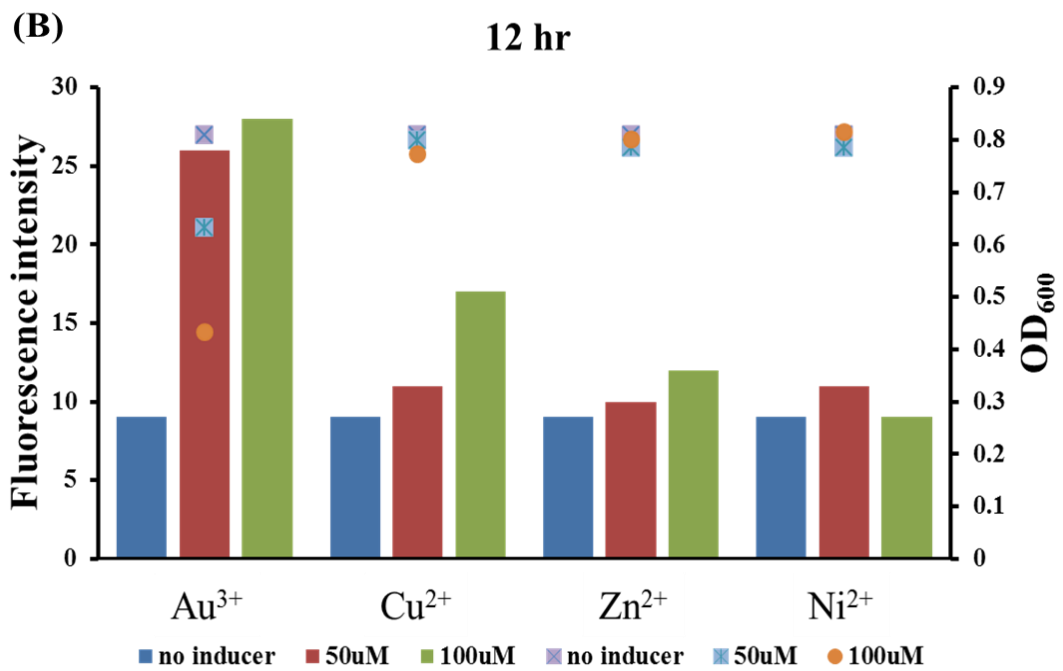
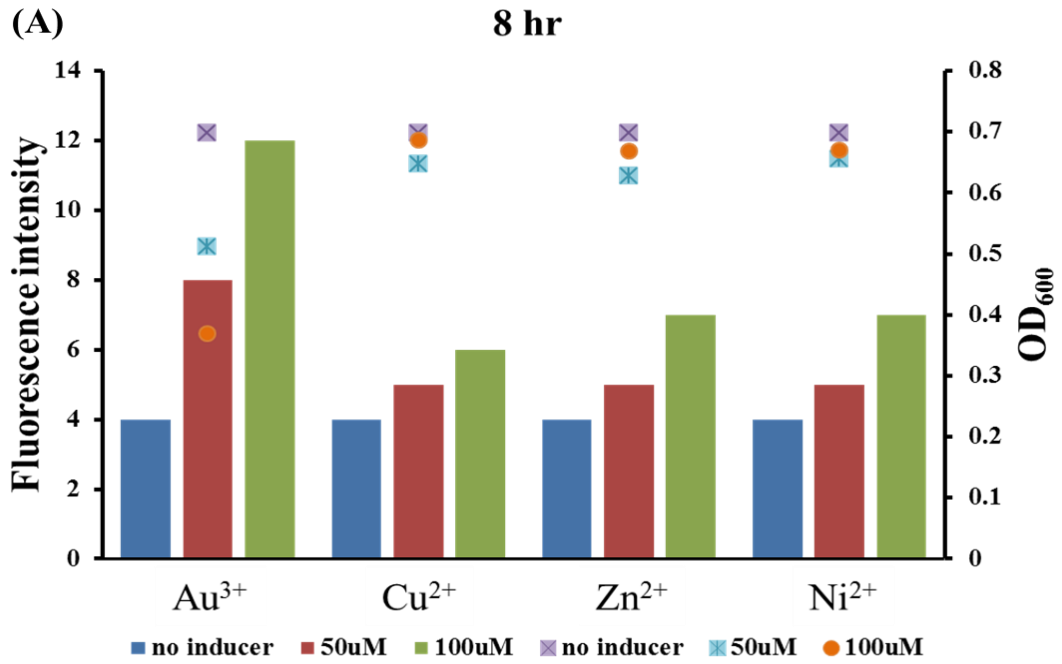


Fig. 4-1 各加入四種不同金屬並分別為 0、50、100 μ M 的濃度於 *E. coli* DH10B 的培養液中。

分別在 (A)8 小時、(B)12 小時和 (C)24 小時，用 Multi-Mode Microplate Reader 檢測螢光的強度以及生長的 OD 值。

PcupA/R-cupR-rfp (*C. metallidurans* CH34)



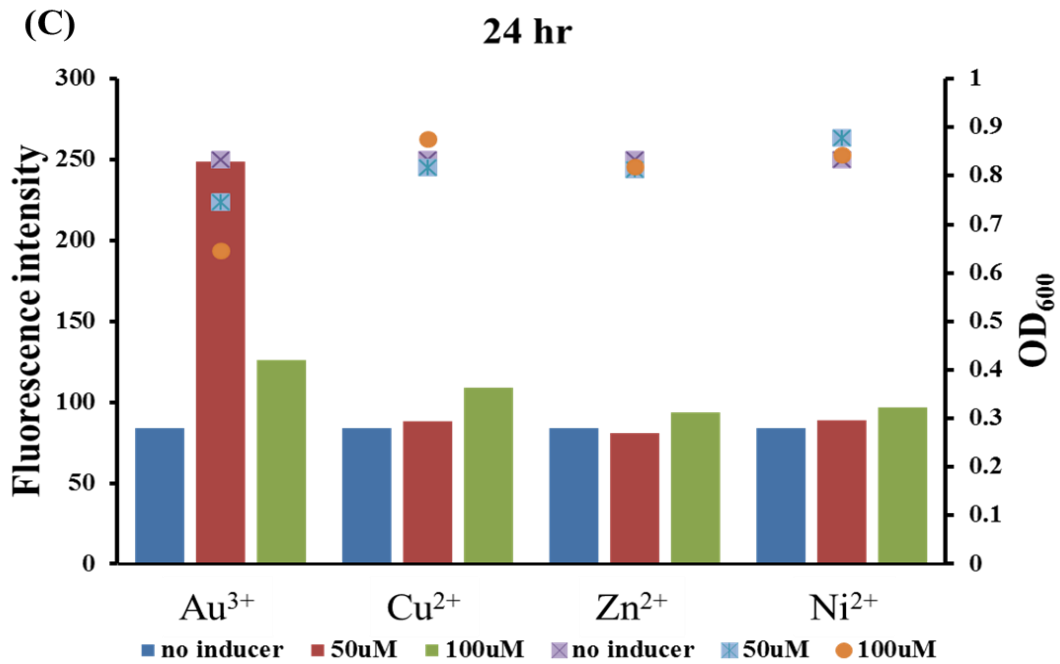
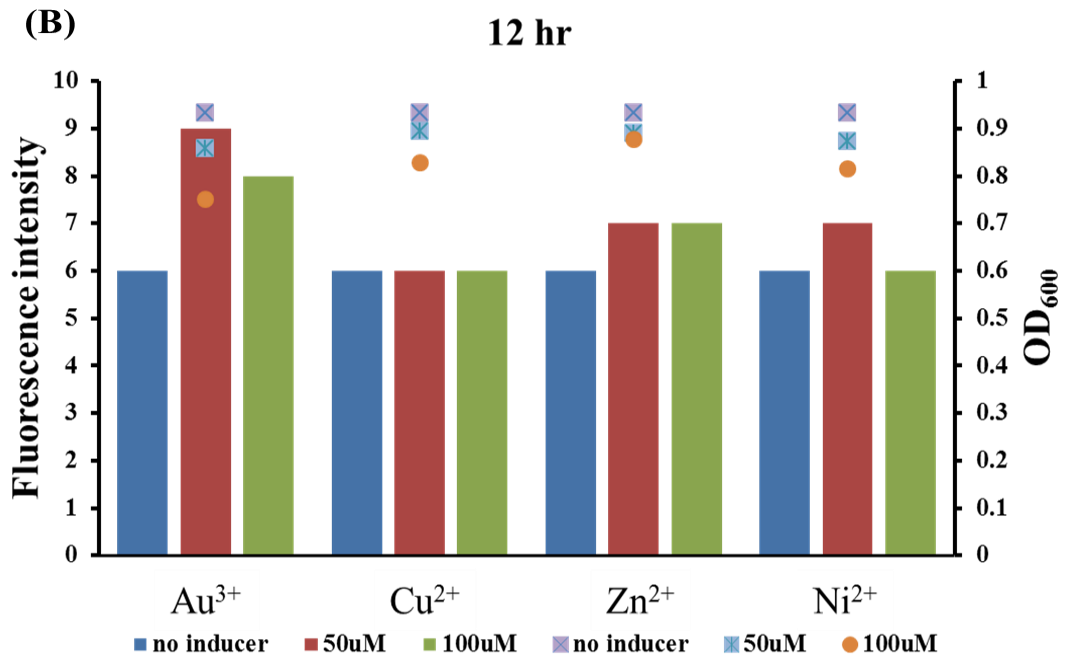
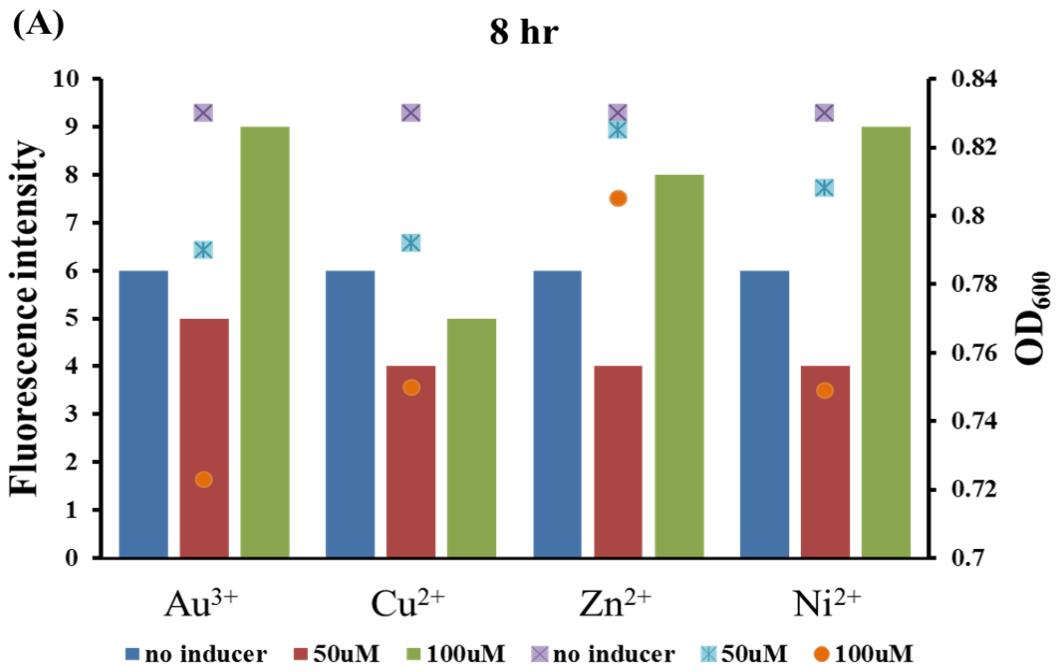


Fig. 4-2 各加入四種不同金屬並分別為 0、50、100 μ M 的濃度於 *C. metallidurans* CH34 的培養液中。

分別於 (A)8 小時、(B)12 小時和 (C)24 小時，用 Multi-Mode Microplate Reader 檢測螢光的強度以及生長的 OD 值。

PcupA/R-cupR-rfp (*R. eutropha* H16)



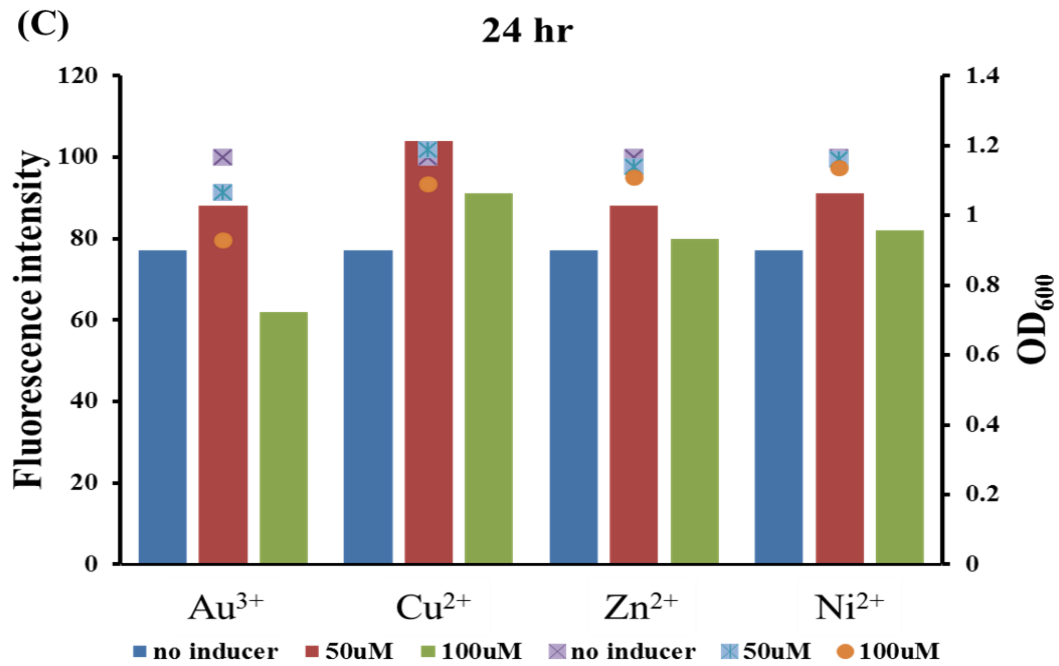
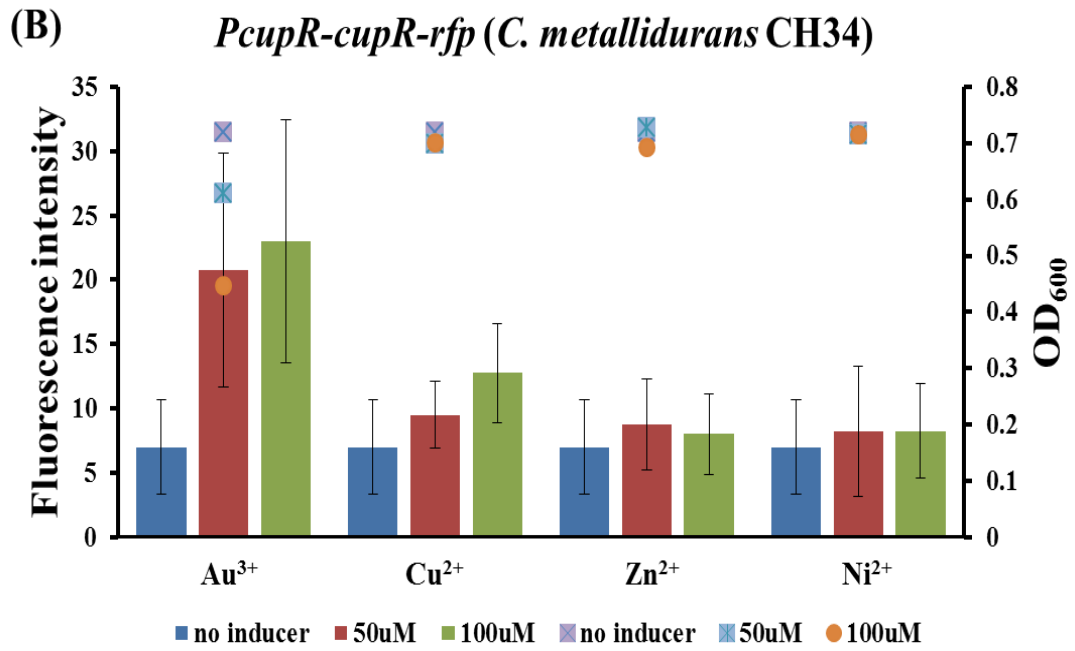
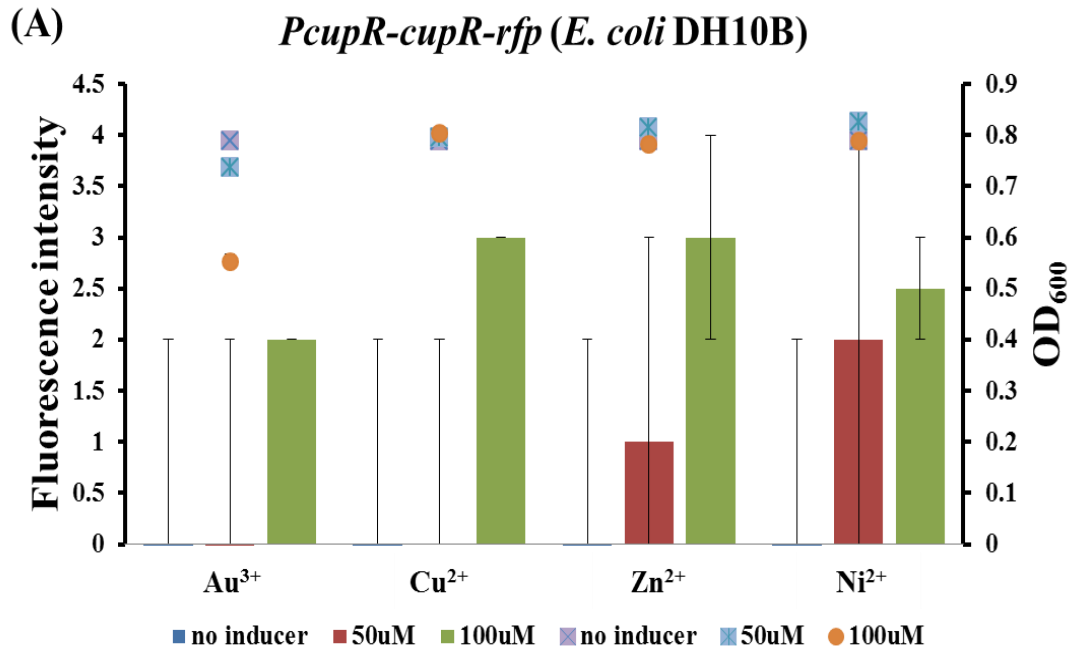


Fig. 4-3 各加入四種不同金屬並分別為 0、50、100 μ M 的濃度於 *R. eutropha* H16 的培養液中。

分別於 (A)8 小時、(B)12 小時和 (C)24 小時，用 Multi-Mode Microplate Reader 檢測螢光的強度以及生長的 OD 值。

經過簡單的測試之後發現，當金屬離子和微生物感測器一起培養 24 小時可得到最佳的值，故我們在做一次實驗並做三重複取誤差值，時間則再比較 12 和 24 小時。

PcupA/R-cupR-rfp 12hr



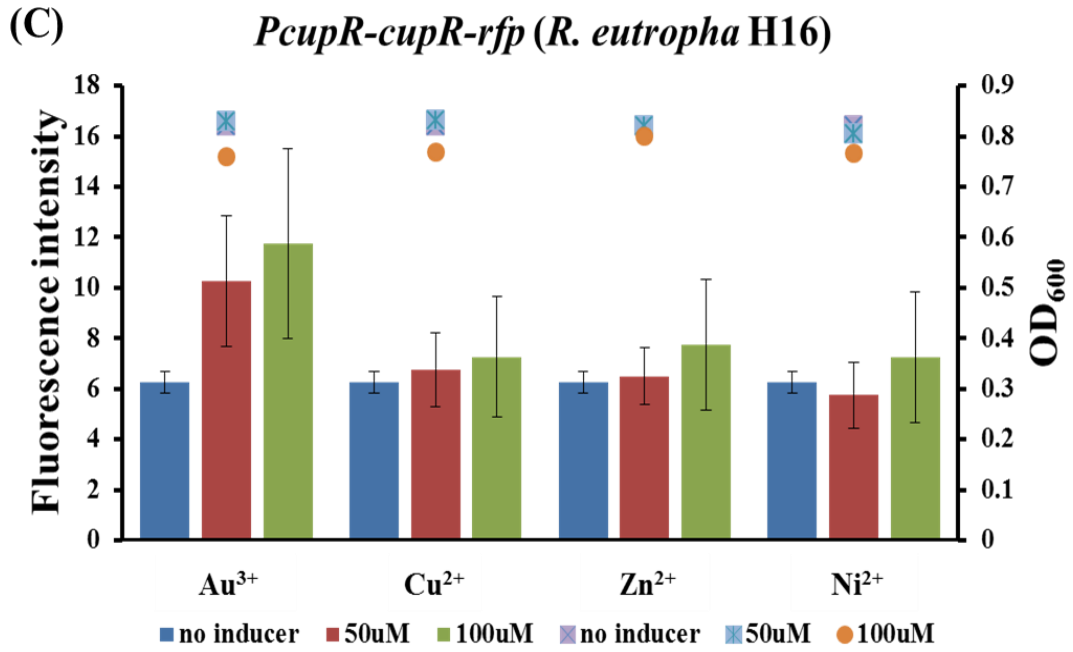
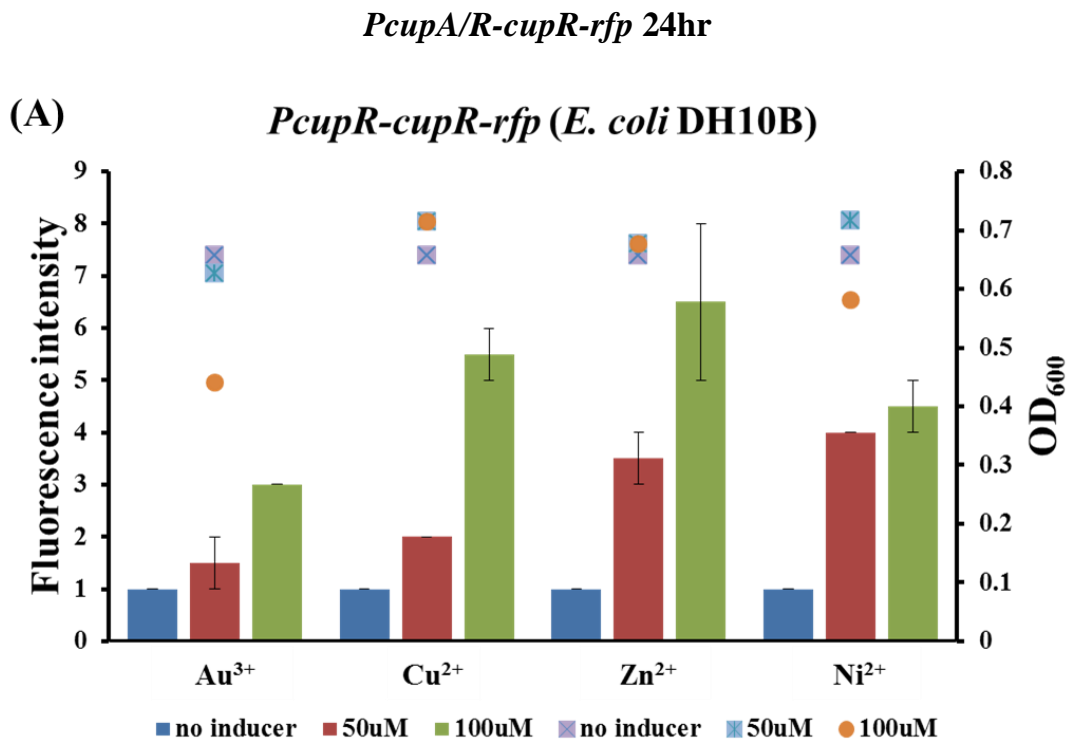


Fig. 4-4 各加入四種不同金屬並分別為 0、50、100 μ M 的濃度在於 12 小時之後比較三個不同微生物宿主的專一性。

(A) *E. coli* DH10B (B) *C. metallidurans* CH34 (C) *R. eutropha* H16。



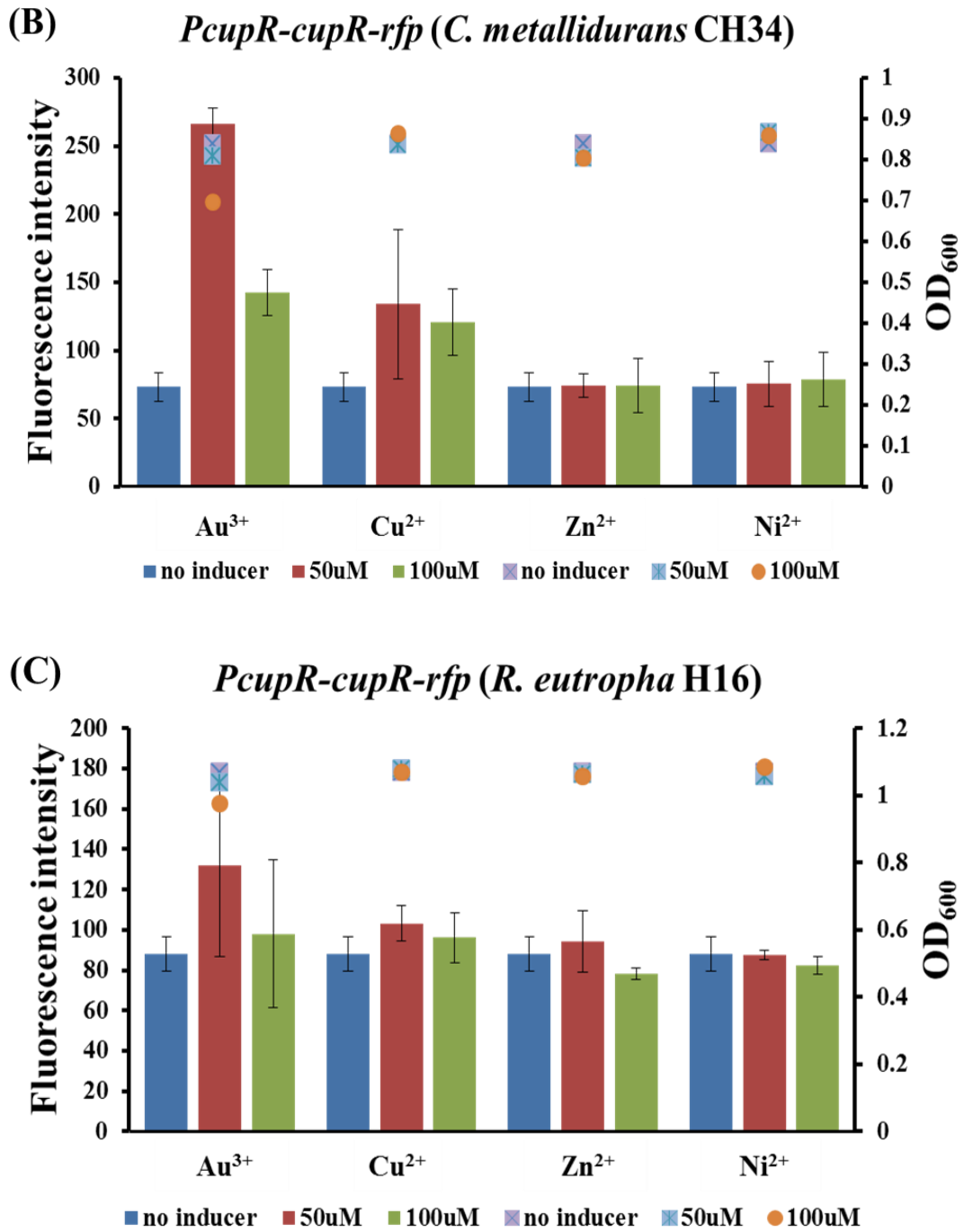


Fig. 4-5 各加入四種不同金屬並分別為 0、50、100 μ M 的濃度於 24 小時之後比較三個不同微生物宿主的專一性。

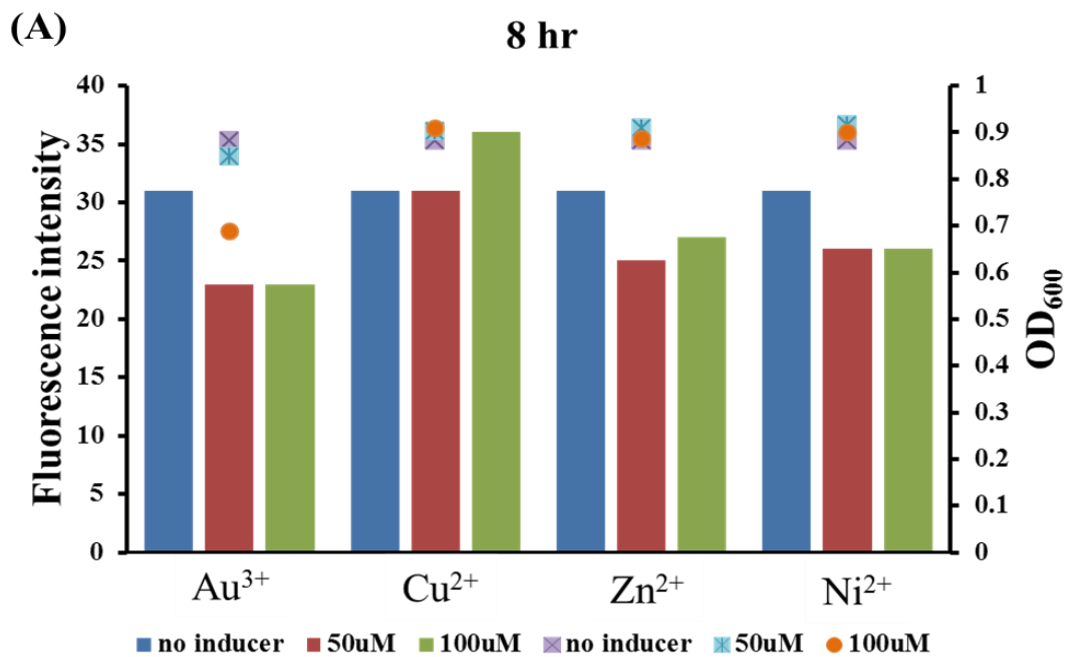
(A) *E. coli* DH10B (B) *C. metallidurans* CH34 (C) *R. eutropha* H16。

從 *PcupA/R-cupR-rfp* 的質體基因組和宿主搭配的專一性實驗中可以發現，當宿主為 *C. metallidurans* 的時候，效果看似還不錯，但是其易受銅離子的干擾，導致不只對金的會產生紅色螢光，這樣會減低金離子感測器探測金離子的效率，接下來，我們換另一組質體基因組 **Fig. 3-1(B)**，重複一樣的專一性實驗。

4.1.2 質體 *cupR(rev)-PcupA/R-PcupC-rfp* 和宿主組合之金離子篩選

組合二：**Fig. 3-1 (B)**的質體配上不同宿主之組合 (*E. coli*、*C. metallidurans* 和 *R. eutropha*)。

cupR(rev)-PcupA/R-PcupC-rfp (*E. coli* DH10B)



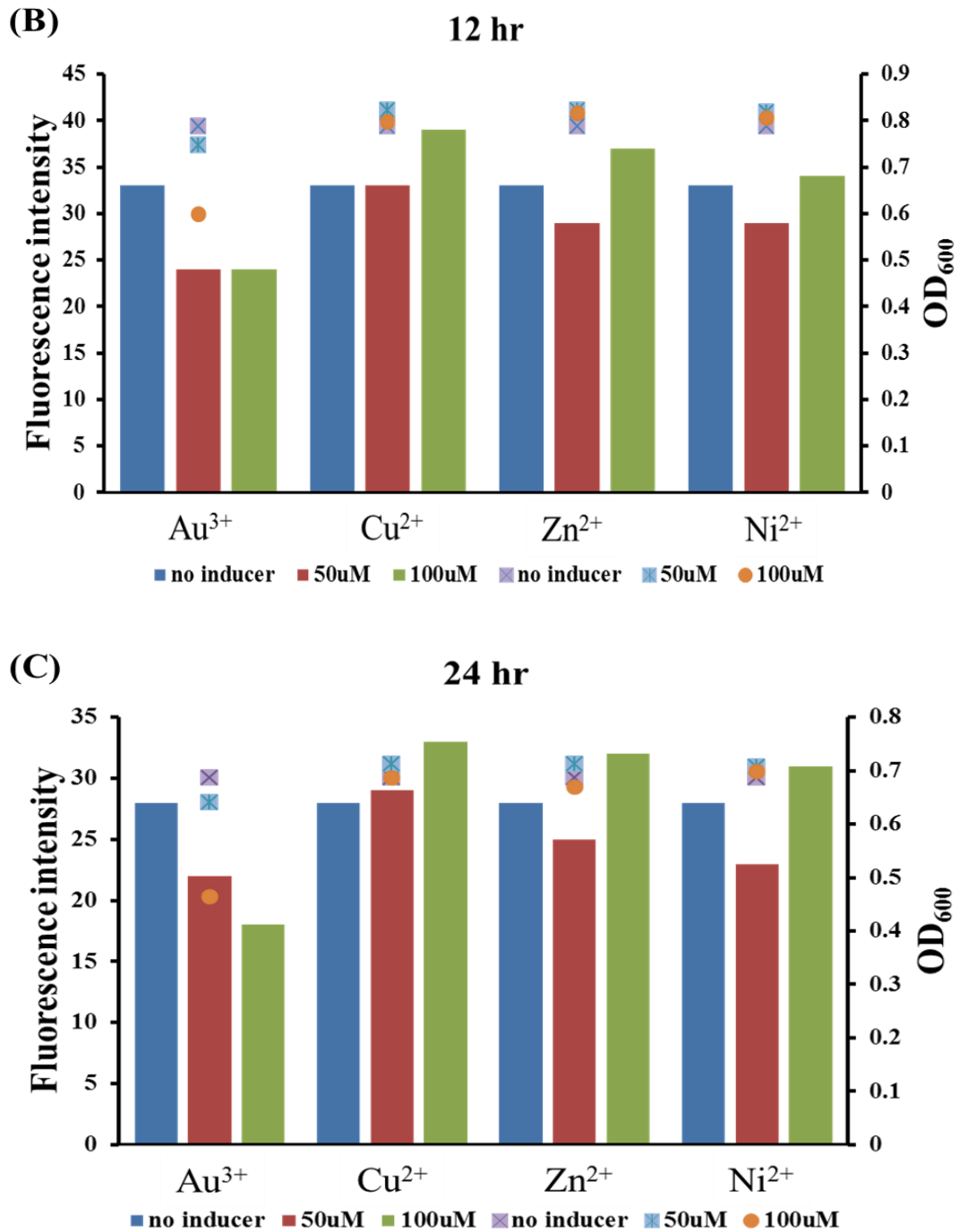
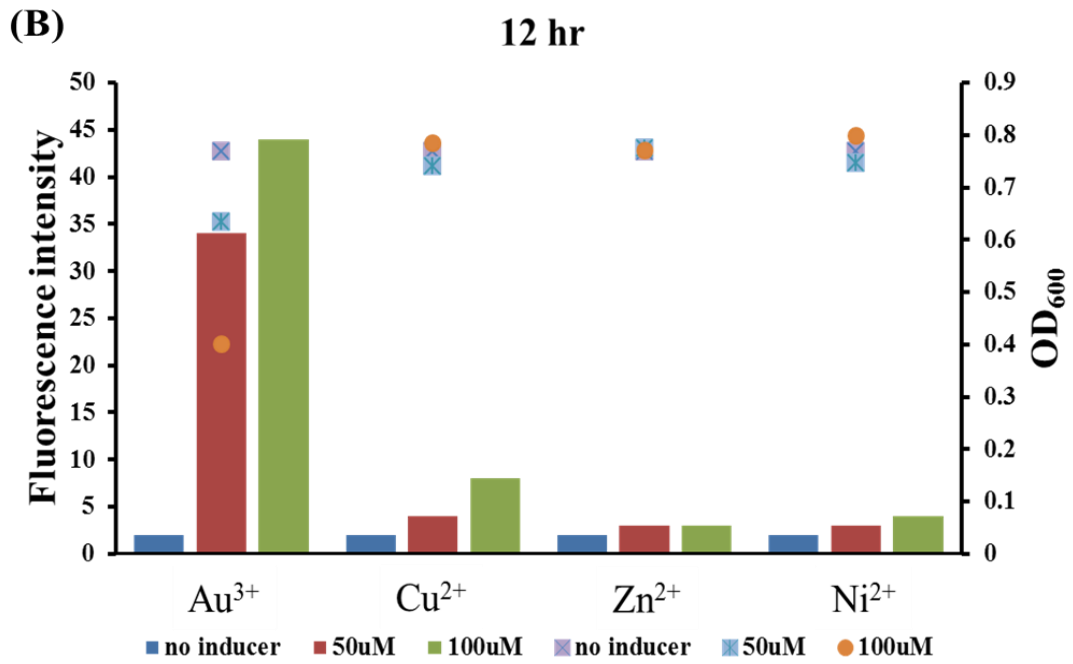
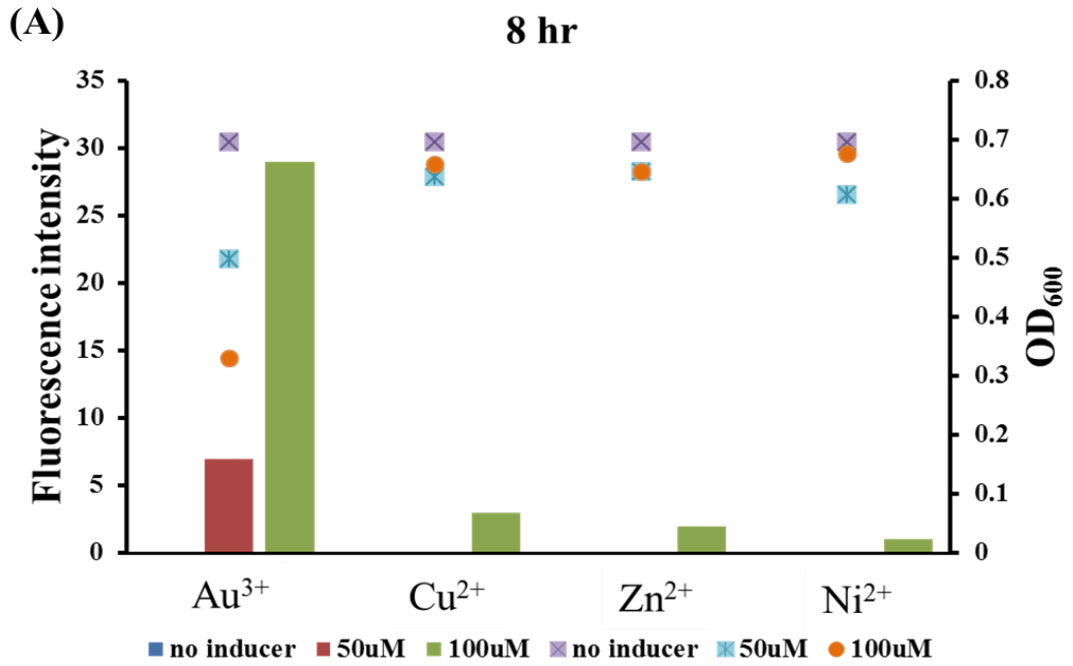


Fig. 4-6 各加入四種不同金屬並分別為 0、50、100 μ M 的濃度於 *E. coli* DH10B 的培養液中。

分別在 (A)8 小時、(B)12 小時和 (C)24 小時，用 Multi-Mode Microplate Reader 檢測螢光的強度以及生長的 OD 值。

cupR(rev)-PcupA/R-PcupC-rfp (C. metallidurans CH34)



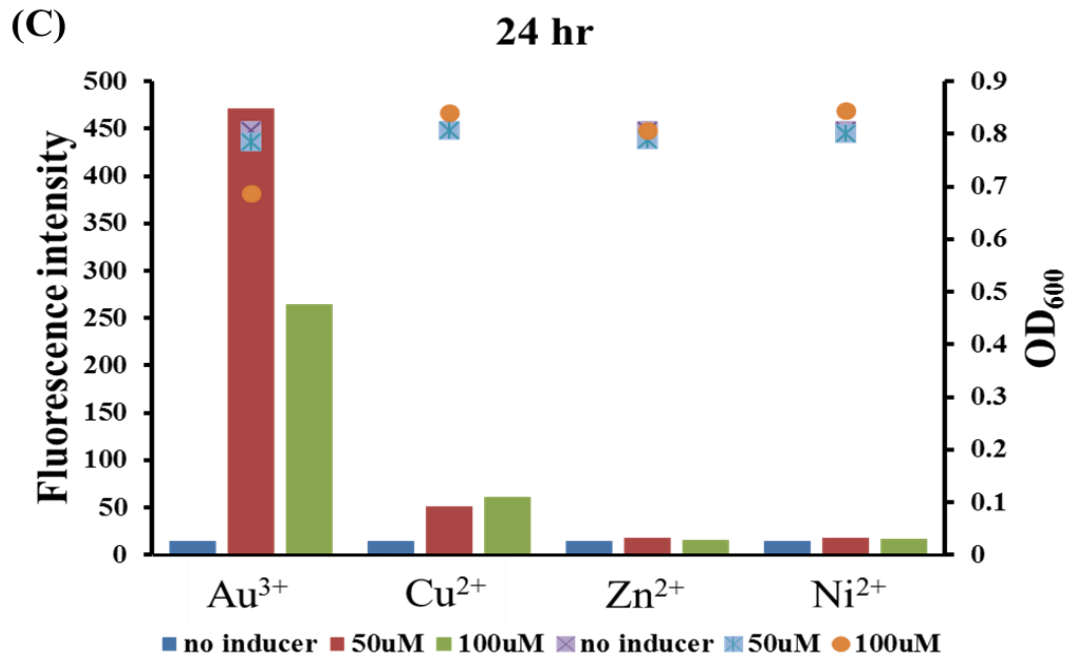
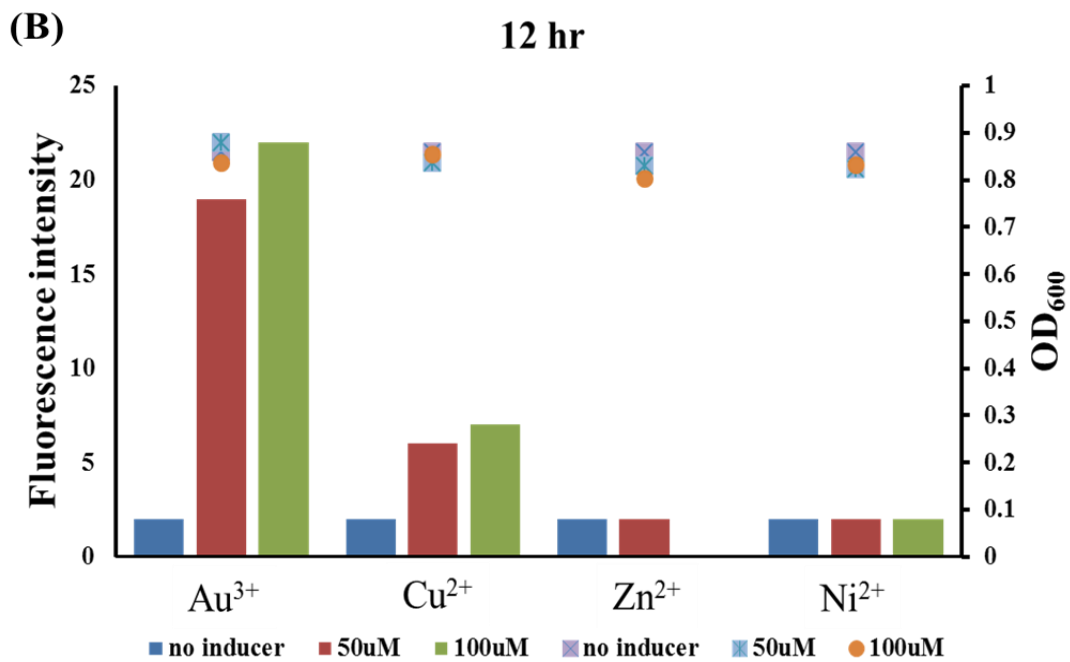
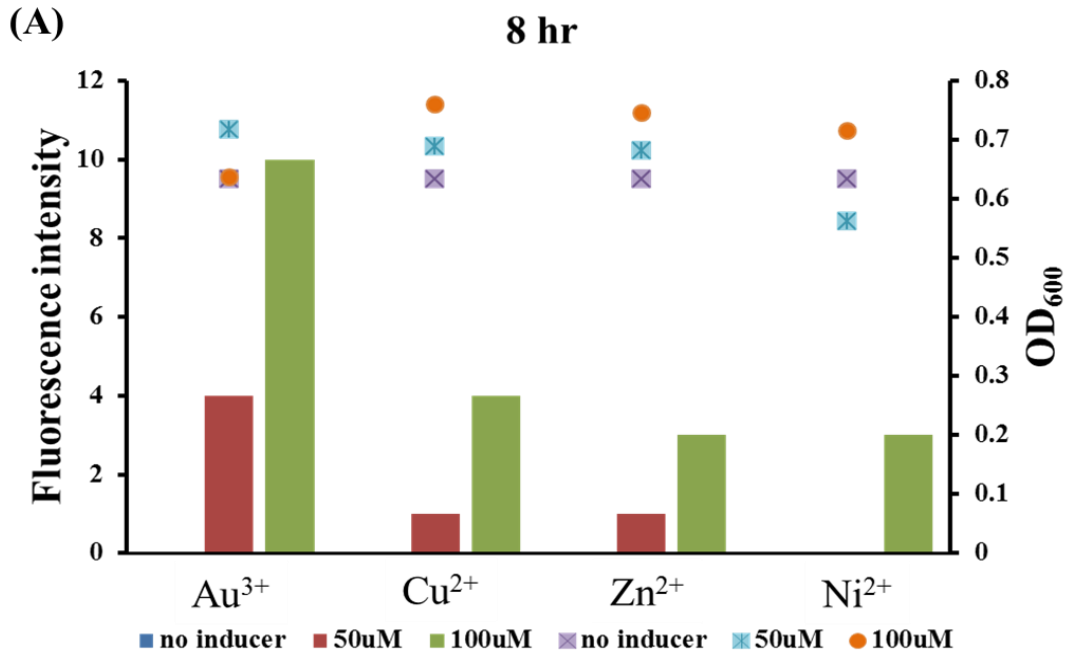


Fig. 4-7 各加入四種不同金屬並分別為 0、50、100 μ M 的濃度於 *C. metallidurans* CH34 的培養液中。

分別在 (A)8 小時、(B)12 小時和 (C)24 小時，用 Multi-Mode Microplate Reader 檢測螢光的強度以及生長的 OD 值。

cupR(rev)-PcupA/R-PcupC-rfp (R. eutropha H16)



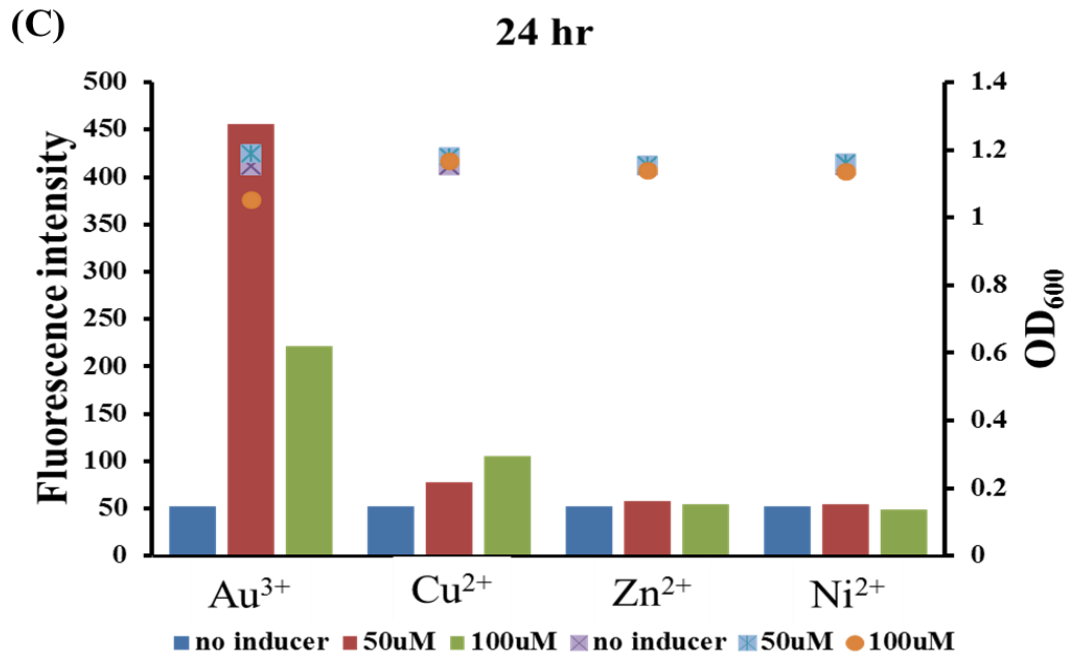


Fig. 4-8 各加入四種不同金屬並分別為 0、50、100 μM 的濃度於 *R. eutropha* H16 的培養液中。

分別在 (A)8 小時、(B)12 小時和 (C)24 小時，用 Multi-Mode Microplate Reader 檢測螢光的強度以及生長的 OD 值。

經過簡單的測試之後發現，當金屬離子和微生物感測器一起培養 24 小時可得到最佳的值，尤其是 *C. metallidurans* 和 *R. eutropha* 兩個做為宿主的感測器效果突出，故我們後面只做這兩種感測器的專一性檢測，並做三重複取誤差值，時間則比較 12 和 24 小時。

cupR(rev)-PcupA/R-PcupC-rfp 12hr

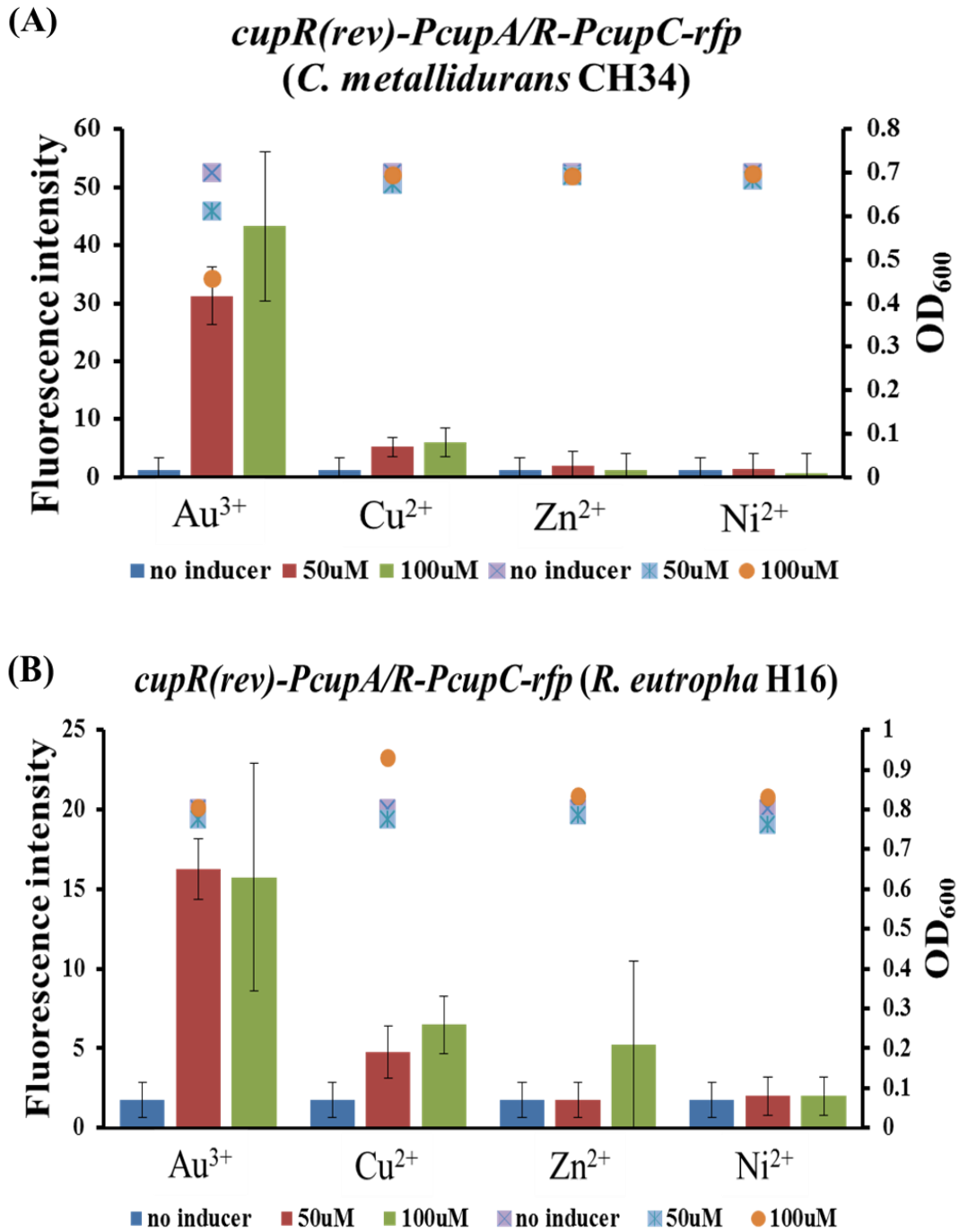


Fig. 4-9 各加入四種不同金屬並分別為 0、50、100 μ M 的濃度於 12 小時之後比較兩個不同微生物宿主的專一性。

(A) *C. metallidurans* CH34 (B) *R. eutropha* H16。

cupR(rev)-PcupA/R-PcupC-rfp 24hr

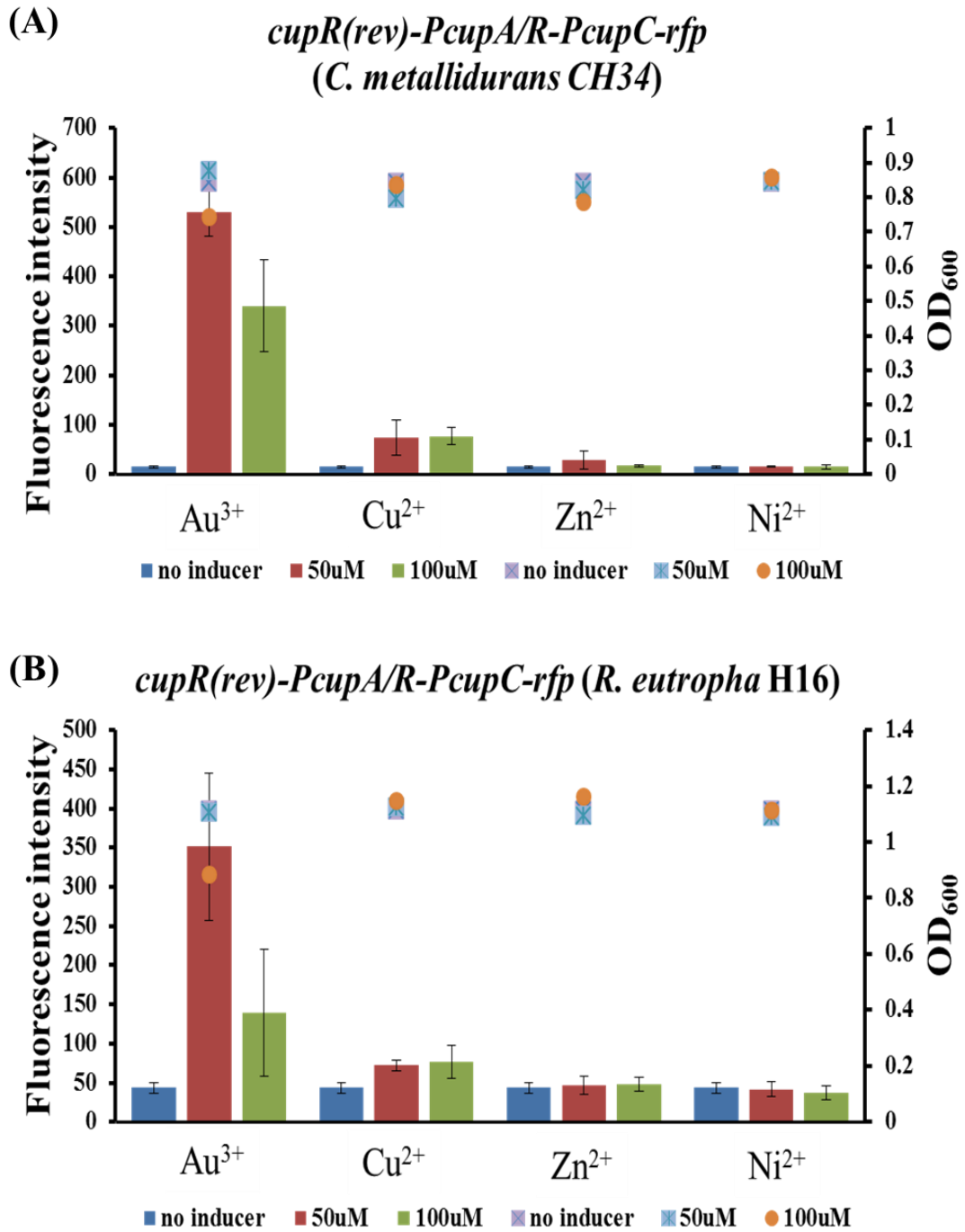


Fig. 4-10 各加入四種不同金屬並分別為 0、50、100 μ M 的濃度於 24 小時之後比較兩個不同微生物宿主的專一性。

(A) *C. metallidurans* CH34 (B) *R. eutropha* H16。

從 *cupR(rev)-PcupA/R-PcupC-rfp* 的質體基因組和宿主搭配的專一性實驗中可以發現，當宿主為 *C. metallidurans* 和 *R. eutropha* 的時候，整體效果佳，其受到銅離子的干擾也較小，產生的紅色螢光強度也較強，這兩組金離子感測器光用肉眼就可以清楚看到顏色的變化。

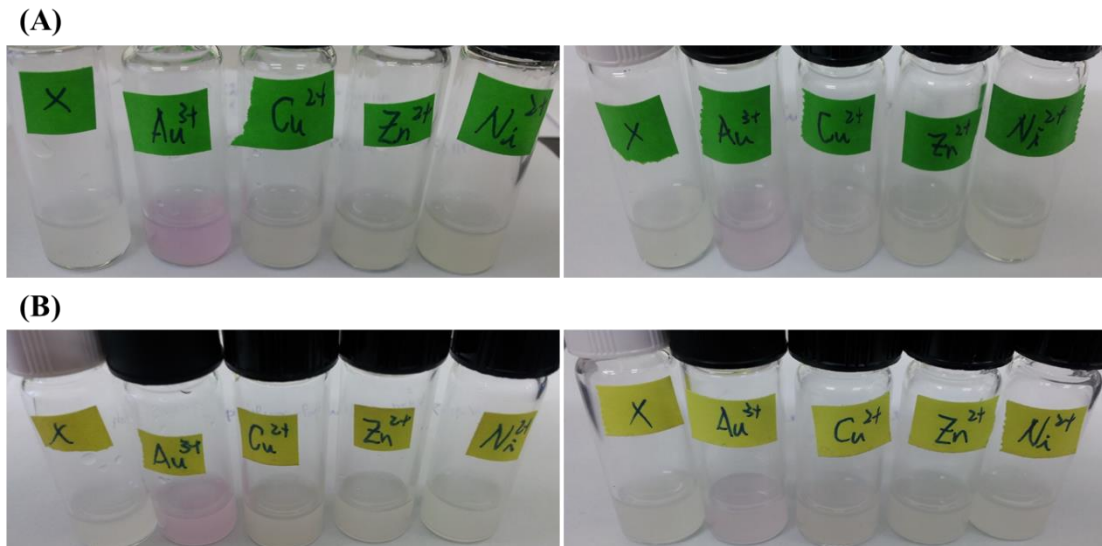


Fig. 4-11 由肉眼判觀察顏色的變化。

(A)為 *C. metallidurans* 在不同金屬離子溶液中並分別為左邊 50 μ M 和右邊 100 μ M 的濃度的顏色變化。(B)則為 *R. eutropha* 在不同金屬離子溶液中並分別為左邊 50 μ M 和右邊 100 μ M 的濃度的顏色變化。

4.2 微生物金離子感測器中 CupR 調控蛋白對金離子的感測

經過重金屬的專一性檢測之後，接下來我們要討論紅色螢光蛋白是否為 CupR 調節蛋白來控制並表現，所以我們將設計好的質體中的 *cupR* 調節基因刪除 (Fig. 4-12) 並與含有 *cupR* 基因的感測器作比較證明 CupR 調控蛋白為主要在有金離子環境下，可以控制並表現紅色螢光蛋白。

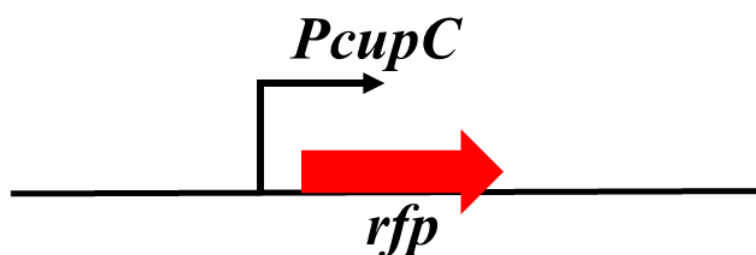


Fig. 4-12 將設計好的質體刪除 *cupR* 基因，只保留啟動子和紅色螢光蛋白 11。

分別透過兩種微生物宿主 *C. metallidurans* 和 *R. eutropha* 的金離子感測器來表現並比較兩組質體的差異，藉此證明 CupR 調節蛋白是主要調控整個機制的關鍵。

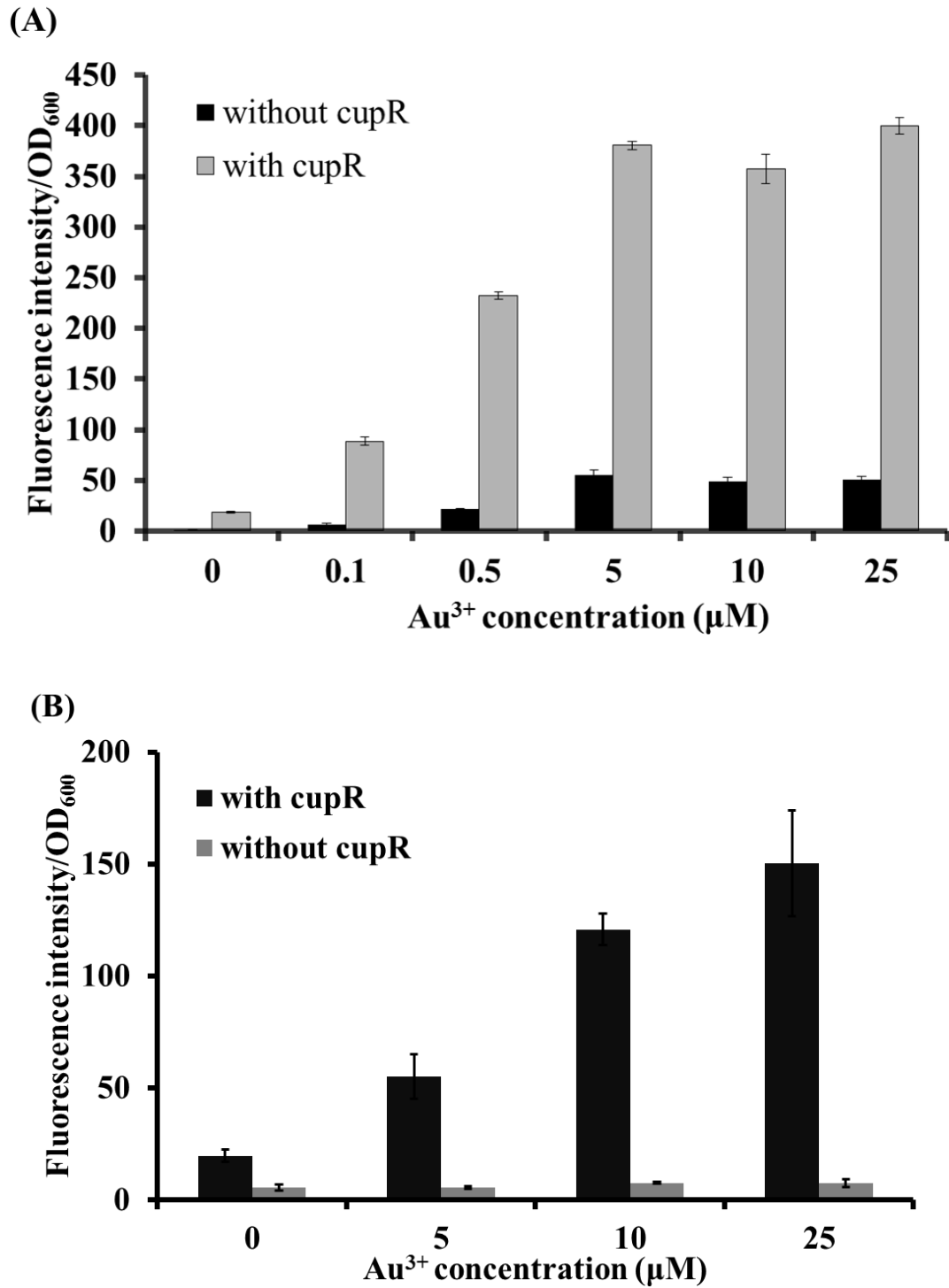


Fig. 4-13 將刪除 *cupR* 基因的質體與原本的質體作比較。

(A)透過 *C. metallidurans* 的感測器分別於 0、0.1、0.5、5、10 和 25μM 的金離子濃度來比較； (B)則是透過 *R. eutropha* 的感測器分別於 0、5、10 和 25μM 的金離子濃度來比較¹¹。

從實驗的結果可以得知，當沒有 CupR 蛋白時，從不同濃度金離子檢測中，微生物感測器的每單位螢光強度皆不變或是變化不大；有 CupR 蛋白時，在不同濃度金離子檢測中，微生物感測器的每單位螢光強度隨著金離子濃度增加而增強，即可證明整個微生物金離子感測器的感測原理，是利用 CupR 蛋白當作感測元件用來檢測金離子，並控制啟動子與表現紅色螢光蛋白的調控蛋白。*C. metallidurans* 的感測器沒有 *cupR* 基因的質體還是會有螢光的產生，而主要的原因是因為 *C. metallidurans* 本身含有 *cupR* 的基因於染色體中，所以會被些許的影響而產生螢光；而 *R. eutropha* 的感測器就可以很明顯地看到，沒有 CupR 蛋白的質體感測器就不會有螢光的產生。

4.3 微生物金離子感測器之重金屬環境干擾及選擇性

為了讓微生物金離子感測器能夠在未來實際的被應用，接下來的實驗則是模擬有多種重金屬的環境，來檢測這兩種微生物感測器對金離子的選擇性和專一性，會不會被其他重金屬所干擾。

這次實驗分別加入 0、0.1、0.5、25 μ M 的金離子濃度於培養液中，並分成多組，共有只有 Au³⁺、Au³⁺ + Cu²⁺、Au³⁺ + Zn²⁺、Au³⁺ + Ni²⁺、Au³⁺ + Fe³⁺、Au³⁺ + Ag⁺和 Au³⁺ 加數個重金屬離子，而後者的重金屬離子都為 50 μ M，並用 Multi-Mode Microplate Reader 檢測螢光的強度以及生長的 OD 值，再將兩值相除作單位螢光的強度。

4.3.1 質體 *cupR(rev)-PcupA/R-PcupC-rfp* 和 *C. metallidurans* 宿主組合之微生物金離子感測器對其他重金屬的干擾探討

在做干擾實驗前，因為多加了鐵離子，外加要再注意每個重金屬離子個別對微生物金離子感測器是否會造成干擾，故會再做一次單獨只加各個重金屬離子的實驗和混合的一起做個比較。

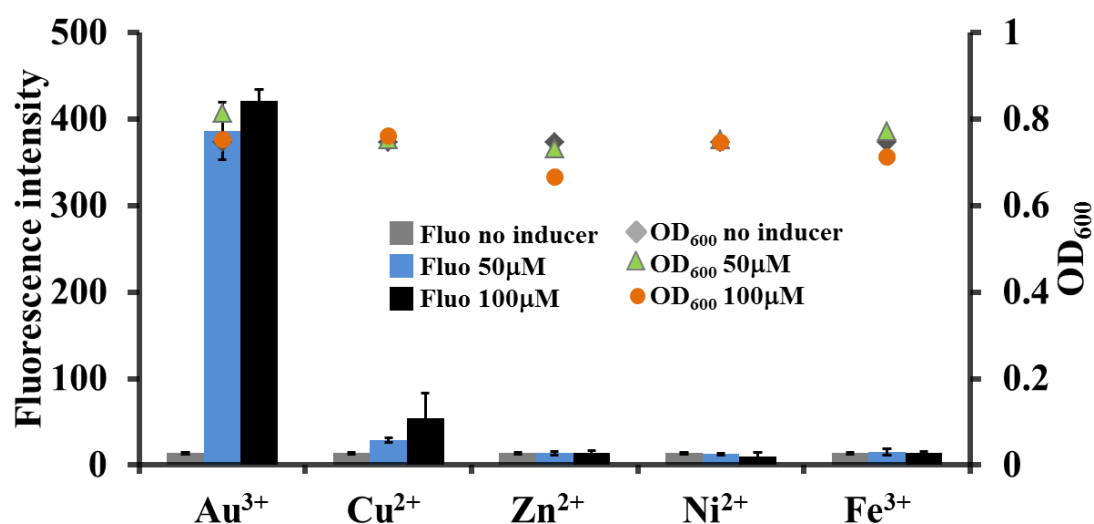
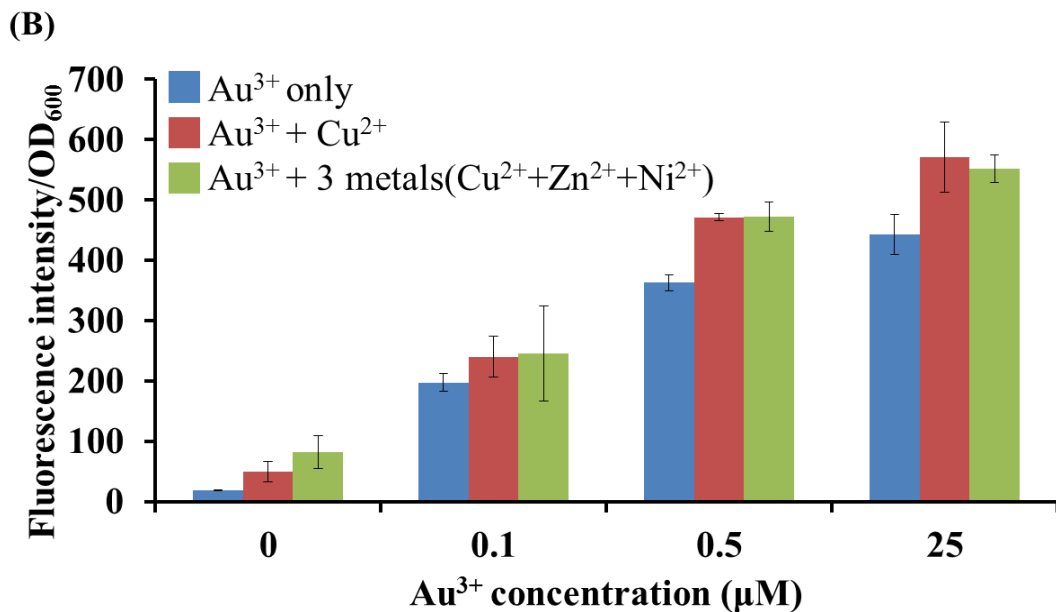
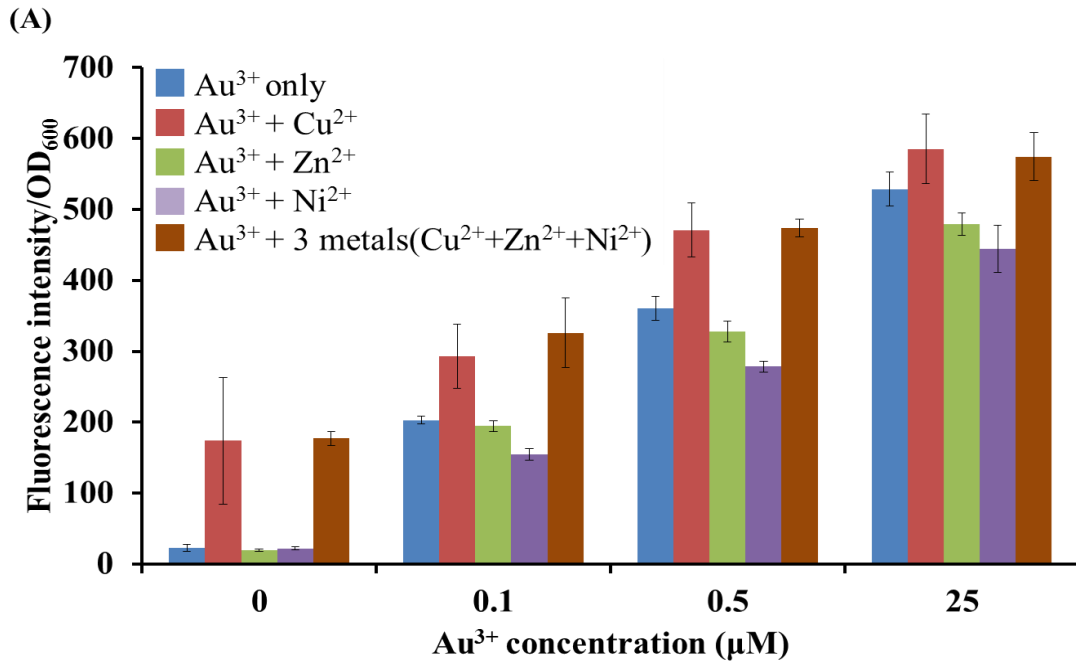


Fig. 4-14 微生物 *C. metallidurans* 感測器在各重金屬的專一性檢測¹¹。

從 Fig. 4-14 可以發現，微生物 *C. metallidurans* 的感測器會被銅離子所影響，而且之前的專一性實驗也顯示出銅離子對微生物 *C. metallidurans* 的感測器的干擾性是存在的 (Fig. 4-10(A))。所以接下來的干擾性實驗，會著重於有關銅離子的干擾性：



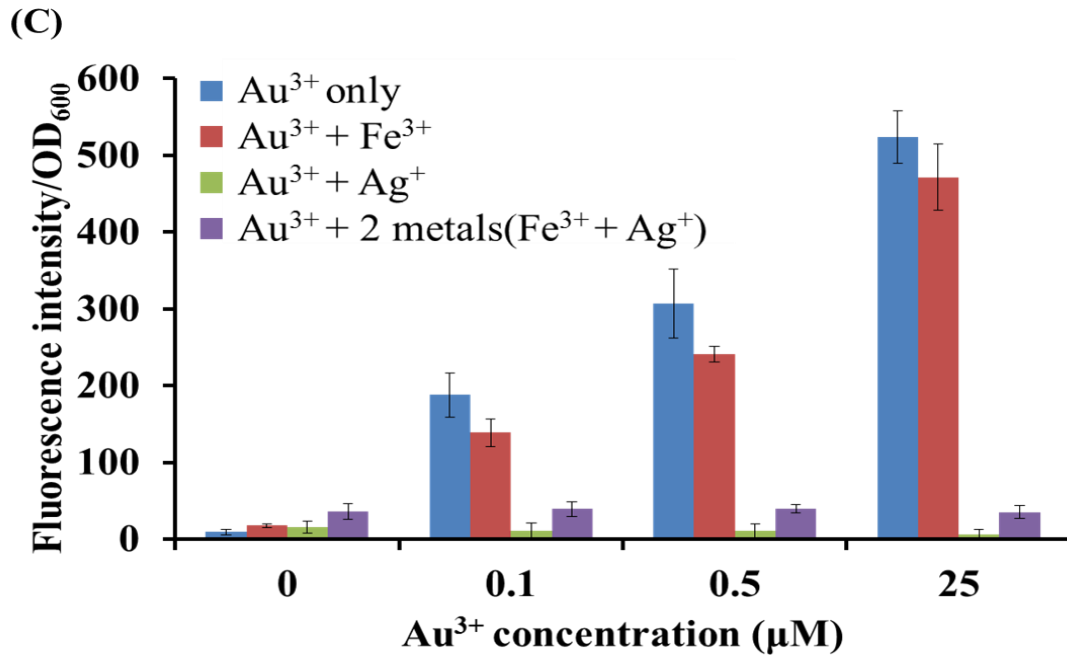


Fig. 4-15 微生物 *C. metallidurans* 感測器在各種重金屬的干擾檢測。

(A)依金離子的濃度變化為主，並在各濃度分別加入都是 50µM 的重金屬離子銅、鋅、鎳三種金屬還有混合的種金屬溶液。(B)依不同金離子的濃度分別加入都是 50µM 的重金屬離子銅、鋅、鎳和三種金屬的混合，並觀察銅離子的影響。(C)依不同金離子的濃度分別加入都是 50µM 的重金屬離子鐵、銀和混合兩者的金屬離子。

由以上的實驗可以觀察出，微生物 *C. metallidurans* 的感測器對銅也有偵測的效果，且做了多組單獨只有銅離子的情況下，產生的螢光情況很不穩定，明顯容易受到銅離子的干擾，若是在檢測金離子的情況下含有銅離子更是會導致螢光強度提升，而造成整體趨勢線改變，影響判斷檢測金離子的效果。在其他重金屬離子方面，對 *C. metallidurans* 的感測器都沒有太多的影響，比較於同濃度只有含金離子的條件下，螢光強度都不會相差太多，但若是含有銀離子的話，則是會造成微生物的死亡，所以沒有螢光的產生。

4.3.2 質體 *cupR(rev)-PcupA/R-PcupC-rfp* 和 *R. eutropha* 宿主組合之微生物金離子感測器對其他重金屬的干擾探討

在做干擾實驗前，因為多加了鐵離子，外加要再注意重金屬離子個別對微生物金離子感測器是否會造成干擾，故會再做一次單獨只加各個重金屬離子的實驗和混合的一起做個比較。

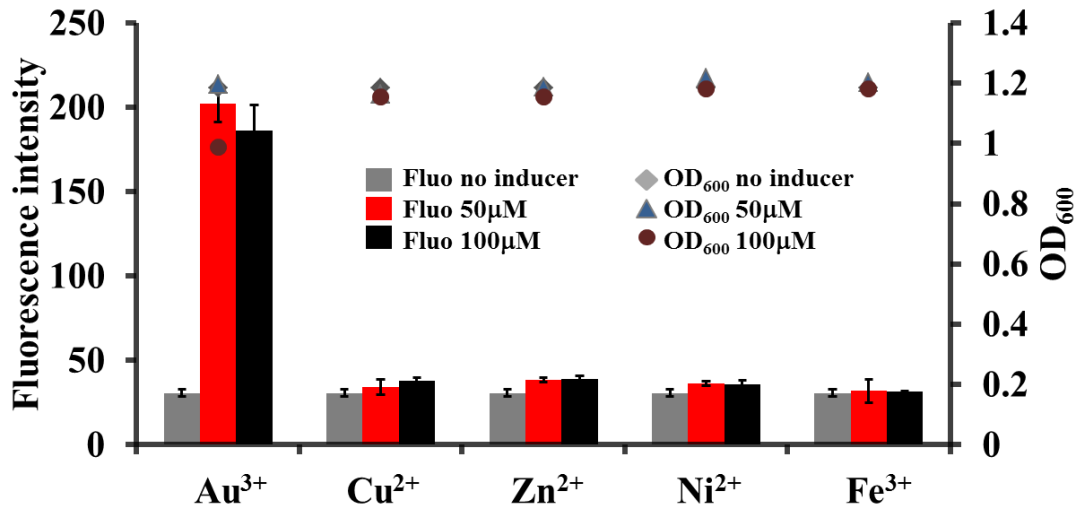
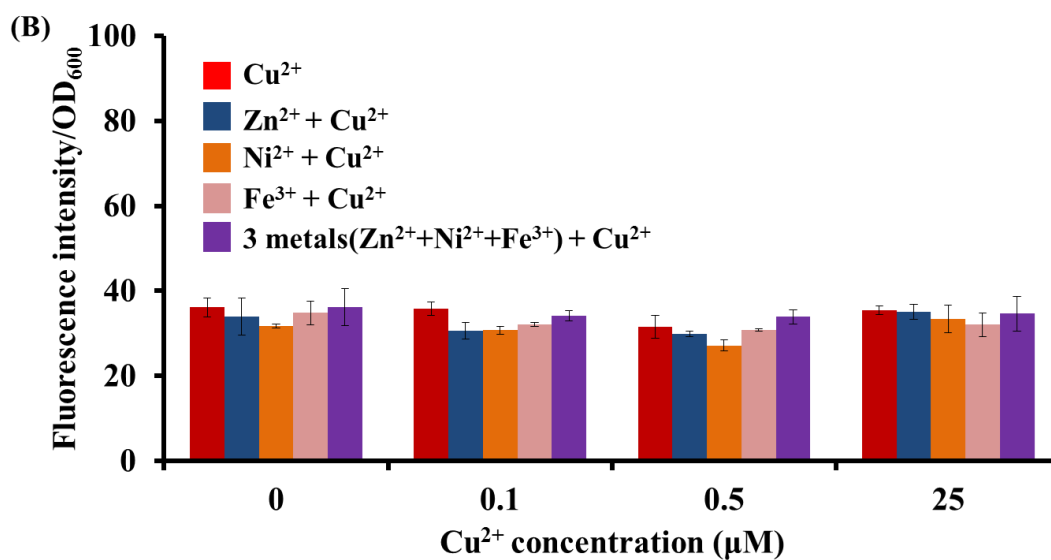
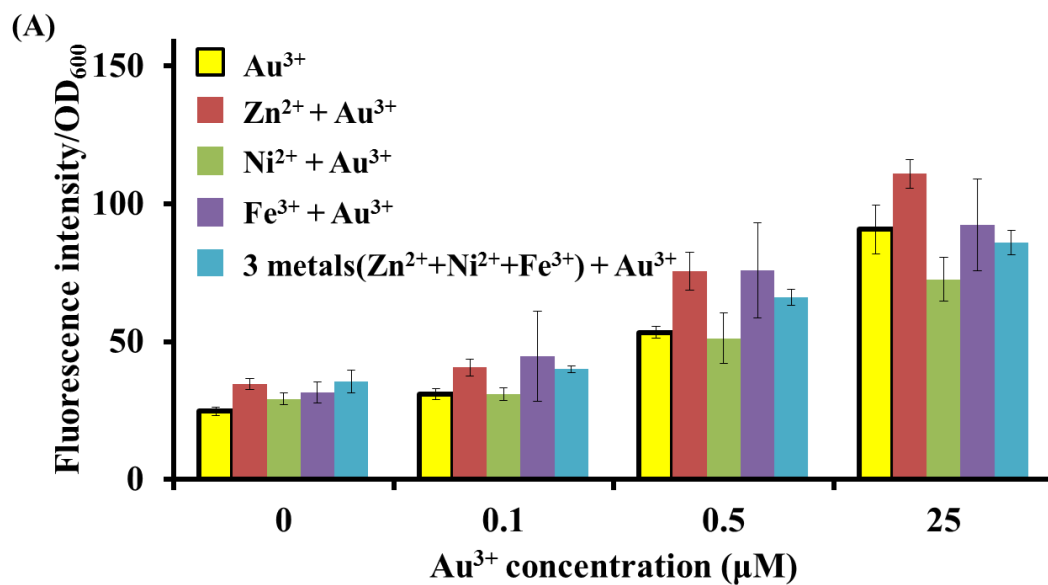


Fig. 4-16 微生物 *R. eutropha* 感測器在各重金屬的專一性檢測¹¹。

從 Fig. 4-16 看不出來微生物 *R. eutropha* 感測器會被銅離子所影響，而且之前的專一性實驗也顯示出銅離子對微生物 *R. eutropha* 感測器的干擾性也是不明顯的 (Fig. 4-10(B))。接下來的干擾性實驗，還是會比較注意有關銅離子的干擾性：



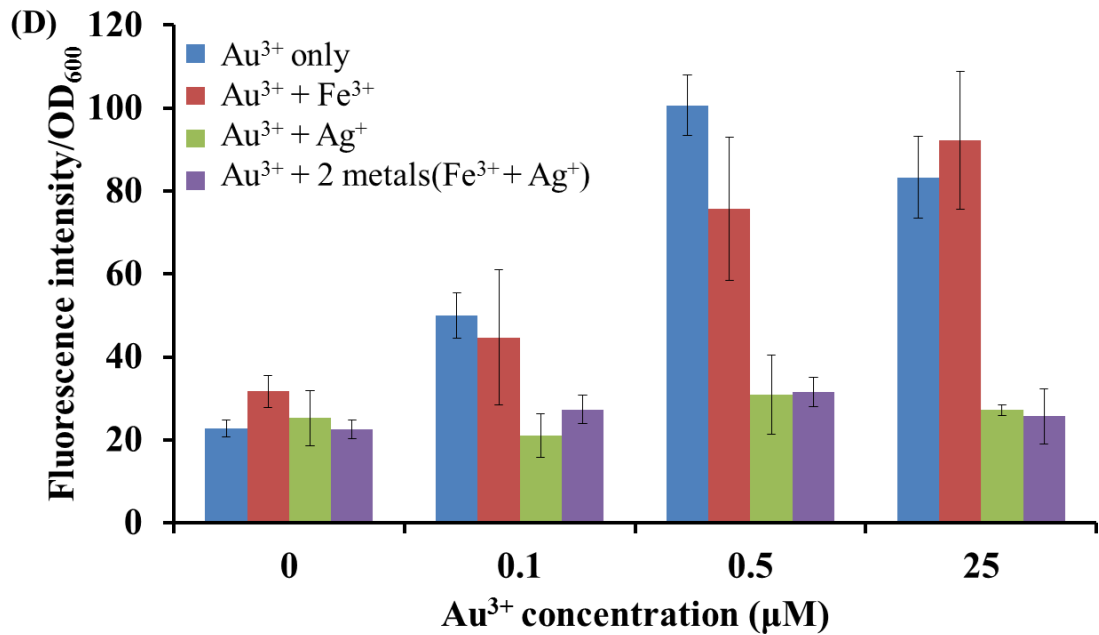
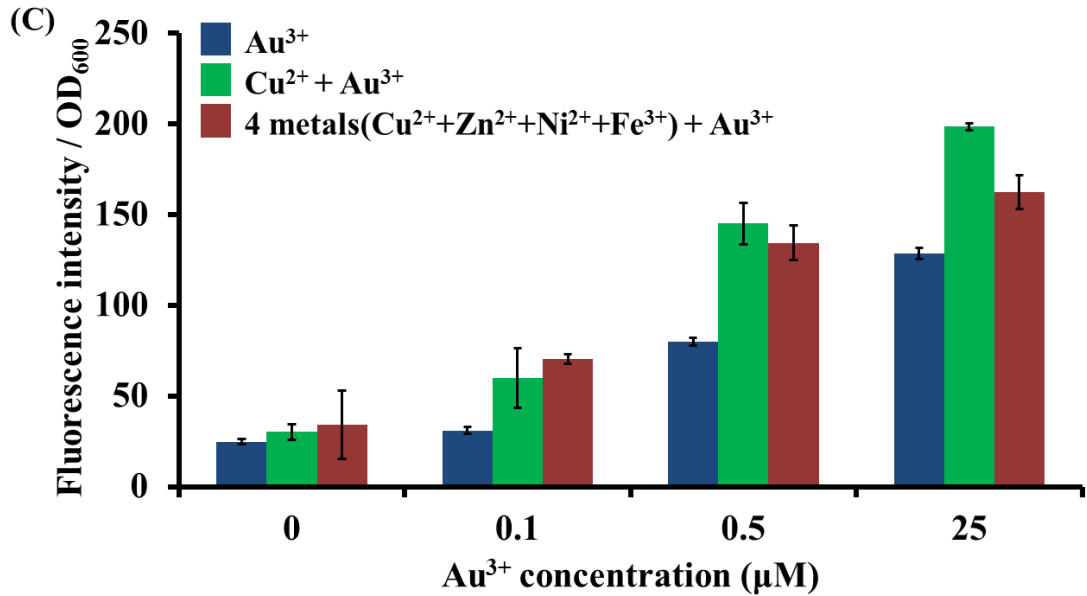


Fig. 4-17 微生物 *R. eutropha* 感測器各加 50μM 重金屬作干擾性檢測。

(A)依金離子的濃度變化為主，並在各濃度分別加入重金屬離子鋅、鎳、鐵和三種重金屬的混合溶液。(B)依銅離子的濃度變化為主，在各濃度分別加入重金屬離子鋅、鎳、鐵和三種重金屬的混合溶液。(C)依金離子的濃度變化為主，比較在各濃度加入銅離子和銅、鋅、鎳、鐵四種重金屬離子的混合溶液。(D)依金離子的濃度變化為主，在各濃度分別加入重金屬離子鐵、銀和混合兩者的重金屬離子溶液¹¹。

由以上的實驗可以觀察出，在 **Fig. 4-17 (A)**，微生物 *R. eutropha* 感測器在各個重金屬的干擾下（沒有銅離子），不會受到太多影響，比較於同濃度只有含金離子的條件下，每單位的螢光強度並沒有差很多。在**(B)**為了檢視只有銅離子的情況下，被其他重金屬的干擾時會不會產生螢光，結果可以看到不管銅的濃度有多少，每單位的螢光強度都不變，且其值也不會被因為含有其他重金屬離子而有所改變。在**(C)**若是在檢測金離子的情況下，環境中含有銅離子會導致每單位的螢光強度提升，而造成整體趨勢線改變，影響判斷檢測金離子的效果。最後在**(D)**，若是環境中含有銀離子的話，則是造成每單位的螢光強度不便或是減少，但是銀會造成微生物的死亡，所以會造成沒有螢光的產生。

4.4 微生物金離子感測器之螢光強度與金離子濃度關係

透過前面的篩選之後，我們得到了三組質體基因組配上宿主有不錯的金離子反應效果的感測器，所以接下來要探討的方向為觀察在不同濃度的金離子情況下，其各個微生物金離子感測器的表現會是如何？此外，還要做微生物感測器對金離子劑量反應曲線的定量分析。

4.4.1 質體 *PcupA/R-cupR-rfp* 和 *C. metallidurans* 宿主組合之金離子濃度探討

這次實驗分別加入 0、0.5、1、10、25、50、60、75、90、100 μ M 的金離子濃度於培養液中，然後分別觀測三組不同微生物金離子感測器的效率及螢光的強度：

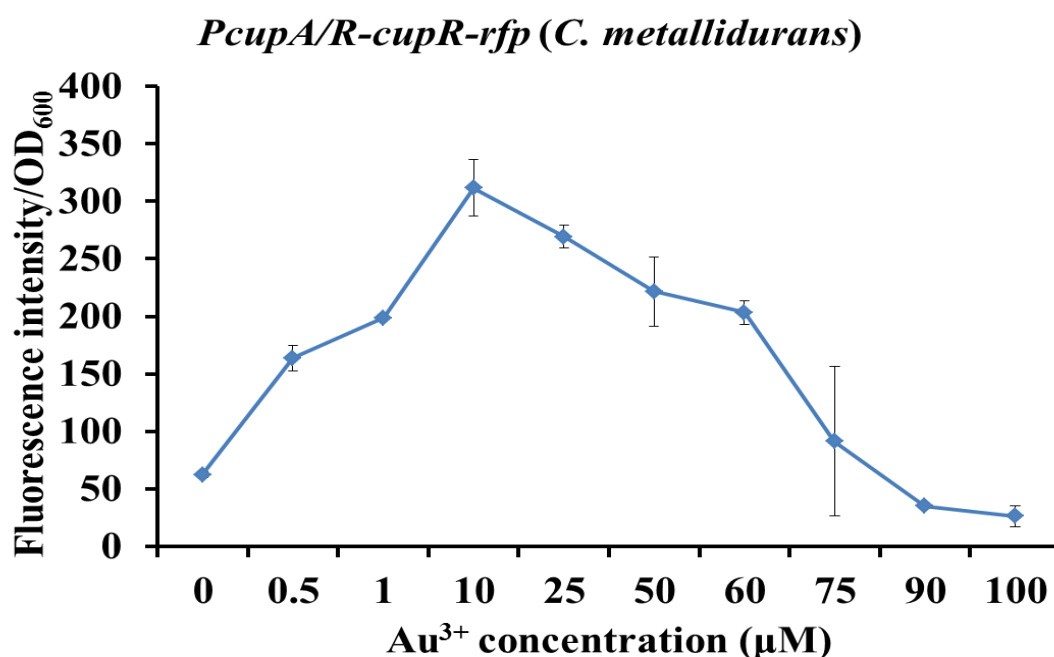


Fig. 4-18 *C. metallidurans* 和 *PcupA/R-cupR-rfp* 的質體基因組感測器劑量反應曲線。

用 Multi-Mode Microplate Reader 檢測螢光的強度以及生長的 OD 值並將兩值相除後作一個劑量反應曲線，雖然有不錯的螢光強度，但耐受性較差。

由 Fig. 4-18 可以發現，*PcupA/R-cupR-rfp* 的質體基因組的 *C. metallidurans* 微生物金離子感測器，對金離子的濃度耐受性較差，雖然螢光強度還算不錯。後續實驗只會針對 *cupR(rev)-PcupA/R-PcupC-rfp* 的質體基因組做一系列的檢測來深入探討其微生物金離子感測器的效果。

4.4.2 質體 *cupR(rev)-PcupA/R-PcupC-rfp* 和 *C. metallidurans* 和 *R. eutropha* 宿主組合之金離子濃度探討

分別加入 0、0.5、1、10、25、50、60、75、90、100 μ M 的金離子濃度於培養液中，然後分別觀測三組不同微生物金離子感測器的效率及螢光的強度：

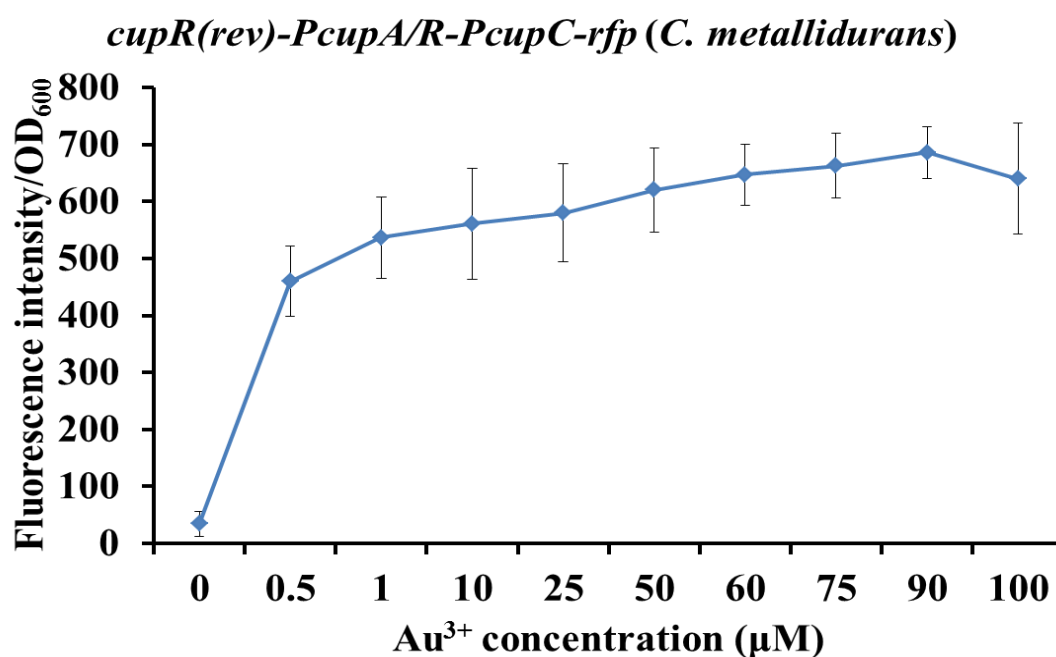


Fig. 4-19 *C. metallidurans* 和 *cupR(rev)-PcupA/R-PcupC-rfp* 的質體基因組感測器劑量反應曲線。

用 Multi-Mode Microplate Reader 檢測螢光的強度以及生長的 OD 值並將兩值相除後作一個劑量反應曲線，有較佳的螢光強度，且其耐受性佳，另外在 0 到 0.5 μ M 的金離子濃度間還可以做低濃度的探測。

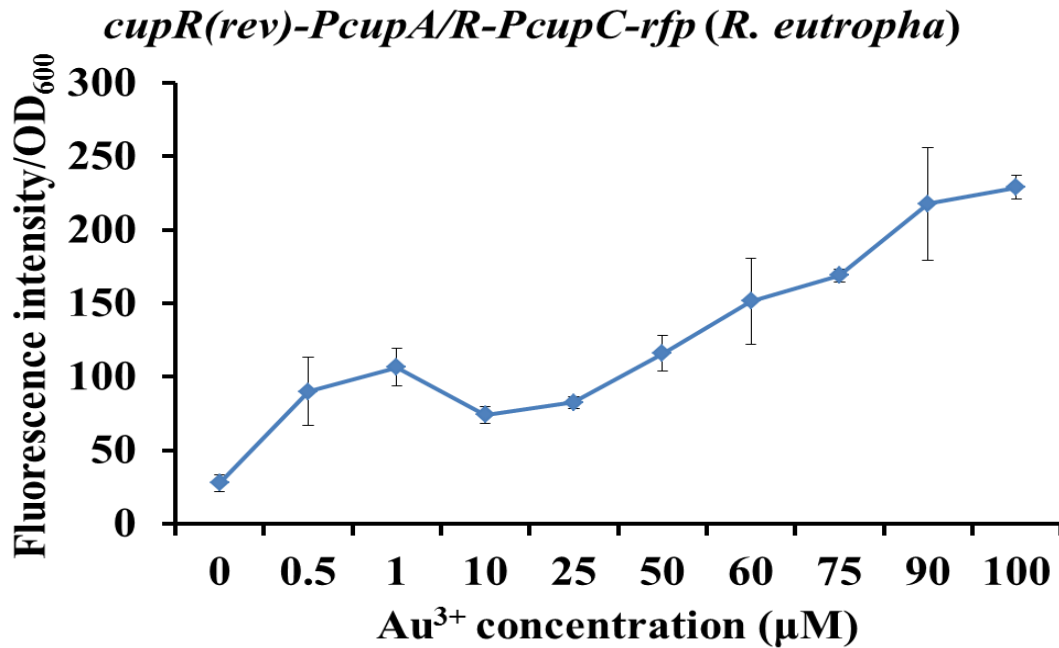


Fig. 4-20 *R. eutropha* 和 *cupR(rev)-PcupA/R-PcupC-rfp* 的質體基因組感測器劑量反應曲線。

用 Multi-Mode Microplate Reader 檢測螢光的強度以及生長的 OD 值，並將兩值相除後作一個劑量反應曲線。雖螢光強度還好，但且其耐受性佳，在 0 到 0.5μM 的金離子濃度間也可以做低濃度的探測。

由 **Fig. 4-18** 到 **Fig. 4-20** 可以發現，*cupR(rev)-PcupA/R-PcupC-rfp* 的質體基因組比起 *PcupA/R-cupR-rfp* 的質體基因組更能夠被宿主 *C. metallidurans* 和 *R. eutropha* 兩者適應，並組成效果較佳的微生物金離子感測器。因此，針對 *cupR(rev)-PcupA/R-PcupC-rfp* 的質體基因組我們會做一系列的檢測來深入探討其微生物金離子感測器的效果。

首先，檢測微生物金離子感測器對金離子的線性關係，在高濃度或是低濃度的趨勢線，接著是檢測最高可承受的金離子濃度以及最低金離子偵測極限。在低濃度檢測的部分，分別加入金離子 0、0.01、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5μM 的濃度，並用 Multi-Mode Microplate Reader 檢測螢光的

強度以及生長的 OD 值，並將兩值相除後作一個劑量反應曲線。

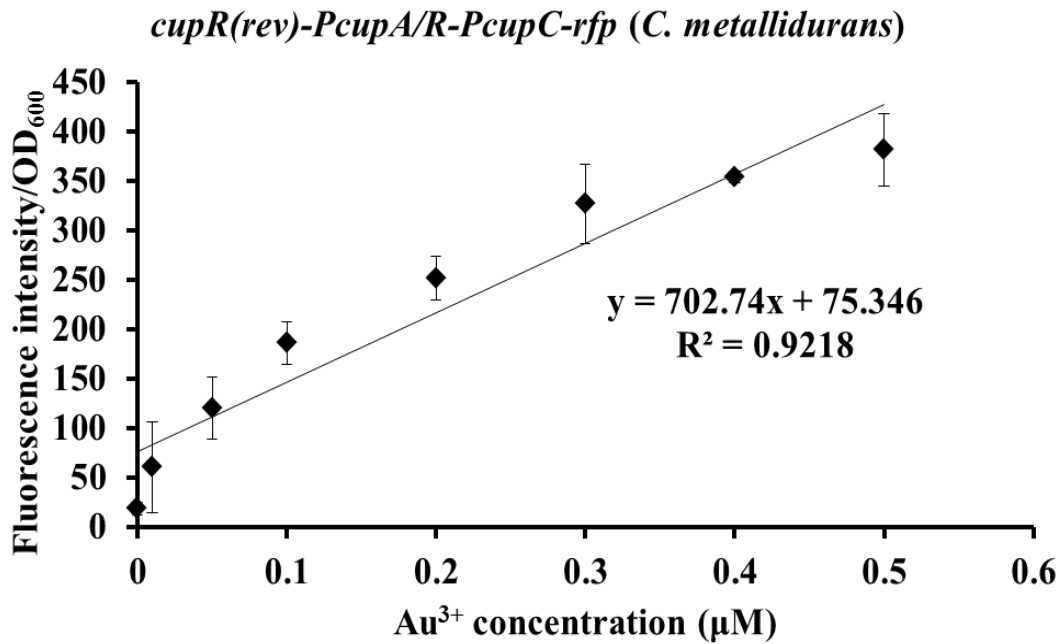


Fig. 4-21 *C. metallidurans* 當作宿主的感測器在低濃度的金離子中檢測。

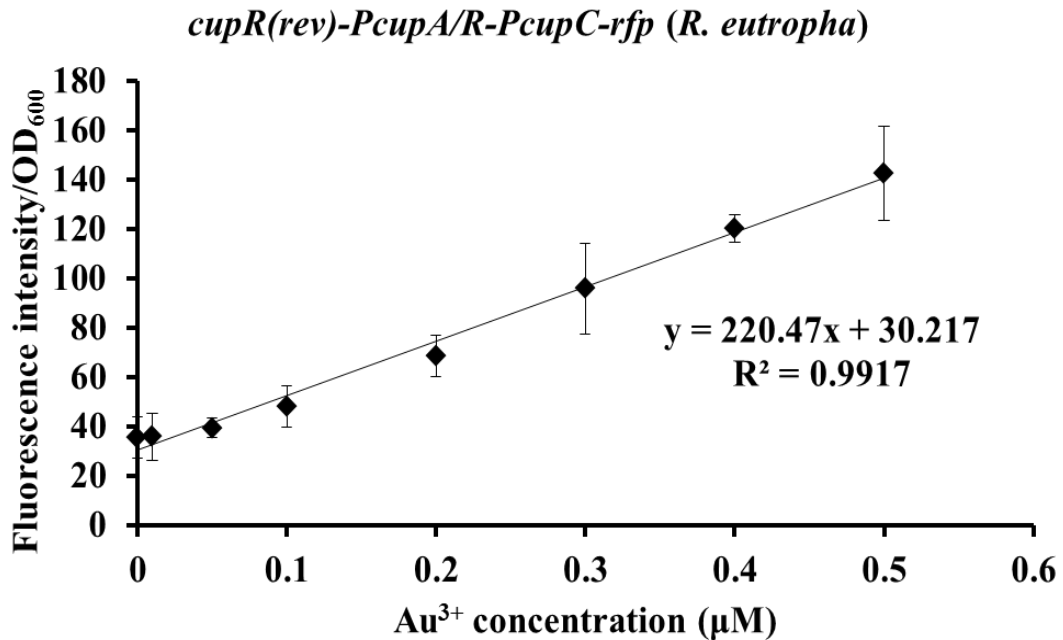


Fig. 4-22 *R. eutropha* 當作宿主的感測器在低濃度的金離子中檢測。

兩次低濃度實驗都各做了三重複取誤差值，並可以發現，雖然由 *C. metallidurans* 當作宿主的感測器的螢光強度較高，但其線性關係的趨勢線 R 平方值只有 0.9218；由 *R. eutropha* 當作宿主的感測器，雖然螢光強度較弱，不過其趨勢線 R 平方值卻有 0.9917。

接下來要檢測這兩組的微生物金離子感測器對金離子濃度的耐受程度並檢視其線性關係，兩者的趨勢線和 R 平方值在哪個範圍的濃度有較佳的值。在金離子濃度檢測的部分，分別加入金離子 0、0.01、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、1、5、10、25、50、60、75、90、100、150、200 μM 的濃度，並用 Multi-Mode Microplate Reader 檢測螢光的強度以及生長的 OD 值，並將兩值相除後作一個劑量反應曲線，另外要在推算其趨勢線和最低偵測極限。

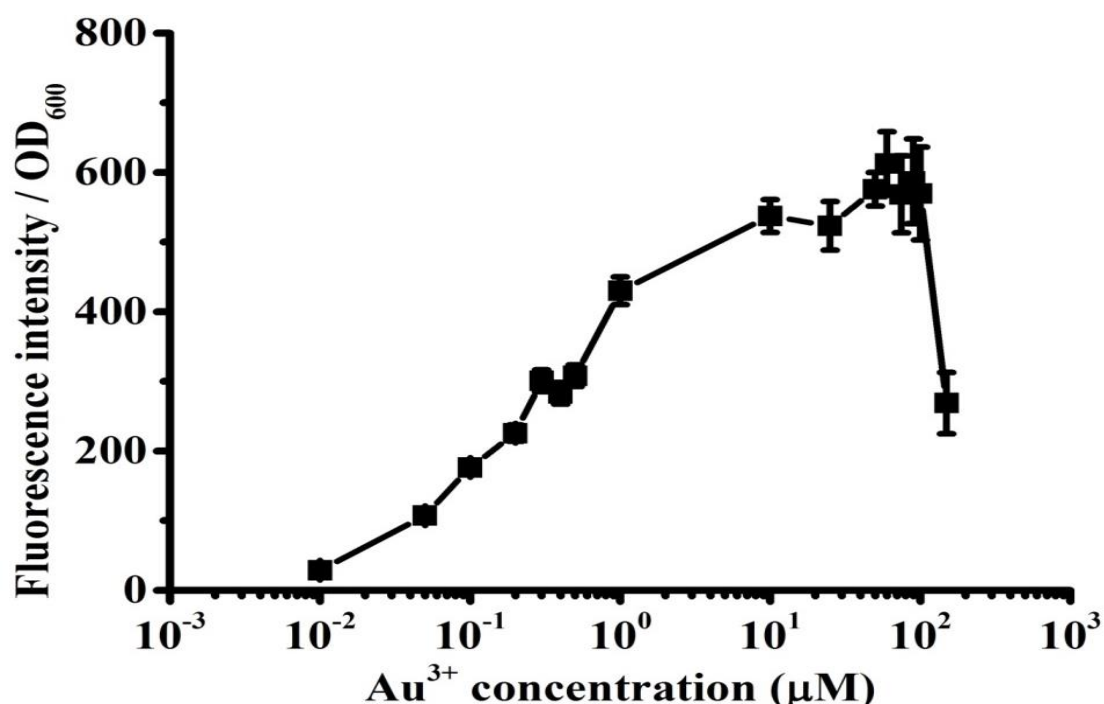


Fig. 4-23 *C. metallidurans* 當作宿主的感測器在金離子濃度中的檢測。

金離子濃度到 50 μM 時已經趨近於飽和狀態，且達到 150 μM 的時候，螢光強度已經驟降¹¹。

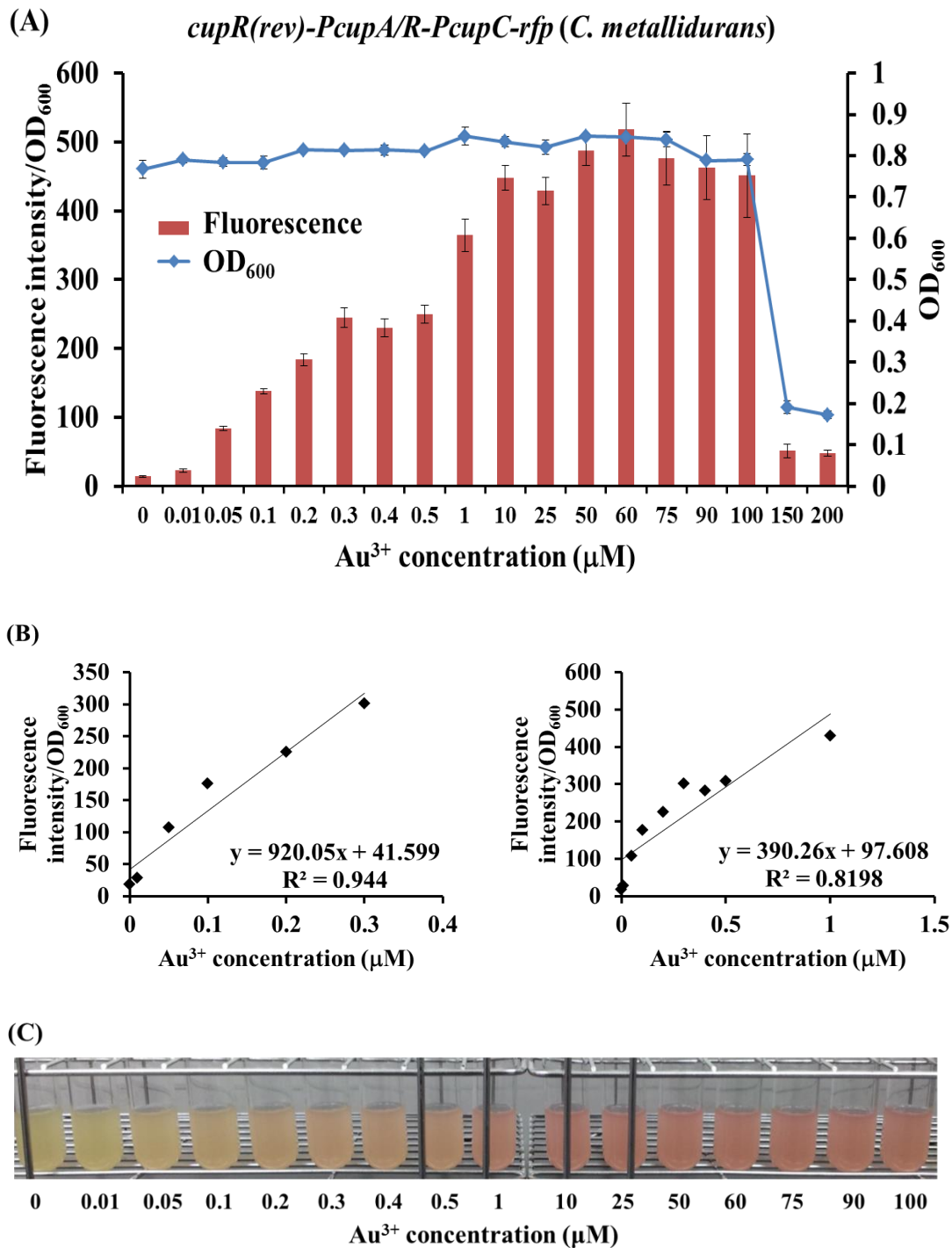


Fig. 4-24 *C. metallidurans* 當作宿主的感測器偵測金離子。

(A)金離子從低濃度到高濃度檢測，達到 150 μ M 時 OD 值驟降，表示微生物無法存活，螢光強度也跟著驟降。(B)兩張圖都是在探討的感測器在低濃度的線性關係，左邊是 0~1 μ M 時，R 平方值 0.8198；右邊是 0~0.3 μ M 時，R 平方值 0.944。(C)可用肉眼直接觀察的圖(A)的螢光強度¹¹。

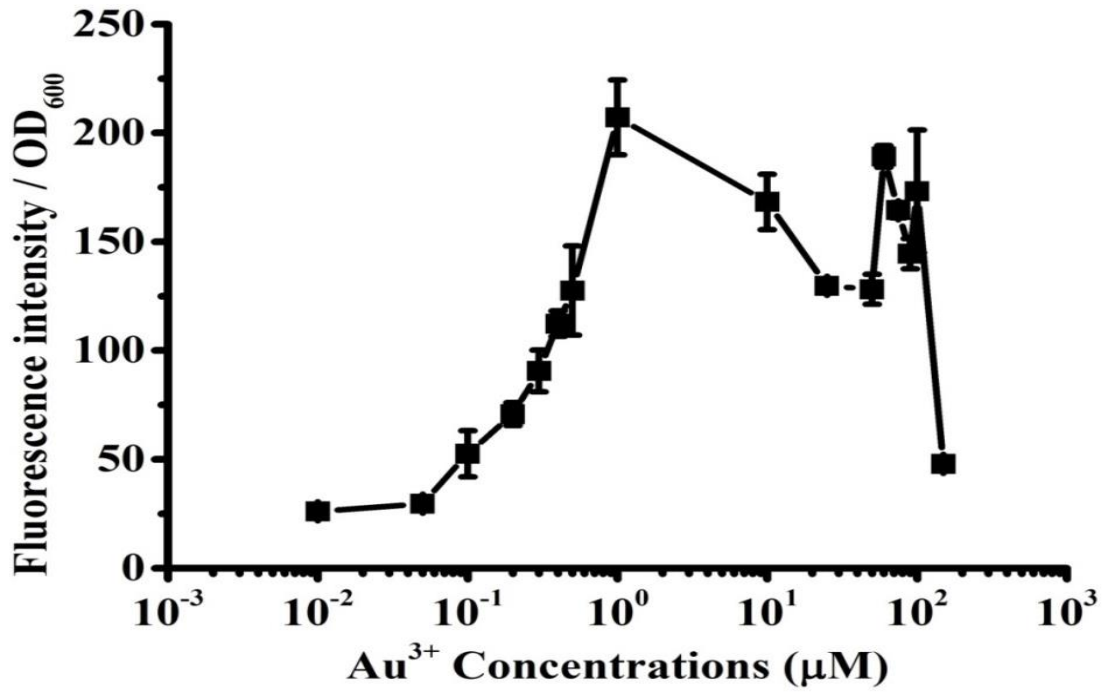


Fig. 4-25 *R. eutropha* 當作宿主的感測器在金離子濃度中的檢測。

金離子濃度到 1μM 時已經趨近於飽和狀態，且達到 150μM 的時候，螢光強度已經驟降¹¹。

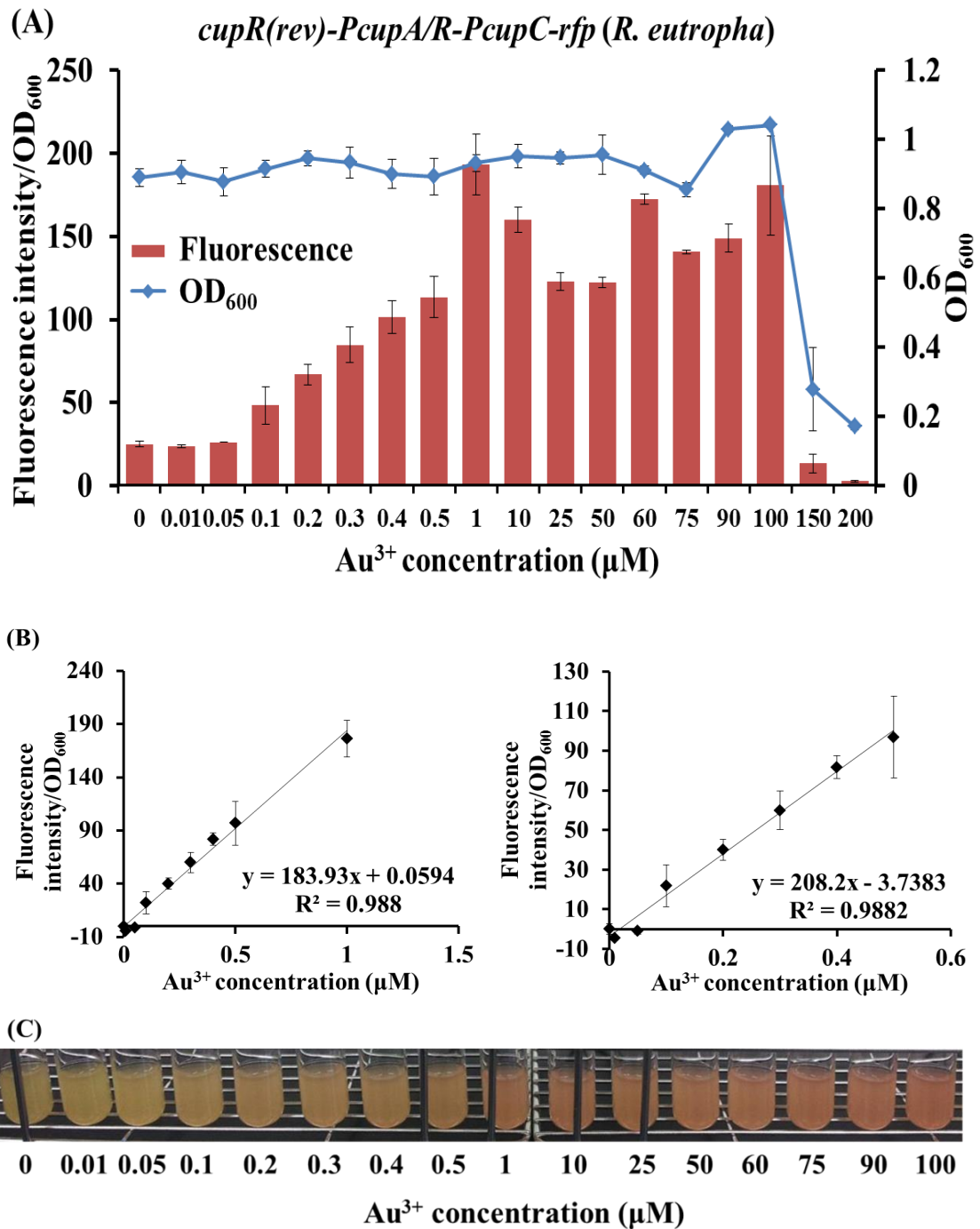


Fig. 4-26 *R. eutropha* 當作宿主的感測器偵測金離子。

(A) 金離子從低濃度到高濃度檢測，達到 $150\mu\text{M}$ 時 OD 值驟降，表示微生物無法存活，螢光強度也跟著驟降。(B) 兩張圖都是在探討的感測器在低濃度的線性關係，左邊是 $0\sim 1\mu\text{M}$ 時，R 平方值 0.988；右邊是 $0\sim 0.5\mu\text{M}$ 時，R 平方值 0.9882。(C) 可用肉眼直接觀察的圖(A)的螢光強度¹¹。

透過金離子濃度的實驗，比較此兩組微生物金離子感測器，雖然微生物為 *C. metallidurans* 感測器螢光很強，且金離子的濃度到 50 μ M 才趨於飽和，不過在整體趨勢線卻不佳。**Fig. 4-21** 顯示，微生物 *C. metallidurans* 感測器在金離子濃度 0~0.5 μ M 時，其 R 平方值可以到 0.9218，但再做一次實驗後，在金離子濃度 0~1 μ M 時，其 R 平方值只剩下 0.8198；金離子濃度只有 0~0.3 μ M 時，R 平方值到 0.944 (**Fig. 4-24(B)**)。反觀微生物為 *R. eutropha* 感測器，雖然螢光較弱，且金離子的濃度到 1 μ M 時已經趨近於飽和狀態，但是整體的趨勢線卻是非常好的。**Fig. 4-22** 顯示，微生物 *R. eutropha* 感測器在金離子濃度 0~0.5 μ M 時，其 R 平方值達 0.9917，且再做一次實驗後，在金離子濃度 0~1 μ M 時，其 R 平方值亦達 0.988；金離子濃度在 0~0.5 μ M 時，R 平方值也有 0.9882 (**Fig. 4-26(B)**)，只比之前的 R 平方值低一點。

透過以上的實驗並比較了兩組微生物金離子感測器，雖然整體的螢光強度為 *C. metallidurans* 感測器較佳，但線性關係透過劑量反應曲線的趨勢可以比較出 *R. eutropha* 感測器線性回歸比 *C. metallidurans* 感測器佳，而且範圍也很廣，再現性的 R 平方值也不會差太多。再來比較兩者對金離子濃度的最低偵測極限 (limit of detection, LOD)，使用公式 $LOD = K \times SD / S$ 來計算：*C. metallidurans* 感測器之最低偵測極限為 $LOD = 3 \times 0.835323 / 0.9201 = 2.723584$ (nM)；*R. eutropha* 的感測器之最低偵測極限為 $LOD = 3 \times 2.71725 / 0.1839 = 44.32708$ (nM)，計算出來的結果 *C. metallidurans* 感測器有非常好的靈敏度其偵測極限可以到約 0.0027 μ M 的金離子濃度(**Fig. 4-24(B)**右邊)，而 *R. eutropha* 感測器則略高一點，只能測到 0.0443 μ M 的金離子濃度 (**Fig. 4-26(B)**左邊)。

4.5 微生物 *R. eutropha* 金離子感測器改良

4.5.1 質體 *cupR(rev)-PcupA/R-PcupC-rfp-cupC* 和 *R. eutropha* 宿主之組合

透過前面的實驗，比較了兩組微生物金離子感測器，整體來說，*C. metallidurans* 感測器螢光強度為較佳，但其他如線性關係、再現性的 R 平方值和檢測的範圍都是 *R. eutropha* 感測器較佳，所以希望能夠提高 *R. eutropha* 感測器整體的螢光強度。

前面 1.2.3 的章節有提到 MerR 家族的調節基因組 *cup* 系統，其中 *cupC* 基因可製造運輸並排解重金屬的蛋白 CupC，其可以幫助 CupR 和 CupA 兩個蛋白質對金離子的結合，故我們在設計好的質體下游再加入 *cupC* 基因 (Fig. 4-27(A))，然後透過劑量回饋的實驗與含有原本質體的 *R. eutropha* 感測器相互比較：

分別加入金離子 0、0.01、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、1、5、10、25、50、60、75、90、100、150、200 μ M 的濃度，並用 Multi-Mode Microplate Reader 檢測螢光的強度以及生長的 OD 值，並將兩值相除後作一個劑量反應曲線並比較原先質體的 *R. eutropha* 的感測器劑量反應曲線 (Fig. 4-27(B))。

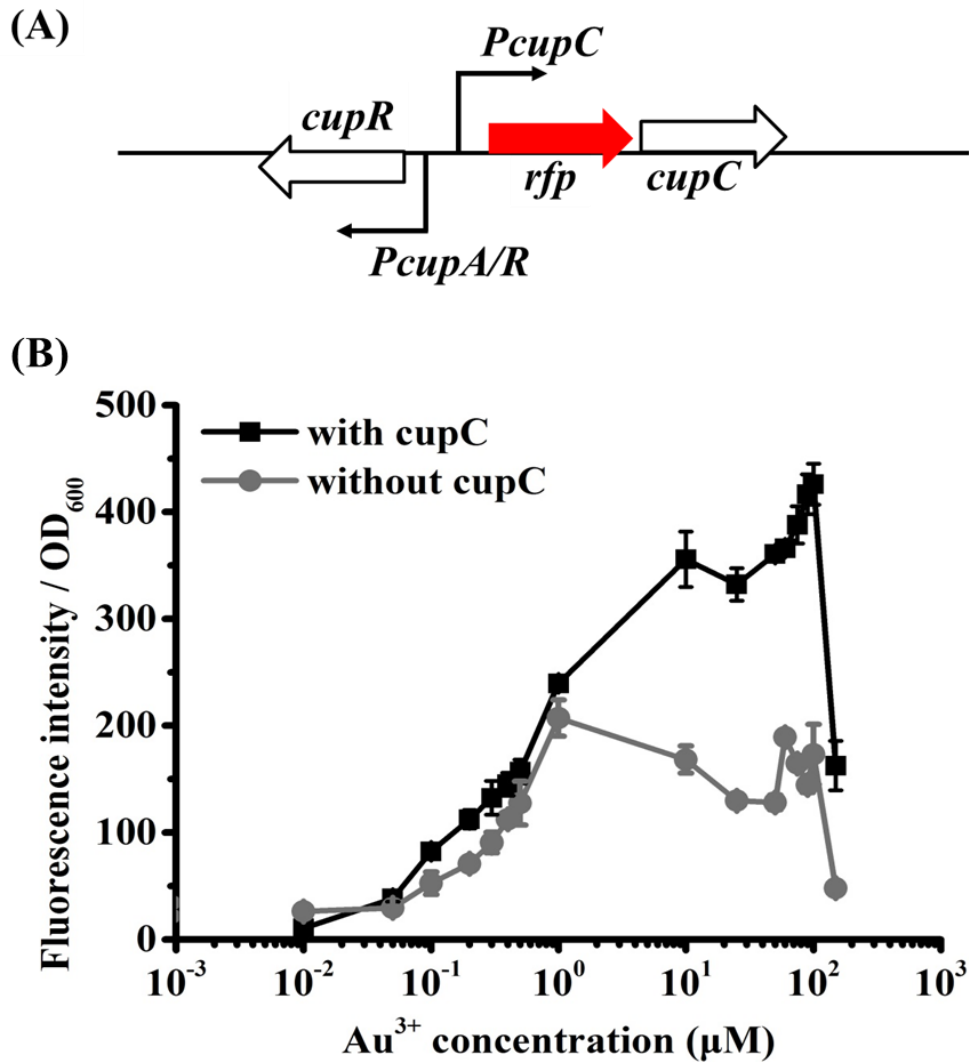


Fig. 4-27 *R. eutropha* 和 *cupR(rev)-PcupA/R-PcupC-rfp-cupC* 的質體基因組感測器。

(A)在原本的質體基因組下游，加入一段 *cupC* 的基因組。(B)與原本的感測器在檢測金離子濃度中比較，含有 *cupC* 基因組的感測器整體呈線性上升，相較於原本的質體感測器則是在 1μM 時已經趨近於飽和狀態，此外兩者的耐受性都達到 150μM。¹¹

透過比較可以明顯的看見，含有 *cupC* 基因組的 *R. eutropha* 感測器明顯的整體螢光上升，且還呈線性的上升到金離子濃度 100μM，相較於原本的感測器螢光在 1μM 時已經趨近於飽和狀態，因此我們達到了我們當初

所設定的目標。接著，我們要來檢視其線性回歸的關係。

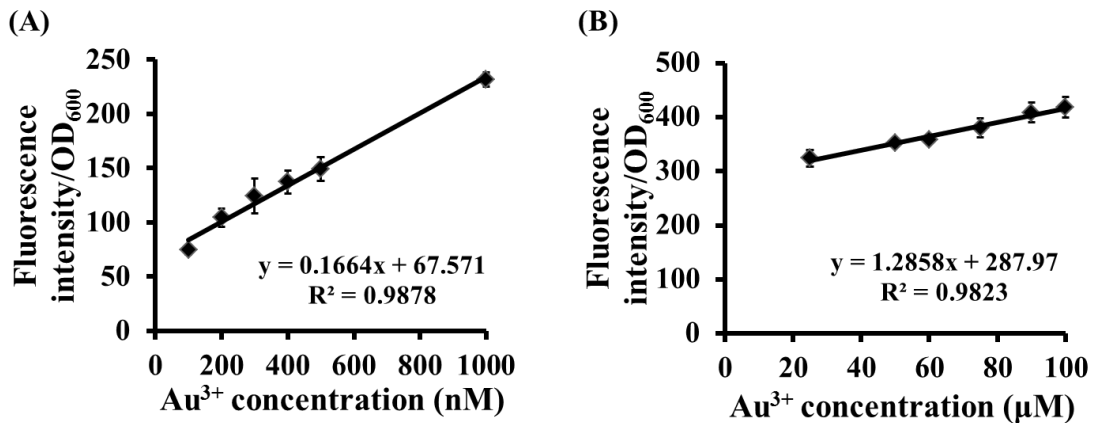


Fig. 4-28 *R. eutropha* 和 *cupR(rev)-PcupA/R-PcupC-rfp-cupC* 的質體基因組感測器高低濃度檢量線。

(A)金離子於低濃度 100~1000nM 的線性回歸。(B)金離子於高濃度 25~100 μM 的線性回歸。¹¹

在金離子濃度的低濃度 0.1~1 μM 可以得到一段線性回歸，且 R 平方值在 0.9878；此外，在金離子濃度的高濃度 25~100 μM 也有一段線性回歸，且 R 平方值在 0.9823。含有 *cupC* 基因組的質體 *R. eutropha* 感測器，不只是提升了整體每單位的螢光強度，更是在定量分析上可以同時定量低濃度和高濃度的範圍。

在得到每單位的螢光強度提升之後，接下來希望能夠提升微生物金離子感測器的耐受性，可以超過 100 μM 並且觀察除了能突破原本 *R. eutropha* 感測器的耐受性之外，還能否有不錯的線性關係。

4.5.2 質體加入 *cupA* 和 *cupC* 的不同組合並與 *R. eutropha* 宿主組成感測器

在前面比較了原本的質體還有加了 *cupC* 基因組的質體，雖然整體每單位的螢光強度有所提升，但是其抵抗重金屬金離子的濃度都只能到 100 μM 左右，所以希望能夠提高 *R. eutropha* 感測器的耐受性。前面 1.2.3

的章節提到的 MerR 家族的調節基因組 *cup* 系統，除了 *cupR* 和 *cupC* 之外，還有一個 *cupA* 基因組，其可製造輸送重金屬的膜上蛋白 CupA，可以幫助微生物體內的金離子排出以減少金離子對微生物造成的毒害。在設計質體方面，我們將設計兩組不同的質體 (Fig. 4-29) 並與之前的質體和加入了 *cupC* 基因組的質體相互比較。

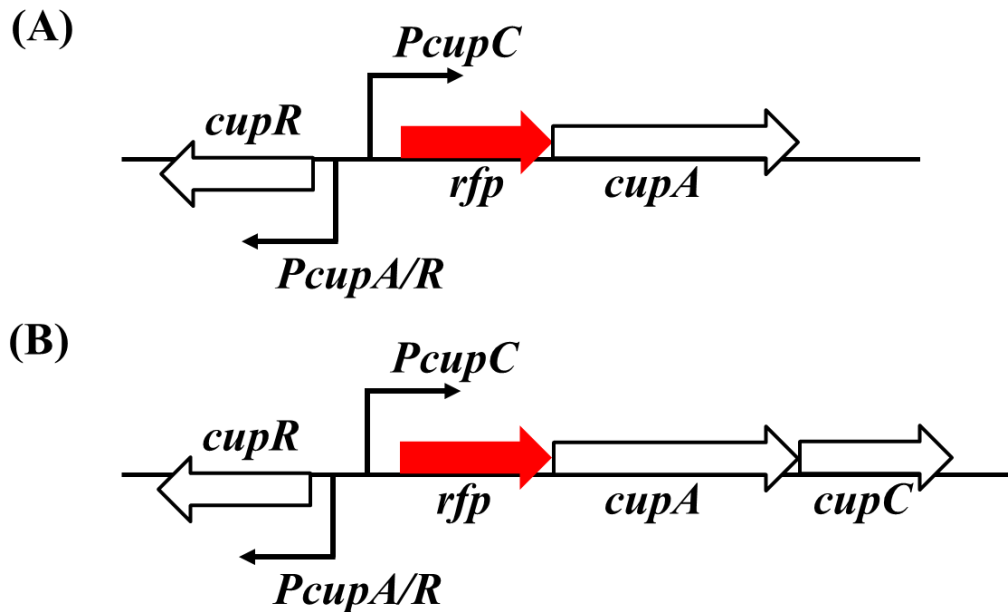


Fig. 4-29 不同的質體設計。

(A) 在原本的質體基因組下游加入了 *cupA* 的基因。(B) 在原本的質體基因組下游依序加入了 *cupA* 和 *cupC* 的基因。

這兩組質體都是使用 *R. eutropha* 當作宿主的感測器，我們分別在質體基因組的下游加入了 *cupA* 和 *cupA-cupC*，接著我們只測試在高濃度的金離子溶液，觀察者兩組的耐受度會不會突破 100 μ M 到更高的濃度：

分別加入金離子 0、90、100、150、200、300、400、500、1000 μ M 的濃度，並用 Multi-Mode Microplate Reader 檢測螢光的強度以及生長的 OD 值，最後與前面原本的質體和加了 *cupC* 的質體作比較。

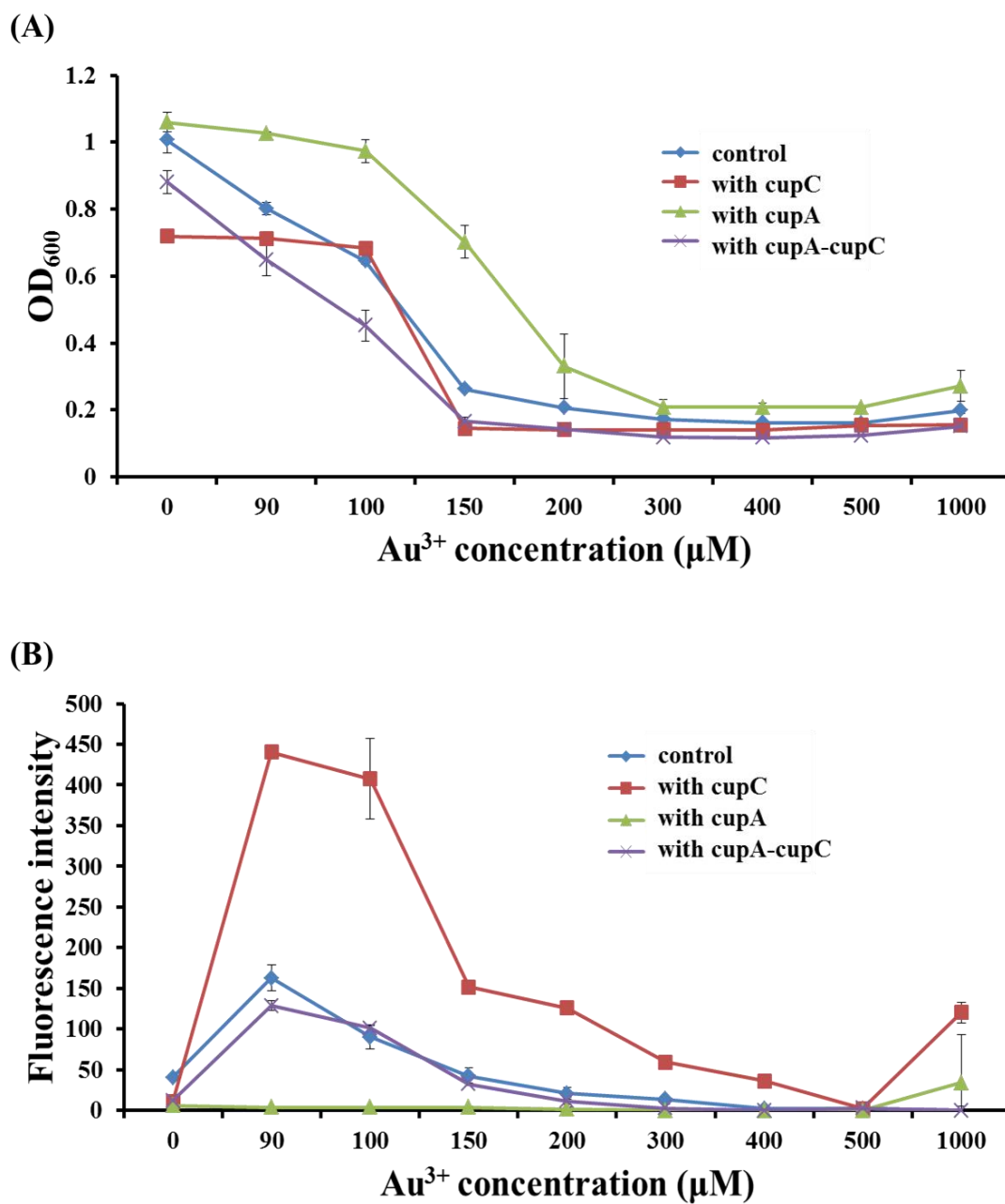


Fig. 4-30 不同質體的 *R. etropha* 的感測器比較。

(A)四組不同質體表現的 OD 值。 (B)四組不同質體表現的螢光強度。

透過結果 **Fig. 4-30** 可以發現，改良後的質體並沒有使 *R. etropha* 感測器對重金屬金離子的耐受度增加，且螢光強度也沒有提升，反而是質體含有 *cupC* 的效果最佳。我們接著將兩個數值相除後，檢視每單位螢光強度的結果：

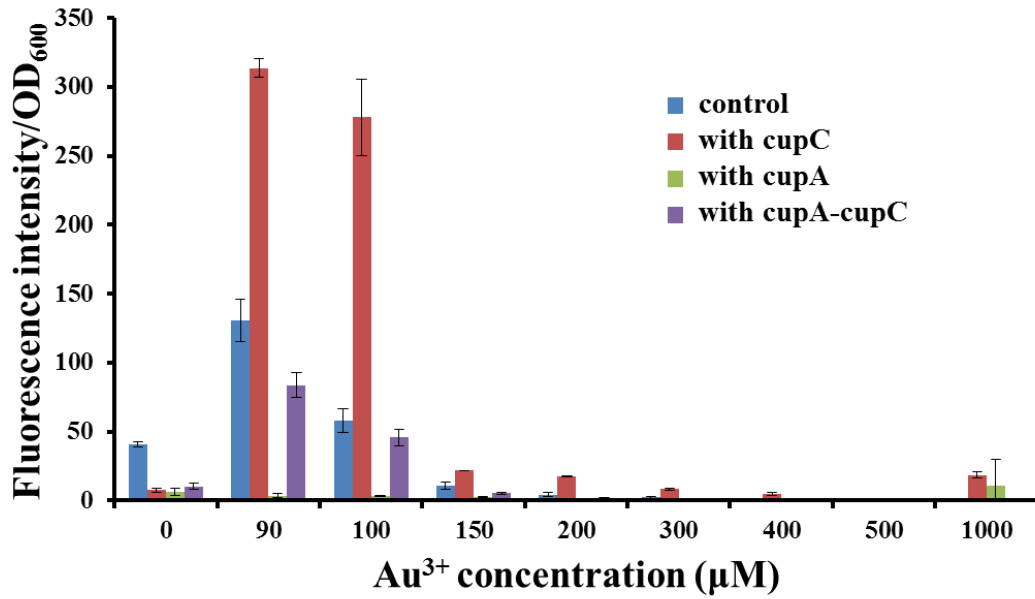


Fig. 4-31 比較四組不同質體的 *R. eutropha* 感測器，其每單位螢光強度及針對高濃度的金離子耐受性。

最後用每單位螢光強度來比較之後，可以更清楚的看到含有 *cupC* 的質體是裡面螢光最佳的，而且耐受性四組質體都一樣，另外新的質體 *cupA* 和 *cupA-cupC* 並沒有特別提高 *R. eutropha* 感測器的耐受度或是螢光。

4.6 螢光顯微鏡下的微生物金離子感測器效率

利用螢光顯微鏡的觀察，我們可以發現各個感測器在有金離子的情況下，其發光的效率：

C. metallidurans *cupR(rev)-PcupA/R-PucpC-rfp* (with Au³⁺)

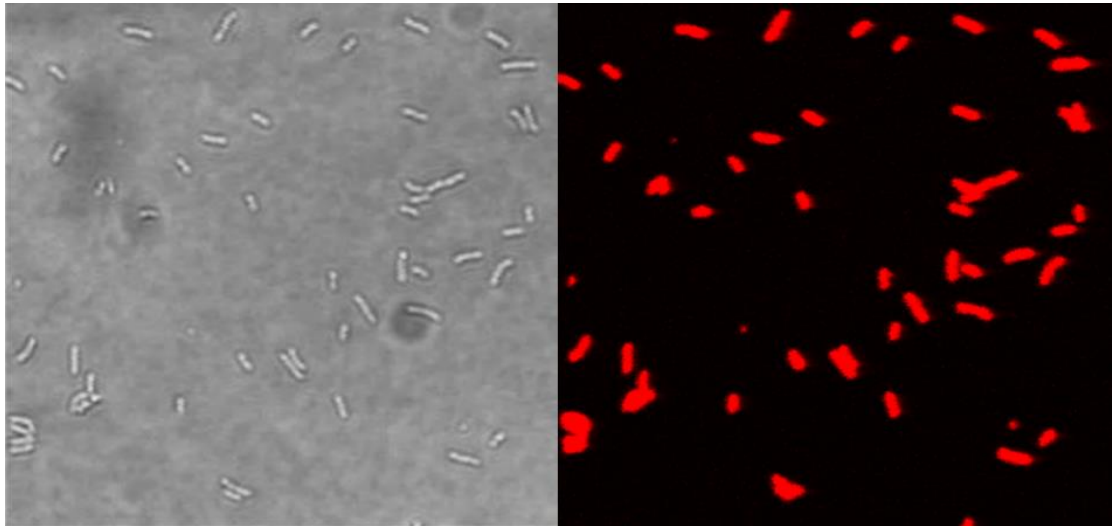


Fig. 4-32 *C. metallidurans* 感測器在有金離子的情況下產生螢光的效率。

對照左圖相位差 (phase contrast)圖來看右圖螢光圖，可以看到每個位置的微生物 *C. metallidurans* 在有金離子的情況下都有螢光的產生。

R. eutropha *cupR(rev)-PcupA/R-PucpC-rfp* (with Au³⁺)

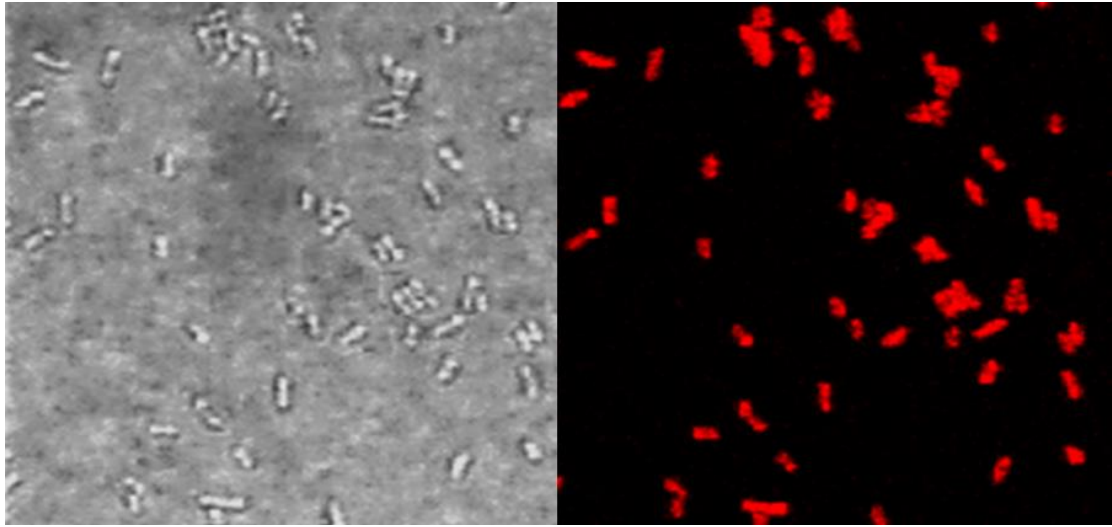


Fig. 4-33 *R. eutropha* 感測器在有金離子的情況下產生螢光的效率。

對照左圖相位差 (phase contrast)圖來看右圖螢光圖，可以看到每個位置的微生物 *R. eutropha* 在有金離子的情況下都有螢光的產生。

R. eutropha *cupR(rev)-PcupA/R-PucpC-rfp-cupC* (with Au³⁺)

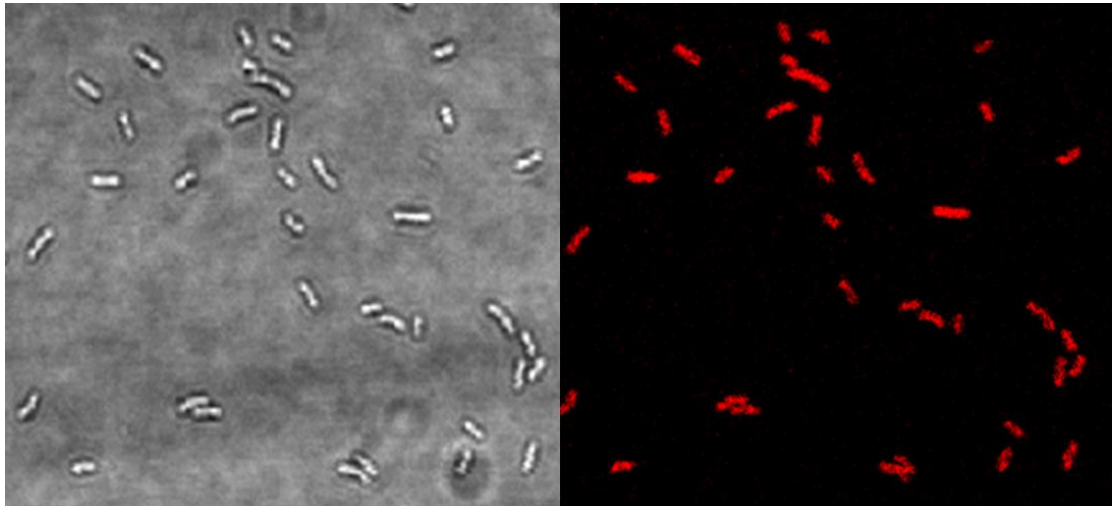


Fig. 4-33 *R. eutropha* 感測器 (含有 *cupC* 基因的質體)在有金離子的情況下產生螢光的效率。

對照左圖相位差 (phase contrast)的圖來看右圖螢光圖，可以看到每個位置的微生物 *R. eutropha* 在有金離子的情況下都有螢光的產生。

第五章 結論

本研究的目的是在於開發並探討生物感測器對重金屬的檢測，尤其是著重在全細胞感測器 (Whole-cell biosensor)，希望能利用快速、低成本、低人力且可以即時觀測等優勢，替代一些傳統的分析方法。

本實驗是透過微生物檢測環境中的重金屬金離子，其中是參考微生物耐金屬貪銅菌 (*Cupriavidus metallidurans*)對金的調節基因組 *cup* 設計出質體，並利用生物遺傳基因工程將質體轉化 (transformation)到大腸桿菌 (*Escherichia coli*)，再經由接合作用 (conjugation)將質體透過大腸桿菌輸送到 *C. metallidurans*，以 *C. metallidurans* 當作宿主的微生物感測器。為了嘗試此系統能夠通用於其他微生物，我們另外選了青枯桿菌 (*Ralstonia eutropha*)當作宿主，而且因為 *R. eutropha* 和 *C. metallidurans* 一樣都是土壤菌，其生長所需的營養條件簡單又生長快速，可以實際的被應用於環境中。

結果可以發現，*cupR(rev)-PcupA/R-PcupC-rfp* 的質體基因組和宿主搭配效果較佳，搭配 *C. metallidurans* 宿主時得到每單位很高的螢光強度；搭配 *R. eutropha* 宿主則是在劑量回饋的測試中，利用線性回歸在 0~1 μ M 得到了不錯的 R 平方值，但其螢光則是相對較弱。為了能夠增加 *R. eutropha* 感測器的定量的範圍 (因為其每單位的螢光在 1 μ M 之後就飽和了)，所以我們想要增強 *R. eutropha* 感測器的螢光並觀察其劑量回饋曲線的趨勢，希望能增加定量的範圍。

回頭來看微生物耐金屬貪銅菌 (*Cupriavidus metallidurans*)對金的調節基因組 *cup*，我們發現其中 *cupC* 基因 可製造運輸並排解重金屬的蛋白 CupC，還可以幫助 CupR 和 CupA 兩個蛋白質對金離子的結合，所以我們在設計好的質體下游再加入 *cupC* 基因，最後透過回饋反應曲線證明了加

入 *cupC* 基因之後整體 *R. eutropha* 感測器每單位的螢光強度明顯的提升了，且線性回歸的結果不只在低濃度，在高濃度 25~100 μ M 也可以做線性回歸，且 R 平方值和低濃度差不多。

改善了 *R. eutropha* 感測器的螢光強度問題，接著我們想提高 *R. eutropha* 感測器的耐受度，希望可以提高檢測金離子的濃度，所以一樣我們回頭來看 *C. metallidurans* 對金的調節基因組 *cup*，其中還有一個 *cupA* 基因組，其可製造輸送重金屬的膜上蛋白 CupA，可以幫助微生物體內的金離子排出以減少金離子對微生物造成的毒害，故我們將 *cupA* 基因加入於質體下游，另外一組則是將 *cupA-cupC* 基因組加入質體下游後，利用金離子高濃度的測試來檢視四組不同質體的 *R. eutropha* 感測器，雖然最後結果耐受性依然是沒有超過 100 μ M。

整體而言，原本設計的質體配合 *R. eutropha* 當作宿主的感測器，雖在線性方面有不錯的 R 平方值，但在每單位的螢光強度卻不理想，不過利用表現 CupC 蛋白，不只增強了感測器的螢光強度，在高濃度也有不錯的線性關係，對於環境重金屬金離子濃度的定量方面有不錯的應用。

II. 微生物蛋白質顯像技術

第六章 緒論

6.1 生物顯像技術 (biological imaging)

生物顯像技術是近來一直都很熱門的技術，因為應用範圍極廣，在醫學、化學、藥物或是分子生物學都有相關的學門需要此技術，而在生物活體細胞方面，則是致力於研究蛋白質的位置或是動態情況，範圍從細胞表面甚至到細胞質或細胞核都可以被標記且顯像。目前普遍的顯像技術是利用螢光蛋白與目標蛋白質做標記結合，使我們在顯微鏡下可以觀察目標蛋白質的動向，而隨後除了螢光蛋白之外，很多化學標記也陸續出現，比起原本的螢光蛋白體積更小、螢光更亮且時效性較長等優勢，逐漸的被大量研發，不過化學標記有專一性不佳、對細胞有毒等一些問題需要被解決¹²。目前標記的方法還是傾向於研發小分子標籤，因為其優勢可以減少對目標蛋白質的運輸或是運動的干擾，包括螢光分子、抗體抗原或是化學分子，這些小標籤亦可以標記胜肽¹³。

依照標籤的大小，可以分為蛋白質標籤 (protein domain tags)和胜肽標籤 (peptide tags)兩種：利用蛋白質標籤的基因與目標蛋白質的基因結合，經過轉錄轉譯後，蛋白質標籤就會接在目標蛋白質上，最後利用螢光標籤或是特定的化學分子與蛋白質標籤結合，就可以完成標記¹³；胜肽標籤一樣是利用基因和目標蛋白質結合後，經過轉錄轉譯就會接在目標蛋白質上，不過胜肽的體積比起蛋白質要小很多，且本身不會有折疊的限制或是影響目標蛋白質的折疊，之後可以利用螢光標籤、特定的抗體、化學分子或是酵素的催化與化學分子結合，就可以完成標記¹³ (見 Fig. 6-1)。

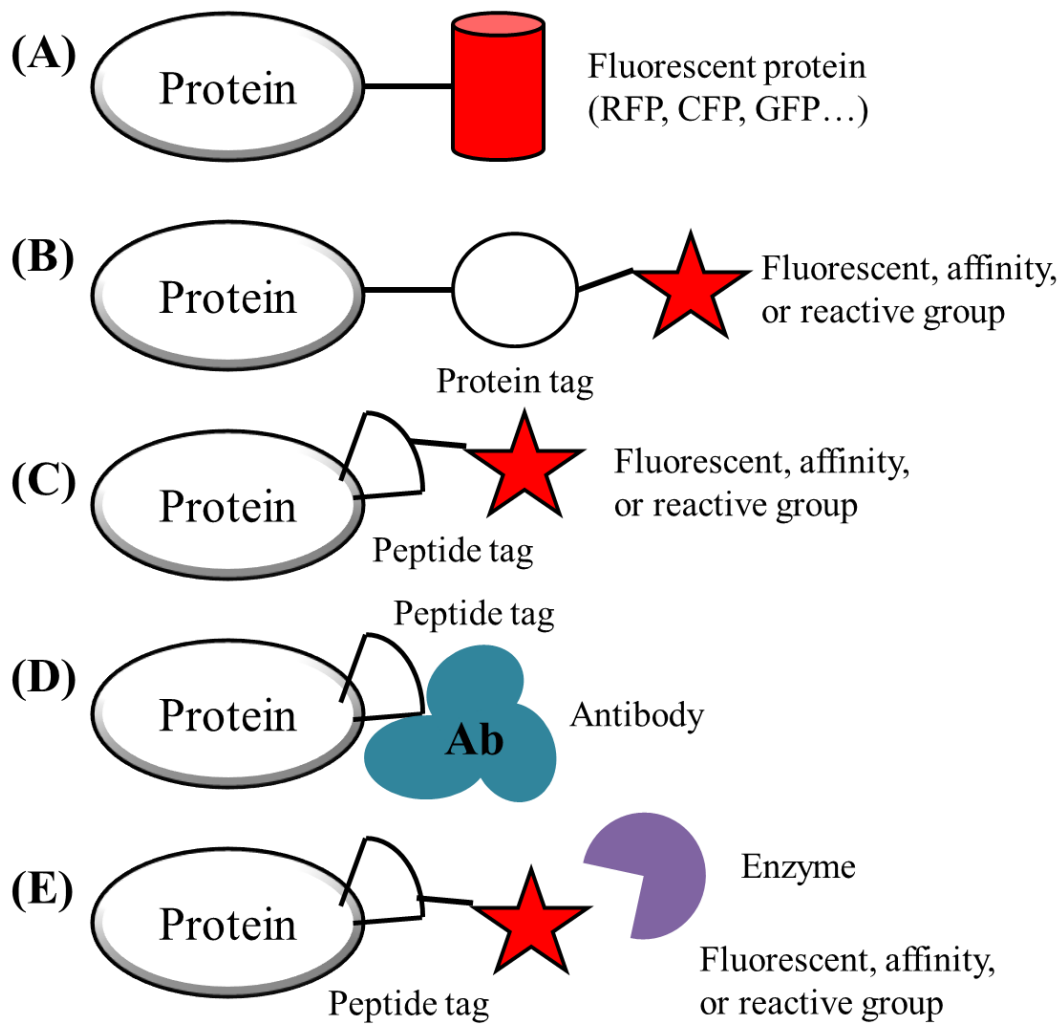


Fig. 6-1 列舉五種常用的標記方法：

(A)傳統的螢光蛋白標記、(B)利用特定的蛋白質做標籤後，再用特定的標籤做標記、(C)利用特定的胜肽做標籤，再用特定的標籤做標記、(D)利用特定的胜肽做標籤，再用特定的抗體做標記和(E)利用特定的胜肽做標籤，需經過酵素的催化後，才可以跟特定的標籤結合並標記¹³。

6.2 生物素化作用 (biotinylation)

運用生物素化作用 (biotinylation)標記並觀察目標蛋白質 (target protein)，此技術是運用一段可結合生物素的胜肽 (biotin acceptor peptide, BAP)，其序列為 GLNDIFEAQKIEWHE，經過生物素的酵素 (biotin ligase, BirA)催化後，就可以與生物素 (biotin)結合 (Fig. 6-2)。我們可以在生物素接上螢光素或是具有螢光性質的粒子 (quantum dots, QDs)，或者是利用與抗生物素蛋白鏈親合素 (streptavidin)與 biotin 結合，因為兩個分子具有很強的作用力和專一性，並在 streptavidin 接上螢光素或是 QDs 完成標記，其中 QDs 為一種奈米粒子，可以抵抗光漂白 (photo bleaching)然後長時間發出較亮的螢光，依照波長不同而有不同的顏色，是常被用於標記並顯像的一種理想標籤¹⁴。

Biotin 是一個很小的有機分子，BAP 可以透過酵素 BirA 催化與 biotin 結合，這是一種常見的標記方法。BirA 是大腸桿菌 (*E. coli*)裡的生物素酵素，可以催化 biotin 和賴氨酸 (lysine)的支鏈做共價鍵的結合，通常會用 BAP 當作標籤與 biotin 做 biotinylation，許多蛋白質標記都會運用此方式，而我們有時會稱為 Avi-tag¹⁵。不管是在試管裡 (in vitro)或是在活體細胞體內 (in vivo)要做 biotinylation 時，BirA 酵素必須和 BAP 胜肽兩個存在且靠近時，使用 biotin 方可使 BAP 接上 biotin，目前為止已經有很多標記細胞表面的蛋白質或是體內的蛋白質都成功的應用此方法標記。

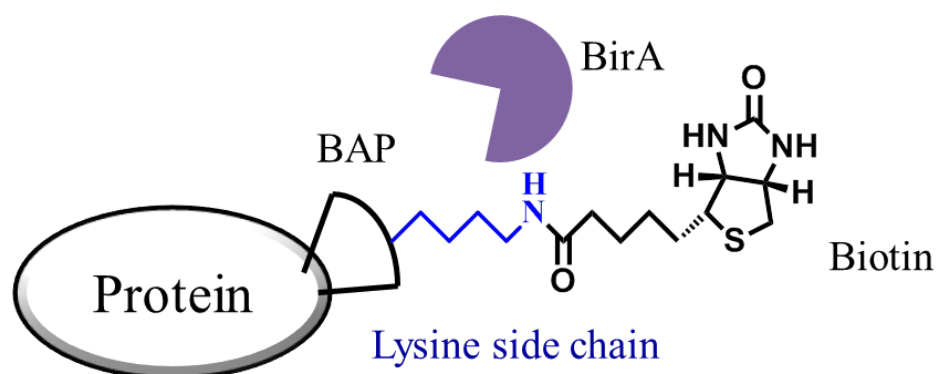


Fig. 6-2 運用 biotinylation 的方法做標記的示意圖。

6.3 目標蛋白質 (target proteins)

利用 biotinylation 的方法標記細胞的蛋白質，其研究成果已經發表在不少的期刊，大部分可分為細胞表面和細胞體內的蛋白質觀察。

6.3.1 細胞表面的目標蛋白質

2005 年 Alice Y. Ting¹⁶ 發表了一篇關於利用 biotinylation 來標記細胞表面蛋白質，並再利用 biotin 接上螢光素來表現被標記的細胞表面上目標蛋白質的位置，再透過最一開始的螢光蛋白，標記同樣位置的細胞表面上目標蛋白質後相互對照，可以發現其專一性和螢光強度都很不錯 (Fig. 6-3)。

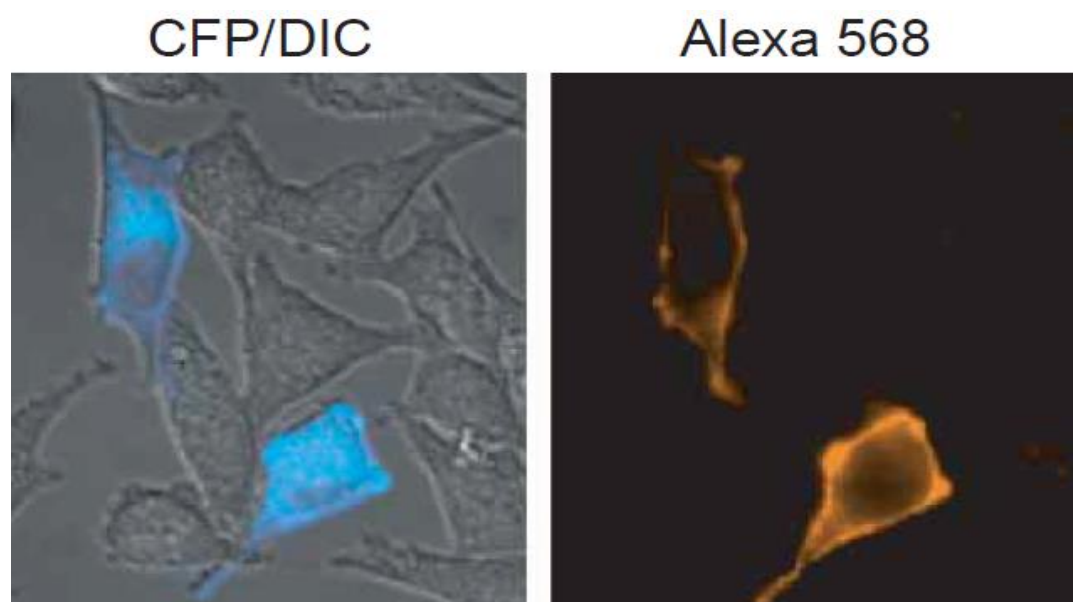


Fig. 6-3 兩圖皆是同一個區域的 HeLa (Helen Lane) 細胞圖，並標記細胞的表面蛋白質。

左圖為運用微分干涉差顯微鏡 (DIC) 和螢光顯微鏡的重疊圖，是傳統的螢光蛋白標記法當作對照圖；右圖螢光顯微鏡的圖是 biotinylation 的標記法，並使用 Alexa 568 的合成螢光素當作標籤¹⁶。

經過比照後可以發現，用 biotinylation 標記的方法跟原本螢光蛋白標記的方法結果差不多，在比照前面提到的優勢，biotinylation 是個可行且專一性很好的標記方法。

本實驗要利用 biotinylation 的方法，標記微生物膜上的蛋白質，並用原本的螢光蛋白比較兩者的標記效果及螢光強度。目標的蛋白質則是大腸桿菌外膜上的蛋白質 FhuA (outer membrane iron transporter protein)，它是位於外膜上的鐵離子或鐵色素 (ferrichrome) 的輸送蛋白¹⁷，我們將 FhuA 接上 BAP 後，另外將 BirA 的酵素蛋白質純化出來，再把含螢光素的 biotin 和 BirA 加入於培養液中培養，最後透過螢光顯微鏡觀察結果。

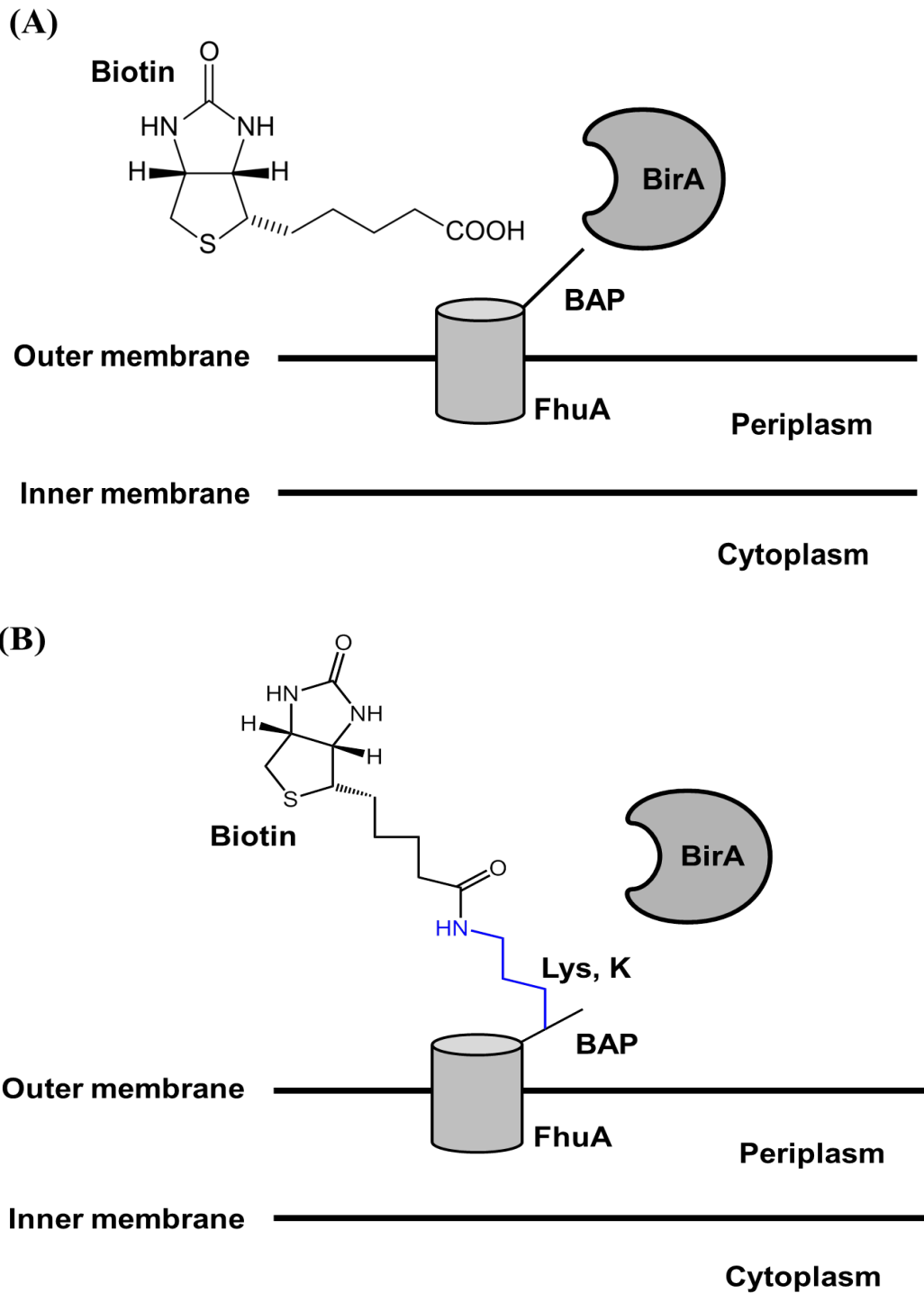


Fig. 6-4 FhuA 蛋白質用 biotinylation 標記的示意圖。

(A) 微生物表現 FhuA-BAP 的蛋白質到外膜上並在培養液中加入純化的 BirA 酵素和 biotin 做 biotinylation。 (B) 經過催化後，BAP 中的賴氨酸 (Lysine, Lys) 的支鏈接上 biotin。

6.3.2 蛋白質與蛋白質之間的作用 (Protein-protein interaction)

在細胞內複雜的環境中，若要控制蛋白質完全表現其功能，有時須仰賴其他協同蛋白質的幫助。目前已經有很多相關的研究在探討蛋白質與蛋白質之間的交互作用 (protein-protein interactions, PPIs)，大部分都是利用雙分子螢光互補 (bimolecular fluorescence complementation, BiFC) 的方法來標記兩邊的蛋白質。

BiFC 的技術是利用螢光蛋白在某些特定位置切開成兩個片段，這兩個片段不會自行發光 (失去原本螢光蛋白發光的特性)，將兩個片段分別接上不同的蛋白質上，如果兩個蛋白質有交互作用而靠近時，兩個螢光蛋白的片段也會靠近並互補，而重新形成具有活性的螢光蛋白並且發光，這個方法不但可以觀察兩個蛋白質的運動和位置，還證明兩個蛋白質確實存在交互作用¹⁸。不過，BiFC 有下列缺點：如兩個螢光蛋白片段互補重建的時間需要大於一小時、只有短暫的螢光、為不可逆反應或背景訊號太強等問題，因此需要其他新的方法來改善¹⁸。

2008 年，Alice Y. Ting¹⁹發表了利用 biotinylation 的標記方法來研究蛋白質與蛋白質之間的交互作用，他們將 BirA 接在一個蛋白質上，而當另一個有接上 BAP 的蛋白質與其靠近並有交互作用時 (Fig. 6-5)，BirA 將會催化 BAP，此時加入 biotin 即可檢視 biotinylation 的過程，隨後加上與 biotin 有很強作用力的分子抗生物素蛋白鏈親合素 (streptavidin) 檢視。

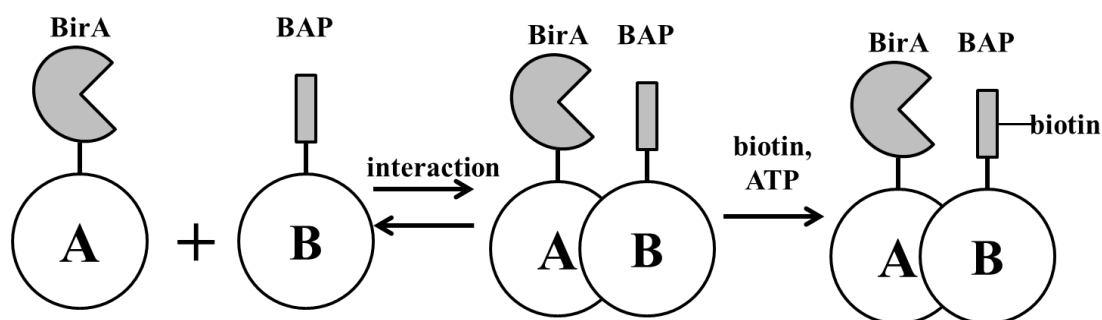


Fig. 6-5 蛋白質 A 與蛋白質 B 間的交互作用，分別接上 BirA 酵素和對其具有專一性的胜肽做 biotinylation 標記並檢視¹⁹。

該篇的重點是將 BirA 和 BAP 的專一性運用於哺乳類細胞裡，而 BirA 為大腸桿菌裡的酵素，不會另外催化其他蛋白質；BAP 則是不會被哺乳類細胞中的生物素催化酵素所辨識，如此實驗才可以不被其他外在的因素干擾下，準確研究出兩個蛋白質間的交互作用¹⁹。

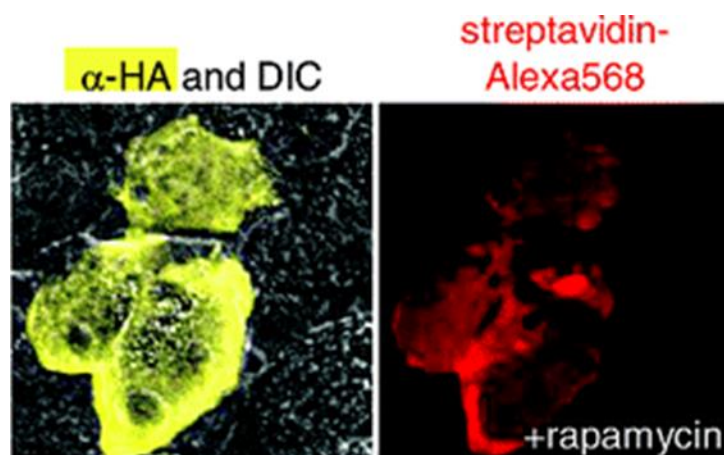


Fig. 6-6 螢光顯微鏡下觀察 HEK 細胞中的 FKBP/FRB 兩個蛋白質間的交互作用。

兩個蛋白質 (FRB/FKBP) 分別接上酵素 BirA 和標籤 BAP 後，加入兩個蛋白質間的調節分子雷帕黴素 (rapamycin) 並做 biotinylation 並檢視。左圖運用微分干涉差顯微鏡 (DIC) 和螢光顯微鏡的重疊圖並利用傳統螢光蛋白質標記做對照圖；右圖為在螢光顯微鏡下，利用 biotinylation 的方法標記後加入含有合成螢光素 Alexa568 的 streptavidin¹⁹。

蛋白質間的交互作用實驗，透過觀察常被研究的 FKBP (FK506 binding protein) 和 FRB (FKBP-rapamycin binding protein) 蛋白質，兩者是透過辨識調節分子雷帕黴素 (rapamycin) 存在時，才會產生交互作用。將 FKBP 接上 BAP 的胜肽；FRB 接上 BirA 的酵素後，利用人類胚胎的腎細胞 (human embryonic kidney cell, HEK cell) 來表現兩種蛋白質 FRB-BirA 和 FKBP-BAP 後，觀察 biotinylation 的標記方法 (已經加入 rapamycin 之後) 有沒有成功。將傳統的螢光蛋白標記法當作對照來比較，可以發現兩者的效果差不多，

但 biotinylation 的標記方法只需要幾分鐘即可，而螢光蛋白的培養則是需要花較長的時間¹⁹。

本實驗則是想運用一樣的方法，觀察微生物體內的蛋白質與蛋白質間的交互作用，我們選擇兩個作用力很強的蛋白質 FtsZ 和 ZapA 當作目標蛋白質²⁰，並分別於 FtsZ 接上 BAP 和 ZapA 接上 BirA 後，利用微生物表現 FtsZ-BAP 和 ZapA-BirA 兩個重組蛋白質並加入 biotin 含螢光分子行 biotinylation，最後透過螢光顯微鏡檢視觀察。FtsZ 是大腸桿菌在進行細胞分裂時，會集中在細胞中央並形成一個類似環的結構 (Z-ring)；ZapA 則是當 Z-ring 形成時會與 FtsZ 產生交互作用並穩定 Z-ring 的形成²¹，故當我們判別 biotinylation 的標記方法有沒有成功時，僅需觀察在微生物中間有無條狀或是環狀的螢光形成。

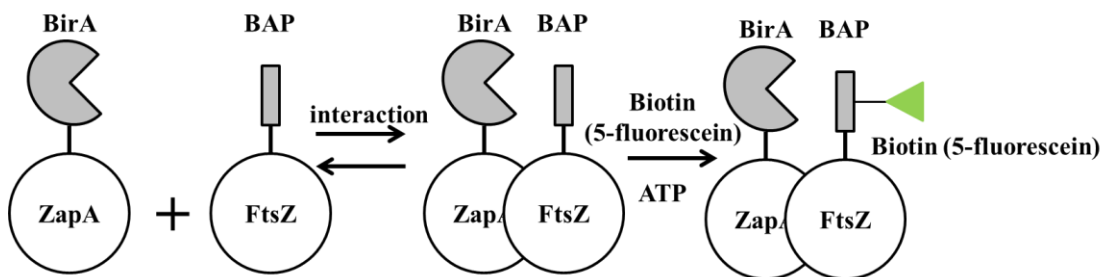


Fig. 6-7 蛋白質 FtsZ 與 ZapA 交互作用透過 biotinylation 標記的示意圖。 微生物表現含有標籤 BAP 的蛋白質 FtsZ 和含有酵素 BirA 的蛋白質 ZapA 後，加入生物素螢光衍生物，即可將生物素標記在標籤上並觀察蛋白質與蛋白質間的交互作用。

6.4 研究動機

生物顯像技術因為應用範圍極廣，在生物活體細胞方面，則是從細胞表面甚至到細胞質或細胞核的蛋白質都可以被標記且顯像。螢光蛋白在生物蛋白質顯像的技術中，一直都是普遍被使用的技術，尤其擁有不錯的專一性而廣受歡迎，但缺點是其分子量較大，有可能會對目標蛋白質造成干擾。然而，後續有很多標記的方法出現，有蛋白質標籤的標記方法，還有則是胜肽標籤的標記方法，但大部分都有專一性不佳、螢光強度不強或是背景訊號干擾，因此透過生物素化作用 (biotinylation)來標記並觀察目標蛋白質 (target protein)，當結合生物素的胜肽 (biotin acceptor peptide, BAP) 經過生物素的酵素 (biotin ligase, BirA) 催化後，就可以與生物素 (biotin) 結合，有不錯的專一性且標記所花的時間較少。

除了研究單一蛋白質的運動之外，還可以利用生物素化作用標記的方法來研究細胞中蛋白質與蛋白質間的交互作用，所以應用此標記法來彌補原本螢光蛋白標記法不足的地方，提供了更多技術選擇投入對蛋白質的研究。

6.5 研究目標

前面提到的標記方法，大部分都應用在哺乳類動物細胞中，只有幾種方法是用在微生物中，且只有螢光蛋白標籤的標記最常被用於觀察活體微生物中的蛋白質，其他標記法幾乎都是要先將微生物裂解後純化出目標蛋白質，或是將微生物製成標本後才能做標記。

本實驗嘗試將 BirA 酵素與 BAP 標籤的 biotinylation 標記法應用在活體微生物上，再透過螢光顯微鏡觀察。實驗不只標記微生物外膜上的蛋白質，也觀察體內蛋白質與蛋白質間的交互作用。

第七章 實驗藥品與器材

7.1 實驗儀器

名稱 (中文)	名稱 (英文)	廠牌
高速冷凍多用途離心機	Centrifuge(Refrigerated)	Hettich
數位顯示型乾浴器	Dry Bath	Basic Life
離心機	High-Performance Micro-Centrifuge	WiseStir
螢光數位影像照膠系統	Image Analysis System	SmartGel™
電泳槽	Mini Horizontal Gel Electrophoresis System	Major Science
蛋白質轉漬	Mini Tank Transfer Unit	Amersham Biosciences
垂直電泳系統	Mini-vertical Gel Electrophoresis Unit	Amersham Biosciences
光學顯微鏡	Optical Microscope	ZEISS
恆溫迴轉式振盪培育箱	Orbital Shaking Incubator	Firstek
酸鹼度測試儀	pH Meter	CLEAN
超音波細胞破碎機	Sonicator	Qsonic
熱循環儀主機	Thermal Cycler	Arktik™
精密天平	Uni Bloc Electronic Balance	Shimadzu
多功能試管振盪器	Vortex	Scientific Industries
精密恆溫水槽	Water Bath	Firstek

7.2 實驗藥品

名稱 (中文)	名稱 (英文)	廠牌
丙烯酰胺/甲叉雙丙烯 酰胺	Acryl/Bis™ 37.5:1 (Acrylamide solution)	AMRESCO
瓊脂	AGAR	Zymeset
瓊脂糖	Agarose	Zymeset
牛血清白蛋白	Albumin, Bovine serum	Bioshop Canada
過硫酸銨	Ammonium persulfate (APS)	AMRESCO
腺甘三磷酸	ATP (Adenosine 5'-triphosphate disodium salt hydrate)	Sigma-Aldrich
生物素螢光衍生物	Biotin (5-fluorescein) conjugated	Sigma-Aldrich
Bradford 蛋白質定量 檢測試劑	Bradford Reagent	AMRESCO
二甲基砒	Dimethyl sulfoxide (DMSO)	AMRESCO
溴化乙啶	Ethidium bromide (EtBr)	AMRESCO
乙烯二胺四醋酸二鈉	Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate (EDTA)	Fluka Chemie (Sigma)
甘油	Glycerol	Zymeset
His•Tag 蛋白質純化 樹脂	HisPur™ Ni-NTA Resin	Thermo Scientific

鹽酸溶液	Hydrochloride	AMRESCO
三水合四氯金酸	Hydrogen tetrachloroaurate(III) trihydrate	Acros Organics
咪唑	Imidazole	AMRESCO
蛋白質染色劑	Imperial™ Protein Stain	Thermo Scientific
異丙基-β-D-硫代吡喃	IPTG	AMRESCO
半乳糖苷		
硫酸卡那黴素	Kanamycin sulfate	Zymeset
蛋白質電泳 Sample 緩衝液	Laemmli Loading Buffer 4X	AMRESCO
阿拉伯糖	L(+)-Arabinose	Acros Organics
LB 培養基	LB Broth Miller (Lysogeny Broth or Luria-Bertani Medium)	Zymeset
溶菌酶	Lysozyme	Sigma-Aldrich
磷酸鹽緩衝液	10X PBS Buffer (Phosphate buffered saline)	BasicLife Bioscience
pH 標準校正液	pH Standard solution (pH=4, 7, 10)	Clean
蛋白酶抑制劑	Protease Inhibitor	Roche Diagnostics
氯化鈉	Sodium chloride	AMRESCO
十二烷基硫酸鈉	Sodium dodecyl sulfate (SDS)	AMRESCO
氫氧化鈉	Sodium hydroxide	AMRESCO

磷酸氫鈉	Sodium phosphate dibasic anhydrous	AMRESCO
四甲基乙二胺	TEMED	AMRESCO
Tris 緩衝液	Tris Buffer 0.5M Solution pH6.8	AMRESCO
Tris 緩衝液	Tris Buffer 1.5M Solution pH8.8	AMRESCO
聚山梨醇脂 20	Tween® 20	AMRESCO
聚乙二醇辛基苯基醚	Triton® X-100	AMRESCO

第八章 實驗方法

8.1 質體設計和基因工程 (cloning)

8.1.1 質體設計

首先，我們要觀察微生物外膜上的蛋白質 FhuA，所以我們要將標籤 BAP 接在 FhuA 上 (Fig. 8-1 (A)) 並利用啟動子 (promoter) 和誘發劑 (inducer) 來控制微生物合成含有標籤的 FhuA 蛋白質表現在外膜上，之後只要再外加酵素 BirA 和生物素螢光衍生物 [Biotin (5-fluorescein) conjugated]，透過螢光顯微鏡觀察 FhuA 蛋白質有沒有被標記成功 (Fig. 8-2)。

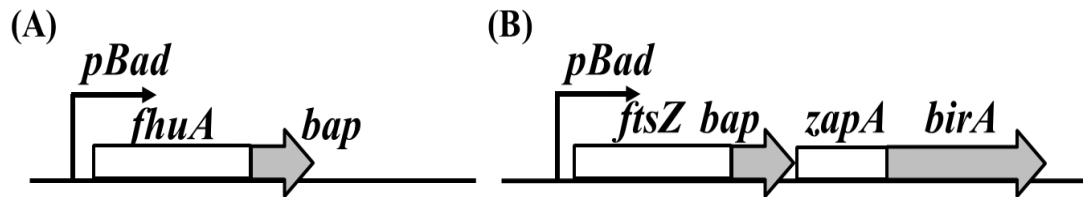


Fig. 8-1 質體的設計。

(A) 為觀察微生物表面的蛋白質 FhuA，而將 BAP 標籤接在 FhuA 上，(B) 則是將兩個蛋白質 FtsZ/ZapA 分別接上 FtsZ-bap/ZapA-birA 的標籤，透過啟動子 pBad 與誘發劑阿拉伯糖 (L(+)-Arabinose) 來調控微生物做蛋白質的合成。

接著，除了觀察微生物外膜上的蛋白質之外，我們還要觀察微生物體內蛋白質與蛋白質之間的交互作用，分別是蛋白質 FtsZ 和蛋白質 ZapA，我們分別在兩個蛋白質接上標籤和酵素，為 FtsZ-BAP 與 ZapA-BirA (Fig. 8-1 (B)) 並利用啟動子 (promoter) 和誘發劑 (inducer) 來控制微生物合成，最後再加入生物素螢光衍生物 [Biotin (5-fluorescein) conjugated] 並用螢光顯微鏡觀察微生物中的蛋白質與蛋白質的交互作用 (Fig. 8-3)。

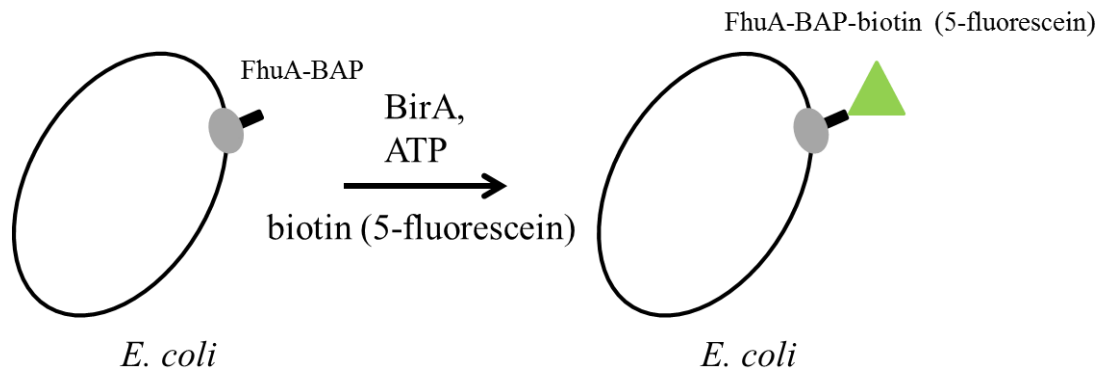


Fig. 8-2 FhuA 蛋白質用 biotinylation 標記的模型圖。

微生物表現含有標籤 BAP 的外膜蛋白質 FhuA 後，加入純化好的酵素 BirA、ATP 和生物素螢光衍生物，即可將生物素標記在目標蛋白質上。

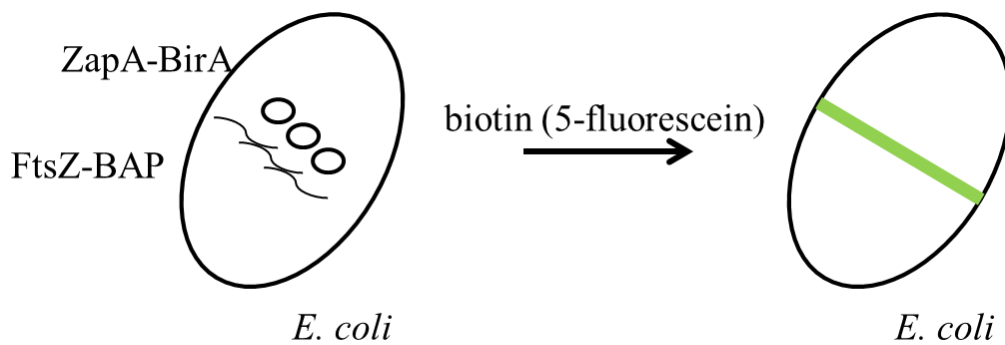


Fig. 8-3 蛋白質 FtsZ 與 ZapA 交互作用透過 biotinylation 標記的模型圖。

微生物表現含有標籤 BAP 的蛋白質 FtsZ 和含有酵素 BirA 的蛋白質 ZapA 後，加入 ATP 和生物素螢光衍生物，即可將生物素標記在標籤上並觀察蛋白質與蛋白質間的交互作用。

8.1.2 質體基因工程 (cloning)

首先，將設計好的質體開始以基因工程的方式，將每個部份的基因組合起來，其過程會經過選育、篩選、定序最後儲存。

A. 選育

1. 引子 (primer)

透過網路尋找要 cloning 的目標物基因，並將其基因序列取前端 (5 端)和後端 (3 端)設計成 20~30 bp 長的引子 (primer)後，再委外以人工方式合成。

以下 **Table 8-1** 為本實驗用到的引子：

Primers	Sequence
fhuA_EcoRI fw	TTTTgaattcaaaagatctagatctttaagaaggagatataatggc
fhuA-bap_XhoI rv	TTTTctcgagtcactcgagctcgtgccattcgatcttctggcctcgaag atgctgttcaggccgaagcggagggtggcgggtggc
birA_NdeI fw	TTTTcatatgaaggataacaccgtgccactg
birA_EcoRI rv	TTTTgaattcggttttctgcactacgca
ftsZ_EcoRI fw	tttgaattctttaagaaggagatataatgtttgaaccaatggaacttaccat ga
ftsZ_BglII rv	tttagatctatcagcttgcttacgcaggaatgc
bap oligo_BglII/NdeI	gatctggcctgaacgacatcttcgaggccagaagatcgaatggcagag taaca
Bap oligo com _BglII/NdeI	tatgttactcgtgccattcgatcttctggcctcgaagatgctggttcaggcca
zapA_NdeI fw	TTTTcatatgtctgcacaaccgctcgatatccaa
zapA_BamHI rv	tttggatccttcaaagtttggttagtttttcggtg
birA_BamHI fw	tttggatccatgaaggataacaccgtgccactg
birA_XhoI rv	tttctcgagttatcttctgcactacgcaggg

Table 8-1 引子的名稱和序列。

2. 基因片段 (insert)

透過 PCR 儀器進行聚合酶連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction)，其中引子 (primer) 結合目標基因片段的前端及後端，引導 DNA 聚合酶開始 DNA 的合成，並且能快速又大量的得到目標基因片段。

接著使用洋菜膠配置膠體，做膠電泳分析來分離 DNA 片段大小 (在這裡是要確認 PCR 之後的目標基因片段是否有成功)，最後透過 DNA 比對尺 (Ladder) 找出目標基因片段後，將其分離並純化。

膠電泳分析之後切下來的膠體，使用 Geneaid™ Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit 將含有目標基因片段的膠體純化並最後加入純水 (ddH₂O) 回收目標基因片段，可將其保存於 4°C or -20°C 的環境。

3. 載體 (vector)

取一個含有質體的大腸桿菌 (含有 Kanamycin 的基因)，將其長於培養液 Luria-Bertani medium (LB medium) 6mL 並加入 1% 的 Kanamycin (Kan)，再將其培養於 37°C 的培養箱並以 250 rpm 轉速培養隔夜。

隔日，使用 Presto™ Mini Plasmid Kit 純化菌液的質體，最後總共加入 30μL 的純水 (ddH₂O) 得到質體並保存於 4°C or -20°C 的環境。

4. 裁減 (digestion)

第二型限制內切酶 (Type II restriction enzyme) 會辨認目標基因中的特定序列，並水解核苷酸之間的磷酸二酯鍵，產生平整或是粘性端切口。

將上述載體和 PCR 出來的目標基因片段，於 37°C 的培養箱以相同的限制酶裁減約 2~4 小時後，再使用 Geneaid™ Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit 純化出載體及目標基因片段，最後可得到有相同的缺口的載體和目標基因片段，緊接著進行連接酶作用反應 (ligation)。

5. 連接作用 (ligation)

使用連接酶 (ligase)將裁切好的載體和目標基因片段一起反應並置於室溫約 1~2 小時，使載體和目標基因片段可以結合，形成完整質體。

6. 轉化 (transformation)

透過轉化作用可以將質體植入微生物體內，使微生物獲得額外的遺傳物質。將剛剛接合作用完的質體，利用轉化作用，將其植入大腸桿菌體內，在塗上含有 Kanamycin 抗生素的培養基上，置於 37°C 的培養箱培養一個晚上。

B. 篩選 (screen)

經由轉化作用得到質體的微生物，會先經過 Kanamycin 抗生素的篩選後，才會生成一個一個的菌落 (colony)，但為了更精準地確認此菌落的微生物是否含有完整的質體，我們會各別選擇可結合載體和目標基因的引子來做 PCR，透過這樣的檢查，可以確保目標系統中的質體有正確的基因序列。

C. 定序

將篩選過後的菌落或是將其質體抽出後，將其和可以包含目標基因片段的引子 (前端或是後端皆可)送至生技公司進行定序，再將定序後的結果作比對，查看否是是接合正確的質體。

D. 儲存 (glycerol stock)

整個實驗完成後，將正確的菌落長於培養液中並包含 1% 的 Kanamycin (Kan)，培養於 37°C 的培養箱並以 250 rpm 的轉速培養隔夜。

隔日，取 700 μ L 的菌液並混合 300 μ L 的甘油 (glycerol)於保存管中，在儲存於-80°C 中。甘油的在低溫中能避免水結冰，使得微生物不會死亡，而且低溫可降低細胞活性，延長保存的時間。

8.2 蛋白質純化 (protein purification)

將要純化的蛋白質 BirA 設計出其對應的基因引子後，透過 PCR 放大出完整的基因組，再插入至含有標籤 His-tag 的載體中，最後將其轉化到 *E. coli* BL21 的菌株中 (此菌株的特性會大量表現蛋白質)。

8.2.1 蛋白質標記 (His-Tag)

首先，要先讓含有質體的 *E. coli* BL21 表現大量的蛋白質 BirA，然後再破壞細胞壁、細胞膜，使內部表現的蛋白質得以釋放。

[溶液配置]：

1M Tris-HCl: 7.882g Tris-HCl + 49.797mL ddH₂O

5M NaCl: 14.61g NaCl + 47.912mL ddH₂O

Lysis Buffer: (25mM Tris-HCl + 200mM NaCl) pH 8.0

12.5mL 1M Tris-HCl

20mL 5M NaCl

0.5mL 10N NaOH

467mL ddH₂O

Protease Inhibitor Buffer: 一錠 Protease Inhibitor + 1mL ddH₂O

Lysis Buffer: (含 Lysozyme)

1mg/1mL Lysozyme

100μL Protease Inhibitor Buffer

30μL DnaseI

1M Imidazole: 3.404g Imidazole + 44.565mL ddH₂O

Wash Buffer: (Lysis Buffer + 20mM Imidazole)

1mL 1M Imidazole

49mL Lysis Buffer

Elution Buffer: (Lysis Buffer + 400mM Imidazole)

20mL 1M Imidazole

30mL Lysis Buffer

[實驗步驟]：

1. 將含有質體的 *E. coli* BL21 長於 5mL 的 LB 培養液 (已高溫高壓殺菌，含 5 μ L 的 Kan)，置於 37 $^{\circ}$ C 的培養箱並用 250rpm 的轉速培養隔夜。
2. 將其中 3mL 的菌液稀釋到含有 150mL LB 培養液的 500mL 的錐形瓶中 (加 150 μ L 的 Kan)，並置於 37 $^{\circ}$ C 的培養箱以 250rpm 的轉速培養。
3. 當細菌生長到 OD₆₀₀ 的吸收值約 0.4~0.6 左右 (約稀釋後 4 小時)，即可加入 150 μ L 的 1M IPTG (異丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷)，放入 18 $^{\circ}$ C 的培養箱並用 250 rpm 搖 22 小時。
4. 在 22 小時之後，用事先測量好重量的 falcon tube 加入菌液並離心 (6000rpm) 10 分鐘，倒掉上清液後再加入剩餘的菌液並再離心直到蒐集完所有的菌體。

[保存]：用 Lysis Buffer 混合沉澱的菌後，離心 (6000rpm) 10 分鐘，倒掉上清液後再用液態氮瞬間冷凍後保存於-80 $^{\circ}$ C 冰箱中。

[取出]：從-80 $^{\circ}$ C 冰箱取出後，要先放在冰中冰浴 10 分鐘。

5. 測量含有菌的 falcon tube 的重量後，以沉澱的菌重量比 Lysis Buffer (含 Lysozyme) 的體積 (6.3g : 30mL) 加入 Lysis Buffer (含 Lysozyme)，均勻混合後置於 4 $^{\circ}$ C 冰箱冰浴並輕搖 30 分鐘。
6. 將 falcon tube 置於冰塊中 (保持冰浴狀態)，並用超音波細胞破碎機 (Sonicator) 來打碎細胞 (共 10 分鐘，30 秒超音波震盪，30 秒靜止，總輸出功率 90%)。
7. 完成後在 4 $^{\circ}$ C 下用最大離心轉速 (9000rpm) 40 分鐘。

[保存]: 離心前先取 100 μ L 出來保存, 並再取其中的 10 μ L 出來後, 加入 4 \times Loading Buffer, 以 95~98 $^{\circ}$ C 乾浴 5 分鐘, 最後將其保存於 -20 $^{\circ}$ C 的冰箱中。

8. 離心完成後取上清液, 並加入 1mL Ni-NTA resin 並置於 4 $^{\circ}$ C 冰箱冰浴並輕搖 3 小時。

[前置]: Ni-NTA resin 加入前要先漏掉管內的酒精, 再用 Lysis Buffer 洗 (加滿管柱), 前兩次都要均勻混合且搖晃, 第三次則要於 4 $^{\circ}$ C 冰浴 30 分鐘, 最後漏掉 Lysis Buffer 後就可以加入上清液中。

9. 將含有 Ni-NTA resin 的上清液於 4 $^{\circ}$ C 離心 (700g) 2 分鐘後, 取上清液另外保留於 4 $^{\circ}$ C 冰箱, 剩下的沉澱物則加入 10mL Wash Buffer 均勻混合後, 置於 4 $^{\circ}$ C 冰箱冰浴並輕搖 30 分鐘。

10. 接著再一次於 4 $^{\circ}$ C 離心 (700g) 2 分鐘後, 取上清液另外保留於 4 $^{\circ}$ C 冰箱, 用 Wash Buffer 均勻混合後, 轉移到 column 管並用 Wash Buffer 重複洗 2 次後, 再一次於 4 $^{\circ}$ C 離心 (700g) 2 分鐘, 一樣保留澄清液於 4 $^{\circ}$ C 冰箱。

[備註]: column 管下要接一個 15mL falcon tube, 接離心掉的澄清液。

11. 經過幾次 Wash 的步驟之後, 接著要將附著在 Ni-NTA resin 含有 His-tag 的蛋白質 BirA 給洗提 (Elute) 下來, 故先架好 column 管並在下面用 1.6mL 的離心管接。

12. 用 1mL 的 Elution Buffer 洗提, 共洗提 8 次, 總共得到 8 管洗提下來的產物, 全部要暫時維持在 4 $^{\circ}$ C 左右。

8.2.2 十二烷基硫酸鈉聚丙烯酰胺凝膠電泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophore, SDS-PAGE)

利用樣品內蛋白質分子量的不同進行分離, 經由蛋白質染色劑染色之後就可以明顯看到樣品蛋白質的分布²²。

[溶液配置]：

Resolving solution: (10% protein 16~70kDa)

1.25mL 40% acrylamide/bis 37.5:1 mixture

1.25mL 1.5M Tris-HCl (pH 8.8)

0.025mL 20% SDS buffer

2.475mL ddH₂O

Stacking solution:

0.24mL 40% acrylamide/bis 37.5:1 mixture

0.5mL 0.5M Tris-HCl (pH 6.8)

0.01mL 20% SDS buffer

1.25mL ddH₂O

0.25M EDTA Buffer: (pH 8.0)

18.6129g EDTA

10mL 10M NaOH

190mL ddH₂O

10× Running Buffer: (1L)

30.2g Tris base (pH 10~)

144g Glycine

10g SDS

900mL ddH₂O

1× Running Buffer: (500mL)

50mL 10× Running Buffer + 450mL ddH₂O

10% APS Buffer: (1mg APS/10μL ddH₂O)

0.5g APS + 5mL ddH₂O

[實驗步驟]：

1. 準備好器材後，將鋁片與玻璃間的膠條夾好後固定在基座上，接著將兩頭的扣環鎖緊。
2. 將配好的 Resolving solution 中加入 2.5 μ L TEMED 和 25 μ L 10% APS buffer 並快速的震盪搖晃均勻後，再慢慢地沿著縫隙邊緣加入大約三分之二的高度。
3. 接著再沿著邊緣慢慢加入 ddH₂O 加到滿，為了將 Resolving solution 透過密度的關係將其向下壓緊成形。
4. 靜置 30~40 分鐘後，當 Resolving gel 成形就可將上面的 ddH₂O 倒掉。
5. 接下來將 Stacking solution 中加入 2 μ L TEMED 和 10 μ L 10% APS buffer 並快速的震盪搖晃均勻後，再慢慢地沿著縫隙邊緣加到滿。
6. 插入齒梳並靜置約 30 分鐘左右。
7. 確定凝固後，將裝著膠的玻璃鋁片裝置從基座上取下之後，換到電泳槽中並鋁片朝向槽心。
8. 槽心的中心加入 1 \times Running Buffer 加到滿，外圍也要用 1 \times Running Buffer 加到滿。
9. 拿掉齒梳之後，依序加入 2 μ L 蛋白質顯像量尺 (protein marker, Ladder)、對照組未加 IPTG 的菌中蛋白質、有加 IPTG 的菌中蛋白質與剛剛收集完的 8 個樣品加到膠的格子中。

[備註]：各取 10 μ L 並也各加 10 μ L 4 \times Loading Buffer，先在 95~98 $^{\circ}$ C 乾浴 5 分鐘後，置於室溫 10 分鐘冷卻即可。

10. 啟動電源並以 100V/100 分鐘進行跑膠。
11. 將完成的 SDS-PAGE 小心地取出並靜置於空盒中，加入 ddH₂O 蓋過膠並浸泡約 5 分鐘後，將 ddH₂O 倒掉，重複洗 2 次。
12. 洗完之後，取 10~20mL 的蛋白質染劑 (Imperial™ Protein Stain) 加入，

確定蓋過膠即可，最後浸泡並搖晃於室溫 1 小時。

13. 將蛋白質染劑倒掉並用 ddH₂O 洗掉後就可以看到 SDS-PAGE 上的蛋白質分布。
14. 只需要浸泡於 ddH₂O 中，即可保存一陣子。

8.2.3 蛋白質純化

透過 SDS-PAGE 可以確認我們要的蛋白質 BirA 位置，並且取 8 個樣品中含有 BirA 的蛋白質出來，由最後的步驟將蛋白質純化出來。

[溶液配置]：

Exchange Buffer: (1L, pH 8.0)

50mL 1M Tris-HCl

8mL 0.25M EDTA

100mL Glycerol

2mL 10N NaOH

840mL ddH₂O

[實驗步驟]：

1. 剪一段透析膜並將其浸泡於 1 公升的 Exchange Buffer 約 15 分鐘左右。
2. 將膜的兩端封口搓開，一端先用夾子繞約兩圈後夾起來；另一端則將 8 個樣品中確定含有蛋白質的取出並加入，膜剩下的空間至少要樣品的兩倍體積。
3. 加完之後將封口一樣用夾子繞約兩圈夾好，放入 1 公升的 Exchange Buffer 並將整個燒杯放入 4°C 冰箱，另外加入磁石 (stir bar) 慢慢攪拌 4~6 小時。
4. 再配好 1 公升的 Exchange Buffer 並保存於 4°C 冰箱。
5. 時間到之後，將原本的 Exchange Buffer 倒掉並換新的 Exchange Buffer

放入 4°C 冰箱，加入磁石 (stir bar) 慢慢攪拌 6 小時。

6. 時間到之後，將透析膜內的樣品取出，並以 200 μ L 用 0.6mL 的離心管分裝，保留兩管於 4°C 冰箱，其餘則用液態氮冷凍保存於 -80°C 冰箱。

8.2.4 蛋白質濃度測定 (Bradford protein assay)

將純化完成的蛋白質進行濃度測定，利用 Coomassie Brilliant Blue G-250 染劑在不同酸鹼環境下會變色。在酸性條件下，最大的吸收值為 465nm 且顏色呈茶色，而在有蛋白質的環境下，會與其結合使得最大的吸收值為 600nm 且顏色會從茶色轉變為藍色，兩者結合的反應在短時間內就可以完成，且方便又靈敏。BSA (Albumin, Bovine Serum) 在定量上有很高的準確率，最大值可以來到 80 μ g/mL，而在 80 μ g/mL 的值以下都可以精準的作定量，接著用儀器 BioTek Synergy HT 來檢測 OD₆₀₀ 的值。

[實驗步驟]：

1. 取 1mg 的 BSA 並溶於 100 μ L 的 ddH₂O。 (10 μ g/ μ L)
2. 將配好的 BSA 作稀釋：
80 μ g/mL (5 μ L stock solution + 620 μ L ddH₂O)
40 μ g/mL (100 μ L 80 μ g/mL + 100 μ L ddH₂O)
20 μ g/mL (100 μ L 40 μ g/mL + 100 μ L ddH₂O)
10 μ g/mL (100 μ L 20 μ g/mL + 100 μ L ddH₂O)
3. 在各個濃度的 BSA 取 80 μ L 並各裝於 0.6mL 的離心管中，另外再取 20 μ L 的 Coomassie Brilliant Blue G-250 染劑各加入管中 (共 4 管)。
4. 加入後，要同時震盪和離心並靜置 5 分鐘。
5. 將 BSA 分別以 0 μ g/mL、10 μ g/mL、20 μ g/mL、40 μ g/mL 和 80 μ g/mL 加到 96 孔盤，接著用儀器 BioTek Synergy HT 來檢測 OD₆₀₀ 的值。
6. 測量完之後，可以做出檢量線 (0.95 以上) 來推算樣品濃度。

7. 將樣品分別稀釋成 1/2、1/4、1/8、1/16 和 1/32 的濃度並各取 80 μL 並各裝於 0.6mL 的離心管中，另外再取 20 μL 的 Coomassie Brilliant Blue G-250 染劑各加入管中
8. 加入後，要同時震盪和離心並靜置 5 分鐘。
9. 接著用儀器 BioTek Synergy HT 來檢測 OD_{600} 的值。
10. 測量到的值若在 BSA 的檢量線上，即可推出樣品的濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)。
11. 推出的值可以依照其倍數反推得到原始的濃度，通常會選其中三組 (1/8、1/16 和 1/32) 回推並算出平均的濃度 (203.908 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。
12. 由此蛋白質的量和蛋白質的分子量 (37649.22 g/mol) 就可算出濃度。
13. 濃度為 5.415995 μM 。

8.2.5 鎳樹脂回收 (recovery of Ni-NTA resin)

使用過的 Ni-NTA resin 經過幾次步驟的清洗，還是可以重複被使用，而最多可以被重複使用三次。

[溶液配置]：

20mM MES Buffer: 0.3846g MES + 98.484mL ddH₂O

[實驗步驟]：

1. 加入 5mL MES Buffer 清洗 column 裡的 Ni-NTA resin，重複 4 次。
2. 加入 5mL ddH₂O 清洗 column 裡的 Ni-NTA resin，重複 2 次。
3. 最後留下沉澱約 1mL 的 Ni-NTA resin，加入 1mL 70% 的酒精。
4. 保存於 4°C 冰箱。

8.3 微生物蛋白質標記 (microbial proteins labeling)

完成了前面的製備之後，我們開始標記微生物的蛋白質。分別為微生物外膜上的 FhuA (outer membrane iron transporter protein) 蛋白質和體內的兩個作用力很強的蛋白質 FtsZ 和 ZapA，研究兩個蛋白質與蛋白質之間的交互作用。

[溶液配置]：

25mM biotin (5-fluorescein) conjugate:

1mg biotin (5-fluorescein) conjugate

62.045 μ L DMSO

[備註]：分裝成三管並包覆鋁箔紙遮光，保存於-20 $^{\circ}$ C 冰箱。

99.975mM ATP solution:

55.1mg/mL ATP

1mL ddH₂O

[備註]：分裝成三管並保存於-20 $^{\circ}$ C 冰箱。

[實驗步驟]：

A. 微生物外膜蛋白 FhuA-BAP

1. 長含有 FhuA 標籤質體的 *E. coli* 於 3mL LB 培養液 (含 3 μ L Kan)，置於 37 $^{\circ}$ C 的培養箱並用 250rpm 的轉速培養隔夜。
2. 將放隔夜的菌液取 60 μ L 稀釋到新的 3mL 的 LB 培養液中 (含 3 μ L Kan)，並置於 37 $^{\circ}$ C 的培養箱並用 250rpm 的轉速培養。
3. 當細菌生長到 OD₆₀₀ 的吸收值約 0.4~0.6 左右 (約稀釋後 4 小時)，即可加入 30 μ L 的 20% L(+)-Arabinose (阿拉伯糖)，並置於 37 $^{\circ}$ C 的培養箱並用 250rpm 的轉速培養隔夜。
4. 隔天取 500 μ L 的菌液到 1.6mL 的離心管。
5. 在裡面加入：

0.2 μ L 25mM biotin (5-fluorescein) conjugate (total 10 μ M)

27.7 μ L 5.415mM BirA (total 0.3 μ M)

5 μ L 99.9795mM ATP (1mM)

(1 μ L DMSO)

6. 置於 37°C 的培養箱並用 250rpm 培養 2 小時。
7. 使用 PBS Buffer 洗 2 次。
8. 置於載玻片上後，再用螢光顯微鏡觀察。

B. 微生物內蛋白質 FtsZ-BAP 與蛋白質 ZapA-BirA 之間的交互作用

1. 長含有 FtsZ 和 ZapA 標籤質體的 *E. coli* 於 3mL LB 培養液 (含 3 μ L Kan)，置於 37°C 的培養箱並用 250rpm 的轉速培養隔夜。
2. 將放隔夜的菌液取 60 μ L 稀釋到新的 3mL 的 LB 培養液中 (含 3 μ L Kan)，並置於 37°C 的培養箱並用 250rpm 的轉速培養。
3. 當細菌生長到 OD₆₀₀ 的吸收值約 0.4~0.6 左右 (約稀釋後 4 小時)，即可加入 30 μ L 的 20% L(+)-Arabinose (阿拉伯糖)，並置於 37°C 的培養箱並用 250rpm 的轉速培養隔夜。
4. 隔天取 500 μ L 的菌液到 1.6mL 的離心管。
5. 在裡面加入：
0.2 μ L 25mM biotin (5-fluorescein) conjugate (total 10 μ M)
6. 置於 37°C 的培養箱並用 250r.p.m 培養 2 小時。
7. 使用 PBS Buffer 洗 2 次。
8. 置於載玻片上後，再用螢光顯微鏡觀察。

第九章 實驗結果與討論

9.1 微生物外膜蛋白質標記

透過前面的實驗方法，我們讓微生物表現含有標籤的膜外蛋白 FhuA，再外加酵素 BirA、ATP 和生物素螢光衍生物 (biotin (5-fluorescein) conjugate)於培養液培養之後，用螢光顯微鏡觀察結果。探討 biotinylation 的標記方法成功與否，首先我們先透過傳統的螢光蛋白標記法 (eg. RFP)，先確定大腸桿菌外膜的 FhuA 蛋白質位置及實際觀察時的情況，透過 Fig. 9-1 可以觀察出大腸桿菌外膜有環狀或是點狀的紅色螢光。

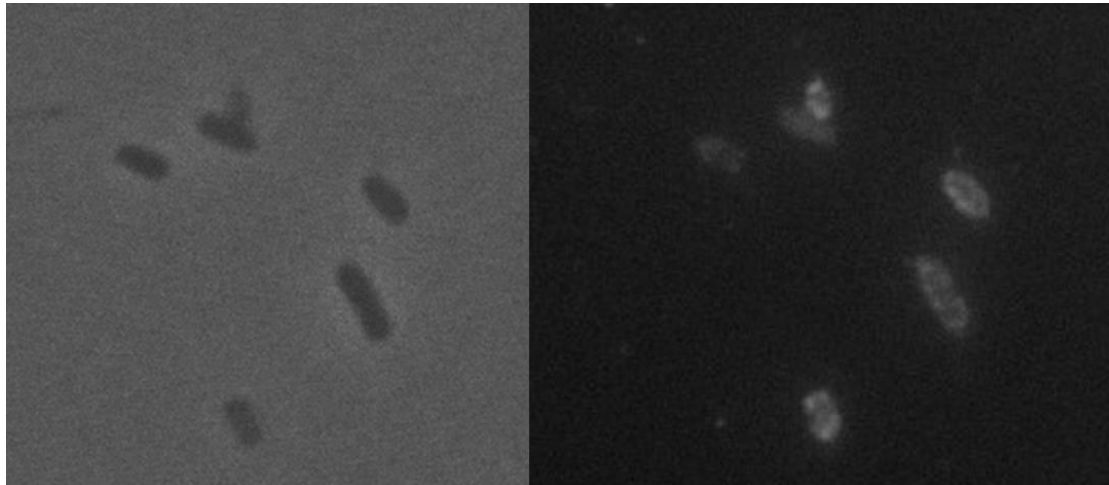


Fig. 9-1 利用顯微鏡觀察大腸桿菌外膜 FhuA 蛋白質接上紅色螢光蛋白。
左圖為相位差 (phase contrast)圖；右圖為螢光圖。

接下來，我們將 FhuA 接上 BAP 標籤，再透過大腸桿菌將其表現之後，用實驗方法 8.3 (A)的步驟標記並用顯微鏡觀察。

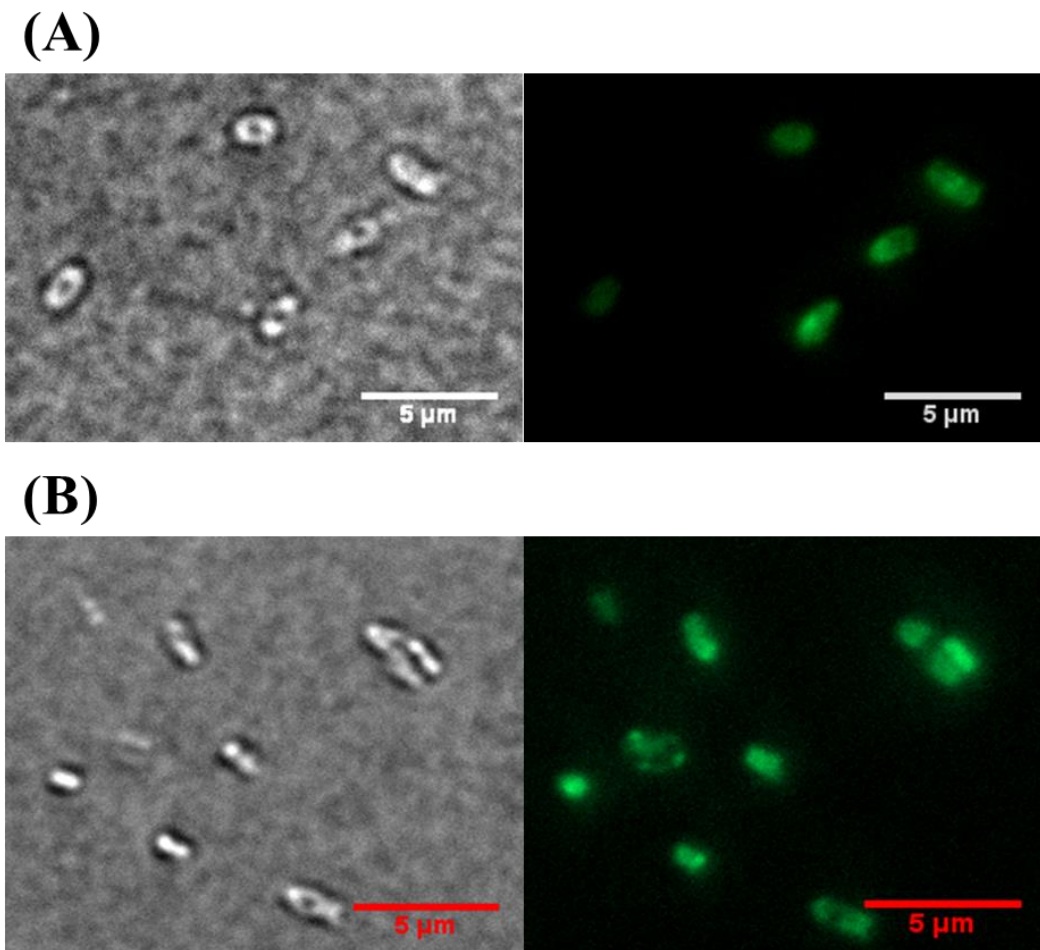


Fig. 9-2 利用顯微鏡觀察大腸桿菌外膜 FhuA-BAP 在加入 BirA 酵素、ATP 和生物素螢光衍生物之後的情況。

(A)左圖為相位差 (phase contrast)圖；右圖為螢光圖。(B)另外加入 1 μ L DMSO，左圖為相位差 (phase contrast)圖；右圖為螢光圖。

透過比較可以發現，有加 DMSO 的效果看似較好。然而，DMSO 的效果是容易穿透微生物的外膜，使得環境中的物質容易滲透到微生物體內，對本次實驗幫助不大。此外，結果顯示用 biotinylation 的標記方法也可以表現出與傳統的螢光蛋白標記法差不多的效果。

9.2 微生物體內蛋白質與蛋白質間的交互作用觀察

除了前面利用 biotinylation 的標記方法標記大腸桿菌的外膜蛋白質 FhuA 之外，我們還可以用來觀察大腸桿菌體內蛋白質 FtsZ 與蛋白質 ZapA 之間的交互作用。接著要探討 biotinylation 的標記方法，首先我們先透過傳統的螢光蛋白標記法，先確定大腸桿菌內的蛋白質 FtsZ 的位置及實際觀察時的情況，透過 **Fig. 9-3** 可以觀察出大腸桿菌中間明顯有一條紅色螢光。

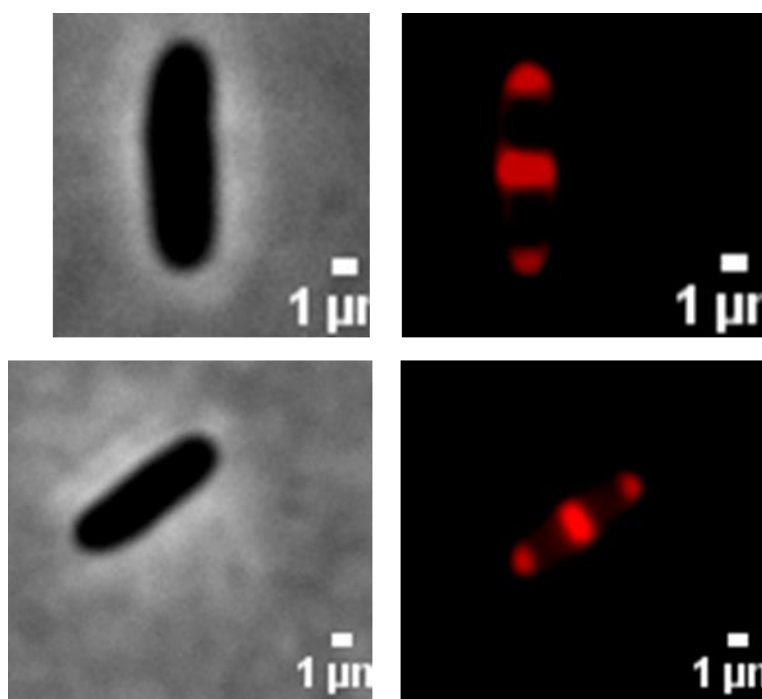


Fig. 9-3 利用顯微鏡觀察大腸桿菌體內 FtsZ 蛋白質接上紅色螢光蛋白。

左圖為相位差 (phase contrast)圖；右圖為螢光圖。

接下來，我們將兩個有交互作用的蛋白質 FtsZ 和 ZapA 分別接上標籤與酵素 (FtsZ-BAP/ZapA-BirA)，再透過大腸桿菌將其表現之後，用實驗方法 **8.3 (B)** 的步驟標記並用顯微鏡觀察。

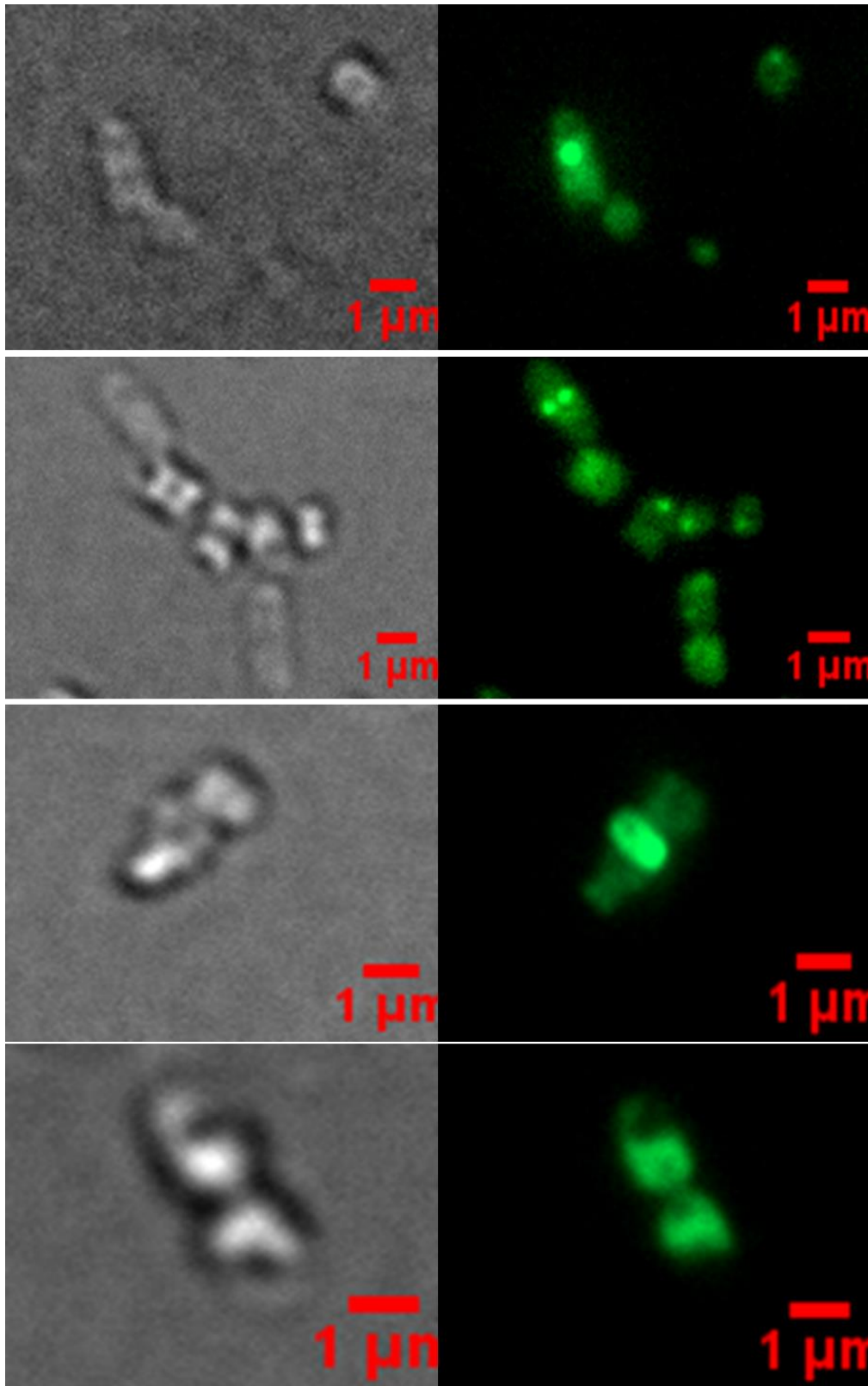


Fig. 9-4 利用顯微鏡觀察大腸桿菌 FtsZ-BAP/ZapA-BirA 在加入生物素螢光衍生物之後的情況。

左圖為相位差 (phase contrast)圖；右圖為螢光圖。

透過比較可以發現，利用 biotinylation 標記方法可以觀察微生物體內兩個蛋白質 (FtsZ/ZapA)之間的交互作用，也間接證明這兩者確實會靠近產生交互作用形成位於細胞中間的環 (Z-ring)。

第十章 結論

本研究的目的是要將 biotinylation 標記法應用在活體微生物上，利用 BirA 酵素將 BAP 標籤催化後接上生物素螢光衍生物，再透過螢光顯微鏡觀察，而此方式大多是應用在標記哺乳類動物細胞的蛋白質。將欲觀察的大腸桿菌外膜上的蛋白質 FhuA 接上 BAP 標籤，再加入純化後的 BirA 酵素、ATP 和生物素螢光衍生物標記，接著用顯微鏡觀察大腸桿菌可以看到，表面有環狀或是點狀的螢光，對照傳統螢光蛋白標記也具有同樣的效果，可以支持本方法的可靠性。另外將此方式運用在大腸桿菌體內蛋白質 FtsZ 與 ZapA 之間有交互作用的特性，將其分別接上標籤與酵素 (FtsZ-BAP/ZapA-BirA)，並在大腸桿菌表現之後只要外加生物素螢光衍生物即可做標記，接著透過顯微鏡觀察到大腸桿菌中央有線狀或是環狀的螢光，對照傳統螢光蛋白標記也具有同樣的效果。

此標記方法與傳統螢光蛋白標記方法效果差不多，但是花費的時間較短，而且提供了另外一種新穎的標記方法，協助觀測微生物的蛋白質。

參考文獻

1. Verma, N.; Singh, M., Biosensors for heavy metals. *BioMetals* **2005**, *18* (2), 121-129.
2. Yagi, K., Applications of whole-cell bacterial sensors in biotechnology and environmental science. *Appl Microbiol Biotechnol* **2007**, *73* (6), 1251-8.
3. Reith, F.; Etschmann, B.; Grosse, C.; Moors, H.; Benotmane, M. A.; Monsieurs, P.; Grass, G.; Doonan, C.; Vogt, S.; Lai, B.; Martinez-Criado, G.; George, G. N.; Nies, D. H.; Mergeay, M.; Pring, A.; Southam, G.; Brugger, J., Mechanisms of gold biomineralization in the bacterium *Cupriavidus metallidurans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2009**.
4. (a) Brown, N. L.; Stoyanov, J. V.; Kidd, S. P.; Hobman, J. L., The MerR family of transcriptional regulators. *FEMS Microbiology Reviews* **2003**, *27* (2-3), 145-163; (b) Ravel, J.; DiRuggiero, J.; Robb, F. T.; Hill, R. T., Cloning and Sequence Analysis of the Mercury Resistance Operon of *Streptomyces* sp. Strain CHR28 Reveals a Novel Putative Second Regulatory Gene. *Journal of Bacteriology* **2000**, *182* (8), 2345-2349.
5. Perez Audero, M. E.; Podoroska, B. M.; Ibanez, M. M.; Cauerhff, A.; Checa, S. K.; Soncini, F. C., Target transcription binding sites differentiate two groups of MerR-monovalent metal ion sensors. *Molecular microbiology* **2010**, *78* (4), 853-65.
6. Checa, S. K.; Espariz, M.; Audero, M. E.; Botta, P. E.; Spinelli, S. V.; Soncini, F. C., Bacterial sensing of and resistance to gold salts. *Molecular microbiology* **2007**, *63* (5), 1307-18.
7. Jian, X.; Wasinger, E. C.; Lockard, J. V.; Chen, L. X.; He, C., Highly sensitive and selective gold(I) recognition by a metalloregulator in *Ralstonia metallidurans*. *J Am Chem Soc* **2009**, *131* (31), 10869-71.
8. Checa, S. K.; Soncini, F. C., Bacterial gold sensing and resistance. *Biometals* **2011**, *24* (3), 419-27.
9. Cerminati, S.; Soncini, F. C.; Checa, S. K., Selective detection of gold using genetically engineered bacterial reporters. *Biotechnology and bioengineering* **2011**, *108* (11), 2553-60.
10. Wei, W.; Zhu, T.; Wang, Y.; Yang, H.; Hao, Z.; Chen, P. R.; Zhao, J., Engineering a gold-specific regulon for cell-based visual detection and recovery of gold. *Chemical Science* **2012**, *3* (6), 1780.
11. Tseng, H. W.; Tsai, Y. J.; Yen, J. H.; Chen, P. H.; Yeh, Y. C., A fluorescence-based microbial sensor for the selective detection of gold. *Chemical communications* **2014**, *50* (14), 1735-7.
12. Uttamapinant, C.; White, K. A.; Baruah, H.; Thompson, S.; Fernández-Suárez, M.; Puthenveetil, S.; Ting, A. Y., A fluorophore ligase for site-specific protein labeling

- inside living cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2010**, *107* (24), 10914-10919.
13. Lin, M. Z.; Wang, L., Selective labeling of proteins with chemical probes in living cells. *Physiology* **2008**, *23*, 131-41.
 14. Chen, I.; Choi, Y. A.; Ting, A. Y., Phage display evolution of a peptide substrate for yeast biotin ligase and application to two-color quantum dot labeling of cell surface proteins. *J Am Chem Soc* **2007**, *129* (20), 6619-25.
 15. Li, Y.; Sousa, R., Expression and purification of E. coli BirA biotin ligase for in vitro biotinylation. *Protein expression and purification* **2012**, *82* (1), 162-7.
 16. Chen, I.; Howarth, M.; Lin, W.; Ting, A. Y., Site-specific labeling of cell surface proteins with biophysical probes using biotin ligase. *Nature methods* **2005**, *2* (2), 99-104.
 17. Plançon, L.; Janmot, C.; le Maire, M.; Desmadril, M.; Bonhivers, M.; Letellier, L.; Boulanger, P., Characterization of a High-affinity Complex Between the Bacterial Outer Membrane Protein FhuA and the Phage T5 Protein pb5. *Journal of Molecular Biology* **2002**, *318* (2), 557-569.
 18. Slavoff, S. A.; Liu, D. S.; Cohen, J. D.; Ting, A. Y., Imaging protein-protein interactions inside living cells via interaction-dependent fluorophore ligation. *Journal of the American Chemical Society* **2011**, *133* (49), 19769-76.
 19. Fernandez-Suarez, M.; Chen, T. S.; Ting, A. Y., Protein-protein interaction detection in vitro and in cells by proximity biotinylation. *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130* (29), 9251-3.
 20. Mohammadi, T.; Ploeger, G. E.; Verheul, J.; Comvalius, A. D.; Martos, A.; Alfonso, C.; van Marle, J.; Rivas, G.; den Blaauwen, T., The GTPase activity of Escherichia coli FtsZ determines the magnitude of the FtsZ polymer bundling by ZapA in vitro. *Biochemistry* **2009**, *48* (46), 11056-66.
 21. Buss, J.; Coltharp, C.; Huang, T.; Pohlmeier, C.; Wang, S. C.; Hatem, C.; Xiao, J., In vivo organization of the FtsZ-ring by ZapA and ZapB revealed by quantitative super-resolution microscopy. *Molecular microbiology* **2013**, *89* (6), 1099-120.
 22. 戴珮琳. 利用化學標定及質譜技術分析經脂多醣刺激後小鼠巨噬細胞 (RAW 264.7) 之比較分泌蛋白質體研究. 國立臺灣師範大學, 2013.