

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

研發綠色螢光基因轉殖微生物生物偵測器作為偵測有機污
染物之研究

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC91-2211-E-002-096-

執行期間：91年08月01日至92年07月31日

執行單位：國立臺灣大學生物環境系統工程學系暨研究所

計畫主持人：廖秀娟

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 92 年 10 月 31 日

研發綠色螢光基因轉殖微生物作為偵測有機污染物之研究

(NSC 91-2211-E-002-096)

(一)中文摘要

生物偵測器 (biosensors) 是指 sensing component (生化或生理的變化) 和 transducing element (當環境改變時, 會產生可測量的訊號) 之結合。對於基因改造(genetically engineered) 細胞的生物偵測器, 可基因重組 sensing element 和 reporter gene, 此重組的質體(recombinant plasmid), 會對外來污染物反應產生一種可量測的訊號。Sensing element 通常是由 regulatory protein 和 promoter 所組成, 這些 sensing element 對污染物的專一性決定此生物偵測器的選擇性, 而 reporter protein 則是決定此生物偵測器的敏感性及偵測極限。

本研究乃研發以綠色螢光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 作為 reporter protein 的專一性有機污染物的生物偵測系統。針對環境中重要的有機污染物, 例如: benzene 及其衍生物, 發展具專一性有機污染物的生物偵測系統。此種以 GFP 作為 reporter protein 的生物偵測器, 其優點是它具有自動發出螢光(auto-fluorescence)的特性, 其發光反應不需要添加任何 cofactors 或受質, 因此, 此種生物偵測器可提供迅速甚至即時 (real time) 環境中有機污染物資訊, 此種以 GFP 作為 reporter protein 生物偵測系統, 將可克服 *luc*, *lux*, 及 *lacZ* 作為 reporter gene 的缺點。

本計畫已成功的建立適合原核生物之 GFP-based 的質體, 此質體將做為有機污染物生物偵測器之 vector。研究結果顯示此質體不具背景螢光, 並具有高度之穩定性。另外建構 benzene 生物偵測器之 sensing elements 之一的 promoter 已成功的分離。

關鍵詞：生物偵測器 (biosensor)、綠色螢光蛋白 (GFP)、reporter protein、有機污染物

(二)英文摘要

A biosensor is composed of a biological sensing component, which recognizes chemical or physical changes, couple to a transducing element that produces a measurable signal in response to the environmental insult. Genetically engineered cell-based biosensors can elicit a response in the presence of an environmental insult by coupling the sensing element to a reporter gene fusion, which upon expression produces a readily measurable signal. The sensing element is often composed of regulatory proteins and promoter. The specificity of these sensing elements for the environmental insult confers selectivity to the system, while the reporter protein determines the systems's sensitivity and detection limits.

This project studied the construction, laboratory characterization, and environmental testing of genetically engineered GFP-based bacterial biosensors that detect specific organic pollutants (e.g., benzene). The reporter plasmid in which expression of *gfp* gene for jellyfish *Aequorea victoria* green fluorescence protein (GFP) will be placed directly under the control of the specific promoter. The primary advantage of GFP as a reporter protein is its autofluorescence, and therefore, its use does not require the addition of cofactors or exogenous substracts to produce fluorescence. Therefore, such GFP-based biosensors might provide even real time monitoring environmental pollutants.

We have successfully constructed a prokaryotic GFP-based vector. This vector is used for developing the benzene biosensor. The results indicated that the GFP-based vector has almost no fluorescence background and high stability. In addition, we have successfully isolated and amplified one of the promoter fragments that are essential for establishing the benzene biosensor.

Keywords : biosensors, green fluorescence protein (GFP), organic pollutants

(三) 背景及目的

生物偵測器 (biosensors) 是指 sensing component (生化或生理的變化) 和 transducing element (當環境改變時, 會產生可測量的訊號) 之結合。依據 sensing component, 生物偵測系統可分為: 分子、細胞及組織三種形式 (Daunert, et al., 2000)。以分子為主的生物偵測器, 雖然具有專一性 (specificity), 選擇性 (selectivity) 及快速反應等優點。然而, 這些系統卻無法提供如污染物之生物獲取率 (bioavailability) 方面的資訊。以細胞為主的生物偵測系統, 可利用基因技術來設計具專一性及靈敏性的生物偵測器, 並可在不同的環境條件下 (例如: 溫度及 pH 的改變), 仍具有相當的穩定性。而且, 以細胞為主的生物偵測器, 更可提供和污染物反應相關的生理數據, 以及污染物的生物獲取率等優點。至於以組織為主的生物偵測器, 是由幾種細胞所組成, 偵測能力較不穩定, 因此其應用較受到限制。

以細胞為主的生物偵測器, 可根據它們的 sensing element 的反應來做分類, 例如: 細胞代謝的改變、基改生物基因表達的改變等。對於基因改造 (genetically engineered) 細胞的生物偵測器, 可基因重組 sensing element 和 reporter gene, 此重組的質體 (recombinant plasmid), 會對外來污染物反應產生一種可量測的訊號。Sensing element 通常是由 regulatory protein 和 promoter 所組成, 這些 sensing element 對污染物的專一性決定此生物偵測器的選擇性, 而 reporter protein 則是決定此生物偵測器的敏感性及偵測極限 (Daunert, et al., 2000)。

一些以細胞為主的生物偵測器運用 reporter gene 已被發展。根據測試的狀況及偵測的方法, 每一 reporter 各有其優缺點。其中在微生物系統中, 最被廣為應用的為 β -galactosidase (*lacZ* gene), bacterial luciferase (*lux* gene), 及 green fluorescent protein (*gfp* gene)。

E. coli β -galactosidase 是由 *lacZ* gene 轉譯而來, 它催化 β -galactosidase 的水解反應。利用 β -galactosidase 當作 reporter protein, 其優點是具有敏感性及穩定性, 且可應用在厭氧的環境中; 然而其缺點是, 它具有內在活性 (endogenous activity), 且需加入適當的受質 (substrates) 才能反應; Luciferase 是指具有催化螢光放射反應的酵素 (Baldwin, et al., 1999); Bioluminescence, 指的是由含有 luciferase 的生物體, 釋放可量測的可見光。細菌是富有 bioluminescence 的生物, 主要被歸類為 *vibrio*, *photobacterium* 及 *xenorhabdus* (Meighen, 1991)。Bacterial luciferase 的 structure subunits 是由 α 及 β 組成, 分別由 *luxA* 及 *luxB* gene 所編譯 (encode), 負責氧化 fatty aldehyde 成為 fatty acid, 造成在 490 nm 附近藍 - 綠光的放射。此系統亦包括 C、D 及 E 三個基因, 負責 fatty acid reductase 的形成, 以利於 fatty aldehyde 的合成及回收 (Wilson and Hastings, 1998)。這五個基因由 *lux CDABE* operon 所操控, *luxA* 和 *luxB* 在宿主生物的表達已足夠生產訊號; 然而, 5 個基因的共同表達時, 則不需要加入額外的受質 (Wilson and Hastings, 1998)。*Lux* 已被應用在微生物系統中, 用來偵測重金屬及有毒有機物。利用 *lux* 作為 reporter gene, 其優點是具高敏感性, 且不需要加入額外的受質, 但缺點是需先經離心、細胞溶解及調節 pH 值等步驟, 才能進一步的測量其發出的訊號。

近年來, 以綠色螢光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 作為 reporter protein 已漸漸被廣泛應用。GFP 是一種由 jellyfish *Aequorea victoria* 分離和 cloned 出來的光蛋白 (photoprotein)。利用 GFP 作為 reporter protein 的主要優點是, 它具有自動發出螢光 (autofluorescence) 的特性, 因此其發光反應不需要添加任何 cofactors 或受質 (Naylor, 1999), 此外, 其優點尚包括 spectral variants 以及在 biological 之 pH 下具有高穩定性、操作簡單、快速省時、以及在大部分的生物中沒有類似的蛋白質等 (Wood, 1995; Naylor, 1999)。GFP 已被廣泛的應用在各種的生物系

統之中，其應用包括：測量基因表達(gene expression)、鑑定 transformed cells、研究 cell-trafficking 機制、以及作為各種分析物之 reporter 等；至於在微生物生物偵測器 (microbial biosensors) 的應用則還在起步階段。

有機化合物是主要的環境污染物之一，許多不同的微生物利用存在於其環境中的有機分子作為碳的來源，這些微生物經由演化，產生代謝這些有機物的各種不同的酵素 (Robinson, et al., 1998)，例如一些細菌已被用來分解石油污染物及工業廢棄物，然而卻也衍生生物獲取率 (bioavailability)，敏感性及選擇性的相關問題 (Daunert, et al., 2000)。為了克服這些問題，可利用基因技術，發展具專一性的有機污染物生物偵測器，將 reporter gene 融合於特定代謝途徑相關的 promoter，當暴露於有機污染物時，藉由量測 reporter gene 表達出之訊號，即可偵測特定有機污染物的存在與否。此種 promoter-reporter-gene 的生物偵測器，具有快速和非破壞性 (nondestructive) 等優點 (Daunert, et al., 2000)，更可以用來監測污染物的生物獲取濃度 (bioavailable concentration)，此乃大部分的有機污染物其水溶解度皆很低，因此這些污染物生物降解的程度是依賴在至微生物體的轉換過程 (transport process) 上 (Daunert, et al., 2000)。

本研究將研發以 *gfp* 作為 reporter gene 的專一性有機污染物的生物偵測系統。針對環境中重要的有機污染物，例如：benzene 及其衍生物，發展具專一性有機污染物的生物偵測系統。此種以 *gfp* 作為 reporter gene 生物偵測系統，其優點是它具有自動發出螢光 (auto-fluorescence) 的特性，其發光反應不需要添加任何 cofactors 或受質，因此，此種生物偵測器可提供迅速甚至即時 (real time) 環境中有機污染物資訊，此外，其優點尚包括 spectral variants 以及在 biological 之 pH 下具有高穩定性、操作簡單、快速省時、以及在大部分的生物中沒有類似的蛋白質等。此種以 *gfp* 作為 reporter gene 生物偵測系統，將可克服 *luc*, *lux*, 及 *lacZ* 作為 reporter gene 的缺點。

本研究計畫執行內容包括：(1) GFP-based 質體的建立，(2) GFP-based 質體的背景螢光值之探討，(3) GFP-based 質體穩定度之探討及 (4) benzene 及其衍生物的生物偵測器的建立。

(四) 研究方法

E. coli strains

使用 *E. coli* HB101 作為架構 GFP-base 的重組質體。此質體包含有 GFPuv 以及 heat-shock protein promoter，transformed 後的 *E. coli* JM105(*lac*⁻) 則將作為生物偵測器。

GFP 螢光的監測

利用螢光顯微鏡觀察綠色螢光。利用螢光光度計測量 GFP 螢光的強度，激發波長為 395nm 而放射波長為 509nm。

重組質體之建立

分子生物技術包括：miniprep DNA, cloning, PCR, DNA sequencing, gel electrophoresis, etc, 操作方法及步驟為參考各分子生物技術 protocol。

建立 GFP-base 的重組質體

GFPuv 將從質體 pGFPuv (Clontech) 分離出來，再將此 GFPuv DNA 片段插入 pBR322。此 GFP-base 重組質體，將作為以後建立其它生物偵測器的基礎。

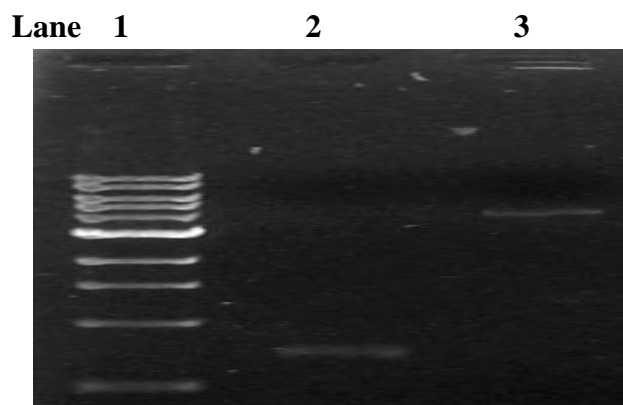
(五) 結果與討論

pEGFP-N1 and pBR322 was purchased from Clontech and NEB, respectively. pEGFP-N1 encodes a red-shifted variant of wild-type which has been optimized for brighter fluorescence and higher expression (Excitation maximum = 488 nm; emission maximum = 507 nm). pEGFP-N1 encodes the GFPmut1 variant which contains the double-amino-acid substitution of Phe-64 to Leu and Ser-65 to Thr.

Generation of “eGFP” and vector

To generate eGFP fragment, pEGFP-N1 was double-digested by restriction enzymes BamH I and Eag I. The 742 bp DNA fragment contains eGFP, the red-shifted variant. The digestion mixture was separated on an agarose gel and the 742 bp DNA was cut for further gel extraction.

pBR322 was cut with restriction enzymes BamH I and Eag I. The digestion mixture was separated on an agarose gel and the 3797 bp DNA fragment that will serve as vector was excised for further gel extraction. Both 742 bp and 3797 bp DNA fragments were extracted from agarose gel using QIAEX II Gel extraction kit (Qiagen). DNA was eluted in 20 μ l 10mMTris-Cl, pH 8.5 and stored at -20°C. Both of the gel-purified DNAs were run on an agarose gel and quantified as shown on below figure.



Lane 1: 1kb DNA ladder (NEB)
Lane 2: eGFP fragment, as “insert”
Lane 3: pBR322 backbone, as “vector”

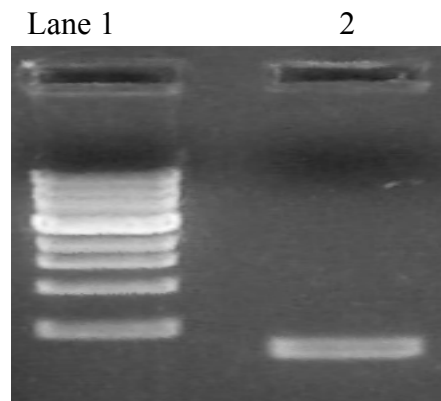
Recombinant eGFP-based plasmid

The 742 bp and 3794 bp DNAs were ligated in a reaction containing T4 DNA ligase (NEB). The ligation reaction was incubated at 16°C overnight. Five μ l of ligation mixture was transformed into calcium-treated DH5 α competent cells. The transformed cells were grown on LB / ampicillin plates at 37°C overnight. To select for eGFP recombinant plasmid, single colony bacteria was grown in a liquid LB medium containing ampicillin at 37°C overnight. Plasmid DNA was further purified and dissolved in 20 μ l TE, pH8.0. Subsequently, purified plasmid DNA was double-digested with restriction enzymes BamH I and Eag I and ran on an agarose gel to check for eGFP insert.

Isolation of Pu promoter

The Pu promoter was PCR-amplified using the Taq DNA polymerase (Qiagen). Primers used in

PCR reaction are a forward primer containing an *Eco*I site and a reverse primer, containing a *Bam*I site. The 324-bp PCR-amplified DNA fragment was gel-purified as shown at following picture.



Lane 1: 1Kb DNA ladder (NEB)

Lane 2: Pu promoter

(六) 計畫成果自評

The goal of proposed grant is accomplished. The results from this grant are publishable and the manuscript is under preparation.

(七) References

- Baldwin, T. O.; Christopher, J. A.; Raushel F.M.; Sinclair, J. F.; Ziegler, M. M.; Fisher, A. J.; Rayment, I. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1995**, 5, 798-809
- Billard, P.; DuBow, M. S. *Clin. Biochem.* **1998**, 31, 1-14.
- The Biology of Heart Shock Proteins and Molecular Chaperones*, Morimoto, R. I., Tissieres, A., Geogopoulos, C., Eds.; Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, NY, **1994**; PP1-30.
- Blaise, C., Forghani, R., Legault, R., Guzzo, J. and Dubow, M. S. (1994) *Biotechniques* 16, 932-937
- Bopp, L. H. J. *Ind. Microbiol.* **1986**, 1, 23-29.
- Cha, H. J.; Srivastava, R.; Vakharia, V. N.; Rao, G.; Bentley, W. E. *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, 65, 409-414.
- Collard, J. M.; Corbisier, P.; Diels, L.; Dong, Q.; Jeonthon, C.; Mergeay, M.; Taghavi, S.; van der Lelie, D.; Wilmotte, A.; Wuertz, S. *FemS Microbiol. Rev.* **1994**, 14, 405-414.
- Cramer, A.; Whitehorn, E. A.; Tate, E.; Stemmer, W. P. *Nat. Biotechnol.* **1996**, 14, 315-319.
- Daunert, S. *Anal. Chem.* **2000**, 72, 2423-2427
- Daunert, S. Barrett, G., Feliciano, J., Shetty, R., and Smith-Spencer, W. *Chem. Rev.* **2000**, 100, 2705-2738
- de Lorenzo, V.; Fernnandez, S.; Herrero, M.; Jakubzik, U.; Timmis, K. N. *Gene* **1993**, 130, 41-46.

- Demple, B. *Annu. Rev. Genet.* **1991**, 25, 315-337.
- Frantz, B.; Chakrabarty, A. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1987**, 84, 4460-4464.
- Gu, M. B.; Gil, G. C.; Kim, J. H. *Biosens. Bioelectron.* **1999**, 14, 355-361.
- Guan, X.; Ramanathan, S.; Garris, J. P.; Shetty, R. S.; Ensor, C. M.; Bachas, L. G.; Daunert, S. *Anal. Chem.* **2000**, 72, 2423-2427.
- Ikariyama, Y.; Nishiguchi, S.; Koyama, T.; Kobatake, E.; Aizawa, M.; Tsuda, M.; Nakazawa, T. *Amal. Chem.* **1997**, 69, 2600-2605.
- Heitzer, A.; Malachowsky, K.; Thonnard, J. E.; Bienkowski, P. R.; White, D. C.; Sayler, G.S. *Appl. Environ. Microbiol.* **1994**, 60, 1487-1494
- King, J. M. H.; Digrazia, P. M.; Applegate, B.; Burlage, R.; Sanseverino, J.; Dunbar, F.; Sayler, G. S. *Science* **1990**, 249, 778-781.
- Layton, A. C.; Muccini, M.; Ghosh, M. M.; Sayler, G. S. *Appl. Environ. Microbiol.* **1998**, 64, 5023-5026.
- Lewis, J. C.; Feltus, A.; Ensor, C. M.; Ramanathan, S.; Daunert, S. *Anal. Chim. Acta* **1998**, 70, 579A-585A
- Lsenberg, D. L. in *Ecotoxicology Monitoring* (Richardson, M., ed.), **1993**, pp. 3-15, *VCH Publishers*
- Meighen, E. A.; *Microbiol. Rev.* **1991**, 55, 123-142
- Mergeay, M. *Trends Biotechnol.* **1991**, 9, 17-24
- Missiakas, D.; Raina, S. *Trends Biochem. Sci.* **1997**, 22, 59-63.
- Naylor, L. H.; *Biotechnol. Pharmacol.* **1999**, 58, 749-757
- Nohava, M. M. Vogel, W. R. and Gaugitsch, H. *Environ. Int.* **1995**, 21, 33-37
- Ramanathan, S.; Shi, W.; Rosen, B. P.; Daunert, S. *Anal. Chim. Acta*, **1998**, 369, 189-19
- Robinson, K. G., Pieters, G. S., Sanseverino, J., Cox, C. D., Wright, C. L., Cheng, C. L., and Sayler, G. S. *Water Sci. Technol.* **1998**, 38, 1-8.
- Selifonova, O. V.; Eaton, R. W. *Appl. Environ. Microbiol.* **1996**, 62, 778-783.
- Selifonova, O. V., Burlage, R., and Barkay, T. *Appl. Environ. Microbiol.* **1993**, 59, 3083-3090
- Silver, S. and Misra, T. K. *Microbiol. Rev.* **1992**, 56, 195-228
- Taurianen, S.; Karp, M.; Chang, W.; Virta, M. *Biosens. Bioelectron.* **1998**, 13, 931-938
- Van Dyk, T. K.; Majarian, W. R.; Konstantinov, K. B.; Young, R. M.; Dhurjati, P. S.; LaRossa, R. A. *Appl. Environ. Microbiol.* **1994**, 60, 1414-1420.
- Van Dyk, T. K.; Smulski, D. R.; Reed, T. R.; Belkin, S.; Vollmer, A. C.; LaRossa, R. A. *Appl. Environ. Microbiol.* **1995**, 61, 4124-4217.
- Willardson, B. M.; Wilkins, L. E.; Rand, T. A.; Schupp, J. M.; Hill, K. K.; Keim, P.; Jackson, P. J. *Appl. Environ. Microbiol.* **1998**, 64, 1006-1012.
- Wilson, T.; Hastings, J.W. *Ammu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **1998**, 14, 197-230.
- Wood, K. V. *Curr. Opin. Biotechnol.* **1995**, 6, 50-5
- Yim, H. H.; Villarejo, M. J. *Bacteriol.* **1992**, 174, 3637-3644.