

行政院國家科學委員會專題研究計畫 期中進度報告

有機污染物綠色螢光蛋白生物偵測器之研發及應用(1/2)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC92-2211-E-002-054-

執行期間：92年08月01日至93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 93 年 5 月 31 日

有機污染物綠色螢光蛋白生物偵測器之研發及應用(1/2)

(92-2211-E-002-054-)

期中精簡進度報告

(一)中文摘要

所謂生物偵測器(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。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。

本研究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, naphthalene 及 salicylate , PCBs , 及 chlorocatechols 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 protein 生物偵測系統, 將可克服 *luc* , *lux* , 及 *lacZ* 作為 reporter gene 的缺點。

本研究計畫分為二年執行, 第一年的研究為以 *gfp* 作為 reporter gene 之生物偵測系統的建立, 其中包括生物偵測系統敏感度 (sensitivity) 及穩定度分析, 以及建立 benzene 及其衍生物的生物偵測器, 並探討此生物偵測器和 benzene 劑量與反應關係 (Dose-response relationship) , 以及時間與反應關係, 以及應用於環境污染實場的測試 (environmental sample field testing) 。目前我們已成功的建構生物偵測器重組質體, 相關的分析正進行中。

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. Cell-based biosensors can be classified according to the response of their sensing element, such as changes in cellular metabolism, pH, altered gene expression in genetically modified organisms. 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 system's sensitivity and detection limits.

We proposed the construction, laboratory characterization, and environmental testing of genetically engineered GFP-based bacterial biosensors that detect specific organic pollutants (e.g., benzene, naphthalene, salicylate, PCBs, and chlorocatechols). 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 substrates to produce fluorescence. Additionally advantages of GFP included high stability at biological pH, assay simplicity, and lack of endogenous homologues in most target organisms. Therefore, such GFP-based biosensors might provide even real time monitoring environmental pollutants.

This is a two-year project. In the first year, the main task is to establish a sensitive and stable biosensing system using GFP as reporter protein. In addition, the benzene and related compound biosensor will be developed. The dose-dependent and time-dependent relationship of the biosensor and organic compound will be investigated. Furthermore, the application of biosensor in detecting environmental will be explored. Currently, we have successfully developed the recombinant biosensor plasmids. Other investigations are in progress.

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

(三) 研究背景及目的

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。

本研究計畫的執行內容包括:以 *gfp* 作為 reporter gene 之專一性有機污染物之生物偵測系統的建立，生物偵測系統敏感度(sensitivity) 及其應用性分析，其中包括：實驗室中生物偵測器和有機化合物劑量與反應關係(Dose-response relationship) 之建立，以及環境污染實場測試(environmental sample field testing)。

本年度研究計畫之目標及分項執行內容如下：

1. GFP-based 的重組質體之靈敏度(sensitivity)分析
2. 生物偵測器標準檢測方法之建立
3. 建立 benzene 及其衍生物的生物偵測器
4. 分析 benzene 及其衍生物生物偵測器之敏感度(Dose-response relationship)
5. Benzene 及其衍生物的生物偵測器之應用評估(field test)

(四) 研究方法

E. coli strains

使用 *E. coli* DH5 α 作為架構 GFP-based 的重組質體及所有重組 DNA 實驗的宿主細胞。

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.

GFP 螢光的監測及定量

生物偵測器所發出之 GFP，可利用螢光光度計測量 GFP 螢光的強度，EGFP 之激發波長為 490 nm，而放射波長為 510 nm。每組實驗重覆三次。另外，單一生物偵測器(individual bacterial cell)對不同濃度污染物所發出之螢光訊號，亦將利用螢光顯微鏡接上 CCD 數位相機及分析軟體來定量螢光的強度。

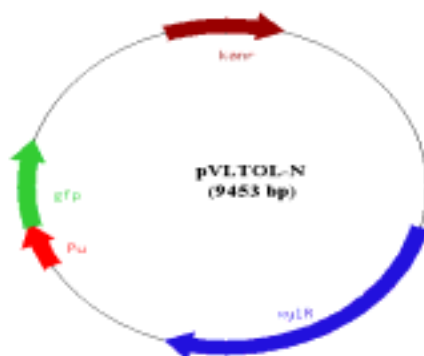
建立 benzene 及其衍生物之生物偵測器

將 *xylS* operon/promoter (O/P) 和調控基因 *xylR* cloned 到 GFP-based 重組質體，此生物偵測器將用來探討 benzene 及其衍生物之特異性及敏感性，並建立劑量-反應之關係。同時，以此 benzene 及其衍生物之生物偵測器對環境水體現場應用評估。

(五) 結果與討論

GFP biosensor 重組質體之建構

Benzene 及其衍生物的生物偵測器之建構原理，乃依據 TOL 質體含有具有降解 xylene, toluene 和其衍生物成為 pyruvate 和 acetaldehyde 的蛋白質的基因。此 TOL 質體包括了兩個 operons, upper: Pu (*xylCA*) 和 meta: Pm (*xylDLEGF*)。其中 *xylCAB* 是用來轉化 toluene 衍生物成為 benzoate 和 toluate；而 *xylDLEGF* 則是將這些 aromatic acids, 進一步轉換為 pyruvate 和 acetaldehyde。這兩個 operons 是分別由調控基因 *xylR* 和 *xylS* 控制。當 benzene 及其衍生物存在時，*xylR* 蛋白受活化並進而誘導 Pu promoter, 其基因產物 *xylC*, *xylA*, *xylB* 並將 benzene 及其衍生物轉換為成為 benzoate；而 *xylS* 基因產生的蛋白質，*xylS*，則受到 benzoate 的活化，並更進一步誘導 Pm, 其 meta operon, *xylDCEGF*, 之基因產物則是將這些 aromatic acids, 進一步轉換為 pyruvate 和 acetaldehyde。本研究之 GFP biosensor 重組質體乃利用 benzene 及其衍生物活化 *xylR* 並進而誘導 Pu promoter, 更進一步誘導 *gfp* 基因之表達以產生 GFP 蛋白質。經由 GFP 蛋白質產生與否用來偵測 benzene 及其衍生物的存在與否；而 GFP 所產生螢光之強弱則可代表 benzene 及其衍生物濃度的高低。本研究之 GFP biosensor 重組質體之示意圖，如圖一所示。



圖一：GFP biosensor 重組質體之示意圖

Pu promoter 乃利用 pI258 plasmid 當 template 藉由 PCR 技術取得，其大小為 324 bp (圖二)，利用 restriction enzymes: *EcoRI* 及 *BamHI* 分別 digested 已純化之 Pu 及 *gfp* vectors (NT':

high copy vector(圖三); KT': low copy vector(圖四))。接著分別純化已被 restriction enzymes digested 過的 Pu 及 gfp vector 並將兩者 ligated, 將 ligated 的質體 transformed 至 DH5 α 並培養於含有 kanamycin 的培養基進行重組質體的篩選。將於含有 kanamycin 的培養基存活生長之 colony 分別單獨培養並製備其中之質體 DNA 用 PCR 或 restriction enzymes digestion 篩選含有 Pu 的重組質體。所得之重組質體分別命名為 pVLPu-N 及 pVLPu-K。

xylR 乃利用 pI258 plasmid 當 template 藉由 PCR 技術取得, 其大小為 2.3 kb (圖五)。利用 restriction enzyme AgeI 分別 digested 已純化之 xylR 及 pVLPu-N 及 pVLPu-K。接著分別純化已被 AgeI digested 過的 xylR 及 pVLPu-N 及 pVLPu-K 並將兩者 ligated, 將 ligated 的質體 transformed 至 DH5 α 並培養於含有 kanamycin 的培養基進行重組質體的篩選。將於含有 kanamycin 的培養基存活生長之 colony 分別單獨培養並製備其中之質體 DNA 用 PCR 或 restriction enzymes digestion 篩選含有 xylR 的重組質體。所得之重組質體分別命名為 pVLTOL-N 及 pVLTOL-K。

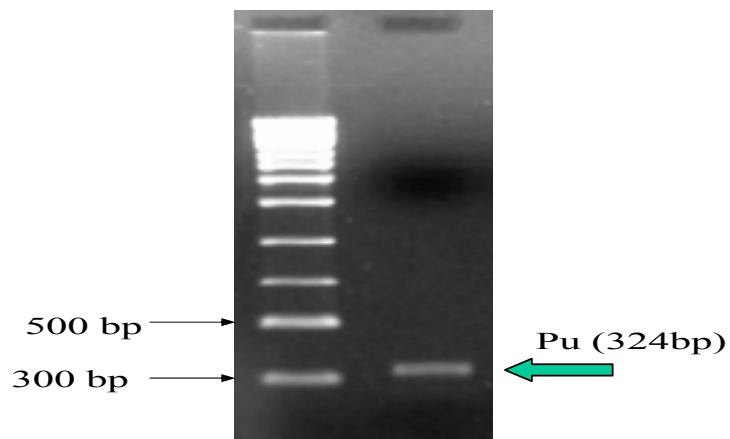
(六) 計畫成果自評

目前我們已成功的建構 high copy 及 low copy 之生物偵測器重組質體, 相關的分析正進行中。目前的研究成果符合計畫目標。最後之研究成果將適和發表於 SCI paper 並且應用於環境監測。

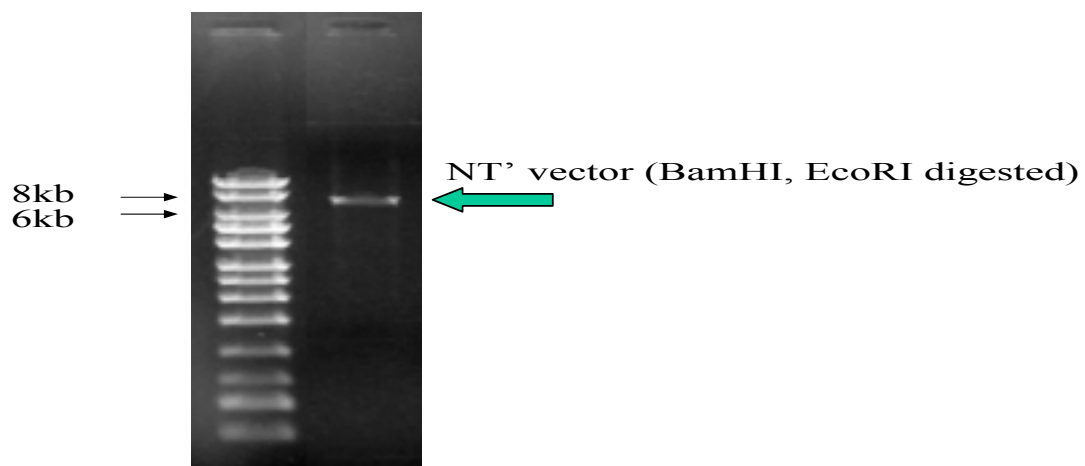
(七) References

1. 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
2. Billard, P.; DuBow, M. S. *Clin. Biochem.* **1998**, 31, 1-14.
3. *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.
4. Blaise, C., Forghani, R., Legault, R., Guzzo, J. and Dubow, M. S. (1994) *Biotechniques* 16, 932-937
5. Bopp, L. H. J. *Ind. Microbiol.* **1986**, 1, 23-29.
6. Cha, H. J.; Srivastava, R.; Vakharia, V. N.; Rao, G.; Bentley, W. E. *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, 65, 409-414.
7. 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.
8. Cramer, A.; Whitehorn, E. A.; Tate, E.; Stemmer, W. P. *Nat. Biotechnol.* **1996**, 14, 315-319.
9. Daunert, S. *Anal. Chem.* **2000**, 72, 2423-2427
10. Daunert, S. Barrett, G., Feliciano, J., Shetty, R., and Smith-Spencer, W. *Chem. Rev.* **2000**, 100, 2705-2738
11. de Lorenzo, V.; Fernnandez, S.; Herrero, M.; Jakubzik, U.; Timmis, K. N. *Gene* **1993**, 130, 41-46.
12. Demple, B. *Annu. Rev. Genet.* **1991**, 25, 315-337.
13. Frantz, B.; Chakrabarty, A. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1987**, 84, 4460-4464.

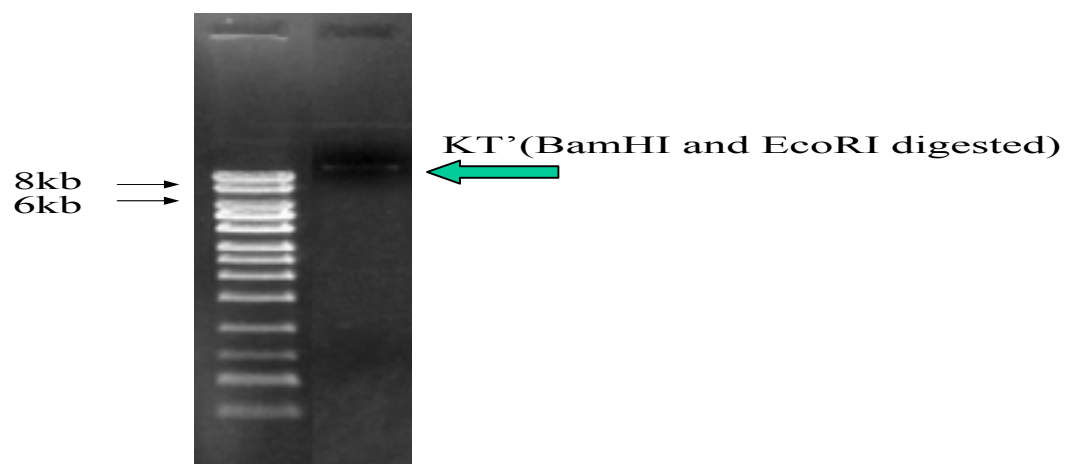
14. Gu, M. B.; Gil, G. C.; Kim, J. H. *Biosens. Bioelectron.* **1999**, 14, 355-361.
15. Guan, X.; Ramanathan, S.; Garris, J. P.; Shetty, R. S.; Ensor, C. M.; Bachas, L. G.; Daunert, S. *Anal. Chem.* **2000**, 72, 2423-2427.
16. Ikariyama, Y.; Nishiguchi, S.; Koyama, T.; Kobatake, E.; Aizawa, M.; Tsuda, M.; Nakazawa, T. *Anal. Chem.* **1997**, 69, 2600-2605.
17. Heitzer, A.; Malachowsky, K.; Thonnard, J. E.; Bienkowski, P. R.; White, D. C.; Sayler, G.S. *Appl. Environ. Microbiol.* **1994**, 60, 1487-1494
18. King, J. M. H.; Digrazia, P. M.; Applegate, B.; Burlage, R.; Sanseverino, J.; Dunbar, F.; Sayler, G. S. *Science* **1990**, 249, 778-781.
19. Layton, A. C.; Muccini, M.; Ghosh, M. M.; Sayler, G. S. *Appl. Environ. Microbiol.* **1998**, 64, 5023-5026.
20. Lewis, J. C.; Feltus, A.; Ensor, C. M.; Ramanathan, S.; Daunert, S. *Anal. Chim. Acta* **1998**, 70, 579A-585A
21. Lsenberg, D. L. in *Ecotoxicology Monitoring* (Richardson, M., ed.), **1993**, pp. 3-15, *VCH Publishers*
22. Meighen, E. A.; *Microbiol. Rev.* **1991**, 55, 123-142
23. Mergeay, M. *Trends Biotechnol.* **1991**, 9, 17-24
24. Missiakas, D.; Raina, S. *Trends Biochem. Sci.* **1997**, 22, 59-63.
25. Naylor, L. H.; *Biotechnol. Pharmacol.* **1999**, 58, 749-757
26. Nohava, M. m Vogel, W. R. and Gaugitsch. H. *Environ. Int.* **1995**, 21, 33-37
27. Ramanathan, S.; Shi, W.; Rosen, B. P.; Daunert, S. *Anal. Chim. Acta*, **1998**, 369, 189-19
28. Robinson, K. G.; Pieters, G. S., Sanseverino, J., Cox, C. D., Wright, C. L., Cheng, C. L., and 29. Sayler, G. S. *Water Sci. Technol.* **1998**, 38, 1-8.
29. Selifonova, O. V.; Eaton, R. W. *Appl. Environ. Microbiol.* **1996**, 62, 778-783.
30. Selifonova, O. V., Burlage, R., and Barkay, T. *Appl. Environ. Microbiol.* **1993**, 59, 3083-3090
31. Silver, S. and Misra, T. K. *Microbiol. Rev.* **1992**, 56, 195-228
32. Taurianen, S.; Karp, M.; Chang, W.; Virta, M. *Biosens. Bioelectron.* **1998**, 13, 931-938
33. 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.
34. 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.
35. 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.
36. Wilson, T.; Hastings, J.W. *Ammu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **1998**, 14, 197-230.
37. Wood, K. V. *Curr. Opin. Biotechnol.* **1995**, 6, 50-5
38. Yim, H. H.; Villarejo, M. J. *Bacteriol.* **1992**, 174, 3637-3644.



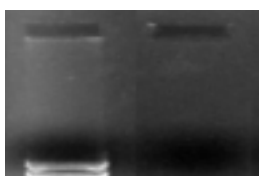
圖二: Pu promoter 之 PCR 產物電泳圖



圖三: High copy vector 經 BamHI 及 EcoRI digested 後之電泳圖



圖四: Low copy vector 經 BamHI 及 EcoRI digested 後之電泳圖



圖五:xyIR 之 PCR 產物電泳圖