

中華民國第 51 屆中小學科學展覽會
作品說明書

高中組 生物(生命科學)科

佳作

040702

有適無恐—讓金黃色葡萄球菌金消玉殞的 DNA

學校名稱：臺北市立第一女子高級中學

作者： 高二 張旖庭	指導老師： 吳雅嵐
---------------	--------------

關鍵詞：DNA 適體、金黃色葡萄球菌、抗生素

中文摘要

隨著細菌產生抗藥性之問題日趨嚴重，尋找出新型的抗生素一直是醫療上的重要研發方向。適體為具有類似抗體功能的核酸分子，與目標物具有極高的親和力，與抗體不同的是，核酸分子非常容易藉由化學方式進行修飾，且成本便宜，更重要的是，小分子的適體於生物體內穿透性高，且人體不易對其產生免疫反應，這些都是適體的優點。本研究中，我們將以抑制細菌生長能力之強弱來篩選適用的適體，以獲得具強力抑制金黃色葡萄球菌生長之適體分子，並進一步分析、鑑定這些適體分子的標的物。這個研究的成功將提供抗生素研究上的新方向，並且將會是第一個以 DNA 分子為基底的新一代的抗生素。

壹、研究動機

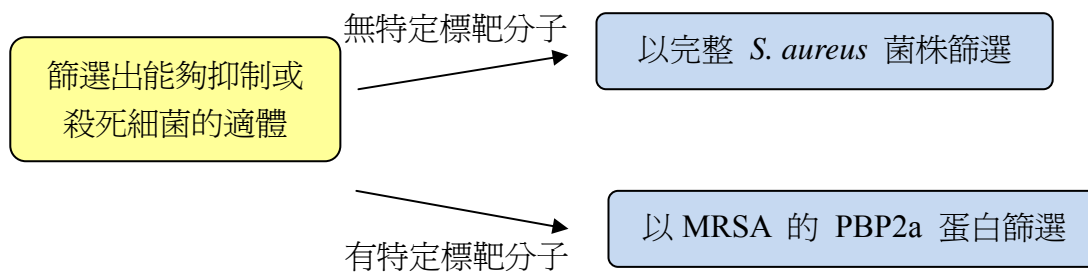
金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) 爲一革蘭氏陽性(Gram positive)之兼性厭氧菌，從課本中學到此菌爲人體常見的致病病原菌，估計大約30%-50%成人曾是此菌的帶原者。臨床上金黃色葡萄球菌是造成肺炎及外傷感染的主因之一(Lowy, 1998)，此外金黃色葡萄球菌也可能造成皮膚感染、食物中毒、心臟內膜炎、甚至敗血性休克(Sepsis shock) (Lowy, 1998) (Salyers & Whitt, 2002)等疾病。近來隨著感染的病例增加，以及抗生素的濫用，已經發現對於最後一線抗生素——萬古黴素(Vancomycin)具有抗藥性的金黃色葡萄球菌，因此金黃色葡萄球菌的治療已是當下重要的議題，尋找新型的抗生素也是醫療上重要的研發方向。

適體(Aptamer)爲單股核酸，利用核酸分子中嘌呤及嘧啶的配對形成二級甚至三級的立體構型(conformation)，隨著內含核酸序列的不同，適體的構型也會不同。適體在癌症治療上已有一些突破，非常容易藉由化學方式進行修飾，且成本便宜，更重要的是，小分子的適體於生物體內穿透性高，且人體不易對其產生免疫反應。因此我們選定適體當作新型抗生素的基底，希望探討其作爲新型抗生素的可行性。

本研究與高一第二章 生物多樣性章節有關，並使用高二第七章 生命科學與人生中所教授的PCR技術。

貳、研究目的與問題

以金黃色葡萄球菌為對象，利用適體的高親合力及專一性，藉由篩選適體的指數增殖系統化配體篩選方法(SELEX; Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment)來篩選出可抑制金黃色葡萄球菌生長的適體，並以篩選到的適體為基礎，研發出新一代的抗生素。本研究分為兩個方向，一個方向是找尋能夠抑制並消滅一般的金黃色葡萄球菌的適體序列，另一個方向是篩選能殺死具 Methicillin 抗藥性的金黃色葡萄球菌(MRSA, methicillin resistance *Staphylococcus aureus*)的適體。



參、研究設備及器材

一、實驗藥品及試劑

(一)、菌種及培養基配方

本實驗所使用的菌種皆購自新竹食品工業研究所生物資源保存及研究中心(FIRDI, Hsinchu, Taiwan)。牛腦心萃取物培養基(Brain heart infusion broth)配方為取 calf brain infusion solids 12.5g, beef heart infusion solids 5g 及 protease peptone 10g 溶於 1 升去離子水中。

(二)、DNA 適體分子庫(aptamer library)及引子

DNA 適體分子庫由 Integrated DNA Technologies(IDT, Coralville, IA,) 合成，其序列 TCCCTACGGCGCTAAC-(N)₃₀-GCCACCGTGCTACAAC，其中 N 為隨機序列(N = A, T, C, or G)。DNA 引子序列由百利生物科技公司(Purigo, Taipei, Taiwan)合成，其序列分別為：

R9F: TCCCTACGGCGCTAAC, R9R: GTTGTAGCACGGTGGC,

T7:TCCCTACGGCGCTAAC, SP6: GTTGTAGCACGGTGGC。

另外使用具有標記的引子為 biotin 標記之 R9F 及 R9R。

(三)、緩衝液配方

適體篩選緩衝液(selection buffer)包含 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM, NaCl, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂ 及 1 mM CaCl₂。TBE 緩衝液配方含有 89 mM Tris, 89 mM borate 及 2 mM EDTA。

二、其他實驗藥劑及其製造公司如下

Agarose 粉末及 DH5 α 勝任細胞(Competent cells)購自 RBC Bioscience 公司(Taipei, Taiwan)、dNTP 購自 Genedragon 公司(Taipei, Taiwan)、DMSO 及 betaine 購自 Sigma-Aldrich 公司(St. Louis, MO)、Taq DNA polymerase 購自 Invitrogen 公司(Carlsbad, CA)、Streptavidin 磁珠購自 Chemogen 公司(So. Portland, Maine)。

三、儀器設備

聚合酶連鎖反應儀 T3000 PCR machine (Biometra, Germany)、可見光吸收光譜儀 SpectraMAX PLUS spectrometer (Molecular Devices, Union City, CA)、638nm 二極體雷射裝置(Electric Optic, Taipei, Taiwan)、電泳裝置設備(BioRad, Hercules, CA)、旋轉混合器、磁力分離座、螢光顯微鏡 (Olympus BX51)。

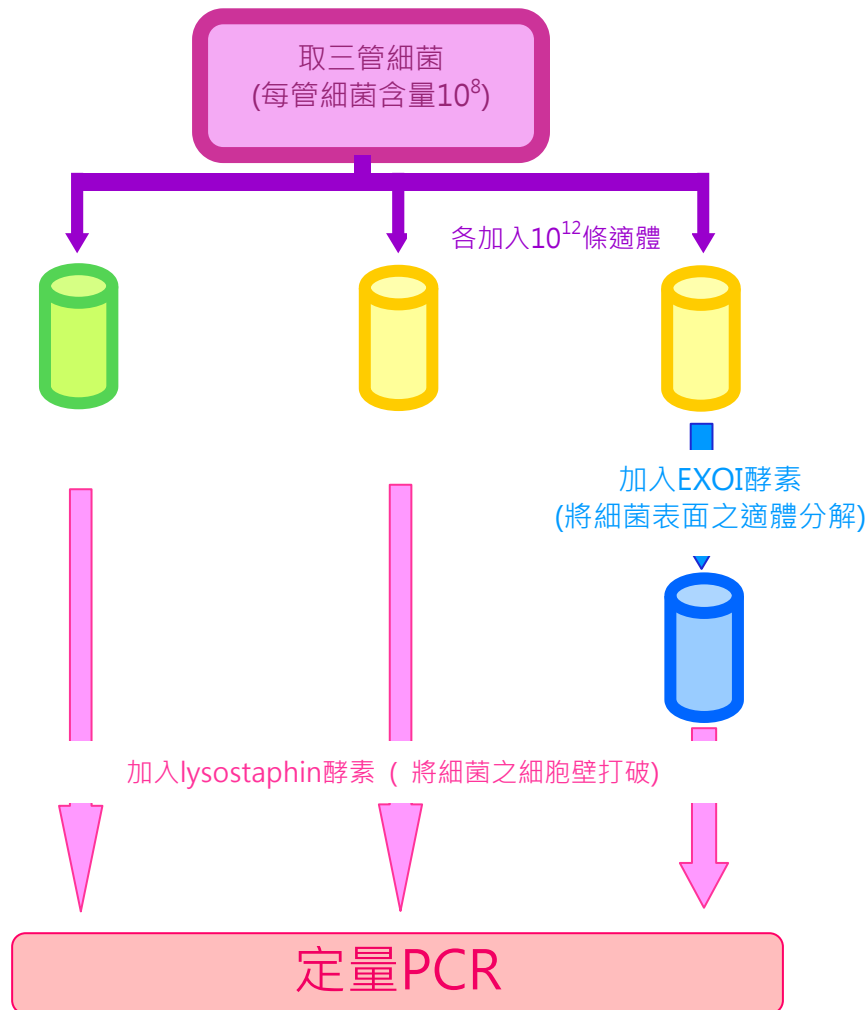
肆、研究過程或方法

一、適體之通透性測試

(一)、以螢光適體檢測適體之通透性

取三管細菌(每管細菌含量 1×10^8 個)，將其中兩管細菌與螢光適體分子庫置於 37°C 反應 30 分鐘，使螢光適體與細菌結合。在將其中一管加入會分解適體之酵素，並置於 37°C 反應 15 分鐘，之後再放到置於 95°C 反應 5 分鐘，使其酵素去除活性。再將三管細菌分別加入會分解細菌之細胞壁的酵素，置於 37°C 反應 60 分鐘，離心後取其上清液拿去螢光顯微鏡底下觀察有無螢光適體。

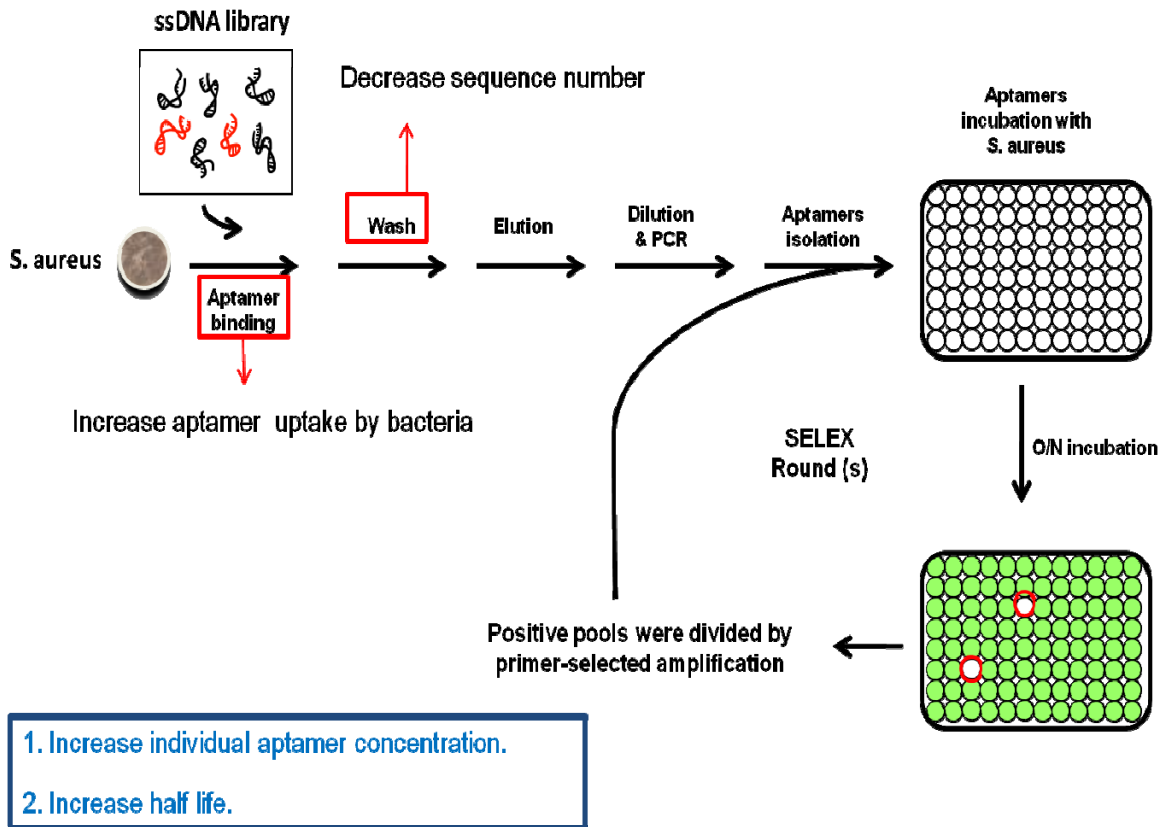
(二)、以定量 PCR 檢測適體之通透性



圖一、適體之通透性實驗之流程圖

取三管細菌(每管細菌含量 1×10^8 個), 將其中兩管細菌與適體分子庫置於 37°C 反應 30 分鐘, 使適體與細菌結合。再將其中一管加入會分解適體之酵素, 並置於 37°C 反應 15 分鐘, 之後再置於 95°C 反應 5 分鐘, 使其酵素去除活性。再將三管細菌分別加入會分解細菌之細胞壁的酵素, 置於 37°C 反應 60 分鐘, 離心後取其上清液拿去定量 PCR。另外取 cycle 數為 17,20,23 的 PCR 產物進行電泳。

二、篩檢具抗生素性質之適體



圖二、篩選具抗生素功能的適體之流程圖

將適體分子庫與菌體萃取液結合, 並分離出會與菌體萃取液結合之適體, 利用 PCR 技術增殖並分離出其中的單股適體序列。把適體加入細菌中培養, 進行適體之功能性測試, 每隔 3 小時觀測其吸光值, 若吸光值較低, 表示內含之細菌數較少, 則該管內含的適體可能可以抑制細菌的生長。將該特定管內的適體, 利用 PCR 以不同的引子增殖, 使管內的適體更為的專一, 並再次進行適體之功能性測試。不斷重複以上步驟, 以找出能夠抑制細菌生長之特定適體序列。

(一)、菌種之培養

所有菌種皆由牛腦心萃取物(brain heart infusion broth)培養液培養於 37°C 培養。

(二)、篩選會與菌體萃取液結合之適體

取金黃色葡萄球菌(OD 值為 1.0，約 1×10^6 顆細菌)，加入 Lysostaphin 酵素打破細菌細胞壁，並放置於 37°C 反應 30 分鐘。以 10000rpm 之轉速離心 5 分鐘，取其上清液，即為菌體萃取液。

取 100 μ l 之適體分子庫(約含 10^{15} 條適體分子)放置於 95°C 五分鐘，再拿到 4°C 五分鐘，最後置於 37°C 十分鐘，以使適體形成正確穩定的構型。將適體分子庫與濃度為 500 μ g/ml 之 Lysostaphin 酵素置於 37°C 反應三十分鐘。將事前浸泡於適體篩選緩衝液中的 NC paper，加入適體分子庫與 Lysostaphin 之混合液中，置於 37°C 三十分鐘後，取其上清液。

將其上清液加入菌體萃取液中形成混合液，置於 37°C 反應三十分鐘，此時組裝 vacume filiter 並事先以適體篩選緩衝液沖洗，讓混合液通過 filiter 後再以適體篩選緩衝液沖洗。剪下結合適體與菌體萃取液的 membrane，以 95°C 加熱兩分鐘，使適體分離。

利用 R9F 及 biotin 標定之 R9R 引子組，以聚合酶連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 增殖所篩選出的適體分子，PCR 反應溶液中包含 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8.9, 10 mM betaine, 1% DMSO, 200 μ M 的 dNTP, 1 mM MgCl₂, 200 nM 的引子(R9F 及 biotin-R9R), 及 2 單位活性的 *Taq* DNA 聚合酵素。PCR 反應一個循環的溫度時間設定為：94°C, 30 秒; 57°C, 20 秒; 72°C, 20 秒。

之後混合 Streptavidin 的磁珠於 1.5 ml 離心管中，放置於旋轉混合器上，於室溫中反應三小時，在此反應中 PCR 產物上的(-)股 5'端的 biotin 會和磁

珠上之 Streptavidin 結合。然後再利用磁座分離結合之 PCR 產物並以 $10\times$ SSC 溶液清洗三次，將其緩衝液換至適體篩選緩衝液中，並以緩慢降溫步驟，使分離之單股適體形成正確結構。

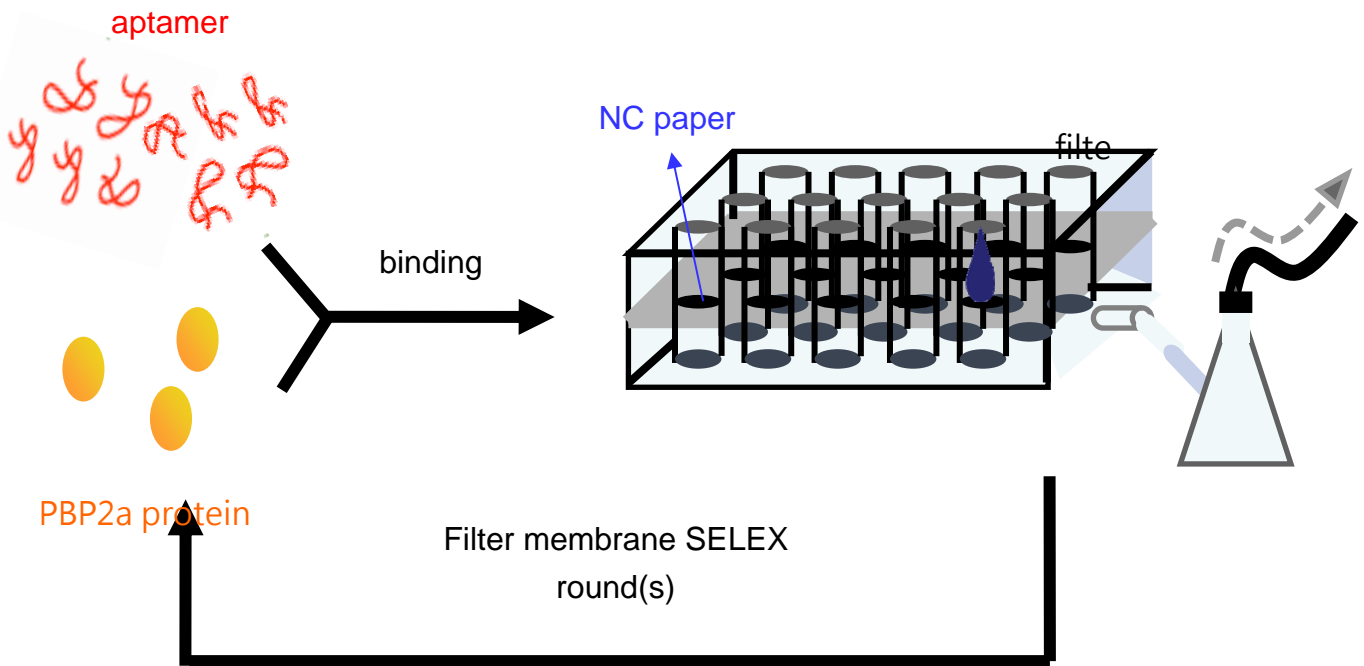
(三)、適體之功能性測試

先將所篩選出會與菌體萃取液結合之適體，置於 95°C 五分鐘，再拿至 4°C 五分鐘，最後置於 37°C 十分鐘，以使適體形成正確穩定的構型。取一個 384 孔盤，每孔分別裝入濃度約為 1×10^2 顆細菌/ μl 之金黃色葡萄球菌 $10\mu\text{l}$ ，加入 $10\mu\text{l}$ 之適體，並於第 3,6,12 小時以及隔日觀測其 OD 值。若有管內的 OD 值較他管低，即可判定該管內之適體具有抑菌作用。

(四)、選擇性放大適體庫

由於適體之前後端序列是固定的，因此我們在前端引子序列 TCCCTACGGCGCTAAC 的後面，再加上兩個核酸序列，由 A、T、C、G 四種鹼基組合分別有 AA、AT、AC、AG、TA、TT、TC、TG、CA、CT、CC、CG、GA、GT、GC、GG 等 16 種配對。由此我們可以將選定的適體庫，利用引子的不同拿去進行聚合酶連鎖反應，而得到 16 種不同的適體庫，再拿去進行適體之功能性測試，不斷重複上述步驟，以得出具有遏制細菌生長能的特定適體。

三、以濾膜 SELEX 方式篩選 MRSA PBP2a 蛋白的適體



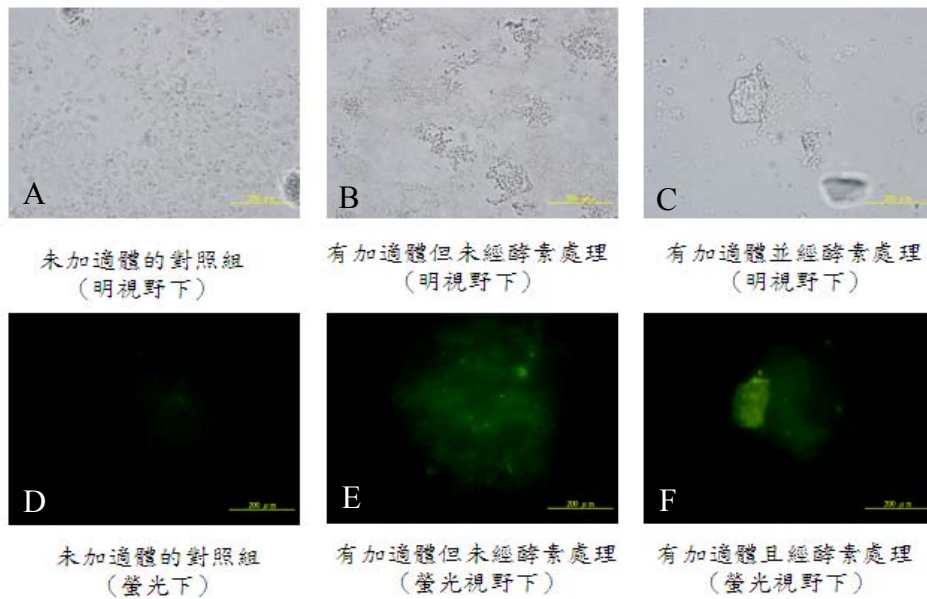
圖三、篩選與 PBP2a 蛋白具高結合力的適體之流程圖

將適體分子庫與 PBP2a 蛋白結合，通過真空裝置，以 NC paper(Nitrocellulose paper)將吸附在蛋白質上的適體與蛋白質分離出來，並以 95°C 加熱使適體與蛋白質分離，以 PCR 將適體增殖並重複其篩選步驟，以找出能夠與 PBP2a 高度結合且具專一性的適體序列。

伍、研究結果

一、適體之通透性測試實驗結果

(一)以螢光染色檢驗適體的通透性



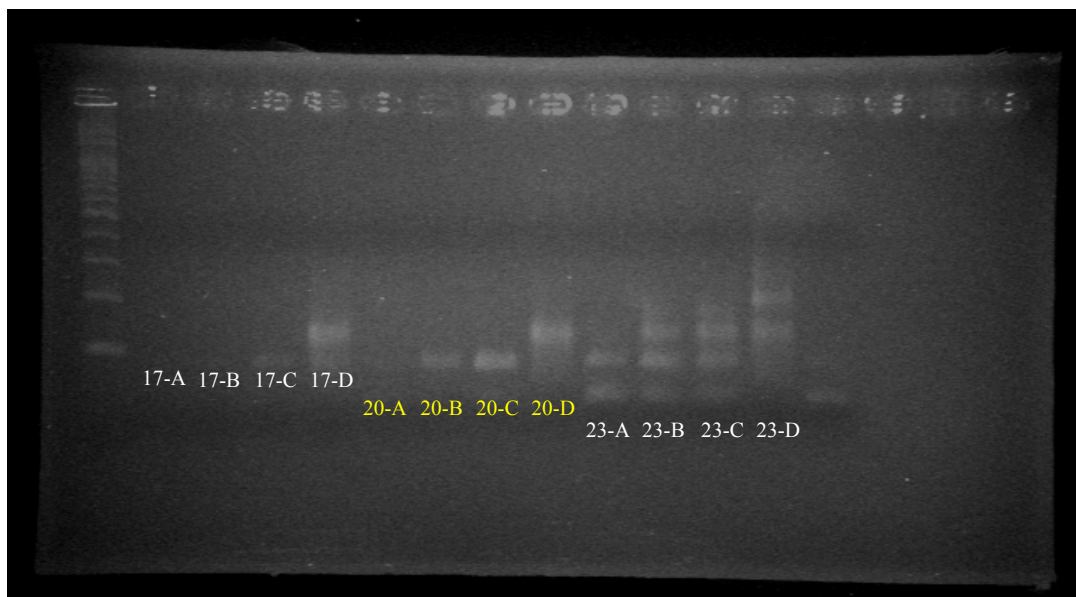
圖四、以螢光染色測試適體對細菌的通透性

圖 A~C 為在一般光學顯微鏡下的照片

圖 D~F 為在螢光顯微鏡下的照片

以上的照片顯示，可能有適體進入細菌的菌體中，為了進一步確認並定量，我們進行下列 PCR 實驗。

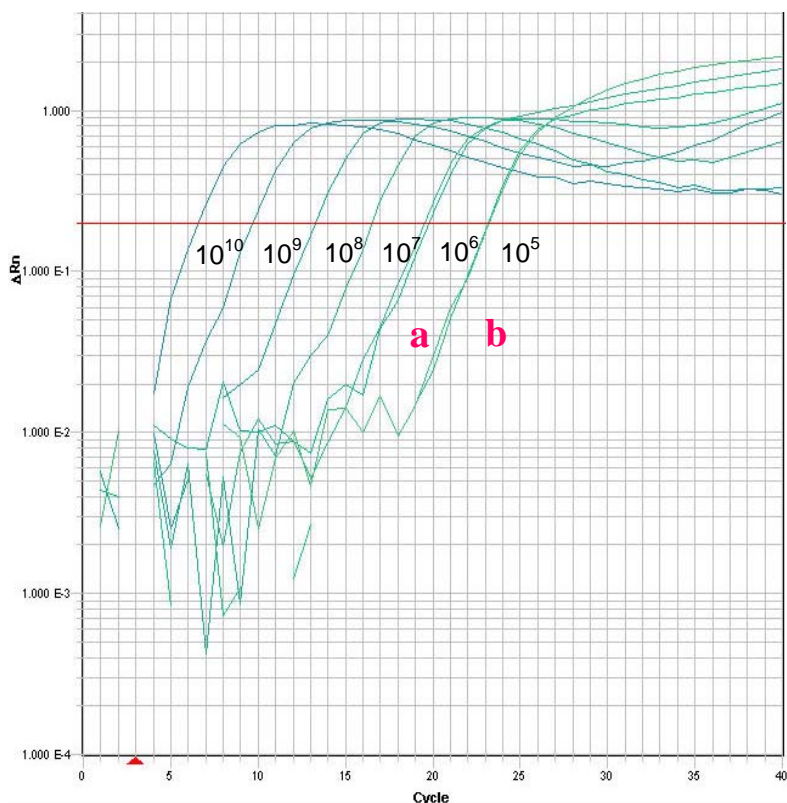
(二)以定量 PCR 檢驗適體的通透性



圖五、適體之通透性結果的電泳圖

以上電泳圖是我們分別三種不同的循環數(分別為 17,20,23)去進行聚合酶連鎖反應之後的結果，於 A 管內置入菌體萃取液，B 管內置入有加入適體並經酵素處理之液體，C 管內為有加入適體但未經酵素處理之液體，D 管內則只放入適體庫。

從 20-A,20-B,20-C,20-D 中可以明顯看出，20-C 管內含的適體比 20-B 內含得多，然而 20-B 內仍然含有適體，因此我們可以推論適體是可以進入到細菌體內的。為了了解進入菌體的適體數量，我們再以定量 PCR 進行實驗。



此圖為定量 PCR 所跑出的照片：

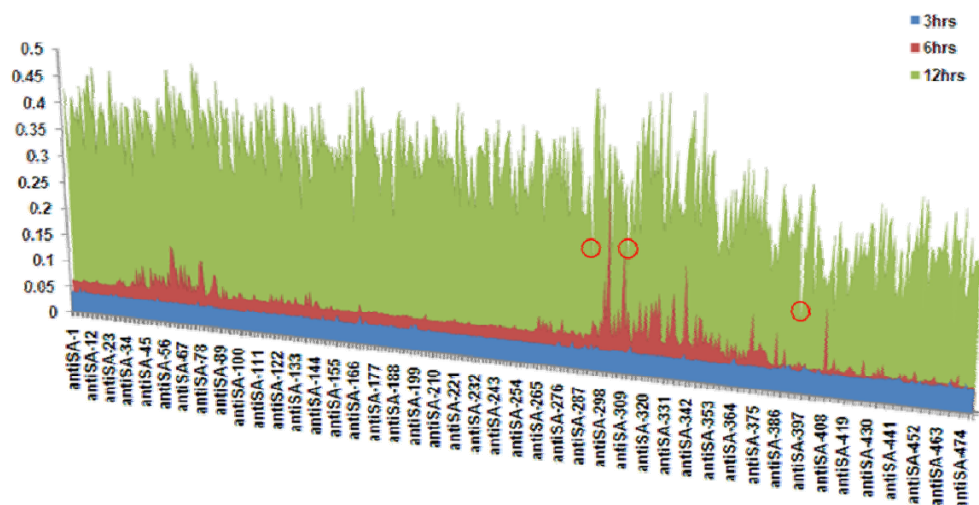
- a. 吸附在菌體表面 + 進入細菌體內的適體數 (約 10⁶ 條)
- b. 進入細菌體內的適體數 (約 10⁵ 條)

圖六、定量 PCR 之結果圖

由上圖我們可以確定適體不但能夠吸附在細菌表面，也可以進到細菌裡面。

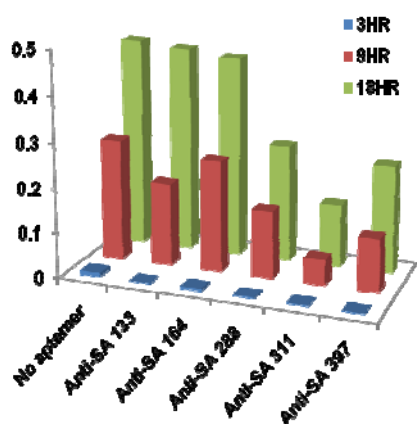
二、篩檢具抗藥性之適體結果

1、適體功能性測試



圖七、適體功能性測試之結果圖

在 480 管的適體中，有其中 3 管的吸光值特別低，因此我們判定此 3 管適體具有抑菌作用。



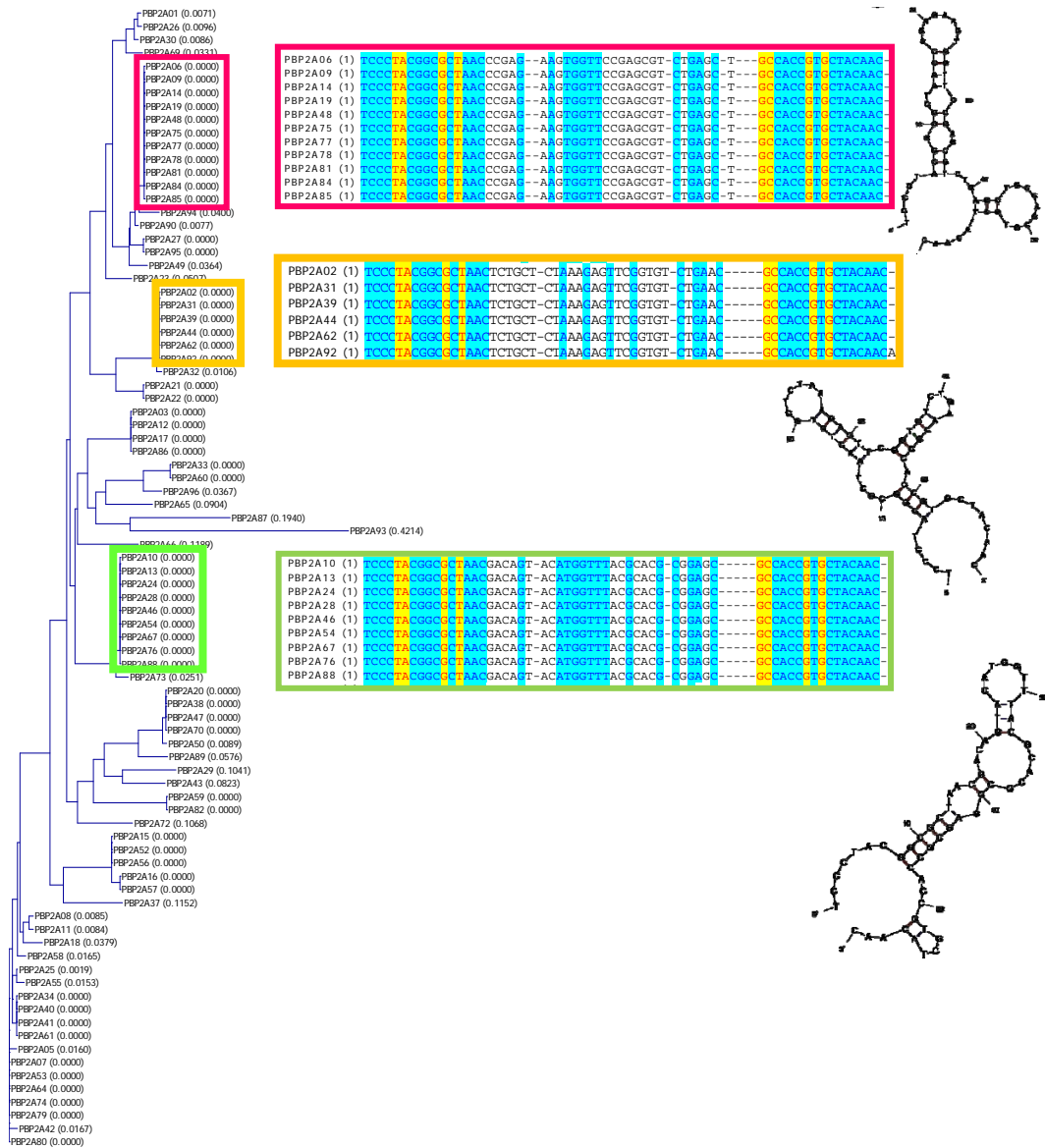
管(編號)	3hr	9hr	18hr
No aptamer	0.0456	0.3111	0.5105
133	0.0382	0.2259	0.5000
164	0.0421	0.2885	0.4880
288	0.0392	0.1907	0.3003
311	0.0386	0.0980	0.1788
397	0.0386	0.1580	0.2788
No bacteria	0.0370	0.0412	0.0397

圖八、具功能之適體的數據

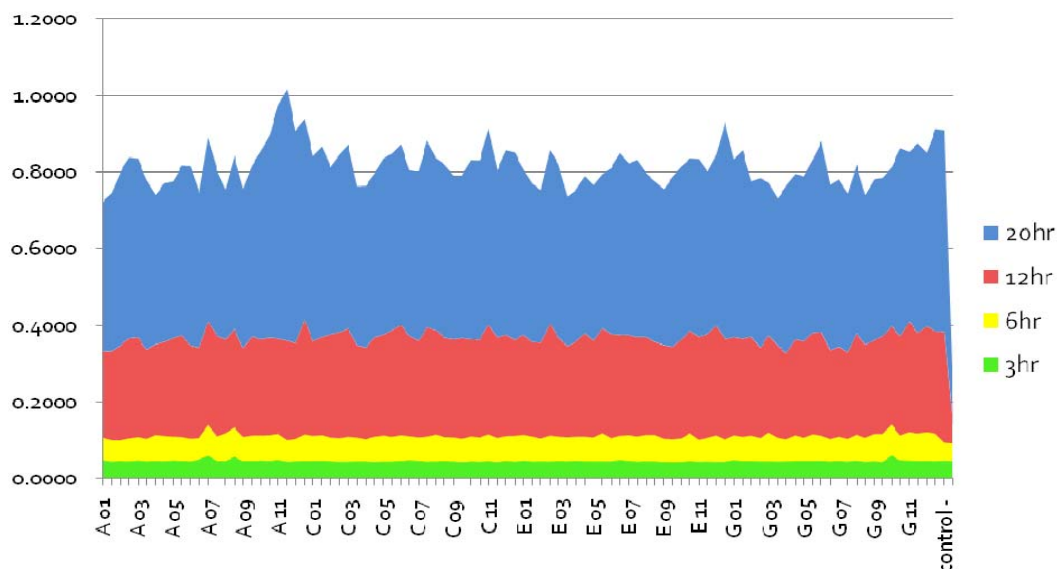
相較於沒有抑菌作用的適體(編號 133,164)，編號 288,311,397 的吸光值明顯較低。

三、以濾膜 SELEX 方式篩選 MRSA PBP2a 蛋白的適體

經 14 個循環之 filter membrane SELEX 篩選過後，將所獲得的適體基因庫送入大腸桿菌中，並選出 96 個菌株進行適體序列定序。定序的結果經 VectorNTI 軟體分析，並藉由序列之相似度排出樹狀分佈圖(圖九)。結果可見三種主要的重覆適體序列(分別紅、黃、綠、之方框標示之)，因此我們可以得知這三種序列的適體相較於其他序列對於細菌有更高的親和力。



圖九、與 MRSA PBP2a 蛋白具親和力的適體樹狀分佈圖



圖十、適體對於具抗藥性之金黃色葡萄球菌之功能性測試之結果

然而當我們將以上的適體拿去進行細菌的抑菌功能測試時，卻未見其功效(圖十)，因此我們更加肯定適體是必須多條同時作用在不同標靶分子上的。

陸、討論

利用 SELEX 技術我們成功地篩選出具有抑菌能力的多株適體組，然而當我們試圖利用不同的 PCR 引子去分離這些適體以分離單株適體時，卻不見其應有抑菌的效果，因此我們推測可能需多條不同的適體同時作用，才能夠抑制細菌的生長。這些多株適體可能同時作用在同樣或不同的標靶分子，壓抑細菌內部多重的抗藥機制，來達到抑菌效果。

而當我們選定一個特定的標靶分子，也就是 PBP2a 蛋白，進一步進行抑菌功能性測試時，未見任何抑菌效果，此實驗結果可以印證先前的推論，也就是適體必須要許多條不同的序列作用在不同的標靶分子上，才能夠產生抑菌作用。

所以我們未來要將高濃度的多株適體組與抗生素進行比較，若它的抑菌效果夠好的話，未來便可以將其製成藥物。

柒、結論

從本研究中我們可以確定單股 DNA 也有抑菌能力。我們可以判定部分適體是具有抑制細菌生長之功能，因此以適體作為新型抗生素是可行的，如此一來可以暫時解決因為抗生素之濫用，而日益嚴重之抗藥性問題，面對超級細菌也不需要如此緊張。本研究之成果將可以大大改變目前醫療體系所使用治療感染症之方式。未來我們會對所篩選出的適體進行定序，找出須共同作用的適體序列，並進行動物實驗以確定其實用性。

捌、未來工作暨展望

一、篩檢具抗生素性質之適體的部分

- (一)、測量適體組作用的最小抑菌濃度(Minimum inhibitory concentration)
- (二)、找出作用的適體序列
- (三)、找出作用的適體與哪些標的物結合

玖、參考文獻

Allaouchiche, B., Meugnier, H., Freney, J., Fleurette, J. and Motin, J. 2005. Rapid identification of *Staphylococcus aureus* in bronchoalveolar lavage fluid using a DNA probe. *Intensive Care Medicine* 22: 683-687.

Clarridge, J. E. 2004. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin Microbiol Rev.* 17:840 – 62.

Hamula, L.A. C., Guthrie, J., Zhang, H., Li, X.F. and Le, X. Chris. 2008. Selection of Aptamers against Live Bacterial Cells. *Anal. Chem.* 80:7812-7819.

Klevens, R. M., Morrison, M. A. and Nadle, J. 2007. Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. *JAMA* 298:1763-1771.

Lowy, D. Franklin, 1998. *Staphylococcus aureus* Infections. *N Engl J Med* 339(8):520-530.

Camille, L. A. H., Zhang, H., Guan, L. L., Li, X. F. and Le, X. Chris. 2008. Selection of Aptamers against Live Bacterial Cells. *Anal. Chem.* 80:7812-7819.

Noble, W. C., Valkenburg, H. A. and Wolters, C. H. L. 1967. Carriage of *Staphylococcus aureus* in random samples of a normal population. *J. Hyg. (Lond).* 65:567-73.

Pestourie, C., Tavitian, B. and Duconge, F. 2005. Aptamers against extra cellular targets for in vivo applications. *Biochimic*(87):921-930.

Yang, D. P. and Cui, D. X. 2009. Advances and Prospects of Gold Nanorods. *Chemistry - An Asian Journal* 3:12, 2010-2022.

【評語】 040702

此作品主要欲找出可標的至金黃色葡萄球菌的適體（2或3級結構之核酸分子），以達到抑制細菌生長的目的。在構想上還算不錯，建議應進一步鑑定出特定的適體及其標的蛋白，以釐清其抑菌的可能轉機。此外應多了解實驗方法之過程及原理。