

中華民國第四十五屆中小學科學展覽會
作品說明書

高中組 生物(生命科學)科

第三名

040719

大腸桿菌生長曲線之系統生物學研究

臺北市立建國高級中學

作者姓名：

高三 歐陽太閒 高二 戴辰宇

指導老師：

方信于 李麗敏

中華民國第四十五屆中小學科學展覽會
作品說明書

科 別：生物科

組 別：高中組

作品名稱：大腸桿菌生長曲線之系統生物學研究

關 鍵 詞：大腸桿菌、生物資訊學、電腦模擬（最多三個）

編 號：

製作說明：

- 1.說明書封面僅寫科別、組別、作品名稱及關鍵詞。
- 2.編號由國立臺灣科學教育館統一編列。
- 3.封面編排由參展作者自行設計。

大腸桿菌生長曲線之系統生物學研究

壹、摘要

系統生物學是結合實驗生物和理論生物科學來探討複雜生物系統的新興科學，在後基因體時代中已慢慢地變成一種不可或缺的研究方法。本研究利用系統生物學來研究大腸桿菌之生長曲線。首先我們以電腦系統建立精準、快速的模擬平臺—— Emu. coli，再以實際培養大腸桿菌生長曲線，藉以評估模擬 Emu. coli 平臺的準確性。此模擬平臺先以生長曲線的三次多項回歸分析及倍增時間為基礎建立常數資料庫，用陣列儲存每個個體的特性參數，經由電腦演算法模擬大腸桿菌二分法分裂增殖的生活史，並設定天擇淘汰條件以留下最適合品種，最後即時顯示陣列對應的生長曲線。本研究除能以我們發展的 Emu. coli 平臺預測不同 pH 值培養液中大腸桿菌的生長曲線外，並能以實際培養所得之生長曲線來加以驗證。本研究未來可以應用於癌細胞之生長模擬，進而找到最適合殺死癌細胞之條件，以達到治療癌症的目的。

貳、研究動機：

在高一基礎生物學中，生態的單元談到族群生長曲線的意義，由文中可知一個族群在固有生長環境及與其他族群交互作用下，生長曲線會有其規律性的變化。一旦將這族群移至新環境，因為加入新的環境變因，生長曲線亦會隨之改變。在實際的狀況下，這種族群生長曲線的觀察，需要大量的觀察記錄及時間的投入，因此應用系統生物學概念以電腦模擬族群之生長曲線，將可降低實驗成本及困難度。

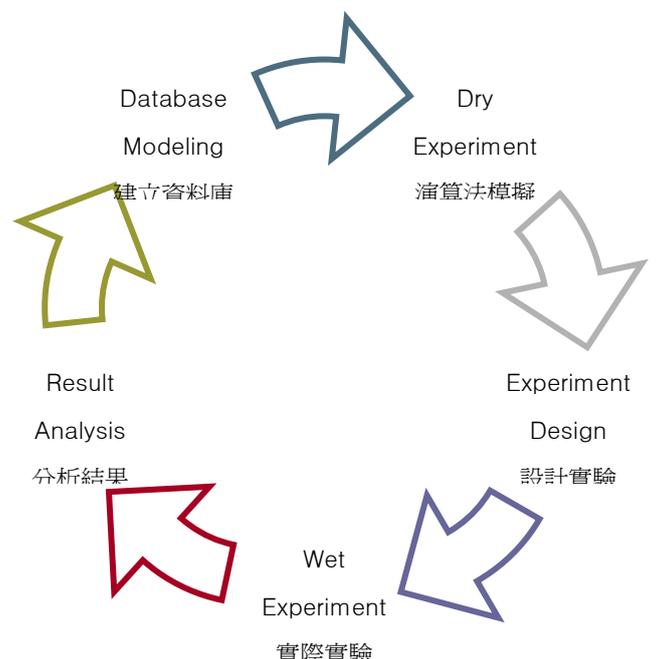
在物種的選擇上，我們選用實驗室中最常使用到的微生物——大腸桿菌(E. coli)，選用大腸桿菌有兩個考量點，首先其生殖方式是以二分法繁殖，在我們建立電腦模擬的演算法演化條件上較易控制。

其次大腸桿菌是遺傳工程及產業界最常利用到的微生物，如大家熟知的胰島素生產；在傳統生技製藥領域中，反覆做著單調的基礎培養試驗，過程中的小錯誤往往導致實驗需全部重來，不僅花費許多時間精力，對研究人員更是痛苦的經驗，若在這些生技製藥領域中應用電腦模擬，建立精準、快速的模擬平臺，以進行所謂的 Dry Experiment，尋找如「最適合殺死癌細胞之條件」，將得以有效縮短藥物開發上市的週期。

參、文獻探討

目前的 Dry Experiment 普遍作法為「實際實驗→建立回歸模型→產生演算法」的循環，其中分析結果的步驟多為利用既定的回歸方程式，將實際實驗結果進行代值計算，進而推導出可能的生長演算法，無法實際觀測生物真實的生長和繁殖狀況。

本程式將改進此步驟，嘗試以陣列方式記錄每個生命體的詳細參數，演算過程中對每個個體的改變都能單獨反應，最後再進行數量的回歸方程式統計。



肆、研究目的

探討以二分-隨機方式，建立一接近微生物每個個體真實生殖與成長情形、和環境變因影響成長實際情況之模擬平臺，命名 Emu. coli (Emulator coli)。使用非傳統生長曲線回歸方程式的純數學計算，使程式系統呈現生物實驗的真實狀況，並且使 Emu. coli 模擬平臺能夠在已知範圍內預測多種環境，品系的生長和繁殖情形。

伍、研究設備及器材

Microsoft(C) Visual Basic(R) 6.0 Educational Edition,
Notebook: HP(C) nc4000 and Asus(C) M2400E with Windows XP Professional

陸、研究過程或方法

建立資料庫及 Emu. coli 模擬程式

基礎平臺建置

首先以物件導向架構為基礎，以數值實際動態模擬 *E. coli* 個體之運動、生長、繁殖以及對於 pH 值等化學或物理因素導致的行為或現象之全面模擬平臺。建立陣列存放每個個體的特徵、位置、世代等資訊，另外預先定義環境影響、存活條件，亂數隨機抽取陣列中的個體並使之變異，或產生兩個新的個體存放到陣列中。

E. coli 有眾多品系，從文獻中我們找到 K-12 *E. coli*、MG1655 品系的完整生長曲線資料及基因序列^[1]以此為 Emu. coli 模擬平臺的資料庫基礎。

E. coli 個體自主物件

即 Emu. coli 程式的主體，*E. coli* 為一物件化的自主性程式。而其中真實細胞具有之週期性，皆以數值化方式交由程式本身進行，可自由進行觀察與控制。

一、運動

我們假設在無外界干擾能量提供充足且平均的理想狀況下，*E. coli* 的運動是全然隨機的，故以一在短時距內產生的隨機模型建立其運動方向，並模擬其對於障礙物件的即時反應。而 *E. coli* 的主體則為一矩陣化的資料流，具有獨立的隨機行為，亦可追蹤其完整路徑，並進行完整的分析。而顯示介面則儘可能以即時繪製的方式精簡地圖形化展示 *E. coli* 的各種行為。

二、繁殖

E. coli 為一無性生殖生物，故假設細胞間期接近終了時，由個體自由隨機決定分裂與否以及精確的分裂時間，並賦予其獨立的矩陣資料，定義子個體的生命狀態，親代，運動狀況等資料。而其分裂週期又依其環境因數對於品系的倍增時間影響，而其影響皆以變數傳遞方式陣列化地保存。

但由於 Emu. coli 平臺為期控制器作為依據，在時間軸之對應上是以函數對應的方式進行真實時間的對應。

三、死亡

對數期後的個體出現死亡現象，Emu. coli 程式中以生命週期為主，並且參照使用者自定的物化數值判定個體是否接近死亡時點，並亦由個體狀況獨立判定詳細死亡時間。其週期亦依其環境因數對於品系的倍增時間影響，而其影響皆以變數傳遞方式陣列化地保存，其對應真實時間軸之方式亦同。

四、化學因素

以 pH 為主，我們假設 *E. coli* 之最佳生長環境為 pH=7 之環境，而對於數值變化做倍率遞減函數，以進行耐受力之模擬，而最後針對實驗數據進行對照和數值分析。

回歸分析統計

Emu. coli 主系統將以變數傳遞方式將即時運算之資料傳遞至迴歸分析器，故可直接針對實驗結果進行分析或微調。矩陣回歸運算與倍增時間，以矩陣進行 Emu. coli 程式執行結果的分析可得倍增時間多次回歸方程式、和圖形的繪製等等，至於倍增時間則以公式為基礎，自由選擇分析所需區塊。

設計實驗驗證 Emu. coli 程式結果

為了證明此平臺能夠預測為之條件下的生長曲線，我們在實驗室中進行另一品系 DH5- α 之 *E.coli* 的培養。

材料：

LB medium(10 g tryptone 、5 g yeast extract 、5 g NaC /per liter)

LB plat(10 g tryptone 、5 g yeast extract 、5 g NaC 、15 g agarose e/ per liter)

分光光度儀(spectrophotometer), *E. coli* 品系：DH-5 α

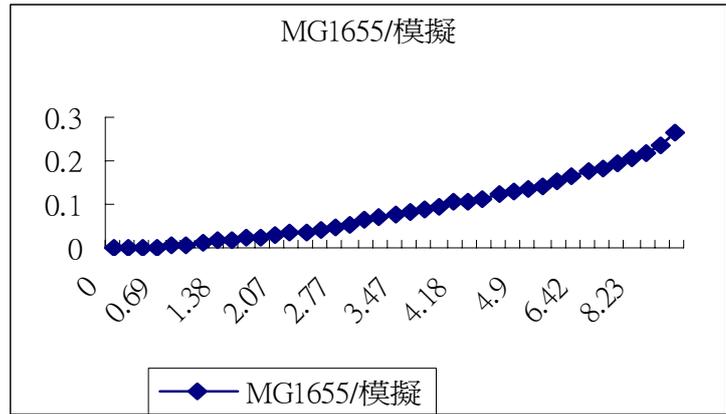
步驟：

- 一、 建立不同環境(pH)下 *E. coli* 的生長曲線，所以在 LB medium 中分別加入適量的 HCl 或 NaOH 以製備 pH = 5、6、7、8、9 的培養
- 二、 3mL LB medium 中加入適量冷凍的 *E. coli*，放在 37°C 培養箱中，並以 200rpm 平臺旋轉搖動，隔夜培養 12 小時以上，製備高濃度菌液。
- 三、 以分光光度儀(spectrophotometer)測量前步驟所置備高濃度菌液的吸光值 (OD600)，因 OD 值的變化可視為族群密度的變化，平均每 0.1 OD 單位大約可等於每毫升 10^8 個細胞[≡]
- 四、 將高濃度菌液稀釋 $1 \times 10^5 \sim 3 \times 10^5$ 倍，均勻塗布於 LB plate 上，置於 37°C 恆溫箱中培養 18 小時，數出菌落數，由此推知原始菌液的濃度，也可以檢驗吸光值與細菌密度的關係。
- 五、 將高濃度菌液加入不同 pH 值的培養液中，稀釋 100 倍後，加入培養用試管，每管 1mL，放入 37°C 培養箱中，並以 200rpm 平臺旋轉搖動培養。
- 六、 每隔一小時取出一培養管，以分光光度儀測定其吸光值。測定時，以 LB medium 做為參考基準點，即定 LB medium 之 OD600 為零。
- 七、 實驗進行約 11 小時後，OD600 已無顯著變化，推測細菌族群已經進入生長曲線中的穩定期。記錄全部變化，繪製實際實驗生長曲線
- 八、 給予 Emu. coli 模擬程式和上述條件相同的參數，得到程式之生長曲線。

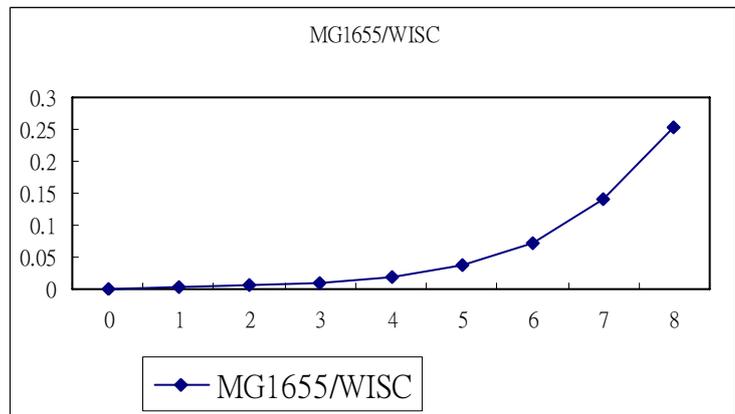
給予模擬程式和上述條件相同的參數，得到模擬程式之生長曲線。

柒、實驗結果
Emu. coli 模擬程式

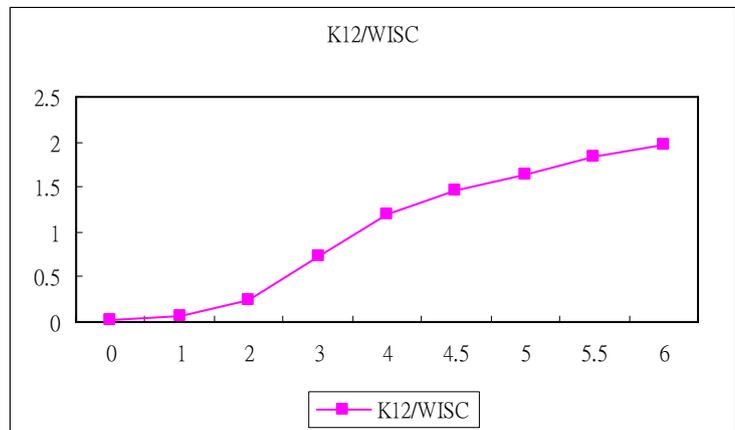
在我們的平台上以 MG1655 品係為基礎達成的模擬演算結果



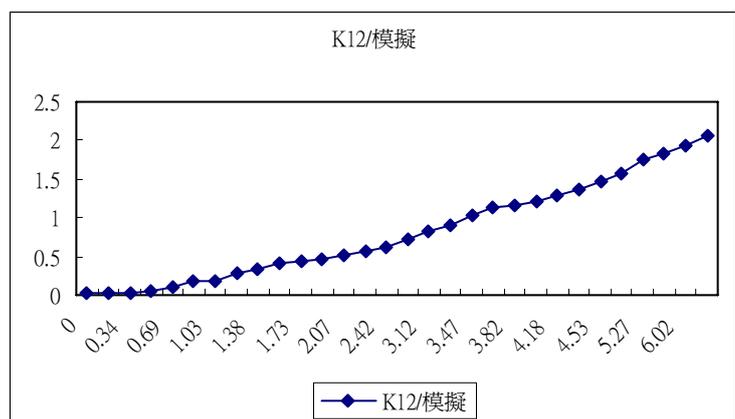
在我們的實驗中以 MG1655 品係為基礎達成的實際實驗結果，和模擬結果有極相似的生長曲線



在我們的平台上以 K12 品係為基礎達成的模擬演算結果



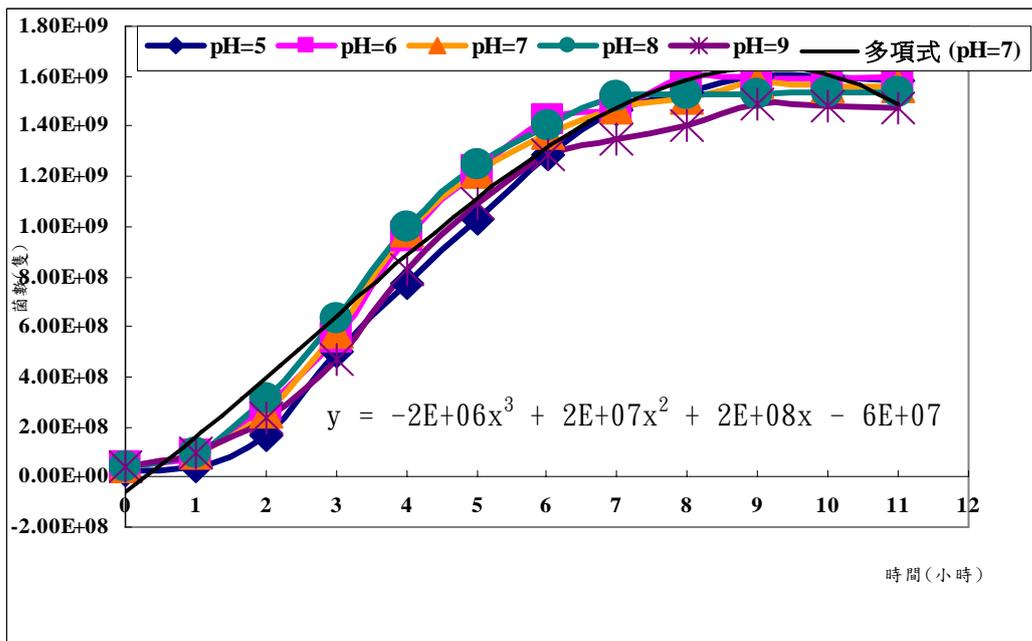
在我們的實驗中以 K12 品係為基礎達成的實際實驗結果，和模擬結果有極相似的生長曲線



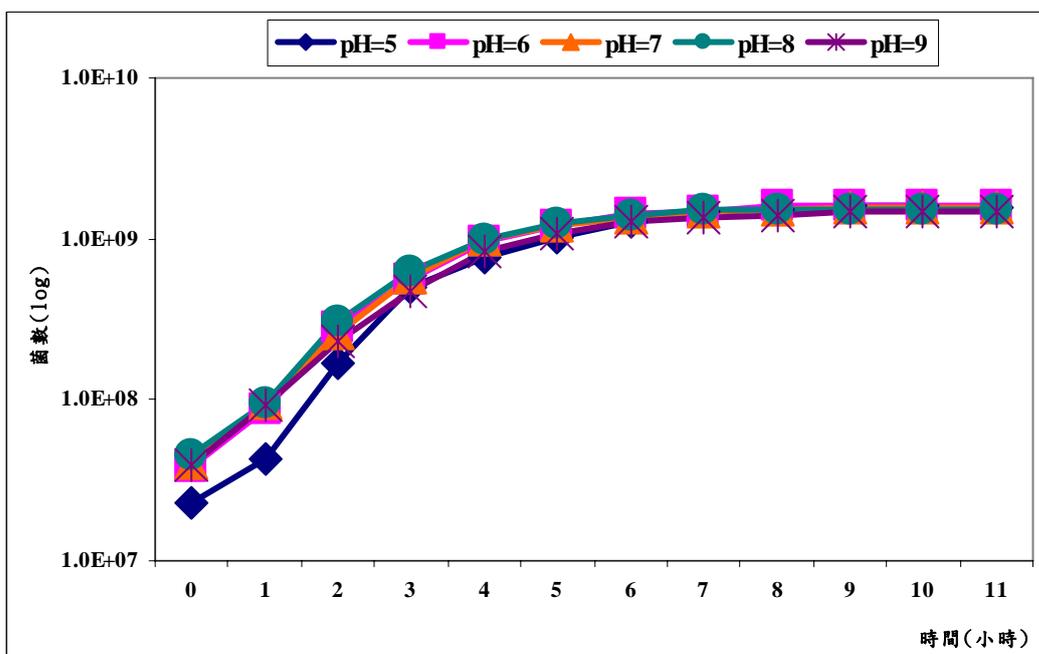
實際實驗

經過比較，發現在 pH=7 的培養環境中，*E. coli* 的生長情形比其他環境好，但不是懸殊的差距。推測 *E. coli* 有足夠的環境耐受力，在這樣的環境差異中不會對個體本身造成劇烈的影響。而在文獻中²提到 *E. coli* 在弱酸性環境中的生長狀況較弱鹼性環境中良好，故我們在 *Emu. coli* 程式中亦加入這個因素，並在實驗後獲得證明。

另外，以 LB medium 的 OD600 值作為 0，則在 *E. coli* 培養中，*E. coli* 的 OD600 值大約等於 1.60 時生長速度明顯停滯，推測 *E. coli* 族群已經進入生長曲線中的穩定期。



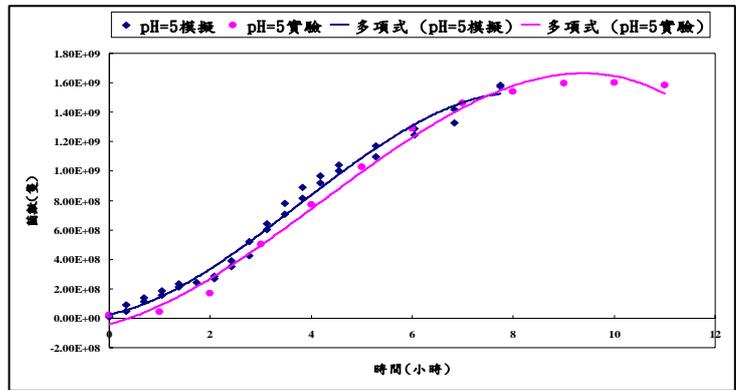
各種 pH 值下的實際實驗結果生長曲線比較



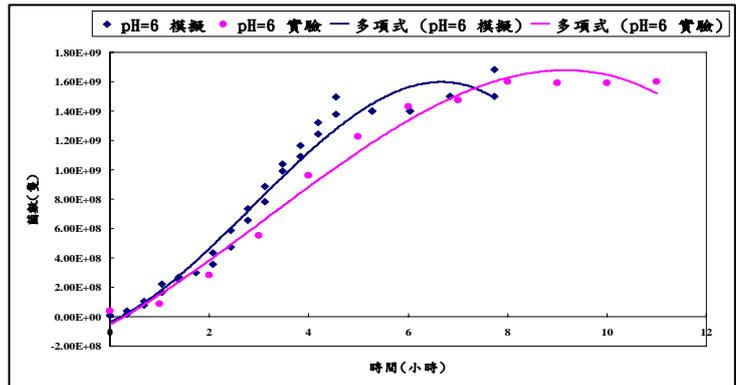
各種 pH 值下的實際實驗結果 Log 對數生長曲線比較

Emu. coli 模擬程式驗證

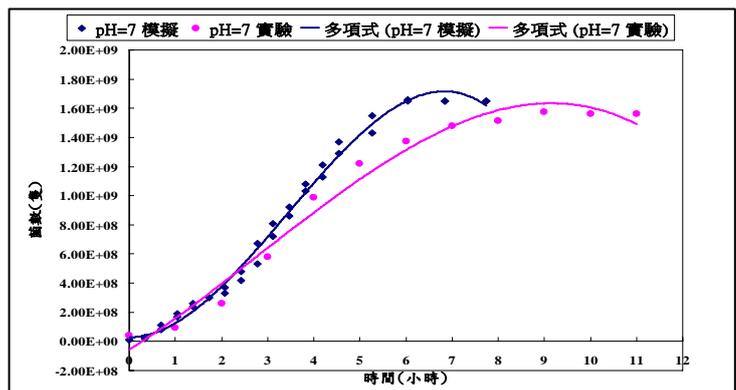
pH=5 生長環境下，模擬和實際實驗所得生長曲線比較，極為近似



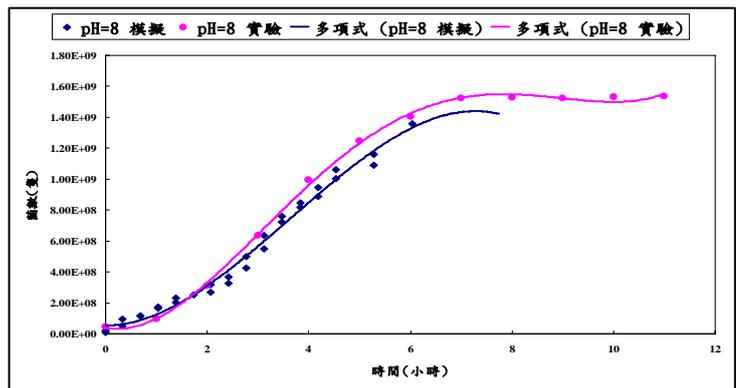
pH=6 生長環境下，模擬和實際實驗所得生長曲線比較，大致近似



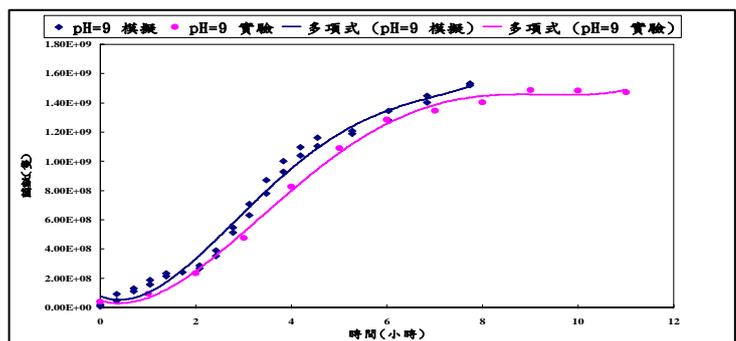
pH=7 生長環境下，模擬和實際實驗所得生長曲線比較，大致近似



pH=8 生長環境下，模擬和實際實驗所得生長曲線比較，極為近似



pH=9 生長環境下，模擬和實際實驗所得生長曲線比較，極為近似



捌、討論

已達成目標

- 生物-環境關係模擬
培養環境 pH 值對於 *E. coli* 的影響，程式執行結果與實驗結果相符，故 Emu. coli 系統在單變數環境的模擬已有相當成果。我們亦已完成真實時間-週期控制器時間的對應，在數據範圍之下，皆可達相當準確的對應。但 *E. coli* 族群成長中往往會有許多複雜的因素：營養、供氧量、族群密度、培養空間等，都在生物體與環境交互作用中影響，環境參數上尚有改進空間。
- 生命現象之模擬
目前個體的運動演示方式效率差強人意，而生殖分裂等若完成高效率的顯示演算程式即可建立相當生動的觀測狀況。
- 使用者介面（數據自動觀測和統計、族系追蹤及變因控制）
平臺中的族系監視器可完整記錄所有個體的族系相關參數且使用者可自由控制平臺中所有的可變變數。
- 模擬結果驗證的圖形 (pH=6)及 (pH=7)乍看之下似乎不完全與實驗結果符合，但如帶入數學回歸方程式則依然相當準確。我們以看來差異最大的 pH=7 為例：
模擬平台產生資料的回歸函數 $y = -2E+06x^3 + 2E+07x^2 + 2E+08x - 6E+07$
實際實驗數據所得的回歸函數 $y = -1E+07x^3 + 1E+08x^2 - 2E+06x + 3E+07$
相似程度(相關係數)超出預期地高於 0.9，可見其他 pH 之模擬結果(pH=5,6,8,9)更是和實際實驗結果接近。

未來發展

- 我們已經嘗試在 Emu. coli 平臺中加入基因序列當作變因之一，給予個體陣列一組簡單的 ATCG 序列，經過一段時間的族群消長，增加淘汰條件使擁有以 TAC 為首序列的個體能夠存活，亦可獲得基因序列對於 pH 值之關係，此部分希望可以取得完整資料庫之建立進一步研究。
- 另一個已經實做的方向，是演算法模擬過程中的大量運算需求，一種得以將本模擬平臺的負擔轉移到其他電腦進行的分散式系統，勢必將大大提升能夠模擬的參數範圍，為其他更複雜的物種建立個體陣列。
- 精密演化（核苷酸-蛋白質-個體的完整影響）
由核苷酸→蛋白質→個體之程式由系統完全模擬，而以物化原理進行影響，建構一完整個體並且由之可得詳細的基因-環境互動，亦甚至可為生物工程之預測模擬器
- 基因圖譜回溯
則可以進行大量個體的圖譜比對，並且可同時經由資料庫進行分析
- 可擴充性
相容大型標準化資料庫連接，並利於進行分析、基因建立比對，即時真實生物觀察資料傳輸後直接修正 Emu. coli 系統內容等。
- 而以 Emu. coli 系統為基礎，發展可得到多種類生態系模擬、複雜多因素交叉模擬、群集演算等等有效、有實際意義的模擬工具。

玖、結論

實際實驗

- 一、對 *E. coli* 而言，在 pH=5~9 的環境中培養，在 pH=7 的生長環境下有較好的生長結果。弱酸中的生長情形又比在弱鹼中的情形好。
- 二、如果以 LB medium 的 OD600 值作為 0，則在 *E. coli* 培養中，*E. coli* 族群進入生長穩定期時的 OD600 值大約等於 1.60。

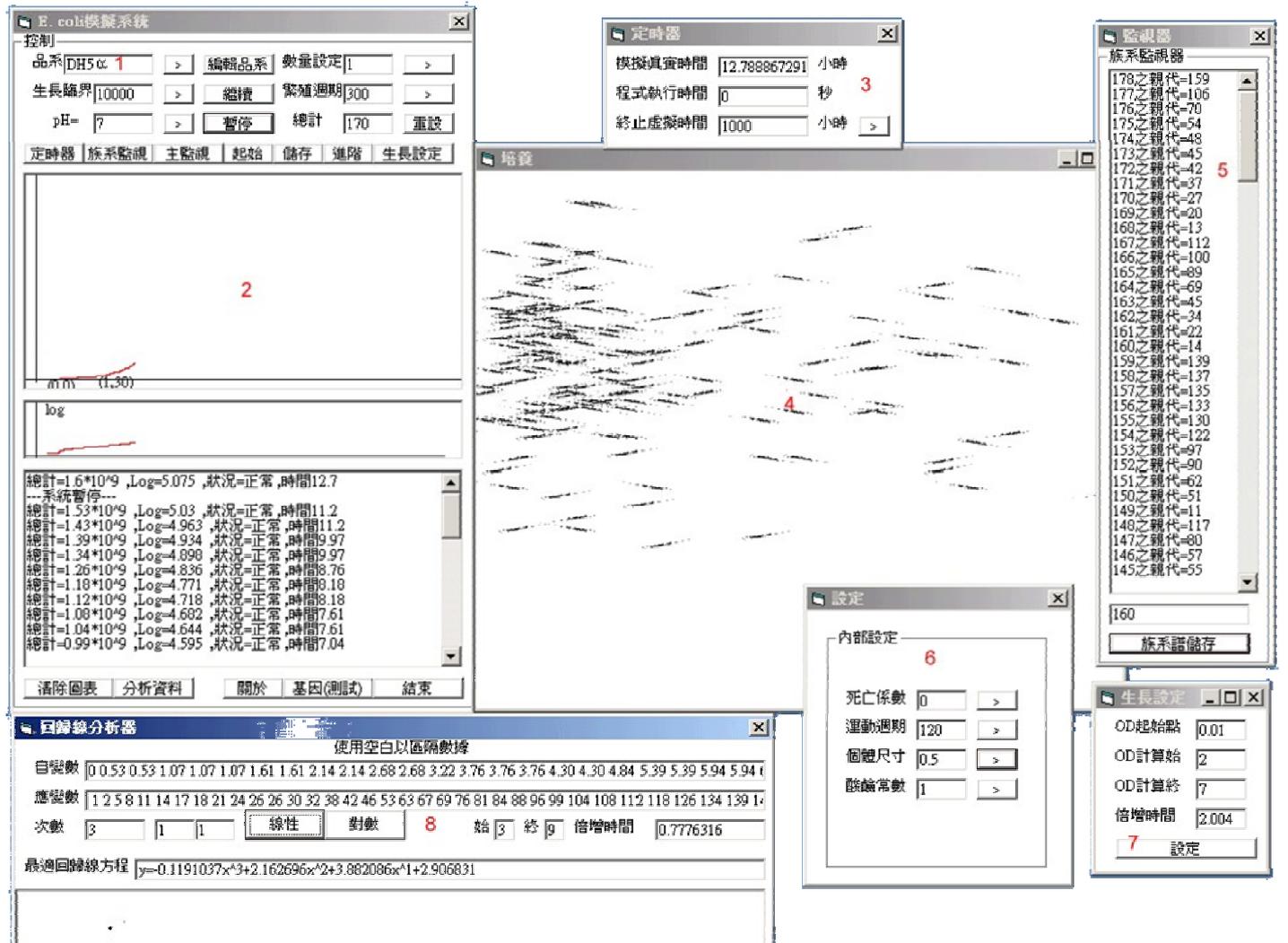
Emu. coli 程式模擬系統

Emu. coli 系統已可以陣列方式進行對所有以二分法(分裂生殖)生物個體的完整生活史模擬並且即時顯示實驗結果。Emu. coli 能夠在已知範圍內，預測不同 pH 值培養液中，大腸桿菌的生長曲線，與實際培養之生長曲線相符，且建立了完整的模擬結果保存方式。針對應用性，Emu. coli 系統已經可以自由建立品系、使用者自行修正與應用、大量資料累積。故 Emu. coli 系統目前已經有實用價值，未來亦極具發展潛力。

拾壹、參考資料

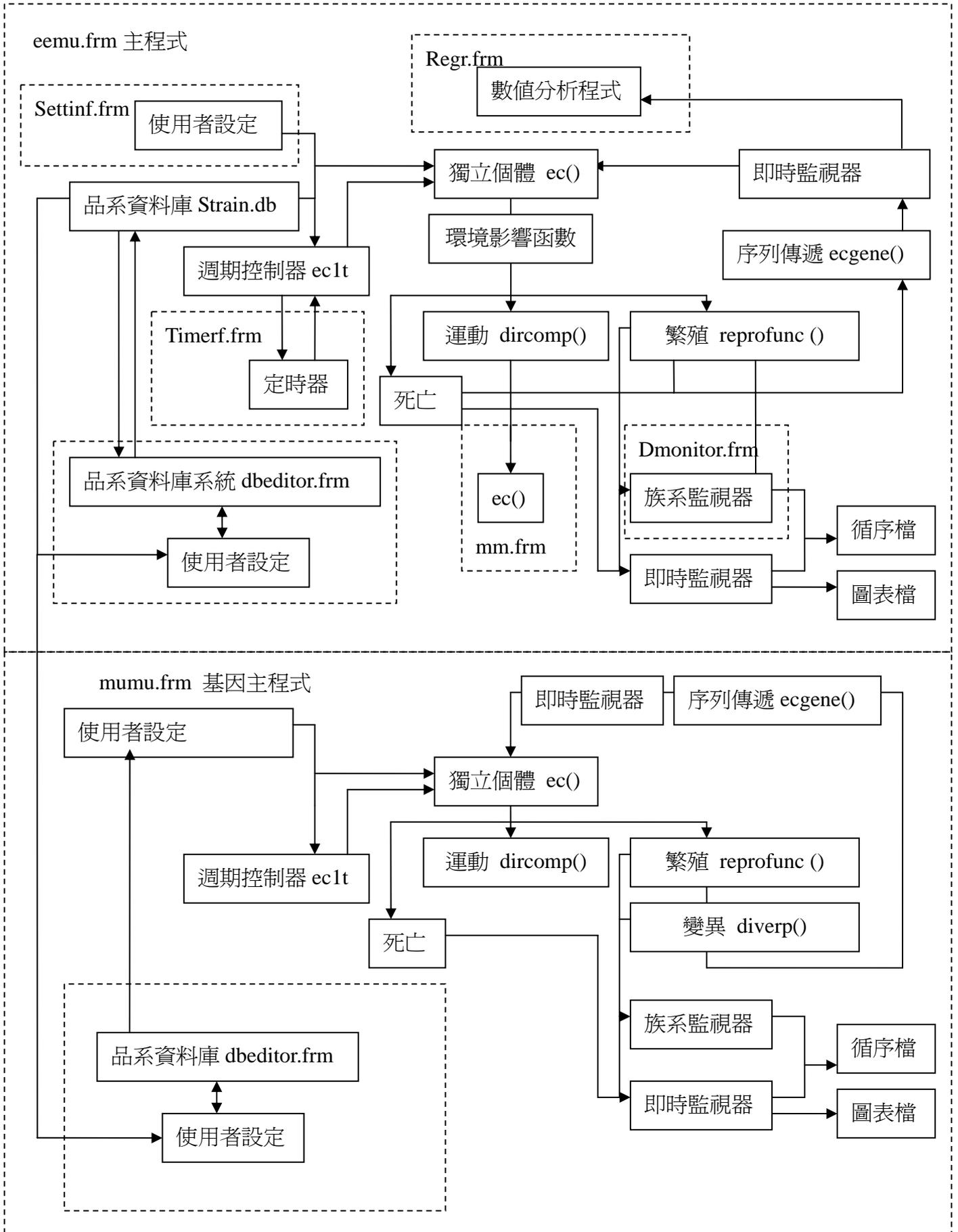
- 一、Hikoaki Kitano(2002), *Systems Biology: the Genome, Legome, and beyond*, Science 295, 1664
- 二、M. B. Lobočka, D. J. Rose, G. Plunkett III, M. Rusin, A. Samojedny, H. Lehnerr, M. B. Yarmolinsky, and F. R. Blattner (2004) *Genome of bacteriophage P1*. J Bacteriol 186(21): 7032-7068.
- 三、Ausubel F. M. et al. (2001) *Current Protocols in Molecular Biology*, New York. John Wiley & Sons
- 四、Haefner J. W. (1996) *Modeling Biological Systems : Principles and Applications*. New York. Chapman & Hall
- 五、Chih-Chun Lee (2002) *The Gene Expression in Escherichia coli during Prolonged Starvation*:Institute of Microbiology and Immunology School of Life Science National Yang - Ming University
- 六、Yugi K. and Tomita M. (2004) *A general computational model of mitochondrial metabolism in a whole organelle scale*.:Keio University.

拾參、附錄——程式介面說明及架構



- 品係參數**
針對每種品係之 E. coli 建立特性參數，包括基因序列、繁殖週期、
- 生長曲線**
此處即模擬所得之個體數目統計後即時繪成之生長曲線。
- 模擬平台的時間週**
可以手動調整整體時間週期，加速實驗結果取得，亦用於防止過渡生長之臨界控制。
- 個體運動及死亡監視器**
點選每個個體可以立刻獲得其基因、運動、代謝等自主物件之陣列內容。
- 族系監視器**
每當某些個體繁殖時，會立刻記錄與其子代之關係。
- 環境參數**
模擬環境天擇所必要的條件，本次實驗中以 pH 變異驗證模擬結果。
- 測量 OD 值**
為得知族群數量，模擬測量 OD 值的計算上下界。
- 回歸分析計**
在 Emu. Coli 系統中，回歸分析計僅用於最終結果曲線繪製，而非模型建立。

Emu. coli 程式架構圖



中華民國第四十五屆中小學科學展覽會
評 語

高中組 生物(生命科學)科

第三名

040719

大腸桿菌生長曲線之系統生物學研究

臺北市立建國高級中學

評語：

1. 能結合電腦程式撰寫及實驗操作
2. 數據分析精確
3. 建議深入進行數學統計的部分