

# 中華民國 第 49 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

040710

金生金適

-結合奈米金粒與 DNA 適體的金黃色葡萄球菌快速檢測系統

學校名稱：臺北市立第一女子高級中學

作者： 高二 孫瑞璘 高二 楊佳穎	指導老師： 陳怡旻
-------------------------	--------------

關鍵詞：DNA 適體、奈米金粒、金黃色葡萄球菌

# 作品名稱

金生金適—結合奈米金粒與 DNA 適體的金黃色葡萄球菌快速檢測系統

## 摘要

金黃色葡萄球菌是生活中常見的病原菌之一，因其抗藥性日益嚴重，是大家所熟知的超級細菌。目前醫院對此菌的檢測方式，從培養到獲得結果大約需要兩天，對許多感染此菌的重症患者是無法接受的醫療時間延誤。有鑑於此，本研究利用創新的適體、光電及奈米技術發展一個可以快速偵檢金黃色葡萄球菌的系統。適體為具有與抗體同樣分子辨識功能的寡核酸。我們利用 DNA 適體篩選技術，獲得能夠專一地辨識金黃色葡萄球菌的適體序列，進一步發展高敏感度細菌檢測系統，並測得靈敏度近個位數的金黃色葡萄球菌。本研究亦結合奈米金與共振光散射原理，以簡便的二極體雷射與偵測裝置，可快速判定檢測樣品中是否有金黃色葡萄球菌，大大縮短檢驗所需的時間。

## 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易致病的病原菌(鄭, 2008)，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，具有抗藥性的金黃色葡萄球菌，例如抗二甲氧基苯青黴素金黃葡萄球菌(*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, MRSA)，病例通報數正逐年上升，一份美國的研究估計，MRSA球菌在2005年期間共造成十萬美國人感染，近一萬九千人死亡(同年因愛滋病死亡人數爲一萬七千人)，預計這個數目還會逐年上升(Klevens, et al., 2007)。因此金黃色葡萄球菌檢測與治療已是當下重要的議題。

傳統的細菌偵測方式，有賴於細菌的培養及鑑定，但細菌生長所需的時間冗長，步驟繁複，沒有辦法滿足現在高效率及快速微生物偵測之需求(Xue, et al., 2009)。近來隨著分子生物學技術的蓬勃發展，已有利用我們從課本中讀到的聚合酶連鎖反應(Polymerase chain reaction, PCR)來放大細菌 16S rRNA 片段並配合定序等後續分析方法來鑑定菌種，但這兩個方法都需要專業的技術及昂貴的儀器，並不適合推廣於一般醫院檢驗部門操作。另外也有研究提到利用核酸放大的方法將目標細菌體中特有的核酸序列增殖來進行鑑定，這個方法雖然比 16S rRNA 的方法更精準但在專一性引子的設計上並不容易。所以我們需要更方便，便宜且兼顧高敏感度及專一性的偵測方式來檢測金黃色葡萄球菌 (Raghavendra, et al., 2009)。

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，在此可以和我們在課本上所學到的 DNA 結構相互印証，以及了解 DNA 的化學組成(施, 2009)。適體的三度空間構型無法經由電腦程式計算核酸序列來預測，必須利用實驗篩選獲得。本研究利用 SELEX(Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment)技術，以寡核酸與目標物反覆結合，分離，放大以獲取具高度目標物專一性的適體。適體可以辨識小分子化學結構

例如四環黴素(Tetracycline) (Suess et al., 2003)，或是單一蛋白質，甚至整顆細胞。目前為止已有許多適體被發現及發表，且整理成資料庫，放置於網路上供人查閱 (<http://aptamer.icmb.utexas.edu>)。

適體分子除了具有和抗體相同高的專一性和親和力，另外還有許多優點，例如不易產生免疫性反應，價格便宜，容易藉化學方式進行合成或修飾等(Hamula, et al., 2008)。這個計畫我們希望藉由 SELEX 技術，找到能與金黃色葡萄球菌高度結合的適體，並利用此適體技術建立一套快速鑑定金黃色葡萄球菌的檢測系統。

## 貳、 研究目的

以金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)為偵測的對象，利用適體(aptamer)之高度結合能力及專一性，藉由 SELEX 技術篩選出可偵測金黃色葡萄球菌的適體，並以篩選到的適體為基礎，發展一系列快速偵測金黃色葡萄球菌的技術。

## 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，其序列為 TCCCTACGGCGCTAAC-(N)<sub>30</sub>-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 MgCl<sub>2</sub> 及 1 mM CaCl<sub>2</sub>。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 $\alpha$  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)、TA Cloning 試劑套組(pGEM-T and pGEM-T Easy Vector System)、磷酸水解酵素(calf intestinal alkaline phosphatase)及核酸磷酸化酵素(T4 polynucleotide kinase)購自 Promega 公司(Madison, WI)、Centri-sep G25 分離管柱購自 Princeton Separations 公司(Freehold, New Jersey)、SAP(shrimp alkaline phosphatase)及 Exonuclease I 購自 New England Biolab 公司(Ipswich, MA)、nitrocellulose 膜、nylon 膜、Whatman 過濾膜、30 奈米之金粒子(gold nanoparticles)購買自 BB International (BBI, Madison, WI)、4% paraformaldehyde(三聚甲醛, Sigma, St Louis, USA)、藻紅素(phycoerythrin, PE)購自 Invitrogen 公司(Carlsbad, CA)。

## 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)、Typhoon 9410 螢光掃描器 (GE Healthcare, Piscataway, NJ)、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、閃耀計數器

(Beckman LS6000TA scintillation counter)、Bio-Dot 微流體過濾裝置(microfiltration apparatus)、螢光顯微鏡(Olympus BX51)。

## 肆、 研究過程或方法

### 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 溫室。

### 二、 SELEX 步驟

取 10 $\mu$ l 之適體分子庫(約含 10<sup>15</sup> 條適體分子)加上 490  $\mu$ l 適體篩選緩衝液，均勻混合後，利用 PCR 機器加熱至 95°C 兩分鐘，再以每 40 秒降 2°C 的降溫速度從 95°C 降至 39°C，以使適體形成正確穩定的構型。取 500  $\mu$ l 金黃色葡萄球菌 Strain 0(維持 OD 值在 1.3~1.4，約為 5 $\times$ 10<sup>9</sup> 顆細菌)，以 6000 $\times$ g 離心 5 分鐘，去除上清液，加入 1 ml 適體篩選緩衝液，均勻混和後，再加入前述穩定好結構的適體溶液樣品，放置於 4°C 的旋轉混合器上 30 分鐘，離心去除上清液後，並以 1 ml 的適體篩選緩衝液配合離心方式重複沖洗菌體 5 次，以去除沒有結合之適體分子，爾後加入 100  $\mu$ l 之適體篩選緩衝液，以 95°C 加熱 10 分鐘來分離結合於菌體上之適體，離心並吸取分離後之適體溶液，再經由前述之緩慢降溫步驟，使適體形成正確結構，然後與 5 $\times$ 10<sup>8</sup> 顆的表皮葡萄球菌於 100  $\mu$ l 體積中混合，並放置於 4°C 的旋轉混合器上反應 30 分鐘，以去除與表皮葡萄球菌結合的適體，離心後吸取上清液保存之。

利用 R9F 及 biotin 標定之 R9R 引子組，以聚合酶連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 增殖上清液中的適體分子，PCR 反應溶液中包含 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8.9, 10 mM betaine, 1% DMSO, 200  $\mu$ M 的 dNTP, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 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，於室溫中反應一小時，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，再用 NaOH 破

壞雙股 DNA 之間的氫鍵結，其中(+)股的 DNA 會由磁珠上脫落並溶在 NaOH 裡，再利用 Centri-Sep G25 管柱根據廠商所建議之步驟做緩衝液交換到適體篩選緩衝液中，並以緩慢降溫步驟，使分離之單股適體形成正確結構，再加入金黃色葡萄球菌以進行下回合的 SELEX 步驟。

### 三、適體的定序

在最後一回合 SELEX 步驟中分離與金黃色葡萄球菌結合的適體樣品，分離的適體樣品以 R9F 及 R9R 引子配合 PCR 技術增殖後，利用 TA-cloning 試劑套組，根據 Promega 公司建議之步驟，將純化過的 PCR 產物轉殖接入具有抗安比希林(Ampicillin)基因之質體中，再將接好的質體，以 RBC Bioscience 公司所附的方法，轉植入 DH5 $\alpha$  勝任細胞 (competent cells)中，再塗抹於含有 Ampicillin 的 LB 培養皿上。於 37°C 培養 16 小時後，將菌落挑出送至中央研究院共儀室以 T7 引子進行定序。

### 四、以定量 PCR 獲得適體(SA14,SA17,SA61)之解離常數(dissociation constant, Kd)

將約 10<sup>6</sup> 顆金黃色葡萄球菌與不同濃度之適體分子於 4°C 適體篩選緩衝液中反應，30 分鐘後將反應物以 1ml 適體篩選緩衝液，6000 $\times$ g 離心 5 分鐘，重複清洗五次後，將管柱加熱至 95°C，並加入 50  $\mu$ l，95°C 之適體篩選緩衝液，以離心方式收集濾液，並以 R9 引子組配合定量 PCR 套組進行適體的定量，並以與金黃色葡萄球菌結合比率 50% 之適體濃度定為解離常數值。

### 五、以螢光顯微鏡觀測適體(SA14,SA17,SA61)專一地辨識金黃色葡萄球菌

將 250nM 帶有 biotin 的適體分子，利用 PCR 機器加熱至 95°C 兩分鐘，再以每 40 秒降 2°C 的降溫速度從 95°C 降至 37°C，以使適體形成正確穩定的結構。取 100  $\mu$ l 之菌液，以 6000 $\times$ g 離心 5 分鐘，去除上清液，加入適體，放置於 4°C 的旋轉混合器上 30 分鐘，離心去除上清液後，並以 1 ml 的適體篩選緩衝液配合離心方式重複沖洗菌體 3 次。再加入與 Streptavidin 結合之藻紅素(phycoerythrin, PE)，適體分子中的 biotin 會和 streptavidin 結合，放置於冰上 30 分鐘後，以 1ml 的 PBS 溶液配合離心方式重複沖洗菌體 2 次。最後加入 4% paraformaldehyde(三聚甲醛) 100 $\mu$ l，離心取底部的菌液 5 $\mu$ l，以

1000 倍放大之螢光顯微鏡觀察白光與螢光的視野並照相。

#### 六、 利用耦合適體的奈米金粒檢測金黃色葡萄球菌

將 500  $\mu$ l 30 奈米大小之金粒子溶液(約  $10^{11}$  分子)以 100 mM  $K_2CO_3$  調整 pH 值至 8.0~8.5 之間，加入 0.1 mg/ml 濃度的 NeutrAvidin 於室溫反應 30 分鐘，再加入 10 % 牛血清蛋白(bovine serum albumin) 於室溫反應 30 分鐘後，以 3000 $\times$ g 離心 10 分鐘，去除上清液並以適體篩選緩衝液清洗兩次。將鍍上 NeutrAvidin 的奈米金產物，與 1  $\mu$ M 之 biotin 標記的 DNA 適體分子在 4 $^{\circ}$ C 反應 3 小時後，再以適體篩選緩衝液清洗五次，耦合適體的金粒子儲存於 4 $^{\circ}$ C 備用。使用時將  $10^8$  分子之適體金粒子添加於 100  $\mu$ l 之適體篩選緩衝液中，與不同濃度的金黃色葡萄球菌混合，並於 4 $^{\circ}$ C 靜置 30 分後，以 638nm 波長二極體雷射光束照射，並於直角方位以光二極體(photodiode)偵測共振散射光(resonance light scattering)之強度。

## 伍、 研究結果

#### 一、 以 SELEX 技術篩選辨識金黃色葡萄球菌的適體分子

根據 SELEX 步驟(圖一)，培養一日的金黃色葡萄球菌與適體分子庫結合，於去除沒有結合的適體分子後，利用高熱將與金黃色葡萄球菌結合的適體分子分離出來，其後利用表皮葡萄球菌進行反向篩選，可以淘汰會結合表皮葡萄球菌的序列。剩下的適體分子，我們利用 PCR 增殖並分離其中的單股適體序列，而後重新與另一批金黃色葡萄球菌反應，經過八個回合的 SELEX 步驟，我們成功分離出 91 條適體序列，並依序列的相似程度畫出樹狀分布圖，且從中挑選出八條序列(展示於圖二)，進行親和力的測試，並依測試結果挑選三條與金黃色葡萄球菌結合力較佳之序列，利用結構預測軟體(mfold, <http://mfold.bioinfo.rpi.edu>)分析後，結構如圖三所示。

軟體所預測的結果中 SA14 的自由能 $\Delta G$  值為-11.2kcal/mol，SA17 為-2.4 kcal/mol，SA61 為-2.8kcal/mol。接下來我們利用定量 PCR 作親和力分析，並得出解離常數(dissociation constant,  $K_d$ )，此數值代表菌體與適體間結合力的強度。解離常數越小，代表越難將兩者分開，其親和力越大。結果發現 SA14 的解離常數約為 71 nM，SA17 為



35 nM，而 SA61 為 129 nM(其測定的結果展示於圖四)。

## 二、以定量 PCR 偵測極低濃度之金黃色葡萄球菌

以等濃度的適體與不同濃度的金黃色葡萄球菌反應，細菌數由  $10^7$  顆，一直稀釋到 10 顆，利用含 0.22  $\mu\text{m}$  濾膜之離心管，將沒有結合菌體的適體分子移除後，再萃取結合在菌體上之適體，並以定量 PCR 分析並定量(以 SA14 SA17 為例子之結果展示於圖五)。我們的結果顯示，此三條適體都可以偵測到實驗中細菌的最低濃度(即 10 顆細菌)，且根據比對連續稀釋之定量適體分子的標準曲線後 (圖四)，我們定出一顆金黃色葡萄球菌細菌可結合超過 1000 條適體序列。

## 三、SA14,SA17 與 SA61 可專一地辨識金黃色葡萄球菌

將等濃度帶有螢光分子的適體分別與不同的菌種反應後，經清洗步驟後，以 1000 倍放大之螢光顯微鏡觀察並照相偵測其螢光強度差異，每一個視野都是以相同的曝光時間所獲得的結果，並以同視野之白光與螢光相片分別展示之。圖六以枯草桿菌、大腸桿菌、金黃色葡萄球菌 Strain 0、金黃色葡萄球菌 Strain 4 及表皮葡萄球菌為例子，結果顯示 SA14、SA17 及 SA61 對金黃色葡萄球菌(Strain 0, Strain 4)有較高的結合螢光值，相對的，枯草桿菌、大腸桿菌及表皮葡萄球菌並沒有觀察到明顯的螢光訊號。

將 15 種常見之細菌與 6 種不同株的金黃色葡萄球菌與等濃度之適體分子反應，將沒有結合菌體的適體分子移除後，再萃取結合在菌體上之適體，並以定量 PCR 分析並定量，來比較各菌種間結合適體分子數的差異。結果顯示 SA14、SA17 及 SA61 不僅可檢測出實驗組之金黃色葡萄球菌，也可檢測出所測試的另外五株金黃色葡萄球菌。這 3 條適體除了 SA61 對綠膿桿菌有些許結合外力外，此三條適體的實驗結果皆顯示了絕佳的專一性。

綜合以上結果，可以得知 SA14、SA17、SA61 對金黃色葡萄球菌有極佳的辨識度(結果整理於表一)

## 四、以奈米金粒子即時偵測金黃色葡萄球菌

為了能做到即時偵測金黃色葡萄球菌，我們利用奈米金粒子發展了一個即時偵測的

方法。因為過去研究發現奈米金粒子具有在分子半徑變大的時候，對光的散射強度會大幅增加的特性，這份報告更指出其光散射強度與金粒子半徑的 6 次方成正比 (Yguerabide, et al., 1998, Yang, et al., 2009)。有鑑於此，首先我們將 SA14、SA17 及 SA61 適體分子分別固定在奈米金粒子表面上，並以這些耦合適體的奈米金粒子來偵測金黃色葡萄球菌的存在，如果菌體存在就會與適體-金粒子結合，最後形成網狀聚集，當雷射光束照射樣品時，此聚集將會產生強大的共振散射光(如圖六所示)。

本實驗的裝置圖七，我們利用 638nm 波長之二極體雷射，直接照射樣品，並於 90 度直角處設置光二極體裝置，此裝置能將散射光訊號轉化成電壓訊號，再經放大器放大後，可經由一般三用電表顯示電壓值，電壓越高代表其放出的訊號強度越強。

圖八可以明顯看出金粒子聚集前與聚集後的光訊號差異。將 SA14、SA17 與 SA61 適體-奈米金粒子與不同濃度之金黃色葡萄球菌反應，結果整理成圖八之圖表，其中可以發現，這三種適體-奈米金粒子在此系統中，細菌濃度最低可偵測到  $4 \times 10^2/\mu\text{l}$ 。其中 SA61 適體的偵測結果優於 SA14 適體及 SA17 適體。內含照片之左圖為加入隨機序列-奈米金粒子與菌體後的結果，隨機序列在此為相對 SA14、SA17 與 SA61 適體-奈米金粒子的控制組，而右方的照片顯示的是 SA61 適體-奈米金粒子與細菌體反應的結果。

## 陸、 討論

近年來，適體分子的相關研究正蓬勃發展中，但將適體分子應用於微生物檢測，目前並無突破性的進展，本實驗選用金黃色葡萄球菌為目標物，因為金黃色葡萄球菌感染常見於臨床病人並為侵犯人體的最主要病原菌之一。利用 SELEX 技術，我們成功地針對金黃色葡萄球菌分離出與其辨識結合的適體分子(圖一)。於定量 PCR 的實驗中我們利用所分離的 SA 適體，檢測到我們實驗中最低數目的細菌體(約 10 顆細菌)(見圖五)，而計算結果顯示，以 SA17 適體為例子，一顆細菌約可結合  $10^3 \sim 10^4$  之適體分子，代表即使樣本中只有一顆細菌，其 PCR 模版(template)數也會因而達到  $10^3 \sim 10^4$  分子數，可以非常有效地增加低濃度菌體的檢出率。過去利用 PCR 增殖細菌特有 DNA 序列的方法，因受限於細菌 DNA 序列複製數(copies)有限，

因此在檢體中細菌濃度極低的狀況下時常有偽陰性(false negative)檢測結果發生，利用我們所開發的新技術或許可克服這個問題。

此外於本實驗中我們篩選了 15 株臨床常見之菌種以驗證 SA14、SA17、SA61 之專一度，結果顯示除 SA61 與綠膿桿菌有些許結合外，這 3 條適體對非金黃色葡萄球菌結合之訊號經定量 PCR 分析皆有至少 10 倍以上的結合差異，此外我們也將這三條適體針對已收集之金黃色葡萄球菌株作測試，結果這三條適體對不同之金黃色葡萄球菌株，都有很高結合力。這個結果顯示，這三條適體所辨識的應該是金黃色葡萄球菌種的共同結構分子，即菌種標的 (species marker)。

爲了進一步做到可以即時性偵測金黃色葡萄球菌的存在，我們將所篩選到的適體分子連接到奈米金粒子的表面，利用奈米金粒子聚集時會增強光散射的特性，我們成功地在液態樣品中直接測得金黃色葡萄球菌的存在，整個反應只需 5 分鐘的時間，所能偵測的最低細菌濃度約爲  $4 \times 10^2 / \mu\text{l}$ ，這個細菌濃度在許多檢體並不難收集到，例如傷口膿液、痰液、或是肺部抽取液(bronchoalveolar lavage (BAL) fluid) (Allaouchichel, et al., 2005)等，這個技術將可以省去寶貴的培養及鑑定時間。

然而，目前之簡易裝置僅爲證明此適體－奈米金粒子的檢測系統之可行性設計。雖然樣品體積爲 100  $\mu\text{l}$ ，但是雷射光實際激發之體積僅有  $2.5 \times 10^{-3} \mu\text{l}$ ，因此在偵測極限濃度所測得訊號僅是 1 顆細菌所發出之共振散射光。若爲偵測極低數目之細菌，例如菌血症病人血液中之金黃色葡萄球菌，該檢測方式可以毛細管盛裝樣品，或以流體裝置將樣品流過雷射光照射之毛細管進行檢測，可大幅降低系統所需的樣品體積。而且根據過去所公佈的研究結果，我們也計畫測試不同大小的奈米金粒子，或是將細菌體以物理力量或酵素打成小片段，這些方法應該能將奈米金粒子聚集的效率最佳化，進而提升信號，增加這個系統的偵測靈敏度。

## 柒、 結論

於這個研究中，我們利用 SELEX 篩選技術成功地分離出針對金黃色葡萄球菌的適體序列，利用所獲得的適體，配合定量 PCR 技術，我們可以成功檢測個位數的細菌數，這項技術可以應用於偵測細菌數或濃度極低的樣品。除此之外，我們更結合了奈米金粒子，利用奈米金粒子對光的高散射特性，我們可以直接偵測高於  $4 \times 10^2 / \mu\text{l}$  濃度的細菌樣品，雖然許多臨床

檢體所含的菌數會高於此一數目，但對於菌數較少的樣品，例如血液檢體，則仍是力有未逮，因此我們計畫將此技術依前述討論之毛細管偵測方法將其最佳化，希望未來能將此一技術發展至不需培養也不需昂貴的 PCR 機器來增殖細菌樣品，而是可以運用簡易且低成本的裝置偵測出絕大多數的檢體中的金黃色葡萄球菌。本研究詳述了如何篩選辨識金黃色葡萄球菌的適體分子，也以實驗數據證明可將其應用在高敏感度的定量 PCR 偵測及快速的奈米生物檢測系統來偵測金黃色葡萄，未來隨著更多能辨識其他細菌之適體的成功篩選，這個技術將可大大改變目前醫療體系所使用的緩慢菌種鑑定方式。

## 捌、 參考資料及其他

鄭湧涇 主編。生物(下冊)。康熹文化。p100。

施河 主編。2009年。生物(下冊)。二版。南一。p96-p107。

**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.

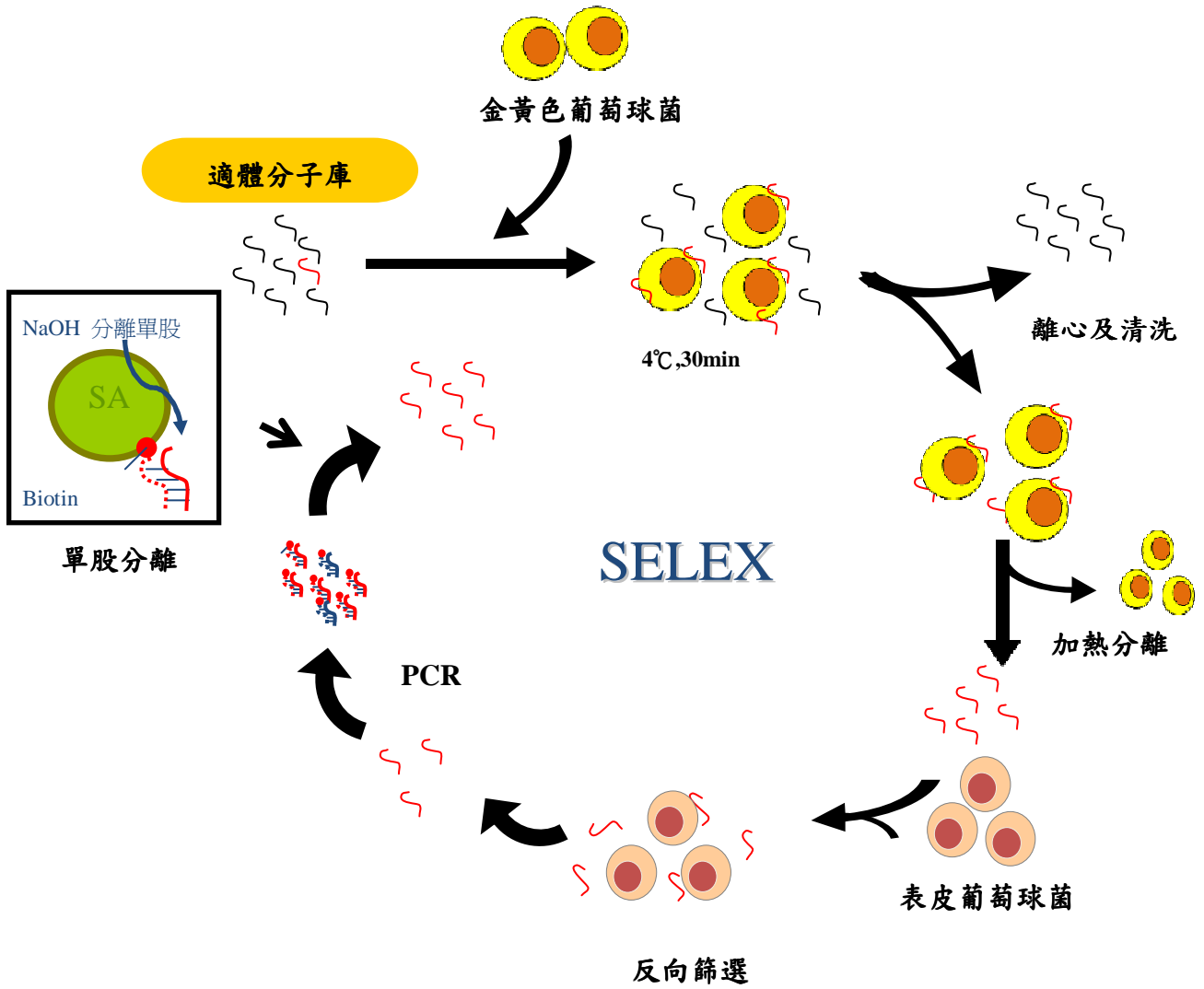
**Klappenbach, J. A., Saxman, P. R., Cole, J. R. and Schmidt, T. M.** 2001. the Ribosomal RNA Operon Copy Number Database. *Nucleic Acids Res.* 29:181–4.

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

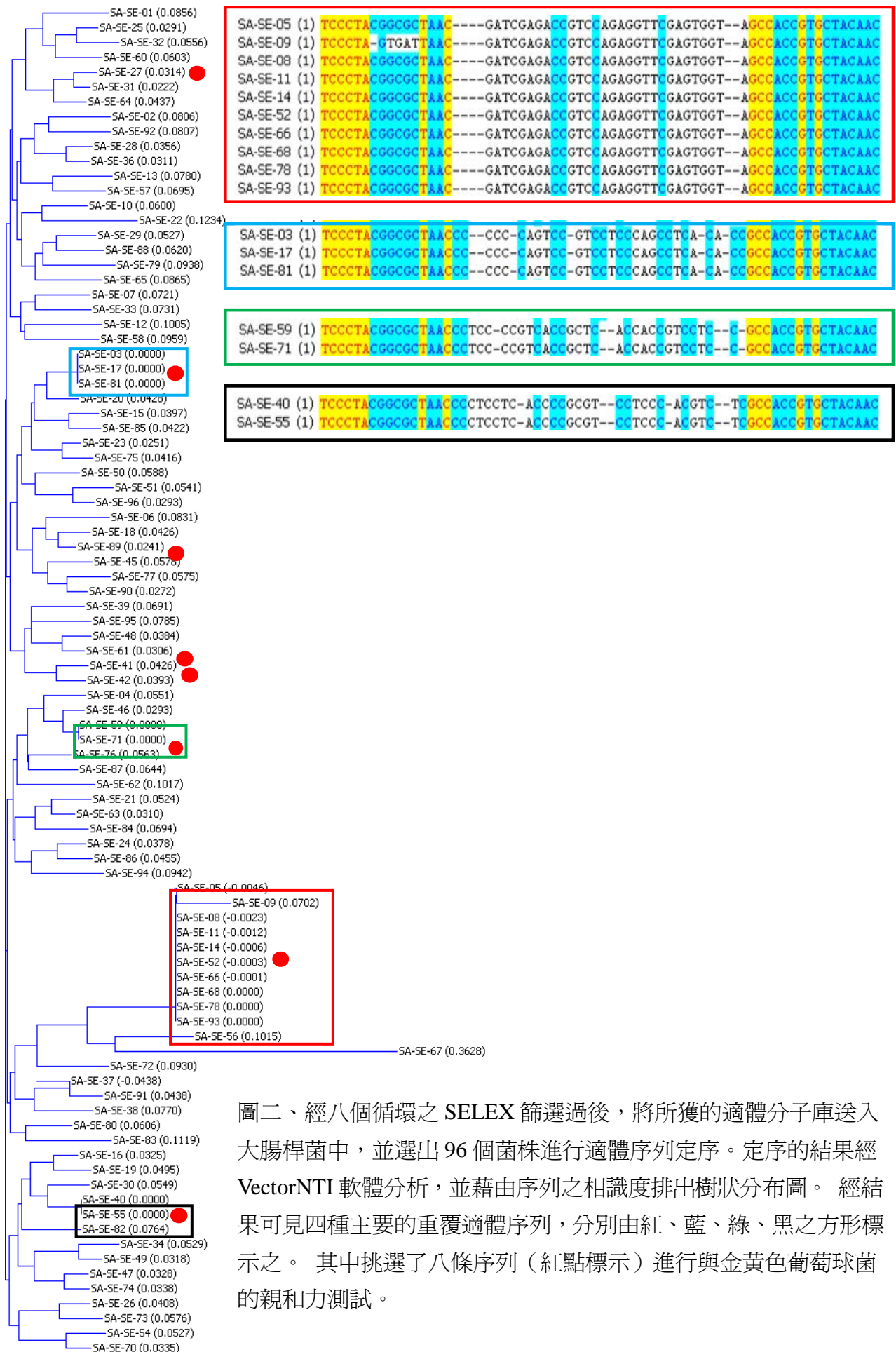
**Raghavendra, J., Janagama, H., Dwivedi, H. P., Senthil Kumar, T. M. A., Jaykus, L.A.,**

- Schefers, J. and Sreevatsan, S.** 2009. Selection, Characterization and Application of DNA Aptamers for the Capture and Detection of Salmonella enterica serovars. *Molecular and Cellular Probes*. 23(1):20-28.
- Salyers, A. A. and Whitt, P. D.** 2002. Bacterial Pathogenesis a Molecular Approach. 2<sup>nd</sup> ed., American Society Microbiology Press. p539.
- Suess, B., Hanson, S., Berens, C., Fink, B., Schroeder, R. and Hillen, W.** 2003. Conditional gene expression by controlling translation with tetracycline-binding aptamers. *Nucleic Acids Res* 31:1853–1858.
- Xue, X., Jian, P., Xie, H., Wang, J. and Zhang, S.** 2009. Detection of Listeria Monocytogenes in a raw whole milk for human consumption in Colombia by real -time PCR, *Talanta*, 77(5):1808-1813.
- Yang, D. P. and Cui, D. X.** 2009. Advances and Prospects of Gold Nanorods. *Chemistry - An Asian Journal* 3:12, 2010-2022.
- Yguerabide, J. and Yguerabide, E. E.** 1998. Light-scattering submicroscopic particles as highly fluorescent analogs and their use as tracer labels in clinical and biological applications. *Anal Biochem* . 262(2):137-56.

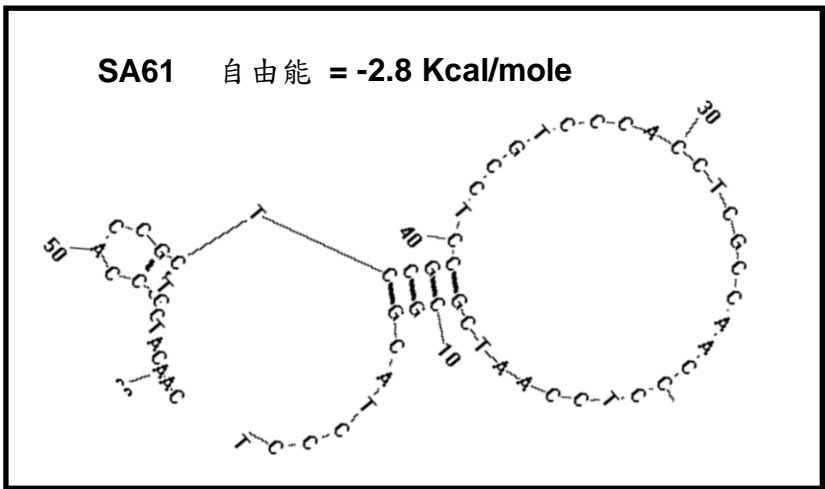
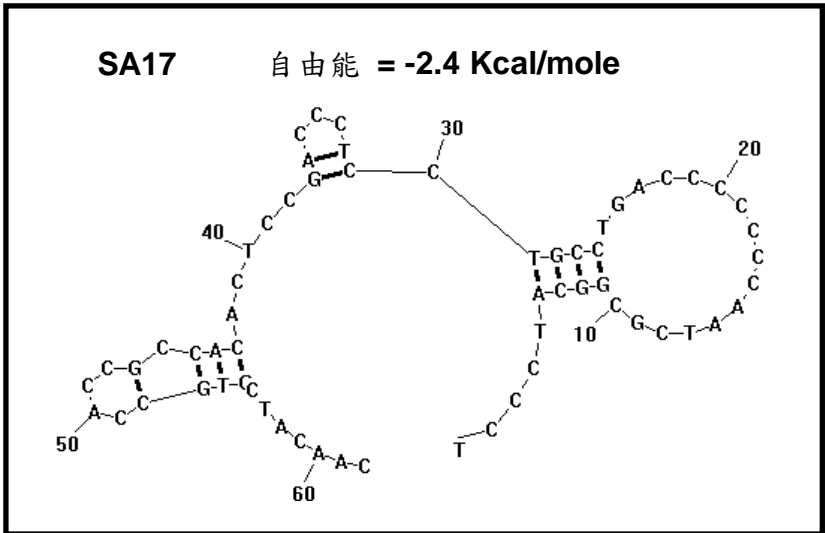
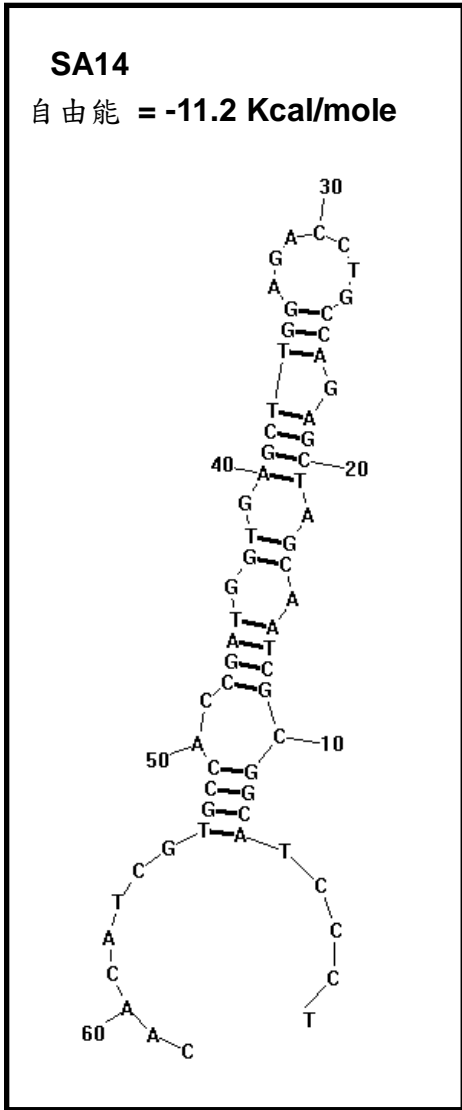
# 玖、 附錄



圖一、以 SELEX 方法篩選辨識金黃色葡萄球菌適體的流程圖。在此過程中加入他種細菌(本研究為加入表皮葡萄球菌)，以剔除非專一性辨識金黃色葡萄球菌的適體。

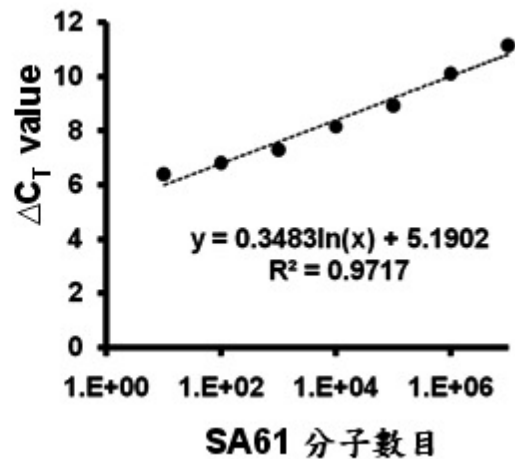
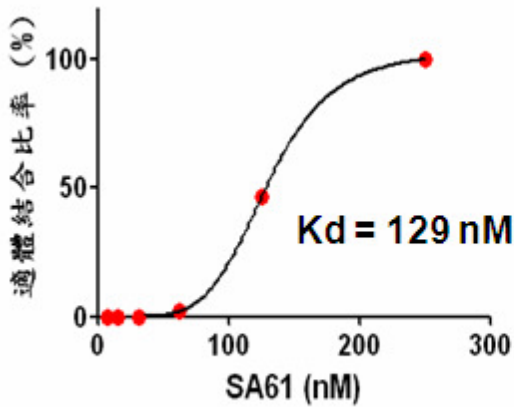
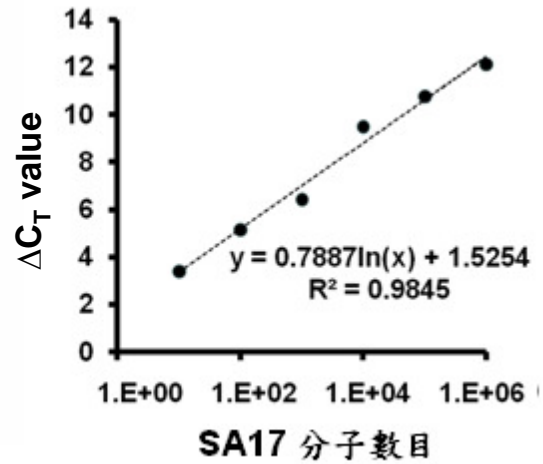
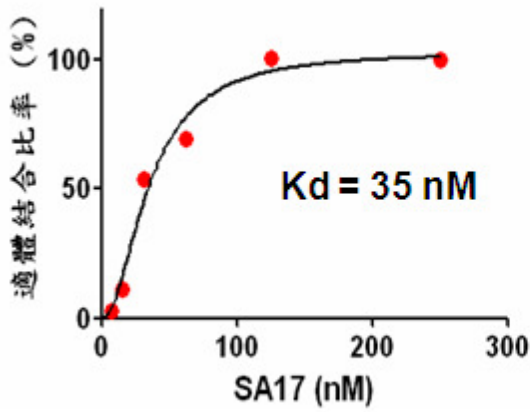
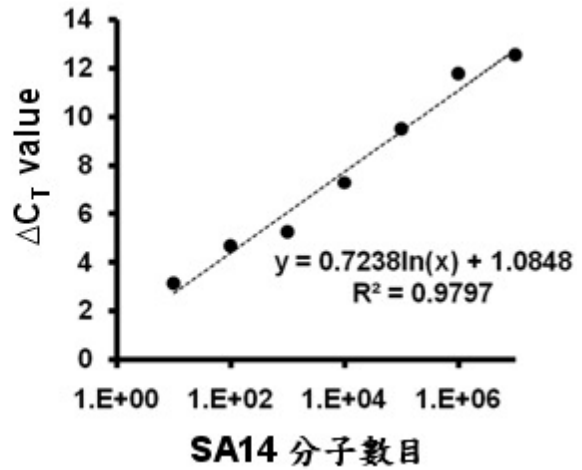
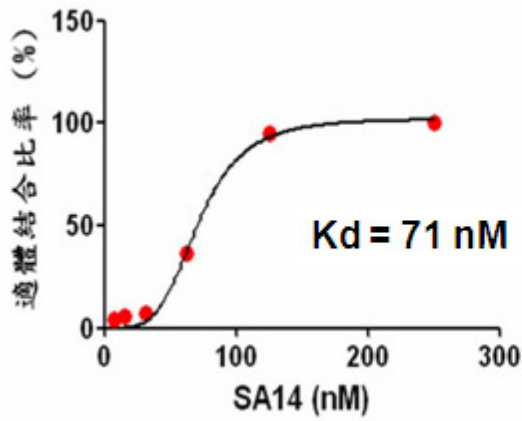


圖二、經八個循環之 SELEX 篩選過後，將所獲的適體分子庫送入大腸桿菌中，並選出 96 個菌株進行適體序列定序。定序的結果經 VectorNTI 軟體分析，並藉由序列之相識度排出樹狀分布圖。經結果可見四種主要的重覆適體序列，分別由紅、藍、綠、黑之方形標示之。其中挑選了八條序列（紅點標示）進行與金黃色葡萄球菌的親和力測試。

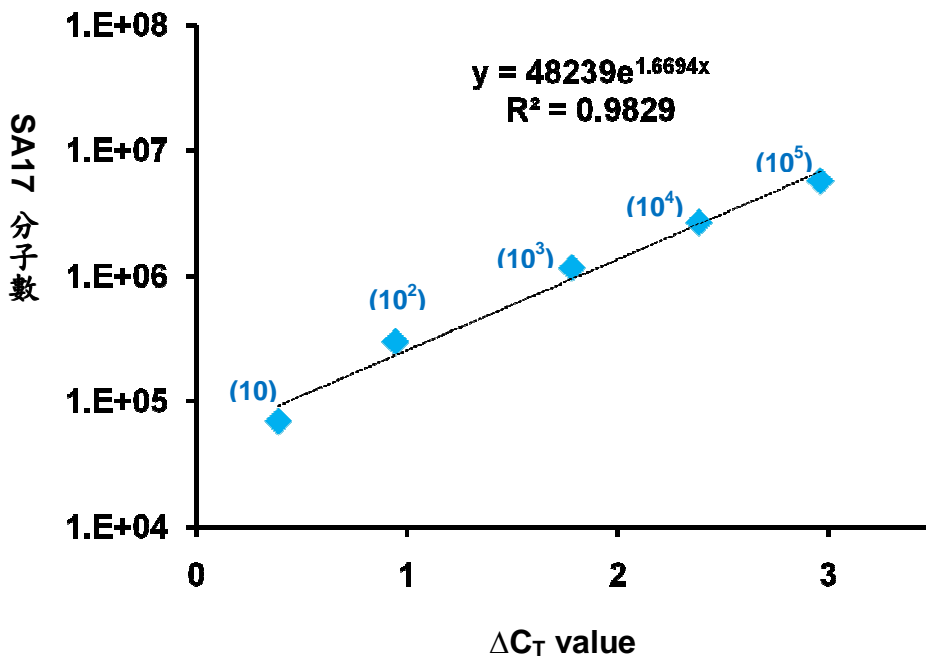
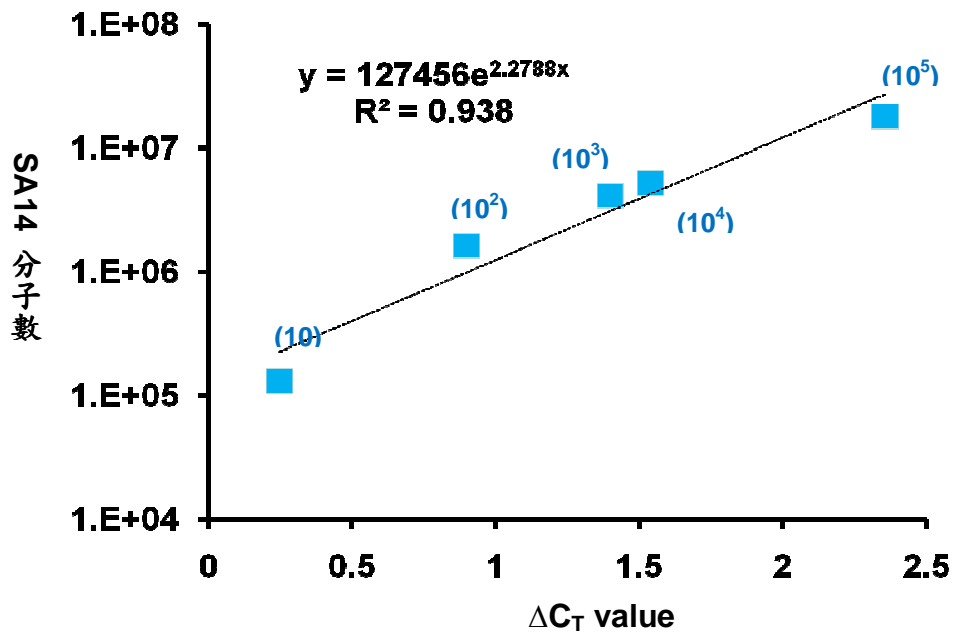


圖三、親和力測試顯示 SA14、SA17、SA61 與金黃色葡萄球菌具有較佳的親和力。 這三條適體的可能二級結構及其自由能經 mfold 軟體所預測的結果如圖示。





圖四、利用 PCR 決定適體分子的親和力，左側的圖形顯示以不同濃度之 SA14、SA17、SA61 與等量的菌體( $1 \times 10^6$  顆細胞)結合後，並將結合於菌體上之適體分子以定量 PCR 定量，並計算其分別之解離常數(dissociation constant,  $K_d$ )。右側圖形為 PCR 連續稀釋已知濃度之 SA14、SA17、SA61 之結果，用以當作  $K_d$  計算時換算適體絕對量之用。結果顯示 SA14、SA17、SA61 的解離常數分別為 71nM、35nM、129nM。

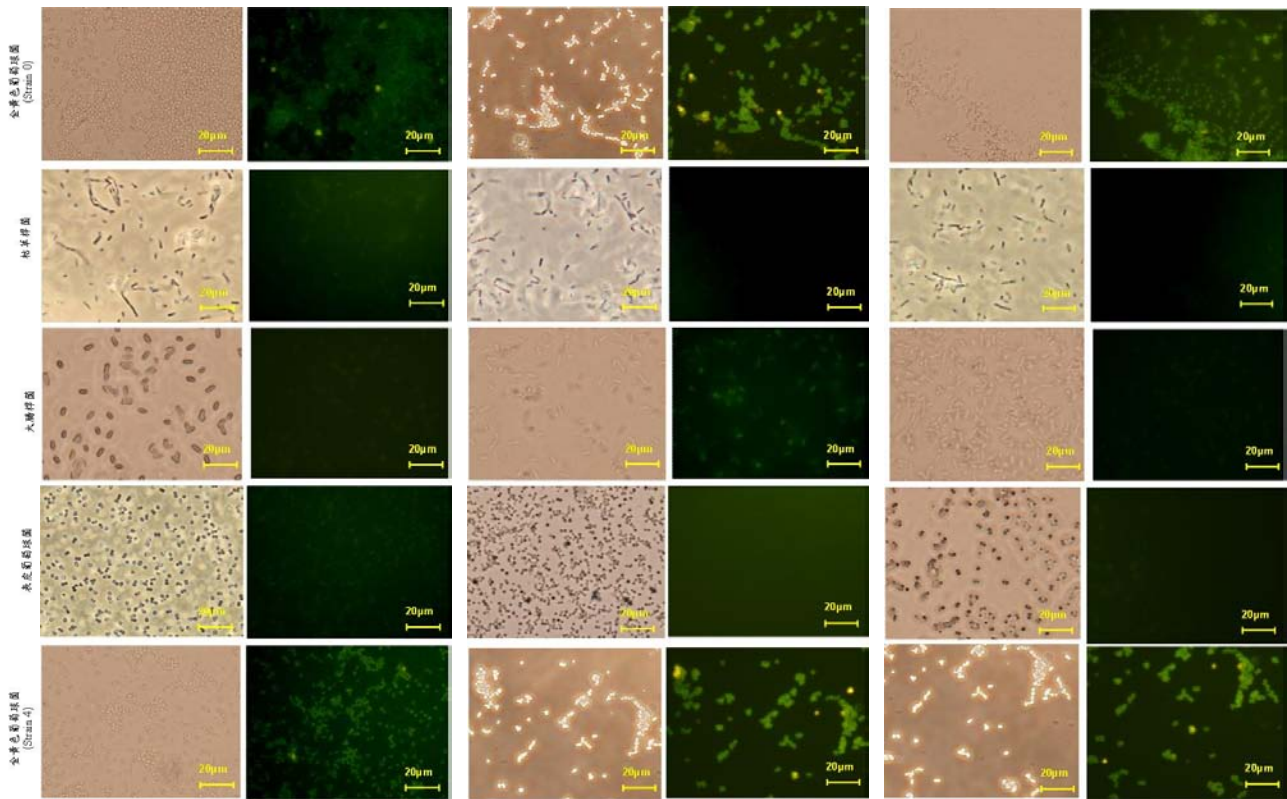


圖五、以定量 PCR 測量 SA14 及 SA17 適體與不同數目金黃色葡萄球菌結合的結果。以等濃度的 SA14 及 SA17 適體與不同濃度的金黃色葡萄球菌反應，細菌數由 10<sup>5</sup> 顆，一直稀釋到 10 顆，將沒有結合菌體的適體分子移除後，再萃取結合在菌體上之適體，並以定量 PCR 分析定量之。圖中 Y 軸為加入進行結合實驗的適體分子數，X 軸為定量 PCR 樣品的檢出循環數(threshold cycle number, C<sub>T</sub>)減去只加去離子水之控制組的檢出循環數所得到的循環數差值(ΔC<sub>T</sub>)。

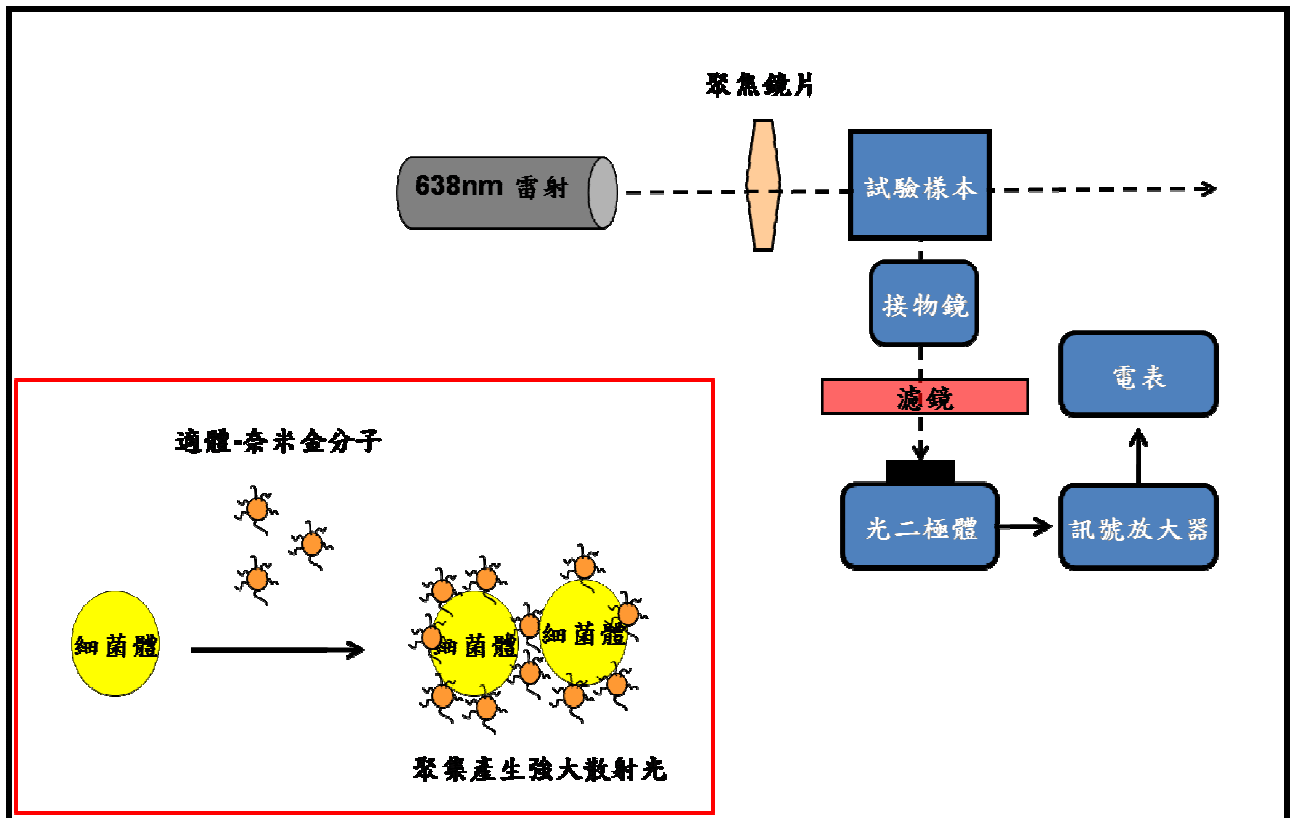
PE-SA14

PE-SA17

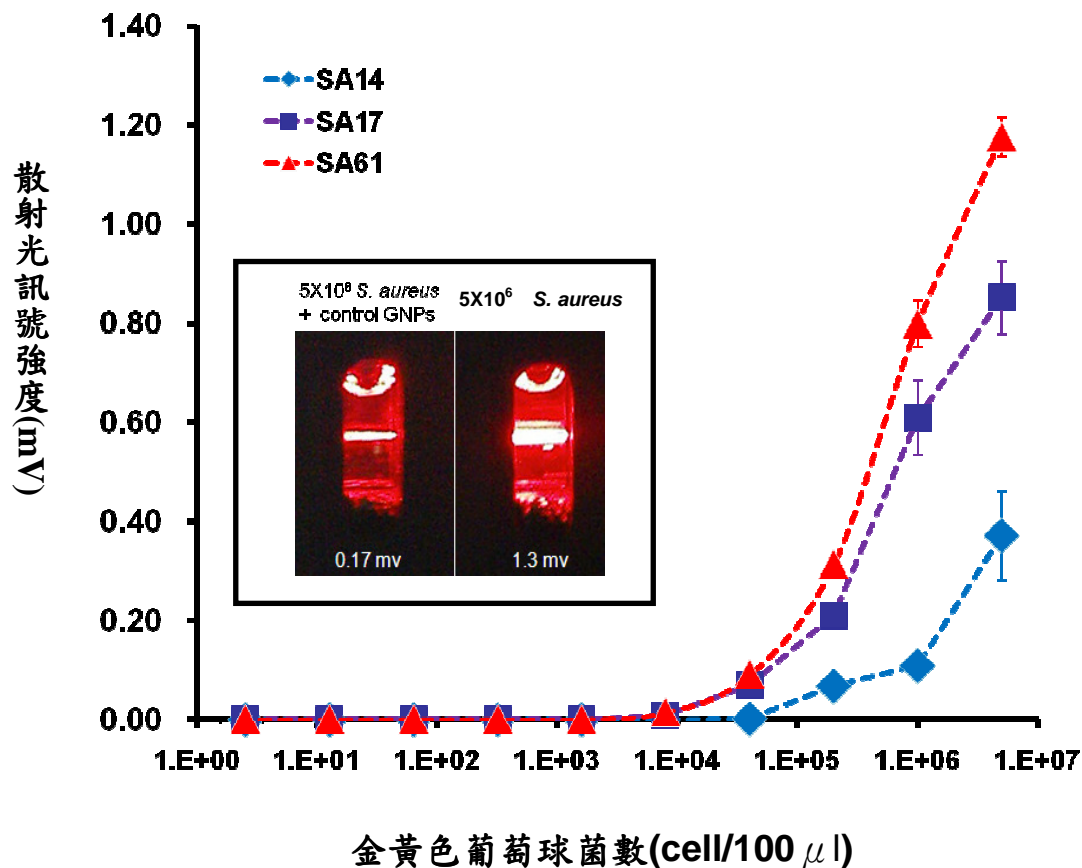
PE-SA61



圖六、將等濃度之 SA14、SA17、SA61 適體分子分別與金黃色葡萄球菌、大腸桿菌、枯草桿菌、表皮葡萄球菌等反應，經清洗步驟後，以 1000 倍放大之螢光顯微鏡觀察並照相判別是否具有辨識上的差異。以螢光顯微鏡觀測辨識金黃色葡萄球菌及其他細菌的結果，分別以白光(左)與螢光(右)相片展示。



圖七、以金粒子共振光散射訊號檢測細菌的原理及裝置。雷射光由鏡片聚焦至檢測樣品，溶液中的金粒子受激發產生共振散射光。其光強度與半徑的6次方成正比，因此金粒子在細菌存在下將聚集成為巨大的光散射體，散射光強度因而增加。



圖八、應用耦合個別 SA14、SA17、SA61 適體的奈米金粒於檢測金黃色葡萄球菌樣品之結果，其中結果值已扣除不同細菌體濃度所導致之不同背景值，Y 軸為電表上的訊號讀值。實驗結果顯示 SA14、SA17、SA61 適體皆可以成功偵測到約  $4 \times 10^2 / \mu$ l 的細菌。在此濃度所測得的訊號平均值(扣除金粒子及細菌之背景值)分別為 0.002 mV、0.069 mV、0.090 mV，而雷射光束所照射的細菌數約為 1 顆。圖中顯示 SA17 及 SA61 適體的檢測曲線斜率，明顯高於 SA14 適體，代表 SA17 及 SA61 適體所辨識之抗原比 SA14 適體所辨識之抗原，在菌體表面含量較多，有較高的偵測靈敏度。

表一、SA14、SA17 與 SA61 適體與不同細菌之親和力分析結果。此結果綜合螢光顯微鏡及定量 PCR 之結果。

Binomial Nomenclature	ATCC Number	SA14	SA17	SA61
<i>Bacillus subtilis</i> (枯草桿菌)	21336	—	—	—
<i>Citrobacter freundii</i> (弗氏檸檬酸桿菌)	8090	—	—	—
<i>Escherichia coli</i> (大腸桿菌)	43896	—	—	—
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (克雷白氏肺炎菌)	13883	—	—	—
<i>Listeria monocytogenes</i> (單核細胞增生利斯特菌)	19112	—	—	—
<i>Moraxella catarrhalis</i> (卡他球菌)	25238	—	—	—
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (綠膿桿菌)	27853	—	—	± (weakly binding)
<i>Salmonella enterica</i> (腸道沙門氏菌)	13314	—	—	—
<i>Shigella boydii</i> (鮑氏志賀氏菌)	8700	—	—	—
<i>Shigella flexneri</i> (弗氏志賀氏菌)	29903	—	—	—
<i>Staphylococcus aureus</i> (金黃色葡萄球菌) Strain 0	6538DR	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i> (金黃色葡萄球菌) Strain 1	6538P	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i> (金黃色葡萄球菌) Strain 2	12600	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i> (金黃色葡萄球菌) Strain 3	25923	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i> (金黃色葡萄球菌) Strain 4	29213	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i> (金黃色葡萄球菌) Strain 5	6538	+	+	+
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (表皮葡萄球菌)	155	—	—	—
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> (嗜血葡萄球菌)	29970	—	—	—
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> (腐生葡萄球菌)	15305	—	—	—
<i>Streptococcus bovis</i> (牛鏈球菌)	43077	—	—	—
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (肺炎鏈球菌)	6301	—	—	—

## **【評語】 040710**

- 1、 能針對重要的微生物檢測設計新穎的實驗流程，並進行詳實數據分析、統計。
- 2、 建議加強專一性及選擇性之探討，並解釋可能的識別機制。
- 3、 建議加強奈米金粒子檢測方法之設計及與其他方法之比較。