

中華民國 第 50 屆中小學科學展覽會
作品說明書

高中組 生物（生命科學）科

040710

揭開抗輻射奇異球菌的神秘面紗--初探抗輻射奇
異球菌之抗紫外線機制

學校名稱：國立蘭陽女子高級中學

作者： 高二 胡詠琪 高二 邱于真 高二 丁璟汶 高二 謝蕓楨	指導老師： 陳美蓮
---	------------------

關鍵詞：抗輻射奇異球菌

（*Deinococcus radiodurans*）、

抗輻射、抗紫外線

摘要

抗輻射奇異球菌(*Deinococcus radiodurans*)是一株具有高度抗游離輻射與紫外光的細菌，我們使用從食品工業研究所購得之抗輻射奇異球菌(*Deinococcus radiodurans* BCRC12827)，利用基礎的分子生物技術，以釐清奇異球菌抗輻射的機制為目標來設計一連串的實驗。包括碳源鑑定、碳源最適化分析(最佳碳源濃度/最適抗紫外線作用強度)等，再將這些基本的特性設計進階的分生試驗來找尋我們想知道的答案。本實驗結果顯示抗輻射奇異球菌之抗紫外線作用與 S-layer protein 有關；碳源的不同能帶給抗輻射奇異球菌不同對抗紫外線破壞的抗性，其中與細胞生長良好、多種蛋白質的產生、細胞壁的外膜 S-layer protein 的大量表現等有關；碳源利用率與所產生的色素和抗紫外線的破壞不成正比，推測抗輻射奇異球菌的抗輻射能力非單一因素有關。

壹、研究動機

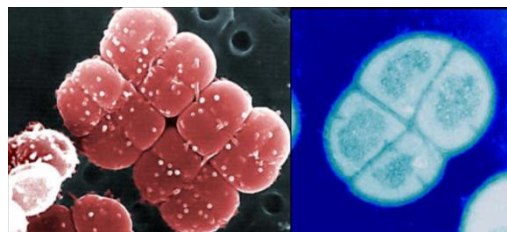
近年來臭氧層的破洞面積擴大，讓地球受到更強烈的紫外線迫害，大量的輻射線照射至地球表面，使生物面臨了滅絕的窘境，而過度的曝曬在紫外線的輻射下，人體的皮膚細胞因此病變而導致皮膚癌。為了降低形成皮膚癌的可能，市面上推出了各式各樣的防曬用品，一般防曬乳成分可分為物理性與化學性，化學性防曬成分是利用化學物質直接吸收紫外線，但化學物質過多容易造成皮膚過敏或易引起其他癌症等問題；物理性防曬乳是利用焦機物質來反射或散射紫外線，或類似不透光物質來遮蔽陽光，缺點是塗抹後會有白色的外觀或易造成毛孔的阻塞引發其他的皮膚問題^[1]。因此尋找可以抵抗輻射線的生物，希望能藉其對於輻射危害所形成的防護機制，開發無毒且天然的防曬用品進而造福人類，於是我們找到了「抗輻射奇異球菌 *Deinococcus radiodurans*」，它對輻射具抵抗性，可以忍受 1.5 million 輻射，也就是地球上生物的 3000 次劑量，和地球上生物相比具有高度抗輻射的能力並且具抵抗使 DNA 受損之傷害因子，如游離輻射、紫外線、過氧化氫等，皆具有極佳的抗性^[2]，這些特性正符合我們的期待也引起我們莫大的興趣。

廣泛蒐集與「抗輻射奇異球菌」相關的資料後，開始了對於「抗輻射奇異球菌」的分析與探討，也因此發現其他值得探討的問題，像是其蛋白質、DNA、色素、醣類的分析，因而進行了我們一連串的實驗。

貳、研究背景與目的

一、抗輻射奇異球菌簡介

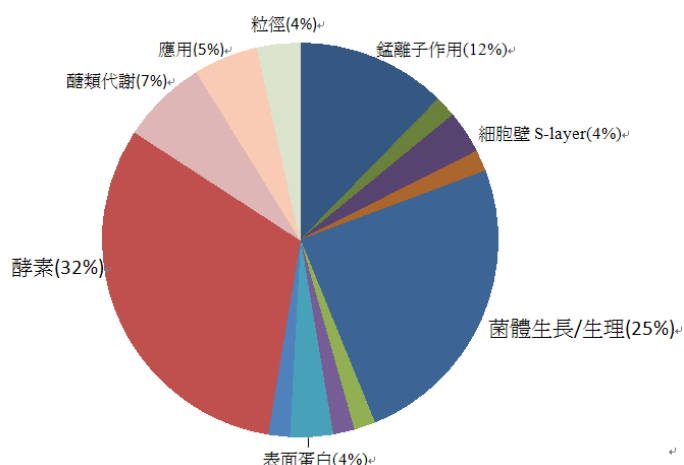
抗輻射奇異球菌(*Deinococcus radiodurans*)於 1956 年被美國人在經過 X 射線滅菌處理的肉罐頭中被分離出來，其菌落為紅色、好氧、不具有運動性的四聯球菌(如右圖所示)，不會產生孢子也無致病性，細胞為直徑 0.5~3.5 μm 。嗜溫性，最適生長溫度 25-35 $^{\circ}\text{C}$ ，最高只能到 41-44 $^{\circ}\text{C}$ ；最低到 4 $^{\circ}\text{C}$ 。為革蘭氏陽性菌，但卻有部分性質類似革蘭氏陰性菌，如此株菌具有外套膜、S-layer 等^[3]。它在自然界分佈甚廣，幾乎無所不在，從養分貧瘠的乾燥氣候，到有潮濕的環境中皆可尋求。此菌所能承受的 γ 射線劑量是人類致死率的 1000 倍，為目前地球上抗輻射能力最強的微生物，其抗輻射能力的可能原因是具有多套的染色體，使得受損的 DNA 具有高效率的修補能力。



(圖片來源: <http://images.google.com.tw>)

二、台灣目前的奇異球菌的研究現況

根據台灣「全國碩博士論文資訊網站」的資料，利用關鍵字「*Deinococcus radiodurans*」搜尋，可獲得 61 筆相關的論文，其所作的研究經過分析如上圖可分為下列幾種類別：以抗輻射奇異球菌所產生的「酵素」之研究佔 33% 為研究最大宗，其中以抗氧化相關的超氧歧化酶為最多(9%)；其次以抗輻射奇異球菌的生長與其生理有關的研究，約有 25%；「錳離子」對抗輻射奇異球菌的影響之相關試驗為第三(12%)，其中多與調控基因表現與其能量供應有關；其他的研究也佔有將近 1/3 的研究地位，分別為細胞壁 S-layer 之研究(4%)、菌體表面蛋白(4%)、醣類代謝(7%)、粒徑研究(4%)與抗輻射奇異球菌的應用(5%)；其餘 2% 以下的研究多為抗輻射奇異球菌較特殊的部份如抗輻射等。



三、研究目的

到目前為止，科學家對於其抗輻射機制所知依然有限，對於自然狀態下此菌為何會對輻射線具高抗性的原因並不清楚，但可以推測的是，抗輻射奇異球菌要能在高能量輻射線下生存，各種生理生化反應中所必需的蛋白質首先要不被這些高能量

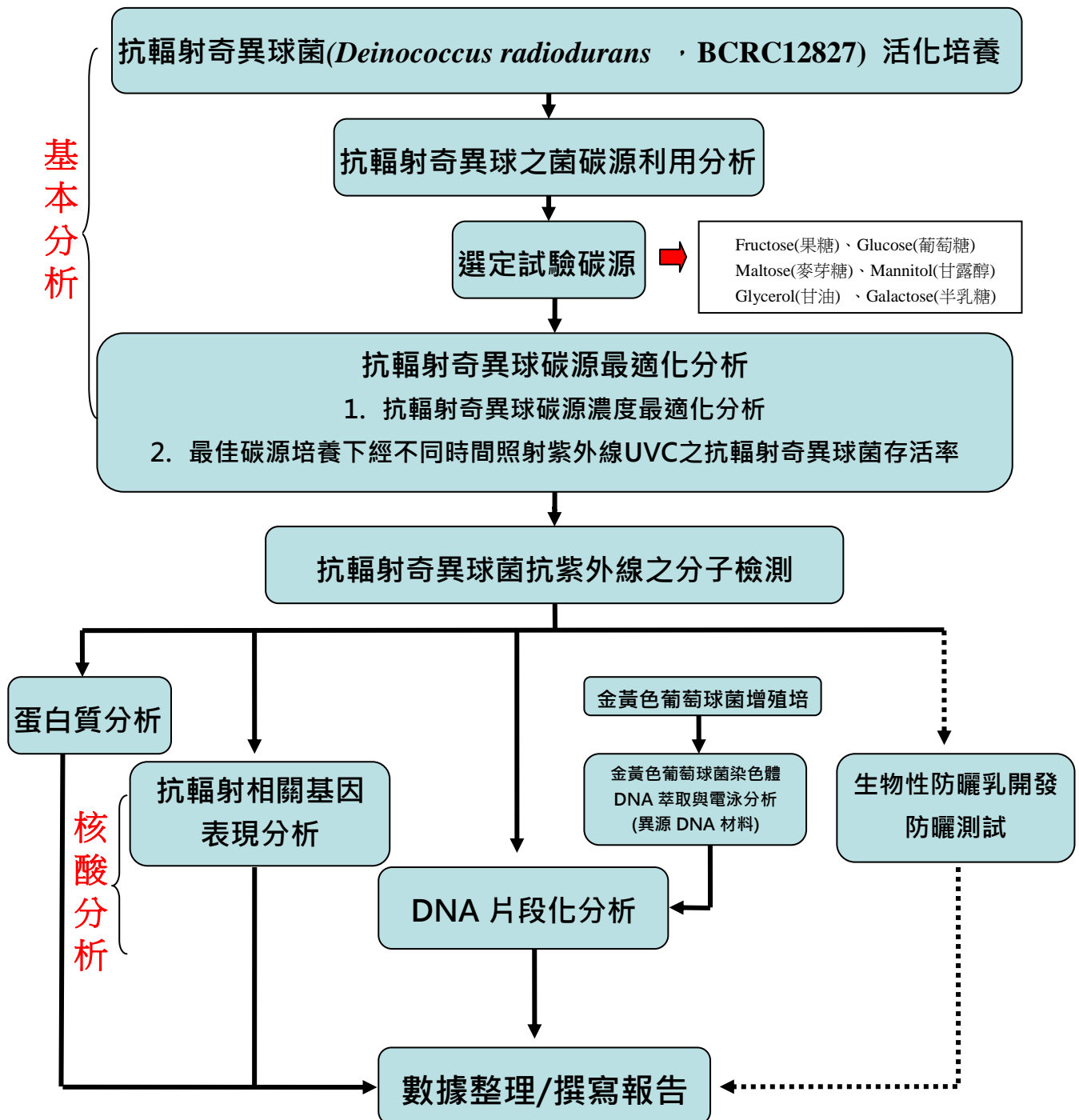
輻射線所破壞，才有可能在菌體遭逢危機時，提供足夠的保護與修補能力來幫助細菌存活^[2]。對紫外線的抗性和其生長分裂的方式、營養的條件是有某種程度的關聯存在^[4]。

本實驗主要目的為：

- (一) 藉碳源鑑定套組取得抗輻射奇異球菌對碳源的利用情形。
- (二) 抗輻射奇異球菌之碳源利用率最佳化分析。
- (三) 利用 **SDS** 聚丙烯醯胺凝膠電泳法檢視抗輻射奇異球菌經紫外線照射之蛋白質的變化情形。
- (四) 抗輻射奇異球菌之細胞壁外膜 **S-layer protein** 之表現分析。
- (五) 進行 **DNA** 片段化分析來取得抗輻射奇異球菌與大腸桿菌保護異源 **DNA** 抵抗紫外線破壞的直接證據。
- (六) 未來目標：生物性防曬試劑的開發。

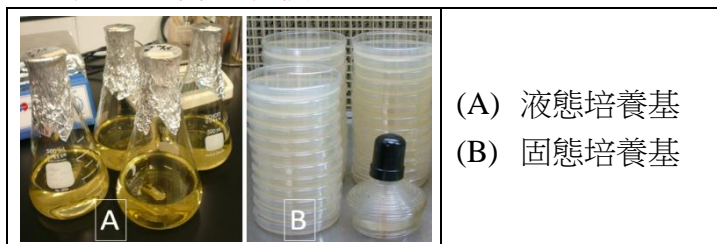
參、研究材料與方法

一、研究方法流程圖



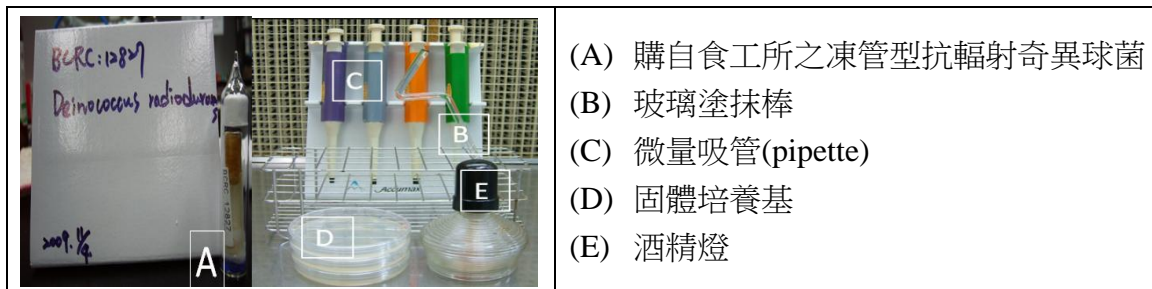
二、實驗材料與方法 (實驗製備流程詳見附件之說明)

(一) 固/液態培養基製備



(二) 基本分析

1. 抗輻射奇異球菌之活化培養

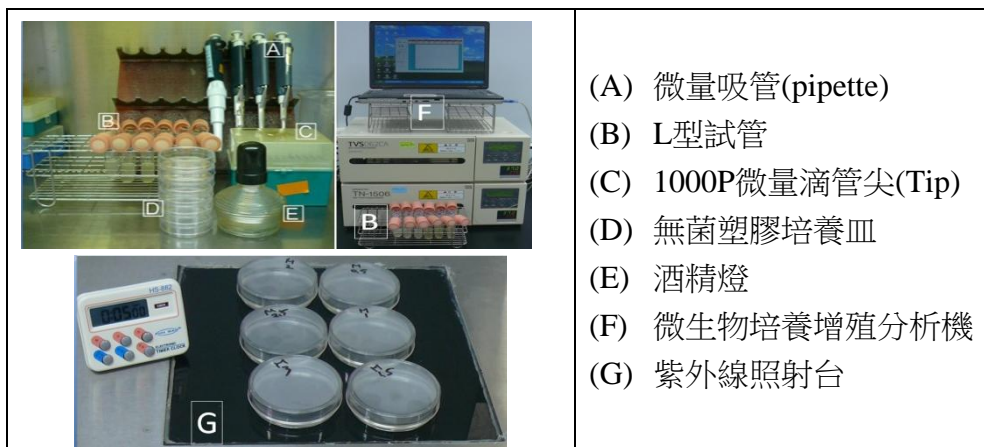


2. 抗輻射奇異球菌碳源利用分析

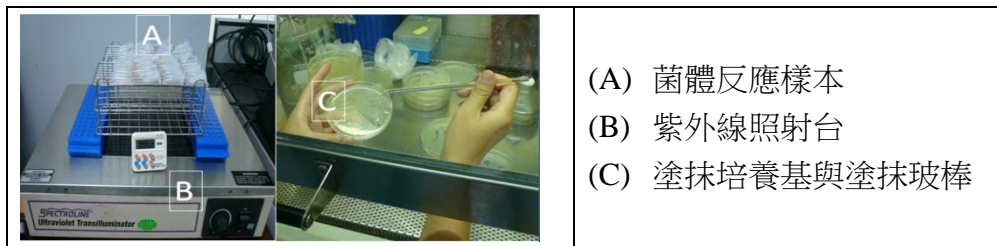


3. 碳源利用最適化分析

(1) 抗輻射奇異球菌之抗紫外線碳源濃度最適化分析



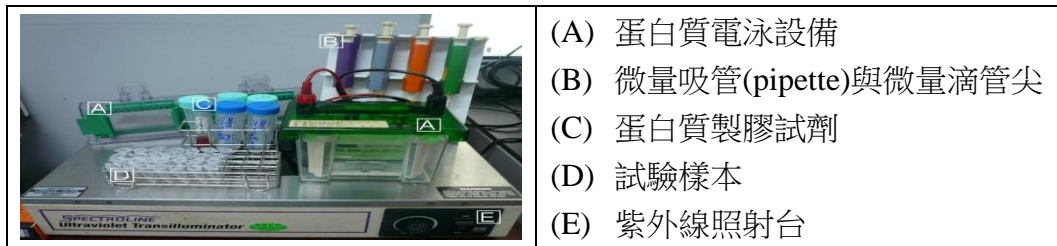
(2) 最佳碳源培養下經不同時間照射紫外線UVC之抗輻射奇異球菌存活率



- (A) 菌體反應樣本
(B) 紫外線照射台
(C) 塗抹培養基與塗抹玻棒

(三)蛋白質分析

抗輻射奇異球菌經紫外線UVC照射後之蛋白質電泳分析



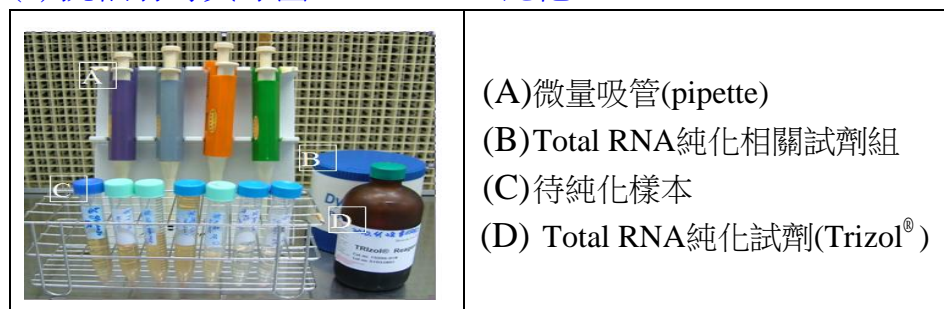
- (A) 蛋白質電泳設備
(B) 微量吸管(pipette)與微量滴管尖
(C) 蛋白質製膠試劑
(D) 試驗樣本
(E) 紫外線照射台

(四)核酸分析

1. 抗輻射相關基因表現分析

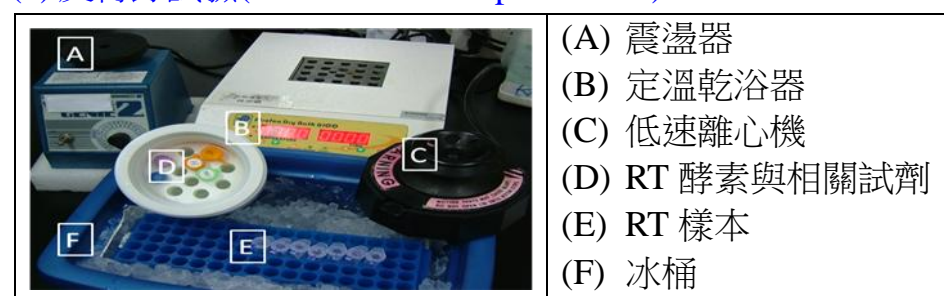
- (1) 專一性引子對(Primers) : SipAF:5'-ttagaagttgacctttagc-3'
SipAR:5'-ccaacacccagctcgacagc-3'

(2) 抗輻射奇異球菌 Total RNA 純化



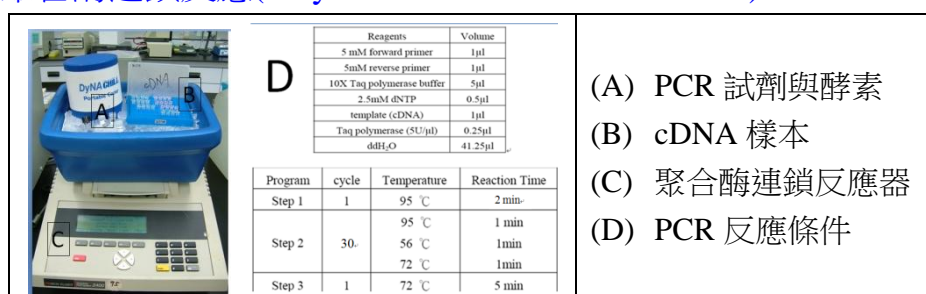
- (A)微量吸管(pipette)
(B)Total RNA純化相關試劑組
(C)待純化樣本
(D) Total RNA純化試劑(Trizol®)

(3) 反轉錄試驗(Rreverse Transcription , RT)



- (A) 震盪器
(B) 定溫乾浴器
(C) 低速離心機
(D) RT 酵素與相關試劑
(E) RT 樣本
(F) 冰桶

(4) 聚合酶連鎖反應(Polymerase chain reaction , PCR)



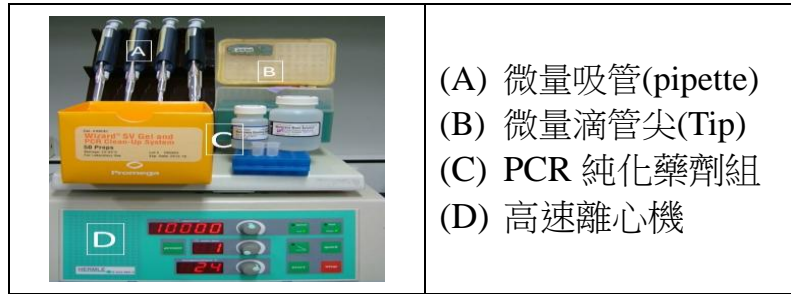
D

Reagents	Volume
5 mM forward primer	1μl
5mM reverse primer	1μl
10X Taq polymerase buffer	5μl
2.5mM dNTP	0.5μl
template (cDNA)	1μl
Taq polymerase (5U/μl)	0.25μl
dH ₂ O	41.25μl

Program	cycle	Temperature	Reaction Time
Step 1	1	95 °C	2 min
Step 2	30	95 °C 56 °C 72 °C	1 min 1 min 1 min
Step 3	1	72 °C	5 min

- (A) PCR 試劑與酵素
(B) cDNA 樣本
(C) 聚合酶連鎖反應器
(D) PCR 反應條件

(5) PCR 產物純化與定序



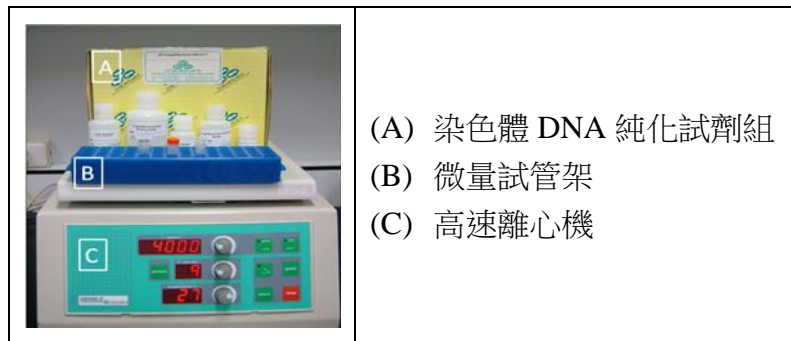
將回溶DNA產物包裝寄送到源資生物科技公司進行基因定序。

(6) 基因比對

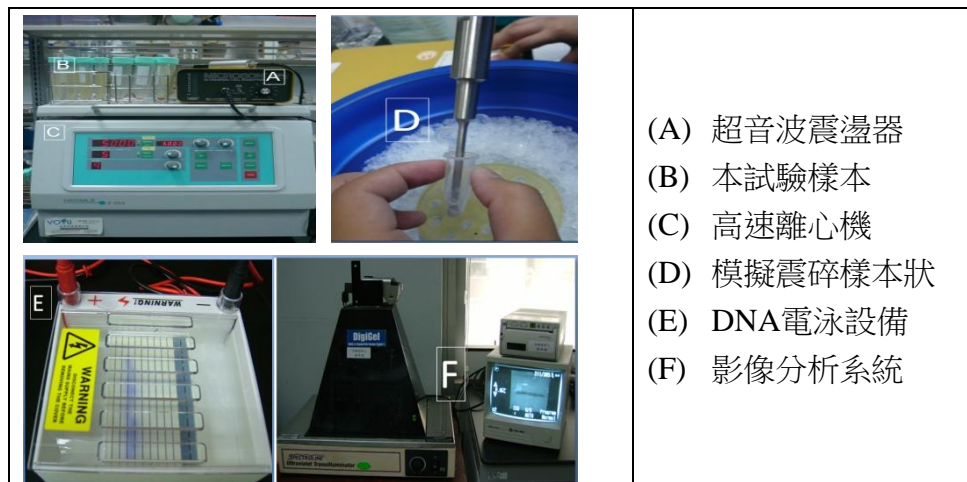
將基因定序的結果 DNA 片段到美國國家衛生院之 NCBI 生物資料庫 <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>進行基因序列比對。

2. 抗輻射奇異球菌經紫外線UVC照射後之DNA片段化分析

(1). 金黃色葡萄球菌染色體 DNA 製備



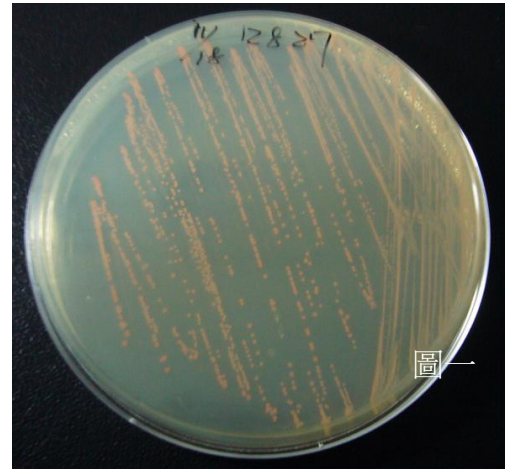
(2). DNA片段化分析樣本製備與分析



肆、實驗結果

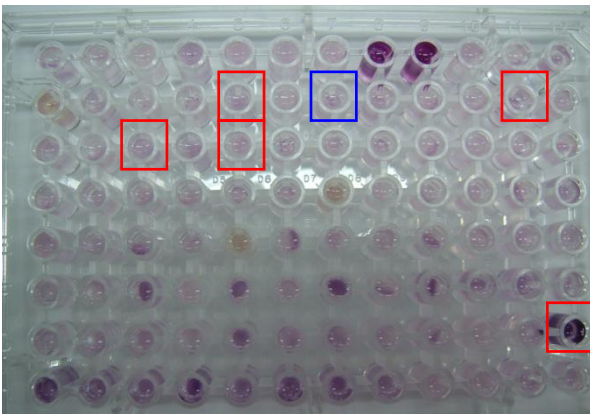
一、基本分析

(一) 圖一為抗輻射奇異球菌 *Deinococcus radiodurans* 生長於Nutrition固體培養基的菌落生長形態。此菌生長於37℃，2天後會產生紅色色素。



(二) 利用Biolog碳源鑑定盤來分析細菌對碳源利用的情形，若該菌對某碳源利用率高則會呈現紫色，顏色越深表利用率越高。圖二(A)是將奇異球菌在營養培養基上活化後，再定量接種至碳源鑑定盤，反應24小時後的結果。結果可明顯看出其所利用的碳源與Biolog公司所提供的資料庫中抗輻射奇異球菌的碳源利用圖譜相當(圖B)。將圖A與圖B的結果一比對，可發現抗輻射奇異球菌利用率較佳的碳源為：Tween40、Tween80、Glycerol、Adenosine、2'-Deoxy-Adenosine、Thymidine、Uridine、Adenosine-5'-Monophosphate、Uridine-5'-Monophosphate、L-Lactic acid、L-Malic acid、Succinic acid mono-methyl ester、Pyruvic acid。圖中的紅/藍色框線為後來選擇作為抗輻射奇異球菌之碳源與抗紫外線相關性研究用。

(A)



(B)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A				Dextrin	Glycerol		Mannan	Tween40	Tween80	D-Glucose		
B	D-Fructose				D-Fructose		Galactose				D-Glucose	
C			Maltose	Maltotriose	D-Mannitol	D-Mannose		D-Melibiose				D-Glucose
D			Ribitose	D-Ribose			D-Ribose					Sucrose
E	D-Thymidine				D-Ribose	Acetic acid	D-Ribose					Sucrose
F	L-Asparagine	D-Lactic acid	L-Lactic acid		Pyruvic acid	Pyruvic acid	Pyruvic acid	Pyruvic acid	Pyruvic acid	Succinic acid	Succinic acid	
G			L-Alanine		L-Alanine	Glycerol	Glycerol	L-Serine				Glycerol
H	Adenosine	2'-Deoxy-Adenosine	Adenosine	Thymidine	Uridine	Adenosine	Thymidine	Uridine		D-Glucose	D-Glucose	

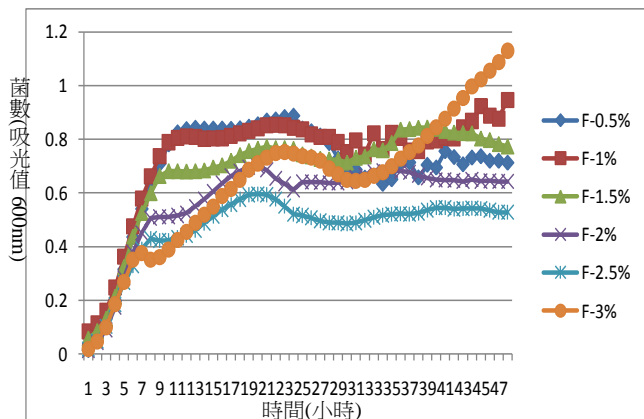
圖二、抗輻射奇異球菌 *D. radiodurans* 碳源利用分析結果與資料庫圖譜。

(三) 碳源分析後，我們選用的碳源有：Fructose(果糖)、Glucose(葡萄糖)、Maltose(麥芽糖)、Mannitol(甘露醇)、Glycerol(甘油)、Galactose(半乳糖)。

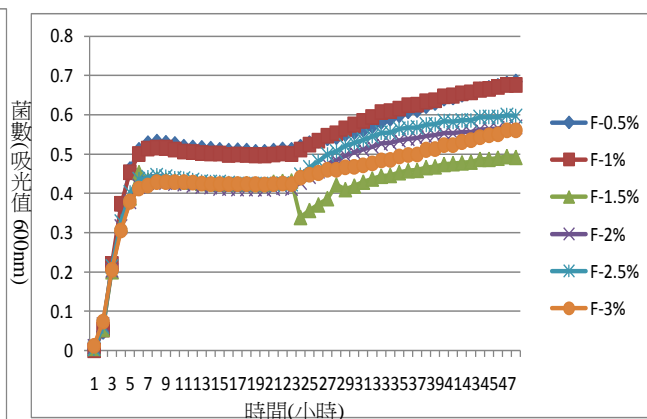
(四) 碳源利用最適化分析

A. Fructose

(1) DR

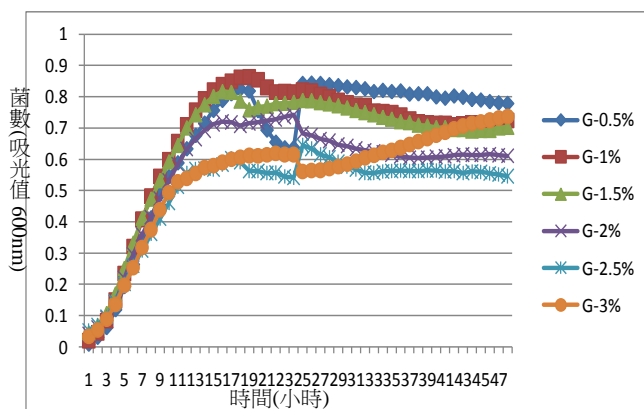


(2) E.coli

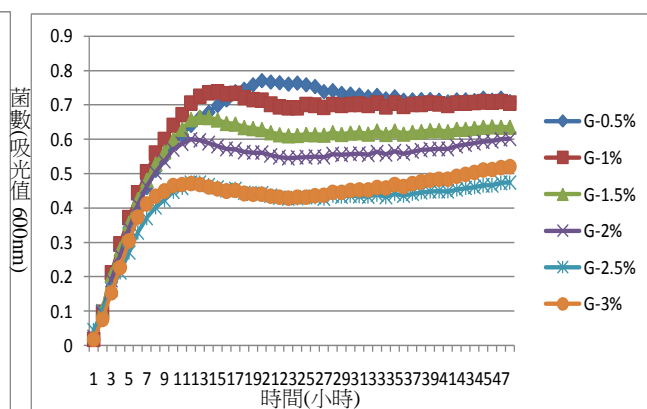


B. Glycerol

(1) DR

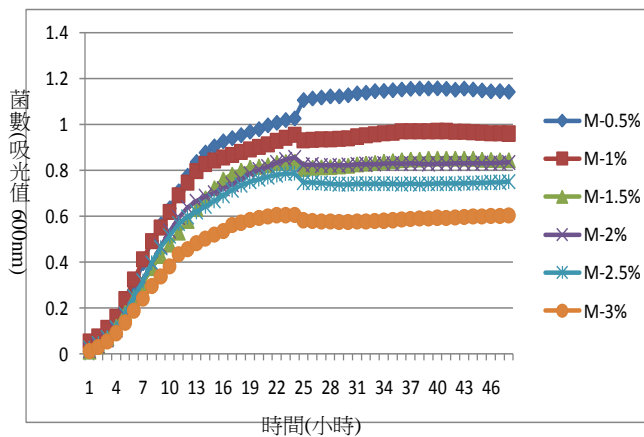


(2) E.coli

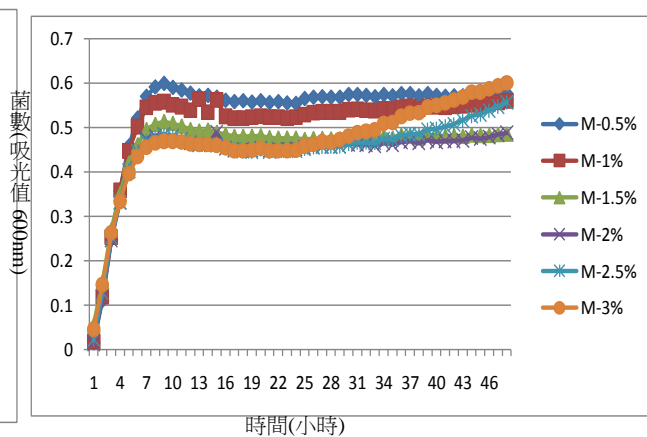


C. Maltose

(1) DR

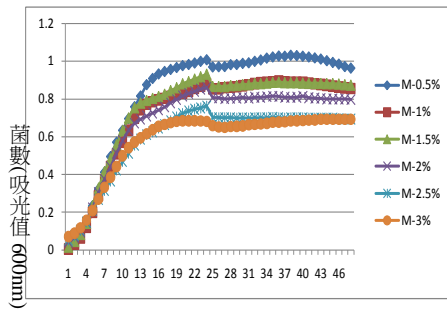


(2) E.coli



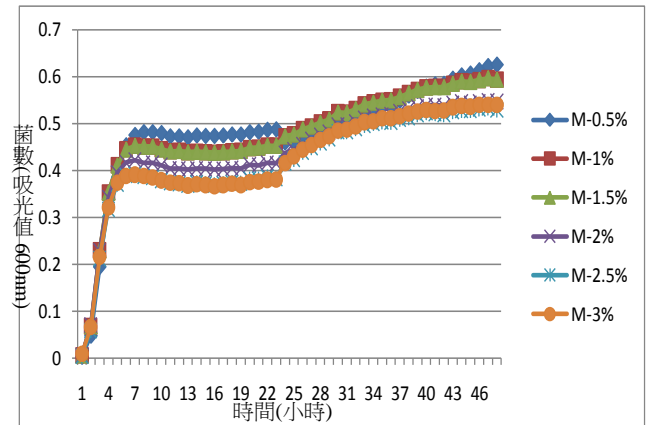
D. Mannitol

(1) DR



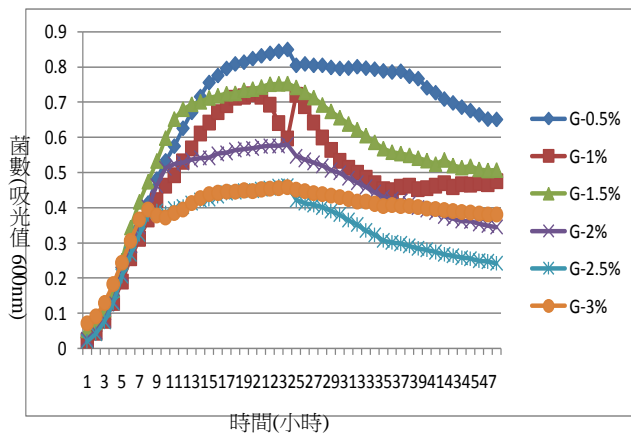
時間(小時)

(2) E.coli



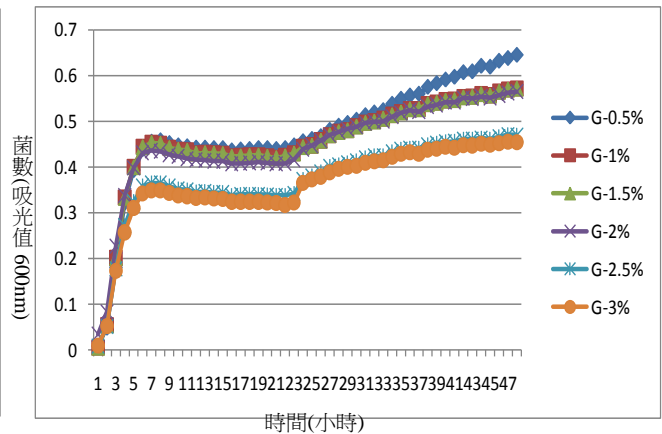
E. Glucose

(1) DR



時間(小時)

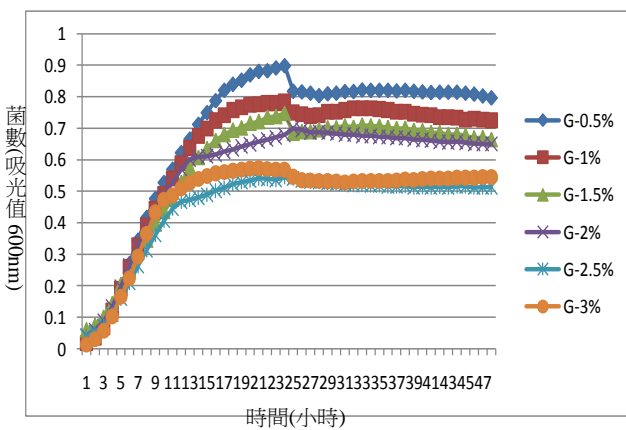
(2) E.coli



時間(小時)

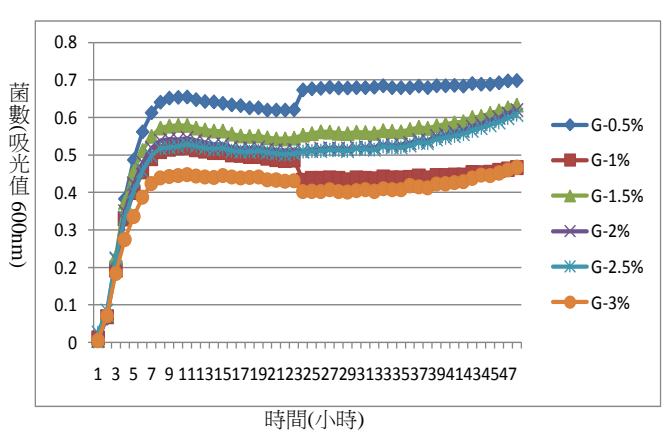
F. Galactose

(1) DR



時間(小時)

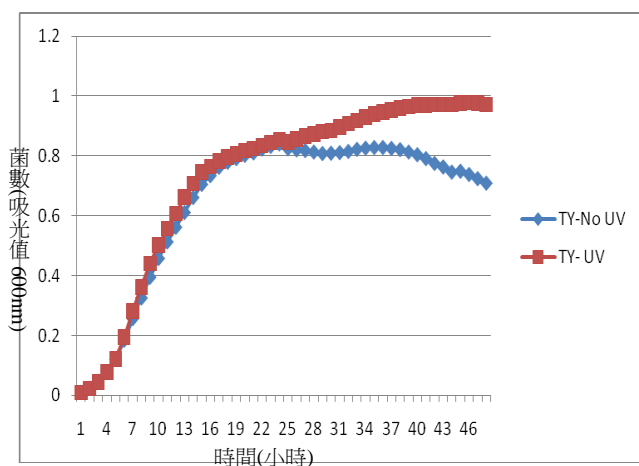
(2) E.coli



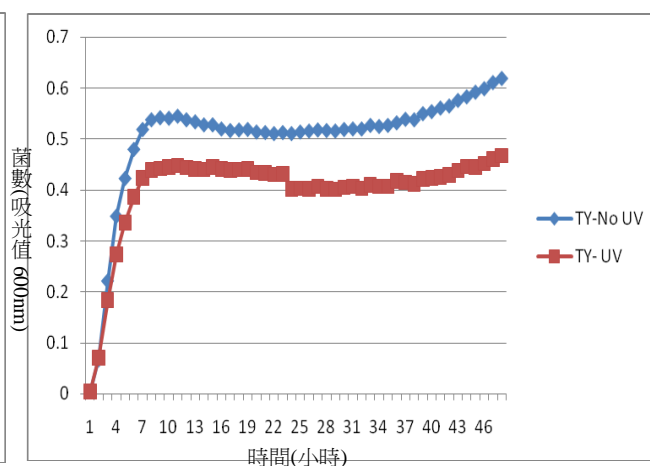
時間(小時)

G. TY(無碳源基礎培養基)

(1) DR

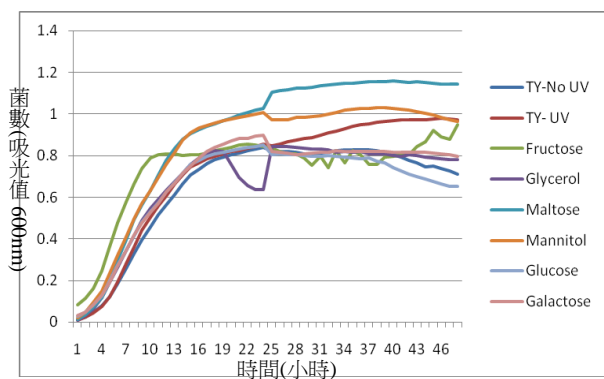


(2) E.coli

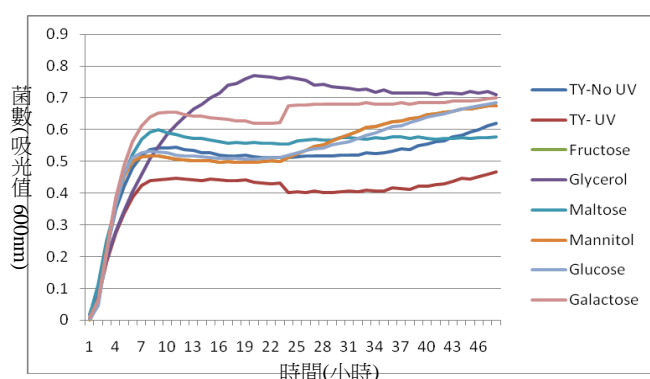


H. 合併比較

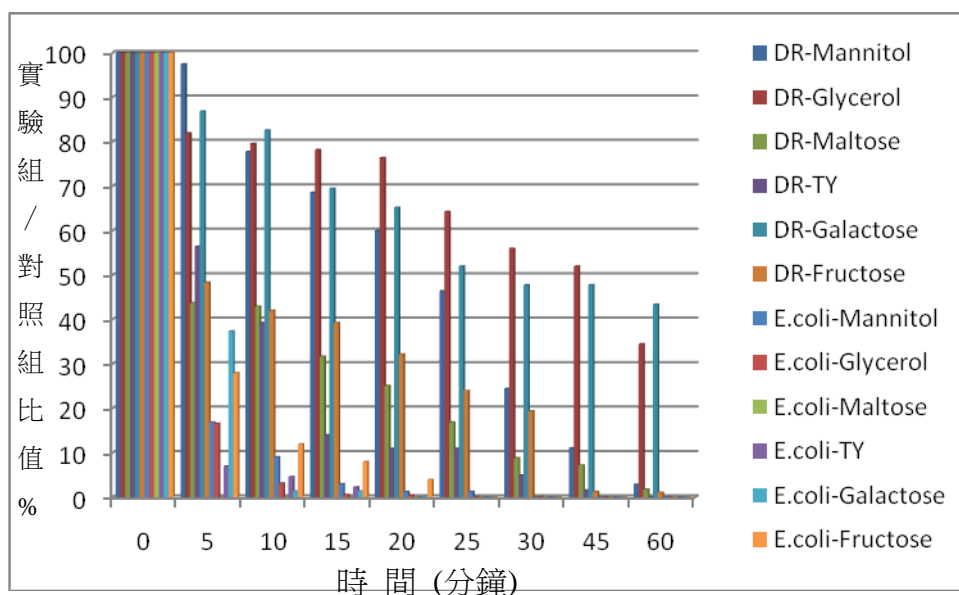
(1) DR



(2) E.coli



I. 綜合比較

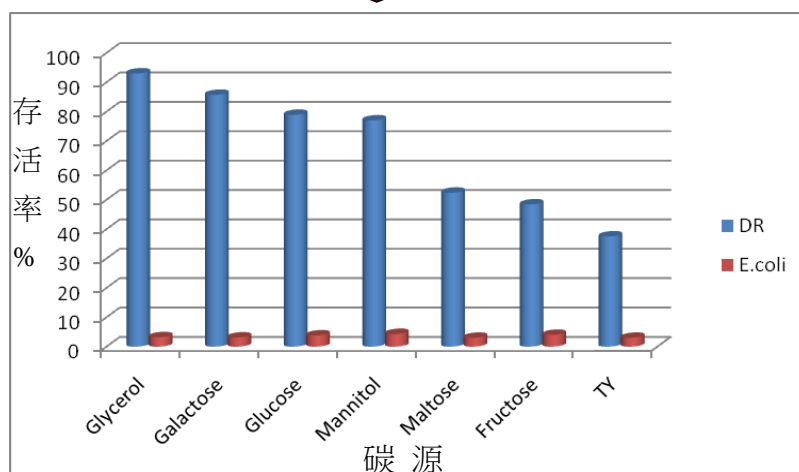


圖三、抗紫外線碳源濃度最適化分析之抗輻射奇異球菌菌體生長曲線。(A)Fructose:(1) *D. radiodurans*(DR)以碳源濃度3%可使菌數達OD₆₀₀近1.2；(2)*E.coli*以碳源濃度1%可使菌數達OD₆₀₀為0.7。(B)Glycerol:(1)DR以碳源濃度0.5%可使菌數達

OD₆₀₀為0.8；(2)*E.coli*以碳源濃度0.5%可使菌數達OD₆₀₀為0.7。(C)Maltose:(1)DR以碳源濃度0.5%可使菌數達OD₆₀₀近0.12；(2)*E.coli*以碳源濃度3%可使菌數達OD₆₀₀為0.6。(D)Mannitol:(1)DR以碳源濃度0.5%可使菌數達OD₆₀₀近0.1；(2)*E.coli*以碳源濃度1%可使菌數達OD₆₀₀為0.6。(E)Glucose:(1)DR以碳源濃度0.5%可使菌數達OD₆₀₀為0.7；(2)*E.coli*以碳源濃度0.5%可使菌數達OD₆₀₀為0.65。(F)Galactose:(1)DR以碳源濃度0.5%可使菌數達OD₆₀₀為0.8；(2)*E.coli*以碳源濃度0.5%可使菌數達OD₆₀₀為0.7。(G)無碳源培養基(TY)的抗輻射奇異球菌在受到紫外線UVC的刺激下可使菌數從原本的OD₆₀₀為0.75上升到1.0；。而無抗紫外線之*E.coli*則受到紫外線UVC的影響從原本的OD₆₀₀ 0.5降至0.4。(H)是將所有碳源的最佳的生長曲線共同比較，DR以Maltose為最佳抗紫外線之碳源，其次為Mannitol；*E.coli*則以Glycerol為較耐紫外線的刺激，但其菌數與*D. radiodurans*相差0.4的OD₆₀₀。(I)是將奇異球菌與大腸桿菌作一個綜合比較，兩菌受到紫外線UVC的照射後，菌數明顯減少。經紫外線照射30分鐘後，大腸桿菌幾乎全死光，而抗輻射奇異球菌在紫外線照射60分鐘則後，Glycerol與Galactose仍保有35%以上的存活率。

2. 抗輻射奇異球菌最佳碳源作用之不同UVC照射時間之存活率

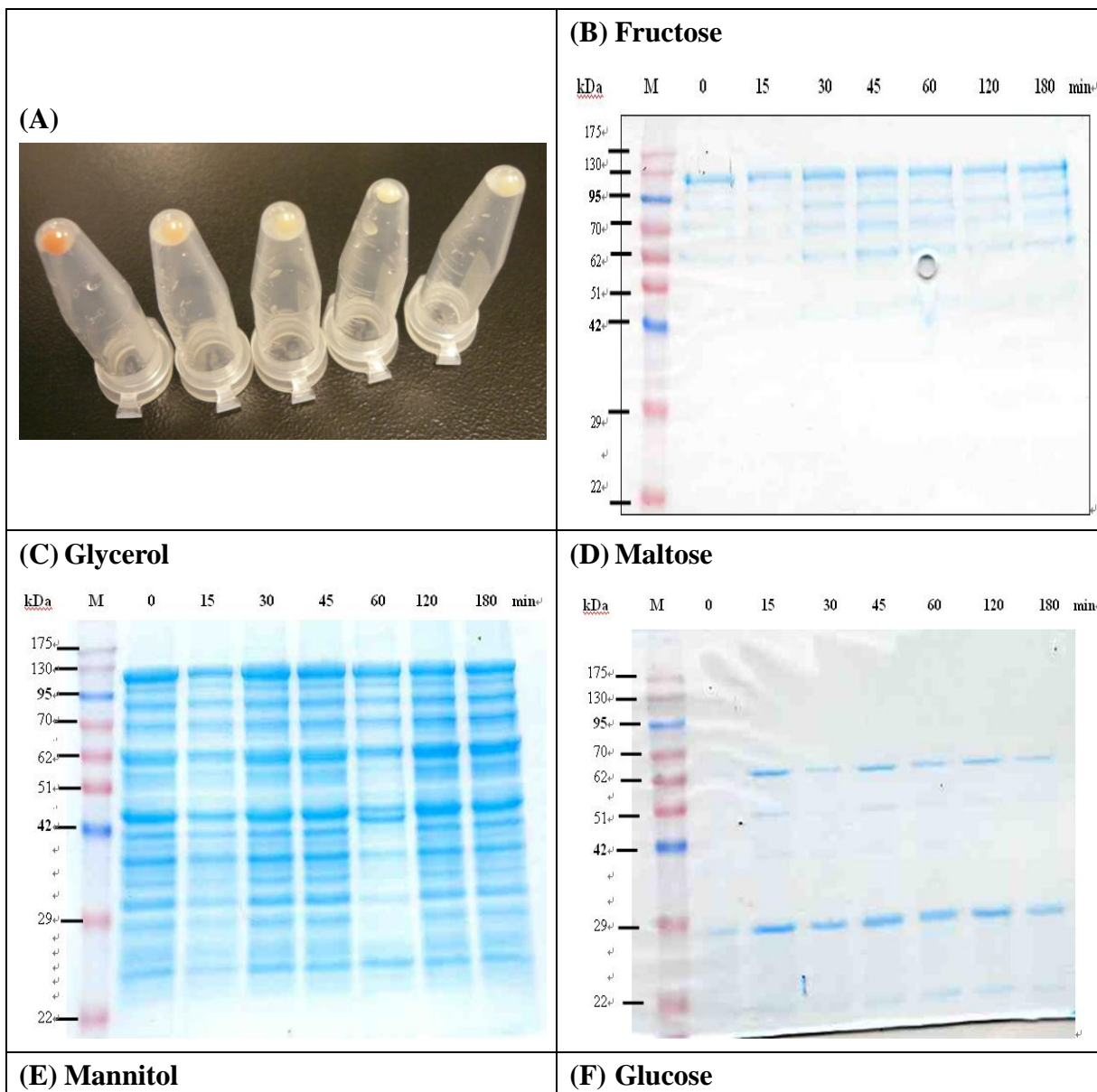
<i>D. radiodurans</i> 實驗條件	存活率	<i>E.coli</i> 實驗條件	存活率
Glycerol	93%	Glycerol	3.2%
Galactose	85.7%	Galactose	3.1%
Glucose	78.9%	Glucose	3.8%
Mannitol	77%	Mannitol	4.3%
Maltose	52.4%	Maltose	3%
Fructose	48.4%	Fructose	4%
TY	37.5%	TY	3%

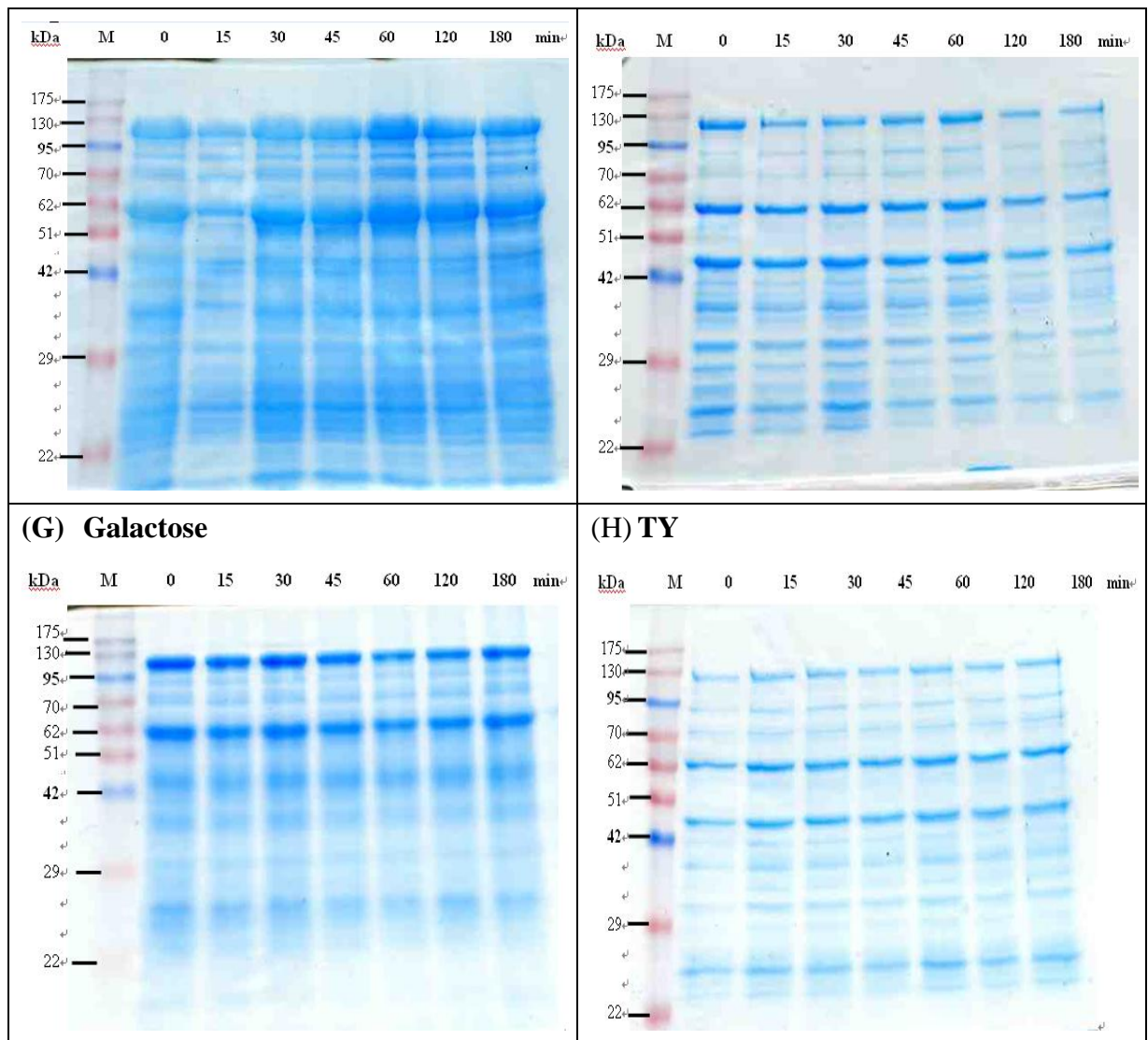


圖四、最佳碳源作用之不同UVC照射時間之抗輻射奇異球菌存活率

將抗輻射奇異球在經紫外線 UVC 以 $3.3\text{mW}/\text{cm}^2$ 的強度下照射 5 分鐘後，將菌體經系列稀釋後，塗抹於基礎培養基中。待 2 天後計數其菌數、與對照組 (未照射 UVC) 相除所統計出的資料表。*D. radiodurans* 在 Glycerol 之存活率達 93%，其次為 Galactose 85.7%，Glucose 78.9%，Mannitol 77%，Maltose 52.4%，Fructose 48.4%，TY 37.5%。*E.coli* 的存活率則遠低於抗輻射奇異球菌，大約在 5% 以下。

二、蛋白質分析



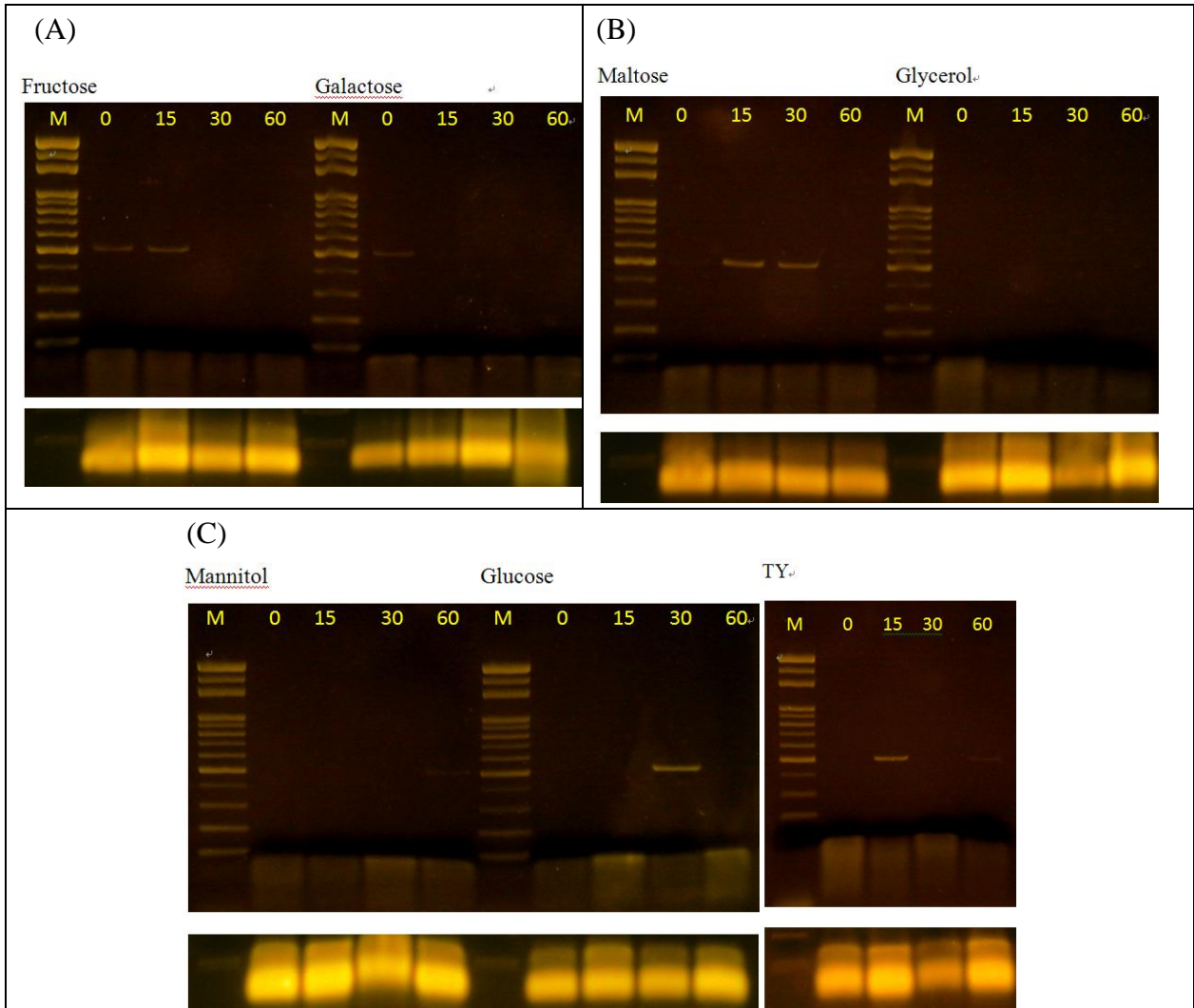


圖五、抗輻射奇異球菌 *D. radiodurans* 經UVC照射後之SDS聚丙烯醯胺凝膠電泳圖。(A)看出，抗輻射奇異球菌經照射UV後之顏色變化，由橘到白，照射UV分別為0、15、30、45、60分鐘。圖五(B)-(H)則是利用不同碳源來培養抗輻射奇異球菌，利用 $3.3\text{mW}/\text{cm}^2$ 的紫外線UVC照射抗輻射奇異球菌，分別照射0、15、30、45、60、120和180分鐘後，利用12%SDS聚丙烯醯胺凝膠，以140伏特的電壓進行電泳2小時來分離蛋白質，M：蛋白質標準品。(B)顯示出不同的照射時間下，出現 123KDa、90 KDa、70KDa和62KDa條帶。(C)Glycerol明顯誘發出許多蛋白質的表現，約有15種條帶，分子量大小為22KDa-130KDa之間，特別明顯的條帶為123KDa、62KDa與42KDa。(D)Maltose誘發了62 KDa與27 KDa之條帶產生。(E)在Mannitol的影響下，也有許多蛋白質產生，特別是123KDa與62 KDa的蛋白質較為明顯。(F)Glucose的作用下也產生濃度多寡不一的蛋白質，約有18個，其中以123KDa、62KDa、44KDa與26KDa之條帶最為明顯。(G)Galactose誘發兩條最明顯的蛋白質位123 KDa與62KDa的位置上。

(H)在無碳源刺激的培養基(TY)仍可產生11種不同的蛋白質，以123KDa、62KDa、46KDa與26KDa為最明顯。

三、核酸分析

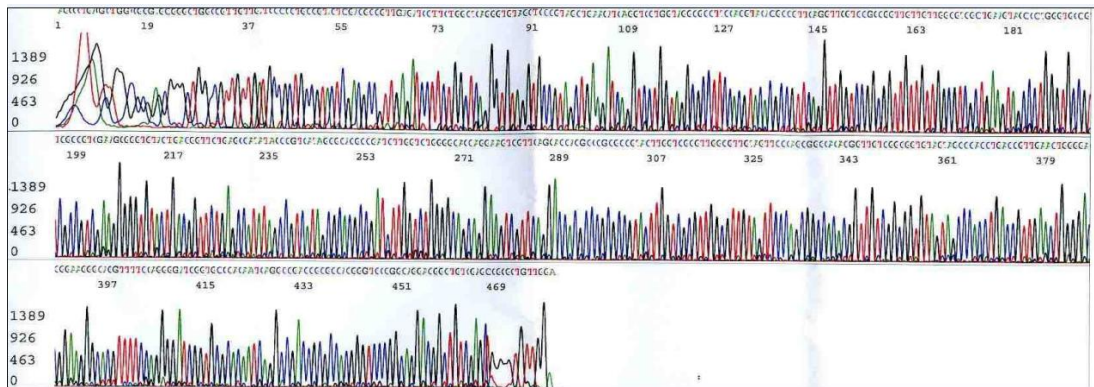
1. 抗輻射相關基因表現分析



圖六、S-layer protein (SLPA)之部分cDNA基因之表現。圖(A)Fructose於未照射紫外線UVC與照射15分鐘時出現500bp之DNA片段；Galactose只在未照射紫外線時有*SipA*表現。圖(B)Maltose在紫外線UVC照射15與30分鐘時表現此基因；Glycerol與圖(C)Mannitol無*SipA*之表現；Glucose與TY各別在紫外線UVC照射30與15分鐘時表現*SipA*。

2. 基因定序分析

(A) 基因定序圖譜



(B)基因序列

1	AGGGCTGAGG	CTGGCCGCGA	GCGGGCTGGC	CGTTGTTGAT	GCCGCTGCCG	TACTCGACGC	CGTTGAGATC	CTTCTGGCTC	AGGGTGTAGG	TGCCGTAGCT
	TCCCGACTCC	GACCGGCGCT	GCGCCGACGC	GCAACAACAT	CGGGCAGGCG	ATGAGCTGGC	GCAACTCTAG	GAAGACCCGAG	TCCACATCC	AGGGCATCGA
101	GAAATAGTCC	TCCGTGGTAG	CGCCTTCCAC	GTACACGCCG	TTGAGGTTGG	TCCGCGGGCT	GTGTGTTGGC	TCGCTGAAGT	AGCCCTGGGT	CGCGTCGCCG
	CTTCTAGTCC	GACCGACTCC	GCGGAAGTCC	CATGTGCGAG	AGGATCCAAC	ACGGCGGCCA	CAACAACGCC	AGGCATGATC	TCCGGACCCA	CGCGAGCGCG
201	TGCAAGGGAG	TGTACTGACG	GTTCCTGAGCC	ATATAGCCGT	CATAGCCGCG	GCGGATCTTG	GTCCTGGGGCA	GCAGGAAGAT	GTTCAGGACC	ACGCCCGCCG
	AGCTTCCCCC	ACATGACTAGC	CAAGACTCGG	TATATCGGCA	GTATCGCGTG	CGGCTAGAAC	CAGACCCCGT	CGTCCCTTAC	CAAGTCTCGG	TGCGGGCGCG
301	CGTACTTGGT	CGCGGTGGCG	TTGTAGTTCC	CAGCGGCCAC	AGGCTGTGTC	CGGGTGTAGT	AGCCCACTAG	ACCGTTGAAC	TGGGGACAGA	AGGGACAGTT
	GCATGAACCA	GCGCAACGCG	AACATCAAGG	GTCGCCGGTG	TGCCAACAGC	GCGCACATAT	TGCGGTGGAC	TGCGAATCTG	ACCCCTGCCT	TCCGCTGCAA
401	TTCCAGGGGA	TCCGTTGCGCA	CAATCAGGCC	GAGCCGCCCA	CGGGTCCCCG	CAGGACGGCT	GTCCAGCGGC	GGTGTTGGAA		
	AAGGTCGCGT	AGCCACGGCT	GTTAGTCCGG	GTCGCCGGCG	GCGCCAGGCGC	GTGCTGCGCA	GATGCTCCGC	CCCATCAACT		

(C) 基因比對

```
> gb|AE000513.1 Deinococcus radiodurans R1 chromosome 1, complete sequence
Length=2648638
```

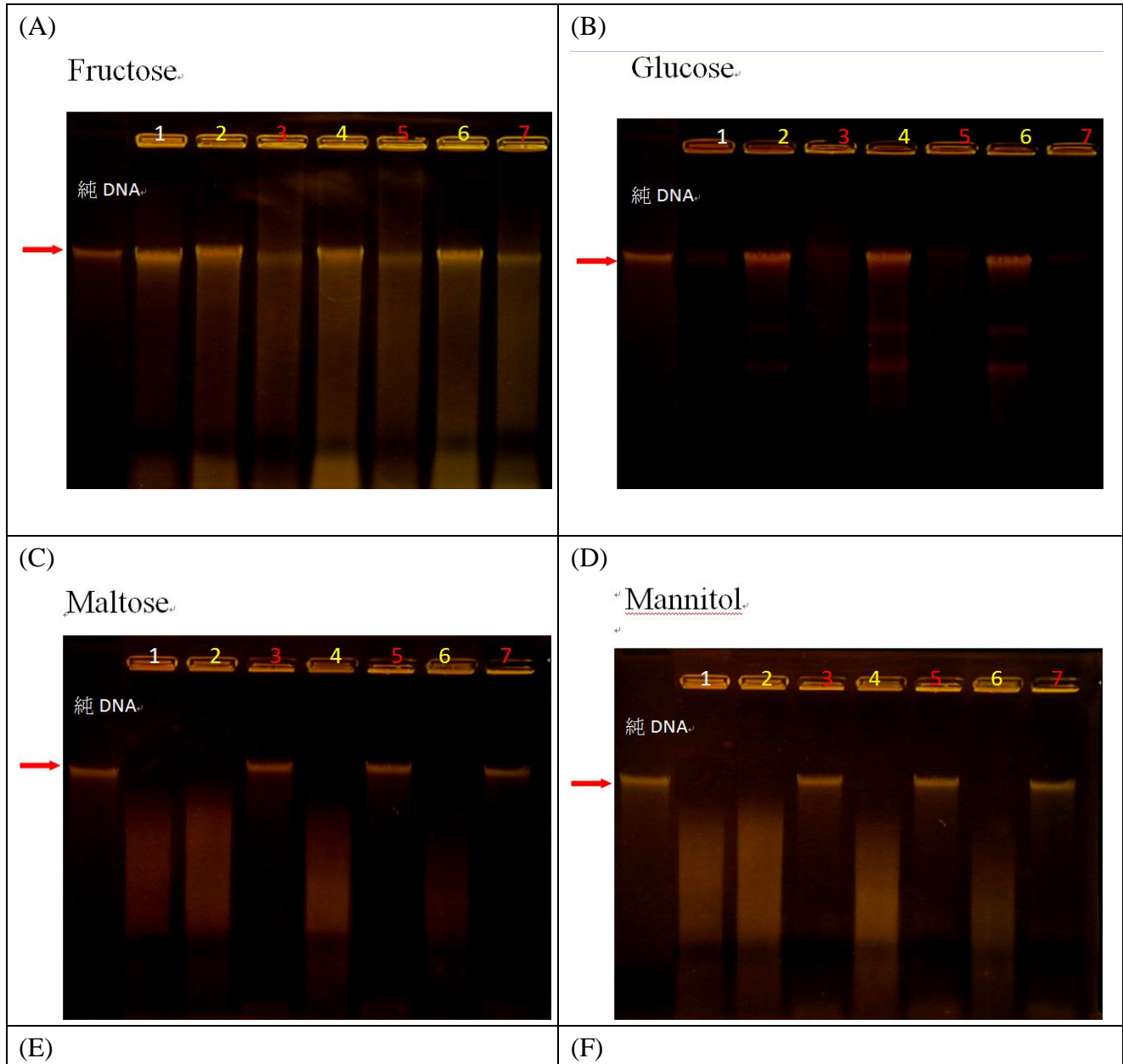
Features in this part of subject sequence:
S-layer protein, putative

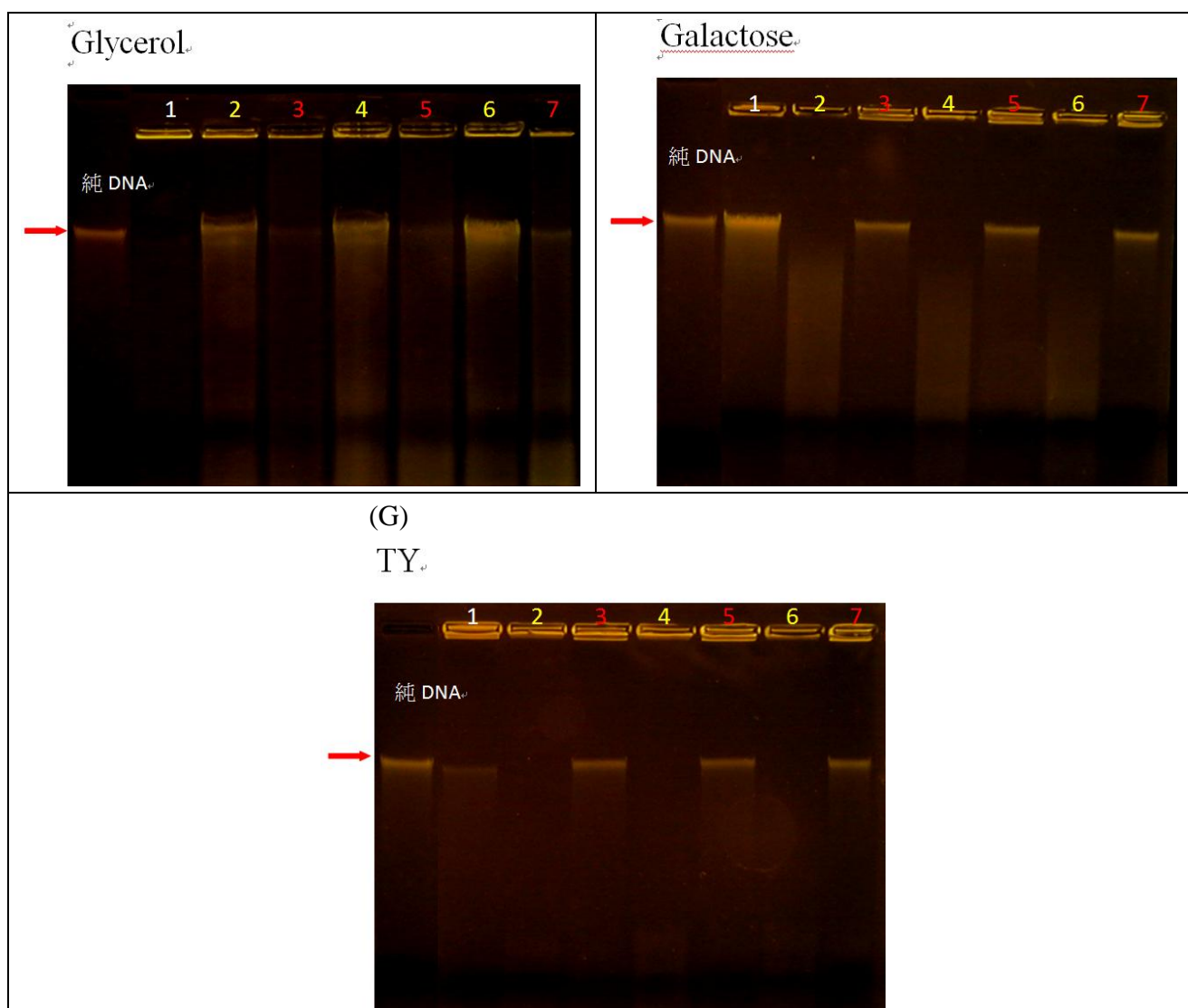
Score = 854 bits (462), Expect = 0.0
Identities = 469/472 (99%), Gaps = 2/472 (0%)
Strand=Plus/Plus

		(1)	1	10	20	30	40	52	Section 1
AE000513		(1)	TTAGAAGTTGACCTTGTAGCTG	TA	TCTTGA	AGGT	CTGGCCCGCAGACGGGCTGG		
SipA450		(1)	-----	AGGCTG	AGG	CTGGCCCGCAGACGGGCTGG			
Consensus		(1)		A		AGG	CTGGCCCGCAGACGGGCTGG		
		(53)	53	60	70	80	90	104	Section 2
AE000513		(53)	CGTTGTGATGCCCGCTGCCGTACTCGACGCCGTTGAGATCCTTCTGGCTCA						
SipA450		(30)	CGTTGTGATGCCCGCTGCCGTACTCGACGCCGTTGAGATCCTTCTGGCTCA						
Consensus		(53)	CGTTGTGATGCCCGCTGCCGTACTCGACGCCGTTGAGATCCTTCTGGCTCA						
		(105)	105	110	120	130	140	156	Section 3
AE000513		(105)	GGGTGTAAGTGGCTAGCTGAAGATCAGGTCTGTTAGGCGCCTTCACGTA						
SipA450		(82)	GGGTGTAAGTGGCTAGCTGAAGATCAGGTCTGTTAGGCGCCTTCACGTA						
Consensus		(105)	GGGTGTAAGTGGCTAGCTGAAGATCAGGTCTGTTAGGCGCCTTCACGTA						
		(157)	157	170	180	190	208	216	Section 4
AE000513		(157)	CACGCCGTTTCAGGTTGGTCCGGCGGTTGTTGTTGGCGTCTGCTGAAGTAGCCCC						
SipA450		(134)	CACGCCGTTTCAGGTTGGTCCGGCGGTTGTTGTTGGCGTCTGCTGAAGTAGCCCC						
Consensus		(157)	CACGCCGTTTCAGGTTGGTCCGGCGGTTGTTGTTGGCGTCTGCTGAAGTAGCCCC						
		(209)	209	220	230	240	250	260	Section 5
AE000513		(209)	TGGGTGCCGTCGCCGCTCGAAGGGGGTGTACTGACGGTTCTGAGCCATATAGC						
SipA450		(186)	TGGGTGCCGTCGCCGCTCGAAGGGGGTGTACTGACGGTTCTGAGCCATATAGC						
Consensus		(209)	TGGGTGCCGTCGCCGCTCGAAGGGGGTGTACTGACGGTTCTGAGCCATATAGC						
		(261)	261	270	280	290	300	312	Section 6
AE000513		(261)	CGTCATAGCGCACGCCGATCTTGGTCTGGGGCAGCAGGAAGTCGTTACGGAC						
SipA450		(231)	CGTCATAGCGCACGCCGATCTTGGTCTGGGGCAGCAGGAAGTCGTTACGGAC						
Consensus		(261)	CGTCATAGCGCACGCCGATCTTGGTCTGGGGCAGCAGGAAGTCGTTACGGAC						
		(313)	313	320	330	340	350	364	Section 7
AE000513		(313)	CACGCCCGCGCCCGTACTTGGTCTGCGGTTGGCGGTTGTAGTTCCAGCGGCCACA						
SipA450		(290)	CACGCCCGCGCCCGTACTTGGTCTGCGGTTGGCGGTTGTAGTTCCAGCGGCCACA						
Consensus		(313)	CACGCCCGCGCCCGTACTTGGTCTGCGGTTGGCGGTTGTAGTTCCAGCGGCCACA						
		(365)	365	370	380	390	400	416	Section 8
AE000513		(365)	CGTTGTGTCGGCGGTTGTAGTAGCCCACTGACCGTTGAAGTGGGGACGGAAGG						
SipA450		(342)	CGTTGTGTCGGCGGTTGTAGTAGCCCACTGACCGTTGAAGTGGGGACGGAAGG						
Consensus		(365)	CGTTGTGTCGGCGGTTGTAGTAGCCCACTGACCGTTGAAGTGGGGACGGAAGG						
		(417)	417	430	440	450	468	476	Section 9
AE000513		(417)	GCACGTTTTCCAGGGGATCGGTGCGCACAAATCAGGCCGACCGCCACGGGT						
SipA450		(394)	GCACGTTTTCCAGGGGATCGGTGCGCACAAATCAGGCCGACCGCCACGGGT						
Consensus		(417)	GCACGTTTTCCAGGGGATCGGTGCGCACAAATCAGGCCGACCGCCACGGGT						
		(469)	469	480	490	500	510	520	Section 10
AE000513		(469)	CCCGGCAGGACGGCTGTCTGAGCTGGG-TGTTGGTGGTTCGAGAACGAGCCCGC						
SipA450		(446)	CCCGGCAGGACGGCTGTCTGAGCTGGG-TGTTGGTGGTTCGAGAACGAGCCCGC						
Consensus		(469)	CCCGGCAGGACGGCTGTCTGAGCTGGG-TGTTGGTGGTTCGAGAACGAGCCCGC						

圖七、基因定序與分析結果圖。圖(A)為源資生技公司所提供之基因定序圖譜，明顯看出每一個鹼基的非常的清晰。圖(B)為本次定序出的序列，為 469bp。圖(C)經 NCBI 之 Blastn 序列比對結果，其序列鑑定率為 99% 為 S-layer protein。

3. 抗輻射奇異球菌經紫外線UVC照射後之DNA片段化分析





圖八、抗輻射奇異球菌經紫外線UVC之DNA片段化分析電泳圖。(A)-(G)分別使用不同碳源培養抗輻射奇異球菌，依序為Fructose(果糖)、Glucose(葡萄糖)、Maltose(麥芽糖)、Mannitol(甘露醇)、Glycerol(甘油)、Galactose(半乳糖)、TY(基礎培養基)。樣品1-7為抗輻射奇異球菌原菌、經超音波震盪器破碎細胞再稀釋1倍(1X)、經超音波震盪器破碎細胞後加去蛋白酵素再稀釋1倍(1X)、經超音波震盪器破碎細胞再稀釋3倍(3X)、經超音波震盪器破碎細胞後加去蛋白酵素再稀釋3倍(3X)、經超音波震盪器破碎細胞再稀釋5倍(5X)、經超音波震盪器破碎細胞後加去蛋白酵素再稀釋5倍(5X)。圖(A)顯示出不論是作任何處理都有很好保護DNA不受紫外線破壞的能力。圖(B)、(C)、(D)、(F)和圖(G)皆為使用了超音波震盪器+去蛋白酵素的保護DNA效果最好；圖(E)則是相反。

伍、討 論

一、基本分析

1. 利用Biolog碳源鑑定盤發現有別於目前所發表的論文之抗輻射奇異球菌可利用的碳源：Tween40、Tween80、Glycerol、Adenosine、2'-Deoxy-Adenosine、Thymidine、Uridine、Adenosine-5'-Monophosphate、Uridine-5'-Monophosphate、L-Lactic acid、L-Malic acid、Succinic acid mono-methyl ester、Pyruvic acid(圖二)。
2. 利用微生物培養增殖分析儀來觀測抗輻射奇異球菌與對照組大腸桿菌對紫外線UVC的刺激下之生長表現(圖三)中可發現，在無碳源培養基(TY)的抗輻射奇異球菌在受到紫外線UVC的刺激下比未照射UVC之菌數還要更多，約增加了0.25 OD₆₀₀。將奇異球菌與大腸桿菌作比較，兩菌受到紫外線UVC的照射後，菌數明顯減少。在5分鐘之存活率以Mannitol 97%為最高，Maltose為最低；10分鐘時Galactose以82%居先，最低碳源還有維持40%以上；15分鐘-45分鐘維持第一(75-52%)，Galactose為其次(70-58%)，最差的Maltose也從30%降到10%以下。當紫外線UVC照射60分鐘時，只剩Galactose與Glycerol所誘導產生的奇異球菌存活率還保持35%以上。
3. 由圖四的表格中可看出抗輻射奇異球菌在各種碳源中經UVC照射後的存活率都遠大於大腸桿菌，其中奇異球菌在Glycerol中的存活率是大腸桿菌的29倍；Galactose 27.5倍；Glucose 20倍；Mannitol 18倍；Maltose 17倍；Fructose與TY則有12倍。而最佳奇異球菌與最差的大腸桿菌還相差了30倍。

二、蛋白質分析

根據基礎培養基(TY)所產生的蛋白質，不論紫外線 UVC 照射時間的長短，皆可產生 123KDa、62 KDa、46 KDa 和 26 KDa 位置的蛋白質。相較於 TY，其他碳源也有一些產生不同於 TY 所產生的蛋白質。Glycerol 多了 31 和 38KDa 位置之蛋白質；Maltose 則多了 27KDa 蛋白質；Mannitol 多了 38 與 70KDa。Glucose 多了 26 KDa、27KDa、28KDa、36 與 44KDa 之條帶位置的蛋白質。參考 RecA、UvsE^[6]、SipA^[7]等抗輻射相關的基因可產生 38KDa、35KDa 和 123KDa 蛋白質。

三、核酸分析

- (一) 由圖六 S-layer protein(*SipA*) 基因的表現結果來看，似乎不同碳源可誘發不同程度 *SipA* 基因的表現。Fructose 似乎使抗輻射奇異球菌在沒有受到紫外線 UVC 的刺激就可以出現此基因，這也從圖八(A)的結果，

不論在何時或做任何處理，都不影響 Fructose 所產生的蛋白質保護 DNA 不受紫外線 UVC 的破壞。圖六(B)Glycerol 的結果看來，不論紫外線刺激與否其皆無 SipA 基因之表現。這與圖八(E)的結果與其它碳源的 DNA 保護試驗的結果相左可見一般，似乎抗輻射奇異球菌經由 Glycerol 刺激以抵抗紫外線的破壞，細胞壁外膜上的 S-layer protein 不是主要的抗輻射角色，似乎還有其它的因子參與作用，這似乎也很適合再深入探討，因為 Glycerol 受到紫外線 UVC 的照射後其存活率可達 93%，也經由紫外線 UVC 照射 60 分鐘後還保有 40% 以上的存活率。至於其碳源，Maltose 可由紫外線照射 15 和 30 分鐘誘發 SipA 基因的表現; Mannitol 則是在經 60 分鐘的照射才有些許的 SipA 表現，這似乎也意味著 Mannitol 對抗輻射奇異球菌有其他的抗紫外線破壞的因子，本實驗也發現到 Mannitol 能使奇異球菌有很高的細胞增殖功能，僅次於 Maltose。圖六(C)Glucose 在紫外線照射 30 分鐘有很強的 SipA 表現，相較於它在蛋白質的表現結果(圖五(F))與圖八(B)，Glucose 都有很好的表現，且其存活率也高達 79%，由此可見 Glucose 對抗輻射奇異球菌是一個很好的碳源。

- (二) 根據陳於 2000 年發表的碩士論文提到：「碳源為 Glucose、Fructose、Mannose、Maltose、Sucrose 時生長情況較為良好，而 Galactose、Lactose、Mannitol，則生長情況差」^[8]；這與本實驗的研究結果有些許不同，本研究發現抗輻射奇異球菌的生長情況：

Fructose>Maltose>Mannitol>Glycerol>Galactose>Glucose>TY

- (三) 根據 2002 年顏發表的碩士論文已整理出耐輻射奇異球菌抗輻射的原因可分為六點：

1. 具有保護色素：耐輻射奇異球菌具有多種類胡蘿蔔素(carotenoids)，而類胡蘿蔔素可以抑制一氧原子與具有氧化力的自由基(free radicals)，可以保護細胞免於受到紫外光或輻射所引起的光氧化傷害(photooxidative damage)。
2. 細胞外具有多層的膜狀構造：多層而且複雜的細胞壁構造，外面還有一層外膜，外膜外還有一層 S layer 以及由碳水化合物組成的膜，可以阻隔部分的輻射與紫外光。(本實驗也利用 S-layer protein(SipA)基因表現與本論證相呼應)
3. 錳離子的保護作用：耐輻射奇異球菌對二價錳離子有很高的攝取性，錳離子輻射奇異球菌的染色體 DNA 結合，減少由光氧化傷害所造成的胸線嘧啶雙元體(thymine-containing pyrimidine dimers)形成，減少 DNA 受到的傷害。

4. Catalase and superoxide SOD：具有 3 種 Catalases 與多種 superoxide dismutase，可快速移除菌體內的自由基，使不至於受到破壞。
5. 對受損 DNA 極高修補能力：即使染色體上有 100 處以上雙股 DNA 斷裂，仍然可以修復而不至於死亡；*E.coli* 只能同時修補 2~3 處，若再有更多的雙股 DNA 斷裂便無法修復而死亡。而這也是目前公認耐輻射奇異球菌擁有極高的抗輻射能力最有可能的原因。
6. 同時具有多套染色體：菌體內有很多額外重複的基因和染色體，使得受損後的同源基因重組修補(homologous recombination-based repair)很有效率。

陸、結 論

- 一、 本實驗結果顯示抗輻射奇異球菌之抗紫外線作用與 S-layer protein 有關。
- 二、 碳源的不同能帶給抗輻射奇異球菌不同對抗紫外線破壞的抗性，其中與細胞生長良好、多種蛋白質的產生、細胞壁的外膜 S-layer protein 的大量表現等有關。
- 三、 碳源利用率與所產生的色素和抗紫外線的破壞不成正比，因為抗輻射奇異球菌的抗輻射能力非單一因素所造成的。

柒、未來展望

在本次實驗當中，我們證實 *D. radiodurans* 之抗輻射能力較其他細菌來得強，希望未來能有機會找出其抗輻射的機制為何，開發出生物性防曬試劑來造福人類上，以對抗這惡劣的環境，造福人類。

捌、參考文獻

1. 防曬乳成份 http://www.unsun.com.tw/knowledge_p03.html
2. 張嘉文(2003)以蛋白質資料庫之比對預測抗輻射奇異球菌之抗輻射機制。國立臺灣大學資訊工程學研究所碩士論文。
3. 抗輻射奇異球菌簡介 <http://microbiology.scu.edu.tw/micro/bacteria/D1.htm>
4. 邱建儀(1996) 錳(II)離子與菸鹼酸對奇異球菌的生長和UV抗性的影響。國立清華大學輻射生物研究所碩士論文。
5. 張阜民(1988)抗輻射細菌*DEINOCOCCUS RADIODURANS* IR的調控DNA 修補機制之研究。國立清華大學輻射生物研究所碩士論文。
6. Tanaka M.et al., (2005)Characterization of Pathways Dependent on the *uvsE*, *uvrA1*,

or *uvrA2* Gene Product for UV Resistance in *Deinococcus radiodurans*. J. Bacteriol., June 2005, p. 3693–3697

7. Rothfuss H., et al., (2006) Involvement of the S-layer proteins Hpi and SlpA in the maintenance of cell envelope integrity in *Deinococcus radiodurans* R1. Microbiology (2006), 152, 2779–2787
8. 陳君麟(2000)探討各種單醣與雙醣對耐輻射奇異球菌生長的影響。國立中山大學生物科學研究所碩士論文。
9. 顏孟畿 (2001) 錳離子對耐輻射奇異球菌DNA修補原料及能量供應的影響。國立中山大學生物科學研究所碩士論文。

玖、附件一實驗製備流程

一、固/液態培養基製備

1. 量取胰化蛋白胨(Tryptone)5克與酵母萃取物(Yeast)1克作為供試菌之基礎培養基(TY medium)加水至一升使其完全溶解後分裝到血清瓶中，經高壓滅菌斧(1.5 kg/cm^2 , 121°C)滅菌15分鐘，液態培養基製備完成。
2. 另外將基礎培養基添加洋菜膠粉(Agar)15克/每公升，經高壓滅菌斧滅菌後待冷卻至 45°C 時，於無菌操作臺中將培養基倒入無菌培養皿中，使其凝固，固態培養基製備完成備用。

二、基本分析

1. 抗輻射奇異球菌之活化培養

- (1) 將購自於食品工業研究所的奇異球菌的冷凍乾燥管，利用棉花沾有70%酒精擦拭外管，在火焰上加熱外管之尖端。
- (2) 滴數滴無菌水在加熱處使外管破裂，再以硬棒敲破尖端。
- (3) 取出隔熱纖維和內管，已滅菌過的鑷子取出內管之棉塞。
- (4) 加0.5ml培養液於內管中，並輕微震盪使菌體溶解成懸浮菌液。
- (5) 取0.1ml懸浮菌液培養於指定平板培養基上，作劃線分離培養並經系列稀釋，再利用無菌L型玻棒均勻塗抹，同時將兩者置於 37°C 之定溫培養箱培養。

2. 抗輻射奇異球菌碳源利用分析

- (1) 將抗輻射奇異球菌培養在碳源鑑定專用之培養基BUG，待2天菌落生長後再利用BUG培養基活化更新一次。
- (2) 將菌落利用棉棒刮下，利用數字式分光光度計在波長600nm的條件下，將菌液濁度調整為20%，此菌液作為樣品比色用的標準品。

- (3) 在操作台將新活化好的奇異球菌，利用無菌棉棒將菌落刮下，接種至碳源鑑定專用接種液，利用比色法將此接種液的濁度調整至20%。
- (4) 利用八爪微量低滴管取150 μ l接種液於GP2鑑定盤的每一個well中，完成後將之置於37 $^{\circ}$ C 培養箱培養24小時後，利用Biolog鑑定讀值機讀取鑑定盤上的反應結果並利用其軟體分析其碳源利用的情形。

3. 碳源利用最適化分析

(1) 抗輻射奇異球菌之抗紫外線碳源濃度最適化分析

- I. 利用微生物培養增殖分析機自動偵測樣品在吸收光600nm下的生長曲線。
- II. 將基礎培養液與事先配製好的碳源溶液，依比例調配出0、0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%之不同濃度的碳源培養液。
- III. 在無菌操作台中，將不同濃度之液態培養液注入L型試管並加入預先培養的菌液(OD₆₀₀為0.6，菌數為1 \times 10¹⁰ 個/毫升)。
- IV. 將L型置於微生物培養增殖分析機，以37 $^{\circ}$ C，40 rpm震盪培養並以可見光600 nm，每小時偵測奇異球菌菌體生長的變化情形。
- V. 於24小時後，將L型試管暫停作用並取出照射紫外線UVC(3.3mW/cm²)，5分鐘，再將L型試管置微生物培養增殖分析機繼續作用至48小時後停止反應。

(2) 最佳碳源培養下經不同時間照射紫外線UVC之抗輻射奇異球菌存活率

- I. 根據「碳源濃度最適化試驗」所得到之抗輻射奇異球菌抗紫外線UVC最佳之碳源濃度，配製該濃度培養基並加入預先培養的菌液(OD₆₀₀為0.6，菌數為1 \times 10¹⁰ 個/毫升)。
- II. 將抗輻射奇異球菌添加不同種碳源使之增殖培養，使用的碳源有：Fructose(果糖)、Glucose(葡萄糖)、Maltose(麥芽糖)、Mannitol(甘露醇)、Glycerol(甘油)、Galactose(半乳糖)、TY(基礎培養基)。
- III. 取菌液1500 μ l至微量試管中，以轉速7,000 rpm 離心10分鐘，倒除上清液，加入100 μ l無菌水使菌體懸浮。
- IV. 將菌體照射紫外線UVC(能量強度為3.3 mW/cm²)，反應時間分別為0、5、10、15、20、25、30、45、60分鐘。
- V. 照射後利用連續稀釋法將菌體稀釋至10⁻⁶、10⁻⁷、10⁻⁸，再將菌液以L型玻棒塗抹於培養基中，置於37 $^{\circ}$ C 定溫培養箱培養。
- VI. 2日後計數奇異球菌菌數，並將不同照射時間之菌數/對照組(UVC照射為0分鐘)之比較值來了解抗輻射奇異球菌在不同紫外線強度之抗性情形(存活率)。

三、蛋白質分析--抗輻射奇異球菌經紫外線UVC照射後之蛋白質電泳分析

1. 戴上實驗用乳膠手套，將電泳分析用的玻璃片經70%的酒精擦拭後晾乾組裝。
2. 將組裝好的裝置經100%酒精量測是否縫隙會漏，若無則將酒精倒除，倒置晾乾。
3. 樣品處理：經紫外線UVC，照射強度為 $3.3\text{mW}/\text{cm}^2$ 照射0、15、30、45、60、120、180分鐘後，利用離心機取得菌體，加入蛋白質sample buffer懸浮菌體後，置於 100°C 作用10分鐘後，立即置於冰水中待冷卻後進行電泳分析。
4. 膠體配製：先配製分離蛋白質之電泳膠(下層膠)，待其凝固後再配置樣品層之電泳膠(上層膠)，其配製劑量如下表所示：

試劑	12%下層膠	5%上層膠
二次蒸餾水(ddH ₂ O)	8592 μl	1802 μl
40% Acrylamide mix	6000 μl	375 μl
1.5M Tris buffer(pH=8.8)	5000 μl	-
0.5M Tris buffer(pH=6.8)	-	760 μl
10% SDS	200 μl	3 μl
10% APS	200 μl	30 μl
TEMED	8 μl	3 μl

5. 將膠片裝置置於裝有電泳反應溶液中，再將樣品注入電泳膠體中，以電壓140伏特進行蛋白質電泳，費時2小時。
6. 將膠片取出，去除上層膠後將之浸染在Comassie Brilliant Blue染劑中緩慢搖晃作用20分鐘，再利用退染劑將膠片退染3小時後，呈相拍照。

四、核酸分析

1. 抗輻射相關基因表現分析

(1) 專一性引子對(Primers)：SipAF:5'-ttagaagttgacctttagc-3'

SipAR:5'-ccaacacccagctcgacagc-3'

(2) 抗輻射奇異球菌 Total RNA 純化

- I. 經不同碳源培養，照射紫外線 UVC 15、30、60 分鐘後之菌體，以轉速 700 rpm 收集。
- II. 將菌體利用冷凍-加熱之物理方法打破菌體，加入 1ml Trizol[®] (10^6 菌數/毫升)使之混合均勻，置於室溫 10 分鐘。
- III. 加入 0.2 ml 氯仿用力混合，15 秒，置於室溫 5 分鐘。
- IV. 於 4°C ，轉速 12000rpm，離心 15 分鐘。
- V. 取上清液，加入等體積異丙醇，置於室溫 10 分鐘。
- VI. 於 4°C ，轉速 12000rpm，離心 15 分鐘。
- VII. 緩緩倒除上清液，加 1ml 75% 乙醇清洗樣本，再以 7400rpm 離心 5 分

鐘。

VIII. 倒除上清液，置 55°C 烘箱使之風乾。

IX. 加 30µl DEPC-H₂O 回溶 RNA。

(3) 反轉錄試驗(Reverse Transcription, RT)

I. 取 2µg Total RNA 加無菌水至 15µl，再加入 10µM 專一性引子對 2µl 於微量試管中，置於 70°C 反應五分鐘。

II. 反應後置於冰上兩分鐘後，加入反轉錄酵素等試劑，於 42°C，作用 60 分鐘後再置於 95 °C，5 分鐘。

III. 即完成反轉錄試驗，得到較 RNA 穩定的樣本 cDNA。

(4) 聚合酶連鎖反應(Polymerase chain reaction, PCR)

I. 利用專一性引子對與聚合酶酵素將 cDNA 增幅擴大產量。

II. 配製 PCR 反應液，置於聚合酶連鎖反應器中，以 95°C，2 分鐘、56°C，1 分鐘、72°C，1 分鐘之溫度循環反應 30 回，再以 72°C，5 分鐘使 PCR 反應完全。

III. 利用 0.8% Agarose 膠體電泳分析結果。

(5) PCR 產物純化與定序

I. 切出膠上正確的DNA片段，置於1.5 ml 的微量試管中，加入等倍體積的 Binding Solution，置於60 °C 水浴中，15分鐘(使膠塊全溶解)。

II. 將步驟I的溶液加到Spin Column/Collection Tube 中，以最高速離心1分鐘後。

III. 倒除下濾液，加入 700µl Wash Solution，以最高速離心1分鐘後，此步驟重複進行兩次。

IV. 倒除下濾液，再以最高速離心5分鐘，以移除 column 中殘存的乙醇溶液。

V. 將清洗過的 spin column 移置另一個新的微量試管中，置於55°C，反應 10分鐘，使 column 中的ethanol 完全去除。

VI. 加 20µl 的無菌水，並置於 60 °C，作用5分鐘，以最高速離心1分鐘。

2. 抗輻射奇異球菌經紫外線UVC照射後之DNA片段化分析

(1). 金黃色葡萄球菌染色體 DNA 製備

I. 取 1.5 ml 菌於微量試管中，用離心機，以轉速 10,000 rpm，離心 10 分鐘後，去除上清液。

II. 加入 400µl 的 ZR BashingBead™ Lysis buffer 於微量試管中，使之懸浮後吸取樣品置於 ZR bashingBead™ Lysis Tube，利用振盪器振盪 5 分鐘後離心 1 分鐘（10,000 rpm）。

- III. 將 400 μ l 的上清液移至 ZR BashingBead™ IV spin Filter，以 7000 rpm，離心 1 分鐘，取之濾液。
- IV. 將濾液加入 1200 μ l 的 Fungal/Bacterial DNA Binding Buffer，混合均勻後轉置 Zymo-spin™ IIC column，以 10,000 rpm，離心 1 分鐘後，倒除濾液。
- V. 加入 200 μ l 的 DNA Pre-Wash Buffer 到 Zymo-spin™ IIC column，以 10,000 rpm，離心 1 分鐘。
- VI. 加入 500 μ l 的 Fungal/Bacterial DNA wash Buffer，以 10,000 rpm，離心 5 分鐘，置於 55°C 烘箱中風乾萃取管柱(約 20 分鐘)。
- VII. 加入 50 μ l 的無菌水，回溶 DNA。
- VIII. 利用 0.8% Agarose 電泳洋菜膠分離 DNA 並使用分光光度計定量 DNA 濃度。

(2).DNA 片段化分析樣本製備與分析

- I. 將菌液利用離心機，以 10,000 rpm，離心五分鐘，去除上清液，加入無菌水使菌體懸浮。
- II. 將懸浮的菌液分成三組，其中兩組利用超音波震盪器來破碎菌體，以震盪 10 秒，休息 10 秒的方式，共反應一分鐘。
- III. 將超音波震碎的其中一組加入去蛋白酵素(終濃度為 50 μ g/ml)，置於 65°C 反應 1 小時。
- IV. 將這三組樣品以無菌水稀釋為 1 倍(1X)、3 倍(3X)、5 倍(5X)後，照射紫外線 UVC，能量強度為 3.3 mW/cm²，反應 5 分鐘。
- V. 再將樣品利用 0.8% Agarose 核酸電泳膠(先行配製：0.8 g agarose + 1X TBE buffer)，以電壓 100V 泳動 30 分鐘後經影像分析系統呈相。

【評語】 040710

- 1.驗證 UVE 處理時誘導蛋白的辨認
- 2.需再確認各碳源基礎下基因表現的意義。