

中華民國第 53 屆中小學科學展覽會 作品說明書

高中組 生活與應用科學科

第一名

040810

光學影像探針用於檢測細菌感染之研發

學校名稱：臺北市立第一女子高級中學

作者： 高二 王郁茜	指導老師： 余惠如 林玟娟
---------------	---------------------

關鍵詞：細菌感染、光學影像探針

得獎感言

渴望

追逐夢想的經驗最是深刻，有如一次冒險，在漫漫薄霧的明滅之間尋找出路。迷失成為一種獲得，曲折起伏之中才看清自己的渴望。

那是一份恆古不變企求，源於祖先們對火焰或是漁網的渴望。進而昇華成一種對知識的嚮往，並改變一個人。在實驗室中與橡膠手套及酒精為伍的這些日子裡，除了知識的積累，我更清楚的了解了科學研究的精神。顯微鏡底下的世界如此神秘複雜，卻又令我深深著迷、無法自拔。我不斷的吸收知識，從最初的懵懂無知慢慢累積，越深入研究便越能感受自身的不足。然而，也就是這份不足讓我更加渴望一頭栽入。一份份艱澀的研究資料與我分享它們的秘密，在無數個深夜裡向我低語著生命世界的種種。途中的種種困難讓我學到更多、更深。最初的那份渴望依舊，在迷失的日子裡引領著我前行，而峰迴路轉之間總會有一絲線索，等待著我去發現。對知識、對未知以及對夢想的種種期盼，使我在製作科展作品的期間學到了許多寶貴的課題，同時也在我心中留下難以忘懷的經驗。

回顧這次參與科展的過程，初衷不過是一份簡單的渴望，讓我堅持到終點，並獲得了許多當初所沒有發現的感動與喜悅。專題本身並不是多麼的艱深或偉大，但卻成為我高中生活裡，最重要、最值得珍惜的一次經驗，並改變了我。



2013 年全國第 53 屆科展北一女中 6 位同學得了物理、化學、地科、應科等四個第一名以及學校團體獎第一名。



與指導老師合影

摘要

本實驗之目的在尋找臨床上針對檢查傷口有無細菌感染時更快速有效的方式，同時期待能降低這方面的醫療成本。本實驗選擇以刀豆蛋白 A 做為細菌的靶向配體，因為以刀豆蛋白 A 製出的光學影像探針可以檢測出大部分常見的細菌。利用刀豆蛋白 A 與螢光染料合成所製出的光學影像探針吸附細菌，以達到檢驗有無細菌感染及標記細菌分布的目的。

實驗結果顯示，製成的影像探針可以檢測和量化細菌的數量，同時不會對細胞產生毒性。本研究結果初步支持了光學影像探針應用於細菌感染檢測的可行性。

一、 研究動機及目的

引起疾病的微生物種類極多，從極微小的濾過性病毒、細菌到較大一些的黴菌、寄生蟲等都可能造成人類發生感染疾病，其中細菌佔了極關鍵的角色。細菌感染是致病菌或條件致病菌侵入血循環中生長繁殖，產生毒素和其他代謝產物所引起的急性感染。其中創傷患者最易感染，因為大多數細菌通過患者的開放性傷口進入，並進行細菌繁殖。在台灣，慢性非癒合傷口患者約占兩成，包括靜脈壓力和糖尿病所引起的潰瘍。據統計，這些非癒合性傷口每年將花去 300 億新台幣，我們也同時發現在這些非癒合性傷口特別容易遭受細菌感染。細菌在傷口上的繁殖進一步的造成了組織損傷以及更多的發炎症狀，延長了傷口的癒合期¹。此外，慢性傷口感染也提高了病人的護理費用以及病人的發病率²。更糟的是，目前並沒有可靠的檢測技術檢測慢性傷口感染，臨床上更缺少可以快速有效監視傷口癒合的工具。因此，當務之急就是尋找有效的治療方法以節省所需的時間，精力和醫療成本。

目前臨床上所使用的方法包括了細菌培養及鑑定、菌體抗原、菌體酵素、菌體核酸和在生物體中所誘發抗體的測定和以分子生物學技術進行基因檢測法等等。通常會採集血液或組織液，再送到臨床實驗室以做細菌培養、鑑定以及相關實驗。這些檢測方式耗時甚久，短則數十小時、長則數日，有些方法的靈敏度也不高，若只是些微的細菌感染也有可能無法偵測。長時間的測試可能會耽誤了治療，並大幅提高住院和治療費用。有鑑於此，尋找一個能在臨床上應用並且能快速有效、即時檢測菌感染的方式是絕對必要的。

近年來，許多醫學影像方法已經應用於各類不同疾病的檢測，包括創傷、各類腦部疾病和癌症。儘管這些方法在臨床上已被廣泛的應用，但是都需要使用特殊的設備和試劑，也須擔負較高的治療費用。光學影像技術有成本低廉、操作簡便、檢測快速精準等優點，因此常應用於疾病檢測。近年來有許多研究已經顯示利用不同類型的細胞標靶所製作的光學影像探針，包含巨噬細胞，嗜中性粒細胞，和活性氧物種³⁻⁵。然而，目前甚少研究利用光學影像技術來檢測感染性的疾病。所以本研究旨在發展以快速有效的螢光影像技術來即時檢測細菌感染。

為了實現這一目標，本研究將著重在用於檢測感染的影像探針之發展。這種影像探針有三個要素，細菌標靶配體、聚合物載體和螢光染劑探針。針對細菌標靶配體，我選擇了刀豆蛋白 A 做為細菌的靶向配體，其原因是因為它能夠與大部分的細菌上的的 α -D-甘露糖基以及 α -D-葡萄糖進行特定相互作用。此外，其成本相對較低，並且對各種細菌細胞壁的碳水化合物上的革蘭氏陽性及陰性菌都具有高親和力⁶⁻⁹。

為了避免探針與細胞間產生相互作用，研究者參考最近發表的文獻來製作由 PNIPAM-CO-ST 微粒做為基底材料的影像探針。另外利用帶有不同螢光染劑(包含羅丹明等)標記的

細菌探針進行活體體內實驗的部分。我研究中的其中一部分將探討此細菌探針是否可以用來檢測和量化細菌的數量。

二、 研究設備及器材

(一) 研究用藥品及試劑

1. 2,20-Azobis(2-methylpropionamidine) dihydrochloride (V50) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
2. N-(3-aminopropyl) methacrylamide (APMA) (procured from Polysciences, Warrington, PA, USA).
3. Concanavalin A (Con A) (purchased from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).
4. Dialysis membrane (6,000-8,000 Dalton, MWCO) (obtained from SpectrumLab, Rancho Dominguez, CA, USA).
5. Divinylbenzene (DVB) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
6. Dimethyl sulfoxide (DMSO) (purchased from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).
7. Dodecyl Trimethyl Ammonium Bromide (DTAB) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).
8. Dulbecco' s Modified Eagle Medium (DMEM) and alamarBlue® (purchased from Invitrogen Life Technologies, Grand Island, NY, USA).
9. 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) (obtained from Thermo scientific, Rockford, IL, USA).
10. Hydrogen Chloride (HCl) (obtained from Thermo scientific, Rockford, IL, USA).
11. 1,1', 3,3,3", 3⁻-Hexamethylindotricarbocyanine (IR750)) (purchased from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).
12. N-isopropylacrylamide (NIPAM)) (purchased from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).
13. Nitrogen gas (N₂)(Matheson, Basking Ridge, NJ, USA).
14. Potassium chloride (KCl) (purchased from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).
15. Rhodamine 6G (染劑)) (purchased from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).
16. Sodium chloride (NaCl) (purchased from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

17. Sodium phosphate dibasic (Na_2HPO_4) (purchased from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).
18. Sodium phosphate monobasic (KH_2PO_4) (purchased from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).
19. Styrene (St) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
20. Tetrahydrofuran (THF) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

(二) 研究儀器

1. Bacteria incubator (Lab-line 314 CO_2 Incubator, Lab-line Instrument, Melrose Park, IL, USA)
2. Biosafety cabinet (NU-425-400, Nuair, Plymouth, MN, USA)
3. Cell culture incubator (Nuair, Plymouth, MN, USA)
4. Centrifuge (5810R, Eppendorf, Hamburg, Germany)
5. Fluorescence standing microscope (Leica, Wetzlar, Germany)
6. Inverted microscope (Leica, Wetzlar, Germany)
7. UV-Vis Spectrophotometer (Beckman DU640, Beckman Coulter, Brea, CA, USA)
8. Microplate reader (Tecan Infinite M 200 plate reader, San Jose, CA, USA).
9. Photon Correlation Spectroscopy (ZetaPALS, Brookhaven Instruments Co., Holtsville, NY, USA)
10. In-Vivo FX Pro system (Carestream Health, Rochester, NY, USA).
11. SpectraMax 340 Spectrophotometric plate Reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).
12. Fluorometer (Tecan Infinite M 200 plate reader, San Jose, CA, USA).

(三) 試劑準備

磷酸鹽緩衝鹽水(PBS) (毫莫耳) 的製備如下:

1. 加入 800 毫升的蒸餾水
2. 加入 8 克的 NaCl。
3. 加入 0.2 克的 KCl。
4. 加入 1.44 克的 Na_2HPO_4 。

5. 加入 0.24 克的 KH_2PO_4 。
6. 利用 HCl 將酸鹼值調整為 7.4。
7. 加入去離子水至總體積為 1 升。
8. 然後將溶液高壓滅菌（20 分鐘， 121°C ）。

三、研究過程或方法

(一)製作光學探針:

1. 製備氮化的微粒子:

在 500 毫升帶磁力攪拌的反應器中,

- (1) 加入 NIPAM 2.49 克。
- (2) 加入 St. 1.61 毫升。
- (3) 加入 DVB 0.28 毫升。
- (4) 加入 0.36 克 APMA。
- (5) 加入 DTAB 0.6 克。
- (6) 加入 200 毫升的去離子水。
- (7) 通以氮氣 10 分鐘, 將反應器中的氣體加熱到 70°C。
- (8) V50 水溶液 (0.01 克/毫升) 向反應器中加入 5 毫升。
- (9) 在 N₂ 中反應 4 小時。
- (10) 將所製備的微粒以去離子水透析一周以上, 此步驟的目的是除去未反應的單體和表面活性劑。
- (11) 純化的微粒分散液貯存於 4°C, 以便後續使用。

2. 螢光染劑負載微粒: 在此研究中我們選擇羅丹明 6G 和 IR750 做為螢光染劑來標記微粒, 可同時應用於體外和體內成像。

- (1) 加入 10 毫升的散狀微粒於玻璃瓶內。
- (2) 加入 5 毫升的 IR750 染劑十二烷基硫酸鈉溶液 (0.2 毫克/毫升)。
- (3) 在無光室溫的恆溫箱中靜置一天。
- (4) 以去離子水透析一星期左右, 刪除嵌入式的染劑。純化的染劑負載的微粒分散液貯存於 4°C 以供進一步使用。

3. 光學探針的製作: 將刀豆蛋白 A 的選為配體是因為它對 α -D-甘露糖基和 α -D-葡糖基皆有高的細菌表面親和性。

- (1) 加入 2 毫升 1 的散狀染劑負載微粒液到小瓶中。
- (2) 用 0.1 莫耳的 HCl 調整溶液的 pH 值至 5.0。
- (3) 加入 3 毫克的刀豆蛋白 A 至粒子分散液中。
- (4) 加入 1.8 毫克的 EDC 至粒子分散液中。
- (5) 放入 4°C 冰箱中靜置一天。
- (6) 以去離子水透析一周以上, 以除去未結合的刀豆蛋白 A。光學探針被存儲在 4°C, 以供進一步使用。

(二)、探針的特性分析:

1. 探針的大小和 zeta 電位：

- (1) 加入一滴探針微粒到樣本至比色管中。
- (2) 加入 2.5 毫升的去離子水稀釋。
- (3) 用光子相關光譜(ZetaPALS, Brookhaven Instruments Co., Holtsville, NY, USA) 測量顆粒和 Zeta 電位。
- (4) 利用 JEM-1200EX 透射顯微鏡觀察微粒子的型態。

2. 探針發射光譜測定：

- (1) 在 96 孔板中，將 2 微升探針溶解到 200 微升的去離子 DI 水。
- (2) 利用 Tecan Infinite M 200 光譜分析儀(San Jose, CA)測量探針的光譜。
- (3) 將 IR750 的激發波長固定為 730 奈米，測量從 770 到 850 奈米的光譜。
- (4) 羅丹明 6G 的激發波長固定為 510 奈米，測量從 540 到 650 奈米的光譜。

3. 探針濃度和發射強度之間的關係的測定

- (1) 準備不同濃度的探針溶液 (0.0032, 0.016, 0.08, 0.1 和 0.4 毫克/毫升)。
- (2) 在 96 - 孔板中加入不同濃度的探針溶液(每個孔板內體積為 200 微升)。
- (3) 利用 Tecan Infinite M 200 光譜分析儀測量 IR750(792 奈米)和羅丹明 6G(557 奈米)的發射光譜。

4. 刀豆蛋白 A 結合效率的評估

- (1) 利用異硫氰酸螢光素(FITC)標記刀豆蛋白 A 並與細胞探針做共軛結合。
- (2) 將此細菌探針冷凍乾燥後並秤重。
- (3) 準備不同濃度的探針溶液(0.0032、0.016、0.08、0.1 和 0.4 毫克/毫升)，並且使用 UV-vis 分光光度計測量 FITC 的螢光強度，以便計算每個細菌探針上共軛結合的刀豆蛋白 A 數量。

5. 羅丹明 6G 和 IR750 染劑的裝載效率

研究者利用螢光儀(fluorometry)技術來評估羅丹明 6G 和 IR750 染劑的裝載效率。³此部分的研究是以 Tecan Infinite M 200 光譜分析儀來量測羅丹明 6G(發射波長 557nm)和 IR750(發射波長 792nm)的螢光強度。

- (1) 建立不同濃度的羅丹明 6G(0.0032、0.016、0.08、0.1 和 0.4 毫克/毫升)和螢光強度(發射波長 510nm)間的相關性並計算出其線性方程式。以此線性方程式來測量羅丹明 6G 的濃度。
- (2) 建立不同濃度的 IR750 染劑(0.0032、0.016、0.08、0.1 和 0.4 毫克/毫升)和螢光強度(發射波長 730nm)間的相關性並計算出其線性方程式。以此線性方程式來測量 IR750 染劑的濃度。

裝載效率的計算公式如下：

裝載效率 = 載入染劑的重量 / 乾燥為粒子的重量)。

6. 細菌影像探針的細胞毒性³⁻⁴

我利用標準的 MTS 細胞毒殺活性測試來評估細菌探針的細胞毒性。簡而言之，我們將利用老鼠的成纖維細胞(3T3)和巨噬細胞(Raw 264.7) (ATCC, Manassas, VA.) 做為研究對象。

- (1) 細胞接種於 96 孔板中，接種密度為每孔版中 1×10^4 個細胞。利用 DMEM 細胞培養液添加 10% 胎牛血清 (FBS) 和 1% 抗生素，在 37°C，5% CO₂ 環境培養。
- (2) 24 小時之後，我們用 200 微升的完全 DMEM 細胞培養液給細胞換液後並加入在不同濃度的細菌探針。
- (3) 經過 24 小時培養後，移除培養液並用滅菌的 PBS(pH 7.4) 清洗三次。另外在每個孔版中加入 20 微升的 CellTiter 96[®] Aqueous One Solution Reagent (Promega, USA) 和 100 微升的 DMEM 培養液再培養 4 小時。
- (4) 最後用 SpectraMax 340 Spectrophotometric plate Reader (Molecular Devices, USA) 來測量 MTS 反應的吸收度(波長設為 490 nm)。

(三)、評估細菌探針之檢測和量化微生物的能力

1. 細菌培養

- (1) 使用從 Caliper Life Science (Hopkinton, MA, USA) 買來的 *Staphylococcus aureus* (Xen43) 和 *Staphylococcus epidermidis* (Xen29, parental strain ATCC 12600) 做為微生物模型來探討細菌探針對細菌感染的檢測能力。這兩種菌株都有 luciferase 基因轉植且在 lucigenin 存在下能導致生物發光。在每個實驗之前，細菌將被培養在 Trypticase Soy Broth (Becton Dickinson and Company, Cockeysville, MD) 上 18 小時 (37°C)。之後利用滅菌的 PBS 洗滌三次後，使用 spectrophotometry 方法來計算細菌數目後利用結合 trypsinization 和 sonication 的方法來證實。¹¹

(2) 細菌探針的最佳濃度

首先，利用不同濃度的細菌探針來培養細菌(濃度為 1.6×10^8 cfu/毫升)。30 分鐘(足夠使探針與細菌結合的時間)後，利用滅菌的 PBS 洗滌三次(用以洗掉未結合的探針)。最後利用 Tecan Infinite M 200 光譜分析儀測量與細菌結合的螢光強度(發射波長為 730nm)。此實驗能用以測量出何為最佳的探針濃度。

2. 細菌探針在檢測和量化微生物的靈敏度

為了探討細菌探針對細菌偵測的靈敏度，我在 37°C 環境下培養不同數量的細菌 (1.6×10^8 , 0.8×10^8 , 0.4×10^8 , 0.2×10^8 cfu/毫升等) 30 分鐘。之後利用滅菌的 PBS 洗滌三次(用以洗掉未結合的探針)。最後利用 Tecan Infinite M

200 光譜分析儀測量與細菌結合的螢光強度(發射波長為 730nm)。利用此方法我們可以建立出螢光強度和細菌數目的關係曲線。

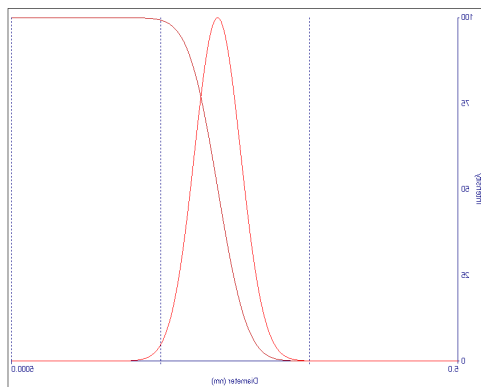
3. 細菌探針的專一性

我使用模擬損傷模型來探討細菌探針用於檢測傷口感染的可能性。本實驗利用金黃色葡萄球菌做為細菌模型，而成纖維細胞 (3T3 細胞) 做為對照組。不同數量的細菌或細胞(1.0×10^6 , 5×10^5 , 2.5×10^5 , 1.25×10^5 , 0.625×10^5 /毫升等) 分別與細菌探針或對照探針分別與成纖維細胞和金黃色葡萄球菌作用 30 分鐘後並用滅菌 PBS 洗滌三次(用以洗掉未結合的探針)。最後利用 Tecan Infinite M 200 光譜分析儀測量與細菌結合的螢光強度(發射波長為 730nm)。

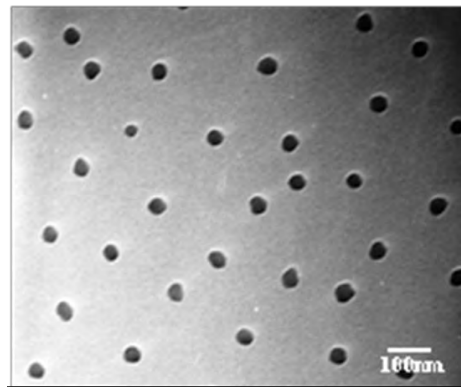
四、研究結果

1 影像探針的物理表徵

通過乳化聚合反應，合成了PNIPAM-co-ST微粒（MPS）。使用動態光散射法，我們測量出粒子的大小平均為 $204\pm 4\text{nm}$ （圖1）。其聚分散度為0.137，可以推知這些微粒子大小具有相當高的單分散性（圖1）。同時，通過透射電子顯微鏡（TEM）的圖像中可以看出PNIPAM-co-St MPs的形態呈現均勻球形（圖2）。由於微粒子在製備過程期間會有脫水現象，使微粒的直徑減小到約45 nm。



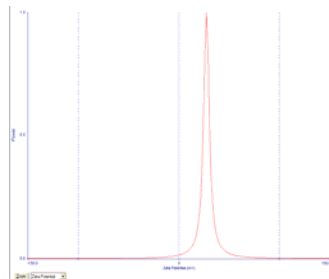
圖一 利用動態光散射儀測量微粒子的大小和分佈特性。微粒子的直徑大小為 $204\pm 4\text{nm}$ 且分散度為 0.137。



圖二 利用透視電子顯微鏡影像觀察P(NIPAM-co-St)的型態，顯示此微粒具有單分散性。

2 細菌探針的化學特性

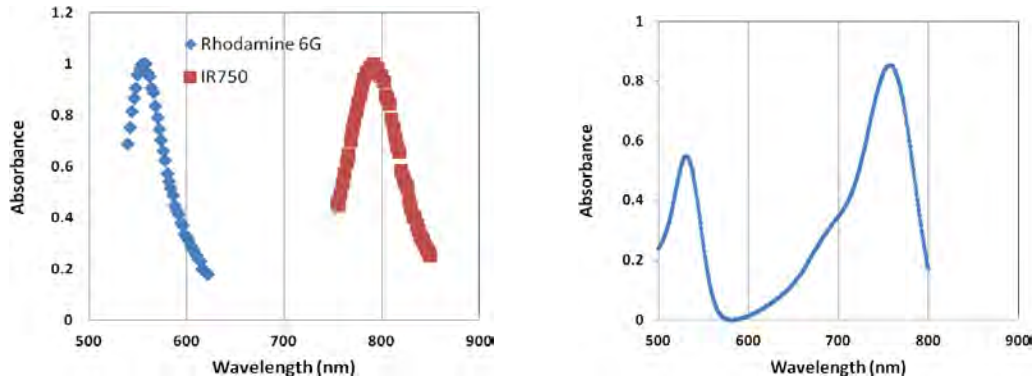
為了測量共軛的表面配體，我們加入N-(3-氨基丙基) 甲基丙烯酰胺溶液中於細菌探針溶液中。微粒子上的氨基(amino group, $-\text{NH}_2$)會造成粒子表面有帶正電的能力。為了評估這樣的特性，我們使用光子相關光譜法（ZetaPALS, Brookhaven儀器公司, Holtsville, 紐約州紐約州, 美國）測定該微粒的zeta 電位。Zeta分析結果顯示微粒的帶正電荷且平均表面電位為 $27.5\pm 1.2\text{mV}$ （圖3），此正電特性可能是來自於表面氨基。



圖三 利用光子相關譜法所測量微粒的zeta電位。Zeta分析結果顯示微粒的帶正電荷且平均表面電位為 $27.5\pm 1.2\text{mV}$ ，此正電特性可能是來自於表面氨基。

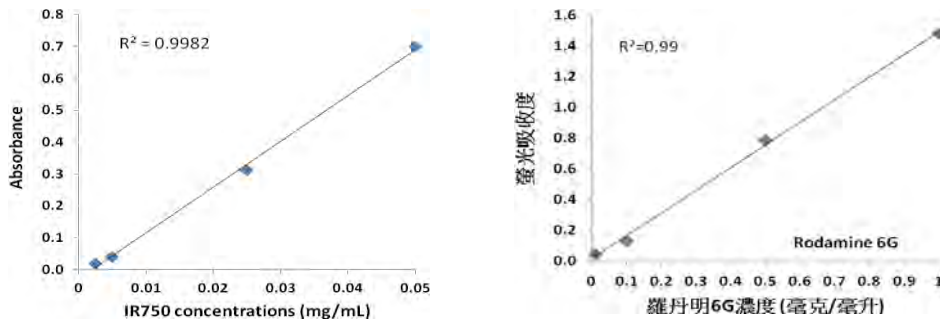
3. 細菌探針的光學特性

為了要檢測的細菌的存在和分佈，細菌探針攜帶了兩種不同的螢光染劑 - 羅丹明 6G 和 IR750。為了將染劑載入微粒，將微粒子放入同時含有螢光染劑的溶劑溶液中。在溶劑揮發後，部分螢光染劑會被載入至探針的內部。為了要確定的光學性能的探針，我們將進行了一系列的實驗來量測不同波長的螢光光譜。首先，通過測量兩個羅丹明 6G 和 IR750 的螢光光譜中，我們發現其相對應的發射峰值分別在 ~ 580 nm 及 ~ 800 nm；正如我們所預期，我們也發現了兩個相應的峰值有大約 30 nm 的藍移現象（圖 4）。



圖四 左圖為羅丹明 6G 和 IR750 的螢光發射光譜。右圖為微粒子的螢光發射光譜，兩個波峰值與上圖的羅丹明 6G 和 IR750 相近，此結果顯示此兩種染劑已經成功的載入微粒子中。

另外我們還測量了游離的染劑的裝載效率。在測量之前，首先我們必須建立了染劑濃度和紫外線吸光度之間的關係。如我們所預期，羅丹明 6G 濃度和紫外線吸光度之間有著高度的相關性，兩者間的線性方程式為 $y=1.4801x+0.0157$ ($R^2 = 0.99$)（圖 5）。此外，IR750 濃度和 UV 吸光度之間也有很好的線性關係，且兩者間的線性方程式為 $y=14.408x - 0.0303$ ($R^2 = 0.998$)（圖五）。基於這些曲線，我們能夠計算細菌探針中，羅丹明 6G 佔細菌探針的 3.1%，而 IR750 則佔 17.8%。



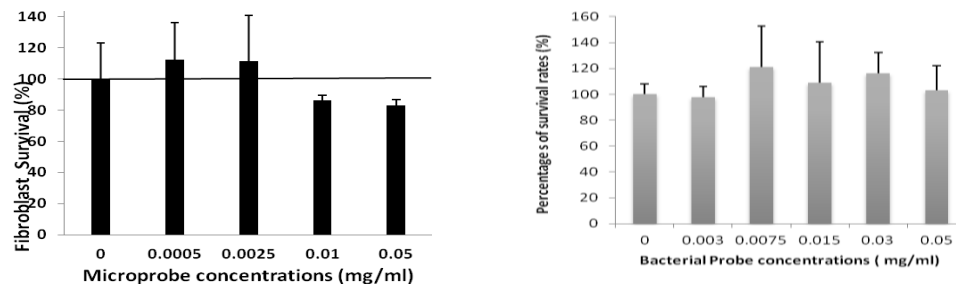
圖五 螢光染劑的濃度與 UV 吸收度間的關係。左圖為 IR750 染劑，右圖為羅丹明 6G。

4. 刀豆蛋白A的結合效率

我也測量每毫克細菌探針中共軛刀豆蛋白A的濃度。首先要決定游離FITC標記的成分和螢光強度之間的關係。因此，我測量在細菌探針中FITC標記的成分，經過計算，發現游離FITC標記成分的吸收強度是10 奈米莫耳的0.89，而1.0毫升細菌探針（1.0毫克/毫升時）的吸收強度為0.54。基於以上數據，我們可以計算出每毫克細菌探針的刀豆蛋白A密度約6奈米莫耳。

5. 探針的細胞毒性

為了確定此細菌探針對人體和細胞沒有毒性，我進行了以下的實驗來評估。我們使用的3T3成纖維細胞和巨噬細胞株RAW264.7來進行MTS 細胞毒殺活性測試（圖6）。首先將3T3成纖維細胞培養在具有不同的濃度細菌探針中24小時後測量活細胞的數目，然後再與未經處理的對照組相做比較，並計算出的細胞的存活百分比。我們發現細菌探針在濃度為0.0025毫克/毫升時與對照組在統計上並無顯著差異。但是在濃度為0.01和0.05毫克/毫升時，我們發現大約10-20%的細胞毒性。同樣的實驗也用在巨噬細胞株RAW264.7上，結果顯示儘管探針劑量高達0.05毫克/毫升也只有小於10%的細胞毒性。根據以上的結果，我們將利用此無毒劑量的細菌的探針（0.0025毫克/毫升）於以下的實驗。

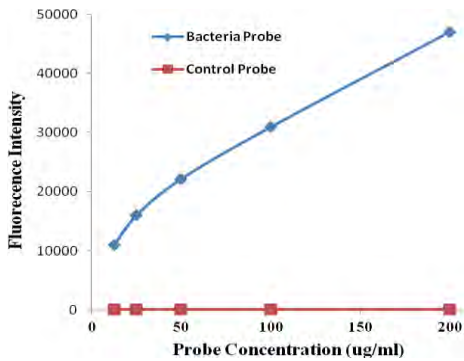


圖六 將 3T3 成纖維細胞(和巨噬細胞 Raw 264.7)培養在具有不同的濃度細菌探針中 24 小時後利用 MTS 細胞毒殺活性測試來測量活細胞的數目，然後再與未經處理的對照組相做比較計算出的細胞的存活百分比。

6. 細菌探針的親和性

首先，我們將評估此細菌探針是否可用來檢測金黃色葡萄球菌（Xen43）。將已培養的金黃色葡萄球菌（ 1.6×10^8 CFU/ml）與不同濃度的細菌探針和對照探針（探針上不帶刀豆蛋白A）作用 30 分鐘，之後用滅菌 PBS 洗滌 3 次。利用螢光酶標儀測量細菌的螢光信號，結果顯示細菌探針對細菌有很高的親和力，但是對照探針卻對細菌有很低或甚至沒有親和力。另外我們也同時發現探針濃度和螢光強度之間有很好的線性關係（圖

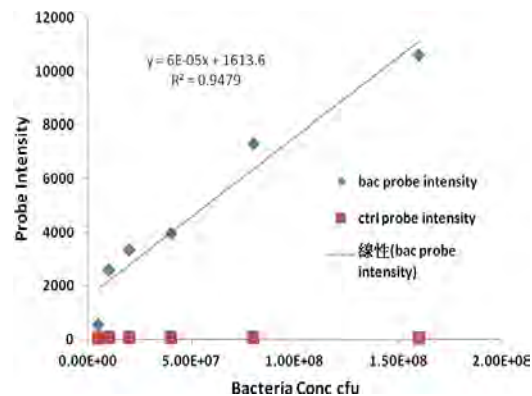
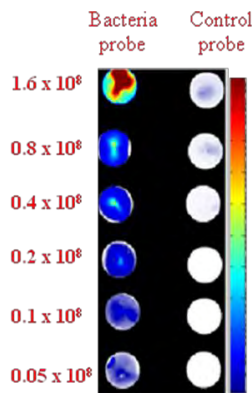
7)。綜合以上結果，在這項研究中所使用的探針並沒有造成細菌壁的結合位點上的飽和。在以下以下的實驗中，我將使用濃度 100 微克/毫升的細菌探針。



圖七 細菌探針(帶有刀豆蛋白 A 配體的微粒子)和對照探針(僅微粒子本身)對細菌親和性的 體外實驗。金黃葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, 1.6×10^8 CFU/毫升)與不同濃度的探針(12.5, 25, 50, 100, and 200 微克/毫升)作用 30 分鐘然後用滅菌 PBS 洗滌三次。利用 Tecan Infinite M 200 光譜分析儀測量探針與細菌間結合產生的螢光強度。

7. 利用細菌探針計算細菌的數量

引起疾病的微生物往往伴有大量的細菌感染。為了評估細菌感染的程度，定量細菌數目是不可或缺的。所以我的第一個目標是要評估的是細菌探針是否可用於測量活細菌的數目。為了實現這一目標，首先我先培養不同數量的金黃色葡萄球菌分別細菌探頭或對照探頭 (100 微克/毫升) 作用 30 分鐘，之後用滅菌 PBS 洗滌 3 次。將一些樣品置於載玻片上，然後在暗室中進行空氣乾燥。事實上，我們在細菌濃度最高的情況 (1.6×10^8 /ml) 觀察到最大的螢光信號。反之，細菌濃度較低時螢光強度較低 (圖 8 左)。此外，我同時發現細菌的數量和細菌探針的螢光強度之間有很好的線性關係 ($Y = 6 \times 10^{-5}x + 1613.6$, $R^2 = 0.947$) (圖 8 右)。



圖八 探討細菌探針對金黃葡萄球菌之特异性的體外研究。(左) 與細菌探針和對照探針作用後的螢光顯微鏡影像，(右)細菌數量和與細菌探針(或對照探針)作用後與細菌結合產生的螢光強度間的相關性。

8. 檢測細菌感染的模擬損傷模型

我們使用模擬損傷模型來探討細菌探針用於檢測傷口感染的可能性。本實驗利用金黃色葡萄球菌做為細菌模型，而成纖維細胞（3T3 細胞）做為對照組。細菌探針或對照探針分別與成纖維細胞和金黃色葡萄球菌作用 30 分鐘後並用滅菌 PBS 洗滌三次。我們利用螢光顯微鏡來評估細菌探針是否可用已檢測細菌。如我們所預期，發現有大量來自細菌探針的螢光信號黏附的細菌，但是對照探針組幾乎沒有螢光信號(圖 9)。另一方面，細菌探針和對照探針在成纖維細胞都只有微弱的螢光信號。整體來說，我們的新細菌探針可用於檢測在宿主細胞和傷口周圍的細菌。

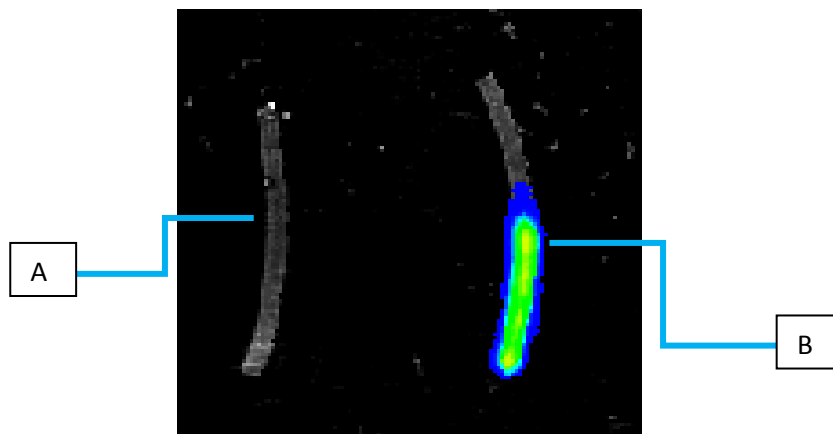


圖 9 在體外，對金黃色葡萄球菌的細菌探針的特異性。(A) 的螢光顯微鏡圖像的細菌培養與的細菌探針與控制探頭 (B) 細菌的數量和細菌的任一的細菌探針或控制探頭與吸附後，螢光強度的相關性。

五、結論

為了探討如何檢測細菌，本研究選擇利用螢光成像的技術，製作螢光染劑探針偵測細菌並同時標記位置。

這次的探針使用NIPAM基底，其優點是體積大，在表面上有較多配體，裏頭也含有較多的螢光染劑，因此敏感度較高。也因為NIPAM的體積大，所以對組織的穿透性小，只能停留在表面。另外在配體的選擇上，我們選用刀豆蛋白A的原因是因為它能和大部分的細菌結合。但其缺點為對不同細菌的親和力差異太大，未來我們可試著發展針對特定細菌的配體以便能更精確的檢測。我們也希望以後的研究能更進一步的快速檢測出細菌種類，將其發揮更大的效果。藉由計算出的細菌數目和螢光信號強度的正向關係圖，顯示兩者之間有高度的正相關。未來如果想進一步將此方法用於體內，我們可以試著利用體積較小的探針。

目前我們發展的細菌探針上裝載了兩種螢光染劑，其波段分別為可見螢光與近紅外光。螢光觀察簡單，檢測快速，但螢光卻不一定是由於細菌感染，也有少數是自體產生；紅外光則可免除這類的疑慮，相較可見螢光卻較難觀察。往後如果有機會，可以試著裝載更多種類的螢光劑，同時以特定螢光劑探測特定的細菌，能夠更具準確性。

此方法可望改善目前的臨床檢測方法。以此作為基礎，我們可以進一步應用在臨床檢測上，將會便於局部治療並降低醫療成本。除去繁瑣的樣本採集和送檢等步驟，有效的縮短檢測時間，更能掌握細菌的分布和數量，有助於更準確及時的醫療照顧。

六、討論

傷口所引起的細菌感染往往會導致嚴重的後果。這項研究的目的是找到一種非侵入性且即時的方法來檢測細菌，並可進一步得到定量的結果。整體來說，結果顯示我們已經可以成功構建新的細菌探針，且此探針對金黃色葡萄球菌等細菌具有高親和性。探針必須對細菌有專一性且同時避免跟宿主細胞結合。此細菌探針的製備必須建立在這兩種設計標準上。

在這個研究中，我決定使用刀豆蛋白 A 來當作細菌的靶向配體，是因其對大部分的細菌上的 α -D-甘露糖基及 α -D-葡糖基具有高的親和力。¹² 此外，刀豆蛋白 A 的成本相對低廉並且有很多種類的碳水化合物能對細菌細胞壁的革蘭氏陽性和革蘭氏陰性的細菌上的多醣體有特異性結合。⁶⁻⁹ 還有許多其他的配體(化合物)也已經被證明對細菌壁具有高的親和性 (affinity)。例如嗜酸性粒細胞陽離子蛋白已被證明對革蘭氏陽性和革蘭氏陰性菌株具有高的親合性。¹³ 此外，最近開發的細胞膜親和層析法也已被用來鑑定不同的微生物上新的胜肽。¹⁴ 在不久的將來這些新的胜肽(化合物)可能對不同的細菌菌株具有高的親合性。這些新的胜肽(化合物)可被做為細菌探針的配體然後使用影像的方法檢測不同微生物的感染。

微粒子往往與細胞會通過吞噬作用而產生相互作用 - 微粒的細胞攝取。為了減少探針吸收的細胞，細菌探針技術製備由 PNIPAM-CO-ST 微粒做為基底，研究證明此微粒有很好的胜物相容性。還應當注意的是，我們也可以使用其他生物相容性材料製造類似的探針，例如脫乙酰殼多醣，矽，金屬或合金製成的微粒。此外，該微探針有一個均勻的直徑為 ~ 200 nm，研究顯示這個尺寸的探針可以減少的細胞攝取。

在活體體內影像的部分，我使用不同的螢光染劑(包含羅丹明 6G 和 IR750)所標記的細菌探針。有趣的是，我發現經過微粒的包埋後，兩種染劑的波長都有紅移的現象。緊密相鄰片段的聚苯乙烯鏈可能減少兩個發光團(chromophores)的能量轉換。³ 利用聚苯乙烯包埋的發光團也有許多優點，因為聚苯乙烯的疏水性會降低發光團因水分發生降解的機會。因此，可以顯著的改進此種物理包埋的發光團之光穩定性。³

目前對於細菌感染的研究和其抗微生物治療的發展已被視為重要的課題。然而，幾乎所有的研究方法都依賴於傳統的細菌培養方法檢測細菌的存活，此方法相當的耗時。我相信本研究提供了新的方法，不但可觀察微生物的存在也同時提供這些入侵者的量化方法和其分佈。這些細菌探針還有許多有潛力的應用。細菌探針可開發成噴霧式應用到傷口的地方，幫助患者確定傷口是否有發生感染。這些細菌探針也可改成帶有放射性核苷酸，這類探針可以用來注射至病人體內，並幫助醫生識別患者在不同器

官的感染位置。該探針也可與生物晶片合用並可用於協助檢測臥床病人所引起感染的微生物的類型。

本研究以刀豆蛋白A (Con A) 修飾螢光奈米顆粒(Fluorescent Nanoparticle) 作為標記物，辨識出細菌表面的蛋白質受體，成功的得知細菌分布，在短時間內即可辨識出樣本有無細菌感染。

如預期，細菌探針的細菌具有高親和力。刀豆蛋白 A 的細胞壁有高親和力是早期觀察所支持的。此外，細菌探針可以結合不同的細菌。事實上，刀豆蛋白 A 已被證明對許多不同類型的細菌擁有高親和力（包括革蘭氏陽菌和革蘭氏陰菌）。應當指出，許多外源凝集素蛋白已被證明有很高的親和力細胞壁。換句話說，其他的外源凝集素蛋白可能被用來製造類似的細菌探針。此外，外源凝集素蛋白已發現對不同種細菌有不同的親和力。因此，製造可識別不同類型細菌的探針也是可行的研究方向。

同時，一些細胞，包括血管內皮細胞，可以結合凝集素。然而，大部分在傷口的細胞，包括成纖維細胞，免疫細胞，巨噬細胞，幾乎沒有凝集素受體。事實上，我們的細胞培養實驗發現，細菌探針可以識別細菌在細菌與細胞共同培養。

臨床上的細菌的量化方法往往使用細菌培養和計數，這樣的測試流程通常需要 2 天以上的時間。我們的研究結果證實利用影像探針可以用低於 30 分鐘的時間計算出細菌的數量。此外，體外實驗的結果也證明我們的影像探針可以用於檢測細菌數量以及細菌的分佈。細菌探針是個可能的方法用於觀察皮膚或醫療器械所引發的細菌感染。應當指出的設備為中心的感染是一個嚴重的疾病，並經常導致植入失敗。

總而言之，我相信此新開發的細菌探針將大大提高我們對細菌感染過程和因素的認識。此外，這種光學影像技術有可能實際應用於臨床上對各種感染的評估和檢測。

七、參考資料

1. Edwards R, Harding KG. Bacteria and wound healing. *Current opinion in infectious diseases* 2004;17:91-96.
2. Robson MC. Wound infection. A failure of wound healing caused by an imbalance of bacteria. *The Surgical clinics of North America* 1997;77:637-650.
3. Zhou J, Tsai YT, Weng H, et al. Real time monitoring of biomaterial-mediated inflammatory responses via macrophage-targeting NIR nanoprobes. *Biomaterials* 2011;32:9383-9390.
4. Zhou J, Tsai YT, Weng H, et al. Real-time detection of implant-associated neutrophil responses using a formyl peptide receptor-targeting NIR nanoprobe. *Int J Nanomedicine* 2012;7:2057-2068.
5. Zhou J, Tsai YT, Weng H, et al. Noninvasive assessment of localized inflammatory responses. *Free Radic Biol Med* 2012;52:218-226.
6. Somers WS, Tang J, Shaw GD, et al. Insights into the molecular basis of leukocyte tethering and rolling revealed by structures of P- and E-selectin bound to SLe(X) and PSGL-1. *Cell* 2000;103:467-479.
7. Blixt O, Han S, Liao L, et al. Sialoside analogue arrays for rapid identification of high affinity siglec ligands. *J Am Chem Soc* 2008;130:6680-6681.
8. Dam TK, Brewer CF. Thermodynamic studies of lectin-carbohydrate interactions by isothermal titration calorimetry. *Chemical reviews* 2002;102:387-429.
9. Komath SS, Kavitha M, Swamy MJ. Beyond carbohydrate binding: new directions in plant lectin research. *Organic & biomolecular chemistry* 2006;4:973-988.
10. Cai T, Hu PD, Sun M, et al. Novel thermogelling dispersions of polymer nanoparticles for controlled protein release. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine* 2012.
11. Su SH, Eaton JW, Venezia RA, et al. Interactions of vancomycin resistant enterococci with biomaterial surfaces. *ASAIO J* 1998;44:770-775.
12. Johnsen AR, Hausner M, Schnell A, et al. Evaluation of fluorescently labeled lectins for noninvasive localization of extracellular polymeric

- substances in *Sphingomonas* biofilms. *Appl Environ Microbiol* 2000;66:3487-3491.
13. Torrent M, Navarro S, Moussaoui M, et al. Eosinophil cationic protein high-affinity binding to bacteria-wall lipopolysaccharides and peptidoglycans. *Biochemistry* 2008;47:3544-3555.
 14. Xiao J, Zhang H, Niu L, et al. Efficient screening of a novel antimicrobial peptide from *Jatropha curcas* by cell membrane affinity chromatography. *J Agric Food Chem* 2011;59:1145-1151.

【評語】 040810

本研究可視為“生醫光電”主題一極佳的範例。作品係結合細菌標靶配體(刀豆蛋白 A)、聚合物載體(PNIPAM-CO-ST)和螢光染劑探針(RGG)，藉以即時檢測細菌感染。

作者對主題之選擇與技巧之掌握極佳，值得鼓勵。若能以醫院院內感染作為應用之範疇，當可發現更多有趣的結果。