

中華民國第 58 屆中小學科學展覽會
作品說明書

高級中等學校組 環境學科

第三名

052605

砷汙染終結者:中藥砷汙染的生物感測器與螯合器

學校名稱：國立臺灣師範大學附屬高級中學

作者： 高二 林奕廷 高二 葉蕙語 高二 朱聖平	指導老師： 陳建廷 蘇淑菁
---	-----------------------------

關鍵詞：砷汙染、生物感測器、生物螯合器

摘要

背景：政府以 ICP-MS 檢驗海關抽樣中藥材的砷汙染，耗資費時，民眾沒有工具可以預防砷中毒。**目的：**開發解決砷汙染的快篩和過濾工具。**方法：**利用合成生物學技術，將 *E. coli* 開發為：(1)產生螢光蛋白的 GFP 砷汙染感測器、(2)產生肉眼可見藍色沉澱的 LacZ'α 砷汙染感測器、(3)產生金屬硫蛋白(fMT metallothionein)的 fMT 砷螯合器。對 *E. coli* 進行功能測試實驗和系統生物等量性分析，並設計具生物安全性的快篩裝置。**結果：**GFP 和 LacZ'α 砷汙染感測器能在 5 和 15 小時內偵測 As(V)，前者能偵測岩精含砷，兩種感測器對鉛與銅離子沒有反應，具專一性。ICP-MS 測量出 fMT 砷螯合器在 As(V) 溶液五小時後的砷螯合量。快篩裝置用的洛神花有抑菌功能。**結論：**生物感測器可作為砷汙染的快篩器，生物螯合器可發展成過濾器。

壹、研究動機

● 砷汙染與砷中毒的健康危害

砷是有毒的致癌物質，分為有機砷與無機砷兩大類，無機砷分為不帶價砷(As)、三價砷(As_2O_3)及五價砷($NaAsO_3$)等三種形式。無機三價及五價砷化物是危害人體健康的主要砷物種，三價砷的毒性比五價砷大。砷廣泛分布於自然界，除了經岩石風化、火山爆發及被地下水溶解等自然因素外，砷汙染來源還包括砷和含砷金屬的開採和冶煉、用砷和砷化合物作原料的玻璃、顏料等生產，以及合金和半導體的製造工業。砷存在於空氣、水源和土壤裡，人類經由呼吸、皮膚接觸和飲用地下水或是進食被汙染植物，暴露於砷中毒的風險。高量的砷會導致肺水腫、呼吸衰竭、休克、急性腎衰竭(圖 1-1)，甚至死亡。慢性砷中毒則會導致神經病變、四肢壞死(烏腳病，見圖 1-2)和腎病變等疾病。



△圖 1-1 腎衰竭洗腎



△圖 1-2 烏腳病病肢

- **中藥砷污染的問題：使用進口藥材來自高度砷污染地區，暴露砷污染的健康風險**

在華人飲食和醫療所使用的中藥，也存在砷污染等問題(Ernst, 2002; Rao, KumarMeena, & Galib, 2011)。台灣因為地勢環境限制，九成以上的中藥從中國進口。而中國因豐富砷礦(袁秋英, 2009)(圖 1-3)及地質化學因素所造成的地下水砷污染(Rodríguez-Lado et al., 2013) (圖 1-4)，成為世界砷污染最為嚴重區域之一。除此之外，中藥(包含漢醫和藏醫)的藥材，除了植物、動物外，也包自然界的礦物。例如，岩精(又叫做渣馴)是最廣為人知的礦物類藏藥，含多種金屬礦石在一定的溫度和濕度作用下，產生溶解，從岩縫中流出，然後凝結而成固態礦物藥，含有金、銀、銅、鐵、鉛等金屬成分。

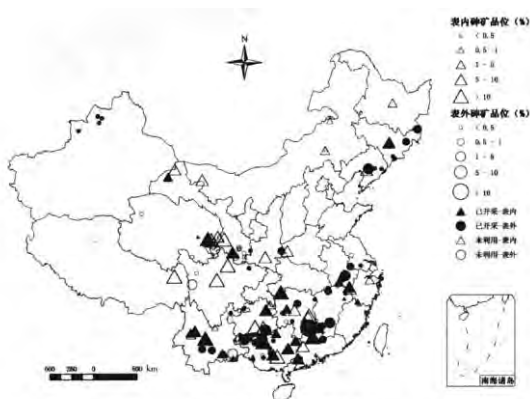


圖 2 我國砷礦資源的品位分布
Fig. 2 Distribution of grade of arsenic deposits in China

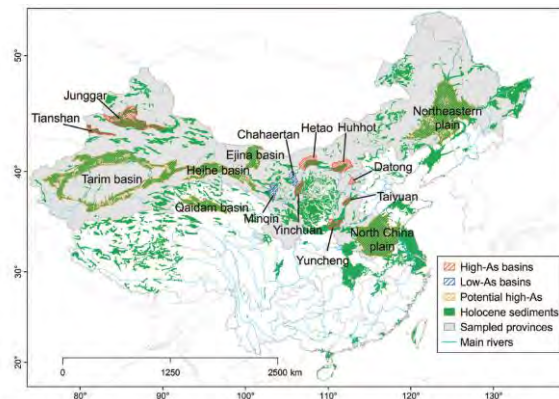


Fig. 1. Location of known and potential arsenic-affected basins in China. Areas with high levels of arsenic (As) are generally characterize Holocene sediments (green), where large basins may be affected.

△圖 1-3 中國砷礦分布(袁秋英, 2009) △圖 1-4 中國地下水砷污染(Rodríguez-Lado et al., 2013)

- **解決中藥砷污染的困境：高成本與低時效的技術，食安不具即時性、全面性、和持續性**

政府雖然針對砷、鉛、汞、鎘四種元素訂出管理辦法與檢驗標準，以結合液相層析法和感應耦合電漿質譜儀(HPLC-ICP-MS)檢測海關抽驗中藥樣品的砷污染。雖然具有靈敏度高、選擇性好、準確度高等優點，但設備昂貴，可近性低，實驗技術性高，過程費時（需要一週以上的等候時間），檢驗費用高（新台幣九千元/單樣），難以達到全面性、即時性和持續性的品質檢驗與監測。在使用者端，除了沒有快速的快篩器可以預警中毒風險，亦缺乏方便可進性高的工具，可以即時去除砷污染，無法預防砷中毒。

- **環保生物技術—生物感測器與螯合器：取經自然，開發技術**

科學家透過了解植物如何調控銅、鋅等生命必要之微量營養素，以及尋找對重金屬或污染物具有抗性或是分解能力的微生物，分析其細胞功能(Cobbett & Goldsbrough, 2002; Mergeay & Van Houdt, 2015; Sandhi, Landberg, & Greger, 2018)。運用生物技術改造微生物，

提高其分解污染物或螯合金屬的效能。1990 年 King 等人首次報導可檢測砷的發光菌株 (King et al., 1990)，以基因重組技術發展出反應靈敏與特異性的生物感測器，使生物感測器在環境污染的議題上，開始發揮功能，扮演重要的角色。

本研究的動機是以高一生物「基因轉殖技術及應用」的觀念，嘗試找出砷調控基因之啟動子，連接報告基因，發展成具砷特異性細胞感測器，並進一步設計具有生物安全性的快篩裝置。此外，從高中化學配位共價鍵的觀念，找出能螯合砷的蛋白，建制基因重組轉形的大腸桿菌，成為砷污染的生物螯合器。

貳、研究目的

解決中藥材的砷污染，需要能夠快速篩檢大量中藥材的快篩器，以及讓民眾有自主預防砷中毒的螯合器，因此我們的研究目的包含發展兩種生物感測器和一種生物螯合器。我們除了進行功能測試外，也測試生物感測器在偵測中藏藥材砷污染的成效。另外，我們對生物感測器和螯合器進行量性分析，並設計具有生物安全性的快篩器裝置。

- 一、 **GFP 砷污染感測器**：發展可偵測中藥砷污染的螢光感測器（稱 GFP 砷污染感測器）
 - 基因設計：結合對砷有獨特性的啟動子和螢光報告基因，成為砷污染感測的質體
 - 生長曲線：確認感測器能在砷酸溶液、中藥溶液和岩精中正常生長
 - 功能測試：分析感測器在砷酸溶液中能偵測砷，且螢光蛋白量與砷濃度相關
 - 專一性：檢測感測器在鉛與銅離子溶液中不會產生螢光蛋白，具有專一性
- 二、 **LacZ' α 砷污染感測器**：利用 LacZ 與 X-gal 產生藍色沉澱和 α 互補作用的原理，發展可以用肉眼觀測藍色沉澱的砷污染生物感測器（稱 LacZ' α 砷污染感測器）
 - 基因設計：結合砷獨特性的啟動子和 LacZ' α 基因，成為砷污染感測器的質體
 - 生長曲線：確認 LacZ' α 砷污染生物感測器能在砷酸溶液和中藥溶液中正常生長
 - 功能測試：分析 LacZ' α 砷污染感測器在砷酸溶液中能偵測砷，產生藍色沉澱。
 - 專一性：確認 LacZ' α 砷污染感測器對鉛、銅離子不會產生藍色沉澱，具專一性
- 三、 **fMT 砷螯合器**：發展生物螯合器產生蛋白，用來螯合環境中的砷(稱 fMT 砷螯合器)
 - 基因設計：結合一般啟動子和金屬硫蛋白基因，成為能產生金屬硫蛋白的質體。

- 生長曲線：確認 fMT 砷整合器在砷酸溶液中能正常生長。
- 功能測試：以 ICP-MS 確認 fMT 砷整合器整合砷量，分析整合時間和整合砷量。

四、**檢測中藥的砷汙染**：用 GFP 砷汙染感測器檢測中藥和藏藥岩精中的砷汙染

- 分析 GFP 砷汙染感測器在中藥、中藥中加砷及藏藥岩精的螢光反應。
- 以 ICP-MS 檢測岩精中的含砷量，定量分析岩精含砷量與 GFP 感測器螢光量。







五、**量性分析**：以量性分析估計勝任細胞在不同環境中的表現：

- 估計大腸桿菌勝任細胞的倍增時間
- 建立兩種砷汙染感測器和 fMT 砷整合器的系統生物模式，了解基因序列的機制








六、**快篩器裝置設計**：設計具有生物安全性的快篩感測器裝置

參、研究設備及器材









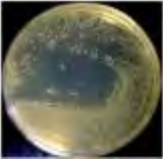
一、儀器設備

<p>Spectrophotometer</p> 	<p>Fluorescence Spectrophotometer</p> 	<p>Centrifuge</p> 
<p>Incubator</p> 	<p>乾水沐浴槽</p> 	<p>Agilent Technologies 7700 Series ICP-MS</p> 

二、器材

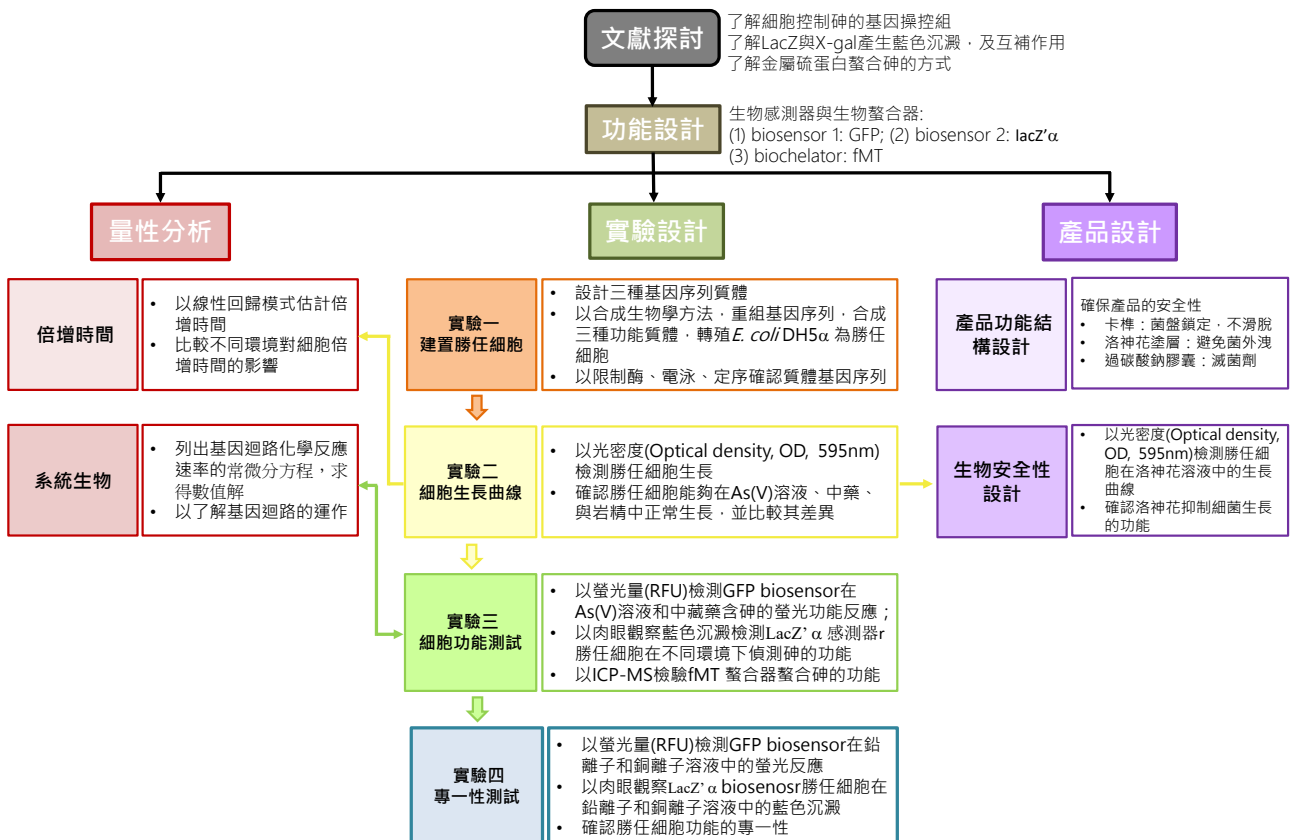
<p>Pipette</p> 	<p>Tip</p> 	<p>Centrifuge Tube</p> 	<p>Eppendorf</p> 
<p>酒精燈</p> 	<p>96 well plate</p> 	<p>培養皿</p> 	

三、藥品與材料

SOC Broth 	Chloramphenicol 	Lead nitrate 
Copper sulfate 	X-gal 	磷酸鈉 
iGEM Registry of Standard Biological Parts 	甘草、當歸等中草藥浸膏及岩精 	<i>E. coli</i> DH5 α 

肆、研究過程或方法

一、研究過程



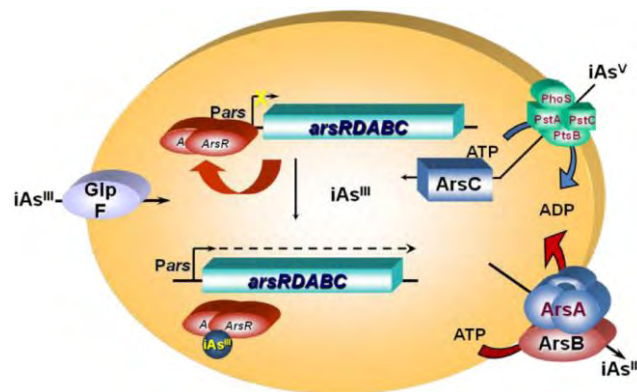
△圖 3-1 研究架構圖

文獻探討細胞調控砷的基因和機制，進行生物感測器與生物整合器的功能設計。針對勝任細胞進行四種實驗設計、量性分析與快篩裝置設計。四種實驗為建置勝任細胞(實驗一)，生長曲線(實驗二)、功能測試(實驗三)、專一性測試(實驗四)。量性分析估計倍增時間。以系統生物模式，了解基因迴路的功能表現。最後，設計具有生物安全性的快篩裝置(見圖 3-1)

二、 文獻探討: 生物抗砷機能與基因調控原理的探索

(一) 砷抗性操縱組(arsenic resistance operon):

大腸桿菌細胞膜上的水通道蛋白(aquaporin, AQP) GlpF 是 As(III)(亞砷酸, 化學式為 $\text{As}(\text{OH})_3$)進出的通道，而 As(V)(砷酸根離子; 化學式: AsO_4^{3-}) 則是透過磷酸鹽運輸蛋白(phosphate transporter)進入細胞內

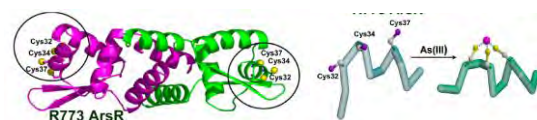


△圖 3-2 大腸桿菌砷的攝取與排出

細菌的砷抗性是靠砷抗性操縱組(*ars operon*)的砷抗性基因群(Mateos, Ordóñez, Letek, & Gil, 2006)，主要有 *arsR* 等基因(圖 3-3)。ArsR 是調節蛋白，當無 As(III)時，ArsR 抑制 *ars operon* 基因轉錄。當 As(III)與 ArsR 結合時，會使得 ArsR 結構改變，啟動 *ars operon* 的轉錄，經轉譯後產生 ArsA, ArsB, ArsC 等蛋白(見圖 3-4)。ArsA 是 ATP 水解酶蛋白，與 ArsB 結合，將 As(III)排出至細胞外。ArsC 是 As 還原酶，把 As(V) 還原成 As(III)(圖 3-4)。



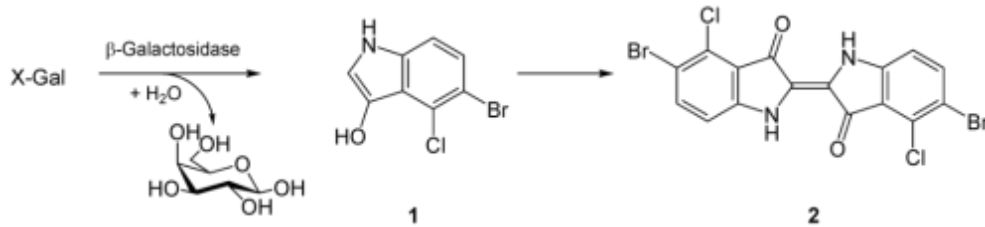
△圖 3-3 大腸桿菌砷抗性操縱組基因群



△圖 3-4 As(III)結合 ArsR 的結構改變(Shen, Li, Cullen, Weinfeld, & Le, 2013)

(二) lacZ、X-gal 和 α 互補作用:

乳糖操作組(Lac operon)的 lacZ 結構基因能產生 β -半乳糖苷酶。X-gal (5-溴-4-氯-3-吡啶基- β -D-吡喃半乳糖苷)，在有 β -半乳糖苷酶下裂解，產生半乳糖和 5-溴-4-氯-3-羥基吡啶，聚化並氧化成不溶性的深藍色產物(5,5'-二溴-4,4'-二氯靛藍(圖 3-5))。



△圖 3-5 X-gal 與 β -半乳糖苷酶的藍色沉澱反應

一般的基因工程菌(例如, *E. coli* DH5 α 等)有編碼 β -半乳糖苷酶的突變基因(lacZ)，缺少正常 N 段一個 146 個氨基酸的短肽(即 α 肽鏈)，不具生物活性。當菌體中植入 lacZ' α 的質體時，質體 lacZ' α 產生的 α 肽鏈和菌株基因組表達的 N 端缺陷的 β -半乳糖苷酶突變體互補，具有與完整 β -半乳糖苷酶相同的作用，與 X-gal 反應生成藍色物質，這種現象即 α -互補。

(三) 螯合金屬的金屬硫蛋白(metallothionein):

螯合是一種金屬離子與陰離子或分子特定的結合方式，單一中心原子與多牙配位基之間形成至少兩個以上的多重配位共價鍵。金屬硫蛋白(Metallothionein)，其分子量大約 6000-7000，由 α 和 β 兩部分組成(Yang & Chu, 2011)(圖 3-6 左圖)，含有多種胺基酸，例如:半胱氨酸(Cysteine)等，其具有 -SH 基能與金屬反應產生鍵結(圖 3-6 右圖的黃色鍵)。可螯合有毒金屬的離子有汞、銀、鉛、砷等。



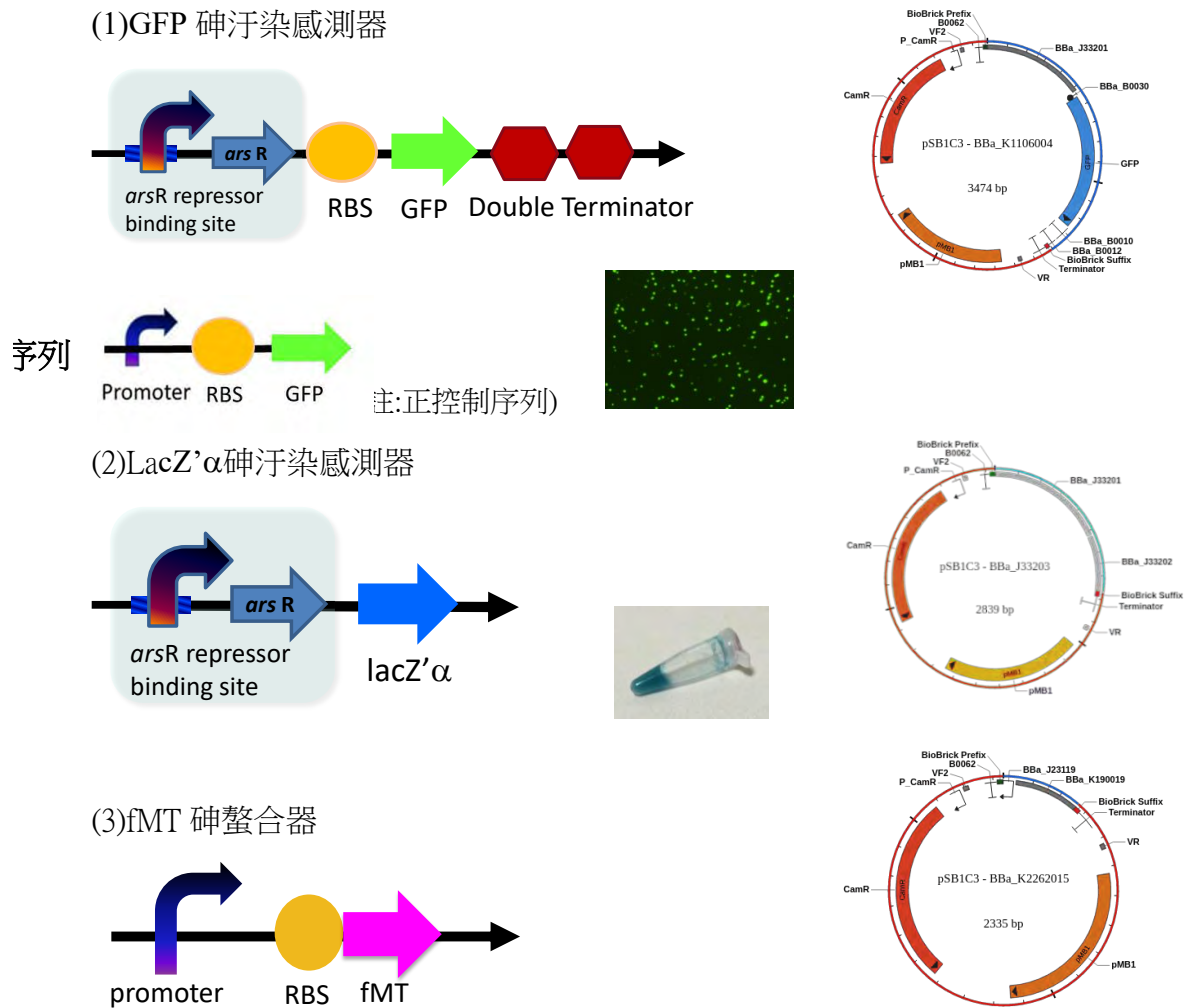
△圖 3-6 金屬硫蛋白的結構

三、 實驗設計

(一) 實驗一：建置勝任細胞

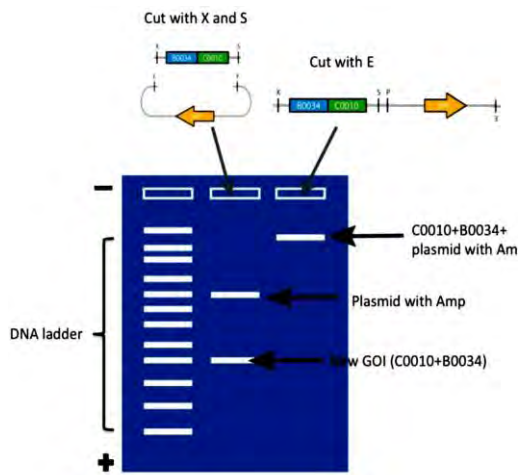
1. 基因設計: 設計三種基因迴路如下(圖 3-7)

- (1). GFP 砷汙染感測器：選取 *E. coli* R773 Plasmid *ars* operon 的砷啟動子，後接螢光蛋白(GFP)。當 As(III)與 ArsR 結合，啟動基因轉錄，產生螢光蛋白。
- (2). LacZ' α 砷汙染感測器：砷啟動子後接 lacZ' α 。當 As(III)與 ArsR 結合，啟動基因轉錄，產生 LacZ' α 胜肽。
- (3). fMT 砷螯合器：用墨角藻(*Fucus vesiculosus*)金屬硫蛋白基因序列(MORRIS, NICOLAUS, SAMPSON, HARWOOD, & KILLE, 1999)，結合一般啟動子。



△圖 3-7 基因序列設計與質體

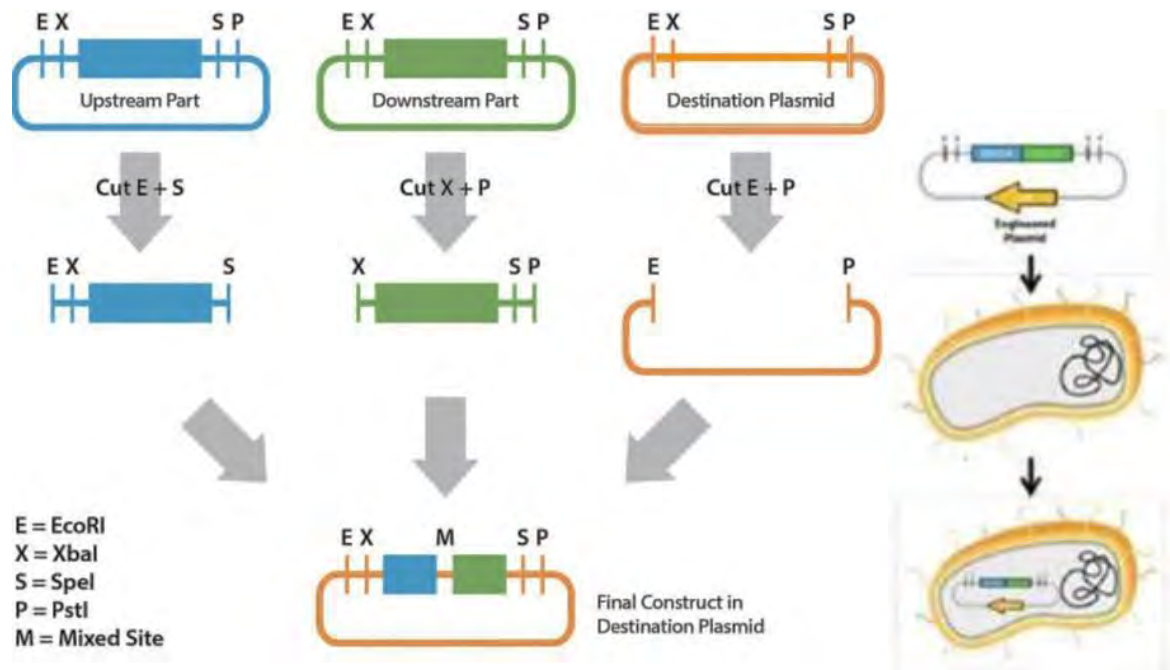
2. 合成生物學方法: 使用國際基因工程機械基金會(The International Genetically Engineered Machine, iGEM)的合成生物序列資料庫(biobricks)。



△圖 3-8 限制酶切割質體與電泳

- 質體限制酶: iGEM 的 biobrick 均標準化，前後各接有 EcoRI、XbaI、SpeI 和 PstI 限制酶序列。
- 基因序列確認: 用限制酶切割質體的目標基因，電泳或定序方法進行目標基因確認(圖 3-8) (見附錄一)

- 列合成(ligation)與質體轉殖: 實驗步驟(詳見附錄一)，pSB1C3 為質體骨架 (backbone)，*E. coli* DH5 α 為轉殖重組質體的菌株(圖 3-9)。



△圖 3-9 限制酶切割質體、序列合成及轉殖

(二) 實驗二：細胞生長曲線

三種勝任細胞在砷酸、中藥與藏藥岩精溶液中的生長曲線的實驗設計

1. 測量不同 As(V)濃度對三種大腸桿菌生長的影響

測量：勝任細胞的光密度(Optical Density, OD吸光度)

- 實驗溶液配方: 30 mL (每個配方做三次(3重覆))

材料	SOC	<i>E. coli</i>	As(V)	氯黴素
----	-----	----------------	-------	-----

加入量	29.1 mL	600 μ L	300 μ L	30 μ L
實驗組	v	v	1 ppm, 10 ppm, 30 ppm, 50 ppm, 100 ppm	V
控制組	v	v	無	V

- 溫度: 37°C ; 時間: 8小時, 每30分鐘一次
- 測量: 以spectrophotometer測量其OD值 (595 nm)

2. 測量不同中藥對兩種生物感測器生長的影響

測量: 勝任細胞的光密度(Optical Density, OD吸光度)

- 實驗組中藥: 甘草、薄荷、加味逍遙散、當歸各10 μ g/mL濃度
- 實驗溶液配方: 30 mL (3重覆)

材料	SOC	<i>E. coli</i>	中藥	氯黴素
加入量	29.1 mL	600 μ L	300 μ L	30 μ L
實驗組	v	v	10 μ g/mL	V
控制組	v	v	無	V

- 溫度: 37°C ; 時間: 8小時, 每30分鐘一次
- 測量: 以spectrophotometer測量其OD值 (595 nm)

3. 測量不同岩精濃度對 GFP 砷汙染生物感測器生長的影響

測量: 勝任細胞的光密度(Optical Density, OD吸光度)

- 實驗溶液配方: 30 mL (每個配方做三次(3重覆))

材料	SOC	<i>E. coli</i>	岩精	氯黴素
加入量	29.1 mL	600 μ L	300 μ L	30 μ L
實驗組	v	v	1 μ g/mL, 3 μ g/mL, 10 μ g/mL, 30 μ g/mL	V
控制組	v	v	無	V

- 溫度: 37°C ; 時間: 8小時, 每30分鐘一次
- 測量: 以spectrophotometer測量其OD值 (595 nm)

生長曲線測光密度實驗步驟(詳見附錄一)

(三) 實驗三: 細胞功能測試

1. GFP 砷汙染感測器在 As(V)與中藥中的螢光功能反應

(1). 不同 As(V)濃度對 GFP 砷汙染感測器螢光蛋白量的影響

測量: 螢光蛋白的螢光量

- 實驗溶液配方: 30 mL (3重覆)

材料	SOC	<i>E. coli</i>	GFP 表達	As(V)	氯黴素
加入量	29.1 mL	600 μ L		300 μ L	30 μ L
實驗組	v	Ars promoter+GFP	調控	1,10, 30, 50, 100 ppm	v

正控制組	v	Constitutive promoter +GFP	持續	0 ppm	v
負控制組	v	Ars promoter+GFP	不表達	0 ppm	v
<ul style="list-style-type: none"> 溫度: 37°C ; 時間: 8小時, 每30分鐘一次 測量: 以螢光光譜儀測螢光強度 					
(2). 測量不同種中藥/濃度對 GFP 砷汙染感測器螢光蛋白量的影響					
測量: 螢光蛋白的螢光量					
<ul style="list-style-type: none"> 實驗組: 中藥 (黃芩、當歸、白芍和加味逍遙散等等) 實驗溶液配方: 5ml (3重覆) 					
材料	SOC	<i>E. coli</i>	GFP	溶液	氯黴素
加入量	4850 μ L	100 μ L		50 μ L	5 μ L
實驗組 (中藥)	v	Ars promoter+GFP	調控	0.1, 0.3, 1, 3, 10 μ g/mL	v
比較組 [As(V)]	v	Ars promoter+GFP	調控	1, 10 ppm	v
正控制組	v	Constitutive promoter +GFP	持續	0 ppm	v
負控制組	v	Ars promoter+GFP	不表達	0 ppm	v
<ul style="list-style-type: none"> 溫度: 37°C ; 時間: 6小時, 從第4小時開始測量, 每小時測一次 測量: 以螢光光譜儀測螢光強度 					
(3). 不同岩精濃度對 GFP 砷汙染感測器螢光蛋白量的影響					
測量: 螢光蛋白的螢光量					
<ul style="list-style-type: none"> 實驗組: 岩精溶液 (溶於水; 溶於鹽酸) 實驗溶液配方: 5ml (3重覆) 					
材料	SOC	<i>E. coli</i>	GFP 表達	溶液	氯黴素
加入量	4850 μ L	100 μ L		50 μ L	5 μ L
實驗組 (岩精)	v	Ars promoter+GFP	調控	10, 30, 100, 300 μ g/mL	v
比較組 [As(V)]	v	Ars promoter+GFP	調控	1, 10 ppm	v
正控制組	v	Constitutive promoter +GFP	持續	0 ppm	v
負控制組	v	Ars promoter+GFP	不表達	0 ppm	v
<ul style="list-style-type: none"> 溫度: 37°C ; 時間: 6小時, 從第4小時開始測量, 每小時測一次 測量: 以螢光光譜儀測螢光強度; 以ICP-MS測岩精砷含量 					
(4). 中藥加砷對 GFP 砷汙染感測器螢光蛋白量的影響					
測量: 螢光蛋白的螢光量					
<ul style="list-style-type: none"> 實驗組: 中藥 3 μg/mL (加味逍遙散、當歸、薄荷、甘草) 加As(V) 實驗溶液配方: 5ml (每配方進行三重覆) 					
材料	SOC	<i>E. coli</i>	GFP 表達	As(V)	氯黴素
加入量	4850 μ L	100 μ L		50 μ L	5 μ L
實驗組	v	Ars promoter+GFP	調控	1 ppm 10 ppm 100 ppm	v
正控制組	v	Constitutive promoter +GFP	持續	0 ppm	v

負控制組	v	Ars promoter+GFP	不表達	0 ppm	v
------	---	------------------	-----	-------	---

• 溫度: 37°C ; 時間: 6-7小時, 每30分鐘 ; 測量: 以螢光光譜儀測螢光強度

實驗步驟(詳見附錄一)

2. LacZ'α砷汙染感測器在 As(V)和 X-gal 中產生藍色沉澱的功能測試

(1). As(V)濃度對 LacZ' α砷汙染感測器在 X-gal 中產生藍色沉澱的影響
測量藍色沉澱(肉眼觀察)

• 實驗溶液配方: (三重複)

材料	X-gal	<i>E. coli</i> +LB	藍色	As(V)	氯黴素
加入量	40 μL	40 μL+1900 μL=1940 μL		20 μL	2 μL
實驗組	v	Ars promoter +lacZ' α	調控	10, 50, 100 ppm	v
負控制組1	v	Ars promoter +lacZ' α	不表達	0 ppm	v
負控制組2		Ars promoter +lacZ' α	不表達	100 ppm	v

• 溫度: 37°C ; 時間: 15小時

實驗步驟(詳見附錄一)

3. fMT 砷螯合器: 在砷酸溶液中螯合砷的功能測試

(2). 不同反應時間對 fMT 砷螯合器螯合 As(V)量的影響
測量: fMT砷螯合器在As(V)溶液中細胞內的砷螯合量

• 實驗溶液配方: 30ml (每個配方進行3重覆)

材料	SOC	<i>E. coli</i>	As(V)溶液	氯黴素
加入量	29.1mL	600μl	300ul	30μl
實驗組1 (4 hr.)	v	Constitutive promoter+fMT	20 ppm	v
實驗組2 (5 hr.)	v	Constitutive promoter+fMT	20 ppm	v
實驗組3 (6 hr.)	v	Constitutive promoter+fMT	20 ppm	v
負控制組(6 hr.)	v	Constitutive promoter+fMT	0 ppm	v
基礎控制組(6 hr.)	v	Constitutive promoter+GFP	20 ppm	v

• 溫度: 37°C ; 時間: 6小時 ; 測量: ICP-MS(單位: ppb)

fMT 砷螯合器功能測試實驗步驟(詳見附錄一)

(四) 實驗四: 專一性測試

測試 GFP 砷汙染感測器和 LacZ'α砷汙染感測器對鉛和銅離子是否會產生反應

1. 銅離子和鉛離子對 GFP 砷汙染感測器產生螢光蛋白的影響

測量發光蛋白的發光量

- 實驗溶液配方: 30 mL (3重覆)

材料	SOC	<i>E. coli</i>	GFP 表達	溶液	氯黴素
加入量	29.1 mL	600 μ L		300 μ L	30 μ L
實驗組Cu ²⁺	v	Ars promoter+GFP	調控	1, 10, 100 ppm	v
實驗組Pb ²⁺	v	Ars promoter+GFP	調控	1, 10, 100 ppm	v
比較組As(V)	v	Ars promoter+GFP	調控	1,10, 100 ppm	v
正控制組	v	Constitutive promoter +GFP	持續	0 ppm	v
負控制組	v	Ars promoter+GFP	不表達	0 ppm	v

- 溫度: 37°C ; 時間: 4小時 ; 測量: 以螢光光譜儀測螢光強度 (RFU)

2. 銅離子和鉛離子對 LacZ' α 砷汙染感測器在 X-gal 中產生藍色沉澱的影響

測量: 藍色沉澱 (肉眼觀察)

- 實驗溶液配方: 30 mL (3重覆)

材料	X-gal	<i>E. coli</i>	藍色	溶液	氯黴素
加入量		200 μ L		100 μ L	10 μ L
實驗組Cu ²⁺	v	Ars promoter +lacZ' α	調控	10 ppm	v
實驗組Pb ²⁺	v	Ars promoter +lacZ' α	調控	10 ppm	v
比較組As(V)	v	Ars promoter +lacZ' α	調控	10 ppm	v
正控制組	v	Constit. promoter +lacZ' α	持續	0 ppm	v
負控制組	v	Ars promoter +lacZ' α	不表達	0 ppm	v

- 溫度: 37°C ; 時間: 15小時

(專一性螢光反應和藍色沉澱的實驗步驟與細胞功能測試相同)

四、量性分析

- (一) 倍增時間(Doubling time): 將每個時間點 OD 值(N_t)除以起始時間點的 OD(N_0), 取對數(\log_2)。在截距為零的限制下, 以 STATA 統計軟體估計 $\log_2(N_t/N_0)$ 與時間線性回歸的斜率(b), 其倒數就是倍增時間。

$$N_t = N_0 \times 2^{t/DT}$$

$$\log_2 \frac{N_t}{N_0} = y = \frac{t}{DT}$$

DT: doubling time (倍增時間)
 N_t : t 時間點菌量
 N_0 : 起始菌量

- (二) 系統生物模式: 建立三種勝任細胞對 As(III)的系統生物模式, 瞭解基因迴路的運作(Chandran, Copeland, Sleight, & Sauro, 2008), 過程包含四個步驟(參見附錄二)。(一)為畫出基因迴路, (二)為列出其基因表達與化學的反應式, (三)列出所有反應速率的常微分方程(ordinary differential equations)。基因表達是以

Michaelis-Menten equation；其他反應則是以 Mass-Action Kinetics，根據文獻給予起始值和參數值，參數值的時間單位為秒(second-1, nMol-1×second-1 and nMol-2×second-1)。假設菌內 As(III)濃度達到平衡為恆定常數，簡化估計模式。(四)用 R 軟體 deSolve 模組的預設方法(LSODA)，得到微分方程式的數值解 (Soetaert, Petzoldt, & Setzer, 2010)，繪製其圖。(詳見附錄二)

五、快篩器裝置設計

1. 實驗設計:洛神花對大腸桿菌的生長曲線影響

(1) LacZ'α砷汙染感測器勝任細胞在洛神花的生存曲線

測量：勝任細胞的光密度(Optical Density, OD吸光度)

- 實驗溶液配方: 5 mL (每個配方做三次)

材料	SOC	<i>E. coli</i>	中藥/ddH ₂ O	氯黴素
加入量	4850 μL	100 μL	50 μL	5 μL
實驗組	v	v	洛神花 50 μg/mL	V
控制組	v	v	ddH ₂ O	V

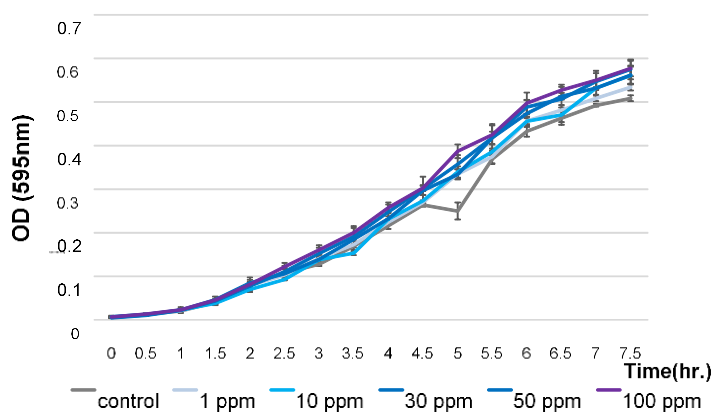
- 溫度: 37°C
- 時間: 2.5小時，每30分鐘
- 測量: 以分光光度計測量其OD值

伍、研究結果與分析

一、GFP 砷汙染感測器

(一) GFP 砷汙染感測器大腸桿菌的成長曲線

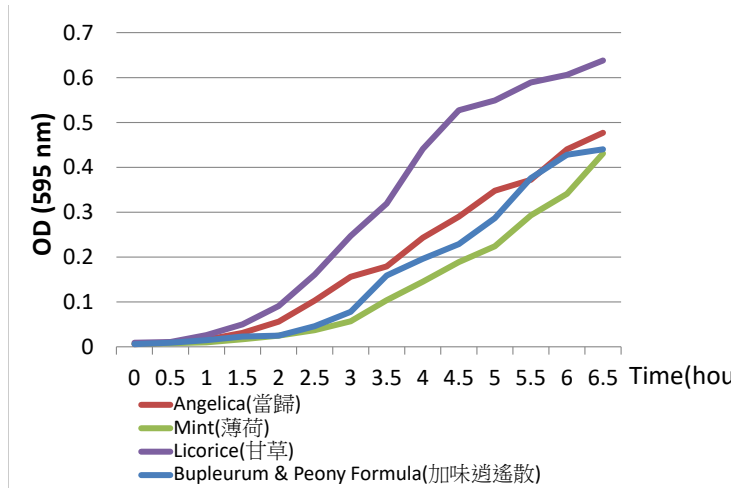
1. 在不同砷酸濃度溶液中的生長曲線(in SOC)



不同 As(V)濃度下，GFP 感測器大腸桿菌生長曲線非常相近，表示其生長不受砷酸濃度影響。約在 7 小時候就開始進入穩定期 (stationary phase)

△圖 5-1 GFP 感測器在不同砷酸濃度溶液中的生長曲線

2. 在中藥溶液中的生長曲線(in SOC)



GFP 感測器大腸桿菌可以在不同的中藥中正常生長，生長的速度不一樣，在甘草中的生長較快。

△圖 5-2 GFP 感測器在四種中藥中的生長曲線

3. 在岩精中的生長曲線(in LB)

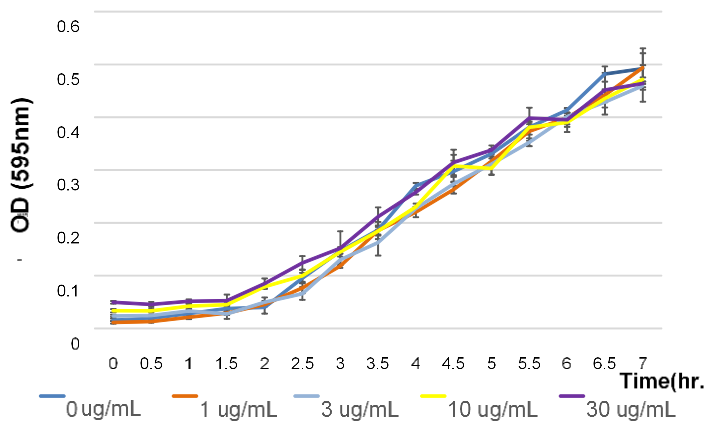
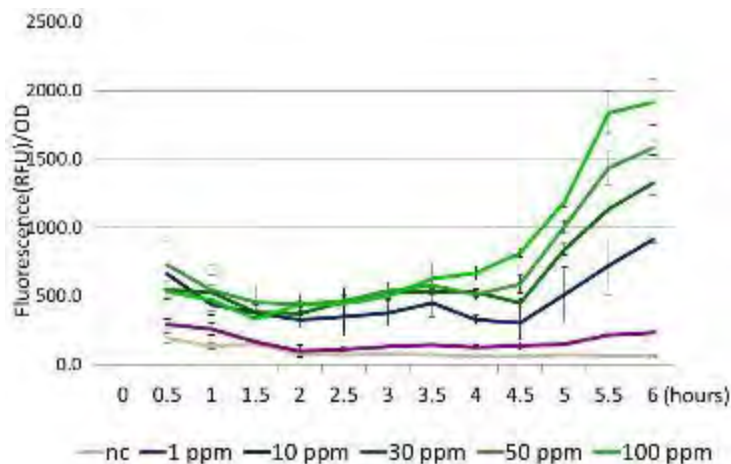


圖 5-3 顯示，GFP 感測器大腸桿菌在不同岩精濃度的還經中，仍可以正常的生長，而且生長曲線非常相近，表示 GFP 感測器大腸桿菌的生長並不會受到岩精濃度的影響。

△圖 5-3 GFP 感測器在岩精中的生長曲線

(二) GFP 砷污染感測器螢光功能測試

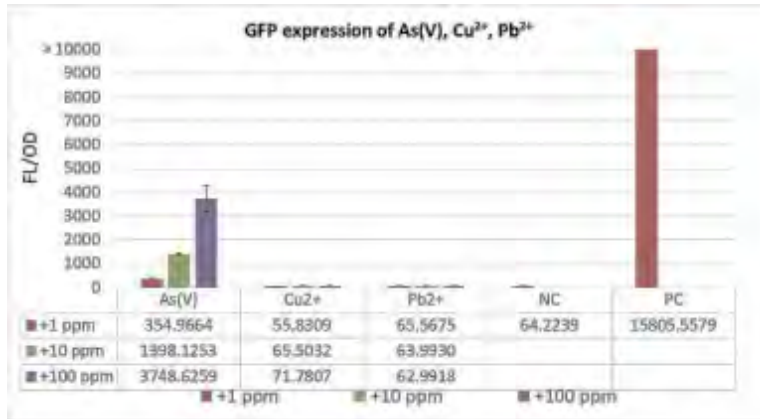
1. 大腸桿菌在不同 As(V)濃度溶液中的螢光(in SOC)



在 4.5 個小時之後(圖 5-4)，單位細胞的螢光量逐漸增加，在愈高 As(V) 濃度下，單位細胞的螢光密度也愈高。

△圖 5-4 GFP 感測器在不同 As(V)濃度的螢光密度值

(三) GFP 螢光感測器專一性測試 (in SOC)

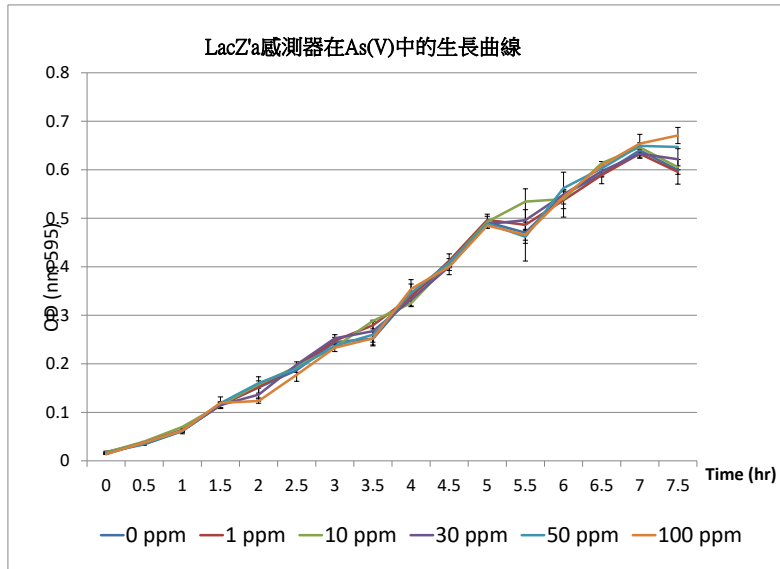


只有在有 As(V)的環境中產生螢光，表示 GFP 感測器功能不會受到銅或鉛金屬離子影響。
 Δ圖 5-5 GFP 感測器在不同 As(V)濃度、鉛離子和銅離子溶液螢光密度

二、 LacZ'α 砷污染感測器

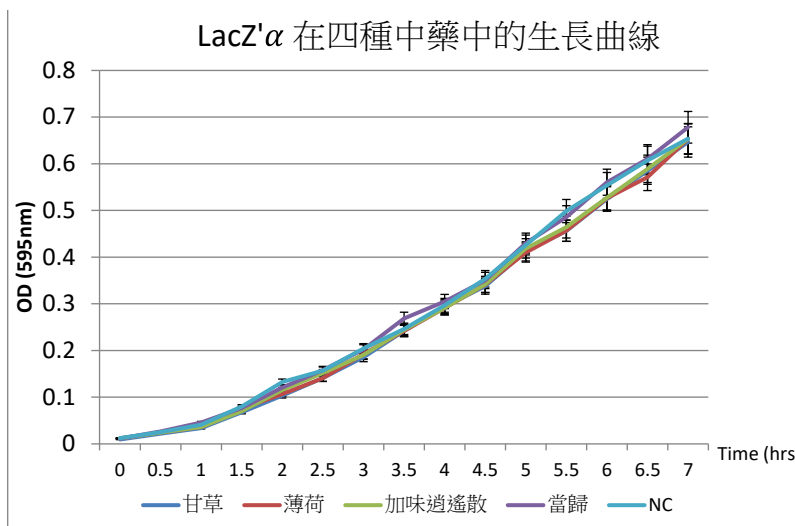
(一) LacZ'α 砷污染感測器大腸桿菌的成長曲線

1. LacZ'α 感測器在 As(V) 溶液的成長曲線



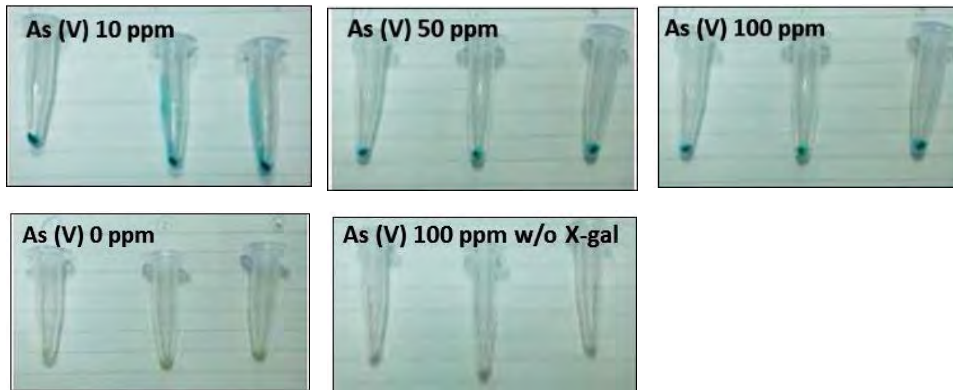
LacZ'α 感測器大腸桿菌在不同 As(V)濃度的環境中的生長曲線是相當接近的(圖 5-6)，表示 LacZ'α 感測器的生長不會受到 As(V)濃度的影響。
 Δ圖 5-6 LacZ'α 感測器在不同砷濃度溶液的生長曲線

2. LacZ'α 感測器在中藥溶液的成長曲線



LacZ'α 感測器在四種中藥中的生長曲線(圖 5-7)相當接近，表示 LacZ'α 感測器的生長不受這些中藥影響。
 Δ圖 5-7 LacZ'α 感測器在不同中藥中的生長曲線

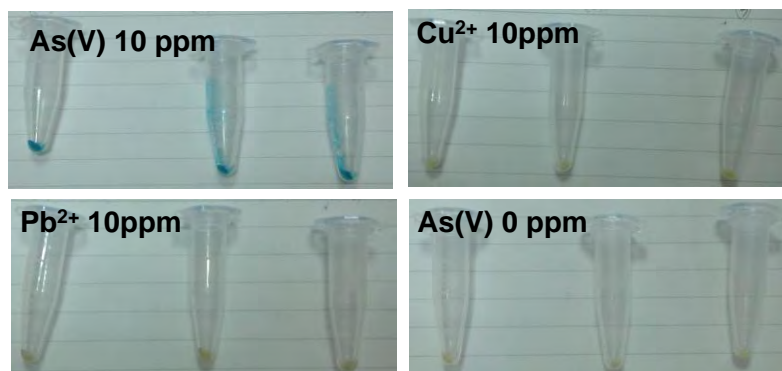
(二) LacZ'α砷污染感測器的藍色沉澱功能



△圖 5-8 LacZ'α感測器在不同 As(V)濃度的藍色沉澱

將 LacZ'α砷污染感測器加入 As(V)溶液和 X-gal 中，15 個小時後，清楚看到藍色沉澱(圖 5-8)。LacZ'α砷污染感測器在無砷或是無 X-gal 中，均無藍色沉澱。

(三) LacZ'α砷污染感測器的藍色沉澱專一性測試

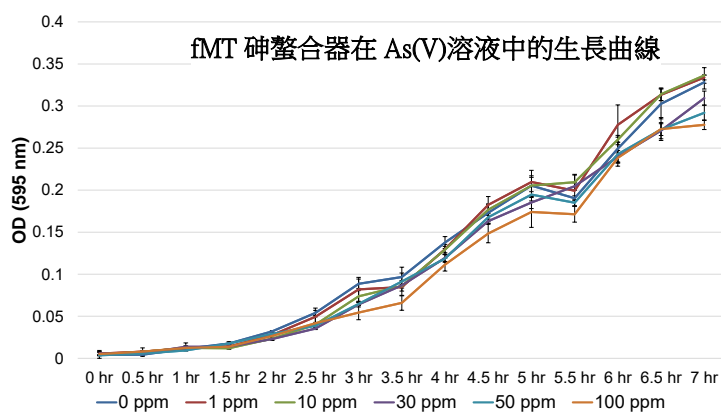


△圖 5-9 LacZ'α感測器在不同金屬離子中的藍色沉澱

LacZ'α砷污染感測器在 10 ppm 的鉛離子和銅離子溶液中(圖 5-9)，皆不會呈現藍色沉澱，顯示 LacZ'α感測器不會對該兩種金屬離子有反應。

三、 fMT 砷螯合器

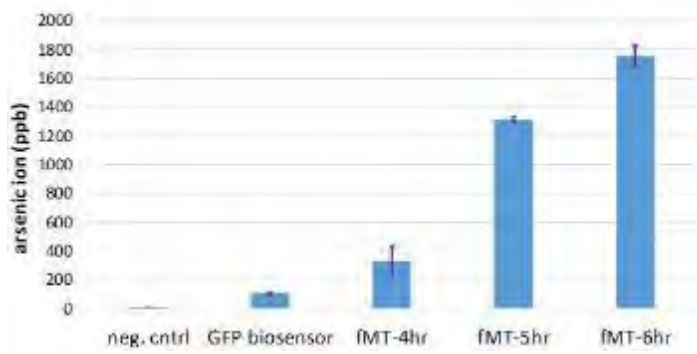
(一) fMT 砷螯合器大腸桿菌在 As(V)溶液的成長曲線



在不同 As(V)濃度的中，fMT 砷螯合器生長曲線相當接近，表示 fMT 砷螯合器大腸桿菌的生長不會受到 As(V)的影響。(圖 5-10)

△圖 5-10 fMT 砷螯合器在 As(V)溶液中的生長曲線

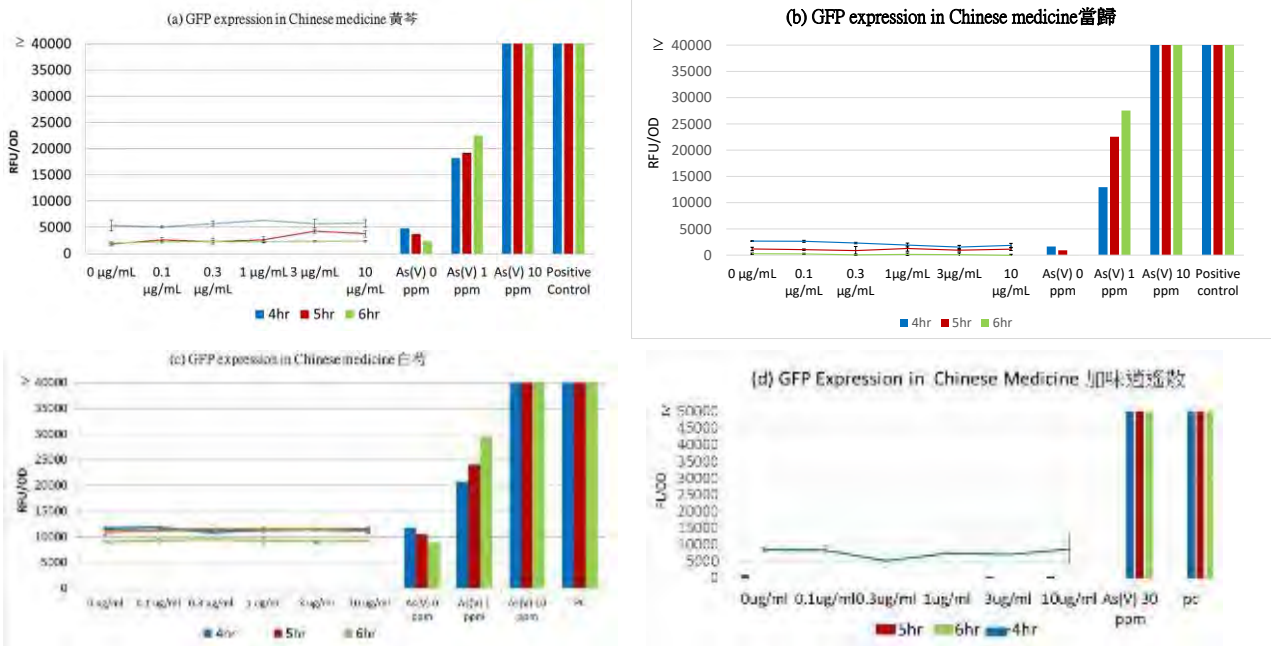
(二) fMT 砷螯合器大腸桿菌在 As(V)溶液的螯合砷量



fMT 砷螯合器與 As(V)溶液反應 4 小時之後，以 ICP-MS 進行檢測，大腸桿菌中螯合砷量隨著時間延長而增加。

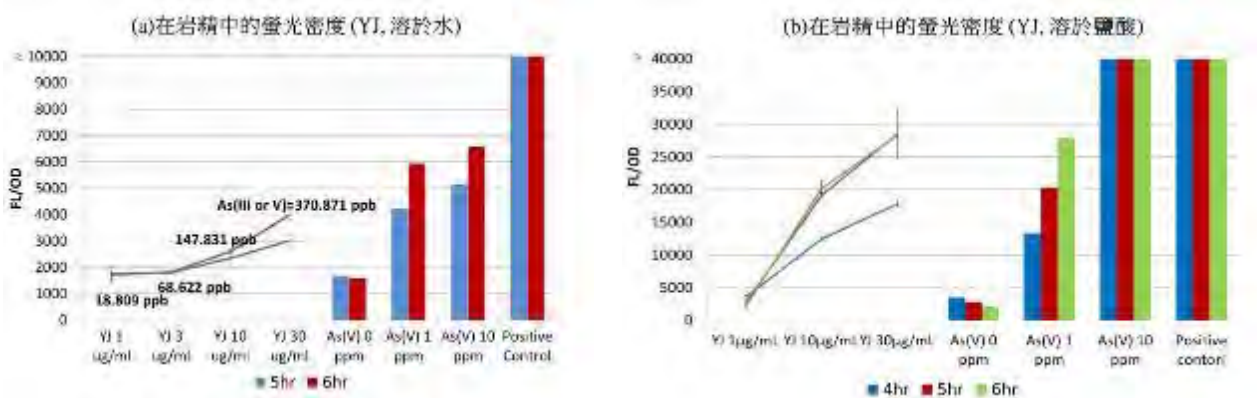
△圖 5-11 fMT 砷螯合器在 20 ppm As(V)溶液中的砷螯合量

四、 GFP 砷污染感測器檢測中藏藥的砷污染



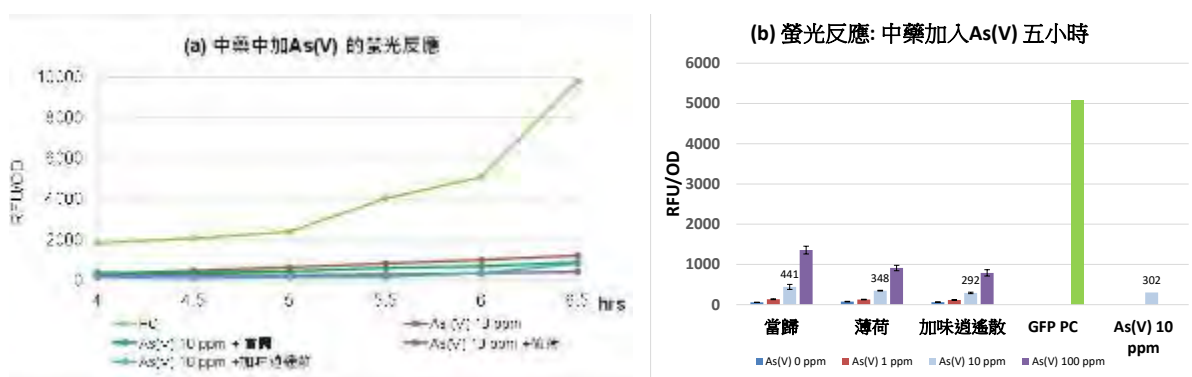
△圖 5-12 螢光感測器在黃芩、當歸、白芍與加味逍遙散中的螢光密度

GFP 感測器在黃芩、當歸、白芍與加味逍遙散四種中藥 4 小時後，螢光密度很低，接近 As(V)=0 ppm 的螢光值，不隨濃度增加而有顯著變化 (圖 5-12)。



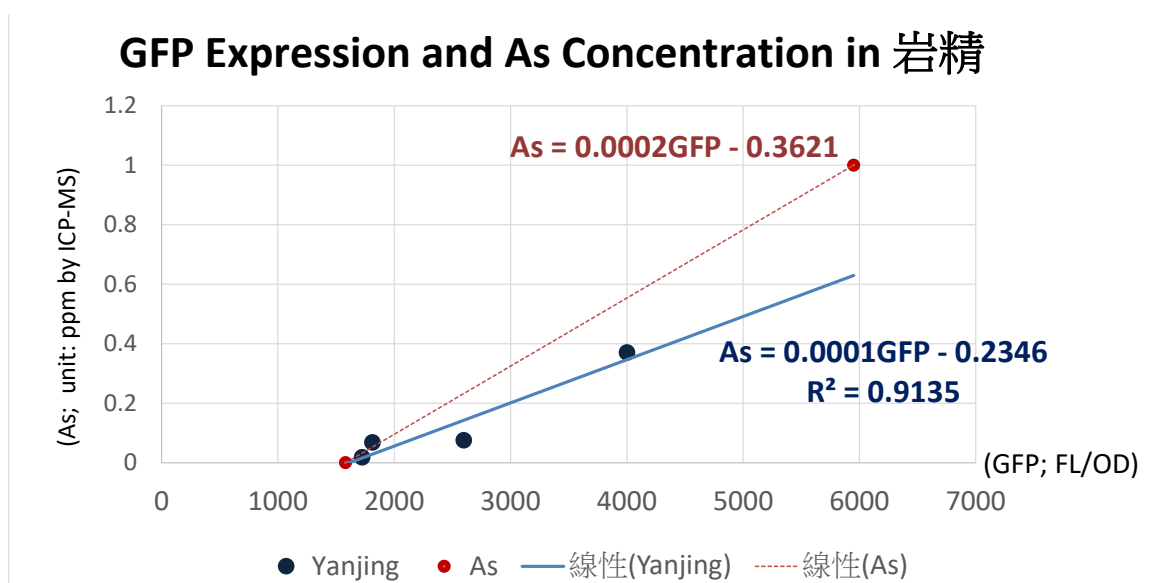
△圖 5-13 GFP 螢光感測器在岩精中的螢光密度: (a)岩精溶於水；(b)岩精溶於鹽酸

GFP 感測器的螢光密度隨岩精濃度而增加，但是螢光密度都低於 As(V) 1 ppm。以 ICP-MS 測岩精中的含砷含量(圖 5-13(a))，螢光密度隨含砷量而增加。



△圖 5-14 螢光感測器在中藥中加入 As(V)的螢光密度

在中藥中加砷酸，GFP 的螢光密度隨時間而增加(圖 a)；在不同中藥中加入不同濃度的 As(V)，感測器五小時後的螢光密度隨 As(V)濃度上升而增加。與 10 ppm 的 As(V) 溶液比較，中藥中加 10 ppm As(V)溶液螢光密度較低，中藥會影響螢光密度量(圖 b)。

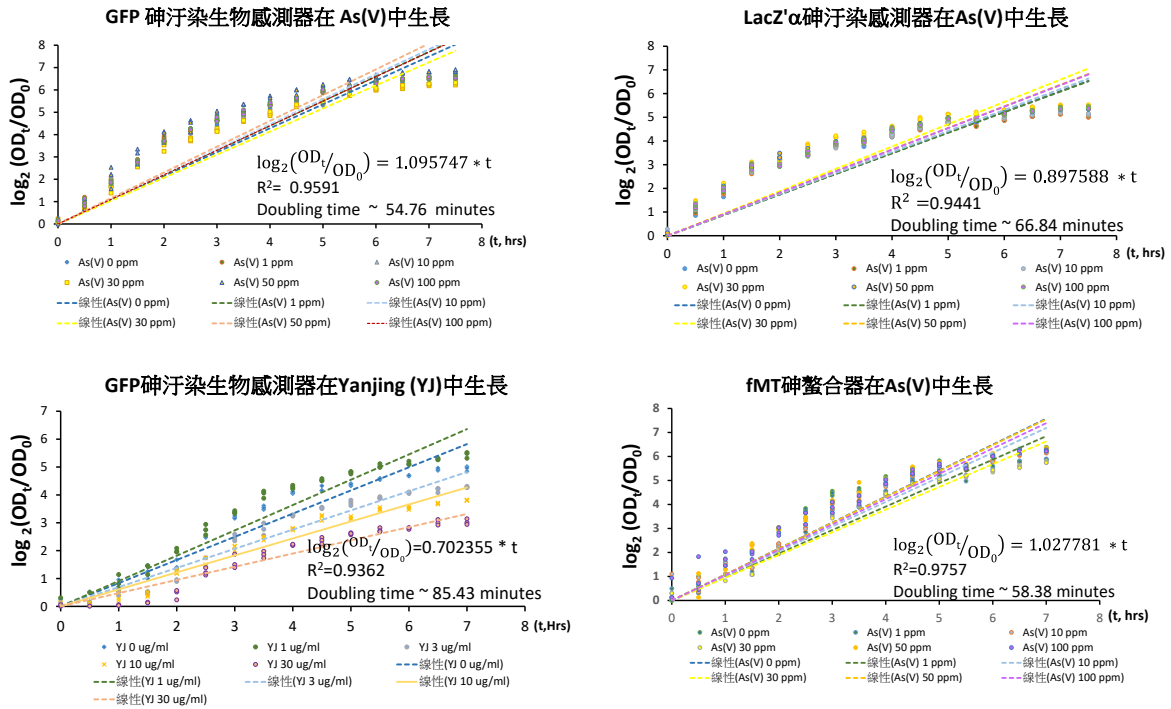


△圖 5-15 GFP 感測器在岩精中螢光密度與砷含量的線性關係

GFP 測砷的螢光密度與 ICP-MS 測得的砷量，求線性回歸(圖 5-15)，可以做為以螢光密度推估岩精中砷含量的參考。紅色為 As(V)溶液，藍色是岩精。

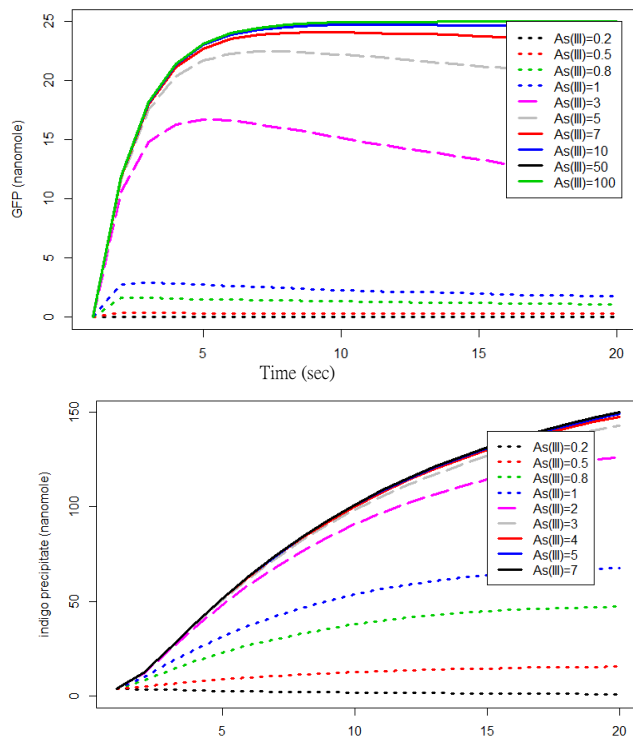
五、量性分析

(一) 倍增時間(Doubling time): 三種大腸桿菌在砷酸溶液中的生長曲線相近，表示生長不受砷酸濃度影響，倍增時間約為 60 分鐘。GFP 感測器的倍增時間隨岩精濃度而延長，顯示大腸桿菌生長會受岩精影響(圖 5-16)。



△圖 5-16 GFP 砷污染感測器、LacZ'α 砷污染感測器和 fMT 砷整合器生長倍增時間的估算

(二) 系統生物模式(system biology model)

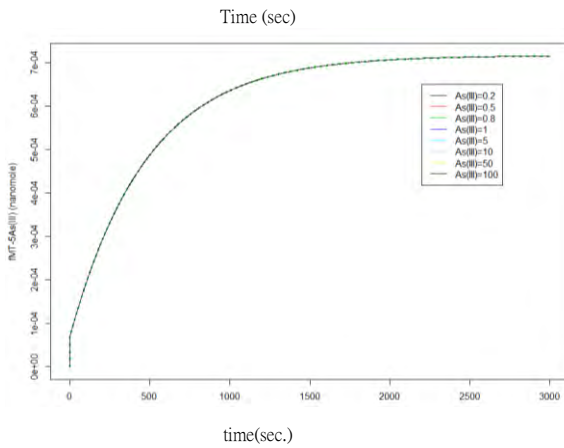


不同砷濃度常數下，GFP 蛋白的時間曲線不同：螢光蛋白的生成速度、生成量和降解速度都不同(圖 5-17(a))。

△圖 5-17(a)系統生物模式: GFP 砷污染感測器的螢光蛋白量

藍色沉澱由 LacZ'α 經 α 互補作用和 X-gal 產生，藍色沉澱不會降解，因此沉澱隨時間而增加(圖 5-17(b))。

△圖 5-17(b) 系統生物模式: LacZ'α 砷污染感測器的藍色沉澱量

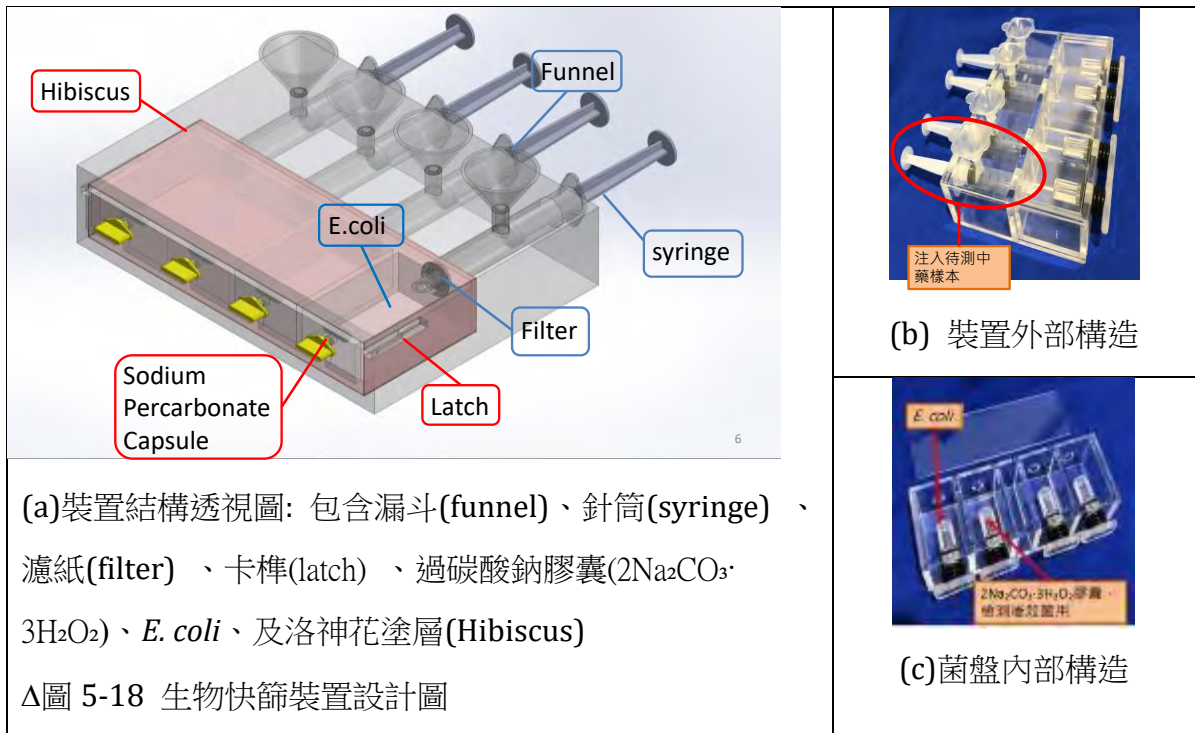


As(III)與金屬硫蛋白螯合為 5:1，As(III)與金屬硫蛋白(fMT)螯合主要是受金屬硫蛋白的生成量影響(圖 5-17(c))，不受 As(III)濃度影響。

△圖 5-17(c) 系統生物模式: fMT 砷螯合器的螯合砷量

六、快篩器裝置設計

搭配可以肉眼觀測藍色沉澱的 LacZ'α感測器，設計快篩裝置，裝置具有高度的生物安全性及方便性及低成本可近性，可做為讓一般民眾使用的中藥砷污染快篩器。



(a)裝置結構透視圖: 包含漏斗(funnel)、針筒(syringe)、濾紙(filter)、卡榫(latch)、過碳酸鈉膠囊($2\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}_2$)、*E. coli*、及洛神花塗層(Hibiscus)

△圖 5-18 生物快篩裝置設計圖

● 裝置設計與原理:

裝置設計分為外部結構與內部菌盤

1. 外部結構

- 漏斗: 輔助使用者將中藥倒入針筒中
- 針筒: 注入中藥於菌盤
- 濾紙: (位於針筒中) 去除中藥中較大顆粒雜質，以免影響觀察結果

2. 菌盤

- 卡榫: 將菌盤鎖在裝置內
- 洛神花塗層: 避免菌之外洩
- 過碳酸鈉膠囊: 使用完畢後做為滅菌劑使用

● 操作原理:

步驟一: 先將插入菌盤，以卡榫將菌盤鎖在裝置內，避免滑脫

步驟二: 將中藥從漏斗注入針筒中，用針筒將中藥推入菌盤中。

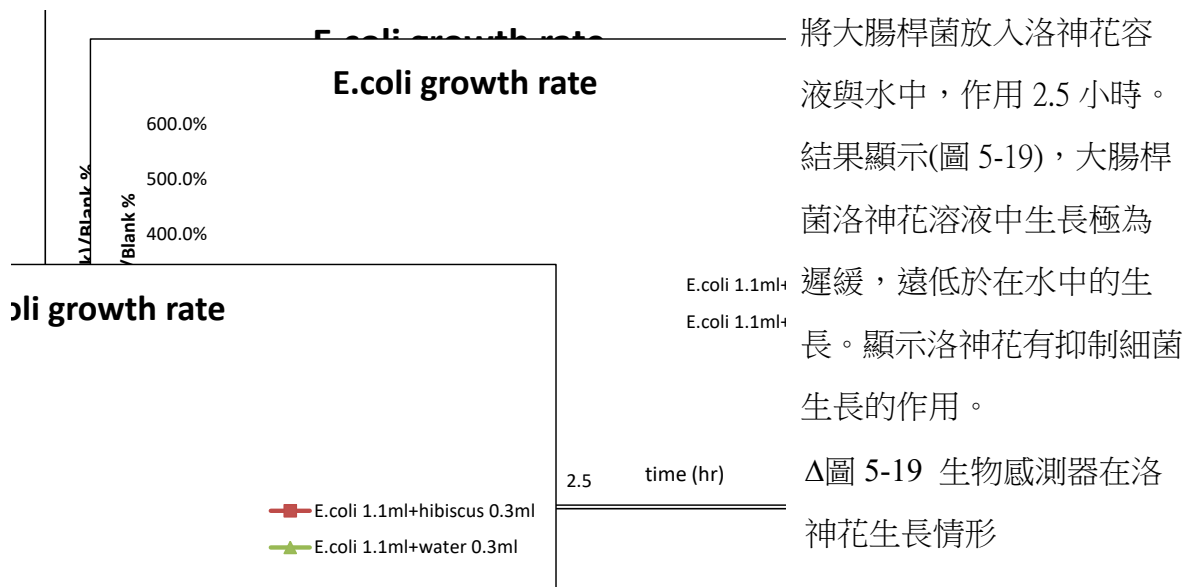
步驟三: 觀察藍色沉澱

步驟四: 使用完畢後，刺破過碳酸鈉膠囊，完成滅菌

● 生物安全性與環境友善性:

裝置生物安全性設計以環境友善性為原則，為了避免大腸桿菌外洩，設計卡榫避免菌盤脫落。菌盤有抑菌功效的洛神花塗層，可以保持菌盤不受汙染。在測試完中藥後，刺破裝置內的用過碳酸鈉膠囊，與水反應，產生 H_2O_2 ，達成滅菌的效果。

● 實驗驗證



● 應用設計

未來在實際應用時，使用者根據操作指示，將中藥材調配成水溶液。使用 GFP 砷汙染感測器者，可以透過比對 GFP 螢光曲線或是檢量線，快速篩檢出可能被汙染的中藥材，然後送國家實驗室進一步以 ICP-MS 檢驗。使用 LacZ'α感測器快篩裝置，則可以在建議時間內觀察是否有藍色沉澱，將可能受汙染的中藥材，進一步以 ICP-MS 檢測。

陸、討論

一、符合時間和費用成本效益的快篩器

相較於目前食藥署以 ICP-MS 檢驗流程至少一周，研究所開發的 GFP 砷污染感測器和 LacZ' α 砷污染感測器分別能在五小時後和十五小時檢測出砷，提高時效性。目前 ICP-MS 的官方的收費是 NT\$9000，快篩器的大量生產，可以降低成本，預計整體裝置 NT\$500，每個菌盤約 NT\$100。此外，目前有 ICP-MS 的機構單位少，可近性低，如果提高抽樣量，等候時間會更長，無法達到食安管控的即時性和全面性。相對而言，快篩器成本低，使用者可以自行購買，可以擴大篩檢面，做到持續性食安管控。

表 6-1: 傳統感應耦合電漿質譜儀檢測與生物感測器快篩器比較

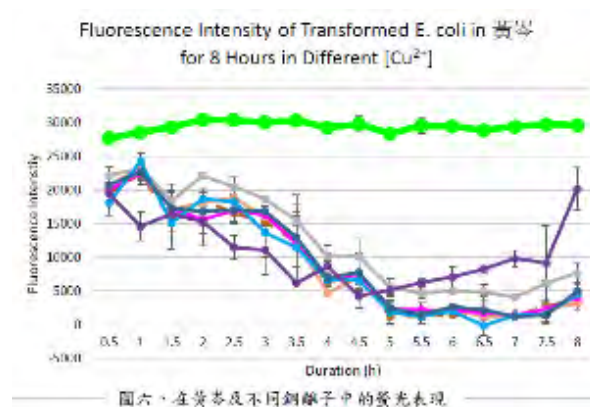
	感應耦合電漿質譜儀 ICP-MS	生物感測器快篩器
時間	1 周以上	GFP 砷污染感測器: 5 小時 快篩器(LacZ' α 感測器):15 小時
成本	衛生福利部「食品藥物化妝品 檢驗收費標準」(部授食字第 1051901465 號) NT\$9000/樣品項	螢光光度計: NT\$ 1,470/件 快篩器(LacZ' α 砷污染感測器): 基本裝置: (預估 NT\$500；固定成本) 菌盤: (預估 NT\$100；變動成本)
可近性	低	高 GFP 砷污染感測器: 多實驗室可測 快篩器:可自行購買
食安管控範圍	隨機抽樣，不能大量篩檢	快篩器:大眾與店商都可以使用

二、實驗結果分析討論：

- GFP 砷污染感測器：螢光蛋白在五小時後達到穩定成長階段，能夠偵測出各種環境中的含砷量，不會對鉛和銅離子產生反應，對砷具有專一性。用不同溶劑溶解岩精，所測的螢光表達不一樣，有可能是溶劑影響螢光蛋白。表示未來快篩器使用時，需要同時考慮標準品，才能做及時的比對。此外，政府現在對中藥材砷含量的標準為 3 ppm，中藥砷污染實驗的結果顯示，我們的 GFP 砷污染感測器底線低於 1 ppm，(岩精 370 ppb)。
- LacZ' α 砷污染感測器：在砷酸溶液和 X-gal 環境中作用十五小時後，可以觀察到

藍色沉澱。在鉛或銅溶液中，沒有藍色沉澱，呈現專一性。雖然這樣的設計無法掌控細菌量，無法做定量分析，但是可以用肉眼觀察到藍色沉澱，有其便利性。之後會繼續測試濃度低於 10 ppm 的 As(V) 溶液以及測試藍色辨識度是否受中藥顏色影響，同時，還會繼續測試是否能在更短的時間內檢測出樣品含砷。

- fMT 砷螯合器：fMT 砷螯合器的質體是改進 iGEM 基因序列資料庫中的質體 BBa_K190031，因為其中的 BBa_J23109 啟動子質體有重複的限制酶，導致在合成兩段基因時失敗。本研究改用另一持續啟動子(BBa_J23119)，經序列定序無誤後，重組新的序列質體(BBa_J23119+BBa_K190019)，寄給總部，成功在 2017 iGEM 註冊新質體(BBa_K2262015)(註冊網頁: http://parts.igem.org/Part:BBa_K2262015)。
- 過去有科展研究以 GFP 結合銅離子啟動子成銅生物感測器，然而，銅為植物生命必要之微量營養素，並不是政府列為中藥檢測項目。該研究顯示常用中藥黃芩會結合銅離子，導致生物檢測器無法用來檢測銅離子。



圖六、在黃芩及不同銅離子中的螢光表現

(取自 2017 年國際科展作品集，No. 200006)

我們的計畫除了設計 GFP 砷污染感測器，可以檢測出中藥和岩精中的砷外，還以 ICP-MS 檢驗含砷量，做出 GFP 砷污染感測器螢光密度與砷濃度的檢量線。本研究還增新增設計肉眼可見藍色沉澱的 LacZ' α 感測器，無須倚賴螢光光度計的設備。另外，設計生物螯合器以預防民眾砷中毒，並且以 ICP-MS 驗證螯合功能。

- 量性分析:
在倍增時間的估計部分，GFP 感測器的 *E. coli* 倍增時間約為 55 分鐘，LacZ' α 感測器約為 66 分鐘，fMT 砷螯合器約為 58 分鐘，均較文獻中大腸桿菌倍增時間長(約為 30 分鐘)，可能因為大腸桿菌被植入基因工程改造的質體，造成影響。
系統生物模式是針對基因迴路在單一細胞內的功能表現，因為單一細胞不能影響環境中的 As(III)濃度，因此系統生物模式假設前提為「細胞內 As(III)濃度恆定」，所以可以不考慮 *E. coli ars operon* 的功能。這個系統模式與實驗設計中的功能測試

不同，實驗操作是用 As(V)。因為 As(V)要先被還原成 As(III)，才會與 ArsR 結合，系統生物模式再加上還原機制，能更接近實驗情境。

三、 後續研究建議：

未來除了可以研究解決其他重金屬污染，還可以朝向以奈米或是生物晶片科技，進化產品設計與效能。

柒、 結論與未來發展

- 一、 研究成功設計出生物感測器能在短時間檢驗出中藥加砷及藏藥含砷，且具有專一性，可以發展為低成本效能快的快篩器。另外，fMT 砷螯合器能螯合砷酸溶液中的 As(V)，未來可以純化成螯合砷的金屬蛋白，開發成過濾器。在生物安全性的前提下，這兩種工具可以供大眾使用，有效解決砷污染問題，降低健康的危害。
- 二、 這樣的環境生物科技，也可以用在開發解決中藥的鉛、鎘、汞和黃麴毒素污染的快篩器和過濾器，讓民眾能夠自己預防和降低重金屬和毒素污染的問題。
- 三、 未來的中藥進口商，可以針對中藥污染的問題，在輸出國即進行快篩，可以用最具成本效益的方式，減少商業風險。中藥種植戶，也可以用生物感測器和生物螯合器，解決中藥種植環境中的砷污染問題，降低因被檢驗出砷污染所造成的財物損失。

捌、 參考文獻及其他

- Chandran, D., Copeland, W. B., Sleight, S. C., & Sauro, H. M. (2008). Mathematical modeling and synthetic biology. *Drug Discovery Today: Disease Models*, 5(4), 299-309.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.ddmod.2009.07.002>
- Cobbett, C., & Goldsbrough, P. (2002). PHYTOCHELATINS AND METALLOTHIONEINS: Roles in Heavy Metal Detoxification and Homeostasis. *Annual Review of Plant Biology*, 53(1), 159-182.
doi:10.1146/annurev.arplant.53.100301.135154
- Ernst, E. (2002). Toxic heavy metals and undeclared drugs in Asian herbal medicines. *Trends in Pharmacological Sciences*, 23(3), 136-139. doi:[https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(00\)01972-6](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(00)01972-6)
- King, J. M. H., DiGrazia, P. M., Applegate, B., Burlage, R., Sanseverino, J., Dunbar, P., . . . Sayler, G. S. (1990). Rapid, Sensitive Bioluminescent Reporter Technology for Naphthalene Exposure and Biodegradation. *Science*, 249(4970), 778-781. doi:10.1126/science.249.4970.778
- Mateos, L. M., Ordóñez, E., Letek, M., & Gil, J. A. (2006). *Corynebacterium glutamicum* as a model

- bacterium for the bioremediation of arsenic. *International Microbiology*, 9(3), 207-215.
- Mergeay, M., & Van Houdt, R. (2015). *Metal Response in Cupriavidus metallidurans: Volume I: From Habitats to Genes and Proteins*: Springer.
- MORRIS, C. A., NICOLAUS, B., SAMPSON, V., HARWOOD, J. L., & KILLE, P. (1999). Identification and characterization of a recombinant metallothionein protein from a marine alga, *Fucus vesiculosus*. *Biochemical Journal*, 338(2), 553-560. doi:10.1042/bj3380553
- Rao, M. M., KumarMeena, A., & Galib. (2011). Detection of toxic heavy metals and pesticide residue in herbal plants which are commonly used in the herbal formulations. *Environmental Monitoring and Assessment*, 181(1), 267-271. doi:10.1007/s10661-010-1828-2
- Rodríguez-Lado, L., Sun, G., Berg, M., Zhang, Q., Xue, H., Zheng, Q., & Johnson, C. A. (2013). Groundwater Arsenic Contamination Throughout China. *Science*, 341(6148), 866-868. doi:10.1126/science.1237484
- Sandhi, A., Landberg, T., & Greger, M. (2018). Phytofiltration of arsenic by aquatic moss (*Warnstorfia fluitans*). *Environmental Pollution*, 237, 1098-1105. doi:<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.11.038>
- Shen, S., Li, X.-F., Cullen, W. R., Weinfeld, M., & Le, X. C. (2013). Arsenic binding to proteins. *Chemical reviews*, 113(10), 7769-7792.
- Soetaert, K., Petzoldt, T., & Setzer, R. W. (2010). Package deSolve: solving initial value differential equations in R. *J. Stat. Softw*, 33(9), 1-25.
- Yang, Z., & Chu, C. (2011). Towards understanding plant response to heavy metal stress *Abiotic Stress in Plants-Mechanisms and Adaptations*: InTech.
- 袁秋英. (2009). 細胞感測器於環境污染物 毒性檢測之研發與應用. *農業生技產業季刊*, 20, 61-66.

附錄一：實驗標準流程

1. 序列合成(ligation): 我們用合成基因序列的步驟，製造質體

- (1) 將要結合的 dried gene fragments 分別加入 50 μ L ddH₂O，靜置 10 分鐘
- (2) 取出 cutsmart buffer 與 purified BSA 於室溫退冰
- (3) 取出一管 eppendorf(標註:mix)，分別加入 18.5 μ L 的 ddH₂O、5 μ L buffer、0.5 μ L BSA 及所需切位各 0.5 μ L。再取出五管 eppendorf，分別標上 gene fragment 1-4 和 plasmid，分別加入” mix” eppendorf 的溶液 4 μ L 及所對應的 gene fragment 或 plasmid 4 μ L
- (4) 將裝有 gene fragment 或 plasmid 溶液的 eppendorf 放入 37°C 恆溫箱 1 hr，再將其放入 80°C 加熱器上 30 分鐘。冷卻後，將 backbone 與各 gene fragments 以 1:3 均勻混和至另四管新的 eppendorf
- (5) 在 4 管有 backbone 和 gene fragments 的 eppendorf 中各加入等體積 ligation reagent，再將這四管 eppendorf 以 4°C 16 小時，進行 ligation(overnight)

2. 質體轉殖

- (1). 將 *E. coli* 從 -80°C 冰箱取出，置於冰上退冰 (待固體轉透明為止)
- (2). 取 2 μ L 的質體加入含有 50 μ L *E. coli* 的 eppendorf 中
- (3). 置於冰上五分鐘。
- (4). 放入 37°C 的恆溫槽 3 min (熱休克 heatshock)
- (5). 再置於冰上 2min
- (6). 加入 SOC 200 μ L，置於 37 °C 的恆溫槽 4 hr
- (7). 塗盤於 culture plate(LB+CP)，置於 37°C 恆溫箱中 over night

3. 電泳

- (1) 將前天抽的質體，測濃度後，分別以水稀釋至 1000 mg/ μ L。
- (2) 放入-20°C 冰箱一個晚上；隔日取出靜置退冰，用 mini centrifuge 離心
- (3) 配置混和溶液 (質體與混和溶液的體積比為 1:9) 250 μ L
 - a. Cutsmart Buffer 取 25 μ L + ddH₂O 219.5 μ L BSA 取 2.5 μ L
 - b. 加入 *E. coli* 3 μ L (*E. coli* 置於冰上，加完後混和溶液不用 VORTEX)
 - c. 混和溶液 9 μ L，加入至新的 eppendorf *24
 - d. 將 24 個質體各取 1 μ L 加入 eppendorf
 - e. 將 eppendorf 放入 37°C 恆溫箱 (3 hr)後，再置於冰中
 - f. 加入 1 μ L Loading buffer 於各 eppendorf
 - g. 取 10 μ L 混合 buffer 的序列放在電泳槽，再加入 marker 於第一格，跑電泳的時間為 20 min
 - h. 確認著色條是否到倒數第 3 條線，沒有的話則每隔 5 min 看一次

4. 生長曲線測光密度實驗步驟(以 As(V)溶液為例)

- (1) 以序列稀釋調配出所需 As(V)溶液/中藥溶液/岩精溶液
- (2) 準備六管 50 mL 試管，分別在每管加入 SOC 29.1 mL、菌液 0.6 mL、抗生素 30 μ L 及對應的 As(V)溶液 0.3 mL
- (3) 將六管試管以 37°C 搖晃培養；計時每 30 分鐘，自試管吸取菌液 200 μ L 至 96 well plate 中，以 spectrophotometer 測量其 OD 值
- (4) 畫出不同砷酸濃度下，大腸桿菌的 OD 圖，並計算 doubling time

5. 螢光功能實驗步驟 (以 As(V)溶液為例)

- (1). 前一晚養菌(培養箱 37°C、120 rpm)
- (2). 加入 Chloramphenicol 繼代 2 小時
- (3). 稀釋菌液至 OD=0.5
- (4). 配置實驗用菌液(30 mL*3*6 管:每濃度三重複)

- a. SOC Broth 29.1 mL ; Chloramphenicol 30 μ L
 - b. As(V)溶液 300 μ L(濃度為 0 ppm, 1 ppm, 10 ppm, 30 ppm, 50 ppm, 100 ppm)
 - c. 前一晚培養之菌液 600 μ L
 - d. 每 0.5 小時取 200 μ L 菌液至 96 well plate 中
 - e. 測量 OD 值及螢光強度 (激發波長 495 nm , 吸收波長 520 nm)
- (5). 以 ICP-MS 測岩精中的砷含量
 - (6). 將測得之螢光強度除以 OD 值 , 再製成圖表

6. 藍色感測實驗步驟

- (1). 養菌 4 小時(培養箱 37 oC 、 120 rpm)
- (2). 配置實驗用菌液(2 mL*3*6 管:每濃度三重複)
 - a. LB Broth 1900 mL;
 - b. Chloramphenicol 2 μ L;
 - c. X-gal 40 μ L;
 - d. 菌液 40 μ L ;
 - e. As(V)水溶液 20 μ L , 濃度 0 ppm 、 10 ppm 、 50 ppm 、 100 ppm
- (3). 置入 37 $^{\circ}$ C 培養箱 15 小時
- (4). 將菌液以 12000 G 離心五分鐘 , 吸走上清液 , 拍照記錄菌落成色

7. fMT 砷螯合器功能測試實驗步驟

- (1) 前一晚養菌(培養箱 37 $^{\circ}$ C 、 120 rpm)
- (2) 加入 Chloramphenicol 繼代 2 小時
- (3) 稀釋菌液至 OD=0.5
- (4) 配置實驗用菌液(30mL*3*6 管:每濃度三重複)
 - a. LB Broth 29.1 mL
 - b. Chloramphenicol 30 μ L
 - c. 菌液 0.6 mL
 - d. As(V) 水溶液 0.3 mL (最終濃度為 20 ppm)
- (5) 放入培養箱培養(37 $^{\circ}$ C 、 120 rpm) , 並分別在 4, 5, 6 小時取出菌液
- (6) 以 6000G 離心十分鐘並取出上清液 ; 加入 10 mL PBS
- (7) 以 6000G 離心十分鐘並取出上清液 ; 加入 15 mL ddH₂O
- (8) 以 12000G 離心五分鐘並取出上清液
- (9) 用微波消化法破菌
- (10) 再以 ICP/MS 測定大腸桿菌中砷量

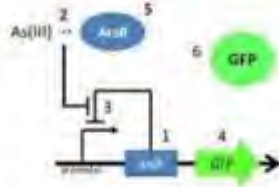
8. 洛神花生物安全性實驗步驟

- (1) 前一晚養菌 (培養箱 37 $^{\circ}$ C 、 120 rpm)
- (2) 加入 Chloramphenicol 繼代 2 小時
- (3) 稀釋菌液至 OD=0.312
- (4) 配置實驗用菌液 (5 mL*3*2 管 : 每個配方三重複)
 - a. SOC Broth 4.85 mL ; Chloramphenicol 5 μ L
 - b. 洛神花溶液 50 μ L (控制組為加入 ddH₂O)
 - c. 前一晚培養之菌液 100 μ L
- (5)每 0.5 小時取 200 μ L 菌液至 96 well plate 中
- (6)測量 OD 值 (波長= 595 nm)

附錄二：系統生物模式

步驟 1: 設計基因迴路

GFP biosensor



步驟 2: 列出化學反應式

Reaction Name	Equation	Rate Law	Parameter [¶]
1 ArsR production	promoter1 → promoter1 + ArsR	Michaelis-Menten	V1m=10, K1m=25
2 ArsR binding to Arsenic	ArsR + 2As(III) → ArsR-2As(III)	Mass Action	K2a=1000, K2b=0.65
3 ArsR binding to promoter2	2ArsR + promoter2 → 2ArsR-promoter2	Mass Action	K3a=10000, K3b=0.65
4 GFP production	promoter1 → promoter1 + GFP	Michaelis-Menten	V4m=10, K4m=25
5 ArsR degradation	ArsR → null	Mass Action	K5=0.05
6 GFP degradation	GFP → null	Mass Action	K6=0.1

¶: http://2006.igem.org/wiki/images/f/f1/Modeling_the_Arsenic_Biosensor_System.pdf

LacZ'α biosensor



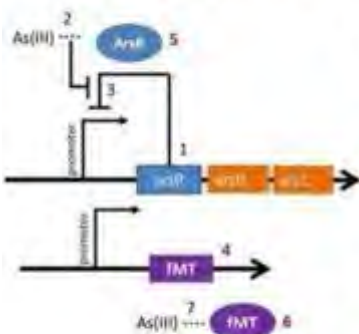
Reaction Name	Equation	Rate Law	Parameter ^{¶¶}
1 ArsR production	promoter1 → promoter1 + ArsR	Michaelis-Menten	V1m=10, K1m=25
2 ArsR binding to Arsenic	ArsR + As(III) → ArsR-As(III)	Mass Action	K2a=1000, K2b=0.65
3 ArsR binding to promoter2	2ArsR + promoter2 → 2ArsR-promoter2	Mass Action	K3a=10000, K3b=0.65
4 LacZ'α production	promoter1 → promoter1 + LacZ'α	Michaelis-Menten	V4m=25, K4m=10
5 ArsR degradation	ArsR → null	Mass Action	K5=0.05
6 LacZ'α degradation	LacZ'α → null	Mass Action	K6=0.1
7 Indigo production (X-gal cleavage)	X-gal + LacZ'α → 5,9'-dibromo-4,4'-dichloro-indigo	Michaelis-Menten → Mass Action	V7m = 3.216 * 10 ⁻² nM / sec (95%CI = 2.654 * 10 ⁻⁵ - 3.778 * 10 ⁻²) * K7m = 1.78 mM (95%CI = 0.84 - 2.72) * K7 = 1.52 * 10 ⁻⁷ (molar X-gal / molecule (l-gal * sec) ⁻¹)

★: <http://2013.igem.org/Team:Berkeley>

△: <http://2008.igem.org/Team:Pradim/Pradim>

¶: http://2006.igem.org/wiki/images/f/f1/Modeling_the_Arsenic_Biosensor_System.pdf

fMT biochelator



Reaction Name	Equation	Rate Law	Parameter ^{¶¶}
1 ArsR production	promoter1 → promoter1 + ArsR	Michaelis-Menten	V1m=10, K1m=25
2 ArsR binding to Arsenic	ArsR + 2As(III) → ArsR-2As(III)	Mass Action	K2a=1000, K2b=0.65
3 ArsR binding to promoter2	2ArsR + promoter2 → 2ArsR-promoter2	Mass Action	K3a=10000, K3b=0.65
4 fMT production	Gene → mRNA (transcription) mRNA → null mRNA → protein (translation)	Mass Action	F4a=5.08 nM/min=8.47*10 ⁻⁷ nM/sec [¶] F4b=1.25x 10 ³ min ⁻¹ =2.08*10 ³ sec ⁻¹ [¶] F4c=6.33 nM/min=1.055*10 ⁻³ sec ⁻¹ [¶]
5 ArsR degradation	ArsR → null	Mass Action	K5=0.05
6 fMT Degradation	fMT → null	Mass Action	K6= 2.31 * 10 ⁻³ min ⁻¹ = 3.85 * 10 ⁻⁴ sec ⁻¹ [¶]
7 fMT binding to arsenic	fMT + 5 AS(III) → fMT5AS	Mass Action	K7=6000

¶: http://2012.igem.org/Team:IANI_Mty-Mexico/Modeling/transport_and_accumulation

¶: http://2006.igem.org/wiki/images/f/f1/Modeling_the_Arsenic_Biosensor_System.pdf

步驟 3: 列出 Ordinary Differential Equations (ODE)

	Ordinary differential equations for the arsenic biosensor system	Reaction	Start value
ArsR change rate	$\frac{d([ArsR])}{dt} = \frac{V_{1m}[promoter]}{K_{1m} + [promoter]} - K_{2a}([ArsR][As(III)]^2 + K_{2b}[ArsR_2As(III)]) - 2 \times K_{3a}[ArsR]^2[promoter] + 2 \times K_{3b}[2ArsR_promoter] - K_5[ArsR]$	1 2 3 5	25
ArsR_2As(III) change rate	$\frac{d([ArsR_2As(III)])}{dt} = K_{2a}([ArsR][As(III)]^2) - K_{2b}[ArsR_2As(III)]$	2	0
2ArsR_promoter change rate	$\frac{d([2ArsR_promoter])}{dt} = K_{3a}[ArsR]^2[promoter] - K_{3b}[2ArsR_promoter]$	3	25
promoter change rate	$\frac{d([promoter])}{dt} = -K_{3a}[ArsR]^2[promoter] + K_{3b}[2ArsR_promoter]$	3	0
GFP change rate	$\frac{d([GFP])}{dt} = \frac{V_{4m}[promoter]}{K_{4m} + [promoter]} - K_6[GFP]$	4, 6	0

	Ordinary differential equations for the arsenic biosensor system	Reaction	Start Value
ArsR change rate	$\frac{d([ArsR])}{dt} = \frac{V_{1m}[promoter]}{K_{1m} + [promoter]} - K_{2a}([ArsR][As(III)]^2 + K_{2b}[ArsR_2As(III)]) - 2 \times K_{3a}[ArsR]^2[promoter] + 2 \times K_{3b}[2ArsR_promoter] - K_5[ArsR]$	1 2 3 5	25
ArsR_2As(III) change rate	$\frac{d([ArsR_2As(III)])}{dt} = K_{2a}([ArsR][As(III)]^2) - K_{2b}[ArsR_2As(III)]$	2	0
2ArsR_promoter change rate	$\frac{d([2ArsR_promoter])}{dt} = K_{3a}[ArsR]^2[promoter] - K_{3b}[2ArsR_promoter]$	3	25
Promoter change rate	$\frac{d([promoter])}{dt} = -K_{3a}[ArsR]^2[promoter] + K_{3b}[2ArsR_promoter]$	3	0
lacZ'α change rate	$\frac{d([lacZ'\alpha])}{dt} = \frac{V_{4m}[promoter]}{K_{4m} + [promoter]} - K_6[lacZ'\alpha]$	4, 6	4
Indigo precipitate change rate	$\frac{d([indigo])}{dt} = K_7[\beta gal], [\beta gal] = [lacZ'\alpha]$	7	0

	Ordinary differential equations for the arsenic biosensor system	Reaction	Start value
ArsR change rate	$\frac{d([ArsR])}{dt} = \frac{V_{1m}[promoter]}{K_{1m} + [promoter]} - K_{2a}([ArsR][As(III)]^2 + K_{2b}[ArsR_2As(III)]) - 2 \times K_{3a}[ArsR]^2[promoter] + 2 \times K_{3b}[2ArsR_promoter] - K_5[ArsR]$	1 2 3 5	25
ArsR_2As(III) change rate	$\frac{d([ArsR_2As(III)])}{dt} = K_{2a}([ArsR][As(III)]^2) - K_{2b}[ArsR_2As(III)]$	2	0
2ArsR_promoter change rate	$\frac{d([2ArsR_promoter])}{dt} = K_{3a}[ArsR]^2[promoter] - K_{3b}[ArsR_promoter]$	2	25
promoter change rate	$\frac{d([promoter])}{dt} = -K_{3a}[ArsR]^2[promoter] + K_{3b}[ArsR_promoter]$	3	25
fMT change rate	$\frac{d([mRNA fMT])}{dt} = F_{4a} \cdot [pro cons] - F_{4b} \cdot [mRNA fMT]$ $\frac{d([fMT])}{dt} = F_{4c} \cdot [mRNA fMT] - K_6[fMT] - K_7[fMT]$	4 6, 7	4 0
AsfMT change rate	$\frac{d([AsfMT])}{dt} = 5 \cdot K_7[fMT] \cdot As(III)^5$	7	0

【評語】 052605

1. 本研究利用合成生物學技術，開發二種砷污染感測器及一種砷螯合器，作為中藥砷污染的快篩和過濾工具。
2. 研究動機與目的具體明確、內容撰寫與格式佳、文獻回顧內容豐富、實驗數據統計分析方法合宜、研究成果具可行性與應用性。
3. 砷污染樣品濃度若能依照食藥署公告之標準分析方法進行前處理，並與 ICP-MS 或原子吸收光譜儀(AAS)等傳統檢測方法進行砷濃度差異性比較，將更能確認生物感測器的精確度及可靠性。
4. 實驗記錄與討論建議能與過去其他相似研究成果比較，並討論其差異性，將有助於凸顯實驗成果之創新性。

摘要

目的：為了有效地解決中藥砷汙染的問題。

方法：利用合成生物學技術重組基因，轉殖質體到大腸桿菌中，建置 (1)GFP砷汙染感測器，(2)lacZ'α砷汙染感測器，和 (3)fMT砷整合器三種勝任細胞。我們測試勝任細胞的功能及專一性，計算勝任細胞的倍增時間，並建立生物系統模式。針對生物感測器進行產品裝置設計，以實驗確認生物安全性的功能。

結果：GFP砷汙染感測器能在5個小時檢測出砷酸溶液與岩精溶液含砷，產生綠色螢光蛋白；而lacZ'α砷汙染感測器能在15個小時能檢測出砷，產生肉眼可見的藍色沉澱。ICP-MS結果顯示，fMT砷整合器在砷酸溶液4-6小時內，細菌的砷含量隨時間而增加。結論：相較於ICP-MS，我們的感測器是低成本而且能有效率檢測出砷汙染，搭配具有生物安全性的裝置設計，適合用來當作快篩的工具，將來可以運用在發展快篩其他重金屬。我們的 fMT 砷整合器未來能被用來去除環境中的砷汙染。

一、介紹

目前台灣面臨的中藥砷汙染議題

超過 90% 的中藥
是從砷汙染地區進口

目前的方法：
隨機抽樣 + ICP-MS

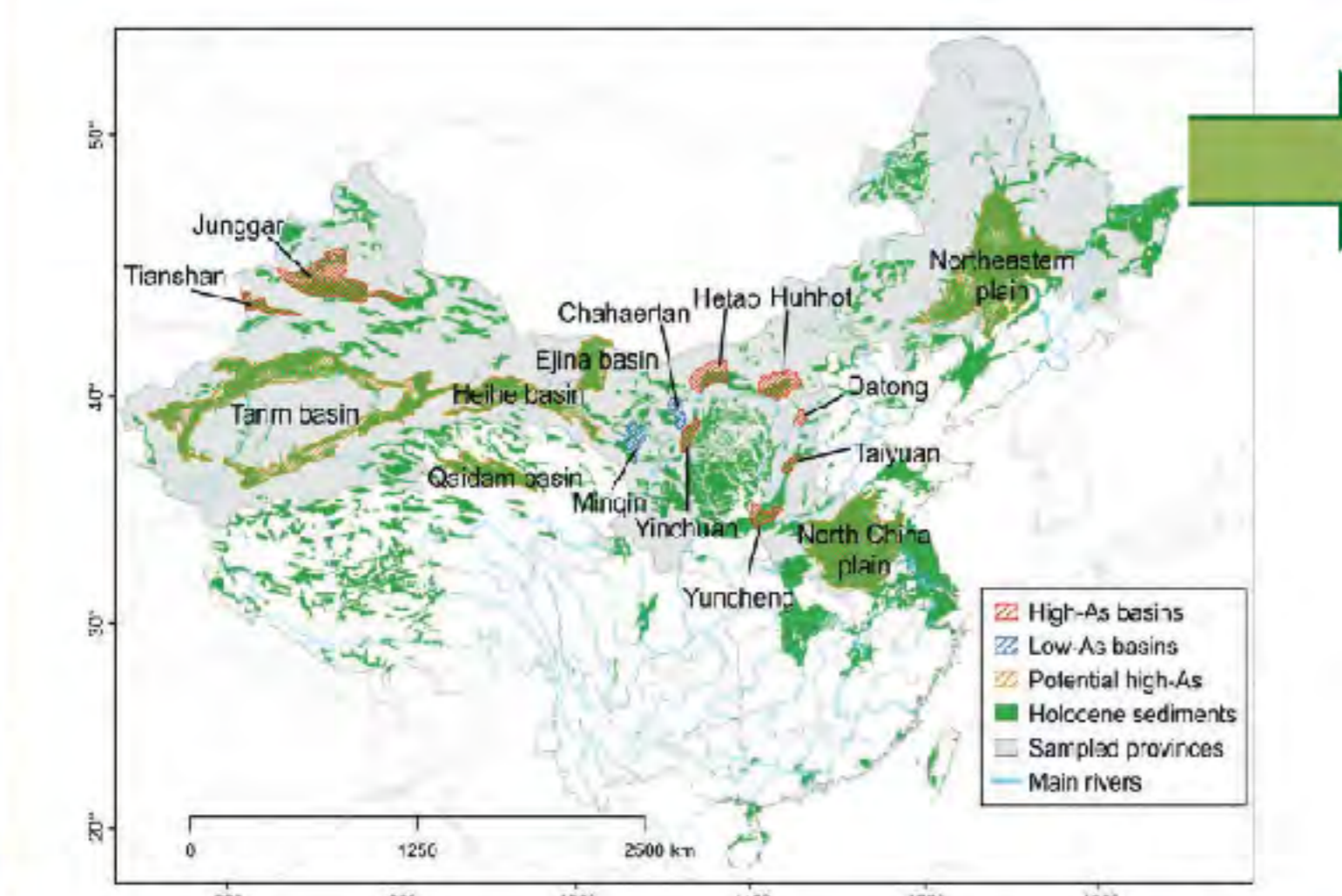
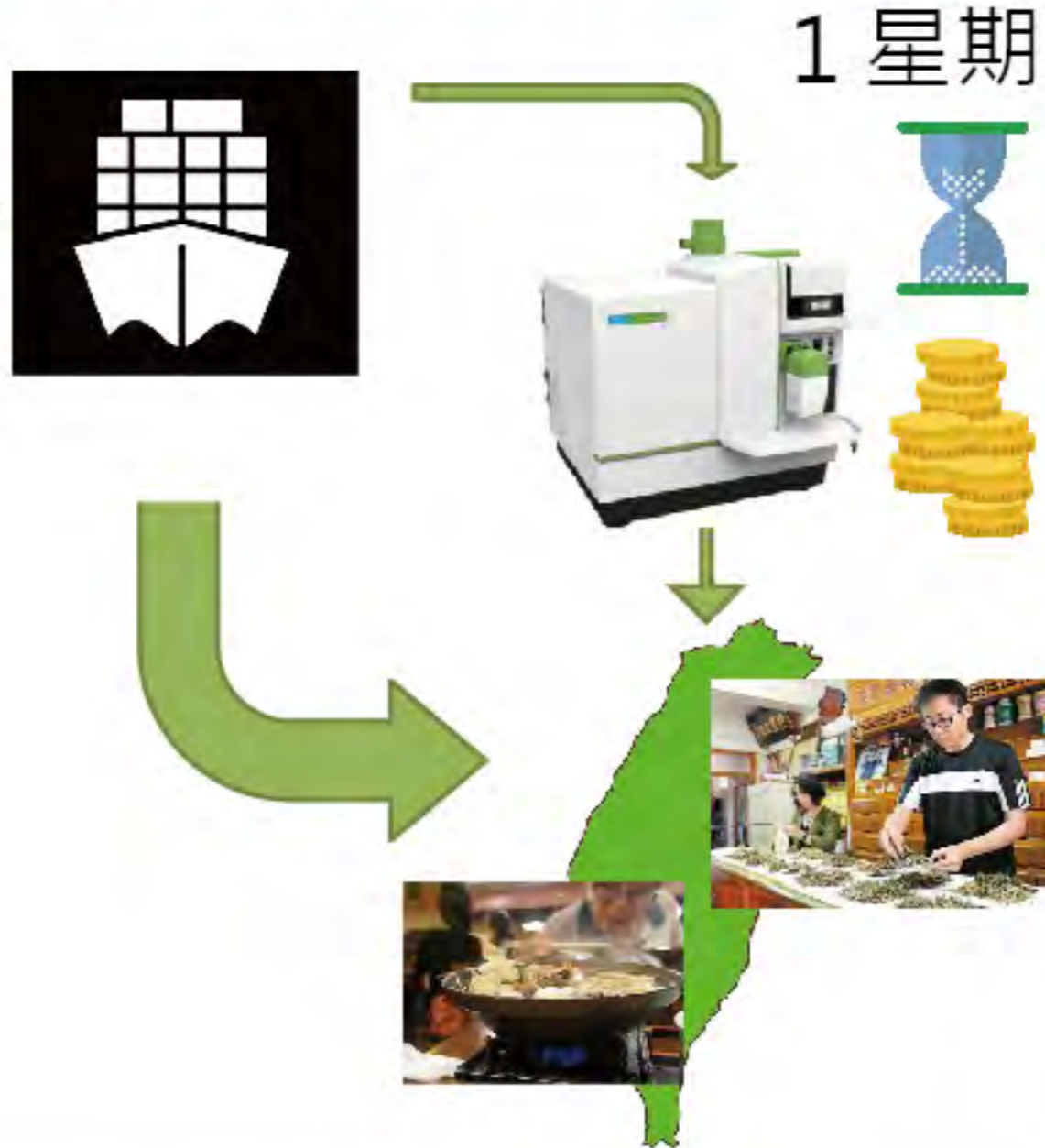


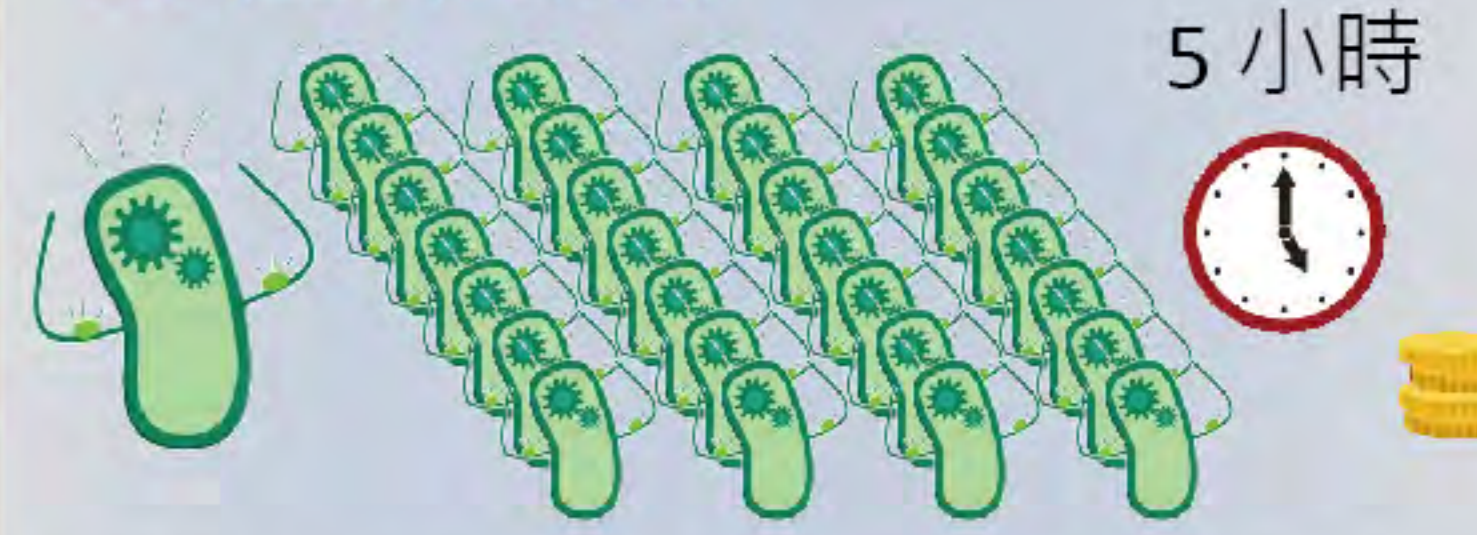
Fig. 1. Location of known and potential arsenic affected basins in China. Areas with high levels of arsenic (As) are generally characterized by Holocene sediments (green), where large basins may be affected.



台灣 90% 的中藥是從高度砷汙染區域進口，加上特殊藥補飲食文化，台灣人面臨中藥砷汙染的高風險。目前的方法是用 ICP-MS 檢測隨機抽樣的中藥樣本，成本高，效率低，普及性不佳。

目的

1. 大量快速篩檢



- 設計低成本、能大量檢測的生物感測器，能被廣泛的用來檢測中藥中的砷汙染

2. 即時清除砷汙染

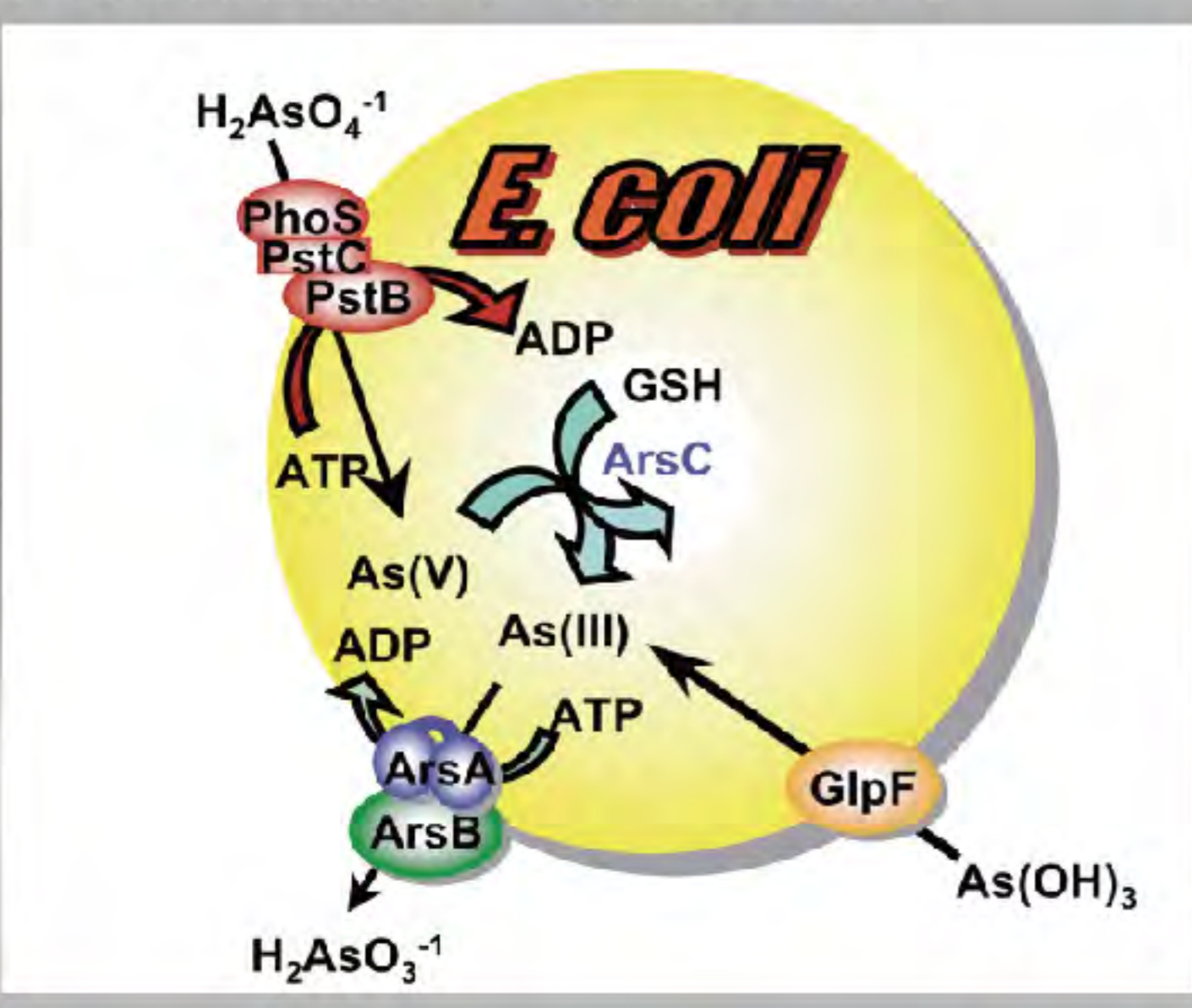


- 產生低成本的生物整合器，能去除中藥中的砷。

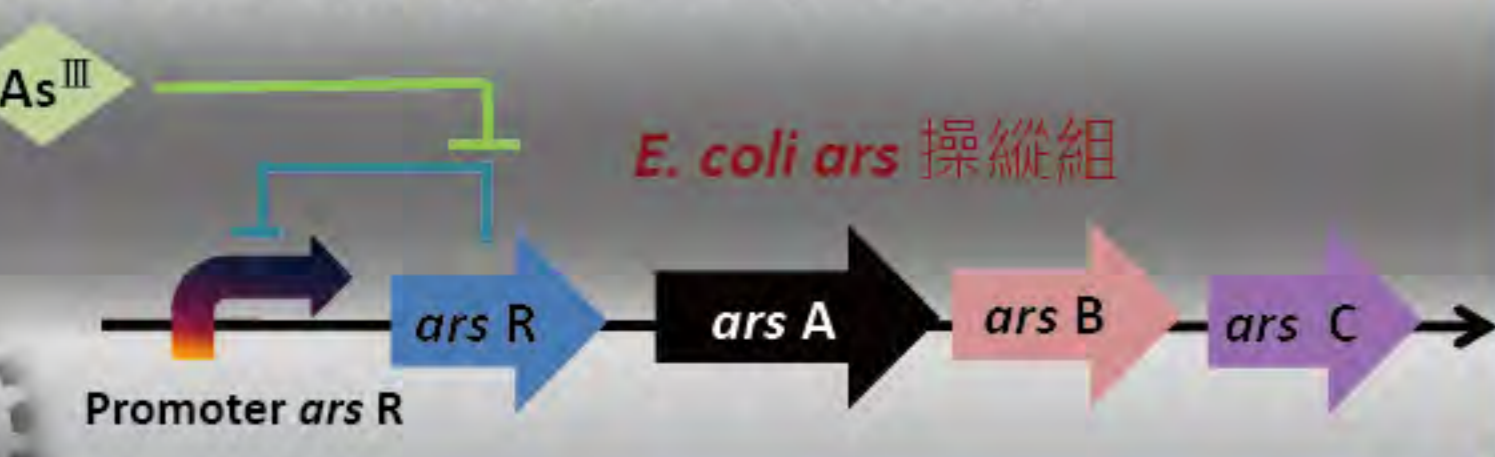
二、方法：兩種砷汙染感測器及一種砷整合器

背景：

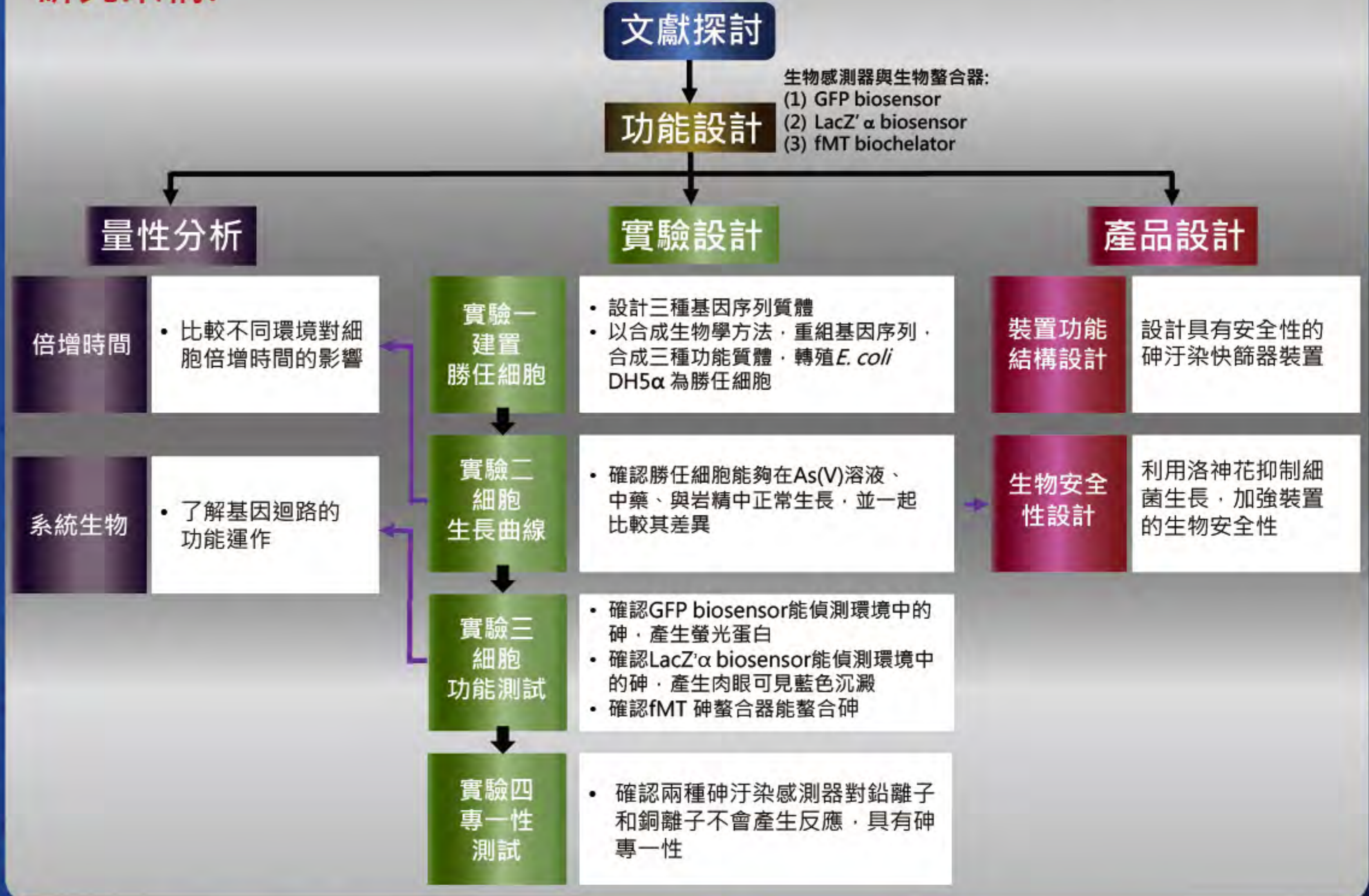
大腸桿菌吸入、排除砷離子



砷抗性操縱組(ars operon)



研究架構：



實驗設計與量性分析

1. 建置勝任細胞

a. 基因序列設計與合成

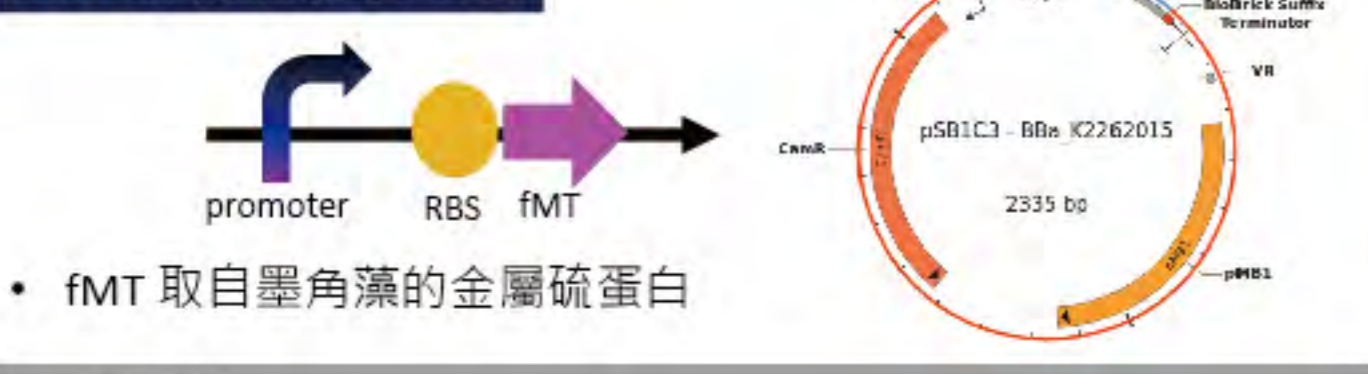
GFP 砷汙染感測器



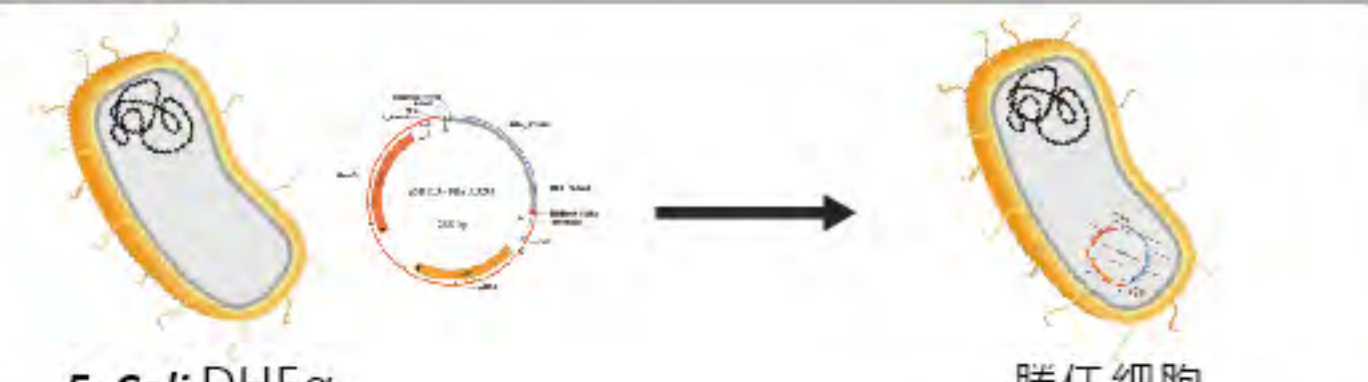
LacZ'α 砷汙染感測器



fMT 砷汙染整合器



b. 轉殖



2. 細胞生長曲線

勝任細胞:	GFP biosensor	LacZ'α biosensor	fMT bio-integrator
測量/儀器; 單位:	Optical Density 分光光度計595nm	Optical Density 分光光度計595nm	Optical Density 分光光度計595nm
實驗一: As(V) 操作變項:	As(V) 1, 2, 3, NC	As(V) 1, 2, 3, NC	As(V) 1, 2, 3, NC
實驗二: 中藥 操作變項:	CM 1, 2, 3, NC	CM 1, 2, 3, NC	CM 1, 2, 3, NC
控制:	溫度 37°C	溫度 37°C	溫度 37°C

3. 細胞功能測試

勝任細胞:	GFP biosensor	LacZ'α biosensor	fMT bio-integrator
測量/儀器; 單位:	螢光蛋白 螢光光度計 (RFU)	藍色沉澱 肉眼觀察	As(V) ICP-MS: ppb
實驗一: As(V) 操作變項:	As(V) 1, 2, 3, NC, PC	As(V) 1, 2, 3, NC, 1	As(V) 4h fMT, 5h fMT, 6h fMT, 6h fMT, 6h fMT, 6h fMT
實驗二: 中藥 操作變項:	CM 1, 2, 3, NC, PC	CM 1, 2, 3, NC, PC	CM 1, 2, 3, NC, PC
實驗三: 中藥 + As(V) 操作變項:	CM 1, 2, 3, NC, PC	CM 1, 2, 3, NC, PC	CM 1, 2, 3, NC, PC
控制變項:	溫度 37°C	溫度 37°C, 15小時	溫度 37°C; As(V) 10 ppm

4. 專一性測試

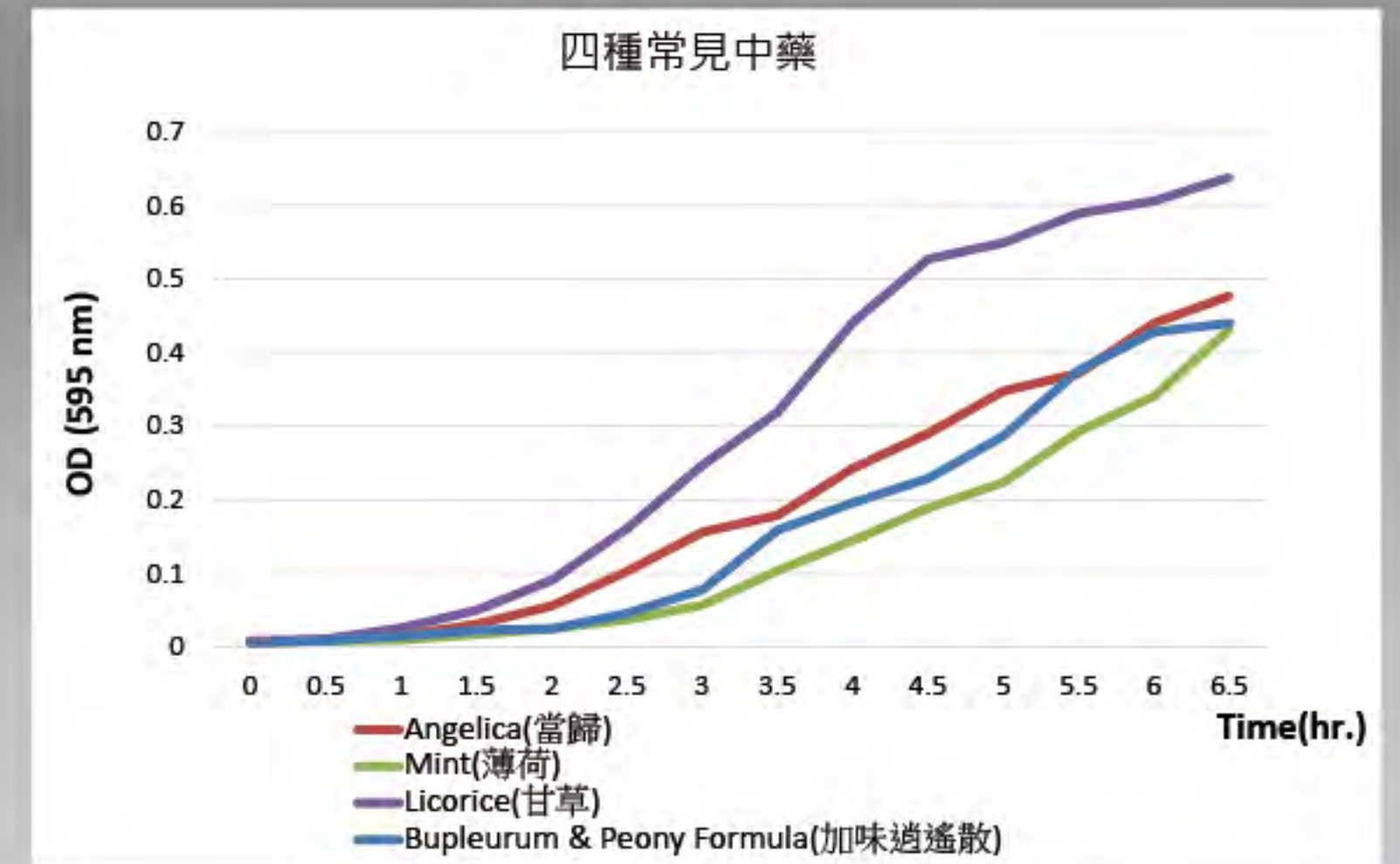
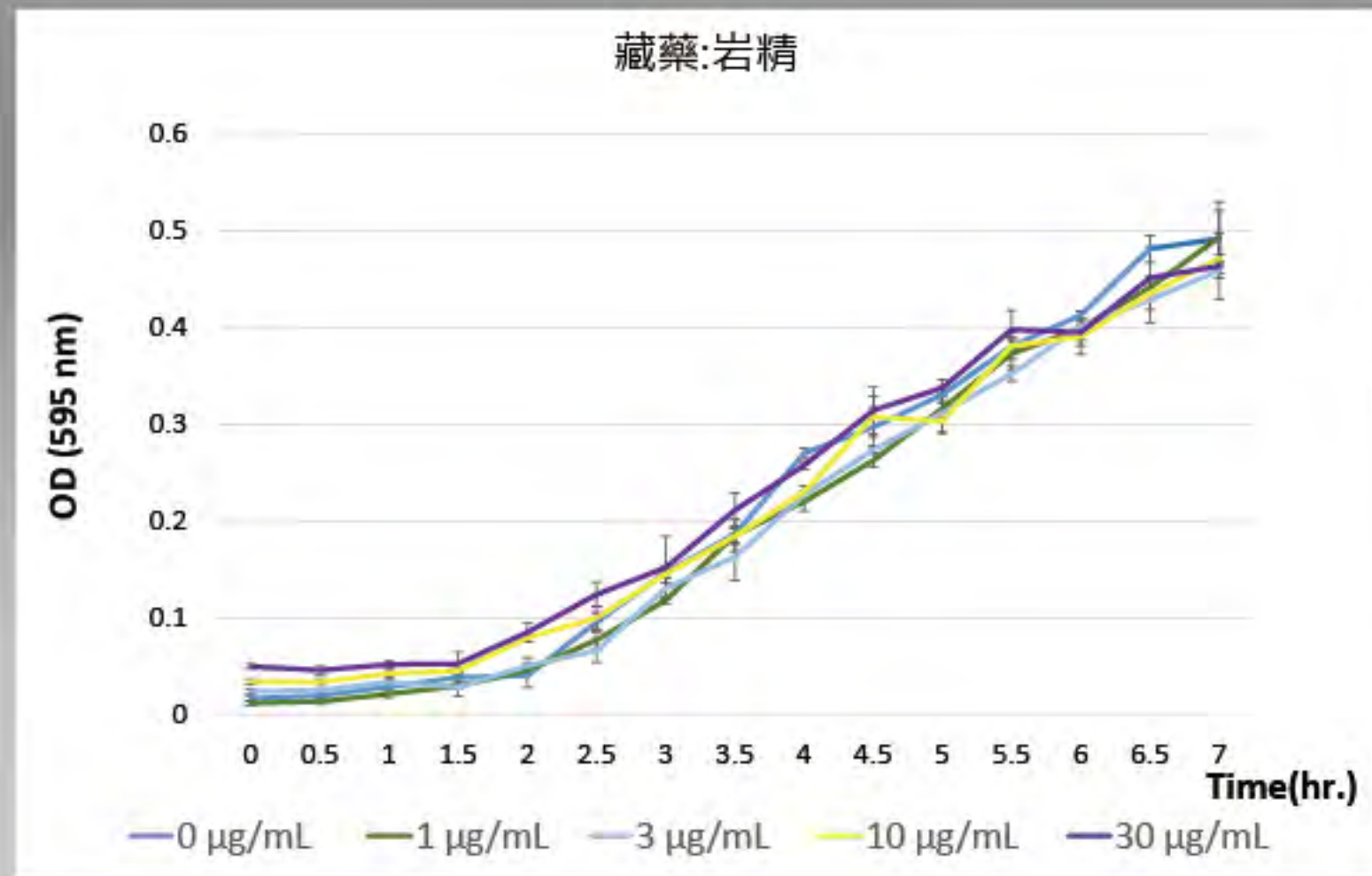
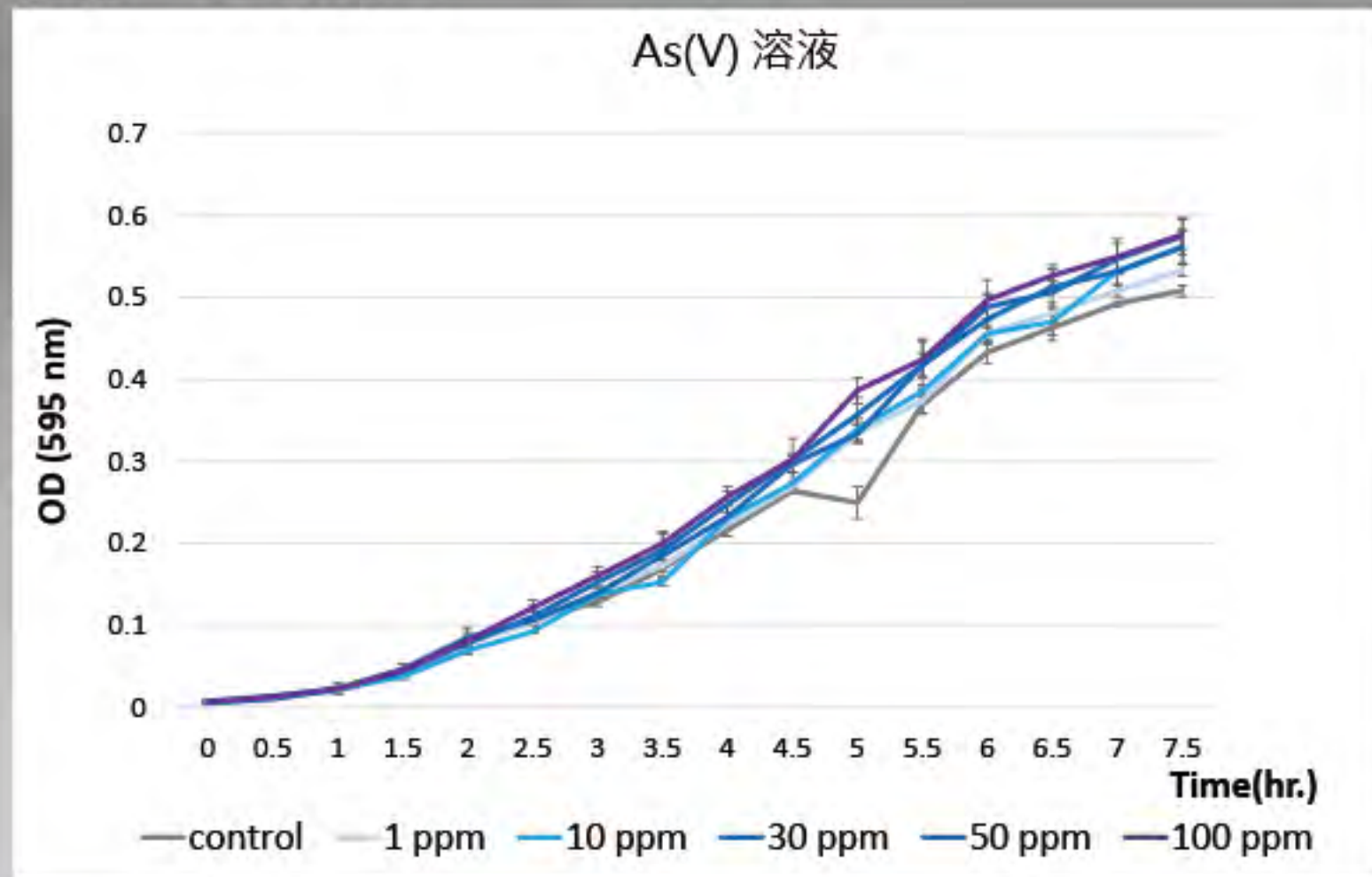
勝任細胞:	GFP biosensor	LacZ'α biosensor
測量/儀器; 單位:	螢光蛋白 螢光光度計 (RFU)	藍色沉澱 肉眼觀察
操作變項:	As(V): 1-100 ppm, Cu ²⁺ 濃度	As(V): 10 ppm, Cu ²⁺ : -10 ppm, Pb ²⁺ : 10 ppm, 負控制組: 0 ppm, 正控制組: [As(V)]=0 ppm
控制:	溫度 37°C; 時間 4 小時	溫度 37°C; 時間 15 小時

量性分析

勝任細胞:	GFP biosensor	LacZ'α biosensor	fMT bio-integrator
倍增時間	在 As(V)、岩精	As(V)	As(V)
公式:	$N_t = N_0 \times 2^{t/DT}$ $\log_2 \frac{N_t}{N_0} = y = \frac{t}{DT}$	DT: doubling time (倍增時間) N_t : t 時間點菌量 N_0 : 起始菌量	線性回歸
統計模式:	線性回歸 STATA	線性回歸 STATA	線性回歸 STATA
軟體:	STATA	STATA	STATA
系統生物	As(III)	As(III)	As(III)
基因迴路 化學反應 (例)	<p>Reaction 1: GFP production promoter → promoter+GFP Rate law: Michaelis-Menten Parameter $V_{max}=10, K_m=25$</p>		
Ordinary Differential Equations (ODE) 常微分方程式 (例)	$\frac{d[GFP]}{dt} = \frac{V_{max}[promoter]}{K_m + [promoter]} - K_d[GFP]$		
數值解結果: R 程式/deSolve package			

三、研究結果：1. GFP砷汙染感測器

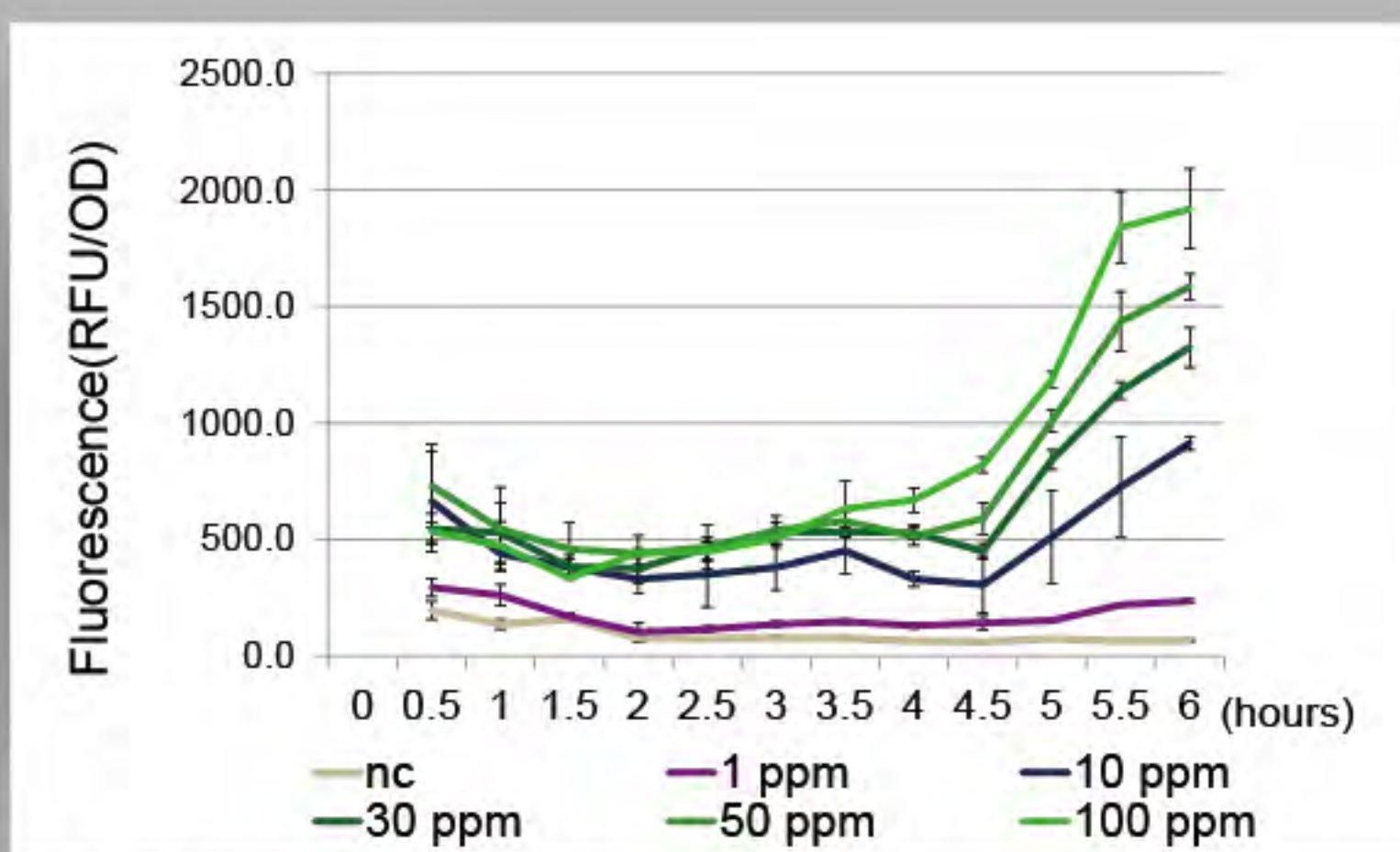
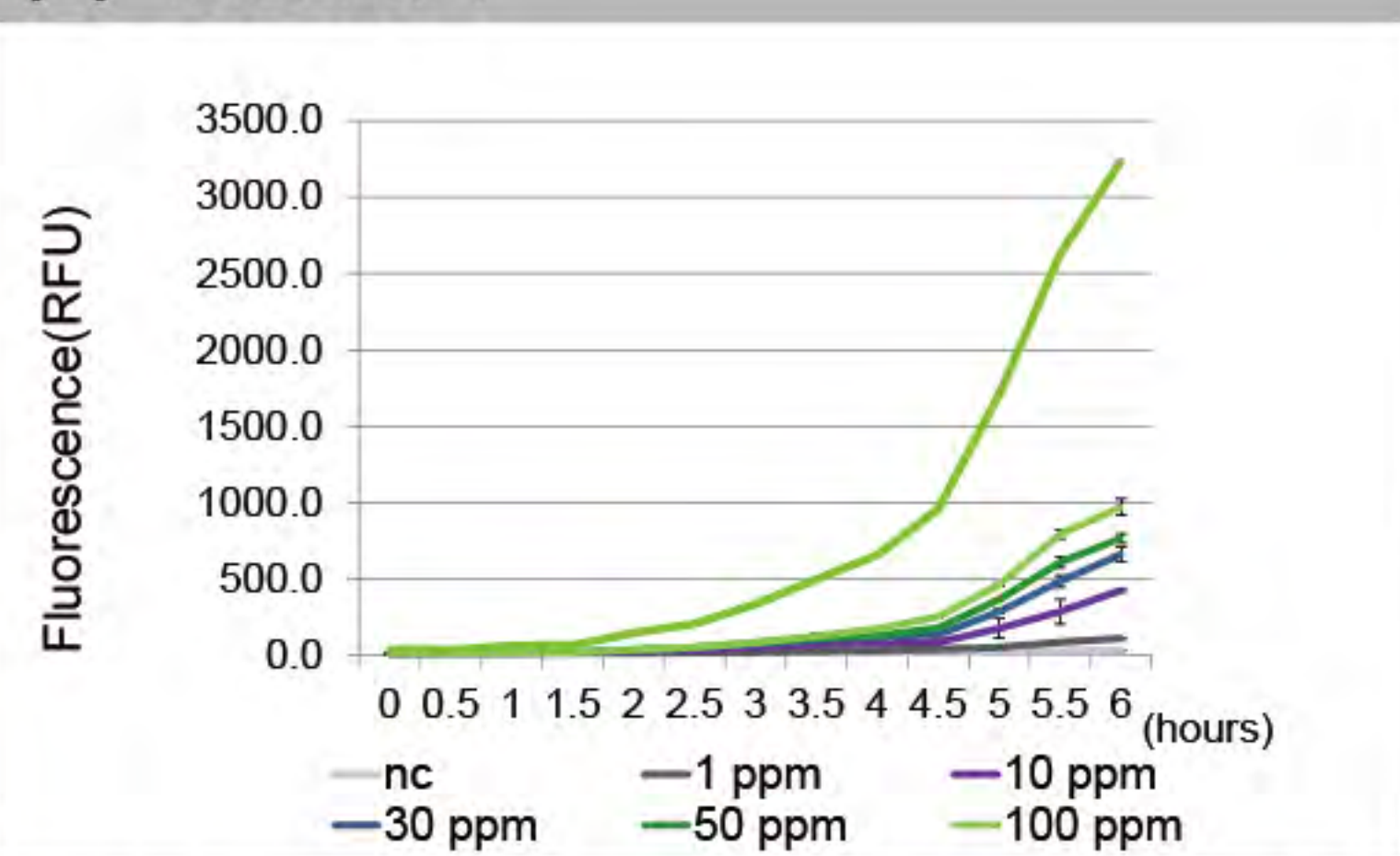
(1) 生長測試



▲圖1-1：GFP砷汙染感測器在As(V)溶液、岩精水溶液及四種常見中藥中的生長曲線 (波長:595 nm)

分析：GFP砷汙染感測器可以在As(V)溶液、岩精水溶液及四種常見中藥中正常生長。

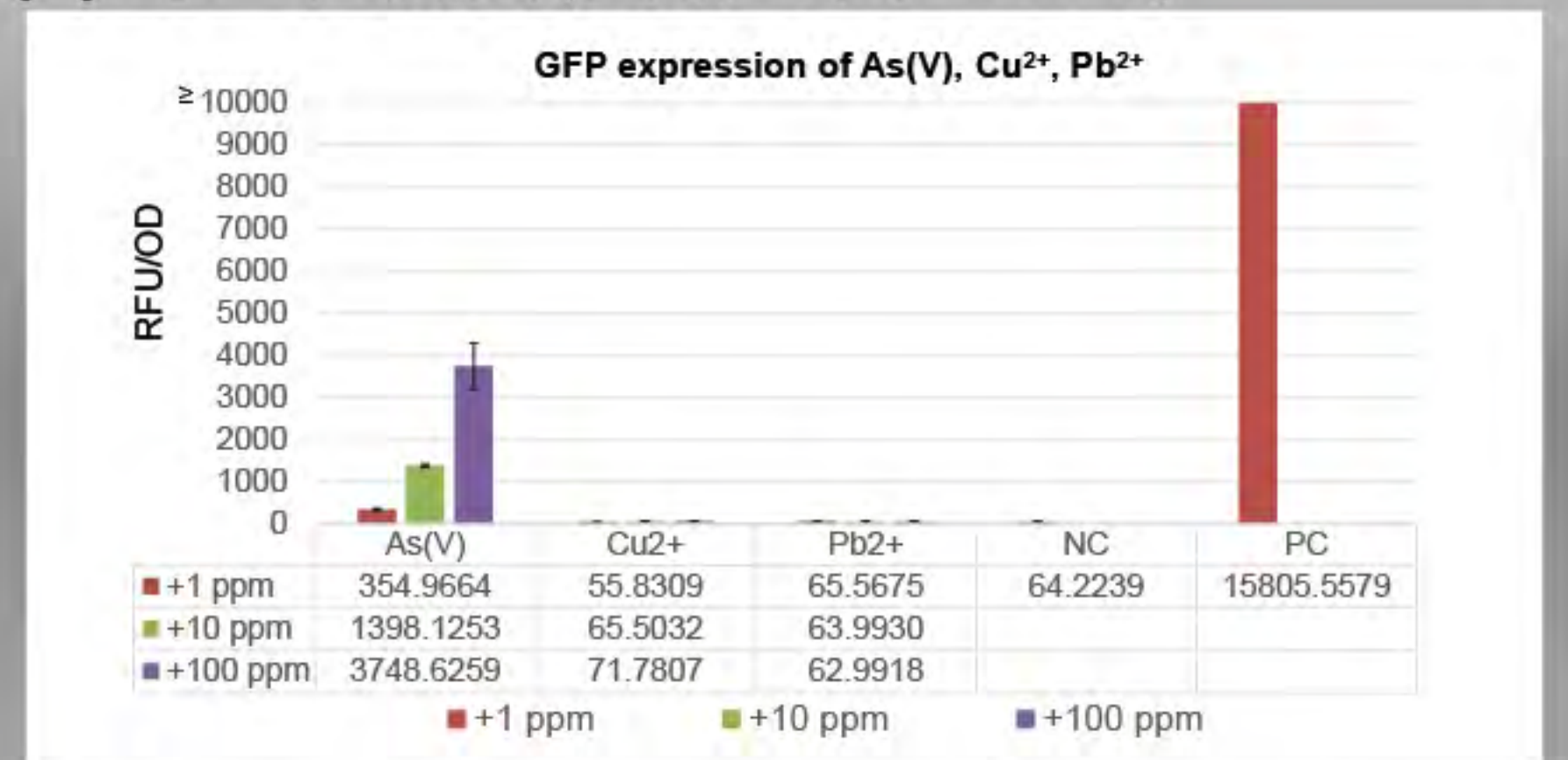
(2) 功能測試



▲圖1-2：GFP砷汙染感測器在不同濃度的As(V)溶液中的螢光量與螢光密度

分析：4.5個小時之後，螢光量與螢光密度與As(V)濃度和時間呈正相關。

(3) 專一性測試(實驗時間:4小時)

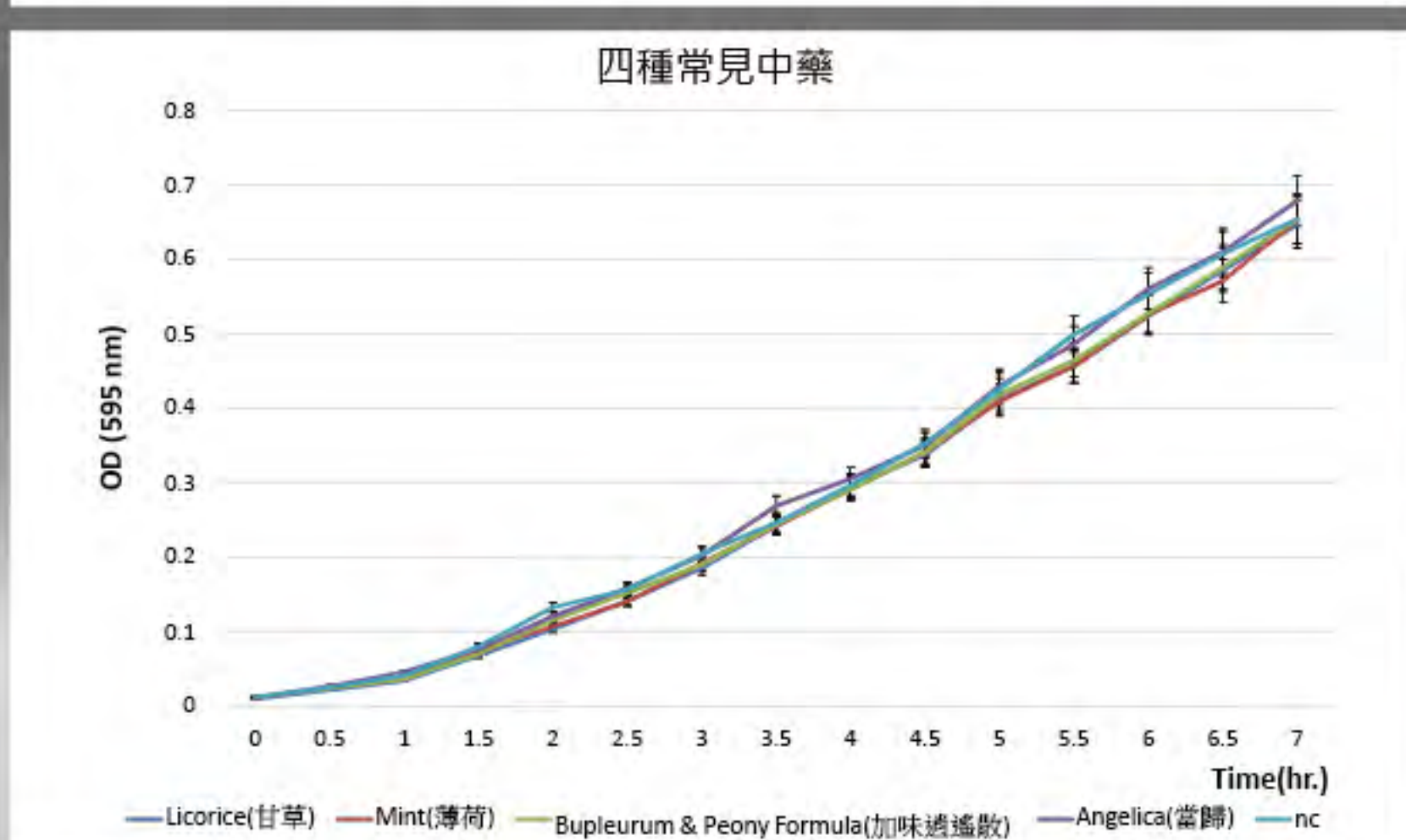
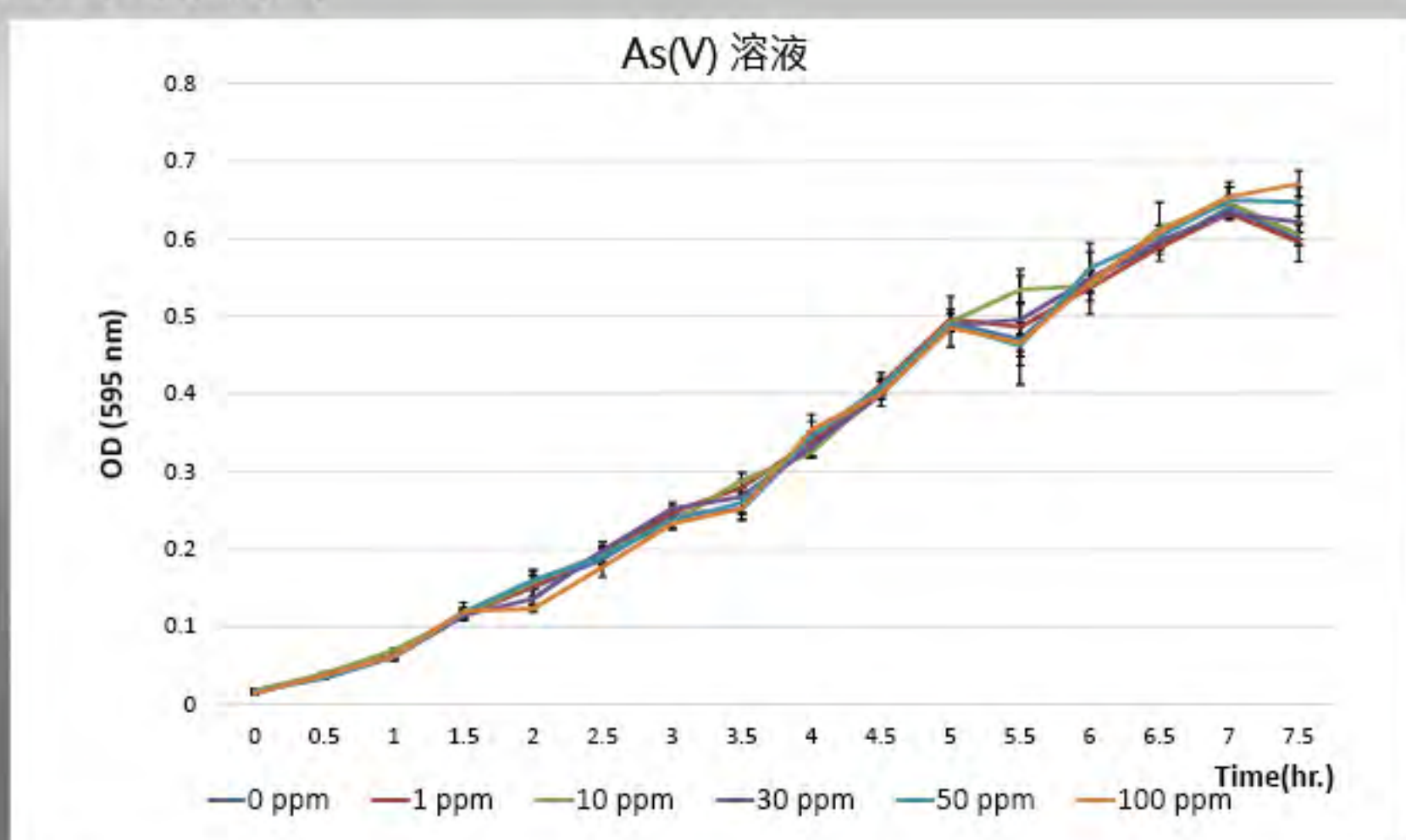


▲圖1-3：GFP砷汙染感測器在不同重金屬溶液中的螢光密度

分析：GFP砷汙染感測器在銅及鉛溶液中產生的螢光密度極為微弱，故GFP砷汙染感測器對砷具有良好的專一性。

三、研究結果：2. LacZ'α砷汙染感測器

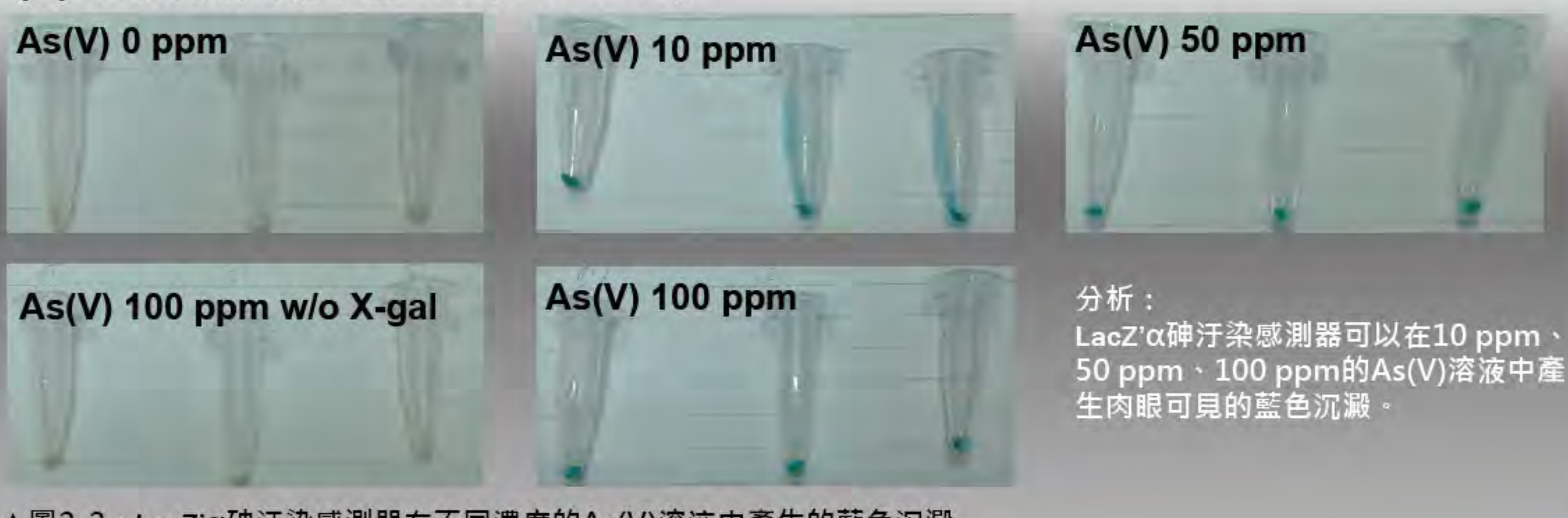
(1) 生長測試



▲圖2-1：LacZ'α砷汙染感測器在As(V)溶液及四種常見中藥中的生長曲線(波長:595 nm)

分析：LacZ'α砷汙染感測器可以在As(V)溶液及四種常見中藥中正常生長。

(2) 功能測試(實驗時間:15小時)



▲圖2-2：LacZ'α砷汙染感測器在不同濃度的As(V)溶液中產生的藍色沉澱

分析：
LacZ'α砷汙染感測器可以在10 ppm、50 ppm、100 ppm的As(V)溶液中產生肉眼可見的藍色沉澱。

(3) 專一性測試(實驗時間:15小時)

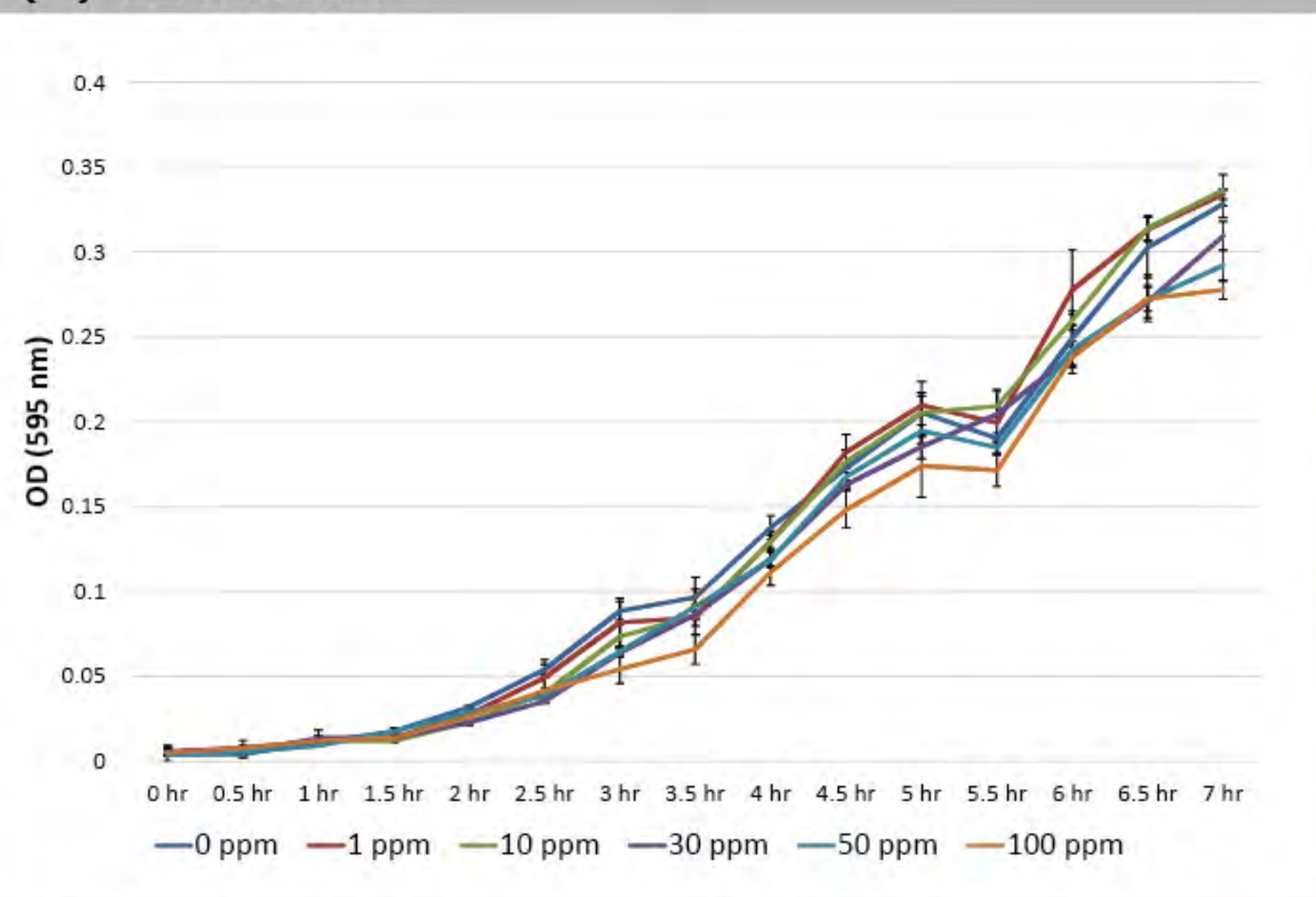


▲圖2-3：LacZ'α砷汙染感測器在不同重金屬溶液中的藍色沉澱

分析：
LacZ'α砷汙染感測器在銅及鉛溶液中無法產生明顯的藍色沉澱，可見LacZ'α砷汙染感測器對砷具有良好的專一性。

三、研究結果：3. fMT砷螯合器

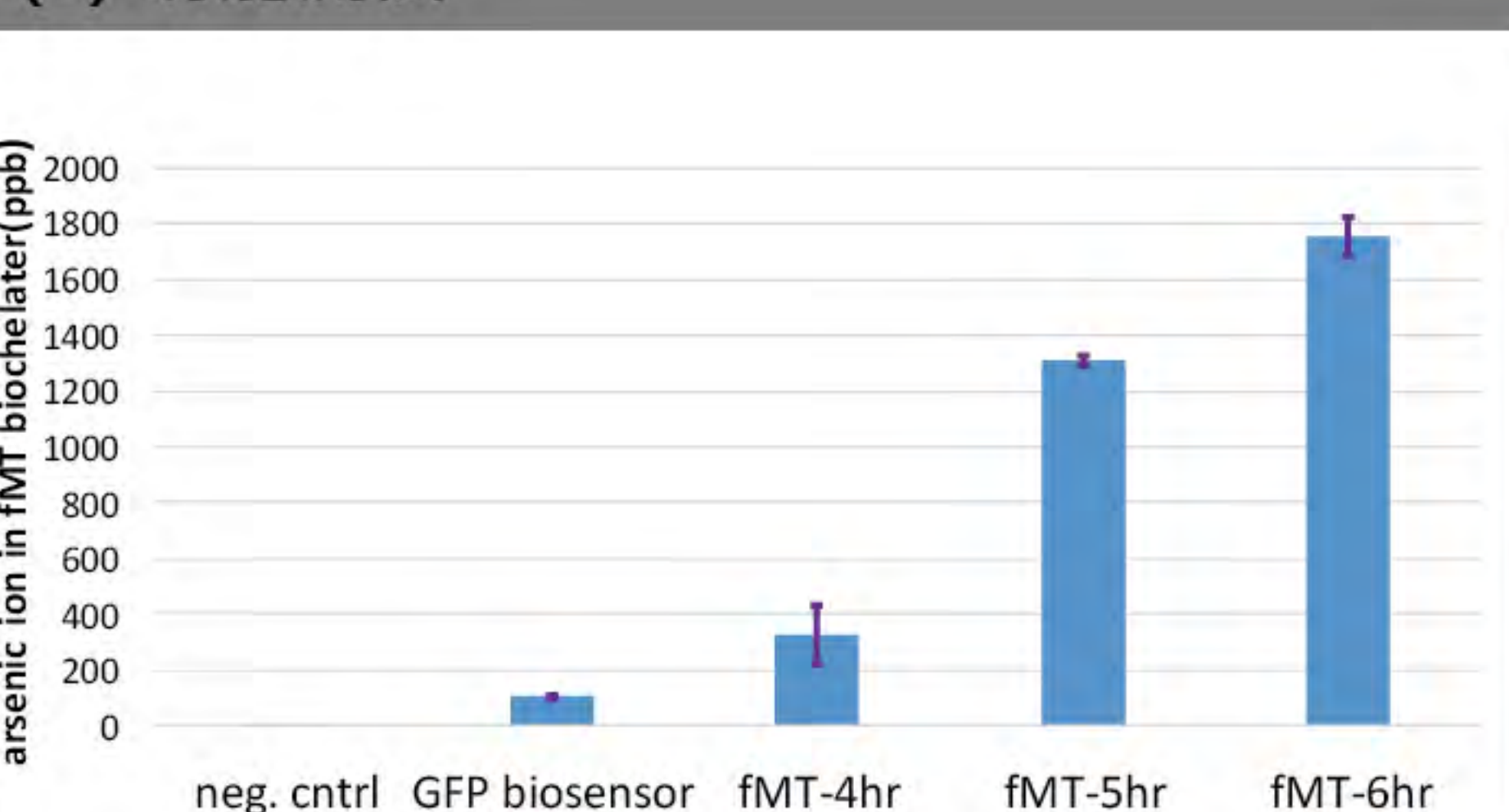
(1) 生長測試



▲圖3-1：fMT砷螯合器在As(V)溶液中的生長曲線

分析：fMT砷螯合器能在As(V)溶液中正常生長。(波長:595 nm)

(2) 功能測試

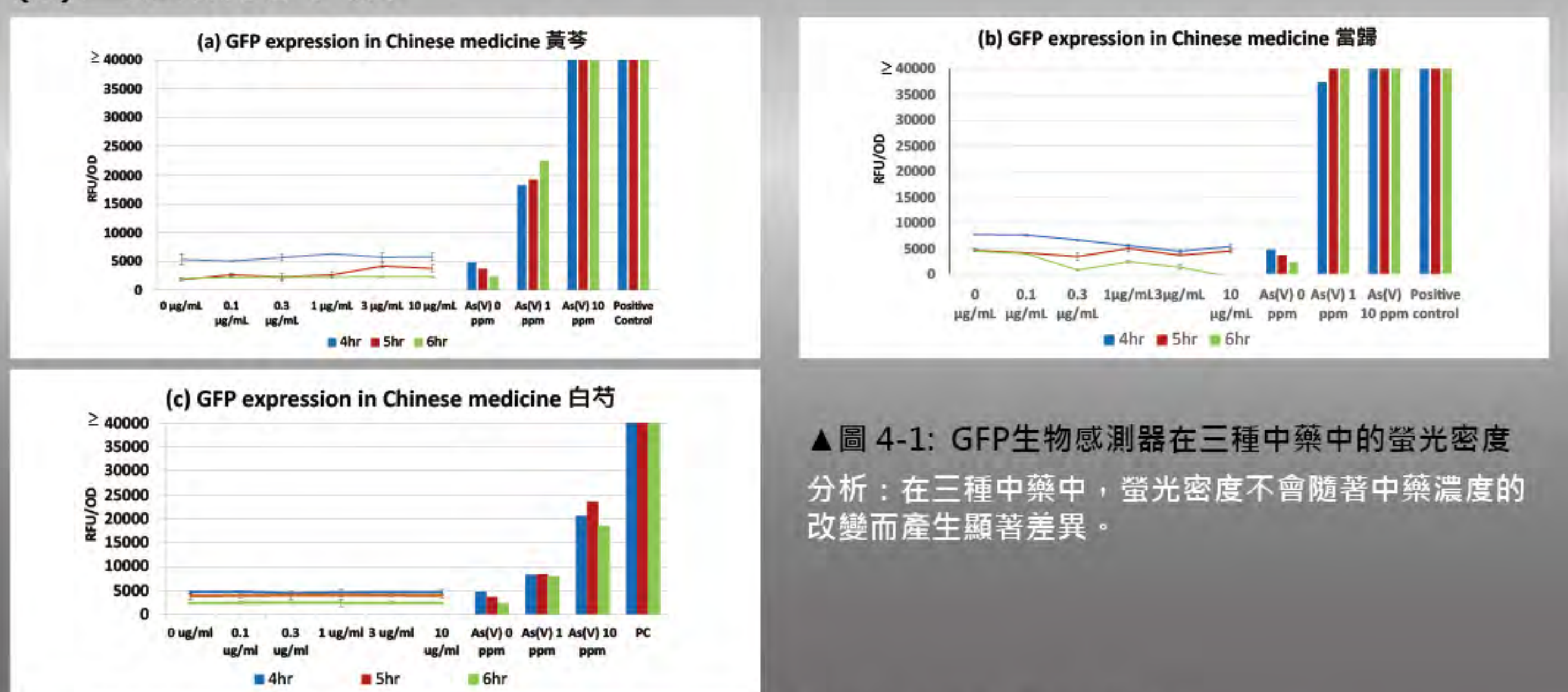


▲圖3-2：fMT砷螯合器在20 ppm的As(V)溶液中的砷螯含量

分析：經ICP-MS檢測，fMT砷螯合器可以有效的螯合砷，且被螯合的砷量與螯合時間成正相關。

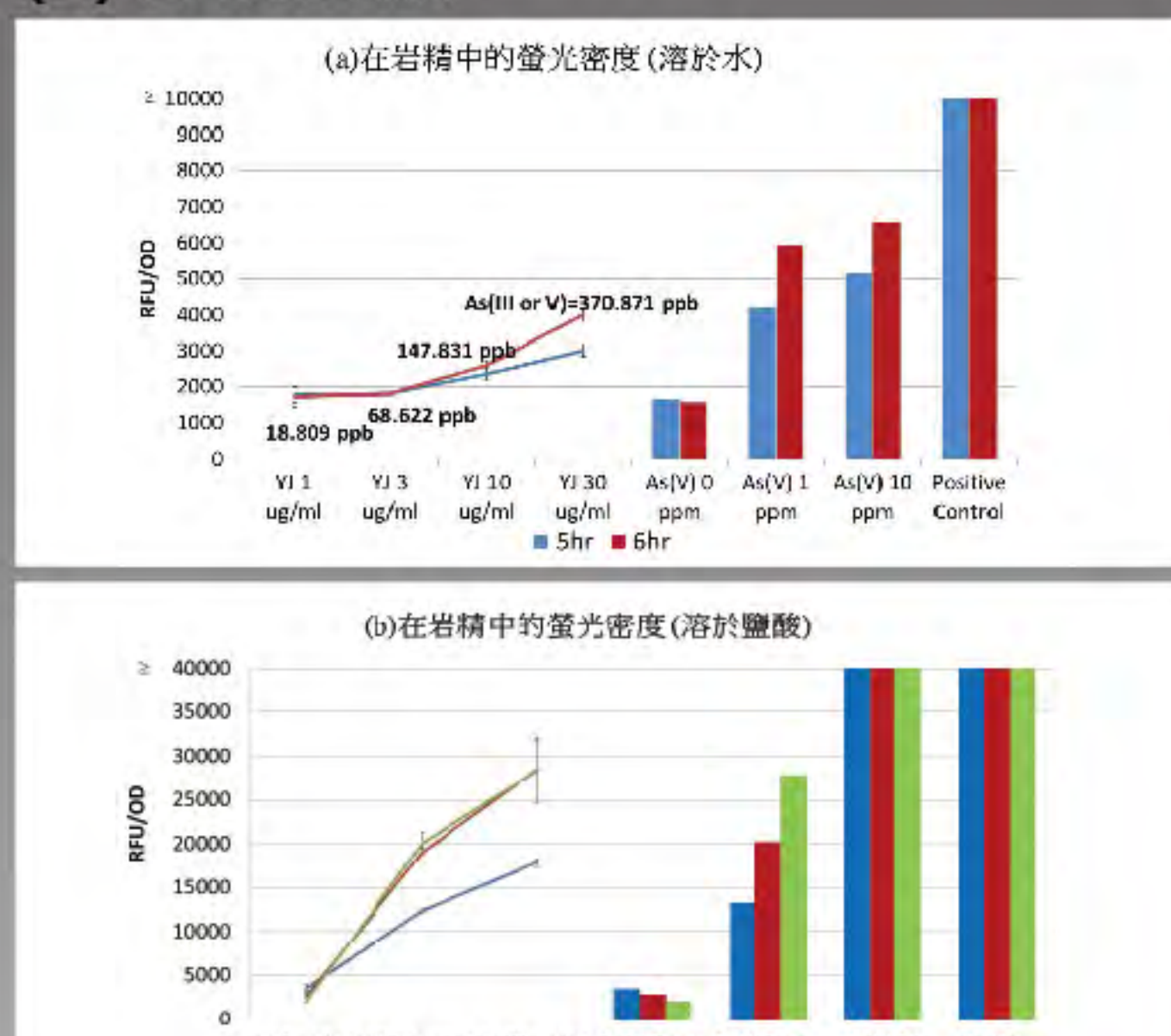
三、研究結果：4. 中藥測試(運用GFP砷汙染感測器)

(1) 三種常見中藥



▲圖4-1：GFP生物感測器在三種中藥中的螢光密度
分析：在三種中藥中，螢光密度不會隨著中藥濃度的改變而產生顯著差異。

(2) 岩精溶液



▲圖4-2：GFP生物感測器在岩精中的螢光密度(岩精水溶液中的砷含量經由ICP-MS測定)
分析：在岩精中，螢光密度與岩精濃度呈正相關，反應岩精的含砷量。

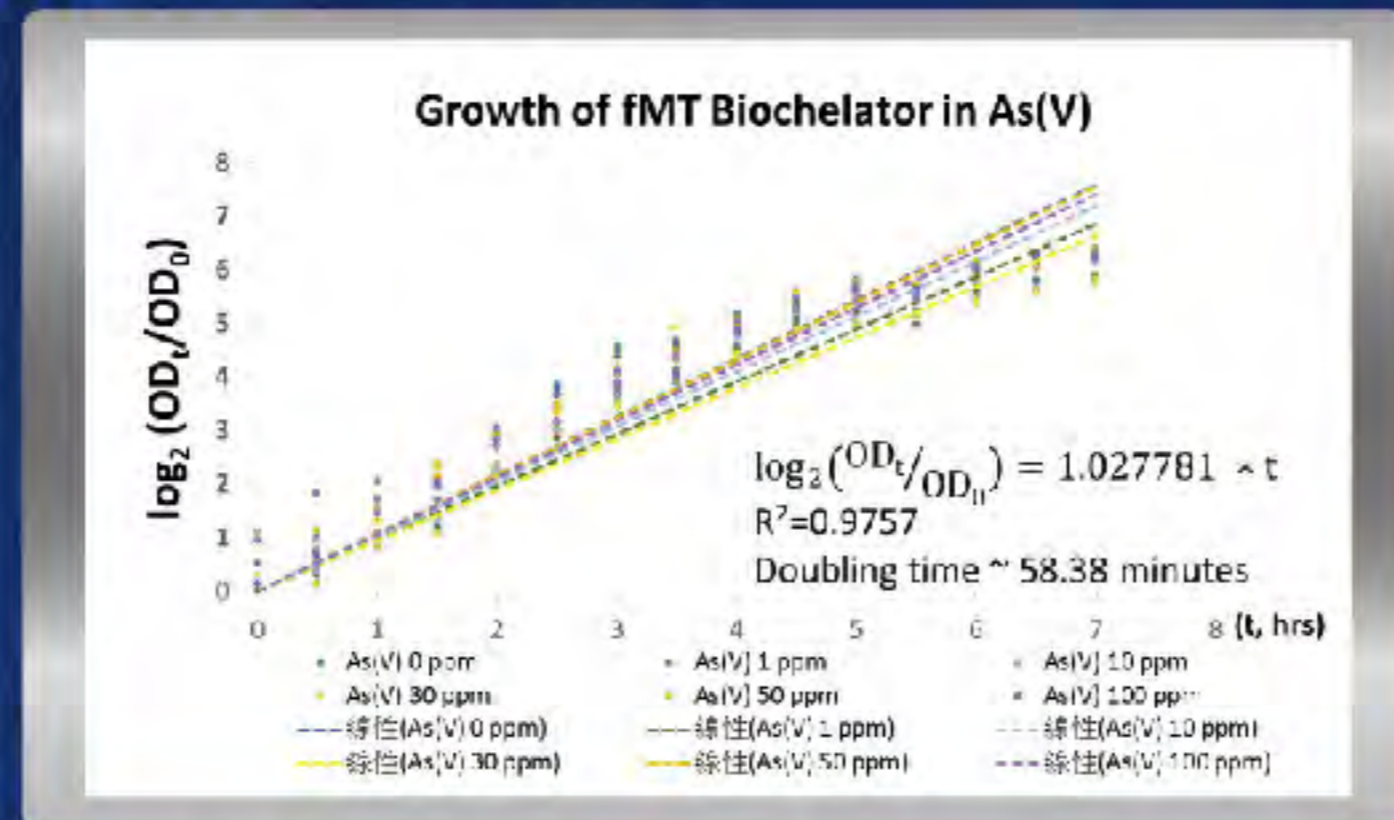
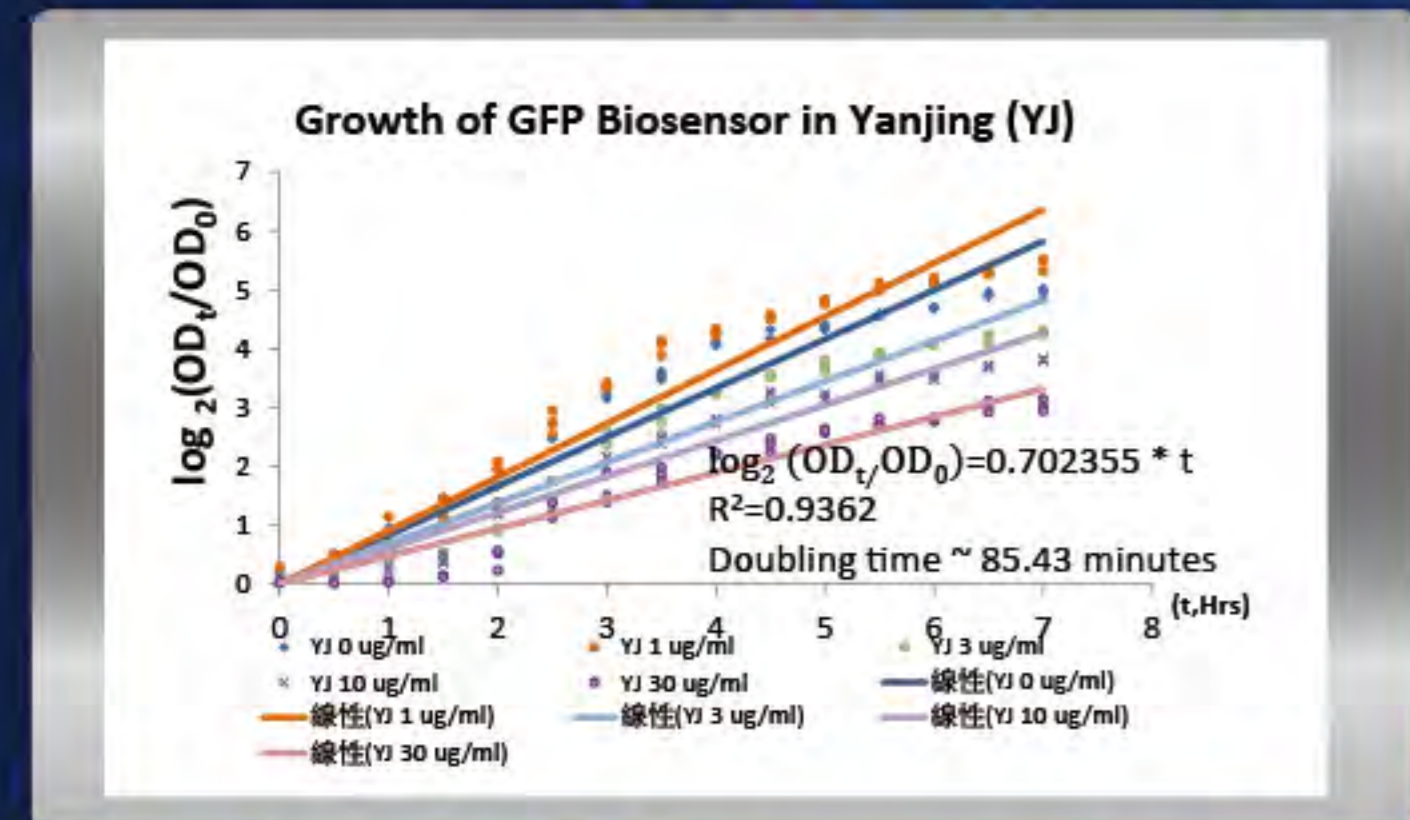
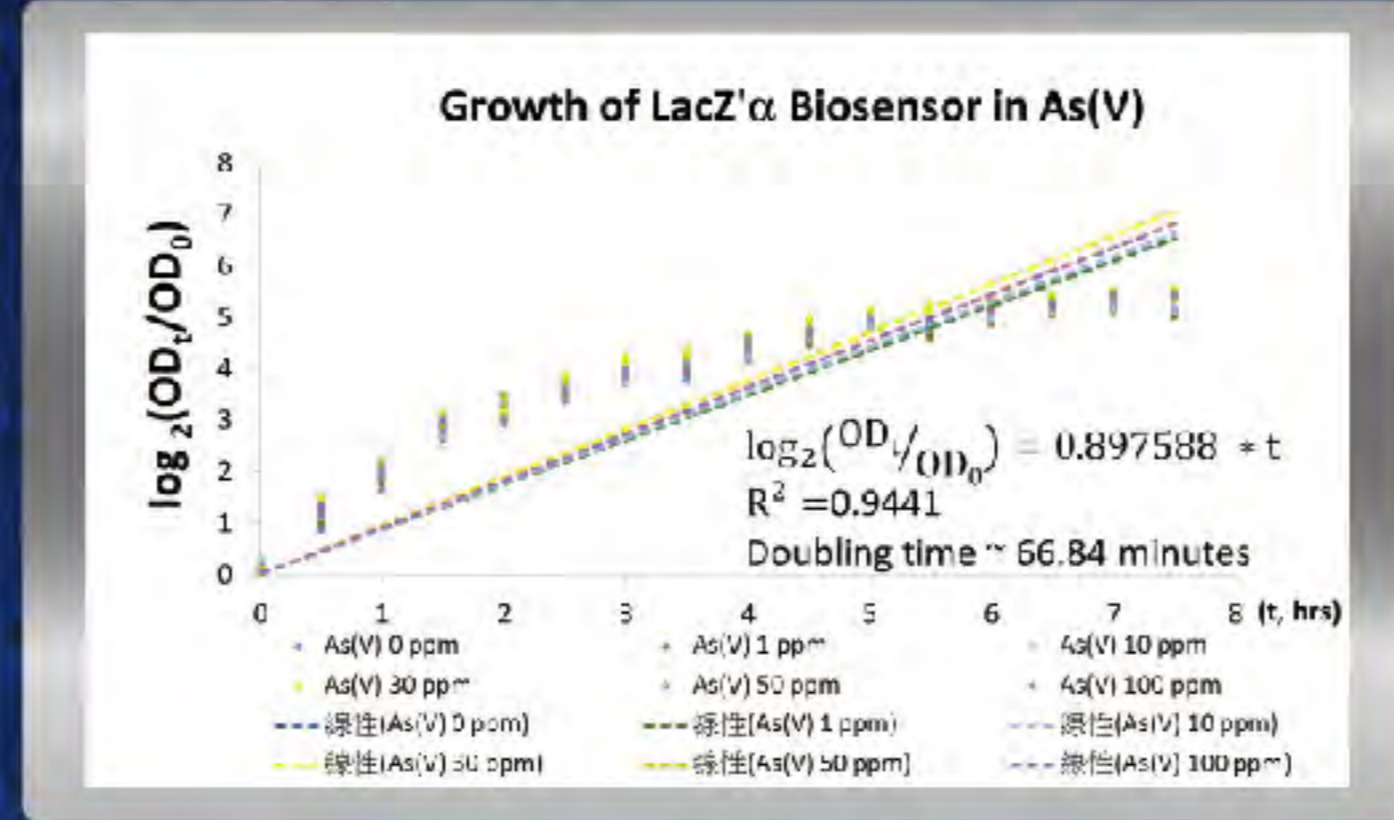
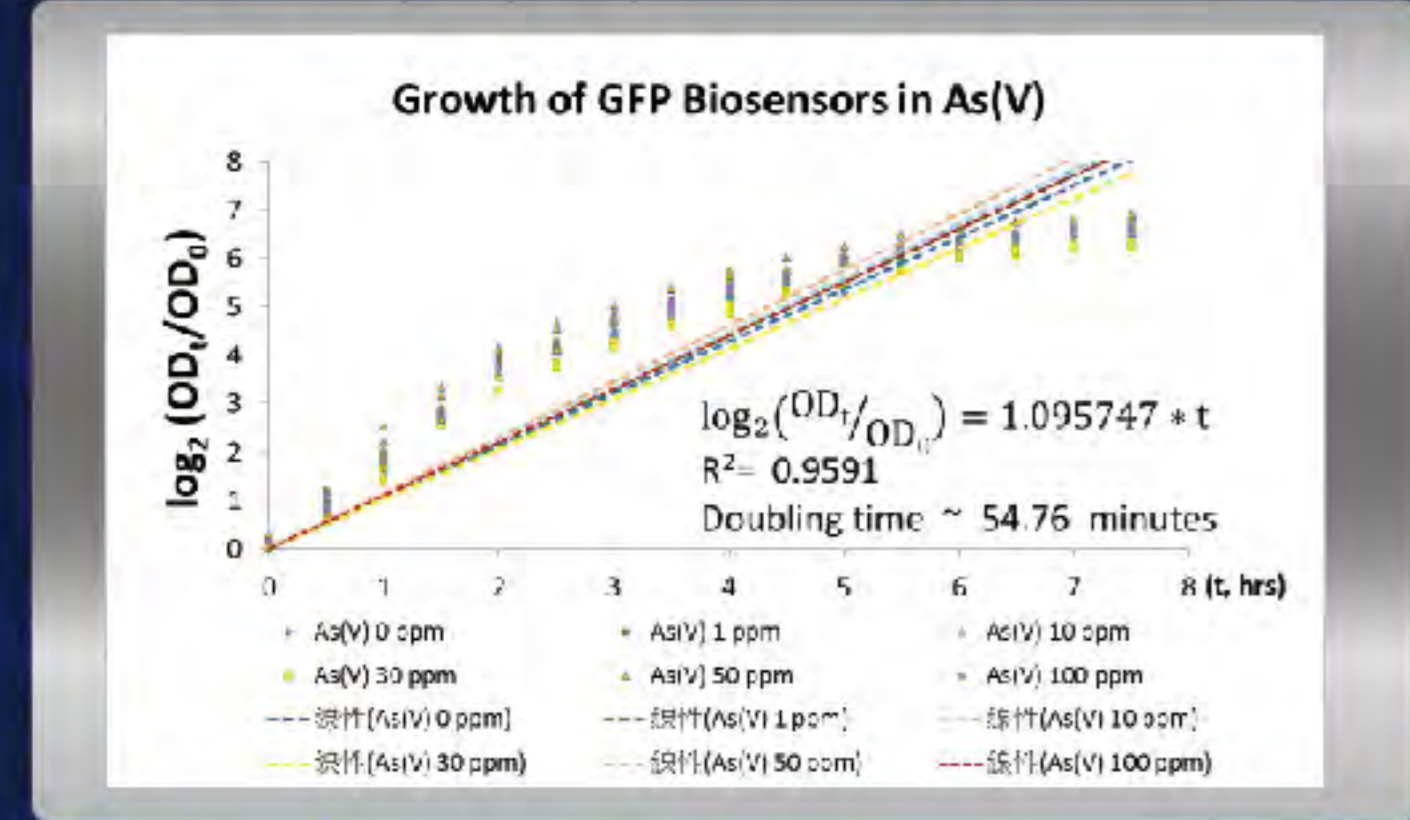
(3) 中藥加As(V)



▲圖4-3：GFP生物感測器在中藥加As(V)的螢光密度
分析：在中藥中加砷，螢光密度隨As(V)濃度增加。

三、研究結果：5. 量性分析

1. 倍增時間(Doubling time)



三種大腸桿菌勝任細胞在不同濃度的As(V)溶液中，個別的生長曲線均不隨著As(V)濃度有顯著的差異。由估計的斜率所推算的倍增時間也相近。

GFP砷污染感測器約54分鐘，lacZ'alpha 砷污染感測器，約66分鐘，fMT砷整合器約58分鐘。

GFP砷污染感測器在岩精溶液(YJ)中，平均倍增時間為85分鐘，顯示在岩精中的生長較慢，倍增時間也隨著岩精濃度增加而較長(左下圖)。

▲圖5-1:生長曲線的估計倍增時間—GFP砷污染感測器(左上)、LacZ'alpha 砷污染感測器(右上)和fMT砷整合器在As(V)溶液(右下)，以及GFP砷污染感測器在岩精水溶液(左下圖)。

2. 系統生物模式 (System biology model)

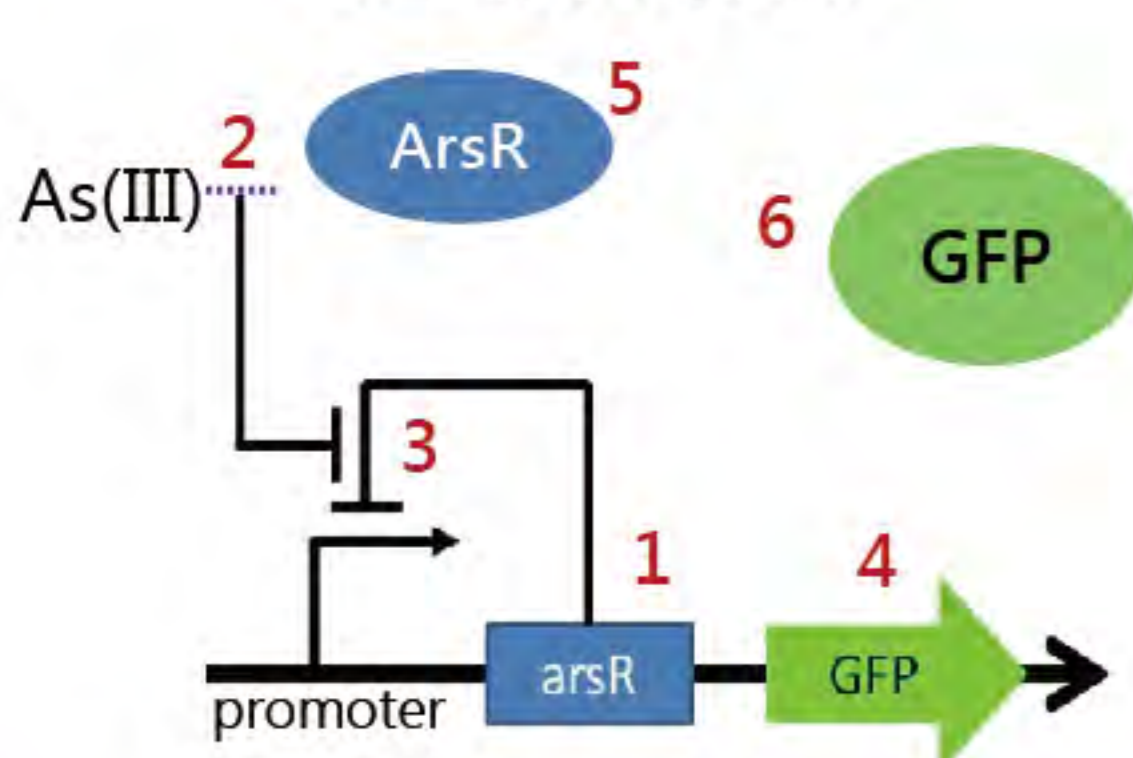
步驟1: 基因迴路

步驟2:

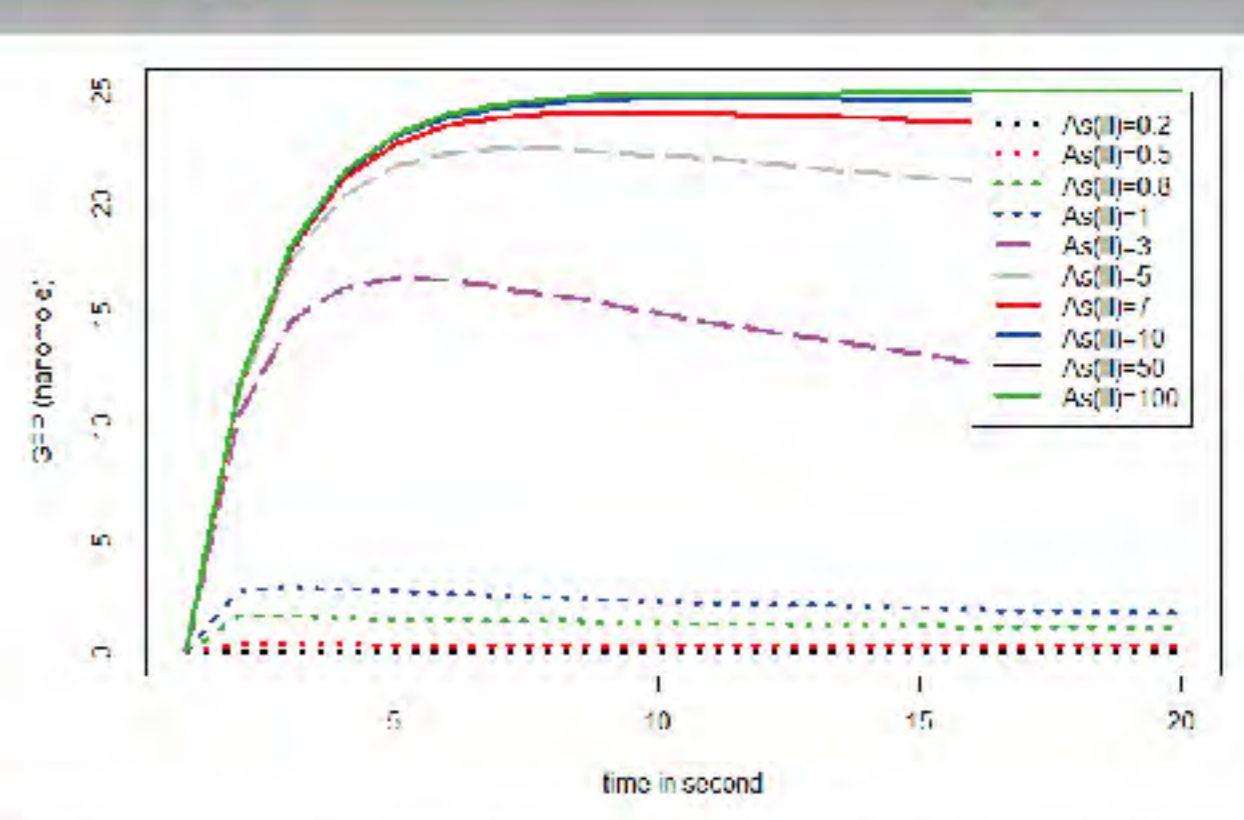
Ordinary Differential Equations (ODE)常微分方程

步驟3: 數值解結果

GFP 砷污染感測器



Reaction	Start value
ArsR change rate	25
ArsR_2As(III) change rate	0
2ArsR_promoter change rate	25
promoter change rate	0
GFP change rate	0

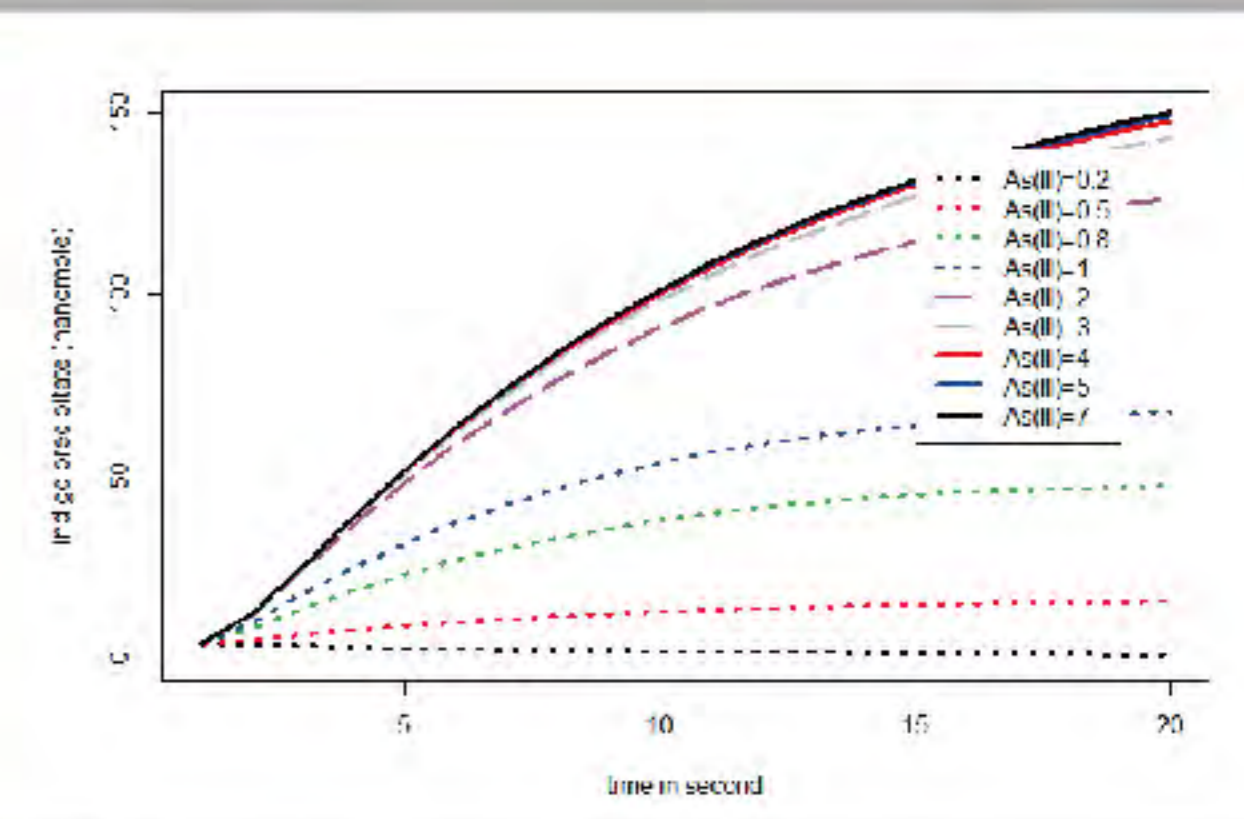


▲圖5-2:不同砷濃度與 GFP 蛋白量的時間關係圖。不同As(III)濃度下，螢光蛋白的產生速度、降解速度及最高螢光值皆有所差異。

lacZ'alpha 砷污染感測器

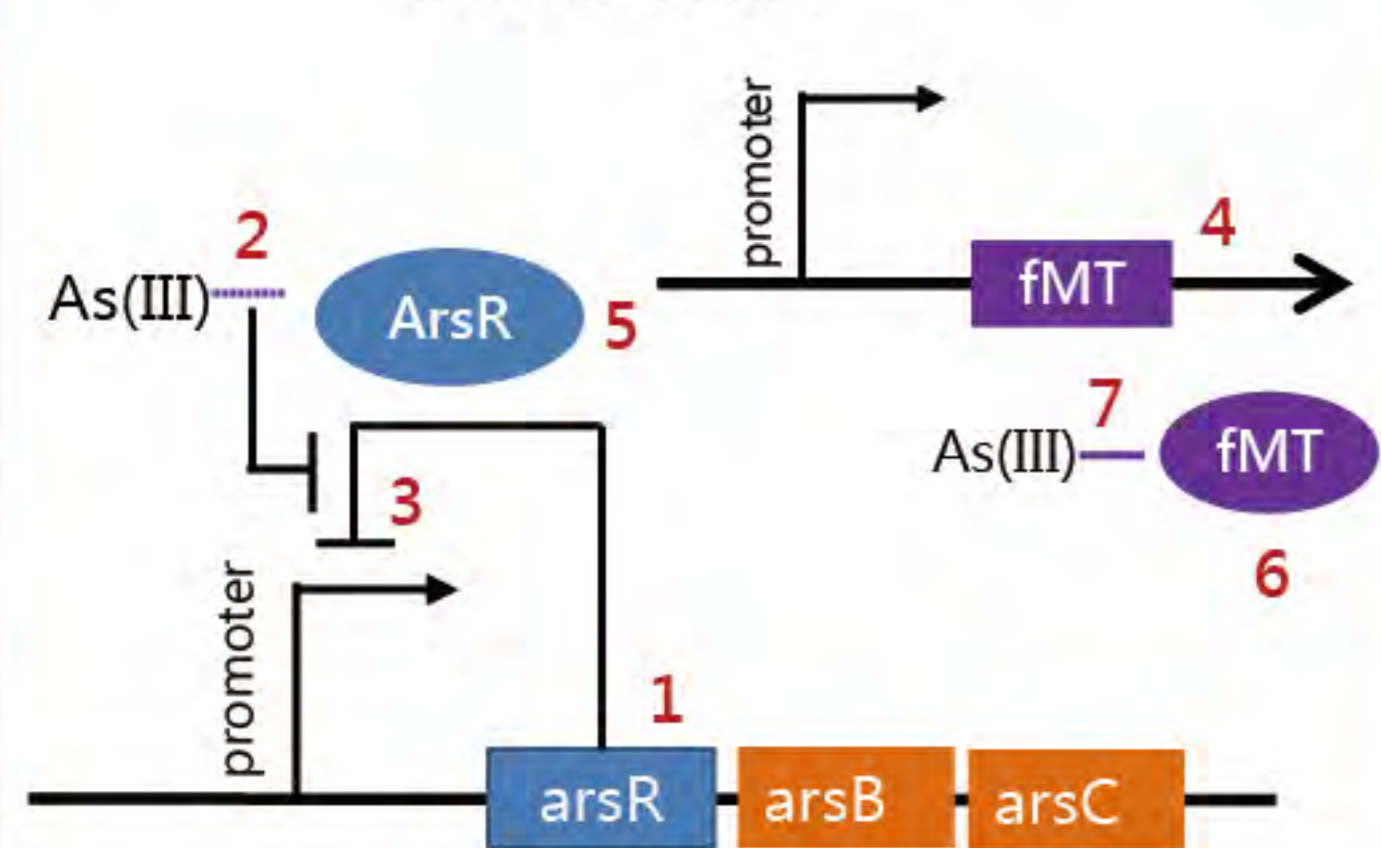


Reaction	Start Value
ArsR change rate	25
ArsR_2As(III) change rate	25
2ArsR_promoter change rate	25
Promoter change rate	0
lacZ'alpha change rate	4
Indigo precipitate change rate	0

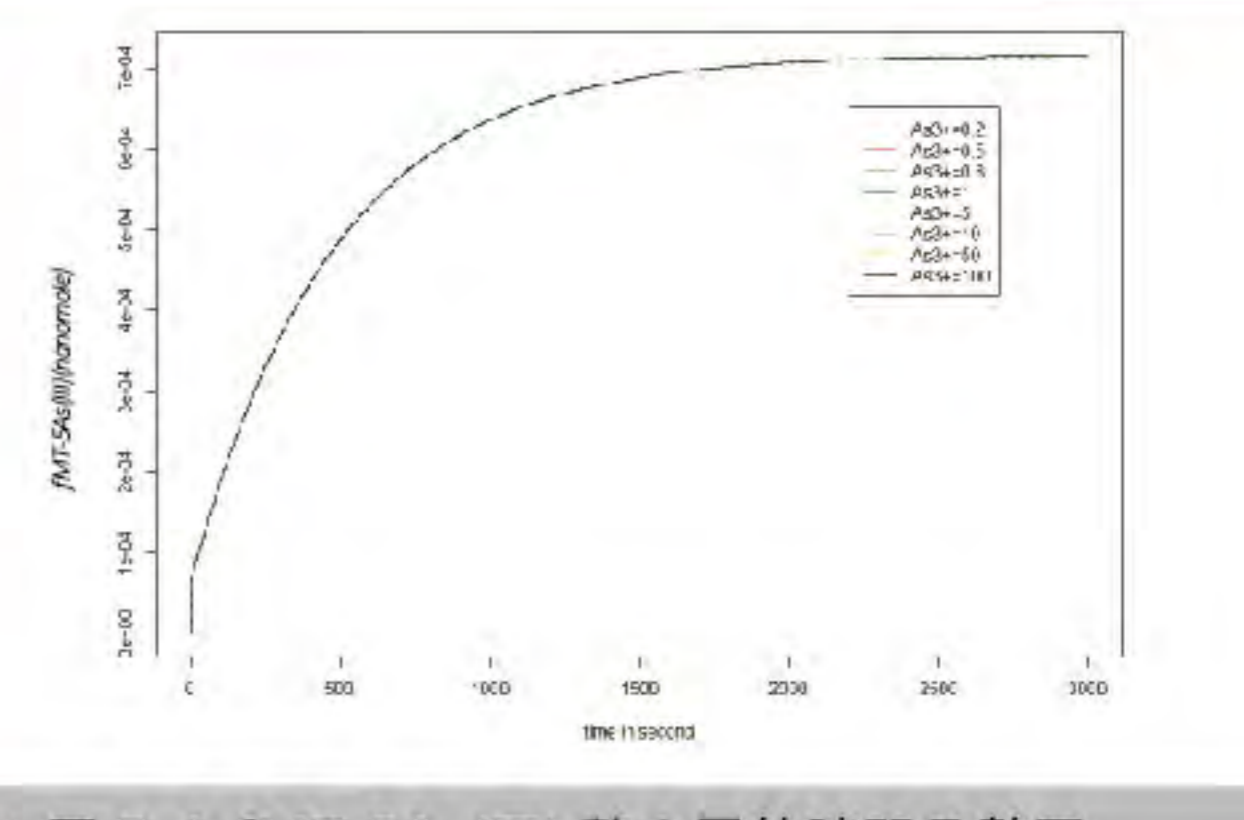


▲圖5-3:藍色 indigo 沉澱時間圖。不同的As(III)濃度下，藍色沉澱量會有所不同。

fMT 砷整合器

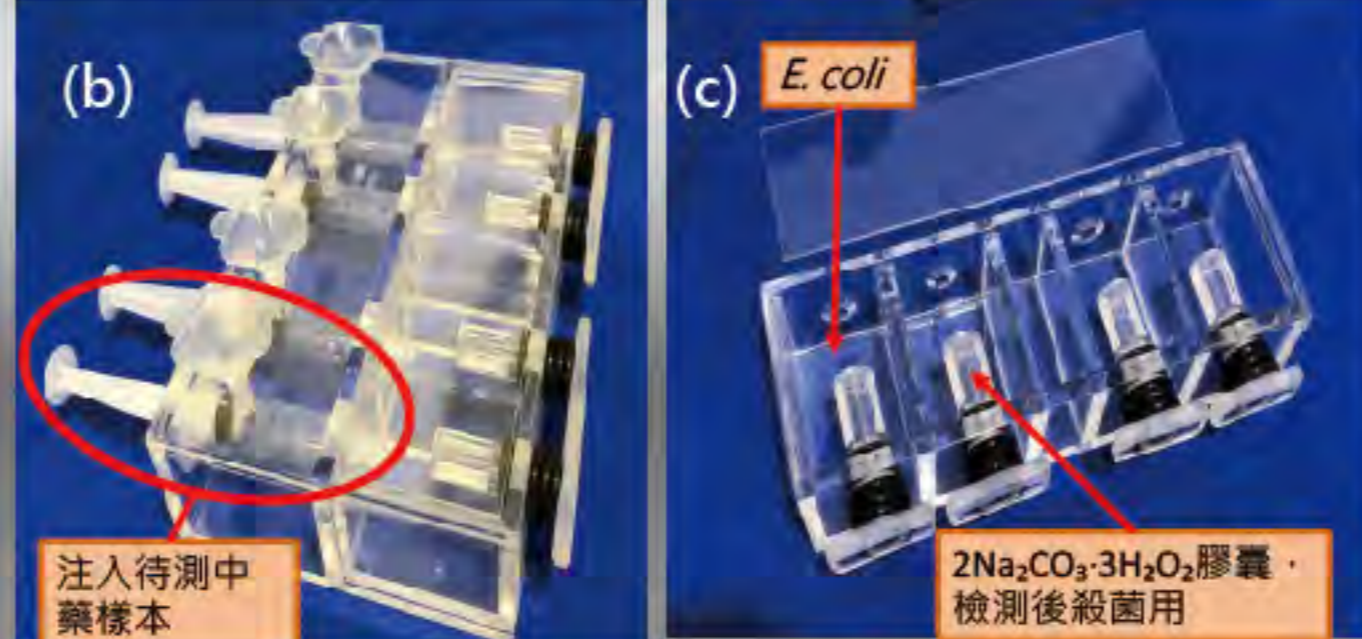
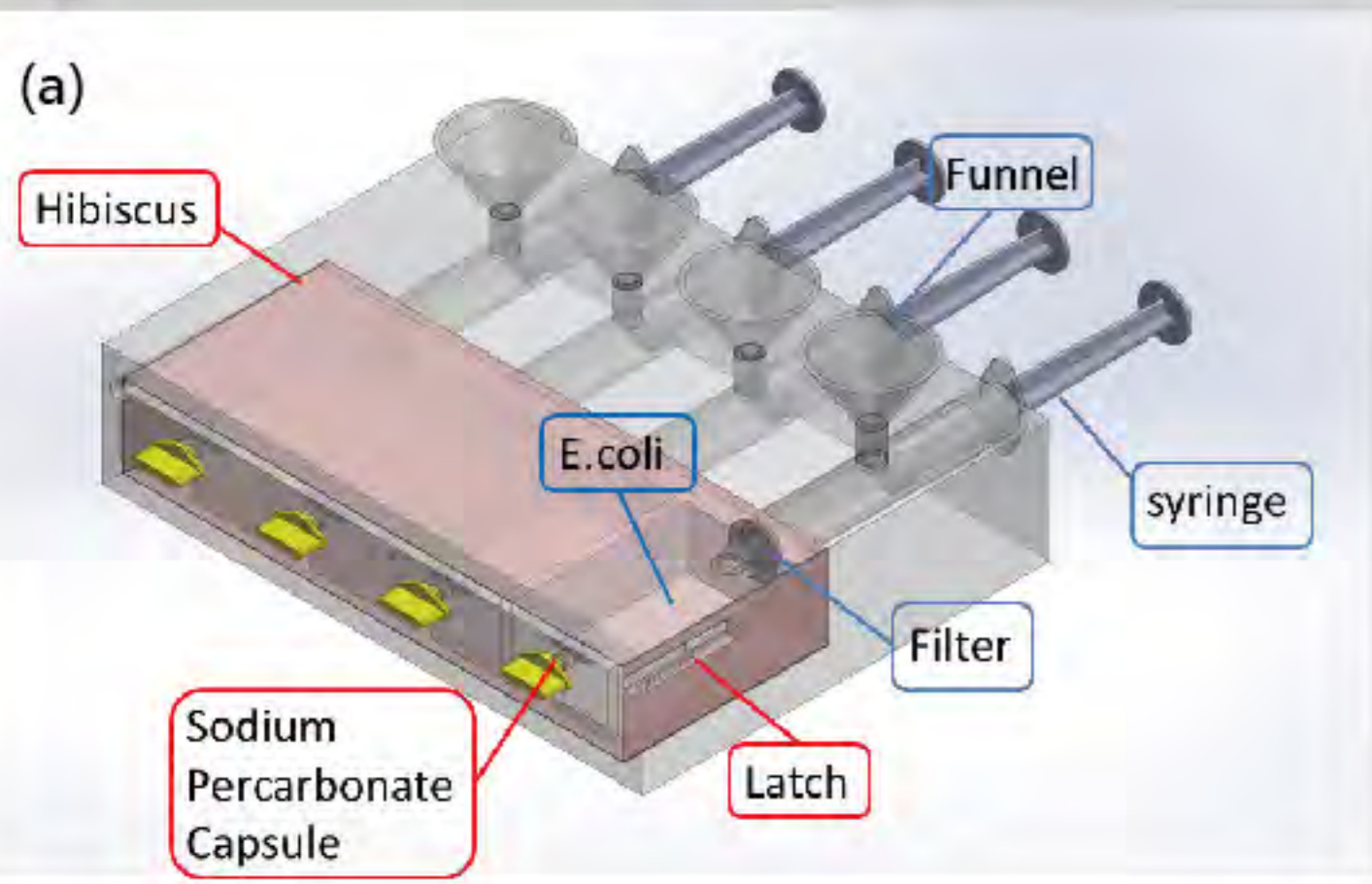


Reaction	Start value
ArsR change rate	0
ArsR_2As(III) change rate	0
2ArsR_promoter change rate	25
Promoter change rate	25
fMT change rate	4
AsfMT change rate	0

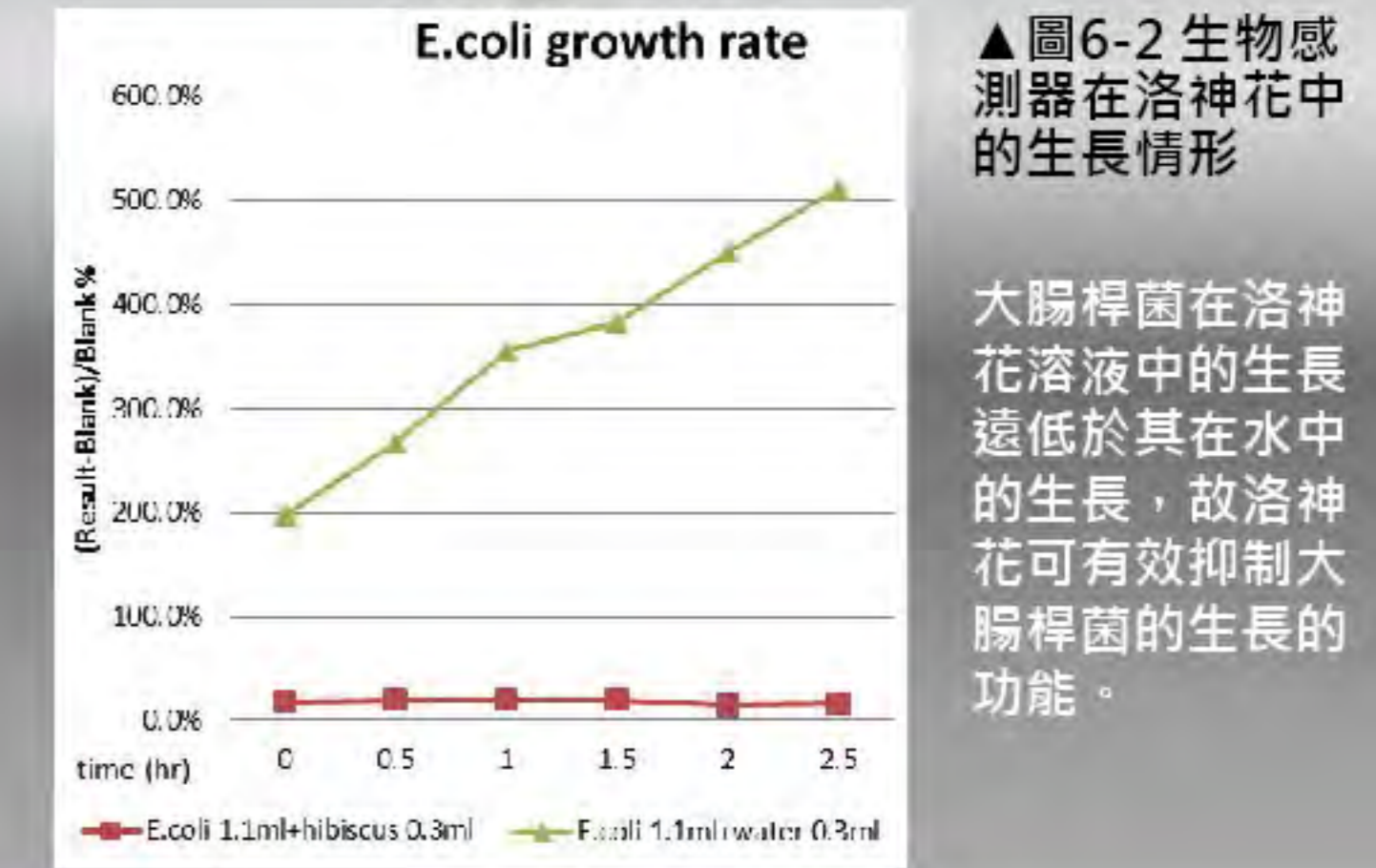


▲圖5-4: fMT-5As(III) 整合量的時間函數圖。砷整合量取決於 fMT 砷整合器所產生的的金屬硫蛋白量，不會因為As(III)濃度而有所不同。

三、研究結果：6. 產品設計



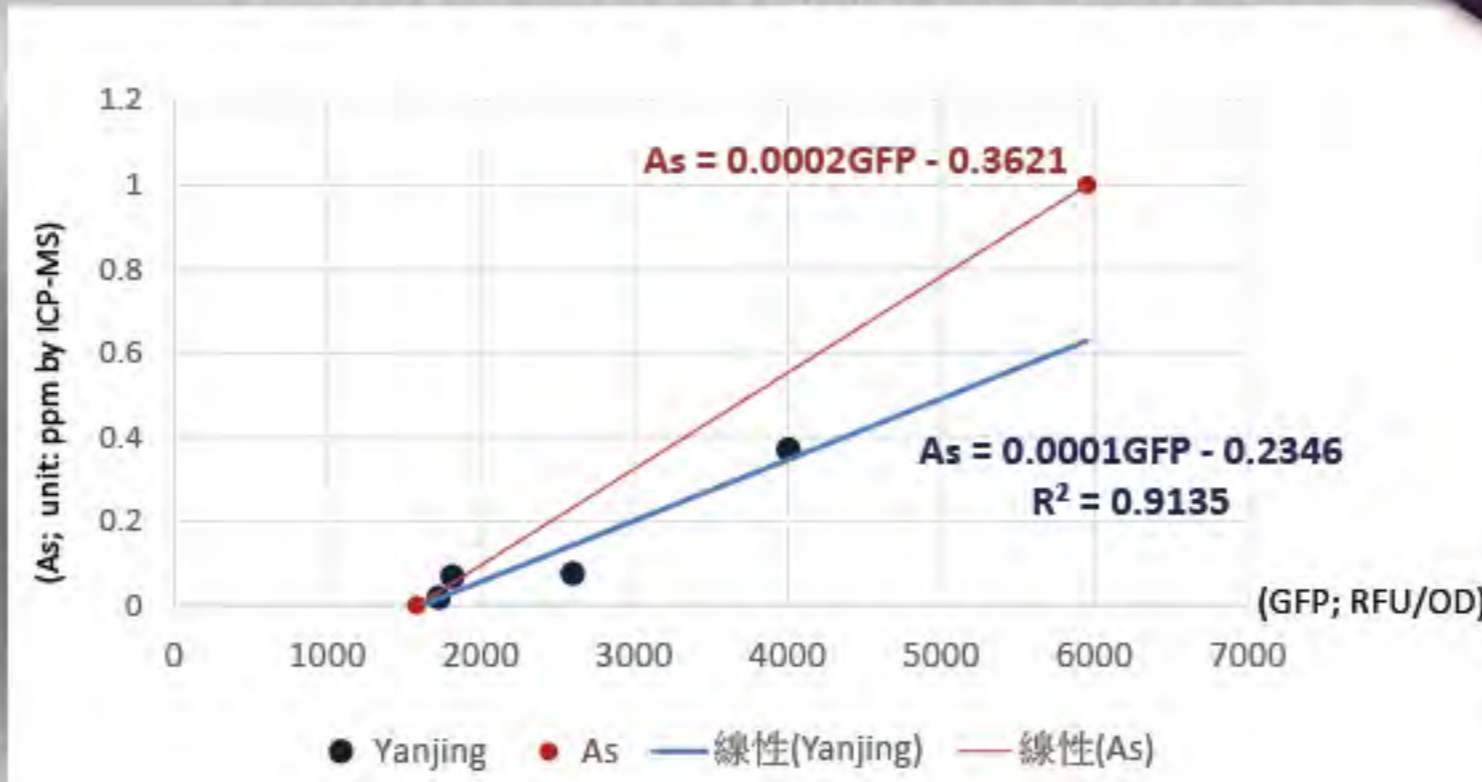
▲圖6-1 快篩產品裝置設計:透視圖(上)、外部構造(左下)及菌盤(右下)
 裝置結構設計卡榫避免菌盤脫落，菌盤有抑菌功效的洛神花塗層，在測試完中藥後，刺破裝置內的過碳酸鈉膠囊，與水反應，產生H₂O₂，達成滅菌的效果。



▲圖6-2 生物感測器在洛神花中的生長情形
 大腸桿菌在洛神花溶液中的生長遠低於其在水中的生長，故洛神花可有效抑制大腸桿菌的生長的功能。

▲表6-1 傳統砷污染檢測與快篩器檢測比較表	
感應耦合電漿質譜儀ICP-MS/抽樣檢驗	砷污染生物感測器/普及快篩
時間效率: 1週以上	GFP砷污染感測器: 5小時 LacZ'alpha快篩器: 15小時
經濟成本: 高 衛生福利部「食品藥物化妝品檢驗收費標準」(即授食字第1051901465號) NT \$9000/樣品項	低 螢光光度計: NT\$1470/件 LacZ'alpha快篩器: • 基本裝置: 預估 NT\$500 • 菌盤: 預估 NT\$100
可近性: 低(標準實驗室, 收費高)	高 GFP砷污染感測器: 實驗室 LacZ'alpha快篩器: 自行購買
食安範圍: 小(海關隨機抽樣; 市場少量)	大(快篩器普及性高)
精準度: 高	GFP砷污染感測器: <1 ppm; R ² =0.91; r _d =0.96

GFP砷污染感測器在As(V)和岩精的螢光密度



▲圖6-3: GFP螢光感測器在岩精中的螢光密度與其砷含量的線性關係

四、結論及應用

- GFP砷污染感測器可以在As(V)和中藥溶液中正常生長，偵測出溶液中砷含量，其螢光密度與As(V)的濃度呈正相關，並且對砷具有專一性。
- 經ICP-MS確認，GFP砷污染感測器可以偵測出藏藥岩精中含有砷，且螢光量與岩精濃度呈正相關。
- LacZ'alpha砷污染感測器可以在As(V)和中藥溶液中正常生長，在有砷的環境中，加入X-gal後，產生肉眼可見的藍色沉澱。對砷具有專一性。
- fMT砷整合器的生長不受As(V)濃度的影響，能在有As(V)的環境中整合As(V)，隨著時間的增加，大腸桿菌內整合砷量也越多。
- 所研發出來的快篩裝置，具有抑菌的生物安全性。
- 未來可以運用這種設計生物感測器與整合器的方法，針對政府管制中藥材中的鉛、汞、鎘及黃麴毒素等毒素，開發低成本的快篩工具及過濾器等，快速解決中藥產地及產品污染的問題。
- 未來還可以廣泛運用在解決不同產業與環境的金屬污染問題，降低金屬中毒對健康的危害。

五、參考文獻

- Ernst, E. (2002). Toxic heavy metals and undeclared drugs in Asian herbal medicines. Trends in Pharmacological Sciences, 23(3), 136-139.
- Rodriguez-Lado, L., Sun, G., Berg, M., Zhang, Q., Xue, H., Zheng, Q., & Johnson, C. A. (2013). Groundwater Arsenic Contamination Throughout China. Science, 341(6148), 866-868.
- Sandhi, A., Landberg, T., & Greger, M. (2018). Phytofiltration of arsenic by aquatic moss (Warnstorffia fluitans). Environmental Pollution, 237, 1098-1105
- Mateos, L. M., Ordoñez, E., Letek, M., & Gil, J. A. (2006). Corynebacterium glutamicum as a model bacterium for the bioremediation of arsenic. International Microbiology, 9(3), 207-215.
- Soetaert, K., Petzoldt, T., Setzer, W. R. (2010). Package deSolve: Solving initial value differential equations in R. Journal of Statistical Software, 33(9), 1-25.