

臺灣二〇〇八年國際科學展覽會

科 別：微生物學

作品名稱：溫泉中的秘密

學校 / 作者：臺北市私立靜心國民中學 林彥成

作者介紹



從小我就對自然科學很有興趣，總是喜歡對許多人認為理所當然的事務和現象進行深入的研究，抽絲剝繭打破砂鍋問到底。不論是天文、物理、化學、生物，我都很有興趣。西元 2002 年的 SARS 令大家聞風喪膽，當時我領悟到微生物還有許多奧妙是我們不知道的，也因此我愛上了微生物。

八年級的暑假，我非常幸運的有機會跟著爸爸的好同學一直在微生物界研究的教授進行了一系列高溫細菌的研究，看到自己所採樣的細菌一天一天的繁殖、成長，我自己覺得好有成就感。而實驗的過程一次次的失敗與到最後的結果，更讓我覺得高興與難忘。在未來，我的目標是繼續研究微生物，希望在這個領域能幫助人類揭開微生物學的扉頁。

Hot Spring-Embedded Secrecy

Abstract

The experiment was primarily focused on studying whether the enzymes from different bacterial species collected in various hot spring areas still exhibited activities at high temperatures. A further study would be conducted on analyzing the unique characteristics universally found in the genes of selected bacteria.

First, hot spring samples were collected from Peitou and Wulai, and then cultured on the PY, PTG, MFB, and TS media in the laboratory. After the broth media growing with thermophilic bacteria, a series of continuous dilution method and solid-plate spreading were applied to separate these bacterial clones. The genomic DNA of the selected bacteria was extracted and used to analyze *subtilisin*-like gene by polymerase chain reaction (PCR) and electrophoresis. Finally, we examined the six selected thermophilic bacteria with the enzymatic activities of fibrin- and milk-protein degradation. We successfully concluded the experiment by proving that these thermophilic bacteria still exhibited significant enzymatic activities in the high-temperature environments.

The results of this experiment can be applied in numerous fields, for example, thrombus treatment and food processing, and a more in-depth study shall warrant the due consideration.

溫泉中的秘密

這次的實驗，主要是研究在不同的溫泉區中所採集不同種類細菌，是否酵素在高溫下仍具活性，如果有，再進而研究它們的基因有何特別的共同之處。

首先，我分別自北投和烏來採集水樣，到實驗室後再以 PY、PTG、MFB 和 TS 四種培養基做細菌的培養，接著再利用連續稀釋和固態塗抹來做細菌的分離。經過挑選和培養之高溫菌直接進行 DNA 的抽取，並利用「聚合酶鏈反應」和「電泳跑膠」技術分析其類似蛋白質分解酵素 *subtilisin* 基因。另外，本研究同時針對所選定之 6 株高溫細菌利用血栓和牛奶蛋白來測試其蛋白質分解酵素的活性。由以上實驗結果可以證明某些細菌在高溫的環境下酵素仍具活性。

這次在高溫菌的實驗結論，可應用在很多地方，例如：血栓的治療、在高溫下食品處理．．．等，應用相當廣泛。

溫泉中的秘密—高溫菌之研究

壹、實驗動機

每天早上媽媽提醒我們要吃高蛋白質的營養補充食品，大部分的人都知道蛋白質是參與身體內很多代謝活動及增強體力非常重要的營養素，蛋白質相關的物質在維持人體生命扮演很重要的角色。有些酵素更能將蛋白質分解成小分子便利人體吸收，而這些蛋白質分解酵素幾乎是由蛋白質成分構成的。既然酵素本身是由蛋白質所構成，因此對高溫應該非常敏感，平常的蛋白質只要溫度太高它就會永久失去活性—即「永久變性」，例如雞蛋經過沸水煮熟後就無法再恢復原狀。但是如果我們注意一些有關溫泉中微生物的科學報導，這些微生物似乎很活躍地生活在高溫的溫泉中，在高溫的環境下這些微生物到底有沒有仍能活動之酵素呢？如果有，它與一般酵素又有何不同呢？不禁讓我好奇起來！

貳、實驗目的

探討北投溫泉及烏來溫泉中的高溫菌，同時分析這些高溫菌是否具有蛋白質分解酵素？其蛋白質分解酵素是否具有活性？

參、實驗設備及器材

一、實驗材料

(一) 實驗器材

實驗使用器材包括 1 公升 (1L) 血清瓶、錫箔紙、無菌袋、長柄水瓢、簽字筆、溫度計、磁性加熱攪拌器、磁攪棒、電子天平、稱藥紙、量筒、酒精燈、酒精、微分注射器、tip、橡膠塞、鐵蓋、光學顯微鏡、載玻片、蓋玻片、針筒 (含長針頭)、立體螢光顯微鏡 (1000 倍)、數位相機、革蘭氏染色材料等等。

(二) 培養基 (若配製成固態平板培養基需另外添加 gellan gum (濃度為 1%) 或洋菜膠 (agar, 濃度為 2%)

製作培養基皆在磁性加熱攪拌器上操作，本實驗所用之培養基如下：

1.MFB

NaCl	0.1g
MgCl ₂ · 6H ₂ O	0.15g
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.05g
Na ₂ SO ₄	0.15g
NH ₄ Cl	0.125g
KH ₂ PO ₄	0.1g
KCl	0.25g

Yeast extract	0.5g
Glucose	5g
Tris	1.21g
Distill water	500ml
PH	7.2

MgCl₂· 6H₂O、CaCl₂· 2H₂O 在添加時速度要快，因容易潮解黏在稱藥紙上，Na₂SO₄ 最後加，否則容易產生沉澱；Tris base 最後才添加。

2. Tryptone Soya (TS)

Tryptone peptone	8.5g/L
Soytone peptone	1.5g/L
Sodium chloride	2.5g/L
Dipotassium hydrogenphosphate	1.25g/L
Glucose	1.25g/L
pH	7.0

3. TSV

Tryptone peptone	8.5g/L
Soytone peptone	1.5g/L
Sodium chloride	2.5g/L
Dipotassium hydrogenphosphate	1.25g/L
Glucose	1.25g/L
善存綜合維生素	0.25 g/L
pH	7.0

4. PY

Peptone	5g/L
Yeast extract	5g/L
pH	7.0

5. PYG

Peptone	5g/L
Yeast extract	5g/L
Glucose	5g/L
pH	7.0

(三) 蛋白質分解酵素測試平板

蛋白質分解酵素測試平板內含物包括奶粉(1%)和洋菜膠(agar powder)(1%)。

(四) 血栓蛋白(fibrin)分解測試平板

將 160 μ l 濃度為 0.6% 的 fibrinogen (血栓蛋白原) 溶液和 40 μ l 活性為 100 U/ml 之 thrombin 溶液混合均勻，再加入 16 ml 之磷酸緩衝液(phosphate buffer)，靜置 1 小時後即成。

備註：

1. phosphate buffer：每 100 ml 水中加入 0.8g NaCl (pH 7.4)、0.144 g Na₂HPO₄ 和 0.024 g KH₂PO₄。
2. fibrinogen 溶液：將 fibrinogen 以 phosphate buffer 配製成 0.6% fibrinogen 溶液。
3. 100 U/ml thrombin 溶液：將 thrombin 溶於 0.85% NaCl 中，配製成 100U/ml。

肆、研究過程及方法

(一) 實驗樣品

採樣自北投溫泉區的樣品之採樣時間為 2006 年 7 月 17 日，地點選擇是「龍鳳谷」地區。所採得樣品有 A (圖一)、B (圖二)、C (圖三) 和 D (圖四) 共 4 個水樣，其溫度分別是 85°C、65°C、65°C 和 65°C；其 pH 值分別為 3.21、5.78、6.13 和 6.48。每個水樣約裝滿 3/4 個 1 L 血清瓶容積，然後用蓋子蓋緊，並包覆錫箔紙，迅速將血清瓶帶回實驗室進行實驗。

(二) 高溫細菌的培養

1. 北投溫泉樣品第一次高溫細菌之增菌培養

北投採集的樣品 A、B、C 和 D 在含有 15 ml 培養基 TS、PY、PYG 和 MFB 的培養瓶中進行增菌培養，實驗為二重複，實驗過程皆在無菌操作台中進行。首先將 TS、PY、PYG 和 MFB 四種培養基各別分裝至培養瓶中，使每個培養瓶中有 15 ml 的培養基，然後以微分注射器取水樣品 5 ml 注入含有培養基之培養瓶中，然後以橡膠塞封住瓶口並置於溫度為 60 oC 的培養箱中進行培養。

※操作時手不要揮過裝有培養基以及菌液的瓶口以免汙染。

※微分注射器的前端不要碰到不必要的器材以免遭受汙染。

※每一小瓶在進行培養前都在無菌無塵操作台裏用橡膠塞塞住，防汙染，並在外面用鐵環鎖緊，防止有些細菌產生氣體，撐開橡膠塞造成汙染。

2. 北投溫泉樣品第二次高溫細菌之增菌培養

經過 4 天的培養，將有高溫菌生長培養瓶中的菌液(共 14 瓶)進行第二次培養。此次培養實驗使用 100 ml 的培養瓶，瓶內裝有 45 ml 的培養基。實驗進

行如下：從長有高溫菌培養瓶中以針筒取 5ml 的菌液，注入至含有與第一次增菌培養相同培養基之培養瓶中，然後以橡膠塞封住瓶口並置於溫度為 60°C 的培養箱中，進行第二次高溫細菌之增菌培養。

※抽取菌液時如果該培養瓶呈現混濁時，則只抽取上層液體部分，而不抽取下層泥土沙石層；如果該瓶在培養時間第 1、2 天時呈現混濁，但後來又變得澄清，則在抽取菌液前須先搖動均勻，再取菌液（會抽取到少許顆粒物質）。

※培養瓶在培養時間第 1、2 天混濁，但後來不混濁，可能不是沒有高溫細菌，而是繁殖的細菌沉澱到培養瓶下層或附著在一些顆粒狀物質上，而使上層液體由混濁變清澈。

※本實驗步驟皆在無菌無塵操作台中進行

※將第一次有長菌的 14 瓶培養瓶再放進培養箱中培養，以避免第二次培養時若無法在培養瓶中繁殖出高溫菌時，本研究仍可保存有第一次增菌培養出之高溫細菌。

※利用針筒取菌液和接種菌液至新的培養瓶時，培養瓶的橡膠塞不打開，只打開鐵蓋中間的洞，隔著橡膠塞取菌液或注入菌液，防止污染。

3. 烏來溫泉樣品中高溫菌之培養

呂 OO 老師實驗室中之前的研究人員已從烏來溫泉水樣中分離出高溫菌的菌株 NK1、NK2、96-1、96-3、WL1-1、WL1-2、WL1-3 和 WL2-4 共 7 株，這些菌株皆適合生長在溫度 55°C，本實驗將此 7 株的高溫菌活化以便進一步進行其他實驗使用。進行實驗前必須將保存之高溫菌株活化，為了將原本保存在 -20°C 的冷凍菌液能夠活化，用下列步驟進行培養：

- (1) 取 TS 和 TSV 固態平板培養基各一。
- (2) 準備碎冰將菌液保持在低溫。
- (3) 取 50 μ l 菌液，在平板培養基上滴七滴。
- (4) 在菌液中央以 tip 尖端戳洞，使菌液能夠固定在孔洞附近
- (5) 標示菌液編號和時間(共有 13 種菌株)。
- (6) 培養於 55°C，逐日觀察生長情形。

在固態平板培養基上活化之高溫菌株接下來進行懸浮培養，將菌株培養在液態培養基 TS 和 TSV 中，以使用以進一步分離出單一菌落。懸浮培養步驟如下：

- (1) 在試管內裝 TS 或 TSV 液態培養基 5 ml。
- (2) 以接種環沾取單一菌落，置於液態培養基中，注意將接種環上沾有之菌落，完全打入培養液中，並混合均勻。
- (3) 標示菌液編號和時間。
- (4) 將試管斜置於 55°C 培養箱中震盪培養，經過 12~16 小時後觀察生長情形。

(三) 細菌生長觀察

在高溫菌之培養過程中，利用複式顯微鏡觀察細菌量和型態，判斷是否有生長繁殖現象。

(四) 菌株的分離與純化

1. 液態培養基連續稀釋法

本實驗利用液態培養基做連續稀釋使細菌在培養基中的數目逐漸減少，期望最後只有一種細菌存在，其生長繁殖後即可得到單一的菌株。

2. 連續稀釋固態培養基塗抹法

利用液態培養基做連續稀釋使細菌在培養基中的數目逐漸減少，然後再取這些稀釋後之液態培養基 200 μ l 均勻塗抹在含有 gellan gum (1%) 或洋菜膠 (2%) 之固態培養上，經過培養以純化出單一菌株。

(五) 革蘭氏染色

革蘭氏染色主要是利用細菌細胞壁肽聚醣和脂質含量之多寡而將細菌染成兩種不同顏色：被染成紫色的細菌稱為革蘭氏陽性細菌，含有大量的肽聚醣和較少量的脂質；被染成紅色的細菌稱為革蘭氏陰性細菌，含有少量的肽聚醣，而在肽聚醣外有脂質的外膜層。染色之基本步驟：

1. 初染：以結晶紫(crystal violet)將細菌染成紫色。

2. 媒染：以碘液處理。碘和結晶紫形成複合物，能使結晶紫對細胞壁之親合力加強。

3. 脫色：以乙醇處理，使細胞壁上的脂質溶解掉，同時沾在脂質上的碘和結晶紫形成複合物也會被沖掉。於是細胞壁含脂質較多的革蘭氏陰性細菌便成無色；而細胞壁含脂質較少的革蘭氏陽性細菌仍保持紫色。

4. 複染：以沙黃作第二次染色。革蘭氏陰性會被染成紅色，而革蘭氏陽性細菌則保持紫色。

(六) 蛋白質分解酵素的活性測試

將培養 48 小時後之高溫菌液，取 200 μ l 滴在蛋白質分解酵素測試平板上，然後放置在 50 $^{\circ}$ C 培養箱中，經過 12 小時，在菌液周圍若有明顯的透明圈，即顯示具有蛋白質分解酵素的活性。

(七) 血栓蛋白的分解活性測試

將培養 48 小時後之高溫菌液，取 200 μ l 滴在血栓蛋白分解測試平板上，然後放置在 30 $^{\circ}$ C 培養箱中，經過 5 分鐘後，在菌液周圍若有明顯的透明圈，即顯示具有血栓蛋白分解的活性。

(八) DNA 的抽取

1. 染色體 DNA (genomic DNA) 萃取：

萃取 DNA 是依照 MO BIO UltraClean Microbial DNA Isolation Kit (catalog #12224-50) 所提供之操作步驟進行實驗。主要原理為分別利用 lysozyme 和 SDS 打破細胞壁和膜，在高鹽的條件下，加入 CTAB 作用，DNA 會溶於下層水層，

細胞膜碎片、已變性蛋白質以及其他雜質則會和 CTAB 形成不可溶的複合物，將上層的不可溶複合物去除後即可得到 DNA。

2. 染色體 DNA (genomic DNA) 大量萃取方法：

此實驗步驟如下所述：

- (1) 20ml 菌液在 4°C 下離心 12000 rpm 10 分鐘。
- (2) 倒掉上清液後加入 20ml TE buffer 充分混合，然後在 4°C 下離心 12000 rpm 10 分鐘。此步驟共進行二次，將細菌細胞洗乾淨。
- (3) 倒掉上清液後加入 3.2ml 的 TE buffer 混合均勻，接著加入 120 μ l 的 lysozyme (50mg/ml) 並在 37°C 靜置 30 分鐘，然後加入 20 μ l 的 protease K 在 55°C 靜置一小時。
- (4) 加入 800 μ l 的 20% SDS 輕輕反覆倒轉混合均勻，在 37°C 靜置 1 小時，再加入 600 μ l 的 5M NaCl 輕輕反覆倒轉混合均勻。
- (5) 加入 80 μ l 的 RNase，將 RNA 分解。
- (6) 加入 560 μ l 的 CTAB 在 65°C 放置 10 分鐘，每 2 到 3 分鐘需混合一次。然後加入與管子中液體同體積的 PCI 混合均勻，靜置 5 分鐘，離心 12000 rpm 10 分鐘。取上清液至新的離心管中，抽取時避免吸取到白色沉澱物。(此步驟需重複做到上清液完全清澈)
- (7) 加入與管子中液體同體積的 95% 酒精，輕輕反覆倒轉混合均勻，直到有白色絲狀沉澱物出現。然後放置於 -20°C 下 2 小時。
- (8) 離心 12000 rpm 20 分鐘。確定沉澱物附著在管壁上，輕輕倒掉上清液，但是要避免 DNA 沉澱物被倒出。
- (9) 加入 1ml 的 70% 酒精，離心 12000 rpm 10 分鐘。確定沉澱物附著在管壁上，輕輕倒掉上清液，避免 DNA 沉澱物被倒出。
- (10) 加入 1ml 的 70% 酒精，離心 12000 rpm 10 分鐘。將管子放在加熱板維持在 30°C，開蓋蒸發管壁上剩餘的酒精。
- (11) 加入 30 μ l 的 ddH₂O。

(九) 聚合酶鏈反應 (polymerase chain reaction, PCR)

用 PCR 的技術來大量複製所需的 DNA 片段。本實驗用來大量擴增細菌已知的蛋白質分解酵素 subtilisin 的基因 DNA。

此實驗之程式設定：

1. 94°C，5 分鐘。
2. 94°C，1 分鐘。
3. 51°C 或 65°C，2 分鐘。
4. 74°C，1 分 30 秒。
5. 步驟(2)→(4)，共循環 35 次。
6. 72°C，7 分鐘。
7. 4°C。

PCR 溶液製備：

1. 77 μ l ddH₂O

2. 10 μ l dNTP
3. 10 μ l 10x buffer
4. 1 μ l NPG-R primer (GATCCTCCGGTGCTTGTGAA)
5. 1 μ l NPG-F primer (CAAATCGGATGCCTGTCTTAT)
6. 1 μ l sample
7. 0.5 μ l Taq

(十) 電泳膠分析 (Agarose Gel Electrophoresis)

1. 取 1 μ l loading buffer 和 1 μ l DNA 樣品混合。
2. 將混合液置入電泳膠的小方格內，注意不要戳破電泳膠或讓大量混合液溢出。
3. 以 1 μ l DNA marker 作為 DNA 大小之標定。
4. 電泳槽之電伏特使用 100V，電泳分析時間約 35 分鐘。
5. 將實驗後的電泳膠以紫外線照射，判斷 DNA 樣品的含量和大小。

伍、實驗結果

一、北投溫泉樣品高溫菌之增菌培養觀察

北投溫泉樣品 A、B、C 和 D 進行高溫菌培養，每個培養基二重複實驗，共有 32 瓶，在實驗中利用複式顯微鏡觀察可以明顯看到高溫菌細胞在培養基中的型態，第一次增菌培養經過 1、2、3 和 4 天後分別有 7、9、10 和 14 瓶有高溫細菌的繁殖（表一、二），由結果發現所有北投溫泉樣品皆可以培養出高溫菌，但是樣品 A 中的高溫菌分別可以生長在 TS、PY、PYG 和 MFB 培養基中，樣品 D 中的高溫菌能生長在 PY 和 MFB 培養基中，而樣品 B 和 C 中的高溫菌只能生長在 MFB 培養基中。由複式顯微鏡可以觀察到樣品 A 在 TS 培養基中有短桿狀之高溫菌生長，樣品 C 在 MFB 培養基中有長桿狀之高溫菌生長。將第一次增菌培養實驗有生長高溫菌之 14 培養瓶進行第二次增菌培養實驗，經過 6 天培養後，由各培養瓶中取 2 小滴菌液進行革蘭氏染色以顯微鏡觀察生長之細菌，其結果如表三所示，在顯微鏡中之型態請見圖五至十八，除了樣品 A 培養在 PYG 培養基編號 1 中只發現到革蘭氏陽性單球菌之外，其他的樣品所培養出來的高溫菌很多樣化，至少包括 2 種以上的細菌，亦有多種型態。

二、北投溫泉樣品高溫菌株之純化分離

本實驗將第二次增菌培養出來的 14 瓶高溫菌培養液，以液態培養基連續稀釋法進行高溫菌株之純化分離，連續稀釋倍數至 10^{-12} ，經稀釋後之培養基經過 60 天之培養，並未發現有任何一個培養瓶中有高溫菌生長，因此以液態培養基連續稀釋法進行高溫菌株之純化分離並沒有成功。另外，為了縮短實驗時間，亦同時採用連續稀釋固態培養基塗抹法來進行菌株分離，固態培養基之凝固劑採用 gellan gum 或洋菜膠，經過 45 天的培養，無論含有 gellan gum 或洋菜膠之固態培養基上皆無高溫菌落產生。有鑑於前兩種分離菌株的方法皆沒有成功培養出高溫菌株，因此實驗直接改用將原來樣品 A、B、C 和 D 塗抹在含有洋菜膠固態培養基上培養，目前此實驗正在進行中。

三、烏來溫泉高溫菌之培養

本實驗成功活化培養出 7 株烏來溫泉高溫菌，這 7 株高溫菌在固態培養基上之型態請見圖十九，在顯微鏡下放大 1000 倍觀察發現這 7 株高溫菌皆是桿菌，除 NK2 無照片之外，其餘 6 株高溫菌之型態如圖二十。在液態培養情形下，發現所有高溫菌株皆會在培養瓶底部產生黏稠絲狀的物質。在本研究中將利用成功活化培養出之 6 株烏來溫泉高溫菌 NK1、WL1-1、WL1-2、WL2-4、96-1 和 96-3 進行以下之蛋白質分解酵素的活性測試、血栓蛋白的分解活性測試和類似蛋白質分解酵素 subtilisin 基因 DNA 的分析。

四、蛋白質分解酵素的活性測試

將活化之 6 株烏來溫泉高溫菌 NK1、WL1-1、WL1-2、WL2-4、96-1 和 96-3 進行蛋白質分解酵素的活性測試，結果顯示 6 株烏來溫泉高溫菌具有很強的蛋白質分解酵素活性，在 12 小時的時間內將菌液周圍之蛋白質溶解成很大的透明圈（圖二十一）。

五、血栓蛋白的分解活性測試

將活化之 6 株烏來溫泉高溫菌 NK1、WL1-1、WL1-2、WL2-4、96-1 和 96-3 進行血栓蛋白的分解活性測試，結果顯示 6 株烏來溫泉高溫菌具有很強的血栓蛋白分解活性，在 5 分鐘的時間內即將菌液周圍之血栓蛋白溶解成透明水狀（圖二十二）。

六、類似蛋白質分解酵素 subtilisin 基因 DNA 的分析

利用 MO BIO UltraClean Microbial DNA Isolation Kit，或是染色體 DNA（genomic DNA）大量萃取方法皆可成功抽取到高溫菌的染色體 DNA，雖然大量萃取方法步驟比較繁瑣，但是可以取得較多量的 DNA。實驗中將獲得之 6 株高溫菌 NK1、WL1-1、WL1-2、WL2-4、96-1 和 96-3 染色體 DNA 利用聚合酶鏈反應技術，進行蛋白質分解酵素 subtilisin 基因 DNA 的擴增，結果顯示在黏合溫度為 51°C 時，菌株 NK1 和 96-1 可以被成功分析到有類似 subtilisin 基因（圖二十三）；實驗進一步將黏合溫度調為 65°C 時，結果顯示除了菌株 96-1 之外，其餘菌株皆被分析出有類似 subtilisin 基因（圖二十四）。

陸、討論

北投溫泉樣品高溫菌之第二次增菌培養實驗中使用較大的培養瓶，我們發現這 14 個培養瓶中的高溫菌都長的很好，有很多的菌，推測這可能是因為瓶子更大而留出更多的空間，有更多的氧氣，讓這些好氧高溫菌能大量繁殖。另外，在顯微鏡觀察中發現樣品 C 之 MFB 培養基中有 U 型狀的細菌，這令人非常驚奇，為何有如此奇形怪狀之細菌呢？北投溫泉樣品高溫菌之增菌培養中，雖然結果發現樣品 A、B、C 和 D 皆可以培養出高溫菌，但是各個樣品中的高溫菌所能生長的培養基不完全一樣，而且經由顯微鏡的觀察發現各個培養基中的菌相相當複雜，幾乎都有好幾種不同形狀的細菌，因此可以推測這 4 個樣品中可能有不同種的高溫菌存在。雖然我們以不同的方法進行高溫菌株的分離，但是一直無法成功獲得純種菌株，而且發現這些生長在液態培養基中的高溫菌很難生長在固態培養基，這個奇特的現象值得我們去注意和探討。

在本實驗中成功活化培養出呂 OO 老師實驗室中保存的 7 株烏來溫泉高溫菌，真是令人高興。我們使用其中 6 株高溫菌 NK1、WL1-1、WL1-2、WL2-4、96-1 和 96-3 來探討蛋白質分解酵素的問題，由實驗結果發現這 6 株高溫菌確實具有能在高溫 50°C 下表現出高活性的蛋白質分解酵素，另外由蛋白質分解酵素 subtilisin 基因 DNA 的分析，亦能肯定這些高溫菌株具有蛋白質分解酵素，更令人驚訝的是，這些蛋白質分解酵素還具有血栓蛋白分解活性，因此可能可以應用在去除造成人體血管阻塞的血栓。

這次的研究是從 2006 年暑假開始，從北投龍鳳谷溫泉樣品的採樣、高溫菌增菌培養和菌株分離，以及烏來溫泉高溫菌株的活化培養，至蛋白質分解酵素的活性測試，血栓蛋白的分解活性測試，類似蛋白質分解酵素 subtilisin 基因 DNA 的分析，每一個階段都令我感到興奮。在 DNA 抽取整個實驗中，我們遇到許多困難，尤其是抽取 DNA 的部份，好幾次只抽出蛋白質，因技術不純熟，每次都要花上 7-8 小時，而我們發現使用傳統方式的抽取法，真的需要很小心的操作，第一次的抽取結果非常令人沮喪，DNA 幾乎全部斷裂，讓我們好失望。經過幾次的重複，才抽出品質不錯的 DNA。經過我們實際從頭到尾進行這些實驗，才確實發現生物技術還有很多我們需要再努力學習的地方。很慶幸地，此研究在技術不是很熟的情況下，我們仍獲得一些有趣的結果，將這些成果自己寫成報告後再交給呂 OO 老師加以修改，使得本研究報告在實驗敘述上更簡要、更科學。

這些高溫菌初步研究，讓我們對高溫菌有深刻的了解，知道細菌在高溫（甚至溫度 85°C）下仍生長得很好，這次實驗讓我們了解到高溫菌仍具有蛋白質分解酵素，而且在高溫下這些蛋白質分解酵素仍具有很強的活性，不會因為高溫菌使這些酵素失去活性。在這個研究之後，我們心中又產生了一些好奇，到底這些蛋白質分解酵素在酸性環境中有較強的活性呢？還是在鹼性的環境呢？或是在中性環境下蛋白質分解酵素最活躍呢？這又引起我們想一步步再繼續研究！

誌謝：感謝呂 OO 老師實驗室中的范 OO 學姊，教導我們實驗技術和原理，並且和我們一起進行實驗，才使我們有這麼豐富的成果。

柒、結論

我們發現樣品 A、B、C 和 D 皆可以培養出高溫菌，但是各個樣品中的高溫菌所能生長的培養基不完全一樣，而且經由顯微鏡的觀察發現各個培養基中的菌相相當複雜，幾乎都有好幾種不同形狀的細菌，因此可以推測這 4 個樣品中可能有不同種的高溫菌存在。

我們也發現有 6 株高溫菌確實具有能在高溫 50°C 下表現出高活性的蛋白質分解酵素，另外由蛋白質分解酵素 subtilisin 基因 DNA 的分析，亦能肯定這些高溫菌株具有蛋白質分解酵素，且這些蛋白質分解酵素還具有血栓蛋白分解活性，因此可能可以應用在去除造成人體血管阻塞的血栓。

捌、參考資料：

http://content.edu.tw/junior/bio/tc_wc/textbook/ch02/supply2-1-1.htm

http://content.edu.tw/junior/bio/tc_wc/textbook/ch02/supply-ch02.htm

戴君如，2003，第 35 卷第 7 期，食品工業專題報導，第 42-53 頁，食品工業月刊社，台北。

玖、本實驗之圖



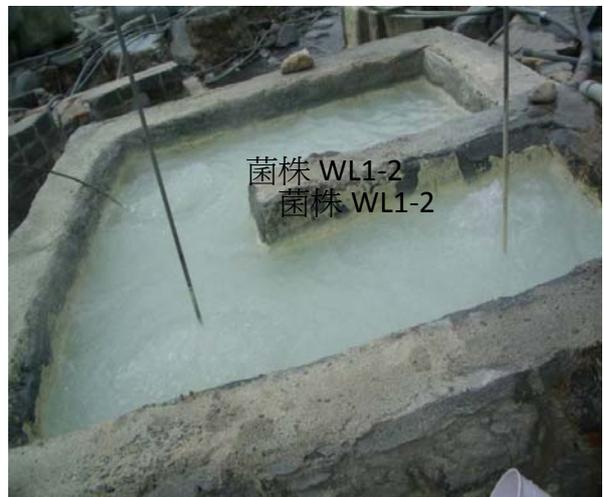
圖一、樣品 A 之採集實景。



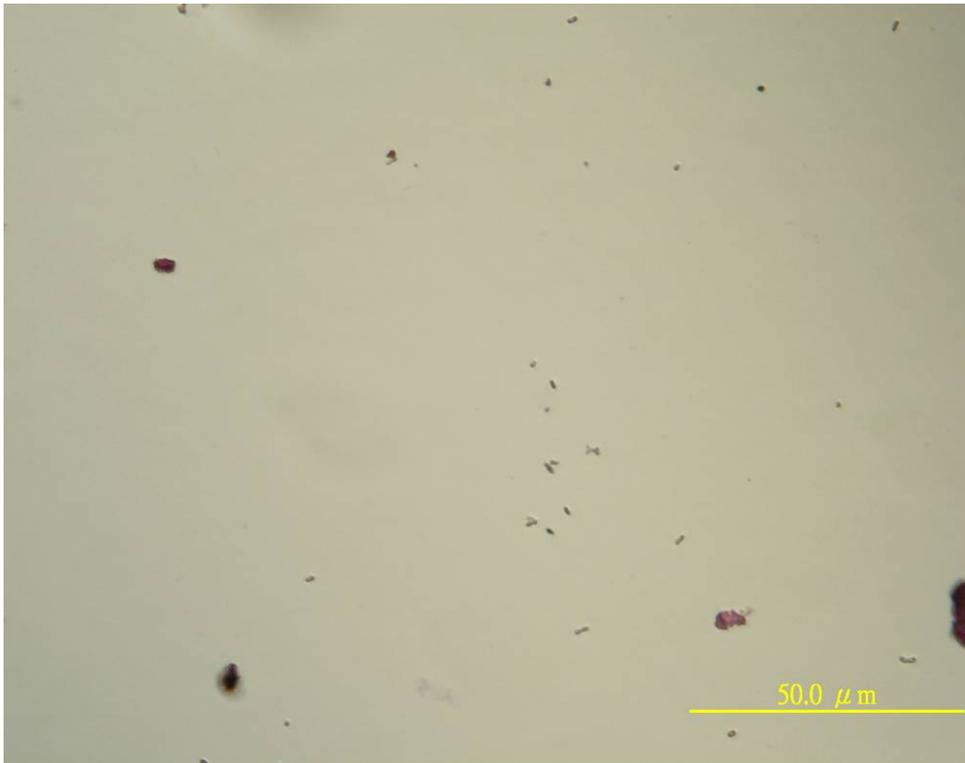
圖二、樣品 B 之採集實景。



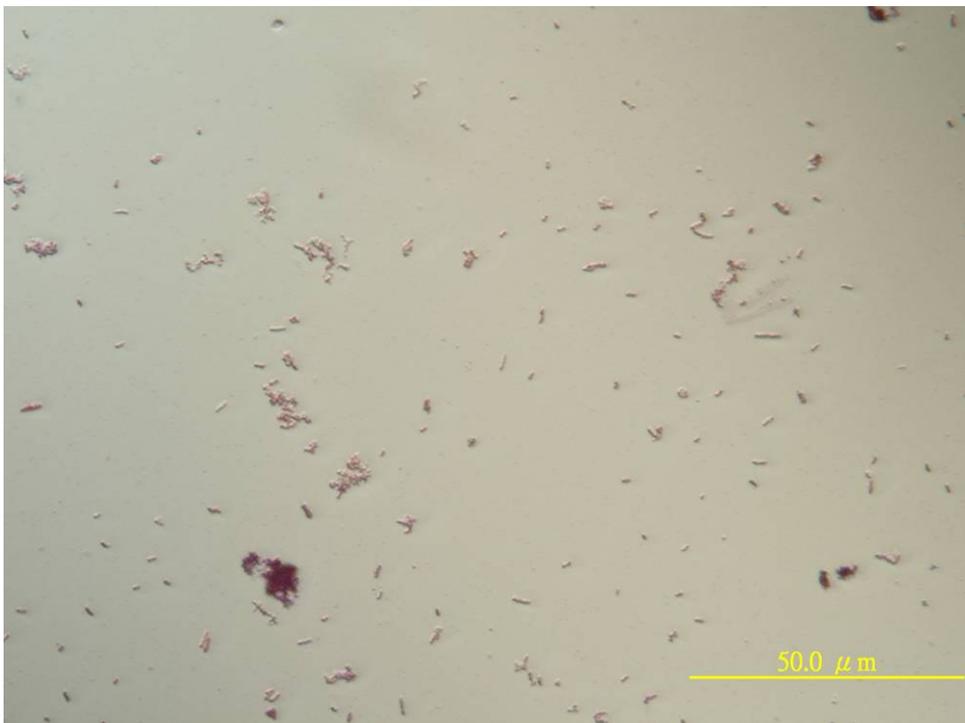
圖三、樣品 C 之採集實景。



圖四、樣品 D 之採集實景。



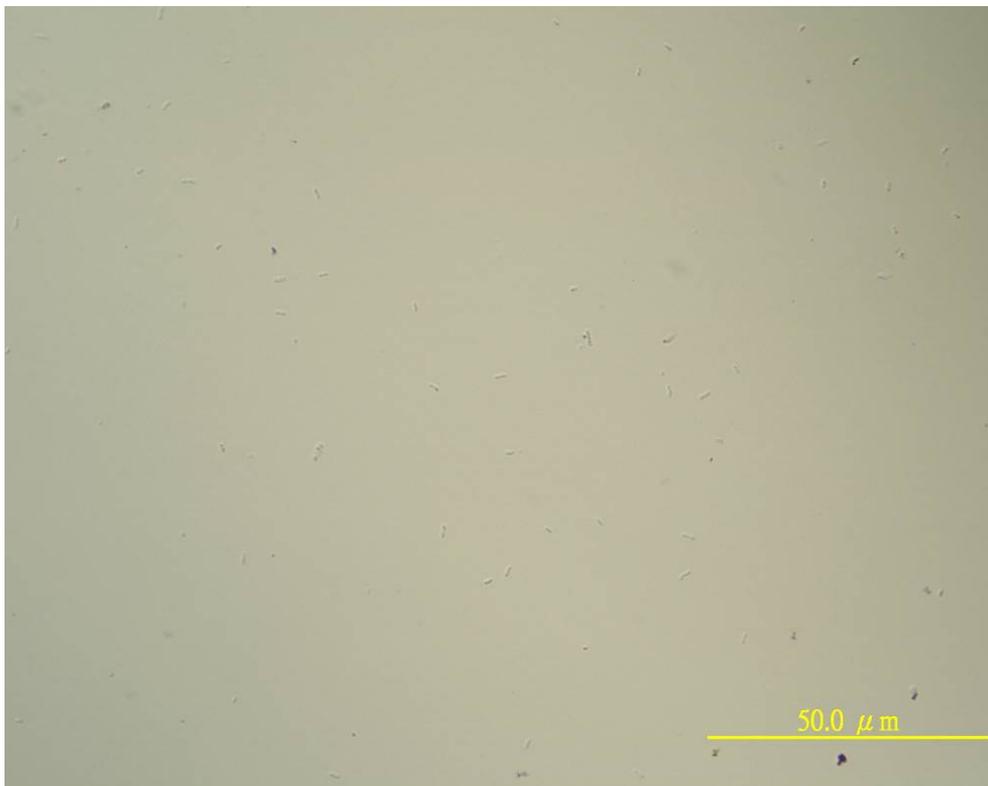
圖五、樣品 A 之 TS 培養基編號 1 中有短桿菌、球狀。



圖六、樣品 A 之 TS 培養基編號 2 中有長桿菌、短桿菌、球狀。



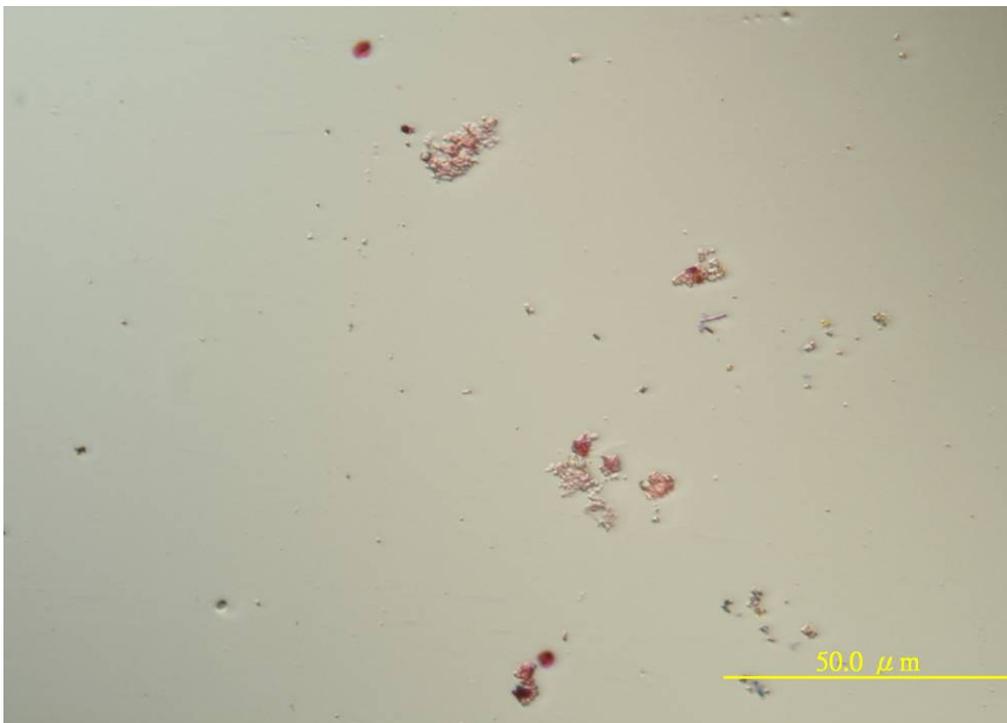
圖七、樣品 A 之 PY 培養基編號 1 中有球菌，呈團聚。



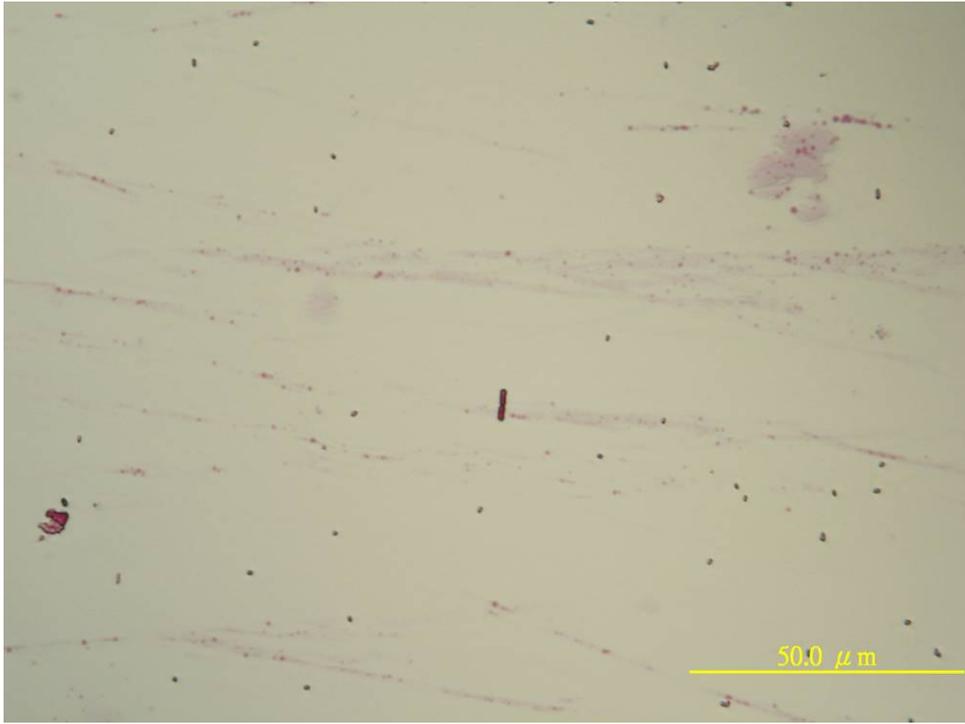
圖八、樣品 A 之 PY 培養基編號 2 中有長桿菌。



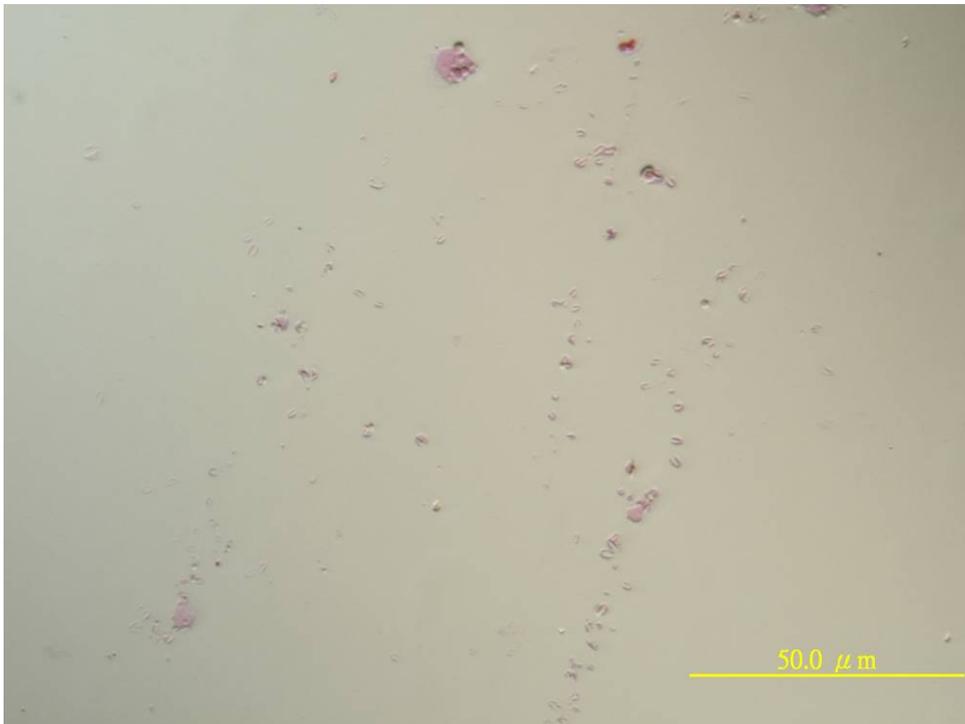
圖九、樣品 A 之 PYG 培養基編號 1 中有球菌。



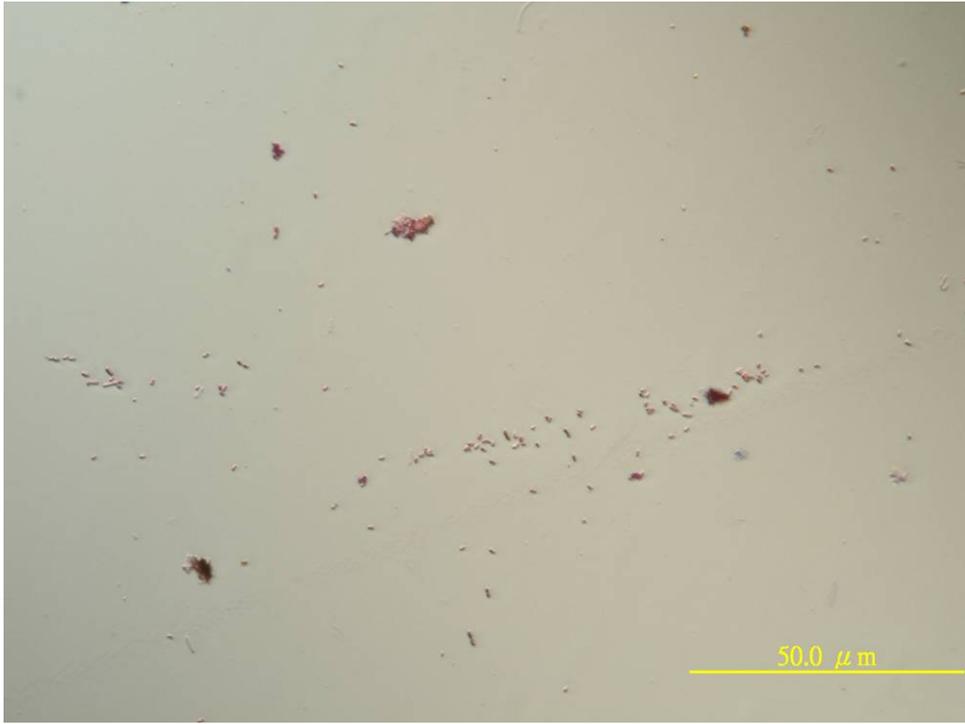
圖十、樣品 A 之 MFB 培養基編號 2 中有長桿菌、球菌。



圖十一、樣品 B 之 MFB 培養基編號 2 中有長桿菌、球菌。



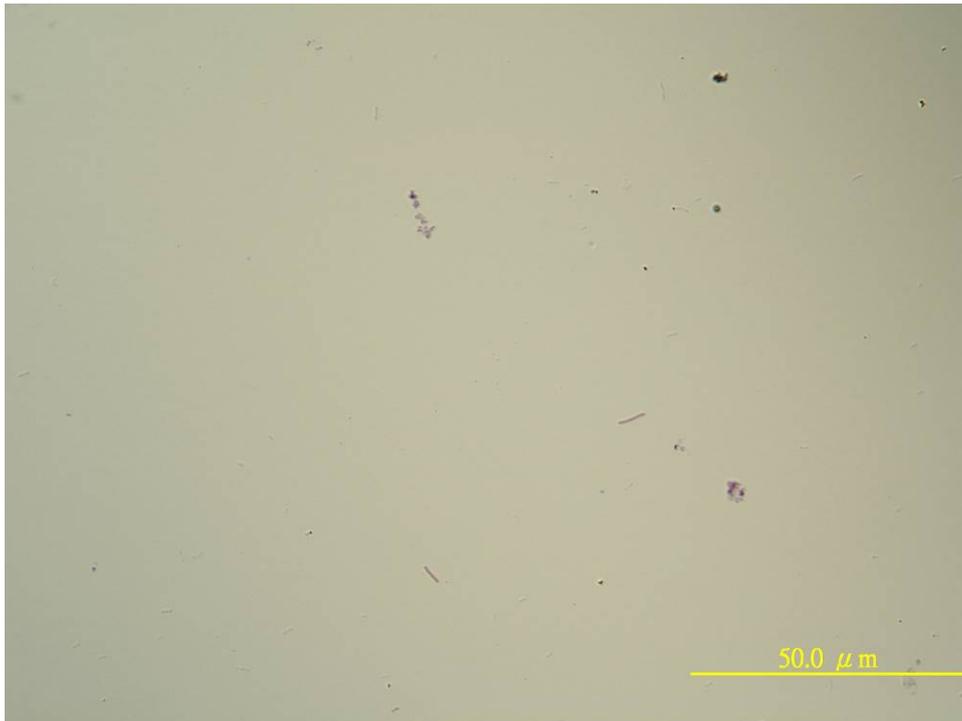
圖十二、樣品 C 之 MFB 培養基編號 1 中有桿菌、U 型菌。



圖十三、樣品 C 之 MFB 培養基編號 1 中有短桿菌。



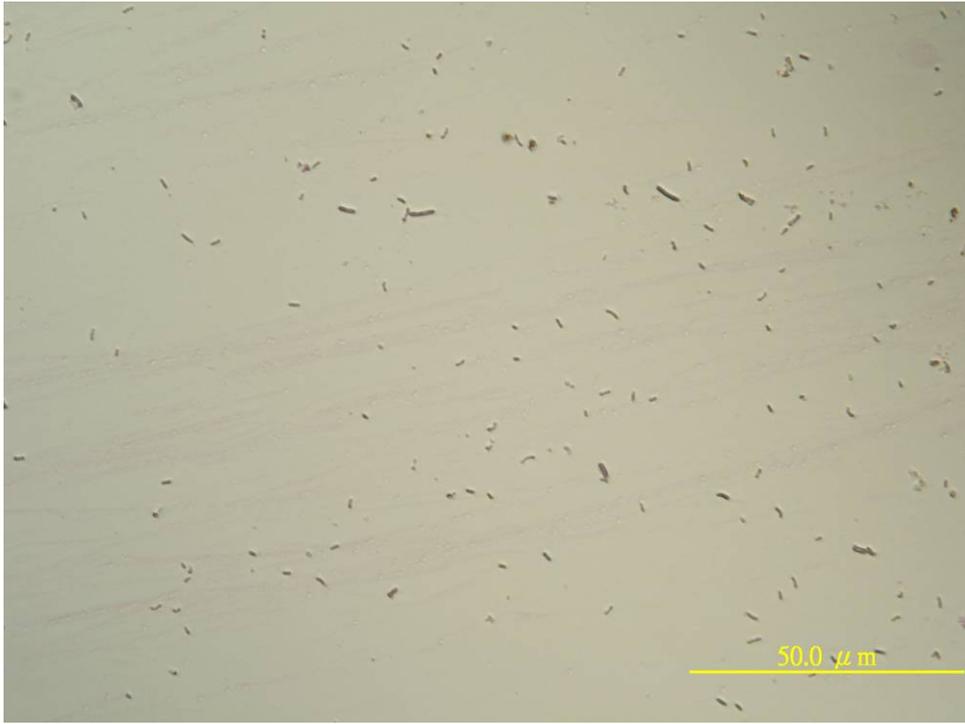
圖十四、樣品 C 之 MFB 培養基編號 2 中有長桿菌、短桿菌。



圖十五、樣品 D 之 PY 培養基編號 1 中有長桿菌、短桿菌、球菌。



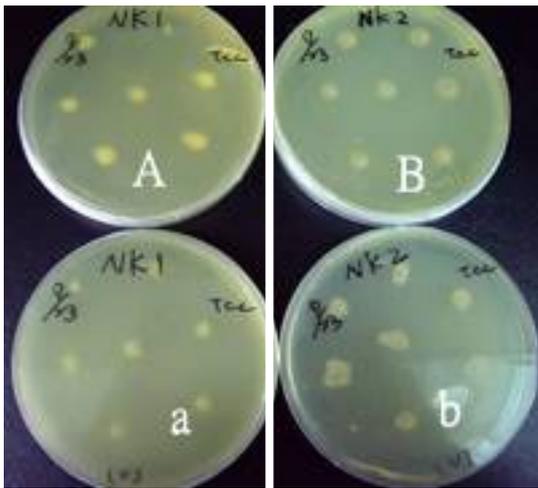
圖十六、樣品 D 之 PY 培養基編號 2 中有短桿菌。



圖十七、樣品 D 之 PY 培養基編號 2 中有長桿菌、短桿菌。

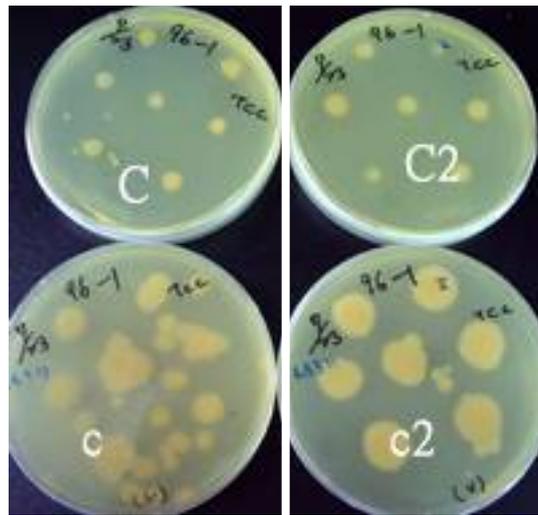


圖十八、樣品 D 之 MFB 培養基編號 2 中有長桿菌、短桿菌、球菌。

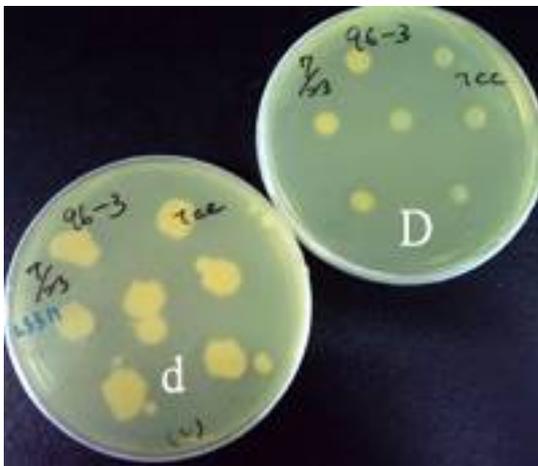


菌株 NK1

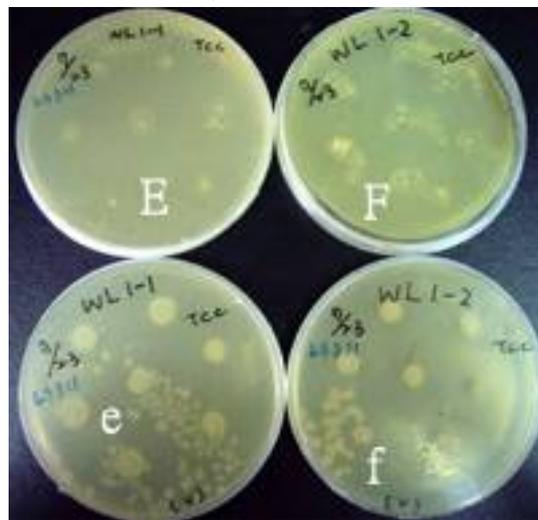
菌株 NK2



菌株 96-1



菌株 96-3



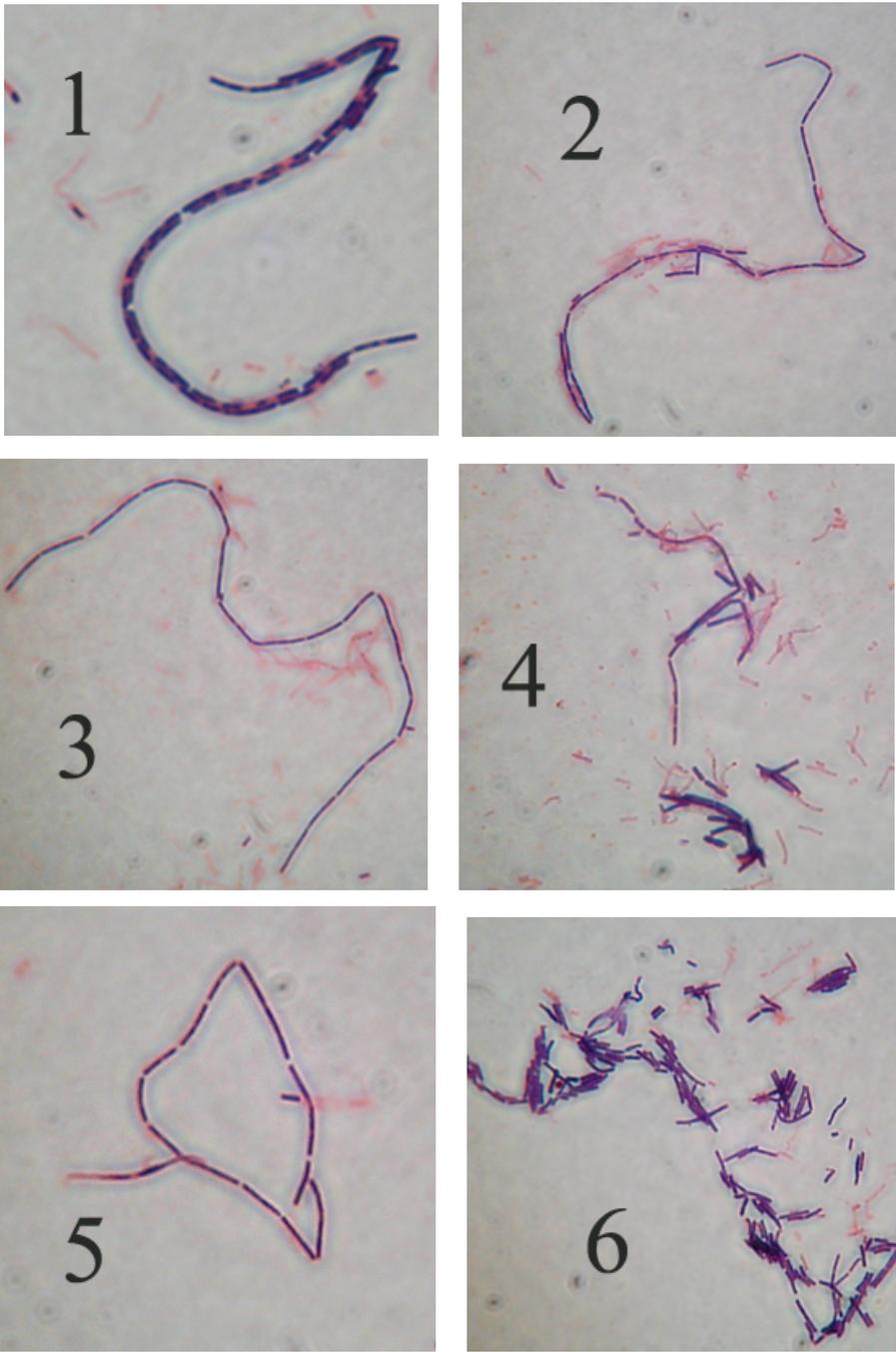
菌株 WL1-1

菌株 WL1-2

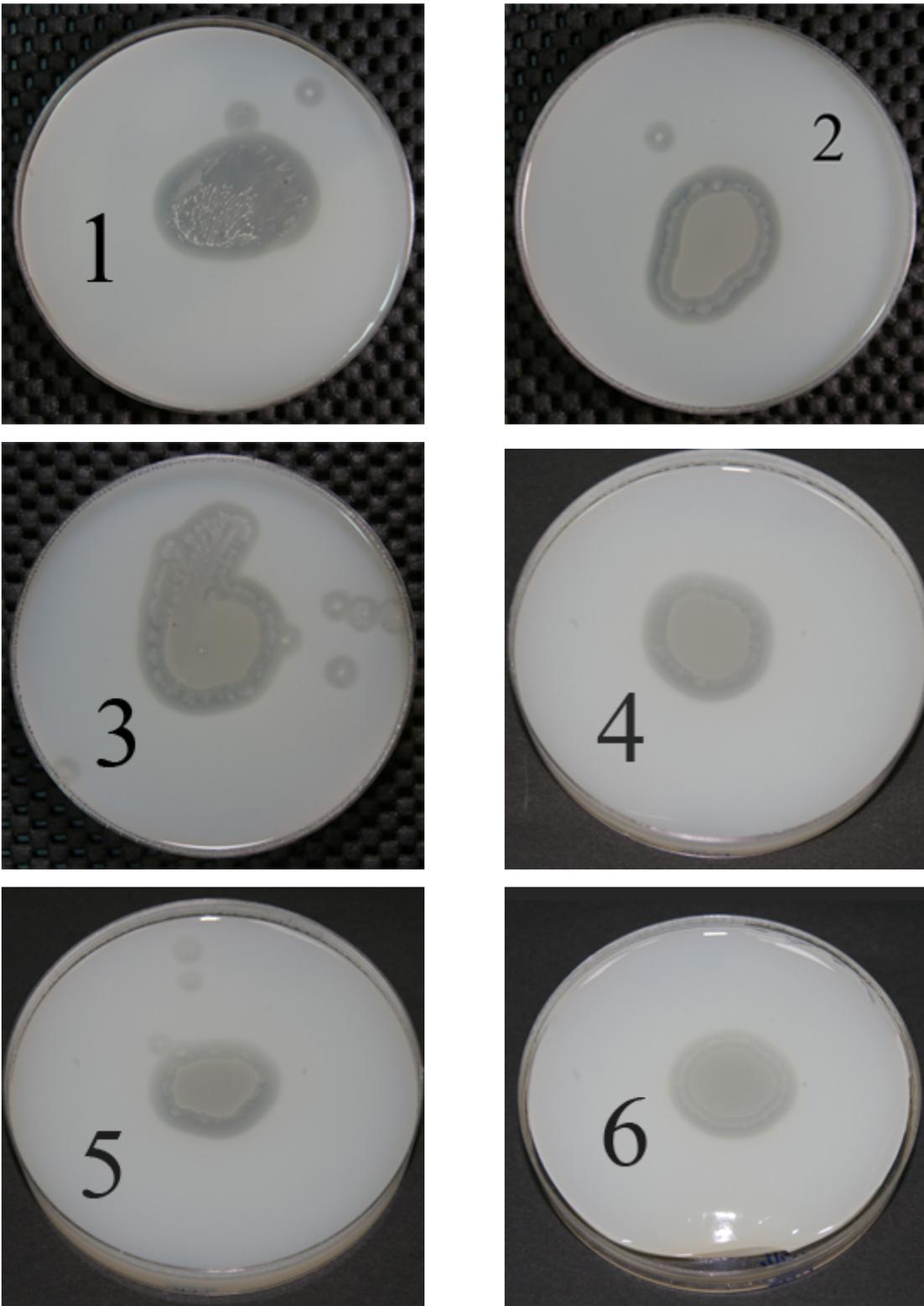
菌株 WL1-3

菌株 WL2-4

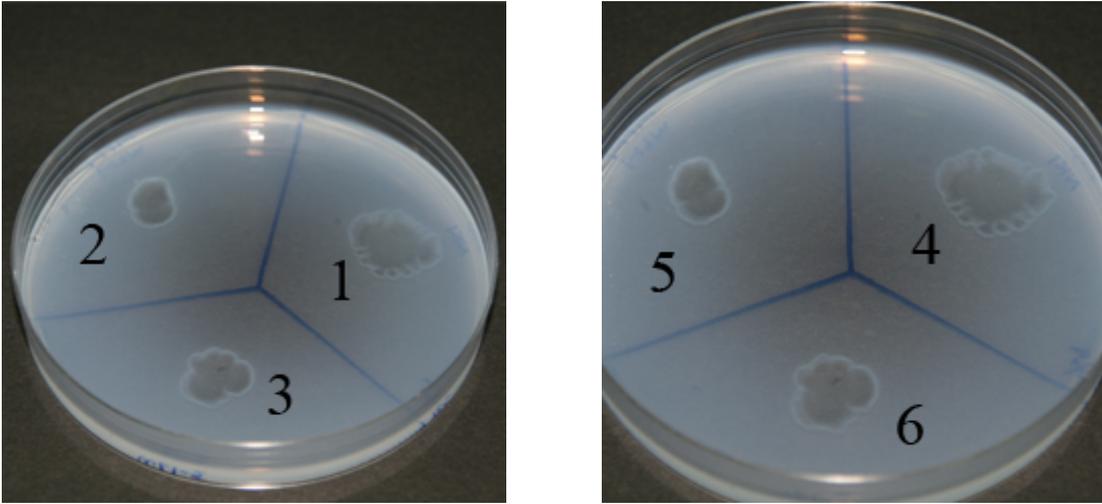
圖十九、烏來溫泉高溫菌之菌落。A、B、C、C2、D、E、F、為使用 TS 固態培養基，a、b、c、c2、d、e、f、為 TSV 固態培養基。



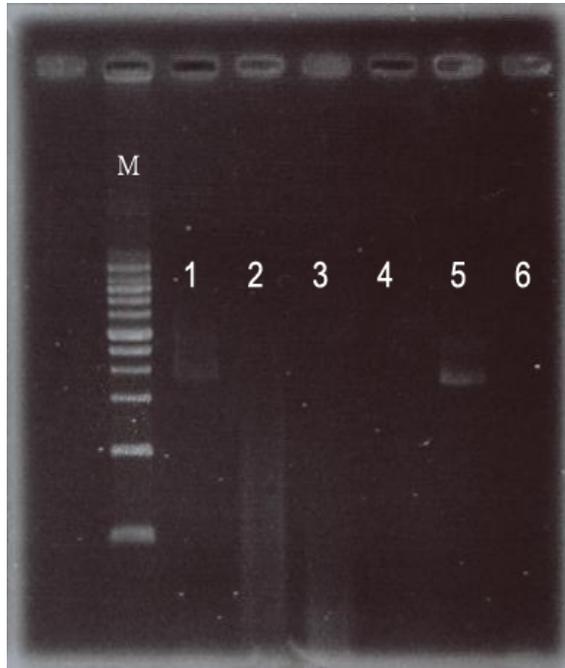
圖二十、烏來溫泉高溫菌株之細胞型態。1：NK1；2：WL1-1；3：WL1-2；4：WL2-4；5：96-1；6：96-3。



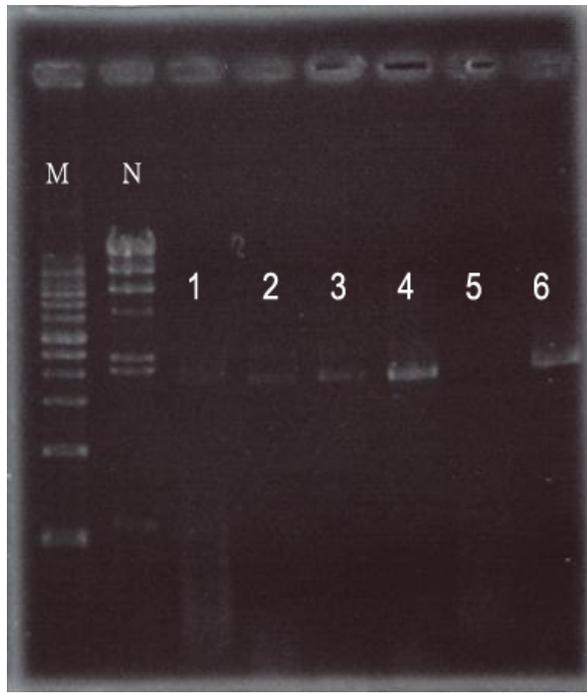
圖二十一、實驗結果顯示 6 株烏來溫泉高溫菌具有很強的蛋白質分解酵素活性，將菌液周圍之蛋白質溶解成透明圈。1：NK1；2：WL1-1；3：WL1-2；4：WL2-4；5：96-1；6：96-3。



圖二十二、實驗結果顯示 6 株烏來溫泉高溫菌具有很強的血栓蛋白分解活性，將菌液周圍之血栓蛋白溶解成水狀。1：NK1；2：WL1-1；3：WL1-2；4：WL2-4；5：96-1；6：96-3。



圖二十三、蛋白質分解酵素 subtilisin 基因 DNA 聚合酶鏈反應之電泳膠，結果顯示菌株 NK1 和 96-1 被分析出有類似 subtilisin 基因。1：NK1；2：WL1-1；3：WL1-2；4：WL2-4；5：96-1；6：96-3；M：1kb 之 maker。



圖二十四、蛋白質分解酵素 subtilisin 基因 DNA 聚合酶鏈反應之電泳膠，結果顯示除了菌株 96-1 之外，其餘菌株皆被分析出有類似 subtilisin 基因。1：nk-1；2：WL1-1；3：WL1-2；4：WL2-4；5：96-1；6：96-3；M：1kb 之 maker；N：0.1nM 定量 maker。

拾、本實驗之表

捌、本實驗之表

表一、北投溫泉樣品 A、B、C 和 D 進行第一次高溫菌增菌培養的結果。

培養瓶 \ 培養時間			1 天	2 天	3 天	4 天
			樣品	培養基	編號	
A	TS	1	+	+	+	+
A	TS	2	+	++	+++	+++
A	PY	1	+	+	+	+
A	PY	2	+	++	++	++
A	PYG	1	+	+	++	++
A	PYG	2	+	+	+	+
A	MFB	1	-	-	+	+
A	MFB	2	-	-	-	+
B	TS	1	-	-	-	-
B	TS	2	-	-	-	-
B	PY	1	-	-	-	-
B	PY	2	-	-	-	-
B	PYG	1	-	-	-	-
B	PYG	2	-	-	-	-
B	MFB	1	-	+	++	++
B	MFB	2	-	-	-	-
C	TS	1	-	-	-	-
C	TS	2	-	-	-	-
C	PY	1	-	-	-	-
C	PY	2	-	-	-	-
C	PYG	1	-	-	-	-
C	PYG	2	-	-	-	-
C	MFB	1	+	+	++	++
C	MFB	2	-	-	-	+
D	TS	1	-	-	-	-
D	TS	2	-	-	-	-
D	PY	1	-	+	++	++
D	PY	2	-	-	-	+
D	PYG	1	-	-	-	-
D	PYG	2	-	-	-	-
D	MFB	1	-	-	-	-
D	MFB	2	-	-	-	+

註：+，微弱生長；++，生長狀況好；+++，生長得很好；-，無生長。

表二、北投溫泉樣品 A、B、C 和 D 第一次高溫菌增菌培養之細菌觀察、生長狀況和培養液最終 pH 值。

樣品	編號	培養基	最終 pH 值	開始生長天數	生長狀況
A	1	TS	6.18	第一天	有菌
A	2	TS	6.18	第一天	短桿菌，數量多
A	1	PY	6.78~6.81	第一天	有菌
A	2	PY	6.78~6.81	第一天	有菌
A	1	PYG	4.92	第一天	有菌
A	2	PYG	4.92	第一天	有菌
A	1	MFB	4.28~4.30	第三天	有菌
A	2	MFB	4.28~4.30	第四天	有菌
B	1	TS	6.86		無菌
B	2	TS	6.87		無菌
B	1	PY	6.58		無菌
B	2	PY	6.59		無菌
B	1	PYG	5.98		無菌
B	2	PYG	6.01		無菌
B	1	MFB	6.59		無菌
B	2	MFB	4.53	第二天	有菌
C	1	TS	6.9		無菌
C	2	TS	6.9		無菌
C	1	PY	6.61		無菌
C	2	PY	6.67		無菌
C	1	PYG	6.02		無菌
C	2	PYG	6.04		無菌
C	1	MFB	4.55	第一天	長桿菌
C	2	MFB	4.52	第四天	有菌，但不明顯
D	1	TS	6.87		無菌
D	2	TS	6.86		無菌
D	1	PY	6.95	第二天	有菌
D	2	PY	6.71	第四天	有菌，但不明顯
D	1	PYG	6.04		無菌
D	2	PYG	6.03		無菌
D	1	MFB	6.61		無菌
D	2	MFB	4.49	第四天	有菌，但不明顯

表三、以顯微鏡觀察第二次增菌培養實驗所生長之細菌型態和革蘭氏染色特性。

樣品	編號	培養基	觀察到的細菌型態及染色特性
A	1	TS	短桿菌（陽）、雙桿菌（?）
A	2	TS	單球菌（陽）、單球菌（陰）、長桿菌（陽）、長桿菌（陰）、桿菌（陽）
A	1	PY	雙桿菌（陽）、桿菌（陽）、葡萄球菌（陰）、單球菌（陰）、長桿菌（陽）
A	2	PY	單球菌（陽）、短桿菌（陰）、桿菌（?）
A	1	PYG	單球菌（陽）
A	2	PYG	雙球菌（陽）、鏈球菌（陰）、桿菌（陽）、短桿菌（陽）、葡萄球菌（陰）
A	1	MFB	雙桿菌（陽）、雙桿菌（陰）、短桿菌（陽）、單球菌（陽）
A	2	MFB	桿菌（陽）、雙桿菌（陽）、單球菌（陰）、雙球菌（陽）
B	2	MFB	單球菌（陽）、單球菌（陰）、長桿菌（陰）、雙桿菌（陽）、雙桿菌（陰）、短桿菌（陽）
C	1	MFB	U型菌（陽）、長桿菌（陽）、雙桿菌（陽）、雙桿菌（陰）、短桿菌（陽）、單球菌（陰）
C	2	MFB	長桿菌（陽）、短桿菌（陽）、桿菌（陰）、弧菌（陽）、單球菌（陽）
D	1	PY	桿菌（?）、長桿菌（陽）、短桿菌（陽）
D	2	PY	長桿菌（陽）、桿菌（陽）、短桿菌（陽）
D	2	MFB	長桿菌（陽）、短桿菌（陽）

註：（陽），革蘭氏陽性菌；（陰），革蘭氏陰性菌；（?），無法確定革蘭氏染色特性。

評語

- 1) 北投採樣菌株尚未完成分離鑑定，相關研究內容可先於報告中移除，待完成分離鑑定工作後再行加入。
- 2) 烏來菌株是否已完成鑑定，也應於報告中說明。