

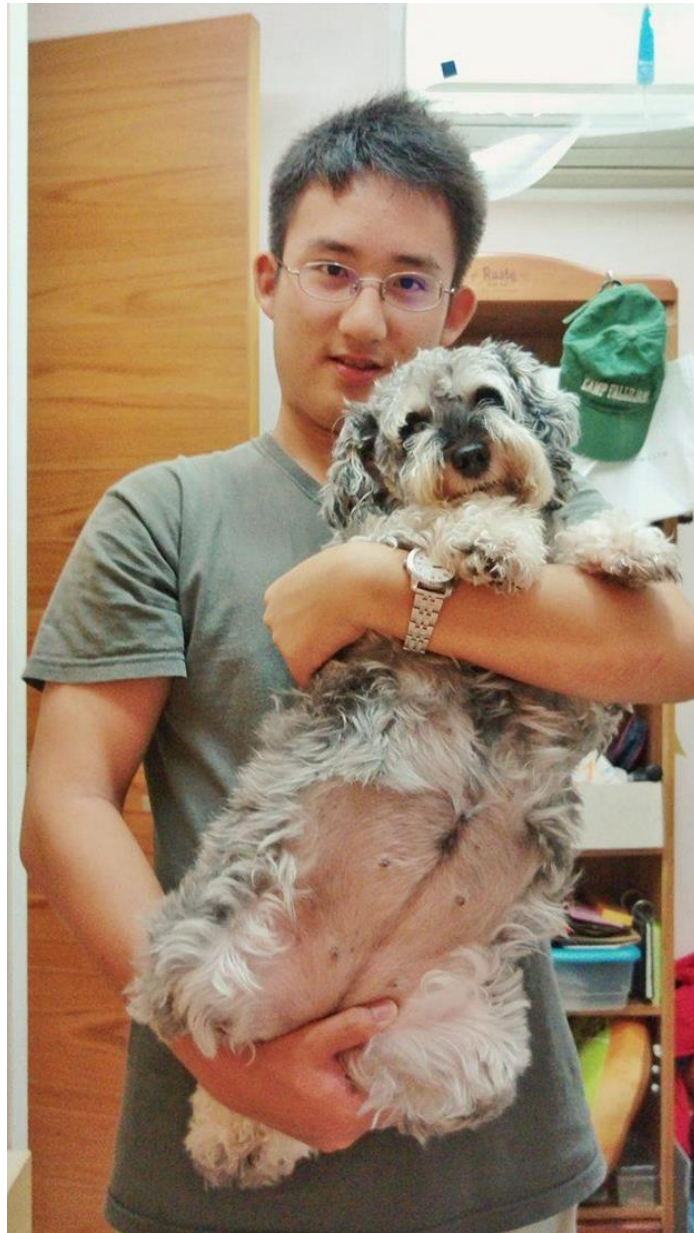
2017 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 200006
參展科別 環境工程科
作品名稱 神農菌、嗜百草-利用基因轉殖的大腸桿菌
偵測中草藥內的重金屬
得獎獎項 大會獎：二等獎

就讀學校 國立臺灣師範大學附屬高級中學
指導教師 陳紀如、江青釗
作者姓名 沈維哲

關鍵字 中草藥、大腸桿菌、重金屬偵測

作者簡介



大家好~我是就讀師大附中高二的沈維哲。我從小就很喜歡觀察生活周遭的科學，所以聽到高中有科展比賽就很興奮地參加。但事後才發現做專題研究是一件多麼辛苦的事：不停的討論、不停的修改、不停的操作、再不停的討論……。但當我走到這一步回頭看時，又感覺多麼快樂，學習這麼多！很高興能參加這次科展並且期待能結交和我一樣喜愛科學的年輕科學家！

摘要

中藥一直存有重金屬污染的疑慮，而目前檢驗這些可疑重金屬的儀器與技術皆需耗費大量金錢與時間，因此研發出簡便快速的偵測工具極為迫切。本研究目的是利用基因轉殖的大腸桿菌，偵測出中草藥內的重金屬。

實驗結果顯示，利用含有銅離子基因轉殖的大腸桿菌，偵測 7 種常見的中藥材浸膏，除了黃芩之外，其他 6 種中藥材內可偵測到銅離子，並且具有定量的螢光表現。其中，研究發現由於黃芩本身會有吸附銅離子的現象，因此利用螯合劑 EDTA 來解決此問題。結果顯示，螯合劑不會影響大腸桿菌的正常代謝，但能成功地將銅離子搶出並誘導細菌產生螢光。最後利用螢光顯微鏡觀察，發現深色的中藥並不會影響大腸桿菌的螢光表現。

未來期望可將本研究初步成果，做更進一步的研究，除了能合成更多不同基因的大腸桿菌，以偵測不同類型的重金屬外，還製成便宜且方便使用的重金屬生物感測器產品，方便民眾檢驗手中的中草藥材，確保所使用的中草藥之安全性。

Abstract

Chinese herbal medicine has played an essential role in the Eastern culture, yet, people have also been concerned about heavy metal contamination in herbal medicine for past decades. Though recent techniques can identify toxic substances in herbs, the process consumes a great deal of money and time. Thus, it is vital to come up with a new way to detect the toxins in Chinese herbal medicine. And, the purpose of this study is to use *E. coli* as a bio detector to detect heavy metals in Chinese herbal medicine.

Results showed that specific *E. coli* can detect copper ions in 6 out of 7 Chinese herbal medicines quantitatively. During the experimental process, it was found absorption of heavy metal ions occurred in some cases. To investigate in depth, EDTA was then used as a chelating agent to conduct ligand exchange. And the results showed that EDTA agent can successfully coordinate with copper ions and even trigger the production of fluorescence protein. Lastly, the bacteria in Chinese herbal medicine and copper ions were examined via a fluorescence spectrometry. It was revealed that the dark brown color of some Chinese herbal medicine will not interfere with the examination of the green fluorescence protein produced. Moreover, it supported the fact that even though *E. coli* in high concentration of copper ions may not attend a high growth, the fluorescence intensity is high enough to distinguish between different concentration levels, and thus offers the viability to measure in quantity.

Future studies may apply these preliminary findings and design a user-friendly biosensor product that allows people to detect their Chinese herbal medicine by themselves. Furthermore, a more diverse implement will be acquired. Different genes will be constructed to detect different toxic substances. That way, consumers can obtain a much more complete bio detecting kit.

壹、研究動機

中藥在中華文化中的食補、藥補、及治病上，扮演著不可或缺的角色。根據世界衛生組織的統計，發展中國家有 80% 民眾使用傳統醫療，已開發國家也有越來越多使用中草藥的趨勢 (World Health Organization, 2013)。然目前大量的重工業發展，造成環境相當嚴重的污染。中草藥會因為土壤、水質或空氣的重金屬污染，或是運送、製作、或儲存的過程中，造成汙染。因此在我們日常生活中，不時就會傳出中草藥因為含過量重金屬的消息，不但沒有達到強身保健的效果，反而因為其中有的污染物質，造成身體的傷害，甚至於致命，造成民眾人心惶惶，害怕而不敢使用中草藥。

中草藥常見的重金屬汙染包括鉛、砷、汞、銅、鎘，對民眾會造成不同形式的急、慢性健康傷害 (Chui et al., 2013; Harris et al., 2011; 徐雅慧, 陳儀驊, 羅吉方, & 林哲輝, 2007)。目前已有許多儀器設備可以檢驗出中草藥內的毒性物質 (Rosecrans & Dohnal, 2009; Yuan, Chapman, & Wu, 2010)，但是過程需耗費大量的人力、時間、金錢，無法頻繁抽檢，尤其現今有九成以上的中藥材都是進口，難以做到全面全程的品質監測，市面上民眾所使用的中藥，其安全性都是個未知數。本研究利用基因合成的大腸桿菌，作為一個簡易篩檢工具，當一旦偵測到溶液中含有銅離子，便能產生螢光蛋白反應，並將此快篩工具應用在中藥材中。由於此生物快篩可節省成本、簡單操作、並且有可攜帶性的優點，希望未來能提供做為進口中藥材的邊境管理快篩使用，或是民眾用來檢驗自己所使用的中藥是否含有重金屬的篩檢工具，能有效提昇掌控民眾使用中草藥的安全性。

貳、研究目的

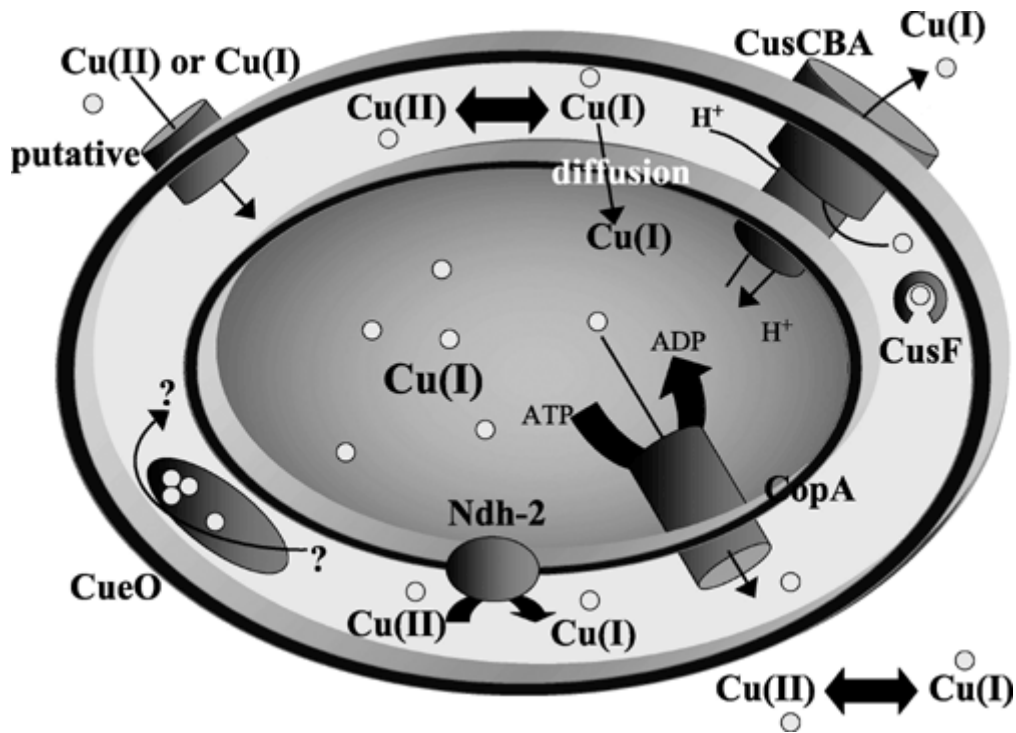
本研究是利用基因合成之大腸桿菌，偵測中草藥中的重金屬銅離子，並且研發簡易篩檢產品的設計及未來的應用。以下是研究目的:

- 一、 基因轉殖大腸桿菌的功能測試
 - (一) 在不同銅離子濃度下大腸桿菌的生長曲線
 - (二) 在不同銅離子濃度下大腸桿菌的螢光表現
- 二、 基因轉殖大腸桿菌在中草藥裡的功能測試
 - (一) 不同中草藥對銅離子的吸附性
 - (二) 不同中草藥對大腸桿菌的螢光表現影響
 - (三) 不同中草藥對大腸桿菌的生長影響
- 三、 螯合劑 EDTA 與具吸附性中藥(浸膏/生草藥)的影響
 - (一) EDTA 對基因轉殖大腸桿菌的生長影響
 - (二) EDTA 對基因轉殖大腸桿菌的螢光影響
- 四、 利用螢光顯微鏡觀察基因轉殖大腸桿菌的發光情形
- 五、 基因轉殖大腸桿菌在不同溫度下的螢光表現測試
- 六、 設計一組重金屬生物感測器產品

參、文獻探討

一、具基因片段大腸桿菌

本研究利用 CueR 蛋白作為大腸桿菌偵測銅離子所產生的蛋白 (Grass & Rensing, 2001)。CueR 蛋白歸屬於 MerR family 蛋白 (Brown, Stoyanov, Kidd, & Hobman, 2003)，其中 MerR family 的共通點就是在受到調控因子活化時會造成啟動基因序列的形變進而影響 RNA 聚合酶優先開始轉譯次等的啟動因子 (Hobman, 2007)。而 MerR family 裡有許多蛋白是會與金屬結合形成新的調控因子。CueR 則是會與銅離子、銀離子、金離子結合調控 CopA、CueO 兩組啟始基因，使後續的基因大量表達 (Stoyanov & Brown, 2003)。因此本研究利用 CopA 做為檢測銅離子的偵測起始點 (Rensing & Grass, 2003)。



圖一、CopA 通道蛋白的示意圖

二、中草藥的簡介

(一) 中藥材裡的重金屬

中草藥的重金屬污染常來自於土壤、空氣、或是刻意添加 (Ernst & Coon, 2001; Harris et al., 2011; Yuan et al., 2010)。除此之外，有一些中藥材本身就具有吸附重金屬的特性 (Tseng, 2005)。主要是因為有些植物會進行修復功能。植物

修復功能是指提取、吸收、分解、轉化土壤中有害物質的總稱，而其中超富集植物則是修復功能特別旺盛的植物。這種超富集體會大量吸收所生長土壤中的重金屬，但譬如黃芩(Scutellaria)。黃芩中含有天然的黃酮類化合物(Flavonoid)(Li, 2011)，能與銅離子結合以作為黃芩根部的抗氧化化合物(Mira et al., 2002)，可以減緩根部細胞的死亡。所以一旦拿這些超富集植物來服用，服用者也會間接受到重金屬的影響。

(二) 中草藥類型

中草藥使用的類型大概可以分為以下三類:

1. 生草藥

生草藥是我們常見在罐子中的藥材。其中經過初步的乾燥處理的植物根、莖、葉、花、果實都包含在生草藥的範圍內。生草藥在中華文化中大多是作為飲食或是藥材的服用，也是目前含重金屬的危害最嚴重的中草藥類型。

2. 浸膏

浸膏是生草藥經過高溫低壓的烹煮之後所得的黏稠膏狀中藥萃取液。這種類型屬於高濃度的中藥，純度相對較高；因此，作中藥的測試實驗通常會以浸膏為主要對象。

3. 科學中藥

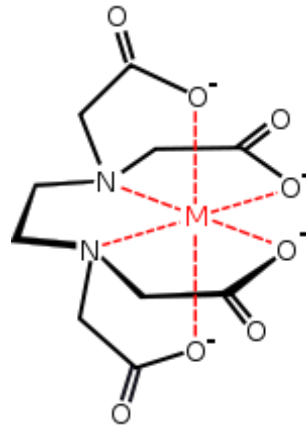
科學中藥是我們在中醫或市面上看到的粉末中藥 (Ergil, Kramer, & Ng, 2002)。其製作過程重要大致分為中草藥清洗、藥材切片、藥材炮製、以及浸膏賦型。把浸膏用高速噴灑同時加入以澱粉為主的塑形劑就可以做成我們所見的咖啡色科學中藥。由於我國科學中藥規範需要通 GMP 認證，因此其中含有重金屬的現況也最低。

為了避免科學中藥的塑形劑可能會帶來實驗上的干擾，本研究大多以浸膏和生草藥為主要的實驗材料。

三、 EDTA 的簡介

由於有些中草藥本身就有吸附重金屬的特性，本研究利用螯合劑去攫取被中藥材

吸收的銅離子，以方便後續的實驗偵測。螯合劑是乙二胺四乙酸 $C_{10}H_{16}N_2O_8$ ，也就是 EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid)，是一種有機化合物。它的結構擁有六齒的配位，能夠將多種金屬離子例如：銅、錳、鐵、鉛、鈣、鎂等螯住於結構的中心 (Song Y, Ammami, Benamar, Mezazigh, & Wang, 2016)。EDTA 本身對人體無害，而且形成的大多易溶於水，鮮少有殘留，除了用在處理環境的金屬污染外 (Peters, 1999)，也可用於臨床上汞、鉛、銅中毒，或心血管疾病的螯合治療 (Cao, Skaug, Andersen, & Aaseth, 2015; Ouyang, Gottlieb, Culotta, & Navas-Acien, 2015)。



圖二、乙二胺四乙酸結構圖

肆、研究器材與藥品

一、轉入基因質體

基因質體、大腸桿菌(DH5 α)、冰塊、乾水浴槽(dry water bath)、SOB 培養基(Super Optimal Broth, SOB)、微量離心管(Eppendorf)、桌上型離心機(Mini Centrifuge)、高速離心機(High Speed Centrifuge)、超微量全波長分光光度計(Thermo Scientific, Nanodrop1000)、電泳設備(Gel System)、LB 固態培養基(LB Agar)、Bacterial Cell Spreader、養菌管、氯黴素(Chloramphenicol)、37°C 搖晃式培養箱、微量滴管(Pipettes)、Tips、無菌操作台、酒精燈、酒精、無菌手套、試管振盪器(Vortex Mixer)、葡萄糖液(Glucose)

二、培養大腸桿菌

SOC 培養基(Super Optimal Catabolite broth, SOC Broth)、養菌管、氯黴素(Chloramphenicol)、37°C 搖晃式培養箱、微量滴管(Pipettes)、Tips、無菌操作台、酒精燈、酒精、無菌手套、試管振盪器(Vortex Mixer)

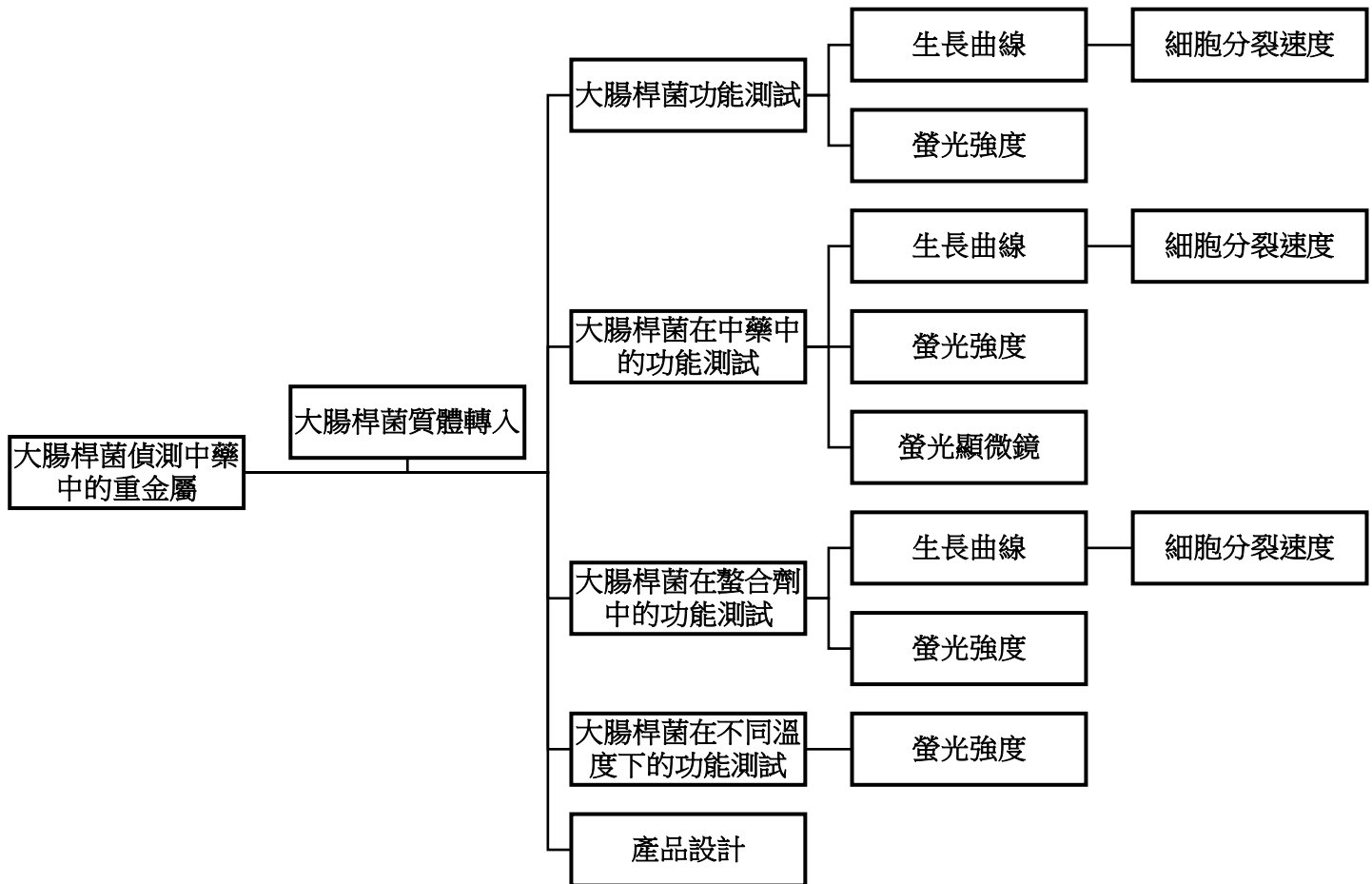
三、大腸桿菌功能測試

螢光光譜儀(Tecan infinite Pro M200, multimode microplate reader 內裝有 i-control 1.11 程式)、分光光度計(Beckman Coulter DU200, spectrophotometer)、黑色微量多孔盤(Costar flat black, IsoPlate)、透明微量多孔盤(Corning flat transparent, SpectraPlate)、強化塑膠光析管(Cuvette)、SOC 培養基(Super Optimal Catabolite broth, SOC Broth)、養菌管、氯黴素(Chloramphenicol)、37°C 搖晃式培養箱、微量滴管(Pipettes)、Tips、無菌操作台、酒精燈、酒精、無菌手套、微量離心管(Eppendorf)、15ml 離心管(Centrifuge tube)、試管振盪器(Vortex Mixer)、帶水硫酸銅($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)、4°C 冰箱

四、中草藥準備

微量滴管(Pipettes)、Tips、無菌操作台、酒精燈、酒精、無菌手套、微量離心管(Eppendorf)、15ml 離心管(Centrifuge tube)、試管振盪器(Vortex Mixer)、去離子水(Double Distillation Water, ddH $_2$ O)、中草藥浸膏(黃芩、薄荷、當歸、甘草、女真子、四物湯、加味逍遙散)、黃芩生草藥

伍、研究方法和過程



圖三、研究流程圖

一、大腸桿菌質體轉入

- (一) 利用超微量全波長分光光度計測出基因液體含質體的密度。將質體稀釋並且取出 1~1.5 μ g 的質體。
- (二) 將質體以及 20 μ l 勝任細胞(DH5 α)混和並且裝入微量離心管插入冰槽中等待 5 分鐘。
- (三) 將微量離心管置入 40 $^{\circ}$ C 的乾水浴槽 90 秒。
- (四) 將離心管取出並再次插入冰塊中等待 2 分鐘。
- (五) 加入 100~200 μ l 的 SOB 培養液。
- (六) 將離心管放入 37 $^{\circ}$ C 培養箱等待培養 4 小時。

- (七) 將 50 μ l 氯黴素加入未含抗生素的固態培養基，並將其塗開直到全乾為止。
- (八) 把菌液取出後均勻地塗抹在現在含有氯黴素的固態培養基上。
- (九) 把培養基放入 37°C 培養箱培養 16 小時。

二、基因轉殖大腸桿菌功能測試

- (一) 將硫酸銅稀釋為 3*10⁻⁸ ppm/ 3*10⁻⁶ ppm/ 3*10⁻⁴ ppm/ 3*10⁻² ppm/ 3ppm/ 3*10² ppm
- (二) 以下列配方做出 10ml 的實驗組

藥材	SOC	大腸桿菌	銅離子	氯黴素
加入量	9.7ml	200 μ l	100 μ l	10 μ l

- (三) 以持續表達綠色螢光蛋白的大腸桿菌做為正向控制組。不加入銅離子為一般控制組。
- (四) 於 1hr/2hr/3hr/4hr/5hr/6hr/7hr/8hr 取出 200 μ l 的菌液做生長曲線與螢光強度的測試。每一組實驗需做三重覆。
- (五) 螢光光譜儀的程式操作如下:

	生長曲線	螢光強度
測試盤	透明盤	黑盤
搖晃時間	5 秒	5 秒
搖晃震幅	2mm	2mm
Absorption	600nm	
Excitation		470nm
Emission		508nm
Gain		Optimal
邊境長	850nm	850nm
重複讀值	2*2	2*2

(六) 細胞分裂速率(Doubling Time)計算

因為在指數生長期(exponential phase)時

$$A \propto Y = K * 2^{T/t}$$

A 為吸收率

Y 為菌量數

K 為起始菌量數

T 為經過時間

t 為每次分裂所需時間
 所以先取以 2 為底的對數，畫出回歸曲線

$$\text{Log}_2 A \propto \text{Log}_2 Y = T/t + \text{log}_2 K$$

得到 $\text{log}_2 Y$ 為縱軸 T 為橫軸時斜率為 $1/t$ 的斜線歸曲線。所以將回歸線斜率取倒數便可求得細菌的分裂所需要花的時間。

三、基因轉殖大腸桿菌在中藥中的測試

- (一) 於前一天挑單一菌落養在 10ml 的已加抗生素 SOC 培養基中，放置搖晃式 37°C 培養箱中，轉速設為 80rpm，培養大約 16 小時。
- (二) 隔天取養好的 10ml 母菌管並且吸 1ml 至光析管照 600nm 的吸收波長。紀錄數據。
- (三) 將每一管母菌稀釋成 OD600 = 0.5 的起始菌量數。
- (四) 將硫酸銅稀釋為 3×10^2 ppm / 9×10^2 ppm / 2.7×10^3 ppm
- (五) 以二次水溶解稀釋中藥材浸膏，有一些藥才會比較慢溶，可以選擇先加溫後再加水。
- (六) 以下列配方做出 10ml 的實驗組

藥材	SOC	大腸桿菌	銅離子	氯黴素	中藥浸膏
加入量	9.7ml	200 μ l	100 μ l	10 μ l	3 μ g

- (七) 以下列表做出控制組

藥材	SOC	大腸桿菌	銅離子	氯黴素	中藥浸膏
加入量	9.7ml	200 μ l	100 μ l	10 μ l	3 μ g
正控制組	✓	持續表達	✓	✓	✓
負控制組	✓	不表達	✓	✓	✓
控制組 1	✓	受調控	✓	✓	✓
控制組 2	✓	受調控	✓	✓	✓
控制組 3	✓	受調控	✓	✓	✓

- (八) 於 0hr~8hr 每 30 分鐘取出 200 μ l 的菌液做生長曲線與螢光強度的測試。
- (九) 螢光光譜儀的程式操作如下:

	生長曲線	螢光強度
測試盤	透明盤	黑盤
搖晃時間	5 秒	5 秒
搖晃震幅	2mm	2mm

Absorption	600nm	
Excitation		470nm
Emission		508nm
Gain		Optimal
邊境長	850nm	850nm
重複讀值	2*2	2*2

(十) 螢光顯微鏡觀察

1. 將螢光顯微鏡的汞燈打開預熱 30 分鐘
2. 把 5 μ l 菌液滴在載玻片上，蓋上蓋玻片
3. 先以可見光調焦距，直到看到大腸桿菌
4. 關閉可見光源以及室內日光燈
5. 旋轉濾片轉盤並且打開雷射，濾片為藍光濾片
6. 觀察大腸桿菌的發光情形

四、螯合劑的功能測試(黃岑)

(浸膏)

- (一) 於前一天挑單一菌落養在 10ml 的已加抗生素 SOC 培養基中，放置搖晃式 37°C 培養箱中，轉速設為 80rpm，培養大約 16 小時。
- (二) 隔天取養好的 10ml 母菌管並且吸 1ml 至光析管照 600nm 的吸收波長。紀錄數據。
- (三) 將每一管母菌稀釋成 OD₆₀₀ = 0.5 的起始菌量數。
- (四) 將硫酸銅稀釋為 3*10²ppm
- (五) 將 EDTA 稀釋成 2*10³ppm
- (六) 以二次水溶解稀釋中藥材浸膏，有一些藥才會比較慢溶，可以選擇先加溫後再加水。
- (七) 以下列表做出控制組

藥材	SOC	大腸桿菌	銅離子	氯黴素	中藥浸膏	EDTA
加入量	9.6ml	200 μ l	100 μ l	10 μ l	3 μ g	100 μ l
正控制組	~	持續表達		~		~

負控制組	~	不表達	~	~
控制組 1	~	受調控	~	
控制組 2	~	受調控	~	~
控制組 3	~	受調控	~	~
控制組 4	~	受調控	~	~
控制組 5	~	受調控	~	~
控制組 6	~	受調控	~	~

(八) 於 0hr~4hr 每 30 分鐘取出 200 μ l 的菌液做生長曲線與螢光強度的測試。每一組實驗需做三重覆。

(九) 螢光光譜儀的程式操作如下:

	生長曲線	螢光強度
測試盤	透明盤	黑盤
搖晃時間	5 秒	5 秒
搖晃震幅	2mm	2mm
Absorption	600nm	
Excitation		470nm
Emission		508nm
Gain		Optimal
邊境長	850nm	850nm
重複讀值	2*2	2*2

(生草藥)

- (一) 從事實驗前兩天，從一般中藥行買得一次服用量的中藥黃岑(約 38g)。
- (二) 回家將中藥放入不鏽鋼鍋中加入兩大碗水(約 500ml)。用中火煮中藥直到鍋中的水大概少一半(約 200ml)，此時中藥黃岑會呈現深咖啡色。耗時大約一個半至兩小時。
- (三) 將殘渣用濾網去除，把中藥液存於玻璃瓶中，放涼後保存在冷藏室。
- (四) 於實驗前一天以中藥比銅離子 4:1 的量配成溶液。保存於 4°C 冰箱。
- (五) 挑單一菌落養在 10ml 的已加抗生素 SOC 培養基中，放置搖晃式 37°C 培養箱中，轉速設為 80rpm，培養大約 16 小時。
- (六) 隔天取養好的 10ml 母菌管並且吸 1ml 至光析管照 600nm 的吸收波長。紀錄數據。
- (七) 將每一管母菌稀釋成 OD600 = 0.5 的起始菌量數。
- (八) 以下列表做出控制組

藥材	SOC	大腸桿菌	氯黴素	中藥銅離子	EDTA	中藥	銅離子
----	-----	------	-----	-------	------	----	-----

加入量	9.2ml	200µl	10µl	500µl	100µl	400µl	100µl
正控制組	✓	持續表達	✓	✓	✓		
負控制組	✓	不表達	✓	✓	✓		
控制組 1	✓	受調控	✓			✓	
控制組 2	✓	受調控	✓				✓
控制組 3	✓	受調控	✓	✓			
控制組 4	✓	受調控	✓		✓		
控制組 5	✓	受調控	✓		✓		✓
控制組 6	✓	受調控	✓	✓	✓		

(九) 於 0hr~4hr 每 30 分鐘取出 200µl 的菌液做生長曲線與螢光強度的測試。每一組實驗需做三重覆。

(十) 螢光光譜儀的程式操作如下:

	生長曲線	螢光強度
測試盤	透明盤	黑盤
搖晃時間	5 秒	5 秒
搖晃震幅	2mm	2mm
Absorption	600nm	
Excitation		470nm
Emission		508nm
Gain		Optimal
邊境長	850nm	850nm
重複讀值	2*2	2*2

五、 基因轉殖大腸桿菌在不同溫度下測試

- (一) 於前一天挑單一菌落養在 10ml 的已加抗生素 SOC 培養基中，放置搖晃式 37°C 培養箱中，轉速設為 80rpm，培養大約 16 小時。
- (二) 由於不會搖晃氧菌管，所以此實驗不稀釋母菌，直接進行實驗。
- (三) 配好 2.7×10^3 ppm 的硫酸銅。
- (四) 利用溫度計測量冰箱(4°C)、室溫(19°C)、恆溫箱(37°C)

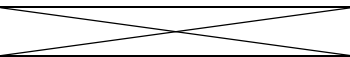
(五) 以下列表做出實驗組:

藥材	SOC	大腸桿菌	銅離子	氯黴素	溫度
加入量	9.7ml	200 μ l	100 μ l	10 μ l	($^{\circ}$ C)
正控制組 1	~	持續表達	~	~	4
正控制組 2	~	持續表達	~	~	19
正控制組 3	~	持續表達	~	~	37
負控制組 1	~	不表達	~	~	4
負控制組 2	~	不表達	~	~	19
負控制組 3	~	不表達	~	~	37
實驗組 1	~	受調控	~	~	4
實驗組 2	~	受調控	~	~	19
實驗組 3	~	受調控	~	~	37

(六) 每一組實驗要做三重複。將養菌管依對應的溫度擺在冰箱、室溫桌面、培養箱中。由於實驗室沒有另外可打氧氣或搖晃的器械，所以統一所有的實驗組都不搖晃。

(七) 於將養菌管靜置後 1、2、3 小時後分別取 200 μ l 的菌液作生長曲線和螢光強度的測試。

(八) 螢光光譜儀的程式操作如下:

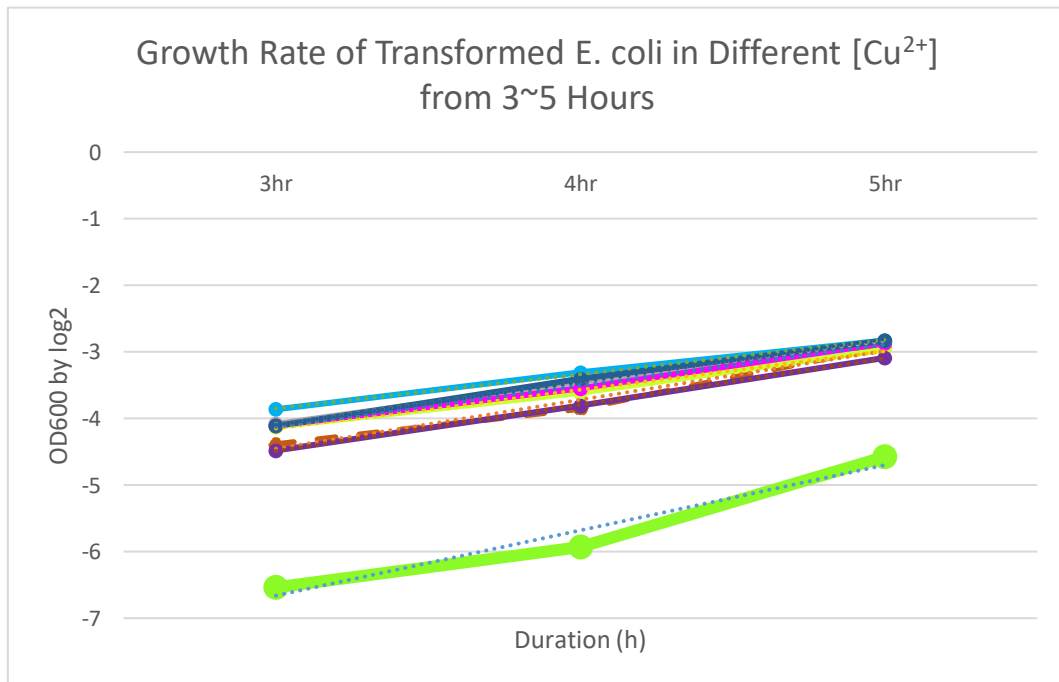
	螢光強度
測試盤	黑盤
搖晃時間	5 秒
搖晃震幅	2mm
Absorption	
Excitation	470nm
Emission	508nm
Gain	Optimal
邊境長	850nm
重複讀值	2*2

陸、研究結果

一、基因轉殖大腸桿菌的功能測試

圖四說明基因轉殖大腸桿菌在不同銅離子濃度下，如表一顯示所推算出來的分裂速率，可得知大腸桿菌的生長並不會受到干擾。而持續表現綠色螢光蛋白的細菌會在一開始前 4 小就有生長緩慢的趨勢，可能是因為持續製造蛋白質的緣故，而造成細菌無法如期快速地增長；但是到了後半期，細菌會慢慢適應並且增加分裂速度。

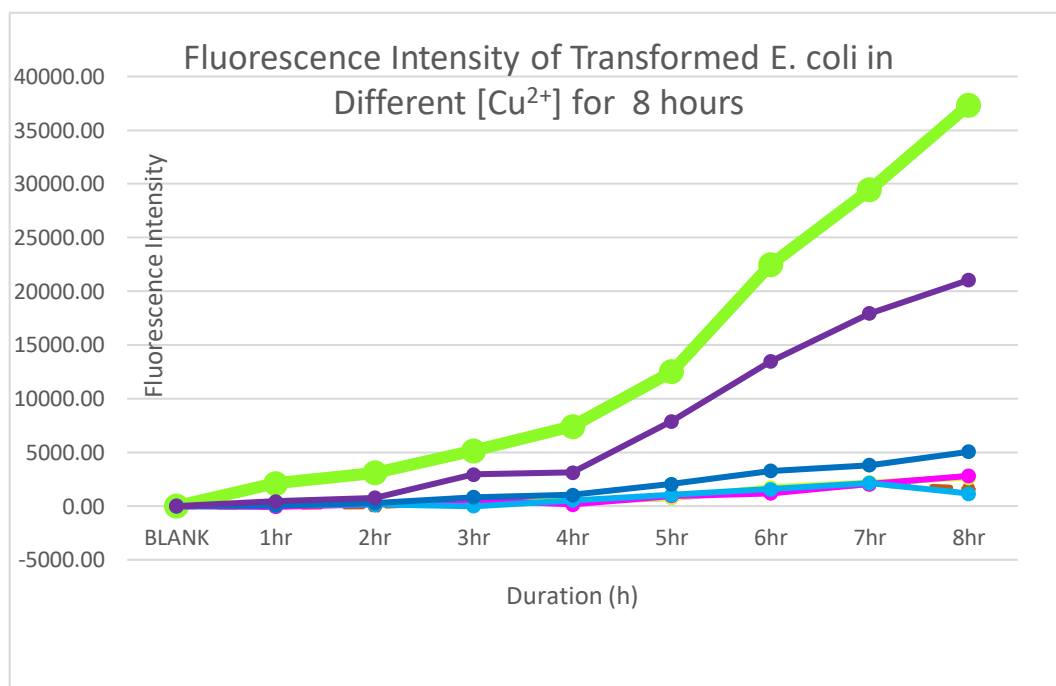
圖五呈現基因轉殖大腸桿菌在不同銅離子濃度下的螢光表現，正控制組(持續表達綠色螢光蛋白)的螢光值隨著時間上升，能確認實驗過程以及激發和吸收光正確無誤。從銅離子濃度為 3ppm 的實驗組也可以看出，大腸桿菌隨著時間大幅增長的趨勢。可是當銅離子濃度低於 3×10^{-2} ppm，細菌則不會有明顯的螢光表現。綜合以上結果，後續的實驗皆以 $[\text{Cu}^{2+}] \geq 3\text{ppm}$ 的濃度進行測試。



圖四、基因轉殖大腸桿菌在不同銅離子濃度下的生長曲線

表一、在生長曲線的實驗結果

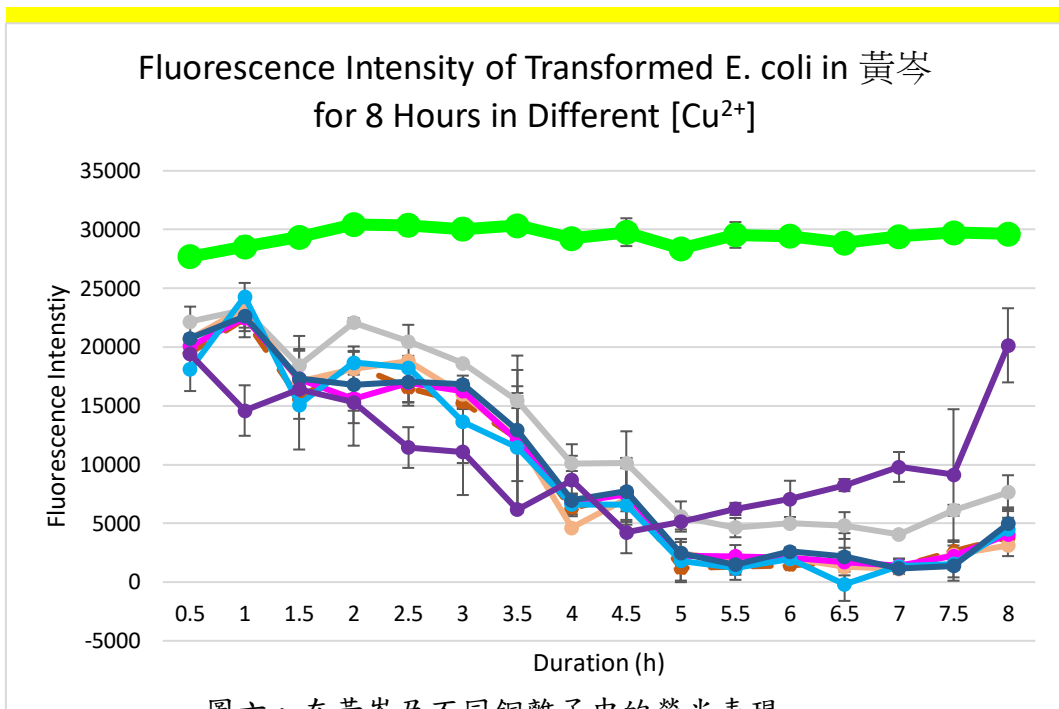
實驗樣本	R ²	方程式	分裂速率	顏色
正控制組	0.9545	y=0.9808x-7.6416	61min	——
控制組	0.9761	y=0.7347x-5.1889	81min	- - - -
實驗 3*10 ⁻¹⁰ ppm	1.0000	y=0.6253x-4.7069	95min	——
實驗 3*10 ⁻⁸ ppm	0.9947	y=0.5795x-4.7284	103min	——
實驗 3*10 ⁻⁶ ppm	0.9969	y=0.6190x-4.7467	96min	——
實驗 3*10 ⁻⁴ ppm	0.9984	y=0.5175x-4.3691	115min	——
實驗 3*10 ⁻² ppm	0.9964	y=0.6413x-4.7327	93min	——
實驗 3ppm	0.9996	y=0.6959x-5.185	86min	——



圖五、基因轉殖大腸桿菌在不同銅離子濃度下的螢光表現

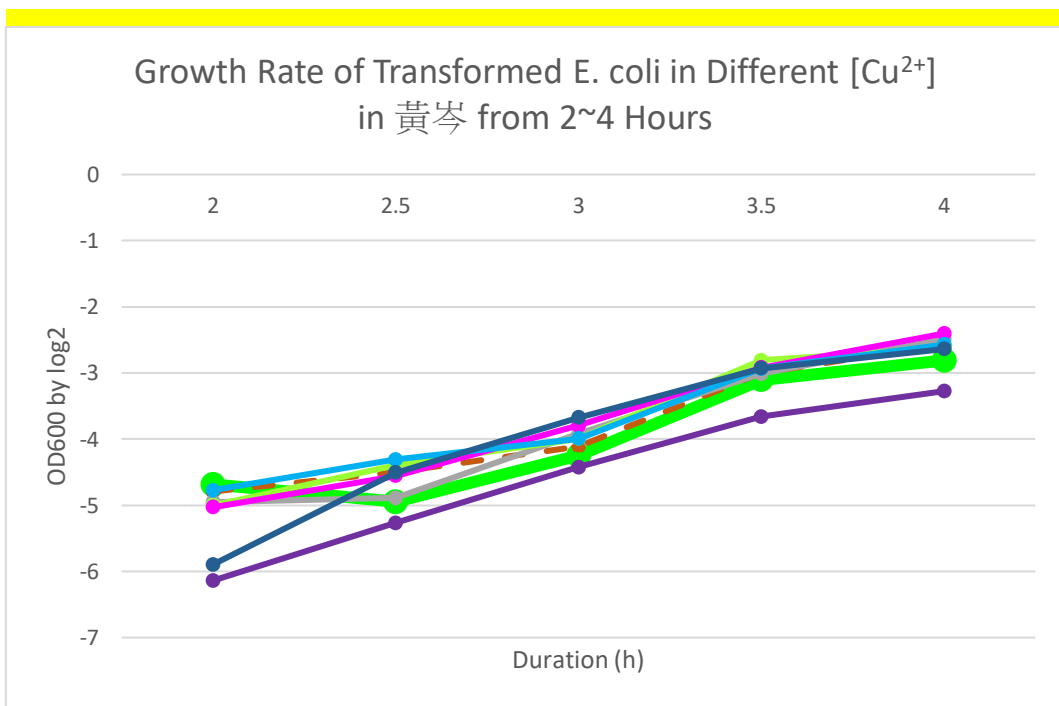
二、基因轉殖大腸桿菌在中草藥裡的功能測試

本研究選取幾種常使用的中藥材，包括黃芩、甘草、當歸、薄荷、女真子五種單方中草藥，以及四物湯、加味逍遙散兩種複方藥劑為中草藥樣本，測試基因轉殖大腸桿菌在這些中草藥材裡的功能反應。發現所有測試的中草藥皆不會影響大腸桿菌的生長。研究中還發現大腸桿菌在甘草、當歸、薄荷、女貞子、四物、以及加味逍遙散這六種中藥裡的螢光表現良好，但在黃芩中會有隨時間下降的趨勢並無法區分有無銅離子的存在。此乃因為黃芩含有大量的黃酮家族而黃酮類會吸附銅離子所造成的現象。



圖六、在黃岑及不同銅離子中的螢光表現

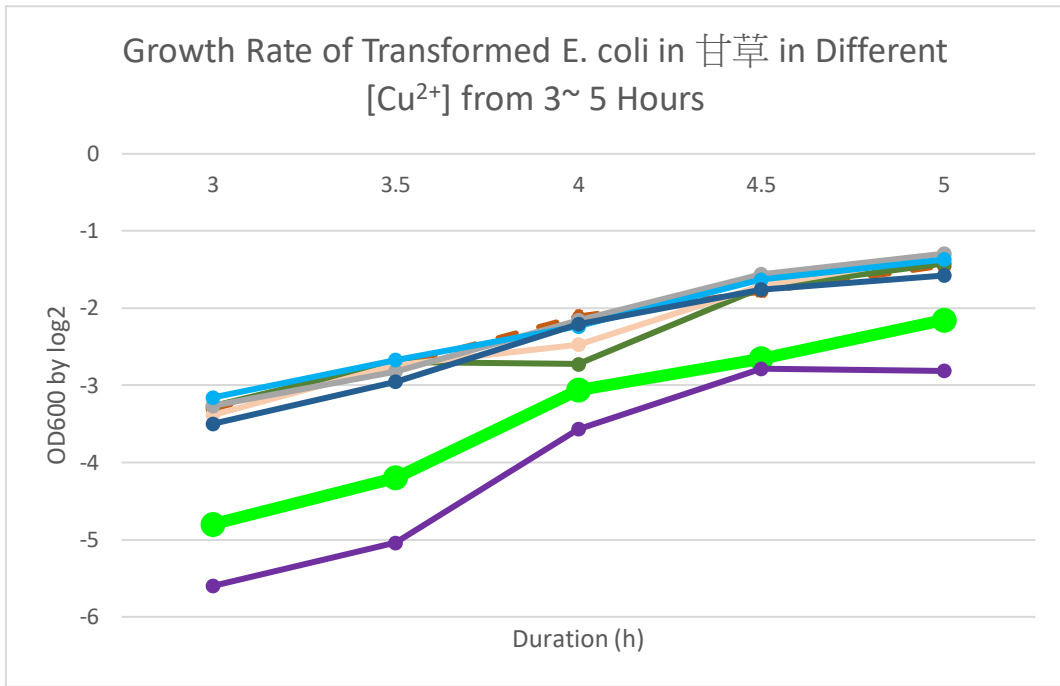
圖六、不同銅離子濃度之基因轉殖大腸桿菌在黃岑中的生長曲線



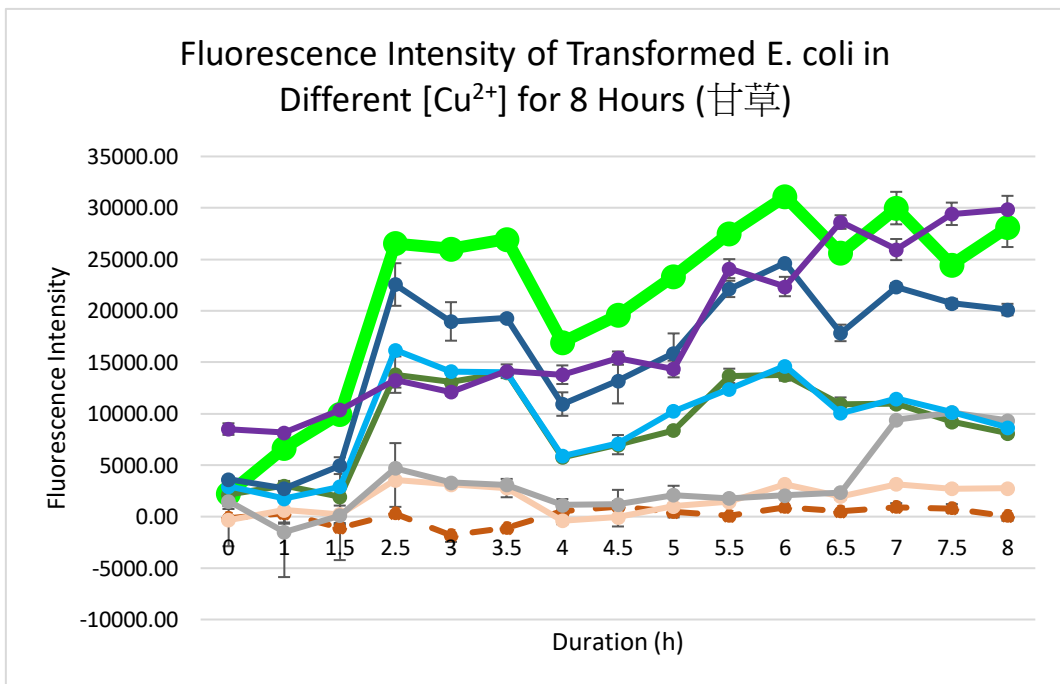
圖七、不同銅離子濃度之基因轉殖大腸桿菌在黃岑中的螢光表現

備註一、黃岑實驗中顏色和實驗組對照

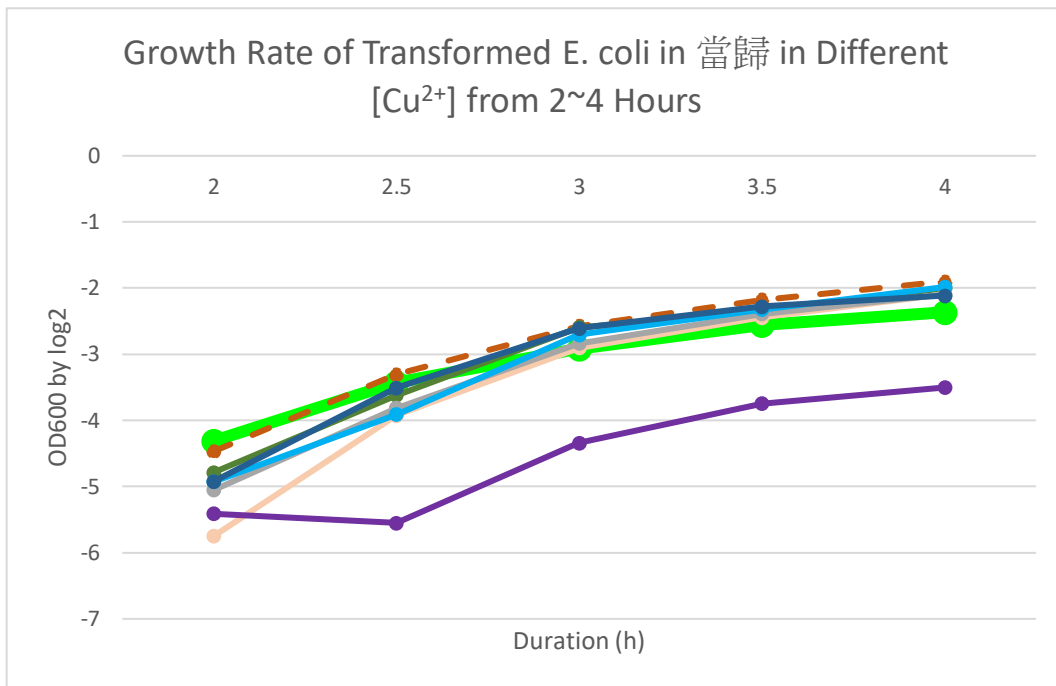
實驗樣本	正控制組	控制組	實驗 3×10^{-10} ppm	實驗 3×10^{-8} ppm
顏色				
實驗樣本	實驗 3×10^{-6} ppm	實驗 3×10^{-4} ppm	實驗 3×10^{-2} ppm	實驗 3 ppm
顏色				



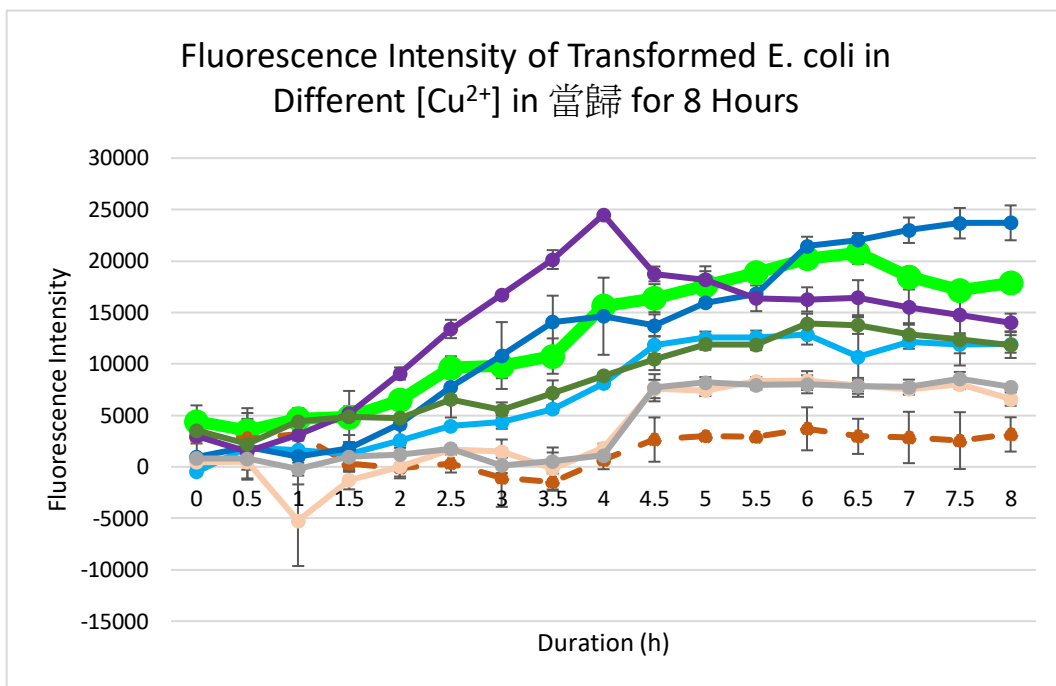
圖八、不同銅離子濃度之基因轉殖大腸桿菌在甘草中的生長曲線



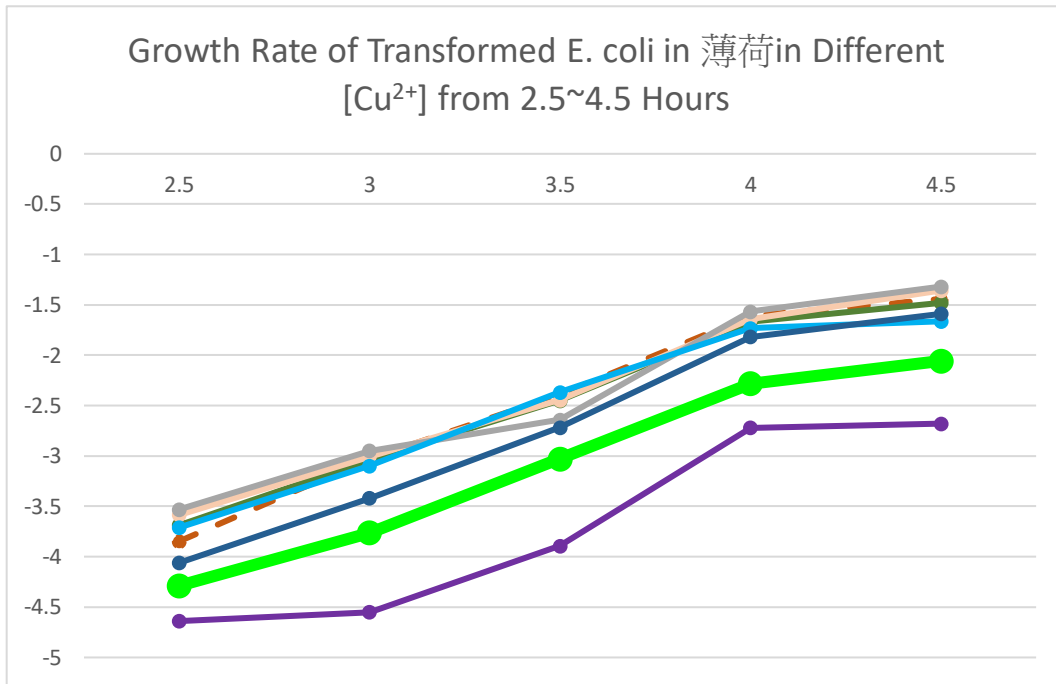
圖九、不同銅離子濃度之基因轉殖大腸桿菌在甘草中的螢光表現



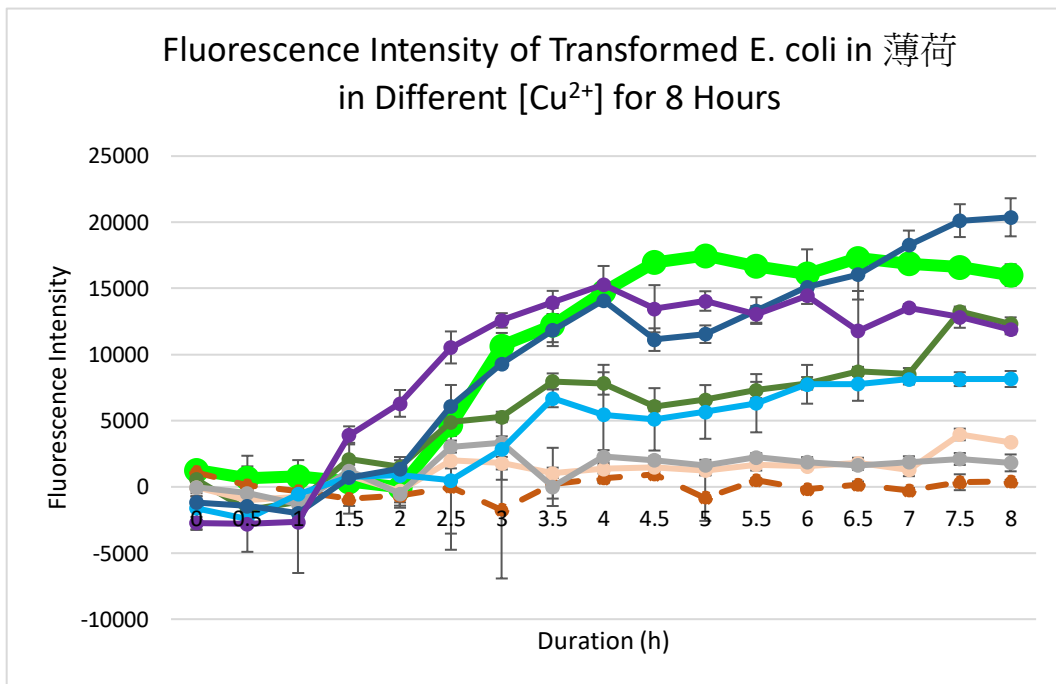
圖十、不同銅離子濃度之基因轉殖大腸桿菌在當歸中的生長曲線



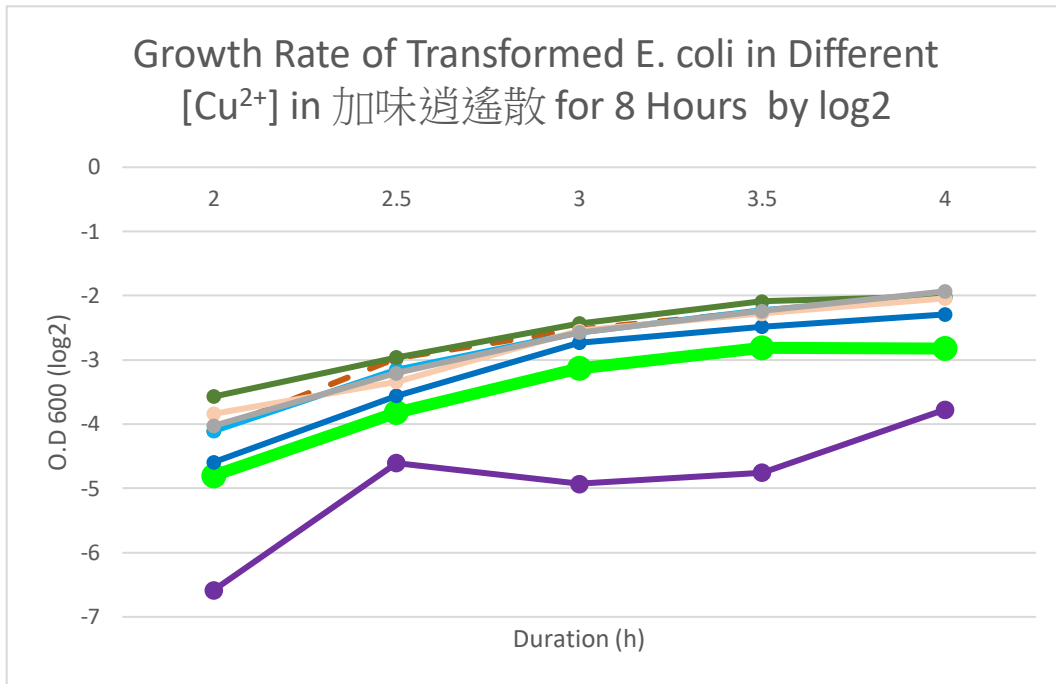
圖十一、不同銅離子濃度之基因轉殖大腸桿菌在當歸中的螢光表現



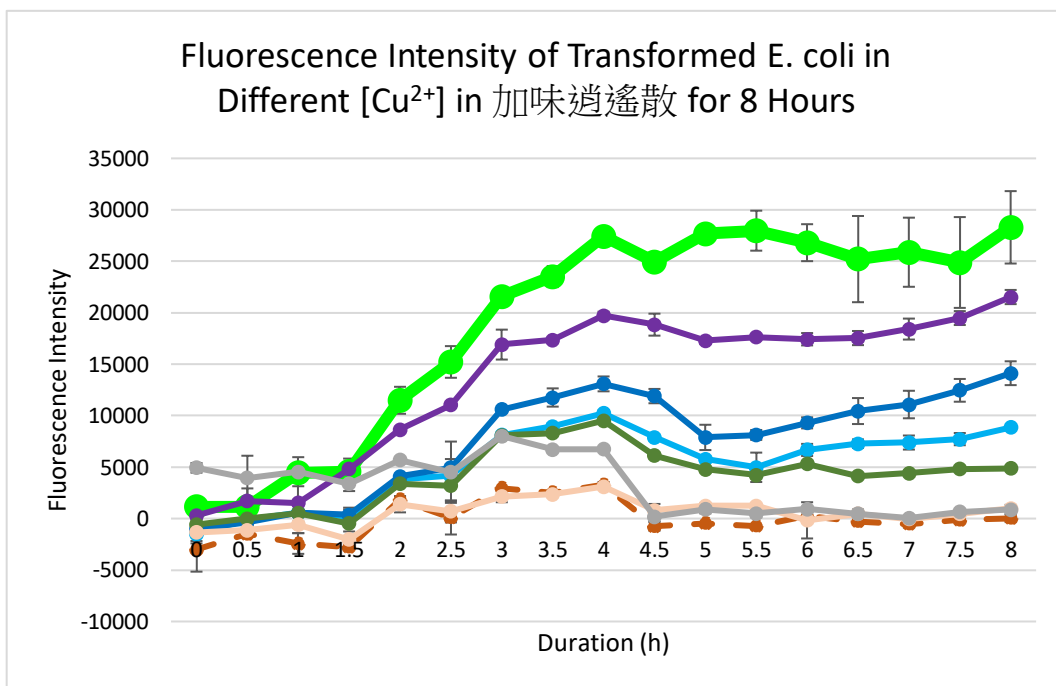
圖十一、不同銅離子濃度之基因轉殖大腸桿菌在薄荷中的生長曲線



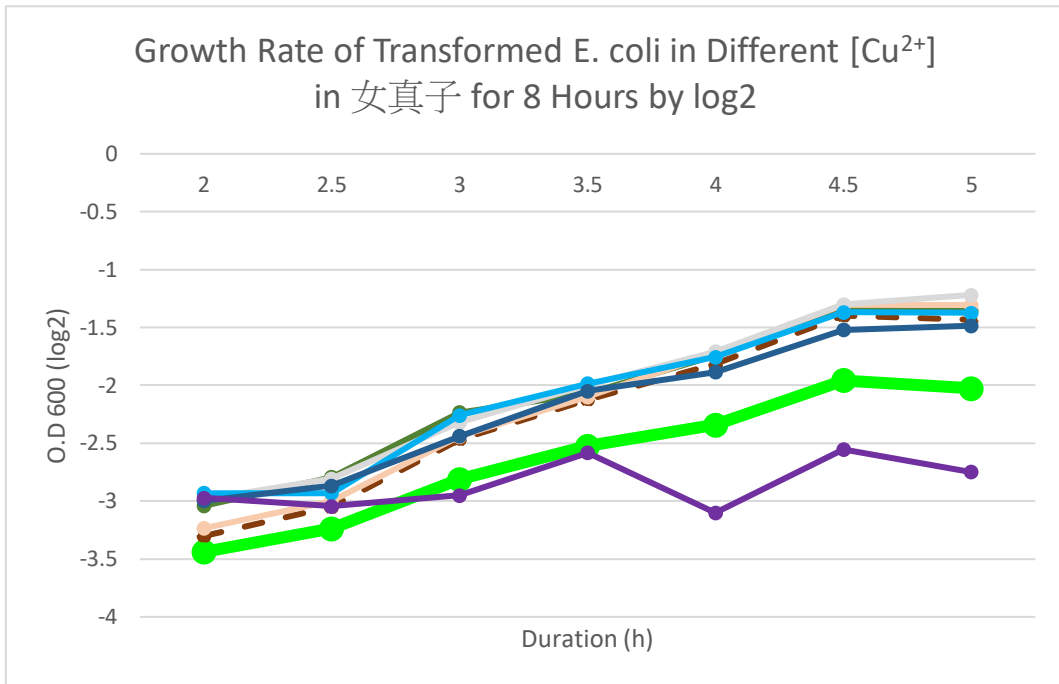
圖十二、不同銅離子濃度之基因轉殖大腸桿菌在薄荷中的螢光表現



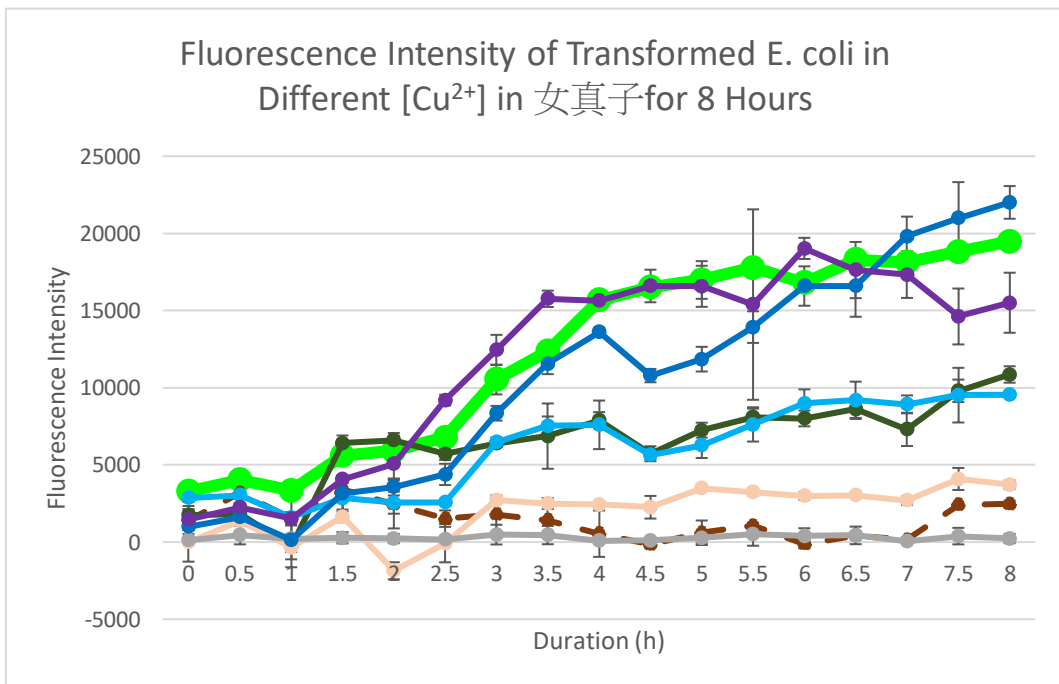
圖十三、不同銅離子濃度之基因轉殖大腸桿菌在加味逍遙散中的生長曲線



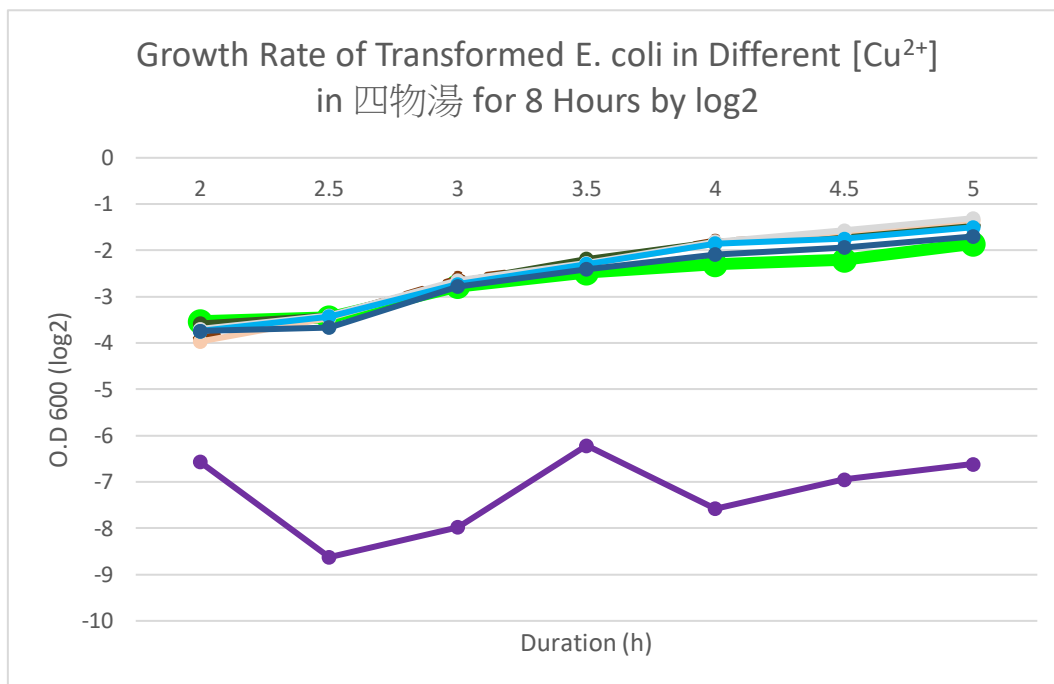
圖十四、不同銅離子濃度之基因轉殖大腸桿菌在加味逍遙散中的螢光表現



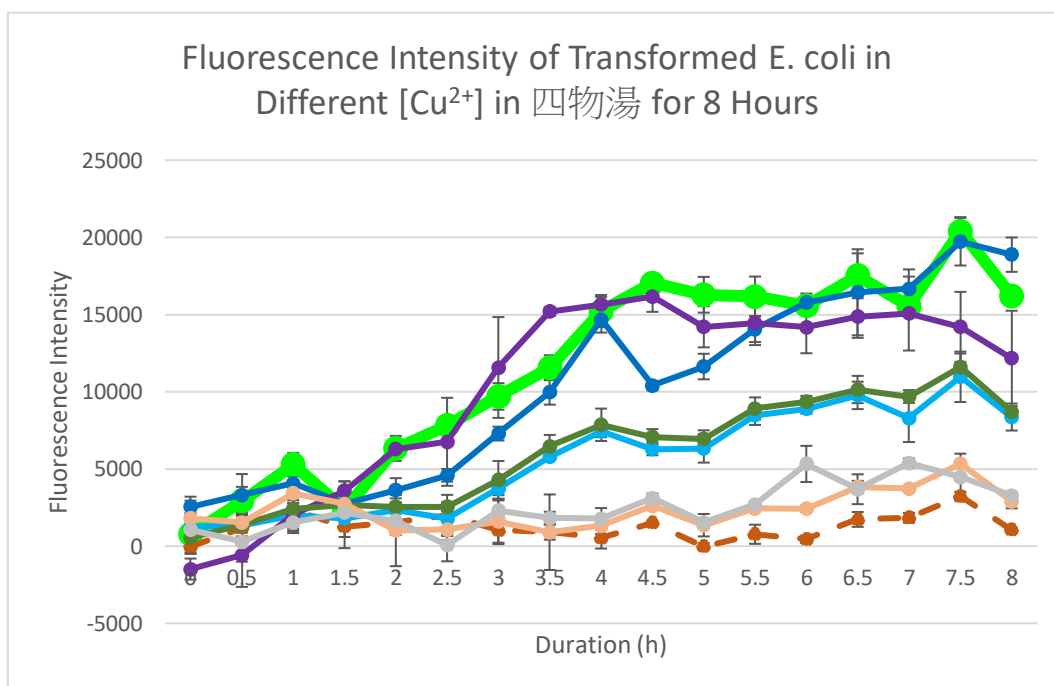
圖十五、不同銅離子濃度之基因轉殖大腸桿菌在女真子中的生長曲線



圖十六、不同銅離子濃度之基因轉殖大腸桿菌在女真子中的螢光表現



圖十七、不同銅離子濃度之基因轉殖大腸桿菌在四物湯中的生長曲線



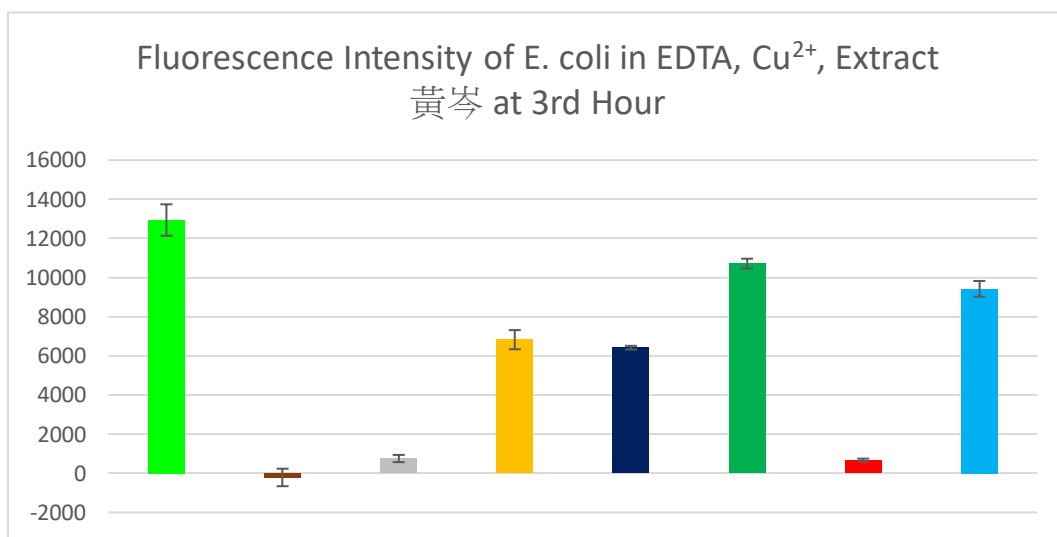
圖十八、不同銅離子濃度之基因轉殖大腸桿菌在四物湯中的螢光表現

備註二、實驗中，顏色和實驗組對照

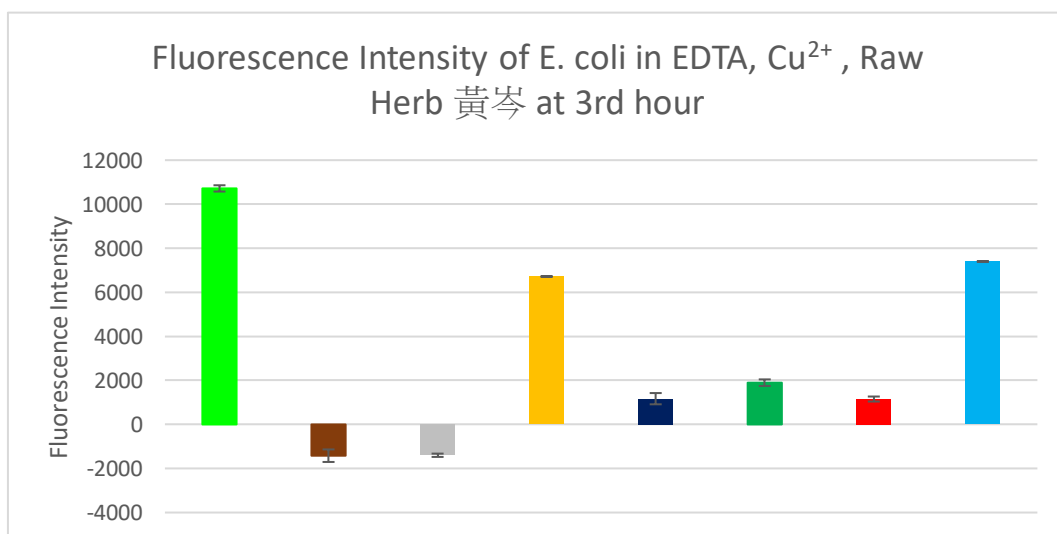
實驗樣本	正控制組	負控制組	控制組 1	控制組 2
顏色	——	- - - -	——	——
實驗樣本	控制組 3	實驗組 3ppm	實驗組 9ppm	實驗 27ppm
顏色	——	——	——	——

三、加入 EDTA 螯合劑的功能測試

在黃岑的實驗中發現基因轉殖大腸桿菌的螢光表現，會隨時間而漸弱，因此想了解發生的原因。經過與老師討論以及文獻查證後發現，黃岑本身就具有吸附銅離子的特性，因此加入 EDTA 螯合劑，來測試基因轉殖大腸桿菌的功能。本實驗測試了浸膏和生草藥由圖十九和圖二十顯示，黃岑會影響大腸桿菌受銅離子調控的現象，螢光表現量低於只有銅離子及大腸桿菌的實驗組。也發現 EDTA 能解決黃岑對大腸桿菌的影響的情況下，並不會干擾大腸桿菌表現綠色螢光蛋白。因此，EDTA 適合做為一個克服具有吸附金屬離子的超富集植物類型的草藥的重金屬偵測媒介。



圖十九、大腸桿菌在有銅離子、黃岑浸膏、螯合劑不同調控環境下的螢光表現小



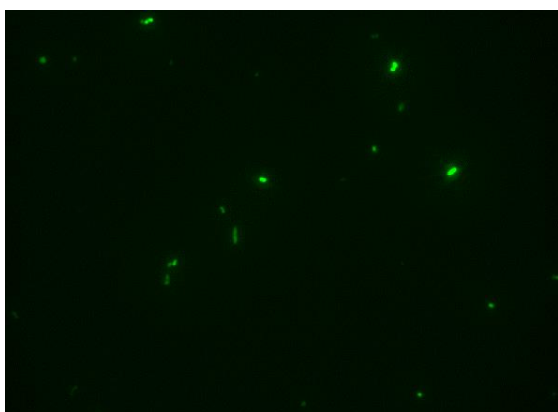
圖二十、大腸桿菌在有銅離子、黃岑生草藥、螯合劑不同調控環境下的螢光表現

備註三、實驗中，實驗組和顏色的對照表

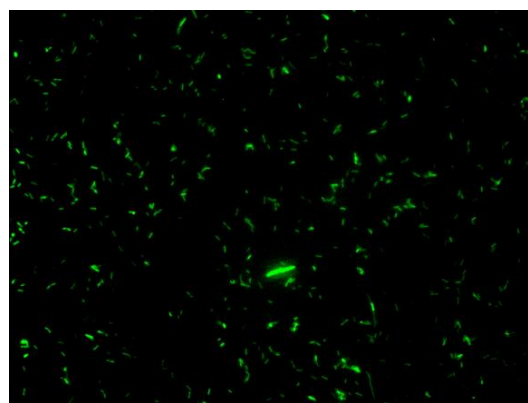
實驗樣本	正控制組	負控制組	控制組 1	控制組 2
顏色				
實驗樣本	控制組 3	控制組 4	控制組 5	控制組 6
顏色				

四、基因轉殖大腸桿菌在螢光顯微鏡下分析

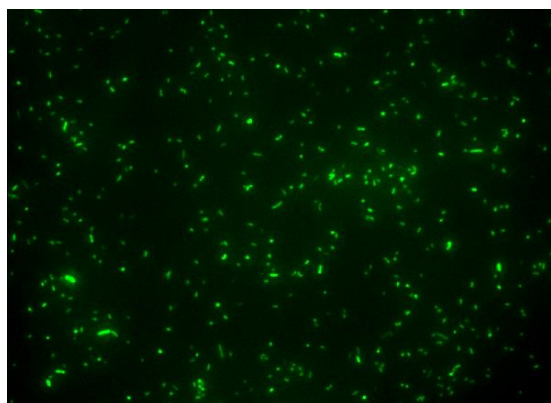
中草藥顏色多是深暗色，為了解中草藥本身的色素是否會影響基因轉殖大腸桿菌偵測銅離子的表現，在螢光顯微鏡下進行測試。圖二十一結果顯示，中草藥本身的色素並不會影響觀察細菌偵測銅離子的表現。乃因為螢光的表現和我們人類一般眼睛看到的色素有所差別，因此在顯微鏡下的大腸桿菌可以避免中藥可見顏色的干擾。其次是因為在玻片中極薄的液體容易失去色素重疊，所以在未來的成品發展，希望可以將大腸桿菌固定在極薄的介面上，會有利於解決色素的影響。



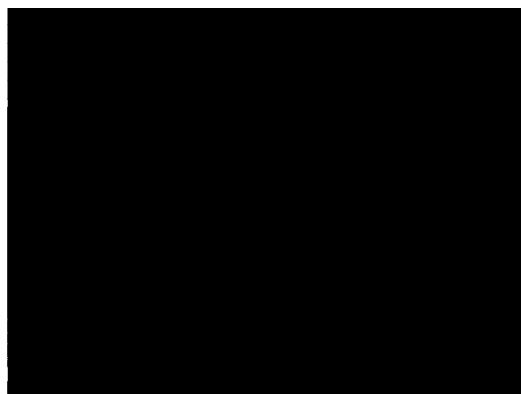
27ppm 實驗組 曝光時間:0.5 秒



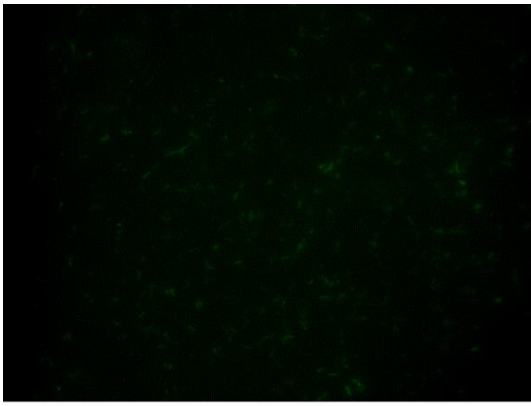
正控制組 曝光時間 0.5 秒



9ppm 實驗組 曝光時間:1.0 秒



負控制組 曝光時間:1.0 秒



3ppm 實驗組 曝光時間:1.0

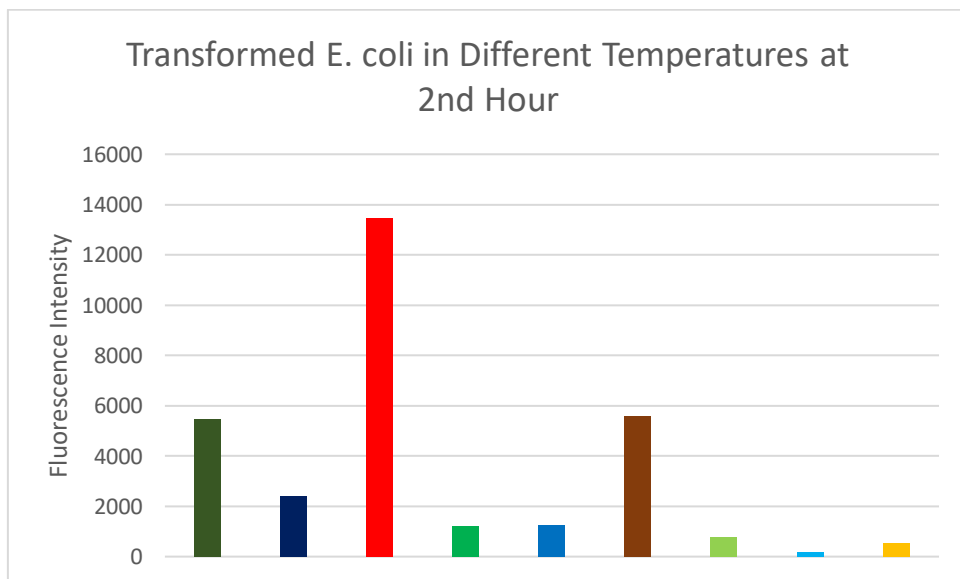


只有加中藥的控制組 曝光時間:1.0 秒










圖二十一、螢光顯微鏡底下的基因轉殖大腸桿菌表

五、基因轉殖大腸桿菌在不同溫度下的功能測試

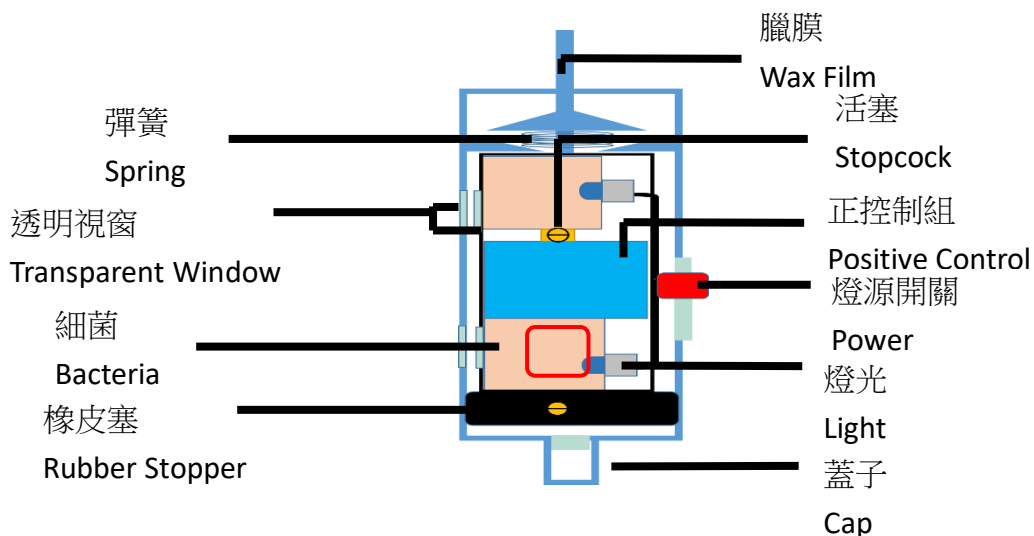
由圖二十二顯示，大腸桿菌在 37°C、19°C 測試功能良好，能與負控制組有明顯的區隔。然而在 4°C 低溫條件下，大腸桿菌活動不明顯，對銅離子偵測反應的現象並不顯著。根據研究結果，此生物感測器可在實驗室培養箱及台灣的室溫使用，而可以保存在一般冰箱冷藏室，利用低溫保存產品延長生物感測器的使用期限。還觀察到持續製造螢光蛋白的細菌在 3 種不同溫度的螢光表現都不佳，推測可能是因為細菌過老所造成的現象。



圖二十二、基因轉殖大腸桿菌在不同溫度下兩小時後的螢光表現

實驗樣本	正控制組 1	正控制組 2	正控制組 3
顏色			
實驗樣本	負控制組 1	負控制組 2	負控制組 3
顏色			
實驗樣本	實驗組 1	實驗組 2	實驗組 3
顏色			

六、設計一組重金屬生物感測器產品



說明: 此產品的使用方法，如原子筆一般使用產品，先去掉管口蓋子，把中藥吸進產品裡。把產品倒放，用指甲或紙張扭轉活塞使正控制組和中藥流進大腸桿菌所在的細菌槽中。確認液體流光後把活塞鎖上，防止細菌留至外部。等待 2 至 4 小時候按下後方紅色的燈源開關，直接從透明視窗觀察大腸桿菌的螢光表現，比較中藥和正控制組。使用完畢，以筆尖端吸取 100°C 的熱水進實驗組的大腸桿菌槽；再以熱水從筆頂灌入把封住的石臘膜溶掉流入控制組大腸桿菌槽。將產品靜置 5 分鐘殺死大腸桿菌。最後將產品整個丟棄，不宜重複使用。

此產品的設計考量到方便做成筆的形狀，可以隨身攜帶而且不占位置。又以彈簧的長短鬆緊做一個吸取固定量的中藥設計。活塞能作為一個既隔絕細菌又能將中藥運輸進產品順便過濾大形殘渣的管道。小巧的燈光和開關解決了觀察螢光所需要的激發光，材料便宜而且隨處可見，不同於實驗室大型的雷射汞燈顯微鏡。為了嚴謹性，此產品還有一組正控制組，能確認同批的大腸桿菌還有偵測功能，降低偽陰性的可能。這些便是在此些考慮下所構想的設計。

柒、研究討論

本研究利用基因轉殖大腸桿菌作為生物感測器(biosensor)來偵測中草藥裡的銅離子。實驗結果有幾項主要發現，第一、本研究所使用的基因轉殖大腸桿菌，螢光反應強度會隨著銅離子濃度的增加而增強，可做為銅離子定量的生物檢測器。第二、轉殖大腸桿菌在本實驗所使用的七種單方或複方的中草藥功能實驗，結果顯示基因轉殖大腸桿菌的基因啟動子對銅離子有高度的專一性，不會受到中草藥材或是色素的干擾，應可用於偵測中草藥裡的銅離子。第三、本研究結果顯示這種基因轉殖大腸桿菌可以在常溫或實驗室培養箱中操作。目前主要的重金屬毒物檢驗方法，需要使用到非常昂貴的儀器(如 ICP-MS)，且這些儀器都需要專業技術人員在實驗室的操作，光是送檢到收到檢驗報告，往往需要 2、3 個星期的時間，相較之下，生物感測器大約 2-4 小時的時間，即能測試出溶液中的銅離子，未來應該可以發展成為簡易便宜的重金屬檢測工具。而由於本研究的基因轉殖大腸桿菌可以偵測到 3ppm 以上的銅離子濃度，比我國中藥合法銅離子濃度(20ppm)容許範圍更低的濃度，因此這種生物感測器未來可以應用在進口中藥材邊境管理時的大量初步篩檢，或是方便民眾自行偵測手邊的中草藥。但是此研究的檢測器不足以確切的顯示銅離子濃度，若檢測出有銅離子並需要確切的金屬濃度含量數值，才再進一步送實驗室進行檢驗。

本研究也發現 EDTA 螯合劑可以與超富集植物競爭吸附金屬離子，但不會影響基因轉殖大腸桿菌的功能，可以用來解決中藥吸附重金屬的問題。目前本研究以實驗經純化後的中藥浸膏以及自己煎煮的生草藥，在未來的實驗中，希望能測試更多的生草藥。本研究自行設計的一個簡易的產品模型，在未來實驗研究，期待能製成產品，實際操作產品進行測試。除此之外，也希望未來能合成不同的基因，偵測更多常見重金屬如汞、鉛、鎘，並提高偵測靈敏度。

雖然生物感測器是兼具快速、便宜、可塑性高、研究價值與潛力大的偵測技術，但畢竟大腸桿菌是生物，不可預期性的問題會較儀器測試高，例如產品的保存方法、有效期限以及最佳測試環境。而基因轉殖的安全的疑慮，更是要層層把關。尤其中草藥多是天然植物，成分極其複雜，混雜著不同的成分及因素，是否產生不同的交互作用，都需要有更多實驗測試，以及嚴謹的討論。從研究重金屬生物感測器，到能實際應用在檢驗各種中草藥的重金屬，雖然還有許多困難需要突破，但是相信持續的研究和努力能使本研究能發展更成熟，將生物科技落實在人民日常生活中。

捌、結論與應用

- 一、本研究發現質體轉殖完成的大腸桿菌能成功檢驗出銅離子。螢光強度會隨著銅離子濃度的增加而增強，故可做為銅離子定量的生物檢測器。
- 二、分析大腸桿菌在不同中藥中的螢光以及其生長所受的影響，結果顯示細菌的生長週期並不會受到中藥材的干擾；大腸桿菌的基因啟動子也因對銅離子有高度的專一性，所以仍可偵測大部分中藥材中的銅離子。
- 三、利用 EDTA(乙二胺四乙酸)螯合劑探討黃芩具有銅離子吸附的影響，發現螯合劑既不會影響大腸桿菌的生長，而且能促使細菌產生螢光，可以成功的解決中藥吸附重金屬的現象。
- 四、運用螢光顯微鏡觀察大腸桿菌在不同中藥以及銅離子的螢光表現，觀察結果發現中草藥的深色背景不會干擾觀察大腸桿菌的綠色螢光表現；而隨著銅離子濃度上升，單位大腸桿菌所發出的螢光有明顯上升的趨勢。
- 五、由結果發現大腸桿菌作為的生物檢測器可在台灣室溫及實驗室培養箱偵測銅離子且可於一般冰箱的冷藏庫保存。
- 六、未來希望能將所研發的大腸桿菌生物檢測器應用在測試實際的產品，並能測試更多種類の中草藥，期盼後續能整合產生中草藥的資料庫，好利於民眾測試多種中草藥。
- 七、未來希望可將不同的基因植體殖入大腸桿菌，以便能同時測試中草藥中其它多種的重金屬。

玖、參考文獻

- 徐雅慧, 陳儀驊, 羅吉方, & 林哲輝. (2007). 中藥材之重金屬檢驗. *藥物食品檢驗局調查研究年報*, 25 127-139.
- Brown, N. L., Stoyanov, J. V., Kidd, S. P., & Hobman, J. L. (2003). The MerR family of transcriptional regulators. *FEMS Microbiology Reviews*, 27, 145-163.
- Cao, Y., Skaug, M. A., Andersen, O., & Aaseth, J. (2015). Chelation therapy in intoxications with mercury, lead and copper. *J Trace Elem Med Biol*, 31, 188-192.
- Li, C., Lin, G., & Zuo, Z. (2011). Pharmacological effects and pharmacokinetics properties of *Radix Scutellaria* and its bioactive flavones. *Biopharm. Drug Dispos.* 32: 427-445.
- Chui, S. H., Wong, Y. H., Chio, H. I., Fong, M. Y., Chiu, Y. M., Szeto, Y. T., . . . Lam, C. W. K. (2013). Study of heavy metal poisoning in frequent users of Chinese medicines in Hong Kong and Macau. *Phytotherapy Research*, 27, 859-863.
- Ergil, K. V., Kramer, E. J., & Ng, A. T. (2002). Chinese herbal medicines. *Western Journal of Medicine*, 176, 275-279.
- Ernst, E., & Coon, J. T. (2001). Heavy metals in traditional Chinese medicines: A systematic review. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 70(6), 497-504.
- Grass, G., & Rensing, C. (2001). Genes involved in Copper homeostasis in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 183(6), 2145-2147.
- Harris, E. S. J., Cao, S., Littlefield, B. A., Craycroft, J. A., Scholten, R., Kaptchuk, T., . . . Eisenberg, D. M. (2011). Heavy metal and pesticide content in commonly prescribed individual raw Chinese herbal medicines. *Sci Total Environ.*, 409(20), 4297-4305.
- Hobman, J. L. (2007). MerR family transcription activators: similar designs, different specificities. *Molecular Microbiology*, 63(5), 1275-1278.
- Mira, L., Fernandez, M. T., Santos, M., Rocha, R., Florencio, M. H., Jennings, K. R. (2002). Interactions of flavonoids with iron and copper ions: a mechanism for their antioxidant activity. *Free Radic Res.* 36(11):1199-208
- Ouyang, P., Gottlieb, S. H., Culotta, V. L., & Navas-Acien, A. (2015). EDTA Chelation Therapy to Reduce Cardiovascular Events in Persons with Diabetes. *Curr Cardiol Rep*, 17(11), 96. doi: 10.1007/s11886-015-0656-y
- Peters, R. W. (1999). Chelant extraction of heavy metals from contaminated soils. *J Hazard Mater*, 66(1-2), 151-210.
- Rensing, C., & Grass, G. (2003). *Escherichia coli* mechanisms of copper homeostasis in a changing environment. *FEMS Microbiology Reviews*, 27, 197-213.
- Rosecrans, R., & Dohnal, J. C. (2009). The effect of complimentary and alternative medicine products on laboratory testing. *Semin Diagn Pathol*, 26(1), 38-48.
- Song Y, Ammami, M., Benamar, A., Mezazigh, S., & Wang, H. (2016). Effect of EDTA, EDDS, NTA and citric acid on electrokinetic remediation of As, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb and Zn contaminated dredged marine sediment. *Environ Sci Pollut Res Int*, 23(11), 10577-10586.

- Stoyanov, J. V., & Brown, N. L. (2003). The Escherichia coli Copper-responsive copA promoter is activated by gold *The Journal of Biological Chemistry*, 278(3), 1407-1410.
- World Health Organization. (2013). WHO Traditional Medicine Strategy 2014-2023. China: WHO.
- Yuan, X., Chapman, R. L., & Wu, Z. (2010). Analytical methods for heavy metals in herbal medicines. *Phytochemical Analysis*, 22, 189-198.

【評語】 200006

本作品運用基因合成大腸桿菌可偵測重金之特性，意圖設計成檢驗中藥草含過量重金屬的快篩工具，研究過程中意外發現某類中藥草有相對銅離子的特性，進而找出解決的方法，作者將設計概念製作成模型，期待能有具體的應用實例和檢測器之原型。