

中華大學生物資訊學系系統開發專題報告

尋找蒜頭之抗菌DNA片段

Search for antimicrobial DNA fragments in *Allium sativum*

專題組員:周世凱、葉展源、李子杰、黃癸倫

專題編號:PROJ102004-BIOINFO-102004

指導老師:張慧玫老師

1. 摘要

本專題是從蒜頭的genomic DNA (gDNA) 中尋找抗菌DNA片段，將[1]gDNA片段放入pET-23a表達載體中，強制轉錄並轉譯，利用[2]台盼藍細胞活性染劑篩選藍色的瀕死細菌。藍色的瀕死細菌代表嵌入之gDNA片段可抑菌或殺菌。本專題確實找到ASA1克隆功能測試上能抑菌或殺菌，經讀序並作NCBI序列分析序列比對後，發現其序列84%相似於一個[3]反轉錄跳躍子，可能藉由其蛋白酶、RNase與Integrase活性，不準確跳躍，干擾細菌基因而抑菌或殺菌。

2. 簡介

(一)物種介紹

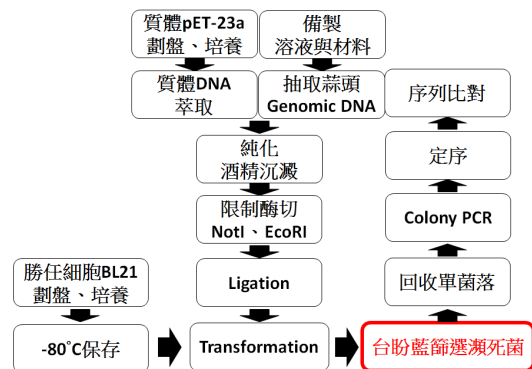
蒜，又稱大蒜(學名：*Allium sativum*)，為蔥科蔥屬，底下的鱗莖稱為蒜頭。蒜的品種很多，按蒜頭的外皮色澤可分為紫皮蒜與白皮蒜，而白皮蒜又分大瓣與小瓣兩種，而我們實驗研究的是白皮的大瓣蒜。

(二)研究動機與目標

因為現在的抗生素大部分是人工合成的，變化性遠遠追不上細菌突變的速度，且現今醫療抗生素的濫用，導致細菌產生抗藥性，使抗生素逐漸地失去原來的效力。或許可以利用gDNA片段抑制細菌特定基因，使其死亡或失去感染力，達到抑菌或殺菌的

作用，達到與抗生素相似的作用，且較不易有抗藥性的問題。本專題就是探討蒜頭是否具有抑菌或殺菌gDNA，進而提供轉錄型先導化合物(lead compound)於新藥研發，突破現在抗生素在醫療上的遇到的窘境。

3. 專題進行方式



圖一.專題流程圖

(一)備製溶液

1. 1M Tris-Cl(pH8.0) 100ml:秤12.11克 Tris加4.2ml HCl，加水至100ml

2. 0.5M EDTA (pH8.0)
(ethylenediaminetetraacetic acid, 乙二胺四乙酸):秤18.61克EDTA、2克 NaOH，加水至100ml

3. TE 緩衝液100ml:1ml 1M Tris (pH8.0) 加0.2ml 0.5M EDTA，加水至100ml 後滅菌。

4. 裂解法solutionI 200ml:秤0.744克 EDTA、0.605克Tris、1.8克 葡萄糖、10.21ml HCl調pH8.0，加水至200ml 後滅菌。

5. 裂解法 solution II 60ml: 秤0.48克 NaOH、0.6克 SDS(十二烷基硫酸鈉)，加水至60ml。
6. 裂解法 solution III 100ml: 秤17.66克 醋酸鉀、6.9ml 冰醋酸，加水至100ml。
7. 100mM CaCl₂ 500ml: 秤 7.35 克 CaCl₂(無水)，加水至500ml。
8. CaCl₂ 85mM (含甘油) 100ml: 15ml 99%甘油，加100mM CaCl₂至100ml。
9. Ampicillin(amp) 50mg/ml 50ml: 秤 2.5g Ampicillin，加水至50ml，用無菌針筒過濾器過濾至新瓶，分裝至1.5ml tube 冰-20°C保存。
10. 2.5%BPB 50ml: 秤1.25克溴酚藍 BPB(bromophenol blue)，加水至50ml，用無菌針筒過濾器過濾至新瓶。
11. 0.1M IPTG 20ml: 秤0.476克 IPTG (isopropylβ-D-1-thiogalactopyranoside，異丙基-β-D-硫代半乳糖苷)加水至20ml，再用無菌針筒過濾器小飛碟過濾。
12. 液態、固態LB培養基 500ml: 秤5克 tryptone、2.5克 yeast extract、5克 NaCl，加水至500ml(固態多加7.5克 agar，滅菌完待溫降至55°C，加500λ amp(50mg/ml)倒至培養皿)。
11. 細胞活性染劑台盼藍檢測盤 400ml: 固態LB滅菌完待降溫至55°C再加4ml 0.1M IPTG、400λ台盼藍(trypsin blue)、400λ BPB、400λ amp倒至培養皿待凝固(如圖二)。

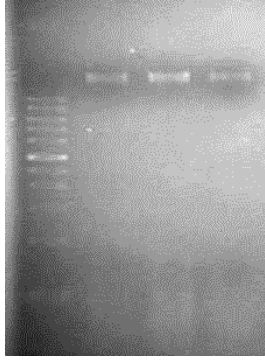


圖二. 製作細胞活性染劑台盼藍檢測盤

13. 5M 醋酸銨 50ml: 秤19.27克醋酸銨(ammonium acetate)，加水至50ml。
14. 萃取酵素
10mg/ml Lysozyme，2.5mg/ml RNase A，50%甘油 glycerol /50mM Tris(pH8.0)。

(二) 抽取蒜頭 genomic DNA

將一顆蒜頭剝皮切塊，立刻加入液態氮磨碎，取0.5克的蒜頭粉末放入1.5ml離心管，加入200λ的Solution I，搖晃均勻靜置室溫5分鐘，加入400λ的Solution II，搖晃均勻靜置室溫5分鐘，最後加入300λ的Solution III搖晃均勻後，用13000rpm離心5分鐘，取上清液至新的1.5ml離心管，加滿99%酒精至1.5ml刻度，上下混和後放置於-20°C沉澱1小時，取出後離心，回溶20λ保存於-20°C，並電泳測試品質與濃度(如圖三)。蒜頭gDNA加入500λ的TE 緩衝液以及1λ的RNase A，50°C水浴槽15分鐘後，立刻加入1λ的Proteinase K，50°C水浴槽15分鐘後，加入500λ(等體積)的苯酚氯仿(phenol/chloroform)搖勻後，12000rpm離心5分鐘，收上清液至新1.5ml離心管做純化(重複此動作，直至分層呈透明狀)，加50λ(1/10體積)的醋酸銨與1ml(兩倍體積)的99%酒精做酒精沉澱，保存於-20°C。



圖三.蒜頭gDNA跑膠圖

0.8%膠,1xTAE,100伏特,20分鐘電泳,第1道.1kb marker,第2~4道.蒜頭gDNA位置如預期高於10kb,亮度顯示約含8ng/λ。

(三)表達載體pET-23a劃盤、萃取

將接種環用酒精燈燒紅並完全冷卻後,利用接種環沾一點原先保存於-20°C的pET-23a保菌液,於LB/amp盤劃菌(如圖四)。37°C培養箱過夜活化後,挑單菌落放入2ml LB/amp培養液,37°C培養箱搖晃過夜達飽和,抽0.4ml的過夜培養液進入200ml LB/amp培養液,並置於37°C培養箱搖晃過夜。



圖四.表達載體pET-23a劃盤

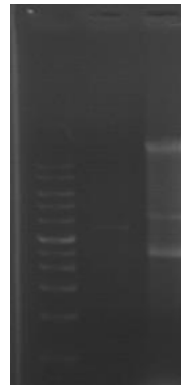
接種環接種pET-23a於LB/amp盤,產生許多單菌落。

將大量培養的200ml菌液倒50ml的離心管後,在4°C 7000rpm離心5分鐘,丟棄上清液,直到完成收集菌體。pET-23a菌體加入3.6ml的Solution I回溶,再加入7.2ml的Solution II搖勻,最後加入5.4ml的Solution III搖勻後,

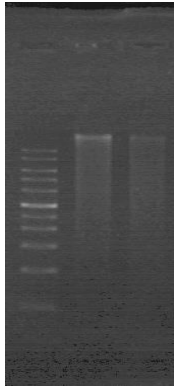
在4°C 7000rpm離心10分鐘,收上清液至新的50ml離心管。做酒精沉澱半小時,在4°C 7000rpm離心10分鐘,丟棄上清液、烘乾。加入500λ的TE緩衝液回溶並轉移至1.5ml離心管,做苯酚氯仿純化,做酒精沉澱1小時,加入100λ的TE緩衝液與50λ的萃取酵素反應,純化沉澱回溶後並保存於-20°C。

(四)限制酶切EcoRI、Hind III

將pET-23a取2λ,加入2λ的10X緩衝液與15λ的UVddH₂O最後加入1λ的EcoRI,最終總體積為20λ,進入37°C水浴槽2小時後,進行電泳跑膠(如圖五),確認EcoRI有完全切割後,在加入1λ的Hind III並放入37°C水浴槽2小時。蒜頭gDNA沉澱,加入10λ的10X緩衝液與89λ的UVddH₂O最後加入1λ的EcoRI,總體積為100λ,進行電泳跑膠(如圖六),確認EcoRI完全切割後,再加入1λ的Hind III並放入37°C水浴槽2小時。最後兩管皆以80°C水浴槽20分鐘去限制酶活性並保存於-20°C。



圖五.pET-23a表達載體DNA限制酶切0.8%膠,1xTAE,100伏特,20分鐘電泳,第1道.1kb marker,第2道pET-23a切EcoRI,第3道未切的pET-23a DNA為對照。第2道pET-23a(全長3,666kb)切EcoRI位置如預期在3~4kb之間,亮度略暗,由於是一條band帶,所以確認EcoRI已完全切割。



圖六.gDNA限制酶切

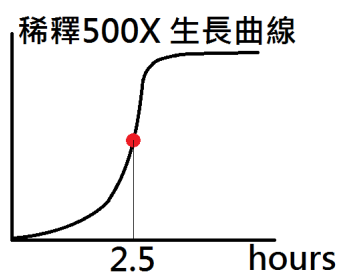
0.8%膠,1xTAE,100伏特,20分鐘電泳，第1道. 1kb marker，第2、3道.gDNA切EcoRI。第3道只剩一條彗星帶，確認為完全切割。

(五)Ligation 接合反應

取新的1.5ml離心管加入2λ的10X ligase 緩衝液與13λ的UVddH₂O以及1λ的ligase，最後加入剛限制酶切完的pET-23a載體DNA 4λ以及蒜頭DNA沉澱物，總體積20λ，進入16°C低溫水浴槽接合過夜。

(六)勝任細胞BL21劃盤、培養

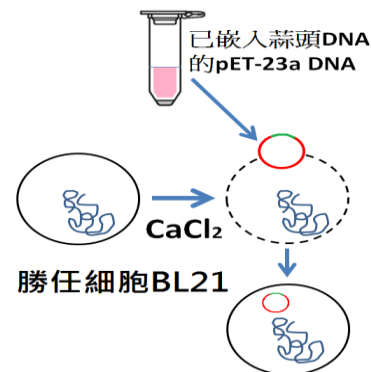
將接種環用酒精燈燒紅並完全冷卻後，接種保存於-20°C的BL21保菌液，於LB/無amp 盤上劃菌。37°C培養箱過夜，挑單菌落入2ml的LB/無amp 培養液，進入37°C培養箱搖晃過夜，將0.2ml的過夜培養液加入100ml的LB/無amp培養液中，進入37°C培養箱中搖晃2.5小時，使生長曲線到達指數成長的中點(A600=0.5)(如圖七)。



圖七.BL21稀釋500x生長曲線圖

取新的50ml離心管收集細菌完，

加入5ml預先冰存於4°C的100mM CaCl₂，快速搖晃使其完全回溶，在4°C 3000rpm離心5分鐘，丟棄上清液(可重複此動作兩次)，加入0.5ml預先冰存於4°C含15%甘油(抗凍劑)的85mM CaCl₂，快速搖晃使其回溶。在冰上，分裝50λ勝任細胞至預先冰於-20°C的1.5ml空離心管，以液態氮急速冷凍，-80°C冰存。



圖八.勝任細胞BL21的功用

(七)Transformation 轉殖作用

取5λ的Ligation產物，加入凍存的BL21混合均勻，置於冰上30分鐘後，放於37°C水浴槽熱休克30秒後，立刻放回冰上5分鐘，加入550λ的LB/無amp 培養液，進入37°C培養箱搖晃1小時。培養完後，取200λ的培養液至LB/amp 盤以L型劃菌棒塗盤，放入37°C培養箱過夜(如圖九)。



圖九.轉殖盤

(八)細胞活性染劑台盼藍盤測試

將轉殖的過夜LB/amp盤上的菌落貼上滅菌過的印菌紙，複印菌落，翻面轉

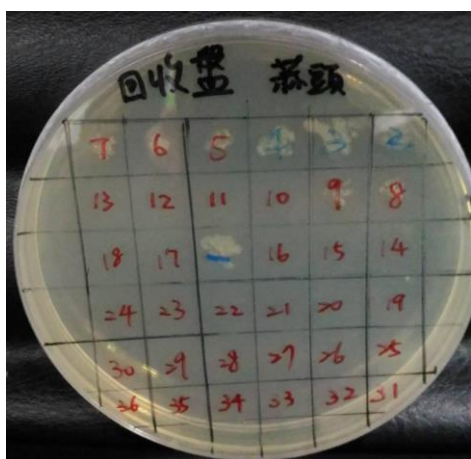
放於細胞活性染劑台盼藍盤(如圖十)，觀察是否變色以篩選瀕死菌落。



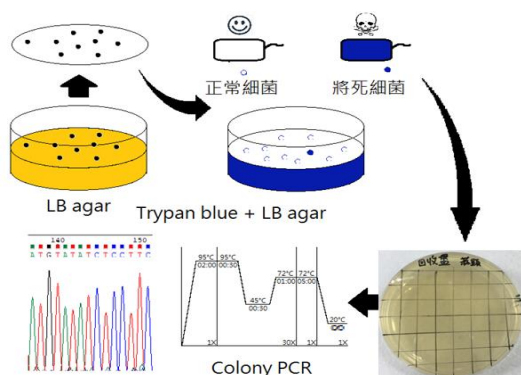
圖十.複印菌落放置藍盤上，紅色圈起為藍色瀕死菌

(九)回收瀕死的單菌落

將有變藍色的瀕死菌落挑起並放入事先畫好格子的一般LB/amp盤以停止死亡恢復生長並保存細菌於4°C作進一步的分析(如圖十一與圖十二)。



圖十一.劃格LB/amp盤



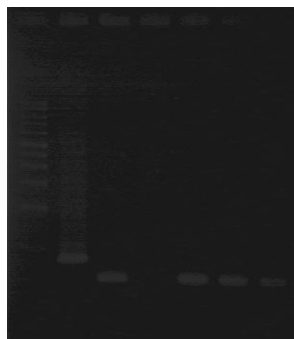
圖十二.細胞活性染劑台盼藍盤測試流程

(十)Colony PCR、設計Primer

Primer設計:

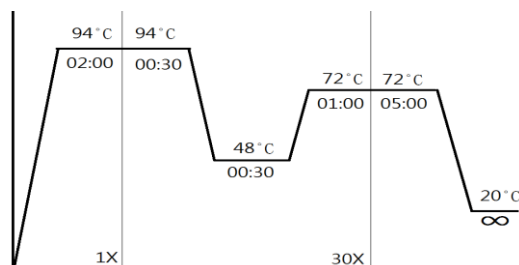
T7promoter : TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG
T7terminator: GCT AGT TAT TGC TCA GCG G

將台盼藍測試盤之候選菌，每菌落都做一次PCR反應，並加入20λ的5X Mix Buffer，在加入78λ的UVddH₂O，最後加入2λ的T7primer組，進入PCR儀器並跑膠(如圖十三)，觀察嵌入片段之長短。



圖十三.菌落PCR跑膠圖

0.8%膠,1xTAE,100伏特,20分鐘電泳，第1道.1kb marker，第2、4道.為瀕死菌所嵌入的gDNA片段。觀察片段之長度小於0.5kb。

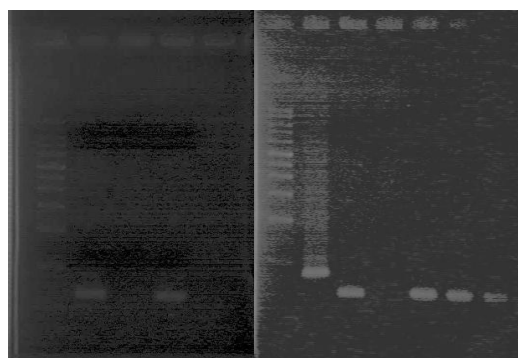


圖十四.PCR反應溫度梯

4. 主要成果

其中ASA1克隆定序後，到NCBI作BLAST序列比對，嵌入gDNA片段185鹼基，低相似度比對到265筆序列，皆為植物序列，許多序列皆為未定義序列，唯一一筆有基因命名的序列為相似度84%的鷹嘴豆Ty3-吉普賽型的反轉錄跳躍子(Ty3-gypsy like Retrotransposon)基因，經查閱[3]論文，得知其具有蛋白酶、RNase與Integrase之活性，此類跳躍子不管是跳入或跳出皆為不準確跳躍，所以會在基因上留下痕跡序列，因而破壞基因

功能，ASA1克隆可能具有蛋白酶、RNase與Integrase之活性，而破壞細菌基因功能才造成抑菌或殺菌的效果。



圖十五.菌落PCR跑膠圖

0.8%膠,1xTAE,100伏特,20分鐘電泳
嵌入之gDNA片段長度小於500bp

5. 評估與展望

本專題確實找到ASA1克隆功能測試上能抑菌或殺菌的蒜頭gDNA片段，而經序列比對後，發現其序列84%相似於一個反轉錄跳躍子，可能藉由其蛋白酶、RNase與Integrase活性，不準確跳躍，干擾細菌基因而抑菌或殺菌，有待將來驗證。另外未來也可針對ASA1合成許多小的序列片段，參照microRNA測試抑菌效果，如此即可以提供轉錄型先導化合物(lead compound)用以製新藥，這將對醫療上有貢獻。

6. 結語

這次實驗過程讓我們擁有更專業的技術(例如：溶液的泡製與濃度計算、釣魚法抽取gDNA、裂解法抽取DNA、製備載體pET-23a、製備勝任細胞BL21、計算勝任細胞轉殖效率以及塗盤比例、Ligation的比例、解析跑膠圖、製作細胞活性染劑台盼藍檢測盤、台盼藍篩選瀕死菌)與更良好的方法以及以前從未知道的知識，最重要的是提升了解決問題的能力以及思考

邏輯。

7. 銘謝

這次專題最需要感謝的當然是我們的專題指導教授:張慧玫教授，不分日夜的替我們想辦法解決我們所遇到的問題，以及我們出錯後的補救辦法，當然還要花大錢幫我們把所需的用具、藥品、設備給買回來，所以特別感謝老師耐心的教導。再來就是感謝同在實驗室做實驗的學長們，有他們的幫忙，我們的實驗進度才不會被其他因素所拖慢，他們也會給予我們很多小技巧以及經驗分享。最後也謝謝所有使用實驗室的同伴，共同愛護我們的設備、維持實驗室的清潔以及幫忙訂購用品與藥品。

8. 參考文獻

- [1] 黃昱詠 陳妍蓁 謝萬璋 張慧玫.2011.從斑馬魚與鯛魚分離抗菌胜肽 cathelicidin 相關之基因之片段。Journal of Information Technology and Applications,Vol. 5, No. 4, pp.176-179.
- [2] E. Loit, K. Wu, X. Cheng, M.T. Hincke, I. Altosaar. (2008) Functional whole-colony screening method to identify antimicrobial peptides. Journal of Microbiological Methods,Vol.75, No. 3,pp.75425-75431.
- [3] Manoj K. Rajput and Kailash C. Upadhyaya. (2009) CARE1, a TY3-gypsy like LTR-retrotransposon in the food legume chickpea (*Cicer arietinum* L.). Genetica,Vol. 136, No. 3,pp.429-437.