

教育部教學實踐研究計畫成果報告
Project Report for MOE Teaching Practice Research Program

計畫編號/Project Number：PAG1080015

學門專案分類/Division：生技農科

執行期間/Funding Period：108/08/01 ~ 109/07/31

(計畫名稱/Title of the Project)

基礎生物技術概論與生物復育

(配合課程名稱/Course Name)

分子生物應用與生物復育

計畫主持人(Principal Investigator)：陳師慶

共同主持人(Co-Principal Investigator)：

執行機構及系所(Institution/Department/Program)：國立中央大學生科系

成果報告公開日期：

立即公開 延後公開(統一於 2022 年 9 月 30 日公開)

繳交報告日期(Report Submission Date)：109/09/20

基礎生物技術概論與生物復育

一. 報告內文(Content)

1. 研究動機與目的(Research Motive and Purpose)

隨著工業發展，已造成許多土地重金屬汙染的問題，隨著環保意識的抬頭，大家才開始重視環境整治。但因為資金上有限，目前解決方案多為混土稀釋或酸淋洗法；然而前者僅稀釋濃度並無解決重金屬存在的問題，後者則須處理酸洗產生的廢液。於是生物復育法逐漸受到重視，包含植物復育法、微生物復育法等。然而植物復育法固然有其成效，但其生存力及繁衍複製速度不及細菌，因此應用微生物成為一項新的課題。縱使微生物學屬於大學科系的一門學科，然而實際上與新興生技產業的合作應用，卻沒有相關培訓課程介紹。因此藉由開設此課程，結合微生物技術與環境整治兩大學門，培育生命科學學生成為重點核心產業人才，創造多元應用的價值。

2. 文獻探討(Literature Review)

(1) 研究背景

近年，重金屬染事件頻傳，主因為台灣是個地狹人稠的海島，土地價值高，導致工廠紛紛坐落於農田之間以降低土地成本，如此地緣關係，導致一些非法業者經常性私倒廢液，透過分布廣大的灌溉渠道系統使得台灣土地受到各類重金屬的汙染，如銅最大宗占全台 90%，另外工廠用地之底泥亦有鎘汙染事件傳出(環保署, 2016)。

重金屬汙染之所以會成為目前主要的環境問題，因為金屬離子其不可降解之特性，永久存在於汙染地。重金屬在環境中的毒性和生物累積(Bioaccumulation)趨勢對活體的健康構成嚴重威脅，與有機汙染物不同，重金屬不能通過化學或生物過程分解，因此欲進行整治，只能依賴物理化學之方法進行分離濃縮處理，此包含物理分離、土壤淋洗法、酸洗法、熱脫附法及電動力法等，又或利用及植生復育法以及微生物處理，將重金屬轉化為毒性較小之型態(Ayangbenro, 2017)。

在生物整治方面，植生復育法用於重金屬土壤整治已被世人認同(USEPA, 2015)。相比傳統物理化學之方法，對於處理大面積汙染土地，植生復育技術成本更低且兼顧土壤品質之維持。但是受限於植物吸附重金屬濃度有極限且所需時間較長，所以更需要搭配微生物相互補足其不足之處(環保署, 2016)，因此如何使用微生物處理重金屬成了重要的課題。

(2) 微生物生物整治

微生物生物整治即為使用微生物作為介質進行吸收(absorption)、沉澱(precipitation)、氧化(oxidation)和還原土壤中之重金屬 (Su, 2013)。微生物具有驚人的代謝途徑，通過呼吸、發酵及共代將各種有毒化合物作為生長能量的來源。由於其特點針對特定污染物的降解酶，他們已經發展出不同的機制維持體內平衡和抵抗重金屬，以適應有毒重金屬生態系統(Brar, 2006; Wei, 2014)。

微生物在重金屬污染環境中能夠生存的策略包括生物累積(Bioaccumulation)、生物礦化(Biomineralization)、生物吸附(Biosorption)和生物轉化(Biotransformation)等機制。開發這些機制可以將微生物用於現地整治及異地整治，對污染場池進行補救。由於這些能力，它們已被有效地用作重金屬去除和回收的生物吸附劑，大多數重金屬破壞微生物細胞膜，但微生物有著優異的防禦機制，如生物膜、運輸蛋白等，幫助他們克服毒性效應。因此微生物對重金屬毒性的反應對於重建污染場地具有重要意義(Ayangbenro, 2017)。

(3) 生物吸收 (Biosorption)

吸附是離子和分子在另一分子表面上的物理粘附。如果發生吸附並導致界面處形成穩定的分子相，則可將其描述為表面複合物(surface complex)。大多數固體，包括微生物，在其表面具有-SH，-OH 和-COOH 等官能團，有助於金屬吸附(Gadd, 2008)。

微生物的細胞結構可以捕獲重金屬離子並隨後吸附到細胞壁的結合位點上(Malik, 2004)。這個過程被稱為生物吸附或被動吸收，並且獨立於代謝週期，吸附的金屬量取決於細胞表面金屬的動力學平衡和組成。該機制涉及幾個過程，包括靜電相互作用、離子交換、沉澱、氧化還原過程和表面螯合(Yang, 2015)這個過程很快，可以在幾分鐘內達到平衡。生物吸附可以通過細胞和組織碎片或通過死亡的生物質或活細胞作為被動吸收通過表面螯合到細胞壁和其他外層(Fomina, 2014)。

各種生物吸附金屬的機制取決於微生物的細胞表面，以及金屬離子的交換和與細胞表面的能力。這些已經被廣泛研究，涉及來自吸附實驗的各種生物吸附等溫線以及各種因素，如 pH、生物質預處理和生物體的生物量的影響。過量的金屬離子容易在細胞表面產生中和反應並且沉澱。由於陰離子結構的存在，所有微生物在其細胞表面都具有負電荷，這使得它們能夠與金屬陽離子結合。參與金屬吸附的負電荷基團是醇基、胺基、羧基、酯基、羰基、巰基、磷酸基、磺酸根、硫醚基和巰基(Gavrilescu, 2004)。

不同微生物之間細胞壁的組成有助於評估不同微生物對金屬的吸收。革蘭氏陽性

菌中的肽聚醣層含有丙氨酸、谷氨酸、內消旋二氨基庚二酸、甘油和磷壁酸的聚合物，革蘭氏陰性菌含有酶、糖蛋白、脂多醣、脂蛋白和磷脂是參與金屬結合過程的活性位點 (Gadd, 2008; Ramrakhiani, 2016; Gupta, 2015)。金屬和類金屬附著在細胞表面的這些配體上，從而使正常結合位點取代基本金屬。一旦金屬和非金屬結合後，微生物細胞可以將它們從一種氧化態轉化為另一種氧化態，進而降低它們的毒性 (Chaturvedi, 2015)。Gavrilescu (2004) 研究指出細菌的細胞壁是聚電解質，它與金屬離子相互作用，通過共價鍵、細胞外沉澱、氧化還原相互作用和凡德瓦爾力等機制維持電中性。

(4) 生物累積 (Bioaccumulation)

另一種方法是通過細胞代謝循環，重金屬離子穿過細胞膜進入細胞質。這被稱為生物累積或活性攝取。生物蓄積是依賴於各種物理，化學和生物機制的活細胞的過程。

這些因素包括細胞內和細胞外的過程，其中生物吸附發揮有限和不明確的作用 (Fomina, 2014)。能夠積累重金屬的生物體應該對高濃度的一種或多種金屬具有耐受性，並且必須表現出增強的轉化能力，將有毒化學物質變為無害形式，使生物體減少金屬的毒性作用 (Mosa, 2016)。

(5) 金屬硫蛋白之特性及功能

金屬硫蛋白 (Metallothionein) 是一種富含半胱氨酸 (Cysteine) 的小分子蛋白質，可以利用其硫基螯合親硫金屬離子使金屬離子轉化成無生物活性的形式，為一種低分子量金屬結合蛋白 (Hamer, 1986)。其為廣效性的抗氧化蛋白質，在人體內具有高效的保健效果及極高的醫療價值，其作用大致如下：(1) 保健食品：具有清除自由基的功效 (2) 重金屬解毒素：有毒重金屬一般指鉛、砷、汞等，一旦中毒是很難治癒的，金屬硫蛋白可與上述有毒金屬物緊密結合，使他們成為無法毒害生物的大分子，使用金屬硫蛋白製成的解毒劑主要用於重金屬中毒人員搶救 (3) 抗輻射劑：X 射線、紫外光等會導致人體大量自由基產生，使正常細胞無法發揮正常的生理功能，金屬硫蛋白可以抵抗輻射或紫外線引起的細胞組織損傷。在生物復育應用層面，金屬硫蛋白被證實可增加菌株對重金屬抗性，以及將重金屬累積在菌體內，它是清除重金屬的重要蛋白 (Ruiz, 2011)。

金屬硫蛋白解毒鎘的機制是通過特定結構域的方式發生的。這種解毒作用可能是由新合成的 apo-MT 結合 Cd^{2+} 或通過交換成 Zn 飽和的 MT 引起的 (Pinter, 2015)。

3. 研究問題 (Research Question)

(1) 基因工程細菌 (Genetic Engineering, GE) 與生物復育

土壤和水是地球上最重要的自然資源。然而，在過去的幾十年中，這些有污染毒化合物包括重金屬，已讓環境污染問題日益惡化，生物復育法已被認為可對於這些有毒廢物進行整治 (Singh et al., 2011)，然而這方法取決於微生物的性質。GE 細菌生物修復是一項新興技術，已收到許多的關注，並且是一種清理有毒金屬污染且具環保和高效率的方法 (Cases and de Lorenzo, 2005; Shukla et al., 2010)。分子生物學可協助改變細菌進行生物復育能力。GE 細菌可擁有較高的降解能力，並已被證明可成功地在限定條件下降解多種污染物 (Barac et al., 2004)。如何成功建立基因工程菌具有高效能生物復育能力和在環境中具有適應力，將是發展此技術思考重點。

(2) 建構金屬硫蛋白於細菌膜表面

在此研究中，我們構建帶有金屬硫蛋白(metallthionein)基因的細菌。金屬硫蛋白可以與許多重金屬結合，藉由增強細菌生物吸附的能力，而能用於整治重金屬污染場地。另外，我們將金屬硫蛋白表現於基因轉殖細菌的細胞表面，以避免細胞內的酵素切割。當基因轉殖細菌建構完成，綠色螢光蛋白 (GFP) 作為報導基因可以使細菌發出綠色螢光。

(3) 應用固定化技術解決回收問題

為了從受污染的場池再回收基因轉殖細菌，我們結合了碳水化合物結合模組 (Carbohydrate-binding module, CBM)。藉由其抓附在纖維上的特性，可透過這個技術，將重金屬沉降在纖維紙上來回收。

(4) 教學實踐研究應用

藉由申請「技術實作教學實踐研究專案計畫」，可透過講授與實作結合做中學的課程規劃，培養學生將所學知識轉化為實務技能之能力，提升學生實務應用的專業技能或就業準備度，以減少學用落差。並在大學階段，激發學生研究動機，實質參與「生物技術」開發產品。

4. 研究設計與方法(Research Methodology)

因應本計畫教學需求編制四大單元：(一)微生物基礎、(二)基因選殖技術、(三)分子生物實驗、(四)生物整治工法，每週課程皆包含前導理論及實作課程，課程綱要及實驗安排如下表 1。其中一週的課程，我們特別邀請業界講師分享生物復育的現況及全景，讓學生有機會接觸並了解業界運作。此課程需具有一定專業知識，因此主要授課對象為生命科學系學生，用以加強學生實驗操作及設計的能力。

表格 1 教學課程大綱

	前導理論課程	實作課程-分子生物應用與生物復育
微生物基礎	<ol style="list-style-type: none"> 1. 課程介紹 2. 微生物應用:好氧菌及厭氧菌培養 3. 生物整治復育前景 	<ul style="list-style-type: none"> • 無菌操作 • 洋菜膠配置 • 種菌及畫菌
基因選殖技術	<ol style="list-style-type: none"> 1. 基因轉殖技術原理 2. 生物資訊軟體建構載體 	<ul style="list-style-type: none"> • 上機操作生物資訊軟體 • 基因轉殖技術 Cloning 設計
分子生物實驗	<ol style="list-style-type: none"> 1. 質體萃取及原理 2. 酵素剪切及原理 3. DNA 膠體純化 4. 質體接合及細菌轉殖 5. 基因誘導及原理 	<ul style="list-style-type: none"> • 質體萃取 • 酵素剪切及 DNA 純化 • 質體接合及細菌轉殖操作 • 基因誘導表現目標蛋白質 • 螢光蛋白表現及螢光顯微鏡使用
生物整治工法	<ol style="list-style-type: none"> 1. 應用基因重組菌來移除環境污染物 2. 清理場址與策略 3. <u>演講課程：台灣生物整治工法</u> 	<ul style="list-style-type: none"> • 基因轉殖前後細菌對重金屬移除能力 • 嗜熱菌分解柴油之生物整治能力 • qPCR 檢驗地下水含氯有機物分解潛力 • 脫鹵球菌厭氧脫氯還原含氯有機物 • GC 檢測脫鹵球菌分解含氯有機物
成果報告	分組討論及結果檢討	<ul style="list-style-type: none"> • 海報製作

(1) 講授

目前生物技術所使用的方法舉凡單株抗體、基因轉殖、細胞培養及細菌發酵等都可採用為製備方法，本計畫講授課程包含如下：

- A. 微生物發酵(fermentation):所謂的細菌發酵，指的是利用發酵槽提供養分，讓微生物（如細菌、酵母菌等）來大量產生生技產品，例如：維生素、胰島素，甚至疫苗等。
- B. 動物細胞或組織培養：目前已經有更多新的技術需要藉細胞培養來完成，例如單株抗體等。

- C. 基因轉殖：簡單的說，就是將某基因送入生物體中，而且能繼續傳遞給後代。基因轉殖在多種生物中均已成功發展，而且有各自的轉殖技術，目前使用最多的還是顯微注射(microinjection)，其他如電穿孔(electroporation)或基因槍(gene gun)，甚至病毒感染等，也都是可以採用的技術。
- D. 植物組織培養：可讓植物組織在進行基因轉殖後，很容易用來繁殖出新的植株，無論是產生基因改良的作物或用以製造其他生技產品均可。
- E. 單株抗體：由於單株抗體的專一性高，可以針對特定分子或特定的目標反應，因此十分有利用價值，應用範圍廣泛，目前是極有潛力的醫療產品之一，
- F. 蛋白質工程(protein engineering)：將蛋白質改造，或是將兩種蛋白質組成一個蛋白質，甚或改變蛋白質與其他蛋白質相互作用的部分。例如增加酵素的活性，結合螢光蛋白質以標記螢光，賦與抗體外加功能如免疫毒素等。
- G. 生物晶片(biochip)：用以快速而大量的進行雜(hybridize)及分析比較不同來源的基因表現差異，例如某些與疾病相關的基因在正常人與病人之間的表現差異。
- H. 生物資訊(bioinformation)：這是隨生物技術進步而日益重要的一門新學科，前面所提到的基因資料庫即藉生物資訊學所提供的方法來加以利用，可以進行基因或蛋白質比對、相似度分析、基因圖譜的製作、蛋白質結構分析及基因的演化關係等。

(2) 實作

A. 基因工程細菌(GE) 與生物復育

土壤和水是地球上最重要的自然資源。然而，在過去的幾十年中，這些有污染毒化合物包括重金屬，已讓環境污染問題日益惡化，生物復育法已被認為可對於這些有毒廢物進行整治 (Singh et al., 2011)，然而這方法取決於微生物的性質。GE 細菌生物修復是一項新興技術，已收到許多的關注，並且是一種清理有毒金屬污染且具環保和高效率的方法 (Cases and de Lorenzo, 2005; Shukla et al., 2010)。分子生物學可協助改變細菌進行生物復育能力。GE 細菌可擁有較高的降解能力，並已被證明可成功地在限定條件下降解多種污染物 (Barac et al., 2004)。如何成功建立基因工程菌具有高效能生物復育能力和在環境中具有適應力，將是發展此技術思考重點。基因工程菌參與生物復育功能如下圖所示如可強化生物復育等。因此，本課程將以如何發展基因工程菌導入生物復育為題材，指導學生如何發掘問題，蒐集資料，技術方法學習，解決環境污染等問題。培養學生具有科學素養態度，融合生命科學系重要基礎科學如生物化學，微生物學和分子生物學等知識，配合業界經驗

(請業界人士演講)，發揮最大產學效益。

B. 重金屬與 Metallothionein 之研究：發展具有外來 metallothionein 基因表現之基因工程菌。

金屬硫蛋白 (metallothionein) 其功能是可增加菌株對重金屬抗性和將重金屬聚集在菌體內，因此，它是清除重金屬的重要蛋白 (Ruiz et al., 2011)。金屬硫蛋白大都是半胱氨酸組成，可以螯合金屬離子使金屬離子轉化成無生物活性的形式，為一種低分子量金屬結合蛋白 (Hamer, 1986)。然而，金屬硫蛋白在細菌中表達不穩定 (Berka et al., 1988)，因此必須與穀胱甘肽-S-轉移酶融合 (GST) 才能穩定其蛋白質 (Chen et al., 1997)。金屬硫蛋白在細菌中的不穩定性原因包括：轉錄和勝肽的快速降解，低蛋白表達，以及菌體內氧化還原途徑干擾 (Chen et al., 1998)。如何使此蛋白表現，能夠更加穩定，將在本計畫實作過程中，訓練學生如何將 GST 成功與 metallothionein 連接，增加其穩定性。

C. 基因選殖技術 (cloning)

為高等生物科技重要項目之一，它可協助發展基因工程應用可應用在不同科學領域中，如利用此技術可變生物細胞原先性狀如改變菌種 DNA 序列，產生基因工程菌，達成加強生物復育目的。

要完成 cloning 技術，須完成下列基本養成訓練，以重金屬為例：

1. 學會自菌種體內抽取 DNA 或 RNA。
2. 學會建立轉殖 特定基因(metallothionein; 已被證明可結合許多不同重金屬)之特定載體。
3. 學會建立將完成載體送入菌體內表現。
4. 學會西方墨點法驗證 metallothionein 確實有表現。
5. 測定汙染重金屬含量，證明基因工程菌確實有強化生物復育功能。

5. 教學暨研究成果(Teaching and Research Outcomes)

(1) 教學過程與成果

A. 產學結合：理論與實作結合，培養學生進入生物技術領域

本課程採用理論與實作教學兼併的上課模式，讓學生除了獲得理論知識，更能掌握實踐的能力。此外，本課程強調與業界的連結，因此本課程邀請業界講師說明生物復育於業界的現況，並且多方面讓學生接觸實驗室合作的計劃，增廣學生們的產業應用思維。



圖表 1 分子生物應用與生物復育課程剪影。(左上)理論課程奠定基礎；(右上)產業講師提供生物復育之業界資訊；(左下)助教帶領大家學習資訊蒐集整理；(右下)助教帶領小組操作實驗。

B. 翻轉教學：培養學生具備創造思維以及研究開發的能力

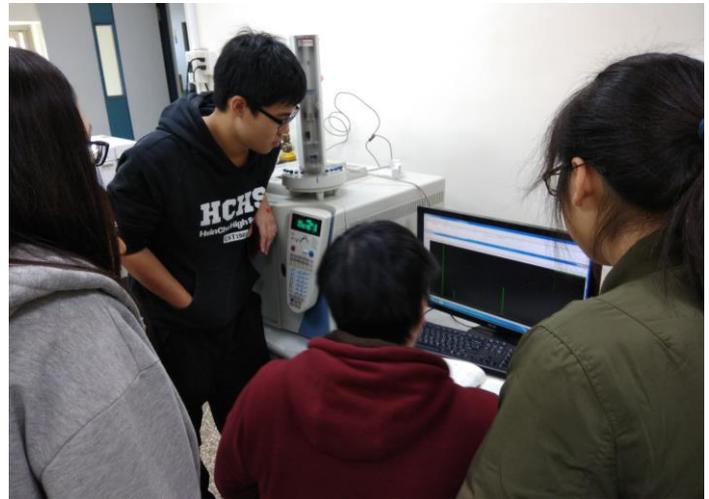
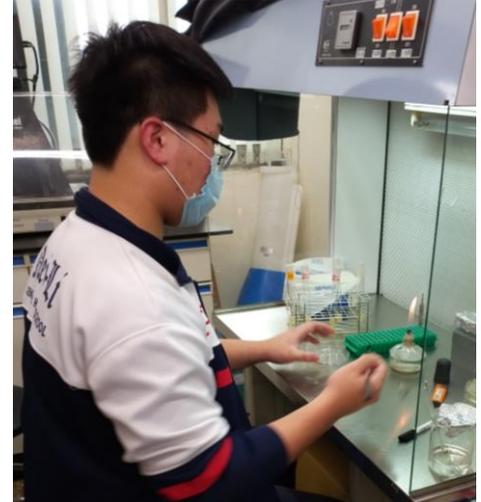
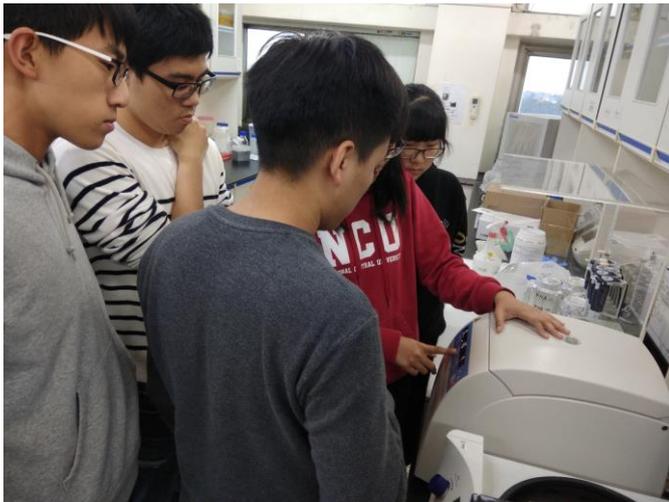
經由課堂教授學生實驗基本學識，配合即將操作之實驗安排課程，經由連結學識與操作，讓知識能被融會貫通。擁有基本學識素養後，開放足夠時間供學生討論。



圖表 2 討論實驗設計剪影。(左圖)小組間討論實驗設計安排；(右圖)討論應對實驗過程發生的問題。

C. 生物技術實作：分組操作實驗，培養學生具備實作及解決問題的能力

先由助教實際帶領實驗，教導學生正確的操作概念，並且了解實驗可能遇到的問題以及應該避免的危險。再透過實際編排實驗進度，設計自己組別的實驗，熟悉實驗時間安排及材料準備事項，培養每位學生獨立操作之能力。



圖表 3 分組進行實驗。(左上)離心以取得蛋白質；(右上)畫盤分離細菌株；(左下)西方墨點法取得轉漬之結果；(右下)分析氣相層析儀之數據。

D. 橫跨多領域應用：透過多元教學，擴展學生的學識見聞

本實驗室在生物復育方面與環保署及產業界皆有合作，兼具多元研究發展方向，包含：(1) 基因轉殖菌移除重金屬應用、(2) 應用嗜熱菌分解柴油、(3) 脫鹵球菌分解含氯有機物 等，讓學生能擴展並習得更全方位的能力。



圖表 4 多領域之應用。(左)基因轉殖菌移除重金屬之蛋白質表現實驗；(右上)脫鹵球菌分解含氯污染物之成效檢測；(右下)嗜熱菌分解柴油之生長趨勢檢測。

E. 研討會成果發表

經過一路上跌跌撞撞，學生逐漸掌握整個研究的邏輯及細節，最後透過團隊討論合作將成果展現出來。藉由研討會張貼成果，可以練習發表自己的研究主張，並且評審會給予研究上的意見，提醒實驗設計上可能沒注意的部分。在參與研討會的過程中，也能同時與其他領域者進行交流，擴展學生的認知與見解。

成果發表之海報如附件二，可以看出學生從理解到展現的學習成長過程，並從中得到一般課堂難以取得的研究潛實力。



圖表 5 研討會參與合影。

(2) 教師教學反思

由於此課程非常著重學生獨立思考的能力，需要具備足夠的知識背景。但學生的生物背景不見得足以獨立設計實驗，在實驗設計經常是沒有想法或是天馬行空。對於學生能試著提出的想法，不妨經由問答了解學生的實驗邏輯為何，再指正設計上的疏漏。另外，向學生分享研究相關的文獻，能夠補足此領域的背景知識，也讓他們試圖自行從別的團隊的資料中，找出自己的構想應如何設計，藉此培養學生自行解決問題的能力。

當然要在一個學期的課程中，從無到有創造一整個專題有其難度。然而由本實驗室既有之生物復育研究為基礎，讓具有概念的博班學生作為助教，引導學生去開發猜想，將完整的研究過程濃縮在一學期中讓學生去體驗。而最後以海報呈現出來的結果，不僅是學生的收穫，同時也是教學成果的反饋。

(3) 學生學習回饋

學期	課號	課名	課制	必/選修	修課人數	綜合評分	標準差
1082	LS5084*	分子生物應用 與生物復育	碩博同修	選修	9	4.67	0.47

6. 建議與省思(Recommendations and Reflections)

研究與教學並行，對於部分學生負擔可能較重，研究資料須緊湊在學期間吸收。原本教學設計讓助教引領同學參與討論，但針對較內向的學生，可能就會有學習困難的疑慮。開放式的教學方法亦有其較難掌握的地方，期望經由多開放此類課程，培養學生勇於發問挑戰的自信，更能擁有自己的想法，並經由培訓成為具備生物學識潛力的產業人才。

另外針對學習結果方面，採用於研討會張貼海報的方式作為成果，此方法沒辦法像考試一樣能以數值呈現，但學生的成長在此課程中是得以看見的。此外本課程無特別準備問卷，僅使用校內共通問卷系統(附件一)，較無法精準呈現學生對於此課程的回饋，下次可以改善這個部分。但根據評鑑結果綜合評分仍有 4.67 分，顯示學生對於課程之正面評價。

二. 參考文獻(References)

- T. Barac, S. Taghavi, B. Borremans, A. Provoost, L. Oeyen, J.V. Colpaert, J. Vangronsveld, and D. van der, Lelie, (2004). Engineered endophytic bacteria improve phyto-remediation of water-soluble, volatile, organic pollutants. *Nature Biotechnology* 22: 583–588.
- T. Berka, A. Shatzman, J. Zimmerman, J. Strickler and M. Rosenberg (1988) Efficient expression of the yeast metallothionein gene in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 170: 21–26.
- I. Cases, V. de Lorenzo (2005) Promoters in the environment: transcriptional regulation in its natural context. *Nature Reviews Microbiology* 3(2):105-118.
- S. Chen, D.B. Wilson (1997). Genetic engineering of bacteria and their potential for Hg²⁺ bioremediation. *Biodegradation* 8:97-103.
- S. Chen, E. Kim, M.L. Shuler, and D.B. Wilson, (1998). Hg²⁺ removal by genetically engineered *Escherichia coli* in a hollow fiber bioreactor. *Biotechnology Progress* 14:667-671.
- D. H. Hamer (1986) Metallothionein. *Annual Review of Biochemistry* 55:913-951
- O.N. Ruiz, D. Alvarez, C. Torres, L. Roman and H. Daniell (2011). Metallothionein expression in chloroplasts enhances mercury accumulation and phytoremediation capability. *Plant Biotechnology Journal* 9: 609-617.
- P. Singh, and S.S. Cameotra (2004). Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. *Trends in Biotechnology* 22: 142-146.
- 環境保護署土壤及地下水整治網. 土壤及地下水污染預防、調查與管理. 各年度年報 4 (2016).
- Ayangbenro, A. S. & Babalola, O. O. A New Strategy for Heavy Metal Polluted Environments: A Review of Microbial Biosorbents. *Int J Environ Res Public Health* 14 (2017).
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28106848>.
- USEPA. Mercury Retrieved. (2015). <http://www.epa.gov/mercury/index.html>.
- Su, C., Jiang, L. & Zhang, W. A review on heavy metal contamination in the soil worldwide: Situation, impact and remediation techniques. *Environ. Skept. Crit.* 3, 24-38 (2014).
- Brar, S. K. et al. Bioremediation of Hazardous Wastes—A Review. *Practice Periodical of Hazardous, Toxic, and Radioactive Waste Management* 10, 59-72 (2006).
- Wei, W. et al. Simple Whole-Cell Biodetection and Bioremediation of Heavy Metals Based on an Engineered Lead-Specific Operon. *Environmental Science & Technology* 48, 3363-3371 (2014).
- Gadd, G. M. Biosorption: critical review of scientific rationale, environmental importance and significance for pollution treatment. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 84, 13-

28 (2008).

Malik, A. Metal bioremediation through growing cells. *Environ Int* 30, 261-278 (2004).

Yang, T., Chen, M.-L. & Wang, J.-H. Genetic and chemical modification of cells for selective separation and analysis of heavy metals of biological or environmental significance. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 66, 90-102 (2015).

Fomina, M. & Gadd, G. M. Biosorption: current perspectives on concept, definition and application. *Bioresour Technol* 160, 3-14 (2014).

Gavrilescu, M. Removal of Heavy Metals from the Environment by Biosorption. *Engineering in Life Sciences* 4, 219-232 (2004).

Ramrakhiani, L., Ghosh, S. & Majumdar, S. Surface Modification of Naturally Available Biomass for Enhancement of Heavy Metal Removal Efficiency, Upscaling Prospects, and Management Aspects of Spent Biosorbents: A Review. *Appl Biochem Biotechnol* 180, 41-78 (2016).

Gupta, V. K., Nayak, A. & Agarwal, S. Bioadsorbents for remediation of heavy metals: Current status and their future prospects. *Environmental Engineering Research* 20, 1-18 (2015).

Chaturvedi, A. D., Pal, D., Penta, S. & Kumar, A. Ecotoxic heavy metals transformation by bacteria and fungi in aquatic ecosystem. *World J Microbiol Biotechnol* 31, 1595-1603 (2015).

Mosa, K. A., Saadoun, I., Kumar, K., Helmy, M. & Dhankher, O. P. Potential Biotechnological Strategies for the Cleanup of Heavy Metals and Metalloids. *Frontiers in Plant Science* 7 (2016).

Hamer, D. H. Metallothionein. *Annual Review of Biochemistry* 55, 913-951 (1986).

Ruiz, O. N., Alvarez, D., Gonzalez-Ruiz, G. & Torres, C. Characterization of mercury bioremediation by transgenic bacteria expressing metallothionein and polyphosphate kinase. *BMC biotechnology* 11, 82 (2011).

Pinter, T. B. J., Irvine, G. W. & Stillman, M. J. Domain Selection in Metallothionein 1A: Affinity-Controlled Mechanisms of Zinc Binding and Cadmium Exchange. *Biochemistry* 54, 5006-5016 (2015).

三. 附件(Appendix)

附件一 教學評量問卷

基本資料

1. 這門課我的缺席次數

從不缺課 缺課1-3週 缺課4-6週 缺課7-12週 缺課13週(含)以上

2. 我有修習本課程

非常同意 同意 普通 不同意 非常不同意

3. 除上課時間外，平均一星期修讀本課程付出的時間

10小時以上 6-9小時 3-5小時 1-3小時 1小時以下

4. 我對這門課的學習態度很認真

非常同意 同意 普通 不同意 非常不同意

對本科目之教學意見

5. 教師提供完整的課程大綱，且教學內容與課程大綱相符

非常同意 同意 普通 不同意 非常不同意 無法回答

6. 教師的課前準備充分，上課內容豐富充實

非常同意 同意 普通 不同意 非常不同意 無法回答

7. 我在課程中感受到教師的教學熱忱

非常同意 同意 普通 不同意 非常不同意 無法回答

8. 本課程授課內容組織完善，有助學習

非常同意 同意 普通 不同意 非常不同意 無法回答

9. 教材設計能顧及學生的學習狀況

非常同意 同意 普通 不同意 非常不同意 無法回答

10. 教師具備講授本課程之專業知識

非常同意 同意 普通 不同意 非常不同意 無法回答

11. 教師講解表達方式良好，使課程容易瞭解

非常同意 同意 普通 不同意 非常不同意 無法回答

12. 教師樂於協助學生解決有關本課程之疑問

非常同意 同意 普通 不同意 非常不同意 無法回答

13. 教師(或助教)對試卷、作業或報告的評分公平合理

非常同意 同意 普通 不同意 非常不同意 無法回答

14. 本科目教師之整體教學表現值得讚許

非常同意 同意 普通 不同意 非常不同意 無法回答

Surface Display *Tetrahymena thermophila* Metallothionein within *Escherichia coli* to Enhance Heavy Metal Bioremediation

Hsin-Cheng Ho, Che-Wei Lu, Lu-Yu Ding, Chih-Hao Lin, Zi-Wei Tsai, Yi-Zhen Chen, Ting-Hsuan Chen, *Ssu-Ching Chen
Department of Life Sciences, National Central University *corresponding author

Background

- Heavy metal has been the main contaminant of waste water after industrialization. Once uptaken by human, they will cause serious health problems.
- In previous study, protozoan *Tetrahymena* metallothionein (MTT5) has potential to bioremediate cadmium and lead.
- In our study, we performed Lpp-OmpA (fusion protein of lipoprotein and outer membrane protein A) to avoid the enzyme interference and cell toxicity.

Specific Aim

- To improve heavy metal bioremediation by surface-displayed MTT5.

Methods

- The MTT5 was synthesized by company MDBio, Inc according to the article published by Zhou Huanxin in 2018.
- Lpp* and *OmpA* were amplified from *Escherichia coli* chromosome and fused by overlapping PCR to form carrier protein Lpp-OmpA.
- Western blotting (His-tag antibody) was used to analyzed protein expression of LO-MTT5.
- ReadyPrep™ Protein Extraction Kit (Membrane II) was used in this study for isolating membrane proteins.
- Fluorescence microscopy was used in this study to detect the fluorescence of LO-sfGFP.
- ICP-AES was used to detect the heavy metal. The biomass was added into medium which contained cadmium, and the supernatant was assigned to the Environmental Technology Research Center.

Results

Construction of LO-MTT5

- The Carrier protein, which the C-terminal was fused with MTT5, contained Lpp(1-9aa) and OmpA(46-159aa). (Figure 1)
- The signal peptide of Lpp transferred fusion protein to periplasm, and OmpA formed transmembrane structure to stabilize the passenger at outer membrane.

Protein expression analysis

- The *E. coli* strain C43(DE3)pLysS was used to produce more products after induction. (Data not shown)
- The LO-MTT5 expressed higher quantity at the time point of 4 hours after IPTG induction. (Figure 2, A)
- Membrane extraction (lane 6) confirmed the presence of LO-MTT5 on the membrane. Inclusion body resulted in the smear in membrane extract. (Figure 2, B)

Fluorescent analysis for functional check

- The LO-sfGFP fluorescence signals were detected under the excitation channel of 460~490 nm. (Figure 3)

Heavy metal biosorption

- Our result showed the concentrations of Cadmium detected in medium after the treatment of the pET21b(+) or LO-MTT5. (Figure 4)
- The removal efficiency of LO-MTT5 was 60% higher than control. (Figure 4)

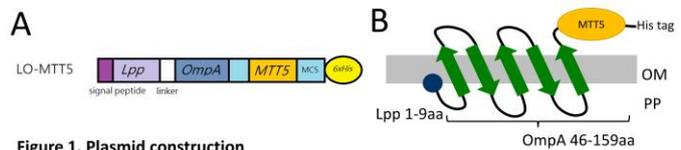


Figure 1. Plasmid construction
(A) Gene maps of pET21b(+) plasmids harboring Lpp-OmpA-MTT5 fusions. (B) cloning/ expression regions and MTT5 displayed on the outer membrane of *E. coli*.

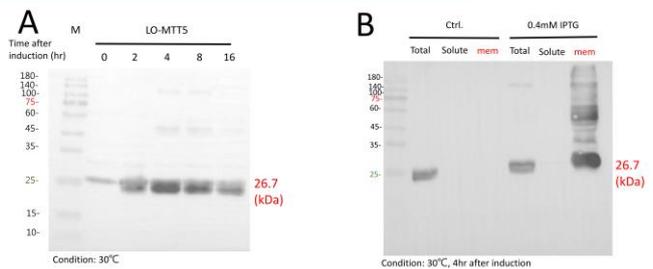


Figure 2. Protein expression of LO-MTT5
Western blot of recombinant proteins probed by anti-His antibody. (A) The expression of LO-MTT5 (26.7 kDa) after IPTG induction. Total cell proteins were separated by 12% SDS-PAGE. (B) Western blot analysis of different cellular fractions. Total: whole-cell lysates, Solute: soluble fraction, mem: outer-membrane fraction.

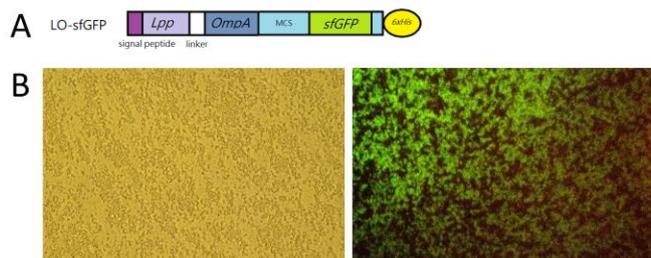


Figure 3. Fluorescence analysis of LO-sfGFP
(A) Gene maps of pET21b(+) plasmids harboring Lpp-OmpA-sfGFP fusions. (B) Phase contrast micrographs and fluorescence images of recombinant *E. coli* cells.

	No treatment	LO-MTT5
Cd (mg/L) in LB medium	112	67.0

Figure 4. Cadmium biosorption in LB medium

Conclusions

- In this study, we successfully optimized the expression process of membrane protein.
- The absorption efficiency of LO-MTT5 is significantly higher than control.
- In the future, we will focus on improving the method to capture the biosorbent and eliminate it in a more efficient way.

References

- Zhou, H., Xu, J., & Wang, W. (2018) Journal of cellular biochemistry, 119(4), 3257-3266.
- Dumon-Seignovert, L., Cariot, G., & Vuillard, L. (2004) Protein expression and purification, 37(1), 203-206.
- Mwandira, W., Nakashima, K., Togo, Y., Sato, T., & Kawasaki, S. (2020) Chemosphere, 246, 125733.