

國立台灣大學生物技術研究中心

生物技術方法

Methods in Biotechnology

Volume 1



卷一

生物技術核心實驗

Biotechnology
Core Techniques



2005

生物技術方法
Methods in Biotechnology
Volume 1



卷一

生物技術核心實驗
Biotechnology Core Techniques

國立台灣大學生物技術研究中心

生物技術方法

Methods in Biotechnology

Volume 1



卷一

生物技術核心實驗

Biotechnology
Core Techniques

總編輯

蔡嘉寅

卷一主編

莊榮輝

卷一作者

黃鵬林 王愛玉 劉瑞芬 莊榮輝

二〇〇五年

ISBN: 957-97286-8-2

生物技術方法
卷一
生物技術核心實驗

保留版權
請勿翻印
二〇〇五

國立台灣大學
生物技術研究中心
二〇〇五年五月

總編輯 蔡嘉寅
卷一主編 莊榮輝
卷一作者 黃鵬林
王愛玉
劉瑞芬
莊榮輝
助理編輯 吳建興
張慈映
黃澄如
徐國凱

印刷設計 高狄有限公司
(02) 2709-5039

連絡方式：(02) 2367-9248
網頁網址：<http://www.cbt.ntu.edu.tw/index.htm>

Methods in Biotechnology
Volume 1
Biotechnology Core Techniques

Copyright 2005
All Rights Reserved

National Taiwan University
Center for Biotechnology
May 2005

Editor in Chief: CY Tsai
Editor, Vol 1: RH Juang
Authors, Vol 1: PL Huang
AY Wang
RF Liou
RH Juang
Assistants: JS Wu
TY Chang
YJ Huang
KK Hsu

Design & Printing: Gaudi

Center for Biotechnology
National Taiwan University
1, Roosevelt Rd. Section 4
Taipei, Taiwan 106

目 錄	v
序 言	ix
誌 謝	xii
概 說	xiii

.....

本核心實驗的主角 - GUS 基因	1
-------------------	---

台灣大學園藝學系 黃鵬林

第一章 基本操作技術	3
------------	---

台灣大學生化科技學系 王愛玉

第二章 表現質體的建立	19
-------------	----

台灣大學生化科技學系 王愛玉

第三章 北方雜合分析	43
------------	----

台灣大學植物病理與微生物學系 劉瑞芬

第四章 表現蛋白質之純化與分析	67
-----------------	----

台灣大學生化科技學系 莊榮輝

.....

附 錄 預定課程表 實驗器材表 撰寫實驗報告	89
------------------------	----

索 引	93
-----	----

詳細目錄

本核心實驗的主角 - GUS 基因 1

第一章 基本操作技術 3

1.0 實驗室安全 3

1.1 微量吸管之使用 5

1.1.1 認識 Gilson Pipetman P 5

1.1.2 基本使用方法 5

1.1.3 使用注意事項 6

1.1.4 練習使用微量吸管 8

1.1.5 檢測微量吸管的準確度 8

1.2 分光光度計之使用 9

1.2.1 日立 U-1100 光度計使用法 9

1.2.1.1 吸光度測定方法 9

1.2.1.2 使用注意事項 9

1.2.2 測定溶液之吸光值 10

1.3 細菌培養方法 11

1.3.1 單一菌落之分離 11

1.3.2 過夜菌液之培養 12

1.3.3 *E. coli* JM109 之生長曲線 12

1.4 DNA 之限制酶分析 14

1.4.1 DNA 之限制酶切割 14

1.4.2 洋菜膠體電泳 16

第二章 表現質體的建立 19

2.1 質體 DNA 的小量分離法 21

2.2 質體 DNA 之限制酶分析 23

2.2.1 質體 DNA 之檢定 23

2.2.2 大量 DNA 之限制酶作用 24

2.3 DNA 片段的分離與純化 26

2.3.1 DEAE membrane 吸附法 26

2.3.2 Silica gel 吸附法 28

2.4 DNA 之定量 30

2.5 接合反應 31

2.6 質體之轉形 32

2.6.1 氯化鈣法 32

2.6.2 電穿孔法 34

2.7 重組質體的檢定 36

2.7.1 Colony hybridization 36

2.7.2 Histochemical detection 38

2.7.3 質體快速檢定法 39

2.7.4 重組質體之檢定 39

2.7.4.1 重組質體之限制酶分析 39

2.7.4.2 Southern 轉印分析 40

第三章 北方雜合分析 43

3.1 RNA 製備 43

3.1.1 自大腸桿菌抽取 RNA 45

3.1.2 胞外轉錄反應 47

3.1.2.1 質體 DNA 酵解反應與洋菜膠體電泳分析 47

3.1.2.2 以 phenol/chloroform 進行 DNA 萃取 49

3.1.2.3 胞外轉錄反應 50

3.2 以 DIG 標定核酸探針 53

3.2.1 Random priming 53

3.2.2 PCR 55

3.3 變性膠體電泳與北方雜合分析 57

3.3.1 變性膠體電泳 57

3.3.1.1 清理電泳槽 57

3.3.1.2 甲醛洋菜膠體電泳 58

3.3.1.3 以毛細管轉移方式進行北方轉印實驗 60

3.3.2 北方雜合反應 61

3.3.3 以酵素連結免疫反應與鹼性去磷酸酶呈色反應偵測雜合訊息 63

第四章 表現蛋白質之純化與檢定 67

4.1 蛋白質純化方法 67

4.1.1 蛋白質抽取 67

4.1.2 膠體過濾法 71

4.1.3 離子交換法 74

4.1.4 親和層析法 75

4.2 蛋白質檢定方法 76

4.2.1 蛋白質定量分析 76

4.2.2 酵素活性分析法 78

4.2.3 膠體電泳法 79

4.2.4 蛋白質轉印法 84

4.2.5 免疫染色法 86

生物技術核心實驗

Biotechnology Core Techniques





校 長 序

進入二十一世紀後，世人面對的將是一個屬於資訊與生物科學的高科技世代。

台灣在資訊科技方面已經有相當好的成績與貢獻，在全球資訊產業的生產比重上，具有舉足輕重的地位。在生物科技方面，雖經過了五十年的基因熱潮，然而真正在醫藥、民生以及環境上的應用，則才漸漸進入佳境，蓄勢待發。台灣在最近的十年間，受到這股風潮的影響，也深深感受到生物科技的壓力。

因應這樣的浪潮，台灣大學在生物科技的發展與推動上，自有其不可豁免的責任與義務；而最基本且最重要的任務，就是生物科技的教學與研究。本校各相關院系在生物科技方面的研究，一向就有良好的基礎與成果，這是發展生物科技的一大資產；而五十年來所培養出來的學生，分布在國內外產官學各界，形成一股隱形力量，成為台灣生物科技發展的重要推動力量。

為了集中力量發展生物科技的教學與研究，本校自一九九五年起就開始推動生物技術教學研究的整合，並且設立生物技術學程，配合教育部『生物科技教育改進計畫』，目前已逐漸成形。生物科技是實驗科學，動手操作是極為重要的訓練，因此『生物技術核心實驗 *BCT*』課程的設立，得以讓學生親身體驗生物學的中心教條，見證五十年來生物科學發展的精髓；本手冊就是此一課程的全部操作記錄，早在兩年前就已發行試用版，然而再經十四梯次的教學琢磨，才正式出版。

我們期望本書對台灣基礎生物科技人才的訓練，能夠有所貢獻；而這些基礎人才，或繼續深造貢獻於生技研發，或深入生技產業服務社會，或結合電腦科技創造新的科研領域，都能帶動台灣的科技實力，使台灣成為全球的科技版圖上一顆閃亮的明星。

國立台灣大學 校長 陳維昭

中華民國九十年元月

宋 序

生物技術科技教育改進計畫之目標，在於藉通識教育與生物技術相關課程之整體規劃，以及學生實驗的環境及內容的改善，達到普及生物技術教育與培育生物技術專業人才之目的。有鑑於此，教育部希望以此計畫達到各校整合校內所有與生物技術有關的系所，提出生物技術科技教育改進計畫方案，重新安排課程，秉持彈性修課的原則，讓學生針對個人興趣及研究的需要，選讀相關課程，並配合各校既有之基礎，朝生命科學、醫藥學、農業化學及生物技術科技等方向發展。

為達到上述計畫的目標，除了持續推動並督促各校執行本計畫案之外，編撰相關之通識課程與應用課程，及相關實習課程的教材益顯重要。教育部委託國立臺灣大學籌劃出版生物技術實驗參考教材。『生物技術實驗』計有五本，由校總區相關系所教授及各方專家共同撰稿。第一本為國立台灣大學生物技術研究中心於暑期開設『生物技術核心實驗』課程的實驗操作手冊，其餘四本分別為：分子生物學技術、細胞培養與轉殖、生物資訊學以及生化工程學；內容涵蓋各種生物技術實驗操作的基本技術、動植物細胞的培養、分子生物學實驗的操作方法，以及利用電子資料庫分析和擷取世界各地生物資訊，都有詳細的說明；應可滿足目前國內生物技術教學相關科目所需。本教材深入淺出，對於改善大學部高年級及研究生的生物技術教學與實習之內容，應可達水到渠成之功效。

教育為百年之大計，是無形的，卻可深遠影響國家，若無紮實之基礎教育，則僅是停留在模仿階段之發展，不易達到創新的領域。教材本土化即是回應國內教育界長久以來的呼籲，藉以編撰適合國人的基礎生命科學的教材。本人代表教育部，樂觀『生物技術實驗』如期付梓，以嚮各位讀者。同時感謝國立台灣大學生物技術研究中心主任蔡嘉寅教授、教學組組長莊榮輝教授及其他相關系所的教授傾力協助，及教育部顧問室之指導，特以為序。

教育部生物技術科技教育改進計畫 農業組主持人 宋賢一

中華民國八十八年元月

蔡 序

從反轉錄酵素及限制性內切酵素被發現之後，生物科技的發展可說是日新月異，特別是最近十年來有了突破性的發展。目前全世界生物技術的主要研發目標，在醫藥及動物方面包含基因治療 (gene therapy, 含運送方法)、疫苗 (vaccines)、合成藥劑 (synthetic drugs)、DNA藥劑 (synthetic DNAs)、治療性的ribozymes (therapeutic ribozymes)、抗體工程 (antibody engineering) 及組織工程 (tissue engineering) 等。在農作物方面則著重於抗蟲、抗病毒、抗菌、控制雜草、營養食品 (nutritious foods)，花色與後熟問題，以及如何以植物做為『工廠』生產各種特用化學品及天然資源等問題。由於這些前景及其影響，在各類科技之中，此一新興性生物技術被認為將繼電腦資訊之後，成為廿一世紀最具發展潛力的科技，其應用範圍相當廣泛，包括了醫藥、食品、農業、林業、畜產、漁業、環保及特用化學品等，關係人類福祉極為巨大，先進國家無不競相投入巨額人力、財力，進行教育與研究發展工作。因此生物技術亦成為目前政府極欲推動的重點科技之一，主要目的在於提升國家競爭力，使產業得以升級，讓台灣成為科技國。

教育部為了落實生物科技人才培育之推動，乃於民國八十六年七月提出『生物技術科技教育改進計畫』，並委託台大於八十七年編輯『生物技術實驗教材』供國內教學之用。感謝學者專家們熱誠的參與，終得於如期完成工作目標。本教材共分五卷：第一卷為『生物技術核心實驗』(Biotechnology Core Techniques)，第二卷為『分子生物學技術』(Techniques for Molecular Biology)，第三卷為『細胞組織培養與轉殖』(In Vitro Cultures and Transformation)，第四卷為『生物資訊』(Bioinformatics)，第五卷為『生化工程』(Biochemical Engineering)，希望這些教材能有助於生物技術之教學。

由於時間匆促，編輯上仍未達預期的目標(譬如索引仍有待完成)，因此請各位先進及讀者們，能對此試用版本多提供寶貴意見，以便在短時間內加以修正出版。

台灣大學生物技術研究中心籌備處 主任 蔡嘉寅

中華民國八十八年元月

誌 謝

要感謝一路走來的所有教師、助教與助手，沒有他們就不會有 BCT

年度及教師	專任講師	助教及助手	學員
1995 BCC			
William Miller, David Presutti		林忠亮 顏維宏 陳翰民 吳建興 杜宜殷	40
1996 BCC			
王愛玉 徐源泰 劉瑞芬 莊榮輝		李昱穎 葉文珊 林暉喬 張世宗 林士民	40
1998S1 (改用 <i>gus</i> 為目標基因，由黃鵬林教授建構成功，同時 BCC 改為 BCT)			
王愛玉 劉瑞芬 莊榮輝	黃一修	陳懋彥 吳弘達 劉育志 陳淑芬 吳建興 曾靖芬 許芸萍 李昱穎 廖憶純	42
1998S2			
王愛玉 劉瑞芬 莊榮輝	黃一修	張慈映 官振群 林子傑 陳玉琪 邱志勇 吳建興 李岳倫 黃澄如 楊凱明	40
87A (BCT 實驗室由農化系遷至生命科學館，班別編號由西元改為學年度)			
黃鵬林 劉瑞芬 張震東 莊榮輝		張慈映 陳玉琪 李岳倫 蔡佳蓉 吳建興	16
87B			
黃鵬林 劉瑞芬 張震東		張慈映 陳玉琪 李岳倫	8
88S1			
杜宜殷 劉瑞芬 周綠蘋	張慈映	王淑珍 李岳倫 顏豪志 陳懋彥 熊健美	41
88S2			
陳昭瑩 張雅君 周綠蘋	張慈映	陳翰民 路幼妍 方素嫻 孟穎潔 陳宛吟	38
88A			
何國傑 劉瑞芬 張震東	張慈映	路幼妍 楊光華 吳君泰 陳宛吟 陳詠哲	39
88M (醫師班)			
黃鵬林 劉瑞芬 周綠蘋	張慈映	吳建興 劉育志 吳弘達 李岳倫 游佳融	40
88B			
黃鵬林 劉瑞芬 張震東	張慈映	鄭瑋宜 黃健瑞 陳 琦 高顯璋	30
89S1			
陳昭瑩 劉瑞芬 楊健志	張慈映	林冠華 邱俊豪 鄭啟承 黃健瑞 吳秉叡	41
89S2			
杜宜殷 張雅君 楊健志	張慈映	陳霏芝 陳俊瑋 楊舒婷 李啟豪 姚蕙芳	40
89A			
王愛玉 沈偉強 張震東	張慈映	劉力閣 謝孟勳 林建良 陳怡安 何子潔	39
89MR (醫師班 進修班)			
黃鵬林 劉瑞芬 莊榮輝	張慈映	吳建興 黃健瑞 陶光恆 李啟豪 黃澄如	29
89F (青輔會培訓班)			
張慈映	張慈映	吳建興 黃澄如 吳雨書 陳怡安	30
			名

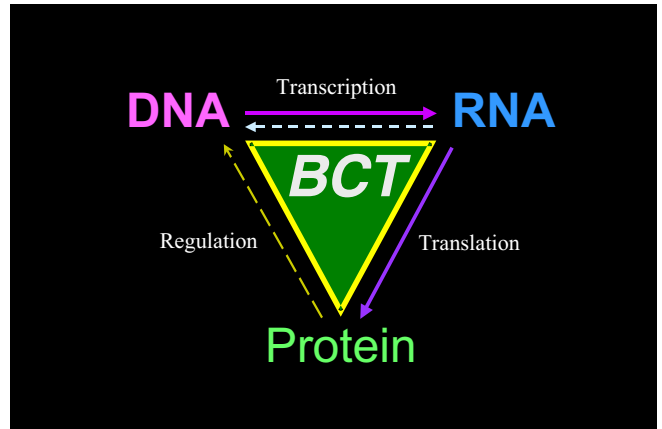
生物技術核心實驗教學小組

概 說

本實驗課程內容的快速導覽

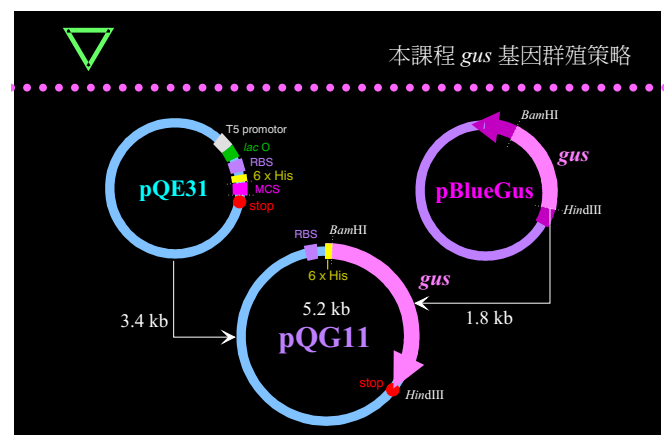
BCT 課程以 Central Dogma 為主軸，從 DNA 經 RNA 到蛋白質的一連串基因表現過程，以一已知基因 *gus* 為對象，將其殖入表現載體 pQE31，觀察其 DNA 以及 mRNA 表現，並檢定其表現蛋白質之構造與活性。

Central Dogma 的 DNA, RNA 與蛋白質，三者是相互關連、相互影響的，尤其蛋白質更密切影響著核酸的調節與表現；我們把這種關係以倒立三角形來表示，這個三角形也成為本課程的標誌。



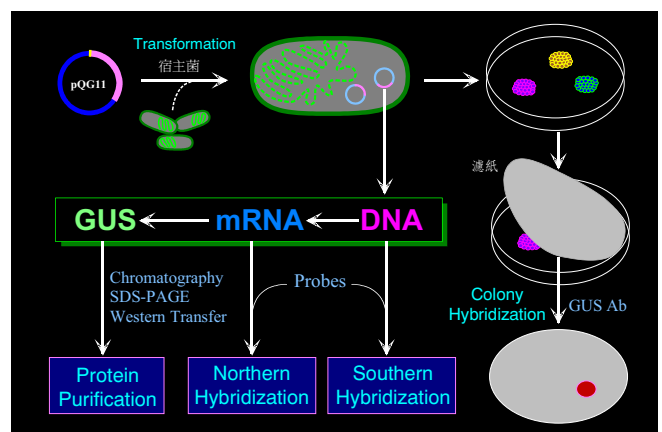
Slide 1

由 pBlueGUS 中切出 1.8 kb *gus* 片段，同時把 3.4 kb 的載體 pQE31 切開，其上已有 cloning sites，前方並接有一段將來可表現出六個 His 的片段。分別純化後進行 ligation，可得到 5.2 kb 的 pQG11。



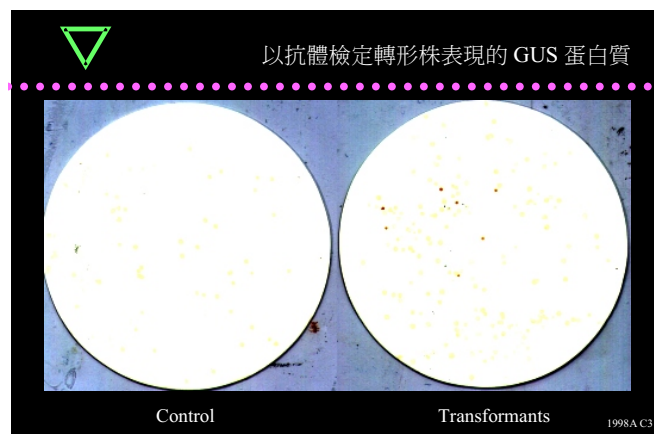
Slide 2

以此 pQG11 對宿主菌進行轉形，以 colony hybridization 挑出轉型株，並以 Southern hybridization 檢定所含 DNA 是否有 *gus* 片段；再以探針檢定其中的 mRNA。最後所表現出來的 GUS 蛋白質，以各種色析法純化，分析其中的酵素活性，並以抗體對 Western transfer blot 進行專一性染色以顯出 GUS 酵素。



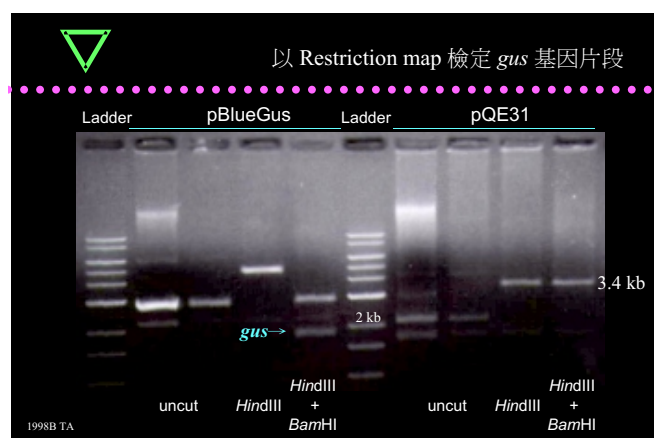
Slide 3

概 說



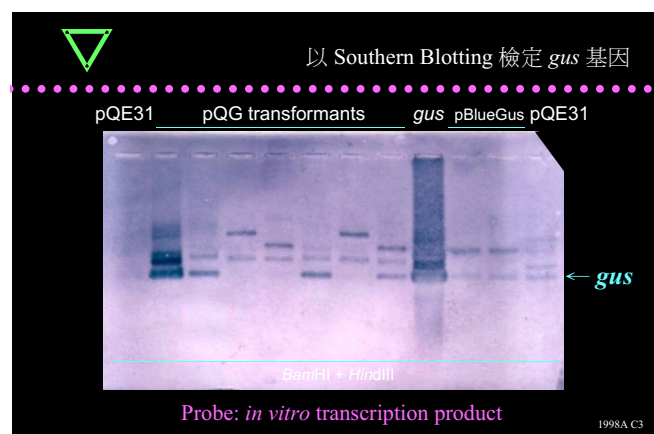
經由 colony hybridization 可用專一性抗體挑出含有正在表現 *gus* 基因的轉形株 (右側濾紙)，不含重組質體的對照組則無 (左側)。

Slide 4



抽取轉形株的質體並以限制酶酶解，以檢定所含 *gus* 的 DNA 片段，可初步檢定重組與轉形是否成功。

Slide 5

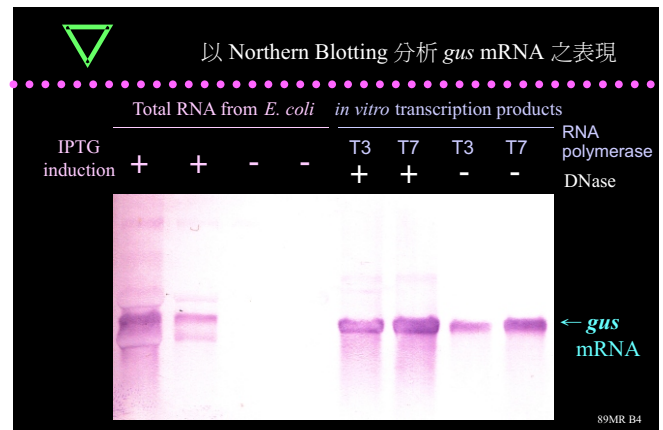


由 Southern blotting 確可在轉形株 DNA 中偵測得正確長度的 *gus* DNA 片段，圖中的正負控制組，均得到預期的結果。

Slide 6

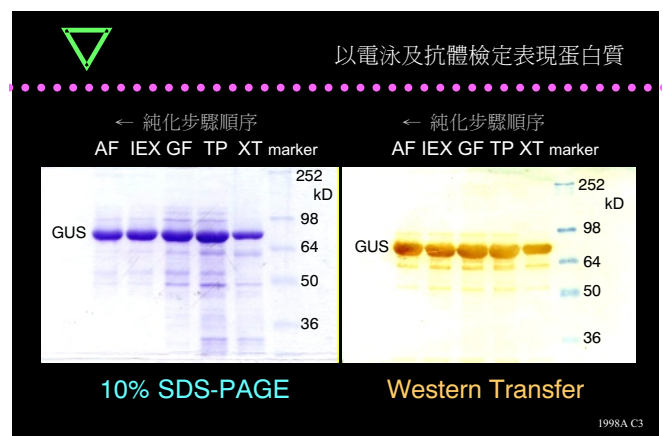
這些轉形株的 *gus* 基因，若以 IPTG 誘導，則可由 Northern blotting 看到其 mRNA 產物；所用的探針，則是自行由 PCR 所合成得到；由 *in vitro* transcription 所得到的 RNA 中，也有可被探針偵測到的色帶。

Slide 7



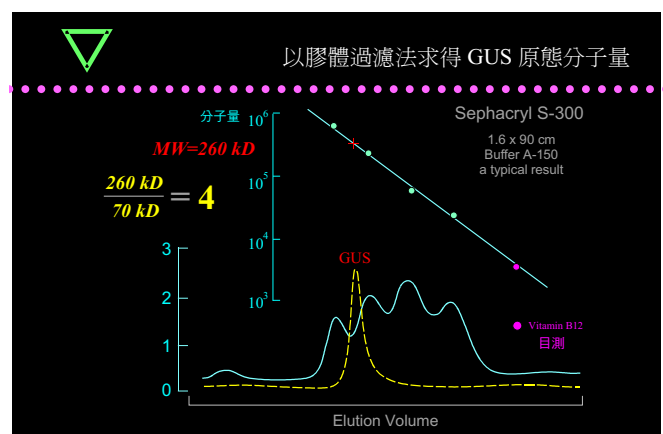
將轉形株大量培養並且破菌收集其蛋白質，經過膠體過濾法、離子交換法、親和層析法等，逐步把酵素純化，每一步驟除了追蹤 GUS 酵素活性之外，並以抗體檢定 (右圖 Western blot)。結果顯示各階段的純化效果相當良好，並顯出抗體與 GUS 間的高度專一性。

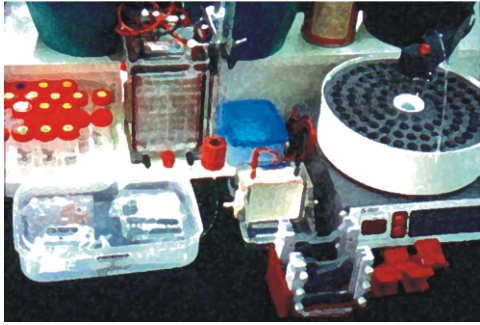
Slide 8



純化的 GUS 酵素進入膠體過濾管柱，與標準分子量的蛋白質比較，結果測得其原態分子量 260 kD，與 SDS 電泳所得單元體的分子量 70 kD 比較，得知 GUS 可能是同質四元體構造。

Slide 9





開始動手做實驗吧 :-)

本核心實驗的主角 - GUS 基因

台灣大學園藝學系 黃鵬林

本實驗課程的目標，係提供初學者基礎的生物技術觀念，並使初學者熟悉生物技術的基本操作。本課程於是設計一系列連貫性的實驗，並依操作技術的不同歸類在三個獨立的領域：其一為DNA，其二為RNA，其三為蛋白質。課程的架構，係使用同一個基因，先進行重組DNA的操作(第二章)，構築一個表現質體，再利用此表現質體表達出RNA，來進行北方雜合分析(第三章)，最後利用該表現質體來表現大量的蛋白質，於是可以進行蛋白質的純化與檢定(第四章)。為了讓初學者容易得到實驗結果，以建立初學者的信心與興趣，於是選擇大腸桿菌 (*Escherichia coli*) 之 β -glucuronidase (GUS) 基因 (*uidA* 或稱 *gusA*) 作為本實驗課程的主角。該基因產物為GUS蛋白質，相當穩定而不易降解，並為一水解酵素，有簡易的測定方法；且可使用市售的基質 (substrate) 在原位 (*in situ*) 顯現出酵素的活性，以肉眼即可檢測其產物，非常便利。基因選定之後，我們於是構築了兩種質體(如表 0.1 所示)，包括 pBlueGus及其表現載體pQG11 (其構築流程顯示於圖 0.1)。簡而言之，首先利用聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction) 合成GUS基因，此基因長度為 1,807 bp，並於 5' 及 3' 端點分別接上 *Bam*HI及 *Hind*III限制酶的切割序列，然後分別使用pBluescript SK(-) 及pQE31 為載體及表現載體，經 *Bam*HI及 *Hind*III酶切之後，將GUS基因與pBluescript連接，或連接至pQE31 核糖體結合序列 (ribosome binding sequence) 以及連續六個組胺酸 (histidine) 解碼序列 (6xHis) 之下游。為了確保GUS基因的忠實度 (fidelity)，防止聚合酶連鎖反應合成基因片段出現失誤的可能性，於是在表現載體pQG11 構築完成之後，利用所表現的蛋白質來測定酵素活性，所使用的檢測法是使用 *p*-nitrophenyl β -D-glucuronide為基質，經反應後於分光光度計測量 415 nm之吸光。如此，為了本課程所設計之實驗材料就準備就緒了。

參考文獻：

- Jefferson RA, Burgess SM, Hirsh D (1986) β -Glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 8447-8451
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987) GUS fusion: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* **6**: 3901-3907

表 0.1 本課程所用之 GUS 基因構築一覽表

Name	Vector	Insert	Host	Selective antibiotics
pBlueGus	pBluescript SK (-) (2.97Kb)	GUS gene (1.8 Kb) <i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III	JM109	Amp
pQG11	pQE31 (3.46 Kb)	GUS gene (1.8 Kb) <i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III	JM109	Amp
pQG11	pQE31 (3.46 Kb)	GUS gene (1.8 Kb) <i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III	M15 [pREP4]	Amp/Kan

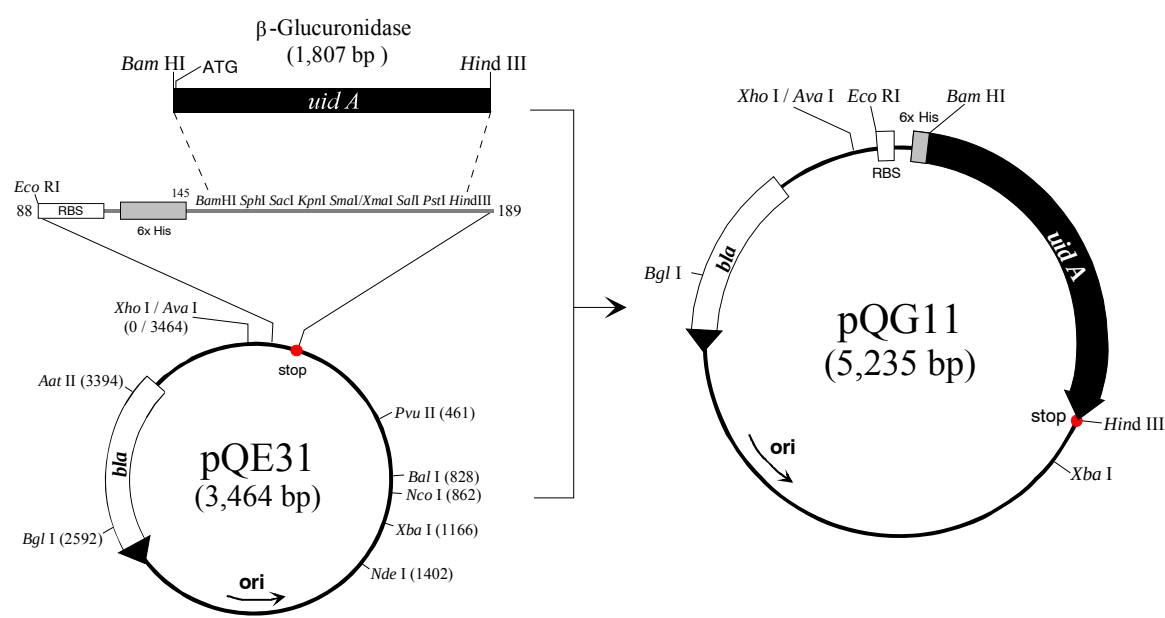


圖 0.1 pQG11 表現載體之構築

第一章 基本操作技術

台灣大學生化科技學系 王愛玉

本章著重於進行本課程或一般相關實驗時，所必需具備的基本知識及基本技術的學習；各實驗項目間彼此具有相關性，但其內容各自獨立，包括微量吸管使用、溶液的配製、分光光度計的使用、基本的微生物操作方法，以及基本的 DNA 分析方法等。

1.0 實驗室安全

『安全』是進行任何實驗最重要的考量，若不注意，經常會造成永久的遺憾，因此，請遵守以下各項規定：

1. 請事先勘查緊急沖洗站、洗眼台及滅火器的位置。
2. 請避免穿著涼鞋或拖鞋 (腳趾不要裸露)，並請穿著實驗衣。留長髮者，在實驗進行前最好將頭髮束好。
3. 在實驗室請勿吸菸、化粧、嚼口香糖、吃東西、喝飲料。食物不可存放於實驗室的冰箱中。
4. 實驗前後請將工作區域清理擦拭乾淨，實驗中打翻任何藥品試劑時，要隨時清理；離開實驗室前請記得洗手。
5. 使用刻度吸管時，切勿用嘴吸取，請用安全吸球或吸管唧筒。
6. 不論近視與否，最好能自備一副安全眼鏡，配製酸鹼溶液、有毒的溶液或進行危險實驗時，請戴上眼鏡。實驗室裡有公用的安全眼鏡及防護面罩，請先熟悉放置的位置。近視的同學，請避免戴隱形眼鏡操作實驗。
7. 使用任何藥品，請先看清標示或翻閱 Merck index，查明是否會對人體造成傷害。
 - a. 揮發性的溶劑：務必在通風櫥中量取、配製。
 - b. 有毒、致癌藥劑：例如acrylamide (神經毒)，ethidium bromide (突變劑) 請戴手套取用，並請勿到處污染。
 - c. 藥品廢液切不可往水槽隨意傾倒，需依指定集中處理。
8. 使用儀器或器具：
 - a. 離心機：相對位置的離心管務必平衡。
 - b. 供電器：會產生極高的電壓，開啟電源時請勿觸摸電極。
 - c. 微波爐：加熱時必須把瓶蓋或管蓋鬆開，以免發生爆炸。
 - d. UV 燈之使用：使用 UV transilluminator 觀察膠片時，務必使用 UV 光不能穿透之防護板或眼鏡。
 - e. 酒精燈之使用：請小心講義、紙張、衣袖以及有機溶劑等易燃物。

9. 菌液的處理：

本實驗使用之細菌雖然不是病原菌，但在某些情況下，任何細菌皆可能造成感染。此外，實驗中部份菌種帶有來自質體的抗藥性，隨意丟棄容易造成環境中抗藥性細菌的繁衍，故請注意：

- a. 與細菌接觸過的任何容器或培養基，使用後必須經過滅菌才可丟棄。
- b. 實驗若不小心被菌液濺到，請用大量清水沖洗，並以 70%酒精消毒。
- c. 桌面或地面有菌液翻覆時，請以 10%漂白水擦拭清理。

10. 不論男同學或女同學，皆不可單獨留在實驗室中。睡眠不足、精神不好時，請立即停止實驗。

1.1 微量吸管之使用

微量吸管 (micropipet) 是進行生化實驗或分子生物學實驗的必備工具，然而使用方法的正確與否，以及微量吸管的準確性，都直接影響了實驗結果的正確性，故請對你持有之微量吸管作深入的認識。本實驗室所使用的微量吸管為Gilson Pipetman P系列，包括P1000, P200, P20 等。以下使用方法及注意事項，部份取材自原廠所附說明書，請詳讀之後才進行實驗。

1.1.1 認識 Gilson Pipetman P - 微量吸管之拆解與組裝

方法步驟：

- 1) 請參照圖 1.1，認識微量吸管每一部份組件之位置及名稱。
 - 2) 將 D (ejector) 取下，C (connecting nut) 旋開；旋開時要特別小心，因 E (piston assembly) 中的彈簧很容易彈出。
 - 3) 依序將 C、H (tip holder) 及 E 部份取下。
 - 4) 檢查 tip holder 內是否有殘留鹽類或試劑。若有任何污垢，則以水清洗乾淨後，擦乾、晾乾。
 - 5) 檢查 E (piston assembly) 上的黑色 O-ring (F) 及白色的鐵氟龍墊圈 (G, piston seal) 是否還在？若有鹽類或試劑殘留，則以水清洗乾淨後，以酒精擦拭，擦乾。
- ◆ 注意 piston assembly 不可以凡士林或真空油膏塗佈。
- 6) 依序將各部份組件組合回復原狀。

1.1.2 基本使用方法

- 1) 選擇適當的 Pipetman：不同型號的微量吸管，各有其吸取體積範圍，請依取用溶液體積取用適當的微量吸管。

型 號	體積範圍 (μL)
P10	0.5 ~ 10
P20	2 ~ 20
P100	20 ~ 100
P200	50 ~ 200
P1000	200 ~ 1,000
P5000	1,000 ~ 5,000

- 2) 設定體積：設定體積時，由低旋轉至高值，須先超越所欲設定值至少三分之一轉後，再反轉至設定值；由高旋轉至低值，則直接轉至設定值即可。請勿將體積調整圈轉到超過最低或最高的使用範圍。
- 3) 套上微量吸管頭，吸取溶液：吸取溶液時，尖端請先套上微量吸管頭 (tip)，P1000 使用藍色微量吸管頭，P200 及 P20 使用黃色微量吸管頭。將按鈕壓至第一段，儘可能保持微量吸管垂直，將微量吸管頭尖端浸入溶液，再緩慢釋放

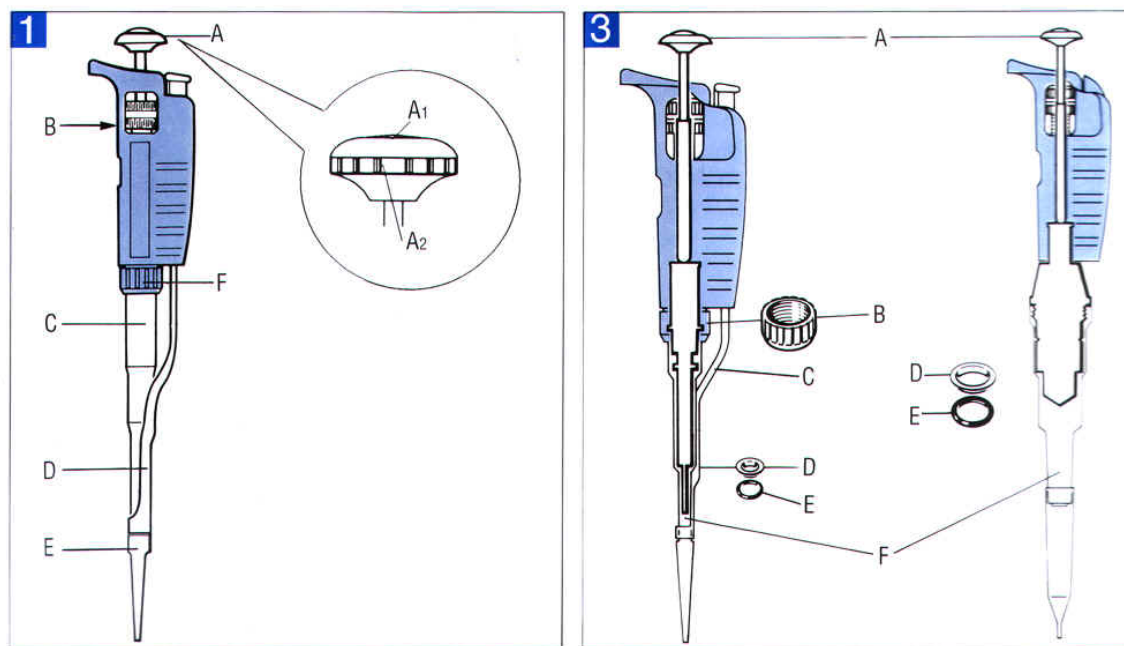
按鈕 (圖 1.2)。釋放按鈕不可太快，以免溶液衝入吸管柱內而腐蝕活塞。微量吸管頭尖端浸入溶液的程度隨吸取的體積及使用型號而定：

P10	< 1 mm
P20, P100	2 ~ 3 mm
P200, P1000	2 ~ 4 mm
P5000	3 ~ 6 mm

- 4) 釋放溶液：將微量吸管頭 **與容器壁接觸**，慢慢壓下按鈕至第一段，停一兩秒再壓至第二段，把溶液完全壓出。

1.1.3 使用注意事項

- 1) 勿將微量吸管本體浸入溶液中。
- 2) 吸取黏度高之試液，請先將微量吸管頭尖端以刀片或剪刀將出口切大，並先行預潤後再吸取。
- 3) 吸取酸液或具腐蝕性溶液後，請將微量吸管拆解開，各部位零件以蒸餾水沖洗乾淨，擦乾後再正確組合回復原狀。
- 4) 微量吸管的任何部份切勿用火燒烤，亦不可吸取溫度高於 70°C 的溶液，避免蒸氣侵入腐蝕活塞。
- 5) 套有微量吸管頭的微量吸管，無論微量吸管頭中是否有溶液，均不可平放，需直立架好。
- 6) P5000 必須使用過濾頭，過濾頭潮溼即需更換。
- 7) 若不小心使溶液進入吸管柱內時，應予以拆解，將活塞組件、吸管柱、O-ring、鐵氟龍墊等各部位以清水沖洗乾淨後，再以酒精擦拭，擦乾後再正確組合回復原狀。
- 8) 定期自行以天平檢查準確度，若有任何問題請送廠維修。



A: Push-button B: Operating rod C: Connecting nut D: Ejector
E: Piston assembly F: O-ring G: Piston seal H: Tip-holder

圖 1.1 微量吸管 Pipetman P 之組件

(節錄自 Gilson Pipetman 使用手冊)

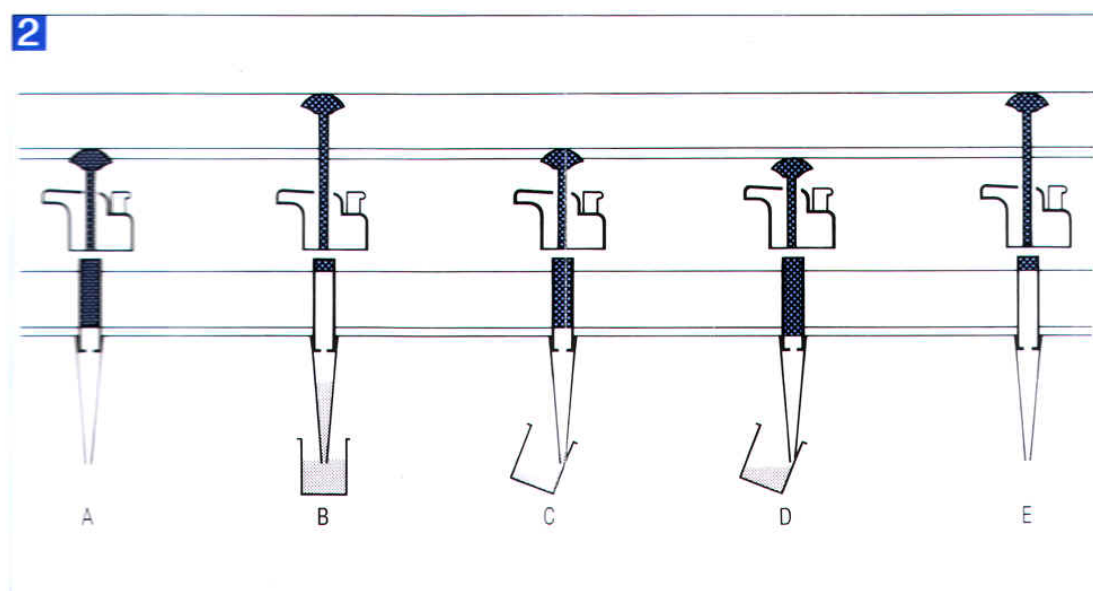


圖 1.2 微量吸管 Pipetman P 的使用

A, 保持微量吸管垂直，將按鈕壓至第一段；B, 微量吸管頭尖端浸入溶液，緩慢釋放按鈕；C, 保持微量吸管垂直，將微量吸管頭與容器壁接觸，慢慢壓下按鈕至第一段；D, 壓至第二段把溶液完全釋放出；E, 釋放按鈕回原狀。(節錄自 Gilson Pipetman 使用手冊)

1.1.4 練習使用微量吸管 Pipetman P

儀器用具：

Pipetman P1000, P200, P20

微量離心機

藥品試劑：

Solution 1

Solution 2

方法步驟：

- 1) 請取六支微量離心管，分別標上 A~F。
- 2) 以正確使用方法，依下表所列體積吸取不同溶液至各管中。

單位 μL	A	B	C	D	E	F
Solution 1	300	820	50	180	18	8
Solution 2	700	180	150	20	2	12
總體積	1000	1000	200	200	20	20

- 3) 將管蓋蓋好，置入微量離心機，離心數秒使溶液混合並集中於管底。

◆ 離心管 請注意要先平衡好！

- 4) 將適當微量吸管之體積調整圈調至總體積處，以乾淨的微量吸管頭吸取管中的溶液，並檢查：

(i) 微量吸管頭尖端是否剛好充滿溶液或留有一些空間？

(ii) 離心管中是否有溶液殘留？

◆ 若微量吸管功能正常並且操作正確，離心管中應無液體殘留，且微量吸管頭尖端剛好充滿溶液。

1.1.5 檢測微量吸管的準確度

儀器用具：

Pipetman P1000, P200, P20

天平

小燒杯及蒸餾水

方法步驟：

- 1) 將 P1000, P200, P20 之體積調整圈旋轉至最高值 (即 1000, 200, 20)。
- 2) 天平上預先放置秤藥紙或秤藥盤並歸零。以微量吸管吸取蒸餾水，加在秤藥紙或秤藥盤上秤其重量。每支微量吸管重複五次，並記錄每一次得到的結果。
- 3) 由結果判斷你的微量吸管是否該校正維修了？

1.2 分光光度計之使用

1.2.1 Hitachi U-1100 Spectrophotometer 使用方法

Hitachi U-1100 Spectrophotometer 屬於簡單型的機型，具備 D2 及 WI 兩種燈泡，可測定的波長範圍為 200~1100 nm，其結構、原理及用途請詳讀原廠之 Instruction Manual。以下所列則為本實驗測定溶液吸光度的基本操作方法，以及使用注意事項。

1.2.1.1 吸光度測定方法

- 1) 打開右前方之電源開關。
- 2) 打開左後側之 UV Lamp 或 VIS Lamp 開關。
- 3) 輸入波長：
按「WAVE-LENGTH」鍵
按數值鍵，例如：「2」「8」「0」
按「ENTER」鍵
- 4) 選擇 MODE:
按「MODE」鍵
按「ABS」鍵
- 5) 放入 Blank，按「100% T 0 ABS」鍵，歸零。
- 6) 放入樣品，讀取吸光值。

1.2.1.2 使用注意事項

- 1) 測定 UV 範圍請用石英測光管。
- 2) 測定之吸光值若超過 2，請將溶液稀釋後再測。
- 3) 光度計上請勿放置任何物品，尤其是溶液。亦請勿在光度計上操作實驗。
- 4) 放入測光管前，請將測光管外壁擦拭乾淨，不可有任何液體殘留。
- 5) 使用後測光管必須立即以蒸餾水沖洗乾淨，拭乾後置回原位。
- 6) 使用後請將光度計內部、表面及周圍清理乾淨。
- 7) 兩次使用間隔時間若不超過 1 h，則請維持開機狀態，不必關掉燈泡及電源。
- 8) 使用完畢務必關掉燈泡及電源開關。

1.2.2 測定溶液之吸光值

在第四章的蛋白質純化實驗中，將會測定 β -glucuronidase (GUS) 的活性，是利用 *p*-nitrophenyl β -D-glucuronide 為基質，加入酵素反應後所釋出之 *p*-nitrophenol 在鹼性下呈現黃色 (圖 1.3)，可測定 415 nm 之吸光度，利用 Beer's Law 即可計算求得反應物之生成量。本實驗將利用已知濃度之 *p*-nitrophenol，測定其 A_{415} ，以求取 *p*-nitrophenol 在 GUS 活性測定條件下之消光係數 (extinction coefficient)。

藥品試劑：

p-Nitrophenol

10×GUS assay buffer (0.5 M Na phosphate, pH 7.0; 1% Triton X-100; 0.1 M

β -mercaptoethanol)

GUS 終止液 (2.5 M 2-amino 2-methyl propanediol, 溶於水中, pH 11)

方法步驟：

- 1) 配製 5 mM *p*-nitrophenol stock solution：秤取 _____ mg *p*-nitrophenol，置於 400 mL 燒杯中，加入 25 mL 10×GUS assay buffer，加水至約 200 mL，攪拌溶解後，加水至 250 mL 並混合均勻。請配製三份。
- 2) 配製 50 μ M *p*-nitrophenol 溶液：分別由三份 stock solution 取適量以 1×GUS assay buffer 稀釋之。
- 3) 取 1 mL 50 μ M *p*-nitrophenol 溶液於試管中，加入 0.4 mL 2.5 M 2-amino 2-methyl propanediol 溶液，混合均勻後測定 A_{415} 。另取 1 mL 1×GUS assay buffer，加入 0.4 mL 2.5 M 2-amino 2-methyl propanediol 溶液，混合均勻，亦測定 A_{415} ，以作為 blank。
- 4) 由 Beer's Law 求出 *p*-nitrophenol 在此測定條件下之消光係數。

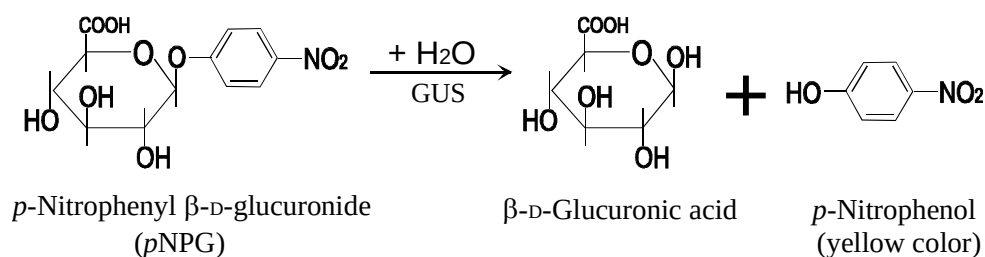


圖 1.3 β -Glucuronidase (GUS) 催化之反應

1.3 細菌培養方法

1.3.1 單一菌落 (single colony) 之分離

儀器用具：

酒精燈

接種環

藥品試劑：

E. coli K-12 菌株 (JM109)

LB agar plates：

1% (w/v) Bacto tryptone, 0.5% Bacto yeast extract, 1% NaCl，以 5 N NaOH 調至 pH 7.0 後，加入 1.5% (w/v) Bacto agar，以溼熱法滅菌。

方法步驟：

- 1) 每組取一個 LB plate，在培養皿底部標明組別及日期，並寫上 JM109。
- 2) 將接種環在酒精燈火燄上燒紅，接種環上方部份亦得以火燄燒過。另一手將生長有 JM109 之培養皿蓋子拿起數吋，將接種環在培養基空白處輕戳數次以使冷卻。
 - ◆ 注意！ 蓋子請勿全開或置於實驗桌上！
 - ◆ 接種環請勿放置在桌上或接觸到其它東西！
- 3) 以接種環輕輕刮下菌落，並將培養皿蓋子置回。
- 4) 打開空白的 LB plate，將沾有菌落的接種環於其上輕輕連畫數條橫線（如圖 1.4 之 Streak 1）後，將培養皿蓋子置回。
- 5) 再次將接種環在酒精燈火燄上燒紅 **並使冷卻**。將培養皿旋轉約 60 度，畫第二次線（如圖 1.4 Streak 2）。
- 6) 重複上一步驟之操作，畫第三次線（如圖 1.4 Streak 3）。
- 7) 將接種環在火燄上燒紅滅菌後方可置回實驗桌上。
- 8) 將培養皿倒置，於 37°C 培養箱中培養過夜。

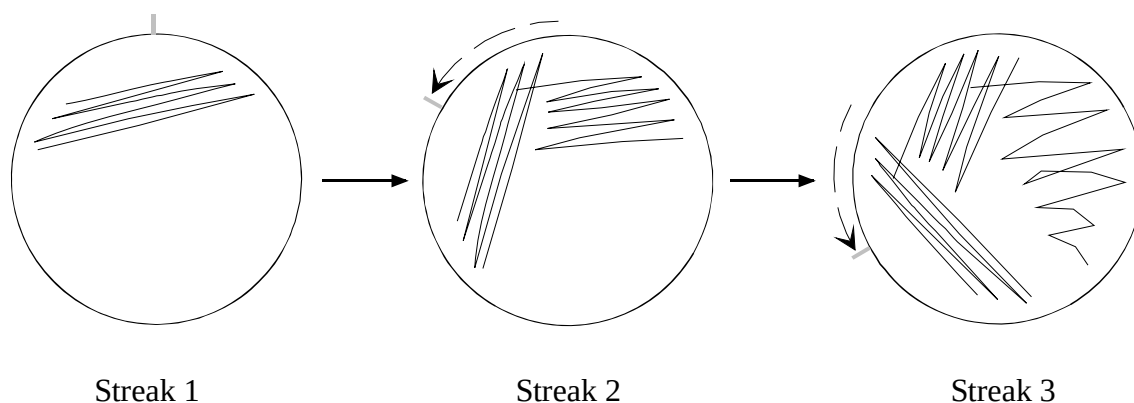


圖 1.4 分離培養單一菌落的方法

1.3.2 過夜菌液 (overnight suspension culture) 之培養

儀器用具：

酒精燈

接種環

藥品試劑：

E. coli 菌株 (JM109)

LB 培養液：

1% (w/v) Bacto tryptone, 0.5% Bacto yeast extract, 1% NaCl，以 5 N NaOH 調至 pH 7.0 後，以溼熱法滅菌。

LB agar plates：LB 培養液中添加 1.5% (w/v) Bacto agar。

方法步驟：

- 1) 每組應有一支 15 mL 試管，裝有 2 mL LB 培養液，請寫上 JM109，並標明組別及日期。
- 2) 將接種環在酒精燈火燄上燒紅，環上方部份亦以火燄燒過。同 1.3.1 方法步驟 2) 之操作，使接種環冷卻並刮下菌落，將培養皿蓋子置回。
- 3) 打開試管蓋（一手握住試管，並以拿著接種環那隻手的小指旋開蓋子），將管口在酒精燈上過火。將沾有菌落的接種環伸入培養液中並輕敲管壁使菌落脫離。將管口再次在酒精燈上過火後，將蓋子置回。
- 4) 將接種環在火燄上燒紅滅菌後置回實驗桌上。
- 5) 將試管的蓋子稍微旋開，並以膠帶固定管蓋，以免震盪培養時蓋子鬆動掉落。
- 6) 將試管置於 37°C 培養箱或水浴中震盪培養過夜。
- 7) 將長有 JM109 之培養皿交回給助教。

◆ 與細菌接觸過的任何容器或培養基，使用後須經過滅菌才可丟棄。實驗中若不小心被菌液濺到，馬上用大量清水沖洗，並以 70%酒精消毒。桌面或地面有菌液翻覆時，須以 10%漂白水擦拭清理。

1.3.3 *E. coli* JM109 之生長曲線

儀器用具：

酒精燈

分光光度計

菌液塗抹棒 (spreader) 及接種環

藥品試劑：

E. coli 菌株 (JM109)

LB 培養液

LB agar plates

方法步驟：

- 1) 每一組應有一瓶裝有 20 mL LB 培養液之三角錐瓶，請標明組別。
◆ 以下請注意無菌操作！
- 2) 取昨天接種並經過夜培養的 JM109 菌液 0.2 mL，加入三角錐瓶中，**混合均勻後**，吸出 1 mL 於微量離心管中，置於冰浴中。三角錐瓶則置於 37°C 震盪培養。
- 3) 其後每隔約 30 min 吸出 1 mL 菌液，直至下午四點，吸出之菌液皆暫置於冰浴中。
- 4) 每組其中一人請將第 0, 1, 2, 3, 4, 5 小時之菌液各取出 100 μ L 於乾淨微量離心管中，作系列稀釋；另一位同學則測不同時間吸出菌液之 A_{600} ，**請以 LB 培養液作為 Blank**。
- 5) 菌液之系列稀釋：100 μ L 菌液加入 900 μ L 的 LB 培養液，**混合均勻**，此即為 10^1 稀釋；並依序作 10^2 , 10^4 , 10^6 稀釋。
- 6) 將空白的 LB plate 分別標明組別、日期、取樣時間及稀釋度 (例如：0 hr, 10^2)。上述 10^2 , 10^4 , 10^6 系列稀釋之菌液，各取 100 μ L 加於 LB plate 中央。
- 7) 將菌液塗抹棒由裝有酒精的燒杯中取出，在酒精燈上過火使殘留酒精揮發，將菌液塗抹棒置於 LB plate 邊緣空白處約 30 s 使冷卻後，將菌液塗佈均勻。靜置數分鐘使菌液完全被培養基吸收。
- 8) 將培養皿倒置，於 37°C 培養箱中培養過夜。
- 9) 每一時間點選菌落數適中的培養皿計算菌落數，乘以稀釋倍數，計算原液中每 mL 之菌數。
- 10) 以時間為 X-軸， A_{600} 及菌數取對數值為 Y-軸作圖。另以 A_{600} 為 X-軸，菌數為 Y-軸作圖。

1.4 DNA 之限制酶分析

本實驗是以質體pBluescript II SK(-) 為材料，以不同限制酶作用，經電泳分離DNA片段後，比較各DNA片段之泳動率與分子量，藉此練習限制酶的使用、電泳分析及簡易DNA限制圖譜 (restriction map) 的建立。以DNA操作為主的各項實驗必須維持溶液與容器不受核酸分解酵素污染，因此請同學遵守以下原則並養成習慣：

- 請隨時保持實驗桌之清潔。
- 微量吸管頭及微量離心管取出後立即將蓋子蓋上。
- 請勿用手觸摸滅過菌的微量吸管頭、微量離心管及各種容器的內部。
- 溶液打開後，蓋子請勿隨意置放。吸取各種溶液請使用滅過菌的微量吸管頭；Pipetman 要保持垂直，不要碰到容器壁；每次吸出溶液後，請立即將蓋子蓋上。

1.4.1 DNA 之限制酶切割

儀器用具：

37°C 及 65°C 水浴或恆溫槽

藥品試劑：

質體 pBluescript II SK (-)

限制酶：*Bam*HI, *Pvu*II 及 *Sca*I (濃度均為 10 units/ μ L, Invitrogen)

10 $\times$ Reaction buffer 6 (0.5 M Tris-HCl, pH 7.4; 60 mM MgCl₂; 0.5 M NaCl; 0.5 M KCl)

無菌水

方法步驟：

- 取 7 支微量離心管，依下表所列體積 (單位 μ L) **依序加於管壁不同位置上**。

◆ 每次吸取限制酶時，請換一支新的微量吸管頭以免造成污染。

	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7
pBluescript	2	2	2	2	2	2	2
10 $\times$ Rx Buf 6	2	2	2	2	2	2	2
dH ₂ O	16	15	15	15	14	14	14
<i>Bam</i> HI	0	1	0	0	1	1	0
<i>Pvu</i> II	0	0	1	0	1	0	1
<i>Sca</i> I	0	0	0	1	0	1	1

總體積為 20 μ L，短暫離心後，以微量吸管頭輕輕混合，#1 置冰浴中，其餘各管置於 37°C 反應 1 h。

- 置 65°C 水浴 15 min 中止反應後，移置冰浴冷卻，即可進行電泳分析。

注解討論：

- a. 限制酶：可購自Roche Molecular Biochemicals (即以前的Boehringer Mannheim Biochemicals), Invitrogen (即以前的Life Technologies或Gibco BRL), New England BioLabs (BioLabs) 或其它公司。
- b. 限制酶的貯存與取用：反覆解凍與凍結是任何酵素的大忌，因此不可存放於無霜冰箱中。大部份限制酶購買來時即保存在 50% glycerol中，存放在 -20℃時不會凍結。有些限制酶相當不穩定，必須存放在 -70℃，請避免大量購買，也請對你所用的各種限制酶的性質作深入的了解。自冰箱取出限制酶請立即放入 -20℃冷凍盒或冰浴中，短暫離心(4℃)將管壁上或蓋上的酵素離心下後再取用。添加不同限制酶必須更換微量吸管頭，絕對不可污染。請一次取出需要量，置於微量離心管中，再分別加入各反應中；取用後請立即放回冰箱。
- c. Isoschizomers：有些不同的限制酶可以作用在相同的 DNA 序列上，這些酵素互稱為 isoschizomers。例如：SstI 與 SacI；HincII 與 HindII；EspI 與 Bpu1102I。相關的資料均可由工具書或各廠商目錄查到。
- d. 限制酶的反應條件：每一廠商生產的限制酶均附有最適用的 10 倍濃度反應液 (10×Rx Buf)，但必須注意，同一種限制酶若來自不同廠商，其Rx Buf及反應溫度可能不同，故使用前請務必參考其說明書或廠商目錄，廠商目錄中都會表列出各種限制酶在不同Rx Buf反應效率。使用兩種以上的限制酶進行切割時，可依照該表選擇適當的Rx Buf，並遵循以下幾點原則：
 1. 若各種限制酶所用的 Rx Buf 相同，則可同時加入反應液中，但須注意 glycerol 的最終濃度不可超過 10%，有些酵素對 glycerol 濃度的限制更嚴格，不可超過 5%。
 2. 若各種限制酶所用的Rx Buf不同，但差異僅在鹽的濃度時，可先加入需鹽濃度較低者，反應完全後直接加入NaCl, KCl, MgCl₂ 等調整鹽濃度，再加入第二種酵素。
 3. 若各種限制酶所用的 Rx Buf 完全不同時，則以任一種酵素作用完全後，先經 drop dialysis 更換溶液或以酒精沉澱 DNA 後，再以另一種酵素作用。
- e. 限制酶使用量與反應時間：一單位的限制酶活性通常定義為，在最適反應溫度與條件下，能使 1 μg 基質 DNA 在 1 h 被切割完全所需之酵素量。通常可加入較多量的酵素或把反應時間加長，但有些酵素不穩定，反應時間加長並不具意義。加入的酵素量需考慮甘油的最終濃度。以避免甘油濃度太高造成對酵素活性的抑制或改變其作用。
- f. 中止反應：一般限制酶可以 65℃加熱 15 min中止反應，但有些酵素具熱安定性，則可加入EDTA (最終濃度為 10 mM) 或以phenol處理。
- g. 限制酶無法作用時：

當樣品 DNA 無法被切割時，請努力回想或檢查：

 1. DNA 是否含有高鹽？
 2. DNA 是否含有雜質？

3. Phenol 或酒精是否去除乾淨？
4. 酵素是否貯存不當而失去活性？
5. 酵素量或 Rx Buf 是否加入過多？
6. 反應溫度太高或太低？
7. 酵素是否無法作用 methylated DNA？

1.4.2 瓊脂糖膠體電泳 (agarose gel electrophoresis)

儀器用具：

迷你電泳槽及鑄膠器 (Mupid II)
UV transilluminator 及影像分析系統
防護面罩

藥品試劑：

瓊脂糖粉末 (agarose, low EEO)

1×TAE電泳緩衝液 (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA, pH 8.0)：

由 50×TAE (每 1 L 含 242 g Tris base, 57.1 mL glacial acetic acid, 100 mL 的 0.5 M EDTA-8.0) 稀釋使用。

10×追蹤染劑 (0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol, 0.1 M EDTA, 50% glycerol)

Ethidium bromide (EtBr) stock solution：500 µg/mL，裝於滴瓶中，每 50 mL 膠體溶液加一滴 (最終濃度為 0.5 µg /mL)

DNA 標準分子量：

DNA/HindIII fragments：包含 8 個片段 23.1, 9.4, 6.5, 4.3, 2.3, 2.0, 0.56, 0.125 kb (圖 1.5A)，濃度為 0.5 µg/µL，以下簡稱 λMr。

1 Kb DNA Ladder Fragments：250 bp~10 kb 共 14 個 DNA 片段 (圖 1.5B)，濃度為 0.5 µg/µL，以下簡稱 LadMr。

方法步驟：

- 1) 每組製備一片 12-well 1.2% agarose gel：秤取適量 agarose 粉末，加入 1×TAE (大片 Mupid II 膠片約需 40 mL)，以微波爐加熱溶解後，置 55°C 水浴降溫。
◆ Ethidium bromide 為突變劑，以下操作請務必戴手套，並禁止戴著手套的手到處亂摸！
- 2) 加入 EtBr (每 50 mL 膠體溶液加一滴 stock solution)，混合均勻，將膠體溶液倒入鑄膠模，插上樣本梳。置室溫凝結後，小心拔開樣本梳，將膠片置於電泳槽中，倒入 1×TAE，直至溶液蓋過膠片。
- 3) 樣品 DNA 及 DNA 標準分子量各加入 1/10 體積之 10×追蹤染劑。將樣品及 λMr 置 65°C 水浴 5~10 min，移至冰浴降溫後，即可加入膠片之樣品槽。
◆ LadMr 請勿加熱！
- 4) 以 50V 或 100V 進行電泳，待追蹤染劑 bromophenol blue 行進至膠體三分之二

二處時，關閉電源，取出膠片，以 UV transilluminator box 觀察色帶位置，並照相記錄結果。

◆ 請務必戴防護面罩，以免受到 UV 傷害。

5) 與標準分子量比較，估計各 DNA 片段之分子量並建立質體 pBluescript 之限制圖譜。

◆ 含有 EtBr 之 agarose gel 請丟至專用容器中！

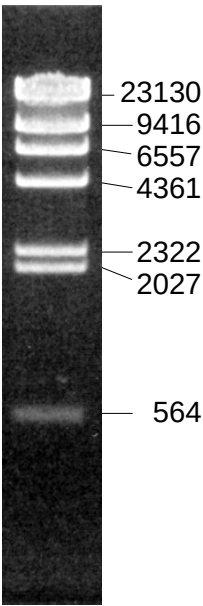
註解討論：

- a. 亦可在鑄膠時不加入 EtBr，而於電泳後以含 0.5 µg/mL EtBr 之 1×TAE 染色，但兩種方法所得到的 DNA 泳動率會稍有不同，EtBr 直接加在膠片時，直鏈雙股 DNA 的泳動率會減慢約 15%。
- b. DNA 片段兩端若為單股 (cohesive ends)，互補的序列會有再黏合的現象。在電泳前 DNA 樣品以 65°C 加熱後，再置於冰浴中，可使兩端黏合的部份打開成單股。

參考文獻：

- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith, JA, Struhl K (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Vol 1. John Wiley & Sons, Inc, New York
- Burton ZF, Kaguni JM (1997) Experiments in Molecular Biology: Biochemical Applications. Academic Press, New York
- Hardin C, Presutti D, Miller W, Robertson D (1996) Nucleic Acids, Cloning and Protein Purification: A Laboratory Manual. Simon & Schuster Custom Publishing
- Micklos DA, Freyer GA (2003) DNA Science: A First Course, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Pipetman P, Gilson 操作手冊
- Sambrook J, Russell DW (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd ed., Vol 1 & 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York

(A) Lambda DNA/*Hind*III Marker



1 μ g Lambda DNA *Hind*III Marker 所含各片段的百分比及實際重量 (ng)

片 段		%	核酸量 ng
1	23130	47.7	476.9
2	9416	19.4	194.1
3	6557	13.5	135.2
4	4361	9.0	89.9
5	2322	4.8	47.9
6	2027	4.2	41.8
7	564	1.2	11.6
8*	125	0.3	2.6
		100.0	1,000

* 最小片段 (8) 沒有染上色或已跑出膠片外

(B) 1 Kb DNA Ladder

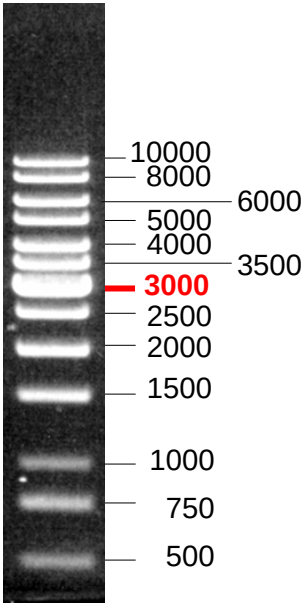


圖 1.5 DNA 標準分子量之組成片段與在 1% 瓊脂糖膠片的電泳圖譜

(A) Lambda DNA/*Hind*III marker; (B) 1 Kb DNA Ladder (1 % agarose)

本圖各色帶之數據取自原廠商所附之說明書

第二章 表現質體的建立

台灣大學生化科技學系 王愛玉

本章實驗主要是藉由基本的 DNA 剪接方法，建構能夠在大腸桿菌中大量表現 GUS 之表現質體 (圖 2.1)。將已經次選殖於質體 pBluescript SK (-) 之 *gusA* (原稱 *uidA*) 基因片段，以適當的限制酶作用後，選殖至表現載體 pQE31 上，以利用其上之 T5 promoter 進行表現。*gusA* 基因原本即存在於大部分的大腸桿菌中，屬於誘導性的基因 (inducible gene)，當培養基中存在 GUS 能夠作用的基質 (glucuronides) 時，即可誘導大腸桿菌中的 *gus* operon 進行表現 GUS, glucuronide-specific permease, GusC 等蛋白質。由於 GUS 相當穩定，活性檢測也十分簡易，因此 *gusA* 基因常被應用為報導基因 (reporter gene)，探討目標基因的表現及其調控機制。本課程則是利用 GUS 相當穩定的優點，作為初學者練習質體建構、基因表現產物分析及純化的材料。基因表現產物分析及純化等實驗將於第三、四章中說明，表現質體的建構則分別在以下各階段進行：

2.1 質體 DNA 的小量分離：

自 *E. coli* 菌株中分離純化 pBlueGus (pBluescript 上帶有 *gusA* DNA 片段) 以及 pQE31。

2.2 質體 DNA 之檢定分析：

純化的兩種質體以限制酶進行切割後進行電泳檢定。

2.3 DNA 片段的分離：

將經過 *Bam*HI 與 *Hind*III 切割的 pBlueGus 及 pQE31，進行電泳分離，並將 *gusA* DNA 片段及 pQE31 自膠體中溶離出。

2.4 DNA 之定量：

將溶離出之 *gus* DNA 及 pQE31 進行定量分析。

2.5 接合反應 (ligation)：

將 *gusA* DNA 片段及經 *Bam*HI 與 *Hind*III 切割之 pQE31 以適當比例混合並加入 T4 DNA ligase 進行接合反應。

2.6 質體對大腸桿菌的轉形 (transformation)：

將接合反應液對 *E. coli* JM109 進行轉形，以得到帶有質體之菌株。

2.7 重組質體的檢定：

以 colony hybridization, histochemical detection, 質體檢定, Southern 轉印等方法，挑選帶有重組質體的轉形株。

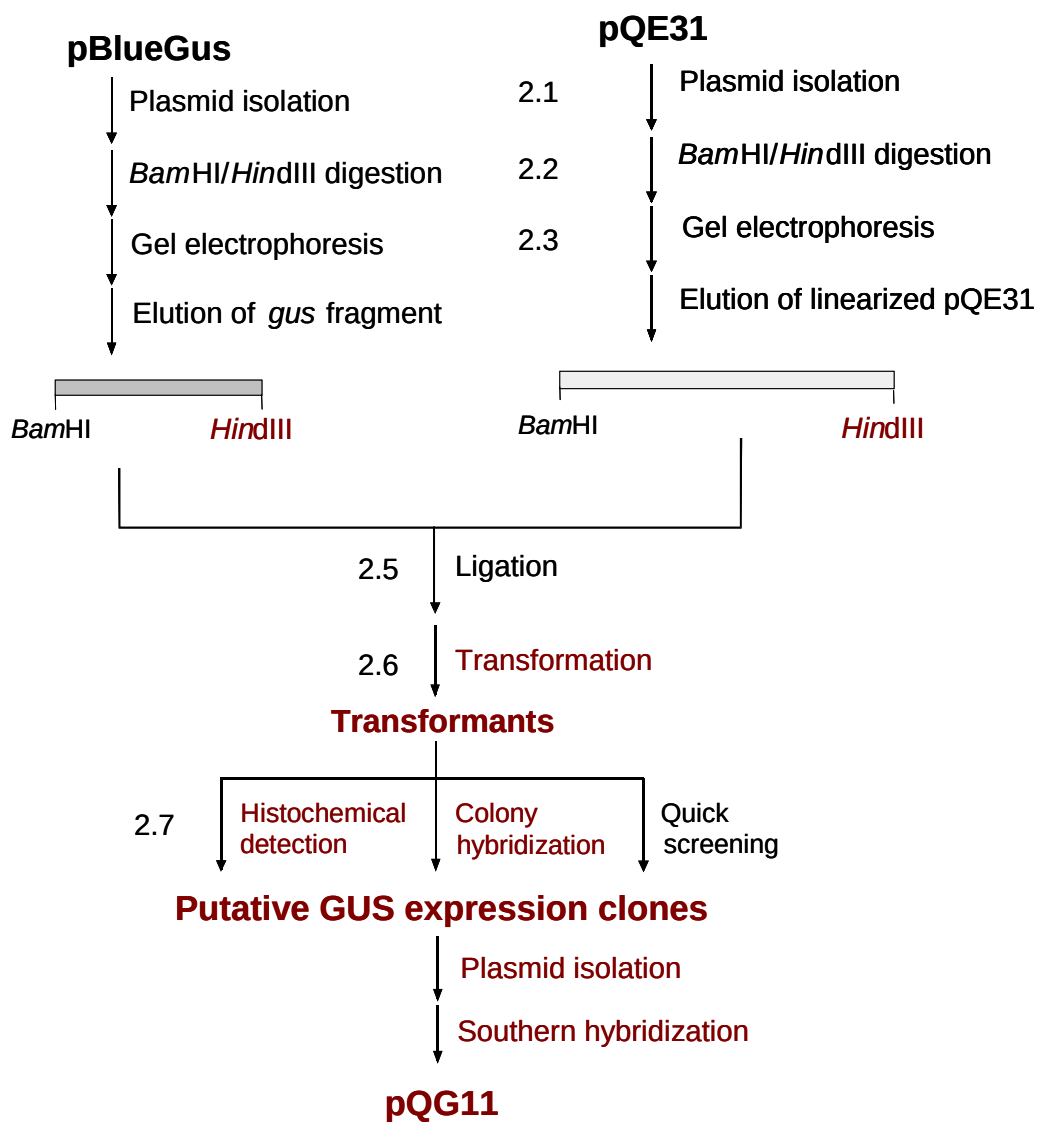


圖 2.1 表現質體 pQG11 之建構流程

2.1 質體 DNA 之小量分離法

這個實驗是以alkaline lysis的方法進行，其原理是將細菌以NaOH及SDS分解，並使蛋白質及DNA變性，繼之以酸中和。在此情況下，小分子質體DNA在中和後可恢復原態，但大部份的細菌染色體DNA則無法完全復原而與 SDS-K⁺所形成之複合物一起沉澱下，可以離心去除之，上清液中所含的質體則可以酒精或異丙醇將其沉澱下來。

儀器用具：

微量離心機

冰浴

藥品試劑：

MP I (25 mM Tris-HCl, pH 8.0; 10 mM EDTA, pH 8.0; 50 mM glucose)

MP II 新鮮配製(0.2 N NaOH; 1% SDS; 使用前以 10 N NaOH, 10% SDS稀釋混合配製)

MP III (3 M 醋酸鉀溶液，pH 5.2，置冰浴中)

RNase A (1 mg/mL, 已經過 100°C 加熱 30 min 以去除 DNase 活性)

純酒精及 70%酒精

TE-8.0 (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA, pH 8.0)

方法步驟：

- 1) pBlueGus/JM109, pQE31/JM109 接種於含 100 µg/mL ampicillin 之 LB 培養基，於 37°C 震盪培養過夜。
- 2) 取 1.5 mL 菌液，加於微量離心管中，以 6,000 rpm 離心 2 min 後，倒去上清，以微量吸管頭儘可能吸去殘留液體。
◆兩種質體均請製備三管！
- 3) 沉澱加入 0.1 mL MP I，劇烈震盪，將沉澱完全打散。
- 4) 慢慢加入 0.2 mL MP II，蓋上管蓋後將管子反覆上下搖動，注意不可震盪！此時溶液應漸澄清且黏度增加；將離心管置冰浴中。
- 5) 加入 0.15 mL MP III，混合均勻，亦不可劇烈震盪，置冰浴中 5 min。
- 6) 以 12,000 rpm 離心 5 min。
- 7) 小心吸出上清至另一離心管，加入 2 倍體積之純酒精（或 0.6 倍體積之 isopropanol），混合均勻，置室溫 2 min。
- 8) 以 12,000 rpm 離心 10 min。倒去上清液，沉澱以 70%酒精洗二次，每次各離心 1 min。
◆小心不要把沈澱也倒掉了！
- 9) 倒去上清液後，將離心管置回離心機，短暫離心後取出，以微量吸管頭儘可能吸去殘留液體。將管蓋打開，置室溫中讓沈澱乾燥。待沈澱乾燥後，以 30 µL

TE-8.0 溶解 (可以微量吸管頭反覆緩慢吸放溶液，以助溶解)。

10) 加入 1 μ L RNase A。

11) 進行限制酶切割、電泳分析等實驗。

註解討論：

- a. 質體抽取的量與品質除了與操作技術相關外，仍與許多因素有關，例如：
 1. 質體的 copy number。
 2. 宿主菌株的基因型 (genotype)。
 3. 細菌的生長時期。
 4. 培養基種類。有報告指出，利用 Terrific broth 或 2XYT 等培養基可得較多量之質體。
- b. 上面步驟 2) 中的菌液體積可加倍至 3 mL。將 1.5 mL 的菌液離心後，倒去上清，再加入 1.5 mL 菌液，同法離心後，再接著進行質體抽取。
- c. 此法抽取質體，在過程中並無法將小分子 RNA 與質體分離，太多的 RNA 常會影響電泳結果的判讀或干擾下游的實驗，因此步驟 10) 中，加入 RNase A 的目的即在去除 RNA。
- d. RNase 的存在會影響下游的實驗時 (例如 *in vitro* transcription)，可於 RNase 作用後，將 DNA 溶液如下處理：
 1. 加入等體積的 phenol/chloroform/isoamyl alcohol (PCI, 三者以體積比 25:24:1 混合)，震盪混合均勻後，以 12,000 rpm 離心 5 min。
 2. 將上層溶液吸至乾淨離心管，加入等體積 chloroform/isoamyl alcohol (24:1, CI)，震盪混合均勻後，以 12,000 rpm 離心 2 min。
 3. 吸出上層溶液至乾淨離心管，加入 2 倍體積的酒精及 1/10 體積的 3 M sodium acetate 溶液 (pH 5.2, 以下簡稱 3 M NaOAc-5.2)，混合均勻，於冰浴或-20°C 靜置 30 min 以上。
 4. 12,000 rpm 離心 15 min (4°C)。沉澱物以 70%酒精洗二次，每次各以同轉速離心 2 min。
 5. 沉澱乾燥後，以 TE-8.0 溶解。

2.2 質體 DNA 之限制酶分析

本實驗是將上一節分離得到的質體，以不同限制酶作用，經電泳分離 DNA 片段後，比較各 DNA 片段之泳動率與分子量，檢定質體之正確性，並進行大量 DNA 之限制酶切割，以進行重組質體的建構。

2.2.1 質體 DNA 之檢定

儀器用具：

37°C 及 65°C 水浴或恆溫槽

Mupid II 迷你電泳槽及鑄膠器

UV transilluminator 及影像分析系統

防護面罩

藥品試劑：

2.1 節中以小量分離法得到的二種質體 pBlueGus 及 pQE31

pBluescript SK(-) 由助教提供

限制酶：*Bam*HI, *Hind*III (10 U/ μ L, Invitrogen)

10 $\times$ Reaction buffer 2 (0.5 M Tris-HCl, pH 8.0; 0.1 M MgCl₂; 0.5 M NaCl)

10 $\times$ Reaction buffer 3 (0.5 M Tris-HCl, pH 8.0; 0.1 M MgCl₂; 1.0 M NaCl)

1 M NaCl

無菌水

10 $\times$ 追蹤染劑 (0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol, 0.1 M EDTA, 50% glycerol)

洋菜膠 (agarose, low EEO)

1 $\times$ TAE 電泳緩衝液

Ethidium bromide (EtBr) stock solution (500 μ g/mL)

DNA 標準分子量 (λ Mr 及 LadMr)

方法步驟：

1) 取 9 支微量離心管，依下表所列 (以 μ L 為單位) 依序加於管壁上：

	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9
pBluescript	2	2	2	-	-	-	-	-	-
pBlueGus	-	-	-	2	2	2	-	-	-
pQE31	-	-	-	-	-	-	3	3	3
10 $\times$ Rx Buf 2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
dH ₂ O	16	15	15	16	15	15	15	14	14
<i>Hind</i> III	0	1	1	0	1	1	0	1	1

◆ 注意！每次吸取限制酶時，請換新的微量吸管頭以免造成污染。

總體積為 20 μ L，短暫離心後，以微量吸管頭輕輕混合。

- 2) #1, #4, #7 暫置冰浴，其餘各管置於 37°C 反應 1 h 後，每管再分別依下表所列 (以 μL 為單位) 依序加於管壁上：

	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9
1 M NaCl	1	1	1	1	1	1	1	1	1
10×Rx Buf 3	1	1	1	1	1	1	1	1	1
dH ₂ O	8	8	7	8	8	7	8	8	7
<i>Bam</i> HI	0	0	1	0	0	1	0	0	1

總體積為 30 μL ，短暫離心後，以微量吸管頭輕輕混合。 #3, #6, #9 置於 37°C 繼續反應 1 h，其餘各管置於冰浴中。

- ◆ 在反應期間，每組請利用空檔製備 12-well 及 6-well 的 1% agarose gels 各二片；其中一片 12-well gel 必須做厚一點。
- ◆ 注意！ Ethidium bromide 為致突變劑，操作時請務必戴手套，並禁止戴著手套的手到處亂摸！

- 3) 每管分別加入 3 μL 10×追蹤染劑，置 65°C 水浴 5 min 後，移至冰浴降溫後即可進行電泳分析。

- ◆ 未使用的電泳膠片請以保鮮膜封好，裝入封口袋中，置 4°C 冰箱，留至明天使用。

2.2.2 大量 DNA 之限制酶作用

若電泳分析結果顯示你所純化的質體 DNA 質量均佳 (請將結果拿給教師或助教看)，則可進行大量 DNA 之 *Bam*HI 及 *Hind*III 切割。

藥品試劑：

2.1 節中以小量分離法得到的二種質體

限制酶：*Bam*HI, *Hind*III (20 U/ μL , BioLabs)

10×NE Buffer *Bam*HI (0.1 M Tris-HCl, pH 7.9; 0.1 M MgCl₂; 1.5 M NaCl; 10 mM dithiothreitol)

100×BSA (10 mg/mL bovine serum albumin)

方法步驟：

- 1) 取兩支微量離心管，分別標上 pQE31 及 pBlueGus，如下所列依序加於管中：

Plasmid	70 μL
10×NE Buffer <i>Bam</i> HI	20 μL
100×BSA	2 μL
dH ₂ O	94 μL
<i>Hind</i> III	7 μL
<i>Bam</i> HI	7 μL

總體積為 200 μL ，短暫離心後，以微量吸管頭輕輕混合，置 37°C 反應過夜。

- ◆ 剩餘的質體請保存在 4°C，不要丟掉，以後的實驗還會用到！

- 2) pBlueGus 取出 5 μL ，pQE31 取出 10 μL ，加入追蹤染劑，進行電泳分析，檢

視切割是否完全。

3) 若切割完全，請由 2.3 節中任選一法進行 DNA 片段純化。

註解討論：

- a. 進行大量 DNA 的限制酶切割，可選用高濃度的限制酶，以減少反應的體積。若沒有高濃度的限制酶，則需將反應總體積增加，以避免加入多量的酵素時，過多的 glycerol 影響酵素的作用。
- b. 這部份的實驗改用 BioLabs 的酵素，所以反應亦依廠商所建議最適條件進行。
- c. 切割完全的 pQE31，亦可不進行 DNA 片段純化，可依 2.1 節註解討論 d 之步驟 1~5 進行純化，以去除限制酶及鹽類。乾燥後之 DNA 沈澱以 25 μ L TE-8.0 溶解。但因切下之 polylinker 小片段未去除，在進行接合反應時，可能會再與載體接合，降低得到重組質體的機率。

2.3 DNA 片段的分離與純化

2.3.1 DEAE membrane 吸附法

利用離子交換的原理，在低鹽情況下使 DNA 吸附在帶正電荷的濾膜上，再利用含有高濃度鹽類的緩衝液將 DNA 自膜上溶離下來。

儀器用具：

Mupid II 迷你電泳槽

UV transilluminator

防護面罩

扁平藥匙

乾淨刀片

65°C 水浴或恆溫槽

藥品試劑：

經 *Bam*HI 及 *Hind*III 作用之 pBlueGus 及 pQE31

含 EtBr 之 1.0 % 12-well agarose gel

1×NET (20 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl; 0.1 mM EDTA, pH 8.0)

High salt NET (20 mM Tris-HCl; 1.0 M NaCl; 0.1 mM EDTA, pH 8.0)

0.5 M NaOH

10 mM EDTA

TE-8.0

n-Butanol

Phenol/chloroform/isoamyl alcohol (PCI, 25:24:1)

Chloroform/isoamyl alcohol (CI, 24:1)

10 M ammonium acetate (NH₄OAc)

DEAE membrane (Schleicher & Schuell, NA 45)

過濾膜 (Millipore VSWP 01300, 0.025 μm, 13 mm)

方法步驟：

- 1) 經 *Bam*HI 及 *Hind*III 作用之 pBlueGus 及 pQE31，置 65°C 水浴 10 min，移至冰浴降溫後，以含 EtBr 之 1.0% agarose gel 進行電泳。
- 2) NA 45 以滅過菌的剪刀剪成適當大小，置於培養皿中，以 10 mM EDTA-8.0 浸泡處理 10 min，繼以 0.5 M NaOH 處理 5 min。以無菌水快速清洗五、六次後，浸泡於無菌水中，置於 4°C 可保存數週。
◆ 此部份助教已準備好。
- 3) 電泳後之膠片以 EtBr 染色後，以長波長 UV 燈觀察 DNA 片段所在位置，並在 DNA 色帶前後切一刀，以扁平藥匙輔助將 NA 45 插入 DNA 前後的切縫中；再以 UV 燈觀察 NA 45 插入的位置是否恰當。

- 4) 將膠片置回電泳槽中，以 100 V 進行電泳約 10 min (時間隨 NA 45 位置與 DNA 距離而定)；以 UV 燈觀察 DNA 是否完全吸附到 NA 45。
- 5) 將 NA 45 取出，浸於 NET 中漂洗以去除附著於 NA 45 的膠體 (可用微量吸管頭末端將膠體輕輕去除)，再移置於微量離心管中 (每 2~3 片置於一管中)，吸去多餘的液體。
◆ 注意！不可讓 NA 45 乾掉，否則 DNA 無法被溶離下來。
- 6) 加入 0.3 mL high salt NET，於 68°C 加熱 40 min，其間不時震盪。
◆ NA 45 膜片避免重疊在一起，並且必須完全浸泡於溶液中。
- 7) 將溶液吸出，原管中之 NA 45 再加入 300 μ L high salt NET，於 68°C 加熱 10 min。
◆ 以下的步驟常容易出錯，請務必分清楚離心後該取上層或下層溶液，請先保留各部份的溶液，確定無誤後再丟棄。
- 8) 將兩次溶離液合併，加入等體積之 *n*-butanol，震盪混合，以 12,000 rpm 離心 5 min。離心後應可分為兩層，DNA 溶液在下層。仔細觀察管底是否有沈澱，吸取下層溶液至另一離心管，避免吸到沈澱。這時 DNA 溶液體積應該減少，可以把兩管或三管的溶液合併成一管。
◆ 溶離後的 NA 45 請以 UV 照射檢查是否仍有 DNA 殘留。
- 9) 加入等體積之 PCI，震盪混合，以 12,000 rpm 離心 5 min。
- 10) 吸取上層水溶液至另一離心管，原管中加入等體積的 TE-8.0，混合均勻，以 12,000 rpm 離心 2 min。將上層液吸出。
- 11) 合併上層液，加入等體積 CI，震盪混合，以 12,000 rpm 離心 2 min。
- 12) 將上層溶液吸出，加入 0.2 倍體積之 10 M NH_4OAc ，2.5 倍體積的絕對酒精，置 -20°C 沉澱至少 30 min。
- 13) 以 12,000 rpm 離心 20 min (4°C)，沉澱以 -20°C 預冷之 70% 酒精洗兩次，以同轉速離心 2 min。
◆ 倒掉上清時請小心，不要讓沈澱流失！沈澱通常很少，且因純度高，沈澱幾近透明，不易察看；上清最好吸到另一微量試管中暫時保留。
- 14) 沉澱乾燥後溶於 20 μ L TE-8.0 中。
- 15) 取一個直徑 3 cm 之培養皿，加入 5 mL TE-8.0。以平端鑷子小心夾取 VSWP 濾膜，將濾膜之光亮面朝上置於液面上。將溶離之 DNA 溶液加在膜上，靜置透析至少 30 min 以去除殘留之鹽。

註解討論：

- a. 當 DNA 分子量較大時 (> 5 kb)，溶離效率會降低。
- b. 步驟 6) 中的溶離時間隨 DNA 大小而作調整。DNA 分子量較小時，溶離時間可縮短。
- c. 步驟 11) 中儘可能避免在 -70°C 進行沈澱，溶液中的鹽會隨之沈澱，因此必須以 drop dialysis (步驟 15) 將大量的鹽去除。
- d. 以 *n*-butanol 萃取 DNA 溶液，主要在去除嵌入 DNA 中的 EtBr，並可濃縮溶

液的體積。當溶液體積已經很少時，則需用事先經過水飽和之 *n*-butanol。

- e. 加入 PCI 及 CI 的用意為何？ PCI 溶液為什麼是黃色的？
- f. 此法比 2.3.2 silica gel 吸附法繁複，需要比較長的操作時間，但可藉由整個操作過程讓初學者體驗 DNA 分離純化常用的方法與原理，包括：以離子交換法分離 DNA、以 PCI 去除 DNA 中的蛋白質及殘留的膠體、以 *n*-butanol 去除 EtBr 及濃縮 DNA、以及以透析法去除 DNA 溶液中的鹽類。

2.3.2 Silica gel 吸附法

藥品試劑：

經 *Bam*HI 及 *Hind*III 作用之 pBlueGus 及 pQE31

含 EtBr 之 1.2% 12-well agarose gel

1×TAE 電泳緩衝液

QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen)，內含：

QIAquick spin column (管柱底部為 silica gel membrane)

Buffer QG

Buffer PE

Buffer EB (10 mM Tris-HCl, pH 8.5)

2 mL 收集管

TE-8.0

方法步驟：

- 1) 經 *Bam*HI 及 *Hind*III 作用之 pBlueGus 及 pQE31，置於 65°C 水浴 10 min，移至冰浴降溫後，以含 EtBr 之 1.0% agarose gel 進行電泳（兩種樣品各用六個 wells，每個 well 注入 30 μ L 樣品）。
- 2) 電泳後以長波長 UV 燈觀察 DNA 片段所在位置，並以乾淨刀片將 GUS 及 pQE31 片段切下，請儘可能去除周圍多餘的膠體。
- 3) 取數個微量離心管，分別稱重並記錄重量後，將膠體置於管中再稱重，估計膠體重量。
◆ 注意！每管膠體不可超過 400 mg。
- 4) 於離心管中加入 Buffer QG，加入比例為：每 100 mg 膠體加入 0.4 mL Buffer QG。
◆ Buffer QG 中含有 guanidine hydrochloride，會對皮膚及眼睛造成傷害，請小心使用。
- 5) 置 50°C 水浴中 15 min，每隔 2~3 min 以手指輕彈管壁促進膠體溶解。如果膠體尚未溶解完全，則延長 5~10 min，務使膠體完全溶解。
- 6) 待膠體完全溶解後，檢查溶液顏色是否為黃色（應與 Buffer QG 相近），若顏色為橘色或紫色，表示 pH 值不恰當，請加入 10 μ L NaOAc (3 M, pH 5.0)，混合均勻後，再檢查溶液的顏色。

- ◆ 膠體溶液的 pH 值必須 ≤ 7.5 ，若大於 7.5，會造成 DNA 與 silica-gel membrane 間的吸附效率驟降。此組套的 Buffer QG 中含有 pH 指示劑，若 $\text{pH} \leq 7.5$ ，溶液顏色應呈黃色。
- 7) 將 spin column 置於 2 mL 收集管中，加入上述完全溶解之膠體溶液，以 12,000 rpm 離心 1 min。
- ◆ 每個 QIAquick spin column 只能裝約 0.8 mL 溶液，所以請分多次離心，每次離心完需將下方收集管內的收集液倒掉。
- ◆ 若 DNA 片段小於 500 bp 或大於 4 kb，可於膠體溶液中加入 1 倍體積的 isopropanol，混合均勻後，再加入 spin column 中離心，以提高 DNA 回收效率。
- 8) 將 spin column 置回收集管上，加入 0.5 mL Buffer QG，再以 12,000 rpm 離心 1 min，以去除殘存的 agarose 膠體。
- 9) 離心後，倒掉收集管中的溶液。將 spin column 置回收集管上，在 spin column 中加入 0.75 mL Buffer PE，於室溫靜置 2~5 min 後，以 12,000 rpm 離心 1 min，並去除收集管中的溶液。
- 10) 將 spin column 置回收集管中，再於 13,000 rpm 離心 1 min，以完全去除 spin column 中殘留的 Buffer PE
- ◆ Buffer PE 中含有酒精，必須完全去除，否則易干擾後續酵素反應。
- 11) 將 spin column 置於乾淨的 1.5 mL 微量離心管中。將 30 μL 溶離緩衝液 (Buffer EB) 加在 silica membrane 上，靜置 1~5 min，以將吸附於膜上之 DNA 完全溶離出。
- ◆ 溶離緩衝液的 pH 值需在 7.0~8.5 間，才能達到最佳溶離效果。也可以用 TE-8.0 或水作為溶離液，但使用 TE-8.0 時，需考慮 EDTA 是否對後續的實驗有影響；使用水進行溶離時，則需注意水的 pH 值，及溶離 DNA 的保存 (DNA 在水中並不穩定)。
- 12) 以 12,000 rpm 離心 2 min。收集微量離心管中含有 DNA 的溶離液，並進行 DNA 的定量及接合反應。

註解討論：

- a. 以 Silica gel 法來進行 DNA 片段的純化，目前有許多商品化的套組 (kit) 可利用，可依需求選擇適當的套組。
- b. 一般而言，Silica gel 吸附法對較小的 DNA 片段 ($< 0.5 \text{ Kb}$) 回收率並不佳，在使用前須詳閱套組操作說明所列適用片段大小及操作條件。

2.4 DNA 之定量

藥品試劑：

純化之 *gusA* 片段及 pQE31 *Bam*HI/*Hind*III 片段

1% 6-well agarose gel

DNA 標準分子量 (λ Mr, 0.5 μ g/ μ L)

方法步驟：

- 1) 取 4 支微量離心管，依下表加入 DNA, TE-8.0 及追蹤染劑 (μ L)：

	#1	#2	#3	#4
DNA	λ Mr 1	λ Mr 2	pQE31 2	<i>gusA</i> 2
TE-8.0	8	7	7	7
染劑	1	1	1	1

- 2) 短暫離心混合後，將各管樣品置 65°C 水浴 5~10 min 後，移至冰浴降溫後進行電泳分析。

- 3) 將膠體置於 UV transilluminator 上觀察各色帶的亮度，與已知量之 λ Mr 比較，找出分別與 #3, #4 亮度相當之片段。

◆ 由圖 1.5 可知 λ Mr 每一 DNA 片段的量。

- 4) 估計 #3, #4 之 DNA 量及計算每 μ L 所含之莫耳數。

2.5 接合反應

純化的 *gusA* 片段與經 *Bam*HI/*Hind*III 作用的 pQE31 片段混合後，末端序列互補的部份會進行黏合，但仍須藉由 DNA ligase 催化 phosphodiester bond 的形成，將缺口接合起來。

儀器用具：

12°C 恆溫槽

藥品試劑：

純化之 *gusA* 片段及 pQE31 *Bam*HI/*Hind*III 片段

T4 DNA ligase (1 U/μL, Invitrogen)

5×T4 DNA ligase buffer (0.25 M Tris-HCl, pH 7.6; 50 mM MgCl₂; 5 mM ATP; 5 mM DTT; 25% PEG-8000)

方法步驟：

- 1) 兩種 DNA 片段於 65°C 水浴加熱 10 min 後，置冰浴中。
- 2) 取 5 支微量離心管置冰浴中，依下表所列 (單位 μL) 依序加入各成份：

	#1	#2	#3	#4	#5
Vector : Insert *	1 : 3	1 : 1	3 : 1	1 : 0	-
5X Ligase Buf	2	2	2	2	0
ddH ₂ O	7-X1-Y1	7-X2-Y2	7-X3-Y3	7-X4	9
<i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III cut pQE31	X1	X2	X3	X4	uncut pQE31 1
<i>gusA</i> fragment	Y1	Y2	Y3	0	0
T4 DNA ligase	1	1	1	1	0

* Vector 與 Insert 之比例為莫耳數比，DNA 總量為 100 ng。

- 3) #1~#4 置於 12°C 反應過夜，#5 則不加 ligase，直接置於 4°C 冰箱。
- 4) #1~#4 反應過夜後，以 70°C 加熱 10 min，置冰浴中。

註解討論：

- a. 步驟 1) 及 4) 加熱及冰浴的作用分別為何？
- b. 以不同莫耳比例進行接合反應的用意為何？
- c. 本實驗是將載體以兩種不同的限制酶進行作用，因此進行接合反應時，載體自我接合的機率較小。若是將 DNA 片段選殖於載體上單一的限制酶位址時，可將限制酶作用過的質體以 alkaline phosphatase 作用，去除 5' 端的磷酸根，以避免進行接合反應時，質體末端自行接合。

2.6 質體之轉形

細菌質體需藉由轉形 (transformation) 的技術，將之引入細菌體中，藉由寄主細菌的系統來達成複製或進行基因表現的目的。寄主細菌的選擇，須視質體的種類及實驗的目的而定。本實驗的目的在建構一個表現質體，使之能在大腸桿菌中大量表現 GUS。然而，利用大腸桿菌進行外源基因的表現時，常遇到的問題是，外源基因的產物會對寄主細菌造成傷害；此外，持續不斷的表現外源基因也會使寄主細菌生長減慢或無法生長。因此，必須有適當的調控機制來控制外源基因的表現。我們所用的載體 pQE31 在 T5 promoter 與外源基因插入位址之間，具有一段 *lac operon* 中的 *lacO* 序列，可利用 *lac repressor* 結合其上來調控 T5 promoter 的啟動，只有在 inducer (例如 IPTG) 加入時，才會啟動轉錄的進行，而 *lac repressor* 的來源則必須靠寄主提供。由於此質體為 multiple copies，一般大腸桿菌菌株中 *lac repressor* 的含量不足以有效地進行調控，縱使未加入 inducer，也會有外源蛋白質的表現，萬一外源蛋白質對寄主造成毒害，使之無法生長，我們可能連表現質體都無法選殖到，更無法達成我們的實驗目的了。我們所選用的寄主菌株 JM109 所具有的 *lacI^q*，能夠過量表現 (overproduce) *lac repressor*，因此可較有效地控制 T5 promoter 的啟動。然而，若是連 JM109 這一類帶有 *lacI^q* 之菌株都發生問題時，就必須再更換其它的寄主菌株；例如 M15[pREP4]，此菌株除了染色體上的 *lacI* 基因外，還帶有能持續表現 *lac repressor* 的質體，應可解決 *lac repressor* 量不足的問題。

2.6.1 氯化鈣法

利用冰冷的 CaCl_2 製備 competent cells，以傳統方法進行質體的轉形。

儀器用具：

37°C 培養箱
42°C 水浴
冰浴

藥品試劑：

0.1 M CaCl_2 置冰浴中

2 M glucose：

取 18 g glucose 溶於水中，並調體積至 50 mL，無菌過濾，分裝後置 -20°C 貯存。

2 M Mg^{2+} ：

取 20.3 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 及 24.65 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 溶於水中，並調體積至 100 mL，無菌過濾之，分裝小瓶置 -20°C 貯存。亦可以 MgCl_2 完全取代 MgSO_4 。

SOB 液體培養基：

2% Bacto tryptone, 0.5% yeast extract, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl，高壓滅菌，使用前加入 2 M Mg^{2+} ，使最終濃度為 10 mM。

SOB 固體培養基：

2% Bacto tryptone, 0.5% yeast extract, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1.5% Bacto agar, 高壓滅菌, 倒plate前加入 2 M Mg^{2+} 使最終濃度為 10 mM。

SOC/Amp 固體培養基：

SOB 中另外添加 20 mM glucose 及 100 μ g/mL ampicillin。

SOC 液體培養基： SOB 中加入 20 mM glucose (使用前加入)。

大腸桿菌菌株： JM109

2.5 節之 #1~#5 接合反應液

方法步驟：

- 1) 進行轉形實驗前 16~20 h, 自 -70°C 取出貯存的菌種, 以劃單一菌落方式將菌株 JM109 接種在 SOB 固體培養基上, 在 37°C 培養。
- 2) 取 40 mL SOB 培養基裝入 125 mL 已滅過菌之三角瓶 (請記得加入 Mg^{2+})。另取 1 mL SOB 加於微量離心管中。由 SOB 固體培養基上選 4~6 個約 2~3 mm 大小的單一菌落接入 1 mL SOB 中, 震盪將菌體打散後, 加入 40 mL SOB 中, 於 37°C 震盪培養約 2~3 h, 直至細胞數約為 $4\sim7\times10^7$ /mL。可於接菌 2 h 後每隔 20~30 min 測 A_{600} 估計。
◆ 請由前面實驗 (1.3.3 節) 所作的生長曲線決定之。
- 3) 收集菌液於離心管中, 置冰浴中 10~15 min。
- 4) 以 750~1,000 g 離心 12~15 min (4°C)。
- 5) 倒去上清, 並盡量將液體倒乾, 或以微量吸管頭吸乾淨。
- 6) 沉澱加入 1/3 菌液體積冰冷的 0.1 M $CaCl_2$, 稍加震盪, 混合均勻, 置冰浴中 10~15 min。
- 7) 同上 4), 5) 之操作。再重複 6), 4), 5) 之操作, 以使反應更完全, 增加成功率。
- 8) 加入 1/25 菌液體積冰冷的 0.1 M $CaCl_2$, 稍加震盪使混合均勻。
◆ Competent cells 製備完成!
- 9) DNA 樣品 (<10 μ L) 先裝於微量離心管中, 置冰浴中預冷, 另取一微量離心管, 標上 #0, 不加入任何 DNA (作為 negative control), 亦置冰浴中預冷。每個樣品加入 200 μ L 菌液, 震盪混合後, 置冰浴中 20~40 min。
- 10) 42°C 加熱 90 s (溫度及時間均需很準確, 請事先檢查水浴鍋的溫度, 不可超過 42°C)。
◆ Heat shock!
- 11) 置冰浴中 2 min。
- 12) 加入 800 μ L SOC, 混合後, 於 37°C 震盪培養 30~60 min。
- 13) 將各管轉形液上下搖動混合均勻後。#5 取 20 μ L 至另一離心管中, 加入 180 μ L SOC (稀釋 10 倍), 混合均勻後, 塗佈於 SOC/Amp plate。#0, #1~#4 各取 200 μ L 塗抹在 SOC/Amp plate。剩餘菌液以 6,000 rpm 離心 1 min, 倒去上清, 沉澱加入 200 μ L SOC, 均勻打散後塗抹在另一個 SOC/Amp plate 上。
- 14) 待培養基表面之菌液完全被吸收後, 倒置培養皿於 37°C 培養 16~20 h 後, 觀

察各個 plate 上菌落的形狀並計算菌落數。

註解討論：

- 每 10 mL 培養液可供 2 個轉形反應。
- 轉形菌液若未全部塗佈於培養基，剩餘菌液以 6,000 rpm 離心 1 min，倒去上清，沉澱加入 1 mL SOC，均勻打散，再以同轉速離心 1 min，倒去上清，再加入 1 mL SOC，打散沉澱，置 4°C 貯存。長久貯存，則需加入甘油至濃度為 20%，以液態氮快速凍結後置 -70°C 貯存。
- 0.1 M CaCl_2 亦可以 Hanahan (1985) 所提之轉形緩衝液 (100 mM KCl, 45 mM MnCl_2 , 10 mM CaCl_2 , 3 mM HACoCl_3 , 10 mM K-MES, pH 6.3) 取代，對部分菌株可得較高之轉形效率 (transformation frequency)，請參考文獻所列步驟。
(HACoCl_3 : hexamine cobalt trichloride)
- 接合反應 (2.5) 與質體轉形都必須同時作控制組，以得知各步驟的效率。在接合反應樣品中的第 4 管 (#4, Vector : Insert = 1:0) 為接合反應的 postive control，第 5 管 (#5, uncut pQE31) 則為轉形反應的 postive control。

2.6.2 電穿孔法 (electroporation)

儀器用具：

37°C 培養箱及冰浴

Electroporation cuvette (electrode gap, 0.1 cm)

Electroporator (Bio-Rad, IBI geneZapper 或其它廠牌)

藥品試劑：

無菌水 (置冰浴中)

10% glycerol (置冰浴中)

SOB 液體培養基

SOB 固體培養基

SOC 液體培養基

SOC/Amp 固體培養基

大腸桿菌 JM109

Ligation mixtures

方法步驟：

菌體的處理：

- 進行轉形實驗的前 16~20 h，將菌種 JM109 接種在 SOB 固體培養基上，並在 37°C 培養箱中培養。
- 取 80 mL SOB 培養基裝入 250 mL 滅過菌之三角瓶。另取 1 mL SOB 加於微量離心管中。由 SOB 固體培養基上選 8 個約 2~3 mm 大小的單一菌落接入 1

mL SOB中，震盪將菌體打散後，加入 80 mL SOB中，於 37°C 震盪培養約 2~3 h，直至細胞數約為 $4\sim7\times 10^7/\text{mL}$ 。

- 3) 收集菌液於離心管中，置冰浴中 10 min。
- 4) 以 750~1,000 g 離心 12~15 min (4°C)。
- 5) 倒去上清，並盡量將液體倒乾，或以微量吸管頭吸乾淨。
- 6) 沉澱加入 80 mL 冰冷之無菌水，稍加震盪，混合均勻後以 750~1,000 g 離心 12~15 min (4°C)。
- 7) 倒去上清，菌體再依序以 40 mL 及 1.6 mL 無菌水同法處理。
- 8) 菌體以 0.16 mL 冰冷之 10% glycerol 懸濁。
- 9) 菌液每 80 μL 分裝一管，可直接用於 electroporation，或以液態氮或乾冰快速凍結後置 -70°C 貯存。

Electroporation：

- 1) 進行 electroporation 的 DNA 樣品溶液中離子強度不可過高，DNA 需先經過透析或以酒精沉澱處理。透析可如 2.3.1 節步驟 15) 進行。
- 2) Cuvettes 自包裝中取出後，置冰浴中至少 5 min。
- 3) 將菌液置於冰浴中，加入 DNA 樣品，混合後，小心將溶液吸至 cuvette 之凹槽中，將 cuvette 置冰浴中。
- 4) 進行 electroporation 時，將 cuvette 由冰浴中取出，將四週水份擦乾，置於反應槽中，並接上電極線。
- 5) 以 2.5 kV, 21 μF 進行 electroporation。
◆ 注意！高電壓！
- 6) 取出 cuvette，立即加入 1 mL SOC。
- 7) 吸出菌液移至微量離心管中，於 37°C 震盪培養 45 min。
- 8) 取 200 μL 菌液塗佈於 SOC/Amp plate。置 37°C 培養 16~20 h。
- 9) 觀察 plate 上菌落的形狀並計算菌落數。

2.7 重組質體的檢定

檢定載體上是否接上外來的 DNA 片段，常因質體不同而有不同方法，一般常利用外來 DNA 片段的插入導致載體某表現型的喪失 (insertional inactivation) 來作為篩選的依據；或者可利用插入的 DNA 上帶有宿主所缺少的表現型進行篩選。若載體與插入 DNA 皆無適當的篩選依據，則可將菌落中的質體抽出後，以限制酶作用後進行電泳分析。而我們實驗中所用的質體 pQE31，並沒有簡易快速篩選重組質體的方法可用，因此需要利用 GUS 之抗體進行 colony hybridization，尋找可表現出 GUS 之轉形株 (2.7.1)；或在培養基中加入 GUS 之基質，轉形株若可表現出 GUS，則可將基質分解使菌落呈現藍色 (2.7.2)；或以質體快速抽取法，篩選帶有正確分子量質體的轉形株 (2.7.3)。三種方法都請同學練習，得到的正反應株均必須再抽取質體進行限制酶分析，以進一步確認質體之正確性 (2.7.4)。

2.7.1 Colony hybridization

前一天進行轉形得到的各轉形株，以 nitrocellulose 濾膜覆蓋菌落後再掀起，可使菌落附著在濾膜上。將濾膜移置含有 IPTG 的培養基上，利用 IPTG 進入菌體後，可與 *lac repressor* 結合，使 *lac repressor* 不會結合在 pQE31 質體上的 *lacO* 序列，則其上游之 T5 promoter 可啟動進行其下游基因的轉錄，合成出之 mRNA 可再經轉譯而表現出蛋白質。若轉形株帶有的質體為接合了 *gus* 基因的重組質體，則應可在 IPTG 的誘導表現條件下表現出 GUS 蛋白質。將經誘導表現後的菌落溶菌後，菌體所釋出的蛋白質可被固定在 nitrocellulose 紙上，則可以 GUS 之抗體進行免疫偵測，尋找可以表現 GUS 的菌落。

儀器用具：

平端鑷子

玻璃乾燥器 (desiccator)，裡面放置一杯 chloroform，蓋緊蓋子，使其內充滿 chloroform 蒸氣。

藥品試劑：

Nitrocellulose 濾膜

LB/Amp/IPTG plate (LB plate 添加 100 µg/mL ampicillin, 0.2 M IPTG)

Chloroform

Lysis buffer:

100 mM Tris-HCl, pH 7.8; 150 mM NaCl; 5 mM MgCl₂; 1.5% bovine serum albumin (或 0.25% gelatin); 1 µg/mL DNase I; 40 µg/mL lysozyme

明膠 NET 液：

50 mM Tris-HCl, 0.25% gelatin; 0.15 M NaCl; 5 mM EDTA; 0.05% Tween-20, pH 8.0

PBS：10 mM Na phosphate, pH 7.0; 0.15 M NaCl

PBST : 10 mM Na phosphate, pH 7.0; 0.15 M NaCl; 0.05% Tween 20

一次抗體 : Anti-GUS antibody

二次抗體 : Goat anti-mouse IgG, HRP-conjugated

DAB 呈色液 :

Diaminobenzidine (DAB) 5 mg溶於PBS中，調體積至 100 mL，加入 10 μ L H_2O_2 。使用前新鮮配製。

方法步驟：

- 1) 前一天轉形的培養皿，當菌落長至約 0.5 mm 大小時，將培養皿移至 4°C 放置 1 h。
- 2) 準備一張無菌的硝化纖維濾膜，以鉛筆在邊緣標上組別。
◆ 請戴手套後再拿取濾膜！
- 3) 打開培養皿蓋子，以兩支扁平鑷子將濾膜兩邊夾住，輕輕覆蓋在菌落上方，儘可能避免有氣泡產生。
◆ 注意！濾膜覆蓋上去後就不要再移動！
- 4) 等濾膜完全溼透後，以針頭在濾膜邊緣戳洞做記號 (至少做三個記號)。小心把濾膜掀起，菌落朝上放置在 LB/Amp/IPTG plate 上。蓋上蓋子，在 37°C 培養 2~4 h，以誘導啟動 T5 promoter，表現其下游基因。原培養皿則置回 37°C 使菌落再長出。
- 5) 將培養皿蓋子打開，培養皿移至充滿 chloroform 蒸氣的乾燥器中，置放 30 min。
- 6) 取一個空 petri dish 或適當大小容器，加入 20 mL lysis buffer。把已經過 chloroform 溶菌之濾膜浸入 lysis buffer，在室溫搖盪 30 min。
- 7) 將濾膜以 PBS 浸洗搖盪 10 min，再更換 PBS 繼續浸洗 10 min。
- 8) 將濾膜浸於明膠 NET 溶液中，室溫搖盪 1 h。
- 9) 濾膜以 PBST 浸洗兩次，每次 10 min。
- 10) 一次抗體以明膠 NET 溶液適當稀釋，再將濾膜浸入，於室溫搖盪 1 h。
- 11) 濾膜以 PBST 浸洗兩次，繼以 PBS 浸洗一次，每次 10 min。
- 12) 將濾膜置於二次抗體溶液中 (以明膠 NET 稀釋)，於室溫搖盪 1 h。
- 13) 濾膜以 PBST 浸洗兩次，繼以 PBS 浸洗一次，每次 10 min。
- 14) 以 DAB 溶液進行呈色反應。觀察呈色情形，當訊號可明顯與背景區別時，將濾膜以水浸洗數次，以中止呈色反應。
- 15) 將濾膜置於濾紙或吸水紙上乾燥後與原培養皿對照，標出有正反應的菌落位置。濾膜以膠膜護貝，避光貯存。
- 16) 選取數個正反應菌落，以劃單一菌落的方式分別接種在 LB/Amp plate 上，置 37°C 培養直至菌落長出。亦同時接種於 3 mL LB/Amp 培養液，於 37°C 震盪培養過夜，以抽取質體，進行限制酶分析。

注解討論：

- a. 前一天進行轉形後，為何不直接將菌液塗抹在含有 IPTG 的培養基？
- b. *gus* 基因原本就存在 *E. coli* 中，難道宿主菌株不會產生 GUS？

2.7.2 Histochemical detection

操作原理與 colony hybridization 相同，但是將濾膜移置於含有 IPTG 及 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-glucuronide (X-Gluc) 的培養基。X-Gluc 可被 GUS 作用而釋出藍色的產物，若轉型株所帶的質體接有 *gus* 基因的重組質體，則應可在 IPTG 的誘導條件下表現出蛋白質，若此重組蛋白質具有 GUS 活性，可將進入菌體的 X-Gluc 分解而使菌落呈藍色。

儀器用具：

平端鑷子

藥品試劑：

Nitrocellulose 濾膜

LB/Amp/IPTG/X-Gluc plate (LB plate 添加 100 μ g/mL ampicillin, 0.2 M IPTG, 50 μ g/mL X-Gluc)

方法步驟：

- 1) 前一天進行轉形的培養皿，當菌落長至約 0.5 mm 大小時，將培養皿移至 4 °C 放置至少 1 h。
- 2) 準備一張無菌的硝化纖維濾膜，以鉛筆在邊緣標上組別。
◆ 請戴手套後再拿取濾膜！
- 3) 打開培養皿蓋子，以兩支扁平鑷子將濾膜兩邊夾住，輕輕覆蓋在菌落上方，儘可能避免有氣泡產生。
◆ 注意！濾膜覆蓋上去後就不要再移動！
- 4) 等濾膜完全溼透後，以針頭在濾膜邊緣戳洞做記號 (至少做三個記號)。小心把濾膜掀起，菌落朝上放置在 LB/Amp/IPTG/X-Gluc plate 上。蓋上蓋子，在 37°C 培養，若轉型株帶有接上 *gus* 的質體，菌落應在 1~2 h 內轉呈藍色。原培養皿則置回 37°C 使菌落再長出。
- 5) 將濾膜與原培養皿對照，標出有藍色菌落位置。選取數個菌落，以劃單一菌落的方式分別接種在 LB/Amp/plate 上，置 37°C 直至菌落長出。亦同時接種於 3 mL LB/Amp 培養液，於 37°C 震盪培養過夜，以抽取質體，進行限制酶分析。

注解討論：

- a. 前一天進行轉形後，為什麼不直接將菌液塗抹在含有 IPTG 及 X-Gluc 的培養基中？
- b. *gus* 基因原本就存在 *E. coli* 中，難道宿主菌株不會產生 GUS？

2.7.3 質體快速檢定法

這個方法是以 phenol 及 chloroform 溶菌後直接進行電泳分析，並未將質體 DNA 與宿主細菌染色體 DNA 分離，得到的 DNA 也不能用限制酶作用。但因其快速簡便，所以可藉之於短時間內檢定大量轉形株中質體 DNA 的相對分子量，以初步篩選帶有重組質體的轉形株。

藥品試劑：

LB/Amp plates (LB plate 添加 100 µg/mL ampicillin)

1×NET (20 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl; 0.1 mM EDTA, pH 8.0)

PCI (25:24:1)

RNase A (1 mg/mL)

1% agarose gel

方法步驟：

- 1) 由前一天轉形所得的轉形株中，挑選 12~24 個單一菌落，在 LB/Amp plate 上劃數道短的橫線或斜線，同時也須要接種帶有載體 pQE31 之菌株，於 37 °C 培養過夜或直至菌體長出。
- 2) 以接種環將菌體刮下，懸濁在 30 µL 1×NET 中，震盪混合均勻。
◆ 不要忘了 pQE31/JM109 !
- 3) 加入 30 µL PCI，劇烈震盪。
- 4) 以 12,000 rpm 離心 3 min (室溫)。
- 5) 將上層液吸至另一支乾淨離心管，加 1 µL RNase A 及 3 µL 10×追蹤染劑，以 50 V 進行電泳分析。由於樣品中有細菌染色體 DNA，所以在加入樣品槽時需十分小心，否則 DNA 極易流失在電泳緩衝液中。電泳後，可由質體 DNA 的泳動率知其相對分子量大小。
- 6) 選取帶有質體分子量大於 pQE31 之菌落，接種於 3 mL LB/Amp 液體培養基，於 37°C 震盪培養過夜，以抽取質體，進行限制酶分析。

2.7.4 重組質體之檢定

2.7.4.1 重組質體之限制酶分析

儀器用具：

微量離心機

冰浴

Mupid II 迷你電泳槽及鑄膠器

UV transilluminator 及影像分析系統

防護面罩

藥品試劑：

如 2.1 節所列各試劑

限制酶：*Bam*HI, *Hind*III (20 U/ μ L, BioLabs)

10 $\times$ NE Buffer *Bam*HI (0.1 M Tris-HCl, pH 7.9; 0.1 M MgCl₂; 1.5 M NaCl; 10 mM dithiothreitol)

100 $\times$ BSA (10 mg/mL bovine serum albumin) 使用前稀釋十倍成 10 $\times$ 無菌水

方法步驟：

- 1) 由 2.7.1、2.7.2 或 2.7.3 中得到的正反應株，接種於 3 mL LB/Amp 培養基，於 37 $^{\circ}$ C 震盪培養過夜後，以 2.1 之方法抽取質體。
- 2) 每一株每反應各取 3 μ L 質體，另取 pQE31 及 pBlueGus 每反應各 3 μ L，分別依下表進行 *Hind*III 及 *Bam*HI 切割。
- 3) 以 1% agarose gel 進行電泳分析，由電泳圖譜挑選帶有 *gus* DNA 片段之重組質體。

◆ 照相後之電泳膠片不要丟掉，可繼續進行 Southern 轉印。

限制酶分析請依照下列表格加入：

編號	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
質體	pBlueGus (3 μ L)	pQE31 (3 μ L)			正反應株 1 (3 μ L)			正反應株 2 (3 μ L)			正反應株 3 (3 μ L)			正反應株 4 (3 μ L)		
dH ₂ O	11	13	12	11	13	12	11	13	12	11	13	12	11	13	12	11
10 $\times$ Buf	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
10 $\times$ BSA	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
<i>Hind</i> III	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1
<i>Bam</i> HI	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1

各管置請於 37 $^{\circ}$ C 反應至少 1 h。

2.7.4.2 Southern 轉印分析

在膠體中的 DNA 可利用毛細現象的作用將 DNA 牽引轉印至覆蓋在膠片上的濾膜，經烘烤或 UV 照射後，可使 DNA 固定在膜上，以進行探針之雜合 (hybridization) 反應。

儀器用具：

玻璃缸

玻璃板或吸水海綿

Crosslinker (Stratalinker 1800, Stratagene)

藥品試劑：

10 $\times$ SSC (1.5 M NaCl; 0.15 M sodium citrate) 或 20 $\times$ SSC

變性溶液 (1.5 M NaCl; 0.5 N NaOH)

中和溶液 (1 M Tris-Cl; 1.5 M NaCl, pH 7.5)

Nylon membrane 尼龍膜

Whatman 3MM 濾紙

吸水紙

方法步驟：

- 1) 電泳之洋菜膠片，浸於 0.25 N HCl 中 15 min (當 DNA 分子量不大時，可省去此步驟)；以無菌水潤洗膠片後，將膠片置於變性溶液中，於室溫緩慢震盪 15 min，更換新的變性溶液後再處理 15 min。
- 2) 以無菌水潤洗膠片，再以中和溶液浸泡 30 min，其間更換一次。
- 3) 戴手套將尼龍膜剪裁成膠體大小，在角落剪一缺口作記號。另裁剪數張較膠片稍小之 3MM 濾紙。
- 4) 取一玻璃缸，加入 10×SSC。將一塊長形玻璃板架在缸上，裁剪一張長形 3MM 濾紙，寬度須略大於膠片，將濾紙置於玻璃板上，使濾紙兩端順著玻璃板垂入缸內溶液中。加一些 10×SSC 於濾紙上使其溼透，並趕掉濾紙與玻璃板間的氣泡。
 ◆ 若有 3~5 cm 厚的乾淨海綿，則可取代玻璃板。可將海綿置於缸中，加入 10×SSC，但不可淹過海綿。海綿濕透後，其上放一張比膠片大的 3MM 濾紙，要趕掉濾紙與海綿間的氣泡。
- 5) 將處理過的膠片置於濾紙上，趕掉氣泡，小心將尼龍膜蓋在膠片上，不要有氣泡產生。再依序蓋上兩張以 10×SSC 浸溼的濾紙及兩張乾的濾紙，並以保鮮膜將膠片四週封住。最後覆蓋一疊吸水紙，上面放一塊玻璃板或塑膠板，以重物壓住即可 (圖 3.2)。在室溫下靜置過夜。
- 6) 轉印後，小心移去重物、吸水紙、3MM 濾紙等，在尼龍膜相對於樣品槽的位置作記號。將尼龍膜掀開，與膠片接觸面朝上，置於 10×SSC 中緩慢震盪 5 min，以洗去附著在膜上的洋菜膠。轉印後的膠片可再以 EtBr 染色，視是否轉印完全。
- 7) 將尼龍膜置於乾淨的濾紙上 (與膠片接觸面朝上)，移至 UV crosslinker 中，進行 crosslinking 以將 DNA 固定在膜上。
- 8) 乾燥後的尼龍膜即可進行雜合。若不立即進行雜合，可將尼龍膜夾於兩張濾紙間，置於乾燥箱中存放。雜合探針的製備與雜合反應將於 3.2.1 及 3.3.2 節中進行。

參考文獻：

- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith, JA, Struhl K (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Vol 1. John Wiley & Sons, Inc, New York
- Birnboim HC (1983) A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. Meth Enzymol **100**: 243~255
- Burton ZF, Kaguni JM (1997) Experiments in Molecular Biology: Biochemical Applications. Academic Press, New York
- Cohen SN, Chang ACY, Hsu L (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. Proc Natl Acad Sci USA **69**: 2110
- Hanahan D (1985) Techniques for transformation of *E. coli*. In DM Glover ed, DNA Cloning, Vol 1. IRL Press, Oxford, pp 109~135
- Hardin C, Presutti D, Miller W, Robertson D (1996) Nucleic Acids, Cloning and Protein Purification: A Laboratory Manual. Simon & Schuster Custom Publishing
- Jefferson RA Burgess SM, Hirsh D (1986) β -Glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. Proc Natl Acad Sci USA **83**: 8447~8451
- Micklos DA, Freyer GA (2003) DNA Science: A First Course, 2nd ed.. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- QIAquick Spin Handbook (2002) Qiagen
- Sambrook J, Russell DW (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd ed, Vol 1 & 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Shigekawa K, Dower WJ (1988) Electroporation of eukaryotes and prokaryotes: A general approach to the introduction of macromolecules into cells. Biotechniques **6**: 742~751
- Southern EM (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J Mol Biol **98**: 503~517
- Vogelstein B, Gillespie D (1979) Preparative and analytical purification of DNA from agarose. Proc Natl Acad Sci USA **76**: 615~619
- Wilson KJ, Jefferson RA, Hughes SG (1992) The *Escherichia coli gus* operon: Induction and Expression of the *gus* operon in *E. coli* and the occurrence and use of GUS in other bacteria. In SR Gallagher ed, GUS Protocols: Using the GUS Gene as a Reporter of Gene Expression. Academic Press, New York, pp 7~22
- The QIAexpressionist: A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins (1997) Qiagen

第三章 北方雜合分析

台灣大學植物病理與微生物學系 劉瑞芬

基因表現的第一步是由RNA polymerase以轉錄反應合成出mRNA。由於mRNA是細胞內不同基因之轉錄產物，其序列與大小不一，存在量也受嚴格調控，一般約佔細胞內全部RNA的1~5%；其餘RNA分屬於rRNA(約佔80~85%)及tRNA，在真核細胞還有small nuclear RNA(snRNA)、small nucleolar RNA(snoRNA)、與small cytoplasmic RNA(scRNA)等，它們分別以RNA的型式直接參與細胞內特定功能之執行，包括蛋白質轉譯(rRNA與tRNA)、mRNA splicing(snRNA)與rRNA processing(snoRNA)等。因為轉錄反應是基因表現的重要調控點，在分析特定基因之表現情形時，勢必得先了解其mRNA的基本性質，包括長度及表現量多寡，常見之RNA分析方法包括北方雜合分析(Northern hybridization analysis)、RNase protection analysis(RPA)與real-time quantitative reverse transcriptase PCR(real-time quantitative RT-PCR)等。本章所介紹的北方雜合分析是進行mRNA分析時最常用之基礎方法；在進行北方雜合反應時，製備好之RNA以變性洋菜膠體(denaturing agarose gel)進行電泳分析後，立刻以毛細管轉印法(capillary transfer)或其他方法轉印於尼龍膜上，再以特定核酸探針進行雜合分析，即可偵測目標mRNA的長度及存在量。在下面實驗，我們一方面將以質體pBlueGus進行胞外轉錄反應(*in vitro* transcription)，製備GUS基因的正意股(sense)與反意股(antisense) RNA。另外，要自大腸桿菌pQG11/M15[pREP4]純化total RNA，以便以北方雜合反應分析在IPTG誘導情況下，表現質體pQG11所攜帶GUS基因的表現情形。實驗流程如圖3.1所示。

3.1 RNA 製備

自細胞抽取RNA的步驟主要包括打破細胞、以特定方法移除細胞內的蛋白質和DNA、及將RNA沉澱出來。一般用於打破細胞的方法包括在低溫下以研鉢研磨，或應用均質機將細胞打破等，將蛋白質與DNA移除的方法則包括酵解、有機溶劑萃取、酒精沉澱及氯化銨梯度離心等。不論採用哪一種方法，最需費心者莫過於RNase的問題。由於RNase會降解RNA，在RNA製備過程中，能否充分避開RNase的作用便成了決定RNA品質好壞的關鍵因子。要解決這個問題，首先得注意的是存在於外在環境的RNase，務求所有實驗器皿都是RNase-free，因此電泳槽、玻璃及塑膠器皿、反應所需之溶液及二次水等，都必須依循一定步驟預先確實處理，實驗操作者也必須隨時帶手套(Sambrook and Russell, 2001; Ausubel et al., 2005)。另一個問題則是細胞內原本就有的RNase活性；為解決這部份的問題，應在收集到生物材料之後立刻進行RNA的製備工作。若須暫時儲存，則應以液態氮將生物材料急速冷凍後，儲存於-80°C冷凍櫃；當進行RNA製備時，一旦取出儲存於冷凍櫃的材料，應立即以液態

氮研磨的方式打破細胞，並適時加入RNA萃取緩衝液，以避免RNase作用。一般RNA萃取緩衝液都含有特定的RNase抑制劑，例如diethylpyrocarbonate (DEPC), guanidium thiocyanate (GTC) 或vanadyl-ribonucleoside complexes等，以便在細胞被打破的剎那，即時抑制細胞裏的RNase。由於某些RNase抑制劑會抑制特定的反應，例如*in vitro* translation等，在選用RNA製備方法時，應先弄清楚所使用的RNase抑制劑會不會影響到後續反應，以免功虧一簣。

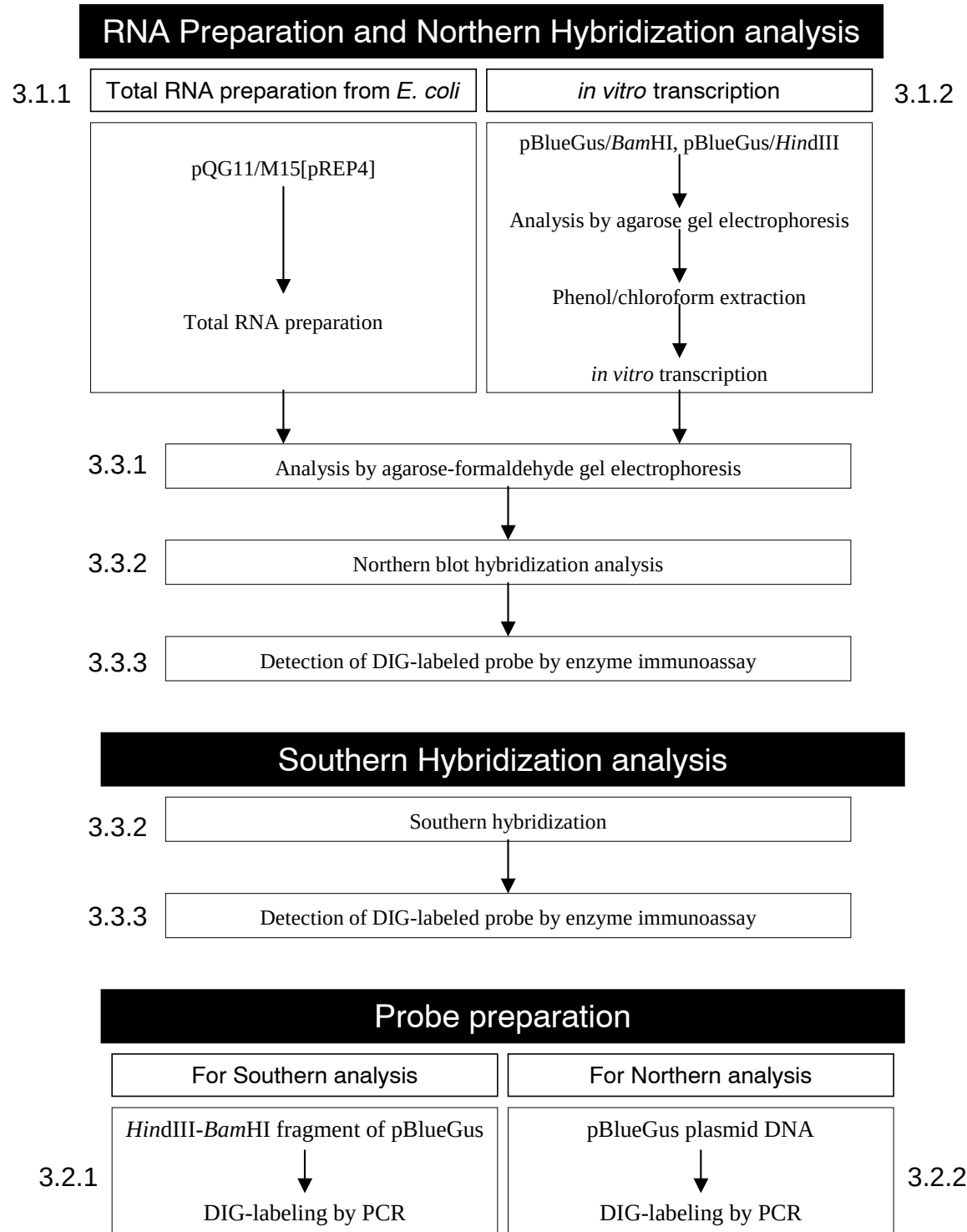


圖 3.1 北方雜合分析實驗操作流程

3.1.1 自大腸桿菌抽取 RNA

之前各組成員已分別構築出 GUS 基因之表現質體 pQG11，若要令啟動子 T5 promoter 之啟動受到更好的調控，應進一步將 pQG11 轉形至大腸桿菌 M15[pREP4]。M15[pREP4] 可持續表現 *lac* repressor，pQG11 上用以驅動 GUS 基因表現之 T5 promoter 的活性將因而受到抑制，但一旦加入 IPTG 就能誘導 GUS 基因大量表現。在這一節的實驗裏，我們將分別自經 IPTG 誘導與未經誘導之 pQG11/M15[pREP4] 菌體抽取 total RNA，以便以北方雜合反應分析 GUS mRNA 之表現情形。下面所採用的方法適用於大腸桿菌及其他革蘭氏陰性菌 total RNA 之抽取，實驗進行時先以 lysozyme 分解細胞壁，再以 sodium dodecyl sulfate (SDS) 裂解原生質膜 (Summers, 1970; Ausubel et al., 2005)；之後加入適量的氯化鈉溶液將 SDS、蛋白質及大腸桿菌的染色體 DNA 一併沉澱下來，並以離心法移除，存留於上清液的 RNA 則以酒精沉澱。實驗過程所使用的 RNase 抑制劑為 DEPC。

儀器用具：

恆溫震盪培養箱 37°C
冰浴
微量離心機
分光光度計 (Hitachi U-1100 spectrophotometer)

藥品試劑：

大腸桿菌菌株 pQG11/M15[pREP4]
LB 培養液
Ampicillin (100 mg/mL)
Kanamycin (25 mg/mL)
IPTG (1 M)
Protoplasting buffer (15 mM Tris-HCl, pH 8.0; 0.45 M sucrose; 8 mM EDTA, stored at 4°C)
Lysozyme (50 mg/mL)
Gram-negative lysing buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 10 mM NaCl; 1 mM sodium citrate; 1.5% SDS)
Diethylpyrocarbonate (DEPC)
飽和氯化鈉溶液 (以 40 g 氯化鈉溶解於 100 mL dH₂O/DEPC)
絕對酒精及 70%酒精

方法步驟：

大腸桿菌 pQG11/M15[pREP4] 之培養：

- 1) 將 pQG11/M15[pREP4] 接種於 2 mL 含 ampicillin (100 µg/mL) 及 kanamycin (25 µg/mL) 之 LB 培養液，於 37°C 震盪培養過夜。

- 2) 隔日早晨，取 0.5 mL pQG11/M15[pREP4] 過夜培養液，加入 25 mL 含有 ampicillin (100 μ g/mL) 與 kanamycin (25 μ g/mL) 之 LB 培養液，於 37°C 震盪培養 2 h。
- 3) 加入 25 μ L 1 M IPTG，繼續放置於 37°C 震盪培養。
- 4) 經過 4 h 後，取出 pQG11/M15[pREP4] 培養液，開始進行 RNA 製備工作。

製備 RNA：

◆ 注意！ 進行以下 RNA 製備實驗時，除了使用依上述步驟所準備的 pQG11/M15[pREP4] 培養液外，請記得向助教領取未經 IPTG 誘導之 pQG11/M15[pREP4] 培養液當做對照組。

- 1) 取出 4 支 1.5 mL 微量離心管，分別標示為 I-1, I-2, U-1 與 U-2。
- 2) 取 3 mL 經 IPTG 誘導之 pQG11/M15[pREP4] 培養液平均分置於微量離心管 I-1 與 I-2。
- 3) 取 3 mL 未經 IPTG 誘導之 pQG11/M15[pREP4] 培養液平均分置於微量離心管 U-1 與 U-2。
- 4) 以 8,000 rpm (4°C) 離心 5 min，小心倒掉上清液，並以微量吸管盡量吸掉殘留之液體。
- 5) 各加入 0.5 mL protoplasting buffer，以微量吸管將大腸桿菌充分懸浮。
- 6) 再加入 1 mL protoplasting buffer 與 12 μ L 50 mg/mL lysozyme，混合均勻之後，移置於冰浴中作用 15 min。
- 7) 以 7,000 rpm 於 4°C 離心 5 min。
- 8) 小心倒出上清液，並以微量吸管盡量吸掉殘留之液體。
- 9) 各加入 75 μ L gram-negative lysing buffer 及 2 μ L DEPC，以微量吸管小心懸浮沉澱於管底之大腸桿菌原生質體，並離心數秒。
 - ◆ 在以微量吸管懸浮大腸菌原生質體時，一旦 pellet 被充分打散即應停止懸浮動作，以避免大腸菌 DNA 斷裂可能造成的問題。
 - ◆ DEPC 可能是一種致癌物質，使用時請在抽氣櫥內操作。
- 10) 將微量離心管放入 37°C 恆溫水槽作用 5 min。
- 11) 作用完畢之後，將離心管移到冰浴中靜置 5 min。
- 12) 加入 38 μ L 飽和氯化鈉溶液，以手指頭輕彈管壁，充分混合均勻。
- 13) 靜置於冰浴中作用 10 min，此時應有白色沉澱出現。
- 14) 以 13,000 rpm 於 4°C 離心 10 min。
- 15) 將上清液移至新的微量離心管，並加入 0.3 mL 絕對酒精。
- 16) 混合均勻後將離心管放置於 -20°C 過夜，以便沉澱 RNA。
 - ◆ RNA 在酒精內相當穩定，若須長期保存，可停在這一步。

隔天：

- 17) 以 14,000 rpm 於 4°C 離心 15 min。
- 18) 小心倒掉上清液後，加入 300 μ L 70%酒精。
- 19) 以 14,000 rpm 於 4°C 離心 5 min 之後，小心倒掉上清液。

- 20) 將微量離心管倒置於桌面上 30 min，以便風乾 RNA。
- 21) 將RNA溶解於 30 μL dH₂O/DEPC。
- 22) RNA定量：取 5 μL RNA，加入 995 μL dH₂O/DEPC稀釋之後，以分光光度計測其在 260 nm與 280 nm之吸光值(記得使用石英測光管)，並計算RNA之濃度與 A_{260}/A_{280} 之比值。
 - ◆ RNA溶液在 260 nm之吸光值為 1.0 時，則濃度相當於 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，而其 A_{260}/A_{280} 之比值應為 1.7~2.0 (DNA則為 1.8 左右)。
 - ◆ 這四個 RNA 樣本將於後續實驗中，分別以甲醛洋菜膠體電泳進行分析(3.3.1.2)。

註解討論：

- a. RNA 製備過程中為何須要加入 DEPC？DEPC 的作用方式為何？它會 modify RNA 嗎？
- b. 在加入飽和氯化鈉溶液後，所得到的白色沉澱包含那些成份？
- c. 以上述方法所得到的 RNA 沉澱除了 RNA 之外，可能還會包含小量 DNA 與蛋白質，但應不致於干擾到後續要進行的北方雜合反應。

3.1.2 胞外轉錄反應 (*in vitro* transcription)

由於RNA聚合酶一般由數個次單元組合而成，早先要在試管內應用RNA聚合酶的轉錄活性合成RNA並非易事，但這個問題在SP6, T3 及T7 等噬菌體之RNA聚合酶陸續被發現以後，情況已完全改觀。這主要是因為這類RNA聚合酶由一條多胜肽(polypeptides) 所構成，其在進行轉錄反應時所須辨認的啟動子長度僅 20 bp左右，而且轉錄起始位置非常明確，轉錄效能良好，成了目前進行胞外轉錄反應時的最佳選擇。要進行胞外轉錄反應時，僅需將目標基因次選殖(subclone)至帶有SP6, T3 或T7 啟動子的轉錄載體，或者運用PCR技術在基因的一端加上SP6, T3 或T7 啟動子的序列，即可運用對應的RNA聚合酶活性在試管內合成正意股或反意股RNA。以質體DNA為模版進行胞外轉錄反應前，應先用限制酶自目標基因的一端切開，以免轉錄反應持續進行至載體的序列(run-on)，但在選擇限制酶切位時應避免使用目標基因也帶有的切位；限制酶內切好之質體DNA經phenol/chloroform萃取之後，即可用來進行胞外轉錄反應。在下列實驗裏，我們要使用的質體是pBlueGus。

3.1.2.1 質體 DNA 酵解反應與洋菜膠體電泳分析

本實驗以 *Bam*HI 與 *Hind*III 酵解 pBlueGus，並以洋菜電泳分析產物。

儀器用具：

微量離心機
37°C 恆溫水槽

Mupid II 迷你電泳槽及鑄膠器

UV transilluminator

防護面罩

拍立得相機

藥品試劑：

質體 pBlueGus DNA (由助教提供)

限制酶 *Bam*HI 與 *Hind*III (Roche)

10× Reaction buffer 2 (Roche)

10× Reaction buffer 3 (Roche)

Agarose

1×TAE 電泳緩衝液

DNA分子量標記(λ DNA/*Hind*III 或 100 bp ladder, 0.5 μ g/mL)

10×追蹤染劑 (0.25% bromophenol blue; 0.25% xylene cyanol; 0.1 M EDTA;
50% glycerol)

Ethidium bromide (500 μ g/mL)

拍立得 667 底片

方法步驟：

- 1) 取兩支 1.5 mL 微量離心管，分別標示為 #1 與 #2 之後，依下表所列順序，逐一加入酵解反應所需各項物質 (體積單位為 μ L)。

◆ 注意：應等所有成份都加了之後，再加入限制酶。

	#1	#2
	pBlueGus/ <i>Hind</i> III	pBlueGus/ <i>Bam</i> HI
dH ₂ O	7	7
10× Reaction Buffer	Buffer 2 2	Buffer 3 2
pBlueGus DNA	10	10
Restriction enzyme	<i>Hind</i> III 1	<i>Bam</i> HI 1
Total volume	20	20

- 2) 以手指頭輕彈微量離心管，以便均勻混合管中各項物質。
- 3) 離心數秒後，放置於 37°C 恆溫水槽作用 1~2 h。
- 4) 請利用這一段時間參照『基本操作技術』所描述的步驟準備一片 1.2% 洋菜膠體。
- ◆ Ethidium bromide 是強力致癌物質，嚴禁戴著手套到處亂摸！
- 5) 自恆溫水槽取出微量離心管，離心數秒後暫存冰中備用。
- 6) 擬進行電泳分析時，請拿出 3 支 1.5 mL 微量離心管，分別標示為 #1, #2 與 #3，並依下表所示在各離心管逐一加入適量之 DNA 與 10×追蹤染劑 (體積單位為 μ L)。

	#1	#2	#3
	pBlueGus/ <i>Hind</i> III	pBlueGus/ <i>Bam</i> HI	λ DNA/ <i>Hind</i> III
DNA sample	2	2	1
dH ₂ O	7	7	8
10×追蹤染劑	1	1	1
Total volume	10	10	10

7) 把膠片移至電泳槽，注入適量電泳緩衝液，以微量吸管 P20 逐一將樣本吸入注出數次使混合均勻，並小心注入膠片的樣本槽中。

8) 接好電極線以定電壓 100 V 進行電泳，待追蹤染劑移動至膠體三分之二處時，關閉電源，將膠體移至 UV transilluminator box，以拍立得相機拍照。

◆ DNA泳動方向為 (-) 向 (+)。此外，在UV transilluminator box上直接觀察DNA色帶時，沒戴眼鏡的同學應戴上護目鏡或面罩，以避免UV灼傷；含有ethidium bromide之洋菜膠體請丟至專用容器中！

註解討論：

- 請檢視 pBlueGus 的 plasmid map，想想為何要選用 *Bam*HI 與 *Hind*III？可以選用其他切位嗎？
- 如果酵解反應不完全，會對後續的胞外轉錄反應造成什麼影響？

3.1.2.2 以 phenol/chloroform 進行 DNA 萃取

儀器用具：

微量離心機

藥品試劑：

Plasmid DNA 酵解產物： #1 (pBlueGus/*Hind*III), #2 (pBlueGus/*Bam*HI)

Phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1) 以下簡稱為PCI

Chloroform/isoamyl alcohol (24:1) 以下簡稱為CI

3 M NaOAc (醋酸鈉 pH 5.2)

純酒精及 70%酒精

方法步驟：

◆ 注意！ 進行這一部份實驗之前，請先確定 pBlueGus/*Hind*III 與 pBlueGus/*Bam*HI 兩者的酵解反應都已經完全。

- 於酵解反應 #1 與 #2 之微量離心管分別加入 182 μ L 去離子水。
- 以 200 μ L PCI 萃取一次，亦即加入 PCI 後，以 Vortex 震盪混合，並在室溫離心 3 min。
- 以微量吸管 P200 將上層液移至新的微量離心管。
- 加入等體積之 CI，以 Vortex 充分震盪混合，並在室溫離心 3 min。
- 以微量吸管 P200 將上層液移至新的微量離心管。
- 加入 0.1 倍體積之 3 M NaOAc (pH 5.2) 及 2.5 倍體積絕對酒精。
- 置於 -20°C 過夜，或於 -80°C 放置 30 min，以便沈澱DNA。

隔天：

- 1) 自冷凍櫃取出微量離心管，以 14,000 rpm 離心 10 min。
 - ◆ 注意：請利用這一段時間參照『基本操作技術』所描述的步驟準備一片 1.2% 洋菜膠體。Ethidium bromide 是一種強力致癌物質，嚴禁戴著手套到處亂摸！
- 2) 小心地倒出上清液。
- 3) 徐徐加入 0.5 mL 之 70% 酒精 (預先放在 -20°C 預冷)。小心不要動到 DNA 沉澱。
- 4) 以 14,000 rpm 低溫離心 5 min 之後，倒去上清液，並將微量離心管倒置於一張乾淨的衛生紙上 30 min，以便風乾 DNA。
 - ◆ 也可以用 SpeedVac 乾燥 DNA，但應小心處理，以免 DNA 沉澱不見了。
- 5) 以 10 μ L dH₂O/DEPC 溶解 DNA。
- 6) 依照下表，自 pBlueGus/BamHI 與 pBlueGus/HindIII 各取 1 μ L DNA 以洋菜膠體電泳進行分析，並估算其濃度。
 - ◆ DNA 濃度之估算請以 λ DNA/HindIII 量為參考值。

	#1	#2	#3	#4
	pBlueGus /HindIII	pBlueGus /BamHI	λ DNA /HindIII	λ DNA /HindIII
DNA sample	1	1	1	2
dH ₂ O	8	8	8	7
10 $\times$ 追蹤染劑	1	1	1	1
Total volume	10	10	10	10

註解討論：

- a. 模版 DNA 是否夠乾淨是胞外轉錄反應能否成功的重要因子。

3.1.2.3 胞外轉錄反應

儀器用具：

微量離心機

藥品試劑：

Plasmid DNA 酵解產物 pBlueGus/HindIII 及 pBlueGus/BamHI

5 $\times$ Transcription buffer (200 mM Tris-Cl, pH 8.0; 40 mM MgCl₂; 10 mM spermidine-(HCl)₃; 125 mM NaCl; Roche)

NTPs (含 ATP, CTP, GTP 及 UTP 各 2.5 mM)

RNase 抑制劑 RNasin (40 U/ μ L)

T7 與 T3 RNA polymerase (Roche)

dH₂O/DEPC

100 mM DTT (dithiothreitol)

DNase (RNase-free)

Phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1), 以下簡稱 PCI

Chloroform/isoamyl alcohol (24:1), 以下簡稱 CI

方法步驟：

◆ 注意：進行下列實驗時，請務必戴手套！

- 1) 取 4 支 1.5 mL 微量離心管，分別標示 #1, #2, #3 與 #4，再依下表依序在 #1 與 #2 加入胞外轉錄反應所需各項試劑 (單位 μL)：

Rxs	Gus#1 (pBlueGus/HindIII)	Gus#2 (pBlueGus/BamHI)
dH ₂ O/DEPC	25 - x	25 - x
Plasmid DNA	x (up to 2 μg)	x (up to 2 μg)
5 $\times$ transcription buffer	10	10
NTP (2.5 mM each)	10	10
RNasin (40 U/ μL)	1	1
DTT (100 mM)	2.5	2.5
RNA polymerase (50 U/ μL)	T3 RNA polymerase 1.5	T7 RNA polymerase 1.5
Total volume	50	50

◆ 注意：在逐一加入各項反應試劑時，微量離心管維持於室溫即可，以免在低溫時，DNA 遇到轉錄緩衝液所含 spermidine 產生沈澱。

- 2) 以手指頭輕彈離心管壁使混合均勻，離心數秒後放置於 37°C 恆溫水槽作用 1 h。
- 3) 反應結束時，自 #1 與 #2 分別取出 4 μL 反應物，放到微量離心管 #3 與 #4 中，將 #3 與 #4 存放於 -20°C 冷凍櫃中。
- 4) 取 1 μL DNase 加到 #1 與 #2，混合均勻後放置於 37°C 作用 15 min，以便去除 DNA 模版。
- 5) 反應結束後，加入 53 μL dH₂O/DEPC，以 100 μL PCI 萃取一次，劇烈震盪後，離心 14,000 rpm 5 min。
- 6) 以微量吸管 P200 將上層液移至一新的微量離心管，下層之 PCI 以 100 μL dH₂O/DEPC 反萃取 (back-extraction) 一次。
- 7) 以微量吸管 P200 將上層液移至步驟 6) 之新離心管。
- 8) 估計兩次上層液聚集之後的總體積，並以等體積之 CI 萃取一次，劇烈震盪後，離心 14,000 rpm 5 min。
- 9) 以微量吸管 P200 將上層液移至一支新的微量離心管，加入 0.1 倍體積之 3 M NaOAc (pH 5.2) 及 2.5 倍體積之絕對酒精。
- 10) 混合均勻，並置於 -20°C 過夜，以便沈澱 RNA。

隔天：

- 1) 自冷凍櫃取出微量離心管，以 14,000 rpm 於 4°C 離心 10 min。
- 2) 仔細移去上清液之後，加入 0.5 mL 70% 酒精。
- 3) 以 14,000 rpm 於 4°C 離心 5 min。

- 4) 去除上清液之後，將微量離心管倒置於一張乾淨的衛生紙上大約 30 min，以便風乾 RNA。
- 5) 以 10 μ L dH₂O/DEPC溶解RNA沈澱。

註解討論：

- a. RNasin是一種RNase抑制劑，一般進行胞外轉錄或轉譯反應 (*in vitro* translation)時，都需添加RNasin，以避免RNA降解的問題。
- b. 以上述胞外轉錄反應所合成出來的 #1 與 #2 RNA 各有多長？
- c. 如何得知 #1 與 #2 RNA 各為 GUS 基因的正意股或反意股 RNA？
- d. 若要以上述胞外轉錄反應製造帶 cap 的 mRNA，可以怎麼進行？

3.2 以 DIG 標定核酸探針

DNA探針一般可以用 ^{32}P , ^{35}S 或非放射性物質如biotin及digoxigenin (DIG) 加以標定；標定時利用DNA聚合酶的活性，在DNA聚合反應中，另加入 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dATP, $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTP或DIG-11-dUTP等標定物質，所合成出來的即是被標定的核酸片段。目前常見的方法包括nick translation, random priming與polymerase chain reaction (PCR) 等。若須對DNA進行end labeling時，可以進行kinase或filling-in reaction。前者以 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP為phosphate donor，利用T4 polynucleotide kinase的活性對帶有5'-OH的DNA進行標定。人工合成的寡核苷酸(oligonucleotides) 5'端為-OH group，可直接用於kinase reaction；一般DNA片段，若5'端帶有phosphate group，最好先經phosphatase處理，再進行kinase reaction。Filling-in reaction是將DNA以特定限制酶切開，露出recessed 3' termini後，利用Klenow的活性把3'端補齊 (filling-in)；因此，只要加入適當的 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dNTP，即可在DNA的3'端進行標定。此外，也可以應用bacteriophage T4 DNA polymerase的3'→5' exonuclease活性製造recessed 3' termini，再進行filling-in。至於正意股或反意股RNA探針，則可以 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ UTP或DIG-11-UTP等為標定物質，應用胞外轉錄反應加以標定。下面要介紹的是目前最常用的方法：random priming及PCR。

3.2.1 Random priming

DNA聚合酶要進行DNA聚合反應時一定要有引子 (primer)，因為它只能以引子所提供的3'-OH為起始點進行延伸 (extension) 的工作，而不能就地重新合成新的DNA (*de novo synthesis*)。一般實驗常以人工合成之寡核苷酸為引子進行DNA聚合反應，這時固然可以根據已知序列設計核酸引子，但也可以採用隨機引子 (random primers)。所謂隨機引子即其序列為隨機序列，不經特別設計，目前應用最廣者是以自動化機器所合成的、六到八個核苷酸長的寡核苷酸混合物；反應進行中若有任何一條隨機引子結合到模版DNA，即可引導DNA聚合反應之進行。以random priming方法進行核酸標定，是以隨機引子引導Klenow fragment (large fragment of *E. coli* DNA polymerase I) 進行DNA聚合反應，並在反應過程中添加 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dNTP或DIG-11-dUTP等標定物質。而為了避免random priming也發生於載體部份的DNA，最好不要直接以質體DNA為模版進行標定反應，而應預先將目標DNA自載體切除出來。

儀器用具：

微量離心機

沸水浴及冰浴

藥品試劑：

模版 DNA (pBlueGus 之 *Bam*HI-*Hind*III DNA 片段，將由助教提供)

0.2 M EDTA, pH 8.0

4 M LiCl

Random priming kit (Roche)：

Hexanucleotide mix (random primer)

dNTP mixture (1 mM dATP, 1 mM dCTP, 1 mM dGTP, 0.65 mM dTTP, 0.35 mM DIG-11-dUTP, pH 7.5)

Klenow enzyme (2 U/ μ L)

絕對酒精

70%酒精

TE (10 mM Tris-Cl, pH 8.0; 1 mM EDTA)

方法步驟：

◆ 以下反應條件與步驟主要參照 random priming kit 製造廠商所提供之產品說明書。

1) 取 100 ng 模版 DNA，加入適量去離子水，把體積補足為 15 μ L。

2) 於沸水中加熱 10 min。

◆ 請記得以夾子固定微量離心管之管蓋部份，以免離心管在加熱過程中蓋子爆開、進水！

3) 加熱後，迅速把微量離心管移至冰浴中，靜置數分鐘。

4) 離心數秒後，依序加入下列三種試劑：

2 μ L hexanucleotide mix

2 μ L dNTP mixture

1 μ L Klenow enzyme

5) 以指頭輕彈離心管，以便混合均勻。

6) 短暫離心後，置於 37°C 恆溫水槽中作用 2 h。

◆ 反應時間至少須要 1 h，最長可反應過夜。

7) 作用完畢之後，加入 2 μ L 之 0.2 M EDTA，以便終止 DNA 聚合反應。

8) 加入 2.5 μ L 4 M LiCl 及 75 μ L 純酒精，混合均勻，置 -20°C 過夜。

隔天：

1) 於 13,000 rpm，4°C 離心 15 min。

2) 倒出上清液，加入 50 μ L 之 70%酒精，再離心 5 min。

3) 倒出上清液並風乾 DNA。

4) 最後以 50 μ L TE 溶解 DNA。

註解討論：

a. 影響標定效率的因子主要包括模版 DNA 的純度、使用量與反應時間；在進行標定反應時，若 DNA 使用量較高 (最高 2 μ g)，或反應時間較長 (最長 20

- h), 可獲得的標定 DNA 量一般比較多。
- b. 標定反應完成後以酒精沉澱標定 DNA, 主要是為了去除 unincorporated nucleotides。由於 unincorporated nucleotides 一般不會影響到後續的南方雜合反應, 酒精沉澱這一步或可省略。但如果所製備的探針是要用於原位雜合反應 (*in situ hybridization*) 時, 最好仍進行酒精沉澱。
- c. 本實驗以 LiCl 取代一般常用的鹽類進行酒精沉澱, 是因為 LiCl 在酒精裡的溶解度比較好, 容易去除。
- d. 不要對 DIG-標定之 DNA 進行 phenol/chloroform 萃取, 因為 DIG 可能會存留在 organic phase。

3.2.2 PCR

PCR是極為重要的DNA增殖技術, 應用層面非常廣, 其中包括了核酸探針之製備。如果一段DNA已經被次選殖至載體上, 要以PCR擴增這段DNA時, 可根據質體multiple cloning sites兩邊的序列, 選用適當的核酸引子(universal primers) 進行擴增反應; 比較常用的引子包括SP6, T3 與T7 promoter primer, M13/pUC forward與reverse primers等; 若有特殊考量, 也可以使用序列專一性核酸引子對。進行PCR反應時若同時添加 [α - 32 P]dNTP或DIG-11-dUTP, 所增殖的DNA即被 32 P或DIG所標定, 所以PCR是製備核酸探針非常便捷好用的方法。

儀器用具：

微量離心機

PCR 反應器

藥品試劑：

模版 DNA： pBlueGus 質體 DNA (~50 pg)

核酸引子對： T3 promoter primer 與 T7 promoter primer (各 2 μ M)

礦物油 (是否需要視PCR反應器機型而定)

PCR DIG probe synthesis kit (Roche), 內含：

Taq DNA polymerase (Expand High Fidelity, 3.5 U/ μ L)

10 $\times$ PCR DIG probe synthesis mix (2 mM dATP, dCTP, dGTP, 1.9 mM dTTP,
及 0.1 mM DIG-11-dUTP, pH 7.0)

Expand high fidelity buffer with MgCl₂ (10 $\times$)

方法步驟：

以下反應條件主要參照 PCR DIG probe synthesis kit 製造廠商所提供之產品說明。

- 1) 取一支 0.5 mL 微量離心管, 依下表逐一加入各項試劑 (單位 μ L)：

Reagents	Volume	Final conc.
dH ₂ O	28.5	-
10×PCR buffer	5	1×
10×PCR DIG mix	5	200 μM dNTP
T3 promoter primer	5	0.2 μM
T7 promoter primer	5	0.2 μM
pBlusGus DNA	1	~50 pg
<i>Taq</i> DNA polymerase	0.5	0.5 U
Total volume	50	

2) 以手指頭輕彈管壁使各項試劑混合均勻。

3) 短暫離心後，徐徐加入 100 μL 礦物油。

◆ 有些 PCR 反應器不需使用礦物油。

4) 在 PCR 反應器上設定 PCR 反應條件：

Denaturation : 94°C/10 min

擴增反應：

30 循環之 [94°C/45 s → 55°C/1 min → 72°C/2 min]

最後之 elongation step : 72°C/10 min

5) 將微量離心管移至反應器上，並開始進行 PCR 反應。

6) 反應完成後，以微量吸管吸出礦物油，並取出 5 μL PCR 反應產物，進行洋菜膠體電泳分析。

註解討論：

- PCR 標定產物所呈現的 molecular mass 應比未標定者大。
- 影響 PCR 反應之因子主要包括哪些？
- 以 PCR 及 random priming 進行標定反應各有哪些優點？

3.3 變性膠體電泳與北方雜合分析

mRNA為單股，一般會捲繞成特定的三級結構，並與某些蛋白質結合，而以messenger ribonucleoprotein particles (mRNPs)的型式存在於細胞內；自細胞抽取RNA時，一般會以特定步驟去除蛋白質，但仍難完全破除RNA的二/三級結構。由於進行電泳分析時，影響核酸泳動速率的因子主要包括核酸之長度與構形 (conformation)，為了去除核酸構形所造成的影響，一般以電泳分析RNA時都採用變性膠體電泳；在進行這一類電泳分析時，由於RNA已經被變性 (denature)，影響其泳動速率的因子主要是長度。一旦RNA以變性膠體電泳解析好，即可進一步進行北方轉印與雜合分析。

3.3.1 變性膠體電泳 (denaturing gel electrophoresis)

在進行RNA變性膠體電泳分析時，如果所要分析的RNA比較小 (<1,000 bases)，可以選用聚丙烯醯胺膠體 (polyacrylamide gel)，此時所使用之變性劑 (denaturing reagent) 主要是尿素 (urea)；這個方法一般也被用來分析核酸定序反應的產物。若所欲分析的RNA分子較大，可採用變性洋菜膠體電泳 (agarose gel electrophoresis)，所使用的變性劑為 (1) glyoxal/dimethyl sulfoxide (DMSO) 或 (2) 甲醛。以glyoxal/DMSO系統進行電泳分析時，所使用之電泳緩衝液為 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0)；為了避免電泳進行過程中，電泳槽兩邊之pH落差過大，以致影響電泳的進行，最好能在兩極之間加裝電泳緩衝液循環裝置，而且核酸泳動速率也應儘量放慢。以甲醛為變性劑時不會有這些問題，因此操作比較省事，但必須注意，甲醛氣體為有毒物質，配製甲醛洋菜膠體及進行電泳分析時應在抽氣櫥裡操作。本實驗將採用甲醛洋菜膠體電泳法。

3.3.1.1 清理電泳槽

前面已強調過，能否將RNase去除乾淨是RNA相關實驗成功與否的主要決定因子。在進行RNA電泳分析時，為了避免RNase可能帶來之問題，實驗室內最好能騰出一套電泳器材，專門用於RNA之分析。如果所使用的電泳槽及鑄膠器一般也用於進行DNA分析的話，在進行RNA變性膠體電泳分析前應仔細地加以清理；清理時除了以中性清潔劑徹底沖洗乾淨外，最好再用 3%過氧化氫 (H_2O_2) 浸泡 10 min。

儀器用具：

Mupid II 迷你電泳槽及鑄膠器

藥品試劑：

中性清潔劑 (abSolve, DuPont NEF971)

3% H_2O_2 (過氧化氫)

d H_2O /DEPC

方法步驟：

◆ 進行下列步驟時，請務必戴手套！

- 1) 以中性清潔劑仔細清洗電泳槽，再以二次水洗去清潔劑，並稍加晾乾。
- 2) 以 3%過氧化氫注滿電泳槽，放置於室溫 10 min。
- 3) 倒掉過氧化氫溶液。
- 4) 以dH₂O/DEPC徹底地沖洗電泳槽。

3.3.1.2 甲醛洋菜膠體電泳 (formaldehyde-agarose gel electrophoresis)

甲醛是一種常用的 RNA 變性劑。在進行甲醛洋菜膠體電泳分析時，必須先配製含有甲醛的洋菜膠體，RNA 也必須先以甲醛及 formamide 進行變性處理，以確保其二度結構充分被打開。由於甲醛可能是一種致癌物質，配製膠體及進行電泳分析時都應在抽氣櫥裡小心操作；進行電泳時所使用的緩衝液為 MOPS (3-[*N*-morpholino] propanesulfonic acid)。此外，含有甲醛的洋菜膠體比較滑溜，容易破裂，在移動膠體時應特別留神。由於 rRNA 佔細胞 RNA 總量之 80~85%，以 ethidium bromide 染色後，呈現於膠體上的兩個主要 RNA 色帶應該分別是 large 與 small rRNAs (真核生物為 28S 與 18S，原核生物為 23S 與 16S)；散佈於 small rRNA 附近，呈淡淡 smear 的就是 mRNAs，這是因為 mRNAs 存在量不多，而且長度不一的緣故。長度較短的 5S rRNA 及 tRNA 等則在膠體下方也以特定色帶呈現。

儀器用具：

65°C 恆溫水槽
微量離心機
Mupid II 迷你電泳槽及鑄膠器
UV transilluminator
防護面罩
拍立得相機
抽氣櫥

藥品試劑：

自菌體抽取之 RNA (I-1, I-2, U-1, and U-2) 與胞外轉錄反應所製備之正意股及反意股 RNA (#1, #2, #3, and #4)。
5×formaldehyde gel running buffer (0.1 M MOPS, pH 7.0; 40 mM sodium acetate; 5 mM EDTA)
Formaldehyde gel loading buffer (0.25% bromophenol blue; 0.25% xylene cyanol; 50% glycerol; 1 mM EDTA)
Ethidium bromide (1 µg/µL in dH₂O/DEPC)
dH₂O/DEPC

方法步驟：

◆ 注意：

- 下列實驗主要參照 Sambrook and Russell (2001) 的方法。
- 進行下列實驗時請務必戴手套。
- 甲醛與 formamide 都放在抽氣櫥內。

準備一片 1.2% 甲醛洋菜膠體：

- 秤取 0.48 g agarose 置 100 mL 血清瓶，加入 25 mL dH₂O/DEPC。
- 以微波爐加熱溶解之後，微微晃動血清瓶使混合均勻，再移至 60°C 恆溫水槽靜置 5 min。
- 將裝著 agarose 溶液的血清瓶移至抽氣櫥，加入 8 mL 之 5× formaldehyde gel running buffer 及 7.2 mL 之甲醛，輕輕搖晃血清瓶以便混合均勻。

◆ 膠體總體積為 40 mL，為了避免 agarose 溶液因溫度快速下降，很快便凝固，應力求動作迅速，但應避免劇烈搖晃，以免弄出一大堆氣泡，影響膠體凝結。

- 儘速於抽氣櫥內把混合液倒入膠體鑄模，並插入樣本梳 (teeth comb)。

◆ 膠體凝固至少需時 30 min。

製備電泳分析所需之 RNA 樣本：

- 取出 8 支 1.5 mL 微量離心管，分別標示為 U-1, U-2, I-1, I-2, #1, #2, #3 及 #4，並根據下表所示依序加入各項試劑 (體積單位為 μ L)。

◆ U-1, U-2, I-1 及 I-2 分別為大腸桿菌所分得之 RNA (3.1.1 節)，#1, #2, #3 及 #4 分別是胞外轉錄反應所得到之 RNA (3.1.2 節)。

	I-1, I-2	U-1, U-2	#1	#2	#3	#4
Reagents	RNA from pQG11/M15[pR EP4] + IPTG	RNA from pQG11/M15[pR EP4] - IPTG	Tx-pBlueGus/ HindIII e/ DNase	Tx-pBlueGus/ BamHI e/ DNase	Tx-pBlueGus/ HindIII e/o DNase	Tx-pBlueGus/ BamHI e/o DNase
dH ₂ O/DEPC	4.5 - x	4.5 - x	2.5	2.5	2.5	2.5
RNA	x (6 μ g)	x (6 μ g)	2	2	2	2
5× formaldehyde gel-running buffer	2	2	2	2	2	2
Formaldehyde	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
Formamide	10	10	10	10	10	10
Total volume	20	20	20	20	20	20

- 混合均勻並離心數秒後，放置於 65°C 恆溫水槽作用 15 min。
- 將作用完之微量離心管移置於冰浴中。
- 離心數秒後，再將離心管放回於冰浴中，並於各離心管分別加入 2 μ L 之 formaldehyde gel loading buffer 與 1 μ L ethidium bromide。

電泳：

- 要進行電泳時，把已凝固之洋菜膠體放進電泳槽，並加入適量 1× formaldehyde gel running buffer。
- 以 50 V 定電壓預跑 5 min。
- 依序注入上列 8 個 RNA 樣本，以 50 V 定電壓進行電泳，待追蹤染劑移動至膠體三分之二處時，關閉電源，將膠體移至 UV transilluminator box，

觀察 RNA 色帶之存在情形，並拍照存證。

◆ 注意：這一片膠體往下將用來進行北方轉印實驗，請小心處置！

注解討論：

- 請觀察膠體上 RNA 色帶之存在情形，你知道它們各代表什麼嗎？
- 若你必須估算特定 mRNA 分子的長度，應如何進行？

3.3.1.3 以毛細管轉移方式進行北方轉印實驗

要進行北方雜合反應前，必須先將RNA自洋菜膠體轉移至硝化纖維紙 (nitrocellulose membrane) 或尼龍膜 (nylon membrane) 上，這一個過程稱為轉印 (blotting)。一般常用的方法包括毛細管轉移法 (capillary transfer)、真空轉移法 (vacuum transfer) 與電轉印法 (electroblotting)。毛細管轉移法借助吸水紙吸收轉移緩衝液時所產生的牽引力將RNA自洋菜膠體轉移至膜上；要轉印完全，起碼需要作用 6 h 以上。雖然所需花費的時間比較長，以其不須要特別的儀器設備，毛細管轉移法目前仍被普遍採用。若分析RNA時採用變性聚丙烯醯胺膠體電泳，則必須以電轉印法進行RNA轉印。至於膜的選擇，硝基纖維素膜的優點是比較不會產生非專一性反應；不過其一旦被潤溼再烘乾之後，容易碎裂，不適用於進行多次雜合反應。尼龍膜的優點是韌性好，與核酸結合的能力也相當強，正可以彌補硝基纖維素膜的缺點，現已成為主流。一旦將RNA轉移至膜上後，即可以利用紫外線照射法 (uv irradiation) 或真空乾燥法 (在真空下 80°C 加熱 2 h) 將其固定於轉印膜上。

儀器用具：

塑膠盒
玻璃板
裁紙刀

藥品試劑：

20×SSC (3 M NaCl, 300 mM sodium citrate)
尼龍膜
3MM 濾紙
吸水紙
dH₂O/DEPC

方法步驟：

- 將甲醛洋菜膠體移放在塑膠盒內，以dH₂O/DEPC沖洗數次，以便去除甲醛。
◆ 注意：在移動膠體時請特別留心，不要把膠體弄破了！
- 注入 100 mL 20×SSC，靜置 5 min。
- 根據圖 3.2 所示，依序在塑膠盒上堆疊玻璃板、濾紙 (作為鹽橋)、電泳膠、

尼龍膜、三層濾紙、與吸水紙，以便以毛細管轉移方式將 RNA 轉印於尼龍膜上；塑膠盒內裝入適量 $20\times\text{SSC}$ ，以便作為轉移緩衝液。

◆ 注意：

- 濾紙與尼龍膜應先以 $20\times\text{SSC}$ 潤濕，再用於堆疊。
- 在濾紙、尼龍膜、與電泳膠夾層間可能會有氣泡存在，因此在放好電泳膠、尼龍膜或濾紙後，應立即檢視，並以食指輕輕平移的方式小心趕走氣泡。
- 此轉印步驟將持續至隔天才結束。

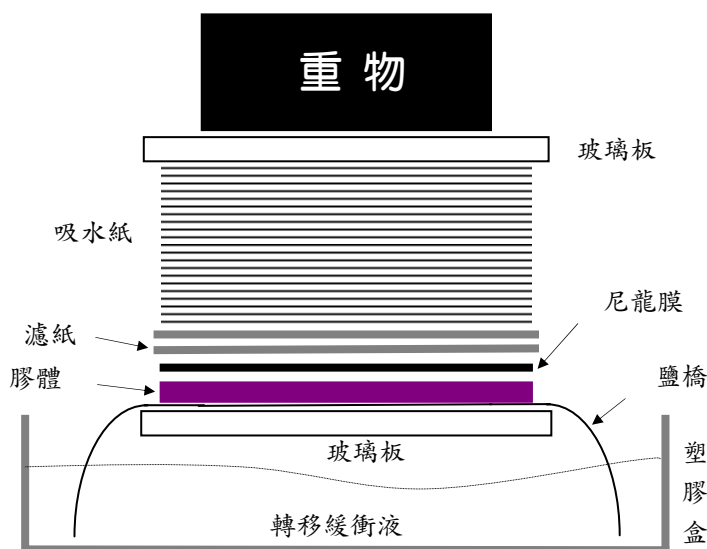


圖 3.2 以毛細管轉移法進行核酸轉印

註解討論：

- 假使所要分析的 RNA 長度大於 2.5 kb，在進行毛細管轉移前，膠體最好先以 0.05 N NaOH 處理 20 min，再以 $20\times\text{SSC}$ 浸泡 40 min，以便局部分解 RNA，提升轉印效率。

3.3.2 北方雜合反應

北方雜合反應的步驟主要包括：(1) 加入核酸探針，使與固定於尼龍膜上的特定 RNA 進行雜合反應，及 (2) 待雜合反應結束後以含鹽緩衝液與 SDS 洗掉非專一性結合於尼龍膜上之核酸探針。進行反應時應注意下列幾個問題：(1) 實驗操作過程仍應儘可能避免 RNase 的污染；(2) 反應前應先進行雜合前置反應 (prehybridization)，以便減少核酸探針與尼龍膜之間的非專一性結合反應；(3) 如果所使用的核酸探針是以 random priming 或 PCR 等方法所製備的雙股 DNA 探針，使用前務必先加熱變性；(4) 選用適當的嚴苛度 (stringency) 進行雜合反應及後續的轉印膜漂洗工作，以便增強雜合反應訊息，並減少雜訊，這主要可以從溫度與鹽濃度兩個方面加以考量。

儀器用具：

Crosslinker (Stratalinker 1800, Stratagene)

塑膠盒

平端鑷子

封口機

42°C 恆溫槽

60°C 恆溫槽

藥品試劑：

6×SSC (0.9 M NaCl, 90 mM sodium citrate)

尼龍膜

Hybridization solution [formamide, 50% (v/v); 5×SSC; blocking reagent, 2% (w/v);
N-lauroylsarcosine, 0.1% (w/v); SDS, 0.02% (w/v)]

3MM 濾紙

2×SSC, 0.1% SDS

0.1×SSC, 0.1% SDS

方法步驟：

◆ 南方雜合反應請參照 6) 之後的步驟進行，惟所使用之探針為 3.2.1 節以 random priming 進行標定者。進行下列實驗時，請務必帶手套。

- 1) RNA 轉印步驟結束後，移除電泳膠上之吸水紙與 3M 濾紙。
- 2) 把尼龍膜連同電泳膠一齊移置於乾淨衛生紙上，並請小心維持電泳膠與尼龍膜的相對位置。
- 3) 以防水筆在尼龍膜上標出電泳膠樣本孔的位置，並以剪刀剪掉尼龍膜左上角，以便標記電泳膠的左右方位。
- 4) 小心地拉開尼龍膜，將之放置於 6×SSC (20 mL) 浸泡 5 min。
- 5) 以平端鑷子夾起尼龍膜，待 6×SSC 滴乾之後，把尼龍膜平放於衛生紙上，風乾至少 30 min。

◆ 與電泳膠接觸的那一面應朝上。

- 6) 以 Stratalinker 1800 進行 uv 連結反應。

7) 雜合前置反應：

- a) 將 10 mL 雜合溶液注入一個塑膠袋。
- b) 把已經風乾之尼龍膜移置於塑膠袋內，小心地把氣泡移除之後，以封口機密封好，再移至 42°C 恆溫槽進行雜合前置反應 1~2 h。

8) 核酸探針變性反應：

- a) 以微量吸管小心地把 PCR 產物移至新的微量離心管。
- b) 將裝著核酸探針的微量離心管放入沸水中加熱 10 min。

◆ 請記得以夾子固定微量離心管之蓋子，以免加熱時蓋子爆開。

- c) 把離心管移入冰浴裏靜置 3 min。
 - d) 瞬間離心後，取出已被變性的核酸探針，加到 5 mL 之雜合溶液。
 - 9) 雜合反應：
 - a) 剪開塑膠袋一角，倒出塑膠袋內雜合前置反應所使用之溶液，並加入新配之含有核酸探針的雜合溶液 (8-d)。
 - b) 小心移除氣泡，並以封口機密封塑膠袋。
 - c) 如前節所述將塑膠袋移至 42°C 恆溫槽，雜合反應將進行過夜。
 - 10) 以含鹽緩衝液與SDS漂洗轉印膜 (Northern blot)：
 - a) 拿出塑膠袋，塑膠方盒以清水沖洗乾淨之後，裝入 80 mL [2×SSC, 0.1% SDS]。剪開塑膠袋，把尼龍膜取出放進 [2×SSC, 0.1% SDS]，於室溫漂洗 2 次，每次 5 min。
 - b) 續以 100 mL [0.1×SSC, 0.1% SDS] 於 60°C 洗 2 次，每次 15 min。
- ◆ 溶液需先置於 60°C 恆溫水槽中預熱。

註解討論：

- a. 在進行步驟 6) 之uv連結反應之後，若無法立即進行北方雜合反應，可將尼龍膜放入塑膠袋中，並放置於 -20°C 冰箱保存。
- b. 在完成步驟 10) 之轉印膜漂洗工作後，若無法立即進行 DIG 酵素連結免疫反應與鹼性去磷酸酶呈色反應，可將轉印膜放入塑膠袋中，並放置於 4°C 冰箱保存。
- c. 最後以 [0.1×SSC, 0.1% SDS] 漂洗轉印膜時，所用的溫度可依實際需要再調整，以便去除非專一性反應，減少雜訊。
- d. 一般可以藉哪些方式控制雜合反應與轉印膜漂洗過程之嚴苛度？

3.3.3 以酵素連結免疫反應與鹼性去磷酸酶呈色反應偵測雜合訊息

進行雜合反應時所使用的探針若為放射性物質所標定者，雜合訊息可經由放射顯影術 (autoradiography) 偵測出來；若為DIG所標定者，則需借助anti-DIG抗體與鹼性去磷酸酶 (alkaline phosphatase, AP) 之conjugate，並利用鹼性去磷酸酶的酵素活性轉現雜合反應訊息。目前常用來進行鹼性去磷酸酶呈色反應的基質為 NBT (nitroblue tetrazolium) 與 BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, toluidinium salt)；此外，也可以選用CSPD或CDP-Star等試劑，以增加檢測敏感度。

儀器用具：

平端鑷子
旋轉搖盪器 (rotary shaker)

藥品試劑：

DIG nucleic acid detection kit (Roche)，內含：

Anti-DIG-AP conjugate
NBT/BCIP stock solution
Blocking reagent

Washing buffer (Maleic acid buffer + 3% Tween 20, v/v)

Maleic acid buffer (0.1 M maleic acid; 0.15 M NaCl; adjust to pH 7.5 with NaOH)

Blocking solution (1% blocking reagent in maleic acid buffer)

Detection buffer (0.1 M Tris-HCl, pH 9.5; 0.1 M NaCl; 50 mM MgCl₂)

TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA)

Color-substrate solution (需要使用時取 10 mL 之 detection buffer，加入 200 μ L NBT/BCIP stock solution 均勻混合)

方法步驟：

◆ 注意：

- 以下反應條件與程序主要是參照 DIG nucleic acid detection kit 製造廠商所提供之產品說明書。
- 北方與南方雜合之尼龍膜可同步處理，所有反應於室溫進行。
- 以平端鑷子將尼龍膜自一種溶液移至次一種溶液時，儘可能滴乾前者之殘留部份，以免影響後續反應。
- 浸洗過程應以搖盪器低速搖動 (50 rpm)，以便加強作用。

1) 進行 anti-DIG/AP conjugate 與 DIG-核酸探針之免疫結合反應：

- 以 50 mL 之 washing buffer 浸洗尼龍膜 1 min。
- Blocking：把尼龍膜放入 20 mL blocking solution 作用 30 min，以便填充尼龍膜上之非專一性結合部位。
- 取出 2 μ L 之 anti-DIG-AP conjugate，並以 10 mL 之 blocking solution 稀釋。
- 免疫結合反應：把 anti-DIG-AP conjugate 稀釋液連同尼龍膜一起放入塑膠袋內，仔細除去氣泡並封口之後，低速搖動作用 30 min。
- 以 50 mL washing buffer 浸洗尼龍膜 2 次 (每次 15 min)，以便去除多餘及非專一性結合於尼龍膜的 anti-DIG-AP conjugate。
- 將尼龍膜放置於 20 mL 之 detection buffer 漂洗 2 min。

2) 鹼性去磷酸酵素呈色反應：

- 取出尼龍膜，放入 10 mL 現配之 color-substrate solution，並隨即把尼龍膜及作用溶液移至黑暗環境 (例如抽屜內) 作用。每幾分鐘檢視一次，待紫色條帶出現時即可終止反應。
- 欲終止反應時，請把尼龍膜移至 50 mL TE 浸漬 5 min。
- 拿出尼龍膜，滴乾反應液後放置於衛生紙上風乾至少 30 min，加以護貝即可保存。

註解討論：

- 可用來定量 RNA 的方法，除了北方雜合分析之外，還有 primer extension, S1 mapping, RNase protection 及 reverse transcriptase-PCR 等；這些方法各有其特色，可依研究內容之需要選擇使用。

- b. 若應實驗需要，須以不同核酸探針對同一張轉印膜進行多次雜合反應時，應注意隨時保持轉印膜溼潤，否則可能會因轉印膜乾透，無法去除膜上之雜合訊息，而影響了後續的雜合反應。

參考文獻：

- Ausubel, F. M., Brent, R. Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., and Struhl, K. 2005. Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, USA
- Gesteland, R. F., Cech, T. R., and Atkins, J. F. 1999. The RNA world : the nature of modern RNA suggests a prebiotic RNA world, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA
- Rapley, R., and Manning, D. L. 1998. RNA isolation and characterization protocols. Humana Press, USA
- Sambrook, J., and Russell, D.W. 2001. Molecular cloning: a laboratory, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA
- Summers WC (1970) A simple method for extraction of RNA from *E. coli* utilizing diethylpyrocarbonate. Anal Biochem **33**: 459-463

第四章 表現蛋白質之純化與檢定

台灣大學生化科技學系 莊榮輝

表現目標基因得到蛋白質後，可以進行各種純化方法(蛋白質抽取、膠體過濾法、離子交換法、親和層析法等)，以便分離出目標蛋白質；同時並檢定其各種基本生化性質(如蛋白質定量、酵素活性分析、膠體電泳、免疫轉印等)。本章是以表現蛋白質 GUS 為例，說明其純化及檢定方法；因為各種蛋白質的性質差異很大，因此每種蛋白質都有其特定的純化或檢定條件，必須個別去找出其自身的條件。本章整體實驗流程如圖 4.1 所示。

4.1 蛋白質純化方法

利用蛋白質間生化特性的差異，可以分離並純化出各種蛋白質。純化蛋白質的方法主要是以色層分析法進行，但是利用蛋白質分子物理或化學特性的沈澱方法，也是相當簡單、有效而且經濟。

4.1.1 蛋白質抽取

蛋白質在細菌中表現後，以反覆的冷凍-解凍方法打破細胞，再用硫酸銨把蛋白質沉澱下來，此步驟可以去除大部份核酸、多醣、脂質等雜物。

儀器用具：

恆溫震盪培養箱 37°C

高速冷凍離心機及離心管(使用 20,000 rpm離心陀)

- ◆ 使用高速離心機要注意：離心機及離心陀的溫度要預冷完全，相對位置的兩隻離心管要平衡好，離心陀轉速絕對不能超過最高速限。

液態氮及冰筒

37°C 溫水浴

藥品試劑：

轉型菌株pQG11/M15 [pREP] 單一菌落

LB/amp/kan 及 IPTG (1 M stock)

Lysis buffer (50 mM Na₃PO₄·12H₂O, pH 7.0; 0.1 M NaCl; 0.1 mM EDTA; 0.2% Triton X-100)

- ◆ 使用前添加成 10 mM β-mercaptoethanol, 25 μg/mL PMSF, 40 μg/mL lysozyme。

Buffer A-0 (50 mM Na₃PO₄, pH 7.0)

- ◆ 使用前每 1 L 添加 70 μL β-mercaptoethanol 成為 10 mM 最終濃度。

Buffer A-150: Buffer A-0 再加有 0.15 M NaCl

硫酸銨(要烘乾並以研钵磨碎)

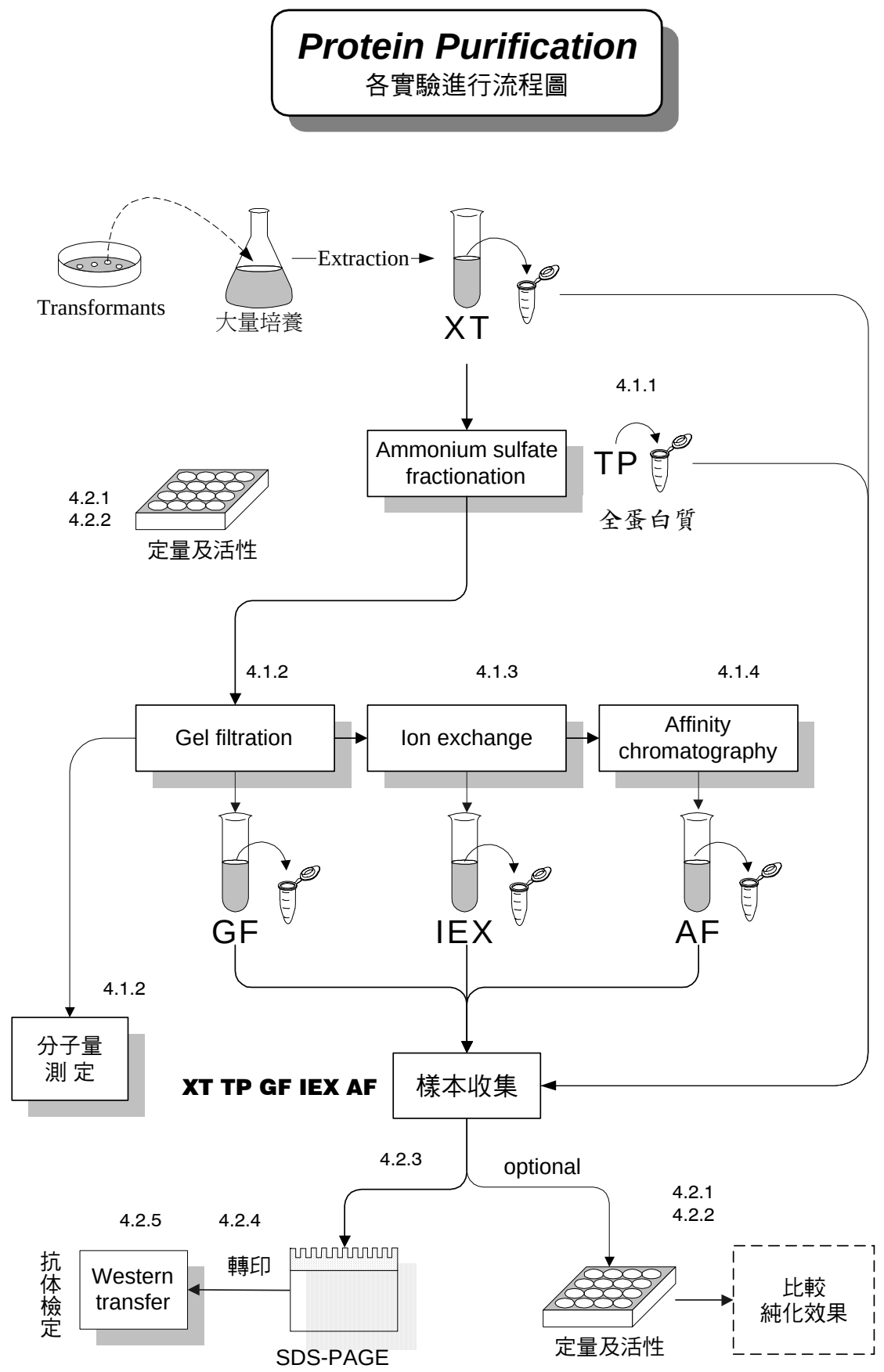


圖 4.1 蛋白質純化與檢定實驗操作的流程

方法步驟：

- 1) 挑取培養皿上單一菌落，培養在 15 mL 之 LB/amp/kan 液體培養基中，以 120 rpm 轉速震盪，在 37°C 下培養過夜。
- 2) 取上述菌液 6 mL 加入 300 mL 新鮮 LB/amp/kan 培養基中，以 120 rpm 37°C 培養至 $A_{600} = 0.6$ 後，加入 IPTG 成為 1 mM 濃度，繼續以 120 rpm 在 37°C 震盪培養 4 h。
- 3) 將菌液倒入 50 mL 離心管 (conical tube) 中離心 10 min (5,000 rpm)。
- 4) 倒去上清，可將菌塊連同離心管置 -20°C 冰箱貯存。
- 5) 取出含菌塊之離心管置碎冰上，待菌塊溶解後，以殘存液體均勻懸濁之。再加入 10 mL lysis buffer 輕輕懸浮之。
- 6) 將菌液放在液態氮中冷凍 1 min，然後在 37°C 水浴中搖盪溶解之。如此反覆三次，儘量不要產生大量氣泡。將離心管的內容物倒入 50 mL 高速離心機的離心管內。
- 7) 離心 20 min (12,000 rpm, 4°C) 取上清共 _____ mL，稱為 粗抽取液 (XT)；預留 100 μ L 以便日後一起進行分析。
◆ 此後樣本均得放置碎冰上，以低溫進行實驗。
- 8) 此上清加入 5 mL buffer A-0 混勻後倒入燒杯，置碎冰上放冷，不時攪拌並緩緩加入固體硫酸銨 _____ gm，使成為 70%飽和度，加完後再攪拌 10 min。
◆ 參照表 4.1 找出該體積所要加的固體硫酸銨，以達 70%飽和度。
- 9) 離心 20 min (12,000 rpm, 4°C) 後小心倒去上清，取白色沈澱部份。
- 10) 沈澱加以 2 mL buffer A-150 均勻懸濁之，再以桌上型離心機去除不溶物質，(10,000 rpm, 5 min)，共得 _____ mL，稱為 全蛋白質 (TP)；預留 100 μ L，連同上述 XT 置 4°C 冷藏。
- 11) 其餘溶液部份準備進行膠體過濾層析，標示清楚後置 4°C 冷藏。

註解討論：

- a. 緩衝液中為何還要添加某些藥品或試劑？(例如硫酸銨, NaCl, EDTA, PMSF, Triton X-100, β -mercaptoethanol等)
- b. 以下處理的意義何在：為何要冰浴、分別取沉澱或上清、冷藏或凍藏？
- c. 為何反覆冷凍-解凍可以把細菌打破？還有哪些方法可以打破菌體？
- d. 以 lysis buffer 破菌時，如何得知你的細胞確實有破裂？
- e. 在細胞打破之後，想像你的目標樣本或蛋白質，會處在何種環境？
- f. 蛋白質沈澱時為何要緩緩加入硫酸銨？若加太快會有何種後果？
- g. 若你的目標蛋白質不會被飽和硫酸銨沈澱下來，你將如何繼續實驗？這給你何種訊息？

表 4.1 百分飽和濃度硫酸銨之添加量

0℃		最終硫酸銨百分飽和濃度															
		20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	90	100	
		加入 1 L 溶液中之固態硫酸銨克數															
硫酸銨起始百分飽和濃度	0	106	134	164	194	226	258	291	326	361	398	436	476	516	603	697	0
	20	0	27	55	83	113	143	175	207	241	276	312	349	387	469	557	20
	25		0	27	56	84	115	146	179	211	245	280	317	355	436	522	25
	30			0	28	56	86	117	148	181	214	249	285	323	402	488	30
	35				0	28	57	87	118	151	184	218	254	291	369	453	35
	40					0	29	58	89	120	153	187	222	258	335	418	40
	45						0	29	59	90	123	156	190	226	302	383	45
	50							0	30	60	92	125	159	194	268	348	50
	55								0	30	61	93	127	161	235	313	55
	60									0	31	62	95	129	201	279	60
	65										0	31	63	97	168	244	65
	70											0	32	65	134	209	70
	75												0	32	101	174	75
	80													0	34	139	80
	90														0	70	90
	100															0	100
本表數據來自 <i>Methods in Enzymology</i> (1990) Vol. 182, p. 291，而該表原始資料又來自 <i>Data for Biochemical Research</i> (1969) Dawson, R.M.C. et al. (ed), 2nd edition, Oxford Univ. Press.																	

4.1.2 膠體過濾法

不同大小的蛋白質分子進入膠體過濾管柱，可依其分子量差異分離；是一種廣泛應用的partition色析法 (Pharmacia操作手冊, Gel Filtration)。

儀器設備：

色析管柱 (Pharmacia C column, 1.6×100 cm)、鐵架、鐵夾及水平儀

◆ 此種管柱的底面積是 2 cm^2 ，因此其總體積為 200 mL。

分劃收集器 (fraction collector, 需準備乾淨試管約 100 支)

◆ 收集分劃有 滴數、體積、時間 三種選擇，因為我們不使用輸液幫浦，因此只能用滴數分劃，請先定好若干滴收一個體積分劃。

濃縮用離心機 (低速 5,000 rpm)

◆ 一般細胞實驗用的離心機即可，若用高速離心機則以低速轉動，但無法蓋上離心陀的蓋子，離心過程要特別小心。

濃縮用離心管 Centriprep-30 (Amicon 4322) 請注意其使用方法

◆ Centriprep系列是利用離心力壓擠小分子，使之濾過超微薄膜上的小孔洞，是一種超微過濾法 (ultrafiltration)；Centriprep-30 可濾過 30 kD以下的分子，因此可以把水分子濾走，以達濃縮效果。

藥品試劑：

膠體 Sephacryl S-300 (Pharmacia)：

a. 預先以緩衝液 buffer A-150 平衡好，並且使完全沈降後的膠體體積，佔全部體積的七至八成；要先預估好膠體的使用量。

b. 膠體溫度要與操作場所的溫度一致，否則溫度變化會產生氣泡。

c. Sephacryl 系列膠體有相當大的吸附力，因此要在緩衝液加入 0.15 M 以上的 NaCl 以除去非專一性吸附。

◆ 一般膠體過濾法均在冷房內操作，但為方便起見，本實驗均在室溫下操作；要盡量保持室溫的恆定，否則膠體溫度的變化會造成氣泡的生成。

Buffer A-150：注意使用時的溫度要與管柱膠體的溫度一致

標準分子量組合 (Bio-Rad 151-1901)：溶於 1 mL 後每組取 0.4 mL。

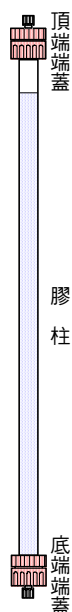
含有thyroglobulin (670 kD), bovine gamma globulin (158 kD), chicken ovalbumin (44 kD), equine myoglobin (17 kD), vitamin B₁₂ (1,350)

◆ 除了上述標準分子量的各種蛋白質外，也可加入目標酵素一起進行膠體過濾，並以活性分析定出目標酵素的溶離體積。

方法步驟：

管柱裝填：

- 1) 以純水沖洗玻璃管柱 (以純水上下沖洗即可，嚴禁使用試管刷)；並請了解管柱的構造與拆裝方法，垂直架好管柱，以軟管連接分劃收集器，並以buffer A-150 試看管路是否通暢；可以用止血鉗或長尾文書夾夾住出口軟管，則可控制溶離的進行。 注意系統的擺設要適當，不要裝置於交通要衝。



- 2) 依預估量取出 Sephadex 膠體，注意膠體的溫度與緩衝液是否已平衡；將瓶中的膠體上下震盪，使之完全懸浮，但勿產生太多氣泡。
- 3) 在管柱內加入約 10 cm 高緩衝液，然後將膠體慢慢沿著管壁倒入管柱，一直加到管柱頂端，開始流洗後膠體沈降很快。當膠體上方的液面逐漸降低時，可於頂端添加膠體，以達所要高度；膠體高度約 90 cm。
- 4) 膠體完全沈降後，小心以 buffer A-150 加滿管柱，關閉出口，裝上頂端端蓋並連通緩衝液瓶，打開出口以重力流洗。調整緩衝液瓶高度，使流速約每五~六秒一滴，並設定收集體積為 2.5 mL/tube。
- 5) 膠柱流洗約 100 mL 後，關閉出口，拆開頂端端蓋，先以滴管吸出膠體上方的溶液到剩約 1 cm 高，注意勿破壞膠體表面平整；然後打開出口，使液面下降至膠體面，再關閉出口，準備注入樣本。

樣本色析進行：

- 6) 以微量吸管或滴管吸取樣本 (樣本體積不得超過膠體總體積的 3%)，沿著膠體上方管壁緩慢加入，注意切勿破壞膠體的平整表面！
(樣本確實體積 _____ mL)
- 7) 打開出口，同時開啟分劃收集器；當樣本完全沒入膠體時，關閉出口，緩緩加入與樣本相等體積的 buffer A-150，打開出口待其慢慢進入膠體中，如此重複二次。不得擾動膠體表面，造成凹陷。
- 8) 暫時關閉出口，將液面高度加滿至管柱頂端，並把頂端端蓋鎖上；然後打開出口開始溶離，調整緩衝液瓶的高度，使流速為 6 s 一滴。
- 9) 要留心觀察前面幾個分劃，確定整個系統運轉無礙，小心分劃收集器最容易出問題。管柱預計將流洗過夜，收集約 80 管。
- 10) 收集分劃試管，進行蛋白質定量分析以及 GUS 活性測定，並請作圖。
◆ 蛋白質定量及GUS活性分析方法，請見下面數節 (4.2.1, 4.2.2)。
- 11) 收集 GUS 活性區，以 Centriprep-30 濃縮至 10 mL 後，加 buffer A-0 稀釋至 20 mL，再次濃縮至 _____ mL (GF)，保留 100 μ L。
- 12) 管柱請再以 buffer A-150 流洗 100 mL 後，小心放置一旁，準備以後進行分子量測定。
◆ 在此期間，請注意不要讓管柱膠體乾掉，也要注意膠體溫度不可變化太大，否則膠體內將會產生氣泡，無法再用，必須重新裝填。

分子量測定：

- 13) 進行分子量測定前一天，請先以 buffer A-150 流洗 100 mL，並檢查膠柱內有無氣泡產生，若有嚴重的氣泡或乾裂，必須重新裝填管柱。
- 14) 取標準分子量溶液 0.4 mL，加上純質目標酵素 0.5 mL (以親和層析法所得之 AF 部份)，如上法注入管柱中，立刻開始進行膠體過濾，並收集各分劃。請依循上述所有管柱及分劃收集器的操作要點。
- 15) 收集所得的各分劃，進行蛋白質定量分析，可定出數個蛋白質尖峰，以作為分子量依據；另以目測法，決定紅色高峰的管數，則可定出 vitamin B₁₂ 的溶離管數。利用以上數據，可畫出分子量與溶離管數間的直線關係，作為分子量判定的標準校正線。

- 16) 同樣的一批分劃，請進行酵素活性分析 (GUS)，則可定出酵素的溶離體積，對照上述標準校正線，則可求出酵素的分子量。

拆除管柱及保存膠體：

- 17) 若管柱長期不用，應當自管柱中取出膠體，以緩衝液清洗後，置冷藏室中保存，但絕對不要放在冷凍箱中。膠體若裝填太緊，有時可能不易取出，要有耐心地以緩衝液慢慢沖出來。
- 18) 膠體可以加 0.01% NaN_3 防止霉菌生長，但使用前記得要洗去；再度使用時，請檢查膠體中有無灰黑色霉菌顆粒，若有結塊而不易打散者，也不要使用。

註解討論：

- 在裝填管柱之前，要先估計所要的膠體體積多少，如何預估？
 - Sephacryl 膠體層析之操作，要緊密裝填管柱膠體，為何要如此做？
 - 在實際操作裝填管柱之前，請先以空的管柱模擬整個過程。
 - 何謂色層分析法？為何膠體過濾法是一種 partition 色析法？
 - 本實驗班所使用到的色層分析用具，雖已經相當齊全，但離正式研究需求，仍有一點距離。以下列出一般常用的色析純化設備 (如圖 4.2)：
- (1) 梯度製造器 可在離子交換法時，拉出各種溶離梯度。
 - (2) 輸液幫浦 可以穩定而有效地輸送緩衝液進入管柱。
 - (3) 管柱 可以加裝 reservoir 以便一次完成膠體的裝填；也可在膠體裝填完成之後，在膠面上方接一 adaptor 以便消除無效空間。
 - (4) 監視器 可同步監視管柱溶離出來的物質，且忠實記錄。
 - (5) 分劃收集器 可收集所有的溶離分劃，是最不可缺的用具。

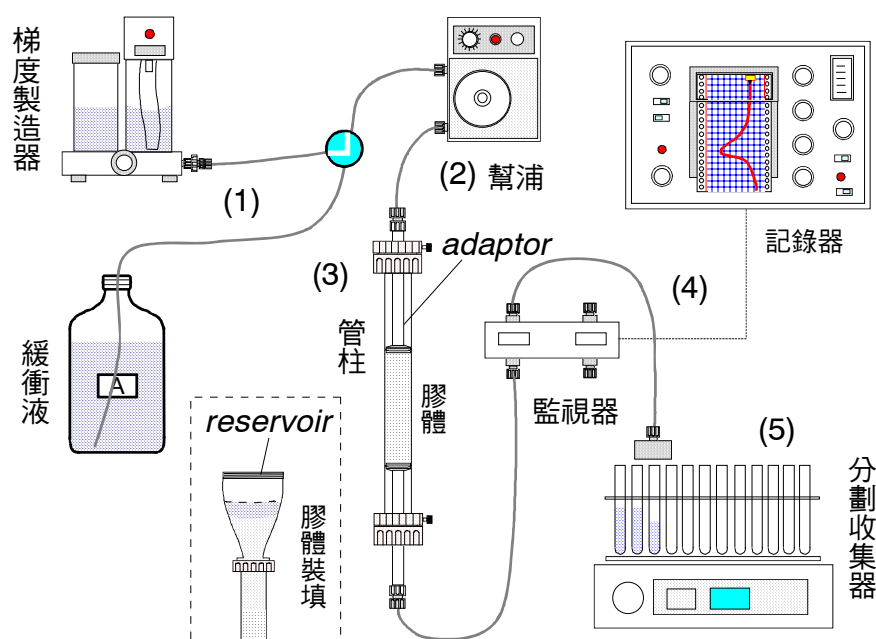


圖 4.2 色析法的全套設備及裝置

4.1.3 離子交換法

各種蛋白質分子上可能帶有不同的電性，經過離子交換管柱，可依其分子帶電性的差異而分離開來 (Pharmacia 操作手冊, Ion Exchange)。

儀器設備：

塑膠管柱 (Bio-Rad Econo-Pac column 732-1010, 1.5×12 cm)

分割收集器 (fraction collector, 另需準備乾淨試管約 60 支)

濃縮用離心機 (低速 5,000 rpm) 及濃縮離心管 Centriplus



藥品試劑：

DEAE Sephacel (膠體體積約 15 mL，預先以緩衝液 Buffer A-0 平衡好)

Buffer A-0 (如上述配法)

Buffer A-300 溶離液：Buffer A-0 加有 0.3 M NaCl

Buffer A-500 溶離液：Buffer A-0 加有 0.5 M NaCl

方法步驟：

- 1) 將 Econo-Pac 管柱架好，並將三向閥及軟管等組合完成。
- 2) 震盪 DEAE Sephacel 膠體使之懸浮，小心倒入管柱中，讓膠體慢慢沈降，在沈降過程中隨時加入 buffer A-0，勿使膠體乾掉。
- 3) 待膠體沈降完全後，高度應在 15 cm 左右。膠柱以 buffer A-0 一直流洗，流速快慢可以不考慮；連接好收集器，每試管收 2.5 mL。
◆ 離子交換法的膠體平衡極為重要，可測流出液的 pH 或離子濃度，看是否與 buffer A-0 相同，若不一樣則需要再流洗之。
- 4) 樣本的添加方法同上述膠體過濾法，並啟動分割收集器開始收集，當樣本全部沒入膠體後，再加入同體積 buffer A-0。以 buffer A-0 流洗 50 mL 後，去除膠體上方的緩衝液，但勿使膠體乾掉。
- 5) 然後依序以 buffer A-300, buffer A-500 溶離之，每批次流洗各 50 mL，注意更換濃度時，膠體上方勿殘存上一種溶液。
- 6) 收集所有分割，進行蛋白質定量分析以及 GUS 活性測定，結果作圖。
- 7) 收集 GUS 活性區，並以 Centriprep-30 濃縮至 _____ mL (IEX)，記得要保留 100 μ L。
- 8) 離子交換膠體以 buffer A-0 洗過 50 mL 後，收起來交回。

註解討論：

- a. 離子交換膠體一定要平衡在緩衝液中，如何確知膠體已平衡完全？
- b. 為何要逐漸升高鹽濃度？其作用機理為何？
- c. 蛋白質分子大多帶有電荷，此種性質是如何形成的？
- d. 在實際操作裝填管柱之前，請先在心中或紙上模擬整個實驗過程。

4.1.4 親和層析法

若表現蛋白質上含有一段六個 His 的片段，而親和吸著劑膠體上接有鎳離子，此蛋白質會專一性地結合到吸著膠體；洗去雜質後可用 imidazole 溶離純質蛋白質 (Pharmacia 操作手冊, Affinity Chromatography)。

儀器設備：

親和層析管柱 (Bio-Rad 731-1550 Poly-Prep column, 0.8×4 cm)

分劃收集器 (另需準備乾淨試管約 25 支)



藥品試劑：

金屬螯合親和層析膠體 (Ni-NTA agarose, QIAGEN 30210) 1 mL

- ◆ 在洋菜膠粒上接有 nitrilotriacetic acid (NTA) 官能基，可以螯合鎳離子；使用前先以鎳離子飽和之。

Buffer B-300/0 (50 mM Na₃PO₄, pH 8.0; 0.3 M NaCl)

- ◆ 使用前才添加成 10 mM β-mercaptoethanol。

Buffer B-300/20: Buffer B-300/0 加有 20 mM imidazole

Buffer B-300/250: Buffer B-300/0 加有 250 mM imidazole

方法步驟：

- 1) 親和層析膠體 1 mL 已經裝填在管柱內，成為一淡藍色膠柱。請把管柱架直在鐵架上，去除下方的填塞物，用 buffer B-300/0 流洗 20 mL 後塞住出口，準備注入樣本。
- 2) 除去膠面上方的緩衝液，並取出樣本 (IEX) 使其回到室溫，慢慢用滴管加到親和膠體上，小心勿弄亂膠體表面；讓樣本沒入膠體中，同時收集流出液每管 2.5 mL。
- 3) 待樣本全部進入膠體後，關閉出口，再慢慢加入 buffer B-300/20，打開出口收集流出液；buffer B-300/20 共流洗 30 mL。
- 4) 接著以 buffer B-300/250 流洗 30 mL，方法同上，收集各分劃。
- 5) 所有分劃均定量蛋白質並測定酵素活性，收集酵素活性最高的數個分劃，共得 _____ mL (AF)，保留 100 μL 以供分析。

註解討論：

- a. 離子交換法及親和層析法操作時，當你要換用另一種溶離液時，膠體表面上能不能留有原來的緩衝液？
- b. 目標蛋白質 GUS 是如何接到親和膠體上？又是如何被溶離下來的？
- c. 若你發現蛋白質無法結合到 Ni-NTA 親和膠體上去，但你確定蛋白質上有 His 片段，則如何解釋之？
- d. 親和層析法的種類非常多，只要兩種物質間有專一性的親和力，就可設計以親和法來進行純化工作，請盡量舉出你所知道的各種例子。

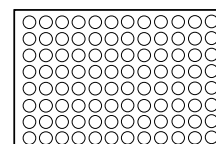
4.2 蛋白質檢定方法

4.2.1 蛋白質定量分析

Bradford 的 dye-binding method 是利用 Coomassie brilliant blue G-250 (CBG) 可與蛋白質結合而變色的特性來定量 (Bradford, 1976)；若試樣中的蛋白質量較多，則結合到蛋白質而變色的 CBG 也多，因而呈色較深。下例是以一組標準蛋白質為對象，製作一條蛋白質量與吸光度的標準校正線。

儀器用具：

ELISA光度計 (Dynatech) 可在一分鐘內測完一片滴定盤
微量滴定盤 (microtiter plate, Nunc F96 Maxisorb 442404)
Micro test tubes, 大頭針或噴火槍



藥品試劑：

- (a) Buffer A-0
 - (b) BSA標準品 (Bio-Rad, bovine serum albumin, 100 µg/mL)
 - (c) 未知濃度樣本 (unknown BSA, 0.8 mL, 由教師調配發給)
 - (d) Dye Reagent (Bio-Rad 500-0006) 先以水稀釋四倍備用
- ◆ 以染料 Coomassie brilliant blue G-250 配製的溶液，勿與膠體電泳染色用的 CBR-250 混淆，各有其使用上的特色，不要互用。

標準品及樣本：

標準品系列：

使用小試管準備一組BSA (b) 標準品的系列稀釋：

Label	BSA (b)	Buffer A-0	Final Conc.	
#5	500 µL	0 µL	100 µg/mL	混合均勻
#4	400 µL	100 µL	80 µg/mL	混合均勻
#3	300 µL	200 µL	60 µg/mL	混合均勻
#2	200 µL	300 µL	40 µg/mL	混合均勻
#1	100 µL	400 µL	20 µg/mL	混合均勻
#0	0 µL	500 µL	0 µg/mL	混合均勻

- ◆ 配製一定要精準，否則校正直線不會很準確；各種試劑的添加，若自稀往濃取樣，則可以不用換吸管頭。

未知樣本：

再以上述 unknown BSA (c) 準備兩種未知樣本：

Label	未知樣本 (c)	Buffer A-0	Final Conc.	
X1	500 µL	0 µL	2×	混合均勻
X2	250 µL	250 µL	1/2×	混合均勻

一般樣本：

- 1) 通常由色析法所收集到的各分劃樣本，都可以直接進行蛋白質定量分析；但若其中含有某些干擾因子 (如含有Triton)，或樣本的濃度太濃，都必須將樣本稀釋後再測。
- 2) 同一樣本的若干不同稀釋濃度，所測出來的最終蛋白質濃度會有差異，通常是以稀釋度大者較為準確。

方法步驟：

- 1) 每槽先加好 50 μ L 標準品 (#0, #1 #5) 或未知樣本 (X1, X2)，以二重複加入 96 孔滴定盤中，如圖 4.3 所示。

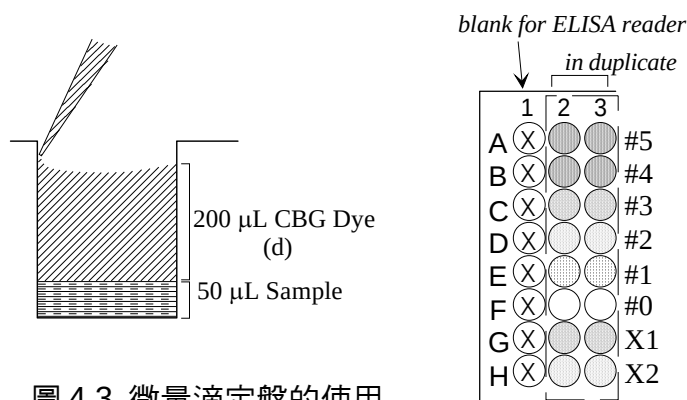


圖 4.3 微量滴定盤的使用

- 2) 每槽再加入 200 μ L Dye-Reagent (d)，在全部樣本槽加完前，不要中斷添加；同時小心避免氣泡產生。
◆ 本步驟是實驗成敗的關鍵！
- 3) 輕拍滴定盤一側，使添加的各成份均勻混合，注意 Dye-Reagent 密度較大，很容易沉積在下方而分層。若還有小氣泡，小心以大頭針刺破，大量時可用噴火槍火燄燒破。
- 4) 靜置室溫 10 min。
- 5) 以 ELISA reader 測量 570 nm (或 595 nm) 的吸光值。

註解討論：

- a. 在作圖紙上畫出標準品的校正線，並決定未知樣本的濃度 (如圖 4.4)。
- b. 請說明本分析方法的原理，並特別以蛋白質構造來說明。
- c. 一般緩衝液或試劑中，何種添加物會影響 Bradford 法的呈色？
- d. 請列出本分析方法的各操作步驟中，哪些會影響分析的準確度？
- e. 還有哪些蛋白質的定量方法？並請比較其優劣點。

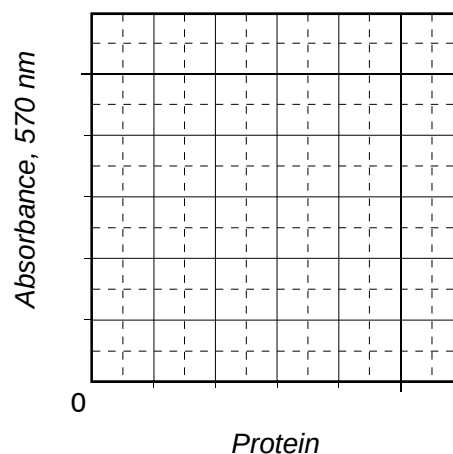
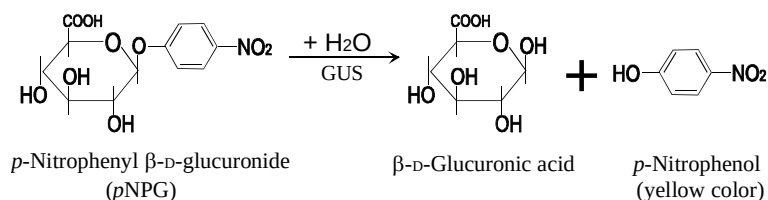


圖 4.4 繪製標準品校正線

4.2.2 酵素活性分析法

表現出來的酵素GUS可以水解其基質衍生物pNPG，所產生的黃色生成物p-nitrophenol，可供活性測定 (Jefferson et al, 1986)；催化反應如下式：



儀器用具：

ELISA光度計 (Dynatech)

微量滴定盤 (microtiter plate, Nunc F96 Maxisorb 442404)

藥品試劑：

基質溶液 (GUS reaction buffer)：

pNPG (p-nitrophenyl β-D-glucuronide, Sigma N-1627)	31.5 mg
溶於 Buffer A-0	100 mL

終止液 (stop buffer)：2.5 M 2-amino-2-methyl propanediol (Sigma A-9754)

方法步驟：

- 1) 吸取 20 μL 的蛋白質樣本，小心注入微量滴定盤中，避免氣泡產生。
- 2) 每一樣品槽加入 200 μL 基質液，混合均勻；可用燒熱的接種環去除氣泡。
- 3) 靜置約 1~2 min，顏色開始加深，然後加入 30 μL 終止液。反應時間的長短，要以樣本中的酵素活性大小來做調整。因為我們只測定色析法各分劃的相對酵素活性，因此並不加終止液。
- 4) 以 ELISA 光度計測定波長 415 nm 之吸光值。

酵素活性單位的測定：

- a. 以上步驟，只可測定 GUS 活性的相對大小，對色析法所得到的各個分劃進行偵測，相當方便，但並非酵素絕對活性單位的測定方法。
- b. 若要測定酵素的絕對活性單位，要使用最適當的酵素用量，使酵素在反應一段固定的時間後，其生成物的呈色吸光度，落在光度計的可測範圍之內；然後計算此段時間內，每分鐘所產生的吸光度增加量，轉換成生成物的莫耳數，即可求得其真正的活性單位。
- c. 因此酵素的活性單位定義為：每分鐘所能催化生成物之 μmole 數。

註解討論：

- a. 實驗之前先規畫好各樣本在滴定盤上的分佈位置，並做好標示。
- b. 以微量滴定盤進行活性測定時，能否使得每一槽的反應時間一致？
- c. 化學反應最重要的操作要點之一，是要使所加入的各種成份均勻混合，在使用微量滴定盤時，你如何使所加的液體混合均勻？

4.2.3 膠體電泳法

電泳的高解析力使其成為生化技術中最有效力的一門分析利器，以下簡略說明各種電泳的形式及其應用。

- a. 不連續膠體電泳 (disc-PAGE) 是以原態蛋白質進行電泳，一般用作純度檢定或活性分析，SDS-膠體電泳 (SDS-PAGE) 則用為次體分子量之測定，梯度 (gradient) 電泳則可輔助原態蛋白質分子量之決定。結合SDS及梯度兩種特性的SDS-梯度膠體電泳，其解析力最高。
- b. 電泳形式 早期使用圓柱狀膠體，演變成直立式的平板膠片 (16×18 cm)，最後改成迷你電泳膠片 (8×10 cm)，電泳時間只約一小時，而其解析力不變。現在柱狀膠體電泳只用在等電聚焦法，以進行二次元電泳；而大型平板電泳則多用在製備式電泳，一般電泳大多以迷你膠片進行之。
- c. 膠體材質 的種類很多，但用在蛋白質者則以聚丙烯醯胺 (polyacrylamide) 為主；聚丙烯醯胺電泳是蛋白質應用最廣的電泳分析方式。也有少數使用洋菜膠體 (agarose gel)，多用在測定pI較廣的異構酶酵素群。
- d. 泳動率：在 pH 8.8 的電泳條件下，大部分 pI 小於 8.8 的分子均能往正極泳動；蛋白質的泳動率與所帶電荷成正比，而與其分子量成反比；若分子量一樣，但形狀越不規則，或體積越鬆散者，泳動率越小。
- e. 聚丙烯醯胺電泳 雖然分有原態的 disc-及變性的 SDS-PAGE 兩種，但兩者除了 SDS-PAGE 在整個系統含有 0.1% SDS 之外，其餘完全相同，且其鑄膠及電泳方法均屬大同小異。
- f. 原態 disc-PAGE 中的樣本蛋白質，因電泳系統中不含界面活性劑 SDS，其活性多能保持，可以在膠體上做活性染色。若目標酵素沒有方便的活性染色法，則可把膠體一片一片切下，做每一片膠體的活性測定。

儀器用具：

迷你電泳槽 (Hoefer Mighty Small SE 250)

鑄膠器 (Hoefer SE 245 可鑄造兩片迷你膠片)

鑄膠三明治組合：(每一片膠片)

(1) 玻璃板	(8×10 cm)	小心易破裂	1 片
(2) 白色氧化鋁板		小心易破裂	1 片
(3) Spacer 間隔條	(0.75 mm)	小心易遺失	2 條
(4) Comb 樣本齒模	(0.75 mm)	小心易遺失	1 隻

電泳樣本專用微量吸管頭 (尖端較長且扁)

供電器 (可供應 200 V 電壓及 500 mA 電流者均可使用)

塑膠染色盒 (比膠片稍大且要能密蓋)

旋轉搖盪器 (rotary shaker)

看片箱 (light box)

護貝機及護貝膜 (可護貝如膠片大小者)

膠片乾燥組合：

- (1) 玻璃板(至少要比膠片大，約 12×15 cm，厚度約 3~4 mm)
- (2) 玻璃紙(cellophane, 年糕紙，比上面玻璃板每邊多出 5 cm以上)

以下聚丙烯醯胺膠體電泳所使用的試劑及方法乃根據 Laemmli (1970) 的方法。

藥品試劑：

由於鑄膠溶液非常重要且多樣，因此下面把所有電泳溶液的配置方法仔細列出，希望能在每一個實驗室成功進行電泳；但使用者一定要明白其配製的原理與各種濃度的算法，而不是只會依配方泡製而已。

A液：丙烯醯胺液 (total 30%, cross-linking 2.6%)

丙烯醯胺	(acrylamide, Merck 10784)	29.2 gm
Bis 架橋劑	(Sigma M-7256)	0.8 gm

加純水溶解至	100 mL
--------	--------

◆ A 液也有商品已經配製好溶液者，若實驗課採用 Ameresco 的 40%溶液 (T40%, C2.6%)，配法有些變動，請特別注意。

◆ Bis 是 *N,N'*-methylene-bis(acrylamide) 的簡稱，可看成是兩分子 acrylamide 連在一起，作為架橋物，以便成為立體的膠體。

◆ 以 30°C 加熱助溶，有不溶物質須過濾去除；若丙烯醯胺品質不佳或久貯，在溶成 100 mL 後，可加一些離子交換樹脂 Dowex MR-3 攪拌，放過夜並過濾後置 4°C 保存。

◆ 注意 acrylamide 溶液有神經毒性！不要直接接觸，凝膠後毒性消失，但膠體無法達到百分之百凝膠，因此也要小心處理膠片。

B液：分離膠體緩衝液 (running或separation buffer)

Tris	(Tris base, 1.5 M)	90.8 gm
TEMED	(Sigma T-8133)	1.8 mL

溶入 300 mL 水，以 1 M HCl 119 mL 調 pH 到 8.8 再加水至 500	mL
--	----

◆ TEMED (tetramethylenediamine) 可幫助自由基傳導，是催化劑。

C液：焦集膠體緩衝液 (stacking buffer)

Tris	(Tris base, 0.5 M)	6.0 gm
TEMED	(Sigma T-8133)	0.4 mL

溶入 40 mL 水，加 1 M HCl 47 mL 調 pH 至 6.8，加水至	100 mL
---	--------

D液：電泳緩衝液 (chamber buffer)，5×溶液

Tris	(Tris base, 0.05 M×5)	30.3 gm
甘胺酸	(glycine, 0.38 M×5)	142.6 gm

溶入 800 mL 水，pH 調到 8.3 後再加水至 1 L 使用時稀釋 5 倍

◆ 甘胺酸是電泳緩衝液的主要分子，是造成電泳樣本焦集的原因；近來多改用 boric acid (下面 F 液)，應自行試用何者為佳。

E 液：SDS-PAGE 樣品溶液，2×溶液

Tris	(Tris base, 125 mM×2)	3.0 gm
EDTA·2Na	(2 mM×2)	14.8 mg

SDS	(2%×2)	4.0 gm
β-mercaptoethanol	(5%×2, Sigma M-6250)	10.0 mL
加水 80 mL 溶之，pH 調到 6.8，再加水至		100 mL
F 液：通用電泳緩衝液，5×溶液		
Tris	(Tris base, 90 mM×5)	54.5 gm
Boric acid	(80 mM×5)	24.8 gm
EDTA·2Na	(2.5 mM×5)	4.7 gm
加水 800 mL 溶之，pH 調到 8.4，再加水至		1,000 mL

◆ 使用時稀釋 5 倍。本溶液在 disc-或 SDS-PAGE 均通用，後者要加 SDS 至 0.1%。

SDS水溶液 (10%)

◆ SDS 粉末很輕，揚起來很容易吸入肺部，在肺泡溶解產生界面活性的作用，使得肺部細胞無法進行氧分子交換，非常危險。

APS溶液 (過硫酸銨, 5%) :

APS (ammonium persulfate, Bio-Rad 161-0700)	50 mg
---	-------

溶於 1 mL 水中，使用前才配製好，隔日不可再用。

◆ APS是自由基 (free radical) 的產生者，可誘發acrylamide的連鎖聚合反應，因此是整個凝膠反應的起始者。

◆ 冬天可增至 10%，夏天可減至 2%。注意 APS 固體很容易分解，應密蓋貯於乾燥皿；鑄膠無法凝結的毛病，多出自 APS 的品質不良。

追蹤染料 (tracking dye) :

Bromophenol blue (Sigma B-6896)	1 mg
---------------------------------	------

溶於 5 mL 水，再加 5 mL 甘油均勻混合。

◆ 加在樣本蛋白質中，可增加樣本密度並賦予顏色，方便目視以注入膠片的樣本槽。

染色液 (CBR染液) :

Coomassie brilliant blue R-250 (CBR, Sigma B-0149)	1 gm
--	------

溶於 250 mL 水後，再加入 250 mL 甲醇及 50 mL 醋酸混合均勻，充分溶解 CBR，若有不溶物質，則須過濾後裝瓶密蓋。

◆ Coomassie blue 有許多種不同的相關化合物，不要取用作為蛋白質定量用的 Coomassie blue G-250 來染色，效果稍差。

脫色液 (20%甲醇及 10%醋酸) :

在一 1 L 量筒中，先到入 200 mL 甲醇及 100 mL 醋酸，再加水至 1 L，混合均勻後密蓋備用。

◆ 甲醇濃度可提高到 30%，則可增加脫色速度，但小心脫色過度。

標準分子量組合：

Pharmacia 有高低兩種分子量的標準蛋白質組合，專供 SDS-PAGE 使用：

高分子量組： Thyroglobulin (669kD, 330 kD), ferritin (440 kD, 220 kD, 18.5 kD), catalase (232 kD, 36 kD), albumin (67 kD)

低分子量組：Phosphorylase (94 kD), albumin (67 kD), ovalbumin (43 kD), carbonic anhydrase (30 kD), trypsin inhibitor (20 kD), lactalbumin (14.4 kD)

另外 Novel 有預先染好藍色的 SeeBlue (LC5625) 標準蛋白質組合，除了一般電泳外，更可用在轉印，檢查轉印是否成功：

SeeBlue: Myosin (250 kD), albumin (98 kD), glutamic dehydrogenase (64 kD), alcohol dehydrogenase (50 kD), carbonic anhydrase (36 kD), myoglobin (30 kD), lysozyme (16 kD), aprotinin (6 kD), insulin B chain (4 kD)

方法步驟：

SDS 平板膠片鑄造：

- 1) 整理出兩組玻璃片及白板鑄膠組合，先用酒精拭淨，並選擇合適的間隔條 (0.75 mm) 組合起來。
◆ 請熟悉鑄膠三明治組合的正確組裝方式，以免灌入的膠液漏出來。
- 2) 三明治組合後直立站好，準備所要濃度的 SDS 膠體溶液如表 4.2。兩片 0.75 mm 厚的平板膠片約需 10 mL 分離膠體溶液，以及 5 mL 焦集膠體溶液。APS 液到最後才加入，未加 APS 以前可在真空中抽去溶液中的氣體。

表 4.2 配製兩片 0.75 mm 膠片所需膠體 (mL)

	分 離 膠 體							焦集膠體	
膠體百分比	5%	7.5%	10%	12.5%	15%	20%	10%	4%	4%
A 液 (40%)	-	-	-	-	-	-	5.0	-	0.5
A 液 (30%)	3.3	5.0	6.7	8.3	10	13	-	0.66	-
B 液	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	-	-
C 液	-	-	-	-	-	-	-	1.24	1.24
10% SDS 液	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.05	0.05
純水	11.4	9.7	8.0	6.4	4.7	1.7	9.7	2.95	3.11
APS 液	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
總體積	20	20	20	20	20	20	20	5	5

◆ 上表反白部份為使用 40% A 液製備的配方。

- 3) 以上分離膠體各成份在小燒杯中混合均勻後，可直接沿著玻璃一側倒入鑄膠組合到預定高度(約八成高)，勿陷住氣泡；再輕輕加上一層isopropanol。也可使用滴管慢慢加入膠體，同樣勿注入氣泡。
- 4) 約 30 min 可凝結，以濾紙吸去 isopropanol，同法倒入焦集膠體溶液，要加到滿；儘快插入樣品槽齒模，注意不可有氣泡陷在膠體中。
◆ 一般在凝膠完成後，膠體與所加的水層之間，會出現清楚的直線界面，但因為背景為白色，較不易觀察之。
- 5) 再度凝結後取下齒模即可使用。若不立刻使用，則把整個膠片組合用保鮮膜包好，膠面上方加一水層，勿使乾掉，在 4°C 約可放 1~2 週。

電泳方法：

- 6) 若膠片組合保存於 4°C，則要等待膠片完全回復室溫，才架到電泳槽。
◆ 膠片一定要完全回溫，否則在進行電泳時，玻璃會因熱脹而破裂。

- 7) 取F液稀釋成一倍溶液，並加SDS成為 0.1%；先倒入下方的正極槽，注意不可有氣泡黏在膠體，然後倒入上方的負極槽。用微量針筒或微量吸管一個一個清洗樣本槽，除去殘留在槽內的膠體(刷牙)。
 - ◆ 刷牙的動作很重要，而且要徹底，否則注入樣本時，會有大麻煩。又因為白色氧化鋁板乃白色背景，不容易看出樣本槽的位置，可用 Hoefer 所附的透明樣本槽位置模板，作為指引，順便可練習樣本添加的動作。
- 8) 取蛋白質樣本溶液，加入同體積 E 液，以及適量追蹤染料 bromophenol blue，混勻後在 100°C 加熱 10 min。放冷短暫離心後即可依次以微量吸管注入樣本槽，樣本體積可自斟酌，但要記好位置及體積；通常都使用 5~15 μL 。
 - ◆ 注入樣本時，儘量把針頭或吸管伸到樣本槽底部，但不要觸到樣本槽底的膠面，則可以使得樣本所佔的體積最小，分離效果較好。
- 9) 裝上電源蓋，以 100~150 V 進行電泳，最高可加至 200 V，視實驗的緊急程度，以及膠片發熱的情形而定。通電後兩極附近會立刻產生無數細微氣泡，是通電的特徵。
- 10) 追蹤染料很快進入膠體，開始焦集成藍色細線，並向下泳動，大約 1 h 可泳動到底邊，中止電泳，除去電源蓋。
 - ◆ 有些分子量較大的樣本，或使用濃度較高的膠片，可以等到藍色細線泳出膠體才停止。

膠片染色法：

- 11) 取出膠片組合，使玻璃板向上，先除去兩側間隔條，再以扁形藥匙輕輕撬起玻璃，膠片則留在白板上。切除焦集膠體，並在分離膠片的右上方截角做記號(區別膠片的左右)。
- 12) 取染色盤(大約比膠片稍大)，倒入CBR染色液，在染色盤上方把上述白板倒翻過來，挑起膠片一角，利用重力使膠片掉落到染色缸中。
 - ◆ 若要進行蛋白質轉印，則膠片不能染色，要浸入轉印緩衝液中。
- 13) 在 CBR 中染色約 30 min，染色盤要加密蓋，置於旋轉平台慢速 50 rpm 搖盪之；要注意膠片是否完全沒入染色液中，否則會造成染色不均勻。
- 14) 染色後小心把 CBR 染劑倒回原來瓶中，整塊膠片變成藍色，先用自來水洗掉殘餘的染色液，再倒入約 20 mL 脫色液，加密蓋後再放回旋轉平台搖盪。染色脫色過程請戴手套，否則會在膠片上留下指紋。
- 15) 膠片的藍色背景漸漸脫掉，待脫色液轉成藍色後，可以換新脫色液；如此脫色數次，在一小時內應可看到蛋白質的藍色色帶出現。用過的脫色液，請回收倒在有機溶液的廢液桶中。
- 16) 待膠片背景完全透明後，染色脫色完成。倒去脫色液，改用 50% 甲醇液洗一兩次，待膠片縮至大約原來的尺寸，則可準備乾燥之。

膠片乾燥法：

- 17) 把玻璃紙 cellophane 先用水浸溼，平鋪在乾燥用的玻璃片上，玻璃紙會比玻璃片大，因此四週有多出來的部份。
- 18) 把膠片平鋪在玻璃紙中央，膠片與玻璃紙間不要有任何氣泡。
 - ◆ 除了氣泡之外，若膠片沒有回復原來的大小，或者膠片的四邊有傷痕，都

很容易造成膠片乾燥後的龜裂現象。

- 19) 在膠片上再加一層浸溼的玻璃紙，也不要陷有氣泡在內；把玻璃紙多出來的部份反摺到玻璃背面，用手抹平表面水份，並用紙巾吸乾。
- 20) 把此乾片三明治組合放在桌上，次日即可得到已經乾燥好的膠片，用電風扇或冷氣機吹之，可以加快乾片速度。
 - ◆ 乾片後用指甲尖輕敲膠片，若還可以看到指甲所留下的痕跡，表示膠片並未完全乾燥，要再等候。
- 21) 待膠片完全乾燥後，以美工刀或剪刀去除多餘的玻璃紙，再加以護貝，則可永久保存之。免疫染色的轉印紙，也可以護貝保存。

4.2.4 蛋白質轉印法

蛋白質經SDS-PAGE後，膠片浸入轉印緩衝液，蛋白質可被轉印到硝化纖維紙(nitrocellulose) 上，先經尿素洗去SDS，並使蛋白質回復原態抗原性，可使用抗體進行免疫染色(Towbin et al, 1979)。

儀器用具：

電泳轉印槽(Hoefer Transphor TE 52)：

轉印槽(可容納 4 個轉印三明治)

轉印三明治(轉印夾、方形海綿墊 2 片)

轉印紙：早期使用硝化纖維紙，現在多用尼龍材質者

Immobilon P (Millipore IPUH 000 10, 0.45 μ m, PVDF 材質)

濾紙(Whatman #1, 3MM) 兩張，裁成比轉印紙稍大者。

供電器(可供 400~500 mA者)

方形培養皿(轉印紙清洗用)

旋轉搖盪器(rotary shaker)

藥品試劑：

轉印緩衝液(Blotting buffer)：10 $\times$ 溶液

Tris	(Tris base, 25 mM $\times$ 10)	60.6 gm
------	--------------------------------	---------

甘胺酸	(0.192 M $\times$ 10)	288 gm
-----	-----------------------	--------

加水 1,500 mL 溶之，pH 以 HCl 調到 8.3，加水至	2,000 mL
------------------------------------	----------

- ◆ 使用時取 500 mL 倒入一 5 L 桶中，加 500 mL 甲醇後，加水到 5 L，均勻攪拌之。如此配成者，含 10%甲醇；若是轉印胜肽或是蛋白質的分子量太小，可提高到 20%。

甲醇(用來潤溼尼龍材質的轉印紙)

PBST 洗液：

PBST 為 pH 7.0 的 PBS (phosphate buffered saline) 緩衝液，另加有 0.05% Tween-20，用來清洗轉印紙，以去除非專一性的蛋白質吸附。

尿素洗液(6M Urea-PBST)：

尿素 180 gm 溶在 300 mL PBST 中，加溫攪拌溶解，再加 PBST 至 500 mL。

方法步驟：

- ◆ 全程請戴手套操作，以免污染轉印紙！
- 1) 電泳後 SDS-PAGE 膠片浸在轉印緩衝液中，洗 2~3 次，每次 10 min。
- 2) 取出轉印槽，先小心放一攪拌子在底部，再倒一半轉印緩衝液。
 - ◆ 攪拌子千萬不能丟到轉印槽內，會打破轉印槽底部的陶瓷散熱片。
- 3) 取轉印紙切成約如膠片大小，先在方形培養皿中以少許甲醇浸溼數秒鐘，再置入轉印槽中的緩衝液 10 min 後使用。另取兩張濾紙，以及兩片方形海綿墊，都放在轉印槽的緩衝液中備用。
- 4) 取出轉印夾打開平放，先墊一張方形海綿墊，舖上一張溼濾紙，小心疊上已潤溼的轉印紙，其間勿陷入氣泡；轉印紙再滴上數滴緩衝液後，小心平舖膠片上去，加蓋一層濾紙，及另一張海綿，也都不可陷入氣泡，即可把整個轉印三明治卡夾裝好。
 - ◆ 膠片疊到轉印紙時，最好一次成功，不要重作，否則蛋白質色帶可能會印上去，最後產生重疊影像。
- 5) 將轉印三明治置入已經放有一半轉印緩衝液的轉印槽中，注意有轉印紙的那一面向正極 (紅色)，膠片那面向負極 (黑色)。
- 6) 當三明治都放入轉印槽後，以轉印緩衝液蓋滿所有的三明治，小心動一動卡夾，除去附在卡夾內外的氣泡，蓋上蓋子，放到一攪拌器上，打開攪拌器開始攪拌，同時接好電源，裝置完成後放置 10 min。
- 7) 以 400 mA 開始轉印，溫度會漸漸上升，轉印 1.5 h 後中止轉印，取出轉印三明治，打開後依次取出轉印紙及膠片。
 - ◆ 上述轉印條件會使溫度上升至 70~90°C，若有冷卻系統，可把溫度控制設在 5°C；轉印槽內應該加以攪拌，以便使整個溫度分佈均勻。
- 8) 轉印後的膠片可以繼續進行 CBR 染色，看有無蛋白質殘留。若電泳時加有藍色標準蛋白質 marker (SeeBlue)，則可在轉印紙上看到藍色的色帶，確定轉印成功，並可評估轉印效率。
- 9) 轉印紙浸在約 15 mL 尿素洗液中浸洗過夜，期間換三次尿素洗液，並且要溫和搖盪之。
- 10) 若不做免疫染色，則轉印後不用尿素洗液清洗，以清水沖過後改用 amido black (1 %溶於 10%甲酸) 染色 1 h，再以 10%甲酸脫色，沖水後晾乾即可，但其靈敏度較低。

註解討論：

- a. 轉印時槽內的水溫並不均勻，液面的溫度比底部要高，電流也就不會均勻，注意轉印效果因此會有差異；最好加以攪拌使水溫均勻。
- b. 膠片及轉印紙應切角做記號，以分辨左右或正反面，免得呈色後分不清樣本的次序。
- c. 甲醇可提高至 20%，一般分子量越小，所用甲醇的含量越高；但甲醇含量太高，可能會使分子量太大者不易泳離膠體。

4.2.5 免疫染色法：

轉印到紙上的蛋白質抗原，可與其專一性抗體結合，再以二次抗體-酵素結合體 (2nd Ab-HRP) 或 Protein A-HRP 呈色；可在一群轉印色帶中，專一性地挑出目標蛋白質，是最有用的檢定工具 (Burnett,1981)。

藥品試劑：

抗體溶液：可用傳統抗血清或單株抗體，其最適使用濃度，隨抗體效價不同而異，以下為一般適用範圍的參考，均以明膠-NET 稀釋之。

- | | |
|------------------|-----------------|
| a. 傳統抗血清： | 1:100 到 1:1,000 |
| b. IgG (冷凍乾燥品)： | 10~50 µg/mL |
| c. 單株抗體 (小白鼠腹水)： | 1:200 到 1:5,000 |
| d. 單株抗體 (細胞培養液)： | 原液或 1:10 |

明膠-NET：用來稀釋抗體溶液或酵素連結體

明膠 gelatin	(Merck 4070, 0.25%)	5.0 gm
NaCl	(0.15 M)	17.5 gm
EDTA	(5 mM)	3.6 gm
Tween-20	(0.05%)	1.0 mL
Tris	(Tris base, 50 mM)	12.1 gm

加熱溶解於 1,800 mL 純水後 pH 調到 8.0，再加水到 2,000 mL

酵素連結體：

可使用 2nd Ab-HRP 或 Protein A-HRP，使用濃度每家商品不同，約為 1:1,000 到 1:5,000 之間，以明膠-NET 稀釋之。

PBST 洗液

DAB 基質溶液：

DAB (diaminobenzidine, Sigma D-5637)	5 mg
--------------------------------------	------

溶於 100 mL Buffer A-0，再加 10 µL H₂O₂，新鮮配製，避光貯存。

◆ DAB 為致癌物質，稱量時勿吸入 DAB 細塵，並小心處理秤量紙。

方法步驟：

- 1) 尿素洗過夜的轉印紙再以 10 mL PBST 洗三次，每次約 10 min，均在上述方形培養皿中進行。
- 2) 轉印紙放在明膠 NET 溶液中反應，置室溫中反應 1 h。一般使用方形培養皿當容器，但亦可裝入塑膠袋中反應，較節省試劑用量。
- 3) 反應後，以 PBST 浸洗二次。
- 4) 把轉印紙放在抗體溶液中反應，置室溫反應 1 h。
- 5) 反應後以 PBST 洗三次，改用酵素連結體反應，在室溫下反應 1 h。
- 6) 以 PBST 洗四至五次，注意容器也要洗乾淨。
- 7) 加入 DAB 基質溶液約 10 mL 呈色，儘量避光，並且不時搖動呈色液。
- 8) 數分鐘內可呈色，在背景加深前倒去 DAB，以水沖過數次後晾乾。

註解討論：

- a. 非專一性的呈色經常會造成困擾，此問題可用尿素洗液解決，尿素可洗去 SDS，且使蛋白質或胜肽回復其構形或抗原性。
- b. DAB 呈色時，應含有一不會呈色之負對照組作為比較；當樣本含有標準分子量的組合時，其蛋白質色帶應不會呈色。

參考文獻：

- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248~254
- Burnett WN (1981) *Anal Biochem* **112**: 195~203
- Coligan JE, Dunn BM, Ploegh HL, Speicher DW, Wingfield PT ed (2005) *Current protocols in protein science* (Vol. **1**) John Wiley & Sons, Inc.
- Deutscher MP ed (1990) *Guide to protein purification* (Methods in Enzymology, Vol. **182**) Academic Press, Inc.
- Jefferson RA, Burgess SM, Hirsh D (1986) β -Glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 8447~8451
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680~685
- Protein Liquid Chromatography (2000) Kastner M ed, *J Chromatography Library* Vol **61**, Elsevier
- Scopes RK (1994) *Protein purification - Principles and practice*, 3rd ed, Springer-Verlag
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**: 4350~4354
- 莊榮輝 主編 (2005) 酵素化學實驗。台灣大學生化科技學系
參考網頁：酵素純化與分析 (<http://juang.bst.ntu.edu.tw/ECX/index.htm>)

致謝：

感謝台大生化所張震東教授對於本章內容，以及在教學與技術上的建議及指正。

附 錄

預定課程表

實驗儀器及各組器材表

如何撰寫實驗報告

生物技術核心實驗

本實驗課程的所有操作，可分為十五次實驗，在一學期中可以完成；若在暑假中密集上課，則約需時四週。上表是本校所規劃的預定課程表，各不同班次的實際進度可能有變動。

實驗儀器及各組器材表 列出本實驗課所需的大小儀器及各組器材

儀 器				消耗品用具			
實驗桌面				組產表			
分配方式	名 稱	數量	check	分配方式	名 稱	數量	check
每組一個	電泳槽 Mupid II	1		請小心保管組產，結業後如數交還。	自動吸管 Autopipet	3	
	冰桶	1			吸管盒	2+2	
	定量瓶	1			馬克筆	2	
	漏斗	1			標籤色帶	1	
	量筒	1			計時器	1	
	燒杯	3+1			微量試管架	1+1	
	震盪器 Vortex	1			微量試管盒	桌上	
	管柱	1			離心管	2	
	鐵架	1+3			剪刀	1	
	收集器	1			刀片 (小心勿割傷)	1	
	電泳槽 Mighty Small	1			刀柄	1	
多組一個	桌上離心機 (單數組)	1/2			玻璃缸組	1	
	加熱攪拌器 (雙數組)	1/2			玻璃棒	1	
	分光光度計 (第二組)	1/4			接種環	1	
	小烏龜離心機 (第三組)	1/4			浮船	1	
	轉印槽 Transphor (第一組)	1/4			酒精燈	1	
	供電器	1/2			藥匙	1	
公用儀器					鑷子	2	
公用桌	看片箱	3			VSWP 濾膜	1	
	水浴	4+2			攪拌子	1	
	微波爐	1			針頭	1	
	ELISA reader	1			打火機	1	
	離心濃縮機 SpeedVac	1			蛋白質零件盒	1	
暗室	DNA Cross-linker	1		其他公用物品 實驗室公用桌			
	震盪培養箱	1		公用桌	膠膜 Parafilm		
	UV illuminator + 相機	1			鋁箔		
	高速離心機	1			保鮮膜 Saran wrap		
	無菌操作台	1			手套		
			各種公用溶液				
準備室	天平 (0.00)	4					
	天平 (0.000)	3		自取	小垃圾罐		
	PH 酸鹼度計	2			洗瓶		
	純水機 Millipore	1					
	製冰機	1					
	冷凍櫃 -20℃	1					

如何撰寫實驗報告

通 則：

實驗報告是 完全根據你自己的實驗歷程撰寫的，因此除了小部份引用他人的文獻之外，都必須是實際的實驗過程與結果的記錄。報告的長短與成績並不一定成正比，實在而有創見的一句話，比起千百行空話要有價值。每個人要寫自己的報告，膠片等影像結果可用掃描或彩色影印附上；儘可能使用電腦及文書處理軟體。

報告的結構：

雖然以下大略描述一般報告的構造與寫法，但報告或論文的格式並無一定規格，只要寫得合理、正確、一致，均為好的論文報告。事實上只要隨手翻開一本科學期刊，參照裡面論文的格式，用心來寫報告，也可以有相當好的成果。

Cover and Content:

第一頁為封面及目錄，上半頁依序寫入 實驗課編號、題目、組別、作者、交出日期等訊息；下半頁要整裡出一張目錄表，詳細標出各項內容的頁碼。

Introduction:

簡單描述實驗的動機與目標，請用 自己的話 說出來，不要直接抄襲。若需要引用他人文獻，請小心註明出處。

Materials and Methods:

請寫出 你自己的 實驗步驟，完全記錄下你所操作的流程與條件，而非講義或論文上所載者。這部份最容易過度抄襲，若完全遵照已知報告或論文中的方法，請加註出處即可，不要原文照抄一次，那沒有任何意義。

Results:

條理分明地寫出你的結果，老實陳述觀察所得結果。實驗數據要經過整理後，作成圖表以利判讀；不要將原始資料原封抄錄。若重複嘗試過多次實驗，請去蕪存菁，只寫出有意義的實驗結果，以免空佔篇幅；但切勿遺漏重要結果。

Discussion:

由結果所得到的觀察，進一步整合分析，說明由結果所透露出來的信息。若有與事實或已知不符的現象，請仔細討論或解釋之；此部份最需發揮專業背景實力。

References:

報告中若有引用他人結果者，一定要列入參考文獻。編輯參考文獻要多下苦功，切勿因為文獻不容易查或不好打字而隨便交差。參考文獻的寫法相當複雜，不同期刊有不同格式，請選定一種寫法；可參考使用 *Plant Physiology* 上的格式。

Figure and Table:

圖表一定要精確製作，正確而易懂的圖表，最有助於研究結果的判讀。所有圖表都要依序編號，並且加註說明文字；好的圖表自己會說話，讀者只要研讀單獨的圖表即可瞭解實驗結果。雖然沒有嚴格規定，但使用電腦軟體作圖已成為必要，*SigmaPlot* 為最常用且必備者。作圖方法的最佳範本都在現成的期刊上，多參考別人如何安排圖表內容，是最佳的學習方式。

Index 索引

abSolve [商品名] 中性清潔劑, 57
 Acetic acid 醋酸, 81
 Acrylamide 丙烯醯胺, 3, 80
 Activity assay 活性分析, 10, 67-68, 78
 Activity unit 酵素活性單位, 78
 Affinity chromatography 親和層析法, 67-68, 75
 Agarose gel electrophoresis 洋菜膠體電泳, 16-17
 Agarose gel 洋菜膠體, 16-17, 24, 26, 28, 30, 48-49
 Agarose 洋菜糖, 16, 23, 39, 48, 59
 Alkaline lysis 鹼溶菌作用, 21
 Alkaline phosphatase 鹼性去磷酸酶 31, 63
 Alumina plate 氧化鋁板, 79, 82-83
 2-Amino-2-methyl propanediol, 2-胺基-2-甲基丙
 二醇, 78
 Amido black 醯胺黑, 85
 Ammonium acetate 醋酸銨, 26-27
 Ammonium persulfate (APS) 過硫酸銨, 81-82
 Ammonium sulfate 硫酸銨,
 percent saturation 百分飽和度表 (0°C), 70
 protein fractionation 蛋白質分劃, 67-69
 Ampicillin 胺苄青黴素抗生素, 45-46
 Antibody 抗體,
 monoclonal antibody 單株抗體, 86
 primary antibody 一次抗體, 37
 secondary antibody 二次抗體, 37, 86
 Antisense RNA 反意股 RNA, 43, 52
 Autopipet 微量吸管, 5-8
 Autoradiography 放射顯影術, 63

 Back-extraction 反萃取, 51
 BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate), 5-溴
 -4-氯-3-吲哚磷酸, 63
 Biotin 生物素, 53
 Bis (*N,N*-methylene-bis[acrylamide]) 亞甲雙丙
 醯胺, 80
 Blotting buffer 轉印緩衝液, 84-85
 Borate buffer 通用電泳緩衝液, 81, 83
 Boric acid 硼酸, 80-81
 Bovine serum albumin (BSA) 牛血清白蛋白, 24,
 76
 Bradford method 蛋白質定量法, 76-77
 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-glucuronide
 (X-Gluc), 5-溴-4-氯-3-吲哚葡萄糖苷酸, 38
 Bromophenol blue 溴酚藍, 16-17, 23, 81, 83
 Buffer A-0 緩衝液 A-0, 67, 69, 74, 76

Buffer A-150 緩衝液 A-150, 67, 69, 71-72
 Buffer A-300 緩衝液 A-300, 74
 Buffer A-500 緩衝液 A-500, 74
 Buffer B 緩衝液 B, 75
n-Butanol 正丁醇, 26-27

 Calcium chloride (CaCl₂) 氯化鈣, 32-33
 Capillary transfer 毛細管轉移, 60-61
 Cellophane 賽路芬 (玻璃紙), 80, 83
 Centrifuge 離心機, 3,
 high speed 高速離心機, 67
 Centriprep (Amicon) [商品名] 濃縮用離心管,
 71-72
 Chamber buffer 電泳緩衝液, 80
 Chloroform 氯仿, 36-37, 39, 49-51
 Chromatography 色層分析法, 67, 71-75
 CI, chloroform/isoamyl alcohol 混合液, 22, 26,
 Cohesive end 黏端, 17
 Colony hybridization 菌落雜和反應, 19-20, 36-37
 Column packing 管柱裝填, 71-72
 Column 管柱, 71-75
 Comb 樣本齒模, 樣本梳, 16, 59, 79, 82
 Competent cell 勝任細胞, 32-33
 Conformation 構形, 57
 Coomassie Brilliant Blue 蛋白質染劑,
 gel staining method, CBR 染色法, 81, 83
 protein assay, CBG 蛋白質定量法, 76-77
 Copy number 複製倍數, 22
 Crude extraction 粗抽取液, 69
 Cuvette 石英測光管, 9

 DEAE membrane NA 45 [商品名] DEAE 濾膜,
 26-27
 DEAE Sephacel [商品名] 陰離子交換膠體, 74
 Denaturing gel electrophoresis 變性膠體電泳, 57
 Denaturing reagent 變性劑, 57
 Denaturing solution 變性溶液, 40-41
 DEPC (diethylpyrocarbonate) 雙乙基焦碳酸,
 RNase 抑制劑, 43-47, 50-52, 57-61
 Desiccator 乾燥器, 22, 36-37
 Destaining solution 脫色液, 81, 83
 Dialysis 透析, 27
 Diaminobenzidine (DAB) 二胺基聯苯胺, 37,
 86-87
 DIG (digoxigenin) 53-55, 63-64
 DIG nucleic acid detection kit, DIG 標定核酸偵測
 套組, 63-64
 Disc-PAGE 原態電泳, 不連續電泳, 79
 Dithiothreitol (DTT) 二硫醇蘇糖醇, 31
 DMSO (dimethyl sulfoxide) 二甲基磺酸 57
 DNA extraction, DNA 萃取, 27, 49
 DNA polymerase, DNA 聚合酶, 53, 55-56

DNA quantitative analysis, DNA 定量, 19, 30
 DNA template, DNA 模板, 51, 55
 DNase, DNA 水解酶, 36, 51
 dNTP (deoxynucleotide triphosphates) 三磷酸去氧核苷酸, 54

 EDTA (ethylenediamine tetraacetic acid) 乙二胺四乙酸, 15, 26, 36, 45, 54, 64, 67, 69, 81, 86
 Electroblothing 電轉印, 60
 Electrophoresis 電泳, *see* agarose electrophoresis, SDS-PAGE, disc-PAGE
 Electroporation 電穿孔, 34-35
 ELISA reader, ELISA 光度計, 76-78
 End labeling 端點標定, 53
Escherichia coli (*E. coli*) 大腸桿菌, 1, 11-12, 19, 32-34, 38, 45
 Ethanol 乙醇 (酒精), 21-22, 45-46, 49-51, 54-55
 Ethidium bromide (EtBr) 溴化乙錠, 3, 16-17, 23-24, 26, 28, 48-49, 58-59
 Expression vector 表現載體, 1-2
 Expression plasmid 表現質體, 19, 32, 45
 Extinction coefficient 消光係數, 10

 Formaldehyde 甲醛, 57-59
 Formamide 胺酸甲醯胺, 59
 Fraction collector 分劃收集器, 71, 73-75
 Free radical 自由基, 81

 Gel drying method 膠片乾燥法, 83-84
 Gel filtration 膠體過濾法, 67-68, 71-73
 Gelatin 明膠, 36, 86
 Gelatin-NET 明膠-NET 溶液, 36-37, 86
 Genotype 基因型, 22
 Glucose 葡萄糖, 32
 β -Glucuronidase (GUS) 葡萄糖苷酸酶, 1-2, 10, 19, 32, 36, 38, 43, 45, 67, 78
 catalytic reaction 催化反應, 10, 78
 Glucuronide 葡萄糖苷酸, 19
 Glycerol 甘油, 15, 23, 34
 Glycine (Gly, G) 甘胺酸, 80, 84
 Glyoxal 乙二醛, 57
 Gradient gel electrophoresis 梯度電泳, 79
 Gram-negative lysing buffer 革蘭氏陰性菌溶菌緩衝液, 45-46
 Growth curve 生長曲線, 12-13, 33
 GTC (guanidium thiocyanate), RNase 抑制劑, 44
gus operon 葡萄糖苷酸操作子, 19
 Gus reaction buffer, Gus 基質溶液, 78
 GUS *see* β -glucuronidase

 Heat shock 熱休克, 33
 Histidine (His, H) 組胺酸, 1, 75

Histochemical detection 組織化學偵測, 19-20, 38
 Hood 通風櫥, 抽氣櫥, 3, 59
 Horse radish peroxidase (HRP) 山葵過氧化酶, 86
 Hydrogen peroxide 過氧化氫, 37, 57, 86

 Imidazole 咪唑, 75
 Immunostaining 免疫染色, 86-87
In situ hybridization 原位雜合反應, 55
In vitro transcription 胞外轉錄反應, 22, 44, 47, 50-52
In vitro translation 胞外轉譯反應, 44, 52
 Incubator 恆溫震盪培養箱, 45-46, 67
 Inducer 誘導物, 32
 Inducible gene 誘導性基因, 19
 Ion exchange 離子交換法, 67-68, 74
 IPTG (isopropylthiogalactoside) 異丙基硫代半乳糖苷, 32, 36-38, 43, 45-46
 Isoamyl alcohol 異戊醇, 22, 49
 Isopropanol (isopropyl alcohol) 異丙醇, 21-22
 Isoschizomer 同位限制酶, 15

 Kanamycin 康黴素, 45-46
 Kinase reaction 激酶反應, 53
 Klenow fragment (Klenow enzyme), Klenow 片段, 53-54

 Label 標定, 53
lac operon 乳糖操作子, 32
lac repressor 乳糖操作子抑制物, 32
 Laminar flow hood 無菌操作箱, 22
 LB agar plate, LB 固體培養基, 11-13
 LB broth, LB 培養液, 12-13
 Ligase 接合酶, 19, 31
 Ligation 接合反應, 19-20, 31
 Light box 看片箱, 79
 Liquid nitrogen 液態氮, 34, 67, 69
 Lithium chloride 氯化鋰, 54-55
 Lysis buffer 溶菌緩衝液, 36-37, 67, 69
 Lysozyme 溶菌酶 45-46, 36

 Maleic acid 順丁烯二酸, 63
 β -Mercaptoethanol β -巯醇基乙醇, 67, 69, 81
 Messenger ribonucleoprotein particles (mRNPs) 訊息核糖核蛋白粒子, 57
 Messenger RNA (mRNA) 訊息 RNA, 43, 45, 52, 58
 Metal chelating affinity chromatography 金屬螯合親和層析, 75
 Methanol 甲醇, 81, 83-85
 Micropipet 微量吸管, 5-8
 Microtiter plate 微量滴定盤, 76-78
 Mineral oil 礦物油, 55-56

Mobility 泳動率, 17, 23, 57, 79

Molecular weight determination 分子量測定, 72-73

Molecular weight standards 標準分子量組合, gel filtration 膠體過濾標準組, 71

LadMr (1 Kb DNA Ladder Fragment), DNA 標準分子量, 16, 18, 23

λMr (DNA/Hind III), DNA 標準分子量, 16-18, 23, 30

SDS-PAGE, SDS 電泳標準組, 81-82

Western transfer 電泳轉印標準組, 82, 86

Monoclonal antibody 單株抗體, 86

NBT (nitroblue tetrazolium) 氮藍四唑, 63

NET 緩衝液, 26-27, 39

Neutralization solution 中和溶液, 41

Ni 鎳, 75

Nick translation 缺口移位, 53

Ni-NTA agarose 鎳螯合親和層析膠體, 75

Nitrocellulose membrane 硝化纖維紙, 36-38, 60, 84

p-Nitrophenol 對硝基酚, 10, 78

p-Nitrophenyl β-D-glucuronide (pNPG), GUS 人造基質 1, 10, 78

Nitrotriactic acid (NTA) 硝基三乙酸, 螯合劑, 75

Northern blotting 北方轉印, 60-61

Northern hybridization analysis 北方雜合分析, 43-44, 57, 61-63

NTPs (nucleotide triphosphates) 三磷酸核苷酸, 50-51

Nucleic acid probe 核酸探針, 53, 55, 61-63

Nylon membrane 尼龍膜, 41, 60-64

Overnight suspension culture 過夜菌液, 12-13

Overproduce 過量表現, 32

Partition chromatography 分配色析法, 71

pBlueGus 1-2, 19, 21-26, 40, 43-44, 47-51, 59

pBluescript 1-2, 14, 17, 19, 23

PBS (phosphate buffered saline) 磷酸生理食鹽水, 36-37, 84

PBST (phosphate buffered saline and Tween) 含 Tween 磷酸生理食鹽水, 36-37, 84, 86

PCI phenol/chloroform/isoamyl alcohol 混合液, 22, 39, 49-50

PCR DIG probe synthesis kit 聚合酶連鎖反應 DIG 標定引子合成套組, 55

PEG (polyethylene glycol) 聚乙二醇, 31

Peptide 胜肽, 87

Phenol 酚, 15, 39, 49, 55

Plasmid isolation 質體分離, 19-22

PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride) 苯甲基磺

醯化氟, 67, 69

Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) 聚丙烯醯胺膠體電泳, 79

Polymerase chain reaction (PCR) 聚合酶鎖鏈反應, 1, 53, 55-56

Power supply 供電器, 3, 79

pQE31 1-2, 19, 23-26, 28, 30-32, 36, 39-40

pQG11 1-2, 20, 43-46, 67

Primary antibody 一次抗體, 37

Primer 引子, 53

Promoter 啟動子, 32

Protein A 蛋白質 A, 86

Protein assay 蛋白質定量分析, 67-68, 76-77

Protein extraction 蛋白質抽取, 67-69

Protein purification 蛋白質純化, 67-75

Protoplasting buffer 原生質體緩衝液, 45

PVDF (polyvinylidene difluoride) 尼龍轉印紙, 84-86

Quick screening 快速檢定, 20, 39

Random primer 隨機引子, 53-54

Random priming kit 隨機引子套組, 54

Restriction enzyme analysis 限制酶分析, 23-24, 39-40

Restriction enzyme 限制酶, 14-15, 23-25

Restriction map 限制圖譜, 14, 18

Ribosomal RNA (rRNA) 核糖體 RNA, 43, 58

Ribosome binding sequence 核糖體結合序列, 1

RNA polymerase, RNA 聚合酶, 43, 47, 50-51

RNA preparation, RNA 製備, 43-52

RNA quantitative analysis, RNA 定量, 47

RNase A, RNA 水解酶 A, 21-22

RNase inhibitor, RNase 抑制劑, 43-44, 50

RNase, RNA 水解酶, 39, 43-45, 57

RNasin, RNase 抑制劑, 51-52

Rotary shaker 旋轉振盪器, 64, 79, 83-84

Rotor 離心轉陀, 67

Running buffer 分離膠體緩衝液, 80

Running gel 分離膠體, 82

Sandwich method (gel drying) 三明治膠片乾燥法, 83-84

SDS (sodium dodecyl sulfate) 硫酸十二酯鈉, 21, 45, 61-63, 79, 81-84

SDS-PAGE sample buffer, SDS-膠體電泳樣品溶液, 80-81, 83

SDS-PAGE, SDS-膠體電泳, 68, 79-85

Secondary antibody 二次抗體, 37, 86

Secondary structure 二級構造, 57

Sense RNA 正意股 RNA, 43, 52

Separating buffer, see running buffer

- Sephacryl [商品名] 膠體過濾層析膠體, 71
 Silica gel 矽膠, 28
 Single colony 單一菌落, 11
 Small cytoplasmic RNA (scRNA) 小胞質 RNA, 43
 Small nuclear RNA (snRNA) 小胞核 RNA, 43
 SOB broth SOB 液體培養基, 32-34,
 SOB plate SOB 固體培養基, 33-34
 SOB/Amp plate SOB/Amp 固體培養基, 33
 SOC broth SOC 液體培養基, 33-35
 SOC/Amp plate SOC/Amp 固體培養基, 33-35
 Sodium acetate (NaOAc) 醋酸鈉, 49
 Sodium azide (NaN₃) 疊氮化鈉, 73
 Sodium dodecyl sulfate, *see* SDS
 Sodium hydroxide 氫氧化鈉, 21
 Southern hybridization analysis 南方雜合分析, 20,
 62-63
 Southern blotting 南方轉印, 19, 40-41
 Spacer 間隔條, 79, 82-83
 Spectrophotometer 分光光度計, 9, 12-13, 45, 47
 SpeedVac [商品名] 真空乾燥濃縮機, 21, 39
 Spermidine 亞精胺, 51
 Spreader 菌液塗抹棒, 12-13
 SSC 緩衝液, 40-41, 60-63
 Stacking buffer 焦集膠體緩衝液, 80
 Stacking gel 焦集膠體, 82
 Stop buffer 終止液, 10, 78
 Stringency 嚴苛度, 61
 Subclone 次選殖, 19, 47
 Sucrose 蔗糖, 45

 TAE 電泳緩衝液, 16, 23, 28
 Target gene 目標基因, 67
 Target protein 目標蛋白質, 67
 TE-8.0, TE 緩衝液, 21-22, 28-29
 TEMED (tetramethylenediamine) 四甲基乙二胺,
 80
 Tip, autopipet 微量吸管頭, 5
 Total protein 全蛋白質, 69
 Tracking dye 追蹤染料, 16-17, 23-25, 81, 83
 Transfer RNA (tRNA) 傳送 RNA, 43, 58
 Transformant 轉形株, 19-20, 36, 38-39
 Transformation 轉形, 19-20, 32-35
 Tris (tris[hydroxymethyl]aminomethane) 三羥甲基
 胺基甲烷, 14, 16, 28-29, 36, 45, 64, 80-81,
 85-86
 Triton [商品名] 界面活性劑, 67, 69
 Tween [商品名] 界面活性劑, 36, 64, 84

 Urea 尿素, 57, 84-85
 Urea-PBST 尿素洗液, 84-85
 UV crosslinker 紫外線連結儀, 41, 62
 UV irradiation 紫外線照射, 60-61

 UV transilluminator 紫外線光源, 3, 16-17, 26, 30,
 39, 48-49, 58, 60

 Vacuum drying 真空乾燥, 60
 Vacuum transfer 真空轉移, 60
 Vanadyl-ribonucleoside complexes, RNase 抑制劑,
 45
 Vector 載體, 1-2
 VSWP [商品名] 濾膜, 26-27

 Western transfer 蛋白質轉印, 84-85