

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

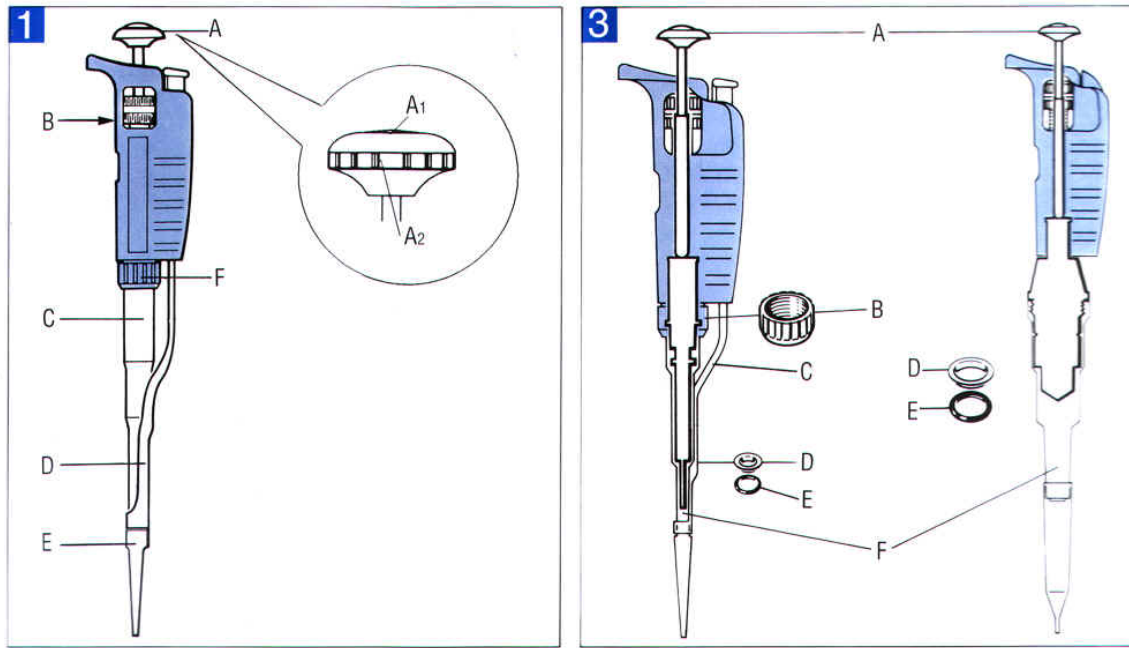
按鈕 (圖 1.2)。釋放按鈕不可太快，以免溶液衝入吸管柱內而腐蝕活塞。微量吸管頭尖端浸入溶液的程度隨吸取的體積及使用型號而定：

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)

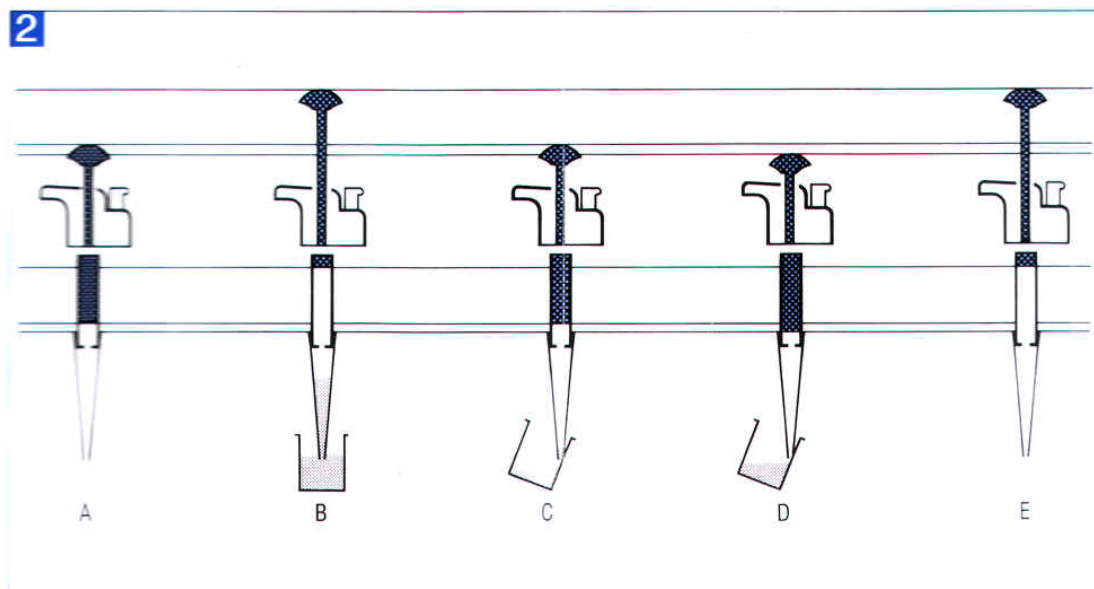


圖 1.2 微量吸管 Pipetman P 的使用

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。

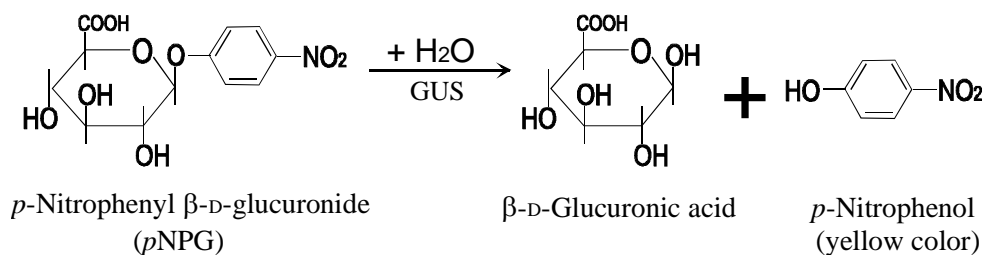


圖 1.3 β -Glucuronidase (GUS) 催化之反應

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。

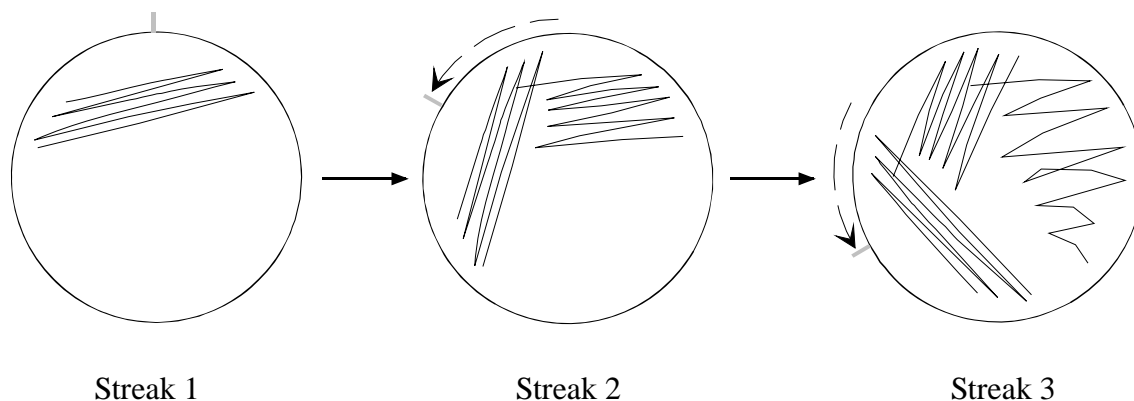


圖 1.4 分離培養單一菌落的方法

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：

- a. 請隨時保持實驗桌之清潔。
- b. 微量吸管頭及微量離心管取出後立即將蓋子蓋上。
- c. 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。
- d. 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：

- 1) 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。

- 2) 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 °C時不會凍結。有些限制酶相當不穩定，必須存放在 -70°C，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°C 冷凍盒或冰浴中，短暫離心(4°C)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°C 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/*Hind*III 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！

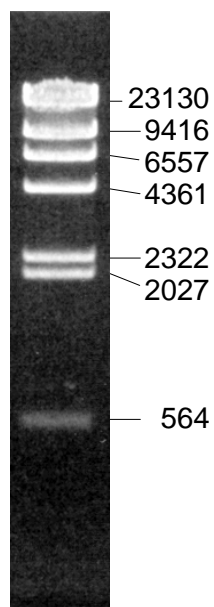
註解討論：

- a. 亦可在鑄膠時不加入 EtBr，而於電泳後以含 0.5 $\mu\text{g/mL}$ EtBr 之 $1\times\text{TAE}$ 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

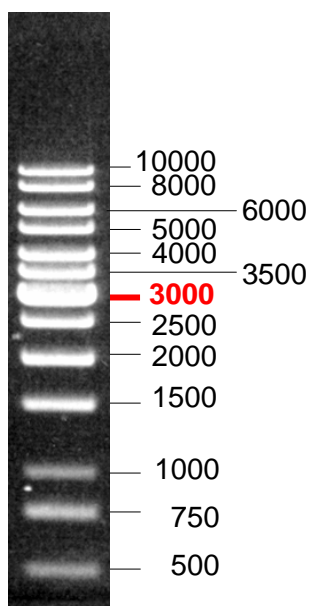


圖 1.5 DNA 標準分子量之組成片段與在 1% 瓊脂糖膠片的電泳圖譜

(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