

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。

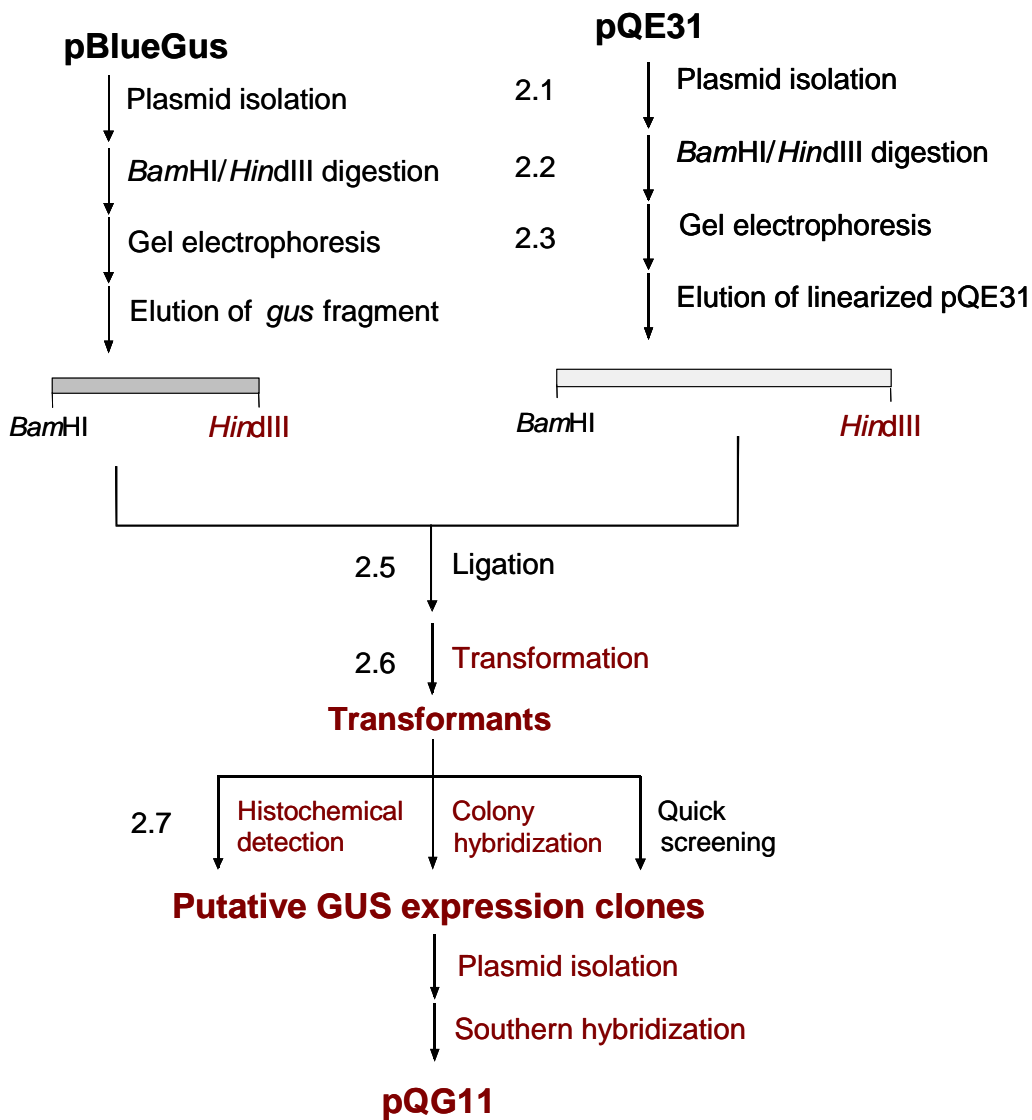


圖 2.1 表現質體 pQG11 之建構流程

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。

注解討論：

- 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 節注解討論 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。

注解討論：

- 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 μL 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 μL 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 pH ≤ 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 μ L 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。

注解討論：

- 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 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/ μ L, 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 μ L) 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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 $4\sim 7 \times 10^7/\text{mL}$ 。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 ($<10 \mu\text{L}$) 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 μL 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 μL 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 μL 至另一離心管中, 加入 180 μL SOC (稀釋 10 倍), 混合均勻後, 塗佈於 SOC/Amp plate。#0, #1~#4 各取 200 μL 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 μL 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：

- a. 每 10 mL 培養液可供 2 個轉形反應。
- b. 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。
- c. 0.1 M CaCl₂ 亦可以 Hanahan (1985) 所提之轉形緩衝液 (100 mM KCl, 45 mM MnCl₂, 10 mM CaCl₂, 3 mM H₂NCoCl₃, 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。(H₂NCoCl₃: hexamine cobalt trichloride)
- d. 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 positive control，第 5 管 (#5, uncut pQE31) 則為轉形反應的 positive 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：

- 1) 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。
- 2) 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 $4\sim 7 \times 10^7$ /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 μ L 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 μ F 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 μ L 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，在室溫震盪 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C 直至菌落長出。亦同時接種於 3 mL LB/Amp 培養液，於 37 $^{\circ}$ 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