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
黃瀅如
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 膠体過濾法 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 膠体電泳法 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

NTU

台灣大學生技中心

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 *gus* 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 黃瀅如 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 方素嫣 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 高顥瑋	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	陳霈芝 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 黃瀅如	29
89F (青輔會培訓班)			
張慈映	張慈映	吳建興 黃瀅如 吳雨書 陳怡安	30
			名

生物技術核心實驗教學小組