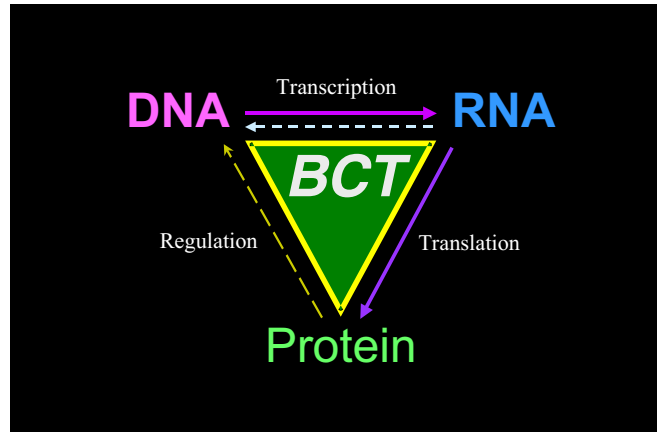


本實驗課程內容的快速導覽 概 說

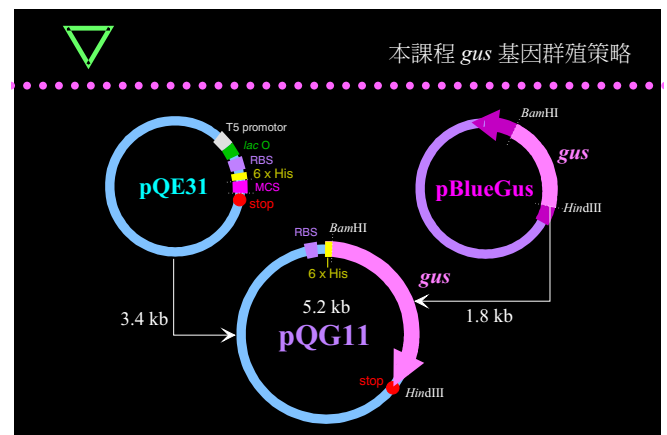
BCT 課程以 Central Dogma 為主軸，從 DNA 經 RNA 到蛋白質的一連串基因表現過程，以一已知基因 *gus* 為對象，將其殖入表現載體 pQE31，觀察其 DNA 以及 mRNA 表現，並檢定其表現蛋白質之構造與活性。

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。



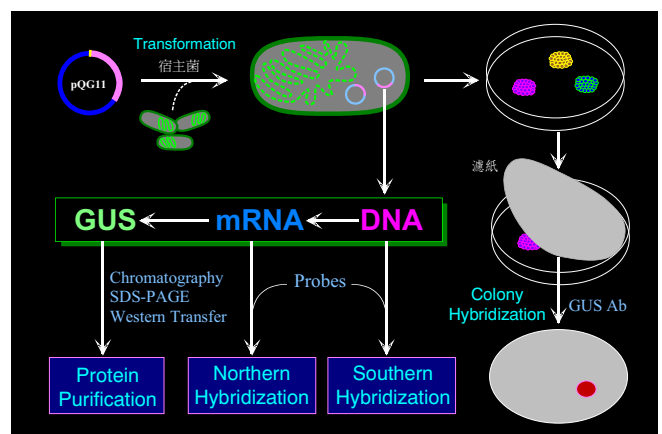
Slide 1

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。



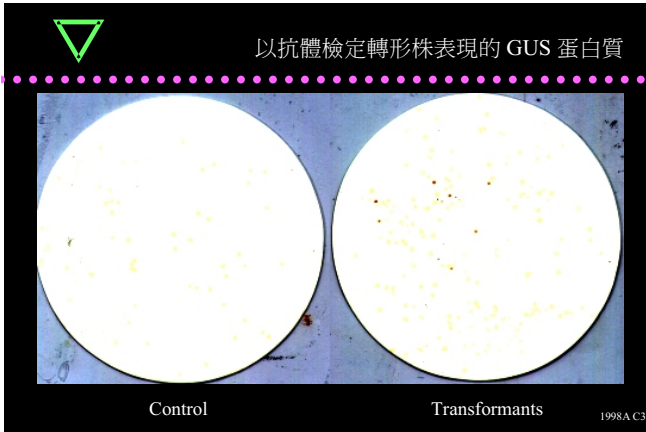
Slide 2

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。



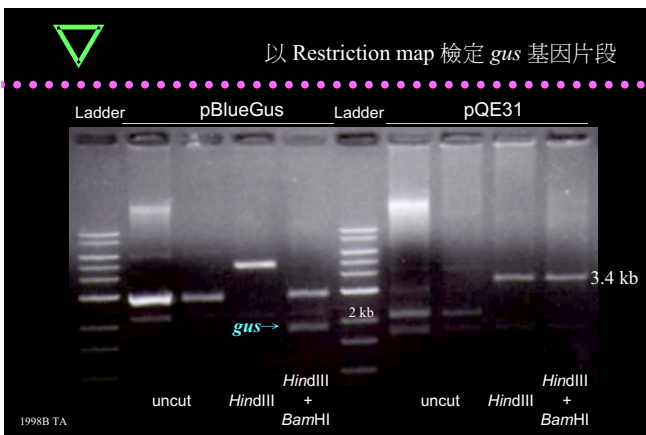
Slide 3

概 說



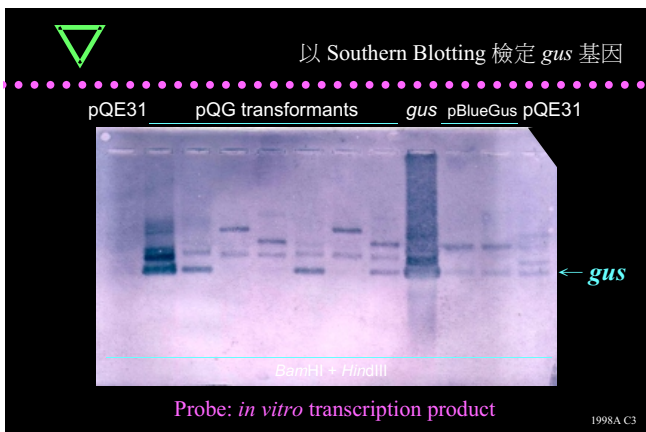
經由 colony hybridization 可用專一性抗體挑出含有正在表現 *gus* 基因的轉形株 (右側濾紙)，不含重組質體的對照組則無 (左側)。

Slide 4



抽取轉形株的質體並以限制酶酵解，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

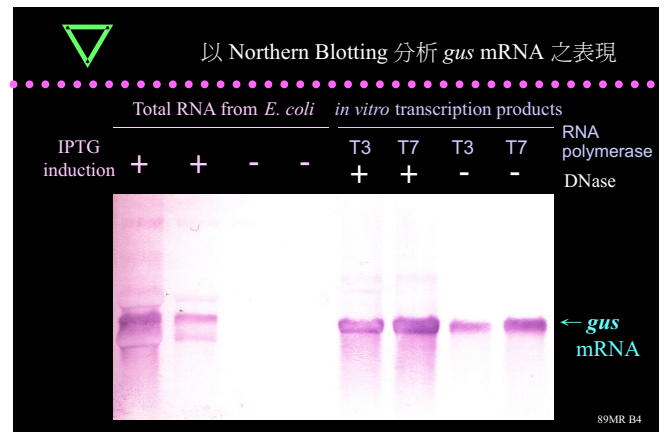


由 Southern blotting 確可在轉形株 DNA 中偵測得正確長度的 *gus* DNA 片段，圖中的正負控制組，均得到預期的結果。

Slide 6

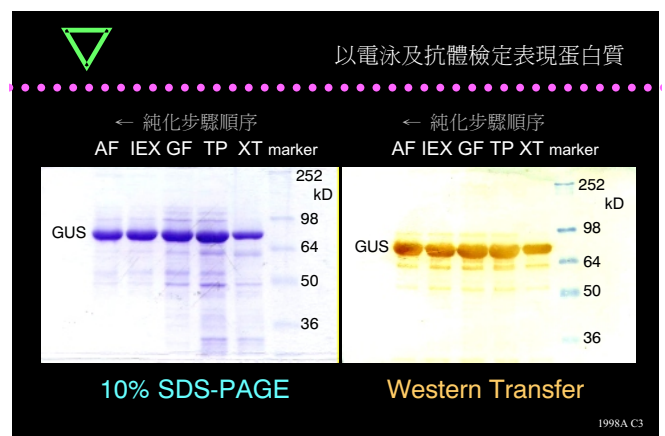
這些轉形株的 *gus* 基因，若以 IPTG 誘導，則可由 Northern blotting 看到其 mRNA 產物；所用的探針，則是自行由 PCR 所合成得到；由 *in vitro* transcription 所得到的 RNA 中，也有可被探針偵測到的色帶。

Slide 7



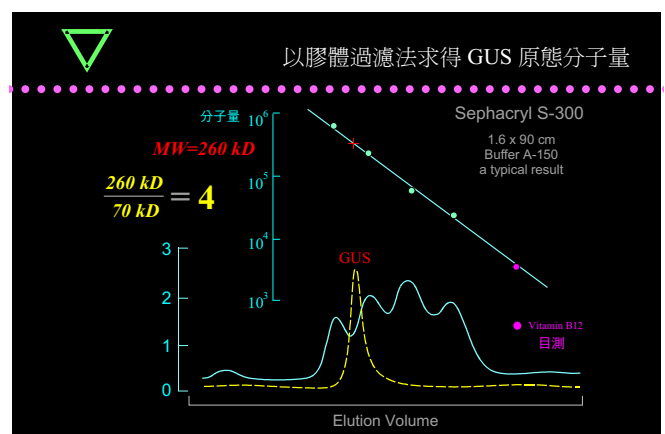
將轉形株大量培養並且破菌收集其蛋白質，經過膠體過濾法、離子交換法、親和層析法等，逐步把酵素純化，每一步驟除了追蹤 GUS 酵素活性之外，並以抗體檢定 (右圖 Western blot)。結果顯示各階段的純化效果相當良好，並顯出抗體與 GUS 間的高度專一性。

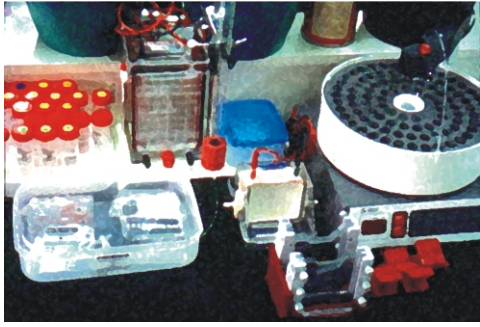
Slide 8



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 :-)