

海洋生物技術
魚類基因轉殖及動物基因選殖實驗
Fish Transgenics and Animal Gene Cloning

陳鳴泉

國立高雄海洋科技大學
海洋生物技術系(所)

2007-8

本實驗在8/13~8/16四天進行，共有2大單元。

第一單元：

美麗海葵Rab11 cDNA的選殖(8/13-14)

第二單元：

魚類基因轉殖與表現分析 (8/15-16)

第一單元：

美麗海葵Rab11 cDNA的選殖(8/13-14)

1. Total *A. pulchella* RNA isolation (~1 hr)
2. Characterization of the RNA preparation (~1 hr)
3. Synthesis of cDNA (~1 hr)
4. PCR amplification of ApRab11 cDNA (3 hrs, O/N)
5. Analysis of PCR products by agarose electrophoresis (~1 hr)
6. Purification of the amplicon (~1 hr)
7. Ligation of the purified amplicon into cloning vector (1-hr)
8. Bacterial transformation (1.5-hr)
9. Plating and Incubation (O/N)
10. PCR-based screening for bacterial colonies containing the recombinant plasmid (3-hr)

Total *A. pulchella* RNA isolation

1. 取總體積為0.1 mL之海葵，置入微量離心管中，加入1 mL TRIzol以研磨杵磨碎。
2. 加入0.2 mL chloroform並蓋緊蓋子，以手用力將之上下搖晃震盪15秒（勿用vortex）使之混合均勻，於室溫下靜置5分鐘。
3. 於4°C下，以12,000 xg離心15分鐘。可見下層為紅色之phenol-chloroform有機層（organic phase），上層為含有RNA之無色水相層（aqueous phase，約佔總體之60%），另外則為含有DNA及蛋白質之中層。
4. 將上層清液（約0.5 mL）移至新的微量離心管，並加入0.5 mL isopropanol均勻混合後於室溫下靜置10分鐘。
5. 於4°C下，以12,000 xg離心10分鐘，此時應有白色沈澱出現，小心倒掉上清液，並以pipetman盡量吸掉殘留液體。
6. 加入1 mL 經ddH₂O/DEPC處理之75%酒精，於4°C下，以7,500xg離心5分鐘，倒去酒精後將離心管倒置於桌上或置於真空乾燥機中5~10分鐘，以便風乾RNA。
7. 將RNA溶解於適量之ddH₂O/DEPC或0.5% SDS，或1 mM EDTA（pH 8.0）。可將之靜置於55~60°C下10至15分鐘，使RNA溶解。
8. 貯存於-80°C備用。

總RNA之電泳分析

1. 準備1.0%原性洋菜膠，秤取1 g agarose置於250 mL錐形瓶內，加入72 mL之ddH₂O/DEPC。
2. 以微波爐加熱溶解後，輕微晃動使之均勻混合。
3. 於凝固前，將之倒入鑄膠器，並插入樣本梳(teeth comb)，須注意防止氣泡形成，以免影響膠體凝結。膠體凝固約需時30分鐘。
4. 取~2 µg 總RNA加入1.5 ml微量離心管中，65°C加熱5分鐘後，置於冰上。
5. 隨後再加入1 µL RNA gel-loading buffer與1 µL EtBr (亦可不加，但須於電泳結束後以EtBr染色，並以ddH₂O/DEPC沖洗數次)，均勻混合。
6. 依序加入RNA樣品，以5 V/cm定電壓跑，待bromophenol blue (BPB, 藍色) 染劑移動至膠體2/3處時，關閉電源，將膠體移至UV transilluminator box上觀察RNA亮帶存在的情形，並拍照存證。

Synthesis of cDNA

1. 反轉錄反應之組裝：

RNA (~2 µg)	X µL	
oligo(dT) primer	1 µL	
0.1 M DTT	1 µL	
10 mM dNTP Mix	2 µL	
DEPC-Treated Water	8-X µL	
Total volume	12 µL	
2. 靜置於65°C下5分鐘，使RNA變性。
3. 置於冰上5分鐘。
4. 加入8 µL之cDNA synthesis mix。

ThermoScript™ RT (15 U/µL)	1 µL	
5x cDNA synthesis buffer		4 µL
0.1 M DTT	1 µL	
RNaseOUT™ (40 U/µL)	1 µL	
DEPC-Treated Water	1 µL	
5. 於50°C下靜置 60分鐘，開始合成cDNA。
6. 靜置於85°C下5分鐘，終結反應。
7. 加入1 µL之RNase H，靜置於37°C下20分鐘，以除去RNA模板。
8. 貯存於-20°C備用，或取2 µL進行後續之PCR反應。

PCR amplification of ApRab11 cDNA

1. 配製PCR預混物，方式如下：

cDNA (100 ng/μL)	2.0 μL	
10X PCR buffer		5.0 μL
2.5 mM dNTPs		4.0 μL
Primer (forward) 10 pmol/μL	0.5 μL	
Primer (reverse) 10 pmol/μL	0.5 μL	
Taq DNA Polymerase (2 U/μL)	0.5 μL	
ddH ₂ O		37.5 μL
總體積		50.0 μL

2. PCR反應物經混合均勻後，分裝至0.2-mL PCR微量分析管，置於PCR熱循環器中

進行35個循環之加熱反應，反應條件如下：

預熱變性階段	94°C	2 min
DNA變性處理	94°C	30 sec
引子黏合反應	55°C	30 sec
新股合成作用	72°C	1 min
增加PCR產物完整性	72°C	5 min
降溫保存	4°C	∞

3. PCR反應完成後，取10 μL反應物加上1 μL呈色劑混合均勻後置於1.5%洋菜膠體進行電泳分析。

Purification of the amplicon

1. Agarose electrophoresis。
2. Ethidium bromide染色 ~8 min。
3. 切膠：在UV light下，事先要用EtOH擦乾淨，鋪保鮮膜，使用完也要用EtOH擦乾淨。
4. 切完的gel放入2 mL的ependorf，秤重。
5. 加入3X的Buffer QE，置於乾浴槽55°C，~10min，至全溶。
6. 加入1X的isopropanol，mix，倒入裝置好的column。
7. Centrifugation at top speed for 1 min，discard the flowthrough。
8. 加入0.75 mL PE buffer (washing 二次)，top speed for 1 min。
9. discard the flowthrough，空轉離心 ~ 2 min。
10. 換new microcentrifuge tube，加入20 uL EB buffer，waiting 3 min，Centrifugation for 1 min(在玻璃纖維上方加入)。
11. 取2 uL，電泳 15 min，Ethidium bromide染色~20 min，確認。

Ligation of the purified amplicon into cloning vector

1. Set up a 10 ul ligation reaction

pGEM-T (50 ng)	1 ul
PCR product	2-8 ul (~100 ng)
2x ligation buffer	5 ul
T4 DNA ligase	1 ul
H ₂ O	1 ul
Total	10 ul
2. Incubation at room temperature for 1 hour or at 4°C O/N

Bacterial transformation

1. Pipette 200 ul competent cells into each of your ice cold Eppendorf tubes.
2. Add 1-3 ul of your ligation reaction to one tube. Place the tubes on ice for 30 min.
2. Put the tubes at 42°C for exactly 90 seconds. Return the cells to ice for 1-2 minutes.
3. Pipette the transformation mixtures onto labeled plates containing ampicillin and spread them around using a sterilized, bent glass rod spreader.
4. Place upside down in a 37°C incubator overnight.
5. 16 - 20 hours later, count the number of colonies on the plate with well-isolated colonies. Put parafilm around the edge of a plate and put it in a refrigerator for later use.

Colony-PCR

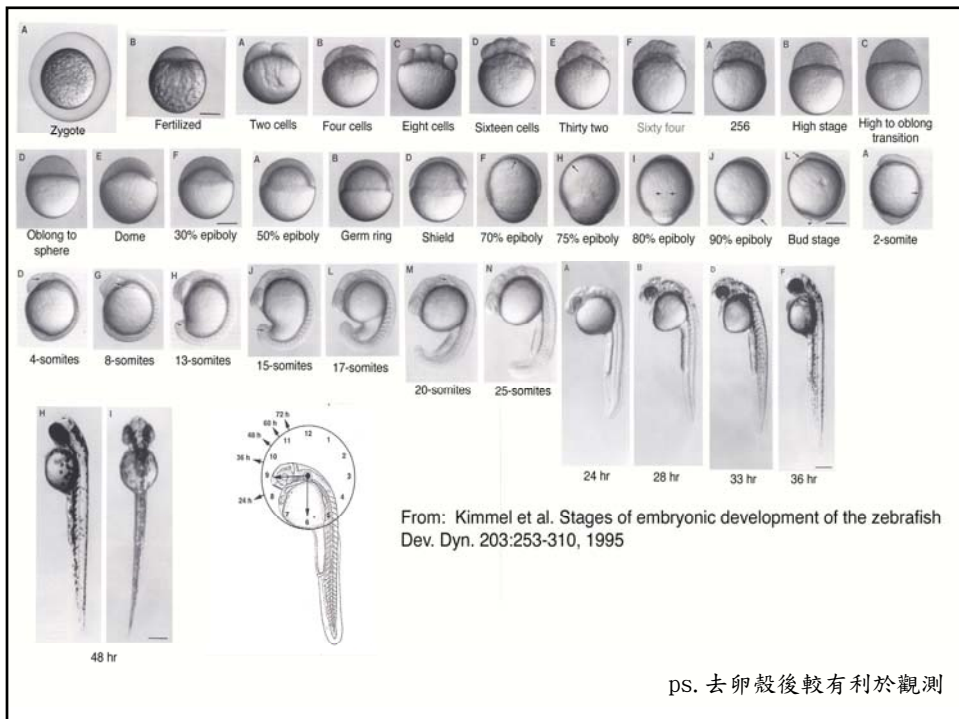
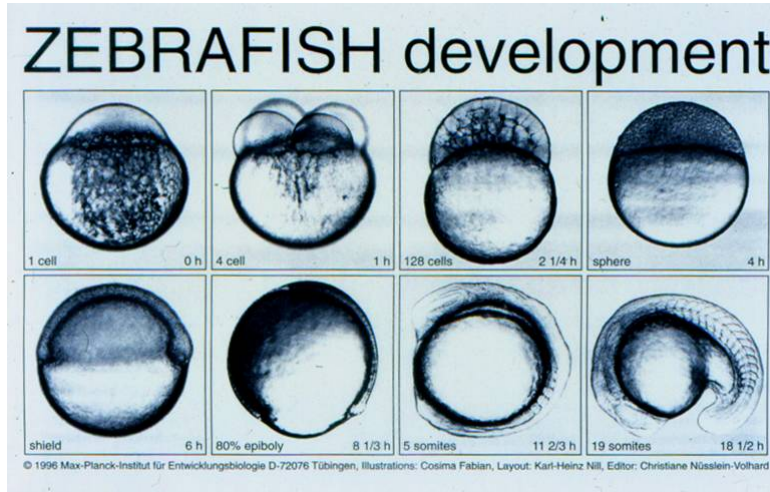
1. Assemble PCR master mix,
2. Aliquot 24 ul to each PCR tube,
3. Pick and transfer one single well-isolated bacterial colony to each PCR tube,
4. (Each group conducts 2 PCR reactions!)
5. Vortex to mix the contents,
6. Run PCR,
7. Load and examine 5 ul of PCR reaction by agarose electrophoresis (1 large gel, 1%),
8. Stain the gel with EtBr,
9. Photograph the gel
10. Determine whether the anticipated PCR product is produced (~700 bp).

第二單元： 魚類基因轉殖與表現分析(8/15-16)

1. 斑馬魚胚胎發育之觀察及記錄
2. 製備顯微注射用玻璃針
 1. 拉針 (1-hr) → 2. 磨針 (45-min) → 3. 上架 (10-min)
3. 斑馬魚胚胎顯微注射
 1. pCMV-EGFP-C1 2. pCMV-FP13
4. 轉基因之檢測
 1. PCR 2. Fluorescence microscopy

☆ 以照相記錄實驗結果

斑馬魚胚胎發育之觀察及記錄



- Zygote (受精卵期)
- Cleavage (卵裂時期)
- Blastula (囊胚時期)
- Gastrula (原腸時期)
- Segmentation (體節生成期)
- Pharyngula (彎曲時期)
- Hatching (孵化時期)
- Early larva (稚魚)

製備顯微注射用玻璃針

- 製備顯微注射用之玻璃毛細管
- 拉針器(Micropipette puller)
- 磨針器(Microgrinder)
- 顯微注射器(Microinjector)
- 解剖顯微鏡 (dissecting microscope)
- 置卵培養皿
- 轉基因(EGFP)溶液(circular and linear, ~250 ng/ul)

Micropipette puller, P-97
(Sutter Instrument Company)



Heat output

The force of pulling

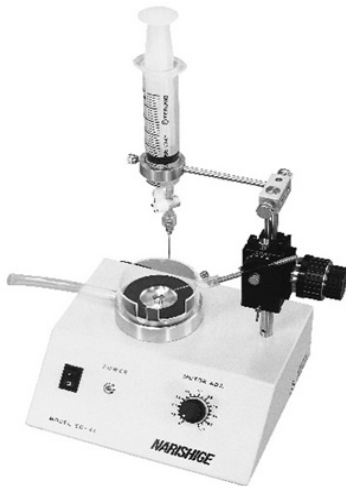
The time length of pulling

毛細針盡量細長

HEAT PULL VEL TIME

296 150 150 150

Microgrinder, EG-400 (Narishige Group)

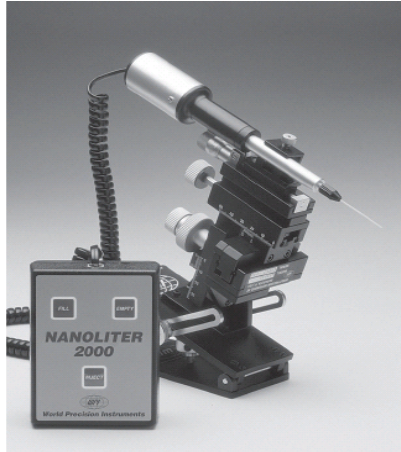


A range between 25-45° angle
to be suitable

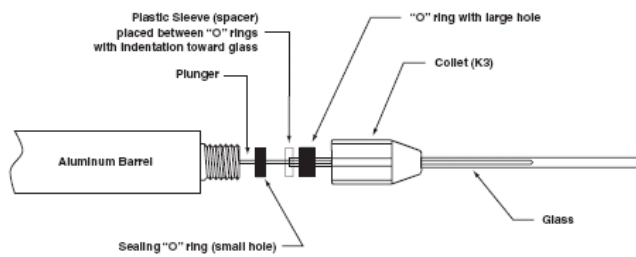
Washing away debris

A micro-injector (Nanoliter 2000) Mounted on a micro-manipulator

油壓式顯微注射器

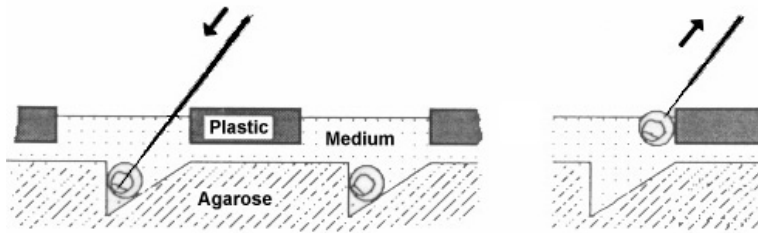


The details of the Nanoliter 2000 injection needle



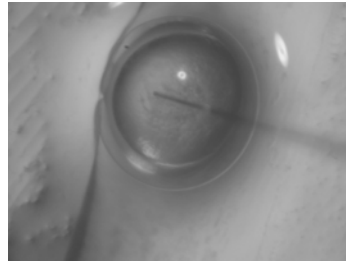
將DNA樣品置於200 ul PCR tube中，以Nanoliter 2000吸取樣品。

Micro-injection stage

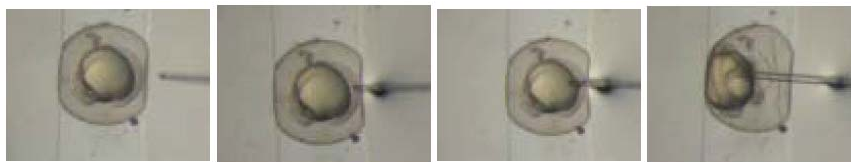


置卵盤之製備

取一軟橡皮條長約6公分，寬0.2公分，高0.2公分，裁成寬、高各約0.15公分的直角三角形。將它黏於載玻片上，再以1% agarose倒於plate上，待溫度降至40°C，將該載玻片橡皮條朝下平放於plate上，待agarose凝固後，將載玻片取出即可。

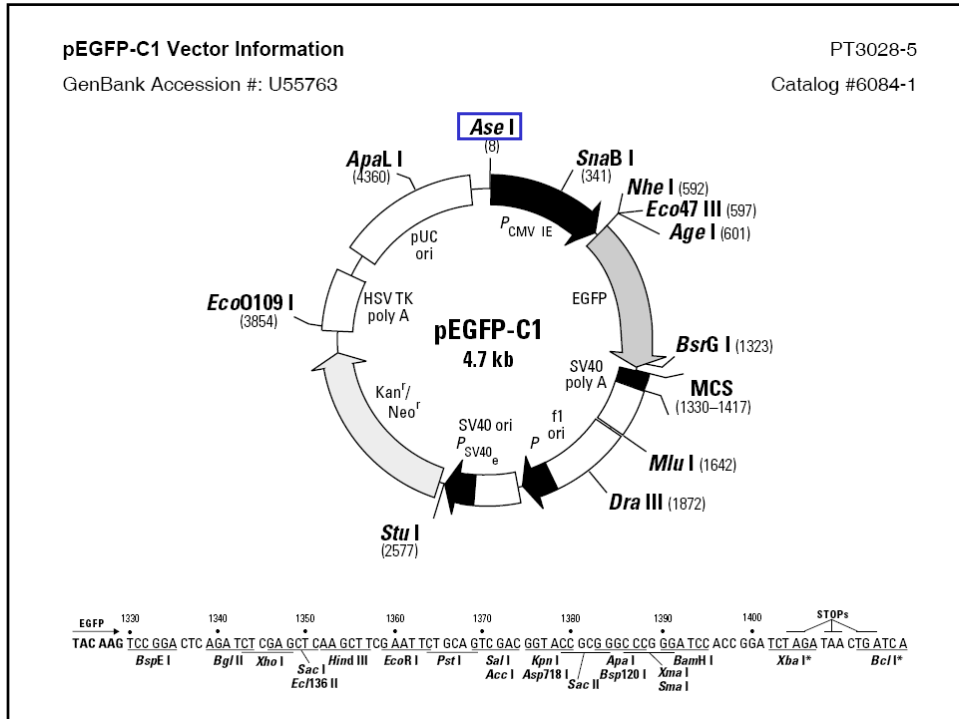


斑馬魚胚胎顯微注射



A、針靠近胚胎 B、刺入卵膜 C、刺入卵黃囊 D、注射DNA

注射時注出量不要超過卵體積的1/20



轉基因之檢測

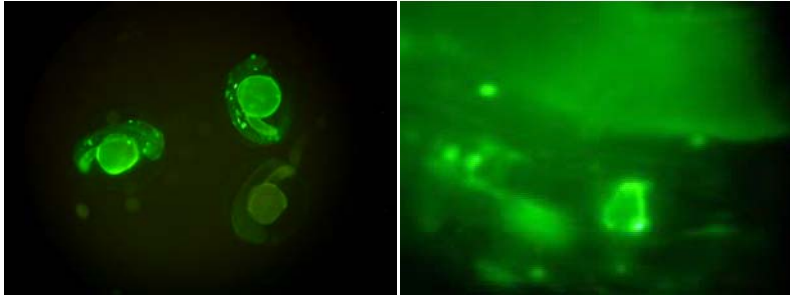
螢光蛋白表現的觀察

- 鏡檢篩選表現GFP之斑馬魚胚胎
- 螢光顯微鏡觀察表現GFP之斑馬魚胚胎
- 螢光顯微照相設備

轉基因之檢測

A、完整胚胎圖

B、放大圖(腸道)



轉基因之檢測

以PCR分析轉基因鑲嵌及其 mRNA表現之程度

- 聚合酶連鎖反應器
- 0.2 mL PCR微量反應試管
- Agarose gel, 水平電泳槽, 溴化錠溶液(EtBr)
- 紫外線燈箱及照膠設備
- *Taq* DNA polymerase (2U/uL) and 10 x reaction buffer
- 10 mM dNTP mix
- 二次純水
- forward and reverse primers (10 mM)

	姓名
	實驗日誌
9:00~10:00	
10:00~11:00	
11:00~12:00	
13:00~14:00	
14:00~15:00	
15:00~16:00	

建立表現質體

藉由基本的 DNA 剪接方法，建構能夠進行基因轉殖之表現載體，將已經次選殖於質體 pGEMT 之 MsrA 基因片段，以適當限制酶進行剪切作用(digation)後，選殖至表現載體 pCAMBIA1301-35S-NOS ter 上，利用表現載體上 35S promoter 進行表現。

儀器用具：

1. pipette
2. 小型離心機
3. 震盪器
4. 電泳槽
5. 製膠器
6. 樣品齒梳(comb)
7. 水浴槽(37°C、42°C)
8. 科學影像處理系統
9. 離心管：1.5 mL 及 0.2 mL
10. 刀片
11. UV Box
12. 低溫櫃(4°C)
13. 恆溫培養箱(37°C)

藥品試劑：

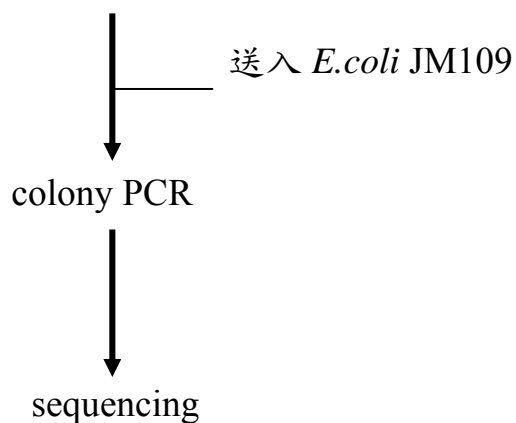
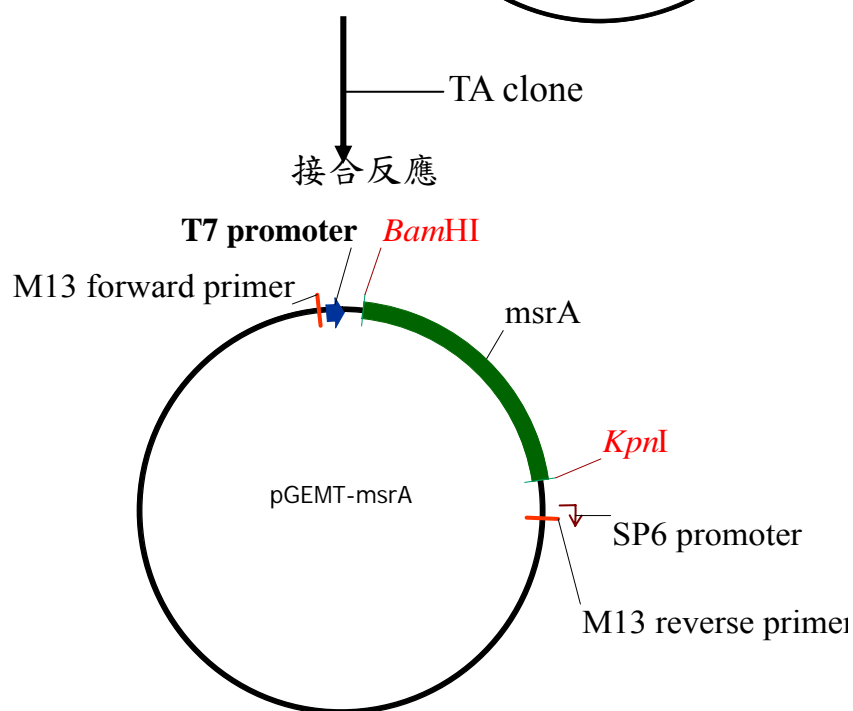
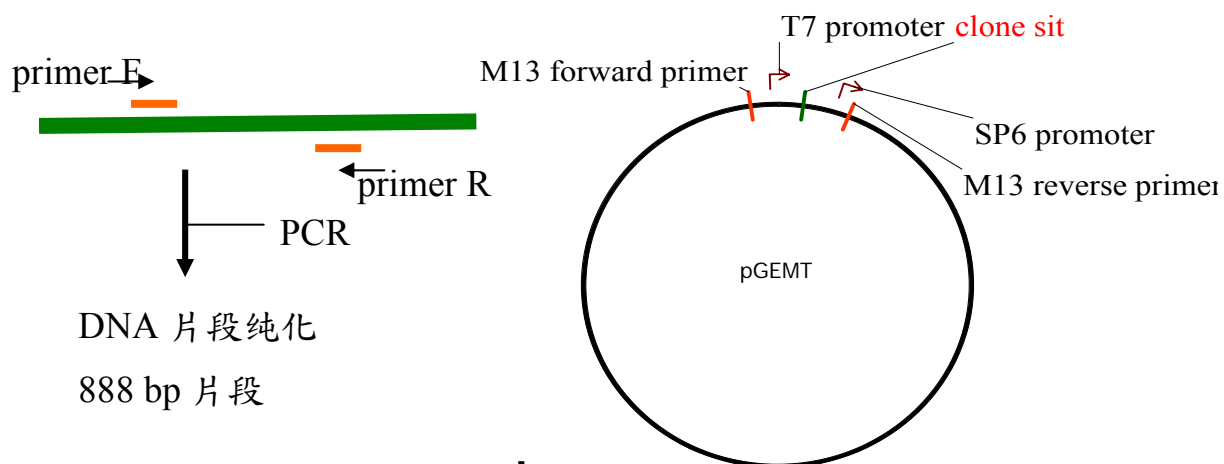
1. 2 × T₄ DNA ligase Buffer
2. T₄ DNA ligase
3. 限制酶：KpnI 及 BamHI
4. 勝任細胞(competent cell)：JM109

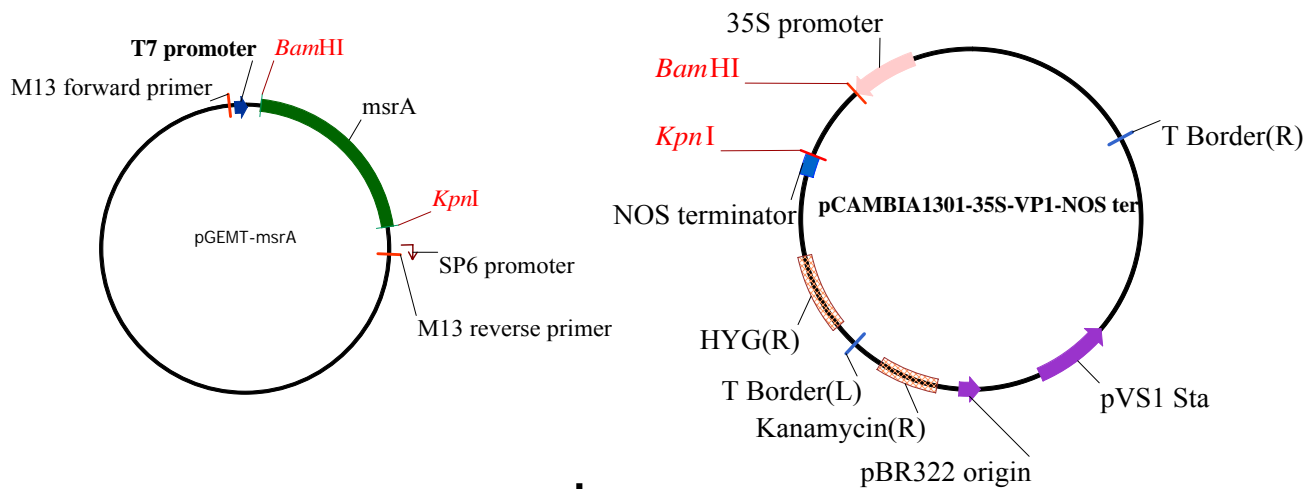
5. pGEM-T-Easy Vector Systems 套組
6. Gel Extraction 套組
7. 無菌二次蒸餾水(d.d. H₂O)
8. SOC medium
9. 10 × 1 NEB Buffer
10. 10 × BSA

方法步驟：

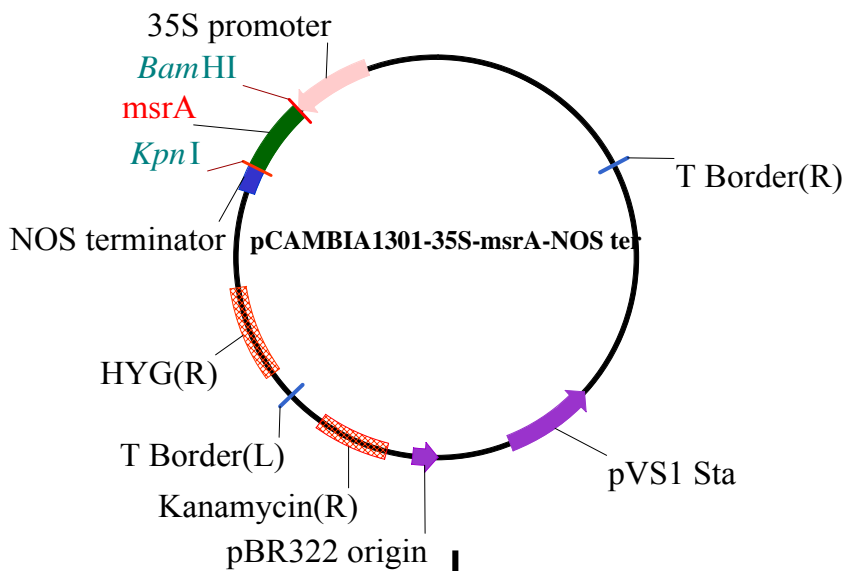
1. 利用 PCR 將所標定的基因進行擴增，完成後，將所有產物進行瓊脂電泳分析。
2. 瓊脂電泳分析後，使用科學影像處理系統將膠體結果照相存檔，再將膠體移置 UV Box 下照射並將 DNA 片段用刀片迅速切下；將切下膠體置於 1.5 mL 離心管中。
3. 使用 Gel Extraction 套組將膠體中 DNA 片段純化。
4. 載體接合反應(ligation)依序添加純化之 PCR 產物 1 μL 、 2 × T₄ DNA ligase Buffer 5 μL 、 T₄ DNA ligase 1 μL 、 pGEM-T-Easy Vector 0.5 μL 及 d.d. H₂O 2.5 μL 至 0.2 mL 離心管至使反應總體積為 10 μL，隔水置放於低溫櫃中(16 小時)。
5. 接合反應後，取 3 μL 的產物與 20 μL 勝任細胞小心混合，置於冰浴 2 分鐘。
6. 移至 42°C 水浴槽 90 秒(此步驟溫度及時間控制非常重要)並迅速置於冰上 2 分鐘。
7. 加入 480 μL SOC medium 並置於 37°C 培養箱培養 1 小時。
8. 將菌液離心以 1000 g，離心 1 分鐘，去除 400 μL 上清液，將細胞 pellet 懸浮塗盤(ampicillin LB agar plate)，於 37°C 培養箱培養隔夜(16~20 小時)。
9. 將長出之單一菌落挑起進行 colony PCR，將片段大小一樣菌落抽取質體 DNA，進行定序分析。
10. 序列完全正確之菌種進行保存。

11. 分別剪切pGEMT-msrA與pCAMBIA1301-35S-NOS ter質體DNA，依序加入反應 1 μg 質體DNA、2 μL 10 \times 1 NEB Buffer、2 μL 10 \times BSA、0.5 μL *Kpn*I及補d.d. H₂O使反應總體積為 20 μL 至 0.2 mL離心管，置放於 37°C水浴槽 3 小時。
12. 重複步驟 3。
13. 分別剪切pGEMT-msrA與pCAMBIA1301-35S-NOS ter質體DNA，依序加入反應 1 μg 質體DNA、2 μL 10 \times 1 NEB Buffer、2 μL 10 \times BSA、0.5 μL *Bam*HI及補d.d. H₂O使反應總體積為 30 μL 至 0.2 mL離心管，置放於 37°C水浴槽 3 小時。
14. 重複步驟 3。
15. 載體接合反應(ligation)依序添加純化之pCAMBIA1301-35S-NOS ter剪切產物 2 μL 、pGEMT-msrA 剪切產物 2 μL 、2 \times T₄ DNA ligase Buffer 5 μL 、T₄ DNA ligase 1 μL 至 0.2 mL離心管反應總體積為 10 μL ，隔水置放於低溫櫃中 (16 小時)。
16. 重複步驟 5~10。





↓
*Kpn*I 及 *Bam*HI
 882 bp 片段
 接合反應



送入 *E. coli* JM109

Colony PCR

sequencing

重組質體的檢測

PCR (聚合酶連鎖反應)是一個利用酵素對特定基因做體外或試管內大量合成的技術。其原理：先要在要擴增的雙股DNA 片段上，個別設計前置引子(forward primer) 及反置引子(reverse primer) →將溫度提高使雙股DNA 變性成單股(稱為變性作用，denaturation) →將上述引子對與已變性的單股DNA 配對結合(稱為引子接合作用，annealing) →利用DNA聚合酶分別以兩股目標DNA做為模板(template)，引子接合處為起點，合成新的 DNA 股(稱為延長作用，extension)；重複變性→配對結合→延長作用等步驟，週而復始，使產物以 2^n 的速率急速地增加，進行 DNA 量的放大。

PCR反應需具備的材料，分述如下：

- (1) 要被複製的DNA 模板(Template)。
- (2) 界定複製範圍的引子對(Primers)：前置引子(forward primer) 和反置引子(reverse primer)。
- (3) DNA 合成酵素： DNA 聚合酶 (DNA *Taq* polymerase)。
- (4) 合成的原料及水：其中包括 dNTP (dATP、dTTP、dCTP、dGTP 等四種核酸)。

儀器用具：

1. pipette
2. PCR mechanism
3. 小型離心機
4. 震盪器
5. 電泳槽
6. 製膠器
7. 樣品齒梳(comb)
8. 科學影像處理系統
9. PCR tube

藥品試劑：

1. Template：pCAMBIA1301-35S-msrA-NOS ter plasmid DNA
2. Primers：msrA-F、msrA-R

Gene	sequence
MsrA	Forward-GGATCCgCCACCATGCGGCCACATTGGCTAGA Reverse-GGTACCATATGTTAGCCGTAGCAGCGGATCTTGTCT

3. 2.5mM dNTP
4. 無菌二次蒸餾水(d.d. H₂O)
5. *Tag* polymerase
6. 10 × PCR Buffer
7. 瓊脂(agarose)
8. 6 × loading Dye
9. 石臘膜(parafilm)

方法步驟：

PCR反應

1. 先將所需藥劑取置冰上備用。
2. 依照下表所示添加各藥劑。

藥劑名稱	添加量(單位：μL)
Template(20ng/)	1
10mM msrA-F Primer	0.5
10mM msrA-R Primer	0.5
2.5mM dNTP	2
10× PCR Buffer	2.5
<i>Tag</i> polymerase	0.1
d.d. H ₂ O	18.4
total	25

3. PCR 反應條件

94°C 5 分鐘

94°C 30 秒

65°C 30 分鐘

72°C 30 秒

30 個循環

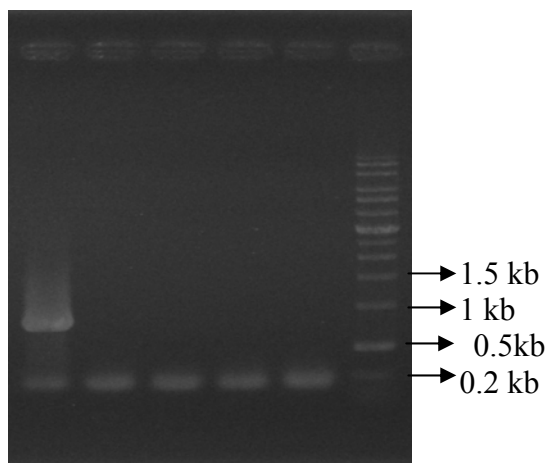
72°C 7 分鐘

4°C ∞

瓊脂電泳分析

1. 將 PCR 反應後之產物取 5 μ L 至 parafilm 上並加入 1 μ L 6 \times loading Dye，均勻混合。
2. 將混合物與 DNA maker loading 於 agarose gel 中。
3. 以 100V，跑 30 分鐘。
4. 將 agarose gel 拿出移至 EtBr 染色 10 分鐘。
5. 利用科學影像系統將影像照相並存檔。

範例：



片段大小為 0.88 kb

細菌培養方法-單一菌落 (single colony) 之分離

為使細菌培養時可得純單一細菌，利用劃線方法將細菌菌落分散於營養平碟上，此種方法為一種快速分離細菌的法。

儀器用具：

1. 無菌操作台
2. 酒精燈
3. 接種環

藥品試劑：

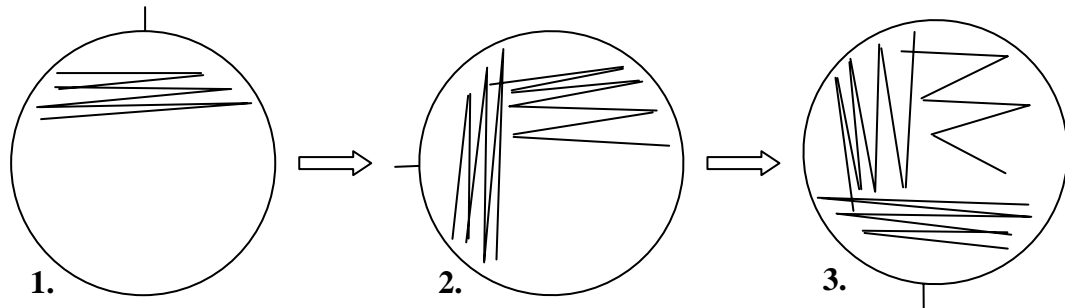
E.coli strain：pCAMBIA1301-35S-msrA-NOS ter/JM109

Kanamycin LB agar plates：1 % (w/v) Bacto tryptone, 0.5 % Bacto yeast extract, 1 % NaCl，調至 pH 7.0，加入 1.5 % (w/v) Bacto agar，以溼熱法滅菌，滅菌後至於 50°C 水浴槽中 30 分鐘，加入 Kanamycin 使最終濃度為 25 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 。

方法步驟：

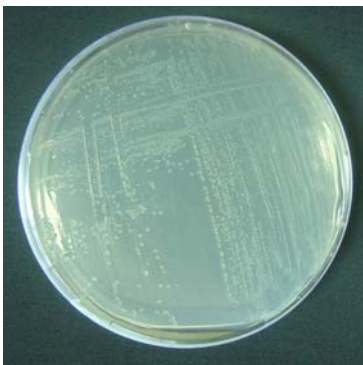
1. 於使用前 30 分鐘將無菌操作台過濾器及紫外燈開啟。
2. 將 *E.coli* strain、agar plate 及接種環經酒精消毒移至無菌操作台內。
3. 接種環在酒精燈火焰上燒紅，並使之冷卻(可於 plate 空白處輕搓數次)。
4. 以接種環輕輕刮下菌落，並將培養皿蓋回。
5. 打開新的 agar plate，將沾有菌落的接種環逾期上輕輕連畫數條橫線(如圖一、1.)後，將培養皿蓋回。
6. 接種環在酒精燈火焰上燒紅，並使之冷卻。
7. 將培養皿旋轉約 60 度，由前次橫線中拉出再輕輕連畫數條橫線後，將培養皿蓋回。

8. 重複步驟 6 及 7，畫最後一次橫線(如圖一、3.)。
9. 接種環在酒精燈火焰上燒紅，待冷卻後，置放於操作台桌面上。
10. 將培養皿倒置，於 37°C 培養箱培養一個晚上(16~20 小時)。



圖一、分離培養單菌落方法

範例



參考文獻：

生物技術方法 莊榮輝 卷一 國立台灣大學生物技術研究中心, 1999。

普通微生物學實驗，楊美桂，藝軒圖書出版社第二版。

邱華賢，生物技術導論，學富文化出版社。

張雯惠，奈米通訊，第 12 卷第一期

細菌培養方法-單一菌落(single colony)之分離 與重組質體的檢測實驗報告

組別：_____

日期：_____

姓名：_____

1. 請說明單一菌落分離之主要目的為何。

2. 請針對重組質體的檢測結果說明其片段大小獲得之原因

	姓名
	實驗日誌
9:00~10:00	
10:00~11:00	
11:00~12:00	
13:00~14:00	
14:00~15:00	
15:00~16:00	

藻類基因轉殖實驗

本實驗主要是利用藍綠藻 *Anacystis nidulans* R2 (PCC7942)作為練習藻類基因轉殖及分析的材料。將已建構好能夠在藍綠藻 PCC7942 細胞表現之腸病毒 Ev71 vp1 基因的 1573-vp1 表現載體，藉由 DNA 轉形送入 PCC7942 細胞中。PCC7942 轉殖株之檢測，直接挑取 PCC7942 之轉殖株 colonies，及萃取轉殖株之 Chromosomal DNA，進行 PCR 反應與洋菜膠體電泳分析，檢測轉殖株 Chromosomal DNA 之 vp1 基因。

一、實驗流程如下：

- I. 藍綠藻 *Anacystis nidulans* R2 (PCC7942)之轉形
- II. 轉殖株之少量 Chromosomal DNA 萃取
- III. PCR 檢測 PCC7942 轉殖株
- IV. 洋菜膠體電泳分析

二、實驗規畫：

8/22

- I. 藍綠藻 *Anacystis nidulans* R2 (PCC7942)之轉形 (step 1 -3)
- II. 轉殖株之少量 Chromosomal DNA 萃取 (step 1 -10)

8/23

- I. 藍綠藻 *Anacystis nidulans* R2 (PCC7942)之轉形 (step 3 -6)
- II. 轉殖株之少量 Chromosomal DNA 萃取 (step 11 -14)
- III. PCR 檢測 PCC7942 轉殖株
- IV. 洋菜膠體電泳分析

三、儀器用具：

- 照光培養箱
- 桌上型微量離心機
- 聚合酵素連鎖反應器(PCR)
- 迷你電泳槽
- 恆溫水浴槽
- UV transilluminator
- 照膠系統
- 微量吸取器
- 滅菌之微量吸管尖
- 滅菌之微量離心管
- 滅菌之 PCR tubes

四、藥品試劑：

1. 轉形實驗

10 mM NaCl 溶液

BG-11-EPPS 液體培養基

BG-11-EPPS 固體培養基，含 Cm (7.5 ug/ml)

2. 轉殖株之少量 Chromosomal DNA 萃取

Lysozyme

Proteinase K:

Use 2.6 ul stock (20 mg/ml, Promega) for 500 ul

10% sarkosyl (N-lauroylsarcosine) solution

TE buffer:

10 mM Tris-Cl

1 mM EDTA, pH 7.5

Phenol/chloroform/isoamylalcohol solution:

Phenol/chloroform/isoamylalcohol = 25: 24: 1

Chloroform:

chloroform : isoamylalcohol = 49: 1

3. PCR 反應:

TE-Triton solution (TE, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH. 8, 1% Triton X-100)

Chloroform

核酸引子對：

primer 1 (psbA promoter primer, 0.1 ug/ul)

primer 2 (vp1 reverse primer, 0.1 ug/ul)

10 x PCR buffer

dNTP (2.5 mM each)

Taq DNA polymerase (5 u/ul)

Colony PCR samples: PCC7942 之轉形株

Positive control: 1573-vp1 plasmid DNA

Negative control: 未轉殖之 PCC7942

4. 洋菜膠體電泳：

1% agarose gel

1x TAE 電泳緩衝液：由 50x TAE 稀釋使用。

6x 追蹤染劑 (dye)：

0.25% (w/v) bromophenol blue

0.25% (w/v) xylene cyanol

30% glycerol

Ethidium bromide (EtBr) stock solution：10mg/mL (使用濃度為 0.5µg /mL)。

五、實驗步驟：

I. 藍綠藻 *Anacystis nidulans* R2 (PCC7942)之轉形

1. 取 10 ml PCC7942 (*Anacystis nidulans* R2)藻液置於 15 ml Falcone tube 中，以桌上離心機離心 10 min (3000rpm 室溫)，將上清液丟棄。
2. 將 pellet 懸浮於 5 ml 10mM NaCl soln，以桌上離心機離心 10 min (3000rpm 室溫)。
3. 將 pellet 懸浮於 1 ml BG-11-EPPS 液體培養基 (細胞濃度約為 $5 \times 10^8 - 1 \times 10^9$)，加入 1 ug plasmid DNA (1573-vp1) 後，移入培養箱培養(28 – 30°C)，黑暗振盪(180 rpm)培養過夜，再以照光處理 6 h。
4. 將經轉形處理之藻液以桌上離心機離心 1 min 後，將 pellet 懸浮於 500 ul BG-11-EPPS 液體培養基。
5. 以BG-11-EPPS液體培養基做連續 10 x 稀釋 (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3})後，取 150 ul 塗 plate (BG-11-EPPS plate添加Cm 7.5 ug/ml)，每一濃度各塗 3 個plates。
6. 以 28°C照光培養直到colonies出現(約 1-2 星期)。

References

1. Golden and Sherman. 1984. J. Bacteriol. 158: 36-42.
1. Hagen and Meeks. 1999. J. Bacteriol. 181:4430-4434.

II. 轉殖株之少量 Chromosomal DNA 萃取

1. 離心收取 10 ml 1573-vp1 轉形株藻液。
2. 倒掉上清液，將藻 pellet 懸浮於 400 ul 含 lysozyme (10 mg/ml)之 Tris-sucrose 溶液 (0.2 M Tris.HCl, pH 8.0, 20% (w/v) sucrose)，以微量吸管尖吸出，移入新的微量離心管中。
3. 37 °C處理 1 小時。
4. 加入 16 μ l 30% sarkosyl及 4 μ l proteinase K (5 μ g/ μ l)，靜置於 65 °C處理 1 小時。
5. 加入 210 μ l phenol 及 210 μ l chloroform (chloroform : isoamylalcohol = 49:1)。
6. 以微量離心機 12,000~14,000 rpm 離心 10 分鐘。
7. 將離心後的上清液小心吸出，移入新的微量離心管中。
8. 加入等體積之 chloroform (約 420 μ l)，以微量離心機 12,000~14,000 rpm 離心 10 分鐘。
9. 將離心後的上清液小心吸出，移入新的微量離心管中。
10. 加入 0.1 倍上清液體積之 3 M Na acetate (42 ul)及 ~ 2.5 倍體積之 ethanol，

置於- 20 °C隔夜沉澱DNA。

11. 以微量離心機 12,000~14,000 rpm 離心 20 分鐘。
12. 倒掉上清液。
12. 加 200µl 之 70% 酒精，以微量離心機 12,000~14,000 rpm 離心 10 分鐘。
13. 倒掉上清液，將離心管倒置，置於室溫乾燥（約 30 分鐘）。
14. 將 DNA pellet 溶於 40 µl TE。

III. PCR 檢測 PCC7942 轉殖株

A. PCC7942 轉殖株 colony PCR 前處理

1. 以滅菌之微量吸管尖（或接種環）直接挑取 PCC7942 之轉形株 colonies 做 Colony PCR 檢測。
2. 將細胞懸浮於 200 ul TE-Triton soln 中，以 95°C 處理 3.5 min。
3. 將處理過之細胞懸浮以 200 ul chloroform 萃取兩次，再以微量離心機 12,000 rpm 離心兩分鐘。
4. 取 2.5 ul 萃取之上層液進行 PCR 分析。

B. PCR 反應

1. 取一支 0.2 ml PCR 管，分別加入下列各項：（總體積 25 ul）

	Colony PCR	DNA *
ddH ₂ O	15.3 ul	16.8 ul
DNA	2.5 ul	1.0 ul
10X PCR buffer	2.5 ul	2.5 ul
primer 1	1.0 ul	1.0 ul
primer 2	1.0 ul	1.0 ul
10 mM dNTP	0.5 ul	0.5 ul
25 mM MgCl ₂	2.0 ul	2.0 ul
Taq polymerase (5 u./ul)	0.2 ul	0.2 ul

PCR samples:

- 1573-vp1 轉殖株 Colony PCR samples
- 1573-vp1 轉殖株 Chromosomal DNA sample
- Positive control: 1 ul plasmid DNA (1573-vp1)
- Negative control: 1 ul d.H₂O

DNA *

- positive control : 1 ul plasmid DNA (1573-vp1)
- negative control: 以 1 ul d.H₂O 取代 DNA
- 1573-vp1 轉殖株 Chromosomal DNA 1 ul

2. 設定 PCR 反應條件：

94°C 4.5 min
53°C 1.5 min 1 cycle
72°C 2 min

94°C 1 min
53°C 1.5 min 30 cycles
72°C 2 min

72°C 5 min
4°C hold

3. 將 PCR 管子置入反應器中進行反應。

4. 取 10 µl PCR 產物進行電泳分析。

IV. 洋菜膠體電泳分析

1. 將 1% agarose gel 置於電泳槽中，倒入 1× TAE，直至溶液蓋過膠片。

2. PCR 樣品及 marker (1 Kb DNA marker) 各加入 1/6 體積之 6× 追蹤染劑。將樣品及 marker 加入膠片之樣品槽。

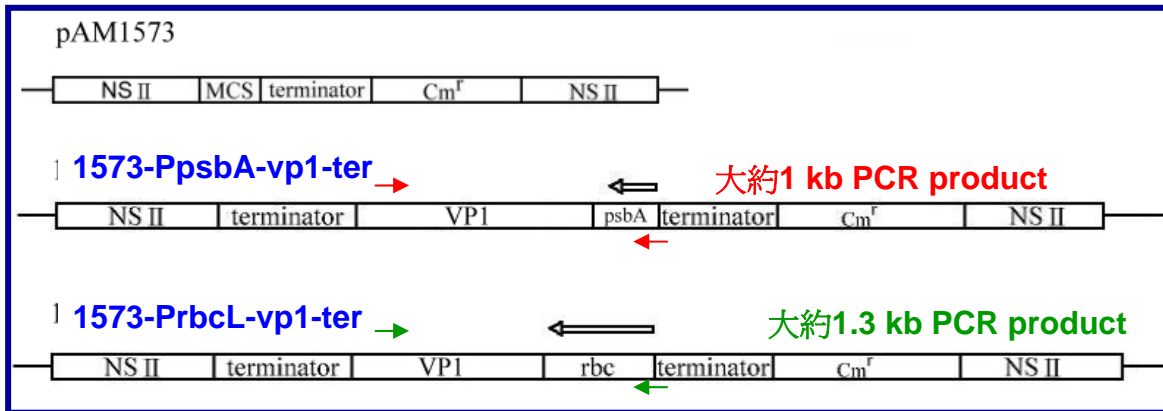
3. 以 50V 或 100V 進行電泳，待追蹤染劑 bromophenol blue 行進至膠體三分之二處時，關閉電源，取出膠片。

4. 以 Ethidium bromide 染色膠體 (final conc. 0.5 µg/ml EtBr, 5 min)。

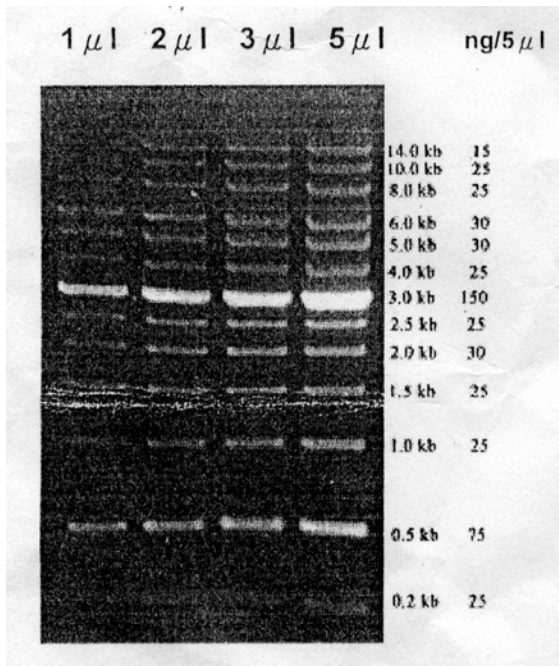
5. 以 d.H₂O 退染 10 min。

6. 以 UV transilluminator box 觀察色帶位置，並以照膠系統照相記錄結果。

PCC7942 腸病毒71型vp1基因之表現載體



1 Kb DNA marker



	姓名
	實驗日誌
9:00~10:00	
10:00~11:00	
11:00~12:00	
13:00~14:00	
14:00~15:00	
15:00~16:00	