

基礎生物技術實習報告

(2003/10/15-2003/11/05)

教授:歐柏榮

試驗 1. Dephosphorylation of linearized plasmid DNA

原理：當 plasmid 被酵素限制酶切割過後，因其切位原本就是互補的，很容易就會再自接，所以將 5' 端之磷酸切除可避免此情形發生頻率偏高。

過程：將線性的 plasmid 加入 CIAP (cattle intestinal alkaline phosphatase)，將兩端的磷酸根切除，利用鹽類(3M NaOAc)與不同濃度之酒精把 DNA 沉澱回收。

結果：在試驗 4 同時觀察。

試驗 2. Extraction of DNA with phenol:chloroform

原理：在去磷酸化過程中，仍殘留許多的蛋白質及鹽類 (CIAP and CIAP buffer)，爲了幫助後續實驗的進行，因此利用 phenol(將 protein 變性)、chloroform(將 phenol 帶離水層)將 DNA 純化、萃取出來。

過程：加入等量 phenol: chloroform，充分混合後離心取上層液，回收 DNA。

結果：在試驗 4 同時觀察。

試驗 3. Precipitation of DNA with ethanol

原理：DNA 爲一帶負電之物質，加入正電離子與 DNA 結合後，利用離心將 DNA 帶出來。

過程：將已經過 phenol: chloroform 純化之 DNA，加入 3M NaOAc(提供正電)，在低溫結合後，經高速離心將 DNA 沉降下來，最後再加入 70%酒精把正電離子洗掉。

結果：在試驗 4 同時觀察。

試驗 4. Ligation by T4 DNA ligase

原理：利用病毒的特殊酵素(T4 DNA ligase)將不同片段的 DNA 接合在一起。

過程：用 T4 DNA ligase 將(試驗 1.2.3.)純化過的 plasmid、GFP 基因與 10 倍 buffer 混合，經 4°C overnight。其特殊之處爲 buffer 中有提供能量之 ATP，最好先分裝避免使用時常解凍而失效。

有二組

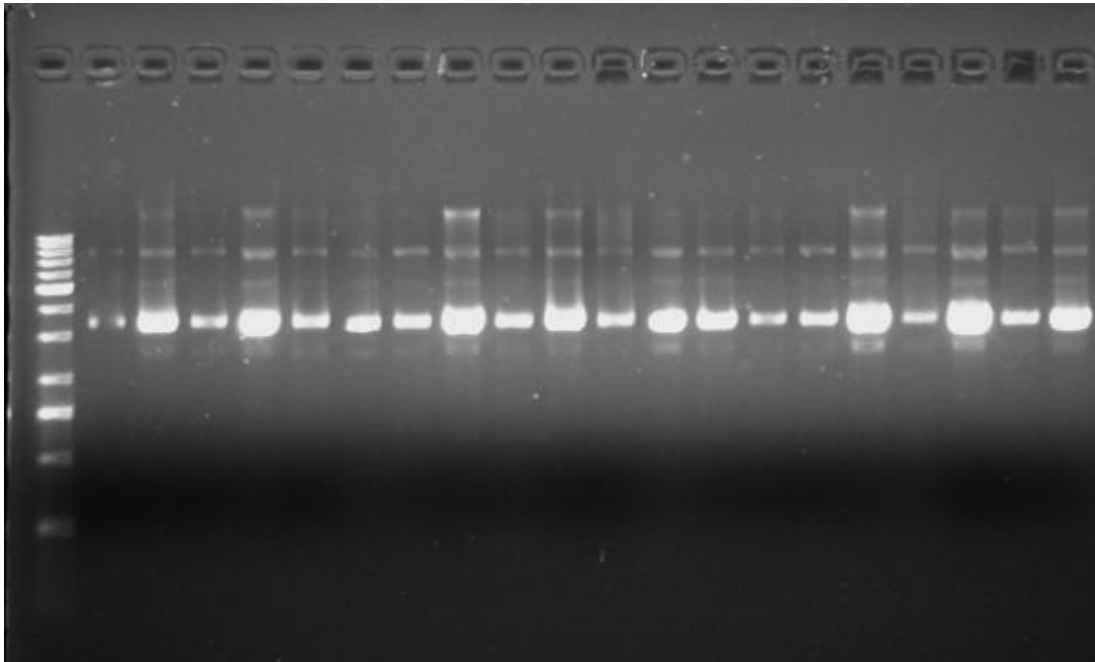
control A : 4 μ l plasmid + 1 μ l ligase + 1 μ l 10*buffer + 4 μ l ddH₂O

exp. B : 4 μ l plasmid + 1 μ l ligase + 1 μ l 10*buffer + 4 μ l GFP fragment

結果：本組為第十組，所 loading 之位置在 lane 14 與 15，lane 14 是 exp. B(有 GFP gene 具有 5271bp)，lane 15 是 control A(4622bp)，兩者差異非常小，不易觀察，應用較長之時間或 1.5% gel 來觀察較佳。

lane

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20



lane 1 : 1K marker (10 μ l)
lane 2-21 : 為 sample(10 μ l)
0.8% TAE gel

試驗 5. Competent cell preparation and DNA transformation

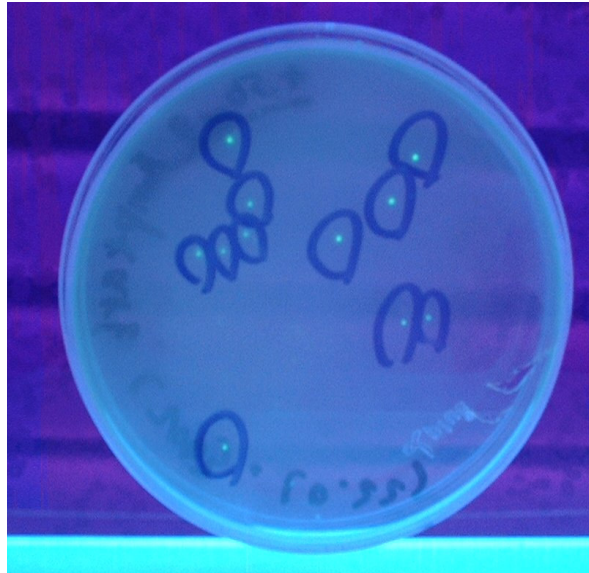
原理：質體 DNA 需藉由 Transformation 的技術，將之引入 competent cell 中，藉由寄主細菌的系統來達成複製 DNA 的目的。進行 Transformation 最常用的一種方法是加入大量的氯化鈣 (Calcium chloride)，導致大腸桿菌的細胞壁發生結構上的變化，變成 competent cell，而有利於質體 DNA 進入細菌細胞內。

過程：

1. 製備 competent cell 前一天，自 -70 °C 取出儲存的菌種，培養在 LB 培養液中並置於 37 °C 恆溫箱中振盪培養過夜。
2. 第二天早上準備 25 ml LB 培養液，加入 100 μ l 過夜菌液，置於 37 °C 振盪培養。
3. 接菌 2 小時後，每隔 20 分鐘測 OD₆₀₀，或可由以前實驗所做的生長曲線估算。

4. 待 $OD_{600} = 0.36$ 時，將菌液至於冰浴中 10 分鐘，在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 中以 4,000 rpm 離心 10 分鐘以收集細胞。
5. 小心把上清液倒掉，將細胞 pellet 以 1/3 原菌液體積的冰冷 0.1 M CaCl_2 做懸浮混勻，置於冰浴中 15 分鐘。
6. 在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 中以 4,000 rpm 離心 10 分鐘。
7. 以 1/25 菌液體積的冰冷 0.1 M CaCl_2 懸浮混勻，並迅速以每 $100\text{ }\mu\text{l}$ 分裝入 0.5 ml 微量離心管。
8. 每組取 1 管 competent cell 在冰浴，加入到新的 1.5 ml 微量離心管，其內含已知濃度的 DNA ($10\text{ }\mu\text{g}$)，混合之並放在冰上 20 分鐘。
9. 置於 $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ 乾浴器水中 90 秒，此為熱休克 (heat shock) 處理。
10. 再迅速置於冰浴中 2 分鐘以上。
11. 加入 $400\text{ }\mu\text{l}$ LB 培養液，置於 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恆溫箱振盪培養 1 小時。
12. 取 $90\text{ }\mu\text{l}$ LB 培養液置於另一新的 1.5 ml 微量離心管，加入 $10\text{ }\mu\text{l}$ 上述轉形細胞，此為 50 倍稀釋。
13. 將此 plate 顛倒 (up side down) 置於 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恆溫箱中過夜 ($12\sim 16$ 小時)。
14. 第 2 天早上取出此 plates，觀察並記錄菌落數目，以計算所製備 competent cell 的轉形效率。

結果：



轉形細胞效率 (colony forming unit / μg)

若由已知的 positive control 去計算，若將已知的 plasmid 取 $1\text{ }\mu\text{g}$ ，可長出 10^6 colony 那此 competent cell 之 cfu/ μg 為 10^6 。

若以此實驗看到的 cfu/ μg 則只有 11 colony 與 $1\text{ }\mu\text{g}$ plasmid 其 cfu/ μg 為 $10^{1.1}$ 。

試驗 6. Gene-Spin™ Miniprep Purification Kit

原理：利用 Kit 快速將細菌內之 pGLO 質體抽出。

過程：將已養到 OD 值為 0.6 之 E. coli 菌液，離心後，分別添加 kit 所附的 solution 1, solution 2, solution 3, 再離心(去除變性物質)，取上清液，過 spin column(使 plasmid DNA 留在 filter 上)，加入 wash buffer(去除離子)清洗，最後再加入 elution buffer 把 plasmid 帶出來。

結果：再試驗 7 觀察。

試驗 7. Sequencing

原理：利用有 lable 之 ddNTP 當成原料，利用 PCR 之原理，將有 lable 之 ddNTP 接在每一個片段之末端，再用各個不同 lable 之 ddNTP(ddATP, ddTTP, ddGTP, ddCTP)所散發出的不同顏色與不同大小片段(由毛細電泳分離)，經儀器解讀出其序列。

過程：將適量的 Big Dye 3.1 所提供之 solution 與 buffer 和欲偵測之 DNA 片段, primer 混合後, 利用 PCR 機器製作出大小不一之片段, 經純化後再上 ABI sequence 解讀序列。

結果：請看下一頁。

此結果不甚理想，各個 singl 都未達 40 以上，無法採信此結果，其原因有可能是因 DNA 純化時，將許多片段也 wash 掉；也有可能是 DNA 的量，在 PCR 反應時不足；或純化後，仍有雜質影響反應……。