

『生物技術』實習手冊

(一) Mini-M plasmid DNA extraction system (VIOGENE)

Grow 1 to 5ml plasmid-containing bacterial cells in LB medium with appropriate antibiotics overnight (12-16 hours) with vigorous agitation



Pellet the cells by centrifuging for 1-2 minutes. Decant the supernatant and remove all medium residue by pipet.



Add 250 μ l of MX1 Buffer to the pellet, and resuspend the cells completely by vortexing or pipetting.



Add 250 μ l of MX2 Buffer and gently mix (Invert the tube 4 ~ 6 times) to lyse the cells until the lysate becomes Clear. Incubate at room temperature for 1-5 minutes.



Add 350 μ l of MX3 Buffer to neutralize the lysate, then immediately and gently mix the solution. A White precipitate should be formed.



Centrifuge for 5~10 minutes, meanwhile place a mini-M Column onto a Collection Tube.



Transfer the supernatant carefully into the column



Centrifuge for 30-60 seconds. Discard the flow-through.



Wash the column once with 0.5 ml WF Buffer by centrifuging for 30-60 seconds. Discard the flow-through.



Wash the column once with 0.7 ml WS Buffer by centrifuging for 30-60 seconds.
Discard the flow-through.



Centrifuge the column at full speed for another 3 minutes to remove residual ethanol.



Place the column onto a new 1.5-ml centrifuge tube. Add 50µl of Elution Buffer (provided) onto the center of the membrane.

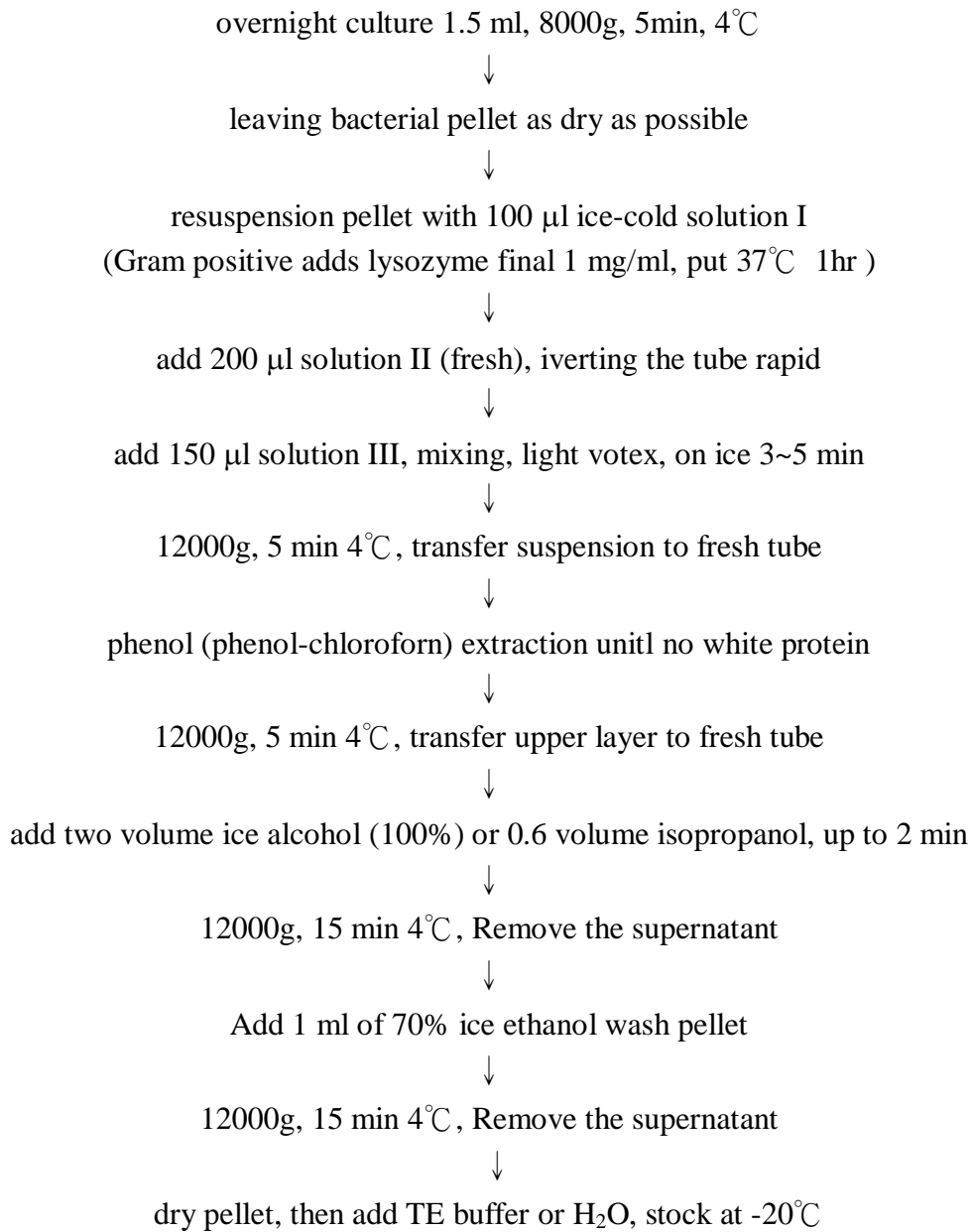


Stand the column for 1-2 minutes, and centrifuge for 1-2 minutes to elute DNA.



Store plasmid DNA at 4°C or -20°C.

(二) Isolation of plasmid DNA (small-scale)(傳統方法)



solution I	solution II	solution III	
50 mM glucose	0.2 N NaOH	5M KoAC	60 ml
25 mM Tris-Cl (pH 8.0)	1% SDS	glacial acetic acid	11.8 ml
10 mM EDTA (pH 8.0)		water	28.5 ml

RNAase(stock solution 10 mg/ml)working solution 50 µg/ml

(三) Genomic DNA extraction miniprep system (VIOGENE)

Pipet up to 200 μ l sample into a 1.5-ml sterile eppendorf tube. When the sample volume is less than 200 μ l, add PBS to make up to 200 μ l. (破細胞的方法因樣品來源而異，植物細胞常用液態氮磨碎，真菌以酵素水解)



Add 20 μ l Proteinase K and 200 μ l EX Buffer into the sample. Mix immediately by vortexing for 20 seconds.



Incubate at 60°C for 20 minutes to lyse the sample. Vortex or invert mix the sample every 3-5 minutes during incubation.



Adjust the incubator to 70°C to incubate for 20 minutes.



Meanwhile, preheat 10 mM Tris-HCl (pH 9.0), ddH₂O, or TE buffer (provided by user) at 70°C (500 μ l /prep) for DNA elution at Step 10.



Add 210 μ l of absolute ethanol or isopropanol to the sample from Step 4 and mix by vortexing.



Place a B/T Genomic DNA Mini Column onto a Collection Tube. Pipette all the mixture (including any precipitate) into the column without touching the rim. Centrifuge at 8000 rpm for 2 minutes. Place the column onto a new Collection Tube.



Wash the column twice with 0.5ml WS buffer by centrifuging at 8000 rpm for 2 minutes. Discard the flow-through after centrifugation.



Centrifuge the column at full speed for another 2 minutes to remove ethanol residue.



Place the column onto a new 1.5 ml tube (provided by user). Elute DNA with 200 μ l of the preheated elution solution from step 5

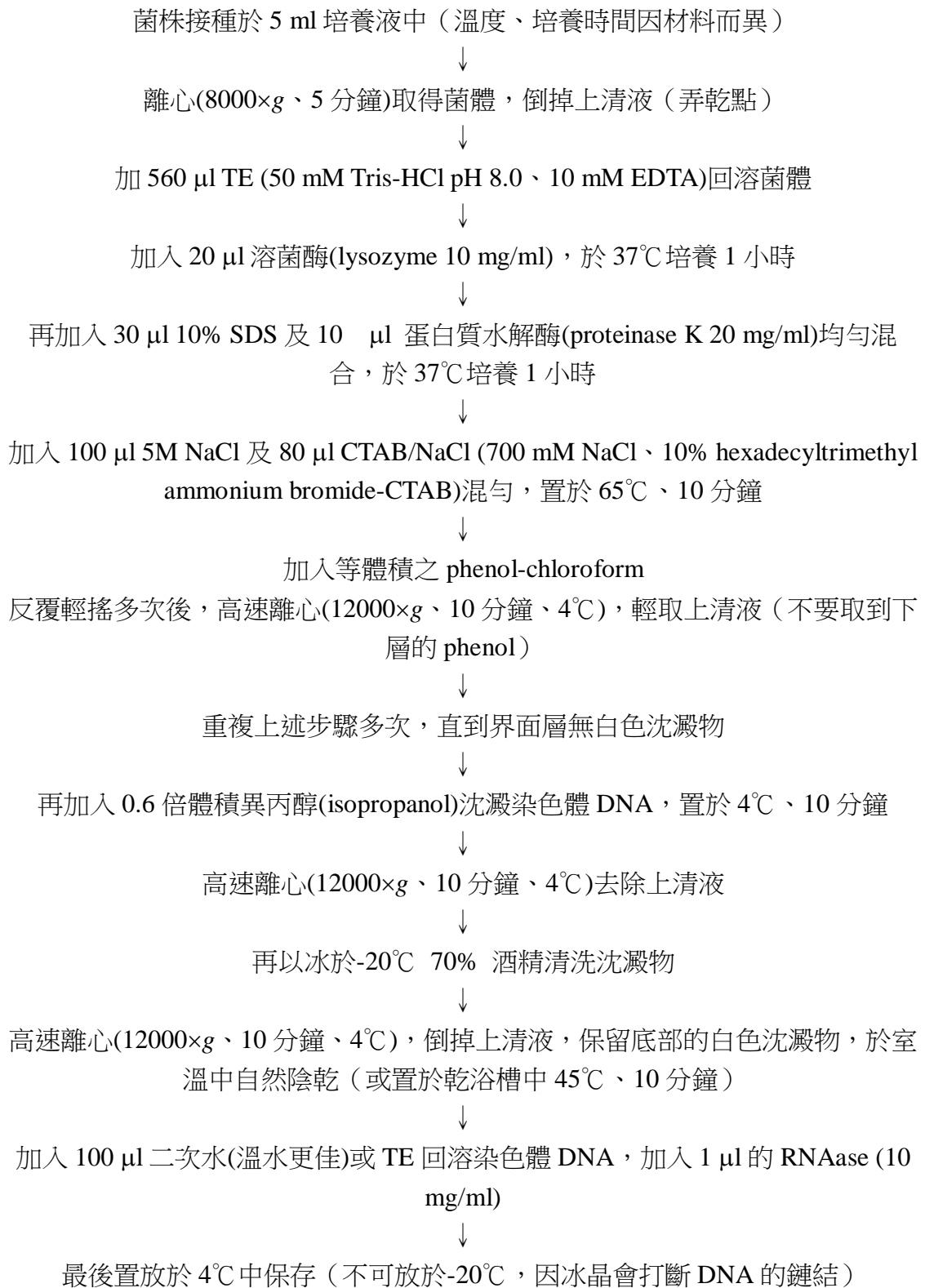


Stand the column for 1-5 minutes, and centrifuge for 1-2 minutes to elute DNA



Store eluted DNA at 4°C

(四) 染色體 DNA 的萃取 (傳統方法)



(五) 核酸電泳

以配置 1%的瓊膠電泳膠片為例（需帶手套操作）

1. 量取 100 ml 1X TAE buffer 倒於血清瓶中。
2. 秤取 1 g agarose 倒於血清瓶中。
3. 以微波爐煮融 agarose（加熱 20 秒後就取出搖晃均勻，快完全溶解時改加熱 10 秒就取出搖勻，直到 agarose 完全溶解）。
4. 加入染劑 ethidium bromide (10 mg/ml)或 SYBR Gold 10 μ l，混合均勻。
5. 裝置好製膠盤，放好齒梳，將稍微『冷卻』後的溶液倒於製膠盤上（太熱會使膠盤變形），倒的膠體僅需均勻淹過齒梳高度即可，一般不需製作厚膠片（割膠回收時就需要使用厚膠片）。
6. 大約 20-30 分鐘膠體會凝固，拔出齒梳，將膠片放於 DNA 電泳槽中。
7. 加入 1X TAE buffer 於 DNA 電泳槽中，直到淹過瓊膠片。
8. 剪一段石蠟膜，取 6X loading buffer 1 μ l 點於石蠟膜上，取 5 μ l 樣品於石蠟膜上與 loading buffer 混勻。
9. 將樣品 loading 到瓊膠片 well 中（tip 伸入 buffer 中，僅需放於 well 正上方，不要戳到 well，『慢慢』將樣品打入 well 中即可）。
10. 連接電泳槽的正負極，開電源供應器電源，設定 100 Volt 大約跑 25-30 分鐘左右（電泳時間會因瓊膠濃度而異）。
11. 關閉電源，取出瓊膠片，置於 DNA 照相系統照相，觀察結果。

Agarose Gel Electrophoresis

Buffers and Solutions

Agarose solutions

DNA staining solution (ethidium bromide (10 mg/ml), SYBR Gold)

Electrophoresis buffer (usually 1x TAE or 0.5x TBE)

6X Gel-loading buffer (0.25% (w/v) bromophenol blue, 40% (w/v) sucrose in H₂O)

Nucleic Acids and Oligonucleotides

DNA samples

DNA size standards

Samples of DNAs of known size are typically generated by restriction enzyme digestion of a plasmid or bacteriophage DNA of known sequence. Alternatively, they are produced by ligating a monomer DNA fragment of known size into a ladder of polymeric forms.

Agarose Concentration in Gel (% [w/v])	Range of Separation of Linear DNA Molecules (kb)
0.3	5-60
0.6	1-20
0.7	0.8-10
0.9	0.5-7
1.2	0.4-6
1.5	0-2-3
2.0	0.1-2

Agarose gels are cast by melting the agarose in the presence of the desired buffer until a clear, transparent solution is achieved. The melted solution is then poured into a mold and allowed to harden. Upon hardening, the agarose forms a matrix, the density of which is determined by the concentration of the agarose.

Ethidium Bromide

Add 1 g of ethidium bromide to 100 ml of H₂O. Stir on a magnetic stirrer for several hours to ensure that the dye has dissolved. Wrap the container in aluminum foil or transfer the 10 mg/ml solution to a dark bottle and store at room temperature.

TAE

Prepare a 50X stock solution in 1 liter of H₂O:

242 g of Tris base

57.1 ml of glacial acetic acid

100 ml of 0.5 M EDTA (pH 8.0)

The 1x working solution is 40 mM Tris-acetate/1 mM EDTA.

TBE

Prepare a 5X stock solution in 1 liter of H₂O:

54 g of Tris base

27.5 g of boric acid

20 ml of 0.5 M EDTA (pH 8.0)

The 0.5x working solution is 45 mM Tris-borate/1 mM EDTA.

EDTA

To prepare EDTA at 0.5 M (pH 8.0): Add 186.1 g of disodium EDTA•2H₂O to 800 ml of H₂O. Stir vigorously on a magnetic stirrer. Adjust the pH to 8.0 with NaOH (approx. 20 g of NaOH pellets). Dispense into aliquots and sterilize by autoclaving. The disodium salt of EDTA will not go into solution until the pH of the solution is adjusted to approx. 8.0 by the addition of NaOH.

(Sambrook, 2001)

(六) PCR (polymerase chain reaction) 配方及 program

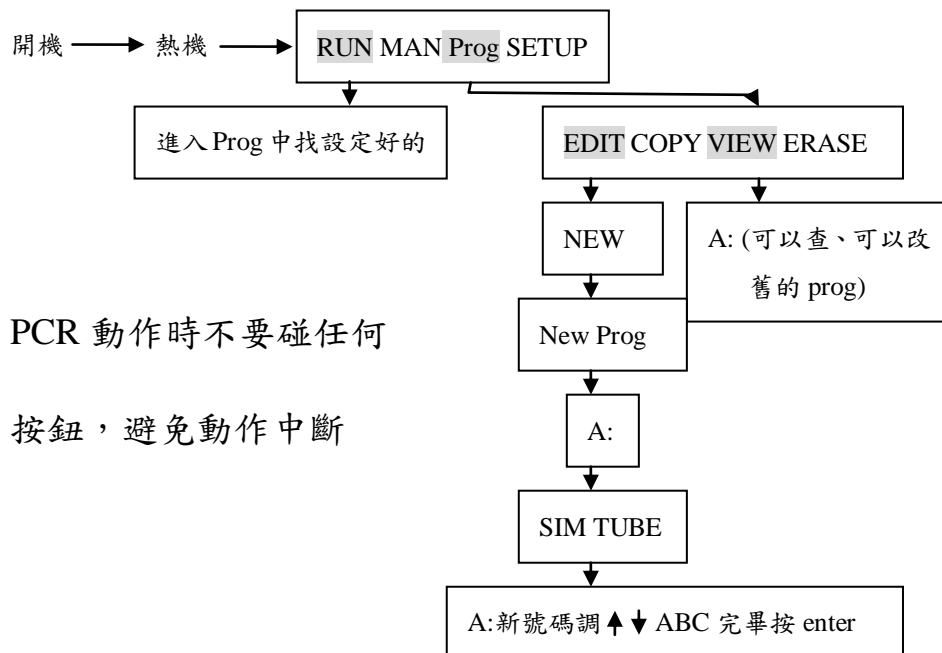
PCR 所需加入反應物

Primer1 (16 μM)	1.5 μl
Primer2 (16 μM)	1.5 μl
Template (chromosome DNA, 50~100 ng)	1 μl
10 X buffer	5 μl
15 mM MgCl ₂	3 μl
dNTP (2.5 mM)	4 μl
H ₂ O	33 μl
Taq polymerase	1 μl
Total	50 μl

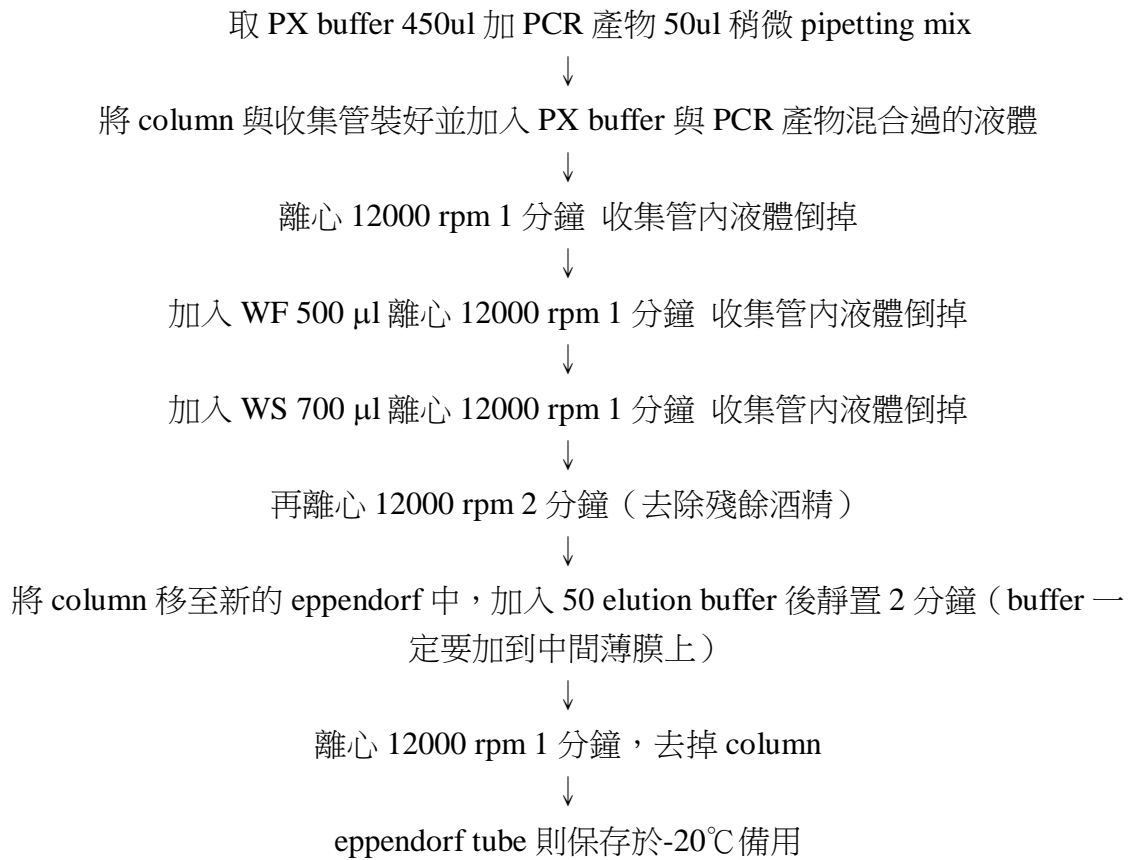
High GC content target need to add DMSO

PCR PROGRAM

動作	Stage	Step	溫度	時間	Cycle
前置工作	1	1	94°C	10min	1
Denature	2	1	94°C	1 min	30
Annealing	2	2	64°C	35sec	
Extension	2	3	72°C	45sec	
Extra extension	3	1	72°C	7min	1



(七) PCR-M Clean-up system kit (PCR 產物純化 KIT)



(八) Gel-M Gel Extraction System (Gel Cutting)

利用 UV 燈照射膠片後，用刀割下特定位置 DNA (操作時必須關燈、戴護目鏡)，
將含有 DNA 的 Gel 50~200mg 置入 tube 中

↓

加 GEX 500 μ l，60°C 水浴 10 分鐘 (tube 要加裝防爆夾避免爆開) (隔 1-2 分鐘搖
晃一下 tube)

↓

Column 與收集管裝好待 Gel 溶解後加入

↓

離心 12000 rpm 1 分鐘 收集管內液體倒掉

↓

加入 WF 500 μ l 離心 12000 rpm 1 分鐘 收集管內液體倒掉

↓

加入 WS 700 μ l 離心 12000 rpm 1 分鐘 收集管內液體倒掉

↓

再離心 12000 rpm 2 分鐘 (去除殘餘酒精)

↓

將 column 移至新的 eppendorf 中，加入 50 elution buffer 後靜置 2 分鐘 (buffer 一
定要加到中間薄膜上)

↓

離心 12000 rpm 1 分鐘，去掉 column

↓

保存於 -20°C 備用

(九) 限制酶切割與接合反應

限制酶切割配方

Plasmid	20 μ l
10 X buffer	3 μ l
10 X BSA	3 μ l
Enzyme I	0.5 μ l
Enzyme II	0.5 μ l
H ₂ O	3 μ l
Total	30 μ l

接合反應配方

Vector (50 ng)	1 μ l
PCR product	3 μ l
10 X ligation buffer	2 μ l
10 mM ATP	2 μ l
Ligase	0.5 μ l
H ₂ O	?
Total	20 μ l

載體與 PCR 產物（接合 DNA）分子數比要控制在 3~5 倍

(十) 製備勝任細胞 (competent cells) (需無菌操作)

從新鮮培養基中取大腸桿菌單一菌落，培養於 5 ml LB broth 中，37°C 培養隔夜
↓
取 0.5 ml 隔夜培養液 overnight culture，加入 50 ml LB broth，37°C 震盪培養約 2~2.5
hr 至 O.D.₆₀₀ 在 0.3-0.4 間
↓
冰浴 10 min (終止菌體生長)
↓
以無菌離心管離心 6000 rpm、5 min、4°C
↓
去除上清液(倒放弄乾些)，加入冰 2 ml 100mM CaCl₂ 輕輕回溶菌體，再加入 8 ml
100mM CaCl₂ 冰浴 10 min
↓
離心 6000 rpm、5 min、4°C，去除上清液
↓
加 2 ml CaCl₂ 回溶菌體
↓
加入 1ml 60% glycerol，混勻後，分裝後置-80°C 保存，隔日即可使用 (可存放三
個月，轉型效率會隨保存時間而遞減)

(十一) 轉形 (Transformation)

自-80°C取出已製備好之勝任細胞，放於冰上回溶



取 100 μ l 勝任細胞於無菌 eppendorf tube，再加入已經接合(ligation)之各組 DNA
10 μ l (包含實驗組、對照組)



冰浴 30 分鐘



移至 42°C 水浴槽 90 秒 (進行熱休克 heat shock)，再冰浴 1~2 min



加入 0.9 ml LB broth，在 37°C 培養 1 hr
(此時取出 LB+Ampicillin 培養基回溫烘乾，塗上 IPTG 及 Xgal 各 40 μ l，IPTG(20
mg/ml) 40 μ l、X-gal(20 mg/ml) 40 μ l)



離心 8000g, 5 min，取出 800 μ l 培養液



每 100 μ l 塗抹(spread plate) LB+Amp 培養基



培養於 37°C 12 hr (養太久會產生衛星現象，有時會養於 30°C 隔夜)

(十二) 超音波破細胞

1. 從-80°C 取出菌塊或是離心取得菌塊
2. 菌塊加 3ml 破細胞緩衝液 PBS (KCl 2.7 mM, NaCl 140 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1.8 mM), Triton X-100 1%, PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride) 0.1 mM, DTT (Dithiothreitol) 1 mM,
3. Pipetting mix
4. Sonication (超音波震盪) 需插冰進行避免發熱影響，功率設定 30，時間設定打 5 秒停 5 秒
5. 冷凍離心 4°C 12000 rpm 10 分鐘
6. 取上層液為 Crude Protein (粗製蛋白)

(十三) 表現蛋白質的純化

1. column 加膠體 1.33 ml (只有新的 column 要加)
2. 加 PBS 7 ml 後 Vortex 再吸出 (不要吸太乾)
3. 加 PBS 5 ml 後 Vortex 再吸出 (不要吸太乾)
4. 加 PBS 5 ml 後 Vortex 再吸出 (不要吸太乾)
5. 加 1 ml sample (欲純化之蛋白)
6. 加 1% triton 100 in PBS 3 ml
7. Vortex 後 column 上下都用 Para film 封住
8. 轉摩天輪 30 分鐘
9. 將 column 內的液體吸出後用 PBS 再洗 3 次(每次都要 vortex, 小心沖倒瓶蓋)
10. 加 Elution buffer 1 ml (內含 reduced GST) 輕拍 mix
11. 靜置 10 分鐘(準備 tube 並標示 E1)
12. 用針筒加壓擠出蛋白純化產物於 tubeE1 完畢後先插冰
13. 再重複 Elute 3 次 (E2 靜置 10 分鐘、E3 靜置 10 分鐘、E4 不用等)
14. E4 之後以 PBS 5 ml 沖洗 column, 吸掉 column 中的液體再加入 2ml 20%酒精
之後保存於 4°C

(十四) SDS-PAGE

SDS-聚丙烯醯胺凝膠電泳(Sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis)

電泳原理：

帶電分子可以在電場中移動，因系統是置於水溶液中又稱泳動，泳動速率受到外加電壓、分子之淨電荷、分子與介質間之摩擦力等因素的影響。蛋白質在不同 pH 環境可能帶不同淨電荷，而大部分電泳系統 pH 通常為 8.3，可使大部分分子帶負電荷，可以蛋白質往正極跑。摩擦力則與分子的大小、形狀相關。

材料：

- (1) 丙烯醯胺(Acrylamide)主要膠體成份，Methylene-bis-acrylamide 構成網狀支鏈，連結丙烯醯胺。最常用 Acrylamide : bis-acrylamide 混合比率為 37.5 : 1，也有人使用 29 : 1 或 19 : 1，bis-acrylamide 濃度越高所形成的膠體孔洞愈緊密。
- (2) SDS(Sodium dodecyl sulfate)，使蛋白質變性形成線狀構形與帶負電荷
- (3) 過硫酸銨 (ammonium persulfate, APS)產生游離基(free radical)
- (4) TEMED (tetramethylethylenediamine)催化劑，幫助游離基的傳遞。

實驗步驟：

(一) 鑄膠

1. 將電泳玻璃片及所有配件洗淨擦乾，以 70%酒精擦拭玻璃片，組裝架設鑄膠套件，由助教事先準備全部鑄膠套件或先架設好。
2. 依照表中的各溶液比例（實驗使用 10%膠體），依序加入選擇所需的藥劑配製下層膠。配置膠體溶液時 10% APS 溶液必須最後加入，以微量吸管攪拌混合均勻（避免產生氣泡），每片鑄膠套件大約加入 3.2 ~ 3.5 ml，沿玻片邊緣緩慢加入。
3. 加完後在膠體液面上方加滿 70%酒精壓平膠體液面，約 30 分鐘凝膠完成（冬天較慢）。
4. 倒出上層 70%酒精。以 RO 水清洗介面多次，用濾紙吸乾多餘水分。
5. 配製上層膠體溶液，方法與下層膠配製方法相似。加入 10% APS 溶液後以微量吸管迅速混勻，將溶液加入鑄膠台至九分滿，將樣本梳 (comb)插入製作跑膠所需的孔(well)(此步驟儘量快速完成，以免膠體凝固)，不到 10 min 即可凝膠。
6. 從鑄膠台拆下膠片，取出樣本梳，將多餘的凝膠去除，以 RO 水清洗 well。一組使用一片。
7. 取 30 μ l 的樣品與 10 μ l 的 4X sample buffer 混勻，於 95°C.煮 3-5 min。

8. 裝置電泳槽。電泳槽中間裝新的 running buffer，外側槽裝回收的 running buffer 約七分滿，因 SDS-PAGE 進行時會產熱影響，使電泳跑的不好看，因此在電泳槽外放碎冰。且需注意不可側漏。
9. loading 樣品。Marker 約 loading 3~5 μl 、樣品 loading 15 μl ，一片 10 孔，loading 時最好對稱，且沒樣品的 well 可 load 15 μl 的 1X Sample buffer，電泳膠片比較不會扭曲變形。
10. 電壓 100 Volt，先調 60 分鐘，不夠再加時間，一般約跑 90 分鐘以上。
11. 藍線位置跑到底即可拆除裝置。

(二) SDS-PAGE 染色

1. 將裝置拆除，running buffer 回收。
2. 連玻璃將 gel 片放入染色盒中，小心的用刮刀在水中將玻璃片剝開，用水的浮力使 gel 脫離玻璃片。
3. 用玻璃片輕輕的將 gel 撈入染色盒中。
4. 加入第一脫色液覆蓋 gel，靜置 10 分鐘。
5. 加入與第一脫色液約等量的第二脫色液。
6. 滴入 5~6 滴染色液染色。(染越久越清楚)。

藥品

一、4X Sample buffer

1、Tris-base pH 6.8	1 ml
2、H ₂ O	4.7 ml
3、Glycerol	1 ml
4、10% SDS	1 ml
5、beta-mercaptoethanol	0.1 ml
6、0.05% bromophenol blue	0.8 ml

二、SDS running buffer

1、Tris-base	6.0 g
2、Glycine	28.8 g
3、SDS	1 g
pH 先調至 8.3 再加水定量	
4、H ₂ O	1000 ml

三、第一脫色液

- 1、Methanol 500 ml
 - 2、Acetic acid 100 ml
- 加 H₂O 定量至 1000 ml

四、第二脫色液

- 1、Methanol 50 ml
 - 2、Acetic acid 70 ml
- 加 H₂O 定量至 1000 ml

五、Staining Solution 染色液

- 1、Coomassie Blue 2 g
 - 2、Acetic acid 14 ml
 - 3、Methanol 90 ml
- 加 H₂O 定量至 200 ml

下層膠（分離層的配方）

Resolving gels	57-212 kDa	36-94 kDa	20-80 kDa	12-60 kDa	10-43 kDa
10 ml (2 page)	6% gel	8% gel	10% gel	12% gel	15% gel
H ₂ O	5.3 ml	4.6 ml	4.0 ml	3.3 ml	2.3 ml
T30	2.0 ml	2.7 ml	3.3 ml	4.0 ml	5.0 ml
1.5M Tris (pH 8.6)	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml
10% SDS	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l
10% APS	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l
TEMED	8 μ l	6 μ l	4 μ l	4 μ l	4 μ l

APS : ammonium persulfate, TEMED : N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine

上層膠（stacking gel 的配方）

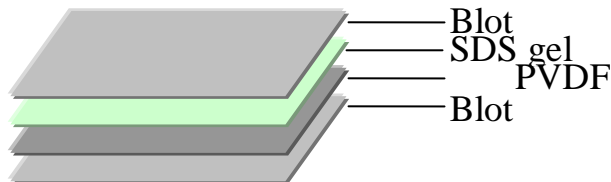
5% stacking gel	3 ml	4 ml	5 ml
H ₂ O	1.7 ml	2.25 ml	2.8 ml
T30	0.5 ml	0.67 ml	0.83 ml
0.5 M Tris (pH 6.8)	0.75 ml	1.0 ml	1.25 ml
10% SDS	30 μ l	40 μ l	50 μ l
10% APS	30 μ l	40 μ l	50 μ l
TEMED	3 μ l	4 μ l	4 μ l

(十五) Western Blotting (西方氏墨點法)

準備：乾淨盒子四個（甲醇、blotting buffer、水、備用）5%（blocking）、2.5%（搭配抗體）PBS 脫脂牛奶、一抗、二抗

一、將 SDS gel transfer 到 PVDF membrane 上

1. 檢下一張適當大小的 PVDF membrane(要戴手套操作)，在甲醇中浸泡 10 秒。
2. 再浸泡於 western blotting buffer (3.03g Tris- base+14.4g glycine 加水到 800ml，再加上 200ml 甲醇)。
3. 再取兩張 Blot paper 及 SDS gel 用 western blotting buffer 浸濕，按順序疊放後，以 15V、20 分鐘進行 transfer。
4. 疊放順序：



SDS-PAGE 要做兩組樣品，第一組做染劑快速染色、第二組做 western blotting 以下操作需戴手套進行

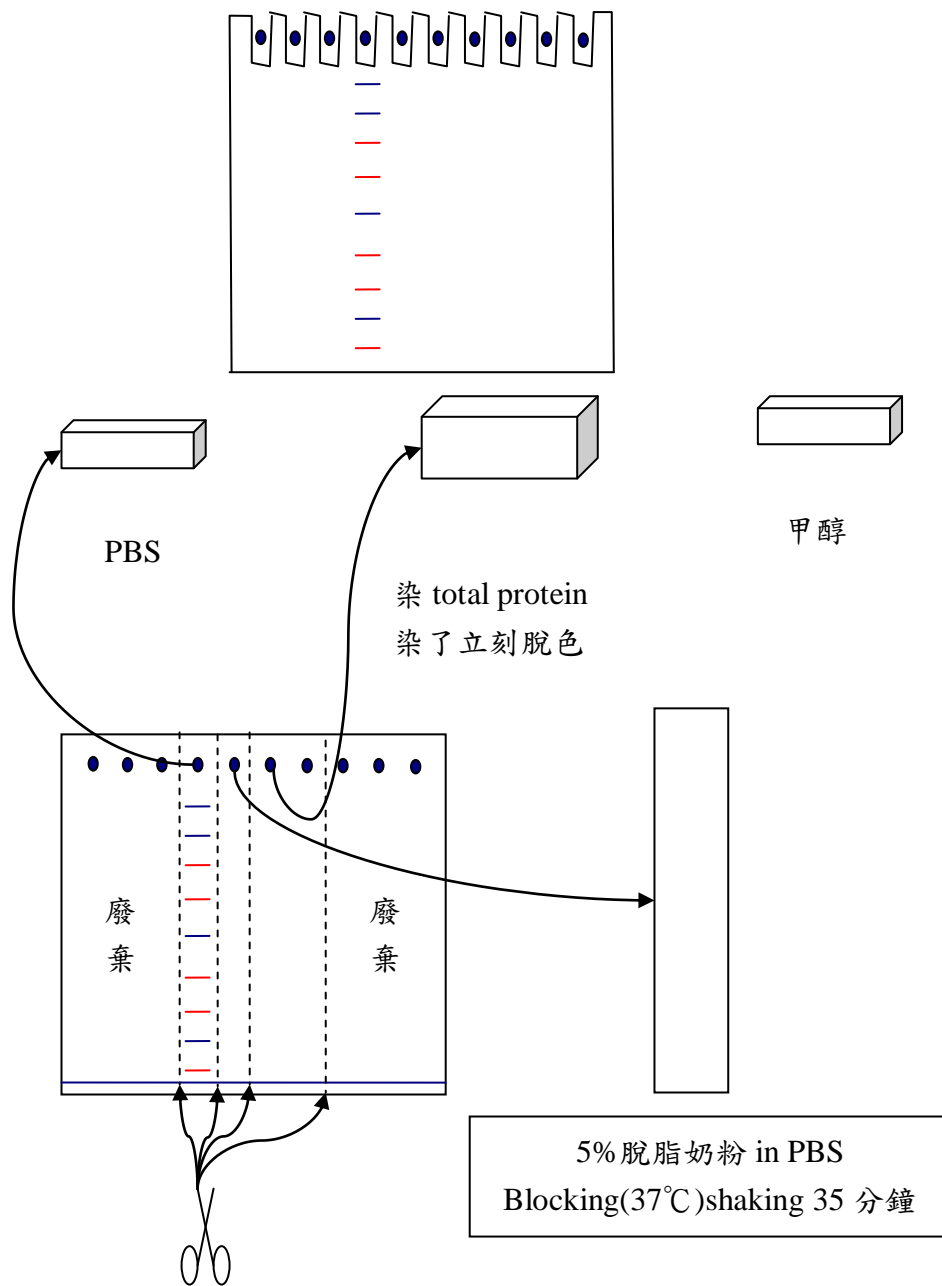
5. transfer 完成後取下上層 Blot Paper 用尺靠在 SDS gel 下緣在 PVDF membrane 劃一條線，並且在 SDS gel 的的上層端每一孔中間點一小點，取下 SDS gel 後在 PVDF membrane 右下角切一個小缺口（確保位置正確）
6. 先將左右多餘的部分剪除，再將 Mark、第一組、第二組分別剪下

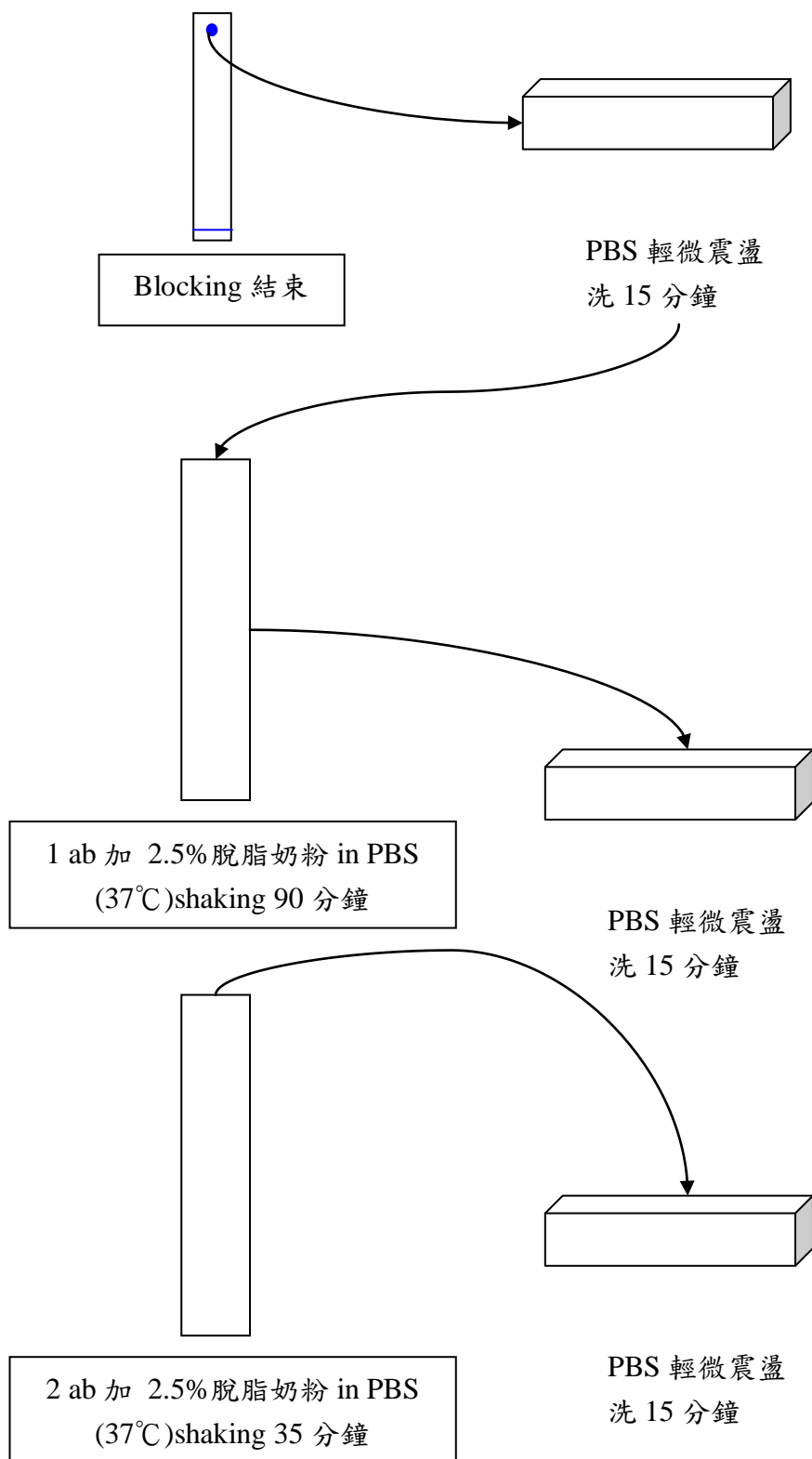
Mark：

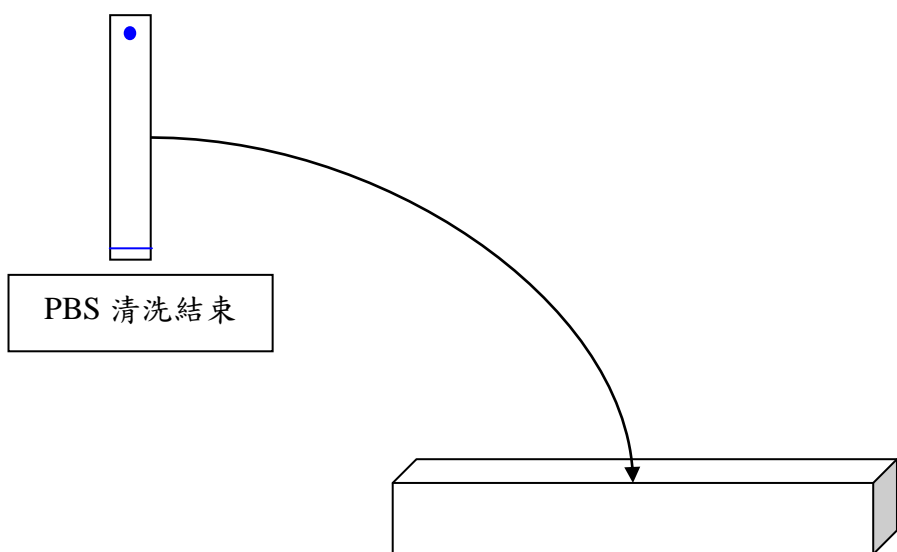
保存於封口袋（封口袋要註明抗原、一抗（稀釋倍數）、二抗（稀釋倍數）、target）袋子裡面要加一點水。

第二組：

執行 Total Protein stain 使用 Coomassie Blue (coomassie blue 2 g + Acetic acid 14 ml + Methanol 90 ml 加水到 200 ml) 沾染一下，使用第一脫色液（Methanol 500 ml + Acetic acid 100 ml 加水到 1000 ml）浸泡。※用回收液比較好







10ml ALP 呈色 substrate 加
50 μ l NBT/BCIT