

OPEN LAB

中正生物醫學營

姓名：_____

小隊：_____

助教：_____

TIMETABLE

課程時程表

08:45 ~ 09:00

報到

09:00 ~ 09:20

開幕式、相見歡

09:20 ~ 09:35

團隊介紹

09:35 ~ 10:20

課程原理講解

10:20 ~ 12:00

實作課 - 螢光蛋白基因選殖
(螢光顯微鏡、PCR、電泳)

LUNCH TIME

13:00 ~ 15:50

實作課 - 螢光蛋白基因選殖
(照膠、萃膠、基因與質體接合)

15:50 ~ 16:50

教授講座
科學研究的基礎：對於萬物的好奇心

16:50 ~ 17:30

實作課 - 螢光蛋白基因選殖
(目標基因轉殖、大腸桿菌培養)

17:30 ~ 18:00

有獎徵答、閉幕式

今日的實驗成果因需要16小時的細菌培養才能表現綠色螢光蛋白，因此我們會將實驗成果照片回寄給參加實驗的大家喔！

Team introduction

團隊介紹

中正大學生物醫學科學系

BMS (Department of Biomedical Science)

本系隸屬中正大學理學院，自創立以來即以生物醫學 (Biomedical Science) 為發展目標，課程強調生物醫學基礎知識之奠基，著重理論與實驗的配合。所聘師資專長皆具有生物醫學相關領域背景與經歷，不僅重視生物化學、分子生物學及細胞生物學等基礎課程，更引領學生往後基因體時代生物醫學之研究發展為主軸，從而開設蛋白質體學、基因體學、幹細胞學、發育生物學、免疫學、及分子癌症學等進階學習課程，並實際配合各實驗室之研究領域，探討生物醫學之相關研究主題。

隸屬於理學院生醫系的跨領域專題研究團隊

iGEM (International Genetically Engineered Machine)

大家好！我們是跨領域專題研究團隊！我們每年都會參加由麻省理工學院首創舉辦，一年一度的國際遺傳工程機器設計競賽 (iGEM) 。我們利用現有的現有的 DNA 資料庫，自行選題並通過設計和模型分析，將所需樣本導入現有的生物體系，合成全新的生物工程系統。結合機械工程、人文實踐的跨領域人才，互相交流合作，完成專利研究。

這是每年合成生物學領域的國際盛事喔！

隆重歡迎我們今年研究的主題 --

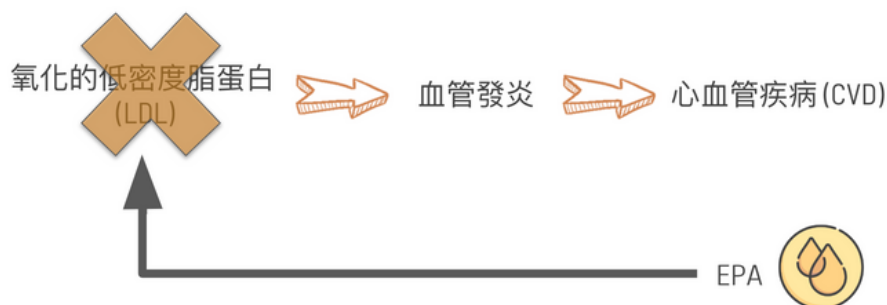
用生物技術製造 EPA (一種魚油中含有的不飽和脂肪酸) 來預防心血管疾病

- 心血管疾病有多嚴重？

根據世界衛生組織 (WHO) 於 2019 年的統計，全世界每年約有一千七百九十萬的人死於心血管疾病 (CVDs)，佔總死亡人數的 32% 呢！

- EPA 要如何預防心血管疾病呢？

根據研究顯示，血管中的低密度脂蛋白 (LDL) 氧化後會造成血管發炎，嚴重的話更可能進一步造成動脈硬化！而 EPA 能降低 LDL 氧化的機會，阻止血管發炎，從而降低心血管疾病！



Team introduction

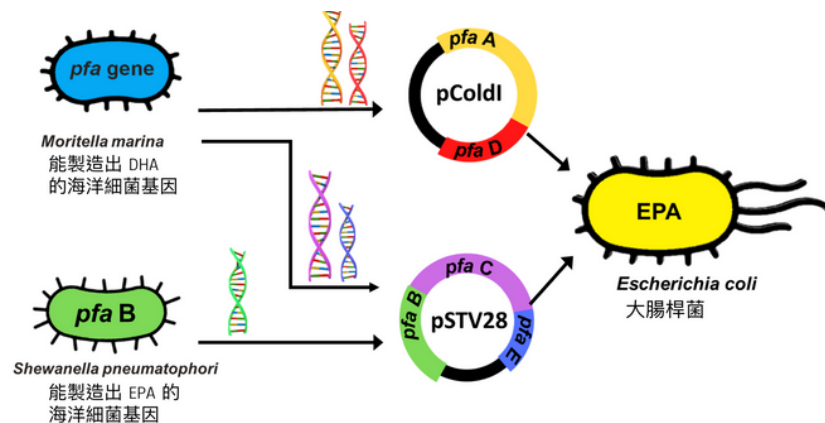
團隊介紹

- 現在的 EPA 有什麼問題？

現在市面上主要的 EPA 來源是魚油，但魚油的製造可能造成海洋資源大量的消耗，受到海洋污染影響的魚也可能讓我們把重金屬、塑膠微粒等污染物吃下肚，且素食者無法食用魚油。

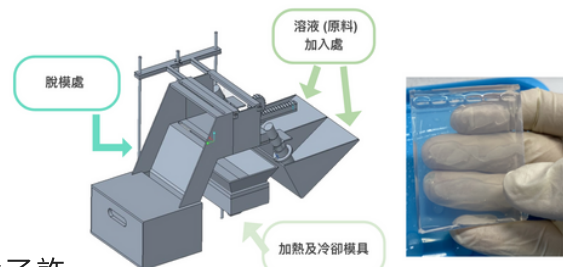
- 我們如何利用生物技術生產 EPA 呢？

我們將能生產出 EPA 的海洋細菌基因（pfaA, B, C, D, E）與 pCold1、pSTV28 質體結合後轉殖進大腸桿菌（*E. coli*）中，讓大腸桿菌幫我們生產 EPA，同樣的技術目前也有使用在其他地方如胰島素的生產喔！而我們今日要體驗的課程就是使用這項技術在大腸桿菌中轉入綠色螢光蛋白基因讓大腸桿菌有綠色螢光！



- 在機械方面我們做了什麼？

我們利用 3D 列印設計出方便我們製作出實驗用品的器具，可以快速的自動幫我們做出許多「膠」，待會的實驗也會用到喔！



- 更多關於 CVD 的資訊？

定義：

心血管疾病是心臟與血管疾病的總稱，包含了許多疾病，例如冠狀動脈硬化造成的冠心病、中風造成的腦血管疾病、深靜脈血栓和肺栓塞等等都屬於心血管疾病。

常見成因：

高膽固醇、高血糖、高血壓，也就是俗稱的三高！

除了食用藥品及保健食品，生活上的預防也很重要喔！例如健康的飲食、規律的運動、定期健檢都是能讓我們遠離心血管疾病的重要步驟喔！



01 實驗安全守則

02 生物安全

03 實驗總覽

04 蛋白質表達

05 綠色螢光蛋白

06 儀器介紹

07 螢光顯微鏡觀察

08 聚合酶連鎖反應 (PCR)

09 凝膠電泳

10 純化 DNA

11 切限制酶

12 接合反應

13 目標基因轉殖

GFP 綠色螢光蛋白轉殖

實驗流程



01 實驗安全守則

- 實驗過程注意事項 -

實驗過程中經常碰到許多溶液或有毒物質，為了確保大家能夠在安全的條件下在享受實驗過程，請大家務必注意並遵守以下事項：

1. 實驗室禁止飲食和奔跑。
2. 實驗前需要穿實驗衣並配戴手套與護目鏡及穿著包鞋。
3. 實驗前後仔細清潔雙手。
4. 實驗前需先詳細了解藥品及儀器，並於試藥前，看明標籤，以免誤用。
5. 當接觸到感染原或化學藥品，應該立刻以大量清水沖洗。



02 生物安全

- 生物安全注意事項 -

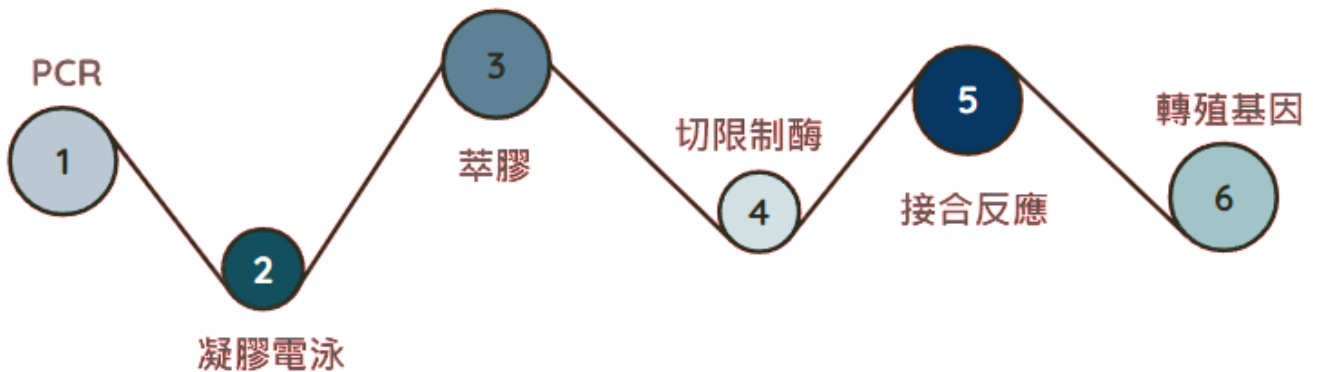
生物安全指的是人們為防止有害生物（如病毒、細菌等）流入以及傳播給動物和植物而採取的措施，目的是儘量減少傳染病的傳播風險以及生物恐怖主義的威脅。

它是一種方法用於分析和管理對人類、動植物、健康和環境的相關風險。在實驗室合法的生物科學設施中採用的一套系統，以降低危險的生物製劑被盜和被惡意使用的風險，並保護研究人員、他們的接觸者和環境避免接觸到意外釋放的病原體。所以有接觸到細菌的實驗都要配合酒精燈或在生物安全櫃進行，實驗結束後馬上使用紙巾和酒精消毒周遭環境。



03 實驗總覽

- GFP 綠色螢光蛋白轉殖 -



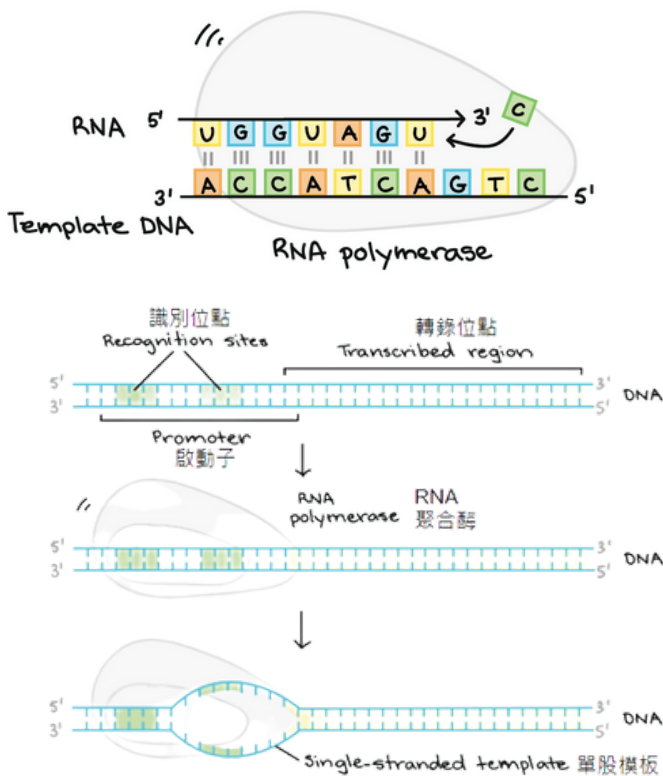
今天我們的目標是在大腸桿菌 (*E. coli.*) 中轉殖綠色螢光蛋白 (Green fluorescent protein, 簡稱GFP), 我們會利用以下幾個步驟達到這個目標：

1. 先使用聚合酶連鎖反應 (Polymerase chain reaction, 簡稱 PCR) 放大目標基因 (GFP)。
2. 使用凝膠電泳 (Gel electrophoresis), 將目標基因分離, 經過純化 (Purify) 後獲得目標基因。
3. 利用限制酶 (Restriction enzyme) 的 BamHI 和 XhoI 在質體 (pET15b) 和基因 (eGFP) 切出相對應能夠連接的切位, 以進行後續的接合反應 (ligation)。
4. 利用DNA 連接酶 (T4 DNA ligase) 將用限制酶 (BamHI, XhoI) 作用過的質體 (pET15b) 和基因 (eGFP) 連接, 完成我們今天的目標質體 (pET15b - eGFP)。
5. 將目標質體 (pET15b - eGFP) 轉殖到大腸桿菌 (*E. coli.*) 中, 經過16 小時後, 我們就能收獲到一個因為表達綠色螢光蛋白而呈現有綠色螢光細菌的菌盤 (plate)。



04 蛋白質表達

- GFP 綠色螢光蛋白轉殖 -



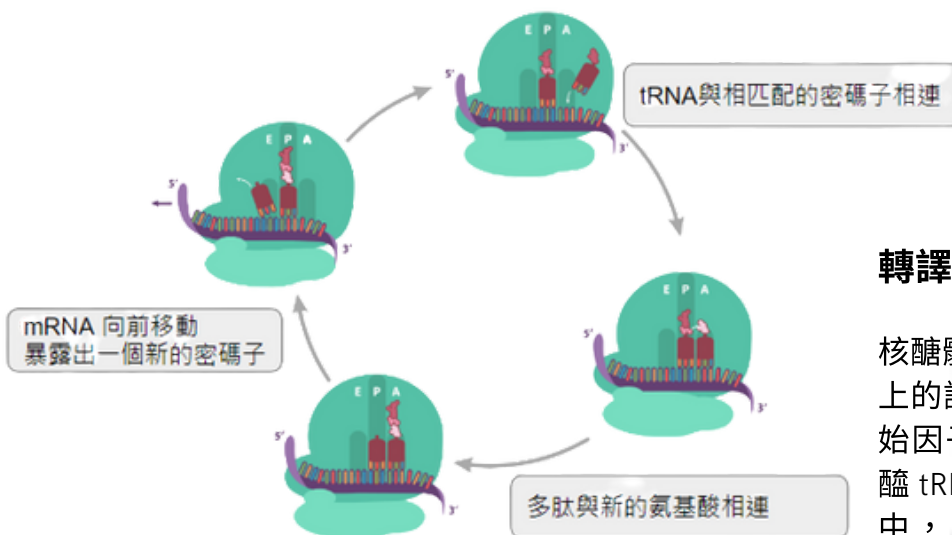
RNA 聚合酶 (RNA polymerase)

RNA 聚合酶是一種負責從 DNA 模板製造 RNA 的酶。

轉錄 (Transcription)

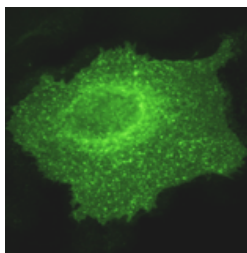
轉錄是遺傳訊息由 DNA 轉換到 RNA 的過程。轉錄是信使 RNA (mRNA) 以及非編碼 RNA (tRNA、rRNA 等) 的合成步驟。

轉錄中，一個基因會被讀取、複製為 mRNA；這個過程由 RNA 聚合酶 (RNA polymerase) 和轉錄因子 (Transcription factor) 所共同完成。



轉譯 (Translation)

核糖體會以三個密碼子來讀取 mRNA 上的訊息，一般是從 AUG 開始。起始因子及延長因子的複合物會將胺基 tRNA 帶入核糖體 - mRNA 複合物中，只要 mRNA 上的密碼子能與 tRNA 上的反密碼子配對，即可按照 mRNA 上的密碼序列加入胺基酸。



05 綠色螢光蛋白

- GFP 綠色螢光蛋白轉殖 -

綠色螢光蛋白（Green fluorescent protein）是生命科學巨大的里程碑，使得生命科學研究學者得以由分子層次的觀點，研究細胞的代謝、恆定、反應、生長、繁殖等現象。

應用：

綠色螢光蛋白讓研究活體蛋白變得容易，雖然蛋白質研究方法持續推陳出新，但是樣品需求大，同時需要經過繁複的處理或是殺死細胞以觀察蛋白質，螢光蛋白的應用讓學者能夠藉由將綠色螢光蛋白的基因殖入欲觀察的細胞，等到綠色螢光蛋白表達之後，藉由照射藍光或紫外光，便能夠觀察外來基因是否成功植入細胞、特定基因的表現能力和時間、蛋白質的位移和交互作用等等。



06 儀器介紹

- GFP 綠色螢光蛋白轉殖 -



微量分注器
Pipette

介紹：

生物實驗常用的一種工具，能夠精確輸送一定體積的液體，和一次性的Tips 搭配使用，能夠抽取實驗所需的少量液體。

Note:

1. 實驗時注意不能倒置，同時慢吸慢吐避免暴衝。
2. 在使用時注意兩段式按法（先按一段吸取，然後按第二段排光）。
3. 記得使用完調回最大刻度。



試管震盪器

介紹：

透過搖晃能夠混合、攪拌試管內的物質。



離心機（小烏龜）

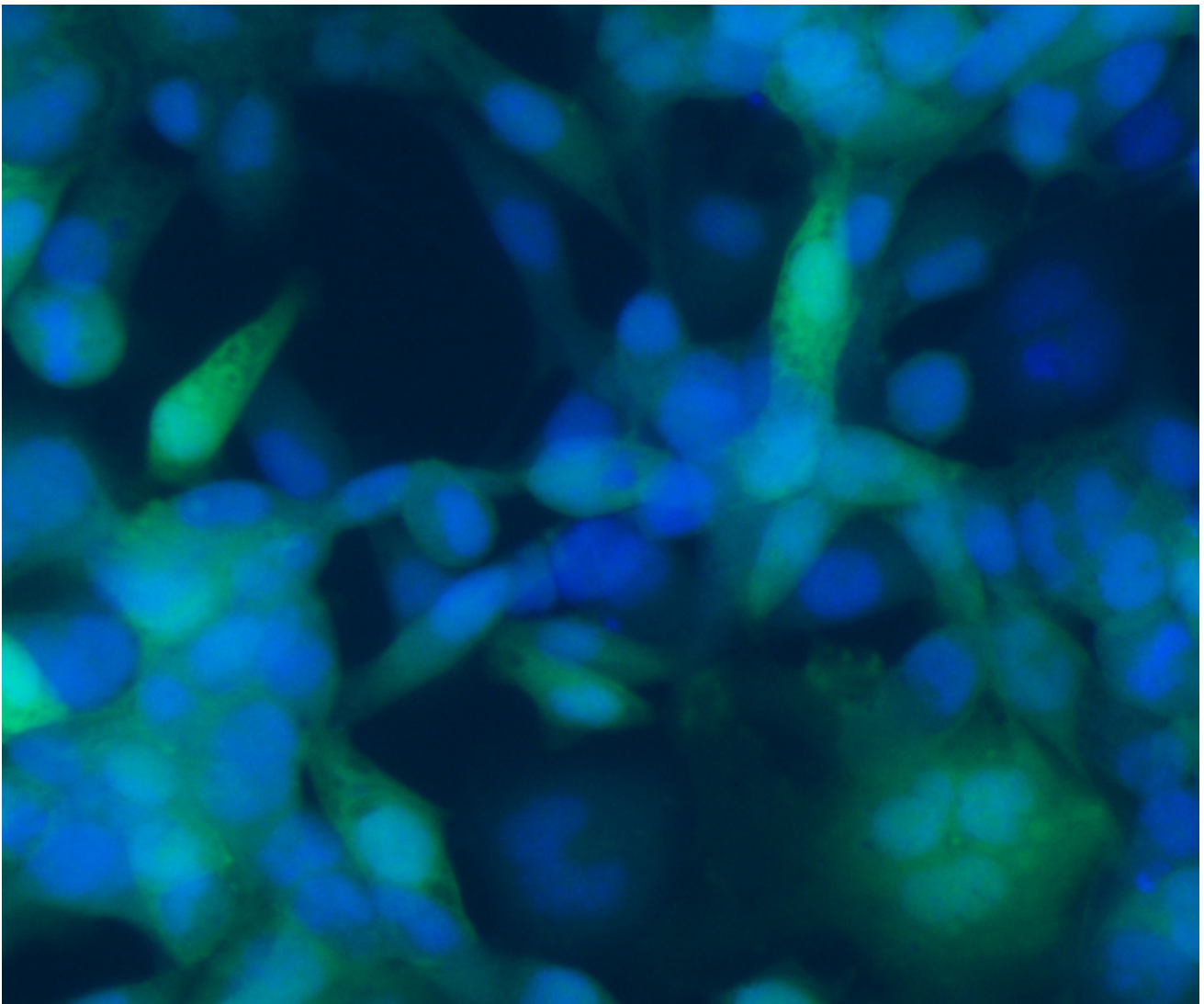
介紹

有時液體會黏附在試管壁上，此時需要離心機將這些溶液聚集到試管底。

07 螢光顯微鏡觀察

- GFP 綠色螢光蛋白轉殖 -

螢光顯微鏡的基本原理，是藉由一個高能量波長的光線，激發出一個較低能量波長的螢光。一般而言，藍、紫色的波長較短，能量較高，可以激發出綠色或紅色的低能量螢光，像是綠色螢光蛋白收到高能量的藍光或紫光能夠產生綠色的螢光。



08

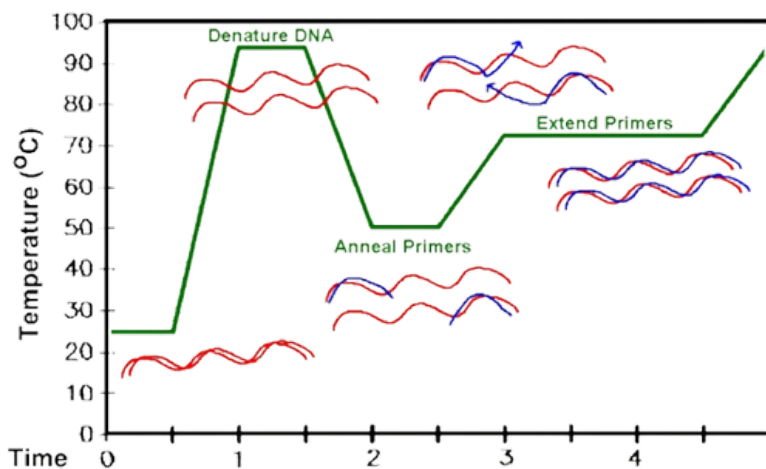
聚合酶連鎖反應(PCR)

- 放大基因的好幫手 -

敘述

聚合酶連鎖反應 (PCR) 是一種實驗室的常見技術，用於快速放大目標 DNA, 利用引子 (Primer) 選擇放大哪一段基因，利用 DNA 聚合酶 (DNA polymerase) 將經過多個循環之後，便能夠獲得足夠數量的基因進行研究。

實驗步驟



材料

1. dNTP
2. DNA polymerase
3. 目標基因 (Template)
4. 引子 (Primer)
5. 水

實驗原理

1. Denaturation

分離雙股 DNA

利用 94-98 °C 持續 20 到 30 秒破壞 DNA 雙股螺旋的結構，讓雙股 DNA 分開成兩個單股 DNA

2. Annealing

將引子 (Primer) 接上目標基因

第二步將溫度降低到 50 - 65 °C 持續 20 - 40 秒，這個步驟非常重要，因為會影響到 PCR 的效率和引子 (Primer) 的專一性

3. Elongation

利用 DNA 聚合酶延長基因

第三步 DNA 聚合酶依照目標基因的序列，將游離的 dNTP 組成和模板互補的 DNA 序列，這一個步驟的時間取決於要放大的 DNA 片段大小，一般來說，1000 bp 的 DNA 大小所需時間是一分鐘

筆記頁

凝膠電泳 (GEL ELECTROPHORESIS)

- 分離目標基因! -

敘述

凝膠電泳 (Gel electrophoresis)，是一種用於大分子（如 DNA、RNA、蛋白質）以及其碎片的分離、分析技術。該技術被科學工作者用於分離具有不同物理性質（大小、電荷、等電點）的分子。凝膠電泳通常用於分析用途，但也可以作為預處理技術，在進行質譜、聚合酶連鎖反應、克隆、DNA測序或者免疫墨點等檢測之前，進行分子的純化。

實驗步驟

1. 在電泳槽中放入托膠器再放上膠
2. 倒入 TAE buffer，高度需要蓋過膠體
3. 注入 3 ul marker 到第一個洞
4. 依序注入 10 ul sample 到每一個洞
5. 電泳槽上方接負極，下方接正極，並打開電源
6. 等待約 1 小時

材料

1. TAE buffer
2. 瓊脂糖凝膠 (Agarose gel)
3. PCR product (sample)
4. marker
5. 電泳槽 (tank)
6. 托膠器 (tray)

實驗原理

瓊脂糖凝膠 (Agarose gel)

瓊脂糖凝膠易溶於沸水，冷卻後會凝固。瓊脂糖凝膠的濃度越大，其分子間的距離越小，即膠體的孔隙越小，分子越難移動，較適合用來跑小片段的 DNA；相反，濃度較低的瓊脂糖凝膠較適合跑大片的 DNA

分離概念

凝膠電泳在分離核酸分子時，帶有負電荷的核酸分子在外加電場的作用下穿過凝膠組成的網格。由於較小的分子更容易通過網孔，較小的分子在凝膠基質中穿行地更快，並且可以移動得更遠

螢光染劑

溴化乙錠 (EtBr) 是一種核酸染料，常在瓊脂糖凝膠電泳中用於核酸染色。在紫外光的照射下，未與核酸結合的溴化乙錠可被激發出橙紅色螢光，在與 DNA 或雙股 RNA 結合時，螢光強度會增強 20 倍，使得核酸電泳後的膠片可以辨識核酸的相對位置

筆記頁

10 純化 DNA

- 從電泳膠獲得 DNA ! -

敘述

DNA 純化 (Purify) 是實驗室中的一項重要技術，本實驗的目的在於當我們上一步利用凝膠電泳將目標基因和其他的 PCR 產物分離之後，我們還需要將目標基因從瓊脂糖凝膠 (Agarose gel) 中分離，以獲得乾淨的目標基因。

實驗步驟

1. 加入 500 ul Gel / PCR Buffer
2. 放入加熱到 60° 的乾浴槽，等待直到膠全部溶解
3. 將溶好的膠及 Gel / PCR Buffer 一起移到 DFH Column
4. 離心 15000 g 30 秒，倒掉下清液
5. 加入 400 ul W1 Buffer
6. 離心 15000 g 30 秒，倒掉下清液
7. 加入 600 ul Wash Buffer，等 1 分鐘以清掉鹽類
8. 離心 15000 g 30 秒，倒掉下清液
9. 再離心一次 15000 g 3 分鐘
10. 將 DFH Column 移到新的 tube 裡面
11. 加入 20 ul 已經預熱到 60° 的 Elution Buffer，等 2 分鐘
12. 離心 15000 g 2 分鐘

材料

1. Gel buffer
2. DFH column + Collection tube
3. W1 buffer
4. Wash buffer
5. Elution Buffer

實驗原理

1. Gel Dissociation

將瓊脂凝膠糖溶解，釋放 DNA

2. DNA Binding

將 DNA 和 DFH column 結合

3. Wash

藉由緩衝液 (Buffer) 洗掉不需要的雜質

4. DNA Elution

藉由緩衝液 (Buffer) 將 DNA

筆記頁

11

切限制酶 (DIGESTION)

- 在質體和基因上切割特定序列的 DNA -

敘述

限制酶 (Restriction enzyme) 是一種特殊的酵素，能夠辨認 DNA 特定的位點，將 DNA 切割成片段，或是為了連接兩個不同來源的基因，我們會事先同時切出相同的切位，之後才能連接兩個基因。

操作流程

1. 將質體 (pET15b) 和基因 (eGFP) 分別加到不同的 Eppendorf 中
2. 先各自加入緩衝液 (Buffer)
3. 再加入限制酶 (BamHI, XhoI)
4. 最後再視情況加水
5. 最後放入培育箱 (Incubator) 維持 37 °C 三小時

材料

1. 質體 (pET15b)
2. 基因 (eGFP)
3. 限制酶 (BamHI, XhoI)
4. 緩衝液 (Buffer)
5. 水
6. 培育箱 (Incubator)

12

接合反應 (LIGATION)

- 將質體與目標基因接合在一起 -

敘述

被相同限制酶作用過的質體和基因，會在兩端形成序列互補的黏性端，透過 T4 噬菌體所攜帶的 DNA 接合酶 (T4 DNA ligase) 將基因與質體接在一起，這個過程稱作接合反應。

操作流程

1. 將切過的質體 (pET15b) 和基因 (eGFP) 分別加 4 ul 到 Eppendorf 中
2. 先加入 1 ul 緩衝液 (Buffer)
3. 再加入 1 ul T4 DNA 連接酶
4. 再放入培育箱 (Incubator) 維持 16 °C 一小時

材料

1. 限制酶作用過的質體
2. 限制酶作用過的基因
3. T4 DNA 連接酶 (Ligase)
4. 緩衝液 (Buffer)
5. 培育箱 (Incubator)

目標基因轉殖 (TRANSFORMATION)

- 將可以表現 GFP 的質體轉殖到大腸桿菌 -

敘述

為了使大腸桿菌可以表達出我們想要的綠色螢光蛋白，我們會將接有綠色螢光蛋白基因（GFP gene）的 pET15b 送入大腸桿菌體內，並且塗到盤子上，37 度 C 養 16 小時後，觀察是否有綠色菌落（colony）來確認實驗是否成功。

操作流程

1. 首先將質體和勝任細胞以 1:3 的比例混合，並於冰上放置五分鐘
2. 熱刺激（heat shock）：將混合完的勝任細胞放入乾浴機以 42 度持續 45 秒
3. 最後再放回冰上 5 分鐘以穩定細菌的細胞膜
4. 最後進行塗盤

材料

1. 質體（plasmid）
2. 勝任細胞（competent cell）
3. 盤子（plate）
4. 乾浴機
5. 玻璃珠
6. 冰桶
7. 酒精燈 + 打火機
8. 培育箱（Incubator）

實驗原理

轉形（Transformation）

一般會使用細菌作為放大質體的宿主，因此 vector 包含細菌內的複製起始和抗生素篩選基因，將質體送進細菌的過程稱作「轉殖」（Transform）

抗生素（Antibiotics）

抗生素是一種可以消滅或防止細菌生長的藥物，能用作預防或治療因細菌感染而引致的疾病，但不能醫治病毒引起的疾病。除了醫療方面也能應用在生物技術上，含有抗生素的盤子可以用來篩選含有目標質體的大腸桿菌

塗盤

轉形完成後要將菌液塗到瓊脂盤（agar plate）上，瓊脂盤需要事先製備，並加入質體使用的抗生素。塗盤完的瓊脂盤放到 37 度C 中培養過夜，預期會看到一顆顆菌落，理論上每顆菌落都是由一顆細菌長成，所以稱做單一菌落（single colony），單一菌落擁有的質體會全部相同，因此可用來做後續的定序分析

筆記頁

Note

筆記頁

