

2020 iGEM NCTU\_Formosa 實驗手冊



NCTU  
Formosa

Synthetic Biology Lab Protocols

NCTU\_FORMOSA 助教團隊 編

# 實驗室注意事項

## 實驗室基本守則

1. 進入實驗室須**穿著包鞋**以保護自己不受藥品之侵害，並展現實驗者之基本態度。
  2. 做任何實驗皆須帶著**手套**，手套需標記自己的記號重複利用。
  3. 為維護實驗室環境整潔及保護自身安全不被化學藥劑傷害，**嚴禁在實驗室中飲食**。
  4. 器材需按排定之編號使用，不可任意使用他組器材，且使用完畢必須**歸位**。
  5. 裝過菌液的容器不得隨意放置，須放到**待滅區**。
  6. 一般垃圾和接觸過細菌的**感染性廢棄物**須分開丟棄。
  7. 若發現各式耗材即將用盡，應立即告知助教。
  8. 實驗進行前應確實了解其目的即進行步驟，方能獨立操作並分析實驗後結果。
  9. 實驗時務必仔細觀察各種變化，將所得結果照實以墨水筆記下。記載必需用裝釘完整的筆記本或特製的實驗報告紙，禁止隨意拿取紙片零亂記錄，且若寫錯數據**不得以修正帶或修正液塗改**，應直接劃掉重寫。
- 完整之日誌應包含：
- A. 進行實驗之年、月、日。
  - B. 實驗目的。
  - C. 實驗時執行之步驟及藥品。
  - D. 實驗結果和觀察。
10. 實驗後所留下之結果應確實標記實驗日期、內容物、特殊處理及實驗者。
  11. 離開實驗室前，務必確保門窗已鎖上。

## 值日生

值日生工作要按照分配的組別按時執行，工作如下：

1. 各藥品配製：
  - A 400mL LB Broth
  - B 各種抗性之 LB Agar Plate
2. Tip、Eppendrof、PCR tube、牙籤補充
3. 實驗用品之滅菌
4. 耗材數量報備
5. 垃圾處理：一般垃圾直接丟棄，接觸過菌液的物品須經滅菌鍋滅菌後才能處理。

## 撰寫實驗報告方式

實驗報告必須是根據你自己的實驗歷程所撰寫的，除小部分引用他人的文獻外，都必須是實實在在的實驗結果與過程的紀錄。報告內容篇幅與成績不一定呈正相關，詳實仔細而有創見的一句話，比起浩浩湯湯的空話更具價值。

### 實驗報告的結構：

預報(1-3)請於實驗開始前完成，中英文皆可，助教檢查完才可開始進行實驗。

#### 1) 目的：

簡單描述實驗的動機與目標，請用**自己的話**說出來，不要直接抄錄。

#### 2) 原理：

描述實驗的原理，請用**自己的話**說出來，不可直接抄錄。若需引用他人文獻，請註明出處。

#### 3) 實驗步驟：

請寫出你**自己的**實驗步驟，完全記錄下你所操作的流程與條件，實驗步驟建議用**流程圖**方式說明，而並非講義或論文上所載者。這部分最容易過度抄錄，若使用已知的報告或論文中的方法，請加註出處即可，不必原文再抄一次，沒有意義。

#### 4) 結果：

條理分明的寫出你的結果，據實陳述觀察所得結果。實驗數據要經過整理，做成圖表以利判讀。

#### 5) 問題討論：

由結果所得到的觀察，進一步整合分析，說明由結果所透露出來的信息。若有與事實或已知不符的現象，請仔細討論或解釋之。此一部份最需要發揮你的專業判斷與經驗，若毫無頭緒可找助教討論。

#### 6) 參考文獻：

報告中若有引用他人結果者，一定要列入參考文獻。

# 實驗一 單一菌落分離

## 目的：

藉分離技術獲得由一個細胞生長成的基因型相同之單一菌落(Pure Culture)。

## 原理：

在自然環境中不同種類的微生物(下列討論以細菌為主)常以混和族群的形式存在，使得微生物學家在研究上增添了許多的困難。德國醫師兼微生物學家羅伯·柯霍(Robert Koch, 1843-1910)為研究細菌和疾病的關係，發明了單一菌落分離的技術，此技術也沿用至今。

在分子生物學實驗中，研究者常利用此技術分離同族群中的不同個體，而非分離不同族群。顯而易見的，單一菌落是由一個細菌細胞所生長而成的，扣除無法避免的自然突變因素，我們可以說這一肉眼可見的單位菌落都帶有同樣的基因型，如此一來便可減少實驗中的變因。

進行單一菌落分離時，可視不同的需求選用不同的固態培養基(Solid Medium)。一般最常使用的是 1.5% LB Agar，其中可再依不同的需求添加各類篩選物質(e.g. Antibiotic)。

## 材料與器材：

- 1 LB Plate 的製備
  - Tryptone
  - Yeast Extract
  - NaCl
  - Agar
  - Antibiotic
  - Plate
- 2 塗佈法及四區畫線
  - 菌液
  - 固體培養基
  - 接種環、塗抹棒或玻璃珠

## 步驟：

- A. LB Plate 的製備(1個Plate 大約10mL，一條袋子內有個 20 盤)
  - 1 按比例(Appx. 1. B)取所需之 Tryptone、Yeast Extract、NaCl 和 Agar 以二次水溶解於血清瓶中，並放入磁石(\*\*現行實驗室使用配方：40g LB Agar Powder/1L ddH<sub>2</sub>O)
  - 2 滅菌前先用磁石攪拌打散沉澱塊。
  - 3 以鋁箔紙包覆在蓋子並貼上滅菌膠帶，蓋子不可以完全轉緊，以 121℃ 濕熱滅菌 2 小時。(\*\*注意：磁石不需取出)
  - 4 滅菌完畢後靜置加熱版上降溫(可開啟攪拌器確保 Agar 不致沉澱)，直到其溫度降至約 65℃(手掌可忍受溫度)。

\* 以下步驟需在無菌操作台中進行。

5. 降溫過程中，先在每個 Plate 盤子側邊註明所使用之抗生素(Ampicillin 一線、Chloramphenicol 二線、Kanamycin 三線、Tetracycline 四線)，並於培養基側標記特殊添加物。外包裝寫上製作日期、添加之抗生素、特殊處理及配製人員。
6. 依需求加入添加物至工作濃度(Working Concentration 見 Appx. 1.C)(抗生素：LB=1:1000, 500  $\mu$ L for 500mL LB Agar)輕輕搖晃使其混和均勻。於每個 9cm 無菌培養皿中緩緩倒入約 10mL Medium (目測表面積一半)，輕搖培養皿使其分佈均勻(勿使其沾附於蓋子上)。
7. 確定無氣泡殘留後於室溫中靜置約 10 分鐘，待凝固後**倒置**(避免水氣凝集於培養基上造成污染)。
8. **曬盤**(15 分鐘左右)，使盤蓋上的小水滴蒸發。
9. 試盤：取一盤 Plate 與空氣接觸後放置於 37°C 培養箱培養 12~16 小時，觀察有無長菌。
10. 其餘盤子裝入袋子內後，在袋外註明抗性與配盤者，收入 4°C 冰箱中進行保存。

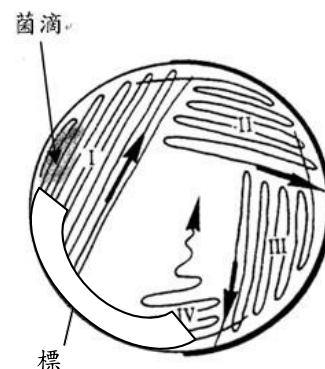
\* 以下實驗需在無菌操作台中進行。

#### B. 單一菌落分離—塗佈法(塗盤)

1. 於 Plate 培養基面標記宿主、處理、抗生素抗性與自己姓名及日期。
2. 將 Plate **倒置**於酒精燈旁，微開令其乾燥(曬盤 15 分鐘左右)。
3. 玻璃塗抹棒浸泡於裝有 75%酒精的燒杯中，將塗抹棒以酒精燈灼燒並待其**冷卻**。(注意：若塗抹棒接觸到酒精燈焰無燒灼現象，請更換燒杯內的酒精)
4. 取適量菌液滴於瓊脂盤上，使用冷卻的塗抹棒均勻塗開至盤在**輕晃下無明顯液體流動**。
5. 置於適當溫度下(視菌株和用途而定，通常為 37°C)培養 12~16 小時，觀察生長結果(理想 CFU 為 30~300 ; CFU, colony-forming unit)。
6. 挑取所需之單一菌落，菌盤冷藏至 4°C 冰箱中。

#### C. 四區畫線(劃盤)

1. 於 Plate Agar 面標記宿主、特殊處理、抗生素抗性、實驗操作者及日期。
2. 將接菌環燒紅，待冷卻後沾取菌液。
3. 選擇 Plate 一角畫 3~4 條線為第 I 區，再將接菌環燒紅並待其冷卻。
4. 旋轉培養基，自 I 區塗佈的邊緣再橫劃數條線到未接種的區域 (II 區)。
5. 重複步驟 4，完成 III 區與 IV 區。
6. 置於適當溫度下(視菌株和用途而定，通常為 37°C)培養 12~16 小時。
7. 觀察生長結果(理想狀況在其中一區會有單一菌落)。挑取所需之單一菌落後，菌盤冷藏至 4°C 冰箱中。



## 實驗二 單一菌落培養

### 目的：

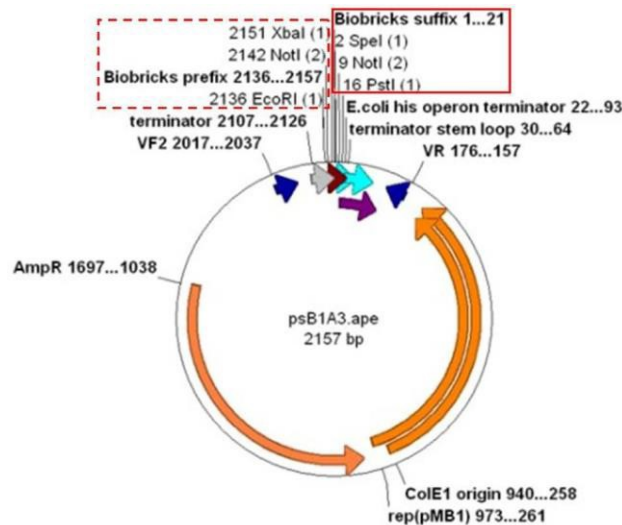
藉由寄主細菌的系統來達成複製質體DNA(Plasmid)。

### 原理：

質體(又稱質粒, Plasmid)為一種獨立於染色體之外的雙股DNA, 通常為環狀且只有數千個鹼基對 (kb, Kilo-Base-pair)。它具有獨立於染色體複製的要素(即複製起始點, Replication Origin, ori), 並隨著細菌分裂會擴散到新生成之細胞中。複製起始點亦決定了細胞內質體相對於染色體的數量(Copy Number)。

自然狀況下, 質體的有無對於細菌生長並無影響, 但質體通常會帶有利於天擇的基因, 如抗藥性(e.g. R Plasmid)。有些質體可以在細菌中傳遞(e.g. F Plasmid)來改變寄主的性狀, 以便其在環境改變時取得生存優勢, 此亦為細菌產生抗藥性的常見途徑。

在應用上, 質體常被用作載體(Cloning Vector, or Vector)轉殖特定的基因或表現蛋白質。為方便篩選細菌是否帶有目標質體, 其上常會被加上一個選擇標記(Selection Marker), 常見的抗藥性基因便是一例。



### 材料與器材：

1. LB (Lysogeny Broth)液態培養基的製備
  - Tryptone
  - Yeast Extract
  - NaCl
  - Antibiotic
  - 玻璃養菌管
2. 單一菌落培養
  - 菌液
  - 液態培養基
  - 牙籤

步驟：

A. LB 液態培養基的製備

- 1 將洗好之玻璃養菌管置於烘箱內烘乾。
- 2 按比例(Appx. 1. A)取所需之 Tryptone、Yeast Extract 和 NaCl 以二次水溶解於血清瓶中，並放入磁石(\*\*實驗室現行配方：25g LB Broth Powder/1L ddH<sub>2</sub>O)。
- 3 滅菌前要先用磁石攪拌打散沉澱塊後，再把磁石取出。
- 4 以鋁箔紙包覆在蓋子並貼上滅菌膠帶，蓋子不可以完全轉緊，以 121℃ 濕熱滅菌 2 小時。
- 5 滅菌完畢後靜置於室溫，直到其溫度降至室溫。
- 6 收入 4℃ 冰箱中進行保存。

\* 以下實驗需在無菌操作台中進行。

B. 單一菌落培養

- 1 準備 LB Broth、抗生素、瓊脂盤和微量吸管，確認無菌操作台內有菌管和牙籤。
- 2 在瓊脂盤上將欲培養的單一菌落標記。
- 3 於菌管上標記日期、菌落名稱等。
- 4 加入 3mL 的 LB Broth 於菌管中。
- 5 加入 3  $\mu$ L 的抗生素(抗生素：LB=1:1000)，並溫和 pipetting。
- 6 用過火後的牙籤挑出標記好的單一菌落。
- 7 將菌管傾斜並將牙籤伸入 LB 液面下攪動。
- 8 置於適當溫度下(視菌株和用途而定，通常為 37℃)培養 12~16 小時。
- 9 觀察生長結果和進行後續實驗。

\* 培養好之菌液僅可保存於 4℃ 冰箱中至多 3 小時，故應盡快進行後續實驗。



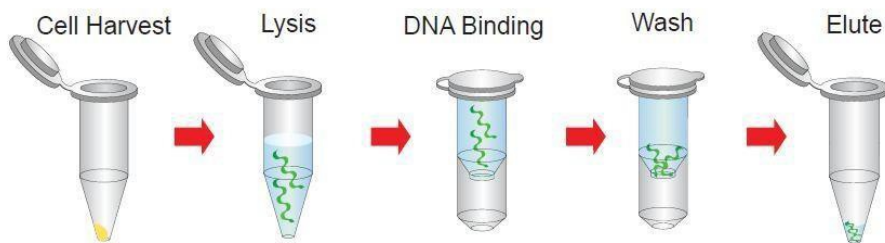
### 實驗三 小量質體的分離

#### 目的：

利用鹼溶裂法(Alkaline Lysis)及矽膠樹脂(Silica Resin)自細菌中分離並純化出質體。

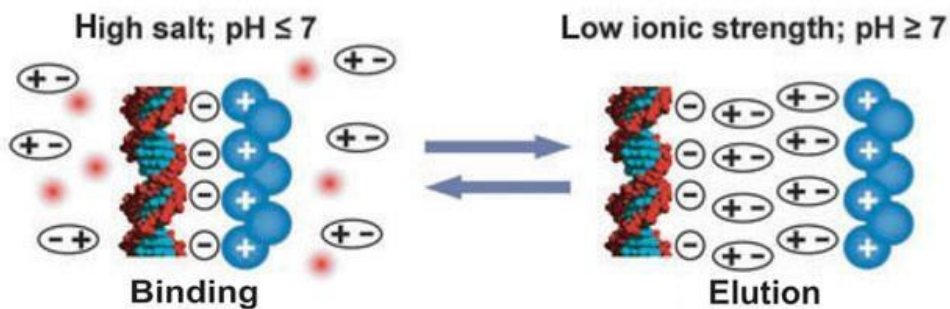
#### 原理：

日前應用於質體의抽取方法眾多，其中以鹼溶裂法配合矽膠膜的方式為大宗，且多數市售之管柱層析套組皆是利用此機制。其原理為先利用鹼性處理令細胞裂解，並使質體及染色體變性呈單股狀態，之後再加入酸中和，使其回復為雙股，此時染色體因分子過於龐大以致於鹼基無法完美配對，導致其溶解度降低而產生沉澱。反之，因質體分子較小，鹼基較易配對而可繼續溶於水中，此時便可離心將兩者分離。



實驗步驟中，加入 Buffer S1 的目的主要是將細菌團塊重新懸浮於緩衝溶液中，Buffer S2 含有 Sodium Dodecylsulfate(SDS)及 NaOH，前者可將細菌溶解，後者則令 DNA 和蛋白質變性，Buffer S3 中含醋酸可中和鹼性。

在偏酸性環境下，DNA 會和矽膠樹脂結合，此時便可用不同的溶劑將雜質和鹽類洗出。最後以微鹼性的無菌二次水或沖提液(Elution Buffer)將 DNA 回溶出來。



#### 材料與器材：

- 培養好的菌液
- Genedirex Plasmid mini PREP Kit (Cat No. NA005-0100)
  - Buffer S1 with RNase (work conc. 0.1mg/mL).
  - Buffer S2
  - Buffer S3
  - Spin Column
  - Buffer W1
  - Buffer W2 with Ethanol.
  - 無菌二次水(pH=7.0~8.5) or Buffer E (Tris Buffer)



### 步驟:

- 1 將 5 mL 菌液加入 1.5mL 微量離心管中，室溫下以 14000rpm 離心 1 分鐘，倒掉上清液 (Supernatant)。重複此步驟直到處理完所有菌液。(重複三次)
- 2 加入 200  $\mu$ L Buffer S1，用震盪器(Vortex)將細菌團塊(Pellet)打散。
- 3 加入 200  $\mu$ L Buffer S2，緩慢上下倒置微量離心管 10 次令其混合均勻(**勿劇烈搖晃**)，此時溶液呈透明狀。室溫靜置 2 分鐘。
- 4 加入 300  $\mu$ L Buffer S3，緩緩上下倒置微量離心管 10 次令其混合均勻(**勿劇烈搖晃**)，溶液中會出現白色棉絮狀懸浮。室溫離心 14000rpm，8 分鐘。
- 5 將上清液(**勿吸到白色沉澱**)轉移至 Spin Column，離心 14000rpm，30 秒，並倒掉廢液。
- 6 加入 400  $\mu$ L Buffer W1，離心 14000rpm，30 秒後倒掉廢液。
- 7 加入 600  $\mu$ L Buffer W2，離心 14000rpm，30 秒後倒掉廢液。
- 8 以 14000rpm 乾離心 2 分鐘去除殘留之 Buffer W2。
- 9 將 Spin Column 移至標記好的 1.5ml 微量離心管，加入 50  $\mu$ L 55°C 無菌二次水(**先置於乾浴槽加熱**)(滴在白色樹脂上)，於室溫靜置 2 分鐘。離心 14000rpm，2 分鐘後即得到質體。  
(注意：離心前將已剪蓋的 Spin Column 移至新的不剪蓋的 Eppendorf，以下蓋緊密扣合 Spin Column)
- 10 視需要取少量質體溶液測量 OD<sub>260/280</sub> 計算濃度 (ng/ $\mu$ L)，並標記於離心管上後，置於 -20°C 冰箱中保存。

### ★ Troubleshooting

#### 質體濃度太低？

- 1 細胞裂解不完全。若菌液太濃則應分二管離心沉澱。或可能是在加入 Buffer S3 之前沒有適當地使整個溶液達到均質。
- 2 錯誤地回溶步驟。確保 Buffer E 或二次水是加在正中心位置，且其濾網有完全吸收液體。
- 3 不完全地回溶步驟。如果目標質體長度大於 10kb，則需事先預熱 (~60°C) Buffer E 或二次水。
- 4 質體量不足。菌液濃度太低或目標質體為 Low Copy Number，此時可接多管菌液離心在同一管中。

質體在接下來的實驗中表現不佳？

1. 酒精污染。加入 Buffer W2 後，務必將 Spin Column 乾離心 5 分鐘，並開蓋放置確使其上的酒精完全去除。
2. RNA 污染。加入 Buffer S1 前，確認其已含有 RNase。
3. 染色體 DNA 污染。避免細菌培養過久，並在加入 Buffer S2 和 S3 時小心混勻，避免染色體 DNA 斷裂分散。
4. DNase 污染。加入 Buffer W1 後，在室溫下靜置 2 分鐘後再進行離心步驟。

## 實驗四 限制酶圖譜分析

### 目的：

將純化所得的質體以不同限制酶(Restriction Enzyme)剪切，再經瓊脂糖凝膠電泳(Agarose Gel Electrophoresis)建立簡易限制酶圖譜(Restriction Map)，確認質體之正確性。

### 原理：

限制酶(Restriction Endonucleases or Restriction Enzyme)為一種對雙股 DNA 中鹼基序列具有專一性核酸內切酶。在原核(Prokaryotic)細胞中，作用於清除侵入細菌的外來DNA(如噬菌體)。其中第二型限制酶為常用的分生工具，故以下討論以其為主。限制酶辨認的序列大多在4~6b.p，而其剪切可能會形成 Sticking End，如：EcoRI  $\begin{matrix} 5' \dots \text{GAATTC} \dots 3' \\ 3' \dots \text{CTTAAG} \dots 5' \end{matrix}$  或 Blunt End 的切口，如：SmaI  $\begin{matrix} 5' \dots \text{CCCGGG} \dots 3' \\ 3' \dots \text{GGGCCC} \dots 5' \end{matrix}$ 。一般而言，會形成 Sticking End 的限制酶較常被使用。

本實驗使用的另一個技術為瓊脂糖凝膠電泳。利用 DNA 帶負電的特性，經限制酶切過的DNA片段會在外加電場中於凝膠中往正極移動。其移動速度依分子大小而定，分子愈大移動性愈慢。凝膠中瓊脂糖的濃度決定了空隙的大小，不同大小的 DNA 片段在不同濃度的膠中移動速率不同，故每次均須和 DNA Marker比較，常用的凝膠濃度為 0.8~1.5%。因不同的質體上含有不同的限制酶切位，故可切出不同大小的片段。在膠體中，經由染劑嵌入 DNA 並以紫外線照射呈現出片段位置，在由電泳後所跑出的特殊圖形即為限制酶圖譜。

電泳常用的緩衝溶液有三種，分別為 TAE、TBE 和 TPE，TAE 的緩衝能力稍差，但其對高分子量的 DNA 有較佳的解析度(低分子量則 TBE 及 TPE 之解析度較佳)。另外，雙股線性之 DNA 在 TAE 中移動的速度也較快。電泳時使用的 Loading Dye作用為與樣品混和增加其比重與產生顏色方便觀察。

### 材料與器材：

#### 限制酶剪切(Digest)

- 質體
- 限制酶
- 10X NEBuffer 2 and 10X BSA (Bovine Serum Albumin，以無菌二次水稀釋 100X BSA stock，存放在-20℃冰箱備用)
- 無菌二次水
- -20℃冰盒

#### DNA 電泳

- Agarose
- 1X TAE Buffer
- DNA Marker(大小對照請參考 Appx. 1. E)
- 6X Loading Dye
- 10000X SYBR Safe

#### 製膠臺和電泳槽

- 紫外光透照箱(UV Transilluminator)

- \* 限制酶永遠是最後加入，且離開冰箱時務必要置於冰盒中，並儘速放回-20℃冰箱。
- \* 每次吸取限制酶時務必使用新的 Tip，避免造成交叉污染。
- \* 限制酶中含 50%甘油以防凍，故用量不可超過反應總體積的1/10，否則可能抑制反應進行。

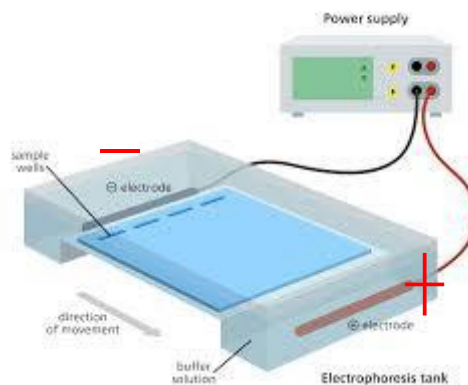
步驟：

#### A. 限制酶剪切 (Appx. 1. G)

- 1 計算需要之 Biobrick 量(500ng)並分別加入標記好的微量離心管中。
- 2 依照總反應體積 20  $\mu$ L 加入對應之 10X CutSmart 和 10X BSA 各 2  $\mu$ L。
- 3 用無菌二次水補充至總反應體積後，輕拍或 pipetting 令其混合均勻。快速離心數秒令溶液聚集於管底(Spin Down)。
- 4 加入各 0.5  $\mu$ L(~10U)的限制酶後，pipetting 令其混合均勻。快速離心數秒令溶液聚集於管底。
- 5 37℃中反應 1~2 小時後，置於 65℃中 20 分鐘使酵素失活。(失活結束放置於室溫冷卻，小烏龜離心。)
- 6 取出下一步所需的反應產物後，置於-20℃冰箱中保存。
- 7 視需要可進行 DNA 電泳確認產物。

#### B. DNA 電泳

- 1 取適量 1X TAE Buffer 和 Agarose Powder (Appx. 1. D) 於錐形瓶中。瓶口覆蓋保鮮膜並戳數個小洞，置於微波爐中短時加熱待溶液沸騰後取出搖晃。重複短時加熱並取出搖晃至Agarose Powder完全溶解，將保鮮膜去除後加入SYBR Safe(小膠 1  $\mu$ L，大膠2  $\mu$ L)。
- 2 組裝製膠台。將膠液緩緩倒入(小片~20mL，大片~40mL)後插入孔梳(Comb)。將膠體至於下方櫃子避免照光，等待至少約1小時令其凝固。
  - \* 倒膠時應警慎避免膠體中產生氣泡。若有氣泡可用Tip刺破或撥至邊緣。
  - \* 孔梳應插於底座有灰色暗帶側，且應注意其是否有接觸底座。
- 3 將電泳膠連同底座一起放入電泳槽如下圖，倒入1X TAE Buffer至淹過凝膠(~350mL)。

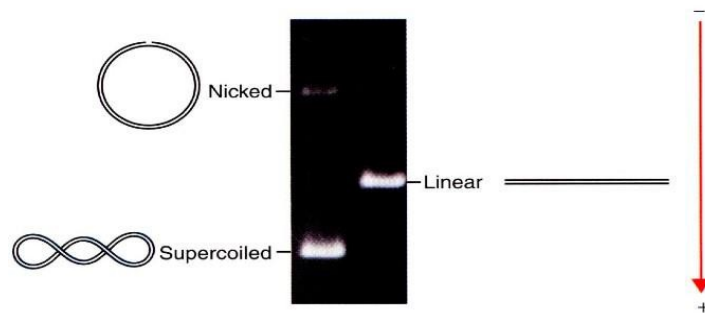


- 4 將樣品和 6X Loading 混合後注入膠片上的孔洞中(比例可參考Appx. 1. F)。
- \*\*\*注意：DNA Ladder(Marker)宜於所有sample都加入後再加入，確保不因長時而溢散。
- \*\*\*注意：Taq Mix當中已含有Loading dye故不需要混Loading dye，實驗室現行Marker若有顏色者亦不需混Loading dye。

- 5 電泳槽上方插上負極的黑色電線，下方插正極的紅色電線。以電壓 100V 跑至深藍色條帶(Bromophenol Blue，在 1% Agarose Gel中約在 600b.p)到達倒數第五條線(約12分鐘)。
- 6 TAE緩衝液不可重複使用，使用完電泳槽後將緩衝液倒水槽正放晾乾。
- 7 以照膠系統觀察，存檔後印出照片牢貼於實驗紀錄簿。

註：觀察膠片時可能遇到三種不同形式的 DNA：

- 1 Nick Form 為雙股 DNA 其中**有一股斷裂**。可能是在抽質體時不夠謹慎或限制酶反應不完全。
- 2 Supercoiled Form 為雙股環形DNA糾纏在一起，體積最小故移動最快。
- 3 Linear Form 為線性 DNA，用於確認片段大小。



### ★ Troubleshooting

膠片上的 Band 太過淡甚至沒有？

- 1 DNA 的濃度不足或不夠量。可增加 DNA 的濃度或量，但勿超過 50ng。
- 2 DNA 分解。應在操作過程中避免 DNase。
- 3 DNA 片段已跑出膠片外(俗稱跳海)。可減少電泳時間、使用較低電壓或使用濃度較高的電泳膠。若需要解析度較高的電泳可製備 2% Agarose gel。
- 4 使用適當波長的 UV 光照射。

看到 Smeared DNA Bands?

- 1 DNA 斷裂。應在操作過程中避免內切酶污染。
- 2 DNA 注入的量或濃度太高，應減少注入量或稀釋樣品。
- 3 電泳條件不適當。電壓不要高於 20V/cm，維持電泳環境低於 30℃，且確認 Buffer具足夠的 Buffer Capacity。

## 實驗五 Biobrick Assembly

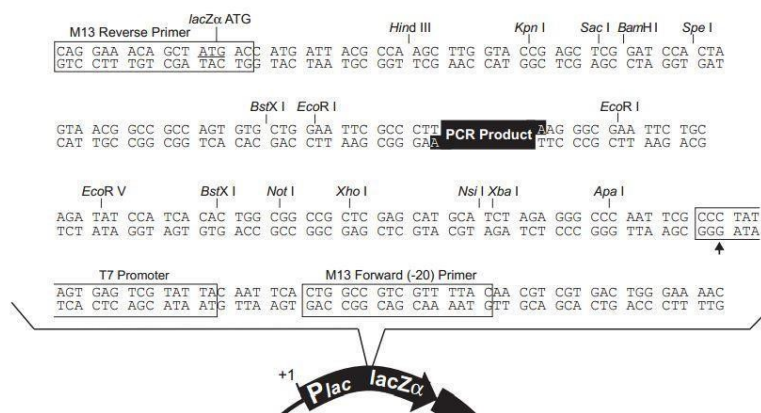
目的：

Biobrick 的剪切與組裝。

原理：

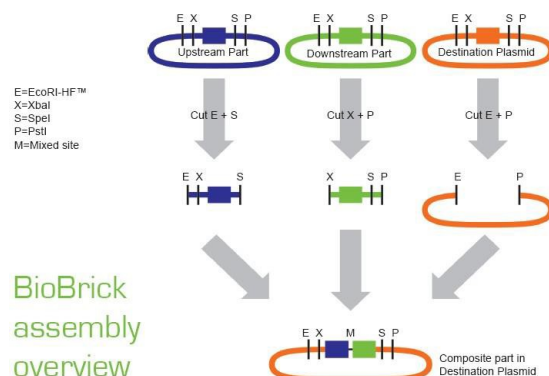
基因工程(Genetic Engineering)一詞原指藉由不同的 DNA 操作技術將目標基因增殖和表達。其起源 1950 和 1970 年代初的研究者：前者解出 DNA 雙股螺旋的結構，而後者則發明了製作重組 DNA (Recombinant DNA)的技術。現今這些技術不僅有許多的運用，如：分析基因結構和蛋白質工程，它所提供的在活體內和活體外(*in vivo* & *in vitro*)操作 DNA 的技術為分子生物學奠定了良好的發展基礎。

在基因工程中，最重要的工具即是前面所介紹的限制酶和轉殖載體(Cloning Vector)。限制酶提供了科學家能剪切特定序列的工具，這使準確改造 DNA 成為可能；而後者則可將目標基因帶入生命體中進行複製或表達。現今常用的載體除了先前所介紹的必須要素複製起始點和選擇標記外，常會加上一含有多種限制酶切位的轉殖位(即 Multiple Cloning Site)方便實驗者的操作。



相對於傳統的方法，Biobrick 為基因工程提供了一個新的概念：標準化。在每一個 Biobrick 中都含有統一的四個切位，分別為 EcoRI、XbaI、SpeI 和 PstI，其中，利用 XbaI 和 SpeI 帶有的相同 Sticky End，即連接酶(Ligase)黏合後可產生出不會被上述四種酵素辨認的序列(Mix site)，因此實驗者可以快速的組裝多個基因。此技術給複雜和龐大的基因設計提供了一個良好的實驗平台。

\*\*\*注意：Backbone之抗性需與Insert parts原有質體抗性不同才能夠篩選。





## 材料與器材：

### 1. Biobrick 組裝

- Upstream、Downstream 和 Backbone Digest Product
- T4 DNA Ligase
- 10X T4 DNA Ligase Buffer
- 無菌二次水
- -20°C 冰盒

\* 酵素永遠是**最後加入**，且離開冰箱時**務必要置於冰盒中**，並儘速放回-20°C 冰箱中。

\* 每次吸取酵素時**務必使用新的 Tip**，避免造成交叉污染。

\* 酵素中含 50%甘油以防凍，故**用量不可超過反應總體積的 1/10**，否則可能抑制反應進行。

## 步驟：

### Biobrick 組裝(Appx. 1. H)

\* 實驗使用的 T4 DNA Ligase Buffer(含有 ATP)不可以手握回溶。

1. 取 Upstream、Downstream 和 Backbone Digestion 產物各 2  $\mu$ L 加入標記好的微量離心管中。
2. 依總反應體積 20  $\mu$ L 加入對應之 10X T4 DNA Ligase Buffer 2  $\mu$ L。
3. 用無菌二次水補充至總反應體積後，輕拍或 pipetting 令其混合均勻。快速離心數秒令溶液聚集於管底(Spin Down)。
4. 加入 0.5  $\mu$ L(~200U)的 T4 DNA Ligase 後，pipetting 令其混合均勻，快速離心數秒令溶液聚集於管底。
5. 於室溫反應 2 小時(或可置於 4°C 下反應隔夜)。
6. 取出下一步所需的反應產物後，置於-20°C 冰箱中保存。

註:NEB 公司的 1 unit 定義為在 16°C 下 20  $\mu$ L 的反應體積(1X T4 DNA Ligase Buffer)內反應 30 分鐘可連接 50%被 HindIII 剪切之  $\lambda$  DNA 所需的連接酶量。

補充：

### 1. Two Part Ligation：

有時會碰到 Upstream 或 Downstream 太小的情況，導致兩Biobricks 在進行Ligation 的時候，容易發生**小片段而不易接上**的情況。因而我們會嘗試使用保留小片段的方式來進行 Ligation，方法為小片段的 Biobrick 切 S 和 P 切位，此 Biobrick 即同時當作 Upstream 或 Backbone，而後只要再接上 Downstream Biobrick (同樣切 X 和 P)即可，因為 Upstream 被保留在 Backbone 上，所以並沒有小片段問題，成功率會上升。反之，如果 Downstream 太小，也可用同樣概念嘗試。

### 2. 切膠純化的Digest Backbone進行Ligation：

若想要避免無螢光可做篩選的Ligation發生自黏現象，可嘗試將Digest 樣品切膠純化後再進行 Ligation，則可確保Backbone無自黏反應。但缺點是切膠純化後的Digest DNA濃度會大幅下降，切膠時需注意原本的Digest量需高於30  $\mu$ L。

## 實驗六 大腸桿菌的轉型

### 目的：

利用轉型作用(Transformation)將質體引入大腸桿菌(*Escherichia coli*, *E. coli*)勝任細胞(又稱全適能細胞, Competent Cell)中, 藉宿主細胞之系統複製或表現。

### 原理：

大腸桿菌的轉型是現今研究者必學的分生技術, 藉此方法可以大量複製或表現特定的基因。現今常用的方法有兩種: 熱休克法(Heat-shock)和電穿孔(Electroporation)法。下面以我們較常使用的熱休克法為主。實驗過程中會利用  $\text{CaCl}_2$  處理細胞以來提高細菌細胞膜的通透性, 也使得 DNA 更容易附著在細胞膜上。之後再利用  $42^\circ\text{C}$  熱處理提高細胞膜流動性使 DNA 通過。

大部分大腸桿菌品系的轉形效率都在  $10^5 \sim 10^8$  間, 即每  $\mu\text{g}$  的質體能成功轉形的細胞數目。此因子受勝任細胞狀況或吸收 DNA 之能力影響, 而這又受是否使用對數生長期(Log Phase)之細菌、處理時是否保持在低溫及氯化鈣處理細胞的時間所影響。

### 材料與器材：

- 質體或 Ligation 產物
- 勝任細胞(*E. coli*, strain:DH5 $\alpha$ , Yeastern Biotech ECOS 101 Competent Cell, Cat. No. FYE678)
- 固體培養基

### 步驟：

1. 勝任細胞從  $-80^\circ\text{C}$  冰箱中取出並置於冰上直到約一半回溶。
2. 取  $2\mu\text{L}$  的質體或  $10\mu\text{L}$  的 Ligation 產物放入標記好微量離心管中並置於冰上預冷。
3. 取  $33\mu\text{L}$  的勝任細胞加入步驟 2. 準備之微量離心管中並溫和的 pipetting, 並將剩下的勝任細胞標記後放回  $-80^\circ\text{C}$  冰箱。

\* 此步驟盡可能不要離開冰上。

4. 將混合好的菌液置於冰上 20 分鐘, 放入  $42^\circ\text{C}$  水浴 35 秒, 再於冰上放置 2 分鐘。
5. 加入  $200\mu\text{L}$  LB 培養基並於  $37^\circ\text{C}$  培養 30 分鐘。
6. 於無菌操作台中利用塗布法將菌液塗抹在標記好的 Plate 上。
7. 置於適當溫度下(視菌株和用途而定, 通常為  $37^\circ\text{C}$ )培養 12~16 小時, 並觀察生長結果。

註：因勝任細胞為經過處理的細菌細胞非常脆弱, 故取用時應保持低溫且減少溫度改變。又因將勝任細胞重複解凍會造成其轉型效率下降, 故每次取用時最好至少做三個反應(一管有  $100\mu\text{L}$ )。

## ★ Transformation Troubleshooting

如果化學勝任細胞轉型效率太低？

- 1 DNA 可能含有一些雜質，如：蛋白質、介面活性劑或酒精。利用 Gel Extraction Kit 做 Clean-up。
- 2 DNA 過多。在小於  $5\mu\text{L}$  volume/ $100\mu\text{L}$  of Cells 中 DNA 不要超過  $1\sim 10\mu\text{L}$ 。
- 3 勝任細胞處理不當。細胞稍融後馬上使用。

菌落都是白色的，但質體中卻沒有 Inserted Part？

- 1 若是以顏色作為篩選依據，可能是菌落顏色尚未明確。可將培養基在  $37^{\circ}\text{C}$  繼續培養數小時或放在  $4^{\circ}\text{C}$  冰箱隔夜再進行挑選。
- 2 可能是有其他 DNA 片段接上骨架。可在進行接合反應前將 DNA 進行切膠純化。

### 補充：

判斷正確菌落的方法(紅白篩)：

iGEM 的 Backbone 系統(EX：PSB1A3、PSB1C3、PSB1K3……)會特殊設計在 SP 切位之間會有 RFP gene，而此 RFP gene 則能夠透過 Backbone 上的 Promoter、RBS、Terminator 表現紅螢光，因此帶有 Backbone 的細菌，外觀上則會形成紅色菌落。

如果今天使用 Ligation 組合的 Biobrick 取代 Backbone 的 SP 切位，那麼最後形成的菌落則會是白色，因此可以初步透過顏色判斷 Ligation 是否成功(註：剛從  $37^{\circ}\text{C}$  培養箱拿出來的盤子上，紅色螢光菌落會不明顯，建議多放  $4^{\circ}\text{C}$  冰箱  $1\sim 2$  小時，菌落顏色會更清楚)。

## 實驗七 聚合酶連鎖反應(Polymerase Chain Reaction, PCR)

### 目的：

利用 PCR 將轉型後細菌中的質體的 Inserted Gene 放大，檢驗 Biobrick 組裝是否有成功。

### 原理：

PCR 為一應用層面非常廣泛的體外 DNA 增殖技術，可在很短的時間內準確地將特定的 DNA 序列放大，使得偵測或應用大為容易。此技術其實是仿照自然界 DNA 合成的步驟並加以自動化。主要包含下列三個步驟：(1)DNA解旋(DNA Denature)：加熱 DNA 處理，將雙股的 DNA 打開成單股以做為複製的模板(Template)；(2)引子黏合(Primer Annealing)：令引子(Primers)於一定的溫度下附著於模板兩端；(3)延長(Extension or Elongation)：在 DNA 聚合酶(DNA Polymerase)的作用下進行引子的延長。如此的週期一再重覆便可使特定 DNA 序列被大量複製。

基本的 PCR 反應須具備：(1)要被放大的DNA 模板；(2)界定複製範圍的兩端引子；(3)高溫下具有活性的 DNA 聚合酶；(4)DNA 合成的原料：dNTP(含 dATP、dTTP、dGTP 和 dCTP)；(5)適合酵素作用的 Buffer。

### PCR 實驗設計：

- A DNA 模板：通常 PCR 所需的模板量很少：質體約為 0.01~1ng，而基因體(Genomic)DNA 則為0.1~1  $\mu$ g。模板濃度過高可能會造成雜訊的產生。此外，純化過程所遺留的化學物質或酵素如 EDTA 和 Proteinase 等都會影響 DNA 聚合酶的作用，故要將之清除乾淨。
- B 引子的設計：
  - 1 引子長度通常為 18~25b.p。
  - 2 G 和 C 的含量(GC Content)約在 40~60%。
  - 3 同反應中的引子序列不可互補，避免造成自相黏合的情況。
  - 4 引子黏合的溫度( $T_m$  值)盡量不要相差到 5°C 以上。
  - 5 注意模板上所有可能和引子互補的區域，設計時應避免含有此序列區域。
- C 通常在合成完的引子資料中會附有黏合溫度的數據，故設計反應時可參考該數據決定。PCR反應黏合溫度最好低於引子  $T_m$  值 5°C 左右。
- D  $MgCl_2$ ： $Mg^{2+}$ 會和模板、引子和 dNTPs 等形成複合物。太少會使整體反應產物會減少，太多則容易產生雜訊。建議的  $MgCl_2$  濃度為 1~4mM(大部份的實驗中為 1.5mM)。
- E dNTPs：通常 PCR 反應中的每種 dNTP 濃度皆為 200  $\mu$ M，若需進行高精確度的PCR 反應，則可將 dNTPs 的濃度控制在 10~50  $\mu$ M。在大部份的實驗中 dNTPs 濃度為 200  $\mu$ M，若任一種dNTP 濃度較高可能會造成點突變(Point Mutation)，故須避免之。

PCR 溫度與時間設定：

1 起始高溫分離兩股 DNA(Start-up Denature)：

將兩股 DNA 完全分開，若作用不完全會得到極少的產物。建議當 G 和 C 的含量在 50%以下時，溫度應設定在 95°C 而時間設定在 1~3 分鐘。此步時間可隨著 G 和 C 的含量在模版上的比例調升至 10 分鐘。若起始溫度設定時間高於 3 分鐘，為避免 DNA 聚合酶活性受影響，可在溫度降下後再加入。

2 引子黏合(Annealing)：通常引子與模版黏合的溫度大約為  $T_m$  值減 5°C，時間為 1~2 分鐘。若出現非預期中的產物，可逐漸提高黏合溫度約 1~2°C。

3 延展(Elongation)：延展的溫度通常在 70~75°C。常用之 Taq DNA 聚合酶合成速率每分鐘約 1kb。

4 循環次數(Cycle)：循環次數多寡可視模版 DNA 在反應溶液中的量而改變。

5 最後延展步驟：循環結束後，樣本通常會在 70~75°C 再延展 5~10 分鐘，其意義在於填補最後幾次循環的產物。此外，若是使用 Taq DNA 聚合酶，其末端轉移酶(Terminal Transferase)活性會在 PCR 產物 3' 端加上幾個額外的 dATP。

材料與器材：

- 需放大的 DNA 序列
- 引子：VF2 和 VR
- 2x Fast-Run Taq Master Mix
- DNA 電泳所需材料(實驗 4. B)

步驟：

1 將 Appx. 1. I 中的反應物加入 PCR 小管中，製備多個 sample 時可先將 2x Taq mix、二次水與引子統一配在 1.5mL 離心管再行分裝至 PCR 小管，以上製備步驟皆需在冰上進行。

**\*\*\*注意：**因微量吸管誤差製備時會多配 1 管 Sample 的量(詳見 Appx. 1. I)，且 2x Taq mix 加入二次水與引子後現配現用，不可於冰箱保存。

2 若為 Colony PCR 則需至無菌操作台用燒好的牙籤挑出菌落沾到已配好的 Taq sample。

3 將 PCR Sample 放入機台，設定 Taq PCR 反應條件如下：

- i Start-up Denature: 95°C, 2 分鐘。
- ii Cyclic PCR(15~30 cycles, for Taq PCR, 30 cycles are recommended):  
95°C(30 秒)→55°C(30 秒)( $T_m$  減 5°C)→72°C (以 1 min/kb 計算再加上 30 秒)。
- iii Final Elongation: 72°C, 10 分鐘。
- iv 4°C(∞)。請盡快取出避免影響實驗室其他人使用機台，更不可放置於機台隔夜。若沒有要馬上跑膠可暫時存放於 4°C 冰箱，一樣不可超過一天。  
**以上 Annealing 溫度設定與 Elongation 時間可依照實際情況作調整。一般來說確認用的 Taq PCR 單一 Sample 體積為 10  $\mu$ L。**

PCR Troubleshooting：

若發現 Taq PCR 於電泳下無 Band 可能原因為沒有 template (Colony PCR 未沾到菌)或是 Primer 未黏上 (Annealing temperature 太高)或是電泳程序錯誤 (Buffer 溫度過高)。要注意的是 Annealing temperature 會大大影響 primer 的專一性，反之如果出現多條 bands 則可考慮將溫度調高，可進行以下實驗。

**Annealing temperature 條件實驗(需使用左邊兩台 PCR 機，欲使用請告知助教)：**

若使用不同於 VR 與 VF2 的 Primer 兩者的  $T_m$  相差甚大或是沒有明顯的 band 出現可以嘗試使用溫度梯度差 (gradient temperature PCR) 來尋找適當的溫度。



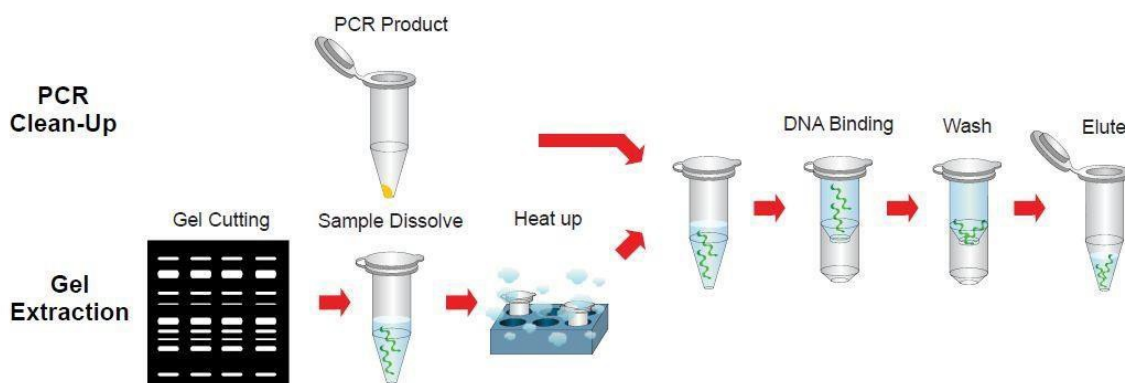
## 補充實驗一 切膠純化

### 目的：

利用 DNA 電泳將不同大小之片段分開已取出特定長度的片段。

### 原理：

在一般的轉殖中若遇到無法確認 Ligation 的產物是否為欲組裝的基因，可在反應前利用 DNA 電泳將各大小的片段分開，再以和抽取質體時使用的矽膠樹脂將其純化出來。其基本的原理和抽取質體相似。市售的套裝通常會在溶膠用的緩衝液中加入特殊的鹽類以確保瓊脂糖不會重新凝結，以利實驗的進行。需要注意的是切膠純化的電泳膠呈色時，**不可以短波紫外光照射**，以免破壞 DNA 的結構。



### 材料與器材：

- DNA 電泳所需材料
- 質體或 Ligation 產物
- Genedirex PCR Clean-Up 和 Gel Extraction Kit (Cat No. NA006-0100)(需使用請通知助教)
  - Spin Column
  - Buffer B
  - Buffer W1
  - Buffer W2 with Ethanol
- 無菌二次水(pH=7.0~8.5)或 Buffer E

### 步驟：

- 1 使用現配的瓊脂糖凝膠和新的 TAE Buffer 進行 DNA 電泳。
  - \* 此步驟的凝膠一片小片可用 30mL、大片60mL，並依需要使用較大的孔梳(Comb)。
  - \* 注入樣品時可在各樣品之間間隔 1~2 孔，如此可避免切膠時的交叉污染。
  - \* 若樣品中有大小相近的片段，可使用濃度較高的凝膠以增加兩者的距離。
- 2 將電泳膠取出冷卻至室溫。
- 3 取500  $\mu$ L的Buffer B於離心管標記好目標片段，用於承裝目標膠體。
- 4 將跑好的膠置於切膠台上，確認波段為長波後便可使用乾淨(DNA free)的刀片將目標片段切下。(\*\*注意：不可照UV光)

- 5 於 65°C 乾浴槽中加熱至膠完全溶解(約 10 分鐘，其中約 每2 分鐘搖晃一下)，靜置冷卻至室溫。
- 6 將溶液轉移至 Spin Column，離心 12000rpm 30 秒後倒掉廢液。  
\* 若溶液總體積大於 800  $\mu$ L，則應分成兩次離心。
- 7 加入 400  $\mu$ L Buffer W1，離心 12000rpm 30 秒後倒掉廢液。
- 8 加入 600  $\mu$ L Buffer W2，離心 12000rpm 30 秒後倒掉廢液。
- 9 12000rpm 乾離心 2 分鐘去除殘留之 Buffer W2，再開蓋放置一下，令殘留酒精揮發。
- 10 將 Spin Column 移至標記好的 1.5mL 微量離心管，加入 50  $\mu$ L 無菌二次水(滴在樹脂上)，於室溫靜置 2 分鐘。離心 12000rpm 2 分鐘後即得到質體。
- 11 視需要取少量質體溶液測量 O.D. 260/280 計算濃度( $\text{ng}/\mu\text{L}$ )，並標記於離心管上後置於-20°C 冰箱中保存。

## 補充實驗二 TA Cloning(參考用)

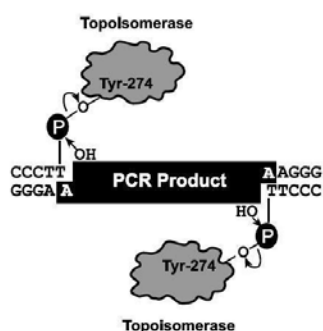
目的：

利用 PCR 放大特定 DNA 片段並將其轉殖進質體中。

原理：

TA Cloning 為一個操作簡單、快速和高效率的轉殖方式，因而變成現今最常用的轉殖法。其利用 Taq DNA 聚合酶的末端連接酶活性，其末端轉移酶(Terminal Transferase)活性會在 PCR 產物 3' 端加上幾個額外的 dATP，此端點便可與 T Vector 上互補的 Sticky End 配對，再加入接合酶反應即可產生完整的環形質體用於轉型。

而 TOPO TA Cloning 原理與普通之 TA Cloning 相同，唯一不同的是 TOPO TA Cloning 利用的是 DNA 拓樸酶(Topoisomerase)。在生物體中拓樸酶常做用於 DNA 複製前，其會把具超螺旋(Supercoil)結構 DNA 切割解旋後，再連接成線性 DNA。TOPO TA Cloning 便使用此酵素的高效連接性把含 A 鹼基的 PCR 擴增片段快速連接到含 T 鹼基的 Vector 上。整個反應只需約 5 分鐘即可完成，不似一般 Ligase 需長時間反應才能完成連接。



材料與器材：

PCR 反應所需材料(參考 p. 20)

- pCR®2.1-TOPO® Vector
- Salt Solution: 1.2M NaCl、60mM MgCl<sub>2</sub>

大腸桿菌轉型所需材料

步驟：

- 1 參考 PCR 實驗將待轉殖的片段放大(實驗 7)
- 2 將下列藥品加入微量離心管中：

TOPO TA Cloning	
純化過之 PCR 產物	4 $\mu$ L
Salt Solution	0.5 $\mu$ L
TOPO Vector	0.5 $\mu$ L
Total	5 $\mu$ L

- 3 將上述反應物混合均勻後置於室溫反應 5 分鐘。
- 4 利用普通勝任細胞轉型步驟進行轉型(實驗 6)。

## 補充實驗三 菌液的甘油冷凍保存

### 目的：

妥善保存菌種供日後研究使用。

### 原理：

菌株保存最重要的就是使菌體保持在活體且不受污染、不發生變異或突變，即維持在原先分離的狀態。現今有許多不同的保存法可以對應不同的菌株（或菌種），如繼代培養（Subculturing）、礦物油保存（Immersing in Mineral Oil）和冷凍乾燥保存法（Lyophilization）等。下面我們將介紹常用的低溫冷凍保存法。

在低溫冷凍保存發中，存放於 $-80^{\circ}\text{C}$ 可讓酵素停止作用以確保菌株不會變質，為防止冰晶破壞細胞結構，在製作冷凍保存管時常會加入甘油作為抗凍劑。要注意的是高濃度的甘油可能會抑制酵素活性，另這菌體解凍後無法達到原本正常的生理活性，因此通常甘油不會超過凍管總體積的 20%。

另外，保存期間的各項紀錄也非常重要。正確的紀錄應包含製作凍管的時間、菌株的外表性狀（Phenotype）、菌株的來源和製作者。分裝時不要大量裝在一起，反覆冷凍解凍過程中，容易增加污染或菌株死亡的機會。

### 材料與器材：

甘油  
一次水  
菌液  
冷凍小管

### 步驟：

- 1 將 80mL 的甘油和 20mL 一次水混合成 **80%甘油溶液**，滅菌備用。
- 2 在清楚標記之冷凍小管中加入 0.75mL 的菌液和 0.25mL 80%的無菌甘油，充分 pipetting。
- 3 將冷凍小管置於 $-80^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存。

## Appx. 1 常用藥品配方和反應試劑比例

A. Lysogeny Broth 25g LB Broth Powder/1L	
Yeast Extract	5g
Tryptone	10g
NaCl	10g
ddH <sub>2</sub> O	To 1L
pH	7.0
Total Volume	1L

實驗室藥品櫃已有LB Broth Powder配方品，內容物比例僅供參考。

B. Lysogeny Broth Agar 40g LB Agar Powder/1L	
Yeast Extract	5g
Tryptone	10g
NaCl	10g
Agar	15g
ddH <sub>2</sub> O	To 1L
pH	7.0
Total Volume	1L

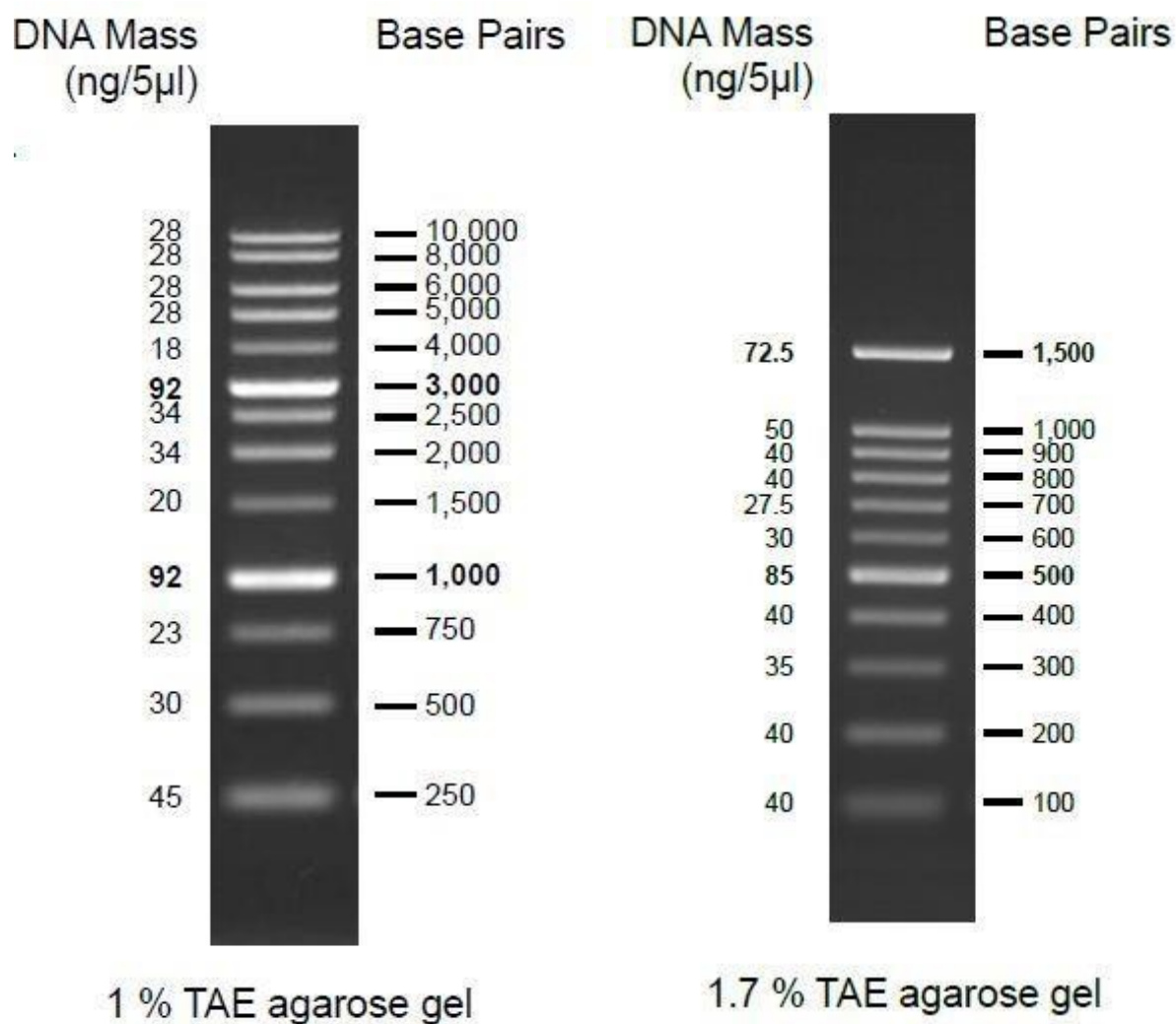
實驗室藥品櫃已有LB Agar Powder配方品，內容物比例僅供參考。

C. Working Concentration of Antibiotics & Other Additions		
Chemical	Stock Conc. (助教製備)	Working Conc.
Ampicillin	50mg/mL	50 $\mu$ g/mL
Chloramphenicol	25mg/mL	25 $\mu$ g/mL
Kanamycin	50mg/mL	50 $\mu$ g/mL
Tetracycline	15 $\mu$ g/mL	15 $\mu$ g/mL
IPTG	0.1M	0.1mM
X-gal	20mg/mL	20 $\mu$ g/mL

D. TAE & Agarose Gel (1L) 50X TAE Buffer(助教製備)	
Tris Base	242g
Glacial Acetic Acid	57.1mL
0.5 M EDTA	10mL
pH	8.0
ddH <sub>2</sub> O	To 1L
Total Volume	1L

1. 0% TBE Agarose Gel(20mL)		
1X TBE	20mL(小片)	40mL(大片)
Agarose Powder	0.2g	0.4g
SYBR Safe(內染) (加熱溶膠後加入)	1 $\mu$ L	2 $\mu$ L

## E. DNA Marker



## F. DNA 電泳建議用量

(單位: $\mu$ L)	DNA Marker	Plasmid	Digestion Check	PCR Product
Sample	3	5	5(10, 若 inserted 500< b.p)	10
6X Loading Dye	0.5	1	1(2)	0(Taq PCR 溶液中已含有 Dye)
Total	3	6	6(12)	10



<b>G. Digest (each for 1 reaction)</b>	
<b>Upstream Part (Enzyme: EcoRI-HF and SpeI)</b>	
Upstream Part Plasmid	5 $\mu$ L (~500ng)
EcoRI-HF	0.5 $\mu$ L
SpeI	0.5 $\mu$ L
CutSmart	2 $\mu$ L
10X BSA	2 $\mu$ L
ddH <sub>2</sub> O	To 20 $\mu$ L
Total	20 $\mu$ L
<b>Downstream Part (Enzyme: XbaI and PstI)</b>	
Downstream Part	5 $\mu$ L (~500ng)
XbaI	0.5 $\mu$ L
PstI	0.5 $\mu$ L
Cutsmart	2 $\mu$ L
10X BSA	2 $\mu$ L
ddH <sub>2</sub> O	To 20 $\mu$ L
Total	20 $\mu$ L
<b>Vector Part (Enzyme: EcoRI-HF 和 PstI)</b>	
Vector Plasmid	5 $\mu$ L (~500ng)
EcoRI-HF	0.5 $\mu$ L
PstI	0.5 $\mu$ L
CutSmart	2 $\mu$ L
10X BSA	2 $\mu$ L
ddH <sub>2</sub> O	To 20 $\mu$ L
Total	20 $\mu$ L

Digest：未來如果要下反應就用 20  $\mu$  L；若只是做確認做 10  $\mu$  L 即可(酵素仍為 0.5  $\mu$  L)

<b>H. Biobrick Assambly (Three-part Ligation)</b>	
Vector Part	2 $\mu$ L
Upstream Part	2 $\mu$ L
Downstream Part	2 $\mu$ L
10X T4 DNA Ligase Buffer(Contain ATP)	2 $\mu$ L
T4 DNA Ligase	0.5 $\mu$ L
ddH <sub>2</sub> O	To 20 $\mu$ L
Total	20 $\mu$ L

I. Taq PCR		設定 PCR 反應條件如下： i Denature: 95°C，2分鐘 ii 30~35 cycles: 95°C(30 秒)→ 55°C(30 秒)(T <sub>m</sub> 減 5°C)→ 72°C(1 min/kb +30 sec) iii Elongation:72°C，10 分鐘 iv 4°C(∞)
DNA Template	菌液或 Plasmid 1ng	
Forward Primer (10 μM)	0.2 μL	
Reverse Primer (10 μM)	0.2 μL	
2X Taq Master Mix	5 μL	
ddH <sub>2</sub> O	To 10 μL	
Total	10 μL	

大量製備舉例：若要配9管Taq PCR，則可將10份的量先計算於紀錄本統一配在1.5mL離心管再分裝至PCR tube。(即2X Taq Mix 50 μL、Forward Primer 2 μL、Reverse Primer 2 μL、46 μL ddH<sub>2</sub>O)

## Appx. 2 常用網站與工具

1. Biobrick 元件庫查詢: [http://partsregistry.org/Main\\_Page](http://partsregistry.org/Main_Page)
2. Biobrick Search (by UT-Tokyo-software 2012): <http://igem-ut.net/bbsearch>
3. PubMed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>
4. BLAST: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
5. NEB 限制酶工具: <http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>
6. Primer 設計: <http://www.bioinformatics.org/primerx/>
7. Uniprot: <http://www.uniprot.org/>
8. Genbank NCBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
9. Protein Data Bank: <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>
10. BRENDA <http://www.brenda-enzymes.org/>

## Appx. 3 參考資料

1. 2012 Appx. 國際生物合成競賽實驗手冊
2. 交通大學 101 學年度生化實驗(二)實驗講義
3. 交通大學 101 學年度微生物學實驗講義
4. Lewin' s Genes X
5. Prescott' s Microbiology 8e
6. Genedirex Plasmid mini PREP Kit Protocol
7. NEB Biobrick Assembly Kit Protocol
8. Yeastern Biotech ECOS 1 Min Transformation Competent Cells Manual
9. Protech Technology Fast-Run Taq Master Mix with Dye Protocol
10. Genedirex PCR Clean-Up & Gel Extraction Kit Protocol
11. Invitrogen TOPO TA Cloning Kit Protocol

常用實驗流程參考：

