中華民國第四十七屆中小學科學展覽會
作品說明書

高中組　生物(生命科學)科

040710

新城雞瘟之NP基因的疫苗研究

學校名稱：國立嘉義女子高級中學

作者：	指導老師：
高二 蔡雨玹	黃世瑛

關鍵詞：NP gene　Tri-system vector　ligase 反應

新城雞瘟之 NP 基因(nucleocapsid protein)的疫苗研究

利用 NP 基因和 Tri-system 載體的結合，在勝任細胞大量複製能夠誘發表現蛋白質的質體

摘要：

此次實驗的大綱流程分成三項，分別為 NP gene 的合成並做限制酶切割；Tri-system vector 的培養並做限制酶切割以及兩者的 Ligase 反應並在勝任細胞中大量合成已將 NP gene 轉殖入 Tri-system vector 的新質體。

◎ NP gene：

1.設計 R primer，利用 PCR 合成沒有 Stop Codons 的 NP gene

2.跑膠確認並做膠純化步驟

3.用 PstI 切 NP gene

4.跑膠確認並做膠純化步驟

5.即可得到 NP gene-PstI

◎Tri-system vector ：

1.用 PstI 切 Tri-system vector

2.加入 CIP 防止 vector 自身 ligase

3.跑膠確認並做膠純化步驟

4.即可得到 Tri-system-PstI

◎Ligase 反應：

1.將 NP-PstI 和 Tri-system-PstI 進行 ligase 反應

2 將 ligase 後的質體 DNA 進行 Chloroform 純化

3.可使用自己製備的 Competent Cell，或是利用商業用 Competent Cell(XL-1-blue)使質體大量複製

4.挑起 plate 上有長出的一個菌落，用加有 Amp 的 LB 培養液培養

5.進行抽質體

6.用 PstⅠ 做限制酶切割

7.跑膠確認即可知 Ligase 反應有無成功

壹、研究動機

在人類與病毒的聖戰中，疫苗總是人類最佳的防衛武器，而疫苗的製作過程一直是我有興趣更進一步了解的。也因爲我幸運的成爲中研院 95 學年度高中生生命科學資優生培育計畫的一員，於是希望能透過高二的實驗課程，從事有關疫苗方面的研究。藉由這次實驗，學習現今常用的一種疫苗製作方法，並且了解每一步製作過程的意義與原理，期盼在未來如有機會從事醫學研究，能成爲一次很好的經驗學習。

貳、研究目的

將新城雞瘟的 NP gene 成功轉殖入 Tri-system vector 中，使 NP gene 有能力轉錄成 RNA，並將此新轉殖質體在勝任細胞中大量複製，以供未來能夠誘導其表現蛋白質，在動物試驗中證實爲能有效引發免疫反應的疫苗。

叁、研究設備及器材

PCR 儀器、電源供應器、電泳槽、離心機、分光光度計、4℃冰箱、-20℃冰箱、-80℃冰箱、有塗 Amp 的 plate、pipate、tip、tube、carlen、電菌器、水浴槽(16℃、42℃)、乾浴槽(65℃)、恆溫箱(37℃)、止洩帶、切膠台、照膠機

肆、研究過程或方法

一、NP gene：

（一）實驗一：PCR

一、原料：

1.DNA template ：0.5×9＝4.5μ l

2.R primer：0.5×10＝5μ l

3.F primer：0.5×10＝5μ l

4.TE buffer：6×10＝60μ l

5.2X phusion(內含 DNA 聚合酶)：7.5×10＝75μ l

二、 PCR 的流程：

98℃ 4 min → 98℃ 20 sec → 45℃ 1 min →72℃ 1.5 min (35 cycle)→72℃ 7 min →4℃ ∞

三、備註：

1.拉溫度梯度(45℃~55℃)

2.鎂離子輔因子的影響

（二）實驗二：跑膠

做膠→跑電泳→染膠、退染→照膠

（三）實驗三：膠體純化

流程：

1.切膠

2.加等體積 SV biding buffer(含化學藥劑，使 protein 變性失活；含有醋酸鉀，有助於 DNA 沉澱，黏在 carlen 上)，在 65℃乾浴器溶膠 10min(每 3min 晃動一次)，再用 pipate 吸入 carlen

3.離心 13000rpm 1min

4.加 wash solution：

（1）700μ l，13000rpm，1min，倒掉下管殘液

（2）500μ l，13000rpm，5min，倒掉下管殘液

5.換新管空轉 1min

6.加入 50μ lTE，使 DNA 回溶，最後離心 5min，即可得純化 DNA

（四）實驗四：用 PstI 切 NP 基因

限制酶切割：

一、*原料：*

1.要切割之 DNA

2.限制酶：1μ l 可作用 20u 的活性單位，1u 可作用 1μ g 的 DNA

3.buffer 1.2.3.4 號

◎稀釋成 0.1 倍使用

◎須查書得知何種 buffer 對該限制酶作用環境最佳

4.BSA(牛血清蛋白) ：有助於酵素活性，可保護主要蛋白質(特定限制酶需要)

5.TE buffer：補至總體積

二、*流程：*

放置 37℃下作用 2 小時

NP-PstI 限制酶切割：(總體積 100μ l)

一、原料：

1. NP gene：20μ l
2. Buffer 3：10μ l
3. BSA：1μ l
4. PstI ：2μ l
5. TE buffer：67μ l

二、流程：

放置 37℃ 2.5 小時

二、Tri-system vector

（一）實驗五：自製 Competent Cell

流程：

1.用 pipate 沾一下 competent cell 的原液，接菌至 10ml 的 LB

2.放置 37℃培養 16 小時

3.取其中 5ml 加到 500ml 的 LB 中(LB 須先滅菌 1hr 後冷卻)

4.放置 37℃培養 4 小時

5.拿到分光光度計測值(0.5~1 爲佳，表 cell 正處於對數期)

6.冰在 4℃ 1~2 小時

7.分裝成 2 根 250ml 的離心管，離心 4000g 15min

8.2 管加入 Q-water，離心 4000g 15min

9.合成一管，用 Q-water 沖散，離心 4000g 15min

10.加入 10ml 10%的甘油，離心 4000g 15min

11.取 1ml 加入 tube，並分裝 tube 中，每管 40μ l

12.冰在-80℃冰箱待其使用

（二）實驗六：Tri-system vector 的培養

流程：

1.取出 1μ l 的 DNA 原液，加入 40μ l 的 competent cell 中混合均勻

2.放入管子的橫徑，並將管外水分擦拭乾淨

3.放入機器以 2.0V 電菌

4.取出後在橫徑緩緩加入 1000μ l 的 LB

5.放置 37℃培養 55min

6.取出 50μ l 均勻塗抹在有 Amp 抗生素的 plate 上

7.放置 37℃培養 16hr

8.輕劃過一菌落，在管中加入 10ml 含有 Amp 的 LB

9.放置 37℃培養 14~16hr

10.抽質體

11.跑膠確認片段

（三）實驗七：抽質體

流程：

1.取出在 LB 培養 14~16hr 的 Tri-system vector，分裝在 tube 中(每管 1500μ l) ，離心 12000rpm 5min 後倒掉殘液

2.加化學藥劑，將質體 DNA 萃取出來

(1) P1 200μ l：

成分：類似 TE buffer，但 EDTA 濃度較高

目的：使細菌塊重新懸浮以利之後的藥品反應

(2) P2 200μ l：

成分：多量 NaOH，少量 SDS(似清潔劑)

目的：打破菌壁，使菌內 DNA、核酸變性(ex：DNA 雙股變單股)

(3) P3 200μ l：

成分：CH_3COOH

目的：中和 NaOH，使 DNA 復性(由單股變雙股) ，但較長的基因體 DNA 無法復性，會與蛋白質一起被鹽析下來

3.離心 12000rpm 15min，可溶者即為質體 DNA

4.吸取上清液(約 600ml)，加入 2-pro(異丙醇) 600ml，充份混合均勻後，冰在-20℃冰箱 20min，可使質體 DNA 沉澱下來

5.離心 12000rpm 15min，丟掉上清液，留下 DNA 團塊

6.加入 500μ l 75％酒精洗 DNA 團塊，離心 2 次，丟上清液，留下 DNA 團塊

7.放入乾浴器 5min，等酒精揮發後加入 200μ l TE buffer 使 DNA 團塊溶解，即可放入 4℃冰箱待其使用

（四）實驗八：用 PstⅠ 切 Tri-system vector

Tri-PstⅠ 限制酶切割：(總體積 80μ l ）

一、原料：

1. Tri-system vector：24μ l
2. Buffer 3：7μ l
3. BSA：0.7μ l
4. PstⅠ ：0.6μ l
5. TE buffer：37.7μ

→放置 37℃ 2 小時

6. 1X CIP：10μ l(防止 Tri-system vector 自身 ligase)

   將其混合均勻

→放置 37℃ 30 分鐘

三、Ligase 反應

（一）實驗九：Ligase 反應

一、原料：

1. NP-PstⅠ 與 Tri-PstⅠ ：共 50μ l
2. Ligase 原液：1μ l
3. 10X buffer：6. 25μ l

二、流程：

放置在 16℃水浴槽 16 小時

三、跑膠：

取 10μ l 跑膠，由結果推測 ligase 反應是否有成功

（二）實驗十：Chloroform 純化

流程：

1.將 ligase 後的 DNA 質體加 TE buffer，將體積補至 700μ l

2.加 70μ l(0.1 倍體積)的飽和食鹽水(幫助 DNA 沉澱)，混合均勻

3.加 700μ l 的 Chloroform(會溶解蛋白質、脂質)，用力搖晃 2 分鐘後，離心 12000rpm 10min

4.抽取 700μ l 的上清液，丟棄殘液

5.同步驟 1. 2. 3 再操作一次，抽取 600μ l 上清液，丟棄殘液

6.加入 10μ l 的 tRNA(幫助胚蕾沉澱，形狀為長條狀)，用手彈均勻

7.加等體積(600μ l)的 2-pro，幫助胚蕾沉澱，冰在-20℃冰箱 20 分。 離心 13200rpm 20min

8.加 75%酒精 500μ l （洗掉 NaCl、2-pro)，離心 13200rpm 5min，倒殘液；再轉一下，抽乾殘液

9.打開 tube 蓋在乾浴器上 air-dry 5 分，再蓋上蓋子放 10 分讓酒精完全蒸發

（三）實驗十一：將 ligase 質體轉殖入自製的 competent cell 中：

流程：

1.在酒精蒸發後的質體 DNA 的 tube 管中加入自製 40μ l 的 competent cell 中，混合均勻

2.放入管子的橫徑，並將管外水分擦拭乾淨

3.放入機器以 2.0V 電菌

4.取出後在橫徑緩緩加入 1000μ l 的 LB

5.放置 37℃培養 1hr

6.取出 200μ l 均勻塗抹在有 Amp 抗生素的 plate 上

7.放置 37℃培養 16hr

（四）實驗十二：將新轉殖質體放入商業用的勝任細胞 (XL-1-blue)中大量合成

流程：

1.在酒精蒸發後的質體 DNA 的 tube 管中加入 XL-1-blue 100μ l，混合均勻

2.放置冰上 30min

3.拿到 42℃水浴槽放 1min

4.放置冰上 2min

5.加入 900μ l 的 SOC

6.放置 37℃培養 1hr

7.取出 200μ l 均勻塗抹在有 Amp 抗生素的 plate 上

8.將剩餘的 800μ l 離心 4000rpm 5min 後抽上清液 600μ l，均勻塗抹濃縮之 200μ l 養菌液在塗有 Amp 抗生素的 plate 上

9.放置 37℃培養 16hr~20hr

10.輕劃過一菌落，在管中加入 6ml 含有 Amp 的 LB

11.放置 37℃培養 14~16hr

（五）實驗十三：抽質體

流程：

1.取出在 LB 培養 14~16 hr 後的 ligase 質體 3ml，離心 12000rpm 5min 後倒掉殘液

2.同 tri-system 增殖步驟

3.回溶在 50μ l 的 TE buffer，並加入 0.2μ l 的 RNase(分解 RNA，避免 RNA 太亮，跑膠時看不清基因片段)

（六）實驗十四：限制酶切割

一、原料：(總體積 20μ l)

1. DNA：2μ l
2. Buffer 3：2μ l
3. BSA：0.2μ l
4. PstI ：0.2μ l
5. TE buffer：16.6μ l

二、流程：

放置 37℃ 2.小時

三、 跑膠：

確認是否有 590 和 5800 左右的片段，如有，則表示 ligase 反應有成功，即已成功將 NP gene 轉殖入 Tri-system vector 中

伍、研究結果

（一）實驗一：PCR

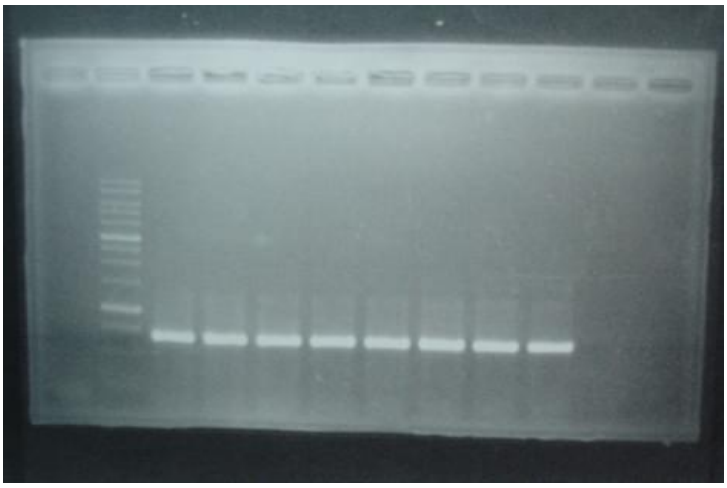


圖 1－1　NP 基因 PCR 產物的跑膠圖片

※跑膠結果比照 marker 後均為正確的 690 片段大小，專一性極高，且 control 組沒有雜片段，表示已成功用 PCR 合成大量純的 NP 基因片段

（二）實驗三：膠體純化

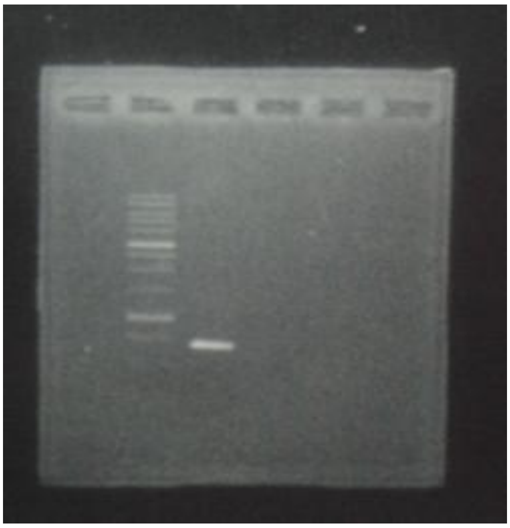


圖 3－1　NP 基因膠體純化的跑膠圖片

（三）實驗四：用 PstⅠ 切 NP 基因

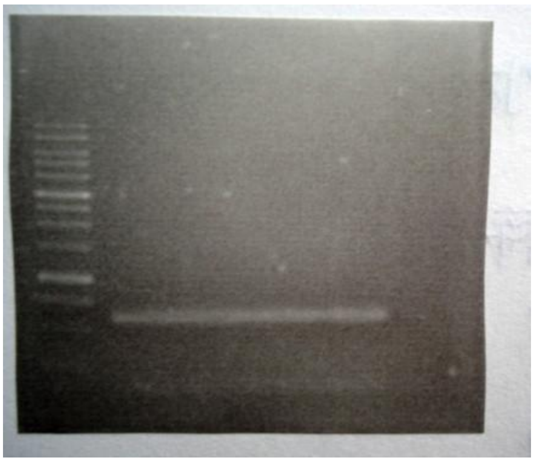


圖 4－1　用 PstⅠ 切 NP 基因的跑膠圖片

※跑膠結果比照 marker 後為正確的 590 片段大小，表示已成功用 PstⅠ 此限制酶將 NP 基因完全切割成 NP-PstⅠ 的片段

（四）實驗八：用 PstⅠ 切 Tri-system vector

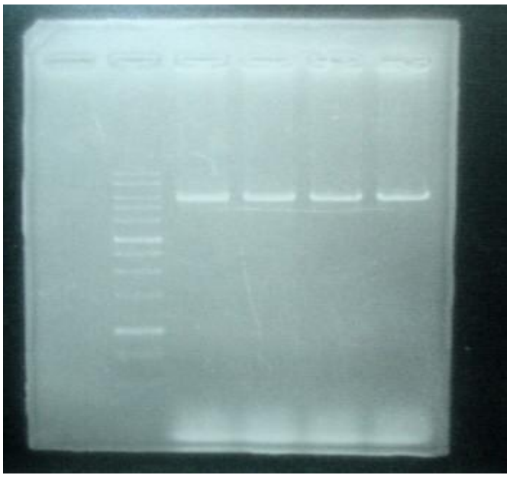


圖 8－1　Tri-system-PstⅠ 的跑膠照片

※跑膠結果比照 marker 後為正確的 5800 片段大小，表示已成功用 PstⅠ 此限制酶將 Tri-system vector 的環狀質體剪成線形片段

（五）實驗九：Ligase 反應

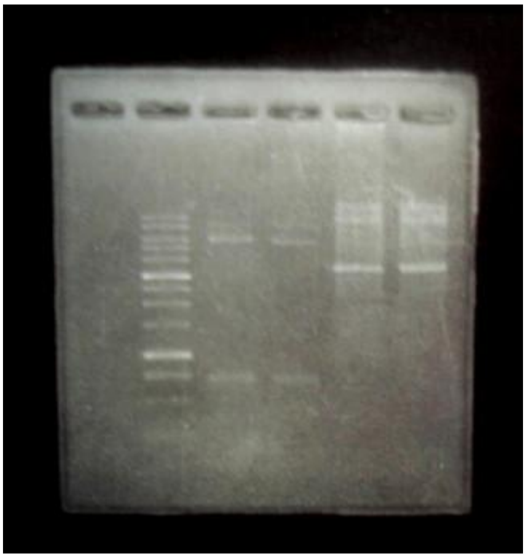


圖 9－1　Ligase 反應的跑膠照片 1(結果轉殖失敗)

※由跑膠結果可知有些許的 ligase 反應發生，但仍有多量的 NP 基因未 ligase 至 Tri-system vector 上形成環狀質體

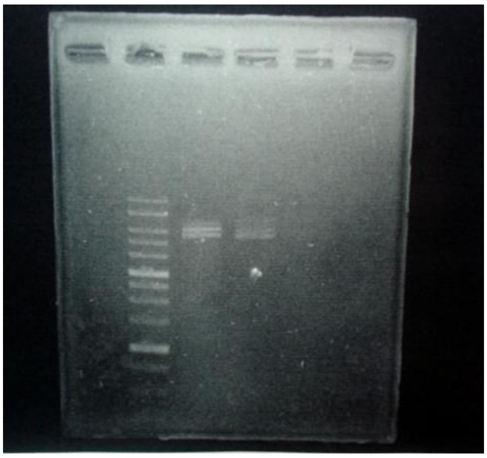


圖 9－2　Ligase 反應的跑膠照片 2(結果轉殖成功)

※ 由跑膠結果可知 ligase 反應十分成功，幾乎所有的 NP 基因皆已 ligase 至 Tri-system vector 上形成環狀質體

（六）實驗十四：competent cell 培養的 ligase 產物經抽質體後做限制酶切割

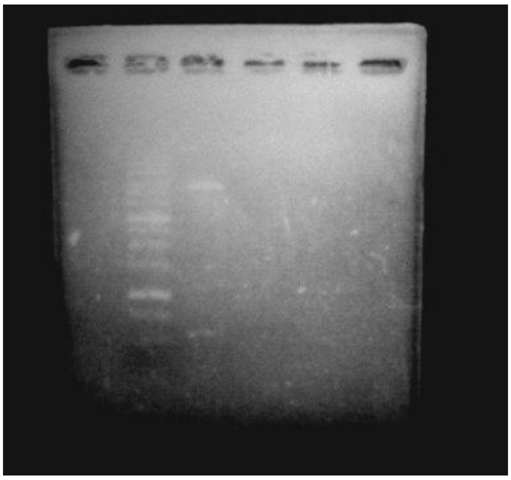


圖 14－1　competent cell 培養的 Ligase 產物做限制酶切割的跑膠照片

※跑膠結果比照 marker 後有 5800 及 590 的片段大小，分別爲 NP 基因和 Tri-system vector 正確的片段大小，表示 ligase 反應已成功將 NP 基因轉殖入 Tri-system vector，並在勝任細胞合成大量新轉殖的質體

陸、討論

1. 選用新城雞瘟的 NP 基因來做疫苗研究的原因：

(1)因為 NP 基因不需醣基化(不需靠醣蛋白修飾),且可直接在 E-coli 大量合成

(2)有研究顯示 NP 基因可誘發出相當高的免疫反應

(3)NP 基因有約 400 個胺基酸為高度保守序列

(4)NP 基因所轉譯出的核蛋白於病毒複製上扮演重要角色，如保護病毒 RNA 免受宿主內的 RNase 分解及幫助病毒 RNA 包裝成螺旋狀結構、幫助病毒 RNA 的合成、與病毒毒性有關，NP 於 NDV 佔有重要的地位

2. 選擇轉殖入 Tri-system vector 中的原因：

因為 Tri-system vector 上有：

(1)多切位，易和 NP gene 擁有共同的酵素切位。

(2)有可啓動 NP gene 的 DNA 轉錄出 RNA 的 promoter。

(3)有可抗 Amp 的基因。

＊當 Tri-system vector 用限制酶(PstⅠ)切割後，加入 CIP 後(防 Tri-system 自身 ligase)才與 NP- PstⅠ 進行 ligase 反應，如可在 competent cell 中大量複製即表示已結合為環狀質體並使 competent cell 有能力抗 Amp，可在塗有 Amp 的 plate 上長出菌落。

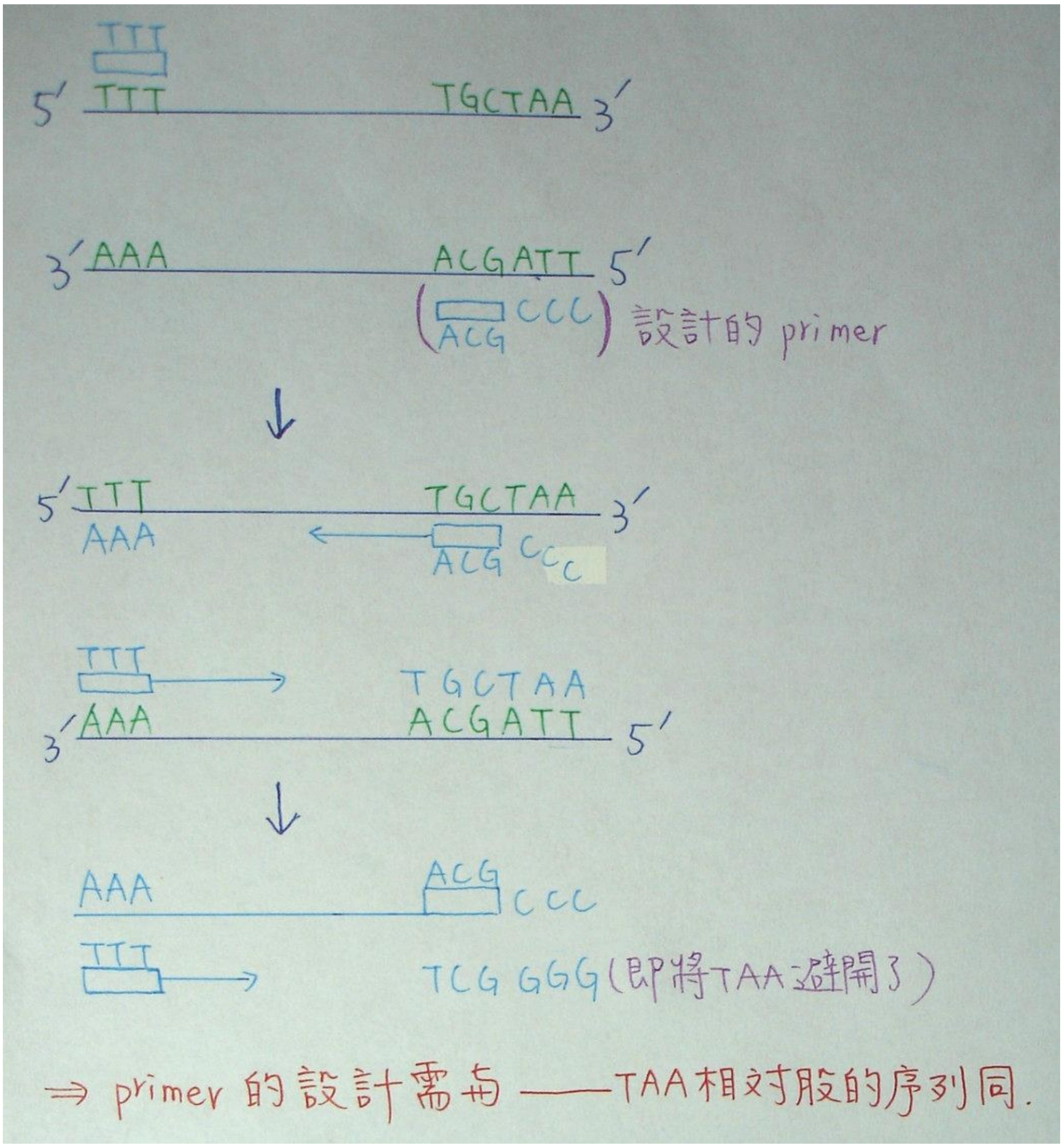
(4)有 8xHis tag 此可幫助純化蛋白質的片段。

(5)有 lac operator，可藉由加入 IPTG(乳糖類似物)誘導轉殖質體表現蛋白質。

3. 需要設計 primer 避開在 NP gene 上的 stop codons 的原因：

因為在 Tri-system vector 上有 8X His tag，為有用的片段，可幫助純化蛋白質。如不避開在 NP gene 上的 stop codons，經 ligase 反應後的質體在複製時就會在中途停下來，無法保有 8X His tag 此有用片段。

4. 設計 primer 就可以合成沒有 stop codons 的 NP gene 的原理圖示：



→仍會有少比例含有 stop codons 的 NP gene 存在，因爲有由原本少量的 template 所合成的片段。但因放入大量自行設計的 primer，所以 PCR 產物仍以沒有終止碼的爲主。

5. PCR 過程中 Mg^{2+} 輔因子和拉溫度梯度(45℃~55℃)的功能：

(1) Mg^{2+} 輔因子有助於提升酵素活性，可提高 PCR 產物的產量，但是因為使酵素活性提高，所以易有雜 band 產生。

(2) 拉溫度梯度(45℃~55℃)的功能是影響 primer 和 template 的連合作用。當溫度太高，primer 會與 template 分開；溫度太低時，primer 會亂黏位置，產生雜 band。故需拉溫度梯度找出使 PCR 產物的產量最多又最專一的合適溫度。

6. ligase 後的產物在要轉殖入 competent cell 前須經過 chloroform 純化步驟的原因：因為 ligase 的產物在之前的實驗步驟已經經過很多次的跑膠和膠純化，而跑膠的膠片和在膠純化步驟中加入的 binding buffer 都會影響 DNA 的穩定性，可能減少成功轉殖入 competent cell 的機會，所以用 chloroform 純化去除以上兩者的干擾。

柒、結論

藉由本次實驗有系統的步驟和仔細確認的跑膠過程，目前已得知 ligase 反應有成功作用，且在塗有 Amp 的 plate 上可長出菌落。培養菌落，經抽質體和限制酶切割後跑膠，已確認為正確片段(NP gene：590；Tri-system vector：5800)。即已成功將 NP gene 轉殖入 Tri-system vector 中，並已在勝任細胞中大量合成新轉殖質體。

捌、未來展望

可將成功轉殖的 NP-Tri 質體加入 IPTG(乳糖類似物)，誘導其表現蛋白質。如果能成功表現蛋白質，就可經動物試驗檢測是否為新城雞瘟之有效疫苗；如果不能表現出蛋白質，則表示 NP gene 無法作為新城雞瘟的預防疫苗。

玖、參考資料

1.PCR 過程：Finnzymes 產品說明書

2.膠體純化：Promega、wizard SV gel and PCR Clean-Up system 產品說明書

3.限制酶切割、ligase 反應：Steve Nadis、New England Biolabs、台灣總代理 細胞科技有限公司、368 頁、2005

4.使用自製 competent cell 培養 Tri-system vector：Molecular cloning 產品說明書

5.使用商業用 competent cell 培養轉殖的 Np-Tri 質體：FAVORGER competent cell 產品說明書

6.抽質體：藥品配置依 Qiagen Plasmid Purification Handbook

7. NP 基因的序列來源：NCBI 的美國網站

8. http://watcut.uwaterloo.ca/watcut/watcut/template.php(可查詢 NP 基因上的酵素切位)

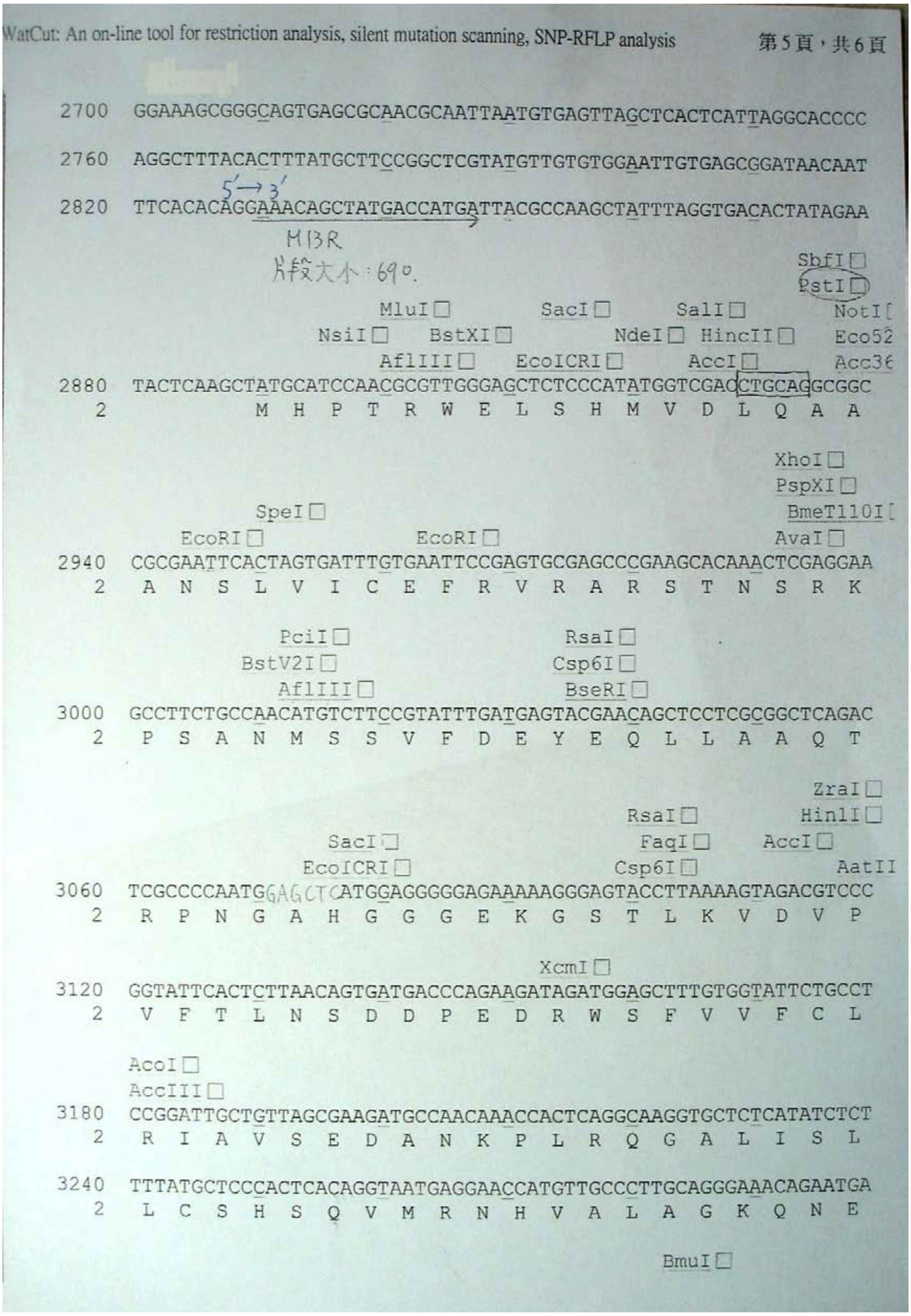
9.Tri-system vector 的簡圖：Qiagen Plasmid Purification Handbook(產品說明書)

10.科技儀器設備、豐常實業有限公司

11.呂榮修、新城雞瘟、中華民國養雞協會出版

拾、附錄

(一)新城雞瘟之 NP gene 的序列(5′→3′)：



WatCut: An on-line tool for restriction analysis, silent mutation scanning, SNP-RFLP analysis　第 5 頁，共 6 頁

2700 GGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCC

2760 AGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAAT

5′→3′

2820 TTCACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTATTTAGGTGACACTATAGAA

M13R

片段大小：690.

SbfI
PstI
MluI SacI SalI NotI
NsiI BstXI NdeI HincII Eco52
AflIII EcoICRI AccI Acc36

2880 TACTCAAGCTATGCATCCAACGCGTTGGGAGCTCTCCCATATGGTCGACCTGCAGGCGGC

2 M H P T R W E L S H M V D L Q A A

XhoI
PspXI
SpeI BmeT110I
EcoRI EcoRI AvaI

2940 CGCGAATTCACTAGTGATTTGTGAATTCCGAGTGCGAGCCCGAAGCACAAACTCGAGGAA

2 A N S L V I C E F R V R A R S T N S R K

PciI RsaI
BstV2I Csp6I
AflIII BseRI

3000 GCCTTCTGCCAACATGTCTTCCGTATTTGATGAGTACGAACAGCTCCTCGCGGCTCAGAC

2 P S A N M S S V F D E Y E Q L L A A Q T

ZraI
RsaI HinlI
SacI FaqI AccI
EcoICRI Csp6I AatII

3060 TCGCCCCAATGGAGCTCATGGAGGGGGAGAAAAAGGGAGTACCTTAAAAGTAGACGTCCC

2 R P N G A H G G G E K G S T L K V D V P

XcmI

3120 GGTATTCACTCTTAACAGTGATGACCCAGAAGATAGATGGAGCTTTGTGGTATTCTGCCT

2 V F T L N S D D P E D R W S F V V F C L

AcoI
AccIII

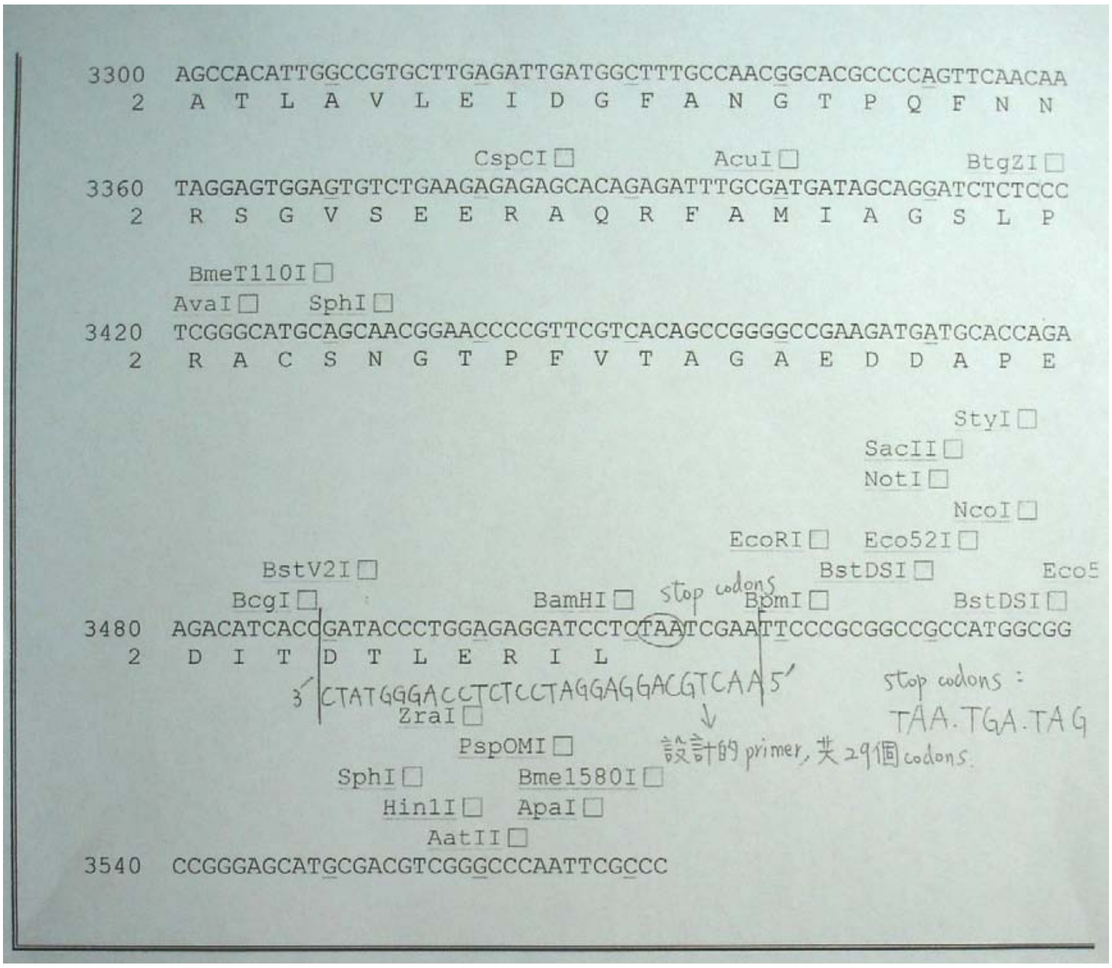
3180 CCGGATTGCTGTTAGCGAAGATGCCAACAAACCACTCAGGCAAGGTGCTCTCATATCTCT

2 R I A V S E D A N K P L R Q G A L I S L

3240 TTTATGCTCCCACTCACAGGTAATGAGGAACCATGTTGCCCTTGCAGGGAAACAGAATGA

2 L C S H S Q V M R N H V A L A G K Q N E

BmuI



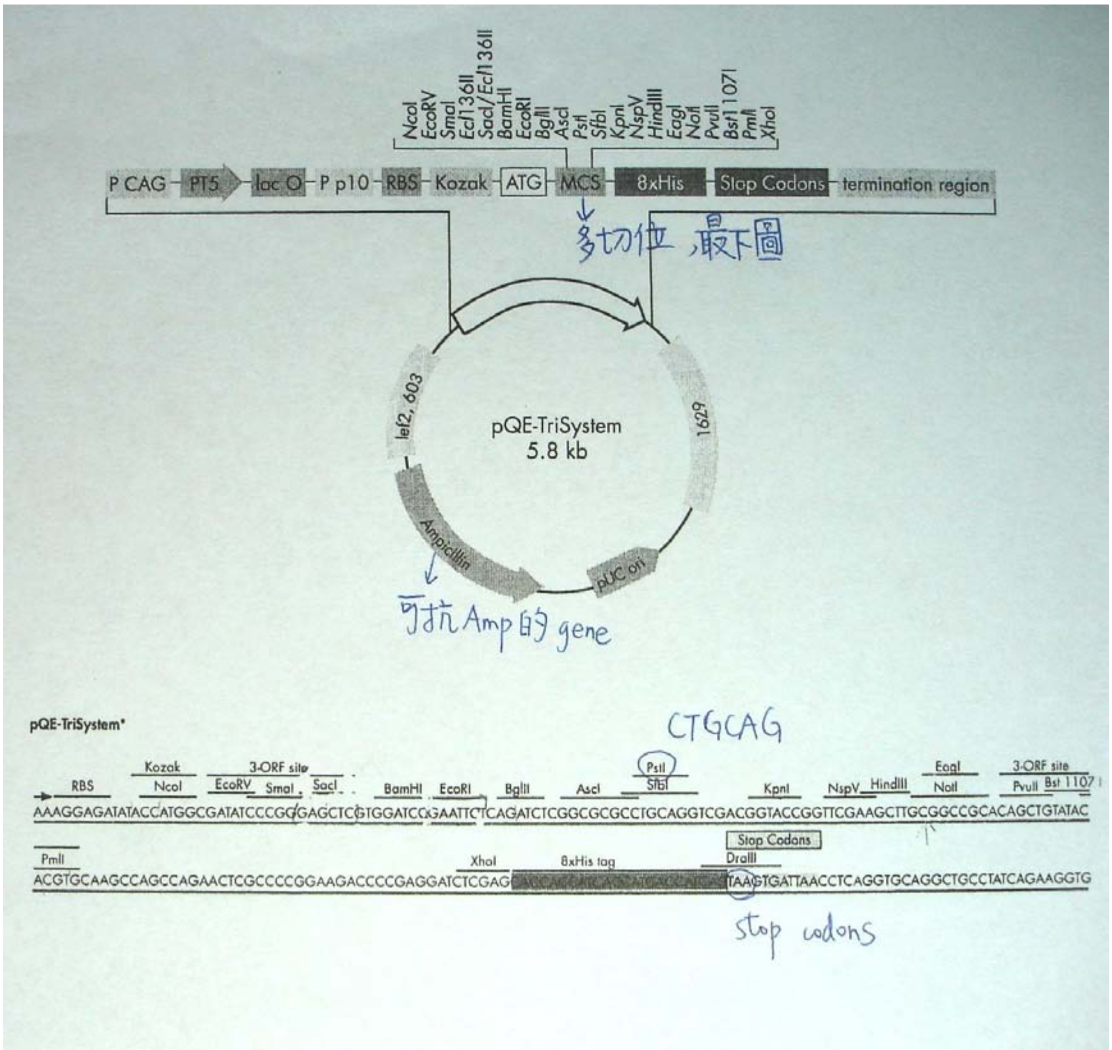
(二) F primer 和 R primer 的序列：

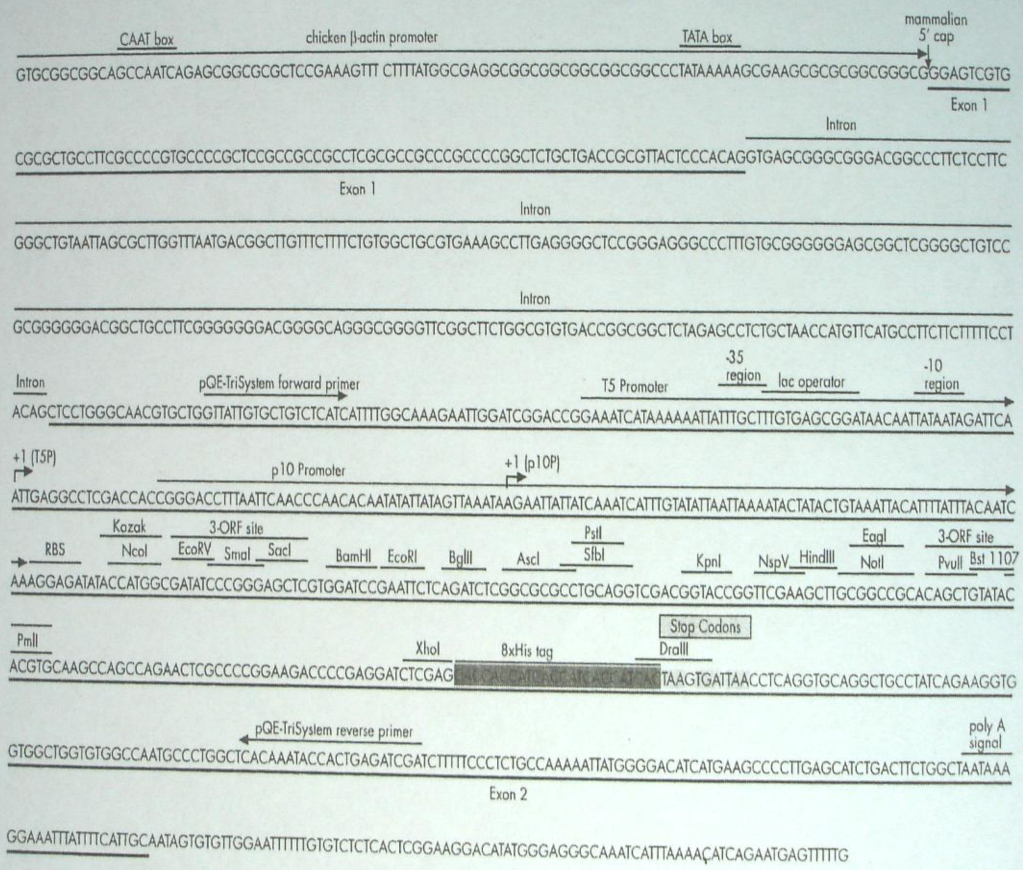
F primer(M13R)：AAACAGCTATGACCATGA

R primer(3′→5′)：CTATGGGACCTCTCCTAGGAG<u>GACGTCAA</u>

(取代 <u>TAATCGAA</u>)

(三) Tri-system vector 的簡圖：





pQE-TriSystem promoter region overview and sequencing primer annealing positions

【評 語】 040710 新城雞瘟之 NP 基因的疫苗研究

1. 能瞭解並報導 recombinant DNA 的原理及技術。

2. 應繼續進行 recombinant NP 蛋白質表達，才能深入探討其製備 antibody 的可能性。

3. 一般會選擇病表之外鞘蛋白作爲 antigen NP protein 之抗原性及疫苗製備可能。