

中華民國 第 49 屆中小學科學展覽會

作品說明書

---

高中組 生物（生命科學）科

040705

細菌轉型作用之探討

學校名稱：國立嘉義高級中學

作者：  高二 邱亮維  高二 洪健睿  高二 魯成旭  高二 羅啟亮	指導老師：  林秀珠
---	------------------

關鍵詞：勝任細胞、細胞轉型

## 作品摘要

在一般文獻中，都以 0.1M 的  $\text{Ca}^{2+}$  溶液製作勝任細胞，但本實驗卻發現分子量較大的質體使用 0.1M 的  $\text{Ca}^{2+}$  溶液並不具最佳的效果，而以 0.25M 的  $\text{Ca}^{2+}$  溶液效果最佳，不過這是質體於二次水中進行轉型作用的前提下。因此在考慮實用性下，本組將質體放在 **Ligation Buffer** 中進行轉型作用，卻發現其成功率下降至約質體於二次水中進行實驗效果的八分之一。接著，本組發現 **Ligation Buffer** 中的 **Tris-HCl** 會抑制轉型效率。所以，本組改用 **MOPS** 及 **HEPES** 取代 **Tris-HCl** 作為 **Ligation Buffer** 中緩衝溶液的成份，發現質體於 **MOPS** 或 **HEPES** 之緩衝液中較質體置於 **Tris-HCl** 中之轉型效率有 2-3 倍之差異。

本組建議往後相關領域在進行實驗時，不妨將 **Ligation Buffer** 的 **Tris-HCl** 改為 **MOPS**，或將 **Ligation Buffer** 中已完成與外來 DNA 連接的質體純化，再置於二次水中，並以 0.25M 的  $\text{Ca}^{2+}$  溶液製備的勝任細胞進行細菌轉型實驗。

## 壹、研究動機

在高一基礎生物的課程中，曾提過質體如何影響細菌的功能，以及質體可藉由人工的方式轉型至目標細菌中。但書中卻未提起細菌轉型的方式，於是小魯利用家中的網路來找尋答案。其中的資料皆顯示一般是使用 0.1M 的  $\text{Ca}^{2+}$  溶液來進行轉型作用。於是小魯心中不禁納悶，難道一定要使用 0.1M 的  $\text{Ca}^{2+}$  溶液才可以進行轉型嗎？於是設計了本實驗，開始了這項研究。

## 貳、研究目的

- 一、將質體置於二次水中進行細菌轉型實驗並探討各種變因對於細菌轉型作用之影響。
  - (一) 使用常見的八種金屬離子，找出何者為最適金屬離子。
  - (二) 使用八種金屬離子中效果最好的金屬離子，找出其最適濃度。
  - (三) 探討質體大小與最適金屬離子濃度與轉型效率之關係。
  - (四) 找出最適的熱休克秒數。
- 二、將質體置於 Ligation Buffer 中進行細菌轉型實驗並探討其中各種成分對於細菌轉型作用之影響。
  - (一) 比較質體置於二次水中及 Ligation Buffer 中細菌之轉型效率。
  - (二) 探討 Ligation Buffer 中各種成分對細菌轉型作用效果的影響。

## 參、研究設備與器材

Agar (ZYMESET)、LB Broth Miller (ZYMESET)、大腸桿菌 DH5 $\alpha$ 、質體 (pSV- $\beta$ -Galactosidase, 6.8kb)、質體(pGFPuv, 3.3kb)、LiCl、KCl、RbCl、MgCl<sub>2</sub>、CaCl<sub>2</sub>、SrCl<sub>2</sub>、BaCl<sub>2</sub>、CuCl<sub>2</sub>、MnCl<sub>2</sub>、Ligation Buffer、Tris-HCl、MOPS、HEPES、ATP、DTT、L 型玻棒、培養盤、Pipette (NICHIRYO)、Pipet • aid (DRUMMOND)、Serological Pipet (BIOFIL)、Shaker、恆溫水槽、瓦斯槍、離心機。

## 肆、研究過程及方法

### 一、製作培養基

- (一) 將 LB 25g 加入 1 公升的水中。
- (二) 加入 Agar 16g 和 14 滴 6N 的氫氧化鈉溶液。
- (三) 滅菌一小時( $121^{\circ}\text{C}$   $1.1 \text{ kg/cm}^2$ )。
- (四) 加入 1mL 的安培西林。
- (五) 製成培養盤。

### 二、製作勝任細胞

- (一) 取單一 DH5 $\alpha$  菌落培養於不含抗生素的 1mL LB 培養液中，在  $37^{\circ}\text{C}$  恆溫培養箱中以 150rpm 震盪培養 24 小時。
- (二) 將 1mL 的 DH5 $\alpha$  稀釋 100 倍。
- (三) 再放入恆溫培養箱以 150rpm 震盪培養 3 小時 15 分，使 DH5 $\alpha$  達到對數期。
- (四) 取 8mL DH5 $\alpha$  加入 4mL(原體積 1/2 倍)含有金屬離子的溶液，並均勻混合之。
- (五) 以  $4^{\circ}\text{C}$  5000rpm 離心 5 分鐘。
- (六) 除去上清液後，加入 0.533mL(原體積 1/15 倍)含有金屬離子的溶液，再次均勻混合之。
- (七) 將此菌液存放於  $4^{\circ}\text{C}$  下保存。
- (八) 放置 18 小時後進行轉型實驗。

### 三、轉型作用(Transformation)

- (一) 將  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  的質體以二次水稀釋 2000 倍(第二部份實驗中各溶液之成分含量如第 19 頁之附表一與第 21 頁之附表二)，取  $10\mu\text{L}$  置入離心管中。

- (二) 將勝任細胞 100 $\mu$ L 分別加入各離心管中。
- (三) 混合均勻後，放入冰中 30 分鐘。
- (四) 隨後利用熱休克(heat shock)方式，於 42.2 $^{\circ}$ C 的恆溫水槽中處理 2 分鐘。
- (五) 再置入冰中 3 分鐘。
- (六) 隨後加入 1mL LB 培養液於 37 $^{\circ}$ C 下震盪培養 1 小時。
- (七) 取出 150 $\mu$ L 之菌液以 L 型玻棒均勻塗抹於含有安培西林之 LB 培養盤上。
- (八) 放置 37 $^{\circ}$ C 恆溫培養箱中培養至隔天。

## 伍、實驗

### 一、將質體置於二次水中進行細菌轉型實驗。

- (一) 探討實驗中之八種金屬離子(Li $^{+}$ 、K $^{+}$ 、Rb $^{+}$ 、Mg $^{2+}$ 、Ca $^{2+}$ 、Sr $^{2+}$ 、Ba $^{2+}$ 、Cu $^{2+}$ 、Mn $^{2+}$ )，何者轉型效果最好。
- (二) 使用效果最好的金屬離子，分別調配成 0.005M、0.01M、0.05M、0.1M、0.2M、0.5M、0.8M 及 1M 等八種不同濃度溶液實驗之。
- (三) 由 0.1M 至 0.45M 再以 0.05M 為間隔細分成八種不同濃度溶液實驗之。
- (四) 改變質體種類(不同大小)，並由 0.1M 至 0.45M 以 0.05M 為間隔細分成八種不同濃度之溶液進行實驗。
- (五) 調整其熱休克(heat shock)的秒數實驗之。

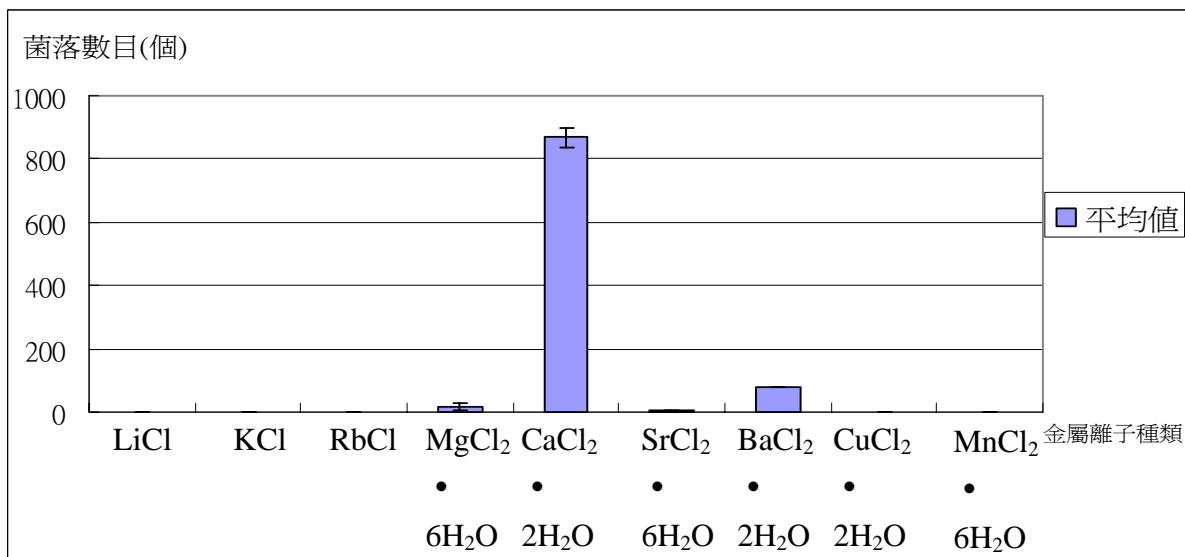
### 二、將質體置於 Ligation Buffer 中進行細菌轉型實驗

- (一) 探討將質體置於二次水中與將質體置於 Ligation Buffer 中其細菌轉型作用效果之差異。
- (二) 探討 Ligation Buffer 中的各種成分對於細菌轉型作用效果之影響。

## 陸、結果及討論

### 一、質體(pSV- $\beta$ -Galactosidase)對不同金屬離子之實驗結果

#### (一) 實驗一之結果：



圖一：質體(pSV- $\beta$ -Galactosidase)對各種金屬離子實驗結果的平均與標準差

#### (二) 實驗一之討論：

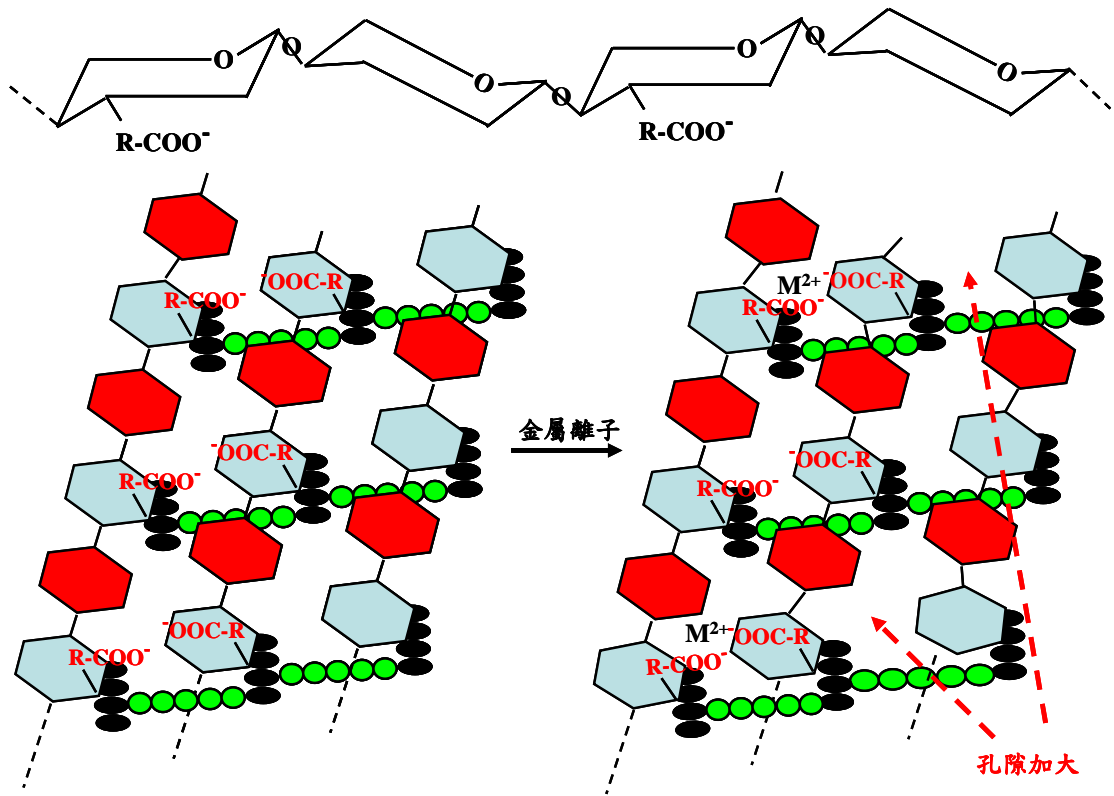
實驗中分別用了 0.1M 之  $\text{Li}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Rb}^+$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Sr}^{2+}$ 、 $\text{Ba}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$  製作勝任細胞，發現以  $\text{Ca}^{2+}$  處理後的細胞，對質體的轉型作用效果最好。而  $\text{Li}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Rb}^+$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ ，皆完全無法產生效果。

對此實驗結果推測可能是因為細菌細胞外壁(細胞膜、細胞壁)表面帶有負電荷，因此把細菌和帶有正電荷的金屬離子溶液混合在一起時，正電的金屬離子會吸附在細胞外壁上帶負電的部份。其中正 1 價的金屬離子只能一次吸附一邊的帶負電部分，所以無法造成細胞外壁上出現較大的孔隙，因此轉型作用的效果較為不佳(完全沒有菌落的生成)。

相較之下，正 2 價的金屬離子具有同時吸附兩旁帶負電部份的能力，造成細胞外壁上出現一些較大的孔隙(如圖二、圖三)，因此使得質體較為容易進入細菌內部，導致轉型效果較為顯著。

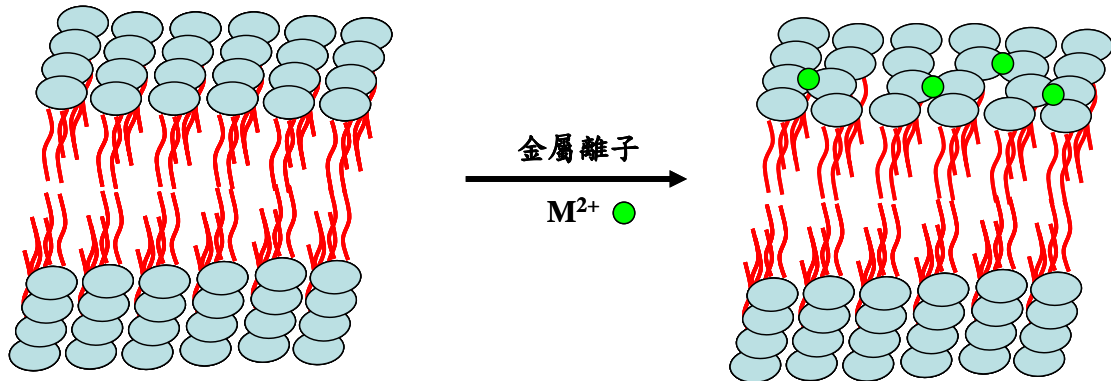
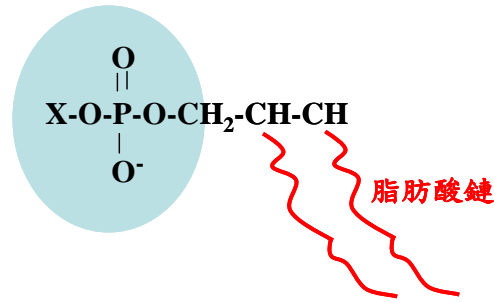
但是在實驗結果中，發現並不是所有的正 2 價金屬離子(例： $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ )都

能有顯著的轉型效果。推測其中的原因可能是因為金屬本身對細菌有害，或者是因為造成孔隙後無法使細胞外壁恢復原狀而導致細菌死亡，造成轉型效果不佳的結果。



圖二：正 2 價金屬離子在細胞壁的作用圖

細胞膜之結構  
主要為磷脂質：



圖三：正 2 價金屬離子在細胞膜的作用圖

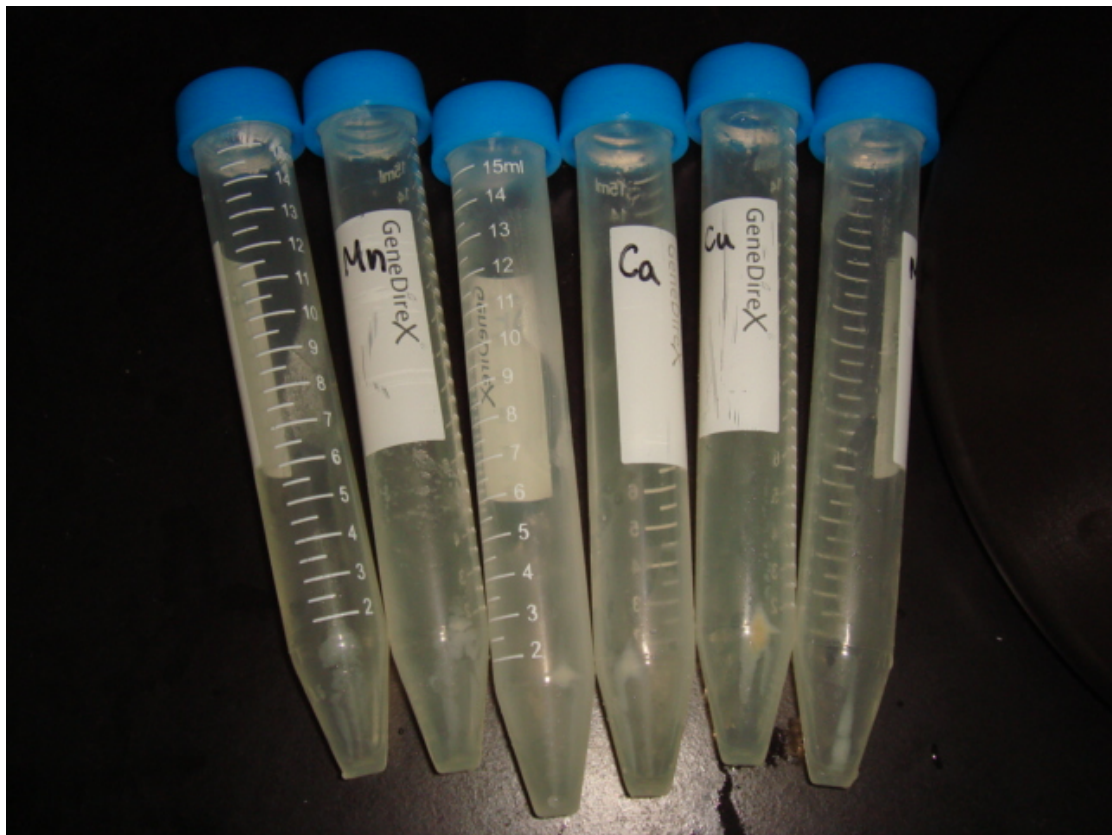
值得一提的是，在製作勝任細胞的過程中，當不同的金屬離子-細菌混合液離心之後，以一價金屬離子與以二價金屬離子處理後的細胞沉澱呈現不同的現象。以二價金屬離子處理後的細胞沉澱呈細長條狀的分佈；相較之下，以一價金屬離子處理後的細胞分佈則較為集中(圖四、圖五)。

由實驗一的結果和上述現象相較之下，發現能使質體進入細胞的金屬離子種類，即  $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Sr}^{2+}$ 、 $\text{Ba}^{2+}$ ，其離心後的細胞沉澱的方式皆為長條狀分佈。依實驗結果推測，二價的金屬離子較容易使細胞外壁的孔隙變大，也使細胞外壁的完整度下降，因此降低了細胞之間互相吸引的力量，而提高了使質體進入細胞的機率。





圖四：經  $\text{Li}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Rb}^+$  離子處理後離心之狀態

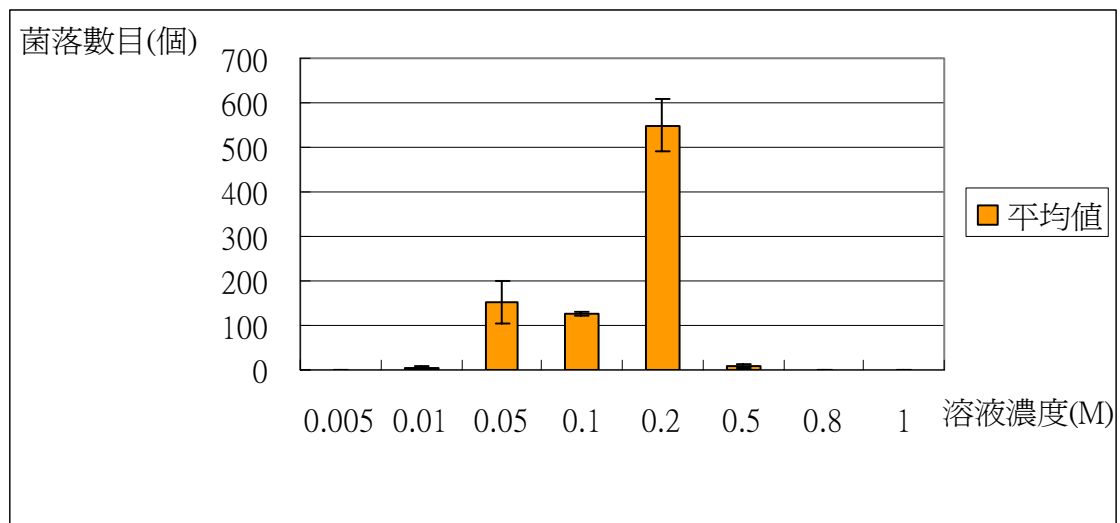


圖五：經  $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Sr}^{2+}$ 、 $\text{Ba}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$  離子處理後離心之狀態

另外，實驗過程中曾經嘗試將製好的勝任細胞放置在冷凍的狀態下數天，發現冷凍過後的勝任細胞沒有任何的轉型效果，即便是效果最好的以  $\text{Ca}^{2+}$  處理的勝任細胞也完全無法有轉型效果。

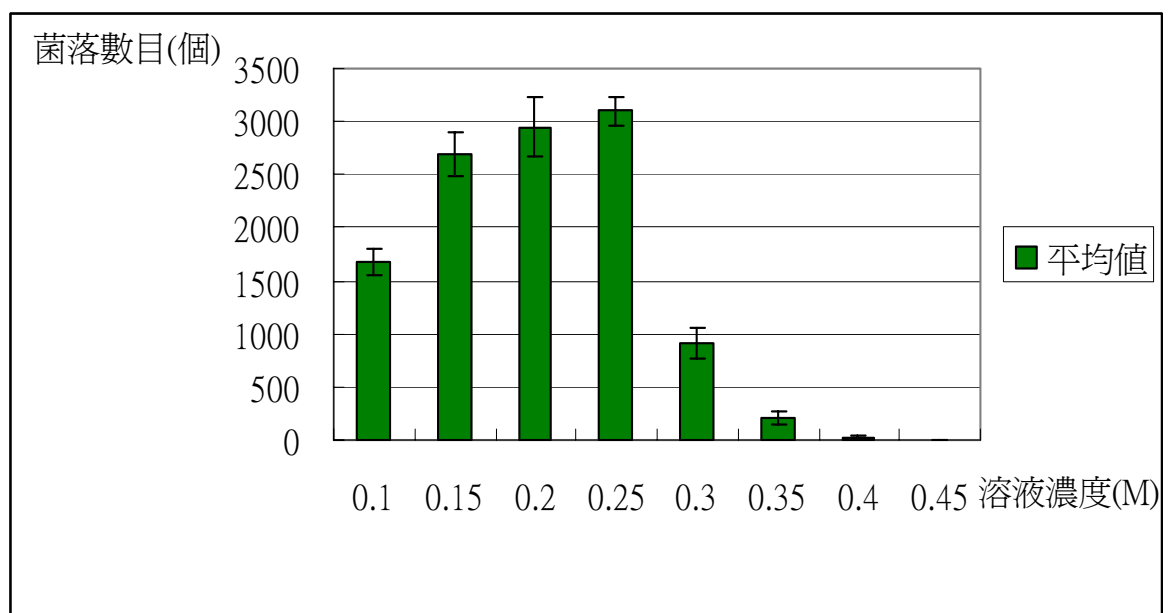
## 二、質體(pSV-β-Galactosidase)對不同 Ca<sup>2+</sup>溶液濃度之實驗結果

(一) 實驗二之結果：



圖六：質體(pSV-β-Galactosidase)對不同濃度 Ca<sup>2+</sup>溶液處理之勝任細胞之轉型實驗結果的平均與標準差

(二) 實驗三之結果：



圖七：質體(pSV-β-Galactosidase)對不同濃度 Ca<sup>2+</sup>溶液處理之勝任細胞之轉型實驗結果的平均與標準差

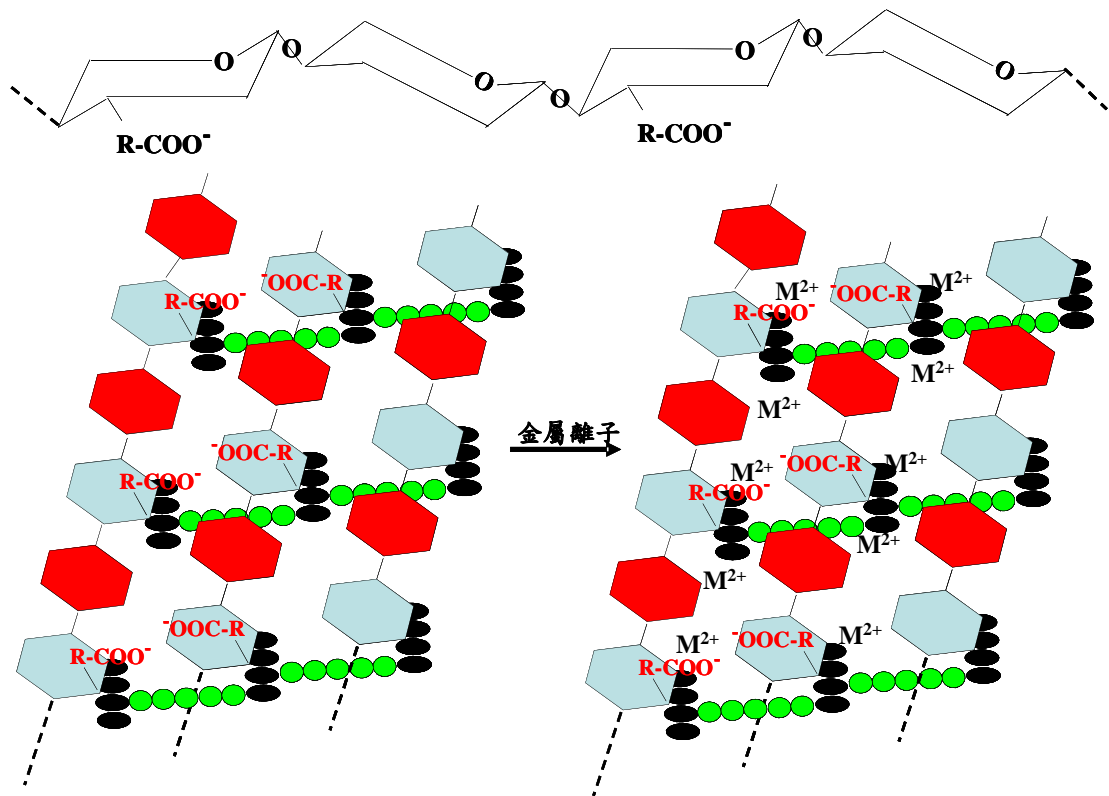
### (三) 實驗二、三之討論：

實驗二中發現在 0.1M 和 0.2M 鈣離子濃度之間有最佳效果，再把濃度細分(以 0.05M 為間隔)進行實驗三，發現又以 0.25M 為最佳濃度。

此結果與書上的實驗方式不同，由本實驗結果得知一般以 0.1M 的濃度進行實驗並非最好，而是 0.25M，且 0.25M  $\text{Ca}^{2+}$  溶液的轉型效率與 0.1M 的效果相比，有 2 倍以上的差異。

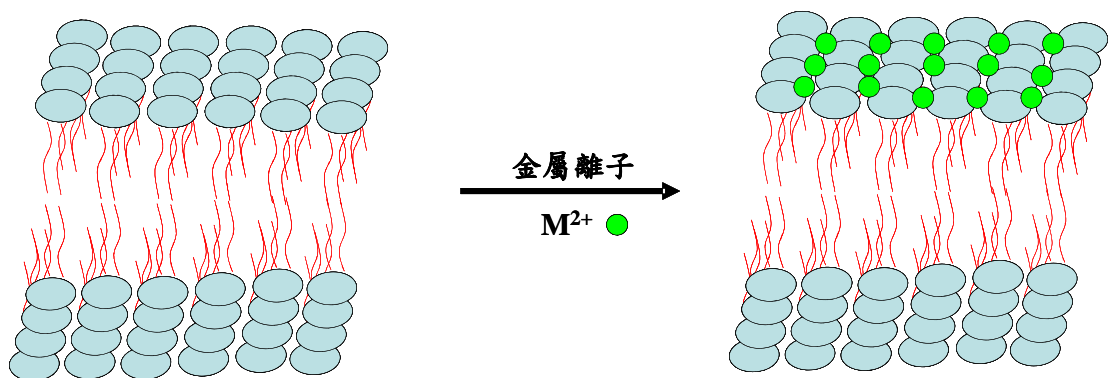
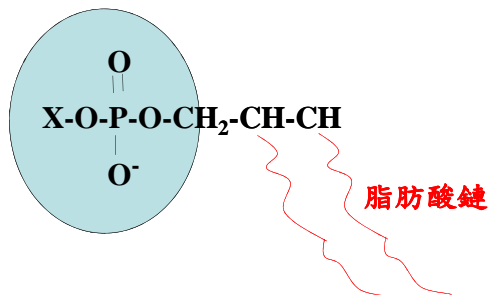
此外，從實驗的結果可以發現，當離子溶液濃度過高時，轉型作用的效果並不佳。根據實驗推測，應該是由於過多的帶正電離子附著在細胞外壁上，使其分佈過於密集，導致離子間因作用力相互抵消，而無法產生孔隙，進而使得轉型效率不佳。

此結果使分子量較大的質體於轉型的實驗中有了新的希望。若於一個實驗中，只需獲得數個含有質體的細胞，那麼在以往使用 0.1M  $\text{Ca}^{2+}$  溶液的狀況下，實驗的失敗率可能十分的高，甚至是不可行的；但如果使用 0.25M 的  $\text{Ca}^{2+}$  溶液，實驗的結果可能就有顯著的改變，因為它大幅提升了進行分子量較大之質體轉型作用時之效率。



圖八：過多正 2 價金屬離子在細胞壁的作用圖

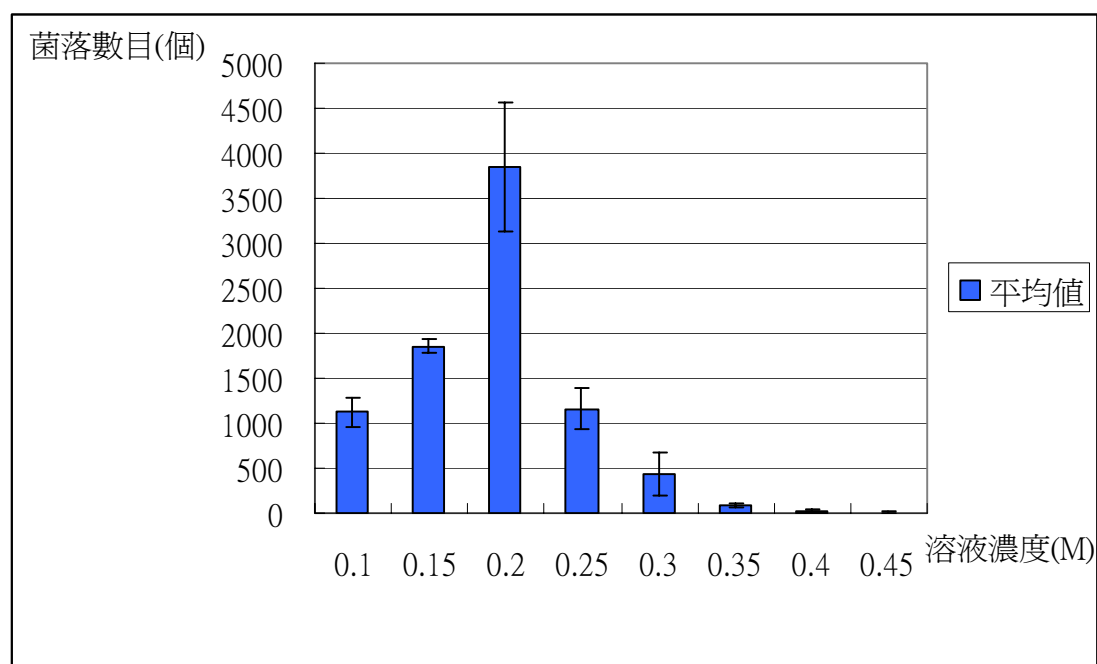
細胞膜之結構  
主要為磷脂質：



圖九：過多正 2 價金屬離子在細胞膜的作用圖

### 三、質體(pGFPuv)對不同 $\text{Ca}^{2+}$ 溶液濃度之實驗結果

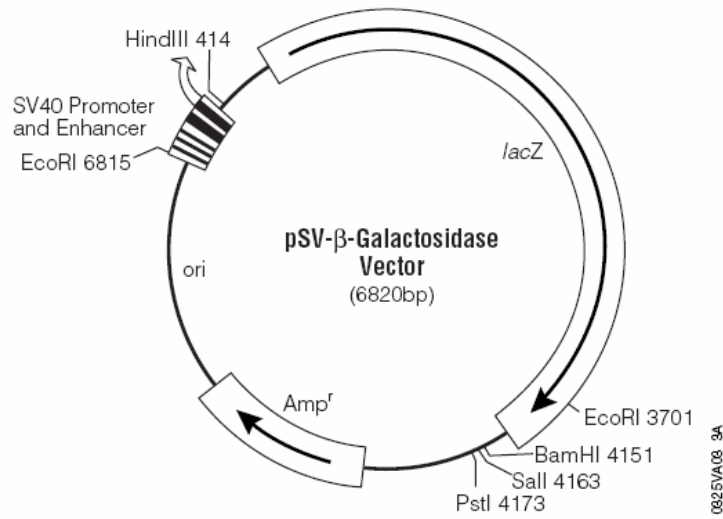
#### (一) 實驗四之結果：



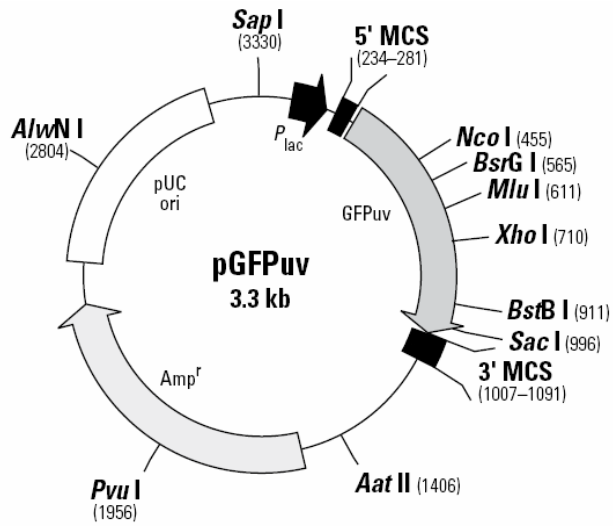
圖十：使用 pGFPuv 對不同  $\text{Ca}^{2+}$  溶液濃度實驗結果的平均與標準差

#### (二) 實驗四之討論：

根據金屬離子作用於細胞外壁的原因推測，質體的大小應該會影響細胞轉型的效率，所以另外找了一種較小的質體(pGFPuv，如圖十二)不同先前的質體(pSV- $\beta$ -Galactosidase，如圖十一)來重複進行實驗三。在實驗的過程中，一開始以 150 $\mu\text{L}$  的菌液來進行塗盤，但是由於菌落長的過於密集，導致無法一一將菌落數清楚，接著改變以 100 $\mu\text{L}$  來進行塗盤，得到了以上的結果。如同本組的預期，實驗結果顯示質體的大小會明顯影響轉型作用的效果。另外，在此實驗中，效果最好的溶液濃度雖然並非 0.25M，而是 0.2M，這個結果仍與文獻上所記載的 0.1M 有所不同，兩者間的差距甚至達三倍之多。



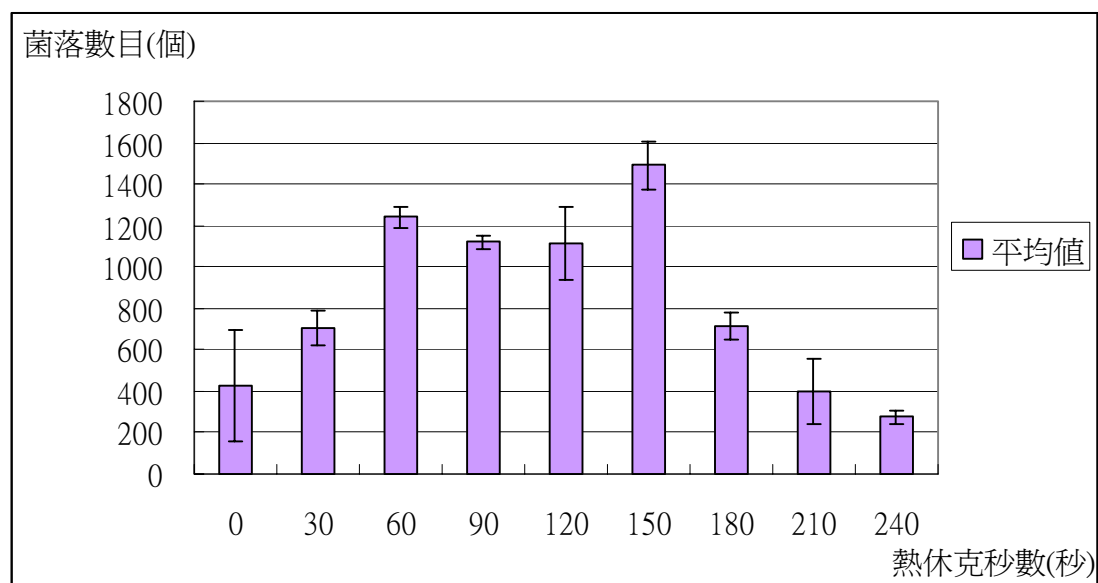
圖十一：pSV-β-Galactosidase 的質體圖譜



圖十二：pGFPuv 的質體圖譜

#### 四、質體(pSV-β-Galactosidase)對不同熱休克秒數之實驗結果

##### (一) 實驗五之結果：



圖十三：質體(pSV-β-Galactosidase)對不同熱休克秒數實驗結果的平均與標準差

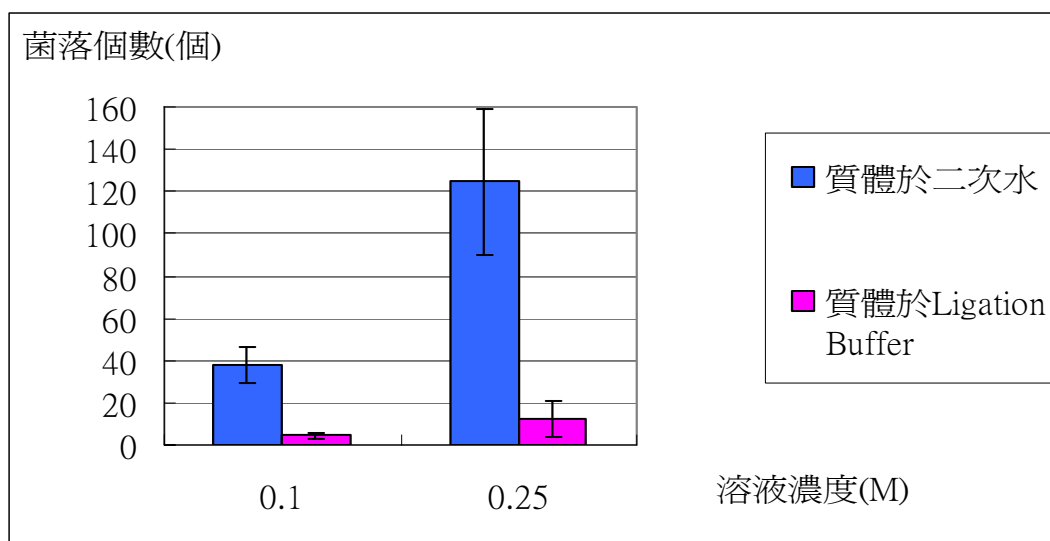
##### (二) 實驗五之討論：

根據文獻上記載，30 到 240 秒的熱休克秒數皆有人使用。從本實驗中發現，細菌的轉型作用即使沒有熱休克也能有不錯的效果，但是整體上來說，從 30 秒到 150 秒間有效果越來越佳的趨勢，而一旦熱休克秒數超過了 150 秒，則可以發現其效果有明顯的下滑趨勢，且是越來越不佳的狀況。對此結果，本組推測可能是因為熱休克的秒數過長使得細胞膜的蛋白質變性，而對細菌造成了不良的影響，進而導致了轉型作用的效果不彰之結果。



## 五、質體(pSV- $\beta$ -Galactosidase)置於二次水中進行細菌轉型作用與置於 Ligation Buffer 中進行細菌轉型作用之實驗結果

### (一) 實驗六之結果：



圖十四：質體(pSV- $\beta$ -Galactosidase)置於二次水中進行細菌轉型作用與置於 Ligation Buffer 中進行細菌轉型作用之實驗結果的平均與標準差

### (二) 實驗六之討論：

先前本組所進行的實驗是採一般分子生物科技公司在進行細菌轉型作用效果之測試時所使用的方式，也就是將質體置於二次水中進行轉型實驗。如果依據此種方式進行實驗，則本組實驗後發現，分子量大的質體(如 pSV- $\beta$ -Galactosidase)以 0.25M 的  $\text{Ca}^{2+}$  溶液進行轉型實驗有最佳的效果。然而，一般進行細菌轉型實驗時，實驗者並非將質體置於二次水中進行實驗的操作，而是在進行完 DNA 接合的步驟後，質體即置於 Ligation Buffer 中直接進行轉型。因此，本組將質體置於 Ligation Buffer 中，並且分別以 0.1M 及 0.25M 的  $\text{Ca}^{2+}$  溶液所製造的勝任細胞進行細菌轉型的實驗。

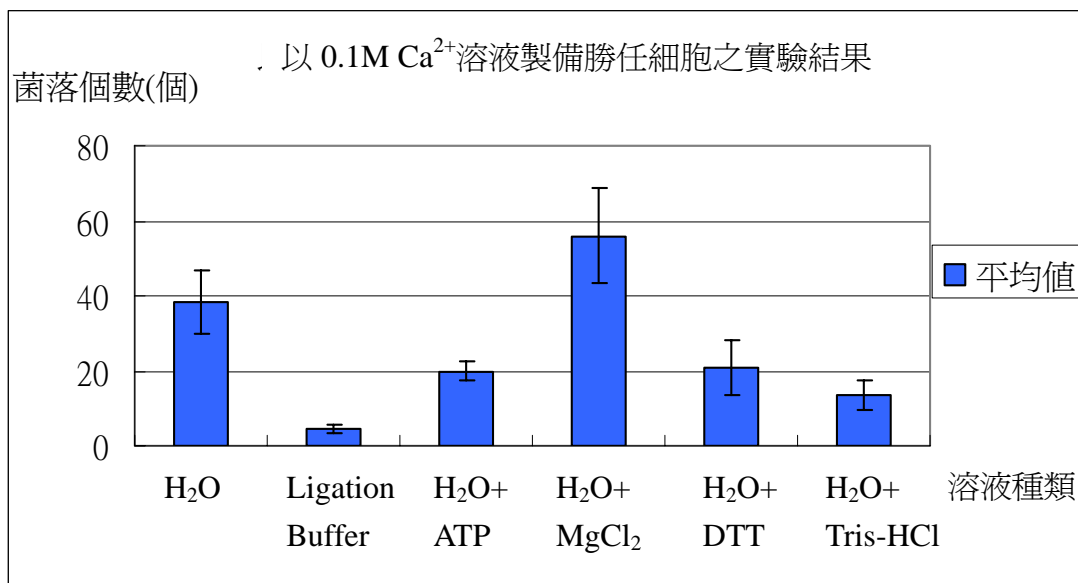
從實驗六的結果可以看出，以相同濃度的  $\text{Ca}^{2+}$  溶液製備勝任細胞，置於 Ligation Buffer 中其轉型成功率下降至約質體置於二次水中進行實驗的效果的八分之一。

針對此實驗的結果，本組推測可能是 Ligation Buffer 中的某些成分對於細菌的轉型作用具有相當程度的影響力，因此本組將質體分別置入 Ligation Buffer 中

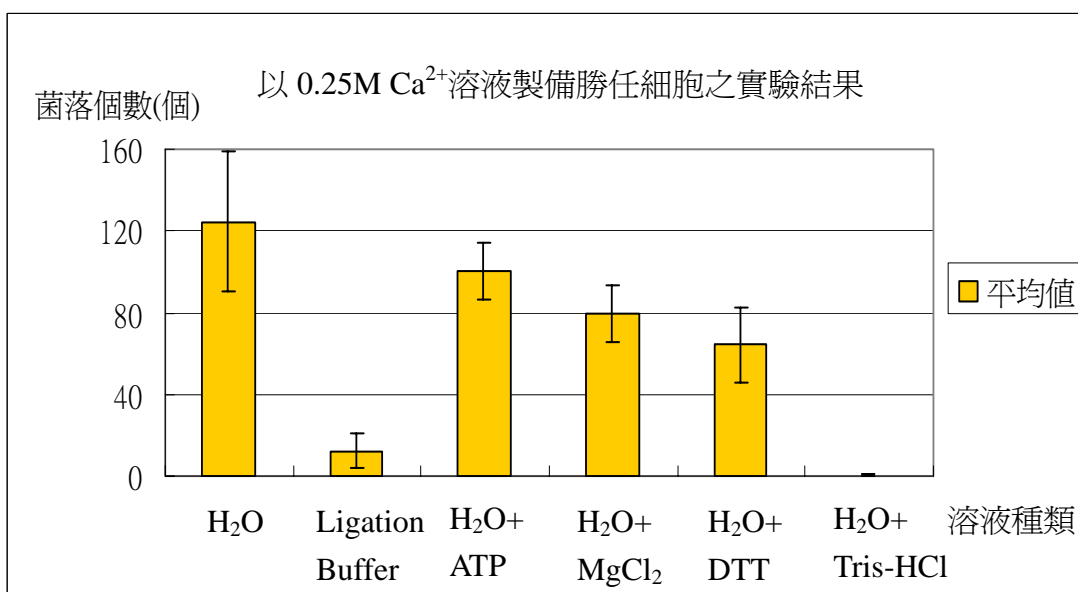
的四種成分—Tris-HCl、MgCl<sub>2</sub>、DTT 及 ATP 中，並分別進行 0.1M Ca<sup>2+</sup>溶液及 0.25M Ca<sup>2+</sup>溶液所製備之勝任細胞之細菌轉型。

六、質體(pSV-β-Galactosidase)置於 Ligation Buffer 內不同成分溶液中其細菌轉型作用之實驗結果

(一) 實驗七之結果：



圖十五：使用 0.1M Ca<sup>2+</sup>溶液處理之勝任細胞進行質體置於 Ligation Buffer 內不同成分溶液中其細菌轉型效果之實驗結果的平均與標準差



圖十六：使用 0.25M Ca<sup>2+</sup>溶液處理之勝任細胞進行質體置於 Ligation Buffer 內不同成分溶液中其細菌轉型效果之實驗結果的平均與標準差

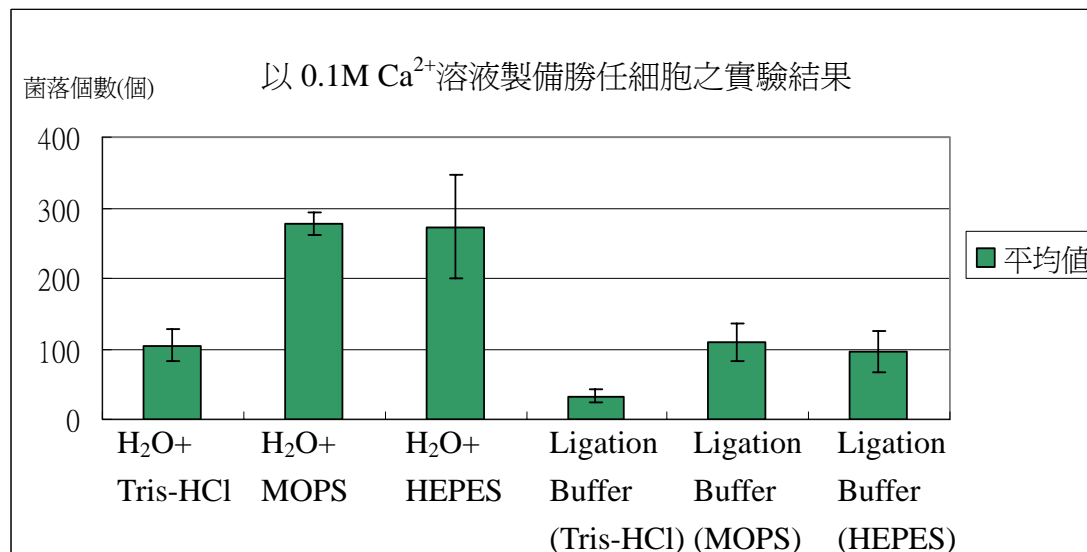
溶液種類 成分	H <sub>2</sub> O	Ligation Buffer	H <sub>2</sub> O+ ATP	H <sub>2</sub> O+ MgCl <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O+ DTT	H <sub>2</sub> O+ Tris-HCl
H <sub>2</sub> O	35	28	28	28	28	28
Plasmid	35	35	35	35	35	35
Ligation Buffer	0	7	0	0	0	0
ATP	0	0	7	0	0	0
MgCl <sub>2</sub>	0	0	0	7	0	0
DTT	0	0	0	0	7	0
Tris-HCl	0	0	0	0	0	7

附表一：實驗七各溶液成分調配量(單位:  $\mu\text{l}$ )

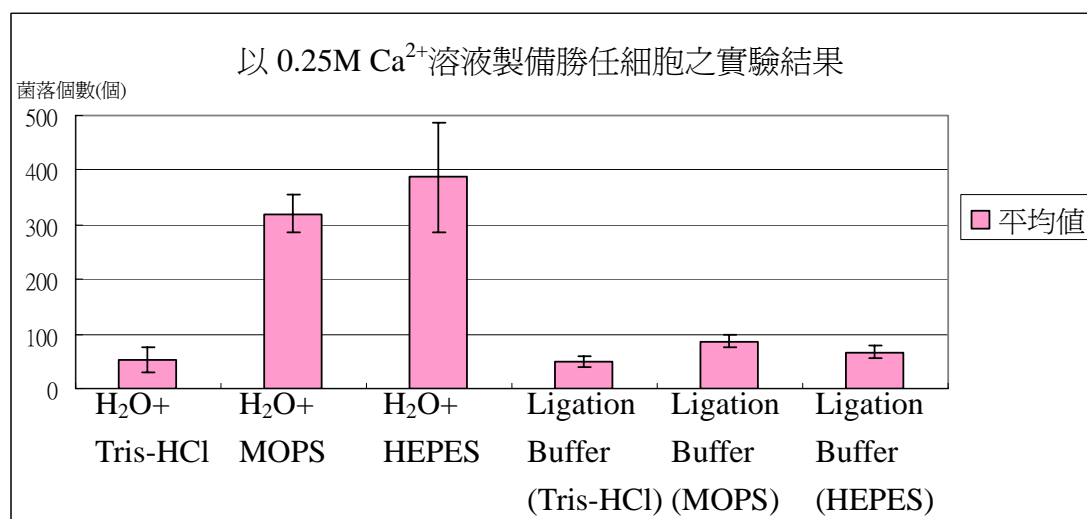
(二) 實驗七之討論：

在加入 MgCl<sub>2</sub>、DTT(DL-Dithiothreitol, for electrophoresis，一種還原劑，可以用來吸收環境中的氧化劑以保護蛋白質不易被氧化)以及 ATP 的情況下進行細菌的轉型實驗，其結果與質體單純置於二次水中並進行細菌轉型並無顯著的差異。然而，將質體置於 Tris-HCl 溶液或 Ligation Buffer 中其轉型作用效果，在相較之下皆有明顯的下滑的趨勢。對此，本組推測，使質體置於 Ligation Buffer 中轉型作用效果不彰的原因應該是受到 Tris-HCl 這種成分的影響。

七、質體(pSV-β-Galactosidase)在不同成分的 Buffer 中細菌轉型效用之實驗結果  
 (一) 實驗八之結果：



圖十七：使用 0.1M Ca<sup>2+</sup> 溶液處理之勝任細胞進行質體置於含 Tris-HCl、MOPS 和 HEPES 三種不同緩衝液其細菌轉型效果之實驗結果的平均與標準差之實驗結果的平均與標準差



圖十八：使用 0.25M Ca<sup>2+</sup> 溶液處理之勝任細胞進行質體置於含 Tris-HCl、MOPS 和 HEPES 三種不同緩衝液其細菌轉型效果之實驗結果的平均與標準差之實驗結果的平均與標準差

溶液種類 成分	H <sub>2</sub> O+ Tris-HCl	H <sub>2</sub> O+ MOPS	H <sub>2</sub> O+ HEPES	Ligation Buffer (Tris-HCl)	Ligation Buffer (MOPS)	Ligation Buffer (HEPES)
H <sub>2</sub> O	45.5	45.5	45.5	24.5	24.5	24.5
Plasmid	17.5	17.5	17.5	17.5	17.5	17.5
Tris-HCl	7	0	0	28	0	0
MOPS	0	7	0	0	28	0
HEPES	0	0	7	0	0	28

附表二：實驗八各溶液成分調配量(單位:  $\mu\text{l}$ )

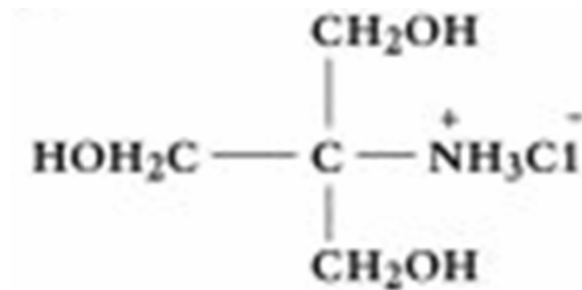
(二) 實驗八之討論：

本組取用了另外兩種分子生物實驗室中常用的 Buffer—MOPS(結構如圖二十)和 HEPES(結構如圖二十一)來進行細菌的轉型實驗。Tris-HCl 於 Ligation Buffer 中的功用為調整溶液之 pH 值，而同濃度之 MOPS 及 HEPES 兩種緩衝液其所能調整的 pH 值範圍皆與 Tris-HCl 十分相近，而且根據資料所示，Tris-HCl、MOPS 及 HEPES 三種緩衝液對 Ligation 的成功率是相當的。因此最初本組預測以此三種 Buffer 進行實驗之結果應當十分相近，但是根據實驗數據，在 0.1M Ca<sup>2+</sup> 溶液及 0.25M Ca<sup>2+</sup> 溶液所製備之勝任細胞下，Tris-HCl 皆會對細菌轉型作用造成不良影響，其效果只有以 MOPS 處理過後的細菌轉型作用的 15%。而以 HEPES 作為緩衝液進行細菌轉型實驗，其細菌轉型作用的效果亦優於 Tris-HCl。

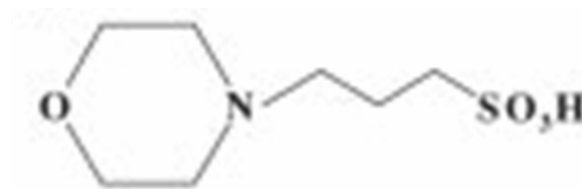
在 pH 值為 7.5 的情況下，Tris-HCl 本身會帶有正電荷，而 MOPS 和 HEPES 則為電中性。由於 Tris-HCl 帶有正電荷，在與含 Ca<sup>2+</sup> 溶液所製備之勝任細胞混合後，混合液中將含有過多的帶正電離子。其對細胞外壁所造成的影響應與過多 Ca<sup>2+</sup> 附著在細胞外壁上所造成的影響相同：分佈過於密集，導致離子間因作用力相互抵消，而無法產生孔隙，進而使得轉型效率不佳 (詳見第 11 頁之推測)。

至於 MOPS 和 HEPES 在 pH 值為 7.5 的情況下為電中性，因此在將之與含

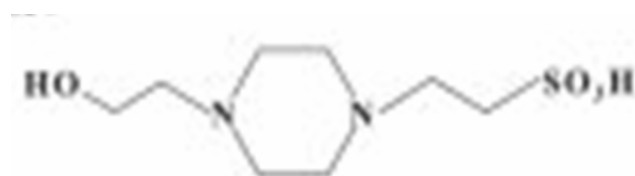
Ca<sup>2+</sup>溶液所製備之勝任細胞混合後，混合液中不會增加額外的帶正電離子，因而不會產生如加入 Tris-HCl 後所產生之影響。



圖十九：Tris-HCl 之結構式



圖二十：MOPS 之結構式



圖二十一：HEPES 之結構式

## 柒、結論

本組將實驗分為兩部份進行：一、將質體置於二次水中並利用  $\text{CaCl}_2$  製備的勝任細胞進行細菌轉型實驗。此方式乃一般分子生物公司用來進行測試細菌轉型作用效果時所使用的方式；二、將質體置於 **Ligation Buffer** 中進行細菌轉型實驗。此種方式是一般進行分子生物實驗時所使用的方式。

將質體置於二次水中進行細菌轉型作用的實驗中本組改變了三個變因。先是以不同的金屬離子製作勝任細胞，找出效果最佳的金屬離子，發現只有 2A 族的金屬可以產生效果，其中又以  $\text{Ca}^{2+}$  處理後的細胞，對質體具有最佳的接受度，其轉型效果遠大於效用第二的  $\text{Ba}^{2+}$ 。推測可能是因為細菌細胞外壁(細胞膜、細胞壁)表面帶有負電荷，因此將細菌和帶有正電荷金屬離子的溶液混合在一起時，帶正電的金屬離子會吸附於細胞外壁上帶負電的部份。其中正 2 價的金屬離子具有同時吸附兩旁帶負電部份的能力，而造成細胞外壁上出現一些較大的孔隙，因此使得質體較容易進入細菌內部，導致轉型作用的效果較為顯著。

然而，並非所有的正 2 價金屬離子(例： $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ )都能有顯著的轉型效果，其原因可能是因金屬離子本身對細菌有害，或是因為造成孔隙後無法使細胞外壁復原而導致細菌死亡，造成轉型效果不佳的結果。

接著，本實驗改變了  $\text{Ca}^{2+}$  的濃度，發現 0.25M 的  $\text{Ca}^{2+}$  溶液對分子量較大的質體(pSV- $\beta$ -Galactosidase)為最佳濃度；而對於分子量較小的質體(pGFPuv)而言，0.2M 的  $\text{Ca}^{2+}$  溶液則為最佳濃度。此結果與參考資料上所記載的以 0.1M 的  $\text{Ca}^{2+}$  溶液進行細菌轉型實驗並不同。

之後藉由實驗的結果發現，質體的分子量大小對於細菌的轉型作用也佔有重要因素，根據實驗推測是因為對於同大小的孔隙，體積較小的質體較容易進入細菌內，以達到最佳的轉型作用效果。

在熱休克的實驗中，本組發現 150 秒的效果最佳，而且過長的熱休克秒數反而會造成不良的影響。推測是由於過長的熱休克秒數使得細胞膜的蛋白質變性進



而導致了轉型作用效果不彰之結果。

另外，就實用性而言，一般實驗者是將質體置於 Ligation Buffer 中進行轉型，但經本實驗發現，其效果並不理想，效用約只有質體置於二次水中進行轉型的八分之一。對此，根據實驗之結果可發現，這是其中一種名為 Tris-HCl 之緩衝液所造成之不良影響。

而在以 0.1M 及 0.25M 的  $\text{Ca}^{2+}$  溶液製備勝任細胞，並將質體置於 Ligation Buffer 中進行細菌轉型作用的實驗中，本組根據實驗所得的結果發現置於 Ligation Buffer 中的質體，其與 0.25M  $\text{Ca}^{2+}$  溶液處理後的勝任細胞混合後進行轉型作用的效果仍優於以 0.1M  $\text{Ca}^{2+}$  溶液處理後的細菌的轉型效果，且甚者可達到三倍的差距。

在接下來的實驗中，本組將 Ligation Buffer 中的 Tris-HCl 以 MOPS 或 HEPES 替代。由實驗結果可發現，以 MOPS 或 HEPES 做替代後的 Ligation Buffer 其質體進行細菌轉型作用的效果為以原 Ligation Buffer(含 Tris-HCl) 進行細菌轉型作用的效果的二至三倍。

然而，現今市面上所販售的 Ligation Buffer 主要的成分大多是 Tris-HCl、 $\text{MgCl}_2$ 、DTT 以及 ATP。另外，一般的分子生物實驗室在進行相關的細菌轉型實驗亦是採用此種 Ligation Buffer 來進行實驗。以往，實驗者總習慣將轉型效果不彰的原因歸咎於各類因素，卻鮮少有人懷疑是 Ligation Buffer 所造成的影響。如今，本組的實驗結果顯示 Tris-HCl 對於細菌的轉型作用有著十分負面的影響，使得細菌的轉型效果不彰而導致一些轉型實驗的失敗。

針對於此現象，本組建議往後分子生物領域在進行相關的細菌轉型實驗時，不妨將常用 Ligation Buffer 的 Tris-HCl 成分改為 MOPS，此舉對於細菌轉型作用可有正向的影響。此外，如果在無法改變緩衝液成分的情況下要得到較佳的細菌轉型作用效果，則可將在 Ligation Buffer 中已完成與外來 DNA 連接的質體利用高效能的管柱純化，再將其置於二次水中，並以 0.25M 的  $\text{Ca}^{2+}$  溶液所製備的勝任細胞進行細菌的轉型實驗。

上述的兩種新方式皆能有效的解決以往置於含有 Tris-HCl 的 Ligation Buffer 中所造成的轉型作用效果不彰的結果。其中又以將質體純化後，再將其置於二次水中並以 0.25M 的  $\text{Ca}^{2+}$  溶液所製備的勝任細胞進行細菌的轉型實驗，其效果較將 Ligation Buffer 中的 Tris-HCl 改為 MOPS 效果為佳。

## 捌、參考文獻

Campbell, N. A. and J. B. Reece, *BIOLOGY PACKAGE, 6<sup>th</sup> Edition*, Pearson Education, Inc., 2002.

Becker, M. B., G. A. Caldwell and E. A. Zachgo, *Biotechnology : A Laboratory Course*, Yi Hsien Publishing Co. Ltd., 1996.

施河等，基礎生物，翰林出版事業股份有限公司，2007。

趙大衛等，生物，翰林出版事業股份有限公司，2008。

施河等，選修生物，翰林出版事業股份有限公司，2008。

## 【評語】 040705

本作品擬探討細菌 Transformation 所運用 Buffer 溶液的應用，這些緩衝液在市售的緩衝液的運用中已非常明瞭，建議作者們應進行更有創意的觀察研究，同時本作品未見任何參考資料。文中提到單價及雙價金屬離子對細菌轉型效果的說法，應再更詳細合理。