

台灣二〇〇五年國際科學展覽會

科 別：微生物學

作品名稱：線蟲捕捉菌 *Arthrobotrys musiformis* 調控捕捉
網之分化及其黏液之基因之選殖和特性界定

得獎獎項：大會獎佳作

學 校：臺北市立第一女子高級中學

作 者：劉翰璇

評語與建議事項：

- 1.能完成 Fosmid library 建立，數據清晰。
- 2.本研究大型之完整研究相關，應加強對整體研究方向材料與實驗方法之瞭解。
- 3.建議未來進行更深入之研究。



我現在就讀於北一女中，對於生命科學有一種莫名的喜愛，不管是上課與閱讀求知或是實驗找答案，總覺得那真是人生最大的樂趣，上了高中之後，加入了數理實驗班，有更多機會接觸到許多熱愛科學的同學與師長，在不同領域裡，大家互相切磋交流，開拓了我的胸襟，高一下時，有機會進入大學的研究室，從另一種不一樣的方式來認識科學，在曾教授以及學長姊熱誠的指導下，在實驗過程中，經歷了大大小小的失敗，嚐到了科學研究的酸甜苦辣，但讓我學習的更多，也更確定自己的研究興趣，我會選擇這一條路，作為一個「科學人」，繼續走下去。

英文摘要

Nematophagous fungi can form different kind of trapping device to trap the nematodes when they show off. They may play a role for control of the plant and animal parasitic nematodes as an alternative choice beside regular practice. We attempt to investigate the adhesive's attributes and the genes that encode trapping structures. Now we have already constructed the *Arthrobotrys musiformis* Fosmid library which will play a vital resource for specific genes analysis, cloning and characterization in the future. We have chosen two genes encoding protease and superoxide dismutase from *Arthrobotrys musiformis*, respectively, and will be used as probes to screen the Fosmid library. The relevant clone(s) will be subject to restrictive enzyme dissection, Southern blotting or even whole Fosmid 40kb DNA fragment sequencing to discover the interesting and paramount genes.

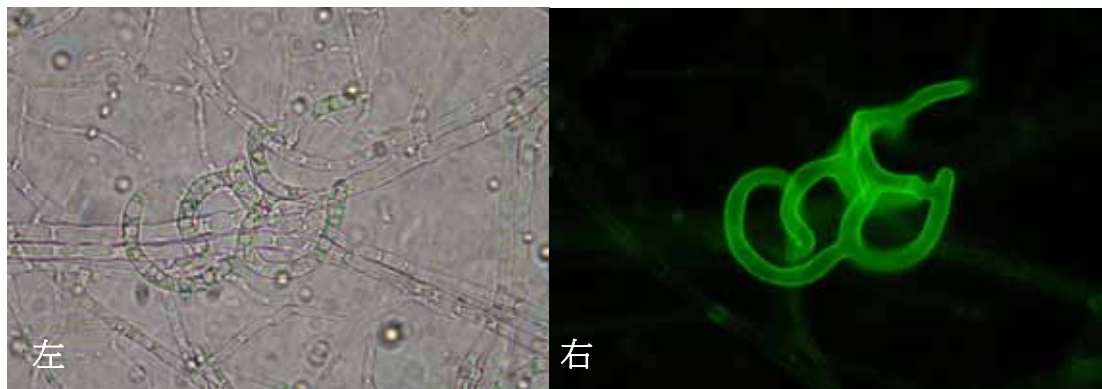
中文摘要

線蟲捕捉菌在線蟲出現時可以產生型態各異的捕捉構造，捕捉或黏著線蟲。它是防治線蟲的另類選擇。本實驗是由生物的分生觀點切入，希望能夠了解線蟲捕捉菌 *Arthrobotrys musiformis* 於捕捉網表面之黏液生化特性以及控制產生捕捉構造的基因。目前已完成建構 *Arthrobotrys musiformis* 之 Fosmid library，並且選擇兩組探針：蛋白質酶(protease)以及超歧氧化酶(superoxide dismutase)，將以 PCR 進行基因探針之 DIG 標定，之後篩檢 Fosmid library，選殖出相關 clone，進行限制酶切割，南方氏雜合特性分析或 40kbDNA 全序列分析，尋找相關基因以利下游實驗工作之進行。

壹、前言

線蟲為植物四大病原之一，常侵染作物造成嚴重之經濟損失，以化學藥劑來消除線蟲，雖然立竿見影成效很大，不過農藥殘存在土壤中造成污染，破壞生態平衡。而在真菌界中，有一類線蟲之天敵——線蟲捕捉菌，其可產生型態各異的捕捉構造，於線蟲出現時，可用以捕捉或黏著線蟲。目前，利用線蟲捕捉菌防治家畜(如牛、羊)寄生線蟲已初見成效，而用於防治植物寄生性線蟲，則受生態逆境影響，其防治效果略遜，但就長遠之生態平衡而論，生物防治仍然是未來有機農業，用以防治線蟲病害之較佳選擇。

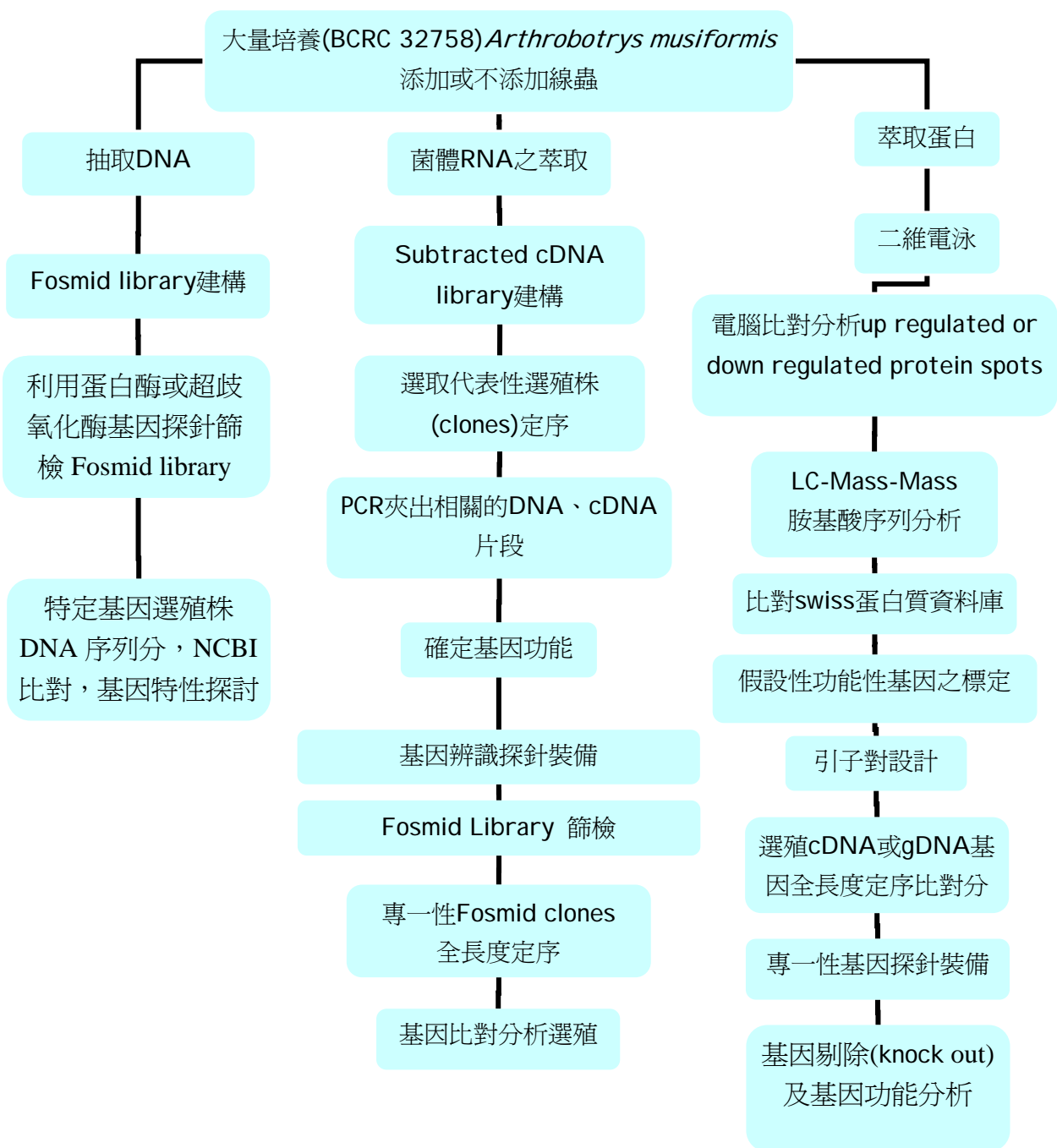
本實驗是希望由生物的分生觀點切入，能夠探討線蟲捕捉菌 *Arthrobotrys musiformis* 於黏著網(圖一)表面之黏液生化特性以及控制產生捕捉構造的基因。



圖一、線蟲捕捉菌 *Arthrobotrys musiformis* 之捕捉網。左圖為光學顯微鏡(光圈 4.8，曝光時間 1/4 秒)；右圖為螢光顯微鏡對應照片(光圈 4.8，曝光時間 1/15)。(宋，2003)

貳、研究方法

主要是從有或無產生捕捉構造之菌體來萃取蛋白質之後跑二維電泳，比較出相異的蛋白質點，將基因組成之氨基解序之後，至 NCBI 資料庫比對是否有類似之胺基酸序列，然後在由胺基酸序列回推至核酸序列，設計探針，選殖相關的 DNA、cDNA 片段，同時建構一 Fosmid library(所插入之 DNA 片段大小大約 40kb)，或應用以完成全序列分析之 *Arthrobotrys musiformis* 之轉入蛋白酶(protease)以及超歧氧化酶(superoxide dismutase)之兩個基因，利用 DIG 標定當為探針可以篩檢所建構之 *Arthrobotrys musiformis* 之 Fosmid library；再設計不同特性之探針篩檢 Fosmid library 之基因庫中的 DNA 片段，如此可以獲悉主要探討基因附近相關 DNA 的序列，可進行更深入的研究。實驗流程如下所示：



一、菌株培養

1. 菌株來源

Arthrobotrys musiformis BCRC32758 為可形成捕捉網的線蟲捕捉菌，係為研究室自土壤分離所得，存放於新竹食品工業研究所之實驗用之菌株，先從保存於-80°C的冷凍保存管中之菌株，於室溫回溫後，移植於馬鈴薯葡萄糖水瓊脂(potato dextrose agar, PDA) 平板培養基上活化，每次大量液態培養前，先接種於鋪有玻璃紙之 PDA 平板培養，每皿接種一點，於 25°C 培養，約五天，菌落即可長滿培養皿，然後將菌絲切割刮下，再接種於 200ml 平底錐形瓶，每瓶接種兩皿之菌絲。

2. 菌體培養

將 *Arthrobotrys musiformis* 接種於以 250ml 之錐形瓶，內裝 100ml 之 PDB(potato dextrose broth, PDB) 培養基，培養 3-5 天；或接種於直徑 9 公分之平板培養皿，每皿含 15-20ml 之 PDA 培養基，培養 4-5 天，所獲之菌絲可供萃取核酸之用。

二、菌體核酸萃取

菌體過濾後以液態氮急速冷凍，再以低溫減壓冷凍乾燥機(lypholizer)抽乾水分，再依據 Al-Samarrai 及 Schmid (2000) 所敘述實驗之方法，略加修飾部份流程後，以萃取菌體之 DNA(附錄一)。

三、Fosmid library 建構

利用 CopyControl™ Fosmid Library Production Kit(Epicentre)建構 *Arthrobotrys musiformis* DNA Library，其詳細實驗流程參考附錄二。

四、以 DIG 標定核酸探針

選取蛋白酶(protease) 以及超歧氧化酶基因(superoxide dismutase) 之片段當為模板，進行聚合酶連鎖反應(polymerase chain reaction)，以 DIG 標定，其詳細實驗流程參照 Rochi 之說明手冊(附錄三)。此兩基因序列請參考圖二。

```
GGTGCAGCTCGGATCCCTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGCCCTTAGCGTGG
TCGCGGCCGAGGTACGCGGGGATCAACGCTTCAAACGGGATCAAAGTTTAGAATGGCAG
AGACATACACCTCCCTCCTCTACCCTATGCTTATAATGCACTGGAGCCATACATATCTTC
CCAGATTATGGAACCTCCACCATTCCAAGCATCACGCAACATACATTGCGAACCTGAACA
AGGCGATTTCTTCCCGAAAGCCGCTAATACCCAATCTCTAATCCACTTCAATGGTGGAG
GACACATCAATCATTCTATATTCTGGAATAACCTCACGCCGGCGGCTTCCGGAGACGCAA
AGCAATCCGCCGCCCATCATTAATTCAAGCCATCGAAAAGGAATACGGCTCCTTTGCTG
ATTTTAAGACCAAGTTCAATGCCGCTCTCTTGGGTATTCAAGGTAGTGGATGGGGCTGGC
TCATCGTTAAGGATGGGAAGTTGGATATTGTGACGACGAAAGATCAAGATACTGTCCCT
GAGGGCACTACAGCAATCTTTGGAGTGGATATGTGGGAGCATGCTTACTATCTTCAGTAC
CTCGGCCGCGACCACGC
```

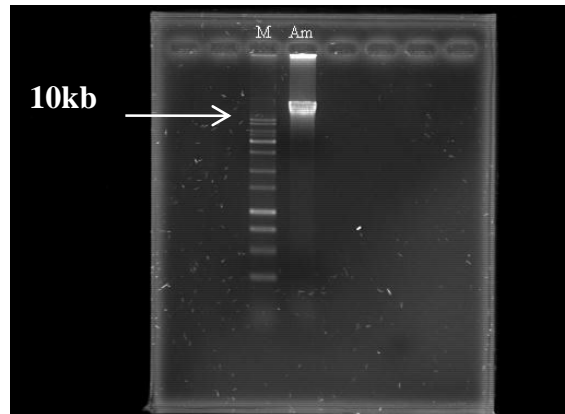
```
TACGATCTCAGAGACTATGCCGCCGTACTTATGATACGACGATACTGCCGCCGGCGC
TGGCACTACCGTCTACGTCATTGACTGTTTTCAGTTTATTAAACATATTATAGGAATTCAAACCGCC
CCTAATATCCCCAGGCGTTTCCAGTTTATTAAACATATTATAGGAATTCAAACCGCC
AATGGAAGTACCGGGCTACCTGGGGATTTAACTCAGTTGACAAGACCGACTCTGACGG
CAATGGTCACGGAACCCACTGCGCCGGTACCATCGCCGAAAGACATACGGTGTGTCTA
AAAAGGCTAAAGTAGTTGCCGTCAAAGTCCTCAGTGCGAGCGGCTCTGGTTCTACTTCTG
GTGTCGTCAACGGAATGAATTGGGTTGCTGAAAATGCCACACCAAAGTTCTCGGTGGCC
AGCATGTCGCTTGGAGGCTCTAAGTTCGACTGTTCTTAATGCCGCTGTTGACGCAATCTTT
AACGCTGGCGTTACTATCGTTGTTGCTGCCGGTAATGAGAGCCAGGACGCTAAGAACGT
CTCGCCAGCCTCTGCTCCCAATGCCATTACCGTAGGCGCTATCGATAGCAGCAACAAGAT
CGCTTCATTCTCTAACTGGGGAAGTCTCATCGACGTT
```

圖二、*Arthrobotrys musiformis* 之蛋白酶部分 DNA 基因序列(上)及超歧氧化酶 cDNA 基因序列(下)。(宋，2003)(曾，2004 未發表)

參、研究結果

一、菌體 DNA 之萃取

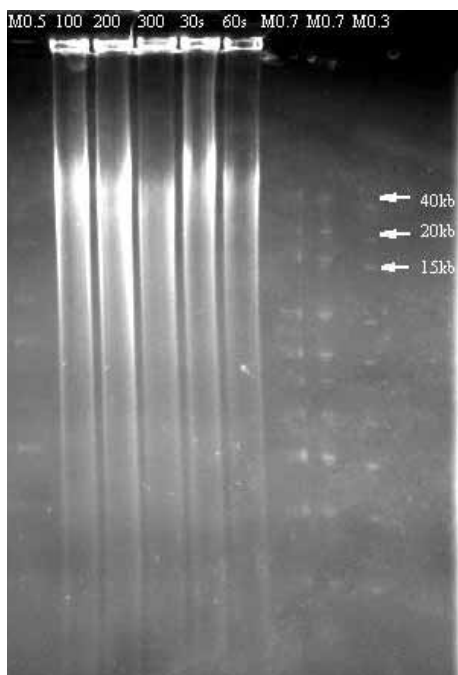
由 *Arthrotrrys musiformis* 菌絲萃取核酸，並用光譜儀在光波長 260/280nm 測量，每 0.5g 之菌絲，可萃取到約 25~30 μ g genomic DNA，其純度介於 1.8-2.0 之間，所得之核酸其純度、濃度皆已符合下游實驗所要(圖三)。



圖三、*Arthrotrrys musiformis* genomic DNA 之大小；每個樣品槽添加 1 μ l 核酸。所標示 M 為 1kb DNA 標幟；*A.m.*為 DNA 樣品。

二、Fosmid library 建構

依據 Epicentre 公司所述之方法建構 Fosmid Library。首先將 DNA 經過微量吸管吸放約 200 次(圖四)，打斷 DNA，獲得長度約 40kb 之 DNA 片段(圖五)，再將其末端以 4 μ l End-Repair 酶修飾(圖六)，並將其粘接到 Fosmid 載體(CopyControl pCC1FOS Cloning-Ready Vector)，以蛋白披覆建構具感染力之噬菌體，再以其感染 *E. coli* (EP1300)，並均勻塗佈於加有抗生素 chloramphenicol, 12.5 μ g/ml 之 LB plate 上，檢測轉型之成功率，並進行稀釋，測量噬菌體(表一)(圖七、圖八)。抽取轉型後 *E. coli* 之質體 DNA，以限制酶 NotI 進行酵解已確定每個載體確實有長 40kb 之 *A.m.* DNA 片段 (圖九)。

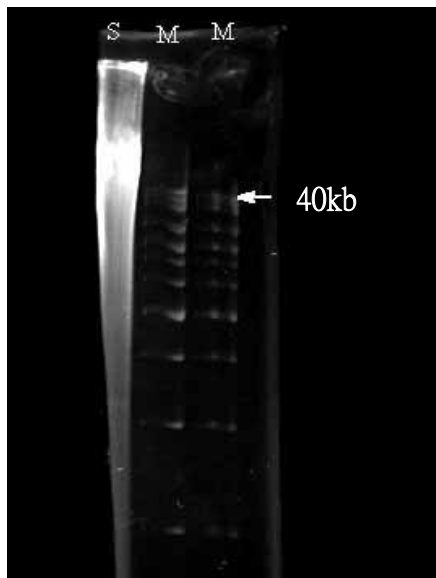


圖四、*Arthrotrrys musiformis* 核酸以微量吸管吸取或以 vortex 震盪，以打斷 DNA 後電泳測定其長度。電泳條件：30v30hr 之電泳；處理別，由左至右：

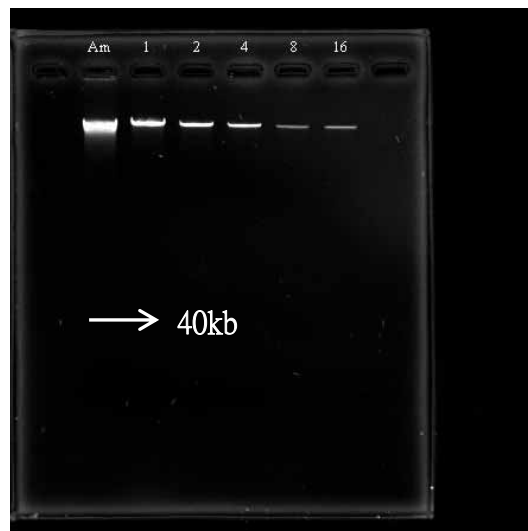
- 第一列-吸放約 100 次
- 第二列-吸放約 200 次
- 第三列-吸放約 300 次
- 第四列-vortex 震 30 秒
- 第五列-vortex 震 60 秒

M0.5-1kb extension 標幟 0.5 μ l

M0.7-1kb extension 標幟 0.7 μ l



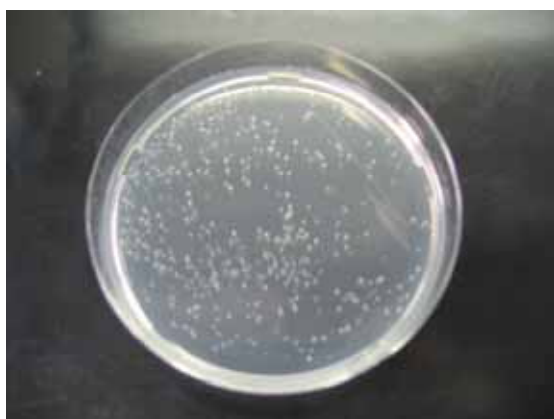
圖五、選擇適當大小之 *Arthrobotrys musiformis* 核酸片段之對照電泳圖。電泳條件：30v30hr；處理別：M 為 1kb extension 標幟 loading 0.7 μ l、S 為樣品 loading 20 μ l。



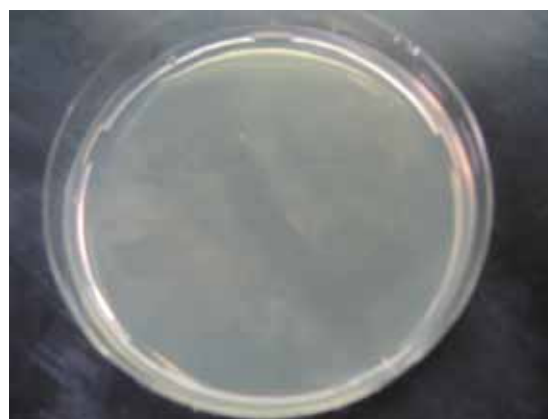
圖六、*Arthrobotrys musiformis* 約 40kb 大小之核酸片段經酵素修飾後，並經不同序列稀釋後之電泳圖。電泳條件：30v/30hr；處理別：A.m.為樣品 loading 1 μ l、1、2、4、8、16 為 T7 DNA Size 標幟系列稀釋 (1x、2x、4x、8x、16x)

表一、轉型後之 *E.coli*，不同系列稀釋所得之菌落數

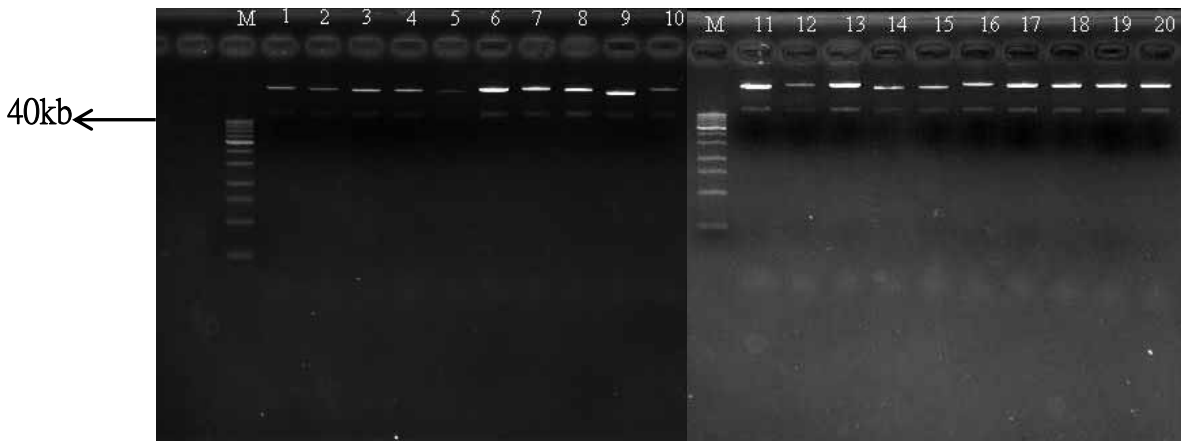
試驗別	稀釋/菌落數				
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
試驗一	412	74	9	1	0
試驗二	518	54	14	0	0



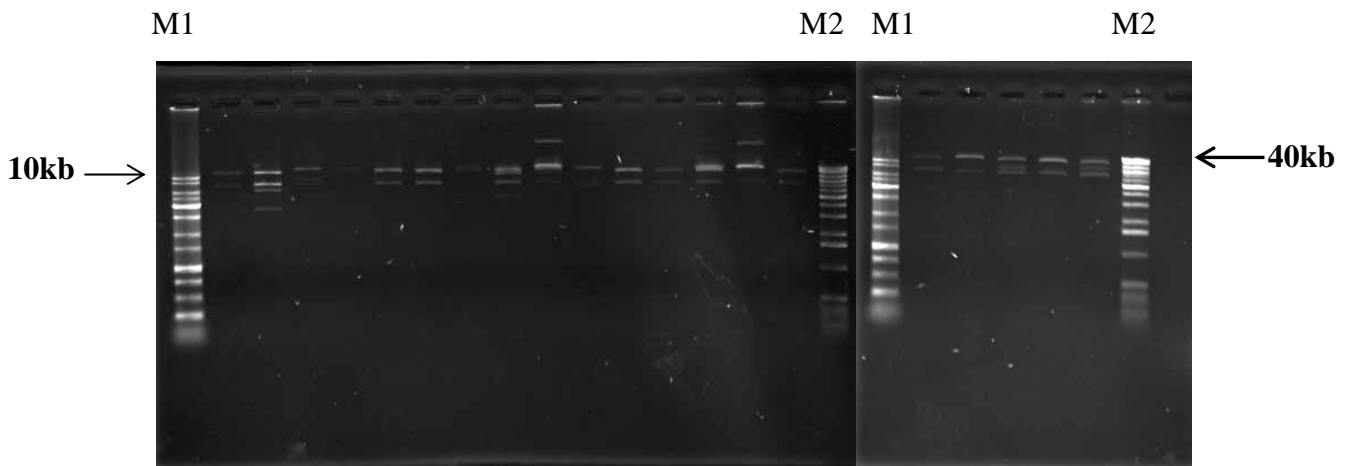
圖七、*E.coli* 轉型株稀釋 10^{-1} 之菌落數：412



圖八、*E.coli* 轉型株稀釋 10^{-4} 之菌落數：1



圖九、轉型成功之 *E. coli* (EP1300) 轉型株(編號 1-20) 萃取質體後之電泳圖。電泳條件：55V50 分鐘；處理別：M 為 1kb 標幟 loading $1 \mu\text{l}$ 、每個樣品槽 loading $3 \mu\text{l}$ 。



圖十、轉型成功之 *E. coli* (EP1300) 轉型株(編號 1-20) 以限制酶 *NotI* 進行酵解，再進行電泳以確定 CopyControl 以及所嵌鑲 *Arthrotrrys musiformis* 長約 40kb 之 DNA 片段。電泳條件：100V25 分鐘；處理別：M1 為 1kb 標幟 loading $1 \mu\text{l}$ 、M2 為 1kb extension 標幟 loading $1 \mu\text{l}$ 、每個樣品槽 loading $3 \mu\text{l}$ 。

肆、討論

一、菌體 DNA 之萃取

1. 在第一次加入 lysis buffer 和 5M NaCl 時，必須確定冷凍菌絲粉末與 buffer 有完全混合均勻，如此之後所萃取之 DNA 的量才不會過少。
2. *A.m.* 不同培養時間回收菌絲，萃取 DNA 時，可能因為培養條件不同，離心後最上層會有異色色素，所以在吸取上清液時要小心吸取，否則之後蛋白質和醣類會不易處理。

- 3.最後要以 TE 緩衝液溶解 DNA 時，假如有白色的沉澱，可先以 10000rpm 離心 1 分鐘，輕敲管壁使沉澱物中 DNA 溶出，然後吸取上清液，經過此步驟後，DNA 的質、量較佳

二、Fosmid library 建構

1. 再選擇適當大小的末端修飾 DNA 時，爲了確保 DNA 的回收量，因此除了切下 marker lane，兩邊也都各留一 sample 以接近真實電泳的情況。
- 2.配置 Phage Dilution Buffer 時，最後酸鹼值的校正，必須非常精確，否則最後 phage particle 包裝的效果很差。
- 3.實驗中使用的 *E. coli* 其生長期最好是不要放超過 24 小時，否則活性較差會影響 phage particle 包裝的效率。
- 4.利用限制酶 NotI 酵解後的 *E. coli* (EP1300)之質體 DNA 片段，會有一個 40kb 和 8kb 左右的 DNA 片段，而假如嵌入之 40kbDNA 片段剛好也有相同的限制酶切位，可能被限制酶切割兩次以上，所以會有更小的片段。
- 5.在經 CopyControl Fosmid 轉型的 *E. coli* clones 之質體 DNA 和 *E. coli* 之質體 DNA 以限制酶 NotI 進行酵解之電泳圖中，可以看到有一大於 40kb 的 DNA 片段，由於 marker 選擇時沒有注意，所以無法辨認大小，將會再用適當的 marker 進行電泳，再一次確認。

伍、結論與展望

目前已完成線蟲捕捉菌 *Arthrobotrys musiformis* 之 Fosmid library 之建構，並送往食品工業研究所進行 colonies 之點選，每張尼龍膜將點上 7000 個 colonies，做爲後續 colony hybridization 之用。目前已選擇兩組探針，分別爲線蟲捕捉菌 *Arthrobotrys musiformis* 之蛋白質酶(protease)以及超歧氧化酶(superoxide dismutase)的基因探針，將以 PCR 進行基因探針之 DIG 標定，之後將會進行南方雜合，選殖出相關 clone，再做進一步的分析註解此 40kb DNA 上之基因以及特性分析。

陸、參考文獻

- 宋惠菁。2003。線蟲捕捉菌 *Arthrobotrys musiformis* 黏著物質及其相關基因之研究。國立台灣大學植物病理研究所碩士論文。
- 曾顯雄、劉俊楊、劉桂郁、袁國芳。1997。台灣產線蟲捕捉菌圖譜。財團法人食品工業研究所。
- Al-Samarrai, T. H. , and Schmid, J. 2000. A simple method for extraction of fungal genomic DNA. *Lwt. Appl. Microbiol* 30:53-56

柒、附錄

附錄一：菌體 DNA 之萃取

依據 Al-Samarrai 及 Schmid (2000) 所實驗之方法，略加修飾部份流程後，以萃取菌體之 DNA。其簡化之流程如下：

1. 利用液態氮將 0.5g 之冷凍乾燥菌絲，研磨成細緻之粉末，置放於 50 ml 之離心管中；隨後加入 lysis buffer，以 1000 μ l 之 micropipet 緩慢吸放。
2. 加入 80 μ l 的 RNase A 於 50 ml 離心管中，37°C 下處理。
3. 加入 5M NaCl，充分搖晃混合均勻，離心 20 分鐘。
4. 吸取上清液到乾淨之 50 ml 離心管中，再離心 30 分鐘。
5. 吸取上清液到乾淨之 50 ml 離心管中，再加入等倍體積的 phenol / chloroform (1:1) 混合液，溫和的均勻搖晃，離心 20 分鐘。
6. 將上清液移至新的 50 ml 離心管中，與等倍體積的 chloroform 充分混合均勻，再次離心 10 分鐘。
7. 吸取上清液至新的 50 ml 離心管中，加入 2 倍體積的 95% ethanol，溫和的翻轉，離心 10 分鐘，使 DNA 沉澱聚集於離心管壁。
8. 倒除上清液，再次加入 lysis buffer，溫和的吸放。加入 165M NaCl，充分混合均勻，後加入等倍體積的氯仿充分混合均勻，離心 20 分鐘。
9. 吸取上清液至滅菌之 eppendorf，加入 2 倍體積的 95% ethanol，溫和的混合，離心 5 分鐘，使 DNA 充分沉澱。
10. 移除上清液，以 70% 的冰乙醇清洗沉澱物，離心 3 分鐘，共流洗 3 次。乾燥後，加入 TE buffer 於 eppendorf，使 DNA 充分的溶解於 TE buffer 中，將 DNA 保存於 -20 °C 以供備用。
11. 將 DNA 進行分光光譜儀 (Gene Quant Pro, Amersham Pharmacia Biotech) 測定 DNA 之濃度及純度，並以電泳分析 DNA 片段的大小。

附錄二：Fosmid library 的建構

A 打斷 DNA

使用 T7 DNA size marker

以 TE buffer 調整 DNA 濃度至 0.5 μ g/ μ l，取 2.5 μ g~20 μ g DNA，以 200 μ l yellow-tip 進行 pipeting 約 200 次即可打斷 DNA。分別取 1-2 μ l 斷裂 DNA 及 1 μ l T7 DNA size marker，利用 20 公分 agarose gel 進行電泳，30V 電泳 30 小時。

B DNA 末端修飾

使用 End-Repair 混合酵素和 10×Buffer、dNTPs 和 ATP

將以下試劑置於冰上融化後，混合均勻，在冰上加入以下項目：

X μ l 無菌水

8 μ l	10 \times End-Repair Buffer
8 μ l	2.5mM dNTP
8 μ l	10mM ATP
Y μ l	斷裂的 DNA (最多 20 μ g)
4 μ l	<u>End-Repair 混合酵素</u>
80 μ l	Total reaction volume

置於室溫下，反應後於 70°C 處理，以終止 End-Repair 混合酵素。進行步驟 C。

C 選擇適當大小的末端修飾 DNA

使用 T7 DNA size marker

配置 20 公分長 0.8% 低熔點 agarose gel (agarose gel Low melting point)，loading 所有 DNA samples (約 15 μ g/well) 及 1 μ l T7 DNA Size Marker，同樣以 agarose gel 封 well 後，30V 電泳 30 小時。切下 marker lane，以 EtBr 染色後，置於 UV 下觀察。以 tip 標出 marker 所在位置。將 marker 與 samples 所在膠片拼合，切下 marker 所在位置及上方 2-4mm 之 DNA samples。將膠塊置於 15ml 離心管，進行步驟 D 或於 -20°C 至 4°C 可保存一年。

D 取出膠裡的 DNA

使用 GELase 50 \times Buffer、GELase Enzyme

以 45°C 預熱 GELase 50 \times Buffer。將切下的膠塊稱重，以 70°C 水浴融化膠塊，迅速移至 45°C，將膠液分裝至小離心管，並加入 GELase 50X Buffer。每 0.1g 膠塊加入 1 μ l GELase Enzyme，置於 45°C 三小時。移至 70°C 處理以終止 GELase enzyme 反應。將融化液體吸至滅菌的 eppendorf 冰浴。離心 20 分鐘以沉澱任何不溶性寡糖類。將 9 上清液移至新的 eppendorf。

加入 1/10 體積的 3M sodium acetate (醋酸鈉) 並小心混合，再加入 2.5 倍體積酒精，翻轉使混合，置於室溫處理。離心 20 分鐘以沉澱 DNA。移除上清液，使用 70% cold ethanol 清洗 DNA 沉澱二次。風乾 DNA 5-10 分鐘後，以 TE buffer 懸浮。

配製 T7 DNA Size marker 系列稀釋 (1 \times 、2 \times 、4 \times 、8 \times 、16 \times)，取 1 μ l DNA sample，以 0.8% 十公分 agarose gel 電泳 50V 50 分鐘，估計 DNA sample 濃度。

E 把 DNA 連到載體上

使用快速連結 10 \times Ligation Buffer、快速連結 DNA Ligase、ATP、CopyControl pCC1FOS Cloning-Ready Vector

一個 ligation reaction 可產生 10³-10⁶ clones。先以下列公式計算所需 clones 數目，再進行 ligation reaction：

$$N = \ln(1-0.99) / \ln(1 - \frac{40\text{Kb}}{\text{sample genome size}}) = \text{clones}$$

混合以下項目，於室溫下處理：

X μ l	無菌水
1 μ l	10×快速連結 Ligation Buffer
1 μ l	10mM ATP
1 μ l	CopyControl pCC1FOS Vector (0.5 μ g/ μ l)
Y μ l	濃縮的要插入 DNA (0.25 μ g of ~40 Kb DNA)
1 μ l	快速連結DNA Ligase
<hr/>	
10 μ l	全部反應體積

移至 70°C 處理以終止 Fast-Link DNA Ligase 的反應。進行步驟 F 或保存於 20°C。

F 包裝 CopyControl Fosmid Clones

使用 MaxPlax Lambda Packaging Extracts、EP1300 Plating Strain (即 *E. coli*)

前處理：

以接種環沾取 EP1300 Plating Strain cells，塗抹於 LB plate，置於 37°C 培養，保存於 4°C。進行步驟 F 前一天，挑取 single colony 置於 10ml LB + 10mM MgSO₄ 震盪培養 37°C 隔夜。取前一天培養的菌液 100 μ l 加到 10ml LB + 10mM MgSO₄ 震盪培養 37°C 約 4 小時，測 OD₆₀₀ = 0.8-1.0 之間即可保存於 4°C 備用。

每個 ligation reaction sample 取一管 MaxPlax Lambda Packaging Extracts，於冰上融化後，取出 25 μ l (約一半量) 到冰上另一支 eppendorf，將其中一支放回 -70°C。加入 10 μ l ligation reaction 至冰上的 25 μ l MaxPlax Lambda Packaging Extracts，pipeting 數次使混合，避免產生任何氣泡，快速離心數秒。於 30°C 培養 90 分鐘，加入另一半 25 μ l MaxPlax Lambda Packaging Extracts，同樣於 30°C 培養 90 分鐘。培養後，加入 Phage Dilution Buffer 至 1ml 並混合均勻。加入 25 μ l chloroform (三氯甲烷)。混合均勻後保存於 4°C。保存於 phage particles 可保存數週。

G Titering the Packaged CopyControl Fosmid Clones

以 Phage Dilution (稀釋噬菌體的) Buffer 序列稀釋 packaged phage 為 10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶ 倍，各取 10 μ l 稀釋液與 100 μ l EP1300 cells 混合於 37°C 培養。塗抹於 LB + 12.5 μ g/ml chloramphenicol，於 37°C 隔夜培養。計算長出的 colonies 數目，計算 cfu/ml。

* 菌體包裝質體效率的計算

估計 cfu 總數，求出 cfu/ μ g 40kb DNA，即為 packaging efficiency。

* 菌體包裝到有用質體效率的計算

任取數個 colonies，分別利用步驟 I 大量培養後，抽取質體 DNA 進行電泳。由於 fosmid pCC1FOS 全長只有約 8.1kb，若插入 40kb DNA 成功，則 size 大

增，可由電泳明顯分辨，則可求出 recombination efficiency。

H Plating and selecting the CopyControl Fosmid Library

根據步驟 G 的結果，將 phage particles 稀釋至適當倍數，每 10 μ l 稀釋 phage particles 與 100 μ l EP1300 cells，於 37°C 培養。將感染的 EP1300 塗抹於 LB + 12.5 μ g/ml chloramphenicol plate，於 37°C 培養，以 colony hybridization 篩選目標 clone。

I Induction of the CopyControl Fosmid Clones to High Copy Number

在 15ml 離心管配置 5ml LB + 12.5 μ g/ml chloramphenicol，將目標 clone 懸浮其中，於 37°C 培養。依下表將培養液、新培養基及 CopyControl Induction Solution 混合：

總體積	新培養基 (LB + 12.5 μ g/ml chloramphenicol)	隔夜培養液	1000 \times CopyControl Induction Solution
1ml	800 μ l	200 μ l	1 μ l
5ml	4.5ml	500 μ l	5 μ l
50ml	45ml	5ml	500 μ l

於 37°C 震盪培養，則每個 cell 內的 fosmid 會由 single copy 變為 10-50 copies。離心收集 EP1300 cells 就可抽取 DNA。

J Plasmid 抽取

*實驗使用 Promega 的 Wizard *Plus* SV Minipreps*

1. 室溫下離心 30 秒，再將上清液去掉
2. 加入 cell suspension solution，短暫震盪，使細胞完全懸浮
3. 加入 cell lysis solution，並上下翻轉數次以混合均勻，靜置 5 分鐘
4. 加入 Alkaline protease solution，上下翻轉數次以混合均勻，在室溫下靜置 5 分鐘
5. 加入 Wizard *Plus* SV Neutralization solution，並上下翻轉數次，以混合均勻，於室溫下離心 20 分鐘
6. 組裝 Spin column 及 collection tube，將澄清液移至 Spin column，於室溫下離心 1 分鐘
7. 去掉 collection tube 澄清液，再於 Spin column 加入 column wash solution，於室溫下離心 1 分鐘
8. 去掉 collection tube 澄清液，再於 Spin column 加入 column wash solution，於室溫下離心 2 分鐘

- 9.將 Spin column 移至新的離心管，以 LABCONCO 冷凍乾燥機進行真空離心
- 10.加入 Nuclease-free water，靜置 5 分鐘，於室溫下離心 1 分鐘(此步驟重複兩次)
- 11.65°C 水浴處理
- 12.保存於-20°C

K 限制酶醇解

1.混合以下溶液

18.45 μ l	無菌水
3 μ l	RE10 \times buffer
0.3 μ l	BSA(10 μ g/ μ l)
8 μ l	DNA
0.25 μ l	NOT 1(restriction enzyme)
<hr/>	
30 μ l	全部反應體積

- 2.室溫下離心 30 秒
- 3.37°C 水浴處理，以終止 enzyme 反應
- 4.跑 0.8% agarose gel，100v，25 分鐘

附錄三：pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems (-20°C or -70°C)

製備 blunt end PCR product

1.將以下各項混合，於 70°C 反應 15-30 分鐘。

Blunt end PCR product	1-7 μ l
10 \times PCR reaction buffer with MgCl ₂	1 μ l
dATP	X μ l
Taq DNA polymerase	5 unit
Deionized H ₂ O	Y μ l
總體積	10 μ l

計算 Insert 所需用量

一般 insert PCR product: pGEM®-T Easy Vector 介於 3:1 至 1:3 之間皆可用。計算公式如下：

$$\text{ng of vector} \times \text{kb size of insert}$$

$$\text{kb size of vector} \times \text{insert: vector} = \text{ng of insert}$$

與 pGEM®-T Easy Vector 連接

2.快速離心裝有 pGEM®-T Easy Vector 及 Control DNA 的離心管，使 vector 及 DNA 集中到管底。

以 pipeting 均勻混合下列各項後，於室溫反應：

Standard	Positive	Background	
2xRapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligase	5 μ l	5 μ l	5 μ l
pGEM®-T Easy Vector (50ng)	1 μ l	1 μ l	1 μ l
PCR product	N μ l	-	-
Control Insert DNA	-	2 μ l	-
T4 DNA Ligase (3 Weiss units/ μ l)	1 μ l	1 μ l	1 μ l
Deionized H2O to a final volume of	10 μ l	10 μ l	10 μ l

3.製備培養基

a. LB plate with ampicillin/IPTG/X-Gal

LB plate with ampicillin: LB agar 冷卻至 50°C 時，加入 ampicillin 100 μ g/ml。

IPTG stock (0.1M) : 0.12g/ 5ml

X-Gal stock: 0.1g 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside / 2ml N, N'-dimethylformamide, 保存於-20°C

LB plate with ampicillin/IPTG/X-Gal: 在配製好的 LB plate with ampicillin，再加入最終濃度 0.5mM IPTG 及 80 μ g/ml X-Gal，再倒 plates。或在已倒好的 LB/ampicillin plate 上平塗 100 μ l 的 IPTG stock 及 20 μ l X-Gal stock，於 37°C 處理後即可使用。

b. SOC medium

2M Mg²⁺ stock: 每 ml 含 0.2033g MgCl₂ · 6H₂O、0.2465g MgSO₄ · 7H₂O。

2M glucose: 每 ml 含 0.3604g glucose。

SOC medium: 取 0.2g Bacto-tryptone

0.05g Bacto-yeast extract

0.00585g NaCl

0.0074g KCl

- 4.加水到 9ml，滅菌後加入 100 μ l 的 2M Mg²⁺ stock 及 2M glucose，再加水到 10ml。
- 5.離心步驟 4 的離心管。取 2 μ l ligation reaction 到置於冰上的無菌 eppendorf，加入 0.1ng uncut plasmid（非 pGEM®-T Easy Vector）另一支置於冰上的 eppendorf 作為轉殖步驟的對照組。
- 6.從-70°C 取出 JM109 High Efficiency Competent Cells，置於冰上待融化。輕彈管壁以均勻混合細胞。
- 7.小心取 50 μ l 大腸桿菌細胞到每支步驟 a 的 eppendorf，輕彈管壁以混合均勻。將 eppendorf 置於冰上 20 分鐘後，於 42°C 水浴 45-50 秒。
- 8.分別加入 950 μ l 及 900 μ l 已回溫至室溫的 SOC medium 至實驗組及轉殖對照組的 eppendorf，於 37°C 震盪培養。
- 9.取出 100 μ l 平塗於 LB/ampicillin/IPTG/X-Gal plates。轉殖對照組則以 SOC medium 稀釋 10 倍後再培養。
- 10.於 37°C 隔夜培養。