

臺灣二〇〇六年國際科學展覽會

科 別：微生物學

作品名稱：線蟲補捉菌 *Arthrobotrys musiformis* 黏液相關基因之選殖與功能界定

得獎獎項：第三名

學校 / 作者：臺北市立第一女子高級中學 郭宇如
臺北市立第一女子高級中學 宋 昱

作者介紹



我是郭宇如，就讀北一女中數理資優班二年級；平常喜歡閱讀各式書籍：張曉風的散文、泰戈爾的詩集還有各式的科普叢書；熱愛美食，夢想可以吃遍世界各地的美食；嚮往大自然的美：海的廣闊、山的高聳、雲的嫵媚、樹的婀娜；任何自然的事物都是我眼中「美」的意象。

國中時期就熱愛科學研究，曾參加過兩次科展，透過做科展的過程發現生物有趣的一面，從此十分喜愛生物，特別是微生物；微生物就像一件件袖珍的藝術品，雖然微小卻有著神奇巧妙的美，總能讓我大開眼界。從事研究的過程雖然辛苦，常常會遭遇許多挫折失敗，但是失敗的過程中往往可以獲得讓我意想不到的收穫，而且透過這個過程也讓我學習到如何面對挫折，讓我看事情的角度更加寬廣；同時透過做研究的過程，也讓我學習到嚴謹、持之以恆的科學精神；科學研究對我而言不僅是增加學科知識的管道，更是培養人格的最好途徑。

我相信，任何事只要持之以恆的努力、有恆心、有毅力，再怎麼困難、再怎麼不可能的事都會有成功的一天！

作者介紹



我的名字是宋昱彤，目前就讀北一女中數理資優班二年級，對於科學領域有著很強的好奇心，從小喜歡閱讀有關科學的書籍，例如：牛頓雜誌、科學人期刊，對於科學研究的嚴謹以及實驗精神深感佩服，希望自己也能效法。

在高二進入生物專研之後，為配合教育部基礎科學資優人才培育計畫，每個星期固定在專研時間以及週末到台大的應用真菌實驗室做線蟲捕捉菌的研究，將近一年的投入下來，我們的研究有了很初步的成果；除了做研究，在台大的這段時間也和一起做實驗的夥伴一字如一共同閱讀了很多相關資料以及書籍，在「生物」這門浩瀚無涯的學科裡奮力游向岸邊，我們學到了很多實驗技巧還有知識，還有和實驗室裡的學長姊們請教討論後，得到很多寶貴的啟示；對於這樣的機緣，我深深的感謝每一個提拔我的人，包括我的指導教授－曾顯雄教授，學校裡的生物老師－林英子老師、胡苓芝老師以及實驗室的學長姐們。

並不是期望獎項，抑或增添科學界的些微光輝，只是期許這樣一個難得的生命經驗，能夠充實我們的生活。這些日子以來不僅僅是加快實驗腳步，更學到了將自己的成果呈現出來的許多知識，在經歷過熬夜趕報告、做實驗做到廢寢忘食這些令人難忘的日子後，在笑與淚之間，僅將我們研究出的這些成果，藉由展覽分享出來，讓所有人能都能感受到這份屬於科學精神、屬於一個青衿學子的夢想追求的實驗作品！

摘要

線蟲捕捉菌 *Arthrobotrys musiformis* 是一種可經線蟲誘導產生捕捉網來捕捉線蟲的真菌，本實驗即針對 *A. musiformis* 的捕捉網黏液相關基因：Manosyltransferase (AH73), β -1,3-glucan transferase (AH102), fimbriin (AH121) 及 mannose-specific lectin precursor (AH338) 進行選殖與功能界定，希望建立這方面的研究基礎，將來能應用在松材線蟲的生物防治上。首先我們大量培養 *A. musiformis*，萃取菌絲體的 DNA；接著進行聚合酶連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR)，利用專一性引子對 (primer) 大量增幅 AH73、AH102、AH121 及 AH338 之基因片段；增幅後的產物經過純化、選殖，定序並進行分析比對，確認增幅之序列無誤後，以 Digoxigenin (DIG) 標示當為探針，篩檢 *A. musiformis* 的 Fosmid Library；目前已成功選殖出 AH73 之可能基因，完成 AH73 之探針製備，並以其篩檢 *A. musiformis* 的 Fosmid Library；呈雜合正反應之選殖株 (clones) 將以散彈槍方法 (shotgun) 定序，作序列組合，探索相關的基因；接下來用 Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) 做出互補 DNA (complementary DNA, cDNA) 全長度後；最後建構基因缺失株，驗證此基因所調控的生理以及生化機能。

Abstract

Nematode trapping fungus *Arthrobotrys musiformis* can capture nematodes by producing adhesive nets when nematodes go through. Many kinds of nematodes, including pine wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*), can be captured. Pine wood nematode causes serious pine wood disease. Therefore, *A. musiformis* has the potential of biocontrol in pine wood nematode. Our research focused on adhesion and adhesive relevant genes of *A. musiformis*: Manosyltransferase (AH73), β -1,3-glucan transferase (AH102), fimbriin (AH121), and mannose-specific lectin precursor (AH338). We try to clone these genes and carry out functional analysis. In order to achieve this goal, we used specific primers derived from previously obtained complementary DNA (cDNA), by Polymerase Chain Reaction (PCR) to amplify these genes and gained adequate quantity of genomic DNA products. After sequencing and verifying of the identity of the genomic DNA, we use Digoxigenin (DIG) to label them and use them as probes to screen the constructed *A. musiformis* Fosmid Library. Currently, the Southern colony hybridization is undergoing. The positive Fosmid clones against the specific probes will be sequenced completely by shotgun library to monitor the existence of adhesion related gene cluster. After working out the full length cDNA of these genes, we will use them to construct replacement vectors to knockout the adhesion related genes, creating mutants and further verify their functions through genotype or phenotype bioassay.

壹、前言

線蟲捕捉菌 *Arthrobotrys musiformis*，可以產生具三度空間之黏著網 (adhesive nets) (圖一)；此黏著網通常會被線蟲誘導產生，其表面披覆黏液，故可以黏附捕捉路過之線蟲 (圖二)，並侵染寄生，破壞其組織器官，吸取其養分。據以往之研究顯示，此菌可以捕捉之線蟲種類繁多，其中包括在臺灣危害松樹，造成松林幾乎滅絕，惡名昭彰之松材線蟲。故就學理而言，此等線蟲之真菌性天敵，具生物防治潛能，而其如何形成捕捉網或如何捕捉線蟲等有關之基因之調控機制，也是頗富旨趣，深值探討。台大植物病理微生物學研究所應用真菌實驗室過去的研究已找出一些可能與 *A. musiformis* 的捕捉網黏液有關的 cDNA 序列，本實驗即針對其中的四個基因：Manosyltransferase (AH73)， β -1,3-glucan transferase (AH102), fimbrin (AH121), 及 mannose-specific lectin precursor (AH338) 進行選殖與功能界定；希望能藉由這方面的研究，對其黏著機制或將來應用在防治線蟲病害及一些相關的生物防治有學理上之依據。



圖一、*A. musiformis* 黏性捕捉網

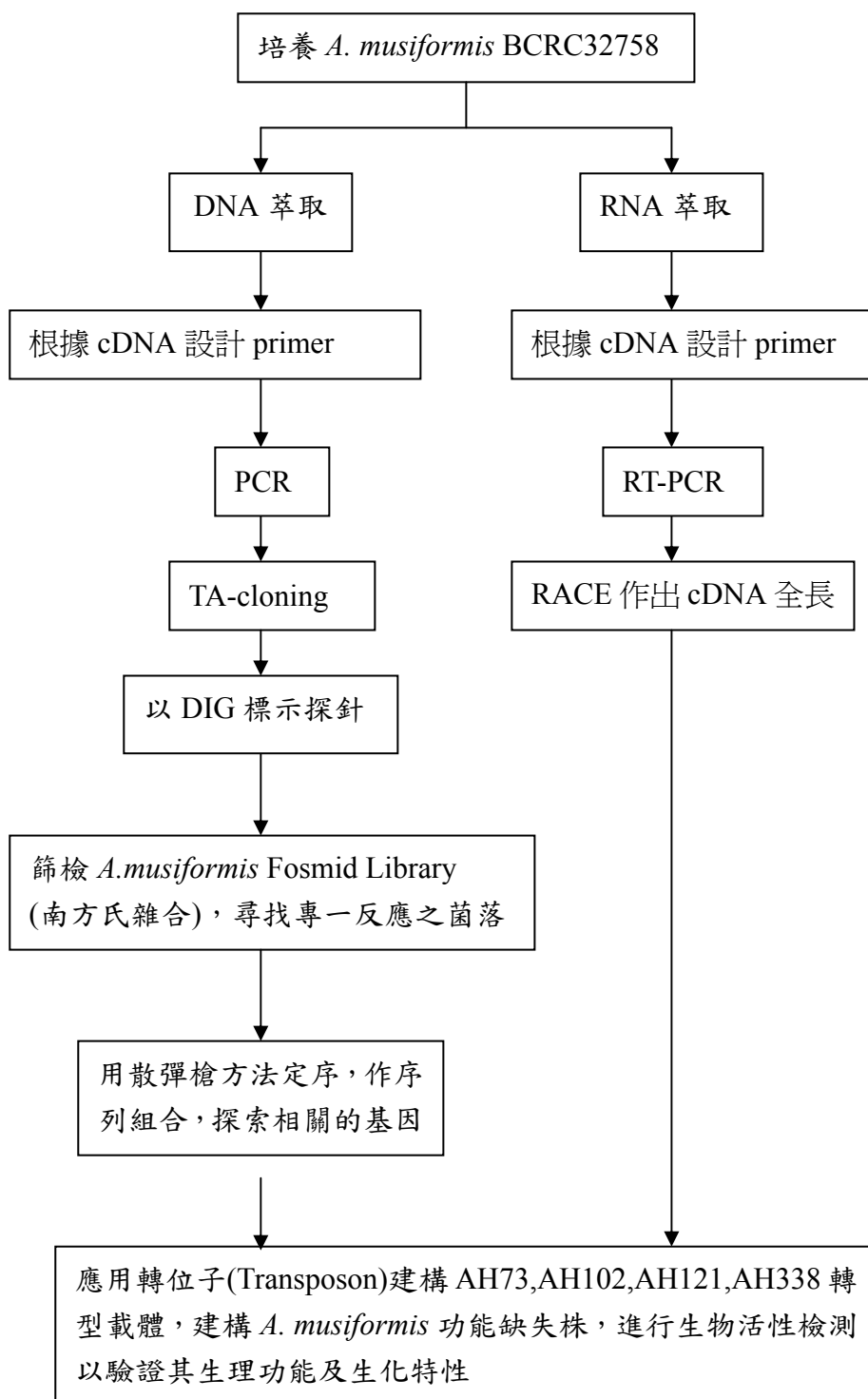


圖二、被捕捉網捕捉住的線蟲 (曾，1997)

貳、研究方法

本研究試驗，依循所設計之流程圖 (圖三) 循序進行。首先以馬鈴薯葡萄糖液態培養基 (Potato Dextrose Broth, PDB) 在室溫下大量培養 *A. musiformis* BCRC32758，約於 7-10 天後進行菌體 DNA 之萃取，以獲得 *A. musiformis* 之 genomic DNA；再由本研究室先前已建構之扣減式基因資料庫 (subtracted cDNA library) 以及上 NCBI (National Center of Biotechnology Information) 之基因資料庫網站比對，所獲得可能與 *A. musiformis* 黏著網黏液有關之基因的 cDNA 序列，以其為依據設計專一性引子對，利用聚合酶連鎖反應大量增幅特定基因，將增幅出的片段切膠，通過 GFX column 過濾吸附的方式進行純化，純化後的產物即可進行 TA-cloning，挑取轉殖成功的 clone 定序；複核確定無誤後，再以 DIG 標定作為探針，用之篩檢 *A. musiformis* Fosmid library，來獲取呈正反應之菌落；之後將以散彈槍方法建構之基因資料庫定序，組合鑑別相關之基因序列；再來進行 RACE，作出 cDNA 之全長；最後以轉位子或其他方法來將 *A. musiformis* 轉型，建構功能缺失株，並進行生物活性檢測，驗證 AH73, AH102, AH121 及 AH338 之生理功能與生化特性。

圖三：實驗流程



一、 菌種

本實驗所使用的 *A. musiformis* BCRC 32758 是台大植物病理與微生物學研究所應用真菌實驗室自土壤分離純化所得，保存於新竹食品工業研究所生物資源保存及研究中心 (BCRC)。首先將先前保存於本研究室低溫冷凍櫃 (-80°C) 的 *A. musiformis* 菌種活化，接於馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基 (Potato Dextrose Agar, PDA) 上，進行大量菌體培養，當為萃取 DNA 或 RNA 之素材。

二、 培養

1. 固態培養：

以 PDA 作為培養基，把菌體接種在含培養基之平板培養皿上，25°C 下培養一週。

2. 液態培養：

使用 PDB 作為培養基，把已培養一週的固態 *A. musiformis* 菌絲用解剖刀刮下(盡量不要刮到培養基)，接種至含 100ml PDB 之圓底錐形瓶 (500ml) 中，25°C 下靜置培養兩週。

三、 DNA萃取

萃取DNA之前，先採取菌絲樣本，在光學顯微鏡下觀察確認所培養之液態 *A. musiformis* 有無其他微生物污染後，利用滅菌過的布氏漏斗 (funnel) 和濾膜 (miracloth) 收取其菌絲，收取完成後馬上置入液態氮中使之急速冷卻，然後用減壓冷凍乾燥機 (lyophilizer) 將菌絲水分抽乾 (約兩天)，即可獲得乾燥菌絲；本實驗採用 Al-Samarrai & Schmid (2002) 的方法以獲取 *A. musiformis* 之 DNA 萃取物 (流程詳見附件一)，萃取完之產物以膠體電泳檢視 [1% agarose gel (W/V) in TAE buffer, 100V cm⁻¹ for 20 min, at room temperature]，並使用分光光譜儀 (photo spectro meter) 測量萃取出之 DNA 濃度，以小牛胸腺細胞為標準判定 DNA 濃度，之後保存在 -20°C 以供後續實驗之用。

四、 聚合酶連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR)

首先根據本研究室所得的可能與黏著機制有關基因之 cDNA 序列設計專一性引子對，依據所設計的引子對適合的黏合溫度 (annealing temperature)，以 genomic DNA 當模板 (template) 進行 PCR，增幅特定序列 (流程詳見附件二)；增幅之後的產物以膠體電泳 [1.5% agarose gel (W/V) in TAE buffer, 100V cm⁻¹ for 25 min, at room temperature] 檢視其 DNA 之長度、濃度，保存在 -20°C 備用。

五、 PCR產物切膠純化

把 PCR 產物進行膠體電泳 [1.5% agarose gel (W/V) in TAE buffer, 100V cm⁻¹ for 25 min, at room temperature]，照膠，確認要切下純化的片段後，放入 UV 箱中，打開紫外光 (UV Light)，小心迅速切下所要的 band，裝入 eppendorf 中，使用 GFX column 過濾吸附之方式進行純化 (流程詳見附件三)。將純化的產物保存在 -20°C 備用。

六、 TA-cloning

使用pGEM-T and pGEM-T Easy Vector System(流程詳見附件四),將純化過的PCR 產物轉殖至 HIT DH5 α 勝任細胞 (competent cells), 再塗抹於含有 LB/Ampicilin/IPTG/X-Gal的平板培養皿上, 於 37°C 下培養 16 小時; 進行藍白菌落篩選, 選擇白色較大的菌落, 以原本的引子對與sp6 和T7 的引子對進行PCR, 確認轉型的結果是否為所求, 把增幅之後的產物以膠體電泳檢視 [1.5% agarose gel (W/V) in TAE buffer, 100V cm⁻¹ for 25 min, at room temperature] 並將確認轉殖成功的菌落定序。

七、 比對序列

將定序所得的序列資料, 以 Vector NTI 進行 vector-masking (去除載體序列), 和原來的 cDNA 序列進行比對; 同時上 NCBI 之資料庫比對, 尋找相似的序列或蛋白質 (BlastX)。

八、 以 DIG 標定探針

本實驗採用 Roche PCR DIG Probe Synthesis kit 製備探針 (流程詳見附件五)。

九、 南方氏雜合(Southern blot hybridization)

將已完成標定的探針與 *A. musiformis* 的 Fosmid Library 進行雜合反應, 以挑選呈正反應的菌落 (流程詳見附件六)。

參、 研究結果與討論

一、 *A. musiformis* 之培養

1. 固態培養

- (1) *A. musiformis* 之生長相當迅速, 接菌後約一週的時間即可見菌絲鋪滿整個培養皿, 若培養的時間太久, 菌絲就會老化, 因此最佳的培養時間為一至二週。
- (2) 我們曾經嘗試在一個培養皿中接三個點, 一開始三點呈輻射狀長出一般的平鋪菌絲, 之後長到要接觸到其他點長出的菌絲時, 會在交界的地方長出氣生菌絲, 平鋪菌絲長到培養皿邊緣時也會出現這種情況 (圖四), 推論這是因為菌絲在平面生長空間不足, 轉而往上長而產生氣生菌絲。



(圖四 *A. musiformis* 在平板培養皿上培養之情形。)

- (3) 實驗過程中偶爾會出現被他種細菌污染的情形, 通常是接菌過程中的疏忽造

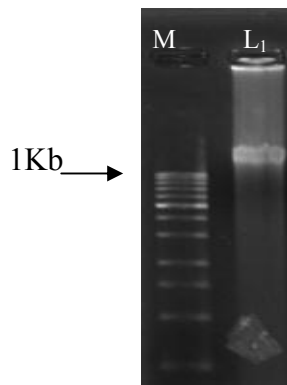
成；有一種情況是因為培養皿邊緣沒有封好，導致細菌甚至是蟎類的入侵所致；我們觀察後發現，細菌污染從外觀看有兩種型態，第一種是很明顯的在 PDA 上看到一個一個的菌落；第二種通常不明顯，沒有一個一個的菌落，反而是會隨著 *A. musiformis* 菌絲一起呈輻射狀擴散出去；後者我們推論是因為在接菌的時候不小心被細菌污染，細菌就跟著 *A. musiformis* 菌絲一起長出去；至於前者會形成一個一個菌落的原因是因為細菌藉由其他外來因素而出現在培養基上，之後便在培養基上形成一個一個的菌落，擴充自己的地盤，和 *A. musiformis* 競爭養分。

2. 液態培養

- (1) 由固態接成液態培養的 *A. musiformis*，在圓底錐形瓶中約生長兩週即能長滿圓底錐形瓶，通常一次接菌會接入 1~2 個培養皿的固態 *A. musiformis*，並且把菌絲切成小段狀，因為菌絲比較分散，長得會比較快。
- (2) 我們曾以震盪培養 *A. musiformis* (150rpm)，結果發現其菌絲不像靜置培養是一大片，而是細細碎碎的，顏色還較靜置培養的黑；一開始懷疑是雜菌，在顯微鏡下觀察後確認沒有污染，推論可能是因為在震盪培養下，菌絲和空氣接觸的量較大，使其產生黑色素，而且也因為震盪的關係，菌絲會聚合成細小球狀，分散在培養液中；由此可見 *A. musiformis* 的表現型會受到環境因素的影響而有所不同

二、DNA 萃取

1. 因為真菌的多醣類較多，所以 lysis buffer 的量可以些微提高，使之分解完全，萃取時較易被溶離；此外在 RNaseA 作用期間應定時將其搖晃均勻，使其作用更完全。
2. 加完 lysis buffer 並 pipet 完後，有時會因氧化而使 sample 變黑，則需及時加入少量具有抗氧化效果的 mercaptoethanol，若未加入則萃取完後 sample 易因氧化而有雜質出現。
3. 若抽取出之 DNA 不純，可用 70%的乙醇再清洗數次，使 DNA 更為純化；且最後可以用 95%乙醇洗一次，這樣可使殘餘的水更快揮發。
4. 使用分光光譜儀測量萃取出之 DNA 濃度，以小牛胸腺細胞 DNA 為標準測出 DNA 濃度，當時抽出的濃度為 284ng/ul（圖五）。



（圖五 菌絲體 DNA 萃取結果。

M : 1Kb ladder

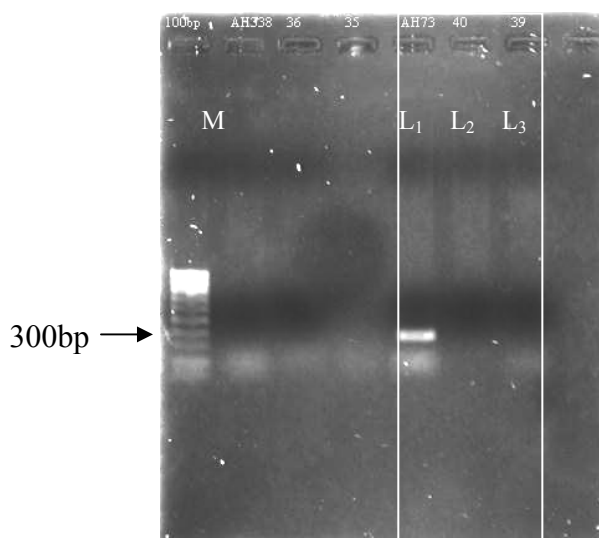
Lane1: 濃度 284ng/ul 的 *A. musiformis* 的 DNA。）

三、TA-cloning

1. 已進行 PCR 後超過一週的產物，其兩端所加上的腺嘌呤（adenine）尾易掉落，而不易與載體黏合，使得轉殖的結果容易失敗；因此進行 TA-cloning 時，應在前一天（或前兩三天）進行 PCR，取其純化之產物和載體黏合，不要使用放置超過一週的 PCR 產物，如此可提高轉殖成功的機率。
2. 以 PCR 檢視完成轉殖的 clone 時，最好用原來的引子對和 sp6 及 T7 的引子對分別進行 PCR，若轉殖成功則不僅原來的引子對可增幅出相同大小且單一的 band；且 sp6 與 T7 的引子對也可增幅出略大 100bp(考慮 sp6 和 T7 的大小)的單一 band；但如果 sp6 和 T7 的引子對都無法增幅出應有的 band，則表示載體未成功轉殖入勝任細胞，或載體有轉殖入勝任細胞，但我們要轉殖的基因片段未成功的與載體黏合；此時若原來的引子對可增幅出 band，則可能是以勝任細胞的 DNA 為模板所增幅出的 band，不代表這些 band 有成功轉殖進勝任細胞。
3. 在勝任細胞本身的基因穩定度沒有非常高的情況下，有可能在勝任細胞本身的 DNA 和質體 DNA 之間發生基因互換的情況，因此有時候會出現要轉殖的 DNA 有純化完全，但是挑 clone PCR 的結果卻顯示出和純化片段大小不同的片段的情形。

四、Manosyltransferase (AH73)

1. PCR 的結果呈現單一的 band (圖六)，於是直接將未純化的 PCR 產物送去定序，分析定序結果圖後，發現利用引子對所定出的序列在首尾的地方會有些微雜訊；用 Vector NTI 比對兩端的引子定出的序列後，相似度 74.1% (序列比對詳見附件七)；但是經過選殖的定序結果相似度 99.4% (序列比對詳見附件八)，由此可見經過選殖所定出的的序列的相似度較高。
2. 經過選殖的序列到 NCBI 的比對結果為 `gi|11181548|gb|AAG32629.1| mannose phospho-dolichol synthase [Hypocrea jecorina]`，Score: 118，E value: $8e-26$
3. 以 PCR 產物定出的序列和原來的 cDNA 序列進行比對，相似度 72.1% (序列比對詳見附件九)，經過選殖的序列同樣和原來的 cDNA 序列比對，相似度 69.0%，並且發現一段約 100bp 疑似為內含子的序列 (序列比對詳見附件十)；以後將進行 RACE，求取其全長度，來加以確定。
4. 我們以 genomic DNA 為模板，用 DIG 標示當為探針，並以膠體電泳檢測其結果 (圖七)，發現以 DIG 標定的產物其大小會較沒有用 DIG 標定的 PCR 產物大小增加約 300bp 左右，討論後我們認為接 DIG 之後，在電場移動變慢，故錯覺以為經標定之探針序列大小增加，其實並非如此。



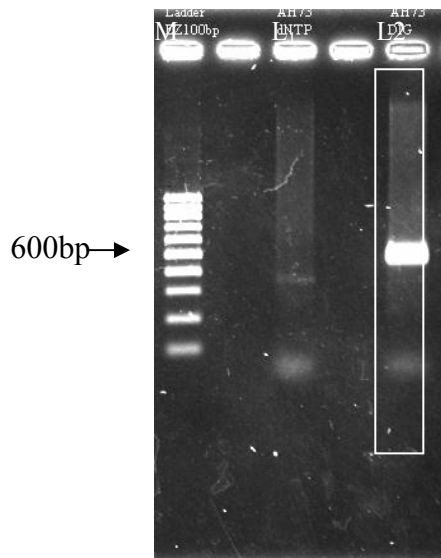
(圖六 AH73 PCR 結果。)

M: 100bp ladder

Lane1: primer F+ primer R

Lane2: primer R

Lane3: primer F



(圖七 AH73 DIG labelled。)

M: 100bp ladder

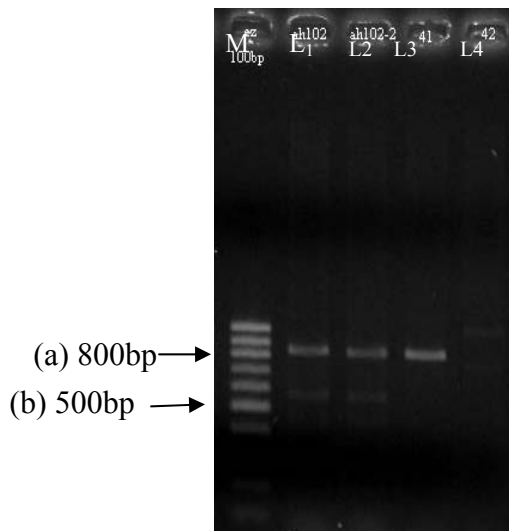
Lane1: 以 dNTP 為原料

Lane2: 以 DIG 取代 dNTP 為原料

5. 應用 DIG 標定完的探針與已建構之 *A. musiformis* Fosmid Library 進行雜合反應，但雜合效果不穩定，並未得到專一結果，推測可能原因如下：
 - (1) 這次製作的探針可能因為是使用未純化的 genomic DNA 製造，較為不純所導致的結果；應以選殖成功之 clone 的質體來做 DIG 探針較好。
 - (2) 可能問題出在實驗所使用已經點選 Fosmid clone 之尼龍膜。根據比對結果，發現同樣為 AH73 之探針，以不同張尼龍膜（同樣 clone）標定出之結果不相同；但在同一張膜以不同探針標定出之結果竟完全相同，有待進一步探討與分析。可能係雜合時條件並非理想，背景值之雜訊所造成的結果。
 - (3) 若問題皆不為上述兩項，實驗方法也都正確，則以散彈槍式基因資料庫方法定序，並進一步組合序列，進行基因註解。

五、 β -1,3-glucan transferase (AH102)

1. PCR 結果出現兩條以上的 band (圖八)，且 DNA 模板的殘留量在電泳槽內也很高，之後把 DNA 模板的量減少，並降低黏合溫度，band 的濃度相較之下有些微提高，但還是有不只一條 band。
2. 將其中兩條主要的 band 經過純化、選殖，所得的定序結果和原來的 cDNA 序列比對，相似值都只有 40.5% (序列比對詳見附件十一、十二)，利用其他程式進行比對的結果也是差不多 40% 左右，相似性不是很高。
3. 在 NCBI 比對的結果，band (a): gi|66851944|gb|EAL92269.1|_ conserved hypothetical protein [*Aspergillus fumigatus* Af293]，Score: 72.4，E value: 2e-11；band (b): gi|51556853|gb|AAU06196.1| Gas1-like protein [*Monacrosporium haptotylum*]，Score: 67.4，E value: 3e-10；E value 值皆低於 15。
4. 也比對不出相似度較高的蛋白質 (期望值只到 10e)，因此這個 band 極可能不是我們所求的 AH102。
5. 歸納定序比對的結果，此引子對可能專一性不理想，將重新設計專一性引子對進行增幅，以求更理想的結果。



(圖八 AH102 PCR 結果。)

M: 100bp ladder

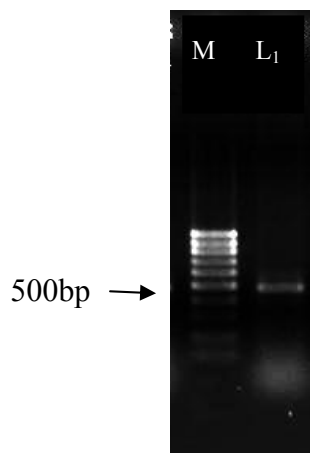
Lane1、Lane2: primer F+ primer R

Lane3: primer F

Lane4: primer R

六、Fimbrin (AH121)

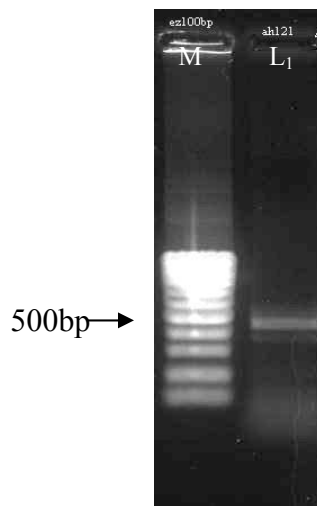
1. 經過多次 PCR 條件的修改，有出現單一的 band (圖九)，直接以 PCR 產物定序的結果卻有很高的雜訊，無法用來分析比對；改用 5X 的染劑進行電泳，重新檢驗 PCR 結果後 (圖十)，發現其實仍有增幅出一些濃度較淡的 band。
2. 挑選其中濃度最高的 band，經過純化、選殖後；其定出的序列和原 cDNA 序列相似度 42.7% (序列比對詳見附件十三)。
3. 此到NCBI資料庫比對結果為gi|28270193|emb|CAD63092.1|_ cell surface hydrolase, membrane-bound (putative) [Lactobacillus] ，Score: 32.0 ，E value: 8.3 ，小於 15 。
4. 此引子對之專一性不理想，將重新設計專一性高的引子對進行 PCR 。



(圖九 AH121 PCR 結果 (6X 染劑)。)

M: 100bp ladder

Lane1: primer F+ primer R



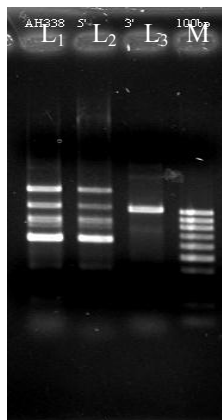
(圖十 AH121 PCR 結果 (5X 染劑)。)

M: 100bp ladder

Lane1: primer F+ primer R

七、Manose-specific lectin precursor (AH338)

1. AH338 在進行過數次 PCR 後發現其專一性過低 (圖十一)，原因為兩端引子的黏合溫度相差過大，若把溫度調高則有一邊夾不到任何 band，但若把溫度降低則另一邊之專一性太低，夾到太多 band；將重新設計專一性引子對，改進溫度的差異性，以達到更為專一之結果。



(圖十一 AH338 PCR 結果。)

M: 100bp ladder

Lane1: primer R+ primer F

Lane2: primer F

Lane3: primer R

肆、結論與應用

- 一、已成功選殖 AH73 的可能基因，其可能與捕捉網表面黏液醣蛋白之生合成有關。
- 二、完成 AH73 專一性探針之製備，並以之篩檢 *A. musiformis* Fosmid Library
- 三、AH102 與 AH121 選殖出的序列在 NCBI 比對出之 E value 在 15 之下，因此將重新設計專一性引子對，以達更專一之結果。
- 四、AH338 因為引子對之黏合溫度差異太大，無法得到有專一性之結果；待完成重新設計專一性引子對後，進行 PCR 並定序，以製作探針和 *A. musiformis* Fosmid Library 進行雜合反應。

伍、未來展望

- 一、完成定序比對確認無誤的轉殖株，萃取其質體，以 DIG 標示當做探針去篩檢 *A. musiformis* Fosmid Library，以獲取具專一性反應之 clone；若雜合反應座落於同一 clone 上，則以 shotgun library 定序，組合序列、註解相關之基因
- 二、萃取 *A. musiformis* 的 mRNA，以 RACE 做出 AH73、AH102、AH121、AH338 之 cDNA 全長度。
- 三、以轉位子或其他適宜之方法建構載體來破壞 AH73、AH102、AH121、AH338 等基因，建構 AH73、AH102、AH121、AH338 之 *A. musiformis* 功能缺失株，並進行生物活性檢測，以驗證 AH73、AH102、AH121、AH338 之生理功能、生化特性。

陸、 參考資料

- 一、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學研究所碩士論文
- 二、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
- 三、劉翰璇。2005。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。台灣國際科學展覽會研究報告
- 四、Al-Samarrai, T. H., and Schmid, J. 2000. A simple method for extraction of fungal genomic DNA. Lett. Appl. Microbiol 30:53-56.

附件一：菌體 DNA 之萃取方法(Al-Samarrai & Schmid, 2000)

1. 利用液態氮將冷凍乾燥菌絲，研磨成細緻之粉末，置放於離心管中；隨後加入 lysis buffer (Tris-acetate、sodium acetate、ethylenediamine tetracetic acid、sodium dodecyl sulfate，以 glycolic acetic acid 調至 pH 7.8)，以 1000 μ l 之 micropipet 緩慢吸放數分鐘，使 DNA 與多醣類分離。
2. 加入處理過的 RNase A (10 mg/ml, Sigma) 於離心管中，37°C 下處理 1 小時。
 1. 加入 5M NaCl，充分搖晃混合均勻，離心 20 分鐘
 2. 吸取上清液到乾淨之離心管中，再加入等倍體積的 phenol / chloroform (1:1) 混合液，溫和的均勻搖晃數分鐘，離心 20 分鐘。
 3. 將上清液移至新的離心管中，與等倍體積的 chloroform 充分混合均勻，離心 10 分鐘。
 4. 吸取上清液至新的離心管中，加入 2 倍體積的 95% ethanol，溫和的翻轉，使 DNA 析出，離心 10 分鐘，使 DNA 沉澱聚集於離心管壁。
 5. 倒除上清液，再次加入些許 lysis buffer，溫和的吸放數分鐘，使 DNA 與多醣類分離較完全。加入些許 NaCl，充分混合均勻，之後加入等倍體積的 chloroform，混合均勻，離心 20 分鐘。
 6. 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。
 7. 移除上清液，以 70% 的冰乙醇清洗沉澱物，並離心 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。
 8. 以分光光譜儀 (Gene Quant Pro, Amersham Pharmacia Biotech) 測定 DNA 之濃度，並以膠體電泳分析 DNA 片段的大小及純度。

附件二：聚合酶連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR)

1. 配置反應混合液，將之裝於PCR專用的eppendorf

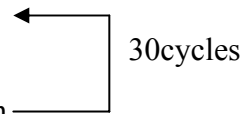
ddH ₂ O	33.9μl
10X PCR buffer	5μl
10mM dNTP(each 10mM)	1μl
20μM primerA	2.5μl
20μM primerA	2.5μl
20ng/μl template DNA.	5μl
Taq DNA polymerase	0.3μl

Total

50μl

2. 短暫離心使混合液集中在管子下部

3. 以 Biometra T3 thermocycler 進行 PCR，PCR 條件如下：

- lip temp: 105°C preheating: on
- (1) 94°C 4.0min
 - (2) 94°C 30sec
 - (3) X°C 30sec
 - (4) 72°C 1.0min
 - (5) 72°C 7.0min
 - (6) 4°C pause
- 30cycles
- 

4. 以膠體電泳檢視增幅產物：1.5% agarose gel 100V 25min

附件三： Purify PCR production from gel(GFX column)

1. 每管 eppendorf 加入 Capture Buffer，每毫克的 agarose gel 加入 1 ul。
2. 將混合物震盪均勻，將其置於 60°C 水浴中數分鐘使 agarose gel 融化。
3. 室溫下短暫離心以確定 eppendorf 底部的內容物，如果 agarose gel 融化後於室溫下不會再固化。
4. 將 GFX column 裝置於 Collection Tube，一個融化的 gel 樣本就組裝一組。
5. 將融化的 gel mixture 轉移到 GFX column，短暫放置於室溫下。
6. 離心 30 秒後，將 GFX column 移出並將 Collection Tube 中的液體移除，再將 GFX column 置於 Collection Tube 上。
7. 加入 Wash buffer（預先以 100% ethanol 稀釋）至 GFX column 以洗滌 column；離心 30 秒。
8. 將 GFX column 移出並將 Collection Tube 中的液體移除，再將 GFX column 移置於新的 eppendorf 上。
9. 離心 1 分鐘，使 GFX column 底部的酒精揮發完全。
10. 直接將少量滅菌過的二次過濾水加至 column 中間，但避免以 tip 尖端接觸到 column 底部的膜。置於室溫下 1 分鐘，再離心 1 分鐘。
11. 將 GFX column 從 eppendorf 上移除，將純化的 DNA 保存於-20°C。

附件四： pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems

1. 與 pGEM®-T Easy Vector 連接：

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 1 小時：

2×Rapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligase	5µl
pGEM®-T Easy Vector (50ng)	1µ
PCR product	3µl
T4 DNA Ligase (3 Weiss units/µl)	1µl
Deionized H ₂ O to a final volume of	10µl

2. 製備培養基(LB plate with ampicillin/IPTG/X-Gal)

LB plate: 用於活化原保存於-70°C之 *E. coli*

LB plate with ampicillin: LB agar 冷卻至 50°C時，加入 ampicillin 100µg/ml，於室溫可保存一週，4°C可保存一個月。

IPTG stock (0.1M) : 0.12g/ 5ml, 過濾後保存於 4°C

X-Gal stock: 0.1g 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside / 2ml N, N'-dimethylformamide, 以鋁箔避光保存於-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 80µg/ml X-Gal，再倒 plates。或在已倒好的 LB/ampicillin plate 上平塗 100µl 的 IPTG stock 及 20µl X-Gal stock，於 37°C 處理 30 分鐘後即可使用。

3. 轉殖

- (1) 從-70°C取出 HIT DH5alpha High Efficiency Competent Cells，置於冰上待融化。輕彈管壁以均勻混合細胞。
- (2) 取 2µl ligation reaction 到置於冰上的無菌 eppendorf，小心取 50µl 大腸桿菌細胞到每支 eppendorf，輕彈管壁以混合均勻。
- (3) 將 eppendorf 置於冰上 20 分鐘後，短暫於 42°C 水浴（勿震盪）。
- (4) 迅速將 eppendorf 移至冰上放置數分鐘
- (5) 於 37°C 震盪培養 1.5 小時。
- (6) 把菌液平塗於 LB/ampicillin/IPTG/X-Gal plates。
- (7) 於 37°C 隔夜培養（16-24 小時）。在 10⁸ cfu/µg DNA 的轉殖效率下，每個 plate 約可見 100 colonies。較長時間的隔夜培養或隔夜培養後將 plates 保存於 4°C，有助於藍/白篩選。

附件五：PCR DIG Probe Synthesis Kit

步驟同 PCR，反應混合液之內容如下：

ddH ₂ O	29.25 μ l
PCR buffer with MgCl	5 μ l
PCR DIG labeling Mix(or dNTP stock)	5 μ l
Primer	5 μ l
Enzyme	0.75 μ l
DNA template	5 μ l

Total *50 μ l*

附件六：Fosmid 專用 colony hybridization

1. 雜合反應

事前準備：blocking reagent (Roche)、雜合液
雜合液 50% Formamide
(molecular cloning) 5× SSC
2% blocking reagent
0.1% N-lauroylsarcosine
0.02% SDS

Formamide	30ml
20X SSC	15ml
10% blocking reagent	12ml
1% N-lauroylsarcosine	6ml
10% SDS	120 μ l

- 風乾的尼龍膜先以 2×SSC 充分潤濕。
- 加入雜合液於 42°C 進行前雜合反應 2 小時，8rpm。
- 加入已變性探針至雜合液中，於 42°C 進行雜合反應 18 小時，8rpm。
註：新製備的探針 (PCR probe synthesis kit, Roche) 可於 96°C 中加熱 10 分鐘，以進行變性處理。變性後立即放入冰中，防止回復成雙股。若是重覆使用的探針 (含探針的雜合液，可保存在 -20°C)，則於 68°C 中加熱 10 分鐘，再放入冰浴中備用。

2. 嚴苛度漂洗

事前準備：2×SSC/0.1% SDS、0.1×SSC/0.1% SDS、Buffer I (0.1M Maleic acid, 0.15M NaCl, NaOH 0.2M, pH 7.5)、Buffer II (blocking reagent diluted 10× in Buffer I)、alkaline phosphatase (AP) conjugate Anti-DIG Ab (Roche)

- 取出尼龍膜，以 2×SSC/0.1% SDS 約 200 ml 於室溫振盪漂洗 2 次。
- 再以 0.1×SSC/0.1% SDS 約 200 ml 於 55°C 漂洗 2 次。
註：高嚴苛度漂洗之 SSC 濃度以及漂洗溫度，視非專一性反應而定。SSC 濃度及漂洗溫度愈高，去除非專一性反應的效果愈強。一般而言，SSC 濃度使用 0.1×至 0.5×之間，漂洗溫度介於 55°C 至 68°C 之間。
- 將尼龍膜依序放入 Buffer I (1ml/cm² membrane) 約 200 ml 震盪漂洗 1 分鐘、Buffer II (1ml/cm² membrane) 約 100 ml 震盪漂洗 30 分鐘。
- 再放入含 alkaline phosphatase (AP) conjugate Anti-DIG Ab (5 μ l/100ml Buffer II) 的 Buffer II 中於室溫振盪作用 30 分鐘。
註：含 AP 的 Buffer II 可回收，24 小時內仍可使用。
- 以 Buffer I (1ml/cm² membrane) 約 200 ml 漂洗尼龍膜 15 分鐘，2 次。
註：在此步驟後，若不立即進行訊號偵測，可將尼龍膜保存於 Buffer I，4°C 中。

3. 訊號偵測

事前準備：CDP-Star、顯影液 (Kodak Developer: ddH₂O = 1:4)、定影液 (Kodafix solution: ddH₂O = 1:3)

- 攤開剪開的 A4 資料夾，在尼龍膜滴上約 800 μ l CDP-Star，將尼龍膜有核酸的一面覆在 CDP-Star 上，閤上資料夾，以擦手紙吸去多餘 CDP-Star。
- 將資料夾放在壓片匣中，尼龍膜有核酸的面朝上。

- c. 於暗室中取出底片，置於資料夾上，閣上壓片匣。開始計時壓片。
- d. 取出底片，依序置入各溶液中震盪，顯影液 40 秒、水 60 秒、定影液 40 秒、水 60 秒，最後以自來水流洗數分鐘，即可看結果。
 註 1：打開底片及洗片過程均需在黑暗中進行。初次壓片時間 15 分鐘，之後視結果縮短或延長壓片時間。
 註 2：根據經驗，壓 1 小時的效果較好

4. Wash membrane to remove probe

事前準備：100mM NaOH，10mM EDTA，0.1% SDS，ddH₂O，5X SSPE
 SSPE (20X)

總體積 1L: 用 10M NaOH 調整 pH 到 7.4,再加 H ₂ O 使體積到達 1L	<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="padding: 2px 10px 2px 10px;">NaCl</td> <td style="text-align: right; padding: 2px 10px 2px 10px;">175.3g</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px 10px 2px 10px;">NaH₂PO₄*H₂O</td> <td style="text-align: right; padding: 2px 10px 2px 10px;">27.6g</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px 10px 2px 10px;">EDTA</td> <td style="text-align: right; padding: 2px 10px 2px 10px;">7.4g</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px 10px 2px 10px;">ddH₂O</td> <td style="text-align: right; padding: 2px 10px 2px 10px;">800ml</td> </tr> </table>	NaCl	175.3g	NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O	27.6g	EDTA	7.4g	ddH ₂ O	800ml
NaCl	175.3g								
NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O	27.6g								
EDTA	7.4g								
ddH ₂ O	800ml								

- a. 100mM NaOH，10mM EDTA，0.1% SDS，室溫下震盪 10min 兩次
- b. ddH₂O rinse 30sec~1min
- c. 5X SSPE 室溫下震盪 10min 兩次
- d. Membrane 放置於無菌箱吹乾，約需 3 小時
- e. 收 Membrane 放置於 4°C
 註：blocking reagent 配好要滅菌一次冰起來

附件七：A. musiformis gDNA以PCR增幅Manosyltransferase (AH73)

產物之定序結果之比對

*Identity: 74.1%

		1	50
AH73-F	(1)	-----G	GAGAC
AH73-R-reverse	(1)	TTGATATTGGGACTTCAGCGACTGAGAAACCCATTGCTCTGGCAC	GAAACC
Consensus	(1)		GA C
		51	100
AH73-F	(7)	ATCATTTCCTGCATGATAACAAAAAGGGCATGATTAGCTTGCATGTCCTA	
AH73-R-reverse	(51)	ATCATTTCCTGCATGATAACAAAAAGGGCATGATTAGCTTGCATGTCCTA	
Consensus	(51)	ATCATTTCCTGCATGATAACAAAAAGGGCATGATTAGCTTGCATGTCCTA	
		101	150
AH73-F	(57)	AACCAAGGAACAGCCAATTGGCTATATTTTAGTCATGGGGGCACAACGT	
AH73-R-reverse	(101)	AACCAAGGAACAGCCAATTGGCTATATTTTAGTCATGGGGGCACAACGT	
Consensus	(101)	AACCAAGGAACAGCCAATTGGCTATATTTTAGTCATGGGGGCACAACGT	
		151	200
AH73-F	(107)	ACCATCTGGAATGTGTATCCCTTGCTTTCTGTG	TCTTGATAACGCTCTC
AH73-R-reverse	(151)	ACCATCTGGAATGTGTATCCCTTGCTTTCTGTG	TCTTGATAACGCTCTC
Consensus	(151)	ACCATCTGGAATGTGTATCCCTTGCTTTCTGTG	TCTTGATAACGCTCTC
		201	250
AH73-F	(157)	CAAGACGGACTTCTTGTAACCGGAACTTCCGGTCAAATCGCTCACAT	
AH73-R-reverse	(201)	CAAGACGGACTTCTTGTAACCGGAACTTCCGGTCAAATCGCTCACAT	
Consensus	(201)	CAAGACGGACTTCTTGTAACCGGAACTTCCGGTCAAATCGCTCACAT	
		251	300
AH73-F	(207)	TCGGCCTGAGTACGACGCTGGCAAAGAGGTTGGCGCCCCTACTAACGAGC	
AH73-R-reverse	(251)	TCGGCCTGAGTACGACGCTGGCAAAGAGGTTGGCGCCCCTACTAACGAGC	
Consensus	(251)	TCGGCCTGAGTACGACGCTGGCAAAGAGGTTGGCGCCCCTACTAACGAGC	
		301	350
AH73-F	(257)	TT	CGCT GAA
AH73-R-reverse	(301)	TT	CGCT GAA
Consensus	(301)	TT	CGCT GAA
		351	
AH73-F	(307)	AA	
AH73-R-reverse	(311)	--	
Consensus	(351)		

附件七： *A. musiformis* gDNA以PCR增幅Manosyltransferase (AH73)

產物選殖後之定序結果之比對

*IDENTITY: 99.4%

		1	50
AH73-SP6-NV	(1)	-GATATTGGGACTTCAGCGACTGAGAAACCCATTGCTCTGGCACGAACCA	
AH73-T7-NV-REV	(1)	TGATATTGGGACTTCAGCGACTGAGAAACCCATTGCTCTGGCACGAACCA	
		51	100
AH73-SP6-NV	(50)	TCATTTCTGCATGATAACAAAAAGGGCATGATTAGCTTGCATGTCCTAA	
AH73-T7-NV-REV	(51)	TCATTTCTGCATGATAACAAAAAGGGCATGATTAGCTTGCATGTCCTAA	
		101	150
AH73-SP6-NV	(100)	ACCAAGGAACAGCCAATTGGCTATATTTAGTCATGGGGGCACAACGTA	
AH73-T7-NV-REV	(101)	ACCAAGGAACAGCCAATTGGCTATATTTAGTCATGGGGGCACAACGTA	
		151	200
AH73-SP6-NV	(150)	CCATCTGGAATGTGTATCCCTTGCTTTCTGTGCTCTTGATAACGCTCTCC	
AH73-T7-NV-REV	(151)	CCATCTGGAATGTGTATCCCTTGCTTTCTGTGCTCTTGATAACGCTCTCC	
		201	250
AH73-SP6-NV	(200)	AAGACGGACTTCTTGTACAACCGGAAACTCCGGTCAAATCGCTCACATT	
AH73-T7-NV-REV	(201)	AAGACGGACTTCTTGTACAACCGGAAACTCCGGTCAAATCGCTCACATT	
		251	300
AH73-SP6-NV	(250)	CGGCTGAGTACGACGCTGGCAAAGAGGTGGCGCCCTACTAACGAGCT	
AH73-T7-NV-REV	(251)	CGGCTGAGTACGACGCTGGCAAAGAGGTGGCGCCCTACTAACGAGCT	
		301	350
AH73-SP6-NV	(300)	TTCGCTTGAAATCCCAGCCGTAGACCCACCGTCGCCTGCATATCGTGT	A
AH73-T7-NV-REV	(301)	TTCGCTTGAAATCCCAGCCGTAGACCCACCGTCGCCTGCATATCGTGT	-

附件九： *A. musiformis* gDNA以PCR增幅Manosyltransferase (AH73)

產物之定序結果與cDNA序列之比對

*Identity: 72.1 %

		1		50
AH 73 Manosyltransferase	(1)	-----T	ACAGACGGTCAACAATGAT	ATTGG
AH73-F	(1)	GGAGACATCATTTCCTGCATGATA	ACAAAAGGGCATGATTAGCT	TGCAT
Consensus	(1)		ACA A GG CA A G T	
		51		100
AH 73 Manosyltransferase	(27)	GACTTCAGCGACTGAGTAACCCATTGCCCTAGCACG	ACCAT	-----CA
AH73-F	(51)	GTCTAAACCAAGGAACAGCCAATTGGCTATATTTT	AGTCAT	GGGGGGCA
Consensus	(51)	G C T A C A GA A CC ATTG C	A CAT	CA
		101		150
AH 73 Manosyltransferase	(71)	T-----T	CCATCTGGAATGTGTATCCCTTGCTTTCTGTGCTCTTGATAAC	
AH73-F	(101)	CAACGT	ACCATCTGGAATGTGTATCCCTTGCTTTCTGTGCTCTTGATAAC	
Consensus	(101)	T	CCATCTGGAATGTGTATCCCTTGCTTTCTGTGCTCTTGATAAC	
		151		200
AH 73 Manosyltransferase	(117)	GCTCTCCAAAACGGATTCTTTATACAACCGGAAACTTC	TAGTCAAATCGC	
AH73-F	(151)	GCTCTCCAAGACGGACTTCTTG	TACAACCGGAAACTTC	CGGTCAAATCGC
Consensus	(151)	GCTCTCAA AC	GGATTCTTTACAACCGGAAACTTC	GTCAAATCGC
		201		250
AH 73 Manosyltransferase	(167)	TCACATTCGGCCTTAGGAC	ACGCTGGCAAAGAGGTTGGCACCCCTACTA	
AH73-F	(201)	TCACATTCGGCCTGAGTAG	ACGCTGGCAAAGAGGTTGGCCCCCTACTA	
Consensus	(201)	TCACATTCGGCCT	AG AC ACGCTGGCAAAGAGGTTGGC	CCCCTACTA
		251		300
AH 73 Manosyltransferase	(217)	ACAAGCTTTCGCTTGAAATCCCAGCCGTA	ACCCACCGTCGCTGCATA	
AH73-F	(251)	ACGAGCTTTCGCTTGAAATCCCAGCCGTA	ACCCACCGTCGCTGCATA	
Consensus	(251)	AC AGCTTTCGCTTGAAATCCCAGCCGTA	ACCCACCGTCGCTGCATA	
		301		
AH 73 Manosyltransferase	(267)	TCGTGT	--	
AH73-F	(301)	TCGTGT	AA	
Consensus	(301)	TCGTGT		

附件十一： *A. musiformis* gDNA以PCR增幅 β -1,3-glucan transferase

(AH102)產物選殖後之定序結果與原cDNA序列之比對 (a)

*Identity: 25.9 %

		1		50
AH 102-EST	(1)	GCGGCCGAG	GTACCGAAACTCCGTCATGGGAA	T---TGA--GAACAAGTC
AH102-SP6-NV	(1)	-----	GTACCGAAACTCCGTCAT	TTCAA
		51		100
AH 102-EST	(46)	TGGAATTG	TGTGCTGAACCA	GACCAACTTGTCA
AH102-SP6-NV	(42)	TGTCATTG	ACCTTGTGATGAAC	CTGCTGTAA
		101		150
AH 102-EST	(96)	AGAAGGCCATT	CCGACACC	CCCTTGAAGTC
AH102-SP6-NV	(92)	GCCGTAGAGGG	GAGGACTAC	CACCA-GAGTCT
		151		200
AH 102-EST	(146)	GACACCTGG	ACCGTCTGGGTCAA	CGTTCCAACA
AH102-SP6-NV	(139)	GGCCGCTTC	AACCTCCCCCAA	AGTCTGGCAGT
		201		250
AH 102-EST	(196)	GTGGACTGG	ATCGGTTTCG	ATGCCTACCCT
AH102-SP6-NV	(189)	GGTGGCA---	ATAGTTTCGG	CAATCGCTCT
		251		300
AH 102-EST	(245)	GACAA	CC-GATCGAAG	CCGCTCACAA
AH102-SP6-NV	(236)	GATAGCTGT	GTCTGTGTA	CCGGTCATC-TTG
		301		350
AH 102-EST	(294)	CTACTCTCC	AGGCTACTGGTAA	AGAGTTTGA
AH102-SP6-NV	(278)	TTGTGTITG	AG--TTC-GGTGAG	GCGTTGGCAATC
		351		400
AH 102-EST	(342)	GGCCGTTG	CCGAAAGGAC	ATGAACTC----
AH102-SP6-NV	(325)	GTCTCGCTT	CAGAGAGACG	ATGTGCCTGGTTG
		401		450
AH 102-EST	(386)	AAGGACGCT	--AAGCA	TACTGGGATACT
AH102-SP6-NV	(375)	CATGATGGT	GCACTGCA	GGAGGGAGT
		451		500
AH 102-EST	(432)	---GAACTA	CAAGACCTGGT	GTACC-----
AH102-SP6-NV	(425)	GGT	GATGCGATGG	CGACGGTGAAG
		501		550
AH 102-EST	(456)	-----		
AH102-SP6-NV	(475)	AACTGTGGG	CGTTGTATAG	ATCTAGGAAGAA
		551		600

附件十二： *A. musiformis* gDNA以PCR增幅 β -1,3-glucan transferase

(AH102)產物選殖後之定序結果與原cDNA序列之比對(b)

*Identity: 40.5 %

		1		50
AH102	(1)	-----GCGGCCGAGGTACCGAAACTC-----		
AH102_sp6_nonvector	(1)	CCAGGTCTTGTAGTTTCCGTAAGTGCCGGTACACCGCAACTCTTTTGCA		
Consensus	(1)	GCCG ACCG AACTC		
		51		100
AH102	(22)	-CGTCATGGGAATGAGACAAAGCTG--GAATTGTGC-TGAACCAAG		
AH102_sp6_nonvector	(51)	GCGCATTTGAATCCAGAGATTGCCGTGCAGCCGTGCCGTGTTGATA		
Consensus	(51)	CG CAT GAAT AGA G C G GA G GC TG A A		
		101		150
AH102	(67)	CCA-ACTTGTTCACCT--ATATTAGATGCTCAAGAGGCCATTGCCGAC		
AH102_sp6_nonvector	(101)	GAATACTGATCACCTGGAATATTGAGAGGGAGTATACCAAGGCCAA-		
Consensus	(101)	A ACT TCACCT ATATT GA G A A C A GCC A		
		151		200
AH102	(113)	ACCCCTTGAAGTCC--GTTCCA---ATTGGTCACGTGAC--ACCTGGA		
AH102_sp6_nonvector	(150)	AGTTGTTGCCGTGCTGTTGATCGATTGTCACTTGAATGGACCTGCT		
Consensus	(151)	A TTG GT C GTT A ATT CAC T A ACCTG		
		201		250
AH102	(156)	CCGTCGGTCAACGGTTCCAAATGCCGTT-----ACCGAACAGTTGG		
AH102_sp6_nonvector	(200)	CCATCGCGTCACTTGATGAATACGCATTGTGACCCACCAACCGCTGA		
Consensus	(201)	CC TC G GT AC AA A TT ACC A C G TG		
		251		300
AH102	(201)	ACTGGATCGGTTTCGATGC-CTACCCTTAC--TTCCAATCTAC-CATGGA		
AH102_sp6_nonvector	(250)	CGCCTTTGGAAATAGATCTCTGTATAAGAGTATCAATTCTTCTTTGG		
Consensus	(251)	T G TT GAT C CT T A T CAAT T C T G		
		301		350
AH102	(247)	CAACCGATCGAAGCCGCTCCACAATGTTCGGGATGCTTATGAGGCTA		
AH102_sp6_nonvector	(300)	TATTGAGCTTGTACCCTGCTCGGTAAGCA-TGAGGTCTGAACCTCGGTG		
Consensus	(301)	A G T G A CCGC C TG TG G T CT A G T		
		351		400
AH102	(297)	CTCTCC--AGGCTACTGTAAAGAAGTTGGATCACTGAAACCGGT----		
AH102_sp6_nonvector	(349)	GTCGCCATCTAC--GTCTCTAAGTTGGGTAAGGCAACATGTCCCT		
Consensus	(351)	TC CC A CTAC GT AAG TTGG A G AAC GT		
		401		450
AH102	(341)	TGGCCGTTGCCGGAAGGACATGAACCTCGCCAAAG--CAGGTGTCAAG		
AH102_sp6_nonvector	(397)	TGCCACATTTCAAAGAGTGTAAAGCCGACGCCTTGCTCCGAATATTTAC		

```

Consensus (401) T GCC T C A AG A GA C GCC C T T A
                    451                                500
AH102 (389) GACG-CTAAGACA TAC TGGGAT---ACTATCGGTGTGTGCTCTCTTTGGAA
AH102_sp6_nonvector (447) GATGTCTACCACA GCA TGGGAT CAGAGGATCTTGAATATAACTGCCGTCA
Consensus (451) GA G CTA ACA TGGGAT A ATC T T CT G A
                    501                                550
AH102 (435) ACTACAAGA CCTGGTGTACC-----
AH102_sp6_nonvector (497) AGTTGGAAG--GGTGCAGCCAATCGCCATGACGGCCGTTCTTGTGAACT
Consensus (501) A T A A GGTG CC
                    551                                571
AH102 (456) -----
AH102_sp6_nonvector (545) TCATGACGGAGTTTCGGTACA
Consensus (551)

```

附件十三：A. musiformis gDNA以PCR增幅fimbrin (AH121)

產物選殖後之定序結果與原cDNA序列之比對

*Identity: 42.7%

		1		50
AH 121 Fimbrin	(1)	TACGGGTCTCAAGGATGCAAATTGGCGTGGGTATT--TTCTGTTGG		
AH121-SP6-NV	(1)	-----TGAAA GCCCTGGGAA CAGTTGAGAA TTCATGCAGG		
		51		100
AH 121 Fimbrin	(49)	AT-GTGCTTAGCGGAATGAAGA GCAGCTATGTGATTATG--AC---CT		
AH121-SP6-NV	(35)	ACCGGAAGAGCTACCAGTCCTGCAGGATATGTTGCATGTTGCGAATCT		
		101		150
AH 121 Fimbrin	(92)	TGTAACACTGGACGAACTGATGAGGATGCTTACTCAACG--CTAA---		
AH121-SP6-NV	(85)	GGAAAACAGGAGCTAAAGGCGCAGTTGGTTACGAGACTGAGCTAAAGG		
		151		200
AH 121 Fimbrin	(137)	GCTCAGTATCTCTATT--GCAC-----GAAAAATGGGGCTACTATC		
AH121-SP6-NV	(135)	GTTGATACTAATCAGCACAGCCGTGGTACGATGGATTATCCCAAC		
		201		250
AH 121 Fimbrin	(177)	TGTTACTGCTGAGG-ATATGTG--GGACTT--GAACTCGTCTATC		
AH121-SP6-NV	(185)	GAGACCATCCAGACATATATGAGCATGGATTGCGAAACTGGTCTCGTG		
		251		300
AH 121 Fimbrin	(222)	ACC---ACCTTTATTGGTAGCTTGATGGCGTTCTCTCAATTTTTTTTG		
AH121-SP6-NV	(235)	CTAGATATCTTTTGGCATCATGCAGGCCG--CCTTTGCTGTCGCTC		
		301		350
AH 121 Fimbrin	(269)	ACACCAGCTACCTCTCTGTTGATTTTTCACCTCTGCTTATATTTCTG		
AH121-SP6-NV	(283)	ACATCAATTGATACCGT---TAGAAGCTTGACATGATTCTGTGAAGCTA		
		351		400
AH 121 Fimbrin	(319)	AACCTTTGGAGGCCCTTGCAGCGGAA TGTTCCTGAGGAAGCTAAAGT		
AH121-SP6-NV	(330)	GAAAGTTGGAAGTTACAATT-GACGGCCTAGCATAAAAAACTAGTTTACC		
		401		450
AH 121 Fimbrin	(369)	TGATGTATTATGTCTGAAGGATCTTTAATATGACTGTTCCAGG--CTT		
AH121-SP6-NV	(379)	-GATGATGTTGCGACTGAACCGG-TGGGACACACTGTTCCCTGCAACAT		
		451		500
AH 121 Fimbrin	(417)	TCAAAAAAAAAAAAAAAAATAAAAAAAAAAAA		
AH121-SP6-NV	(427)	TACCTCCTGCTAGTCAAAATCGCAGAGTTAATAATCGACGCCAAATTT		
		501		
AH 121 Fimbrin	(467)	AAAAAGT		
AH121-SP6-NV	(477)	GCAACA--		

評語

本研究立意甚佳，經由前人經驗之提供及實驗材料之轉移。兩位同學在短期內已有不錯之成果。但從「基因之選殖與功能」而言，功能部份仍未有較為完善之結果。本計劃可依原有思考方向但更為專注(Focus)方式延續進行。