

大葉大學 生物醫學系

高中生物輔助教學課程



生醫系 Facebook 網頁

樣 本



生醫系 Web 網頁

授課詳細內容請
連結此網頁查詢



主辦單位：大葉大學

協辦單位：大葉大學 生物醫學系

地址：彰化縣 515 大村鄉 福興村 學府路 168 號

連絡人：(04) 8511-888 轉 4251 蕭小姐

大葉大學 地理位置



授 課 教 師 學 經 歷 表

| 教 師 | 教 師 學 經 歷 |
|-----|-------------------------------------|
| 蔡孟峰 | 國立台灣大學 動物學博士 大葉大學 生物醫學系/所 教授 |
| 張雲祥 | 國立台灣大學 動物學博士 大葉大學 生物醫學系/所 教授 |
| 黃尉東 | 德國 哥廷根大學 農學博士 大葉大學 生物醫學系/所 副教授 |
| 游志文 | 清華大學 輻射生物學博士 大葉大學 生物醫學系/所 副教授 |
| 劉淑瑛 | 美國 喬治亞大學 微生物學博士 大葉大學 生物醫學系/所 副教授 |
| 余聰安 | 國立中興大學 植物病理學博士 大葉大學 生物醫學系/所 副教授 |
| 李泰林 | 英國 曼徹斯特大學 生物學博士 大葉大學 生物醫學系/所 副教授 |

目錄

| 正課課程 | 主講人 | 頁數 |
|------------------------------------------------------|-----|----|
| 1. 螢光仙子的由來 – 螢光魚的產製及研究與應用 (細胞、生物體、生殖、發育) | 黃尉東 | 1 |
| 2. 偽裝大師 – 病毒 (細胞、生命科學、遺傳) | 劉淑瑛 | 16 |
| <hr/> | | |
| 實習課程 | | |
| <hr/> | | |
| 1. 斑馬魚受精卵之收集與觀察(細胞、動體、生殖、發育) | 黃尉東 | 25 |
| 2. 斑馬魚胚之顯微注射(細胞、動體、生殖、發育、遺傳) | 黃尉東 | 29 |
| 3. 顯微注射吸管之製備 (生命科學) | 黃尉東 | 39 |
| 4. 蛋白質光譜定量分析 (細胞、生命科學、遺傳) | 游志文 | 43 |
| 5. 微生物的奧秘 (生物體、生命科學、遺傳) | 劉淑瑛 | 45 |
| 6. 動物細胞外源基因轉染(細胞、動體、發育、生命科學) | 李泰林 | 52 |
| 7. DNA 萃取與分析 (細胞、發育、生命科學) | 張雲祥 | 57 |
| 8. 聚核酶鍊反應(Polymerase chain reaction·PCR)(細胞、生命科學、遺傳) | 張雲祥 | 61 |
| 9. 癌細胞特性分析(細胞、免疫、遺傳、生命科學) | 蔡孟峰 | 62 |
| 10. 植物細胞組織培養 (植物、生殖、發育、營養、代謝) | 余聰安 | 67 |

◇ 後方括號內為對應之高中生物課程相關章節

大葉大學 生物醫學系

生物輔助教學課程 預習內容

| 教師 | 課程 | 建議預習內容 |
|------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 黃尉東 副教授 | <p>正課</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 生物科技導論 2. 螢光仙子的由來 – 螢光魚的產製及研究與應用 <p>實習操作</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 斑馬魚受精卵之收集與觀察 2. 顯微注射吸管之製備 3. 斑馬魚胚之顯微注射 | <p>正課課程</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. DNA、RNA 及 protein 之結構、功能與相互關係介紹。 2. 細胞結構、胞器及增殖分裂介紹。 3. 基因轉殖之概念與方法。 4. 陸生(哺乳)與水生動物之生殖差異。 5. 動物複製之概念及方法 <p>實習課程</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 斑馬魚之基礎生命週期。 2. 基因轉殖、顯微注射器材之種類與使用方法之介紹。 3. 顯微注射後之觀察與檢驗方法。 |
| 游志文 副教授 | <p>正課</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 光譜分析原理簡介 2. Bradford 蛋白質定量法操作說明 <p>實習操作</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 蛋白質光譜定量分析 2. 光譜分析儀操作說明 | <p>建議預習</p> <p>光譜分析</p> <p>實驗原理</p> <p>蛋白質定量是一般生物實驗室常用的基礎技術，依定量的基本原理可以區分為兩大類：物理性與化學性分析法。物理性的蛋白質定量分析法，是偵測蛋白質樣本的折射率、比重、特定氨基酸對紫外線的吸收程度；化學性的蛋白質定量分析法，常被使用的有 Lowry、Bradford 等方法，其原理是分別藉由銅離子於鹼性溶液中，與蛋白質形成複合物，或是以染劑與蛋白質結合，再偵測特定光譜波長的吸收變化，用以推估樣本中蛋白質的濃度。不同的定量方法各有其優缺點，應當依照實</p> |

| | | |
|--------------------|------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | | <p>驗樣本的特性而選擇使用。</p> <p>本次課程所使用之蛋白質定量技術為 Bradford 蛋白質定量法，是一種利用光譜分析估算蛋白質濃度的分析技術。此定量法是利用染劑 Coomassie Brilliant Blue G-250 (以下簡稱 G-250) 與蛋白質結合後，G-250 顏色會由原有之紅棕色轉變為藍色，此時光譜的最大吸收峯波長，由原有 465 nm 轉變為與蛋白質結合後的 595 nm。此一技術的優點有：染劑 G-250 與蛋白質結合所需時間很短，並且 G-250 與蛋白質所形成之複合物有足夠的穩定時間，以進行後續的光譜分析。此外，Bradford 蛋白質定量法相當靈敏、操作步驟簡便，適用於大量樣本的分析，是其另一優點。但此一分析方法仍存有部分缺點：G-250 與蛋白質之結合能力，容易受界面活性劑 sodium dodecyl sulfate (SDS)、Triton，以及蛋白質中胺基酸的組成種類所干擾，而影響定量結果的精準度。</p> |
| <p>劉淑瑛 副教授</p> | <p>正課 偽裝大師-病毒</p> <p>實習操作 微生物的奧秘</p> | <p>正課課程 病毒並非細胞構成之生物體，因此不具任何代謝、複製、生長、分裂等功能，而是具有感染不同宿主之感染性物質。藉由辨認連結宿主細胞表面受體後，進一步入侵到宿主細胞中，夾持宿主細胞所有複製合成機制，組裝出大量嶄新病毒顆粒，釋放到細胞外，繼續感染其它細胞。</p> <p>實習課程</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 選擇性培養基操作。 2. 區別性培養基操作。 3. 增幅培養基操作。 |

| | | |
|---------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>李泰林 副教授</p> | <p>實習操作 動物細胞外源基因轉染</p> | <p>實驗原理</p> <p>轉染 (Transfection) 是以非病毒入侵的方式，將外源遺傳物質 (DNA 或 RNA) 植入真核細胞的一種過程。動物細胞的轉染作用方法如下，(A)經由磷酸鈣攜帶進入細胞，(B)亦可藉由在細胞膜上開出一個暫時性的小孔，使細胞較容易攝取外源基因(電穿孔法)，(C)將細胞及外源基因浸泡在充滿脂質體的液體中，脂質體將會包住外源基因，然後融入細胞膜，並將外源基因釋放到細胞內部。當外源 DNA 進入細胞後，經由 RNA 轉錄及蛋白質轉譯，科學家藉此研究基因功能或生產藥用蛋白。</p> |
| <p>張雲祥 教授</p> | <p>實習操作</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. DNA 萃取與分析 2. 生物跡證分析:現代福爾摩斯 DNA 指紋辨識(PCR) | <p>建議預習</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. DNA 萃取與分析： <ul style="list-style-type: none"> (1) 甚麼是 DNA ? 甚麼是質體 (plasmid) DNA ? 質體 DNA 在現代生物技術上有何應用 ? (2) 何謂基因選殖(克隆) (cloning) ? (3) 何謂 DNA 電泳(electrophoresis) 及其原理。 2. 生物跡證分析-現代福爾摩斯 DNA 指紋辨識(PCR)： <ul style="list-style-type: none"> (1) 聚合酶連鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)的原理與應用。 (2) 何謂生物跡證 ? 何謂 DNA 指紋 ? |
| <p>蔡孟峰 教授</p> | <p>實習操作 癌細胞特性分析</p> | <p>正課課程</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 分子生物學發展歷程與後基因體時代。 2. 標靶治療、個人化醫療與精準醫療 3. 癌症醫學研究新趨勢。 4. 癌症研究分析法簡介 |

| | | |
|------------|-------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | | 實習課程 1. 細胞增生能力分析。 2. 細胞移動能力分析。 3. 細胞侵入能力分析。 |
| 余聰安 副教授 | 實習操作 植物細胞組織培養 | 基礎原理課程 介紹植物複製、全能性、再生之間的相關性、生長調節劑的作用、植物組織的類型。讓學生了解組織培養基本概念後，才會進入實驗主題。 實習課程 瓶中花 DIY 及後續管理注意事項。 |

大葉大學 生物醫學系
高中生物輔助教學課程

螢光仙子的由來－
螢光魚的產製及研究與應用 (基因轉殖)



黃尉東 副教授

Tel : 048-511888-4252 Fax : 048-511326
Email: kater@mail.dyu.edu.tw

1

2015年11月19日，在確認其食用安全性五年、環境安全性三年之後，美國食品藥物管理局（FDA）批准了Aqua Bounty公司的基因改造鮭魚品牌「AquaAdvantage」上市，從而使之成為首個獲批的供食用基改動物。這種鮭魚的主要特點是生長迅速，僅需18個月便能長成一而一般鮭魚需要至少三年。



(大西洋鮭, Salmo salar)

一個基因來自另外一種鮭魚——大鱒大麻哈魚帝王鮭 (King Salmon, 又名契努克鮭 Chinook salmon, 學名 (Oncorhynchus tshawytscha) 提高生長激素分泌水準 美洲綿鯿抗凍蛋白基因的啟動子 全部是三倍體無生育力的雌性

2

商業應用－螢光基因魚



(邵港科技股份有限公司) 3



4

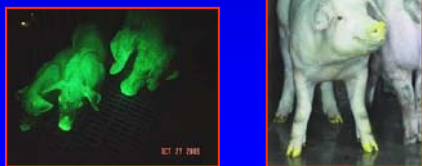
生物醫學應用

螢光鼠



(吳信志, 2005)

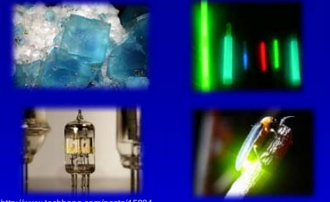
螢光豬



(吳信志, 2006) 5

螢光是什麼?

- 光致發光－螢光、磷光
- 化學發光－螢光棒
- 陰極射線發光－陰極射線
- 生物發光－生物體冷發光



<http://www.techbana.com/posts/15884-scientific-perspective-sound-3-balls-of-the-vacuum-tube-4>



https://travel.network.com.tw/ecourses/firstlypoint_detail.asp?point=104407

基因轉殖動物之螢光是由螢光蛋白所發出





<https://zh.wikipedia.org/wiki> 6



The Nobel Prize in Chemistry (諾貝爾化學獎) 2008

Osamu Shimomura
下村 脩
1/3 of the prize
USA
Marine Biological Laboratory (MBL)
Woods Hole, MA, USA
b. 1928
(in Kyoto, Japan)

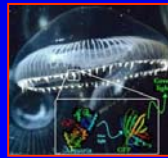



Martin Chalfie
1/3 of the prize
USA
Columbia University
New York, NY, USA
b. 1947

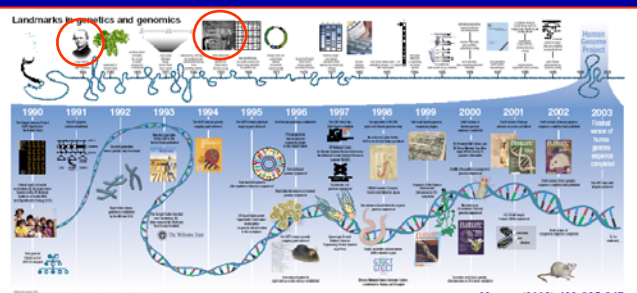
Roger Y. Tsien
錢永健
1/3 of the prize
USA
University of California
San Diego, CA, USA
b. 1952-2016

"for the discovery and development of the green fluorescent protein, GFP"



7

遺傳學及基因體學上之重要發現



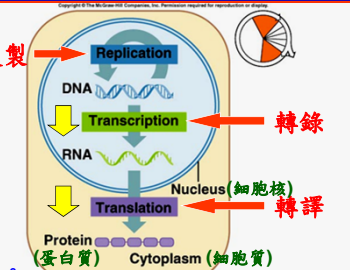
Nature (2003) 422:835-847

Genome = Gene + Chromosome
基因組/體 = 基因 + 染色體


8

何謂基因

基因 (遺傳因子) 是具有遺傳效應之DNA片段。基因支持着生命之基本構造與性能。儲存生命的種族、血型、孕育、生長、凋亡過程的全部信息。環境和遺傳的互相依賴，演繹着生命的繁衍、細胞分裂和蛋白質合成等重要生理過程。生物體的生、長、衰、病、老、死等一切生命現象都與基因有關。它也是決定生命健康的內在因素。因此，基因具有雙重屬性：物質性 (存在方式) 和信息性 (根本屬性)。(百度百科)



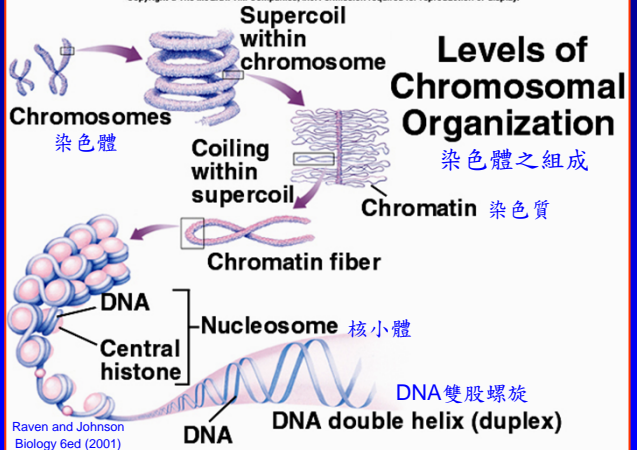
Central Dogma
(中心假說/法則)



9

Levels of Chromosomal Organization

染色體之組成

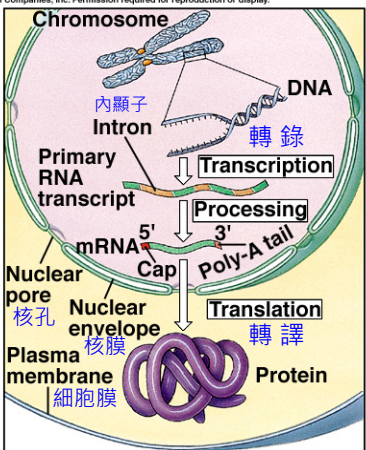


10

Gene Information Processing— Eukaryotes

真核生物

蛋白質從何而來?
蛋白質由基因(DNA)經轉錄作用(RNA)及轉譯作用而產生



11

脊椎動物胚之發育

Development of Vertebrate Embryos

| Xenopus | Chick | Mouse | Zebrafish |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  1 mm |  10 mm |  1 mm |  1 mm |
|  1 dpf |  4 dpl |  10 dpf |  1 dpf |
|  60 dpf |  21 dpl |  50 dpf |  90 dpf |

12

Viruses

- acellular infectious agents
- virologists
 - scientists that study viruses
- virology
 - study of viruses

1

Viruses 病毒

- Cause many infections of humans, animals, plants, and bacteria
- Cannot carry out any metabolic pathway
- Neither grow nor respond to the environment
- Cannot reproduce independently
- Obligate intracellular parasites 絕對細胞內寄生性

2

Characteristics 特性 of Viruses

- Cause most diseases that plague industrialized world (common cold傷風, influenza流感, herpes泡疹, AIDS)
- Virus – miniscule微小, acellular不具細胞構造, infectious agent具感染性 having one or several pieces of either DNA or RNA
- No cytoplasmic membrane, cytosol, organelles (once viruses have invaded a cell, they take control of the cell's metabolic machinery to produce more molecules of viral)

Characteristics of Viruses

- Extracellular state
 - Called virion病毒顆粒
 - Protein coat (capsid蛋白外殼) surrounding nucleic acid
 - Nucleic acid and capsid also called nucleocapsid
 - Some have phospholipid envelope被膜
 - Outermost layer provides protection and recognition sites for host cells
- Intracellular state
 - Capsid removed

4

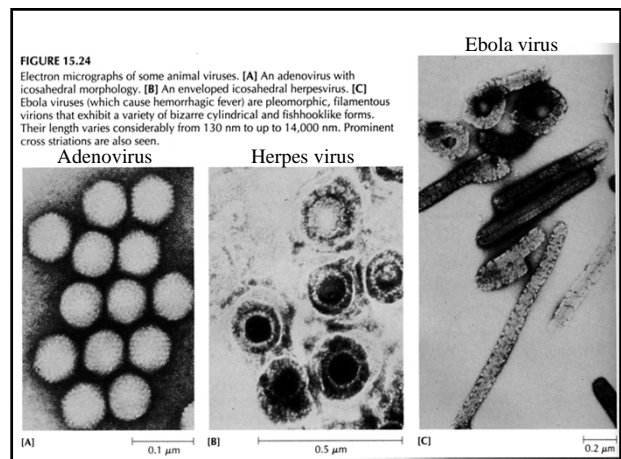
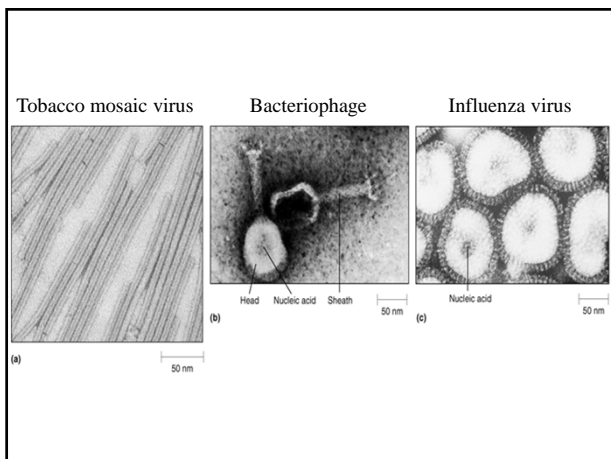
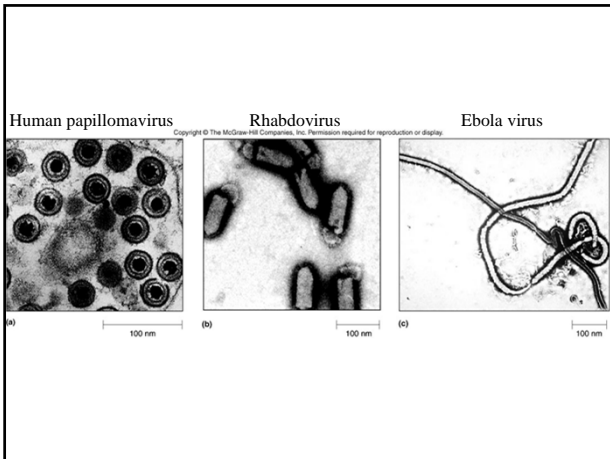


FIGURE 15.24

Electron micrographs of some animal viruses. [A] An adenovirus with icosahedral morphology. [B] An enveloped icosahedral herpesvirus. [C] Ebola viruses (which cause hemorrhagic fever) are pleomorphic, filamentous virions that exhibit a variety of bizarre cylindrical and fishhooklike forms. Their length varies considerably from 130 nm to up to 14,000 nm. Prominent cross striations are also seen.



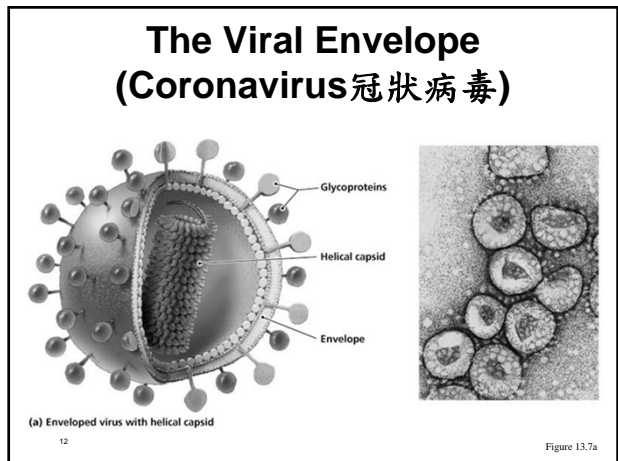
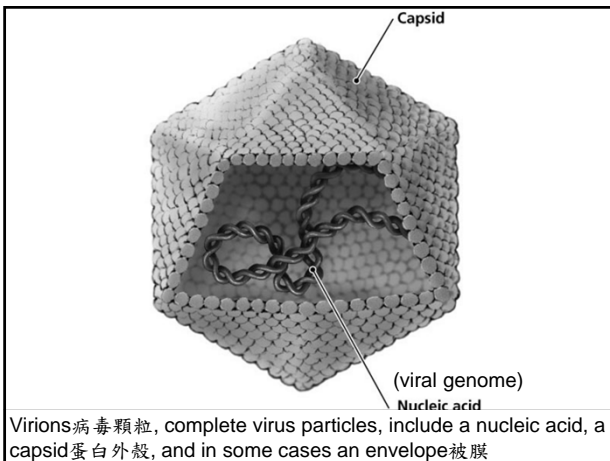
Viral agents assigned to biosafety level 4

| | | | |
|------------------------------------------|---------------------------------|------------------------------------|-----------|
| Central European tick-borne encephalitis | Congo-Crimean hemorrhagic fever | Ebola | Guanarito |
| Junin | Kyasanur Forest disease | Lassa | Machupo |
| Marburg | Omsk hemorrhagic fever | Russian Spring-Summer encephalitis | Sabia |

行政院衛生署預防醫學研究所生物安全防護基準 病原體層級

| 病原體的生物安全層級分類標準 | 病原體層級例 |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 第1級 對個體及地區社會造成低度危險，不可能引起人類疾病或獸醫學上重要動物疾病。 | 病毒： 疫苗病毒（牛痘除外）。 細菌： 第2、3級以外全部。 真菌： 第2、3級以外全部。 寄生蟲： 第2級以外全部。 |
| 第2級 對個體造成中度危險，對地區社會造成輕度危險，對人類或動物具致病性，但對實驗室人員、地區社會、家畜、環境等不會帶來重大災害。於實驗室內不慎暴露在这些病原體下，雖可能嚴重感染，但有有效的治療方法，傳染的可能性低。 | 病毒： 腺病毒、肝炎病毒A-E、所有的人類疱疹病毒、人類T細胞白血病毒、流行性感冒病毒、日本腦炎病毒、麻疹病毒、腮腺炎病毒(Mumps virus)、德國麻疹病毒、登革熱病毒(Dengue virus)等 細菌： 大腸桿菌、腦膜炎雙球菌、百日咳桿菌、痢疾桿菌、破傷風桿菌、葡萄球菌、披衣菌(<i>Chlamydia</i>)、霍亂弧菌等 真菌： 霉菌(<i>Aspergillus</i>)、隱球菌(<i>Cryptococcus</i>)念珠菌等 寄生蟲： 痢疾阿米巴、毒漿原蟲、水胞條蟲(<i>Echinococcus</i>)等 |

| 病原體的生物安全層級分類標準 | 病原體層級例 |
|--------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 第3級 對個體造成高度危險，對地區社會造成低度危險感染人類雖能引起重大疾病，但傳給其他個體的可能性低。 | 病毒： 愛滋病毒、裂谷熱病毒、漢他病毒(Hanta virus)、狂犬病毒(Rabies virus)、黃熱病毒(Yellow fever virus)、SARS virus等 細菌： 結核桿菌、傷寒桿菌、萊菌式菌、立克次體、抗美錫西林黃色葡萄球菌等 真菌： 芽生菌(<i>Blastomyces</i>)、組織漿菌(<i>Histoplasma</i>)等 寄生蟲： 無 |
| 第4級 對個體及地區社會造成高度危險能引起人類和動物重大疾病，且易由患者直接或間接傳染給其他個體。會經由空氣傳播，目前無疫苗及藥物可用。 | 病毒： 拉薩熱病毒、伊波拉病毒、馬堡病毒、克里米亞-剛果型出血熱病毒等 細菌： 無 真菌： 無 寄生蟲： 無 |



大葉大學 生物醫學系
高中生物輔助教學課程

實驗：斑馬魚受精卵之收集與觀察



Zebrafish (*Danio rerio*)

黃尉東 副教授

Tel : 048-511888 ext 4252 Fax : 048-511326
Email: kater@mail.dyu.edu.tw

一、斑馬魚簡介
二、斑馬魚受精卵之收集與觀察

一、斑馬魚簡介

The Biology And Genetics Of Zebrafish

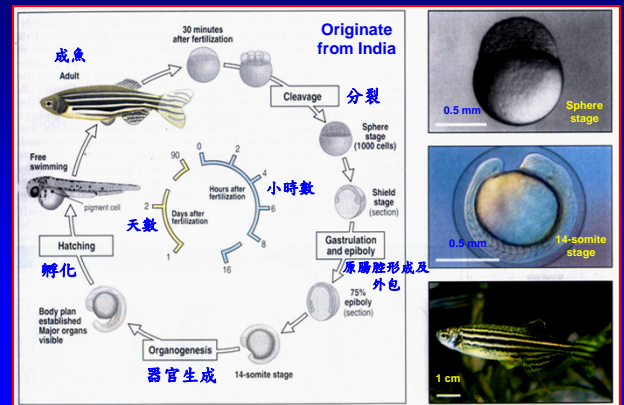
• Biology of zebrafish (*Danio rerio*)

- a. 體長：成魚約 3-4 cm
- b. 器官生成：受精後1天
- c. 孵化時間：受精後2-3天
- d. 性成熟時間：受精後2-3月
- e. 生命期：2年
- f. 卵子特性：受精後2天均為透明
- g. 性成熟雌魚可生產卵數：200 卵/星期
- h. 生長溫度：28.5 °C

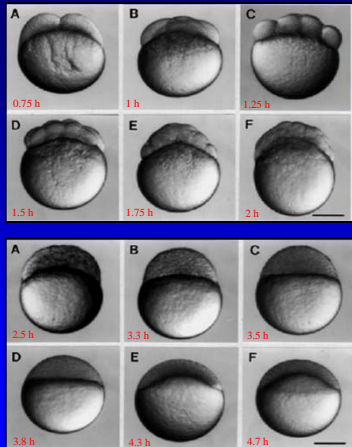
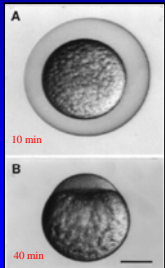
• Zebrafish genome size (基因組大小)

- a. 1.7×10^9 bp, 人類： 3×10^9 bp
- b. 染色體對數：25

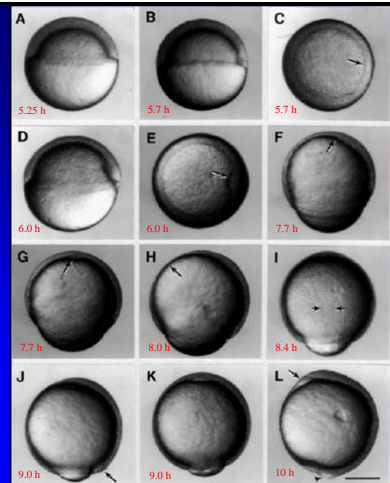
斑馬魚之發育



斑馬魚之發育(一)

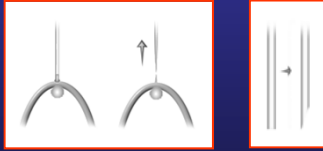


斑馬魚之發育(二)



大葉大學 生物醫學系
高中生物輔助教學課程

實驗：顯微注射吸管之製備



黃尉東 副教授

Tel : 048-511888 ext 4252 Fax : 048-511326

Email: kater@mail.dyu.edu.tw

1

前言

進行顯微操作的第一步即為製作顯微工具，目前已有商業化的產品可以購買，但為符合各個實驗室之試驗需求以及經費之考量，製作顯微工具已成為顯微操作之基本技術。

製作顯微工具應避免過程中的污染，故需特別注意毛細管的清洗、滅菌及製針時的無菌操作。

2

大葉大學 生物醫學系
動物基因轉殖技術課程
顯微注射設備



3



大葉大學 生物醫學系
動物基因轉殖技術課程
顯微注射吸管製備設備

4

儀器介紹

拉針器 (Puller)



主要是將毛細管拉出所需顯微工具之雛形，不同用途的工具需調整其設定值，其包括速度 (velocity index, VI)、拉力 (pull index, PI) 及熱度 (heat index, HI) 。

圖 1. 拉針器 (Puller, Sutter Instrument Co., Model P-80)

5

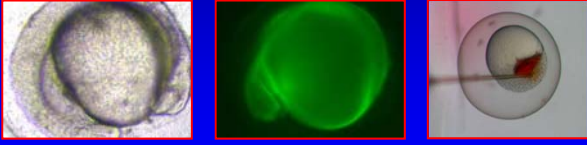
圖 2. 拉針器 (Puller, Sutter Instrument Co., Model P-97)



6

大葉大學 生物醫學系
高中生物輔助教學課程

實驗：顯微注射法 (Microinjection)



黃尉東 副教授

Tel : 048-511888 ext 4252 Fax : 048-511326
Email: kater@mail.dyu.edu.tw

1



兩棲、爬蟲或魚
類胚之顯微操作

Nikon
SMZ 800

Narishige
IM 300

2



拉針器 (Puller)

磨針器 (Grinder)

鍛燒器 (Microforge)

注射器 (Injector)

3



Narishige IM 300
注射器 (Injector)

4



5



Narishige
IM 151

顯微注射操作手臂
(氣壓式注射)

6

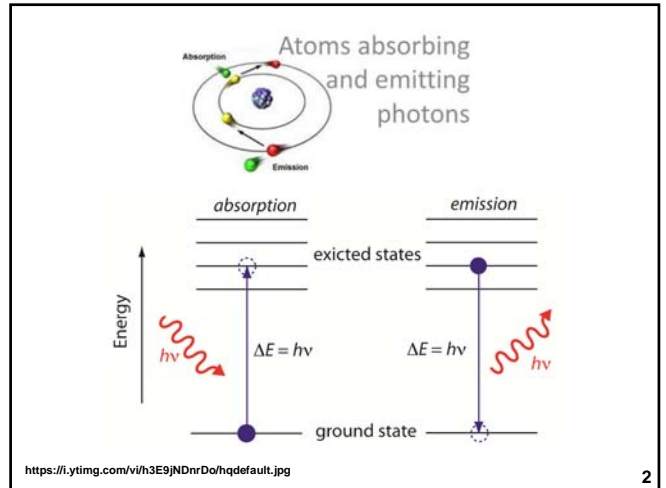


大葉大學 生物醫學系
高中生物輔助教學課程

大葉大學

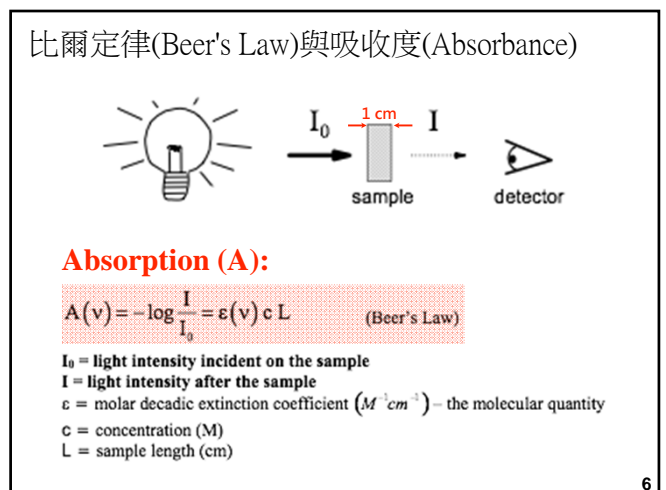
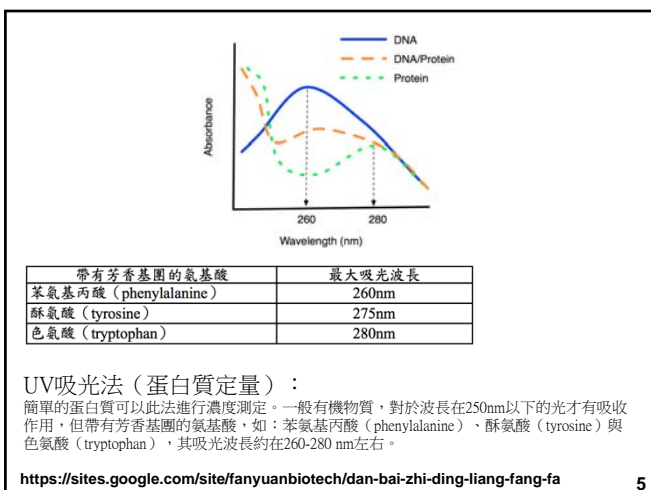
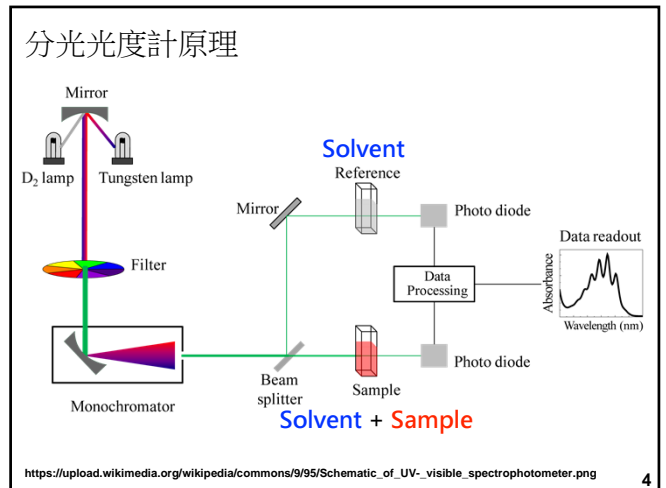
蛋白質光譜定量分析

游志文 副教授
 Tel : 048-511888 ext 4258 Fax : 048-511326
 Email: cwyu@mail.dyu.edu.tw



電磁輻射不同波長對物質的影響

| 電磁輻射區域 | 波長(nm) | 性質的影響 |
|-----------|-----------------------------------------|--------|
| γ-射線 | $5 \times 10^{-14} \sim 0.14$ | 原子核 |
| X-射線吸收 | 0.01 ~ 10 | 內層電子 |
| 真空UV吸收 | 10 ~ 180 | 鍵結電子 |
| UV/Vis 吸收 | 180 ~ 780 | 鍵結電子 |
| IR 吸收 | $780 \sim 3 \times 10^5$ | 分子旋轉震動 |
| 微波吸收 | $7.5 \times 10^5 \sim 3.75 \times 10^6$ | 分子旋轉 |
| 無線電波 | 0.6 ~ 10 m | 核子自旋 |



Exp.1,2,3 Techniques for Culture Transfer and Isolation of Pure Cultures, Characteristics of Microbiol Colonies

Principle:

1. An **inoculating needle** or **loop** must be sterilized by flame until the entire wire becomes red hot. Then the upper portion of the handle is rapidly passed through the flame.
2. The caps and necks of the tubes are briefly passed through the flame.
3. The sterile inoculating needle or loop is further cooled by touching the inner wall of the culture tube or Petri dish before transferring the **inoculum**.
4. In the case of a **broth** medium, the loop or needle is shaken slightly to dislodge the organisms, with an agar **slant** medium, it is drawn lightly over the slant surface in a straight or zigzag line.
5. In a **stab** inoculation, the inoculating needle is inserted in the bottom of the **agar deep tube** in a straight line and rapidly withdrawn along the line of insertion.

Materials:

- I. 24-h nutrient broth and nutrient agar slant cultures of *Serratia marcescens*.
- II. Mixed culture of three parts *Serratia marcescens* and one part *Escherichia coli*.

Media:

- I. Two NB tubes, 2 NA slant, and 2 NA deep tubes per group.
- II. Three NA plates per group.

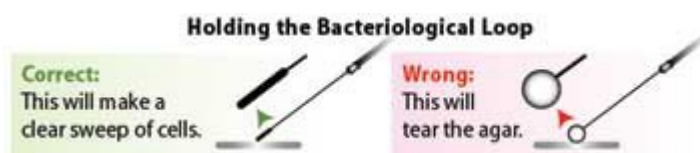
Procedure:

I.

1. Label all tubes with group name, culture name, and date.
2. Subculture *Serratia marcescens* from both broth and slant culture to NB, NA slant and deep tubes according to the principles.
3. Incubate all cultures at 25°C for 24-48 h.

II.

1. **Streak plating.**
2. Incubate all plates in an inverted position at 25°C for 24-48 h.



大葉大學 生物醫學系
高中生物輔助教學課程

轉介選殖基因進入動物細胞 (introducing cloned genes into cultured mammalian cells)
 (轉染; transfection)

李泰林 副教授
 Tel : 048-511888-4257 Fax : 048-511326
 Email: tailin@mail.dyu.edu.tw

1

如果你發現了一個神祕、未知基因或蛋白質，你該怎麼做以了解此基因功能？

2

←1987前，農耕種模式

孟山都抗殺草劑植物問世後

3

基因功能始於DNA轉錄RNA而終止於蛋白質功能。因此，將DNA送入生物體或細胞中是了解該基因功能首要步驟。

4

轉基因作物是如何產生？抗蟲害玉米或棉花！

5

轉基因之應用:

- 黃金米(富含維生素A)
- AquAdvantage salmon (快速生長)

6

DNA 萃取與分析

張雲祥 教授

大葉大學 分子生物科技學系

目的

將質體 DNA 自大腸桿菌(*Escherichia coli*)中萃取分離及進行電泳分析。

前言

許多細菌內除染色體 DNA (chromosomal DNA)外，另存有一稱為質體(plasmid)之環狀 DNA，質體為基因選殖(gene cloning)過程中常用之載體(vector)之一。質體之抽取以 alkaline lysis 為目前最常用之方法，此法是先將細菌細胞懸浮在等張(isotonic)之 glucose/Tris/EDTA 溶液中，再以含 SDS 之鹼性溶液(pH 12.0~12.5)處理細胞。SDS 可將細胞膜打破，而鹼則可破壞 DNA 之氫鍵，致使染色體 DNA 變性(denature; 由雙股變為單股的結構)，但因質體 DNA 為超螺旋(supercoil)之結構，於 pH 12.0~12.5 之範圍內不會變性；而在加入酸性溶液(pH 5.5)中和後，變性之染色體 DNA 即相互配對而形成團狀，而質體 DNA 則維持原來形狀，經離心後，成團之染色體 DNA 與蛋白質會沉澱於管壁，而質體 DNA 則留存於上清液(supernatant)中，再利用 phenol (pH>7.6)萃取上清液，進一步去除殘留之蛋白質，最後再以酒精沈澱質體 DNA。另將質體 DNA 以限制酶切割後，以瓊脂膠體電泳(agarose gel electrophoresis)將 DNA 之片段依大小予以分離。DNA 含有磷酸根(phosphate group)，於中性及鹼性環境下，會帶有負電荷，致使其於電場中往正極移動。Agarose 於高溫下(>60 °C)會融解，而在室溫時則會凝固成為膠體，膠體內有許多孔隙，孔隙的大小(pore size)決定於所使用之瓊脂濃度，濃度愈高孔隙則愈小。於電場中，不同大小之 DNA 片段，在瓊脂膠體之孔隙內往正極移動，DNA 體積(分子量)愈大者，移動時所受之阻力愈大，致使其移動較慢；而 DNA 體積(分子量)較小者，則移動較快。因此藉由瓊脂膠體電泳之過程，即可將大小不同之 DNA 分開。

材料與方法

A. 材料

菌種及質體：內含質體 DNA 轉形 *E. coli* (DH5 α)細胞

培養基：LB 液態培養基(含抗生素 20 μ g/mL Ampicillin)

註：須依質體上所帶之抗生素選擇標誌(selection marker)種類，選擇不同抗生素

其他藥劑：Glucose/Tris/EDTA 溶液 (50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0)

1 M Tris-HCl pH8.0

0.5 M EDTA pH 8.0

NaOH/SDS 溶液 (0.2 N NaOH, 1% SDS)

3 M potassium acetate(KOAc, pH 5.5)

DNA 之瓊脂膠體電泳(agarose gel electrophoresis)分析

目的

PCR 大量複製或其他方式與來源得到的 DNA 片段後，以瓊脂膠體電泳(agarose gel electrophoresis)將 DNA 片段依將其分子量大小予以分離，得以初步觀察得知欲分析 DNA 之數量以及分子量大小。

原理

瓊脂凝固成膠體後在膠體內部會形成孔隙，藉由 DNA 分子帶有負電的特性，在膠體兩端建構電場及可使 DNA 在膠體內泳動，當 DNA 通過膠體內孔隙時即會因分子大小而影響其泳動通過速度，藉此即可依分子量大小予以分離，再經特殊染料染色 DNA，以紫外光源照射膠體即可激發 DNA 片段所發出螢光，而可觀察到 DNA 片段。可直接觀察或以觀察到以照相系統記錄之。

材料

1. DNA：前項實驗所得的 DNA
2. 瓊脂
3. 螢光染劑(EtBr 或 Sypro Green 等)
4. DNA Marker (100 bp)
5. 1× TAE 電泳緩衝溶液
6. 10× DNA 電泳樣品緩衝溶液(loading buffer)
7. 鑄膠器、尺梳(comb)、電泳槽、電源供應器、微量吸管器、微量吸管

方法

1. 秤取配製所需濃度膠體之重量的瓊脂加入 100 ml 1× TAE 電泳緩衝溶液中，於高溫下令其完全融解並加以攪拌，待溫度略降後加入螢光染劑並混勻倒入鑄膠器中，插入尺梳，再令其繼續降溫至完全凝固(室溫下 20 分鐘以上)，製備成特定所需濃度之瓊脂膠體。
2. 完全凝固後拔去尺梳，將瓊脂膠體置入電泳槽，加入 1X TAE 電泳緩衝溶液至完全淹過膠體 1~2 mm。
3. 將 9 μ l DNA 樣品混合 1 μ l 10× DNA 電泳樣品緩衝溶液，加入在膠體上由尺梳所形成的孔(well)。
4. 蓋上電泳槽上蓋，連接開啟電源進行電泳；注意電場正負極方向。
5. 於紫外燈激發下產生螢光，觀察 DNA 片段並照相記錄。

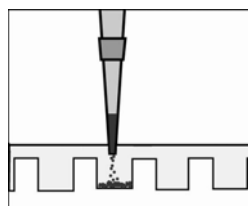


Figure by MIT OpenCourseWare

聚合酶鍊反應(polymerase chain reaction, PCR)

目的

利用聚合酶鍊反應(polymerase chain reaction, PCR)來大量複製所需的 DNA 片段。PCR 的運用範圍很廣，常用的有(1)從基因體中擴增出特定的 DNA 片段，(2)製造 DNA 探針(probe)，(3)進行 DNA 突變(mutagenesis) (例如 point mutation、deletion 及 insertion 等)。

原理

PCR 反應的進行需要有耐高溫 DNA 聚合酶(polymerase)、模版(template) DNA、引子(primer)、 Mg^{2+} 、四種核苷酸(dNTP: dATP、dTTP、dGTP 及 dCTP)，在適當的緩衝溶液下，以三種不同溫度進行 DNA 分子的變性(denaturation)，黏合(annealing)，及延伸(聚合)(elongation)等三個步驟，在經過連續多個循環後重複進行 DNA 聚合反應，便可得到大量特定的 DNA 片段。

材料

細菌質體(plasmid) DNA (作為模版 DNA)、Taq DNA 聚合酶、引子、dNTP、10× PCR 緩衝溶液及滅菌純水，PCR 儀器、0.2 ml 薄壁微量離心管、微量吸管器(micropipette)、微量吸管(tip)。

方法

以滅菌純水適當稀釋 DNA 溶液和引子備用。取微量離心管配製 PCR 溶液，依序加入滅菌純水、10× PCR 緩衝溶液、dNTP、質體 DNA 溶液、引子及 Taq DNA 聚合酵素，混合均勻後將反應管置於離心機短暫離心，使混合液聚積於反應管之底部，移入 PCR 儀器，設定條件進行反應，結束後，取出 PCR 產物進行膠體電泳分析。

► PCR 溶液配製


| | |
|---------------------------------|--------------|
| 滅菌純水 | 7.1 μ l |
| 10× PCR 緩衝溶液(含 15 mM $MgCl_2$) | 1.0 μ l |
| 2.5 mM dNTP | 0.8 μ l |
| 模版 DNA 溶液(100 ng) | 0.5 μ l |
| 10 μ M 引子 F | 0.2 μ l |
| 10 μ M 引子 R | 0.2 μ l |
| Taq DNA 聚合酵素(2 U/ μ L). | 0.2 μ l |
| 總體積 | 10.0 μ l |

► PCR 條件

| 步驟 | 溫度 | 時間 |
|--------------------|-------|--------|
| 1. 最初變性 | 95 °C | 3 min |
| 2. 變性 | 95 °C | 30 sec |
| 3. 黏接 | 55 °C | 30 sec |
| 4. 延展 | 72 °C | 20 sec |
| 步驟2至步驟4，共進行28個循環反應 | | |
| 5. 最終延展 | 72 °C | 5 min |

大葉大學 生物醫學系
高中生物輔助教學課程

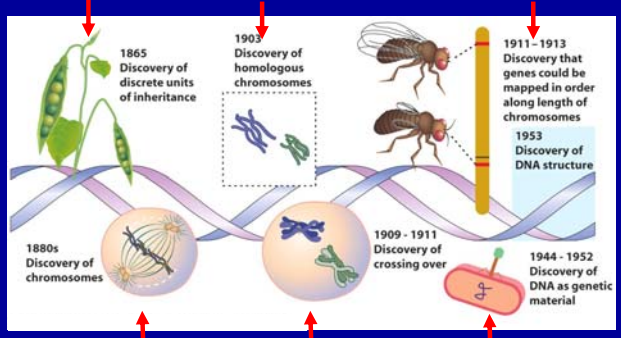
「癌細胞特性分析實驗」課程



蔡孟峯 博士 (Meng-Feng, Tsai PhD)
教授
大葉大學 生物醫學系

1

Gregor Mendel Meiosis: synapsis Tomas Hunt Morgan: Sex Linkage

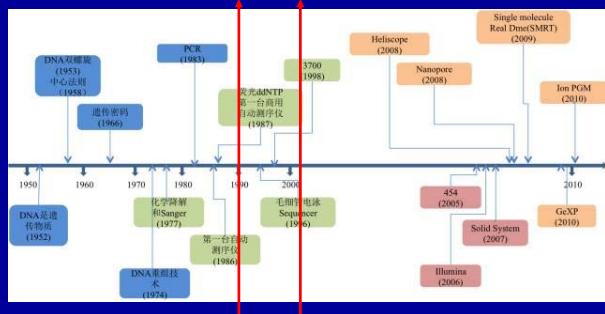


1865 Discovery of discrete units of inheritance
1880s Discovery of chromosomes
1903 Discovery of homologous chromosomes
1909 - 1911 Discovery of crossing over
1911-1913 Discovery that genes could be mapped in order along length of chromosomes
1944 - 1952 Discovery of DNA as genetic material
1953 Discovery of DNA structure

Mitosis Meiosis: crossing over Avery (1944)
Hershey-Chase (1952)

2


基因選殖 基因體 後基因體
基因重組 解序



1950 DNA是遺傳物質 (1952)
1953 DNA複製中心法則 (1953)
1956 遺傳密碼 (1956)
1960
1970 化學降解和Sanger (1977)
1974 DNA重組技術 (1974)
1983 PCR (1983)
1987 第一台商用測序儀 (1987)
1996 毛刷式 Sequencer (1996)
1998 3700 (1998)
2005 454 (2005)
2006 Illumina (2006)
2007 Solid System (2007)
2008 Helioscope (2008)
2008 Nanopore (2008)
2009 Single molecule Real Dms(SMRT) (2009)
2010 Ion PGM (2010)
2010 GEXP (2010)


3

Human Genome Project




2004, Nature

4



5



6

大葉大學 生物醫學系

高中生物輔助教學課程

植物細胞組織培養

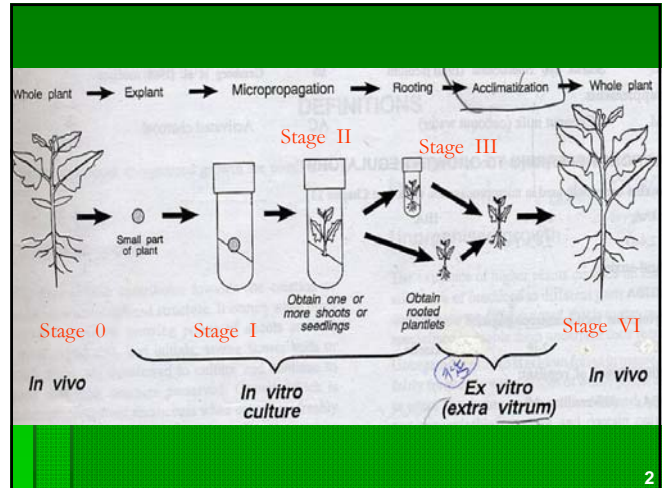
Plant Tissue Culture Techniques

余聰安 副教授

Tel : 048-511888-4259 Fax : 048-511326

Email: tay@mail.dyu.edu.tw

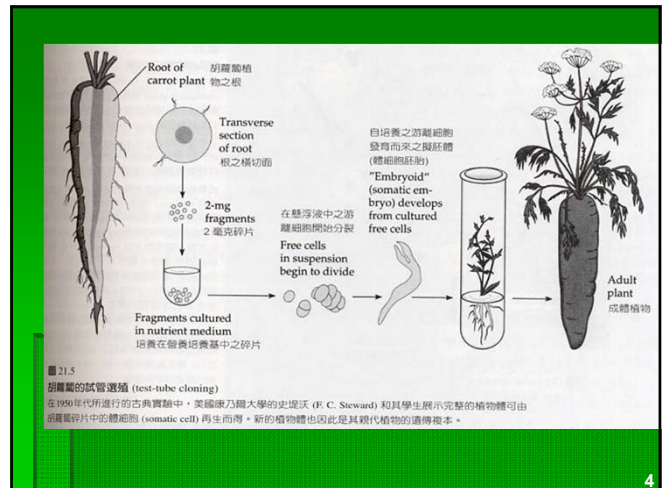
1



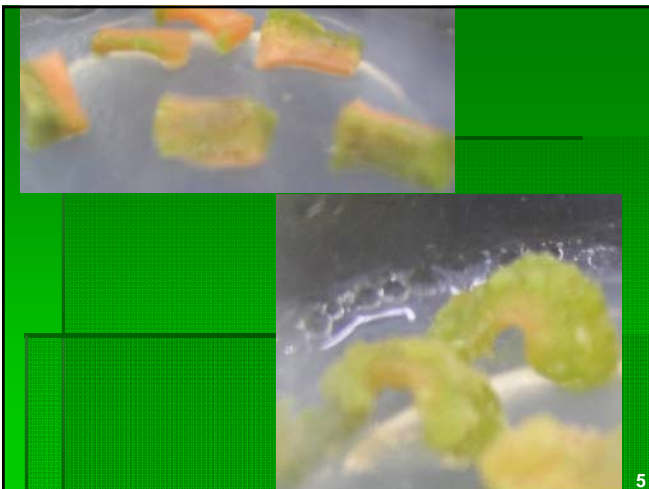
2

Totipotency

Plant cells retain a latent capacity to produce a whole plant.



4



5



6