實驗活動（一）

細菌轉化

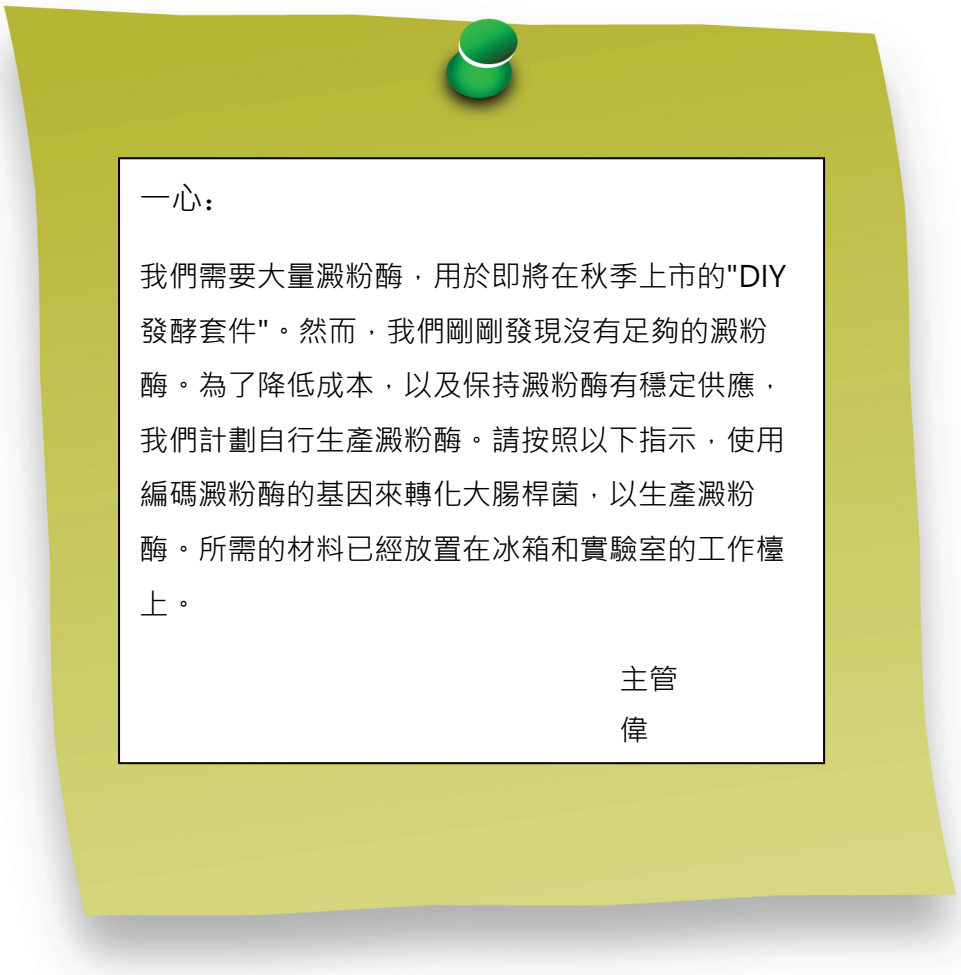
（學生版本）

I. 背景

現今，許多生物分子都可以通過轉化微生物來製造。例如，糖尿病患者需要注射胰島素來控制血糖水平，由於患者眾多，對胰島素需求量甚高，科研人員就以轉化人類胰島素基因的細菌，如大腸桿菌（*E. coli*）和釀酒酵母（*S. cerevisiae*）來大規模生產胰島素。因此，細菌轉化是生物工程領域中一項重要且具實用價值的技術。

情景

假設你在生物技術公司做實習生，你的主管在你的工作檯留下了幾份材料和一則備忘錄：



一心：

我們需要大量澱粉酶，用於即將在秋季上市的"DIY發酵套件"。然而，我們剛剛發現沒有足夠的澱粉酶。為了降低成本，以及保持澱粉酶有穩定供應，我們計劃自行生產澱粉酶。請按照以下指示，使用編碼澱粉酶的基因來轉化大腸桿菌，以生產澱粉酶。所需的材料已經放置在冰箱和實驗室的工作檯上。

主管

偉

II. 關於實驗設計的導引問題

1. 大腸桿菌本身並不會製造澱粉酶，如何把它們轉化，以產生澱粉酶？
2. 本實驗將使用一種稱為「pAmylase」的重組質粒。在這個重組質粒中需具備哪些基因？
3. 如何辨識已經成功攝入重組質粒的細菌？要使用哪種培養基？

III. 實驗目標

1. 以生物技術程序，把重組質粒「pAmylase」轉化入非致病性大腸桿菌內，該質粒具備一個澱粉酶基因和一個抗氨苄青黴素基因；以及
2. 顯示大腸桿菌細胞已被成功轉化。

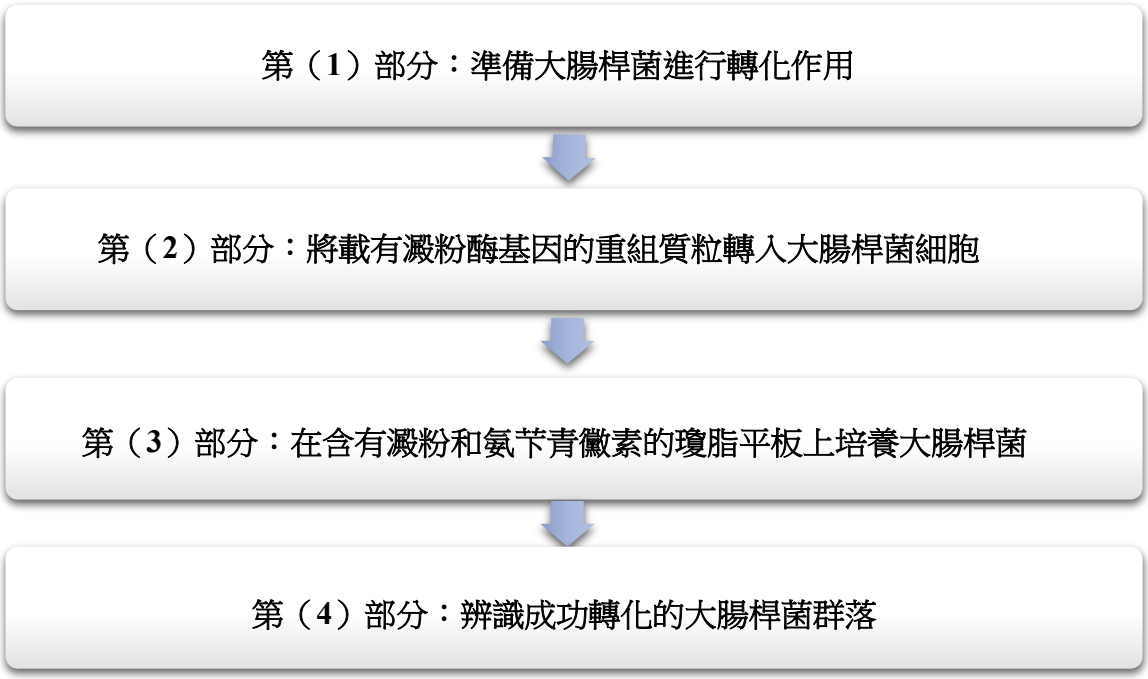
IV. 預期學習成果

完成這項學習活動後，學生應能：

1. 認識細菌轉化的潛在應用；
2. 以無菌技術培養細菌；
3. 進行基本的細菌轉化程序；以及
4. 辨識成功轉化的細菌。

V. 實驗活動

A. 概述



B. 實驗第（1）部分：準備大腸桿菌進行轉化作用

a) 設備和材料（每組）

設備

- 本生燈 × 1
- 打火器 × 1

材料

- 瓊脂平板（帶有大腸桿菌群落） × 1（每班）
- 培養管（盛有 5 ml LB 液體培養基*） × 1
- 接種環 × 1
- 標記筆 × 1
- 噴壺（盛有 70% 乙醇） × 1
- 紙巾 × 1 盒
- 生物危害品丟棄袋 × 1
- 廢棄物貯存容器（盛有 10% 氯漂白劑） × 1

*註解：Luria Bertani（LB）液體培養基是一種含鹽量比常規培養基更適合大腸桿菌生長的培養基。

b) 安全措施

- 穿着實驗袍。
- 束起長髮。
- 實驗期間佩戴手套。
- 實驗前後洗手，以去除所有污染。
- 在靠近任何火焰之前，請確保雙手或手套上的乙醇已完全揮發。
- 實驗結束後，妥善處理或消毒所有材料。

c) 實驗步驟

1. 以 70%乙醇# 消毒實驗檯面和戴着手套的手。

#注意危險：遠離火源！在乙醇未完全揮發之前，不要點燃火焰！

2. 標記盛有 5 ml LB 液體培養基的培養管為「大腸桿菌」，並寫上實驗日期、班別及組別（圖 1 ）。

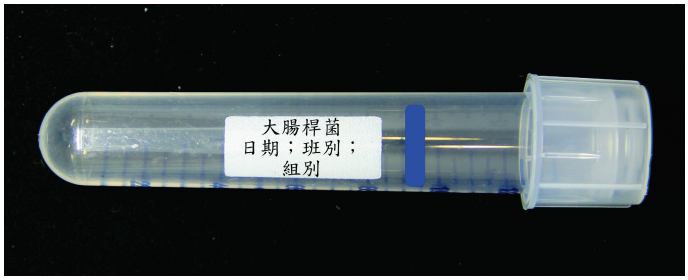


圖 1

3. 點燃本生燈。
4. 將接種環燒至通紅（圖 2），然後讓其冷卻[*]。

[*]註解：必須將金屬接種環燒至通紅，去除之前的所有細菌殘留，以防止當前樣本被污染。

讓接種環充分冷卻也是很重要的，因為冷卻不足會殺死接種的細菌。

如果使用一次性的無菌塑料接種環，則無需用火燒，但必須每次更換。

圖 2

5. 以無菌技術[#]用已消毒的接種環從瓊脂平板挑選單一大腸桿菌群落。

[#]註解：有關無菌技術的詳細內容，請參閱附錄 1 步驟 3–4。

6. 把瓊脂平板蓋打開至約 45º[^]（圖 3），將接種環放到瓊脂平板上。

[^]註解：這做法可盡量減少瓊脂暴露於大氣中。

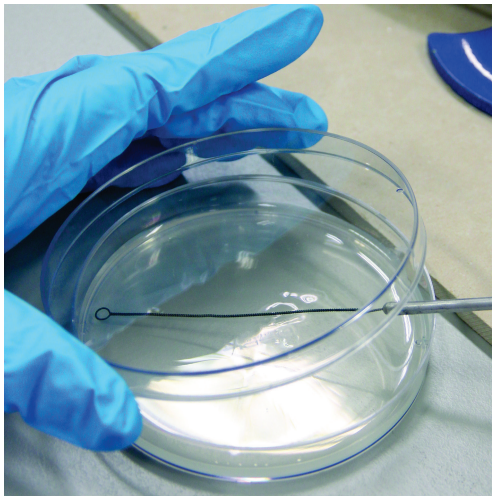


圖 3

7. 將大腸桿菌群落轉移到標記「大腸桿菌」的 5 ml 培養管中（圖 4）。

圖 4

8. 將培養管蓋好，用手指輕拂培養基 2–3 次讓細胞再懸浮。
9. 關掉本生燈。
10. 將培養管放於室溫*環境下或放置在 25–30°C 的培養箱中培養 48 小時。

> *註解：室溫可因不同的處所環境而有所差異；因此，所需要的培養時間也可能會有所不同。

11. 在建議的培養時間後，將培養管存放於 4°C，直到進行實驗第（2）部分。

C. 實驗第（2）部分：將載有澱粉酶基因的重組質粒轉入大腸桿菌細胞

a) 設備和材料（每組）

設備

- 適用於 2 ml 微量離心管的微量離心機 × 1（每班）
- 水浴（42°C） × 1（每班）
- 冰浴 × 1
- 計時器 × 1
- 微量移液器（P1000, P200 及 P20）和無菌移液器吸頭

材料

- 來自第（1）部分的大腸桿菌培養物 × 1
- 感受態緩衝液（450 µl） × 1
- pAmylase 質粒（0.08 µg／µl, 7 µl） × 1
- 無菌蒸餾水（20 µl） × 1
- LB 液體培養基（550 µl） × 1
- 1.75 ml 微量離心管 × 2

- 標記筆 × 1
- 噴壺（盛有 70% 乙醇） × 1
- 紙巾 × 1 盒
- 生物危害品丟棄袋 × 1
- 廢棄物貯存容器（盛有 10% 氯漂白劑） × 1

b) 安全措施

- 穿着實驗袍。
- 束起長髮。
- 實驗期間佩戴手套。
- 實驗前後洗手，以去除所有污染。
- 在靠近任何火焰之前，請確保雙手和手套上的乙醇已完全揮發。
- 實驗結束後，妥善處理或消毒所有材料。

c) 實驗步驟

以感受態緩衝液代替 LB 液體培養基

1. 以 70%乙醇*消毒實驗檯面和戴着手套的手。

#注意危險：遠離火源！
在乙醇未完全揮發之前，
不要點燃火焰！

2. 將 2 支微量離心管分別標記為「pAmy」及「-C」（此代表陰性對照），並寫上組別（圖 5）。

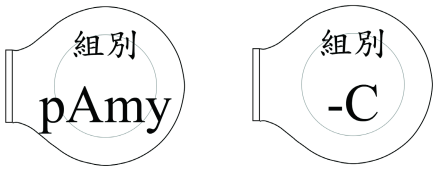


圖 5

3. 用手指輕拂（圖 6）大腸桿菌培養管讓細胞再懸浮，用 P1000 微量移液器*及新的無菌吸頭，分別把 1.5 ml 大腸桿菌培養物轉移到每支已標記的微量離心管中。

*註解：P1000 微量移液器的最大容量為 1000 µl 或 1 ml。 如果需要轉移 1.5 ml 的容量，就需要吸取 2 次，每次 750 µl。

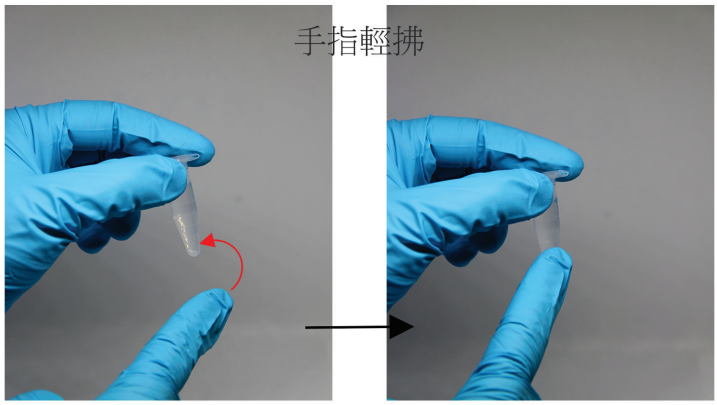


圖 6

4. 以 5,000 rpm 的速度把 2 支離心管進行 3 分鐘離心處理，以沉澱大腸桿菌（圖 7）。將離心管的上清液小心地倒入盛有 10% 氯漂白劑的廢棄物貯存容器中。**保留沉澱的細胞團**。

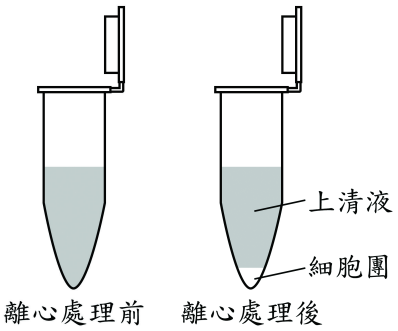


圖 7

5. 用 P200 微量移液器及無菌吸頭*，分別以 100 µl 冰凍的感受態緩衝液** 沖洗每個沉澱的細胞團（圖 8）。用移液器輕輕地上下吸移液體，把沉澱細胞完全懸浮。跟着立即執行步驟 6。

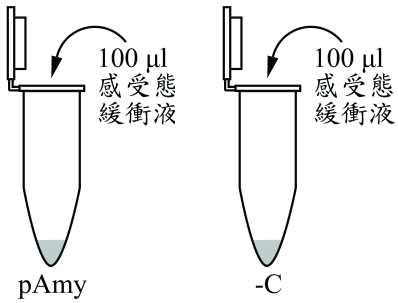


圖 8

*注意：在處理不同樣本時使用新的吸頭。

**註解：在正常情況下，DNA 是不能穿過細菌的細胞膜。但感受態緩衝液中的鈣離子有助增加細菌細胞膜的通透性，從而讓細胞更容易攝入外在的質粒。

6. 以 5,000 rpm 的速度把 2 支離心管進行 3 分鐘離心處理，以沉澱大腸桿菌（圖 7）。將上清液小心地倒入指定盛有 10% 氯漂白劑的廢棄物貯存容器中。**保留沉澱的細胞團**。

7. 用 P200 微量移液器及無菌吸頭#，分別以 100 µl 冰凍的感受態緩衝液沖洗每個沉澱的細胞團（圖 8）。用移液器輕輕地上下吸移液體，把沉澱細胞完全懸浮。

#注意：在處理不同樣本時使用新的吸頭。

8. 用手指輕拂^（圖 6）離心管，以避免細胞在離心管底部沉澱。

^註解：此時，大腸桿菌很脆弱，要以溫和的方式去混和，不能使用渦漩混合器混合，否則這些細胞很容易破裂並死亡。

9. 將所有離心管放在冰浴中直至步驟 12。

10. 用 P20 微量移液器及新的無菌吸頭，添加 5 µl 無菌蒸餾水至「-C」管（圖 9）。用手腕輕拂樣本以混和所有試劑（圖 10），**把「-C」管放回冰浴中**。

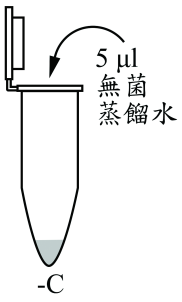


圖 9

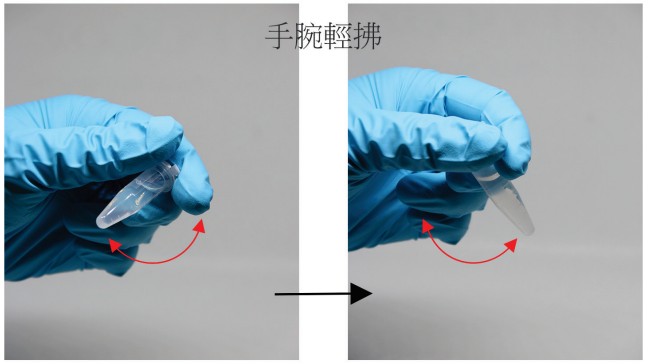


圖 10

11. 用 P20 微量移液器及新的無菌吸頭，添加 5 µl 質粒至「pAmy」管。用手腕輕拂樣本以混和所有試劑（圖 11），**把「pAmy」管放回冰浴中**。

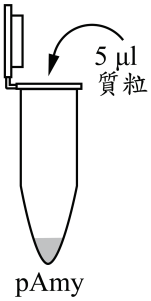


圖 11

12. 將離心管置於冰浴中至少 30 分鐘（圖 12）。

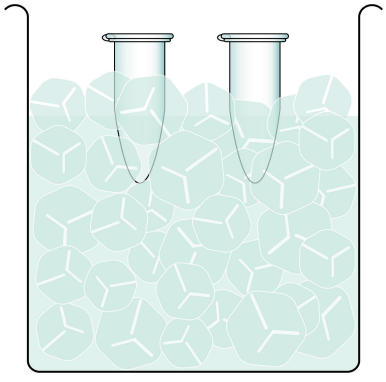


圖 12

13. 30 分鐘 後，將裝有離心管的冰浴移到熱水浴旁，並要確保管子密閉，跟着盡快將 2 支離心管從冰浴轉移到 42°C 的熱水浴中，進行 90 秒的「熱激」（圖 13）。

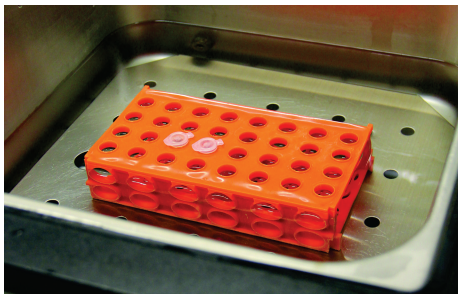


圖 13

14. 90 秒後，將離心管快速放回冰浴中靜置 2 分鐘*。

*註解：溫度突然升高會令大腸桿菌的細胞膜上產生小孔，讓質粒可進入細菌細胞。熱激的溫度變化愈明顯，轉化的效率就愈高。

15. 用 P1000 微量移液器及新的無菌吸頭#，將 250 µl 無菌 LB 液體培養基添加至每支離心管中（圖 14），用手指輕拂以混和管中液體。

#注意：在處理不同樣本時使用新的吸頭。

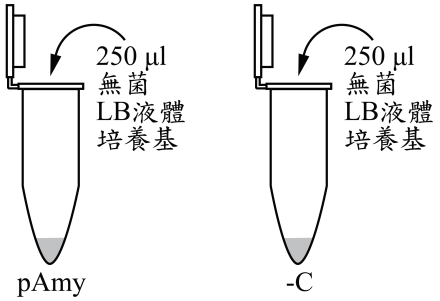


圖 14

16. 將所有離心管靜置於室溫^環境下或放置在 25–30°C 的培養箱中培養 45 分鐘。

^註解：室溫可因不同的處所環境而有所差異；因此，所需要的培養時間也可能會有所不同。

17. 將使用過的離心管和吸頭丟棄在指定盛有 10% 氯漂白劑的廢棄物貯存容器內（無需高壓滅菌處理）；或放置於生物危害品丟棄袋內，以便容後進行高壓滅菌處理。

D. 實驗第（3）部分：在含有澱粉和氨苄青黴素的瓊脂平板上培養大腸桿菌

a) 設備和材料（每組）

設備

- 微量移液器（P200）和無菌移液器吸頭

材料

- 來自第（2）部分的大腸桿菌培養物	× 2 支
- LB 瓊脂平板	× 1
- 含氨苄青黴素和 2%澱粉的 LB 瓊脂平板	× 1
- 即棄式無菌接種環	× 4
- 膠帶	
- 標記筆	× 1
- 噴壺（盛有 70%乙醇）	× 1
- 紙巾	× 1 盒
- 生物危害品丟棄袋	× 1
- 廢棄物貯存容器（盛有 10%氯漂白劑）	× 1

b) 安全措施

- 穿着實驗袍。
- 束起長髮。
- 實驗期間佩戴手套。
- 實驗前後洗手，以去除所有污染。
- 在靠近任何火焰之前，請確保雙手或手套上的乙醇已完全揮發。
- 實驗結束後，妥善處理或消毒所有材料。

c) 實驗步驟

1. 以 70% 乙醇消毒實驗檯面和戴着手套的手*。如果有的話，可使用層流通風櫥。

*注意危險：遠離火源！
在乙醇未完全揮發之前，
不要點燃火焰！

2. 拿取 1 塊 LB／氨苄青黴素／澱粉瓊脂平板（即用作篩選的瓊脂平板）和 1 塊 LB 瓊脂平板（即對照瓊脂平板）。在瓊脂平板的底部寫上實驗日期、班別和組別，並在底部的中央向下畫一條線，標記一側為「 pAmy」，標記另一側為「 -C」（圖 15）。

圖 15

3. 拿取 LB／氨苄青黴素／澱粉瓊脂平板，把瓊脂平板蓋打開至約 45º。

4. 用 P200 微量移液器及新的無菌吸頭，將 30 µl 大腸桿菌培養物從「 pAmy」管轉移至 LB／氨苄青黴素／澱粉瓊脂平板上的「 pAmy」部（圖 16 和圖 17）。將使用過的吸頭丟棄在指定盛有 10% 氯漂白劑的廢棄物貯存容器內。

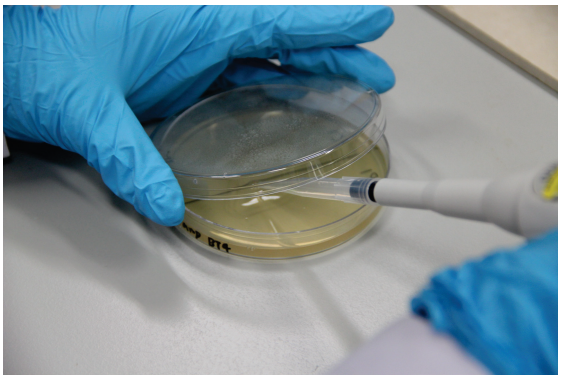
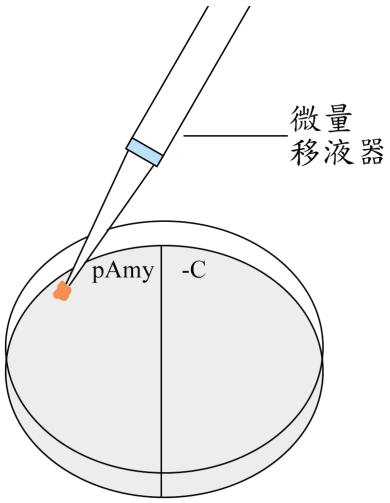


圖 16

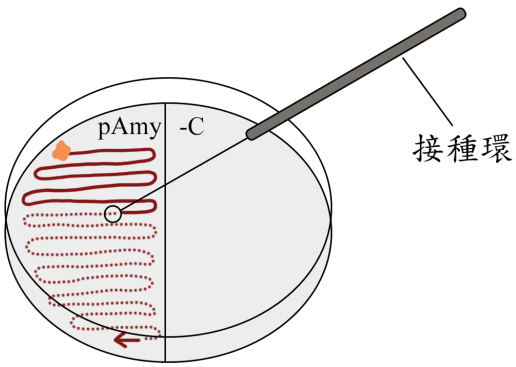


LB／氨苄青黴素／澱粉瓊脂平板

圖 17

5. 用即棄式無菌接種環在「 pAmy」部分以平板劃線法劃線（圖 18），然後將接種環*丟棄在指定盛有 10% 氯漂白劑的廢棄物貯存容器中。

*註解：如果使用可重用的接種環，請參閱附錄 1 步驟 3–4 相關無菌技術的詳細內容。



LB／氨苄青黴素／澱粉瓊脂平板

圖 18

6. 拿取 LB 瓊脂平板，把瓊脂平板蓋打開至約 45º 。

7. 用 P200 微量移液器及新的無菌吸頭，將 30 µl 大腸桿菌培養物從「 pAmy」管轉移至 LB 瓊脂平板上的「 pAmy」部分（圖 19 和圖 20）。將使用過的吸頭丟棄在指定盛有 10% 氯漂白劑的廢棄物貯存容器內。

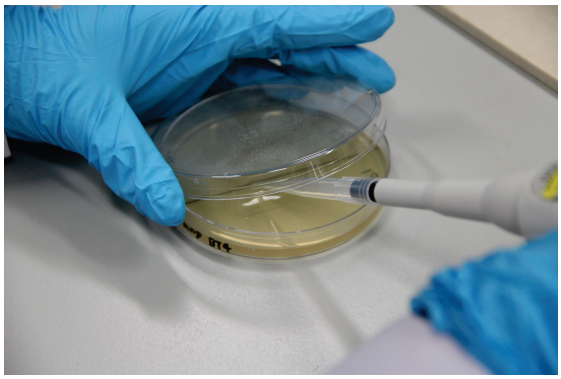
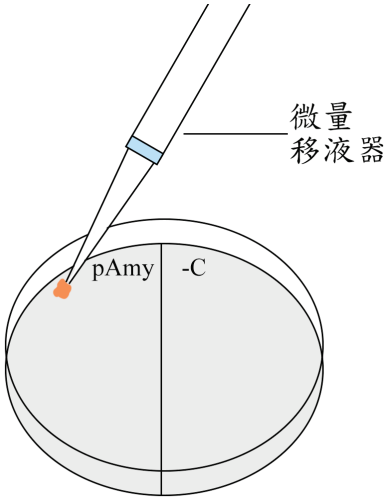


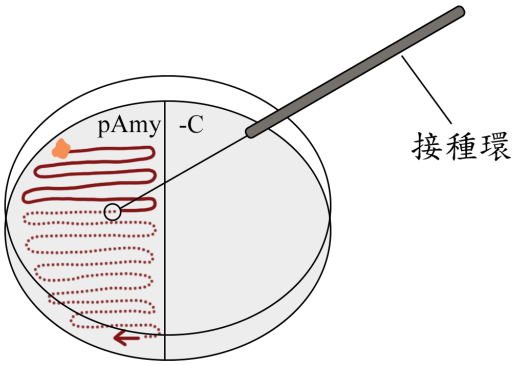
圖 19



LB 瓊脂平板
圖 20

8. 用即棄式無菌接種環在「 pAmy」部分以平板劃線法劃線（圖 21），然後將接種環*丟棄在指定盛有 10%氯漂白劑的廢棄物貯存容器中。

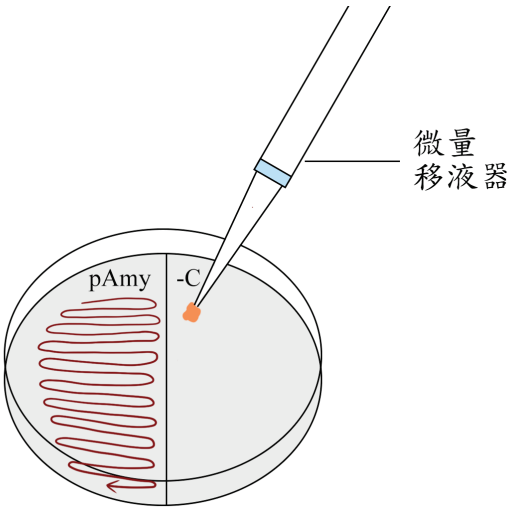
*註解：如果使用可重用的接種環，請參閱附錄 1 步驟 3–4 相關無菌技術的詳細內容。



LB 瓊脂平板
圖 21

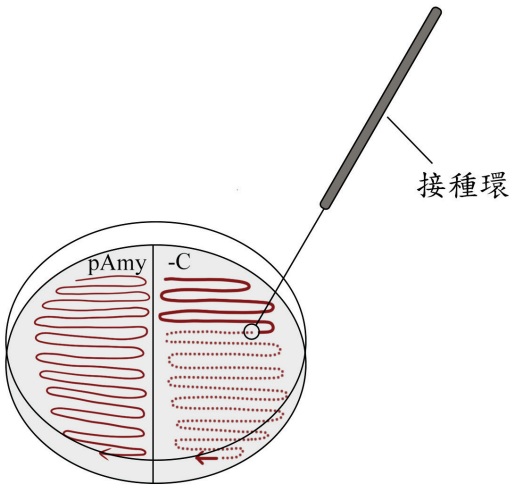
9. 拿取 LB／氨苄青黴素／澱粉瓊脂平板，把瓊脂平板蓋打開至約 45º 。

10. 用 P200 微量移液器及新的無菌吸頭，將 30 µl 大腸桿菌培養物從「-C」管轉移至 LB／氨苄青黴素／澱粉瓊脂平板上的「-C」部分（圖 22）。將使用過的吸頭丟棄在指定盛有 10% 氯漂白劑的廢棄物貯存容器內。



LB／氨苄青黴素／澱粉瓊脂平板
圖 22

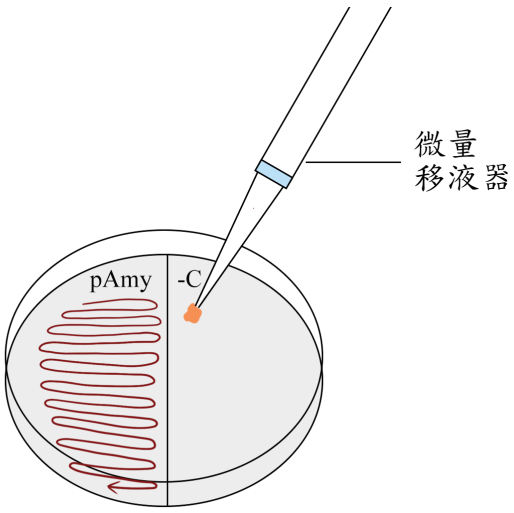
11. 用即棄式無菌接種環在「-C」部分以平板劃線法劃線（圖 23），然後將接種環*丟棄在指定盛有 10% 氯漂白劑的廢棄物貯存容器中。



LB／氨苄青黴素／澱粉瓊脂平板
圖 23

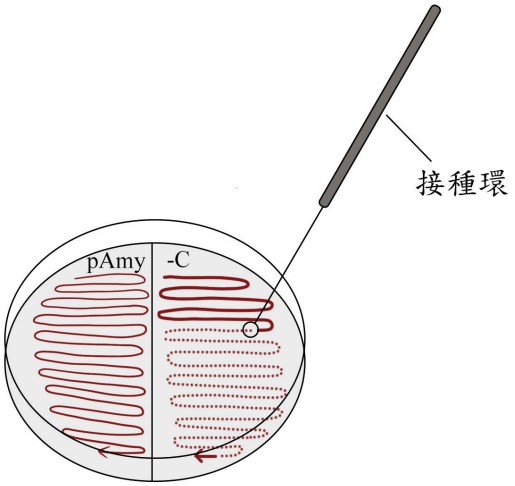
12. 拿取 LB 瓊脂平板，把瓊脂平板蓋打開至約 45º 。

13. 用 P200 微量移液器及新的無菌吸頭，將 30 µl 大腸桿菌培養物從「-C」管轉移至 LB 瓊脂平板上的「-C」部分（圖 24）。將使用過的吸頭丟棄在指定盛有 10% 氯漂白劑的廢棄物貯存容器內。



LB 瓊脂平板
圖 24

14. 用無菌接種環在「-C」部分劃線（圖 25），將即棄式接種環*丟棄在指定盛有 10% 氯漂白劑的廢棄物貯存容器中。



LB 瓊脂平板
圖 25

15. 將瓊脂平板蓋好，蓋子朝上，放在實驗檯上 5 分鐘，讓菌液被瓊脂吸收。

16. 將所有瓊脂平板堆疊一起；疊起後在平板的相對的邊緣貼上膠帶，以防止平板蓋被意外打開。

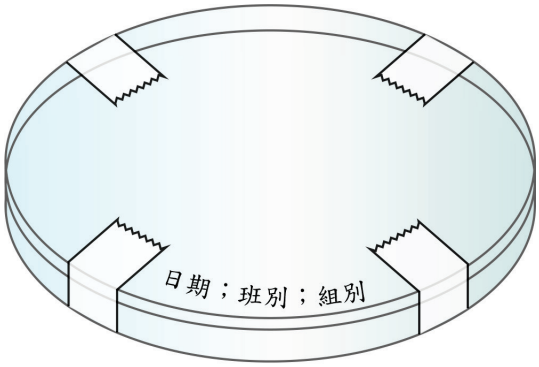


圖 26

17. 將瓊脂平板倒置，於室溫*環境下或放置在 25–30°C 的培養箱中培養 3 天。

> *註解：室溫可因不同的處所環境而有所差異；因此，所需要的培養時間也可能會有所不同。

18. 將瓊脂平板倒置放於 4°C 下培養 24 小時，在實驗第（4）部分（必須在 3–4 天內）觀察結果。

E. 實驗第（4）部分：辨識成功轉化的大腸桿菌群落

a) 設備和材料（每組）

<u>設備</u>

- 流動裝置 × 1

<u>材料</u>

- 來自實驗第（3）部分的瓊脂平板 × 2
- 噴壺（盛有 70% 乙醇） × 1
- 紙巾 × 1 盒
- 生物危害品丟棄袋 × 1
- 廢棄物貯存容器（盛有 10% 氯漂白劑） × 1

b) 安全措施

- 穿着實驗袍。
- 束起長髮。
- 實驗期間佩戴手套。
- 實驗前後洗手，以去除所有污染。

c) 實驗步驟

1. 取回屬於你組別的所有平板。
2. 觀察不同瓊脂平板上的菌落。
3. 使用相機或流動裝置為瓊脂平板拍照。
4. 在觀察和分析後，將不需要的瓊脂平板丟棄在指定盛有 10% 氯漂白劑的廢棄物貯存容器內（無需高壓滅菌處理）；或放置於生物危害品丟棄袋內，以便容後進行高壓滅菌處理。

VI. 結果

1. 貼上 LB 瓊脂平板（即對照瓊脂平板）的照片或以繪圖記錄。

2. 貼上 LB／氨苄青黴素／澱粉瓊脂平板（即用作篩選的瓊脂平板）的照片或以繪圖記錄。

3. 在 LB／氨苄青黴素／澱粉瓊脂平板上的「 pAmy」部分中，你觀察到什麼？請描述及扼要說明。

VII. 討論

1. 為什麼在本實驗中使用含有澱粉的瓊脂平板？

2. 建議一種方法以顯示澱粉被大腸桿菌消化。

3. 細菌在冷激和熱激後，只可以使用「手指輕拂」和「手腕輕拂」混和，而不能使用渦漩混合器混合。試解釋背後原因。

4. 在本實驗中的生長瓊脂上中添加氨苄青黴素有什麼作用？