實驗活動（一）

細菌轉化

（教師版本）

I. 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。

II. 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。

III. 教學筆記：

1. 與學生一起探討「背景」和「情景」部分，或讓學生閱讀這些部分以及「關於實驗設計的導引問題」，作為課前活動。
2. 使用「關於實驗設計的導引問題」與學生討論實驗的設計。
3. 根據學校的課時並參考第 IV 部分「實驗活動時間分配」以編排實驗流程。
4. 時刻提醒學生有關實驗各部分的安全預防措施。
5. 請注意，在實驗課二將有 45 分鐘的培養期，你可能需要計劃一下在此段等候時間內進行的教學活動。
6. 與學生一起探討「結果」和「討論」部分。

IV. 實驗活動時間分配：

實驗活動		需時	
		課堂內	課堂外（由實驗室技術員完成）
實驗課一：實驗第（1）部分			
1	製備大腸桿菌液體培養基	30 分鐘	
2	培養微生物		48 小時
實驗課二：實驗第（2）部分			
1	冰冷大腸桿菌		40 分鐘
2	熱激和冷激	10 分鐘	
3	在 LB 液體培養基進行培養	45 分鐘	
實驗課二：實驗第（3）部分			
1	平板劃線法	25 分鐘	
2	培養微生物		在室溫放置 3 天，隨後在 4°C 下放置 1 天。最佳觀察時限：在 4°C 下不超過 4 天
實驗課三：實驗第（4）部分			
1	瓊脂平板數算和分析	30 分鐘	
總實驗課時		實驗課一：30 分鐘 實驗課二：1 小時 20 分鐘 實驗課三：30 分鐘	

V. 實驗設備、材料和準備工作

此實驗需要使用一套市面有售的教學套裝「Transformation of *E. coli* with p-Amylase；G-Bioscience；#BTNM-8C」。

此套裝包含足夠 24 名學生（6 組，每組 4 名學生）使用的實驗材料和試劑；除此套裝之外，可能還需要其他設備或材料。

本地經銷商：Medikonia Limited

電郵：cs@medikonia.com

網址：https://www.gbiosciences.com/Educational-Products/Transformation-of-E-coli-with-pAmylase-Lab-8C

A. 實驗第（1）部分：準備大腸桿菌進行轉化作用

a) 設備（每組）

- 本生燈 × 1
- 打火器 × 1

b) 材料（每組）

- 瓊脂平板（帶有大腸桿菌菌落） × 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

*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。

- 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

c) 準備工作

製備大腸桿菌培養板和 LB 液體培養基（**實驗課前一天由教師或實驗室技術員完成**）

1. 將大腸桿菌培養物（非致病性菌株，即 DH5α，教學套裝中提供）以平板劃線法在 LB 瓊脂平板上劃線，並在室溫下培養 24 小時 ，為每班學生準備 1 塊 LB 瓊脂平板。
2. 根據製造商的說明，將 LB 培養粉溶解於蒸餾水中，對 LB 培養液進行高壓滅菌，然後將其等分加至無菌培養管中（每支 5 ml）。為每組學生準備 1 支。如沒有足夠時間製備，可向本地的生物技術公司購買即用式 LB 液體培養基。

B. 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（每組）

- 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

b) 材料（每組）

- 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

c) 準備工作

製備 LB 液體培養基和分配實驗材料（**由教師或實驗室技術員完成**）

1. 實驗課前一天，根據製造商的說明，將 LB 培養粉溶解於蒸餾水中，對 LB 培養液進行高壓滅菌，然後將其等分加至無菌培養管中（每支 550 µl）。為每組學生準備 1 支。如沒有足夠時間製備，可向本地的生物技術公司購買即用式 LB 液體培養基。
2. 將 450 µl 感受態緩衝液等分加至微量離心管中，為每組學生準備 1 支。
3. 將 7 µl pAmylase 質粒溶液等分加至微量離心管中，為每組學生準備 1 支。
4. 將 20 µl 無菌蒸餾水等分加至微量離心管中，為每組學生準備 1 支。

d) 消毒和棄置

實驗後，應當把一些設備及需要棄掉的材料（固體或液體）以 121°C、15 psi 壓力下的壓力蒸汽（高壓滅菌器）消毒至少 30 分鐘，或浸入 10% 的氯漂白劑中至少 2 小時。

C. 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（每組）

- 微量移液器（P200）和無菌移液器吸頭

b) 材料（每組）

- 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

c) 準備工作

製備 LB 瓊脂平板，以及含氨苄青黴素和 2% 澱粉的 LB 瓊脂平板（**由教師或實驗室技術員完成**）

1. 實驗課前一天，根據製造商的說明，將 LB 瓊脂粉溶解於蒸餾水中，把 LB 瓊脂溶液進行高壓滅菌，然後將其倒入培養皿中（每盤 15–20 ml）。待瓊脂凝固後，用石蠟封口膜將瓊脂平板包裹，然後放 4°C 保存，直至使用。如沒有足夠時間製備，可向本地的生物技術公司購買即用式 LB 瓊脂平板。為每組學生準備 1 塊瓊脂平板。
2. 實驗課前一天，根據製造商的說明，將 LB／澱粉瓊脂粉溶解於蒸餾水中，對 LB／澱粉瓊脂溶液進行高壓滅菌，讓其冷卻至約 ~50ºC，然後添加適量的氨苄青黴素，充分攪拌瓊脂溶液，將其倒入培養皿中（每盤 15–20 ml）。待瓊脂凝固後，用石蠟封口膜將瓊脂平板包裹，然後放 4°C 保存，直至使用。為每組學生準備 1 塊瓊脂平板。如沒有足夠時間製備，可向本地的生物技術公司購買即用式 LB／氨苄青黴素／澱粉瓊脂平板。

d) 消毒和棄置

實驗後，應當把一些設備及需要棄掉的材料（固體或液體）以 121°C、15 psi 壓力下的壓力蒸汽（高壓滅菌器）消毒至少 30 分鐘，或浸入 10% 的氯漂白劑中至少 2 小時。

D. 實驗第（4）部分：辨識成功轉化的大腸桿菌群落

a) 設備（每組）

- 流動裝置 × 1

b) 材料（每組）

- 來自第（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

c) 準備工作

此部分不需要準備工作 。

d) 消毒和棄置

實驗後，應當把一些設備及需要棄掉的材料（固體或液體）以 121°C、15 psi 壓力下的壓力蒸汽（高壓滅菌器）消毒至少 30 分鐘，或浸入 10%的氯漂白劑中至少 2 小時。

E. 其他適合此實驗的市售教學套裝：

1. HiPer® Transformation Teaching Kit；HiMedia Laboratories；#HTBM017

   網址：http://www.himedialabs.com/intl/en/products/Molecular-Biology/HiPer%C2%AE-Teaching-Kits-Molecular-Biology/Transformation-Teaching-Kit-HTBM017

   電郵：info@himedialabs.com

2. GeNei Transformation Teaching Kit；BioMall.in；#6100700021730

   網址：https://www.biomall.in/product/genei-transformation-teaching-kit-6100700021730-6100700021730

   電郵：info@biomall.in

VI. 「關於實驗設計的導引問題」的建議答案

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？

   可以利用生物技術程序將載有澱粉酶基因的質粒轉入大腸桿菌基因組中，使大腸桿菌產生澱粉酶。

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？

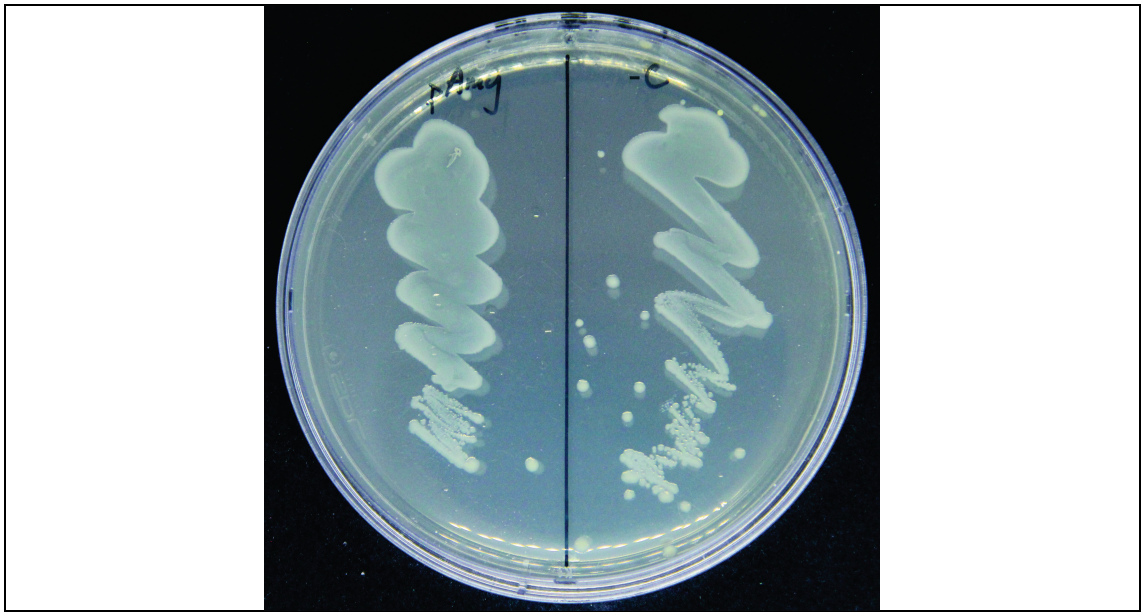
   重組質粒應包含編碼澱粉酶的基因和編碼氨苄青黴素抗性的基因。「澱粉酶 」基因是當前轉化作用的目標基因，而氨苄青黴素抗性基因則有助於區分成功轉化的大腸桿菌。

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？

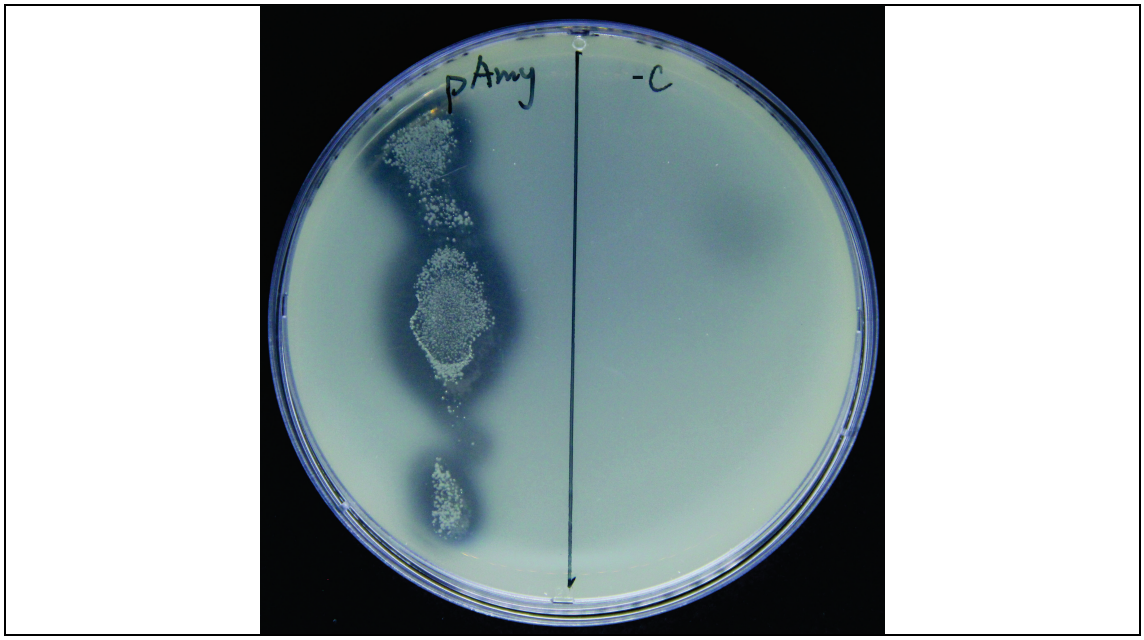
   若要辨識已經成功攝入外在重組質粒的細菌，可以使用選擇性瓊脂平板。細菌如果能夠在含有澱粉和氨苄青黴素的 LB 瓊脂上生長，表明細菌已成功攝入了重組質粒。已轉化的細菌能生產澱粉酶，瓊脂中的澱粉將會被消化，因此這些菌落的周圍會變得比較透明。已轉化的細菌有氨苄青黴素抗性基因，它們可以在含有氨苄青黴素的瓊脂上正常生長，否則生長會被抑制。

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。

在瓊脂平板的 pAmy 部分的大腸桿菌群落周圍發現了較透明的區域。 這表明白色澱粉被轉化細菌產生的澱粉酶消化。

VII. 討論

1. 為什麼在本實驗中使用含有澱粉的瓊脂平板？

- *澱粉是一種大型生物分子，不溶於水並能在瓊脂平板中形成膠體。*
- *澱粉可以被澱粉酶消化，澱粉酶只能由成功轉化的大腸桿菌細胞產生。*
- *當瓊脂平板中的澱粉被消化就證明大腸桿菌細胞成功轉化了。*

2. 建議一種方法以顯示澱粉被大腸桿菌消化。

- *我們可以在瓊脂板上添加碘溶液。*
- *在有澱粉的情況下，碘溶液會從棕色變成藍色，紫色或黑色（取決於碘的濃度）。*
- *細菌菌落周圍的較透明區域表明該細菌能消化澱粉。*

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。

- *鈣離子增強細菌細胞膜的通透性；*
- *熱激步驟削弱了細胞結構；*
- *渦漩混合器會向細胞施加剪切力，使細胞破裂並導致細胞死亡；*
- *所以必須使用溫和的方法去混和細胞。*

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？

在正常情況下，大多數細菌的生長都可以被氨苄青黴素抑制。 在本實驗中，大腸桿菌成功轉化後，由於攝入了來自重組質粒的氨苄青黴素抗性基因，大腸桿菌變得對氨苄青黴素有抗性。 因此，在本實驗中的生長瓊脂中添加氨苄青黴素的作用是區分成功轉化的大腸桿菌。

VIII. 參考資料

Panja, S., Aich, P., Jana, B., & Basu, T. (2008). How does plasmid DNA penetrate cell membranes in artificial transformation process of Escherichia coli? *Molecular Membrane Biology, 25*, 411–422.

https://www.sciencelearn.org.nz/resources/2032-bacterial-transformation

https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/transformation.html