

實驗活動（二）

藍-白斑篩選

（教師版本）

I. 實驗目標

1. 進行細菌轉化作用，把帶有製成 β -半乳糖苷酶基因編碼（即 *LacZa* 基因）的重組質粒轉化入大腸桿菌細胞內；
2. 進行藍-白斑篩選測試；以及
3. 展示被成功轉化的大腸桿菌突變菌株細胞。

II. 預期學習成果

完成這項學習活動後，學生應能：

1. 概述轉化作用的原理；
2. 以無菌技術培養細菌；
3. 進行細菌轉化作用；
4. 了解藍-白斑篩選的原理；以及
5. 進行藍-白斑篩選。

III. 教學筆記：

1. 與學生一起探討「背景」部分，或讓學生閱讀這部分及「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. 與學生一起探討「結果」和「討論」部分。

IV. 實驗活動時間分配：

| 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 | 將 DNA 插入質粒 | | 75 分鐘 |
| 2 | 冷卻和熱激大腸桿菌 | 60 分鐘 | |
| 實驗課一：實驗第(2)部分 | | | |
| 1 | 在瓊脂平板上塗抹大腸桿菌 | 20 分鐘 | |
| 2 | 培養微生物 | | 1 – 2 天 |
| 實驗課二：實驗第(3)部分 | | | |
| 1 | 數算菌落含量及分析 | 30 分鐘 | |
| 總實驗課時 | | 實驗課一： 1 小時 20 分鐘 實驗課二： 30 分鐘 | |

V. 設備、材料和準備工作

此實驗需要使用市面有售的教學套裝「Blue/White Cloning of a DNA fragment and Assay of β -galactosidase ; EDVOTEK ; EDVO-Kit #300」。

此套裝包含足夠 24 名學生（六組，每組四名學生）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。

網址：<https://www.edvotek.com/300>

A. 實驗第(1)部分：將 DNA 片段插入載體質粒並轉化大腸桿菌

a) 設備 (每組)

- 水浴 (42°C) × 1 (每班)
- 水浴 (37°C) × 1 (每班)
- 離心機 × 1 (每班)
- 本生燈 × 1
- 打火器 × 1
- 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)

- 帶有大腸桿菌細胞的瓊脂平板 × 1
- 無菌微量離心管 × 3
- 微量離心管架 × 1
- 接種環 × 1

- 「D」管 (盛有 DNA 及質粒的混合溶液) × 1
- 「P」管 (盛有質粒溶液) × 1
- 「C」管 (盛有無菌蒸餾水) × 1
- 反應緩衝液 (60 µl) × 1
- 氯化鈣溶液 (800 µl) × 1
- 復甦溶液 (800 µl) × 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

c) 準備工作

製備大腸桿菌培養板（實驗課前 2 天，由教師或實驗室技術員完成）

1. 用鑷子將小瓶中的單個 BactoBead™（教學套裝中提供）轉移到常規的瓊脂培養平板（如 LB 瓊脂平板）上。
2. 加入 10 µl 無菌蒸餾水以溶解 BactoBead。
3. 使用無菌接種環，將溶解的微珠液置於瓊脂平板上，以平板劃線法分離至 4 個區域。
4. 瓊脂將平板倒置，於室溫下培養 24–48 小時。
5. 為每組學生準備 1 塊帶有大腸桿菌細胞的瓊脂平板。

製備樣本（實驗課前，由教師或實驗技術員完成）

1. 「D」管：加入 15 µl 反應緩衝液和 20 µl DNA 及質粒混合溶液，於室溫下培養 1 小時；為每組學生準備 1 支「D」管。
2. 「P」管：加入 15 µl 反應緩衝液和 20 µl 質粒溶液，於室溫下培養 1 小時；為每組學生準備 1 支「P」管。
3. 「C」管：加入 15 µl 反應緩衝液和 20 µl 無菌蒸餾水，於室溫下培養 1 小時；為每組學生準備 1 支「C」管。

等分實驗材料（實驗課前，由教師或實驗室技術員完成）

1. 將 800 µl 氯化鈣溶液等分加入微量無菌離心管中；為每組學生準備 1 支。
2. 將 800 µl 復甦溶液等分加入微量無菌離心管中；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。

B. 實驗第(2)部分：在瓊脂平板上培養大腸桿菌

a) 設備(每組)

- 本生燈 × 1
- 打火器 × 1

b) 材料(每組)

- X-gal/IPTG/ampicillin 瓊脂平板 × 1
- 接種環 × 1
- 膠帶 × 1
- 石蠟封口膜
- 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 X-gal/IPTG/ampicillin 瓊脂平板(實驗課前 1 天, 由教師或實驗室技術員完成)

1. 用微波爐或電熱板將一瓶 ReadyPour 培養基(教學套裝中提供)加熱, 偶爾旋轉, 直至介質完全融化。
2. 讓融化的培養基冷卻至~50°C, 加入 add 0.3 ml 氨苄青黴素、0.3 ml IPTG 和所有 X-gal (所有試劑都是教學套裝中提供), 將其充分旋轉混和, 然後倒入培養皿中(每盤 12 ml)。或可從生物技術公司購買即用型 X-gal/IPTG/ampicillin 的培養基平板。
3. 為每組學生準備 1 塊 X-gal/IPTG/ampicillin 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。

C. 實驗第(3)部分：觀察和分析實驗結果

a) 設備(每組)

- 流動裝置 × 1

b) 材料(每組)

- 來自第(2)部分的瓊脂平板 × 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

c) 準備工作

此部分不需準備工作。

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。

D. 其他適合此實驗的教學套裝

1. HiPer Cloning Teaching Kit (Blue-White Selection); HiMediaLaboratories; #HTBM036

網址：<http://www.himedialabs.com/intl/en/products/Molecular-Biology/HiPer%C2%AE-Teaching-Kits-Molecular-Biology/HiPer%C2%AE-Cloning-Teaching-Kit-Blue-White-selection-HTBM036>

2. Genetic defect correction with bacteria transformation; G-Biosciences; #BE-313

網址：<https://www.gbiosciences.com/Educational-Products/Genetic-Defect-Correction-with-Bacterial-Transformation>

VI. 「關於實驗設計的導引問題」的建議答案

1. 試列出一種可將外源質粒轉化入大腸桿菌細胞的分子技術。

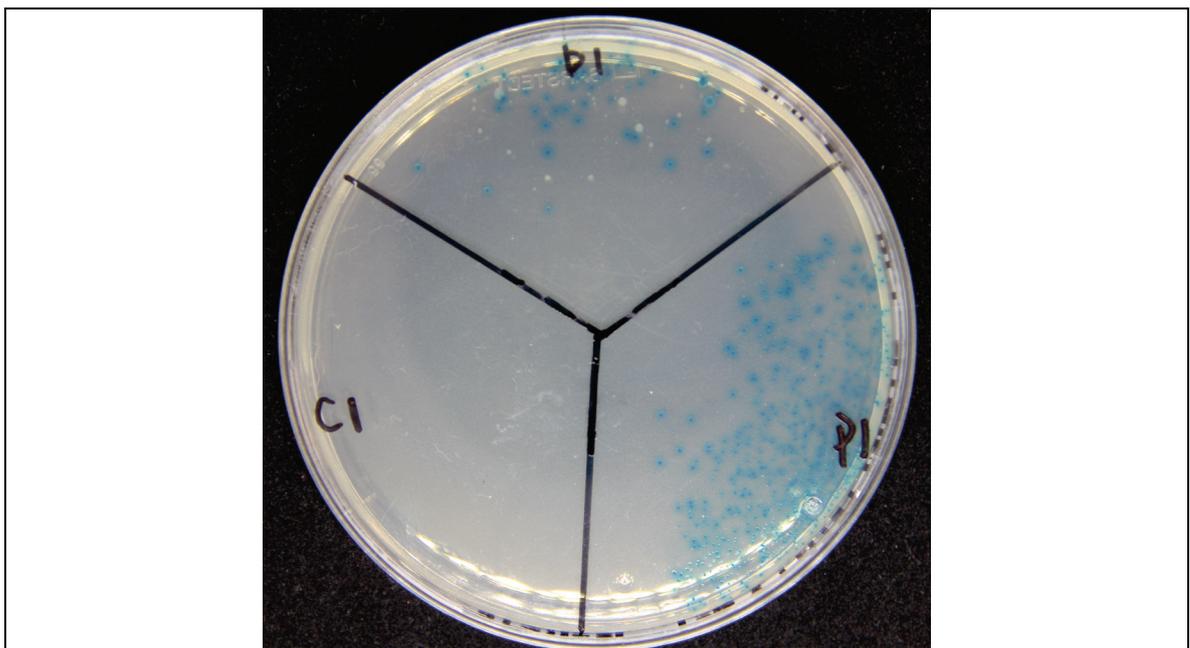
熱激。

2. 在瓊脂平板中加入哪種試劑，才能令細菌群落產生含藍色色素的產物？

X-gal 和 IPTG。

VII. 結果

1. 在下面的空框內，貼上瓊脂平板的照片或以繪圖記錄。



2. 在以下的數據表中，記錄瓊脂平板上藍色菌落和白色菌落的含量。

提示：

藍色菌落：中心為淺藍色，外圍為密集的藍色。

白色菌落：中間為淡藍色，外圍為無色。

[僅供參考]

| 區 | 藍色菌落含量 | 白色菌落含量 |
|----|--------|--------|
| D1 | 48 | 22 |
| P1 | TNTC | 1 |
| C1 | 無 | 無 |

3. 在瓊脂平板的 C1 區觀察到菌落嗎？請簡要解釋你的觀察結果。

在 C1 區沒有發現菌落。這部分的大腸桿菌細胞沒有轉入任何質粒，因此在氨苄青黴素存在下它們不能生長。

4. 在瓊脂平板的 P1 區觀察到什麼？請描述並解釋你的觀察結果。

在瓊脂平板的 P1 區上發現藍色菌落，這些藍色菌落代表大腸桿菌細胞已成功轉化入外源質粒。由於質粒帶有 LacZ α 基因和抗氨苄青黴素的基因，因此轉化後的大腸桿菌細胞能夠在 LB/amp 瓊脂平板上生長，經 IPTG 誘導後，能代謝瓊脂平板上的 X-gal，並產生含藍色色素的產物。

5. 在瓊脂平板的 D1 區觀察到什麼？請描述並解釋你的觀察結果。

我們可以在瓊脂平板的 D1 區上發現白色及藍色菌落，這些菌落能在含有氨苄青黴素的瓊脂平板上生長，即意味着帶有抗氨苄青黴素基因的質粒已將菌落轉化。

還有，有些菌落呈現藍色，即意味着這些菌落能產生具功能的 β -半乳糖苷酶，所以底物 *X-gal* 被代謝後能產生藍色色素。由此可見，這些藍色菌落在轉化後含有的質粒並沒有插入目標基因，這些質粒只是自我複製。

另外，有些菌落維持白色，即意味着這些菌落不能編製出具功能的 β -半乳糖苷酶，以致底物 *X-gal* 不能被代謝，而沒有形成藍色沉澱物或產生藍色色素。由此可見，這些白色菌落在轉化後含有的質粒已插入目標基因，當中的 *LacZ α* 基因已受到破壞。

VIII. 討論

1. 在實驗第（1）部分：細菌經過熱激後，在步驟 21 中，只可用「手指輕拂」或「手腕輕拂」以混和細菌，而不能使用渦漩混合器混合，試解釋背後原因。

鈣離子提高了細菌細胞膜的通透性，熱激步驟進一步削弱了細胞結構，此時使用渦漩混合器混合，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。

2. 在熱激步驟中，一名學生不小心將細胞在 42°C 下加熱了 5 分鐘，實驗結束時在瓊脂平板上只找到數個菌落，試解釋結果。

在轉化過程中，細菌的細胞結構被削弱；長時間加熱會損壞細胞並導致細胞死亡。

3. X-gal 和 IPTG 在藍-白斑篩選測試中的功用是什麼？

X-gal 是 β -半乳糖苷酶的底物，經過酶代謝後會產生含藍色色素的產物。IPTG 用來誘導 LacZ 基因在細菌中作出高度表達。

IX. 參考資料

Julin, D. A. (2018). Blue-white selection. In R. D. Wells, J. S. Bond, J. Klinman, & B. S. S. Masters (Eds.), *Molecular life sciences*. NY: Springer.

Ullmann, A., Jacob, F., & Monod, J. (1967). Characterization by in vitro complementation of a peptide corresponding to an operator-proximal segment of the beta-galactosidase structural gene of *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, 24(2), 339–343.