

實驗活動（三）

微生物感測器

（學生版本）

I. 背景

現今，科研人員已通過基因改造將一些微生物，如大腸桿菌（*E. coli*）和釀酒酵母（*S. cerevisiae*）用作感測器，協助檢測樣本中的重金屬物質、抗生素殘餘、藥物殘餘及某些化學物質和分子。因為這些物質可觸發基因改造微生物，尤其是細菌的一些特定顏色轉變，讓肉眼可見。這些顏色的轉變就成為一種既簡單、直接又可靠的方法來檢測上述提及的物質。而更重要的是，應用基因改造微生物作檢測的方法，已被廣泛地用於監控水質和食品的質量上。

情景

假設你在生物工程公司做實習生，你的主管在你的工作檯面留下了幾份材料和一則備忘錄：

一心：

我們將製作一款用作檢測樣本中的抗生素殘餘物（特別是氨苄青黴素；簡稱 **amp**）的試劑盒，當中會使用一種非致病性的大腸桿菌菌株。我們有 3 個適合用來轉化細菌的重組質粒（即 **pCH1**、**pCH2** 和 **pCH3**），每個質粒都帶有一個用於顯色的基因。如果生長培養基含有氨苄青黴素，成功轉化的菌落便會顯示一種獨特顏色。請測試這 3 個質粒的顯色差異，所需的材料已放在冰箱內和實驗檯上。

主管
偉

II. 關於實驗設計的導引問題

1. 在正常情況下，氨苄青黴素可抑制大腸桿菌的生長；但細菌經成功轉化後，由於重組質粒中帶有氨苄青黴素抗性的基因，細菌會對氨苄青黴素產生抗性。若是這樣，在轉化實驗前後，我們應分別使用哪種類型的瓊脂平板（LB 瓊脂平板 或 含氨苄青黴素的 LB 瓊脂平板）去檢測大腸桿菌的屬性呢？
2. 列出一種可將外源質粒轉入大腸桿菌細胞的分子技術。

III. 實驗目標

1. 把重組質粒「pCH1」、「pCH2」和「pCH3」轉入感受態大腸桿菌的細胞內（每個質粒均帶一個顯色基因和一個氨苄青黴素抗性基因）；以及
2. 通過觀察顏色變化來顯示重組質粒已成功轉化入大腸桿菌細胞中。

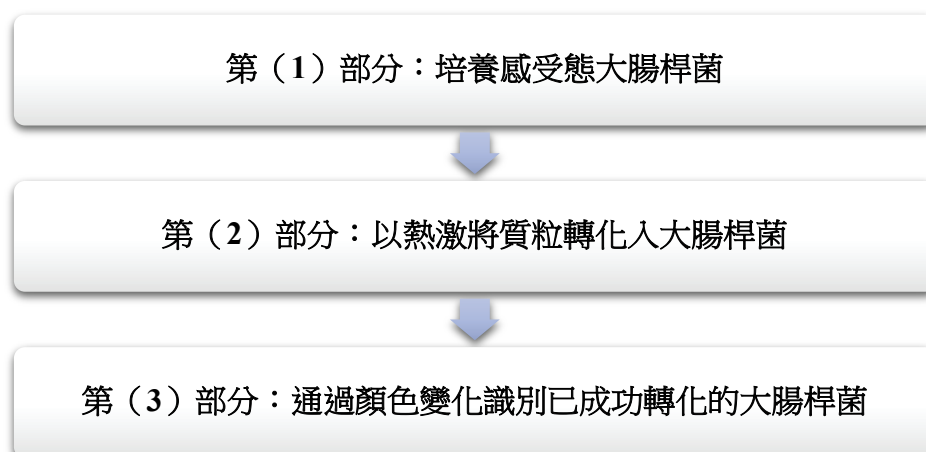
IV. 預期學習成果

活動完成後，學生應能：

1. 概述製造基因改造微生物的原理；
2. 認識到生物感測器的潛在應用；
3. 運用無菌技術轉移及培養微生物；以及
4. 進行轉化細菌實驗。

V. 實驗活動

A. 概述



B. 實驗第（1）部分：培養感受態大腸桿菌

a) 設備和材料（每組）

設備

- 本生燈 × 1
- 打火器 × 1
- 微量移液器（P20）和無菌移液器吸頭

材料

- BactoBead™（感受態大腸桿菌*） × 1 瓶（每班）
- 復甦培養液（15 µl） × 1
- 鑷子 × 1
- 一次性的無菌接種環 × 4
- LB 瓊脂平板 × 1

- 標記筆 × 1
- 噴壺（盛有 70% 乙醇） × 1
- 紙巾 × 1 盒
- 膠帶
- 石蠟封口膜
- 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：即經過處理後易於接受外來 DNA 的大腸桿菌

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。
- 使乙醇遠離火源。
- 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. 在 1 塊 LB 瓊脂平板上寫上實驗日期、班別和組別（圖 1）。

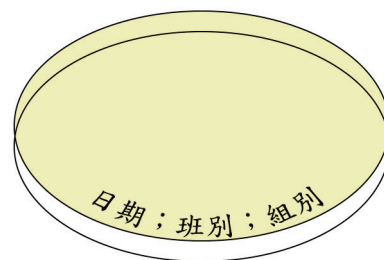


圖 1 LB 瓊脂平板

3. 點燃本生燈。
4. 對鑷子進行火焰消毒，然後讓其冷卻（圖 2）。

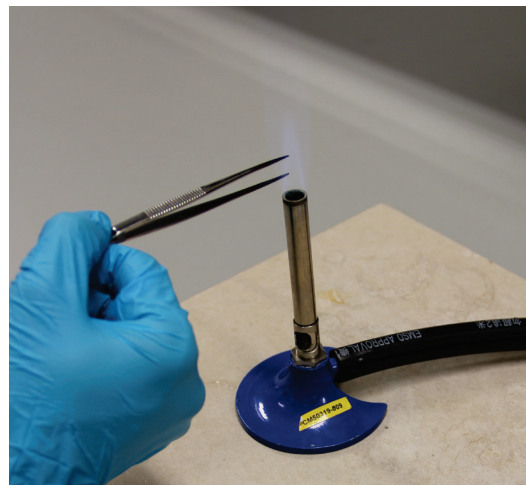


圖 2

5. 使用一對無菌鑷子，將 1 粒 BactoBead™（即感受態大腸桿菌）珠由容器瓶中轉移到 LB 瓊脂平板的左上部分（圖 3）。

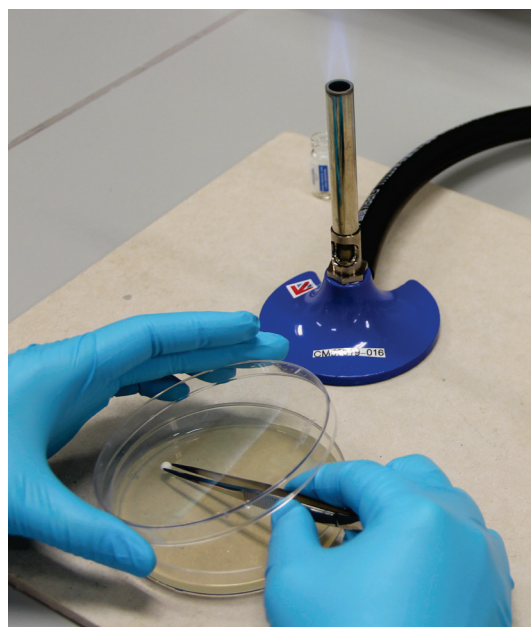


圖 3

6. 使用 P20 微量移液器和無菌吸頭，將 10 μ l 復甦培養液從微量離心管轉移至大腸桿菌珠上（圖 4）。



圖 4

7. 當大腸桿菌珠被復甦培養液溶解後，如圖 5 及圖 6a 所示，使用新的無菌接種環*以鋸齒模式將瓊脂平板的第一區劃線（圖 6 a 部分）。

*註解：如果使用金屬接種環，有關無菌技術的詳細資料，請參閱附錄 1 的步驟 3–4。

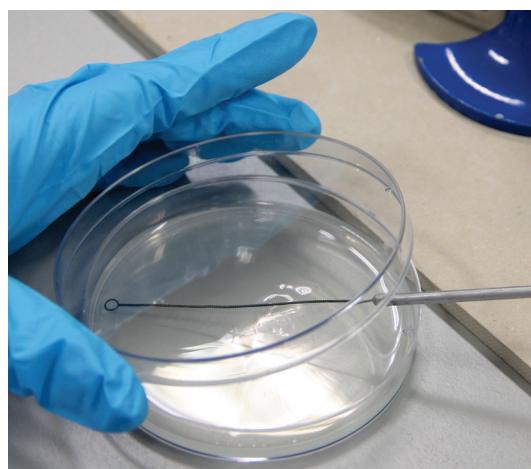


圖 5

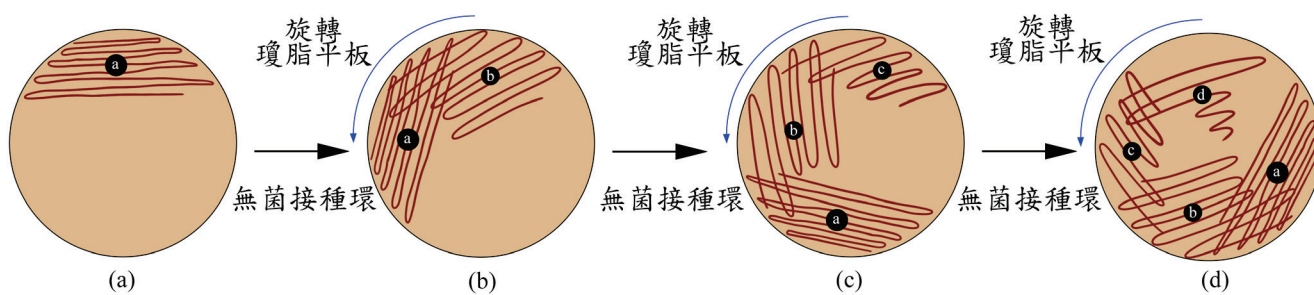


圖 6 大腸桿菌的劃線分離模式

8. 蓋上蓋子。
9. 將瓊脂平板旋轉 90°。
10. 如圖 6b 所示，使用新的無菌接種環，交疊接種前一區部分的樣本 2 – 3 次，並以鋸齒模式劃線至下一區（⑥部分）。
11. 如圖 6c（③部分）及 6d（④部分）所示，重複步驟 8 – 10，以完成第三及第四區的劃線分離。
12. 蓋上蓋子，如圖 7 所示，在瓊脂平板的邊緣貼上短膠帶，將蓋子和底部固定在一起。

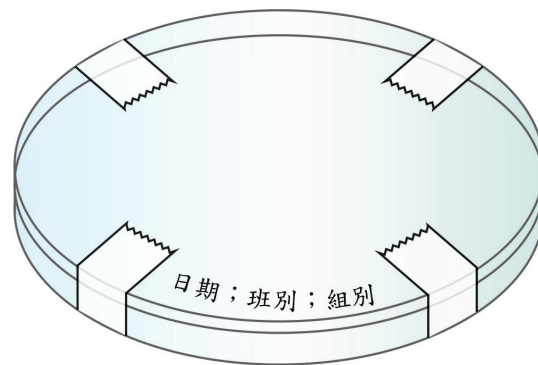


圖 7



13. 將瓊脂平板倒置，在室溫*下或放置在 25 – 30°C 的培養箱中培養至少 16 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。

14. 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（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。
15. 建議的培養時間完結後，用石蠟封口膜將瓊脂平板邊緣包裹，並放於 4°C 保存，直至進行實驗第（2）部分。

C. 實驗第（2）部分：以熱激將質粒轉化入大腸桿菌

a) 設備和材料（每組）

設備

- | | |
|------------------------------------|---------|
| - 熱水浴（42°C） | × 1（每班） |
| - 熱水浴（37°C） | × 1（每班） |
| - 冰浴 | × 1 |
| - 本生燈 | × 1 |
| - 打火器 | × 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 LB 瓊脂平板 × 1
- pCH1 質粒 (8 μ l) × 1
- pCH2 質粒 (8 μ l) × 1
- pCH3 質粒 (8 μ l) × 1
- 無菌蒸餾水 (8 μ l) × 1
- 氯化鈣溶液 (1200 μ l) × 1
- 復甦培養液 (1200 μ l) × 1
- 無菌微量離心管 × 5
- 微量離心管架 × 1
- 一次性的無菌接種環 × 5
- LB/amp/IPTG 瓊脂平板 × 1

- 標記筆 × 1
- 噴壺 (盛有 70% 乙醇) × 1
- 紙巾 × 1 盒
- 膠帶
- 石蠟封口膜
- 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。
- 使乙醇遠離火源。
- 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。
2. 點燃本生燈。
3. 將 1 支微量離心管標記為「S」，並寫上組別 (圖 8)。

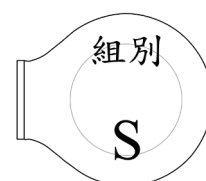
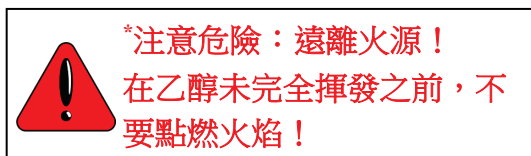


圖 8

4. 使用 P1000 和 P200 微量移液器和無菌吸頭，添加 1100 μl 氯化鈣溶液至「S」管中（圖 9）。

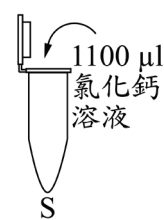


圖 9

5. 使用無菌接種環，以無菌操作程序[#]將 10 個大腸桿菌落由 LB 瓊脂平板（圖 10）轉移至「S」管中（圖 11）。使用 P1000 微量移液器和無菌吸頭，將混合物上下吸移 10 次。

[#]註解：如果使用金屬接種環，有關無菌技術的詳細資料，請參閱附錄 1 的步驟 3–4。

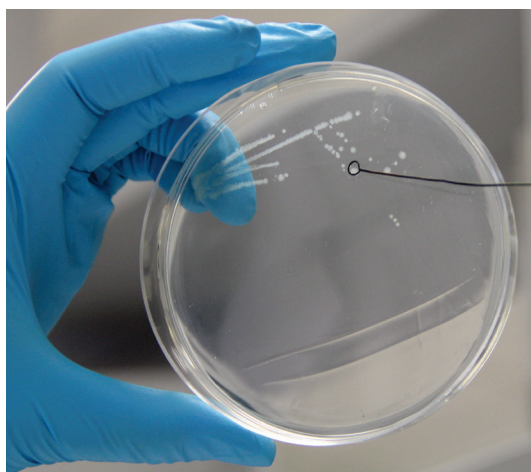


圖 10

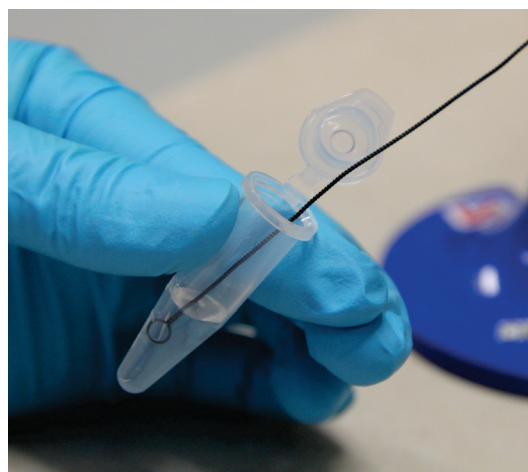


圖 11

6. 將 4 支微量離心管標記為「CH1」、「CH2」、「CH3」和「neg」（此代表陰性對照），並寫上組別（圖 12）。

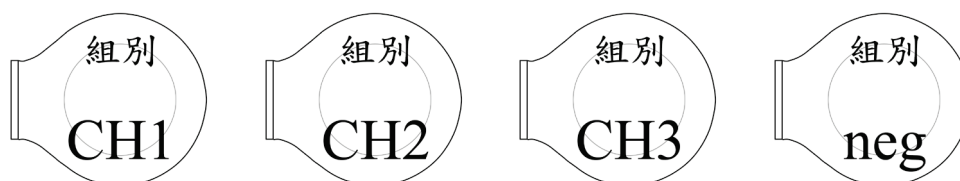


圖 12

7. 使用 P1000 微量移液器和無菌吸頭，從「S」管中分別把 250 μ l 溶液轉移至每支已標記「CH1」、「CH2」、「CH3」及「neg」的微量離心管中（圖 13），然後將「S」管丟棄於指定的廢棄物貯存容器內。

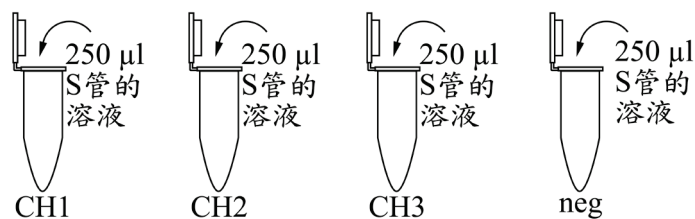


圖 13

8. 使用 P20 微量移液器和無菌吸頭，將 5 μ l pCH1 質粒添加至「CH1」管中（圖 14）。

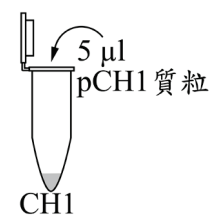


圖 14

9. 使用 P20 微量移液器和無菌吸頭，將 5 μ l pCH2 質粒添加至「CH2」管中（圖 15）。

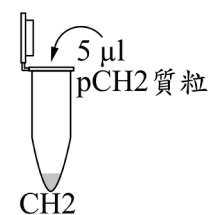


圖 15

10. 使用 P20 微量移液器和無菌吸頭，將 5 μ l pCH3 質粒添加至「CH3」管中（圖 16）。

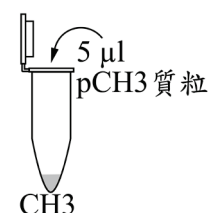


圖 16

11. 使用 P20 微量移液器和無菌吸頭，將 5 μ l 無菌蒸餾水添加至「neg」管中（圖 17）。

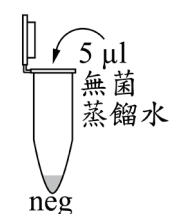


圖 17

12. 用手指輕拂所有微量離心管，以便混和管中液體（圖 18）。

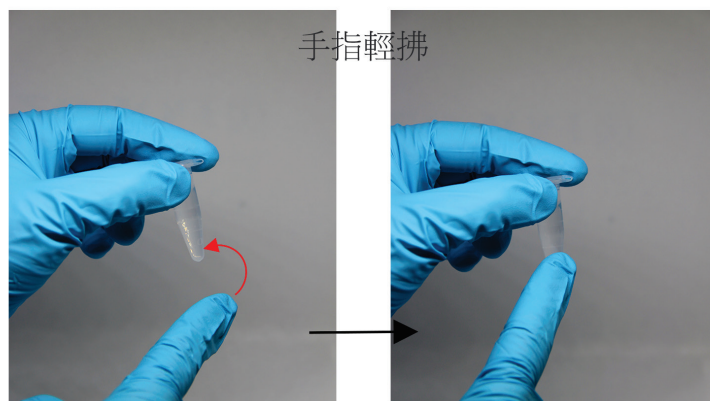


圖 18

13. 關掉本生燈。



14. 將所有微量離心管置於冰浴中至少 30 分鐘（圖 19）。

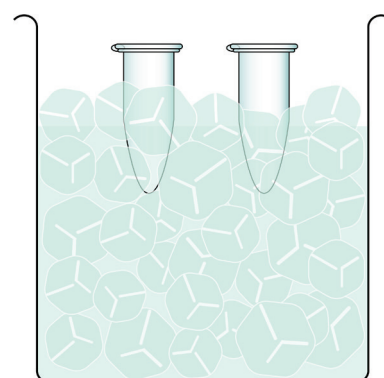


圖 19



15. 30 分鐘後，將裝有微量離心管的冰浴移到熱水浴旁，確保管子密閉。



16. 盡快將所有微量離心管從冰浴轉移到 42°C 的熱水浴中（圖 20），進行 90 秒的「熱激」*。

*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。

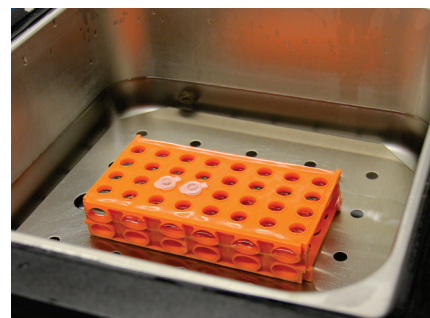


圖 20



17. 90 秒後，將離心管快速放回冰浴靜置 2 分鐘（圖 21）。

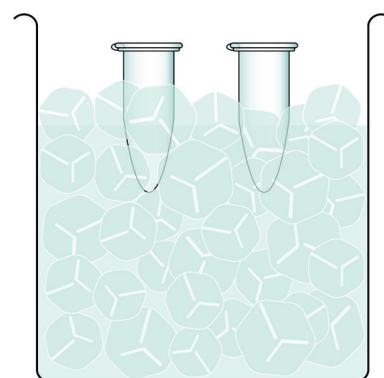


圖 21

18. 用 P1000 微量移液器及無菌吸頭，將 250 μ l 復甦培養液添加至每支離心管中*（圖 22）。

*注意：在處理不同樣本時使用新的吸頭。

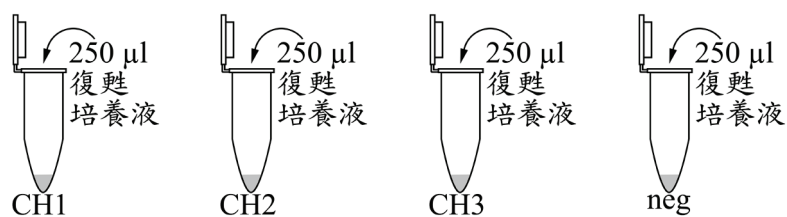


圖 22



19. 用手指（圖 23）或手腕（圖 24）輕拂所有微量離心管，將所有離心管靜置於 37°C 熱水浴中培養 30 分鐘（圖 25）。每 10 分鐘用手指或手腕輕拂離心管一次。

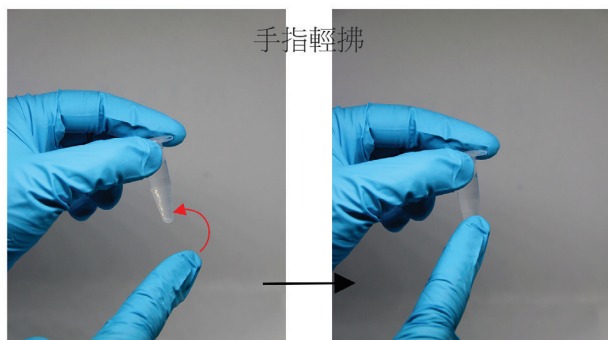


圖 23

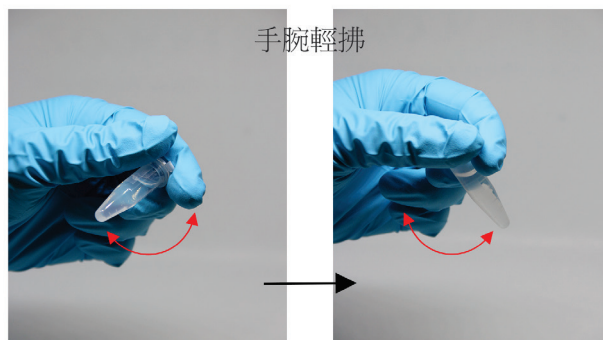


圖 24

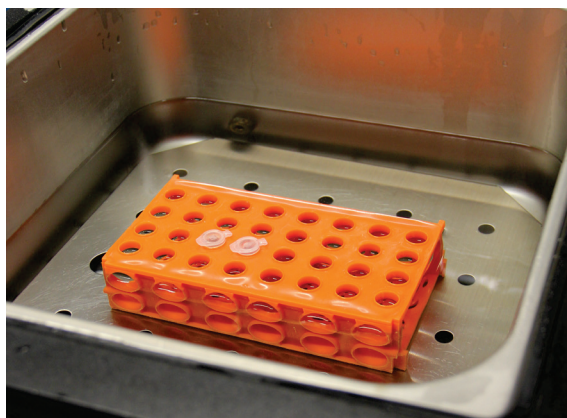


圖 25

20. 在 LB/amp/IPTG 瓊脂平板的底部畫兩條線，將平板分成 4 個部分，在平板底部標記「CH1」、「CH2」、「CH3」及「neg」，並寫上實驗日期、班別和組別（圖 26）。

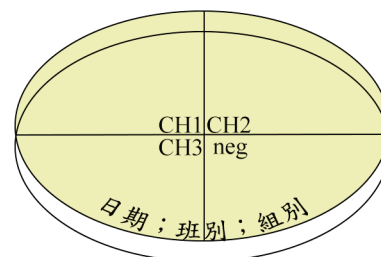


圖 26 LB/amp/IPTG 瓊脂平板

21. 使用 P200 微量移液器和無菌吸頭，將 40 μ l 微生物培養基從「CH1」管轉移至平板上的「CH1」部分（圖 27 a），使用新的無菌接種環把培養基塗抹在平板上。
22. 重複步驟 21，分別將微生物培養基從「CH2」管、「CH3」管及「neg」管轉移至平板上的對應部分，即分別為「CH2」部分（圖 27 b）、「CH3」部分（圖 27 c）及「neg」部分（圖 27 d）。每次應使用新的無菌接種環把培養基塗抹在平板上。

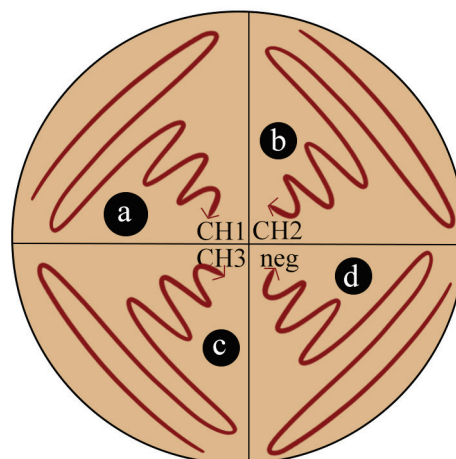


圖 27



23. 如圖 28 所示，在瓊脂平板的邊緣兩側貼上短膠帶，將蓋子和底部固定在一起，將平板倒置，於室溫*環境下或放置在 25 – 30°C 的培養箱中培養 2–3 天。

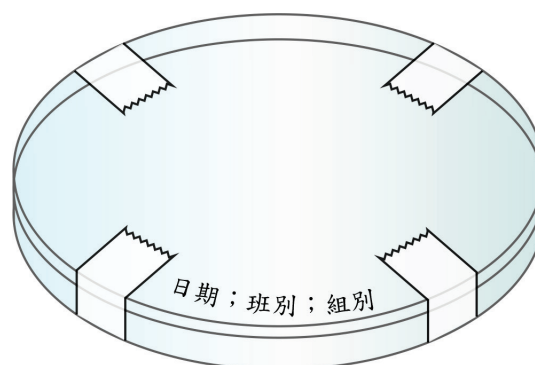


圖 28

*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。

24. 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。
25. 完成建議的培養時間後，用石蠟封口膜將瓊脂平板邊緣包裹，並放於 4°C 保存，直至進行實驗第（3）部分。

D. 實驗第（3）部分：通過顏色變化識別已成功轉化的大腸桿菌

a) 設備和材料（每組）

設備

- 流動裝置 × 1

材料

- 來自第（2）部分 LB／amp／IPTG 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

b) 安全措施

- 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。
- 實驗結束後，妥善處理或消毒所有材料。

c) 實驗步驟

1. 取回自己組別的瓊脂平板，用標記筆在平板的背面以點作標記來數算菌落的含量。
2. 記錄平板上的「菌落形成單位」（colony-forming unit, CFU）*的含量及顏色，如果平板上的菌落含量高於 250 CFU，標籤為 TNTC（Too Numerous To Count；數不清）。

*注意：菌落含量在 25 到 250 之間才可用於數算。

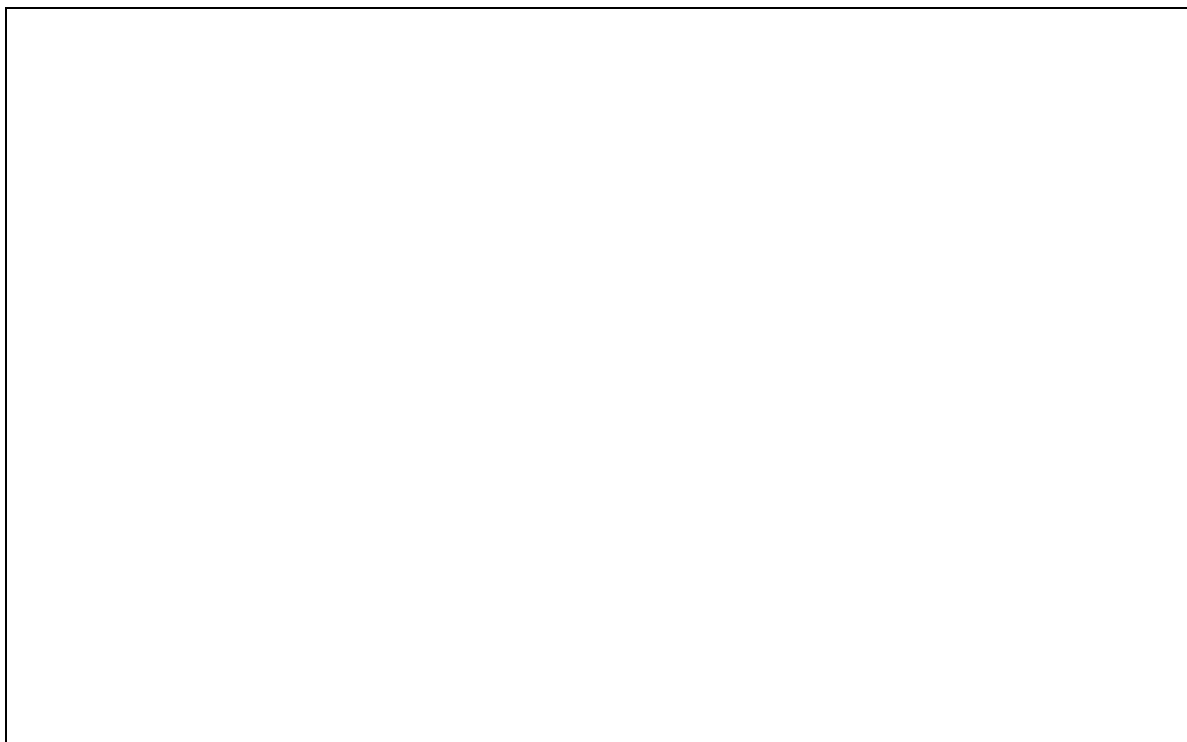
用 CFU 代替「菌落」是為了反映一個實際情況，因為在瓊脂平板上看到的單個菌落不一定是由單一細菌細胞形成的，可能是由附近的幾個細菌細胞結合而形成的。

如果使用「菌落」去表示細菌含量時，這樣計算出來的細菌總含量可能略低於實際的細菌總含量。

3. 用流動裝置為瓊脂平板拍照。
4. 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. 在下面的空框內，貼上瓊脂平板的照片或以繪圖記錄其現狀。



2. 在下表中，記錄平板上大腸桿菌的 CFU 含量及菌落顏色。

質粒	CFU 含量	菌落顏色
pCH1		
pCH2		
pCH3		
陰性對照		

VII. 討論

1. 在熱激後，只可用「手指輕拂」或「手腕輕拂」混和細菌，而不能使用渦旋混合器混合，試解釋原因。

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的菌落，試解釋其結果。

3. 在進行大腸桿菌轉化過程後，為什麼要使用含有氨苄青黴素的 LB 瓊脂平板代替一般 LB 瓊脂平板來培養大腸桿菌呢？

4. 為什麼在「陰性對照」的塗抹部分中沒有發現細菌群落？
