

實驗活動（三）

微生物感測器

（教師版本）

I. 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。

II. 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。

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，在實驗課二將分別有兩節 30 分鐘的培養期，你可能需要計劃在這兩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	接種大腸桿菌珠及平板劃線	30 分鐘	
2	培養微生物		2 天
實驗課二：實驗第(2)部分			
1	添加質粒	10 分鐘	
2	冷卻大腸桿菌	30 分鐘	
3	熱激大腸桿菌及復甦	40 分鐘	
4	塗布平板	10 分鐘	
5	培養微生物		2 – 3 天
實驗課三：實驗第(3)部分			
1	觀察和分析	30 分鐘	
總實驗課時		實驗課一：30 分鐘 實驗課二：1 小時 30 分鐘 實驗課三：30 分鐘	

V. 實驗設備、材料和準備工作

此實驗需要使用市面有售的教學套裝「Edvotek™ Rainbow Transformation Kit; Edvotek；#224」。

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。

網址：<https://www.edvotek.com/224>

A. 實驗第(1)部分：培養感受態大腸桿菌

設備（每組）

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

材料（每組）

- | | | |
|------------------------|-----------|----------------------------|
| - BactoBead™（即感受態大腸桿菌） | × 1 瓶（每班） | *註解：即經過處理後易於接受外來 DNA 的大腸桿菌 |
| - 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 | |

預備工作

製備 LB 瓊脂平板及等分復甦培養液（實驗課前一天由教師或技術員完成）

1. 根據製造商的說明，將 LB 瓊脂粉溶解於蒸餾水中，對 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）。用石蠟封口膜將瓊脂板包裹後放 4°C 保存，直至使用；為每組學生準備 1 塊 LB 瓊脂板。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 瓊脂板。
2. 將 15 µl 復甦培養液等分加至微量離心管中，為每組學生準備 1 支。

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：以熱激將質粒轉化入大腸桿菌

設備 (每組)

- 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 (每組)

- 來自第(1)部分的 LB 瓊脂平板 × 1
- pCH1 質粒 (8 µl) × 1
- pCH2 質粒 (8 µl) × 1
- pCH3 質粒 (8 µl) × 1
- 無菌蒸餾水 (8 µl) × 1
- 氯化鈣溶液 (1200 µl) × 1
- 復甦培養液 (1200 µl) × 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 × 1
- 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

預備工作

製備 LB／ampicillin／IPTG 瓊脂平板及等分實驗材料（實驗課前一天由教師或實驗室技術員完成）

1. 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後，讓其冷卻至 $\sim 50^{\circ}\text{C}$ ，然後添加適量的氨苄青黴素及 IPTG 溶液，立即混勻，將溶液倒入培養皿中（每盤 15 – 20 ml）。用石蠟封口膜將瓊脂平板包裹後放 4°C 保存，直至使用；為每組學生準備 1 塊 LB／amp／IPTG 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／amp／IPTG 瓊脂平板。
2. 將 1200 μl 氯化鈣溶液等分加至微量離心管中，為每組學生準備 1 支。
3. 將 1200 μl 復甦培養液等分加至微量離心管中，為每組學生準備 1 支。

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：通過顏色變化識別已成功轉化的大腸桿菌

設備(每組)

- 流動裝置 × 1

材料(每組)

- 來自第(2)部分LB／amp／IPTG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

預備工作

此部分不需要準備工作。

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。

其他適合此實驗的教學套裝：

1. pGLO™ Transformation and Inquiry Kit；Bio-rad；#10048976

Website: <https://www.bio-rad.com/zh-cn/product/pglo-transformation-inquiry-kit-for-ap-biology?ID=NEXYOKKG4>

香港代理：香港鰂魚涌 Bio-Rad Pacific Limited

聯絡電話：2789-3300 或 2272-8989

2. What a Colorful World Kit; Carolina; #217004P

網址：<https://www.carolina.com/gene-expression-advanced-topics/biobuilder-what-a-colorful-world-kit-with-perishables/217004P.pr?question=>

VI. 「關於實驗設計的導引問題」的建議答案

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？

在轉化實驗前應使用 LB 瓊脂平板；在轉化實驗後則使用含氨苄青黴素的 LB 瓊脂平板。

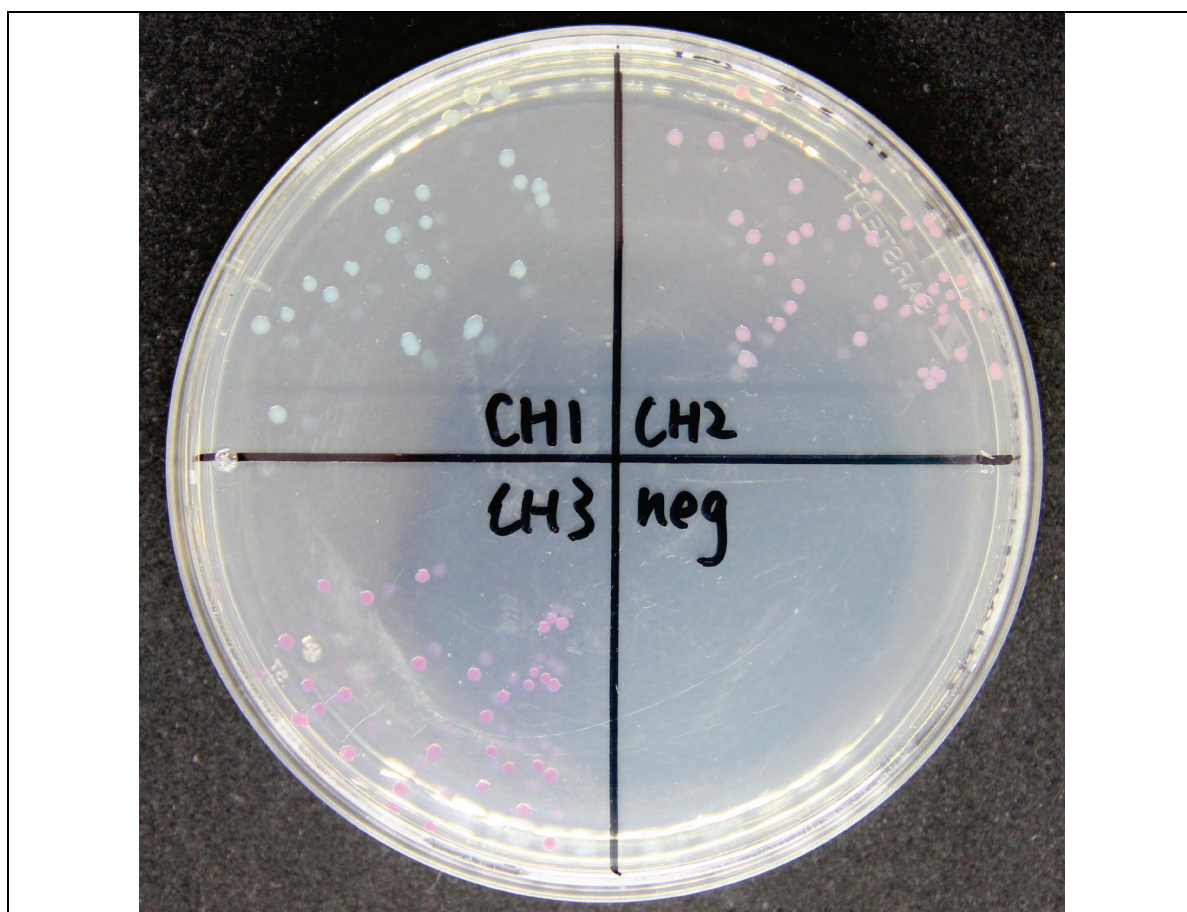
2. 列出一種可將外源質粒轉入大腸桿菌細胞的分子技術。

熱激。

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其現狀。

（只供參考）



2. 在下表中，記錄平板上大腸桿菌的 CFU 含量及菌落顏色。

(只供參考)

質粒	CFU 含量	菌落顏色
pCH1	22	淺藍色
pCH2	43	粉紅色
pCH3	34	紫色
陰性對照	0	不適用

VIII. 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。

鈣離子增強細菌細胞膜的通透性，削弱了細胞結構。

渦旋向細胞施加剪切力，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的菌落，試解釋其結果。

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. 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？

在實驗中進行轉化過程後，成功轉化的大腸桿菌應會變得對氨苄青黴素有抗性。使用含有氨苄青黴素的 LB 瓊脂板作培養可以選擇性地讓成功轉化的細菌生長。

4. 為什麼在「陰性對照」的塗抹部分中沒有發現細菌群落？

「陰性對照」管中的大腸桿菌細胞沒有轉化入任何帶有氨苄青黴素抗性基因的重組質粒，所以這些細胞不能在含有氨苄青黴素的培養瓊脂中生長。

IX. 參考資料

Froger, A., & Hall, J. E. (2007). Transformation of plasmid DNA into E. coli using the heat shock method. *Journal of Visualized Experiments*, 6, e253. doi:10.3791/253

錄像片段：

<https://www.jove.com/t/253/transformation-of-plasmid-dna-into-e-coli-using-the-heat-shock-method>

<https://www.khanacademy.org/science/biology/bacteria-archaea/prokaryote-structure/a/prokaryote-reproduction-and-biotechnology>

錄像片段：

<https://www.pbslearningmedia.org/resource/biot11.sci.life.gen.transbact/transforming-bacteria/>