

# 實驗一、即時定量 Q-PCR (Real-time Quantitative Polymerase Chain Reaction)

## 在檢測蝴蝶蘭基因表現上的應用

**實驗目的：**為了快速並精準的偵測基因表現，Real-time Quantitative Polymerase Chain Reaction (Q-PCR)在這幾年內大量被使用，本實驗將讓同學實際操作 Q-PCR 在蝴蝶蘭基因表現檢測上的方法及步驟，讓同學對實驗原理及未來應用有更深一步的了解。

**實驗樣本：**2 倍體(2x) 與 4 倍體(4x) 的白花蝴蝶蘭 (*Phalaenopsis aphrodite*) 葉部組織 cDNA

**使用引子：**PACT4 (actin)、PRCW (proline-rich cell wall protein)

### 實驗步驟：

1. 使用”8 連排管”。 \*由於 Q-PCR 偵測極為敏感，所以不要在管壁或管蓋留下任何標記
2. 依序加入下列藥品：

順序	藥品	體積
5	cDNA template	2 $\mu$ l
4	10 $\mu$ M primer (Forward)	0.4 $\mu$ l
3	10 $\mu$ M primer (Reverse)	0.4 $\mu$ l
2	SYBR Green Master Mix (2X)	10 $\mu$ l
1	ddH <sub>2</sub> O	7.2 $\mu$ l

共計 20.0  $\mu$ l

3. 藥品加入 8 連排管後，蓋上管蓋。
4. 用桌上型離心機，離心 10 秒。
5. 設定 StepOne software：Set up 選”Advanced Setup”，Experiment properties 介面：
  - (i) instrument  $\rightarrow$  96 well
  - (ii) experiment  $\rightarrow$  comparative C<sub>T</sub> ( $\Delta\Delta$ C<sub>T</sub>)
  - (iii) detect  $\rightarrow$  SYBR Green reagents
  - (iv) ramp speed  $\rightarrow$  Fast (~ 40 min to complete a run)

\*\*Plate Setup :

(i) Target Name	(ii) Sample Name
PACT4、PRCW	2N PA、4N PA

Assign the Plate : (依照 Target 與 Sample 排列順序設定)

\*\*Run Method :

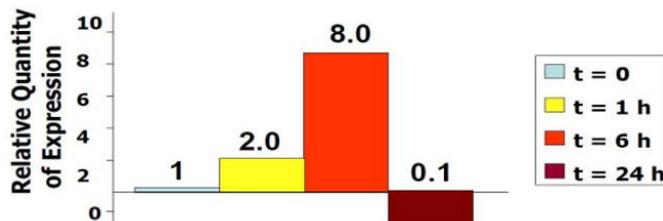
Hold	Cycling		Melt Curve		
95°C	95°C	60°C	95°C	60°C	95°C
0'20"	0'03" →	0'30"	0'15" →	1'00" →	0'15"
1x		40x			1x

\* 將設定完成檔案存入隨身碟帶到 Q-PCR 機，sample 照設定順序放入，Start PCR，3 小時。

結果：

以 Excel 檔輸出，利用所得  $C_T$  值計算基因表現量差異。

	Target gene	Endogenous control	$C_{t_{sample}}$	$C_{t_{control}}$	$\Delta\Delta C_t$	$2^{-\Delta\Delta C_t}$
	IL-2	18S	$\Delta C_t$			
<b>T=0</b> (Control)	24	9	15	0	0	1.0
<b>T=1hr</b>	24	10	14	-1	-1	2.0
<b>T=6hr</b>	23	11	12	-3	-3	8.0
<b>T=24hr</b>	28	10	18	3	3	0.1



實驗後的問題討論：比較反轉錄 PCR (reverse transcription-PCR, RT-PCR) 與即時定量

PCR (real-time quantitative PCR, Q-PCR) 的強項與各自優勢。(下周繳交)

## 實驗二：以眼色突變基因認識基因遺傳調控 (2 實驗)

- 觀察眼色突變基因以認識一基因一酵素之觀念
- 觀察眼色突變在雌雄果蠅之不同表現形式劑量效應

### 實驗目的：

在 1940 年早期，Dr. George W. Beadle 與 Dr. Edward L. Tatum 研究 *Neurospora*，結論是：基因控制酶，酶為一種有機催化劑，用以調節細胞之生化反應。Beadle 與 Tatum 建議一基因一酶之假說。在 Beadle 與 Tatum 之研究以前，英國之物理學家 Garrod 曾證明某些人類之遺傳缺點，與酶之缺乏有關。一般來說，在高等動物中，要證明特殊基因之變異與酶之缺乏彼此間的關係是很困難的。

利用色層分析法(TLC)，可探索與顯示出不同基因組合之果蠅其化學的變異。此步驟首先在 1951 年由 Dr. Ernst Hadorn 與 Dr. Herschel K. Mitchell 所發展出來，可瞭解更多關於果蠅之基因作用。根據 Hadorn 與 Mitchell 所設計之步驟，果蠅在一濾紙之一邊壓碎。之後，把濾紙放在適當之溶劑中，過一段時間後，溶劑因毛細管作用往上。當溶劑經過果蠅壓碎點，溶解那些可溶性之物質，將物質依其化學及物理特性與以分開，分成兩種成分。其中一種化合物為 Pteridines。野生之果蠅含七種 Pteridines，眼色突變種之果蠅其 Pteridines 之型態很明顯與野生果蠅有差異。一些”正常”之 Pteridines 可能完全消失，或者有反常大量的”正常” Pteridines 存在。白眼果蠅只是當年新出現的多種果蠅突變型之一，簡稱為「白眼」(white)，另外還有桃紅眼、墨綠眼突變，這些新出現的遺傳性狀全都是隱性變異，而且全都表現出孟德爾的遺傳模式。

1909 年 Morgan 發現果蠅細胞中有一對決定性別的染色體，稱為性染色體。Morgan 在果蠅實驗發現紅眼、白眼基因位在 X 染色體上，Y 染色體無此基因，一般野生型果蠅皆為紅眼，因此白眼相對於紅眼為隱性，故雌蠅必須兩條 X 染色體都有白眼基因，才會表現出白眼，但在雄性，只要有一條 X 染色體有白眼基因，便可表現。以一基因一酵素的觀念來看，雌雄果蠅的眼色基因因為各為兩個與一個，所以應有眼色色素表現上的差異，應有劑量效應(dosage effect)的差別，但雌雄果蠅的眼色基因調控--劑量補償效應(dosage compensation)--造成雌雄果蠅的眼色蛋白量相同，值得討論。

本實驗利用色層分析法分析果蠅眼色基因之表現，比較各種果蠅眼色在色層分析中的表現量，以及雌雄間表現量差異。

### 實驗材料：

解剖顯微鏡 (一組一台)，5X7” 長方形之 Whatman No.1 濾紙 作為 TLC membrane，乙醚、玻璃瓶、棉花塞、大夾子，水彩刷、解剖針，玻棒，展開槽，紫外光燈源(請戴眼鏡或實驗護目鏡)，數種不同眼色突變種果蠅 雄雌 *Drosophila melanogaster* 各一隻，e.g.，野生型 wild type、白色眼(white)、Cy b (捲翅、黑體、紅色眼)、殘翅(vg、紅色眼)，展開液為 1:1 之 28%NH<sub>4</sub>OH 及 n-propyl alcohol (propanol) 混合物

### 實驗步驟：

利用色層分析法比較下列果蠅之野生型及突變型，**不同性別之果蠅**進行。利用色層分析法測定 Pteridines 之每種突變種之特徵。

1. 取一張 5X7” 長方形之 Whatman No.1 濾紙，以鉛筆在邊緣的 1.5CM 處畫一直線，在線上每

隔 1 吋之地方輕輕的點一點，事先劃分好區域，各區域分別放上一隻果蠅，不可直接以手指碰觸紙面，以免影響實驗結果。利用玻棒壓碎兩隻經乙醚處理過之迷昏的野生型**不同性別**之果蠅，雌雄各一隻。玻棒對準果蠅眼睛壓出色素(不可壓到果蠅身體，以免產生實驗誤差)。果蠅給壓碎後，**將身體殘骸移除**。

2. 重複第一步驟，將突變種之兩隻不同性別果蠅做測定。每隔一吋將各種類型果蠅點在濾紙上。每壓碎一種果蠅後須利用等體積之 28%NH<sub>4</sub>OH 及 n-propyl alcohol 液體沖洗玻棒**(或用清水沖洗玻棒並擦乾)**，盡量避免手指接觸到濾紙上(為什麼?)以數目或字母替每一點做編號，並紀錄那一種果蠅是在哪一點給壓碎的。繼續下一個步驟前每個壓碎點風乾至少 1 分鐘。
3. 準備等份量之 28%NH<sub>4</sub>OH (ammonia)及 n-propyl alcohol (propanol) =1:1(體積比)。
4. 將全部 50ml 之混合溶液分別倒入展開槽，約 1cm 高，並將移除果蠅遺跡的一方朝下放，容器中之溶液不能接觸到果蠅被壓碎點。之後將展開槽蓋子蓋上。濾紙不能全部碰到容器旁邊。Pteridines 對光敏感，色層分析圖譜**最好**在黑暗中進行。
5. 色層分析圖譜在展開槽中發展 1 至 1½ 小時。此時，溶液會因毛細管作用吸附在濾紙上，並把不同之 Pteridines 色素依分子量大小分布在濾紙上之不同的位置。因此色素在濾紙上分開。之後，從溶液中拿出濾紙，讓它在黑暗中風乾幾分鐘。
6. 以紫外光燈觀察色層分析圖譜。**不能直接看紫外光**。

### 結果：

- a. 描述並劃圖表示
- b. R<sub>f</sub> 值計算：化合物在濾紙上所移動的距離與化合物本身之化學特性及溶液移動的全部距離是有關係的。此距離乃某種化合物之特徵及用以鑑定化合物之一種特性。

$$R_f = \frac{\text{從底線移到 Pteridines 點中心之距離}}{\text{從底線移到溶液前端之距離}}$$

當確立此實驗方程式後，便可從 R<sub>f</sub> 值鑑別化合物。因此它們在統計學上變得很重要，因它可顯示個別化合物之特徵。不同 Pteridines 之 R<sub>f</sub> 值可計算出來。

1. 色層分析圖譜從展開槽中拿出時，以鉛筆劃出溶液前端。
2. 色層分析圖譜在紫外光下觀察時把不同之色素點圈起來，以測量適當之距離及計算 R<sub>f</sub> 值。現在做此步驟並完成果蠅之 Pteridines 圖。

### 實驗後的問題討論：

1. 以眼色基因的與眼色素的關係，討論一基因一酵素的觀念
2. 眼色基因的表達在果蠅雌雄間的無差異，討論果蠅 dosage compensation 機制  
(下周繳交)