

教育部高中生物科學資優生培育計畫  
高雄區

# 分子生物實驗手冊

學生：\_\_\_\_\_

學校：\_\_\_\_\_

授課教師：楊文仁 老師

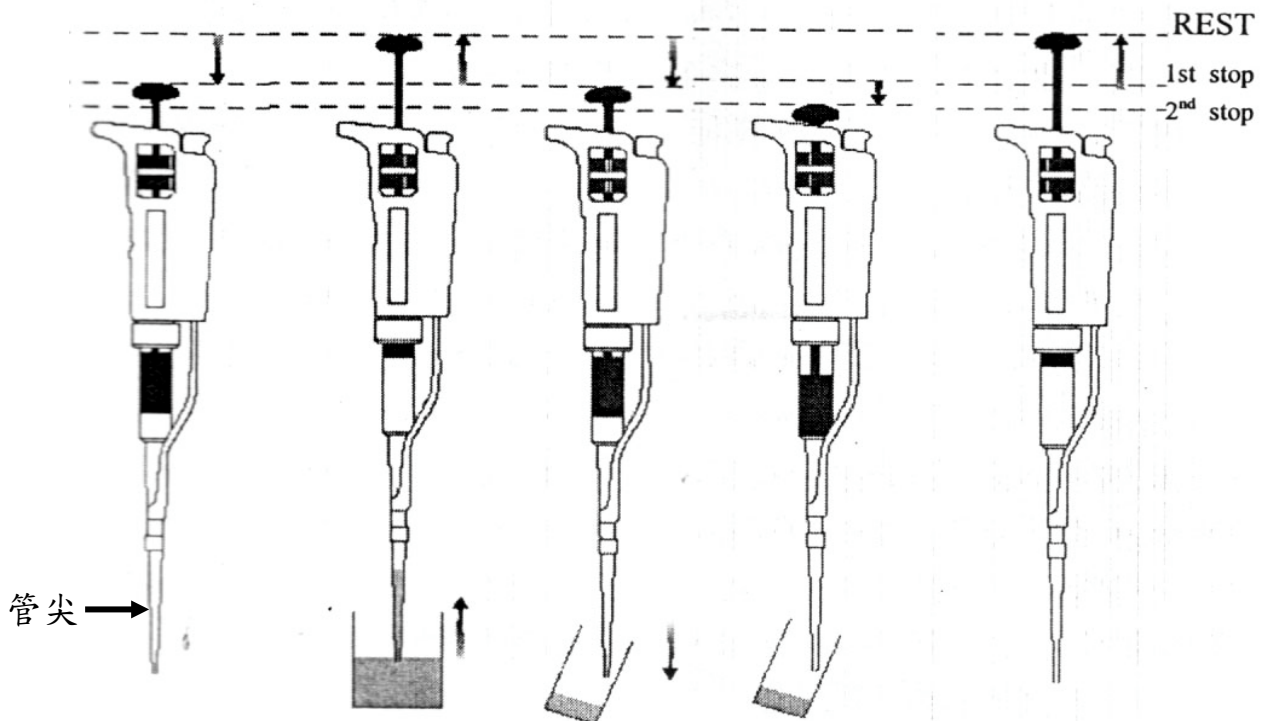
國立高雄大學 生命科學系

## 實驗室安全及注意事項

1. **嚴禁**在實驗室中**飲食**或**吸煙**。
2. 實驗室不可穿著脫鞋，必要時應戴上**乳膠手套**，以確保自身安全。
3. 揮發性溶劑藥品，應在通風櫥中量取配製；有毒物質或致癌性物質，取用時應戴上手套，必要時應戴上口罩；毒性藥品廢液需應依照規定指示處理，倒入規定之**廢液收集桶**中，不可隨意往水槽傾倒。
4. 實驗時打翻任何藥品試劑，應立即清理。
5. 實驗室器材、藥品於使用後應整理清潔並放回原位。
6. 實驗室器材、藥品不可擅自攜出實驗室外。
7. 所有儀器於使用前**應先了解其性能及操作方式**再行使用。
8. 應清楚了解緊急沖洗站、沖眼站、滅火器之位置，若發生任何緊急事件**應立即通知老師及相關人員**，並進行緊急處理措施。
9. 有任何問題，立即反應給老師及相關人員。

## 微量吸管(PIPETMAN)操作要點

1. 使用pipetman 前，下壓按鈕數次，以做排氣動作。
2. 將**管尖(tip)**裝於微量吸管柱前端，安裝時**壓緊旋轉**以確保其**密閉性**。
3. 操作微量吸管時要盡量保持垂直，造成吸取液面的最小截面積。
4. 管尖浸於液面下**約5 mm**，等1~2 秒待其氣壓回穩後將管尖拉離液劑。
5. 從管尖排出液劑時，應將吸管尖之管口靠在容器之內壁上(傾斜10~45 度)，緩緩壓下按鈕至第一段處。
6. 將按鈕完全按下(至第二段處)，並小心的將管尖沿著容器內壁滑動而拉離容器(如此可使試劑完全注入而不會殘留在吸管尖內)。
7. 設定吸取容量碼表值，由低值旋轉至高值時，需旋轉超越所欲設定值後，再反轉至設定值；由高值旋轉至低值時，則直接旋轉至設定值即可。
8. 吸取試劑時，**釋放按鈕不可過速**，以免試液衝入吸管柱內而腐蝕活塞。
9. 濃稠或具黏性之試液，如血液、蛋白質、有機溶劑等，均需先行將tip預潤。切勿吸取溫度高於70°C之試劑，以免蒸汽侵入而腐蝕活塞。



# 實驗一

## 小量細菌質體 DNA 的製備及其定量

### 目的

本實驗將使用鹼性溶裂法自細菌細胞製備小量質體 DNA，並利用 DNA 會吸收波長 260nm 紫外光的特性，以分光光度計來估算所製備質體 DNA 的濃度。

### 背景

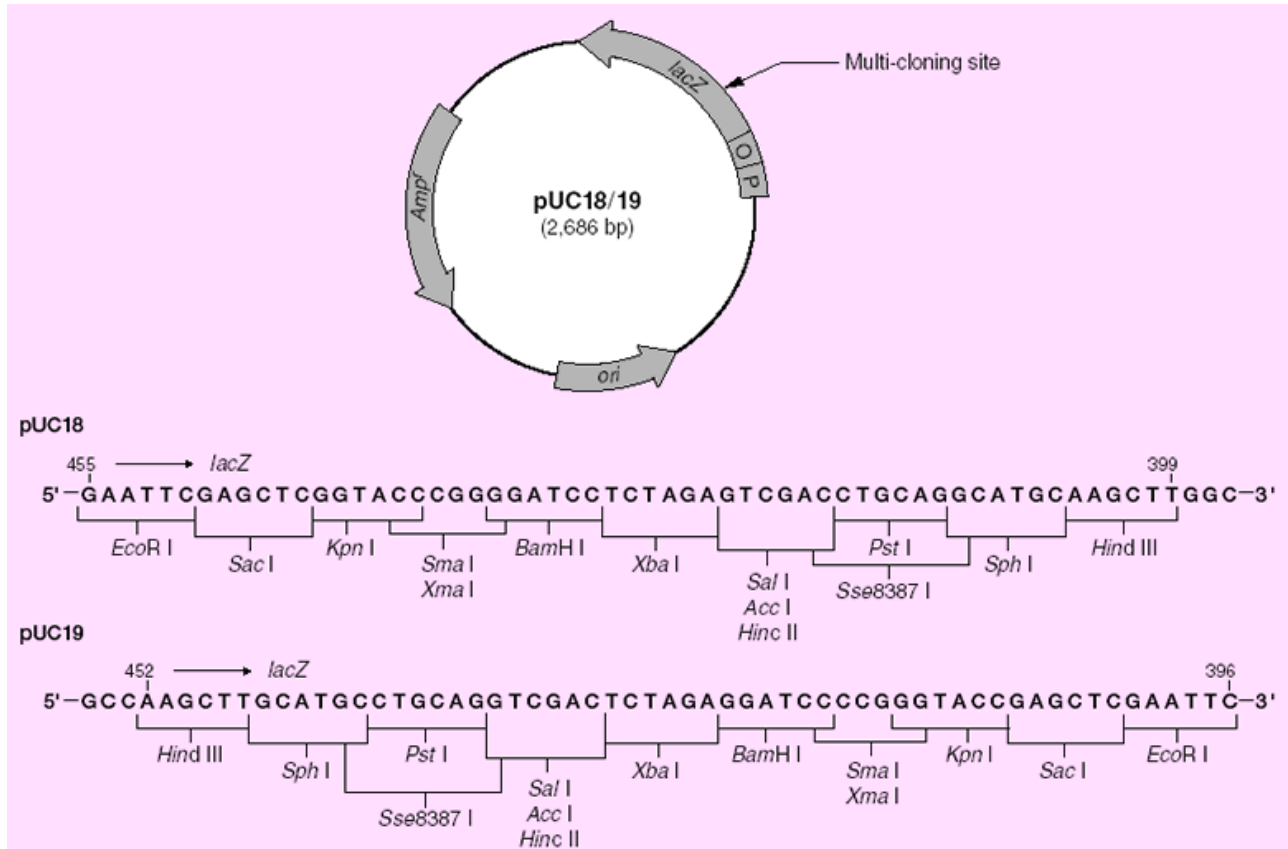
質體是細菌染色體以外的遺傳物質，由雙股環狀 DNA 組成。細菌所帶質體的大小及數目不定。質體 DNA 可以在細菌間互相轉移，而將外來的基因轉移到其他宿主細胞中表現。因此，質體 DNA 的製備是分子遺傳學的一項基本而且重要的技術。

### 質體 DNA 製備的原理及步驟

1. 培養並收穫細菌。
2. 破壞細菌的細胞壁與外膜。
3. 破壞細胞膜使細菌裂解。
4. 移除染色體 DNA。
5. 移除蛋白質與 RNA。
6. 純化 DNA。

### 鹼性溶裂法製備質體 DNA

有許多方法用於製備質體 DNA，一般實驗室常用的是鹼性溶裂法 (alkaline lysis method) 及煮沸法 (boiling method)。鹼性溶裂法的原理是以 NaOH 和 SDS 將細菌分解，並造成蛋白質及 DNA 變性，再用酸加以中和。質體 DNA 在中和後可以恢復原狀，而大部分細菌染色體 DNA 無法復原，並與 SDS-K<sup>+</sup> 所形成的複合物一起沉澱，藉由離心去除之，再以酒精或異丙醇將上清液的質體 DNA 沉澱，即可得到質體 DNA。本實驗所使用大腸桿菌 (*E. coli*) 宿主細胞攜帶有質體 pUC19 (圖一)，由於 pUC19 帶有抗 ampicillin 抗藥性基因 (Amp<sup>R</sup>)，故需將細菌培養於含有 ampicillin 的培養基中，才能篩選出帶有 pUC19 質體的細菌。



圖一 pUC18/19 質體示意圖及 multiple cloning site 限制酶切位

## 材料與設備

### 儀器設備

1. 桌上型離心機
2. 1.5 ml 離心管
3. 震盪器 (vortex)
4. 微量吸管 (pipetman) ; P20、P200、P1000
5. 管尖
6. 37°C 水浴槽
7. 分光光度計 (spectrophotometer)
8. 石英測光管 (cuvette)

### 藥品試劑

1. 隔夜培養之大腸桿菌 (*E. coli* 攜帶質體 pUC19) 菌液
2. 酚 (phenol)
3. 氯仿 (chloroform)

4. 100%絕對酒精(ethanol)、70%酒精
5. 異丙醇(isopropanol)
6. 碎冰
7. TE 緩衝液 (10mM Tris-HCl 及 1mM EDTA, pH8.0)
8. 無菌水
9. RNase

### 溶液 I

50 mM glucose	作用: _____
25 mM Tris-HCl (pH 8.0)	作用: _____
10 mM EDTA (pH 8.0)	作用: _____

### 溶液 II (使用前**新鮮配製**)

0.2N NaOH	作用: _____
1% SDS	作用: _____

( 1 ml 1N NaOH + 0.5 ml 10% SDS + 3.5 ml H<sub>2</sub>O = 5 ml 溶液 II )

### 溶液 III (作用: \_\_\_\_\_)

5M potassium acetate	60 ml
glacial acetic acid	11.5 ml
H <sub>2</sub> O	28.5 ml

## 實驗步驟

1. 取 1.5 ml 隔夜培養的菌液，置入 1.5 ml 離心管中，於室溫下以 6,000 rpm 離心 3 分鐘，將菌體離至管底。
2. 移除上清液，重覆步驟 1。
3. 將離心管中的上清液(supernatant)抽出丟棄，上清液需確實移除。
4. 加入 100 μl 冰冷的溶液 I，劇烈震盪(vortex)使沉澱物(pellet)再懸浮。需確定沉澱物完全溶解在溶液 I 中。
5. 加入 200 μl 新鮮製備的溶液 II，上下翻轉試管數次，確定混合均勻，靜置於冰浴中 5 分鐘，菌液將呈現透明狀。
6. 加入 150 μl 冰冷的溶液 III，上下搖晃試管數次，確定混合均勻，會有白

色絲狀物產生，靜置於冰浴中 5 分鐘。

7. 以 12,000 rpm 離心 5 分鐘，取上清液至新的 1.5 ml 離心管中。
8. 加入 400  $\mu$ l 的 phenol/chloroform，搖晃試管使其混合均勻。
9. 以 12,000 rpm 離心 5 分鐘，取上清液至新的 1.5 ml 離心管中(勿吸取到界面間的物質)。
10. 重複步驟 8~9，直至界面無污染物存在。
11. 加入 2.5 倍體積的冰冷 100% 絕對酒精(或等體積的異丙醇)，混合均勻，置於室溫 5 分鐘(或-20°C，30 分鐘)。
12. 以 12,000 rpm 離心 5 分鐘，移除上清液。
13. 加入 500 $\mu$ l 冰冷的 70% 酒精洗沉澱物，移除上清液(**注意！勿使沉澱物掉出**)，於室溫倒置 20 分鐘(5~10 分鐘)，使試管中的 DNA 乾燥。(沉澱物會逐漸變透明)
14. 加入 40  $\mu$ l 的 TE 緩衝液或無菌水將**試管底(及離心面之管壁)**的 DNA 溶出，此即為製備所得的 DNA。
15. 此時製備之 DNA 中仍含有 RNA，可加入 RNase 將其去除。取出 20 $\mu$ l 的 DNA 溶液，加入 1 $\mu$ l 的 RNase，於 37°C 作用 20 分鐘。剩下的 20 $\mu$ l DNA 溶液，作為對照組之用。
16. 取出 2 $\mu$ l 加水稀釋至 98 $\mu$ l，將稀釋液裝入石英測光管，測其在 UV 260nm 及 UV 280nm 的吸光值，並估算其濃度。
17. DNA 樣品名稱標示清楚後，進行後續分析或儲存於-20°C 備用。

## 煮沸法(boiling method)製備質體 DNA

### 材料與方法

大致與鹼性溶裂法相同，另外包括下列材料：

1. lysozyme (10 mg/ml in 10 mM Tris-HCl, pH 8.0)
2. 5 M LiCl
3. 滅菌牙籤
4. 沸水浴

STET 緩衝液配製：

{	8% sucrose	8 g	sucrose
	5% Triton X-100	5 ml	Triton X-100
	50 mM EDTA	10 ml	0.5 M EDTA (pH 8.0)
	50 mM Tris-HCl (pH 8.0)	5 ml	1M Tris-HCl (pH 8.0)
			<hr/>
			add dH <sub>2</sub> O to 100 ml

### 實驗步驟

1. 取 1.5 ml 隔夜培養的菌液，置入 1.5 ml 離心管中，於室溫下以 6,000 rpm (12,000 rpm) 離心 3 分鐘(1 分鐘)，將菌體離至管底。
2. 移除上清液，重覆步驟 1。
3. 將離心管中的上清液(supernatant)抽出丟棄，上清液需確實移除。
4. 加入 300 µl 的 STET 緩衝液，使沉澱物再懸浮，需確定沉澱物完全溶解。
5. 加入 25 µl 的 lysozyme 溶液，vortex 混合 3 秒鐘。
6. 將離心管移入沸水煮 40 秒鐘。(裝上防管口爆開裝置，放於浮板上)
7. 於室溫下以 12,000 rpm 離心 20 分鐘(15 分鐘)。
8. 用滅菌牙籤將白色的細菌碎片沉澱物移除。
9. 加入 300 µl 的 5M LiCl 以移除大分子 RNA，混合均勻，置於冰上 5 分鐘。
10. 以 12,000 rpm 離心 5 分鐘，取上清液到新的離心管中。
11. 加入 600 µl 的異丙醇，混合均勻，置於-20°C，30 分鐘(20 分鐘)。
12. 以下步驟如同鹼性溶裂法步驟 12 ~ 17。



## 附錄

1. 以分光光度計對 DNA 或 RNA 定量時，需測 260nm 及 280nm 的吸光值。  
核酸和蛋白質分別在波長 260nm 及 280nm 有最大吸光值，若有任何蛋白質污染可經由 280nm 吸光值得知。因此， $A_{260/280}$  比值可提供評估樣品的純度。製備 DNA 之  $A_{260/280}$  比值為\_\_\_\_；製備 RNA 之  $A_{260/280}$  比值為\_\_\_\_，即為好的純度。
2. 核酸之定量：  
雙股 DNA 在 UV 260nm 的吸光值= 1.0；相當於濃度 \_\_\_\_\_  $\mu\text{g/ml}$ 。  
單股 DNA 在 UV 260nm 的吸光值= 1.0；相當於濃度 \_\_\_\_\_  $\mu\text{g/ml}$ 。  
單股 RNA 在 UV 260nm 的吸光值= 1.0；相當於濃度 \_\_\_\_\_  $\mu\text{g/ml}$ 。
3. 重量單位之換算：  
1 cg (centi-) = \_\_\_\_\_ g      1 pg (pico-) = \_\_\_\_\_ g  
1 mg (milli-) = \_\_\_\_\_ g      1 fg (femto-) = \_\_\_\_\_ g  
1  $\mu\text{g}$  (micro-) = \_\_\_\_\_ g      1 ag (atto-) = \_\_\_\_\_ g  
1 ng (nano-) = \_\_\_\_\_ g
4. 注意事項：  
phenol/chloroform 為毒性物質，操作時要小心，避免接觸皮膚。使用後應集中放置，依照有機毒物廢棄物相關規定處理。

# 實驗二

## 聚合酶連鎖反應

### 目的

本實驗的目的在使學習者熟悉 PCR 的基本原理及操作技術，如何自植物樣本中抽取 DNA，並利用瓊膠電泳來分析 PCR 產物。

### 背景

#### PCR 原理

聚合酶連鎖反應(Polymerase Chain Reaction, PCR) 是美國 Cetus 公司的 K. B. Mullis 於 1984 年所發明的一種在細胞外(*in vitro*)複製 DNA 的技術。此技術將一段特定的 DNA，與 DNA polymerase 作用，在短時間內經 denaturation – annealing – extension 等步驟重複反應，使產物以  $2^n$  的速率急速增加，即使原本只有 picogram (pg,  $10^{-12}$ g) 的 DNA，快速增加至 microgram ( $\mu$ g,  $10^{-6}$ g)。此技術不論在學術研究或生物科技之應用上均有劃時代之意義，因此 Mullis 於 1993 年榮獲諾貝爾化學獎。

PCR 的原理，即是利用 DNA 聚合反應(DNA polymerization)，重複地進行 DNA 的合成。主要包括下列三個步驟：

#### 1. DNA 模板之變性(DNA template denaturation)

利用高溫（一般約 94 ~ 95°C）使雙股 DNA 變性，打開成單股 DNA。

#### 2. 引子的煉合(primers annealing)

降低溫度(一般約 50 ~ 60°C) 使具有對 DNA 模板序列互補的引子與 DNA 模板煉合。此時單股 DNA 也可能再度結合成雙股。但由於引子的濃度遠超過 DNA 模板的濃度，所以單股 DNA 再度結合成雙股的機會不大。

#### 3. 引子的延伸(primers extension)

將溫度升高至 DNA 聚合酶反應的適當條件(一般為 72°C)，使其以引子為開端，依據 DNA 模板序列，進行延伸作用，合成出互補股的 DNA 片段。

PCR 反應不斷重複此三個步驟，產物得以幾何級數迅速地增加，顯著地提高實驗的靈敏度並降低工作的困難度，現已成為分析 DNA 的利器，並廣泛被應用在基礎分子生物、醫學診斷、刑事科學、考古學等方面。

# 材料與設備

## 儀器設備

DNA 溫度循環機

PCR 反應試管(0.2 ml)

微量吸管 (P20、P200 pipetman，可吸取 20  $\mu$ l、200  $\mu$ l)

無蓋的離心管(1.5 ml)

微量吸管尖

桌上型離心機

震盪器(vortex)

## 材料

模板 DNA

引子

*Taq* DNA polymerase

*Taq* polymerase buffer (10x)

dNTP 混合液 (各 dNTP 的濃度為 2.5 mM)

無菌去離子水

## 實驗步驟

1. 取一 **0.2 ml PCR** 反應試管，依下列用量加入反應物，完成後置入 DNA 溫度循環機中。**注意 *Taq* polymerase 要最後才加入**。並於加入所有反應物後，用手指輕敲試管使其混合均勻。可用無蓋的 1.5 ml 離心管托住 PCR 反應試管，置於離心機中離心數秒鐘，使反應物集中於底部。把 PCR 反應試管置入溫度循環機之前，**將試管立於碎冰上**。

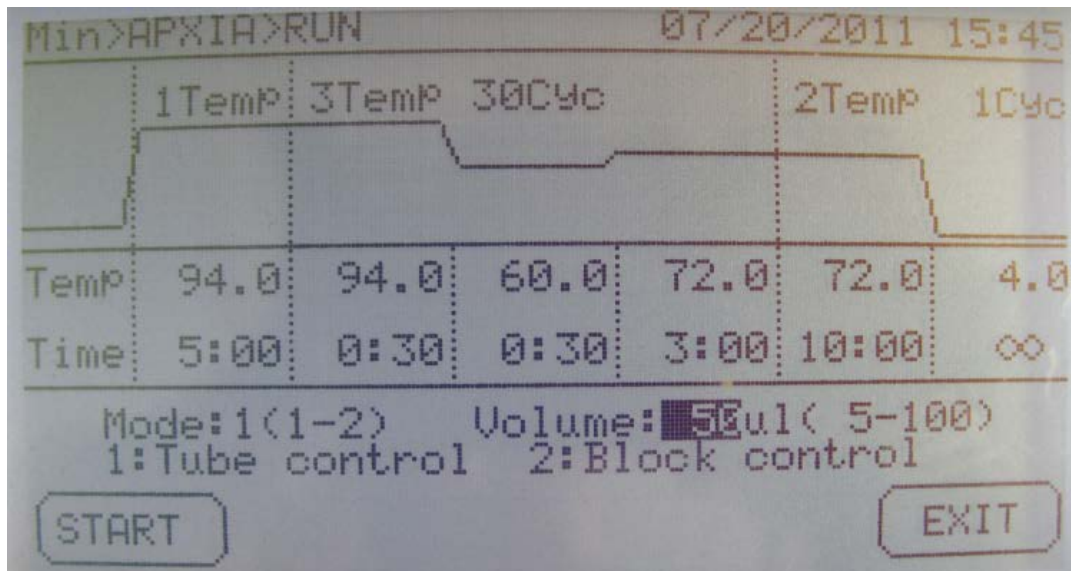
Template DNA	1 $\mu$ l
dNTP mix (2.5 mM)	4 $\mu$ l
forward primer (10 $\mu$ M)	4 $\mu$ l (1 $\mu$ l)
reverse primer (10 $\mu$ M)	4 $\mu$ l (1 $\mu$ l)
<i>Taq</i> polymerase buffer (10 X)	5 $\mu$ l
<i>Taq</i> polymerase	1 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	31 $\mu$ l (37 $\mu$ l)
total	50 $\mu$ l

2. 設定溫度循環機(圖二)的程式(圖三)如下：



圖二 PCR 溫度循環機

94°C	5 min	(3 min)	
94°C	30 sec	} 25 ~ 30 cycles (20 cycles)	
60°C	30 sec		
72°C	3 min		(1 min)
72°C	10 min		(5 min)
4°C	∞		



圖三 PCR 程式設定

3. 設定完成後，按下 START 鍵，即可進行反應。反應約需 2~3 小時。

4. 反應完畢，取出樣品進行電泳分析。

# 實驗三

## 以限制酶切割 DNA 和瓊膠電泳分析

### 目的

本實驗之主要目的在使學習者熟悉利用限制酶(restriction enzymes)對序列認知的專一性來切割及鑑定 DNA，並以瓊膠電泳觀察結果。

### 背景

#### 何謂核酸內切酶

在原核生物細胞中，多存在有核酸內切酶(restriction endonucleases)，簡稱限制酶。它們組成限制-修飾系統(restriction – modification system) 一方面標記自體 DNA，一方面將侵入細菌細胞的外來 DNA 切掉，但不會切已“標記”(例如甲基化)的自體 DNA。因其對 DNA 序列的認知具有專一性，而成為在生物技術上的一項重要工具。

#### 限制酶之命名

限制酶命名是以其來源的細菌之學名簡稱而得，例如 *EcoRI* 是由 *Escherichia coli* RI 而來。依對 DNA 序列的認知及切割部位不同，可將限制酶分成 I、II、III 等三型。第 I 型其認知序列與切割部位相距至少 1000 bp 以上；第 II 型限制酶可在其認知序列中，很準確地切在特定的位置，所以此型限制酶常被用於生物技術的分子選殖上。通常其認知的序列為 4~6 個鹼基；第 III 型其切割部位在認知序列附近幾十個鹼基。有些限制酶在其認知的序列中，將對稱的雙股交互的切開，使 DNA 片段的 3'和 5'端形成黏著端(sticky end)，有些則會在對稱軸上將認知位置切開形成平頭端(blunt end)。

#### 瓊膠電泳

瓊膠電泳是將 agarose 溶解於 TAE 緩衝溶液中，冷卻後 agarose 會以氫鍵形成凝膠，在電場影響下使帶負電的 DNA 分子向陽極移動，移動速度依分子大小而定，分子愈大移動愈慢。一般而言，在某範圍內 DNA 片段的大小其移動距離的對數(log)與凝膠濃度成直線相關，因此必須選擇一個適當的濃度，才能有效地將 DNA 片段分開。例如 0.8% (w/v)濃度適度分離 0.5~10 kb 的線狀 DNA。用已知的 DNA 片段為標誌，可用來決定未知長短的 DNA 片段大小。在瓊膠電泳上也可測定 DNA 的純度和完整性，被 RNA 污染會

造成低分子量位置的 band 模糊不清。利用限制酶切割所產生的 DNA 片段，可測試質體圖譜是否正確？

本實驗將以限制酶切割 DNA 片段來鑑定質體 DNA 的圖譜，並利用瓊膠電泳觀察 DNA 的大小、純度和圖譜完整性。

## 材料與設備

### 儀器設備

1. 水平迷你瓊膠電泳系統
2. 微波爐
3. 桌上型離心機
4. 水浴槽
5. 照像系統
6. Ethidium bromide 染劑容器
7. 玻璃瓶
8. 1.5 ml 離心管
9. 微量吸管尖
10. 塑膠平板
11. 漂浮墊

### 藥品試劑

1. 實驗一所製備的質體 DNA
2. 瓊膠( agarose )
3. Ethidium bromide ( EtBr ; 10 mg/ml )
4. Restriction enzymes : *Bgl* I , *Hind* III
5. Restriction enzymes reaction buffer (10 x)
6. purified BSA 1mg/ml (100x)
7. DNA ladder (50ng/ $\mu$ l)
8. DNA loading dye (6x)
9. 無菌水
10. TAE buffer (1M Tris, 15mM EDTA, 125mM sodium acetate, pH=7.8)
11. 蠟紙( parafilm )
12. 熱感應相紙
13. RNase (10 mg/ml)

### DNA loading dye (6x) 製備

- 0.25% bromophenol blue
- 0.25% xylene cyanol FF
- 30% 甘油溶於水中

### TAE 緩衝液 (25x) 製備方法

將 121g Tris base, 10.25g sodium acetate 及 18.6g EDTA 溶於 750ml 蒸餾水中，再用冰醋酸調整至 pH = 7.8，加水調整體積至 1000ml。

## 實驗步驟

### (一) 限制酶切割 DNA 實驗

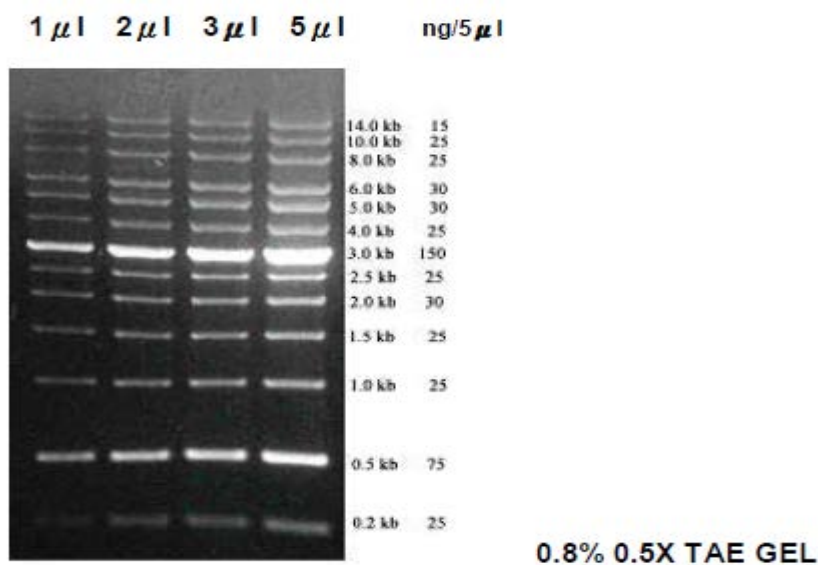
1. 取欲切割的 DNA(約 0.5~1  $\mu\text{g}$ )，置入 1.5ml 離心管中。
2. 計算切割 DNA 所需限制酶的量(參考廠商提供的相關資料)。一個限制酶的單位(1 unit)定義為在 50  $\mu\text{l}$  的反應體積中，作用 60 分鐘，可切割 1 $\mu\text{g}$  DNA。
3. 取適當的反應體積，使甘油含量小於 5% (w/v)，並計算須加入多少 10x 緩衝液，使其反應混合物中的最終濃度達到 1x。緩衝液的使用須參考廠商提供的說明(低、中、高鹽類之緩衝液)。
4. 加入適量的蒸餾水達到最後的反應體積。(此次實驗反應體積請參閱 P.16 實驗結果 2 ---限制酶切割 DNA 實驗)
5. 在離心機高速離心 5 秒，以減少管壁少量液體的附著。
6. 將反應物放入 37°C 水浴槽作用一小時。(在此一小時的等待時間內，另外著手進行瓊膠的製備。)

### (二) 瓊膠的製備

1. 依照儀器說明將迷你膠體電泳組件組合起來。
2. 將 25x TAE 緩衝液用蒸餾水稀釋成 1x TAE。稱取 0.2g agarose 溶於 25ml 的 1x TAE 緩衝液中(製備成 0.8 % 的瓊膠)，用微波爐加熱使溶解，待冷卻至 45°C 左右，將其倒入膠體製備槽中，厚度約 7.5 mm，並立刻插入梳板(comb)。(應避免氣泡產生，並注意液面是否平整、厚度是否一致。)
3. 在室溫下冷卻凝固約 20 分鐘，輕輕的將梳板移開，瓊膠的製備即完成。

### (三) 膠體電泳

1. 將凝膠連同鑄膠皿置入電泳槽中，再倒入 1x TAE 緩衝液蓋過凝膠，達電泳槽內側的刻記處。
2. 剪下一段蠟紙，吸取 1 $\mu$ l 的電泳染劑溶液於蠟紙上，再吸取 5 $\mu$ l 經限制酶消化的樣品與其混合，用微量吸管將混合液加到凝膠凹槽(well)中。取 2 $\mu$ l 的 DNA ladder 注入凹槽中，以做為 DNA 樣品大小之判斷標準。
3. 連接電源插頭，將開關開到“ON”，設定電壓 100 volt，電泳方向為負極往正極泳動。(DNA 帶何種電荷?)
4. 在此條件下進行電泳約 23 分鐘，直到 bromophenol blue 染劑移動到距離凝膠底部約 1.5 公分處，即停止電泳，將開關切至“OFF”，拔除電源。
5. 取出凝膠置入 EtBr 染劑溶液中染色 10 分鐘，以 H<sub>2</sub>O 洗去凝膠表面染劑。
6. 用塑膠平板取出凝膠，置於照相系統的透射光源板上，開啟紫外燈，於紫外光下觀察並拍照紀錄結果。



Gen-KB LC DNA ladder (Hopegen Biotechnology Development Enterprise)

### 注意事項

1. 電泳使用的電力為高壓電(⚡)，在通電後切勿碰觸電泳儀器。
2. EtBr 為毒性物質(☠)，操作時須戴手套。
3. 用微量吸管將各成分加入 1.5ml 離心管時，每加入一種成分就須更換新的無菌吸管，以避免交叉污染。
4. 進行限制酶切割 DNA 實驗時，限制酶應放在 -20°C 下，直到使用前才取出，而且要最後加入。



# 實驗報告

學校：\_\_\_\_\_ 姓名：\_\_\_\_\_

## 1. 抽取質體 DNA 實驗

抽取質體 DNA 吸光值：

OD<sub>260 nm</sub> = \_\_\_\_\_ ; OD<sub>280 nm</sub> = \_\_\_\_\_ ; OD<sub>260/280</sub> = \_\_\_\_\_ ;  
估計 DNA 濃度 = \_\_\_\_\_

加入 RNase 後，測得質體 DNA 吸光值：

OD<sub>260 nm</sub> = \_\_\_\_\_ ; OD<sub>280 nm</sub> = \_\_\_\_\_ ; OD<sub>260/280</sub> = \_\_\_\_\_ ;  
估計 DNA 濃度 = \_\_\_\_\_

## 2. 限制酶切割 DNA 實驗

(1)

pUC19 DNA \_\_\_\_\_ μl (\_\_\_\_\_ μg)  
(RNase treated)

No.3 Buffer (10x) 5 μl

Enzyme *Bgl* I 0.5 μl

無菌水 \_\_\_\_\_ μl

總體積 50 μl

(2)

pUC19 DNA \_\_\_\_\_ μl (\_\_\_\_\_ μg)  
(RNase treated)

No.2 Buffer (10x) 5 μl

Enzyme *Hind* III 0.5 μl

無菌水 \_\_\_\_\_ μl

總體積 50 μl

反應條件：\_\_\_\_\_ °C，\_\_\_\_\_ 分鐘。

## 3. 瓊膠電泳分析實驗

瓊膠濃度：\_\_\_\_\_。

電壓強度：\_\_\_\_\_。

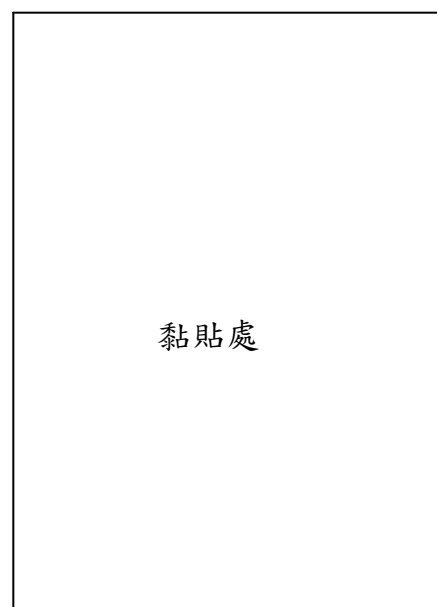
電泳時間：\_\_\_\_\_。

染色時間：\_\_\_\_\_。

照片說明

<u>樣品名稱</u>	<u>體積</u>
lane 1 : DNA ladder	2 μl
lane 2 : pUC19 (uncut)	_____ μl
lane 3 : pUC19 (+ RNase)	_____ μl
lane 4 : pUC19/ <i>Bgl</i> I	_____ μl
lane 5 : pUC19/ <i>Hind</i> III	_____ μl
lane 6 : PCR product	_____ μl

電泳照片



## 作業

學校：\_\_\_\_\_ 姓名：\_\_\_\_\_

1. 請依據您抽質體 DNA 測得之 OD 值，比較加入 RNase 前後，對估算 DNA 濃度之影響。並依 OD<sub>260/280</sub> 比值，探討您所抽出 DNA 之純度(purity)。若純度品質不佳，請討論可能之原因？該如何改善？(10 分)
2. 某日，老師拿了 100 μl 未知濃度的 plasmid DNA 給助教，助教取了 5 μl 樣品，加水稀釋至 500 μl，測得 260nm 吸光值為 0.25，請問此 plasmid DNA 的濃度為何？(10 分)
3. 單位換算：(10 分)  
1 ng = \_\_\_ mg = \_\_\_ fg = \_\_\_ pg = \_\_\_ μg = \_\_\_ ag
4. 請依據電泳圖 DNA ladder 估算您所抽的 DNA 經限制酶 *Bgl* I 及 *Hind* III 切出之片段大小為何？未切割的 DNA 電泳圖中呈現幾個條帶(band)？請解釋為什麼？(15 分)
5. 實驗課時，助教從冰箱取出裝有不同樣品的四支 1.5ml 離心管，發現標籤已經脫落，已知其中一管為無菌水，一管為蛋白質溶液，另兩管為不同濃度的 DNA 溶液。請依據您實驗課所學的方法，幫忙助教確定四支離心管分別為何？(請說明採用此方法的原理)(15 分)
6. 一線性 DNA(linear DNA)經限制酶做一次與兩次 digestion 之結果如下，請畫出限制酶圖譜。(意即畫出 restriction enzymes 在 DNA 上的切位圖)(20 分)

<u>restriction enzymes</u>	<u>切出片段 (kb)</u>
<i>Eco</i> RI	2.9, 4.5, 7.4, 8.0
<i>Hind</i> III	3.9, 6.0, 12.9
<i>Eco</i> RI & <i>Hind</i> III	1.0, 2.0, 2.9, 3.5, 6.0, 7.4

7. 有一 DNA 片段序列如下：  
5'-CATGCCCATTCCTTAACGTATTCGAAGGGTTGTTATCATGAACTTA-3'  
請設計一對引子(primers)，長度各為 10 mers，利用 PCR 來放大此段 DNA。(請標示清楚 3' 及 5' 端)(10 分)
8. 某生進行 PCR 實驗，電泳結果分析發現不只一條 band 產生，請問可能的原因為何？該如何解決？(10 分)

(請將報告電子檔 e-mail 到 [wjyang@nuk.edu.tw](mailto:wjyang@nuk.edu.tw))

檔名：學號+姓名；例如：1 號高大雄)