

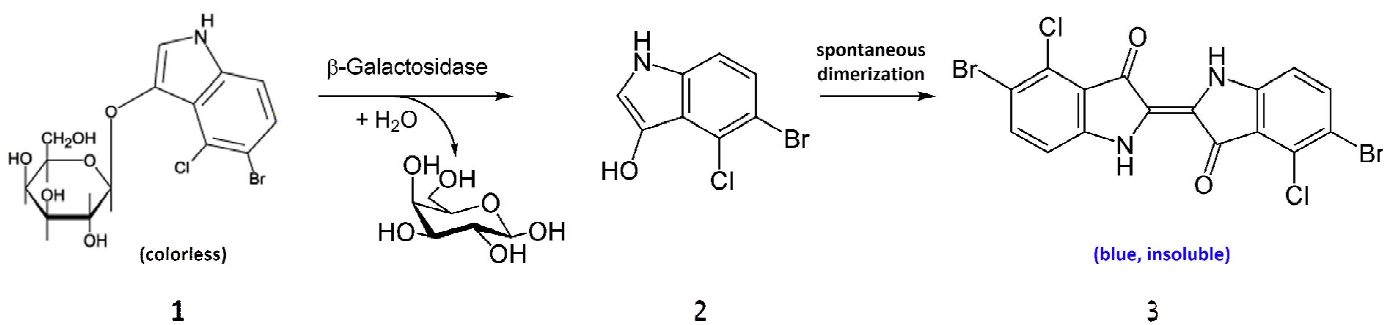
# 實驗 1

## 原核細胞重組蛋白系統(I) - 以藍白篩選挑選出帶有重組質體 DNA 的轉型細菌

### I. 目的

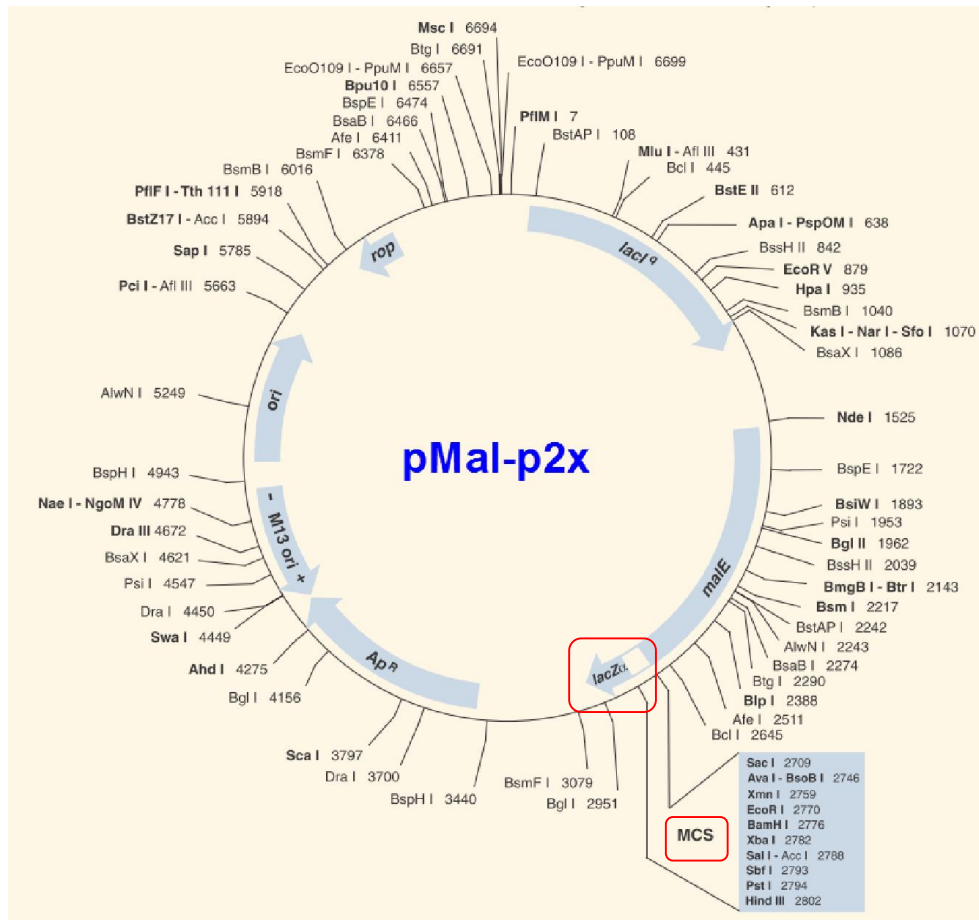
藉由酵素活性呈色法來選擇經由轉形作用送入大腸桿菌中的重組質體 DNA。

X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside;  $C_{14}H_{15}BrClNO_6$ ) 是  $\beta$ -galactosidase (*lacZ* 的產物) 的受質。它在分子生物學中的應用廣泛，尤其是用於檢測報告基因 (*lacZ*) 的活性。當外源 cDNA 片段插入到帶有 *lacZ* 基因的質體的 MCS (multiple cloning sites) 時，由於外源 cDNA 的核酸序列存在改變了 *lacZ* 基因的編碼，從而影響了其產物  $\beta$ -galactosidase 的活性(其活性會喪失)。因此，經過轉型作用(transformation)後，具有重組質體的細菌在選擇培養基(含 IPTG 和 X-Gal 及適宜的抗生素)上呈白色，沒有外源 cDNA 片段的質體則呈藍色，此即稱為藍白篩選。



1. X-Gal
2. 5-bromo-4-chloro-3-hydroxyindole
3. 5,5'-dibromo-4,4'-dichloro-indigo

本次實驗所用的質體為 pMal-p2x 與 pMal-p2x-ECCD23。其中，環型的 pMal-p2x 質體，因其所帶有的 *lacZ* 基因結構完整，因此在藍白篩選過程中會呈現藍色菌落。pMal-p2x-ECCD23 則是將外源基因(ECCD23)之 PCR 產物接入 pMal-p2x 後的質體，因 PCR 產物破壞了 *lacZ* 基因的結構完整性，因此在藍白篩選的過程中會呈現白色菌落。



MCS: multiple cloning sites

## II. 實驗流程

1. 從講台拿取 competent cells (DH5- $\alpha$ ) 標示組別，放在冰上待其溶解。
2. 由講台拿取標示自己組別之 plasmid DNA (約 10  $\mu$ l)，小心加入 competent cells，以手指輕敲管壁使其混合均勻(切勿上下 pipetting 或大力上下搖晃!!)。
  - 共有兩種不同的質體(pMal-p2x 以及 pMal-p2x-CD23)比例；每組會分配到一種。

3. 置於冰上 5 分鐘，每隔一分鐘輕輕敲打管壁。
4. 置入水浴槽進行 heat shock(42°C ; 45 秒)。
5. 加入 1 ml LB media。
6. 置於冰上 5 分鐘(recovery)。
7. 放入 37°C 培養箱；150 rpm，60 min。
8. 標示 LB plate(含有 Ampicillin；每組 1 個 plate)後，置放在 37°C 培養箱內 30 分鐘以將盤內的水氣烘乾。
9. 將 60 min 後培養結束的 transformed competent cells 離心 13000 rpm；5 min。
10. 小心吸除 800  $\mu$ l 的上清液(注意不可吸起最底下的 competent cells!!)。
11. 先在 LB plate 上均勻塗抹 X-gal 45  $\mu$ l，IPTG 100  $\mu$ l
12. 輕輕 pipetting 使剩下的菌液混合均勻，並將所有的菌液(約 260  $\mu$ l)均勻塗抹在 LB plate 上。
13. 置入 37°C 培養箱；O/N 培養(18-20hr)
14. 隔天早晨收盤並計算藍白菌落的數量與比例。