

綠色螢光蛋白質粒轉化實驗 pGLO Bacterial Transformation

一. 課前思考

骨骼是怎麼變疏鬆的

報章來源: http://www.tj.xinhuanet.com/shkj/2013-08/19/c_114413781.htm

報章日期: 2013 年 8 月 19 日

日本大阪大學研究人員利用螢光蛋白標識實驗鼠的破骨細胞，首次“目睹”了破骨細胞破壞骨骼的情形，研究還發現破骨細胞在患骨質疏鬆症的實驗鼠體內與健康實驗鼠體內的明顯差異。這一發現將有助於研發出治療骨質疏鬆症和風濕病的新藥物。

破骨細胞具有促進骨骼代謝的作用。機體中存在著分解骨質的破骨細胞和形成骨骼的成骨細胞，正常情況下這兩種細胞的作用保持平衡。骨質疏鬆症患者體內這種平衡被打破，導致“破壞”快於“再造”。

大阪大學教授石井優率領的研究小組首次成功觀察到活體實驗鼠體內破骨細胞的破骨情形。研究發現，破骨細胞會以兩種狀態存在，一種是在骨組織表面釋放強酸溶解骨骼，被稱為 R 型；一種僅在骨組織表面移動但不破壞骨組織，被稱為 N 型。破骨細胞會在這兩種狀態之間轉換。

研究發現，在健康實驗鼠體內，R 型破骨細胞佔總量的約 40%，而在骨質疏鬆症實驗鼠體內，這一比例則上升到 90% 以上。如果使用常用治療藥物，雖然可以大幅降低破骨細胞的總數，但破骨細胞過少會導致骨質脆弱。

思考:

1. 在研究人體內部的細胞變化、轉移時可以利用什麼來觀察得知?

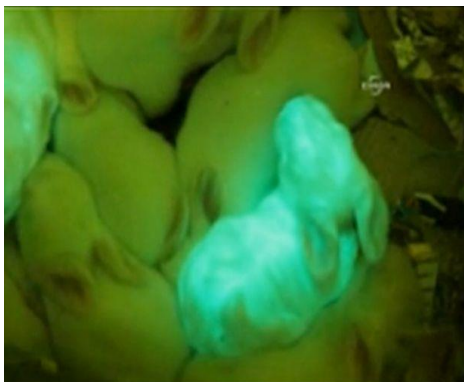
2. 根據上述報導，試分析科學家運用了什麼技術去觀察骨骼細胞變化?

3. 除了觀察骨骼細胞變化外，利用上述技術還可以做作怎樣的 research?

螢光兔技術 可協助藥物量產

報章來源：http://www.awakeningtw.com/awakening/news_center/show.php?itemid=43539

報章日期：2013 年 8 月 15 日



【台灣醒報記者李昀濤綜合報導】兔子發出綠色螢光，可不是徒具觀賞價值而已。透過「基因轉殖」技術，研究人員可將螢光蛋白的基因，與能夠製造藥物蛋白的序列相結合，植入動物胚胎，若動物能夠發出螢光，代表轉殖成功，則動物也具備了製造藥物蛋白的能力。未來搭配、飼養、繁殖、食用及商用的法律規範，將可望以動物為生產工具，提升量產藥物的經濟效益。

夏威夷大學跟土耳其的研究人員，利用基因轉殖的技術，從水母的基因中，提取能夠合成螢光蛋白的序列，植入 8 個兔子的胚胎，再將胚胎送入「代理孕兔」的子宮。夏威夷大學生物基因研究中心「基因轉殖」技術主持人喬馬爾說，「一窩 8 隻新生兔子當中，有 2 隻成功表現了螢光基因。」這 2 隻兔子跟其他 6 隻同胞外觀上並無差異，但能夠在黑暗中發出綠色螢光。

主導該計畫的夏威夷大學副教授莫伊斯亞蒂表示，轉殖螢光蛋白的技術，可以用來作為追蹤蛋白轉殖路徑的標記。研究人員將某個基因與螢光蛋白的序列結合，植入動物胚胎，當動物發出螢光的時候，研究人員就能夠確認基因轉殖成功。「以血友病的患者為例，」莫伊斯亞蒂說，「他們體內缺乏催化血液凝結的酵素，我們可以透過基因轉殖技術，讓動物來生產這類酵素。」

莫伊斯亞蒂跟他的同事們相信，未來應該能藉由操作基因調控的技術，從動物身上取得對某些疾病具有療效的物質，例如從兔子的乳汁當中，提煉出跟工業生產相比，造價相對便宜的蛋白質藥物。各國目前針對基因轉殖動物，都有科學背景、安全評估、飼養、繁殖、食用或商用等相關法規，未來實驗室可望與農場、畜牧業者合作，繁殖藥物生產專用的動物。

目前基因轉殖的技術相當蓬勃，世界各地的研究團隊，已經成功運用基因轉殖技術，讓螢光蛋白的基因表現在豬、羊、猴、狗及貓等較大型，且適合在農場繁殖的哺乳動物身上。另外已有公司在販賣觀賞用螢光魚，有多達六種不同的顏色可供挑選。2007 年《美國國家科學院院刊》刊載了一篇約翰霍普金斯大學的研究報告，該團隊研發出眼睛會發出螢光的蚊子，有效應用於瘧疾傳播的相關研究。

思考：

1. 轉殖螢光蛋白技術可以用作為什麼？

2. 根據上述報導，研究人員將螢光蛋白的基因與什麼結合，再植入動物胚胎？為什麼要結合螢光蛋白基因，使其發出綠光？

3. 研究中成功表現螢光蛋白的 2 隻新生兔代表着什麼？即具備了什麼能力？

4. 綜合報章所述，試說明什麼是基因轉殖技術？

5. 在動物身上運用基因轉殖技術製作藥物，可以取得什麼？有何好處？

6. 以血友病為例，怎樣利用基因轉殖技術去製造病人所缺少的酵素？

二· 實驗背景

1.1 基因轉化(Genetic transformation)

我們常聽到的基因，實質上是一小段帶有遺傳信息的 DNA，作用是用來編碼蛋白質，這樣的蛋白質才可以表現出生物學特性。基因轉化從字面上理解，就是將外源的基因轉入另一生物體，那些植入外源基因的生物就能編碼出原本不具有的蛋白質，從而改變生物體的特性。基因轉化應用在很多生物產業中，如轉基因食物、醫學上的基因治療等。

1.2 如何將基因轉化到另一個生物體內?

要將一段基因轉化到另一生物體，需要一個幫手—質粒(Plasmid) (圖 1)。細菌內除了染色體外，還有一段在染色體外的環狀 DNA，這就是質粒，它可以編碼出多個有利細菌生長的基因。在自然界中，質粒可以在不同的細菌中轉移，因此在轉移的過程就能將自身帶有的基因轉到不同的細菌中，這種特性幫助細菌不斷適應新的環境。利用質粒這個可以轉移的特性，就可將基因轉入另一生物 (圖 2：質粒能夠插入其他細菌的染色體內，令另一細菌也有相同的特性)。

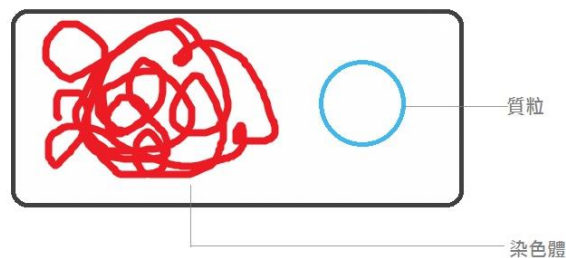


圖 1. 細菌構造

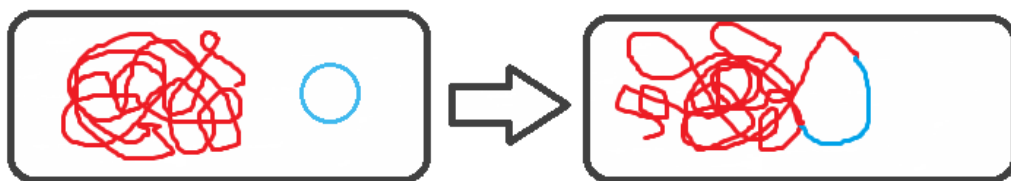


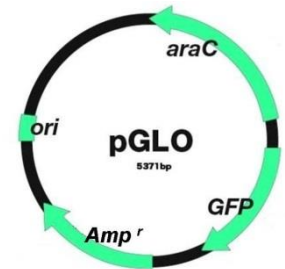
圖 2. 質粒幫助基因轉化

二· 實驗簡介

2.1 綠色螢光蛋白(Green Fluorescent Protein)

本次實驗是**綠色螢光蛋白**的轉化實驗，綠色螢光蛋白存在於一種水母中，能使水母在黑暗中發出螢光。在實驗中，我們使用這種蛋白來驗證轉化實驗是否成功，原則是未經過轉化的細菌不含有綠色螢光蛋白，在紫外燈照射下不會發出螢光，相反地，成功轉化的細菌帶有綠色螢光蛋白，能在紫外燈下發出螢光。

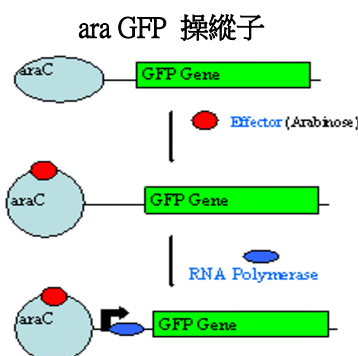
生物技術 Bio-Rad 公司專門構建了一種質粒稱為 pGLO（右圖），這種質粒內含：



- 綠色螢光蛋白（GFP）
用來編碼綠色螢光蛋白質，若成功編碼則能在紫外光下發出螢光
- 抗氨苄青黴素基因(Ampr)
用來編碼內酰胺酶(beta-lactamase)蛋白質，此蛋白能分解氨苄青黴素基因
- 調控基因（araC）
可調控綠色螢光蛋白的表達，在培養基中加入了阿拉伯糖(Arabinose)時，能啟動綠色螢光蛋白的表達，使菌落在紫外光下發綠色螢光。若培養液中無阿拉伯糖，綠色螢光蛋白便不能表達，菌落為白色。
- Ori：複製的源頭

2.2 綠色螢光蛋白的基因調控體系

當培養基中有阿拉伯糖(圖中紅色)時，會結合在調控基因 **araC** 上使之起作用，此時會啟動綠色螢光蛋白的表達，RNA 聚合酶(圖中藍色)會開始 **GFP** 綠色螢光蛋白的基因(圖中綠色)的轉錄和轉譯的工作，合成綠色螢光蛋白。



三· 實驗試劑

以 2-4 人一組的份量

試劑名稱		份量	備註
<i>E.coli</i> HB101 K-12 strain, on LB agar plate ¹	大腸桿菌, 在 LB 培養基上	1 隻	
Transformation solution	轉化液 TS	1 支	50mM CaCl ₂ , pH6.1, 1ml
pGLO Plasmid()	pGLO 質粒	在冰桶內	
LB nutrient broth	LB 培養液	1 支	0.75ml
LB 培養基平板 ²		1 隻	
LB/amp 培養基平板 ³		2 隻	
LB/amp/ara 培養基平板 ⁴		1 隻	

¹ 本實驗中試用的 *E.coli* 不會令人不適，而且不可以在培養基外生存。

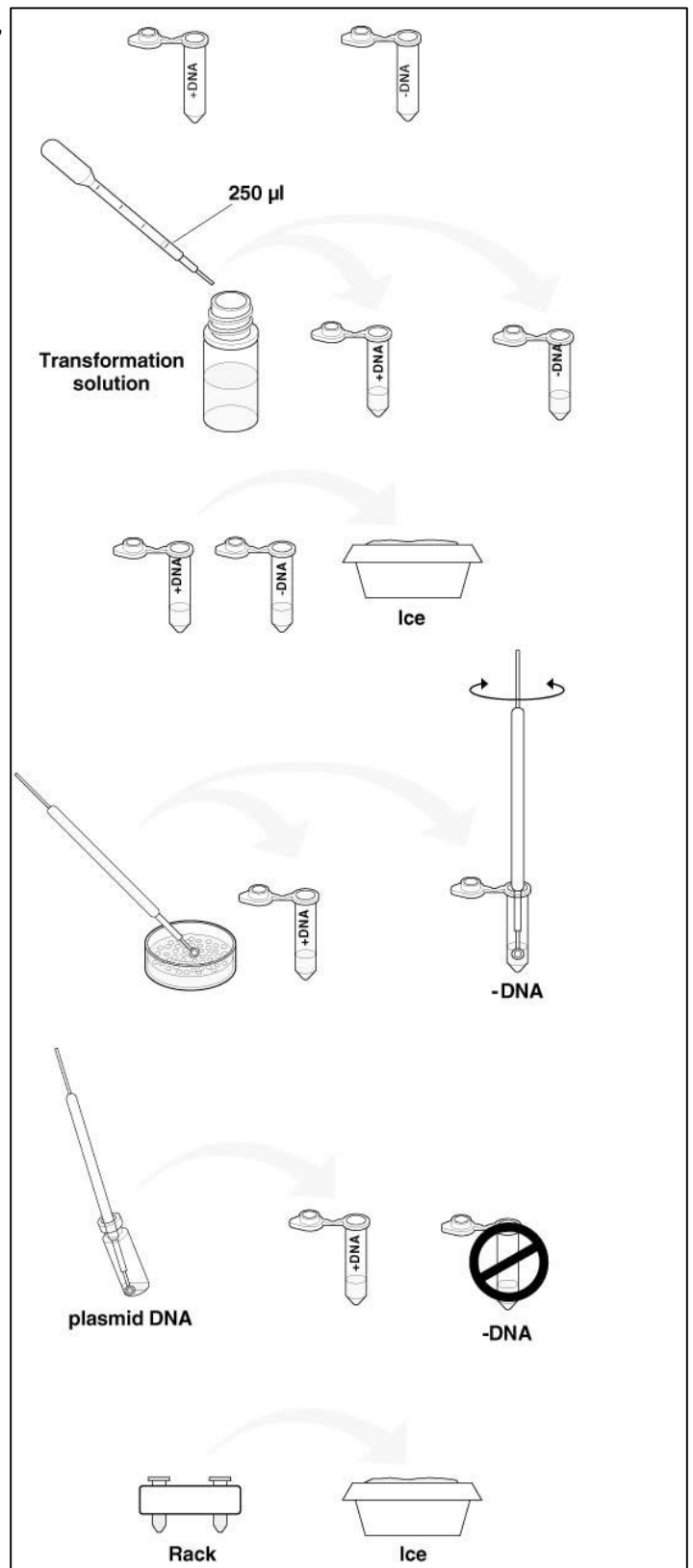
² LB 培養基的成份: Peptone(消化蛋白質), Yeast Extract(酵母提取物), NaCl, Agar(瓊脂)

³ LB/amp 培養基中另外加入了 amp – Ampicillin(氨苄青霉素)

⁴ LB/amp/ara 培養基中另外加入了 amp – Ampicillin(氨苄青霉素) 和 ara – Arabinose (阿拉伯糖)

三·實驗步驟

1. 將兩根小管分別標記上“+DNA”和“-DNA”，並請同時加上自己的組名。
2. 用無菌吸液管吸取 250 μ l (0.25 ml)的轉化液至每一根小管中。(吸液管上有刻度)
3. 將兩根小管放置於冰上。
4. 用無菌接種環從起始平板上(或菌液)挑取轉化用受體菌（大腸桿菌 HB101-K12），將接種環伸至每個小管底部，用食指和拇指輕輕旋轉接種環，使轉化用受體菌溶入轉化液。
5. 用一根新的無菌接種環從質粒 DNA 小瓶中沾一下（可以看到接種環中類似於肥皂泡的物質），接種到標有“+DNA”的小管中，不要加質粒在標有“-DNA”的小管中。
6. 蓋好蓋子，將兩小管均置於冰上冰浴 10 分鐘，注意使小管下端全處於冰面下。



7. 在冰浴的等待過程中，用 Marker 筆按右圖標記平板。

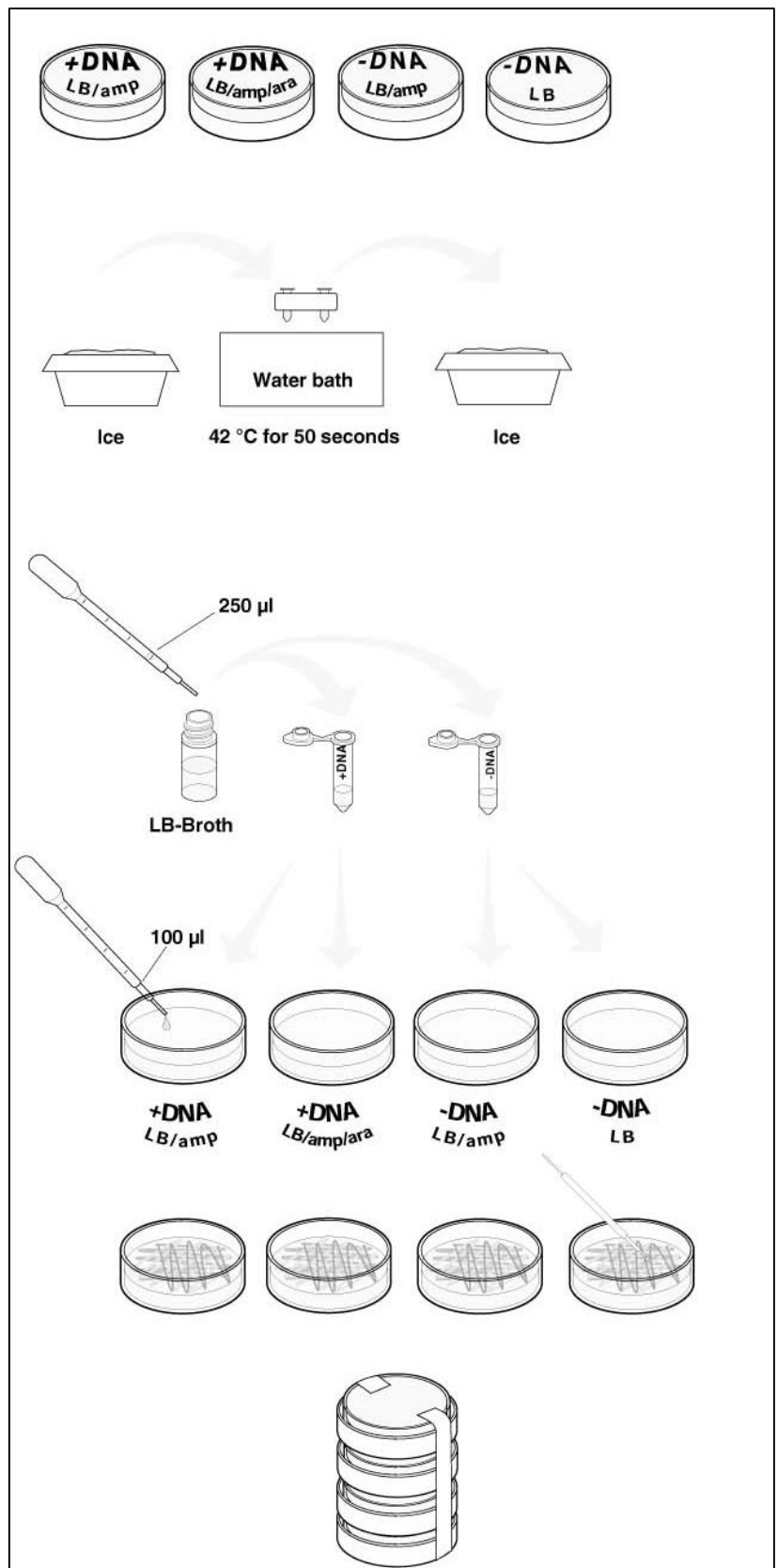
8. 將冰浴結束的小管在水浴鍋中 42°C 熱激 50 秒。注意使小管下部完全處於水浴中。50 秒後立刻置於冰上，冰浴 2 分鐘。

9. 在兩小管中分別加入 250 μ l (0.25 ml) 的 LB 液體培養基（使用無菌吸液管）。蓋好蓋子，然後室溫放置 10 分鐘。

10. 手指輕彈小管使管內溶液混勻，利用無菌吸液管吸取 100 μ l (0.1 ml) 的菌液並加入到標記好的相應平板培養基中。

11. 用接種環在平板表面來回劃線，確保菌液在板上均勻分佈。

12. 倒置平板，將自己組的組名寫在板底，37°C 溫箱培養過夜。



四· 實驗討論及思考

1 · 你認為在那一個培養基平板上能找出原本未被轉化的 *E.coli* ? 為什麼?

2 · 你認為那兩個培養基平板上的結果可以用來判斷轉化實驗是否成功? 為什麼?

3 · Transformation solution(轉化液)有什麼作用?

4 · 實驗中用到的熱激 50 秒，冰浴 2 分鐘，和加入 LB 液體培養基，有什麼作用?

5 · 為什麼在培養細菌時要把平板倒置?

6 · 什麼是中心法則(central-dogma)?
