

材料與方法

I. 實驗材料

一、菌種、噬菌體與質體：

(參見 Table 1.)

二、藥品與酵素：

實驗所需之藥品：菌種培養基使用的藥品購自 Difco Laboratories 或 Accumedia manufacturers, Inc.。化學藥品購自 E. Merck, J. T. Backer Company, Sevrva Frvafeinrobiochemica, Boehringer mannhrim GmhH Biochemical, Pharmacia, Sigma Chemical Company, Biosolve 及日本和光藥廠。抗生素藥品購自 Sigma Chemical Company。限制酵素和其他酵素購自 TaKaRa Shuzo Co. Ltd., New England Biolabs (NEB)、Promega corp. 及 Bethesda Research Laboratories (BRL)。T4 DNA ligase (2.8 U/ μ l, Weiss units)。

三、培養基：

1. Luria-Bertani broth medium (LB)：

其成分為每公升水中含 10 g 的 tryptone，5 g 的 yeast extract 及 5 g 的 NaCl。

2. Luria-Bertani agar (LA)：

於 LB broth medium 中加入 1.5 % agar。添加抗生素於培養基時，其所使用之濃度為每 ml 含 50 μ g Ampicillin，15 μ g Getamycin，50 μ g Kanamycin，15 μ g Tetracycline。

3. Soft agar：於 LB broth medium 中加入 0.75 % agar。

四、試劑與緩衝溶液：

1. TEs buffer：10 mM Tris-HCl (pH 7.5) , 1 mM EDTA , 50 mM NaCl。

2. 抽取質體 DNA 試劑：

質體 DNA 之抽取係依 Birnboim and Doly (1979) 所述之 alkaline method 修飾後進行。其所需試劑如下：

(1) Solution I：25 mM Tris-HCl (pH 8.0) , 10 mM EDTA (pH8.0) 及 50 mM Glucose。

(2) Solution II：0.2 N NaOH 及 1% SDS。

(3) Solution III：3 M Potassium acetate (pH 4.8) , 5 M Glacial acetic acid。

3. 抽取染色體之試劑：

(1) STE buffer：10 mM Tris-HCl (pH 8.0) , 100 mM NaCl , 1 mM EDTA (pH8.0)。

(2) Proteinase K (10mg/ml)。

4. 一般 DNA 電泳試劑：

(1) 6x Loading dye：0.25% (w/v) bromophenol blue , 0.25% (w/v) Xylene cyanol 及 30% (w/v)Glycerol。

(2) TAE running buffer：40 mM Tris-acetate (pH8.0) 及 2 mM EDTA (pH8.0)。

(3) TBE running buffer：89 mM Tris-borate , 89 mM boric acid 及 2 mM EDTA (pH8.0)。

(4) Staining buffer：1 mM EDTA (pH8.0) , 10 mg/ml Ethidium bromide , 100 μ l Rnase A , 150 ml DI。

5. PFGE 電泳試劑：

(1) 0.5 \times TBE running buffer：45 mM Tris-borate , 1 mM EDTA (pH8.0)。

(2) agarose gel：1.0 % agarose in 0.5 \times TBE。

(3) low melting temperature agarose gel：1 % low melting temperature agarose in 0.5 \times TBE。

(4) size marker：? ladder markers。

(5) ESP solution：0.5 M EDTA (pH8.0) , 1 % lauroyl sarcosine , 1 mg/ml proteinase K。

6. SDS-PAGE 電泳試劑：

- (1) 15 % Rssolution gel (40 ml) : 20.2 ml 30 % Acrylamide (acrylamide : bis = 29 : 1) , 10.0 ml 1.5 M Tris-HCl (pH 8.8) , 0.4 ml 10 % SDS , 9.2 ml ddH₂O , 0.4 ml 10 % APS , 0.016 ml TEMED。
- (2) 5 % Staking gel (8 ml) : 1.3 ml 30 % Acrylamide (acrylamide : bis = 29 : 1) , 1.0 ml 1 M Tris-HCl (pH 6.8) , 0.08 ml 10 % SDS , 5.5 ml ddH₂O , 0.08 ml 10 % APS , 0.008 ml TEMED。
- (3) 10×Running buffer : 250 mM Tris-base , 2.5 M Glycine , 1 % SDS。
- (4) Stain solution : 1.25 g Coomassie Blue R-250 , 500 ml Methanol , 100 ml Glacial acetic acid and add ddH₂O to 1000 ml。
- (5) Destain solution: 100 ml Methanol, 70 ml Glacial acetic acid and add ddH₂O to 1000 ml。

7. Protein N-terminal sequence analysis :

- (1) 10×CAPS buffer : 22.13 g CAPS and add ddH₂O to 500 ml , 以 10 N NaOH 調整 pH 值至 11。
- (2) Electroblotting buffer : 100 ml 10×CAPS buffer , 100 ml Methanol and add ddH₂O to 1000 ml。
- (3) Coomassie Blue G-250 stain solution : 100 ml acetic acid , 0.25g Coomassie Blue G-250 and add ddH₂O to 1000 ml 混合一小時並且以 Whatman no.1 paper 抽氣過濾。
- (4) Destain solution : 50% methanol and 10 % glacial acetic acid。

II. 實驗方法

一、細菌之培養

取一白金耳之細菌接種於 LB 或 LA 或特定之培養基當中，在 37 的培養箱中震盪或靜置培養。在培養過程中所需添加的抗生素濃度如材料中所述。

二、菌種甘油保存法

將單一菌落於 37 下隔夜培養後，取 0.9 ml 的菌液加入 0.3 ml 的甘油，長期保存於-80 。

三、噬菌體的篩選

我們以本實驗室先前篩選到的具 ESBL 之克雷伯氏肺炎桿菌的一些菌株如 K6、K55 等，和可以作為噬菌體宿主細胞的 *Klebsiella pneumoniae* 10693 當作 indicator cell，將中國醫藥學院附設醫院所收集之液體（如尿液、脊椎液、膽液、痰液、廢液等等……）之上清液，利用點測試法（spot test，後面會介紹）大量篩選噬菌體。

四、噬菌體濃度（titer）之測定

噬菌體液經 10 倍系列稀釋（searial dilution）後，取適當稀釋度之噬菌體液 0.1 ml 與隔夜培養的 *K. pneumoniae* 10693 菌液（OD₅₅₀ 約 3-4）0.1 ml 一起加至 5 ml 之 soft agar（42 ~ 50 ）震盪混勻之後，迅速倒入 LA 固體培養基上。待 top agar 凝固後置入 37 培養，隔天計算出現的感染菌斑數（plaque）。

五、噬菌體的純化

取 10 μ l 噬菌體液感染新鮮培養的 *K. pneumoniae* 10693 菌液 (OD₅₅₀ 約 1), 隔夜培養後離心取上清液利用系列稀釋測 titer, 隔夜後從出現的感染菌斑中用牙籤挑選一個 plaque 感染新鮮培養的 *K. pneumoniae* 10693 菌液 (OD₅₅₀ 約 1), 重覆以上步驟(從隔夜培養後離心取上清液...這句開始)三次, 純化出單一的 lytic phage。

六、噬菌體之增殖 (amplification)

依 Tseng et al. (1990) 所述之方法進行噬菌體之增殖, 其方法如下: 取 1 ml 隔夜培養之 *K. pneumoniae* 10693 菌液 (OD₅₅₀ 約 3-4) 至 20 ml 的 LB 培養液中, 於 37 培養箱中繼續震盪培養至 OD₅₅₀ 為 0.5。然後以 MOI (multiplicity of infection) 為 0.1 下加入噬菌體液繼續震盪培養。震盪培養 5-6 小時後, 收取菌液離心 (SIGMA 2K15, 12139 rotor, 8,000 rpm, 4 下, 10 分鐘)。上清液以 Millipore (0.45 μ m) 過濾, 貯於 4 冰箱備用。

七、大量噬菌體液的製備

取隔夜培養後的 *K. pneumoniae* 10693 菌液 (OD₅₅₀ 約 3-4) 4 ml 入 400 ml LB 培養液, 再 37 下培養至菌液濃度 OD₆₅₀ 約 0.2 時, 感染適量噬菌體 (titer: 10^9 - 10^{10} PFU/ml) 使 MOI (multiplicity of infection) 達到 0.01, 接著繼續在 37 下培養至菌液呈現裂解 (lysis) 而澄清後, 加入數滴 Chloroform, 劇烈搖晃使未被噬菌體裂解的菌體能充分與 Chloroform 反應而死亡, 然後在 4 下, 以 6000 rpm, 10 分鐘離心把細菌細胞殘骸物沉澱下來後, 上清液接著以 8500 rpm, 4 下離心 2 小時, 當充分去除上清液後, 加入 2 ml TEs buffer, 在 4 下隔夜靜置, 隔天輕微搖散混勻後, 分裝入 1.5 ml 離心管中, 入 4 保存。

八、*K. pneumoniae* 10693 染色體 DNA 之抽取

取培養於平板培養基上的 *K. pneumoniae* 10693 單一菌落, 接種於 3ml 的 LB 培養液中, 於 37 震盪培養箱中隔夜培養至穩定期 (stationary phase)。再將菌液移至微量離心管中, 以轉速 8,000 rpm 離心 5 分鐘, 去除上清液。加入 700 μ l 1 x

STE 緩衝液後，利用震盪器將沉澱的菌體打散並重新懸浮，之後再加入 25 μ l 10 % SDS 溶液，以溫和的方式輕輕搖晃混和均勻，至出現些微澄清後，再置於 65 $^{\circ}$ C 水浴 30 分鐘，直至菌種完全溶解呈透明狀，此時加入 10 μ l Proteinase K (20 mg/ml)，置於 37 $^{\circ}$ C 水浴下作用 4 小時以上，而後以等量之 phenol/chloroform 萃取 (操作時需緩慢搖勻，以避免染色體 DNA 斷裂)，以 12,000 rpm 離心 10 分鐘，取上清液至另一新的微量離心管。重覆上述步驟直至界面層無白色雜質存在，再以等量 chloroform 萃取一次。取出的上清液加入 1/10 體積的 3M sodium acetate (NaOAc) 及 2 倍體積的 95 % 酒精，緩慢搖勻，析出物 (即染色體 DNA) 以 tip 捲起撈出，置於室溫晾乾後，再以 70 % 酒精潤洗以去 DNA 上的鹽類，靜置室溫晾乾，最後懸浮於適量無菌水中，保存於 4 $^{\circ}$ C 備用。

九、噬菌體 DNA 之抽取

將粗噬菌體液 20 ml，通過 0.45 μ m 濾膜，濾液加入 DNase 至終濃度為 1 μ g/ml，置於 37 $^{\circ}$ C 作用 30 分鐘，再加入 1/6 體積 20% PEG 溶於 2.5 M NaCl 的混合液，在冰上置 1 小時後離心 12000 rpm，20 分鐘；倒去上清液，取 2 ml TEs buffer 回溶沉澱物，接著分裝於 4 個乾淨的離心管中，再分別加入等體積之 Chloroform 萃取，離心 12000 rpm，5 分鐘；取上清液加入 SDS、EDTA、及 proteinase K 至終濃度分別為 0.1%、0.5 mM 及 50 μ g/ml，移至 65 $^{\circ}$ C 水浴 30 分鐘；接著以等體積 phenol / chloroform 萃取至分層處無白色物，再以等體積 chloroform 萃取一次。將離心後之上清液移至新的離心管內，加入 700 μ l isopropanol，置於 -20 $^{\circ}$ C，沉澱 1 小時；然後離心 (12000 rpm，20 分鐘)，將噬菌體 DNA 沉澱下來；倒去上清液；用 70% 酒精清洗 DNA 一次後，晾乾 DNA。

十、照電子顯微鏡之前處理

取 *K. pneumoniae* 10693 隔夜菌液 (OD₅₅₀ 約 3-4) 100 μ l，和噬菌體液 (titer : 10⁹-10¹⁰ PFU/ml) 100 μ l 混合均勻，室溫靜置 2 分鐘，冰上 10 分，然後以 6000 rpm，離心 5 min；接著置冰上，吸去上清液，加入冰的滅菌水溶解開來，用銅網 (先沾取 0.1% bacitracin 以增加銅網之吸力) 沾取菌液 (20 μ l) 3 分鐘，接著把銅網吸

乾,再用 2 % UA(Uranyl acetate)負染 10 秒,吸乾後即可照電顯,電顯儀器為 JEOL. JEM-1200 EXII, 於 100 KV 下操作。

十一、*K. pneumoniae* 10693 生長曲線與細菌裂解 (bacteriolysis) 曲線之測試

1. 生長曲線之測試：

取適量 *K. pneumoniae* 10693 隔夜菌液 (OD_{550} 約 3-4) 到含有 40 ml LB 培養液之錐形瓶中使起始 OD_{550} 是 0.05, 接著放入 37 °C 水浴震盪培養, 測時間 0 點和每 30 分鐘後之 OD 值, 直達到 stationary phase 為止, 此時吸光值不再上升, 最後製成圖表 (time-log OD_{550} 之半對數曲線)。

2. 細菌裂解 (bacteriolysis) 曲線之測試：

取適量 *K. pneumoniae* 10693 隔夜菌液 (OD_{550} 約 3-4) 到含有 40 ml LB 培養液之錐形瓶中使起始 OD_{550} 是 0.05, 接著放入 37 °C 水浴震盪培養, 測時間 0 點和每 30 分鐘後之 OD 值, 培養 1.5 小時後 (OD_{550} 約 0.5 上下) 感染適量噬菌體 KPP95 (titer : 10^9 - 10^{10} PFU/ml) 使 MOI (multiplicity of infection) 達到 0.1, 繼續每 30 分鐘測試其 OD 值並觀察 OD 值下降的情形, 製成圖表 (time-log OD_{550} 之半對數曲線)。

十二、噬菌體 KPP95 宿主分布的決定

KPP95 噬菌體宿主分布的決定是以點測試法 (spot test) 來分析, 而點測試法是參照 Eisenstark (1967) 所述之 double layer 方法加以進行。 培養 93 個臨床分離到的 Indicator cells (當 Indicator cells, 如 Table 1. 所列, 含有 25 株具 ESBL 之 *Klebsiella pneumoniae*、24 株具 ESBL 之 *Enterobacter cloacae*、29 株在臨床上抗第三代頭孢菌素 cefotaxime 的 *Serratia marcescens*、13 株 *Escherichia coli*、1 株在臨床上抗第三代頭孢菌素 cefotaxime 的 *Klebsiella oxytoca* 和 1 株具 ESBL 之 *Enterobacter agglomerans*) 於含有 0.8ml LB broth 的 2ml 離心管內, 在 37 °C 下培養隔夜後, 從中各取 100 μ l 菌液與 5 ml soft agar (42 ~ 50 °C) 震盪混勻之後, 迅速倒入 LA 固體培養基上。 待 top agar 凝固之後, 將 5 μ l 噬菌體培養液 (titer 10^8 - 10^9

PFU/ml) 滴於右邊表層上，另外也在左邊滴上無菌水 5 μ l 當 negative control，待液體充分被吸收後，入 37 培養，隔天觀察有無溶菌斑(clearing zone or plaque)形成。若測試之菌株可被噬菌體感染則可見澄清的溶菌斑。反之，則不會有溶菌斑出現。

十三、脈衝電泳法 Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

1. 完整噬菌體染色體 DNA 之製備：

完整染色體 DNA 之製備係參考 Birren 和 Lai (1993) 方法加以修飾進行。取大量噬菌體液製備後的噬菌體液調整其 titer 至每毫升 10^9 PFU 後，於 40 中保溫；另取 1% low melting temperature agarose 於 100 溶解，於 40 中保溫。待溫度恆定後，各取 0.5 ml 均勻混合，並置入容量 1 ml，不帶針頭之針筒中使其凝固，凝固後之塊狀物稱為 agarose insert，待凝固後推出針筒，放入含有 10 ml ESP solution 的 15 ml 離心管中於 50 水浴下緩慢搖動作用 24 小時以去除蛋白質；接著用 0.5 M EDTA 清洗一小時，並重複此步驟一次，然後再把整條 agarose insert 推回針筒中於 4 保存。

2. 脈衝電泳法：

跑電泳時，從針筒中切取一小 agarose insert 薄片，連同 size maker 於 $0.5 \times$ TBE buffer 中清洗 3-4 次，使其與電泳緩衝液達到平衡，並放入 1% agarose gel 之 mell 中，再以 1% agarose 填滿 mell 空隙，於 4 下使其凝固。另將 $0.5 \times$ TBE buffer 注入電泳槽中並接上冷卻系統使緩衝液維持在 14 下。把 agarose gel 放入電泳槽內，設定電壓在 200 V，initial time 為 1 秒，final time 為 40 秒，連續跑電泳 16 (或 20) 小時；電泳完畢後以 EtBr 染液染色 30 分鐘，去離子水退染 10 分鐘，在 UV 光下觀察並拍照。脈衝電泳 (pulsed-field gel electrophoresis) 所使用之儀器為 Bio-Rad CHEF-DRII 電泳裝置。

十四、洋菜凝膠電泳製備與分析 (agarose gel electrophoresis)

秤取適量的洋菜粉，加入於電泳緩衝液 $0.5 \times$ TAE buffer 中，以微波爐加熱溶解，而洋菜膠體的濃度視欲分析之 DNA 片段大小而定，一般使用濃度為 0.7% ~

2% (w/v)。待洋菜膠溶液冷卻至 50-60 °C 時，將之倒入鑄膠槽，並插入 comb。洋菜膠溶液冷卻凝固後，將 comb 拔除。將洋菜膠體置入含電泳緩衝液 0.5x TAE buffer 之水平式電泳槽裝置中。將欲分析的 DNA 樣品與 loading dye 染劑 (0.25% bromophenol blue、0.25% xylene cyanol 及 30% glycerol) 適量比例混合後，注入洋菜膠體溝槽處。其電泳條件之設定為電壓為 100 伏特、0.5 安培，而泳動時間長短視需要而定。待泳動完畢，取出洋菜膠體以 ethidium bromide (濃度為 0.5 µl / ml) 染色 10 分鐘，置於 UV 燈照射下觀察 DNA 樣品，並與 DNA 分子量標誌 (DNA kb ladder, Stratagene®) 相比對，以估計 DNA 片段的大小及濃度。

十五、限制？切割 (Restriction enzyme digestion)

將欲分析之 DNA 與限制？及合適的限制？緩衝液混合，並視不同限制？的需要加入 1/10 總體積的 BSA，最後加入無菌水至適量的反應體積，於 37 °C 進行切割反應後即可做電泳分析，並在 UV 光下觀察並拍照。

十六、KPP95 噬菌體其 SDS-PAGE 之蛋白分析

1. 蛋白樣本之製備：

前面步驟如同大量噬菌體液的製備，除了最後是用 10 ml TEs buffer 來回溶噬菌體。接著利用 Sorvall Ultracentrifuge (CsCl-density gradient centrifugation) 在 4 °C 下，31 K 離心 24 小時進一步純化噬菌體液，用針筒吸出位在底層的噬菌體液 (最底層是雜質)，然後放入透析膜中以 TEs buffer 進行透析 (dialysis) 一小時，重複此步驟一次，接著換上新鮮 TEs buffer，靜置隔夜後分裝入 1.5 ml 離心管中於 4 °C 下保存。取 0.5 ml 裝入 2 ml 離心管中，以功率 0.5 W，振盪 5 秒間隔 5 秒方式進行音波振盪 (sonicated) 兩分鐘，接著以 12,000 rpm 離心 5 分鐘，將上清液取至新的乾淨之微量離心管中存於 -20 °C 下備用。

2. SDS-PAGE 之配製及電泳分析：

SDS-PAGE 之蛋白電泳分析係依照 Sambrook 等人 (1989) 所述的方法修飾進

行。首先以 Hoefer (Pharmacia) SE 600 series 裝置配置含有 SDS 之 15% polyacrylamide (acrylamide:bis= 29 : 1) 解析凝膠 (resolving gel) 40 ml , 再將解析凝膠混合液注入已架設好之電泳玻璃片中, 並注入 95% 酒精將膠體壓平, 待膠體凝固後, 倒除上層酒精, 再注入配製之 5% 聚焦凝膠 (stacking gel) 8 ml , 並插入齒梳 (comb) , 待膠體凝固後, 將齒模拔出, 再將整個裝置置入電泳槽內, 於槽內注入 Tris-glycine 電泳緩衝液。將樣品蛋白與等體積的蛋白裝載染液 (2 × loading dye) 混合均勻於 100 水浴鍋中煮沸十分鐘, 再置於冰上冷卻, 以 12,000 rpm 離心 5 分鐘, 取 20 μ l 上清液載入凝膠齒溝槽中, 先以 200V 進行電泳, 約三十分鐘後待樣品蛋白進入解析凝膠後, 再以 500V 的電壓, 150 mA 進行電泳分離, 直至染劑跑至凝膠底部為止。取出凝膠, 以孔雀藍染液 (comassie blue R250) 染色 30 分鐘後, 將凝膠移至褪染液 (destain buffer) 中, 直到蛋白片段清楚可見, 再將凝膠移至清水中清洗。待褪染液全部清洗掉後, 將凝膠封於兩層玻璃紙間, 待自然風乾後, 凝膠即能於室溫保存。

十七、KPP95 噬菌體蛋白質之 N-端定序之處理

同上所述取煮沸離心後之上清液 200 μ l 載入凝膠齒溝槽中以 15 % SDS-PAGE 將蛋白質分離後, 利用濕式轉漬到經由甲醇處理過的 PVDF 轉漬膜上。此即將經電泳分離完成之膠體, 置於一張經轉漬緩衝液浸濕的 3MM 濾紙上, 再以經甲醇處理過的 PVDF 轉漬膜, 以轉漬緩衝液浸濕後, 將其緊貼於膠體上並避免氣泡的產生, 再覆蓋另一張經轉漬緩衝液浸濕之 3MM 濾紙; 裝置完成後將其放至 Bio-Rad Protein II cell transfer apparatus , 膠體面向負極, 轉漬膜面向正極, 之後將轉漬緩衝液加入電泳槽中, 並將 Ice-chamber 置於轉漬裝置內以降低溫度, 以 200 mA 電流進行轉漬約 24 小時, 將蛋白質由膠體上轉漬至蛋白質轉漬膜上。轉漬後的轉漬膜以 Commassie blue G-250 staining solution 染色約 30 分鐘, 再以含 50% methanol and 10 % glacial acetic acid 的 Destain buffer 清洗直至轉漬膜上可看見清楚的蛋白, 將轉漬膜以去離子水清洗後自然風乾, 以乾淨剪刀剪下欲定序之蛋白, 送給伯森生技公司進行 N-端定序。

十八、DNA 的黏接反應 (ligation)

將欲進行接合反應之 DNA 片段與經適當限制酶切割後的載體 DNA 片段以適當比例混合，加入 2 μ l 之 10x ligation buffer 及 1 μ l 的 3 unit/ml 之 T4 DNA ligase，反應液加入無菌去離子水使最後體積為 20 μ l，將混勻之反應液置於 16 $^{\circ}$ C 下作用 16 小時以上。

十九、*E. coli* 之轉形作用 (transformation)

1. 勝任細胞 (competent cell) 之製備：

勝任細胞 (competent cell) 之製備參照 Sambrook et al. (1989) 之方法進行。將 *E. coli* 菌株 DH5 α 以 3 ml LB broth 隔夜培養後，取 400 μ l 菌液加入 25 ml LB broth 中，於 37 $^{\circ}$ C 下擴大培養，使其細胞長至 early-log phase (OD₅₅₀ 約 0.6)，於 4 $^{\circ}$ C, 8,000 rpm 離心 5 分鐘以收集菌體。將菌體懸浮於 20 ml 預冷的 100 mM CaCl₂ 中，靜置冰上 30 分鐘至一小時。於 4 $^{\circ}$ C，以 5,000 rpm 離心 10 分鐘。去上清液，將所得菌體懸浮於 2 ml 預冷之 100 mM CaCl₂ 中，冷藏備用，未使用完之勝任細胞可加入甘油 (glycerol) 至最終濃度約為 20%，輕輕混勻後置於 -80 $^{\circ}$ C 下保存備用。

2. 轉形作用 (transformation)：

取適量 (約 20 ~ 200 ng) 之重組 DNA 加入 100 μ l 的勝任細胞中，冰浴 5 分鐘後，置於 42 $^{\circ}$ C 水浴槽中熱休克，反應一分三十秒後，取出移至冰上兩分鐘。加入 700 μ l 之 LB 培養液，於 37 $^{\circ}$ C 培養箱中以震盪培養一小時。最後取適量菌液與 50 μ l IPTG (20 mg/ml) 及 50 μ l X-gal (20 mg/ml) 混勻，塗於含有適當之抗生素培養基中，於 37 $^{\circ}$ C 隔夜培養後便可利用 β -galactosidase 表現進行藍白篩選，即挑選白色菌落作進一步的分析 (如抽取其質體 DNA 等等...)。

二十、小量質體 DNA 之抽取

依 Birnboim 和 Doly (1979) 之 Alkaline lysis 方法修改而成。挑取單一菌落於 2 ml 含有 800 μ l LB 培養液的離心管中，隔夜培養後以 8,000 rpm 離心 5 分鐘沉澱

菌體，吸乾上清液，加入 100 μ l 冰浴過的 Solution I，將菌體劇烈震盪完全打散，室溫靜置 5 分鐘後加入 200 μ l 新鮮配置之 Solution II，溫和地上下搖勻，冰浴 10 分鐘，再加入 150 μ l 冰浴過的 Solution III 輕輕搖勻，冰浴 10 分鐘。接著以 12,000 rpm 離心 10 分鐘，吸取上清液至新的 1.5 ml 微量離心管，以等體積 phenol/chloroform 及 chloroform 分別萃取，直至界面乾淨無雜質為止，離心後取上清液至新的微量離心管，加入兩倍體積之 95% 冰酒精，置冰上 10 分鐘。經 12,000 rpm 離心 10 分鐘沉澱 DNA，再以 70% 冰酒精洗除鹽類，真空抽乾後溶於無菌水或是 TE 緩衝液中。

二十一、聚合？連鎖反應 (Polymerase chain reaction, PCR) 及其產物之定序

我們依據先前發表的期刊使用的引子來進行 PCR (Francoise Tetart et al., 2001)，其序列如下：

1. FT18-N2 (5'-GGTAAATTCCAATGGGGTCCAGCTT-3')
FT18-C1 (5'-TATCAGCAGCCAACGGAACCCAA-3')
 2. Mzial (5'-TGTTATAGGTATGGTACGACGTGCTAT-3')
CAP8 (5'-TGAAGTTACCTTCACCACGACCGG-3')
- (為 degenerate primer)

首先取 1 μ l 的 KPP95 噬菌體 DNA 當作模板，置放於 0.5 ml 微量離心管中，並加入配置好的 PCR 反應液，其組成份為，5 μ l 10 \times Taq DNA polymerase buffer (500 mM Tris-HCl, pH 9.0; 100 mM MgCl₂)，2 μ l 之 1.25 mM dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)，各 2 μ l 的雙股引子及 2 μ l Taq DNA polymerase，總體積以無菌水加至 50 μ l。利用 GeneAmp PCR system 2400 (Perkin Elmer) 進行三步驟聚合？連鎖反應。如果雙股引子是 FT18-N2 和 FT18-C1，則反應之條件為 94 5 分鐘一循環；94 10 秒鐘，使模板 DNA 分開成單股 (Denature)；降溫至 54，維持 30 秒鐘進行引子對與模板 DNA 之黏合作用 (annealing)；再升溫至 68 進行 10 秒鐘的 DNA 聚合延長作用 (extension)，如此進行 10 個循環；接著再以 94 10 秒鐘，54 30 秒鐘，68 15 秒鐘，進行 15 個循環。而另一對雙股引子 (Mzial 和 CAP8) 的反應條件為 94 5 分鐘一循環；96 30 秒鐘，使模板 DNA 分開成單股 (Denature)；降溫至 62，維持 2 分鐘進行引子對與模板 DNA 之黏合作用 (annealing)；再升

溫至 72 進行 3 分鐘的 DNA 聚合延長作用 (extension), 如此進行 28 個循環。所有過程均以程式連結。反應後產物以適當濃度之 agarose gel 於 0.5x TAE buffer 中進行電泳分析, 並交由明欣生技公司定序。