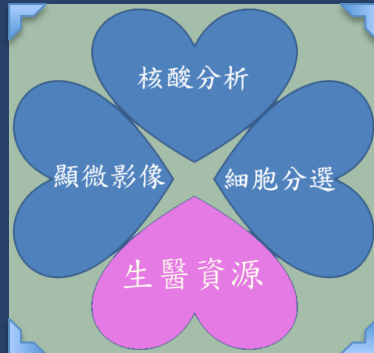




# 台大醫學院第一共研電子報

103年4月 第14期



Ⓢ 注意事項：  
儀器的訓練課程日期公告在第一共研網站



## 本期目錄

- 生醫資源中心介紹 P2
- 人類疾病模式生物中心介紹 P8
- Warehouse的管理 P12
- 如何改善PCR P14

## 下期預告

介紹細胞分選核心實驗室

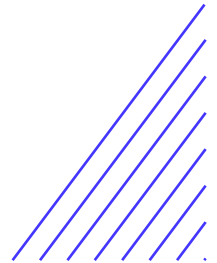
本期編輯: 詹琍婷、蔡賢竹、林以璇

編輯委員: 鄧述諄、詹迺立、吳明賢、林淑華、吳君泰、林泰元

# 生醫資源中心

## BioMed Resource Core

1. 地點：醫學院基礎醫學大樓R1438 & R1439
2. 開放時間：週一至週五 9:00~17:00
3. 使用資格：以本校各科系所實驗室(或計畫)
4. 服務項目：
  - A. 提供索取生物材料
  - B. 提供相關技術支援服務
  - C. 人類疾病模式生物中心服務平台
  - D. 定期作貴儀的品質控管：real-time PCR 和 Biacore T200 等。
  - E. **Warehouse**的管理



## ◎ 生醫資源中心目前所收集之生物材料種類：

### 一、各種基因功能分析之質體、載體：（1792個）

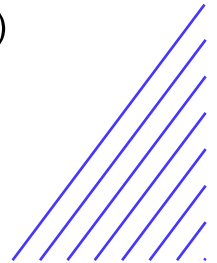
- (1) 可於細菌、昆蟲及哺乳動物細胞中表現之質體
- (2) 可於細胞膜、細胞核、粒線體...等特定位置標定之質體
- (3) 可表現CFP、GFP、YFP、RFP...等質體
- (4) 各種基因功能分析之質體
- (5) 可表現各種siRNA、miRNA之質體
- (6) Adenoviral、lentiviral及retroviral vectors
- (7) 酵母菌相關之各種質體

### 二、細胞株：（222個，僅提供查詢資料庫）

- (1) 各種適用於轉染及表現特殊蛋白質之細胞株
- (2) 哺乳動物之肝癌、乳癌、腸癌、淋巴癌...等細胞株
- (3) 血液及神經相關細胞

### 三、微生物：（1990個，除了E. coli之外，其他僅提供查詢資料庫）

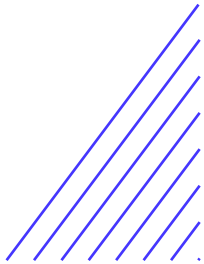
E.coli competent cell，Staphylococcus及Streptococcus之標準菌株



## 五、Yeast two-hybrid cDNA library：17 種

項目	內容
1	Human Fetal Liver Matchmaker® cDNA Library
2	Human Fetal Kidney Matchmake® cDNA Library
3	Human Lymphocyte Matchmaker® cDNA Library
4	Human Pancreas Matchmaker® cDNA Library
5	Human Ovary Matchmaker® cDNA Library
6	Human Spleen Matchmaker® cDNA Library
7	Human Thymus Matchmaker® cDNA Library
8	Human Liver Matchmaker® cDNA Library
9	Human Leukocyte Matchmaker® cDNA Library
10	Human Kidney Matchmaker® cDNA Library
11	Human Lymph Node Matchmaker® cDNA Library
12	Human Mammary Gland Matchmaker® cDNA Library
13	Mouse Liver Library Matchmake® cDNA Library
14	Mouse Kidney Matchmaker® cDNA Library
15	Mouse Testis Matchmaker® cDNA Library
16	Mouse Embryonic Fibroblast Matchmaker® cDNA Library
17	Mouse 7-day Embryo Matchmaker® cDNA Library

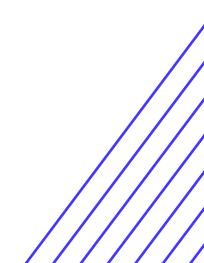
## 四、抗體：（368 種，僅提供查詢資料庫）



資料庫內容將不對外公開，加入會員即可來信要求瀏覽資料庫內容  
請洽 陳美麟 小姐，分機 88283

自2010.06月起至2014.1.31止，共有125位醫學院與醫院的老師和醫師加入會員。

統計期間2010.06~2013.1.31					
研究所	會員數	研究中心	會員數	學科	會員數
臨床醫學研究所	3	光電生物醫學研究中心	1	寄生蟲學科	2
臨床基因醫學研究所	2	實驗動物中心		耳鼻喉科	5
分子醫學研究所	7	癌症研究中心		皮膚科	3
免疫學研究所	3	藥物研究中心		內科	11
口腔生物科學研究所	2	台大醫院肝炎研究中心	1	復健科	1
臨床藥學研究所	2			小兒科	3
醫學工程研究所	3			婦產科	2
解剖學暨細胞生物學研究所	5			眼科	2
生物化學暨分子生物學研究所	7			外科	1
生理學研究所	6			醫學研究部	1
微生物學研究所	10			檢驗醫學科	1
藥理學研究所	6			骨科	1
病理學研究所	6			綜合診療部	1
法醫學研究所	1				
臨床牙醫學研究所	3				
藥學研究所	7				
醫學檢驗暨生物技術學系(所)	10				
轉譯醫學研究中心	1				
腫瘤醫學研究所					
毒理學研究所	2				
腦與心智科學研究所					
物理治療學系暨研究所					
職能治療學研究所					
護理學研究所					
生科院生化科技學系暨研究所	2				
生科院生化科學研究所	1				
合計	89		2		34



## ◎技術支援服務項目

建構質體 (gene cloning)

純化質體 ———— mini- /midi- /max kit  
CsCl banding

篩選stable clone

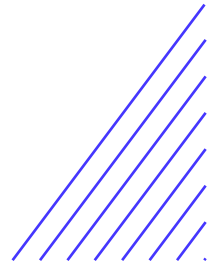
純化蛋白質 ———— E coli  
Baculovirus

Yeast two hybrid screening

建構cDNA library ———— cDNA library  
Genomic DNA library

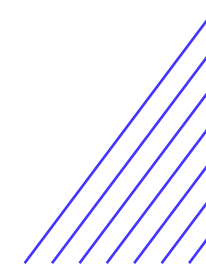
組織細胞primary culture

代養細胞



2013.01.01~2014.01.31 各實驗室單位提出服務申請的次數：

申請時間：2013/1/1~2014/1/31	
單位	申請服務次數
臨床醫學所	7
毒理所	1
醫學檢驗暨生物技術系	4
生化分生所	6
生理所	6
微生物所	5
藥理學科	6
藥學所	5
分子醫學所	2
耳鼻喉科	1
復健部	7
骨科	1
外科	1
病理部	7
內科	1
小兒科	2



# 人類疾病模式生物中心

## Human disease modeling center

本年度於第一共同研究室成立「人類疾病模式生物中心」。成立「人類疾病模式生物中心」之目的為：提供容易操作、無倫理疑慮之「模式生物」，利用此模式生物研究疾病病因、治療方法，同時可以篩選藥物。目前「人類疾病模式生物中心」提供之「模式生物」為：

1. 酵母菌模式

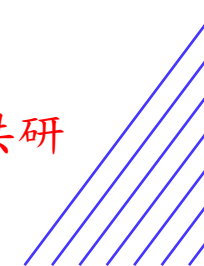
2. 線蟲動物模式

3. 果蠅模式

4. 小鼠動物模式

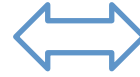
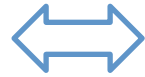
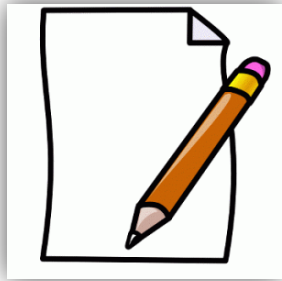
共四種模式生物以提供醫學院區之研究同仁使用。

2014年4月新成立基因剔除(剔除)細胞株核心實驗室，管理辦法請參考第一共研網頁。





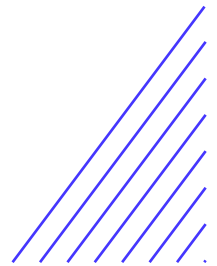
# 如何申請模式生物技術服務



- 填寫申請書以電子郵件方式寄送至生醫資源中心信箱。(e-mail: ltjang@ntu.edu.tw)，  
收件人：詹琍婷 博士，  
分機：88931
- 得到服務成果之後，提供具可行性的下一步實驗計畫。

- 接洽實驗室，提供可行性與收費標準。
- 收費

- 分發至人類疾病模式生物中心之各實驗室。



# 台灣酵母菌生物資源中心運作

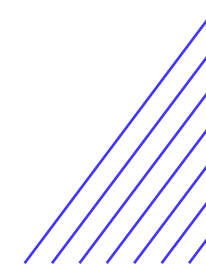
目前提供索取的生物材料

<b>Thermo Scientific Open Biosystem</b>
Yeast deletion collection MAT_a
Yeast deletion collection MAT_alpha
Yeast TAP Fusion ORF Collection
Yeast Magic Maker Collection( Kan) – diploid deletion mutants ( These strains were derived from direct transformation of the RESGEN KanMx YKO Collection of Heterozygous Diploid <i>S. cerevisiae</i> with the “Magic Marker”, officially known as the “SGA reporter”, and developed by Boone and coworkers (Tong <i>et al.</i> , <i>Science</i> 294:2364).)
Yeast Kinase YFP Fusion Collection (plasmid form)-- It is a mini-collection of low-copy yeast plasmids bearing gene-YFP fusions. The genes are cloned along with 1 kb upstream sequence to encompass native promoters using the Gateway Cloning system. The fusion is at the carboxy-terminus of the encoded protein.
<i>S. cerevisiae</i> Hansen BY4730
<i>S. cerevisiae</i> Hansen BY4739
<i>S. cerevisiae</i> Hansen BY4741
<i>S. cerevisiae</i> Hansen BY4742
<i>S. cerevisiae</i> Hansen BY4743
yeast-GST-tagged ORF-- The Yeast GST-tagged ORFs are a collection of more than 5,000 yeast strains that each overexpresses a different yeast open reading frame (ORF) when induced with galactose.
ysc5049-yeast-cross-capture-system-bait-mata
ysc5092-yeast-cross-capture-system-prey-matalpha
Yeast Tet-promoters Hughes Collection (yTHC)-- with 800 essential yeast genes under control of a tetracycline-regulated promoter permits experimental regulation of essential genes.
Yeast GFP Fusion ORF collection (Invitrogen)—The GFP fusion proteins are integrated into the yeast chromosome through homologous recombination and are expressed using endogenous promoters.



提供全台灣研究學者免費索取，僅收取100元作為維持基本存放及耗材品物。從2013年1月～2014年2月已經有中研院和8所學校，總共20個實驗室，向本中心索取生物材料，總共申請了164個菌株，申請次數共為46次。申請明細如下：

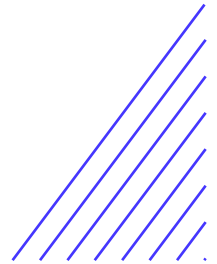
： 2013/1/1~2013/1/31		
單位	申請數目	申請次數
臺大植微所	3	1
臺大植科	1	1
臺大生命科學系	37	3
臺大生理所	1	1
臺大分醫所	18	9
臺大微生物所	1	1
臺大農化	15	3
臺大食科所	3	1
陽明大學生化所	1	1
成功大學	3	2
中央大學生科系	5	4
中央大學生科系	6	1
長庚大學生物醫學系	7	2
長庚大學天然藥物所	14	6
淡江大學化學系	31	3
陽明生化所	5	1
中研院分生所	1	1
中研院植微所	3	1
清大生技所	8	3
中研院生化所	1	1
Total	164	46



# Warehouse的服務項目

本院為協助師生同仁能夠以較優惠的價格、方便且即時地取得您需要的研究資源，第一共研生醫資源中心warehouse即日起新增以下品項，提供師生同仁們申請使用：

- 一、常用酵素 (廠牌：NEB, TaKaRa, Fermentas) **NEW!**
- 二、DNA & Protein Marker (廠牌：Fermentas) **NEW!**
- 三、細胞培養用藥 (廠牌：Biological Industries) **NEW!**
- 四、實驗室耗材 (103年集中採購案)
- 五、酵母菌菌株



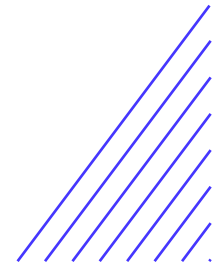
各品項之價格及申請方式詳述如下：

品項	價格	申請方式
常用酵素 (NEB, TaKaRa, Fermentas)	八折價 (提供品項 詳如附檔)	此為廠商預存於生醫資源中心之貨品，請先來電確認後，即可前來取貨，廠商之後會再開立發票送至各實驗室。 聯絡人：蔡賢竹先生、林以璇小姐 分機：88341 / 88507 地點：基醫大樓R1438 / R1439
DNA & Protein Marker (Fermentas)		
細胞培養用藥 (Biological Industries)		
實驗室耗材	參考本院實驗室耗材集中採購案	請逕洽得標廠商訂購，後將發票直接核銷即可。
酵母菌菌株	NT 100 元 /strain	填寫 <b>菌株索取申請表</b> 以e-mail 方式申請，申請表送出後請來電確認。 聯絡人：詹珣婷博士 e-mail：ltjang@ntu.edu.tw 分機：88931/ 88507

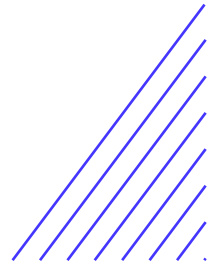
## PCR 的最佳條件：

- 可以改善 PCR 產物的添加物(如果有添加以下物質時，必須調降 annealing temperature。)
  1. DMSO (2%~5%)，不要超過 10%。
  2. PEG 6000 (5%~15%)
  3. Glycerol (5%~20%)
  4. nonionic detergents
  5. formamide (1~5%)
  6. BSA (5% or 10 to 100  $\mu\text{g/ml}$ )
  7. Betaine (1~1.7M)
  8. Non-ionic detergents: 0.1~1% Triton X-100, Tween 20 or NP40
  9. TMAC (15~100mM)
  10. 7-deaza-2'deoxyguanosine (50  $\mu\text{M}$ ；但是最佳比例是 3:1  $\text{dc}^7\text{GTP}$  to  $\text{dGTP}$ ，150  $\mu\text{M}$   $\text{dc}^7\text{GTP}$  和 50  $\mu\text{M}$   $\text{dGTP}$ )
  11.  $\text{Mg}^{2+}$  (0.5~5mM, finally)
  12.  $\text{K}^+$  (35~100mM, finally)

DMSO 和 Formamide 會抑制大約 50% polymerase 的活性，所以如果有加 DMSO 或 Formamide 時，polymerase 的量要增加。

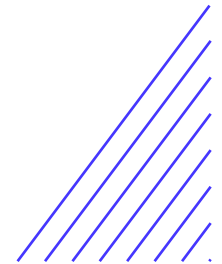


- dNTPs 會直接螯合  $Mg^{2+}$ ，所以需注意 dNTPs 的用量，以免影響 free  $Mg^{2+}$ 。一般每種 dNTP 的用量是  $200 \mu M$ 。
- $Mg^{2+}$  濃度過高容易出現 non-specific product。一般第一次使用  $Mg^{2+}$  濃度是  $0.5mM$ ，若要增加濃度，則可以每次增加  $0.5mM$ ，但是如果  $Mg^{2+}$  的嘗試用量已經到達  $5mM$ ，那麼則可以每次增加  $0.2\sim 0.3mM$  來做測試。常建議的  $Mg^{2+}$  濃度是  $1\sim 4mM$ 。
- 如何決定 annealing temperature:  $T_m \approx (G+C)4 + (A+T)2$  如果有一個 base mismatch，則  $T_m$  值是依照公式再減  $5^\circ C$ 。第一次 annealing temperature 是使用公式得到的  $T_m$  值減  $5^\circ C$ ，依需要再逐次增加  $2\sim 5^\circ C$ 。
- denature 的溫度和時間可以決定 DNA 的 denature 程度，若 denature 不完全則會讓 PCR 的效能降低。
- 如何設計 primer:
  - $40\sim 60\%$  GC content, 3'terminal 至少有 1~2 個 G 或 C, 長度約  $18\sim 25$  bases，避免有 polypurines and polypyrimidines，最好不要重複 4 個以上。
  - 長度是  $15\sim 30$  bases.
  - primer 的  $T_m$  值可以是  $45\sim 65^\circ C$ ，但是最佳的  $T_m$  值是  $52\sim 58^\circ C$ 。
  - primer 的濃度： $0.2\sim 1 \mu M$
- Template 的使用量：以  $20 \mu l$  總反應體積為例：plasmid 和 phage DNA 的需要量是  $5pg\sim 500pg$ ，一般第一次使用  $10pg$ ；genomic DNA 的需要量是  $50ng\sim 500ng$ ，一般第一次使用  $100ng$ 。



- Touchdown PCR: Annealing 的最高溫度和最低溫度是差了大約 15。最高溫度是高於  $T_m$  值但是不會高於  $T_m$  值得  $10^{\circ}\text{C}$ 。

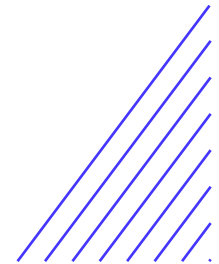
舉例說明：有一組 primer 的  $T_m$  值是  $62^{\circ}\text{C}$ ，Annealing 的溫度設定在  $65\sim 50^{\circ}\text{C}$ ，溫度的差距是  $1^{\circ}\text{C}$ ，每個溫度設定 2 個 cycles，這樣總共有 30 個 cycles，再額外加作 15 個 cycle 是 Annealing 溫度  $50^{\circ}\text{C}$  的。



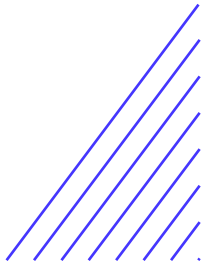


## PCR改進方法-問與答

問題	可能原因	改進方法
無產物	不正確的 annealing 溫度 或時間	重新計算 primer 的 Tm 值 進行 gradient PCR 找尋合適 Tm 值 增加 annealing 時間
	引子設計不良	再次確認引子序列 確認無二級結構
	反應條件不佳	調整鎂離子濃度至 0.2~1mM 使用 clean up kit 純化模板 減少反應時 template 的體積 再次確認反應程式是否正確 校正機器溫度
	Cycles 數不足	增加 cycles 數
	Extension 時間不足	重新計算 extension 所需時間
序列錯誤	聚合酶正確率不足	選擇合適的 DNA 聚合酶
	反應條件不佳	減少 cycles 數 減少 extension 的時間 減少鎂離子濃度至 0.2~1mM
	核苷酸種類不平衡	使用新的核苷酸混合液
	模板受損	使用新的模板或嘗試修復 減少照膠時模板暴露在紫外光下的時間
產物大小 錯誤	不正確的 annealing 溫度	重新計算 primer 的 Tm 值
	引子黏合錯誤	確認引子在模板上只有一處互補
	鎂離子濃度不正確	調整鎂離子濃度至 0.2~1mM
多個產物 或無專一 性	引子 annealing 溫度過低	增加 annealing 溫度
	鎂離子濃度不正確	調整鎂離子濃度至 0.2~1mM
	引子設計不良	避免 GC-rich 3' end 並確認序列正確
	引子濃度過高	調整引子濃度至 0.05~1 $\mu$ M
	外源性 DNA 污染	注意實驗時試劑與材料的清潔
	錯誤的模板濃度	低複雜性(如質體)調整至 1pg~10ng 高複雜性(如 genomic DNA)調整至 1ng~1 $\mu$ g
	Cycles 數過多	調整 cycles 數至 20~35
	Extension 時間過長	一般約為 15sec~1min/kb
	升降溫速度過慢	調整儀器升降溫速度



產物模糊	Cycles 數過多	調整 cycles 數至 20~35
	Extension 時間過長	一般約為 15sec~1min/kb
	Annealing 時間過長	一般約為 30sec
	Annealing 溫度過低	通常為 primer 的 Tm 值減 5°C
	升降溫速度過慢	調整儀器升降溫速度
	primer 的 Tm 值計算錯誤	重新計算 primer 的 Tm 值
	模板濃度過高	依模板種類調整濃度
	模板受損	使用新的模板或嘗試修復
	外源性 DNA 汙染	注意實驗時試劑與材料的清潔
其他	促進 PCR 反應的物質	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 鎂離子(Mg<sup>++</sup>) : 增加 PCR 產量。</li> <li>2. 甘油(glycerol) : 增加 DNA polymerase 熱穩定性。</li> <li>3. BSA : 增加 DNA polymerase 熱穩定性。</li> <li>4. Betaine : 增加 PCR 的產量和特異性。</li> <li>5. DMSO : 通常使用於 GC-rich 的 DNA 模板，主要為解開 DNA 模板的二級結構，使引子易黏合於模板上。</li> </ol>
	抑制 PCR 反應的物質	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 鈣離子(Calcium ions) : 和鎂離子(Mg<sup>++</sup>)競爭。 *鎂離子(Mg<sup>++</sup>) : 一般的濃度介於 1.5~2.0mM 之間，功能為 DNA polymerase 的輔因子，濃度高可以增加 PCR 產量，但是會降低專一性，濃度太低則降低 PCR 產量。</li> <li>2. EDTA : 螯合鎂離子(Mg<sup>2+</sup>)，影響 PCR 反應速率。</li> <li>3. 胞外多糖(Exopolysaccharides) : 黏合至 DNA polymerase。</li> <li>4. 肝素(Heparin) : 黏合至核酸。</li> <li>5. IgG : 黏合至核酸。</li> <li>6. 乳鐵蛋白(Lacoferrin) : 釋放鐵離子。</li> <li>7. 酚 (phenol) : 使 DNA polymerase 變性。</li> <li>8. 蛋白質酶 (proteinases) : 使 DNA polymerase 降解。</li> </ol>



## 參考文獻

- Bachmann, B., W. Luke and G. Hunsmann (1990). "Improvement of PCR amplified DNA sequencing with the aid of detergents." Nucleic Acids Res **18**(5): 1309.
- Chakrabarti, R. and C. E. Schutt (2001). "The enhancement of PCR amplification by low molecular weight amides." Nucleic Acids Res **29**(11): 2377-2381.
- Costa, G. L., A. Graftsky and M. P. Weiner (1994). "Cloning and Analysis of Pcr-Generated DNA Fragments." Pcr-Methods and Applications **3**(6): 338-345.
- Costa, G. L. and M. P. Weiner (1994). "Protocols for Cloning and Analysis of Blunt-Ended Pcr-Generated DNA Fragments." Pcr-Methods and Applications **3**(5): S95-S106.
- Demeke, T. and R. P. Adams (1992). "The effects of plant polysaccharides and buffer additives on PCR." Biotechniques **12**(3): 332-334.
- Henke, W., K. Herdel, K. Jung, D. Schnorr and S. A. Loening (1997). "Betaine improves the PCR amplification of GC-rich DNA sequences." Nucleic Acids Res **25**(19): 3957-3958.
- Hube, F., P. Reverdiau, S. Iochmann and Y. Gruel (2005). "Improved PCR method for amplification of GC-rich DNA sequences." Mol Biotechnol **31**(1): 81-84.
- Lorenz, T. C. (2012). "Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies." J Vis Exp(63): e3998.
- Mcconlogue, L., M. A. D. Brow and M. A. Innis (1988). "Structure-Independent DNA Amplification by Pcr Using 7-Deaza-2'-Deoxyguanosine." Nucleic Acids Research **16**(20): 9869-9869.
- Radstrom, P., C. Lofstrom, M. Lovenklev, R. Knutsson and P. Wolffs (2008). "Strategies for overcoming PCR inhibition." CSH Protoc **2008**: pdb top20.
- Roux, K. H. (1995). "Optimization and troubleshooting in PCR." PCR Methods Appl **4**(5): S185-194.
- Roux, K. H. (2009). "Optimization and troubleshooting in PCR." Cold Spring Harb Protoc **2009**(4): pdb ip66.
- Sarkar, G., S. Kapelner and S. S. Sommer (1990). "Formamide Can Dramatically Improve the Specificity of Pcr." Nucleic Acids Research **18**(24): 7465-7465.
- Turner, S. L. and F. J. Jenkins (1995). "Use of Deoxyinosine in Pcr to Improve Amplification of Gc-Rich DNA." Biotechniques **19**(1): 48-52.

