



# 第一共同研究室

108年6月 第5期



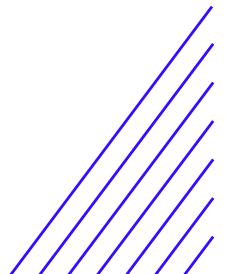
## 本期目錄

- 生醫資源中心介紹 P2
- 人類疾病模式生物中心介紹 P6
- 台灣酵母菌生物資源中心介紹 P7
- 質體建構的技術性分享 P9

# 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 8:30~17:00
3. 使用資格：以本校各科系所實驗室(或計畫)及附設醫院各科部負責人為主
4. 服務項目：
  - A. 提供索取生物材料
  - B. 提供技術支援服務
  - C. Warehouse的管理
  - D. 定期作貴儀的品質控管：real-time PCR 和 Biacore T200 等。
  - E. 人類疾病模式生物中心服務平台



# 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：（1823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：（241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：（1991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

## 四、抗體：（368 種，僅提供查詢資料庫）

來自各實驗室推薦的各種自公司購得及由院內老師實驗室自製之抗體

# 技術支援服務項目

質體建構(gene cloning)

質體純化

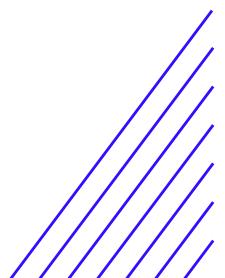
篩選stable clone

Yeast two hybrid screening

製作competent cell

建構cDNA library

組織細胞primary culture



## 酵素庫房

本院為了協助師生同仁能夠以較優惠的價格、方便且即時地取得需要的限制酶酵素，第一共研生醫資源中心管理廠商寄賣的酵素。目前是寄賣使用率較高的NEB酵素，使用率不高的NEB酵素，則可以透過生醫資源中心代訂，也同樣享有優惠。庫房計有34種常用酵素供申請索取。去年度至庫房領取NEB酵素之件數有234件，電話代訂有129件。

寄賣的酵素品項可以到生醫資源中心網頁的庫房專區查詢(<http://rd.mc.ntu.edu.tw/bomrd/brc/stock.asp>)。

# 人類疾病模式生物中心

## Human disease modeling center

模式生物可以用來研究疾病的病因和治療方法，並且也可以用來篩選藥物。為了協助計畫主持人在不同模式生物研究同源基因，本中心作為實驗室之間的橋樑，代為詢問實驗的可行性，和調查願意提供技術服務的實驗室。

### 提供技術教導的實驗室

#### 人類疾病的酵母菌模式核心實驗室

Yeast Core Facility for Human Disease Model

諮詢：李芳仁 博士(分子醫學所)、鄧述諄 博士(微生物所)

#### 人類疾病的線蟲動物模式核心實驗室

C. elegans Core Facility for Human Disease Model

諮詢：潘俊良醫師(分子醫學所)，詹世鵬博士(微生物所)

#### 人類疾病的果蠅模式核心實驗室

Drosophila Core Facility for Human Disease Model

諮詢：李秀香博士(分子醫學所)

#### 人類疾病的小鼠動物模式核心實驗室

Mouse Core Facility for Human Disease Model

諮詢：黃祥博醫師、陳佑宗博士（基因體暨蛋白體醫學研究所）、游益興博士、林淑華博士(醫技所)

#### 基因剔除(剔入)細胞株核心實驗室

Gene Knockout/in Cell Line Modeling Core

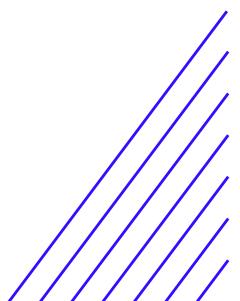
諮詢：黃呈彥 博士（研發分處）、陳佑宗博士（基因體暨蛋白體醫學研究所）、林淑華博士(醫技所)

# 台灣酵母菌生物資源中心

## Taiwan Yeast Bioresource Center

在生物與醫學研究上，人類細胞及個體常常不是最佳的研究物種及系統，有些疾病研究與篩選藥物需要使用酵母菌作為模式生物。酵母菌可長成雙倍體或單倍體，是單細胞微生物，繁殖迅速及操作便利並且不具有致病性，可以用很簡單及廉價的原料來生長，培養容易，使得酵母菌實驗系統很快的被運用到各種不同的研究領域。酵母菌屬於單倍體，基因體有12 MB DNA，約有6,275個基因，1996年酵母菌全基因體序列已經完成，是真核細胞中第一個基因被定序完成。

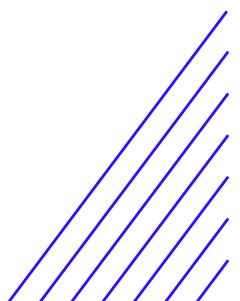
台灣酵母菌生物資源中心作為酵母菌生物材料分享平臺，提供生物醫學相關的研究學者索取功能性酵母菌菌株。



# 提供索取的酵母菌菌株

<b>Knockout Strains</b>	<b>Protein-Protein Interaction Collections</b>
Haploid knockout strains- Yeast deletion collection (MAT_a)	Yeast Cross and Capture System
Haploid knockout strains- Yeast deletion collection (MAT_alpha)	Yeast Protein Interactome Collection
Heterozygotes knockout strains – Yeast Magic Maker collection	
Yeast Tet-promoters Hughes Collection	<b>Mutant Strains and Screening Collections</b>
	Yeast genomic Tiling collection
<b>Tagged ORFs</b>	<b>Parental strain</b>
Yeast TAP Fusion ORF Collection	S. cerevisiae Hansen BY4730
The Yeast GST-tagged ORFs	S. cerevisiae Hansen BY4739
Yeast GFP Fusion ORF collection	S. cerevisiae Hansen BY4741
Yeast Kinase YFP Fusion Collection (plasmid form)	S. cerevisiae Hansen BY4742
Yeast ORF Collection	S. cerevisiae Hansen BY4743
Yeast HA Tag Collection	

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。107年有中研院和6所學校，總共13個實驗室，向本中心索取酵母菌株，  
總共申請了225個菌株，申請次數共為57次。



# 質體建構的技術性分享

針對幾個無法得到PCR產物的原因，提出解決方法

## 問題一：基因序列的差異

解決方法：質體建構除了要選擇high-fidelity DNA polymerase做PCR之外，也須針對不同序列的特性來做調整。例如需使用能有效合成含有GC content較高序列的DNA Polymerase與其緩衝液。如果DNA序列上有二級結構的問題，則可分段PCR放大序列。

## 問題二：Primer黏附的問題

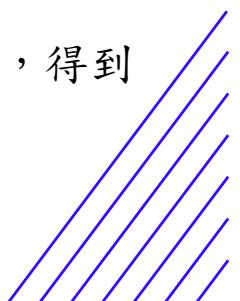
解決方法：針對目標DNA片段設計的引子 (primer)，有幾點基本注意事項：一、引子的長度要足夠可以辨識在genomic DNA或cDNA pool中目標DNA片段，一般Tm值設置在52~58 °C。二、一對引子的annealing temperature 之間的溫度不要相差超過5 °C。三、引子的GC content 不要太高。

## 問題三：primer不專一

解決方法：PCR產物在膠片(agarose)上，若太多相近的片段無法區分（例如有大小相近的variant cDNA，也可以利用分段釣取的方式，設計專一性足夠的二對或以上的引子，將單一的目標cDNA產物區隔出來。

## 問題四：細胞內該基因的mRNA量太低

解決方法：使用該基因的3' 引子（替代random primer或dT primer）做反轉錄實驗，得到該基因的cDNA後，再進行PCR來釣取其基因，此方式會大大提高基因釣取的機率。



問題四：使用符合標準規格的一對引子，仍然無法得到全長PCR產物  
解決方法：

- (1) 檢查當作PCR模板的cDNA是否來自於有表現該基因蛋白的組織，必須選取來自正確組織的cDNA pool來做PCR。
- (2) 若序列上GC比例較高，則可使用GC序列專用的酵素與緩衝液來進行PCR。若實驗室沒有這樣的PCR酵素與緩衝液，則可嘗試在PCR反應中添加0.5~3 % 的DMSO，建議從0.5 % 開始添加，因為DMSO添加越多時，PCR產物的錯誤率也會有增加的風險。
- (3) 若改善PCR反應的條件(包含 $\pm 3$  °C annealing temperature)都無法出現產物片段，則可以嘗試分段PCR (sewing PCR)。序列如果有2級結構，有時候因為primer的黏附，會造成2級結構瓦解，進而可以順利得到PCR產物。大部分的DNA序列，分成兩段PCR時，就可以得到我們需要的片段，但有少部分的基因，甚至要分段成三至四段才能得到完整片段。
- (4) 如果2級結構非常緊，導致PCR失敗的情況，也可以嘗試設計目標序列（基因或啟動子等序列）之前或之後位置的引子，避開疑似出現結構或GC含量稍高的序列位置。待PCR出涵蓋目標長度更長的序列後，再以該基因的配對引子進行PCR，即可得到完整基因的PCR產物。
- (5) 若上述都試驗過後，仍有釣不出的cDNA片段，則可利用genomic DNA當作模板，分別將exon DNA序列釣出，最後再將全部片段與載體 (vector) 利用In-fusion assembly的方式將數個片段接成全長cDNA產物。

[*BioTechniques* 43:354-359 (September 2007)]