

基礎植物學研究法


簡 萬 能

中央研究院 植物暨微生物學
研究所

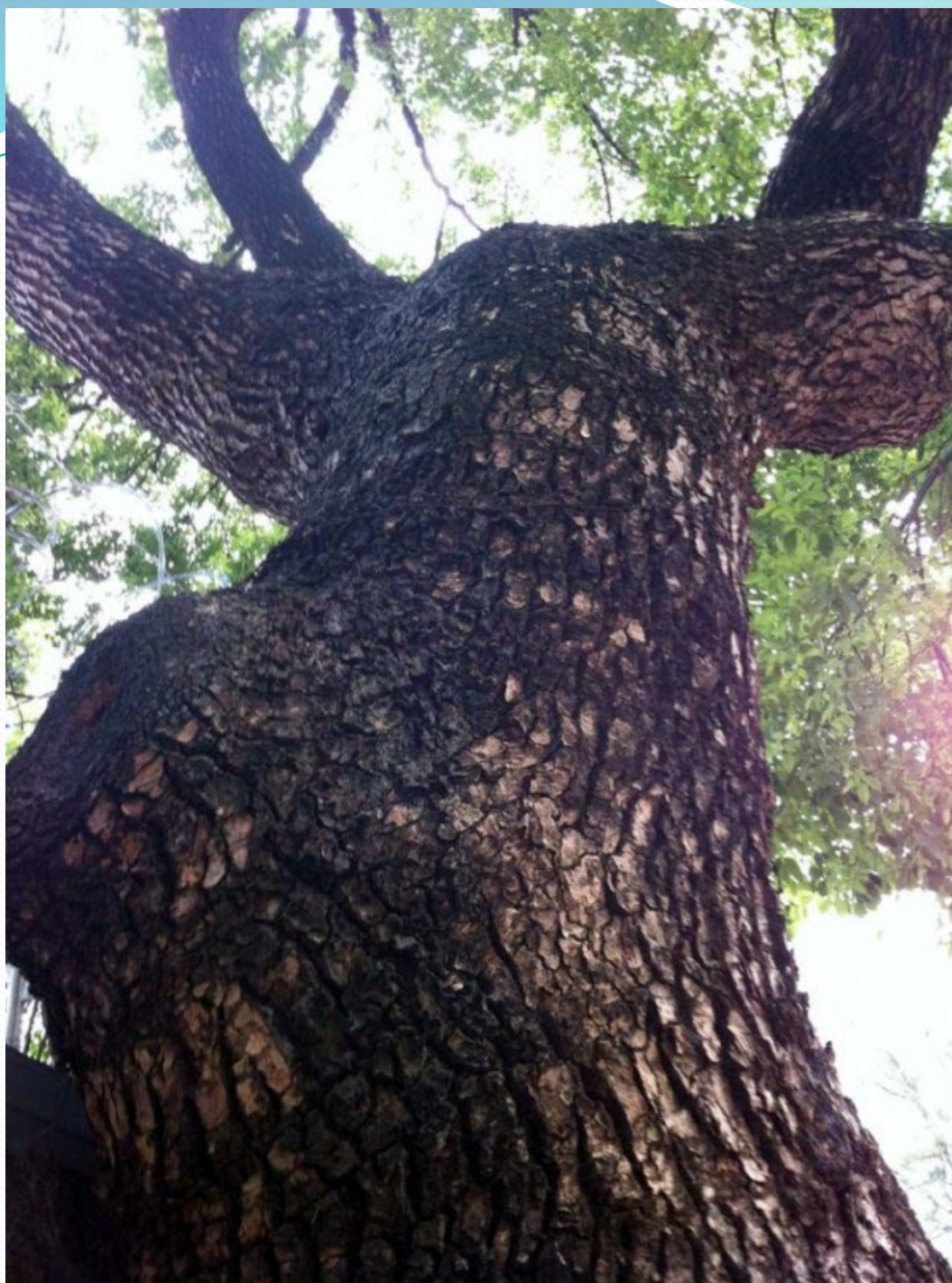
wnjane@gate.sinica.edu.tw

2024.03.23





* 這是什麼植物？
* 有何用處
* 原產地？
* 分佈區域？
* 生活史？



樟樹(*Cinnamomum camphora*)

石虎



林育秀 攝

植物學範疇

- 植物分類學 (Plant Taxonomy)
- 植物形態學 (Plant Morphology)
- 植物解剖學 (Plant Anatomy)
- 植物生理學 (Plant Physiology)
- 植物生化學 (Plant Biochemistry)
- 植物細胞學 (Plant Cell Biology)
- 植物遺傳學 (Plant Genetics)
- 植物分子生物學 (Plant Molecular Biology)
- 植物生態學 (Plant Ecology)



巨觀 → 微觀 → 功能、代謝 → 遺傳

植物顯微技術

1. 顯微鏡系統

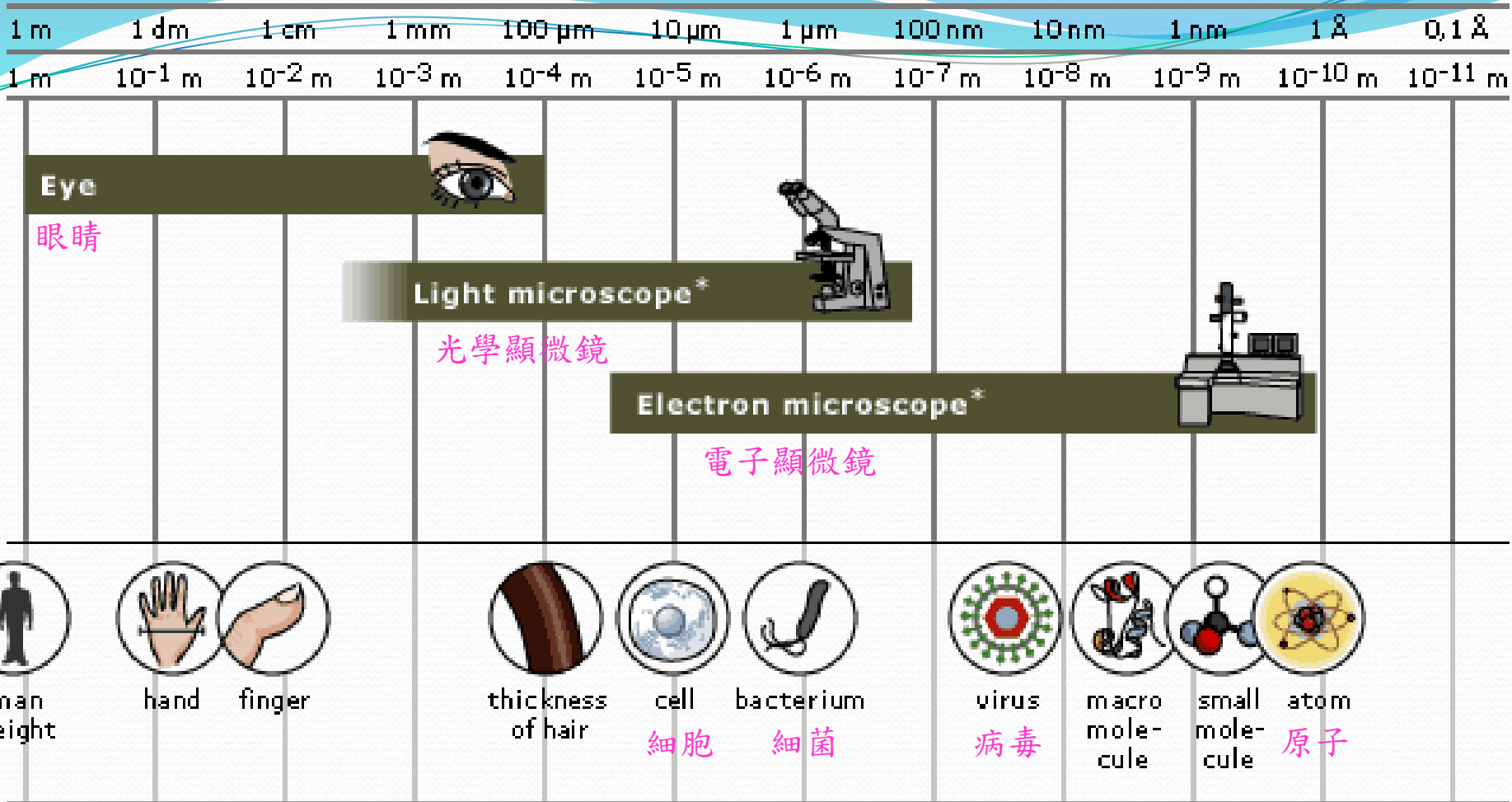
2. 組織切片：1) 整體包埋；2) 徒手切片；3) 石蠟包埋切片
4) 塑膠包埋切片；5) 冷凍切片

3. 應用：1) 組織化學 (histochemistry)
2) 免疫組織化學 (immuno-histochemistry)
3) 原位雜交 (*In situ* hybridization)
4) 自動放射顯影 (autoradiography)

4. 染色體觀察

顯微鏡 (Microscope)

- 光學顯微鏡 (Light microscope)
- 電子顯微鏡 (Electron microscope)
- 原子力顯微鏡 (Atom force microscope)



<http://www.nobel.se/physics/educational/microscopes/powerline/index.html>

Resolution (解析率)：區分兩點的最小距離

Naked eyes 0.2mm

LM 0.2μm (40nm)

EM 0.2nm (0.1nm)

實驗室中常用的生物顯微鏡

解剖(實/立體)顯微鏡
Stereomicroscope



正立顯微鏡
Upright Microscope



倒立顯微鏡
Inverted Microscope



Stereomicroscope 解剖/實體顯微鏡

適合觀察大體積實體：

- 植物
- 果蠅
- 斑馬魚
- 老鼠..., etc



Upright Microscope 正立顯微鏡

- 工作距離短
- 放大倍率高
- 解析度高

適合玻片樣本觀測：

- 細菌
- 細胞玻片
- 病理切片



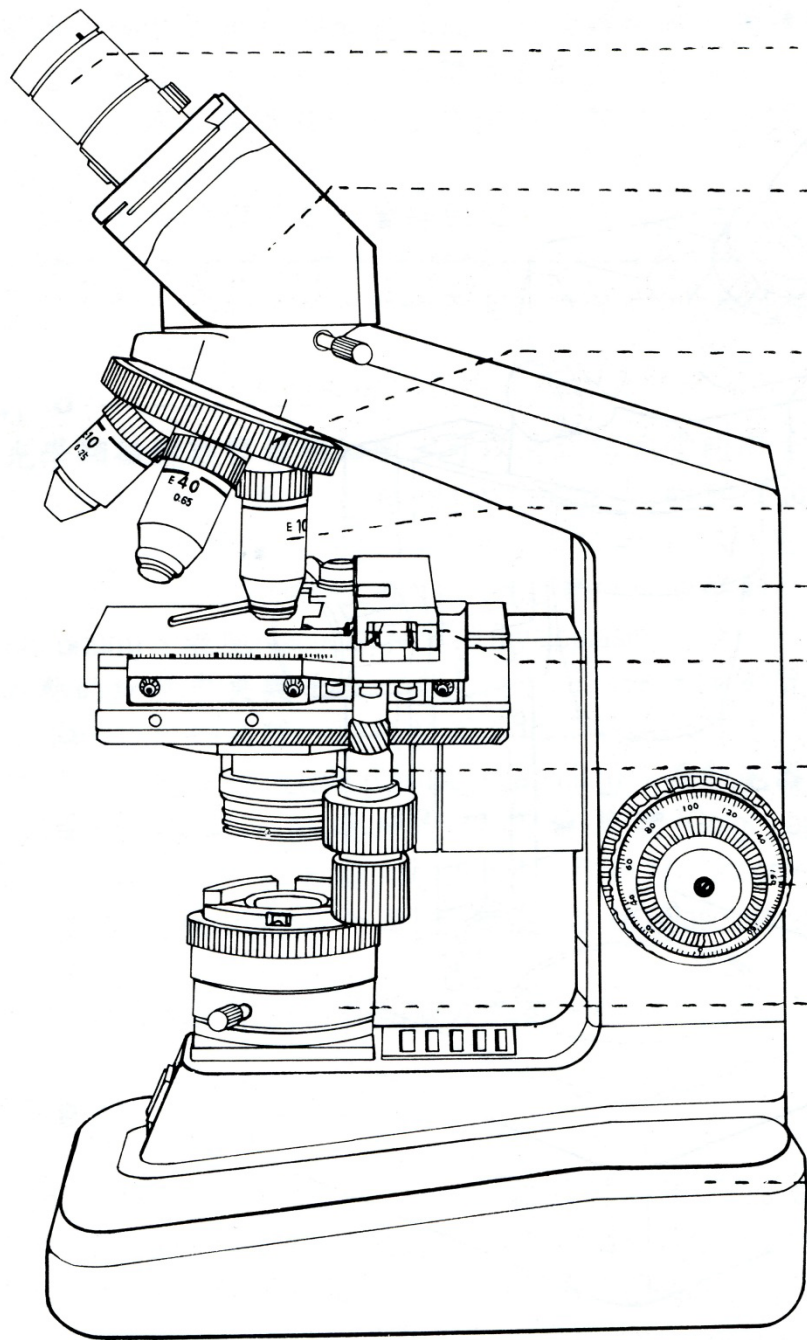
Inverted Microscope 倒立顯微鏡

- 工作距離長, 擴充性高
- 適合活細胞培養裝置
- 可架設顯微操作系統

適合活細胞樣本&玻片樣本觀察：

- 活細胞玻璃培養皿
- 活細胞塑膠培養皿
 - 細胞玻片
 - 病理切片





接目鏡 (ocular lens)

鏡筒 (eye piece tube)

旋轉盤 (revolving nosepiece)

接物鏡 (objective lens)

鏡柱 (arm)

載物台 (slide clip)

聚光鏡 (condenser lens)

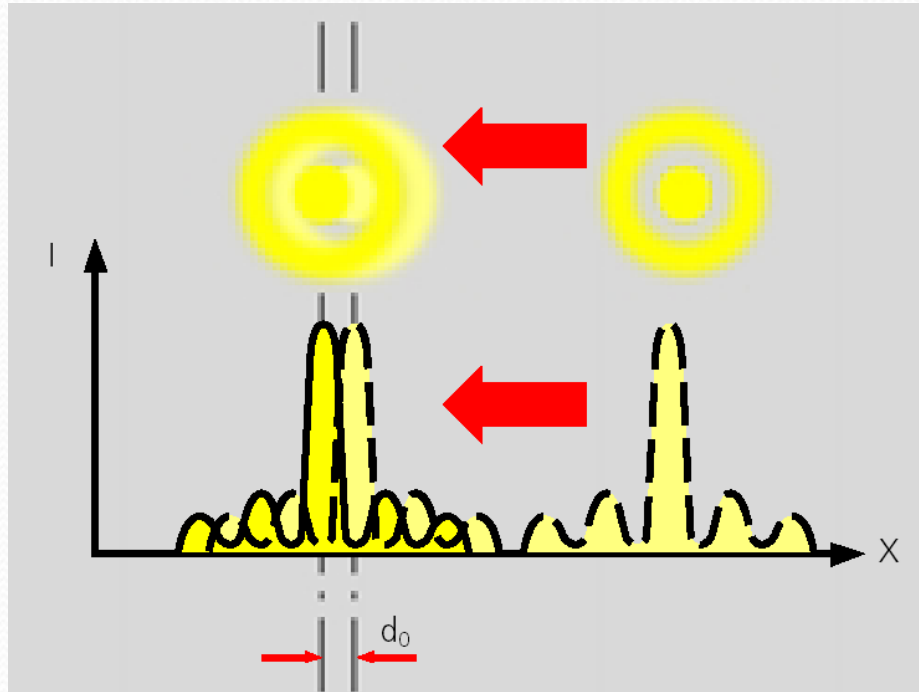
調節輪 (focusing knob)

燈源 (illuminator)

鏡座 (base)

何謂解析度(resolution)?

能夠區分兩點的最小距離



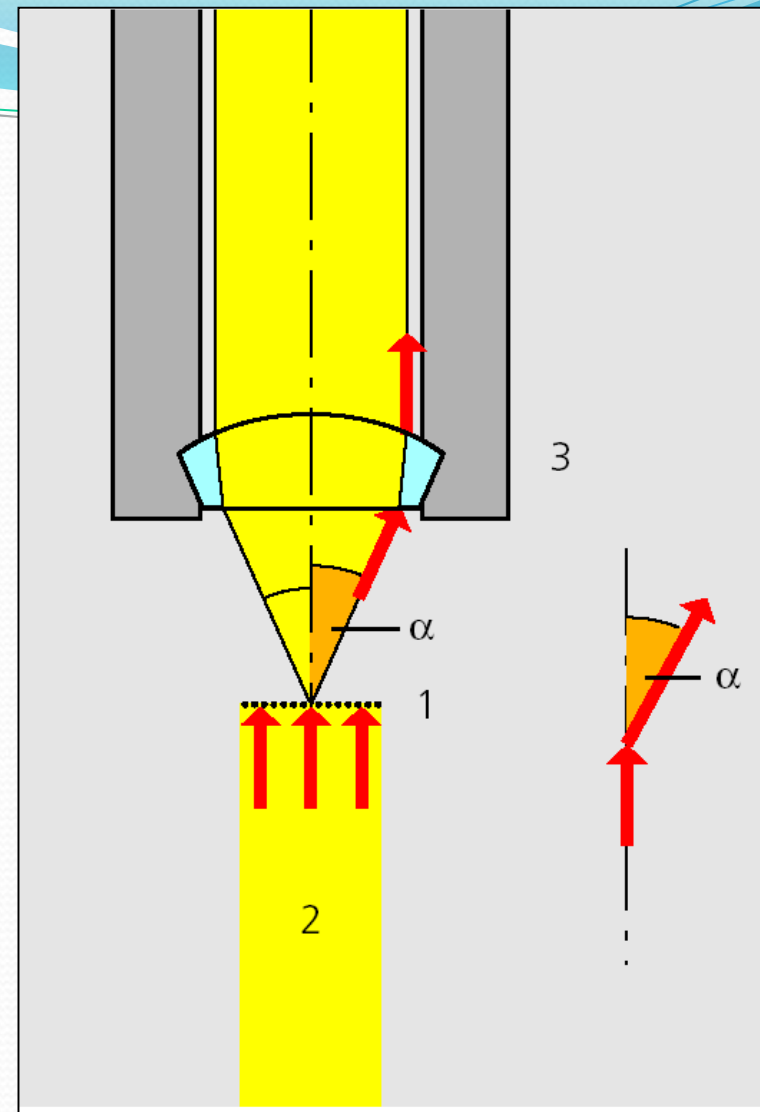
$$\text{解析度}(R) = 0.61\lambda / \text{NA} (n \sin\theta)$$

λ : 入射光波長

n : 環境折射率

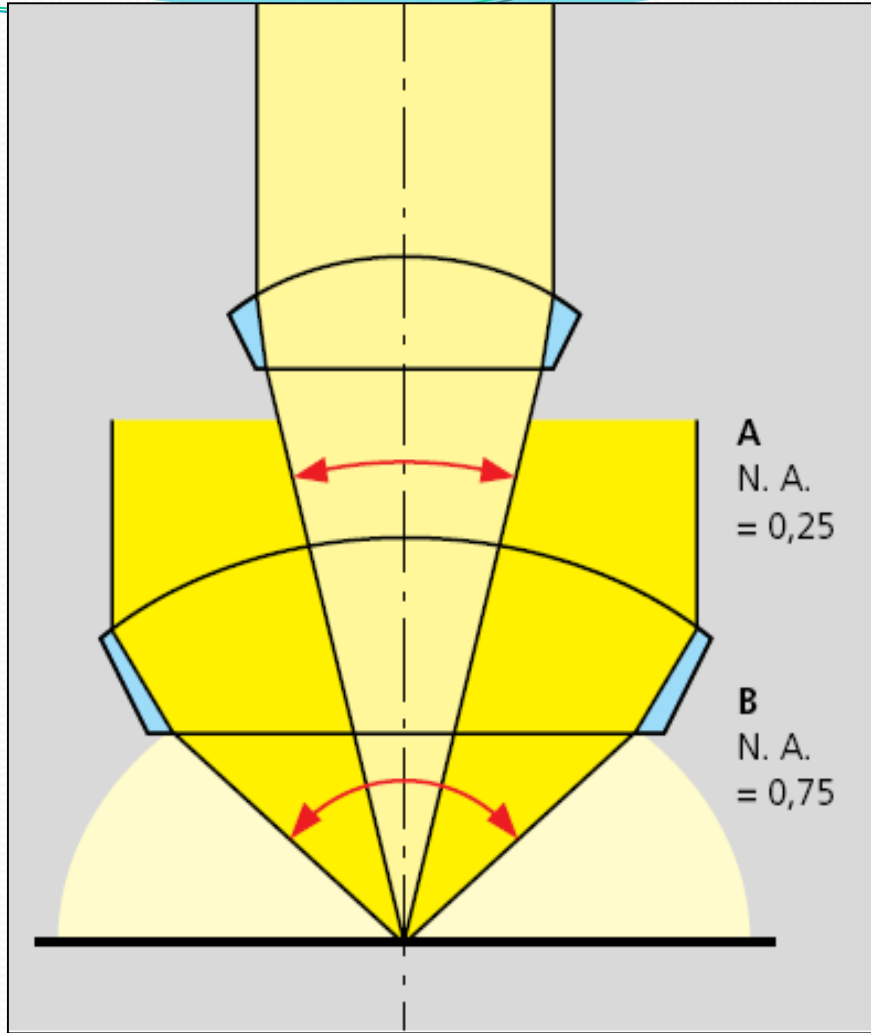
θ : 物鏡最大收光角度的一半

NA: Numerical aperture





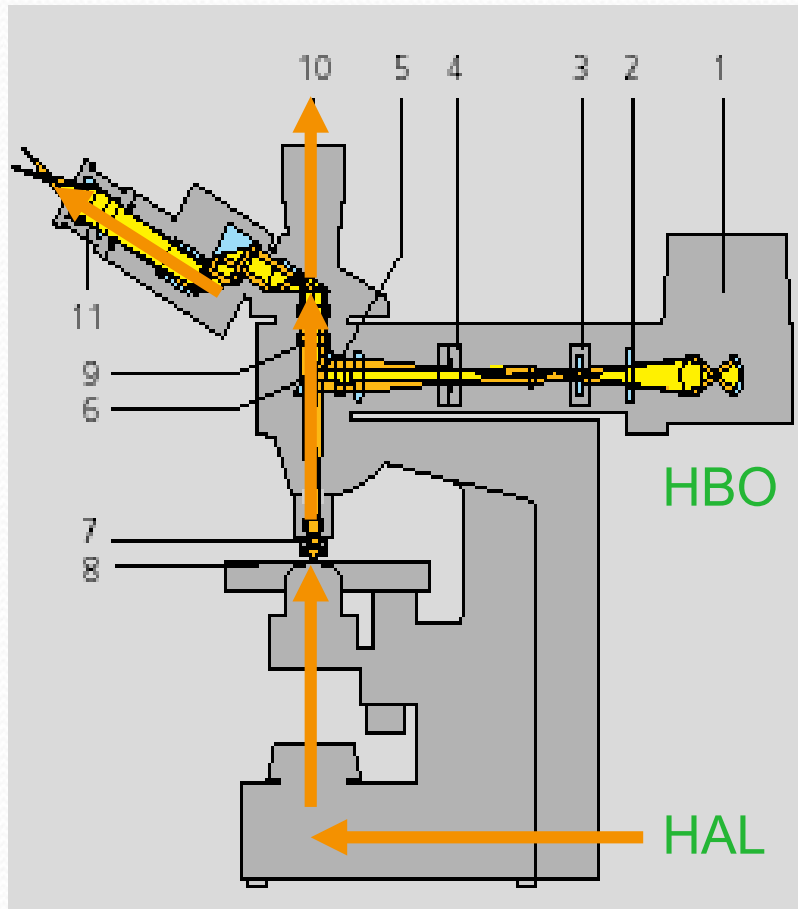
物鏡的NA值



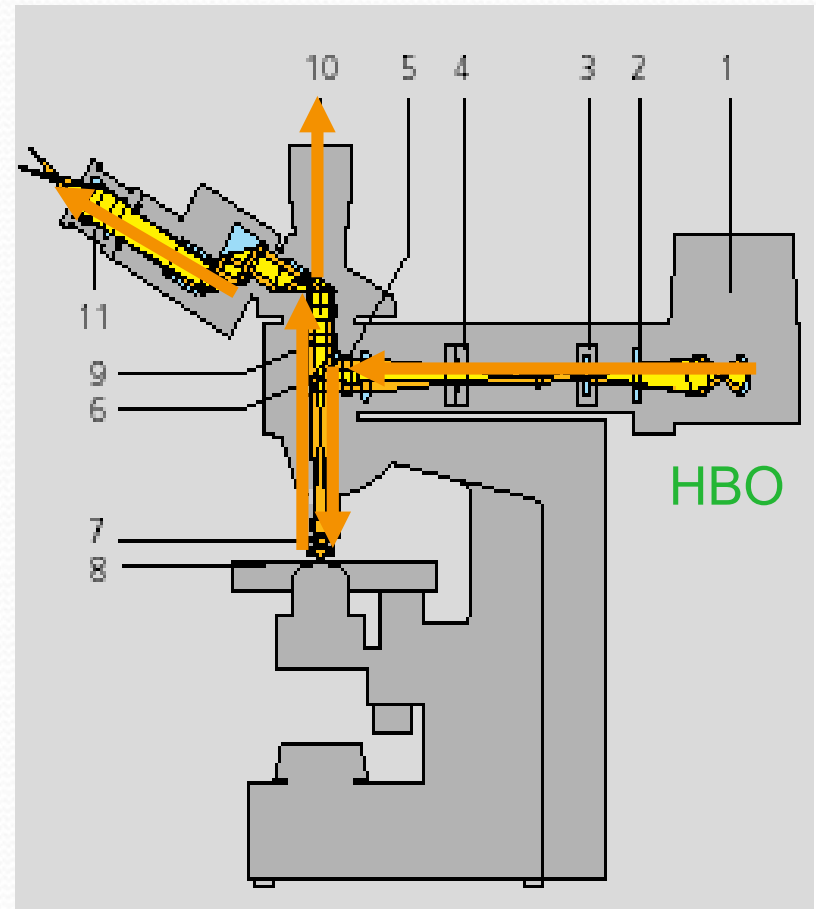
A. Low Magnification (10X/0.25)
B. High Magnification (40X/0.75)

正立顯微鏡光的路徑

穿透光 (transmitted light)



反射光 (reflected light)

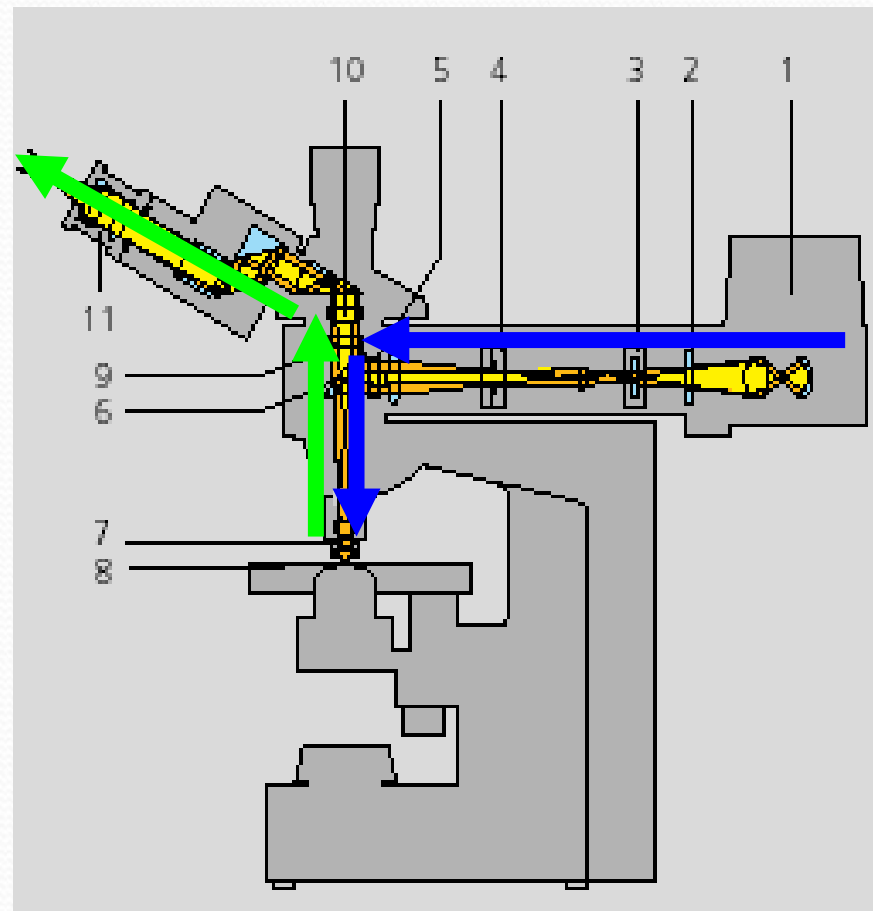


呈像的方式

- 明視野 Bright field – 最常用，染色、對比佳樣本
- 暗視野 Dark field – 對比差、極小樣本
- 相位差 Phase contrast – 折射光，透明、無染色、對比差樣本
- 偏光 Polarization – 結晶體(澱粉、聚合物)、有偏光反應樣本
- 干涉位相差 Differential Interface Contrast - 對比差、表面形態觀察，影像立體
- 螢光 Fluorescence - 適合用於特定對象之鑑別與定位

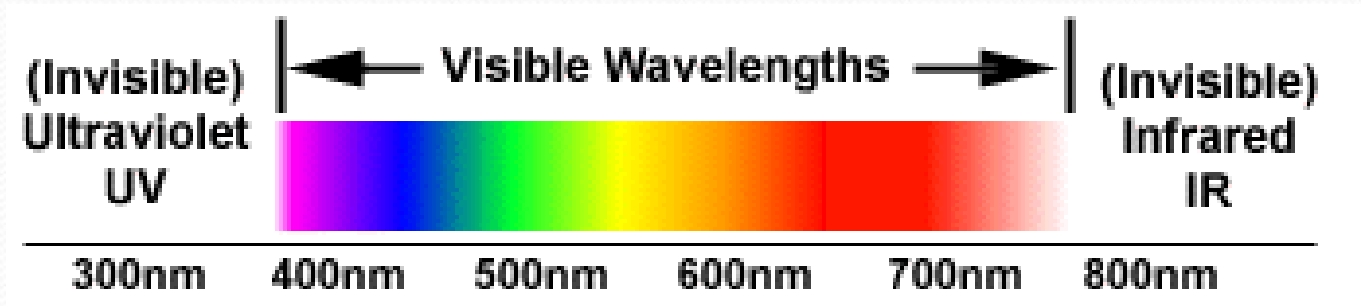









正立螢光顯微鏡



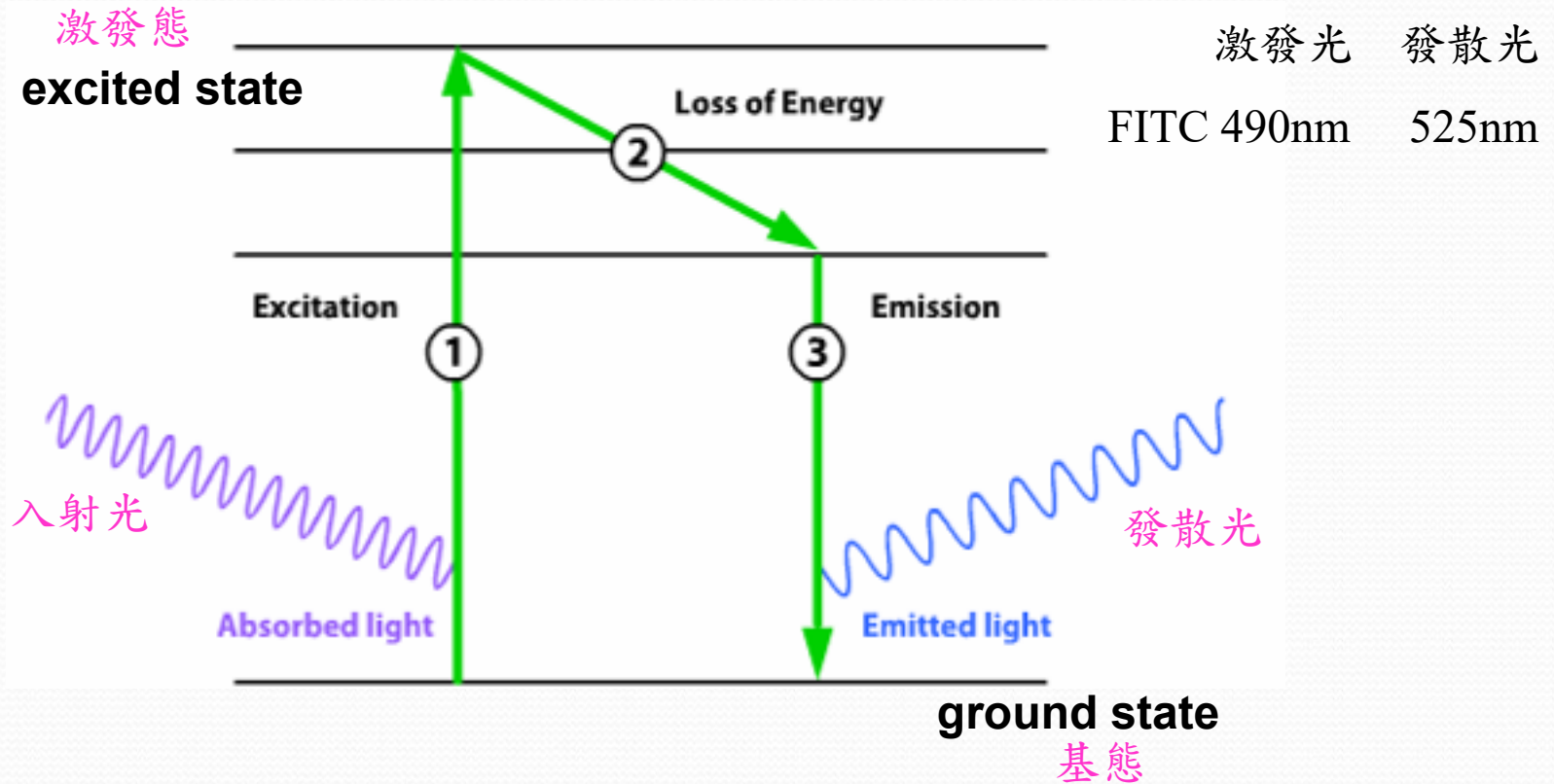
反射光(螢光、雷射光)路徑

螢光顯微鏡基本概念



Wavelength in color		
1. 340 - 400 nm	near Ultraviolet (UV) - Invisible	
2. 400 - 430 nm	Violet	
3. 430 - 500 nm	Blue	
4. 500 - 560 nm	Green	
5. 560 - 620 nm	Yellow to Orange	
6. 620 - 700 nm	Orange to Red	
7. Over 700 nm	near Infrared (IR) - Invisible	

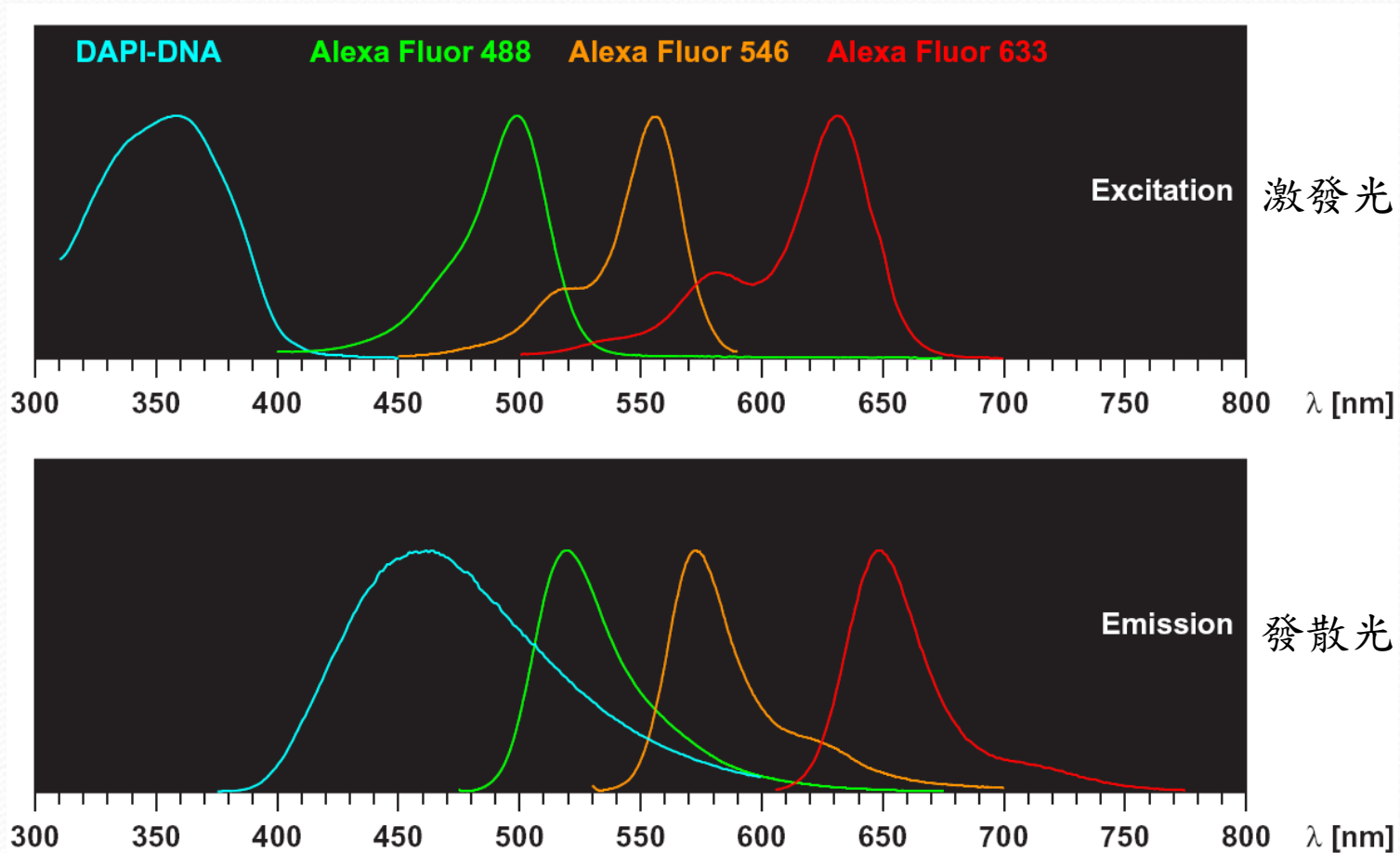
螢光顯微鏡基本概念



螢光顯微鏡基本概念

Fluorescence

Fluorochrome excitation and detection of fluorescence



植物顯微技術

1. 顯微鏡系統

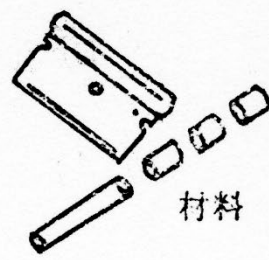
2. 組織切片：1) 整體包埋；2) 徒手切片；3) 石蠟包埋切片
4) 塑膠包埋切片；5) 冷凍切片

3. 應用：1) 組織化學 (histochemistry)
2) 免疫組織化學 (immuno-histochemistry)
3) 原位雜交 (*In situ* hybridization)
4) 自動放射顯影 (autoradiography)

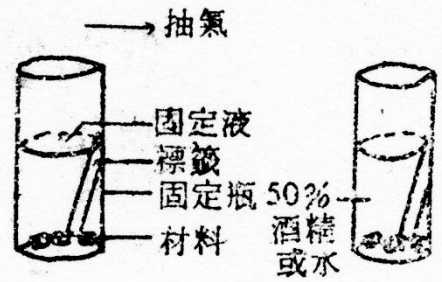
4. 染色體觀察

固定材料至埋蠟的過程

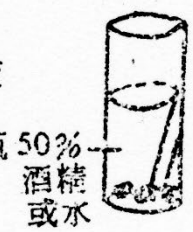
(一) 將材料切成適當大小



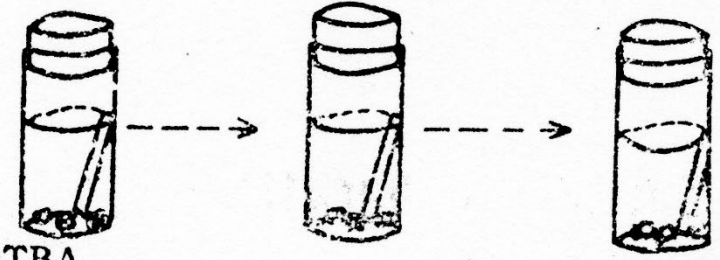
(二) 固定



(三) 沖洗



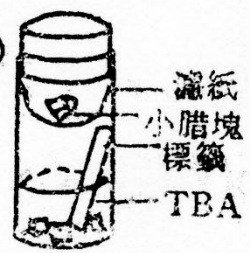
(四) 脫水



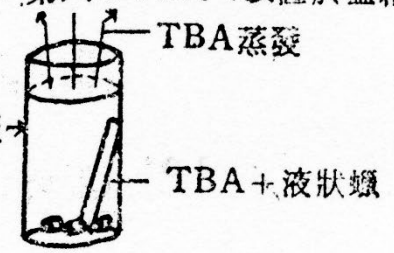
第一步 TBA

第六步 TBA (放置於溫箱上)

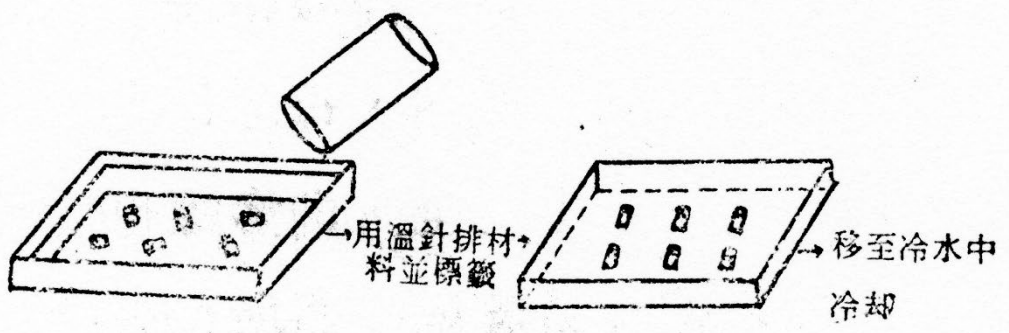
(五) 浸蠟
(於 60°C 溫箱內)



加三至五次 - 打開瓶蓋

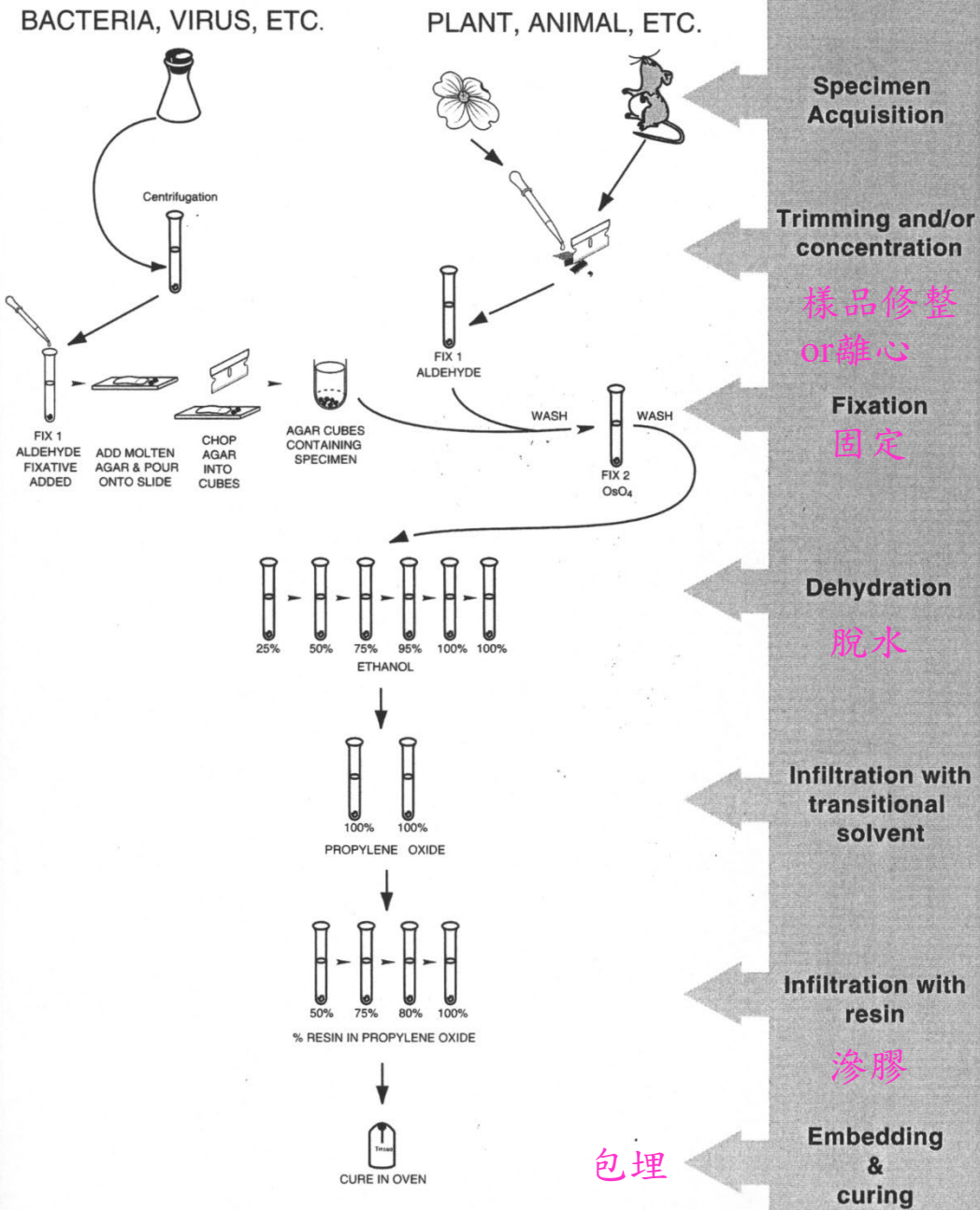


(六) 埋蠟



節錄自植物組織切片技術綱要，蔡淑華 1988

TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPY SPECIMEN PREPARATION



穿透式電子顯微鏡
樣品處理程序

節錄自Bozzola和Russell所寫
Electron Microscopy 2nd E.



埋蠟切片機



冷凍切片機

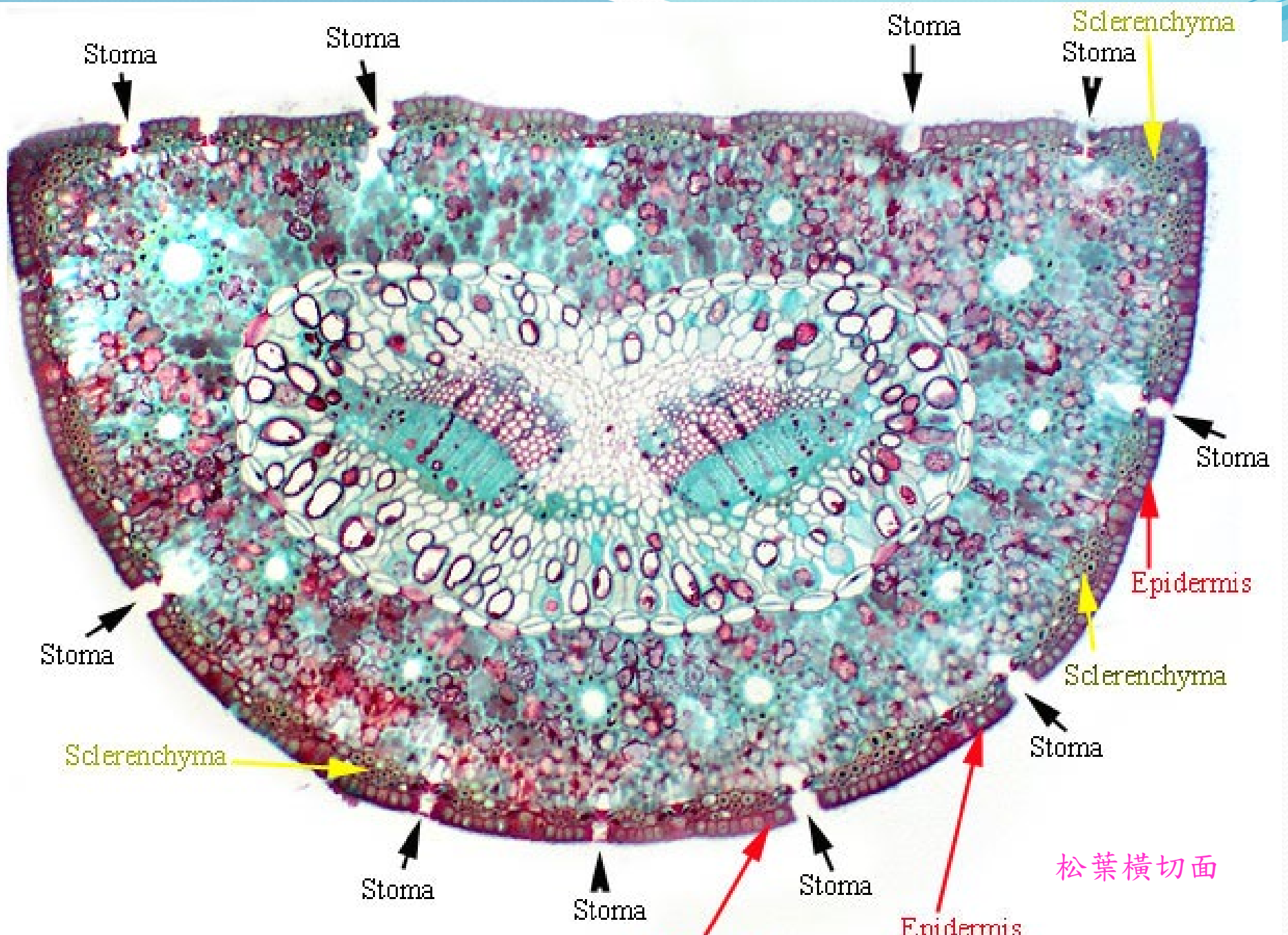


超薄切片機

植物組織切片染色(埋蠟切片)

1. 二甲苯 (xylene) (溶蠟)
2. 二甲苯：酒精=1：1
3. 100%酒精 → 95%酒精 → 85%酒精 → 70%酒精 → 50%酒精 → 30%酒精 → 蒸餾水
4. 0.5% Delafield's hematoxylin → 蒸餾水沖洗
5. 蒸餾水 → 30%酒精 → 50%酒精 → 0.5% Safranin O/ 50%酒精
6. 70%酒精 → 85%酒精 → 95%酒精 → 1% Fast-green/ 95%酒精
7. 100%酒精 → 二甲苯：酒精=1：1 → 二甲苯 → 封片

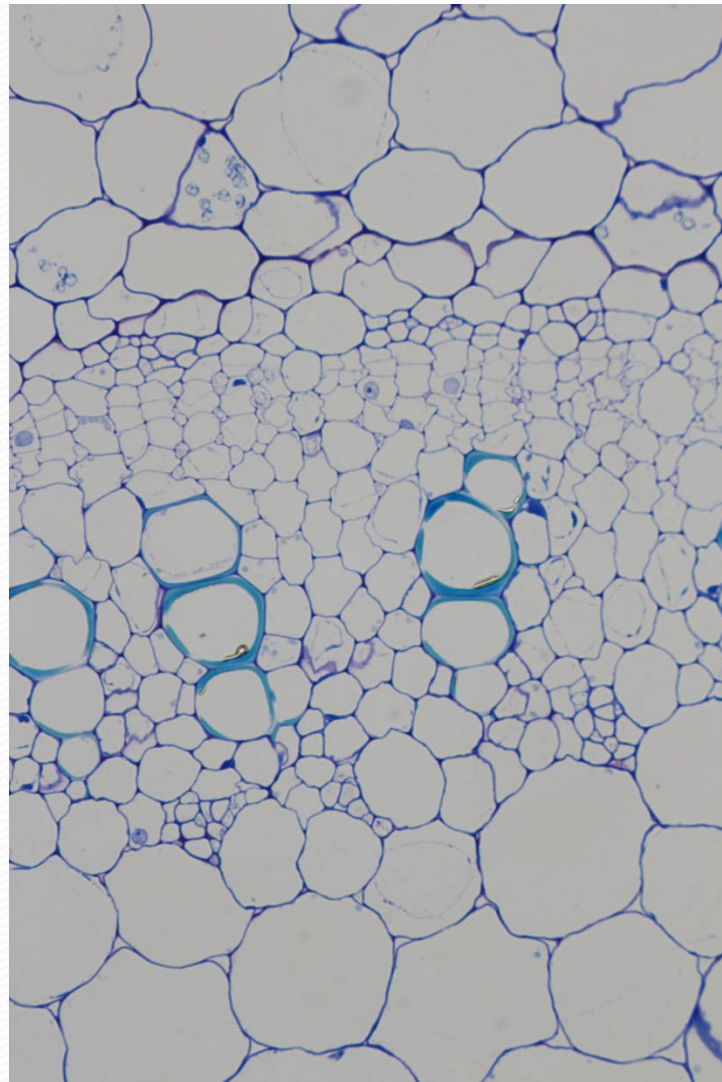
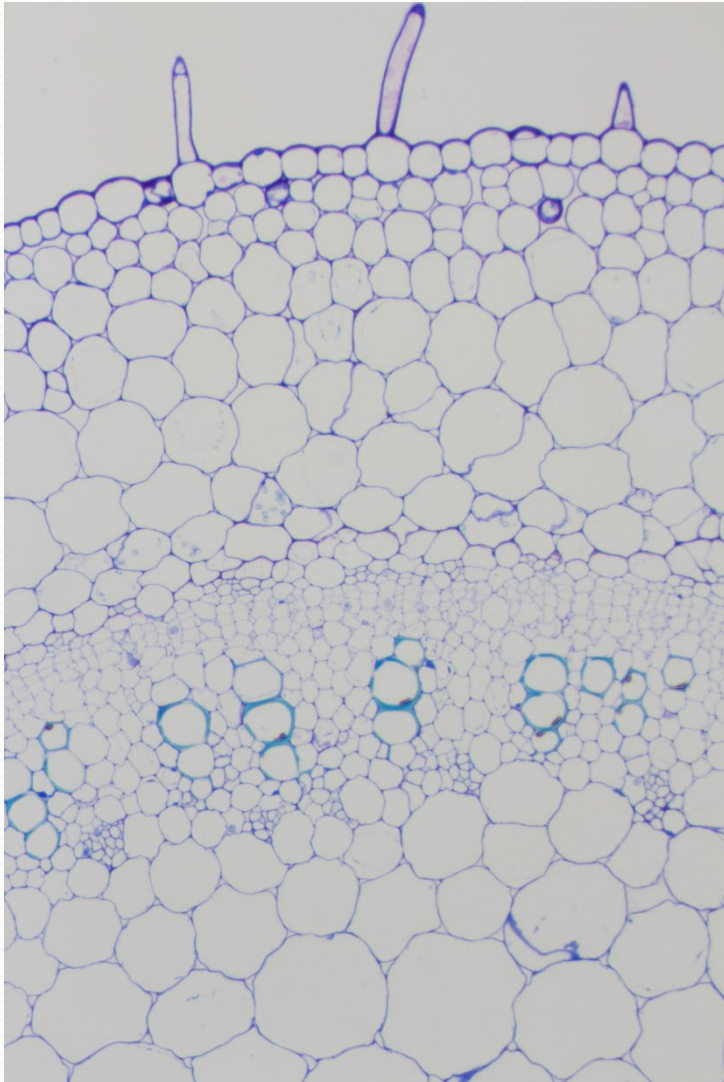
ps. Safranin O為鹼性染劑，可將木質、染色體、核仁、角皮質等染上紅色；Fast-green為酸性染劑，可染細胞內其他部分為綠色；hematoxylin染色，細胞質、初生細胞壁呈灰色，細胞核、核仁、染色體、粒線體、色素體可染成深藍至深紫色。



松葉橫切面

植物組織切片染色(埋膠切片)

1% Toluidine Blue O (甲苯基藍)/1% Na Borex 60°C 1分鐘



菸草莖
橫切面

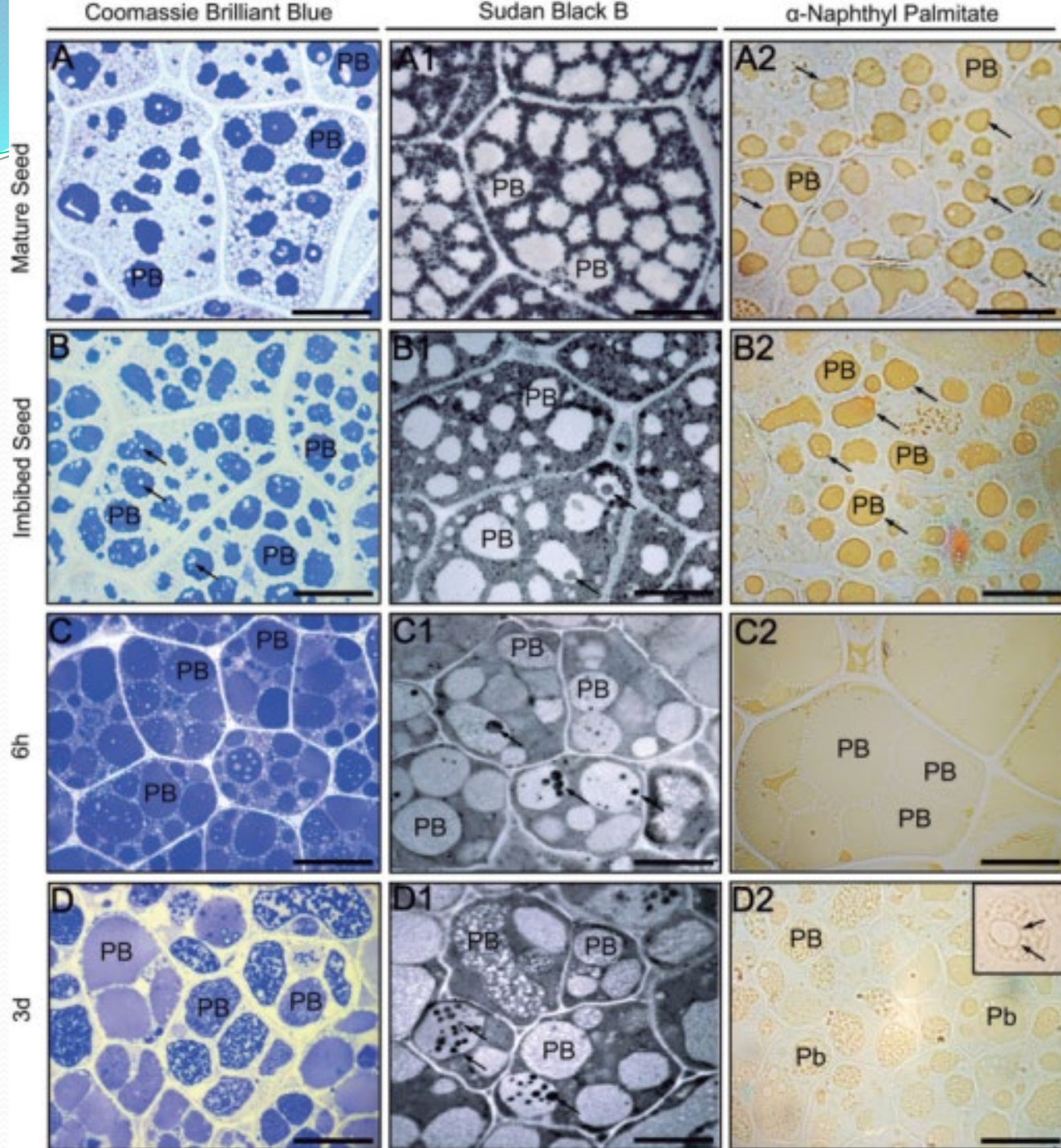
植物顯微技術

1. 顯微鏡系統

2. 組織切片：1) 整體包埋；2) 徒手切片；3) 石蠟包埋切片
4) 塑膠包埋切片；5) 冷凍切片

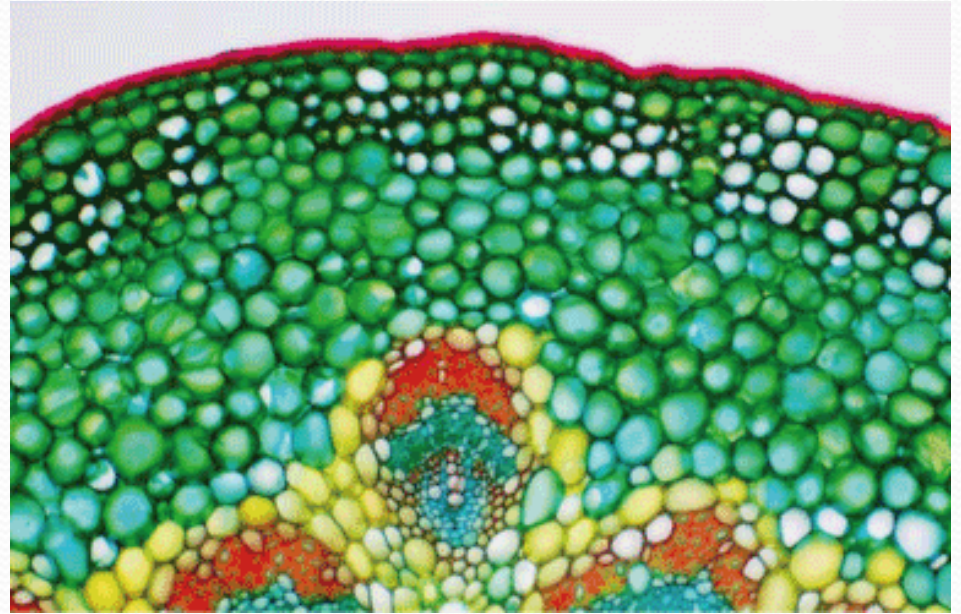
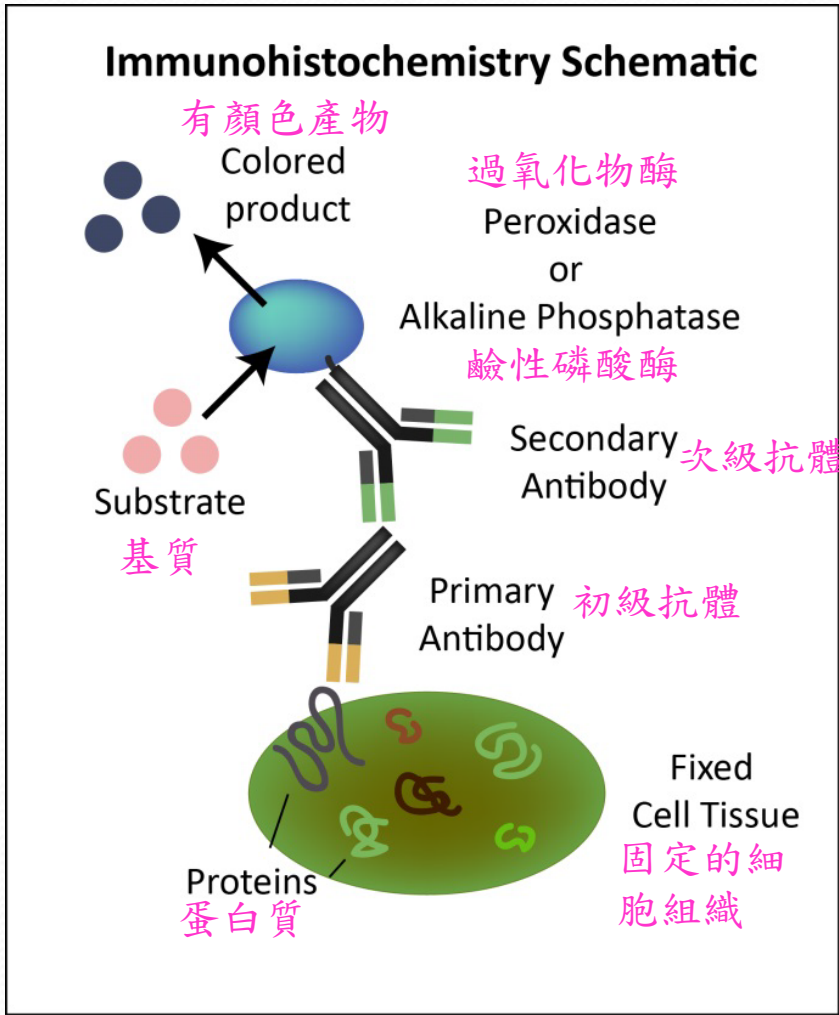
3. 應用：1) 組織化學 (histochemistry)
2) 免疫組織化學 (immuno-histochemistry)
3) 原位雜交 (*In situ* hybridization)
4) 自動放射顯影 (autoradiography)

4. 染色體觀察



CBB: protein (蛋白質)
 SBB: lipid (脂質)
 NP: lipase activity
 (脂肪酶活性)

免疫組織化學原理圖



節錄自 biosizebio.com

植物顯微技術

1. 顯微鏡系統

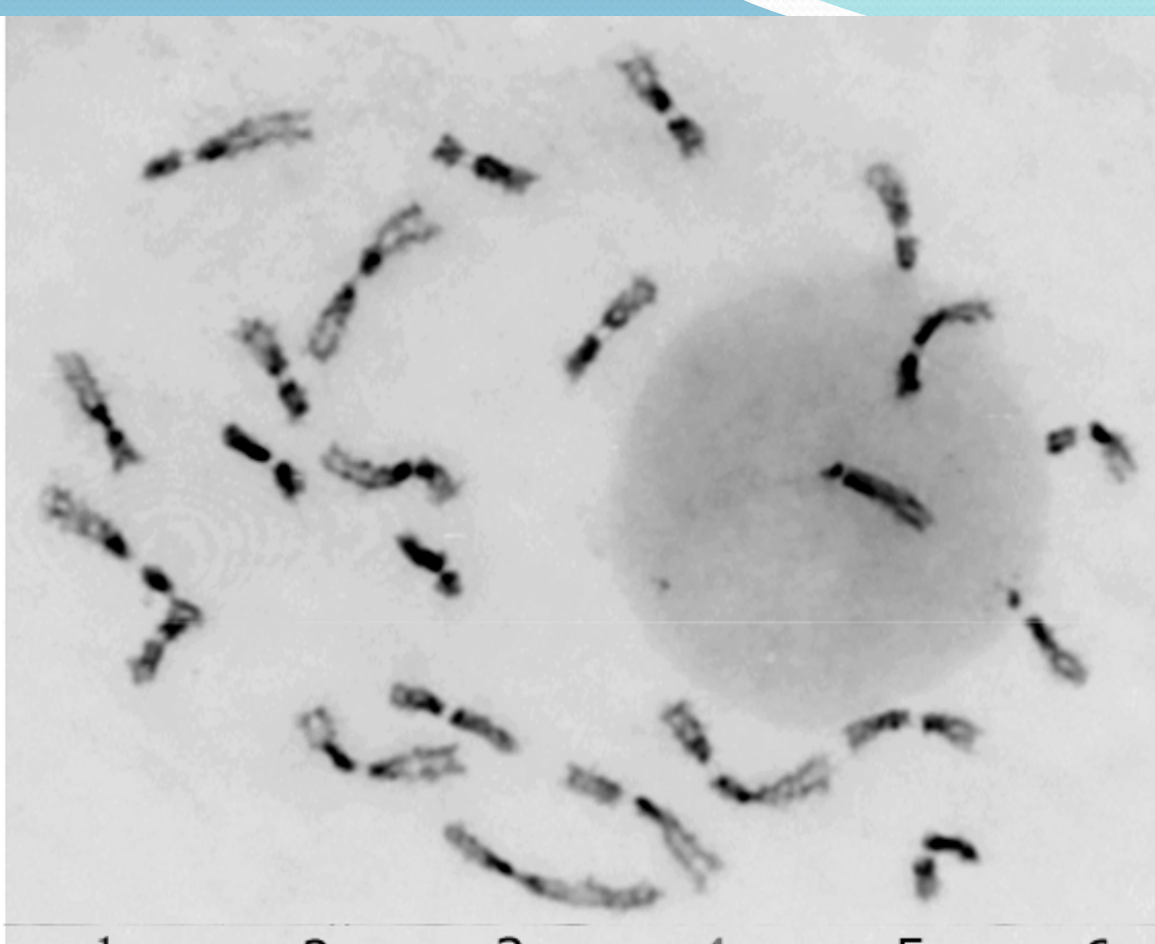
2. 組織切片：1) 整體包埋；2) 徒手切片；3) 石蠟包埋切片
4) 塑膠包埋切片；5) 冷凍切片

3. 應用：1) 組織化學 (histochemistry)
2) 免疫組織化學 (immuno-histochemistry)
3) 原位雜交 (*In situ* hybridization)
4) 自動放射顯影 (autoradiography)

4. 染色體觀察

處理流程：

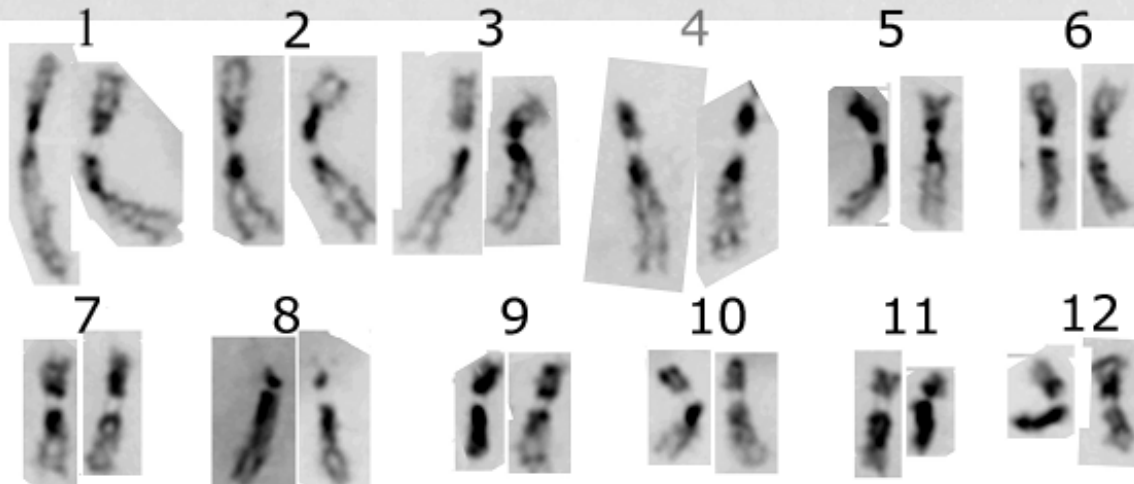
1. 取植物生長旺盛的組織 (eg.根尖)
2. 固定 (酒精：醋酸=1:1)
3. 軟化組織 (68°C鹽酸煮10分鐘or酵素處理)
4. 壓片
5. 染色 (醋酸洋紅 or DAPI)
6. 顯微鏡觀察



- 在水稻根尖生長點細胞分裂的中期可以觀察到24條染色體 ($2n=24$)

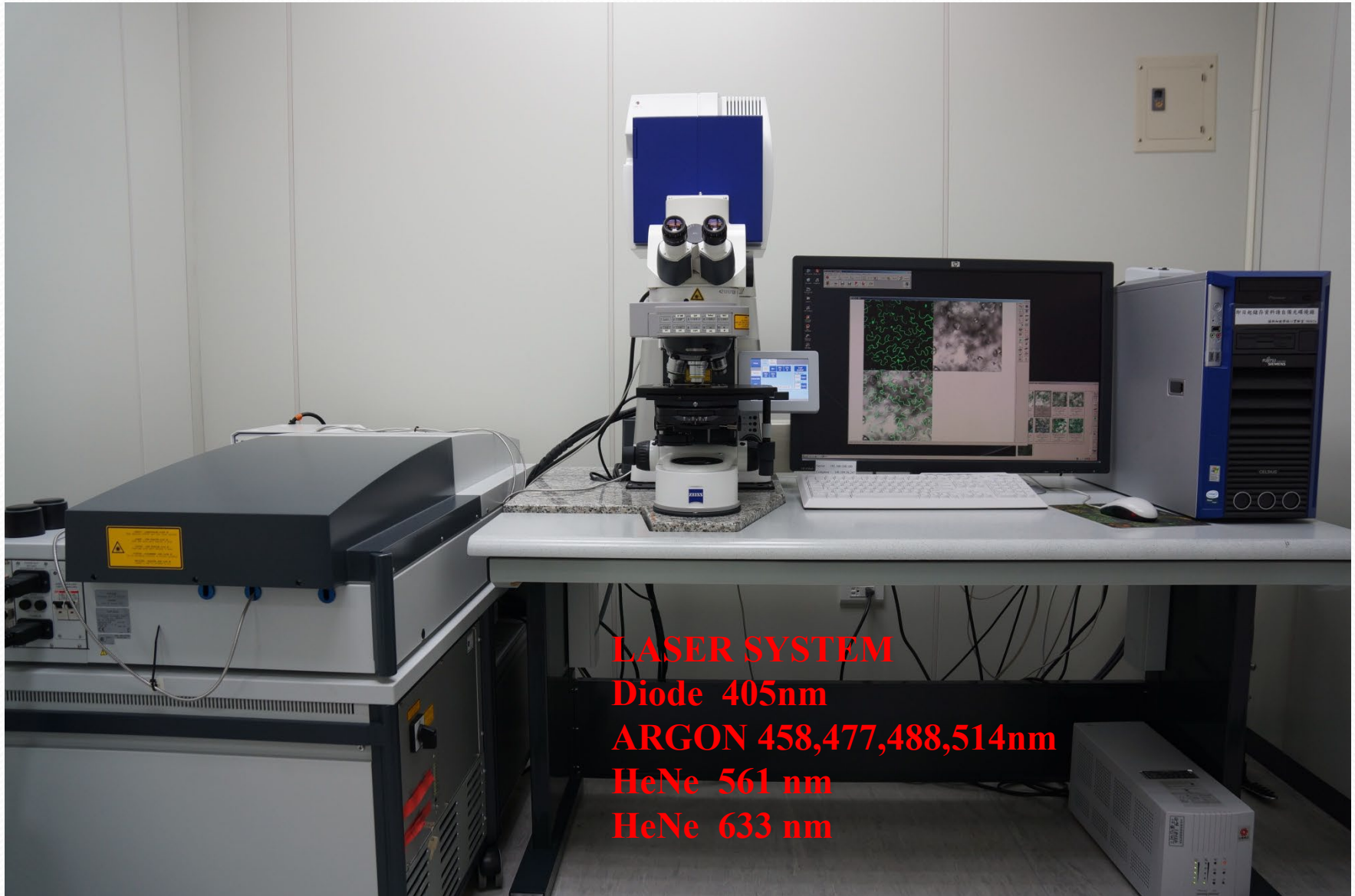
- 依照染色體的形態及長度可以排出水稻染色體的核型(karyotype)

- 12對染色體由長而短排列以編號命名



雷射共軛焦掃描顯微鏡

Laser Confocal Scanning Microscope



LASER SYSTEM

Diode 405nm

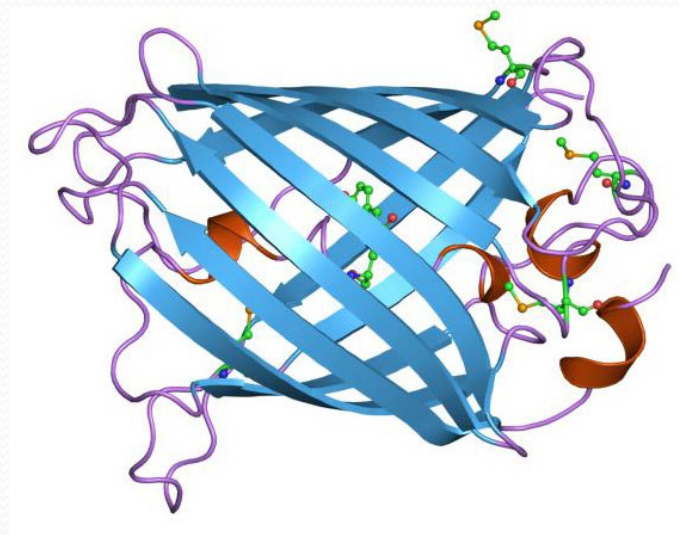
ARGON 458,477,488,514nm

HeNe 561 nm

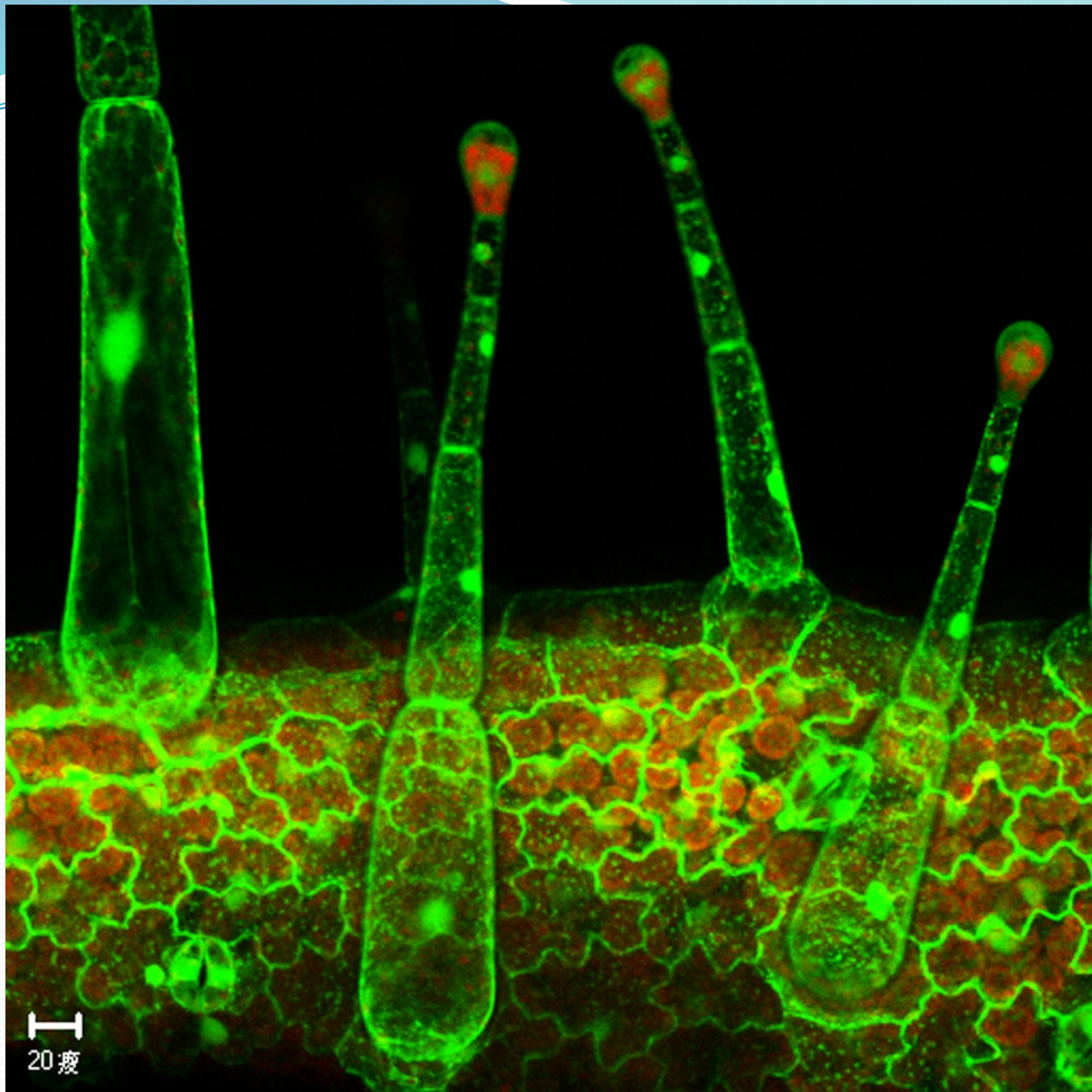
HeNe 633 nm

綠色螢光蛋白(Green fluorescent protein, GFP)

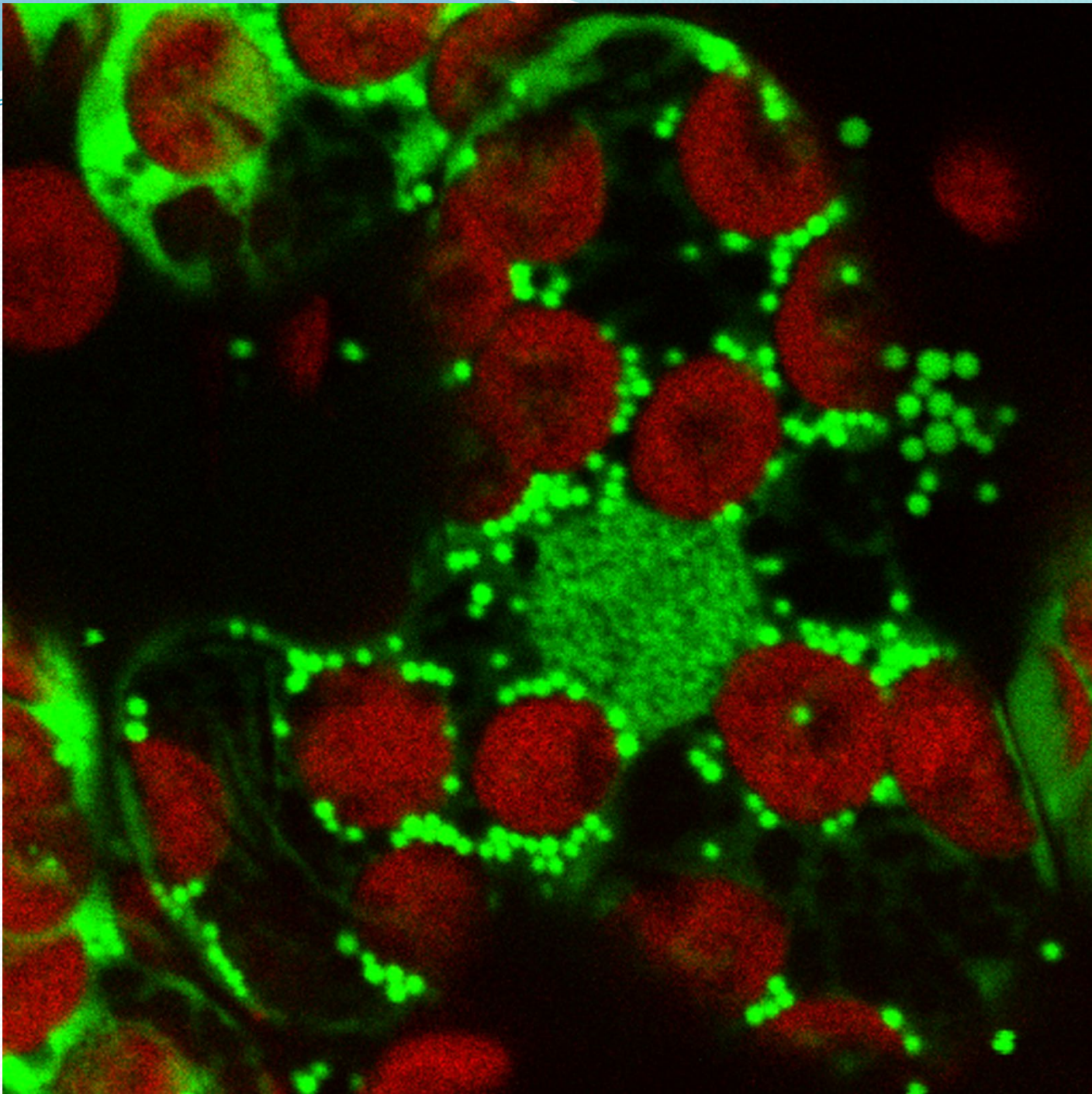
- 來自於維多利亞多管發光水母
- 238個胺基酸組成的蛋白
- 在藍色到紫外線波長範圍的光線激發下，會發出綠色螢光
- 下村脩於1962年發現



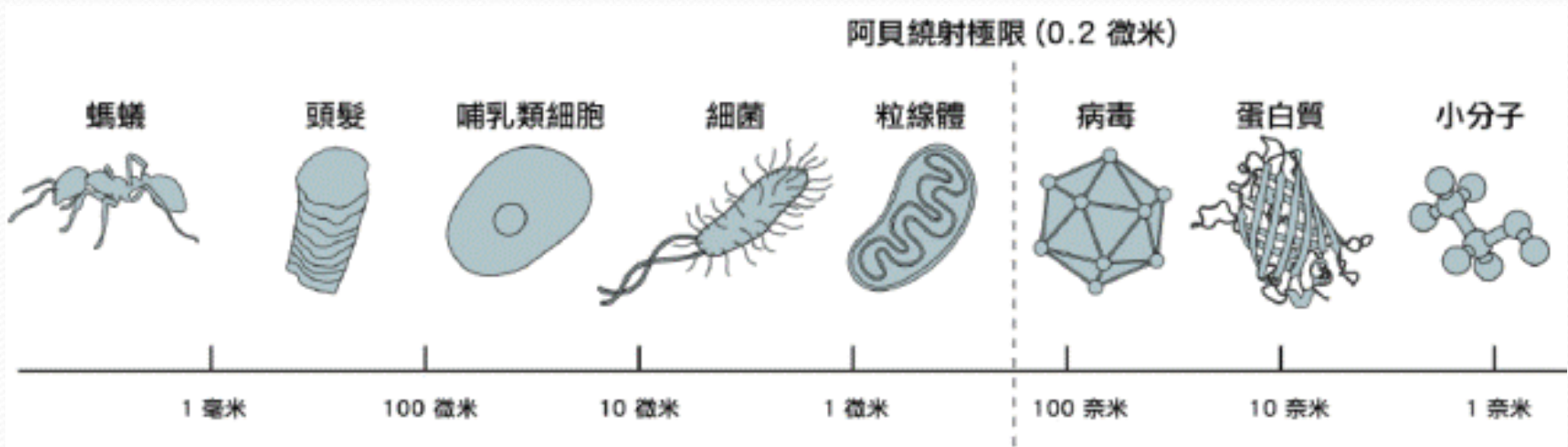
- 2008年諾貝爾化學獎：發現和改造綠色螢光蛋白
日本下村脩、美國馬丁·查爾菲和錢永健



菸草葉表面
之茸毛



菸草之葉肉
細胞



阿貝(Abbe)方程式 繞射極限
 解析度(R)= $0.61\lambda / NA (n\sin\theta)$

λ : 入射光波長

n: 環境折射率

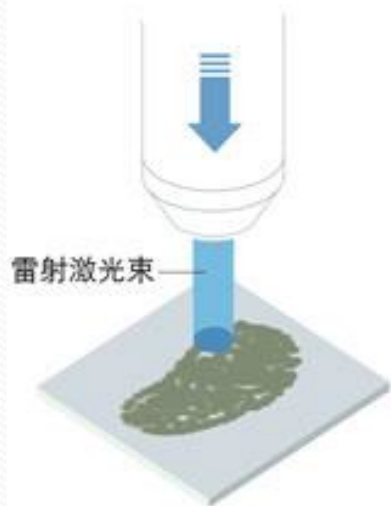
θ : 物鏡最大收光角度的一半

2014年的諾貝爾化學獎

- 艾瑞克·貝齊格(Eric Betzig)
藉著影像的重疊超越阿貝繞射極限
- 史蒂芬·海爾(Stefan W. Hell)
受激放射消去法(stimulated emission depletion, STED)
- 威廉·莫納(William E. Moerner)
首先觀測到單一的螢光分子

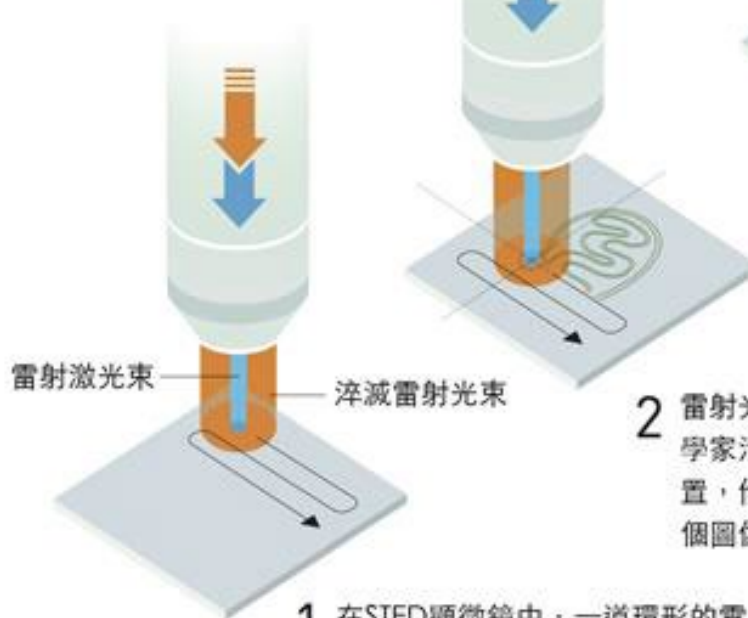
STED顯微鏡術的原理

尋常的光學顯微鏡



在尋常的光學顯微鏡中，可以辨別一個粒線體的輪廓，但其解析度卻永遠無法好過0.2微米

STED顯微鏡

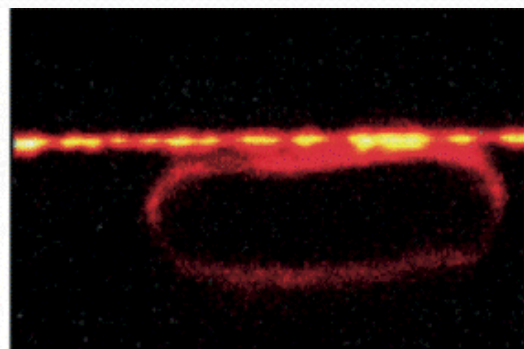
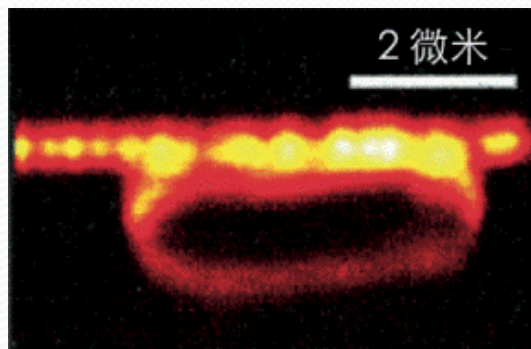


1 在STED顯微鏡中，一道環形的雷射光束，淬滅了一個奈米尺度大小的體積之外之所有螢光。

2 雷射光束掃瞄過整個樣品，因為科學家清楚的知道雷射光束照射的位置，他們可以利用這個資訊，對這個圖像取得更高的解析度。

3 最後取得之圖像，其解析度可以好過0.2微米。

轉載自台大化學網站

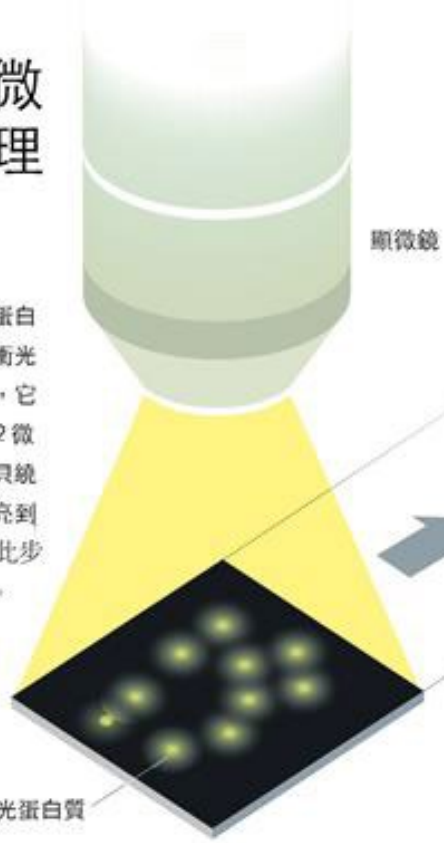


Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:8206-8210, 2000

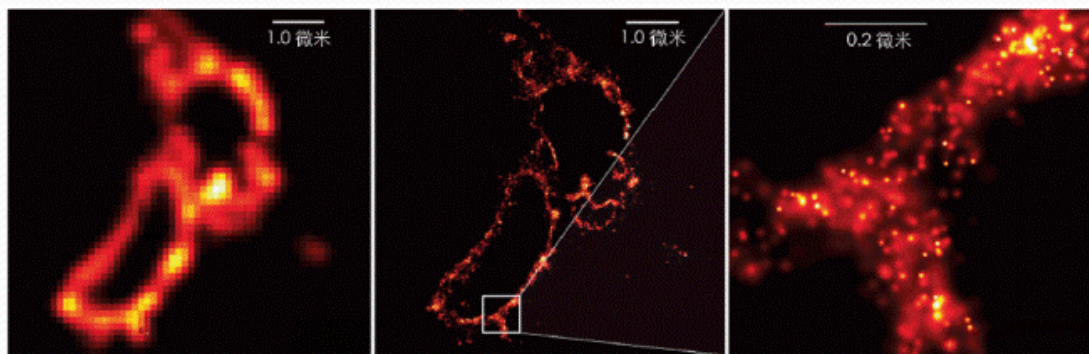
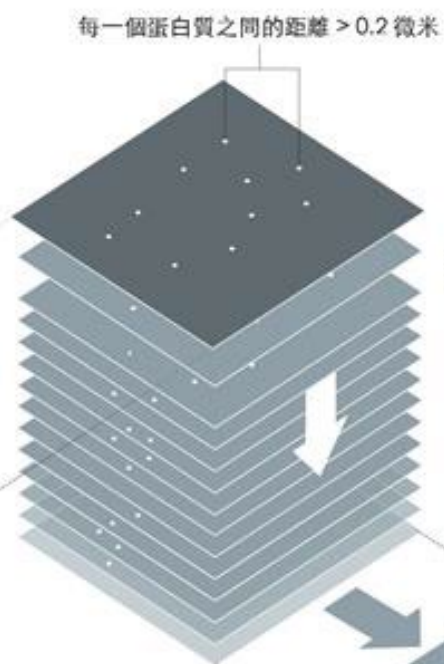
圖四

單分子顯微鏡術的原理

1 對一群都能放螢光的蛋白質，以一個微弱的脈衝光活化了其中的一部份，它們之間的距離大於 0.2 微米，也就是所謂的阿貝繞射極限，等它們一直亮到淬滅為止，此時重複此步驟讓另一部份發光。



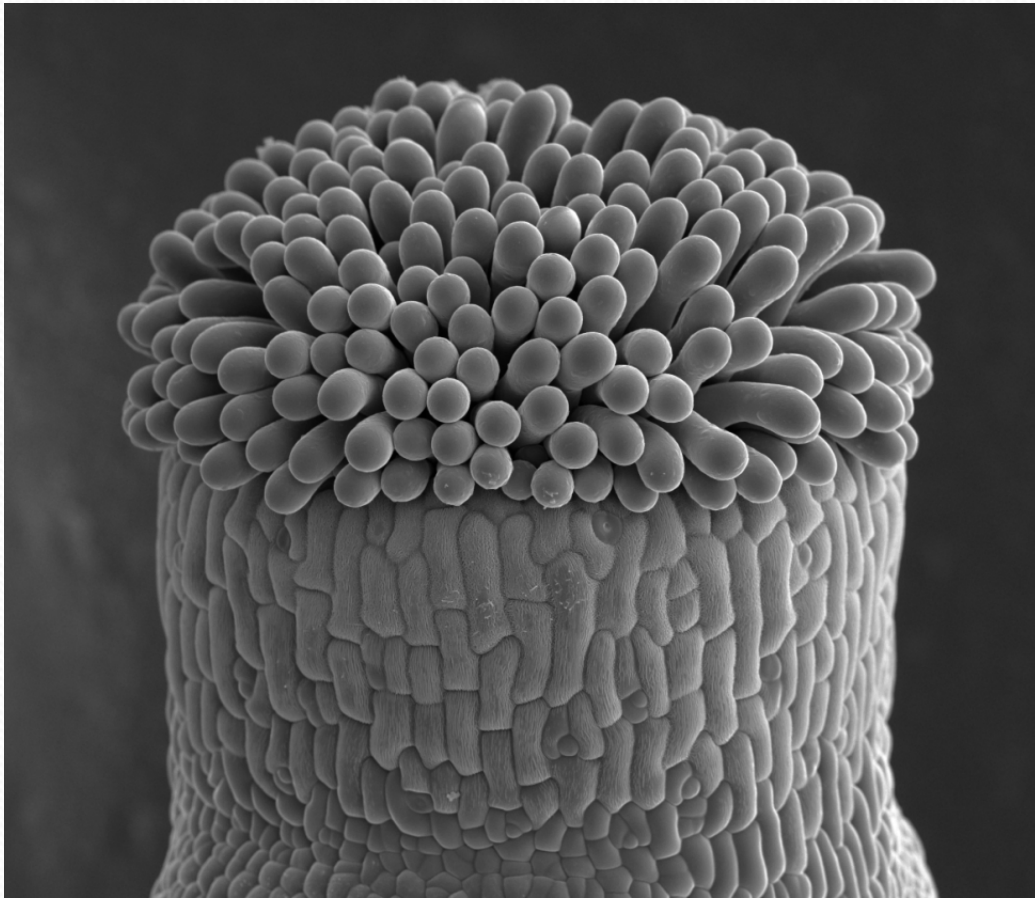
2 模糊的影像利用機率理論重新處理，好讓圖像更為清晰。



轉載自台大化學網站

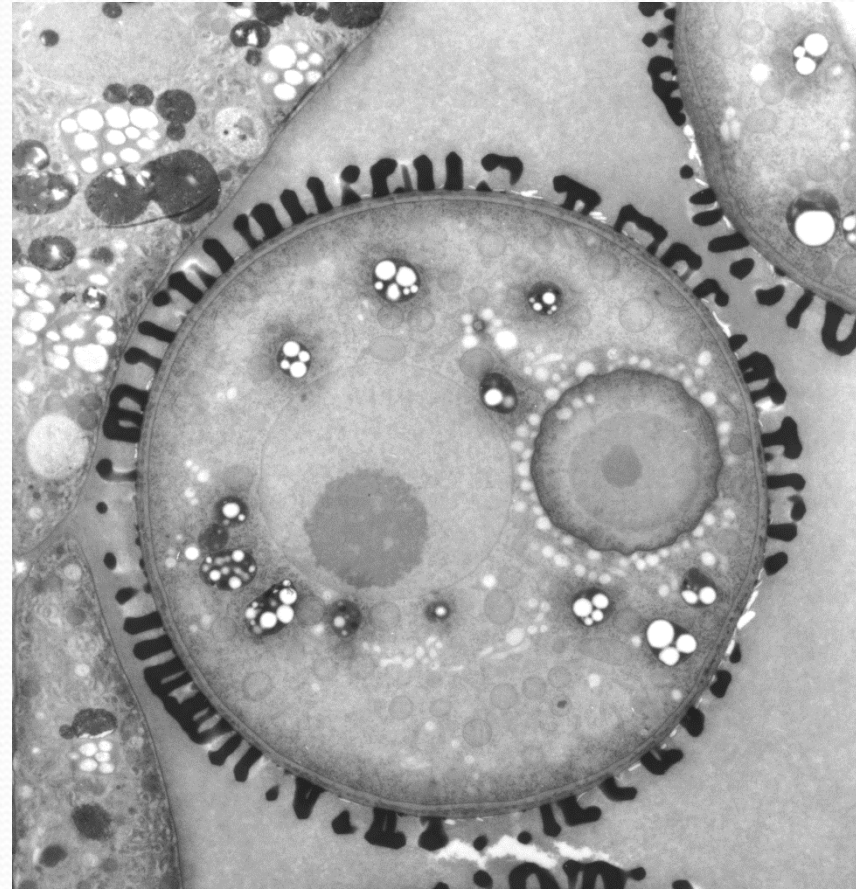
Science 313:1642-1645, 2006

掃描式電子顯微鏡 外部形態



阿拉伯芥年輕的雌蕊

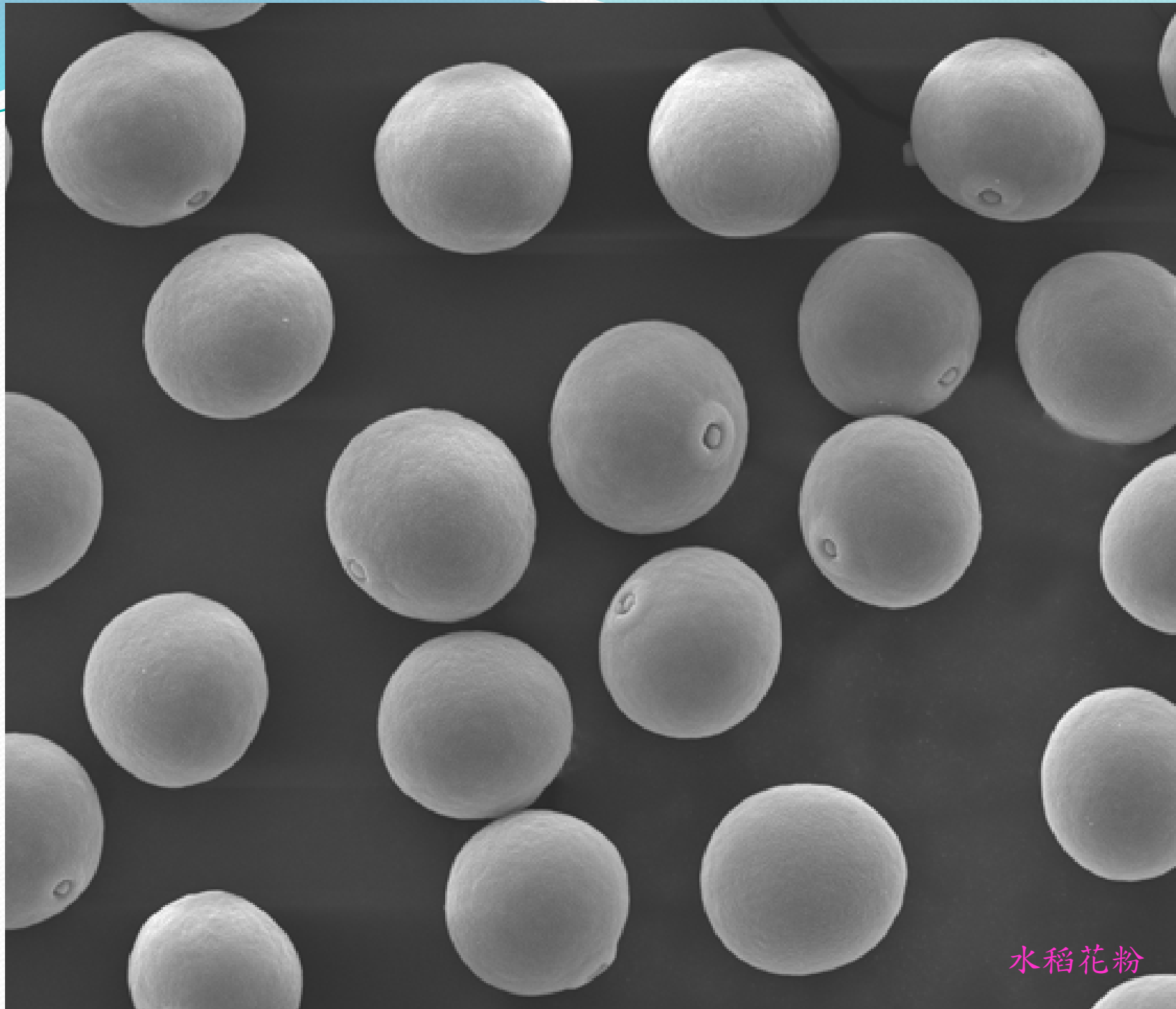
穿透式電子顯微鏡 內部構造



阿拉伯芥雙細胞花粉

掃描式電子顯微鏡 (Scanning Electron Microscope, SEM)



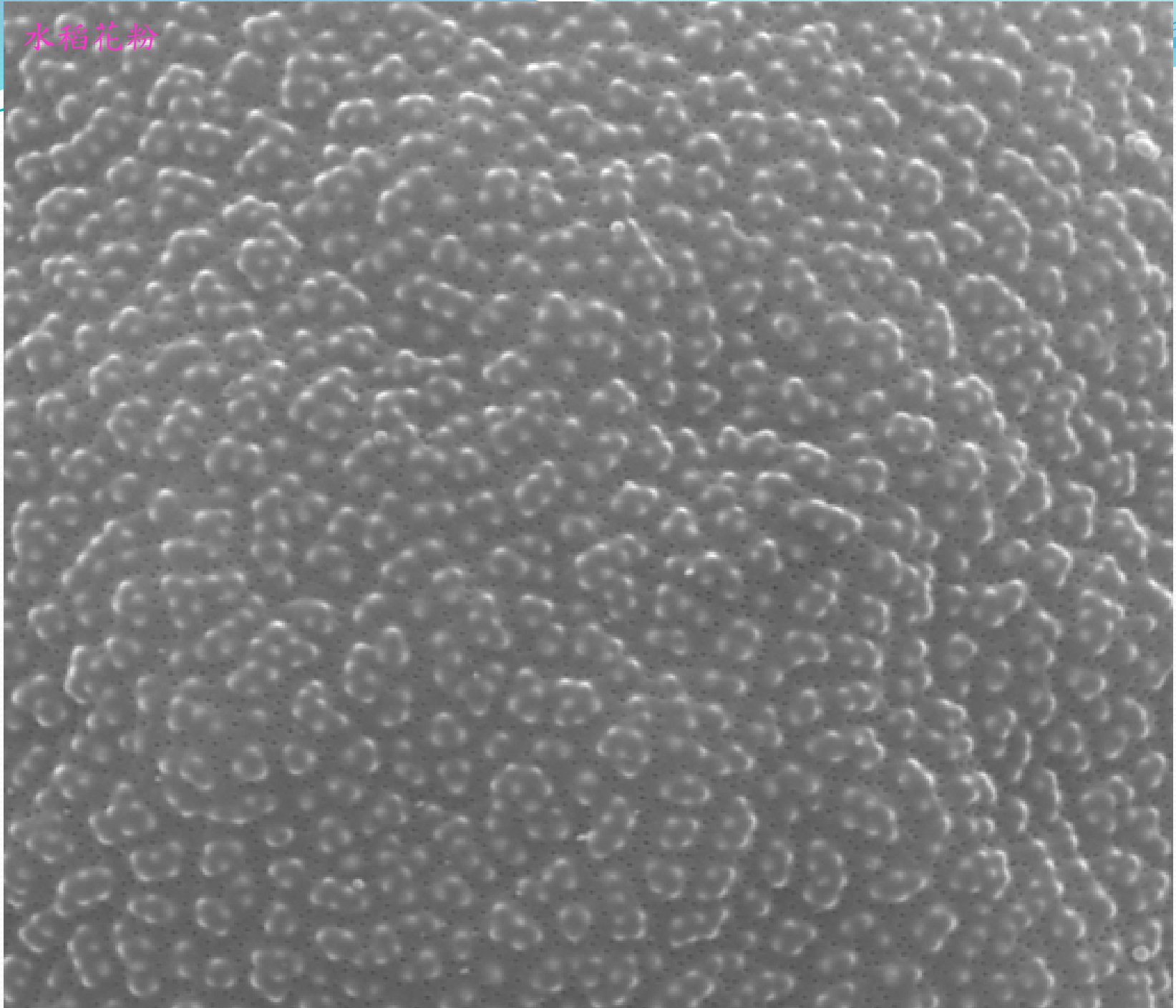


水稻花粉

水稻花粉



水稻花粉





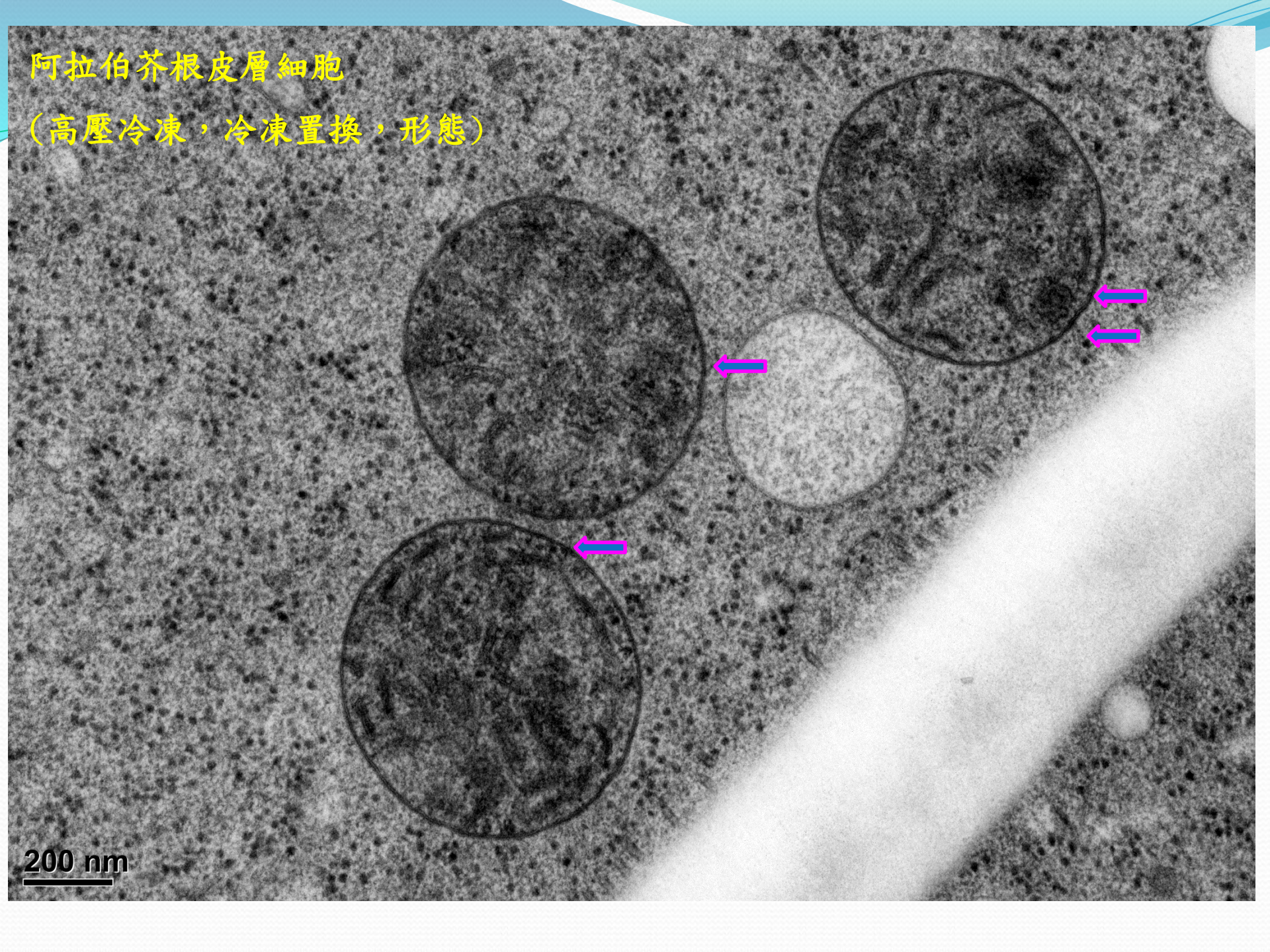
穿透式電子顯微鏡
Transmission Electron
Microscope (TEM)

穿透式電子顯微鏡相關技術

- 1.Ultrathin sectioning (超薄切片)
- 2.Negative staining (負染色)
- 3.Shadow casting (金屬投影)
- 4 Freeze etching (冷凍蝕刻)
- 5.Freeze substitution (冷凍置換)
- 6.Immunolabeling (免疫定位)

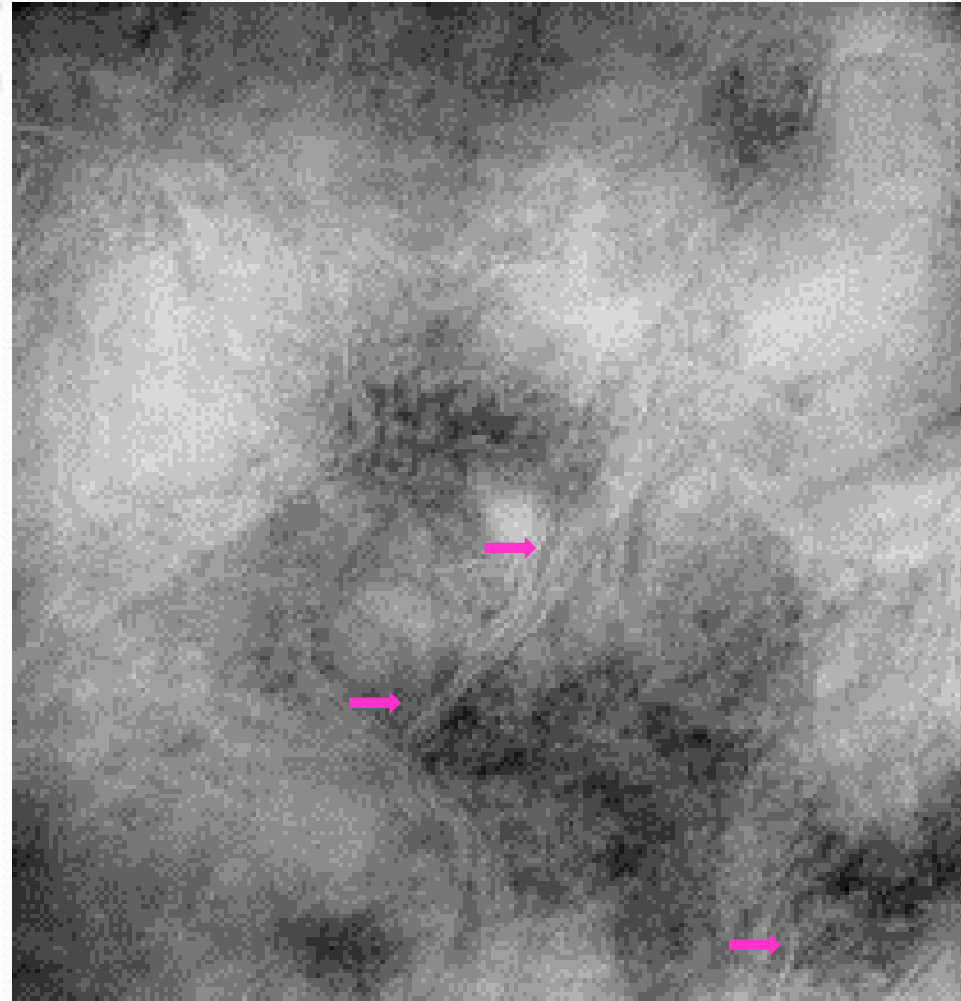
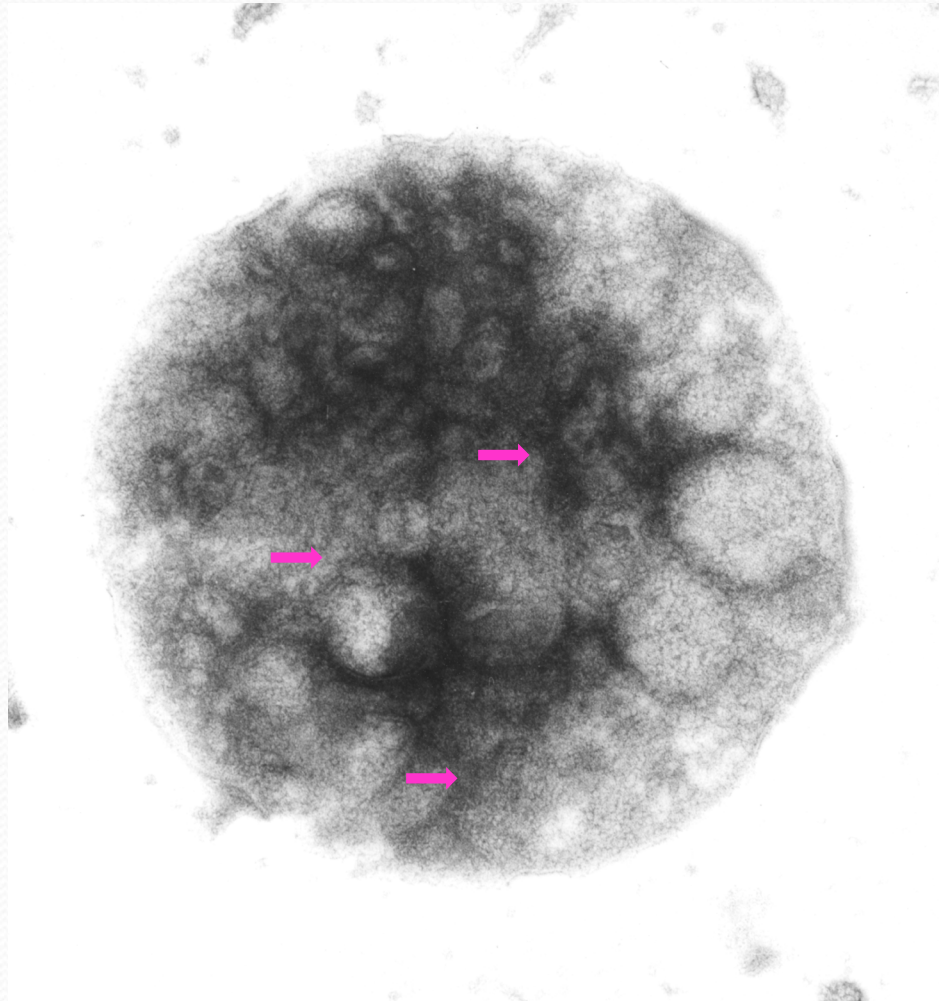
阿拉伯芥根皮層細胞

(高壓冷凍，冷凍置換，形態)



200 nm

綠豆白化苗分離粒線體



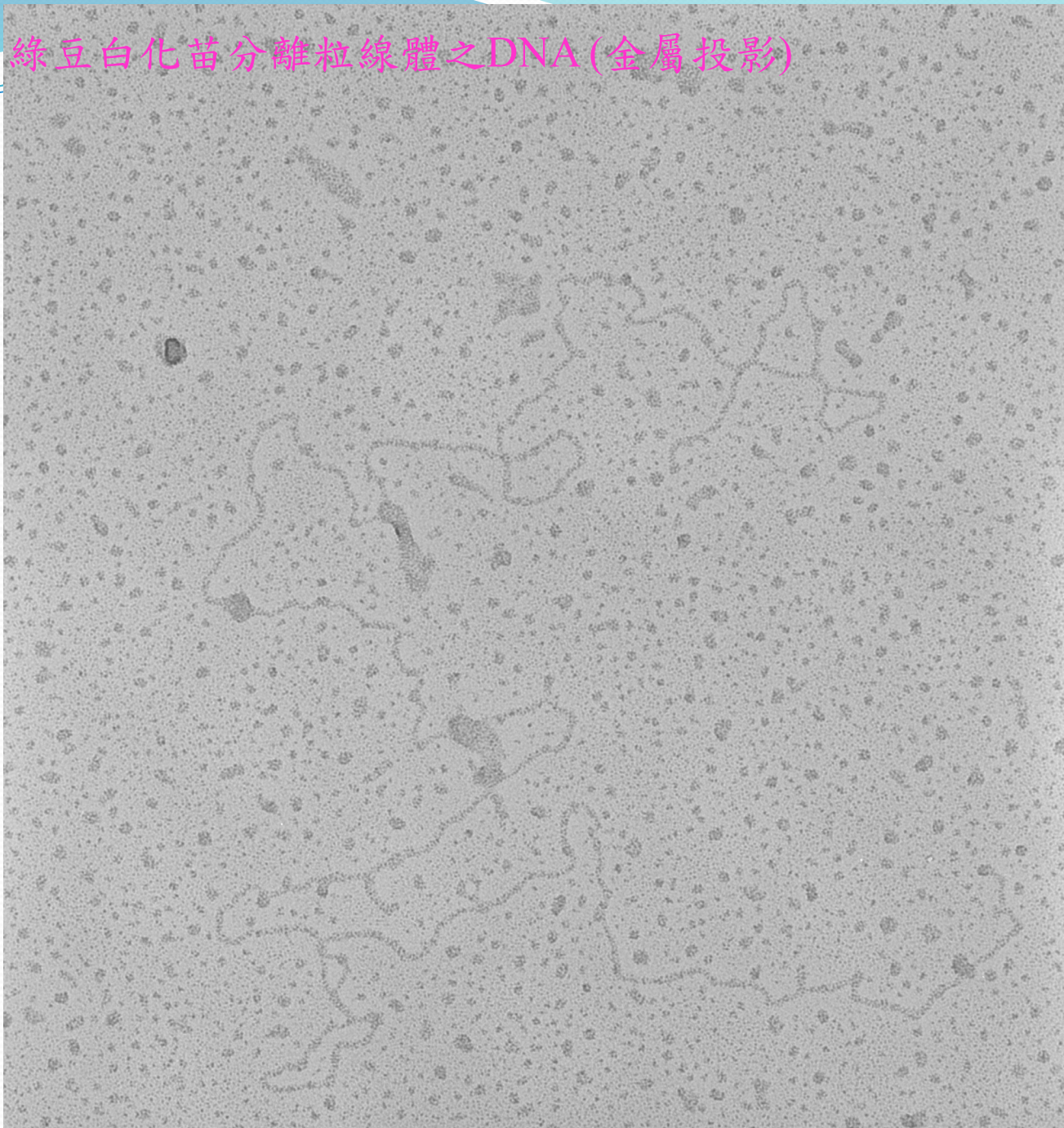
負染色 (negative staining)

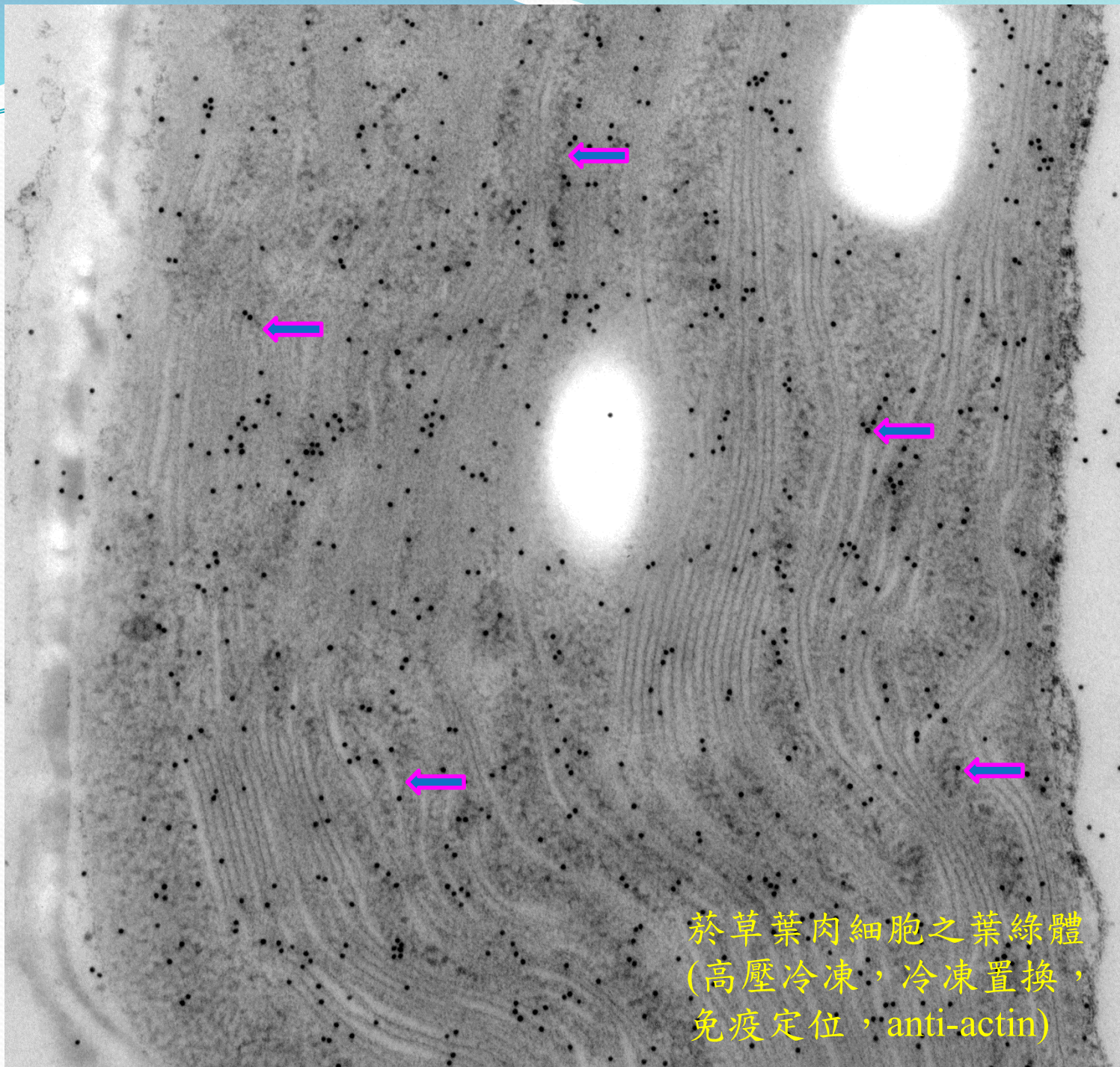
綠豆白化苗分離粒線體



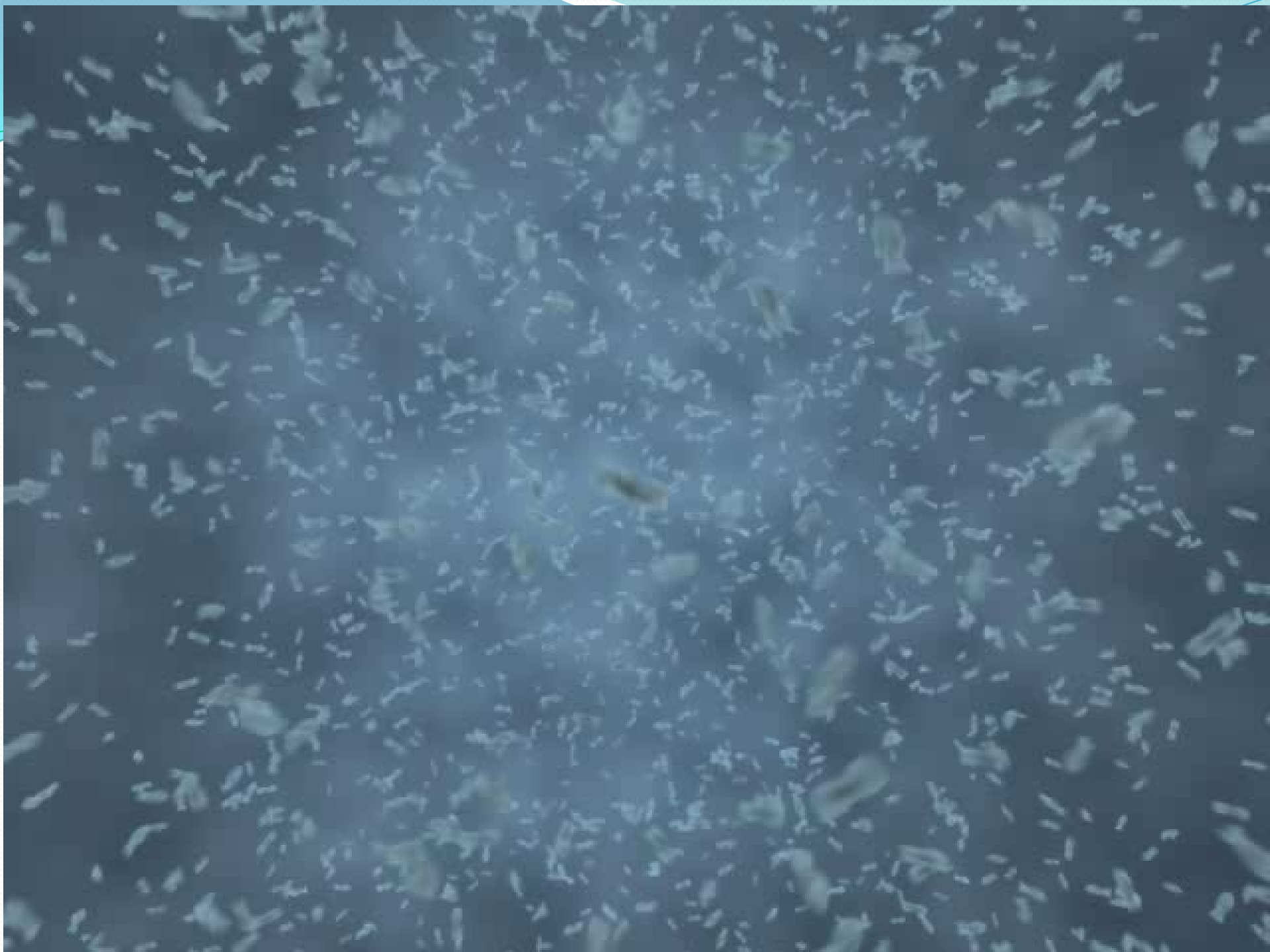
冷凍蝕刻 (freeze etching)

綠豆白化苗分離粒線體之DNA (金屬投影)





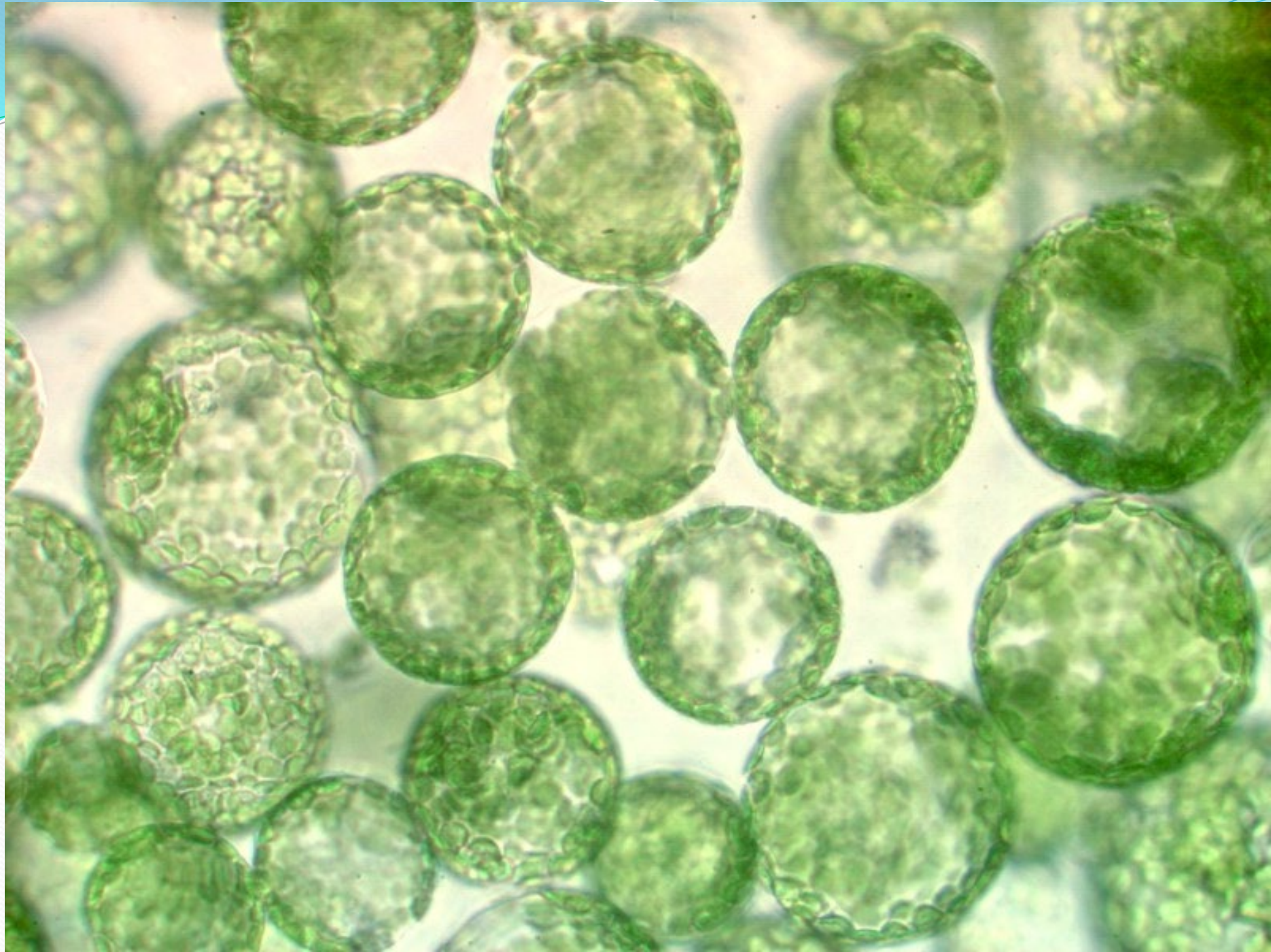
菸草葉肉細胞之葉綠體
(高壓冷凍，冷凍置換，
免疫定位，anti-actin)



原生質體(protoplast)分離

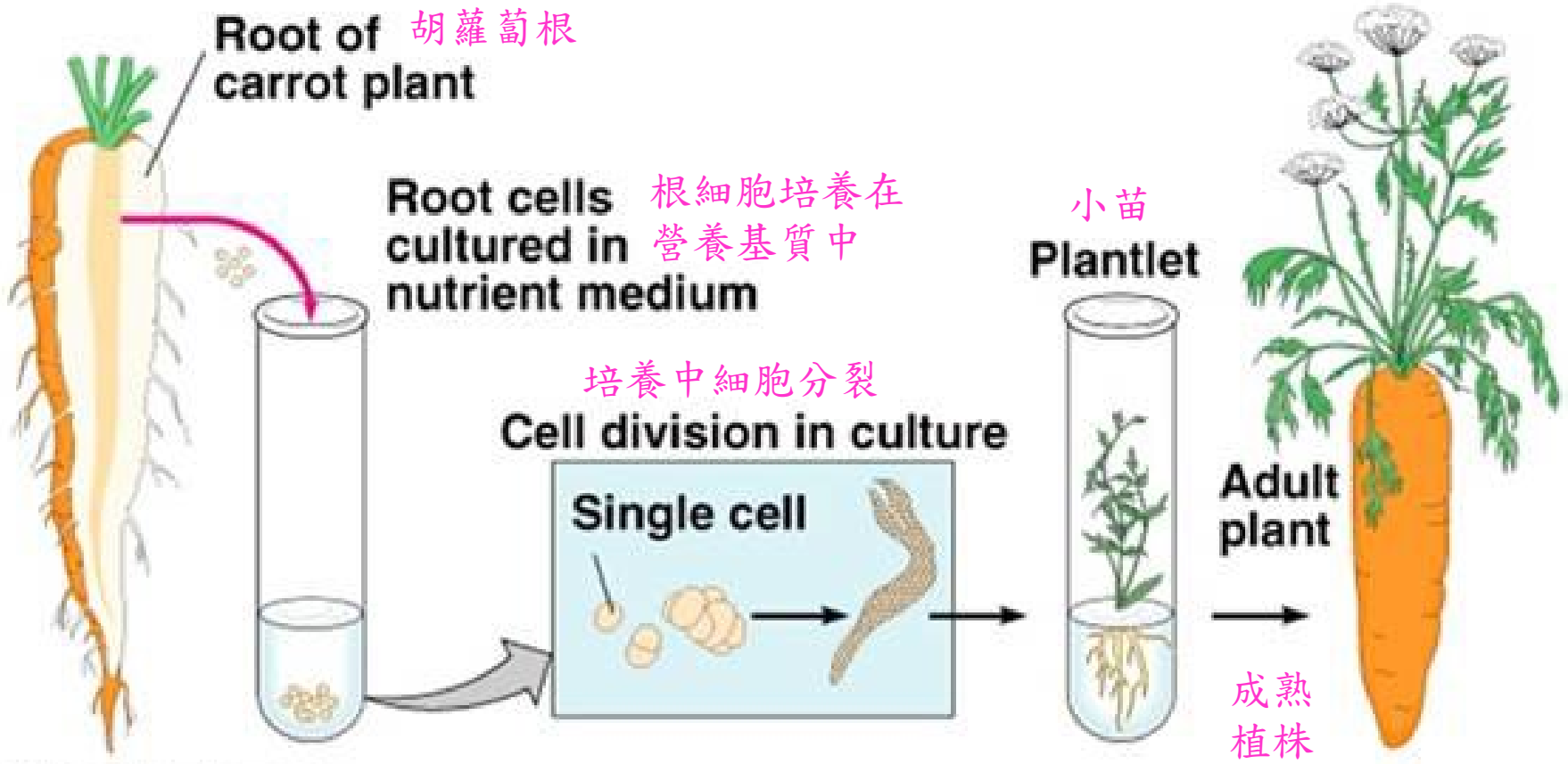
1. 葉片（菠菜 or 菸草）洗淨
2. 將葉片切成一公分平方大小，置入培養皿中
3. 慢慢加入10ml的酵素液
4. 以封口膜封住培養皿，放在室溫下一天
5. 以吸管吸取少許綠色溶液，顯微鏡下觀察
6. 滅菌過的棉布或是尼龍網過濾至離心管
7. 離心（75g, 2min），取懸浮液

酵素液：1%軟化酵素(macerase)+2%纖維酵素(cellulysin)/0.625M 甘露糖醇(mannitol)



植物細胞培養(Plant Cell Culture)

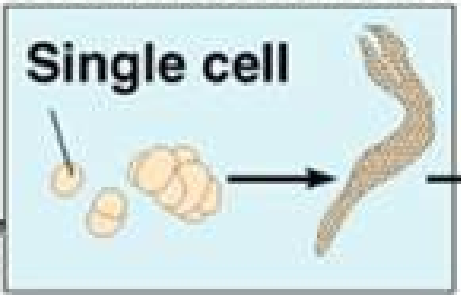
- 以植物組織細胞為單位，在離體的條件下，於適當的培養基與無菌環境，進行培養、分化或生產有用物質。
- 培養基組成：無機鹽類、碳源、生長調節劑等。
- **細胞全能性**是指單一活細胞具有產生完整個體的潛力，即植物細胞具有去分化與再分化的能力。
- 種類：癒傷組織培養；懸浮細胞培養；體胚培養；器官培養；花藥培養；原生質體培養。
- 應用：種原保存；各種倍數體的育成；基因轉殖；健康種苗生產；生產有用的二次代謝物；食品工業；分子農場；學術研究。



Root of 胡蘿蔔根
carrot plant

Root cells 根細胞培養在
cultured in 營養基質中
nutrient medium

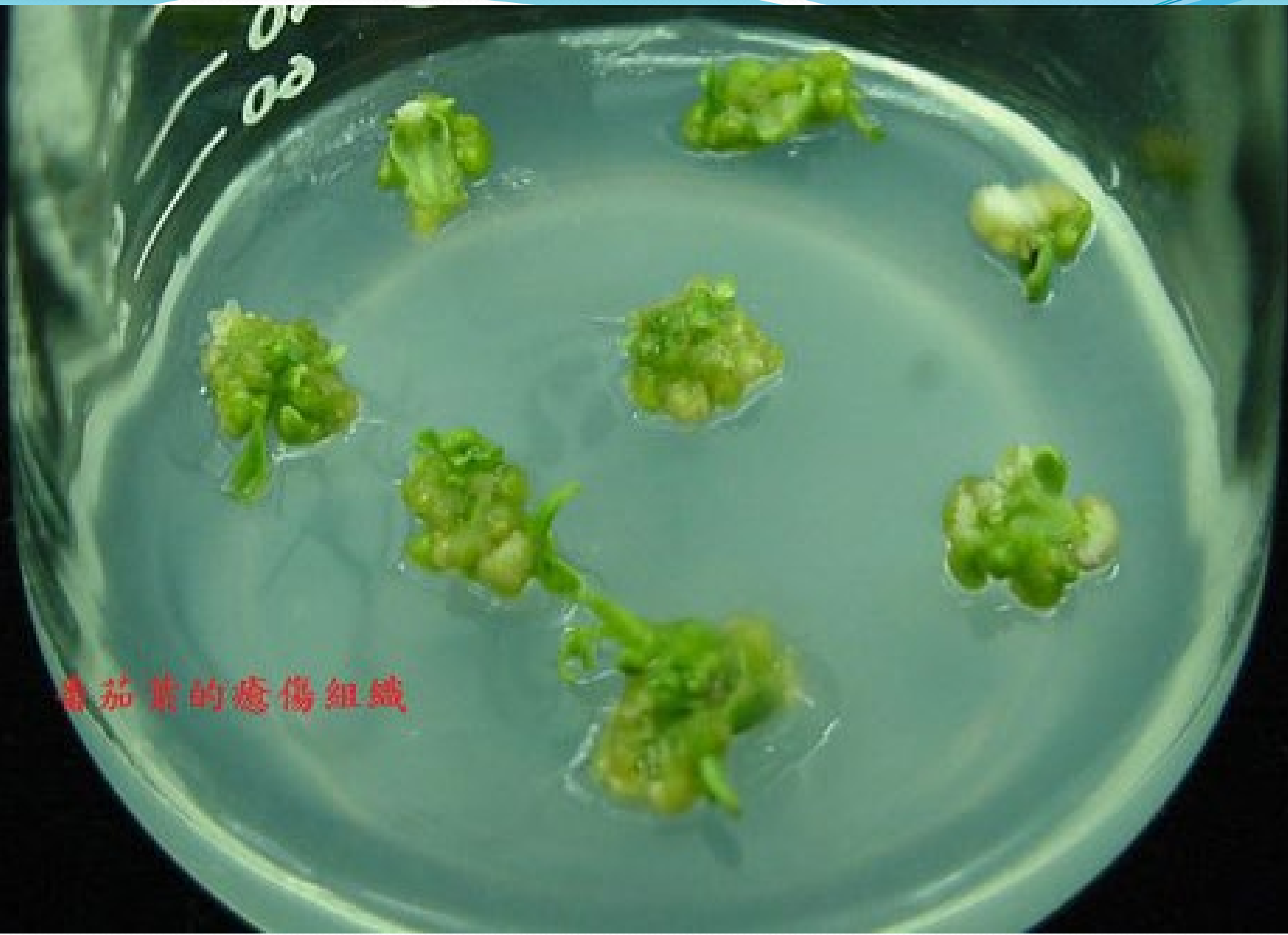
培養中細胞分裂
Cell division in culture



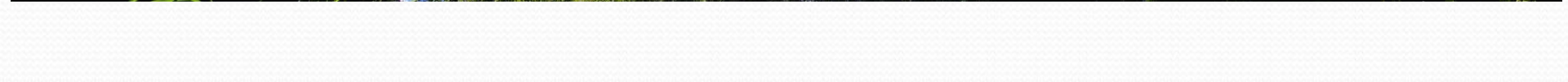
小苗
Plantlet

Adult
plant

成熟
植株



番茄葉的癒傷組織







空氣中的二氧化碳

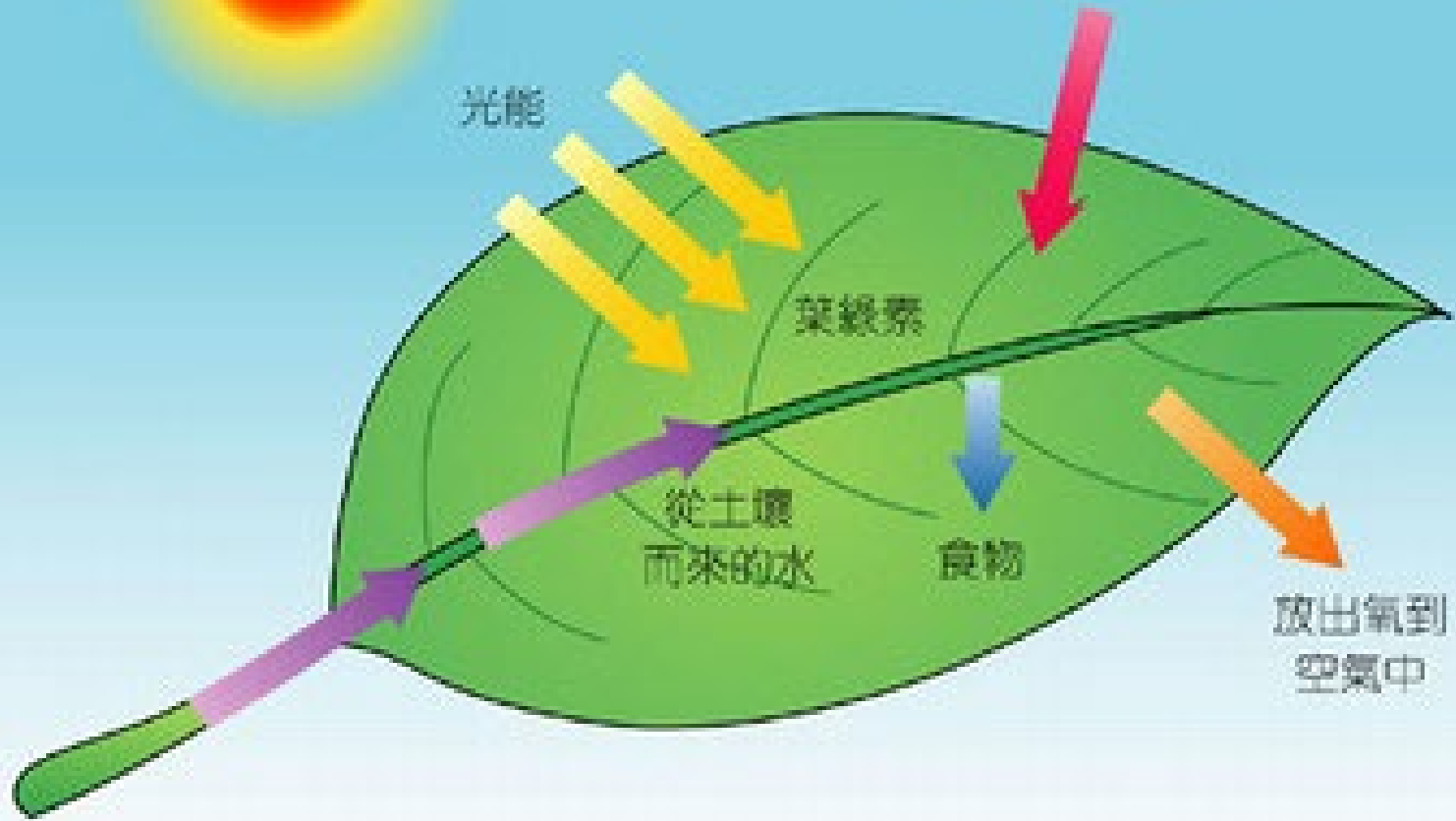
光能

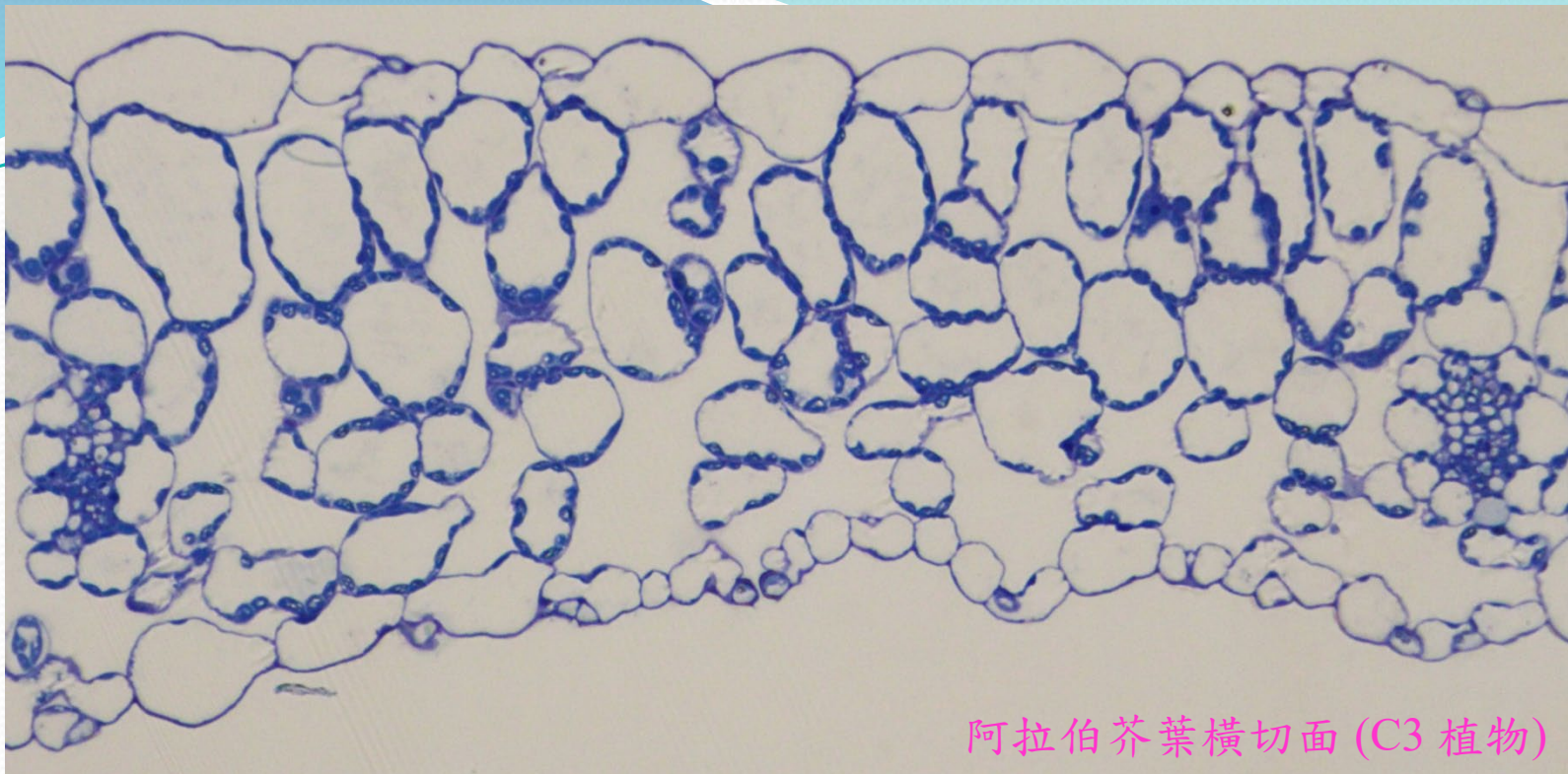
葉綠素

從土壤
而來的水

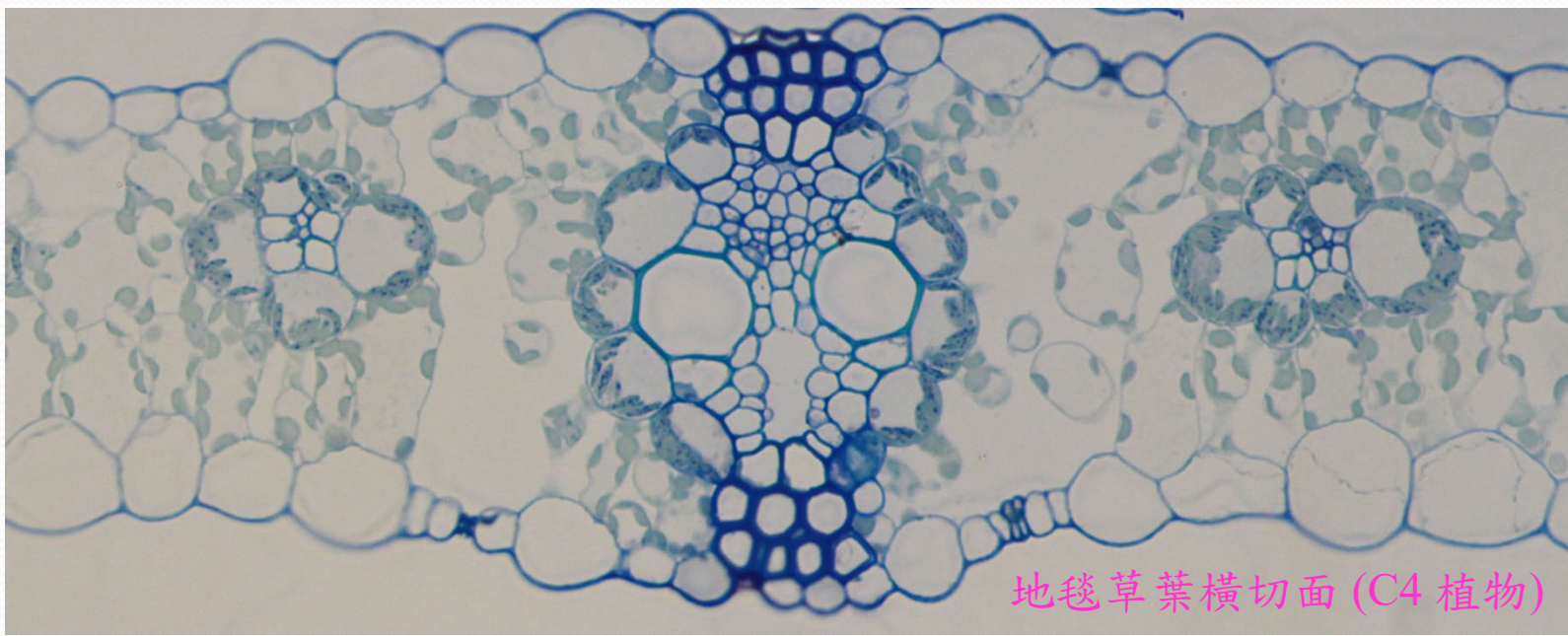
食物

放出氧到
空氣中

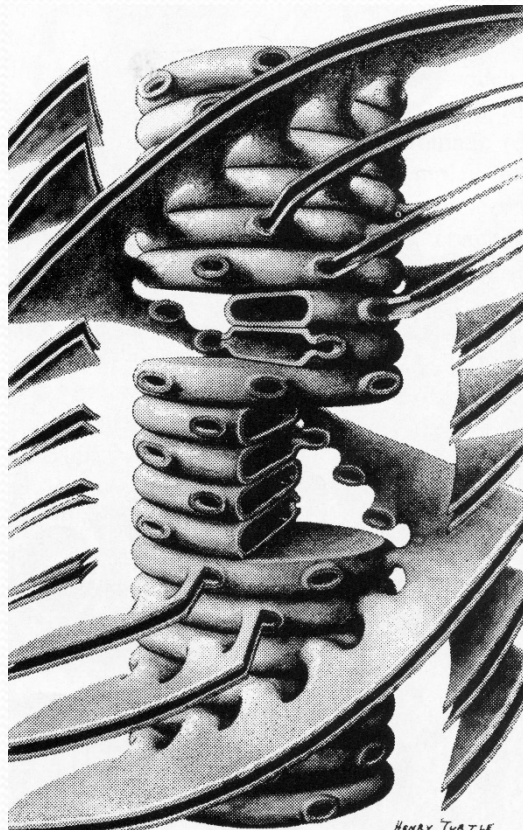
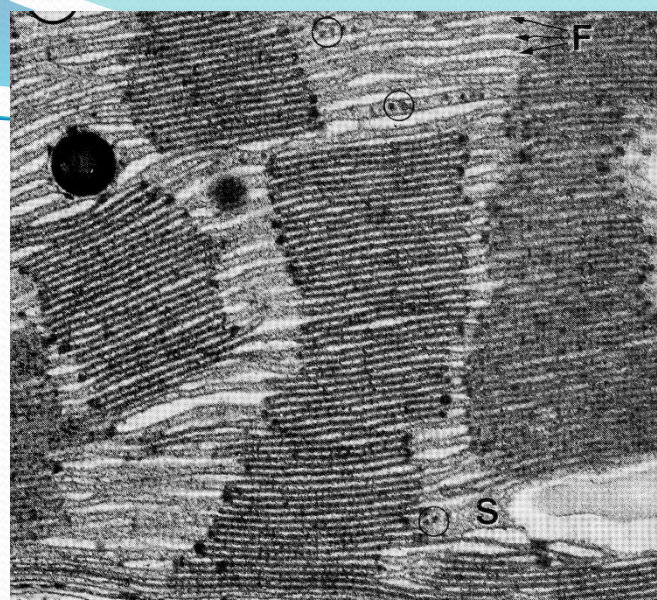
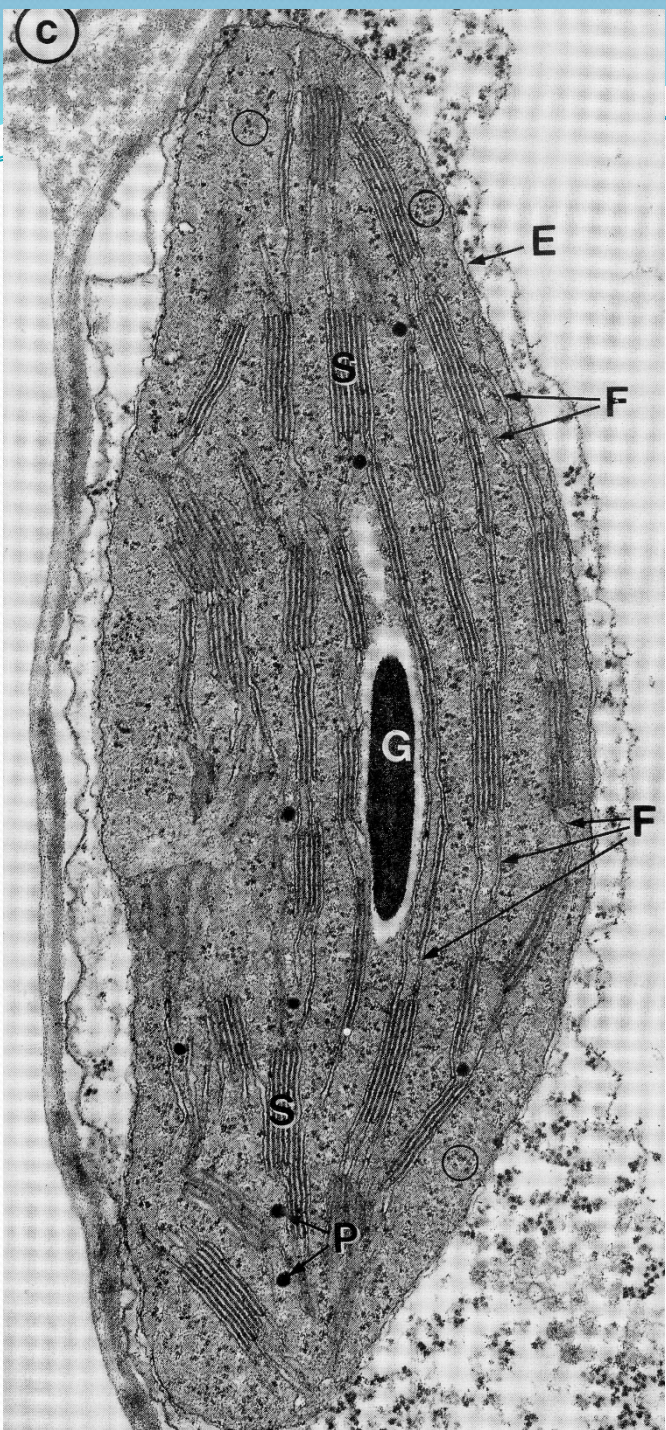




阿拉伯芥葉橫切面 (C3 植物)



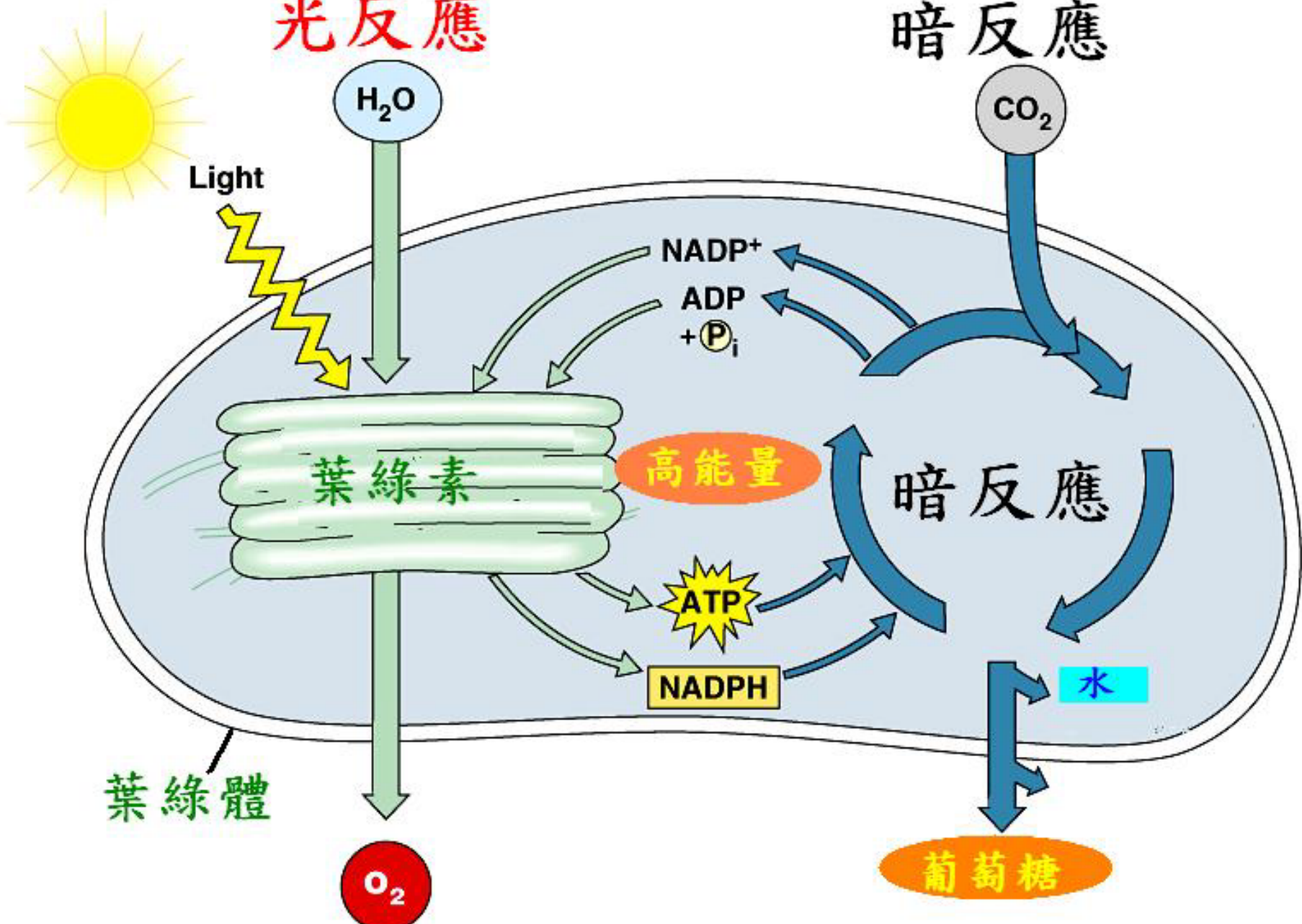
地毯草葉橫切面 (C4 植物)



節錄自 Gunning & Steer
1996. *Plant Cell Biology,*
Structure and Function.

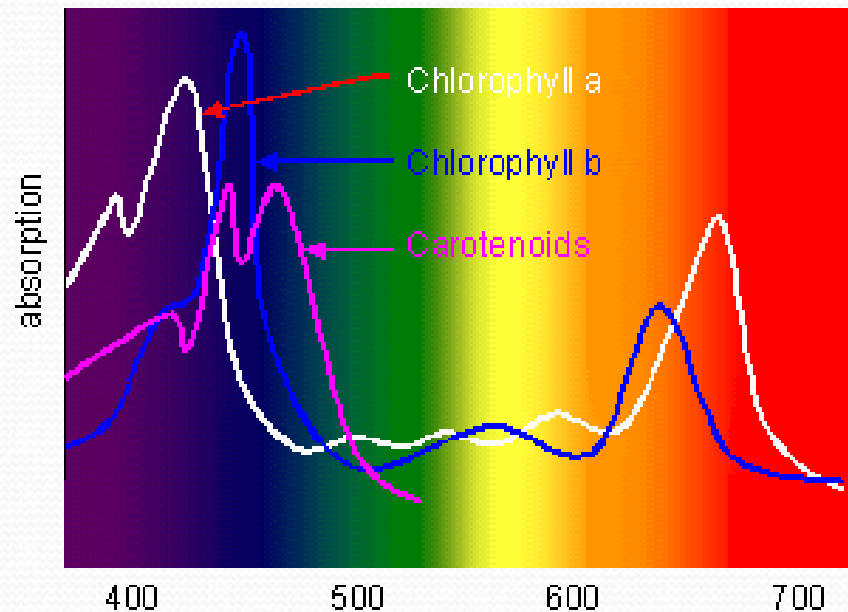
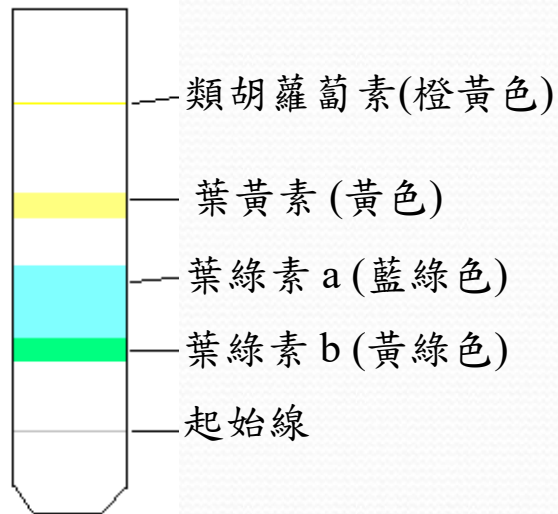
光反應

暗反應

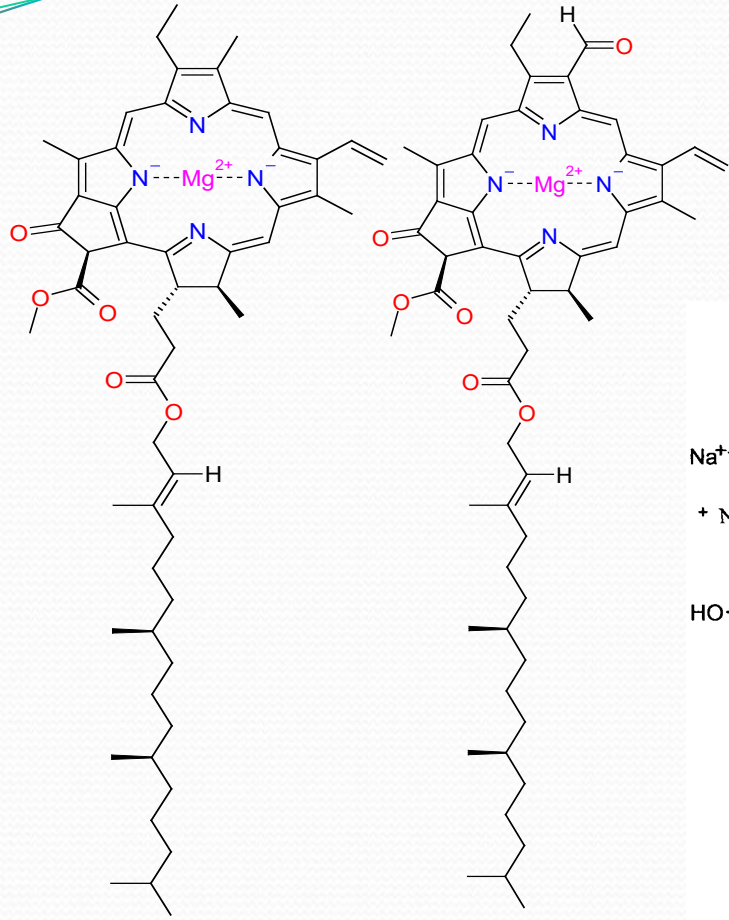


光合作用色素的萃取與分離

1. 將新鮮或乾燥的植物葉片剪成小片，放入研鉢中，加入丙酮，磨碎後過濾；
2. 利用色層分析將光合作用色素分離；
3. 取出分離的光合作用色素，回溶；
4. 以分光光度計測OD值。

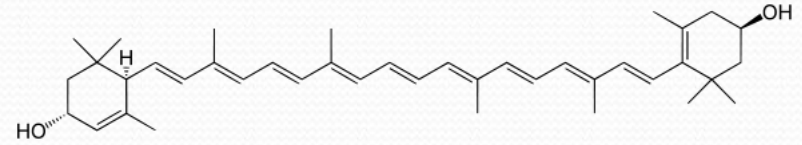


光合色素結構式

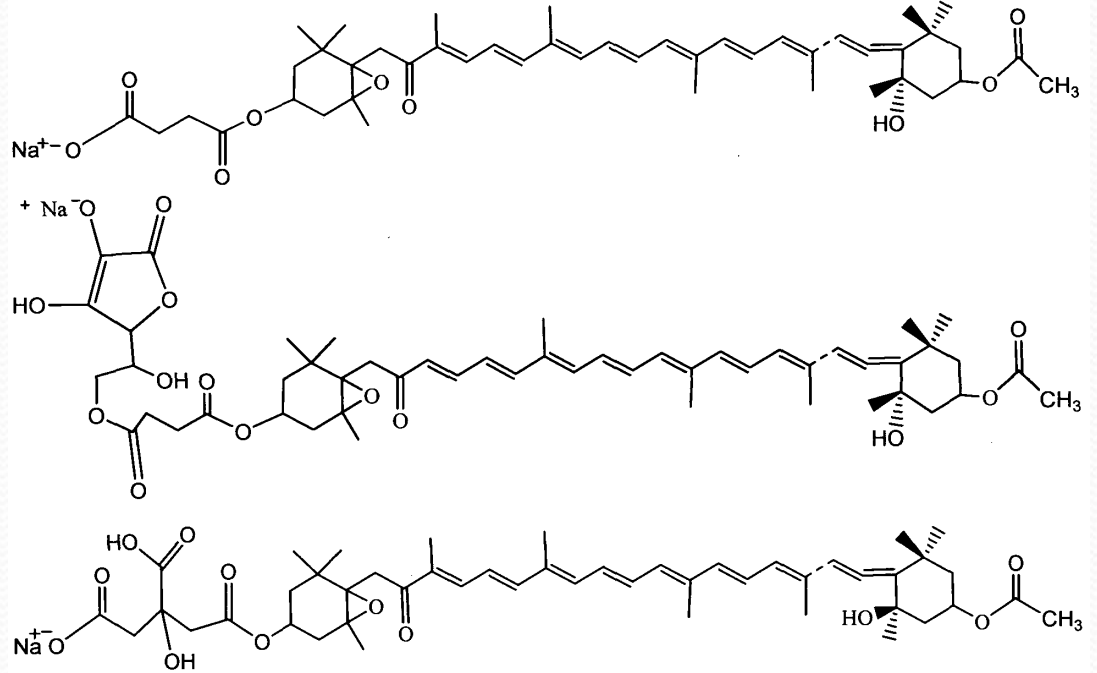


葉綠素 a

葉綠素 b



葉黃素



類胡蘿蔔素

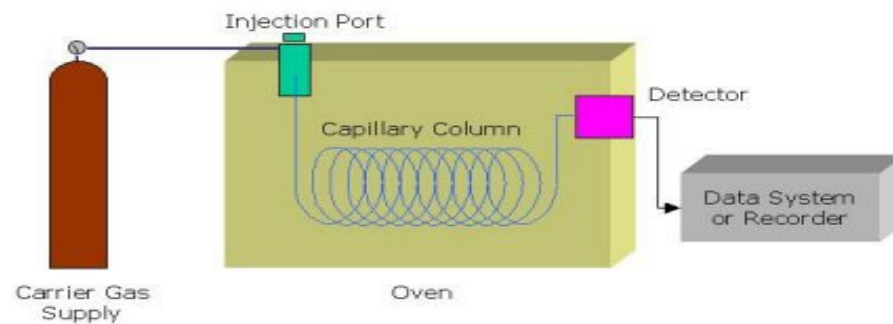
色層分析 (Chromatography)

1. 原理：利用混合物質對固定相(stationary phase)和流動相(mobile phase)親和力不同，而產生分離效果。
2. 結果：與固定相親和力大者，移動距離小；
與流動相親和力大者，移動距離大。
3. 方法：濾紙色層分析 (paper chromatography, PC)
薄層色層分析 (thin layer chromatography, TLC)
氣相色層分析 (gas chromatography, GC)
液相色層分析 (liquid chromatography, LC)



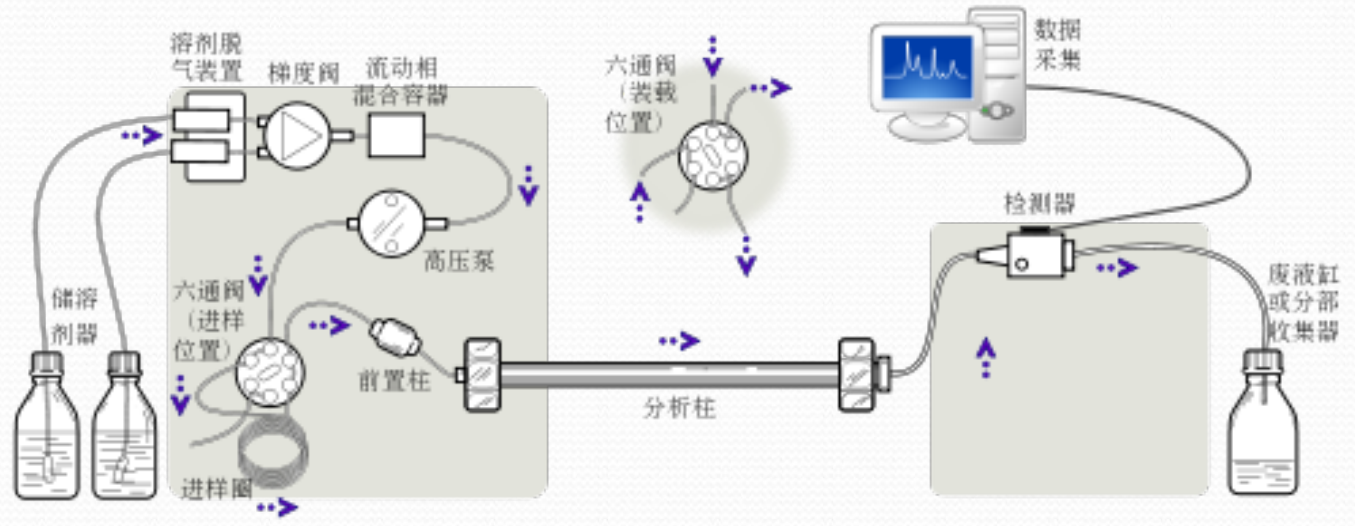
Bruker 450 GC 氣相層析儀

Gas Chromatograph

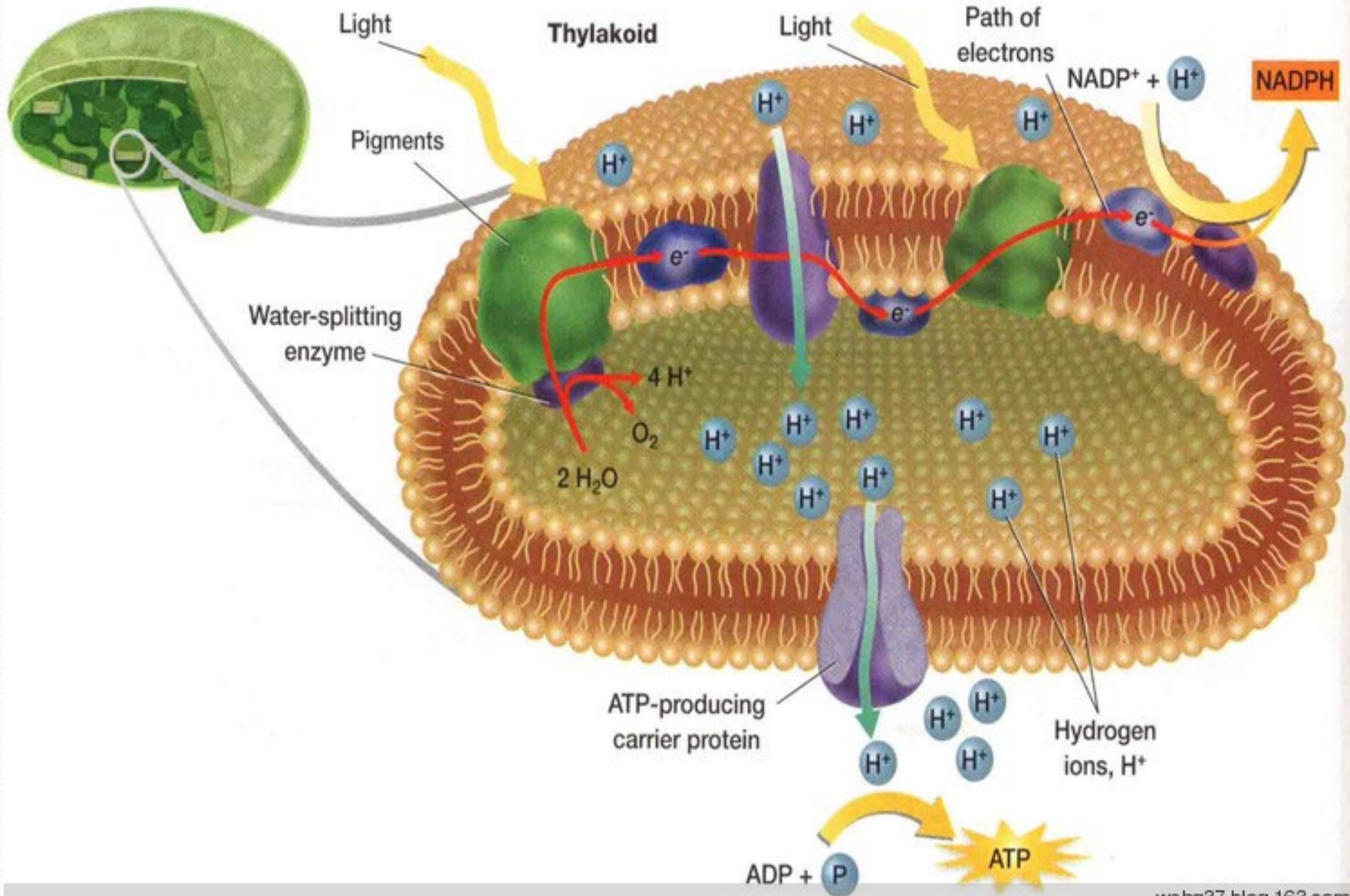


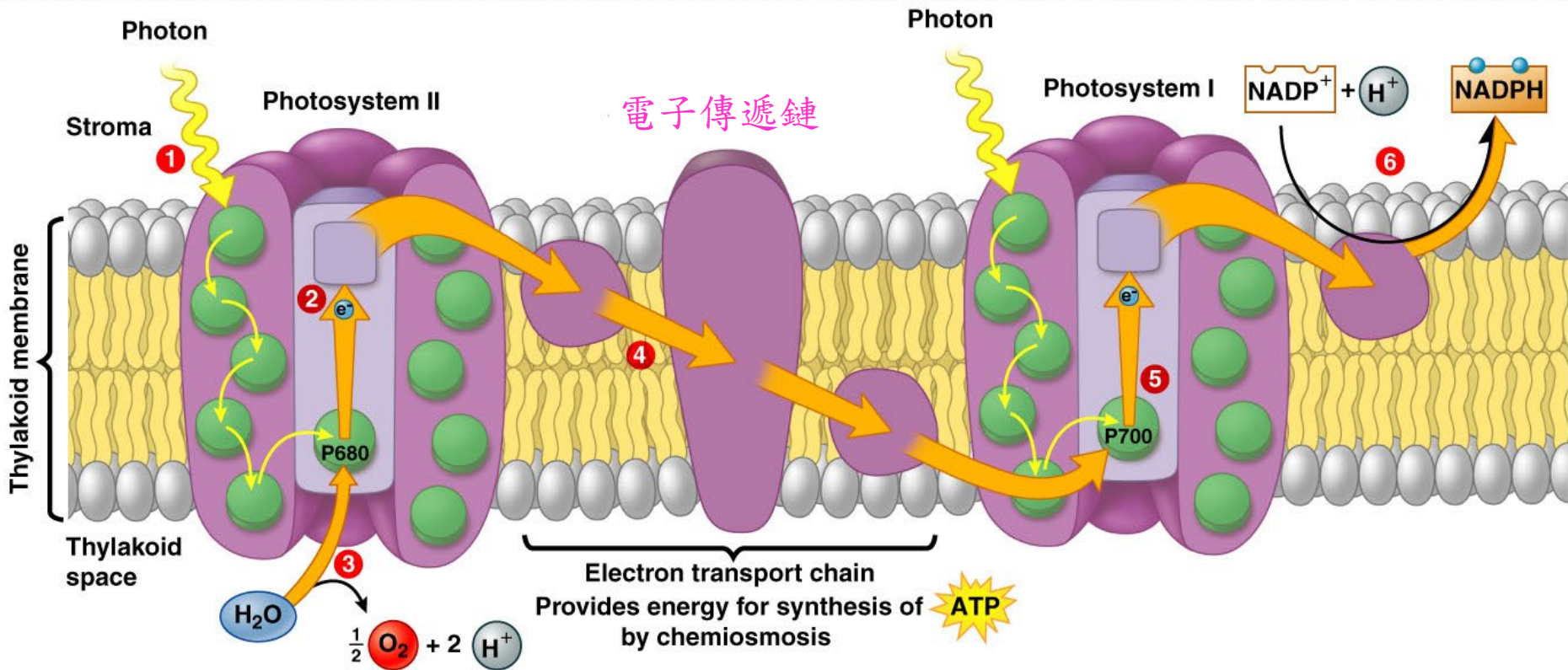


高效液相層分析HPLC (High performance liquid chromatography)



Electron transport chains convert light energy to chemical energy.





● Photosystem II 分離與獲取

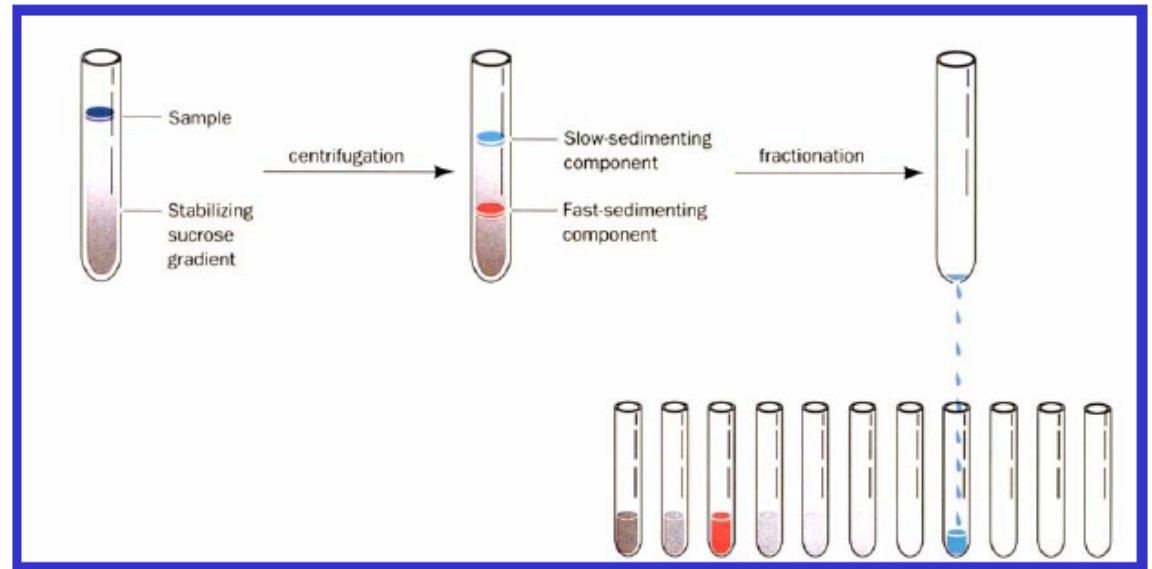
1. 新鮮植物葉片(菠菜)洗淨後以果汁機打碎；
2. 以紗布過濾，取濾液；
3. 濾液以1,500rpm離心1分鐘，取上層液；
4. 上層液以12,000rpm離心20分鐘，取沉澱物；
5. 以緩衝液回溶沉澱物，以12,000rpm離心20分鐘，取沉澱物；
6. 慢慢加入適當量的 triton，攪拌20分鐘；
7. 上層液以20,000rpm離心30分鐘，取沉澱物；
8. 沉澱物以等體積的SMN緩衝液回溶並以20,000rpm離心30分鐘，取沉澱物；
9. 沉澱物再以少量體積的SMN緩衝液回溶，備用。

離心 (Centrifugation)

高速旋轉的離心力能夠按照分子的沉降係數 (sedimentation coefficient) 來分離分子，因此能夠用來描繪出分子在溶液的特性。

離心最簡單的功能是沉澱溶液中的雜質，收集澄清液。

常用的密度梯度 (density gradient) 溶液有蔗糖 (sucrose) 和氯化銫 (CsCl, cesium chloride)

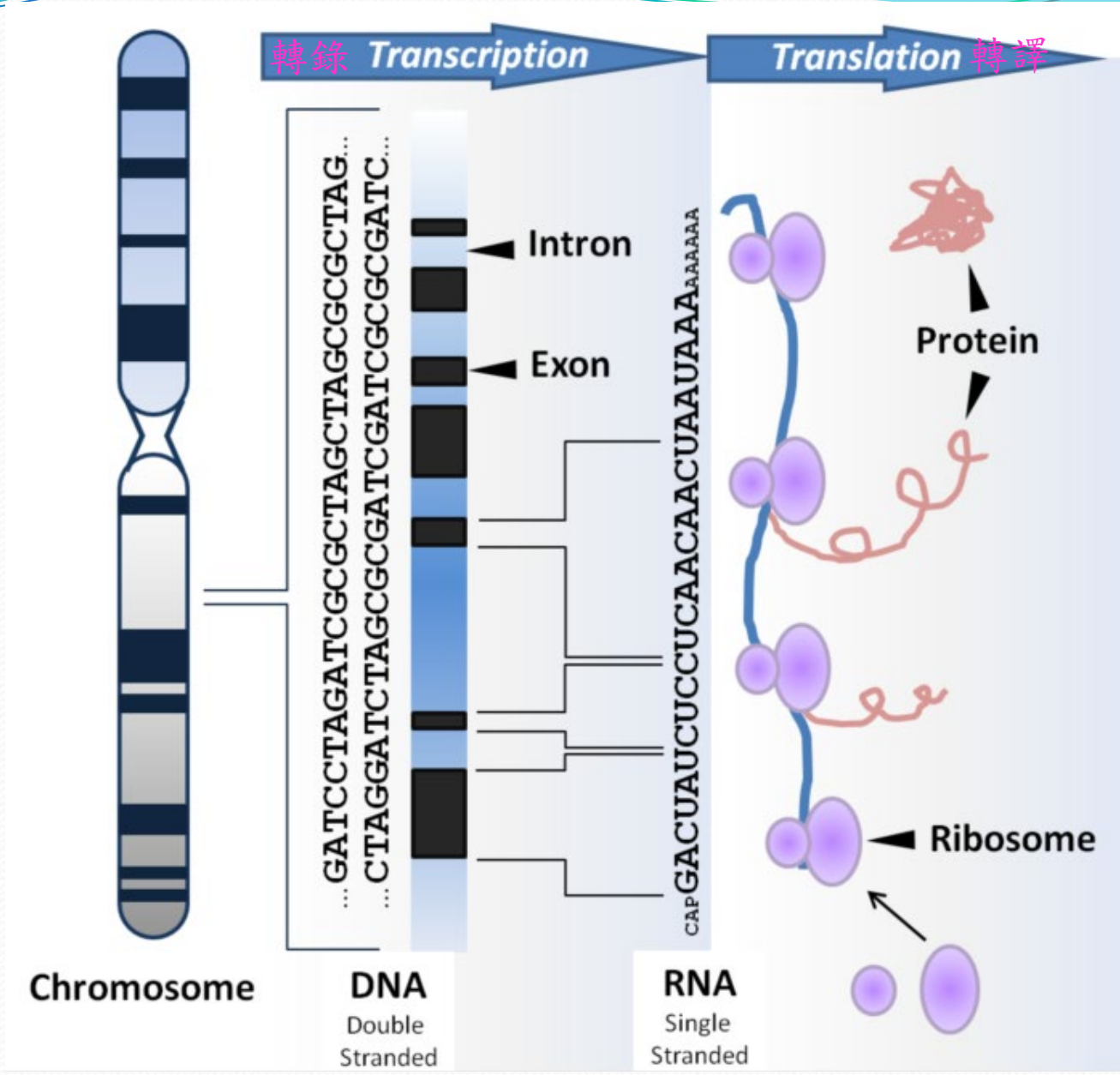


早期常用來做DNA分離，將樣品放在sucrose gradient 溶液中，經由離心，將離心管打孔後分液量收集，分析其含量。

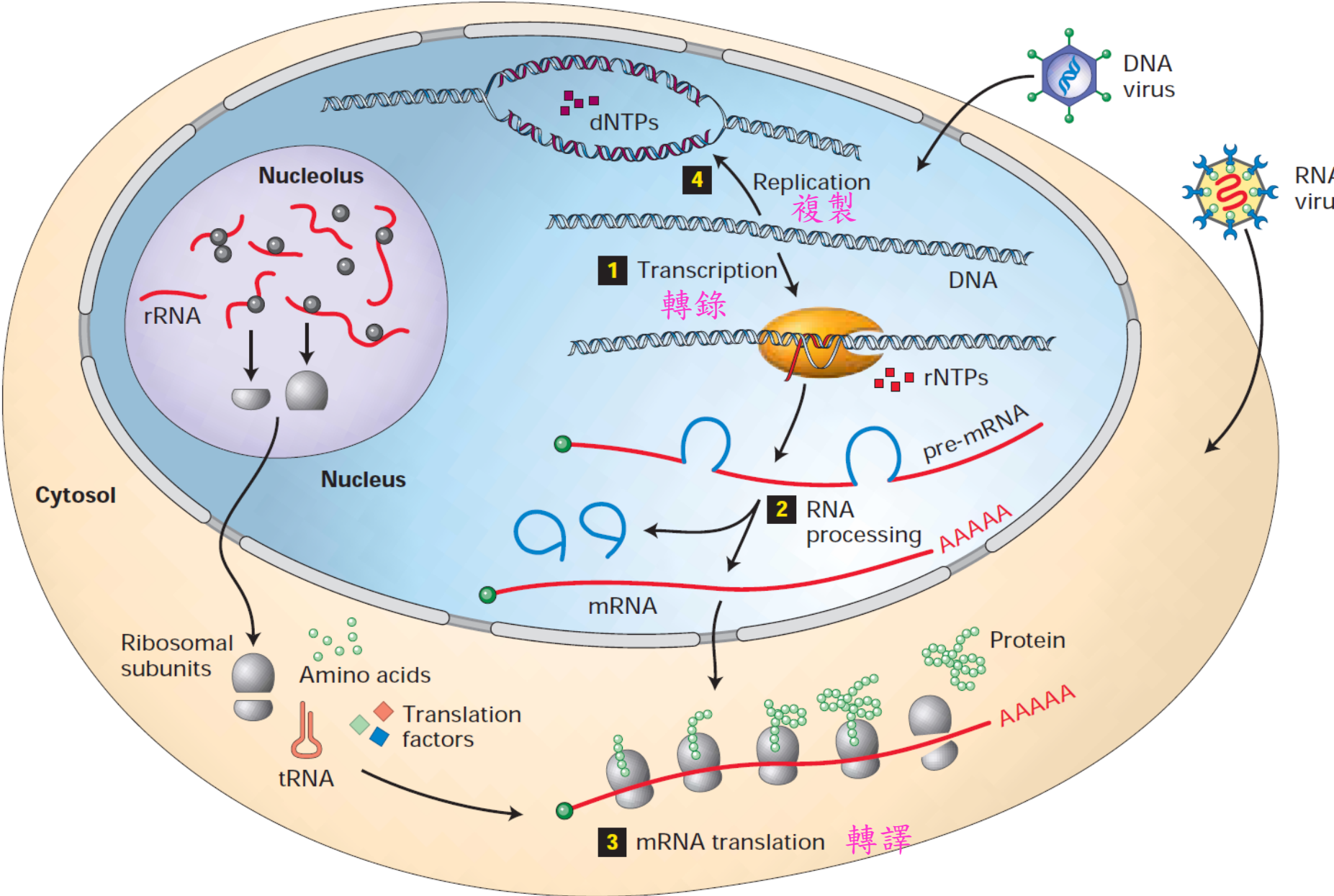


DNA, RNA與蛋白質的 分離和鑑定

生物運作的原則: Central Dogma of Biology

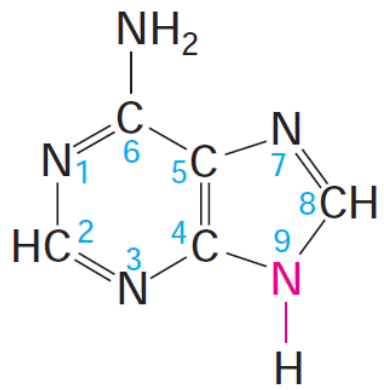


Basic molecular genetic processes

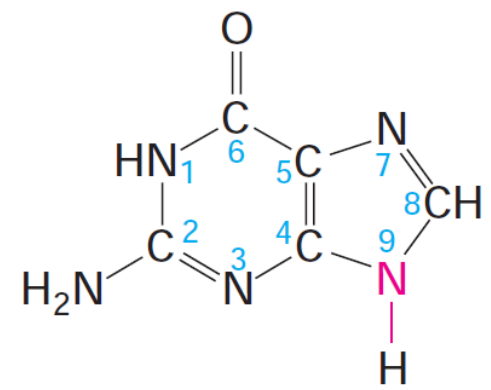


Chemical structures of the principle bases in nucleic acids

PURINES 嘌呤

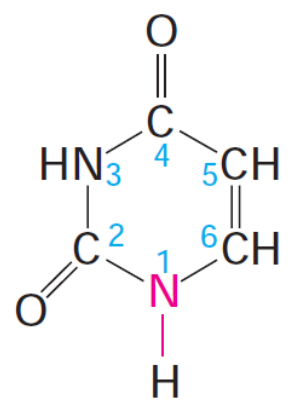


腺嘌呤 Adenine (A)



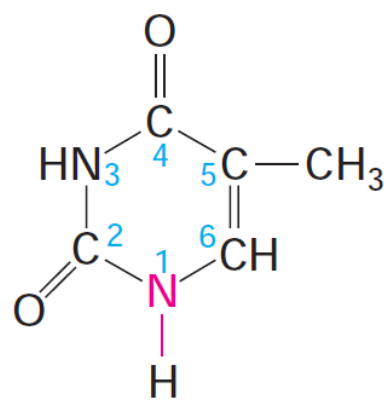
Guanine (G) 鳥糞嘌呤

PYRIMIDINES 嘧啶



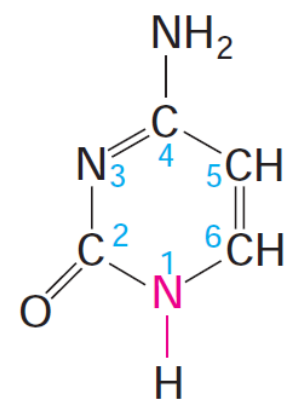
Uracil (U) 尿嘧啶

Only in RNA



Thymine (T) 胸腺嘧啶 Cytosine (C) 胞嘧啶

Only in DNA



1. 細胞分解 (Cell Lysis)：利用含陰離子性清潔劑的細胞分解液將細胞徹底地打破，讓細胞核中的DNA暴露到分解液中。

2. 蛋白酶 (Proteinase K) 水解：蛋白酶K可以將蛋白質水解，尤其是與DNA結合的組蛋白 (Histone)，使DNA完全裸露出來。此酵素作用溫度為55°C，作用時間約需1小時以上，作用時間越久DNA產率越高。

3. 蛋白質沉澱 (Protein Precipitation)：利用含有高濃度鹽類的蛋白質沉澱液，經過高速離心 (約16000x g) 將蛋白質與DNA兩者分離。

4. DNA 沉澱 (DNA Precipitation)：利用異丙醇將DNA離心沉澱出來，可加入肝醣 (Glycogen) 增加DNA產率。

5. 酒精清洗：利用70%的乙醇清洗DNA分子，去除多餘鹽類。

6. DNA 乾燥：最後將純化的DNA進行真空乾燥，呈現半透明凝膠狀即可。

7. DNA 回溶：加入適量體積的鹼性緩衝液 (TrisBuffer, pH8.0)，並且適當的混合使DNA分子均勻地分散在其中，可用65°C水浴幫助DNA回溶。

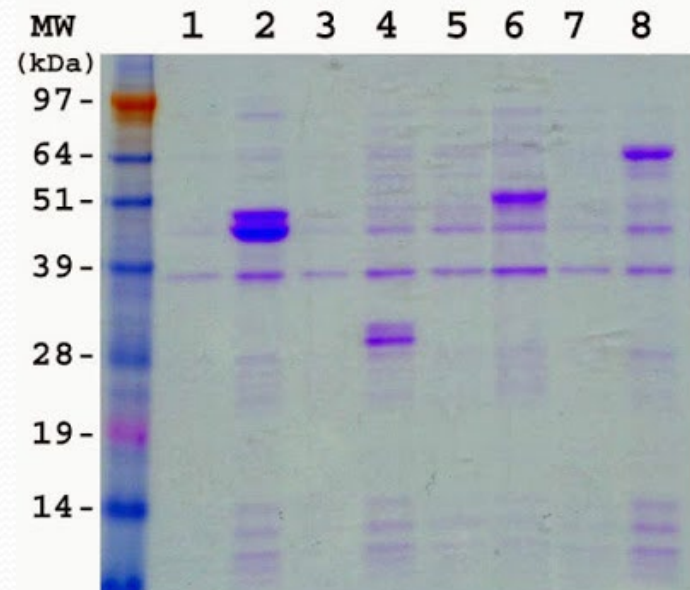
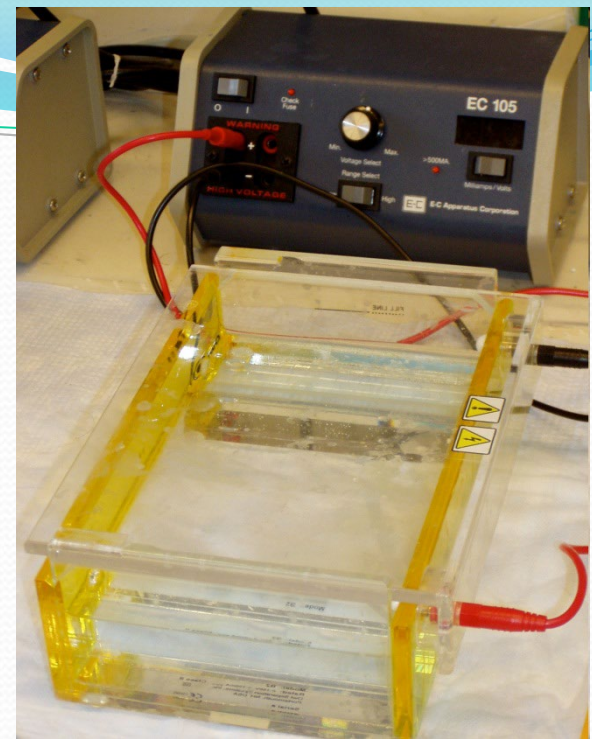
8. DNA 電泳定性分析。 9. DNA 定量分析。 10. DNA 保存於-80°C冰箱中。

膠體電泳 (gel electrophoresis)

帶電顆粒在電場作用下，向著與其電性相反的電極移動，稱為電泳(electrophoresis, EP)。而帶電顆粒可以是小的離子，也可以是生物大分子、蛋白質、核酸、病毒顆粒、胞器等。

高密度的凝膠，有澱粉凝膠、聚丙烯醯胺凝膠、瓊脂或瓊脂糖凝膠。其中最常用的膠體是聚丙烯醯胺凝膠，其具三維網狀結構，而以此凝膠為支持物的電泳稱為聚丙烯醯胺凝膠電泳(polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)。

PAGE應用範圍廣，可測定蛋白質、酶、核酸等生物分子的分離、定性、定量極少量的製備，還可測定分子量、等電點等。



Blotting

Source: Lehninger Biochemistry

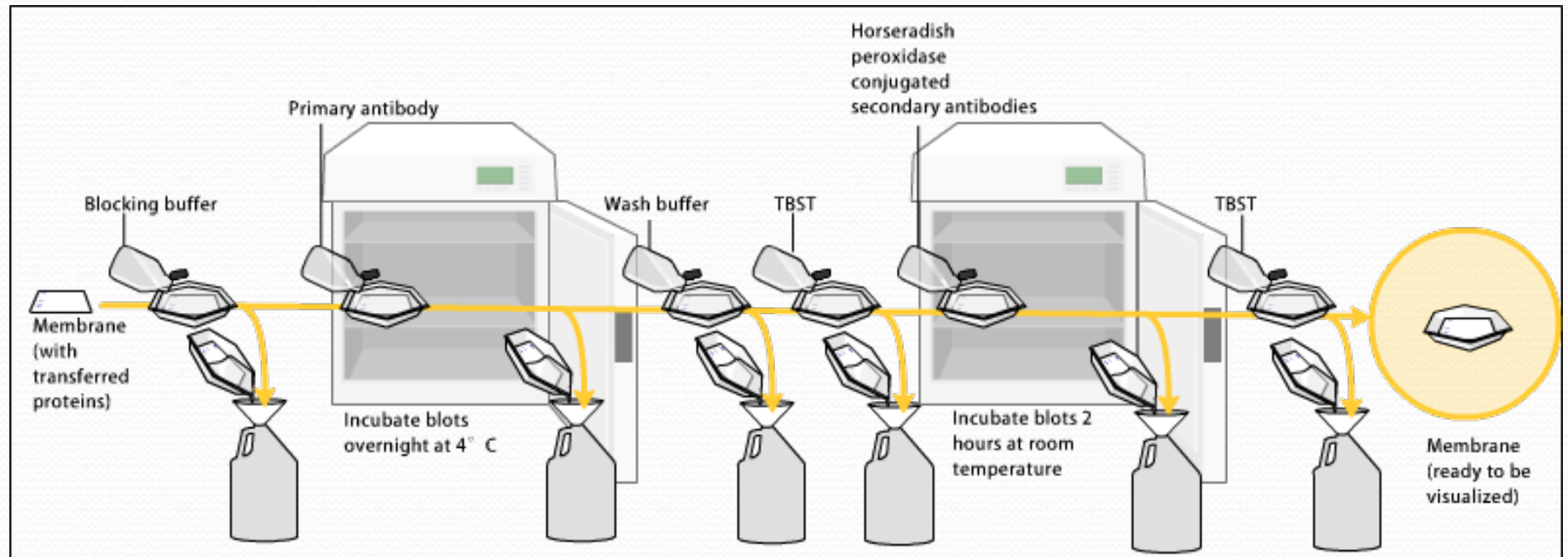
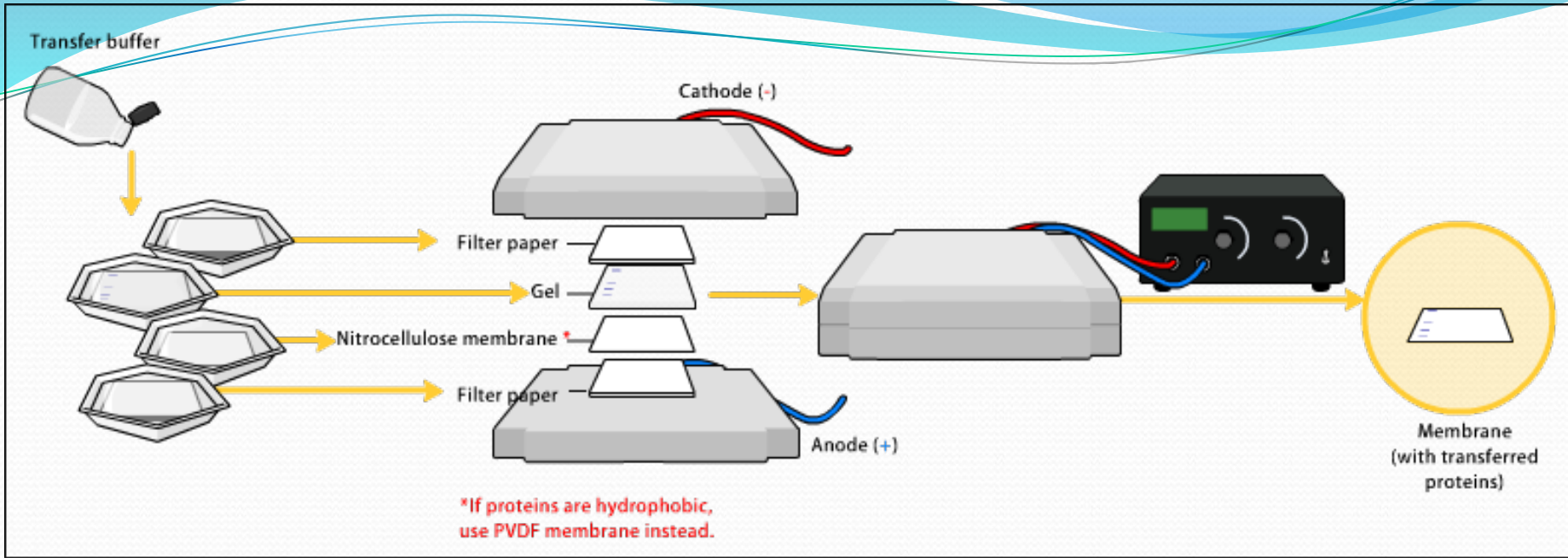
This type of blot:	Southern	Northern	Western
Is used to analyze:	DNA	RNA	Proteins
Procedure: 1. Preparation of sample ↓ 2. Separate by gel electrophoresis ↓ 3. Treat gel ↓ 4. Transfer molecules to membrane ↓ 5. Identify molecules of interest	Cleave in fragments Denature DNA with alkali Capillary action Radioactive RNA probe or ssDNA	None None Capillary action Radioactive RNA probe or ssDNA	None None Electric field Radioactive or fluorescent antibody

南方墨點法 (Southern blot) 是由英國生物學家Sir Edwin Southern發明的，是利用基因探針去偵測由膠體電泳分離出來再轉印至薄膜的DNA片段，以搜尋到含有特定序列的DNA片段。探針是已被標記會產生放射線或螢光物質的單股DNA或核糖核酸（RNA）片段，讓探針和DNA雜交（hybridize）。

北方墨點法(Northern blot)是由史丹佛大學的James Alwine and George Stark所發明，將所要偵測的樣本DNA片段改為RNA片段。

西方墨點法(Western blot)〔或稱免疫墨點法(immuno blot)〕一般認為是史丹佛大學的George Stark所發明，利用特定抗體能夠專一結合其抗原蛋白質的原理來對樣品進行著色，通過分析著色的位置和著色深度獲得特定蛋白質在所分析的細胞或組織中的表現情況的資訊，來分析檢測特定蛋白質的生物學檢測技術。

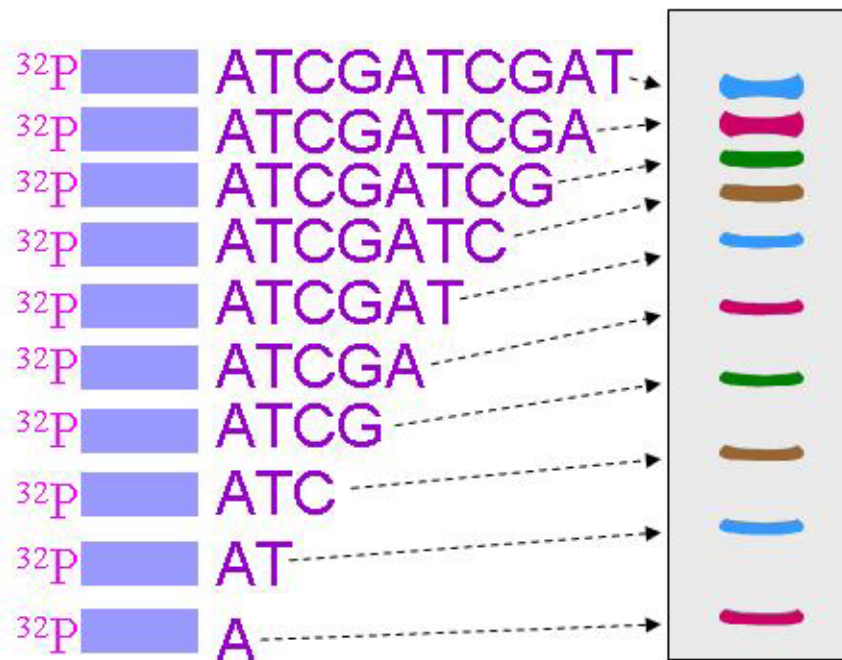
Western Blotting 西方墨點法





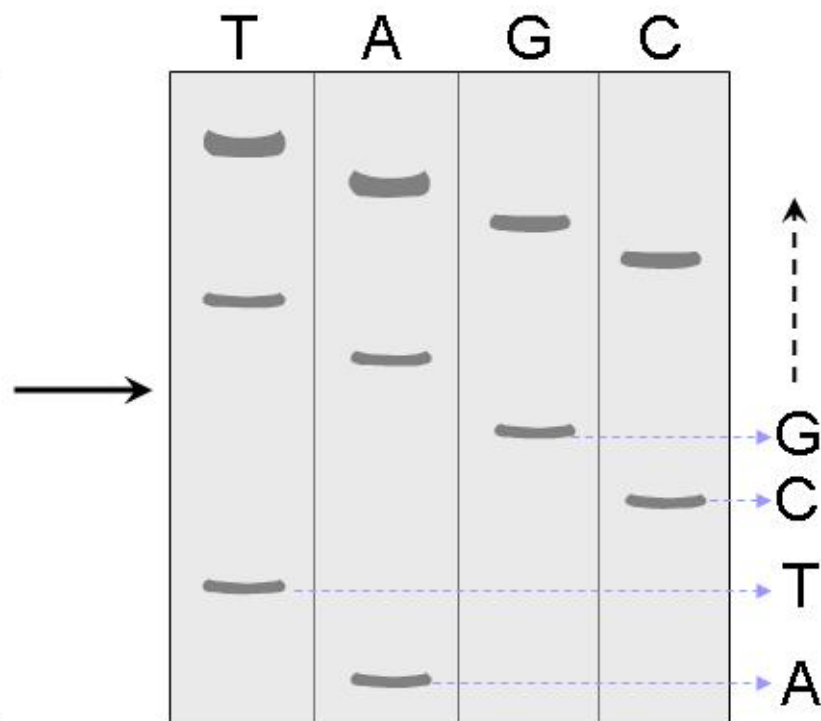
核酸定序原理

膠體電泳可以分開各種不同長度的核酸，在電泳膠片依序排開：



但這樣的圖譜不能判別出各核酸端點的核苷酸種類

Polyacrylamide Gel Electrophoresis



若能把尾端核苷酸相同的片段提出，跑在同一行，則比較這樣的四行，即可讀出序列。



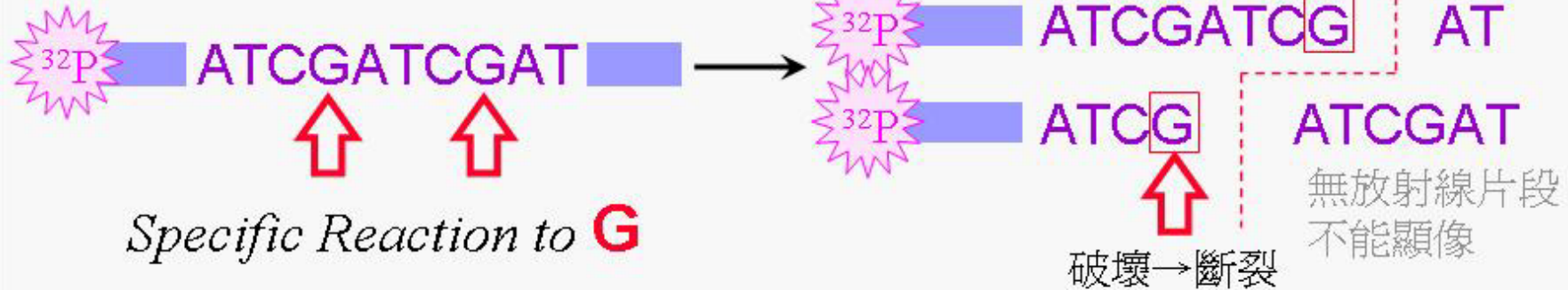


做出不同長短核酸的方法

Maxam-Gilbert's Method:

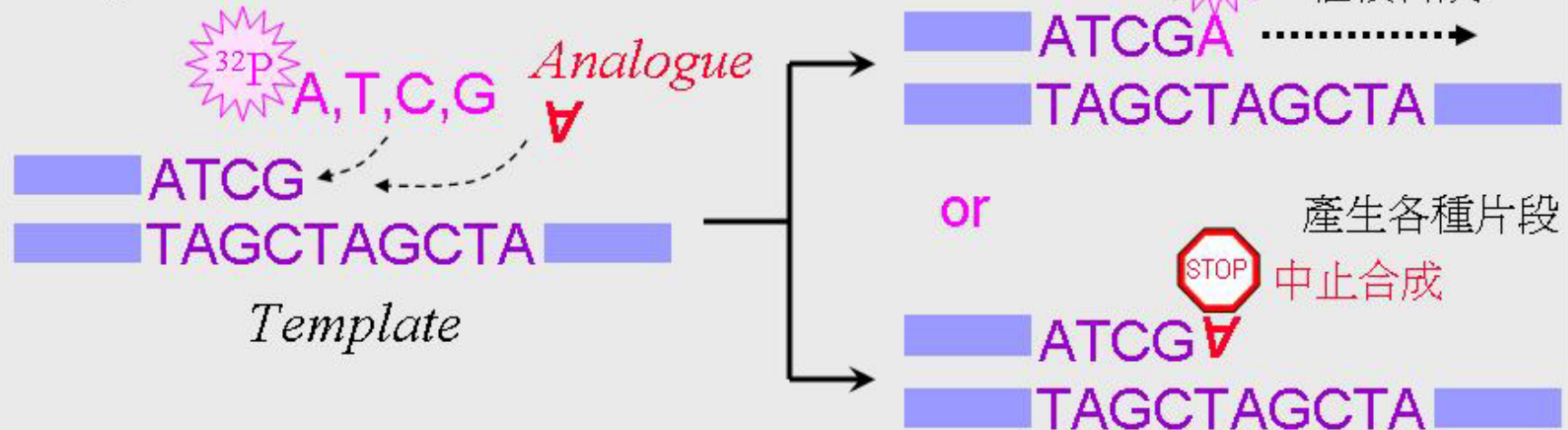
化學法

破壞→斷裂



Sanger's Method:

生合成法



PCR : Polymerase Chain Reaction

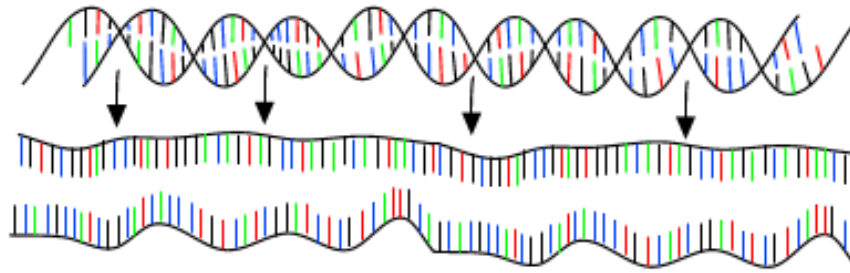
聚合酶連鎖反應

30 - 40 cycles of 3 steps :

變性

Step 1 : denaturation

1 minut 94 °C

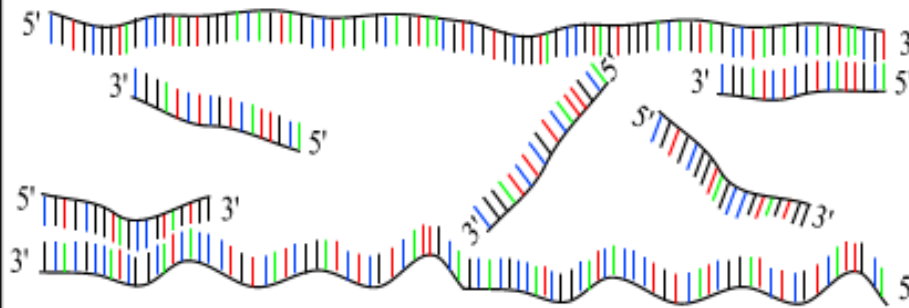


引子黏合

Step 2 : annealing

45 seconds 54 °C

forward and reverse primers !!!

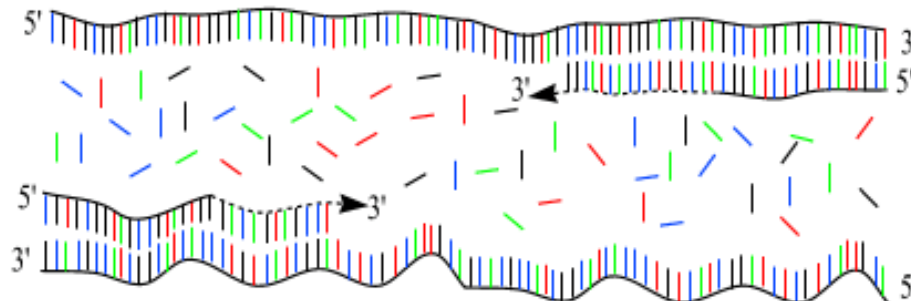


引子延長

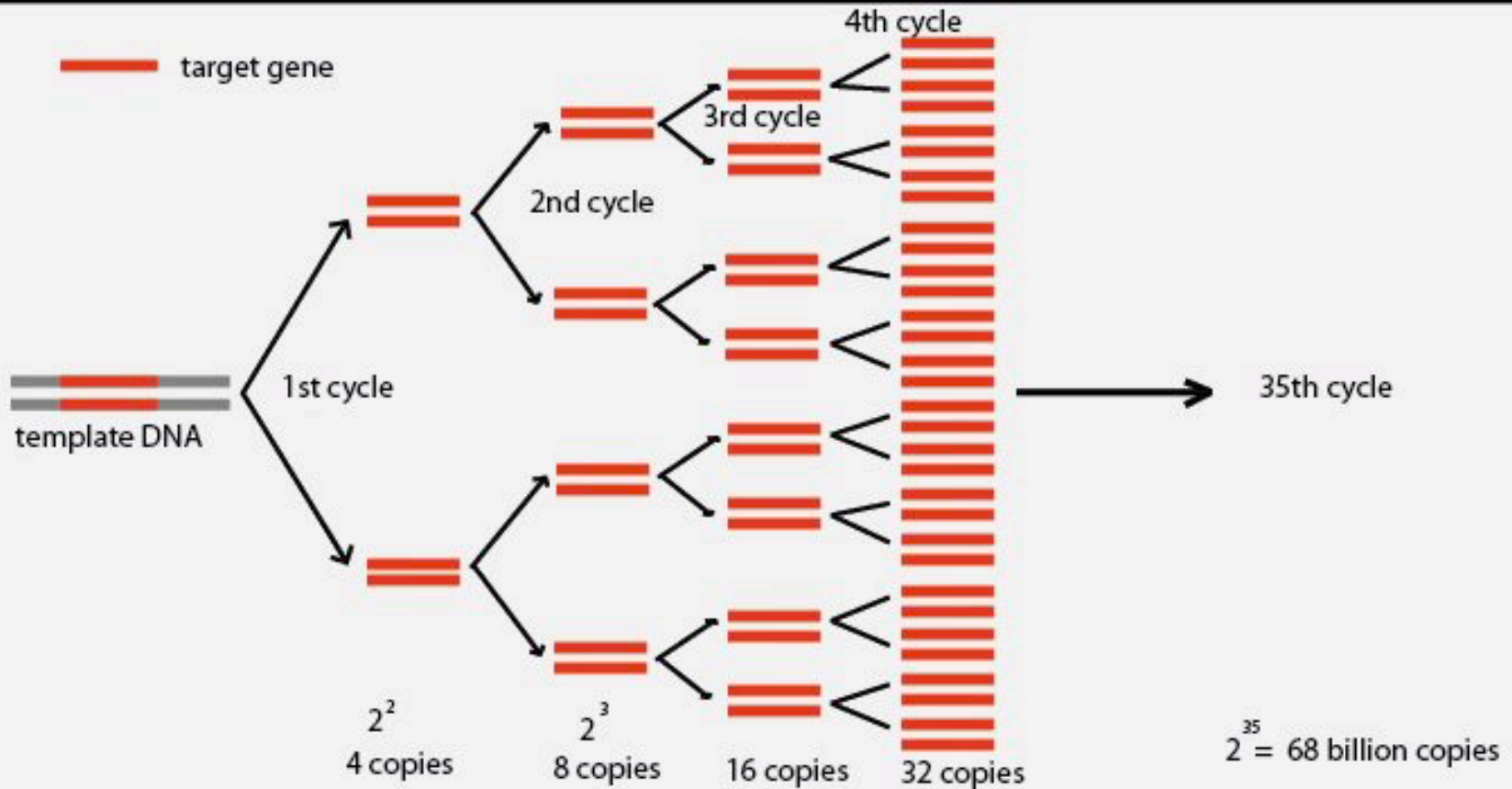
Step 3 : extension

2 minutes 72 °C

only dNTP's

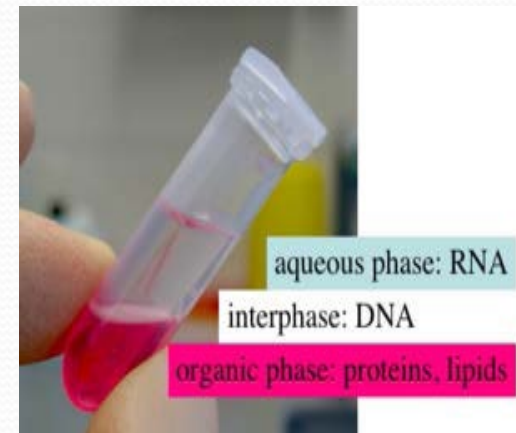


PCR Amplification



RNA的萃取 (RNA extraction)

1. 吸去cultural medium，以PBS清洗兩次。
2. 加入1ml Trizol，並移入1.5ml的離心管中
3. 加入200 μ l chloroform，均勻混合，於室溫下作用2分鐘。
4. 於4°C下以12000g離心15分鐘。
5. 收取上層液 (上層: RNA, 中間: DNA, 下層: protein)
6. 加入500 μ l的isopropanol，均勻混合，於室溫下作用10分鐘。
7. 於4°C下以12000g離心10分鐘。
8. 去除上清液, 加入-20 °C, 1 ml, 75% 酒精wash
9. 7500 g離心, 4 °C, 5 min
0. 去除上清液, 沉澱物乾燥後, 回溶於 Rnase-free water

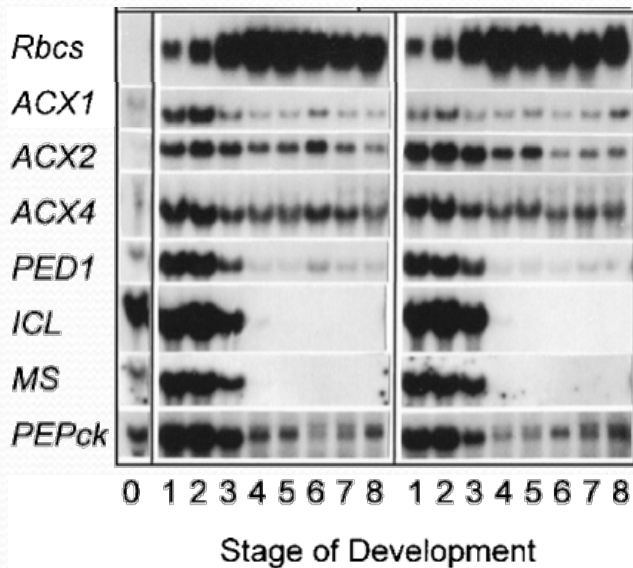
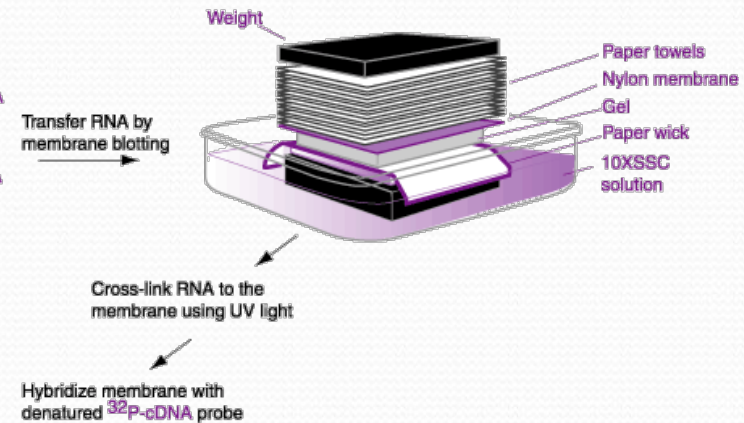
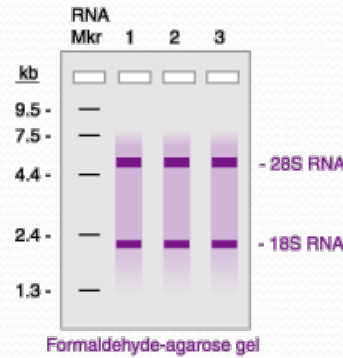
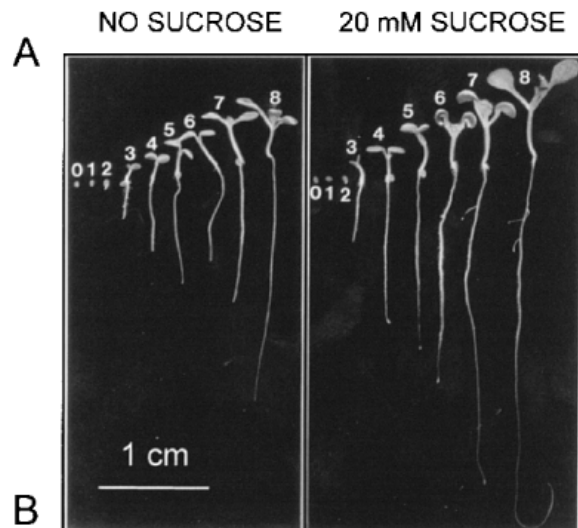


DNA微陣列(DNA microarray)



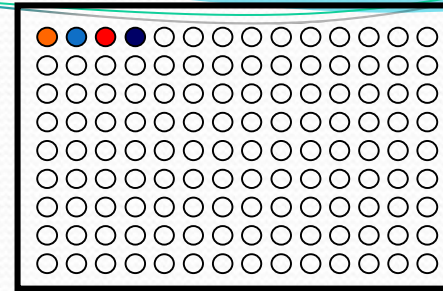
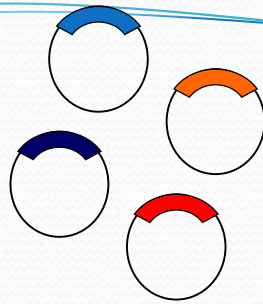
DNA微陣列為一偵測基因表現(gene expression)的快速方法，植物與微生物學研究者一**高效能的研究工具與選擇**，可加速功能基因體學相關研究。

Northern Blot – Gene expression



一、基因資料庫的蒐集與建立

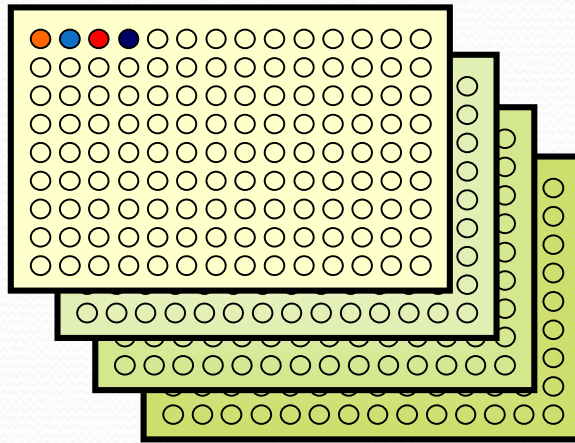
收集欲研究的 DNA (EST, library clones)



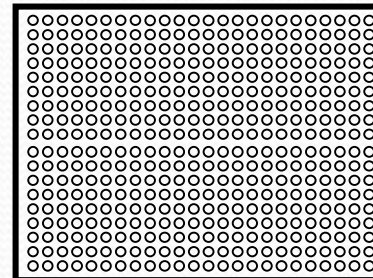
96孔盤

PCR 反應擴增

PCR product purification:
1. Ethanol precipitation
2. Affinity or gel filtration purification



Re-racking



384孔盤

微矩陣晶片樣品溶液
(DNA printing solution
ready for robotic gridding)

Quality control

1. Quantitation

gel estimation

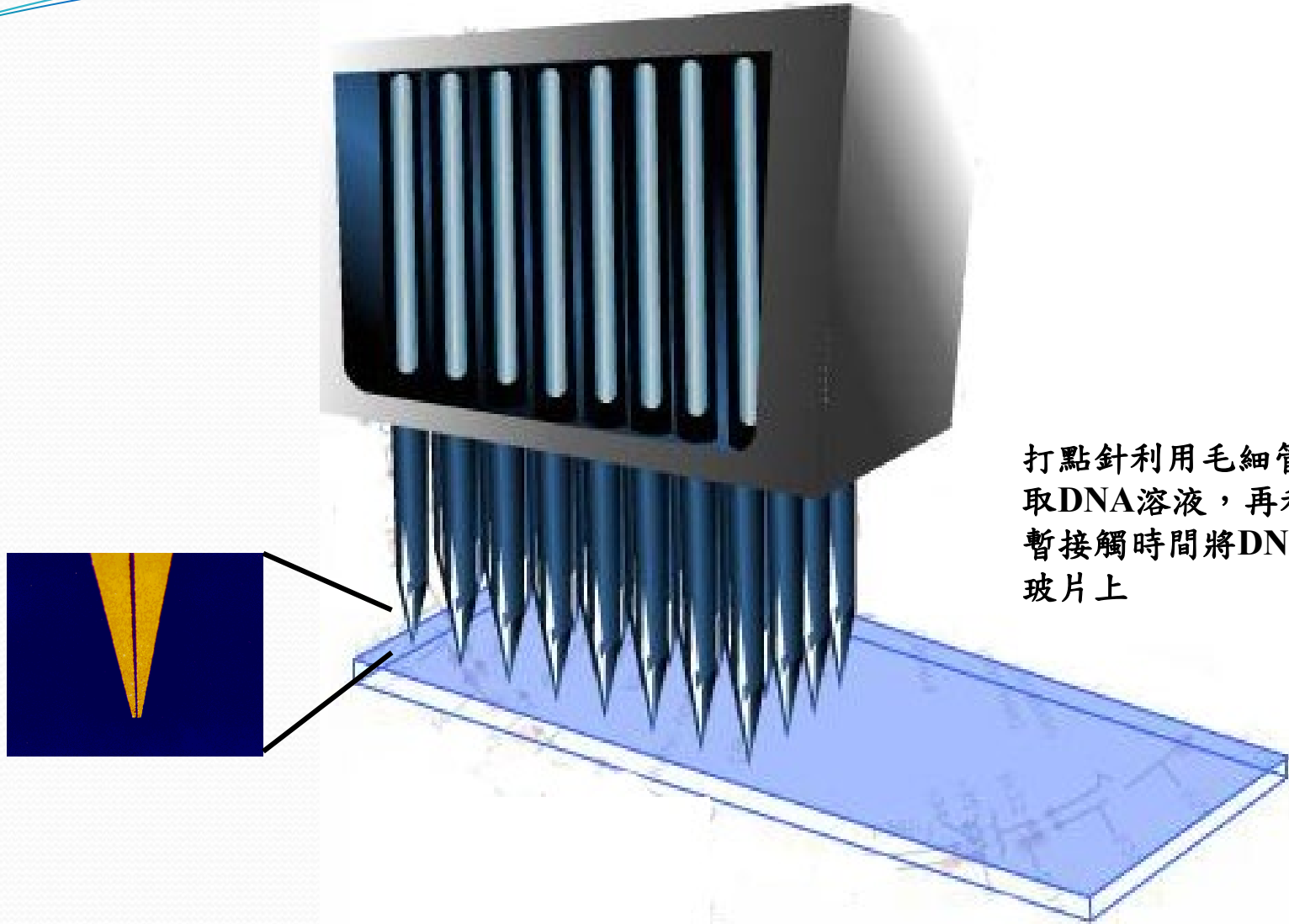
fluorescent DNA binding

dye assay

2. Evaluation for the presence

of a single band

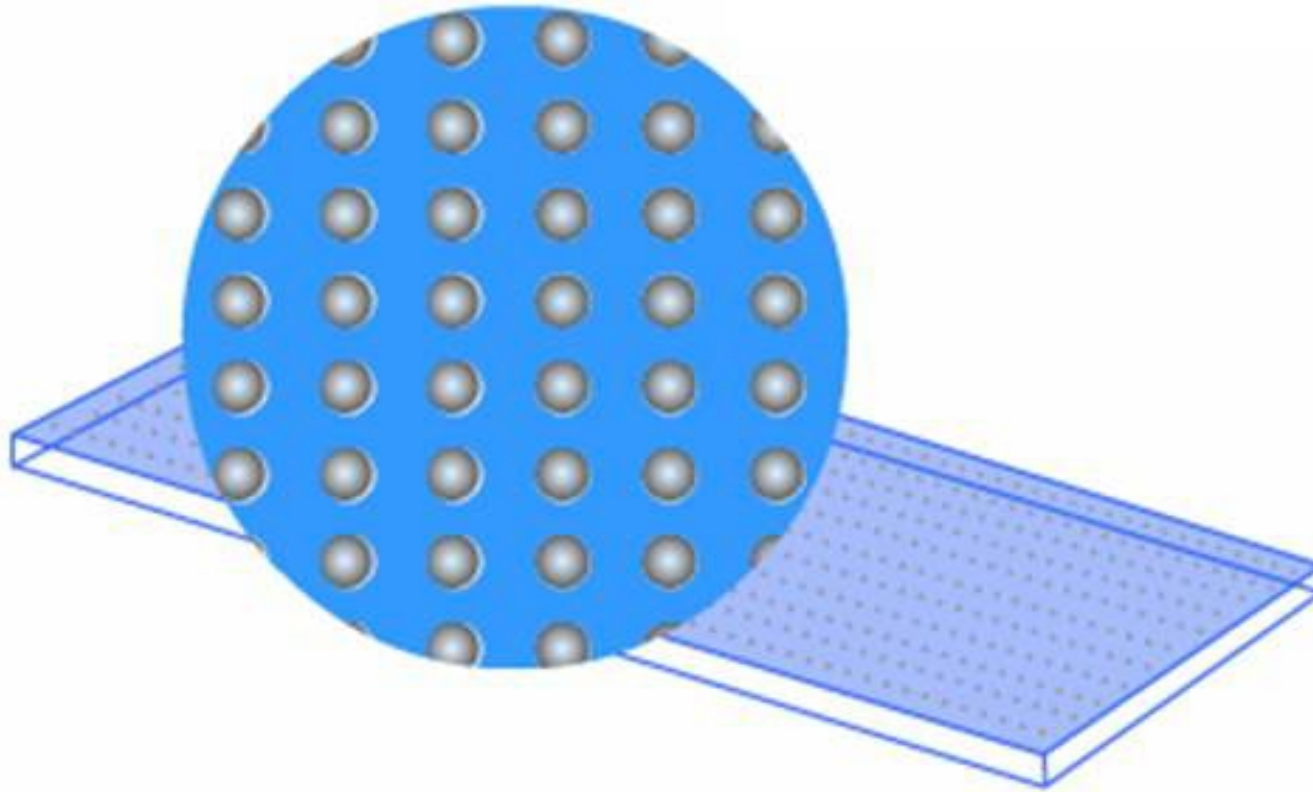
二、DNA microarray 晶片製備



打點針利用毛細管原理吸取DNA溶液，再利用極短暫接觸時間將DNA點製在玻片上



每一點代表一個不同的基因



運用DNA微矩陣進行基因表現分析

葉子



花

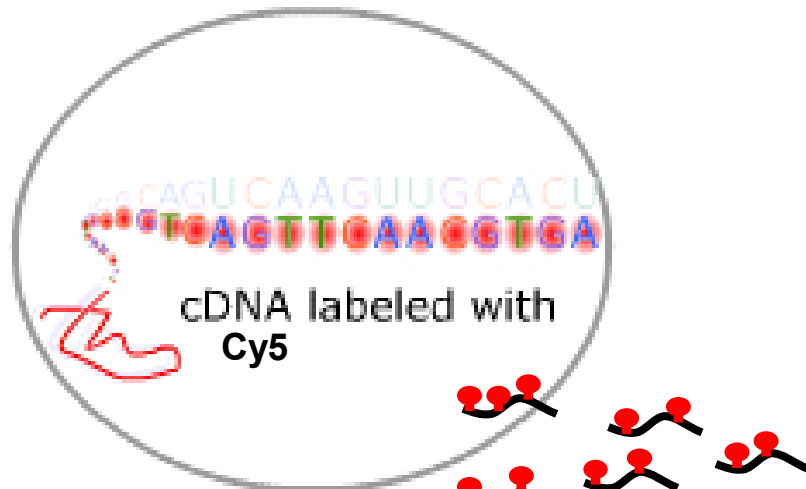


一、樣本 mRNA 螢光標定

螢光物質標定於互補DNA

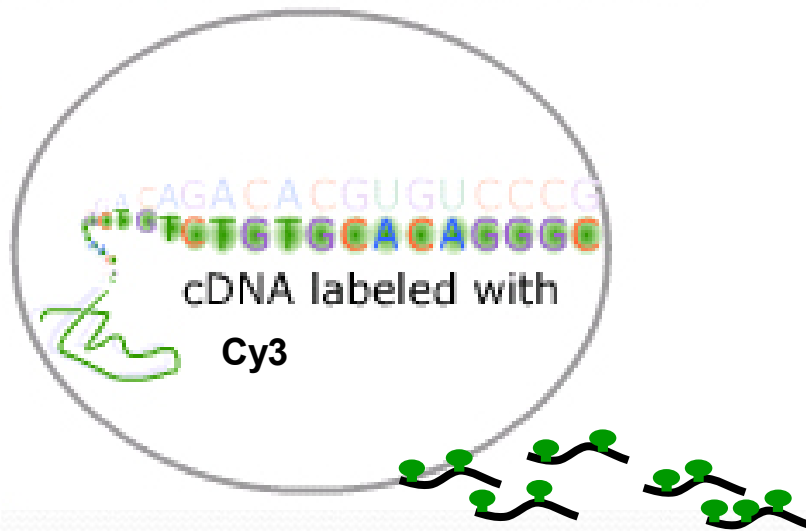
萃取RNA

花

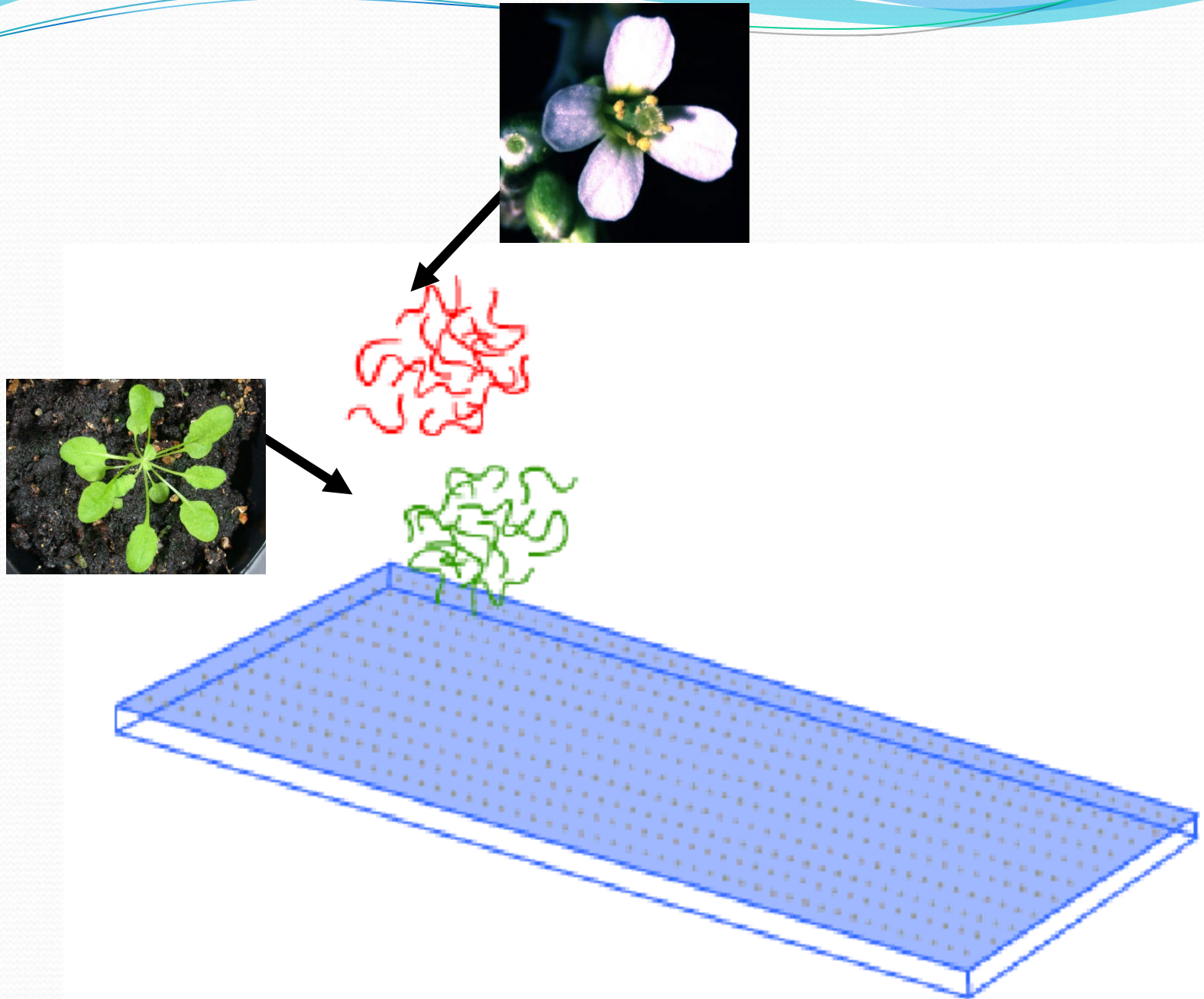


Make fluorescent labeled cDNA

葉子

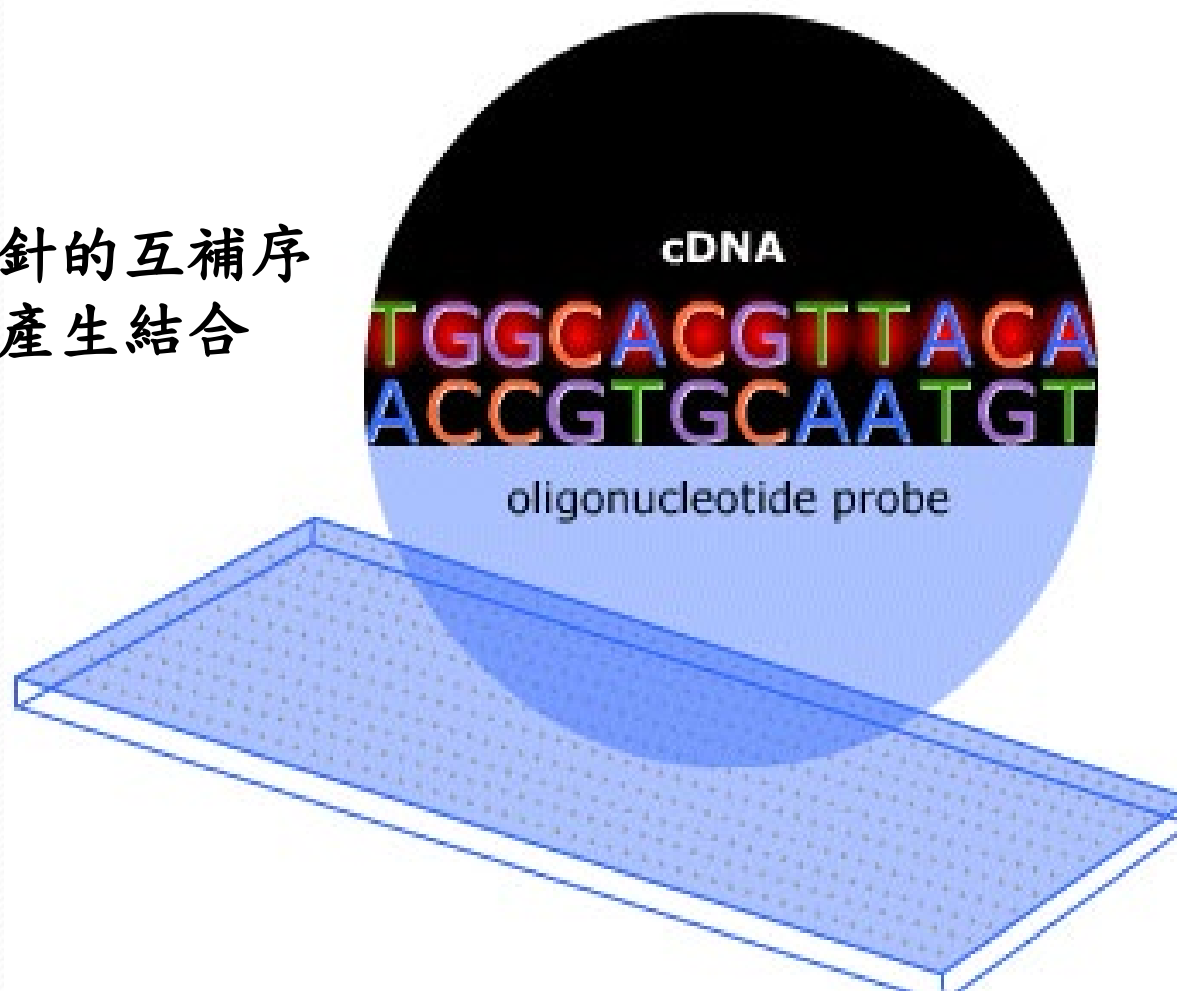


二、微矩陣晶片之雜合反應

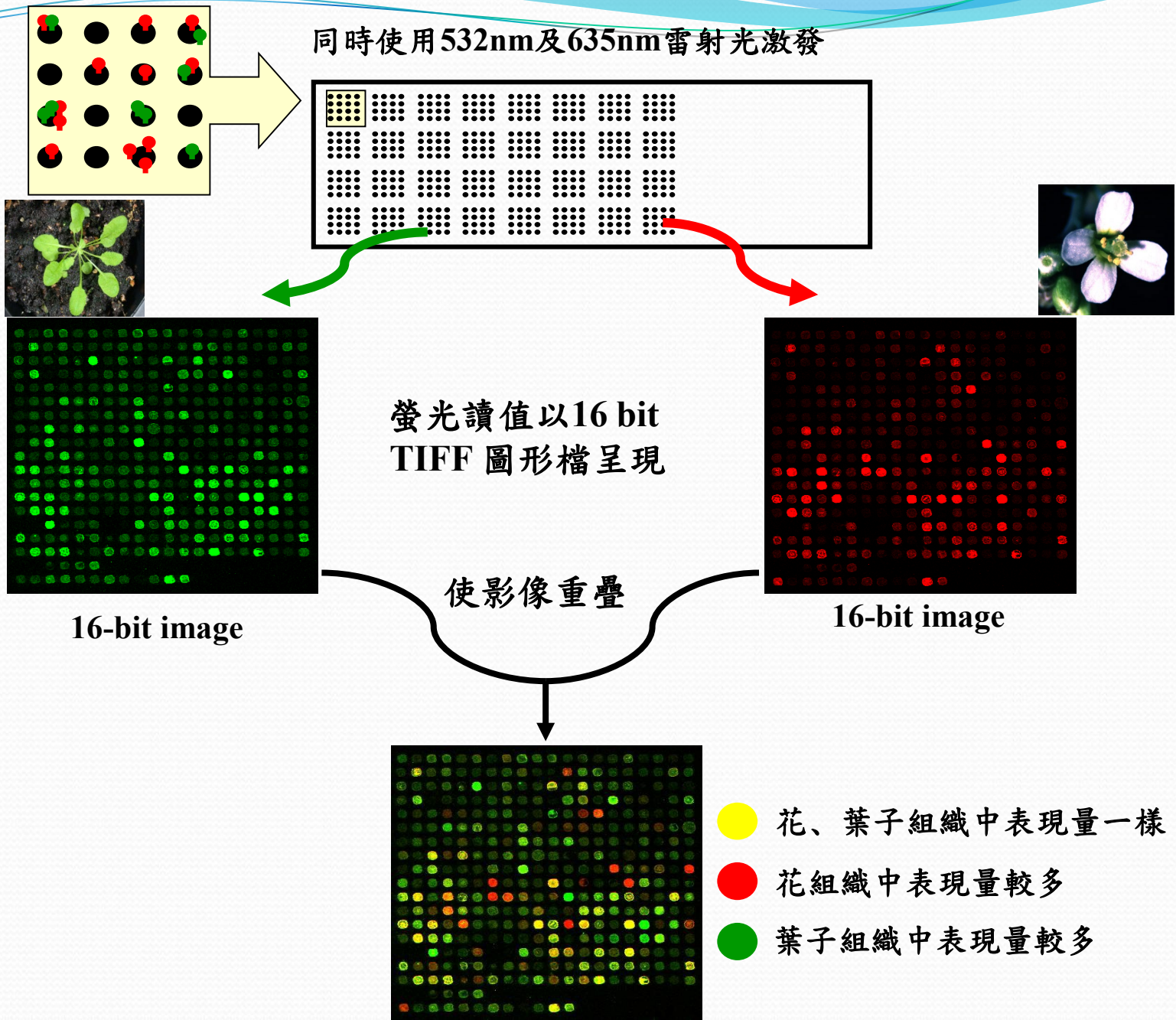




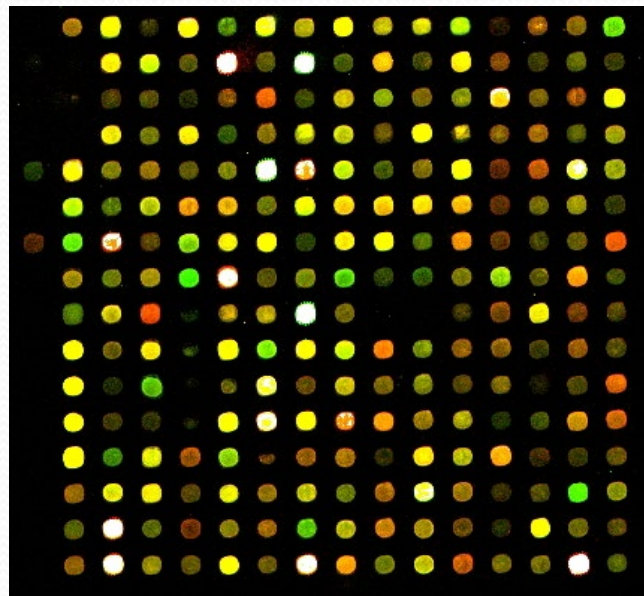
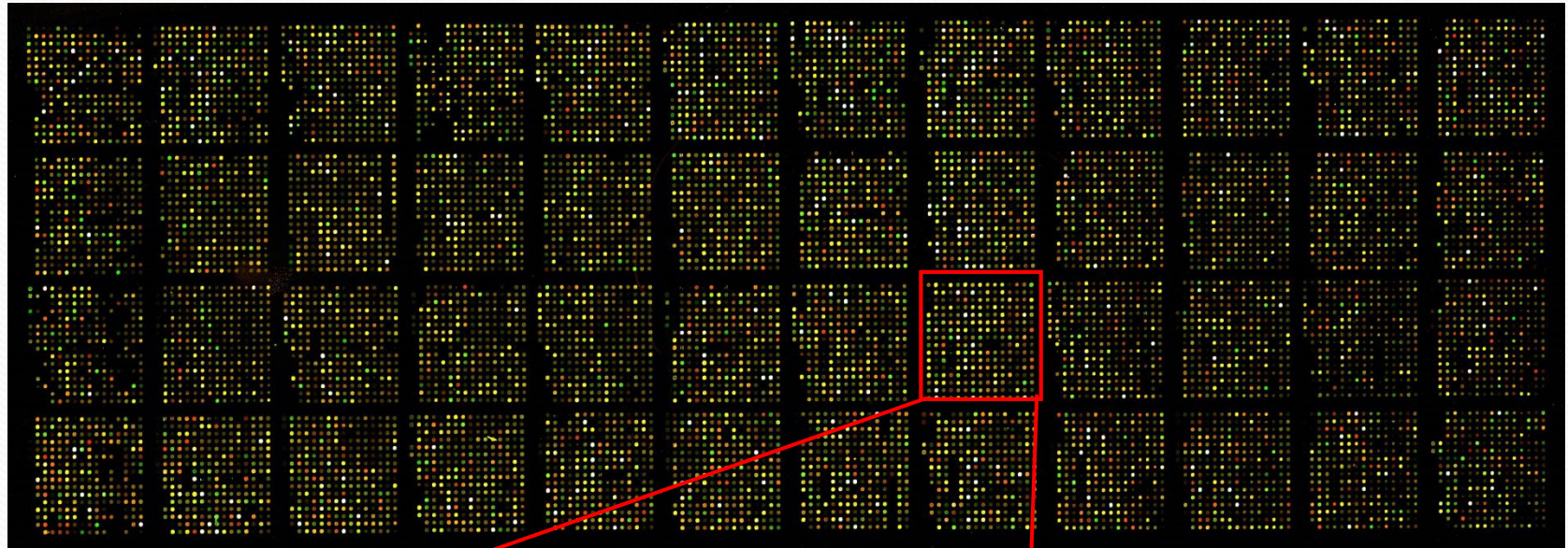
基因與探針的互補序列能充分產生結合



三、晶片掃描分析



有多少“花”基因？有多少“葉片”基因？



蛋白質的萃取與分離

1. 打破細胞或組織

Detergent lysis; osmotic lysis; enzymatic lysis; sonication

2. 蛋白質沉澱

Ammonium sulphate; TCA (trichloroacetic acid) ; Acetone and/or ethanol

3. 蛋白質溶解

Urea (8-9.8 M); Detergent(CHAPS); Reductant (DTT, DTE, TBP); Carrier ampholyte (IPG buffer)

4. 蛋白酶活性抑制

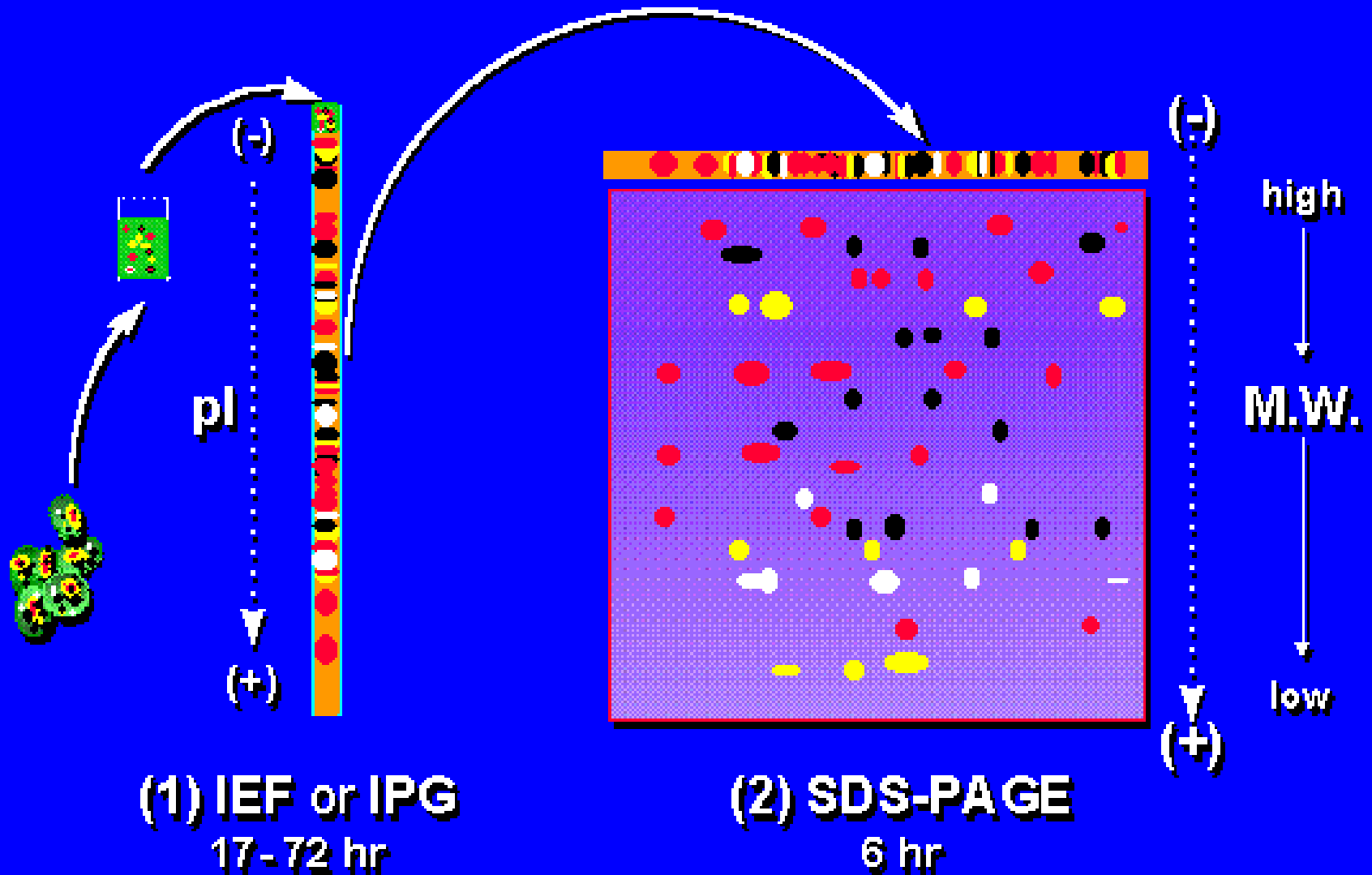
PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride) ; AEBSF (Aminoethylbenzylsulphonyl fluoride) ; EDTA; High pH

5. 非蛋白質部分的去除： nucleic acids, lipids, salts, buffers, ionic small molecules, insoluble material

6. 蛋白質分群： 利用離心去除abundant protein，和利用affinity column或antibody enrich low abundant protein

7. 蛋白質分離：色層分析 (Chromatography) & 電泳 (Electrophoresis) 2-D電泳分析 (2-D PAGE)，先以蛋白質的電荷做為基準(第一維)，之後再以蛋白質分子量大小(第二維)

Two Dimensional Electrophoresis



Mr

pH4

7

97kD

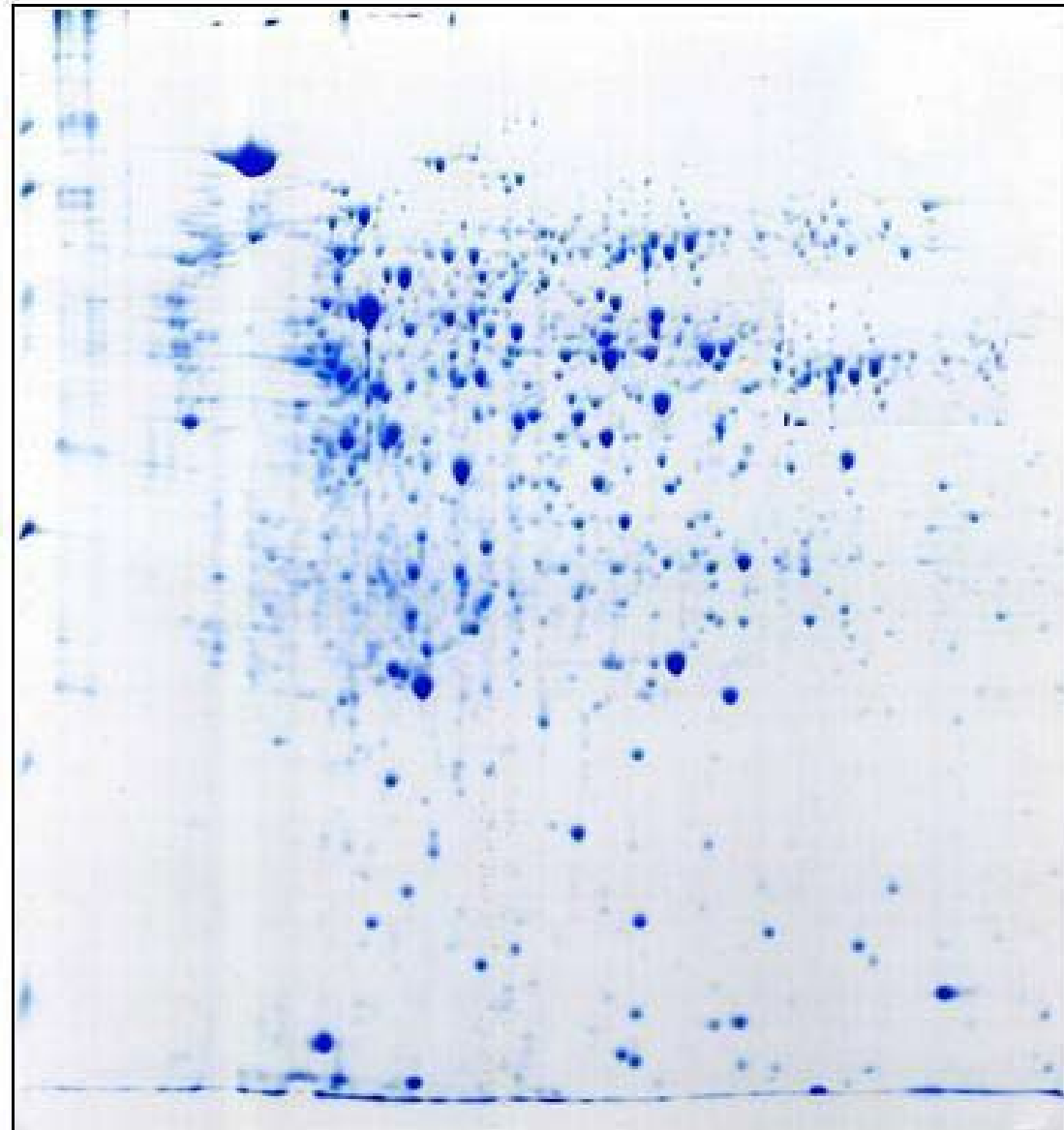
66kD

45kD

30kD

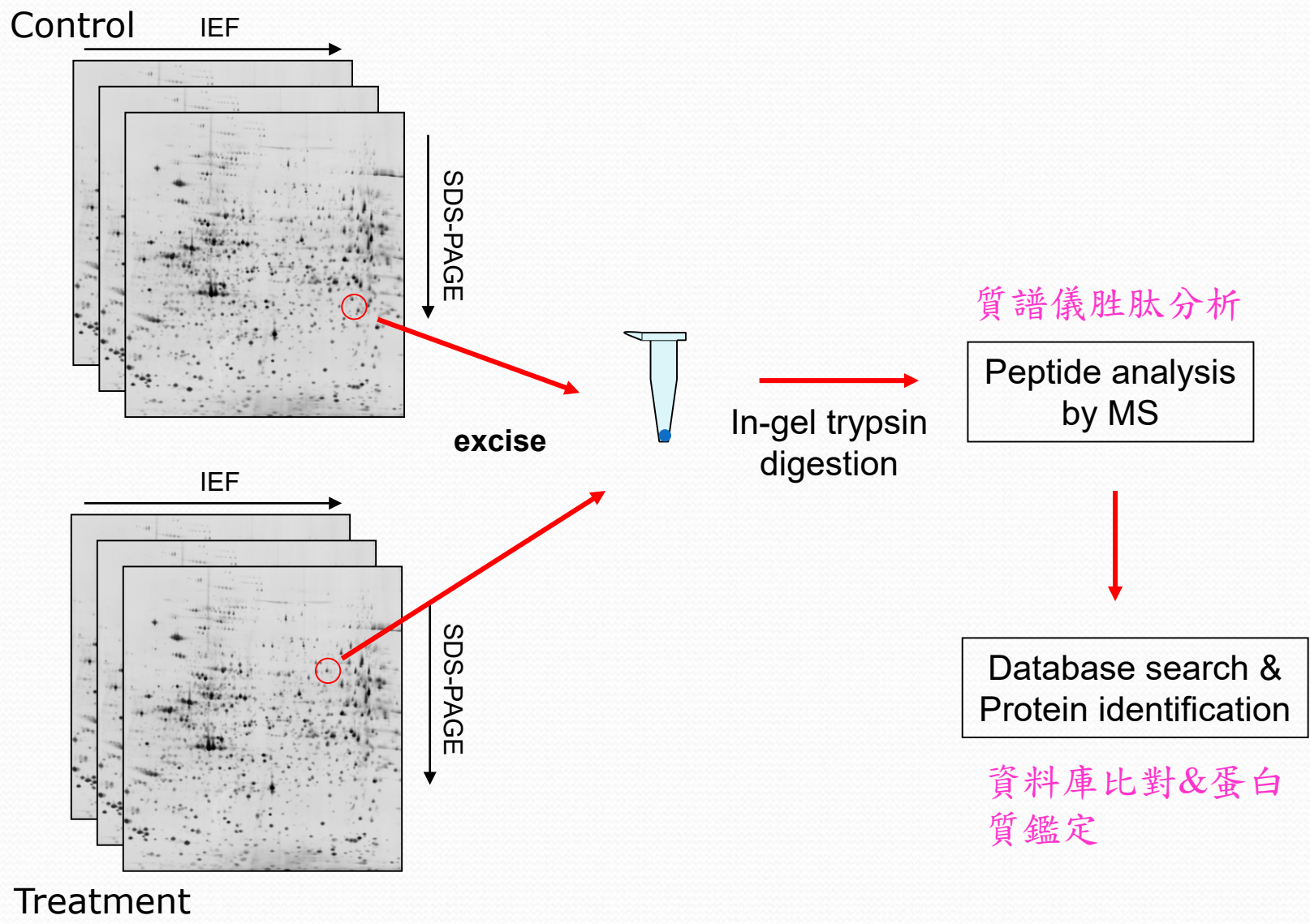
20kD

14kD

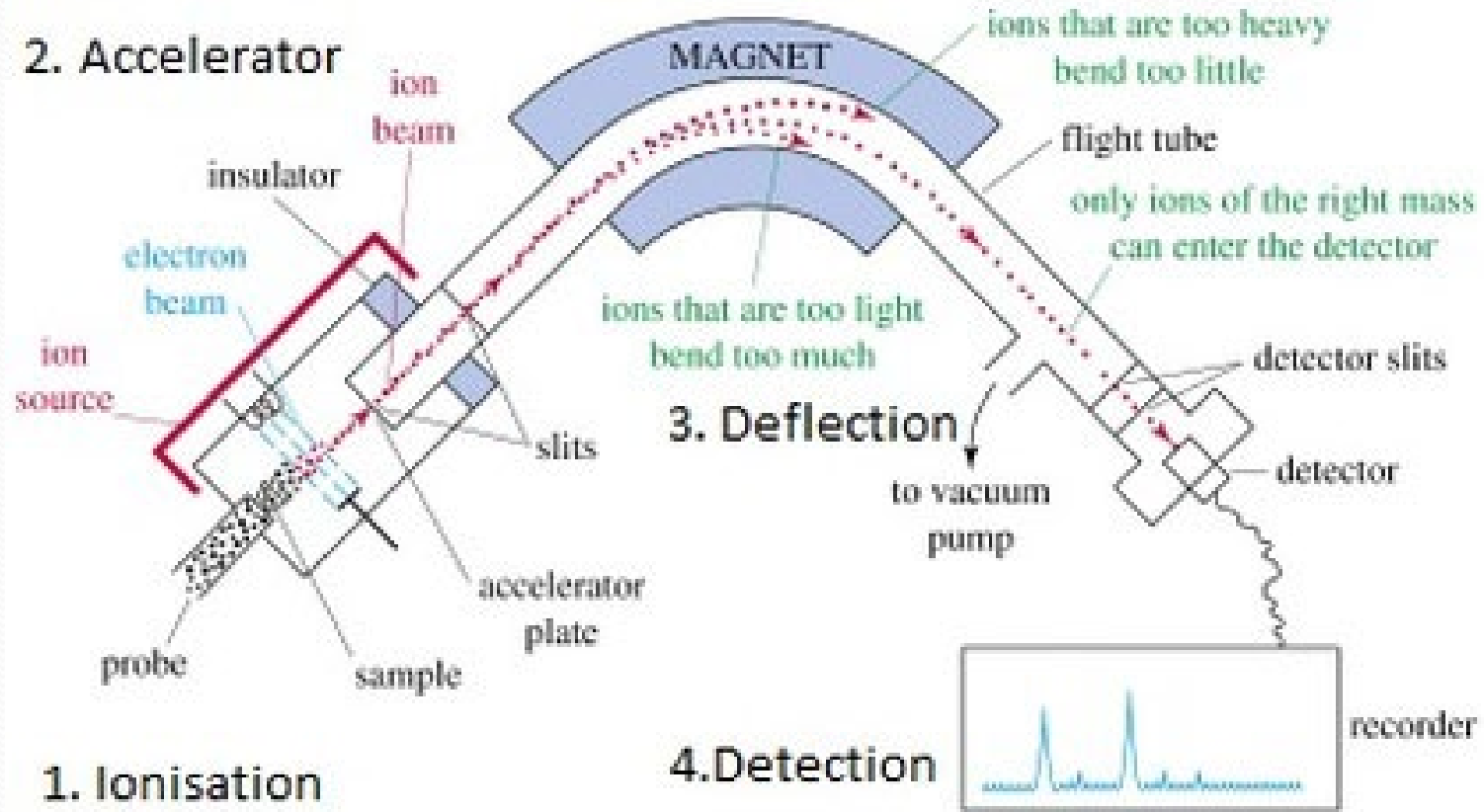


Commassie Blue Stain bacteria 2D Gel Electrophoresis

蛋白質的鑑定 (Protein identification)



Mass Spectrometer 質譜



質譜是一種電離化學物質並根據其質量/電荷比對其進行排序的分析技術。簡單來說，質譜測量樣品內的質量。質譜法被用於許多不同領域，並被用於純樣品和複雜混合物。質譜是離子信號作為質荷比的函數的曲線圖。這些頻譜被用於確定樣品的元素或同位素簽名，顆粒和分子的質量，並闡明分子的化學結構，如肽和其他化合物。

植物基因轉殖

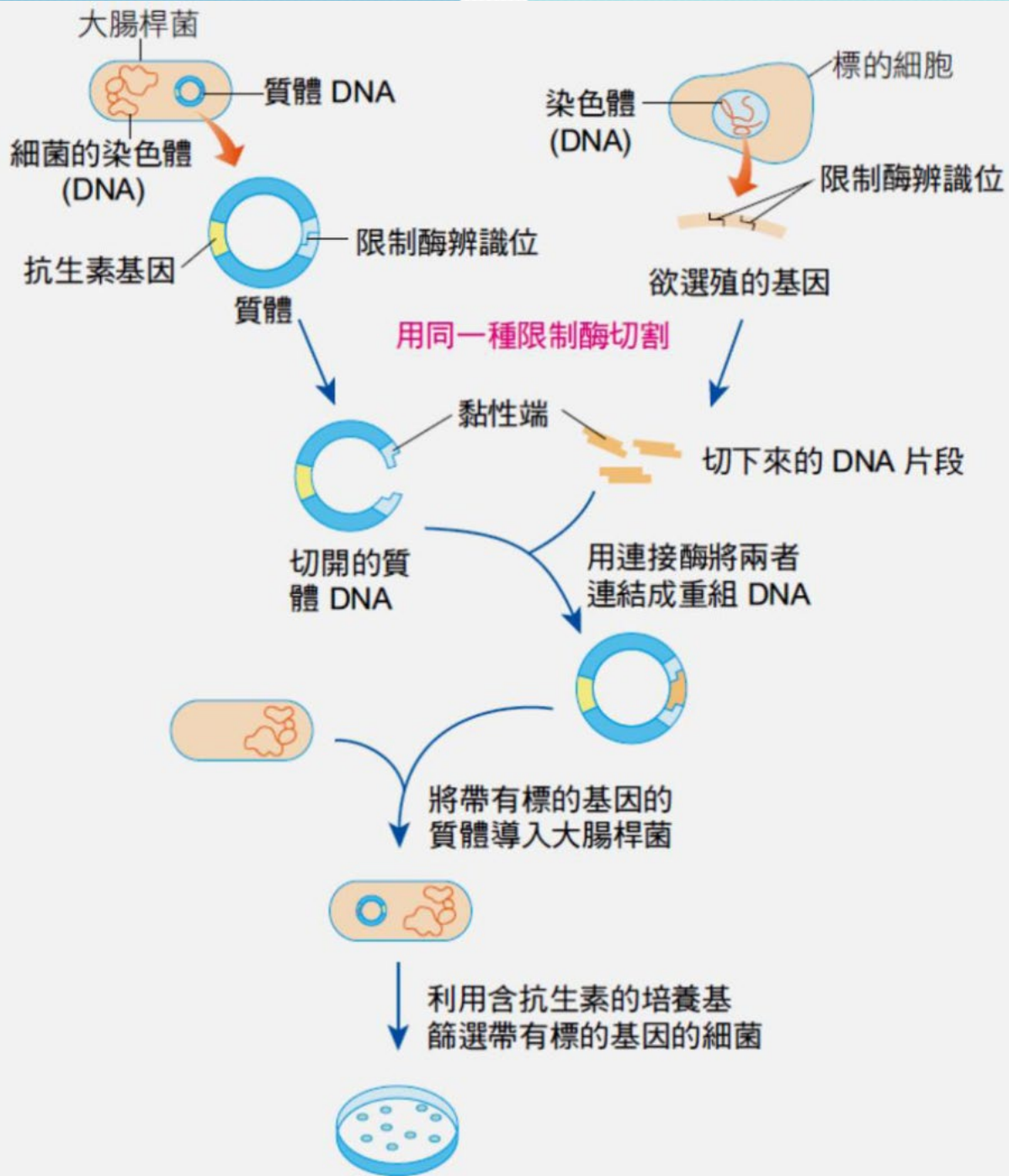
- 使用分子生物技術，將遺傳物質直接轉移入植物細胞或生物體(宿主細胞)，產生基因改造的現象。

常用方法

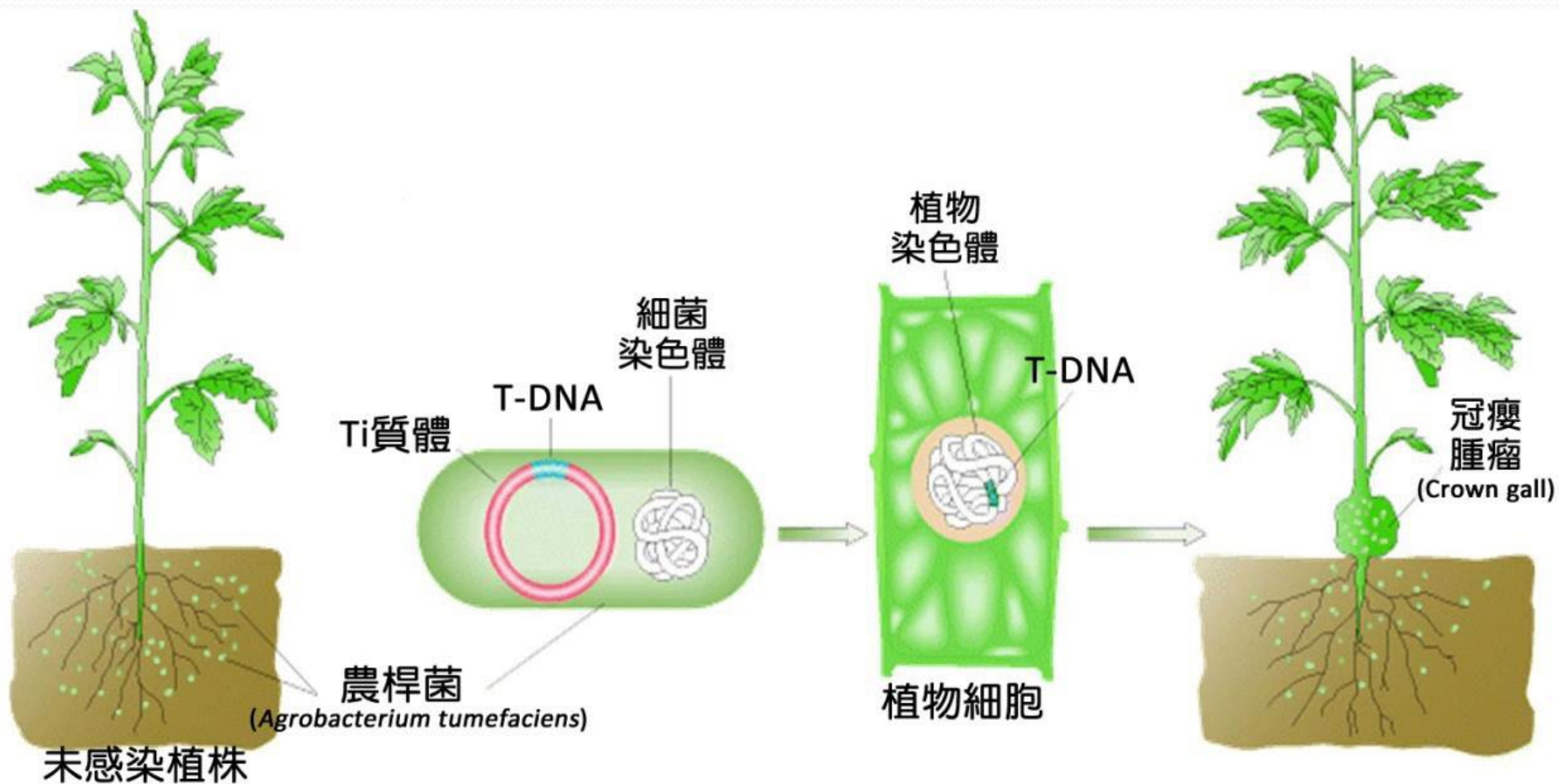
1. **農桿菌法**：將目標基因重組到農桿菌的Ti質體上，農桿菌感染時，會將Ti質體插入寄主細胞的染色體中表現，達到基因轉殖的目的；常用於植物的基因轉殖。
2. **基因槍法**：利用微粒射入的原理，將重組DNA包覆在細微的金粒子表面，再藉由高壓氦氣將粒子直接射入動物、植物細胞中。

其他方法

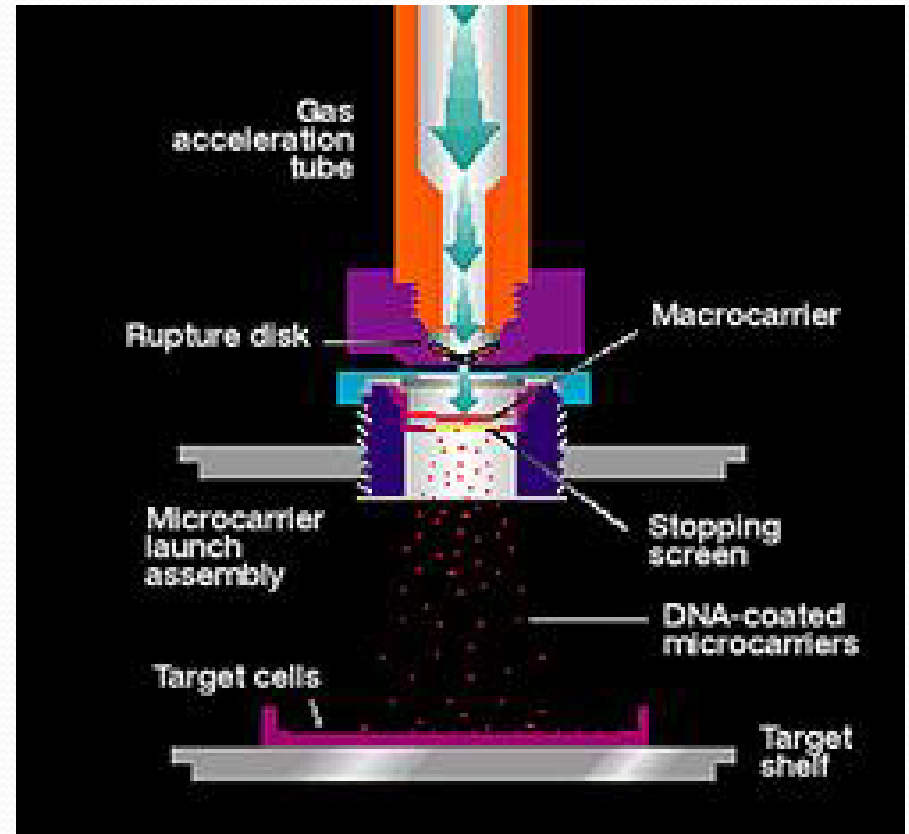
- 1.轉型作用**：利用氯化鈣來改變細菌表面結構，幫助DNA吸附在細胞外側，細胞經由氯化鈣的處理後，細胞壁會有破損，再加上利用熱休克(heat-shock)處理，使質體DNA可以送入細胞中；用於細菌的基因轉殖。
- 2.顯微注射法**：利用管尖極細(0.1~0.5 μm)的玻璃微毛細管，將外來的基因片段直接注射到受精卵或培養的細胞核中；常用於動物的基因轉殖。
- 3.電穿孔法**：通過高強度的電場作用，瞬間提高細胞膜的通透性，使一定大小的外來基因片段可以通過細胞膜進入細胞內；常用於細菌的基因轉殖。
- 4.微脂體轉染法**：先將人工合成的陽離子微脂體和帶負電荷的DNA片段結合成複合物，當複合物接近細胞膜時便會藉由胞吞作用進入細胞；常用於動物的基因轉殖。
- 5.反轉錄病毒感染法**：將目標基因重組到反轉錄病毒的基因體中，利用病毒感染的方式將目標基因插入寄主細胞的染色體中表現；常用於動物的基因轉殖。



農桿菌感染植物體的過程

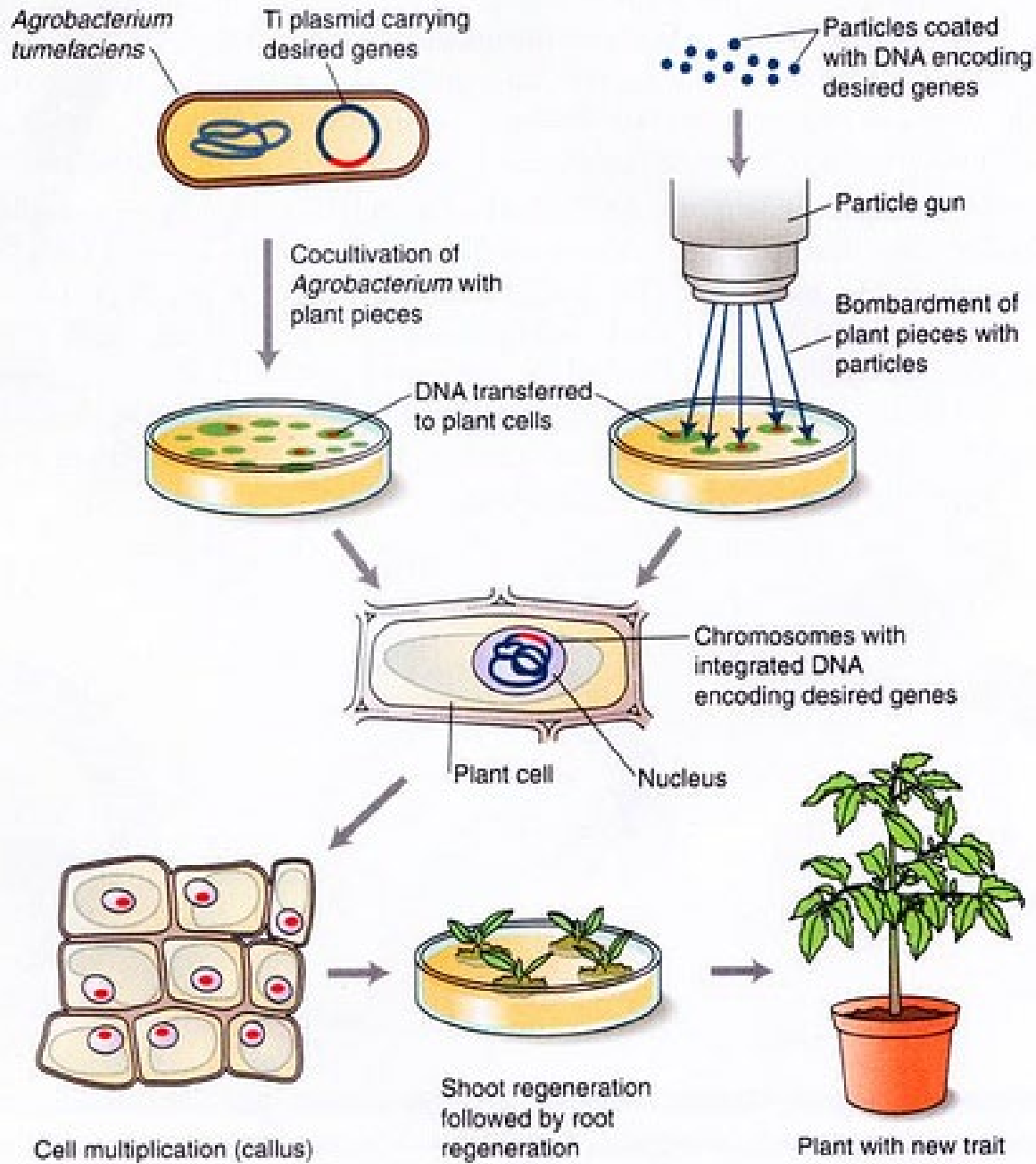


基因槍



Agrobacterium method 農桿菌法

Particle gun method 基因槍法





下課囉！

簡萬能博士

Tel: 02-27871012

Email: wnjane@gate.sinica.edu.tw

FB粉絲專頁：簡萬能的微觀世界

中央研究院

植物暨微生物學研究所

細胞生物學核心實驗室

電子顯微鏡部門

光學顯微鏡部門

流式細胞儀部門