



## 2012 IGEM 國際生物合成競賽實驗手冊

NCTU-FORMOSA



# 微生物技術

## I. LB 液態培養基的配製

- 1.以 25g LB/1L 二次水 的比例調配所需的量。先拿適當的血清瓶或燒瓶，取二次水。
- 2.放入適當大小的磁石，加入稱重好的 LB powder ，放在加熱器上以適當轉速攪拌。
- 3.等到 LB powder 完全溶解後，在以 5mL 的 pipetman 吸取 3mL 或 5mL 至事先準備好的試管中。
- 4.填裝完畢後，以鋁箔紙覆蓋在整個試管架上，並貼上滅菌帶，以 121°C、30 分濕熱滅菌即可。
- 5.依照實驗條件，LB 試管使用前加入一定量的抗生素（抗生素 stock 濃度 50mg/ml，最終濃度 25µg/ml）。

## II. LB agar plate 培養基配製

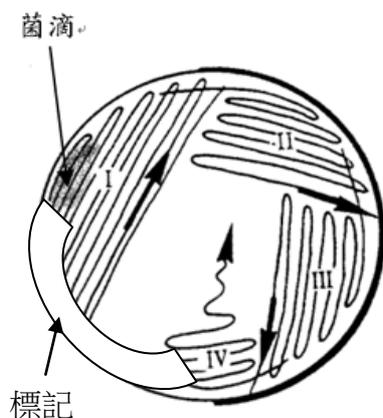
- 1.以 25g LB+15g agar/1L 二次水 的比例調配所需的量。先拿適當的血清瓶或燒瓶，取二次水。
- 2.放入適當大小的磁石，加入稱重好的 powder ，放在加熱器上以適當轉速攪拌。
- 3.等到 powder 完全溶解後，以鋁箔紙覆蓋在燒瓶瓶口並貼上滅菌帶，以 121°C、30 分濕熱滅菌即可。
- 4.滅菌完畢後，在室溫下靜置（需注意底部是否凝結），直到其溫度約在 65 度左右(手掌可忍受卻不燙傷)，即可進行倒盤。
- 5.倒盤前，依照需求加入定量的抗生素（抗生素 stock 濃度 50mg/ml，最終濃度 25µg/ml）。每個 9 cm 無菌培養皿約緩緩倒入 10 ml LB- agar(目測)，輕輕搖晃培養皿使其分佈均勻。
- 6.確定無氣泡殘留後於室溫中放置 30 min，待凝固後倒放避免水氣凝集於培養基上造成污染。
- 7.取一培養基放置於 37°C 培養箱培養 overnight 觀察有無長菌。
- 8.其餘培養基保存於冰箱中留待使用，盤子側邊需註明所使用之抗生素，ampicillin 畫一線，chloramphenicol 畫二線，kanamycin 畫三線，tetracycline 畫四線，同時外包裝之塑膠袋也須寫上日期、抗生素、配製人。

## III. 畫線法

- 1.於 LB-agar 培養盤背面標記宿主名稱、抗生素抗性與自己姓名及日期。

- 2.將接菌環燒紅，待冷卻後沾取菌液。
- 3.選擇 plate 一角畫 3~4 條線為第 I 區，再將接菌環燒紅，待冷卻。
- 4.旋轉培養基，自 I 區塗佈的邊緣再橫劃數條線到未接種的區域（II 區）。
- 5.重複步驟 3 動作，完成 III 區與 IV 區。
- 6.灼燒接種環，將接種環歸位。
- 7.37°C 恆溫培養箱中放置 12~16 hr(overnight)。
- 8.若得單一菌落，將此培養盤以 parafilm 封住，並置於 4°C 冰箱中保存。

※用途：短時間菌種保存、colony 單離...等。



#### IV. 塗佈法

1. 將玻璃塗抹棒以酒精灼燒並冷卻。
- 2.由轉型步驟完成之 ependorf 中，取適當菌液加入 LB agar plate 中，使用冷卻之玻璃棒均勻塗開，塗至 plate 在輕晃下無明顯的(菌)液體流動即可。
- 3.在 37°C 恆溫培養箱中放置 12~16 hr 後，挑取所需之單一菌落培養後，以 parafilm 封盤冷藏至 4°C 冰箱。

※用途：transformation 的最後一步。

#### V. 單一菌落培養

將接種環燒紅後，放置一旁冷卻，此時於玻璃試管內加入 3 ml LB broth + 3  $\mu$ l 25 mg/ml (1000:1)的抗生素 (Final concentration: 25  $\mu$ g/ml) 混合均勻，待接種環冷卻後，即可在培養基上挑選單一菌株至玻璃試管內，於 37°C 培養箱內培養 overnight。

## VI. 菌液的甘油冷凍保存

1. 取冷凍管於管身標明細菌名稱、製備人姓名、抗生素抗性與日期。
2. 以無菌吸管吸取 0.1 ml 80% 無菌甘油於冷凍小管中，再以無菌吸管吸取 0.4 ml 取已活化的菌液，輕輕混合後蓋上。
3. 將冷凍管以-80°C 保存。

## 分生技術

### Plasmid Preparation Protocol

1. 將菌液放至 Eppendorf 內，離心 13,000 rpm，1 分鐘後倒掉上清液。
2. 重複第一步，可得 3 ml 菌液離心後的 Pellet。
3. 加入 200  $\mu$ l 的 PD1 buffer（置於 4°C 冰箱，含 RNase），震盪至 Pellet 完全看不見為止。
4. 加入 200  $\mu$ l 的 PD2 buffer，溫和搖晃至澄清狀（勿使用震盪器），室溫靜置 2 分鐘。
5. 加入 300  $\mu$ l 的 PD3 buffer，溫和搖晃至出現白色棉絮狀的蛋白質，離心 13,000 rpm，5 分鐘。
6. 將上清液（勿吸到白色的蛋白質）吸至 Collection tube。
7. 離心 13,000 rpm，1 分鐘後倒掉廢液。
8. 加入 400  $\mu$ l 的 W1 buffer，離心 13,000 rpm，1 分鐘後倒掉廢液。
9. 加入 600  $\mu$ l 的 Wash buffer，離心 13,000 rpm，1 分鐘後倒掉廢液。
10. 再次離心 5 分鐘，去除殘留之 Wash buffer，再放置一下去除殘留酒精。
11. 將 PD Column 移至新的 Eppendorf 內，加入適量的二次水(30~50 $\mu$ l)，室溫靜置 2 分鐘，離心 13,000 rpm，2 分鐘後即得純化過的 Plasmid。

## ★ Troubleshooting

### 1. 若 Plasmid 的濃度太低？

#### Reasons & Solutions:

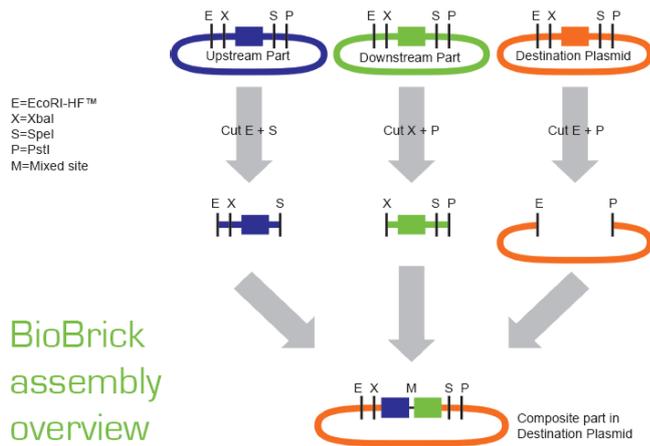
1. 細胞裂解不完全。若菌液一開始太濃，則應分二管離心沈澱。或者，再加入 PD3 solution 之前，適當地 pipetting 或 inverting，確使整個溶液達到均質。
2. 錯誤的 elution 步驟。確保在最後一步加入 elution buffer 或二次水至 PD column 時，是加在正中心位置，並且其濾網以完全吸收液體。
3. 不完全的 elution 步驟。如果目標質體長度大於 10kb，則事先預熱 elution buffer 或二次水（60°C~70°C）。

### 2. 如果抽取的 Plasmid，在接下來的反應，表現並不理想？

#### Reasons & Solutions:

1. 殘餘的酒精污染。加入 Wash buffer 後，務必再將 PD column 進行高速離心 5 分鐘，確使其上的酒精完全揮發。
2. RNA 污染。加入 PD1 buffer 之前，確認 PD1 buffer 已含有 RNase A。
3. Genomic DNA 污染。避免宿主細胞培養過久，並且在加入 PD2 及 PD3 buffer 時，請小心混勻避免 genomic DNA 斷裂分散。
4. DNA 內切酶污染。加入 W1 buffer 後，在室溫下靜置 2 分鐘後再進行離心步驟。

# Biobrick Assembly Kit Protocol



1 Start with two BioBrick parts and a BioBrick destination plasmid. The destination plasmid contains a toxic gene, *ccdB*, in the BioBrick cloning site and a different antibiotic resistance marker to the upstream and downstream parts.

2 Digest each of the parts with the appropriate restriction enzymes.

3 Mix the digests together and perform a ligation step. One of the ligation products formed will be the correctly assembled composite part in the destination plasmid. You can use the ligation mix to transform competent cells with the new composite part.

The BioBrick™ Assembly Kit from NEB and Ginkgo BioWorks has been designed for use with this manual. Download this manual from <http://ginkgobioworks.com/support>

剪切(3 part)：前段 gene 使用 EcoR1 和 Spe1  
後段 gene 使用 Xbar1 和 Pst1  
Vector 使用 EcoR1 和 Pst1

剪切(2 part)：較長的 gene 使用 EcoR1 和 Spe1  
較短的 gene 使用 EcoR1 和 Xbar1 (留 backbone)  
或者  
較長的 gene 使用 Xbar1 和 Pst1  
較短的 gene 使用 Spe1 和 Pst1 (留 backbone)

## ■ Digestion Protocol

### (3 part)

1. Upstream part 用 EcoR1 和 Spe1	
Upstream part plasmid	5 $\mu$ l (~500ng)
EcoR1-HF	0.5 $\mu$ l
Spe1	0.5 $\mu$ l
10X NEBuffer 2	2 $\mu$ l
10X BSA(註 2)	2 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	10 $\mu$ l
Total	20 $\mu$ l

2. Downstream part 用 Xbar1 和 Pst1	
Downstream part plasmid	5 $\mu$ l (~500ng)
Xbar1	0.5 $\mu$ l
Pst1	0.5 $\mu$ l
10X NEBuffer 2	2 $\mu$ l
10X BSA(註 2)	2 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	10 $\mu$ l
Total	20 $\mu$ l

<b>3. Vector part 用 EcoR1 和 Pst1</b>	
Vector plasmid	5 $\mu$ l (~500ng)
EcoR1	0.5 $\mu$ l
Pst1	0.5 $\mu$ l
10X NEBuffer 2	2 $\mu$ l
10X BSA(註 2)	2 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	10 $\mu$ l
Total	20 $\mu$ l

## (2 part)

<b>1. Upstream part 用 EcoR1 和 Spe1</b>	
Upstream part plasmid	5 $\mu$ l (~500ng)
EcoR1-HF	0.5 $\mu$ l
Spe1	0.5 $\mu$ l
10X NEBuffer 2	2 $\mu$ l
10X BSA(註 2)	2 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	10 $\mu$ l
Total	20 $\mu$ l

<b>2. Downstream part 用 EcoR1 和 Xbar1</b>	
Downstream part plasmid	5 $\mu$ l (~500ng)
EcoR1-HF	0.5 $\mu$ l
Xbar1	0.5 $\mu$ l
10X NEBuffer 2	2 $\mu$ l
10X BSA(註 2)	2 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	10 $\mu$ l
Total	20 $\mu$ l

\*\* Digestion 的 buffer 可用手握使其回溶。

所使用的 vector 含有紅螢光蛋白，發紅光菌株為自我黏合菌株，避免挑到紅色菌落。攜帶 upstream 和 downstream 的 plasmid 的 antibiotic resistance marker 和 vector 上所攜帶的的要有所不同，方便之後進行篩選。

將上述 3 部分在 37°C 中放置 1 小時使之進行剪切動作(此步驟時間可有彈性，時間 30 分鐘~24 小時均可)，再放置到 80°C 中 20 分鐘使其失活。

反應完成產物可以跑膠確定限制酵素片段大小。

## ■ Ligation Protocol：黏合 upstream 和 downstream 到 vector 上

黏合 upstream 和 downstream 到 vector 上	
Vector plasmid	2 $\mu$ l
Upstream part	2 $\mu$ l
downstream part	2 $\mu$ l
10X T4 DNA ligase buffer	2 $\mu$ l
T4 DNA ligase	0.5 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	9.5 $\mu$ l
1mM ATP	2 $\mu$ l
Total	20 $\mu$ l

\*\*Ligation 的 buffer (T4 DNA ligase buffer 和 1mM ATP)不可用手握回溶! 要在冰上溶解!!

將上述反應在 16°C 中放置 30 分鐘使之進行黏合動作(此步驟時間可有彈性，時間 30 分鐘~24 小時均可)，再放置到 80°C 中 20 分鐘使其失活。反應完後直接進行 transformation 或放 4°C 保存。

備註：

1. 加入所有試劑或樣品時，由大體積開始，使用無菌 ddH<sub>2</sub>O 配製，當所有試劑與樣品加入後，再用冰盒取用酵素加入反應 tube 中，要盡量縮短酵素離開冷凍的時間，避免酵素失去活性。

10XBAS 以 ddH<sub>2</sub>O 由 100X BAS stock 稀釋 10 倍存放在-20°C 冰箱備用。

## ECOS Transformation

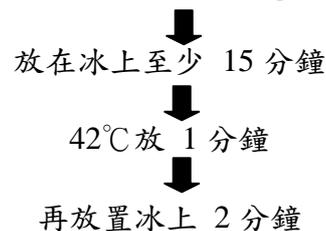
Step 1：從-80°C 中取出勝任細胞置於冰上回溶。

Step 2：直至勝任細胞約二分之一溶解(半溶狀態)，加入預冷之 2  $\mu$ l 的 Plasmid (若為 Ligation 產物，則加 5  $\mu$ l 或 10  $\mu$ l)，溫和攪拌或 pipetting 使其混勻。



\*不易 transform 成功時可嘗試此種 protocol:

Competent cell + Plasmid(Ligation 產物)



註：

1. Competent cell 一管有 100  $\mu$ l，一次最少要做兩到三個反應，如果當次只有一個反應，請找別組合作一起轉型。
2. 拿取 Competent cell 務必先準備好冰，在-80°C 冰箱拿出，馬上插入冰上，約 5 分鐘後即可分裝，分裝之 ependorf 也要預冷，分裝後可馬上轉型。

### 3. 塗佈法

- i. 將玻璃塗抹棒以酒精灼燒並冷卻。
- ii. 由轉型步驟完成之 ependorf 中，取適當菌液加入 LB agar plate 中，使用冷卻之玻璃棒均勻塗開，塗至 plate 在輕晃下無明顯的(菌)液體流動即可。
- iii. 在 37°C 恆溫培養箱中放置 12~16 hr 後，挑取所需之單一菌落培養後，以 parafilm 封盤冷藏至 4°C 冰箱。

## ★ Transformation Troubleshooting

1. 如果化學勝任細胞轉型效率太低？

Reasons & Solutions:

1. DNA 可能含有一些雜質，例如：phenol、蛋白質、活性劑或酒精。利用酒精沈澱或商業化 DNA 分離系統。
2. DNA 過多。在小於 5  $\mu$ l volume/100  $\mu$ l of cells 中，DNA 不要超過 1–10  $\mu$ g。
3. 勝任細胞處理不當。細胞稍融之後，馬上使用，切勿再冷凍或 vortex 處理。

2. 如果菌落都是白色的，但 Plasmid 中卻沒有 Insert part？

Reasons & Solutions:

1. 若以顏色作為篩選依據，可能是菌落顏色尚未明確，可將培養基在 37°C 或放在 4°C 冰箱隔夜，再進行挑選。
2. 可能是有其他 DNA 片段接上骨架，可在進行接合反應前，將 DNA 進行切膠純化。

# Polymerase Chain Reaction

## I. PCR 組成注意事項:

(1) Template DNA:通常 template DNA 量很少,plasmid DNA 約為 0.01 ~ 1 ng,而 genomic DNA 則為 0.1 ~ 1 µg。太多的 template DNA 會造成雜訊的產生,所以要 控制在精確的範圍內。另外,template DNA 純化過程所遺留的 phenol、ethanol、EDTA、proteinase K 等都會影響 DNA polymerase 的作用,要將之清除乾淨。

(2) Primers:設計 primer 時要注意的事項有:(a) Primer 長度通常為 18 ~ 25 個鹼基。(b) G+C 含量約在 40~60%。(c) 同一反應中的 primer 序列不可互補,以免造成自相黏合的情況。(d) Primer annealing 溫度盡量不要相差 5°C 以上。(e) 注意 template DNA 中所有可能和 primer 互補的區域,設計時避免含有這些區域。

(3) 如何估計反應的黏合溫度:若 primer 長度不超過 25 個鹼基,則以公式  $T_m$  (melting temperature) =  $4(G + C) + 2(A + T)$  估算。若 primer 長度超過 25 個鹼基,則不適用此公式來運算。通常,在合成完畢的 primer 資料中會附有黏合溫度的數據,故設計反應時可參考該數據決定。PCR 反應黏合溫度最好低於 primer 的  $T_m$  值 5°C 左右進行。

(4) MgCl<sub>2</sub> 的濃度:Mg<sup>2+</sup>會和 primer、template 及 dNTPs 形成複合物,太少則整體 PCR 反應產物都會減少,太多則會產生許多的雜訊,故適量的 Mg<sup>2+</sup>濃度是很重要的。建議 MgCl<sub>2</sub> 濃度為 1 ~ 4 mM,在大部份的實驗中,dNTPs 濃度為 0.2 mM,MgCl<sub>2</sub> 濃度為 1.5 mM。

(5) dNTPs:通常 PCR 反應中的每種 dNTP(dATP、dTTP、dGTP 及 dCTP)濃度為 100 mM,若需進行高精確度的 PCR 反應,則將 dNTPs 的濃度控制在 10 ~ 50 mM。

## II. PCR 溫度循環設定:

(1) 起始高溫分離兩股 DNA:完全將兩股 DNA 分開對 PCR 起始步驟是相當重要的。作用不完全將得到很少的 PCR 產物。建議在 G、C 總含量是 50%以下時,溫度應設定在 95°C 時間在 1 ~ 3 分鐘的範圍。時間可隨著 G + C 在模版上的比例調升至 10 分鐘。如果起始溫度設定時間低於 3 分鐘,則 Taq DNA polymerase 可以一開始就加入 PCR 反應混合液中。但是如果高於 3 分鐘,為了避免 Taq DNA polymerase 酵素活性受影響,最好在溫度降下後再加入。

(2) 高溫分離兩股 DNA:通常 94 ~ 95°C 進行 1 ~ 2 分鐘即可將兩股 DNA 分離,如果 G、C 總含量過高,可將時間提高至 3 ~ 4 分鐘。或者加入以下的溶液促使 DNA 分離:10 ~ 15% glycerol、10% DMSO、5% formamide 等。加了以上的溶液會造成  $T_m$  值的下降,使得

primer 及模版 DNA 結合溫度需視實驗做調整。加入溶液有個副作用是使得 Taq DNA polymerase 活性受約 50%的抑制。因此,另一種降低 Tm 的方法是用 7-deaza-dGTP 取代 dGTP。

(3) primer 黏合:通常 primer 與模版 DNA 黏合的溫度大約為 Tm 值減 5°C,黏合時間約 1 ~ 2 分鐘。如果除了預期產物外,有些非預期的產物出現,則可逐漸提高黏合溫度約 1 ~ 2°C。

(4) 延展:延展的環境在 68 ~ 75°C。Taq DNA polymerase 合成速率每分鐘約 1 kb 左右。

(5) 循環次數:循環次數多寡視模版 DNA 在反應溶液中的量而改變。(6) 最後延展步驟:循環結束後,樣本通常會在 68 ~ 75°C 延展 5 ~ 10 分鐘。用意在於填補最後幾次循環的產物。另外,在這個過程中,Taq DNA polymerase 的末端轉移酶(terminal transferase)活性會將 PCR 產物 3'端加上幾個額外的 dATP。因此,如果 PCR 產物是用在重組 DNA 上,其載體末端也含 dTTP,則最後延展步驟可將時間提高至 30 分鐘。

### **III. Colony PCR 步驟:**

1.取一支 0.2 ml 薄壁 PCR 管,各加入下列各項:

組成	取用量(體積單位:µl)
ddH2O	18
10 × PCR Taq buffer	5
dNTP(2.5 mM)	(premix)
Taq DNA polymerase	(premix)
Forward primer(10 µM)	1
Reverse primer(10 µM)	(premix)
稀釋菌液	1
Total	25

2. 設定 PCR 反應條件:

(a) Denature: 95°C (5 分鐘)。

(b) 15~30 cycles: 95°C (30 秒) → 55~60°C (30 秒) (T<sub>m</sub> 值減 5°C) → 72°C (insert 1Kb 1 分鐘  
再加 30 秒)。

(c) Elongation: 72°C (10 分鐘)。

(d) 15°C (∞)

以上溫度設定可依照實際情況作調整。

3. 將 PCR 管子置入 PCR 熱循環器中進行反應。

待 PCR 反應完後, 進行電泳分析 (110V、35 分鐘), 觀察 PCR 產物增殖的情形, 照相記錄。

## **IV. Construction Technique: Agarose Gel Electrophoresis**

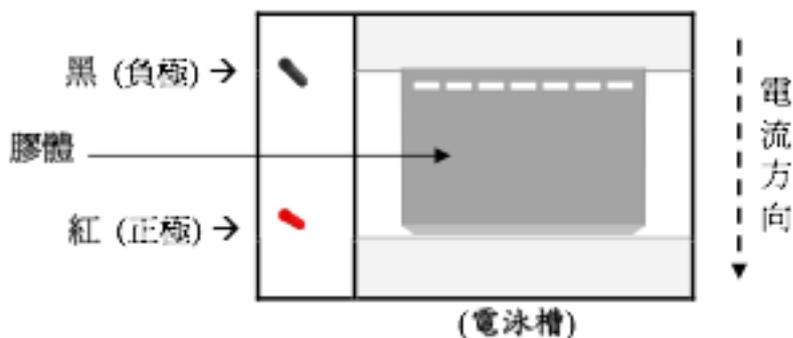
材料準備

1. 1X TAE: 依照原來 Stock 的濃度稀釋至 1L。
2. 造膠用血清瓶: 使用前可先以 1X TAE 潤洗。
3. Agarose powder:
4. 注膠器: 包含尺梳、塑膠框, 事先清洗好擦乾。
5. Dye: 染色用, 使用小心需配戴手套。
6. 電泳槽: 含變壓器。

步驟

1. 量取適量的 1X TAE buffer 至血清瓶。(總量計算方式: 小塊 20mL, 大塊 40mL)
2. 量取適量 agarose powder 至血清瓶, 使濃度為 1%。(0.2g agarose/20mL buffer)
3. 將血清瓶放在微波爐, 以最大強度微波, 以 30 秒為一單位, 使其完全溶解直到液體呈現透明無色且無明顯懸浮物。

- 將血清瓶靜置冷卻至可以赤手碰觸超過五秒以上(室溫靜置約十五分鐘)。
- 將注膠器裝好後，將膠液緩緩倒入注膠器，避免有氣泡，若有任何氣泡出現，以 tip 尖端刺破，或撥弄至邊緣。最後將尺梳插上，注意尺梳與底盤的距離，避免碰底。(注膠器使用前請先沖洗並晾乾之)
- 等到膠片凝固後，將所要進行電泳之膠片連同底盤放在電泳槽。



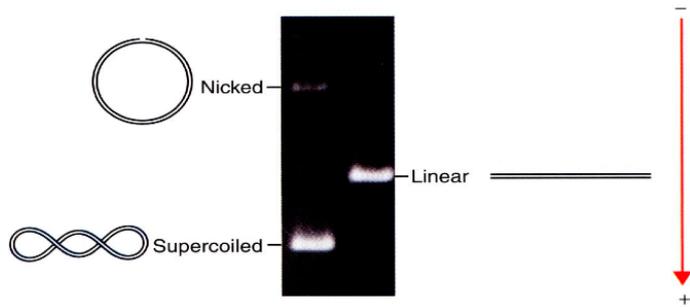
- 傾倒 1X TAE buffer 至電泳槽，使其淹沒膠片 3~5mm 高度。(稍微蓋過即可)
- 將樣品以下列比例注入膠片上的孔洞。

(單位： μl)	DNA marker	Plasmid DNA(check)	Digestion check(大於 500bp)	Digestion check(小於 500bp)	PCR product
Sample	5~6	2~3	5	10	10
6X loading dye	1	1	1	2	2
Total	6	6	6	12	12

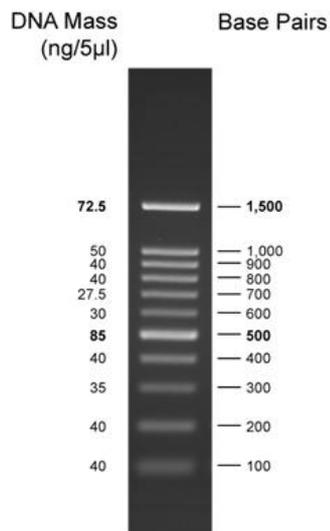
- 電泳槽上方為插負極的黑色電線，下方為插正極的紅色電線。電壓調整至 100V，計時 30 分鐘（過程中需肉眼確認染劑不要跑出膠片）。
- 以照膠系統觀察，並印出照片或存檔。

註：

- 觀察膠片時，會遇到三種形式的 DNA 在膠片上，Nick form 為雙股 DNA 其中一股有斷裂，可能是在抽取質體時不夠小心謹慎或限制酵素切不完全。Supercoiled form 為雙股 DNA 糾纏一起的形式，體積最小，所以跑最快。Linear form 為限制酵素切一位的形式，用於確認片段大小。

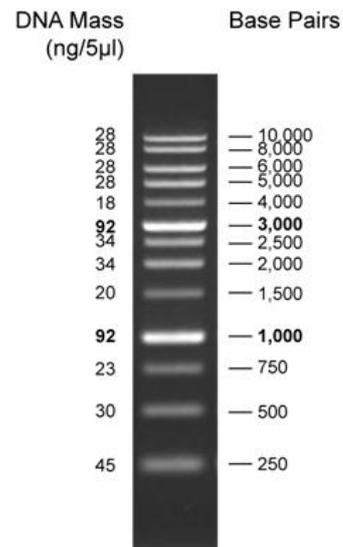


100 b.p. DNA marker 對照。



1.7 % TAE agarose gel

1k.b. DNA marker 對照。



1 % TAE agarose gel

## ★ Troubleshooting

1. 膠片上的 band 太過微弱甚至沒有？

Reasons & Solutions:

1. DNA 的濃度不足或不夠量。增加 DNA 的濃度及量，每個 band 勿超過 50ng。
2. DNA 被分解了。應在操作過程中，避免內切酶污染。
3. DNA 片段已跑出膠片外。應減少電泳時間、使用較低電壓或使用濃度較高的膠片。
4. 使用適當的 UV 光照射。

## ★ Troubleshooting

2. 如果看到 smeared DNA bands ?

Reasons & Solutions:

1. DNA 被分解了。應在操作過程中，避免內切酶污染。
2. DNA 注入的量太高，應減少注入量。
3. 電泳條件不適當。不要讓電壓高過於 20V/cm，並維持電泳環境少於 30°C，且 buffer 具足夠的 buffer capacity。
4. 在 DNA 樣品中殘有太多鹽類。在電泳前，使用酒精沈澱法處理樣品。
5. DNA 被蛋白質污染。使用酚萃取去除蛋白質。

## **V. Construction Technique: Agarose Gel Purification**

1. 切下來的膠需 < 300 mg，且多餘的膠愈少愈好，若膠塊太大，可稍微切碎加速溶解。

2. 加入 FAGX buffer 500  $\mu$ l。

3. 55~60°C 水浴 10~15 分鐘，使膠完全溶解（每 2~3 分鐘要上下倒置一次）。

4. 待上述步驟之產物冷卻後，將溶液移至 Column 中，以 13,000 rpm 離心 30 秒。

（若體積 > 800  $\mu$ l 時，則分二次離心。）

5. 加入 600  $\mu$ l 的 Wash buffer 至 Column 中，以 13,000 rpm 離心 30 秒。

6. 倒掉濾液後，空轉 3 分鐘，使 Column 上酒精乾燥。

7. 加入 15~50  $\mu$ l 的 Elution buffer 或無菌二次水，靜置 3 分鐘後，以 13,000 rpm 離心 2 分鐘即得產物。

## ★ Troubleshooting

### 1. 若純化的 DNA 濃度太低？

#### Reasons & Solutions:

1. 膠塊溶解不完全。若膠塊一開始大於 300mg，則應分二管溶解，或者，將水溫維持在 60°C 溶解膠塊。
2. 錯誤的 elution 步驟。確保在最後一步加入 elution buffer 或二次水至 FAGX column 時，是加在正中心位置，並且其濾網以完全吸收液體。
3. 不完全的 elution 步驟。如果目標 DNA 長度大於 8kb，則事先預熱 elution buffer 或二次水 (60°C~70°C)。

### 2. 如果純化的 DNA，在接下來的反應，表現並不理想？

#### Reasons & Solutions:

1. 殘餘的酒精污染。加入 Wash buffer 後，務必再將 FAGX column 進行高速離心 5 分鐘或放在 60°C 烘箱，確使其上的酒精完全揮發。
2. DNA 已變性。將已純化之 DNA 放在 95°C 下兩分鐘，接著緩慢冷卻使其黏合回復。

4.

## 常用網站與工具

- 1.iGEM 元件庫查詢。 [http://partsregistry.org/Main\\_Page](http://partsregistry.org/Main_Page)
- 2.BLAST 工具。 <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- 3.NEB 限制酶工具。 <http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>
- 4.DNA 序列輔助。  
[http://www.cellbiol.com/scripts/complement/reverse\\_complement\\_sequence.html](http://www.cellbiol.com/scripts/complement/reverse_complement_sequence.html)
- 5.Primer 設計。 <http://www.bioinformatics.org/primerx/>