

行政院所屬各機關出國報告
(出國類別：研究)

不可培養微生物之多樣性分析

服務機關：財團法人食品工業發展研究所
出國人職稱：副研究員
姓名：劉祖君
出國地區：德國
出國時間：91/11/19~91/12/20
報告日期：92/02/10

I61

09>000000

公務出國報告提要

頁數: 41 含附件: 是

報告名稱:

不可培養微生物之多樣性分析

主辦機關:

經濟部

聯絡人/電話:

/

出國人員:

劉祖君 財團法人食品工業發展研究所 副研究員

出國類別: 研究

出國地區: 德國

出國期間: 民國 91 年 11 月 19 日 - 民國 91 年 12 月 20 日

報告日期: 民國 92 年 02 月 10 日

分類號/目: I6/生物學 I6/生物學

關鍵詞: uncultured, rDNA

內容摘要: 本研習計畫主要為到著名的菌種中心德國DSMZ, 研習「不可培養(uncultured)微生物多樣性分析」之相關技術。研習內容主要利用分子生物學的技術, 直接將環境所萃取的DNA以PCR(polymerase chain reaction)的方式擴增其rDNA基因、選殖於載體。再藉由核甘酸定序及序列分析後, 與已知微生物的rDNA序列作比較, 判斷序列的真偽的可能性並找出最接近的微生物名,以利後續在分子類緣上將其歸群。初步實驗結果, 不可培養微生物的選殖株數目較可培養的數目來的多, 仍有許多微生物仍無法被培養, 這些微生物也許在未來生技產業的標的對象。此外亦請教有關利用denaturing gradient gel electrophoresis(DGGE)的相關技術,可作為快速分析環境樣品中菌相的方法。

本文電子檔已上傳至出國報告資訊網

目 錄	頁 次
一、摘要	1
二、研習目的	2
三、訓練時間地點及機構	2
四、訓練項目及內容.....	3
五、訓練心得.....	6
六、檢討及建議.....	8
七、謝誌.....	8
八、附錄	8

不可培養微生物之多樣性分析

一、摘要

本研習計畫主要為到著名的菌種中心德國 DSMZ，研習「不可培養(uncultured)微生物多樣性分析」之相關技術。研習內容主要利用分子生物學的技術，直接將環境所萃取的 DNA 以 PCR(polymerase chain reaction) 的方式擴增其 rDNA 基因、選殖於載體。再藉由核苷酸定序及序列分析後，與已知微生物的 rDNA 序列作比較，判斷序列的真偽的可能性並找出最接近的微生物名，以利後續在分子類緣上將其歸群。初步實驗結果，不可培養微生物的選殖株數目較可培養的數目來的多，仍有許多微生物仍無法被培養，這些微生物也許在未來生技產業的標的對象。此外亦請教有關利用 denaturing gradient gel electrophoresis(DGGE)的相關技術，可作為快速分析環境樣品中菌相的方法。

二、 研習目的

依據許多學者的研究估計，在自然界中尚不可培養(uncultured)的微生物種類遠大於可培養微生物，而不可培養(uncultured)的微生物，目前可利用分子生物學的技術，將其 rDNA 以 PCR(polymerase chain reaction) 的方式擴增後，或選殖於載體，或以 DGGE 的方法將其分離純化。再藉由核甘酸定序及序列分析後，與其他微生物的 rDNA 序列作比較，在分子類緣上將其歸群，確認它的存在及分類的位置。此方法可以用來研究生物多樣性，幫助了解本土微生物資源的詳細概況。由於聯合國生物多樣性公約實施，世界各國日漸重視生物資源，本土微生物被視為國家寶貴資財，不可培養(uncultured)的微生物相關技術的建立，確有其必要性。

另一方面由親緣性的分析，可以在培養的技術上獲得相關的資訊，進一步使這些微生物能夠被培養。此外相關的技術可應用於將不可培養(uncultured)的微生物重要用途的基因選殖出來，以提供生技產業的利用，具有相當大的開發潛力。

藉由本次的研習機會，到已有豐富經驗的德國菌種中心 DSMZ 對於提升在不可培養(uncultured)微生物多樣性分析之相關技術之能力，具有相當大的幫助。

三、研習時間與地點及機構

研習期間自 2002 年 11 月 19 至 12 月 20 日。研習地點為德國菌種中心 Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), 所在城市為 Braunschweig。

四、研習項目及內容

本次研習所使用的樣品，為 2 個臺灣本土溫泉底泥之 DNA 樣品。採樣點的資料如表一。

使用的方法主要為將其 rDNA 以 PCR 的方式擴增、選殖於載體。

實驗內容與流程如下：

1 構築 16srDNA library, 進行序列分析：

(1) 樣品 DNA 16srDNA 基因之擴增

將 2 個溫泉樣品 DNA 進行 PCR 試驗，擴增樣品 DNA 中之 16srDNA 基因。

實驗中所使用的引子為 10x30F 與 1500R 見附件一、二，PCR 溫度的條件與反應配方見附件三。

首先進行之 PCR 反應以電泳觀察並無產物。接著將 DNA 以加入十分之一倍體積(3M) Na-acetate 與 2.5 倍 95% 酒精進行沉澱，存放於 4°C 隔夜後，以 13,000 rpm 進行離心 30 分鐘。去上清液後再加入 300 μ l 70%酒精以 13,000 rpm 進行離心 30 分鐘，去上清液，以去掉殘餘的鹽分。接著以真空離心 (speed vac) 5 分鐘。經此處理後可見黃褐色沉澱於離心管底。推測可能 DNA 仍有許多雜質。將 2 個溫泉樣品 DNA 各懸浮於 30 μ l TE(Tris-EDTA) 緩衝液。

接著以 0.1、1 及 2 μ l DNA 為模板，進行 PCR 反應，其中僅 0.1 μ l 可擴增出約 1.5Kb 大小之 DNA 片段(如圖一)。較多量的模板 DNA 反而沒有產物，推測可能是 DNA 樣品中雜質較多，較多量的 DNA 相對含雜質也較高而導致 PCR 無產物。

對含雜質也較高而導致 PCR 無產物。

(2) 16srDNA 基因之選殖

將所擴增的 PCR 產物，以 QIAquick PCR Purification Kit(QIAGEN)純化後(方法見附件四)，進行選殖。使用的套組為 TOPO TA Cloning kits (Invitrogen)，此套組的特色為使用 topoisomerase 接合 PCR 產物與載體，與一般使用接合酵素(ligase)有所不同。使用原理與方法流程詳見附件五、六。使用載體 PCR2.1-TOPO(3.9kb)附件七，進行轉型作用於 TOP010F'大腸桿菌勝任細胞，以 LB 培養基含 50 μ g/ml ampicillin 及 40mg/ml X-gal 挑選白色菌落，以上述培養基培養隔夜，另挑一藍色菌落作為對照組。其中樣品 4 一共挑了 360 個菌落，樣品五挑了 80 個菌落。

(3) 簡易轉型株 DNA 抽取

首先於無菌之 0.5ml 無菌離心管中放入 100 μ l 無菌水，將前述培養的菌，確認仍為白色無誤後，以無菌之 tip 刮取適量的菌量，均勻懸浮於無菌水中，於 98 $^{\circ}$ C 加熱板上作用 10 分鐘，立刻置於冰上，再混勻，以 14'000rpm 離心 3 分鐘，取上清液 80 μ l。另同時抽取一藍色菌落 DNA 作為對照組。

(4) 轉型株接合 DNA 片段大小的確認

將(3)所抽取的 DNA 進行 PCR 擴增，所使用的引子位於接合位置兩側，序列為 M13F 與 M13R(附件八、九)。PCR 條件如附件十所述。接著將 PCR 產物以 agarose 電泳，確認其接合片段大小。見圖二、三、四、五、六及七。使用 DNA marker 為 Boehringer III (Boehringer)，由圖上可看到大多數選殖株的插入片段約 1.5kb，有

些則片段大小明顯不對，另有些選殖株雖插入片段大小與 1.5kb 僅有些微差異，如樣品 5 編號 14 與 16 號選殖株，不易發覺，但仍應捨棄。

(5) 定序反應

將(4)所確定為正常接合片段的 PCR 產物，以 QIAquick PCR Purification Kit(QIAGEN)進行純化後，以引子 357R(附件十一)進行 cycle sequencing 定序(sequencing kit)，反應條件如附件十二，引子的代號代表相對於 16srRNA 的位置，R 則表示反向(reverse)，16srRNA 的二級結構圖見附件十三，圖上紅色部分表保守區域，大部分，綠色表半保守區域，黃色表多變性區域。

(6) Cycle sequencing PCR 反應的純化

於 0.5ml 離心管加入 2 μ l sodium acetate EDTA 緩衝液，將(5)之 PCR 產物 spin down，取 20 μ l 加入離心管中，加入 80 μ l 95%的 ethanol 混勻後置於冰上 10 分鐘，接著以桌上型離心機 14,000 轉離心 30 分鐘，去掉上清液，接著加入 250 μ l 70% ethanol，再以桌上型離心機 14,000 轉離心 30 分鐘，將上清液以小心吸出，而不要碰觸到 DNA 的 pellet，接著以真空離心 (speed vac) 5 分鐘，於定序電泳時加入 4 μ l loading buffer，以 tip 吸放 3 次後，即可進行。

(7) 序列比對

所得序列以 Microsiq 軟體進行序列校正並去掉載體序列載體相關序列如附件。接著將序列於資料庫進行比對。以(5)所使用的引子位於相對大腸桿菌 16sDNA 基因 357 鹼基且方向為反向，因此所

訂出的序列長度最多約 350 個鹼基左右。如要進行更長片段或全基因固定序，可搭配使用其它引子，如附件十四、十五、十六與十七。以上述方法將兩個 DNA 樣品各約 40 個轉形株的序列分析的結果如表二、三。

2. 以 denaturing gradient gel electrophoresis(DGGE)的方法, 分析樣品 DNA 微生物的多樣性

在分析樣品 DNA 進行 16srDNA 基因之擴增後以 DGGE 的方法將不同序列的 16srDNA 基因片段分離, 並直接以定序是此方法便利之處。所利用的原理則是不同的 DNA 序列具有不同的 T_m 值, 於此研習期間亦同時請教這方面的技術條件, 也獲得對方慷慨的給予一些相關資料及條件(附件十八、十九、二十)。

五、研習心得

試驗結果由表二、三, 可見許多選殖株的序列比對到最可能或接近的微生物名中, 有許多為不可培養的微生物, 這也顯示環境樣品中確實存在著相當多的尚不可培養的為微生物。此外有些序列比對到的, 並非直接的菌名, 而是與本研習採相同方法所定出的選殖株序列。另外樣品編號 4 的多樣性較樣品編號 5 具有較多的多樣性, 這可由序列比對到的菌名種類多寡看出。這也許與樣品編號 4、5 環境的 pH 值有關。樣品編號 4 的 pH 質值偏中性, 為 7.55。而樣品編號 5 的 pH 質值為酸性, 為 2.38。在序列比對時, 有些選殖株序列則只有部分序列比對到相似性, 而其它部分則並無比對到, 或

是比對時出現大片段 gap。與 DSMZ 學者討論時，他們認為這樣的序列可能有問題，可能源自於 PCR 反應時所產生的錯誤，但這些都須要經驗作為判斷。於此次研習中，這些序列則多出自於樣品編號 4(如表四)，事後分析原因，不知是否與樣品的新鮮與否有關。樣品編號 4 之 DNA 抽取後置於 4°C 保存一個多月，而樣品 5 則為研習前才製備。

研習過程中，示範人員對實驗的每個動作都求嚴格，如 vortex 多少強度多少時間等，不由得令人佩服其實驗嚴謹的態度。

使用的套組為 TOPO TA Cloning kits (Invitrogen) 提供 rDNA 基因選殖時快速的方法。以簡易轉型株 DNA 抽取方法作為 PCR 所需的模板，提供了快速、簡便且經濟的方法。

序列比對時，DSMZ 專家認為序列上網站資料庫比對，只是第一步，粗略看到可能的微生物名，接著應該進一步比較序列是否具有這些可能屬名或種名之特殊的序列(specific nucleotide signature)較為可靠。而這些特殊的序列的位置，常出現於 rRNA 鹼基配對行成 loop 之位置，因此須加強對於 rRNA 基因二級結構的認識，這使筆者對分子系統生態學有更進一步的認識。

此外微生物序列資料庫的建立，以利於序列與接近的屬或種的特殊的序列進行比較，確有其必要性。這個資料庫的建立，可到網站 Ribosomal Database Project II (RDPII) (<http://rdp.cme.msu.edu/hml/index.html>) 下載 AE2 alignment Editor 等相關軟體。或至 ARB Project <http://www.arb-home.de/> 下載軟體，此 ARB 系統為 linux 系統。接著再將這些序列進行 multialign，將

序列裁切成相同的長度，進行樹狀圖的分析。

在序列上網比對方面，除了一般常上的網站 National Center for Biotechnology Information (NCBI)<http://www.ncbi.nlm.gov> 之外，NGFN-Blast at GBF <http://ngfnblast.gbf.de/blast.html> 也是一個不錯的選擇，資料庫的內容也不遜於 NCBI。免費的 alignment 軟體 Clustal X 及 親緣圖軟體 treeview 也都可由網路下載。

六、檢討及建議

由於微生物序列資料庫的軟體是為 linux 系統，筆者對此作業系統並不熟悉，再加上研習時間有限，僅能片面將這些訊息帶回國內，待國內生物資訊專才繼續努力。

另外雖無法進行 DGGE 的試驗操作，不過得到他們的介紹及相關資料，相信在短時間內及可對此實驗有所進展。

此行到德國研習的時間，於十一月到十二月期間，正值當季的冬季，天氣十分寒冷，且晝短夜長，建議相關研習活動最好於夏季或秋季進行。

七、謝誌

本研習經費承蒙經濟部國際合作處贊助。感謝 DSMZ 所長 Prof. Dr. Erko Stackebrandt 的協助使研習活動成行。此外對指導者 Evelyne Bramilla 等人熱心指導表萬分謝意。

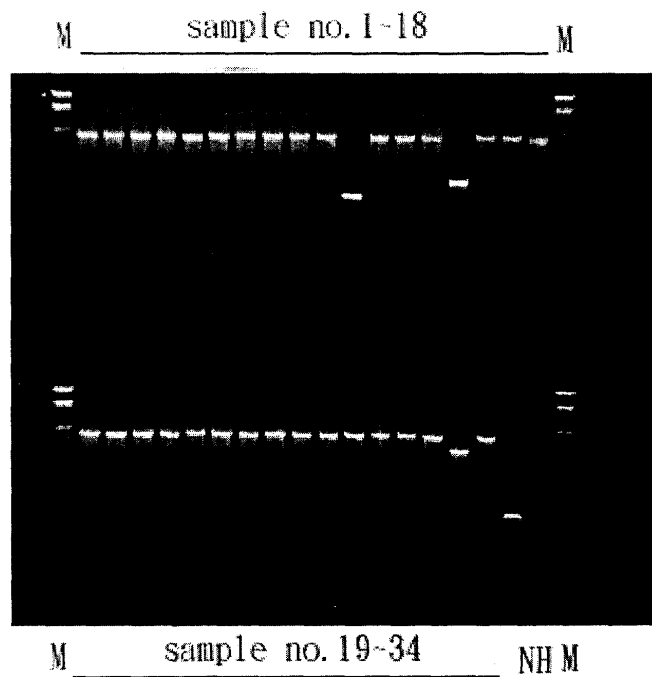
八、附錄

圖一、溫泉樣品 DNA PCR 結果



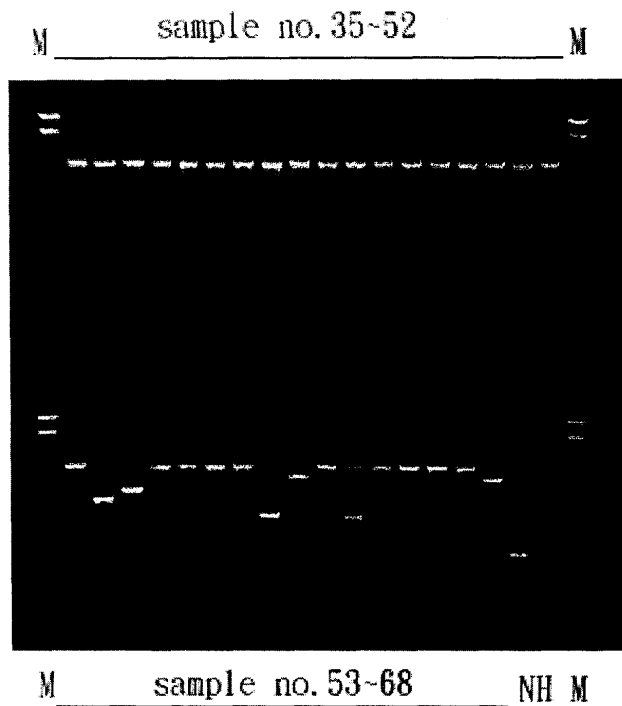
M: maker(Boehringer III)
A,G: sample 4 temple 0.1 μ l
B,H: sample 4 temple 1 μ l
C,I: sample 4 temple 2 μ l
D,J: sample 5 temple 0.1 μ l
E,K: sample 5 temple 1 μ l
F,L: sample 5 temple 2 μ l

圖二、溫泉樣品 4 轉型株接合 DNA 片段大小之確認(一)



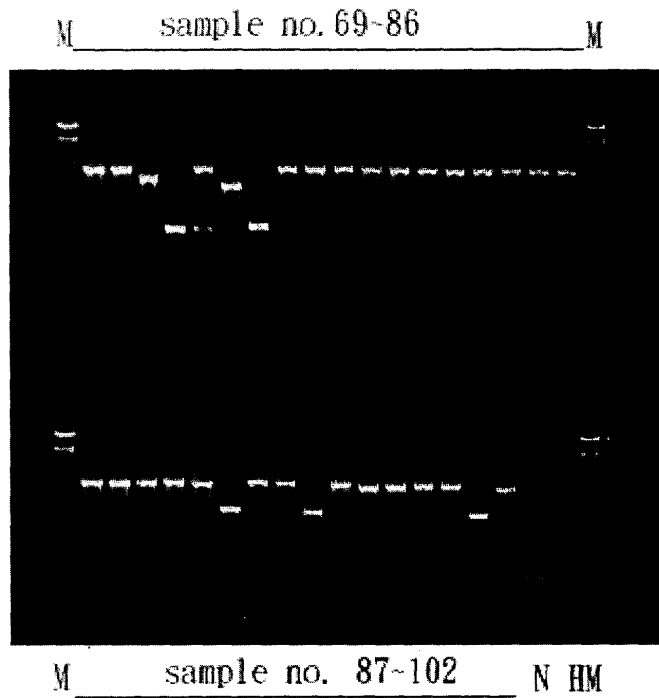
M: maker(Boehringer III)
N: negative control(blue colony)
H: sterile water as temple
溫泉樣品 4 選殖株編號 1~34

圖三、溫泉樣品 4 轉型株接合 DNA 片段大小之確認(二)



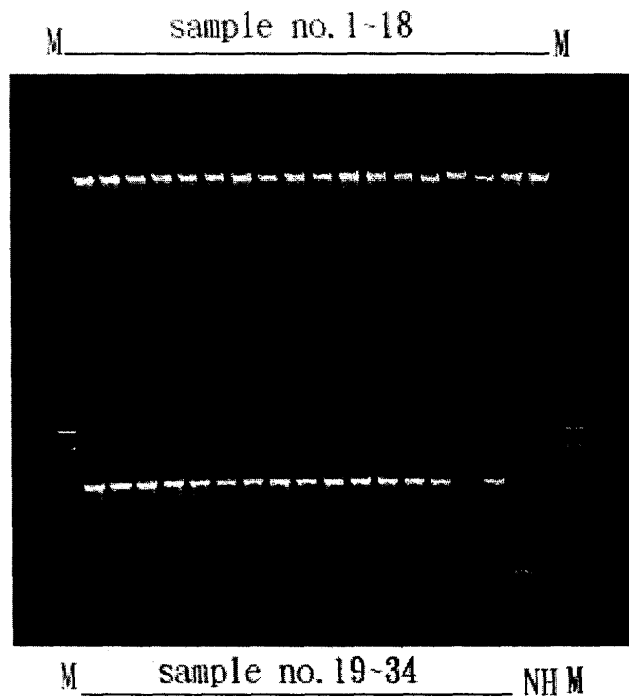
M: maker(Boehringer III)
N: negative control(blue colony)
H: sterile water as temple
溫泉樣品 4 選殖株編號 35-68

圖四、溫泉樣品 4 轉型株接合 DNA 片段大小之確認(三)



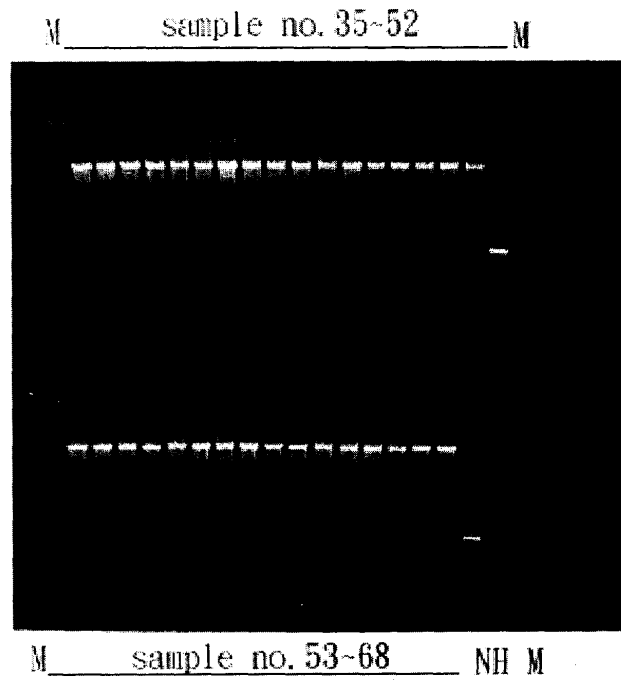
M: maker(Boehringer III)
N: negative control(blue colony)
H: sterile water as temple
溫泉樣品 4 選殖株編號 67-102

圖五、溫泉樣品 5 轉型株接合 DNA 片段大小之確認(一)



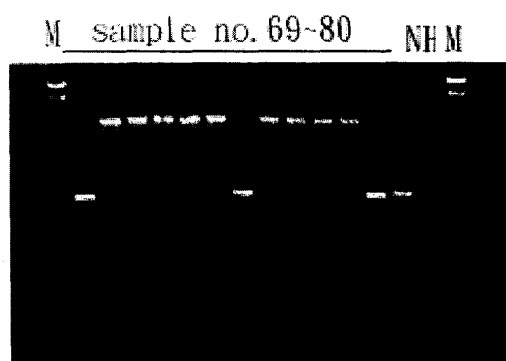
M: maker(Boehringer III)
N: negative control(blue colony)
H: sterile water as temple
溫泉樣品 5 選殖株編號 1-34

圖六、溫泉樣品 5 轉型株接合 DNA 片段大小之確認(二)



M: maker(Boehringer III)
N: negative control(blue colony)
H: sterile water as temple
溫泉樣品 5 選殖株編號 35-68

圖七、溫泉樣品 5 轉型株接合 DNA 片段大小之確認(三)



M: maker(Boehringer III)
N: negative control(blue colony)
H: sterile water as temple
溫泉樣品 5 選殖株編號 69-80

表一、DNA 樣品基本資料

樣品編號	採樣點	Temp.(°C)	pH
4	秀巒	46	7.55
5	金山	50	2.38

表二、 樣品四選殖株序列分析最接近的菌名及數目

no. of clone	nearest phylogenetic name (Blast)
1	95% Soil bact. clone SC-I-24
1	93% uncultured bacterium SJA-15.
1	90% uncult.bact.clone SJA-116
1	91% uncult.bact.clone G94
1	88% uncultured bacterium SHD58
1	97% uncult.bact.clone B63, beta
1	89% uncultured Flavobacterium sp., (Flavobacteria)
1	93% uncult.acidobacterium
4	92% uncult.bact.clone SJA-69
1	95% uncult.bact.clone B01
1	89% Uncultured bacterium D65
1	96% uncult.bact.clone, alfa
1	92% uncult.bact.clone III-B-2, beta
1	96% uncult.bact.clone s002
2	91% uncultured Cyanobacterium sp.
2	88% uncult.bact.clone d006, delta
1	91% uncult.bact.clone FW48(Chloroflexi)
1	88% uncult.bact.clone FW27,actino
1	88% uncult.delta bact.+Pelobacter acetylenicus, delta
1	99% uncultured Capnocytophaga bac, CFB
1	88% Spirochaeta sp.
1	98% Azoarcus sp.FC05, beta
1	92% Holophaga foetida, eigene Linie
1	88% Toluene degrading bact. Eub6
1	94% Geobacter Grbicium TACP5, delta (anaerobic)

表三、樣品五選殖株序列分析最接近的菌名及數目

no. of clones	nearest phylogenetic name (Blast)
7	100% uncult. bact. clone BA33+ <i>Leptospirillum ferriphilum</i> , actino
12	98% uncult. bact. clone BA31
5	99% uncultured <i>Acidithiobacillus caldus</i> P5-10, gamma
1	100% uncultured <i>Acidithiobacillus</i> sp.V1, gamma
3	96% uncult. bact. clone MS9, gamma
1	99% uncultured bacterium MS5+ <i>Acidophilum multivorans</i> , alpha
1	93% uncultured clone RCP1-55+ <i>Melittangium alboraceum</i> , delta
1	93% <i>Gracilibacillus</i> sp., (Bacillales)
3	89% <i>Alicyclobacillus hesperidum</i> , GP
3	95% <i>Desulfurella acetivorans</i> , delta

表四、樣品四可能有問題的選殖株序列分析結果

clone no.	nearest phylogenetic name (Blast)	length(bp)
4/39	96% <i>Rhodococcus opacus</i> , actino (1-164)	288
4/40	Uncultured <i>Chloroflexi</i> (85%1-142, 91% 200-236)	251
4/42	86% Uncultured <i>Chloroflexi</i> (1-142, 200-259)	271
4/50	96% <i>Holophaga</i> sp.(1-113)	254
4/51	Potato plant root bacterium clone RC-III (1-55,83-120,229-244)2gaps	253
4/52	88% uncultured bacterium clone FW71, gamma (28-166)	251
4/2	96% uncultured eubacterium clone SM2(1-114,183-219)	234
4/13	92%chimeric sequence; 91% uncult.bact.clone WCHB91	264
4/50	96% <i>Holophaga</i> sp.(1-113)	254
4/22	91% uncult.bact.clone NS-g28 (200-299)	301
4/31	96% uncult.bact.clone to30 (1-118)	317

附件一、PCR 引子 10x30F

EUROGENTEC

Bel S.A.

Telefon +32 42 40 76 76 Telefax +32 42 64 07 88

TECHNISCHE DATEN
OliGold <i>PCR</i> 972857

Kunde	BRAMBILLA E.
Ort	D-38124 BRAUNSCHWEIG
Auftragsnr.	

Ihre Bestell-Nr.	Produktions-Nr.	Synthesemaßstab	Chemie	Anzahl Basen		
10x30F	750379	200 nmol	ADN Oligos	19		
Sequenz	5'-GAG-TTT-GAT-CCT-GGC-TCA-G-3'					
Zusammensetzung	A 3	C 4	G 6	T 6	Andere 0	Wobbles 0
Modifikationen					6	
5'					7	
3'					8	
5					9	

% GC	52,63	Extinktionskoeffizient	178600,00 l/(mol cm)
MW	5834,86 g/mol	Menge µg	581 µg
Tm (2 AT + 4 GC)	58,00 °C	nmol	100 nmol
Tm (% GC)	49,30 °C	OD-Einheiten	18 OD
Reinigungs-Datum	13-03-2001	Mass Spectr.	---

Empfehlung zur Lösung	Um sicherzugehen, daß alles lyophilisierte Material am Boden liegt, kurz zentrifugieren. In TE-Puffer oder destilliertem Wasser in der gewünschten Konzentration lösen.
Allgemeine Anmerkungen	Tm % GC berechnet mit 50 mM NaCl und 0 % Formamid (PCR-Bedingungen).
Empfehlungen zur Aufbewahrung	lyophilisiert auf 4°C, auf - 20°C in TE Puffer, pH = 8 in wasser.
Spezielle Anmerkungen	<i>in 100µl H2O aufgenommen = 0,58 µg/ml</i>

附件二、PCR 引子 1500R

OligGold		PCR		TECHNISCHE DATEN		972857	
Kunde		BRAMBILLA F.					
Ort		D-38124 BRAUNSCHWEIG					
Auftragsnr.							
Ihre Bestell-Nr.	Produktions-Nr.	Synthesemaßstab	Chemie	Anzahl Basen			
1500R	750380	200 nmol	ADN Oligos	20			
Sequenz	5'-AGA-AAG-GAG-GTG-ATC-CAG-CC-3'						
Zusammensetzung	A 7	C 4	G 7	T 2	Andere 0	Wobbles 0	
Modifikationen				6			
				7			
				8			
				9			
% GC	55,00			Extinktionskoeffizient	207100,00 l/(mol cm)		
MW	6200,12 g/mol			Menge µg	526 µg		
Tm (2 AT + 4 GC)	62,00 °C			nmol	85 nmol		
Tm (% GC)	51,29 °C			OD-Einheiten	18 OD		
Einigungs-Datum	13-03-2001			Mass Spectr.	---		
Empfehlung zur Lösung	Um sicherzugehen, daß alles lyophilisierte Material am Boden liegt, kurz zentrifugieren. In TE-Puffer oder destilliertem Wasser in der gewünschten Konzentration lösen.						
Gemeine Anmerkungen	Tm % GC berechnet mit 50 mM NaCl und 0 % Formamid (PCR-Bedingungen).						
Empfehlungen zur Aufbewahrung	lyophilisiert auf 4°C, auf -20°C in TE Puffer, pH = 8 in wasser.						
Zielle Anmerkungen							

附件三、PCR 反應配方與條件

PCR 反應配方：

DNA Template	1 μ l
10X Buffer	5 μ l
dNTP Mix (2.5mM)	10 μ l
Primer 10-30F(0.5 μ g/ μ l)	0.5 μ l
Primer 1500R(0.5 μ g/ μ l)	0.5 μ l
Sterile water	32.8 μ l
Taq polymerase(5U/ μ l)	0.2 μ l
Total Volume	50 μ l

PCR 反應條件：

Step	Time	Temperature	Cycles
Initial Denaturation	3 min	94°C	1x
Annealing	1 min	52°C	28x
Extention	2 min	72°C	
Denaturation	1 min	93°C	
Final Annealing	1 min	52°C	1x
Final Extention	5 min	72°C	

附件四、PCR 產物純化方法

QIAquick PCR purification kit

1. Add 5 volume (about 250 μ l) of buffer PB to 1 volume of the PCR sample.
2. Place a QIAquick spin column in a provided 2 ml collection tube.
3. Centrifuge 2 min.
4. Discard flow through
5. Add 740 μ l PE buffer then centrifuge 2 min.
6. Discard flow through centrifuge for a additional 3 min (13'000rpm).
7. Place QIAquick column in a new tube (cut the lid).
8. Add 50 μ l sterile water, stand 1 min at room temp. and centrifuge for 3 min.
9. Transfer to a new 1.5ml tube.

附件五、TOPO TA Cloning kits 使用原理

Methods

Overview

Introduction

TOPO TA Cloning[®] provides a highly efficient, 5-minute, one-step cloning strategy ("TOPO[®] Cloning") for the direct insertion of *Taq* polymerase-amplified PCR products into a plasmid vector. No ligase, post-PCR procedures, or PCR primers containing specific sequences are required.

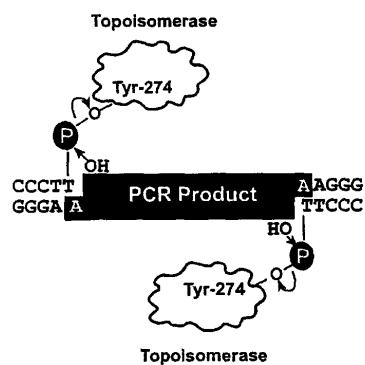
How It Works

The plasmid vector (pCR[®]II-TOPO[®] or pCR[®]2.1-TOPO[®]) is supplied linearized with:

- Single 3'-thymidine (T) overhangs for TA Cloning[®]
- Topoisomerase I covalently bound to the vector (referred to as "activated" vector)

Taq polymerase has a nontemplate-dependent terminal transferase activity that adds a single deoxyadenosine (A) to the 3' ends of PCR products. The linearized vector supplied in this kit has single, overhanging 3' deoxythymidine (T) residues. This allows PCR inserts to ligate efficiently with the vector.

Topoisomerase I from *Vaccinia* virus binds to duplex DNA at specific sites and cleaves the phosphodiester backbone after 5'-CCCTT in one strand (Shuman, 1991). The energy from the broken phosphodiester backbone is conserved by formation of a covalent bond between the 3' phosphate of the cleaved strand and a tyrosyl residue (Tyr-274) of topoisomerase I. The phospho-tyrosyl bond between the DNA and enzyme can subsequently be attacked by the 5' hydroxyl of the original cleaved strand, reversing the reaction and releasing topoisomerase (Shuman, 1994).



附件六、TOPO TA Cloning kits 使用方法

TOPO TA Cloning[®] Kits

Catalog nos.K4500-01, K4550-01, K4600-01, K4650-01
 Catalog nos.K4500-40, K4550-40, K4600-40, K4650-40



- Production of PCR Products**
1. Produce PCR products using *Taq* polymerase and your own protocol. Be sure to end with a final 7 to 10 minutes extension step.
 2. Analyze 10 μ l of each PCR sample by agarose gel electrophoresis.

- TOPO[®] Cloning Reaction**
1. For electroporation, dilute Salt Solution 4-fold to prepare Dilute Salt Solution.
 2. Set up one of the following 6 μ l TOPO[®] Cloning reactions:

Reagent	Chemical Transformation	Electroporation
Fresh PCR product	0.5 to 4 μ l	0.5 to 4 μ l
Salt Solution	1 μ l	--
Dilute Salt Solution	--	1 μ l
Sterile Water	add to a final volume of 5 μ l	add to a final volume of 5 μ l
TOPO [®] vector	1 μ l	1 μ l

3. Mix gently and incubate for 30 seconds to 30 minutes at room temperature.
4. Place tubes on ice. Proceed to One Shot[®] Chemical Transformation or One Shot[®] Electroporation.

- One Shot[®] Chemical Transformation**
1. Thaw One Shot[®] *E. coli* on ice.
 2. Add 2 μ l of the TOPO[®] Cloning reaction to a vial of One Shot[®] *E. coli* and mix.
 3. Incubate on ice for 5-30 minutes.
 4. Heat-shock the cells for 30 seconds at 42°C without shaking.

U.S. Headquarters
 Tel: 800 955 6288
 Fax: 760 602 6500
 tech_service@invitrogen.com
 www.invitrogen.com



U.S. Patents 5,487,993, 5,766,891, and 5,627,657
 European Patent No. 0550493
 Other patents pending
 PCR is a registered trademark of Invitrogen.

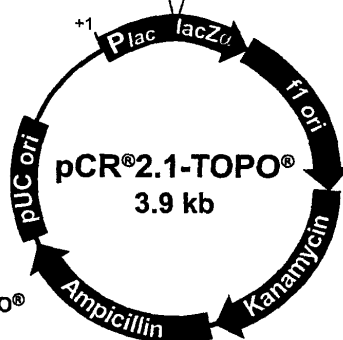
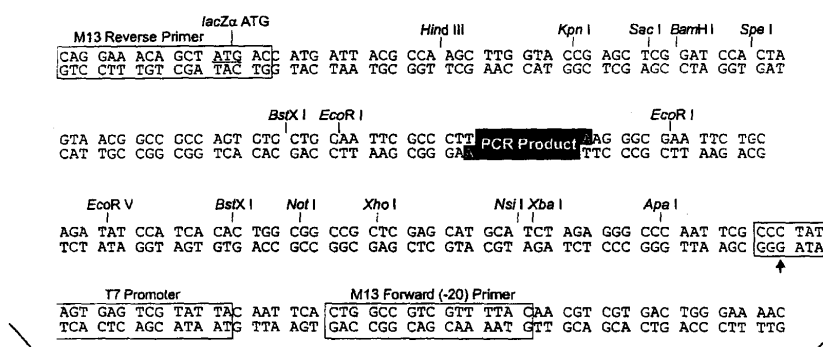
European Headquarters
 Tel: 00800 5345 5345
 Fax: +44 (0) 141 814 6287
 eurotech@invitrogen.com

附件七、載體 PCR2.1-TOPO 圖譜

Map of pCR[®]2.1-TOPO[®]

pCR[®]2.1-TOPO[®]
Map

The map below shows the features of pCR[®]2.1-TOPO[®] and the sequence surrounding the TOPO[®] Cloning site. Restriction sites are labeled to indicate the actual cleavage site. The arrow indicates the start of transcription for T7 polymerase. The complete sequence of pCR[®]2.1-TOPO[®] is available for downloading from our Web site (www.invitrogen.com) or by contacting Technical Service (page 21).



Comments for pCR[®]2.1-TOPO[®]
3931 nucleotides

- LacZα fragment: bases 1-547
- M13 reverse priming site: bases 205-221
- Multiple cloning site: bases 234-357
- T7 promoter/priming site: bases 364-383
- M13 Forward (-20) priming site: bases 391-406
- f1 origin: bases 548-985
- Kanamycin resistance ORF: bases 1319-2113
- Ampicillin resistance ORF: bases 2131-2991
- pUC origin: bases 3136-3809

附件八、PCR 引子 M13F

EUROGENTEC

Bel S.A.

Telefon +32 42 40 76 76 Telefax +32 42 64 07 88

TECHNISCHE DATEN	
oligoGold	103174

Kunde	BRAMBILLA E.
Ort	D-38124 BRAUNSCHWEIG
Auftragsnr.	

Ihre Bestell-Nr.	Produktions-Nr.	Synthesemaßstab	Chemie	Anzahl Basen					
M13F	842913	200 nmol	ADN Oligos	17					
Sequenz	5'-GTA-AAA-CGA-CGG-CCA-GT-3'								
Zusammensetzung	A 6	C 4	G 5	T 2	Andere 0	Wobbles 0			
Modifikationen	<table border="1" style="width: 100%;"> <tr><td>6</td></tr> <tr><td>7</td></tr> <tr><td>8</td></tr> <tr><td>9</td></tr> </table>					6	7	8	9
6									
7									
8									
9									
3'									
5'									

% GC	52,94	Extinktionskoeffizient	172500,00 l/(mol cm)
MW	5228,49 g/mol	Menge µg	1287 µg
Tm (2 AT + 4 GC)	52,00 °C	nmol	246 nmol
Tm (% GC)	45,99 °C	OD-Einheiten	42 OD
Reinigungs-Datum	01-01-1900	Mass Spectr.	—

Empfehlung zur Lösung	Um sicherzugehen, daß alles lyophilisierte Material am Boden liegt, kurz zentrifugieren. In TE-Puffer oder destilliertem Wasser in der gewünschten Konzentration lösen.
Allgemeine Anmerkungen	Tm % GC berechnet mit 50 mM NaCl und 0 % Formamid (PCR-Bedingungen).
Empfehlungen zur Aufbewahrung	lyophilisiert auf 4°C, auf - 20°C in TE Puffer, pH = 8 in wasser. <i>in 1 ml TE aufgenommen</i>
Spezielle Anmerkungen <i>0,5 µl -20°C</i>	Primes, um Klone zu checken. <i>0,5 µl / 0,39 µl</i> <i>100 µl Ansatz 39 µl Primes + 61 µl 1x TE</i>

附件九、PCR 引子 M13R

EUROGENTEC

Bel S.A.

Telefon +32 42 40 76 76 Telefax +32 42 64 07 88

TECHNISCHE DATEN
OligoGold
103174

Kunde	BRAMBILLA E.
Ort	D-38124 BRAUNSCHWEIG
Auftragsnr.	

Ihre Bestell-Nr.	Produktions-Nr.	Synthesemaßstab	Chemie	Anzahl Basen						
M13R	842914	200 nmol	ADN Oligos	19						
Sequenz	5'-GGA-AAC-AGC-TAT-GAC-CAT-G-3'									
Zusammensetzung	A 7	C 4	G 5	T 3	Andere 0	Wobbles 0				
Modifikationen	<table border="1"> <tr><td>6</td></tr> <tr><td>7</td></tr> <tr><td>8</td></tr> <tr><td>9</td></tr> </table>						6	7	8	9
6										
7										
8										
9										

% GC	47,37	Extinktionskoeffizient	193000,00 l/(mol cm)
MW	5845,90 g/mol	Menge µg	1321 µg
Tm (2 AT + 4 GC)	56,00 °C	nmol	226 nmol
Tm (% GC)	47,66 °C	OD-Einheiten	44 OD
Reinigungs-Datum	14-12-2001	Mass Spectr	---

Empfehlung zur Lösung	Um sicherzugehen, daß alles lyophilisierte Material am Boden liegt, kurz zentrifugieren. In TE-Puffer oder destilliertem Wasser in der gewünschten Konzentration lösen.
Allgemeine Anmerkungen	Tm % GC berechnet mit 50 mM NaCl und 0 % Formamid (PCR-Bedingungen).
Empfehlungen zur Aufbewahrung	lyophilisiert auf 4°C, auf - 20°C in TE Puffer, pH = 8 in wasser. <i>in 1 ml ATE aufbewahren</i>
Spezielle Anmerkungen <i>0,5 µg/µl</i>	<i>Primer, um Klone zu checken</i> <i>0,5 µg = 0,38 µl</i> <i>100 µl Ansatz 38 µl Primer + 62 µl ATE</i>

附件十、PCR 反應配方與條件

PCR 反應配方：

DNA Template	7 μ l
10X Buffer	5 μ l
dNTP Mix (2.5mM)	10 μ l
Primer M13F(0.5 μ g/ μ l)	0.5 μ l
Primer M13R(0.5 μ g/ μ l)	0.5 μ l
Sterile water	26.8 μ l
Taq polymerase(5U/ μ l)	0.2 μ l
Total Volume	50 μ l

PCR 反應條件：

Step	Time	Temperature	Cycles
Initial Denaturation	3 min	94°C	1x
Annealing	1 min	52°C	28x
Extention	2 min	72°C	
Denaturation	1 min	93°C	
Final Annealing	1 min	52°C	1x
Final Extention	5 min	72°C	

附件十一、定序引子 357R

OLIGODEOXYRIBONUCLEOTIDE SYNTHESIS ORDER FORM

(Nr. 2247)

User: Dr Rainey
 Phone: 84102
 Department: DSM
 Codeword:

Date of order:
 Date of delivery: 24 JUN 1993

Eingegangen
 21. Juni 1993
 S 2261R 1246

Sequence name (max 8 blocks): 1 357R

Application of oligo.:

Modifications?:

Special purification requirements?: OPC; (dried)

Please copy out your sequence clearly (5' - 3'):

5'

120	119	118	117	116	115	114	113	112	111	110	109
108	107	106	105	104	103	102	101	100	99	98	97
96	95	94	93	92	91	90	89	88	87	86	85
84	83	82	81	80	79	78	77	76	75	74	73
72	71	70	69	68	67	66	65	64	63	62	61
60	59	58	57	56	55	54	53	52	51	50	49
48	47	46	45	44	43	42	41	40	39	38	37
36	35	34	33	32	31	30	29	28	27	26	25
24	23	22	21	20	19	18	17	16	C	T	G
C	T	G	C	C	T	C	C	C	G	T	G
12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1

Nr. nucleotides

A: 1 G: 3

C: 7 T: 4

Others: —

TOTAL: 15

OD₂₆₀:

concentration:

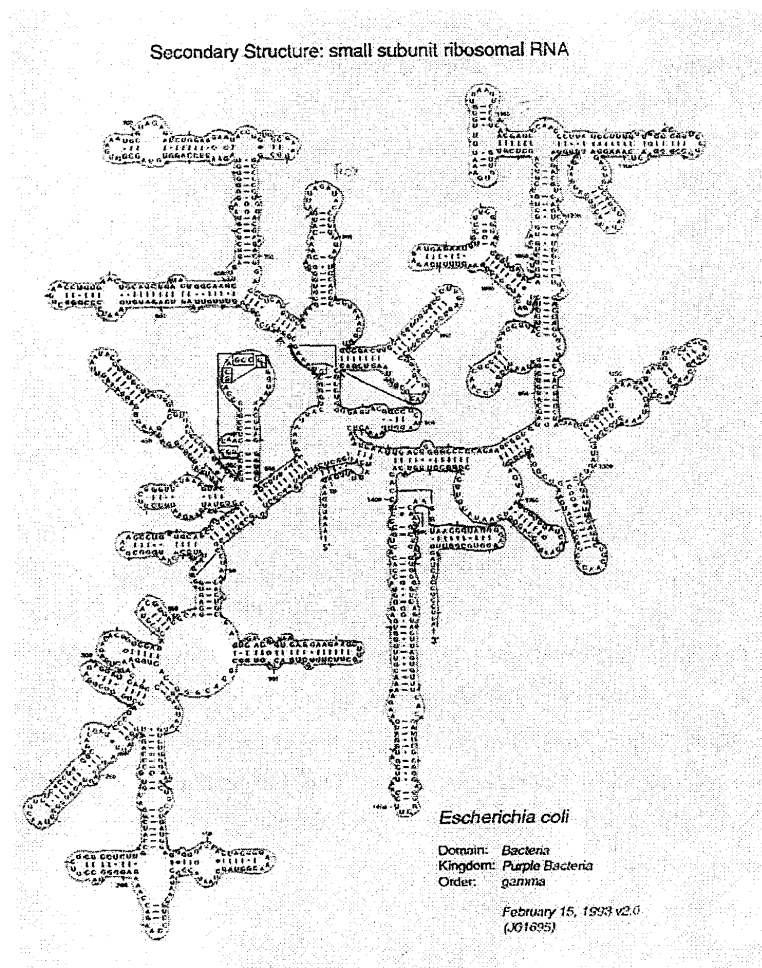
µg/µl

User's signature

附件十二、cycle sequencing 反應配方

DNA Template	1 μ l
Primer 357R (5pmole/ μ l)	2 μ l
Sterile water	9 μ l
Dilution buffer	4 μ l
Sequencing premix	4 μ l
Total Volumn	20 μ l

附件十三、16srRNA 的二級結構圖



黃色:多樣化區域
綠色:部分保守區域
紅色:保守區域

附件十四、定序引子 357F

EUROGENTEC Bel S.A.

Telefon +32 4 366 01 50 Telefax +32 4 365 51 03

OliGold

TECHNISCHE DATEN

739236

Kunde DR J. BURGHARDT
Ort D-38124 BRAUNSCHWEIG

Ihre Bestell-Nr.	Produktions-Nr.	Synthesemaßstab	Chemie	Anzahl Basen		
357F	341389G1	0.2 µmol	ADN	15		
Sequenz	5'-TAC-GGG-AGG-CAG-CAG-3'					
Zusammensetzung	A 4	C 3	G 7	T 1	Andere 0	Wobbles 0
Modifikationen						
5'						
3'						
5'						

% GC	66.67 %	Extinktionskoeffizient	152400 l/(mol cm)
MW	4667 g/mol	Menge µg	1111 µg
Tm (2 AT + 4 GC)	50.0 °C	nmol	238 nmol
Tm (% GC)	42.2 °C	OD-Einheiten	36 OD
Reinigungs-Datum	28/11/1997		

Empfehlung zur Lösung	Um sicherzugehen, daß alles lyophilisierte Material am Boden liegt, kurz zentrifugieren. In TE-Puffer oder destilliertem Wasser in der gewünschten Konzentration lösen.
Allgemeine Anmerkungen	Tm % GC berechnet mit 50 mM NaCl und 0 % Formamid (PCR-Bedingungen).
Empfehlungen zur Aufbewahrung	4° C lyophilised, -20° C in TE buffer, pH = 8.0 in water.
Spezielle Anmerkungen	

附件十五、定序引子 530R

EUROGENTEC Bel S.A.

Telefon +32 4 366 01 50 Telefax +32 4 365 51 03

OliGold	TECHNISCHE DATEN
	713201

Kunde	DR SPROEX
Ort	D-38124 BRAUNSCHWEIG

Ihre Bestell-Nr.	Produktions-Nr.	Synthesemenge	Chemie	Anzahl Basen		
530R	266686M2	0.2 µmol	ADN	18		
Sequenz:	5'-GKA-TTA-CCG-CGG-CKG-CTG-3'					
Zusammensetzung	A 2	C 5	G 6	T 3	Andere 0	Wobbles 2
Modifikationen					6	
5'					7	
3'					8	
5					9	

% GC	61.11 %	Extinktionskoeffizient	163300 l/(mol cm)
MW	5532 g/mol	Menge µg	1382 µg
Tm (2 AT + 4 GC)	60.0 °C	nmol	250 nmol
Tm (% GC)	49.7 °C	OD-Einheiten	41 OD
Reinigungs-Datum	22/04/1997		

Empfehlung zur Lösung	Um sicherzugehen, daß alles lyophilisierte Material am Boden liegt, kurz zentrifugieren. In TE-Puffer oder destilliertem Wasser in der gewünschten Konzentration lösen.
Allgemeine Anmerkungen	Tm % GC berechnet mit 50 mM NaCl und 0 % Formamid (PCR-Bedingungen).
Empfehlungen zur Aufbewahrung	4° C lyophilised, -20° C in TE buffer, pH = 8.0 in water.
Spezielle Anmerkungen	

附件十六、定序引子 FOXF

EUROGENTEC Bel S.A.

Phone +32 4 366 01 50 Fax +32 4 365 51 03

OliGold	TECHNICAL DATA SHEET
706730	

Customer	DR SPROER
Location	d-38124 braunschweig

Customer Ref.	Sample No.	Synthesis Scale	Chemistry	Bases		
FOXF	248982J1	0.2 µmol	ADN	17		
Sequence	5'-ATT-AGA-TAC-CCT-GGT-AG-3'					
Composition	A 5	C 3	G 4	T 5	Others 0	Wobble 0
Modification					6	
5'					7	
3'					8	
5					9	

% GC	41.18 %	Extinction Coefficient	172200 l/(mol cm)
MW	5209 g/mol	Quantity µg	1893 µg
Tm (2 AT + 4 GC)	48.0 °C	nmoles	363 nmol
Tm (% GC)	37.1 °C	OD units	63 OD
Purification date	26/02/1997		

Reconstitution recommendation	Use a short spin in centrifuge to ensure all lyophilized material is at the bottom of tube. Reconstitute in TE Buffer or distilled water at concentration appropriate for the intended use.
General comments	Tm % GC calculated with 50 mM NaCl and 0 % formamide (PCR conditions)
Storage recommendation	4°C lyophilised, -20°C in TE buffer, pH = 8.0 in water.
Specific comments	

附件十七、定序引子 1100F

EUROGENTEC Bel S.A.

Telefon +32 4 366 01 50 Telefax +32 4 365 51 03

OliGold	TECHNISCHE DATEN
	739236

Kunde	DR J. BURGHARDT
Ort	D-38124 BRAUNSCHWEIG

Ihre Bestell-Nr.	Produktions-Nr.	Synthesemaßstab	Chemie	Anzahl Basen		
1100 F	341392F2	0.2 µmol	ADN	16		
Sequenz	5'-GCA-ACG-AGC-GCA-ACC-C-3'					
Zusammensetzung	A 5	C 7	G 4	T 0	Andere 0	Wobbles 0
Modifikationen					6	
5'					7	
3'					8	
5					9	

% GC	68.75 %	Extinktionskoeffizient	151900 l/(mol cm)
MW	4845 g/mol	Menge µg	982 µg
Tm (2 AT + 4 GC)	54.0 °C	nmol	203 nmol
Tm (% GC)	45.9 °C	OD-Einheiten	31 OD
Reinigungs-Datum	28/11/1997		

Empfehlung zur Lösung	Um sicherzugehen, daß alles lyophilisierte Material am Boden liegt, kurz zentrifugieren. In TE-Puffer oder destilliertem Wasser in der gewünschten Konzentration lösen.
Allgemeine Anmerkungen	Tm % GC berechnet mit 50 mM NaCl und 0 % Formamid (PCR-Bedingungen).
Empfehlungen zur Aufbewahrung	4° C lyophilised, -20° C in TE buffer, pH = 8.0 in water.
Spezielle Anmerkungen	

附件十八、DGGE 引子 341fgc(原核生物)

EUROGENTEC

Bel S.A.

Telefon +32 42 40 76 76 Telefax +32 42 64 07 88

Ihre Bestell-Nr.		Produktions-Nr.		Synthesemaßstab		Chemie		Anzahl Basen					
341Fgc		776142		1 µmol		ADN Oligos		57					
Sequenz		5'-CGC-CCG-CCG-CGC-CCC-GCG-CCC-GTC-CCG-CCG-CCC-CCG-C CC-GCC-TAC-GGG-AGG-CAG-CAG-3' ✓											
Zusammensetzung		A	4	C	33	G	18	T	2	Andere	0	Wobbles	0
Modifikationen										6			
5'										7			
3'										8			
5										9			
% GC		89,47				Extinktionskoeffizient		482100,00 l/(mol cm)					
MW		17268,19 g/mol				Menge		µg		921 µg			
Tm (2 AT + 4 GC)		216,00 °C						nmol		53 nmol			
Tm (% GC)		78,78 °C						OD-Einheiten		26 OD			
Reinigungs-Datum		01-06-2001						Mass Spectr.		---			
Empfehlung zur Lösung		Um sicherzugehen, daß alles lyophilisierte Material am Boden liegt, kurz zentrifugieren. In TE-Puffer oder destilliertem Wasser in der gewünschten Konzentration lösen.											
Allgemeine Anmerkungen		Tm % GC berechnet mit 50 mM NaCl und 0 % Formamid (PCR-Bedingungen).											
Empfehlungen zur Aufbewahrung		lyophilisiert auf 4°C, auf -20°C in TE Puffer, pH = 8 in wasser.											
Spezielle Anmerkungen		<p><i>53000 pmol = 1000 µl</i></p> <p><i>500 pmol = 1000 µl</i></p> <p><i>in 1000 µl aufgenommen</i></p>											

附件十九、DGGE 引子 907R(原核生物)

EUROGENTEC		Bel S.A.		Telefon +32 42 40 76 76		Telefax +32 42 64 07 88	
OligGold		neu 23.5		TECHNISCHE DATEN			
				980765			
Kunde		DR E.BRAMBILLA		50µl			
Ort		D-38124 BRAUSCHWEIG					
Auftragsnr.							
Ihre Bestell-Nr.	Produktions-Nr.	Synthesemaßstab	Chemic	Anzahl Basen			
907R	770892	200 nmol	ADN Oligos	20			
Sequenz	5'-CCG-TCA-ATT-CMT-TTG-AGT-TT-3' ✓						
Zusammensetzung	A 3	C 4	G 3	T 9	Andere 0	Wobbles 1	
Modifikationen				6			
5'				7			
3'				8			
5				9			
% GC	35,00		Extinktionskoeffizient		182400,00 l/(mol cm)		
MW	6061,02 g/mol		Menge µg		1070 µg		
Tm (2 AT + 4 GC)	56,00 °C		nmol		177 nmol		
Tm (% GC)	46,56 °C		OD-Einheiten		32 OD		
Reinigungs-Datum	15-05-2001		Mass Spectr.		---		
Empfehlung zur Lösung	Um sicherzugehen, daß alles lyophilisierte Material am Boden liegt, kurz zentrifugieren. In TE-Puffer oder destilliertem Wasser in der gewünschten Konzentration lösen.						
Allgemeine Anmerkungen	Tm % GC berechnet mit 50 mM NaCl und 0 % Formamid (PCR-Bedingungen).						
Empfehlungen zur Aufbewahrung	lyophilisiert auf 4°C. auf - 20°C in TE Puffer, pH = 8 in wasser.						
Spezielle Anmerkungen	$\frac{177000 \text{ pmol}}{50 \text{ pmol}} = 3,54 \text{ ml}$ im 354 µl in TE aufgenommen						

附件二十、DGGE 相關條件

DGGE-run

Preparation

- clean the glasplates with isopropanol
- ad some fat to the Spacer (outside)
- build the plates with the spacer together

- clean the pump and the mixer with dcion. water
- fix the needle between the plates in the middle
- make the gel-solutions
- ad TEMED and APS to the solutions, mix it well
- put the lower concentrated solution in the left column and the higher in the right
- start the pump (4.9ml/min)
- open the connection between the columns
(the solution in the right column is mixing all the time)
- try to remove the bubbles by knocking against the plates
- put the comb between the plates and than overflow the gel with 0%-solution
- let the gel polymerize over night (cover the gel with foil)

for the run:

- fill the buffertank with ca. 6 Liter 1x TAE buffer (could be used several times)
- temperate the buffer to the right temperatur
- ad ¼ loadingbuffer to the PCR-products (max. 50µl/lane)
- load the gel
- start the DGGE

after the run:

- let the gel on one side of the plate
- 10min in Ethidiumbromide-solution
- put water on the UV-table
- remove the gel from the plate
- make a foto from the gel

cut the bands:

- cut them with a knife
- overnight in 50µl 1xTE-buffer
- next day take 1µl for the PCR-reamplification
- check the products again on the DGGE if you have single bands
- than you can clean them and sqequence them(only single bands)