

第三章 實驗方法與設備

3-1 實驗流程與架構

本實驗之流程架構如圖 3-1 所示，首先利用混合實驗設計法建立出數組欲處理之廢水重金屬組合濃度，經由進行反應 14 天後，採樣分析各項水質參數如：硫酸鹽、硫離子、溶解性有機碳、揮發性懸浮固體物及重金屬濃度，以瞭解生物沈澱過程中硫酸鹽被 SRB 還原產生硫離子量之多寡、碳源被微生物利用的情形、重金屬去除效率以及微生物生長狀況。

藉由分析出之硫酸鹽還原率的結果可得知重金屬交互作用對 SRB 生長之影響，並找出一組硫酸鹽還原效率最高的重金屬組合，放大反應體積進行確認試驗，並藉由分子生物法之螢光原位雜交法及變性梯度膠體電泳法分析微生物中 SRB 佔總微生物數量百分比及了解族群結構的變化。

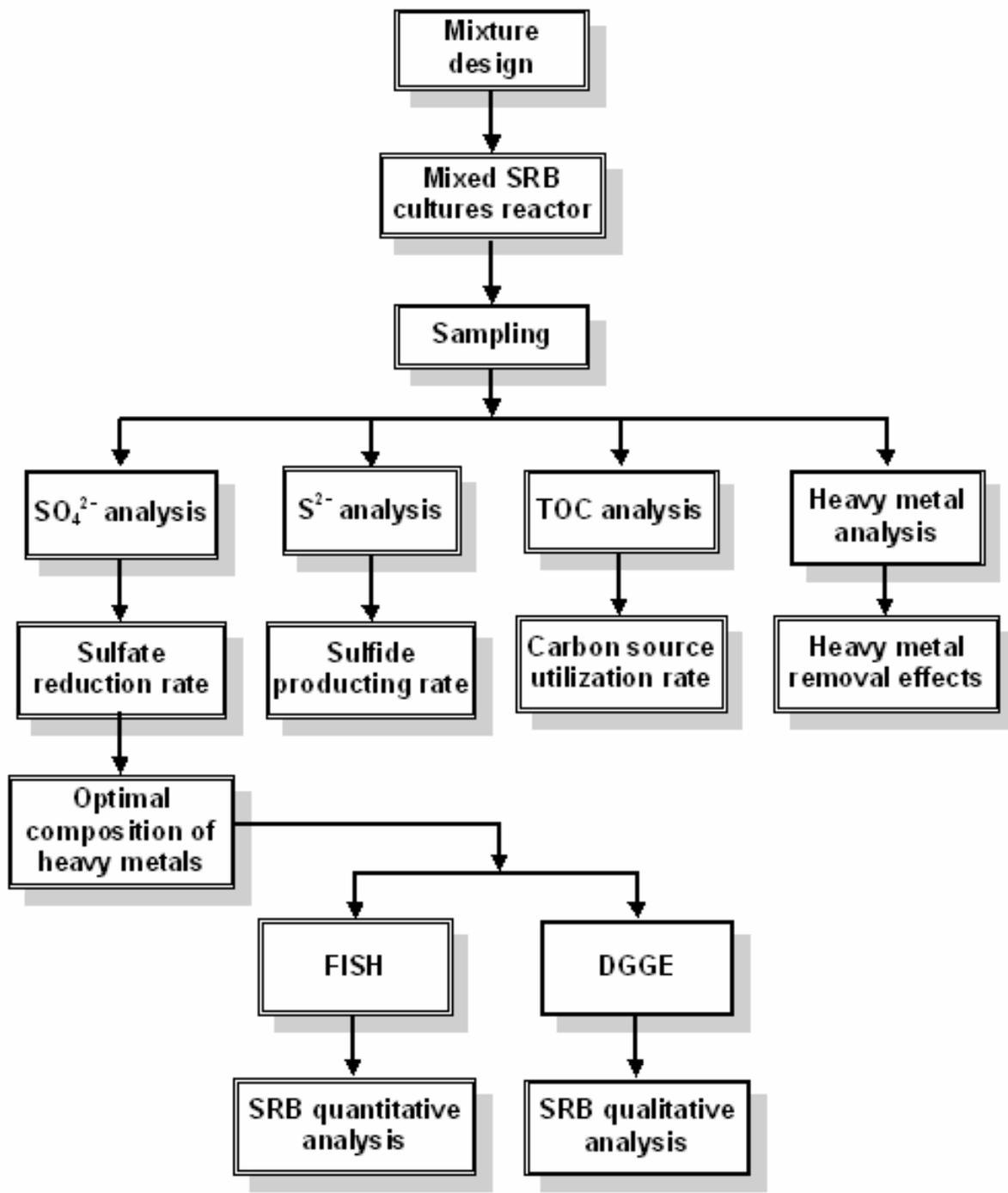


圖 3-1 實驗流程圖

3-2 各項水質分析方法及使用儀器

本實驗所採用的水質分析方法皆為環檢所公告之標準方法，分析項目包含揮發性懸浮固體物 (volatile suspended solid)、溶解性有機碳 (dissolved organic carbon)、硫離子 (sulfide)、硫酸根離子 (sulfate)、重金屬 (heavy metal)，各項水質分析方法及使用儀器如表 3-1 所示。

表 3-1 各項水質分析方法及其使用儀器

Items	Unit	Methodology	Instruments
懸浮固體物 (SS)	mg/L	NIEA W210.56A	真空過濾裝置及烘箱
揮發性懸浮固體物 (VSS)	mg/L	NIEA W210.56A	真空過濾裝置及高溫爐
總有機碳 (TOC)	mg/L	NIEA W532.51C	OI Analytical ModI 1010
硫化物 (Sulfide)	mg/L	NIEA W433.50A	HITACHI, U3210
硫酸根 (Sulfate)	mg/L	NIEA W430.51C	HITACHI, U3210
重金屬 (Heavy metal)	mg/L	NIEA W306.50A	HITACHI, Z-8100

3-3 植種污泥之來源及馴養

3-3.1 培養基成分

污泥馴養所使用之培養基為文獻中提到利於 SRB 生長之 SRB1 medium (White and Gadd, 1997)，其主要組成為：乳酸鈉 (Lactate)、Yeast extract、 Na_2SO_4 、 NaHCO_3 、 NH_4Cl 、 KH_2PO_4 、 $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ，其成分之詳細濃度如表 3-2 所示。

表 3-2 修正後之 SRB1 培養基組成成分及含量

	Composition	Contain
1	乳酸鈉 Lactate (70%)	3,500 mg/L
2	酵母萃取物 Yeast extract	0.1 g/L
3	硫酸鈉 Na_2SO_4	3.7 g/L
4	碳酸氫鈉溶液 NaHCO_3 (84g/L)	30 mL
5	氯化銨 NH_4Cl	1.0 g/L
6	磷酸二氫鉀 KH_2PO_4	0.25 g/L
7	氯化鈣 $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.06 g/L
8	氯化鐵 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.04 g/L

其中乳酸鈉為其生長所需之碳源；本實驗培養基中所採用之硫酸鹽濃度 (2,500 mg/L) 與文獻中所使用的 (1,800 mg/L) 有所差異，由於本實驗室曾進行過培養基最佳硫酸鹽添加濃度分析，藉由不同硫酸鹽添加濃度配合中心組合實驗設計法找出最利於 SRB 生長之硫酸鹽濃度為 2,500

mg/L (詳細數據未提供)，故修正原 SRB1 medium 之硫酸鹽濃度改採用最佳濃度馴養；而配製好的培養基需送入滅菌釜 (EA-635, EASTERN MEDICAL) 進行培養基之滅菌 15 分鐘 (121°C) 後方能進行馴養使用。

3-3.2 厭氧污泥之批次馴養

本實驗所使用之 SRB 菌種來源是採自養豬廢水的厭氧污泥，經由調配利於硫酸還原菌生長之培養基 SRB1 (修正後) 進行長期批次馴養，每批次馴養七天後再取出 500 mL 的菌液加入修正過之 SRB1 培養基使最終體積達 3 L，再連續通入氮氣使之成厭氧的條件下，利用循環水浴方式使溫度控制在 30°C，以進行下一批次之馴養。首先需將滅完菌之培養基以 NaOH 及 HCl 調整 pH 到 7.2-7.5，接著以氮氣進行預曝氣約半小時再倒入反應槽中，並以磁石攪拌方式進行培養，培養期間亦進行 pH 及 ORP 之即時監控，以確保 pH 介於 7.2-7.5 及 ORP 低於 -400 mV。偵測裝置如圖 3-2，每次培養週期為 7 天。



圖 3-2 厭氧污泥馴養槽及 pH, ORP, 溫度偵測器

3-4 印刷電路板業模擬廢水之水質及成分

重金屬污染源產業之多，各種污染源所含的重金屬種類也不盡相同，就電鍍業而言，常見用來電鍍的金屬種類有鎳、六價鉻、鋅、銅、鐵等。然而並非所有電鍍業廢水皆同時包含多種重金屬物種，故為因應混合實驗設計法的需求，本實驗必須挑選出一種同時含有多種重金屬污染物種之廢水源作為參考指標，依據該廢水中所含重金屬種類進行模擬廢水的配製。

印刷電路板 (printed circuit board，簡稱 PCB) 為電子零件裝載的機板，是結合電子、機械、化工、材料等眾多領域的基礎產品，其製程包含表面處理、蝕刻、鑽孔、鍍通孔、鍍銅、鍍錫鉛、剝錫鉛及鍍鎳金等多項繁瑣程序，其所產生的廢液依各廠商產品的需求，而含有三到五種不同類型的重金屬離子 (銅、鋅、鎳、鉻、鉛) (Chang, 1995; Gan, 2000)，本實驗所使用之廢水，乃是參考新竹科學園區某印刷電路板公司所處理後之排放廢水成分，自行於實驗室調配出合成廢水進行實驗及探討，資料顯示該印刷電路板製造工廠原廢水中所含有之重金屬種類為六價鉻、鎘、銅、鋅、鎳五種重金屬 (表 3-3)，其中六價鉻及鎘的濃度皆低於 0.05 及 0.01 mg/L，故僅針對剩餘三種濃度較高的重金屬 (銅、鋅、鎳) 進行去除效率的探討。

表 3-3 一般印刷電路板業放流水中所含之重金屬濃度

(Unit: mg/L)	Cu ²⁺	Zn ²⁺	Ni ²⁺	Cr ³⁺	Pb ²⁺	Cd ²⁺	Cr ⁶⁺
Gan, 2000	37	0.9	0.4	0.8	2.8	—	—
Chang, 1995	3.38	2.61	3.98	2.0	0.69	0.69	—
園區 A 廠	16.6	0.08	0.48	—	—	0.01	0.05

3-5 以混合設計法及反應曲面分析法建立實驗組數

本研究實驗組數之建立主要是採用實驗設計中的混合型實驗方法 (mixture experiments)，挑選印刷電路板廢水中所含的三種重金屬 (Cu²⁺、Zn²⁺、Ni²⁺) 為模擬廢水組成成分，利用統計軟體 (Minitab) 建立起實驗組數，而由於十七組反應皆同時進行，故不採用隨機化設計。考慮先前本實驗所採用之污泥對水中單一重金屬銅之處理能力可高達 180 mg/L (詳細數據未提供)，故初步實驗所設計之重金屬濃度範圍為 0-180 mg/L，目的在於方便瞭解處理含多種重金屬廢水時，重金屬的交互作用對 SRB 生長的影響，其三種重金屬成分的限制濃度分別為：(濃度單位：mg/L)

$$0 < \text{Cu}^{2+} < 180$$

$$0 < \text{Zn}^{2+} < 180$$

$$0 < \text{Ni}^{2+} < 180$$

將三種成分進行編碼後，使三者總和為 1，即：

$$X + Y + Z = 1$$

$$0 < X < 1$$

$$0 < Y < 1$$

$$0 < Z < 1 \dots\dots\dots (X = \text{Cu}^{2+}、Y = \text{Zn}^{2+}、Z = \text{Ni}^{2+})$$

本實驗所採用之實驗設計方法為混合實驗設計法，表 3-4 為設計比例編碼 (code) 與相對之重金屬濃度及重金屬調配添加量之對照表；表 3-5 為三種重金屬成分之混合比例設計表；而圖 3-3 為混合實驗設計實驗組分佈圖。表 3-6 詳細列出各組反應所需添加之重金屬標準溶液添加量、植種量及培養基量，使最終體積皆等於 250 mL。

表 3-4 設計比例編碼與重金屬濃度及調配添加量之對照表

比例編碼	0.00	0.25	0.33	0.50	0.75	1
重金屬設計濃度 (mg/L)	0.0	45.0	60.0	90.0	135.0	180.0
重金屬標準品添加量 (mL)	0	11.25	15.0	22.5	33.75	45.0

備註：重金屬標準品濃度為 1000 mg/L，最終反應體積為 250 mL。

表 3-5 混合實驗之三種重金屬混合比例編碼表 (Design Table)

	混合比例編碼		
	Cu ²⁺	Zn ²⁺	Ni ²⁺
1	1.00	0.00	0.00
2	0.75	0.25	0.00
3	0.75	0.00	0.25
4	0.50	0.50	0.00
5	0.50	0.25	0.25
6	0.50	0.00	0.50
7	0.25	0.75	0.00
8	0.25	0.50	0.25
9	0.25	0.25	0.50
10	0.25	0.00	0.75
11	0.00	1.00	0.00
12	0.00	0.75	0.25
13	0.00	0.50	0.50
14	0.00	0.25	0.75
15	0.00	0.00	1.00
16	0.33	0.33	0.33
17	0.00	0.00	0.00

備註：第 17 組為控制組

表 3-6 各組反應之試劑添加量及植種量 (單位：mL)

	Cu ²⁺	Zn ²⁺	Ni ²⁺	植種量	SRB1 培養基
1	45	0	0	50	155
2	33.75	11.25	0	50	155
3	33.75	0	11.25	50	155
4	22.5	22.5	0	50	155
5	22.5	11.25	11.25	50	155
6	22.5	0	22.5	50	155
7	11.25	33.75	0	50	155
8	11.25	22.5	11.25	50	155
9	11.25	11.25	22.5	50	155
10	11.25	0	33.75	50	155
11	0	45	0	50	155
12	0	33.75	11.25	50	155
13	0	22.5	22.5	50	155
14	0	11.25	33.75	50	155
15	0	0	45	50	155
16	15	15	15	50	155
17	去離子水加 45 mL			50	155

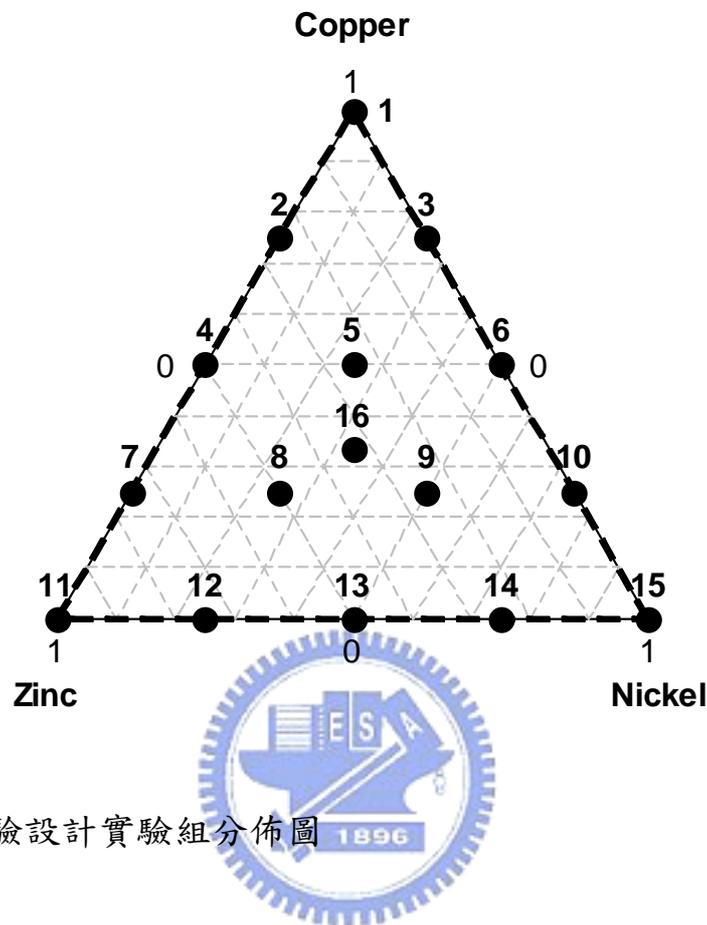


圖 3-3 混合實驗設計實驗組分佈圖

為使各組反應所添加之培養基濃度符合表 3-2 之修正過的 SRB1 濃度，而不會因添加重金屬標準品及植種污泥而改變培養基的濃度，故需依表 3-7 的培養基成分的取量配成三升的量，再各取 155 mL 置於各組反應容器中，即可符合表 3-2 所需之培養基濃度。

藉由進行批次式實驗後所得的硫酸根還原率的結果，套入統計軟體分析後可得知在三重金屬的交互作用下會對 SRB 生長產生何種影響，亦可由其結果可回歸出如下之反應方程式：

Sulfate reduction ratio (%)

$$= a X + b Y + c Z + d XY + e XZ + f YZ$$

其中 a、b、c、d、e 及 f 分別為各項式係數，X、Y 及 Z 則分別為銅、鋅、鎳的比例編碼。由以上公式可預測出在規定濃度內，三種重金屬混和下對硫酸鹽還原率的影響。

表 3-7 實驗規劃所需調配的培養基配取量

	組成分	濃度
1	乳酸鈉	5.87 mL/L
2	酵母萃取物	0.16 g/L
3	Na ₂ SO ₄	5.92 g/L
4	NaHCO ₃ (84 g/L)	48 mL/L
5	NH ₄ Cl	1.6 g/L
6	KH ₂ PO ₄	0.4 g/L
7	CaCl ₂ · 6H ₂ O	0.096 g/L
8	FeCl ₃ · 6H ₂ O	0.064 g/L

3-6 反應槽的設置

本實驗所使用的反應槽為 17 個 250 mL 之磨口三角燒瓶，其中 1 個反應槽為空白對照組不添加任何重金屬，其餘 16 個則依混合型實驗設計所建立的比例濃度配製；實驗所採用配製重金屬銅、鋅、鎳標準溶液 (1000 mg/L) 的藥品分別為 $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 、 ZnCl_2 、 $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 。批次式反應槽的培養基取量為 155 mL (圖 3-4)，再添加不同比例總量為 45 mL 的重金屬溶液 (圖 3-5)，污泥植種量為 50 mL，使最終重金屬濃度比例如表 3-4 所示，培養基使用前先進行滅菌後各曝氣 3-5 分鐘，待加入適當的重金屬標準品後再將 pH 調到 7.2-7.5，最後再加入 50 mL 馴養污泥溶液 (圖 3-6)，混合均勻後取出 100 mL 反應時間為 $t = 0 \text{ hr}$ 之溶液進行離心過濾等前處理待分析 AA (銅、鋅、鎳)、 SO_4^{2-} 、 S^{2-} 、DOC，剩餘的 150 mL 溶液封緊瓶口 (圖 3-7)，置於恆溫震盪培養箱進行反應，反應時間為 14 天，反應溫度控制在 30°C ，反應震盪速率為 150 rpm (圖 3-8)，剩餘未用完之馴養污泥溶液則進行 MLVSS 分析。



圖 3-4 裝入培養基的混合實驗批次式反應槽



圖 3-5 加入不同重金屬濃度的混合實驗批次式反應槽



圖 3-6 植入厭氧濃縮污泥後的混合實驗批次式反應槽



圖 3-7 反應時間 $t = 0$ hr 採樣後的混合實驗批次式反應槽



圖 3-8 混合實驗批次式反應槽恆溫震盪

3-7 分子生物技術

本研究除了藉由物化分析方法探討生物沈澱 (bioprecipitation) 步驟對廢水中的重金屬去除的效率外，亦結合分子生物技術之螢光原位雜交法 (fluorescence in situ hybridization, 簡稱 FISH)、聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, 簡稱 PCR) 及變性梯度膠體電泳法 (denaturing gradient gel electrophoresis, 簡稱 DGGE) 等試圖瞭解反應過程中微生物族群結構的變化。而分子生物技術於環境微生物的應用乃是藉由萃取來自環境樣品中微生物的總 DNA 或 RNA, 再利用聚合酶連鎖反應 (PCR) 放大微生物特有的 16S rDNA 或具有特定生理意義之功能性基因片段；此 PCR 產物可由 DGGE 分析微生物族群的基因指紋譜，將分離後的不同序列定序並建立 16S rDNA 基因資料庫。經由 16S rDNA 基因

資料庫比對，建立微生物的親緣演化樹 (phylogenetic tree)，從演化分析上的分群結果，推測演化關係相近的菌群其可能之生理特性，並適當修正分離的策略以達到分離特定菌群的目的。此外，藉由基因資料庫比對，設計特定微生物群的專屬探針 (probe)，利用核酸探針螢光原位雜交法 (FISH)，監測環境中特定族群的數量和分佈情形，亦可隨時間分析菌群的動態變化 (dynamic population) (吳，2003)。本實驗由多篇文獻中找出四種對 SRB 具專一性的探針及一種針對細菌的探針進行螢光原位雜交實驗，各實驗方法之詳細步驟如下述：

3-7.1 FISH 實驗步驟



螢光原位雜交分析法乃直接將生物樣品以 4% paraformaldehyde 固定，以乙醇進行脫水後，再利用一段標示了螢光染劑且長度約 20 bp 的核苷酸探針雜合互補的核苷酸序列，再藉由螢光顯微鏡觀測樣品的螢光特性，此技術最大的優點是避免可能導致誤差的 DNA 萃取及 PCR 反應等步驟，可直接應用於微生物族群的鑑定、空間分佈與族群的定量分析之研究 (Ito et al., 2002)。

本實驗所選用的探針為： EUB338、SRB385、SRB385Db，詳細序列及 rRNA 位置分別如表 3-8 所示：

表 3-8 硫酸還原菌族群所使用之探針

Probes	Sequence (5'-3')	rRNA 位置	specific	染劑種類	FA (%)	文獻來源
EUB338	GCTGCCTCC CGTAGGAGT	338-355	bacteria	Cy3	20	Ravenschlag et al. (2000) Ito T. et al. (2002) Labrenz et al. (2000)
SRB385	CGGCGTCGC TGCGTCAGG	385-402	δ - subgroup of Proteobacteria	Cy3	35	Ravenschlag et al. (2000) Ito T. et al. (2002) Rabus R. et al. (1996) Labrenz et al. (2000)
SRB385Db	CGGCGTTGC TGCGTCAGG	385-402	δ - subgroup of Proteobacteria	FITC	35	Ravenschlag et al. (2000) Ito T. et al. (2002) Rabus R. et al. (1996)

詳細實驗步驟如下：

1. 配製 4% PFA (Paraformaldehyde，簡稱 PFA):

- a. 秤取 0.5 g PFA 置入 45 mL 離心管。
- b. 加入 3 μ L 濃度為 10 M 的氫氧化鈉溶液。
- c. 加入 4.125 mL 濃度為 3 倍的 PBS (Phosphate Buffered Saline，簡稱 PBS)。
- d. 加入 8.25 mL DEPC (Diethyl pyrocarbonate，簡稱 焦炭酸二乙酯)。
- e. 以加熱板隔水加熱 20 分鐘，溫度控制在 60°C。
- f. 待冷卻後加入 30 μ L 濃度為 6 M 的 HCl 使 pH 為 7.2。
- g. 以 0.2 μ m 針筒式濾膜進行過濾。
- h. 過濾後所得之濾液冷藏在 4°C 冰箱中保存。

2. 固定 (Fixation)

- a. 將採的污泥樣品取 0.25 mL 置入 1.5 mL 之微離心管中。
- b. 加入 0.75 mL 之 4% 的 PFA。
- c. 將微離心管送入 -4°C 冷凍庫 30 分鐘。
- d. 30 分鐘後將樣品取出退冰。
- e. 以 10,000 rpm 離心機進行高速離心 3 分鐘。
- f. 離心完後移除上澄液並加入 1 mL 濃度為 1 倍的 PBS。
- g. 震盪使混合均勻。

- h. 重複上述 e-g 之步驟兩次。
- i. 以 10,000 rpm 高速離心 3 分鐘。
- j. 離心完後移除上澄液並加入 1 mL 50% 的 PBS/乙醇 (v/v)。
- k. 震盪使混合均勻。
- l. 將微離心管內的樣品全取置入均質器中均質化。
- m. 將已均質化的樣品取出置入另一 1.5 mL 之微離心管。
- n. 取 3 μ L/well 量固定在 FISH 專用雜交玻片上 (如圖 3-9 所示)。

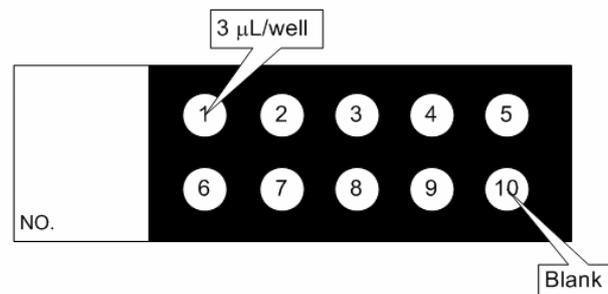


圖 3-9 螢光原位雜交法專用之雜交玻片

- o. 將已固定樣品的雜交玻片放置在通風的盒子上蓋隔夜風乾。
- p. 將已風乾的雜交玻片取出，插到脫水用提籃中。
- q. 先將提籃泡入 50% (v/v) 乙醇脫水兩分鐘。
- r. 取出後再將提籃泡入 80% (v/v) 乙醇脫水兩分鐘。
- s. 取出後再將提籃泡入 96% (v/v) 乙醇脫水兩分鐘。
- t. 將已脫水的雜交玻片放回通風盒中自然風乾約 5-6 個小時。

3. 雜交 (Hybridization)

- a. 取部分 WB (Washing buffer, 簡稱 WB) 置入 46°C 恆溫培養箱中預熱。
- b. 取 160 μL 的 HB (Hybridization buffer, 簡稱 HB) 置入 1.5 mL 微離心管中 (暗房中進行)。
- c. 加入 5 μL 的探針 (表 3-8), 並以 tip 混合均勻 (暗房中進行)。
- d. 取 16 $\mu\text{L}/\text{well}$ 量之混合均勻的 HB 點到每個 well 上 (暗房中進行)。
- e. 將雜交玻片水平放入含潤溼過衛生紙的 45 mL 離心管中加蓋, 如圖 3-10 所示 (暗房中進行)。
- f. 將離心管置入 46°C 之恆溫培養箱中進行雜交 1.5 個小時 (暗房中進行)。

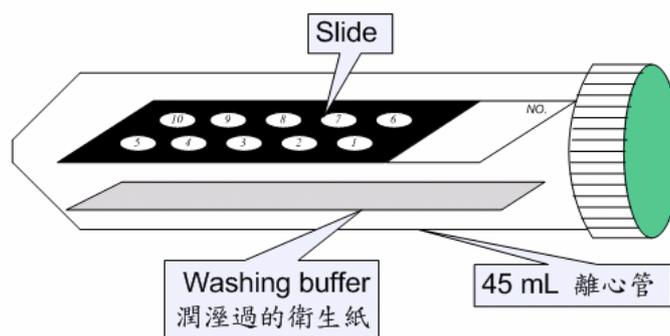


圖 3-10 螢光原位雜交裝置

4. 清洗 (Washing)

- a. 雜交完畢後，取出離心管並將恆溫培養箱溫度調到 48°C (暗房中進行)。
- b. 將離心管中的 雜交玻片 取出，並丟棄衛生紙 (暗房中進行)。
- c. 待 WB 預熱達 48°C 時則從恆溫培養箱中取出 (暗房進行)。
- d. 吸取 1 mL 的 WB 輕輕淋洗 雜交玻片 上的每個 well 2-3 次 (暗房中進行)。
- e. 將剩餘的 WB 到入 45 mL 離心管中達刻度 35 mL 的位置，並將 雜交玻片垂直插入離心管中浸泡 (暗房中進行)。
- f. 將離心管置入 48°C 恆溫培養箱中 20 分鐘 (暗房中進行)。
- g. 取出離心管中的 雜交玻片 並以滅菌水淋洗數次 (暗房中進行)。
- h. 將 雜交玻片 放入通風盒中使自然風乾 (暗房中進行)。

5. 染色 (Staining)

- a. 取出已風乾的 雜交玻片 並滴入 20 μ L/well 量的 DAPI 染劑 (4' 6' - diamidino - 2 - phenylindole，簡稱 DAPI) (暗房中進行)。
- b. 靜置染色 30 分鐘 (暗房中進行)。
- c. 取出染色完畢後的 雜交玻片，並以滅菌水淋洗過剩的 DAPI 染劑 (暗房中進行)。
- d. 將 雜交玻片 置入通風盒中風乾 (暗房中進行)。

6. 顯像

於雜交程序完成後，使用直落式螢光顯微鏡或其他螢光顯微裝置對雜交玻片進行觀察，以數位相機 (CCD camera) 觀察樣品螢光強度，並對其進行分析比較，圖 3-11 為本實驗所使用之螢光顯微鏡照相設備。一般染色之標本應立即觀察，因當時螢光最顯著，若不能馬上觀察，需儲存在雜交玻片盒內。在螢光顯微鏡之螢光照射下，染出之螢光會慢慢消失，故要照相存證者，需於材料新鮮時染色，並馬上照相，才會有好效果，上述顯像步驟皆須在暗房中進行。



圖 3-11 螢光顯微鏡照相設備

7. 結果處理

取十張具代表性的螢光顯微照片，計算每張照片上所含菌數，計算經探針染色呈現螢光反應細菌個數佔經 DAPI 染色之總菌數比例，即為樣品中 SRB 菌群百分比。

8. 品質管制

- a. 應記錄原始數據，以備查核之用。
- b. 一片 雜交玻片 上須留一格 well 做為空白試驗。
- c. 進行檢測時，所用的器具均應為 RNase Free。

9. 相關藥品配製請見附錄三。

3-7.2 DNA 萃取實驗步驟

本實驗所使用之 DNA 萃取方法為市售 Microbial DNA Isolation Kit

(MO BIO Laboratories, Inc.)，其詳細操作步驟如下：

1. 取 2 mL 樣品到微離心管中。
2. 以 10,000 rpm 高速離心 1 分鐘。
3. 用 tip 除掉一半上澄液。
4. 再次以 10,000 rpm 高速離心 1 分鐘。
5. 再以 tip 除掉所有上澄液，留下 pellet。
6. 加入 300 μ L micro bead solution。
7. 震盪使其混合均勻。
8. 全取樣品到 micro bead tube 中。
9. 取 50 μ L Solution MD. 1 加到 micro bead tube 中。
10. 將 micro bead tube (含樣品) 置於 65°C 下加熱 10 分鐘。

11. 將加熱後的 micro bead tube (含樣品) 黏置於震盪器上，並將轉速調到最大震盪 10 分鐘。
12. 以 10,000 rpm 高速離心 1 分鐘。
13. 全取上澄液到新的微離心管中 (量約 300-350 μ L)。
14. 加入 100 μ L Solution MD. 2。
15. 震盪 5 秒鐘使其混合均勻。
16. 將樣品置於 4°C 下冷藏 5 分鐘。
17. 以 10,000 rpm 高速離心 1 分鐘。
18. 全取上澄液到新的微離心管中 (量約 450 μ L)。
19. 加入 900 μ L Solution MD. 3。
20. 震盪 5 秒鐘使其混合均勻。
21. 取 700 μ L 樣品到 spin filter 中。
22. 以 10,000 rpm 高速離心 1 分鐘。
23. 倒掉濾液，並全取剩餘之樣品到 spin filter 中。
24. 以 10,000 rpm 高速離心 1 分鐘。
25. 倒掉濾液，並加入 300 μ L Solution MD. 4 到 spin filter 中。
26. 以 10,000 rpm 高速離心 1 分鐘。
27. 倒掉濾液，並再次以 10,000 rpm 高速離心 1 分鐘。
28. 將 Spin filter 移裝到新的微離心管中 (注意：spin filter 上不能有殘留)

的液體)。

29. 加入 50 μ L Solution MD. 5 到 spin filter 中。

30. 以 10,000 rpm 高速離心 1 分鐘，所得濾液即為 DNA 產物。

3-7.3 PCR 實驗步驟

由於原樣本 DNA 的濃度相當低，不利於分析，因此可藉由 PCR 的實驗過程將欲探討的序列擴增到儀器可解析之濃度。PCR 是一種將原樣本的 DNA 一直複製的步驟，藉由加入適當的引子 (primer) 及聚合酵素等反應物，利用儀器反覆升溫降溫，便可將原始 DNA 以 2 的次方倍數增加，一般而言，使 DNA 增加 230 次方倍約僅需 3 小時 (吳，2003)。

本實驗所使用之引子如表 3-9 所示，而 PCR 複製條件如表 3-10 所示。

表 3-9 聚合酶連鎖反應所使用之引子

Primer name	序列位置	Sequence (5'-3')
907r	907-926	CCGTCAATTCCTTTGAGTTT
519f	519-536	CAGCAGCCGCGGTAATAC
519f-GC	GC-519-907	GC clam-CAGCAGCCGCGGTAATAC

表 3-10 聚合酶連鎖反應實驗控制條件

Cycle	Temperature (oC)	Time (min:sec)
1x	94	06:00
	94	01:00
35x	55	01:00
	72	01:10
1x	72	06:00
1x	4	∞

PCR 詳細操作步驟：

1. 取 36 μL 無菌水置入 200 μL eppendrop 中。
2. 加入 PCR master mix 10 μL 。
3. 加入 primer-r 1.5 μL 。
4. 加入 primer-f 1.5 μL 。
5. 加入 DNA Template 1 μL 。
6. 以儀器 (圖 3-12) 進行聚合酶連鎖反應。
7. 將 PCR 產物進行 Agarose Gel 水平電泳。
8. 進行顯影照相看 PCR 是否成功。

3-7.4 DGGE 實驗步驟

1. 配製含 7% 梯度為 30~70% 的聚丙烯醯胺凝膠電泳 (polyacrylamide gel electrophoresis, 簡稱 PAGE) 膠體。
 - a. 取兩支 45 mL 離心管分別標示上 30% 及 70%。
 - b. 分別秤取 2.52 g 及 5.88 g 的 Urea 置入離心管中 (皆依 30% 及 70% 順序添加)。
 - c. 兩離心管皆加入 3.5 mL 濃度為 40% 的 acrylamide/bis。
 - d. 兩離心管皆加入 0.4 mL 濃度為 50 倍的 TAE (Tris-acetate/EDTA electrophoresis, 簡稱 TAE) buffer。
 - e. 分別加入 2.4 mL 及 5.6 mL 的 formamide。
 - f. 兩離心管皆加入無菌水定量到 20 mL。
 - g. 緩慢均勻搖晃。
 - h. 兩離心管皆加入 200 μ L 濃度為 10% (即取 0.04 g APS 於 1.5 mL 微離心管中, 加入 400 μ L 無菌水, 即為 10% APS) 的 APS (Ammonium Persulfate, 簡稱 APS)。
 - i. 緩慢均勻搖晃。
 - j. 架設水平注膠台。
 - k. 兩離心管皆加入 8 μ L TEMED (N, N, N', N' -Tetramethylethylenediamine, 簡稱 TEMED)。

l. 緩慢均勻搖晃後開始注膠。

2. 電泳反應槽

a. 先將 7 L 濃度為 1 倍的 TAE buffer 預熱到 80°C 並倒入電泳槽中，溫度調到 60°C。

b. 取 20 μ L 6 倍染料加入 100 μ L 樣品中。

c. 離心使混合均勻。

d. 將 PAGE 膠體架上電泳槽，待溫度降到 60°C 再注入樣品 (每個 well 約注入 30~40 μ L)。

e. 樣品注入完後架上加熱控制器，並將溫度調到 56°C，電壓 200 volt，時間 300 分鐘進行電泳，裝置如圖 3-13。

3. PAGE 膠體顯影照相

a. 取下跑完電泳的 PAGE 膠體，並在去離子水中浸泡數分鐘。

b. 將 PAGE 膠體移至含有 ETBR (ethidium bromide，簡稱 ETBR) 的溶液中進行染色約 10~15 分鐘。

c. 以顯影照相設備 (圖 3-14) 存取電泳結果。



圖 3-12 聚合酶連鎖反應器

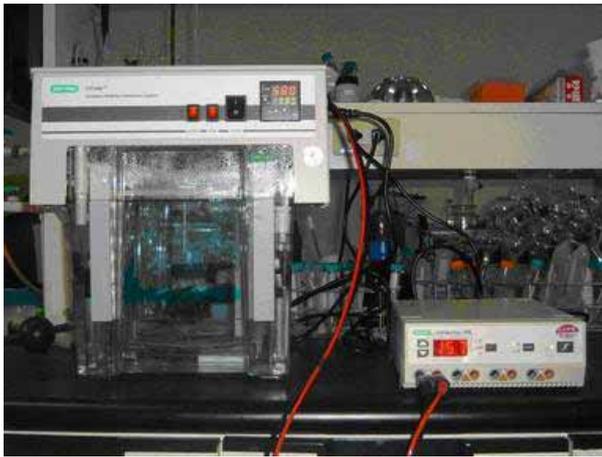


圖 3-13 變性梯度膠體電泳槽



圖 3-14 顯影照相設備