

研究材料與方法

一、研究材料

本研究使用的東方果實蠅蒙中研院動物所李文蓉老師慨然贈與，置 $27\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、12L/12D 的培養箱飼養。

二、研究方法

1 clone 視蛋白

1.1 total RNA之粹取

- (1) 將雌蟲放入 -20°C 冰箱凍昏。
- (2) 將其放進冰冷的研鉢內，以液態氮急速冷凍後研磨成粉末狀。
- (3) 將碎片移入1.5ml離心管中。
- (4) 加入TRIZOL reagent、chloroform (Sigma St. Louis USA)，比例為TRIZOL reagent:chloroform=5:1。
- (5) 上下翻轉離心管5秒後靜置於 4°C 15分鐘。
- (6) 4°C 離心 (20000g) 15分鐘後將上層液轉移至乾淨的1.5ml離心管。
- (7) 加入與上層液等體積的isopropanol (Sigma)，在 -20°C 靜置30分鐘。
- (8) 4°C 離心 (20000g) 15分鐘。
- (9) 倒掉上清液，加入0.4ml 75%的酒精 (RNase-free)， 4°C 離心

(20000g) 6分鐘。

(10) 倒掉上清液，置於抽風櫃中風乾。

(11) 加入50 μ l ddH₂O (RNase-free)，將此total RNA粹取液放入-80°C 冰箱保存。

1.2 測定粹取液RNA濃度

(1) 取1 μ l total RNA粹取液加入99 μ l ddH₂O，混合後放入石英管。

(2) 測OD₂₆₀的吸光值，並依下列公式測知RNA濃度：OD₂₆₀吸光值
*40*100= ? ng / μ l

1.3 反轉錄 (reverse transcription, RT)

本實驗以Adventage ® RT-for-PCR Kit (BD biosciences, K1402-2) 進行反轉錄。

(1) PCR tube (Eppendorf) 加入12.5 μ l total RNA粹取液及1 μ l Oligo (dT) Primer。

(2) 放入溫度循環機 (MJ Research)，以：

第一階段：70°C 10分鐘。1次循環

(3) 加入1 μ l dNTP Mixture、4 μ l 5X Reaction Buffer、0.5 μ l Recombinant RNase Inhibitor、1 μ l MMLV Reverse Transcriptase。

(4) 放回溫度循環機，以：

第二階段：42°C 1小時。1次循環

第三階段：94°C 5分鐘。1次循環

(5) 取出混合管加入80 μ l ddH₂O (RNase-free)，將此RT反應產物放入-20°C 冰箱保存。

1.4 設計Rh1 group退化引子 (degenerate oligonucleotide primers)

(1) 以果蠅 ninaE (GenBank accession number NP_524407) 核苷酸序列為基礎，使用BLASTP (Altschul *et al.* 1997) 在NCBI資料庫 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中，尋找胺基酸序列相近的DNA片段。

(2) 找出Score 600以上、期望值 (E Value) 小於等於 10^{-178} 的8個視

蛋白Rh1序列：

GenBank accession number	物種	描述
AAB87898	<i>D. subobscura</i>	rhodopsin 1
AAO01038	<i>D. virilis</i>	ninaE-PA
NP_524407 附註：Fig. 1 顯示為 ninaE	<i>D. melanogaster</i>	NINAE
AAO01119	<i>D. pseudoobscura</i>	ninaE-PA
P28678	<i>D. pseudoobscura</i>	Opsin Rh1
AAB31030	<i>D. simulans</i>	opsin Rh1
P22269	<i>C. erythrocephala</i>	Opsin Rh1
AAO01095	<i>D. willistoni</i>	ninaE-PA

(3) 使用"Vector NTI"軟體 (InforMax) 內建的"Align X Blocks"程式

搜尋上述各Rh1胺基酸序列中較保留的區塊，N端取156個胺基酸、C端取166個胺基酸（Fig. 1）。

- (4) 使用”Genefisher”軟體（Giegerich *et al.* 1996）以這兩段較保留區塊設計一對退化引子為

dRh1F: CCAYCTGATYAGCCCVTAYTGGAA

dRh1R: CARATSGTRTTCAGBGGSGTCA

1.5 退化（degenerate）聚合酵素連鎖反應（PCR）

本實驗以TAKARA TaqTM（TAKARA, R001A）進行退化PCR。

- (1) 取0.2或0.5ml PCR tube加入：1 μ l RT反應產物、18.3 μ l ddH₂O、2.5 μ l 10X PCR Buffer、2 μ l dNTP Mixture、0.2 μ l TAKARA TaqTM、0.5 μ l 10 pmole/ μ l 5'端引子、0.5 μ l 10 pmole/ μ l 3'端引子。

5'端引子, dRh1F: CCAYCTGATYAGCCCVTAYTGGAA

3'端引子, dRh1R: CARATSGTRTTCAGBGGSGTCA

- (2) 將混合管放入溫度循環機

第一階段：95°C 5分鐘。1次循環

第二階段：95°C 40秒，46°C～56°C 1分鐘，72°C 1分鐘。45次循環

第三階段：72°C 10分鐘。1次循環

1.6 DNA電泳

- (1) 以0.5X TBE buffer（45mM Tris-borate, 1mM EDTA）依需要配

- 製0.5-2.0%的洋菜膠體，微波加熱溶解後倒入鑄膠器聚膠1小時。
- (2) 將膠體放入水平電泳槽 (Major Science MJ-105) ，加0.5X TBE buffer 蓋過膠體。
 - (3) 在DNA樣品中加入0.2 μ l 6X Loading buffer (0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol, 30% glycerol in H₂O) 混合後，加入膠體樣品槽中，以電壓125-130伏特進行電泳分離30分鐘。
 - (4) 在紫外光下觀察電泳分離結果，並且以熱感應照相裝置照相。

1.7 自洋菜膠體粹取DNA片段

本實驗以Gel/PCR DNA Fragments Extraction kit (Geneaid) 自洋菜膠體粹取DNA片段。

- (1) 以刀片將DNA band (退化PCR主產物) 自洋菜膠體上切下，放入1.5ml離心管中。
- (2) 秤重後加入 ((膠重/200mg) *3) μ l DF Buffer，水浴55°C 10分鐘，每隔3分鐘搖晃一下。
- (3) 將溶液抽出加到DF Column(接上Collection Tube)，離心(6000g) 30秒。
- (4) 倒掉濾液，加500 μ l Wash Buffer，離心(6000g) 30秒。
- (5) 倒掉濾液，離心20000g 2分鐘。
- (6) 加入15 μ l ddH₂O，靜置3分鐘。

(7) 離心 (20000g) 取得DNA片段粹取液。

(8) 以DNA電泳鑑別產物。

1.8 定序

DNA 片段由明生生物科技股份有限公司 (3100 Genetic Analyzer ABI PRISM)、波仕特生物科技股份有限公司 (CEQ2000 Beckman) 定序。

1.9 退化PCR主產物DNA片段分析

將退化PCR主產物DNA片段定序結果分三方面分析。

(1) 至NCBI資料庫比對、搜尋相似DNA片段並推測其蛋白質功能。

(2) 用”Multalin”軟體 (Corpet 1988)，和果蠅ninaE的核苷酸序列

(NM_079683)比對，並設定高度保留 (high consensus) 為90%、

低度保留 (low consensus) 為50%。

(3) 以”BLAST 2 SEQUENCES”軟體 (Tatusova and Madden 1999)，

比對果蠅的ninaE核苷酸序列 (NM_079683) 比對，找出近似片

段位置。

1.10 設計專一引子

使用”Vector NTI”軟體 (InforMax) 內建的”PCR analysis”功能以
上述退化PCR主產物核苷酸序列設計5’、3’端專一引子為

BDRh1F: ATGGCGTGGTGATTTATATATTCT

BDRh1R: TCATTTTCTTGGCTTGTTTCG

1.11 Rh1 group 專一PCR及定序

(1) 依實驗1.5步驟進行PCR，有修改處於下表示：

5'端引子, BDRh1F: ATGGCGTGGTGATTTATATATTCT

3'端引子, BDRh1R: TCATTTTCTTGGCTTGTTTCG

溫度循環機第二階段：95°C 40秒，62°C 1分鐘，72°C 30秒。45次循環

(2) 依實驗1.6、1.8步驟進行DNA電泳及送定序。

1.12 結合Rh1 group 專一PCR產物及退化PCR主產物並進行分析

使用"Vector NTI"軟體(InforMax)"ContigExpress"程式連結退化及Rh1 group 專一PCR產物的核苷酸序列得到"部分片段"核苷酸序列，將"部分片段"核苷酸序列依實驗1.9步驟進行三方面分析。

1.13 設計5'-RACE (rapid amplification of 5' cDNA end) 專一引子

(1) 使用"Vector NTI"軟體(InforMax)內建的"PCR analysis"功能以"

部分片段"核苷酸序列設計gene specific primer為前置引子

(forward primer)

5RACEF: CCGAACCCAAACCACCAT

- (2) 參考SMART RACE cDNA amplification kit (BD Biosciences) 之 oligo(dT)-based 3'-RACE CDS primer A:
AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC(T)30N₁N, where N is A, C, G, or T and N₁ is A, C, or G, 設計反置引子 (reverse primer) 為

5RACER: AAGCAGTGGTATCAACGCAGATTTTTTTTTTTTTTTTTTTT

1.14 設計3'-RACE專一引子

- (1) 依實驗1.13步驟(1)設計gene specific primer為反置引子

3RACER: CGCGAACAAGCCAAGAAA

- (2) 前置引子就是前述1.13(2) 5'-RACE的反置引子。

1.15 5'-RACE

1.15.1 分離複眼視覺相關細胞

- (1) 將雌蟲放入冰箱凍昏。
- (2) 在解剖顯微鏡 (Nikon SMZ-1) 下用眼科剪刀剪下複眼。
- (3) 用鑷子固定複眼，以解剖針尖刮下複眼內側的細胞到昆蟲生理食鹽水中。
- (4) 將聚成團的色素塊用針尖壓碎打散。
- (5) 吸取充滿複眼細胞的生理食鹽水加入1.5ml離心管中，將細胞離下以備抽取RNA用。

1.15.2 粹取複眼相關視覺細胞total RNA、濃度測定、RT

依實驗1.1(4)~1.3步驟進行，有修改處於下表示：

以複眼視覺相關細胞為材料

1.15.3 純化cDNA片段

本實驗以Gel/PCR DNA Fragments Extraction kit (Geneaid) 純化cDNA片段。

- (1) 60 μ l RT反應產物加入300 μ l DF buffer，手彈混勻。
- (2) 依照1.7 (3) ~ (7) 進行純化cDNA片段。
- (3) “純化產物”移入-20°C 冰箱保存。

1.15.4 加poly dATP到純化產物之3'端

本實驗以 Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (TdT) (TAKARA, 2230A) 在”純化產物” cDNA片段的3'端加上poly dATP。(Fig. 9A)

- (1) 加1 μ l “純化產物”、10 μ l 5X TdT buffer、5 μ l 0.1% BSA、2.5 μ l 100mM dATP (TAKARA, 4026)、30.5 μ l ddH₂O、1 μ l TdT 到1.5ml離心管混勻，置37°C 30小時。
- (2) 加入450 μ l ddH₂O，將此”3'-polyA純化產物”移至-20°C 冰箱保存。

1.15.5 5'-RACE PCR

- (1) 依實驗1.5步驟進行PCR，有修改處於下表示：

以”3'-polyA純化產物”進行PCR

5'端、3'端引子為

5RACEF: CCGAACCCAAACCACCAT

5RACER: AAGCAGTGGTATCAACGCAGATTTTTTTTTTTTTTTTTTTT

溫度循環機第二階段：95°C 40秒，56°C 1分鐘，72°C 30秒。30次循環

(2) 依實驗1.6步驟進行DNA電泳。

1.15.6 選殖載體與DNA片段的銜接、勝任細胞的轉形

以ECOS 9-5 1分鐘勝任細胞試劑組 (Yeastern, YE708-10)進行選殖載體與DNA片段的銜接、勝任細胞的轉形。

(1) 1.5ml離心管加入2 μ l yT&A vector、5 μ l PCR產物、1 μ l ligation buffer A、1 μ l ligation buffer B、1 μ l DNA ligase，此為”銜接混合液”。

(2) ”銜接混合液”放4°C冰箱overnight。

(3) 加2.5 μ l ”銜接混合液”至50 μ l全溶菌液ECOS 9-5 (*E. coli*)，混勻，水浴42°C 1分鐘。

(4) 將菌液倒到培養基 (LB agar, Ampicillin 50 μ g/ml) 中劃菌，置37°C培養12-16小時。

(5) 挑菌落劃至另一培養皿，置37°C培養12-16小時後，以牙籤挑菌落進行colony PCR。

1.15.7 colony PCR

(1) 依實驗1.5步驟進行PCR，有修改處於下表示：

牙籤挑的菌群為反應物

5'端引子, M13F: GTAAAACGACGGCCAGT

3'端引子, M13R: CAGGAAACAGCTATGAC

溫度循環機第二階段：95°C 40秒，55°C 1分鐘，72°C 30秒。30次循環

(2) 依實驗1.6步驟進行DNA電泳。

(3) 分析電泳結果，挑可能帶有目標基因DNA片段的菌落劃於另一培養皿，置37°C培養12-16小時後依實驗1.8步驟送定序。

1.16 3'-RACE

1.16.1 3'-RACE PCR

(1) 依實驗1.5步驟進行PCR，有修改處於下表示：

以實驗1.15.2步驟的產物為材料

5'端、3'端引子為

3RACEF: AAGCAGTGGTATCAACGCAGATTTTTTTTTTTTTTTTTTTT

3RACER: CGCGAACAAGCCAAGAAA

溫度循環機第二階段：95°C 40秒，59°C 1分鐘，72°C 30秒。30次循環

(2) 依實驗1.6步驟進行DNA電泳。

1.16.2 選殖載體與DNA片段的銜接、勝任細胞的轉形、colony

PCR

依實驗1.15.6~1.15.8步驟進行以完成3'-RACE。

1.17 連結5'-, 3'-RACE產物DNA片段及“部分片段”DNA片段並進行分析

- (1) 5'-, 3'-RACE定序所得的核苷酸序列以”Multalin”(Corpet 1988)比對、剔除錯誤的核苷酸，得到”正確RACE核苷酸序列”。
- (2) 使用”Vector NTI”軟體 (InforMax) ”ContigExpress”程式連結”正確RACE核苷酸序列”及“部分片段”核苷酸序列得到”完整片段”。
- (3) “完整片段”核苷酸序列送至NCBI資料庫中比對搜尋相似DNA片段，以推測其蛋白質功能
- (4) 使用”Translate tool” (ExPASy) 將”完整片段”核苷酸序列轉譯成胺基酸序列。
- (5) “完整片段”胺基酸序列送至NCBI資料庫中比對搜尋相似的蛋白質。
- (6) 使用”InterProScan” (Zdobnov and Apweiler 2001) 、”GenQiz” (Iliopoulos *et al.* 2000) 分析“完整片段”胺基酸序列功能。
- (7) 用”Vector NTI”軟體 (InforMax) ”AlignX”程式比較”完整片段”和果蠅NinaE蛋白質家族在保留區域上及二級結構上的胺基酸

序列。

- (8) ”MEGA2” (Kumar 2001) 繪製Opsin RH1/RH2親緣關係樹。下列為蒐集得到的相關DNA片段的核苷酸序列註冊號碼，依物種排列為：

C. erythrocephala: Rh1 (GenBank accession number M58334)

D. erecta: Rh2 (GenBank accession number AAO00983)

D. littoralis: ninaE (GenBank accession number AAO01038)、Rh2 (GenBank accession number AAO01080)

D. malenogaster: Rh1 (GenBank accession number NM_079683)、Rh2 (GenBank accession number NM_079674)、Rh6 (GenBank accession number NM_079644)

D. miranda: Rh1 (GenBank accession number AF451008)

D. persimilis: Rh1 (GenBank accession number AF451006)

D. pseudoobscura: Rh1 (GenBank accession number X65877)、Rh2 (GenBank accession number X65878)

D. pseudoobscura bogotana: Rh1 (GenBank accession number AF450992)

D. subobscura: Rh1 (GenBank accession number AF025813)

D. willistoni: ninaE (GenBank accession number AAO01095)、Rh2 (GenBank accession number AAO01064)

M. viciae: Megopsin1 (GenBank accession number AF189714)

使用Neighbor-joining (NJ)方式、Tamura-Nei模式繪製。

下列為蒐集得到的相關蛋白質的胺基酸序列註冊號碼，依物種排列為（括號內為GenBank accession number）：

C. erythrocephala: Rh1 (GenBank accession number P22269)

D. erecta: Rh2 (Swiss-Prot accession number Q8I1I6)

D. littoralis: Rh1 (Swiss-Prot accession number Q8I1D8)、Rh2 (Swiss-Prot accession number Q8I192)

D. malenogaster: Rh1 (GenBank accession number P06002)、Rh2 (GenBank accession number P08099)、Rh6 (GenBank accession number O01668)

D. miranda: Rh1 (Swiss-Prot accession number Q8STC8)

D. persimilis: Rh1 (Swiss-Prot accession number Q8STC7)

D. pseudoobscura: Rh1 (GenBank accession number P28678)、Rh2 (GenBank accession number P28679)

D. subobscura: Rh1 (GenBank accession number O44108)

D. willistoni: Rh1 (Swiss-Prot accession number Q8I181)、Rh2 (Swiss-Prot accession number Q8I1A8)

M. viciae: Megopsin1 (Swiss-Prot accession number Q9GU64)

使用Neighbor-joining (NJ)方式、Gamma distance模式繪製。

(9) 依照柑橘蝴蝶 (*Papilio xuthus*) 視蛋白 (AB028218) 基因命名

方式，將所獲得的序列進行命名工作，並送入NCBI資料庫登入。

2 複眼和身體其他部分的BdoRh1表現量比較

2.1 尋找內控制組並設計專一引子

(1) 在NCBI資料庫，從東方果實蠅所有的核苷酸序列中尋找 housekeeping gene (glucose 6 phosphate dehydrogenase, G6PD)當作內控制組。

(2) 使用”PrimerExpress”軟體 (Applied Biosystems) 設計一對內控制組專一引子為

G6PDF: ACATGAAGGTACAACCACACA
G6PDR: ATGCGATTACAATTGGAATG

2.2 複眼視覺相關細胞total RNA之粹取、濃度測定、RT

依實驗1.15.1-1.15.2步驟進行。

2.3 身體其他部分total RNA之粹取、濃度測定、RT

依實驗1.1-1.3步驟進行，有修改處於下表示：

以斷頭的東方果實蠅為材料

2.4 測定內控制組G6PD PCR適當的循環次數

(1) 依實驗1.5步驟進行PCR，有修改處於下表示：

以身體其他部分的RT反應產物進行PCR

5'端引子, G6PDF: ACATGAAGGTACAACCACACA

3'端引子, G6PDR: ATGCGATTACAATTGGAATG

第二階段: 95°C 40秒, 49°C 1分鐘, 72°C 10秒。20, 25, 30, 35, 40, 45

次循環

- (2) 依實驗1.6步驟進行DNA電泳，使用”AlphaImagerTM 1220 Documentation & Analysis systems”進行band的亮度分析，繪製”在不同PCR循環次數下DNA band亮度曲線圖”。
- (3) 依照DNA band亮度曲線圖調整循環次數為33-37次循環，依實驗2.4步驟(1) - (2)進行PCR、DNA電泳以找出適當的PCR循環次數。

2.5 測定Rh1 group專一PCR適當的循環次數

- (1) 依實驗1.11步驟(1)進行PCR，有修改處於下表示：

以複眼視覺相關細胞的RT反應產物為材料

第二階段：95°C 40秒，62°C 1分鐘，72°C 30秒。20, 25, 30, 35, 40, 45次循環

- (2) 依實驗2.4步驟(2)進行DNA電泳，繪製”在不同PCR循環次數下DNA band亮度曲線圖”。
- (3) 依照DNA band亮度曲線圖調整循環次數為21-29次循環，依實驗2.5步驟(1) - (2)進行PCR、DNA電泳以找出適當的循環次數。

2.6 內控制組G6PD PCR

- 依實驗2.4步驟(1)進行PCR，有修改處於下表示：

以複眼視覺相關細胞及身體其他部分的RT反應產物為材料

第二階段：95°C 40秒，49°C 1分鐘，72°C 10秒。35次循環

2.7 Rh1 group 專一PCR

依實驗2.5步驟（1）進行PCR，有修改處於下表示：

以複眼視覺相關細胞及身體其他部分的RT反應產物為材料

第二階段：95°C 40秒，62°C 1分鐘，72°C 30秒。25次循環

2.8 Rh1 group 專一PCR產物及內控制組G6PD PCR產物之DNA電泳

依實驗1.6步驟進行DNA電泳，有修改處為：將實驗2.5得到的內控制組G6PD PCR產物和實驗2.6得到的Rh1 group 專一PCR產物load在同一個well內，使用”AlphaImagerTM 1220 Documentation & Analysis systems”進行band的亮度分析。

3 複眼視覺相關細胞免疫化學染色

3.1 取複眼視覺相關細胞

依實驗1.15.1步驟取複眼視覺相關細胞，有修改處於下表示：

吸取充滿複眼細胞的生理食鹽水塗於蓋玻片上，靜置於室溫中，待乾燥使細胞黏附於蓋玻片上。

3.2 複眼視覺相關細胞phalloidin染色

（1）將黏附有細胞的蓋玻片放入小培養皿中。

- (2) 加入 1ml 3% paraformaldehyde in PBS (Phosphate-buffered Saline), 固定20分鐘。
- (3) 以1ml PBS洗5分鐘中。
- (4) 加入1ml 0.1% triton X-100 in PBS泡2分鐘。
- (5) 以1ml 0.5% Tween 20 in PBS洗10分鐘。
- (6) 將蓋玻片夾起，有細胞的那面朝下蓋到滴有 20 μ l phalloidin-FITC (1.65ng/ml) 的parafilm上，置37°C反應1小時。
- (7) 將蓋玻片夾起放回培養皿，加入1ml 0.5% Tween 20 in PBS洗3次，每次10分鐘。
- (8) 將蓋玻片夾起，有細胞的那面朝下蓋到加有mounting medium (H-1000, VECTOR) 載玻片上，之後在片子的邊緣塗上指甲油，乾後拿至共軛焦光學顯微鏡 (LEIKA TCS SP2) 觀察。

3.3 複眼視覺相關細胞免疫化學染色

依實驗3.2步驟進行，但步驟(4)改成下列步驟：

- A. 將蓋玻片夾起，有細胞的那面朝下蓋到滴有undiluted 1級抗體：4C5 (mouse anti-rhodopsin R1-R6由Heinz Gert de Couet, Teuchi Tanimura (1987) 設計，並由University of Iowa維持的Developmental Studies Hybridoma Bank提供該抗體) 的parafilm，置37°C反應1小時。

B. 將蓋玻片夾起放回培養皿，加入1ml 0.5% Tween 20 in PBS洗3次，每次10分鐘。

C. 將蓋玻片夾起，有細胞的那面朝下蓋到滴有20 μ l 1:300接rhodamine的anti-mouse IgG (Sigma) 的parafilm，置37°C反應1小時。

4 不同發育時期BdoRh1的表現情形

4.1 觀察不同發育時期複眼發生情形

以下列不同發育時期的蟲體進行實驗。

L5：幼蟲期5天、LJ：找尋化蛹處的老熟幼蟲

P3-P9：蛹期3天到9天

A1：剛羽化的雌蟲

(1) 將樣本放到載玻片上觀察，蛹則必須先在在解剖顯微鏡 (Nikon SMZ-1) 下以刀片切開剝去蛹殼。

(2) 將樣本放到光學顯微鏡下觀察，並使用數位相機 (Nikon COOLPIX 5000) 拍照，並描述東方果實蠅複眼的發生情形。

4.2 不同發育時期total RNA之粹取、濃度測定、RT

依實驗1.1-1.3步驟進行，有修改處於下表示：

以L5、L9、P3-P9、A1期蟲體為材料

4.3 不同發育時期內控制組G6PD PCR

依實驗2.6步驟進行PCR，有修改處於下表示：

以L5、L9、P3-P9、A1期RT反應產物進行PCR

4.4 不同發育時期Rh1 group專一PCR

依實驗2.7步驟進行PCR，有修改處於下表示：

以L5、L9、P3-P9、A1期RT反應產物進行PCR

第二階段：95°C 40秒，62°C 1分鐘，72°C 30秒。27次循環

4.5 不同發育時期Rh1 group專一PCR產物及內控制組 G6PD PCR產物之DNA電泳

依實驗2.8步驟進行DNA電泳，有修改處於下表示：

不進行 band 亮度測定的步驟。