

OAC-110-010 (研究報告)

**建立夜光蟲基因轉殖技術以及應用於海洋毒物環  
境檢測研究**

(正式報告)

**海洋委員會補助研究**

中華民國 110年 10 月

「本研究報告僅供海洋委員會施政參考，並不代表該會政策，該會保留採用與否之  
權利。」

OAC-110-010 (研究報告)

**建立夜光蟲基因轉殖技術以及應用於海洋毒物環  
境檢測研究  
(正式報告)**

**學校：國立臺灣海洋大學**

**指導教授：林翰佳 教授**

**學生：劉昕昀**

**研究期程：中華民國110年4月至110年11月**

**研究經費：新臺幣 7 萬元**

**海洋委員會補助研究**

**中華民國 110年 10月**

「本研究報告僅供海洋委員會施政參考，並不代表該會政策，

該會保留採用與否之權利。」

# 目 次

壹、表 次 .....	5
貳、圖 次 .....	6
參、摘 要 .....	7
肆、前 言 .....	8
一、研究緣起.....	8
二、研究背景.....	9
4.2.1 渦鞭毛藻 (dinoflagellate) .....	9
4.2.2 渦鞭毛藻的特徵 .....	9
4.2.3 夜光蟲 ( <i>Noctiluca scintillans</i> ).....	9
4.2.4 roGFP (redox-sensitive GFP) .....	10
三、現況分析.....	11
四、研究重點與目標.....	11
伍、研究內容 .....	12
5.1 夜光蟲 ( <i>Noctiluca scintillans</i> ) 培養與計數.....	12
5.2 夜光蟲濃縮與過濾 .....	12
5.3 周氏扁藻 ( <i>Tetraselmis chui</i> ) 培養與計數 .....	12
5.4 尋找適合夜光蟲攝食之餌料 .....	12
5.4.1 餌料選擇 .....	12
5.4.2 以 <i>Tetraselmis chui</i> 做冷凍餌料之食性測試 .....	13
5.5 周氏扁藻的缺氮培養 .....	13
5.6 將缺氮培養之周氏扁藻作為餌料餵食夜光蟲 .....	13

5.7 夜光蟲之抗生素篩選 .....	13
5.7.1 測試有效的電轉殖篩選標記.....	13
5.7.2 測試有效的抗生素濃度.....	14
5.8 夜光蟲基因轉殖載體的構築 .....	14
5.9 夜光蟲電轉殖條件設計 .....	16
5.9.1 夜光蟲電轉步驟.....	18
陸、結果與討論 .....	19
6.1 夜光蟲濃縮條件測試 .....	19
6.2 夜光蟲餌料偏好測試 .....	20
6.2.1 餌料選擇 .....	20
6.2.2 冷凍餌料食性測試.....	21
6.3 缺氮培養下的周氏扁藻 ( <i>Tetraselmis chui</i> ) .....	22
6.4 夜光蟲對周氏扁藻之攝食率 .....	23
6.5 夜光蟲之抗生素篩選 .....	24
6.5.1 有效的電轉殖篩選標記.....	24
6.5.2 Basts 和 Blastidinc 殺死夜光蟲之能力 .....	24
柒、結論 .....	27
捌、參考資料 .....	28
玖、附錄 .....	30

## 壹、表 次

表 5.1 夜光蟲電轉殖條件測試.....	17
表 6.1 有效的電轉殖篩選標記.....	24

## 貳、圖 次

圖 5.1 DinoIII-pat-EGFP 載體圖譜。.....	15
圖 5.2 DinoIII-pat-EGFP 載體圖譜。.....	16
圖 6.1 夜光蟲過濾與濃縮裝置示意圖.....	19
圖 6.2 螢光顯微鏡下夜光蟲對於 3 種餌料的進食狀況 .....	20
圖 6.3 夜光蟲對冷凍周氏扁藻的適口性.....	21
圖 6.4 以缺氮培養基培養的周氏扁藻 ( <i>Tetraselmis chui</i> ) 之生長曲線 ..	22
圖 6.5 將缺氮培養之周氏扁藻作為餌料餵食夜光蟲之攝食率 .....	23
圖 6.6 Basts (上) 和 Blastidinc (下) 殺死夜光蟲之能力 .....	25
圖 6.7 顯微鏡下經抗生素殺死之夜光蟲.....	26

## 參、摘要

**關鍵詞：渦鞭毛藻、夜光蟲、基因轉殖、特殊型綠色螢光蛋白**

夜光蟲是種美麗又神秘的生物，像是夜晚中隨著浪花翩翩起舞的藍色精靈，讓人不自覺想靠近。這樣美麗的生物是屬於渦鞭毛藻的一種，夜光蟲這類生物廣泛存在於全球海洋中，是常見的海洋浮游生物之一。從溫帶、亞熱帶至熱帶沿海地區都有發它的蹤跡。本篇所研究的夜光蟲種類為紅夜光蟲，紅夜光蟲身為異營生物，是以其他浮游生物為食。因為夜光蟲具有比較大的液泡，令牠擁有很強的漂浮性。知名的馬祖藍眼淚美景就是夜光蟲大量增生所造成的現象，夜光蟲不但是生態中重要的物種，也已經是生態旅遊產業的要角，因此我們也開始重視有關夜光蟲的研究。

從夜光蟲的適口性開始，到它的攝食率，一步步建立大量養殖夜光蟲的技術。有了充足的實驗數目和標準培養的方法，我們希望著手開創一個夜光蟲的基因轉殖技術。基因轉殖技術是現代生物學研究相當重要的工具，透過基因轉殖可以幫助我們更多的了解一個物種，可對於夜光蟲的研究帶來極大的幫助。2020年，在《Nature Method》期刊上發表了40多種海洋浮游生物的基因轉殖方法，其中表示在渦鞭毛藻的基因轉殖有所突破，但是在目前在夜光蟲的部分仍然沒有成功。優化基因轉殖中的各個條件，針對夜光蟲設計屬於他的機轉條件。並在將來，我們期待可以應用這項技術，讓我們在研究夜光蟲上有更多的方法，提供夜光蟲在未來的學術研究或生物技術應用中的優勢。例如，利用名為 roGFP 的特殊型綠色螢光蛋白對氧化還原敏感的特性，使夜光蟲帶有產生 roGFP 蛋白的基因，可以在不同汙染程度的刺激下改變夜光蟲的螢光。

為了挑戰這項技術，我們須先對夜光蟲的培養和生理進行一定的研究。因此本次計畫的主題為：(1)建立夜光蟲標準培養法，在實驗室中可以有系統性的培養夜光蟲；(2)建立夜光蟲的基因轉殖技術，以表現外源螢光蛋白 EGFP 為電轉殖條件做測試；(3)使夜光蟲基轉技術實際應用於生活之中：表現外源螢光蛋白 roGFP，利用 roGFP 對氧化還原敏感的特性，可以在不同汙染程度的刺激下改變夜光蟲的螢光。未來可以將此技術應用於海洋汙染檢測，同時也能更了解夜光蟲的生理反應與培養條件。

從夜光蟲培養條件篩選標記、基因轉殖載體工具開發，到電轉殖實驗條件，我們已經完成了夜光蟲的標準培養法並利用研究結果計算出夜光蟲的攝食率；基因轉殖的關鍵準備步驟，我們也找尋到合適的篩選用抗生素，取得渦鞭毛藻廣用型質體，並設計了具備抗 Basta 和 Blasticidin 的基因的轉殖載體和電轉前置作業的改良。

## 肆、前言

### 一、研究緣起

人類活動形成的有害廢物被釋放到空氣、水資源與土地中，造成地球環境很大的污染，其中海洋污染是目前世人尚未充分認識且控制不足的環境危害 (Philip et al., 2020)。目前人為嚴重的海洋污染包括：(1) 汞污染：因燃燒煤炭和開採金礦所產生；(2) 塑膠微粒污染：全球塑膠產量巨幅增長，目前每年約有 1000 萬噸塑膠廢物被旁放入海洋，這些塑膠廢物經風化、磨損後會被分解為較小顆的塑膠微粒(直徑小於 5 毫米)，因為尺寸微小，容易被海洋中的微生物吸收進入食物鏈當中，造成生物體的危害 (Philip et al., 2020)；(3) 其他人造化學污染，例如石化燃料(石油)、農藥、醫學藥品、工業和家庭廢水等。他們大多通過河流、逕流、大氣沉積或是直接排放進入海洋中，通常在海岸附近程度最為嚴重，而且還在持續惡化。

生物指標 (bio-indicators) 為水資源的管控提供了重要的價值，我們可以利用這些生物能夠承受的化學、物理和生物學有限的條件範圍來評估環境品質。其中，對環境變化能快速做出反應的浮游生物更是能作為特定指標物種廣泛應用於水質評估當中 (Uday Bhan et al., 2013)。夜光蟲作為形成馬祖藍眼淚的主要生物，本來就是當地海域的重要物種，因此是適合台灣附近海洋環境的指標生物。透過基因轉殖讓夜光蟲的研究更進一步，未來也能對於藍眼淚生態旅遊產業帶來價值。

夜光蟲 (*Noctiluca scintillans*) 是一種沒有甲殼的海洋浮游性渦鞭毛藻 (dinoflagellate)，它廣泛分布於世界各地，從溫帶、亞熱帶至熱帶沿海地區都有發它的蹤跡 (Harrison et al., 2011; S. Fonda et al., 2004)。全世界的夜光蟲又可以分為兩群，具有共生青綠藻 (*Pedinomonas noctilucae*) 的綠葉光蟲，與沒有共生藻的紅夜光蟲。在食物充足的情況下，兩者皆為異營生物，以其他浮游生物為食，尤以矽藻與其他鞭毛藻為其主要的食物 (Harrison et al., 2011)。夜光蟲具有比較大的液泡，令他擁有很強的漂浮性。夜光蟲也是重要的赤潮生物之一，因為浮力、潮汐、洋流、風向等原因會在海面上堆積，通常會在春季和夏季形成藻華 (Algal bloom)(S. Fonda et al., 2004)。

2020 年，在《Nature Method》期刊上發表了 40 多種海洋浮游生物的基因轉殖方法 (Faktorová et al., 2020)。其中也有提到用於渦鞭毛藻的轉殖載體。目前已經成功基因轉殖的渦鞭毛藻包括：(1) 用於毒理研究的卡氏前溝藻 (*Amphidinium carterae*)(Nimmo et al., 2019)；(2) 在食品產業上用來萃取 DHA 的原料生物-寇氏隱甲藻 (*Crypthecodinium cohnii*)(Diao et al., 2018)；(3) 因為具有劇毒而受到詳細研究的劇毒卡爾藻 (*Karlodinium veneficum*)(Faktorová et al., 2020)；(4) 以及具生態重要性的海洋尖尾藻 (*Oxyrrhis marina*)( Sprecher et al.,

2020)。

然而目前對於夜光蟲的了解還不夠完全，雖然國外最新研究已經在渦鞭毛藻的基因轉殖有所突破，但是在夜光蟲的部分仍然還沒有成功。因此，如何在實驗室中有系統的大量培養夜光蟲，並應用基因轉殖技術於夜光蟲身上，可以讓我們未來在研究夜光蟲有更多的方法。

## 二、研究背景

### 4.2.1 渦鞭毛藻 (dinoflagellate)

渦鞭毛藻是水生生態系常見的原生動物，可分為兩大類：一類為可行光合作用的自營生物，另一類為異營生物，其中也包含了會與珊瑚內共生的蟲黃藻 (zooxanthella)。它們是生態中極為重要的海洋初級生產者之一，在海生生物鏈當中扮演著重要的角色。渦鞭毛藻門目前約有 2000 個物種，其中 1700 多種為海洋物種，220 個為淡水物種 (Taylor et al., 2008)。渦鞭毛藻也是引起藻華 (algal blooms) 的常見藻類之一，它們引起的赤潮 (red tides) 往往會因其產生的毒素或是遭大量細胞阻塞造成缺氧，導致魚類或貝類的死亡。因此研究這類生物也是一個重要的生態議題。

### 4.2.2 渦鞭毛藻的特徵

從細胞學特徵上來說，相比於其他真核生物，渦鞭毛藻具有較大的細胞核，因此也被人稱做甲藻核 (dinokaryotes)。比較特別的是，在渦鞭毛藻的細胞核中缺少核小體 (nucleosomes)。真核細胞染色體常見的組蛋白 (histone) 由渦鞭毛藻病毒核蛋白 (dinoflagellate viral nuclear proteins) 取代。而其染色體在有絲分裂之後仍保持濃縮 (Brittany, 2019)。

渦鞭毛藻通常具有 2 條由腹側延伸出來的鞭毛，一條橫向繞於細胞，負責產生前進動力，也會產生漩渦；一條為易辨別的縱向鞭毛，向後擺動。渦鞭毛藻的外殼稱為表質膜 (amphiesma)，由扁平的囊泡 (alveolae) 組成。緊密貼合的纖維素板將囊泡包起便形成有甲殼的渦鞭毛藻 (Hoppenrath & Saldarriaga, 2012)。

### 4.2.3 夜光蟲 (*Noctiluca scintillans*)

夜光蟲屬於沒有甲殼的渦鞭毛藻，外型透明呈球狀，直徑 200–2000  $\mu\text{m}$ 。腹部尾端的下凹溝槽為口部，口部前有一小鞭毛，鞭毛前方有一大觸手。觸手上具有黏膜，用來抓取食物送入口部，食物進入體內後會形成食泡，食泡內會分泌消化酶將食物進行消化。夜光蟲藉由浮力生活於水體表層，隨水流漂流 (Yasuhiro, 2006)。從細菌到魚卵都能作為夜光蟲的餌料，但據目前研究

了解其比較偏愛吃矽藻和綠藻。

夜光蟲可依體內是否有共生藻區分為兩群，不具有共生藻的紅夜光蟲主要分布於熱帶、副熱帶與溫帶沿海水域；具有共生藻的綠夜光蟲主要分布於西太平洋與印度洋熱帶水域 (Harrison, 2011)。本計畫所使用的夜光蟲為海洋大學環態所蔣國平教授自馬祖採集之，屬於紅夜光蟲，以下內容所提及的夜光蟲也皆指紅夜光蟲。

#### 4.2.3 夜光蟲的生物冷光

夜光蟲能夠產生生物發光，通常會在夜間的海浪波峰上可以看到它產生的藍色小光點。夜光蟲的發光器位於表皮上，每隻約有  $10^4$  個發光源，每個發光源大約可持續發光 80 msec。發光源分為三部分組成，先由發光素接合蛋白 (luciferin binding proteins) 去抓住發光素 (luciferin)，發光素是一種可被氧化放出能量之物質，於是接下來需要一種氧化酵素，稱為發光素氧化酶 (luciferase)，發光素氧化酶會氧化發光素放出藍色生物光。在 1873 年由 Haeckel 提出將夜光藻歸入渦鞭毛藻前，它一直被歸類為水母。後來經過詳細研究，1920 年 Kofoid 創建夜光蟲目 (order Noctilucales) (Yasuhiro, 2006)。在 1990 年代，利用基因分析的方式證明了夜光蟲為渦鞭毛藻的一個早期分化族群 (Saunders et al., 1997)。

#### 4.2.4 roGFP (redox-sensitive GFP)

roGFP 是由 EGFP (enhanced green fluorescence protein) 的雙點突變 (S147C/Q204C) 衍生而來的特殊型綠色螢光蛋白，其放射波長為 510 nm (綠色螢光 emission)。當 roGFP 被氧化後，其蛋白構型會因為 2 個半胱氨酸殘基 (Cys residue) 形成雙硫鍵而改變，同時也會改變螢光蛋白的激發波長。當 roEGFP 在氧化環境中形成雙硫鍵時，會導致位在 405 nm 的激發峰 (excitation peaks) 增加；而當雙硫鍵因還原反應而斷開，則會增加 488 nm 處的激發峰 (Meyer et al., 2007)。透過比較在 405 nm 和 408 nm 激發出的螢光強度比例就可以推測出 roGFP 的氧化程度。目前常被應用於研究各類模式生物的活體氧化壓力上 (Meyer et al., 2007; Rhee et al., 2010)。

### 三、現況分析

基因轉殖技術是現代生物學研究相當重要的工具，可在夜光蟲的研究上仍然還沒有成功。所幸國外最新研究已經在渦鞭毛藻的基因轉殖有所突破，以這些研究為參考依據，可用在夜光蟲建立基因轉殖技術的基礎。夜光蟲的生理原因在目前的中還未被清楚的知道，在培養上仍有地方需要修正和系統化。夜光蟲因其細胞較大，在電轉的電擊管選擇和電轉細胞數目上都需要重新計算和測試。且夜光蟲是沒有細胞壁的渦鞭毛藻，在如何清洗細胞鹽類，又不能讓細胞死亡的地方也是一項研究要點。

### 四、研究重點與目標

- (1) 發現夜光蟲合適的營養提供者，建立夜光蟲的標準培養法，找到合適的餌料濃度，知曉夜光蟲的每日攝食量。以定時定量餵食適量的餌料，降低餵食過量所造成的水質不佳情形，提供足夠數量的夜光蟲來進行各式實驗。
- (2) 優化夜光蟲電轉殖實驗的事前準備工作，建立了良好的抗生素篩選系統，以及設計好預備轉殖入夜光蟲體內的質體。
- (3) 透過本研究室所建立之三角褐指藻的多重方波電轉殖方式進行改良，提高電轉殖效率。建立夜光蟲的基因轉殖技術，以表現外源螢光蛋白 EGFP 為電轉殖條件做為預實驗，確定電轉步驟及條件。
- (4) 使夜光蟲基轉技術實際應用於生活之中：表現外源螢光蛋白 roGFP，利用 roGFP 對氧化還原敏感的特性，可以在不同汙染程度的刺激下改變夜光蟲的螢光。

## 伍、研究內容

### 5.1 夜光蟲 (*Noctiluca scintillans*) 培養與計數

本實驗室使用之夜光蟲是由海大環境生態研究所蔣國平老師所提供，將夜光蟲培養於以 0.22 μm 過濾杯過濾之人工海水(本實驗室配置方法如附錄 1)。後續實驗皆以此藻種為實驗對象，且培養條件皆在 20°C、光照 115 μE m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>、24 小時全光照。

計數細胞方面，將培養瓶輕搖數次，使細胞均勻分布於水體中，以吸量管吸取 1 mL 至透明孔盤，以顯微鏡 (Olympus, SZ61) 觀察計數，並做三重複。

### 5.2 夜光蟲濃縮與過濾

夜光蟲無法使用離心進行濃縮，但在攝食率實驗和電轉的過程中皆須使用濃度較高的夜光蟲進行。因此在進行後續實驗前，須有先建立一個方法能將夜光蟲的濃縮但不會造成夜光蟲死亡，也就是須考慮到回收率的問題。本實驗設計的濃縮辦法及裝置請參考圖 7.1。

### 5.3 周氏扁藻 (*Tetraselmis chui*) 培養與計數

本實驗室使用之周氏扁藻為成功大學陳逸民老師所提供。在實驗中使用的周氏扁藻人工培養基為 Walne's 培養基，為依照先前文獻的配方所配置 (Peter R.W., 1970) (詳見附錄 2)。且培養條件皆在 20°C、光照 115 μE m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>、24 小時全光照。

計數細胞方面，先取 900 μL 藻類樣本，後以 100 μL 10X 盧戈氏碘液 (Lugol's solution) 試劑 (詳見附錄 3) 固定與染色。取 10 μL 置於浮游生物計數盤 (Sedgewick-Rafter counting chamber, Wildlife Supply Company, Yulee, FL, USA) 中靜至 5 分鐘。最後以顯微鏡 (Optiphot-2, Nikon, Tokyo, Japan) 在 100X 放大倍率下計數。計數盤中有著 5 X 5 共 25 格的小格子，計算所有格子中的矽藻總數量乘於 10<sup>4</sup> 即代表 1 mL 中所含有之藻細胞數目。每樣品至少需做三重複計數。

細胞計數公式為：

$$\text{細胞數} \times \text{稀釋倍率} \times 10^4 \times \text{總體積} = \text{總細胞數}$$

### 5.4 尋找適合夜光蟲攝食之餌料

#### 5.4.1 餌料選擇

實驗前，所有夜光蟲皆需先饑餓 72 小時，並於顯微鏡下確認體內皆無其他殘餘食物。夜光蟲攝食餌料範圍非常寬廣，但目前了解比較愛吃矽藻與

綠藻。實驗將嘗試分別以 3 種餌料藻類，包含三角褐指藻 (*Phaeodactylum tricorutum*, 矽藻)、周氏扁藻 (*Tetraselmis chui*, 綠藻) 和螺旋藻 (*Arthrospira platensis*, 藍綠藻) 來餵食夜光蟲。實驗時會使用 6 孔培養盤進行，每組皆有 10 隻夜光蟲，並於 3 ml 人工海水內投入過量的餌料。培養 6 小時後，以螢光顯微鏡觀察夜光蟲食泡，並比較夜光蟲攝食狀況 (圖2-1)。

#### 5.4.2 以 *Tetraselmis chui* 做冷凍餌料之食性測試

周氏扁藻會先在 Walne's 培養基，放置於 20°C、24 小時全光照的培養箱中培養 5 天。之後離心 4000 g 10 分鐘，去除上清液後放在 -20 度冰 2 天，確定所有藻皆冷凍。

實驗使用 6 孔培養盤進行，每孔一組以 3 ml 人工海水在起始時放置 60 隻夜光蟲。在使用活藻和冷凍藻的組別分別測試放置  $10^3$ 、 $10^4$ 、 $10^5$  cells/mL 的藻類，以及一組只放置夜光蟲但沒有餌料的對照組。實驗進行 3 天後，計數夜光蟲數目以計算生長狀況。並以顯微鏡觀察夜光蟲攝食狀況。

#### 5.5 周氏扁藻的缺氮培養

在進行實驗前，周氏扁藻細胞會預先以 Walne's 培養液進行 5 天的培養。經計數後取  $2 \times 10^5$  cells 以 4000 g 離心 10 分鐘。去除上清液後，加入 200 ml 無氮 Walne's 培養液將藻類懸浮後，再倒入 75T 細胞培養瓶。以  $10^5$  cells/ml 作為周氏扁藻實驗的初始濃度，培養於 20°C、光照  $115 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 、24 小時全光照之培養箱。觀察 4-6 天。每天計數期細胞數目變化。

#### 5.6 將缺氮培養之周氏扁藻作為餌料餵食夜光蟲

在進行實驗前，所有夜光蟲先經過 72 小時的禁食，並於顯微鏡下確認體內皆無其他殘餘食物。攝食率實驗條件為：在 T25 培養瓶中，以 50 ml 的人工海水接種 XX 隻夜光蟲 (濃度 50 cells/ml)，並分別加入  $3 \times 10^5$  與  $6 \times 10^4$  cells/ml 兩種濃度的周氏扁藻做測試。放入恆溫 20°C、全光照的培養箱進行實驗，每三小時取樣一次，進行周氏扁藻的細胞計數。取樣前須均勻搖盪培養瓶，然後吸量管取樣。高濃度組 ( $3 \times 10^5$  cells/ml) 每次取樣 100  $\mu\text{l}$ 。低濃度組 ( $6 \times 10^4$  cells  $\text{ml}^{-1}$ ) 每次取樣 1000  $\mu\text{l}$ ，放置於 1.5 ml 離心管，先以 13000 g 離心 5 分鐘後去除 900  $\mu\text{l}$  上清液。各組樣品 100  $\mu\text{l}$  加上 900  $\mu\text{l}$  lugol's 染劑染色與固定後，取 10  $\mu\text{l}$  至細胞計數盤，並以顯微鏡觀察計數。

#### 5.7 夜光蟲之抗生素篩選

##### 5.7.1 測試有效的電轉殖篩選標記

實驗中所用的抗生素均購買自 Sigma。參考文獻中被電轉過的渦鞭毛藻抗生素篩選資料，選其中 9 種效果較佳之抗生素：Ampicilin、Streptomycin

、Chloramphenicol、Zeocin、Kanamycin、Basta、Blasticidin、Rifampicin、Tetracycline (Sprecher, Zhang, et al. 2020)。實驗以 12 孔盤為容器，每組 50 cells/ml 夜光蟲，置於 3 ml 人工海水中。實驗開始前，所有夜光蟲皆饑餓 72 小時，並於顯微鏡下確認體內皆無其他殘餘食物。每種抗生素皆測試 6 種濃度: 0、1、5、20、100、500 ( $\mu\text{g/ml}$ )。先將所有抗生素分別配置成 10 mg/mL、30 mg/mL 各兩管儲備溶液至於 -20 度冰箱保存。將夜光蟲濃縮並取 50 cells 至 12 孔盤，依各條件加入不同濃度之抗生素，連續觀察 10 天。

### 5.7.2 測試有效的抗生素濃度

實驗中所用的抗生素草銨磷 (Glufosinate ammonium, Basta) 和滅瘟素 (Blasticidin) 均購買自 Sigma。先前實驗中，已經測試 9 種對渦鞭毛藻有效的抗生素對夜光蟲的效果如何 (Sprecher, Zhang, et al. 2020)，其中以草銨磷 (Glufosinate ammonium, Basta) 和滅瘟素 (Blasticidin) 效果較佳。後續實驗則更進一步測試夜光蟲對這兩種抗生素忍耐極限。

實驗容器為 24 孔盤，夜光蟲濃度為 50 cells/ml，總體積為 1 ml。實驗開始前，所有夜光蟲皆饑餓 72 小時，並於顯微鏡下確認體內皆無其他殘餘食物。Basta 和 Blasticidin 的測試條件分別為：

- (1) Basta : 0、20、50、100、250  $\mu\text{g/ml}$
- (2) Blasticidin : 0、50、100、250、500  $\mu\text{g/ml}$ 。

先將 Basta 和 Blasticidin 粉末分別配置成 10 mg/mL、30 mg/mL 各兩管儲備溶液至於 -20 度冰箱保存。將夜光蟲濃縮並取 50 cells / 500  $\mu\text{l}$  人工海水至 24 孔盤，另依各條件配置 2 倍抗生素濃度之 500  $\mu\text{l}$  人工海水於 1.5 mL 離心管。將離心管內人工海水加入先前的 24 孔盤，桌面水平搖晃混勻。放置於恆溫 20°C、全光照的培養箱，每日以顯微鏡計數細胞數變化，持續進行 4-5 天。

此實驗做三重複進行。

## 5.8 夜光蟲基因轉殖載體的構築

DinoIII-pat-EGFP 和 DinoIII-bsr-EGFP 轉殖載體皆由 DinoIII-pat (附錄 5) 和 Dino-bsr (附錄 6) 載體進行改造。DinoIII (附錄 4) 質體為一種專為渦鞭毛藻設計的基因轉殖質體 以 pMD-19TM T-Vector 作為載體骨架，優化了渦鞭毛藻的表現系統 (Sprecher et al., 2020)。DinoIII-pat 和 Dino-bsr 質體皆購買於 addgene。

DinoIII-pat-EGFP 載體改造自 DinoIII-pat 載體，並可以分為 2 個部分。第一部分包含 DinoIII-pat-EGFP 基因卡匣 (cassette)，包含 Basta 抗性基因 (pat gene)。第二部分為 DinoIII 的載體骨架 pMD-19TM T-Vector，包含盤尼西林抗性基因 (ampicillin resistance gene, Amp) 與複製起始點 (the origin of replication, ori)。DinoIII-pat-EGFP 載體總長度為 6413 bp。

DinoIII-bsr-EGFP 載體改造自 DinoIII-bsr 載體，可分為 2 個部分。其一為 DinoIII-bsr-EGFP 基因卡匣 (cassette)，包含 Blasticidin 抗性基因 (bsr gene)。其二為 DinoIII 的載體骨架 pMD-19TM T-Vector，包含盤尼西林抗性基因 (ampicillin resistance gene, Amp) 與複製起始點 (the origin of replication, ori)。DinoIII-bsr-EGFP 載體總長度為 6290 bp。

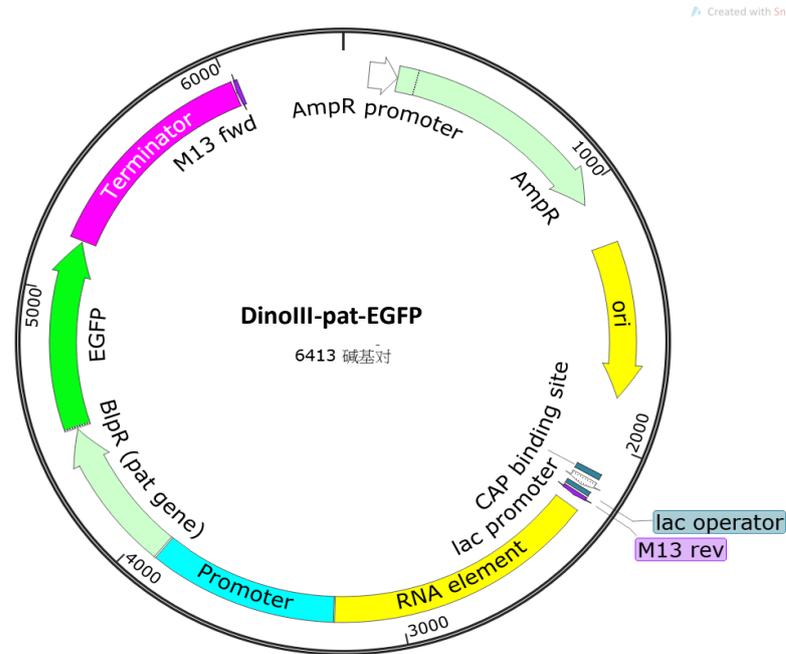


圖5.1 DinoIII-pat-EGFP 載體圖譜。

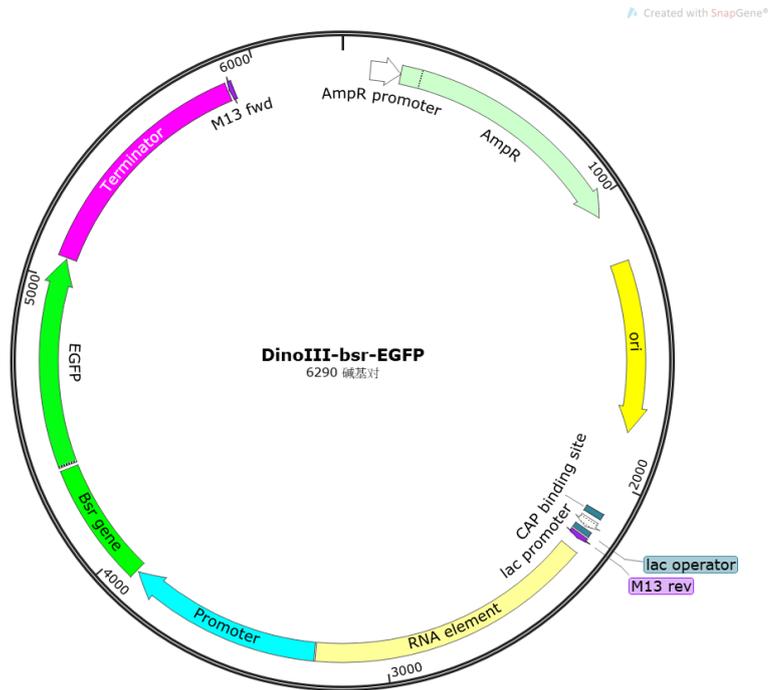


圖5.2 DinoIII-pat-EGFP 載體圖譜。

### 5.9 夜光蟲電轉殖條件設計

這部分實驗我們參考過去文獻，諸如 *Amphidinium carterae*、*Cryptocodinium cohnii*、*Karlodinium veneficum*、*Oxyrrhis marina* 的基因轉殖條件 (如表 6.1)。下表分為物物種名稱、物種尺寸、電轉時使用的藻類濃度、電擊管 (cuvette) 大小、使用機型和模式和電轉的 DNA 數量。

我們初步將採用物種尺寸相近的 *Cryptocodinium cohnii* 條件以及三角褐指藻的多重方波電轉殖方法，並視轉殖率結果做滾動式調整。夜光蟲的大小約 1000  $\mu\text{m}$ ，約是表格中藻類的 50-100 倍，在夜光蟲電轉濃度的抉擇會考量到細胞大小去做改動，cuvette 也選擇直徑較寬的 4mm。

表 5.1 夜光蟲電轉殖條件測試

Species	Size	Density	Cuvette size	Maschine/mode	DNA	References
<i>Amphidinium carterae</i> 強壯前溝藻	Length 7 - 10 $\mu\text{m}$ , width 12 - 17 $\mu\text{m}$	$1.3 \times 10^7$ cells	-	Lonza Nucleofector X-100, D-023, L-029 and EH 100	$1 \times 10^6$ cells	12
<i>Cryptocodinium cohnii</i> 植物油對隱甲藻	10 - 50 $\mu\text{m}$	10 mL in exponential phase  0.25 g	2 mm	Gene Pulser Xcell ; Bio-Rad  2000 V field strength and 50 $\mu\text{F}$ capacitance	200 $\mu\text{l}$ algal + 1-2 $\mu\text{l}$ DNA + 1 $\mu\text{l}$ sperm DNA	11
<i>Karlodinium veneficum</i> 桑溝灣赤潮藻	9-18 $\mu\text{m}$	$4 \times 10^5$ cells	-	BioRad's MicroPulse DIC DIC -2 shocks SHS SC2	20 $\mu\text{l}$ algal + 2 $\mu\text{g}$ DNA	13
<i>Oxyrrhis marina</i> 海洋尖尾藻	20 - 30 $\mu\text{m}$	$2.5 \times 10^5$	-	Lonza's 4D-Nucleofector™ X Unit System DS-137(strongest performance) DS-134(strongest performance) ED-150 DS-138 DS-130 DS-150 DS-120(strongest performance)	-	12
<i>Phaeodactylum tricorutum</i> 三角褐指藻	8x 3um	$2 \times 10^8$ cells	2 mm	Cyto Pulse Sciences, Inc. 300 V 、 5 ms	40 ug salmon sperm DNA, 5 ug 線性化質體	

### 5.9.1 夜光蟲電轉步驟

將夜光蟲培養在人工海水至足夠數量，再將夜光蟲過濾，以新鮮人工海水清洗。隨後以山梨糖醇 (sorbitol, Merk) 輕柔地清洗細胞兩次，再以 1 mL sorbitol 回溶藻體，並取 2000 cells 備用。鮭魚精子 DNA (salmon sperm DNA, Sigma Aldrich) 先 95°C 加熱 5 分鐘後冰鎮預處理，隨後將 5 ug 線性化質體、鮭魚精子 DNA、藻體輕柔混合後冰浴 20 分鐘，最後將樣品轉移到電穿孔管 (electroporation cuvette, 0.4 cm cap) 進行電轉殖。電轉殖使用 Model p-4000 advanced Pulse Agile 電轉殖系統 (Cyto Pulse Sciences, Inc.) 產生多重序列方波脈衝。參考先前文獻，測試 *Cryptocodinium cohni* 和 *Phaeodactylum tricorutum* 電轉條件再做修正。電轉殖結束後，立即將夜光蟲轉移到預冷的 20 mL 人工海水中培養 24-48 小時。後續將 1000 cells 以塗抹棒尖端塗散至含有抗生素的人工海水培養基，並全光照培養約 2-3 週後以螢光顯微鏡 (Optiphot-2, Nikon, Tokyo, Japan) 確認經抗生素篩選後轉殖株是否帶有轉殖載體與成功表現目標蛋白。

## 陸、結果與討論

欲建立一個全新的夜光蟲基因轉殖系統，有幾點重要的條件。第一，我們需要在短時間獲得大量的細胞數才能進行後續電轉實驗；第二，需要有個不會傷害到細胞的濃縮方法；第三，能夠進行抗生素篩選的正確用藥和濃度；第四，構築適合的基因轉殖載體；第五，有了前面的數據，便可以進行基因轉殖條件的測試。

### 6.1 夜光蟲濃縮條件測試

實驗操作流程如圖 7.1 所示。夜光蟲的起始濃度為 40 cells/ml，在 35 ml 的人工海水內有 1400 隻夜光蟲。經濾網過濾，去除人工海水培養基，將夜光蟲濃縮於網上。然後再使用新的人工海水培養基清洗，重複 3 次後。將夜光蟲連同新的培養液吸取到培養瓶中進行培養。經過實際操作的結果，原本總數 1400 隻的夜光蟲，最後可回收約 1225 隻，回收率為 87.5%，夜光蟲的耗損仍在可控制的範圍。證實此方法可用於更換夜光蟲培養基，或是濃縮夜光蟲，達到高細胞密度的實驗需求。

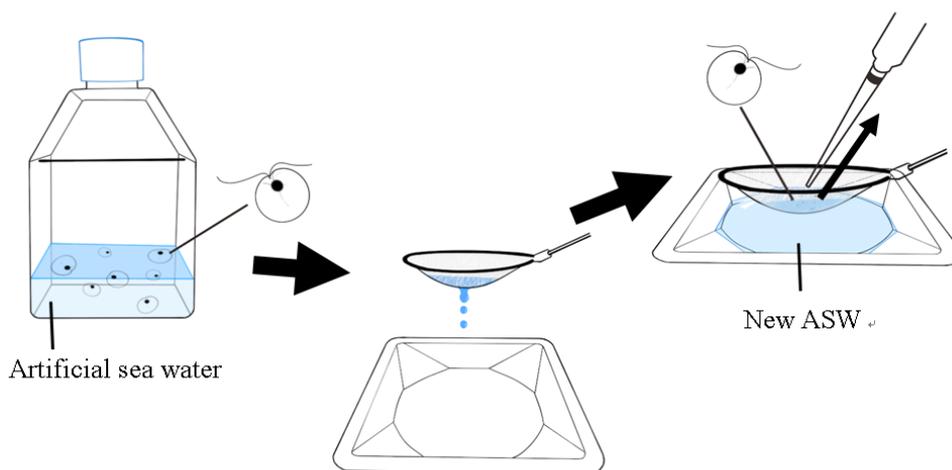


圖 6.1 夜光蟲過濾與濃縮裝置示意圖

## 6.2 夜光蟲餌料偏好測試

### 6.2.1 餌料選擇

由於藻類的葉綠體具有螢光的特性。因此我可以透過螢光顯微鏡觀察夜光蟲在不同餌料培養下，體內食泡螢光來判斷夜光蟲的進食狀況。實驗進行至第 6 小時，將夜光蟲置於中間有凹槽的玻片，於螢光顯微鏡下觀察並拍照。

結果顯示，餵食周氏扁藻和螺旋藻的夜光蟲體內食泡較大，螢光訊號也較強。而餵食三角褐指藻的夜光蟲的食泡則較不明顯 (圖 7.2)。進一步統計體內具有食泡的夜光蟲數目，則發現餵食周氏扁藻的組別還是高於餵食螺旋藻的組別，周氏扁藻組共有 7 隻夜光蟲體內具食泡，而螺旋藻組則為 4 隻。因此周氏扁藻應該是夜光蟲較偏好的餌料。

至於為何夜光蟲較為偏好周氏扁藻？從我們的觀察發現，夜光蟲比較容易捕捉漂浮於水面的藻類，而三角褐指藻和螺旋藻皆是容易沉降的藻類。可能這就是周氏扁藻成為夜光蟲較喜歡的餌料的原因。

比例尺為 50.0  $\mu\text{m}$ 。

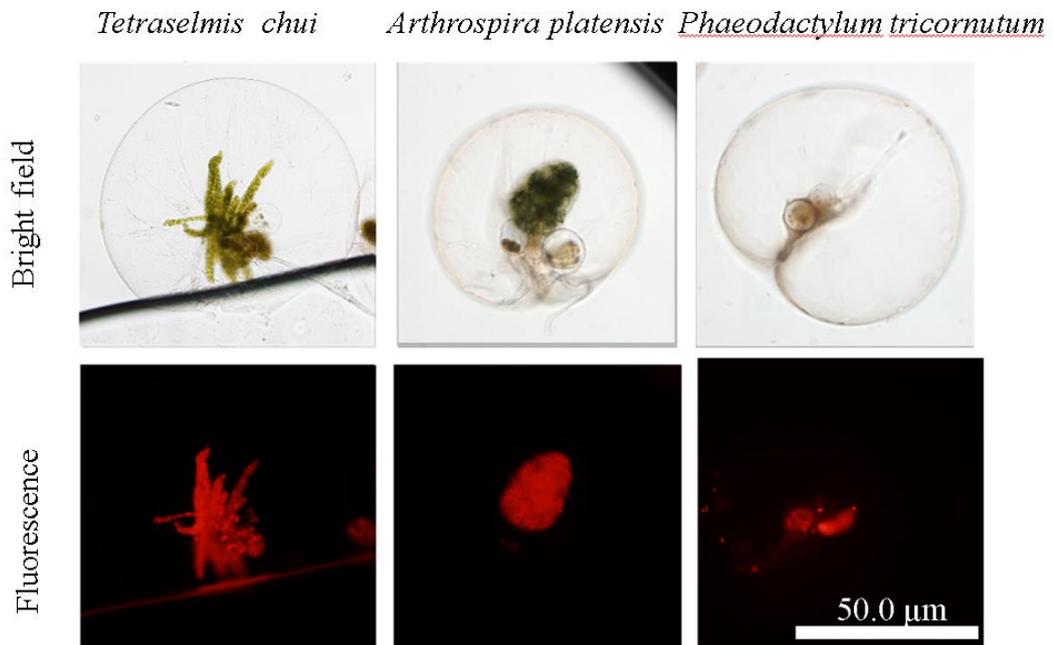


圖 6.2 螢光顯微鏡下夜光蟲對於 3 種餌料的進食狀況

## 6.2.2 冷凍餌料食性測試

過去實驗室在進行海水纖毛蟲培養實驗時，有發展出使用冷凍細菌作為餌料的技術 (Hung-Yun Lin et al., 2020)。若夜光蟲也能接受冷凍處理的餌料，那麼就能事先大量培養餌料藻類，然後分裝保存，再依照需要解凍使用。如此將可以大幅減少培養工作的繁複性。

在各組的實驗一開始都含有 60 隻夜光蟲，經過三天的培養後。餵食新鮮周氏扁藻的組別，夜光蟲數目都有增加。尤其是周氏扁藻在  $3 \times 10^5$  最高濃度的組別，夜光蟲成長到 190 隻。而餵食  $3 \times 10^4$  的組別，夜光蟲也成長到 170 隻。顯示以  $3 \times 10^4$  到  $3 \times 10^5$  之間的周氏扁藻應該已經提供夜光蟲足夠的餌食。

但是在餵食冷凍周氏扁藻的所有組別，夜光蟲的數目都沒有增加。以螢光顯微鏡觀察也沒有看到夜光蟲體內有螢光食泡的產生。而冷凍的周氏扁藻也都沉澱在培養盤底部。

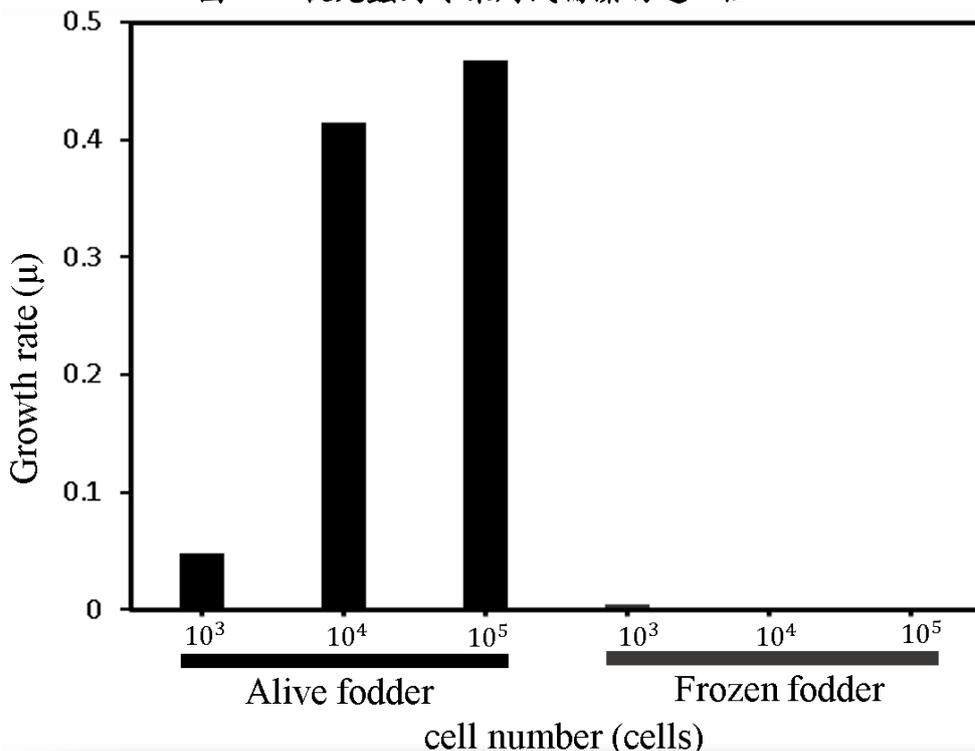
從這部份實驗結果來看，冷凍後的周氏扁藻因為已經死亡所以會沉降，失去了原本容易被夜光蟲捕食的優勢。因此冷凍餌料的概念無法實際應用，後續實驗仍必須以活藻做餌料來建立標準培養法。

夜光蟲之成長率公式如下：

$$\mu = \sqrt[n]{\frac{C_F}{C_0}} - 1$$

$\mu$ : 成長率； $C_0$ : 初始夜光蟲隻數； $C_F$ : 最終夜光蟲隻數； $n$ : 實驗歷時天數

圖 6.3 夜光蟲對冷凍周氏扁藻的適口性



### 6.3 缺氮培養下的周氏扁藻 (*Tetraselmis chui*)

於先前實驗中，已經測試過夜光蟲對三角褐指藻 (*Phaeodactylum tricorutum*)、周氏扁藻 (*Tetraselmis chui*) 以及螺旋藻 (*Arthrospira platensis*) 之適口性研究。根據其結果，最後選擇適口性較佳之周氏扁藻作為夜光蟲的餌料建立標準培養法。而且我們也已經知道周氏扁藻必須是以活藻的狀況才能最為餌料。不過活的藻類在培養時自己也會分裂生長，這會在我們計算攝食率時造成干擾。最理想的狀況是我們在實驗一開始時放入的藻類，隨著時間減少，而計算減少的速度就可以算出夜光蟲的攝食速度。也就可以找出最佳的培養條件。

那麼，我們應該如何讓周氏扁藻保持活體狀況，但又同時不會自己分裂呢？在此我的想法是建立方法，讓周氏扁藻在缺乏氮鹽條件培養，如此一來細胞就不會自然增長。而且許多文獻也指出，在缺氮的培養基中的的藻類，其細胞油脂較多 (Mohammad et al., 2019)。那麼也有增加被夜光蟲捕食的好處。

因此，此部分的實驗想知道，將周氏扁藻從正常Walne's 培養基轉換到缺氮的 Walne's 培養基需要經過多久才能耗盡營養鹽而停止增長。實驗結果顯示，在無氮Walne's 培養基生長的周氏扁藻與在全養Walne's 培養基生長的周氏扁藻做比較，確實生長率會較低。在缺少氮的 Walne's 培養基中，周氏扁藻的數量在第三天達到生長極限，到達  $2.5 \times 10^5$  cells/ml，就不再增加。因此可以確定在後續實驗，會等到周氏扁藻轉換到無氮Walne's 培養基三天之後，才能來作為攝食率實驗的餌料。

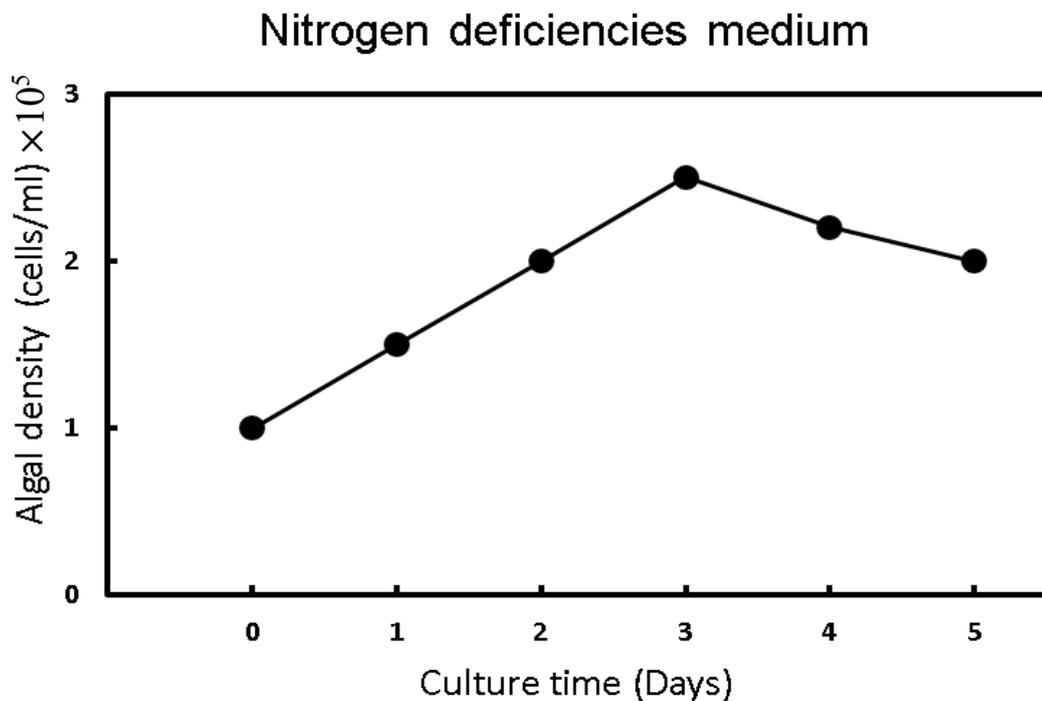


圖 6.4 以缺氮培養基培養的周氏扁藻 (*Tetraselmis chui*) 之生長曲線

#### 6.4 夜光蟲對周氏扁藻之攝食率

在進行此部分實驗前，會先讓夜光蟲禁食72小時，以確保夜光蟲細胞內無殘留餌料。之後再將缺氮培養三天的周氏扁藻加入一起培養。本實驗中設計了兩種周氏扁藻的濃度分別為  $3 \times 10^5$  以及  $6 \times 10^4$  cells/ml，然後每三小時取樣分析。不論是在哪個濃度之下，前三小時的藻類下降速度都是最快的，但是在高濃度的組別從第三到第十二小時藻類數目都沒有太明顯的改變。可能的解釋包含了：(1) 藻類密度已經過低導致夜光蟲捕捉效率下降 (2) 夜光蟲需要更長的時間將食泡完全消化。

由於在低濃度組別，藻類數量也有明顯下降，因此推測至少在實驗設計的藻類密度下，夜光蟲仍可有效捕食。而依照實驗的結果可以推算出：在 12 小時內，1000 隻夜光蟲可以捕食  $1.1 \times 10^6$  隻周氏扁藻。平均每隻夜光蟲在 12 小時內約攝食 1000 隻周氏扁藻，而這可能就是培養夜光蟲時，每日最適的餌料餵食數量。

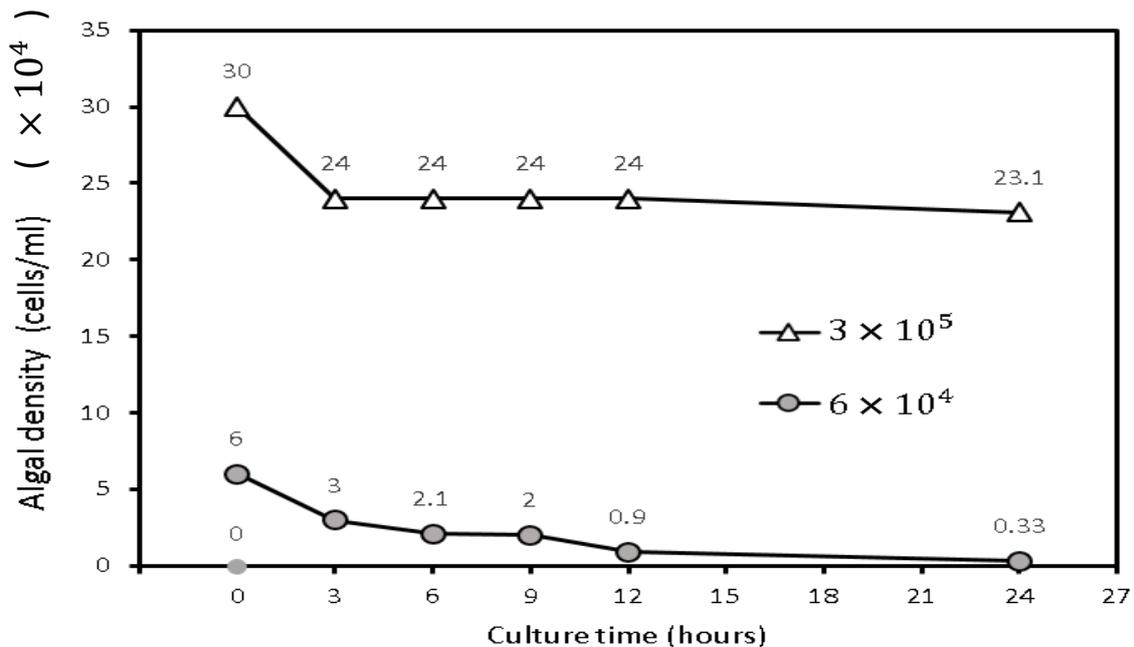


圖 6.5 將缺氮培養之周氏扁藻作為餌料餵食夜光蟲之攝食率

## 6.5 夜光蟲之抗生素篩選

### 6.5.1 有效的電轉殖篩選標記

從過去文獻整理，曾經提出 9 種對渦鞭毛藻效果較佳的抗生素。我們一一針對這些抗生素進行測試，看看哪些抗生素可以應用來作為未來基因改造後的篩選藥物。結果我們發現 Chloramphenicol、Basta、Blasticidin 和 Tetracycline 對夜光蟲有效。其中又以 Basta 和 Blasticidin 能在較低濃度之下就產生作用。因此下一步，我們就鎖定 Basta 和 Blasticidin 這兩隻抗生素作更精確的測試。

表 6.1 有效的電轉殖篩選標記

抗生素	有效殺死夜光蟲的濃度 Conc.( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )
<u>Ampicilin</u>	-
Streptomycin	-
Chloramphenicol	500
<u>Zeocin</u>	-
Kanamycin	-
<u>Basta</u>	100、500
<u>Blasticidin</u>	100、500
Rifampicin	-
Tetracycline	500

### 6.5.2 Basts 和 Blasticidine 殺死夜光蟲之能力

在基因轉殖實驗中，除了選擇敏感度高的抗生素之外，我們也需要知道最適合的反應濃度。尤其是在電轉殖後還處於虛弱狀態的細胞需要有緩衝時間，因此此時抗生素的濃度不可以太強。

測試不同濃度的 Basta 需要幾天才能讓夜光蟲完全死亡。結果顯示在 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的濃度下，三天即可讓夜光蟲全數死亡。但是在 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  時則需四天。至於使用 Blasticidin 時，則是在高於 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的濃度，夜光蟲

皆會在三天內全數死亡。因此據實驗觀察後，未來在篩選基因轉殖夜光蟲時，Basta 合適的使用濃度應為 100  $\mu\text{g/ml}$ ；而 Blasticidin 則以濃度 50  $\mu\text{g/ml}$  最為適合。

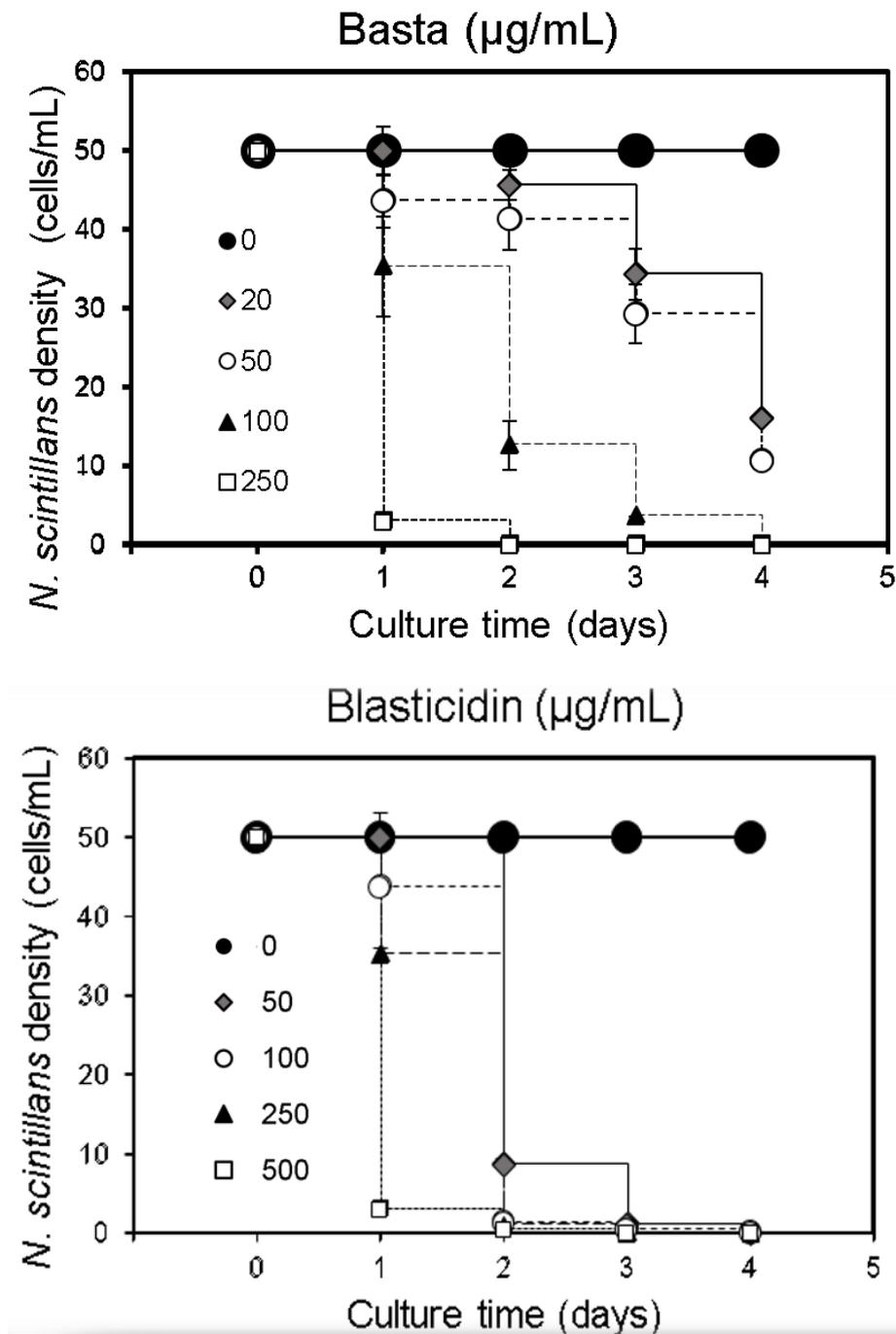


圖 6.6 Basts (上) 和 Blasticidin (下) 殺死夜光蟲之能力



圖 6.7 顯微鏡下經抗生素殺死之夜光蟲

## 柒、結論

在本次計畫中，為了達成建立夜光蟲的基因轉殖技術這個無人做過的目標。從優化夜光蟲培養條件、找尋篩選標記與抗生素、基因轉殖載體工具開發，到電轉殖實驗條件的測試，每一步都是從零開始，而且必須穩紮穩打累積數據，最後才能達到目標。

在一開始，我們從建立夜光蟲的標準培養法 (Batch feeding) 開始。夜光蟲攝食餌料範圍非常寬廣，早期的研究認為各種浮游植物都能成為其餌料。但是經過了本研究比較了夜光蟲對三角褐指藻 (矽藻)、周氏扁藻 (綠藻) 和螺旋藻 (藍綠藻) 這三種餌料的適口性實驗。我們確認了三組餌料對夜光蟲的攝食率和成長率比較皆為周氏扁藻 > 螺旋藻 > 三角褐指藻。因此後續實驗決定以周氏扁藻作為餌料進行研究。

我們也嘗試建立以冷凍藻作為餌料餵夜光蟲的培養方法，經過冷凍處理，能夠做到分批製備和儲存餌料，達到簡化培養流程的目的 (Hung-Yun Lin et al., 2020)。但實際結果顯示冷凍後的藻會沉降，與夜光蟲漂浮於水體表面的習性相反，導致夜光蟲無法攝食。因此確立未來仍會以活藻進行標準培養法的建立。

另一個本研究的貢獻，是在於確認夜光蟲對於周氏扁藻的攝食率與最佳培養條件的建立夜光蟲標準培養法中。這其中我們找出了濃縮夜光蟲的最佳條件，也建立了在缺氮培養下停止分裂的周氏扁藻培養條件。利用這些結果設計攝食率測試實驗，計算出一隻夜光蟲一天內約可攝食 1000 周氏扁藻。意味著維持夜光蟲數目與周氏扁藻餌料 1:1000 的條件可能就是培養夜光蟲的最適條件。

最後，我們也完成了在夜光蟲基因轉殖實驗前的最後幾個關鍵準備步驟。包括我們已經找到了合適的篩選用抗生素，也找出 100  $\mu\text{g/ml}$  的 Basta 或 50  $\mu\text{g/ml}$  的 Blaasticidin 會是最適合的劑量。我們也是實際取得渦鞭毛藻廣用型質體 -DinoIII-pat 和 DinoIII-BSR (Faktorová et al., 2020)，並著手改造具備抗 Basta 和 Blaasticidin 的基因的轉殖載體和電轉前置作業的改良。

我們相信本計畫完成的工作，對於未來夜光蟲基因轉殖已經打下重要的基礎，未來我仍會持續投入這個領域的工作，希望能成為世界上第一個完成夜光蟲基因轉殖的人。

## 捌、 參考資料

1. Taylor, F. J. R., M. Hoppenrath, and J. F. Saldarriaga.(2008) Dinoflagellate diversity and distribution. *Biodiv. Cons.* 17:407-418.
2. Brittany N. Sprecher, Huan Zhang, Senjie Lin (2019) Nuclear gene transformation in a dinoflagellate : *Microorganisms* ,10.3390/8010126
3. Sprecher, B. N.; Zhang, H.; Lin S.-J. (2020) Nuclear Gene Transformation in the Dinoflagellate *Oxyrrhis marina*. *Microorganisms*, 8, 126
4. Drahomíra Faktorová, R. Ellen R. Nisbet, José A. Fernández Robledo et al. (2020) Genetic tool development in marine protists: emerging model organisms for experimental cell biology, *Nature Methods*, 17, 481–494
5. Philip J. Landrigan, John J. Stegeman, Lora E. Fleming, Denis Allemand, et al.(2020) Human Health and Ocean Pollution, 10.5334/aogh.2831
6. (2019)Global Mercury Assessment 2018. United Nations Environmental Programme
7. Harrison, P. J.; Furuya, K ; Glibert, PM; Xu, J ; Liu, HB; Yin, K; Lee, JHW; Anderson, DM; Gowen, R; Al-Azri, AR ; Ho, AYT (2011) Geographical distribution of red and green *Noctiluca scintillans*, 10.1007/s00343-011-0510-z
8. S. Fonda Umani, A. Beran, S. Parlato, D. Virgilio, T. Zollet, A. De Olazabal, et al (2004) *Noctiluca scintillans* MACARTNEY in the Northern Adriatic Sea: long-term dynamics, relationships with temperature and eutrophication, and role in the food web
9. Yasuhiro Fukuda, Hiroshi Endoh (2006) New details from the complete life cycle of the red-tide dinoflagellate *Noctiluca scintillans* (Ehrenberg) McCartney, 10.1016/j.ejop.
10. Uday Bhan Singh<sup>1</sup> , A.S. Ahluwalia<sup>1</sup> , C. Sharma<sup>2</sup> , R. Jindal<sup>2</sup> and R.K. Thakur,( 2013 )Planktonic indicators: A promising tool for monitoring water quality (early-warning signals)
11. Diao, J.; Song, X.; Zhang, X.; Chen, L.; Zhang, W. (2018) Genetic engineering of *Cryptocodium cohnii* to increase growth and lipid accumulation. *Front. Microbiol.*, 9, 492.
12. Nimmo, I.; McEwan, M.L.; Fast, N.M.; Taylor, F.J.R.; Keeling, P.J. (2019) Genetic transformation of the dinoflagellate chloroplast. *eLife*, 8, e45292.
13. Faktorová, D., Nisbet, R. E. R., Robledo, J. A. F., Casacuberta, E., Sudek, L.,

- Allen, A. E., Ares Jr., M., Aresté, C., Balestreri, C., Barbrook, A. C. et al., (2020) Genetic tool development in marine protists: Emerging model organisms for experimental cell biology. *Nat. Methods* 17, 481–494.
14. Thomas KiOrbo e and Josefi n Titelma n ,(2016)Feeding , prey selectio n an d prey encounte r mechanism s i n th e heterotrophi c dinoflagellat e *Noctiluca scintillans*,DOI:10.3354/meps11702
  15. Ma´ximo Frango´pulos 1,2 , Evangelos Spyrakos 2 , Ca´ stor Guisande,(2011)Ingestion and clearance rates of the red *Noctiluca scintillans* fed on the toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum* (Halim) doi :10.1016/j.hal.2010.11.002
  16. Mohammad J. Z., Omidvar F., Fatemeh P. H., Javad K., Eleni K., Michael K., Ehsan D., Effect of nitrogen concentration on the growth rate and biochemical composition of the microalga, *Isochrysis galbana*, *The Egyptian Journal of Aquatic Research* (2019) ,Doi:10.1016, 153-158
  17. Hung-Yun Lin, Wei-Yu Yeh, Sheng-Fang Tsai, Kuo-Ping Chiang, John Han-You Lin, Che-Chia Tsao and Han-Jia Lin, Biological Protective Effects Against *Vibrio* Infections in Grouper Larvae Using the Strombidium sp. NTOU1, a Marine Ciliate Amenable for Scaled-Up Culture and With an Excellent Bacteriovorous Ability, *Frontiers in Marine Science* (2020), Doi: 10.3389
  18. Peter Richard Walne, Studies on the food value of nineteen genera of algae to juvenile bivalves of the genera *Ostrea*, *Crassostrea*, *Mercenaria* and *Mytilus* (H.M.S.O, 1970), 1-26

## 玖、 附錄

### 附錄1. 人工海水配方

總配製流程如下步驟

(一) 配製人工海水、主要營養鹽、微量金屬、維他命溶液。

人工海水	
化合物	公克 (g)
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.125
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	14.7
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	40.61
MgSO <sub>4</sub>	24.08
KBr	2.025
KCl	7.46
NaHCO <sub>3</sub>	1.68
NaCl	233.76
補二次水至 10 公升 (L)	

主要營養鹽			
分類	化合物	公克 (g)	補水
硝酸鹽	NaNO <sub>3</sub>	3.0 g	各別補二次水 至 40 mL
磷酸鹽	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0.2 g	
矽酸鹽	Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.9 g	

微量金屬		
化合物	公克 (g)	補水
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.315	全部加完 補二次水至 100 mL
Na <sub>2</sub> ·EDTA	0.436	
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.000025	
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.000199	
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.000199	
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.001781	
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.00023	
H <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	0.0000129	
NiSO <sub>4</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.0000263	
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	0.0000184	
Kr <sub>2</sub> CrO <sub>4</sub>	0.0000194	

維他命溶液		
化合物	毫克 (mg)	補水
Biotin	0.1	全部加完 補二次水至 100 mL
Thiamin	20	
Vit B <sub>12</sub>	0.1	

(二) 將人工海水、維他命溶液以 0.22 μm 過濾杯過濾；主要營養鹽、微量金屬以滅菌釜滅菌。

(三) 依比例將人工海水、主要營養鹽、微量金屬、維他命溶液混合後即為 L1。

L1 人工海水	
溶液	毫升 (mL)
人工海水	1000
主要營養鹽(硝酸鹽)	1
主要營養鹽(磷酸鹽)	1
主要營養鹽(矽酸鹽)	1
微量金屬	1
維他命溶液	0.5

## 附錄2. Walne's 配方

總配製流程如下步驟

(一) 配製人工海水、主要營養鹽、微量金屬、維他命溶液。

Stock	per 100ml
(1) Trace metal solution	
ZnCl <sub>2</sub>	2.1 g
CoCl <sub>2</sub> • 6H <sub>2</sub> O	2.0 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> MO <sub>7</sub> O <sub>24</sub> • 4H <sub>2</sub> O	0.9 g
CuSO <sub>4</sub> • 5H <sub>2</sub> O	2.0g
(2) Vitamine solution	
Vitamine B <sub>12</sub> (Cyanocobalamine)	10.0 mg
Vitamine B <sub>1</sub> (Thiamine. • HCL)	10.0 mg
Vitamine H (Biotin)	200 µg
(3) Nutrient solution	
	per litre
FeCl <sub>3</sub> • 6H <sub>2</sub> O	1.3 g
MnCl <sub>2</sub> • 4H <sub>2</sub> O	0.36 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	33.6 g
EDTA (Disodium salt)	45.0 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> • 2H <sub>2</sub> O	20.0 g
NaNO <sub>3</sub>	100.0 g
TMS (1 above)	1.0 ml
Distilled water	1 Liter

(二) 將人工海水、維他命溶液以 0.22 µm 過濾杯過濾；主要營養鹽、微量金屬以滅菌釜滅菌。

(三) 依比例將人工海水、主要營養鹽、微量金屬、維他命溶液混合後即為 Walne's。

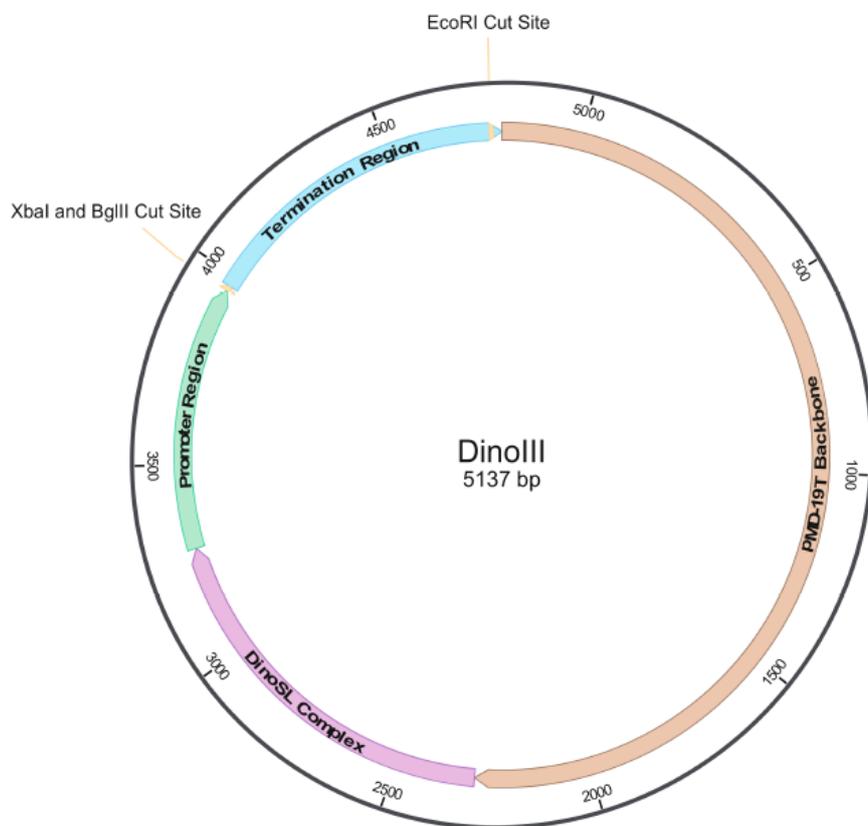
Medium	per liter
Nutrient solution	1.0 ml
Vitamine solution	0.1 ml
Sea water	1.0 liter

附錄3. 盧戈氏碘液 (Lugol's solution) 的配方

藥品	重量或體積
Acetic acid	20 mL
Potassium iodide	20 g
Iodine	10 g
H <sub>2</sub> O	to 200 mL

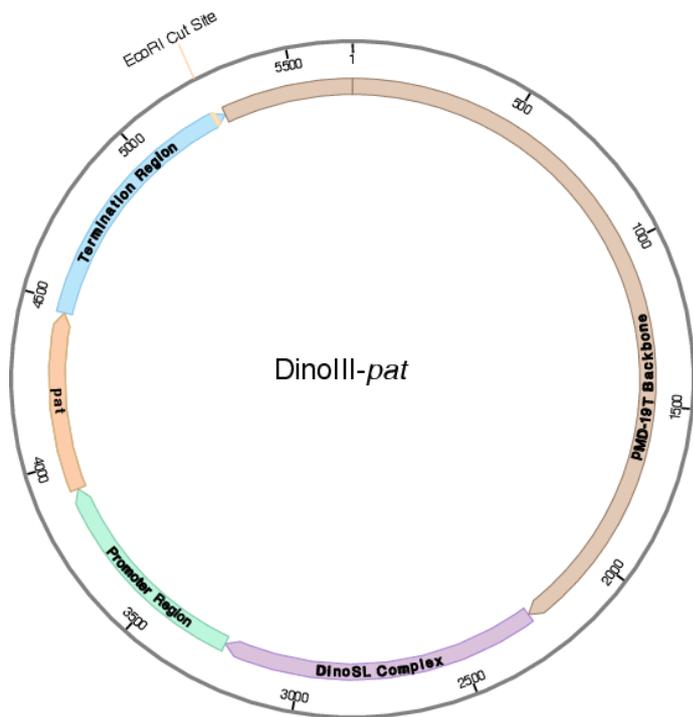
備註: 需至抽風櫃中配置

#### 附錄4. 渦鞭毛藻專用質體 **DinoIII** 圖譜



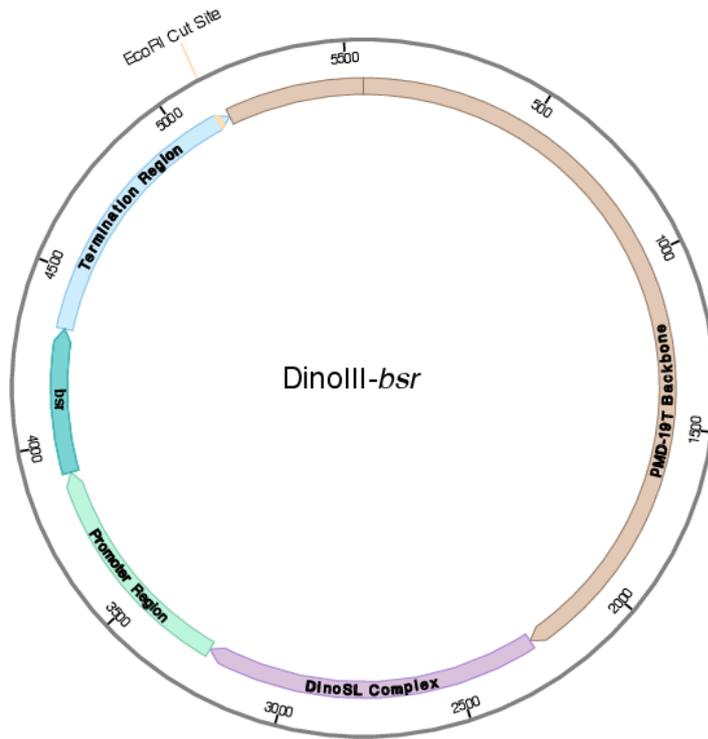
(Sprecher et al., 2020)

### 附錄5. DinoIII-pat 載體圖譜



(Sprecher et al., 2020)

## 附錄6. DinoIII-bsr 載體圖譜



(Sprecher et al., 2020)

附錄6. PCR所使用之專一因子

	Name	mer	Seq	Tm	GC%	PCR product
bsr-EGFP	Promotor_Fw	21	caaatgggcacaggcagggtac	61	57	560 bp
	pro-Bsr_Rv	37	agatcatcaatttcgggtatatttgagtggaatgagt	62	35	
	Bsr-XhoI-EGFP_Fw	45	ataccgaaattgatgatctctcgagATGGTGAGCAAGGGCGAGG	60	51	772 bp
	EGFP-MluI-Ter_Rv	50	tttctgtgactcctggccgacgcgtTACTTGTACAGCTCGTCCATGCC	60	54	
	Ter_Fw	21	cggccaggagtcacagaaaac	60	57	835 bp
	Ter_Rv	24	ttgtaaacgacggccagtgaatt	60	42	
pat-EGFP	pro-pat_Fw	30	atgattgatgatgattgattcctgaaggc	60	37	1021 bp
	pro-pat_Rv	21	tcagatttcggtgacgggcag	60	57	
	pat-XhoI-EGFP_Fw	45	tgcccgtcaccgaaatctgactcgagATGGTGAGCAAGGGCGAGG	62	60	772 bp
	EGFP-MluI-Ter_Rv	50	tttctgtgactcctggccgacgcgtTACTTGTACAGCTCGTCCATGCC	60	52	
	Ter_Fw	21	cggccaggagtcacagaaaac	60	57	835 bp
	Ter_Rv	24	ttgtaaacgacggccagtgaatt	60	42	

## 附錄7. 抗抗生素基因序列

### 1. Basta

PAT gene (Phosphinothricin N-acetyltransferase)

ATGAGCCCAGAACGACGCCCGGCGACATCCGCCGTGCCACCGAG  
GCGGACATGCCGGCGGTCTGCACCATCGTCAACCACTACATCGAG  
ACAAGCACGGTCAACTTCCGTACCGAGCCGCAGGAACCGCAGGAG  
TGGACGGACGACCTCGTCCGTCTGCGGGAGCGCTATCCCTGGCTC  
GTCGCCGAGGTGGACGGCGAGGTCGCCGGCATCGCCTACGCGGGC  
CCCTGGAAGGCACGCAACGCCTACGACTGGACGGCCGAGTCGACC  
GTGTACGTCTCCCCCGCCACCAGCGGACGGGACTGGGCTCCACG  
CTCTACACCCACCTGCTGAAGTCCCTGGAGGCACAGGGCTTCAAG  
AGCGTGGTCGCTGTCATCGGGCTGCCCAACGACCCGAGCGTGCGC  
ATGCACGAGGCGCTCGGATATGCCCCCGCGGCATGCTGCGGGCG  
GCCGGCTTCAAGCACGGGAAGTGGCATGACGTGGGTTTCTGGCAG  
CTGGACTTCAGCCTGCCGGTACCGCCCCGTCCGGTCCTGCCCGTCA  
CCGAAATCTGA

### 2. Blasticidin

Bsr gene

ATGAAGACCTTCAACATCTCCCAGCAGGATCTAGAATTAGTAGAA  
GTAGCGACAGAGAAGATTACAATGCTTTATGAGGATAATAAACAT  
CATGTGGGAGCGGCAATTCGTACGAAAACAGGAGAAATCATTTCG  
GCAGTACATATTGAAGCGTATATAGGACGAGTAACTGTTTGTGCA  
GAAGCCATTGCGATTGGTAGTGCAGTTTCGAATGGACAAAAGGAT  
TTTGACACGATTGTAGCTGTTAGACACCCTTATTCTGACGAAGTAG  
ATAGAAGTATTCGAGTGGTAAGTCCTTGTGGTATGTGTAGGGAGTT  
GATTCAGACTATGCACCAGATTGTTTTGTGTTAATAGAAATGAAT  
GGCAAGTTAGTCAAAACTACGATTGAAGAACTCATTCCACTCAA  
TATACCCGAAATTGA