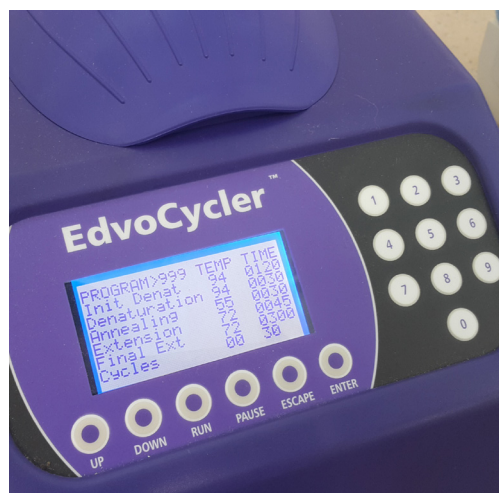
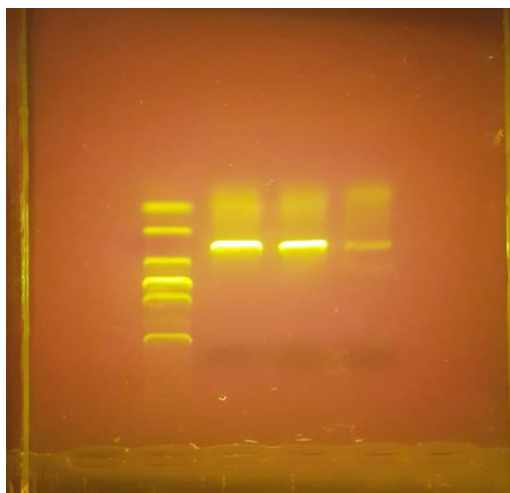
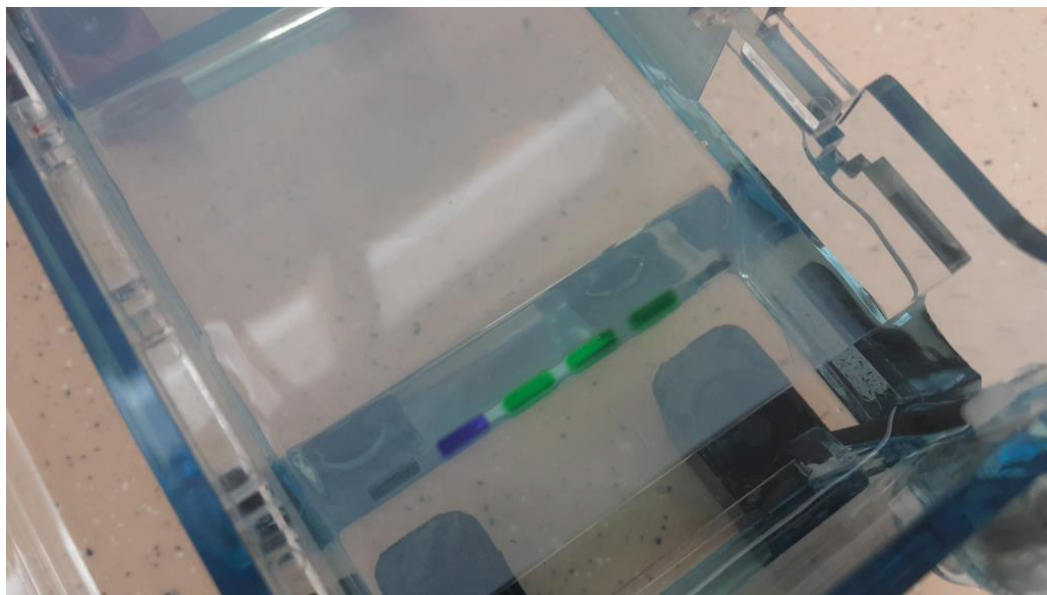


物種辨識（包含選修部份） DNA 提取、聚合酶鏈反應和凝膠電泳



DNA 指紋圖譜分析

去氧核糖核酸 (DNA) 是一種生物大分子，可組成遺傳指令，引導生物發育與生命機能運作。主要功能是資訊儲存，可比喻為「藍圖」用作蛋白質的製造。在哺乳動物當中，大部份 DNA 都並非用作合成蛋白質的藍圖，但其不同的排列方式卻造就出不同的物種及即使同一物種，生物體之間亦存在一定程度的差異。我們更可根據基因圖譜的檢測去分別不同的生物體。現今世代基因檢測多用於遺傳病的研究，例如準備懷孕前父母的基因檢測，以提早避免有致命遺傳病的嬰兒誕生，其次是生物鑑證，以處理生物遺骸及鑑定死者身分協助警方追查。現時案發現場的蒐證都需要生物科技的應用，受害人及嫌疑犯的確證都會用上生物科技進行分析，以準確鑑定罪犯及協助調查風化案件。

儀器與物料

250 毫升錐形瓶.....	1
冷卻水浴	1
電子溫度計.....	1
電子天平	共用
電泳槽及有關儀器.....	1 套
微波爐.....	共用
微波爐保鮮紙.....	共用
即棄手套	1 對
移液管及吸咀	1 套

化學品

凝膠	共用
TAE 緩衝劑 (劑 1X)	50 毫升

裂解物準備程序

1. 將水浴設置為 55°C。
2. 將 1g 的組織放入無菌微量離心管中
3. 向管中加入 180 μ l 基因組消化緩衝液和 20 μ l 蛋白酶 K。確保組織完全浸入緩衝液混合物中。
4. 在 55°C 下，偶爾渦旋直至裂解完成（約 1 小時）。
5. 為去除任何顆粒物質，在室溫下以最大速度離心裂解物 3 分鐘。
6. 將上清液轉移到新的離心管中。
7. 向裂解液中加入 20 μ l 核糖核酸酶 A，短暫渦旋混勻，室溫孵育 2 分鐘。
8. 加入 200 μ l 基因組裂解 / 結合緩衝液，渦旋混合均勻。
9. 向裂解物中加入 200 μ l 99% 乙醇。
10. 裂解物完成。

DNA 純化程序

1. 將裂解物 (~640 μ l) 添加到離心柱中。
2. 在室溫下以 10,000rpm 離心 1 分鐘。
3. 丟棄收集管並將離心柱放入試劑盒隨附的 PureLink™ 收集管中。
4. 向柱子中加入 500 μ l 用乙醇製備的洗滌緩衝液 1。
5. 在室溫下以 10,000rpm 離心柱 1 分鐘。
6. 丟棄收集管並將離心柱放入隨試劑盒提供的乾淨的收集管中。
7. 向柱中加入 500 μ l 用乙醇製備的洗滌緩衝液 2。
8. 室溫下以最大速度離心 3 分鐘。丟棄收集管。
9. 將離心柱放入無菌的 1.5ml 微量離心管中。
10. 向柱中加入 100 μ l 基因組洗脫緩衝液。
11. 室溫孵育 1 分鐘。在室溫下以最大速度離心 1 分鐘。
12. 獲取純化 DNA。

程序

製作凝膠 (1.5% , 7 厘米 x10 厘米)

1. 把 250ml 錐形瓶放上電子天平並調整重量至零。
2. 移送 0.75g 凝膠到錐形瓶。
3. 移送 50ml 1x TAE 緩衝劑到錐形瓶。
4. 用微波爐保鮮紙包好錐形瓶並在保鮮紙上刺上小孔。
5. 用微波爐加熱至凝膠完全融解溶液應當呈清澈透明。
6. 利用冷水浴把凝膠溶液冷卻至 55°C。
7. 加入 5 μ l DNA 螢光染劑 (由老師完成)。
8. 移送已降溫的凝膠到電泳床並放置好膠梳。
9. 讓凝膠冷卻並完全凝固, 需時約 20 分鐘。
10. 慢慢垂直拉起膠梳, 小心避免破壞放置 DNA 樣本的載穴。



移送 DNA 樣本及進行電泳

1. 移送 20 μ l DNA 樣本進入載穴。
2. 當所有 DNA 樣本已處理妥當, 電泳槽便可接上直流電源, 開始進行凝膠電泳。
3. 檢查電流能順利流通, 同學能留意白金電極位置應有細氣泡冒出, 進行凝膠電泳的時間老師會因應流程快慢而有所調整, DNA 樣本移動距離太短或過遠甚至離開凝膠均不適合。
4. 當凝膠電泳過程完成, 暴露凝膠在紫外光下觀察 DNA 片段。

結果

每個載穴中 DNA 產物的片段大小大約是多少?

載穴	片段 1 大小	片段 2 大小	片段 3 大小
A			
B			
C			
D			
E			

討論

背景

DNA 樣本是從以下生物中提取：

- 1) 轉基因木瓜；2) 非轉基因木瓜；3) 其他植物

使用 3 對不同的引物擴增 DNA

- 1) 木瓜蛋白酶
- 2) 木瓜輪點病毒鞘蛋白
- 3) 線粒體中細胞色素氧化次單位 1 (CO1)

通過聚合酶鏈反應 (PCR) 擴增相應基因

- 1) PCR 反應混合物的成分是什麼？
- 2) 每個片段代表什麼？
- 3) 你能區分所有的樣本嗎？他們是什麼？
- 4) 結果中是否缺少任何預期的片段？可能的原因有哪些？

從生果中提取去氧核糖核酸 (DNA)

儀器與物料

1 毫升 針筒	1
5 毫升 針筒	1
100 毫升 燒杯	1
紗布 / 濾紙	1
過濾漏斗	1
研砵及杵	1
生果樣本	
試管及試管架	1
木條	1

化學品

提取溶液	10 毫升
清潔劑	1 份
蒸餾水	9 份
氯化鈉	1.5 克

程序

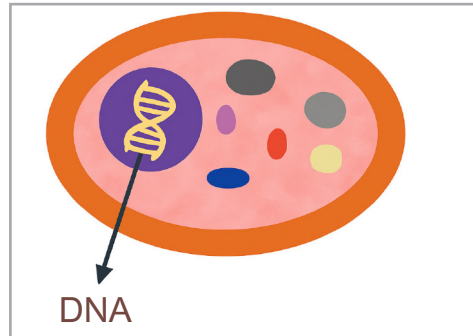
提取生果 DNA

1. 利用研砵及杵將生果搗爛，過程約 2 分鐘。
2. 把 10ml DNA 提取溶液加入已完全搗爛的生果中。
3. 再搗爛生果及讓溶液混和約 1 分鐘。
4. 裝置過濾用的儀器，把混合物傾進過濾裝置，收集濾液於 100ml 燒杯。
5. 把 2ml 濾液轉移至試管中。
6. 沿試管壁慢慢加入 4ml 凍酒精（切勿混和這兩層液體）。
7. 觀察及記錄在酒精層中出現的變化。

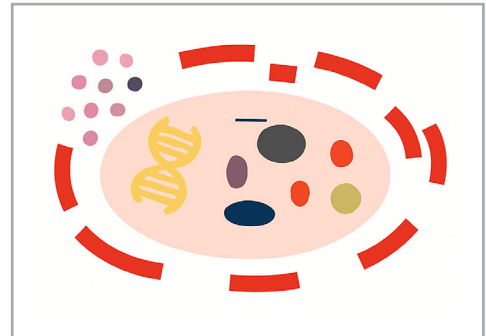
提示

DNA 會在酒精和草莓提取液層相接的位置出現，如希望提取更多 DNA 可輕搖試管，DNA 最後會浮到酒精上層。

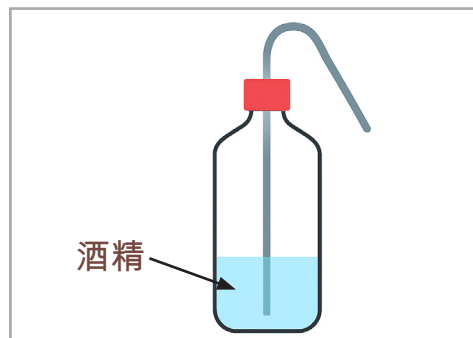
程序



① DNA 主要會在細胞核中找到



② 細胞膜結構被清潔劑破壞



③ 凍酒精加到生果混合物中 DNA 會出現於酒精層



④ 可用木條把 DNA 轉移到顯微鏡下觀察

討論

1. 提取溶液中的氯化鈉及清潔劑有何用途？
2. 酒精有何作用？為什麼需要先把酒精冷凍？
3. 冷凍的生果與未經冷凍的生果能提取的 DNA 量有沒有分別？為什麼？
4. 為何會常用草莓或奇異果作提取 DNA 實驗的生果？
5. 為什麼不同生果的 DNA 提取量各有不同？
6. 如何增加 DNA 的提取量？試解釋原因？
7. 以上實驗提取得到除了 DNA 外還可能有什麼物質？