

口腔細胞 DNA 抽提 - 自製基因小瓶

DNA Extraction – Gene in Bottle

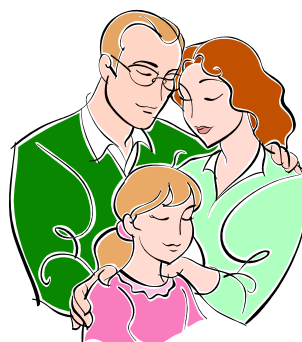
實驗目標：利用 DNA 抽提技術，製作自己專屬的基因小瓶



實驗介紹：

什麼是 DNA?

脫氧核糖核酸（DNA）是一種存在於包括細菌，植物，和動物在內的所有生命體的分子。DNA 攜帶有可從父母遺傳給子女的遺傳信息。它決定一個人的頭髮，眼睛，和膚色，面部特徵，身高，血型。它使個體獨一無二，同時又帶有全人類共同的關於人體的資訊。換言之，你的 DNA 就像是你整個身體的生長和發育的藍圖。你的 DNA 藍圖是一半你母親 DNA 和一半你父親的 DNA 的組合體。這就是為什麼你有來自於雙方的特徵。

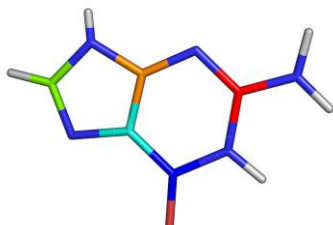


DNA 包含有 4 個化學單位，以他們英文名稱的首字母簡稱：腺嘌呤 **A**(adenine)，鳥嘌呤 **G**(guanine)，胸腺嘧啶 **T**(thymine)，和胞嘧啶 **C**(cytosine)。

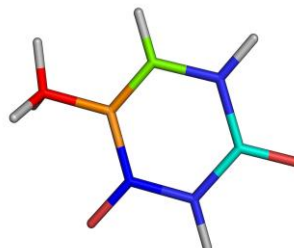
腺嘌呤 **A** (adenine)



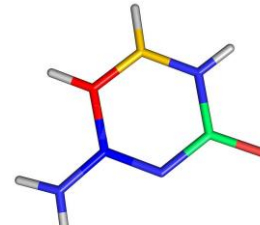
鳥嘌呤 **G** (guanine)



胸腺嘧啶 **T** (thymine)



胞嘧啶 **C** (cytosine)



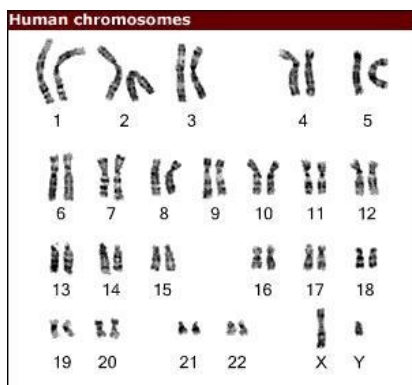


圖1 人類的20對染色體

這4個字母組成了遺傳資訊的編碼。DNA編碼的字母功能與字母表中的字母的功能很相像。英語字母表中，26個字母可以以無限種方式排列組成單詞和句子，從而產生各種資訊；類似的，DNA的4個化學字母可以組織產生能被細胞理解的資訊，稱之為“基因”。基因含有製造蛋白質的資訊，而蛋白質是幾乎所有身體和細胞結構與功能的基礎。一個基因就像是一個功能表，因為它攜帶由所有蛋白質合成所需要的資訊。(圖1)

你的DNA序列是你的全部基因中的化學字母的特殊組合與排列。科學家們已經測定出人類DNA序列99.9%是完全一樣的。也就是說人與人之間這不到0.1%的序列差異使我們每個人都變得獨特。換句話說，你與你同學的不同是由你們基因組中的化學字母的偶然差異引起的。

在哪裡能找到DNA

生物體的基本單位是細胞——它們組成了你所有的組織和器官（例如，肌肉，消化系統，皮膚，腺體等）。細胞內的細胞核就像是細胞的控制司令部，它含有DNA分子，是細胞功能的主要指導者。(圖2)

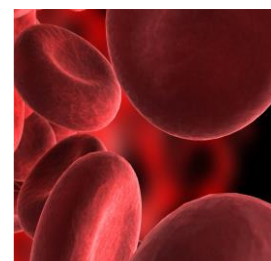


圖2 紅血球



圖3 染色體

人類DNA組織成46個緊密盤繞的結構。每次一個細胞為了生長，修復，或繁殖而分裂成二個完全相同的細胞時，染色體就會被複製，從而保證新細胞得到生物體基因藍圖的一個完整拷貝。(圖3)

DNA長什麼樣

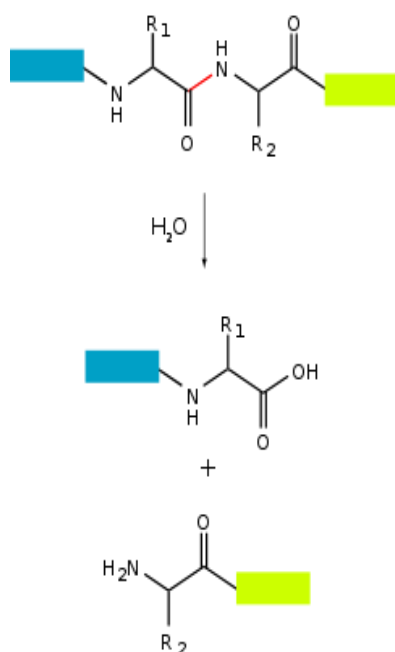


在分子水準，DNA看起來象盤旋的階梯。這個階梯事實上由2股DNA鏈組成，鏈上的A、T、C、G化學字母配對形成橫檔。由於DNA雙鏈形成這樣的螺旋形狀，因此這種結構被稱為DNA雙螺旋結構。DNA的每條鏈都很細長且緊緊地盤繞使它能裝在細胞核裏。如果一個人類細胞中的所有46條染色體都被解開並首尾相接地排列在一起，那麼DNA將會有2米長--但只有2納米（一米的十億分之二）寬。(圖5)

圖4 DNA 雙螺旋結構

它是怎麼運作的？

在這個活動的開始，學生們先要刮取他們口腔內側的細胞，並把收集到的細胞置於一個裝有裂解液的小試管。裂解液中含有去垢劑，可使磷脂結構的細胞膜和核膜破裂，釋放 DNA。它也含有一個可維持溶液 pH 的緩衝劑從而使 DNA 保持穩定。



蛋白酶（一種消化蛋白質的酶）的加入可除去結合在 DNA 上的蛋白質並破壞細胞內可消化 DNA 的酶。這就最大限度地保證了你抽提到的完整 DNA 的數量。含有蛋白酶的細胞抽提物需要在 50°C 溫浴，這是蛋白酶活性的最佳溫度。(圖 6)

圖 6 蛋白酶消化蛋白質過程

DNA 和其他的細胞組分，如脂肪，糖和蛋白質溶解在裂解液中。DNA 骨架上的磷酸基團使得 DNA 帶有一個負電荷，這個負電荷使得 DNA 變得可溶。

當樣品中加入鹽時，鹽上帶正電荷的鈉離子會與 DNA 上的負電荷相吸引，中和 DNA 的電荷。這就使得 DNA 分子聚在一起而不是相互排斥。加入預冷的酒精可沉澱 DNA，因為 DNA 在高鹽和酒精中是不可溶的。DNA 的沉澱開始在酒精層介面形成可見的，纖細的白絲，而其他的細胞組分仍保持在溶液中。



DNA 的沉澱而形成的白絲

新聞：

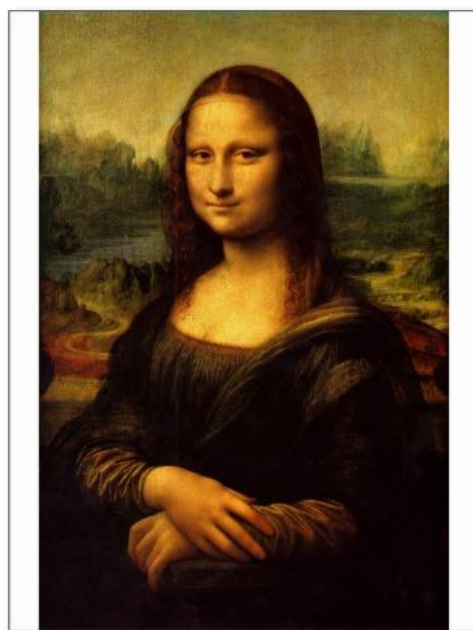
科學家打開古墓提取 DNA 或揭《蒙娜麗莎》真面目

中新網 2013 年 8 月 11 日

意大利城市佛羅倫薩的科學家打開一座古墓提取 DNA，希望藉此解開達芬奇筆下《蒙娜麗莎》畫中人的身份之謎。這座古墓內埋葬的是絲綢商人喬貢多之妻麗莎·蓋拉爾迪尼(Lisa Gherardini)的家人。據信，她曾經為達芬奇作模特。

科學家希望，此次提取的 DNA 能夠幫助鑑別去年從附近聖厄爾索拉修道院中發現的三位女性遺骨。

幾百年來，“蒙娜麗莎”原型的身份和她的微笑一樣一直是一個解不開的謎。為了獲取 DNA，科學家在教堂石地板上切割一個圓孔，地下是佛羅倫薩絲綢商人弗朗切斯科·喬貢多(Francesco del Giocondo)的家族墓穴。



研究人員將把獲取的 DNA 與從修道院中發現的遺骨 DNA 加以對比。麗莎·蓋拉爾迪尼在 1542 年死於修道院內。研究人員希望，此次打開的古墓內遺骨中至少包括她的一位血親，比如，她的兒子皮耶羅(Piero)。

研究人員說，如果 DNA 匹配，“就等於找到了蒙娜麗莎。”

此後，研究人員將可以通過頭骨塑造出麗莎·蓋拉爾迪尼的原貌，並與名畫《蒙娜麗莎》加以比較。

網址：<http://www.chinanews.com/cul/2013/08-11/5147763.shtml>

小偷用口香糖開鎖盜竊 警察提取 DNA 破案

中新網泉州 2013 年 4 月 25 日電(郭斌李桂芳)

僅憑一塊小小的口香糖，就能打開各式厚重的防盜門，一名男子利用“絕活”半年內作案十餘起，盜竊財物價值十餘萬元。

25 日，福建泉州鯉城公安刑侦大隊對外通報，成功將利用口香糖技術開鎖入室盜竊的毛賊丁某及同夥宋某抓獲。

近一段時間以來，泉州鯉城警方連續接到報案，多起被盜住戶家中門窗都未被破壞，經現場勘察，未發現案犯留下任何指紋及相對明顯的線索。

細心的民警發現，雖然現場找不到指紋等明顯的痕跡，但防盜門鎖孔內卻都殘留口香糖痕跡，警方據此判斷應為同一夥人所為，且案犯極有可能有犯罪前科。

經過比對，警方通過嫌疑人遺留在現場的口香糖上提取的 DNA 鎖定四川籍丁某。24 日凌晨，民警在泉州鯉城一家酒吧內，成功將丁某及同夥宋某抓獲。經訊問，丁某交代了利用口香糖開鎖入室盜竊的犯罪事實。

落網後，丁某交代，他開鎖的功夫，是之前坐牢時，裡面的“高人”傳授給他的，他通過將口香糖嚼軟後塞進鎖孔等導致鎖孔失效，再用特製的工具開鎖入室行竊。為掩人耳目，丁某和同夥作案時，都脫下腳上所穿的襪子套住雙手，以免留下指紋。

經查，丁某利用這種口香糖技術開鎖在泉州、南安等地作案多起。目前，“口香糖大盜”丁某及宋某已移泉州警方刑事拘留，案件還在進一步審理當中。(完)

(來源:中國新聞網)

網址: <http://news.nen.com.cn/system/2013/04/26/010341743.shtml>

思考題:

1. 為甚麼 DNA 能夠幫助鑑別身份？

同一人的 DNA 型，除若干之例外，原則上其細胞核莫不相同。又 DNA 型係由 4 個鹼基所組成，但人之 DNA 型在鹼基的組合上，卻因個人之不同而異其部位，倘能找出其個人差異之部位，即可作為其人是否具有同一性之認定判斷。在此，從全體來看，DNA 型之鹼基配列，除非為同卵孿生子，世界上不可能有二人的 DNA 鹼基配列完全相同。

2. 為何遺骨裏仍存在 DNA？怎樣從遺骨中提取 DNA？

人類體內之細胞（cell）是依分裂方式增加體內之細胞數，同時亦因此而形成人體組織與器官。構成人體組織的細胞內含有細胞核，而包含於細胞核染色體內者，即為遺傳因數（gene；或稱基因）。而細胞核內含有核酸，核酸可分為二種，一種含醣，稱為核醣核酸（RNA），另一種含去氧核醣，即稱為去氧核醣核酸（DNA），DNA 即為決定及傳遞遺傳之物質。

3. 在上述兩篇報道，抽取 DNA 能協助研究人員及員警辨認身份外，DNA 還可以在哪些領域上有幫助？

遺傳工程：重組脫氧核醣核酸技術在現代生物學與生物化學中受到廣泛應用，所謂重組 DNA，是指集合其他脫氧核醣核酸序列所製成的人造脫氧核醣核酸，可以質體或以病毒載體搭載所想要的格式，將脫氧核醣核酸轉型到生物個體中。經過遺傳改造處理之後的生物體，可用來生產重組蛋白質，以供醫學研究使用，或是於農業上栽種，

歷史學與人類學：由於脫氧核醣核酸在經歷一段時間後會積聚一些具有遺傳能力突變，因此其中所包含的歷史訊息，可經由脫氧核醣核酸序列的比較，使遺傳學家瞭解生物體的演化歷史，也就是種系。這些研究是種系發生學的一部分，也是演化生物學上的有利工具。假如對物種以內範圍的脫氧核醣核酸序列進行比較，那麼群體遺傳學家就可得知特定族群的歷史。此方法的應用範圍可從生態遺傳學到人類學，舉例而言，脫氧核醣核酸證據已被試圖用來尋找失蹤的以色列十支派。

4. 你認為透過對比 DNA 可以找出自己的血親嗎？為甚麼？

可以。一個人有 23 對（46 條）染色體，同一對染色體同一位置上的一對基因稱為等位基因，一般一個來自父親，一個來自母親。如果檢測到某個 DNA 位點的等位基因，一個與母親相同，另一個就應與父親相同，否則就存在疑問了。

利用 DNA 進行親子鑒定，只要作十幾至幾十個 DNA 位點作檢測，如果全部一樣，就可以確定親子關係，如果有 3 個以上的位點不同，則可排除親子關係，有一兩個位點不同，則應考慮基因突變的可能，加做一些位點的檢測進行辨別。DNA 親子鑒定，否定親子關係的準確率幾近 100%，肯定親子關係的準確率可達到 99.99%。

我們怎樣才能看見 DNA？

步驟 1：收集細胞

為了要看見你的 DNA，我們會收集細胞，將之破裂，並將所有細胞內的 DNA 濃縮在一起。只要用一個刷子溫和而充分地刮擦你口腔的內側，你就能收集數千個細胞。你口腔周圍的細胞分裂頻繁，新的細胞不斷的替換它們，所以容易脫落。實際上，每次你吃東西咀嚼時，這些細胞都會脫落並被替換。



思考題：

1. 你怎麼能證實你是否真的從你的口頰收集到了細胞？你會使用什麼樣的實驗室儀器？

顯微鏡觀察

步驟 2：裂解細胞

一旦你收集好細胞，這些細胞就需要被裂解以釋放 DNA。因為細胞膜和核膜是由脂肪和蛋白質組成的，去垢劑將會溶解細胞的膜，就像洗盤子的去垢劑溶解沾滿油污的盤子上的油脂和蛋白質。膜的溶解導致了 DNA 被釋放。細胞破裂的過程被稱為**裂解(Lyse)**，含有去垢劑的溶液被稱為**裂解液(Lysis buffer)**。(圖 7,圖 8)



圖 7 裂解液

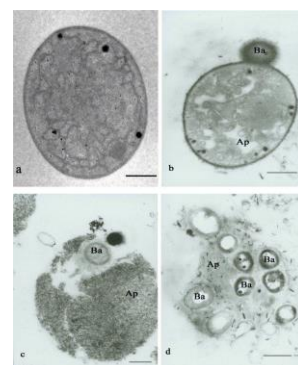


圖 8 細胞破裂的過程(裂解)

思考題：

2. 當你洗盤子時，是溫水還是冷水的效果好？裂解細胞時，你認為是高溫還是低溫更有效？

溫水效果好，利於汙物的溶解；

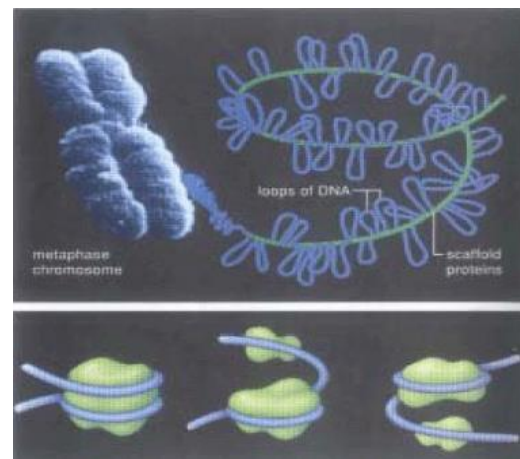
裂解細胞時可能高溫效果更好，但是因為裂解細胞需要獲得的是細胞內的活性物質，因此還是應該選則低溫裂解。

3. 當你裂解細胞後，你認為你能看到你的 DNA 嗎？為什麼？

看不到，因為 DNA 很細小，且存在與溶液中，肉眼是無法看到的。

步驟 3： 除去蛋白質

DNA 緊密地包圍著蛋白質。就想線軸對於線的作用一樣，這些蛋白使 DNA 有組織地緊緊纏繞，從而不會在細胞核內纏結。去除蛋白質使 DNA 鬆開，膨脹，接著可以與其他細胞的 DNA 一起聚集成一團，以便於我們可以看到 DNA。將蛋白酶於裂解後的口頰細胞共同溫浴，可以降解蛋白質，使之不再結合 DNA。蛋白酶是一種酶，或蛋白質機器，它的最佳作用溫度是 50°C，相當於微燙的水的溫度。蛋白酶可以破壞結合在 DNA 上的蛋白質，同時還有助於消化所有殘存的細胞膜或核膜的蛋白質。



思考題：

4. 在你的身體裏，你認為在哪裡可以找到蛋白酶？提示：你所吃的蛋白質是在哪裡被消化的？
胃液、腸道等，含有胃蛋白酶、胰蛋白酶等。

步驟 4 和步驟 5： 濃縮 DNA

DNA 鏈實在是太細了，當它們溶解在溶液中時，是不可能被看到的。把細長的 DNA 分子想像成纖細的白絲線，如果把絲線沿著一個房間拉直，我們將很難看到它。為了使絲線能更好地被看見，你可以把它們收集在一起並在地板上堆起來。在這個實驗中，你將用鹽和預冷的酒精把 DNA 從溶夜裏分離出來，或稱沉澱。鹽和預冷的酒精造成一種環境使 DNA 不能保持在溶液裏，這樣 DNA 就會結團形成一個可見的固體物質。

思考題：

5. 你試過把糖加到冰茶裏嗎？糖容易化嗎？比起把同等量的糖放到同等量的熱茶中的情形怎樣？
加到冰茶中糖不易溶化，在熱茶中易溶化，原因是溫度升高，分子運動、擴散運動加劇，
溶解速度加快。

沉澱的 DNA 看起來是什麼樣子的？

像糖和鹽一樣，DNA 溶解在液體裏時是無色的，但當它沉澱出足夠看見的數量時，它是白色的。沉澱時，它以漂浮在液體裏非常纖細的白絲線的形態出現。這些絲線比較脆弱，像非常細的麵條一樣，如果操作粗暴會把它們打斷。而且，如果把一團沉澱 DNA 從液體里拉出來，它們就會結成塊，就像把煮熟的麵條從水裏拿出來會結成塊一樣。



實驗試劑： [4 人一組]

95% Ethanol(乙醇) [95% EtOH], 10ml, 預冷	4 支
Lysis Buffer(裂解液) – 飽和鬆肉粉溶液,10ml	1 支
Saturated Protease solution(飽和蛋白酶溶液)[Prot], 1ml	1 支

實驗步驟：

- 1) 取一支空的 15ml 圓底試管，用耐久記號筆寫上你的名字。



- 2) 小心溫柔地按摩口頰兩側，維持 30 秒。小心不要傷著自己。(不要吞下唾液)



- 3) 在紙杯中加入少許蒸餾水(大約 2ml), 然後用水漱口 30 秒或以上, 為了得到最佳實驗結果, 請確定你花了所推薦的時間用於收集細胞。然後吐回紙杯。
- 4) 用塑膠移液管將液體於 15ml 圓底試管中(注意大約液體容量約為 2ml)。



- 5) 加入 2ml 的裂解液 (Lysis)於試管中。
- 6) 蓋上細胞提取物管蓋子, 溫和的上下顛倒 5 次以混勻。觀察並記錄管內的情況。



- 7) 分別從標有 Prot 的試管中吸取 5 滴(200ul) 蛋白酶(Prot), 加入到含有你細胞抽提物的試管裏。蓋上細胞提取物管蓋子, 溫和的上下顛倒 5 次以混勻。

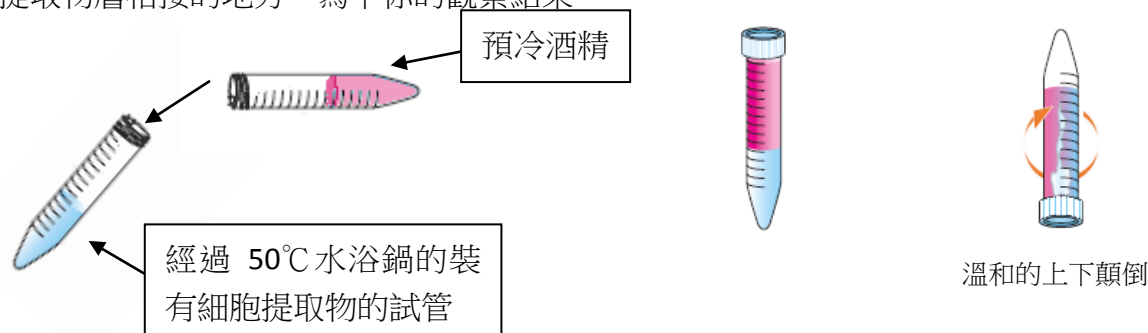


- 8) 在你的工作臺上, 把裝有你細胞提取物的試管放在泡沫小試管架上, 將樣品放入 50°C 水浴鍋 10 分鐘, 使蛋白酶發揮作用。

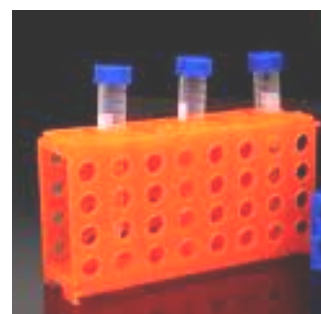


50°C 水浴鍋
10 分鐘

- 9) 把裝有你細胞提取物的試管傾斜 45°，慢慢地加入約 10ml 的預冷酒精(EtOH)，讓它順著管內壁溫和的流下來。你應該會看到形成上下兩層。當你加酒精時，仔細觀察酒精層和細胞提取物層相接的地方。寫下你的觀察結果。



- 10) 把試管豎直置於試管架上，室溫靜置 5 分鐘。
- 11) 5 分鐘後，再觀察管內的物質，特別是酒精層和細胞提取物層相接的區域。你看到什麼了嗎？寫下你的觀察結果。把你的樣品與你同學們的相比較。
- 12) 慢慢地上下顛倒 5 次混勻，讓 DNA 開始沉澱。注意一切纖維狀，白色或透明物質。**這就是你的 DNA。**
- 13) 用一個塑膠移液管仔細的把沉澱 DNA 與酒精轉移到小瓶裏。你便完成基因小瓶的製作了。



注意：

- 1) 先把小量上層酒精移至小瓶
- 2) 再把沉澱 DNA 移至小瓶
- 3) 最後加滿酒精，小瓶便制成



實驗後思考問題:

1. 設想你正試著給比你小 2 歲的弟弟或妹妹解釋染色體、基因、和 DNA 間的差異，用他們能理解的簡單的語言寫下你的解釋。
基因→DNA+蛋白質→染色體。基因是有功能的 DNA 片段，染色體是 DNA 的載體，DNA 和蛋白質共同組成了染色體。所以染色體 > DNA > 基因。
2. 一個肝細胞中所含的的染色體是否和一個口頰細胞相同？
相同。

3. 如果你想分離一個給在胃裏發現的某蛋白質編碼的基因的拷貝，這個基因可以在口頰細胞裏被找到嗎？說出你的理由。

可以，因為它們兩者都屬於體細胞，體細胞的遺傳物質相同。

4. 你認為在哪個細胞器內可以找到你的基因組 DNA?

細胞核中可以找到基因組 DNA。

5. 你認為哪一步是細胞 DNA 抽提的第一步？

細胞 DNA 抽提的第一步是破碎細胞。

6. 一旦細胞膜溶解，DNA 會被釋放到溶液裏去，但同時許多其他類型的細胞分子也一樣被釋放到溶液裏。除了 DNA 外，列出你認為能在細胞裏發現的一些分子類型。

有 RNA，蛋白質，脂肪顆粒，ATP, ADP，還有一些多糖、肽鏈、蛋白、脂類物質等。

7. 你認為什麼方法或試劑可以用來降解這些不需要的分子？

i. 如果只想要 DNA 的話，不用考慮那麼多，直接我們就是通過一些沉降反應（利用一些變形劑，使蛋白變性沉澱，然後用油水分層的方法是 DNA、蛋白分離），提取 DNA，然後再一步一步的純化。

ii. 不用降解，向燒杯中依順序加入鹽水和蒸餾水後，DNA 自動析出。

8. 在細胞內，什麼類型的蛋白質有可能與 DNA 結合在一起？

分裂間期合成的蛋白質：組蛋白、核糖體蛋白、核蛋白，還有相關的複製、解旋酶。

9. 這個實驗所使用的蛋白酶在 50°C 活性最好，你認為可以從大腸桿菌裏分離出這個酶嗎？說出你的理由。提示：大腸桿菌生活在哪裡？

不行，溫度不適宜。

10. 肉類嫩化劑經常被用來嫩化硬塊肉類，比如牛排。我們知道牛排是由蛋白質豐富的牛的肌肉組織組成的，你能解釋肉類嫩化劑是怎麼起作用的嗎？

肉類嫩化劑實質上是一種酶，可以使肉中各種“鍵”斷裂，使肉質更細嫩。

- 11 · 請把左邊的結果與右邊的實驗步驟用線連起來。

收集細胞	在含去垢劑的溶液裏混勻
降解蛋白質	用牙刮擦你的口頰內側
溶解細胞膜	加入鹽
沉澱 DNA	加入蛋白酶
使 DNA 在水裏不可溶	細胞提取物上的預冷酒精層

- 12 · 實驗中用以裂解細胞的 Lysis buffer, 其每一樣成份的作用是什麼? [Tris, EDTA, SDS, dd H₂O]

Tris：三羥甲基氨基甲烷，用 Tris 和 HCl 配製的緩衝液是最常用的生物緩衝液
作用-----緩衝 pH

EDTA：乙二胺四乙酸，金屬離子螯合劑，可用於抑制金屬酶或以金屬離子作為輔助因數
的酶的活性

SDS：十二烷基磺酸鈉，典型的陰離子表面活性劑，可用於破碎細胞

ddH₂O：雙蒸水，溶劑

參考來源：

<http://www.nist.gov/oles/forensics/images/DNA-Strand.jpg>

<http://cdn.c.photoshelter.com/img-get/I0000vvi8jCVC96o/s/860/860/DNA-Base-Pair-Adenine-Molecule.jpg>

<http://cdn.c.photoshelter.com/img-get/I00009GKBkFRaIcl/s/860/860/DNA-Base-Pair-Guanine-Molecule.jpg>

<http://cdn.c.photoshelter.com/img-get/I0000WONyAmgd00U/s/860/860/DNA-Base-Pair-Thymine-Molecule.jpg>

<http://cdn.c.photoshelter.com/img-get/I0000wL9xHE8tmdA/s/860/860/DNA-Base-Pair-Cytosine-Molecule.jpg>

<http://wenwen.soso.com/p/20110913/20110913155200-1041459195.jpg>

<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/e/ec/Proteolysis.svg/240px-Proteolysis.svg.png>

http://www.eurekalert.org/multimedia/pub/web/8935_web.jpg

<http://bjpsbiotech.edublogs.org/files/2008/08/lysis-buffer-for-dna-necklace.jpg>

<http://origin-ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S1049964406001721-gr5.jpg>

<http://www.bbboo.com/uploadfile/200609/2006091215553859.gif>