

新竹市第三十九屆中小學科學展覽會

作品說明書

科 別：生物科

作品名稱：「粗」類拔「萃」—DNA 的粗萃取

關 鍵 詞：DNA 粗萃取、水果 DNA

編號：

摘要

本研究在探討影響 DNA(去氧核糖核酸)粗萃取實驗結果的可能變因。我們的實驗結果如下：一、測量標準 DNA 樣品的吸光值，做出吸光值(A260)-DNA 濃度之檢量線，並由 A260/A280 比值了解自製光度計之準確性及限制，發現在 DNA 濃度低於 3 μ M 時準確度會下降。二、不同種類水果的 DNA 萃取量有明顯差異，在顯微鏡下觀察果肉細胞並比對，發現不同種類的水果，在單位面積下的細胞數量越多，DNA 萃取量也越大。三、使用高濃度食鹽水回溶 DNA 萃取物，溶解度高且純度佳，其次為低濃度食鹽水，而純水回溶效果較差。四、萃取香蕉 DNA 時使用陽離子、兩性離子或非離子界面活性劑都有不錯的萃取量與純度，陰離子界面活性劑最差。五、兩倍體的旦蕉 DNA 萃取量高於三倍體北蕉，進一步觀察兩者的果肉細胞，發現旦蕉單位面積下的細胞數量遠多於北蕉。

壹、研究動機

在國一生物實驗課時，老師曾帶我們進行了 DNA 萃取的補充實驗，當時老師準備了香蕉及奇異果進行實驗，實驗結果發現兩者萃取出來的 DNA 量及狀態有明顯差異，也懷疑析出的白色絮狀物是否全都是 DNA。我們開始對 DNA 萃取過程原理產生好奇，在經過實驗原理查證及文獻查詢後，便著手探究不同水果 DNA 萃取結果不同的原因，及探討萃取步驟中不同變因造成的萃取結果差異，期望本實驗結果，在國高中生物課程進行相關的 DNA 粗萃實驗時，能具有參考價值。

貳、研究目的

- 一、探究自製光度計測定 DNA 的準確性
- 二、比較不同水果之 DNA 萃取結果的差異
- 三、探究不同濃度食鹽水對於 DNA 溶解度差異
- 四、探究在 DNA 萃取的標準實驗步驟中，不同種類界面活性劑對萃取量之影響
- 五、探究二倍體且蕉和三倍體北蕉萃取 DNA 後的異同

參、研究設備與器材

一、器材

果汁機、試管、燒杯、錐形瓶、嫩精、食鹽、純水、豆漿濾袋、咖啡濾紙、95%乙醇、自製光度計、離心管、陰離子界面活性劑(十二烷基硫酸鈉)、陽離子界面活性劑(十六烷基三甲基氯化銨)、兩性離子界面活性劑(椰油鹽安丙基二甲基甘胺酸)、非離子界面活性劑(TritonX-100)、arduino 板、DNA 引子、碘液、刮鬍刀片、偏光顯微鏡、載玻片、蓋玻片

二、實驗材料介紹

(一)DNA

1.構造

真核生物的 DNA 主要位於細胞核中，是一種長鏈聚合物的雙螺旋結構分子，組成單位稱為核苷酸。核苷酸是由一個鹼基、一個去氧核糖和一個磷酸組成，磷酸在水中會解離，釋出氫離子 (H^+) 因此在中性水溶液中（例如細胞中的環境），DNA 上絕大部份的磷酸根都會釋出氫離子，因而帶負電(文獻一)。

2.DNA 引子(primer)

在實驗一中，我們使用的標準 DNA 樣品是人工合成的 DNA 片段，在實驗室中用以進行聚合酶連鎖反應(PCR)，當需要複製 DNA 時，作為複製起點。下表為本研究中使用的兩種 DNA 引子樣品：

| | 長度 | 分子量 | 濃度 |
|----------|-------|-----------------|-------|
| 樣品一(CO5) | 36 單位 | 11054.2ug/umole | 100uM |
| 樣品二(CO6) | 36 單位 | 11072.2ug/umole | 100uM |

表 3-2-1DNA 引子資料

(二)界面活性劑

界面活性劑分子可分為親油基、連結基與親水基三部分，溶於水後可視是否解離而分為兩大類—離子型及非離子型，而離子型又根據解離後親水基狀態細分成陰離子性界面活性劑、陽離子性界面活性劑以及兩性離子界面活性劑。(文獻三)

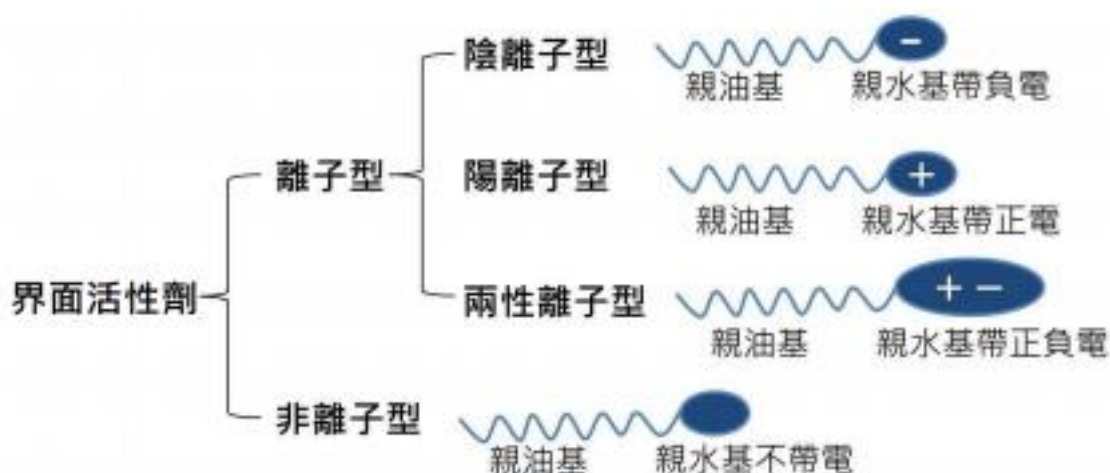


圖 3-2-1 界面活性劑種類

1.陰離子性界面活性劑

陰離子性界面活性劑是指在水溶液中界面活性劑本身呈陰離子性(Anionic)。如肥皂類界面活性劑、合成洗劑或洗髮精等，其使用量約占全界面活性劑的 1/3。

2.陽離子性界面活性劑

陽離子性界面活性劑是指界面活性劑在水溶液中呈陽離子性。陽離子性界面活性劑一般很容易吸著在帶負電的固體表面而具柔軟性、殺菌性等性質。常作為纖維柔軟劑、毛髮潤濕劑或殺菌劑使用。

3.兩離子性界面活性劑

兩性界面活性劑是因水溶液的 pH 值使界面活性劑本身產生呈陰離子性或陽離子性的共存狀態，分子中有胺基和酸基，在酸性溶液中，分子中的胺基與酸作用而溶解；在鹼性溶液中，酸基與鹼中和而有水溶性，主要用途有洗髮精基劑、潤絲精基劑、柔軟劑。

4.非離子性界面活性劑

非離子性界面活性劑(Nonionic Surfactant)，被水溶解也不呈離子性，包含以下的各種界面活性劑。具有滲透性、乳化性等性能面特色，近年非離子性界面活性劑的使用量急劇增加，與陰離子性界面活性劑並列為主力的界面活性劑。依據分子內的主要結合的方式將其分類為醚型、酯型、及等類。

在 DNA 萃取的文獻中，常以陽離子界面活性劑 CATB(十六烷基三甲基溴化銨)來破壞細胞膜和核膜，來進行 DNA 的萃取，但在一般國、高中的 DNA 萃取只標註使用清潔劑，因此本研究欲探討四種不同的界面活性劑在 DNA 萃取實驗中的效果差異(文獻四)。

三、實驗設備介紹

(一)吸光值原理

因 DNA(核酸)在 260nm 的紫外光中有最大吸收峰值，蛋白質及酚類的吸光峰值則為 280nm(如下圖所示)。A 是 Absorbance(吸光度)的縮寫，一般來說 A₂₆₀ 代表核酸的吸收峰值，A₂₈₀ 代表蛋白質及酚類的吸收峰值。

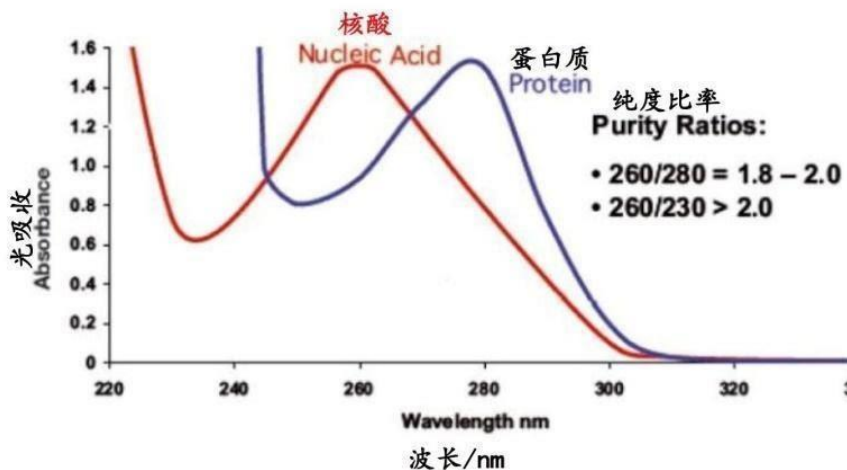


圖 3-3-1 核酸與蛋白質對不同波長的光吸收情形。出處：<https://pse.is/3chncu>

(二)自製光度計

為了能對 DNA 萃取物進行檢測，我們設計了 A260 和 A280 的分光光度計裝置(如下圖)，發射端(光源)利用單色 LED 燈，發射接近核酸峰值的吸收波長(260nm)和接近蛋白質峰值的吸收波長(280nm)的光線，穿過比色管後，由接收端的光電二極體(240-370nm)接收光強度，傳送至 Arduino 板轉換為可讀取之數值(電壓)並根據比爾朗伯定律換算為待測物吸光度。

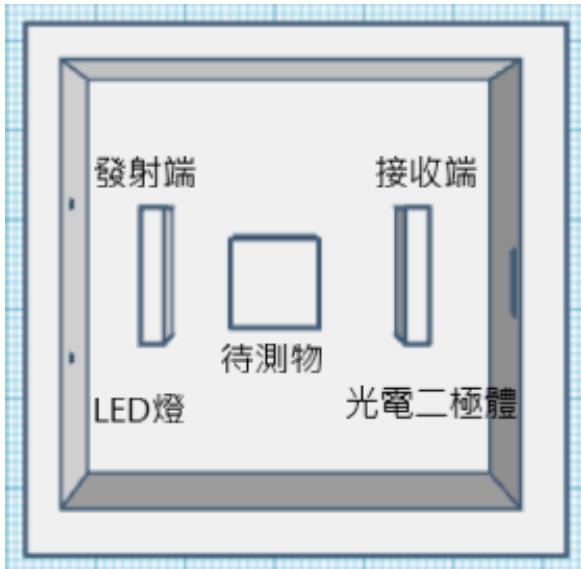


圖 3-3-2 自製光度計配置圖

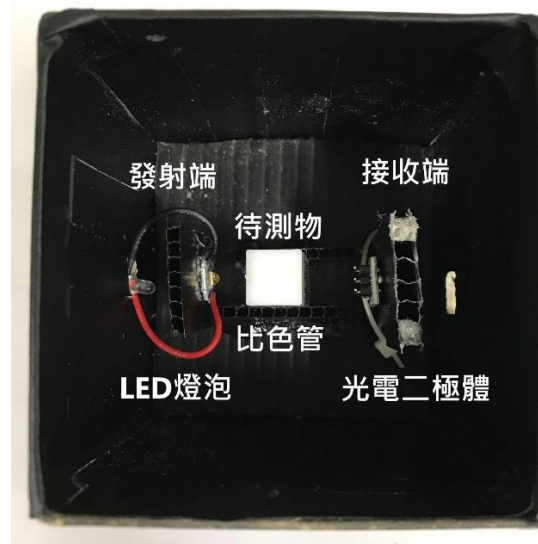


圖 3-3-3 自製光度計實體圖

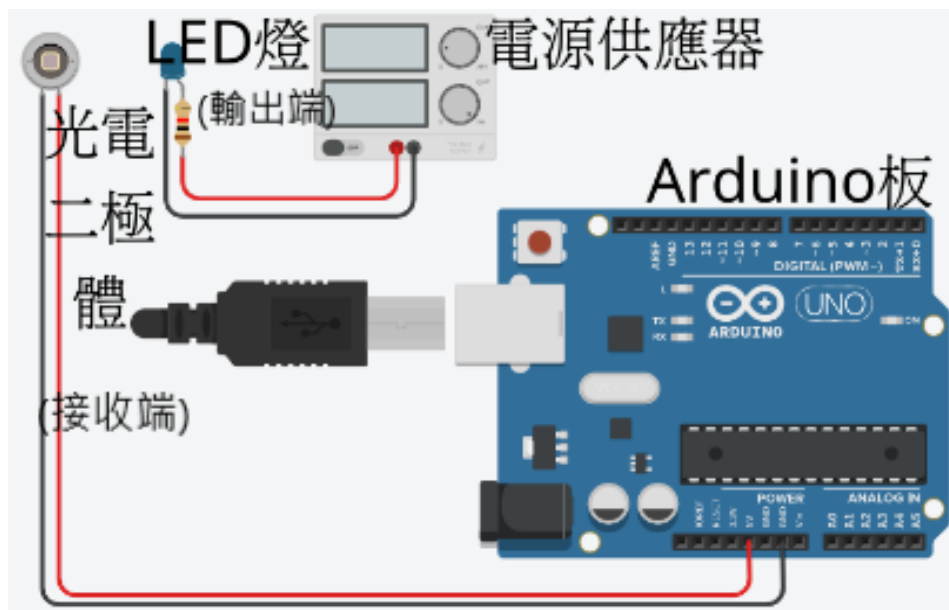


圖 3-3-4 自製光度計線路圖

(三)DNA 測量方法

本研究利用分析吸光值來評估 DNA 樣本濃度及純度，A260 吸光值代表萃取物質中核酸的含量，利用 A260/A280 之比值來估算核酸中的蛋白質及酚類的汙染量。在 pH 值 7~8.5 之下，理想的 DNA 之 A260/A280 比值為 1.8~2.0(文獻六)。本裝置以電壓的大小表示光的強度，再根據比爾朗伯定律得出電壓與吸光度的換算公式：

$$A = \frac{V_0}{V_t}$$

V_0 ：空白溶液經裝置測量得出的電壓(mV)

V_t ：萃取液經裝置測量得出的電壓(mV)

A：測量得出的吸光度

(四)DNA 萃取流程

1.DNA 粗萃取標準實驗步驟

我們根據高中教科書上萃取 DNA 的實驗步驟，來進行 DNA 的萃取結果探討。本實驗參考之萃取標準步驟如下(文獻四)：

- (1)取 100 克的水果放入果汁機中，加 100 毫升蒸餾水打碎(打碎細胞)。
- (2)將打好的果汁倒入燒杯中，加 5 毫升洗碗精(界面活性劑)，用玻棒攪拌 5 分鐘，使果肉細胞的細胞膜及核膜破壞，釋出遺傳物質。
- (3)加入 5 毫升的 5M 食鹽水，攪拌 5 分鐘。(分離 DNA 與組蛋白，並利用鈉離子降低 DNA 的負電互斥)
- (4)再加入嫩精 5 公克，持續攪拌 5 分鐘(分解蛋白質)。
- (5)將燒杯中的混合液以濾袋過濾，收集濾液至燒杯內。
- (6)取濾液 10 毫升放入乾淨的試管內，沿著試管壁緩慢倒入 10 毫升的 95%冰酒精(不攪拌)，此時在溶液和酒精交界處出現棉絮狀的白色物質，此棉絮狀物質的主要成分為該水果的 DNA。(DNA 不溶於有機溶劑，因此酒精可使 DNA 析出)。
- (7)以滴管吸取上層液體，用於 DNA 的測定。

2.DNA 測量實驗步驟

- (8)將萃取到的液體或絮狀物以濃食鹽水回溶。
- (9)回溶後再以咖啡濾紙過濾掉其他雜質。
- (10)將含有 DNA 的濾液，取 3ml 放入比色管，並放入燈光波長 260nm 的自製光度計裝置的樣品放置處，進行電壓數值的讀取。

- (11)再用同一樣品放入燈光波長 280nm 的自製光度計，進行電壓數值的讀取。
- (12)將燈光波長 260nm 及 280nm 的電壓值利用公式轉換成吸光度。

肆、研究過程與結果討論

實驗一、發展自製光度計測定 DNA 標準樣本

在進行各項變因的探討前，想先了解我們自製的光度計對於測 DNA 樣品的準確性，因此從大學實驗室要到了一段人工合成的 DNA Primer 樣品，長度為 36 單位，濃度已知為 100uM，利用 DNA 標準樣品來測定 A260 與 A280 的吸光值。

實驗 1-1 DNA 標準樣本的 A260 測定

(一)實驗步驟

- 1.分別配置五種濃度的 DNA 引子樣品如下：
標準 A：樣品一(CO5)100uM100ul+1.9ml 水配成 5uM2ml
標準 B：樣品二(CO6)100uM200ul+1.8ml 水配成 10uM2ml
標準 C：樣品三 10uM200ul+1.8ml 水配成 1uM2ml
標準 D：樣品一 1ml+樣品二 1ml 配成 7.5uM2ml
標準 E：樣品二 1ml+樣品三 1ml 配成 3uM2ml
- 2.分別以波長 260 與 280 光度計測量五種樣品及水的吸光值。
- 3.比較波長 260、280 吸光度。
- 4.重複以上步驟共 3 次，取平均值。

(二)實驗結果

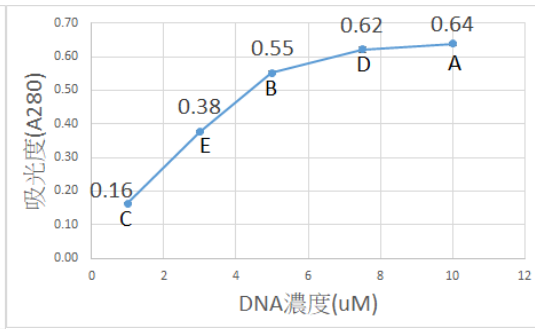
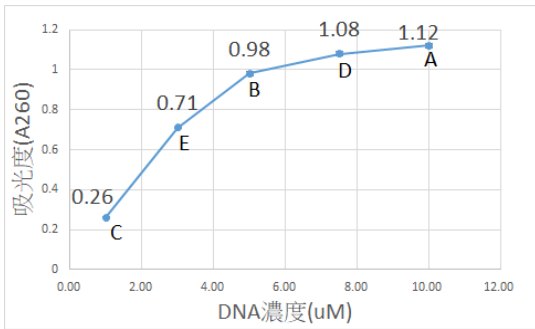


圖 4-1-1 標準 DNA 的吸光度(A260)

圖 4-1-2 標準 DNA 的吸光度(A280)

由圖 4-1-1 及圖 4-1-2 得知，越高濃度的標準 DNA，吸光度也越高，但超過 5uM 以上的吸光度增加趨勢將越來越平緩。

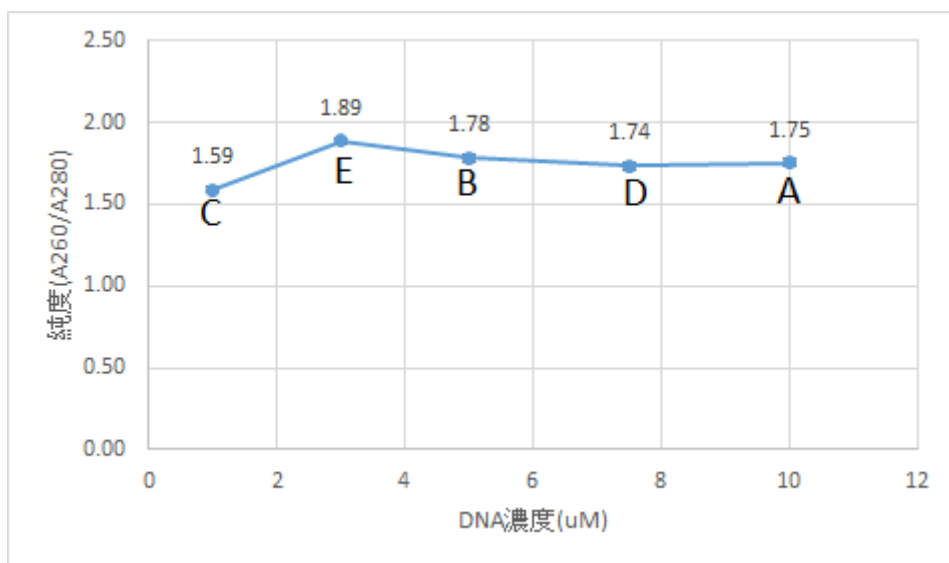


圖 4-1-3 標準 DNA 的純度(A260/A280)

由圖 4-1-3 得知 3uM 的標準 DNA 純度最高，且 1uM 的標準 DNA 純度最低。

實驗 1-2 製作 DNA 標準樣本濃度之檢量線

(一)實驗步驟

- 1.將實驗 1-1 由五種不同濃度的 DNA 標準樣品所測得之 A260 值，以 excel 畫出 DNA 標準樣品濃度與吸光值之間的關係。
- 2.由文獻可知 DNA 的吸光度具適當（吸光度-濃度）線性關係，因此我們以線性模式推算出 DNA 濃度與吸光度的關係式。

(二)實驗結果

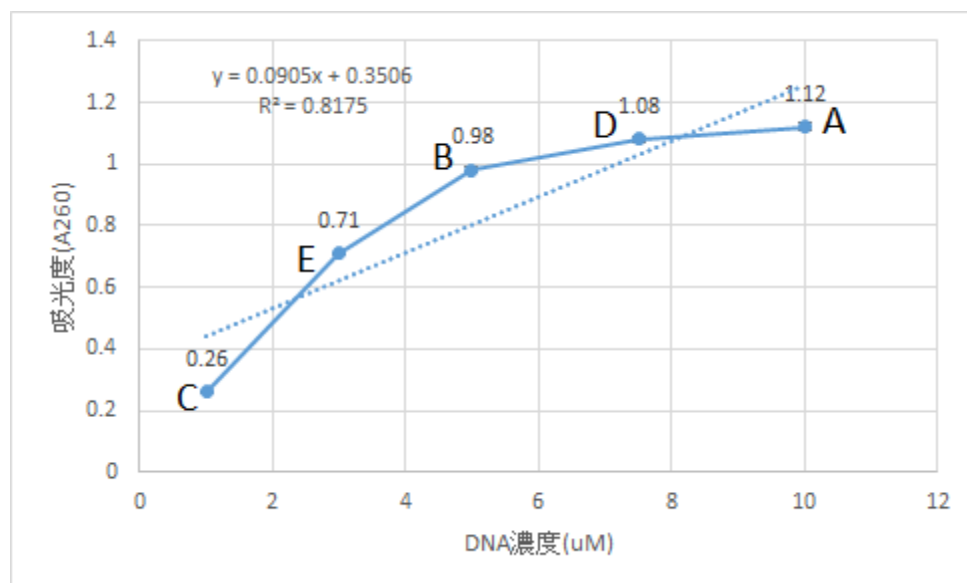


圖 4-1-4 標準 DNA 的檢量線

圖 4-1-4 為五種濃度做出來之檢量線，可看到這五點濃度連接後的趨勢為一條曲線，但以線性關係來預估 DNA 濃度與吸光值度的關係式為 $y(A260)=0.0905x(\text{DNA 濃度})+0.3506$ ，相關係數為 $R^2=0.8175$ 。

實驗一 討論與分析

- 1.我們可從圖 4-1-1 中得知，DNA 濃度越高吸光度也會越高，兩者呈正相關。
- 2.A260 及 A280 的圖形狀況類似，但 A280 的數值明顯較低，表示 A260 與 A280 皆能測得 DNA，但 DNA 的吸收值 A260 大於 A280，其結果符合文獻中(圖 3-3-1)DNA 吸光值的標準曲線圖。
- 3.DNA 濃度在 1uM 時，純度下降明顯，由於使用的是純 DNA 樣品，表示 DNA 濃度低於 3uM 以下時，讀值數據不穩定，會影響此裝置測 DNA 的準確性。
- 4.A260-DNA 濃度關係圖當吸光值高於 1.0 時，會隨著吸光值增加而變得不線性，因此用線性的關係式來估計較高濃度的 DNA 時，無法非常準確，因此我們在之後的實驗中，會將濃度較高的萃取物樣品稀釋後再進行分析。

實驗二、比較不同水果萃取 DNA 結果的差異

由於觀察到在課堂上萃取奇異果與香蕉的 DNA 結果不同，我們想了解不同水果的 DNA 萃取情形，小組討論之後，決定了四種水果來進行 DNA 萃取之分析。除了在國、高中課程中常用來萃取 DNA 的「奇異果」，還有未來我們想探討萃取二倍及三倍染色體 DNA 差異「香蕉」，及水果酵素含量豐富的「木瓜」與「鳳梨」，此四種為我們實驗分析的水果樣品，觀察其萃取情形，並比較 DNA 萃取量及純度的差異。

實驗 2-1 不同水果 DNA 萃取量與純度之差異

(一)實驗步驟

- 1.將香蕉、奇異果、木瓜和鳳梨去皮後取 100g 果肉並分別加入 100g 蒸餾水加入果汁機打碎三分鐘。
- 2.分別進行 DNA 萃取標準實驗步驟與 DNA 測量步驟 2 到 12。
- 3.以吸光值及檢量線計算出樣品的濃度及純度。
- 4.重複以上步驟共 3 次，取平均值。

(二)實驗結果

萃取狀況如下圖：

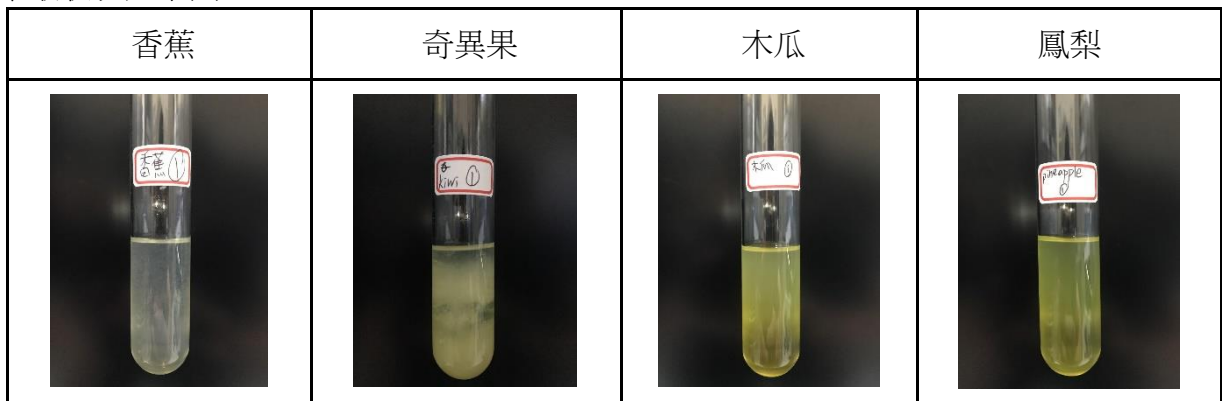


表 4-2-1 不同水果之 DNA 萃取情形

我們觀察四種水果初步萃取出來的 DNA 狀態，發現香蕉、木瓜及鳳梨的萃取物較不清楚，只有酒精跟濾液的分層有些微模糊，奇異果的 DNA 萃取物則呈明顯的棉絮狀。

接著讀取 A260 及 A280 吸光值如下表：

| | 空白值 | 香蕉 | 奇異果 | 木瓜 | 鳳梨 |
|-----------|------|------|------|------|------|
| 吸光度(A260) | 1.86 | 0.81 | 0.96 | 0.90 | 0.75 |
| 吸光度(A280) | 1.68 | 0.53 | 0.58 | 0.48 | 0.43 |

表 4-2-2 不同水果 DNA 萃取的吸光度(A260、A280)

將吸光值轉換成濃度與純度分析如下圖：

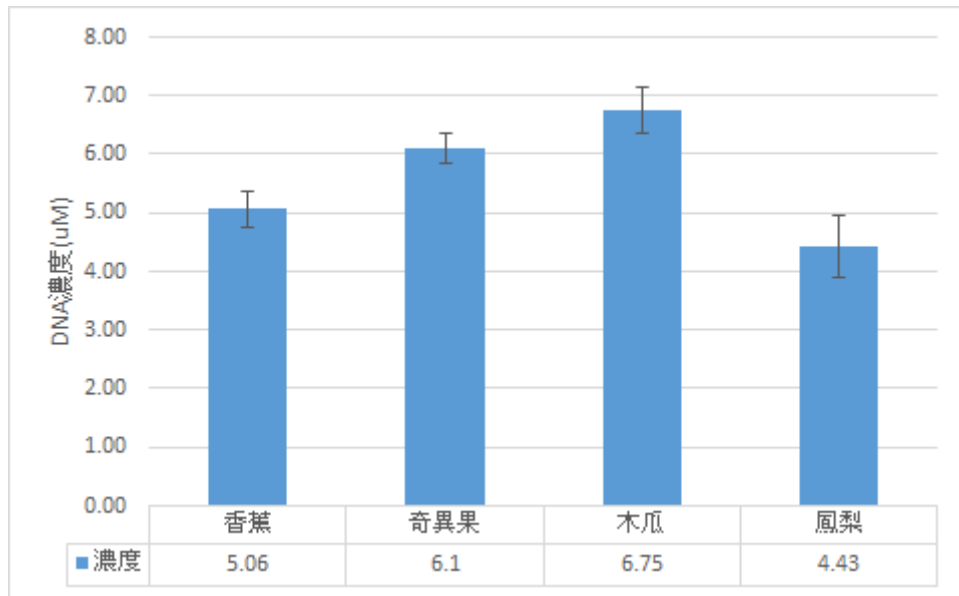


圖 4-2-1 不同水果 DNA 的濃度

由圖 4-2-1 得知，萃取出 DNA 的濃度比較：木瓜>奇異果>香蕉>鳳梨。

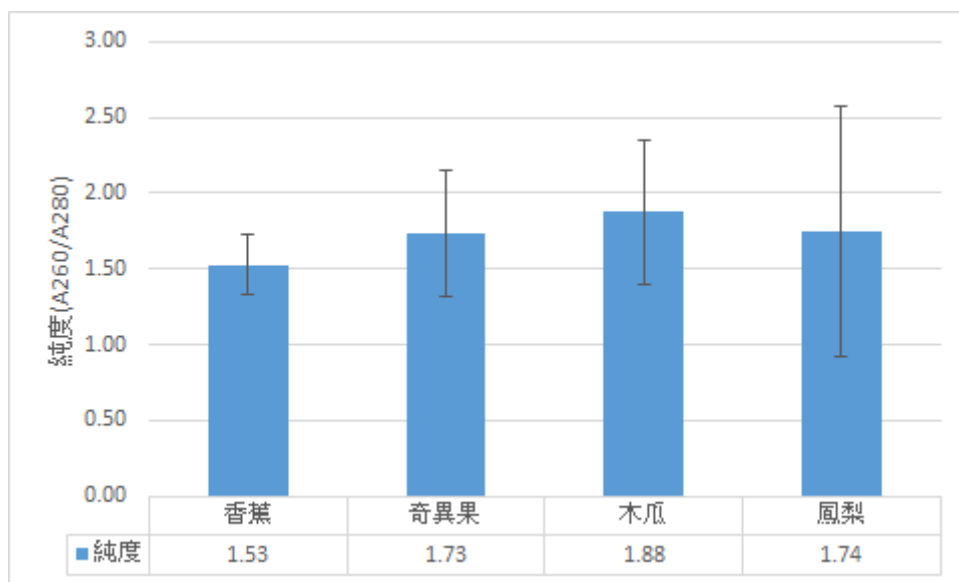


圖 4-2-2 不同水果 DNA 的純度

由圖 4-2-2 得知，不同水果 DNA 純度有些微差異，純度比較：木瓜>奇異果>鳳梨>香蕉，且鳳梨的標準差極大。

根據濃度得出的結果，我們猜測不同水果有不同的 DNA 萃取量及純度的差異，可能原因在於每種水果的細胞大小及排列密度都不同，因此影響萃取出 DNA 的濃度，所以我們再將奇異果、香蕉、木瓜及鳳梨切片，並置於顯微鏡下觀察並計算同放大倍率，與同視野範圍下的細胞數。

實驗 2-2 不同水果果肉細胞大小之比較

(一)實驗步驟

- 1.將四種水果(奇異果、香蕉、鳳梨、木瓜)去皮，用徒手切片法將果肉切出薄片樣品。
- 2.將將果肉樣品製成玻片標本。
- 3.將玻片標本以偏光顯微鏡進行觀察。因在一般複式顯微鏡下，木瓜與鳳梨果肉的細胞壁並不明顯，因此使用偏光顯微鏡調整光線進行觀察。
- 4.將顯微鏡影像進行拍照記錄，計算照片內同面積下四種水果果肉細胞數量。

(二)實驗結果

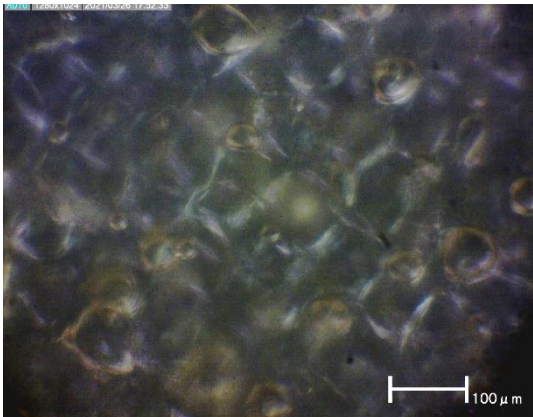
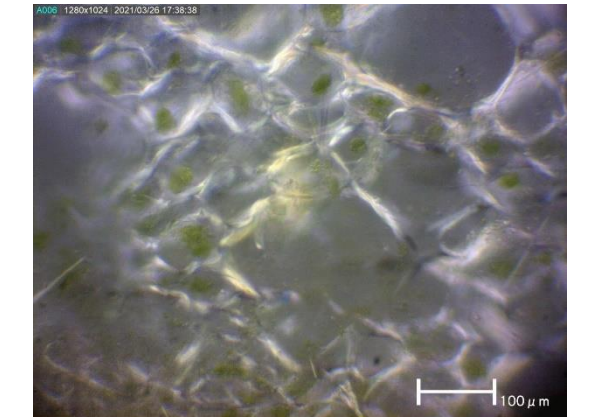


| | | | |
|----|--|-----|---|
| 木瓜 |  <p>細胞數：41</p> | 奇異果 |  <p>細胞數：35</p> |
| 鳳梨 |  <p>細胞數：30</p> | 香蕉 |  <p>細胞數：16</p> |

表 4-2-3 不同水果同面積下的細胞數

由表 4-2-3 可見鳳梨及木瓜的細胞排列整齊且大小平均，而奇異果及香蕉的細胞排列較鬆散，細胞與細胞之間的空隙較大，另外奇異果的細胞大小差距大，香蕉的細胞則大小平均。四種果肉同面積下細胞數比較：木瓜>奇異果>鳳梨>香蕉。

實驗二 討論與分析

1. 萃取結果用肉眼觀察的效果由優至劣為奇異果>木瓜>鳳梨>香蕉，但樣本的濃度由高至低則為木瓜>奇異果>香蕉>鳳梨。兩種結果比對後發現我們初步萃取出來的絮狀物多寡及形狀與 DNA 濃度無關，肉眼所見的絮狀物可能含有一定量的雜質。
2. 由實驗 2-1 可得知以不同水果進行實驗 DNA 濃度高至低為：木瓜>奇異果>香蕉>鳳梨。3. 在實驗 2-2 中，我們猜想在同面積下的細胞數量越多，萃取出來的 DNA 也會越多。我們發現從實驗 2-2 中計算出的細胞數量與萃取出來的結果相符。因此推論細胞排列密度將影響實驗結果。

實驗三、探究不同食鹽水濃度對於 DNA 溶解度差異

DNA 本身為核苷酸之聚合物，核苷酸因含有磷酸分子而帶負電，為了將其沉澱出來，必須使用含有正電之物質與其結合以抵銷電荷，故使用氯化鈉以帶正電之鈉離子中和 DNA 之電荷(文獻二)。本實驗探討步驟 7 中以不同濃度食鹽水幫助溶解，比較其效果之不同。

實驗 3-1 不同食鹽水濃度對於香蕉的 DNA 溶解度差異

(一)實驗步驟

1. 配製食鹽水 0M、0.1M、1M、2M 和 5M 各 5ml。
2. 取去皮香蕉 100g 五組，進行標準實驗步驟 1 到 6。
3. 在步驟 7 時，吸出五組內的含 DNA 液體並將其均勻混合。
4. 在步驟 8 時取出 5ml DNA 混合液，並將其分別混入 5ml 的 0M、0.1M、1M、2M 和 5M 的食鹽水中攪拌 30 秒。
5. 進行步驟 9 到 12。
6. 以吸光值及檢量線計算出樣品的濃度及純度。
7. 重複以上步驟共 2 次，取平均值。

(二)實驗結果

萃取狀況：



表 4-3-1 香蕉的萃取情況

析出物的聚集不明顯，但仍可從肉眼看出液面分為兩層，因此我們取上層液體來做吸光度分析。

空白樣品與萃取樣品吸光度讀值如下表：

| | 空白 0M | 空白 0.1M | 空白 1M | 空白 2M | 空白 5M |
|-----------|-------|---------|-------|-------|-------|
| 吸光度(A260) | 2.15 | 1.89 | 1.97 | 1.88 | 1.88 |
| 吸光度(A280) | 1.81 | 1.87 | 1.77 | 1.73 | 1.82 |

表 4-3-2 不同濃度空白食鹽水的吸光度(A260、A280)

| | 0M | 0.1M | 1M | 2M | 5M |
|-----------|------|------|------|------|------|
| 吸光度(A260) | 0.94 | 1.00 | 0.99 | 0.98 | 0.99 |
| 吸光度(A280) | 0.75 | 0.70 | 0.66 | 0.67 | 0.63 |

表 4-3-3 不同濃度食鹽水回溶的吸光度(A260、A280)

將吸光值轉換成濃度與純度分析如下圖：

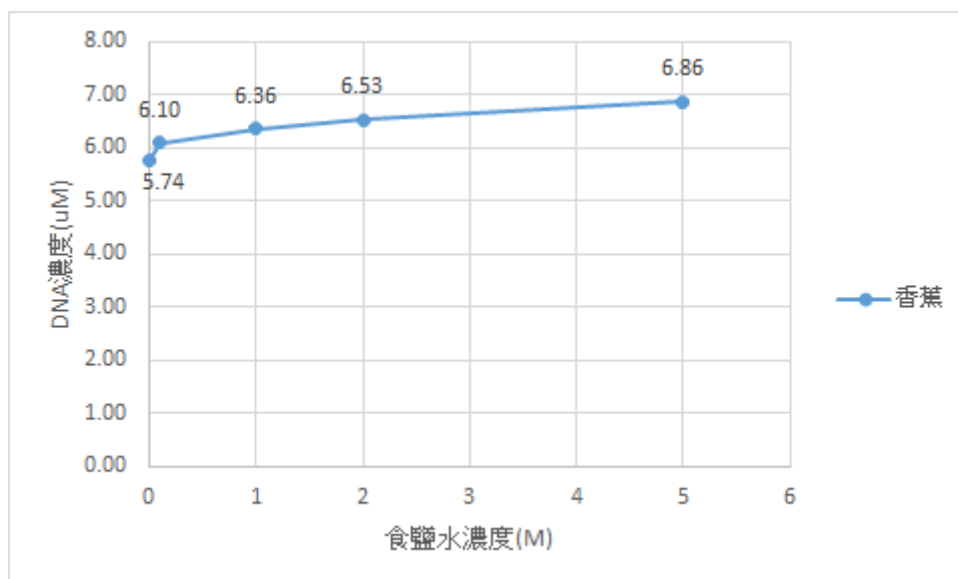


圖 4-3-1 香蕉以不同濃度食鹽水回溶的 DNA 濃度

由圖 4-3-1 可知，回溶的食鹽水濃度越高，溶解的 DNA 濃度也會越高，且在 0M 純水中，DNA 濃度偏低。

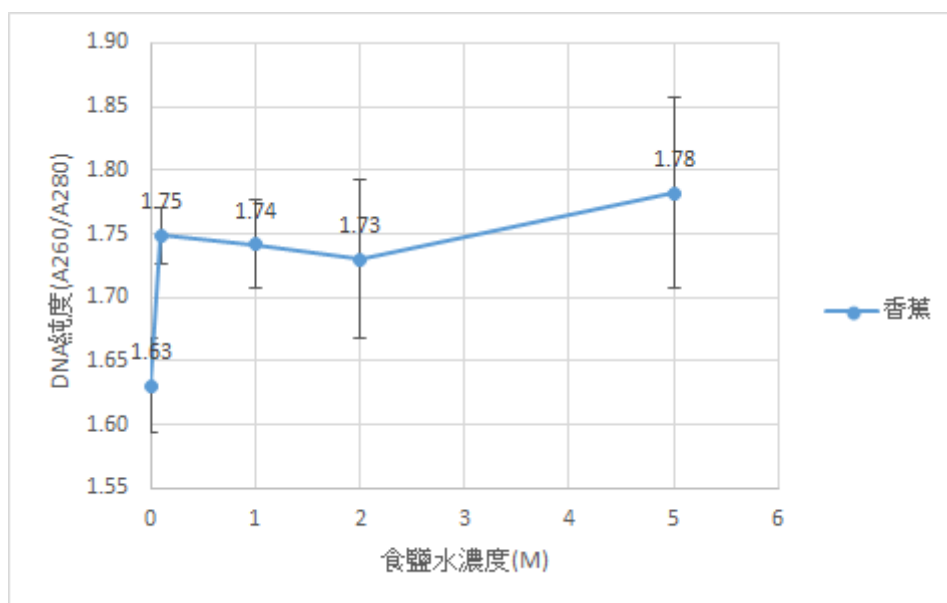


圖 4-3-2 香蕉以不同濃度食鹽水回溶的 DNA 純度(A260/A280)

由圖 4-3-2 可得知溶解在不同濃度食鹽水的 DNA 純度，並不會隨食鹽水濃度產生規律變化，用 0M 回溶的 DNA 純度較低，0.1M、1M、2M、5M 純度則都差異不大。

實驗 3-2 不同食鹽水濃度對於奇異果的 DNA 溶解度差異

(一)實驗步驟

- 1.配製食鹽水 0M、0.1M、1M、2M 和 5M 各 5ml。
- 2.取去皮奇異果 100g 五組，進行標準實驗步驟 1 到 6。
- 3.在步驟 7 時，吸出五組內的含 DNA 液體並將其均勻混合。
- 4.在步驟 8 取出等量約 5mlDNA 混合液，並將其分別加入 5ml 的 0M、0.1M、1M、2M 和 5M 的食鹽水中攪拌 30 秒讓其溶解。
- 5.進行步驟 9 到 12。
- 6.以吸光值及檢量線計算出樣品的濃度及純度。
- 7.重複以上步驟共 2 次，取平均值。

(二)實驗結果

萃取狀況如下：

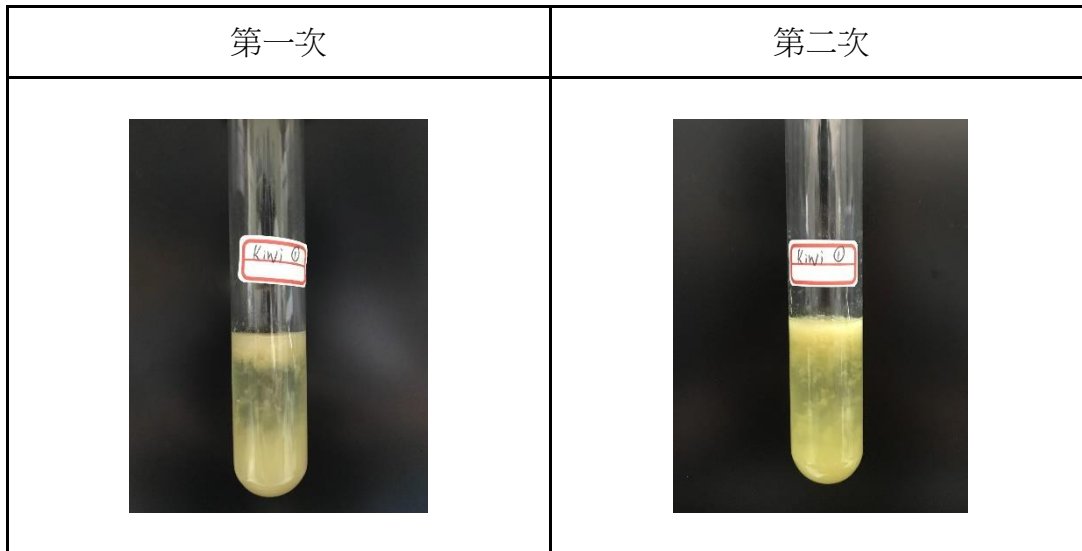


表 4-3-4 奇異果 DNA 萃取情形

初步用肉眼判斷兩次奇異果萃取結果一致，分層明顯且析出物懸浮於酒精層，空白樣與萃取樣品讀值如下表：

| | 空白 0M | 空白 0.1M | 空白 1M | 空白 2M | 空白 5M |
|-----------|-------|---------|-------|-------|-------|
| 吸光度(A260) | 2.15 | 1.89 | 1.97 | 1.88 | 1.88 |
| 吸光度(A280) | 1.81 | 1.87 | 1.77 | 1.73 | 1.82 |

表 4-3-5 不同濃度空白食鹽水吸光度(A260、A280)

| | 0M | 0.1M | 1M | 2M | 5M |
|-----------|------|------|------|------|------|
| 吸光度(A260) | 1.01 | 1.06 | 1.12 | 1.25 | 1.17 |
| 吸光度(A280) | 0.56 | 0.55 | 0.56 | 0.55 | 0.57 |

表 4-3-6 以不同濃度食鹽水回溶的吸光度(A260、A280)

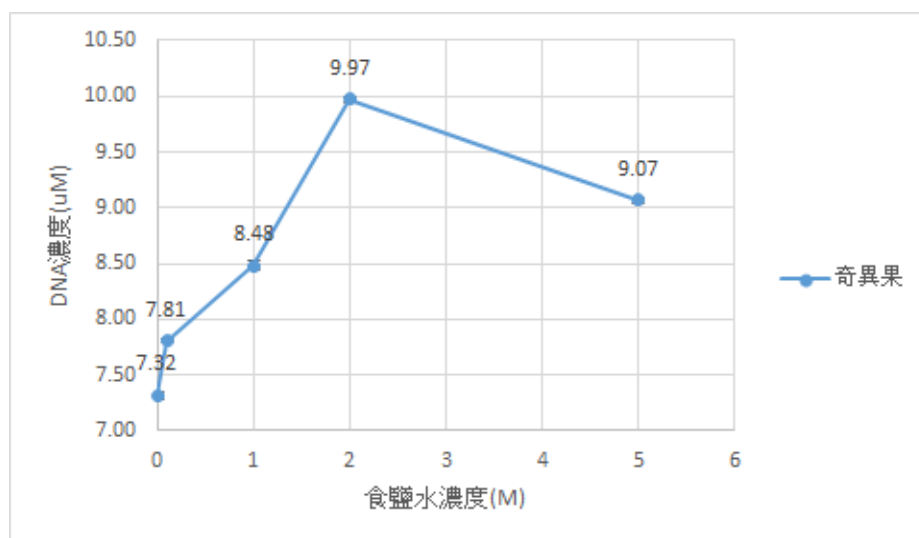


圖 4-3-3 不同濃度食鹽水回溶的 DNA 濃度

由圖 4-3-3 奇異果的 DNA 濃度與食鹽水濃度之關係圖，在 2M 食鹽水時 DNA 濃度最大，其次為 5M 食鹽水，而在 0M 食鹽水的 DNA 濃度最小。

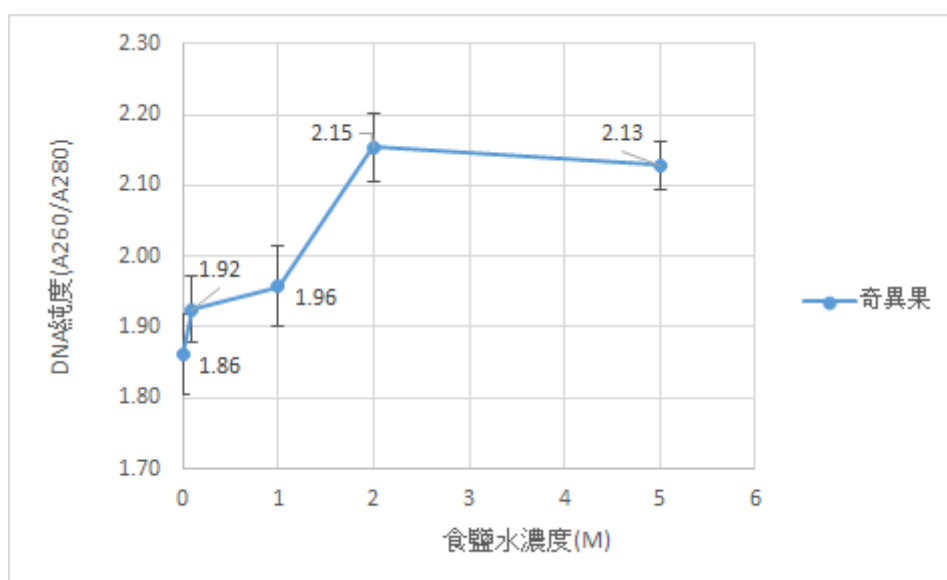


圖 4-3-4 不同濃度食鹽水回溶的 DNA 純度(A260/A280)

由圖 4-3-4 得知，五種不同濃度的食鹽水測得的 DNA 純度，皆在 1.8 以上，在 2M 和 5M 食鹽水的純度甚至達到 2 以上。

實驗三 討論與分析

- 1.從香蕉的實驗結果得知，食鹽水濃度越濃，DNA 濃度越高，表示食鹽水濃度越高，DNA 的溶解度越大，推測是因為愈多的氯離子，可和愈多染色質中的組蛋白結合，引發組蛋白與 DNA 分離，使 DNA 分子間相斥而分離，造成 DNA 溶於水(文獻二)。
- 2.雖然奇異果的 DNA 濃度並非以 5M 回溶為最佳，但萃取出 DNA 純度 2M 與 5M 皆較 0M、0.1M、1M 還高。
- 3.比較實驗 3-1 和 3-2 中，相同食鹽水濃度中香蕉與奇異果 DNA 含量及純度差異，兩者萃取狀況比較如下：

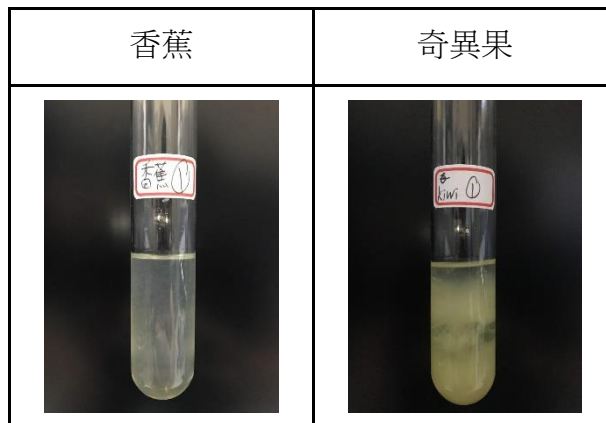


表 4-3-7 香蕉與奇異果 DNA 萃取情形

萃取物聚集情形奇異果較香蕉明顯，奇異果上層液體有明顯的絮狀物，香蕉上層則是混濁液體。因此目測奇異果萃取 DNA 效果佳。接著比較兩者的 DNA 濃度-食鹽水濃度關係圖如下：

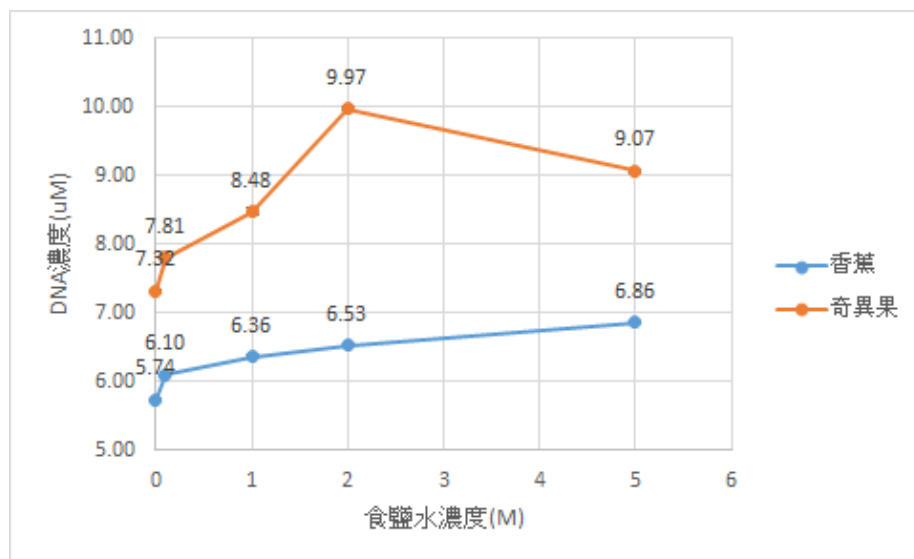


圖 4-3-5 不同濃度食鹽水回溶的 DNA 濃度

由圖 4-3-5 得知，不管任何濃度的食鹽水，奇異果的 DNA 萃取濃度皆明顯多於香蕉。香蕉的萃取 DNA 濃度會隨著食鹽水濃度上升而上升，但奇異果的萃取 DNA 濃度則是在食鹽水濃度低於 2M 時，有隨著食鹽水濃度上升呈增加的趨勢，在食鹽水濃度高於 2M 後則些微下降。

我們原先預期食鹽水濃度越高時，DNA 溶解度越高，但實驗結果與預期不符合，推測可能在奇異果果肉細胞中含有可在 2M 食鹽水中較易被溶解的蛋白質，因此在 A260 的吸光度偏高，算出的 DNA 濃度也偏高，而在香蕉中並無此現象，可能是因香蕉中蛋白質性質不同故溶解狀況不同。

我們想進一步了解奇異果與香蕉的萃取 DNA 的純度差異，因此比較兩者 DNA 純度與食鹽水濃度之關係圖如下：

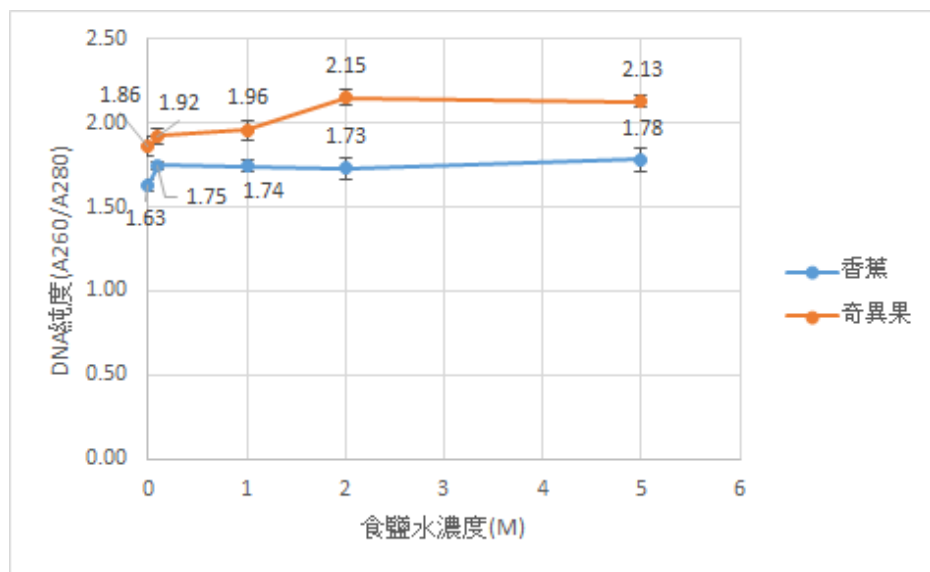


圖 4-3-6 香蕉與奇異果不同濃度食鹽水回溶的 DNA 純度(A260/A280)

由圖 4-3-6 可知香蕉在 1M 之後純度差異不大，奇異果的 DNA 純度則在 2M 前隨著食鹽水濃度上升，在 2M 之後也趨於穩定，不論是香蕉或奇異果，以純水(0M)進行 DNA 回溶的 DNA 純度皆為最低，推測食鹽水中含有鈉離子有助於 DNA 回溶，並可以幫助 DNA 與蛋白質分離，符合萃取原理。

依以上討論結果，使用 5M 食鹽水回溶理論上為最佳，但實驗過程中發現，以 5M 食鹽水進行 DNA 回溶時，會產生食鹽析出的情形，而以 2M 食鹽水回溶的 DNA 純度皆與 5M 相近，因此以後實驗維持標準步驟，均以 2M 食鹽水回溶。

實驗四、不同種類界面活性劑對 DNA 萃取結果之影響

細胞膜與細胞核的構造皆為雙層的磷脂質，可使用界面活性劑將其溶解，細胞膜與核膜溶解後，位於細胞核內之染色體便會暴露於溶液中，我們假設不同種類的界面活性劑，溶解細胞膜的效能不同，進而影響 DNA 萃取量。界面活性劑共有四個種類(陰離子、陽離子、非離子及兩性離子)，本實驗探討此四種界面活性劑對 DNA 萃取的影響。

實驗 4-1 四種界面活性劑萃取 DNA 的比較

(一)實驗步驟

- 1.測量 100g 去皮香蕉和 100ml 水各五組，進行標準實驗步驟 1。
- 2.在標準實驗步驟 2 時分為五組，分別加入 5 克之陰離子界面活性劑、陽離子界面活性劑、非離子界面活性劑、兩性離子界面活性劑、對照組(不加界面活性劑)。
- 3.進行實驗步驟 3 到 12。
- 4.以吸光值及檢量線計算出樣品的濃度及純度。
- 5.重複以上步驟共 3 次，取平均值。

(二)實驗結果

不同界面活性劑 DNA 萃取狀況如下：

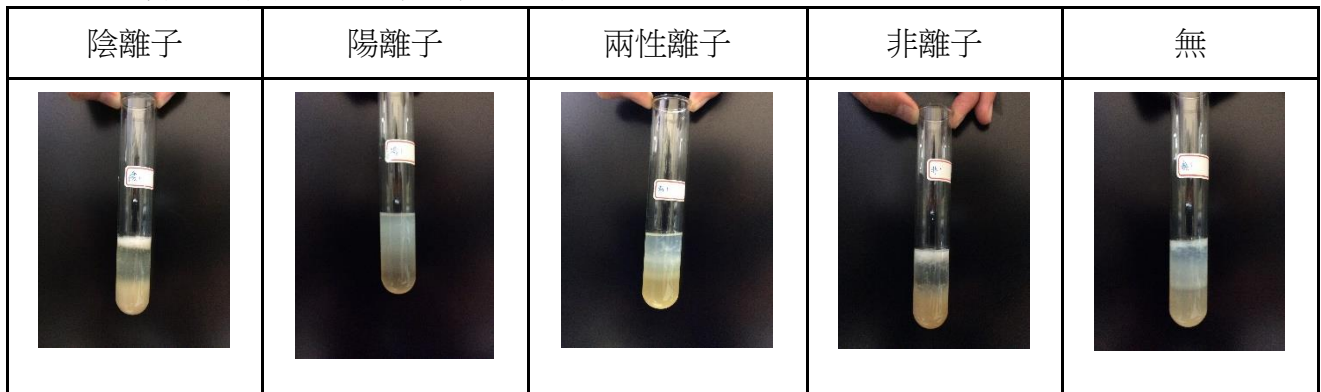


表 4-4-1 使用不同界面活性劑的析出狀態

由表 4-4-1 觀察可見，使用不同界面活性劑，進行 DNA 析出時都有明顯分層；但使用陽離子界面活性劑無明顯絮狀析出物，兩性離子界面活性劑的析出物並無浮起。

| | 空白值 | 陰離子 | 陽離子 | 兩性離子 | 非離子 | 無 |
|-----------|------|------|------|------|------|------|
| 吸光度(A260) | 2.17 | 0.6 | 1.04 | 1.02 | 1.09 | 0.68 |
| 吸光度(A280) | 1.76 | 0.47 | 0.68 | 0.61 | 0.75 | 0.51 |

表 4-4-2 使用不同界面活性劑的吸光度(A260、A280)

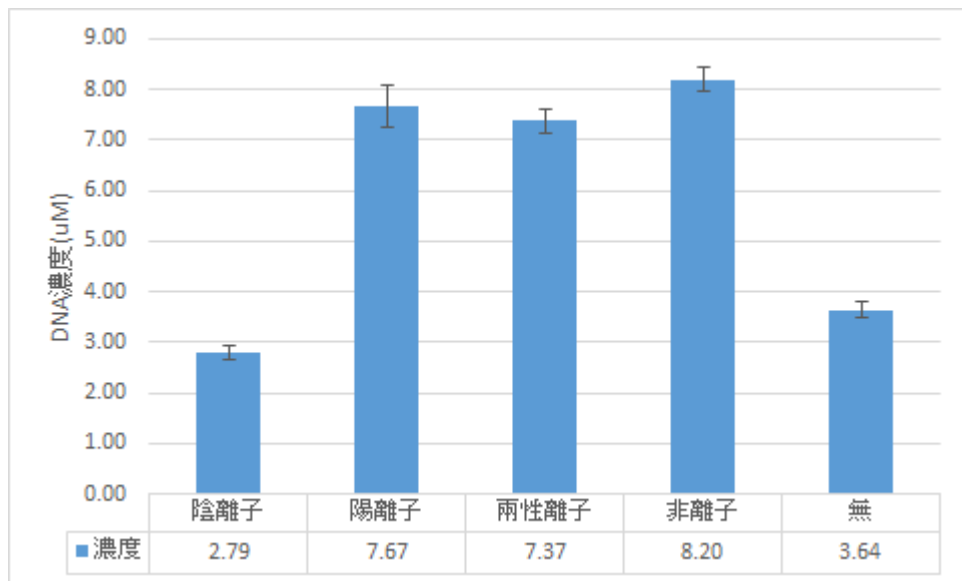


圖 4-4-1 使用不同界面活性劑的 DNA 濃度

使用不同界面活性劑的 DNA 濃度非離子>陽離子>兩性離子>無(對照組)>陰離子，其中陰離子與對照組明顯較其他三者低。

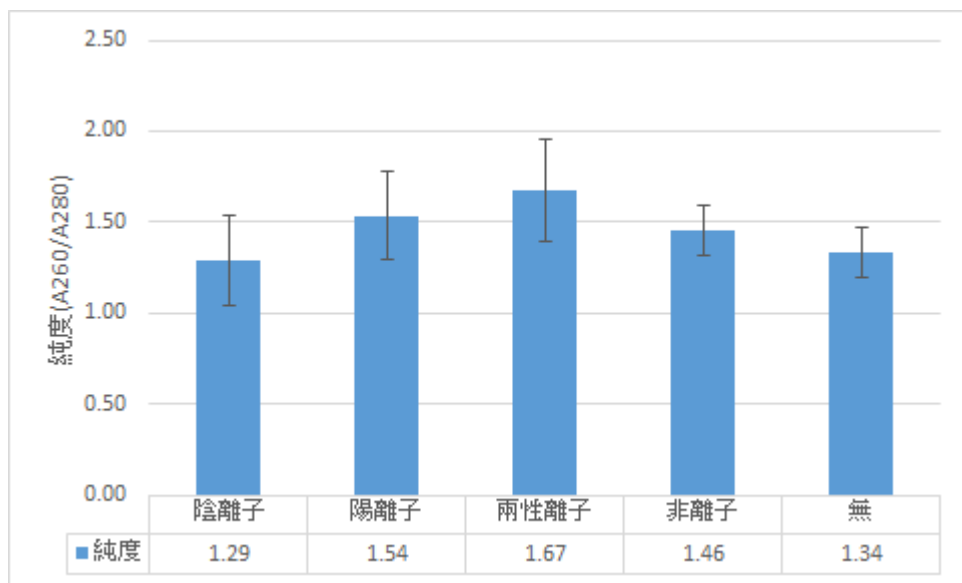


圖 4-4-2 使用不同界面活性劑的 DNA 純度(A260/A280)

由圖 4-4-2 可知，萃取所得 DNA 純度為兩性離子最佳，其次依序為陽離子、非離子、無(對照組)、陰離子。

實驗 4-2 四種界面活性劑溶解細胞核膜的速率差異比較

為了確認實驗 4-1 的結果是否與界面活性劑溶解細胞核膜的效率有關，所以我們取洋蔥的表皮細胞並將其細胞核用碘液染色，置於顯微鏡下觀察並錄影紀錄不同界面活性劑加入至細胞開始模糊消失的時間，藉此比較四種界面活性劑對細胞核膜溶解效果。

(一)實驗步驟

- 1.剝下洋蔥表皮細胞置於載玻片上。
- 2.將碘液滴在表皮細胞上等待數分鐘使其染色。
- 3.蓋上蓋玻片並置於顯微鏡上觀察。
- 4.開始錄影後從玻片側邊滴入界面活性劑。
- 5.觀察細胞核狀況並記錄秒數。

(二)實驗結果

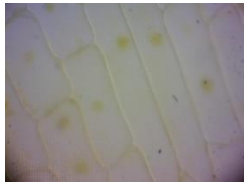


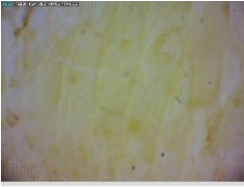


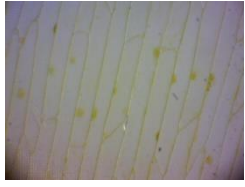

| 界面活性劑 | 加入前 | 加入後 | 備註 |
|-------|---|---|------------------------|
| 兩性 |  |  | 加入界面活性劑後約 40 秒細胞核淡化並消失 |
| 非離子 |  |  | 加入界面活性劑後約 34 秒開始有細胞核消失 |
| 陽離子 |  |  | 加入界面活性劑後約 66 秒細胞核淡化 |
| 陰離子 |  |  | 加入界面活性劑後直至第三分鐘都無任何變化 |

表 4-4-3 加入不同界面活性劑後細胞溶解的情形

由表 4-4-3 可得知界面活性劑溶解細胞膜速度的比較由快至慢為：非離子>兩性>陽離子>陰離子。

實驗四 討論與分析

- 1.比較表 4-4-1 使用不同界面活性劑的析出狀態及圖 4-4-1 使用不同界面活性劑的 DNA 濃度 (A260)可得知，使用了陽離子及兩性離子界面活性劑的濾液進行 DNA 析出，懸浮物並不明顯，但在回溶後以自製光度計測量 DNA 濃度(A260)，DNA 的濃度較預期為高，由此可知，以肉眼觀察的結果與實際不一定相符。
- 2.比較實驗 4-1 及實驗 4-2 的實驗結果，發現使用不同界面活性劑進行 DNA 萃取的濃度差異與 DNA 溶解植物細胞核膜效率有關，且使用非離子界面活性劑不論是在 DNA 濃度或是在溶解細胞核膜時效果皆最佳，而使用陰離子界面活性劑則是在 DNA 濃度及溶解細胞膜速度皆為最差，由此推論界面活性劑溶解核膜效率越高，進行 DNA 萃取的濃度越高。
- 3.但兩性離子界面活性劑純度最高，濃度又和非離子界面活性劑只有些微差異，溶解核膜效率僅次於非離子界面活性劑，所以在萃取香蕉 DNA 實驗中還是使用兩性離子界面活性劑效果最佳。

實驗五、探究二倍體香蕉和三倍體香蕉萃取 DNA 後的異同

我們懷疑不同染色體倍數的水果可能會影響 DNA 萃取的量。我們根據文獻得知，台灣常見的北蕉為三倍體，而廣泛種植於泰國及馬來西亞的旦蕉則為二倍體(文獻七)。因此此實驗將比較北蕉及旦蕉 DNA 萃取的差異。

實驗 5-1 不同倍體香蕉的萃取差異

(一)實驗步驟

- 1.分別測量 100g 的北蕉及旦蕉去皮後的果肉，以及配製兩杯 100g 的 5M 食鹽水。
- 2.分別進行標準實驗步驟 1 到 9。
- 3.在步驟 10 時先將濾出液以 2M 時鹽水兩倍稀釋，再進行步驟 10 到 12。
- 4.以吸光值及檢量線計算出樣品的濃度及純度。
- 5.重複以上步驟共 3 次，取平均值。

(二)實驗結果

萃取狀況如表 4-5-1：

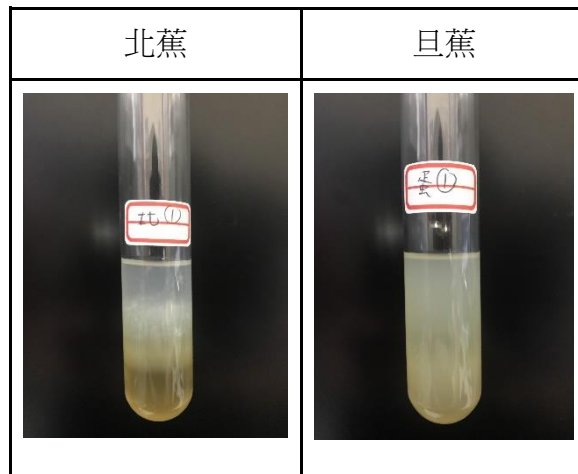


表 4-5-1 北蕉與旦蕉的析出狀態

北蕉及旦蕉析出時皆有明顯分層，北蕉的 DNA 萃取物有明顯絮狀物，旦蕉則是混濁的上層液。

| | 空白 | 北蕉 | 旦蕉 |
|-----------|------|------|------|
| 吸光度(A260) | 1.87 | 0.90 | 1.01 |
| 吸光度(A280) | 1.75 | 0.62 | 0.68 |

表 4-5-2 不同染色體倍數之香蕉的吸光度(A260、A280)

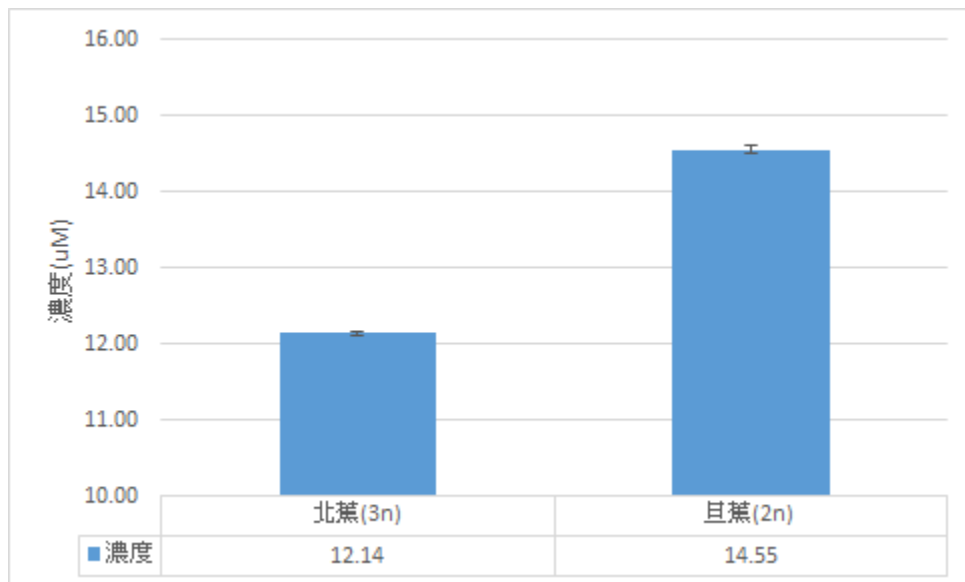


圖 4-5-1 北蕉與旦蕉的 DNA 濃度

由圖 4-5-1 可得知旦蕉(2n)萃取到的 DNA 濃度明顯高於北蕉(3n)。

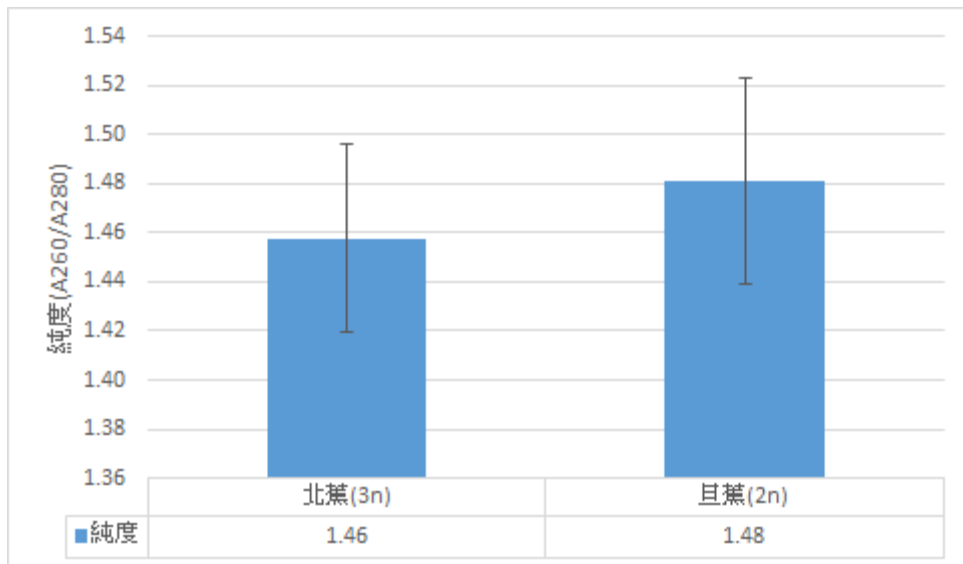


圖 4-5-2 北蕉與旦蕉的 DNA 純度比較(A260/A280)

由圖 4-5-2 得知，計算得到的 DNA 的純度：旦蕉>北蕉，但差異不大，僅相差 0.02。因為此結果與我們預期中北蕉(3n)DNA 萃取量應該大於旦蕉(2n)不符，因此進行實驗 5-2，想進一步了解是否兩者細胞大小有差異。

實驗 5-2 比較北蕉及旦蕉同視野下細胞大小

(一)實驗步驟

- 1.將兩種水果(旦蕉、北蕉)去皮，用徒手切片法將果肉切出薄片果肉樣品。
- 2.將果肉樣品製成玻片標本。
- 3.以偏光顯微鏡觀察樣本。因在一般複式顯微鏡下，果肉的細胞壁並不明顯，因此使用偏光顯微鏡調整光線進行觀察。
- 4.影像拍照紀錄後，計算照片內同面積下細胞數量。

(二)實驗結果

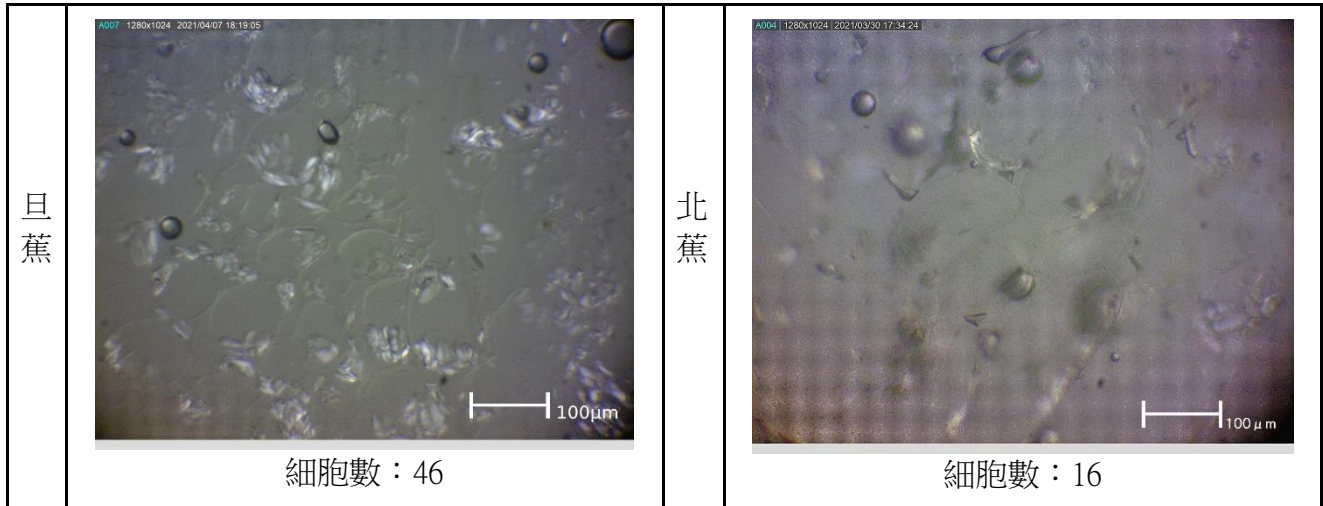


表 4-5-3 不同倍體數(且蕉與北蕉)在同倍率下的細胞數

表 4-5-3 可觀察到北蕉單一細胞較大，且蕉單一細胞較小，且同單位面積範圍內，且蕉的細胞數目明顯多於北蕉。

實驗五 討論與分析

- 1.原本預期北蕉(3n)的 DNA 萃取量會多於且蕉(2n)，但進行了三次實驗結果 DNA 濃度皆為且蕉高於北蕉，我們推測是否且蕉的蛋白質雜質較多導致 A260 讀值偏大。但從 A260/A280 純度分析，發現且蕉 DNA 萃取物的純度仍高於北蕉。
- 2.進一步觀察兩者的果肉細胞才發現，同單位面積下，北蕉細胞數目較少、且蕉細胞數目較多，進而影響從細胞核萃取出來的 DNA 量多寡差異。從此實驗結果我們推測萃取時細胞數量的影響遠大於染色體套數的差異。

伍、綜合討論

一、影響萃取物穩定度之因素

- (一)不同成熟度的水果，在步驟 1 打出來的果肉溶液濃稠度會有差異，如：香蕉越青澀，果肉溶液越濃稠，因此過濾時需要耗費較久時間，甚至須等到隔天才能進行下一個實驗步驟，拉長實驗時間可能造成 DNA 容易被破壞。因此我們會挑選熟度適中的水果樣品進行實驗。
- (二)不同區域栽植的水果可能會有品種之差異性，因此同一次實驗儘量用同一批水果，例如使用同一串香蕉來進行單一次實驗，並以多次實驗取平均值來進行分析討論。
- (三)有些操作的細微之處，例如：在操作標準步驟 6 時，析出 DNA 完全以人工混合酒精與濾液，操作手法不同易影響分層，使分層不明顯或破壞分層，不易於吸出析出物。或在標準步驟 7 時，若 DNA 萃取物分層不明顯，用滴管吸取時容易混入下層雜質，導致測量出的 DNA 純度較低。因此我們儘量以同一人操作同一次實驗，且每次實驗中的同一個項目皆做兩管取平均，如實驗五中，且蕉與華蕉之比較，在一次實驗中會萃取且蕉兩管、北蕉兩管，分別讀取吸光值再取平均來計算濃度與純度，避免因為人為因素導致實驗誤差。
- (四)有時候因實驗時間較長的因素，需要先將吸出的 DNA 萃取物樣品低溫保存在冰箱，隔天再進行回溶，但擔心低溫可能影響其回溶時 DNA 的溶解度，進而影響吸光讀值，必須先放置室溫退冰再進行回溶。

二、DNA 萃取量之變因分析

- (一)不同水果的萃取差異量主要與同面積下細胞數量有關，同面積下細胞數量越多的水果，進行 DNA 萃取後的 DNA 濃度會越高。在實驗五中，亦看到相同的結果，只是二倍體與三倍體的影響遠小於同面積下不同細胞數量對 DNA 濃度的影響。
- (二)實驗三結果得知，食鹽水濃度越高，對 DNA 的溶解度越大，因此可判斷在標準步驟三使用高濃度的食鹽水，增加 DNA 溶解度，提升 DNA 萃取效果，但我們沒有做出如文獻那樣的「微笑曲線」，在 0.14M 溶解度最低，推測是因為粗萃時可能含有較多蛋白質雜質，所以純水無法有效分離雜質及 DNA，導致 A260 吸光度和 A260/A280 皆偏低。
- (三)經過實驗四的結果，可得知兩性離子界面活性劑在 DNA 萃取實驗中效果最佳。其次為非離子、陽離子界面活性劑，在比較四種界面活性劑溶解洋蔥細胞核膜速率的實驗中，亦有相似的結果，因此這三類的使用在萃取 DNA 實驗中，皆可使用。

陸、結論

- 一、自製光度計之準確性有其限制濃度範圍，在 DNA 濃度低於 3uM 時準確度會下降。
- 二、在進行 DNA 粗萃取實驗時，可選用同面積下細胞數量較多的水果(如：奇異果、木瓜)，萃取出來的 DNA 量較大。
- 三、食鹽水濃度越高，DNA 溶解度越大，可繼續使用高濃度食鹽水進行實驗。
- 四、實驗中使用的界面活性劑則是建議避免使用到陰離子界面活性劑(如：肥皂、合成洗劑或洗髮精等)。
- 五、不同套數的染色體比較，實驗五的結果中雖然沒有看到差異，甚至相反，但在本研究中僅比較北蕉(3n)與旦蕉(2n)一種，建議未來相關研究可以再多比較其他物種的雙倍與多倍體。

柒、參考資料及其他

- 一、高瞻自然科學教育平台 • 核糖核酸 • 取自 <https://pse.is/3ddx6z>
- 二、蔡任圃 • 非你所想-DNA 粗萃取的原理與延伸探究活動 • 取自 <https://reurl.cc/bzDGY3>
- 三、蘇裕昌 • 界面活性劑的基礎及應用 • 取自 <https://pse.is/39pik5>
- 四、謝議範 • 以融合微滴電噴灑游離質譜法消除蛋白質分析時有機鹽類和界面活性劑所造成的困擾 • 取自 <https://pse.is/3e2wcm>
- 五、龍騰文化 • 技高生物 • 取自 <https://pse.is/3cggqt>
- 六、豐技生物科技 • DNAQC 品管攻略! • 取自 <http://yt1.piee.pw/3cnzav>
- 七、台灣香蕉研究所 • 漫談台灣芭蕉栽培品種 • 取自 <https://pse.is/3dgv4h29>