N1 染色體 DNA 分離與檢定

王 愛 玉

DNA 是由核苷酸 (nucleotide) 聚合而成的生物巨分子，為細胞中重要的遺傳物質。本實驗是以大腸桿菌為材料，學習染色體 DNA 的抽取，繼而進行瓊脂糖膠體電泳檢定 DNA 的完整性，並以測定 UV 吸光值來定量及檢定純度。得到的 DNA 將用在 N2 中，以 polymerase chain reaction 來選殖 *lacZ* 基因片段。

1.1 背景知識

本實驗將展示：(1) 細菌染色體 DNA 的分離與純化、(2) 核酸定量法、以及 (3) 瓊脂糖膠體電泳法，這些都是在核酸操作上常用的技術，學習得這些方法及原理後，未來可應用在不同材料核酸的抽取與檢定上。

1.1.1 細菌染色體 DNA 的分離與純化

本實驗所用的方法是修改自 Marmur (1961) 所提出之方法，包括下列步驟：

a) 破菌：以含有 lysozyme、EDTA 及 RNase 的溶液處理菌體。lysozyme 可水解細菌細胞壁中 peptidoglycan 的糖苷鍵，使得菌體無法承受滲透壓逆境而破裂；EDTA 可抑制 DNases 的活性，防止 DNA 受到 DNases 的作用；RNase 則可水解細胞中的 RNA。接著再加入 SDS 將細胞膜徹底瓦解，並使 DNases 及其它蛋白質發生變性。

b) 去除蛋白質：加入高濃度的鹽，使結合於 DNA 上的蛋白質完全脫離 DNA，再依序以酚/氯仿/異戊醇 (phenol/chloroform/isoamyl alcohol) 及氯仿/異戊醇各萃取一次，離心後，溶液可被分離成有機溶液層及含有 DNA 之水溶液層，中間界面則聚集了被酚及氯仿變性的蛋白質。

c) 分離沈澱 DNA：去除蛋白質後之 DNA 溶液，加入酒精使 DNA 沈澱，離心後之沈澱即為純化之 DNA。

1.1.2 DNA 定量法

DNA 定量的方法有很多，也各有優缺點，以下為常用的方法：

a) 測定 260 nm 之吸光值：核酸中的鹼基可以吸收紫外光，使得 DNA 及 RNA 在 260 nm 具最大吸光值。測定核酸溶液之 A_{260}，利用 Beer-Lambert 定律，可以求得核酸之濃度。這個方法的優點是簡單快速而且對樣品不具破壞性，然而此法對 DNA 及 RNA 並不具區別性。此外，樣品溶液若含有其它會吸收紫外光

的物質則會造成干擾。核酸樣品中最常有的其它吸光物質為蛋白質，因此除了測定 A_{260} 外，需同時測定 A_{280}，以估計核酸溶液的純度。純化的 DNA 及 RNA 之 A_{260}/A_{280} 比值應分別接近 1.8 及 2.0，當溶液中含有蛋白質時，會造成 A_{260}/A_{280} 比值降低，在此種狀況下，以此法估計 DNA 的量是不準確的。

b) Hoechst 33258 定量法：Hoechst 33258 為 bis-benzimidazole 螢光染劑的一種，可結合於雙股 DNA 之 minor grooves 上。Hoechst 33258 與 DNA 結合後，對 365 nm 的光有最大之吸收值，而後在 458 nm 有最大螢光釋出量。由測定螢光值，與標準曲線比對後，可得知 DNA 之濃度。此法比測定 A_{260} 方法靈敏，並且對 DNA 具專一性。然而，Hoeschst 33258 與小於 1 kb 之 DNA 結合不佳，因此在使用上受到限制；此外，此染劑主要結合於 A-T rich 區域，因此 DNA 中 A-T 的含量也會影響測定的結果。加入 Hoechest 33258 的 DNA 溶液無法再回收使用。

c) Ethidium bromide (EtBr) 定量法：EtBr 可嵌入 DNA 或 RNA 之雙股結構中，吸收紫外光後，可釋出螢光。可在樣品中加入一定量的 EtBr 後，測定樣品在 590 nm 螢光值，與標準曲線比對，由內差法求得 DNA 含量。然而比較常用的估計法並非直接測定螢光值，而是將未知濃度樣品 DNA 與數個已知量標準 DNA 分別與 EtBr 混合後，取等體積點在保鮮膜或 agarose 膠體上，或進行膠體電泳後，以 UV 燈照射並觀察比較各樣品之亮度，找出與未知濃度 DNA 樣品亮度相當之標準 DNA，此標準 DNA 之量即可視為未知濃度 DNA 樣品之估計量。此法常用於 DNA 少而無法測定吸光值或樣品中含有大量會吸收紫外光之物質時。

1.1.3 瓊脂糖膠體電泳法

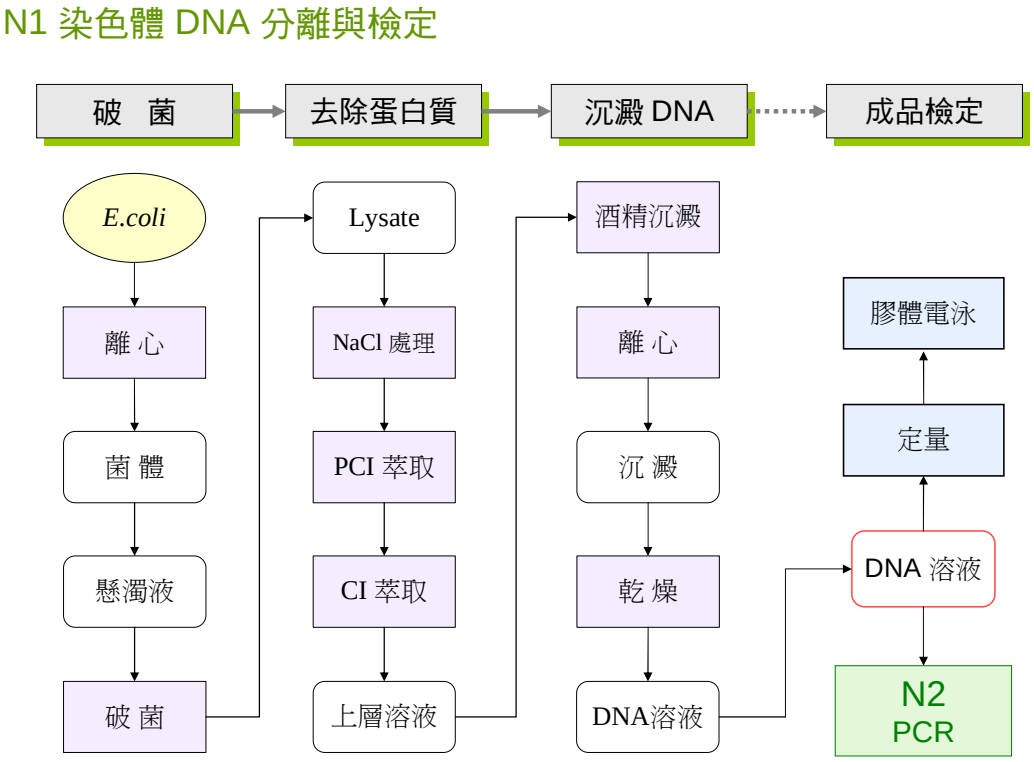
電泳不僅是分析蛋白質的利器外，也是分離、檢定核酸的重要技術，藉由電泳的結果可以得知核酸的分子量、純度、結構、與蛋白質之交互作用等等。常用的系統有聚丙烯醯胺 (polyacrylamide) 膠體電泳與瓊脂糖 (agarose) 膠體電泳兩種，前者用於分離分子量較小之核酸（例如 500 bp 以下的 DNA）或用於核苷酸定序、gel mobility shift assay 等；後者則廣泛用於較大分子之核酸分離檢定。本實驗是以一般傳統的瓊脂糖膠體電泳來檢定抽取到的 DNA 是否有 RNA 未完全去除，以及抽取過程中是否造成 DNA 被水解或斷裂。事實上，要分離大於 50 kb 之 DNA 需要用到 pulsed field gel electrophoresis (PFGE) 才能達到分離的目的。

a) 瓊脂糖：由海藻中分離的多醣，為洋菜 (agar) 中的成分之一，主鏈是由 agarobiose [D-galactose ($\beta1\rightarrow\alpha4$) 3,6-anhydro-L-galactose] 聚合而成，側鏈則由 6-methyl-D-galactose 組成。瓊脂糖加熱溶解後，在水溶液中是以 random coil 的狀態存在 ，隨著溫度降低，兩條瓊脂糖聚醣鏈可互相形成雙股螺旋，雙股螺旋間又彼此結合形成具有孔洞的膠體結構。孔洞大小隨著 agarose 的濃度而

異，也影響了分子分離的程度，所以在進行電泳前需針對樣品中核酸的大小選擇適當的膠體濃度。

b) 影響 DNA 在膠體中泳動的因素：DNA 在膠體中的泳動率會受到分子量及構形的影響。相同構形的 DNA，分子量越小，泳動越快；同一種 DNA 以不同構形存在時，不同構形的泳動率不同，例如，質體 DNA 之 supercoiled 形式會比 relaxed circular 形式泳動快。此外，膠體濃度、電泳緩衝液、電壓、是否存在 intercalating dye 等外在因素均會影響 DNA 的泳動率及分離情形。

1.1.4 實驗大綱



1.2 由大腸桿菌中分離純化染色體 DNA

1.2.1 儀器設備

a) 微量離心機
   - ◆ 請先熟悉使用方法並注意平衡問題。

b) 37℃水浴鍋或培養箱

c) 60℃水浴鍋

1.2.2 藥品試劑：

a) NaCl/EDTA 溶液：0.15 M NaCl, 0.1 M EDTA (pH 8.0)

b) Lysozyme：50 mg/mL，置冰浴上。

c) RNase A: 10 mg/mL

d) SDS 溶液：25%，溶於水中。

e) NaCl：5 M，溶於水中。

f) Phenol/$CHCl_3$/IAA 混合液 ：Phenol、chloroform 與 isoamyl alcohol 以體積比 25:24:1 混合，4℃避光貯存，於通風櫥中取用。

◆ 具灼傷性及毒性，請小心使用！

g) $CHCl_3$/IAA 混合液：chloroform 與 isoamyl alcohol 以體積比 24:1 混合，4℃避光貯存，於通風櫥中取用。

◆ 具毒性，請小心使用！

h) 絕對酒精（或 95%酒精）及 70% 酒精

i) TE-8.0：10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, pH 8.0。

1.2.3 操作步驟：

破菌：

1) 每組有兩管菌液（每管 1.5 mL），將菌液以 6000 rpm 離心 5 min。離心後，倒掉上清液，並以微量吸管吸去殘留液體，保留沈澱（菌體）部分。
2) 每管加入 0.25 mL NaCl/EDTA 溶液，將菌體充分懸濁後，加入 10 μL lysozyme 溶液及 20 μL RNaseA，小心混合均勻後，置於 37℃水浴鍋或培養箱中反應 30 min。
3) 每管加入 20 μL 25% SDS 溶液，以試管尖小心攪拌混合均勻。將離心管蓋緊，置於 60℃水浴鍋 10 min 後，移至裝有冷水之燒杯中，使之冷卻至室溫。

去除蛋白質：

◆ 步驟 4 及 5 請戴手套操作。

4) 每管加入 90 μL 5 M NaCl，小心混合均勻後，加入 0.4 mL Phenol/$CHCl_3$/IAA (PCI) 混合液。蓋緊管蓋，慢慢將離心管反覆上下搖晃 5 min。

◆ 不可以劇烈震盪！

5) 以 10000 rpm 離心 10 min 後，小心將上層溶液吸至乾淨離心管中（注意不要吸到中間界面），再加入 0.4 mL $CHCl_3$/IAA (CI) 混合液，蓋緊管蓋，慢慢將離心管反覆上下搖晃 5 min，以 10000 rpm 離心 5 min。

沈澱 DNA：

6) 離心後， 將上層溶液吸至乾淨離心管中，加入 0.8 mL 絕對酒精，小心混合

均勻，置室溫 10 min。

7) 以 10000 rpm 離心 10 min 後，吸去上清液，保留沈澱（沈澱即為 DNA）。每管加入 1 mL 70% 酒精，蓋緊管蓋，上下混合後，以 10000 rpm 離心 1 min。吸去上清液（小心別吸到 DNA 或把 DNA 倒掉了！），沈澱再以 70% 酒精重複清洗及離心三次。去除上清液後，將離心管置回離心機，離心 10 sec 後取出，以微量吸管儘可能吸去殘留液體。將管蓋打開，待沈澱表面乾燥後，蓋緊管蓋，標示好組別後交給助教貯存，下週請繼續步驟 8 之操作及 1.3 ~ 1.4 之實驗。
8) 每管加入 100 μL TE-8.0，以吸管尖緩慢吸放溶液，使沈澱完全溶解。

1.3 定量 DNA

1.3.1 儀器設備：

a) 分光光度計
b) 石英測光管

1.3.2 藥品試劑：

a) TE-8.0
b) 1.2 純化之 DNA

1.3.3 操作步驟：

稀釋 DNA 溶液：

1) 緩慢吸取 20 μL DNA 溶液至乾淨微量離心管中，加入 1 mL TE-8.0，充分混合均勻。

測定吸光值：

2) 光度計波長設定於 260 nm，以 TE-8.0 歸零後，測定 DNA 溶液之吸光值。
3) 光度計波長調整於 280 nm，以 TE-8.0 歸零後，測定 DNA 溶液之吸光值。

1.4 以瓊脂糖膠體電泳分析 DNA

1.4.1 儀器設備：

a) 迷你電泳槽及鑄膠器 (Mupid II)
b) UV transilluminator 及膠片影像分析系統
c) 防護面罩

1.4.2 藥品試劑：

a) 瓊脂糖粉末

b) 1×TAE 電泳緩衝液：40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA, pH 8.0。

c) 10×追蹤染劑：0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol, 0.1 M EDTA, 50% glycerol

d) Ethidium bromide (EtBr) stock solution：500 μg/mL，裝於滴瓶中，每 50 mL 膠體溶液加一滴（最終濃度為 0.5 μg /mL）

◆ EtBr 為突變劑，請小心！

e) DNA 標準分子量：λ DNA/*Hin*dⅢ Fragments，包含 8 個片段，大小分別為 23.1, 9.4, 6.5, 4.3, 2.3, 2.0, 0.56, 0.125 kb，濃度為 0.5 μg/μL，以下簡稱 λMr。

1.4.3 操作步驟：

膠片製備：

1) 每組製備一片 6-well 0.8% agarose gel：秤取適量 agarose 粉末後，加入 1×TAE（小片 Mupid II 膠片約需 20 mL），以微波爐加熱溶解後，置 55℃水浴降溫。

◆ 此部分請每大組之第一小組同學統一製備四組的膠體。

◆ 鑄膠及電泳等步驟請戴手套操作。EtBr 為突變劑，請小心！

2) 加入 EtBr（每 50 mL 膠體溶液加一滴 stock solution），混合均勻，將膠體溶液倒入鑄膠模，插上齒模，置室溫至少 30 分鐘使凝結。

準備 DNA 樣品：

3) 每管染色體 DNA 各取 2 及 10 μL 兩種體積，分別置於微量離心管中（請標示清楚），各加入 1 μL 10×追蹤染劑。

4) 將染色體 DNA 及 λMr （已經加入追蹤染劑） 置 65℃ 水浴 5 ～ 10 min 後，立即移置冰浴中。

電泳：

5) 小心拔開齒模（0.7% 膠片較脆弱，要小心！），將膠片置於電泳槽中，倒入 1×TAE，直至溶液蓋過膠片。

6) 將各個 DNA 樣品加入樣品槽中，蓋上電泳槽之透明蓋。以 50 V 進行電泳，待追蹤染劑 bromophenol blue 行進至膠體三分之二處時，關閉電源，取出膠片，以 UV transilluminator box 觀察色帶位置，並記錄結果。

1.5 結果報告與討論

◆ 實驗報告格式請參考第 8 頁。

1.5.1 結果報告：

a) 簡單描述你所得到的 DNA 沈澱的顏色、大小，以及溶解的狀況。

b) 記錄 A_{260} 及 A_{280} 之值，計算原液中 DNA 濃度及 DNA 總量 （請寫出算式）。並計算 A_{260}/A_{280} 之值。

c) 列出電泳結果，每一行加入之樣品及加入的量要標示清楚。

1.5.2 問題與討論

a) 說明在實驗操作過程中應注意的事項。

b) 實驗過程中，是否觀察到一些特殊現象？

c) 說明在實驗過程中你遇到的問題，並請提出可能的解決方法。

d) 由你所得到的電泳圖譜可以說明哪些事情？

e) 由 A_{260}/A_{280} 之值，如何評估 DNA 的純度？請就你得到的數據及電泳結果，討論你所抽取的 DNA 之質與量。

f) 如果 DNA 溶液以 100℃加熱 15 min 後，立即置冰浴冷卻， 再測定 A260，結果會有什麼不同？

g) 若今天要抽取的是動物細胞 DNA，我們所用的方法中，哪些步驟可能需要修改？

1.6 參考文獻：

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith, JA, Struhl K (1987) Current Protocols in Molecular Biology. Vol.1. John Wiley & Sons, Inc. New York

Boyer RF (1993) Modern Experimental Biochemistry, 2nd ed. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.

Marmur J (1961) A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. J Mol Biol **3**: 208.

Micklos DA, Freyer GA (2003) DNA Science: A First Course, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Sambrook J, Russell DW (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd ed. Vol 1 & 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Switzer RL, Garrity LF (1999) Experimental Biochemistry, 3rd ed, W. H. Freeman and Company, New York.

N1　染色體 DNA 分離與檢定 實驗報告

班次：＿＿＿＿　組別：＿＿＿＿　姓名：＿＿＿＿＿＿　學號：＿＿＿＿＿＿

I. 實驗目的：

（簡要列出本實驗之目的）

II. 材料與方法：

（列出主要實驗材料及主要方法）

◆ I、II 兩項敘述以一頁為限。

III. 實驗結果：

1. 分離出之 DNA 的特性：

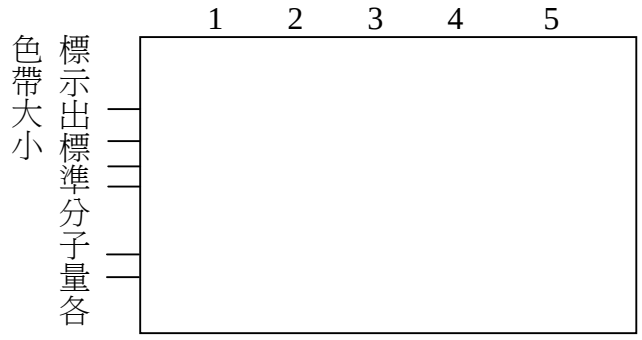
2. DNA 定量結果：

（先說明取？mL，加入？mL 什麼溶液，稀釋？倍，再說明測定結果。）

3. DNA 電泳結果：

書寫範例：……(先說明樣品的量及電泳前處理情形，電泳條件…..)…，結果如圖一第 1 行為標準 DNA 分子量（說明色帶是否與預期相符？），第 2~5 行則分別為……..。由電泳結果可知……。

（在說明後插入電泳圖，圖上要標示清楚，並且要在圖下方列出圖的標題及說明）



圖一：由大腸桿菌抽取之染色體 DNA，以 0.8% agarose 膠體電泳分析之結果。
（說明每一行的樣品為何，說明要盡可能詳細）

IV. 問題與討論：

回答第 7 頁所列的問題。