2023 年【科學探究競賽-這樣教我就懂】

普高組 成果報告表單

題目名稱： 我看到的是真的 DNA 聚集嗎？

一、摘要

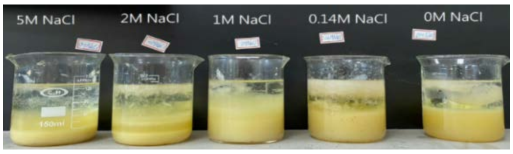
在基礎生物Ⅰ中有 DNA 粗萃取的探討活動，但在步驟中 NaCl 扮演的角色及其濃度的影響並沒有太清楚的說明，因此我們利用分光光度計波長 260nm 的吸光值大小代表 DNA 的量及 A260/A280 的比值代表 DNA 的純度設計實驗來探討此問題。我們發現雞肝的 DNA 在 0.14M 的溶解度並不是最小的且不管任何濃度雞肝粗萃取物中的 DNA 溶解度都非常低而以 0.14M 的 NaCl 溶液處理雞肝 DNA 萃取並沒有得到最大量的 DNA 且其純度亦不是最佳，可見 NaCl 在雞肝粗萃取實驗中扮演的效果被其他雜質給干擾著。另外，以酒精萃取 0.05M NaCl 處理的雞肝組織碎塊條件下得到最大的萃取總量，可見酒精萃取時 Na^+ 是必要，但並不是越多越好。最後以 $MgCl_2$ 取代 NaCl 實驗中發現 $MgCl_2$ 亦可做雞肝粗萃取的鹽類，而其最佳濃度為 0.05M 與 NaCl 溶液落在 0.2M 不同。

二、探究題目與動機

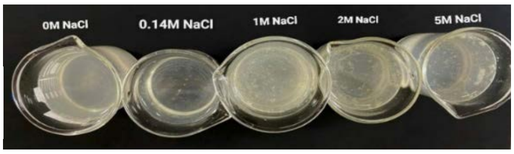
「帶負電荷的 DNA 會被鈉離子中和成為非極性分子，DNA 分子間不會因為彼此的負電荷而互斥，得以聚集，再加入極性溶液酒精，非極性 DNA 不溶於極性溶液中而析出」，這是課本上所告訴我們 NaCl 在粗萃取實驗中進行的作用，而在課堂中我們進行 DNA 粗萃取實驗時，發現以蒸餾水進行實驗再利用酒精萃取也可將產物析出，對此我們產生了疑惑，NaCl 在粗萃取實驗中所扮演的角色是什麼?

針對以上問題我們進行了文獻探討，沒有發現不同濃度的 NaCl 溶液對 DNA 溶解度的資料， 但有文獻提及利用大鼠胸腺萃取出的 DNA 在不同濃度的 NaCl 溶液中的溶解度也有所不同(Itzhaki,1967.)，這資料也可能是在教科書中或網路資料提及「在 0.14mole/L 的 NaCl 溶液中 DNA 溶解度最低」的資料來源。因此，我們設計了 5 種濃度的 NaCl 溶液(0M、0.14M、1M、2M、5M)來進行奇異果 DNA 粗萃取實驗，結果發現這 5 種濃度都可萃取出黏稠透明的產物，是教科書中認定的 DNA 產物(圖一)。而我們另外又將文獻中提及 DNP 溶解度最低的 0.14M 萃取出的產物撈出後定量溶於 5 種不同濃度的 NaCl 溶液中，發現這 5 種濃度的 NaCl 溶液皆可將產物溶解(圖二)。但在肉眼觀察的溶解現象中，在濃度 0.14M 的 NaCl 溶液中懸浮物最少，但其溶液為清澈白色，而其他濃度成乳白色，

圖一



圖二



然而肉眼觀察並不客觀，是否存在其他更好的方法呢？

在網路資料中有提及吸光值測定法，這是基於 Beer-Lambert law 顯示，分子對於特定波長光之吸光程度會隨著分子濃度而有所不同，所以可以藉由測量溶液的吸光程度推估分子的濃度(https://qinqianshan.com/biology/genetalks/nucl-con/)。DNA 及 RNA 分子會吸收波長 260nm 的光，而蛋白質的吸收高峰在波長 280nm。此測定法操作簡單且快速，因此，我們想利用分光光度計法來作萃取效果的檢測、並設計實驗討論 NaCl 溶液的濃度對雞肝細胞 DNA 粗萃取時的影響。

三、探究目的與假設

一、 雞肝 DNA 粗萃取物對於不同 NaCl 濃度之溶解度

假設：若如文獻中 DNP 在不同濃度之溶解度不同，則雞肝 DNA 粗萃取物在 0.14M NaCl 溶液中溶解度最小。

二、 四種不同濃度的 NaCl 溶液對雞肝 DNA 粗萃取的效果。

假設：(一)若加入 NaCl 溶液是為了利用 DNP 在 0.14M 的溶解度最低來純化 DNP 除去細胞中其他蛋白雜質，則使用 0.14M 的 NaCl 溶液萃取雞肝 DNA 可得到分光光度計測得 A260/A280 的比值最高。

(二)若高濃度的 NaCl 溶液是為了提供 Na^+，中和雞肝 DNA 的電荷而沉澱，但由於 Na^+極性高於水中不易靠近 DNA，而萃取時利用酒精極性低有利於使 Na^+更容易達到此效果，則使用不同濃度的 NaCl 溶液會有不同的萃取量總量。及酒精對溶於不同濃度 NaCl 的 DNA 萃取量也會不同。

三、 探討以 $MgCl_2$ 取代 NaCl 對雞肝 DNA 萃取量的效果。

假設：若高濃度的 NaCl 溶液是為了提供 Na^+，中和雞肝 DNA 的電荷而沉澱，則 Mg^{2+} 也會有同樣的萃取效果。

四、探究方法與驗證步驟

一、 研究設備與器材：

高速食物粉碎機、分光光度計、石英比色管、高速離心機、離心管

二、 研究方法：

(一) 雞肝 DNA 粗萃取的沉澱對於各濃度 NaCl 之溶解度差異

概述：將雞肝 DNA 粗萃取物溶於 1M、0.5M、0.2M、0.14M、0.05M NaCl 溶液中再以分光光度計測量其波長 260nm 之吸光值來檢測雞肝 DNA 粗萃取物對不同 NaCl 濃度的溶解度。

實驗步驟：

1.用高速食物粉碎機將雞肝均質打碎

2.取 10ml 雞肝加入 20ml 蒸餾水等待 20 分鐘，利用低張溶液將細胞打破。

3.以紗布過濾雞肝溶液，

4.取其 20ml 並加入 2M NaCl 混合使整體溶液成 1M NaCl 溶液的環境。

5.將溶液以每管 1.5ml 分裝至離心管中，以 12000r.p.m 離心 5 分鐘。

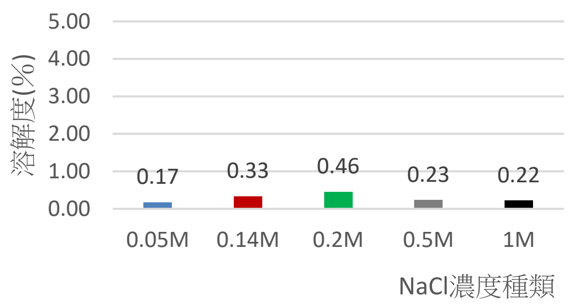
6.取清液以每管 0.5ml 裝至離心管中，每管加入 1ml 95%酒精萃取。

7.將酒精萃取物取出後過夜晾乾秤重。

8.將乾燥後的萃取物分別溶入 1M、0.5M、0.2M、0.14M、0.05M 中 NaCl 溶液中。

9.以 12000r.p.m 離心 5 分鐘，取上清液以分光光度計測 A260 的數值。

數據分析：



圖三：雞肝DNA萃取物在不同濃度的NaCl溶液溶解度。

由圖可知，實驗數據中以 0.2M NaCl 溶液對粗萃取之雞肝 DNA 溶解度最高，其與文獻中提及 0.14MNaCl 溶液溶解度最低的結果有所差異，而且溶解度非常低，顯示粗萃取中肉眼可以看見的萃取物中仍含有約 99.5%以上的其他物質，所以，我們的結果與文獻不符，非常有可能是其他雜質造成的效果。

（二）四種不同濃度的 NaCl 溶液對雞肝萃取 DNA 的效果

概述：(1)以不同濃度的 NaCl 溶液萃取雞肝 DNA，每次清洗皆利用分光光度計測 A260、A280 的數值並取得到最後萃取物的 A260、A280 測量數值及重量。(2) 以 0.05M、0.14M、0.2M、0.5M NaCl 溶液處理雞肝均質破壞之細胞，再以酒精萃取後測量萃取物之 DNA 含量。

實驗方法(1)：

1. 在冰塊上將雞肝切碎，使用食物粉碎機 5 秒、休息 30 秒，重複 8 次，再取 3g 雞肝分別加 15ml 的離心管中。
2. 以 5M NaCl 溶液和蒸餾水使離心管內 NaCl 濃度分別達到體積為 14m L 之 0.05M、0.14M、0.2M、0.5M。
3. 在 10˚C 的條件下、以 6000r.p.m 離心 10 分鐘。

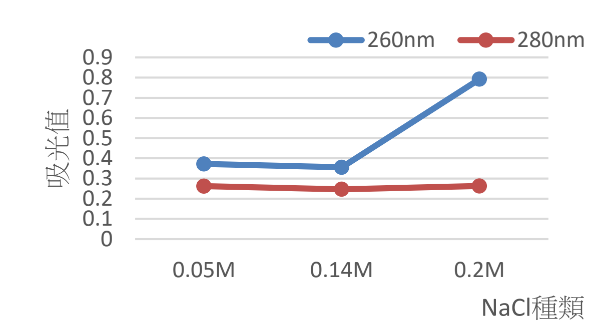
4. 離心後沉澱物重複步驟 2-3 兩次。
5. 再取最後一次的沉澱物過夜晾乾並秤其重量。
6. 再將沉澱物溶於 1M NaCl，利用水浴震盪機混合 20 分鐘。
7. 在 10˚C 的條件下、以 6000r.p.m 離心 10 分鐘。
8. 取 3ml 清液利用分光光度計測 A260、A280 的數值。

數據分析：

1-1 四種不同濃度的 NaCl 溶液處理之雞肝 DN 之純度

表一：不同濃度的 NaCl 溶液處理的雞肝 DNA 萃取物之 A260/A280 的比值

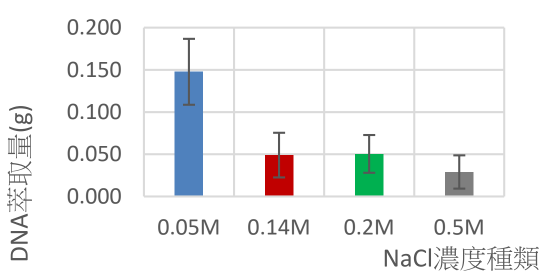
NaCl 種類	0.05M	0.14M	0.2M
A260/A280	1.42	1.44	3.01



圖四：不同濃度的NaCl溶液之雞肝DNP萃取物之A260及A280吸光值的比較。

說明：由表一可知以不同濃度的 NaCl 溶液處理的雞肝的 DNA 萃取物之 A260/A280 比值在 0.14M 並沒有呈現最大值，反而是在 0.2M 的 NaCl 溶液處理下，比值最大表示其萃取的 DNA 純度最高且其 A260 的吸收值是最大的(見圖四)，表示在這條件下可以獲得最多的 DNA 萃取量。綜合以上，NaCl 濃度對雞肝萃取的 DNA 純度並沒有關係。

1-2 不同濃度 NaCl 溶液的雞肝 DNA 粗萃取總量。



圖五：不同濃度NaCl溶液的雞肝DNA萃取總

說明:由圖可知,在 8 次的實驗數據中以 0.05M NaCl 溶液處理雞肝 DNA 的萃取量總量為最高。綜合圖一的結果,其中可能包含有除 DNA 外得其他雜質。因此，若要的到最佳的 DNA 萃取效果，應使用酒精萃取溶於 0.05M NaCl 溶液中效果最佳。

實驗方法(2)：
1. 在冰塊上將雞肝切碎，使用食物粉碎機 5 秒、休息 30 秒，重複 8 次，再取 3g 雞肝分別加

15ml 的離心管中。

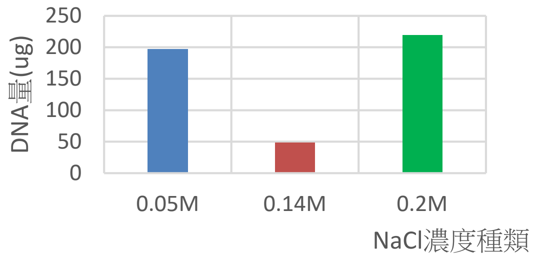
2. 以 5M NaCl 溶液和蒸餾水使離心管內 NaCl 濃度分別達到體積為 14m L 之 0.05M、0.14M、0.2M、0.5M。
3. 在 10˚C 的條件下、以 6000r.p.m 離心 10 分鐘。
4. 離心後沉澱物重複步驟 2-3 兩次。
5. 最後一次沉澱物以 5M NaCl 溶液和蒸餾水使離心管內 NaCl 濃度分別達到體積為 14m L 之 0.05M、0.14M、0.2M、0.5M。
6. 以 95%冰酒精萃取溶液中的 DNA 並將其取出後過夜晾乾秤重。

7.將乾燥後的萃取物分別溶入 1M NaCl 溶液中。

8.以 12000r.p.m 離心 5 分鐘，取上清液以分光光度計測 A260 的數值。

數據分析：

1. 酒精對溶解於不同 NaCl 濃度的 DNA 萃取量



圖六：酒精對不同濃度NaCl溶液的雞肝DNA萃取量。

說明：均質破壞後的雞肝細胞分別加入 0.2M、0.14M 及 0.05M 的 NaCl，再利用 95%冰酒精萃取後利用分光光度計測其波長 260nm 的吸收值換算出的 DNA 量，由圖可知在 0.14M 的 NaCl 濃度中，萃取量最低，這有可能是雖已提供了 Na^+中和其負電荷，但 DNA 在 0.14M 溶解度最低，而使酒精無法發揮其萃取效果。

(三) 探討以 $MgCl_2$ 取代 NaCl 對雞肝 DNA 萃取量的效果。

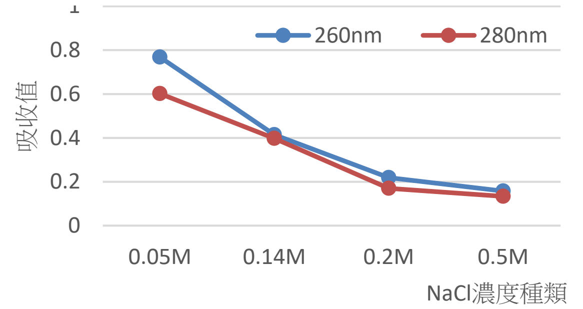
1. 在冰塊上將雞肝切碎，使用食物粉碎機 5 秒、休息 30 秒，重複 8 次，再取 0.3g 雞肝分別加 1.5ml 的離心管中。
2. 以 5M $MgCl_2$ 溶液和蒸餾水使離心管內 $MgCl_2$ 濃度分別達到體積為 1.5m L 之 0.05M、0.14M、0.2M、0.5M。
3. 在 10˚C 的條件下、以 12000r.p.m 離心 10 分鐘。
4. 離心後沉澱物重複步驟 2-3 兩次。
5. 再取最後一次的沉澱物過夜晾乾並秤其重量。
6. 再將沉澱物溶於 1M $MgCl_2$，利用震盪機混合 20 分鐘。
7. 在 10˚C 的條件下、以 12000r.p.m 離心 10 分鐘。

8. 取 3ml 清液利用分光光度計測 A260、A280 的數值。

數據分析：

表二：不同濃度的 $MaCl_2$ 溶液處理的雞肝 DNP 萃取物之 A260/A280 的比值

$MaCl_2$ 種類	0.05M	0.14M	0.2M	0.5M
A260/A280	1.28	1.04	1.29	1.18



圖七：不同濃度的 $MaCl_2$ 溶液之雞肝DNP萃取物之A260及A280吸光值的比較。

說明：由表二可知以不同濃度的 $MaCl_2$ 溶液處理的雞肝的 DNP 萃取物之 A260/A280 比值在 0.14M 顯得是最小的，但四種濃度並沒有太大差異，且在 0.05M 的 $MaCl_2$ 溶液處理下，A260 的吸收值是最大的，其值為 0.77 與圖三 0.2M NaCl 之 A260 吸收值 0.79 相差不多，可見 $MaCl_2$ 與 NaCl 有相同效果但最適濃度可能不一樣。

五、結論與生活應用

結論一：在 DNA 粗萃取實驗中 NaCl 溶液提供 Na^+ 中和電荷的效果會因其他雜質而干擾。

結論二：在雜質干擾下雞肝組織以 0.2M NaCl 處理的 DNA 萃取量及純度效果最佳。

結論三：$MgCl_2$ 在 DNA 粗萃取中亦可扮演 NaCl 的角色，但其最佳濃度為 0.05M。

我們的實驗結果能釐清在高中選修生物課程中未清楚說明的原理依據和步驟，協助同學更清楚學習的課程內容。

參考資料

一、蔡任圃(2020)。非你所想 - DNA 粗萃取的原理與延伸探究活動。檢索自 https://captainbiologyclass.blogspot.com/2020/12/dnadna.html(2020 年 12 月 14 日)

二、Gene Diagnosis(2022)。核酸濃度、純度的測定方法。檢索自 https://mp.weixin.qq.com/s/GCu0si-udTtU_rt2I5jC3Q (2022 年 07 月 23 日)

三、丁香通。從豬脾中提取 DNA。檢索自 https://www.biomart.cn/experiment/430/431/432/732/45997.htm

四、丁香通。動物 DNA 提取實驗。檢索自 https://www.biomart.cn/experiment/14.htm