

聚合酶連鎖反應技術

許華欣

台灣省農業試驗所

一、DNA 萃取 (DNA Extraction) (本法修飾自 Dellaporta, S. L., J. Wood, and J. B Hicks. 1983. A plant DNA minipreparation.: version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1(4): 19-21)

(一)所需藥品及其配置：

1. 液態氮

2. EB(extraction buffer)緩衝液：

100mM Tris pH 8.0 , 50mM EDTA pH 8.0 , 500mM NaCl , 10mM mercaptoethanol (抗氧化劑，處理時再添加，避免揮發)

3. 20% SDS

4. 5M potassium acetate

5. phenol

6. chloroform : isoamyl alcohol = 24:1

7. TE 緩衝液：

10mM Tris · Cl (pH 8.0),1mM EDTA (pH 8.0)

8. 3M sodium acetate

9. 80% 酒精

(二)操作步驟：

1. 摘取葉片約 0.5 至 0.75 克，添加液態氮且磨成粉末狀後，將粉末移至 30ml 離心管中。

注意：1. 添加 EB 緩衝液前，勿使組織解凍，否則易導致細胞解離，且釋放內生核酸分解酵素，進而分解 DNA。2. 由於液態氮蒸發快速，故在液態氮未蒸發結束前，可置放於凍箱中保持溫度，勿上蓋。

2. 加入 15ml 的 EB 緩衝液並混勻之。

3. 添加 1ml 的 20% SDS，經混勻之後培養於 65 °C 中 10 分鐘。

4. 室溫下添加 5ml 的 5M potassium acetate，混勻後培養於 0 °C 凍箱中 20 分鐘。

注意：potassium acetate 會與蛋白質以及多醣類形成 potassium dodecyl sulfate，而沉澱下來。

5. 以 25,000 × g 的離心轉速離心 20 分鐘，利用不織布將沉澱物與上清液分離，從而將上清液過濾至另一個離心管中。再添加 10ml isopropanol，混勻後培養於 -20 °C 凍箱中 30 分鐘，以利 DNA 的沉澱。

6. 利用 20,000 × g 的離心轉速離心 15 分鐘，輕倒上清液，並將離心管於室溫

中倒放，處理 10 分鐘以晾乾 DNA。

7. 添加 0.5ml 的 TE 緩衝液於沉澱的 DNA 上，使之溶解後，進行酚洗 (phenol wash) 的步驟。

8. 加入等量的 phenol，充分混合後以 $15,000 \times g$ 的離心轉速離心 5 分鐘，取出上層液至另一乾淨的微量離心管中，勿吸取兩層間之蛋白質部分。

注意：1. phenol 在配製時，其酸鹼度必須高於 7.8，否則 DNA 易於酸性環境中解離。2. 配製 phenol 時可添加 hydroxyquinoline 至最終濃度為 0.1%，此物質可作為抗氧化劑、RNAase 的抑制劑、以及其黃色可作為辨識有機層的標示。3. 利用 phenol 進行酚洗的工作可以有效的移除核酸內的蛋白質，此步驟可重複至無蛋白質殘留於水層與有機層間。

9. 重複步驟 8 之程序，但以半量 phenol 和半量 chloroform : isoamyl alcohol (24:1) 取代等量的 phenol.

注意：chloroform 可將蛋白質由 DNA 移除，亦可去除 phenol 在 DNA 的殘留。另外 isoamyl alcohol 則可再萃取時減少泡沫的產生。

10. 重複步驟 8 之程序，但以等量 chloroform : isoamyl alcohol (24:1) 取代等量的 phenol..

11. 將上清液轉移到另一乾淨的微量離心管中並添加 0.3 倍的 3M sodium acetate 以及 1.5 倍的 -20°C 無水酒精，輕輕混勻使之混合，此時應有白色懸浮狀的 DNA 及小氣泡。若不明顯，可放置於 -20°C 後約 30 分鐘，再行檢視。

注意：此步驟可將大分子的 DNA 由多醣類中分離出，且使 DNA 形成緊密的沉澱，易於清洗與乾燥。

12. 以 $15,000 \times g$ 的離心轉速離心 15 分鐘，去除上清液，再以 70-80% 酒精清洗 DNA，隨之重複離心，收集 DNA，倒掉上清液。晾乾 DNA 後，再利用 $100 \mu\text{l}$ 的 TE 緩衝液溶解 DNA，貯存於 -20°C 凍箱中備用。

二、聚合酶連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction ; PCR)(本反應利用毛細管 PCR 方法)

(一)藥品配置：

1. 酵素稀釋液

10mM Tris (pH 8.3)，2.5 mg/ml BSA

2. $10 \times$ PCR 緩衝液

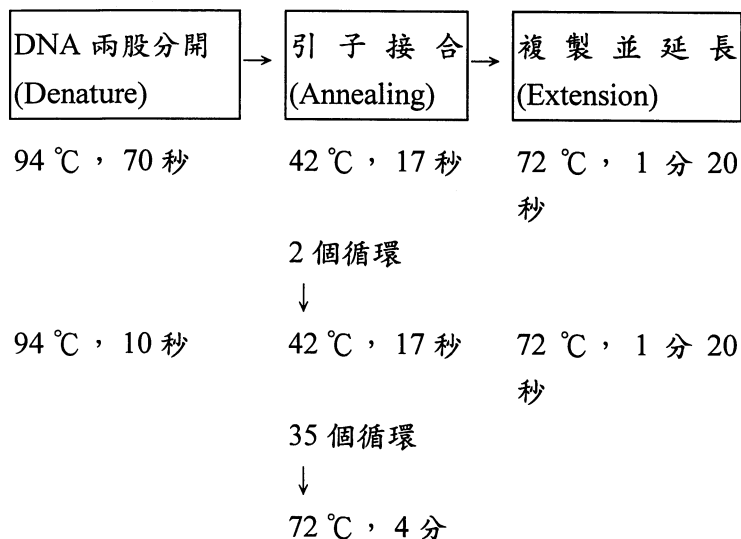
10mM Tris (pH 8.3)，2.5 mg/ml BSA，30mM MgCl_2

(一)操作步驟：(注意：所有步驟均在冰上進行，約 $0-4^{\circ}\text{C}$)

1. 將 $5\text{U}/\mu\text{l}$ Taq 聚合酶以酵素稀釋液稀釋至 $0.4\text{U}/\mu\text{l}$ ，備用。

2. $20 \mu\text{l}$ 的反應液中含 20 ng 的模板 DNA，9 pg 的引子， $2 \mu\text{l}$ 的 $10 \times$ dNTP， $2 \mu\text{l}$ 的 $10 \times$ PCR 緩衝液，0.8 U 的 Taq 聚合酶以及 $10 \mu\text{l}$ 的無

菌水，經混勻後，將反應液裝入毛細管中，進行 PCR 反應。
PCR 反應條件如下：



反應結束後，取出 DNA ，進行電泳分析。

三、電泳分析 (Electrophoresis Analysis)

(一)藥品配置：

1. 6 × dye

40% (g/ml) sucrose, 0.25% (g/ml) bromophenol blue

2. 電泳緩衝液：10 × TPE

0.89M Tris base, 0.026g/ml phosphoric acid , 0.02M EDTA (pH 8.0)

3. 電泳緩衝液：1 × TPE

由 10 × TPE 稀釋十倍即可

注意：1. 電泳緩衝液除了 1 × TPE ，尚有 1 × TBE (0.045M Tris -borate, 0.001M EDTA)、1 × TAE (0.04M Tris-acetate, 0.001M EDTA)以及 Alkaline (50mN NaOH, 1mM EDTA)，其功用為在電泳分析時，提供離子的傳導，促使 DNA 移動。2. 電泳緩衝液所提供之離子傳導對 DNA 的移動非常的重要，若缺乏離子(如以水代替電泳緩衝液，電流傳導將降到最低，DNA 將移動非常緩慢)，若離子濃度過高(如以 10 × 電泳緩衝液取代)，電流傳導將過快且所產生的大量熱能，將使膠溶解並分解核酸。

4. 0.8%瓊酯膠片

0.32g agarose , 40ml 1 × TPE , 0.125 μ g/ml EtBr

注意：1. 瓊酯膠(agarose)為由海藻所提煉得來，一般生化等級所用的瓊酯

膠雖已經純化，但仍有多醣類、鹽類及蛋白質的殘留，端看所需等級而定，不同等級的瓊脂膠也將影響 DNA 的移動以及其由膠中回收的量。2. EtBr 使 DNA 顯色，由於其分子嵌合於 DNA 結構，使 DNA 於紫外光下可顯色，EtBr 為致癌物質，使用時必須小心。

(二)操作步驟：

1.取 10 μ l 的 DNA 與 2 μ l 的 6 \times dye 混勻。

注意：添加 6 \times dye 有三種目的，提高樣本的密度，使樣本可確實注入電泳膠片中；賦予樣本顏色，以了解電泳分析的進度，以及使樣本於電泳槽可有效的朝陽極移動。

2.將電泳槽內添加 1 \times TPE 電泳緩衝液並放入 0.8%瓊脂膠片，注入 DNA 混合液於瓊脂膠片之槽內，以 100V 的電流，處理 40 分鐘，進行電泳分析。

注意：1. DNA 於中性環境下帶負電，因此於電泳分析時會由陰極向陽極移動。2. 瓊脂膠的濃度與電流的強度均會影響 DNA 的移動

3.於 365nm 紫外光下拍照並記錄。

注意：一般可用 254nm, 302nm 以及 365nm 波長的紫外光進行拍照，波長越短的紫外光，其 EtBr 所顯示的亮度越強，但是，對 DNA 所產生的傷害越大。因此，若 DNA 要回收時，以 365nm 波長的紫外光進行照射為最佳。

聚合酶連鎖反應實習所需工具與儀器一覽表

試驗名稱	工 具	儀 器
DNA 萃取	1. 研鉢 2. 離心管 3. 不織布 4. 微量分注器 5. 微量離心管	1.水浴箱 (KS, Shaking Bath SB303R) 2.0 $^{\circ}$ C, -20 $^{\circ}$ C 凍箱 3.高速離心機 (HITACHI HIMAC, Centrifuge SCR20BA) 4.微量離心機 (HERMLE Z233MK)
聚合酶連鎖反應	1. 毛細管 2. 微量分注器 3. 微量離心管	1.毛細管 PCR 儀器 (Idaho Technology, Air Thermo-Cycler 1605)
電泳分析	1. 微量分注器 2. 微量離心管	1.微量電泳槽 (COSMO BIO, Mupid [®] -2) 2.紫外光電泳膠片觀察儀 3.手提式照相設備