

中華大學生物資訊學系系統開發專題報告

專題中文名稱：植物 DNA 萃取試劑組的開發

專題英文名稱：DEVELOPMENT PLANT GENOMIC DNA PURIFICATION KIT

專題組員：游智程、黃少廷、沈哲民、黃致遠、陳彥丞

專題編號：PROJ2016-BIOINFO-102005

指導老師：張慧玫老師

## 1. 摘要

我們利用 CTAB、PVP、ILB、GuSCN、SDS，彼此依照不同的濃度配置成不同的萃取試劑組合，在以黃金葛作為樣本植物，採樣相同的步驟抽取樣本 DNA，並依據實驗獲得的不同試劑組的萃取結果，研究哪些是比較適合的組合？哪些是不適合的組合？再將比較適合的組合，紀錄並保留下來，之後在與市售的試劑互相比較，看是否能夠達到相似的萃取效率。實驗結果發現，我們配製的試劑組能成功萃取 DNA，與市售試劑具有類似的抽取效果，不過尚未達到市售試劑的效率等級。

## 2. 簡介

現在市面上萃取植物 DNA 的試劑組非常多，但不管是哪一種試劑組，在價格上都非常的昂貴，所以我們參考相關論文資料，從原料藥品開始，以不同的濃度，自行配置萃取植物 DNA 的試劑組，進行植物 DNA 萃取得實驗。我們將自行配置的試劑組分為 4 組 每組 12 種，一共 48 種組合。以相同的步驟分別萃取植物 DNA，試驗並比對每種試劑組合的萃取效果，藉以選出效果比較良好的試劑組合，然後再與市售組合的萃取效果進行比較，研究是否能達到與市面上販售的試劑組效率相近甚至更好。我們期望本實驗結果能獲得一種良好的劑組合，同時利用

此一方法朝向商品化開發的目標前進。

## 3. 專題進行方式

### (一) 實驗材料

樣本植物：黃金葛

DNA 染劑：EtBr

SDS PAGE：0.8% 膠片 (洋菜粉 + 一倍 TAE)

1.5ml tube

FAPD Column (FAVORGEN BIOTECH CORP.)

萃取試劑

### Lysis buffers:

CTAB：[2% CTAB, 100mM Tris-HCl pH 8.0, 20mM EDTA, 1.4M NaCl]

CTAB+PVP：[2% CTAB, 100mM Tris-HCl pH 8.0, 20mM EDTA, 1.4M NaCl, 2% PVP]

ILB+PVP：[700mM GuSCN, 30mM EDTA pH 8.0, 30mM Tris-HCl pH 8.0, 0.5% Triton X-100, 5% Tween-20, 1% PVP]

TES：[100 mM NaCl, 50mM Tris-HCl pH 8.0, 10mM EDTA pH 8.0, 0.5% SDS]

### Guanidine thiocyanate stocks:

GSS1：[6M GuSCN, 20mM EDTA pH 8.0, 10mM Tris-HCl pH 6.4, 4% Triton X-100]

GSS2：[6M GuSCN, 20mM EDTA pH 8.0, 10mM Tris-HCl pH 6.4]

### Binding buffers

PBB1：[40ml of GSS1, 8ml ddH<sub>2</sub>O]

PBB2 : [40ml of GSS2, 8ml ddH2O]  
PBM1 : [50ml of GSS1, 50ml 100% ethanol]

### First wash buffers

PWB1 : [50ml of GSS1, 50ml 100% ethanol]  
PWB2 : [50ml of GSS2, 50ml 100% ethanol]

### Second wash buffers

PW1 : [60% ethanol, 50mM NaCl, 10mM Tris-HCl pH 7.4, 0.5mM EDTA pH 8.0]  
PW2 : [75% ethanol]

## (二) 實驗設備

鉢杵  
水浴槽  
微量吸取器、tips  
微量天平  
微量離心機  
烘乾箱  
電泳台  
搖擺器  
穿透鏡像成像系統(CCD)

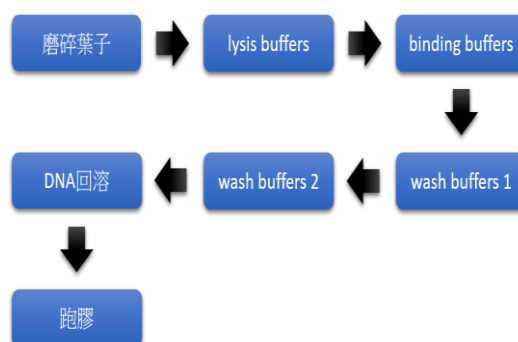
## (三) 實驗方法

我們使用黃金葛作為樣本植物，並將自行配置的試劑分為 4 組，每組 12 種，一共 48 種組合配對方式如表一，進行 DNA 抽取。

Lysis Buffers 4種  
Binding Buffers 3種  
First Wash Buffers 2種  
Second Wash Buffers 2種  
共48種組合

首先使用液態氮使黃金葛凍結，將植

物組織磨成細小粉末，並保持在低溫下讓 DNA 不降解，分別放入 1.5ml 的試管中，每管 200~300mg，再依 4 組試劑組合加入 1000  $\lambda$  的 CTAB(A 組)、CTAB+PVP(B 組)、ILB+PVP(C 組)、TES(D 組)用來打破細胞核膜，混合均勻後放入 65°C 的水浴槽裡 1 小時。移入離心機裡以 10000xg 離心 3 分鐘，離心分離上清液，分別抽取管內 400  $\lambda$  的上清液，與 800  $\lambda$  的 Binding buffers 在新的 1.5ml 試管均勻混合，接著再從其中抽取 400  $\lambda$ ，放入 Column 離心管中，以 5000xg 離心 2 分鐘，重複抽取，直到混和溶液全部離心完畢。加入 400  $\lambda$  的 First wash buffer，以 5000xg 離心 2 分鐘，將非 DNA 物質利用 First wash buffer 沖洗乾淨。加入 800  $\lambda$  的 Second wash buffer，以 5000xg 離心 2 分鐘，將 First wash buffer 無法沖下的物質沖洗乾淨。為了避免沖洗過程中有酒精殘留，放入 56°C 烘乾箱 5 分鐘將酒精完全蒸乾，之後加入 100  $\lambda$  ddH2O，放入 65°C 水浴槽裡 3 分鐘，拿出後以 5000xg 離心 5 分鐘，將 ddH2O 跟 DNA 離心至 1.5ml 試管中，取 DNA 溶液進行電泳，查看自行配置各種試劑組合抽取 DNA 的結果。



#### 4. 主要成果

本專題的目的是以市售的試劑組作為對照組來與我們自行配製的試劑組加以比較，並判斷哪些試劑組是較有效率、效果的。

我們配製的 4 組試劑組合以相同步驟抽取植物 DNA，再以 SDS PAGE 電泳並進行染色與退染，分析抽取結果。經過多次反覆實驗後，結果在圖一、圖二及圖三的電泳染色膠片上預期的位置沒有觀察到 DNA band，顯示以試劑 A、B、D 組的組合方式抽取獲得的 DNA 濃度過低，這三種試劑組的搭配方式並不適合。

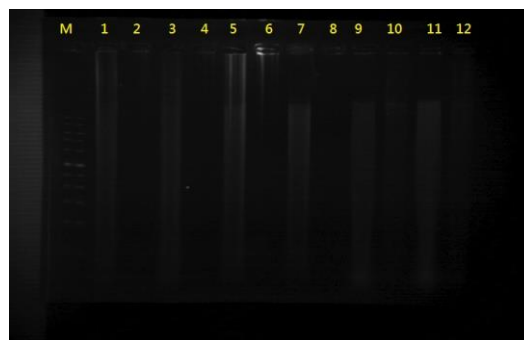
圖一：A 組試劑抽取 DNA 電泳圖



圖二：B 組試劑抽取 DNA 電泳圖



圖三：D 組試劑抽取 DNA 電泳圖



在圖四電泳膠片上可觀察到 lane1~12 共有 8 組試劑在預期的位置顯示出 DNA band，顯示這些組合可成功萃取出 DNA。

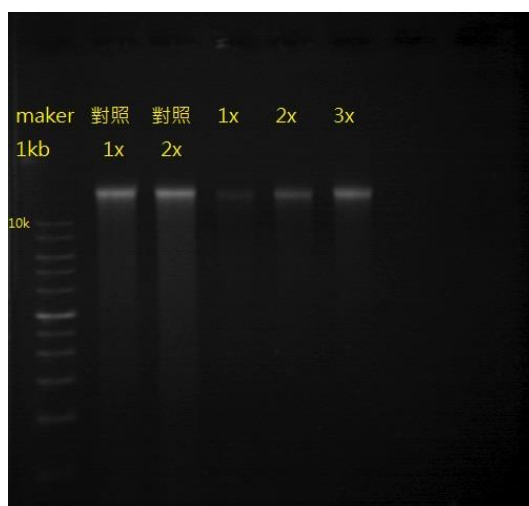
圖四：C 組試劑抽取 DNA 電泳圖



為了採用最好的效果所以把看起來較佳的再進行一次比較如圖五。



此處我們選擇 2 號的組合來與市售試劑比較，比較結果如圖六。



## 5. 評估與展望

### (一) 預期結果

在 48 組試劑裡，最初希望能有超過一半的試劑效率是可以跟市售萃取植物 DNA 試劑組達到相似的效率，而在經過多次實驗後，最終的電泳圖結果顯示出只有 8 組試劑是有足夠效率的。

### (二) 實驗過程可能導致失敗原因：

一：黃金葛葉片粉末沒有磨的很細，細胞壁並沒有被打碎，導致溶液無法與 DNA 產生作用。

二：調配溶液的濃度不正確

三：溫度太高，DNA 降解

四：細碎的葉子粉末與裂解液混合時，混合溶液時搖混太大力，導致 DNA 破裂

五：試管放置水浴槽時，水不慎流入試管內

### (三) 心得

雖在短期內無法配置出極為成功的成品，但在組員們互相合作、分工、各自挪出空閒時間進行實驗內容，已成為我們彼此之間堅不可摧的力量

了。在過程中，由於學生們的操作失誤，使得實驗室充滿刺鼻的藥劑味，但也藉由本次的教訓真正體會到了實驗室的危險性，並多次組內檢討、反省，確保不會再有嚴重失誤發生。

## 6. 結語

在經過長時間的反覆實驗下發現不是所有試劑都是適用於同一種實驗方式，所以需微調實驗步驟來達到更好的效率，但由於在有限的時間內，無法將最有效的試劑調配出來，因此將總實驗結果效果最顯著的試劑組拿來當作實驗結果。在這次專題實驗中學到步驟對實驗的重要性，不然可能導致 DNA 降解或被污染，所以在未來的實驗會更加注意這方面的影響。

本次專題尚在實驗階段，因此選擇的樣本是選較易取得的黃金葛，未來有機會會試著使用較有價值的經濟作物，例：水稻、蝴蝶蘭等方向測試。

## 7. 銘謝

感謝慧政老師，在製作專題實驗的過程中給予我們許多的協助與教導，當我們遇到困難時，給了我們不同方向的意見，讓我們從失敗的過程中學到很多新的實驗技巧，和做實驗的精神是反覆檢討，所以我們才能更加順利執行我們的專題實驗。

## 8. 參考文獻

1 Semi-automated, membrane-based protocol for DNA isolation from plants

2 NV Ivanova, AJ Fazekas, PDN Hebert - Plant Molecular Biology Reporter, 2008 - Springer