

鑒證實錄之 DNA 指紋圖譜和瓊脂糖凝膠電泳

Forensic DNA Fingerprinting & Agarose Gel Electrophoresis

一．課前思考

比對 DNA 建功 熱心警助無名屍歸根

- 報章來源：<http://www.libertytimes.com.tw/2013/new/aug/28/today-so15.htm>
- 報章日期：2013 年 8 月 28 日

新北市警局海山分局戶口組巡佐蔡淑女年初發現土城區公墓某具無名屍與一名通報的失蹤人口特徵相近，她憑藉豐富的尋人經驗決定展開追蹤，透過 DNA 比對，證實為 97 年失蹤的王姓男子，讓心懸多年家人相當欣慰。

據警方調查，王男於 97 年間離家出走後，家人立即向警方報案，4 年多來生死未卜。今年年初，警方在土城彈藥庫附近發現一堆白骨，因確切死因及死亡的時間難以判定，只好暫時以無名屍下葬。

蔡淑女得知此事，發覺屍體特徵與轄區內一名失蹤人口非常相近，但家屬難以面對親人辭世的消息，遲遲不願出面，歷經數個月苦口婆心的勸導，確認家屬 DNA 與無名屍吻合，心中的那塊石頭終於放下。

回憶整件事情的過程，蔡淑女除了感謝家屬出面，也感謝台中市警方和法醫研究所的協助，更要感謝長久以來協助弱勢尋找墓地及籌措喪葬費用的善願愛心協會會長郭志祥，因為有他們的幫忙王男才能順利落葉歸根。

思考問題：

1. 你知道什麼是 DNA 嗎？在哪裏可以找到 DNA？

2. 報導指出只發現了一堆白骨，能夠利用從白骨中找出 DNA 作比對嗎？

3. 試分析怎樣利用 DNA 比對而鑒定出無名屍與失蹤人口是同一人士？

4. DNA 只能從人類中萃取出來作鑒證嗎？

貓毛 DNA 破案 擒碎屍兇徒 首成人罪證據

- 報章來源：<http://hk.apple.nextmedia.com/international/art/20130816/18380997>
- 報章日期：2013 年 8 月 16 日

指紋、血迹、毛髮……這些破案線索往往屬於人類，英國警方卻憑着八條貓毛，將一名碎屍案兇徒入罪，是當地首次靠貓咪脫氧核糖核酸（DNA）資料庫破刑事案件。

30 歲男子蓋伊（David Guy）去年 7 月被人肢解，棄屍於漢普郡紹斯西一處沙灘，除了一堆殘肢，裹屍布上的八條貓毛成了僅餘線索。以動物 DNA 破案，美國加州大學戴維斯分校的獸醫遺傳學實驗室有超過 10 年經驗，可惜亦只能查出八條毛髮所屬的貓品種，警方於是轉向萊斯特大學教授韋頓（Jon Wetton）求助。

大學擬公開資料庫

韋頓曾建立狗隻 DNA 資料庫，他用了六周時間，在英格蘭收集 152 隻貓的粒線體 DNA 樣本，當中 23 隻貓來自紹斯西；這種 DNA 為母系親屬之間的貓咪共有。製成貓隻 DNA 資料庫後，韋頓追查到八條貓毛屬於蓋伊的 47 歲鄰居希爾德（David Hilder）的貓咪，連同在希爾德住所找到蓋伊血迹等證據，希爾德被裁定誤殺罪成，判囚終身，至少監禁 12 年才能假釋。韋頓指「全英國很多家庭的衣物與家具都黏上貓咪毛髮」，他打算公開貓隻 DNA 資料庫，「相信對科學鑑證有莫大裨益」。

思考問題：

1. 以上報導是利用什麼來作線索以分析 DNA?

2. 掉在地上或是黏在衣物上的毛髮是否就一定可以做 DNA 分析?

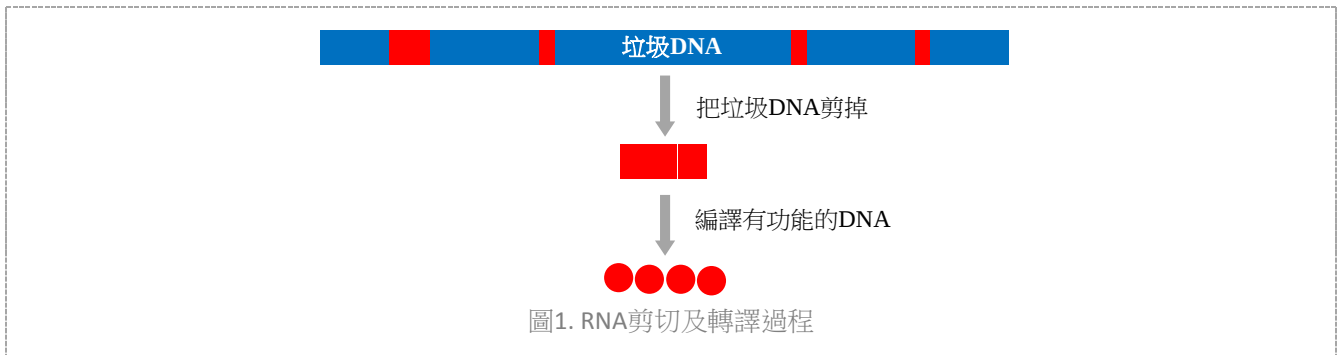
3. 你認為利用 DNA 鑒證作法證及失蹤人口方面的調查有何好處?

4. 除了尋找失蹤人口和法證方面，DNA 鑒證能夠運用在哪些方面?

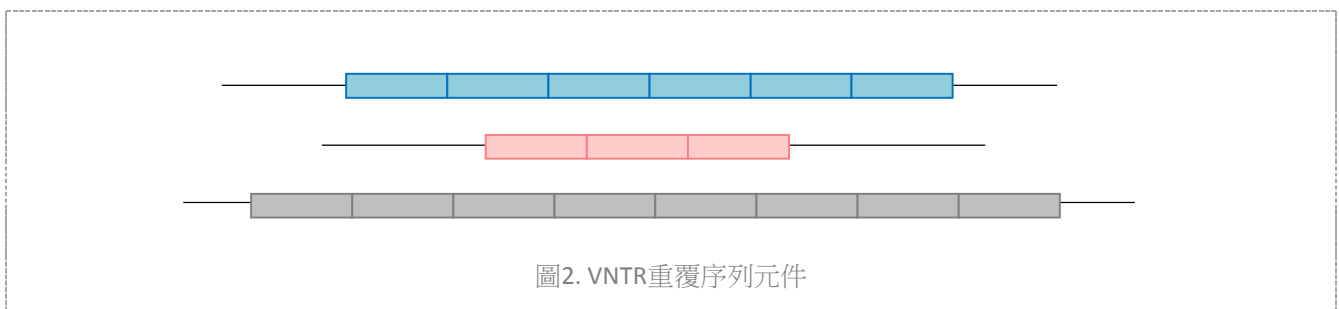
二·鑒證實錄簡介

2.1 為什麼人們的基因差異這麼少，卻有着截然不同的樣貌？

人類基因組估計約有三百萬對碱基對，構成數量龐大且複雜的基因序列，但其中只有少於5%的基因（圖1中紅色長方形）可以編譯成有功能的蛋白（圖1中紅色圓形），而其餘大多數的DNA序列（圖1中藍色長方形）只能製造出無轉譯能力的RNA，此類DNA稱之為“垃圾DNA”（非編碼DNA）。過去很長一段時間科學家認為這些垃圾DNA沒有作用，但隨着越來越多的研究，開始發現其實很多非編碼DNA都有獨特功能，尤其是基因剪切方面。

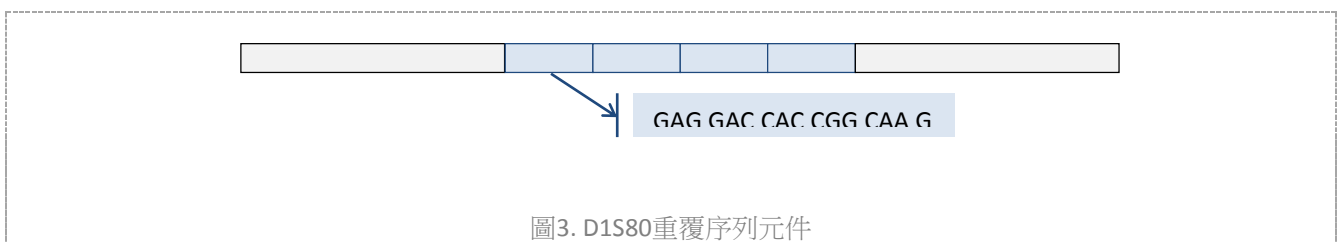


這些“垃圾DNA”中有大量重覆的序列，當中有一種名叫VNTR（串聯重覆變量）。VNTR是一段在垃圾DNA上不斷重覆出現的DNA序列，在VNTR上，有不同的重覆序列元件（圖2長方形），會在某一位點開始以串聯的方式重覆出現，每人所帶有的重覆次數不同，而這些基因組DNA序列之間的區別，令人們存在遺傳多態性，因此人類的基因組雖然只有很少的差異，但卻能展現出不同的模樣。

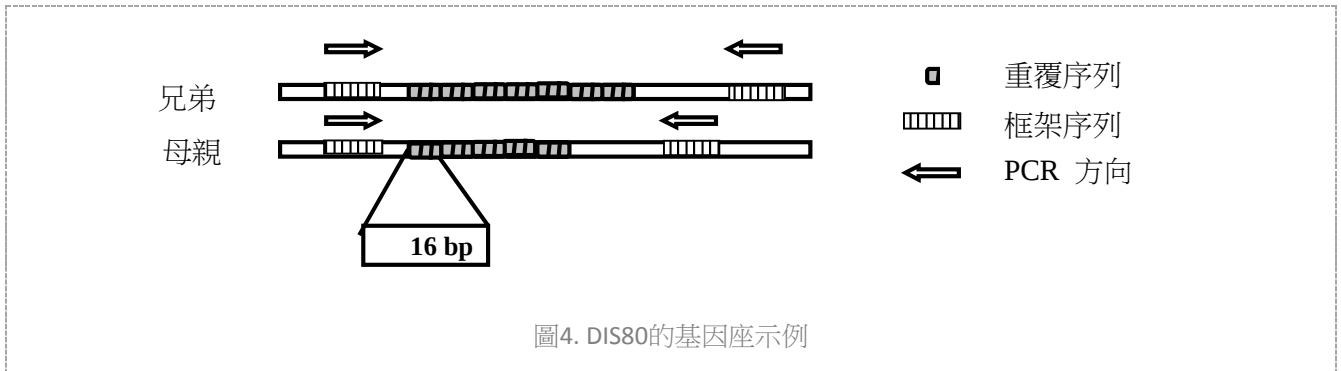


2.2 微少的基因組差異有什麼應用？

VNTR上有一個常用的串聯重覆序列元件—DIS80，位於第一對染色體上，並帶有十六個碱基對的重覆序列（圖3所示重覆序列：GAG GAC CAC CGG CAA G）。



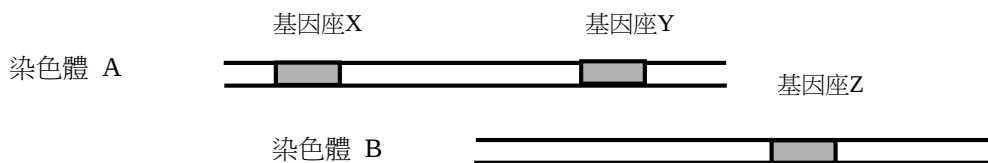
每人VNTR上DIS80的重覆次數不同，如圖 4 所示，兄弟染色體上有有21個重複單位，母親則有15個。利用這個重複次數能夠應用在親子鑒定，或是一些法證鑒定、調查失蹤人口、大型災難死亡人士的身份認證等方面。



例如親子鑒定分析中，要檢測一個家庭中VNTR的基因座，假設父親有12和18個重複序列(12,18)，而母親是(15,30)，則其子代應有以下配搭的其中一個：(12, 15)，(12, 30)，(15, 18) 或 (18, 30)。可是只檢測兩個基因座錯誤鑒定的機會是十分高的，因此在親子鑒定中，通常會檢測數個VNTR的位點以減低假陽性的發生。

2.3 思考題

以下是對一個家庭中三個VNTR基因座：X，Y，Z檢測的例子。你知道誰是他們所收養的孩子？



	X	Y	Z
父親	10, 14	18, 24	8, 9
母親	12, 20	22, 22	8, 15
兒子	10, 20	22, 24	8, 8
女兒	12, 14	22, 22	26, 9

三·實驗原理及目標

3.1 實驗材料—瓊脂糖凝膠電泳

實驗中所用的瓊脂糖是從海藻中提取的糖分子鏈，瓊脂糖會溶解於沸水中，後再將其冷卻會發生聚合作用，糖分子鏈會相互交聯在一起，形成一個網狀的結構，當中構成了很多“細孔”，冷卻後最終會形成半固體的凝膠，就如平日我們吃的大菜糕一般。



DNA因為有糖基磷酸鹽骨架而帶負電，因此DNA將會在電場的作用下向正極移動，通電的時候DNA片段會通過瓊脂糖凝膠中的“細孔”，但由於這些細孔是非常微小的，分子量大的DNA片段則不能通過，分子量小的則能通過，且分子量越小，移動的速度則越快，就如篩子的作用，小的DNA片段能夠通過，最終目標是以分子量大小分離開不同的片段。

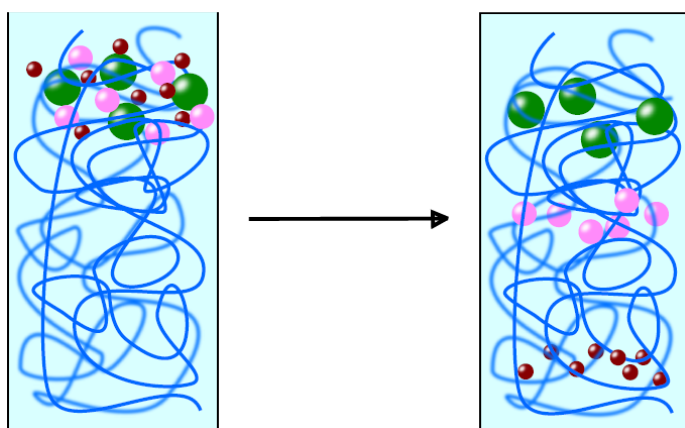


圖5. DNA片段在瓊脂糖凝膠電泳中的移動情況

3.2 怎樣解讀瓊脂糖凝膠電泳的結果?

DNA分子是無色的，為了能夠在瓊脂糖凝膠上看見，就需要染色。常用的有溴化乙錠，它能夠插入DNA分子中，在紫外燈照射下發出橙色熒光，但由於溴化乙錠是致癌物；因此，我們將在實驗中使用一個相對較安全的染色劑——Cybr Green，原理與溴化乙錠相同，跑完電泳後用紫外燈照射，會發出熒光，讓我們能夠解讀。

3.3 實驗目標

在這個實驗中，將安排六個家庭成員的DNA樣品（當中有親生的，也有可能不是親生的）和一個DNA標準分子量來進行瓊脂糖凝膠電泳，每個樣品都包含有三個VNTR基因座的串聯重覆DNA片段，而DNA標準分子量則是用作參照的。由於每人的VNTR基因座串聯重覆次數不同，在凝膠上的跑出來的DNA片段都各有差異，因此就像我們的指紋一樣，是獨一無二的，所以此實驗稱為DNA指紋圖譜。

四 · 實驗材料

4.1 儀器設備

- ◆ 電泳槽（如圖6所示）
- ◆ 電源
- ◆ 微波爐/加熱板
- ◆ 250ml錐形瓶

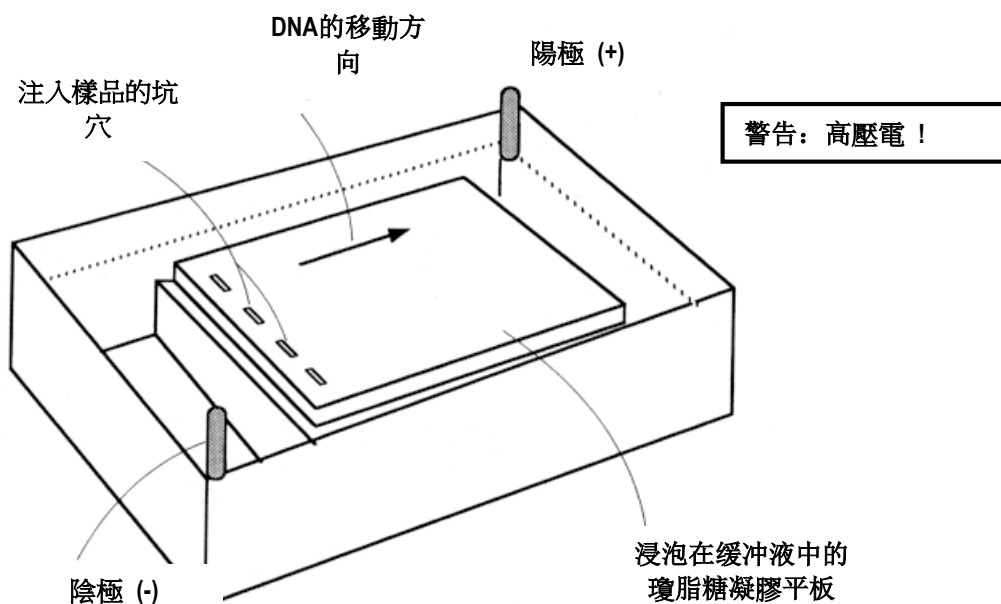


圖6. 用於分離DNA片段的瓊脂糖凝膠電泳

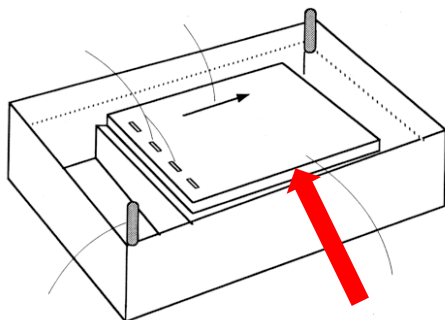
4.2 實驗材料

材料	份量	備註
瓊脂糖凝膠	1.5% ， 50ml	利用0.75g瓊脂糖粉末製1.5% 50ml瓊脂糖凝膠
1x磷酸緩衝鹽(TAE)	1x ， 50ml	包含0.089M的tris-磷酸， 0.89M的硼酸以及0.02M的EDTA
1xTAE緩衝液	600 ml	利用1x磷酸緩衝鹽配製成1x緩衝液
DNA樣品	10uL	六個樣品：M， F， D1， D2， S1， S2， MK 依次代表：Mother， Father， Daughter1， Daughter2， Son1， Son2， Marker (DNA標準分子量， 用作參照)
Cybr Green		

五·實驗步驟

5.1 製備瓊脂糖凝膠

1

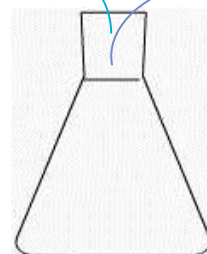


拿出電泳槽中的凝膠槽，用膠紙把兩邊封好。

2

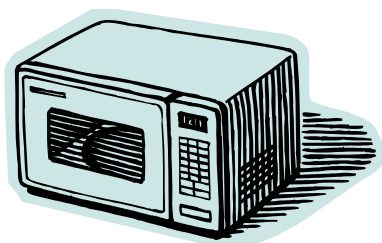
0.75g瓊脂糖

40ml 1x TAE



在三角锥形瓶加入0.75g 的瓊脂糖和40ml 的1x TAE

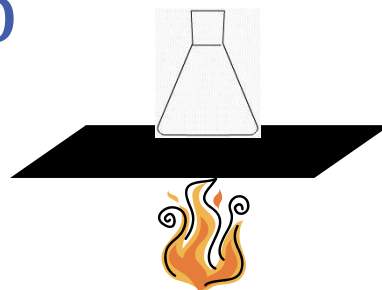
3a



微波爐加熱法

一開始時用中火加熱3分鐘，取出後小心轉動，使試劑混合，然後每次加熱30秒，取出後轉動使之混合，直至所有粉末溶解，溶液呈透明才停止加熱，然後放涼至60℃，並加入SYBR Green。

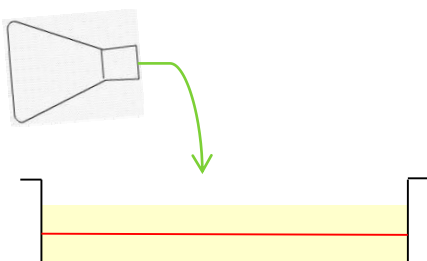
3b



加熱版法

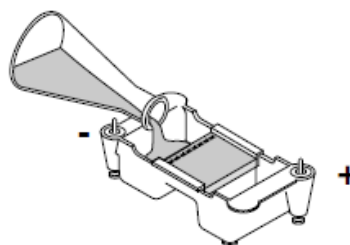
把三角锥形瓶放上加熱版，不時小心轉動，使試劑混合，直至所有粉末溶解和溶液呈透明，然後放涼至60℃，並加入SYBR Green。

4



涼卻後把把溶液慢慢倒入凝膠槽中，大約0.5 - 0.75cm厚（注意不要產生太多氣泡），圖中所示為凝膠槽側面，注意倒溶液約到紅線位置。溶液倒完後把梳垂直插進尚未凝固的溶液中，靜待10 - 15分鐘。

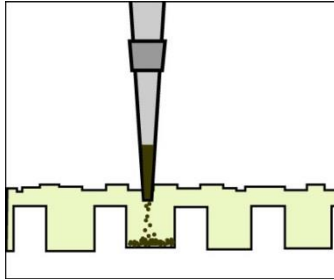
5



凝膠凝固後，慢慢將梳取出，撕下膠紙，把凝膠槽放回電泳槽，有孔的一邊放在黑色(負極)那一邊，加入緩衝液1xTAE，份量為覆蓋凝膠，並高出3mm左右。**（注意：電泳槽中和凝膠所用的電泳緩衝液必須是同一批製備的）。**再加入Sybr Green。

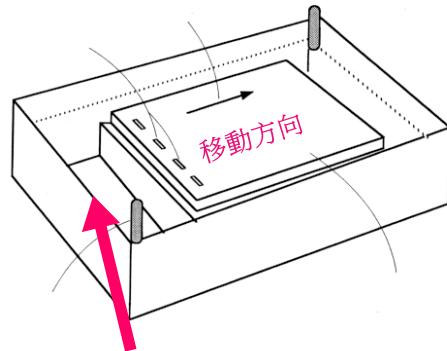
5.2 注入DNA樣品

6



把10ul DNA樣品按以上順序慢慢地注入各個坑穴中。倒好後蓋上凝膠槽的蓋子，接通電源，施100V電壓，30分鐘時間進行電泳(此時要加入Sybr Green至電泳槽中之TAE溶液中)。

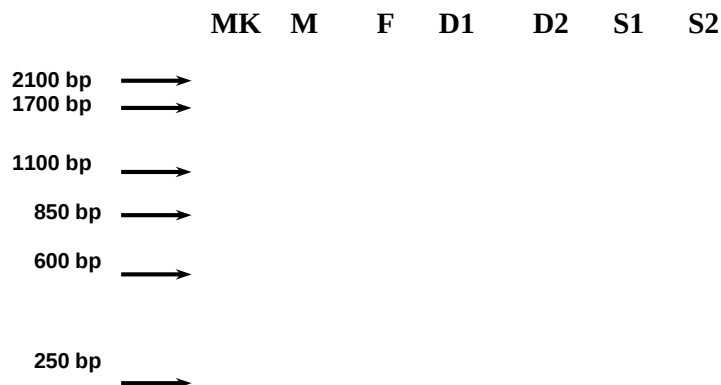
7



DNA會由負極向正極移動(黑色移向紅色方向)。如果金屬片貼附得很好，那麼通電的時候，電極附近就會產生氣泡(紅色箭頭位置)。30分鐘後觀察移動情況，切斷電流，並將凝膠小心地從凝膠槽中取出。

5.3 顯現DNA

拿出凝膠後，把凝膠放在Blue Light Box上，在sybr Green的染色下，DNA能夠在藍光下顯現，請在下圖中畫出凝膠條紋：



MK	分子量標準物
M	母親
F	父親
D1	女兒1
D2	女兒2
S1	兒子1
S2	兒子2

5.4 DNA指紋圖譜的分析

分析你的凝膠的指紋圖譜並填到下面的空格中。

D1：_____ 親生子女/收養子女/前夫(或妻)所生子女

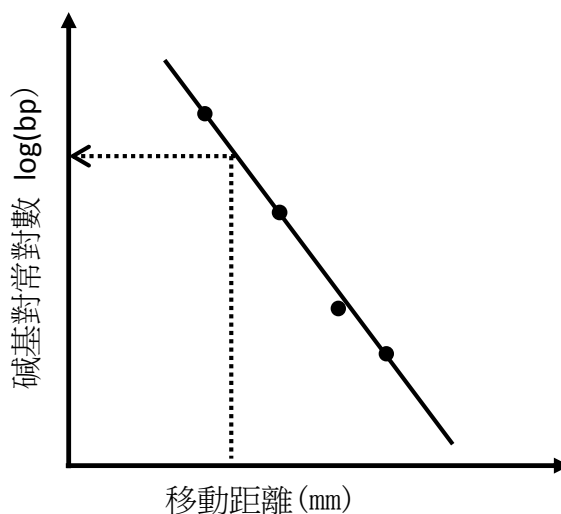
D2：_____ 親生子女/收養子女/前夫(或妻)所生子女

S1：_____ 親生子女/收養子女/前夫(或妻)所生子女

S2：_____ 親生子女/收養子女/前夫(或妻)所生子女

5.5 構建標準曲線

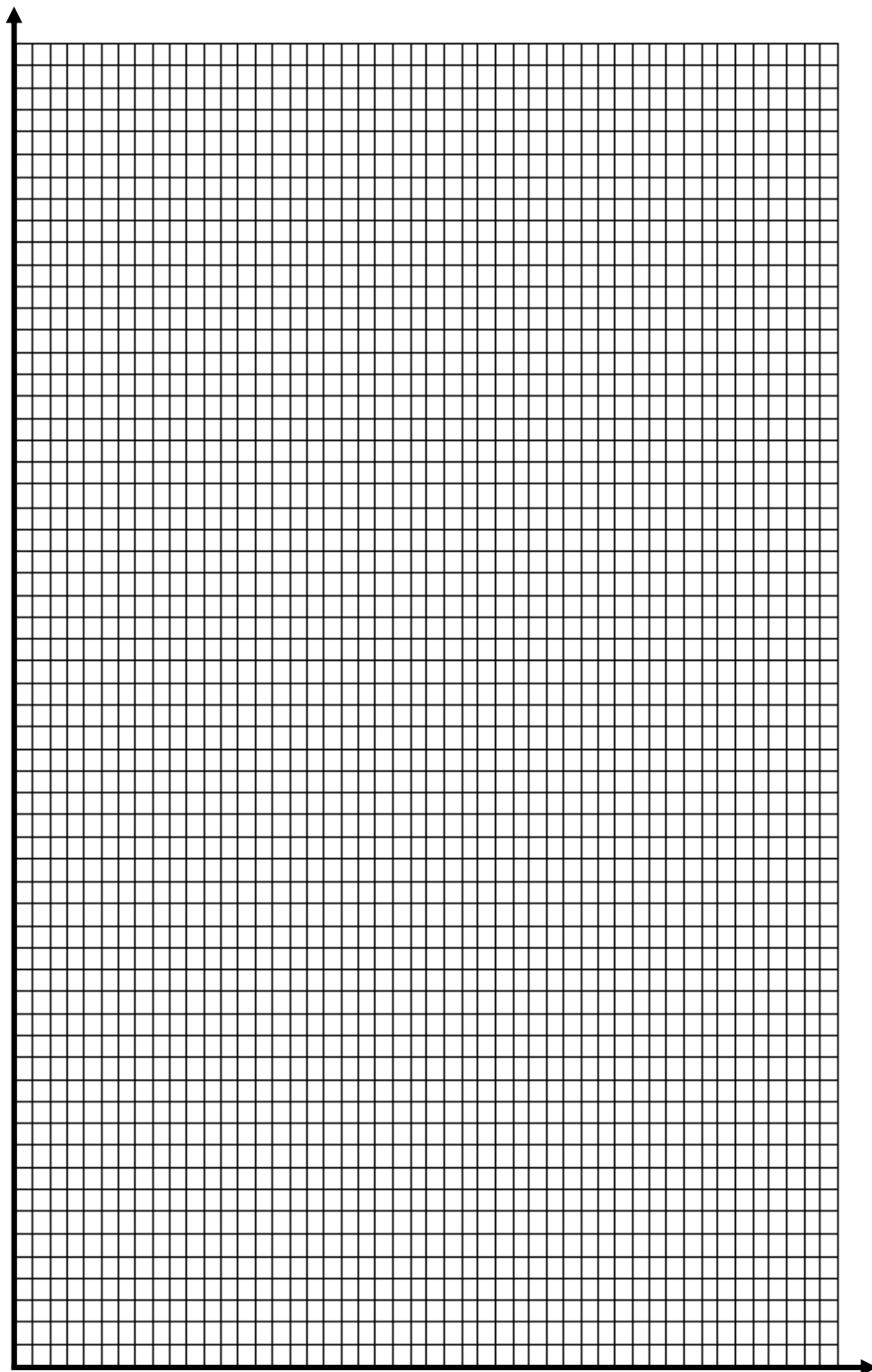
如果在對照品的基礎上，碱基對的常對數與移動距離關係很好，將可以得到一條標準曲線，並且可以通過標準曲線確定DNA片段的大小。(注意：移動距離是指上樣坑和DNA片段之間距離)



通過MK和S2兩個DNA片段測量移動距離(上樣坑和樣品帶之間的距離)。然後，以MK構建標準曲線並估測S2的DNA片段的大小。

樣品	片段序號	片段大小	$\log(\text{bp})$	移動距離(mm)
MK	1	2100 bp		
	2	1700 bp		
	3	1100 bp		
	4	850 bp		
	5	600 bp		
	6	250 bp		
S2	1			
	2			
	3			
	4			

請在下圖劃出一個**碱基對常對數log(bp)**對**移動距離(mm)**的標準曲線圖



六·課後思考及討論

1. 實際應用中，需要怎樣獲得DNA樣本來作DNA指紋圖譜技術？

2. 樣本中要利用多少個細胞才能進行DNA指紋圖譜分析？有什麼技術是用來擴增DNA數目？

3. 是次實驗是利用DNA指紋圖譜來作親子鑒證，那麼利用此技術可以鑒證非近親的親屬關係嗎？如祖父母、表親嗎？

4. 若是雙生兒，可以利用DNA指紋圖譜來分析基因組的不同嗎？

5. 近年來，DNA指紋圖譜的應用層面運用到中藥方面。「正如每個人的指紋不同，中藥也各具特性。對某種中藥材或中成藥經適當處理後，採用一定的分析手段，得到標示該中藥材或中成藥特性的圖譜，這就是中藥指紋圖譜。指紋圖譜已成為國際公認的辨別中藥真偽、控制中藥或天然藥物質量的最有效手段之一。」那麼，試分析中藥指紋圖譜是如何繪就的呢？

(來源: <http://www.biosino.org/news-2003/200301/03010610.htm>)
