

實驗活動（四）

親子鑑定

（教師版本）

I. 實驗目標

利用凝膠電泳來分析四個模擬 DNA 樣本是否存有血源關係。

II. 預期學習成果

完成這項學習活動後，學生應能：

1. 認識 DNA 指紋分析的應用；
2. 概述 DNA 指紋分析的原理；以及
3. 進行凝膠電泳。

III. 教學筆記：

1. 與學生一起探討「背景」部分，或讓學生閱讀這部分以及「關於實驗設計的導引問題」，作為課前活動。
2. 使用「關於實驗設計的導引問題」與學生討論實驗的設計。
3. 根據學校的課時並參考第 IV 部分「實驗活動時間分配」以編排實驗流程。
4. 時刻提醒學生有關實驗各部分的安全預防措施。
5. 與學生一起探討「結果」和「討論」部分。

IV. 實驗活動時間分配：

實驗活動		需時	
		課堂內	課堂外 （由實驗室技術員完成）
1	灌製瓊脂糖凝膠		30 – 45 分鐘
2	把模擬基因樣本進行凝膠電泳	45 分鐘	
3	電泳凝膠圖像處理及分析	15 分鐘	
總實驗課時		實驗前準備：30 分鐘 實驗課：60 分鐘	

V. 實驗設備、材料和準備工作

此實驗需要使用市面有售的教學套裝「Innovating Science™ DNA Paternity Testing Electrophoresis Lab Activity Educational Kit；Fisher Scientific；#S28494」。

此套裝包含足夠 24 名學生（6 組，每組 4 名學生）使用的實驗材料和試劑；除此套裝之外，可能還需要其他設備或材料。

網址：<https://www.fishersci.com/shop/products/dna-paternity-testing-electrop/s28494>

實驗

a) 設備（每組）

- | | |
|----------------------|-----|
| - 電泳槽 | × 1 |
| - 電泳槽電源 | × 1 |
| - 凝膠成像儀 / 紫外光燈 | × 1 |
| - 微量移液器（P10）和無菌移液器吸頭 | |

b) 材料（每組）

- | | |
|------------------------|-------|
| - 模擬母親的 DNA（6 µl） | × 1 |
| - 模擬兒子的 DNA（6 µl） | × 1 |
| - 模擬男士 A 的 DNA（6 µl） | × 1 |
| - 模擬男士 B 的 DNA（6 µl） | × 1 |
| - 微量離心管架 | × 1 |
| - 瓊脂糖凝膠托盆及梳子 | × 1 |
| - TBE 緩衝液（1 L） | × 1 |
| - DNA 梯（4 µl） | × 1 |
| - 石蠟封口膜 | |
| - 標記筆 | × 1 |
| - 紙巾 | × 1 盒 |
| - 生物危害品丟棄袋 | × 1 |
| - 廢棄物貯存容器（盛有 10% 氯漂白水） | × 1 |

c) 預備工作

製備瓊脂糖凝膠（由教師或實驗室技術員在實驗課前完成）

1. 取一個錐形瓶，加入 0.20 g 瓊脂糖粉（一塊凝膠的分量）。

[提示：或在小型稱量紙上稱量粉末，稱量後將其倒入錐形瓶中。]

2. 再加入 20 ml TBE 緩衝液（一塊凝膠的分量），放進微波爐加熱至瓊脂糖粉完全溶解及溶液變得透明清澈。

[重要訊息：加熱前應避免搖晃 TBE 緩衝液，因為搖晃可能會將未溶解的瓊脂糖粉末帶到錐形瓶的側壁。這些聚集在側壁的粉末，即使加熱後，亦可能不易溶解。]

[提示：可以可從生物技術公司購買即用式 1X TBE 緩衝液，或者可以購買 10X TBE 緩衝液，使用前以蒸餾水或去離子水稀釋至 1X。]

[重要訊息：完全溶解的瓊脂糖溶液應是透明並十分清澈的。當近距離觀察溶液時，如果發現加熱後溶液中有一些細小的纖維狀物質，這些纖維狀物質其實是未完全溶解的瓊脂糖，這意味着需要進一步加熱。]

3. 以流動的自來水冷卻瓊脂糖溶液。

[提示：擦去錐形瓶上所有的水後，將錐形瓶的底部放在戴着手套手背上，檢查加熱後的瓊脂糖溶液是否充分冷卻。如果感覺瓊脂糖溶液是溫熱的，代表已充分冷卻，過分冷卻反而會導致凝膠過早固化。]

4. 加入 2 μ l（一塊凝膠的份量）凝膠紅（gel red）；於瓊脂糖溶液中並輕輕混勻。

[重要訊息：傳統的 DNA 顯影劑具致癌性，而較新型的 DNA 顯影劑（如凝膠紅和凝膠綠）對人體並無毒性。但仍然建議小心處理凝膠紅，避免直接接觸皮膚。也應避免將凝膠紅加到非常熱的瓊脂糖凝膠溶液中，因為凝膠紅可能會蒸發到空氣中。]

5. 把 1 個 8-凹穴梳子放進凝膠托盆中，然後小心地將瓊脂糖溶液倒入凝膠托盆，使用 P200 移液器吸頭的末端去除表面的氣泡（即將吸頭倒置使用）。

6. 靜待 25–30 分鐘，讓瓊脂糖溶液固化，變成不透明的凝膠。

[提示：如果將瓊脂糖凝膠放於 TBE 緩衝液中，並放在 4°C 保存，則可以在實驗前一天製備。]

分裝實驗材料（由教師或實驗室技術員在實驗課前完成）

1. 將 6 μ l 模擬母親的 DNA 等分加入微量離心管中，為每組學生準備 1 支。
2. 將 6 μ l 模擬兒子的 DNA 等分加入微量離心管中，為每組學生準備 1 支。
3. 將 6 μ l 模擬男士 A 的 DNA 等分加入微量離心管中，為每組學生準備 1 支。
4. 將 6 μ l 模擬男士 B 的 DNA 等分加入微量離心管中，為每組學生準備 1 支。
5. 將 4 μ l DNA 梯等分加入微量離心管中，為每組學生準備 1 支。

VI. 「關於實驗設計的導引問題」的建議答案

1. 進行凝膠電泳的目的是什麼？

- 分離並顯出不同大小的基因樣本。
- 比較每個樣本中基因座的大小

2. 在圖 2 中，試畫出下列不同大小的 DNA 片段在電泳後的凝膠圖像上大概出現的位置。

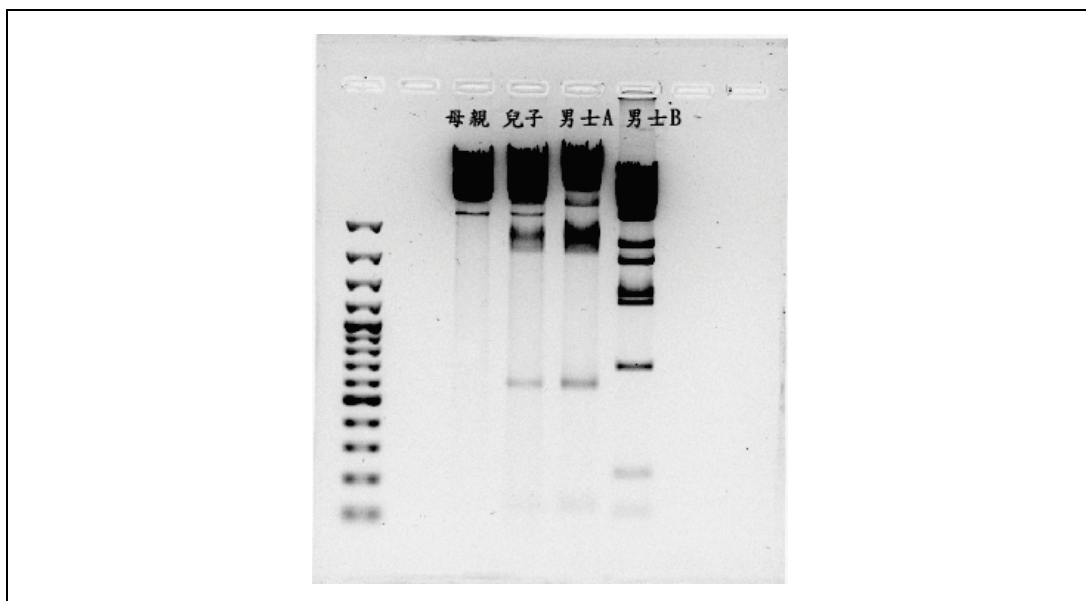
凹穴 1：1000 鹼基 (bp)；凹穴 2：780 bp；凹穴 3：400 bp 及 凹穴 4：800 bp。



圖 2 一塊凝膠

VII. 結果

1. 在下面的空框內，貼上模擬 DNA 樣本的凝膠電泳圖像。



2. 根據 4 個模擬 DNA 樣本的凝膠電泳結果，哪位男士（A 或 B）是孩子的生父？簡要說明你的答案。

男士 A 是孩子的生父，因為孩子應該與其父親和母親有着相同的顯帶帶型。男士 B 與孩子的顯帶帶型差異很大。

VIII. 討論

1. 根據電泳圖像上的顯帶帶型，怎樣確定父母與孩子之間存有血源關係？

- 通過比較多個基因座（即基因）等位基因的大小，即比較瓊脂凝膠上 DNA 顯帶的位置。
- 為了確認潛在的父母與子女關係，在每個測試的基因座位點應該有着一個相同大小的等位基因。換句話說，孩子的一個基因座中一個等位基因的大小應與母親的等位基因大小相同，同一基因座的另一個等位基因的大小則與父親等位基因大小相同。

2. 可用類似方法確定兄弟姊妹的關係嗎？

可以，兄弟姐妹應該在至少 50% 的測試基因座位點上，有着一個相同大小的等位基因（即相同顯帶帶型）。

3. 為什麼進行親子鑑定時要檢查 18-20 個基因座？

排除個體偶然具有相同等位基因的可能性，從而提高測試的準確度。

4. 身體上哪些組織可作為提取 DNA 的生物樣本，以進行親子鑑定？

血液、頭髮、骨頭、指甲、肌肉組織、器官組織、皮膚組織和羊水。

5. 提取 DNA 樣本進行聚合酶鏈反應（PCR）的目的是什麼？

為了增加目標 DNA 的數量。

延伸討論問題

6. 在進行 PCR 時，除 DNA 樣本外，還需要將以下的化學品添加到 PCR 管中。這些化學品的功能是什麼？

化學品	功能
無核酸酶的水	為反應提供液體環境，並維持最終容積
10× <i>Taq</i> 緩衝液	為 <i>Taq</i> 聚合酶提供合適的化學環境，例如提供最佳pH值和足夠的離子濃度
25 mM 氯化鎂	用作 <i>Taq</i> 聚合酶的輔助因子，從而增強 <i>Taq</i> 活性
10 mM dNTP	提供游離核苷酸以合成新的DNA鏈
正向和反向引物	正向和反向引物分別連接到要擴增的DNA序列的起點和終點。這可標示DNA樣本中將要擴增的目標區域的兩端接來指導DNA的擴增過程。
<i>Taq</i> 聚合酶	這酶催化游離核苷酸組成一條新的DNA鏈的合成作用

7. 在親子鑑定中，進行 PCR 時通常會檢查 18-20 個基因座的短串聯重複序列（STR），以比較每個基因座中兩個等位基因的長度。如果基因座的兩個等位基因的長度相同，此等位基因稱為純合子；若長度不相同，就稱為雜合子。通過比較不同基因座等位基因的大小，可相應地確定測試樣本的血源關係。

- (a) 從書籍和互聯網上搜尋資料，列出一些在親子鑑定中常見帶有 STR 的基因座。

常見例子有 *CSF1PO*, *FGA*, *TH01*, *TPOX*, *VWA*, *D3S1358*, *D5S818*, *D7S820*, *D8S1179*, *D13S317*, *D16S539*, *D18S51* 和 *D21S11*。

- (b) 確定以下的 STR（即位於人類 2 號染色體上的 *TPOX*）中重複單元 [AATG] 的數量。

CCACACAGGTAATGAATGAATGAATGAATGAATGCCTAAGTGCC

重複單元 [AATG] 的數量為 6。

- (c) 從下表中所列出特定的基因座上的等位基因的短序列的重複數量，判斷等位基因是雜合子還是純合子。

基因座	重複的短序列	等位基因 1 的重複數量	等位基因 2 的重複數量	雜合子 或 純合子
STR D5S818 位於 5 號染色體上	AGAT	7	8	雜合子
STR CSF1PO 位於 5 號染色體上	AGAT	13	13	純合子
STR D7S820 位於 7 號染色體上	GATA	6	12	雜合子
STR D8S1179 位於 8 號染色體上	TCTA	10	10	純合子

- (d) 根據以下結果，哪些人有機會有血源關係？

	男士 A	男士 B	男士 C
基因座	等位基因 1 / 2 的重複數量	等位基因 1 / 2 的重複數量	等位基因 1 / 2 的重複數量
STR D5S818	10 / 12	7 / 8	10 / 12
STR CSF1PO	13 / 13	13 / 12	13 / 13
STR D7S820	6 / 12	12 / 12	6 / 12
STR D8S1179	10 / 10	8 / 10	10 / 10

男士 A 與男士 C 有機會有血源關係，因為他們在 4 個等位基因座的等位基因的短序列的重複數量全都吻合。

IX. 參考資料

Eskandarion, M., Najafi, M., Akbari Eidgahi, M., Alipour Tabrizi, A., & Golmohamadi, T. (2015). Optimization of short tandem repeats (STR) typing method and allele frequency of 8 STR markers in referring to forensic medicine of Semnan Province. *Journal of Medicine and Life*, 8(Special Issue 4), 180–185. PubMed PMID: 28316728; PubMed Central PMCID: PMC5319289.

International Committee of the Red Cross. (2009). *Missing people, DNA analysis and identification of human remains: A guide to best practice in armed conflicts and other situations of armed violence*. Geneva: ICRC.

Micka, K. A., Sprecher, C. J., Lins, A. M., Theisen Comey, C., Koons, B. W., Crouse, C., et al. (1996) Validation of multiplex polymorphic STR amplification sets developed for personal identification applications. *Journal of Forensic Science*, 41(4), 582–90. PubMed PMID: 8754568.