

中華民國第 55 屆中小學科學展覽會 作品說明書

國中組 化學科

030214

分子天堂路

學校名稱：康橋學校財團法人新北市康橋高級中學

作者： 國二 徐浚瑋 國二 楊心美 國二 林亮宇	指導老師： 田代蕙 余承翰
---	-----------------------------

關鍵詞：電泳、電解

摘要

本實驗始於好奇的想法，我們因為想知道怎麼檢測DNA產生很大的興趣，若把非極性物質加入電泳基中，分子分離的效果是否會更明顯？以此想法作整個實驗的主體開始研究。然而，過程中遭遇許多挫折，我們找不到可以支持的相關資料，所以在實驗的建立上須嘗試自己解決問題。從數據上分析，不管是洋菜膠還是蛋白質電泳，加入六個碳數的物質（葡萄糖）後，小分子分離效果更優異，所以在進行電泳分離物質時，加入葡萄糖能使分離的效果更明顯。我們也發現此效果有一定的限度，加入16~18個碳的物質（PEG 400），結果和預期不同，雖然我們無法精準測出不同物質的最佳碳數，但我們證明了兩點 1. 加入非極性物質能使電泳效果更佳 2. 使用非極性物質的碳數有一定的上限。

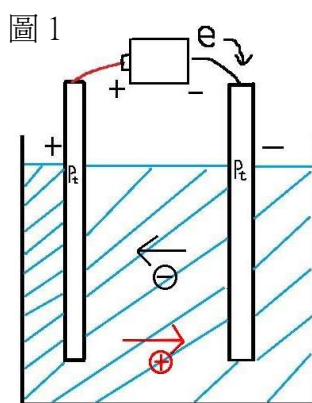
壹、研究動機

我們在電視上看偵探片時常會看到警察利用 DNA 檢驗來抓住犯人，這讓我們產生了懷疑，到底 DNA 檢驗是如何進行的呢？經由上網查詢資料，發現原來要檢測DNA 要用專業的儀器，進行『電泳』才行，不過我們不死心所以又再去問了老師，與查詢課本和其他資料瞭解到，電泳的原理是利用分子的帶電性（電荷數）與分子量來做分離檢驗。帶電荷的蛋白質，在電場中會往與其所帶電荷電性相反的電極泳動稱為電泳，和我們在國中課程中學到的電解質移動方向一樣。而目前洋菜膠體電泳（agarose gel electrophoresis）是分離及分析 DNA 最簡單和最普遍的方式，DNA 分子因為帶負電，所以在電場的作用下會往正極移動，而且移動的速度與其分子量大小成反比，除電場大小及 DNA 本身分子大小外，膠體的密度高低也明顯影響 DNA 分子在膠體中運動的速度，一般分離 DNA 常用的膠體濃度範圍為 0.7%~2%，選擇與欲分離 DNA 分子量適當的濃度，才能有較佳的解析，膠體濃度與 DNA 分離解析間相關性如下表。

表格 1：膠體濃度與 DNA 分離解析間相關性

膠體濃度(%)	DNA最佳分離解析之尺寸範圍(kb)
0.5	30-1.0
0.7	12-0.8
1.0	10-0.5
1.2	7-0.4
1.5	3-0.2

老師為了讓我們更加的了解，就把各種染劑混在一起，在水溶液中做了一次模擬的實驗，可是卻因為結果並不明顯所以失敗告終。我們認為，在實驗的過程當中，一定是什麼樣的物質影響了分子的移動，導致效果不明顯，為了解決我們的疑慮，我們決定利用所學來做個模擬電泳的工具，並且想探討在電泳膠中，加入什麼樣的物質，才能讓不同的帶電物移動較明顯，方便觀察。



貳、研究目的

- 一、探討不同濃度的洋菜膠進行的電泳實驗反應
- 二、觀察將不同碳數之物質（非極性; 3C、4C、6C）加入洋菜膠後，電泳實驗所產生的效果
- 三、比較先前的結果與真正的 DNA Loading Dye 的差異
- 四、找到最適合跑 DNA 電泳的膠體條件
- 五、比較不同種類膠體加入不同碳數物質後，分子移動的差異

參、研究藥品與器材

一、器材：培養皿、量筒 100ml&10ml、燒杯 500ml&100ml&50ml、塑膠或玻璃滴管、微量吸管、玻璃棒、試管、秤紙、尺、刮勺、剪刀、碼表、相機、噴槍、微波爐、電子秤、交直流電源裝置、電泳槽、做膠檯

圖 2：自製電泳槽

第一代	固定電極的架子是用紙板製成，因為紙板不透明，所以有觀察上的困難因此不採用	第二代	改用透明塑膠架子兩邊可以固定，但距離太短無法到達直徑，會與預設直徑的控制變因有所衝突故不採用
第三代	修正後的透明架子，但沒辦法固定所以不採用	第四代	符合預期，我們進行了所以初步的實驗，之後因改變實驗方式而停止使用

圖 3：現用電泳槽。我們了解電泳的原理之後，向指導老師所屬之實驗室借用；前四代的電泳槽具有放電不均勻的共同問題，如今使用的電泳槽可均勻放電，增加精準度。

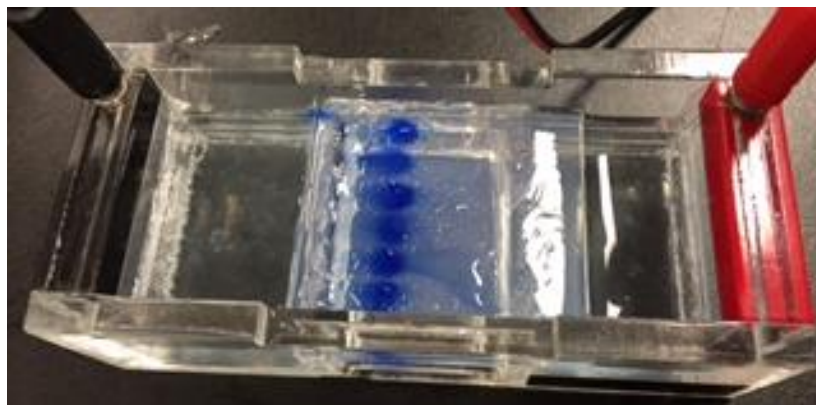


圖 4：自製做膠（洋菜膠）台



第一代		第二代	
	用鐵尺壓出染劑槽，距離培養皿壁 1cm，沒有問題，因好奇所以製作了第二代。		用火柴壓出染劑槽，因為好奇若染劑是由單點出發那是否會呈單一直線，但是後發現結果不如預期（四散），所以用第一代進行初步的實驗進行。

圖 5：現用做膠檯。固定洋膠體大小為長 6cm 和寬 5cm，能壓製六或八個染劑槽。



器材說明：電極間間距需符合預設且每次都要相同，所以現在的做膠檯是因為它同時可壓出六或八孔，量多，較不耗染劑，且同時又能達到節省時間和所求的效果。

二、藥品：

做膠材料：洋菜粉(Agarose)、甘油(3C)、乙醚(4C)、葡萄糖(6C)、PEG(400C)、TAE（電解液）

染劑：考馬斯亮藍液(coomassie blue)、DNA Loading Dye、prestained protein ladder

SDS-PAGE 材料：acrylamide、bis-acrylamide、buffer、AP、TEMED

使用說明：

(一)原本我們選擇濃度 1%、5%、10%的葡萄糖做實驗，但發現 1%、10%的效果已經達到我們的預期，故不加入 5%濃度做實驗。

(二)TAE：是一種電解液，可以讓酸鹼的影響值降低，pH 質變小，能幫助電泳的效果。

肆、研究過程與方法

一、觀察不同物質加入洋菜膠後，電泳實驗產生的效果

表格 2：使用藥品比例

	洋菜粉	純水	甘油	葡萄糖	乙醚	TAE	考馬斯亮藍液
對照組	1%	99%					
甘油組	1%	98%	1%				
葡萄糖組	1%	89%		1%、10%			
乙醚組	1%	98%			1%		
稀釋 TAE		1%				99%	
考馬斯亮藍液		89%	1%				10%

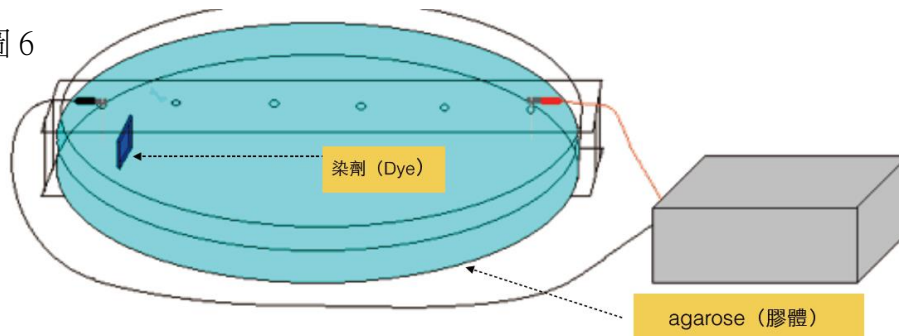
(一)、研究步驟：

1. 初步的實驗使用一代做膠檯 & 四代電泳架，實驗步驟如下：

- (1) 準備器材
- (2) 依上述比例加入純水、洋菜膠粉、甘油或葡萄糖液或乙醚或都不加（對照組）
- (3) 依上述比例加入 TAE（在膠體內的重量百分濃度為 1%）
- (4) 包上保鮮膜（防蒸發）
- (5) 放進微波爐，時間設定一分半（50ml）或三分鐘(100ml)
- (6) 倒進培養皿
- (7) 放入一代做膠檯
- (8) 壓好染劑槽
- (9) 等待它凝固，確認它凝固
- (10) 把膠體套上四代電泳架
- (11) 用滴管吸起染劑 $2\mu\text{l}$ ，滴入染劑槽中
- (12) 拿出直流電流裝置

- (13) 把電線和電極夾在一起，卡在四代電泳架的孔洞中並插在膠體上
- (14) 把電壓設為 100V，把時間設為 30min，把電流設為 2 mA
- (15) 等染劑跑到預定位置（2cm）
- (16) 記錄膠體狀況、染劑情況，拍照

圖 6

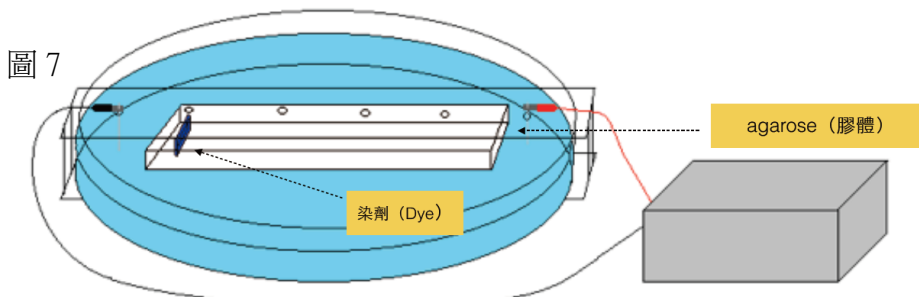


淘汰原因：本設計最後被淘汰，因為我們發現與其用距離來算時間，不如用時間來算距離，所以最後所有實驗我們都固定時間來算距離，且染劑在這個膠體環境中跑太慢，可能較不易導電，所以不續用。

2. 改版實驗使用四代電泳架，實驗步驟如下：

- (1) 準備器材
- (2) 依上述比例加入純水、洋菜膠粉、甘油或葡萄糖液或乙醚或都不加（對照組）
- (3) 依上述比例加入 TAE（在膠體內的重量百分濃度為 1%）
- (4) 包上保鮮膜（防蒸發）
- (5) 放進微波爐，時間設定一分半（50ml）或三分鐘(100ml)
- (6) 倒進培養皿
- (7) 放入一代做膠檯
- (8) 壓好染劑槽
- (9) 等待它凝固，確認它凝固

- (10) 用美工刀把它切成 5x5cm，再對切成 2.5x5cm
- (11) 用美工刀在切好的膠體的短邊切長 1.5cm 的染劑槽
- (12) 用滴管吸起染劑，滴入染劑槽中
- (13) 在膠體的外圍加入稀釋過的 TAE (100:1 稀釋)
- (14) 拿出直流電流裝置
- (15) 把電線和電極夾在一起，卡在四代電泳架的孔洞中並插在膠體上
- (16) 把電壓設為 100V，把時間設為 30min，把電流設為 2 mA
- (17) 等染劑跑到預定位置 (2cm)
- (18) 記錄膠體狀況、染劑情況，拍照



淘汰原因：雖然一個培養皿可以做兩個膠體，也達到了希望節省材料的目的，但實驗多次後發現製作這樣膠體的話會因電極單點接觸而使電流量太強，同時也會侵蝕膠體後端，造成實驗結果不夠精準，但保留實驗數據作參考。

3. 最終洋菜膠體實驗步驟

(1) 製作膠體

表格 3：因為實驗條件不同，以下是不同膠體的配置材料

	洋菜膠粉	純水	0.5X TAE	甘油	乙醚	葡萄糖
對照組	0.5g	48.5g	1cc			
甘油 (3C)	0.5g	48g	1cc	0.5cc		
乙醚 (4C)	0.5g	48g	1cc		0.5cc	
10%葡萄糖 (6C)	0.5g	43.5g	1cc			5cc

1. 取洋菜膠粉 0.5g，加入 48.5g 純水，0.5X TAE 1g 配置成 1%洋菜膠，依上述比例加入甘油、乙醚、葡萄糖或者都不加

2. 將燒杯放入微波爐中，加熱 3-5 分鐘至滾燙

註:在加熱過程中需放入約 20cc 純水一起加熱，因為可以彌補加熱後洋菜膠的水分蒸發

3. 將加熱後的 1%洋菜膠加入 50cc 的試管中，加入純水至刻度 50cc，輕輕混和均勻

註:混和過程中動作需輕柔以免產生氣泡

4. 將 1%洋菜膠倒入第三代做膠台中，每格 25ml，插入孔夾，靜待冷卻

註:可放重物在上，壓緊檯子

(2) 配置染劑

材料: DNA Loading Dye 6X、50X TAE 0.5X 為 running buffer

1. 將冷卻膠體放入電泳槽，加入 0.5X TAE，需要覆蓋過膠體，形成一個均勻的電場

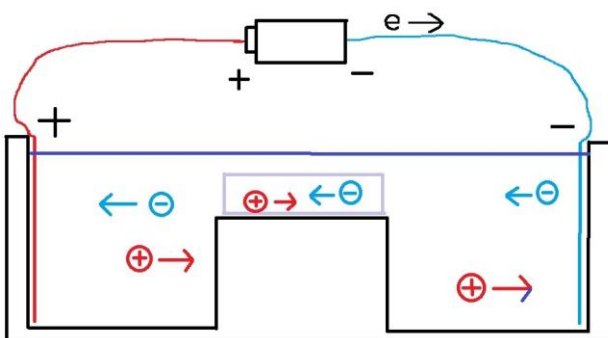
2. 將 6X DNA Loading Dye 以純水稀釋至 1X，以微量吸管加入膠體的染劑槽，每一格染劑槽為 $20 \mu\text{l}$

(3) 開始電泳過程

1. 直流電流裝置設定為 50V，固定電流為 10mA（不可超過 10mA），持續時間 30 分鐘，每次各跑一個膠體

2. 設定 100V，持續時間 30 分鐘（同時跑兩個膠體）

圖 8-9：電泳示意圖



實驗操作說明：電極平躺在水中所以不會造成瞬間電流量過強而造成膠體被侵蝕，同時一次可做六或八個所以較節省材料，缺點就是因為在進行電泳時電流會產熱，同時也可能會加熱 TAE 以及電極，反覆的加熱會使電力下降進而影響到實驗結果。

解決方式：因此我們每做完一次實驗都要更換，共有兩組等量的稀釋 TAE 輪流交替使用，讓每組 TAE 有時間冷卻以不影響結果。

二、使用不同類膠體加入不同碳數物質後分子移動的差異

(一) SDS-PAGE 實驗步驟

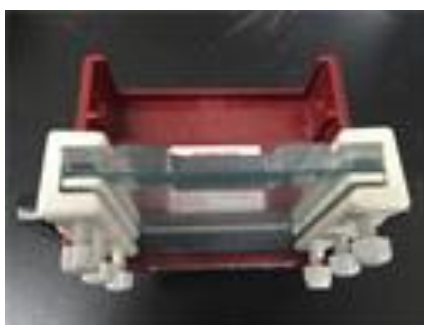
(1) 架設做膠台

a. 將兩片玻璃四邊對齊，以免漏膠，夾上做膠台插上卡榫卡緊玻璃底部

圖 10：對齊玻璃四邊



圖 11：將玻璃夾上做膠台



(2) 製作膠體

表格 4：因為實驗條件不同，以下是不同膠體的配置材料

	Acrylamide	純水	3X buffer	Glycerin	Glucose	PEG400	AP	TEMED
對照組	3ml	6ml	3ml				50 μ l	5 μ l
10%甘油	3ml	3ml	3ml	3ml			50 μ l	5 μ l
10%葡萄糖	3ml	3ml	3ml		3ml		50 μ l	5 μ l
10%PEG 400	3ml	3ml	3ml			3ml	50 μ l	5 μ l

先製作下層膠：

- a. 取 24% acrylamide 3ml，加入 3ml 純水，3ml 3X buffer 和 3ml 10%Glucose、Glycerin、PEG 400(對照組用純水替代)配置成 10%膠體
- b. 加入 50 μ l AP、5 μ l TEMED 使其凝固
- c. 將燒杯輕輕晃動均勻，以免產生氣泡
- d. 滴入做膠台，靜待 45min 凝固
- e. 滴入 50%酒精，因為密度較小所以會浮在膠體上面，可以清楚看到分層

圖 12：下層膠與酒精的分層



上層膠：

- a. 1. 取 acrylamide 3ml，加入 3ml 純水，3ml 3X buffer 和配置成 8%膠體
- b. 加入 50 μ l AP、5 μ l TEMED 使其凝固
- c. 將燒杯輕輕晃動均勻，以免產生氣泡
- d. 滴入做膠台，靜待 15min 凝固

(3) 配置染劑

- a. 將冷卻的膠體架設到電泳槽
- b. 夾入標示染劑槽所在位置之卡片
- c. 滴入 prestained protein ladder，每格之間間距為一格染劑槽，降低實驗誤差
- d. 抽起卡片，蓋上蓋子

圖 13-16：完成滴入染劑



(4) 開始電泳過程

a. 直流電流裝置設定為 170V，持續時間 45 分鐘，每次各跑一個膠體

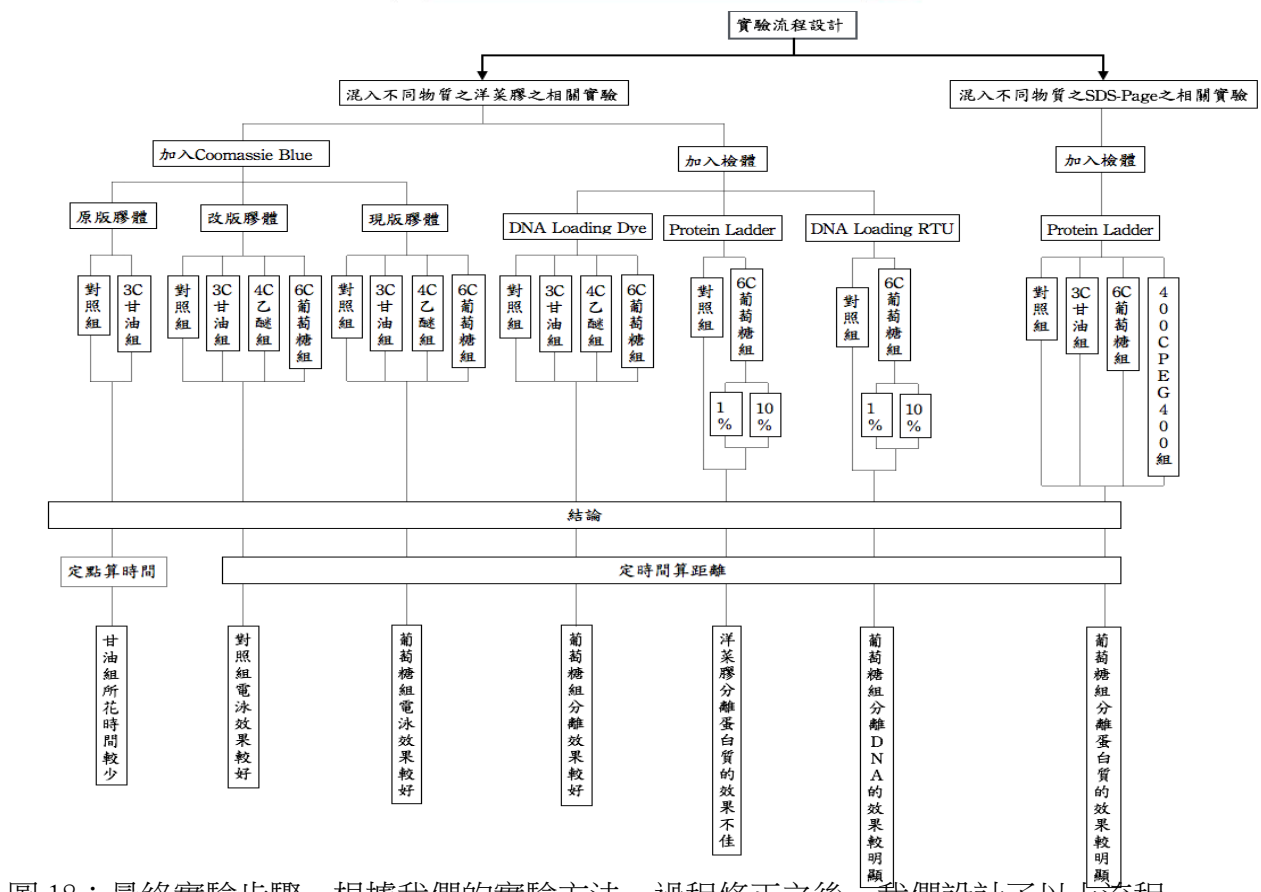
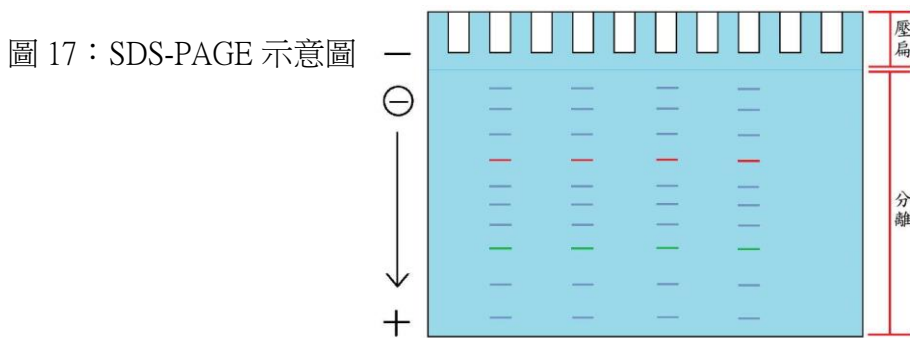


圖 18：最終實驗步驟，根據我們的實驗方法，過程修正之後，我們設計了以上流程

伍、研究結果

一、使用原版膠體進行實驗

實驗一：觀察洋菜膠中加入不同碳數的物質，並利用考馬斯亮藍液的移動距離找出自製電泳槽的最佳效果，找出添加多少個碳數的物質能夠對膠體在執行電泳的結果上有更大的幫助。

實驗設計：

膠體	目標距離	電壓	電解液	染劑	濃度	電流
洋菜膠	2cm	50v	TAE	考馬斯亮藍液	1%	2mA

實驗結果：若膠體內加入甘油（3C），則染劑的移動距離達 2cm 後，所花的時間較短。

表格 5：單位：時間分/秒

濃度	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	結果
對照組	25' 30"	17' 48"	11' 41"	12' 27"	23' 23"	18' 11"
甘油（3c）	15' 30"	10' 68"	13' 90"	19' 70"	11' 77"	14' 55"

圖 19：比較對照組與加入甘油的膠體染液移動至 2cm 所需的時間

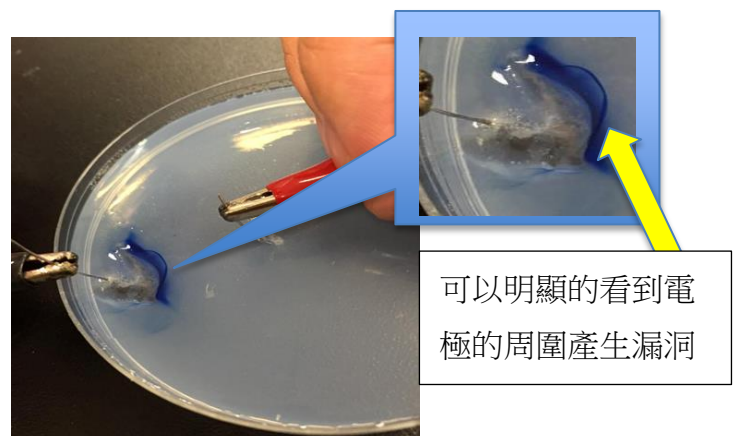
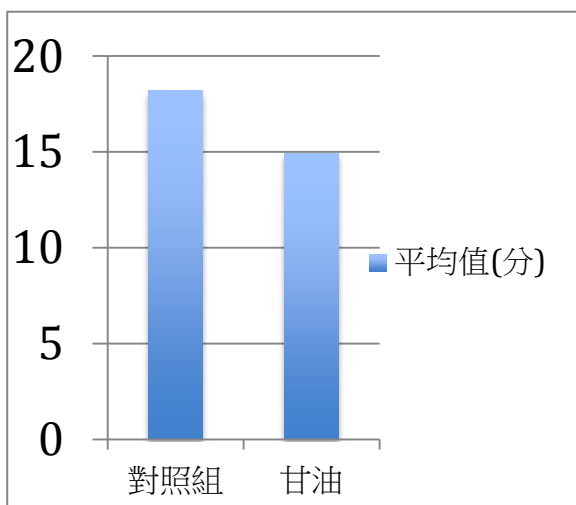


圖 20：原版膠體實驗一討論解說圖片

實驗討論：我們發現，甘油（3C）的表現較明顯，若加入其他的物質去測量有較高的困難度，所以我們未列出其他物質的實驗數據，因為用時間為記錄基準需要太多時間，且一旦實驗太長則膠體表面會有凹陷，甚至在電極周圍的膠體會融化，甚至蒸發，而這個會在實驗上造成很大的影響，但是基本上這些資料是可用的，我們認為會造成這樣的原因是：因為比起沒加甘油的對照組，甘油就像是潤化劑，能夠使染劑跑得更快，也因此加甘油的膠體跑 2cm 所需之時間會較純粹的洋菜膠還短。

二、使用改版膠體進行實驗

實驗一：探討添加多少個碳能夠在非極性上能夠對膠體在執行電泳的結果上有更大的幫助。

實驗設計：

膠體	實驗時間	電壓	電解液	染劑	濃度	電流
洋菜膠	30min	50v	TAE	考馬斯亮藍液	1%	2mA

實驗結果：加入葡萄糖（6C）後，染劑移動的距離較對照組短。

表格 6：單位：公分

物質	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	平均值
對照組	1.5 cm	2 cm	1.7 cm	2.3 cm	1.7 cm	1.84 cm
甘油 (3C)	2.1 cm	1.9 cm	1.6 cm	1.5 cm	1.7 cm	1.76 cm
乙醚 (4C)	1 cm	1.2 cm	1.3 cm	1.2 cm	1.3 cm	1.2 cm
葡萄糖 (6C)	1.2 cm	0.8 cm	1.3 cm	1.4 cm	1.3 cm	1.2 cm

圖 21：洋菜膠體加入不同碳數的物質後

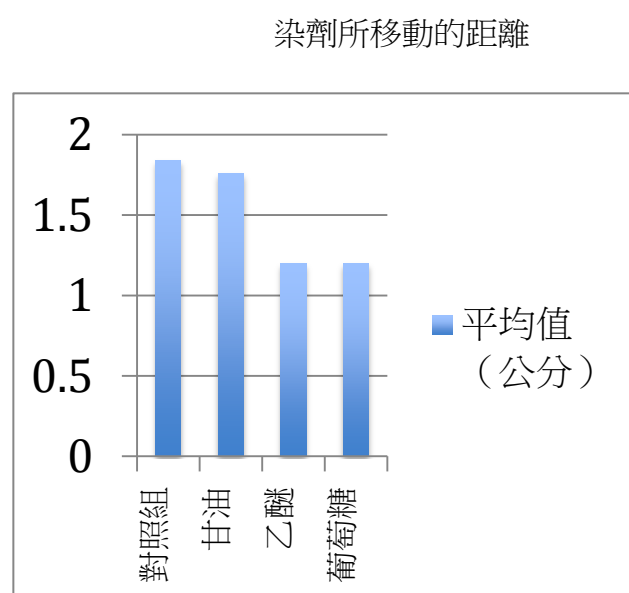


圖 22：改版膠體實驗一討論解說圖片



明顯的看到染劑成圓弧狀，且膠體也因單點電流過大造成表面被侵蝕

實驗討論：我們發現這個實驗的結果與後續實驗之結果有所衝突，以下為可能之原因：

(一)由於此實驗同時共進行四個項目，所以可能會造成固定電流的情況下單一膠體所受的電壓不同而造成誤差。

(二)此實驗使用的電極是 2B 筆心，但筆心只是單點接觸在液體表面，單點電流過大，所以可能造成造成染劑最後成弧形，因而造成可能性的誤差。

(三)單點電流過大，導致膠體表面被侵蝕，而造成誤差，所以綜觀上述理由可知改版交體實驗有所缺陷，因此資料不使用，但保留作參考之用。

三、修正後，使用目前膠體進行實驗

實驗一：探討不同濃度的洋菜膠進行的電泳實驗反應。

我們從其他資料中知道了 1%、2%的洋菜膠能更快速的進行電泳，而我們想知道是 1%較好，還是 2%較佳，所以先以這個為第一個實驗，作為往後製作膠體的基準。

實驗設計：

膠體	實驗時間	電壓	電解液	染劑	電流
洋菜膠	30 min	50V	TAE	考馬斯亮藍液	2mA

實驗結果:

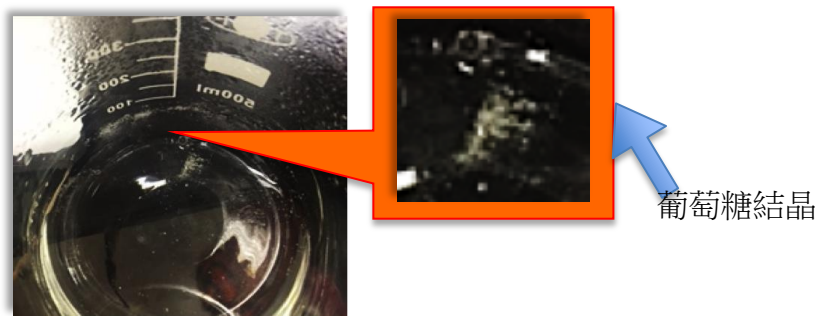
表格 7：濃度為洋菜膠濃度，結果以考馬斯亮藍液移動公分表示

濃度	結果/頭(平均)	結果/尾(平均)
1%	1.375	2.341666667
2%	0	1.083333333

實驗討論：濃度越高則膠體內之碳量就越高，可能代表其非極性則越強，所以則速度本應較快，但 2%之洋菜膠容易結成晶體所以較不適用於做此實驗。

註：由於不知道不明晶體是什麼，所以我們把它稱作 X，然後根據我們的推測，不明物體 X 是：葡萄糖，因為洋菜膠 $1(C_{12}H_{18}O_9) + 水 3(H_2O)$ 會轉變成葡萄糖 $2(C_6H_{12}O_6)$ 。

圖 23：2% 洋菜膠體凝結狀況之說明



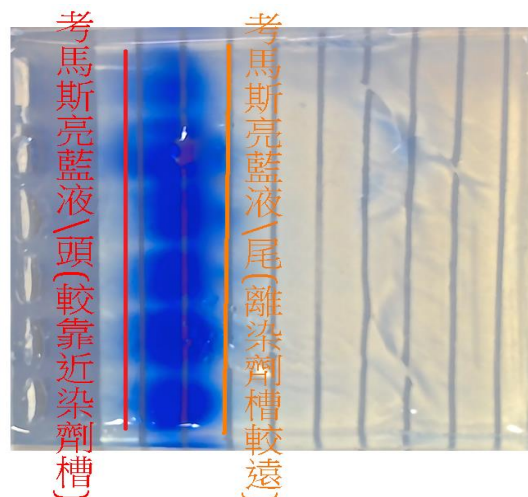
小結：在本實驗中最合適的洋菜膠濃度比例為 1%。

實驗二：觀察將不同碳數之物質 (非極性; 3C、4C、6C) 加入洋菜膠後，電泳實驗產生的效果。

實驗設計：

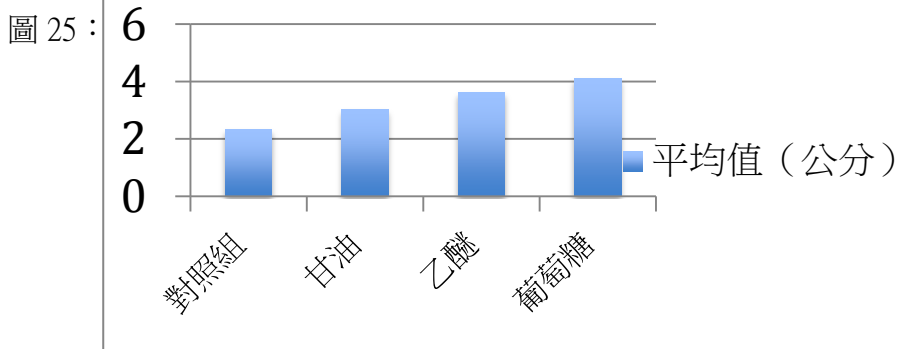
膠體	實驗時間	電壓	電解液	染劑	濃度	電流
洋菜膠	30 min	100V	TAE	考馬斯亮藍液	1%	2mA

圖 24：染劑頭尾位置圖



實驗結果：表格 8：將不同碳數物質加入洋菜膠結果

物質	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6	No.7	No.8	No.9	No.10	No.11	No.12	平均
對照組/頭	1	1.1	1	1.2	1.7	1.7	1.7	1.6	1.6	1.8	1	1.1	1.375
對照組/尾	2	2.1	2.1	2.3	2.5	2.5	2.5	2.7	2.5	2.5	2.5	1.9	2.341667
甘油/頭	1.5	2.8	1.8	1.8	1.6	1.7	2	2.5	2.4	2.5	1.5	2.8	2.075
甘油/尾	2.7	3.4	2.6	2.5	2.6	2.6	3.4	3.2	3.5	3.5	2.6	3.8	3.0333
乙醚/頭	2.2	2.1	2	2.4	1.9	2.5	2.3	2.3	2.4	2.4	1.9	2.3/3	2.21667
乙醚/尾	3.6	3.8	3.6	3.8	3.63	3.5	3.3	3.6	3.7	3.5	3.5	3.8	3.61667
葡萄糖/頭	3	2.8	2.5	2.5	2.9	3.5	3.2	3.4	2.7	3.3	2.5	4.1	3.033
葡萄糖/尾	4.2	3.8	4	4	3.9	4.6	4.4	4.2	3.3	3.4	3.5	5.1	4.1033



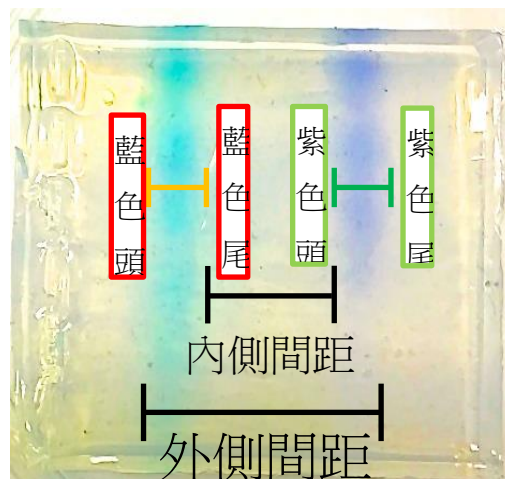
小結：這個實驗結果跟先前原版膠體的結果相近，只要加入含碳物質在洋菜膠內就如同潤滑液一樣，可以加速電泳的速率，而碳數越多移動距離越長，發現葡萄糖是四組之中最快的。

實驗三：混合不同染劑進行電泳，觀察是否與之前實驗結果相近，只是我們改用 DNA Loading Dye 當作染劑，觀察與先前結果是否類似。

實驗設計：

膠體	實驗時間	瓦數	電解液	染劑	濃度	電流
洋菜膠	30 min	100V	TAE	DNA Loading Dye	1%	50mA

圖 26：染劑頭尾位置圖

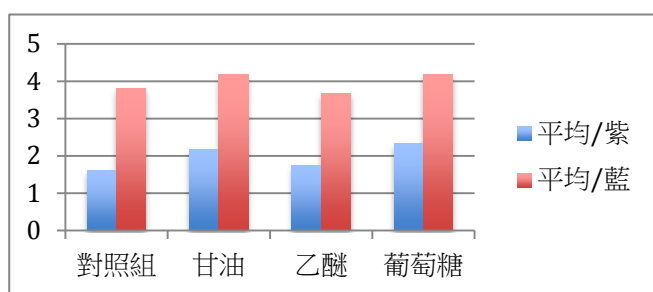


實驗結果：

表格 9：DNA Loading Dye 經過電泳的作用下移動的距離比較，單位：公分

物質 /距離	No.1 紫	No.1 藍	No.2 紫	No.2 藍	No.3 紫	No.3 藍	No.4 紫	No.4 藍	No.5 紫	No.5 藍	No.6 紫	No.6 藍	平均紫	平均藍
對照組/頭	1	3	1.3	3.2	1	3	0.9	3	1.1	3.5	1.2	3.5	1.083	3.253
對照組/尾	1.5	3.9	1.8	3.9	1.5	3.7	1.4	3.8	1.7	3.7	1.6	3.8	1.6	3.8
甘油/頭	1.5	3.5	1.3	3.4	1.3	3.5	1.5	3.5	1.6	3.2	1.5	3.7	1.45	3.5
甘油/尾	2	4.3	2.2	4.2	2.3	4.1	2.2	4.1	2.2	3.8	2.1	4.2	2.1667	4.1667
乙醚/頭	1	3.2	0.9	3	ND	ND	1	3.2	ND	ND	ND	ND	0.9667	3.1333
乙醚/尾	1.7	3.7	1.7	3.6	ND	ND	1.8	3.7	ND	ND	ND	ND	1.7333	3.6667
葡萄糖/頭	1.3	4.2	ND	ND	1.5	3.9	1.5	3.8	ND	ND	1.5	3.8	1.38	3.74
葡萄糖/尾	2	3.8	ND	ND	2.1	4.4	2.1	4.4	ND	ND	2.2	4.3	2.34	4.18

圖 27：DNA Loading Dye 在不同成分洋菜膠中的移動距離（使用尾巴的數據）

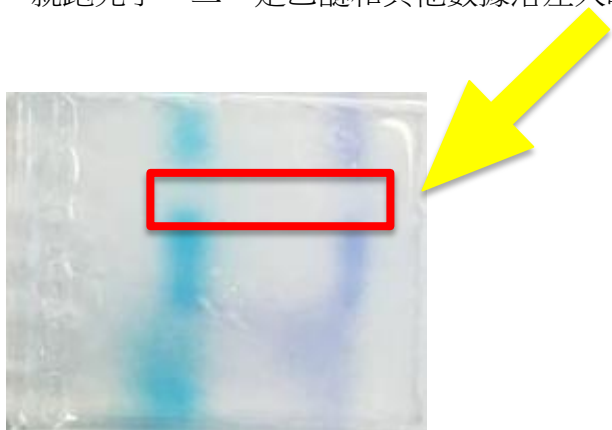


實驗討論：

(1) DNA Loading Dye的主要成分是bromophenol blue, xylene cyanol FF 和甘油, bromophenol blue 可以標定待檢物的位置，同時在電泳時會分成兩條線，一條紫和一條藍，DNA 的分子量會在這兩條之間，若我們可以控制兩條線の間距，就可以較容易觀察到DNA，以表格與圖的比較來說，葡萄糖造成兩條線的寬度範圍最廣，未來要觀察DNA會更容易。

(2)關於乙醚加入膠體後的結果，我們提出了兩項問題及可能的答案。對於後半ND(No Detect)過多的原因可能是因為潤滑劑潤滑得太過頭了，就跑光了。二，是乙醚和其他數據落差大的原因可能是乙醚揮發光了，所以有所誤差。

圖28：針對實驗結果進行討論之範例（乙醚）



(3)我們原本要加入 PEG 400，但是因為做完的膠體十分脆弱，以至於根本沒辦法取出，所以在 DNA 的電泳實驗當中我們不做 PEG 400 的相關實驗。

實驗四：探討不同物質對 DNA Loading Dye 解離的影響。

實驗設計：

膠體	實驗時間	瓦數	電解液	染劑	濃度	電流
洋菜膠	30 min	100V	TAE	DNA Loading Dye	1%	50mA

實驗結果:

表格 10：單位：公分

物質/距離	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6	平均
對照組/內側間距	1.4	1.4	1.5	1.7	1.8	1.9	1.62
對照組/外側間距	2.8	2.6	2.7	2.8	2.6	2.6	2.6833
甘油(3C)/內側間距	1.5	1.2	1.2	1.3	1.4	1.6	1.3667
甘油(3C)/外側間距	2.8	2.9	2.8	2.6	2.2	2.7	2.67

乙醚(4C)/內側間距	1.5	1.3	ND	1.4	ND	ND	1.4
乙醚(4C)/外側間距	2.7	2.7	ND	2.7	ND	ND	2.7
葡萄糖(6C)/內側間距	2.2	ND	1.8	1.7	ND	1.6	1.82
葡萄糖(6C)/外測間距	2.5	ND	2.9	2.9	ND	2.8	2.775

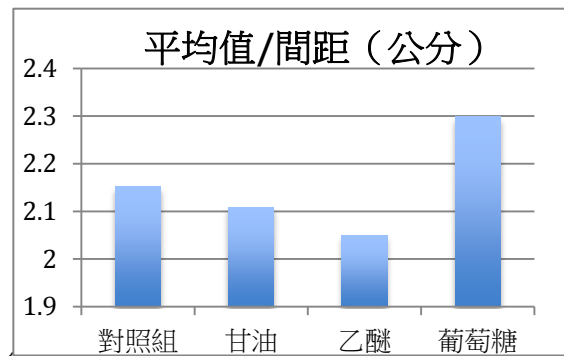
圖 29：不同碳數物質造成兩條染劑的間距不同

實驗討論：紫色線為小分子，藍色線是大分子。

因為分子大小會影響電泳速率，小分子會比大

分子跑得快，當我們在膠體內加入葡萄糖，兩個

同時加速後，小分子加速較多，相同時間下，差距會更大。



小結：葡萄糖可以影響分子的移動速度，尤其是小分子的移動。

實驗五之一：從之前的實驗結果，我們發現在洋菜膠體內加入葡萄糖（6C）物質的電泳效果最好，加上評審的建議，我們想找到何種濃度的葡萄糖加入膠體內效果最好，所以我們配置不同濃度的葡萄糖液加入膠體後，再使用 DNA loading dye 當成染劑，觀察實驗結果。

實驗設計：

圖 30：DNA loading dye

膠體	實驗時間	電壓	電解液	染劑	濃度
洋菜膠	30 min	100V	TAE	DNA Loading dye	1%、10%



實驗結果：

圖 31：表示電泳過程是同時進行



圖 32：agarose 1% agarose 1% + 1%葡萄糖



圖 33-36： agarose 1% agarose 10% + 1% 葡萄糖

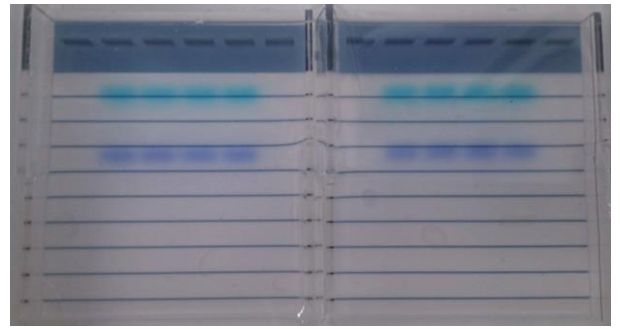


agarose 1%

agarose 10% + 1% 葡萄糖

agarose 1%

agarose 1% + 10% 葡萄糖



agarose 1%

agarose 1% + 10% 葡萄糖



圖 31 到 32 顯示雖然兩者有速度的落差，但測量後依然是葡萄糖的距離較廣，其中 10% 較佳。

圖 33 到 36 顯示染劑依然有在移動，且間距越拉越大。

實驗討論：

我們發現對照組與洋菜膠加入 1%、10% 葡萄糖組中，1%、10% 組雖跑得比對照組慢，但分離效果較佳，小分子分離的較完整。

實驗五之二：使用 DNA 進行電泳實驗

EtBr：為了完整重現 DNA 電泳實驗，我們查到讓 DNA 顯現就是將膠體泡入 EtBr，但是他的危險性高，所以改用類似 EtBr 的 SYBR Safe (顯影劑) 並用實驗五的完成膠體泡入此顯影劑，再利用藍光使發光，因為此顯影劑會和 DNA 結合，所以會發光的位置就是 DNA 的所在位置。

實驗步驟：

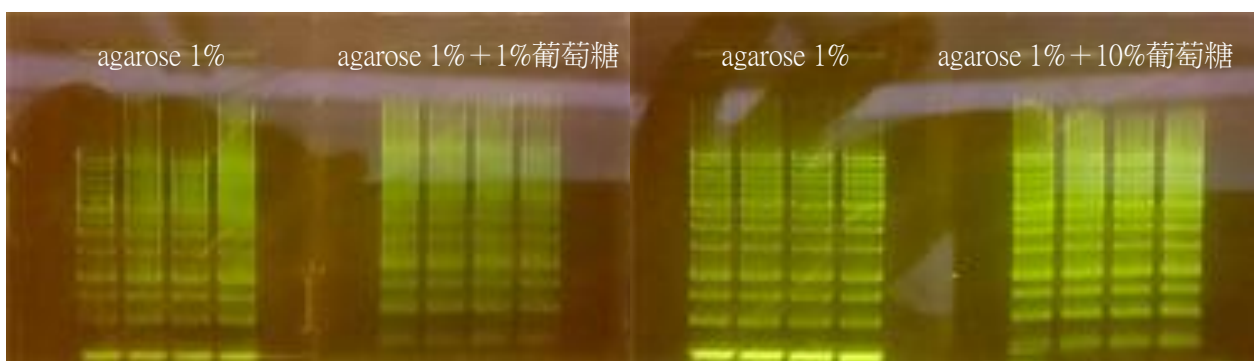
1. 準備電泳：配置 0.5X TAE Buffer 150 ml (148.5ml 純水+ 1.5 ml of 50X TAE)，將 0.5X TAE

Buffer 放入電泳槽內

2. 製作 DNA 電泳膠體：泡製 1% 洋菜膠體 150ml，並加入 0.5X TAE Buffer，利用微波爐將膠體加熱後，倒入做膠槽，待其溫度下降後，將膠體放入 4 度 c 冰箱 5 分鐘
3. 樣本製備：0.5 μ l 的 DNA sample (or DNA marker: 1kb) + 8.5 μ l 的 0.5X TAE + 1 μ l 的 10X dye
4. 開始跑膠：使用 100V，跑 40min
5. 染色觀察：膠體完成電泳後，需要使用 SYBR Safe 來染色，染色方法則是將膠體放入含有 SYBR Safe 的 0.5X TAE Buffer 中，浸泡 30 分鐘（若不夠亮可再泡到一小時）
6. 照相：將浸泡完成的膠體放置於紫外線燈下照相（cDNA 為 5429 bp，因此會位於 5000 bp 的位置附近）

實驗結果：圖 37

圖 38



實驗討論：利用圖 37-38，我們可以觀察到 DNA 在膠體進行電泳的效果如何。附圖 39 為 DNA 的標準品在 1% TAE 洋菜膠中所跑出來的結果對照圖。右邊的數字代表 DNA 的鹼基對數目（分子量大小），鹼基對數目越小跑得越遠。左邊的數字代表 DNA 濃度大小，濃度越高，亮度越高，數字也越大。所以從圖 37-38 可以觀察到，加入 10% 葡萄糖（圖右）後，不同 DNA 分子之間間距較大，而且跑得較慢。對照組（左邊）因跑得較快則濃度較濃，因此最下面的小分子區域較亮，利用圖 40 的模式圖來解釋分子的移動，就像賽跑一樣，一堆跑很快的人到最後就會擠在一起，慢慢跑反而可以讓分子慢慢分開，因此我們推測，加入葡萄糖的膠體會使 DNA 分子分離效果較佳。

圖 39: 為 DNA Loading RTU 應該要有的效果

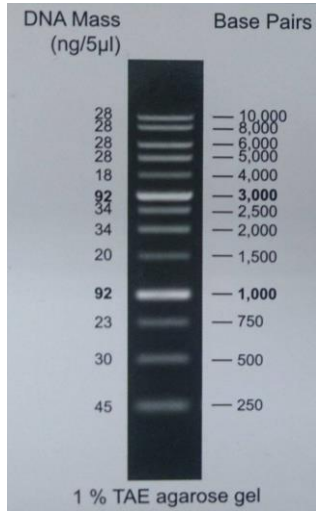
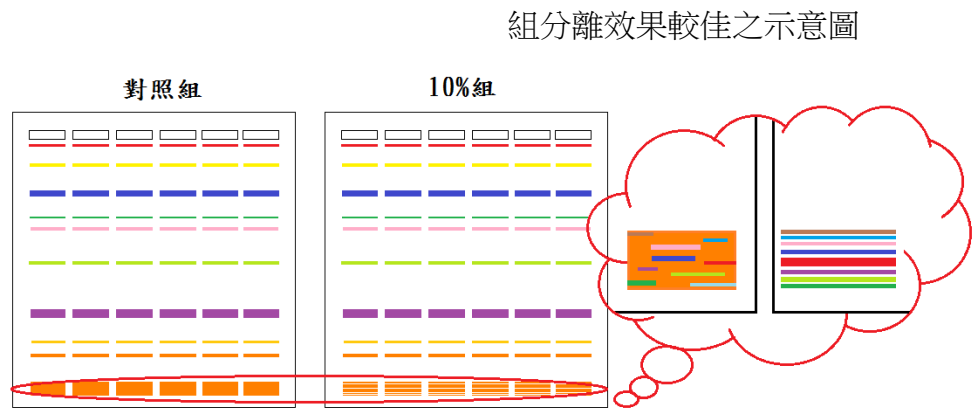


圖 40: 實驗討論中提到的在小分子區域中 10% 組分離效果較佳之示意圖



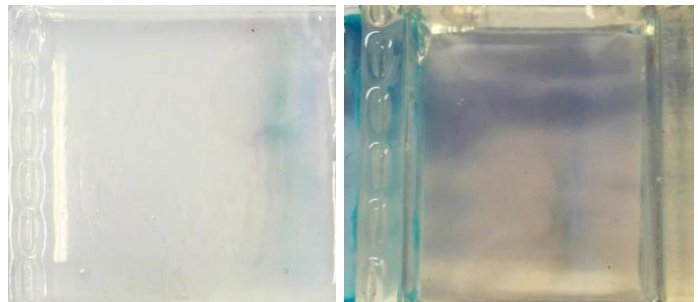
實驗六：探討蛋白質在洋菜膠體中移動的效果。

從之前的實驗結果，我們發現在洋菜膠體內加入葡萄糖（6C）物質得電泳效果最好，加上評審建議實驗樣品種類多一點，我們想知道蛋白質在洋菜膠體中的分離效果如何？所以我們加入 prestained protein ladder 當成染劑，進行此項實驗。

實驗設計：

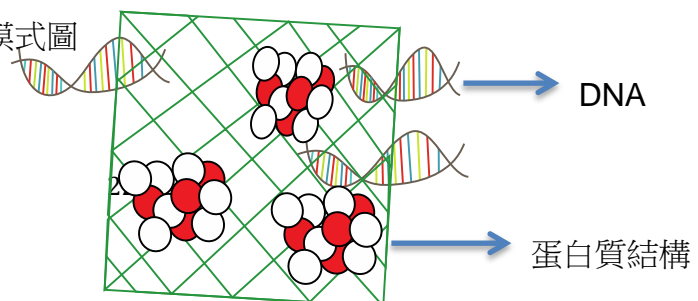
膠體	實驗時間	電壓	電解液	染劑	濃度
洋菜膠	30 min	100V	TAE	Prestained protein ladder	1%

實驗結果： 圖 41-42：實驗六的結果



實驗討論：跟之前的實驗結果相比，我們發現此次實驗的染劑顏色不明顯，推論用洋菜膠分離蛋白質的效果不佳，查了蛋白質的結構後，認為蛋白質是小分子，在電泳的過程中，因洋菜膠體內的孔洞大，蛋白質可以輕易穿過孔洞，無法與膠體有交互作用，所以效果不明顯。

圖 43：蛋白質與 DNA 在膠體內移動模式圖



小結：由圖中的模式圖，我們推測，膠體內的孔洞可能太容易讓蛋白質通過，無法與膠體有交互的作用，或許蛋白質需要再經由其他方式處理後，我們才能看到明顯變化。

實驗七：觀察不同種類的膠體加入不同碳數物質後，蛋白質分子移動的效果。

將以前的實驗加以延伸，我們使用 SDS-PAGE 膠體系統進行蛋白質電泳，觀察其實驗結果。

實驗設計：

圖 44：Prestained protein ladder

膠體	實驗時間	瓦數	電解液	染劑
SDS-PAGE	45 min	170V	正 buffer、負 buffer	Prestained protein ladder



實驗結果：

表格 11：

	Control	Glucose	Glycerol	PEG 400
No.1 (170kDa)	1	0.8	0.9	0.8
No.2 (130kDa)	1.2	1	1.1	1.1
No.3 (93kDa)	1.8	1.4	1.6	1.6
No.4 (70kDa)	2.2	1.8	2	1.9
No.5 (53kDa)	2.9	2.4	2.6	2.4
No.6 (41kDa)	3.5	3	3	2.8
No.7 (30kDa)	4.2	3.5	3.5	3.2
No.8 (22kDa)	5	4	4	3.6
No.9 (14kDa)	5.5	4.7	4.7	4
No.10 (9kDa)	6	5.5	5.5	4.7

圖 45：預期的結果

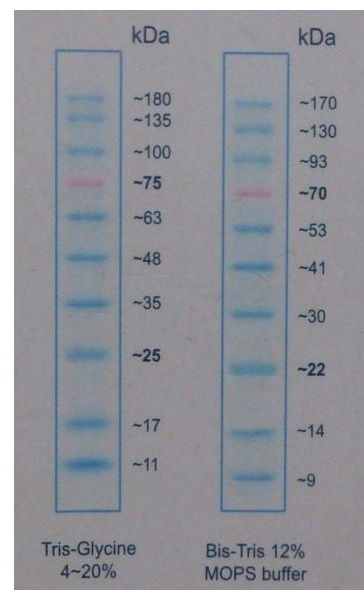


圖 46：

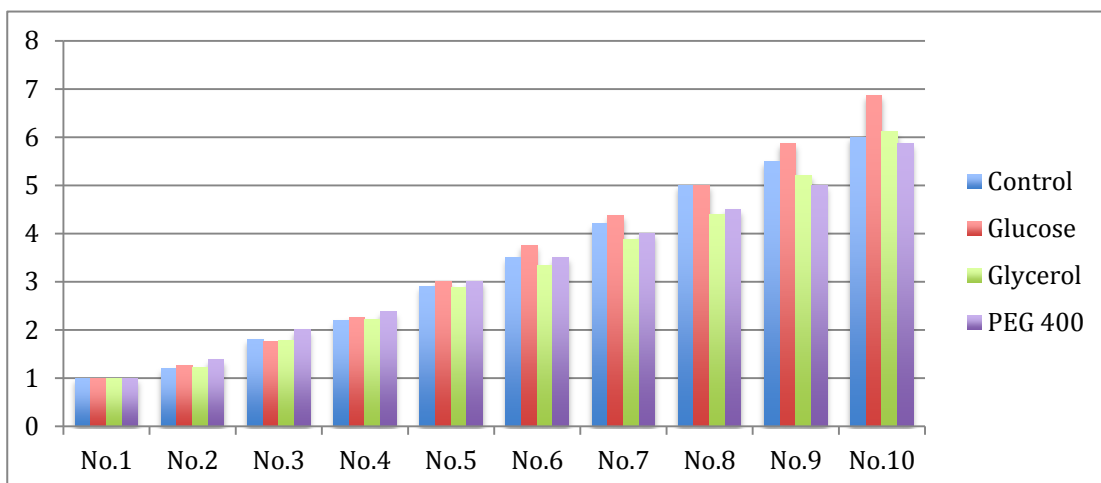


圖 47-50：電泳進行五分鐘後



圖 51-54：電泳進行 45 分鐘後



圖 55：四組實驗結果

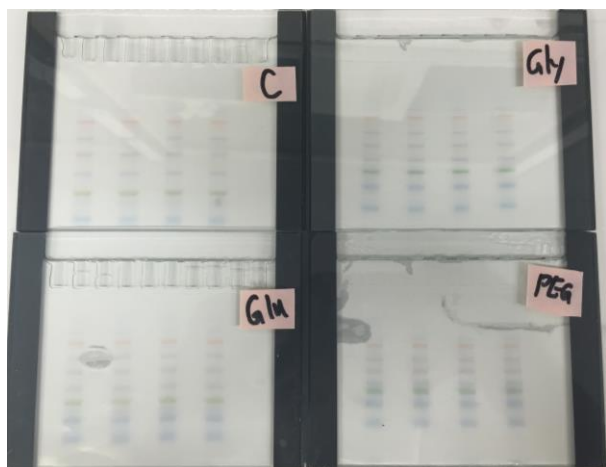


圖 56：對照組

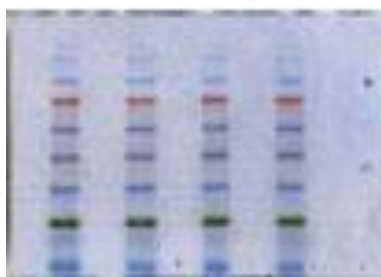


圖 57：甘油組

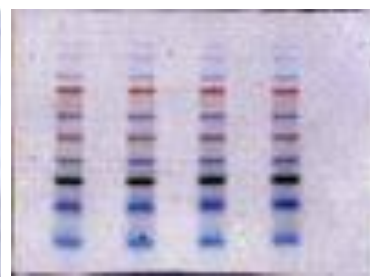


圖 58：葡萄糖組

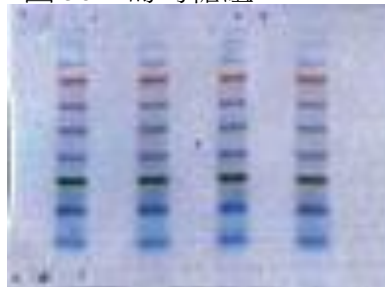


圖 59：PEG-400

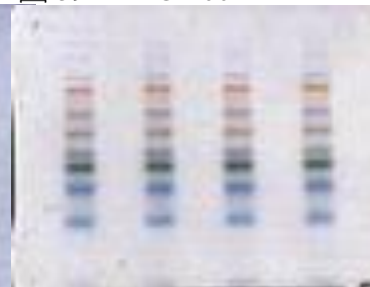
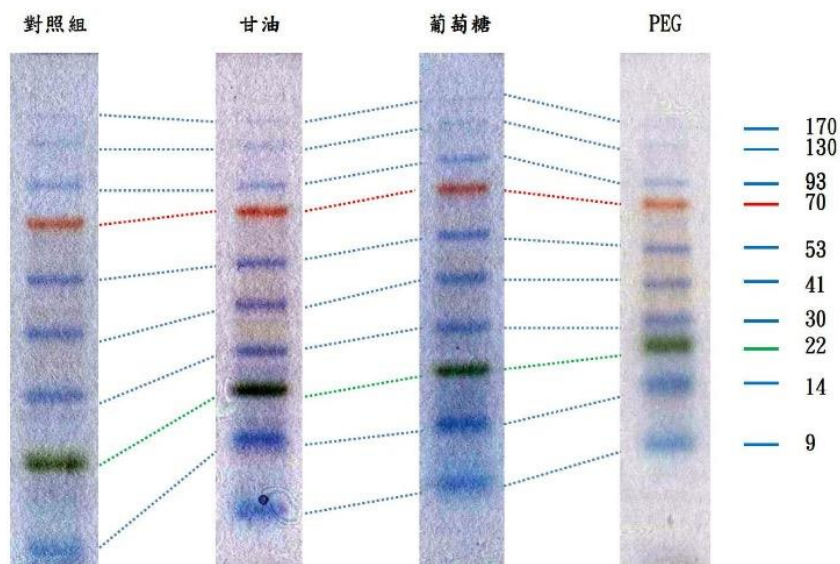


圖 60：加入不同碳數的蛋白質電泳結果比較圖



實驗討論：

為了保持實驗的一致性，所以在加入不同的碳數的實驗中，我們選擇同時進行。在固定的時間下(45min)，對於甘油和葡萄糖，在膠體中所跑的距離剛剛好可以均勻分散在 SDS-PAGE 中。因為我們太過於專注在實驗組，所以後來才發現對照組的第十條蛋白質跑過頭了(老師說這叫作跳海)，但是也因為這樣子，我們發現在沒有任何添加物的狀況下，蛋白質跑的都比較快。但是在加入甘油和葡萄糖的實驗組中，我們可以發現在分子量在 9kDa 到 170kDa 的範圍中，膠體分部的很均勻，也就是整體的解析度變得比較好。在加入 PEG 400 的實驗組中，我們不但發現泳動速率比較低(阻礙增大)，同時也發現對於 22kDa 以下的蛋白質好像分離的效果比較好，這樣的條件對於觀察小分子量的蛋白質也許是比較適合的。

整個實驗做完後，我們再回過頭來看，甘油和葡萄糖不只是碳數增加，同時氫鍵(氫接在氧或氮上)的數目也有增加，而我們在查證其他資料時發現，DNA 和蛋白質的結構上面的確有許多的氫鍵存在，這些力量也同時增加了電泳的阻礙，未來我們可以討論氫鍵障礙的效應。但是經過討論之後，我們認為在這個實驗中是可以忽略這個因素的，因為 PEG 400 比較是單純的碳數上升，但是效果和碳數上升的推測是一致的。所以我們可以說，膠體電泳如果是用大小來分離小分子，在加入添加物後，我們可以利用添加物的性質來增強另外一種分離效果的作用(非極性或是氫鍵)。若是擔心添加物本身會造成樣品不純，只需要找到適合的添加物，也就是易於和樣品進行分離就可以，而我們可以先利用添加物把幾種不好分離的樣品給分離開來，甚至我們可以把這樣的添加物用化學合成的方式直接接在膠體上，使用兩種分離效果來分離樣品。

蛋白質電泳的實驗結果也告訴我們，不同分子量的蛋白質需要不同的添加物來幫助分離，甚至對於同一種添加物來看，我們也可以嘗試用不同濃度來觀看效果。另外我們也考慮到，添加物會影響膠體的形成，基本上若是影響膠體的形成，應該是會加大孔徑而造成分離效果

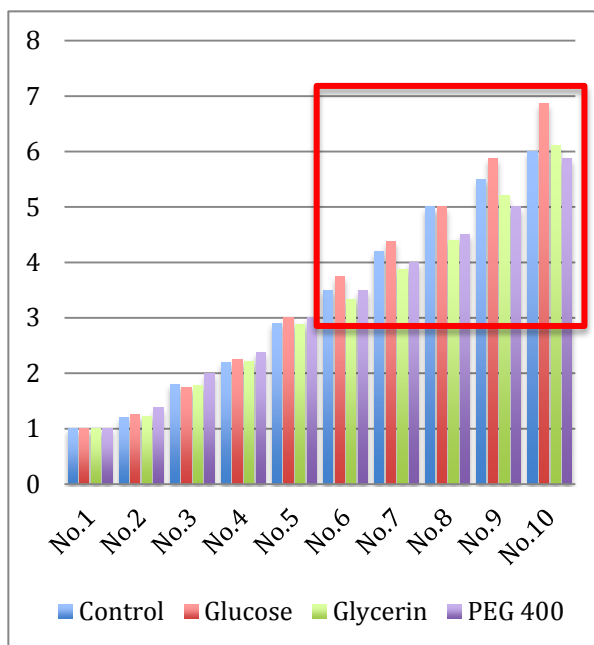
不好，但是在我們的實驗當中，分離效果都比較好，並且優於單純只是加大膠體的濃度(樣品都會卡在下膠上半部)，所以我們可以清楚地觀察到樣品是可以均勻分散在膠體中。此外，老師有和我們提到，真正在分離藥物時是會用特別的管柱和加壓來分離(高壓分子篩等等)(High Performance Gel Filtration)，也許在單純的藥物分析上，膠體和溶劑中適時加入添加物，也許會有意想不到的效果在裡面。

由於大分子量的蛋白質被添加物影響的效果比較小，所以由上到下以第一條線為基準當做 1，可算出其他蛋白的相對泳動率。泳動率是帶電分子在電場中會被電流移動，是為泳動；其泳動的大小程度稱為泳動率，即為單一分子泳動的速率，泳動率的大小同時和分子移動的距離成正比，藉此可比較電泳的效率及分離效果。所以我們發現，9~41kDa 的蛋白質泳動效果的區別特別明顯。

表格 12：這個是用小分子區域去算泳動率

	Control	Glucose	Glycerol	PEG 400
No.1 (170kDa)	1	1	1	1
No.2 (130kDa)	1.2	1.25	1.22	1.375
No.3 (93kDa)	1.8	1.75	1.77	2
No.4 (70kDa)	2.2	2.25	2.22	2.375
No.5 (53kDa)	2.9	3	2.88	3
No.6 (41kDa)	3.5	3.75	3.33	3.5
No.7 (30kDa)	4.2	4.375	3.88	4
No.8 (22kDa)	5	5	4.4	4.5
No.9 (14kDa)	5.5	5.875	5.2	5
No.10 (9kDa)	6	6.875	6.11	5.875

圖 61



實驗討論: SDS-PAGE 中加入 PEG 400 進行電泳的效率超乎我們的想像，小分子量蛋白的泳動率異常的慢，我們提出一個可能的解釋：碳數越大非極性越強，小分子量蛋白因為分子量小，容易受到其他作用力的影響，所以當我們的目標物分子量小的時候，我們可以用碳數比較高的添加物，當我們的目標物分子量比較大的時候，添加物的碳數就可以不用那麼高。

陸、討論與結論

我們原本所想的，是先用染劑當成 DNA 再加上 DNA Loading Dye 的數據來推論若兩者合在一起大概會發生的事，但很可惜的是我們沒辦法真的把 DNA 放下去跑，我們使用的 DNA 樣本是合成的，但根據實驗的過程我們仍舊有了初步的結論，在不同碳數的物質（3C、4C、6C）之中，以含 6 碳的葡萄糖效果最佳，或許我們也可以說，在這幾種碳數中，6C 是最適合用來分離 DNA 的，同時也證明了我們剛開始的目的：把非極性物質也加入電泳基之中，可以增強分離的效果，或者是說可以改變泳動率。

在得知入圍區域性複賽之後，我們決定在有限的時間內將 DNA 檢體進行電泳實驗，得到的實驗結果和我們之前做的現象相反。和指導老師討論後，我們從兩個方面來解釋：

（一）我們覺得最終的結果可能取決於染劑的性質（極性大小），葡萄糖可以成為推力也能成為阻礙；如果染劑是極性較強，葡萄糖相較之下接近是非極性（6C），葡萄糖就會造成反效果，阻礙分子的移動。相反的，如果染劑是非極性，那麼葡萄糖就能幫助染劑前進。

（二）為了方便觀察、節省時間，我們採用兩個膠體並排的方式進行 DNA 檢體電泳，以並聯的方式維持等電壓，但之前是一個一個膠體進行染劑電泳的實驗，比較像是以串聯的方式，所以我們之前維持的是等電流。根據 V （電壓） $=I$ （電流） R （電阻）公式，當我們在進行之前的實驗時的控制變因是等電流，所以當電流固定（ I ）的時候，染劑只是其中一個會跑的分子，這個時候膠體內含葡萄糖，可以使染劑跑比較快。而 DNA 檢體實驗的控制變因是等電壓，所以當電壓固定（ V ）的時候，則葡萄糖（電阻： R ）越多，電流（ I ）就越低，所以實驗條件就會改變，進而影響實驗結果，這就是為什麼跑染劑電泳和 DNA 檢體電泳的結果是相反的。

另外，我們同時也比較了不同膠體環境之下，不同分子移動的現象，我們發現：

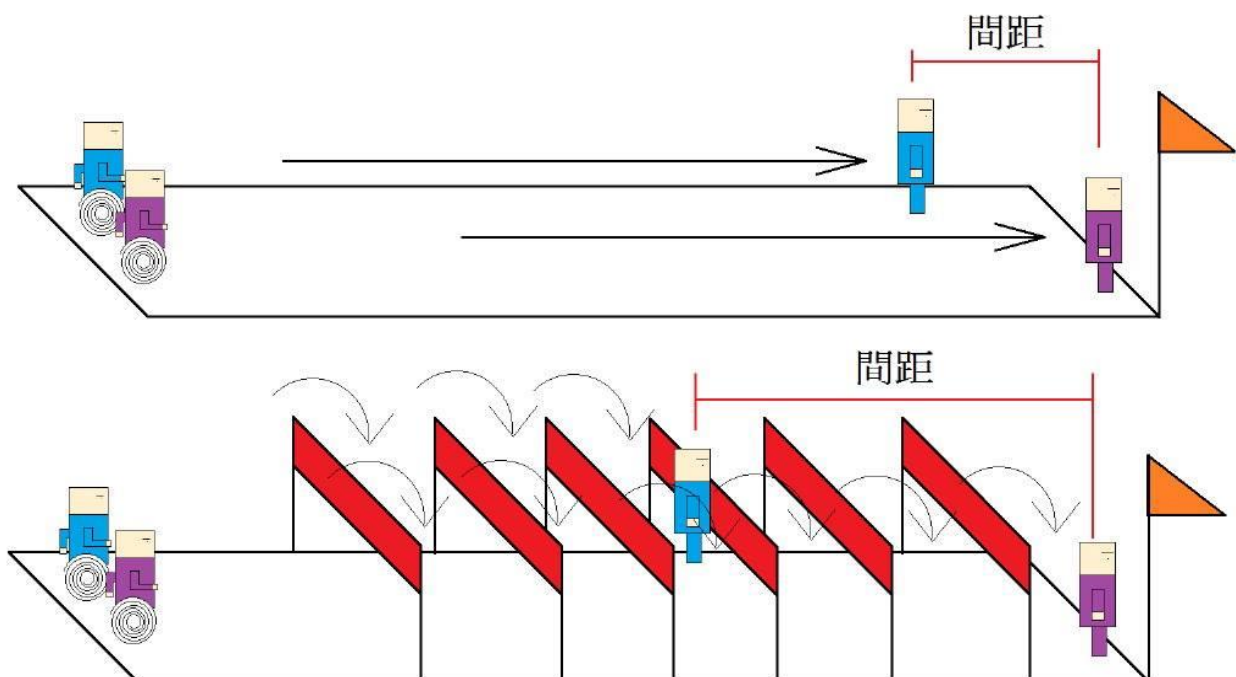
(一) 不同的膠體環境，適合不同大小的分子移動，洋菜膠比較適合DNA分子(大)，SDS-PAGE 比較適合蛋白質(小)和小片段的DNA。

在得知入圍全國比賽之後，經由區域性評審建議我們多些樣品，所以決定在有限的時間內將蛋白質檢體進行SDS-PAGE電泳實驗。

(二) 在SDS-PAGE膠體環境中，蛋白質的移動也會受到不同碳數物質的影響

當我們完成 DNA 和蛋白質檢體的實驗後，發現了原來加入非極性物質能讓電泳分離效果更明顯，無論是使分子移動的速度改變，或是分子間的距離分得比較開，往後希望也能多加利用這樣的性質，在藥物分析以及各種不同物質成分的分析上，能夠方便觀察，使電泳結果更加順利。在這裡我們提出了一個解釋，利用百米障礙賽來看，在一般的直線衝刺過程中，當第一位跑者到達終點時，第二位跑者和第一位跑者的間距會比較小。但是當兩位相同的跑者在跑百米障礙賽時，由於增加了適當的阻礙，當地一位跑者到達終點時，第二位跑者和第一位跑者的間距就會拉大。所以，跑者本身的體力就像是分子大小，柵欄就像是添加非極性的物質，當兩者因素加在一起的時候，效果就更明顯（圖 62）。

圖 62:實驗總結論示意圖



柒、參考文獻

1. 中華民國第四十五屆中小學科學展覽會國中組
理化科第三名——離子趴趴走——更環保、更輕巧地進行電解、電鍍實驗
2. 第四十一屆國中組化學科——交流電解的探討
3. 國中自然與生活科技第四冊，第二章酸鹼鹽，第三章氧化還原（民 94）。南一書局
4. 國中理化第三冊，第十三章電解質（民 91）。國立編譯館

【評語】 030214

本作品所用的實驗材料及研究方法超越國中生可理解的地方頗多，且本作品所列的參考資料與本實驗研究的內容幾乎完全無關，作者能從材料特性及研究方法深入研究則更具科學研究之趣味與價值。