

变性梯度凝胶电泳

变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 是一种根据 DNA 片段的熔解性质而使之分离的凝胶系统。核酸的双螺旋结构在一定条件下可以解链, 称之为变性。核酸 50% 发生变性时的温度称为熔解温度 (T_m)。 T_m 值主要取决于 DNA 分子中 GC 含量的多少。 DGGE 将凝胶设置在双重变性条件下: 温度 50~60 °C, 变性剂 0~100%。当一双链 DNA 片段通过一变性剂浓度呈梯度增加的凝胶时, 此片段迁移至某一点变性剂浓度恰好相当于此段 DNA 的低熔点区的 T_m 值, 此区便开始熔解, 而高熔点区仍为双链。这种局部解链的 DNA 分子迁移率发生改变, 达到分离的效果。 T_m 的改变依赖于 DNA 序列, 即使一个碱基的替代就可引起 T_m 值的升高和降低。因此, DGGE 可以检测 DNA 分子中的任何一种单碱基的替代、移码突变以及少于 10 个碱基的缺失突变。

详细

实验方法

- 变性梯度凝胶电泳(DGGE)

实验材料

- DNA 样品

试剂、试剂盒

- 尿素
- 去离子甲酰胺
- 丙烯酰胺
- 甲叉双丙烯酰胺
- 琼脂糖

仪器、耗材

- PCR 扩增仪
- 变性梯度凝胶电泳仪
- 凝胶成像及分析系统
- 紫外透射仪
- 高速离心机
- 电泳仪
- 电泳槽
- 微量加样器
- Tip 头
- Tip 头盒
- Eppendorf 管
- Eppendorf 管架

一、实验原理

变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 是一种根据 DNA 片段的溶解性质而使之分离的凝胶系统。核酸的双螺旋结构在一定条件下可以解链, 称之为变性。核酸 50% 发生变性时的温度称为溶解温度 (T_m)。 T_m 值主要取决于 DNA 分子中 GC 含量的多少。 DGGE 将凝胶设置在双重变性条件下: 温度 50~60 °C, 变性剂 0~100%。当一双链 DNA 片段通过一变性剂浓度呈梯度增加的凝胶时, 此片段迁移至某一点变性剂浓度恰好相当于此段 DNA 的低熔点区的 T_m 值, 此区便开始溶解, 而高熔点区仍为双链。这种局部解链的 DNA 分子迁移率发生改变, 达到分离的效果。 T_m 的改变依赖于 DNA 序列, 即使一个碱基的替代就可引起 T_m 值的升高和降低。因此, DGGE 可以检测 DNA 分子中的任何一种单碱基的替代、移码突变以及少于 10 个碱基的缺失突变。

为了提高 DGGE 的突变检出率，可以人为地加入一个高熔点区——GC 夹。GC 夹 (GC clamp) 就是在引物的 5'端加上一个 30~40bp 的 GC 结构，这样在 PCR 产物的一侧可产生一个高熔点区，使相应的感兴趣的序列处于低熔点区而便于分析。因此，DGGE 的突变检出率可提高到接近于 100%。

作为一种突变检测技术，DGGE 具有如下的优点：（1）突变检出率高。DGGE 的突变检出率为 99%以上。（2）检测片段长度可达 1kb，尤其适用于 100~500bp 的片段。（3）非同位素性。DGGE 不需同位素掺入，可避免同位素污染及对人体造成的伤害。（4）操作简便、快速。DGGE 一般在 24 小时内即可获得结果。（5）重复性好。但是，该方法需要特殊的仪器，而且合成带 GC 夹的引物也比较昂贵。

二、实验用品

1. PCR 扩增仪；变性梯度凝胶电泳仪；凝胶成像及分析系统；紫外透射仪；高速离心机；电泳仪；电泳槽。
2. 尿素、去离子甲酰胺、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、琼脂糖
3. 微量加样器 (200 μ l, 20 μ l) ； Tip 头 (200 μ l, 20 μ l) 。 Tip 头盒 (200 μ l, 20 μ l) ； Eppendorf 管 (0.5ml, 0.2ml) ， Eppendorf 管架。
4. PCR 扩增相关试剂

三、实验步骤

1. PCR 反应 (同前)

其中，上游引物加 40bp [GC] Clamp。

2. PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳确认。
3. 垂直变性梯度凝胶电泳

变性梯度递增的方向与电泳方向垂直。所使用的胶为 6%聚丙烯酰胺凝胶，变性浓度为 0~100%。其中，含 7 M 尿素和 40%去离子甲酰胺的胶为 100%变性，不含尿素和去离子甲酰胺的胶为 0%变性。垂直变性梯度凝胶电泳主要是检测引物的最适解链条件（即变性浓度）。

PCR 产物加上样缓冲液后上样，300~400 μ l/孔，电压 150V，温度 60 $^{\circ}$ C，时间 2~4 小时。

4. 平行变性梯度凝胶电泳

变性梯度递增的方向与电泳方向平行。根据垂直变性梯度凝胶电泳检测的解链区域的变性浓度，制备相应变性浓度的平行变性梯度凝胶，检测各标本是否存在突变。

PCR 产物加上样缓冲液后，25 μ l~30 μ l/孔，电压 150V，温度 60 $^{\circ}$ C，时间 3~6 小时。

5. 染色 5 分钟，凝胶成像仪分析结果。

四、注意事项

1、该实验中提取 DNA，以及 DGGE 操作中接触到得很多药品都有毒，还有致癌、变性等毒害，一定要严格操作，做好防护保护自己。

2、严格按操作步骤。