

DNA 的琼脂糖凝胶电泳

实验目的

琼脂糖凝胶电泳是常用的检测核酸的方法，具有操作方便、经济快速等优点。本实验学习 DNA 琼脂糖凝胶电泳的使用技术，掌握有关的技术和识读电泳图谱的方法。

实验原理

琼脂糖凝胶电泳是常用的用于分离、鉴定 DNA、RNA 分子混合物的方法，这种电泳方法以琼脂凝胶作为支持物，利用 DNA 分子在泳动时的电荷效应和分子筛效应，达到分离混合物的目的。DNA 分子在高于其等电点的溶液中带负电，在电场中向阳极移动。在一定的电场强度下，DNA 分子的迁移速度取决于分子筛效应，即分子本身的大小和构型是主要的影响因素。DNA 分子的迁移速度与其相对分子量成反比。不同构型的 DNA 分子的迁移速度不同。如环形 DNA 分子样品，其中有三种构型的分子：共价闭合环状的超螺旋分子(cccDNA)、开环分子(ocDNA)、和线形 DNA 分子(lDNA)。这三种不同构型分子进行电泳时的迁移速度大小顺序为:cccDNA > lDNA > ocDNA

核酸分子是两性解离分子，pH3.5 是碱基上的氨基解离，而三个磷酸基团中只有一个磷酸解离，所以分子带正电，在电场中向负极泳动；而 pH8.0-8.3 时，碱基几乎不解离，而磷酸基团解离，所以核酸分子带负电，在电场中向正极泳动。不同的核酸分子的电荷密度大致相同，因此对泳动速度影响不大。在中性或碱性时，单链 DNA 与等长的双链 DNA 的泳动率大致相同。

影响核酸分子泳动率的因素主要是：

1、样品的物理性状

即分子的大小、电荷数、颗粒形状和空间构型。一般而言，电荷密度愈大，泳动率越大。但是不同核酸分子的电荷密度大致相同，所以对泳动率的影响不明显。

对线形分子来说，分子量的常用对数与泳动率成反比，用此标准样品电泳并测定其泳动率，然后进行 DNA 分子长度 (bp) 的负对数——泳动距离作标准曲线图，可以用于测定未知分子的长度大小。

DNA 分子的空间构型对泳动率的影响很大，比如质粒分子，泳动率的大小顺序为：cDNA > IDNA > ocDNA 但是由于琼脂糖浓度、电场强度、离子强度和溴化乙锭等的影响，会出现相反的情况。

2、支持物介质

核酸电泳通常使用琼脂糖凝胶和聚丙烯酰胺凝胶两种介质，琼脂糖是一种聚合链线性分子。含有不同浓度的琼脂糖的凝胶构成的分子筛的网孔大小不同，是于分离不同浓度范围的核酸分子。聚丙烯酰胺凝胶由丙烯酰胺 (Acr) 在 N,N,N'-四甲基乙四胺 (TEMED) 和过硫酸铵 (AP) 的催化下聚合形成长链，并通过交联剂 N,N'-亚甲双丙烯酰胺 (Bis) 交叉连接而成，其网孔的大小由 Acr 与 Bis 的相对比例决定。

琼脂糖凝胶适合分离长度 100 至 60 的分子，而聚丙烯酰胺凝胶对于小片段 (5bp-500bp) 的分离效果最好。选择不同浓度的凝胶，可以分离不同大小范围的 DNA 分子。

3、电场强度

电场强度愈大，带点颗粒的泳动越快。但凝胶的有效分离范围随着电压增大而减小，所以电泳时一般采用低电压，不超过 4V/cm。而对于大片段电泳，甚至用 0.5-1.0V/cm 电泳过夜。进行高压电泳时，只能使用聚丙烯酰胺凝胶。

4、缓冲液离子强度

核酸电泳常采用 TAE、TBE、TPE 三种缓冲系统，但它们各有利弊。TAE 价格低廉，但缓冲能力低，必须进行两极缓冲液的循环。TPE 在进行 DNA 回收时，会使 DNA 污染磷酸盐，影响后续反应。所以多采用 TBE 缓冲液。

在缓冲液中加入 EDTA，可以螯合二价离子，抑制 DNase，保护 DNA。

缓冲液 pH 常偏碱性或中性，此时核酸分子带负电，向正极移动。

核酸电泳中常用的染色剂是溴化乙锭 (ethidium bromide EB)。溴化乙锭是一种扁平分子，可以嵌入核酸双链的配对碱基之间。在紫外线照射 BE-DNA 复合物时，出现不同的效应。254nm 的紫外线照射时，灵敏度最高，但对 DNA 损伤严重；360nm 紫外线照射时，虽然灵敏度较低，但对 DNA 损伤小，所以适合对 DNA 样品的观察和回收等操作。300nm 紫外线照射的灵敏度较高，且对 DNA 损伤不是很大，所以也比较适用。

使用溴化乙锭对 DNA 样品进行染色，可以在凝胶中加入终浓度为 0.5 μ g/ml 的 EB。EB 掺入 DNA 分子中，可以在电泳过程中随时观察核酸的迁移情况，但是如果测定核酸分子大小时，不宜使用以上方法，而是应该在电泳结束后，把凝胶浸泡在含 0.5 μ g/ml EB 的溶液中 10~30min 进行染色。EB 见光分解，应在避光条件下 4 $^{\circ}$ C 保存。

材料、试剂及器具

1、材料

1kbMarker (分子量标准)；DNA 样品

2、试剂

加样缓冲液 (6x)：0.25%溴酚兰，40%蔗糖；琼脂糖；溴化乙锭 (EB)；酶液 (10mg/ml)。

3、器具

(1) 电泳系统：电泳仪、水平电泳槽、制胶板等。

(2) 紫外透射仪。

操作步骤

- 1、按所分离的 DNA 分子的大小范围，称取适量的琼脂糖粉末，放到一锥形瓶中，加入适量的 0.5×TBE 电泳缓冲液。然后置微波炉加热至完全溶化，溶液透明。稍摇匀，得胶液。冷却至 60℃左右，在胶液内加入适量的溴化乙锭至浓度为 0.5μg/ml。
- 2、取有机玻璃制胶板槽，有透明胶带沿胶槽四周封严，并滴加少量的胶液封好胶带与胶槽之间的缝隙。
- 3、水平放置胶槽，在一端插好梳子，在槽内缓慢倒入已冷至 60℃左右的胶液，使之形成均匀水平的胶面。
- 4、待胶凝固后，小心拔起梳子，撕下透明胶带，使加样孔端置阴极段放进电泳槽内。
- 5、在槽内加入 0.5×TBE 电泳缓冲液，至液面覆盖过胶面
- 6、把待检测的样品，按以下量在洁净载玻片上小心混匀，用移液枪加至凝胶的加样孔中。
1μl 加样缓冲液 (6×) + 5μl 待测 DNA 样品
〔+0.5μl EB 液 (10mg/ml) (注：若胶内未加 EB，可选用此法) 。〕
- 7、接通电泳仪和电泳槽，并接通电源，调节稳压输出，电压最高不超过 5V/cm，开始电泳。点样端放阴极端。根据经验调节电压使分带清晰。
- 8、观察溴酚兰的带（蓝色）的移动。当其移动至距胶板前沿约 1cm 处，可停止电泳。
- 9、染色：把胶槽取出，小心滑出胶块，水平放置于一张保鲜膜或其他支持物上，放进 EB 溶液中进行染色，完全浸泡约 30min。
- 10、在紫外透视仪的样品台上重新铺上一张保鲜膜，赶去气泡平铺，然后把已染色的凝胶放在上面。关上样品室外门，打开紫外灯 (360nm 或 254nm) ，通过观察孔进行观察。

注意事项

- 1、电泳中使用的溴化乙锭 (EB) 为中度毒性、强致癌性物质, 务必小心, 勿沾染于衣物、皮肤、眼睛、口鼻等。所有操作均只能在专门的电泳区域操作, 戴一次性手套, 并及时更换。
- 2、预先加入 EB 时可能使 DNA 的泳动速度下降 15%左右, 而且对不同构型的 DNA 的影响程度不同。所以为取得较真实的电泳结果可以在电泳结束后再用 0.5 μ g/ml 的 EB 溶液浸泡染色。若胶内或样品内已加 EB, 染色步骤可省略; 若凝胶放置一段时间后才观察, 即使原来胶内或样品已加 EB, 也建议增加此步。
- 3、加样进胶时不要形成气泡, 需在凝胶液未凝固之前及时清除, 否则, 需重新制胶。
- 4、以 0.5 \times TBE 作为电泳缓冲液时, 溴酚兰在 0.5%~1.4%的琼脂糖凝胶中的泳动速度大约相当于 300bp 的线性 DNA 的泳动速度, 而二甲苯青 FF 的泳动速度相当于 4Kb 的双链线形 DNA 的泳动速度。