

质粒DNA的 琼脂糖凝胶电泳

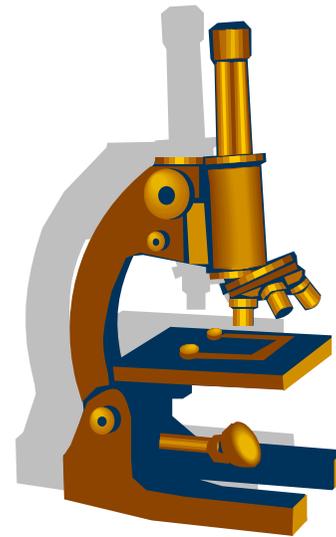


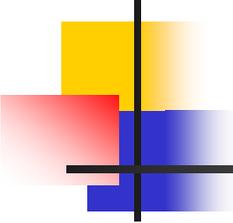


实验目的

- 学习琼脂糖凝胶电泳分离质粒DNA的原理和方法
- 学习利用琼脂糖凝胶电泳法测定DNA片段的大小和浓度

琼脂糖凝胶电泳的原理





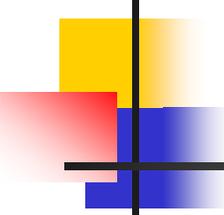
电泳 (electrophoresis)

- 电泳：电泳是带电颗粒在电场作用下向着与其电荷相反的电极移动的现象。许多生物分子都带有电荷，其电荷的多少取决于分子组成、性质及其所在介质的pH。如果混合物中各组分的结构组成不同，在某一pH溶液中，各组分所带电荷性质、电荷数量不同，加之其分子量不同，在同一电场的作用下，各组分泳动的方向和速度也各异，而达到分离鉴定各组分的目的
- 迁移率(U)：带电颗粒在单位电场强度下的泳动速度



琼脂糖凝胶电泳简介

- 琼脂糖凝胶电泳是一种非常简便、快速、最常用的分离纯化和鉴定核酸分子的方法
- 琼脂糖是从海藻中提取的一种线状高聚物，为半乳糖及其衍生物构成的中性物质，不带电荷，不具可解离基团



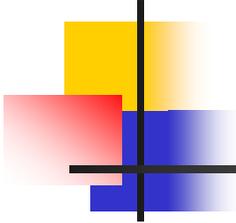
影响DNA片段在凝胶中移动速度的因素

- 电荷
- 分子大小：DNA片段在凝胶中的迁移距离与它的分子量的对数成反比
- 分子构型：一般说分子愈接近球形，在电场中的泳动速度愈快；反之则慢



质粒DNA的3种构型

- 共价闭环 (cccDNA) **A**
- 线形DNA **B**
- 开环DNA (opDNA) **C**
- 泳动速度: **A > B > C**



凝胶浓度选择

琼脂糖浓度(%)	线型DNA分子的分离范围(Kb)
0.3	5~60
0.6	1~20
0.7	0.8~10
0.9	0.5~7
1.2	0.9~6
1.5	0.2~3
2.0	0.1~2



核酸电泳的指示剂

- 指示剂:核酸电泳常用的指示剂有溴酚兰和二甲苯氰
- 溴酚兰在碱性液体中呈紫兰色，在0.6%、1%、1.4%和2%琼脂糖凝胶电泳中，溴酚兰的迁移率分别与0.15Kb、0.2Kb、0.6Kb和1Kb的双链线性DNA片段大致相同
- 二甲苯氰的水溶液呈兰色，它在1%和1.4%琼脂糖中电泳时，其迁移速率分别与1.6Kb和2Kb的双链线性DNA大致相似



核酸电泳的染色剂

- 染色剂:最常用的是溴化乙锭 (EB) 染色法, 其次是银染色
- 嵌入EB分子的DNA在波长254nm紫外光照射下显橙红色荧光 
- 荧光强度对于同等分子量的核酸分子可以体现其量的多少

溴化乙锭 (EB) 与DNA的结合

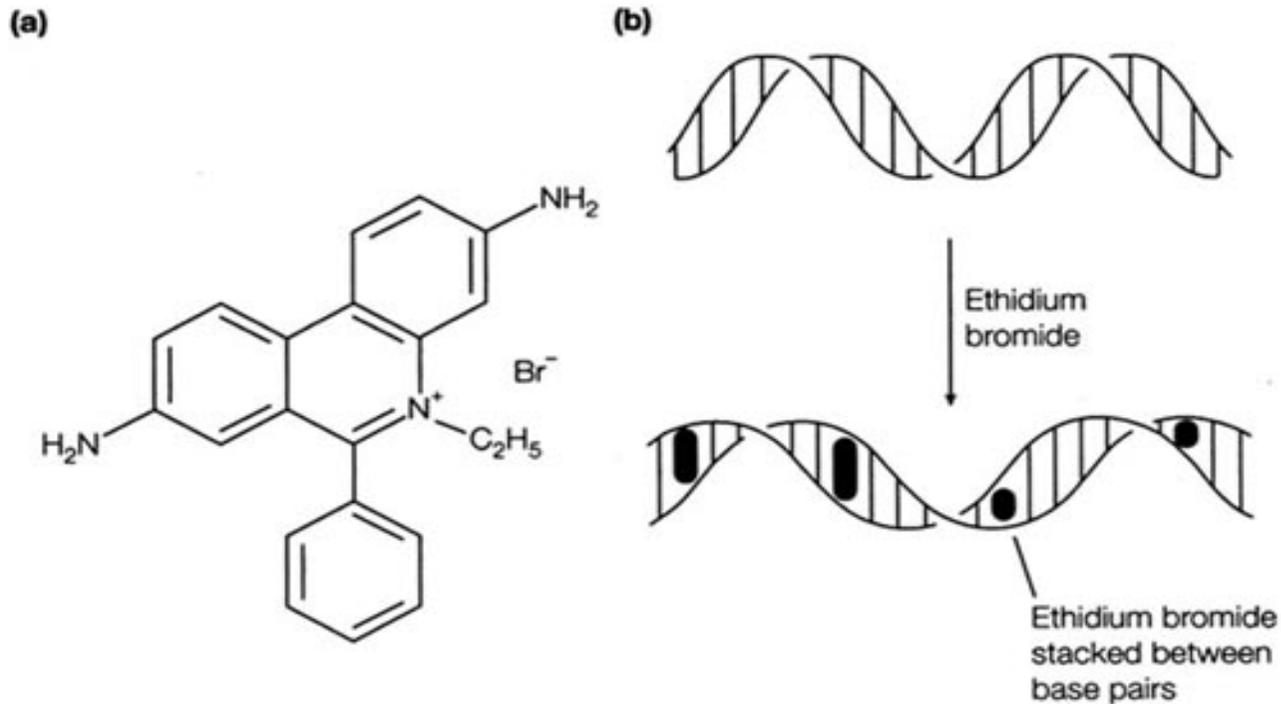
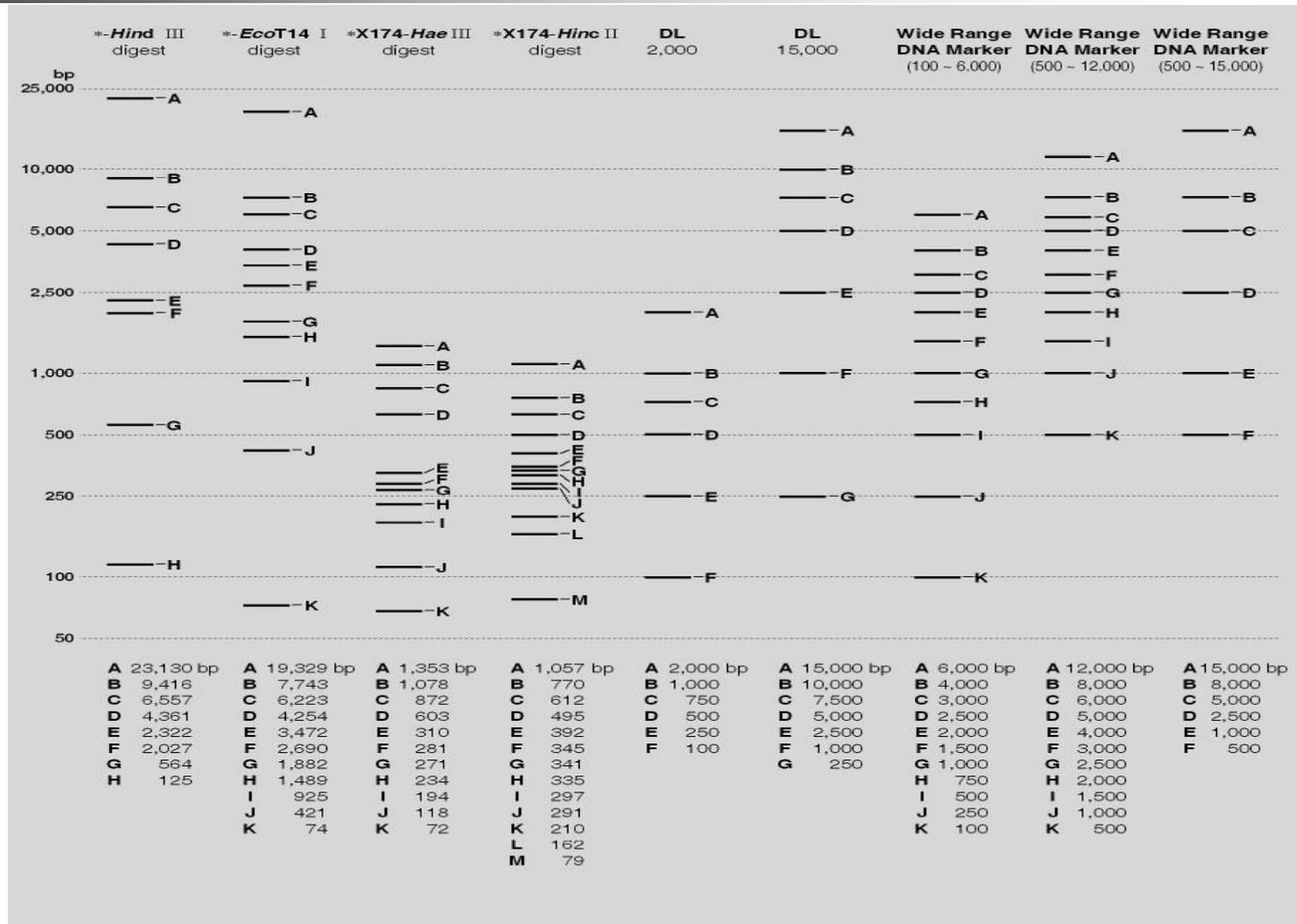


Fig. 3. (a) Ethidium bromide; (b) the process of intercalation, illustrating the lengthening and untwisting of the DNA helix.

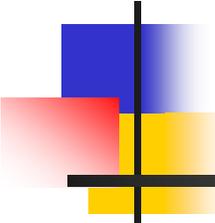


核酸电泳的标准分子量Marker



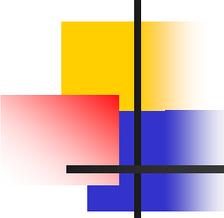
实验主要器材





实验步骤

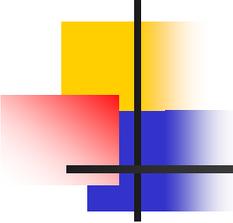




处理质粒

试剂	1号管
pBR322 (μ l)	0.5
酶反应混合液 (μ l)	10

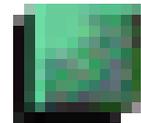
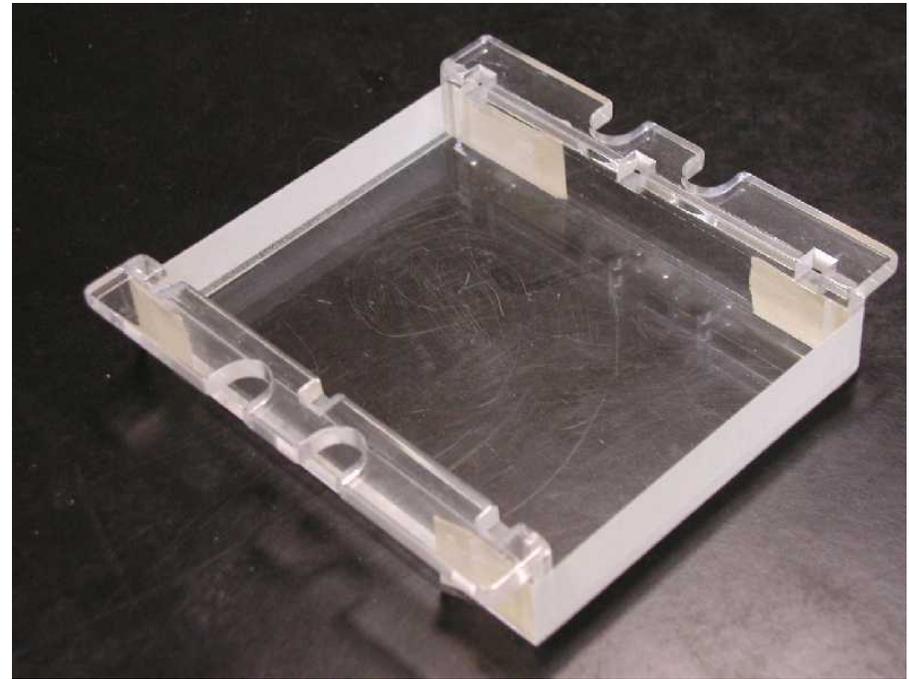
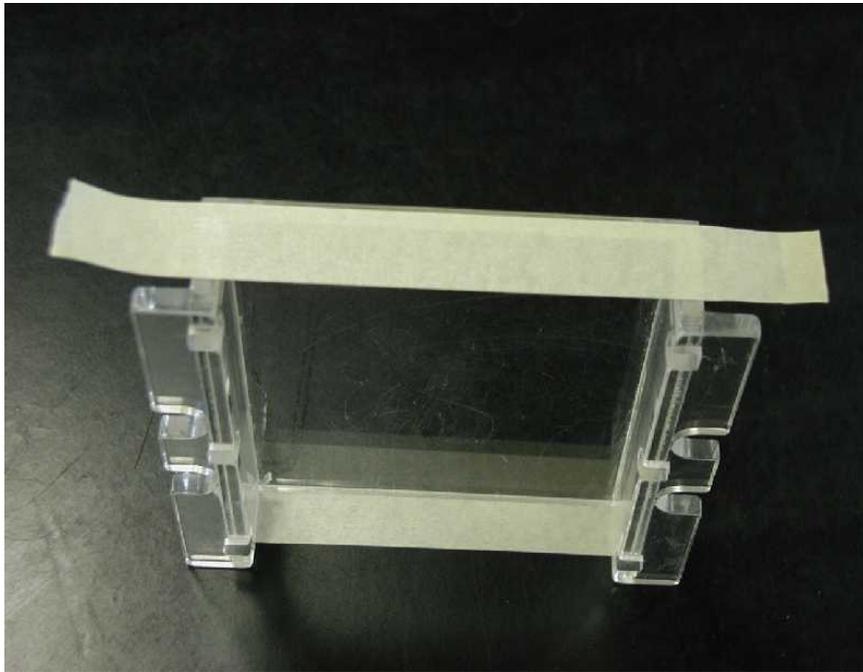
37°C温育40min



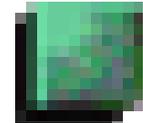
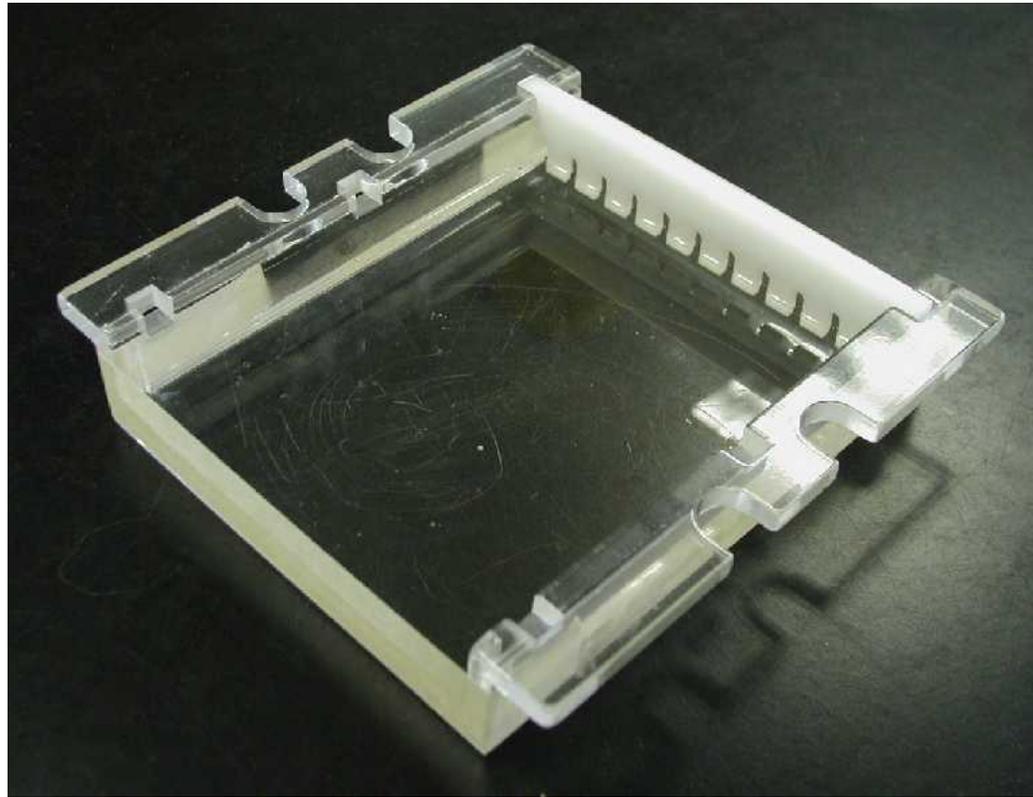
制胶

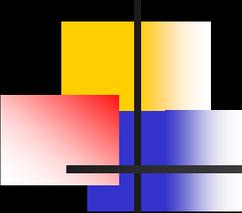
- 清洗电泳槽
- 制胶槽的封边 
- 以1×TBE（Tris-硼酸）缓冲液（buffer）配制0.8%琼脂糖凝胶20ml，加热制琼脂糖融化成清亮的液体
- 凉至65℃以下加入微量EB，摇匀，倒入已插好加样梳的制胶槽中，候其凝固 

封边

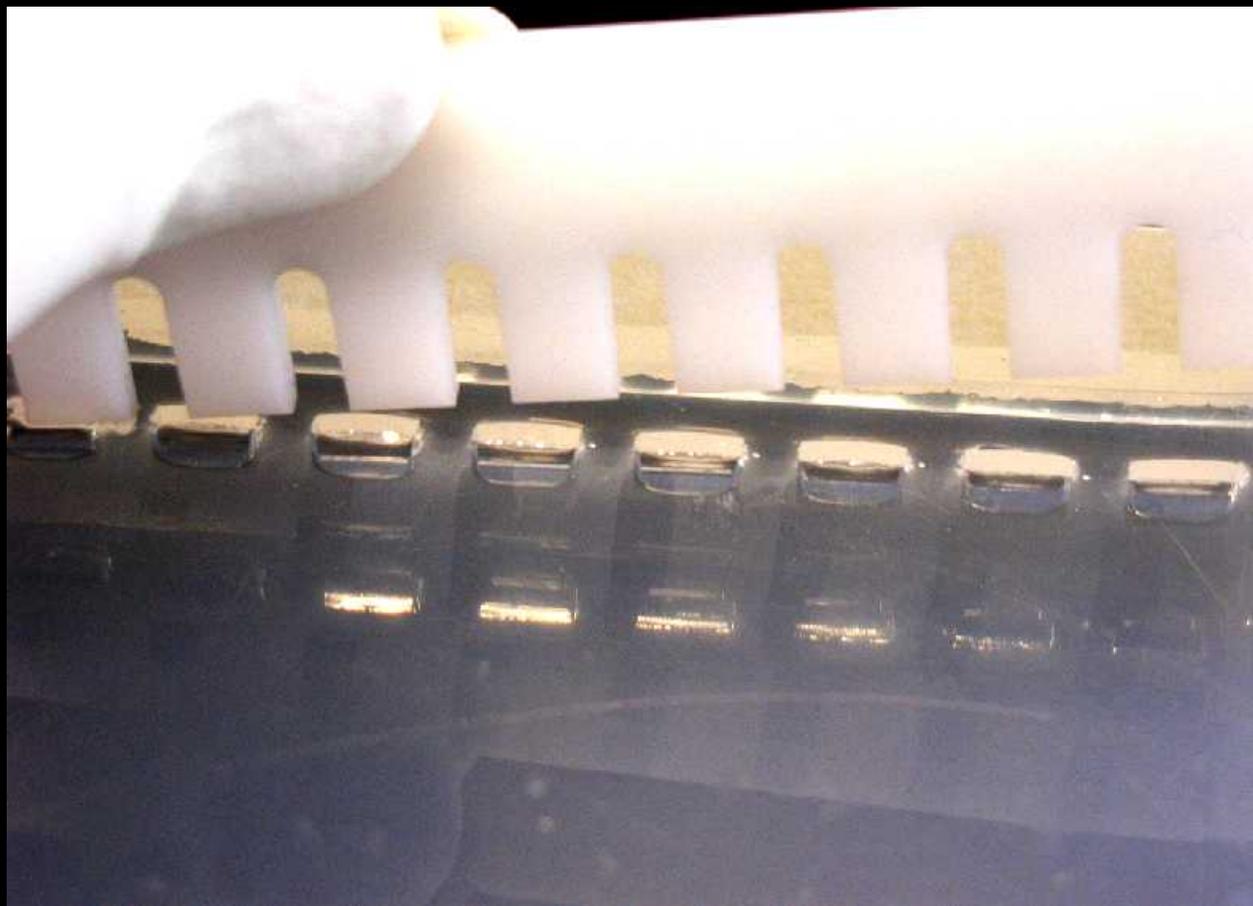


铺胶





小心拔取加样梳

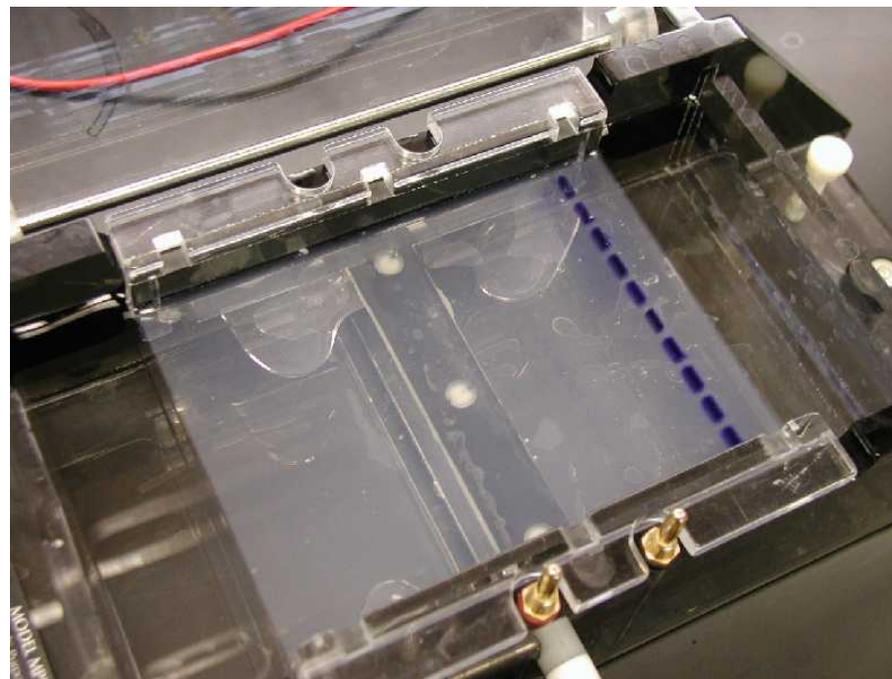
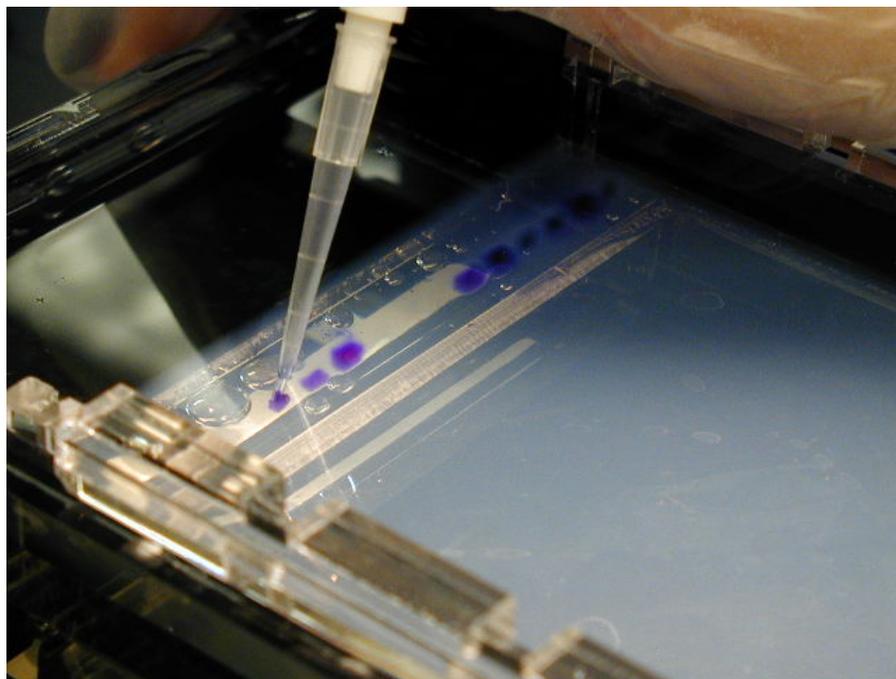


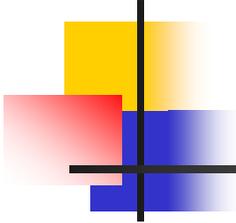
加样

- 除去封边胶布，将制胶槽放入电泳槽
- 倒入 $1\times$ TBE缓冲液至没过胶面
- 小心拔取加样梳
- 点样



点样



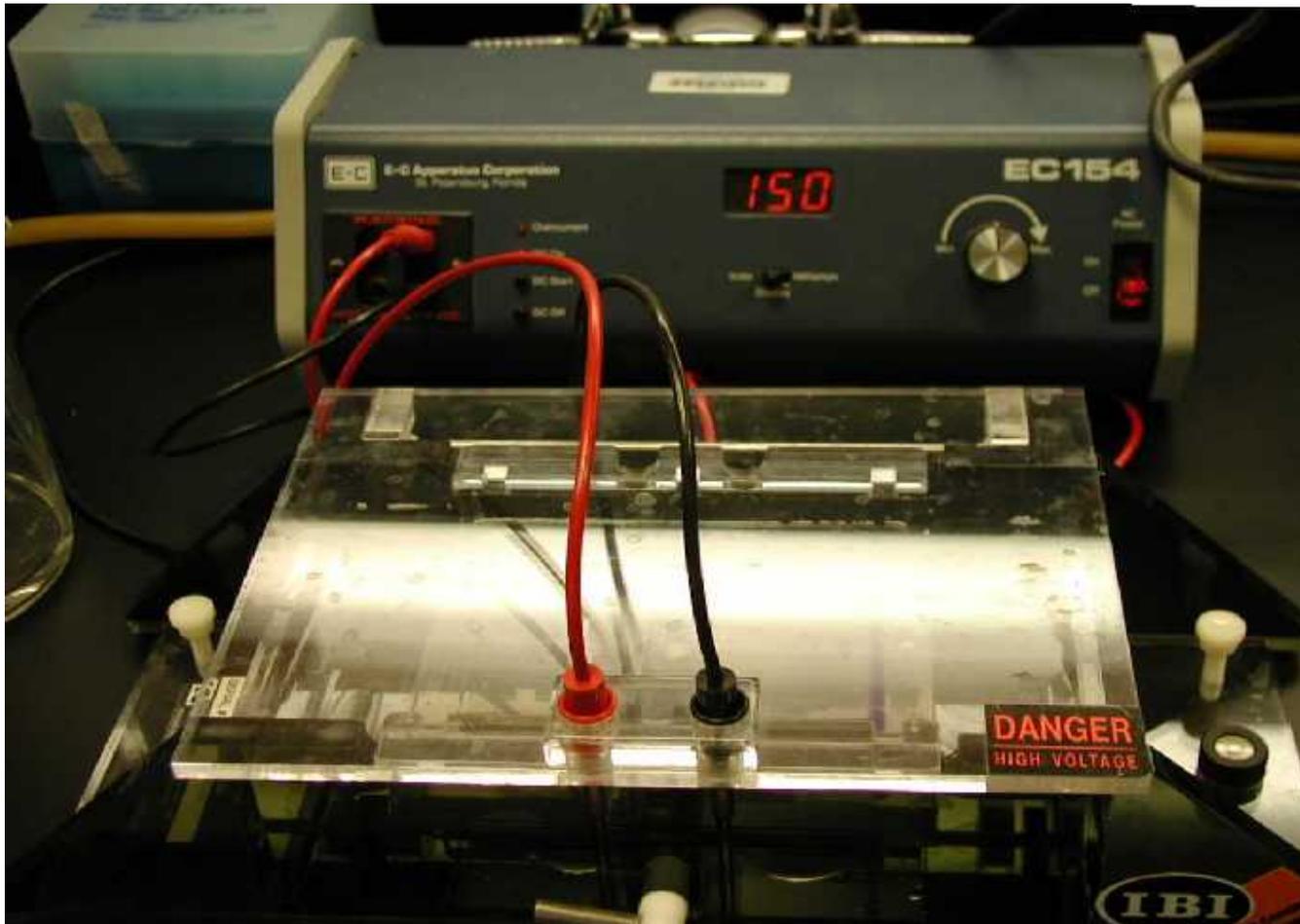


电泳

- 电泳时电压不应该超过 $20\text{V}/\text{cm}$
- 电泳温度应该低于 30°C ，对于大分子量的DNA电泳，温度应该低于 15°C
- 注意如果电泳时电压和温度过高，可能导致出现条带模糊和不规则的DNA带迁移的现象。特别是电压太大可能导致小片段跑出胶而出现缺带现象



电泳

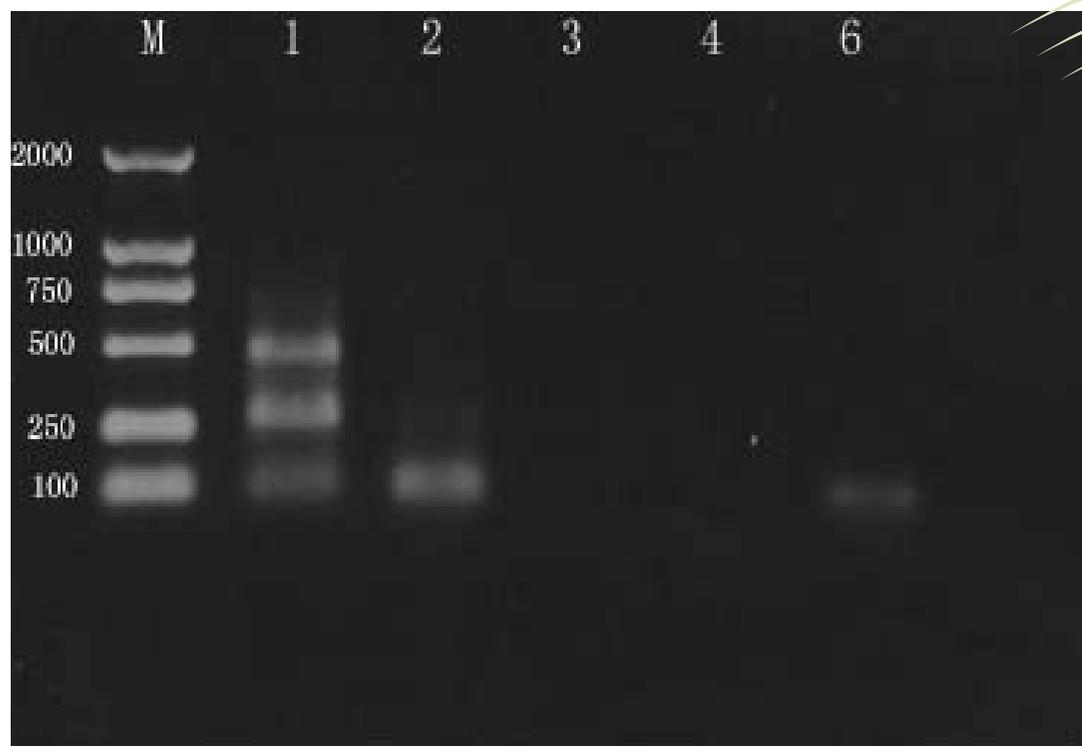


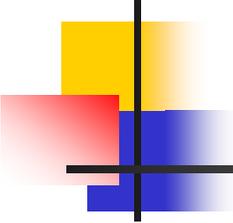
观察

- 将电泳完毕的凝胶取出，放入紫外成像系统的观察室中，分析电泳结果



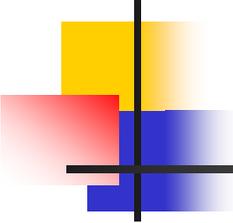
照片示例





注意事项

- EB为一种强烈的诱变剂，勿用手直接接触
- DNA marker 中分子量较小的条带由于其荧光很弱，往往不易观察到
- 电泳完毕后，含有EB的凝胶送到单独的危险品垃圾桶，专门处理



思考？

- 琼脂糖凝胶电泳的优缺点？
- 要得到清晰的电泳带型，需要注意哪些问题？

谢谢

