

琼脂糖凝胶电泳 *Agarose Gel Electrophoresis*

实验原理

琼脂糖凝胶电泳 (Agarose Gel Electrophoresis) 用琼脂或琼脂糖作支持介质的一种电泳, 用于分离、鉴定和提纯 DNA 片段的标准方法。对于分子量较大的样品, 如大分子核酸、病毒等, 一般可采用孔径较大的琼脂糖凝胶进行电泳分离。琼脂糖凝胶电泳的分析原理与其他支持物电泳最主要区别是: 它兼有“分子筛”和“电泳”的双重作用。

琼脂糖凝胶电泳, 是以琼脂糖为介质, 对不同大小的 DNA 或 RNA 实现分离的一种电泳方法。琼脂糖是一种多糖, 具有亲水性, 但是不带电荷。使得 DNA 在碱性条件下使其带负电荷 (pH8.0 的缓冲液), 在电流作用下, 以琼脂糖凝胶为介质, 由负极向正极移动, 根据不同的 DNA 分子片段的大小和形状不同, 在电场中泳动的速率也不相同, 同时在样品中加入染料 (如 EB 或花青素类染料) 能够和 DNA 分子间形成络合物, 经过紫外照射, 可以看到 DNA 的位置 (比对 marker 可知分子量大小), 从而达到分离、鉴定的目的。

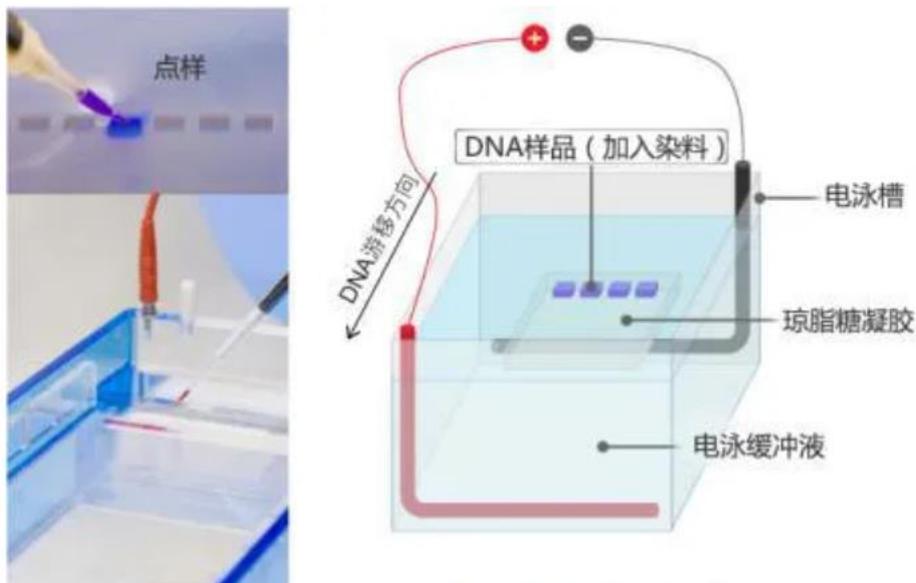


图 2 琼脂糖凝胶电泳原理

实验用具及材料

1. 琼脂糖
2. 染料
3. TAE/TBE 缓冲液
4. 仪器及其他用品:电泳装置, 三角烧瓶, 量筒

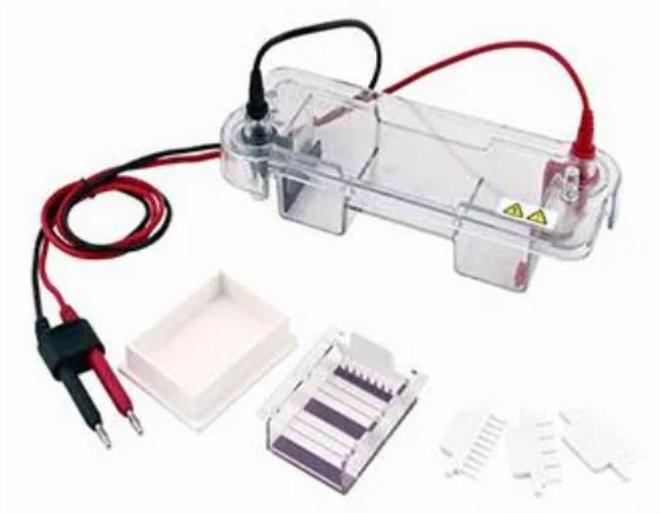


图3 电泳装置

实验步骤

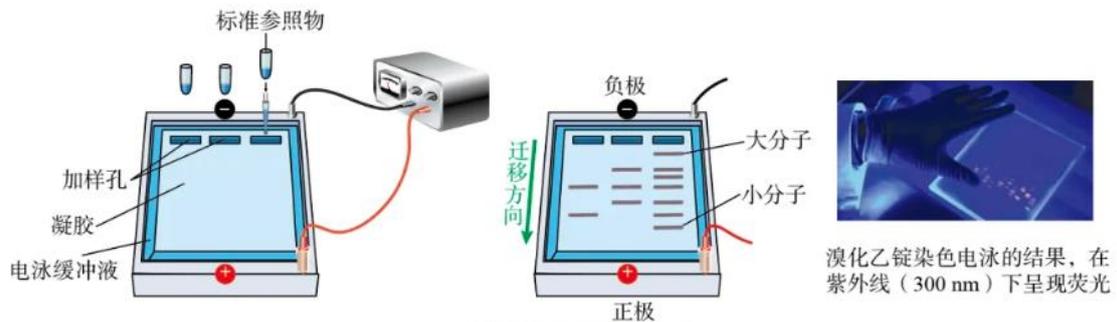
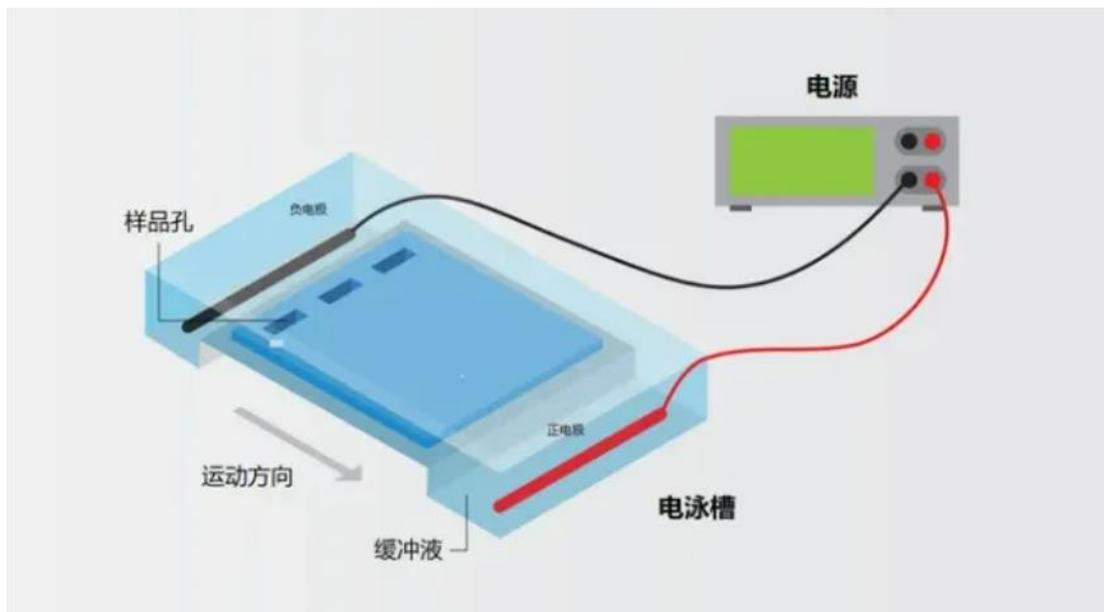


图4 琼脂糖凝胶电泳操作步骤

1. **配胶:** 1%琼脂糖凝胶 100ml: 称取 1.0 g 琼脂糖置于锥形瓶中, 加入 100ml 1×TAE, 微波炉加热煮沸至琼脂糖全部融化, 摇匀, 即成 1.0%琼脂糖凝胶液。
2. **凝固:** 将制胶托盘和凝胶托盘洗干净晾干, 待凝胶液冷却到 60℃左右, 倒在透明托盘上, 并在固定位置放好梳子, 等凝胶液完全凝固。垂直轻拔梳子, 取下凝胶, 将凝胶及内槽放入电泳槽中。

3. **加样:** 用移液枪分别将样品加入凝胶孔中, 每加完一个样品, 应更换一个加样头, 以防污染, 加样时勿碰坏样品孔周围的凝胶面。

4. **电泳:** 加样后的凝胶板立即通电进行电泳, 设置电压 (110V), 样品由负极(黑色)向正极(红色)方向移动. 电压升高, 琼脂糖凝胶的有效分离范围降低。当溴酚蓝移动到距离胶板下沿约 1cm 处时, 停止电泳。



5. **凝胶成像观察:** 当样品运行得足够远以获得足够的分离时, 将凝胶从槽中取出并放在一个紫外光箱上。然后, 夹层染料可以使样品条带可视化, 并通过与已知条带大小的 DNA marker 进行比较来确定其大小。

五、注意事项

琼脂糖浓度	最佳线形DNA分辨范围 (bp)
0.5%	1,000 ~ 30,000
0.7%	800 ~ 12,000
1.0%	500 ~ 10,000
1.2%	400 ~ 7,000
1.5%	200 ~ 3,000
2.0%	50 ~ 2,000

1. 使用水替代凝胶缓冲液或电泳缓冲液是不可取的。通常, 琼脂糖凝胶制备和电泳需要使用 TAE 或 TBE 缓冲液。如果使用水, 凝胶在电泳过程中会迅速融化。因此, 在凝胶配制时, 请检查容器标签以确保使用正确的缓冲液。

2. 使用错误浓度的琼脂糖也会影响实验结果。标准的 DNA 凝胶电泳所需琼脂糖浓度为 1.0%。浓度越高，可以获得更高分辨率的小片段；反之，浓度越低，可以获得更高分离程度和分辨率的大片段。使用错误浓度的琼脂糖凝胶会使 DNA 条带的可靠性受到影响。注意，低百分比浓度的琼脂糖凝胶往往较软，更容易破损。
3. 注意正确连接电泳槽与电源连接线的方向。如果不小心颠倒连接线的方向，样品会朝相反方向移动，导致样品丢失。
4. 选择适合您实验的正确缓冲液非常重要。常用的缓冲液类型包括 TAE 和 TBE，选择取决于 DNA 片段大小和实验后的应用。
5. 为了获得最佳分辨率，需要根据 DNA 含量确定上样量。最小可检测的 DNA 量取决于使用的染色方法，例如使用 SYBR Safe DNA 凝胶染色可以检测到 3 ng 的 DNA。
6. 凝胶的配制会影响条带的分辨率。推荐的凝胶厚度为 3-4 mm，过厚的凝胶会产生模糊的条带和较高的染色背景。梳齿的厚度也很重要，薄梳会产生清晰的条带，而厚梳会导致分辨率降低。
7. 凝胶类型会影响 DNA 的分辨率，根据实验需求选择合适的琼脂糖类型。
8. 选择适当的电泳运行条件很重要，包括电压和距离。推荐的电压范围是 4 - 10 V/cm，电压太低会降低迁移率，电压太高会降低分辨率。
9. 如果 DNA 条带呈微笑状或波浪形，可以尝试提高灌胶温度、使用小分子核酸染料，或者在电泳结束后进行染色处理。

(来源: 微信公众号 BioMolly)