**实验二 琼脂糖凝胶电泳**

**一、实验目的**

学习琼脂糖凝胶电泳分离DNA的原理和方法，检测基因组DNA的纯度、浓度与分子量。

**二、实验原理**

琼脂糖是一种天然聚合长链状分子，沸水中溶解，45℃开始形成多孔性刚性滤孔，凝胶孔径的大小决定于琼脂糖的浓度。DNA分子在碱性环境中带负电荷，在外加电场作用下向正极泳动。DNA分子在琼脂糖凝胶中泳动时，有电荷效应与分子筛效应。不同DNA，其分子量大小及构型不同，电泳时的泳动率就不同，从而分出不同的区带。琼脂糖凝胶电泳法分离DNA，主要是利用分子筛效应，迁移速度与分子量的对数值成反比关系。溴化乙锭(EB)为扁平状分子，在紫外光照射下发射荧光。EB可与DNA分子形成EB-DNA复合物，其发射的荧光强度较游离状态EB发射的荧光强度大10倍以上，且荧光强度与DNA的含量成正比。用肉眼观察，可检测到5 ng以上的DNA。

**三、实验材料及仪器用具**

1. 实验材料

提取到的拟南芥基因组DNA

2. 实验试剂

 琼脂糖 、10×TBE电泳缓冲液、10×载样缓冲液、EB母液(0.5 mg/ml) 、分子量标记

3. 实验仪器：

微波炉、电泳仪、微型电泳槽、紫外透射检测仪、微量取液器、吸管头若干、加样板、量筒100 ml、三角瓶500 ml、透明胶带

**四、实验步骤**

1. 制胶

(1) 称取0.8 g琼脂糖加入盛有100 ml 1×TBE电泳缓冲液的500 ml三角瓶中，摇匀，用电子天平称三角瓶的总重量。在微波炉或电炉上加热至琼脂糖完全溶解，放在天平上加蒸馏水至原重量。冷却到约60℃后，加入100 µl的0.5 mg/ml溴化乙锭(EB，终浓度为0.5 µg/ml)，并摇匀。

(2) 用胶带将制胶板两端封好，将溶解的琼脂糖(约50℃)倒入其中，直至厚度为4~6 mm。

(3) 插入适当的梳子，在室温下冷却凝固。

(4) 充分凝固后撕掉两端的胶布，小心垂直向上拔出梳子，以保证点样孔完好。

(5) 将凝胶置入电泳槽中，加电泳缓冲液至液面覆盖凝胶1~2 mm。

2. 点样

用微量取液器 吸取实验一的DNA样品2 µl于点样板小孔中，再加入8 µl TE或电泳缓冲液及1 µl的载样缓冲液，混匀后，小心加入点样孔，蓝色样品混合物将沉入点样孔下部。同时点10µl分子量标记于其中一侧点样孔中。

3. 电泳

打开电源开关，调节电压，可见到溴酚蓝条带由负极向正极移动，约一小时后即可观察。

4. 观察

    将电泳好的凝胶置于紫外透射检测仪上，戴上防护观察罩，打开紫外灯，可见到橙红色核酸条带，根据条带粗细和荧光强度，可粗略估计该样品DNA的浓度。同时根据已知分子量的标准DNA，通过线性DNA条带的相对位置初步估计样品的分子量。

**五、注意事项**

1. 用微波炉煮胶时，胶液的量不应超过三角瓶容量的1/3，否则易溢出。

2. 煮好的胶应冷却至50℃左右时再倒，以免制胶板变形，并减少漏胶的机会。

3. 倒胶注意厚度(4~6 mm)，充分凝固后再拔出梳子，以保持齿孔形状完好。也可待胶稍凝固后，放入4℃冰箱10多分钟，以加速胶的凝固。

4. 加样前赶走点样孔中的气泡，点样时吸管头垂直，切勿碰坏凝胶孔壁，以免使带型不整齐。

5. 一般情况下不必每点一个样品都换枪头，吸电泳缓冲液洗几次即可再点下一个样品。

6. 凝胶中含有EB，切勿直接用手接触胶，废弃胶应集中处理，勿乱丢。