



# 生物化学实验

## 电泳技术

### 5.3 琼脂糖凝胶电泳

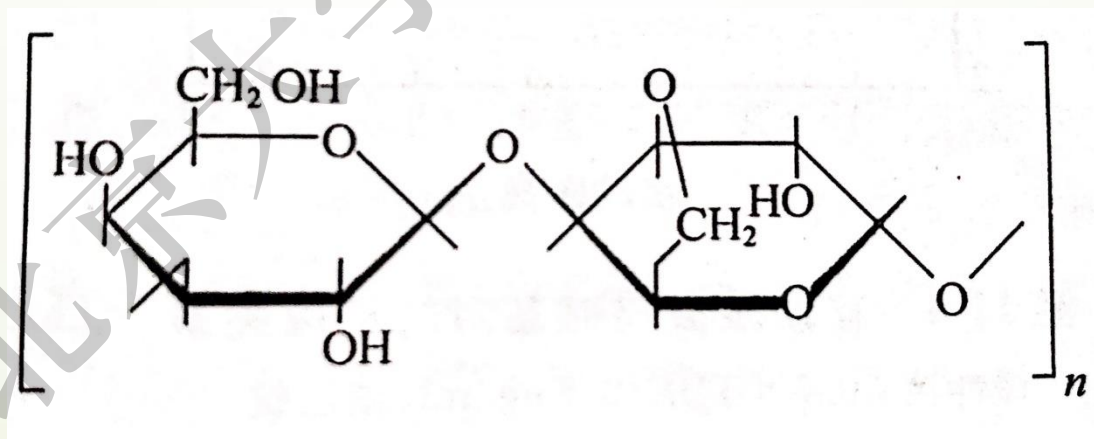
北京大学 王青松 胡晓倩

# 概述

- 琼脂糖凝胶电泳 (Agarose Gel Electrophoresis)是以琼脂糖为支持物的电泳分析技术。
- 琼脂糖凝胶电泳具有操作方便、设备简单、需要的样品量少、分辨能力高等优点。
- 琼脂糖凝胶电泳广泛用于核酸的分离、鉴定，为DNA分子相对分子质量测定和DNA分子构象分析提供了重要手段。在临床生化检验中常用于LDH、CK等同工酶的分离与鉴定。

# 琼脂糖

- 天然琼脂 (agar)是从天然红色墨角藻中提取的一种胶状多聚糖。它主要由**琼脂糖 (约80%)**和**琼脂胶**组成。
- 琼脂糖 (agarose)的分子结构：1,3连接的 $\beta$ -D-半乳糖和1,4连接的3,6脱水- $\alpha$ -D半乳糖交替连接起来的长链线性多聚物。
- **琼脂糖的特性：**琼脂糖在水中一般加热到 $90^{\circ}\text{C}$ 以上融化，温度下降到 $35\sim 40^{\circ}\text{C}$ 时形成良好的半固体状的凝胶。



# 琼脂糖凝胶电泳分离DNA的原理

- DNA分子在碱性缓冲液中带负电荷，在外加电场作用下由负极向正极泳动。
- DNA分子在琼脂糖凝胶中泳动时，由于电荷效应与分子筛效应，不同DNA的分子量大小及构型不同，电泳时的泳动率不同，从而分离为不同的区带。
- DNA 分子的迁移速度与分子大小（碱基对，bp）的对数值成反比关系。在同一浓度凝胶中，较小的DNA片段迁移速度比大片段快。
- 琼脂糖凝胶电泳可分离不同分子大小的DNA，也可以分离分子大小相同，但构型不同的DNA 分子。

# 凝胶浓度与分辨DNA大小的关系

| 琼脂糖凝胶浓度 | 线形DNA的最佳分辨范围 (kb) |
|---------|-------------------|
| 0.3     | 50~60             |
| 0.6     | 1~20              |
| 0.7     | 0.8~10            |
| 0.9     | 0.5~7.0           |
| 1.2     | 0.4~6.0           |
| 1.5     | 0.3~3.0           |
| 2.0     | 0.1~2.0           |

琼脂糖凝胶性能通常用凝胶强度表示，强度越高，凝胶性能越好。

# 琼脂糖凝胶的优点

- 1. 琼脂糖凝胶是具有大量微孔的基质，可用来分离酶的复合物、核酸、病毒等大分子物质；
- 2. 电泳操作简单，电泳速度快；
- 3. 凝胶结构均匀，含水量大，样品扩散度较自由电泳小；
- 4. 对样品吸附极低，无拖尾现象，电泳图谱清晰，分辨率高，重复性好；
- 5. 凝胶透明度较好，无紫外吸收，电泳过程和结果可直接用紫外检测；电泳后区带易染色，样品易洗脱，便于定量测定；
- 6. 琼脂糖具有较低胶凝温度及低熔点，有热可逆性，有利于样品回收，达到样品制备目的；
- 7. 琼脂糖无毒，凝胶过程中不需催化剂、加速剂，不会发生自由基聚合。

# 琼脂糖凝胶电泳基本方法





# 1. 凝胶电泳类型&缓冲液系统

- 凝胶电泳类型：用于分离核酸的琼脂糖凝胶电泳为水平型（常用）。
- 水平型电泳时，凝胶板完全浸泡在电极缓冲液下1-2mm。
- **水平型电泳是目前常用的类型**，电泳槽简单，制胶与加样易于操作，可根据需要制备不同规格的凝胶板，节约凝胶。



水平型电泳槽

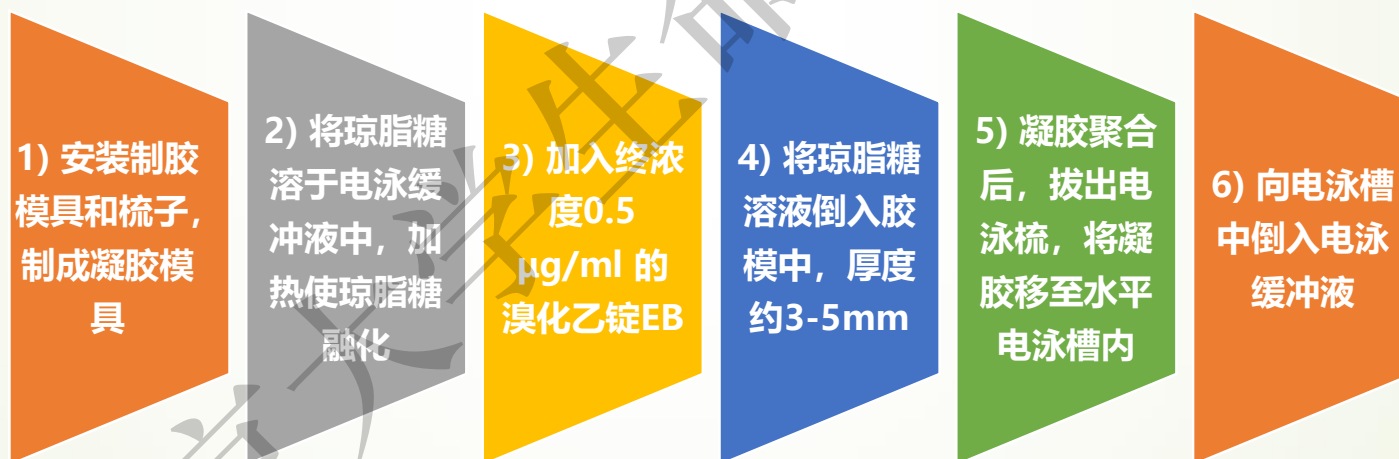


# 电泳缓冲液

- DNA电泳多用连续系统，迁移率受电泳缓冲液的成分及离子强度的影响。高离子强度的缓冲液由于电流太大会大量产热，严重时，会造成凝胶熔化和DNA的变性。
- 常用的电泳缓冲液有：
  - 1) TAE缓冲液：Tris-乙酸盐和EDTA缓冲液
  - 2) TBE缓冲液：Tris-硼酸盐缓冲液(TBE)
- 电泳缓冲液一般配制成浓 $10\times$ 贮液，临用时稀释到 $1\times$ 工作电泳缓冲液即可。

## 2. 琼脂糖凝胶的制备

- 琼脂糖凝胶电泳多采用水平型，以稀释的工作电泳缓冲液配制所需的凝胶浓度，融化的琼脂糖凝胶直接倒入凝胶模具中，使其冷却凝固。



**注：凝胶不立即使用时，请用保鲜膜将凝胶包好后在4℃下保存，一般可保存2~5天。**

### 3. 样品制备与加样

- 核酸样品需用含有指示剂的核酸上样缓冲液 (loading buffer) 溶解。
- **核酸上样缓冲液配方：**
  - 用于DNA电泳 (6×loading buffer) : 0.05% 溴酚蓝、0.05% 二甲苯腈蓝FF (Xylene Cyanol FF)、36% 甘油、30mM EDTA
  - 用于RNA电泳 (10×loading buffer ) : 0.25% 溴酚蓝、0.25% 二甲苯腈蓝FF、50% 甘油、30mM EDTA

# 核酸上样缓冲液各成分的作用

- **溴酚蓝和二甲苯腈蓝FF**：电泳指示剂，显示电泳的进程
- **甘油**：增加样品液的比重，利于样品集中沉降到样品孔中
- **EDTA**：络合2价金属阳离子，抑制依赖于金属阳离子的DNase活性，防止DNase降解DNA

# 样品的加样方法

1) 混合DNA样品和6X上样缓冲液（混合后，上样缓冲液的终浓度应不小于1X）。



2) 用移液器将样品加入凝胶的样品槽内。

**注意：** 1) 每加完1个样品，更换1个吸头，以防污染；  
2) 加样时勿破坏样品孔周围的凝胶。

## 4. 电泳

- 琼脂糖凝胶分离DNA实验条件的研究表明，在低浓度、低电压下，分离效果较好。
- 在低电压条件下，线性DNA分子的电泳迁移率与所用的电压呈正比。为了获得电泳分离DNA片段的最大分辨率，电场强度不宜高于5V/cm。
- 电泳系统的温度对于DNA在琼脂糖凝胶中的电泳行为没有显著的影响。通常在室温下电泳。

通常在60~120 V下电泳，当溴酚蓝指示剂电泳至阳极端时，停止电泳。

## 5. 染色&结果观察

- 常用荧光染料溴化乙锭 (Ethidium Bromide, EB) 染色, 使用**凝胶成像系统**, 用302nm紫外光观察DNA条带, 并拍照保存。
  - 染色方法: 将配好的琼脂糖凝胶加热融化后, 冷却片刻, 加入终浓度0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的溴乙锭EB, 混匀后倒入电泳槽 中, 待其凝固。**此方法省去了电泳后的染色脱色过程, 实际中常用。**
- **注意:**
  - **EB染料是强诱变剂, 操作时需注意防护, 务必戴手套。**
  - **替代: 使用没有诱变性的EB替代升级产品, 如GelRed等, 用于凝胶染色。**



# 琼脂糖凝胶电泳注意事项

1

- 凝胶机械强度差，易碎，浓度不能太低

2

- 凝胶易被细菌污染，不易保存，临用前配制

3

- 琼脂糖支持层上的区带易于扩散，电泳后必须立即固定染色

4

- 与PAGE凝胶相比，分子筛作用小，区带少