

食品中转基因成分检测

第 5 章

琼脂糖凝胶电泳

M.Somma, M.Queric



目 录

第 5 章

琼脂糖凝胶电泳

引言	3
琼脂糖凝胶电泳的物理学原理	4
琼脂糖凝胶电泳的组成	7
实验	9
参考文献	13

引言

凝胶电泳是一项根据分子大小、电荷差异和其它物理性质分离大分子的技术。电泳可描述为在电场作用下带电粒子的移动，“Electro”表示带电的和“电泳现象”，源于希腊字母 *phoros*，意为“穿越”。因而，凝胶电泳是一项在电流推动作用使分子穿越凝胶的技术。电泳的推动力是在凝胶两端电极提供的电压，分子的性质决定了其如何在电场作用下快速地通过凝胶介质。

许多重要的生物大分子（例如：氨基酸、多肽、蛋白质、核苷和核酸）都具有带电基团，在给定的 pH 下，在溶液中呈阳离子 (+) 或阴离子 (-) 的电属性。根据净电荷的属性，带电离子将移动至正极或负极。例如，在电场作用和 pH 中性条件下，DNA 带负电的磷酸基团使它在凝胶中移向正极 (Westermeier, 1997)。

琼脂糖凝胶电泳是一项分离、鉴定和纯化 DNA 片段的标准技术，该技术简单、快捷，能分离其它方法无法完全分离的 DNA 片断。此外，凝胶中 DNA 的位置可以通过低浓度的溴化乙锭（一种荧光染料）染色来确定。以下部分将简述琼脂糖凝胶电泳分离的物理原理、组成（凝胶介质、缓冲液、上样缓冲液和分子量标记）和实验步骤 (Sambrook *et al.*, 1989)。

琼脂糖凝胶电泳的物理学原理

凝胶电泳是一项用于分离核酸和蛋白质的技术。大分子的分离依据两个变量：电荷和分子量。当一个生物样品（如：DNA）与缓冲液混合加入凝胶中时，这两个变量将共同作用。一个电极所发出的电流排斥分子，而同时另一个电极则吸引分子。而凝胶介质的摩擦阻力则像“分子筛”一样，根据分子大小分离分子。电泳过程中，大分子穿过凝胶孔隙移动，它们通过电场的移动速率受以下因素影响：

- 电场强度
- 分子大小及类型
- 样品的相对疏水性
- 分子移动环境中缓冲液的离子强度和温度

为了完全理解带电离子在凝胶电泳中的分离，有必要了解与电泳相关的等式。当电极提供电压时，产生了一个电位梯度： E ，可以由以下等式表示：

$$E = V/d \quad (1)$$

其中 V 是提供的电压（单位：V）， d 是电极间的距离（单位：cm）。

当存在一个电位梯度 (E) 时，产生的带电分子上的推动力 (F) 由以下等式表述：

$$F = Eq \quad (2)$$

其中 q 是分子上携带的电量（单位：C）， F 以牛顿为单位，是电极间带电分子的推动力。

此外，还存在摩擦阻力会减缓带电分子的移动，由以下因素造成：

- 分子亲水部分的大小
- 分子的类型
- 电泳介质中的孔径大小
- 缓冲液的粘性

电场中带电分子的移动速度 v 受电位梯度、分子电荷及摩擦阻力的共同作用，可由以下等式表示：

$$v = Eq / f \quad (3)$$

其中 f 是摩擦系数。

离子的电泳迁移率 M ，可定义为离子迁移速度除以电位梯度：

$$M = v / E \quad (4)$$

此外，从公式 (3) 可以得出，电泳迁移率 M 也可以用摩擦系数 f 除以分子电量 q 来表示：

$$M = q / f \quad (5)$$

当存在电位梯度时，带不同总电荷的分子将由于不同的电泳迁移率而发生分离。电泳迁移率是带电分子或粒子的一个重要的特征性参数，取决于带电基团的 pK 值和分子或粒子的大小。因此，分子大小不同的分子，将会受到不同的摩擦阻力，即使带有相似电荷的也可以发生分离。线性双链 DNA 通过凝胶介质的速率同碱基对数目的对数成反比。较大的分子移动较慢，因为它们受到了更大的摩擦阻力，在穿过凝胶孔隙时效率较低。

溶液中电极之间电流强度主要通过缓冲液离子与样品离子的大小比例来调节。电流 I 、电压 V 和电阻 R 之间的关系用欧姆定律表示：

$$R = V / I \quad (6)$$

该公式证明了在给定电阻 R 的情况下，可以通过增加电压 V 加速电泳分离，同时也导致电流 I 的相应增加，迁移的距离与电流和时间成正比。然而，电压 V 的增加和相应电流 I 的增加导致了在大多数电泳中的产热问题。这可以由以下公式表明，其中在电泳过程中产生的功率 W (单位：W) 相当于电阻与电流平方的乘积：

$$W = I^2 R \quad (7)$$

由于电泳过程中产生的大部分功率以热量的形式散失了，可以导致产生如下的不利作用：

- 增加了样品和缓冲液离子扩散速率，导致分离的样品条带加宽。

- 形成对流电流，造成分离样品的混合
- 对热相当敏感的样品的热不稳定 (如: DNA 的降解)
- 减少缓冲液的粘性，导致介质阻力的下降

琼脂糖凝胶电泳的组成

琼脂糖

琼脂糖是一种从海藻中提取的天然胶体，一种由琼脂胶重复单位组成的线性多聚糖（平均分子量约为 12,000 Da），其中琼脂胶单位是由半乳糖和 3,6-无水半乳糖交替组成的。琼脂糖易碎，在处理中易被破坏。琼脂糖凝胶有较大的“孔径”，主要用来分离分子质量大于 200 kDa 的大分子。

琼脂糖凝胶过程方便快捷，但是有一定限制，因为在琼脂糖凝胶中形成的条带易模糊/弥散、扩散，这是由于孔径大小的原因造成的，无法控制。琼脂糖凝胶的制备过程是先将干燥的琼脂糖粉末悬浮于缓冲液中，加热沸腾至琼脂糖完全融化，溶液变为透明为止。然后，将溶液倒入制胶盘中，室温下冷却至形成硬质的胶体。冷却变硬后，琼脂糖形成一块胶体，其密度由凝胶浓度决定。

电泳缓冲液

DNA 的电泳迁移率受电泳缓冲液的成份和离子强度的影响。在离子缺乏的情况下，电导率很小而 DNA 移动缓慢。在一个高离子强度的缓冲液中，电导率是非常强的并会产生大量的热量，在最坏的情况下，会产生凝胶软化、DNA 降解的现象。

几种缓冲液可用于双链 DNA 的电泳。这些缓冲液含有 EDTA (pH 8.0) 和 Tris-acetate (TAE)、Tris-borate (TBE) 或 Tris-phosphate (TPE)，浓度大约为 50 mM (pH 7.5-7.8)。电泳缓冲液常配置为浓缩溶液并储存于室温。TBE 最初是在 1×的浓度下用于凝胶电泳，然而，0.5×的作用溶液将提供更强的缓冲力，如今几乎所有的琼脂糖凝胶电泳都使用这一浓度的缓冲液。

琼脂糖浓度

根据琼脂糖的浓度，给定大小的 DNA 片断以不同的速率在凝胶中移动。对于一特定浓度的琼脂糖和/或缓冲液，可以分离大小在 20 bp 到 50,000 bp 之间的 DNA 片断。在水平凝胶电泳中，常用的琼脂糖浓度为 0.7% 到 3% (见表 1)。

表 1. 分析线性 DNA 分子推荐的琼脂糖凝胶浓度

%琼脂糖	DNA 大小范围 (bp)
0.75	10,000-15,000
1.0	500-10,000
1.25	300-5000
1.5	200-4000
2.0	100-2500
2.5	50-1000

DNA 分子量标记

在一定的电压、琼脂糖凝胶和缓冲液浓度条件下，迁移率取决于原始材料的分子量。因此，需要将一个已知大小的 DNA 分子量标记加入到凝胶右边和左边的点样孔中。DNA 分子量标记通常包含规定数目的已知 DNA 片断，这使得在电泳过程中存在系统误差的情况下，能够更容易地确定未知 DNA 的大小。

上样缓冲液

加入琼脂糖凝胶中的 DNA 样品首先要与上样缓冲液混合，缓冲液一般由水、蔗糖和一种染料 (例如：二甲苯胺、溴酚蓝、溴甲酚绿等) 组成。DNA 样品的最大上样量根据片段的数量而定。在 0.5 cm 宽的条带中，能被凝胶成像仪检测到的溴化乙锭染色的 DNA，最小量约为 2 ng。如果在这一宽度中含有超过 500 ng 的 DNA，点样孔就会“超载”，导致拖尾效应。上样缓冲液有以下 3 个作用：

- 增加样品的密度保证 DNA 均匀加入到点样孔中
- 使样品着色，以简化点样过程
- 在样品中加入染料，能使其在电场中以可预见的速率移动。

实验

警告：溴化乙锭是一种极强的诱变剂/致癌物质，有慢性毒性。在操作含有溴化乙锭的溶液和凝胶时必须戴手套。

仪器

- 带电源的水平电泳槽
- 微波炉或加热搅拌器
- 微量移液器
- 1.5 ml 反应管
- 精确度到 0.1 g 的天平
- 抹刀
- 反应管架
- 玻璃器具
- 透射仪 (紫外激发, 312 nm)
- 文件处理设备 (例如: 宝丽来照相机或摄影机)

试剂

- 适用于 DNA 电泳的琼脂糖
- Tris[hydroxymethyl]aminomethane (Tris) CAS 77-68-1
- 硼酸
- Na₂EDTA CAS 6381-92-6
- 溴化乙锭 CAS 1239-45-8
- 蔗糖

- 二甲苯胺 FF CAS 2650-17-1
- DNA 分子量标记:
 - *EcoRI/HindIII*消化的 λ DNA (或其它相似的适合标记物)
 - 100 bp DNA 梯度标记

10×TBE 缓冲液 (1L)

Tris[hydroxymethyl]aminomethane (Tris)	54.0 g
硼酸	27.5 g
Na ₂ EDTA	7.44g

- 在去离子水中混合试剂，调节溶液 pH 为 8.3，加水至 1L
- 室温储存

6×上样缓冲液 (10 ml)

二甲苯胺 FF	0.025 g
蔗糖	4 g

- 将蔗糖和二甲苯胺 FF 加入去离子水中调至 10 ml
- 混合溶液，高温灭菌后储存于 4℃

实验步骤

- 用胶带或其它方法将一个洁净、干燥的塑料制胶盘边缘密封。插入多孔的梳子以便在加入琼脂糖溶液时能形成需要的点样孔。
- 稀释 10×TBE 缓冲液，制备成适量的 0.5×TBE 缓冲液，能够满足灌注电泳槽和配置凝胶的需要。
- 根据表 2 称取琼脂糖干粉，加入到含有适量 0.5×TBE 缓冲液的锥形瓶中，混匀。(通常是 15×15 cm 的制胶盘加入 150 ml 的凝胶溶液；15×10 cm 的制胶盘加入 100 ml 的凝胶溶液)。

表 2. 实验中使用的琼脂糖凝胶浓度

	GMO3 GMO4	ZEIN3 ZEIN4	p35S-cf3 p35S-cr4	HA-nos118-f HA-nos118-r	CRYIA3 CRYIA4	GM07 GM08	mg3 mg4	Genomic DNA
0.8-1%								×
1.5%	×	×						
2.0%			×	×	×	×	×	

- 在微波炉或沸水中加热混合溶液直至琼脂糖完全溶解 (加热后检查溶液体积)。
- 溶液冷却至 50-60℃，加入溴化乙锭 (10 mg/ml 的备用溶液) 使其终浓度为 0.2 μg/ml，充分混匀。
- 将溶液倒入制胶盘中，使凝胶凝固。应使凝胶溶液的量达到大约 3-5 mm 的深度。
- 凝胶凝固后，小心拔出梳子和胶带，然后将凝胶放入电泳槽中。
- 加入足量的 0.5×TBE 缓冲液到电泳槽中，直至浸末胶体大约 2-5 mm。

根据以下配方准备基因组 DNA 样品和分子量标记:

<i>样品</i>		<i>DNA 分子量标记</i>	
水	3 μ l	水	6 μ l
上样缓冲液	2 μ l	上样缓冲液	2 μ l
<u>样品</u>	<u>5 μl</u>	<u>λ DNA <i>EcoR</i> I/<i>Hind</i> III</u>	<u>2 μl</u>
	10 μ l		10 μ l

根据以下配方准备 PCR 产物的样品和分子量标记:

<i>样品</i>		<i>DNA 分子量标记</i>	
上样缓冲液	2 μ l	100 bp DNA 梯度标记	15 μ l
<u>样品</u>	<u>8 μl</u>		
	<u>10 μl</u>		

- 分别在每个点样槽中连续加入 10 μ l 样品，并在第一个和最后一个泳道中加入适当的 DNA 分子量标记。
- 盖上电泳槽盖，接上电导线，使 DNA 在 5-10 V/cm 的电压下电泳。
- 电泳，直到二甲苯胺移动到凝胶中的适当位置 (约 40-60 min)
- 关掉电源：移去电导线和电泳槽盖。将凝胶放入紫外线照射箱中拍照
- 将凝胶丢弃于专用的溴化乙锭固体废物箱中

参考文献

- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989). Gel electrophoresis of DNA. In: Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (Eds.) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, chapter 6.
- Westermeier, R. (1997). *Electrophoresis in Practice: a Guide to Methods and Applications of DNA and Protein Separation*, VCH, Weinheim.