

实验六 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
- 检测总**DNA**的纯度与分子量
- 检测**PCR**的结果

二 实验原理

- 电泳是分离和纯化**DNA**片段的最常用技术
- 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

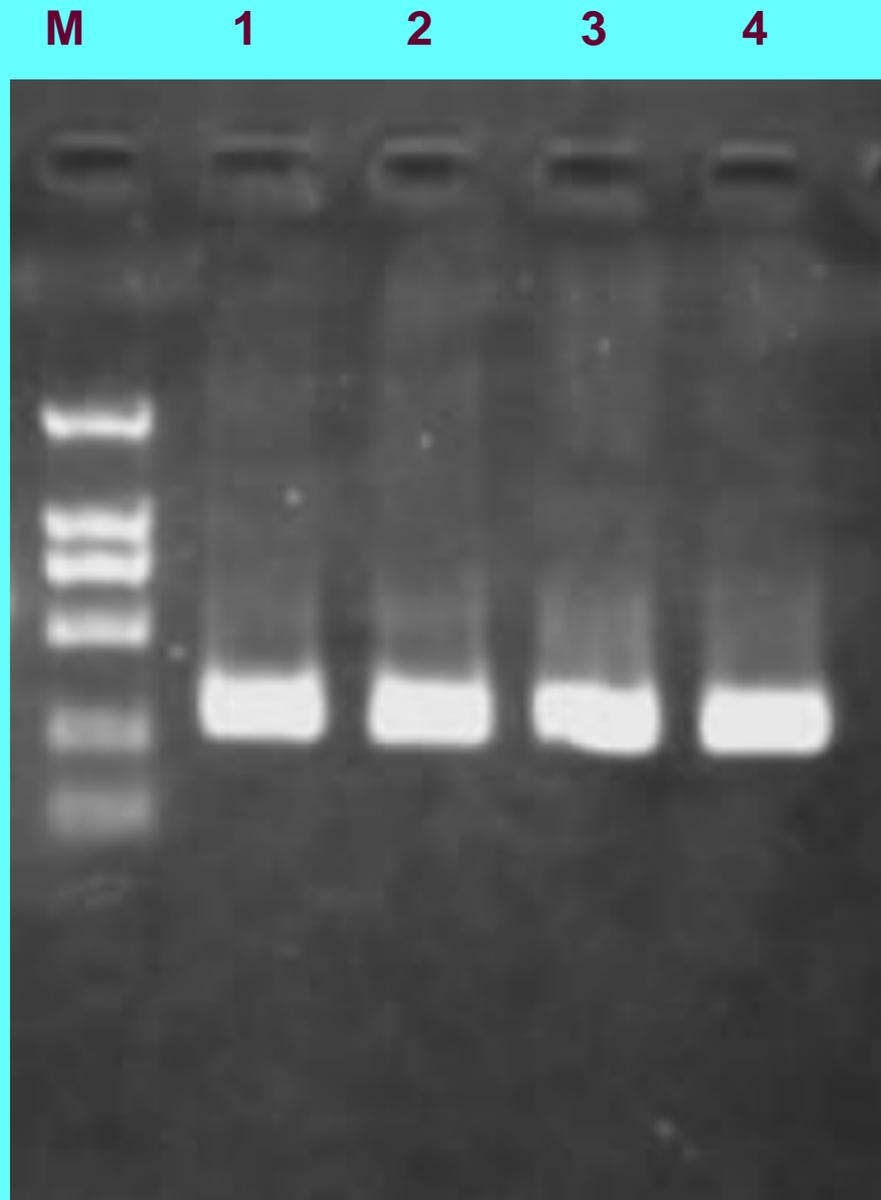
二 实验原理

- **DNA**分子在琼脂糖凝胶中泳动时，有电荷效应与分子筛效应。不同的**DNA**，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**，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
- 可依据**DNA**分子的大小使其分离

二 实验原理

- **Goodview**可与**DNA**分子形成复合物，发射的荧光强度较游离的**Goodview**强度大**10**倍以上，且荧光强度与**DAN**含量成正比
- 示踪染料和分子量标准参照物

PCR产物的 琼脂糖凝胶电泳



三 实验材料、用具及试剂

- 提取的叶片总**DNA**和**PCR**产物
- 电泳仪，电泳槽，电子水平，移液器，枪头，三角瓶、点样板，微波炉等
- 琼脂糖，**TAE**电泳缓冲液，**Goodview**，载样缓冲液（**Loading buffer**）

四、实验步骤

1 制胶:

100ml(0.5×TAE)+0.8g琼脂糖 →三角瓶(1/3)

煮胶→溶解，冷却至**60°C(不烫手)**，加

Goodview，倒板**(4-6mm)**，室温下充分凝固，竖

直拔下梳子

四、实验步骤

2 点样:

5 μ l总DNA+1 μ l loading buffer=7 μ l

PCR产物+3 μ l loading buffer, 混匀, 吸取10 μ l

10 μ l λ DNA-HindIII)

3 电泳: 电压3-5V/cm, 约80-90V, 注意电极方向

4 观察: 紫外透射分析仪下观察, 时间不要太久

五 注意事项

- 1 倒胶时把握好胶的温度，不要高于**60℃**，否则温度太高会使制板变形
- 2 胶一定要凝固好才能拔梳子，方向一定要竖直向上，不要弄坏点样孔
- 3 点样时枪头下伸，点样孔内不能有气泡，缓冲液不要太多
- 4 **Goodview**有毒，切勿用手接触，更不要污染环境，胶勿乱扔
- 5 紫外线照射不要太久

六 作业

- 画出电泳图，分析观察到的结果