

关于琼脂糖：

琼脂糖是由 1, 3 连结的 β -D-半乳糖和 1, 4 连结的 3, 6-脱水 α -L-半乳糖相间联结而成。琼脂糖具有亲水性，并几乎完全不存在带电基团，极少吸附生物大分子也极少引起其变性，是理想的惰性载体。琼脂糖在水中一般加热到 90℃ 以上溶解，温度下降到 35-40℃ 形成良好的半固体状的凝胶。琼脂糖凝胶是最常用的分离介质，用作电泳和层析载体，分离生物大分子（核酸、蛋白、多糖等）。

琼脂糖凝胶的优点：

- 1、样品无需预处理，电泳操作简单，电泳速度快。
- 2、凝胶结构均匀，电泳图谱清晰，分辨率高，重复性好。
- 3、凝胶透明无紫外吸收，电泳结果可直接用紫外光灯下监测。
- 4、易染色，样品易洗脱，便于定量测定。制成干膜可长期保存。

琼脂糖凝胶的制备方法

- 1、根据电泳需要，配制电泳缓冲液。
- 2、准确称量的琼脂糖加入三角瓶，加入电泳液（1%琼脂糖凝胶，即为 1g 琼脂糖，加入 100 ml 1×TAE）。
总液体量不宜超过三角瓶的 50% 容积

3、微波炉高火加热至沸腾，保持 30 秒，戴上防热手套，小心摇动三角瓶，重悬未溶解颗粒，再次高火加热 1-2 分钟，直至琼脂糖完全溶解。

注：加热时如胶液剧烈沸腾发泡，停止加热。微波炉中加热时间不宜过长。

- 4、溶液冷却至 60℃ 左右，可加入 EB 溶液（终浓度为 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，其它核酸染料也可），并充分混匀。
- 5、将琼脂糖溶液倒入制胶模中，在适当位置插上梳子。凝胶厚度一般在 3-5 mm 之间。
- 6、室温下自然凝固（约 30-60 分钟），然后放置于电泳槽中进行电泳。

注：凝胶不立即使用，用保鲜膜将凝胶包好后在 4℃ 保存，可保存 2-5 天。

琼脂糖浓度与 DNA 分离范围

琼脂糖浓度 (%)	0.3	0.6	0.7	0.9	1.2	1.5	2.0
线状 DNA (kb)	25-5	20-1	10-0.8	7-0.5	6-0.4	4-0.2	3-0.1

常见问题及解决办法

微波炉溶解琼脂糖时，胶液剧烈沸腾冲溢出三角锥瓶怎么办？

- 1、总液体量不宜超过三角锥瓶的 50% 容量。

2、胶液浓度为 2%以上的请设置中火加热。

3、胶液剧烈沸腾时，停止加热，戴上防热手套小心摇动三角瓶，然后再次加热至沸腾，直至琼脂糖完全溶解胶液清澈。

琼脂糖电泳图像背景模糊的原因及解决办法

琼脂糖没有完全溶解会造成电泳图像背景模糊不清。完全溶解的琼脂糖，三角瓶内壁应没有粘附琼脂糖颗粒。

DNA 条带模糊，拖尾的原因及解决办法

1、DNA 降解。样品应避免放置时间过长，避免核酸酶污染。

2、上样量过多。减少上样量。

3、电泳缓冲液失效。多次使用的电泳缓冲液，离子强度降低，pH 值上升，缓冲能力减弱，影响电泳效果。建议更换电泳缓冲液。

4、电泳条件不合适。电泳时电压不应超过 20V/cm，温度 $<30^{\circ}\text{C}$ ，超长 DNA 链，温度应 $<15^{\circ}\text{C}$ 。

5、DNA 含盐过高。电泳前通过乙醇沉淀去除过多的盐。

6、蛋白污染。电泳前抽提去除蛋白。

7、DNA 变性。电泳前勿加热，用 20mM NaCl 缓冲液稀释 DNA。

DNA 条带淡薄或无条带的原因及解决办法

1、上样量不够。增加上样量。

2、DNA 降解。避免 DNA 的核酸酶污染。

3、DNA 跑出凝胶。缩短电泳时间，降低电压，增强凝胶浓度。

4、分子大小相近的 DNA 条带不易分辨。增加电泳时间，使用正确的凝胶浓度。

5、DNA 变性。电泳前请勿高温加热 DNA 链，用 20mM NaCl Buffer 稀释 DNA。

6、DNA 链超长，常规凝胶电泳不合适。在脉冲凝胶电泳上分析。

DNA Marker 条带扭曲的原因及解决办法

1、配制凝胶的缓冲液和电泳的缓冲液，不是同时配制的。使用同时配制的缓冲液，缓冲液高过凝胶 1-2mm。

2、电泳时电压过高。可以在电泳前 15 分钟用较低电压(3V/cm)，等条带出孔后，再调高电压。

3、尽量慢慢加样，等样品自然沉降后再加电压。

外观	白色粉末
EEO	≤ 0.13
凝胶温度	36°C ± 1.5°C (1.5% gel)
mp	88°C ± 1.5°C (1.5% gel)
溶解性	无色清澈胶液
水分	≤ 10%
凝胶强度	≥ 1200 g/cm ² (1% gel)
硫化物 (SO ₄ ²⁻)	≤ 0.15%
灰分	≤ 0.5%
DNA 酶& RNA 酶	未检出
蛋白酶	未检出
核酸内切酶	未检出