

实验四 分子生物学技术基础

电泳技术及琼脂糖电泳；分光光度计使用

-以**DNA**的提取、分离及其含量和纯度的测定为例

蔡奇英

1. 实验目的

- 1) 掌握DNA提取方法和原理
- 2) 掌握电泳的原理和琼脂糖电泳的原理和方法
- 3) 掌握分光光度计的使用

2.电泳技术及琼脂糖凝胶电泳

➤2.1 定义

是指带电荷的供试品（蛋白质、核苷酸等）在惰性支持介质（如纸、醋酸纤维素、琼脂糖凝胶、聚丙烯酰胺凝胶等）中，于电场的作用下，向其对应的电极方向按各自的速度进行泳动，使组分分离成狭窄的区带，用适宜的检测方法记录其电泳区带图谱或计算其百分含量的方法。

➤ 2.2 电泳技术的基本原理

在电场中，推动带电质点运动的力（ F ）等于质点所带净电荷量（ Q ）与电场强度（ E ）的乘积。 $F=QE$ 质点的前移同样要受到阻力（ F' ）的影响，对于一个球形质点，服从Stoke定律，即：

$$F' = 6\pi r\eta v$$

式中： r 为质点半径， η 为介质粘度， v 为质点移动速度，

当质点在电场中作稳定运动时： $F=F'$ 即 $QE = 6\pi r\eta v$

推导出 $v = QE / 6\pi r\eta$

2.3 影响电泳迁移率的因素:

(1) 球形质点的迁移率，首先取决于自身状态，即与**所带电量**成正比，与其**半径及介质粘度**成反比。

(2) **电场强度** 电场强度是指单位长度（cm）的电位降，也称电势梯度，电场强度大，带电质点的迁移率加速，因此省时，但因产生大量热量，应配备冷却装置以维持恒温。

(3) **溶液的pH值** 溶液的pH决定被分离物质的解离程度和质点的带电性质及所带净电荷量。溶液的pH离pI越远，质点所带净电荷越多，电泳迁移率越大。因此在电泳时，应根据样品性质，选择合适的pH值缓冲液。

pI是一个分子或者表面不带电荷时的pH值

(4) **溶液的离子强度** 电泳液中的离子浓度增加时会引起质点迁移率的降低。其原因是带电质点吸引相反符合的离子聚集其周围，形成一个与运动质点符合相反的离子氛，离子氛不仅降低质点的带电量，同时增加质点前移的阻力，甚至使其不能泳动。

(5) **电渗** 在电场作用下液体对于固体支持物的相对移动称为电渗 (electro-osmosis)。

其产生的原因是固体支持物多孔，且带有可解离的化学基团，因此常吸附溶液中的正离子或负离子，使溶液相对带负电或正电。如以滤纸作支持物时，纸上纤维素吸附 OH^- 带负电荷，与纸接触的水溶液因此产生 H_3O^+ ，带正电荷移向负极，若质点原来在电场中移向负极，结果质点的表现速度比其固有速度要快，若质点原来移向正极，表现速度比其固有速度要慢，可见应尽可能选择低电渗作用的支持物以减少电渗的影响。

2.4 电泳技术分类

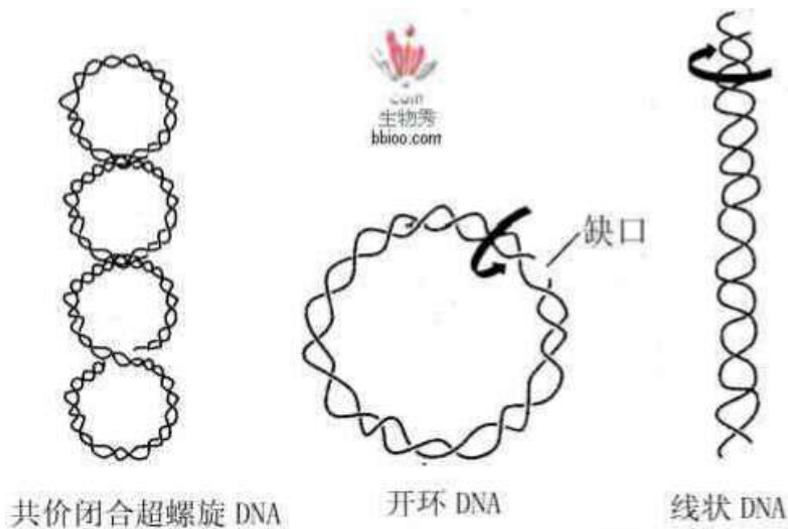
可分为自由电泳（无支持体）及区带电泳（有支持体）两大类。前者包括Tise-leas式微量电泳、显微电泳、等电聚焦电泳、等速电泳及密度梯度电泳。区带电泳则包括滤纸电泳（常压及高压）、薄层电泳（薄膜及薄板）、**凝胶电泳**（琼脂、琼脂糖、淀粉胶、聚丙烯酰胺凝胶）等。

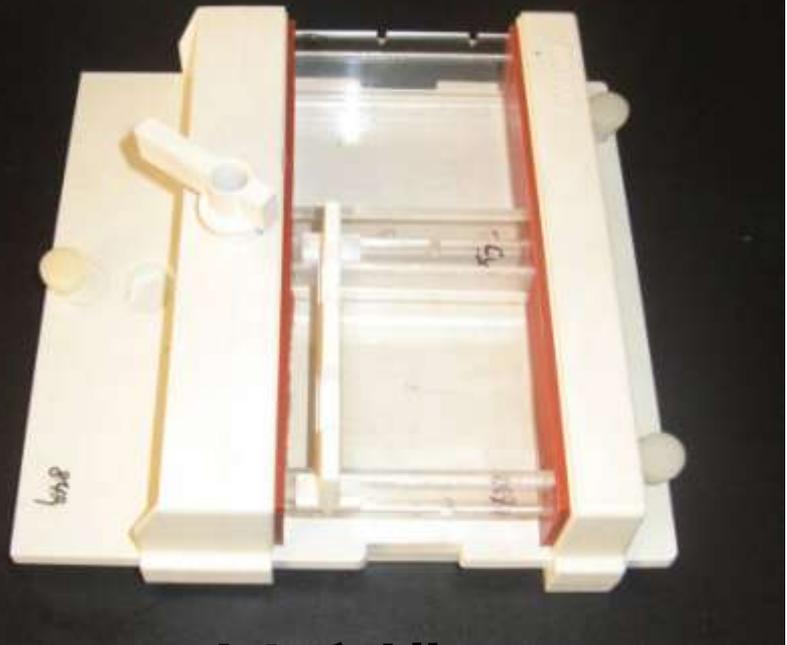
自由电泳法的发展并不迅速，因为其电泳仪构造复杂、体积庞大，操作要求严格，价格昂贵等。而区带电泳可用各种类型的物质作支持体，其应用比较广泛。

■ 琼脂糖凝胶电泳检测DNA

- 琼脂糖是由琼脂分离制备的链状多糖。其结构单元是D-半乳糖和3,6-脱水-L-半乳糖。许多琼脂糖链依氢键及其它力的作用使其互相盘绕形成绳状琼脂糖束，构成大网孔型凝胶。
- 该凝胶适合于免疫复合物、核酸与核蛋白的分离、鉴定及纯化。

□ 在一定浓度的琼脂糖凝胶介质中，DNA分子的电泳迁移率与其分子量的常用对数成反比；分子构型也对迁移率有影响，如共价闭环DNA > 直线DNA > 开环双链DNA。当凝胶浓度太高时，凝胶孔径变小，环状DNA（球形）不能进入胶中，相对迁移率为0，而同等大小的直线DNA（刚性棒状）可以按长轴方向前移，相对迁移率大于0

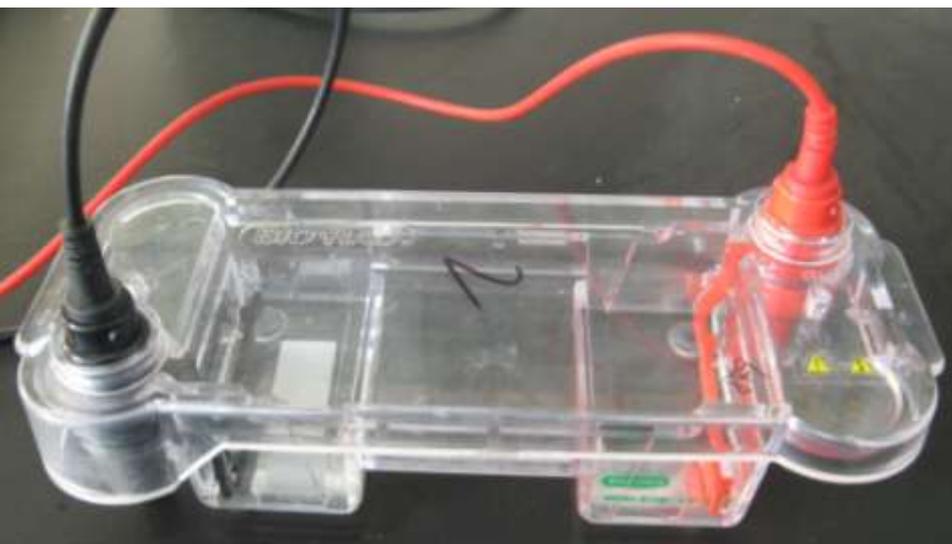




制胶模具



梳板



电泳槽



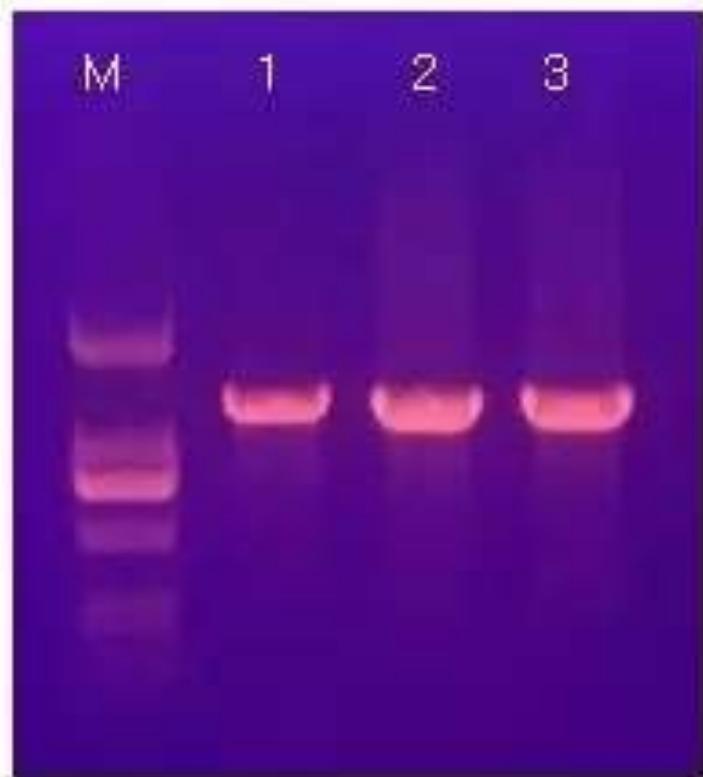
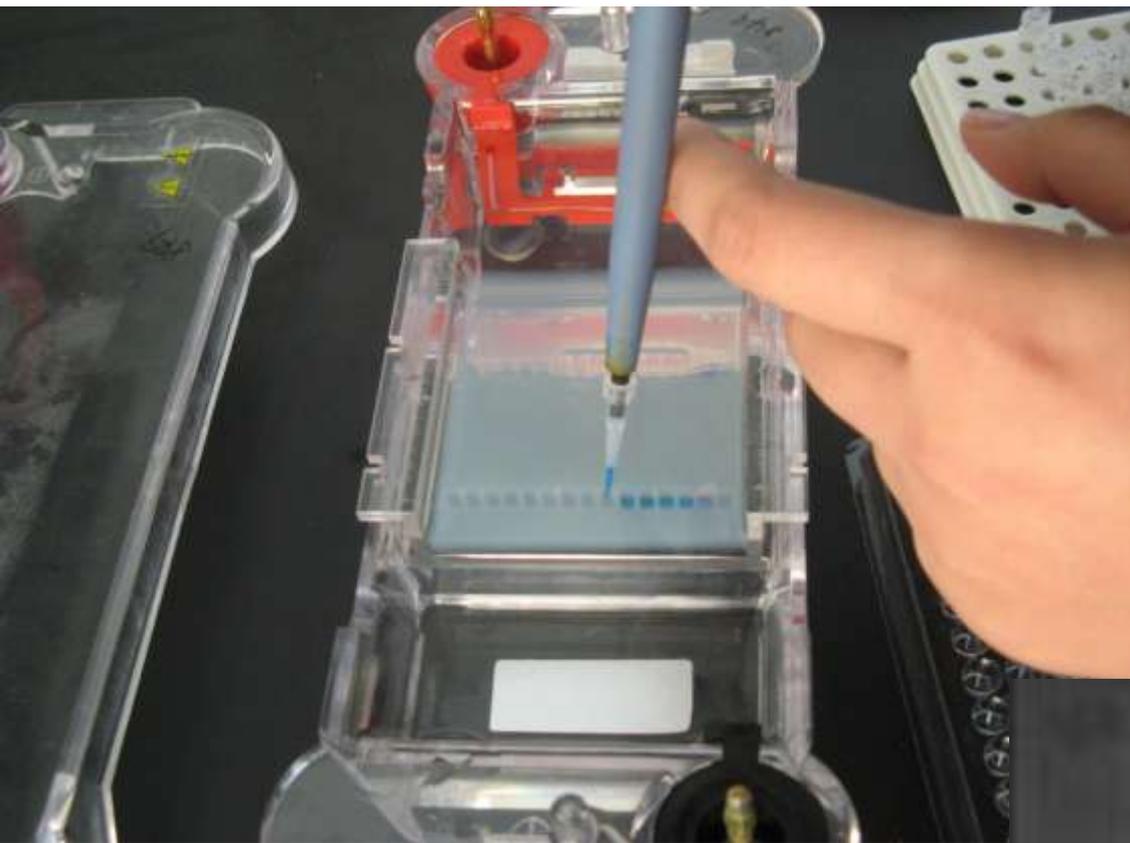
电泳仪

■ 操作步骤：

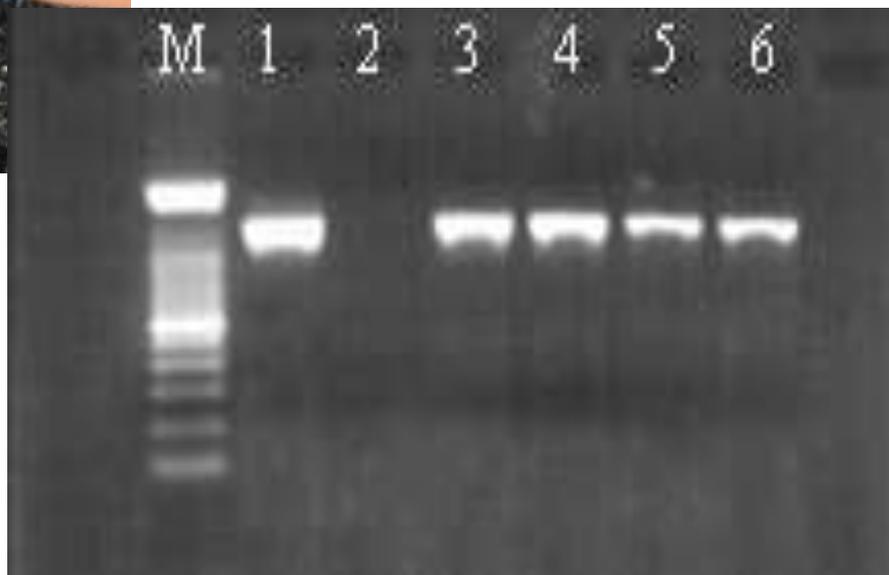
- **凝胶制备：**用50mL TAE缓冲液配制**1.0%**琼脂糖凝胶溶液，在微波炉加热使之融化，冷至55°C时加入核酸染料（如EB, Goldview）至终浓度为0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，然后将其注入有机玻璃板组装好的模子中，注胶时，梳齿下端距玻璃板0.5-1.0mm，待脱凝固后，取出梳子，加入适量电极缓冲液使板胶浸没在缓冲液下1mm处。

- **样品制备与加样：** DNA样品（5 μL ）与上样缓冲液（1 μL ）混匀，然后用移液器加入到齿孔中，使样品集中沉到孔底部，每个学生加样一个齿孔。
- **电泳：** 所有同学都加完样后，开始在电泳，一般电压为5-15V/cm。对大分子的分离可用电压5V/cm。
- **观察：** 电泳结束后在紫外灯下观察样品的分离情况，对需要的DNA分子或特殊片段可从电泳后的凝胶中以不同的方法进行回收。

点样



电泳图谱



3.分光光度计的原理和使用

□ 3.1 分光光度计的原理

物质的吸收光谱本质上就是物质中的分子和原子吸收了入射光中的某些特定波长的光能量，相应地发生了分子振动能级跃迁和电子能级跃迁的结果。由于各种物质具有各自不同的分子、原子和不同的分子空间结构，其吸收光能量的情况也就不会相同，因此，每种物质就有其特有的、固定的吸收光谱曲线，可根据吸收光谱上的某些特征波长处的吸光度的高低判别或测定该物质的含量，这就是分光光度定性和定量分析的基础。

分光光度分析就是根据物质的吸收光谱研究物质的成分、结构和物质间相互作用的有效手段。

□ 3.2 紫外可见分光光度法的定量分析基础是朗伯-比尔 (Lambert-Beer) 定律：

$$A = -\lg T = \epsilon bc$$

A——吸光度，又称光密度“OD”。

T——透光度， $T = I / I_0$

ϵ ——摩尔吸光系数或克分子吸光系数 ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$) 。

b——样品光程 (cm)，通常使用1.0cm的吸收池，**b=1cm**。

C——样品浓度 (mol/L) 。

由上式可以看出：吸光度A与物质的吸光系数“ ϵ ”和物质的浓度“C”成正比。

□ 3.3 分光光度计光源与波段

紫外光区：**氢灯**（或氘灯） 185~400 nm ；

可见光区：**钨灯** 400~760nm 。

紫外可见光分光光度计 光谱区：195-1000 nm **石英比色皿**

可见光分光光度计 光谱区：320-1000 nm **玻璃比色皿**



分光光度计及比色皿

□ 3.4 分光光度计的应用

物质的定性分析

根据吸收光谱图上的一些特征吸收，特别是最大吸收波长和摩尔吸收系数是鉴定物质的常用物理参数。这在药物分析上就有着很广泛的应用。在国内外的药典中，已将众多的药物紫外吸收光谱的最大吸收波长和吸收系数载入其中，为药物分析提供了很好的手段。

物质的定量分析

通过朗伯-比尔定律，确定物质在合适波长下吸光值与浓度的之间关系，就可以测定物质的浓度。

反应动力学研究

推测化合物的分子结构

UV-752紫外可见分光光度计的使用

- 1、接通电源，打开仪器开关，至少预热20分钟。
- 2、选择波长，通过波长设定键，调节到所需的波长。
- 3、通过SET选择测量方式，选择光度测量（选择透射比（T）或吸光度（A）模式）。
- 4、将空白液及测定液分别倒入比色杯3/4处，用擦镜纸擦拭外壁，放入样品室内，使空白管对准光路。
- 5、按下调零键，使读数为0。
- 6、然后拉出样品滑竿，使测定样品管进入光路，分别读出测定管的吸光值，并记录。
- 7、比色完毕，关上电源，取出比色皿，清洗干净，表面用擦镜纸擦干净，放回比色皿盒。样品室用软布或软纸擦净。

DNA提取、电泳分离及其含量和纯度的测定

□ 实验原理：

核酸是重要生物大分子，在细胞核中，核酸通常是与某些组织蛋白质结合成复合物，即以脱氧核糖核蛋白（DNP）和核糖核蛋白（RNP）的形式存在。因此，在提取和制备DNA时，首先必须将这类核蛋白分开。

在不同浓度的盐溶液中，RNP和DNP的溶解度有很大的差别，在0.14mol/L的盐溶液中，DNP溶解度很低，而RNP的溶解度仍相当大，因此，通常采用0.14mol/L的盐溶液来除去RNP，使DNP仍保持在沉淀中，然后使用高盐溶液（1.7mol/L 浓度以上的NaCl）来提取DNP。

将提取得到的核蛋白用SDS处理，DNA即与蛋白质分离，可用氯仿-异戊醇（24:1，v/v）将蛋白质沉淀除去，而DNA则溶解于溶液中，向溶液中加入适量乙醇，DNA即可析出。为防止DNA降解，提取时加入EDTA络合试剂。

实验试剂及器材

试剂:

溶液A: 0.14mol/L NaCl-0.15mol/L EDTA-Na₂

5mol/L NaCl

250g/L SDS

氯仿: 异戊醇=24:1 (V/V)

乙醇 (70%)

➤ **样品: 猪肝脏**

器材

匀浆器，离心管，恒温水浴锅，玻璃棒，剪刀和镊子



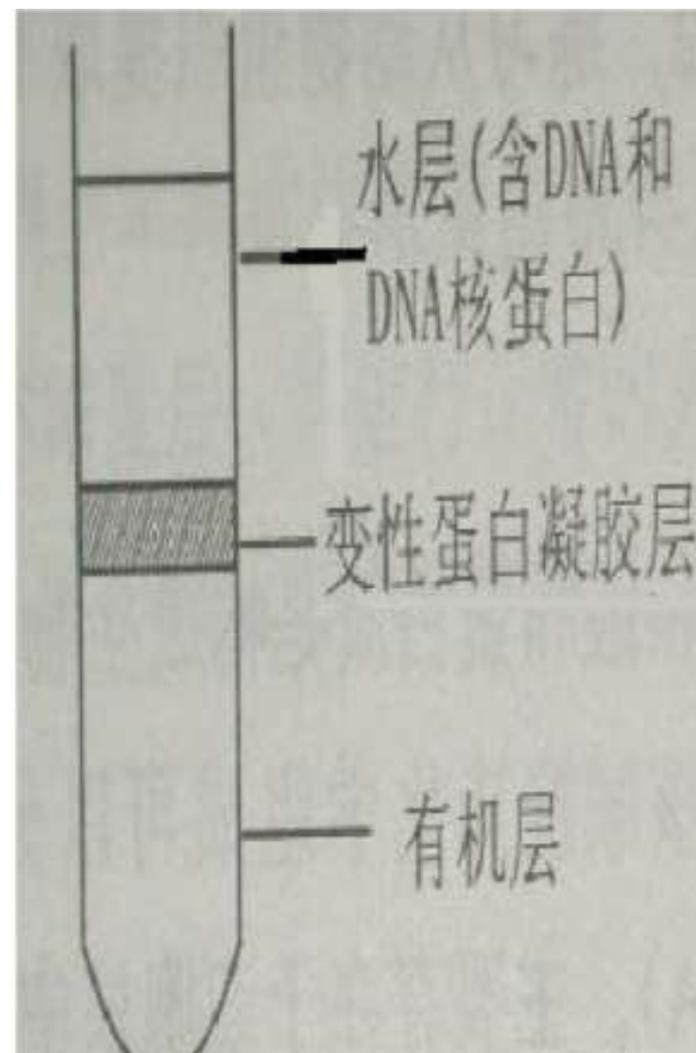
实验操作

- 1) 去新鲜猪肝1g，用溶液A洗去血液，剪碎，加入2 mL溶液A，在匀浆器中制成匀浆，将匀浆置于10 mL离心管中，再用2mL 溶液A洗涤匀浆器后，置于同一离心管中，然后 4000r/min离心10min，弃去上清，沉淀用溶液A悬浮，于上述条件下再离心一次，所得沉淀为脱氧核糖核蛋白粗制品。
- 2) 向上述沉淀中加入4 mL溶液A，然后滴加250g/L SDS 溶液0.3ml，边加边摇动，置于60度恒温水浴锅保温10min（不停摇动），取出冷却到室温，此步骤使核酸与蛋白分离。

实验操作

3) 加入5mol/L NaCl 1.1ml, 使最终浓度为1mol/L。搅拌5min, 加入约一倍体积的氯仿: 异戊醇=24:1 混合液, 轻轻振摇5min, 4000r/min离心10min, 离心管内的物质分成三层, 上层为含DNA的水相层, 下层为氯仿-异戊醇的混合物, 中间层为变性的蛋白质。

4) 吸出上层液, 转移到一个新的离心管中, 加入2倍体积的预冷的95%乙醇, 上下轻轻颠倒, 产生絮状沉淀。



实验操作

- 5) 将离心管在4000r/min离心10min，去上清，用5ml 80%的乙醇洗涤DNA沉淀一次。或者用移液枪头勾出絮状沉淀，放入用80%的乙醇洗涤DNA沉淀一次。
- 6) 加入适量的pH8.0的TE 缓冲液，使DNA沉淀充分溶解，待用。
- 7) DNA样品用于琼脂糖凝胶电泳和采用分光光度计进行检测浓度和纯度。

DNA浓度和纯度计算

DNA或RNA 链上碱基的苯环结构在紫外光区具有较强吸收，其吸收峰在260nm处，因此可以用分光光度测定其含量。

在 $\lambda = 260\text{nm}$ 时，DNA或RNA的吸光度不仅与总含量有关，也随构型而有差异。如对标准品来说，浓度为 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 时，DNA钠盐的 $OD_{260}=0.02$ 。

当 $OD_{260}=1$ 时，dsDNA浓度约为 $50\ \mu\text{g}/\text{ml}$

ssDNA浓度约

$37\mu\text{g}/\text{ml}$

RNA浓度约为40

$\mu\text{g}/\text{ml}$

寡核苷酸浓度约为

$30\mu\text{g}/\text{ml}$

蛋白质在280nm处有最大的吸收峰，盐和小分子则集中在230nm处。当DNA样品中含有蛋白质、酚或其他小分子污染物时，会影响DNA吸光度的准确测定。一般情况下同时检测用一个样品的 OD_{260} 、 OD_{280} 和 OD_{230} ，计算其比值来衡量样品的纯度。

纯DNA: $OD_{260}/OD_{280}=1.8$ (大于1.9, 表明有RNA污染; 小于1.6, 表明有蛋白质、酚等污染)

纯的RNA: $1.7 < OD_{260}/OD_{280} < 2.0$ (小于1.7 说明有蛋白质或酚污染; 大于2.0 说明可能有异硫氰酸污残存)

- 1) 先打开UV-752 紫外可见分光光度计电源开关，预热20min;
- 2) 用蒸馏水清洗比色皿，用吸水纸吸干，然后加入TE 缓冲液，作为空白对照，放入到样品室的槽中。
- 3) 将待测DNA样品进行一定稀释后，倒入比色杯3/4处，用擦镜纸擦干净表面后，放入样品室槽中，关闭盖板。
- 4) 设定紫外光波长，分别测定230nm，260nm，280nm波长下的吸光值OD。
- 5) 计算样品的浓度和纯度:

$$\text{DNA样品浓度 (}\mu\text{g}/\mu\text{L)} = \text{OD}_{260} \times \text{稀释倍数} \times 50/1000$$

$$\text{DNA样品纯度} = \text{OD}_{260} / \text{OD}_{280}$$

问答

- 1、请说明样品在电泳时影响其迁移速度有那些因素？请说明原因？
- 2、琼脂糖凝胶电泳获得较好的电泳图谱应注意那些事项？
- 3、提取DNA要注意那些事项？