

琼脂糖凝胶电泳

本文主要介绍了琼脂糖凝胶电泳的原理及实验操作步骤，及电泳后 DNA 的回收方法；琼脂糖凝胶的特点及电泳实验相关试剂的配置及琼脂糖凝胶电泳常见问题分析。

琼脂糖凝胶电泳样品制备

大肠杆菌质粒 DNA 模板提取：

- 1、接 1%含质粒的大肠杆菌细胞于 2ml LB 培养基
- 2、37°C 振荡培养过夜
- 3、取 100ul 菌体于 2ml Ep 管中，4000rpm 离心 3min，弃上清
- 4、加 100ul 溶液 A (1%葡萄糖 50mM/L EDTA pH8.0，25mM/L Tris-HCl pH8.0) 充分混合
- 5、加入 200ul 溶液 B (0.2 mM/L NaOH，1% SDS)，轻轻翻转混匀，置于冰浴 5 min
- 6、加入 150ul 预冷溶液 C (5 mol/L KAc，pH4.8)，轻轻翻转混匀，置于冰浴 5 min
- 7、10000rpm 离心 20min，取上清
- 8、加入等体积的异戊醇，混匀后于 60°C 静置 10min
- 9、再次 10000rpm 离心 20min，弃上清
- 10、用 500ul 70% 的乙醇洗涤，抽干所有液体
- 11、待沉淀干燥，溶于 5ul 的 TE 缓冲液中 (通常可获得 3-5ug 的 DNA)

真核细胞 DNA 模板提取：

真核细胞 DNA 的提取是进行功能和结构研究的重要一步，真核 DNA 提取要保证 DNA 的完整性 (不断裂)。真核 DNA 可以从培养的细胞新鲜的组织中提取。通常都是采用蛋白酶消化后用酚抽提获得。不同来源的材料进行不同的预处理，但是后续提取 DNA 的方法是类似的，提取的原则就是，尽量减少对 DNA 的破坏或降解，保持其完整性。具体提取步骤如下：

(一) 材料预处理：

培养细胞用缓冲液洗涤后离心 (4000rpm/5min) 去除上清，得到细胞沉淀物加入 10 倍体积的裂解缓冲液，55°C 水浴 1-2 小时；

组织（组织要剪碎匀浆）加入 1.5ml 到离心管中，加入 20%的 SDS 25ul，蛋白酶 K（2mg/ml）25ul，然后混匀，60°C水浴 1-3 小时；

（二）DNA 的提取（适用于处理后的细胞或组织）

1. 预处理的样品加入饱和酚，轻轻混匀几分钟后离心（5000rpm/10min），去上层水相；
2. 加入等体积的饱和酚，混匀，再次离心，去上层水相；直至去上层水相变得澄清，不然可重复此操作；
3. 加入十分之一的 3M 错酸钠（pH2.5）HE 2.5 倍体积的无水乙醇，轻轻混匀；
4. 出现絮状物后离心（5000rpm/10min），弃上清；用 75%乙醇洗涤沉淀，再次离心，弃上清；
5. 室温下晾干（待乙醇挥发），加入 100ul TE 溶解即可。

提取 DNA 的物品需要高压灭菌，以防止带入其他核酸污染；试剂同样高压灭菌；

PCR 扩增

琼脂糖凝胶电泳原理

琼脂糖凝胶电泳，是以琼脂糖为介质，对不同大小的 DNA 或 RNA 实现分离的一种电泳方法。琼脂糖是一种多糖，具有亲水性，但是不带电荷。使得 DNA 在碱性条件下使其带负电荷（pH8.0 的缓冲液），在电流作用下，以琼脂糖凝胶为介质，由负极向正极移动，根据不同的 DNA 分子片段的大小和形状不同，在电场中泳动的速率也不相同，同时在样品中加入染料（如 EB 或花青素类染料）能够和 DNA 分子间形成络合物，经过紫外照射，可以看到 DNA 的位置（比对 marker 可知分子量大小），从而达到分离、鉴定的目的。

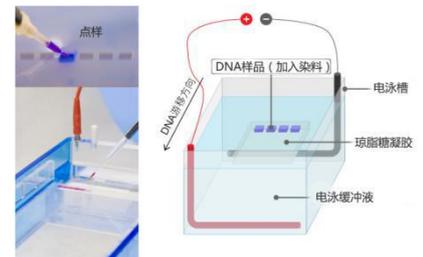


图 1 琼脂糖凝胶电泳原理

琼脂糖凝胶电泳优点

1. 琼脂糖凝胶是具有大量微小孔道的基质，其孔径尺寸取决于它的浓度。0.075 琼脂糖的孔径为 800nm，0.16 的孔径为 500nm，1%的琼脂糖孔径为 150nm，这都是常用的琼脂糖凝胶的浓度，可以分离 0.1-60kb 左右的 DNA，大孔性有利于免疫固定、免疫电泳和微量制备；
2. 琼脂糖具有较高机械强度，允许在 1%或更低的浓度下使用；且与别的生物只存在微弱的结合；
3. 琼脂糖无毒，琼脂糖胶凝固过程不会发生自由基聚合，无需催化剂；

4. 琼脂糖胶具有热可逆性，低熔点易于回收样品，可用于对温度敏感材料的制备；
5. 易于保存，是高灵敏放射自显影的理想材料。

琼脂糖凝胶电泳步骤

1. 用蒸馏水将制胶工具洗干净，准备好制胶平板，用琼脂将模具边缘封闭，架好梳子；
2. 根据要分离的样品（DNA）大小配制合适浓度的琼脂糖凝胶。准确的称取一定量的琼脂糖干粉，加入到合适体积的锥形瓶中，加入一定量的电泳缓冲液（30ml 左右 TAE）；放入到微波炉内加热融化，冷却片刻（不烫手即可）；
3. 融化后的琼脂溶液摇晃混匀，倒入电泳槽中，等其凝固；
4. 室温下凝固 30-40min 左右，小心的拔出梳子，取出凝固好的凝胶放入电泳槽内，准备上样；
5. 在电泳槽中倒入电泳缓冲液（TAE）；没过胶面 1mm 左右，去除胶孔内的气泡；
6. 上样，5ulDNA 样品加入 1ul 上样缓冲液（loading buffer）和 1ul 的染料，用枪混匀后加入到凝胶孔内；
7. 上样结束，接通电源，红色正极，黑色负极，DNA 样品有负极往正极运动，加样孔侧为负，，40-50v 电压，电压 30 敏左右即可（<40min）；
8. 电压结束，关闭电源，凝胶成像仪上观察电压位置并比对 marker 判断大小。

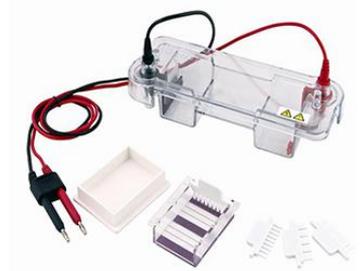


图 2：琼脂糖凝胶电泳仪器

琼脂糖凝胶配制浓度与 DNA 的最佳分离范围

琼脂糖浓度/%	0.3	0.6	0.7	0.9	1.2	1.5	2.0
DNA 大小/kb	5-60	1-20	0.8-10	0.5-7	0.4-6	0.2-4	0.1-3

琼脂糖凝胶电泳相关试剂配置

（一）50 x TAE buffer (pH8.5)

在 1L 烧杯中准确称取 Tris 242g，EDTA (Na) 37.2g，加入 800ml 的去离子水，充分搅拌溶解，加入 57.1ml 的乙酸，充分搅拌，调 pH8.5 后，定容至 1L。每次使用加水稀释 50 倍即 1xTAE buffer。

（二）10 x TBE buffer (pH8.3)

在 1L 烧杯中准确称取 Tris 108g，EDTA 7.44g，硼酸 55g，加入 800ml 的去离子水，充分搅拌，调 pH8.3 后，定容至 1L。

(三) 6 x loading buffer

在 500ml 烧杯中,准确称取 EDTA 4.4g,二甲苯青 FF250mg、溴酚蓝(Bromophenol Blue)250mg,加入 200ml 去离子水,加热至充分溶解;在加入 180ml 甘油,条 pH 为 7.0,用去离子水定容至 500ml,常温保存。

琼脂糖凝胶电泳结束 DNA 的回收

对一些电泳结束的 DNA 进行回收,用于亚克隆或者探针标记。常用的方法有低熔点琼脂糖法,压碎法。或使用目前较为方便的试剂盒回收。下面介绍冻融法回收 DNA 片段。

1. 切胶(无核酸污染的干净刀片切):电泳结束后,切下对应片段大小的琼脂糖凝胶,置于 1.5ml 的离心管中;
2. 加入等体积的 Tris-HCl 饱和酚(pH7.6),振荡混匀,在-20°C放置 10min;
3. 低温离心(10000rpm/5min),将离心上层转移至新的离心管中;
4. 在含胶的离心管中加入一半体积的水,振荡混匀,在-20°C放置 10min;
5. 低温离心(10000rpm/5min),合并上清液;
6. 用等体积的酚和氯仿分别抽提一次,获得上清;加入十分之一体积 3M NaAc(pH5.2)和 2.5 倍体积预冷的无水乙醇,混匀;在-20°C放置 30min;
7. 低温离心(13000rpm/10min),弃上清,75%乙醇洗沉淀 2 次,待乙醇挥发后加入水或者 TE 溶解即可。

更多优质服务推荐



SingleB® mAb Discovery Service

SingleB®单B细胞快速单抗发现

德泰生物提供SingleB®单B细胞快速单抗发现服务,利用SmartFlow® FACS记忆B细胞筛选平台与DeepLight®浆细胞筛选平台,实现记忆B细胞与浆细胞的双筛选。平台适用于小鼠、兔、羊驼、人源化小鼠、绵羊等多种免疫对象,从动物免疫到获得单抗,快至29天,比传统杂交瘤技术至少节省120天。

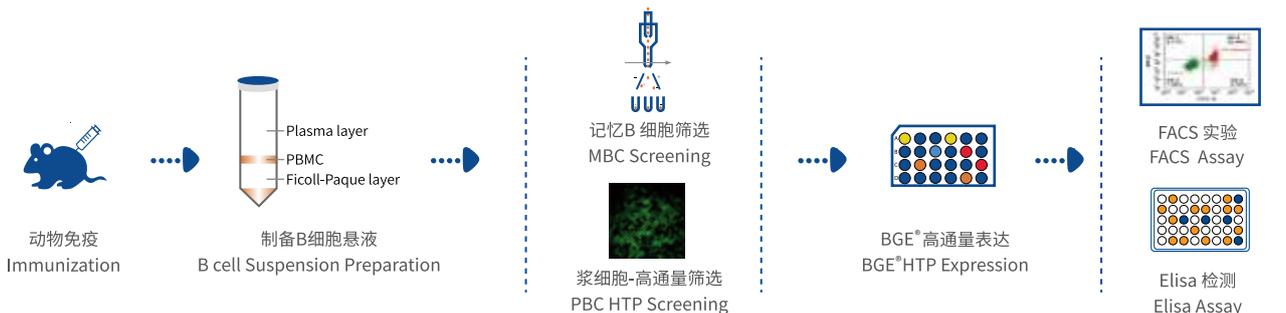
平台优势

- 支持蛋白、多肽、细胞、病毒等多种类型抗原免疫
- 记忆B细胞 & 浆细胞双筛选,保证B细胞多样性
- 单细胞扩增阳性率高,无需刺激培养,减少多样性损失
- 重轻链天然配对,亲和力更优
- 高通量,周期短,单抗发现快至29天
- ELISA、FACS、WB、IHC等多平台验证

可开发单抗物种



服务流程





Recombinant Antibody Expression Service

重组抗体表达

德泰生物拥有完善的重组抗体表达与纯化体系、抗体多工艺质量验证体系。已交付的重组抗体项目种类包括scFv、Fab、(Fab')₂、VHH、嵌合抗体、双特异性抗体、Fc融合蛋白、全长IgG、IgM。cGMP标准的百级洁净细胞房及生物反应器用于HEK293/CHO细胞的小试及大量培养。HPLC纯度、内毒素、浓度等要求均可以根据您的下游应用进行定制。

服务优势



服务流程

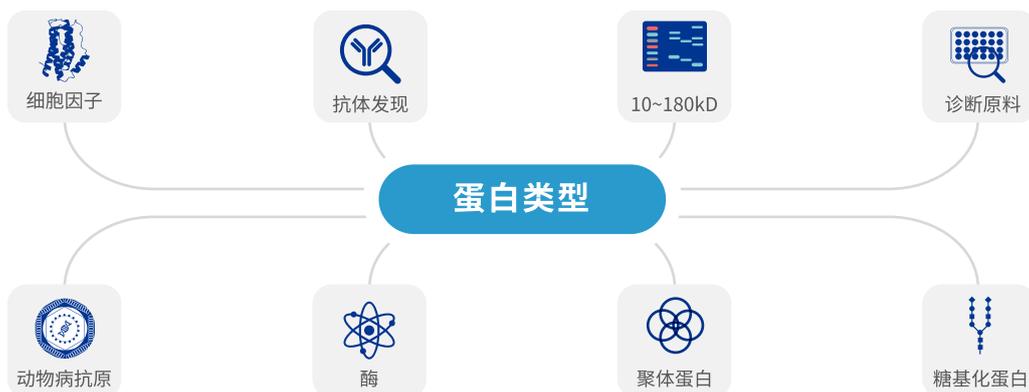


Recombinant Protein Expression Service

重组蛋白表达

原核蛋白表达系统、哺乳动物细胞蛋白表达系统

德泰生物拥有完善的原核蛋白表达与纯化体系和哺乳动物细胞蛋白表达与纯化体系。基于细胞因子、酶、诊断原料蛋白的工业化需求，我们配备了发酵设备并推出了大规模发酵制备服务；我们还配备了cGMP标准的百级洁净细胞房及生物反应器，用于HEK293/CHO等真核细胞的小试及大量培养。



4

Hybridoma Antibody Gene Sequencing Service

杂交瘤抗体基因测序

德泰生物拥有mRNA全长测序平台和Failsafe®假基因排除技术,能够提供快速、可靠的杂交瘤抗体基因测序服务。

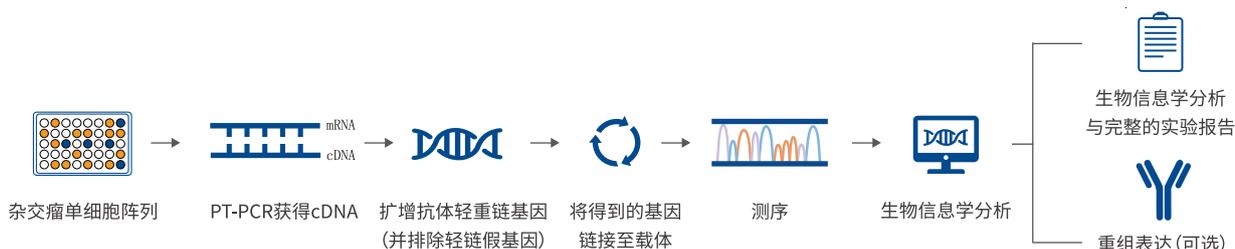
应用场景

- 抗体序列保护:获取抗体基因序列后可通过专利对CDR区进行保护。
- 生产方式备份:杂交瘤存在退化转阴风险,抗体序列可通过基因工程方式轻松转化为抗体样品。
- 抗体工程改造:获得的抗体序列可用于抗体人源化、双特异性抗体等抗体工程改造。

服务优势

- 极速体验:测序5天,表达5天,全程高通量
- 细胞需求少:只需1~5个细胞,可以接收孔板样品
- 保证测序结果准确:采用Failsafe®假基因排除技术,可排除κ轻链假基因
- 测序范围广:可测小鼠、大鼠、兔、羊等物种的IgM和IgG的所有亚型
- 一站式服务:德泰生物拥有丰富经验,可提供表达验证服务

服务流程



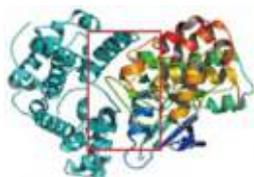
5

Biomolecular Interaction Analysis Service

分子间相互作用检测

德泰生物提供的分子间相互作用检测服务基于表面等离子共振 (SPR) 平台及生物膜干涉技术 (BLI) 平台,能够实现对分子间亲和力的定量和定性分析。与传统的GST pull down, 免疫共沉淀, 酵母双杂交等相比, 具有更高的灵敏度、检测通量及较低的样品要求等优点。

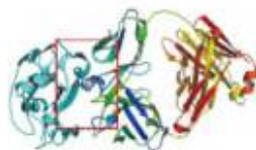
检测范围



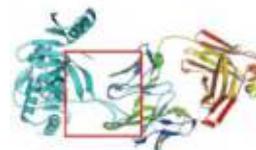
蛋白和蛋白



蛋白和小分子



蛋白和抗体



蛋白和抗体Fab片段

检测范围包括蛋白-蛋白、抗体-抗原、抗体片段-抗原、蛋白-抗体、蛋白-小分子、抗体-多肽、蛋白-DNA、DNA-DNA间的相互作用。

6

Antibody Humanization Service

抗体人源化

德泰生物人源化改造服务基于人工智能之深度学习算法,通过构建抗体结构模型、CDR移植与回复突变、识别关键氨基酸及人源化运算,获得人源化程度高且突变能低的抗体序列。

服务优势



重链和轻链同时参与优化



改造后的抗体人源化程度>90%



人源化抗体的亲和力与初始抗体相当



可进行多物种的抗体人源化

服务流程

- 1 Antibody sequence confirmation
- 2 Human germline acceptor selection
- 3 CDR grafting
- 4 Back mutation
- 5 Mutation energy ranking
- 6 Antibody expression
- 7 Affinity ranking

7

Stable Cell Line Development Service

生产型稳转细胞株构建

德泰生物提供高表达哺乳动物稳定细胞株构建服务,筛选过程使用先进的可视化DeepLight®单克隆细胞筛选平台,较传统筛选流程快近100天,大大缩短了稳定细胞株的开发周期。

DeepLight®细胞筛选平台的优势

	有限稀释法筛选	DeepLight® On-chip筛选
筛选时间	8周	1天
细胞分离效率	低	高
筛选通量	低	高
单细胞水平筛选	否	是

服务流程



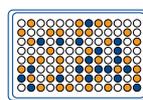
基因合成&质粒抽提



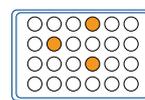
稳定转染



On-chip筛选



压力筛选



扩大培养



交付单克隆细胞株

服务优势



更快的筛选速度

从DNA到细胞株
较传统方法快近100天



百k级筛选通量

一次筛选640k细胞
优选高表达细胞株



可视化筛选结果

先进DeepLight®平台
高表达细胞株实时成像



稳定高产

可稳定转代50代
重组单抗可达5 g/L