

實驗七 電泳膠製作

實驗目的

製作 DNA 電泳所需膠片。

實驗原理

在接下來的實驗中，我們將進行質體 DNA 的萃取，修改，回收，以及轉形至其它細菌。過程中，我們必須確認結果以及分離 DNA 片段，藉由 DNA 分子的帶電特性，以及 agarose 膠體內部的網狀錯合結構，我們得以利用不同大小 DNA 分子在 agarose 膠體中不同的速度來區分不同大小的 DNA 分子。

進行電泳之前，必須先製作進行電泳所合適的環境。使用的材料很多種，但同樣都是多孔，立體網狀連接的聚合物。依所需分子大小所使用的材料孔徑與使用材質也不盡相同。一般來說，分離較小分子比如蛋白質分子，或是鹼基數目較小的核酸(DNA, RNA)，甚至是寡核酸(oligonucleotides)時，使用聚丙烯醯胺(poly-acrylamide)，

實驗步驟

A. 儀器用具

電子天平
錐形瓶
塑膠稱藥皿
鑄膠模具

B. 藥品試劑

TAE buffer 50X
Argarose
ddH₂O

C. 方法步驟

※依需要製做所需大小之電泳膠片:此次每兩組製做四片小片，兩片大片電泳膠片。大片:需 30ml，小片:15ml，共配製 120ml，0.8% w/v agarose 膠體溶液。

1. 取一 250ml 廣口血清瓶，加入 1.2ml 50x TAE buffer。
2. 稱取 0.96g agarosej94，以及 118.8ml ddH₂O 加入瓶中。
3. 瓶口蓋上保鮮膜，戳兩個洞，弱微波兩分鐘。同時準備好作膠盤以及透明膠承片並組合好，壓緊。
4. 取出搖晃均勻，再加熱 10~30sec。
5. 重覆上步直到整瓶溶液呈現澄清透明狀後，再重覆一次。
6. **[此步動作要快!!]**將膠體溶液倒入組合好的膠片模具中，注意不要產生氣泡。若有氣泡，用 tip 戳破。同時將尺梳小心插入。
7. 在齒梳上鋪上一片保鮮膜，注意勿碰到液面，放置 30 分鐘以上使其硬化。
8. 和緩的將齒梳水平拔出，注意勿破壞樣品注入槽。
9. 馬上使用，或者放置加滿 0.5X TAE buffer 的保鮮盒裡，液面需高於膠體，儲存於 4°C 冰箱。
10. 跑電泳時，DNA 樣品通常會與追蹤染劑(PROTECH 6x DNA Loading Dye 或 bromophenol blue 等)一起置入，以為樣品位置之參考。
11. 跑完電泳後，應將膠片浸放於含 EtBr 之 TAE 溶液中染色，以便 UV 激發色帶之觀測與紀錄 (若於鑄膠時直接加入 EtBr，則不必於事後浸泡染色)。

實驗結果與分析

製作好的膠片外觀上應該是半透明乳白色膠片，且表面平整，中間不能有氣泡，尤其樣品槽的部分需要十分完整，如下圖。



問題與討論

1. 為何進行 DNA 電泳時，需要 agarose 而非 agar? 緩衝液選擇 TAE 的優缺點何在?