

变性梯度凝胶电泳 DGGE 操作规程

一、制胶

1. 将海绵垫固定在制胶架上，把类似‘三明治’结构的制胶板系统垂直放在海绵上方，用分布在制胶架两侧的偏心轮固定好制胶板系统，注意一定是短玻璃的一面正对着自己。
2. 共有三根聚乙烯细管，其中两根较长的为 15.5cm，短的那根长 9cm。将短的那根与 Y 形管相连，两根长的则与小套管相连，并连在 30ml 的注射器上。
3. 在两个注射器上分别标记‘高浓度’与‘低浓度’，并安装上相关的配件，调整梯度传送系统的刻度到适当的位置。
4. 反时针方向旋转凸轮到起始位置。为设置理想的传送体积，旋松体积调整旋钮。将体积设置显示装置固定在注射器上并调整到目标体积设置，旋紧体积调整旋钮。例如 16*16cm gels(1mm thick) :设体积调整装置到 14.5。
5. 配制两种变性浓度的丙烯酰胺溶液到两个离心管中。
6. 每管加入 18 μ l TEMED，80 μ l 10%APS，迅速盖上并旋紧帽后上下颠倒数次混匀。用连有聚乙烯管标有‘高浓度’的注射器吸取所有高浓度的胶，对于低浓度的胶操作同上。
7. 通过推动注射器推动杆小心赶走气泡并轻柔地晃动注射器，推动溶液到聚丙烯管的末端。注意不要将胶液推出管外，因为这样会造成溶液的损失，导致最后凝胶体积不够。
8. 分别将高浓度、低浓度注射器放在梯度传送系统的正确一侧固定好，注意这里一定要把位置放正确！再将注射器的聚丙烯管同 Y 形管相连。

9. 轻柔并稳定地旋转凸轮来传送溶液,在这个步骤中最关键的是要保持恒定匀速且缓慢地推动凸轮,以使溶液恒速的被灌入到三明治式的凝胶板中。
10. 小心插入梳子,让凝胶聚合大约一个小时。并把电泳控制装置打开,预热电泳缓冲液到 60°C。
11. 迅速清洗用完的设备。

二、点样

1. 聚合完毕后拔走梳子,将胶放入到电泳槽内,清洗点样孔,盖上温度控制装置使温度上升到 60°C。
2. 用注射针点样(预先准备好的活性污泥 16S rDNA V3 区 PCR 扩增产物,变性聚丙烯酰胺凝胶电泳纯化)。

三、电泳

1. 设置电流条件,电压为 200V,大约电泳时间为 5h。
2. 取胶:电泳完毕后,先拨开一块玻璃板,然后将胶放入盘中。用去离子水冲洗,使胶和玻璃板脱离。

四、**固定**:倒掉去离子水,加入 250 ml 固定液(10%乙醇,0.5%冰醋酸)中,放置 15min。

五、**染色**:倒掉固定液,用去离子水冲洗两次,倒掉后加入 250 ml 银染液(0.2% AgNO₃,用之前加入 200μl 甲醛)中,放置在摇床上摇荡,染色 15min。

六、**显色**:倒掉银染液,用去离子水冲洗两次,倒掉后加入 250 ml 显色液(1.5% NaOH, 0.5% 甲醛)显色。

七、**拍照**:待条带出现后拍照。