

Rotaphor 6.0 脉冲场电泳系统简要操作指南

一、准备样品

1. 琼脂糖包埋的样品

常用的 DNA 提取方法不能得到完整的大分子量 DNA。大分子量 DNA 很脆弱，在制备过程中容易因移液等操作造成机械剪切。将完整细胞包埋入琼脂糖后再进行裂解，去除蛋白的操作，可防止大分子量 DNA 的断裂。琼脂糖块包埋的 DNA 可以避免被机械剪切，并且是一种简单的操作方法。处理过的包埋有 DNA 的琼脂糖块可以直接放入琼脂糖凝胶的点样孔。

在将细胞包埋入琼脂糖之前要先确定细胞浓度，尽管吸光度很常用，但是并不可靠。单位吸光度对应的细胞浓度会因菌株不同或培养基不同而有差异。这会影响琼脂糖块中 DNA 的含量，导致上样量过大或不足。不论细菌、真菌还是哺乳动物细胞，使用血球计数板均可得到准确和高重复性的细胞浓度。

2. 液体样品

小于 200kb 的 DNA 片断可以不用琼脂糖包埋，可直接以液体形式加入点样孔。当操作的 DNA 大于 50kb 时，必须用大开口的吸头。

二、电泳前的准备工作

1. 温度预冷 在 KH-6 冷却循环水中加入纯水或 25 乙醇，溶液高度达

到指定刻度 **Min~Max** 之间（第一次加液要达到 **Max** 位置），将面板上的温度箭头调到对准 **80** 的位置。打开 **KH-6** 前面板电源开关，待显示屏显示待机状态（**System Standby**），按 **Power** 键激活。设定制冷温度进行预冷。脉冲场电泳一般的工作温度是 **10-15** 度，冷却循环水设定的温度必须低于电泳的工作温度。（比如：电泳所需温度为 **10** 度，必须将 **KH-6** 冷却循环水的温度设为低于 **10** 度）；

2. 电泳液预冷 将配置好的电泳缓冲液 **0.5X TBE** 或 **1.0X TAE** 导入电泳槽内进行预冷，电泳液的体积不超过 **2.4L**；
3. 制备凝胶 取下四个导流块，将制胶框用螺丝固定在制胶板上，组成制胶架。将制胶架放置在水平桌面上，用水平仪调整至水平。配制脉冲场专用凝胶（称取 **0.8~1.0g** 的脉冲场专用琼脂糖，溶入 **100ml** 的 **0.5XTBE** 缓冲液中，质量体积百分比为 **0.8%~1.0%**），先沿框内侧倒入少许冷却到 **60°C** 左右的凝胶液，进行封边工作，剩余凝胶液放置在 **60°C** 的水浴箱中待用。待内侧胶凝固后，插好梳子，倒入凝胶液，注意倒时动作轻缓，用枪头移除气泡，待胶冷却凝固，固胶时间约为 **30~45min** 即可，留少许凝胶液 **60°C** 放置用于样品封孔

三、上样

1. 放置凝胶 待凝胶凝固后，**KH-6** 显示屏的温度达到设置的温度后。拔除梳子，移去制胶框，装上四个导流块，将胶孔位置放置到靠近冷却管的位置。
2. 点样 将制备好的样品胶块和 **Mark** 分别点到不同的孔中，用 **60°C**

的凝胶进行封孔；

三、电泳

1. 参数设置 打开电脑电源，电泳仪电源，单击电脑桌面菜单栏下的 Rotaphor6.0 脉冲场电泳的软件，选择列表中列出的用户名，输入用户密码，点击选择用户（Select user account）或是新建用户；在 Parameter Edit 窗口，在 Parameter list 中选择列表中已优化好的 9 组实验条件，或是按用户自己的条件来编辑新的电泳参数，选好后点击选中的参数来电泳（Use Select Parameter For Experiment）；在 Rotaphor V6 窗口的界面下对电泳温度（一般 8~14°C 之间），温度控制，加泵，警报等参数进行选择；
2. 预电泳 为了防止电泳槽的电泳液在泵的作用下将点样孔的样品荡出，先在无泵条件下运行 20~30min(Pump 框不勾选)；
3. 电泳 完成预电泳后，暂停电泳，选中泵，继续电泳，直至达到所设置的时间；

四、结果处理

1. 荧光染料浸染 取一干净手术托盘，在托盘中加入 300ml 双蒸水，滴加 30ul 的核酸染料，混匀，将胶块小心放入托盘中，在轻微振荡的条件下泡染 15~20min，详情请参照相关核酸染料的泡染说明；
2. 成像 将泡染好的胶块放置在凝胶成像的 UV 灯下拍摄成像，详情请参照相关凝胶成像仪器的操作指南；

五、实验洁净

1. 将用过的制胶板，制胶框，梳子洗净待用；
2. 将电泳槽中的缓冲液导出，用双蒸水洗净待用；
3. 若长时间不运行，请将 KH-6 的冷却液导出，以免长时间滋生细菌，堵塞管道；