

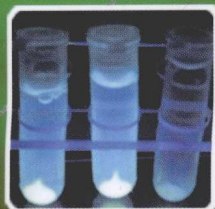
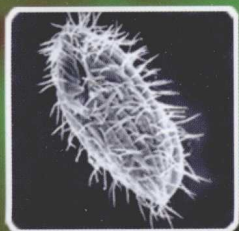
FENZISHENGWUXUE
YUXIBAOSHENGWUXU
JICHUSHIYANJIAOCHENG

E

分子生物学 与细胞生物学

基础实验教程

■ 孙群 编著



中国林业出版社

分子生物学与细胞生物学 基础实验教程

孙 群 编著

中国林业出版社

图书在版编目(CIP)数据

分子生物学与细胞生物学基础实验教程 / 孙群编著. —北京: 中国林业出版社, 2010. 1

ISBN 978-7-5038-5774-4

I. ①分… II. ①孙… III. ①分子生物学-实验-高等学校-教材 ②细胞生物学-实验-高等学校-教材 IV. ①Q7-33 ②Q2-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2010)第 014017 号

出 版 中国林业出版社(100009 北京市西城区德内大街刘海胡同 7 号)

网 址 www.cfph.com.cn

E-mail cfphz@public.bta.net.cn 电话:(010)83229512

发 行 新华书店北京发行所

印 刷 三河市祥达印装厂

版 次 2010 年 1 月第 1 版

印 次 2010 年 1 月第 1 次

开 本 880mm × 1230mm 1/16

印 张 5 彩页 8

字 数 120 千

印 数 1~4000 册

定 价 20.00 元

前 言

笔者到上海交大生命学院工作的时间是 2000 年。第二年春天，在院领导的安排下，首次为生命学院开设了细胞生物学实验，到现在已经过去了 8 年多的时间。学院开设分子生物学技术综合实验的时间是 2003 年秋，笔者毛遂自荐承担起这个责任。至今，这两门实验课都至少进行了 10 个轮回，带实验课的教师也先后换成了年轻人。两个实验的讲义虽然分别改写了多次，但基本上仍然维持了原来的格局。时下，笔者以原有的两个实验讲义为基础，对其中部分内容做了修改和补充，将两者合并在一起，正式出版，名为《分子生物学与细胞生物学基础实验教程》。

有关细胞生物学和分子生物学的实验指南一类的书籍目前国内已经出了很多，其中不乏高水平的。那为什么还要再出一本呢？我想理由有三。

第一，本书有自己的特色。分子生物学实验部分，以融合蛋白的表达和检测作为主线，构成一个内容上紧密联系的系列实验，前后连贯，不可割裂。细胞生物学部分，以四膜虫为主要实验材料，其他材料尽可能少用，这对教学资源有限、又在开展细胞生物学实验的国内院校来讲可能有值得借鉴之处。

第二，已有的书往往收录的内容比较多，带有手册的性质，其中很多实验的条件要求高、耗材贵、需时长，适合研究工作者作为参考，但并不适合作为本科生的实验来做。本书所收录的内容都是在本院已经开展很久（少数即将开展）的实验，对那些实际上难以开展的实验本书是不收录的。也就是说，本书是一个实实在在的实验操作指导，并非手册。也正是因为如此，它至少可以作为一本正式的实验教材，代替原来的讲义，供上海交大的学生使用。实际上也有这样的需求，因为每年上海交大仅做细胞生物学实验的学生就有近 500 人，如果加上选修分子生物学实验的学生人数就更多。

第三，也是最重要的一点，本书在实验内容上有所创新。就以免疫印迹实验为例，在近年出版的分子生物学实验教材中这是必不可少的内容。但给本科生开设这样的实验，且每个学生都要亲自操作，谈何容易！如果用商品化的抗体，无论检测何种抗原，其运转费用都非常高，对于教学资源匮乏的普通高校来说很难承担得起。本书介绍的免疫印迹实验是用自制血清抗体来做的，这就大幅度降低了实验的成本，保证它能够顺利而持久地开展下去。也正是因为用的是自制血清抗体，特异性不高，实验还特意安排了血清抗体的快速亲和纯化这个关键环节。这样既降低了实验运行的成本，又大大丰富了实验的内容。要知道，抗体的亲和纯化即使对训练有素的研究人员来讲也不是一件易事，但上海交大的学生却能做得相当不错，本书后所附彩色照片即可证明这一点。创新之处在本书的细胞生物学实验部分也不乏实例，不拟累述。

最后，还要对中国林业出版社徐平编审表示感谢，本书的面世与她的热情帮助是分不开的。在本书的出版过程中，徐平女士对于作者的悉心指点和极大的耐心都令人难忘，在此表示由衷的感谢。

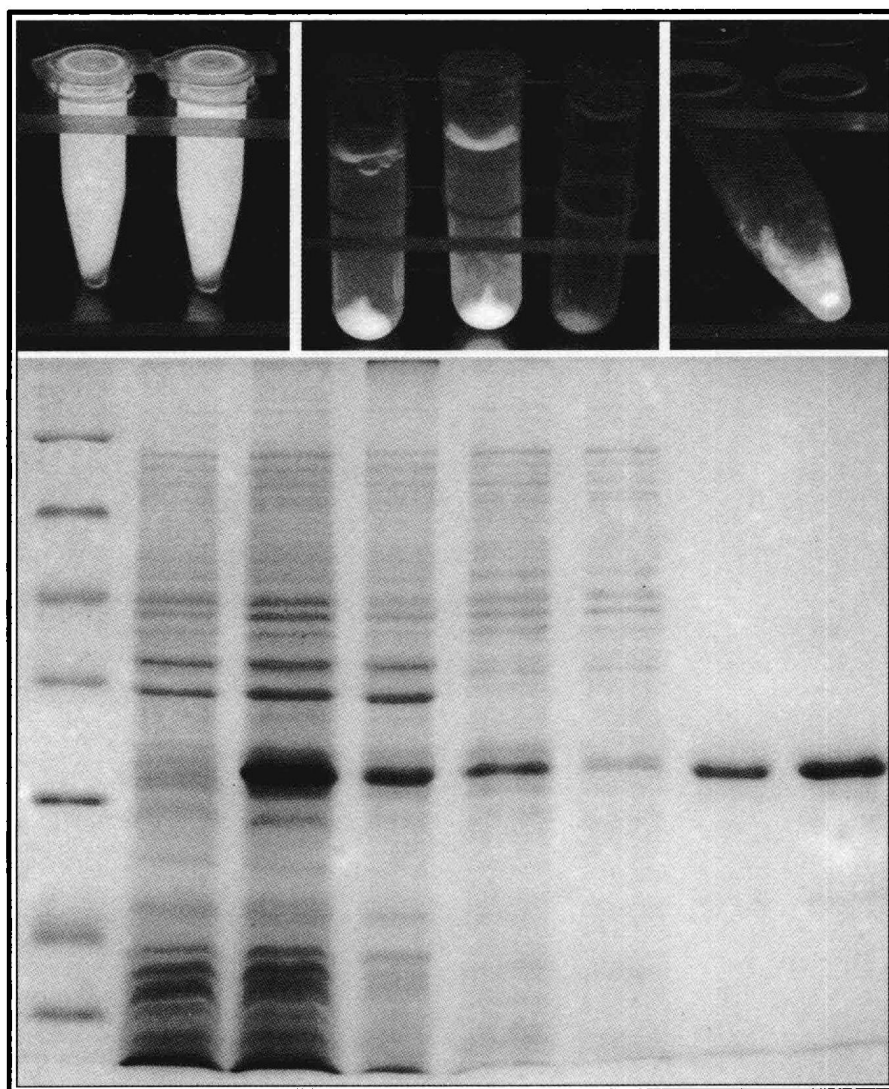
上海交通大学生命科学技术学院

孙 群 2009 年 12 月

目 录

第一部分 分子生物学实验	(1)
实验的总体设计和实验日程安排.....	(3)
实验一 大肠杆菌感受态细胞的制备及转化.....	(8)
实验二 质粒 DNA 的提取.....	(11)
实验三 质粒 DNA 的琼脂糖凝胶电泳.....	(13)
实验四 DNA 重组.....	(15)
实验五 转化后细菌菌落的快速裂解及质粒大小的检查.....	(19)
实验六 重组 DNA 的酶切鉴定.....	(20)
实验七 大肠杆菌中表达的 GFP 的超声破碎抽提.....	(22)
实验八 GFP 血清抗体的琼脂免疫双扩散检测.....	(24)
实验九 非变性条件下 GFP 的制备电泳.....	(26)
实验十 GFP 血清抗体的快速亲和纯化.....	(27)
实验十一 免疫印迹.....	(31)
实验十二 GST 的亲纯化与纯化过程的 SDS-PAGE 分析.....	(34)
实验考勤及完成情况登记表.....	(39)
第二部分 细胞生物学实验	(41)
四膜虫简介.....	(43)
实验一 四膜虫的计数.....	(45)
实验二 一些化学试剂对四膜虫影响的观察.....	(47)
实验三 四膜虫吞噬的观察及酸性磷酸酶染色.....	(56)
实验四 福尔根染色显示四膜虫细胞核 DNA.....	(59)
实验五 四膜虫饥饿诱导后接合行为与细胞核变化的姬姆萨染色观察.....	(61)
实验六 四膜虫细胞核与纤毛的分离.....	(63)
实验七 间接免疫酶标染色显示四膜虫纤毛.....	(66)
实验八 牛蛙骨髓细胞染色体的制备.....	(68)
实验九 CHO 细胞药物合并离心处理后中间纤维的免疫酶标染色.....	(70)
主要参考文献.....	(73)
附录一: GFP 和 GST 血清抗体的制备.....	(74)
附录二: 实验所需设备器材清单.....	(76)

第一部分 分子生物学实验



实验的总体设计与实验安排

本实验的设计围绕着综合两字展开。它不是由彼此孤立的、相互间缺乏内在联系的一个个实验组成的，而是把生物学研究中最常用的那些分子生物学技术，以融合蛋白的表达和免疫印迹检测为主线，按照逻辑顺序有机地揉合在一起，构成了一个前后连贯、相互呼应的整体，从而体现了实验的综合性。

实验包括了从质粒的提取、DNA 凝胶电泳、融合蛋白的表达质粒的构建、大肠杆菌中外源蛋白的表达、分离和制备电泳、血清抗体的快速亲和纯化，直到最后用纯化的抗体去进行免疫印迹检测等内容。整个实验组成了一个系列，或者说一条完整的链条，一环接一环，环环相扣，不可割裂。在修完本实验课程后，同学们对分子生物学最基本、最常用的技术应该能够比较熟悉，有些甚至基本掌握了。这将为同学们今后的学习和工作打下一个比较坚实的分子操作的基础。

实验的基本思路，是将目前生物学研究中最常使用的一种标记蛋白——绿色荧光蛋白(GFP)的基因，与另一种经常使用的工具性分子——蛋白谷胱苷肽转移酶(GST)的基因连在一起，构建成 GST-GFP 融合蛋白的表达质粒，令其在大肠杆菌中表达。之后，用经亲和纯化的 GFP 血清抗体做免疫印迹，检测是否有融合蛋白的表达。

实验分为两个部分：前一部分是核酸的操作，构建 GST-GFP 融合蛋白的表达质粒；后一部分是蛋白的操作，包括 GFP 的分离和制备性电泳纯化、血清抗体的快速亲和纯化和免疫印迹检测。

核酸部分的实验流程如图 0-1 所示。

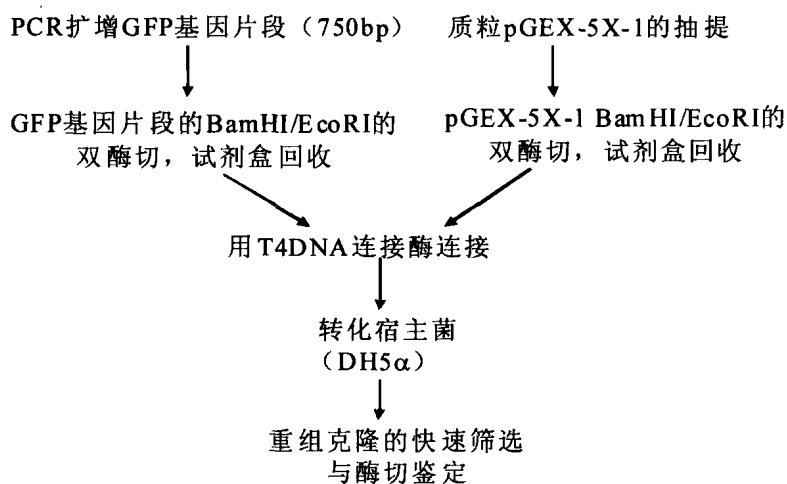


图 0-1 核酸部分的实验流程

一、核酸操作部分

GST-GFP 融合蛋白表达载体的构建:

pGEX-5X-1 质粒是 pGEX 系列中的一种, 该系列是为在大肠杆菌中表达 GST 融合蛋白而设计的。这些质粒一般都带有 Amp(氨苄青霉素)的抗性标记, GST 蛋白的表达受控于 Ptac 操纵子(一种 trp 和 lac 的融合操纵子), 可被 IPTG 所诱导。在 GST 基因的后面有 MCS(多克隆位点), 含有一些常用的限制酶的识别位点, 其中包括 BamHI 和 EcoRI 这两个最常使用的限制酶的识别位点。

GFP 的基因是以 pGFP 质粒为模板、用 PCR 扩增来的 750bp 的 DNA 片段, 在 PCR 的两个引物上分别设计有 BamHI 和 EcoRI 的识别位点。

以 pGEX-5X-1 质粒为载体, 以 750bp 的 GFP 基因为插入片段, 构建成 GST-GFP 融合蛋白的表达质粒, 表达的 GST-GFP 融合蛋白产物大小在 55kd 左右。

GST-GFP 融合蛋白表达载体构建的原理如图 0-2。

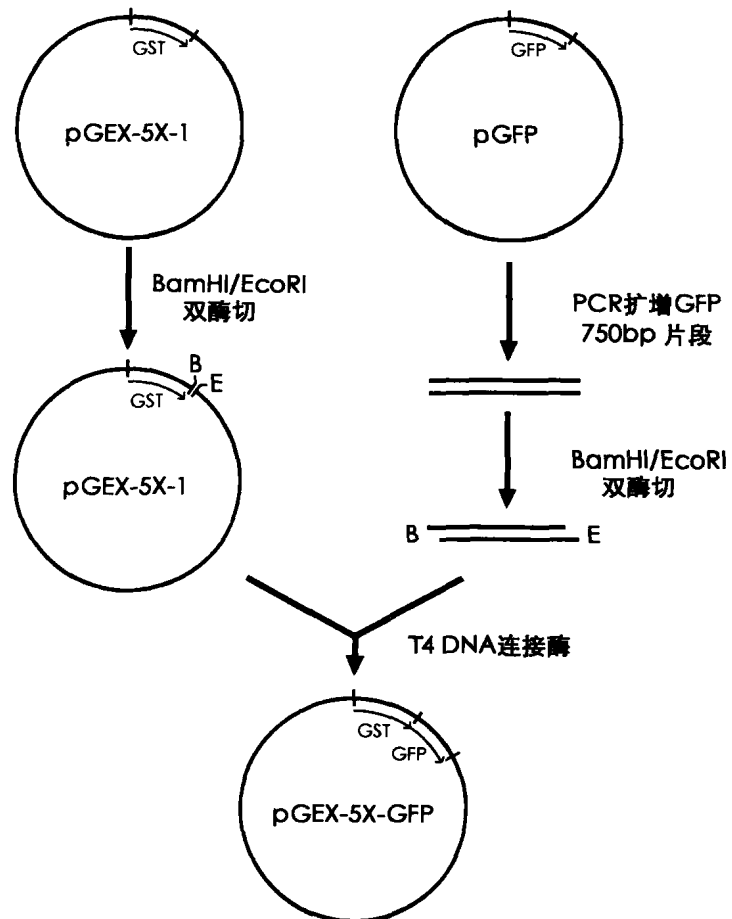


图 0-2 GST-GFP 融合蛋白表达载体构建原理示意图

pGEX-5X-1 和 pGFP 两个质粒的相关顺序、以及 PCR 引物的设计如图 0-3:

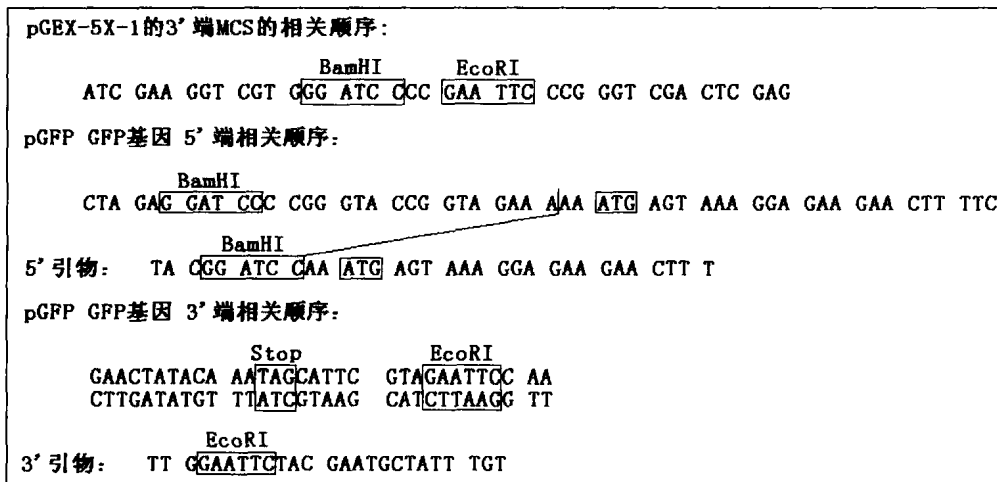


图 0-3 pGEX-5X-GFP 融合蛋白表达载体引物设计

二、蛋白操作部分

蛋白操作部分的实验流程如图 0-4。

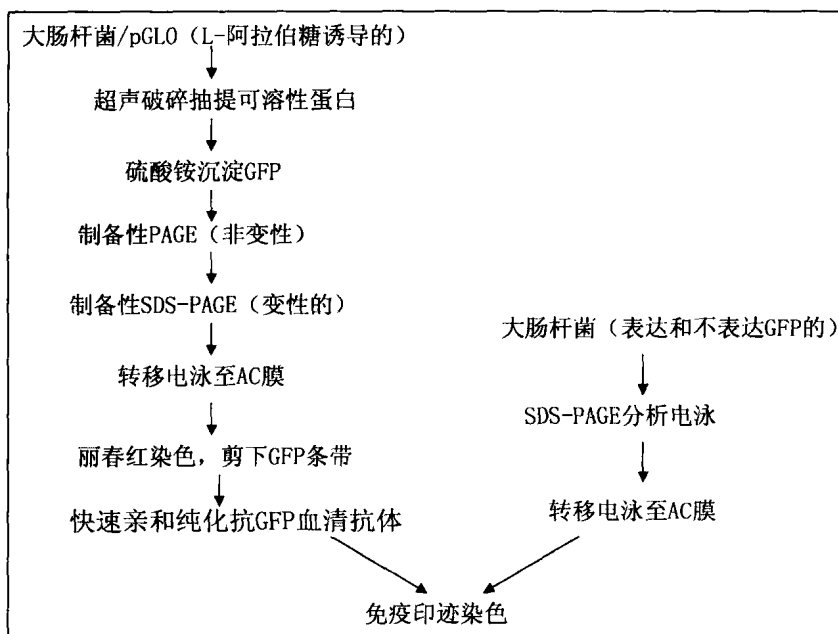


图 0-4 蛋白操作部分的实验流程图

本实验做免疫印迹用的 GFP 抗体是自己制备的血清抗体, 未经过亲和纯化, 特异性不好。为了提高抗体的特异性, 在做免疫印迹前需要用亲和纯化的方法将血清抗体纯化。而亲和纯化需要有纯的抗原, 所以首先必须要纯化 GFP。

实验所需的 GFP 是 pGLO/HB101 经阿拉伯糖诱导后表达的。表达了 GFP 的大肠杆菌在紫光照射下可发绿色荧光, 在 GFP 的抽提纯化过程中, 可以很容易用其荧光活性来进行追踪。这也正是选择 GFP 来进行实验的主要原因。

实验用超声破碎的方法来抽提大肠杆菌中表达的 GFP，它基本上是以可溶性蛋白的形式存在的。在超声破碎比较完全的情况下，细菌抽提物经离心处理后，GFP 的荧光活性应主要出现在上清液中。抽提的上清液用硫酸铵先后两次处理，这样可以将 GFP 沉淀下来，而去掉一部分杂蛋白。然后在非变性条件下做一次制备性聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)，在紫光照射下将 GFP 的条带从凝胶中切下来。接着把凝胶中的 GFP 用 Tris 浸泡出来，再用变性条件下的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)做一次制备电泳。将制备电泳后凝胶中的蛋白用电泳的方法转移到醋酸纤维素滤膜上(AC 膜)。滤膜经丽春红染色显示出蛋白条带，将 GFP 从膜上剪下来。经两次制备电泳后 GFP 可以提得相当纯，用剪下来的那一部分膜作为固相抗原，进行血清抗体的快速亲和纯化。经过这样的操作后，抗体的特异性大大提高，免疫印迹的效果可与商品化的抗体相比。

实验的安排

本实验是一个系列实验，共 60 学时左右，通常集中安排在 2 周内完成。具体的日程安排可参照下表进行：

表 0-1 分子生物学实验日程安排

第 n 天	实验内容
1	实验流程的介绍，培养液和器具的灭菌、试剂的配制及其他需要物品的准备
2	感受态大肠杆菌制备和转化、质粒的提取(试剂盒)
3	质粒的双酶切、DNA 琼脂糖凝胶电泳，DNA 片段的回收连接，重组 DNA 转化大肠杆菌
4	转化菌落的快速鉴定
5	转化克隆的质粒抽提与酶切鉴定
6	大肠杆菌表达的 GFP 的超声抽提与 PAGE 非变性的蛋白制备电泳
7	非变性制备电泳初步纯化的 GFP 的 SDS-PAGE 制备电泳与转移电泳
8	一些不同的大肠杆菌裂解物的 SDS-PAGE 电泳和转移电泳(免疫印迹用)
9	免疫印迹染色与 GST 的超声破碎抽提与亲和纯化
10	GST 纯化结果的 SDS-PAGE 分析
11	免疫印迹实验结果的讲评、实验室的清理打扫

几点说明：

(1) 实验第一天除了由实验指导教师对整个实验安排做一简要介绍外，主要是让同学们按照指导教师的分组安排，自己配制和分装整个实验所需的各种溶液，高压灭菌所需的培养液、吸头和制作琼脂平板等。这不仅可以减少教师实验准备的工作量，对学生也是一种很好的训练。虽然都曾经做过一些化学和生物学实验，但很多同学实际上是不会配液的，应该让他们在这方面得到一些应有的训练。当然，在关键的地方实验指导教师要把好关，如对配制的溶液浓度和 pH 是否正确要进行检查，监督氨苄青霉素 LB 琼脂平板的制作是否规范等。实践中，学生在做氨苄青霉素 LB 琼脂平板时，把抗菌素加到培养液后先高压灭菌而后再倒平板，这种致命的错误是时有发生。

(2) 关于如何考核的问题：本教程在分子生物学实验部分后附有一考核表，实验者本人每日要填写实验内容，然后连同自己当日的实验结果交老师过目，由老师当堂签字认可。实验最后结束时将此表交给老师，根据同学的出勤情

况、实验的结果和为公众服务的态度综合评定实验成绩。通常不需要写实验报告。如果要求写实验报告，结果经常使学生的注意力不是放在实验操作上，而是在文字上做表面文章，适得其反。

可能有些同学参加过一些课题组的研究工作，他们中的一些人对本实验的部分或全部操作都已经相当熟悉。这些同学可以部分或完全免修，但必须向老师提出书面申请，提供有关的证明材料(如实验记录等)，获准后方可。

(3)通过本实验的训练，同学们可以熟悉并初步掌握(有些甚至是熟练掌握)的技术包括：

- 1)感受态大肠杆菌的制备、转化
- 2)质粒的提取
- 3)DNA 的琼脂糖凝胶电泳、DNA 片段的回收
- 4)DNA 重组
- 5)转化菌落的快速筛选、酶切鉴定
- 6)大肠杆菌表达的外源蛋白的超声破碎抽提
- 7)GST 蛋白的亲纯化
- 8)蛋白质的 SDS-PAGE(包括制备 SDS-PAGE)
- 9)血清抗体的快速亲和纯化
- 10)转移电泳和免疫印迹

其中 DNA 重组的操作对于初学者来说一次成功的比例可能不会太高。如果时间充裕，允许重复，可增加 1~2 天的实验时间。蛋白部分的实验，如果教师的指导得当，一般都能得到良好的实验结果。

(4)教师在实验中的主导作用：实验指导教师在实验中的作用至关重要。要想实验取得良好的效果，指导教师除了尽心尽责外，对实验原理和实验操作本身必须非常熟悉。因为指导实验是一件非常具体的事情，一个操作细节的错误往往造成整个实验的失败，所以指导教师必须首先要自己亲自操作，把整个实验至少成功地完成一遍才成。只有这样，才能真正带好实验，少出纰漏。

(5)实验后的讲评与总结其作用不可忽视。在系列实验的扫尾阶段，同学们的态度往往过于松懈，注意力不集中，结果实验虎头蛇尾，甚至对自己最后的实验结果也缺乏兴趣。这样的话，即使是完成了整个的实验操作，也是稀里糊涂地走了个过场，连实验是成功还是失败都不知道。这样的实验其效果就要大打折扣。把大家最后免疫印迹的结果集中起来，找出其中几个典型，进行一次认真的讲评是很有必要的。只需短短 1 个小时的讲评，其效果也许就会完全改观。对讲评、总结的作用千万不可低估。

实验一 大肠杆菌感受态细胞的制备及转化

[实验原理]

细菌处于容易吸收外源 DNA 的状态叫感受态。转化是指质粒 DNA 或其他 DNA 导入细菌的过程。质粒 DNA 进入大肠杆菌感受态细胞的机制到现在仍然不十分清楚。可能的原理是：转化缓冲液中的 DNA 形成羟基钙磷酸复合物，此复合物黏附于细菌细胞表面，被细胞所吸收。转化过程中 42℃ 短时间处理（热休克），一般认为可以促进细胞对 DNA 的吸收。处理后的细菌在没有抗菌素的培养液中培养一段时间，促使转化过程中获得的抗性的表达。然后再涂布于含有抗菌素的选择性平板上，培养过夜后即可得到转化菌落。

本实验采用上海生工公司生产的 Sangon 高感受态细胞制备试剂盒。使用这种试剂盒能非常方便地制备大肠杆菌感受态细胞，制备方法与传统的氯化钙方法基本相同。此试剂盒的转化溶液中含有氯化铷，转化效率比其他转化溶液通常要高些。

[仪器、材料与试剂]

1. 仪器

- (1) 小型高速离心机
- (2) 恒温摇床
- (3) 恒温箱
- (4) 冰箱
- (5) 恒温水浴

2. 材料

- (1) 氨苄青霉素
- (2) 大肠杆菌 DH5 α
- (3) pGEX-5X-1 质粒
- (4) 1.5mL 离心管
- (5) 可调式移液器、吸头
- (6) 试管、培养皿

3. 试剂

- (1) Sangon 高感受态细胞制备试剂盒
- (2) LB 培养液

在 950mL 去离子水中加入：

胰蛋白胨 (tryptone)	10g
酵母提取物 (yeast extract)	5g
NaCl	10g

摇动容器直至溶质完全溶解，用 NaOH 调节 pH 至 7.0，加入去离子水至总体积为 1L，121℃ 湿热灭菌 20 分钟。

(3) SOB 培养液

胰蛋白胨	20g
------	-----

NaCl	0.5g
酵母提取物	5g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	5g

加入去离子水至总体积为 1L, 121℃ 湿热灭菌 20 分钟。

(4) 氨苄青霉素(Amp), 用无菌水配制成 100mg/mL 溶液, 置 -20℃ 冰箱保存。

(5) Amp/LB 固体培养基

在 950mL 去离子水中加入:

胰蛋白胨 (tryptone)	10g
酵母提取物 (yeast extract)	5g
NaCl	10g

摇动容器直至溶质完全溶解, 加入去离子水至总体积为 1L, 加入 20g 琼脂粉。121℃ 湿热灭菌 20 分钟。待培养基冷却至 70℃ 左右, 加入 1mL 100mg/mL 的氨苄青霉素溶液, 混匀后倒入灭菌的平板中(约 25mL)。待凝固后冷却到室温, 放 4℃ 保存。

[实验步骤]

1. 感受态细胞的制备

(1) 使用试剂盒(根据原试剂盒说明修改, 现制现用)

1) 从大肠杆菌 DH5 α 平板上挑取一个单菌落接种于 5mL LB 培养液的试管中, 37℃ 振荡培养过夜。

2) 取 50 μ L 菌液转接到一个含有 5mL SOB 培养液的试管中, 37℃ 振荡培养 2 小时。

3) 取用 SOB 培养的大肠杆菌 1mL 于 1.5mL 离心管中, 14000r/m 离心 1 分钟。

4) 加入 0.5mL 预先冰浴的试剂 A, 悬浮细胞, 冰浴 15 分钟。

5) 14000r/m 离心 1 分钟。彻底吸去上清液。

6) 加入 100 μ L 预先冰浴的试剂 B, 悬浮细胞。

(2) CaCl₂ 处理(作为试剂盒的对照, 以比较两者的转化效率)

步骤 1、2 和 3 与用试剂盒的处理相同。

4) 加入 1mL 预冷的 0.1mol/L CaCl₂, 悬浮细胞, 冰浴 15 分钟。

5) 14000r/m 离心 1 分钟, 吸去上清液。

6) 加入 100 μ L 预冷的 0.1mol/L CaCl₂, 悬浮细胞。

下面便可加入质粒 DNA 作转化, 转化步骤两种处理是相同的。

2. 转化

(1) 新鲜制备的 100 μ L 感受态细胞, 置于冰上。

(2) 加入 5 μ L pGEX-5X-1 质粒, DNA 浓度约为 10pg/ μ L, 轻轻混匀。

(3) 冰上放置 30 分钟。

(4) 42℃ 水浴热激 90 秒。

(5) 冰上放置 2 分钟。

(6) 加 400 μ L LB 培养液, 37℃ 250 转/分 振荡培养 30 分钟。

(7) 取培养物 200 μ L 加在 Amp/LB 琼脂平板上, 均匀地涂布开。

(8) 平皿在 37℃ 下正向放置 1 小时, 待接种的液体吸收进琼脂后, 将平皿倒置, 培养过夜。

[实验结果]

经 37℃ 培养过夜的，在氨苄青霉素/LB 琼脂平板上出现的菌落即为 pGEX-5X-1 质粒转化的大肠杆菌。计数菌落总数，计算所制备的感受态菌的转化效率，以每微克(μg) 质粒 DNA 转化的菌落数表示。比较两种不同处理的转化效率，看何者为高。

实验二 质粒 DNA 的提取

[实验原理]

碱裂解法是抽提质粒的经典方法，现在普遍使用的各种抽提质粒的试剂盒实际上都是从碱裂解法发展而来的。碱裂解法抽提质粒利用的是闭环质粒 DNA 与线状染色体 DNA 片段在拓扑结构上的差异。用碱处理可以破坏 DNA 的碱基配对，使线状的染色体 DNA 变性，而闭环质粒两互补 DNA 链由于处于拓扑缠绕状态，虽然变性但彼此不能分离。当加入醋酸钾高盐缓冲液将碱性中和后，闭环质粒 DNA 的两条互补链迅速准确地复性，重新形成天然的超螺旋分子。而线状的染色体 DNA 不能迅速准确地复性，缠绕形成网状结构。通过离心，染色体 DNA 和蛋白质与 SDS 的不溶性钾盐复合物等一起沉淀下来，质粒 DNA 则留在上清液中。

质粒抽提试剂盒的作用是在碱裂解法的基础上进一步纯化质粒 DNA。基本原理是：装在柱子上的特殊介质在高盐条件下可以吸附 DNA，质粒抽提的上清液(含盐很高)过柱后，用含酒精的漂洗缓冲液洗去吸附在柱上的 RNA、蛋白等杂质，再用低盐缓冲液(或去离子水)将 DNA 洗脱下来。这样处理后的 DNA 很纯，有利于酶切等后续的操作。

[仪器、材料与试剂]

1. 仪器

- (1) 恒温培养箱
- (2) 恒温摇床
- (3) 小型高速离心机

2. 材料

- (1) pGEX-5X-1/DH5 α (大肠杆菌 DH5 α 株)
- (2) 1.5mL 离心管
- (3) 可调式移液器、吸头

3. 试剂

EZ-10 离心柱质粒 DNA 小量制备试剂盒(上海生工公司产品)

试剂盒的参考配方：

Solution I

- | | |
|------------|----------------------------------|
| 50mmol/L | 葡萄糖 |
| 5mmol/L | 三羟甲基氨基甲烷(Tris) Tris · HCl(pH8.0) |
| 1.0 mmol/L | 乙二胺四乙酸(EDTA)(pH8.0) |

Solution II

- 0.2mol/L NaOH, 1% SDS(十二烷基硫酸钠)

Solution III

- | | |
|------------|--------|
| 5mol/L 醋酸钾 | 60mL |
| 冰乙酸 | 11.5mL |
| 水 | 28.5mL |

Elution Buffer(洗脱缓冲液)

10mmol/L Tris · HCl

1mmol/L EDTA(pH8.0)

[实验步骤]

1. 材料的准备

在试管中的 5mL LB 培养液中加入氨苄青霉素(终浓度为 100 μ g/mL), 接入 pGEX-5X-1/DH5 α , 37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜。

2. 提取质粒

以下的操作按试剂盒的说明书进行。

(1) 在 1.5mL 离心管中加入 1.5mL 培养过夜的大肠杆菌, 12,000r/m 离心 2 分钟。彻底去除液体。对低拷贝质粒见后面的方法。

(2) 加入 100 μ L 溶液 I, 充分混匀, 放置 1 分钟。

(3) 加入 200 μ L 溶液 II, 用颠倒 4~6 次的方式温和地混合, 然后在室温中放置 1 分钟。为防染色体 DNA 的污染, 不要用旋涡混匀仪。

(4) 加入 350 μ L 溶液 III, 温和地混合。于室温放置 1 分钟。

(5) 12,000r/m 离心 5 分钟。

(6) 将上清液转移到 EZ-10 柱中。10,000r/m 离心 2 分钟。

(7) 将离心管中的过柱液去掉。加入 500 μ L 洗涤液于柱中, 10,000r/m 离心 2 分钟。

(8) 重复步骤(7)一次。

(9) 将离心管中的过柱液去掉。10,000r/m 再离心 1 分钟, 以彻底去除残留的洗涤液。

(10) 将柱子转移到一干净的 1.5mL 离心管中。在柱子的中心部位加入 50 μ L 洗脱液, 于室温放置 2 分钟。10,000r/m 离心 2 分钟。

(11) 纯化的质粒 DNA 于 4 $^{\circ}$ C 或 -20 $^{\circ}$ C 保存。

[实验结果]

将 10 μ L 洗脱液与 2 μ L 的 DNA 样品缓冲液混合, 加于 1.2% 琼脂糖凝胶做电泳分析。具体操作见实验三。