

生物科学
生物技术
系 列

FENZI SHENGWUXUE SHIYAN ZHIDAO

普通高等教育“十三五”规划教材

分子生物学实验指导

郜金荣 主编



化学工业出版社

· 北 京 ·

本书包括分子生物学基础实验、综合性实验、研究性实验以及考研参考实验四部分内容,涵盖了分子生物学研究的最新实验方法和技术。在编写方面,本书比一般实验指导书增加了实验的准备和实验的时间安排,方便教师做预备实验或学生做开放性实验;在研究性实验中增加了实验用途,特别适合学生考研复习。

本书适用于本科院校生物科学、生物技术、生物工程等相关专业学生使用,并可为相关实验人员、研究人员提供实验参考,也可作为本科生的考研指导。

图书在版编目(CIP)数据

分子生物学实验指导/郜金荣主编. —北京:化学工业出版社, 2015. 7

ISBN 978-7-122-23965-5

I. ①分… II. ①郜… III. ①分子生物学-实验
IV. ①Q7-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2015) 第 101853 号

责任编辑:魏巍 赵玉清

装帧设计:关飞

责任校对:宋玮

出版发行:化学工业出版社(北京市东城区青年湖南街13号 邮政编码100011)

印刷:北京永鑫印刷有限责任公司

装订:三河市宇新装订厂

710mm×1000mm 1/16 印张11 $\frac{3}{4}$ 字数233千字 2015年8月北京第1版第1次印刷

购书咨询:010-64518888(传真:010-64519686)

售后服务:010-64518899

网址: <http://www.cip.com.cn>

凡购买本书,如有缺损质量问题,本社销售中心负责调换。

定 价: 26.00 元

版权所有 违者必究

《分子生物学实验指导》编写人员名单

主 编 邵金荣

副 主 编 王宝琴 雷 湘 李晓玲

编写人员 (按姓氏汉语拼音排序)

代建丽 邵金荣 巩校东

郭鲜蒲 黄权军 雷 湘

李世杰 李晓玲 刘楠楠

宋新强 王宝琴 吴业颖

易 飞 张国彬 周 伟

2015年3月

前言

目录 Contents

伴随全球生物科学的高速发展,《国家科学技术发展中长期规划纲要(2006—2020年)》提出了在2020年使我国转变为“创新导向型”国家的战略目标,《“十二五”国家战略性新兴产业发展规划》也将大力推进生物类新产品的研发及产业化,《“十二五”生物技术发展规划》提出将建立多渠道投入机制,加大财税金融等政策扶持力度,推动“十二五”期间我国生物技术整体水平进入世界先进行列。作为生命科学的基础,分子生物学技术已经成为生命科学及相关学科教学和科研不可缺少的重要部分,是生命科学相关专业本科学子必须掌握的核心技术。

为了适应高校教学改革,提高教学质量,培养高级应用型本科人才,我们根据多年的教学经验,编写了本教材。本教材分为基础实验、综合性实验、研究性实验及考研参考实验四个部分。从实验目的、原理、实验所需的仪器材料、试剂的配制到实验步骤、结果分析、注意事项等各个方面都做了较为详细的叙述,力求每个实验都具有科学性、实用性和可靠性,可供生命科学相关专业的各层次学生根据自己的不同需求而选用。

由于我们水平有限,同时分子生物学技术发展又非常迅速,希望读者在使用本教材的过程中发现不妥之处,不吝批评指正。

编者

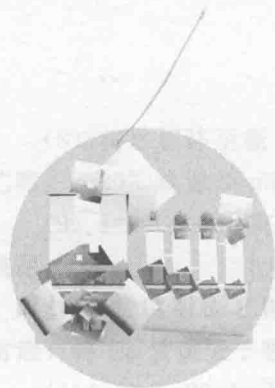
2015年3月

目录

Contents

第一部分 基础实验	1
实验 1 质粒的提取	1
(I) 碱法	1
(II) 硅石粉法	4
实验 2 质粒 DNA 琼脂糖凝胶电泳	7
实验 3 质粒 DNA 酶切检查	10
实验 4 DNA 片段的回收	12
(I) 低熔点琼脂糖法	12
(II) 玻璃奶法	14
实验 5 DNA 片段的体外连接	16
实验 6 大肠杆菌感受态细胞的制备和转化	18
实验 7 阳性克隆的筛选及鉴定	21
实验 8 噬菌体的空斑纯化	23
实验 9 噬菌体的制备及效价测定	25
实验 10 λ 噬菌体 DNA 的小量制备	28
实验 11 M13 噬菌体 DNA 的制备	30
实验 12 哺乳动物基因组 DNA 的制备	33
实验 13 植物 DNA 的制备	36
实验 14 细菌基因组 DNA 的制备	38
实验 15 基因组 DNA 的电泳分析	40
实验 16 PCR 扩增 DNA 中的引物设计 (I)	42
PCR 扩增 DNA 中的引物设计 (II)	46
实验 17 PCR 扩增 DNA 的基本反应	50
实验 18 动物细胞总 RNA 的快速提取	53
实验 19 植物细胞总 RNA 的提取	56
实验 20 细菌总 RNA 的提取	59
实验 21 总 RNA 的变性琼脂糖凝胶电泳检测	62
实验 22 探针的制备	65
实验 23 Southern 杂交	68

实验 24 Northern 杂交	72
实验 25 Western 吸印	76
第二部分 综合性、设计性实验	80
实验 1 克隆并鉴定一个真核单拷贝基因	80
实验 2 溶藻弧菌外膜蛋白基因 <i>OmpU</i> 的克隆与原核表达	81
第三部分 研究性实验及实验技术的应用	91
实验 1 DNA 导入细胞技术	91
实验 2 DNA 的体外转录	99
实验 3 DNA 的体外翻译	103
实验 4 DNA 的定点突变	106
实验 5 DNA 的转录起始点确定	110
实验 6 具启动子活性的 DNA 序列确定	113
实验 7 启动子与调控蛋白结合实验	118
实验 8 甲基化干扰和足迹实验	122
实验 9 RNA 的酶保护实验	127
实验 10 mRNA 代表性差异展示技术	131
实验 11 oligo(dT)-纤维素色谱法提取 poly(A) ⁺ RNA	134
实验 12 基因表达序列分析	136
实验 13 DNA 改组技术	144
实验 14 蛋白质糖基化及磷酸化研究	148
实验 15 免疫共沉淀	153
实验 16 GST pull-down 技术研究蛋白质互相作用	156
实验 17 酵母双杂交系统钓取与某一蛋白互相作用的蛋白	159
实验 18 RNA 干扰研究蛋白质功能	167
实验 19 染色质共沉淀技术	171
实验 20 基因敲除实验	175
实验 21 基因敲低实验	177
第四部分 考研例题及常考的分子生物学实验技术	179
参考文献	180



第一部分 基础实验



实验 1 质粒的提取

(I) 碱 法

一、实验部分

1. 实验目的

- (1) 学习碱法提取质粒的基本原理。
- (2) 掌握碱法提取质粒的操作方法。

2. 实验原理

质粒的分离是分子生物学研究中最基本的技术，碱法是一种经典的分离质粒 DNA 的方法，碱变性抽提质粒 DNA 是基于染色体 DNA 与质粒 DNA 的变性与复性的差异而达到分离目的。将细菌悬浮于葡萄糖等渗溶液中，加入 SDS 一类去污剂使细菌裂解，在 pH 值高达 12.6 的碱性条件下，染色体 DNA 的氢键断裂，双螺旋结构解开而变性。质粒 DNA 的大部分氢键也断裂，但超螺旋共价闭合环状的两条互补链不会完全分离，当以 pH4.8 的乙酸钠高盐缓冲液去调节其 pH 值至中性时，变性的质粒 DNA 又恢复原来的构型，保留在溶液中，染色体 DNA 不能复性而形成缠绕的网状结构，通过离心，不能正确复性的染色体 DNA 与不稳定的大分子 RNA、蛋白质-SDS 复合物等一起沉淀下来而被除去。

3. 实验仪器、材料及试剂

(1) 仪器与耗材

恒温摇床、超净工作台、高压灭菌锅、旋涡振荡器、制冰机、台式离心机、微量移液器、冰箱；Tip 头、Ep 管、三角瓶、培养皿等。

(2) 材料

含质粒的大肠杆菌 DH5 α 菌株。

(3) 试剂

① LB 培养基

10g/L 蛋白胨, 5g/L 酵母提取物, 10g/L NaCl, pH7.0 (固体培养基另加 15g/L 琼脂), 120℃ 高压灭菌 20min 后备用。

② 溶液 I

50mmol/L 葡萄糖、25mmol/L Tris-HCl (pH8.0)、10mmol/L EDTA (pH8.0), 高压灭菌后, 4℃ 保存备用。

③ 溶液 II (新鲜配制)

浓度为 0.2mol/L NaCl, 1% SDS (如总体积 1mL: 0.8mL 无菌去离子水, 加 0.1mL 2mol/L NaCl, 摇匀, 加 0.1mL 10% SDS 摇匀)。

④ 溶液 III

5mol/L 乙酸钾 60mL、冰乙酸 11.5mL, 蒸馏水 28.5mL (pH4.8)。

⑤ 氨苄青霉素 (Amp)

用无菌蒸馏水配制 100mg/mL 氨苄青霉素贮存液, -20℃ 保存备用。

⑥ RNaseA 溶液

用无菌水配制 10mg/mL 的 RNaseA 溶液。配成的 RNaseA 的溶液在沸水浴中加热 15min, 自然冷却至室温, 分装成小份, -20℃ 保存。

⑦ TE 缓冲液

含 10mmol/L Tris-HCl (pH8.0) 和 1mmol/L EDTA (pH8.0)。高压灭菌后冷却至室温, 加入 RNaseA 溶液, 至终浓度 20 μ g/mL。

⑧ 苯酚/氯仿/异戊醇 (25:24:1)

⑨ 70% 乙醇

⑩ 无水乙醇

4. 实验步骤

(1) 在超净工作台上, 用接种环挑取单菌落放入 50mL LB 液体培养基中 (含 50~100 μ g/mL 的 Amp), 37℃ 下振荡培养过夜。

(2) 取 1.5mL 菌液于 Ep 管中, 12000r/min 离心 2min 收集菌体, 弃去上清液, 将 Ep 管倒置于吸水纸上使液体流尽。

(3) 在菌体沉淀中加入 100 μ L 溶液 I, 涡旋振荡使菌体充分悬浮。

(4) 加入 200 μ L 溶液 II, 立即温和颠倒 Ep 管 5~10 次 (不要振荡), 直至菌悬液透亮, 室温放置 5min。

(5) 加入 150 μ L 溶液 III, 立即温和颠倒 Ep 管 5~10 次充分混匀, 冰浴 5min。

(6) 12000r/min 离心 10min, 将上清液移至新的 Ep 管中。

(7) 加入等体积苯酚/氯仿/异戊醇, 振荡抽提, 12000r/min 离心 10min。

(8) 将水相移至新 Ep 管中, 加 1/10 体积的乙酸钠, 再加入 2 倍体积的无水乙醇, -20°C 放置 30min 沉淀质粒 DNA。

(9) 12000r/min 离心 10min, 弃去上清液, 将 Ep 管倒置于吸水纸上, 使液体流尽。

(10) 加入 70%乙醇 500 μL 洗涤沉淀, 12000r/min 的转速离心 2min, 弃去上清液, 将 Ep 管倒置于吸水纸上, 使液体流尽, 空气中干燥 10~15min。

(11) 加入 20 μL TE (含 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 RNaseA) 缓冲液, 溶解质粒 DNA, -20°C 保存。

5. 实验结果

提取的质粒 DNA 可经琼脂糖凝胶电泳检验, 本方法可获得高拷贝数质粒 DNA 约 1 μg 。提取的质粒 DNA 可直接用于限制性内切酶的酶切、PCR 扩增等。

6. 注意事项

(1) 溶液 II 要新鲜配制。

(2) 加入溶液 II 后要快速操作, 混匀时溶液呈黏性即可, 动作一定要轻, 防止 DNA 断裂。

(3) 苯酚/氯仿/异戊醇有强腐蚀性, 小心操作。

7. 思考题

(1) NaOH 在质粒提取中的主要作用是什么?

(2) 苯酚/氯仿/异戊醇在质粒分离纯化中的主要作用是什么?

(3) 溶液 II 中加入 SDS 有什么作用?

二、实验准备工作

1. 试剂的配制及灭菌

(1) 溶液 I

称取 0.99g 葡萄糖溶于 80mL 蒸馏水中, 加入 1mol/L Tris-HCl (pH8.0) 2.5mL、0.5mol/L EDTA (pH8.0) 2mL, 定容至 100mL, 高压灭菌后, 4°C 保存。

(2) 溶液 II

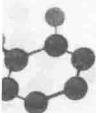
称取 8g NaOH、10g SDS 分别溶于 80mL 去离子水中, 分别定容至 100mL, 室温保存。

(3) 5mol/L 乙酸钾

称取 49.07g 乙酸钾溶于 80mL 蒸馏水中, 定容至 100mL, 室温保存。

2. 实验器皿的清、洗、包、灭

Tip 头、Ep 管需要装盒高压灭菌; LB 培养基要装瓶高压灭菌。



三、实验时间安排

第一天：试剂的配制和灭菌，细菌的振荡培养。

第二天：质粒 DNA 的提取。

(II) 硅石粉法

一、实验部分

1. 实验目的

(1) 了解硅石粉法纯化质粒的基本原理。

(2) 学习硅石粉法纯化质粒的操作方法。

2. 实验原理

硅石粉在一定条件下可以选择性吸附 DNA。在水溶液中 DNA 分子带负电荷，硅石粉表面的硅氧键水化后也带负电荷，DNA 分子和硅胶之间产生静电排斥，硅石粉不能结合 DNA；当溶液中含有高浓度阳离子时，阳离子在 DNA 与硅石粉表面形成阳离子桥，DNA 吸附在硅石粉表面；当溶液离子浓度再次降低时，水分子破坏了硅石粉表面阳离子桥，硅石粉表面再次水化带负电荷，DNA 从硅石粉表面解吸，释放到溶液中。

用硅石粉纯化质粒 DNA 时，先用碱法提取质粒 DNA，再在高盐条件下用硅石粉特异性吸附质粒 DNA，并用 70% 乙醇溶液洗去不被硅石粉吸附的杂质（蛋白质和多糖等），最后利用超纯水洗脱硅石粉上吸附的质粒 DNA，获得高纯度的质粒。

3. 实验仪器、材料及试剂

(1) 仪器与耗材

恒温摇床、超净工作台、高压灭菌锅、旋涡振荡器、台式离心机、制冰机、制纯水机、微量移液器、冰箱。Tip 头、Ep 管、三角瓶、培养皿等。

(2) 材料

含质粒的大肠杆菌 DH5 α 菌株。

(3) 试剂

① LB 培养基 [参见实验 (I)]。

② 溶液 I、II、III [参见实验 (I)]。

③ 氨苄青霉素 (Amp) [参见实验 (I)]。

④ 硅石粉悬液。

⑤ 70% 乙醇。

⑥ 6mol/L 盐酸胍。

4. 实验步骤

- (1) 在超净工作台上, 用接种环挑取单菌落放入 50mL LB 液体培养基中 (含 50~100 μ g/mL 的 Amp), 37 $^{\circ}$ C 下振荡培养过夜。
- (2) 取 1.5mL 菌液于 Ep 管中, 12000r/min 离心 2min 收集菌体, 弃去上清液, 将 Ep 管倒置于吸水纸上使液体流尽。
- (3) 在菌体沉淀中加入 100 μ L 溶液 I, 涡旋振荡使菌体充分悬浮。
- (4) 加入 200 μ L 溶液 II, 立即温和颠倒 Ep 管 5~10 次充分混匀 (不要振荡), 室温放置 5min。
- (5) 加入 150 μ L 溶液 III, 立即温和颠倒 Ep 管 5~10 次充分混匀, 冰浴 5min。
- (6) 12000r/min 离心 10min, 将上清液移至新的 Ep 管中。
- (7) 加入 6mol/L 盐酸胍 600 μ L, 混匀后, 再加入 50 μ L 硅石粉悬液混匀, 12000r/min 离心 5min, 弃去上清液。
- (8) 加入 70% 乙醇 1mL, 充分悬起硅石粉, 12000r/min 离心 5min, 弃去上清液。
- (9) 重复步骤 8。
- (10) 干燥沉淀 10min。
- (11) 加入 50 μ L 超纯水, 65 $^{\circ}$ C 水浴 5min。
- (12) 室温下, 12000r/min 离心 5min。
- (13) 取上清液至新的 Ep 管中, -20 $^{\circ}$ C 储存。

5. 实验结果

提取的质粒 DNA 可经琼脂糖凝胶电泳检验, 用硅石粉法纯化 DNA, 无需酚抽提, DNA 回收率高, 纯度满足 DNA 酶切、测序、连接、转化和体外转录等分子操作。

6. 注意事项

- (1) 加入溶液 II、溶液 III 后, 轻轻颠倒混匀, 防止基因组 DNA 断裂, 此过程与碱法提取质粒 DNA 一致。
- (2) 65 $^{\circ}$ C 水浴有利于质粒充分从硅石粉上解吸, 提高质粒 DNA 的回收率。

7. 思考题

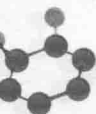
- (1) 实验中, 盐酸胍的作用是什么?
- (2) 本实验中如何除去样品中的 RNA?

二、实验准备工作

1. 试剂的配制及灭菌

- (1) 溶液 I、溶液 II、溶液 III [参见实验 (I)]。
- (2) 硅石粉悬液。

称取 5g 硅石粉, 加 20mL 超纯水, 完全悬浮, 然后静置 2h, 轻轻的倾去浑浊



的悬液，保留沉淀，重复清洗沉淀 3 次，用 20mL 超纯水悬浮硅石粉，4℃ 保存备用。

2. 实验器皿的清、洗、包、灭

Tip 头、Ep 管需要装盒高压灭菌；LB 培养基要装瓶高压灭菌。

三、实验时间安排

第一天：试剂的配制和灭菌，细菌的振荡培养。

第二天：质粒 DNA 的提取和纯化。

实验 2 质粒 DNA 琼脂糖凝胶电泳

一、实验部分

1. 实验目的

- (1) 学习琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的基本原理。
- (2) 掌握琼脂糖凝胶电泳的操作方法。

2. 实验原理

琼脂糖是电泳中的支持介质，其密度和形成的孔径大小取决于琼脂糖的浓度，选用不同浓度的琼脂糖凝胶，可分离 200bp~50kb 的 DNA 片段。DNA 分子在琼脂糖凝胶中泳动时有电荷效应和分子筛效应。DNA 分子在高于等电点的 pH 值溶液中带负电荷，在电场中向正极移动。由于糖-磷酸骨架在结构上的重复性质，相同数量的双链 DNA 几乎具有等量的净电荷，因此它们能以同样的速度向正极方向移动。在一定的电场强度下，DNA 分子的迁移速度取决于分子筛效应，即 DNA 分子本身的大小和构型。具有不同的相对分子质量的 DNA 片段泳动速度不一样，可将其进行分离。DNA 分子的迁移速度与相对分子质量的对数值成反比关系。

琼脂糖凝胶可用低浓度的荧光染料溴化乙锭 (ethidium bromide, EB) 染色，在紫外光下可以灵敏地检出发橙色荧光的 DNA 样品，根据标准 DNA Marker 和质粒 DNA 片段在凝胶中的相对位置，可以判断待检测 DNA 片段的大小。

3. 实验仪器、材料及试剂

(1) 仪器与耗材

微量移液器、电泳设备、紫外分析仪、微波炉 (电炉)、台式离心机、高压灭菌锅、冰箱、Tip 头、一次性手套等。

(2) 材料

实验 (I) 提取的质粒。

(3) 试剂

① 琼脂糖。

② DNA Marker。

③ 1×TAE 电泳缓冲液 含 40mmol/L Tris-乙酸盐, 1mmol/L EDTA, 用 50×TAE 母液稀释。

④ 6×加样缓冲液 含 2.5mg/mL 溴酚蓝和 0.4g/mL 蔗糖。

⑤ 10mg/mL 溴化乙锭 (EB) 母液。

4. 实验步骤

(1) 凝胶的制备



① 配胶：称取一定量的琼脂糖于三角瓶中，按照比例加入 $1\times$ TAE 电泳缓冲液，加热至完全溶解，无颗粒状琼脂糖，待其自然冷却到不烫手时 ($50\sim 60^{\circ}\text{C}$)。

② 制胶：选择合适的制胶板放入制胶槽，插好梳子，将凝胶倒入制胶槽中，在室温下放置 $20\sim 30\text{min}$ ，使其自然凝固。凝固后拔去梳子，将制胶板连同凝胶放入电泳槽，倒入适量 $1\times$ TAE 电泳缓冲液，浸没过凝胶约 1mm 。

(2) 样品制备

取适量质粒 DNA 样品溶液，加入约 $1/6$ 样品体积的 $6\times$ 加样缓冲液，混匀。

(3) 点样

将 DNA Marker、DNA 样品按顺序加入加样孔内。

(4) 电泳

接通电源（点样孔应在负极），恒压 $80\sim 100\text{V}$ 进行电泳。

(5) 结果观察

当溴酚蓝带迁移到距凝胶下缘 $1\sim 2\text{cm}$ 时，停止电泳，关闭电源，取出凝胶，EB 染色约 20min （小搪瓷盘中加适量去离子水，滴加几滴 EB，混匀，至呈微黄色即可），紫外分析仪进行观察和分析。

5. 实验结果

电泳后在凝胶中可观察到 DNA Marker 和质粒 DNA 的条带，根据 DNA Marker 和质粒 DNA 片段在凝胶中的相对位置，可以判断质粒的大小。

6. 注意事项

(1) 制胶时琼脂糖要完全溶解，注意凝胶浓度与待检测质粒 DNA 分子量之间的关系。

(2) 点样时 Tip 头不要碰破点样孔；每加完一个样，可在阳极池缓冲液内吸打洗涤 Tip 头后再用，不必每个样品换一个 Tip 头。

(3) EB 是诱变剂，戴手套操作，防止污染。

7. 思考题

(1) 电泳中为什么要用加样缓冲液？

(2) 电泳缓冲液的作用是什么？除了 TAE 缓冲液，还有哪些常用的电泳缓冲液？

(3) 溴化乙锭为什么可以对 DNA 进行染色？

二、实验准备工作

1. 试剂的配制及灭菌

(1) $50\times$ TAE 电泳缓冲液

称取 Tris 24.2g 溶于 80mL 蒸馏水中，加入 0.5mol/L EDTA ($\text{pH}8.0$) 10mL ，冰乙酸 5.71mL ，定容至 100mL 。

(2) $6\times$ 加样缓冲液

称取 0.025g 溴酚蓝和 4g 蔗糖溶于 8mL 蒸馏水中，定容至 10mL，4℃ 保存。

(3) 10mg/mL 溴化乙锭 (EB) 母液

称取 1g 溴化乙锭溶于 80mL 蒸馏水中，定容至 100mL，置于棕色瓶中保存。

2. 实验器皿的清、洗、包、灭

Tip 头需要装盒高压灭菌。

三、实验时间安排

第一天：试剂的配制和灭菌，质粒 DNA 的提取。

第二天：质粒 DNA 的琼脂糖凝胶电泳。



实验3 质粒 DNA 酶切检查

一、实验部分

1. 实验目的

- (1) 掌握限制性内切酶的特性。
- (2) 学习限制性内切酶消化质粒 DNA 的基本原理。
- (3) 掌握限制性内切酶消化质粒 DNA 的操作步骤。

2. 实验原理

限制性内切核酸酶是一类识别双链 DNA 分子中的特定核苷酸序列，并将其切割的核酸内切酶，共分 I 型、II 型、III 型三种类型，其中 II 型酶识别 4~6 个回文对称的核苷酸序列，并在识别序列内切割，产生平齐末端或黏性末端的双链 DNA 片段。II 型酶是 DNA 重组技术中的重要工具酶。影响限制性内切酶活性的因素很多，除反应温度、反应时间、反应缓冲体系、DNA 的纯度和浓度外，样品中残留污染物如：苯酚、氯仿、乙醇、EDTA、EB、SDS 以及琼脂糖凝胶中的硫酸根离子也会抑制酶活性，影响酶切效果。

本实验根据质粒 DNA 上含有的酶切位点，选择相应的限制性内切酶对质粒和目的片段进行切割，为进行体外连接形成重组 DNA 分子奠定基础。同时还可以用酶切对重组 DNA 分子进行鉴定。

3. 实验仪器、材料及试剂

(1) 仪器与耗材

微量移液器、制冰机、制纯水机、高压灭菌锅、恒温水浴锅、台式离心机、冰箱、Tip 头、Ep 管等。

(2) 材料

实验 1 提取的质粒。

(3) 试剂

- ① 限制性内切酶。
- ② 10×限制性内切酶缓冲液。

4. 实验步骤

(1) 根据质粒 DNA 上含有的酶切位点，选择相应的限制性内切酶进行酶切反应。

(2) 建立反应体系：取一 Ep 管，按下列顺序分别加入以下成分。