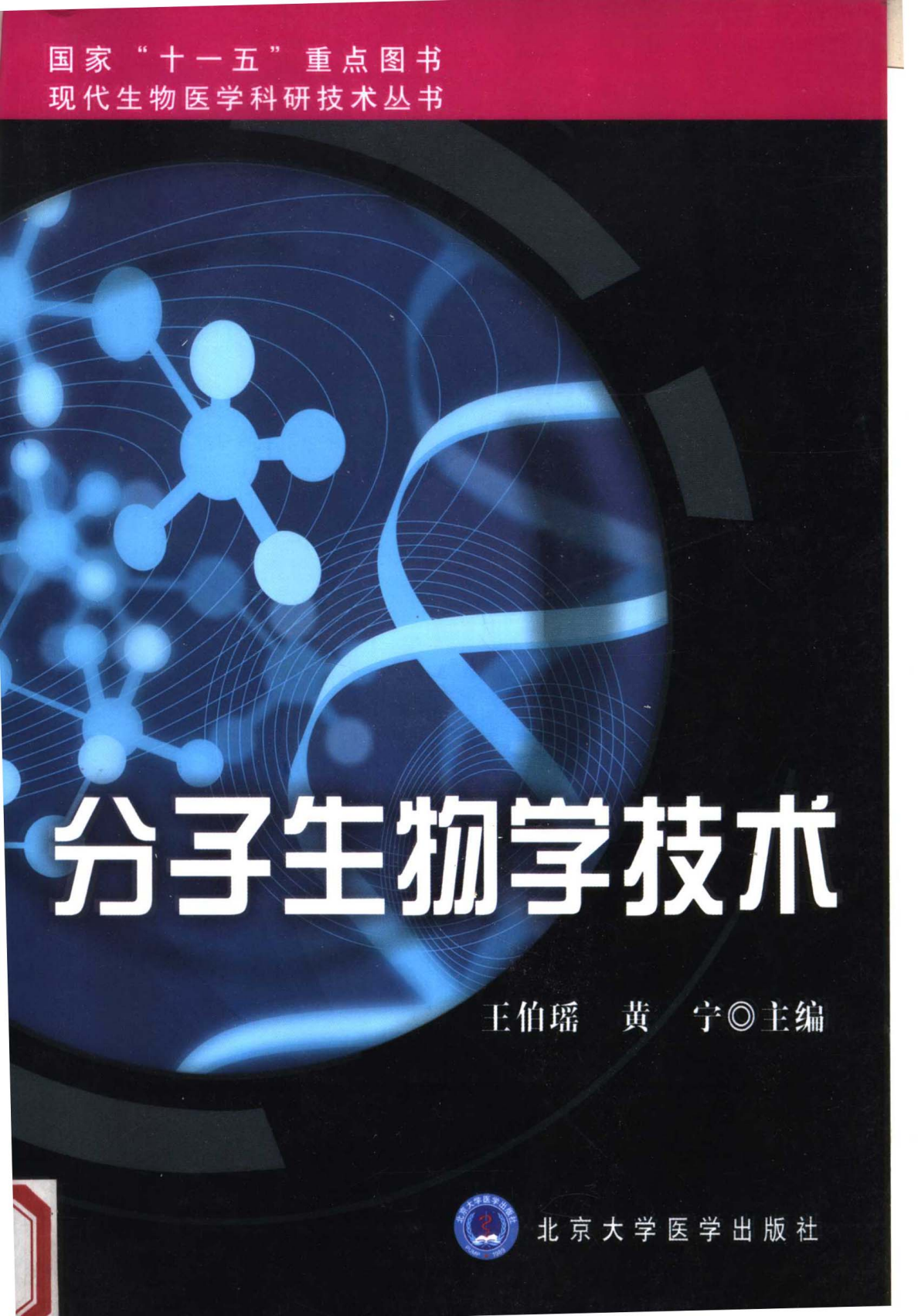


国家“十一五”重点图书
现代生物医学科研技术丛书



分子生物学技术

王伯瑶 黄 宁◎主编



北京大学医学出版社

国家“十一五”重点图书
现代生物医学科研技术丛书

分子生物学技术

主 编 王伯瑶 黄 宁

编 者 (按姓氏拼音首字母排列)

冯 云 (四川大学)

黄 宁 (四川大学)

李 明 (广东省人民医院)

李明远 (四川大学)

沈 斌 (成都华神集团)

汪宇辉 (四川大学)

王伯瑶 (四川大学)

王国兴 (德国图宾根大学)

吴 琦 (四川大学)

熊文碧 (四川大学)

祝秉东 (复旦大学)

北京大学医学出版社

FENZI SHENGWUXUE JISHU

图书在版编目 (CIP) 数据

分子生物学技术/王伯瑶, 黄宁主编. —北京: 北京大学医学出版社, 2006. 6

(现代生物医学科研技术丛书)

ISBN 7-81116-023-4

I. 分... II. ①王...②黄... III. 分子生物学—高等学校—教材 IV. Q7

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2006) 第 025643 号

分子生物学技术

主 编: 王伯瑶 黄 宁

出版发行: 北京大学医学出版社 (电话: 010-82802230)

地 址: (100083) 北京市海淀区学院路 38 号 北京大学医学部院内

网 址: <http://www.pumpress.com.cn>

E - mail: booksale@bjmu.edu.cn

印 刷: 莱芜市圣龙印务有限责任公司

经 销: 新华书店

责任编辑: 药 蓉 责任校对: 金彤文 责任印制: 张京生

开 本: 880mm×1230mm 1/32 印张: 9.75 字数: 282 千字

版 次: 2006 年 10 月第 1 版 2006 年 10 月第 1 次印刷 印数: 1—3000 册

书 号: ISBN 7-81116-023-4/R·023

定 价: 23.50 元

版权所有, 违者必究

(凡属质量问题请与本社发行部联系退换)



出版说明

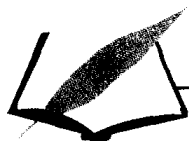
生物医学科研领域的技术多，方法杂，而且伴随着科技进步，还在不断涌现新的技术和方法。为了让该领域的研究人员能够扎实地掌握基本技术，提高在操作中解决实际问题的能力，并能在较短的时间内了解和应用新的方法、技术，我们策划并出版了这套《现代生物医学科研技术丛书》。本套丛书具有以下几点特色：

1. 专家牵头，组织有长期实践经验的一线科研工作者编写。每本书特别增加了“写在前面的话”，由作者介绍自己在科研实践中的思路和心得，为读者提供启示与帮助。

2. 内容全面，重点突出。本套丛书全面囊括了生物医学领域中的常用实验技术，并重点介绍一些新兴的、热门的技术，同时还包括几本专门介绍与科研相关的仪器设备的使用和计算机软件应用的图书，以方便读者使用。

3. 内容简明、实用。本套丛书注重操作，强调经验的总结。内容中的“注意事项”，介绍影响实验结果的关键步骤或易于出错的地方。

本丛书主要面向生物、医学专业的研究生、高年级本科生，以及相关专业的其他研究人员。我们真诚地希望，这套丛书能为各位读者的科研实践提供切实有效的帮助。



——写在前面的话——

分子生物学技术是当代生物学和医学研究使用最为广泛的强有力的先进技术。古人云，“工欲善其事，必先利其器”。纵观医学科学发展史，每项重大成就无不与先进技术和仪器的发展密切相关，譬如有了显微镜的出世才有了病原微生物的发现和细胞病理学的创立。而今，分子生物学技术就是生物医学科研获取突破的利器。我所领导的科研组应用蛋白质生化和基因操作技术在天然免疫与炎症领域进行科学探索，精确地说，已有 18 载了，在这不太短的科研实践历程中使我们深切地感悟到上述迷津。以我所熟知的当前免疫学的发展为例，自从 40 多年前提出克隆选择理论以来，免疫学领域的研究大多集中在以克隆选择为基础的获得性免疫上，天然免疫常常被认为在免疫功能上是次要的系统，甚至被认为是在免疫系统的进化中被“废弃”的器官，以致对机体抗感染防御机制的研究少有大的进展，而现在感染性疾病依然是影响全球人类健康的重大医学问题之一。由于蛋白质生化和基因克隆技术的发展与应用，近 20 年来在天然免疫细胞陆续发现许多由基因编码的内源性抗菌肽，天然免疫在机体抗感染防御机制中的重要性重新引起学者们的广泛关注。皮肤和粘膜一直被人们认为是被动阻止病原微生物入侵的机械屏障，但由于上皮细胞多种抗菌肽的发现，这种传统观念业已发生改变。应用基因操作技术我们还可以对天然抗菌肽进行任意剪接和改造，可能研发出抗耐药菌感染的新一代抗菌药物，或产生出抗病性转基因动植物新品种，以提高人类健康水平，改善人们的生活品质。

这十多年来，我们研究组的主要目标是：应用微量多肽分离纯化和鉴定技术寻找人体内新的抗菌肽分子；应用基因

表达检测和报告基因技术探讨上皮细胞抗菌肽基因表达调节的分子机制；应用基因操作技术进行抗菌肽分子改造，重组抗菌肽基因进行动植物细胞和小鼠转基因等。这些科研实践，使我们积累了一些在国内实验室条件下应用分子生物学技术的经验。一方面因为不时有各地的研究生通过电子信箱询问我们某些实验操作步骤，回复相当费时；另一方面我们也不想总结、规范一下我们的实验操作程序。鉴于此，我接受北京大学医学出版社药蓉同志之约，编写《生物医学科研技术丛书》之《分子生物学技术》，组织我所指导过的部分具体实践分子生物学技术的博士编写了这本书，以期对研究生的科研实践有所帮助。本书主要介绍分子生物学实验技术，理论叙述少，并尽量详细地叙述其实验操作和注意事项，因此这是一本实验手册性质的图书。

全书共 13 章，第 1 章尽可能全面地叙述了分子生物学基本的实验技术，内容包括凝胶电泳、质粒的制备、基因组 DNA 的制备和分析、总 RNA 的提取和分析、cDNA 文库的构建、聚合酶链式反应、目的基因片段的克隆、Southern 印迹、Northern 印迹、Western 印迹等。其余各章对一些特殊的实验技术或新技术进行了经验性质的介绍，包括哺乳动物细胞和组织基因表达分析、报告基因技术、基因上游调控序列的分析、重组基因大肠杆菌表达产物的制备、重组基因酵母菌表达产物的制备、聚合酶链式反应诱导的基因定点突变、酵母双杂交技术、噬菌体展示技术、哺乳动物转基因、RNA 干扰技术等。基因的生物学功能是由其编码的蛋白质来实现的，而且在基因重组产品的制备亦必须涉及蛋白质的分离纯化，因此，第 2 章叙述了通常使用的蛋白质分离纯化技术。细胞内信号转导是功能基因组学的重要组成部分，因此，第 13 章对细胞内信号通路检测技术亦进行了经验性质的介绍。此外，我室未开展 RNA 干扰技术，特请四川大学基础医学与法医学院微生物教研室的李明远教授编写该章，在此表示衷心感谢。这里还要特别感谢吉林大学第二医院肾内科刘庆鑫教授、同济医科大学公共卫生学院牛丕业博士对

转基因小鼠模型建造一章的审校和修改。

本书一定存在不少问题和错误，敬请同道批评指正。

王伯瑶

2005 年 10 月 10 日

目 录

第 1 章 分子生物学常规实验技术	(1)
第 1 节 凝胶电泳	(1)
第 2 节 质粒 DNA 的制备	(8)
第 3 节 真核细胞 DNA 的制备与定量	(15)
第 4 节 总 RNA 的提取和分析	(19)
第 5 节 cDNA 文库的构建	(27)
第 6 节 聚合酶链式反应 (PCR)	(37)
第 7 节 重组 DNA 的构建、筛选与鉴定	(47)
第 8 节 Southern 杂交	(55)
第 9 节 Northern 杂交	(63)
第 10 节 Western 免疫印迹	(68)
第 2 章 蛋白质提取与纯化技术	(72)
第 1 节 蛋白质制备的基本步骤	(72)
第 2 节 层析法分离纯化蛋白质	(86)
第 3 章 哺乳动物细胞和组织基因表达分析	(111)
第 1 节 逆转录-聚合酶链式反应 (RT-PCR)	(112)
第 2 节 实时定量 RT-PCR	(124)
第 3 节 酶联免疫吸附试验方法 (ELISA)	(134)
第 4 章 报告基因技术	(143)
第 5 章 基因调控序列分析	(155)
第 6 章 聚合酶链式反应引导的基因定点突变	(165)
第 7 章 重组基因大肠杆菌表达产物的制备	(171)
第 1 节 大肠杆菌表达的策略	(171)
第 2 节 细菌裂解方法和包涵体复性技术	(182)
第 3 节 融合蛋白的酶解和化学裂解方法	(188)
第 4 节 实用举例	(191)

第 8 章 酵母菌遗传学方法	(198)
第 1 节 酵母菌的培养	(198)
第 2 节 酵母菌 DNA 分离	(199)
第 3 节 酵母菌 RNA 的制备	(202)
第 4 节 酵母菌蛋白质的提取	(203)
第 5 节 外源 DNA 导入酵母细胞的方法	(204)
第 9 章 酵母双杂交技术	(208)
第 10 章 噬菌体展示技术	(227)
第 1 节 噬菌体展示技术简介	(227)
第 2 节 噬菌体随机肽库的构建与筛选	(231)
第 3 节 噬菌体抗体库技术	(234)
第 11 章 转基因小鼠模型的建立	(237)
第 12 章 哺乳动物细胞中的 RNA 干扰技术	(253)
第 13 章 细胞信号转导通路检测技术	(264)
第 1 节 概 述	(264)
第 2 节 信号转导通路的基本研究思路和方法	(268)
第 3 节 蛋白激酶的检测	(288)
附录 通用试剂与缓冲液的配制	(293)
主要参考文献	(296)

第1节 凝胶电泳

(一) 琼脂糖凝胶电泳分离 DNA

琼脂糖凝胶电泳是分离、纯化、鉴定 DNA 片段的常用方法，具有简便、快速的优点。DNA 琼脂糖凝胶电泳的原理与蛋白质的电泳原理基本相同，DNA 分子在高于其等电点的溶液中带负电荷，在电场中向正极移动。DNA 分子在电场中通过介质而泳动，除电荷效应外，凝胶介质还有分子筛效应，与分子大小及构象有关。对于线性 DNA 分子，其电场中的迁移率与其分子量的对数值成反比，因此不同长度的 DNA 片段就会表现出不同的迁移率，因而可依据 DNA 分子的大小使其分离（表 1-1）。当用低浓度的荧光嵌入染料溴化乙锭（ethidium bromide, EB）染色，其分子可插入 DNA 的碱基之间，因此可在紫外灯下直接观察到 DNA 片段在凝胶上的位置，而相对分子质量标准参照物可以提供一用于确定 DNA 片段大小的标准，并可在紫外灯下或经凝胶成像系统观察或拍照。

表 1-1 线状 DNA 片段分离的有效范围与琼脂糖凝胶浓度关系

琼脂糖凝胶的百分浓度 (%)	线状 DNA 分子的有效范围 (kb)
0.3	60~5
0.6	20~1
0.7	10~0.8
0.9	7~0.5
1.2	6~0.4
1.5	4~0.2
2.0	3~0.1

【仪器及材料】

水平电泳槽、电泳仪、紫外灯或凝胶成像仪、微量移液器、微量离心管等。

【试剂】

(1) 琼脂糖。

(2) 电泳缓冲液：

1×TAE: 0.04mol/L Tris, 0.02mol/L 乙酸, 2mmol/L EDTA。

1×TBE: 89mmol/L Tris, 89mmol/L 硼酸盐, 2mmol/L EDTA。

(3) 5mg/ml 溴化乙锭。

(4) 6×电泳样品上样缓冲液: 0.25%溴酚蓝, 0.25%二甲苯青 FF, 40% (W/V) 蔗糖水溶液, 4℃保存。

【操作步骤】

(1) 称 0.2g 琼脂糖, 加 20ml 电泳缓冲液 (1×TAE) 加热熔化。

(2) 胶液冷至 60℃ 左右时, 加入溴化乙锭, 终浓度为 0.5μg/ml。轻轻地旋转以充分混匀凝胶溶液。浇灌温热的琼脂糖溶液进入模具。凝胶适宜厚度为 3~5mm, 在胶一端插上梳子。

(3) 让凝胶溶液完全凝结, 室温下需 30~45min。拔出梳子, 将模具置于电泳槽中, 加入 1×TBE, 让液面高于胶面 1mm。

(4) 混合 DNA 样品和 0.2 倍体积 6×载样缓冲液。用微量移液器及一次性吸头, 或拉长的巴斯德吸管, 或玻璃毛细管将样品混合液缓慢加至浸没凝胶的加样孔内。

(5) 关上电泳槽盖, 接好电极插头。DNA 应向阳极侧泳动。给予 1~5V/cm 的电压, 其中距离以阳极至阴极之间的测量为准。如电极插头连接正确, 阳极和阴极由于电解作用将产生气泡, 并且几分钟内溴酚蓝从加样孔迁移进入胶体内。

(6) 据指示剂溴酚蓝和二甲苯青迁移位置, 判断是否终止电泳。切断电源后, 取出凝胶, 紫外灯下或经凝胶成像系统观察或拍照。



【注意事项】

- (1) 溴化乙锭是强诱变剂，有毒，取用时须戴手套。
- (2) 紫外线对人眼有害，观察时须戴护目镜。
- (3) 应选择质量好的琼脂糖，否则 DNA 条带可能不清晰。
- (4) 配制琼脂糖凝胶时特别要注意附在容器壁上的琼脂糖的溶解，熔化后的琼脂糖应是清澈透明的。
- (5) 琼脂糖电泳是根据带电物质在电场中向相反电极移动，DNA 在一定 pH 条件下可解离成带电荷的离子，离子在电场中向相反电极移动，因此加有 DNA 的一端连负极，另一端连正极。
- (6) 琼脂糖凝胶分离大分子 DNA 实验条件的研究表明，在低浓度、低电压下，分离效果较好。在低电压条件下，线性 DNA 分子的电泳迁移率与所用的电压呈正比。但是，在电场强度增加时，较大的 DNA 片段迁移率的增加相对较小。因此，随着电压的增高，电泳分辨率反而下降，为了获得电泳分离 DNA 片段的最大分辨率，电场强度不宜高于 5V/cm。
- (7) 琼脂（糖）电泳常用缓冲液的 pH 在 6~9 之间，离子强度为 0.02~0.05mol/kg。离子强度过高时，会有大量电流通过凝胶，因而产生热量，使凝胶的水分蒸发，析出盐的结晶，甚至可使凝胶断裂，电流中断。为了防止电泳时两极缓冲液槽内 pH 和离子强度的改变，可在每次电泳后合并两极槽内的缓冲液，混匀后再用。
- (8) 琼脂糖主要在 DNA 制备电泳中作为一种固体支持基质，其密度取决于琼脂糖的浓度。在电场中，在中性 pH 值下带负电荷的 DNA 向阳极迁移，其迁移速率由下列多种因素决定：①DNA 的分子大小；②琼脂糖浓度；③DNA 分子的构象；④电源电压；⑤嵌入染料的存在；⑥离子强度影响。琼脂糖浓度对核酸迁移率的影响是：一定大小的 DNA 片段，在不同浓度的琼脂糖凝胶中的迁移率不同；在一定浓度的琼脂糖凝胶能够分辨的核酸片段大小范围内，核酸片段的迁移率与其相对分子质量大小相反，相对分子质量大的，迁移率小。

(二) 聚丙烯酰胺凝胶电泳

聚丙烯酰胺凝胶是由丙烯酰胺单体，在催化剂 TEMED (N,

N, N', N'-四甲基乙二胺) 和过硫酸铵的作用下, 丙烯酰胺聚合形成长链, 聚丙烯酰胺链在交联剂 N, N'-亚甲双丙烯酰胺参与下, 聚丙烯酰胺链与链之间交叉连接而形成凝胶。

SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳测定蛋白分子量, 是根据大多数蛋白都能与阳离子表面活性剂十二烷基硫酸钠 (SDS) 按重量比结合成复合物, 使蛋白分子所带的负电荷远远超过天然蛋白分子的负电荷, 消除了不同蛋白分子的电荷效应, 使蛋白分子相对迁移率的大小取决于分子量的高低, 因此可从已知分子量的标准蛋白的对数和相对迁移率所做的标准曲线中求出未知蛋白样品的分子量。

凝胶浓度和交联剂浓度按下式计算:

$$\text{凝胶浓度}\% = \frac{\text{Acr (g)} + \text{Bis (g)}}{\text{体积 (ml)}} \times 100\%$$

$$\text{交联剂浓度}\% = \frac{\text{Bis (g)}}{\text{Acr (g)} + \text{Bis (g)}} \times 100\%$$

样品	分子量范围	分离胶浓度 (%)
蛋白质	$<10^4$	20~30
	$(1\sim4) \times 10^4$	15~20
	$4 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$	10~15
	$(1\sim5) \times 10^5$	5~10
	$>5 \times 10^5$	2~5
核酸	$<10^4$	15~20
	$10^4 \sim 10^5$	5~10
	$10^5 \sim 2 \times 10^6$	2~2.6

【仪器及材料】 垂直式电泳槽装置等。

【试剂】

(1) 30% 储备胶溶液: 丙烯酰胺 (Acr) 29.0g, 亚甲双丙烯酰胺 (Bis) 1.0g, 混匀后加 ddH₂O, 37℃ 溶解, 定容至 100ml, 棕色瓶存于室温。

(2) 1.5mol/L Tris-HCl (pH 8.0): Tris 18.17g 加 ddH₂O 溶解, 浓盐酸调 pH 至 8.0, 定容至 100ml。

(3) 1mol/L Tris-HCl (pH 6.8): Tris 12.11g 加 ddH₂O 溶解, 浓盐酸调 pH 至 6.8, 定容至 100ml。

(4) 10% SDS: 电泳级 SDS 10.0g 加 ddH₂O 68℃助溶, 浓盐酸调至 pH 7.2, 定容至 100ml。

(5) 10×电泳缓冲液 (pH 8.3): Tris 3.02g, 甘氨酸 18.8g, 10% SDS 10ml 加 ddH₂O 溶解, 定容至 100ml。

(6) 10%过硫酸铵 (AP): 1g AP 加 ddH₂O 至 10ml。

(7) 2×SDS 电泳上样缓冲液: 1mol/L Tris-HCl (pH 6.8) 2.5ml, β-巯基乙醇 1.0ml, SDS 0.6g, 甘油 2.0ml, 0.1%溴酚蓝 1.0ml, ddH₂O 3.5ml。

(8) 考马斯亮蓝染色液: 考马斯亮蓝 0.25g, 甲醇 225ml, 冰醋酸 46ml, ddH₂O 225ml。

(9) 脱色液: 甲醇、冰醋酸、ddH₂O 以 3 : 1 : 6 配制而成。

【操作步骤】

(1) 安装电泳槽装置: 根据产品说明书安装电泳槽装置, 根据玻璃板的大小和间隔片的厚度计算所需凝胶的体积。

(2) 聚丙烯酰胺凝胶的配制

1) 分离胶的配制:

不同浓度分离胶的配制

凝胶浓度	5.0%	7.5%	10%	12.5%	15%
30%储备胶 (ml)	5	7.5	10	12.5	15
1 mol/L Tris-HCl (ml) pH8.0	11.2	11.2	11.2	11.2	11.2
ddH ₂ O (ml)	13.7	11.2	8.7	6.2	3.7
抽气					
10% SDS (ml)	0.3				
10% AP (ml)	0.1~0.2				
TEMED (μl)	20				

分离胶混匀后灌入玻璃板间, 以水封顶, 注意使液面平, 凝胶完全聚合 30~60min。

2) 积层胶 (5%) 的配制:

ddH₂O 6.8ml

30%储备胶 1.7ml

1mol/L Tris-HCl (pH6.8)	1.25ml
10%SDS	0.1ml
10%AP	0.1ml
TEMED	10 μ l

将分离胶上的水倒去，加入上述混合液，立即将梳子插入玻璃板间，小心勿使梳齿下留有气泡。完全聚合需 15~30min。

3) 样品处理：将样品加入等量的 2 $\times$ SDS 上样缓冲液，100 $^{\circ}$ C 加热 3~5min，离心 12 000 $\times g$ ，1min，取上清液作 SDS-PAGE 分析，同时将 SDS 分子量蛋白标准品作平行处理。

4) 上样：将样品加入样品池中，并加入蛋白质分子量标准品作对照。

5) 电泳：在电泳槽中加入 1 $\times$ 电泳缓冲液，连接电源，负极在上，正极在下，电泳时，积层胶电压 80V，分离胶电压 100V，电泳至溴酚蓝行至电泳槽下端停止。

6) 染色：将胶从玻璃板中取出，加入考马斯亮蓝染色液，在摇床上室温下振荡染色，4~6h。

7) 脱色：将胶从染色液中取出，放入脱色液中振荡脱色，多次更换脱色液至蛋白条带清晰。

8) 凝胶摄像和保存：在图像处理系统下将脱色好的凝胶摄像，结果存于软盘中，凝胶可保存于双蒸水中或 7%乙酸溶液中。

【注意事项】

(1) 未聚合的丙烯酰胺、亚甲双丙烯酰胺、过硫酸胺具有神经毒性，可通过皮肤和呼吸道吸收，应注意防护。操作时戴上手套和口罩。

(2) 制备凝胶应选用高纯度的试剂，否则会影响凝胶聚合与电泳效果。

(3) 为达到较好的凝胶聚合效果，缓冲液的 pH 值要准确。室温较低时，TEMED 的量可加倍。过硫酸胺易被氧化，10%过硫酸胺配制好后分装保存，如果胶聚合不好或是完全不聚合，一般都是过硫酸胺的问题，最好现配。

(4) 琼脂封底及灌凝胶时不能有气泡，以免影响电泳时电流的

通过。

(5) 为防止电泳后区带拖尾, 样品中盐离子强度应尽量低, 含盐量高的样品可用透析法或凝胶过滤法脱盐。最大加样量不得超过 $100\mu\text{g}$ 蛋白/ $100\mu\text{l}$ 。

(6) 在配制凝胶过程中, 分离胶聚合后, 洗净胶面后才能制备浓缩胶。浓缩胶制备后, 不能进行预电泳, 以充分利用浓缩胶的浓缩效应。

(7) 电泳时, 电泳仪与电泳槽间正、负极不能接错, 以免样品反方向泳动, 电泳时应选用合适的电流、电压, 过高或者过低都会影响电泳效果。

(8) 电泳后, 应分别收集上下贮槽的电泳缓冲液, 在冰箱贮存, 可用 2~3 次。为保证电泳结果满意, 最好使用新稀释的缓冲液。

(三) 酸性尿素聚丙烯酰胺凝胶电泳 (AU-PAGE)

酸性尿素聚丙烯酰胺凝胶电泳用于分离和鉴定碱性蛋白质。

【仪器】垂直式电泳槽装置。

【材料和试剂】

(1) A 液: 50% 丙烯酰胺, 1.33% 亚甲双丙烯酰胺, 棕色瓶存于室温。

(2) B 液: 4% TEMED, 43.2% 乙酸。

(3) C 液: 8mol/L 尿素, 0.4% 过硫酸铵。

(4) 电泳缓冲液: 5% 乙酸。

(5) 2× 加样缓冲液: 1% 乙酸, 3mol/L 尿素, 10% 甘油, 0.01% 甲基绿。

(6) 染色液: 0.1% 考马斯亮蓝, 40% 甲醇, 10% 乙酸。

(7) 脱色液: 10% 甲醇, 10% 乙酸。

【操作步骤】

(1) 安装电泳槽装置。

(2) 配制凝胶: 按照 A 液 : B 液 : C 液 = 2 : 1 : 5 的比例配制。

(3) 把配制好的凝胶加入到灌胶器中, 加满为止。将梳子加入

胶内。于室温下让凝胶聚合 30~60min。胶凝后小心拔取梳子。

(4) 预电泳：把电泳槽装置接通电极，特别需要注意的是酸性尿素聚丙烯酰胺凝胶电泳的电极方向与 SDS-PAGE 的正相反，电泳槽中加入电泳缓冲液，内外槽均为 5% 乙酸，进行预电泳。150V 预电泳 1.5h 或 50V 过夜。

(5) 点样：将样品与 2× 加样缓冲液混合均匀， $10\,000\times g$ 离心 2min 以去除沉渣。用微量注射器将样品加入上样孔底部。

(6) 电泳：150V 电泳，电泳至甲基绿行至电泳槽下端停止。

(7) 染色：从电泳槽装置中取出凝胶，加入到染色液中，在摇床上染色 2h。

(8) 脱色：将胶从染色液中取出，放入脱色液中，多次更换脱色液，在摇床上脱色至背景清楚。

(9) 凝胶摄像和保存：在图像处理系统下将脱色好的凝胶摄像，或拍摄照片。



【注意事项】

(1) 特别需要注意的是酸性尿素聚丙烯酰胺凝胶电泳的电极方向与 SDS-PAGE 的正相反，电泳时，电泳仪与电泳槽间正、负极不能接错。

(2) 盐离子对酸性尿素聚丙烯酰胺凝胶电泳的影响很大。为防止电泳后区带拖尾甚至变形，样品中盐离子强度应尽量低，含盐量高的样品可用透析法或凝胶过滤法脱盐。

第 2 节 质粒 DNA 的制备

(一) 概述

质粒 (plasmid) 是一种双链共价闭合的环状 DNA，是染色体以外稳定的遗传因子。在细菌、放线菌、真菌以及一些动植物细胞中都发现有质粒，其中细菌质粒存在最为普遍，研究得较为深入，是基因工程中常用的基因载体。已经提出过许多方法用于从细菌中提纯质粒 DNA，这些方法都包含以下 3 个步骤：①细菌培养物的