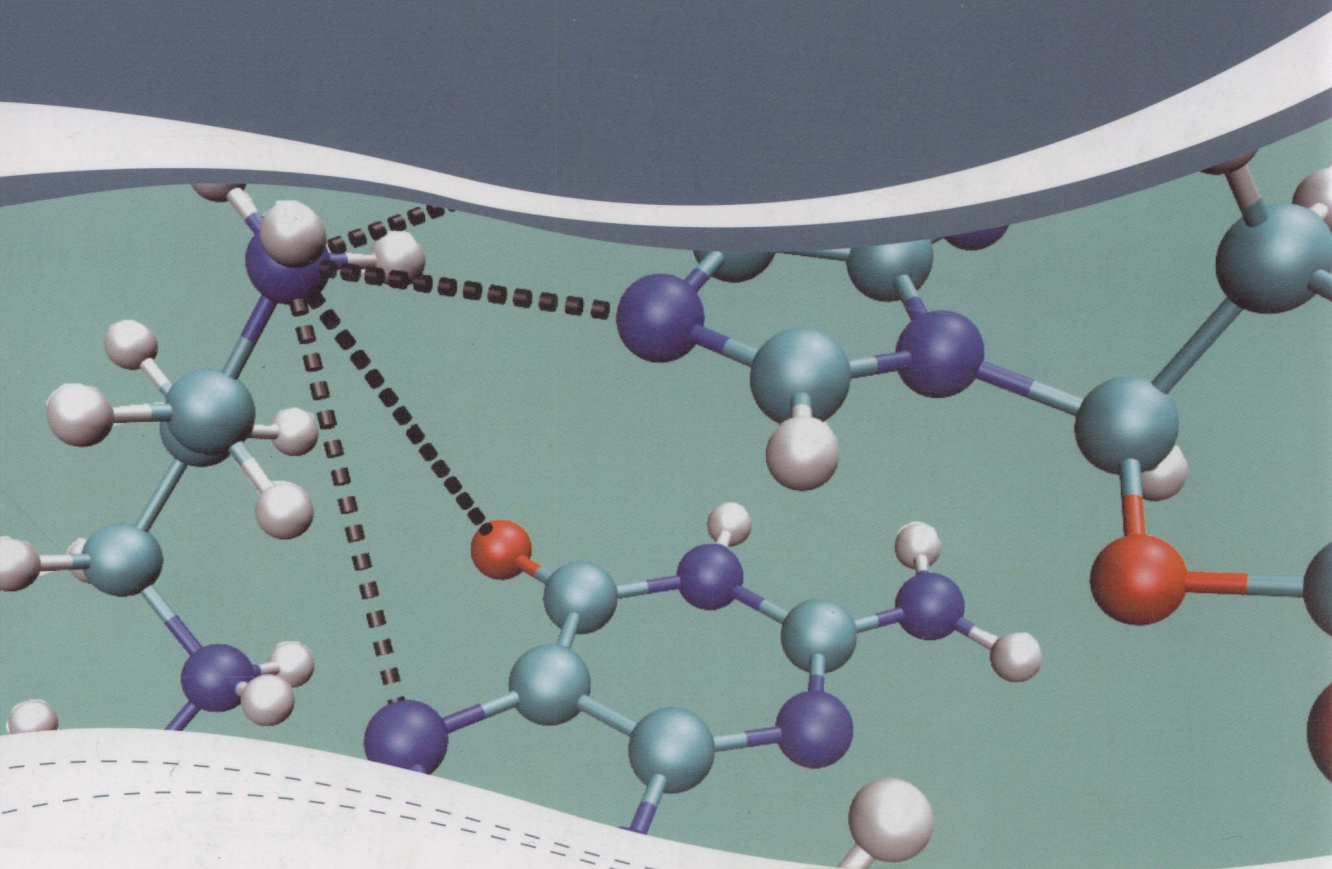


高等农林院校基础生物学系列实验教材

分子生物学 实验教程

主编 薛仁镐 盖树鹏

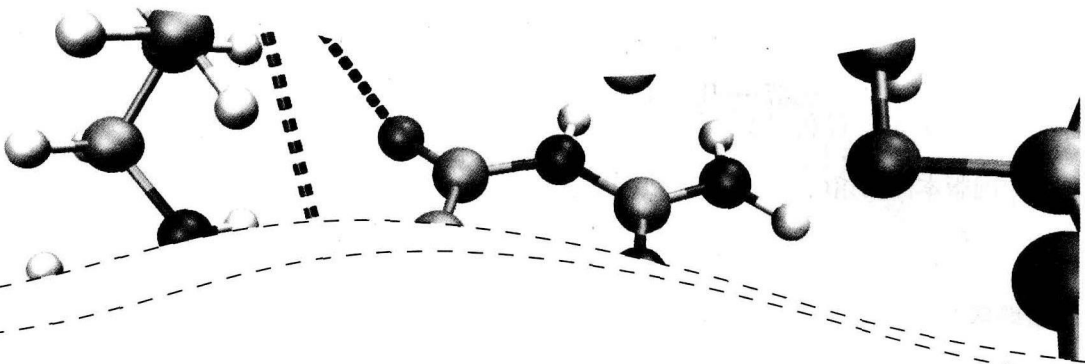


 高等教育出版社
HIGHER EDUCATION PRESS

高等农林院校基础生物学系列实验教材

分子生物学实验教程

Fenzi Shengwuxue Shiyān Jiāochéng



主 编 薛仁镐 盖树鹏
副主编 全先庆 蔡春梅 赵春梅 赵美爱

编 者 (以姓氏笔画为序)

王晓杰	王爱华	王晶珊	乔利仙
全先庆	孙世孟	杨国锋	赵春梅
赵美爱	徐丽娟	郭宝太	盖树鹏
隋炯明	蔡春梅	樊连梅	薛仁镐
穆 平			



高等教育出版社·北京
HIGHER EDUCATION PRESS BEIJING

■ 内容提要

本书是一本简明而实用的分子生物学实验教材。全书共分为三部分。第一部分是基础性实验,主要介绍质粒 DNA 提取等分子生物学基本实验方法,以培养学生的基本实验操作技能;第二部分是综合性实验,主要介绍基因表达分析、植物遗传转化技术、生物大分子印迹技术等,以提高学生综合分析问题的能力;第三部分是研究性实验,针对科研中可能会遇到的一些实际问题,提出实验目的和要求,提供实验材料,让学生独立探索完成实验,以激发学生的科研兴趣,培养学生的独立思考能力,提高综合素质。

本书可作为高等院校生物、农林相关专业本科生的分子生物学实验教材,也可作为相关研究人员和中学生物教师的参考书。

图书在版编目(CIP)数据

分子生物学实验教程 / 薛仁镐, 盖树鹏主编. -- 北京: 高等教育出版社, 2011.1
ISBN 978-7-04-031357-4

I. ①分… II. ①薛… III. ①分子生物学-实验-高等学校-教材 IV. ①Q7-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2011)第002115号

策划编辑 吴雪梅 李光跃 责任编辑 高新景 封面设计 张志奇 责任印制 张福涛

出版发行 高等教育出版社
社 址 北京市西城区德外大街4号
邮政编码 100120

购书热线 010-58581118
咨询电话 400-810-0598
网 址 <http://www.hep.edu.cn>
<http://www.hep.com.cn>

经 销 蓝色畅想图书发行有限公司
印 刷 北京七色印务有限公司

网上订购 <http://www.landaco.com>
<http://www.landaco.com.cn>
畅想教育 <http://www.widedu.com>

开 本 787×1092 1/16
印 张 5
字 数 120 000

版 次 2011年1月第1版
印 次 2011年1月第1次印刷
定 价 9.80元

本书如有缺页、倒页、脱页等质量问题,请到所购图书销售部门联系调换。

版权所有 侵权必究

物料号 31357-00

► 前 言

分子生物学是一门实践性很强的学科,通过实验训练可以提高学生的科研素质、分析问题及解决问题的能力。分子生物学实验已成为高等院校生物、农林各专业学生的重要课程。掌握分子生物学实验技术是从分子水平上揭示生命奥秘的必要条件。

本书是针对高等农林、师范类院校本科教学中开设的分子生物学实验课程,结合编者多年的分子生物学教学和科研经验编写而成。

本书的特点之一是编入常用而基本的分子生物学实验技术,内容包括质粒 DNA 的提取、酶切、连接、感受态细胞制备、遗传转化、基因表达、生物大分子杂交技术等。特点之二是由多年来从事分子生物学教学和科研的一线老师在不断总结经验的基础上,使内容不断完善,使实验操作更加简明而实用;而且在每一个实验里详细列出所需材料、试剂及仪器,学生可独立地进行试剂的配制和实验。特点之三是系统性较好,实验内容包括从 DNA 水平上的操作到基因表达分析;从植物遗传转化到分子鉴定等。全书共分为三部分:第一部分是基础性实验,主要介绍质粒 DNA 提取等分子生物学基本实验方法;第二部分是综合性实验,主要介绍基因表达分析、植物遗传转化技术、生物大分子印迹技术等;第三部分是研究性实验,主要是给学生提供一个独立探索完成实验的机会,以发挥学生的科研潜能,提高学生的独立思考能力,提高综合素质。

在本书编写过程中,中国科学院遗传与发育生物学研究所朱保葛老师审阅了全书,提出了许多宝贵的意见,在此表示感谢。

由于编者水平有限,书中难免有不足之处,敬请读者批评指正。

编 者

2010 年 10 月

目 录

第一部分 基础性实验

实验 1 细菌质粒 DNA 的提取	2
实验 2 质粒 DNA 的限制性核酸内切酶酶切	5
实验 3 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA	7
实验 4 琼脂糖凝胶中 DNA 片段的回收	10
实验 5 DNA 的连接	12
实验 6 大肠杆菌感受态细胞的制备及转化	14
实验 7 目的基因的 PCR 扩增	17
实验 8 PCR 产物的 T - A 克隆	20

第二部分 综合性实验

实验 9 外源基因在大肠杆菌中的诱导表达	24
实验 10 融合蛋白质的分离、纯化及检测	27
实验 11 利用酵母双杂交系统研究蛋白质的相互作用	30
实验 12 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测 DNA	34
实验 13 真核生物基因组 DNA 的提取	38
实验 14 植物总 RNA 的提取	40
实验 15 农杆菌介导的植物遗传转化	43
实验 16 基因枪转化法	47
实验 17 转基因植物的筛选与鉴定	51
实验 18 Southern 杂交	56
实验 19 Northern 杂交	59
实验 20 Western 杂交	62

第三部分 研究性实验

实验 21	目的基因的亚克隆	66
实验 22	重组子的筛选与鉴定	67
实验 23	SSR 标记检测玉米杂交种郑单 958 的纯度	69
实验 24	利用 PCR 技术定点突变	71
实验 25	农杆菌介导的烟草遗传转化体系的优化	72
参考文献		73

第一部分

基础性实验



实验 I

细菌质粒 DNA 的提取

一、实验目的

1. 掌握碱裂解法提取质粒 DNA 的基本原理和实验技术。
2. 熟悉分子生物学实验常用仪器。

二、实验原理

碱裂解法提取质粒 DNA 是基于染色体 DNA 与质粒 DNA 变性与复性的差异。当细胞在 NaOH 和 SDS 溶液中裂解时,细菌的线性染色体 DNA 变性,而共价闭合环状质粒 DNA 的两条链并不相互分开;加入醋酸钾中和后,线状染色体 DNA 片段因与变性的蛋白质和细胞碎片缠绕在一起而难以复性,变性的质粒 DNA 则恢复原来的构象,留在上清液中,再经酚/氯仿抽提、乙醇沉淀等步骤可获得质粒 DNA。

质粒 DNA 的存在形式有 3 种:①共价闭环 DNA:常以超螺旋形式存在;②开环 DNA:质粒 DNA 两条链中有一条发生一处或多处断裂;③线性 DNA:因质粒 DNA 的两条链在同一处断裂而形成。电泳时,同一质粒 DNA 的存在形式不同,其泳动速度存在差异:超螺旋 > 线性 > 开环。

三、材料、试剂及仪器

1. 材料

含 pUC18 质粒的大肠杆菌 DH5 α 或 JM109 菌株。

2. 试剂

(1) LB 液体培养基

称取胰蛋白胨 3.0 g、酵母提取物 1.5 g、NaCl 3.0 g,加蒸馏水 200 mL 溶解,用 5 mol/L NaOH 调至 pH 7.0,定容至 300 mL,转移至三角烧瓶中,121 $^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 20 min。

(2) 10 mg/mL 氨苄青霉素(Amp)溶液

在无菌条件下配制, -20 $^{\circ}\text{C}$ 贮存备用。

(3) 含 Amp 的 LB 固体培养基

在高压灭菌前,在每 100 mL LB 培养液中加入 1.5 g 琼脂;121 $^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 20 min;溶液尚未完全冷却时,取出培养瓶,轻轻摇动以使琼脂均匀分布于整个培养基中。

等培养基降至 50 $^{\circ}\text{C}$ (用手背碰一下瓶壁不烫手)时,方可加入 Amp 溶液,每 100 mL 培养基加 10 mg/mL Amp 溶液 1 mL,使其终浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$,然后在超净台上铺平板,直径

90 mm 的培养皿约需 25 mL 培养基。

(4) Tris - HCl 饱和酚(pH 8.0)

由于酚重蒸和平衡费时,操作有一定危险,因此也可直接从试剂公司购买 Tris - HCl 饱和重蒸酚。

(5) 溶液 I

含 50 mmol/L 葡萄糖、10 mmol/L EDTA - Na₂ 和 25 mmol/L Tris - HCl(pH 8.0)。

(6) 溶液 II (新鲜配制)

含 200 mmol/L NaOH、1 % SDS。由新配制的 400 mmol/L NaOH 和 2 % SDS 等体积混合而成。

(7) 溶液 III

5 mol/L 醋酸钾溶液 60 mL(称取 29.4 g 醋酸钾,定容至 60 mL)、冰醋酸 11.5 mL 和双蒸水 28.5 mL 混合而成。

(8) 10 mg/mL RNase A 溶液

称取 0.5 g RNase A,加入 40 mL 灭菌水,充分混合溶解之后定容至 50 mL,100 °C 煮沸 15 min,缓慢冷却至室温,小份分装(每管 1 mL)后,置于 -20 °C 保存。

(9) TE 缓冲液(pH 8.0)

含 10 mmol/L Tris - HCl(pH 8.0),1 mmol/L EDTA - Na₂(pH 8.0),121 °C 高压灭菌,4 °C 贮存。

3. 仪器

超净工作台,台式离心机,恒温水浴锅,微量移液器,电子天平,高压灭菌锅,冰箱,制冰机,恒温摇床,电热恒温培养箱。

四、操作步骤

1. 用接种环挑取冷冻保存的含质粒 DNA 的大肠杆菌,划线接种于含有 Amp 的 LB 固体培养基平板上,37 °C 倒置培养过夜。

2. 用接种环或消毒牙签挑取单菌落于盛有 2 mL LB 液体培养基(含 100 µg/mL Amp)的试管中,37 °C 摇荡培养过夜。

3. 将菌液收集在 1.5 mL 的 EP(eppendorf)管中,10 000 r/min 离心 2 min,弃上清,将离心管倒置于一纸巾上,使所有液体流出。

4. 在沉淀中加入溶液 I 100 µL,涡旋混匀。

5. 加入新鲜配制的溶液 II 200 µL,颠倒数次,轻轻混匀(溶液变透明,黏稠)。

6. 加入溶液 III 150 µL,颠倒混匀,冰浴 5 ~ 10 min(溶液出现白色沉淀)。

7. 12 000 r/min 离心 5 min,将上清转移至另一 EP 管中。

8. 加等体积酚:氯仿:异戊醇[25:24:1(V/V/V)]抽提 1 次,12 000 r/min 离心 2 min,将上层水相转移至另一 EP 管。

9. 加入两倍体积无水乙醇振荡混匀,于室温放置 2 min 沉淀 DNA。12 000 r/min 离心 5 min,弃乙醇。

10. 用 70 % 乙醇洗涤沉淀, 12 000 r/min 离心 5 min, 弃乙醇, 将离心管倒置于一纸巾上, 室温下静置使乙醇挥发或真空干燥。

11. 用 20 μ L 含 RNase A 的 TE 缓冲液溶解 DNA, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

五、思考题

1. 溶液 II、III 的作用各是什么?
2. 乙醇沉淀 DNA 利用了核酸的什么性质?

实验 2

质粒 DNA 的限制性核酸内切酶酶切

一、实验目的

1. 掌握用限制性核酸内切酶(*EcoR* I)酶切质粒 DNA。
2. 熟悉 II 型限制性核酸内切酶的功能、作用特点和用途。

二、实验原理

限制性核酸内切酶是一类能够识别双链 DNA 分子中特定的核苷酸序列,并在该特定定位点切割 DNA 双链的核酸内切酶,可分为 I 型、II 型和 III 型三类,其中 II 型限制性核酸内切酶可识别并切割某一特异的核苷酸序列,因而在分子克隆中得到了广泛应用,它们是 DNA 重组的基础。绝大多数 II 型限制酶识别长度为 4 至 6 个核苷酸的回文对称特异核苷酸序列(如 *EcoR* I 识别 6 个核苷酸序列:5' - G↓AATTC - 3')。II 型限制性核酸内切酶的切割位点在识别序列中,有的在对称轴处切割,产生平末端 DNA 片段(如 *Sma* I;5' - CCC↓GGG - 3'),有的切割位点在对称轴一侧,产生带有单链突出末端的 DNA 片段,称黏性末端,如 *EcoR* I 切割识别序列后,产生两个互补的黏性末端。

三、材料、试剂及仪器

1. 材料

限制性核酸内切酶(*EcoR* I)及其缓冲液。

2. 仪器

高压灭菌锅,恒温水浴锅,电子天平,微量移液器等。

四、操作步骤

1. 将实验 1 中得到的质粒 DNA 从冰箱中取出,在冰上自然溶解。
2. 酶切前先确定待切样品的浓度,并选择合适的限制性核酸内切酶和配套的缓冲液(buffer)。
3. 在 0.5 mL EP 管中依次加入以下组分:

缓冲液	4 μ L
质粒 DNA	2 μ L
<i>EcoR</i> I	1 μ L



灭菌双蒸水 13 μL

4. 混匀样品并短暂离心,使样品沉于管底,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 2 h。
5. 取出放于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

五、思考题

1. 在酶切实验中,用单酶切与双酶切所得的酶切片段有何区别?
2. 在酶切反应体系中,限制性核酸内切酶的体积不要超过反应液总体积的十分之一,为什么?



实验 3

琼脂糖凝胶电泳检测 DNA

一、实验目的

- 1. 掌握电泳仪的使用方法和凝胶制备技术。
- 2. 掌握凝胶成像系统的使用和实验结果的分析方法。

二、实验原理

琼脂糖凝胶电泳是分离、鉴定和纯化 DNA 片段的标准方法。不同大小的核酸分子由于受到来自电场的驱动力和凝胶分子筛网孔的阻力差异而具有不同的迁移率,通过琼脂糖凝胶电泳可将不同大小和构象的核酸分子分离。

琼脂糖凝胶可以制成各种形状、大小和孔隙度。琼脂糖凝胶分离 DNA 片段大小范围较广,不同浓度的琼脂糖凝胶可分离长度从 200 bp 至近 50 kb 的 DNA 片段。琼脂糖凝胶通常用水平装置在强度和方向恒定的电场下电泳。而聚丙烯酰胺凝胶分离小片段 DNA(5 ~ 500 bp)效果较好,分辨力极高,甚至相差 1 bp 的 DNA 片段也能分开。聚丙烯酰胺凝胶电泳很快,可容纳相对大量的 DNA,但制备和操作比琼脂糖凝胶困难。聚丙烯酰胺凝胶采用垂直装置进行电泳。目前,一般实验室多用琼脂糖凝胶水平平板电泳装置进行 DNA 电泳。

琼脂糖凝胶在 DNA 电泳中主要作为一种固体支持基质,基质的密度取决于琼脂糖的浓度。在电场中,中性 pH 条件下带负电荷的 DNA 向阳极迁移,其迁移速率由下列多种因素决定:

1. DNA 分子大小

线状双链 DNA 分子在一定浓度的琼脂糖凝胶中的迁移速率与 DNA 相对分子质量对数成反比,分子越大则所受阻力越大,也越难于在凝胶孔隙中爬行,因而迁移得越慢。

2. 琼脂糖浓度

一个给定大小的线状 DNA 分子的迁移速度在不同浓度的琼脂糖凝胶中各不相同。DNA 电泳迁移率的对数与凝胶浓度呈线性关系。凝胶浓度的选择取决于 DNA 分子的大小。分离小于 0.5 kb 的 DNA 片段所需胶浓度是 1.2 % ~ 1.5 %,分离大于 10 kb 的 DNA 分子所需胶浓度为 0.3 % ~ 0.7 %,DNA 片段大小介于两者之间时,所需凝胶浓度为 0.8 % ~ 1.0 % (表 3-1)。

表 3-1 分离线状 DNA 分子的有效范围与琼脂糖凝胶浓度的关系

琼脂糖凝胶浓度/%	分离线状 DNA 分子的有效范围/kb
0.3	60 ~ 5
0.6	20 ~ 1
0.7	10 ~ 0.8

续表

琼脂糖凝胶浓度/%	分离线状 DNA 分子的有效范围/kb
0.9	7 ~ 0.5
1.2	6 ~ 0.4
1.5	4 ~ 0.2
2.0	3 ~ 0.1

3. DNA 分子构象

DNA 分子在电场中的迁移率不仅和相对分子质量有关,还与其自身构象有关。相同相对分子质量的线状、开环和超螺旋 DNA 在琼脂糖凝胶中移动速度是不一样的,超螺旋 DNA 移动最快,线状双链 DNA 移动最慢。

在凝胶中需加入少量溴化乙锭(ethidium bromide, EB), EB 分子可插入 DNA 的碱基之间,形成一种光络合物,在 254 ~ 365 nm 波长紫外光照射下,呈现橘红色的荧光,因此可对分离的 DNA 进行检测。在紫外光下,可以检出 1 ~ 10 ng 的 DNA 条带,从而可以确定 DNA 片段在凝胶中的位置。此外,还可以从电泳后的凝胶中回收特定的 DNA 片段,用于以后的克隆操作。

电泳时以溴酚蓝及二甲苯氰(蓝)作为双色电泳指示剂,即上样缓冲液(loading buffer)。目的是:①增大样品密度,确保 DNA 均匀进入样品孔内;②使样品呈现颜色,了解样品泳动情况,使操作更为便利;③以 0.5 × TBE 做电泳缓冲液时,溴酚蓝的泳动率约与长 300 bp 的双链 DNA 相同,二甲苯氰(蓝)则与 4 kb 的 DNA 相同。

三、材料、试剂及仪器

1. 试剂

琼脂糖, EB (5 mg/mL, 避光保存), Tris 碱, 硼酸, 盐酸, EDTA, DNA Marker, 上样缓冲液 (10 × loading buffer), 50 × TAE 缓冲液 [2 mol/L Tris - 乙酸, 0.05 mol/L EDTA (pH 8.0)]。

50 × TAE 缓冲液的配制方法 (1 000 mL): Tris 242 g, 冰醋酸 57.1 mL, 0.5 mol/L EDTA 100 mL, 加入 600 mL 去离子水后搅拌溶解, 将溶液定容至 1 L。

2. 仪器

核酸电泳仪, 电泳槽, 制胶板, 点样梳, 电子天平, 微量移液器, 冰箱, 凝胶成像系统。

四、操作步骤

1. 用蒸馏水将制胶板和点样梳冲洗干净, 架好点样梳。
2. 称取 1 g 琼脂糖, 加入 100 mL 1 × TAE 缓冲液 (琼脂糖和缓冲液的量可根据情况增减)。
3. 把盛有琼脂糖的三角烧瓶放到微波炉中加热至琼脂糖溶解。
4. 当琼脂糖溶液冷却至 65 °C 时, 加入 EB 至溶液终浓度为 0.5 μg/mL。
5. 将琼脂糖溶液倒入制胶板。待凝胶凝聚后, 小心拔去点样梳, 将支架放入装有电泳

缓冲液电泳槽中,电泳缓冲液以没过胶面 1 mm 为宜。

6. 分别取 DNA Marker、酶切片段 5 ~ 10 μL , 分别滴加适量上样缓冲液, 混匀, 用微量移液器加入样品孔。

7. 接通电源, 开始电泳。电压为 10 V/cm, 当溴酚蓝迁移到距离凝胶前沿约 1 cm 处时 (一般 60 ~ 100 V 电压, 电泳 20 ~ 40 min 即可)。

8. 电泳完毕, 关上电源, 在凝胶成像仪上观察电泳条带及其位置, 并与核酸相对分子质量标准 Marker 比较 DNA 大小, 拍照。

注意: EB 是一种强致突变剂, 在操作和配制时应戴手套。含 EB 的溶液不能直接倒入下水道, 应进行如下处理。

方法 I :

- (1) 每 100 mL 溶液中加入 2.9 g 非离子型多聚吸附剂 Amberlite XAD - 16;
- (2) 室温下放置 12 h, 不时摇动;
- (3) 用新华 1 号滤纸过滤, 弃滤液;
- (4) 用塑料袋封装滤纸和 Amberlite 树脂, 作为有害废物丢弃。

方法 II :

- (1) 每 100 mL 溶液中加入 100 mg 粉状活性炭;
- (2) 室温条件下放置 1 h, 不时摇动;
- (3) 用新华 1 号滤纸过滤, 弃滤液;
- (4) 用塑料袋封装滤纸和活性炭, 作为有害废物丢弃。

溴化乙锭在 260 $^{\circ}\text{C}$ 分解, 在标准条件下进行焚化后不会有危险性; Amberlite XAD - 16 或活性炭可用于净化被 EB 污染的物体表面。

五、思考题

1. 琼脂糖凝胶电泳是利用了核酸的什么性质?
2. 琼脂糖凝胶电泳中 DNA Marker 的作用是什么?

实验 4

琼脂糖凝胶中 DNA 片段的回收

一、实验目的

掌握从琼脂糖凝胶中回收纯化 DNA 片段的技术。

二、实验原理

DNA 片段的分离与回收是一项重要的分子生物学技术。DNA 回收纯化的主要目的是得到纯的目的 DNA 片段,去除影响 DNA 连接酶活性的物质以及其他的 DNA 片段。DNA 回收和纯化的常用方法有压碎法、低熔点琼脂糖法、冻融法等,也有 DNA 回收试剂盒可以选用。

DNA 回收试剂盒纯化 DNA 的原理:采用独特的缓冲液系统,DNA 片段被选择性地吸附于离心柱内的硅基质膜上,再通过一系列快速的漂洗-离心步骤,去除蛋白液和漂洗液,将核苷酸、蛋白酶等杂质去除,最后用低盐、高 pH 的洗脱缓冲液将纯净的 DNA 从硅基质膜上洗脱。

三、材料、试剂及仪器

1. 试剂

Tris-HCl 饱和酚,3 mol/L NaAc(pH 5.2)。

2. 仪器

台式离心机,恒温水浴锅,微量移液器,-70℃冰柜,制冰机,紫外透射仪。

四、操作步骤

1. 冻融法

(1) 在 UV 灯下,用手术刀片将含 DNA 片段的琼脂糖凝胶切下,-70℃冷冻至少 15 min,然后在 65℃水浴中使胶熔化。

(2) 加入等体积 Tris-HCl 饱和酚,剧烈振荡 30 s,然后 -70℃冷冻 15 min。

(3) 室温融化后,12 000 r/min 离心 5 min,将上层水相移至另一离心管中,用 2.5 倍体积乙醇和 0.1 倍体积 3 mol/L NaAc(pH 5.2)沉淀 DNA 片段,离心后的沉淀用 75%乙醇漂洗一次,室温干燥 DNA,用双蒸水或 TE 缓冲液溶解 DNA 后,-20℃保存备用。

2. 使用 DNA 回收试剂盒(离心柱法)

(1) 琼脂糖电泳后,用手术刀片将特异电泳带切下放入 EP 管中,称琼脂糖凝胶的重量。

(2) 按照每 100 mg 凝胶加 400 μL 的量加入 binding buffer(结合缓冲液),放入 EP 管振荡器中,45 ~ 55 $^{\circ}\text{C}$ 温育振荡,直到所有的琼脂糖都溶解(约需 5 min)。

(3) 取出纯化柱,将上述溶解液转移至柱中,室温下放置 2 min,8 000 r/min 离心 1 min,弃 EP 管中的液体,将纯化柱放回 EP 管中。

(4) 加 500 μL 的 washing buffer(洗涤缓冲液)至柱中,8 000 r/min 离心 1 min,弃管中的液体。

(5) 重复操作(4)步的操作 1 次,最后将纯化柱放入 EP 管中 10 000 r/min 离心 30 s,除去痕量的 washing buffer(洗涤缓冲液)。

(6) 将纯化柱放入一个新的 EP 管。加 30 ~ 40 μL H_2O 或者 elution buffer(洗脱缓冲液)至纯化柱膜的中央,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 或 50 $^{\circ}\text{C}$ 下放置 2 min,10 000 r/min 离心 1 min 洗脱 DNA,将 EP 管中的 DNA 溶液置 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

五、思考题

为什么切胶时应尽量缩短紫外光照射的时间?