本学期所做实验：

实验一、  大肠杆菌感受态细胞的制备，质粒的转化

实验二、  质粒小量提取，电泳检测质粒条带

实验三、  质粒DNA的酶切鉴定，电泳检测

实验四、  DNA目的片段回收及定量，DNA重组（连接反应）

实验五、  大肠杆菌感受态细胞的制备、重组质粒的转化

实验六、  重组克隆的鉴定（菌落PCR检测），接种培养

实验七、  质粒小量提取，酶切鉴定，表达质粒的转化

实验八、  外源基因在大肠杆菌中的诱导表达

实验九、  蛋白质的小量纯化

实验十、  SDS-PAGE

考试形式：每个同学按学号单独考试，抽签题目（1+2），口述回答问题，由老师和助教评分。

考试内容：

  1、实验原理步骤：分子克隆总流程+10次实验原理步骤（共11个题，抽其中1题详细回答）

  2、实验理论、知识、技巧：实验中的各种小窍门，注意事项，理论知识，操作要点等。（抽其中2题简要回答）

简述基因的克隆和表达的步骤

1）获得目的基因和质粒载体；

2）形成重组质粒；

3）制备感受态细胞，用重组质粒转化大肠杆菌细胞；

4）培养大肠杆菌，让重组质粒及外源目的基因形成大量拷贝；

5）筛选含重组质粒的大肠杆菌细胞，进行检查或鉴定；

6）表达目的蛋白。

实验一：质粒DNA的提取及鉴定

1.分子生物学实验常用载体有哪些?它们的特点是什么?

常用载体：大肠杆菌中的质粒、λ噬菌体、M13噬菌体、噬菌粒、酵母人工染色体载体、动植物病毒载体。

特点：具有复制子（一段具特殊结构的DNA序列，使与之结合的外源基因复制）、可检测的遗传表型、限制性内切酶单一识别位点（便于外源基因插入）、适合的拷贝数（有利于载体制备；使细胞中克隆基因的剂量增加）

2.分离基因组DNA和质粒DNA有哪些异同点？

相同：提取的步骤基本上都属DNA的提取步骤，包括细胞裂解，DNA释放，纯化，最后沉淀溶解。

不同：质粒提取过程中，有一个DNA变性、复性的过程，这个与基因组提取完全不同，这是利用质粒是以超螺旋结构存在于大肠杆菌中的特殊状态，分离纯化质粒时总是会利用这个特点来分离基因组DNA与质粒DNA。

3.核酸分离过程中，酚、氯仿、异戊醇的作用是什么？

1）酚、氯仿作用是变性蛋白质。

酞与氯仿是非极性分子，水是极性分子，当蛋白水溶液与酚或氯仿混合时，蛋白质分子之间的水分子就被酚或氯仿挤去，使蛋白失去水合状态而变性。经过离心，变性蛋白质的密度比水的密度为大，因而与水相分离，沉淀在水相下面，从而与溶解在水相中的DNA分开。而酚与氯仿有机溶剂比重更大，保留在最下层。作为表面变性的酚与氯仿，在去除蛋白质的作用中，各有利弊，酚的变性作用大，但酚与水相有一定程度的互溶，大约10％～15％的水溶解在酚相中，因而损失了这部分水相中的DNA，而氯仿的变性作用不如酚效果好，但氯仿与水不相混溶，不会带走DNA。所以在抽提过程中，混合使用酚与氯仿效果最好。经酚第一次抽提后的水相中有残留的酚，由于酚与氯仿是互溶的，可用氯仿第二次变性蛋白质，此时一起将酚带走。也可以在第二次抽提时，将酚与氯仿混合（1:1）使用。

2）异戊醇是消泡剂。同时可以增大比重。

在抽提DNA时，为了混合均匀，必须剧烈振荡容器数次，这时在混合液内易产生气泡，气泡会阻止相互间的充分作用。加入异戊醇能降低分子表面张力，所以能减少抽提过程中的泡沫产生。一般采用氯仿与异戊酵为24：1之比。也可采用酚、氯仿与异戊醇之比为25：24:1（不必先配制，可在临用前把一份酚加一份24：1的氯仿与异戊醇即成），同时异戊醇有助于分相，使离心后的上层水相，中层变性蛋白相以及下层有机溶剂相维持稳定。

4.在TE缓冲液中为什么要加入EDTA？

EDTA是为了螯合Mg2+、Ca2+等金属离子，抑制Dnase

5.纯化的核酸如有酚和蛋白质的污染，对它的后期操作有何影响？

DNA制品中的蛋白质、酚污染会降低内切酶的活性，影响酶切效果。（好像还有什么的，想不起来了）

6.有哪些因素影响核酸的沉淀？

溶液pH值，温度，盐浓度，乙醇含量

7. 提质粒时，溶液2为什么现配现用？

溶液2中的主要成分是NaOH和SDS 。NaOH是裂解细胞膜的主要成分，长时间与空气接触会吸收二氧化碳，导致碱性下降，不利于破碎细胞，影响质粒的产量。

8. 加入溶液3后产生的白色沉淀成分是什么？

钾离子置换了SDS中的钠离子形成了不溶性的PDS。SDS专门和蛋白质结合，平均两个氨基酸上结合一个SDS分子，钾钠离子置换所产生的大量沉淀自然就将绝大部分蛋白质沉淀了，大肠杆菌的基因组DNA也一起被共沉淀了。

9. 为什么用TE缓冲液悬浮和保存质粒更好？

TE是Tris-HCl和EDTA的简称。在后续对质粒的操作中,不同的酶对辅助因子的种类及数量要求不同,有的要求高离子浓度,有的则要求低盐浓度,其他缓冲液系统（如磷酸盐缓冲系统（pKa=7.2）和硼酸系统(pKa=9.24)等）虽然也都符合细胞内环境的生理范围,可作DNA的保存液,但在转化实验时,磷酸根离子的种类及数量将与Ca2+产生Ca3(PO4)2沉淀。而Tris-HCL(pKa=8.0)缓冲系统使用缓冲对是TrisH+/Tris,不存在金属离子的干扰作用,故在提取或保存DNA时,大都采用Tris-HCL系统,而TE缓冲液中的 EDTA更能稳定DNA的活性。不存在金属离子，不产生干扰作用

10. 碱裂解法的原理和步骤（步骤见ppt）

原理：根据共价闭合环状质粒DNA和线性染色体DNA在拓扑学上的差异来分离质粒DNA。

在pH12.0-12.5，线性的DNA双螺旋结构解开而被变性，尽管在这样的条件下，质粒DNA的氢键断裂，但两条互补链仍紧密结合。

当加入pH4.8的KAc高盐缓冲液中和pH至中性时，共价闭合环状的质粒DNA复性迅速而准确，而线性的染色体DNA的两条互补链彼此已完全分开，复性慢，缠绕形成网状结构。通过离心，染色体DNA与RNA、蛋白质-SDS复合物等一起絮状沉淀下来而被除去。

11.酚抽提的酚的两个作用

使蛋白质变性沉降、抑制DNase活性

实验二、质粒DNA的酶切鉴定及电泳检测

1.  对核酸进行限制性酶切时应注意什么？

保证样品纯度（DNA制品中的污染蛋白质、酚、氯仿、乙醇、EDTA、SDS等会影响内切酶活性）对于酶切条件的控制（合适的酶反应体积、酶作用单位、反应时间）

2. 如何提高核酸电泳的分辨率？

主要的是加大琼脂糖凝胶的密度，还可以降低跑电泳的电压，增大跑电泳的时间等.

实验三、DNA片段的回收及连接反应

1. 单酶切重组DNA有哪些弊端，如何避免？

弊端: 末端相同，可能发生自连，产生大量无效连接产物；插入片段没有方向性

避免方法：使用双酶切；若用单酶切，可以将载体5’末端去磷酸化，并提高插入片段与载体的浓度比。

2. 在不计算DNA片段浓度的情况下，如何快速简便的估算连接片段的比例？

3. DNA连接反应的原理步骤、两种常用的筛选方法（见ppt）

4. 质粒重组的影响因素？

反应温度；连接酶的用量；DNA末端的性质；DNA浓度及两种DNA分子数的比例

5. 连接时目的基因和载体的最佳摩尔比

最佳比例是由构造及末端的类型决定的，一般需要较高的插入片段与载体的摩尔比例，如2：1 甚至5：1。

6. DNA回收照胶紫外线使用短波还是长波？

应使用长波紫外灯。因为短波紫外线（254nm）会引起DNA链断裂，或是造成基因突变。

7. DNA连接反应的原理步骤

8. 乙醇中为什么不加盐？

参考答案：洗的时候不加盐是为了除盐，做乙醇沉淀时加盐是因为单价阳离子有利于聚沉DNA

9．DNA连接酶两个主要特点是什么；

催化DNA 5’磷酸基与3’羟基之间（切口）形成磷酸二酯键；DNA连接酶只能作用于双链DNA分子而不能将二个单链DNA分子连接（这个算不算？）。

10．连接反应体系的加样顺序是什么

ddH2O,10×T4缓冲液,DNA片段,最后加T4DNA连接酶

11.在设计酶切和连接的时候，应该特别注意什么？

 阅读框的保证

实验四、感受态细胞的制备与重组DNA的转化

1. 如阴性对照中长出菌，可能原因是什么？

污染……

2. 菌的密度过高或培养时间过长时，会在阳性菌的周围长出一些小的卫星菌落，它们是非Kan抗性的，试分析原因。

阳性菌能编码一种周质酶（β-内酰胺酶）可特异地切割Amp的β-内酰胺环，从而使其失去杀菌能力。培养时间过长，β-内酰胺酶使周围抗生素的降解，使得不带抗性的菌也能生长，形成卫星菌落。

3.制作感受态细胞中最关键的操作？

4. 重组子两种常用的筛选方法

抗生素筛选法：

    菌株为某种抗性缺陷型，而质粒上带有该抗性基因（如氨苄青霉素（Ampr）抗性基因编码一种周质酶（β-内酰胺酶）可特异地切割Amp的β-内酰胺环，从而使其失去杀菌能力。）这样只有转化子才能在含该抗生素的培养基上长出。

互补法：

    又称蓝白斑筛选法，质粒上LacZ′基因编码的α肽链与受体菌中编码的β半乳糖苷酶C端突变体互补，形成有功能的β半乳糖苷酶，在特定培养基上显蓝斑，这种现象称为α互补。如果有外源DNA片段插入质粒上的LacZ′基因中，则β半乳糖苷酶失活，显白斑。

6.影响转化效率的因素

细菌的生长状态：大肠杆菌在对数中期易产生感受态（OD值：0.3－0.5 (5X107个/ml)）；试剂的质量；化合物及无机离子（Rb+、Mn+、二甲亚砜等）；质粒：大小、构型；外源DNA（质粒）与细胞的比例；器皿的洁净度；污染（尽量所有打开器皿盖的操作都在超净台中进行）

7.转化效率计算

转化效率(每微克质粒DNA的转化子数)＝转化子总数(个转化子)/加入质粒DNA的量(μg)

转化子总数＝菌落数×（转化反应原液总体积/涂板菌液体积）

8.简述蓝白斑检测原理

 质粒上LacZ′基因编码的α肽链与受体菌中编码的β半乳糖苷酶C端突变体互补，形成有功能的β半乳糖苷酶，在特定培养基上显蓝斑，这种现象称为α互补。如果有外源DNA片段插入质粒上的LacZ′基因中，则β半乳糖苷酶失活，显白斑。

实验五、重组克隆的鉴定（菌落PCR检测），接种培养

1.PCR变性，退火，延伸温度

 （95℃      预变性   5  min）

    94 ℃     变性       45 sec

    50 ℃     退火       45 sec

    72 ℃     延伸       45 sec

2．怎么计算PCR退火温度  Tm-5

3. PCR中如果出现非特异的条带，可能是哪些方面出现问题，应该如何调整？

4. 减少错掺的对策：

加入Taq酶后迅速反应，避免低温下进行的链延伸；酶浓度不可过大；dNTP 不可过浓；Mg2+浓度适中

实验六、重组克隆子的酶切鉴定

1. 比较菌落PCR 和提质粒酶切这两种方法的优缺点，为什么需要两次鉴定？

菌落PCR 快，灵敏，但是易出现假阳性，一般做初筛；提质粒酶切结果可靠，但是耗时比较长，一般做最终确定。

实验七、大肠杆菌BL21感受态细胞制备及重组DNA的转化

1. 简述BL21感受态制备和转化的步骤

实验八、蛋白质的诱导表达

1.BL21和DH5a的比较

1）DH5a菌株

DH5a是一种常用于质粒克隆的菌株。E.coli DH5a在使用pUC系列质粒载体转化时，可与载体编码的β－半乳糖苷酶氨基端实现α－互补。可用于蓝白斑筛选鉴别重组菌株。DH5α质粒拷贝数高,用于质粒克隆、重组筛选、适合保存菌种,也可以表达某些蛋白

2）BL21(DE3) 菌株

该菌株用于高效表达克隆于含有噬菌体T7启动子的表达载体（如pET系列）的基因。T7噬菌体RNA聚合酶位于λ噬菌体DE3区，该区整合于BL21的染色体上。该菌适合表达非毒性蛋白。

2.       IPTG的作用原理（ppt）

3.      如何通过调节IPTG的浓度和温度来控制蛋白表达速度，从而提高蛋白的可溶性？

4.       在诱导表达时，对蛋白质表达的影响因素？

5.       原核表达系统的特点

其遗传图谱明确，容易培养且费用低，生产成本低廉。

•细菌RNA聚合酶不能识别真核基因启动子

•真核基因mRNA无SD序列，不能启动翻译

•缺乏转录后加工系统，不能切除内含子, cDNA,

•表达的蛋白不稳定，容易被细菌蛋白酶破坏

•缺乏翻译后加工体系

•可能形成不溶性的包涵体

 6.诱导表达蛋白为什么要使用T4噬菌体的启动子而不用大肠杆菌自己的启动子？

实验九、蛋白质的纯化

1. 在蛋白纯化过程中，lysis buffer，wash buffer和Elution buffer中所含有的咪唑的作用是什么？

lysis buffer，wash buffer中低浓度咪唑封闭多于结合位点，防止杂蛋白与镍离子结合。

Elution buffer中高浓度咪唑与目的蛋白竞争镍离子，将目的蛋白洗脱下来。

 实验十、诱导表达蛋白的SDS-PAGE 电泳检测

1. 蛋白电泳上样缓冲液的作用及煮沸的作用

蛋白电泳上样缓冲液包括2%SDS , 0.1%溴酚蓝 10%甘油,SDS是保证样品中的所有蛋白带电荷一致，减少电荷对电泳结果的影响。还原剂是让二硫键处于断开状态，保证蛋白分子的线性.溴酚蓝作用是指示上样蛋白的跑胶时标记的，甘油是增加上样重量的，以免漂浮，煮沸是使蛋白变性的永久保存。

2. SDS-PAGE的应用有哪些？

1）蛋白质纯度分析；

2）蛋白质分析量的测定，根据迁移率大小测定蛋白质亚基的分子量；

3）蛋白质浓度的测定；

4）蛋白质水解的分析；

5）免疫沉淀蛋白的鉴定；

6）免疫印迹的第一步；

7）蛋白质修饰的鉴定；

8）分离和浓缩用于产生抗体的抗原；

9）分离放射性标记的蛋白质；

10）显示小分子多肽。

3.SDS-PAGE电泳的原理和步骤（详见ppt）

（我就考到了这一题，原理我才提到三个效应还没解释老师就让我过了）

4. 不连续的SDS-PAGE电泳过程中利用了哪些效应？

电荷效应、分子筛效应、浓缩效应

5. 过硫酸铵的作用是什么引发剂

点样孔为什么是亮的？

主要是蛋白质污染，蛋白质无法跑出胶孔，所以点样孔周围会很亮。也可能是基因组DNA污染。（拔梳子搓了据说也会照出反光效果）

离心机的使用：

离心管的对称平衡；关好内盖及外盖；设置离心速度和时间；转头完全停止后开盖；“Short”键的使用。

培养皿为什么要倒置？

1）由于重力的作用使培养基表面及次层能富集微生物生长所需的营养物质，利于微生物生长；

2）防止空气中微生物的污染培养基及培养物：倒置时平板内的空气是不流动的,杂菌不会沉降到培养基表面,如果不倒置,很快平板周边会长起杂菌。

3）倒置培养使琼脂里水分不易蒸发出去，而充分的保持琼脂的弹性与细菌容易繁殖和生存的环境。如果不倒置，大概3天左右培养基就会出现龟裂等水分散失的情况。而一些落菌等试验，需验证培养基无菌，就要先倒置培养48小时才可作为模板做落菌，水分散失是很重要的。

其他：

1）由于现在一般拿平板的操作均为：小盖子朝向手心，五指张开抓住平板，大拇指推动平板的大盖子进行操作，所以倒置平板有利于操作。

2）其他人打开培养箱的时候一不小心就把平皿盖给打开了，倒置培养的时候不容易打开。

3）倒置培养方便拿起来观察。

4）培养过程中产生的水分在盖上聚成小水滴，可能滴到正在生长的菌落上而将其冲散，不容易辨别菌落特征，也不好计数。

怎么鉴定包涵体

参考：破菌、离心，然后分别取上清和沉淀SDS-PAGE,如果目的蛋白在沉淀,说明是包涵体

pcr体系short的作用（2个）

混匀、把壁上的液体集中到管底

为了方便理解，这里罗列一下碱法质粒抽提用到三种溶液：

溶液I，50 mM葡萄糖 / 25 mM Tris-Cl / 10 mM EDTA，pH 8.0；

溶液II，0.2 N NaOH / 1% SDS；

溶液III，3 M

醋酸钾 / 2 M 醋酸。

让我们先来看看溶液I的作用。任何生物化学反应，首先要控制好溶液的pH，因此用适当浓度的和适当pH值的Tris-Cl溶液，是再自然不过的了。那么50 mM葡萄糖是干什么的呢？说起来不可思议，加了葡萄糖后最大的好处只是悬浮后的大肠杆菌不会快速沉积到管子的底部。因此，如果溶液I中缺了葡萄糖其实对质粒的抽提本身而言，几乎没有任何影响。所以说溶液I中葡萄糖是可缺的。那么EDTA呢？大家知道EDTA是Ca2+和Mg2+等二价金属离子的螯合剂，配在分子生物学试剂中的主要作用是：抑制DNase的活性，和抑制微生物生长。在溶液I中加入高达 10 mM 的EDTA，无非就是要把大肠杆菌细胞中的所有二价金属离子都螯合掉。如果不加EDTA，其实也没什么大不了的，只要不磨洋工，只要是在不太长的时间里完成质粒抽提，就不用怕DNA会迅速被降解，因为最终溶解质粒的TE缓冲液中有EDTA。如果哪天你手上正好缺了溶液I，可不可以抽提质粒呢？实话告诉你，只要用等体积的水，或LB培养基来悬浮菌体就可以了。有一点不能忘的是，菌体一定要悬浮均匀，不能有结块。

轮到溶液II了。这是用新鲜的0.4 N的NaOH和2％的SDS等体积混合后使用的。要新从浓NaOH稀释制备0.4N的NaOH，无非是为了保证NaOH没有吸收空气中的CO2而减弱了碱性。很多人不知道其实破细胞的主要是碱，而不是SDS，所以才叫碱法抽提。事实上NaOH是最佳

的溶解细胞的试剂，不管是大肠杆菌还是哺乳动物细胞，碰到了碱都会几乎在瞬间就溶解，这是由于细胞膜发生了从bilayer（双层膜）结构向micelle（微囊）结构的相变化所导致。用了不新鲜的0.4 N NaOH，即便是有SDS也无法有效溶解大肠杆菌（不妨可以自己试一下），自然就难高效率抽提得到质粒。如果只用SDS当然也能抽提得到少量质粒，因为SDS也是碱性的，只是弱了点而已。很多人对NaOH的作用误以为是为了让基因组DNA变性，以便沉淀，这是由于没有正确理解一些书上的有关DNA变性复性的描述所导致。有人不禁要问，既然是NaOH溶解的细胞，那为什么要加SDS呢？那是为下一步操作做的铺垫。这一步要记住两点：第一，时间不能过长，千万不要这时候去接电话，因为在这样的碱性条件下基因组DNA片断会慢慢断裂；第二，必须温柔混合（象对待女孩子一样），不然基因组DNA也会断裂。基因组DNA的断裂会带来麻烦，后面我再详细说明。

每个人都知道，溶液III加入后就会有大量的沉淀，但大部分人却不明白这沉淀的本质。最容易产生的误解是，当SDS碰到酸性后发生的沉淀。如果你这样怀疑，往1%的SDS溶液中加如2M的醋酸溶液看看就知道不是这么回事了。大量沉淀的出现，显然与SDS的加入有关系。如果在溶液II中不加SDS会怎样呢，也会有少量的沉淀，但量上要少得多，显然是盐析和酸变性沉淀出来的蛋白质。既然SDS不是遇酸发生的沉淀，那会不会是遇盐发生的沉淀呢？在1％的SDS溶液中慢慢加入5 N的NaCl，你会发现SDS在高盐浓度下是会产生沉淀的。因此高浓度的盐导致了SDS的沉淀。但如果你加入的不是NaCl而是KCl，你会发现沉淀的量要多的多。这其实是十二烷基硫酸钠（sodium dodecylsulfate）遇到钾离子后变成了十二烷基硫酸钾（potassium dodecylsulfate, PDS），而PDS是水不溶的，因此发生了沉淀。如此看来，溶液III加入后的沉淀实际上是钾离子置换了SDS中的钠离子形成了不溶性的PDS，而高浓度的盐，使得沉淀更完全。大家知道SDS专门喜欢和蛋白质结合，平均两个氨基酸上结合一个SDS分子，钾钠离子置换所产生的大量沉淀自然就将绝大部分蛋白质沉淀了，让人高兴的是大肠杆菌的基因组DNA也一起被共沉淀了。这个过程不难想象，因为基因组DNA太长了，长长的DNA自然容易被PDS给共沉淀了，尽管SDS并不与DNA分子结合。

那么2 M的醋酸又是为什么而加的呢？是为了中和NaOH，因为长时间的碱性条件会打断DNA，所以要中和之。基因组DNA一旦发生断裂，只要是50－100 kb大小的片断，就没有办法再被PDS共沉淀了。所以碱处理的时间要短，而且不得激烈振荡，不然最后得到的质粒上总会有大量的基因组DNA混入，琼脂糖电泳可以观察到一条浓浓的总DNA条带。很多人误认为是溶液III加入后基因组DNA无法快速复性就被沉淀了，这是天大的误会，因为变性的也好复性的也好，DNA分子在中性溶液中都是溶解的。NaOH本来是为了溶解细胞而用的，DNA分子的变性其实是个副产物，与它是不是沉淀下来其实没有关系。溶液III加入并混合均匀后在冰上放置，目的是为了PDS沉淀更充分一点。

不要以为PDS沉淀的形成就能将所有的蛋白质沉淀了，其实还有很多蛋白质不能被沉淀，因此要用酚/氯仿/异戊醇进行抽提，然后进行酒精沉淀才能得到质量稳定的质粒DNA，不然时间一长就会因为混入的DNase而发生降解。这里用25/24/1的酚/氯仿/异戊醇是有很多道理的，这里做个全面的介绍。酚（Phenol）对蛋白质的变性作用远大于氯仿，按道理应该用酚来最大程度将蛋白质抽提掉，但是水饱和酚的比重略比水重，碰到高浓度的盐溶液（比如4M的异硫氰酸胍），离心后酚相会跑到上层，不利于含质粒的水相的回收；但加入氯仿后可以增加比重，使得酚/氯仿始终在下层，方便水相的回收；还有一点，酚与水有很大的互溶性，如果单独用酚抽提后会有大量的酚溶解到水相中，而酚会抑制很多酶反应（比如限制性酶切反应），因此如果单独用酚抽提后一定要用氯仿抽提一次将水相中的酚去除，而用酚/氯仿的混合液进行抽提，跑到水相中的酚则少得多，微量的酚在乙醇沉淀时就会被除干净而不必担心酶切等反应不能正常进行。至于异戊醇的添加，其作用主要是为了让离心后上下层的界面更加清晰，也方便了水相的回收。

回收后的水相含有足够多的盐，因此只要加入2倍体积的乙醇，在室温放置几分钟后离心就可以将质粒DNA沉淀出来。这时候如果放到－20℃，时间一长反而会导致大量盐的沉淀，这点不同于普通的DNA酒精沉淀回收，所以不要过分小心了。高浓度的盐会水合大量的水分子，因此DNA分子之间就容易形成氢键而发生沉淀。如果感觉发生了盐的沉淀，就用70％的乙醇多洗几次，每次在室温放置一个小时以上，并用tip将沉淀打碎，就能得到好的样品。得到的质粒样品一般用含RNase（50 ug/ml）的TE缓冲液进行溶解，不然大量未降解的RNA会干扰电泳结果的。

琼脂糖电泳进行鉴定质粒DNA时，多数情况下你能看到三条带，但千万不要认为你看到的是超螺旋、线性和开环这三条带。碱法抽提得到质粒样品中不含线性DNA，不信的话你用EcoRI来线性化质粒后再进行琼脂糖电泳，就会看到线性质粒DNA的位置与这三条带的位置不一样。其实这三条带以电泳速度的快慢而排序，分别是超螺旋、开环和复制中间体（即没有复制完全的两个质粒连在了一起）。如果你不小心在溶液II加入后过度振荡，会有第四条带，这条带泳动得较慢，远离这三条带，是20-100kb的大肠杆菌基因组DNA的片断。

非常偶然的是，有时候抽提到的质粒会有7－10条带，这是由于特殊的DNA序列导致了不同程度的超螺旋（超螺旋的圈数不同）所致。这里暂不深究。