



“十二五”普通高等教育本科国家级规划教材



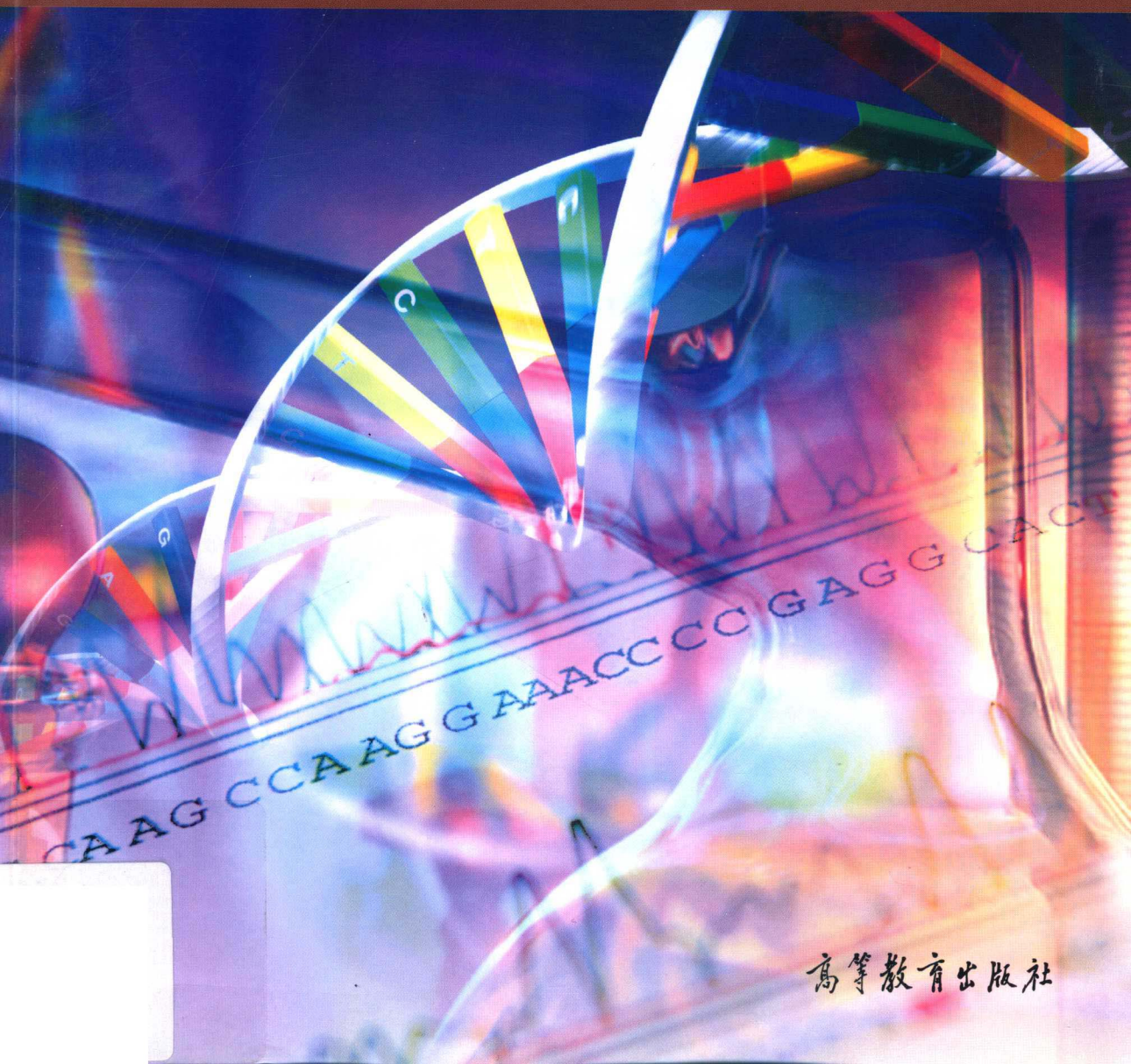
iCourse · 教材

分子生物学实验指导

Laboratory Manual for Molecular Biology

(第3版)

主编 魏群



高等教育出版社



“十二五”普通高等教育本科国家级规划教材



iCourse · 教材

分子生物学实验指导

Laboratory Manual for Molecular Biology

(第3版)

主编 魏 群

编者 魏 群 向本琼 王海龙 骆 静 姜国华

尹燕霞 崔丽华 马 晴 杨淑杰

高等教育出版社·北京

FENZI SHENGWUXUE SHIYAN ZHIDAO

内容提要

《分子生物学实验指导》(第3版)是一本简明实用且与目前高校实验教学相适应的分子生物学实验指导用书。全书分为两篇:第一篇简明介绍了分子生物学的实验方法和理论;第二篇选编了18个学生实验,包括感受态细胞的制备和转化,质粒DNA的提取和分析,琼脂糖凝胶电泳检测DNA,PCR基因扩增,DNA重组,基因表达和检测,蛋白质印迹,基因组DNA的分离和分析,总RNA的提取和分析,RT-PCR,实时荧光定量PCR,定点突变,Southern杂交,DNA序列测定等内容。

第3版新增加了实时荧光定量PCR实验,在Southern杂交实验中补充了真核基因方面的内容,改进了寡核苷酸介导的定点突变实验的方法,删除了PCR法差异显示mRNA实验。在许多实验中增加了警告、提示和需要注意的内容,并在每个实验后面加设了思考题。建设了与教材配套的“数字课程”(http://abook.hep.com.cn/41894),涵盖实验操作录像、课堂讲解实录、教学PPT、实验室仪器操作技术、实验设计选录、分子克隆经验小结等内容,以期进一步提高实验教学效率,培养学生的基本实验技能、独立分析和解决问题的能力 and 创新思维。

本书适合作为高等院校生物类专业及农林、医药院校开设分子生物学实验的教学用书,也可供有关研究人员和技术人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

分子生物学实验指导 / 魏群主编. —3版. —北京: 高等教育出版社, 2015.3
ISBN 978-7-04-041894-1

I. ①分… II. ①魏… III. ①分子生物学—实验—高等学校—教学参考资料 IV. ①Q7-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2014)第312617号

策划编辑 吴雪梅 赵晓媛 责任编辑 单冉东 封面设计 张楠 责任印制 张泽业

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
印刷 北京市大天乐投资管理有限公司
开本 787mm×1092mm 1/16
印张 12.5
字数 300千字
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>
网上订购 <http://www.landaco.com>
<http://www.landaco.com.cn>
版 次 1999年12月第1版
2015年3月第3版
印 次 2015年3月第1次印刷
定 价 22.00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 41894-00

数字课程（基础版）

分子生物学 实验指导（第3版）

魏 群 主编



“十二五”普通高等教育本科国家级规划教材

分子生物学实验指导（第3版）

主编 魏群

用户名 密码 验证码 3 6 0 9 进入课程

使用说明

内容介绍

纸质教材

版权信息

联系方式

本数字课程与纸质教材一体化设计，紧密配合。数字课程的资源包括实验操作录像、课堂讲解实录、课堂PPT、实验室仪器操作技术、实验设计选录、分子克隆经验小结等内容。充分运用多种形式媒体资源，极大地丰富了知识的呈现形式，拓展了教材内容。在提升课程教学效果同时，为学生学习提供思维与探索的空间。



数字课程网站

网址：<http://abook.hep.com.cn/41894>
<http://abook.edu.cn/czy/41894>

用户名：输入教材封底的16位明码；密码：刮开“增值服务”涂层，输入16位暗码；输入正确的验证码后，点击“进入课程”开始学习。

高等教育出版社

<http://abook.hep.com.cn/41894>

数字课程资源目录

实验操作录像

- 质粒 DNA 的提取(实验二)
- 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA(实验三)
- PCR 基因扩增及产物的回收(实验四)
- SDS-PAGE 及蛋白质印迹(实验六、七)
- 基因组 DNA 的分离及 Southern 杂交(实验八、九、十、十六)
- 植物总 RNA 的提取(实验十一)
- 实时荧光定量 PCR 对小鼠脾细胞特定基因表达的分析(实验十三)

课堂讲解实录

- 质粒 DNA 的提取及其分析(实验二)
- PCR 基因扩增及产物的回收(实验四)
- DNA 重组(实验五)
- 外源基因在大肠杆菌中的诱导表达及检测(实验六、七)
- 基因组 DNA 的分离及 Southern 杂交(实验八、九、十、十六)
- 植物总 RNA 的提取及 RT-PCR(实验十一、十二)

教学 PPT

- 质粒 DNA 的提取及其分析(实验二)
- PCR 基因扩增及产物的回收(实验四)
- DNA 重组(实验五)
- 外源基因在大肠杆菌中的诱导表达及检测(实验六、七)
- 基因组 DNA 的分离及 Southern 杂交(实验八、九、十、十六)
- 植物总 RNA 的提取及 RT-PCR(实验十一、十二)

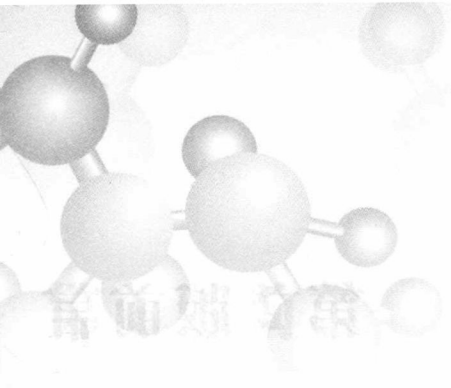
实验室仪器操作技术

- 实验室常规设备及基本操作
- 常用的灭菌技术

实验设计选录

- 碱性磷酸酶的基因克隆
- 1,4- α -糖原分支酶的分子克隆
- β -半乳糖苷酶的克隆及表达
- 根癌农杆菌 Ti 质粒的提取和 *ipt* 基因的重组与转化
- 碱性磷酸酶 S102A 的 PCR 定点突变

分子克隆经验小结



第3版前言

时光荏苒,《分子生物学实验指导》第2版作为普通高等教育“十一五”国家级规划教材出版至今已历7载,又有幸被列为北京市精品教材、“十二五”普通高等教育本科国家级规划教材。与此同时,分子生物学相关的新技术、新知识不断涌现,课程改革也不断深入,进行新版修订已经刻不容缓。

第3版主要进行了以下三方面的修订:

首先,增加了一些与时俱进的新技术。第一篇新增了“实时荧光定量PCR技术”一章,在其他各章节中也引入了一些新概念和常用的新方法(如新一代测序、定点突变的新方法),还对一些技术方法增加了新内容。第二篇增加了“实时荧光定量PCR对小鼠脾细胞特定基因表达的分析”,“寡核苷酸介导的定点突变”改用既简便又快速的新方法,“Southern杂交”增加了真核基因的内容等;删除了“mRNA差异显示技术”等个别实验。对第一篇的章节和第二篇的实验顺序均进行了个别调整,使之更好地相互衔接。

第二方面,为了使教材更实用,更好地为初学者和广大读者服务,我们在对本科生、研究生十几年课堂实验教学积累的基础上,对学生在实验操作和对实验技术理解中的问题又进行了梳理和总结,尤其针对实验中应注意的地方、学生在实验中容易出现的问题等,增加了许多必要的提示。并在每个学生实验后面加设了思考题。

第三方面,建设了与教材配套的数字课程(<http://abook.hep.com.cn/41894>)。“十二五”期间,教育部启动了国家精品开放课程建设项目,北京师范大学“分子生物学”原国家精品课程成功转型升级,获得国家级精品资源共享课首批立项,并在爱课程网(www.icourses.cn)上线。在当前信息技术深度融入课程教学的背景下,高等教育出版社推出了一系列融入国家精品开放课程建设成果的“iCourse·教材”,采用“纸质教材+数字课程”的出版形式——纸质教材更加精炼适用,数字课程对纸质教材内容加以巩固、补充和拓展,为学生自主学习和教师创新教学方法提供支撑。本书第3版亦有幸列入其中,在数字课程中主要涵盖了以下内容:在实验操作录像中,对实验的每个步骤、操作的关键节点进行解释和说明;对主要的实验提供了课程配套的教学PPT,部分实验配置了教师讲解录像;以课程涉及的仪器为例,对实验室常规设备及其基本操作进行了录像和讲解,还对常用的重要技术(如灭菌技术)提供了详细的操作录像;为培养学生的创新思维、融会贯通和独立分析问题、解决问题的能力,将在课堂进行的部分实验设计的录像和学生独立实验设计作品一并展示给读者;为了帮助刚走上科研工作岗位的读者,满足进行实验设计和操作实施的需求,专门撰写了分子克隆经验小结以供参考和讨论。上述这些内容均在本书对应的数字课程中呈现,书中配有数字课程目录和相应知识的提示。

由于编者的水平有限,衷心希望广大同行和读者在使用过程中不吝批评指正,以期日臻完善。

编者

2014年10月



第2版前言

分子生物学作为21世纪的前沿科学,一直在与时俱进,学科进展十分迅速,研究方法与科研成果日新月异,了解、熟悉和掌握分子生物学技术,对于理解学科研究思路和成就、把握学科动态、应用学科知识至关重要,也是全面提高人才培养素质的关键所在。

本书第1版自1999年出版以来,深受广大读者的欢迎。多年来为了更好地培养读者尤其是本科生的实践技能和科研素质,我们在教学实践中不断改革探索、总结经验。本次再版,结合我们的实践教学经验和分子生物学技术的发展,在第一篇的常用分子生物学实验技术及原理中增加了“mRNA 差异显示技术”一章,同时在其余章节中也注入了新的内容;在第二篇的学生实验部分删去了“酵母 tRNA 的制备”和“鼠肝氨酰 tRNA 合成酶的制备及 tRNA 接受氨基酸活力的测定”两个目前技术方法不常用的实验项目,增加了“大肠杆菌基因组 DNA 的提取”“RT-PCR”和“PCR 法差异显示 mRNA”三个新的实验技术项目。同时也调整了部分实验项目的顺序,并在部分实验项目中增加了新的内容。

本书第2版仍保持了第1版简明、实用、易于普及的编写宗旨和编写风格。设计体系更接近于分子生物学的科研思路,以便读者通过本书的系统学习,在获得较好实验结果的同时即可进行接近正规科学研究的综合实验技能训练,从而达到培养和提高广大读者的科研能力、创新能力、分析问题与解决问题能力和综合实践能力。

由于我们的水平有限,希望读者在使用过程中,对我们教材的不当之处,提出批评指正。

编者

2007年5月

第1版前言

分子生物学技术已不再神秘,它已经渗入生物学的各个分支学科及医药农林的各个分支领域,并正在迅速改变着它们的面貌。对分子生物学实验技术的掌握已成为这些学科在新的高度和水平揭示生命奥秘的共同需求。

本书在我们多年用作北京师范大学生物化学及分子生物学专业本科生及生命科学学院研究生实验指导讲义的基础上,经修订和改编形成,可以作为高等院校生物和医药、农林等专业的分子生物学实验指导用书。

全书分为前后呼应的两大部分,前部分扼要介绍了有关分子生物学的实验方法和理论,内容包括载体;分子生物学中常用的工具酶;电泳;真核生物基因组文库的构建;cDNA文库的构建;DNA序列测定;PCR基因扩增;基因表达;印迹法及分子检测;克隆化定点诱变等,以供学生实验时查找和老师讲解。后部分是学生实验,内容包括感受态细胞的制备和转化;质粒的提取和酶切;DNA重组;PCR基因扩增;哺乳动物和植物基因组DNA的分离和提取;凝胶电泳检测蛋白质和DNA;Southern杂交;蛋白质印迹和免疫检测;总RNA和tRNA的制备及分析;核酸序列测定;在原核细胞中表达真核基因;基因突变及检测等。书后还摘编了许多对分子生物学实验有用的附录。为适合不同领域对象的需要,对某些实验内容,安排有以动物为材料或以植物为材料的不同实验。为适合不同水平的对象,除最基础的实验外,还编排了较高层次的实验,供有条件的单位选用。

本书的编写宗旨是简明、实用。实验尽量避免购买昂贵的仪器和材料。为提高学生的动手能力,学生根据我们在实验器材中详细罗列的所需仪器和材料,即可独立地进行试剂的配制和实验。每个实验操作步骤叙述得较为详细,特别是对实验中应注意的地方,学生在实验过程中易出现的问题,加入关键试剂应有的正常现象,某些仪器的正确操作等均给予了提示(书中用楷体标注)。对实验的时间安排,根据每一个实验的特点提出了我们的建议。希望本书能像一位无声的老师,指导初学者入门。

本书是我们北京师范大学生物化学和分子生物学系几代老师和学生从教学和科研中总结经验、不断完善而凝聚提取的精华。在编纂和修订中由魏群、崔丽华、杨淑杰、马晴、姜国华、向本琼、刘玉等老师执笔,魏群统稿。孙秀英老师在本书的实验优化、排印、校稿等方面作了大量工作。中科院生物物理所静国忠老师审阅了全书,为本书提出了许多宝贵的意见。另外北京师范大学京师公司的齐建国同志,鼎国公司的周卫东同志,生命科学学院的杨中海老师、颜卉君老师、李大海老师等对本书的实验工作提供了不少帮助,在此一并感谢。

由于我们的水平有限,希望读者在使用过程中,对我们教材的不当之处,提出批评指正。

编者

1999年6月

目 录

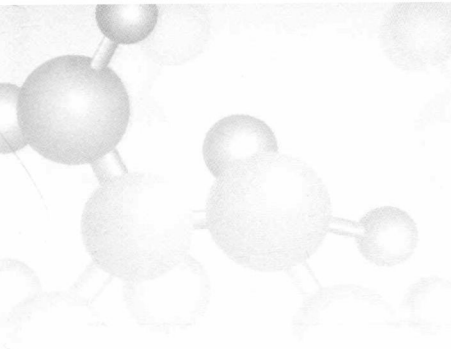
第一篇 常用分子生物学实验技术及原理

第一章 载体	3
第二章 工具酶	13
第三章 电泳	22
第四章 真核生物基因组文库的构建	29
第五章 cDNA 文库的构建	33
第六章 PCR 基因扩增	39
第七章 克隆化 DNA 的定点突变	45
第八章 DNA 序列测定	54
第九章 基因表达	63
第十章 印迹法及分子检测	69
第十一章 实时荧光定量 PCR 技术	75

第二篇 学 生 实 验

实验一 大肠杆菌感受态细胞的制备及质粒 DNA 的转化	85
实验二 质粒 DNA 的提取及其定性定量分析	88
实验三 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA	92
实验四 PCR 基因扩增及产物的回收	96
附 扩增片段的全序列	99
实验五 DNA 重组	101
实验六 外源基因在大肠杆菌中的诱导表达及检测	107
I 外源基因在大肠杆菌中的诱导表达	107
II 活性分析检测表达蛋白	109
III SDS - PAGE 检测表达蛋白	110
实验七 蛋白质印迹	114
附 小鼠腹水多克隆抗体制备	117
实验八 哺乳动物基因组 DNA 的分离及分析	119
实验九 植物基因组 DNA 的提取	123
实验十 大肠杆菌基因组 DNA 的提取	126

实验十一	植物总 RNA 的提取	129
实验十二	RT-PCR(反转录-聚合酶链反应)	133
附	β -微管蛋白编码序列	135
实验十三	实时荧光定量 PCR 对小鼠脾细胞特定基因表达的分析	137
实验十四	利用聚合酶链反应(PCR)定点突变	142
实验十五	寡核苷酸介导的定点突变	146
实验十六	Southern 杂交	150
I	大肠杆菌基因组 DNA Southern 杂交	150
II	小鼠肝基因组 DNA Southern 杂交	155
实验十七	双脱氧链终止法测定 DNA 序列	159
实验十八	DNA 核苷酸序列分析——银染色法	164
实验室仪器操作技术	⑤	169
实验设计选录	⑤	169
分子克隆经验小结	⑤	169
附录		171
一、	常用核酸、蛋白质换算数据	171
二、	氨基酸符号及相应密码子	172
三、	常见市售酸碱的浓度	172
四、	离心机转速与相对离心力的换算	173
五、	常用电泳缓冲液及凝胶加样缓冲液	175
六、	常用限制酶酶切位点及缓冲液	178
七、	分子生物学常用试剂和缓冲液的配制	179
八、	常用细菌培养基和抗生素溶液	182
九、	X 射线底片的冲洗方法	185
十、	溴化乙锭溶液的净化处理	186



第一篇

常用分子生物学实验技术及原理

- 第一章 载体
- 第二章 工具酶
- 第三章 电泳
- 第四章 真核生物基因组文库的构建
- 第五章 cDNA 文库的构建
- 第六章 PCR 基因扩增
- 第七章 克隆化 DNA 的定点突变
- 第八章 DNA 序列测定
- 第九章 基因表达
- 第十章 印迹法及分子检测
- 第十一章 实时荧光定量 PCR 技术

第一章

载 体

基因工程中,携带目的基因进入宿主细胞进行扩增和表达的工具,称为载体。目前使用的已知载体除了大肠杆菌中的质粒、 λ 噬菌体、M13噬菌体、噬菌粒和黏粒外,还有酵母、细菌人工染色体载体以及动、植物病毒载体等。

作为基因工程中使用的载体必须具备以下条件:①复制子是一段具有特殊结构的DNA序列,载体有复制子才能使与它结合的外源基因复制繁殖;②有一个或多个利于检测的遗传表型,如抗药性、显色表型反应等等;③有若干个限制性内切酶的单一识别位点,便于外源基因的插入;④适当的拷贝数,一般而言,较高的拷贝数不仅利于载体的制备,同时还会使细胞中克隆基因的剂量增加。

一、质粒

质粒是基因工程中常用的载体之一。质粒是染色体外小型双链环状的DNA,大小在1~200 kb之间。质粒能自主复制,在细菌中不断复制自身。在细胞内的复制分成两种类型:一种是低拷贝数的质粒,每个细胞仅含有1个或几个质粒分子,称这种类型为“严紧型”复制的质粒;另一类是高拷贝数的质粒,一般在20个以上,称这种类型为“松弛型”复制的质粒。

质粒能编码一些遗传性状,如抗药性(如抗氨苄青霉素、抗四环素、耐受重金属、产生细菌素等),被质粒转化的细菌也获得了这些额外的特性。

1. pBR322

pBR322是由几个质粒DNA通过DNA重组技术构建而成的克隆载体。具有较小的相对分子质量,DNA分子的长度为4361 bp;具有氨苄青霉素和四环素两种选择的抗药性标记(图1-1)。pBR322共有24种限制性内切酶的单一的识别位点,其中7种酶(*EcoRV*, *NheI*, *BamHI*, *SphI*, *SalI*, *XmaIII*, *NruI*)的识别位点位于四环素抗性基因内部,2种酶(*ClaI*, *HindIII*)存在于这个基因的启动子内部。所以在这9个限制性位点上插入外源DNA通常都会导致四环素抗性基因(*Tet'*)的失活。3种酶(*ScaI*, *PvuI*, *PstI*)在氨苄青霉素抗性基因(*Amp'*)内具单一的识别位点,在这个位点插入外源DNA则会导致*Amp'*基因的失活。利用这种插入失活来检测重组体质粒需经过两个步骤,如将外源基因插入到*BamHI*位点,便产生*Amp'**Tet'*的重组子,将经过这种

重组子转化的受体菌涂布在含氨苄青霉素培养基上,存活下来的菌落有 *Amp^rTet^r* 和 *Amp^rTet^s* 两种表型,再将它们分别涂布在含四环素和氨苄青霉素的培养基上,凡是在氨苄青霉素平板上生长,而在四环素平板上不生长的菌落通常被认为有外源基因的插入。

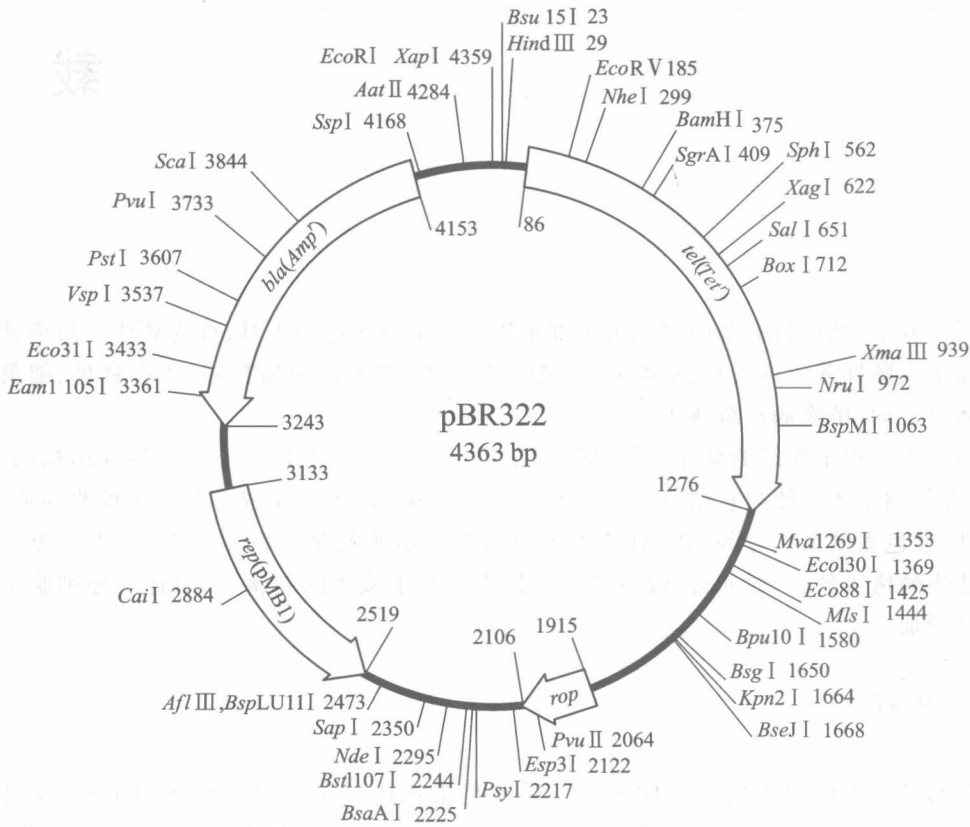


图 1-1 pBR322 的结构示意图

2. pUC 载体

pUC 载体系列是由大肠杆菌 pBR322 质粒与 M13 噬菌体改建而成的双链 DNA 质粒载体,即将组建 M13 mp 系列载体所用的大肠杆菌 β -半乳糖苷酶基因(*lacZ*)片段插入到 pBR322 的一种缺失变种之中。它含有来自 pBR322 质粒的复制起点(*ori*),氨苄青霉素抗性基因(*Amp^r*),*lacZ* 的启动子及其编码 α -肽链的 DNA 序列(此结构称为 *lacZ'* 基因),并且在 *lacZ'* 基因中有一段多克隆位点(MCS)区段。当外源的 DNA 片段插入到这些克隆位点时,使 α -互补破坏形成的是无活性的 β -半乳糖苷酶,于是被转化的大肠杆菌细胞,就在 X-gal-IPTG 培养基上形成白色菌落;而没有外源 DNA 插入的质粒转化大肠杆菌细胞后,在 X-gal-IPTG 培养基上形成蓝色菌落。另外与 pBR322 相比,pUC 质粒载体具有更小的相对分子质量,而且由于 *rop* 基因的缺失(其基因产物 ROP 蛋白,控制质粒复制),使得其拷贝数大增,每个细胞可达 500~700 个拷贝。因此由 pUC 质粒重组体转化的大肠杆菌细胞,可获得高产量的克隆 DNA 分子。

在 pUC 载体系列中,用得最多的是 pUC18 和 pUC19(图 1-2)质粒载体,二者除多克隆位点

以互为相反的方向排列外,其他方面都相同。在 pUC18 中, *Eco*R I 位点紧接于 *Lac*(乳糖)操纵子(*P*_{lac})下游,而在 pUC19 中, *Hind* III 位点紧接于 *P*_{lac} 下游。

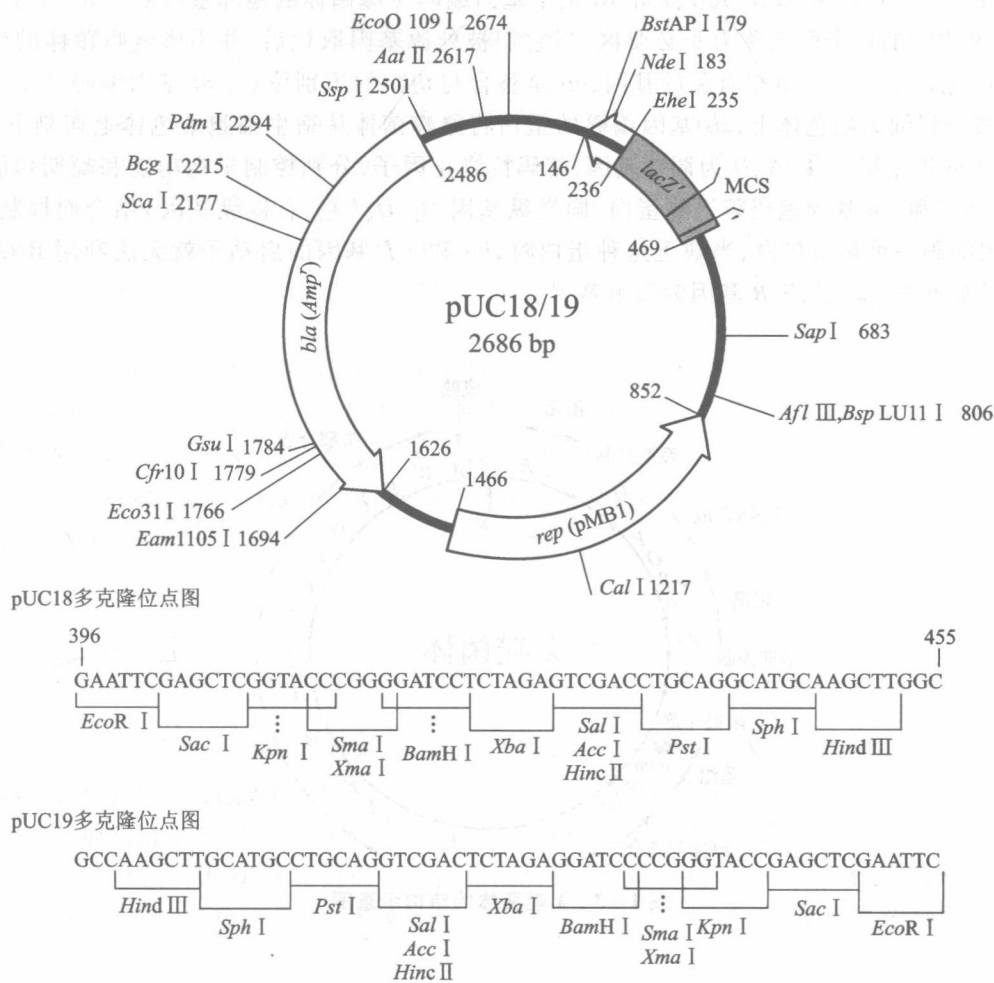


图 1-2 pUC18/19 的结构示意图及其多克隆位点

二、λ 噬菌体载体

λ 噬菌体(图 1-3)是最早使用的克隆载体,为基因组长度约为 50 kb 的线性双链 DNA 分子。在其两端,各有一条由 12 个核苷酸组成的互补的 5'单链突出序列,即黏末端。当 λ 噬菌体 DNA 注入到寄主细胞后,线性 DNA 分子会通过黏末端的碱基配对而形成环状 DNA 分子。这种由黏末端结合形成的双链区段称为 *cos* 位点。λ 噬菌体是一种中等大小的温和噬菌体,它既能进入溶菌生命周期又能进入溶源生命周期。在溶菌周期,噬菌体将其感染的宿主细胞裂解,并能产生出大量的子代噬菌体颗粒。而在溶源生长周期,在感染过程中没有产生出子代噬菌体颗粒,噬菌体 DNA 是整合到寄主细胞染色体 DNA 上,成为它的一个组成部分,并随寄主染色体的复制而复制。在溶源状态下,只有一个拷贝噬菌体基因组 DNA。λ 噬菌体进入大肠杆菌寄主后,无论是

进入溶源状态,还是进入溶菌状态,都由 *cI* 基因控制,它编码一个阻遏蛋白质。 λ 噬菌体基因组的基因,按功能的相近性聚集成簇。① *A*、*W*、*B*、*C*、*D*、*E*、*F* 这 7 个基因组成头部基因,编码头部蛋白。② *Z*、*U*、*V*、*G*、*H*、*M*、*L*、*K*、*I*、*J* 等 10 余个基因编码 λ 噬菌体的尾部蛋白质。③ 介于基因 *J* 与基因 *N* 之间的这个区又称为非必要区,当它们被外源基因取代后,并不影响噬菌体的生命功能。本区包括了一些与重组有关的基因,*att* 是整合与切割的识别位点,*int* 基因编码的蛋白能使 λ DNA 整合到细菌染色体上,*xis* 基因编码的蛋白将原噬菌体从宿主细胞染色体上切割下来,*red* 基因负责促进重组。④ *N*、*Q* 为调节基因,编码抗终止因子,分别控制早期功能和晚期功能的调节,*cI* 基因和 *cro* 基因编码阻遏物蛋白,同操纵基因 *O_L*、*O_R* (左、右操纵基因) 结合而抑制转录。*cII* 基因编码一种调节蛋白,当缺乏这种蛋白时,*int* 和 *cI* 基因的启动子就无法利用 RNA 聚合酶,因而无法进行转录,*S*、*R* 基因为裂解基因。



图 1-3 λ 噬菌体的结构示意图

现在实验室用的 λ 噬菌体载体都是在野生型基础上改造而成,即从 λ 噬菌体的基因组 DNA 上消去一些多余的限制位点和切除掉非必要的区段。改建之后的常用载体有两类。① 插入型载体,具有一个可供外源 DNA 插入的克隆位点,如 λ gt10、 λ gt11;② 替换型载体,具有成对的克隆位点,在两个位点之间的 λ DNA 区段可被外源插入的 DNA 片段取代,如 *charon4*、*charon10*、*charon35*。这两种载体在克隆中有不同的用途,插入型载体只能插入较小的外源 DNA 片段 (<10 kb),而替换型载体能插入较大的外源 DNA 片段(20~24 kb 左右)。

应用噬菌体载体构建重组体分子时,应注意包装限度。当重组体 DNA 分子长于 λ 噬菌体基因组 105% 或小于 75% 时,重组噬菌体的活力会大大下降,不能形成正常大小的噬菌斑,所以重组体 DNA 分子长度应控制在包装限度范围内。

λ 噬菌体重重组体分子的筛选与质粒重组体分子不同,不具有抗生素抗性选择标记,主要是依据噬菌斑的形态学特征和 X-gal-IPTG 显色反应来判断。

cI 基因编码阻遏蛋白,它的存在将使 λ 噬菌体进入溶源状态,因此在培养基上形成混浊型

的噬菌斑。*c I* 基因失活或缺失的 λ 噬菌体,无法使其寄主细胞产生溶源效应,这时在培养基上形成清亮型噬菌斑。所以如果在 λ 噬菌体的插入型载体的克隆位点或在替换型载体的可替换区段中,有一个 *c I* 基因,那么插入了外源 DNA 片段的 λ 重组体分子将表现 *c I*⁻,形成清亮型噬菌斑。而非重组体分子 *c I*⁺,形成混浊型的噬菌斑。根据这个形态学特征可筛选 λ 重组体分子。

许多 λ 载体,如 *charon2*、 λ gt11 含有编码 β -半乳糖苷酶的基因 *lacZ* (其中引入多克隆位点)。由这种载体感染的大肠杆菌(*lac*⁻菌),涂布在含有 IPTG 和 X-gal 的培养基平板上,会形成蓝色噬菌斑。当外源 DNA 片段插入到这些克隆位点时,形成无活性的 β -半乳糖苷酶,被感染的大肠杆菌寄主细胞,就会在 X-gal-IPTG 培养基上形成无色噬菌斑,没有插入外源 DNA 的载体,形成蓝色噬菌斑。同样,如果在替换型载体的可替换区段含有 *lacZ* 基因序列,也会出现同样结果。

λ gt10 和 λ gt11 载体系列适用于克隆 6 kb 左右的外源 DNA,适合构建 cDNA 基因文库。 λ gt10 的外源 DNA 插入位点 *EcoR* I 和 *Hind* III 都在 *c I* 基因内,外源 DNA 插入使 *c I* 失活。重组噬菌体在溶源性突变株 hfl⁻ 寄主细胞上能有效地形成噬菌斑,而 *c I* 完整的载体在 hfl⁻ 菌株上不能形成噬菌斑。 λ gt11 载体内含有 *lacZ* 基因,插入位点 *EcoR* I 在其编码的 C 端。当插入的 cDNA 的阅读框架与 *lacZ* 相一致时,就形成一个融合蛋白产物,可用免疫学方法检测。

三、噬菌粒载体

单链噬菌体为含单链核酸的噬菌体,如 M13 噬菌体、f1 噬菌体等,闭合环状单链(+)DNA 是其遗传信息的储存形式。当它们感染大肠杆菌后,以(+)链 DNA 为模板,合成互补的(-)链 DNA,从而形成双链复制型 DNA(RF DNA)。(-)链转录成 mRNA,用于合成其特定的蛋白质,其中的内切酶作用于 RF DNA 正链的特定位点切割形成切口,以环形的(-)链为模板合成(+)链 DNA,当 DNA 复制叉环绕负链模板整整一周时,新合成的(+)链 DNA 被内切酶切下后环化形成基因组,并以单链(+)DNA 形式分泌到大肠杆菌细胞外。

噬菌粒是一类含有单链噬菌体复制子与包装序列(IG)以及质粒复制子、克隆位点和标记基因的人工载体。含噬菌体来源的复制子,在细菌的细胞中出现有辅助噬菌体的情况下,可被诱导成单链 DNA 噬菌体颗粒,同时具有噬菌体和质粒的特征,可以像噬菌体或质粒一样复制,它兼具丝状噬菌体与质粒载体的优点。

1. pUC118 和 pUC119

pUC118 和 pUC119(图 1-4)是分别由 pUC18 和 pUC19 质粒与 M13 噬菌体的复制子和包装序列重组而成的噬菌粒载体,即将含有 M13 噬菌体的复制起点的 476 bp 长片段插入到 pUC18 和 pUC19 质粒的 *Nde* I 位点上,长约为 3.2 kb。具有质粒和丝状噬菌体的双重特性。含有 *Amp*^r 基因作为选择记号,便于重组子的选择。具有 *lacZ'* 基因,并在其上引入多克隆位点,所以当有外源 DNA 片段插入时,可按照 X-gal-IPTG 组织化学显色反应来筛选重组子。含有一个质粒的复制起点,在没有辅助噬菌体的情况下,克隆的外源基因像质粒一样,复制形成大量的双链 DNA 分