



分子克隆 操作指南

T. 曼尼阿蒂斯
〔美〕 E. 弗里奇 著
J. 萨姆布鲁克

科学出版社

分子克隆

操作指南

[美] T. 曼尼蒂斯 E. 弗里奇 J. 萨姆布鲁克 著

余茂勋 译 潘惟钧 校

科学出版社

1986

内 容 简 介

本书系统地介绍了分子克隆技术和方法。全书共分十二章,简明扼要地叙述分子克隆的基本原理、操作方法及步骤,并附有注意事项等,已成为各国有关实验室的通用手册。此外,译者还根据国内情况增加了注释和一部分附录,以应国内读者之需。可供生物技术、遗传工程、分子生物学等方面的研究和教学人员使用。

T. Maniatis E. F. Fritsch J. Sambrook

MOLECULAR CLONING

A LABORATORY MANUAL

Cold Spring Harbor Laboratory 1982

【美】T. 曼尼阿蒂斯 E. 弗里奇 J. 萨姆布鲁克 著

余茂勋 译 潘惟钧 校

责任编辑 刘安

科学出版社出版

北京朝阳门内大街137号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1986年2月第一版 开本:787×1092 1/16

1986年2月第一次印刷 印张:21 1/2

印数:0001—2,500 字数:492,000

统一书号:13031·3054

本社书号:4074·13—10

定价: 5.30 元

前 言

这本书最初是 1980 年冷泉港真核基因分子克隆讲习班使用的实验室方案的汇集。当时这些方法曾在我们的实验室中使用过，但分散在许多个人的笔记本中。1981 年我们决定编写一本较为完整和时行的手册，不仅供下次冷泉港讲习班使用，而且也是为了最终能出版。由于所使用的方法经过多次更改，我们编集了一套“一致同意的方案”，甚至当 1981 年讲习班还在进行时，该实验方案已被复印并广泛散发到许多实验室了。后来，在 1981—1982 年冬，对手册基本上重新编写，不仅增添了全新的章节，而且也增加了新的或修正的方案和图例。

但从最近这次重新编写以来，在这一领域里又有不少进展：不断地创立了新的方法，根据正在变化的需要将已有的技术加以改进。虽然在这本书中所包括的都是曾经在我们实验室里全面试用和成功使用的方案，但是我们并不认为这些方案是不可逾越或完美无缺的。我们欢迎改进的建议，并且对任何提供创建的新方法表示感谢。

至于各个方案的发展应归功于何人，这是一个困难问题。我们试图在正文适当的地方对最先发展并在本书中引用了的方法的作者给予一一肯定，然而在许多情况下，溯源一种具体方法的毋庸置疑的来源是不可能的。因此，对于那些不能被我们认清的设想、方法或配方的作者谨表示歉意和致以谢意。我们的主要作用在于汇编、查证，并希望能加以阐明；在少数情况下进行一些修改，只是在极个别的情况下，设计了一些新的方案。因而，本书的大部分是建立在别人发展起来的方法基础上的，所以任何的赞扬应归属于他们。

因为最初撰写这本书是为了给在分子克隆方面没有经验的读者作指南，所以拥有较多的基础材料。但目前的版本也较详细地涉及几乎每一实验室现在用于进行分子克隆的工作。因此，我们希望进行克隆研究技术的新手和老将一样，将会发现本书中有价值的资料。

虽然分子克隆在理论上看来是简单的，但做起来就较为困难。绝大多数的方案涉及到许多个别的步骤，其中任何一步发生问题，都会导致实验者处于困境。对待这些问题，重要的是充分理解每一程序的基本原理。因此，我们提供一些基础知识和资料，以备发生问题时有所适从。当然，我们还建议，应该测定方案的每一步产物，以便验证反应是否成功。

T. 曼尼阿蒂斯
E. 弗里奇
J. 萨姆布鲁克

目 录

第一章 载体-宿主体系	1
质粒	1
在质粒中进行克隆	9
噬菌体 λ	13
裂解循环	13
溶源性	16
λ 噬菌体载体的构建	17
选择合适的载体	18
噬菌体 λ 载体图	19
粘粒	29
单链噬菌体	41
噬菌体 M13 载体	42
总结	43
第二章 细菌菌株与病毒的繁殖和保存	46
菌株的检验	46
单菌落的分离	46
细菌菌株的生长、保存和保藏	48
噬菌体 λ 噬菌斑的纯化	49
从单斑制备噬菌体 λ 原液	50
培养基和抗生素	52
液体培养基	52
含琼脂或琼脂糖的培养基	54
抗生素	54
第三章 噬菌体 λ 和质粒 DNA 的分离	57
噬菌体 λ 的大量制备	57
感染	57
诱导	58
噬菌体 λ 的提纯	59
噬菌体 λ DNA 的提取	62
质粒 DNA 的大量分离	63
细菌的生长和质粒的扩增	63
菌体的采集和裂解	64
利用氯化铯-溴化乙锭梯度平衡离心提纯闭环 DNA	66
从质粒 DNA 制品中去除 RNA	67
第四章 分子克隆中所用的酶	69
限制酶	69

同裂酶	69
甲基化作用	70
用限制酶消解 DNA	74
分子克隆中使用的其它酶类	75
大肠杆菌 DNA 聚合酶 I	76
大肠杆菌 DNA 聚合酶 I Klenow 片段	79
T4 DNA 聚合酶	82
用 T4 多核苷酸激酶标记 DNA 5' 末端	86
依赖于 RNA 的 DNA 聚合酶	90
DNA 的脱磷酸作用	93
核酸酶 Bal 31	95
核酸酶 S1	97
绿豆核酸酶	98
核糖核酸酶类	98
脱氧核糖核酸酶 I	99
核酸外切酶 VII	99
核酸外切酶 III	99
λ 核酸外切酶	101
多聚(A)聚合酶	101
T4 DNA 连接酶	102
T4 RNA 连接酶	102
EcoRI 甲基化酶	103
末端脱氧核苷酸转移酶	103
第五章 凝胶电泳	104
琼脂糖凝胶电泳	104
凝胶电泳槽	106
缓冲液	106
琼脂糖凝胶的制备	110
琼脂糖凝胶中 DNA 的染色	111
摄影技术	112
微型凝胶	112
从琼脂糖凝胶中回收 DNA	113
碱性琼脂糖凝胶	117
聚丙烯酰胺凝胶电泳	118
聚丙烯酰胺凝胶的制备	118
从聚丙烯酰胺凝胶中分离 DNA 片段	121
分离链的凝胶	121
利用聚丙烯酰胺凝胶分离链	122
利用琼脂糖凝胶分离链	123
利用变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离短的双链 DNA 的链	124
第六章 真核细胞 mRNA 的抽提、提纯和分析	126
哺乳动物细胞 mRNA 的分离	128

细胞总 RNA 的分离	129
多聚 (A) ⁺ RNA 的选择	131
RNA 的凝胶电泳	132
RNA 的核酸酶 S1 定位	137
第七章 cDNA 的合成和克隆	140
cDNA 的合成	140
第一 cDNA 链的合成	140
第二 cDNA 链的合成	141
利用核酸酶 S1 切割发夹环	142
双链 cDNA 的分子克隆	143
同聚物尾序	143
合成的 DNA 接头	144
克隆 cDNA 的其它方法	145
cDNA 克隆的策略	148
高丰度 mRNA	148
低丰度 mRNA	148
cDNA 克隆的程序	151
双链 cDNA 的合成	151
用核酸酶 S1 消解	156
双链 cDNA 的克隆	157
将载体和双链 cDNA 进行退火	159
通过依次加合接头来克隆双链 cDNA	160
第八章 将质粒和噬菌体 λ DNA 引入大肠杆菌	163
利用质粒 DNA 转化大肠杆菌	163
利用氯化钙程序转化	163
利用氯化钙/氯化铷程序转化	164
大肠杆菌 x1776 的转化	165
噬菌体 λ DNA 的离体包装	167
噬菌体 λ 溶源菌的保持和测定	168
包装抽提物制备方案 I	169
离体包装方案 I	170
包装抽提物制备方案 II	171
离体包装方案 II	173
第九章 基因组文库的构建	175
噬菌体 λ 载体中基因组文库的构建	175
载体 DNA 的制备	178
从组织培养生长的细胞中分离大分子量真核 DNA	181
真核 DNA 20 kb 片段的制备	182
连接和包装	184
文库的扩增	188
粘粒载体基因组文库的构建	189
磷酸酯酶处理的粘粒载体中的克隆	190

用两种限制酶消解和磷酸酯酶处理过的粘粒载体中的克隆	192
粘粒文库的扩增、贮存和筛选	195
第十章 重组克隆的鉴定	198
细菌菌落或噬菌斑的原位杂交	198
筛选少量细菌菌落	199
将菌落复印在硝酸纤维素滤膜上	201
利用杂交筛选噬菌体 λ 噬菌斑	202
噬菌体 λ 噬菌斑原位扩增后通过杂交进行筛选	204
固定在滤膜上的 DNA 或 RNA 与放射性探针杂交	205
与带有噬菌斑或菌落复印的硝酸纤维素滤膜杂交	206
利用杂交选择来鉴定 cDNA 克隆	208
利用与硝酸纤维素相结合的 DNA 进行杂交选择	208
杂交选择的 RNA 在网织红细胞裂解液中转译	215
注入到蛙卵母细胞的信使 RNA 的转译	219
利用大肠杆菌中的重组, 从噬菌体 λ 文库中筛选特异性 DNA 序列	221
利用重组进行选择的原理	221
在 π VX 筛选中使用的菌株	224
π VX 的制备	224
W3110 $r^- m^+$ (p3) 的转化	224
在 W3110 $r^- m^+$ (p3) (π VX) 上进行噬菌体 λ 文库平板测定	224
含有校正基因的噬菌体的遗传测定	224
π VX 系统的测定	225
π VX 系统的利用	227
第十一章 重组体 DNA 克隆的分析	228
质粒或噬菌体 λ DNA 的快速分离	228
快速分离少量质粒 DNA	228
快速分离少量噬菌体 λ DNA	230
作限制酶切位点图	232
一次和多次消解作图	232
依次消解	233
部分消解	234
Southern 转移	236
DNA 从琼脂糖凝胶转移到硝酸纤维素滤膜上	237
Southern 滤膜杂交	239
小片段 DNA 次级克隆到质粒载体中	241
利用粘性末端次级克隆 DNA 片段	241
在次级克隆中利用合成的 DNA 接头	241
连接两个平端末端 DNA 分子以创建限制性位点	245
进行快速依次克隆的步骤	246
第十二章 在大肠杆菌中表达克隆 DNA 的载体	248
启动子	248
利用噬菌体 λ_{PL} 启动子的载体	249

其它启动子	251
核糖体-结合位点	251
真核基因的表达	252
表达非融合的真核蛋白的载体	252
表达融合的真核蛋白的载体	257
克隆基因的最大表达	265
增加基因剂量	265
总结	266
附录	267
1: 生化技术	267
玻璃器皿和塑料器皿	267
有机试剂的配制	268
液体培养基	268
用于噬菌体 λ 工作的溶液	270
抗生素	271
缓冲液和溶液的配制	273
蛋白水解酶类	274
酶类	274
限制酶消解缓冲液	276
常用电泳缓冲液	276
常用凝胶载样缓冲液	277
透析管的准备	278
从乙醇和水混合液中干燥 ^{32}P -标记的核苷酸	278
核酸的纯化	279
核酸的浓缩	280
Sephadex G-50 层析	282
DNA 和 RNA 的定量	284
放射自显影	285
核酸中放射性的测量	287
制备质粒多种聚合体作为分子量参照物	288
用 Maxam-Gilbert 技术定序的方案	288
2: pBR322	291
pBR 322 的核苷酸序列	291
pBR 322 的限制切点	299
pBR 322 DNA 的限制片段	304
3: 常用细菌菌株	314
4: 厂商地址和产品简介	315
参考文献	319

第一章 载体-宿主体系

有四类载体可用于克隆外源 DNA 片段,并能在大肠杆菌中增殖:

质粒

噬菌体 λ

粘粒

噬菌体 M13

这四类载体虽然在大小和结构上差异悬殊,但共同具有下列性质:

1. 它们即使与一外源 DNA 片段共价连接时,也能在大肠杆菌中自律复制(即它们就是复制子);
2. 它们易于与细菌核酸分开,并能提纯;
3. 这些载体含有一些对于它们在细菌中增殖并非必要的 DNA 区段。插到这些区段的外源 DNA,可以象载体的正常组分一样进行复制和增殖。

各类载体具有适用于不同目的的特别的生物学特征。在本章中我们将描述这些克隆的载体,并讨论运用它们解决分子克隆问题的原理。

质 粒

质粒是一些存在于多种细菌染色体外的遗传单位。它们是一类双链、闭环 DNA 分子,其大小范围从1—200 kb 以上。质粒时常含有编码一些酶的基因,它们在有些情况下对细菌宿主是有利的。不同质粒所提供的表型中有:

对抗生素的抗性

产生抗生素

降解复杂有机化合物

产生大肠杆菌素

产生内毒素

产生限制和修饰的酶

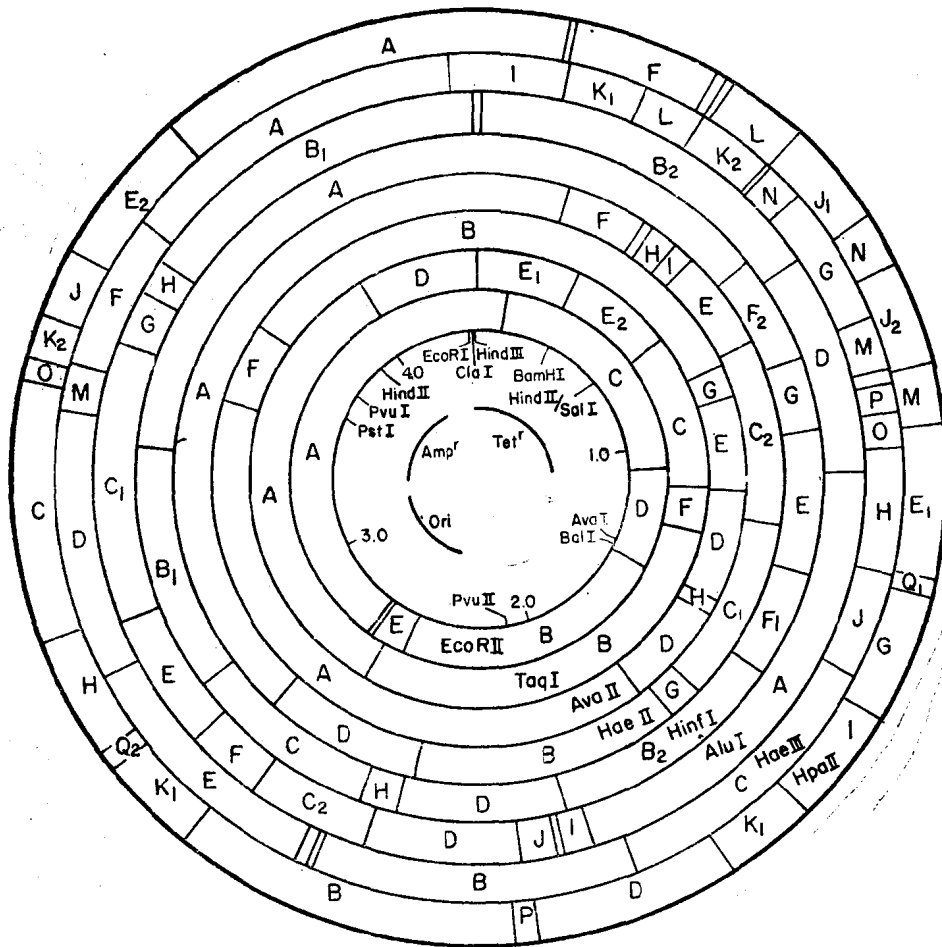
在自然条件下,许多质粒通过一种类似细菌接合的过程转递到新的宿主。但是,在实验室中质粒能通过一种称为转化的人工过程转移到细菌,在转化中质粒导入一些经处理后能使细胞暂时让小的 DNA 分子透过的细菌。质粒授予受体新的表型(例如,对抗生素的抗性)可简单地选择已经成功转化了的细菌。

在极大程度上,质粒 DNA 的复制是由细菌染色体复制所使用的一套相同的酶进行的。有些质粒处于“严紧控制”下,意味着它们的复制与宿主的繁殖相结合,致使每个细菌细胞中只有一个或至多几个拷贝质粒(见 Novick 等 1976 年的综述)。另一方面,处于“松弛控制”下的质粒有 10—200 拷贝数。更为重要的是,“松弛型”质粒的拷贝数在宿主

蛋白停止合成时(例如,用氯霉素处理),每个细胞可以增到数千份 (Clewell, 1972)。在没有蛋白合成时,松弛型质粒继续复制,而染色体 DNA 和严紧型质粒则停止复制。

用作克隆的载体,质粒应该具有某些特性。它应该相对较小,并应以松弛型复制。它应该带有一个或几个可供选择的标记,以作转化子的鉴定,并在细菌群体中保持该质粒。最终,它应在质粒复制的非主要区段有一种或多种限制酶的单一识别位点。更可取的是能被外源 DNA 插入的这些限制位点,应该分布在编码可供选择的标记的基因内,这样可使外源 DNA 片段的插入导致基因的失活。

下面描述一些能体现这类性质的多方面适用的克隆载体(见 Bolivar 和 Backman, 1979



pBR322

大小: 4.3 kb

复制子: ColE1, 松弛型

选择标记: Amp^r, Tet^r

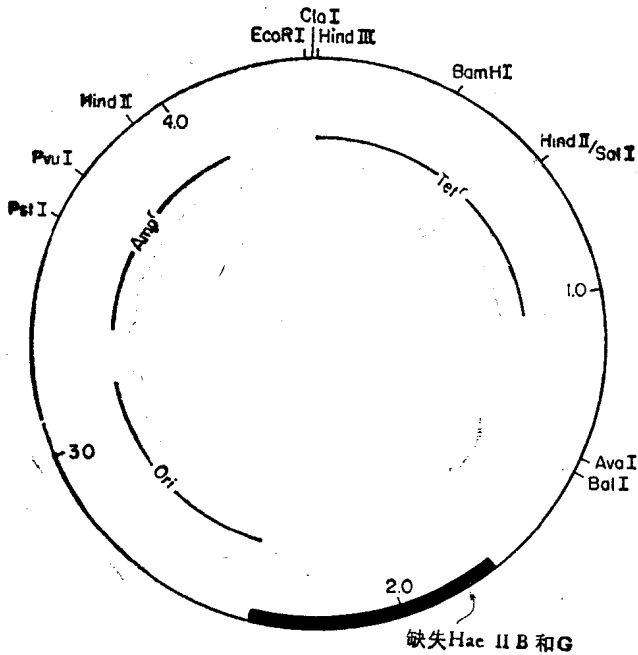
单一位点: AvaI, PstI, BamHI, Pvu II, ClaI, SalI, EcoRI, HindIII

插入失活: Amp^r-PstI

Tet^r-BamHI, HindIII (可变), SalI

资料: Bolivar 等 (1977); Sutcliffe (1978, 1979)

备注: pBR 322 是适用于最多方面的克隆载体的质粒。它的完整核苷酸序列是已知的 (Sutcliffe, 1979)。



pAT153

大小: 3.6 kb

复制子: ColEI, 松弛型

选择标记: Amp^r, Tet^r

单一位点: AvaI, PstI, BamHI,
ClaI, Sall, EcoRI,
HindIII

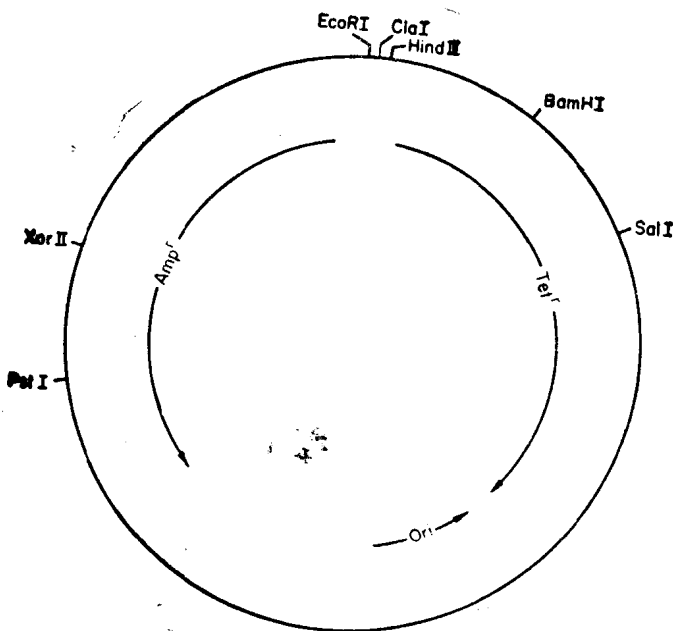
插入失活: Amp^r-PstI

Tet^r-BamHI, HindIII

(可变), Sall

资料: Twigg 和 Sherratt (1980)

备注: pBR 322 的高拷贝变异体。



pXf3

大小: 3.16 kb

复制子: ColEI, 松弛型

选择标记: Amp^r, Tet^r

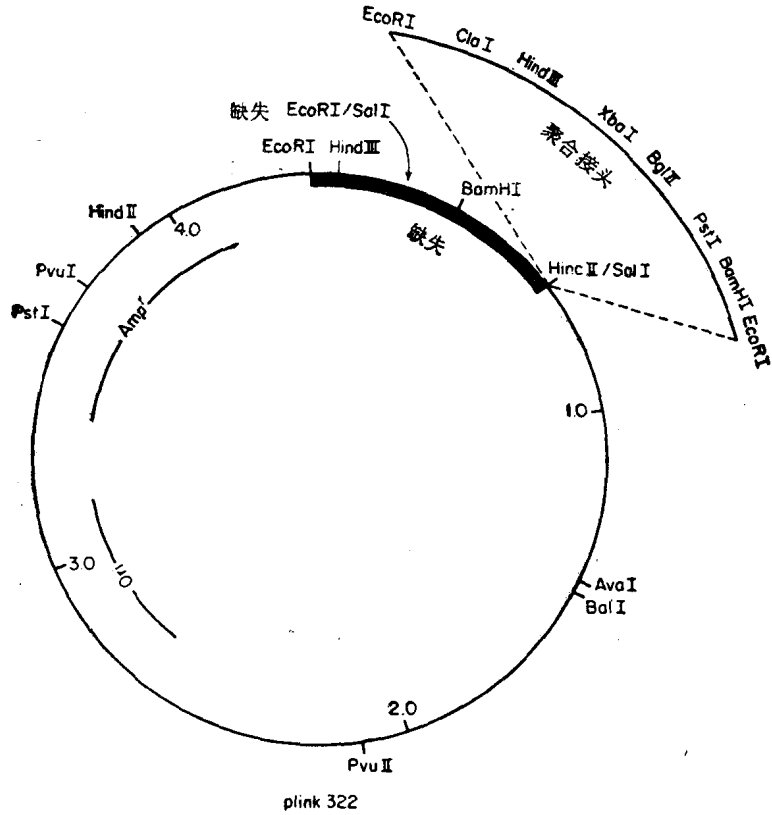
单一位点: EcoRI, ClaI, HindIII

插入失活: Tet^r-BamHI, SalI

Amp^r-PstI, XorII

资料: Sutcliffe (1978); D. Hanahan
(私人通讯)

备注: pXf 3 是 pBR 322 的衍生物。原
pBR 322 含有复制子的ThaI-A
片段与 Ava I 的一个片段融合
成 Sau 3A 片段, 这段编码氨
苄青霉素和四环素抗性, 产生
一个约 3,160 bp 的质粒。

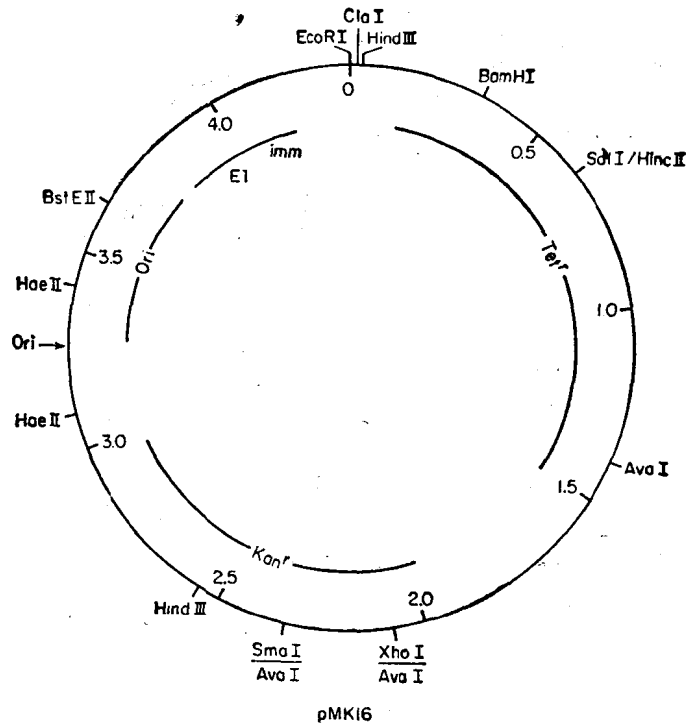


大小: 3.8 kb
 复制子: ColE1, 松弛型
 选择: Amp^r
 单一位点: ClaI, HindIII, XbaI, BglII, BamHI
 plink 322 是 pBR 322 的一株变异体, 含有一聚合接头, 可以增加有用的克隆位点效。
 资料: B. Seed (未发表)

聚合接头序列:
 GAATTC TCAIGTTTGACAGCTTATC ATCGA T AAGCIT CTAGAG ATCT
 EcoRI ClaI HindIII XbaI BglII
 TCCATACCTACCAGTTCTCCGC CTGCAG CAATGGCAACAACGTTGCC
 PstI
 CGGATCCGGTTCGCGC GAATTC
 BamHI EcoRI

年与 Bernard 和 Helinski 1980 年的综述)。最广泛使用的载体是 pBR322, 这是一种处于松弛方式控制的质粒, 具有氨苄青霉素和四环素抗性基因和一些适用的限制位点 (Bolivar 等, 1977)。附录 2 提供已知 pBR 322 的完整核苷酸序列 (Sutcliffe, 1978)。

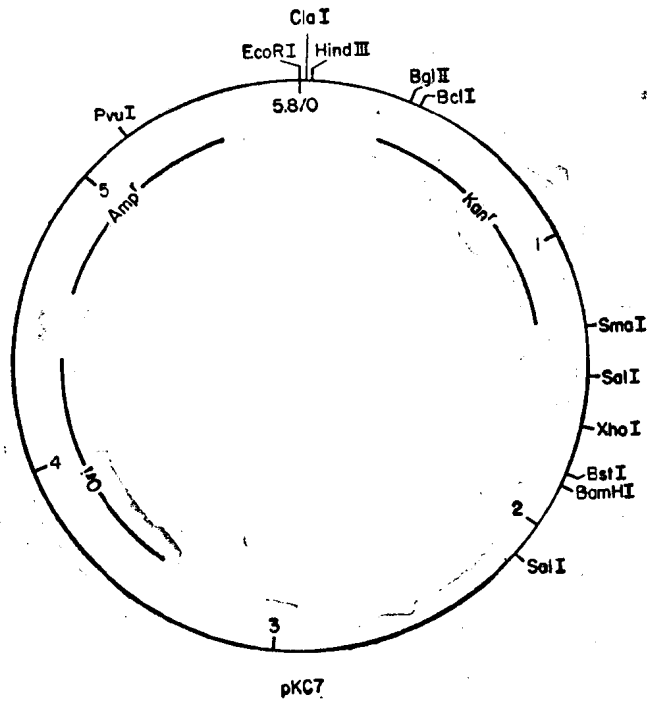
最近, 有两种 pBR 322 的衍生物可供使用, 其优点在于具有甚至更高的拷贝数。衍生物 pAT 153 (Twigg 和 Sherratt, 1980) 缺失 Hae II 的 B 和 G 片段 (A. Cowie 和 E. Ruley, 私人通讯), 这些缺失片段包含在质粒基因组中控制拷贝数目的区域里(见 3 页)。每个细胞



大小: 4.6 kb
 复制子: ColE1, 松弛型
 选择标记: ColE1 imm, Kan^r, Tet^r
 单一位点: BamHI, Sma I, EcoRI, Xho I, Hinc II, Sal I, Bst EII
 插入 BstEII 位点后干扰复制。
 插入失活: Tet^r-BamHI, Hinc II, SalI Kan^r-Sma I, Xho I
 外源 DNA 插入 Xho I 位点使 Kan^r 基因失活。
 资料: Kahn 等 (1979)
 备注: 对克隆带有 Sma I 或 Xho I 末端的 DNA 片段来说,它是最有用的载体。

含有的 pAT 153 拷贝数要比 pBR 322 多约 1.5—3.0 倍。另一衍生物, pXf 3 (D. Hanahan, 未发表)甚至比 pAT 153 还小。

小质粒的优点是很多的: 质粒 DNA 较易于处置,因它不易受物理损伤,它的限制酶切图较简单。此外,较小质粒一般具有较高拷贝数这一事实,增加了利用放射性标记杂交探针来鉴定带有外源 DNA 序列的细菌的灵敏度。但是,质粒的缩小可以导致有用克隆位点的消失。例如, pXf 3 缺乏存在于 pBR 322 和 pAT 153 中的 Bal I 和 Ava I 位点。为了



大小: 5.8 kb

复制子: ColE1, 松弛型

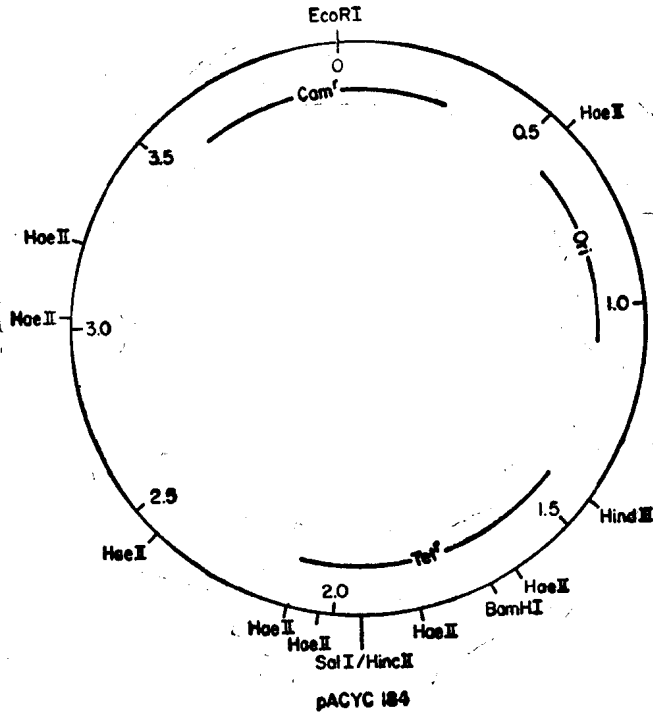
选择标记: Amp^r, Kan^r

单一位点: SmaI, XhoI, BstEII,
BamHI, PvuI, EcoRI,
HindIII, BglII, BclI

插入失活: Kan^r-BclI, BglII (可变)
Amp^r-PvuI

资料: Rao 和 Rogers (1979)

备注: 外源 DNA 插入 BglII 位点使
Kan^r 基因失活。



大小: 4.0 kb

复制子: P15A, 严紧型

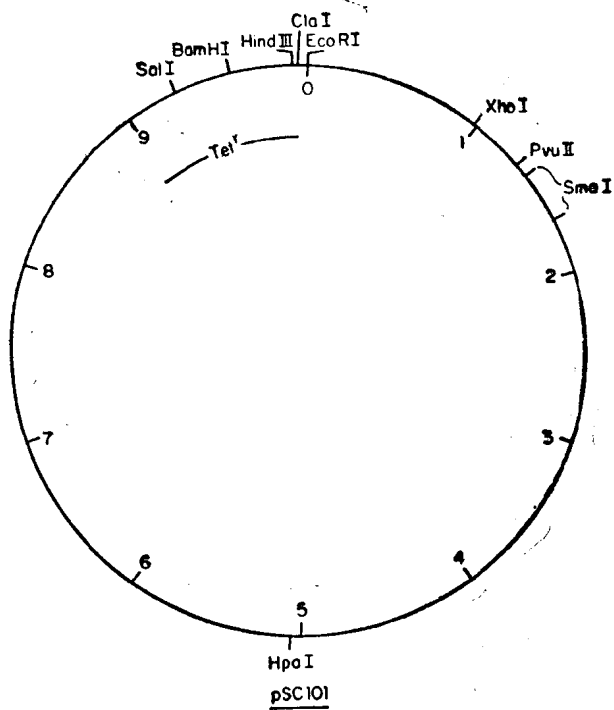
选择标记: Cam^r, Tet^r

单一位点: BamHI, EcoRI, HindIII,
SalI

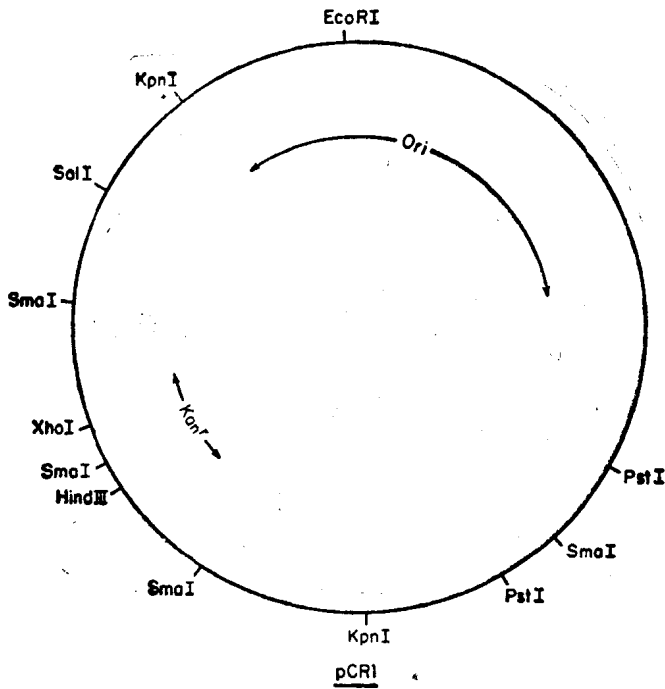
插入失活: Cam^r-EcoRI
Tet^r-BamHI, HindIII,
SalI

资料: Chang 和 Cohen (1978)

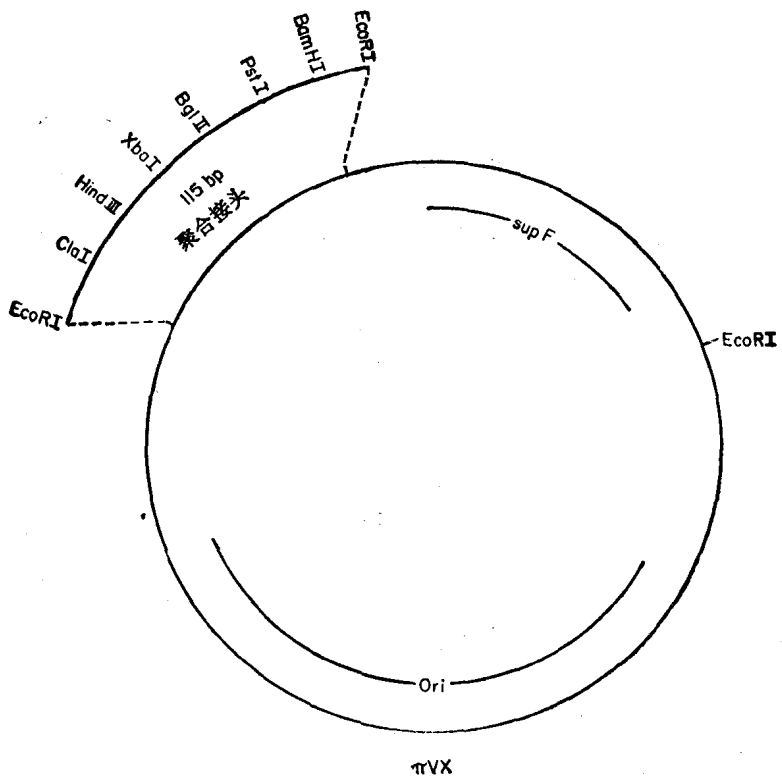
备注: 该质粒的特点是具有通过插入
EcoRI 位点使 Cam^r 失活的能力。



大小: 9.09 kb
 复制子: 严紧型, 低拷贝数
 选择标记: Tet^r
 单一位点: EcoRI, HindIII, BamHI,
 Sall, XhoI, PvuII, SmaI
 插入失活: Tet^r-HindIII, BamHI,
 Sall
 资料: Cohen 和 Chang (1973,
 1977)
 备注: pSC 101 与 pCR1 没有可检测
 到的同源性。



大小: 11.4 kb
 复制子: ColE1, 松弛型
 选择标记: Kan^r
 单一位点: EcoRI, HindIII
 插入失活: Kan^r-HindIII
 资料: Armstrong 等 (1972), Covey
 等 (1976)
 备注: pCR 1 与 pSC 101 没有可检
 测到的同源性。



大小: 902 bp
 复制: 松弛型?
 选择: supF

单一切点: ClaI, HindIII, BglII, PstI, BamI

资料: B. Seed (未发表)

备注: 该质粒由 3 个 EcoRI 片段组成: 由 pMB1 衍生的 508 bp 片段、一个合成的含 207 bp 的酪氨酸 tRNA 校正基因和一个由上述列出位点所组成的“聚合接头”。

聚合接头序列: 见 plink 322 图。

扩大有用克隆位点的范围, 曾经把聚合接头插到某些小质粒中。聚合接头是含有紧密相间的某些限制酶切位点的 DNA 片段。质粒 plink 322 (B. Seed, 未发表) 是带有--聚合接头的实例, 如 4 页所示。

一些对特殊克隆目的非常有用的质粒, 虽然不如 pBR 322 及其衍生物那么广泛使用, 也以简图表示。例如, pMK 16 (见 5 页) 在编码卡那霉素抗性基因中含有一个 Sma I 和 Xho I 限制位点。pKC 7 和 pACYC 184 在编码氯霉素抗性基因中带有一些有用的克隆位点 (见 6 页)。大质粒 pCR1 [(11.4kb) 和 pSC 101 (9.9 kb), 见 7 页] 在克隆实验中不是常规使用的, 但具有不相互杂交的独特性质。因此, 可能将一种来源的 DNA 片段克隆到 pSC 101, 并将另一来源的片段克隆到 pCR 1, 然后在所插入的两个 DNA 片段间进行交叉杂交实验而没有质粒 DNA 序列的干扰。或许所有质粒中最特异的是 pVX, 利用它从重组 λ 噬菌体群体中选择个别的噬菌体, 它们含有与插入质粒中的外源 DNA 片段同源的 DNA 序列 (B. Seed, 未发表; 见 8 页)。