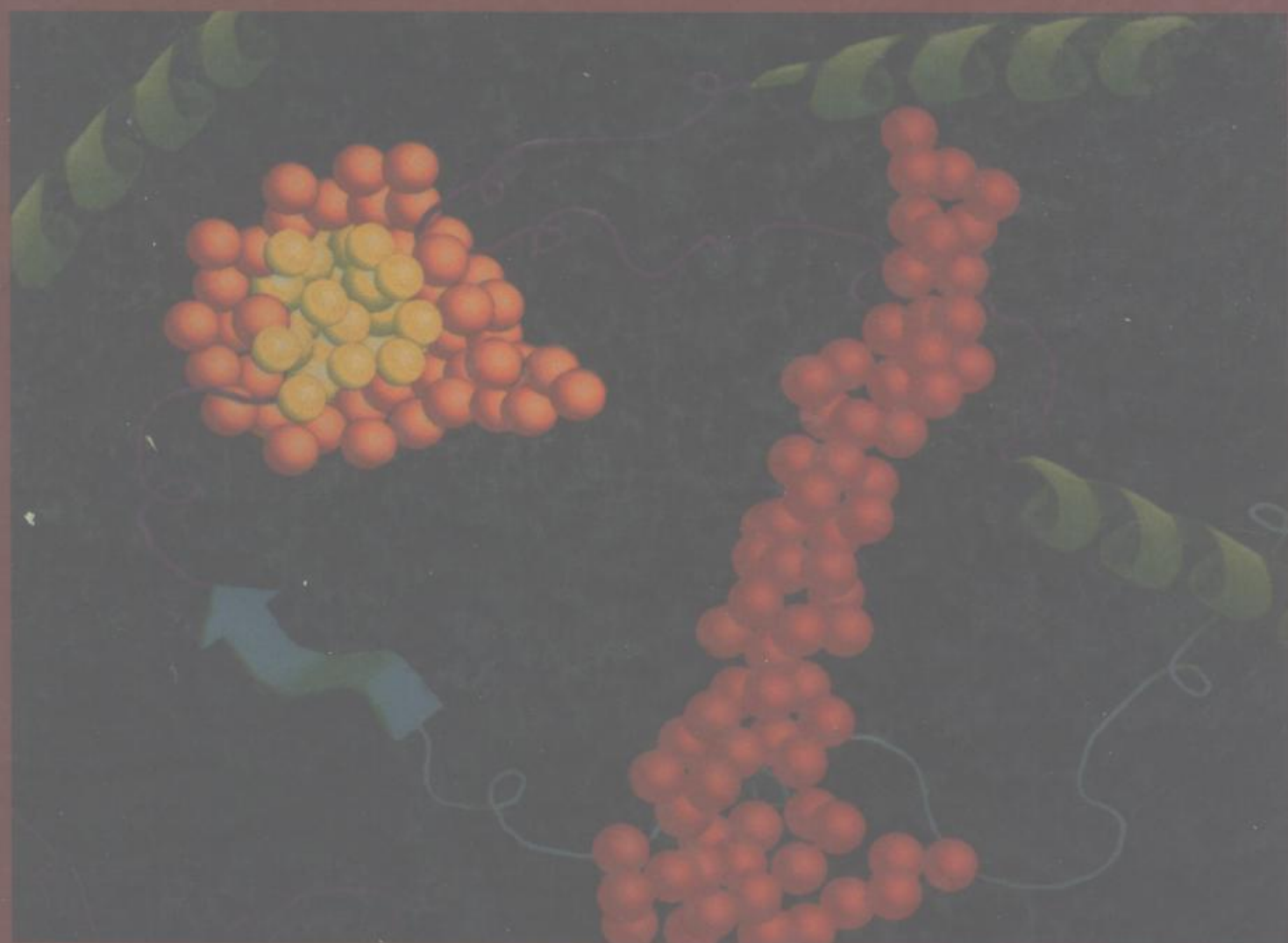


现代生物技术译丛

精编分子生物学实验指南

SHORT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY



[美] F. 奥斯伯 R. 布伦特
R. E. 金斯顿 D. D. 穆尔
J. G. 塞德曼 J. A. 史密斯
K. 斯特拉尔

科学出版社

内 容 简 介

本书是一本集现代分子生物学最新技术的基本原理和操作方法之大成的工具书。所收入的全是十分常用的重要方法,涉及 17 方面的内容:大肠杆菌、质粒和噬菌体,DNA 制备与分析,DNA 和 RNA 的酶促操作,RNA 的制备与纯化,重组 DNA 文库,重组 DNA 文库的筛选,DNA 测序,重组 DNA 诱变,DNA 转染哺乳动物细胞方法的介绍,蛋白质分析,免疫学,DNA-蛋白质相互作用,酿酒酵母,原位杂交与免疫组织化学,聚合酶链式反应,蛋白质表达,蛋白质磷酸化分析等。本书内容新颖、丰富、实用,适用于从事生物、医学和其他与生命科学相关的基础和应用研究的科研或教学人员。

Frederick M. Ausubel et al.

SHORT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY

3rd ed.

John Wiley & Sons, Inc., 1995

图字:01-97-1038

图书在版编目(CIP)数据

精编分子生物学实验指南/(美)F. 奥斯伯等著;颜子颖,

王海林译.-北京:科学出版社,1998

书名原文:Short Protocols in Molecular Biology

ISBN 7-03-006408-9

I. 精… II. ①奥… ②颜… ③王… III. 分子生物学-
实验方法 IV. Q7-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(97)第 26797 号

科学出版社出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码:100717

北京双青印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1998 年 6 月第 一 版 开本:787×1092 1/16

1998 年 6 月第一次印刷 印张:56

印数:1-5 020 字数:1 274 000

定价:110.00 元

中译本序

1953年Watson和Crick提出了脱氧核糖核酸(DNA)的双螺旋结构模型,并阐明了DNA是遗传信息的携带者,从而开辟了现代分子生物学的新纪元。近十年来,分子生物学处于快速发展时期,它渗透到生命科学的各个领域,特别是医药学和农学。分子生物学的新方法、新技术层出不穷。1992年由病毒基因工程国家重点实验室金冬雁、黎孟枫博士主译的《分子克隆实验指南》(*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*以下简称《分子克隆》)第二版是我国生物科学领域最畅销的图书之一,它在我国问世不到5年,印刷已达5次之多,对我国生物技术的普及与提高发挥了十分重要的作用。

1996~1997年,由病毒基因工程国家重点实验室颜子颖、王海林博士主译,其他博士生与博士后参与,并由金冬雁博士统校,已将Frederick M. Ausubel等主编的《精编分子生物学实验指南》(*Short Protocols in Molecular Biology*)第三版译出,由科学出版社出版发行,这是我国生物技术界的又一个喜讯。

《精编分子生物学实验指南》是已出版的《最新分子生物学实验方法汇编》(*Current Protocols in Molecular Biology*以下简称《汇编》)一书的简编版本。它是由原作者从每季度翻新的《汇编》中提炼而来,包括了最新版本的《汇编》中所有的基本方法和详细实验步骤。此书共17章,囊括了当今分子生物学的主要技术,并对近年来迅速发展起来的新领域有所侧重。书中第1章到第4章及第7章的部分内容为分子生物学的基本技术,在《分子克隆》一书中已有涉及,除此以外的其他章节均是《分子克隆》中没有的新内容,如基因组YAC文库,蛋白质-核酸、蛋白质-蛋白质相互作用,蛋白质磷酸化分析,差示PCR技术,以及酵母系统等等,基本上反映了当前分子生物学技术发展的方向。本书还详述了近年来原核和真核生物表达系统、真核生物细胞基因转移研究的新技术新方法。此外,有关蛋白质分析及免疫学方面的基本技术和新方法使本书作为一本权威的分子生物学实验技术手册更具有全面性和实用性。在当今世界上,本书以其独特的装帧设计与风格而获得“分子生物学红皮书”(The Red Book)的美誉。它与《分子克隆》齐名,常被西方学者并称为现代生物科学技术的“圣经”。

本室颜子颖、王海林博士均是承担国家生物高技术“863”计划的课题负责人,本室金冬雁博士远在美国国立卫生研究院工作。他们年轻有为,在出色完成自己繁重的科研任务之余,国内国外同时进行翻译、校订,日以继夜,辛苦工作,在短期内译成了这部巨著。译意准确、文字流畅,向我国读者奉献出又一部难得的好书。对此,我深感欣慰,并向他们表示热烈的祝贺。我相信,本书的出版对我国分子生物学及生物技术的发展必将起到重要的推动作用。

侯云德

病毒基因工程国家重点实验室主任
一九九七年六月二十六日于北京

• i •

44192

前言

这本书是已出版的《最新分子生物学实验方法汇编》(*Current Protocols in Molecular Biology*, CPMB 即《汇编》)一书中的实验方法的简编版本。它是从《汇编》的核心手册和每季度翻新的服务手册中提炼而来,包括了《汇编》中所有基本方法及其详细实验步骤。该书拟作为实验室手册使用,对象是那些熟悉《汇编》中各种详细解释的研究生和博士后人员,然而,在该书中对实验方法有详细的步骤说明,使有经验的研究人员也可将它作为独立的实验室操作指南。

虽然熟练掌握本手册中的技术方法可使读者进行分子遗传学研究,但这本手册并不适用于替代研究生水平的分子生物学教材或作为这一领域的综合性读本。另外,我们推荐读者在使用本手册时要对照参考《汇编》中的评述和详细注释。最后,我们极力要求读者通过在分子生物学实验室的工作获得对基本技术和实验室安全操作规程的第一手经验。

如何使用这本手册

结构

这本手册按章编排,每种实验方案均可从各节中获得。每一节中包括了材料、实验方案的步骤和每种技术的参考文献。在附录 5 中囊括了整个手册的全部的参考文献。本手册的排列和结构均与《汇编》中的基本一致。尽管各节的编号可能不完全相对应,但各节的标题在两个版本中是相同的。因此,拥有两种版本手册的使用者当需要更详细的解释时会发现对照参考汇编十分容易和便利。

在整本手册中,许多试剂和实验程序被反复应用,不过我们并不是反复复制这些信息,而是在章节之间广泛地使用对照参考。在手册中前面的各章(和附录 3A~3E)主要介绍常用的技术方法,如基本微生物学和酶、DNA、RNA 的基本操作方法,而后面的各章介绍的是更先进的技术方法。因此,在一种方案中无论什么时候用到某一特定的酶,均可对照参考第 3 章中适当的节,找到对该酶反应条件进行介绍的内容(如 3.7 节介绍反转录酶)。同样,在整个手册中读者可参照 1.3 节进行铺平板或在平板上划线;参照 1.2 节进行酚抽提和乙醇沉淀;参照 2.5A 节进行琼脂糖凝胶电泳等等。这样,在本书的后面章节所介绍的方案中就省略了制备、纯化和分析样品或目的分子的辅助程序。

附录提供了试剂和溶液的配方(附录 1),缩写的全称、有用的测量值和数据(附录 2),常用的生物化学实验技术(附录 3),供应商的名称和地址(附录 4)和所有被引用参考文献的完整信息(附录 5)。

方案

许多节中都含有几组方案。在每个节中首先出现的是基本方案,它一般也是首推的实验方法。备择方案提供在以下情况下使用:①使用不同的仪器或试剂可得到相似的结果;

在每个方案的材料栏中也将一些特殊的仪器列了出来。在此,我们并未试图将每个实验过程所需的所有仪器一一列出,而是提及那些在实验室可能并未常备或需要特别准备的仪器。在现代分子生物学实验室,应备有下列各种标准仪器,例如在本书中的常用仪器,而它们并未包括在各个材料栏中。

高压设备

天平 分析天平和制备天平

桌布 塑料布垫(包括“蓝色垫子”)

离心机 实验中需要一台低速(20 000 r/min)冷冻离心机和一台超速(20 000~80 000 r/min)离心机。制备质粒DNA时,使用垂直超速离心转头十分方便。至少需要一台可离心1.5 mL微量离心管的微型离心机。另外,还应有一台大容量、低速度的离心机用来收获大量的细菌培养液,以及一台带配适器的台式吊桶式离心机用来甩干96孔微量酶标板

计算机和打印机

暗室和显影罐或 X-Omat 自动 X 光片显影仪

过滤装置 用于在硝酸纤维滤膜或其他膜上收集酸沉淀

分部收集器

冷冻和冷藏冰柜 用于4℃、-20℃和-70℃孵育或贮存

通风橱

盖革氏计数器

干胶机

凝胶电泳装置 至少有一套可满足不同分子量大小的水平电泳仪和一套小型水平电泳仪。对于从事大规模测序的研究人员需要配备一套测序凝胶装置。一套用于聚丙烯酰胺蛋白质凝胶的垂直电泳仪,根据需要,配备一套用于双向蛋白质凝胶的特制电泳仪

制冰机

恒温箱(37℃) 用于培养细菌。我们推荐采用可以容纳组织培养转鼓的恒温箱,它可用于在标准的18mm×150mm试管中进行5 mL培养液的培养。New Brunswick Scientific公司生产一种便利和可定时的试管转鼓

恒温箱/摇床 一种封闭式摇床(如 New Brunswick 的恒温摇床)可振动4 L的烧瓶,这对培养1L的大肠杆菌培养液是必要的。而旋转水浴摇床(New Brunswick R76)对小量烧瓶培养液的培养有利

灯箱 用于观看放射自显影胶片

液氮

磁力搅拌器(最好带加热功能)

微量离心机 Eppendorf 型,最大转速在12 000~14 000 r/min

微量离心管 1.5 mL

微波炉 用于熔化琼脂和琼脂糖

研钵和研杵

裁纸刀 大号,可用来裁切大小46 cm×57 cm Whatman 滤纸

pH 计

pH 试纸

移液器 适用于1~1 000 μL 一次性吸头,每一位研究人员最好配备一套移液器

Polaroid 照相机和 UV 透射仪 用于拍摄染色凝胶照片

细胞刮 橡胶或塑料的

电源 对于凝胶电泳,300 V 电源就足够了。而对于DNA测序需要2 000 V 电源

放射线保护屏 (Lucite 或 Plexiglas)

放射性墨水

放射性废料收集箱 液体和固体废料

冰箱 4℃

防护眼罩

解剖刀和刀片

液体闪烁仪

封口机

摇床 定轨和平台,室温或37℃

分光光度计 UV 和可见光

真空旋转蒸发器

热循环仪

组织培养箱 CO₂加湿培养箱、相差显微镜、液氮贮存罐和层流罩

UV 交联仪

UV 灯 长波和短波

UV 透射仪

真空干燥器/冻干器

真空烤箱

旋涡混合器

水浴箱 至少两台可调温至80℃

纯水仪 或玻璃蒸馏装置,用来纯化用于分子生物学实验的水

X 光片、暗盒和增感屏

致 谢

如果没有 John Wiley & Sons 出版社《最新分子生物学实验方法汇编》全体工作人员的鼎力相助,就不可能有本书的出版。在这些帮助我们的人当中,我们特别要感谢:Karren Janssen, Kathy Morgan, Kathy Wisch, Janet Blair, Hazel Chan, Rebecca Barr, 和 Elizabeth Konkle。我们同样要特别感谢 Sarah Greene,是他首先提出了出版本书的构想,并且以他对业务的熟悉和对工作的耐心帮助我们形成了本书的框架。

对帮助本书的合作者,他们或撰写材料,或评论章节,或对方案作现场实验验证,我们由衷感谢他们。对那些——工作在我们实验室、工作在波士顿和全世界的研究院和产业实验室的人,我们深表谢意!

Frederick M. Ausubel	Roger Brent
Robert E. Kingston	David D. Moore
J. G. Seidman	John A. Smith
Kevin Struhl	

目 录

中译本序

前言

第1章 大肠杆菌、质粒和噬菌体	1
1.1 培养基及细菌学常用工具的准备	2
1.1.1 极限培养基	2
1.1.2 丰富培养基	3
1.1.3 固体培养基	3
1.1.4 顶层琼脂培养基	4
1.1.5 穿刺琼脂培养基	5
1.1.6 实验工具	5
1.2 在液体培养基中培养	6
1.2.1 基本方案1 过夜培养	6
1.2.2 基本方案2 大体积培养	6
1.2.3 基本方案3 细菌培养的检测	6
1.3 在固体培养基中培养	7
1.3.1 基本方案1 通过连续稀释法滴定和分离细菌菌落	7
1.3.2 基本方案2 通过平板划线法分离单菌落	7
1.3.3 基本方案3 通过铺平板分离单个菌落	8
1.3.4 辅助方案1 影印平板	8
1.3.5 辅助方案2 菌株的保存和复苏	8
1.4 经典细菌遗传学选论	9
1.5 质粒图谱	13
1.6 质粒 DNA 的小量制备	17
1.6.1 基本方案1 碱裂解小量制备法	17
1.6.2 备择方案 96孔微量滴定板碱裂解法	17
1.6.3 基本方案2 煮沸小量制备法	18
1.6.4 辅助方案 质粒 DNA 的保存	19
1.7 质粒 DNA 的大量制备	19
1.7.1 粗制裂解物的制备	19
基本方案1 碱裂解法	19
基本方案2 氯化铯/溴化乙锭平衡离心法	20
1.7.2 备择方案 利用离子交换层析和分子筛层析纯化质粒 DNA	21
1.8 将质粒 DNA 导入细菌细胞	22
1.8.1 基本方案1 CaCl_2 转化法	22
1.8.2 备择方案 一步法制备和转化感受态细菌	23
1.8.3 基本方案2 高效率的电转化方法	23
1.9 源于丝状噬菌体的载体	25

1.9.1 丝状噬菌体载体的发展和应用	25
1.10 M13噬菌体衍生载体的制备和应用	27
基本方案 利用辅助噬菌体从质粒制备单链 DNA	27
第2章 DNA 的制备和分析	29
2.1 水溶液中 DNA 的纯化和浓缩	30
2.1.1 基本方案 DNA 的酚抽提和乙醇沉淀	31
2.1.2 备择方案1 异丙醇沉淀 DNA	31
2.1.3 辅助方案1 酚的平衡及酚/氯仿/异戊醇的配制	31
2.1.4 辅助方案2 丁醇浓缩 DNA	32
2.1.5 辅助方案3 醚抽提法去除残存酚、氯仿或丁醇	33
2.1.6 备择方案2 玻璃珠法纯化 DNA	33
2.1.7 备择方案3 RNA 及 DNA 稀溶液的纯化和浓缩	34
2.1.8 备择方案4 乙醇沉淀法去除低分子量的寡核苷酸和核苷三磷酸	35
2.2 从哺乳动物组织中制备基因组 DNA	35
基本方案	35
2.3 从植物组织中制备基因组 DNA	36
2.3.1 基本方案 氯化铯离心法制备植物 DNA	36
2.3.2 备择方案 用 CTAB 制备植物 DNA	37
2.4 从细菌中制备基因组 DNA	39
2.4.1 基本方案 细菌基因组 DNA 的小量制备	39
2.4.2 备择方案 氯化铯法大规模制备细菌基因组 DNA	39
2.4.3 辅助方案 从所得到的基因组 DNA 制备物中除去多糖	40
2.5A 琼脂糖凝胶电泳	41
2.5A.1 基本方案 大片段 DNA 在琼脂糖凝胶上的分离	41
2.5A.2 辅助方案 微型凝胶及中型凝胶	42
2.5B 脉冲场凝胶电泳	43
2.5B.1 基本方案 倒转电场凝胶电泳	43
2.5B.2 备择方案 钳位均匀电场电泳(CHEF 电泳)	44
2.5B.3 辅助方案 高分子量 DNA 样品和分子量标准物的制备	45
2.6 从琼脂糖凝胶中分离和纯化大的 DNA 限制性酶切片段	46
2.6.1 基本方案1 琼脂糖凝胶电洗脱	46
2.6.2 基本方案2 NA-45 纸电泳	47
2.6.3 基本方案3 用低熔点琼脂糖凝胶分离 DNA 片段	48
2.6.4 备择方案1 使用 β -琼脂糖酶消化法从低熔点琼脂糖凝胶中回收 DNA	49
2.6.5 备择方案2 用玻璃珠法从低熔点琼脂糖凝胶中回收 DNA	49
2.6.6 辅助方案 用溴化乙锭斑点定量法对 DNA 浓度进行快速估测	50
2.7 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳	50
2.7.1 基本方案	50
2.7.2 备择方案1 通过电洗脱从聚丙烯酰胺凝胶纯化片段	52
2.7.3 备择方案2 DEAE 膜电洗脱法纯化标记片段	52
2.7.4 辅助方案 可重复使用的用于凝胶加样的塑料毛细管	54
2.8 筛分型琼脂糖凝胶电泳	54

基本方案	54
2.9A Southern 印迹法	55
2.9A.1 基本方案 用高盐缓冲液在尼龙膜或硝酸纤维素膜上进行 Southern 印迹	55
2.9A.2 辅助方案 紫外透射仪的校准	57
2.9A.3 备择方案1 用碱性缓冲液在尼龙膜上进行 Southern 印迹	58
2.9A.4 备择方案2 用向下毛细管转移法进行 Southern 印迹	58
2.9A.5 备择方案3 从聚丙烯酰胺凝胶至尼龙膜的电转印法	59
2.9B DNA 的斑点和狭线印迹	60
2.9B.1 基本方案 用多样抽滤加样器在不带电荷的尼龙膜和硝酸纤维素膜上进行 DNA 斑点和狭线印迹	60
2.9B.2 备择方案1 用多样抽滤加样器在带正电荷的尼龙膜上进行 DNA 斑点和狭线印迹	61
2.9B.3 备择方案2 DNA 斑点印迹的手工制备	62
2.10 DNA 印迹的杂交分析	62
2.10.1 基本方案 放射性标记的 DNA 探针对 DNA 印迹的杂交分析	63
2.10.2 备择方案 用放射性标记的 RNA 探针对 DNA 印迹进行杂交分析	67
2.10.3 辅助方案 从杂交膜上除去探针	68
2.11 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳纯化寡核苷酸	69
基本方案	69
第3章 DNA 和 RNA 的酶学操作	72
3.1 限制性内切酶消化 DNA	73
3.1.1 基本方案 单酶单 DNA 样品消化	73
3.1.2 备择方案1 多限制性内切酶消化 DNA 样品	76
3.1.3 备择方案2 消化多个 DNA 样品	77
3.1.4 备择方案3 限制性内切酶对 DNA 样品的部分消化	77
3.1.5 辅助方案 DNA 的甲基化	77
3.2 用多种酶消化进行 DNA 作图	79
基本方案	79
3.3 用限制酶部分消化进行 DNA 作图	79
基本方案	79
3.4 核酸操作的常用试剂和放射性同位素	80
3.4.1 贮液	80
3.4.2 10×酶缓冲液	80
3.4.3 酶反应条件及应用	82
3.4.4 核苷三磷酸(NTP)	85
3.4.5 标记核酸的放射性同位素	86
基本方案 酸沉淀法测定 DNA 和 RNA 中的放射性	86
备择方案 柱离心法分离放射性标记 DNA	87
3.5 依赖于 DNA 的 DNA 聚合酶	88
3.5.1 大肠杆菌 DNA 聚合酶 I Klenow 片段	90
基本方案1 标记 DNA 的3'末端	90
基本方案2 修复突出的3'或5'末端以产生平端	90

基本方案3 随机寡核苷酸引物介导的 DNA 标记	90
Klenow 酶的其他应用	91
3.5.2 T4 DNA 聚合酶	91
3.5.3 天然 T7 DNA 聚合酶	92
3.5.4 经修饰的 T7 DNA 聚合酶	93
3.5.5 <i>Taq</i> DNA 聚合酶	93
3.6 不依赖于模板的 DNA 聚合酶	94
末端脱氧核苷酸转移酶(末端转移酶)	94
3.7 依赖 RNA 的 DNA 聚合酶	95
反转录酶	95
3.8 依赖 DNA 的 RNA 聚合酶	96
噬菌体的 RNA 聚合酶:SP6、T7和 T3	96
3.9 不依赖 DNA 的 RNA 聚合酶	97
poly(A)聚合酶	97
3.10 磷酸酶和激酶	97
3.10.1 碱性磷酸酶	97
3.10.2 T4多核苷酸激酶	98
基本方案1 正向反应标记5'端	98
基本方案2 交换反应标记5'端	98
其他应用	98
3.11 外切核酸酶	99
3.11.1 单链5'→3'和3'→5'外切核酸酶	99
3.11.2 双链5'→3'末端外切核酸酶	99
3.11.3 双链3'→5'外切核酸酶	99
3.12 内切核酸酶	100
3.12.1 <i>Bal</i> 31核酸酶	100
3.12.2 S1核酸酶	101
3.12.3 绿豆核酸酶	101
3.12.4 微球菌核酸酶	101
3.12.5 脱氧核糖核酸酶 I (DNase I)	102
3.13 核糖核酸酶	103
3.13.1 核糖核酸酶 A(RNaseA)	103
3.13.2 核糖核酸酶 H	103
3.13.3 核糖核酸酶 T1	104
3.14 DNA 连接酶	104
3.14.1 T4 DNA 连接酶	104
3.14.2 大肠杆菌 DNA 连接酶	105
3.15 RNA 连接酶	105
T4 RNA 连接酶	105
3.16 DNA 片段的亚克隆	105
3.16.1 基本方案	105
3.16.2 备择方案 凝胶块中 DNA 片段的连接	107

3.17	聚合酶链式反应构建重组 DNA	108
	基本方案 DNA 片段亚克隆	108
3.18	非同位素探针的标记和比色检测	112
3.18.1	基本方案1 用切口平移法制备生物素酰化的探针	112
3.18.2	基本方案2 用随机寡核苷酸引物合成法制备生物素酰化探针	113
3.18.3	辅助方案 生物素酰化探针的比色法检测	114
3.18.4	备择方案 制备和检测地高辛标记的 DNA 探针	115
3.19	非同位素探针的化学发光检测	116
3.19.1	基本方案 生物素标记探针的化学发光检测	116
3.19.2	备择方案 地高辛标记探针的化学发光检测	118
3.19.3	辅助方案 紫外光源的标化	119
第4章	RNA 的制备和分析	120
4.1	从组织培养细胞中提取细胞质 RNA	121
4.1.1	基本方案	121
4.1.2	辅助方案 除去混杂的 DNA 污染	122
4.2	异硫氰酸胍法制备总 RNA	123
4.2.1	基本方案 CsCl 法纯化从培养细胞中提取的 RNA	123
4.2.2	备择方案1 CsCl 纯化组织 RNA	124
4.2.3	备择方案2 从组织或培养细胞中一步法分离 RNA	125
4.3	酚/SDS 法制备植物 RNA	126
	基本方案	126
4.4	制备细菌 RNA	127
4.4.1	基本方案1 从革兰氏阴性细菌中分离高质量的 RNA	127
4.4.2	基本方案2 从革兰氏阳性细菌分离 RNA	128
4.4.3	备择方案 从革兰氏阴性菌中快速分离 RNA	129
4.5	poly(A) ⁺ RNA 的制备	130
	基本方案	130
4.6	用单链 DNA 探针进行 mRNA 的 S1 核酸酶作图分析	131
4.6.1	基本方案 用 M13 模板进行 mRNA 的 S1 作图	131
4.6.2	备择方案1 从双链模板合成单链探针	134
4.6.3	备择方案2 用寡核苷酸探针进行 mRNA 的定量 S1 作图分析	134
4.6.4	辅助方案 S1 核酸酶 mRNA 定量分析的实验对照	135
4.7	核酸酶保护试验	136
4.7.1	基本方案	136
4.7.2	辅助方案1 RNA 探针的提纯	137
4.7.3	辅助方案2 模板 DNA 的制备	138
4.8	引物延伸	138
	基本方案	138
4.9	RNA 的 Northern 印迹和狭线杂交分析	141
4.9.1	基本方案 甲醛-琼脂糖凝胶电泳分离 RNA 的 Northern 杂交	141
4.9.2	备择方案1 经戊二醛/二甲基亚砜变性处理的 RNA 的 Northern 杂交	144
4.9.3	备择方案2 经狭线印迹固定的未分级 RNA 样品的 Northern 杂交	145

第5章 重组 DNA 文库的构建	147
5.1 基因组 DNA 文库概述	148
5.1.1 表现度与随机性	149
5.1.2 亚基因组文库	149
5.1.3 基因组 DNA 文库载体	150
5.2 cDNA 文库概述	150
5.3 噬菌体文库的扩增	151
基本方案	151
5.4 粘粒和质粒文库的扩增	152
基本方案	152
第6章 重组 DNA 文库的筛选	154
6.1 噬菌体文库的铺平板和转移	156
基本方案	156
6.2 粘粒及质粒文库的铺平板和转移	158
基本方案	158
6.3 应用 DNA 片段作探针	159
6.3.1 基本方案 在甲酰胺溶液中进行杂交	159
6.3.2 备择方案 在水溶液中进行杂交	160
6.4 使用合成寡核苷酸作探针	160
6.4.1 基本方案1 在氯化钠/柠檬酸钠溶液(SSC)中杂交	160
6.4.2 基本方案2 在氯化四甲铵(TMAC)中杂交	161
6.4.3 辅助方案 混合寡核苷酸5'末端标记	162
6.5 噬菌体克隆的纯化	164
基本方案	164
6.6 粘粒和质粒克隆的纯化	165
基本方案	165
6.7 在 λ 噬菌体噬斑中产生的融合蛋白的免疫筛选	165
6.7.1 基本方案 用抗体筛选 λ gt11表达文库	165
6.7.2 备择方案 在抗体筛选之前用IPTG诱导融合蛋白表达	166
6.8 在杂交选择和翻译后进行的免疫筛选	167
基本方案	167
6.9 概述筛选 YAC 文库和分析 YAC 克隆的策略	169
6.9.1 YAC 文库的构建	169
6.9.2 中心实验室的 YAC 文库筛选	171
6.9.3 筛选用的基因座特异性 PCR 试验的设计	171
6.9.4 分析独立的 YAC 克隆	172
6.9.5 YAC 插入片段的亚文库的构建与分析	173
6.10 对分离得到的 YAC 克隆的分析	173
6.10.1 基本方案1 含 YAC 的酵母菌株的培养和保存	174
6.10.2 基本方案2 制备 YAC DNA 进行 Southern 印迹分析	175
6.10.3 基本方案3 制备用于脉冲电场凝胶电泳的包埋于琼脂糖胶块中的酵母染色体	176

6.10.4	基本方案4	用 PCR 扩增法进行末端片段分析	177
6.10.5	备择方案	采用亚克隆至细菌质粒载体中分析末端片段	180
6.10.6	辅助方案	设计和制备 pUC19-ES 和 pUC19-HS 亚克隆载体	181
6.10.7	基本方案5	制备高分子量的含 YAC 的酵母 DNA	182
6.10.8	基本方案6	制备和分析 YAC 插入片段的亚文库	184
第7章 DNA 序列测定			185
7.0	DNA 测序方法概述		185
7.0.1	双脱氧测序(Sanger 法)		186
7.0.2	化学测序(Maxam-Gilbert 法)		188
7.0.3	双脱氧法或化学测序法的选择		189
7.0.4	放射性标记测序反应的备择标记		190
7.1	DNA 测序策略		191
7.1.1	双脱氧测序		191
7.1.2	化学测序		192
7.2	构建用于 DNA 测序的嵌套式缺失突变体		194
7.2.1	基本方案1 用外切酶 III 构建单向缺失突变体		194
7.2.2	辅助方案1 用 $[\alpha\text{-}^{35}\text{S}]$ dNTP 使 DNA 免于外切酶 III 消化		198
7.2.3	基本方案2 用 <i>Bal</i> 31 核酸酶构建嵌套式缺失突变体		198
7.2.4	辅助方案 制备 M13mp 测序载体以亚克隆 <i>Bal</i> 31 消化的 DNA 片段		203
7.3	制备 DNA 测序模板		204
7.3.1	基本方案1 制备单链 M13 噬菌体 DNA		204
7.3.2	基本方案2 从小量裂解物中制备 λ 噬菌体 DNA		205
7.3.3	基本方案3 小量制备用于双脱氧测序的双链质粒 DNA 模板		206
7.3.4	基本方案4 用于双脱氧测序的双链质粒 DNA 的碱变性		207
7.3.5	基本方案5 制备用于热循环测序质粒或噬菌体 DNA		207
7.4	双脱氧法 DNA 测序		208
7.4.1	基本方案1 用测序酶进行标记/终止测序反应		209
7.4.2	备择方案1 使用 Mn^{2+} 的标记/终止反应		213
7.4.3	备择方案2 使用 <i>Taq</i> DNA 聚合酶进行 Sanger 双脱氧测序		213
7.4.4	备择方案3 用 5' 末端标记引物一步法进行测序反应		214
7.4.5	基本方案2 用 α -标记核苷酸进行热循环测序反应		215
7.4.6	备择方案4 用 5' 末端标记引物进行热循环测序反应		218
7.5	化学发光双脱氧 DNA 测序法		218
7.5.1	基本方案 利用生物素标记引物的化学发光 DNA 测序法		220
7.5.2	备择方案1 链亲和素和生物素酰化碱性磷酸酶两步检测法(间接法)		222
7.5.3	备择方案2 用半抗原标记引物进行测序并用抗体碱性磷酸酶偶联物进行检测		222
7.6	用于测序的变性凝胶电泳		224
7.6.1	基本方案 测序胶的灌制、电泳及处理		224
7.6.2	备择方案1 缓冲液梯度测序胶		227
7.6.3	备择方案2 电解质梯度测序胶		228
7.6.4	备择方案3 含甲酰胺的测序胶		229

7.7 DNA 和蛋白质序列的计算机处理和分析	229
7.7.1 序列数据的录入	229
7.7.2 序列数据的确证和组装	232
7.7.3 限制酶作图	235
7.7.4 核酸结构预测	236
7.7.5 寡核苷酸设计策略	237
7.7.6 蛋白质编码区的识别	239
7.7.7 同源性检索	240
7.7.8 向分子生物学家提供的基因序列库及其他计算机资源	243
附录	243
第8章 克隆化 DNA 的诱变	252
8.1 无需表型选择的寡核苷酸介导的诱变	253
基本方案	253
8.2A 用简并寡核苷酸诱变:在小段 DNA 序列中产生大量突变	256
基本方案	256
8.2B 基因合成:用互为引物的长段寡核苷酸合成目的序列	259
基本方案	259
8.3 区域特异性诱变	260
8.3.1 基本方案	260
8.3.2 辅助方案 突变克隆的富集	263
8.4 DNA 的接头分区诱变	263
8.4.1 辅助方案 用嵌套缺失体和互补寡核苷酸进行接头分区诱变	263
8.4.2 备择方案 寡核苷酸介导的接头分区诱变	265
8.5 利用聚合酶链式反应(PCR)的定点诱变	266
8.5.1 基本方案1 通过 PCR 引入限制性内切酶位点	266
8.5.2 基本方案2 利用 PCR 引入点突变	268
8.5.3 备择方案 通过顺序 PCR 步骤引入点突变	271
第9章 DNA 导入哺乳动物细胞	274
9.1 磷酸钙转染法	277
9.1.1 基本方案 磷酸钙-DNA 在 HEPES 中形成沉淀的转染方法	277
9.1.2 辅助方案1 哺乳动物细胞的甘油/二甲基亚砜休克	279
9.1.3 备择方案 在 BES 中形成磷酸钙-DNA 沉淀的高效转染方法	279
9.1.4 辅助方案2 质粒 DNA 的纯化	280
9.2 利用 DEAE-葡聚糖的转染	281
9.2.1 基本方案	281
9.2.2 备择方案1 DEAE-葡聚糖大批量转染	283
9.2.3 备择方案2 悬浮细胞的转染	283
9.2.4 备择方案3 用氯喹处理细胞	284
9.3 电穿孔转染法	284
9.3.1 基本方案 电穿孔法转染哺乳动物细胞	284
9.3.2 备择方案 植物原生质体细胞的电穿孔转染	285
9.4 脂质体介导的转染	286

9.4.1	基本方案 用脂质体介导短暂表达	286
9.4.2	备择方案 用脂质体进行稳定转染	287
9.5	将基因稳定转染至哺乳动物细胞	287
9.5.1	基本方案	287
9.5.2	哺乳动物细胞的选择标记	288
9.6	遗传报道基因系统概述	290
9.6.1	报道载体的设计	294
9.6.2	体外报道分子分析方法	295
9.6.3	体内报道分子分析方法	298
9.7A	报道基因活性的同位素分析方法	299
9.7A.1	基本方案1 CAT 活性的层析分析法	299
9.7A.2	备择方案1 原位裂解细胞的 CAT 分析方法	302
9.7A.3	备择方案2 CAT 活性的相-抽提分析法	302
9.7A.4	基本方案2 人生长激素的放射免疫分析法	303
9.7B	非同位素分析报道基因活性	305
9.7B.1	基本方案1 萤火虫荧光素酶报道基因分析	305
9.7B.2	备择方案 冻融裂解的细胞的荧光素酶分析	306
9.7B.3	基本方案2 β -半乳糖苷酶报道基因的化学发光分析	307
9.8	转染后 RNA 的直接分析	308
9.8.1	转染效率	308
9.8.2	RNA 制备	309
9.8.3	RNA 分析	309
9.8.4	启动子强度	309
9.9	转染条件的优化	309
9.9.1	DEAE-葡聚糖转染法	309
9.9.2	磷酸钙转染法	310
9.9.3	电穿孔法	311
9.9.4	脂质体介导的转染	311
9.10	反转录病毒转导系统概述	312
9.10.1	反转录病毒生活周期	312
9.10.2	无复制能力的载体	315
9.10.3	有复制能力的载体	315
9.10.4	包装细胞系和病毒的产生	315
9.10.5	安全性问题	316
9.11	建立特异的反转录病毒产毒细胞系	317
9.11.1	基本方案1 将反转录病毒载体导入包装细胞系	317
9.11.2	基本方案2 测定病毒滴度:高滴度产病毒细胞克隆的鉴定	319
9.11.3	备择方案 产毒克隆的快速评价	320
9.11.4	辅助方案 培养细胞的 Xgal 染色	321
9.12	大规模制备和浓缩反转录病毒原液	321
9.12.1	基本方案 用离心法制备和浓缩病毒原液	321
9.12.2	备择方案 用聚乙二醇均相沉淀及层析法浓缩病毒	322

9.12.3 备择方案 用分子量截留滤膜进行浓缩	323
9.13 反转录病毒原液中辅助病毒的检测	323
9.13.1 基本方案 通过药物抗性的水平传播分析辅助病毒	324
9.13.2 备择方案 用反转录酶分析法检测辅助病毒	325
9.14 用反转录病毒在体外及体内感染细胞	326
9.14.1 体外细胞感染	326
9.14.2 在体内感染啮齿类动物	326
第10章 蛋白质的分析	329
10.1 比色法测定蛋白质含量	332
基本方案 Bradford 法	332
10.2 蛋白质的单向 SDS 凝胶电泳	333
10.2.1 电与电泳	333
10.2.2 基本方案1 变性(SDS)不连续凝胶电泳;Laemmli 凝胶电泳法	334
10.2.3 备择方案1 在 Tris-Tricine 缓冲系统中电泳	338
10.2.4 备择方案2 在无尿素条件下用 Tris 缓冲液分离多肽	340
10.2.5 备择方案3 连续 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳	341
10.2.6 备择方案4 超薄凝胶的灌制和电泳	342
10.2.7 辅助方案1 一次灌制多块浓度均一的凝胶	343
10.2.8 备择方案5 在梯度凝胶中分离蛋白质	345
10.2.9 辅助方案2 一次灌制多块梯度胶	347
10.2.10 基本方案2 在均一浓度的微型凝胶上电泳	349
10.2.11 辅助方案3 制备多块梯度胶	351
10.3 使用 O'Farrell 系统的双向凝胶电泳	352
10.3.1 基本方案1 第1向凝胶(等电聚焦)	353
10.3.2 基本方案2 第2向凝胶	354
10.3.3 备择方案1、2(第1向凝胶电泳)极端碱性、酸性蛋白的等电聚焦	356
10.3.4 备择方案3 小型凝胶双向电泳	357
10.3.5 辅助方案 组织来源的蛋白质样品的溶解和制备	357
10.4 从已染色的凝胶中电洗脱回收蛋白质	358
基本方案	358
10.5 凝胶中蛋白质的染色	360
10.5.1 基本方案1 考马斯亮蓝染色	360
10.5.2 基本方案2 银染法	361
10.5.3 备择方案 非氨盐银染法	362
10.5.4 基本方案3 快速银染法	363
10.5.5 辅助方案 凝胶拍照	364
10.6 检测转印到膜上的蛋白质	364
10.6.1 基本方案 印度墨汁染色	364
10.6.2 备择方案 金染色	365
10.6.3 辅助方案 碱处理增强蛋白质的染色	365
10.7 免疫印迹与免疫检测	366
10.7.1 基本方案1 用转移槽转印蛋白质	366

10.7.2	备择方案1	用半干转移系统转印蛋白质	368
10.7.3	辅助方案	转印后蛋白质的可逆染色	369
10.7.4	基本方案2	用第二抗体偶联物进行免疫检测	369
10.7.5	备择方案2	用亲和素-生物素偶联的第二抗体进行免疫检测	371
10.7.6	基本方案3	用发色底物显迹	371
10.7.7	备择方案3	用发光底物显迹	373
10.8	凝胶过滤层析		373
10.8.1	基本方案	蛋白质的凝胶过滤分离	374
10.8.2	备择方案	蛋白质的凝胶过滤脱盐	376
10.8.3	辅助方案	凝胶介质和层析柱的选择	376
10.9	离子交换层析		377
10.9.1	基本方案		377
10.9.2	辅助方案	离子交换层析介质和层析柱的选择	379
10.10	免疫亲和层析		380
10.10.1	基本方案	可溶性抗原或膜结合抗原的分离	380
10.10.2	备择方案1	抗原的批处理纯化	382
10.10.3	备择方案2	低 pH 洗脱抗原	382
10.11	金属螯合亲和层析		383
10.11.1	基本方案	天然 MCAC 纯化带组氨酸尾的可溶性融合蛋白	383
10.11.2	备择方案1	变性条件下用 MCAC 纯化带组氨酸尾的不溶性融合蛋白	386
10.11.3	备择方案2	MCAC 纯化蛋白的固相复性	387
10.11.4	辅助方案1	已纯化蛋白的分析和处理	387
10.11.5	辅助方案2	NTA 介质的再生	388
10.12	反相高效液相层析		388
10.12.1	基本方案	多肽和蛋白质的分离	388
10.12.2	备择方案	蛋白质的分离	390
10.12.3	辅助方案	水、缓冲液和溶剂的脱气	390
10.13	离子交换高效液相层析		391
10.13.1	基本方案1	阴离子交换 HPLC	392
10.13.2	基本方案2	阳离子交换 HPLC	393
10.14	分子排阻高效液相层析		393
	基本方案		393
10.15	免疫沉淀法		394
10.15.1	基本方案	用抗体-Sepharose 偶联物免疫沉淀放射性标记抗原	394
10.15.2	辅助方案	制备抗体-Sepharose 偶联物	396
10.15.3	备择方案1	用抗 Ig 血清免疫沉淀放射性标记抗原	397
10.15.4	备择方案2	用抗 Ig 抗体-Sepharose、蛋白 A-或蛋白 G-Sepharose 或金黄色葡萄球菌(<i>S. aureus</i>)免疫沉淀放射性标记抗原	398
10.15.5	备择方案3	使用更剧烈的解离和洗涤条件的免疫沉淀	399
10.15.6	备择方案4	用抗体-Sepharose 琼脂糖偶联物免疫沉淀非标记抗原	399
10.16	克隆化基因的体外转录和翻译		400
	基本方案		400