

The Condensed Protocols

From Molecular Cloning:

A Laboratory Manual

分子克隆实验指南

精编版

[美] J. 萨姆布鲁克 (Joseph Sambrook) 著
D. W. 拉塞尔 (David W. Russell)

黄培堂 主译

王恒樑 周晓巍 刘先凯 苏国富 副主译



化学工业出版社
生物·医药出版分社

生物实验室系列

分子克隆实验指南 精编版

The Condensed Protocols

From Molecular Cloning: A Laboratory Manual

[美] J. 萨姆布鲁克 (Joseph Sambrook) 著
D. W. 拉塞尔 (David W. Russell)

黄培堂 主译

王恒樑 周晓巍 刘先凯 苏国富 副主译



化学工业出版社
生物·医药出版分社

·北京·

图书在版编目 (CIP) 数据

分子克隆实验指南精编版/[美] 萨姆布鲁克 (Sambrook, J.),
[美] 拉塞尔 (Russell, D. W.) 著; 黄培堂主译. —北京: 化学
工业出版社, 2007. 10

书名原文: The Condensed Protocols From Molecular Cloning:
A Laboratory Manual

(生物实验室系列)

ISBN 978-7-122-01148-0

I. 分… II. ①萨…②拉…③黄… III. 脱氧核糖核酸-重组-
实验 IV. Q523-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2007) 第 147006 号

The Condensed Protocols From Molecular Cloning: A Laboratory Manual, by Joseph
Sambrook, David W. Russell.

ISBN 087969771-7

Copyright © 2006 by Cold Spring Harbor Laboratory Press. All rights reserved.

Authorized translation from the English language edition published by Cold Spring Harbor
Laboratory Press.

本书中文简体字版由 Cold Spring Harbor Laboratory Press 授权化学工业出版社独家出版
发行。

未经许可, 不得以任何方式复制或抄袭本书的任何部分, 违者必究。

北京市版权局著作权合同登记号: 01-2006-6045

责任编辑: 傅四周 郎红旗

文字编辑: 周 侗 朱 恺

责任校对: 宋 玮

装帧设计: 关 飞

出版发行: 化学工业出版社 (北京市东城区青年湖南街 13 号 邮政编码 100011)

印 刷: 北京云浩印刷有限责任公司

装 订: 三河市万龙印装有限公司

787mm×1092mm 1/16 印张 44 $\frac{3}{4}$ 字数 1133 千字 2008 年 1 月北京第 1 版第 1 次印刷

购书咨询: 010-64518888 (传真: 010-64519686) 售后服务: 010-64518899

网 址: <http://www.cip.com.cn>

凡购买本书, 如有缺损质量问题, 本社销售中心负责调换。

定 价: 97.00 元

版权所有 违者必究

译者名单

主 译 黄培堂

副主译 王恒樑 周晓巍 刘先凯 苏国富

参加翻译和校阅的人员

(以姓氏笔画排序)

王恒樑	冯尔玲	朱 力	刘先凯	刘志敏
刘纯杰	许 龙	孙忠科	苏国富	李 朝
杨 晓	杨予涛	杨志新	吴 军	张兆山
张莹莹	张惟材	陆 兵	周建光	周晓巍
赵莉霞	胡宝成	俞炜源	段海清	袁 静
黄培堂	崔 芳			

出版者的话

21 世纪是生物科学的世纪，这已成为人们的共识。

生命科学随着人类对自身和自然的认识、探索而萌芽，随着人类生产和科学实践的进步而发展。现代生命科学包括生物学、医学、农学等传统学科领域，以及生物学、生物技术与环境科学乃至社会科学等其他学科相互渗透、交叉而产生的新型学科体系。20 世纪后叶现代生物科学尤其是分子生物学取得了一系列突破性成就，使得生命科学在自然科学体系中的位置发生了革命性的变化，成为 21 世纪的带头学科。人们对生命科学也寄予了无限的期望，希望能够解决人类社会所面临的人口膨胀、资源匮乏、疾病危害、环境污染和生态破坏等一系列重大问题。

回顾生命科学的发展历程，实验技术一直起着非常重要的促进作用。如 17 世纪 Leeuwenhoek 等人发明并应用显微镜技术，直接催生了“细胞学说”的建立和发展；1973 年 Cohn 和 Boyer 完成了 DNA 体外重组实验，标志着基因工程的肇始；1988 年 Kary Mullis 发明的 PCR 技术甚至使生命科学产生了飞跃性的发展。可以说，生命科学无时无刻离不开实验，实验是开启神奇的生命王国大门的钥匙。没有实验技术的不断进步，也就没有生命科学今天的巨大发展；同时，生命科学的发展又对实验技术提出了更高的要求，进一步刺激了后者的不断进步。生命科学正是在“实验催生和验证着基础理论，理论指导和发展了实验技术”的不断循环中从必然王国走向自由王国。

工欲善其事，必先利其器。为了有助于生命科学工作者更多地了解相关实验技术和仪器设备，更好地设计实验方案，更有效地开展实验过程，更合理地处理实验结果，化学工业出版社组织出版了“生物实验室系列”图书。系列图书在整体规划的基础上，本着“经典、前沿、实用，理论与技术并重”的原则组织编写，分批出版。

在题材上，系列图书涵盖综合实验技术和单项实验技术两个方面。其中综合实验技术既有以实验目的为题，如“蛋白质化学分析技术”，内容纵向覆盖多项实验技术；也有以某一生命学科领域的综合实验技术为题，如“发酵工程实验技术”、“生物化学实验技术”等。而单项实验技术则以深入介绍某一专项技术及其应用为主，在阐述其基本原理的基础上，横向介绍该项技术在多个领域的应用，如“双向电泳技术”、“流式细胞术”等。

在内容上，系列图书主要有以下两个显著特点。一是强调先进性——除了系统介绍常用和经典实验技术以外，特别突出了当前该领域实验手段的新理论、新技术、新发展，为国内专业人员起到借鉴和引导作用。二是强调可操作性——对于每一项实验技术，系统介绍其原理方法、设备仪器和实验过程，让读者明了实验的目的、方案设计以及具体步骤和结果处理，以期起到实验指南的作用。

本系列图书坚持质量为先，开拓国内和国际两个出版资源。一方面，约请国内相关领域兼具理论造诣和丰富实验室工作经验的专家学者编著；另一方面，时刻关注国际生命科学前沿领域和先进技术的进展，及时引进（翻译或影印）国外知名出版社的权威力作。

“生物实验室系列”图书的读者对象设定为国内从事生命科学及生物技术和相关领域（如医学、药学、农学）的专心研究人员，企业或公司的生产、研发、管理技术人员，以及

高校相关专业的教师、研究生等。

我们殷切希望“生物实验室系列”图书的出版能够服务于我国生命科学的发展需要，同时热忱欢迎从事和关心生命科学的广大科技人员不仅对已出版图书提供宝贵意见和建议，也能对系列图书的后续题目设计贡献良策或推荐作者，以便我们能够集思广益，将这一系列图书沿着可持续发展的方向不断丰富品种，推陈出新。

**谨向所有关心和热爱生命科学，为生命科学的发展孜孜以求的
科学工作者致以崇高的敬意！**

祝愿我国的科技事业如生命之树根深叶茂，欣欣向荣！

化学工业出版社
生物·医药出版分社

译者序

分子生物学实验技术的建立和发展大大推动了生命科学和生物技术等方面的科学研究，同时学科的交叉发展和科研成果的不断涌现也使得分子生物学实验技术更加完善成熟、更加丰富翔实、更日新月异，在此方面无可非议的权威著作当数美国冷泉港实验室的《分子克隆实验指南》。

《分子克隆实验指南》初版写于1982年，当时仅有为数不多的实验室开展了该领域的研究，实验手段并不多，方法也不尽成熟。7年后的1989年分子生物学研究已较为普遍开展，一部内容丰富、更加实用的《分子克隆实验指南》第2版应运而生。进入20世纪90年代以后，分子生物学研究蓬勃发展，同时也带动了相关技术的飞速发展，如PCR技术及测序技术的自动化、多种试剂盒可以代替标准的实验步骤、现成的文库取代了繁杂的工作、工具酶的数量和质量的提高等，促进了分子生物学技术手段的快速发展，2001年第3版《分子克隆实验指南》应运而生。该版是一种成熟的操作规程，内容更加丰富，技术更加先进可靠，我们及时组织一线科技人员将其译成中文，科学出版社于2002年出版。

第3版中除实验操作程序之外，并有一定的篇幅对相关的基础理论、方案对比及解决难点的建议等进行了阐述。这些内容无疑对有些科技工作者是相当必要的，然而作为一种工具书显得冗长，特别是包括了大量参考文献，翻阅起来不甚方便。为此，原书作者仅将第3版的实验材料和操作技术抽出并进行了适当的修正，编写了《分子克隆实验指南精编版》，于2006年出版。为了方便我国广大相关科技人员使用，在原来参加翻译第3版人员的基础上重新组织了军事医学科学院生物工程研究所的部分青年科技工作者翻译了此精编版。该精编版仅保留第3版的实验材料和技术操作步骤，删除了其它内容，使其真正成为一本手册性实验技术指南。这样使第3版的中译本两册变为现在的一册，使用起来更为方便了。需要特别说明的是，精编版中的少量资料需与《分子克隆实验指南》英文原著第3版（书中一般缩写作“MC3”）对照阅读。

在此还应再次指出，尽管参加翻译的人员均是从事该领域研究的高级研究人员和博士毕业生，且大都参加过原书的翻译工作，但由于知识、能力和水平的限制，译文中难免存在错误和不当之处，敬请读者批评指正。

黄培堂

2007年11月

目 录

第 1 章 分子克隆中使用的质粒载体的制备

方案 1.1	SDS 碱裂解法制备质粒 DNA: 小量制备	1
方案 1.2	SDS 碱裂解法制备质粒 DNA: 中量制备	3
方案 1.3	SDS 碱裂解法制备质粒 DNA: 大量制备	5
方案 1.4	煮沸法小量制备质粒 DNA	7
方案 1.5	煮沸法大量制备质粒 DNA	9
方案 1.6	用牙签挑取菌落小量制备质粒 DNA	11
方案 1.7	SDS 裂解法制备质粒 DNA	13
方案 1.8	聚乙二醇沉淀法纯化质粒 DNA	15
方案 1.9	层析法纯化质粒 DNA	17
方案 1.10	氯化铯-溴化乙锭梯度平衡离心法纯化闭环 DNA: 连续梯度法	18
方案 1.11	氯化铯-溴化乙锭梯度平衡离心法纯化闭环 DNA: 不连续梯度法	20
方案 1.12	有机溶剂萃取法从 DNA 中去除溴化乙锭	22
方案 1.13	离子交换层析法从 DNA 中去除溴化乙锭	24
方案 1.14	NaCl 离心法去除质粒 DNA 样品中的小片段核酸	25
方案 1.15	Sephacryl S-1000 层析法去除质粒 DNA 样品中的小片段核酸	26
方案 1.16	氯化锂沉淀法去除质粒 DNA 样品中的小片段核酸	28
方案 1.17	在质粒载体中进行定向克隆	29
方案 1.18	在黏性末端上连接接头	31
方案 1.19	在质粒载体中进行平末端克隆	33
方案 1.20	质粒 DNA 的去磷酸化	36
方案 1.21	平末端 DNA 连接合成的接头	38
方案 1.22	在低熔点琼脂糖中连接质粒和目的 DNA	40
方案 1.23	制备和转化大肠杆菌感受态的 Hanahan 方法: 高效的转化方法	42
方案 1.24	制备和转化感受态大肠杆菌的 Inoue 方法: 超级感受态细胞	45
方案 1.25	氯化钙制备大肠杆菌感受态	48
方案 1.26	大肠杆菌的电转化	50
方案 1.27	用 X-gal 和 IPTG 筛选细菌克隆: α 互补	52
方案 1.28	小量细菌克隆的杂交筛选	53
方案 1.29	中量细菌克隆的杂交筛选	54
方案 1.30	大量菌落的杂交筛选	56
方案 1.31	菌落的裂解和 DNA 与滤膜的结合	58
方案 1.32	在滤膜上进行细菌 DNA 的杂交	59

第 2 章 λ 噬菌体及其载体

方案 2.1	λ 噬菌体的平板培养	63
--------	--------------------	----

方案 2.2	λ 噬菌体噬菌斑的挑取	65
方案 2.3	通过平板裂解和洗脱制备 λ 噬菌体原种	66
方案 2.4	用小量液体培养制备 λ 噬菌体原种	68
方案 2.5	λ 噬菌体的大规模培养: 低倍数感染	69
方案 2.6	从大规模裂解物中沉淀 λ 噬菌体颗粒	70
方案 2.7	通过凝胶电泳测定 λ 噬菌体原种和裂解物中 DNA 的含量	72
方案 2.8	通过 CsCl 等密度梯度离心纯化 λ 噬菌体颗粒	73
方案 2.9	通过甘油分级梯度离心纯化 λ 噬菌体颗粒	76
方案 2.10	通过沉淀/离心纯化 λ 噬菌体颗粒	77
方案 2.11	用蛋白酶 K 和 SDS 从大规模培养物中提取 λ 噬菌体 DNA	78
方案 2.12	用甲酰胺从大规模培养物中提取 λ 噬菌体 DNA	79
方案 2.13	用作克隆载体的经单一限制性酶切割的 λ 噬菌体 DNA 的制备	81
方案 2.14	用作克隆载体的双限制性酶切割的 λ 噬菌体 DNA 的制备	83
方案 2.15	λ 噬菌体载体 DNA 的碱性磷酸酶处理	85
方案 2.16	λ 噬菌体臂的纯化: 通过蔗糖密度梯度离心	88
方案 2.17	用于基因组文库中的真核 DNA 的部分酶切: 预反应	91
方案 2.18	用于基因组文库的真核 DNA 的部分酶切: 制备反应	92
方案 2.19	λ 噬菌体臂与外源 DNA 片段的连接	94
方案 2.20	基因组文库的扩增	96
方案 2.21	噬菌体 DNA 从噬菌斑转移到滤膜	98
方案 2.22	噬菌体 DNA 在滤膜上的杂交	101
方案 2.23	λ 噬菌体快速分析: 从平板裂解物中纯化 λ DNA	103
方案 2.24	λ 噬菌体分离物的快速分析: 从液体培养物中纯化 λ DNA	106

第 3 章 M13 噬菌体载体

方案 3.1	M13 噬菌体铺平板	109
方案 3.2	M13 噬菌体液体培养	111
方案 3.3	M13 噬菌体双链 (复制型) DNA 的制备	112
方案 3.4	M13 噬菌体单链 DNA 的制备	114
方案 3.5	单链和双链 M13 噬菌体 DNA 的大规模制备	116
方案 3.6	M13 噬菌体作为克隆载体	118
方案 3.7	重组 M13 噬菌体克隆的分析	121
方案 3.8	用噬菌粒载体制备单链 DNA	122

第 4 章 高容量载体的应用

方案 4.1	用黏粒载体构建基因组 DNA 文库	126
方案 4.2	通过杂交方法筛选未经扩增的黏粒文库: 在杂交膜上涂铺文库	130
方案 4.3	黏粒文库的扩增和保存: 在液体培养基中扩增	132
方案 4.4	黏粒文库的扩增和保存: 在膜上扩增	133
方案 4.5	噬菌体 P1 及其克隆系统的应用	135
方案 4.6	在 <i>E. coli</i> 宿主间转移 P1 克隆	138
方案 4.7	细菌人工染色体基本操作	139

方案 4.8	从小规模培养物中分离 BAC DNA	141
方案 4.9	从大规模培养物中分离 BAC DNA	142
方案 4.10	酵母人工染色体的应用	145
方案 4.11	酿酒酵母的培养和 DNA 制备	146
方案 4.12	酵母 DNA 的小规模制备	148
方案 4.13	用 PCR 方法鉴定酵母克隆	150
方案 4.14	克隆在高容量载体上的基因组 DNA 片段末端的分离: 小载体 PCR	152

第 5 章 DNA 凝胶电泳和脉冲场琼脂糖凝胶电泳

方案 5.1	琼脂糖凝胶电泳	155
方案 5.2	琼脂糖凝胶中 DNA 的检测	158
方案 5.3	琼脂糖凝胶中 DNA 的回收: DEAE-纤维素膜电泳	159
方案 5.4	琼脂糖和聚丙烯酰胺凝胶中 DNA 的回收: 电洗脱至透析袋	162
方案 5.5	阴离子交换色谱纯化从琼脂糖和聚丙烯酰胺凝胶回收的 DNA	164
方案 5.6	低熔点琼脂糖凝胶中 DNA 的回收: 有机溶剂抽提	166
方案 5.7	低熔点琼脂糖凝胶中 DNA 的回收: 用琼脂糖酶消化	167
方案 5.8	碱性琼脂糖凝胶电泳	169
方案 5.9	中性聚丙烯酰胺凝胶电泳	171
方案 5.10	聚丙烯酰胺凝胶中 DNA 的染色检测	174
方案 5.11	聚丙烯酰胺凝胶中 DNA 的放射自显影检测	175
方案 5.12	聚丙烯酰胺凝胶中 DNA 片段的回收: 压碎与浸泡法	177
方案 5.13	脉冲场凝胶电泳的 DNA 制备: 哺乳动物细胞和组织 DNA 的分离	179
方案 5.14	脉冲场凝胶电泳的 DNA 制备: 酵母 DNA 的分离	181
方案 5.15	限制性内切酶消化琼脂糖凝胶栓中的 DNA	183
方案 5.16	脉冲场凝胶电泳的分子量标准	185
方案 5.17	横向交变脉冲场凝胶电泳 (TAFE)	186
方案 5.18	箝位匀强脉冲场凝胶电泳	189
方案 5.19	脉冲场凝胶中 DNA 片段的直接回收	191
方案 5.20	回收脉冲场凝胶中的 DNA 片段并浓缩	193

第 6 章 真核基因组 DNA 的制备和分析

方案 6.1	用蛋白酶 K 和苯酚从哺乳动物细胞中分离高分子量 DNA	196
方案 6.2	用甲酰胺从哺乳动物细胞中分离高分子量 DNA	201
方案 6.3	用缠绕法从哺乳动物细胞中分离 DNA	203
方案 6.4	从 96 孔微量滴定板上生长的哺乳动物细胞中分离 DNA	205
方案 6.5	从鼠尾或其它小样本中制备基因组 DNA	207
方案 6.6	哺乳动物 DNA 的快速分离	209
方案 6.7	酵母 DNA 的快速分离	211
方案 6.8	Southern 印迹: 用毛细管转移 DNA 到膜上	212
方案 6.9	Southern 印迹: DNA 从一块琼脂糖凝胶同时向两张膜转移	217

方案 6.10	放射性标记的探针与固定在膜上的核酸的 Southern 杂交	219
第 7 章 真核细胞 mRNA 的提取、纯化和分析		
方案 7.1	用酸性苯酚-硫氰酸胍-氯仿从细胞和组织中抽提纯化 RNA	224
方案 7.2	一步法从细胞和组织中同时制备 DNA、RNA 和蛋白质	226
方案 7.3	oligo (dT)-纤维素层析法分离 poly(A) ⁺ RNA	229
方案 7.4	批量层析法分离 poly(A) ⁺ RNA	231
方案 7.5	根据大小分离 RNA: 琼脂糖凝胶电泳分离乙醛酸化的 RNA	233
方案 7.6	按大小分离 RNA: 含甲醛的琼脂糖凝胶电泳分离 RNA	235
方案 7.7	变性的 RNA 转移、固定至膜	237
方案 7.8	Northern 杂交	241
方案 7.9	纯化的 RNA 的斑点杂交和狭缝杂交	243
方案 7.10	用核酸酶 S1 对 RNA 作图	245
方案 7.11	核糖核酸酶保护: 用核糖核酸酶和放射性标记的 RNA 探针 对 RNA 作图	251
方案 7.12	引物延伸法分析 RNA	255
第 8 章 聚合酶链反应体外扩增 DNA		
方案 8.1	聚合酶链反应	260
方案 8.2	制备克隆用 PCR 产物的纯化	262
方案 8.3	通过超滤去除 DNA 扩增产物中的寡核苷酸及过剩 dNTP	264
方案 8.4	PCR 产物的平末端克隆	265
方案 8.5	克隆 PCR 产物至 T 载体	267
方案 8.6	通过 PCR 在扩增的 DNA 产物末端引入限制性内切酶位点	269
方案 8.7	应用 PCR 的遗传工程	271
方案 8.8	应用 mRNA 反转录扩增 cDNA (RT-PCR)	274
方案 8.9	cDNA 5'末端的快速扩增 (5'-RACE)	277
方案 8.10	cDNA 3'末端的快速扩增 (3'-RACE)	281
方案 8.11	应用混合寡核苷酸引物引导的 cDNA 扩增 (MOPAC)	284
方案 8.12	原核载体中 DNA 克隆片段的快速鉴定	287
方案 8.13	长距离 PCR	289
方案 8.14	反向 PCR	291
方案 8.15	定量 PCR	294
方案 8.16	差异显示 PCR	297
第 9 章 放射性标记 DNA 探针与 RNA 探针的制备		
方案 9.1	随机引物法: 利用随机寡核苷酸延伸法对纯化 DNA 片段进行放射性标记	303
方案 9.2	随机引物法: 在熔化琼脂糖存在下利用随机寡核苷酸延伸法进行 DNA 的放射性标记	305
方案 9.3	利用聚合酶链反应制备放射性标记 DNA 探针	307
方案 9.4	从 M13 噬菌体模板合成固定长度的单链 DNA 探针	309
方案 9.5	从 M13 噬菌体模板合成非固定长度的单链 DNA 探针	312
方案 9.6	体外转录合成单链 RNA 探针	315

方案 9.7	用随机寡核苷酸引物从 mRNA 合成 cDNA 探针	318
方案 9.8	用寡聚 (dT) 作引物合成放射性标记的扣除 cDNA 探针	320
方案 9.9	用随机寡核苷酸延伸法进行扣除 cDNA 探针的放射性标记	324
方案 9.10	利用大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片段标记双链 DNA 的 3'端	327
方案 9.11	利用 T4 噬菌体 DNA 聚合酶标记双链 DNA 的 3'端	329
方案 9.12	用 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{3}'\text{-脱氧腺苷 } 5'\text{-三磷酸}$ 或 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ 双脱氧 ATP 进行双链 DNA 3'突出端的末端标记	331
方案 9.13	用碱性磷酸酶进行 DNA 片段的去磷酸化	332
方案 9.14	含 5'突出羟基端的 DNA 分子的磷酸化	334
方案 9.15	去磷酸化的 5'平端或 5'凹端 DNA 分子的磷酸化	336
方案 9.16	通过交换反应进行 5'突出端 DNA 分子的磷酸化	338

第 10 章 人工合成的寡核苷酸探针

方案 10.1	用聚丙烯酰胺凝胶电泳纯化合成的寡核苷酸	341
方案 10.2	寡核苷酸 5'末端磷酸化	345
方案 10.3	乙醇沉淀法纯化放射性标记的寡核苷酸	347
方案 10.4	CPB 沉淀法纯化放射性标记的寡核苷酸	348
方案 10.5	大小排阻层析法纯化放射性标记的寡核苷酸	349
方案 10.6	用 Sep-Pak C ₁₈ 柱层析法纯化放射性标记的寡核苷酸	351
方案 10.7	用大肠杆菌 DNA 聚合酶 I Klenow 片段标记合成的寡核苷酸	352
方案 10.8	寡核苷酸探针液相杂交: 用含季铵盐缓冲液洗涤	355
方案 10.9	解链温度的实验测定	357

第 11 章 cDNA 文库制备及基因鉴定

方案 11.1	cDNA 文库的构建	361
阶段 1	反转录酶催化合成 cDNA 第一链	361
阶段 2	cDNA 第二链的合成	363
阶段 3	cDNA 的甲基化	366
阶段 4	与接头或衔接子的连接	368
阶段 5	Sepharose CL-4B 凝胶过滤分离 cDNA	371
阶段 6	cDNA 与 λ 噬菌体臂的连接	373
方案 11.2	真核表达文库的构建与筛选	374
阶段 1	在真核表达载体上构建和筛选 cDNA 文库	374
阶段 2	在真核表达载体上构建的 cDNA 文库的筛选	376
方案 11.3	外显子捕获与扩增	379
阶段 1	文库的构建	379
阶段 2	电穿孔法将文库 DNA 转染 COS-7 细胞	382
阶段 3	mRNA 的提取	383
阶段 4	反转录 PCR	385
阶段 5	克隆分析	389
方案 11.4	用大片段基因组 DNA 克隆直接筛选 cDNA	391

第 12 章 DNA 测序

方案 12.1	建立随机重叠 DNA 插入文库	397
方案 12.2	用于双脱氧链终止法测序的变性双链 DNA 模板制备	402
方案 12.3	用 T7 噬菌体 DNA 聚合酶 (测序酶) 进行双脱氧测序反应	404
方案 12.4	用大肠杆菌 DNA 聚合酶 I Klenow 片段及单链 DNA 模板进行双脱氧测序反应	408
方案 12.5	用 <i>Taq</i> DNA 聚合酶进行双脱氧测序反应	411
方案 12.6	循环测序: 用 PCR 和末端标记的引物进行双脱氧测序反应	414
方案 12.7	化学测序法	417
方案 12.8	变性聚丙烯酰胺凝胶的制备	420
方案 12.9	含甲酰胺的变性聚丙烯酰胺凝胶的制备	423
方案 12.10	配制电解质梯度凝胶	424
方案 12.11	DNA 测序凝胶的加样和电泳	425
方案 12.12	放射自显影与测序凝胶的解析	428

第 13 章 诱 变

方案 13.1	含尿嘧啶的单链噬菌体 M13 DNA 制备	431
方案 13.2	寡核苷酸指导的单链 DNA 诱变	434
方案 13.3	以双链 DNA 为模板的体外诱变: 用 <i>Dpn</i> I 选择突变体	437
方案 13.4	通过单一限制位点消除进行寡核苷酸指导的诱变 (USE 诱变)	440
方案 13.5	利用大引物 PCR 在同一试管中进行高效快速定点诱变	444
方案 13.6	重叠延伸法产生特专一位点诱变	446
方案 13.7	用放射性标记的寡核苷酸杂交筛选定点诱变重组克隆	449
方案 13.8	利用单链构象多态性分析方法检测突变	454
方案 13.9	利用外切核酸酶 III 消化产生多组嵌套缺失突变体	458
方案 13.10	利用 BAL31 核酸酶消化法产生套缺失突变体	460

第 14 章 表达文库的筛选

方案 14.1	筛选构建于 λ 噬菌体载体的表达文库	465
方案 14.2	筛选构建于质粒载体的表达文库	470
方案 14.3	抗血清中交叉反应抗体的去除: 假筛选	476
方案 14.4	抗血清中交叉反应抗体的去除: 与 <i>E. coli</i> 裂解液孵育	477
方案 14.5	抗血清中交叉反应抗体的去除: 亲和层析	479
方案 14.6	λ 噬菌体表达文库中 DNA 结合蛋白的鉴定	480
方案 14.7	λ 溶原噬菌体编码的融合蛋白裂解液的制备: 细菌菌落的裂解	484
方案 14.8	λ 溶原噬菌体编码的融合蛋白裂解液的制备: 琼脂平板的裂解性感染	487
方案 14.9	λ 溶原噬菌体编码的融合蛋白裂解液的制备: 液体培养基中的裂解性感染	489

第 15 章 克隆基因在大肠杆菌中的表达

方案 15.1	利用 IPTG 可诱导启动子在大肠杆菌中表达克隆基因	491
方案 15.2	利用 T7 噬菌体启动子在大肠杆菌中表达克隆基因	493
方案 15.3	利用噬菌体 λ_{pL} 启动子在大肠杆菌中表达克隆基因	496

方案 15.4	利用碱性磷酸酶启动子 (<i>phoA</i>) 和信号肽序列分泌表达外源蛋白	499
方案 15.5	利用谷胱甘肽琼脂糖亲和层析纯化融合蛋白	502
方案 15.6	利用直链淀粉树脂亲和层析纯化麦芽糖结合蛋白融合蛋白	504
方案 15.7	利用固化 Ni ²⁺ 吸收色谱纯化带 His 标签的蛋白	507
方案 15.8	从包含体中纯化表达蛋白	509

第 16 章 克隆基因转入培养的哺乳动物细胞

方案 16.1	脂质体介导的 DNA 转染	514
方案 16.2	磷酸钙介导的质粒 DNA 转染真核细胞	517
方案 16.3	磷酸钙介导的高分子量基因组 DNA 转染真核细胞	520
方案 16.4	DEAE-葡聚糖介导的高效转染	522
方案 16.5	利用电穿孔技术介导 DNA 转染细胞	524
方案 16.6	利用基因枪技术介导 DNA 转染细胞	527
方案 16.7	利用 Polybrene 介导 DNA 转染细胞	529

第 17 章 哺乳动物细胞基因表达分析

方案 17.1	DNA 酶 I 足迹法确定蛋白质在 DNA 序列上的结合位点	532
方案 17.2	凝胶阻滞实验确定 DNA 结合蛋白	537
方案 17.3	DNA 酶 I 超敏感位点作图	539
方案 17.4	行进间转录分析	541
方案 17.5	哺乳动物细胞抽提物中氯霉素乙酰转移酶的活性分析	547
方案 17.6	哺乳动物细胞抽提物中荧光素酶的活性分析	549
方案 17.7	哺乳动物细胞抽提物中 β -半乳糖苷酶的活性分析	551
方案 17.8	四环素作为调节物诱导目的基因在哺乳动物细胞中的表达	553
阶段 1	pTet-tTA 稳定转染成纤维细胞	553
阶段 2	四环素调控的目的基因转染可诱导表达 <i>tTA</i> 基因的 NIH-3T3 细胞	556
阶段 3	分析转染细胞中表达的蛋白质	559
方案 17.9	蜕皮激素作为调节物诱导目的基因在哺乳动物细胞中的表达	561

第 18 章 蛋白质相互作用研究技术

方案 18.1	双杂交和其它双成分系统	563
阶段 1	诱饵-LexA 融合蛋白的鉴定	563
阶段 2	筛选一个相互作用子	567
阶段 3	阳性相互作用的再次确定	571
方案 18.2	用 GST 融合蛋白进行 Far Western 印迹来检测蛋白-蛋白相互作用	576
方案 18.3	用 GST 融合蛋白沉降技术检测蛋白-蛋白相互作用	579
方案 18.4	通过免疫共沉淀鉴定结合蛋白	581
方案 18.5	采用 GFP 和荧光共振能量转移技术测定蛋白质相互作用	584
阶段 1	用荧光染料标记蛋白质	584
阶段 2	进行 FLIM-FRET 分析前的准备	587
阶段 3	FLIM-FRET 测量	589
方案 18.6	利用 BIAcore 通过表面等离子共振光谱学技术分析蛋白质的相互作用	591
阶段 1	捕获表面的制备和结合活性测试	591

阶段 2 抗原-抗体相互作用的动力学分析	594
----------------------------	-----

附 录

附录 1 分子克隆中使用的缓冲液和试剂的配制	597
1.1 缓冲液	598
1.2 酸和碱	601
1.3 分子生物学中使用的缓冲液和贮存液的配制	601
1.4 有机试剂的配制	616
1.5 化学贮存液	617
1.6 元素周期表	620
1.7 试剂和缓冲液索引	621
附录 2 培养基	623
2.1 用于大肠杆菌的液体培养基	624
2.2 含有琼脂或琼脂糖的培养基	626
2.3 贮存培养基	626
2.4 抗生素	627
2.5 用于 λ 噬菌体操作的溶液	628
2.6 用于酵母繁殖和筛选的培养基	628
2.7 培养基索引	632
附录 3 分子克隆中的常用技术	634
3.1 玻璃制品和塑料制品的处理	636
3.2 透析管的处理	636
3.3 细菌培养物的保存	637
3.4 细胞数目的估算	637
3.5 核酸的纯化	639
3.6 核酸的浓缩	640
3.7 核酸的定量	645
3.8 核酸中放射性的测定	650
3.9 污染有溴化乙锭溶液的处理	652
3.10 凝胶过滤层析	653
3.11 通过羟基磷灰石层析分离单链 DNA 和双链 DNA	655
3.12 DNA 的片段化	657
3.13 离心	659
3.14 蛋白质的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳	660
3.15 SDS-聚丙烯酰胺凝胶的染色	666
3.16 SDS-聚丙烯酰胺凝胶的干燥	668
3.17 免疫印迹	669
3.18 技术索引	672
附录 4 告诫	673
索引	687

第 1 章

分子克隆中使用的质粒载体的制备

背景信息

如果没有其它说明,背景信息均见《分子克隆实验指南》(第 3 版)(简称 MC3)。

选择合适的大肠杆菌菌株	MC3, pp. 1. 14~1. 16 ^①
大肠杆菌菌株的遗传标记及其它性质	MC3, pp. A3. 6~A3. 10
个别质粒的性质	MC3, pp. A3. 2~A3. 3
质粒载体的类型	MC3, pp. 1. 11~1. 14

方案 1.1

SDS 碱裂解法制备质粒 DNA: 小量制备

通过 SDS 碱裂解法处理小量的细菌培养液 (1~2ml) 来提取质粒 DNA。

材料

注意: 标有 < ! > 的材料 的正确操作见附录 4。

试剂和溶液

贮存液、缓冲液和试剂的成分见附录 1。使用时将贮存液稀释到合适的浓度。

碱裂解溶液 I、碱裂解溶液 II、碱裂解溶液 III

碱裂解溶液 II 需要新鲜制备,并在室温使用。

乙醇

70%乙醇

酚: 氯仿 (1:1, 体积比) < ! > (选用; 参见步骤 8)

TE (pH 8.0), 含 20 μ g/ml 无 DNA 酶的 RNA 酶 A

载体和宿主

转化了有关质粒的大肠杆菌克隆

培养基和抗生素

含有相应抗生素的 LB 培养基、YT 培养基或 TB 培养基

① 这里的编号为《分子克隆实验指南》(第 3 版)英文原著中的编号。——译者注

离心机/转头/离心管

微型离心机 (4°C)

其它材料

真空抽吸装置 (见图 1-1)

附加信息

碱裂解方法的原理

MC3, p. 1. 31

碱裂解方法的疑难解析

MC3, p. 1. 42

方法

1. 挑取转化的单克隆菌落，接种于 2ml 含有相应抗生素的 LB 培养基、YT 培养基或 TB 培养基中，37°C 剧烈振荡培养过夜。
2. 将 1.5ml 培养物倒入微量离心管中，4°C 以最大速度离心 30s。剩余的原始培养物贮存于 4°C。
3. 尽可能吸尽离心管里的上清液 (图 1-1)。
4. 加入 100 μ l 冰预冷的碱裂解溶液 I，剧烈振荡将沉淀重悬。

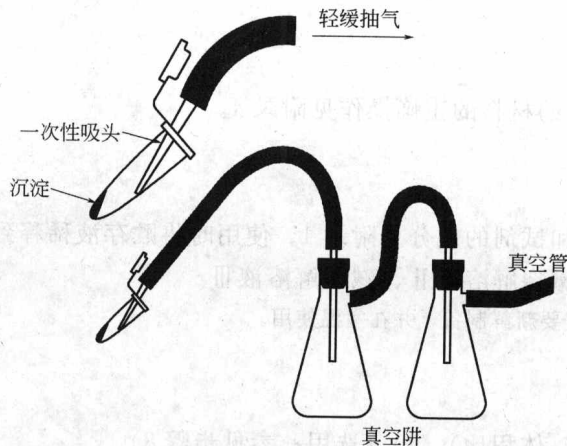


图 1-1 抽吸上清液

以一定角度握住敞口的离心管，使沉淀处于管底的上侧。用一个连接于真空管的一次性吸头吸掉离心管内的液体。将吸头刚好插入到离心管内的液面下。随着液体的吸出，将吸头移向管底。轻缓抽吸，防止将沉淀吸入吸头，并使吸头的尖端远离沉淀。最后吸尽附着于管壁的液滴

5. 在菌悬液中加入 200 μ l 新配制的碱裂解溶液 II，盖紧离心管，快速颠倒 5 次混匀溶液。不要涡旋振荡！置于冰上。
要确保整个离心管的管壁表面均与碱裂解溶液 II 接触。
6. 加入 150 μ l 冰预冷的碱裂解溶液 III，盖紧离心管盖，颠倒数次，使碱裂解溶液 III 均匀分散到黏稠的菌裂解液中。冰上放置 3~5min。
7. 菌裂解液于 4°C 以最大速度离心 5min，上清液转移到一个新离心管中。