



生命科学实验指南系列

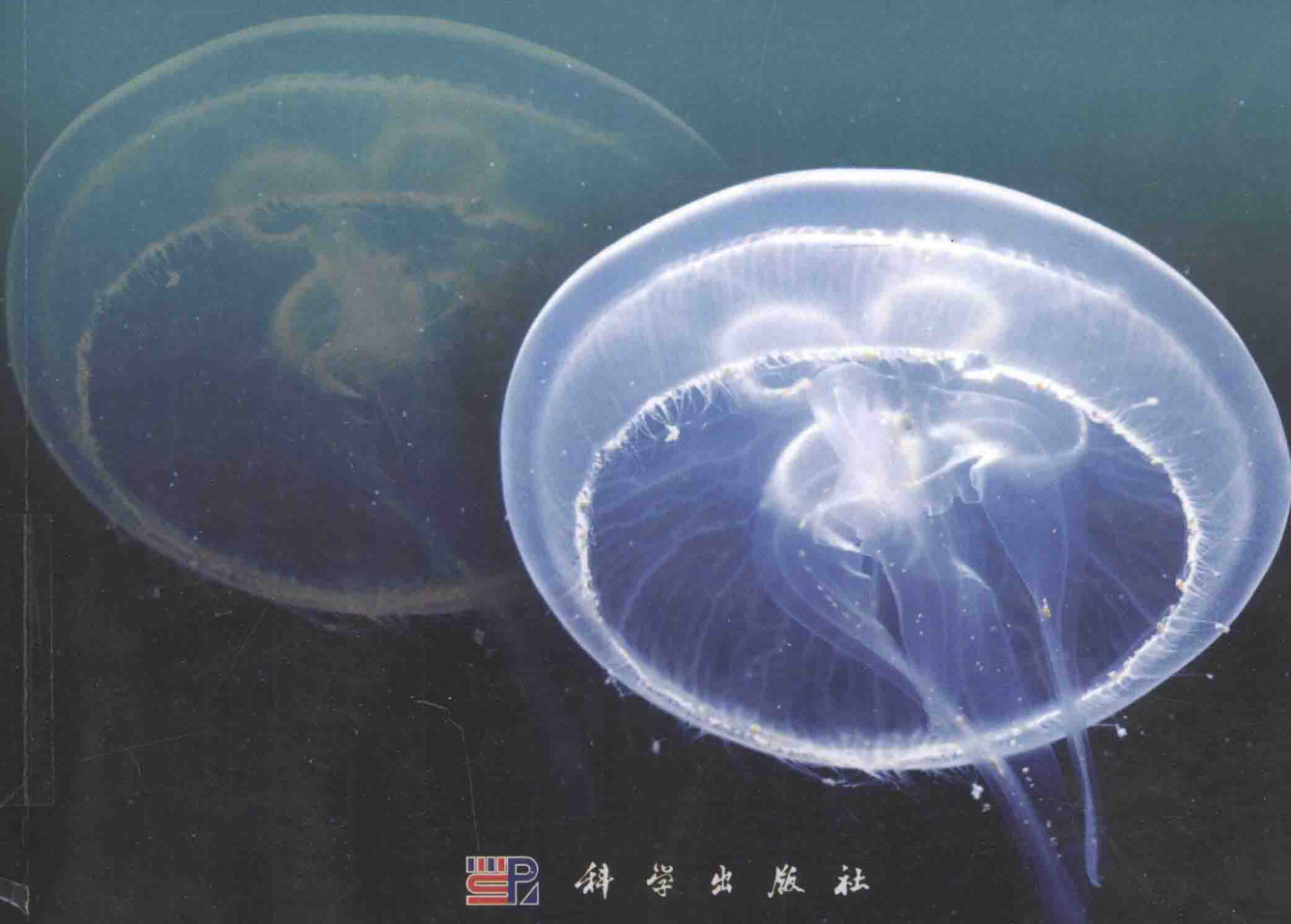


分子克隆实验指南

(第三版)

下册

[美] J. 萨姆布鲁克 D. W. 拉塞尔 著
黄培堂 等 译



科学出版社

生命科学实验指南系列·典藏版

分子克隆实验指南

(第三版)

(下 册)

[美]J. 萨姆布鲁克 D. W. 拉塞尔 著

黄培堂 等译

科学出版社

北 京

图字：01-2001-0665 号

内 容 简 介

“生命科学实验指南系列”图书均出自名家，包括众多从 Cold Spring Harbor Laboratory Press 和 John Wiley & Sons 等国际知名出版社引进的实验室必备工具书，是生命科学领域最先进、实用、权威的实验手册类优秀图书。该系列图书简单明了，囊括了全世界最著名的生物类实验室操作方法，无论是初学者还是需要深入研究的科研工作者都能从中获益。该系列图书在读者群中有较高的知名度和美誉度，特别是以《分子克隆实验指南》和《精编分子生物学实验指南》为代表，堪称经典，分别被喻为生命科学领域的“蓝宝石”和“红宝石”。现挑选其中的精品集结成典藏版。

Joseph Sambrook, David W. Russell

Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed.

© 2001 by Cold Spring Harbor Laboratory Press

图书在版编目（CIP）数据

生命科学实验指南系列：典藏版/雷东锋等编著. —北京：科学出版社，2016

ISBN 978-7-03-047486-5

I. ①生… II. ①雷… III. ①生命科学—实验—指南 IV. ①Q1-0

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2016)第 043878 号

责任编辑：王 静 李 悦

责任印制：张 伟 / 封面设计：刘新新

科学出版社出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码：100717

<http://www.sciencep.com>

北京厚诚则铭印刷科技有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2016 年 7 月第 一 版 开本：787×1092 1/16

2016 年 7 月第一次印刷 印张：1310 1/2

字数：31 074 000

定价：4500.00 元

(如有印装质量问题，我社负责调换)

第 12 章 DNA 测序

12.1

引言

- 方案 1 建立随机重叠 DNA 插入文库
- 替代方案: M13 噬菌体小量单链 DNA 模板制备
 - 附加方案: 随机克隆用去磷酸化平末端 M13 噬菌体载体 DNA 制备
- 方案 2 双脱氧链终止法测序用变性模板的制备
- 附加方案: 双链 DNA 的快速变性
 - 附加方案: 聚乙二醇沉淀法小量纯化质粒 DNA

12.2

- 方案 3 用 T7 噬菌体 DNA 聚合酶 (测序酶) 进行双脱氧测序反应
- 方案 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
- 方案 5 用 *Taq* DNA 聚合酶进行双脱氧测序反应
- 方案 6 循环测序: 利用 PCR 和引物末端标记进行双脱氧测序
- 附加方案: 使用 PCR 和 [α - 32 P] dNTP 内部标记进行的循环测序反应
- 方案 7 化学测序法
- 替代方案: 快速 Maxam-Gilbert 测序法
 - 附加方案: 制备化学测序中的末端

标记 DNA

- 方案 8 变性聚丙烯酰胺凝胶的制备
- 方案 9 含甲酰胺的聚丙烯酰胺凝胶的制备
- 方案 10 配制电解质梯度胶
- 方案 11 上样并进行 DNA 测序
- 方案 12 放射自显影和从测序凝胶上读取 DNA 序列

信息栏

自动化 DNA 测序

微量滴定板

E. coli DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片段
用于测序的寡核苷酸引物的贮存液的制备
测序酶

使用 PCR 扩增 DNA 进行传统的链终止测序
用于 DNA 测序的 dNTPs 和 ddNTPs 贮存液
的制备

DNA 序列测定中的甘油

在 DNA 测序凝胶中的压缩现象

7-脱氮-dGTP

二氯二甲基硅烷

阅读放射自显影相片

DNA 的电泳迁移率

当战争终于结束的时候, 我对将来感到迷茫……我拥有许多证书, 虽然没有很高的资历, 但在英国海军部取得的一点成就给了我少许安慰。对于有限的一点电磁学和流体力学知识, 我没有体现出丝毫的热情, 更没有论文发表……。逐渐地我意识到没有资历可能是一种优势。那时大部分科学家都已经 30 多岁了, 他们深深地沉迷于他们的专业, 他们在某一特殊领域投入如此巨大的精力, 以至于要在他们的职业生涯中做出根本的改变是非常困难的。另一方面, 我除了在过时的物理学和数学方面有一些基本训练以及一点适应新事物的能力外, 对其他领域几乎一无所知……。正是由于我的无知, 所以我可以完全自由地进行选择……。

Francis Crick, *What Mad Pursuit*.

目 录

中译本序
译者的话
第三版前言

上 册

第 1 章 质粒及其在分子克隆中的应用

导言	2
SDS 碱裂解法制备质粒 DNA(方案 1~3)	26
方案 1 SDS 碱裂解法制备质粒 DNA:小量制备	27
方案 2 SDS 碱裂解法制备质粒 DNA:中量制备	30
方案 3 SDS 碱裂解法制备质粒 DNA:大量制备	32
煮沸裂解法制备质粒 DNA(方案 4 和 5)	36
方案 4 煮沸裂解法小量制备质粒 DNA	36
方案 5 煮沸裂解法大量制备质粒 DNA	39
方案 6 牙签法小量制备质粒 DNA	42
方案 7 SDS 裂解法提取质粒 DNA	45
方案 8 聚乙二醇沉淀法纯化质粒 DNA	48
方案 9 层析法纯化质粒 DNA	50
方案 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	53
方案 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	56
方案 12 用有机溶剂抽提法从 DNA 中除去溴化乙锭	59
方案 13 用离子交换层析法从 DNA 中去除溴化乙锭	61
方案 14 NaCl 离心法去除质粒 DNA 制备物中的小片段核酸	63
方案 15 Sephacryl S-1000 层析法去除质粒 DNA 制备物中的小片段核酸	65
方案 16 氯化锂沉淀法去除质粒 DNA 制备物中的小片段核酸	66
方案 17 在质粒载体中进行定向克隆	68
方案 18 在凸出末端上连接接头	71
方案 19 在质粒载体中进行平末端片段的克隆	73
方案 20 质粒 DNA 的去磷酸化	76
方案 21 向平末端 DNA 连接合成接头	80
方案 22 在低熔点琼脂糖中连接质粒和目的 DNA	85
方案 23 制备和转化感受态大肠杆菌的 Hanahan 方法:高效的转化策略	87
方案 24 制备和转化感受态大肠杆菌的 Inoue 方法:制备超级感受态细胞	93

方案 25	用氯化钙制备和转化感受态大肠杆菌	96
方案 26	大肠杆菌的电击转化	99
方案 27	用 X-gal 和 IPTG 筛选细菌菌落; α 互补	103
	• 替代方案: X-gal 和 IPTG 直接用于琼脂板	105
方案 28	小量细菌克隆的杂交法筛选	105
方案 29	中等量细胞克隆的杂交法筛选	107
	• 替代方案: 菌落的快速裂解和 DNA 固定于尼龙膜	109
方案 30	大量细菌克隆的杂交方法筛选	110
方案 31	菌落的裂解和 DNA 与滤膜的结合	112
方案 32	在滤膜上进行细菌 DNA 的杂交	114
信息栏	118
氯霉素	118
卡那霉素	120
pBR322	121
四环素	122
氨苄青霉素和羧苄青霉素	123
X-gal	124
α 互补	125
溴化乙锭	126
缩合剂与聚合剂	127
聚乙二醇沉淀法纯化质粒 DNA	128
溶菌酶	128
聚乙二醇	129
氯化铯和氯化铯平衡密度梯度	130
DNA 连接酶	132
接头	136
电击转化	137

第 2 章 λ 噬菌体及其载体

导言	147
方案 1	λ 噬菌体的铺平板培养	170
	• 附加方案: 表达 β -半乳糖苷酶噬菌体的噬菌斑分析	175
	• 附加方案: 大噬菌斑	176
方案 2	λ 噬菌体噬菌斑的挑取	176
方案 3	通过平板裂解和洗脱制备 λ 噬菌体原种	177
	• 替代方案: 通过平板裂解和刮取制备 λ 噬菌体原种	180
方案 4	用小量液体培养物制备 λ 噬菌体原种	181
方案 5	λ 噬菌体的大规模培养: 低倍数感染	183
	• 替代方案: λ 噬菌体的大规模培养: 高倍数感染	185

方案 6	从大规模裂解物中制备 λ 噬菌体颗粒	185
方案 7	通过凝胶电泳测定 λ 噬菌体原种和裂解物中 DNA 的含量	187
方案 8	通过 CsCl 等密度梯度离心纯化 λ 噬菌体颗粒	189
	• 替代方案:通过 CsCl 平衡梯度等密度离心纯化 λ 噬菌体颗粒	192
方案 9	通过甘油分级梯度离心纯化 λ 噬菌体颗粒	193
方案 10	通过沉淀/离心纯化 λ 噬菌体颗粒	194
方案 11	用蛋白酶 K 和 SDS 从大规模培养物中提取 λ 噬菌体 DNA	195
方案 12	用甲酰胺从大规模培养物中提取 λ 噬菌体 DNA	198
方案 13	可被单一限制酶切割用作克隆载体的 λ 噬菌体 DNA 的制备	200
方案 14	经双限制酶切割用作克隆载体的 λ 噬菌体 DNA 的制备	202
方案 15	λ 噬菌体载体 DNA 的碱性磷酸酶处理	206
方案 16	λ 噬菌体臂的纯化:通过蔗糖密度梯度离心	209
方案 17	用于基因组文库中的真核 DNA 的部分酶切:预反应	213
方案 18	用于基因组文库的真核 DNA 的部分酶切:制备反应	216
方案 19	λ 噬菌体臂与外源基因组 DNA 片段的连接	219
方案 20	基因组文库的扩增	222
方案 21	噬菌体 DNA 从噬菌斑到膜的转移	224
	• 替代方案:从噬菌斑到滤膜的快速转移	229
方案 22	噬菌体 DNA 在滤膜上的杂交	229
方案 23	λ 噬菌体分离物的快速分析:从平板裂解物中纯化 λ DNA	233
	• 附加方案:通过 CTAB 沉淀除去多糖	238
方案 24	λ 噬菌体分离物的快速分析:从液体培养物中纯化 λ DNA	238
信息栏	241
	噬菌体:历史回顾	241
	将对 DNA 大分子的损伤减少到最低程度	242
	体外包装	243

第 3 章 M13 噬菌体载体

导言	251
方案 1	M13 噬菌体铺平板	266
方案 2	M13 噬菌体液体培养	268
方案 3	M13 噬菌体双链(复制型)DNA 的制备	270
方案 4	M13 噬菌体单链 DNA 的制备	273
方案 5	单链和双链 M13 噬菌体 DNA 的大规模制备	276
方案 6	M13 噬菌体载体的克隆	278
方案 7	重组 M13 噬菌体克隆分析	284
	• 替代方案:杂交法筛选 M13 噬菌体噬菌斑	286
方案 8	用噬菌粒载体制备单链 DNA	286
信息栏	292

生长时间	292
聚乙二醇	293

第 4 章 高容量载体的应用

导言	297
方案 1 应用黏粒载体构建基因组 DNA 文库	307
方案 2 通过杂交筛选未扩增的黏粒文库;滤膜影印	320
• 附加方案:减少交叉杂交	322
方案 3 黏粒文库的扩增和贮存;在液体培养基内扩增	323
方案 4 黏粒文库的扩增和贮存;在滤膜上扩增	325
• 替代方案:在平板上扩增	328
方案 5 P1 噬菌体及其克隆系统的应用	328
• 附加方案:用点滴透析法纯化高分子质量 DNA	337
• 替代方案:用 Qiagen 树脂层析纯化高分子质量环状 DNA	337
方案 6 P1 噬菌体克隆在大肠杆菌宿主间的转移	338
方案 7 细菌人工染色体的应用	340
方案 8 从小量培养物中分离 BAC DNA	345
方案 9 从大量培养物中分离 BAC DNA	347
方案 10 酵母人工染色体的应用	350
方案 11 酿酒酵母的生长及其 DNA 的制备	359
方案 12 酵母 DNA 的小量制备	361
方案 13 利用 PCR 分析酵母菌落	361
方案 14 高容量载体中基因组 DNA 片段末端的分离;小载体 PCR	365
信息栏	373
Cre- <i>loxP</i>	373
大片段克隆产品及其服务	377

第 5 章 DNA 凝胶电泳和脉冲场琼脂糖凝胶电泳

导言	385
方案 1 琼脂糖凝胶电泳	387
方案 2 琼脂糖凝胶中 DNA 的检测	396
方案 3 琼脂糖凝胶中 DNA 的回收;DEAE-纤维素膜电泳	400
方案 4 琼脂糖和聚丙烯酰胺凝胶中 DNA 的回收;电洗脱至透析袋	404
方案 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	406
方案 6 低熔点琼脂糖凝胶中 DNA 的回收;有机溶剂抽提	408
• 替代方案:用玻璃珠从琼脂糖凝胶中回收 DNA	411
方案 7 低熔点琼脂糖凝胶中 DNA 的回收;用琼脂糖酶消化	412
方案 8 碱性琼脂糖凝胶电泳	414
• 附加方案:碱性琼脂糖凝胶的放射自显影	417

方案 9 中性聚丙烯酰胺凝胶电泳	418
方案 10 聚丙烯酰胺凝胶中 DNA 的染色检测	424
方案 11 聚丙烯酰胺凝胶中 DNA 的放射自显影检测	425
方案 12 聚丙烯酰胺凝胶中 DNA 片段的回收:压碎与浸泡法	426
脉冲场凝胶电泳(方案 13~20)	429
方案 13 脉冲场凝胶电泳制备 DNA:哺乳动物细胞和组织 DNA 的分离	435
方案 14 脉冲场凝胶电泳制备 DNA:酵母完整 DNA 的分离	438
方案 15 琼脂糖凝胶柱中 DNA 的限制性内切核酸酶消化	441
方案 16 脉冲场凝胶电泳的分子质量标准	444
方案 17 横向交变场的脉冲场凝胶电泳	446
• 替代方案:PFGE 凝胶的银染	449
方案 18 箝位匀强电场的脉冲场凝胶电泳	450
方案 19 脉冲场凝胶中 DNA 片段的直接回收	454
方案 20 脉冲场凝胶中浓缩 DNA 片段的回收	455

第 6 章 真核基因组 DNA 的制备和分析

导言	461
方案 1 用蛋白酶 K 和苯酚从哺乳动物细胞中分离高分子质量 DNA	463
• 附加方案:用荧光计估计 DNA 的浓度	470
方案 2 用甲酰胺从哺乳动物细胞中分离高分子质量 DNA	471
方案 3 用缠绕法从哺乳动物细胞中分离 DNA	474
方案 4 从 96 孔微培养板生长的哺乳动物细胞中分离 DNA	476
• 附加方案:适用于 PCR 的优化基因组 DNA 分离	478
方案 5 从鼠尾或其他小样本中制备基因组 DNA	479
• 替代方案:不用有机溶剂从鼠尾分离 DNA	482
• 替代方案:一管法从鼠尾中分离 DNA	482
• 替代方案:从石蜡块中提取 DNA	483
方案 6 哺乳动物 DNA 的快速分离	483
方案 7 酵母 DNA 的快速分离	485
方案 8、9、10 的导言	487
方案 8 Southern 印迹:毛细管法将 DNA 转移到膜上	492
方案 9 Southern 印迹:DNA 从一块琼脂糖凝胶上同时向两张膜转移	499
方案 10 放射性标记的探针与固定在膜上的核酸的 Southern 杂交	502
• 附加方案:从膜上洗去探针	508
• 附加方案:低严谨性杂交	509
信息栏	509
甲酰胺及其在分子克隆中的应用	509
缠绕 DNA(历史注脚)	511
快速杂交缓冲液	512

CTAB	512
------------	-----

第 7 章 真核细胞 mRNA 的提取、纯化和分析

导言	516
方案 1 用酸性酚-硫氰酸胍-氯仿提取法纯化组织和细胞中的 RNA	518
方案 2 用一步法从细胞和组织中同时制备 DNA、RNA 和蛋白质	522
方案 3 oligo(dT)-纤维素层析法提取 poly(A) ⁺ RNA	525
方案 4 批量层析方法筛选 poly(A) ⁺ RNA	529
Northern 杂交	532
方案 5 根据大小分离 RNA; 乙二醛化 RNA 的琼脂糖凝胶电泳	537
方案 6 按大小分离 RNA; 在含有甲醛的琼脂糖凝胶上进行的 RNA 的电泳	540
方案 7 变性 RNA 在膜上的转移和固定	544
• 替代方案: 下行毛细管转移	548
方案 8 Northern 杂交	549
方案 9 纯化的 RNA 的点杂交和狭线杂交	552
方案 10 用 S1 核酸酶对 RNA 作图	556
方案 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	567
方案 12 用引物延伸法进行 RNA 的分析	577
信息栏	582
如何去除 RNA 酶	582
RNA 酶的抑制剂	583
DEPC(焦碳酸二乙酯)	584
胍盐	585
核酸酶 S1	586
外切核酸酶 VII	586
绿豆核酸酶	587
噬菌体编码的 RNA 聚合酶识别的启动子序列	587
放线菌素 D	588

第 8 章 聚合酶链式反应体外扩增 DNA

导言	597
方案 1 聚合酶链式反应	611
方案 2 制备克隆用 PCR 产物的纯化	618
方案 3 通过超滤去除 DNA 扩增产物中的寡核苷酸及过剩 dNTP	620
克隆 PCR 产物的导言(方案 4~7)	622
方案 4 PCR 产物的平末端克隆	624
方案 5 克隆化的 PCR 产物连入 T 载体	627
方案 6 通过 PCR 扩增在扩增 DNA 产物末端引入限制性核酸内切酶酶切位点	628

方案 7 应用 PCR 的遗传工程	633
方案 8 应用 mRNA 反转录扩增 cDNA(RT-PCR)	636
方案 9 cDNA 5'末端的快速扩增(5'-RACE)	644
方案 10 cDNA 3'末端的快速扩增(3'-RACE)	651
方案 11 应用混合寡核苷酸引物引导的 cDNA 扩增(MOPAC)	657
方案 12 克隆在原核载体的 DNA 片段的快速鉴定	663
• 附加方案:用 PCR 方法筛选酵母转化子	666
• 附加方案:筛选 λ 噬菌体文库	666
方案 13 长距离 PCR	667
方案 14 反向 PCR	671
方案 15 定量 PCR	676
方案 16 差异显示 PCR	687
信息栏	698
多重 PCR	698
Taq DNA 聚合酶	700
热启动 PCR	701

第 9 章 放射性标记 DNA 探针与 RNA 探针的制备

导言	719
方案 1 随机引物法:利用寡核苷酸延伸法进行纯化 DNA 片段的放射性标记	721
方案 2 随机引物法:在融化琼脂糖存在下利用随机寡核苷酸延伸进行 DNA 的放射标记	725
方案 3 利用聚合酶链反应制备放射性标记的 DNA 探针	730
• 附加方案:不对称探针	733
方案 4 从 M13 噬菌体模板合成固定长度的单链 DNA 探针	734
方案 5 从 M13 噬菌体模板合成非固定长度的单链 DNA 探针	739
方案 6 体外转录合成单链 RNA 探针	742
• 附加方案:用 PCR 法将噬菌体编码的 RNA 聚合酶启动子加至 DNA 片段上	749
方案 7 用随机寡核苷酸引物从 mRNA 合成 cDNA 探针	750
方案 8 用寡聚(dT)作引物合成放射性标记的扣除 cDNA 探针	753
方案 9 用随机寡核苷酸延伸法进行扣除 cDNA 探针的放射性标记	757
方案 10 用大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片段标记双链 DNA 的 3'端	761
方案 11 用 T4 噬菌体 DNA 聚合酶标记双链 DNA 的 3'端	767
方案 12 用 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]3'$ 脱氧腺苷 5'-三磷酸或 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ 双脱氧 ATP 末端标记双链 DNA 的 3'突出端	770
方案 13 用碱性磷酸酶进行 DNA 片段的去磷酸化	771
方案 14 含 5'突出羟基端的 DNA 分子磷酸化	774
方案 15 去磷酸化的平端或 5'凹端 DNA 分子的磷酸化	778

方案 16 用交换反应进行 5'突出端 DNA 分子的磷酸化	780
信息栏	782
核酸的非放射性标记	782
大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 和 Klenow 片段	788
体外转录系统	794
通过差异筛选和克隆分离差异表达的 cDNA	796
碱性磷酸酶	800

第 10 章 合成寡核苷酸探针

导言	811
方案 1 用聚丙烯酰胺凝胶电泳纯化合成的寡核苷酸	820
方案 2 寡核苷酸 5'末端磷酸化	825
方案 3 乙醇沉淀法纯化放射性标记的寡核苷酸	827
方案 4 CPB 沉淀法纯化放射性标记的寡核苷酸	828
方案 5 大小排阻层析法纯化放射性标记的寡核苷酸	830
方案 6 用 Sep-Pak C ₁₈ 柱层析法纯化放射性标记的寡核苷酸	833
方案 7 用大肠杆菌 DNA 聚合酶 I Klenow 片段标记合成的寡核苷酸	834
方案 8 寡核苷酸探针在溶液中的杂交:用含季铵盐的缓冲液洗涤	838
方案 9 解链温度的实验测定	841
信息栏	845
寡核苷酸的合成	845
解链温度	849
纯化合成寡核苷酸的方法	851

第 11 章 cDNA 文库制备及基因鉴定

导言	857
方案 1 cDNA 文库的构建	889
阶段 1:反转录酶催化合成 cDNA 第一链	890
阶段 2:cDNA 第二链的合成	894
阶段 3:cDNA 的甲基化	898
阶段 4:与接头或衔接子相连接	901
阶段 5:Sepharose CL-4B 凝胶过滤分离 cDNA	906
阶段 6:cDNA 与 λ 噬菌体臂的连接	909
• 替代方案:cDNA 与质粒载体的连接	913
• 附加方案:cDNA 文库的扩增	914
方案 2 真核表达文库的构建与筛选	917
阶段 1:在真核表达载体上构建 cDNA 文库	917
阶段 2:在真核表达载体上构建的 cDNA 文库的筛选	922
方案 3 外显子捕获与扩增	927

阶段 1:文库的构建.....	929
阶段 2:电穿孔法将文库转染 COS-7 细胞	932
阶段 3:mRNA 的提取	934
阶段 4:反转录 PCR	936
阶段 5:克隆分析.....	942
方案 4 用大片段基因组 DNA 克隆直接筛选 cDNA	944
信息栏.....	953
商品化的 cDNA 合成与文库构建试剂盒	953
Mo-MLV 反转录酶	955
同聚物加尾	956
λ gt10 和 λ gt11	957
少量细胞制备 cDNA 文库	958
体外包装	959
COS 细胞	960
生物素	961
磁珠	965
不依赖连接的克隆	967

下 册

第 12 章 DNA 测序

导言.....	981
方案 1 建立随机重叠 DNA 插入文库	986
• 替代方案: M13 噬菌体小量单链 DNA 模板制备	998
• 附加方案: 随机克隆用去磷酸化平末端 M13 噬菌体载体 DNA 制备	999
方案 2 双脱氧链终止法测序用变性模板的制备	1000
• 附加方案: 双链 DNA 的快速变性	1003
• 附加方案: 聚乙二醇沉淀法小量纯化质粒 DNA	1004
方案 3 用 T7 噬菌体 DNA 聚合酶(测序酶)进行双脱氧测序反应	1005
方案 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	1011
方案 5 用 <i>Taq</i> DNA 聚合酶进行双脱氧测序反应	1015
方案 6 循环测序: 利用 PCR 和引物末端标记进行双脱氧测序	1020
• 附加方案: 使用 PCR 和 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dNTP}$ 内部标记进行的循环测序反应	1027
方案 7 化学测序法	1028
• 替代方案: 快速 Maxam-Gilbert 测序法	1036
• 附加方案: 制备化学测序中的末端标记 DNA	1038
方案 8 变性聚丙烯酰胺凝胶的制备	1039
方案 9 含甲酰胺的聚丙烯酰胺凝胶的制备	1044

方案 10 配制电解质梯度胶	1046
方案 11 上样并进行 DNA 测序	1047
方案 12 放射自显影和从测序凝胶上读取 DNA 序列	1051
信息栏	1054
自动化 DNA 测序	1054
微量滴定板	1061
<i>E. coli</i> DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片段	1062
用于测序的寡核苷酸引物的贮存液的制备	1064
测序酶	1065
使用 PCR 扩增 DNA 进行传统的链终止测序	1067
用于 DNA 测序的 dNTPs 和 ddNTPs 贮存液的制备	1068
DNA 序列测定中的甘油	1069
在 DNA 测序凝胶中的压缩现象	1069
7-脱氮-dGTP	1071
二氯二甲基硅烷	1072
阅读放射自显影相片	1072
DNA 的电泳迁移率	1073

第 13 章 诱变

导言	1080
方案 1 含尿嘧啶的单链噬菌体 M13 DNA 制备	1088
方案 2 寡核苷酸指导的单链 DNA 诱变	1091
方案 3 以双链 DNA 为模板的体外诱变:用 <i>DpnI</i> 选择突变体	1095
方案 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)	1101
方案 5 利用大引物 PCR 在同一试管中进行高效快速定点诱变	1105
方案 6 重叠延伸产生特异位点诱变	1109
方案 7 用放射性标记的寡核苷酸杂交筛选定点诱变重组克隆	1113
• 替代方案:放射性标记的寡核苷酸杂交筛选含噬菌粒的细菌克隆	1118
• 替代方案:PCR 方法检测确定的突变体	1119
方案 8 单链构象多态性和异源双链分析方法检测突变	1119
方案 9 外切核酸酶 III 消化产生多组嵌套缺失突变体	1127
方案 10 BAL 31 核酸酶消化法产生双向缺失突变体	1131
信息栏	1135
BAL31	1135
外切核酸酶 III	1140
接头分区诱变	1143
随机诱变	1144
丙氨酸扫描诱变	1148
诱变寡核苷酸	1149

排除野生型 DNA 的定点诱变筛选	1151
N^6 -甲基化腺嘌呤, DAM 甲基化酶和甲基化敏感限制酶	1154
定点突变的商业试剂盒	1156
甘油	1156
突变检测	1158

第 14 章 表达文库的筛选

导言	1172
方案 1 筛选构建于 λ 噬菌体载体的表达文库	1175
方案 2 筛选质粒载体构建表达的文库	1183
方案 3 去除抗血清中交叉反应的抗体;假筛选	1190
• 替代方案:用噬菌体感染细胞裂解液吸收抗体	1192
方案 4 从抗血清中去除交叉反应性抗体;与大肠杆菌裂解液共同温育	1192
方案 5 从抗血清中去除交叉反应性抗体;亲和层析法	1194
方案 6 利用 λ 噬菌体文库筛选 DNA 结合蛋白	1196
方案 7 制备含有由 λ 噬菌体溶源菌所编码融合蛋白质的裂解液;细菌克隆的溶解	1201
方案 8 含有 λ 噬菌体编码融合蛋白质裂解液的制备;琼脂板上裂解性感染	1205
方案 9 含有 λ 噬菌体编码融合蛋白裂解液的制备;液体培养液中裂解感染	1207
信息栏	1209
质粒及 λ 噬菌体表达载体	1209
基因组 DNA 和 cDNA 表达文库	1211
抗体在免疫筛选中的应用	1212

第 15 章 在大肠杆菌中表达克隆化基因

导言	1217
方案 1 用 IPTG 诱导启动子在大肠杆菌中表达克隆化基因	1228
方案 2 用 T7 噬菌体启动子在大肠杆菌中表达克隆基因	1232
方案 3 用 λ 噬菌体 P_L 启动子在大肠杆菌中表达克隆基因	1236
方案 4 用碱性磷酸酶启动子(<i>phoA</i>)和信号序列在大肠杆菌中分泌表达外源蛋白	1241
• 附加方案:PhoA 融合蛋白的亚细胞定位	1244
方案 5 谷胱甘肽琼脂糖亲和层析纯化融合蛋白	1245
方案 6 直链淀粉树脂亲和层析纯化麦芽糖结合融合蛋白	1248
方案 7 用固化 Ni^{2+} 吸收色谱纯化带组氨酸标签的蛋白	1252
• 替代方案:用 pH 递降的缓冲液从金属亲和柱洗脱多聚组氨酸标签蛋白	1255
• 附加方案:NTA- Ni^{2+} -琼脂糖再生	1255
方案 8 从包涵体中纯化表达蛋白	1256

附加方案:重折叠从包涵体提取的溶解蛋白	1259
信息栏	1260
克隆基因的表达	1260
大肠杆菌表达系统	1261
LacZ 融合	1263
离液剂	1265

第 16 章 哺乳动物培养细胞中导入克隆化基因

导言	1271
方案 1 脂染介导的 DNA 转染	1276
• 附加方案:单层细胞组化染色鉴定 β -葡萄糖醛酸酶	1282
方案 2 磷酸钙介导的质粒 DNA 转染真核细胞	1282
• 替代方案:高效率的磷酸钙介导的质粒 DNA 转染真核细胞	1286
方案 3 磷酸钙介导的高分子量基因组 DNA 转染细胞	1287
• 替代方案:磷酸钙介导的贴壁细胞的转染	1290
• 替代方案:磷酸钙介导的悬浮细胞的转染	1291
方案 4 DEAE-葡聚糖介导的高效率转染	1291
• 替代方案:DEAE 介导的转染:增强细胞生存力	1295
方案 5 电穿孔转染 DNA	1296
方案 6 生物粒子介导的 DNA 转染	1299
• 附加方案:单层细胞组化染色鉴定 β -葡萄糖醛酸酶	1303
方案 7 利用 Polybrene 进行 DNA 转染	1303
信息栏	1306
共转化	1306
稳定转染的筛选试剂	1307
脂染	1309
磷酸钙-DNA 沉淀物转染哺乳动物细胞	1311
二磷酸氯喹	1312
电穿孔	1313

第 17 章 哺乳动物培养细胞的基因表达分析

导言	1322
方案 1 DNA 酶 I 足迹法对 DNA 上的蛋白质结合位点作图	1323
• 替代方案:羟自由基足迹法对 DNA 上的蛋白质结合位点作图	1331
方案 2 DNA 结合蛋白的凝胶阻滞分析	1332
• 附加方案:超迁移分析	1335
• 附加方案:竞争分析	1336
方案 3 DNA 酶 I 超敏感位点作图	1336
方案 4 连缀转录分析	1341

报道分子测定:CAT、萤光素酶和 β -半乳糖苷酶(方案 5、6 和 7 的导言).....	1347
方案 5 薄层层析法测定哺乳动物细胞提取物中氯霉素乙酰基转移酶含量	1350
• 替代方案:有机溶剂萃取法测量 CAT	1356
• 替代方案:通过把反应产物分散到闪烁液的方法测量 CAT	1356
方案 6 哺乳动物细胞抽提物中萤光素酶的测定	1357
• 替代方案:用闪烁计数器测量萤光素酶活性	1361
• 替代方案:测量 96 孔板上培养细胞的萤光素酶活性	1361
方案 7 哺乳动物细胞提取物中 β -半乳糖苷酶的测定	1362
方案 8 四环素作为哺乳动物细胞中可诱导基因表达的调控物	1366
阶段 1:pTet-tTAc 稳定转染成纤维细胞	1373
阶段 2:四环素调控的靶基因稳定转染可诱导表达 tTA 的 NIH-3T3 细胞	1378
阶段 3:分析转染细胞中的蛋白质表达	1381
• 替代方案:用 tTA 自调控系统在瞬时转染细胞中进行四环素调控的基因诱导表达	1383
方案 9 蜕皮激素作为调控物诱导哺乳动物细胞中的基因表达	1384
信息栏	1388
DNA 足迹法	1388
凝胶阻滞分析	1392
杆状病毒和杆状病毒表达系统	1395
绿色荧光蛋白	1399
抗原表位标记	1405
氯霉素乙酰基转移酶	1409
萤光素酶	1412
β -半乳糖苷酶	1413

第 18 章 蛋白质相互作用研究技术

导言	1428
方案 1 双杂交和其他双成分系统	1431
第一阶段 诱饵-LexA 融合蛋白的鉴定	1442
• 替代方案:通过氯仿覆盖分析 β -半乳糖苷酶活性	1454
第二阶段 筛选一个相互作用子	1455
第三阶段 阳性相互作用的再次确定	1464
• 替代方案:相互作用陷阱阳性克隆的快速筛选	1473
方案 2 用 GST 融合蛋白进行 Far Western 印迹来检测蛋白质-蛋白质相互作用...	1474
• 附加方案:膜结合蛋白的再折叠	1480
• 替代方案:用抗 GST 抗体检测蛋白质-蛋白质相互作用	1480
方案 3 用 GST 融合蛋白沉降技术检测蛋白质-蛋白质相互作用	1481
方案 4 通过免疫共沉淀确定结合蛋白	1486