



生命科学实验指南系列

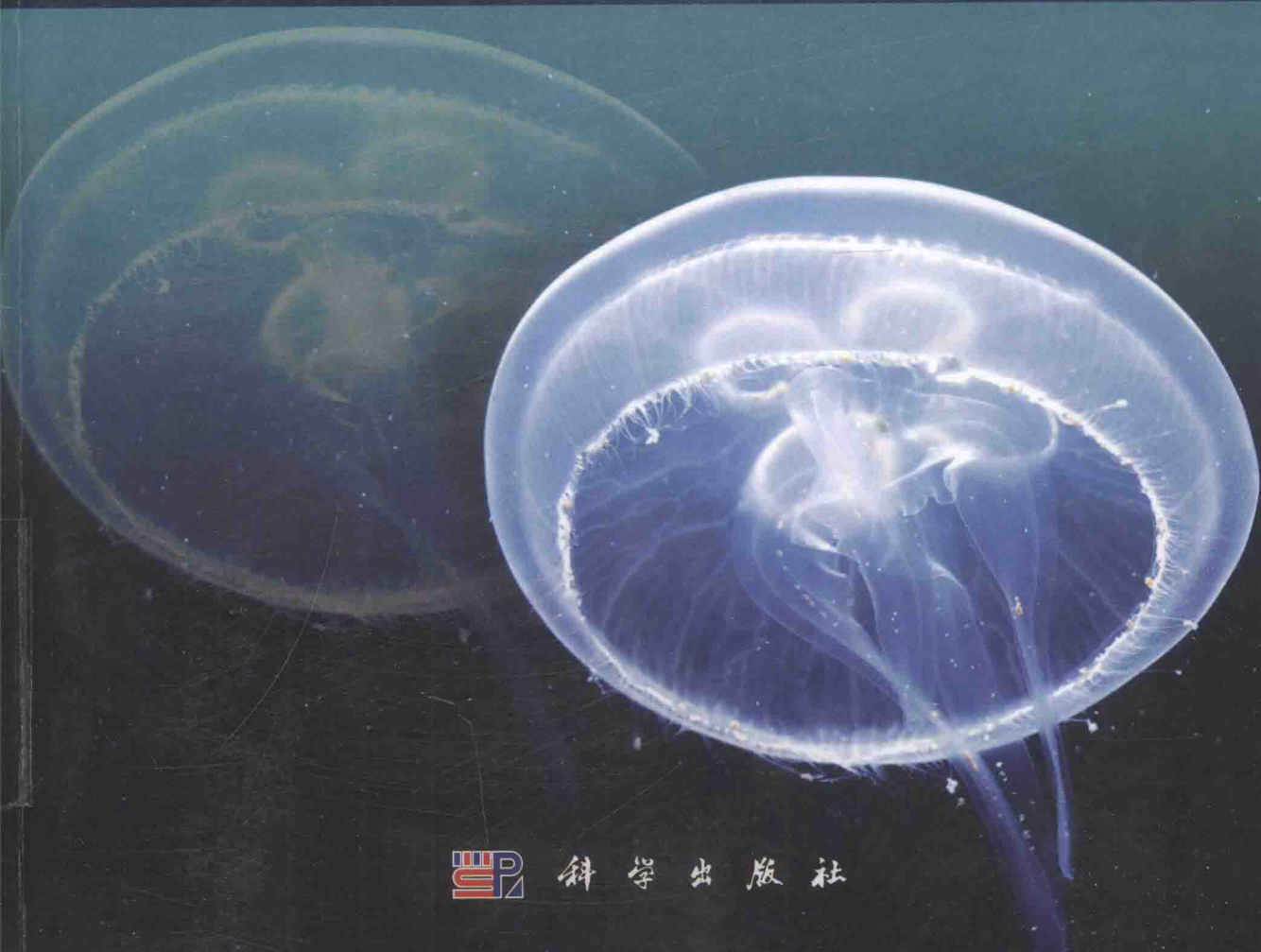


分子克隆实验指南

(第三版)

上册

[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)

(上册)

[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“蓝宝书”和“红宝书”。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)

《分子克隆实验指南(第三版)》参加翻译人员

(以姓氏笔划排序)

主 译:黄培堂

副主译:王嘉玺 朱厚础 张兆山 陈惠鹏 范 明 俞炜源
贺福初

翻译和审校人员:

王恒盎	王嘉玺	刘志敏	吕 星	朱旭东	朱厚础	吴 军
张兆山	张成岗	张惟材	张锦超	李 勇	李 赏	杨 晓
杨子义	杨晓明	邵宁生	陆 兵	陆应麟	陈惠鹏	周建光
周晓巍	房 涛	范 明	范 玲	俞炜源	柳 川	胡宝成
贺福初	袁清安	郭 宁	崔 芳	梁 龙	阎明凡	黄培堂
敖 翼	薛沿宁	瞿祥虎	郑晓飞			

参加工作人员:

许春阳	张晓红	陈惠鹏	孟庆东	房 涛	郑 涛	胡向军
贾向红	黄留玉	董 洁				

中译本序

DNA 双螺旋结构的发现,基因重组技术的建立,奠定了分子生物学的基础。《分子克隆实验指南》于 1982 年出版,1989 年再版,为基因的分离、克隆、重组、表达等研究起到了推动作用。以后经过十多年的研究与实践,分子生物学技术更趋成熟,现在的第三版(2001 年版)就是将所积累的丰富经验进行系统地、详尽地整理,较过去的两版信息量有了很大的增加。如此丰富的分子克隆技术,正与计算机技术、芯片技术、细胞生物技术、整体实验模型技术、生物信息技术等等先进技术相互结合、相互渗透,随着人类基因组结构与功能的阐明,生物医学定将有新的突破并带动相关学科的发展,使 21 世纪成为辉煌的生物科学世纪。

本书覆盖了迄今最重要、最有效的实验程序方案,从理论的阐述到相关方案的对比,包括新的载体系统的应用、原核细胞及真核细胞表达系统的要点、新基因的获得与鉴定、突变体的产生以及基因产物的相互作用等等。本书系统性好、浏览方便,读者易于从中寻找切合自己工作的技术方案。在设计方案中常附有补充资料,指出可能遇到的难点及解决困难的建议,必要时还加以图解,直观性强。本书参考资料亦十分详尽,加强了其实用性,是分子生物学工作者十分有用的工具书。当然,由于生物高技术的发展日新月异,学科间的融合加强,读者除参照本书的技术方案外,还须经常关注新技术的进展以提高科研工作的质量和效率。

本书译者均是军事医学科学院生物工程研究所、放射医学研究所和基础医学研究所的科技工作者,大家是在繁重的科研任务之余,抽出时间将本书译成中文,相信能更有效地加速我国分子生物技术人员的成长。

黄翠芬

中国工程院院士

2002 年 5 月 18 日

译者的话

在 20 世纪 90 年代,许多重复性的分子生物学技术手段已经实现自动化、模块化,多步骤的实验环节已被转换成试剂盒,因此作为一本国际通用的权威的分子生物学实验室手册,《分子克隆实验指南》第三版反映出的是一系列成熟的操作规程,内容丰富而详细,给科研人员提供了最新和最系统的技术方法。该书第一版和第二版都出版了中文版,还在广泛使用并得到了广大学者的认可,因此我们深感第三版的翻译工作压力较大。我们在翻译过程中始终坚持忠实原文的指导思想,严格遵照科学出版社提供的《翻译图书编写须知》进行文字处理,对于专业词汇的翻译,我们依据《英汉生物学词汇(第二版)》进行规范处理,并遵循其命名原则处理了类似或相关的一些定名问题,个别尚未审定统一的词汇,我们按照“约定俗成”的原则进行处理。

这本书的翻译、审校、统稿和定稿工作是在军事医学科学院生物工程研究所的组织协调下,由军事医学科学院生物工程研究所、放射医学研究所和基础医学研究所的第一线科技骨干完成的,他们加班加点,为尽快完成本书的翻译审校工作做出了很大努力和贡献。在此,我谨向所有参加译校工作的同志们表示崇高的敬意和感谢。

科学出版社多位领导和编辑为确保高质量地完成本书的翻译、定稿和出版工作付出了大量精力。李锋、马学海、谢灵玲、刘安等同志做了细致的编前工作,周辉、彭克里、莫结胜、霍春雁、盖宇、王静等同志在书稿加工和质量把关方面付出了心血。科学出版社责任编辑的辛勤工作是本书如期出版的有力保障,在此谨向他们表示由衷的感谢。

军事医学科学院生物工程研究所黄翠芬院士对本书的翻译审校工作进行了指导。军事医学科学院生物工程研究所的陈惠鹏、黄留玉、郑涛、孟庆东、贾向红、许春阳等同志,放射医学研究所的胡向军、董洁等同志,基础医学研究所的房涛、张晓红等同志为本书的翻译、审校工作付出了艰辛的劳动,尤其是孟庆东、贾向红两位同志为本书按时翻译出版做出了重要贡献。在此,我谨向他们表示衷心感谢。

这本书的翻译专业性强、工作量大、时间要求紧,参加翻译的主要同志虽然都是科研工作第一线的高级研究人员和博士毕业生,但由于知识、能力、精力和水平的限制,在翻译过程中难免存在错漏,在文字处理上也可能有不当之处,谨请专家和读者批评指正。



(黄培堂)

2002 年 7 月 23 日于军事医学科学院生物工程研究所

第三版前言

《分子克隆实验指南》第一版写于约 20 年前,当时分子克隆的基本方法远未成熟,仅在少数几个实验室建立了起来。《分子克隆实验指南》的出版大大改变了这种局面,其指南性的特点使 20 世纪 70 年代后期和 80 年代早期对这些技术仍感到陌生的读者获得了信心。本书第二版于第一版出版后的第 7 年出版,通俗易懂,内容更丰富。此时,个别方法日益通用和简化,但是在多步骤的实验环节中仍然难以把它们成功地串在一起。作为第二版的修订本,第三版反映出的是一种成熟的操作规程,可靠性高,十分有利于科技人员的使用操作。在 20 世纪 90 年代,为满足科技人员的要求许多枯燥且重复性强的分子生物学技术已经实现自动化了。为满足科技人员的要求,多步骤的实验环节已被转换成试剂盒。现在很容易从商业制造商那里买到高质量的基因组和 cDNA 文库。而且包括核酸在内的所有手工操作也极大地受益于试剂和酶的质量的提高。伴随着这些进步及其他方面的发展,合格的实验室工作者现在能够轻易避免许多实验方面的问题,而这些问题在几年前还曾困扰着最熟练的研究人员。并非表明每一细节都尽善尽美,也不是说技术不可能有进一步的发展了。然而,现在通过认真仔细地实验设计并应用已有知识,比反复试验能够更容易地避免困难。

《分子克隆实验指南》所有版本的主要目的就是给科研人员提供最新的重复性好的技术方法。前两版的使用者将会发现本版实验部分具有组织良好的特征。不仅如此,本版内容更为全面而详尽。老方法被现代化了,而新的方法也被增加进来,从而使分子克隆技术几乎渗透到生物医学研究的绝大多数领域。同样重要的是我们希望提供合理的依据,证明在可供选择的程序中,特定方法为什么及如何起作用。因此这个版本不仅包含了对于实验方法中要点的说明,还将丰富的材料以信息栏的形式列示出来,放在每章的末尾和附录 9 中。我们希望贯穿在本书中的 115 个信息栏可以对为什么某些技术方法中要用某些方式,以及某些技术怎样逐步发展等问题予以清晰的说明。最后,我们提供了丰富的参考文献,以便感兴趣的读者可以对这些方法和观点追根求源。很少有人会从头到尾读这本书,但我们希望对于分子克隆感兴趣的人员将会从这些书页中找到许多有助于他们思考和有助于他们手头工作的内容。

假若一本书酝酿创作的时间比较长,则每个人的努力都很重要。我们要特别感谢 Erica Golemis 和她的同事撰写的第 18 章“蛋白质相互作用研究技术”,这是一个范围广泛而且变化迅速的领域,非我们力所能及。在本书开头列出的人员都对本书出版做出了宝贵的贡献——有些是口头的,有些是书面的,还有一些是指正意见——对此我们深表感谢。其他一些同事则对文体风格和内容方面进行了指正,而他们有时则是在无意中说出来的。此外,冷泉港实验室出版公司的编辑和出版人员付出了几千小时,细心核对参考文献、事例和语法,为本书顺利出版付出艰苦卓绝的努力。若没有 Maryliz Dickerson、Inez Sialiano、Joan Ebert、Mary Cozza、Dorothy Brown、Susan Schaefer、Danny deBruin、Nora McInerney 和 Denise Weiss 等人的毅力、努力和伟大的奉献,本书的出版将很困难。若没有

冷泉港实验室图书馆、达拉斯城德克萨斯大学西南医学中心以及位于墨尔本市的 Peter MacCallum 癌症研究所长期的支持和迅速反馈,本书也是不可能完成的。

我们对合作作者 Kaaren Janssen 和 Nina Irwin 深表谢意,他们给了我们无私的支持,他们专业性的工作、清晰的观点以及持久专注的乐观精神使我们受益匪浅。Siân Curtis 和 Michael Zierler 处理了实验方法中的科学问题,同时 Siân 还整理了附录。Mark Curtis 则把画在纸上的草图转换为优美清晰的插图。所有这些都为本书的顺利出版提出了许多好的建议。遗憾的是,可能我们没有全部接受这些建议,因此任何遗留的错误描述和说明,全是由于我们自己的原因造成的。

我们可能永远难以充分报答那些给予我们帮助的人。我们的责任编辑 Jan Argentine 在许多方面给予我们以支持。她慷慨地付出了她的时间,她明智而有条理地处理了有时可能导致混乱的问题,她的谦虚和不厌其烦使我们深受感动。并非所有的作者都会得到如此多的支持和友谊。我们要特别感谢 Daphne Davis,他很高兴地对有关实验细节方面的许多问题提供了答案。我们也得益于许多人的鼓励和持久的热情——特别是冷泉港的 John Inglis 和 Jim Watson,在本书创作早期阶段共事的 Nancy Ford,以及墨尔本的 Rose Williams。Kate Simpson 曾为本书的编写做了几个月的工作,但尚未见到本书出版就去世了,我们希望她鲜活的优点已经反映在本书的字里行间。最后,我们对家人的感谢无以言表,他们亲眼注视着本书一句一句地写成,他们的鼓励永存。

J. 萨姆布鲁克 (Joe Sambrook)

D. 拉塞尔 (David Russell)

(黄培堂 译)

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	少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
<i>Cre-loxP</i>	373
大片克隆产品及其服务	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 箱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

引言	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