



# 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

## 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

## 分 子 克 隆

操作指南

【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

# 目 录

<b>第一章 载体-宿主体系</b> .....	1
质粒 .....	1
在质粒中进行克隆 .....	9
噬菌体 $\lambda$ .....	13
裂解循环 .....	13
溶源性 .....	16
$\lambda$ 噬菌体载体的构建 .....	17
选择合适的载体 .....	18
噬菌体 $\lambda$ 载体图 .....	19
粘粒 .....	29
单链噬菌体 .....	41
噬菌体 M13 载体 .....	42
总结 .....	43
<b>第二章 细菌菌株与病毒的繁殖和保存</b> .....	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 $\lambda$ 噬菌斑的纯化 .....	49
从单斑制备噬菌体 $\lambda$ 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
<b>第三章 噬菌体 <math>\lambda</math> 和质粒 DNA 的分离</b> .....	57
噬菌体 $\lambda$ 的大量制备 .....	57
感染 .....	57
诱导 .....	58
噬菌体 $\lambda$ 的提纯 .....	59
噬菌体 $\lambda$ 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
<b>第四章 分子克隆中所用的酶</b> .....	69
限制酶 .....	69

同裂酶 .....	69
甲基化作用 .....	70
用限制酶消解 DNA .....	74
<b>分子克隆中使用的其它酶类</b> .....	<b>75</b>
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
<b>第五章 凝胶电泳</b> .....	<b>104</b>
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
<b>第六章 真核细胞 mRNA 的抽提、提纯和分析</b> .....	<b>126</b>
哺乳动物细胞 mRNA 的分离 .....	128

细胞总 RNA 的分离	129
多聚 (A) <sup>+</sup> RNA 的选择	131
RNA 的凝胶电泳	132
RNA 的核酸酶 S1 定位	137
<b>第七章 cDNA 的合成和克隆</b>	<b>140</b>
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
<b>第八章 将质粒和噬菌体 <math>\lambda</math> DNA 引入大肠杆菌</b>	<b>163</b>
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 $\alpha$ 1776 的转化	165
噬菌体 $\lambda$ DNA 的离体包装	167
噬菌体 $\lambda$ 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
<b>第九章 基因组文库的构建</b>	<b>175</b>
噬菌体 $\lambda$ 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
<b>第十章 重组克隆的鉴定</b> .....	<b>198</b>
细菌菌落或噬菌斑的原位杂交 .....	198
筛选小量细菌菌落 .....	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 $\lambda$ 噬菌斑 .....	202
噬菌体 $\lambda$ 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 $\lambda$ 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 $\pi$ VX 筛选中使用的菌株 .....	224
$\pi$ VX 的制备 .....	224
W3110 $r^- m^+$ (p3) 的转化 .....	224
在 W3110 $r^- m^+$ (p3) ( $\pi$ VX) 上进行噬菌体 $\lambda$ 文库平板测定 .....	224
含有校正基因的噬菌体的遗传测定 .....	224
$\pi$ VX 系统的测定 .....	225
$\pi$ VX 系统的利用 .....	227
<b>第十一章 重组体 DNA 克隆的分析</b> .....	<b>228</b>
质粒或噬菌体 $\lambda$ DNA 的快速分离 .....	228
快速分离小量质粒 DNA .....	228
快速分离小量噬菌体 $\lambda$ 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
<b>第十二章 在大肠杆菌中表达克隆 DNA 的载体</b> .....	<b>248</b>
启动子 .....	248
利用噬菌体 $\lambda_{pL}$ 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
<b>附录</b> .....	267
<b>1: 生化技术</b> .....	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 $\lambda$ 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 $^{32}\text{P}$ -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
<b>2: pBR322</b> .....	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
<b>3: 常用细菌菌株</b> .....	314
<b>4: 厂商地址和产品简介</b> .....	315
<b>参考文献</b> .....	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  $\lambda$

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。

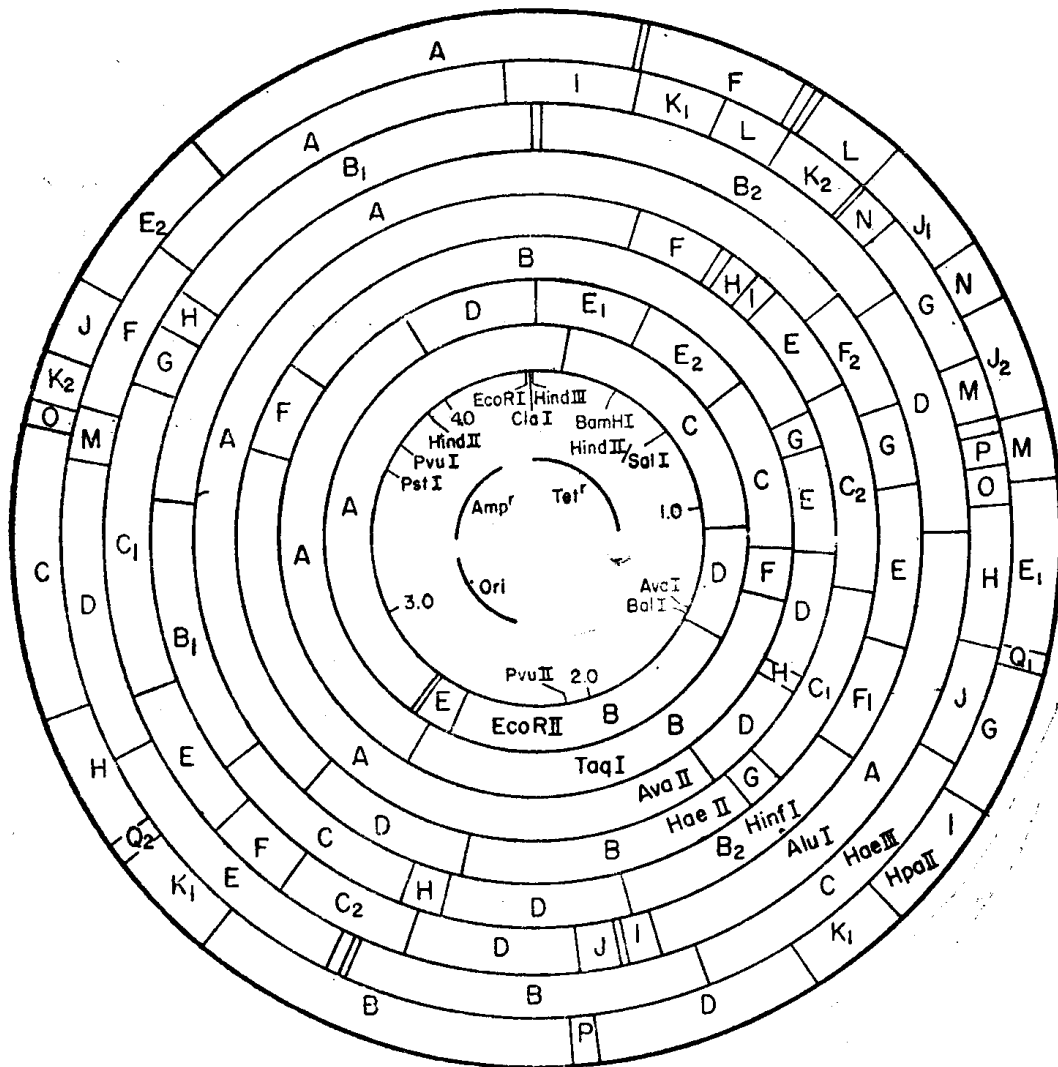
在极大程度上,质粒 DNA 的复制是由细菌染色体复制所使用的一套相同的酶进行的。有些质粒处于“严紧控制”下,意味着它们的复制与宿主的繁殖相结合,致使每个细菌细胞中只有一个或至多几个拷贝质粒(见 Novick 等 1976 年的综述)。另一方面,处于“松弛控制”下的质粒有 10—200 拷贝数。更为重要的是,“松弛型”质粒的拷贝数在宿主



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 (Clewel, 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: ColEI, 松弛型

选择标记: Amp<sup>r</sup>, Tet<sup>r</sup>

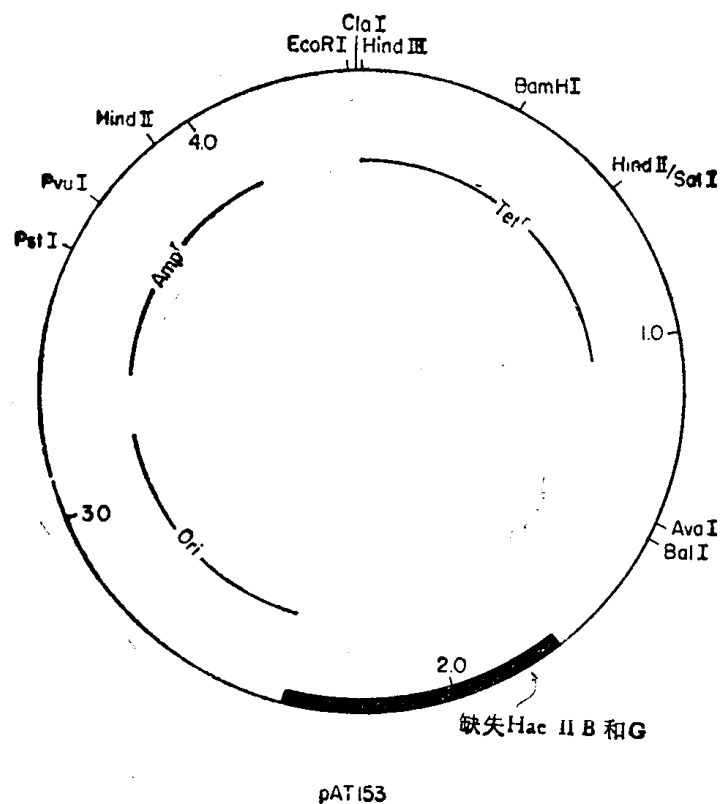
单一位点: AvaI, PstI, BamHI, Pvu II, ClaI, SalI, EcoRI, HindIII

插入失活: Amp<sup>r</sup>-PstI

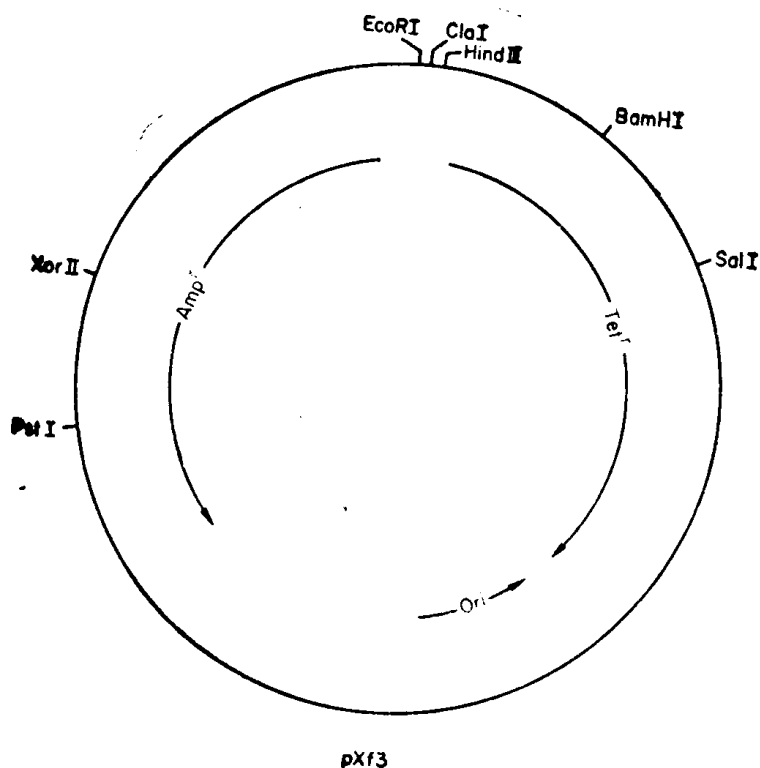
Tet<sup>r</sup>-BamHI, HindIII (可变), SalI

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

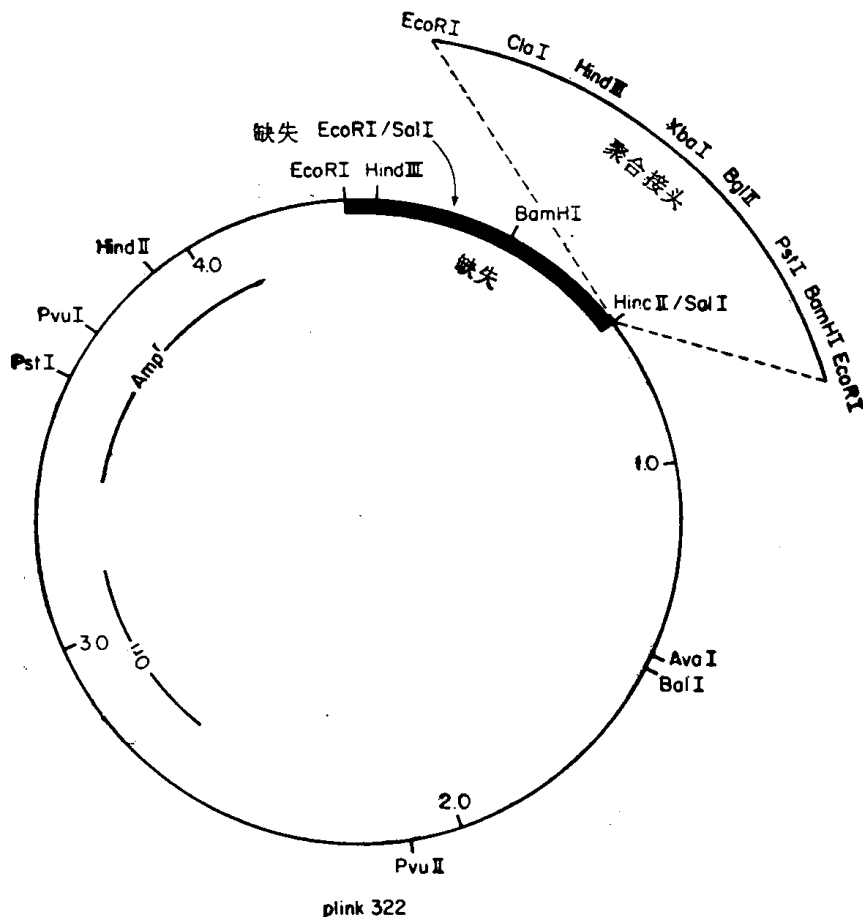
备注: pBR 322 是适用于最多方面的克隆载体的质粒。它的完整核苷酸序列是已知的 (Sutcliffe, 1979)。



大小: 3.6 kb  
 复制子: ColEI, 松弛型  
 选择标记: Amp<sup>r</sup>, Tet<sup>r</sup>  
 单一位点: AvaI, PstI, BamHI, ClaI, SalI, EcoRI, HindIII  
 插入失活: Amp<sup>r</sup>-PstI  
 Tet<sup>r</sup>-BamHI, HindIII (可变), SalI  
 资料: Twigg 和 Sherratt (1980)  
 备注: pBR 322 的高拷贝变异体。



大小: 3.16 kb  
 复制子: ColEI, 松弛型  
 选择标记: Amp<sup>r</sup>, Tet<sup>r</sup>  
 单一位点: EcoRI, ClaI, Hind III  
 插入失活: Tet<sup>r</sup>-BamHI, SalI  
 Amp<sup>r</sup>-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 *AvaI* 的一个片段融合成 *Sau* 3A 片段, 该片段编码氨基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<sup>r</sup>

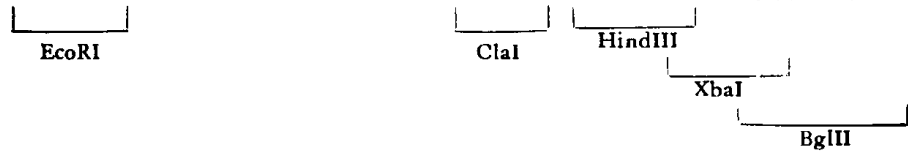
单一位点: ClaI, HindIII, XbaI, BglII, BamHI

pInk 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数。

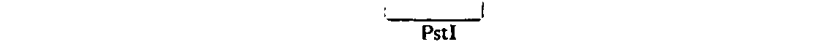
资料: B. Seed (未发表)

聚合接头序列:

GAATTC TCAATGTTTGACAGCTTATCATCGA T AAGCTT CTAGAG ATCT



TCCATACCTACCAGTTCTCCGC CTGCAG CAATGGCAACAACGTTGCC

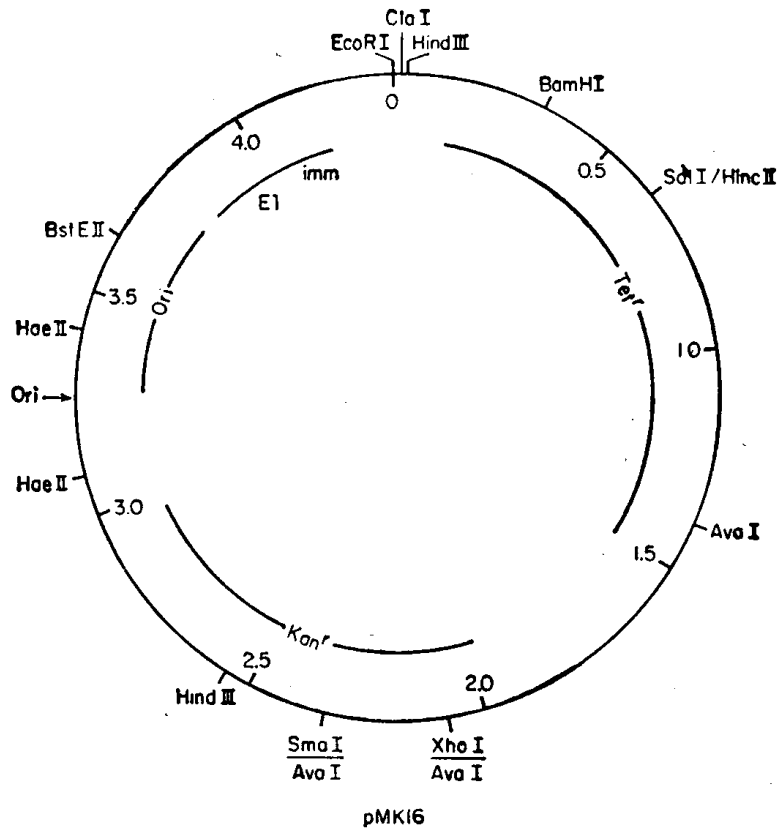


CGGATCCGGTTCGCCG GAATTC



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<sup>r</sup>, Tet<sup>r</sup>

单一位点: BamHI, Sma I, EcoR I, Xho I, Hinc II, Sal I, Bst EII

插入 BstEII 位点后干扰复制。

插入失活: Tet<sup>r</sup>-BamHI, Hinc II, SalI Kan<sup>r</sup>-Sma I, Xho I

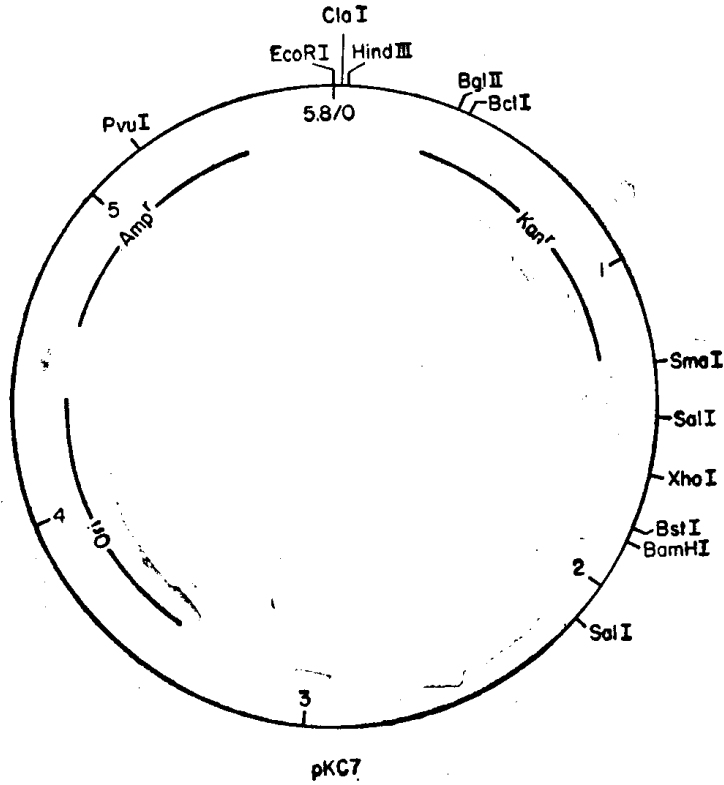
外源 DNA 插入 Xho I 位点使 Kan<sup>r</sup> 基因失活。

资料: Kahn 等 (1979)

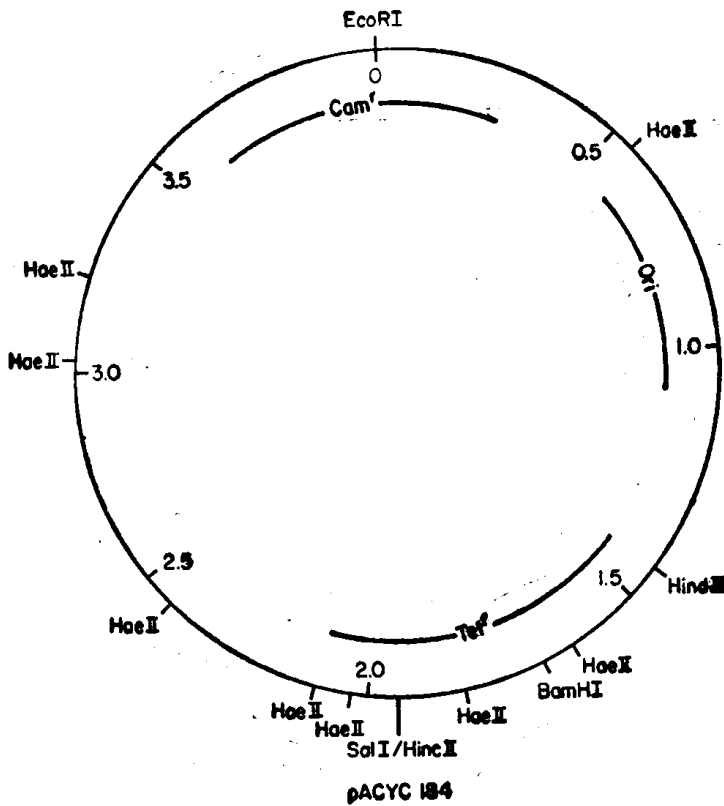
备注: 对克隆带有 Sma I 或 Xho I 末端的 DNA 片段来说,它是最有用的载体。

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。

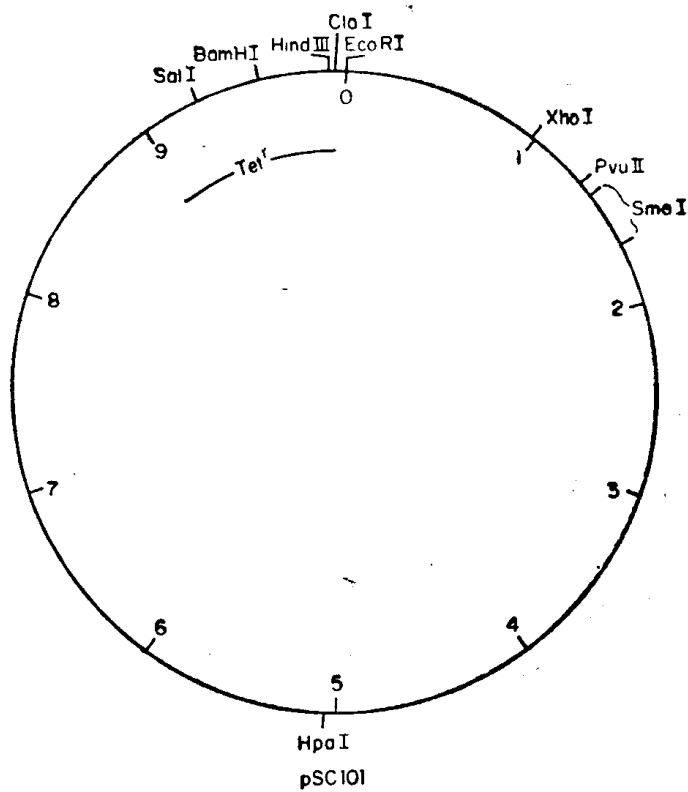
小质粒的优点是很多的: 质粒 DNA 较易于处置,因它不易受物理损伤,它的限制酶切图较简单。此外,较小质粒一般具有较高拷贝数这一事实,增加了利用放射性标记杂交探针来鉴定带有外源 DNA 序列的细菌的灵敏度。但是,质粒的缩小可以导致有用克隆位点的消失。例如, pXf 3 缺乏存在于 pBR 322 和 pAT 153 中的 Bal I 和 Ava I 位点。为了



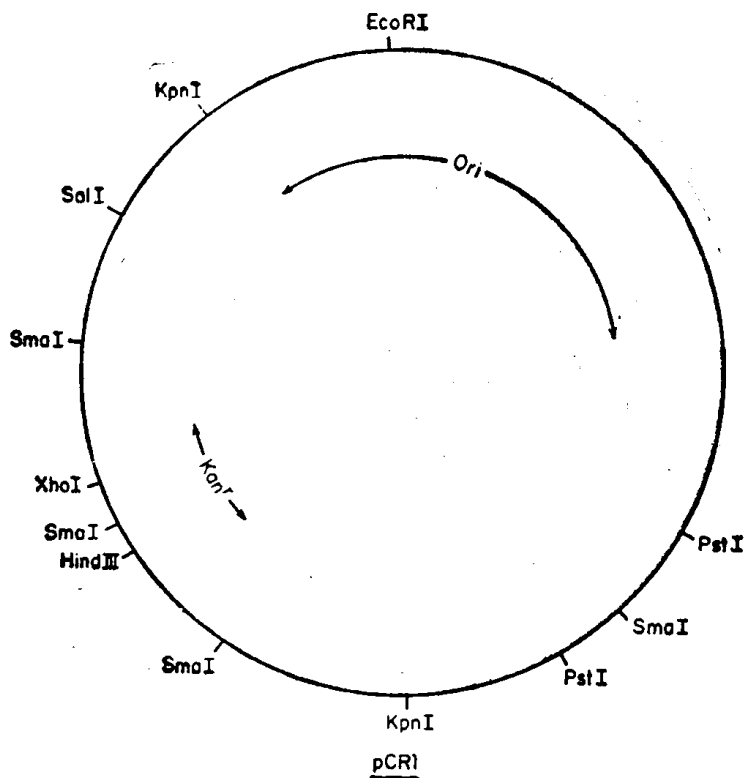
大小: 5.8 kb  
 复制子: ColE1, 松弛型  
 选择标记: Amp<sup>r</sup>, Kan<sup>r</sup>  
 单一位点: SmaI, XhoI, BstEII, BamHI, PvuI, EcoRI, HindIII, BglII, BclI  
 插入失活: Kan<sup>r</sup>-BclI, BglII (可变) Amp<sup>r</sup>-PvuI  
 资料: Rao 和 Rogers (1979)  
 备注: 外源 DNA 插入 BglII 位点使 Kan<sup>r</sup> 基因失活。



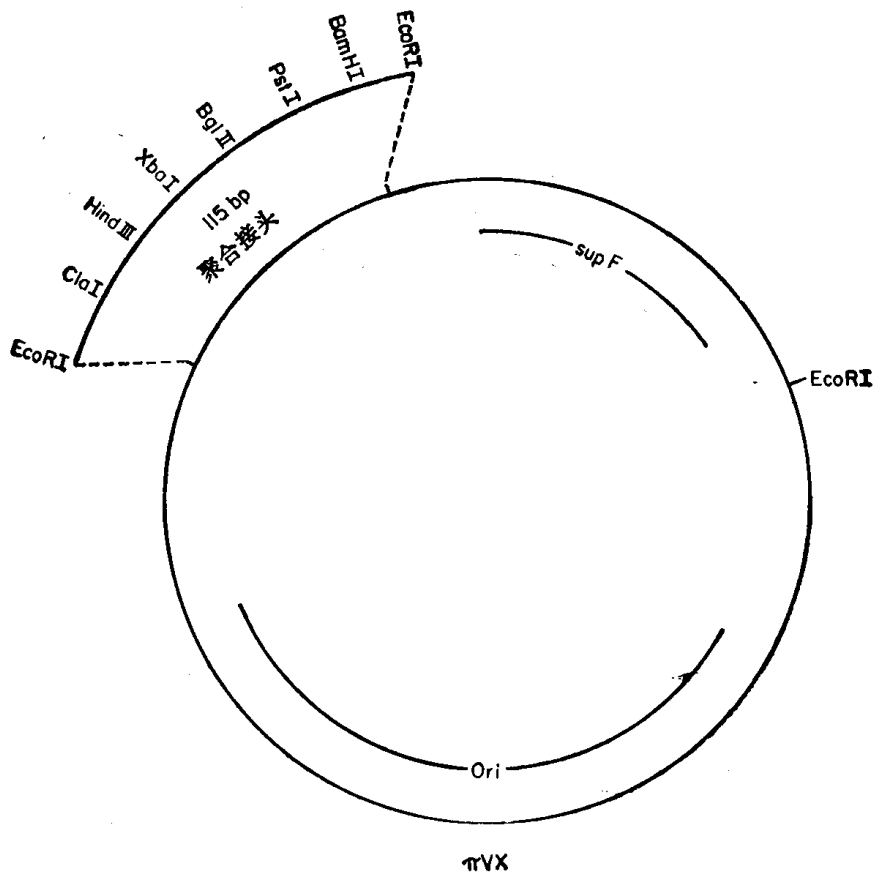
大小: 4.0 kb  
 复制子: P15A, 严紧型  
 选择标记: Cam<sup>r</sup>, Tet<sup>r</sup>  
 单一位点: BamHI, EcoRI, HindIII, Sall  
 插入失活: Cam<sup>r</sup>-EcoRI Tet<sup>r</sup>-BamHI, HindIII, Sall  
 资料: Chang 和 Cohen (1978)  
 备注: 该质粒的特点是具有通过插入 EcoRI 位点使 Cam<sup>r</sup> 失活的能力。



大小: 9.09 kb  
 复制子: 严紧型, 低拷贝数  
 选择标记: Tet<sup>r</sup>  
 单一位点: EcoRI, HindIII, BamHI, SalI, XhoI, PvuII, SmaI  
 插入失活: Tet<sup>r</sup>-HindIII, BamHI, SalI  
 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<sup>r</sup>  
 单一位点: EcoRI, HindIII  
 插入失活: Kan<sup>r</sup>-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  $\pi$ VX, 利用它从重组  $\lambda$  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)。

## 在质粒中进行克隆

原则上,在质粒载体中进行克隆是十分简易的。用限制酶把质粒 DNA 切割,并在离体下与外源 DNA 连接。然后用所产生的重组质粒转化细菌。但是,在实际中必需谨慎选择载体质粒,以尽量减少确定和鉴定重组体所需的工作量。主要的困难是区别含有外源 DNA 序列的质粒和没有外源序列插入而重新环化的载体 DNA 分子。在连接反应过程中,通过调节外源 DNA 和载体 DNA 的浓度,可以在一定程度上限制质粒的环化。但是,正如下述,已经建立了一些方法,可以进一步减少质粒的环化,或者通过遗传技术,把重组体与非重组体分开。

### 插入失活

这种方法是利用携带两种或多种抗生素抗性标记的质粒(见图 1.1)。在这实例中,用

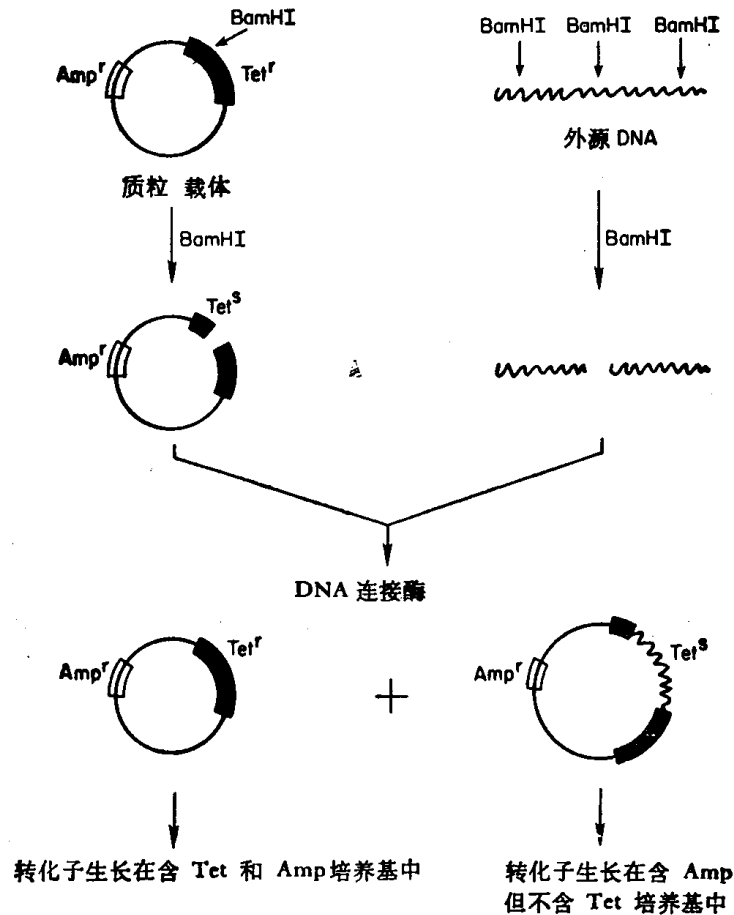


图 1.1 插入失活。

一种限制酶消解待插入的 DNA 和提纯的质粒 DNA,而这种酶能识别位于质粒中四环素抗性基因的单独位点。在适当浓度下把两种 DNA 连接后,例如利用连接混合物进行转化,使对氨苄青霉素敏感的大肠杆菌变为对氨苄青霉素抗性的细菌。生长在含氨苄青霉素培养基上的有些菌落含有重组体质粒,另一些菌落则含有在连接时没有外源 DNA



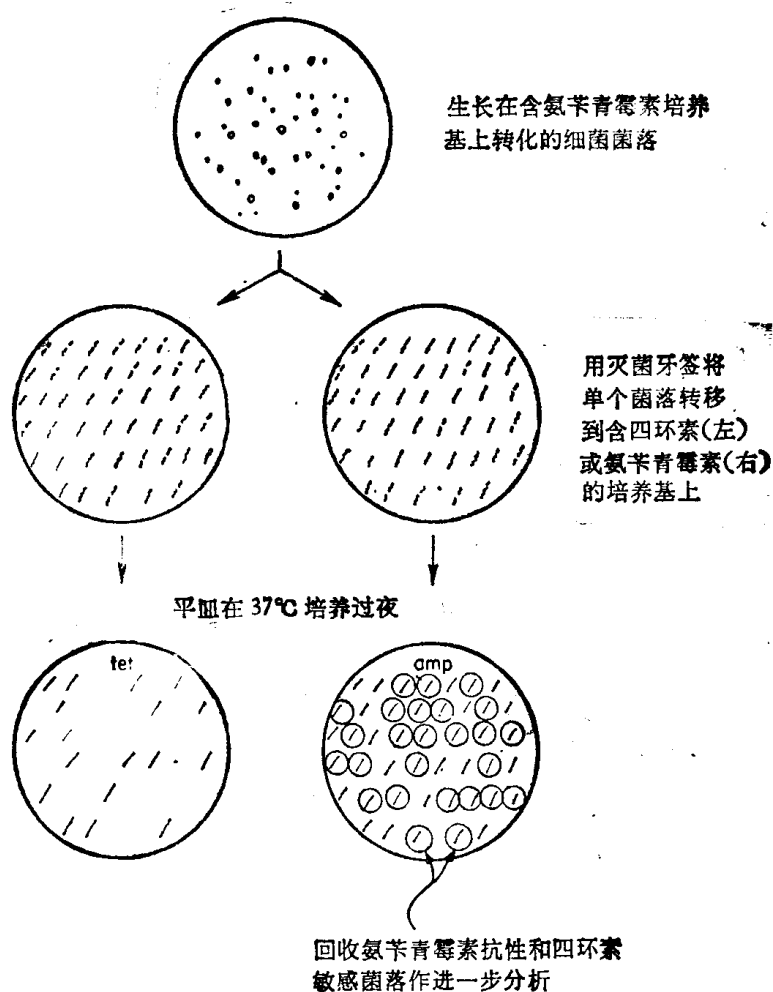


图 1.2 通过质粒所特有抗生素抗性基因的失活来筛选外源 DNA 的插入。

插入而重新环化的质粒 DNA。为了区分这两类转化子，需要在含氨苄青霉素或四环素的平板上，于相应的同一位置划线接种一些菌落(见图 1.2)。在含四环素的平板上存活和生长的菌落，含有有活性的四环素抗性基因；这种质粒看来不携带外源 DNA 的插段。只有在含氨苄青霉素平板上才能生长的菌落，含有无活性的四环素抗性基因的质粒；这些质粒可能带有外源 DNA 序列。

在少数情况下，已经建立了一些方法，可用于正向选择，从抗性细菌占优势的群体中获得对一种抗生素敏感的细菌。按照此法，可能选择由于插入外源 DNA 序列而携带失去活性的抗生素抗性基因的重组体质粒。Bochner 等 (1980) 和 Maloy 及 Nunn (1981) 叙述了这些体系中最有用的一种，他们设计了含有亲脂的螯合剂、萘萘酸或喹啉-2-羧酸可从  $Tet^s$  和  $Tet^r$  细菌群体中直接正向选择  $Tet^s$ 。对绝大多数大肠杆菌株系来说，从有四环素和萘萘酸的培养基上获得的菌落，当涂布在只含有四环素的培养基平板时，约有 90% 是  $Tet^s$ 。因此，可能从 pBR 322 或 pAT 153 转化的细菌群体中，选择带有在 BamHI 和 SalI 位点有插入片段的质粒的细胞。

一种选择对巴龙霉素敏感的细菌的类似技术已经建立 (Slutsky 等, 1980)。这应选择 SmaI 或 XhoI 位点有插段的 pMK 16 衍生物 (Kahn 等, 1979)。

虽然外源 DNA 序列插入到抗生素抗性基因几乎经常导致该基因的失活，至少已知