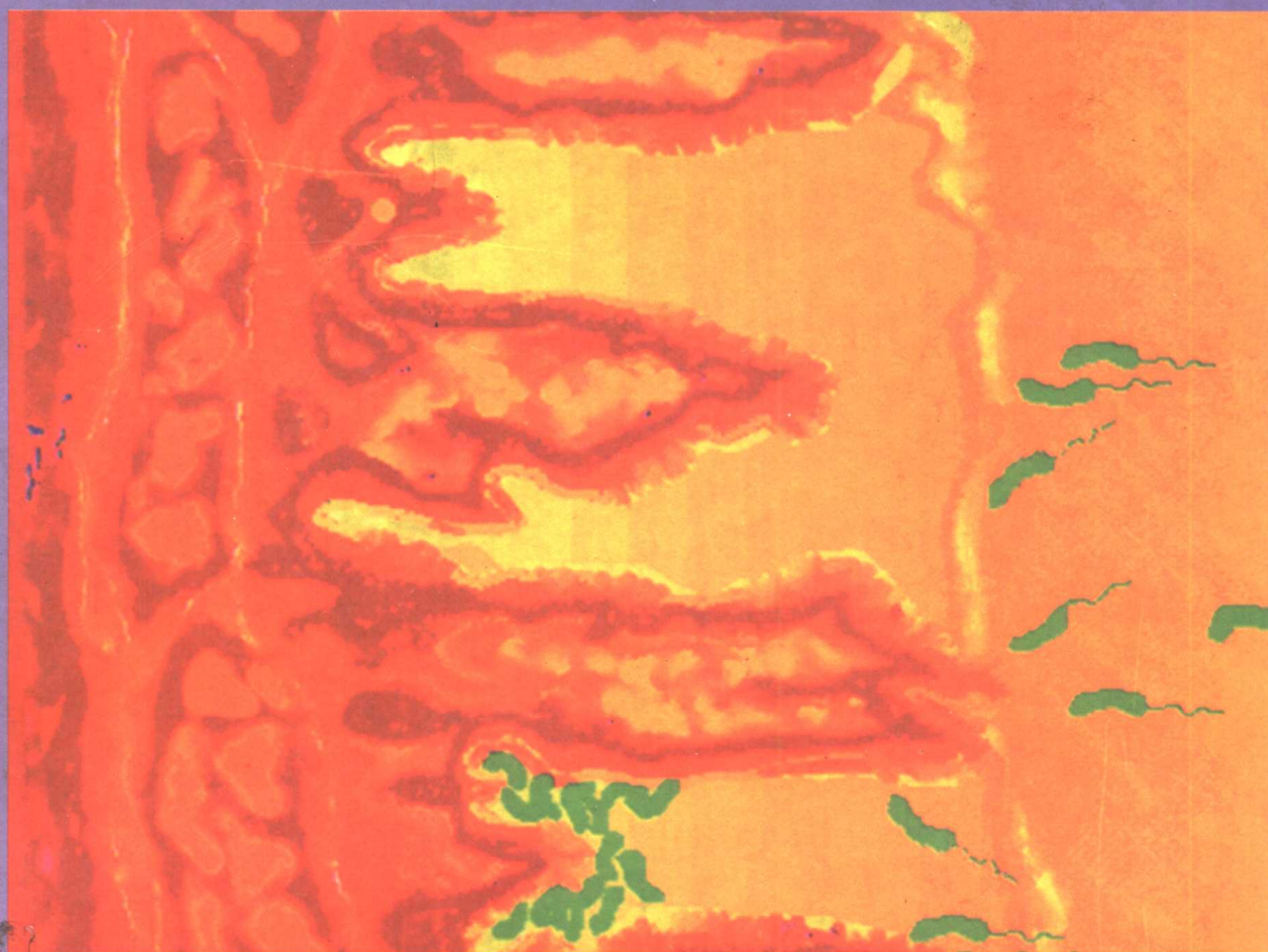


现代生物技术译丛

医用细菌遗传学实验指南

**GENETIC ANALYSIS
OF PATHOGENIC BACTERIA**



〔美〕 S.R.马洛伊
V.J.斯图特
R.K.泰勒

科学出版社

内 容 简 介

一部有关下一个十年“热点”的大型手册,由各国科学家在美国冷泉港实验室的不断实践与修改而诞生。本书理论与实践兼备,是一本阐述细菌致病性的分子遗传学手册。在介绍概念、技术和应用之后,详述了以沙门氏杆菌和弧菌所进行的15个实验。本书内容包括细菌致病机制及其一般概念、微生物遗传的应用、遗传作图、突变及其分析、转导与融合、基因调控、重组DNA和实验描述部分等。

本书可供从事分子生物学、遗传学、医用细菌研究的科研人员及大专院校有关专业师生参考。

Stanley R. Maloy, Valley J. Stewart, Ronald K. Taylor
Genetic Analysis of Pathogenic Bacteria: A Laboratory Manual
Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996

图字:01-97-1997

图书在版编目(CIP)数据

医用细菌遗传学实验指南/(美)马洛伊(Maloy, S.R.)等著;徐建国等译.
-北京:科学出版社,1998.9

书名原文:Genetic Analysis of Pathogenic Bacteria: A Laboratory Manual
ISBN 7-03-006548-4

I. 医… II. ①马… ②徐… III. 细菌-微生物遗传学-实验-指南
IV. Q933

中国版本图书馆CIP数据核字(98)第08398号

科学出版社出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

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

*

1998年9月第一版 开本:787×1092 1/16

1998年9月第一次印刷 印张:26 1/4

印数:1-3 500 字数:583 000

定价:68.00元

(如有印装质量问题,我社负责调换〈科印〉)

译者名单

	译者	审校者
Delbrück 的遗赠	徐建国	
前言	徐建国	
纵览	徐建国	
第一章 细菌的致病机制	阙 飙	徐建国
第二章 微生物遗传学的实践方面	俞东征	徐建国
第三章 遗传作图	余秀军	徐建国
第四章 突变体及其分析	余秀军	徐建国
第五章 转座子与融合	何九芽	徐建国
第六章 基因调控	何九芽	徐建国
第七章 重组 DNA	蓝景刚	徐建国
第八章~第十三章 (实验 1~6)	付晓丽	徐建国
第十四章~第十八章 (实验 7~11)	许爱国	徐建国
第十九章~第二十二章 (实验 12~15)	陈剑平	徐建国
第二十三章~第二十六章 (附录 A~D)	刘彩莲	徐建国
第二十七章~第二十九章 (附录 E~G)	吴海彦	徐建国
索引	肖会芳	徐建国

译者的话

第一次看到这本书,就爱不释手。冷泉港实验室出版社出版的《分子克隆实验指南》早已闻名遐迩,这本书也同样令我们这些细菌学研究工作者欣喜。

细菌学研究为分子生物学的诞生和发展作出了巨大的贡献,譬如转化、接合和转导的发现,等等。近年来,我国医学细菌学的研究相对来说滞后了许多,在技术方面可能与两个因素在关:① 细菌的基因组比较大,不如病毒那样容易操作;② 分子生物学技术的应用不如病毒学那样普及。科学发展到了今天,分子生物技术的普及应用,已经不再是主要矛盾。要从根本上了解病毒性细菌的毒力因子、致病机制以及关于诊断技术和菌苗的研究,分子生物学技术是必须运用的“常规”手段。如果不这样,那就必然要落后。分子生物学技术的运用,已为致泻性大肠杆菌、霍乱弧菌、志贺氏菌等的研究带来了突破性进展。然而这仅仅是开始。未来的几十年,将是分子生物学技术在细菌学研究领域大显身手的几十年。在细菌学研究中,有必要准确理解、正确运用遗传学技术,发挥技术的潜能,解决实际问题。从某种意义上来说,这本书应运而生。

现有的细菌学实验手册多种多样,而本书有着独特的风格。首先,它一反其他手册的惯例,结合理论问题分门别类地介绍了各种方法的特点和用途以及使用这些方法的策略和所能够解决的问题。其中不乏经验之谈,我对此深有同感,并且获益匪浅。在研究工作中我们也发现,只要能够获得可靠的设备和试剂,看看书和文献,照猫画虎,就可以成功了。如果技术复杂一些,可以到比较好的实验室进修学习。同时,许多过去比较难做的实验,现在已经有了商品化的试剂盒,照着说明书操作就行。但是,如果你仅仅知道如何操作,三板斧过后,束手无策,就不能够适应现代科学发展的需要。对研究人员来说,不仅需要掌握技术,还要清楚在何时何地正确地使用所掌握的技术。从这个意义上讲,本书的确是与众不同。

本书的第二个特点是对方法的叙述非常详细实用,对一些具体的操作细节都考虑到了,并且还见缝插针地介绍了某些试剂的应用原理,特别适合于初学者。有一些同事,虽然可以非常熟练地进行实验操作,但知其然不知其所以然。譬如说,提取质粒 DNA 是许多实验室的常规技术,差不多就像过去使用接种环一样。如果要问,在沉淀质粒 DNA 方面,使用乙酸钠和乙酸铵有什么优缺点,就不一定每位都能回答上来了。我们没有必要了解所有试剂的用途,但是我们应该知道某些关键试剂的使用原理。否则,实验出了问题,你将不知道应该怎样解决,更谈不上对实验方法的改进了。本书在此方面,可谓独具匠心。

本书反映了医学细菌领域里的最新思维。譬如说,过去对细菌的致病基因的研究大多是在试管内进行的,这也最多是尽可能地模拟了体内的条件。许多细菌学家已经注意到,体内和体外的情况有着明显的差异。如何才能确定哪些基因只在宿主体内表达呢?本书讨论了扣除文库(subtraction libraries)方法、体内表达技术(*in vivo* expression technology, IVET)和独特 DNA 序列标识(unique DNA sequence tag)的转座技术。而这些方法

在近几年的文献中才开始比较多地出现,可以说是代表了一种发展趋势。

本书囊括了大多数在细菌学研究中常用的分子生物学技术。从基本的质粒接合、DNA 转化实验,到研究 DNA 蛋白质相互作用的方法;从基本的细菌划线培养,到致病性相关基因的定位、克隆和调节。本书比较适合于研究生、大专院校教师和基层卫生防疫部门的研究人员。即使对在细菌学领域辛勤耕耘了多年的中老年研究人员,也有很高的实用价值。如果说掌握了本书的技术方法,知道如何正确地使用这些方法,取得科研成果也就是时间的问题了。对此我深信不疑。

翻译本书的宗旨是尽量尊重原文,兼顾中文习惯。本书的译者基本上是卫生部分子医学细菌学重点实验室的博士、硕士学位获得者和在读博士研究生,每人至少有两年的实验室工作经验。尽管如此,我们基本上还是一支青年军,勇猛有余,沉稳不足,翻译工作中一定还有不少缺点和错误,望同行不吝指正。

徐建国

医学博士

卫生部分子医学细菌学重点实验室主任

在冷泉港实验室首届噬
菌体学习班 50 周年之
际, 将本书奉献给 Max
Delbrück, 以示怀念

Delbrück 的遗赠

噬菌体和细菌遗传学学习班简史

1945 年 Max Delbrück 组织了第一个噬菌体学习班, 目的是为了对一些不同领域的科学家进行培训, 利用噬菌体作为一个简单的模式系统, 研究生物学的基本问题。这个噬菌体学习班塑造了分子生物学的新领域。学习班产生了很大的影响: 应该提一些什么样的问题, 如何用试验来回答这些问题, 如何解释试验结果。Delbrück 强调, 生物学问题应该定量地回答。如果不是这样, 那只不过是简单的现象学, 或者是“集邮”。他还认为, 科学家们对自己的工作应该能够自由地给予批评和接受批评, 而不作为个人的事情来看待。避免自负和拘泥于礼节。科学家互相之间应该直呼其名, 而不要顾及对方的威望。作为噬菌体这个群体的头头, Delbrück 关于礼节的想法在噬菌体和细菌遗传学领域被接受了, 今天依然如此。

噬菌体的分子解剖曾经为中心生物学过程提供了许多重要的线索, 然而还有一些问题需要直接对细胞进行研究, 不能够用噬菌体来回答。随着对噬菌体分子遗传学不断的了解和新的遗传学工具的发展, 我们开始能够比较自如地研究更复杂的生物体——细菌的分子遗传学了。1950 年 Milislav Demerec 开始组织噬菌体学习班的分支, 强调细菌遗传学。在噬菌体学习班之后, 紧接着就举办了细菌遗传学学习班。许多学生先后参加了这两个学习班, 得到了在噬菌体遗传学和细菌遗传学两方面的训练。

许多年来, 细菌遗传学学习班导入了一些噬菌体学习班的技术和概念。1971 年, 这两个学习班终于被合并成了。如同噬菌体学习班一样, 细菌遗传学学习班在科学上也有着重大的影响。培训了许许多多的科学家。学习班还形成了一本非常有影响的实验指南《分子遗传学试验》(*Experiments in Molecular Genetics*)。手册由学习班的指导教师 Jeffrey Miller 编写, 冷泉港实验室出版社 1972 年出版。这本书为迅速膨胀的一群期望使用分子遗传学新工具、而又不知道怎样使用的科学家们, 提供了一本“菜谱”。

到了 70 年代中叶, 两种新发现的工具: 分子克隆和转座子, 开始了遗传学上的一次方法学革命。把这些新方法纳入学习班的内容, 学习班名称改为《高级细菌遗传学》(*Advanced Bacterial Genetics*)。Don Davis, David Botstein 和 John Roth 编写的《高级细菌遗传学实验室手册》由冷泉港实验室出版社 1980 年出版。那时候, 许多科学家们已经意识到了克隆和转座子的威力, 却只有很少数人知道如何使用这些工具。这本实验室手册的影响也是非常大的。两年后, Tom Maniatis, Ed Fritsch 和 Joe Sambrook 编写的《分子克隆实验指南》(*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*) 出版了。David, Botstein 和 Roth 编写的手册是技术方面的最初来源。

1981 年, Tom Silhavy, Lynn Enquist 和 Mike Berman 承担了高级细菌分子遗传学的教学工作, 引入了新的方法学: 使用基因和操纵子融合技术在体内研究基因的表达。

1984年,冷泉港实验室出版了另一本有影响力的实验室手册《基因融合试验》(*Experiments with Gene Fusions*)。这本实验室手册推动了融合技术的普及,开启了在体内研究任何基因表达的大门,无论是否存在检测该基因产物的简单方法。

1986年,George Weinstock、Russ Maurer和Peter Berget开始教授这个学习班。他们继续使用转座子、克隆和基因融合技术,还引入了一些新的方法,如脉冲场电泳(pulsed-field gel electrophoresis)。1991年,我们接受了教学工作。除了引入新的方法学外,如使用攻击噬菌体(challenge phage)研究DNA-蛋白质的相互作用和体内基因克隆,我们还强调了经典遗传学分析方法。经典遗传学方法仍然是研究基因的结构和功能的基本工具。然而,对于在“切粘(cut and paste)遗传学”上成长起来的一代学生来说,缺少这方面训练。我们把一个在遗传学上还不太发达的细菌(霍乱弧菌)引入了教程,来演示如何从头开始来研究你所感兴趣的细菌的遗传学。

1945年以来,学习班的名字更改了多次,从噬菌体到细菌遗传学,从细菌遗传学到高级细菌遗传学。但是学习班的目的和方法仍然符合Delbrück的初衷:教授科学家们如何使用一整套精细的、高水平的遗传学工具,强调对试验结果的正确解释,就像传教士那样把正确的遗传学思维传播给那些“还没有看见光明的可怜的众生”。

现在,直接对一些更复杂的真核系统进行研究是可能的。所以,人们可能会问:在将来,噬菌体遗传学和细菌遗传学还会对科学具有今天这样重大的影响吗?许多指标显示:还会的。若要对一个细胞进行全面的研究,噬菌体和细菌仍然是非常有用的模式系统。遗传学研究需要确立一种直接的因果关系,而这在细菌和噬菌体上是非常容易实现的。在未来的许多年里,噬菌体和细菌仍将会为我们通过许多有价值的模式系统。现在我们就可以使用这些方法对那些在人类健康和全球生态方面有重要意义的细菌进行研究。因为这些细菌具有重要的实际意义,因为细菌的多样化很可能会产生新的激动人心的生物学思维。然而,生物的多样化将会需要新的遗传学工具,需要新的在细菌遗传学方面得到过训练的科学家队伍。

(徐建国译)

前 言

本书是为下列读者而写的:希望在实验室具体操作某些技术的富有经验的研究人员;虽然在细菌遗传学方面几乎没有什么经验,但却希望学习如何才能把遗传学方法应用到自己所研究的细菌中去,或者是希望学习如何才能为自己所研究的细菌发展一种新的遗传学方法的研究人员;以及那些正在筹划一个分子遗传学方面的高级实验室学习班的指导教师。

本书来源于我们1991~1995年间在冷泉港实验室教授的高级细菌遗传学学习班。举办那期学习班的本意是要证明如何才能利用细菌和噬菌体遗传学的威力来回答各种各样的生物学问题。我们很快就意识到学习班的大多数学员是从事细菌致病性研究的科学家。因此,我们就把重点放在如何使用遗传学方法去研究细菌致病性方面。

从病原性细菌中分离基因和进行下列分析,现在来说相对要容易多了。但是,通常还需要使用遗传学方法来鉴定一些与毒力有关的、先前未知的基因,来满足“分子科克氏原则”(Molecular Koch's Postulates),证明某个特定的基因在致病性中的作用。有效地使用遗传学工具,不仅需要了解某项特定技术的相关知识,还需要知道为什么要使用这项技术而不用另一项技术,以及如何来解释试验结果。然而,由于一些其他领域的科学家的影响,许多从事细菌致病性研究的同事,对细菌遗传学缺乏足够的了解。在需要的时候,往往不能够正确地使用现有的遗传学工具,也不知道如何才能发展一种新的遗传学工具。所以,在本书中我们尝试着为读者提供细菌遗传学的扎实背景,并介绍如何使用多种多样的遗传学工具。当然,要囊括所有的细菌性病原体是不可能的。我们把实验集中在两个病原性细菌上:鼠伤寒沙门氏菌和霍乱弧菌。鼠伤寒沙门氏菌的遗传学比较发达,霍乱弧菌更具有典型意义;可用的遗传学工具和大多数病原菌差不多。本书中的许多特异的方法虽然只能在鼠伤寒沙门氏菌中使用,但是其原理却具有广泛性。只需要一点点独创,就可为许多其他的细菌建立类似的方法。

许多同仁为本书的问世作出了重要的贡献。我们在很大程度上受益于前期学习班的指导教师们。特别感谢 Peter Berget、Russ Maurer、John Toth、Tom Silhavy 和 George Weinstock。我们很幸运能得到学习班助理的合作,他们是 Scott Allen、Clark Brown、Li-Mei Chen、Andrew Darwin、Barry Goldman、Melissa Kaufman、Janine Lin、Alicia Muro-Pastor、Paula Ostrovsky、Joel Peek、James Pfau、Ross Rabin、Karen Skorupski 和 Thomas Zahrt。学习班助理们纠正了许多错误,对实验方面提出了大量的建设性意见。他们的奉献和执着是无价的。对 Barry Goldman 在 Mud-P22 作图实验方面的贡献和 Tom Zahrt 在 PFGE 实验方面的贡献,我们表示特别的谢意。还有,学习班的学员们在实验方面非常认真,他们对本手册中许多插入、缺失、重排以及点突变的修复,作出了贡献。每一个学习班的学员,都值得我们表示特别的谢意,他们是:Celia Alpuche、Irmgard Behlau、Amanda Brown、Elena Budrene、Asa Eliasson、Cecil Forsberg、Donald Granger、Reiner Hedderich、Laura Kiessling、Rafael Maldonado、Philippe Moreillon、Robert Poole、Philippe Regnier、Deborah Smith、Jeffrey Stein、Sogaard-Andersen、Trudee Tarkowski、Joyce Velterop、Alberto Villasenor、Michael Waldor、Philippe Cottagnoud、Ansley Crockford、Amando Flores、Richard

Fraze, Valerie Grandjean, Allen Honeyman, Weihong Hsing, Katherine Kezdy, Tamara Barlow, Lisa Barsom, Hein Boot, Kerstin Calia, Angeles Dominguez, Howard Gold, Geeta Gupte, Joseph Hendrick, Ute Hentschel, Alison Holmes, Timothy Hoover, Krystyna Krajewska-Grybkiewicz, Leah Macfayden, Lara Madison, Barbara Troup, Jaap Van Dissel, Paul Anderson, Katherine Andrews-Cramer, Lisa Armitage, Kauline Cipriani, Carmen Collazo-Custodio, Klas Flardh, Alicia Gil, Marten Hammar, Karin Hansson, Ronald Mackenzie, Patricia Marini, Lalita Ramakrishnan, Cecilia Toro, Renee Tsolis, Anne Vanet, Carol Webber, Joseph Barbieri, Creg Darbv, Robert Edwards, Darrell Galloway, Julie-Ann Gavigan, Mary Hondalus, K. Heran Hong, Michael Konkel, Alvydas Mikulski, Heather Miyagi, Marlana Moors, Mads Norregaed-Madsen, Ruth Ann Schmitz, Paul Sullam, Friedrich Widdel 和 Eva Zydch。

衷心地感谢冷泉港实验室的工作人员,我们在冷泉港实验室期间,他们提供了周到的服务和招待。冷泉港实验室出版社的工作人员作出了特殊的贡献。John Inglis 热情地鼓励我们出版本书。Nancy Ford 帮助我们对本书进行概念设计。Mary Cozza 有效地帮助我们根据时间表行事。Dotty Brown 仔细地对最后一稿进行修改。Maryliz Dickerson 和 Susan Schaefer 作了文字输入和排版工作。

最后,我们要衷心感谢我们的妻子 Lisa, Janine 和 Darlene。在我们教授高级细菌遗传学学习班和编写本书的日日夜夜里,她们表现了极大的耐心、理解和支持。

S. R. Maloy
V. J. Stewart
R. K. Taylor

(徐建国译)

目 录

译者的话
Delbrück 的遗赠
前言

原 理 篇

纵览	2
对多种细菌进行遗传学分析	3
0.1 开头的话	4
0.2 近期目标	5
0.2.1 诱变	5
0.2.2 基因转移系统	5
0.2.3 限制和修饰系统	6
0.2.4 反选择	7
0.3 中期目标	7
0.3.1 自杀载体	7
0.3.2 互补分析	8
0.4 远期目标	8
0.4.1 物理作图	8
0.4.2 普遍性转导	8
第一章 细菌的致病机制	9
1.1 细菌致病机制的一般概念	9
1.2 细菌致病机制各论	13
1.2.1 鼠伤寒沙门氏菌	13
1.2.1.1 沙门氏菌属分类	13
1.2.1.2 沙门氏菌感染	14
1.2.1.3 毒力机制	14
1.2.1.4 注意	15
1.2.1.5 鼠伤寒沙门氏菌 LT2 株	16
1.2.2 霍乱弧菌	16
1.2.2.1 霍乱毒素	16
1.2.2.2 其他毒素	17
1.2.2.3 定居因子	17
1.2.2.4 毒力因子的胞外分泌	18
1.2.2.5 毒力基因表达的调控	19

第二章 微生物遗传学的实践方面	21
2.1 遗传学术语	21
2.1.1 基因型与表现型	21
2.1.2 基因与操纵子	22
2.1.3 等位基因的编号	22
2.1.4 菌株的命名	23
2.1.5 缺失	23
2.1.6 插入	23
2.1.7 融合	23
2.1.8 可抑制性突变和条件性突变	24
2.1.9 定位缺失和重复	24
2.1.10 基因图谱和物理学图谱	24
2.2 微生物学操作	25
2.2.1 基本细菌学技术	25
2.2.1.1 液体培养基的接种	25
2.2.1.2 单个菌落的纯化	25
2.2.1.3 涂平板	26
2.2.1.4 大量的液体培养	26
2.2.1.5 倍数稀释	27
2.2.1.6 影印培养	27
2.3 培养基	27
2.3.1 确定成分培养基	27
2.3.2 复合培养基	28
2.3.3 特殊复合培养基	29
2.3.3.1 Luria-Bertani 肉汤	29
2.3.3.2 营养肉汤	29
2.3.4 鉴别培养基	29
2.3.4.1 四氮唑培养基	29
2.3.4.2 麦康凯琼脂培养基	30
2.3.5 XGal	30
2.3.6 XP	31
2.3.7 在 <i>lac</i> 遗传学中有用的化合物	32
2.3.8 P22 溶原菌的指示培养基	32
2.3.8.1 绿色培养基	32
2.3.8.2 EBU 培养基	32
2.3.9 选择性培养基	33
2.3.9.1 萘萘酸培养基	33
2.4 抗生素、抗生素抗性、正选择与负选择	33
2.4.1 正选择与负选择	33

2.4.2	表现型的表达	34
2.4.3	氨基糖甙类抗生素	34
2.4.3.1	一种负选择方法	35
2.4.4	氨基青霉素	35
2.4.5	氯霉素	36
2.4.6	四环素	36
2.4.6.1	一种负选择方法	36
2.4.7	蔗糖抗性;一种负选择方法	36
2.5	细菌生理学	36
2.5.1	生理学与代谢	37
2.5.2	培养物的生长	37
2.5.2.1	培养基的选择	38
2.5.2.2	通气	38
2.5.2.3	监视培养物的密度	38
2.5.3	酶活性的测定	39
2.5.4	酶合成差率的测定	40
第三章	遗传作图	42
3.1	染色体基因的遗传作图	42
3.1.1	利用接合和转导技术绘制遗传图谱	42
3.1.2	物理作图	43
3.1.2.1	物理图谱和遗传图谱的关系	43
3.1.2.2	物理作图的实际应用	44
3.1.3	鼠伤寒沙门氏菌的 Mud-P22 作图	44
3.2	普遍性转导	46
3.2.1	P22 噬菌体	47
3.2.1.1	P22 的调节和包装	47
3.2.1.2	P22 介导的普遍性转导	48
3.2.1.3	P22 HT(高频转导)突变体	49
3.2.1.4	P22 的溶源性和超感染排斥	50
3.2.1.5	P22 介导的质粒转导	52
3.2.2	把 P22 的宿主范围扩展到其他细菌	52
3.2.3	P1 噬菌体	53
3.2.4	转导噬菌体的分离	53
3.3	利用普遍性转导技术进行遗传作图	54
3.3.1	根据共转导数据确定遗传连锁和基因顺序	54
3.3.2	共转导频率和物理距离之间的关系	57
3.3.3	改良的转导作图公式	58
3.3.4	影响遗传连锁的因素	58
3.4	缺失作图	58

3.4.1	缺失作图的实际应用	60
3.4.2	定向缺失	60
第四章	突变体及其分析	62
4.1	诱变	62
4.1.1	何为突变?	63
4.1.2	突变的类型	63
4.1.3	突变体的分离	65
4.1.3.1	遗传学选择	65
4.1.3.2	遗传学筛选	65
4.1.4	诱变	66
4.1.4.1	自发诱变	66
4.1.5	诱变剂	67
4.1.5.1	碱基类似物诱变剂	68
4.1.5.2	烷化剂	68
4.1.5.3	氧化剂	69
4.1.5.4	嵌入剂	69
4.1.5.5	紫外线	69
4.1.6	DNA 修复	69
4.1.6.1	易错修复	70
4.1.7	增变株	70
4.1.8	体外诱变	71
4.1.8.1	定域诱变	71
4.1.8.2	应用核酸酶和 PCR 构建突变	71
4.1.8.3	定点诱变	72
4.1.9	随机和定向诱变	76
4.2	广宿主范围的等位基因交换系统	77
4.2.1	在选择性标记交换中质粒不相容性的应用	77
4.2.2	利用条件性复制子(“自杀质粒”)技术构建遗传重复和无效等位基因	79
4.2.3	利用自杀载体进行非选择突变的等位基因交换	79
4.2.4	把突变的染色体等位基因体内克隆到质粒载体上	82
4.3	抑制	82
4.3.1	基因内抑制	84
4.3.2	基因间抑制	84
4.3.2.1	信息性抑制	84
4.3.2.2	相互作用抑制基因	85
4.3.2.3	剂量补偿性抑制	86
4.3.2.4	旁路抑制基因	86
4.3.2.5	生理性抑制	86
4.4	基因互补	86

4.4.1	基因内互补	87
4.4.2	互补方法	88
4.4.2.1	串联重复	88
4.4.2.2	整合性质粒	90
4.4.2.3	F'附加体	90
4.4.2.4	特异性转导噬菌体	91
4.4.3	基因调控的互补分析	91
4.5	极性	93
4.5.1	Rho 依赖性的转录终止	93
4.5.2	无义极性	93
4.5.3	插入极性	95
4.5.4	极性的复杂性	96
第五章	转座子与融合	98
5.1	转座子在细菌遗传学中的应用	98
5.1.1	转座子 Tn10 及衍生体	99
5.1.1.1	ATS 转座酶	100
5.1.1.2	缺损型 mini-Tn10 转座子	101
5.1.1.3	反式互补	101
5.1.1.4	调节转座酶的表达	101
5.1.1.5	Tn10 启动的缺失和重排	101
5.1.2	Tn5 转座子	102
5.1.3	用于笔迹标识突变的转座子	102
5.2	Mu 噬菌体	103
5.2.1	Mud 衍生体	104
5.2.2	瞬间顺式互补作用	105
5.2.3	作为克隆载体的 Mud	106
5.2.4	在细菌遗传学中使用 Mu 的实践方面	107
5.3	操纵子和基因融合	107
5.3.1	lacZ 的操纵子和基因融合	108
5.3.2	uidA(gus)的操纵子和基因融合	109
5.3.3	phoA 的基因融合	109
5.3.4	体内表达技术	111
第六章	基因调控	114
6.1	毒力基因的调节	114
6.1.1	何谓毒力基因?	114
6.1.2	细菌为什么要对毒力基因进行调节?	115
6.1.3	细菌是如何调节其毒力基因的?	115
6.1.4	为什么要研究毒力基因的调节?	116
6.2	攻击噬菌体:DNA-蛋白质相互作用的遗传分析	117

6.2.1 DNA 结合蛋白质	117
6.2.2 DNA 结合位点	117
6.2.3 DNA-蛋白质相互作用	117
6.2.4 P22 调节机制	118
6.2.5 攻击噬菌体	119
6.2.6 攻击噬菌体的构建	119
6.2.7 DNA 结合蛋白的表达	121
6.2.8 攻击噬菌体的使用	123
6.2.8.1 体内 DNA 结合分析	123
6.2.8.2 DNA 结合位点突变体的选择	123
6.2.8.3 DNA 结合蛋白突变体的选择	123
6.2.9 范例之一: Nac 蛋白质	125
6.2.10 有关 P22 噬菌体的一些突变	125
6.2.10.1 超感染排斥	125
6.2.10.2 <i>arc</i> (Am)突变	126
6.2.10.3 基因 9	127
6.2.10.4 噬菌斑	127
第七章 重组 DNA	128
7.1 质粒与接合	128
7.1.1 质粒接合的机制	128
7.1.2 染色体的诱动	130
7.1.3 质粒诱动转移	132
7.1.4 不相容性与遗传分析	132
7.1.5 质粒接合的应用	132
7.2 转化和电转化	133
7.2.1 大肠埃希氏菌和鼠伤寒沙门氏菌的转化	133
7.2.2 电转化	134
7.2.3 电穿孔仪	134
7.3 分子生物学的基本技术	135
7.3.1 小量质粒纯化(“微量制备技术”)	136
7.3.2 大量纯化质粒 DNA	137
7.3.3 酚抽提法	137
7.3.4 乙醇沉淀	138
7.3.5 从 DNA 标本中去除污染的小分子	139
7.3.6 DNA 浓度推算	139
7.3.7 双脱氧法 DNA 序列分析	139
7.4 DNA 电泳	142
7.4.1 电流、电压和功率	142
7.4.2 琼脂糖	143

7.4.3 丙烯酰胺	143
7.4.4 用溴化乙锭染色	144
7.5 聚合酶链式反应	144
7.5.1 对称性 PCR	144
7.5.2 温度	144
7.5.3 DNA 聚合酶	146
7.5.4 引物	146
7.5.5 模板 DNA	147
7.5.6 dNTP	147
7.5.7 镁	147
7.5.8 循环数	147
7.5.9 不对称性 PCR	148
7.5.10 PCR 诱变	148

实 验 篇

实验 1~6 简介	154
第八章 实验 1 转座子:在结构基因中插入 Mini-Mu-lac	155
8.1 构建 MudJ 的随机“跳跃”	156
8.1.1 材料	156
8.1.2 步骤	156
8.2 将 MudJ 插入回交到野生型菌株	158
8.2.1 材料	158
8.2.2 步骤	158
8.3 利用 Mud-P22 作图确定 <i>srl</i> ::MudJ 的染色体图位	159
8.3.1 材料	159
8.3.2 步骤	159
8.4 使用 <i>srl</i> ::MudJ 插入构建定点缺失	159
8.4.1 材料	159
8.4.2 步骤	160
8.5 <i>srl</i> 区域的缺失作图	161
8.5.1 材料	161
8.5.2 步骤	161
第九章 实验 2 转座子:与结构基因连锁的 Tn 10 d 插入	163
9.1 构建 Tn10d (Tc)的随机“跳跃”	164
9.1.1 材料	164
9.1.2 步骤	164
9.2 对 <i>srl</i> 邻近区域插入库的筛选	165
9.2.1 材料	165
9.2.2 步骤	166

9.3 证实 Tn10d(Tc)插入与 <i>srl</i> 基因座的连锁	168
9.3.1 材料	168
9.3.2 步骤	168
9.4 使用 Mud-P22 作图确定 <i>zgc::Tn10d(Tc)</i> 插入的图位	168
9.4.1 材料	168
9.4.2 步骤	168
9.5 确定 <i>zgc::Tn10d(Tc)</i> 插入的相对图位:三点杂交	169
9.5.1 材料	169
9.5.2 步骤	169
第十章 实验 3 转座子:将 Tn 10 d 插入调节基因	172
10.1 构建 Tn10d(Cm)的随机“跳跃”	173
10.1.1 材料	173
10.1.2 步骤	173
10.2 将 Tn10d(Cm)插入回交到野生型菌株	174
10.2.1 材料	174
10.2.2 步骤	174
10.3 检测 <i>reg::Tn10d(Cm)</i> 插入与 <i>srl</i> 操纵子的连锁	175
10.3.1 材料	175
10.3.2 步骤	175
10.4 使用 Tn10d(Cm)插入测定非连锁的 <i>Reg^c</i> 的遗传图位	176
10.4.1 材料	176
10.4.2 步骤	176
10.5 构建 <i>srl</i> 串联重复菌株	176
10.5.1 材料	177
10.5.2 步骤	177
10.6 连锁的 <i>Reg^cTn10d(Cm)</i> 插入的互补分析	179
10.6.1 材料	179
10.6.2 步骤	179
第十一章 实验 4 分离条件性突变体(热敏和琥珀突变)	181
11.1 分离 DES(硫酸二乙酯)诱导的 <i>srl</i> 突变体	182
11.1.1 材料	182
11.1.2 步骤	182
11.2 定域诱变:分离羟胺诱导的 <i>srl</i> 突变体	183
11.2.1 材料	183
11.2.2 步骤	184
11.3 温敏突变体的回交和鉴定	185
11.3.1 材料	185
11.3.2 步骤	186
11.4 琥珀抑制性突变体的回交和鉴定	187