

Short Protocols in Molecular Biology

生命科学实验指南系列

精编分子生物学 实验指南 (第四版)

[美] F.M. 奥斯伯 / R.E. 金斯顿 / J.G. 塞德曼

K. 斯特拉尔 / R. 布伦特 / D.D. 穆尔 / J.A. 史密斯

主编

马学军 舒跃龙 等译校



科学出版社

www.sciencep.com

生命科学实验指南系列

精编分子生物学实验指南

(第四版)

	F. M. 奥斯伯	R. 布伦特	
〔美〕	R. E. 金斯顿	D. D. 穆尔	主编
	J. G. 塞德曼	J. A. 史密斯	
	K. 斯特拉尔		

马学军 舒跃龙 等译校

科学出版社

北 京

图字:01-2000-0442

内 容 简 介

本书是知名度很高、不断更新的《最新分子生物学实验方法汇编》(Current Protocols in Molecular Biology)系列的精编版本。新版对原有内容进行了修订和更新,包括:大肠杆菌、质粒和噬菌体,DNA 制备与分析,DNA 和 RNA 的酶促操作,RNA 的制备与纯化,重组 DNA 文库,重组 DNA 文库的筛选,DNA 测序,重组 DNA 诱变,DNA 转染哺乳动物细胞方法的介绍,蛋白质分析,免疫学,DNA-蛋白质相互作用,酿酒酵母,原位杂交与免疫组织化学,聚合酶链式反应,蛋白质表达,蛋白质磷酸化分析等;又新增了生物信息学、蛋白质相互作用、统计分析等新内容。

书名原文:Short Protocols in Molecular Biology, 4th ed.

Copyright © 1999 by John Wiley & Sons, Inc.

All rights Reserved. Authorized translation from the English language edition by John Wiley & Sons, Inc.

图书在版编目(CIP)数据

精编分子生物学实验指南(第四版)/(美)奥斯伯(Ausubel, F. M.)等主编;马学军等译校. —北京:科学出版社,2005

(生命科学实验指南系列)

ISBN 7-03-014725-1

I. 精… II. ①奥…②马… III. 分子生物学-实验-指南 IV. Q7-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2004)第 130870 号

责任编辑:马学海 莫结胜 庞在堂 李 悦/责任校对:钟 洋

责任印制:钱玉芬/封面设计:耕者设计工作室

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>

双青印刷厂 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2005 年 1 月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2005 年 1 月第一次印刷 印张:72

印数:1—4 000 字数:1 648 000

定价:130.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换〈新欣〉)

参加翻译人员

(排名不分先后)

马学军	舒跃龙	颜子颖	王海林	金冬雁
李武平	李启明	周蕊	匡治洲	郑丽舒
孙梅生	段招军	谢志萍	王刚	张成海
衣作安	吴小兵	李亚洲	周圆	蒋立新
王晓丹	伍志坚	董小岩	魏博	

中译本序

由病毒基因工程国家重点实验室金冬雁博士、黎孟枫博士主译的《分子克隆实验指南》第二版自 1992 年发行以来已成为我国生命科学领域最畅销的图书之一，对我国生物技术的普及和提高发挥了十分重要的作用。

由病毒基因工程国家重点实验室颜子颖博士、王海林博士主译，金冬雁博士统校的《精编分子生物学实验指南》（*Short Protocols in Molecular Biology*, Fredrick M. Ausubel 等主编）第三版自 1998 年发行以来也已成为我国分子生物学技术领域深受欢迎的另一本参考书。

2004 年底，由病毒基因工程国家重点实验室马学军博士、舒跃龙博士主持，在上一版的基础上，将《精编分子生物学实验指南》的第四版译出，由科学出版社出版发行。

新版的内容覆盖了当今分子生物学的主要技术，它和《分子克隆实验指南》被西方学者并称为现代生物科学技术的“圣经”。《精编分子生物学实验指南》第四版全书共 19 章，除保留了第三版的内容外，增加了两章全新内容（18 章：生物信息学，19 章：蛋白质相互作用的分析），此外部分章节还做了较大的删减和增改，反映了分子生物学主要技术的最新进展。如第 1 章增加了 λ 衍生的噬菌体载体等；第 2 章增加了阴离子交换色谱法纯化 DNA，筛分型琼脂糖凝胶电泳，DNA 的毛细管电泳等；第 4 章增加了 Northern Blot 探针的除去等；第 7 章增加了使用荧光引物或荧光终止物进行循环测序等；第 9 章增加了反转录病毒相关内容，包括禽反转录病毒、鼠反转录病毒等；第 10 章增加了应用 A_{280} 来测定蛋白浓度；肽的反相分离，通过表位标签纯化重组蛋白等；第 12 章增加了 DNA 结合蛋白在凝胶电泳中的迁移率变动分析，PCR 辅助结合位点选择确定蛋白质 DNA 序列特异性等，第 13 章增加了从酵母细胞中分离除去质粒的基本方案，克隆化酵母 DNA 的操作等，第 14 章增加了 ^{32}P 标记寡核苷酸探针等；第 16 章增加了麦芽糖结合蛋白融合蛋白的表达及纯化，痘苗病毒表达系统等；第 17 章增加了酶法检测磷酸化作用，用外源性底物分析蛋白激酶和研究蛋白磷酸化的渗透策略等。在第四版的附录部分增加了哺乳动物细胞组织培养技术（附录 3F），放射性同位素安全使用（附录 3G）和分子生物学家的统计学：组比较（附录 3H）。

马学军博士、舒跃龙博士曾在美国留学深造，近年回国，承担着我国“863”和“973”计划的课题，他们的译文保留了第三版的风格，译意准确，文字流畅，我为年轻科学家的成长深感欣慰。我相信本书的出版发行将一如既往地有利于我国分子生物学技

术的进一步发展和提高。

A handwritten signature in black ink, appearing to read '陈光' (Chen Guang), written in a cursive style.

病毒基因工程国家重点实验室
病毒生物技术国家工程研究中心

二零零四年十二月十二日于北京

前 言

这本书是已出版的《最新分子生物学实验方法汇编》(*Current Protocols in Molecular Biology*, CPMB 即《汇编》)一书中的实验方法的简编版本。它是从《汇编》的核心手册和每季度翻新的服务手册中提炼而来,包括了《汇编》中所有基本方法及其详细实验步骤。本书拟作为实验室手册使用,对象是那些熟悉《汇编》中各种详细解释的研究生和博士后人员,然而,在本书中对实验方法有详细的步骤说明,使有经验的研究人员也可将它作为独立的实验室操作指南。

虽然熟练掌握本手册中的技术方法可使读者进行分子遗传学研究,但这本手册并不适用于替代研究生水平的分子生物学教材或作为这一领域的综合性读本。另外,我们推荐读者在使用本手册时要对照参考《汇编》中的评述和详细注释。最后,我们极力要求读者通过在分子生物学实验室的工作获得对基本技术和实验室安全操作规程的第一手经验。

如何使用这本手册

结构

这本手册按章编排,每种实验方案均可从各节中获得。每一节中包括了材料、实验方案的步骤和每种技术的参考文献。在附录 5 中囊括了整个手册全部的参考文献。本手册的排列和结构均与《汇编》中的基本一致。尽管各节的编号可能不完全相对应,但各节的标题在两个版本中是相同的。因此,拥有两种版本手册的使用者当需要更详细的解释时会发现对照参考汇编十分容易和便利。

在整本手册中,许多试剂和实验程序被反复应用,不过我们并不是反复复制这些信息,而是在章节之间广泛地使用对照参考。在手册中前面的各章(和附录 3A~3E)主要介绍常用的技术方法,如基本微生物学和酶、DNA、RNA 的基本操作方法,而后面的各章介绍的是更先进的技术方法。因此,在一种方案中无论什么时候用到某一特定的酶,均可对照参考第 3 章中适当的节,找到对该酶反应条件进行介绍的内容(如 3.7 节介绍反转录酶)。同样,在整个手册中读者可参照 1.3 节进行铺平板或在平板上划线;参照 1.2 节进行酚抽提和乙醇沉淀;参照 2.5A 节进行琼脂糖凝胶电泳等等。因此,在本书的后面章节所介绍的方案中就省略了制备、纯化和分析样品或目的分子的辅助程序。

附录提供了试剂和溶液的配方(附录 1),有用的测量值和数据(附录 2),常用的生物化学实验技术(附录 3),供应商的名称和地址(附录 4)以及所有被引用参考文献的完整信息(附录 5)。

方案

许多节中都含有几组方案。在每个节中首先出现的是基本方案，它一般也是首推的实验方法。备择方案在以下情况下使用：①使用不同的仪器或试剂可得到相似的结果；②起始材料需要方法有所改变；或③对最终产物的要求与基本方案不同。辅助方案介绍了基本方案和备择方案所需的附加步骤。这些步骤之所以从核心方案中单列出来，是因为它们可能在本书中具有其他用途，或操作时与基本方案各步骤在时间上可以分开。

试剂与溶液

实验步骤开始之前，材料栏中列出了一个方案中所需要的各种试剂。除培养基和限制性内切酶反应缓冲液配方外相应的配方都在附录 1 中列出，并在括号中列出了这些配方的出处。尤其要注意这些特殊溶液中有些溶液的名称在一个节与另一个节中可能是相似的（如杂交液、裂解缓冲液等），但配方却不同；因此，在按适当的配方配制试剂时要仔细确认。为了避免混淆，在附录 1 中紧接每个试剂名称的括号内列出了使用每个配方的节序数，但常用缓冲液和溶液除外，如 TE 缓冲液、PBS 和 1mol/L CaCl_2 等。

【注】本书中提到的所有溶液均应使用去离子蒸馏水。

仪 器

现代分子生物学实验室中标准仪器及其用品在本文后列出，并在本书中广泛采用。在每个方案之前的材料栏中仅包括“特殊”仪器，即在实验室不易备有的或需要特殊制备的仪器。

供 应 商

在本书的某些实验中，我们推荐一些化学试剂、生物材料或实验仪器的供应商。但我们尽量避免这种做法，因为对某种品牌的喜好是主观的，而且一般并无广泛比较试验的基础。对所推荐的供应商，我们的原则是：①这种特殊品牌实际上已证实具有出众的品质；或②这种材料在市场上很难找到。附录 4 列出了推荐的供应商的名称、地址和电话号码，但它们并非唯一的生物试剂供应商。读者也可使用自己喜好的品牌进行实验。

安全考虑

任何一个按这些方案进行实验的研究者都将遇到以下有害材料：①放射性物质；②有毒化学物质和致癌或致畸试剂；③致病或具感染性的生物因子；④重组 DNA。使用这些材料时必须严格遵守地方和国家条例。在本书中的许多情况下都出现了警示的标志，但我们强调使用者应具有较好的实验室实践经验，在操作有害材料时必须小心谨慎。

在每个方案的材料栏中也将一些特殊的仪器列了出来。在此，我们并未试图将每个实验过程所需的所有仪器一一列出，而是提及那些在实验室可能并未常备或需要特别准备的仪器。在现代分子生物学实验室，应备有下列各种标准仪器，例如在本书中的常用仪器，而它们并未包括在各个材料栏中。

高压设备

天平 分析天平和制备天平

桌布 塑料布垫（包括“蓝色垫子”）

离心机 实验中需要一台低速（20 000r/min）冷冻离心机和一台超速（20 000~80 000r/min）离心机。制备质粒 DNA 时，使用垂直超速离心转头十分方便。至少需要一台可离心 1.5mL 微量离心管的微型离心机。另外，还应有一台大容量、低速度的离心机用来收获大量的细菌培养液，以及一台带适配器的台式吊桶式离心机用来甩干 96 孔微量酶标板

计算机和打印机

暗室和显影罐或 X-Omat 自动 X 光片显影仪

过滤装置 用于在硝酸纤维滤膜或其他膜上收集酸沉淀

分部收集器

冷冻和冷藏冰柜 用于 4℃、-20℃ 和 -70℃ 孵育或贮存

通风橱

盖革氏计数器

干胶机

凝胶电泳装置 至少有一套可满足不同分子量大小的水平电泳仪和一套小型水平电泳仪。对于从事大规模测序的研究人员，需要配备一套测序凝胶装置。一套用于聚丙烯酰胺蛋白质凝胶的垂直电泳仪，根据需要，配备一套用于双向蛋白质凝胶的专用电泳仪

制冰机

恒温箱（37℃） 用于培养细菌。我们推荐采用可以容纳组织培养转鼓的恒温箱，它可用于在标准的 18mm×150mm 试管中进行 5ml 培养液的培养。New Brunswick Scientific 公司生产一种便利和可定时的试管转鼓

恒温箱/摇床 一种封闭式摇床（如 New Brunswick 的恒温摇床）可振动 4L 的烧瓶，这对培养 1L 的大肠杆菌培养液是必要的。而旋转水浴摇床（New Brunswick R76）对小量烧瓶培养液的培养有利

灯箱 用于观看放射自显影胶片

液氮

磁力搅拌器（最好带加热功能）

微量离心机 Eppendorf 型，最大转速在 12 000~14 000r/min

微量离心管 1.5mL

微波炉 用于熔化琼脂和琼脂糖

研钵和研杵

裁纸刀 大号，可用于裁切大小 46cm×57cm Whatman 滤纸

pH 计

pH 试纸

移液器 适用于 1~1 000μL 一次性吸头，每一位研究人员最好配备一套移液器

Polaroid 照相机和 UV 透射仪 用于拍摄染色凝胶照片

细胞刮 橡胶或塑料的

电源 对于凝胶电泳，300V 电源就足够了。而对于 DNA 测序需要 2 000V 电源

放射线保护屏（Lucite 或 Plexiglas）

放射性墨水

放射性废料收集箱 液体和固体废料

冰箱 4℃

防护眼罩

解剖刀和刀片

液体闪烁仪

封口机

摇床 定轨和平台，室温或 37℃

分光光度计 UV 和可见光

真空旋转蒸发器

热循环仪

组织培养箱 CO₂ 加湿培养箱、相差显微镜、液氮贮存罐和层流罩

UV 交联仪

UV 灯 长波和短波

UV 透射仪

真空干燥器/冻干器

真空烤箱

旋涡混合器

水浴箱 至少两台可调温至 80℃

纯水仪 或玻璃蒸馏装置，用来纯化用于分子生物学实验的水

X 光片、暗盒和增感屏

参编人员

Susan M. Abmayr
Pennsylvania State University
University Park, Pennsylvania

Lonnie D. Adams
Upjohn Company
Kalamazoo, Michigan

Lisa M. Albright
Reading, Massachusetts

Alejandro Aruffo
Bristol-Myers Squibb
Seattle, Washington

Frederick M. Ausubel
Massachusetts General Hospital
and Harvard Medical School
Boston, Massachusetts

Omar Bagasra
Thomas Jefferson University
Philadelphia, Pennsylvania

Albert S. Baldwin, Jr.
University of North Carolina
Chapel Hill, North Carolina

Daniel M. Becker
Pennie & Edwards
Menlo Park, California

Claude Besmond
Hôpital Robert Debré
Paris, France

Stephen M. Beverley
Harvard Medical School
Boston, Massachusetts

Kenneth D. Bloch
Massachusetts General Hospital
Boston, Massachusetts

Juan S. Bonifacino
National Institute of Child Health
and Human Development
Bethesda, Maryland

Ann Boyle
Current Protocols
Madison, Connecticut

Allan R. Brasier
University of Texas
Galveston, Texas

Michael Brenowitz
Albert Einstein College
Bronx, New York

Roger Brent
Molecular Sciences Institute
Berkeley, California

Terry Brown
University of Manchester
Institute of Science and Technology
Manchester, England

Bernard H. Brownstein
Howard Hughes Medical Institute
Washington University
School of Medicine
St. Louis, Missouri

Kim Budelier
QIAGEN, Inc.
Valencia, California

William Buikema
University of Chicago
Chicago, Illinois

Linda Buonocore
Yale University School of Medicine
New Haven, Connecticut

Stephen Buratowski
Harvard Medical School
Boston, Massachusetts

Miles W. Carroll
Oxford BioMedica
Oxford, United Kingdom

A. Nigel Carter
The Salk Institute for Biological Studies
La Jolla, California

Anthony Celeste
Genetics Institute
Cambridge, Massachusetts

Constance Cepko
Harvard Medical School
Boston, Massachusetts

David D. Chaplin
Howard Hughes Medical Institute
Washington University
School of Medicine
St. Louis, Missouri

Claudia A. Chen
National Institute of Mental Health
Bethesda, Maryland

Jin-Long Chen
Tularik, Inc.
South San Francisco, California

J. Michael Cherry
Stanford University
Palo Alto, California

Jonathan D. Chesnut
Invitrogen Corporation
Carlsbad, California

Lewis A. Chodosh
University of Pennsylvania
Philadelphia, Pennsylvania

Piotr Chomczynski
University of Cincinnati College
of Medicine
Cincinnati, Ohio

Joanne Chory
The Salk Institute
La Jolla, California

Donald M. Coen
Harvard Medical School
Boston, Massachusetts

Martine A. Collart
Harvard Medical School
Boston, Massachusetts

James F. Collawn
The Salk Institute
La Jolla, California

Helen M. Cooper
Melbourne Hospital
Victoria, Australia

Norman Cooper
National Institute of Allergy &
Infectious Diseases
Bethesda, Maryland

Lynn M. Corcoran
Walter & Eliza Hall Institute
Victoria, Australia

Brendan Cormack
Harvard Medical School
Boston, Massachusetts

Robert L. Dorit
Yale University
New Haven, Connecticut

Allan D. Duby
Medical City
Dallas, Texas

Barbara Dunn
GenPharm International
Mountain View, California

Patricia L. Earl
National Institute of Allergy &
Infectious Diseases
Bethesda, Maryland

Richard L. Eckert
Case Western Reserve School
of Medicine
Cleveland, Ohio

Karen L. Elbing
Fish and Richardson
Boston, Massachusetts

Elaine Elion
Harvard Medical School
Boston, Massachusetts

Andrew Ellington
University of Texas
Austin, Texas

- Orna Elroy-Stein
Tel Aviv University
Tel Aviv, Israel
- JoAnne Engebrecht
State University of New York
Stony Brook, New York
- Michael J. Eveleigh
ADI Diagnostics
Rexdale, Ontario
- Rhonda Feinbaum
Massachusetts General Hospital
Boston, Massachusetts
- Russell L. Finley, Jr.
Wayne State University
School of Medicine
Detroit, Michigan
- Michael Finney
MJ Research
Watertown, Massachusetts
- John J. Fortin
Tropix, Inc.
Bedford, Massachusetts
- Verna Frasca
Amersham Pharmacia Biotech
Piscataway, New Jersey
- Steven A. Fuller
Univax Biologics
Rockville, Maryland
- Sean R. Gallagher
Hoefer Scientific Instruments
San Francisco, California
- Subinay Ganguly
SmithKline Beecham
King of Prussia, Pennsylvania
- Paul A. Garrity
University of California Los Angeles
Los Angeles, California
- David H. Gelfand
Roche Molecular Systems
Alameda, California
- Michael Gilman
Cold Spring Harbor Laboratory
Cold Spring Harbor, New York
- Erica A. Golemis
Fox Chase Cancer Center
Philadelphia, Pennsylvania
- Michael E. Greenberg
Harvard Medical School
Boston, Massachusetts
- John M. Greene
National Institutes of Health
Bethesda, Maryland
- David Greenstein
Massachusetts General Hospital
Boston, Massachusetts
- Mitchell S. Gross
SmithKline Beecham
King of Prussia, Pennsylvania
- Barbara Grossman
Amersham Life Sciences, Inc.
Cleveland, Ohio
- Stefan Grünwald
Pharmingen
San Diego, California
- Tod Gulick
Massachusetts General Hospital
Charlestown, Massachusetts
- Jeno Gyuris
Mitotix, Inc.
Cambridge, Massachusetts
- Lars Hagel
Amersham Pharmacia Biotech AB
Uppsala, Sweden
- John Hanson
MJ Research
Watertown, Massachusetts
- Grant Hartzog
Harvard Medical School
Boston, Massachusetts
- Joseph S. Heilig
University of Colorado
Boulder, Colorado
- Peter Heinrich
Consortium für Elektrochemische
Industrie
Munich, Germany
- William J. Henzel
Genentech, Inc.
South San Francisco, California
- David E. Hill
Applied Biotechnology
Cambridge, Massachusetts
- James P. Hoeffler
Invitrogen Corporation
Carlsbad, California
- Charles S. Hoffman
Boston College
Chestnut Hill, Massachusetts
- Peter Hornbeck
University of Maryland
Baltimore, Maryland
- John G.R. Hurrell
Boehringer Mannheim Biochemicals
Indianapolis, Indiana
- Charles B.-C. Hwang
Harvard Medical School
Boston, Massachusetts
- Nina Irwin
Harvard University
Cambridge, Massachusetts
- Kenneth A. Jacobs
Genetics Institute
Cambridge, Massachusetts
- Kaaren Janssen
Current Protocols
Guilford, Connecticut
- Stephen Albert Johnston
University of Texas Southwestern
Medical Center
Dallas, Texas
- Jingyue Ju
Incyte Pharmaceutical
Palo Alto, California
- Mustak A. Kaderbhai
University College of Wales
Penglais, Aberystwyth, United Kingdom
- James T. Kadonaga
University of California San Diego
La Jolla, California
- Steven R. Kain
Clontech Laboratories
Palo Alto, California
- Randal J. Kaufman
University of Michigan
Ann Arbor, Michigan
- Leslie A. Kerrigan
University of California San Diego
La Jolla, California
- Robert E. Kingston
Massachusetts General Hospital
and Harvard Medical School
Boston, Massachusetts
- Carol M. Kissinger
Millipore
Burlington, Massachusetts
- Lloyd B. Klickstein
Brigham and Women's Hospital
Boston, Massachusetts
- Mikhail G. Kolonin
Wayne State University
School of Medicine
Detroit, Michigan
- Martha F. Kramer
Harvard Medical School
Boston, Massachusetts
- Thomas A. Kunkel
National Institute of Environmental
Health Sciences
Research Triangle Park, North Carolina
- Edward R. LaVallie
Genetics Institute
Cambridge, Massachusetts
- Peng Liang
The Vanderbilt Cancer Center
Nashville, Tennessee

Peter Lichter
Deutsches Krebsforschungszentrum
Heidelberg, Germany

Victoria Lundblad
Baylor College of Medicine
Houston, Texas

Thomas L. Madden
National Center for Biotechnology
Information
Bethesda, Maryland

Chris S. Martin
Tropix, Inc.
Bedford, Massachusetts

John M. McCoy
Genetics Institute
Cambridge, Massachusetts

Jill Meisenhelder
The Salk Institute
La Jolla, California

David D. Moore
Baylor College of Medicine
Houston, Texas

Malcolm Moos, Jr.
Center for Biologics Evaluation
& Research
Food and Drug Administration
Bethesda, Maryland

Zarmik Moqtaderi
Harvard Medical School
Boston, Massachusetts

Richard Mortensen
Brigham and Women's Hospital
Boston, Massachusetts

Bernard Moss
National Institute of Allergy &
Infectious Diseases
Bethesda, Maryland

Paul R. Mueller
California Institute of
Technology
Pasadena, California

Cheryl Isaac Murphy
Aquila Biopharmaceuticals
Worcester, Massachusetts

Richard M. Myers
Stanford University School
of Medicine
Stanford, California

Robert J. Nelson
Molecular Dynamics
Sunnyvale, California

Rachael L. Neve
McLean Hospital
Belmont, Massachusetts

B. Tracy Nixon
Pennsylvania State University
University Park, Pennsylvania

Marjorie Oettinger
Massachusetts General Hospital
Boston, Massachusetts

Osamu Ohara
Shionogi Research Laboratories
Osaka, Japan

Hiroto Okayama
Osaka University
Osaka, Japan

Salvatore Oliviero
Harvard Medical School
Boston, Massachusetts

Arthur B. Pardue
Dana-Farber Cancer Institute
Boston, Massachusetts

Yvonne Paterson
University of Pennsylvania
Philadelphia, Pennsylvania

Warren Pear
University of Pennsylvania
Philadelphia, Pennsylvania

Heather Perry-O'Keefe
Perceptive Biosystems
Framingham, Massachusetts

Kevin Petty
University of Texas Southwestern
Medical Center
Dallas, Texas

Mary C. Phelan
Greenwood Genetic Center
Greenwood, South Carolina

Helen Piwnicka-Worms
Washington University School
of Medicine
St. Louis, Missouri

Jack D. Pollard, Jr.
Massachusetts General Hospital
and Harvard Medical School
Boston, Massachusetts

Roy M. Pollock
Ariad Pharmaceuticals
Cambridge, Massachusetts

Roger Pomterantz
Thomas Jefferson University
Philadelphia, Pennsylvania

Huntington Potter
Harvard Medical School
Boston, Massachusetts

Thomas Quertermous
Massachusetts General Hospital
Boston, Massachusetts

Elisabeth Raleigh
New England Biolabs
Beverly, Massachusetts

K.J. Reddy
State University of New York
Binghamton, New York

Ann Reynolds
University of Washington
Seattle, Washington

Randall K. Ribaud
National Institute of Allergy &
Infectious Diseases
Bethesda, Maryland

Eric J. Richards
Washington University
St. Louis, Missouri

Paul Riggs
New England Biolabs
Beverly, Massachusetts

Phil Robakiewicz
Worcester Polytechnic Institute
Worcester, Massachusetts

Melissa Rogers
Harvard Medical School and
Dana-Farber Cancer Institute
Boston, Massachusetts

William G. Romanow
Corning Costar
Portsmouth, New Hampshire

John K. Rose
Yale University School of Medicine
New Haven, Connecticut

Martin Rosenberg
Smithkline Beecham
King of Prussia, Pennsylvania

Elizabeth F. Ryder
Worcester Polytechnic Institute
Worcester, Massachusetts

Nicoletta Sacchi
National Cancer Institute
Frederick, Maryland

Thomas P. St. John
ICOS Corporation
Bothwell, Washington

Joachim Sasse
Shriners Hospital for Crippled Children
Tampa, Florida

Stephen J. Scharf
Cetus Corporation
Emeryville, California

David Schatz
Howard Hughes Medical Institute &
Yale University School of Medicine
New Haven, Connecticut

Paul Schendel
Genetics Institute
Cambridge, Massachusetts

Paul Schendel
Genetics Institute
Cambridge, Massachusetts

Joachim Schorr
QIAGEN GmbH
Hilden, Germany

Robert Scopes
La Trobe University
Bundoora, Australia

Brian Seed
Massachusetts General Hospital
and Harvard Medical School
Boston, Massachusetts

Bartholomew M. Sefton
The Salk Institute
San Diego, California

Christine E. Seidman
Harvard Medical School
Boston, Massachusetts

J.G. Seidman
Harvard Medical School
Boston, Massachusetts

Richard F. Selden
TKT Inc.
Cambridge, Massachusetts

Kentaro Semba
The Salk Institute
La Jolla, California

Donald F. Senear
University of California
Irvine, California

Ilya Serebriiskii
Fox Chase Cancer Center
Philadelphia, Pennsylvania

Thikkavarapu Seshamma
Thomas Jefferson University
Philadelphia, Pennsylvania

Raj Shankarappa
Biogenex
San Ramon, California

Jen Sheen
Massachusetts General Hospital
and Harvard Medical School
Boston, Massachusetts

Shirish Shenolikar
Duke University Medical Center
Durham, North Carolina

Penny Shockett
Yale University School of Medicine
New Haven, Connecticut

Michael H. Simonian
Beckman Instruments, Inc.
Fullerton, California

Harinder Singh
University of Chicago
Chicago, Illinois

Barton E. Slatko
New England Biolabs
Beverly, Massachusetts

Alan Smith
Beckman Center, Stanford University
Stanford, CA

Donald B. Smith
University of Edinburgh
Edinburgh, Scotland

John A. Smith
University of Alabama at Birmingham
Birmingham, Alabama

Timothy A. Springer
Center for Blood Research
Boston, Massachusetts

Julie M. Stone
University of Missouri, Columbia
Columbia, Missouri

William M. Strauss
Whitehead Institute
Cambridge, Massachusetts

Kevin Struhl
Harvard Medical School
Boston, Massachusetts

John T. Stults
Genentech, Inc.
South San Francisco, California

Jonathan C. Swaffield
University of Texas Southwestern
Medical Center
Dallas, Texas

Stanley Tabor
Harvard Medical School
Boston, Massachusetts

Miyoko Takahashi
Spectral Diagnostics, Inc.
Toronto, Ontario

Douglas A. Treco
TKT Inc.
Cambridge, Massachusetts

Steven J. Triezenberg
Michigan State University
East Lansing, Michigan

Baruch Velan
Israel Institute of Biological Research
Ness Ziona, Israel

Daniel Voytas
Iowa State University
Ames, Iowa

Simon Watkins
University of Pittsburgh Medical School
Pittsburgh, Pennsylvania

John H. Weis
University of Utah School of Medicine
Salt Lake City, Utah

Michael Whitt
University of Tennessee
Memphis, Tennessee

Alan Williams
Amersham Pharmacia Biotech
Piscataway, New Jersey

Kate Wilson
Wye College
Wye, England

Fred Winston
Harvard Medical School
Boston, Massachusetts

Scott E. Winston
Univax Biologics
Rockville, Maryland

C. Richard Wobbe
Harvard Medical School
Boston, Massachusetts

Barbara Wold
California Institute of Technology
Pasadena, California

Tyra G. Wolfsberg
National Center for Biotechnology
Information
Bethesda, Maryland

Jerry L. Workman
Pennsylvania State University
University Park, Pennsylvania

Linda S. Wyatt
National Institute of Allergy &
Infectious Diseases
Bethesda, Maryland

Wayne M. Yokoyama
University of California
School of Medicine
San Francisco, California

Rolf Zeller
Harvard Medical School
Boston, Massachusetts

Ning Zhang
Tularik, Inc.
South San Francisco, California

Louis Zumstein
Baylor College of Medicine
Houston, Texas

致 谢

如果没有 John Wiley & Sons 出版社《最新分子生物学实验方法汇编》全体工作人员的鼎力相助，就不可能有本书的出版。在这些帮助我们的人当中，我们特别要感谢：Karren Janssen, Kathy Morgan, Kathy Wisch, Janet Blair, Hazel Chan, Rebecca Barr, 和 Elizabeth Konkle。我们同样要特别感谢 Sarah Greene，是他首先提出了出版本书的构想，并且以他对业务的熟悉和对工作的耐心帮助我们形成了本书的框架。

我们由衷感谢帮助本书出版的合作者，他们或撰写材料，或评论章节，或对方案作现场实验验证。对那些工作在我们实验室、工作在波士顿和全世界的研究院和产业实验室的人，我们一并深表谢意！

Frederick M. Ausubel	Roger Brent
Robert E. Kingston	David D. Moore
J. G. Seidman	John A. Smith
Kevin Struhl	

目 录

中译本序

前言

参编人员 致谢

第 1 章 大肠杆菌、质粒和噬菌体	1
1.1 培养基及常用工具的准备	2
1.1.1 极限培养基	2
1.1.2 丰富培养基	3
1.1.3 固体培养基	4
1.1.4 顶层琼脂培养基	4
1.1.5 穿刺琼脂培养基	5
1.1.6 实验工具	5
1.2 在液体培养基中培养	6
1.2.1 基本方案 1 过夜培养	6
1.2.2 基本方案 2 大体积培养	6
1.2.3 基本方案 3 细菌培养的监测	6
1.3 在固体培养基中培养	7
1.3.1 基本方案 1 通过连续稀释法滴定和分离细菌菌落	7
1.3.2 基本方案 2 通过平板划线法分离单菌落	7
1.3.3 基本方案 3 通过铺平板分离单个菌落	7
1.3.4 辅助方案 1 影印平板	8
1.3.5 辅助方案 2 菌株的保存和复苏	8
1.4 经典细菌遗传学选论	9
1.5 质粒图谱	13
1.6 质粒 DNA 的小量制备	20
1.6.1 基本方案 1 碱裂解小量制备	20
1.6.2 备择方案 96 孔微量滴定板碱裂解法	20
1.6.3 基本方案 2 煮沸小量制备法	21
1.6.4 辅助方案 质粒 DNA 的保存	22
1.7 质粒 DNA 的大量制备	22
1.7.1 粗制裂解物的制备	22
基本方案 1 碱裂解法	22
基本方案 2 氯化铯/溴化乙锭平衡离心法	23
1.7.2 备择方案 利用离子交换层析和分子筛层析纯化质粒 DNA	24
1.8 将质粒 DNA 导入细菌细胞	25
1.8.1 基本方案 1 CaCl_2 转化法	25
1.8.2 备择方案 一步法制备和转化感受态细菌	26

1.8.3 基本方案2 高效率的电转化方法	27
1.9 λ 噬菌体概述	28
1.9.1 裂解性生长	29
1.9.2 溶原性生长	30
1.10 作为克隆载体的 λ 噬菌体	31
1.10.1 用 λ 噬菌体的优点	31
1.10.2 选择插入的 DNA	31
1.10.3 λ 噬菌体来源的克隆载体的图谱	34
1.11 λ 噬菌体铺平板产生噬斑	34
1.11.1 基本方案1 通过连续稀释法分离单个噬斑	34
1.11.2 基本方案2 噬菌体转染和体外包装	35
1.12 培养 λ 衍生的噬菌体载体	36
1.12.1 基本方案 通过平板裂解制备噬菌体库	36
1.12.2 备择方案 制备液体裂解物	37
1.13 从噬菌体裂解液中制备 λ DNA	37
1.13.1 基本方案 通过分级平衡梯度离心制备 DNA	37
1.14 源于丝状噬菌体的载体	39
1.15 M13 噬菌体衍生载体的制备和应用	42
基本方案 利用辅助噬菌体从质粒制备单链 DNA	42
第2章 DNA 的制备和分析	44
2.1A 水溶液中 DNA 的纯化和浓缩	45
2.1A.1 基本方案 DNA 的酚抽提和乙醇沉淀	46
2.1A.2 备择方案1 异丙醇沉淀 DNA	46
2.1A.3 辅助方案1 酚的平衡及酚/氯仿/异戊醇的配制	46
2.1A.4 辅助方案2 丁醇浓缩 DNA	47
2.1A.5 辅助方案3 醚抽提法去除残存酚、氯仿或丁醇	48
2.1A.6 备择方案2 玻璃珠法纯化 DNA	48
2.1A.7 备择方案3 RNA 及 DNA 稀溶液的纯化和浓缩	49
2.1A.8 备择方案4 乙醇沉淀法去除低分子量的寡核苷酸和核苷三磷酸	50
2.1B 阴离子交换色谱法纯化 DNA	50
基本方案	50
2.2 从哺乳动物组织中制备基因组 DNA	52
基本方案	52
2.3 从植物组织中制备基因组 DNA	53
2.3.1 基本方案 氯化铯离心法制备植物 DNA	53
2.3.2 备择方案 用 CTAB 制备植物 DNA	54
2.4 从细菌中制备基因组 DNA	55
2.4.1 基本方案 细菌基因组 DNA 的小量制备	55
2.4.2 备择方案 氯化铯法大规模制备细菌基因组 DNA	56

2.4.3 辅助方案 从所得到的基因组 DNA 制备物中除去多糖	56
2.5A 琼脂糖凝胶电泳	57
2.5A.1 基本方案 大片段 DNA 在琼脂糖凝胶上的分离	57
2.5A.2 辅助方案 微型凝胶及中型凝胶	58
2.5B 脉冲场凝胶电泳	59
2.5B.1 基本方案 倒转电场凝胶电泳	59
2.5B.2 备择方案 钳位均匀电场电泳 (CHEF 电泳)	60
2.5B.3 辅助方案 高分子量 DNA 样品和分子量标准物的制备	61
2.6 从琼脂糖凝胶中分离和纯化大的 DNA 限制性酶切片段	62
2.6.1 基本方案 1 琼脂糖凝胶电洗脱	62
2.6.2 基本方案 2 NA-45 纸电泳	63
2.6.3 基本方案 3 用低熔点琼脂糖凝胶分离 DNA 片段	64
2.6.4 备择方案 1 使用 β -琼脂糖酶消化法从低熔点琼脂糖凝胶中回收 DNA	65
2.6.5 备择方案 2 用玻璃珠法从低熔点琼脂糖凝胶中回收 DNA	65
2.6.6 辅助方案 用溴化乙锭斑点定量法对 DNA 浓度进行快速估测	66
2.7 用常规的凝胶电泳分离小分子 DNA 片段	66
2.7.1 基本方案 1 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳	66
2.7.2 备择方案 通过电洗脱从聚丙烯酰胺凝胶纯化片段	68
2.7.3 基本方案 2 筛分型琼脂糖凝胶电泳	68
2.8 DNA 的毛细管电泳	69
2.8.1 基本方案 1 寡核苷酸的分离	72
2.8.2 基本方案 2 定量 PCR 分析	74
2.8.3 备择方案 基因型分析	74
2.9A Southern 印迹法	75
2.9A.1 基本方案 用高盐缓冲液在尼龙膜或硝酸纤维素膜上进行 Southern 印迹	75
2.9A.2 辅助方案 紫外透射仪的校准	77
2.9A.3 备择方案 1 用碱性缓冲液在尼龙膜上进行 Southern 印迹	78
2.9A.4 备择方案 2 用向下毛细管转移法进行 Southern 杂交	78
2.9A.5 备择方案 3 从聚丙烯酰胺凝胶至尼龙膜的电转印法	79
2.9B DNA 的斑点和狭线印迹	80
2.9B.1 基本方案 用多样抽滤加样器在不带电荷的尼龙膜和硝酸纤维素膜上进行 DNA 斑点和狭线印迹	80
2.9B.2 备择方案 1 用多样抽滤加样器在带正电荷的尼龙膜上进行 DNA 斑点和 狭线印迹	81
2.9B.3 备择方案 2 DNA 斑点印迹的手工制备	82
2.10 DNA 印迹的杂交分析	83
2.10.1 基本方案 放射性标记的 DNA 探针对 DNA 印迹的杂交分析	83
2.10.2 备择方案 用放射性标记的 RNA 探针对 DNA 印迹进行杂交分析	87
2.10.3 辅助方案 从杂交膜上除去探针	89