

武汉大学出版社

马延高 陈蔚梅 译 卢文筠 校

基因融合技术

基因融合技术

马延高 陈蔚梅 译

卢文筠 校



武汉大学出版社

基因融合技术

马廷高 陈蔚梅 译
卢文筠 校

基因融合技术

马廷高 陈蔚梅 译
卢文筠 校

武汉大学出版社出版

(武昌 珞珈山)

新华书店湖北发行所发行

武汉大学印刷厂印刷

*

850×1168毫米 1/32 10.375印张 254千字

1990年6月第1版 1990年6月第1次印刷

印数：1—1000

ISBN 7-307-00749-5/Q·23

定价：2.70元

译 序

分子遗传学是一门年轻而又发展极快的学科，而遗传学实验对于推动分子遗传学的发展及遗传工程的研究，又是一个极为重要的手段。

本书共有 14 个实验，54 个技术方法及 16 则附录。比较详细地介绍了突变体的诱发，分离及特征鉴定。这对于已掌握了由 J. H. Miller 所著分子遗传学实验(即 Experiments in Molecular Genetics 1972)原理和基本操作的大学生、研究生及从事分子生物学、分子遗传学研究的科学工作者进一步了解和掌握基因融合技术，在分子水平上解决遗传学问题，无疑是有极大的参考价值的。为此，我们结合自己的工作，翻译了这本书，献给国内同行。

本书最重要的特点在于理论与实际相结合，把理论阐述与具体实验结合起来，以理论作为实验的指导思想，把实验作为验证理论的手段。使读者有理论和实际知识兼收的效果。

卢文筠教授在百忙中抽出时间审校了全书，在此敬表谢忱。

由于我们水平有限，本书在译校等方面一定存在许多谬误和不足，请予批评指正。

译者 1987.5.

珞珈山

目 录

菌株	(1)
细菌噬菌体	(4)
导论	(11)
实验	(16)
实验 1 以遗传学转座法分离 <i>lacZ</i> 融合体	(16)
实验 2 在质粒上以体外突变或非同源重组法建造 <i>LacZ</i> ⁺ 蛋白质融合体	(27)
实验 3 在高拷贝数质粒上克隆 <i>lacZ</i> 融合体	(38)
实验 4 利用基因融合和DNA杂交技术分析染色体的结构	(44)
实验 5 用重组 DNA 技术构建 λ 转导噬菌体	(50)
实验 6 用 DNA 杂交技术鉴定 λ 转导噬菌体	(54)
实验 7 用遗传学互补法鉴定 λ 转导噬菌体	(58)
实验 8 Tn10 在基因中或其附近的插入突变体的分离	(64)
实验 9 染色体的有目的诱变	(71)
实验10 染色体缺失突变体的分离	(75)
实验11 在 λ 转导噬菌体上分离缺失突变体	(83)
实验12 λ 转导噬菌体的有目的突变	(87)
实验13 构建遗传图谱	(92)
实验14 用基因融合法在体外分离特殊的转导噬菌体以确 定基因的方向	(96)
方法	(101)
方法 1 2-ml 高滴度 λ 裂解液的制备	(101)
方法 2 噬菌体平板贮液的制备	(102)
方法 3 1-liter 裂解液的制备	(104)

方法 4	由平板贮液或小量裂解液中纯化噬菌体的快速方法	(105)
方法 5	λ <i>Int</i> 和 <i>xis</i> 功能的红色空斑试验	(107)
方法 6	λ 溶源菌的筛选	(108)
方法 7	用紫外光诱导 λ 溶源菌	(111)
方法 8	用 Xgal 计数 LacZ ⁺ 噬菌体空斑	(112)
方法 9	原噬菌体缺失突变体中噬菌体基因的检测	(113)
方法 10	P1 <i>vir</i> 裂解液的制备	(115)
方法 11	P1 Tn9cl ^r 100 裂解液的制备	(116)
方法 12	用 P1 <i>vir</i> 作遗传学转导	(117)
方法 13	Mud I (<i>lac</i> , Ap) 裂解液的制备	(118)
方法 14	Mud I (<i>lac</i> , Ap) 的转导作用	(119)
方法 15	Mud I (<i>lac</i> , Ap) 溶源菌转变为 λ 溶源菌	(120)
方法 16	λ CI ⁺ 融合菌向 λ CI ⁺ ts857 溶源菌的转变	(121)
方法 17	Tn10 由 λ NK561 转移到 <i>E. coli</i> 染色体和一种随机 Tn10 库的制备	(123)
方法 18	染色体缺失突变体的分离和随后的 λ 诱导	(124)
方法 19	用 EDTA 平板选择 λ 缺失突变体	(125)
方法 20	λ 中含有一个 <i>Dam</i> 等位基因缺失突变体的分离	(129)
方法 21	亚硝基胍突变	(131)
方法 22	用紫外光突变 λ	(132)
方法 23	噬菌体的羧胺诱变	(134)
方法 24	λ 的 <i>mutD</i> 突变	(135)
方法 25	从细菌细胞中抽提 DNA	(137)
方法 26	λ DNA 的大量分离	(140)
方法 27	λ DNA 的快速分离	(142)
方法 28	质粒 DNA 的大量分离	(143)
方法 29	质粒 DNA 的快速分离法	(146)
方法 30	构建 λ 杂种	(151)
方法 31	构建杂种质粒	(153)

方法32	λ 文库的转导	(154)
方法33	根据CsCl密度筛选杂种噬菌体	(158)
方法34	制备细菌DNA的Sau 3A部分降解物	(160)
方法35	利用辅助噬菌体构建 λ D68杂种的溶源性细菌	(164)
方法36	与 λ DamrIA3共同构建选择的 λ 杂种噬菌体	(165)
方法37	氯化钙处理过的细胞的转化	(167)
方法38	氯化钙处理过的细胞的转染	(168)
方法39	λ DNA的体外包装	(170)
方法40	酚/氯仿抽提DNA样品	(174)
方法41	乙醇沉淀DNA	(176)
方法42	DNA制备的滴透析法	(178)
方法43	DNA的限制性内切酶酶切及凝胶电泳	(179)
方法44	DNA吸印转移	(182)
方法45	DNA-DNA杂交的琼脂糖凝胶的脱水法	(185)
方法46	DNA-DNA杂交	(187)
方法47	噬菌斑杂交	(191)
方法48	DNA的缺口转移	(194)
方法49	用BND-纤维素纯化DNA	(195)
方法50	微型胶过滤柱的准备	(197)
方法51	核酸酶BAL-31酶切	(198)
方法52	SDS蛋白质抽提物的制备	(201)
方法53	蛋白质的电泳	(202)
方法54	特大细胞:质粒基因的表达	(206)
附录		(208)
附录A	培养基和标准溶液	(208)
附录B	<i>Escherichia coli</i> 的表现型和基因型	(213)
附录C	可转移的遗传元件	(216)
附录D	<i>Escherichia coli</i> 的生长和贮存注意事项	(222)
附录E	λ 生长和贮存注意事项	(224)
附录F	λ 的表现型和基因型	(227)

附录G	噬菌体裂解液的滴定	(231)
附录H	自发诱导和从溶解性细菌中释放噬菌体	(233)
附录I	克隆载体质粒A6.102的构建	(236)
附录J	利用重组从一个复制子到另一个复制子的移动突变菌的构建	(245)
附录K	基因融合的遗传学鉴定	(251)
附录L	λ placMu I 的应用	(253)
附录M	乳糖操纵子	(258)
附录N	Omp 调节子	(280)
附录O	麦芽糖调节子	(283)
附录P	阿拉伯糖调节子	(285)
文献		(288)
英汉名词对照和索引		(309)

菌 株

品 系	基因型 ^b
BHB2688	F ⁻ <i>recA</i> λ' (λ <i>Eam4b2 red 3 imm434 cIts</i> Sam 7)
BHB2690	F ⁻ <i>recA</i> λ' (λ <i>Dam15b2 red 3 imm 434 cIts</i> Sam 7)
KLF41	F ⁺ 141/ <i>leu B6 his G1 recA1 arg G6 metB1</i> <i>lacY1 gal-6 xyl-7 mtl-2 malA1</i> <i>rpsL104 tonAtsx supE44</i>
LE30	F ⁻ <i>mutD5 rpsL azi galU95</i>
LE292	HfrH <i>argEam rpoB galT::</i> ($\lambda\Delta$ (<i>int-FII</i>))
LE392	F ⁻ <i>supF supE hsdR galK trpR metB lacY tonA</i>
LE392.23	LE392 Δ (<i>argF-lac</i>)U169
MAL103	F ⁻ Δ (<i>spt-proAB-argF-lac</i>)XIII <i>rpsL</i> (<i>MudI(lac, Ap)</i>)(<i>Mucts62</i>)
MB100	MC4100 <i>ara⁺leu ABCD::Tn10</i>
MB101	MBM7014 ϕ (<i>araBA'-lacZ⁺</i>)101(λ p1(209))
MBM7007	F ⁻ <i>araCam araD</i> Δ (<i>argF-lac</i>)U169 <i>trpam malBam rpsL relA thi</i>
MBM7014	MBM7007 <i>SupF</i>
MBM7060	MBM7014(λ p1048)
MBM7060	(pMLB952)
MC1000	F ⁻ <i>araD 139</i> Δ (<i>araABC-leu</i>)7679 <i>galU</i> <i>galK</i> Δ (<i>lac</i>)X74 <i>rpsL thi</i>
MC1000	(pMLB524)

品 系	基因型 ^b
MC1000	
(pMLb1034)	
MC4100	F ⁻ <i>araD</i> 139Δ(<i>argF</i> - <i>lac</i>)U169 <i>rps</i> L150 <i>relA</i> 1 <i>flb</i> B5301 <i>deo</i> C1 <i>pts</i> F25 <i>rbs</i> R
MC4100	
(pRT516)	
MH225	MC4100Φ(<i>ompC'</i> - <i>lacZ</i> ⁺)10 - 25, (λp1(209))
MH2101	MH225 <i>ompR</i> 101
MH 2472	MH225 <i>ompR</i> 472
MH513	MC4100 <i>ara</i> ⁺ φ(<i>ompF'</i> - <i>lacZ</i> ⁺)16 - 23, [λp1(209)]
MH5101	MH513 <i>ompR</i> 101
MH5473	MH513 <i>envZ</i> 473
MH760	MC4100 <i>ompR</i> 472
MH1160	MC4100 <i>ompR</i> 101
MH1471	MC4100 <i>envZ</i> 473
N3098	<i>lig7ts</i> <i>supF</i>
RT3	MC4100 <i>envZ</i> 3
RT203	MH225 <i>envZ</i> 3
SE3001	MC4100 Δ(<i>malK</i> - <i>lamB</i>)1
SE5000	MC4100 <i>recA</i> 56
SG158	MC4100 φ(<i>malP'</i> - <i>lacZ</i> :: <i>kan</i> 1081.1)1
(pRT516 101)*	(λp1(209) <i>cIts</i> 857)
SG263	MBM7014 <i>malPQ</i> :: <i>Tn</i> 10
SG265	F ⁻ Δ(<i>spt</i> - <i>proAB</i> - <i>argF</i> - <i>lac</i>) X III <i>ara</i> <i>argE</i> <i>am</i> <i>gyrA</i> <i>rpoB</i> <i>thi</i> <i>supP</i> (P1 <i>crx</i>)
SG404	F'141/MC4100 <i>asd</i> (<i>p1cam</i>)
SG480 ^d	MC4100Δ(<i>malPQ</i> - <i>bioH</i> - <i>ompB</i>)61
SG608	MH225(λpRT2.3)

品 系	基因型 ^b
SG624	MH225 <i>envZ</i> 22
SG626	MH225 <i>aroB</i> 菌 菌 菌
SV101	MC4100 <i>malPQ::Tn10</i>
SW101	Δ (<i>araD139</i> Δ (<i>araABC-leu</i>)7679 <i>zab::Tn10</i> Δ (<i>argF-lac</i>)U169 <i>rpsL150 relA1</i> 菌菌菌菌菌 <i>flbB5301 deoC1 ptsF25 rbsR</i>
TK821	MC4100 <i>ompR331::Tn10</i>
TK827	MH513 <i>ompR331::Tn10</i>
594	<i>rpsL</i>
a	所有的品系均是 <i>E. coli</i> K-12
b	融合体
其他菌株	
<i>Enterobacter cloacae</i>	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
<i>proteus mirabilis</i>	
<i>Salmonella typhimurium</i> LT2	
<i>Serratia marcescens</i>	
<i>Shigella</i> SP.	

细菌噬菌体

细菌噬菌体

基因组型

B10	λ imm21cI
B17	λ int6 red3 imm21cI
B500	λ h80 imm21c
G6	λ imm434 cI
G216	λ b2 imm 434 cIts
G244	λ b538 imm 434 cISam7
Y1	λ cIts 857 cI ind
Y2	λ b2 cIts 857
Y47	λ cIts 857 Sam7
Y2223	λ Wam 403 cIts857
W14b	λ v ₂ v ₁ v ₃
W30	λ b2 cI
W248	λ h80 Δ (att-int)g-cI
λ NK561	λ b221 cI::Tn10 Oam29 Pam80
λ p1(209) ^c	
λ placMu1 ^d	
λ pMu507	λ cIts 857 Sam7 MuA ⁺ B ⁺
λ p10-25	$\lambda\phi$ (ompC'-lacZ ⁺)10-25
λ p16-13	$\lambda\phi$ (ompF'-lacZ ⁺)16-13
λ TK10	$\lambda\phi$ (ompR'-lacZ)hyb 1
λ pSG1	λ p1(209) lacY::Tn9
λ D69	λ bam λ 1 ^a Δ (srI λ 1-srI λ 2) imm21 nin5 shn6 ^o

细菌噬菌体	基因型 ^a
λ pRT2	λ D69 <i>bam</i> λ 3::(<i>env</i> Z ⁺) <i>ompR</i> ⁺
λ pSG10	λ D69 <i>bam</i> λ 3::(<i>ompR</i> ⁺)
λ pSG11	λ pSG10 <i>h</i> 80
λ pSG517 ^e	λ pRT 2 Δ (<i>ompR</i>)517 ^e
λ pRT2-80	λ pRT2 <i>h</i> 80
λ pRT2.3	λ pRT2 <i>env</i> Z3
λ pRT2.101	λ pRT2 <i>ompR</i> 101
λ Dams <i>srI</i> λ 3	λ Dam15 <i>b</i> 538 <i>cIts</i> 857 <i>srI</i> λ 1 ⁰ <i>nin</i> 5 <i>srI</i> λ 5 ⁰
λ pRT1 <i>imm</i> 434	λ Dam <i>srI</i> λ 3::(<i>ompR</i> ⁺) <i>imm</i> 434
λ NF1955 ^f	
λ p1048 ^g	λ NF1955 Φ (<i>try</i> T' - <i>lac</i> Y ⁺)1048
λ p1081.1 ^h	
λ ap <i>malB</i> 13 ⁱ	λ malG ⁺ F ⁺ E ⁺ K ⁺ <i>lamB</i> ' <i>h</i> 80 <i>cIts</i> 857 Sam7
<i>hy</i> 2J	λ hPA - 2 <i>imm</i> λ <i>vir</i>
K20 ^k	
<i>MudI</i> (<i>lac</i> ·Ap) <i>l</i>	
<i>p1vir</i>	<i>p1 vir</i>
<i>p1cam</i>	<i>p1</i> ::Tn9 <i>clr</i> 100
ϕ 80 <i>vir</i>	ϕ 80 <i>vir</i>
ϕ 80 <i>pSuIII</i>	ϕ 80 <i>psupF</i> ⁺

a. 除非另有说明, 所有融合转导噬菌体均是 λ p1(209) 的衍生物 (见实验 8 图 7)

b. λ *vir*

c. 见实验 8 图 7

d. 见附录 L 图 28

e. 见实验 13 图 15

f. 见附录I 图24

g. 见实验2和Berman和Jackson(1984)

h. 见实验10, 图43. $\text{Nernst: } 22.5 \text{ mV} \log 10$

i. 见 Marchal 等人 (1978): *Journal of*

1. *hy2*的受体是 *OmpC*

k. K 20 的受体是 *OmpF*.

1. 见实验1 图1

平板1

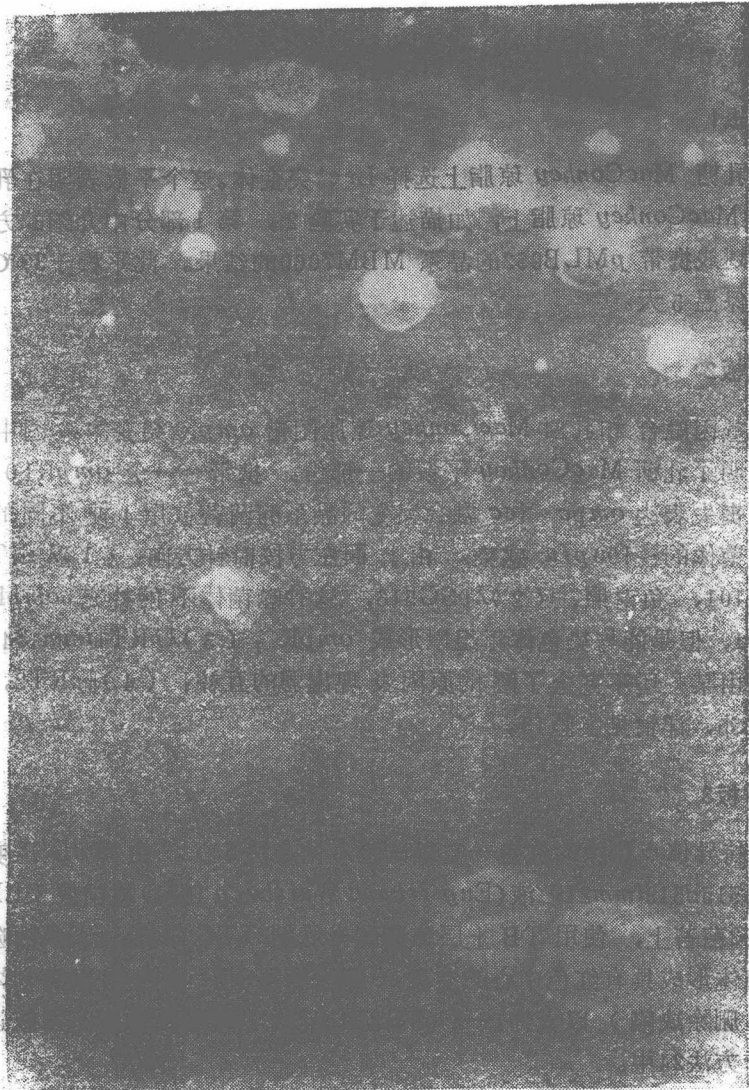
在乳糖 MacConkey 琼脂上选择 Lac⁺ 突变体。这个平板显示在乳糖 MacConkey 琼脂上，如描述于实验 2。第 1 部分中介绍的方法划线携带 pMLB952 的品系 MBM7060 的结果。此平板于 37°C 下保温 5 天。

平板2

用基因融合和乳糖 MacConkey 琼脂图谱 *ompR* 突变体。图中表明了乳糖 MacConkey 平板的一部份。携带有一个 *ompR*101 而丧失表达 *ompc-lac* 融合突变的品系的菌苔被用 4 种不同的噬菌体的 ~100 pfu 感染。由上面左方按顺时针方向：(1) λ pRT 2.101，负对照；(2) λ pSG516，这种噬菌体不能补充 *ompR* 101，但是能与染色体重组以形成 *ompR*；(3) λ pRT1imm434，它由某些还不完全了解的原因表现出弱的互补；(4) λ pRT2，互补，详情见实验 13。

平板3

λ 特异位点删除的红色—空斑试验（见方法 5）。由 *mutD* 诱变 λ b515b519imm21 噬菌体 (Engel and Weisberg 1971) 被铺放于 LE 292 菌苔上，使用 TB 上层琼脂和半乳糖 TTC 平板。大多数噬菌体形成具有红色中心的空斑（删除能手）。白色空斑突变体（删除缺陷）以大约 1—2% 的比率出现。*lacD*—删除方案叙述于方法 24 中。



平板 1



平版