

高级细菌遗传学

——遗传工程手册

GAOJI XIJUN YICHUAN XUE
YICHUANGONGCHENG SHOUC

-33

R.W.Davis D.Botstein J.R.Roth
A MANUAL FOR GENETIC ENGINEERING
Advanced Bacterial Genetics

Cold Spring Harbor Laboratory
Cold Spring Harbor, New York 11724
1980

高级细菌遗传学

——遗传工程手册

(美)R.W.戴维斯
D. 博茨坦 著
J.R. 罗思

陈德凤 王嶽五 译
高才昌 蔡宝立

周与良 审校

责任编辑:李馥华

*

天津科学技术出版社出版

天津市赤峰道124号

天津新华印刷四厂印刷

新华书店天津发行所发行

*

开本 787×1092毫米 1/32 印张 7.125 字数 146,000

一九八四年十二月第一版

一九八四年十二月第一次印刷

印数: 1—67,000

书号: 14212·115 定价: 1.30元

内 容 简 介

本书译自美国冷泉港实验室戴维斯等所著 Advanced Bacterial Genetics—A Manual for Genetic Engineering一书，它着重介绍了重组DNA技术的有关实验之原理、方法和步骤，并在书末附有实验所需的各种参考资料，是一本在遗传工程研究中很有实用价值的参考书，也可作为大学高年级学生和研究生的教材，还可供从事分子生物学、生物工程学、微生物学、遗传学、生物化学等有关学科的研究人员和大专院校的师生以及工、农、医等学科的有关研究和教学人员参考。

审译者的话

我们翻译这本《高级细菌遗传学——遗传工程手册》的目的，是想把基因重组这一新技术及时地介绍给我国科技工作者，使大家很快地掌握这一新技术，尤其是使一些边远地区和从事工、农、医等学科的有关人员也能及时地了解并利用它，以使这一新技术能在我国广泛应用。

鉴于当前生物工程学是一门多学科的在我国优先发展的技术学科，而基因工程又是生物工程学的核心，所以我们译这本手册也是为了促进这一新领域的发展。此外，这本手册的实验方法简单易懂，易于掌握，只要按照实验方法进行操作，便可取得预定的结果。1980年我访问美国时，这本手册还未正式出版，许多分子生物学研究室的研究人员都公认这是一本比较好的实验手册。

中译本中的序号基本上按照原著编排，每个实验的讨论部分的序号，都与它所讨论的实验步骤的序号对应。为了便于阅读，译者在个别地方加了小标题；原著中的菌株目录，我们把它作为附录十二，编排在本书的第三部分。此外，对原书中的某些笔误也做了修正。

最后，中译本一定有错误和不妥之处，敬请读者批评指正。

周 与 良

1983年10月

目 录

前言.....	(1)
绪论.....	(3)

第一部分 实 验

实验一 插入Tn10的营养缺陷型的分离.....	(8)
实验二 特殊基因附近Tn10插入突变体的分离	(15)
实验三 Tn10引起的缺失突变	(21)
实验四 局部诱变.....	(26)
实验五 通过羟胺形成的 λ 噬菌体点突变体的分 离和鉴定.....	(31)
实验六 λ amp ^r 缺失突变体的分离	(34)
实验七 缺失定位.....	(36)
实验八 通过互补作用选择 λ gt ⁻ his克隆	(39)
实验九 噬菌斑杂交	(44)
实验十 凝胶杂交	(48)
实验十一 DNA的电子显微镜观察	(50)
实验十二 从 λ 载体到质粒载体的次级克隆	(52)
实验十三 Tn10介导的F' ['] ts lac ⁺ 插入.....	(54)

第二部分 实 验 方 法

实验方法一 噬菌体的噬菌斑纯化.....	(57)
----------------------	------

一、寄主细胞	(57)
二、噬菌体划线分离	(57)
三、挑选噬菌斑	(58)
四、噬菌体的滴度测定	(58)
实验方法二 噬菌体原液的制备	(61)
一、寄主细胞	(61)
二、铺平板的步骤	(61)
三、平板收集	(61)
实验方法三 制备 P22转导噬菌体的快速方法	(64)
实验方法四 噬菌体的纯化	(66)
一、CsCl区域密度梯度离心	(66)
二、平衡梯度离心	(67)
实验方法五 Tn10 转位	(69)
一、从NK337菌株产生缺陷性转导噬菌体	(69)
二、加噬菌体尾部到P22头部	(70)
三、转位转导	(71)
实验方法六 由携带Tn10的菌株选择Tet ^s 突变体	(74)
实验方法七 红色平板用于试验具有 β -内酰胺酶功能基 因的 λ 噬菌体	(76)
实验方法八 羟胺诱变	(78)
一、噬菌体或克隆基因（如 β -内酰胺酶基因）中突变体的 分离	(78)
二、通过并发转导进行局部诱变	(79)
实验方法九 λ 缺失突变体的选择	(82)
实验方法十 噬菌体的重组和体内互补试验	(85)
一、标准杂交	(85)
二、噬菌体生长的互补试验	(85)

三、突变噬菌体 (λ 或P22) 互补作用的点滴试验	(86)
实验方法十一 λ 噬菌体DNA的提取	(90)
一、甲酰胺法	(90)
二、 λ DNA的快速分离	(92)
三、用可被温度诱导的 <i>S</i> am 7 溶源菌制备 λ DNA	(95)
四、 λ DNA的解链	(96)
实验方法十二 质粒DNA和细菌DNA的分离	(98)
一、大量 <i>E. coli</i> 质粒DNA的分离	(98)
二、少量质粒DNA和细菌DNA的分离	(101)
(一) 从菌落或液体培养物中快速分离 质粒 DNA 和 (或) 细菌DNA	(101)
(二) 从10毫升培养物中快速分离质粒DNA	(103)
实验方法十三 从DNA氯化铯溶液中除去溴化乙锭	(105)
实验方法十四 λ gt杂种的组建	(107)
一、DNA切割	(107)
二、以T4DNA连接酶进行共价连接	(107)
实验方法十五 体外包装 λ DNA为病毒颗粒	(110)
一、包装反应	(110)
二、诱导过的包装细胞的制备	(110)
实验方法十六 λ DNA的转染	(113)
一、细胞培养	(113)
二、细胞制备	(113)
三、DNA感染	(113)
四、细胞保藏	(114)
实验方法十七 将DNA片段次级克隆到 <i>E. coli</i> 质粒载体中	(116)
实验方法十八 质粒DNA的转化	(118)

实验方法十九	<i>E. coli</i> 中杂种噬菌体的互补作用	(120)
一、由杂种库进行裂解选择		(120)
二、杂种库中双溶源菌的选择		(121)
实验方法二十	琼脂糖凝胶电泳	(125)
一、琼脂糖凝胶		(125)
二、琼脂糖凝胶中DNA的染色		(129)
三、含有核酸的凝胶的照相		(130)
四、乙二醛凝胶		(131)
实验方法二十一	DNA转移到硝酸纤维素或重氮 滤膜上	(134)
一、从琼脂糖凝胶上转移		(134)
二、从 λ 噬菌体的噬菌斑上转移		(135)
三、从细菌菌落上转移		(139)
实验方法二十二	缺口转译 α - ^{32}P 标记DNA	(141)
一、反应		(141)
二、脱氧核苷三磷酸 (dNTP)		(142)
三、脱氧核糖核酸酶		(142)
四、 ^{32}P 参入DNA的检测		(142)
五、标记DNA的回收		(143)
六、附注		(144)
实验方法二十三	与固体支持物上的DNA或RNA 的杂交	(145)
实验方法二十四	固体支持物上 ^{32}P 的放射自显影	(149)
实验方法二十五	从琼脂糖凝胶中回收DNA	(150)
一、玻璃纤维过滤法		(150)
二、KI平衡密度梯度离心法		(152)
三、将DNA电泳洗脱至羟基磷灰石中		(152)
实验方法二十六	用溴化乙锭快速测定DNA	

的浓度	(154)
一、琼脂糖平板法	(154)
二、塑料膜-环法	(154)
实验方法二十七 DNA的电子显微镜观察	(156)
一、水样法	(156)
二、甲酰胺法	(157)
实验方法二十八 形成异源双链的一般方法	(159)
一、异源双链的形成	(159)
二、异源双链的电镜观察	(159)
实验方法二十九 由 λ _C I 857 Sam 7 溶源菌制备不同组 分的酶	(161)
一、一般程序	(161)
二、从 <i>E. coli</i> 594裂解液中纯化DNA聚合酶I	(162)
三、从 <i>E. coli</i> 1150裂解液中纯化T ₄ DNA连接酶	(164)

第三部分 附 录

附录一 培养基、药物浓度和补充营养物	(166)
一、培养基	(166)
二、药物浓度	(171)
三、补充营养物	(174)
附录二 营养缺陷型的鉴别(生长谱测定)	(175)
附录三 细菌、噬菌体和DNA的保藏	(177)
一、细菌和噬菌体的保藏方法	(177)
二、细菌和噬菌体保藏的操作步骤	(177)
三、DNA的保存	(178)
附录四 缓冲液和溶液浓度	(181)
一、缓冲液	(181)

二、溶液浓度	(183)
附录五 透析袋的制备	(185)
附录六 度量衡	(186)
一、微升体积的测量	(186)
二、DNA的解链温度 (T_m)	(187)
三、离心澄清时间	(188)
四、单位	(189)
附录七 限制性核酸内切酶的切割	(190)
一、方法	(190)
二、限制性核酸内切酶的性质	(190)
附录八 λ 载体的容量	(194)
附录九 限制性图谱	(195)
一、 λ 图谱和 λ 载体	(195)
二、pBR322图谱	(206)
附录十 组氨酸缺失图	(208)
附录十一 栅格式样	(209)
附录十二 菌株目录	(211)

前 言

最近五年，分子遗传学的实验方法已经有了革命性的变化。这一变化有两个主要方面，即基因分离和操作方法——通称为重组DNA技术的发展和可转位的抗药因子（转位子）的发现和利用。这本手册的目的在于：以某种容易为那些熟悉细菌遗传学基本原理的分子生物学家所能接受的方式，阐述上述两个方面的新技术所包含的各个实验。在某种意义上，本书是J. H. Miller几年前所编的分子遗传学实验一书的续篇。本书所采用的基本操作都是公认的。凡较早出版的手册中的一些实验，本书不予重复。

一些科学家希望在自己的研究工作中应用现代遗传学方法（特别是分子克隆方法），但是却又面临着许多问题。主要是需要有丰富的细菌学和噬菌体遗传学的基本知识和技术。我们希望这本实验手册（也可作为大学课程的教材）能够满足上述的需要。

本书的基本结构可扩充为用于三周的细菌遗传学高级课程。此课程最近四年来我们一直在冷泉港实验室讲授。我们可以设想本书用在别处的几个方面：首先，从对这本非正式出版书的大量需求情况来看，我们希望本书作为实验方案的汇集，能用在研究实验室中；其次，它将适用于研究生高级实验课程的教学。我们认为这样的研究生课程，可以从分子遗传学一书和本书中各选出一些实验来组成。

本书一个突出的特点是鼠伤寒沙门氏菌的使用。此特点部分地反映了作者的兴趣和专长，也表明了它在教学上有很大的优点。沙门氏菌和大肠杆菌的遗传学原理是相同的。还有，包括某些转位子（尤其那些基于转导的转位子）的一些重要操作，在沙门氏菌中比较容易和快速进行。更重要的是大肠杆菌中沙门氏菌基因的克隆，对于所有种类的分子克隆来说是一个合适的模型：可期待各基因发挥功能（如同某些酵母基因所做的那样），但同源现象受到充分的限制，因此克隆基因和寄主之间的重组是不成问题的。而且，这些实验能精确地阐明大肠杆菌中关于某一克隆基因的体外遗传操作与机体中的该基因在体内的结构和功能的遗传分析之间的关系。对我们来说，研究那些其自身在遗传上可控制的有机体的优点，甚至可能通过重组DNA方法的发展而扩充了。

R.W.Davis

D.Botstein

J.R.Roth

〔陈德风 译〕

绪 论

结构和内容

本书分成三个部分：实验、实验方法和附录。它以普通的术语描述了十三个相关实验的设计、理论和使其达到精确结果的方法，实验方法中提供了详细的步骤，其中某些步骤也可能包含在每一实验中；附录中所收集的图表，还包括了实验和实验方法中有关的资料。在实验和实验方法部分，还包括了讨论的内容，提供了有关理论和解释，并对某些需要进一步实验和核对的问题提出建议。

各个实验，一般来说是为了便于阐明以及根据彼此的依赖关系来设计的。例如，实验七构成的遗传缺失图与实验十中的物理图谱有共同关系的。后者系利用实验八、九、十中所得到的材料做的实验。这些实验的安排，可不必以某种规定顺序来进行；在冷泉港实验室所开的三周课程中，基本上是同时进行的。

各实验方法力求适用于相应的实验，但它们也可单独进行。某些特殊方法可用于许多完全不同的目的，而各实验方法尽可能地写成每部分是独立的。本书的编排方式是根据便于使用来设计的，即：操作步骤与理论部分分开。后者放在讨论部分。我们希望这些实验方法在研究实验室中将是有益的。

本书还列有菌株目录，作为各实验的参考。在某些情形

中（如克隆到 λ 载体中），列出许多选择，需要时只选一种即可。成套的噬菌体和细菌菌株盒可资利用，并可从冷泉港实验室购得。

安全准则

本书中许多实验是用鼠伤寒沙门氏菌做的。在实验室经过多年的培养后，鼠伤寒沙门氏菌LT2（本书所用的所有菌株都来自于该菌株）对于人体来说不再是致病菌，尽管它是从那些确实可以引起腹泻的菌株传代而来的。鼠伤寒沙门氏菌LT2在实验室中经过多年的使用，已不存在对人体感染的情况，虽然报道过人体的某些感染是由类似菌株（如LT7或1559）引起的。LT2菌株对小鼠的感染力也被减弱了，然而足够的剂量仍能致小鼠以死命。

因此，所有的实验应当谨慎地按照细菌学常规来进行。培养物以及与培养物接触过的玻璃器皿在洗涤前应当消毒，而废物（培养皿）应在处理前消毒或者烧毁。应当避免用嘴吸移液管。

本书中的一些实验包括重组DNA实验。这些实验是国立健康研究所重组DNA研究准则所允许的，尽管鼠伤寒沙门氏菌和大肠杆菌通常形成染色体重组体。然而，我们用重组体做实验时，应如同用沙门氏菌那样谨慎。

本书的一些实验若采用沙门氏菌以外的细菌DNA时，应在国立健康研究所的重组DNA研究准则指导下进行。故从事这些实验前，参考一下该准则是必要的。由于用来作为重组体DNA寄主的所有菌株均是*E. coli*K12的衍生菌，故实际上所有这些实验最多只需要P1级的物理防护。

菌株和突变命名法

对大肠杆菌和沙门氏菌的各遗传物质使用统一的命名系统。该系统最初系Demerec等(1966)所描述。为了适用于插入因子,该命名系统已加进了一些新的惯例。Campbell等(1976)和Chumley等(1979)描述了这些修改部分。各种突变类型和它们的名称以及图谱位置的摘要,可在Bachman和Low(1980)有关大肠杆菌以及Sanderson和Hartman(1978)有关鼠伤寒沙门氏菌的文献中找到。

基本系统:每一菌株不管其所携带的突变数目,均指定一原号,它与该菌的分离情况有关系。实际上,菌株号码通常由两个大写字母(指明实验室)以及收集此菌株的实验室的菌株编号所组成。例如,菌株TR248携带*hisC*527和*cysA*1349突变,由John Roth所收集。新收集的菌株应当用两个过去未曾用过的字母来定名。

每一突变体位点以三个字母来定名(少数情况用斜体字),一般根据它的表型或分离方法来选择(例如,影响组氨酸生物合成的突变被定备为*his*)。在这个突变位点的单个基因或影响该突变过程的基因,是在三个字母之后用一个斜体的大写字母来区别(例如,*hisC*基因编码组氨酸生物合成中的一种转氨酶)。

个别突变顺次地指定号码。一个单独的系列被用于每个三字母位点名称(例如,*hisC*527是指一特殊的*his*突变,它影响*hisC*基因,其它的*his*突变,不用号码527来表示)。

经常地查阅某一菌株的表型并与基因型相区别是必要的。缩写的表型名称并不是斜体字,而是以大写字母开头的(例如,菌株TR251[*hisC*527 *cysA*1349 *supD*]是一株Cys⁺ His⁺菌[表型],因为*supD*抑制基因突变改正了*cysA*

和 $hisC$ 突变的营养缺陷型)。

转位因子的利用已有必要增加规则。插入突变以三字母名称表示, 基因名称和等位基因号码已如上述。此外, 它们还应加上描述插入物的名称。即在基因名称和等位基因号码后面标以双冒号。接着为插入物名称(例如, $hisC8691::Tn10$ 表明在 $hisC$ 基因中插入了可转位的药物抗性因子 $Tn10$, 其突变命名为 his , 等位基因号码是8691)。在转位因子的命名中, 两个大写字母表明因子的类型。IS只包括简单的插入顺序, 而不包括那些与转位有关的基因。 Tn 是指更复杂的包括附加基因(如药物抗性等)的转位子。

许多 $Tn10$ 插入片段已被分离出来, 但不知它影响哪个特殊基因的突变。它们大多数是作为靠近重要基因附近的插入片段而被分离的(见实验2)。Hong和Ames (1971)的建议已作了修改, 以便当插入物不在特殊基因内时, 按照物理图谱位置来命名 $Tn10$ 插入片段。所有这样的插入片段都以 z 开头的三字母符号来定名。第二和第三个字母指明物理图分针中的近似位置。第二个字母表明按顺时针方向由零分到每10分的物理图片段($a = 0 - 10$, $b = 10 - 20$, $c = 20 - 30$ 等)。第三个字母同样表明在任一10分片段中的分数。例如, 一个位于 $hisW$ 附近的 $Tn10$ 插入片段, 在47和48分之间, 被命名为 $zeh-754::Tn10$; 一个位于44分处靠近 his 基因的 $Tn10$ 插入片段被命名为 $zee-2::Tn10$ 。等位基因号码按顺序排列到上述插入片段, 而不管其在第二和第三个位置中的字母。这样, 如果有更精确的作图数据, 就能使得一新的三字母符号更加合适, 使插入突变保持数字上的一致性。这个规则用 $zaa-zjj$ 来表示。我们已经以 zz 命名在染色体外各因子上的

插入突变，再用一个字母表示插入突变的位置。名称 zzf 表示在 F' 质粒上的插入突变。

[陈德风 译]