

Molecular Cloning
A Laboratory Manual

〔美〕T.马尼阿蒂斯 E.F.弗里奇 J.萨姆布鲁克

沈桂芳 毛江森主译



分子克隆实验手册

浙江科学技术出版社

内 容 简 介

本书译自 T. 马尼阿蒂斯等所著, 国际著名的分子生物学中心——美国冷泉港实验室 1983 年 9 月第七次印刷发行的“Molecular Cloning—A Laboratory Manual”一书。全书系统地介绍了分子克隆技术的基本原理、操作方法、步骤及注意事项, 同时对各项技术作了详细论述和比较, 并提示说明有关技术难点。全书共十二章, 另加常用生化技术和常用细菌菌株等三部分附录, 内容全面, 方法可靠, 是基因工程技术权威性的工具书, 为分子生物学工作者所必备。

本书可供分子生物学、生化、遗传、微生物、医药、环保、化学、育种、食品等工业的科研人员、教师、研究生、本科生使用。对希望掌握基因工程有关知识和技术的初学者也是一本很好的教本。

T. Maniatis E. F. Fritsch

J. Sambrook

MOLECULAR CLONING A LABORATORY MANUAL

Cold Spring Harbor Laboratory 1982

分子克隆实验手册

T. 马尼阿蒂斯

[美] E. F. 弗里奇 著

J. 萨姆布鲁克

沈桂芳 毛江森 主译

*

浙江科学技术出版社出版

浙江新华印刷厂印刷

浙江省新华书店发行

开本: 787×1092 1/16 印张: 19 字数: 464,000

1987 年 12 月 第 一 版

1987 年 12 月 第 一 次 印 刷

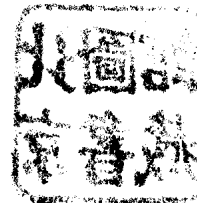
印数: 1—2,120

统一书号: 15221·140

定 价: 4.50 元

责任编辑: 李平凡

封面设计: 潘孝忠

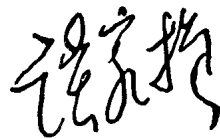


谈 序

当前在我国,生物工程特别是基因工程正为愈来愈多的人所重视,一大批来自农业、工业、医疗卫生以及高等院校科研单位的工作者正从事或即将从事这一具有划时代重要性的工作。

基因工程的核心是 DNA 重组,是分子生物学领域最新技术发展的应用。从分子水平研究基因是技术方法上的革命,也就是说, DNA 重组是一项技术性十分强的工作。因此,技术方法上的先进性和标准化具有莫大的重要性。

这本“分子克隆实验手册”是当今国际上讲述 DNA 重组技术最好的一本实验手册。它出自国际著名的分子生物学中心——美国冷泉港实验室。该书因内容全面,实用性强而深受国际同行的好评。现在浙江的同行们将这本手册译成中文出版,将有助于基因工程技术在我国的普及和推广。在此,我寄希望于广大的热心读者,一方面吸收消化国外基因工程技术,另一方面也要勇于探索,为发展我国的生物工程,造福于人民而努力奋斗。



1985年8月20日

施 序

DNA 分子克隆与单克隆抗体制备被誉为现代生物学两大划时代的技术。它们使过去许多无法探讨的生物学问题得以被顺利地研究。DNA 分子克隆技术与单克隆抗体技术一样也是综合性的技术,涉及到许多基础理论和多种技术知识。过去这些知识散见在各种专业杂志上。现今这方面虽已有一些综述性的手册,但对企图应用这一技术的生物学工作者来说有的不够全面,有的不够具体。T. Maniatis 等所著的这本《分子克隆实验手册》既全面又具体,是其中的佼佼者,是国际上读者最为广泛的一本。可是在我国能获得这本手册原著的人不多,且广大的生物学工作者中尚有不少同志阅读英文文献有一定的困难。翻译这本手册是必要的,浙江同志们在百忙中挤出时间在短期内将它译出以供国内同志参考应用,体现了他们对我国四化的献身精神。相信这译本必将对我国从事这方面工作的同志以很大的帮助。

施履吉

1985年8月13日

译 者 的 话

《分子克隆实验手册》是一本全面介绍 DNA 重组技术原理及方法的工具书。它是作者根据世界著名的分子生物学研究中心——美国冷泉港实验室多次技术讲座的资料编写而成的。本书广泛收集已经验证过的基因工程的最新技术方法，是一本迄今最全面的 DNA 重组技术的实验手册。

全书共十二章外加三部分附录，系统阐述了 DNA 重组及其相关技术的实验方法。当叙述一种技术方法时，对其技术原理、详细的操作步骤、注意事项及有关背景材料作了全面介绍。该书内容全面，实用性强，所介绍的方法可靠，深受各国分子生物学家的欢迎与好评，被认为是分子生物学工作者的必备用书。自 1982 年初版以来，仅一年多时间，已七次再版印刷，对于基因工程近年来在美国的迅速普及起了重要的促进作用。

当前，我国对基因工程及整个分子生物学的研究十分重视，愈来愈多的学者在不同的领域正在或即将从事这一工作。我们翻译本书的目的，就是为尽可能多的有志于这一工作的人们提供一本方法学上的实验指南，以加速这一十分重要的科学技术在我国的推广普及。

虽然该译本是根据本书 1983 年第七次印刷版翻译的，但是，由于分子生物学发展迅猛，技术日新月异，因此，不能认为书中所列的方法都是完美无缺的，正如谈老在序中所指出的一样。希望我国广大的读者在吸收消化本书的同时，注意方法的不断演进并且勇于探索。

这一译本是集体翻译的，参加翻译的有沈桂芳、毛江森、王进、孙范五、郑友常、毛子旭、杨能宇诸同志。沈桂芳、毛江森、王进对全书译文作了审校。最后由施履吉先生审定。另外，费承伟同志亦为本译本做了许多具体工作。

由于有关 DNA 重组的许多实验方法是近年来发展的新技术，对我们来说经验不多，加上文字水平有限，错误之处尚待读者批评指正。

译 者

1985 年 8 月 30 日 杭州

前 言

本手册的编写是从收集 1980 年冷泉港真核生物基因分子克隆课程中所用的实验方法开始的。这些实验操作方法都是我们实验室所采用过的,不过当时都分散在许多人的笔记本上。因冷泉港课程教学及最后出版的需要,1981年我们决定出一本更加完整,能反映最新科技成就的手册。为此,在所用的各种不同方法中,我们编集了一本“通用的方法指导书”。在 1981 年课程进行中,它已被广为复制和流传于各实验室。尔后,在 1981 年至 1982 年冬,本手册又经一次重写,添加了新的或修改了的操作方法和图表以及新的章节。

为适应新需求,新方法总是在不断地发明,已有的方法也在不断地改进中,就是在本手册最后重写后,该领域中又有了新的进展。虽然在本手册中收集的方法都经过严格验证,在我们实验室中证明是成功的方法,但我们并不认为它是完善无缺或不能改变的。我们欢迎对本手册中所述方法提出改进的任何建议。新的操作方法如蒙告知,也将不胜感激。

操作方法的演进牵涉到一个由谁作出贡献的难题。本手册对所引操作方法的最先发明者,在适当的章节中给予表彰性的注明。但在许多情况下,要毫无争议地去追踪一个方法的作者是谁是难以做到的。因此,对无法注明某一创见、操作方法或某种配方的同事们表示歉意和致谢。我们主要是起了方法的编集、验证和澄清的作用,很少对其进行修正,只有极个别的方法是我们自己新设计的。因此,这本手册的极大部分是基于别人的方法,功劳应归于这些同事们。

本手册原是为分子克隆的初学者作为指导书而编写的,因此包含许多基础资料。而在本版中,对于目前分子克隆的几乎每一个实验方法,均作了详细的叙述。我们希望本手册对于分子克隆的新、老工作者均将有所裨益。

从字面上看,分子克隆似乎很简单,但实际做起来却要困难得多。大多数的实验方法都有许多实验步骤,只要其中一步出了毛病,就会陷入困境。因此,有必要对每一步的产品加以验证和设立对照,以检验每一步反应的效率。为了解决这些问题,对每一操作步骤的原理应有深刻的理解,这是十分必要的。为此,在本手册中我们指出一些背景资料和文献,以供参阅。

没有我们实验室的同事们的帮助和建议以及其他许多实验室的贡献,本书是不可能写成的。因此,我们要感谢 Joan Brooks, John Fiddes, Mary-Jane Gething, Tom Gingeras, David Goldberg, Steve Hughes, David Ish-Horowitz, Mike Mathews, Patty Reichel, Joe Sorae, Jim Stringer, Richard Treisman 和 Nigel Whittle。我们还要特别感谢 Arg Efstratiadis 对第七章的审阅;感谢 Brian Seed 允许引用他尚未公开发表的重组方法(第十章)和其他许多好建议;感谢 Doug Hanahan 对转化的意见(第 8 章);感谢 Bryan Roberts 对杂种筛选法和 cDNA 克隆的建议;感谢 Doug Melton 提供注入 *Xenopus* oocytes 的操作法;Ronni Greene 对改进许多具体操作的建议;Nina Irwin 提供了真核蛋白在细菌中表达的标准方法汇编(第 12 章);Rich Roberts 供给 pBR322 顺序的电脑分析;Barbara Bachman 和 Ahmad Bukhari 检查和订正了大肠杆菌菌株的编目;感谢 Tom Broker, Louise Chow, Jeff Engler 和 Jim Garrels 为封面、封底所拍的优美照片。

我们也要感谢 1980 和 1981 年参加冷泉港分子克隆课程的同学,他们是些优秀的大学

生,他们为本手册的第一、二稿作出了努力并提出许多很好的建议。同样感谢 Nancy Hopkins 帮助我们第一年的教课,劝说我们编写这样一本手册。1981年 Doug Engel 帮助教过这门课程并对此手册提出许多改进意见。两届课程的成功也是与 Catherine O'Connell 和 Helen Doris Keller(1980年夏) Susan Vande-Woude, Paul Bates, 和 Michael Weiss(1981年)等教学助理员的贡献与努力分不开的。

我们还要感谢 Patti Barkley 和 Marilyn Goodwin 为历次修改的手稿打字所表现的热情和耐心,艺术家 Fran Cefalu 和 Mike Oekler 以极大的努力和坚韧创作了本手册的图表, John Ebert 注意了本课程中许多文献的增删并编纂了参考文献目录。我们同样感谢冷泉港实验室出版经理 Nancy Ford 对我们的鼓励和支持。最后,如果没有 Doug Owen 为本手册准备付印稿所表现的耐心、熟练以及交际本领和其他许多方面的帮助,这本手册的出版也是不可能的。

T. 马尼阿蒂斯

E. E. 弗里奇

J. 萨姆布鲁克

目 录

谈序	1
施序	2
译者的话	3
前言	4
第一章 载体—宿主系统	1
质粒	1
用质粒进行的克隆	8
λ 噬菌体	11
裂解性生长周期	14
溶源性	15
λ 噬菌体载体的构建	16
合适载体的选择	17
λ 噬菌体载体的图谱	18
柯斯质粒	36
单链噬菌体	40
小结	42
第二章 细菌菌株和病毒的增殖与保存	44
菌株的鉴定	44
单菌落的分离	44
细菌菌株的生长、保持和保藏	46
λ 噬菌体噬斑的纯化	46
从单噬斑制备 λ 噬菌体纯种	47
培养基和抗生素	49
液体培养基	49
含琼脂或琼脂糖的培养基	50
抗生素	51
第三章 λ 噬菌体和质粒 DNA 的分离	53
λ 噬菌体的大量制备	53
感染	53
诱导 (Pirrota et al., 1971)	54
λ 噬菌体的纯化 (Yamamoto et al., 1970)	55
λ 噬菌体 DNA 的抽提	58
质粒 DNA 的大量分离	58
细菌的生长和质粒的扩增	59
细菌的收集和裂解	59

用氯化铯—溴化乙锭等密度平衡离心和提纯闭环 DNA	61
质粒 DNA 制剂中 RNA 的去除	62
第四章 用于分子克隆的酶	64
限制性内切酶	64
同切口限制性内切酶.....	64
甲基化作用.....	67
用限制性核酸内切酶酶切 DNA	68
用于分子克隆的其他酶类	69
大肠杆菌 DNA 聚合酶 I	70
大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片段	73
T4 DNA 聚合酶	75
用 T4 多核苷酸激酶标记 DNA5' 末端	78
依赖于 RNA 的 DNA 聚合酶	82
DNA 的去磷酸化	84
核酸酶 <i>Bal31</i>	85
SI 核酸酶	88
绿豆核酸酶(绿豆种子).....	88
核糖核酸酶.....	88
脱氧核糖核酸酶 I(DNase I)	89
核酸外切酶 VII.....	89
核酸外切酶 III	90
λ 核酸外切酶	91
Poly(A) 聚合酶.....	91
T4 DNA 连接酶	92
T4 RNA 连接酶	92
EcoRI 甲基化酶.....	93
脱氧核糖核苷末端转移酶(末端转移酶).....	93
第五章 凝胶电泳	95
琼脂糖凝胶电泳	95
凝胶电泳槽.....	96
缓冲液.....	98
琼脂糖凝胶的制备.....	98
琼脂糖凝胶中 DNA 的染色	100
照相	102
微型凝胶电泳	102
琼脂糖凝胶中 DNA 的回收	102
碱性琼脂糖凝胶	105
聚丙烯酰胺凝胶电泳	106
聚丙烯酰胺凝胶的制备	107
聚丙烯酰胺凝胶中 DNA 片段的分离(Maxam and Gilbert 1977).....	109

链分离凝胶	109
聚丙烯酰胺凝胶中的链分离	110
琼脂糖凝胶中 DNA 的链分离	111
用变性聚丙烯酰胺凝胶电泳进行短双链 DNA 的链分离	111
第六章 真核细胞中 mRNA 的抽提、纯化与分析	114
哺乳动物细胞中 mRNA 的分离	115
细胞总 RNA 的分离	117
Poly(A) ⁺ RNA 的筛选	118
RNA 凝胶电泳	119
RNA 的核酸酶-S ₁ 酶切制图法	123
第七章 cDNA 的合成与克隆	125
cDNA 的合成	125
cDNA 第一链的合成	125
cDNA 第二链的合成	127
发夹环的核酸酶 S ₁ 切割	127
双链 cDNA 的分子克隆	127
同聚尾接法	128
DNA 接头的合成	129
cDNA 克隆的其他方法	130
cDNA 克隆的策略	132
高丰度 mRNAs	132
低丰度 mRNAs	132
cDNA 的克隆程序	135
双链 cDNA 的合成	135
用核酸酶 S ₁ 的酶切	138
双链 cDNA 的克隆	140
载体和双链 cDNA 的退火	142
双链 cDNA 克隆的顺序添加接头法	142
第八章 质粒和 λ 噬菌体 DNA 引入大肠杆菌	145
质粒 DNA 在大肠杆菌中的转化	145
用氯化钙转化的程序	145
用氯化钙/氯化物转化的程序	146
大肠杆菌 <i>α</i> L7763 的转化	147
λ 噬菌体 DNA 的体外包装	148
λ 噬菌体溶源菌的保存和检测	149
包装提取物的制备方法 I	150
体外包装方法 I	151
包装抽提物的制备方法 II	152
体外包装方法 II	154
第九章 基因库的构建	155

用 λ 噬菌体作载体构建基因库	155
载体 DNA 的制备	157
用组织培养细胞分离高分子量的真核 DNA (Blim and Stafford 1976)	160
真核 DNA 20 kb 片段的制备	161
连接和包装	163
基因库的扩增	167
用柯斯载体构建基因库	167
用经磷酸酶处理的柯斯载体进行的克隆	168
用两种限制酶酶切和磷酸酶处理的柯斯载体进行的克隆	170
柯斯质粒基因库的扩增、保存及筛选	173
第十章 重组克隆系的鉴定	176
细菌菌落和噬菌体的原位杂交	176
少量细菌菌落的筛选	177
菌落在硝酸纤维素滤膜上的影印	173
杂交筛选 λ 噬菌斑 (Benton and Davis 1977)	180
λ 噬菌斑原位扩增后的杂交筛选	181
固定于滤膜的 DNA 或 RNA 与放射性探针杂交	182
印染在硝酸纤维素滤膜上的噬菌斑或菌落杂交	183
用杂交筛选鉴定 cDNA 克隆株	184
利用固定于硝酸纤维素滤膜上的 DNA 进行杂交选择	185
杂交选择的 RNA 在网质红细胞裂解物中的翻译	190
注入蛙卵母细胞内 mRNA 的翻译	193
通过大肠杆菌细胞内重组筛选 λ 噬菌体基因库中特定的 DNA 序列	195
重组选择的原理	195
用于 π VX 质粒筛选的菌株	197
π VX 的制备	198
W3110r ⁻ m ⁺ (P3)的转化	198
将 λ 噬菌体基因库涂布于 W3110r ⁻ m ⁺ (P3) (π VX) 菌	198
含有抑制基因噬菌体的遗传学检测法	198
π VX 系统的检测	198
π VX 系统的应用	200
第十一章 重组 DNA 克隆系的分析	202
质粒 DNA 及 λ 噬菌体 DNA 的快速分离	202
质粒 DNA 的少量快速分离	202
λ 噬菌体 DNA 的少量快速分离	204
限制性核酸内切酶切点图谱的制作	205
用单酶切或多酶切作图	206
顺序式酶切	206
部分酶切	207
索氏吸印 (Southern) 转移	209

DNA 从琼脂糖凝胶向硝酸纤维素滤膜的转移	209
索氏滤膜的杂交	211
小片段 DNA 在质粒载体中的次级克隆	212
具粘性末端的 DNA 片段的次级克隆	213
在次级克隆中使用合成的 DNA 接头	213
通过平头末端 DNA 片段连接产生限制酶切点	216
克隆步骤的快速连续法	217
第十二章 大肠杆菌中表达克隆化 DNA 的载体	219
启动子	219
使用 λ 噬菌体 P_L 启动子的载体	220
其他启动子	222
核糖体结合位点	222
真核基因的表达	223
表达非融合性真核蛋白的载体	223
表达融合性真核蛋白的载体	229
克隆化基因的高效表达	235
增加基因的剂量	235
小结	235
附录 A 生物化学技术	237
玻璃和塑料器皿	237
有机试剂的制备	237
液体培养基	238
用于 λ 噬菌体操作的溶液	239
抗生素	239
缓冲液和溶液的配制	240
蛋白水解酶	242
酶	243
限制性核酸内切酶酶切缓冲液	244
常用的电泳缓冲液	244
常用凝胶上样缓冲液	244
透析袋的预处理	245
^{32}P 标记核苷酸乙醇水混合液的干燥浓缩	245
核酸的纯化	245
核酸的浓缩	246
Sephadex G-50 层析	248
DNA 和 RNA 的定量	249
放射自显影	250
核酸放射活性的测定	252
作分子量标记的多体质粒的制备	252
Mavam-Gilbert 序列测定技术	253

附录 B pBR322	256
pBR322 的核苷酸序列	256
pBR322 的限制酶切点	260
pBR322 DNA 的限制性片段	265
附录 C 常用细菌菌株	274
参考文献	276

第一章 载体—宿主系统

下列四类载体可用于外源 DNA 片段的克隆并使之在大肠杆菌中增殖。这些载体是：质粒、 λ 噬菌体、柯斯质粒(Cosmids)及 M13 噬菌体。

尽管四种载体大小、结构各不相同,但都具有下列特征:

1. 它们能在大肠杆菌中自我复制。即使与外源 DNA 片段共价连接时也不影响其复制,它们是独立的复制子。

2. 容易从细菌核酸中分离,纯化。

3. 载体中的某些 DNA 区域对载体在细菌中的增殖无关紧要。外源 DNA 片段插入该区域后可同载体的正常组分一样进行复制和增殖。

此外,各载体也有独特的生物学特征,因此可按不同的目的选择使用。本章将分别介绍这些克隆载体,并讨论其应用于分子克隆的原理。

质 粒

质粒是染色体外遗传因子,存在于各种不同的细菌中。它们是双链闭合环状 DNA 分子,大小为 1 kb~200 kb。质粒通常都带有编码某些酶的基因,这些酶在某些情况下对宿主菌是有利的。各类质粒所赋予的不同表现型有:

抗生素的抗性,

抗生素的产生,

复杂有机化合物的降解,

大肠杆菌素的产生,

肠毒素的产生,

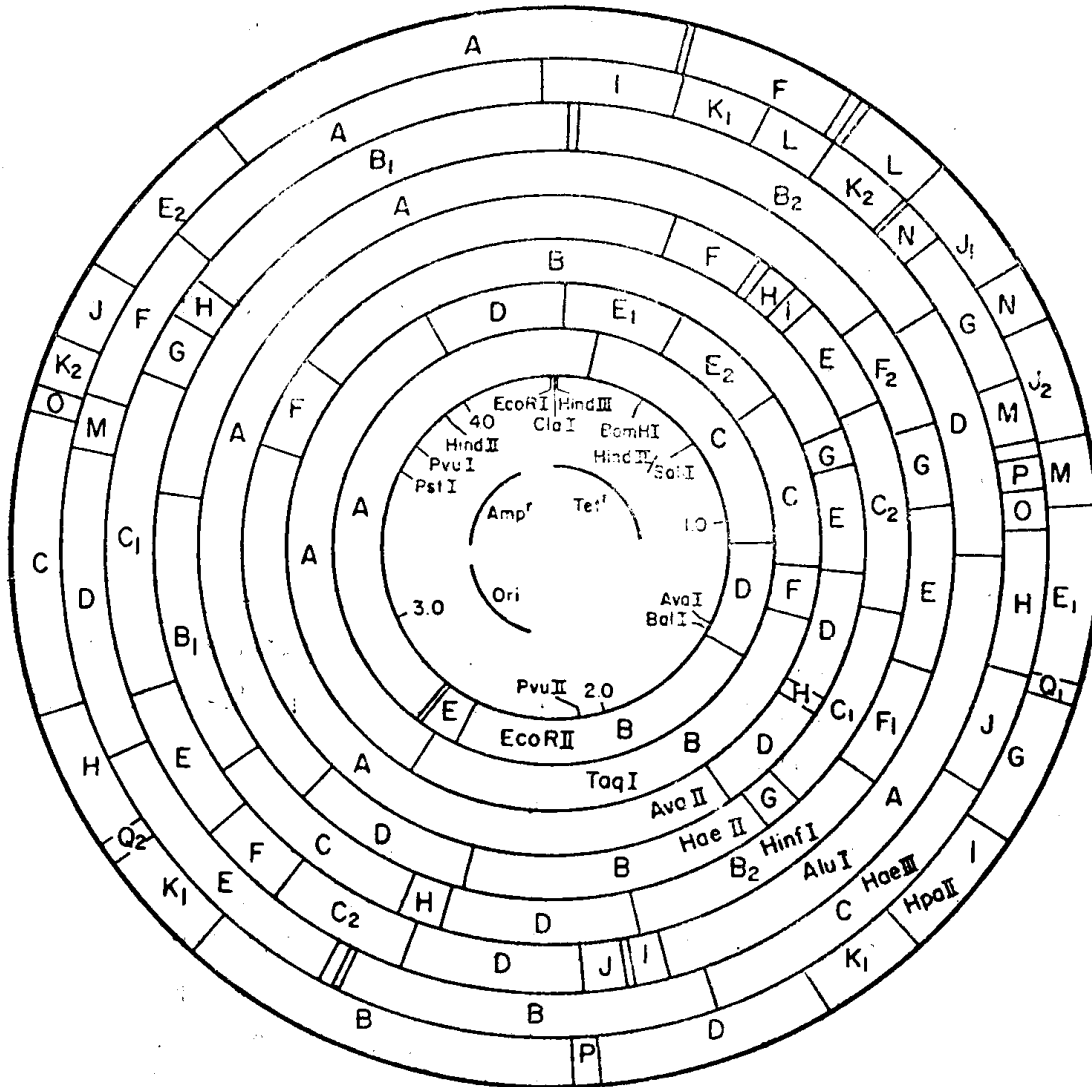
限制性内切酶和修饰酶的产生。

在自然条件下,许多质粒可通过类似于细菌接合(bacterial conjugation)的方式从一宿主转移到新的宿主。然而,在实验室的条件下,质粒可按人为的手段转移到细菌宿主中,这种转移过程叫转化。进行转化时,先要对受体菌作适当处理,使某些细胞对小分子 DNA 具有暂时的通透性,便于质粒的导入;质粒进入细胞后,使受体菌产生新的表现型,如产生对某一抗生素的抗性,因而很容易区分转化体与非转化体的菌落。

大多数质粒复制所用的酶与细菌染色体复制所用的是同一组酶。有的质粒处于严紧型控制(stringent control)下,即这些质粒的复制与染色体复制是偶联的,因此这种质粒的拷贝数在细菌细胞中很低,每个细胞只有一个或者几个(综述,Novick 等人 1976)。相反,有的质粒的复制处在松弛型控制(relaxed control)下,其拷贝数可达 10~200 之多。更重要的是,如果使宿主蛋白合成停止(如用氯霉素处理),松弛型质粒拷贝数可增加至每个细胞达几千个之多(Clewell, 1972)。原因在于,松弛型质粒的复制能在宿主蛋白质合成终止的情况下照常进行,而染色体 DNA 和严紧型质粒则不能复制。

要作为有价值的克隆载体,质粒应具备下列特征:结构比较小,呈松弛型复制;具有一个或数个选择性标记以便鉴别转化体,并有利于质粒在细菌中的保存;质粒在其复制非必需区内应具有一种或多种限制性内切酶的单切点,这些供外源 DNA 片段插入的切点最好坐落在编码选择性标记的基因内,这样,一旦外源 DNA 片段插入,就会导致该基因的失活。

下面介绍用途广泛并具有上述特性的克隆载体 (Bolivar 和 Backman 1979, Bernard 和 Helinski 1980)。用途最广的载体是 pBR322(附图 1), 它是一种松弛型复制的质粒, 含有氨基青霉素和四环素的抗性基因, 以及多种使用方便的限制酶切点。pBR322 的所有核苷酸顺序已搞清, 详见附录 B。

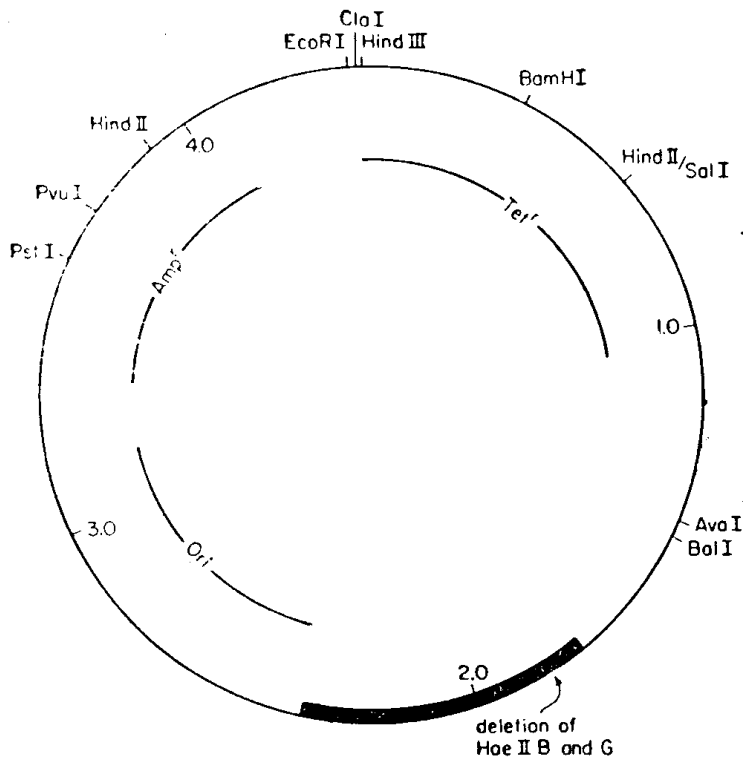


附图 1 pBR322

大小: 4.3 kb
 复制子: ColE1, 松弛型
 选择标记: Amp^r, Tet^r
 单切点: Ava I, Pst I, BamH I, Pvu II, Cla I, Sal I, EcoR I, Hind III
 插入性失活: Amp^r-Pst I Tet^r-BamH I, Hind III(不稳定), Sal I
 参考文献: Bolivar 等(1977); Sutcliffe (1978, 1979)
 说明: pBR322 是用途最广的质粒克隆载体, 它的核苷酸全部序列已被测知(Sutcliffe 1979)

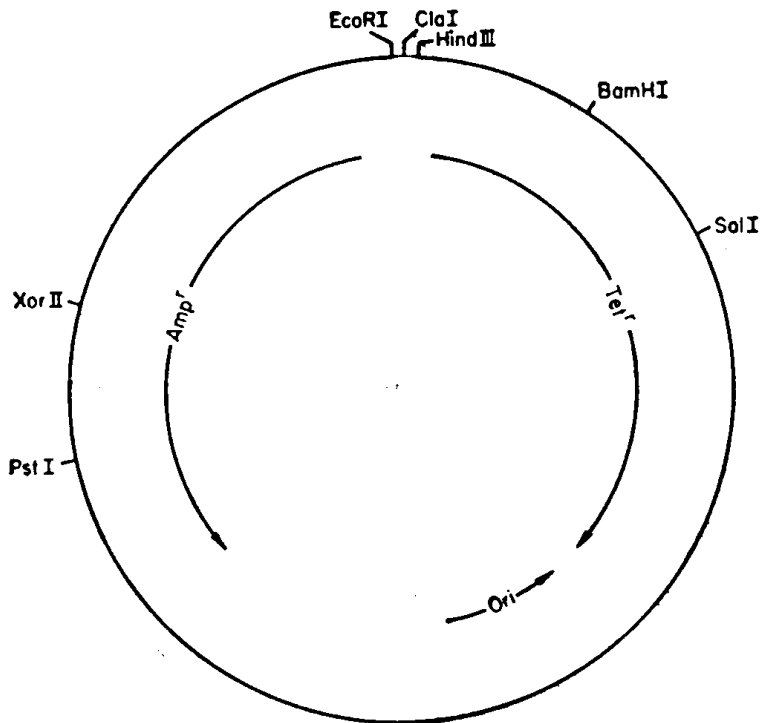
近来, 又出现两种 pBR322 的衍生质粒, 其优点是复制拷贝数更高。其中, pAT153(附图 2)是缺失了 Hae II B 和 G 片段(它们正好涉及质粒基因组拷贝数的控制区)(A. Cowie 和 E. Ruley 私人通讯)后构建成的(Twigg 和 Sherratt 1980), 见第 6 页。pAT153 在每个细胞中的拷贝数约比 pBR322 多 1.5~3.0 倍。第二种衍生质粒 pXf3(D. Hanahan 未发表)(附图 3)比 pAT153 要小。

小分子质粒的好处是多方面的: 它对机械性损伤不甚敏感, 因而容易操作; 它的限制酶图



大小: 3.6 kb
 复制子: ColzI, 松弛型
 选择标记: Amp^r, Tet^r
 单切点: AvaI, PstI, BamHI, ClaI, SalI, EcoRI, HindIII
 插入性失活: Amp^r-PstI
 Tet^r-BamHI, HindIII
 (不稳定)
 SalI
 参考文献: Twigg 和 Sherratt(1980)
 说明: 这是 pBR322 的高拷贝变种

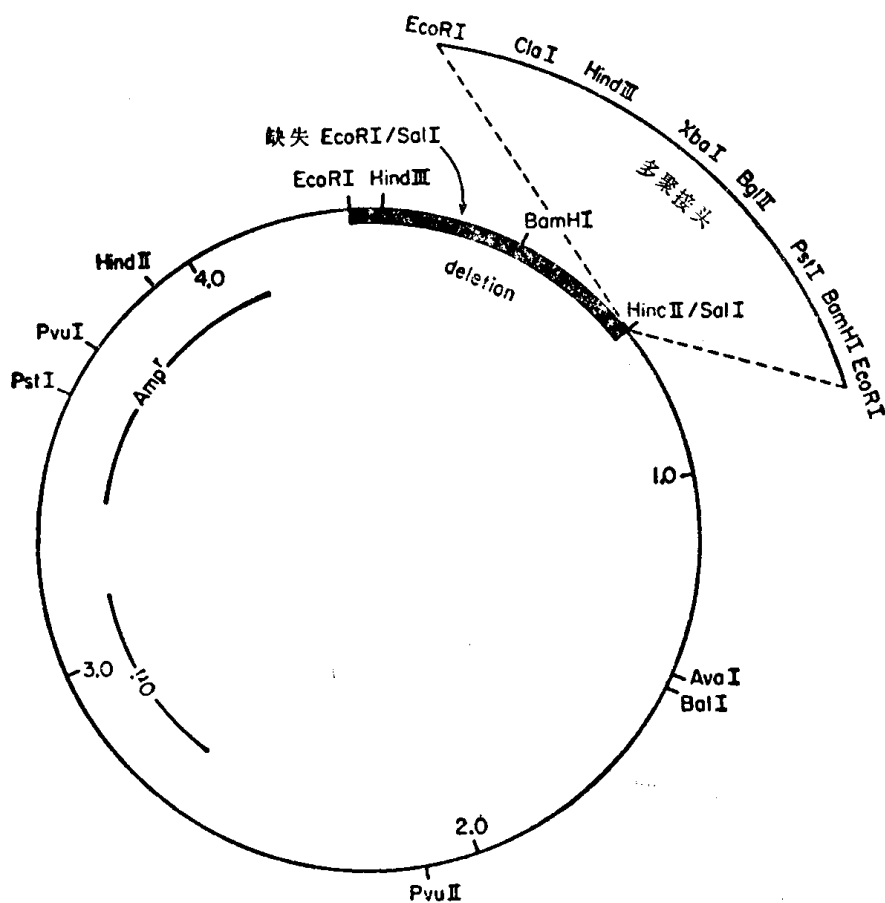
附图 2 pAT153



大小: 3.16 kb
 复制子: ColEI, 松弛型
 单切点: EcoRI, ClaI, HindIII
 选择标记: Amp^r, Tet^r
 插入性失活: Tet^r-BamHI, SalI
 Amp^r-PstI, XorIII
 参考文献: Sutcliffe(1978), D.
 Hannahan(私人通讯)
 说明: pXf3 是 pBR322 的一种衍生质粒, 它是由 pBR322 复制子所在的 ThaI-A 片段与编码 Amp^r 和 Tet^r 基因的 AraI-Sau3A 片段融合产生的~3160 bp 的质粒

附图 3 pXf3

谱也较简单；此外，由于小质粒一般都是高拷贝数，当用放射性同位素标记的探针对携带外源 DNA 片段的细菌进行杂交筛选时，就增加了检出灵敏度。当然，质粒分子量的减少也会造成失去某些有价值的克隆位点，如 pXf3 就缺乏 pBR322 和 pAT153 中存在的 *Bal* I 和 *Ava* I 切点。为了增加有价值的克隆位点，已在几个小质粒中插入了多聚接头(polylinker)。这是一种几个限制酶切点紧密排列的 DNA 片段，如 plink322 质粒(B. Seed, 未发表)就带有一多聚接头，详见附图 4。



附图 4 plink322

大小: 3.8 kb

复制子: ColE1, 松弛型

选择标记: *Amp^r*

单切点: *Cla*I, *Hind*III, *Xba*I, *Bgl*II, *Bam*HI plink322, 是 pBR322 的一变种, 它具有一段多接头序列, 从而增加了用于克隆的位点数

参考文献: B. Seed (未发表).

多接头序列:

