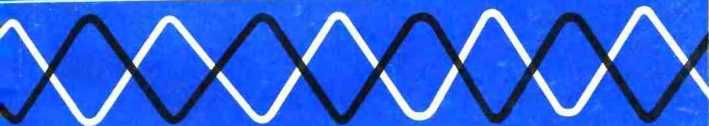
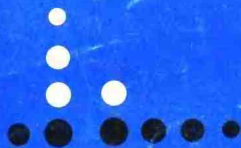


分子生物学实验手册

主编 戴长柏
郭仁



云南●科技出版社



责任编辑: 百友
封面设计: 张丽旌

分子生物学实验手册

〔美〕G·戴维斯 D·蒂伯勒 F·贝蒂 著
戴长柏 郭仁 等编译

云南科技出版社出版发行 (昆明市书林街100号)
滇黔桂石油地质研究所印刷厂印装

开本: 787×1092 1/16 印张: 16 字数: 345000
1990年5月第1版 1990年5月第1次印刷
印数: 1—3000

ISBN 7-5416-0288-4/Q·5 定价: 8.50元
登记证号: (滇)第04号

内 容 简 介

本书较全面地介绍了有关分子生物学领域中常用技术的基本原理，操作步骤及仪器设备，并附有注意事项。编者还根据国内情况增加了某些章节，以供实际需要。本书可供有关专业的研究和教学人员使用。

G. Davis, D. Dibner, E. Battey.
Basic Methods in Molecular Biology.
New York, Amsterdam, London, 1986

分子生物学实验手册

(美) G.戴维斯, D.蒂伯勒, F.贝蒂 著
编译: 戴长柏 鄂仁

译者序

分子生物学是一门新兴的学科，它是在细胞生物学、生物化学、遗传学和微生物学等学科发展的基础上产生出来的一门边缘学科。分子生物学技术的发展具有极大的潜在力量，成为生物技术革命的动力，十分活跃地作用在生物学的各个领域里，并推动着生物学的发展。在最近的十多年里，分子细胞生物学、分子遗传学、分子病理学、分子免疫学和基因工程学等等相应地发展起来，使生物科学呈现了一种崭新的面貌。

分子生物学技术的发展也促进了基因工程、酶工程、细胞工程和发酵工程等一系列生物高技术的发展，并在工业、农业和医学上开始发挥它潜在的巨大作用。在发达国家里几乎所有与生物学有关的实验室里都在引用着分子生物学技术研究各种各样的课题。

分子生物学技术的发展，在我国目前尚处在初期阶段，但已受到政府和科学界的极大关注。制定了发展规划，采取了一些有力的措施，使我们满怀信心地展望，在今后的十年、二十年里，分子生物学技术必将在我国兴盛起来，以不断出现新的成果来展示我国科学技术的进步和经济建设事业的发展。

我们正是怀着这样的认识，为了促进分子生物技术在我国的应用和发展，翻译出版了这本《分子生物学实验手册》。

这本书是以美国 Leonard G. Davis, Mark D. Dibner 和 James F. Battey 三位博士编著的《Basic Methods in Molecular Biology》一书为蓝本编译的。关于这本书的评价和内容简介，美国哈佛大学遗传学系主任 Philip Leder 教授已在本书写的前言及第一章中作了介绍，这里不再赘述。总之，这本书写得论理简明、要领清晰、方法步骤具体、内容丰富而实用，是分子生物学工作者的良师益友；特别是对初学者、研究生和大学生来说，更是入门捷径，依步骤要求操作，便可较快地掌握实验技术。故此，我们将该书称为《分子生物学实验手册》。为了使本书更适合国内读者需要，我们在本书第 7 章和 21 章中分别增加了“生物素制备探针技术”和“RNA 病毒寡核苷酸指纹图分析”两节，并对“单克隆抗体的制备”一节做了适当增补。

该书是在中国医学科学院医学生物学研究所病毒生化室主任戴长柏付教授主持下，该实验室研究人员参加共同翻译的。参加翻译工作的有戴长柏、郭仁、张建文、何俊、孙茂盛、李琦涵、陈元鼎、蔡宏荣、丁雪凤、许如君、秦红星、赖众、胡凝珠、彭小忠、杜秋江、管云红、刘宏岩等十七位同志。罗其胜同志参加了部分文字工作。全书译完后由戴长柏、郭仁两位教授进行了总的审校。这些同志都是严肃、认真地工作。然而，由于我们从事分子生物学研究工作时间不长，实践经验、理论素养和外语水平有限，因此编译中的差错和不妥之处定必不少，尚望同道们及广大读者不吝指正。谢谢。

中国医学科学院医学生物学研究所 戴长柏 郭仁
1990.元.

前 言

生物学新近飞跃发展的核心在于遗传学技术的发展。它的成就改变了生物学家科学活动的内容，甚至对他们的思维方法也产生了深刻的影响。过去有许多曾经受过广泛训练的科学家现在竟然急速地转入到去认识如此微小的多少有点神秘的世界。他们为此发展了许多新技术，并且很快地将这些技术运用到科学活动的实践中去。随着新突起的研究技术逐渐取代了传统的实验手段，生物学家开始领悟到有那么多的工作可做，有那么多的事物需要去探索。在这方面 Davis、Dibner 和 Battey 博士做了许多十分有益的工作，总结了这些技术汇编成书，为我们提供了迄今实验室最常用、最重要的工具，是从事该工作可供查找的渊博的手册。他们都是富有经验的科学家，他们在本书中既阐明了实验技术的原理，又写明了操作细节。因此如何选用好它那就是我们自己的事了。

Philip Leder

波士顿

致 谢

作者向那些有助于完成该书的人们和研究单位表示由衷地感谢。

有许多科学家为此书提供了很有价值的帮助。诸如 Shoshana Segal 博士对哺乳类细胞的转染、Marian Kelley 女士对单克隆抗体的制备、Hunt Potter 博士对 Electroporation 章节、Donna Reed 对蛋白质制备方法、Eric Sinn 博士对转基因小鼠分析、S. Carl Falco 对酵母的使用以及 Edosard Sausville 博士对 cDNA 克隆等分别提供了有价值的素材或详细的技术资料。J. Blancy 博士为本书绘制了封面。

还有很多学者为本书原稿进行了认真审阅并提出过很宝贵的修正意见。他们是：Philip Leder, Marion Cohen, Edward Berger, Rick Woychik, Keith Lawrance, Eric Seifter, Anne-Marie Lebacqz 和 Michael Kuchl 等博士。此外，J. Angulo, R. Arentzen, M. Leisis, F. Baldino, Jr. 和 L. Hennighansen 博士也为本书某些章节作了审定。A. Callahan, R. Manning 和 R. Lampe 也对本书的评论有所帮助。

我们感谢 Elsevier 科学出版社的工作人员，特别是 Yale AHman 和 Jonathan Wiener 先生为本书编辑出版提供了很多支持和帮助。Brian Treuch 先生绘制了很多插图。我们也感谢 New England Bio Labs, Bethesda Research Labs, Bio-Rad, Boehringer Mannheim 和 Pharmacia 诸公司为本书提供了一些插图。我们感谢 Sherry M. Vari 女士为本书做了精细的文字加工。

最重要的是，作者特别感谢 Philip Leder 博士，哈佛大学医学院遗传系主任。在他的领导下，才使得本书中的大多数方法得以建立和完善。同时，我们也不会忘记他实验室的所有成员，无论是过去的还是现在的。因为在本书中也凝聚着他们才智的结晶。有了他们才使这本书的出版成为可能。

最后，我们愿将这本书奉献给我们的妻子们，Penny、Elaine 和 Fran，她们对本书的出版付出了艰辛的代价，包括珍贵的光阴。

Leonard G. Davis

Mark D. Dibner

James F. Battey

1986.4.

目 录

前言与致谢

第一章 分子生物学的基础	(1)
第二章 分子生物学家的工具	(4)
第三章 总 则	(8)
3—1 本书的使用	(8)
3—2 安全性考虑	(10)
3—3 分子生物学研究所需设备	(11)
第四章 克隆载体与宿主菌	(13)
4—1 PBR ₃₂₂	(13)
4—2 M13	(15)
4—3 PUC	(18)
4—4 λ gt ₁₀	(20)
4—5 λ gt ₁₁	(20)
4—6 EMBL ₃ 和 EMBL ₄	(21)
4—7 Charon 28	(23)
4—8 细菌株	(24)
第五章 真核细胞 DNA 的制备	(25)
5—1 快速制备 DNA	(25)
5—2 真核细胞 DNA 的制备。一般方法	(26)
5—3 从培养的细胞及组织制备 DNA	(28)
5—4 限制性核酸内切酶 (RE _n) 及其使用	(30)
5—5 琼脂糖凝胶电泳	(36)
5—6 Southern 印迹法	(38)
第六章 标记的合成探针探查核酸	(41)
6—1 制备合成 DNA 探针	(41)
6—2 合成探针的末端标记	(43)
6—3 用 P ³² 末端标记的探针进行杂交	(45)
第七章 质粒衍生的探针检测核酸	(48)
7—1 缺口翻译	(48)
7—2 DNA 杂交 (Southern 印迹杂交)	(50)
7—3 生物素标记的分子杂交	(52)
第八章 质粒 DNA 的制备	(55)
8—1 细菌转化	(55)
8—2 质粒 DNA 的制备: Triton 溶菌酶法	(57)

8—3	碱性溶菌法: 纯化质粒	(61)
8—4	小量质粒制备法	(63)
第九章	制备 DNA 限制性酶切片段	(66)
9—1	小胶	(66)
9—2	酶切后的 DNA 片段分析: 琼脂糖凝胶电泳	(67)
9—3	电泳洗脱	(69)
9—4	DNA 限制性片段的聚丙烯酰胺凝胶电泳	(71)
第十章	DNA 的纯化	(74)
10—1	DNA 的精胶纯化	(74)
10—2	DNA 的玻璃粉末洗脱	(75)
10—3	DNA 纯化: 其它方法	(77)
第十一章	真核细胞 RNA 的制备和分析	(79)
11—1	异硫氰酸盐的总 RNA 制备法	(79)
11—2	微量法制备 RNA	(84)
11—3	用 Oligo (dT) 的纤维素层析柱分离 poly(A) RNA	(85)
11—4	用甲醛凝胶电泳分离 RNA 和 Northern 印迹	(88)
11—5	标记探针与 DNA 或 RNA 样品的点迹 (Dot Blot) 杂交	(91)
11—6	探针检测 RNA 时应注意的一般问题	(93)
11—7	以质粒中的 DNA 克隆制备 RNA 探针的方法	(94)
第十二章	噬菌体克隆 DNA 的制备	(98)
12—1	噬菌体的培养和制备	(98)
12—2	噬菌体 DNA 的大量制备和纯化	(100)
第十三章	真核基因组的 DNA 克隆	(103)
13—1	真核基因组的 DNA 克隆: 介绍	(103)
13—2	基因组 DNA 的制备: 部分 <i>MobI</i> 消化法	(104)
13—3	用于基因组克隆噬菌体的制备	(107)
13—4	基因组 DNA 与噬菌体臂的连接以及基因库的包装	(110)
13—5	包装库的滴定和培养	(112)
13—6	用放射性标记的探针筛选接种后的基因库	(114)
13—7	基因库的放大	(118)
第十四章	cDNA 在 λ gt ₁₀ 和 λ gt ₁₁ 的克隆	(119)
14—1	λ gt ₁₀ 、 λ gt ₁₁ cDNA 克隆载体的制备	(119)
14—2	从真核 mRNA 中制备 cDNA 插入物	(122)
14—3	cDNA 库在 λ gt ₁₀ 或 λ gt ₁₁ 臂上连接和包装	(129)
14—4	有插入片段的 λ gt ₁₀ 和 λ gt ₁₁ 的接种和筛选	(130)
14—5	从 λ gt ₁₀ 和 λ gt ₁₁ cDNA 克隆制备 DNA	(134)
第十五章	亚克隆质粒	(136)
15—1	亚克隆质粒: 一般概念	(136)
15—2	亚克隆 pBR ₃₂₂ 质粒的制备和插入片的连接	(137)

15—3	pBR ₃₂₂ 菌落杂交	(140)
15—4	PUC 质粒的次级克隆	(142)
第十六章	M ₁₃ 噬菌体在分子克隆和序列分析中的应用	(144)
16—1	M ₁₃ 克隆和测序; 一般概况	(144)
16—2	利用特异的限制性位点制备克隆插入片段	(147)
16—3	BAL31 核酸外切酶制备 M ₁₃ 克隆的插入片段	(150)
16—4	M ₁₃ 载体的制备及插入片段与载体的连接	(153)
16—5	M ₁₃ 转化 JM ₁₀₃ E. coli 宿主	(156)
16—6	放射性标记的探针筛选 M ₁₃ 克隆选择插入片段进行序列分析	(157)
16—7	用于序列分析的单股 M ₁₃ DNA 的制备	(159)
16—8	M ₁₃ 克隆的单项筛选分析	(160)
16—9	聚丙烯酰胺测序胶的制备	(162)
16—10	M ₁₃ 克隆的序列分析	(165)
第十七章	克隆 DNA 的进一步鉴定	(169)
17—1	S ₁ 核酸酶保护试验	(169)
第十八章	组织培养的哺乳动物细胞的转染	(177)
18—1	用纯化的质粒进行非粘连和粘连的细胞磷酸钙转染	(177)
18—2	哺乳动物悬浮和贴壁细胞的 DEAE 葡聚糖介导转染	(179)
18—3	电转化	(181)
18—4	转染后哺乳动物细胞的挑选; G ₄₁₈ 法	(182)
18—5	氯霉素乙酰转移酶 (CAT) 试验	(184)
第十九章	蛋白质方法	(186)
19—1	体外翻译和免疫沉淀	(186)
19—2	聚丙烯酰胺凝胶分离蛋白质	(189)
19—3	蛋白 Western 印染分析	(191)
19—4	蛋白质或 RNA 凝胶的银染色	(194)
第二十章	一般方法	(197)
20—1	DNA / RNA 提取及沉降	(197)
20—2	塑料袋密封	(199)
20—3	光密度分析测定	(201)
20—4	凝胶照相或放射自显影	(202)
20—5	放射自显影	(203)
20—6	制备细菌培养碟	(204)
20—7	噬菌体的滴定和铺板	(206)
第二十一章	特殊方法	(208)
21—1	转基因小鼠的制备	(208)
21—2	RNA 病毒寡核苷酸指纹图谱分析	(213)
21—3	杂交瘤——单克隆抗体的制备	(216)
21—4	对标记探针组织切片的原位杂交	(222)

21—5 酵母菌在基因克隆中的应用	(225)
第二十二章 贮液配制	(228)
附录 I 贮液	(228)
附录 II 酶	(233)
附录 III 试剂和设备供应	(234)

第一章 分子生物学的基础

当代的生物科学已为最近 15 年内发展起来的一系列新的研究技术所更新。这些技术使得诸如细胞生长、分裂、代谢、分化和发育等复杂过程的分子机制和结构变得更加清晰。更重要的是可以在分子水平上来操纵这些过程，并观察整合新的分子后活体系统的改变。

核酸和蛋白质均为大分子，是由多个亚单位组成的线性多聚物。核酸编码遗传信息，使所有蛋白质的一级结构适合于特定的一种有机体。加上脂肪和细胞外的支持性基质一起，它们便具有了细胞活性和生理功能。这样，通过检查它们关键成分的内在联系，就可以对其生物功能有部分的了解。细胞的遗传物质，脱氧核糖核酸 (DNA)，是一种由 4 种核苷酸组成的多聚体。每一种核苷酸含有一个核酸碱基 (A、腺嘌呤；G、鸟嘌呤；T、胸腺嘧啶；C、胞嘧啶)、一个脱氧核糖的糖基和一个磷酸。每一条链是由一个核苷酸中脱氧核糖的 5' 碳原子与相邻另一脱氧核糖残基上的 3' 位碳原子被磷酸二酯键共价结合在一起组成的一条核苷酸链。这些 DNA 亚单位链呈两股，彼此作反向平行排列，以磷酸盐糖链为基轴环绕延伸，呈双螺旋结构。一链中的特定碱基与另一对应链，或叫互补链的碱基之间形成一种氢键，把这两股链紧密相联。通常是腺嘌呤 (A) 与胸腺嘧啶 (T) 配对，鸟嘌呤 (G) 与胞嘧啶 (C) 配对。碱基配对的精确使核酸合成按一定结构进行，即正常情况下，按照模板的要求，仅仅加上“校正”的碱基，延长而成新链。正是这种互补碱基配对的恒定性和专一性，使 DNA 的功能性碱基成为遗传信息的宝库。DNA 上核苷酸的顺序与蛋白质上氨基酸的顺序相对应。这样 DNA 能够为蛋白质编码，每 3 个相邻的核苷酸组成一组，代表一种 mRNA 密码，指令一特定的氨基酸。因而，DNA 的线性核苷酸序列就能指令细胞结构、功能和酶蛋白的氨基酸序列。DNA 的另外区域，虽不能直接编码蛋白质，却含有指导调节基因产物合成的信息。

当遗传信息由 DNA 流向蛋白质时，必定要通过 RNA (核糖核酸) 来传递。双股 DNA 链中编码蛋白质序列信息的那股链被拷贝，或者叫转录，或为 DNA 的一股互补链——RNA。该 RNA 链含有和 DNA 相似的碱基，唯独其中的尿嘧啶核苷 (U) 取代了 DNA 中的胸腺嘧啶核苷 (T)，核糖取代了脱氧核糖。基因的这种 RNA 复本，称为信息 RNA (mRNA)，在转移 RNA (tRNA) 和核糖体 (rRNA 和相联蛋白质) 的帮助下转译，并按一定顺序装配氨基酸，构成蛋白质的一级结构。

在许多分子生物学实验室中均采用了像细菌那样的原核细胞系统，因为它具有结构相对简单的优点。在原核细胞中，连续的线性 DNA 序列直接同线性 RNA 和蛋白质相对应。然而，在真核细胞中，编码蛋白质的 DNA 并不能连续地阅读，因为在可转译的序列中含有间断序列 (内含子, introns)。因而，在真核细胞中，DNA 首先拷贝成原始转录体 (异核 RNA)，后者在细胞核内经历了一个剪切加工外显子 (exons) 过程。外显子线性地参入到成熟的信息 RNA 中，再在细胞核里得到进一步加工处理，之后被移送到细胞质里，进行蛋白质的翻译。这需要有一些新的方法进行真核细胞系统基因的研究。

对基因及其产物的结构、功能和调节的认识，有助于我们去正确了解生物学系统。这包含着认识有机体核酸的组织。先前的这种理解被真核细胞中基因组的复杂性给混淆了。在真核细胞中含有 50,000 基因，有 10^9 核苷酸。为了分析这种复杂环境中基因的结构和活动，就需要有能力分离和研究经提纯的单一基因。DNA 的分子克隆技术提供了从一基因群体中分离单一 DNA 片段的机制。经纯化成为均一的片段，将其扩增，以产生足够纯的物质用于化学的、遗传的和生物学的分析。克隆的过程完全依赖于在实验室内进行酶的反应，使用已经充分鉴定标化好的细菌 DNA 切割酶（限制性内切酶），修饰酶来处理 DNA 分子。然后把 DNA 分子整合进入能够自主复制的 DNA 环（质粒）或细菌病毒（噬菌体）中，再引入到细菌细胞。经多周期的复制，再分离和纯化这种杂交分子，以获得足够量的克隆 DNA 片段。

借助分离、纯化 DNA 片段，碱基的核苷酸序列可以很快得以确定。于是也便知道了编码蛋白质的氨基酸序列，这种提纯 DNA 的放射标记使得科学家可以制备出特异的探针，用于测定复杂细胞基因组中，在一个背景从上百万的无关序列中检测出相应的 DNA 序列或相应的细胞内 mRNA。从提纯的 DNA 合成 mRNA，可以被检测、定量到每个细胞中 1—10 个拷贝那样低的量。将克隆 DNA 在细菌和酵母中再重新组装，可使它的蛋白质密码序列得以表达，这就为获取生物学和医学上一些十分重要的蛋白类物质提供了一个廉价与丰富的来源，而要做到这一点用其他方法几乎是不可能的。如果在实验室改变这种结构和序列，就可创造克隆 DNA 的变体。然后将这种 DNA 再引入细胞或整体动物，研究这种人为突变所造成的结果，可以更完全地了解基因的功能和调节。

在本书中，我们描述了进行这种分子遗传学的实验方法。在每一例中，都是分步骤地加以介绍，采用“烹调书”形式，并己为应用所考验。

对本书内容的简介：

本书所描述的方法，从简单到复杂。首先介绍了质粒和载体系统，以及方法中所涉及的细菌宿主细胞。然后着重讨论了专一合成的或克隆的 DNA 探针的应用，而使目的基因得以选择、扩增或检测。在第五章介绍了从组织中分离 DNA，并将其切割到可用大小，再根据大小分离。在第六和第七章中，描述了探针制备方法，或者合成或者取自质粒或用生物素标记，用于目的 DNA 的筛选。第八至十章，列述了质粒制备和扩增的方法。从扩增的质粒，切割和纯化克隆的 DNA。

第十一章介绍 RNA 的制备、筛选、分离和分析。十二章描述另一类型的载体，噬菌体。第十三和十四章列出了在噬菌体载体中构建基因组 DNA 和 cDNA 文库的技术。从制备的文库中，可以选择所期望的 DNA，然后大规模地复制。在十五章中，叙述了为制备性复制而在质粒中进行亚克隆，应用 M_{13} 载体（十六和十七章），可以研究它的序列及特性。至此为止，已利用简单的原核细胞系统对 DNA 进行了较深入的研究。如果把修饰过的克隆基因变体放回到真核细胞基因组中，就能更恰当地评价它的调节和功能意义。在第十八章介绍了 DNA 导入到培养的哺乳类动物细胞的方法。

第十九章描述体外转译 RNA 与蛋白质有关的方法学。因为蛋白质是遗传物质的产物，对研究和理解基因调节具有重要意义。

第二十章介绍了基础的技术方法，这在本书中多处提到过，如 DNA 提取、放射自显影和蚀斑滴定。可以预料初学者将乐于开始掌握这些方法，然而慢慢地就会意识到它们是

处于第二位了。

最后，在第二十一章中描述了有关的分子生物学方法。首先是转基因小鼠的分析，包括将新的 DNA 片段掺入到小鼠胚胎中，随后对其产仔进行分析。接着又介绍了 RNA 病毒寡核苷酸指纹图分析，病毒的生物学性质与基因组的关系可以通过比较不同毒株间的寡核苷酸指纹图而澄清。之后，介绍了单克隆抗体生产技术。所得单抗可用于制备某种特异基因产物的免疫学探针，以及用于原位杂交，即使用核苷酸探针来定位和研究组织切片中专一的遗传信息。本书末尾提出了应用酵母宿主和载体系统进行分子生物学技术的一般注意事项。在最后的几页里，讨论了分子生物研究中一些研究技术的应用，以及使用这些方法可能产生的问题。

第二章 分子生物学家工具

为了说明分子生物学方法的应用，本章节主要列举一系列的实验，来阐明他们如何利用各种有关的方法来研究一个典型的基因——x 基因。

对基因 x 结构或在某些生物机体内的表达的研究是一项很有价值的探讨。为此首先，需要有一个放射性标记的 DNA 探针，它带有与 x 基因相似的序列，例如从另一物种来的基因（但与 x 基因同源）。这个基因首先通过纯化，再以缺口翻译的方法形成一个带放射性标记的探针，以便在 Southern 印迹法分析中检测出 x 基因的存在。另外，实验室合成的寡核苷酸探针亦应带有与 x 基因部分互补的序列。然后使用标记的探针，用 DNA 印迹法分析来自某种组织或细胞系的 DNA，通过 DNA 印迹确定基因组中是否有与基因 x 相关的序列存在。

进行 DNA 的 Southern 印迹实验，第一步是从一种组织或细胞系中分离提纯 DNA，用特异的限制性内切酶（RES）将其切割成限定的片段，然后，这些 DNA 片段再在琼脂糖凝胶电泳上按分子量大小分离。继之，用电转移的方法将凝胶上的 DNA 再转移到硝酸纤维素膜上与 x 基因的特异性探针进行杂交（Southern 杂交）。由于只有同源序列的片段方能与探针形成互补碱基对，所以将非特异性的放射性物质洗去后，印迹的放射性自显影所出现的条带可决定是否有 x 基因的存在。

在对一种特定组织样品的 DNA 进行 Southern 印迹时，可能会出现杂交 DNA 限制性片段有变化的图象，这表明 x 基因的序列有了改变。例如：若特异性组织或肿瘤的 DNA 出现了重排，这种“体细胞”的重排，就能从不同来源的组织中提纯的 DNA 以及上述提到的探针来加以鉴别。从不同类型的细胞或组织所得的基因组 DNA，在 Southern 印迹上可能会形成大小不同的杂交片段。所以 DNA 序列发生了重排，就可能出现印迹图象的这种改变。

此外，限制性片段长度的多形性（RFLPs）或不同基因形式（即等位基因）也可以导致 DNA 酶谱的变化。如果将从 100 个个体的基因组 DNA 用限制性内切酶 EcoR I 切割，然后用 x 基因的探针在 Southern 印迹上检测，可能会出现两个或更多不同的亚群。因此，有些个体的基因组 DNA 中可能含有 10—kb 的限制性杂交片段，另一些则是具有 6—kb 的杂交片段，而杂合子中则带有 6—kb 和 10—kb 的片段，这表明所研究的人群中，在 x 基因的位点上，有两个不同的等位基因。而某些 RFLPs，可能与遗传性疾病或是恶性肿瘤一种诱因有关。x 基因的一个特殊等位的检测有可能与遗传病或恶性肿瘤易发性之间有密切的关系。Southern 印迹分析已能对这类疾病发生发展作出恰当评估。最近，已证实 Huntington's 病，Duchenne's 肌营养不良，囊性纤维性病变，与 RFLPs 的遗传检测有关，在他们达到育龄之前，甚至在他们出生之前就可以予以确诊。

为进一步了解 x 基因的详细结构以及在不同的生物学条件下引起的结构变化，人们就需要大量匀一的 DNA。因此，有必要建立一个基因库。由于它们是随机地从基因组中选出来的，故能代表这个基因组的全部区域各个片段。再将这些片段分别插入到各个可独

立复制的原核类 DNA 或载体中，如噬菌体 λ 的衍生物。然后分别用于感染细菌细胞，这些细胞经多次分裂后，每个细胞含有多个拷贝插入的噬菌体基因。在通常情况下，至少有几个克隆片段含有它们所要的 x 基因，那么，如上所述的放射标记的探针，就可用于从基因文库中分离含 x 基因的克隆。

至此为止，我们就建成一个带有克隆基因片段的噬菌体库。尽管噬菌体库中含有成千上万的噬菌体，但它们只生产单一的插入序列。为了从许多噬菌体中挑出正在复制基因 x 的噬菌体，下一步就应对整个文库进行筛选。方法是將文库中的所有噬菌体都接种于平皿上，然后，将每个噬菌体噬斑所产生的 DNA 的小部分转移到硝酸纤维膜上，用 x 基因的特殊探针杂交，再进行自显影，根据 x 光片上的黑点来鉴别已杂交上的 DNA。只要在自显影上检测出斑点，就可确定该克隆是具有 x 基因或 x 基因相关序列的噬菌体克隆。因而我们可以对这一克隆进行分离并进一步纯化。经过多次对这个库的全面查找，就有可能挑选出多个含 x 基因的同源克隆，此时所得到的噬菌体中只含有单一的 x 基因插入片段。含 x 基因的片段可以用一种限制性内切酶从噬菌体基因组上切下，然后再将它再插入更合适的载体，例如质粒之中。所形成的质粒能复制出大量的克隆 DNA，产生毫克级数量的 x 基因，以利于进一步研究。

使用基因组 DNA 克隆的方法，不仅使我们可以观察基因的结构标志，同时也为基因 x 的核苷酸序列测定奠定了基础。如基因 x 的样品可以用不同的限制性内切酶切割，并对 x 基因的限制性内切酶的切点位置作图（限制性内切酶的切割位点对于特定的 DNA 序列是高度特异的）。这就需要一组限制性内切酶处理 x 基因 DNA（用多种酶同时切或分别切），处理后的样品在琼脂糖凝胶上电泳，再根据各种酶切方式产生片段的大小，可以绘制出一张基因组 DNA 克隆的限制性酶切位点图谱。

用 x 基因的酶切位点图，制备 x 基因中小的 DNA 片段，并将其克隆到 M_{13} 噬菌体载体上，用双脱氧链端终止法和化学降解技术，测定这些片段的序列。通过这些序列，可以获得 x 基因中有关编码区（外显子）和非编码区（内含子）的信息以及对一些已知调节成分进行鉴定。参照整个基因的编码序列，就可以进一步确定 x 基因内编码的氨基酸序列。

针对 x 基因同样标记的探针，还可用来在真核细胞中查找相关的 RNA，它的意义在于，可以更好地理解 x 基因是如何进行表达的。RNA 可以从细胞分离纯化，而 mRNA 则可利用在其 3' 末端带有一段多聚腺嘌呤碱基（即多聚-A 尾）它可与层析柱上的寡聚脱氧胸苷特异性结合，这样就可将 mRNA 与 rRNA 和 tRNA 分开。这种 mRNA 在变性琼脂凝胶上可以据其分子量大小进行分离，最后用印迹法（Northern 印迹）将其转移到硝酸纤维膜上。这时针对 x 基因的同源探针能够与之杂交。这一实验不但可以表明 x 基因转录产物的大小，而且还能显示出 x 基因在两种组织中表达的相对数量。用此方法，可以观察 x 基因在不同组织中表达的全过程，以及弄清诱导和抑制因子的调节机理。而且， x 基因的产物——成熟 mRNA 或是一个 mRNA 前体的大小也可用 Northern 印迹技术来确定。

如果 x 基因的蛋白产物是已知的，就可以有更多的研究基因的方法：针对基因产物的抗体也可以制备成一种探针。要验证这个 x 基因分离的 mRNA 就是用于翻译的模板，可以先在体外将这一 mRNA 翻译成相应的蛋白产物，再用合适的单克隆、多克隆抗体，以

及其它功能性的生物实验进行分析。这些方法原则上都相似于 DNA 和 RNA 的印迹分析法，蛋白产物亦能据其大小在聚丙烯酰胺凝胶电泳上进行分级分离，然后再转移到硝酸纤维素膜上，以抗体鉴定之（Western 印迹分析）。

由 x 基因转录来的 RNA 的更详细的分析可用 S_1 核酸酶保护性图谱法，先用 ^{32}P 标记特异的 x 基因的单链 DNA 探针与 RNA 杂交，再对这些 RNA—DNA（异源双链）结构以单链 DNA 特异性内切酶 S_1 处理，这种酶可消化所有不能与 RNA 形成碱基对的单链 DNA 部位。而被保护的 DNA 区域则可以按其大小在凝胶上分离，再以自显影技术显示出来。利用 x 基因克隆片段作为探针与转录出来的 mRNA 杂交，我们可以精确的测出其内含子和外显子区。这个分析还能提供有关 x 基因区的 5' 和 3' 末端基因组的定位情况。

用含 x 基因的细胞或组织中得到的 mRNA，可以制备一些互补 DNA (cDNA) 的克隆。这些克隆一般能从 cDNA 库的克隆中分离，由已知细胞或组织的 mRNA 构建一个 cDNA 库，则用依赖于 RNA 的 DNA 多聚酶 (AMV 逆转录酶) 逆转录 mRNA 成 cDNA 拷贝。然后用 RNA 酶 H 和 DNA 多聚酶 I 使形成双链 DNA。此双链 DNA 再插入噬菌体 DNA 克隆的载体上 (λgt_{10} 或 λgt_{11})，每个重组的噬菌体都会有一个来自单链 mRNA 分子拷贝的 cDNA，然后由 x 基因所得的 cDNA 克隆可以用与 x 基因的特异探针杂交方法分离到，所用的方法与基因克隆的方法相同。将 cDNA 的基因限制性内切酶谱和所得到的核苷酸序列与 x 等位基因组序列作比较，我们可以精确的测定出转录 x 基因的所有结构变化和编码区的界限。

从若干相同的 cDNA 库中，人们可以得到一个基因的亲代克隆。这些原始的克隆可合成一种寡核苷酸杂交探针来选育，这个探针是根据部分已知氨基酸序列，反推出编码该蛋白区域的核苷酸序列而制备的。另一个方法是以一个蛋白融合载体体系，如 λgt_{11} ，来构建一个 cDNA 库。在这个克隆的载体中，双股 cDNA 插入到半乳糖苷酶基因的羧基端附近。如果此 cDNA 插入合适的翻译读码框架处，且方向正确，则这个重组噬菌体就可合成一个 β -半乳糖苷酶融合蛋白，此蛋白的羧基端将是一段由克隆化的 cDNA 插入物特异化了的氨基酸序列。由此方法所制备的 cDNA 克隆，可用针对此蛋白的特异性抗血清筛选。所形成融合蛋白的克隆可以和抗血清发生阳性反应，从而选择并纯化出同种克隆来。

至此，基因 x 的结构和表达性质已可以确定。这个基因还可以用 DNA 转化技术再插入脊椎动物的基因组中去。通过此类实验能够分析和确定此基因侧支序列中的调节因子。如将 x 基因的修饰片段插入培养细胞中，就可以进一步检测这些调节序列的功能，既研究产物也可研究基因 x 的调节。当然，亦可以用于由基因的插入和基因表达发生的改变而引起宿主细胞表型变化方面的检查。

上述这种方法更进一步的扩展是小鼠转基因分析。通过这个方法，可以将来自基因 x 的 DNA 用微量注射法注入小鼠受精卵中，然后将带有插入 DNA 的胚胎移植入假孕母体。待生育后，子代就是特异化的了。从这些转基因化的小鼠中提取基因组 DNA，可以用来检查 x 基因在这个种系中的整合稳定性。同时利用转化基因的小鼠，还可研究该基因在宿主中的效应和表达调节作用。尽管单一的基因能在多种宿主细胞上（如不同的组织）进行研究，然而，用细胞培养研究该基因的复制在某种程度上是非常困难的；另外，也可对

它的组织分化和发育过程中特化基因调节进行研究。总之，它们的性质可以在整个动物体内进行探索。

本书所描述的技术方法，对脊椎动物表达的系统研究提供了基础。当然，以上实验都有一定难度，可是，一旦将其掌握，就成为研究者了解生物系统功能的有力工具。本书涉及的范围可以从简单的 DNA 分离到较为复杂地将外源 DNA 置入宿主动物的基因组中。同样，实验设备也可以从一般的实验室工具到很复杂的精密仪器。用这些方法，可以确定某些已知疾病的生理反应，生化机理和细胞过程的基因基础。这些工具也正在用于生物技术产品的生产，包括新的有效的治疗、诊断用品，和其他有价值的生物医学产品。