



全国高技术重点图书·生物技术领域

分子克隆

实验指南

第二版

〔美〕J·萨姆布鲁克 E·F·弗里奇 T·曼尼阿蒂斯 著

科学出版社

Q7-33
SMB.2

分子克隆

实验指南

第二版

[美] J. 萨姆布鲁克 E. F. 弗里奇 T. 曼尼阿蒂斯 著

金冬雁 黎孟枫 等 译

侯云德 等 校



4X35/08



A0022254

科学出版社

1992

(京)新登字 092 号

内 容 简 介

本书根据美国冷泉港实验室出版社的《分子克隆实验指南》第二版译出,全面介绍分子克隆技术的基本原理与操作程序,是国际通用的权威的分子生物学实验室手册,也是当今生命科学领域的重要工具书。原书篇幅为初版的3倍,共分18章,其中有11章是新增加的,原有各章也经过全面改写与更新,充分反映了近年分子克隆技术的飞速发展。尤其是有关DNA测序、聚合酶链式反应、克隆化基因的诱变、克隆化基因在哺乳动物细胞中的表达,以及基因表达产物的检测与分析等章节内容十分丰富。书后除有原书附录和索引之外,为方便国内读者,还增加了注射针基本尺寸表、专有名词详解、英汉基因工程词汇等译者增编附录。可供生物学、分子生物学、生物化学、生物技术、医药卫生,以及农、林、牧等方面有关的科研、教学与技术人员参考。

J. Sambrook E. F. Fritsch T. Maniatis

MOLECULAR CLONING

A Laboratory Manual

2nd ed

Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989

分 子 克 隆

实 验 指 南

第 二 版

(美) J. 萨姆布鲁克 E. F. 弗里奇 T. 曼尼阿蒂斯 著

金冬雁 黎孟枫 等 译

侯云德 等 校

责任编辑 刘 安 何伟华

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100707

北京理工大学印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

1986年2月第一版 开本:787×1092 1/16

1992年10月第二版 印张:69 1/4

1992年10月第一次印刷 插页:2

报纸 1-8 960

印数: 道林 1-1 040 字数:1 574 000

ISBN 7-03-002808-2/Q·372(报)

ISBN 7-03-002991-7/Q·398(道)

定价: 报纸精装 45.00 元
道林精装 75.00 元

《全国高技术重点图书》出版指导委员会

主任:朱丽兰

副主任:刘 杲 卢鸣谷

委员:(以姓氏笔划为序)

王大中	王为珍	王守武	牛田佳	卢鸣谷
叶培大	刘 仁	刘 杲	朱丽兰	孙宝寅
师昌绪	任新民	杨牧之	杨嘉墀	陈芳允
陈能宽	张钰珍	张效详	罗见龙	周炳琨
欧阳莲	赵忠贤	顾孝诚	谈德颜	龚 刚
梁祥丰				

总干事:罗见龙 梁祥丰

《全国高技术重点图书·生物技术领域》编审委员会

主任:顾孝诚

委员:(以姓氏笔划为序)

陈受宜	邹承鲁	罗见龙	范云六
侯云德	曾建飞		

中 译 本 序

生物技术是指对于有机体的操作技术,它从史前时代起就一直为人们所开发利用,造福于人类。1953年 Watson 和 Crick 阐明了脱氧核糖核酸的双螺旋结构,从而开辟了分子生物学的新纪元。DNA 重组技术或基因工程被认为是 20 世纪生物学一项最伟大的成就,也是当今新技术革命的重要组成部分。目前,这项新技术已经渗透到生命科学的各个领域,例如基因工程应用于农业科学研究,促进了新的绿色革命;基因工程应用到医学科学研究,兴起了生物治疗、基因治疗等新领域。我国“863”高技术研究发展计划把生物技术放在重要地位,足见生物技术对我国科学发展的重要性。

本书原著是一部现代生物技术的权威性著作,首版于 1982 年发行。1989 年底的再版本,不仅在内容上增加了两倍,而且全面概括了当代分子生物学从基本原理到技术方法上的主要成就和最新进展,实为关于分子克隆原理和操作的代表性著作,也是从事生命科学研究工作的广大科技人员的必备手册。

金冬雁、黎孟枫等同志承担了本书的全部翻译工作。他们都是在读的分子病毒学博士研究生,在完成极其繁重的科研任务的同时,能利用业余时间翻译这部巨著,实在难能可贵。这说明他们有强烈的事业心、坚强的毅力和献身精神。本书译者全部是处于实验室工作第一线的年轻同志,各自在专项生物技术方面积累了丰富的实践经验。可以说,这部著作的翻译成功是病毒基因工程国家重点实验室青年同志集体劳动和集体智慧的结晶。中译本在内容上忠实于原著,文字流畅。译者对书中新名词的翻译,反复推敲,再三斟酌,表现出在科学上一丝不苟的严谨态度和对读者的高度责任感。从这部巨著的翻译中可以看到我国年轻一代科技工作者的成长和他们的才干,令人欣慰。

我相信这部中译本的出版,无疑将对我国生物技术领域高科技的研究发展及高技术产业的兴起,起到应有的推动作用。

侯云德

1991 年 4 月于病毒基因工程国家重点实验室,北京

译 者 的 话

冬尽春来,本书的翻译工作历时半年有余,现已基本完成。我们愿于卷首陈明翻译本书的指导思想和过程,以及译文的某些体例,以谕读者。

本书英文原著是一部出类拔萃的科学名著,也是当今世界上引用率最高的科技文献之一。其第一版于1982年由美国冷泉港实验室出版,随即风行全球,成为分子克隆技术方面的经典性著作。

科学出版社于1986年出版了由余茂效教授翻译的本书第一版中译本,对国内分子生物学和基因工程技术的启蒙和发展起到了重要的推动作用。第一版的中译本至今仍供不应求,这说明本书具有强大的生命力,也反映了我国读者对这类图书如饥似渴般的需求。我们既对为之付出辛勤劳动的前辈学者深感钦佩,同时也因此萌生了继续翻译原著第二版的想法。我们认为,这既是病毒基因工程国家重点实验室责无旁贷的任务,也是对该室青年同志的锻炼。

本书原著于1989年底再版后,在内容上充分反映了当代分子生物学和基因工程的研究进展,篇幅比第一版增加了2倍(英文原书分为3册,译著合而为一,但内容不变),其中有11章完全是新增加的内容,而原有各章也经过了全面的改写和更新。在写作风格上,它一方面保持和发扬了第一版的优点,继续详细提供各种技术方法的每一具体步骤、注意事项和疑难解答,注重实用、力尽其详;另一方面又着重介绍有关技术方法的基本原理、背景知识和新近进展,因而以一种清新明快、图文并茂、基本原理与技术方法并举、理论与实际相结合的全新面目出现。我们认为,这部名著不仅是分子克隆技术的实验手册,也是分子克隆原理方面不可多得优秀教科书。

有些同行认为,在分子克隆实验工作中应争取使用原著。我们赞成这样的观点。但我们同时认为,由于分子克隆早已不是一门单纯的技术,而是与多学科多领域相联系、内容博大精深而涉及面广的分子生物学核心研究手段,因此,无论是在分子生物学的学习还是在分子克隆的实验中,无论是为了更好地理解原著精神还是为了使分子克隆技术得到普及并在中国的土地上生根、开花、结果,都迫切需要一部能够充分保持原著风格的译作。为此,我们早在1989年初,就同Maniatis博士联系过本书的翻译工作,并承蒙允诺在本书正式出版前提供原书以组织翻译(可惜由于种种变故而未能实现,致使翻译工作推迟了整整一年)。我们从事本书翻译工作的初衷,是在保持原书的权威性、规范性、严谨性和实用性的基础上,采用丰富多彩的语言并结合中国的实际,明白无误地将原著丰富的精神和内容传递给读者。在翻译工作中,我们力图将这一指导思想贯彻始终。

本书的内容十分新颖,有一些名词在中文正式出版物中前所未见,而为数更多的术语,则中文译名相当混乱,往往令人无所适从。在翻译过程中,适逢全国自然科学名词审定委员会公布由全国遗传学名词审定委员会审定的第一批遗传学名词[《遗传学名词(1989)》,科学出版社,1990年6月]。本书完稿后,全国自然科学名词审定委员会又公布了由全国生物化学名词审定委员会审定的第一批生物化学名词[《生物化学名词(1990)》,科

学出版社,1991年9月]。译文全面使用了这些规范名词,并遵循其命名原则处理了类似或相关的一些定名问题。对本书中出现的化学命名问题,我们均按中国化学会推荐使用的《无机化学命名原则(1980)》和《有机化学命名原则(1980)》进行处理。只有对部分尚未审定统一的名词,我们才按照“尊重‘约定俗成’,严格保持规范”的原则进行取舍或试定。对一些新近出现的疑难名词,例如 CHEF、chromosome crawling、guessmer 等等,我们采取了十分慎重的态度,不但反复斟酌,而且仔细查对了英文原始文献,才试定了它们的译名。为便于读者查考、检索和对比,我们在书末选编了英汉基因工程词汇表(收词 2000 多条),作为译者增编附录四。为方便起见,我们还在词汇表的适当位置上收入了一些本书未予采用但在有关文献中仍时有出现的译名和用法。鉴于目前国内尚未见出版具有权威性的英汉基因工程词书,因此如将上述词汇表与本书的索引结合使用,当可权充分子生物学和基因工程方面的常用词词典。

分子克隆是一项新兴的生物高技术,又同现代产业有着密切的关系,从某种意义上说,它也是一门“舶来”的技术。在分子克隆的技术文献中,专有名词层出不穷,本书当然也不例外。这种情况虽然在所难免,但确实使我国读者倍感不便。对于本书出现的大量专有名词,我们区别不同情况作出了相应的处理。对于正文中出现的所有厂商名称一律保持原貌,以便读者可从附录 G 中查到这些厂商的全称及联系地址。对于带有商标性质的名词,我们一般倾向于既保持商标原英文名,又略附数语,对其性质加以说明。例如“Saran Wrap”译作“Saran 包装膜”、“Scotch Tape”译作“Scotch 胶带”、“Parafilm”译作“Parafilm 膜”等等。只有对个别具有“普遍名词化”倾向的商标,我们才试定译名并采取商标名和译名两头兼顾的处理方案,例如“Sequenase(测序酶)”、“Aprotinin(抑蛋白酶肽)”等。对于某些具有特定含义的人名反应、特殊器材或特指现象,除个别人名已有固定译法(如“Pausteur”译作“巴斯德”)或类似译名已为多数分子生物学工作者所熟悉(如“Cerenkov”译作“切仑科夫”)而可以沿用,或因某些名词已有约定俗成的合理译法(如“Erlenmeyer flask”译成“三角锥瓶”,简称“锥瓶”)而毋庸变更外,我们一般均保持原英文名,仅在必要时略作解释。为了说明某些专有名词的特定含义,特别是为了解答某些商标或特殊器材名称的词源、词义,并在必要和可能的情况下指出其代用品,我们在书末专辟了“专有名词详解”,作为译者增编附录三。该附录是从国内实际情况出发编写的,是对全书译文的补充和注释。读者如在使用本书及其他文献时遇及有关专有名词释义方面的问题,可查阅之。为使读者了解本书及同类文献中采用的注射针规格与其实际外径和孔径的关系,我们还在译者增编附录一中选入注射针基本尺寸表,其中附有与此相关的我国国家标准。

我们一直将“明白无误”视为翻译本书的宗旨,因此我们不但注意在行文的流畅与遣词造句方面精雕细凿,努力达到更高的境界,而且对所有数量表达式进行了严格校对和认真复核。在翻译过程中,我们力求首先吃准吃透原著的内容和精神,为此,每每反复追索原始文献,直至冰释所有疑难。对原著的个别疵漏之处,我们一经发现,便马上予以更正。为了便于读者区分全书的层次及查找引文,我们根据原著的精神为全书增编了章节与条目的序号,并为某些内容增添了“概述”、“引论”、“引言”一类的标题。而对原著中采用暗背景来表示的配方等内容,译著中采用变换字体(中文使用仿宋体而英文使用等线体)的方式加以突出。译著中全面采用了我国法定计量单位,并统一采用这些单位的国际

符号(极个别没有相应符号的无量纲单位,则使用中文)。为此,我们对原著中使用的部分单位进行了必要的转换,对个别仍需使用的非许用单位,均在其后加注相应的法定计量单位值。

本书的翻译工作由侯云德教授领导,由主译组织实施并具体负责全书的通读、再校、统稿和定稿。承担译校任务的人员全部是直接从事实验工作的年轻同志,其中半数以上是在读研究生,而翻译小组的主力是侯云德教授的博士研究生。这种安排既出于抢时间、保质量的考虑,而更主要的是因为我们坚信实验手册应当由实验人员来翻译,每位译校者必须首先在密切相关的研究工作中积累经验,才能胜任翻译工作。本书的翻译从1990年8月正式开始并主要利用业余时间进行。在此同时,绝大多数译校人员都承担了书稿的计算机录入工作。书稿最后由我们两人及李晨、周圆、张励同志承担了计算机排版工作。在此,我们谨向所有参加译校和录入工作并付出艰苦劳动的同事们表示崇高的敬意,谨向不断给予我们鞭策鼓励并不遗余力地帮助我们拾遗补缺以提高翻译质量的科学出版社责任编辑表示衷心的感谢。

这部译著是病毒基因工程国家重点实验室青年同志团结协作的丰硕成果。重点实验室主任、国家“863”高技术研究发展计划生物技术领域专家委员会首席科学家侯云德教授自始至终全力关心和指导翻译工作,并欣然命笔为本书作序,这是导师对我们的爱护和支持,我们深表谢忱。

我们还要感谢:科学出版社及其第二编辑室各级领导对本书翻译和出版工作给予多方面的支持;李载平教授、强伯勤教授、吴淑华教授、余茂效教授和张智清副教授对本书翻译工作给予热情关心和大力支持;方肇寅副教授为翻译工作提供第一部原书,陈受宜教授慷慨为译著的照排制版工作提供样书;陈晓燕、李景源、朱丽辉、韩东方等同志承担了部分文稿的计算机录入工作;华美生物工程公司和中国医学科学院基础医学研究所友谊医学科技开发公司对本书的顺利出版给予大力支持。

这部译著是急就章,而翻译的主力又是学生军。我们囿于知识、能力、精力和水平,囿于对国外分子克隆实验室缺乏感性认识,在翻译过程中疏忽与错漏在所难免。如能得到同行专家和读者的批评指正,我们将不胜感激。

金冬雁 黎孟枫

1991年4月于病毒基因工程国家重点实验室,北京

第二版前言

自从1982年本书第一版出版以来,运用分子克隆技术的人数与日俱增;与此同时,重组DNA操作技术所包括的范围不断扩大,其威力也日益增强。克隆方法的显著激增,可从GenBank DNA序列库中所收入基因序列的条目数上得到反映。1982年所存入的基因序列不足350条,短短不出4年,这一数字就增加到接近5000条,而今天则已超过15000条。这些数字虽然令人咋舌,但仍然远远不足以确切反映目前在克隆化基因的分析方面业已增加的复杂程度。1982年,一些深孚众望的杂志仍然接受只包含cDNA克隆的部分序列的文章。时至今日,要求发表全序列已经不言而喻,而报道cDNA首次克隆的文章往往也要对基因产物在原核或真核细胞中的表达进行一番细致的讨论。大多数情况下,首例报道一经发表,其他利用位点特异性诱变技术研究相应蛋白质结构与功能关系的文章便接踵而来。有关真核基因表达调控元件的克隆与分析研究,其推进的速度也与此相仿,同样令人振奋。

为了反映分子克隆技术的不断扩充和突飞猛进,本书的篇幅增加了2倍,并因此分为3册。第一版中一掠而过的技术,如诱变、克隆化基因在哺乳动物细胞中的表达,以及双脱氧法测序等内容,如今都作了深入讨论;对于聚合酶链式反应扩增DNA等新创立的技术,都另辟新的章节进行了专题介绍;对于作为第一版主体的许多基本方法,都注入了反映目前最新成就的增订和加工润色。我们希望因本书篇幅膨胀而带来的任何不便,都可以由它所增添的丰富内容得到补偿。我们希望第二版能够成为克隆技术行家的工具书和初学者的入门书,成为指导下一代分子克隆研究工作者的实验手册。

分子克隆技术的发展,也随之带来了它的商业化。今天我们可以购置得到各种各样质量过硬而价格合理的试剂和酶。虽然这一发展形势有其十分积极的一面,但也带来了一些令人遗憾的副作用,其中之一就是各种具有特殊克隆用途的成套试剂盒蜂涌出现。尽管这些试剂盒可以减少出现某些轻微的错误,但也容易妨碍实验工作者开动脑筋对所做的工作进行思考。盲目地按照说明书加入2 μ l溶液A,简直易如反掌,操作者完全可以对这一特定试剂的来龙去脉熟视无睹:既无须知其然,也无须知其所以然,完全不必理会为什么要在一个特定的实验步骤加入这一试剂。因此试剂盒无异于在科学上一无所知的玄物,是改进实验技术的障碍。为了遏止这种趋势,我们在本书每章伊始都开门见山地增加了大量的背景材料,并提供充分完备的参考文献,以便使读者无论对实验方案的总体设计还是特殊细节都能一目了然。我们竭力奉劝读者在动手工作之前完整地阅读相应的实验流程,以便能够预先配制试剂,并更加有效地进行实验。

如果没有一大批同道们的帮助和鼓励,本书将不可能写成。我们衷心感谢达拉斯城得克萨斯大学西南医学中心、遗传学研究所、哈佛大学,以及其他许多研究机构的同事们审阅某些章节、提供实验方案并提出种种使本书得到重大改进的有益建议。我们在第二版前言之后专项罗列了所有这些个人及其服务机构。

我们不胜感激旧金山加利福尼亚大学 Rick Myers 和 Alison Cowie 审阅全书各章草

稿,剔除种种令人窘迫的错误,并提出许多富有价值的改进意见;感激冷泉港实验室 Winship Herr 和西南医学中心 Mary-Jane Gething,他们分别起草 DNA 测序和克隆化基因在哺乳动物细胞的表达两章;感激 Judy Campbell 为编写工具酶一章作出重大贡献。我们还要感谢 Mike Ockler 为本版制作了所有示意图,感谢 Carolyn Doyle 汇编了全书的索引。

Nina Irwin 为撰写本书作出了特殊贡献。大肠杆菌菌株总表及多种 λ 噬菌体、质粒、粘粒和 M13 噬菌体的图谱,都是她许多杰作中的一部分。这些图谱是她经过许多个月锲而不舍的艰苦努力,重建和查证各种宿主与载体系谱资料之后绘成的。此外,Nina 还起草了克隆化基因在原核宿主中的表达一章,阅读和检查了全书各章的草稿和校样,并以高度的智慧和娴熟的技巧追索科学文献,核实了本书的许多素材。

我们谨向 Jim Watson 表示谢忱,感谢他对本书的长期关注。正是他的支持,才使本版得以写就。

最后,我们要对本书编辑 Nancy Ford 的出色工作给予高度的评价并致以深深的谢意。两年多来,她孜孜不倦,为使整个计划能够有条不紊地顺利进行并使我们的手稿有所改进而且更加简炼作出了不懈的努力。对 Nancy 及其助手 Michele Ferguson 所给予的鞭策、鼓励、同情和友谊,我们永志难忘。

J. 萨姆布鲁克

E. F. 弗里奇

T. 曼尼阿蒂斯

(金冬雁译 黎孟枫校)

鸣 谢

Ed Alderman, Genetics Institute
Patricia Ashley, University of Texas Southwestern Medical Center
Margaret Baron, Harvard University
Frank Baas, Harvard University
Phil Bird, University of Texas Southwestern Medical Center
Tom Bittick, University of Texas Southwestern Medical Center
Colleen Brewer, University of Texas Southwestern Medical Center
Gene Brown, Genetics Institute
H. Franklin Bunn, Harvard Medical School
Steve Clark, Genetics Institute
Preston Dunnmon, University of Texas Southwestern Medical Center
Anne Ephrussi, Harvard University
Henry Erlich, Perkin Elmer Cetus
Chen-Ming Fan, Harvard University
Ken Ferguson, Cold Spring Harbor Laboratory
Bill Garrard, University of Texas Southwestern Medical Center
Bob Gerard, University of Texas Southwestern Medical Center
Gary Gilliland, Harvard Medical School
Doug Hanahan, University of California, San Francisco
Ed Harlow, Cold Spring Harbor Laboratory
Jean Henneberry, University of Texas Southwestern Medical Center
Bill Huse, Stratagene
David Ish-Horowicz, Imperial Cancer Research Fund
David Israel, Genetics Institute
Randy Kaufman, Genetics Institute
Andrew Keller, Harvard University
John Knopf, Genetics Institute
Steve Lacey, University of Texas Southwestern Medical Center
Ray MacDonald, University of Texas Southwestern Medical Center
Ed Madison, University of Texas Southwestern Medical Center
Mike Mathews, Cold Spring Harbor Laboratory
Michael McClelland, University of Chicago
John McCoy, Genetics Institute
Steve McKnight, Carnegie Institution of Washington
Doug Melton, Harvard University
Alan Michelson, Harvard University
George Morris, Genetics Institute
Michael Nelson, University of Chicago
Robin Reed, Harvard University
Rich Roberts, Cold Spring Harbor Laboratory
Laura Roman, University of Texas Southwestern Medical Center
Susan Rosenberg, University of Utah
David Russell, University of Texas Southwestern Medical Center
Brian Seed, Harvard Medical School
Conrad Seghers, University of Texas Southwestern Medical Center
Mark Segal, University of Texas Southwestern Medical Center
Chuck Shoemaker, Harvard School of Public Health
Huda Shubeita, University of Texas Southwestern Medical Center
Harinder Singh, University of Chicago
Beth Smith, Information Center, Genetics Institute
Joe Sorge, Stratagene
Lisa Sultzman, Genetics Institute
Galvin Swift, University of Texas Southwestern Medical Center
Patty Temple, Genetics Institute
Jeff Vieira, Rutgers University
Geoff Wahl, Salk Institute
Steve Wasserman, University of Texas Southwestern Medical Center
Gordon Wong, Genetics Institute
Rick Young, Massachusetts Institute of Technology
Jian-Hua Zhang, University of Texas Southwestern Medical Center
Mark Zoller, Genentech

第一版前言

本书的雏形是 1980 年冷泉港真核基因分子克隆讲习班所用实验方案的汇编。这些实验方案当时在我们实验室沿用已久,只是散落在许多不同人士的笔记当中。1981 年我们决定编著一本更为完整也更能反映最新进展的实验指南,不仅可用于下届冷泉港讲习班,也可供最终出版。我们斟酌了当时所用方法的种种变通方案,从中汇集出一套能被普遍接受的流程。甚至 1981 年的讲习班尚在进行之中,这套流程就已被复印并在许多实验室广为流传。此后在 1981 年冬至 1982 年,又对这部实验指南进行了大规模的改写,既增添了新的或经过修订的方案和插图,也加入了全新的篇章。

然而,即使从最后一次改写以来,这一领域也有不少新的进展:新的方法不断创立,已有的技术亦适应不断变化的现实需要而得到改进。虽然本书只收入了在我们实验室久经考验、屡获成功的实验方案,但我们从未宣称这些方法是不可违背或者是完美无缺的。我们欢迎提出改进意见,如能惠赐所设计的新方案,我们将感激不已。

种种实验方法从无到有、从简单到复杂的发展变迁,往往使我们难以弄清它们的发明权。我们尽量在正文适当位置一一指出所收入实验方法的创立者,但在许多情况下已不可能追本溯源,去确定某一特定实验方法无可争议的出处。因此对那些提出有关构思、流程与配方而本书未予提及的作者,我们谨致歉意并深表谢忱。我们的主要职责在于汇编、查证,并希望做到去粗存精,阐明真谛。我们偶尔才进行一些修改,只在极少数情况下提出过新方案。因此本书内容大部分都建立在他人发展起来的各种方法之上,任何褒奖都应当属于他们。

由于编写本书的初衷是为那些在分子克隆方面缺少经验的工作者提供指南,因此收入了较多的基础知识和方法。但本版也对当今用于分子克隆的几乎每一件实验室工作都进行了深入浅出的介绍。因此,我们希望无论是分子克隆技术方面的初学者还是行家里手都同样会从本书中找到有价值的资料。

分子克隆实验若纸上谈兵,似乎轻而易举;但要付诸实践,却又举步维艰,谈何容易。大多数实验都是步骤繁多,若一着不慎,即会陷入困境。验证每步产物,设置对照以检查每一反应的效率,都是可取的良策。而要对上述种种问题应付自如,又必须透彻理解每一实验流程所涉及的原理。为此,我们提供了一些背景知识和参考文献,一旦读者遇到困难,便能有所裨益。

如果没有我们实验室同事们的帮助和建议,没有许许多多同道的支持,本书将不可能写成。我们为此对 Joan Brooks, John Fiddes, Mary-Jane Gething, Tom Gingeras, David Goldberg, Steve Hughes, David Ish-Horowicz, Mike Mathews, Patty Reichel, Joe Sorge, Jim Stringer, Richard Treisman 和 Nigel Whittle 表示衷心的感谢。我们尤其感激:Arg Efstratiadis 对第七章所进行的有益探讨和批评指正;Brian Seed 惠许我们收入他尚未发表的利用重组来筛选 DNA 文库的实验方法(第十章),并提出其他许多有益建议;Doug Hanahan 关于转化方面的建议(第八章);Bryan Roberts 关于杂交选择及 cDNA 克

隆方法的建议; Doug Melton 提供注射非洲爪蟾(*Xenopus*)卵母细胞的实验方法; Ronni Greene 对许多实验方案提出改进意见; Nina Irwin 精心汇集并且订正现有各种在细菌中表达真核细胞蛋白的方法(第十二章); Rich Roberts 提供 pBR322 序列的计算机分析; Barbara Bachmann 和 Ahmad Bukhari 检查并修正大肠杆菌菌株汇总表,以及 Tom Broker, Louise Chow, Jeff Engler 和 Jim Garrels 提供用于本书封面和封底的精美照片。

我们还要感谢 1980 和 1981 年冷泉港分子克隆讲习班的所有参加人员。就是这群优秀的学员克服困难,率先试用了本实验指南的最初两部草稿,并提出了许多有益的建议。我们也感谢 Nancy Hopkins 帮助我们讲授第一期讲习班,并鼓励我们编写实验指南。1981 年, Doug Engel 帮助授课,并对实验指南提出了许多改进意见。此外,为两期讲习班顺利举行而努力作出贡献的还有几位助教,其中 1980 年夏季有 Catherine O'Connell 和 Helen Doris Keller, 1981 年有 Susan Vande-Woude, Paul Bates 和 Michael Weiss。

我们感谢 Patti Barkley 和 Marilyn Goodwin 不厌其烦,乐于为我们打印不断修改的手稿;感谢美工师 Fran Cefalu 和 Mike Ockler 不辞劳苦地为本书制作插图;感谢 Joan Ebert 悉心掌握许多参考文献从正文中增删的线索,并汇编出参考文献总表。我们还要感谢冷泉港实验室出版主任 Nancy Ford 的鼓励和支持。最后需要指出,如果没有 Doug Owen 的耐心、技巧及其交际能力,没有他为我们整理付印书稿并在其他许多方面提供帮助,本书将不可能问世。

T. 曼尼阿蒂斯

E. F. 弗里奇

J. 萨姆布鲁克

(金冬雁译 黎孟枫、林 枫校)

目 录

中译本序	(1)
译者的话	(3)
第二版前言	(7)
鸣谢	(9)
第一版前言	(11)
第一章 质粒载体	1
第一节 质粒的基本特性	1
(一) 复制能力和不相容性	1
(二) 转移性	3
(三) 选择标记	4
第二节 质粒载体	5
一、质粒克隆载体的发展	5
(一) 可用组织化学方法鉴定重组克隆的质粒载体	6
(二) 带有单链噬菌体复制起点的质粒载体	6
(三) 带有噬菌体启动子的质粒载体	7
(四) 可对重组克隆进行正选择的质粒载体	7
(五) 质粒表达载体	7
二、通常使用的质粒载体	7
1. pBR322	8
2. pUC18, pUC19	8
3. pUC118, pUC119	9
4. pSP64, pSP65, pGEM-3, pGEM-3Z, pGEM-3Zf(-), pGEM-4, pGEM-4Z	10
5. π AN13	15
6. Bluescript M13+, M13-	15
第三节 质粒 DNA 的提取和纯化	16
一、导论	16
(一) 细菌培养物的生长	17
(二) 细菌的收获和裂解	17
(三) 质粒 DNA 的纯化	18
二、质粒 DNA 的小量制备	19
(一) 细菌的收获和裂解	19
1. 收获	19
2. 碱裂解法	19
3. 煮沸裂解	22

(二) 质粒 DNA 小量制备的问题与对策	23
(三) 细菌菌落的快速裂解及质粒大小的检查	23
三、质粒 DNA 的大量制备	24
(一) 在丰富培养基中扩增质粒	24
(二) 细菌的收获和裂解	24
1. 收获	24
2. 煮沸裂解法	25
3. SDS 裂解法	25
4. 碱裂解法	26
四、质粒 DNA 的纯化	28
(一) 聚乙二醇沉淀法纯化质粒 DNA	28
(二) 氯化铯-溴化乙锭梯度平衡离心法纯化闭环 DNA	28
1. 连续梯度	28
2. 不连续梯度	30
(三) 从经过纯化的质粒 DNA 中去除溴化乙锭	31
1. 方法 I: 有机溶剂抽提	31
2. 方法 II: 离子交换层析	31
(四) 溴化乙锭溶液的净化处理	32
1. 溴化乙锭浓溶液(即浓度 > 0.5 mg/ml 的溴化乙锭溶液)的净化处理	32
2. 溴化乙锭稀溶液(如含有 0.5 μg/ml 溴化乙锭的电泳缓冲液)的净化处理	33
(五) 从质粒 DNA 制品中去除 RNA	33
1. 通过 1 mol/L NaCl 进行离心	34
2. 通过 Bio-Gel A-150m 或 Sepharose-CL 4B 进行层析	34
第四节 在质粒载体中进行克隆的策略	34
一、连接反应的策略	35
(一) 外源 DNA 片段末端的性质	35
1. 带有非互补突出端的片段	35
2. 带有相同末端(平端或粘端)的片段	37
3. 带有平端的片段	40
(二) 质粒载体和外源 DNA 中限制酶切位点的性质	40
二、线状质粒 DNA 的去磷酸化	40
(一) 去磷酸化	40
(二) 连接预试验和转化	41
三、连接反应	42
(一) 外源 DNA 和质粒载体的连接反应	42
(二) 粘端连接	46
(三) 平端 DNA 连接	47
1. 囊聚剂	47
(四) 质粒载体中的快速克隆	48

第五节 大肠杆菌感受态细胞的制备和转化	49
(一) 高压电穿孔法转化大肠杆菌(电转化法)	50
(二) 方案一: 制备新鲜或冷冻的大肠杆菌感受态细胞	50
(三) 方案二: 用氯化钙制备新鲜的大肠杆菌感受态细胞	55
第六节 含重组质粒的细菌菌落的鉴定	56
一、小规模制备质粒 DNA 进行限制酶切分析	57
二、 α 互补	57
(一) α 互补现象的检查	57
三、插入失活	60
四、杂交筛选	60
(一) 将少数菌落转移到硝酸纤维素滤膜上	61
(二) 将菌落影印在硝酸纤维素滤膜上	62
1. 方法 I	62
2. 方法 II	64
(三) 菌落的裂解及 DNA 结合于硝酸纤维素滤膜	65
1. 方法 I	65
2. 方法 II	65
(四) 与菌落的影印滤膜进行杂交	66
参考文献	69
第二章 λ 噬菌体载体	75
第一节 λ 噬菌体的分子生物学	75
一、裂解周期	75
(一) 吸附	75
(二) 立即早期转录	77
(三) 延迟早期转录	77
(四) DNA 复制	77
(五) 晚期转录	77
(六) 噬菌体的组装	79
(七) 裂解	80
二、溶源状态	80
第二节 λ 噬菌体载体	80
一、 λ 噬菌体载体的构建简史	80
二、选择适当的 λ 噬菌体载体	81
三、 λ 噬菌体载体的图谱	84
(一) Charon 4A、Charon 21A、Charon 32—35 和 Charon 40 载体	84
1. Charon 4A	86
2. Charon 21A 载体	88
3. Charon 32 载体	90
4. Charon 33 载体	92

5. Charon 34 和 Charon 35 载体	94
6. Charon 40 载体	98
(二) EMBL3、EMBL4 和 EMBL3A 载体	100
(三) λ 2001、 λ DASH 和 λ FIX 载体	102
1. λ 2001 载体	102
2. λ DASH 和 λ FIX 载体	104
(四) λ gt10 载体	108
(五) λ gt11 和 λ gt18—23 载体系列	108
1. λ gt11 载体	110
2. λ gt18 和 λ gt19 载体	112
3. λ gt20 和 λ gt21 载体	114
4. λ gt22 和 λ gt23 载体	116
(六) λ ORF8 载体	118
(七) λ ZAP 载体	120
1. λ ZAP/R 载体	122
四、选择适于 λ 噬菌体载体的宿主	123
(一) 限制与修饰	123
(二) 琥珀突变抑制基因	123
(三) 重组系统	123
第三节 λ 噬菌体的培养、纯化和 DNA 提取	127
一、 λ 噬菌体的噬斑纯化	127
(一) 铺平板细菌的制备	127
(二) λ 噬菌体的铺平板培养	127
(三) 挑取 λ 噬菌体噬斑	128
二、从单斑制备 λ 噬菌体原种	129
(一) 平板裂解物原种	129
1. 平板裂解物原种的制备:方法 I	129
2. 平板裂解物原种的制备:方法 II	130
(二) 小规模液体培养	131
(三) λ 噬菌体原种的长期贮存	131
三、 λ 噬菌体的大规模制备	132
1. 低复数感染法	132
2. 高复数感染法	133
四、 λ 噬菌体的纯化	133
(一) λ 噬菌体纯化的标准方法	133
(二) λ 噬菌体纯化的其他方法	136
1. 沉淀噬菌体颗粒	136
2. 甘油分级梯度离心	136
3. 氯化铯平衡离心	137