

# 重组DNA的 原理和方法

# 重组 DNA 的原理和方法

The Principles and Methods of  
Recombinant DNA

李德葆 徐 平 主编

浙江科学技术出版社

(浙)新登字第 3 号

责任编辑 李卓凡

封面设计 詹良善

**重组 DNA 的原理和方法**

李德葆 徐 平 主编

\*

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 31.5 字数 80 000

1994 年 5 月 第一版

1994 年 5 月第一次印刷

ISBN 7-5341-0619-2/Q·19

---

定 价: 38.00 元

## 内 容 简 介

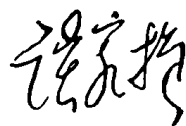
本书全面系统地介绍了重组 DNA 常用实验的原理和方法,比较了各种方法的优劣,列举了在实验中经常遇到的问题及解决办法,可供实验者参考和不断改进。许多方法配有插图,便于读者掌握。书中还收集了许多当今世界上的最新方法和技术,并附有参考文献,读者可根据需要进行查找。全书共分十三章,内容包括分子克隆的工具酶、凝胶电泳、常用载体、DNA 的制备、RNA 的制备和分析、DNA 文库的构建、重组 DNA 导入宿主、基因表达、利用核酸方法筛选鉴定重组子、蛋白质检测和分析、核酸测序、定位诱变和聚合酶链反应。书中附有大量参考资料,不失为一本极有价值的参考书和工具书。

本书可供生物技术、分子生物学、生物化学、生物物理、微生物、遗传学、医学及其他与重组 DNA 有关学科的研究工作者和大专院校的师生作为教材和参考书。

# 序

生物技术是与信息技术、材料技术并列的三大新技术之一。生物技术尤其是重组 DNA 技术正日益渗透到生物学的各个分支。新的资料迅速积累,新的方法不断涌现,其发展之迅速、涉及之广泛、研究之深入令人瞩目。在我国,生物技术也迅速发展,它已被列为国家“863”高新技术和“八五”计划的一项重要研究内容。随着国民经济的发展,在下个世纪——人称“生物学世纪”中,相信我国的生物技术必将获得更大的发展,赶上世界生物科学研究的先进水平。

“工欲善其事,必先利其器”。随着生命科学的发展,越来越多的科学工作者将利用重组 DNA 技术进行研究,同时重组 DNA 技术也日新月异,逐步完善。为了适应形势发展需要,李德葆和徐平同志主编了这本书,他们比较全面扼要地介绍了重组 DNA 技术的原理和方法,并在阐述原理的同时还比较了各种方法的优劣,列举了工作中可能遇到的问题及解决办法。该书内容丰富,方法新颖,是我国当前比较系统地介绍重组 DNA 技术的一本著作,具有较高的学术价值。它的出版无疑将有助于我国生物技术的研究和发展,为促进我国的科学技术事业作出应有的贡献。因此我很高兴地向读者推荐该书,希望广大读者在参考该书的同时,勇于探索,不断创新,为促进我国生物技术事业的发展而努力。



1993 年 4 月

# 前 言

随着分子生物学的发展,重组 DNA 技术越来越多地渗入到生物学各学科,极大地促进了这些学科的发展。重组 DNA 技术在与这些学科结合的同时,也丰富了其自身的内容,出现了一系列新技术和新方法,建立了一套更完善的现代分子生物学研究技术体系。科学家们预测,下个世纪生物学研究将有较大的发展。自然科学研究经历了物理、化学的鼎盛时期后,人们正在逐步揭开更复杂的生命现象的奥秘。所以,掌握重组 DNA 技术和方法,对于生物学工作者来说十分重要。

本书主要介绍重组 DNA 的原理和方法,全书共分十三章,包括分子克隆的工具酶、凝胶电泳、常用载体、DNA 的制备和分析、RNA 的制备、DNA 文库的构建、重组 DNA 导入宿主、基因表达、核酸方法筛选鉴定重组子、蛋白质检测和分析、核酸测序、定位诱变和聚合酶链反应(PCR)。它简明扼要地介绍了许多方法的原理和步骤,归纳了各种方法的特点,比较它们的优劣,并列举了实验中的常见问题和解决办法。读者可根据需要选用合适的方法进行实验,还可根据文献查找更详细的资料。在编写过程中,我们除介绍一些基本方法外,还尽量加入近几年发展的新方法和新技术,例如聚合酶链反应、精简 DNA 文库和脉冲凝胶电泳等,以反映重组 DNA 技术的最新发展。

本书由李德葆和徐平同志主编,参加编写工作的还有:朱伟光、孟征、李世君、陈雄风、钟静萍、陈卫良、余旭平、陈国强、陈集双。另外,许多老师和同学也提出了许多宝贵的意见。在编写过程中,浙江科技出版社的同志给予了大力支持,我们在此表示感谢。

限于编者的水平与经验,书中的缺点与错误在所难免,竭诚希望读者诸君批评指正。

编 者

1993 年 3 月

## 常用名词缩写

|       |                                                        |                        |
|-------|--------------------------------------------------------|------------------------|
| A     | adenosine                                              | 腺苷                     |
| AMV   | avian myeloblastosis virus                             | 禽成髓细胞瘤病毒               |
| Ap    | ampicillin                                             | 氨苄青霉素                  |
| BAP   | bacterial alkaline phosphatase                         | 细菌碱性磷酸酶                |
| BCIP  | 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate                   | 5'-溴-4-氯-3-吲哚磷酸        |
| bp    | base pair(s)                                           | 碱基对                    |
| BSA   | bovine serum albumin                                   | 牛血清白蛋白                 |
| C     | cytidine                                               | 胞苷                     |
| CAT   | chloramphenicol acetyltransferase                      | 氯霉素乙酰基转移酶              |
| cDNA  | complementary DNA                                      | 互补 DNA                 |
| cfu   | colony forming unit                                    | 菌落形成单位                 |
| CHEF  | contour-clamped homogeneous field electrophoresis      | 等高均匀电场电泳               |
| CHO   | Chinese hamster ovary                                  | 中国仓鼠卵巢                 |
| CIP   | calf intestinal alkaline phosphatase                   | 小牛肠碱性磷酸酶               |
| Cm    | chloramphenicol                                        | 氯霉素                    |
| cos   | cohesive site                                          | 粘性位点                   |
| cpm   | counts per minute                                      | 每分钟计数                  |
| Da    | dalton                                                 | 道尔顿                    |
| DEAE  | diethylaminoethyl                                      | 二乙氨基乙基                 |
| DEPC  | diethyl pyrocarbonate                                  | 焦碳酸二乙酯                 |
| DMSO  | dimethyl sulfoxide                                     | 二甲基亚砷                  |
| dpm   | disintegrations per minute                             | 每分钟衰变                  |
| DTT   | dithiothreitol                                         | 二硫苏糖醇                  |
| EDTA  | ethylene diaminetetraacetic acid                       | 乙二胺四乙酸                 |
| EGTA  | ethyleneglycol bis (2-aminoethylether)tetraacetic acid | 乙二醇双(2-氨基乙醚)四乙酸        |
| ELISA | enzyme-linked immunosorbent assay                      | 酶联免疫吸附测定               |
| EMBL  | European Molecular Biology Laboratory                  | 欧洲分子生物学实验室             |
| G     | guanosine                                              | 鸟苷                     |
| G418  | geneticin 418                                          | 遗传素 418, 氨基糖苷类抗生素      |
| HAT   | hypoxanthine, aminopterin and thymidine medium         | 次黄嘌呤, 氨基蝶呤和胸苷培养基       |
| HEPES | N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid    | N-2-羟乙基哌嗪-N'-2-乙磺酸     |
| HGPRT | hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase        | 次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶        |
| HPLC  | high-performance liquid chromatography                 | 高效液相色谱                 |
| HRP   | horseradish peroxidase                                 | 辣根过氧化物酶                |
| IgG   | immunoglobulin G                                       | 免疫球蛋白 G                |
| IPTG  | isopropylthio- $\beta$ -D-galactoside                  | 异丙基硫代- $\beta$ -D-半乳糖苷 |

|        |                                                    |                               |
|--------|----------------------------------------------------|-------------------------------|
| IS     | insertion sequence                                 | 插入序列                          |
| kb     | kilobase                                           | 千碱基                           |
| Km     | kanamycin                                          | 卡那霉素                          |
| LB     | Luria-Bertani                                      | LB 培养基                        |
| LTR    | long terminal repeat                               | 长末端重复序列                       |
| MES    | 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid               | 2-(N-吗啉代)乙磺酸                  |
| Neo    | neomycin                                           | 新霉素                           |
| nt     | nucleotide                                         | 核苷酸                           |
| ORF    | open reading frame                                 | 开读框                           |
| ori    | origin of DNA replication                          | DNA 复制起点                      |
| PAGE   | polyacrylamide gel electrophoresis                 | 聚丙烯酰胺凝胶电泳                     |
| PBS    | phosphate-buffered saline                          | 磷酸缓冲盐溶液                       |
| PCR    | polymerase chain reaction                          | 聚合酶链反应                        |
| PEG    | polyethylene glycol                                | 聚乙二醇                          |
| PFGE   | pulsed field gel electrophoresis                   | 脉冲凝胶电泳                        |
| pfu    | plaque forming unit                                | 噬菌斑形成单位                       |
| PIPES  | piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid)         | 六氢吡啶-N,N'-双(2-乙醇磺酸)           |
| PMSF   | phenylmethylsulfonyl fluoride                      | 苯甲基磺酰氟                        |
| RF DNA | replicative form DNA                               | 复制型 DNA                       |
| RFLP   | restriction fragment length polymorphism           | 限制性片段长度多态性                    |
| RIA    | radioimmunoassay                                   | 放射免疫测定                        |
| SD     | Shine-Dalgarno                                     | SD 序列                         |
| SDS    | sodium dodecyl sulfate                             | 十二烷基磺酸钠                       |
| SSB    | single-stranded DNA binding protein                | 单链 DNA 结合蛋白                   |
| Str    | streptomycin                                       | 链霉素                           |
| SV40   | simian virus 40                                    | 猴病毒 40                        |
| T      | thymidine                                          | 胸苷                            |
| TCA    | trichloroacetic acid                               | 三氯醋酸                          |
| TEMED  | N,N,N',N'-tetra methyl ethylene diamine            | N,N,N',N'-四甲基乙二胺              |
| Tet    | tetracycline                                       | 四环素                           |
| Tm     | melting temperature                                | 解链温度                          |
| TMACl  | tetramethylammonium chloride                       | 氯化四甲铵                         |
| Tn     | transposon                                         | 转座子                           |
| Tris   | tris(hydroxymethyl) aminomethane                   | 三(羟甲基)氨基甲烷                    |
| X-gal  | 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside | 5-溴-4-氯-3-吲哚- $\beta$ -D-半乳糖苷 |
| XGPRT  | xanthine-guanine phospho-ribosyl transferase       | 黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶                |
| YAC    | yeast artificial chromosome                        | 酵母人工染色体                       |

# 目 录

## 常用名词缩写

## 第1章 分子克隆的工具酶

|                                     |    |
|-------------------------------------|----|
| 1.1 限制酶                             | 1  |
| 1.1.1 限制酶的发现和命名                     | 1  |
| 1.1.2 I型和II型限制酶                     | 2  |
| 1.1.3 III型限制酶                       | 2  |
| 1.1.4 DNA甲基化                        | 6  |
| 1.1.4.1 用常用的 <i>E. coli</i> 菌株进行甲基化 | 6  |
| 1.1.4.2 用甲基化酶进行甲基化                  | 8  |
| 1.1.4.3 甲基化对DNA图谱分析的影响              | 16 |
| 1.1.5 限制酶酶切反应                       | 17 |
| 1.1.5.1 酶切反应注意事项                    | 17 |
| 1.1.5.2 酶切反应                        | 21 |
| 1.1.5.3 酶切反应中常见问题                   | 22 |
| 1.1.5.4 酶切产物的连接                     | 24 |
| 1.2 分子克隆中的其他酶                       | 25 |
| 1.2.1 酶的用途及反应条件                     | 25 |
| 1.2.2 连接酶                           | 28 |
| 1.2.2.1 T4 DNA连接酶                   | 28 |
| 1.2.2.2 <i>E. coli</i> DNA连接酶       | 29 |
| 1.2.2.3 T4 RNA连接酶                   | 29 |
| 1.2.3 聚合酶                           | 29 |
| 1.2.3.1 DNA聚合酶I                     | 30 |
| 1.2.3.2 Klenow片段                    | 31 |
| 1.2.3.3 T4 DNA聚合酶                   | 32 |
| 1.2.3.4 T7 DNA聚合酶                   | 33 |
| 1.2.3.5 修饰的T7 DNA聚合酶                | 33 |
| 1.2.3.6 Taq DNA聚合酶                  | 33 |
| 1.2.3.7 DNA末端转移酶                    | 34 |
| 1.2.3.8 反转录酶                        | 34 |
| 1.2.3.9 <i>E. coli</i> RNA聚合酶       | 36 |
| 1.2.3.10 噬菌体SP6、T7和T3 RNA聚合酶        | 36 |
| 1.2.3.11 多聚(A)聚合酶                   | 37 |
| 1.2.3.12 鸟苷酸转移酶                     | 37 |
| 1.2.4 核酸酶                           | 37 |
| 1.2.4.1 绿豆核酸酶                       | 37 |
| 1.2.4.2 核酸酶S1                       | 37 |
| 1.2.4.3 核酸外切酶III                    | 38 |
| 1.2.4.4 DNA酶I                       | 38 |

|                            |    |
|----------------------------|----|
| 1.2.4.5 核酸酶BAL31           | 39 |
| 1.2.4.6 $\lambda$ 噬菌体核酸外切酶 | 39 |
| 1.2.4.7 $\lambda$ 末端酶      | 40 |
| 1.2.4.8 尿嘧啶N-糖基酶           | 40 |
| 1.2.4.9 RNA酶H              | 40 |
| 1.2.4.10 RNA酶A             | 40 |
| 1.2.4.11 RNA酶T1            | 41 |
| 1.2.5 激酶和磷酸酶               | 41 |
| 1.2.5.1 T4多核苷酸激酶           | 41 |
| 1.2.5.2 碱性磷酸酶              | 42 |
| 1.2.5.3 氯霉素乙酰转移酶           | 42 |
| 1.2.6 DNA结合蛋白              | 42 |
| 1.2.6.1 单链DNA结合蛋白(SSB)     | 42 |
| 1.2.6.2 RecA蛋白             | 43 |
| 1.2.6.3 拓扑异构酶I             | 43 |
| 第2章 凝胶电泳                   |    |
| 2.1 影响凝胶电泳迁移率的因素           | 44 |
| 2.1.1 样品                   | 44 |
| 2.1.2 电场                   | 44 |
| 2.1.3 电泳环境                 | 44 |
| 2.2 凝胶电泳的类型                | 45 |
| 2.2.1 琼脂糖凝胶电泳              | 45 |
| 2.2.1.1 琼脂糖凝胶性质            | 45 |
| 2.2.1.2 电泳装置               | 45 |
| 2.2.1.3 电泳缓冲液              | 46 |
| 2.2.1.4 凝胶浓度的选择            | 46 |
| 2.2.2 聚丙烯酰胺凝胶电泳            | 46 |
| 2.2.2.1 聚丙烯酰胺凝胶的性质         | 46 |
| 2.2.2.2 电泳装置               | 47 |
| 2.2.2.3 凝胶浓度的选择            | 47 |
| 2.3 DNA琼脂糖凝胶电泳             | 48 |
| 2.3.1 常规琼脂糖凝胶电泳            | 48 |
| 2.3.2 微型琼脂糖凝胶电泳            | 49 |
| 2.3.3 碱性琼脂糖凝胶电泳            | 50 |
| 2.3.4 脉冲凝胶电泳               | 51 |
| 2.3.4.1 脉冲凝胶电泳的原理及装置       | 51 |
| 2.3.4.2 脉冲凝胶电泳DNA的制备       | 53 |
| 2.3.4.3 脉冲电场凝胶电泳           | 54 |
| 2.4 RNA琼脂糖凝胶电泳             | 54 |
| 2.4.1 戊二醛变性电泳              | 55 |

|                            |    |                               |    |
|----------------------------|----|-------------------------------|----|
| 2.4.2 甲醛变性电泳               | 56 | 3.1.1.2 质粒的不相容性               | 79 |
| 2.5 DNA 聚丙烯酰胺凝胶 DNA 电泳     | 57 | 3.1.1.3 选择标记                  | 79 |
| 2.5.1 未变性聚丙烯酰胺凝胶电泳         | 57 | 3.1.1.4 移动性                   | 80 |
| 2.5.2 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳          | 59 | 3.1.1.5 质粒的分类                 | 80 |
| 2.5.3 聚丙烯酰胺凝胶电泳中的常见问题及解决办法 | 60 | 3.1.1.6 质粒载体的优缺点              | 81 |
| 2.6 RNA 聚丙烯酰胺凝胶电泳          | 61 | 3.1.2 常用筛选方法                  | 81 |
| 2.6.1 非变性圆盘聚丙烯酰胺凝胶电泳分离 RNA | 61 | 3.1.2.1 插入失活筛选                | 81 |
| 2.6.2 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离 RNA    | 62 | 3.1.2.2 $\alpha$ 互补筛选         | 81 |
| 2.6.2.1 甲酰胺凝胶              | 63 | 3.1.2.3 直接筛选                  | 82 |
| 2.6.2.2 尿素凝胶               | 64 | 3.1.2.4 限制酶图谱筛选               | 82 |
| 2.7 蛋白质聚丙烯酰胺凝胶电泳           | 64 | 3.1.2.5 表达筛选                  | 83 |
| 2.7.1 SDS 聚丙烯酰胺不连续凝胶电泳     | 64 | 3.1.2.6 核酸探针筛选                | 83 |
| 2.7.2 非变性不连续凝胶电泳           | 65 | 3.1.3 常用质粒载体图谱                | 84 |
| 2.7.3 蛋白质染色检测              | 66 | 3.1.3.1 pBR322                | 84 |
| 2.7.3.1 考马斯亮蓝染色            | 66 | 3.1.3.2 pUC18                 | 84 |
| 2.7.3.2 银染                 | 66 | 3.1.3.3 pGEM-3Z               | 84 |
| 2.7.3.3 其他蛋白质染色方法          | 67 | 3.1.3.4 pKK223-2              | 84 |
| 2.8 放射自显影和荧光自显影检测          | 68 | 3.1.3.5 pAN13                 | 85 |
| 2.8.1 凝胶干燥                 | 68 | 3.2 $\lambda$ 噬菌体             | 85 |
| 2.8.1.1 SDS 聚丙烯酰胺凝胶的干燥     | 68 | 3.2.1 $\lambda$ 噬菌体的性质        | 85 |
| 2.8.1.2 测序聚丙烯酰胺凝胶的干燥       | 68 | 3.2.1.1 $\lambda$ 噬菌体基因组      | 85 |
| 2.8.1.3 琼脂糖凝胶的干燥           | 69 | 3.2.1.2 裂解生长                  | 86 |
| 2.8.2 放射自显影                | 69 | 3.2.1.3 溶源生长                  | 88 |
| 2.8.2.1 预曝光 X 光片           | 69 | 3.2.1.4 选择 $\lambda$ 噬菌体载体和宿主 | 88 |
| 2.8.2.2 放射自显影              | 69 | 3.2.1.5 $\lambda$ 噬菌体的优缺点     | 90 |
| 2.8.3 荧光自显影                | 69 | 3.2.2 常用筛选方法                  | 90 |
| 2.9 从凝胶中回收和纯化生物大分子         | 70 | 3.2.2.1 $\alpha$ -互补筛选        | 90 |
| 2.9.1 DNA 的回收              | 70 | 3.2.2.2 cI 基因插入失活筛选           | 90 |
| 2.9.1.1 压碎浸泡法              | 70 | 3.2.2.3 Spi 筛选                | 90 |
| 2.9.1.2 透析袋电洗脱法            | 71 | 3.2.2.4 包装片段筛选                | 91 |
| 2.9.1.3 低熔点琼脂糖凝胶法          | 71 | 3.2.2.5 同源重组筛选                | 91 |
| 2.9.1.4 DEAE-纤维素膜法         | 72 | 3.2.2.6 用表达载体筛选               | 92 |
| 2.9.1.5 琼脂糖酶法              | 73 | 3.2.2.7 核酸探针筛选                | 92 |
| 2.9.1.6 回收 DNA 的纯化处理       | 73 | 3.2.3 常用 $\lambda$ 噬菌体载体图谱    | 92 |
| 2.9.2 RNA 的回收              | 74 | 3.2.3.1 卡龙 40                 | 93 |
| 2.9.3 蛋白质的回收               | 75 | 3.2.3.2 EMBL3                 | 93 |
| 2.10 凝胶电泳中常见的问题            | 75 | 3.2.3.3 $\lambda$ gt10        | 93 |
| 第3章 常用载体                   |    | 3.2.3.4 $\lambda$ gt11        | 93 |
| 3.1 质粒                     | 78 | 3.2.3.5 $\lambda$ DASH        | 93 |
| 3.1.1 质粒的性质                | 78 | 3.2.3.6 $\lambda$ ZAP/R       | 93 |
| 3.1.1.1 质粒的复制              | 78 | 3.3 丝状噬菌体                     | 93 |
|                            |    | 3.3.1 丝状噬菌体的性质                | 93 |
|                            |    | 3.3.1.1 丝状噬菌体的性质              | 93 |
|                            |    | 3.3.1.2 丝状噬菌体载体的优缺点           | 95 |

|                      |     |                                  |     |
|----------------------|-----|----------------------------------|-----|
| 3.3.2 常用筛选方法         | 97  | 3.8.2.2 Bin19                    | 112 |
| 3.3.3 常用单链噬菌体载体图谱    | 97  | 3.9 动物细胞克隆载体                     | 113 |
| 3.4 噬粒               | 97  | 第4章 DNA 的制备                      |     |
| 3.4.1 噬粒的性质          | 97  | 4.1 质粒 DNA 的分离纯化                 | 115 |
| 3.4.1.1 噬粒的组成        | 97  | 4.1.1 简介                         | 115 |
| 3.4.1.2 噬粒载体的优缺点     | 98  | 4.1.2 微量提取质粒 DNA                 | 117 |
| 3.4.2 载体的使用          | 98  | 4.1.2.1 煮沸法                      | 117 |
| 3.4.3 常用噬粒载体图谱       | 98  | 4.1.2.2 碱裂解法                     | 117 |
| 3.4.3.1 pUC118       | 98  | 4.1.2.3 96-孔微量滴定板法               | 118 |
| 3.4.3.2 pGEM-3Zf     | 99  | 4.1.2.4 直接测定菌落中质粒大小              | 118 |
| 3.4.3.3 pBS SK       | 99  | 4.1.3 大量提取质粒 DNA                 | 119 |
| 3.4.3.4 M13KO7       | 99  | 4.1.3.1 细菌的收集                    | 119 |
| 3.5 粘粒               | 99  | 4.1.3.2 碱裂解法                     | 119 |
| 3.5.1 粘粒的性质          | 99  | 4.1.3.3 煮沸法                      | 120 |
| 3.5.1.1 粘粒的组成        | 99  | 4.1.3.4 Triton 裂解法               | 120 |
| 3.5.1.2 粘粒中克隆        | 100 | 4.1.4 纯化质粒 DNA                   | 121 |
| 3.5.1.3 粘粒载体的优缺点     | 101 | 4.1.4.1 PEG 沉淀法                  | 121 |
| 3.5.2 载体的使用          | 102 | 4.1.4.2 氯化铯/溴化乙锭平衡离心法            | 122 |
| 3.5.2.1 双酶切载体定向克隆    | 102 | 4.2 $\lambda$ 噬菌体 DNA 的分离纯化      | 123 |
| 3.5.2.2 双 cos 位点载体克隆 | 102 | 4.2.1 $\lambda$ 噬菌体的噬菌斑纯化        | 123 |
| 3.5.2.3 体内重组         | 102 | 4.2.1.1 通过系列稀释滴定分离单噬菌斑           | 123 |
| 3.5.3 常用粘粒载体图谱       | 105 | 4.2.1.2 通过划线接种法分离单噬菌斑            | 124 |
| 3.5.3.1 pJB8         | 106 | 4.2.1.3 挑取 $\lambda$ 噬菌斑         | 124 |
| 3.5.3.2 c2RB         | 106 | 4.2.2 制备 $\lambda$ 噬菌体原液         | 125 |
| 3.5.3.3 pWE15        | 106 | 4.2.2.1 平板裂解法                    | 125 |
| 3.6 卡粒               | 106 | 4.2.2.2 液体裂解法                    | 125 |
| 3.6.1 卡粒的性质          | 106 | 4.2.2.3 噬菌体裂解液的保存                | 126 |
| 3.6.2 载体的使用          | 107 | 4.2.3 制备噬菌体 DNA                  | 126 |
| 3.6.3 常用卡粒载体图谱       | 107 | 4.2.3.1 从大量液体裂解物中制备 DNA          | 126 |
| 3.7 酵母克隆载体           | 107 | 4.2.3.2 从少量液体裂解物中制备 DNA          | 127 |
| 3.7.1 酵母载体的性质        | 107 | 4.3 单链噬菌体 DNA 的分离纯化              | 128 |
| 3.7.2 用酵母载体克隆        | 109 | 4.3.1 M13 噬菌体的噬菌斑纯化              | 128 |
| 3.7.3 常用酵母载体图谱       | 110 | 4.3.2 M13 噬菌体单链 DNA 的制备          | 128 |
| 3.7.3.1 YIp5         | 110 | 4.3.3 M13 噬菌体双链 DNA 的制备          | 129 |
| 3.7.3.2 YRp7         | 110 | 4.4 染色体 DNA 的分离纯化                | 129 |
| 3.7.3.3 YEp24        | 110 | 4.4.1 细菌基因组 DNA 的制备              | 129 |
| 3.7.3.4 YCp50        | 111 | 4.4.1.1 微量制备法                    | 129 |
| 3.7.3.5 YAC3         | 111 | 4.4.1.2 大量制备法                    | 130 |
| 3.7.3.6 pJS97/pJS98  | 111 | 4.4.1.3 从基因组 DNA 制备液中除去存在<br>的多糖 | 131 |
| 3.8 植物克隆载体           | 111 | 4.4.2 从植物组织提取基因组 DNA             | 131 |
| 3.8.1 植物克隆载体的性质      | 111 | 4.4.3 从哺乳动物组织提取基因组 DNA           | 132 |
| 3.8.2 常用植物载体图谱       | 112 | 4.4.4 琼脂糖凝胶电泳                    | 133 |
| 3.8.2.1 pGV3850      | 112 |                                  |     |

|                                   |     |                                |     |
|-----------------------------------|-----|--------------------------------|-----|
| 4.4.5 DNA 蔗糖梯度分级分离                | 133 | 5.2.2.1 RNA 酶保护分析              | 156 |
| 4.5 用有机溶剂抽提、纯化和浓缩核酸               | 134 | 5.2.2.2 凝胶电泳纯化 RNA 探针          | 159 |
| 4.5.1 酚:氯仿抽提、乙醇沉淀纯化核酸             | 134 | 5.2.3 引物延伸                     | 159 |
| 4.5.2 用正丁醇浓缩 DNA                  | 135 | 5.2.4 Northern 杂交              | 161 |
| 4.5.3 乙醇沉淀除去低分子量的寡核苷酸和三磷酸         | 135 | 5.2.4.1 RNA 甲醛变性电泳             | 161 |
| 4.6 核酸色谱                          | 135 | 5.2.4.2 RNA 乙二醇/DMSO 变性电泳      | 163 |
| 4.6.1 羟磷灰石柱分离单链和双链核酸              | 137 | 5.2.5 斑点杂交                     | 163 |
| 4.6.2 凝胶过滤色谱                      | 137 | <b>第 6 章 DNA 文库的构建</b>         |     |
| 4.6.2.1 Sephadex 的制备              | 137 | 6.1 构建文库需考虑的问题                 | 165 |
| 4.6.2.2 常规柱色谱                     | 137 | 6.1.1 载体                       | 166 |
| 4.6.2.3 离心柱色谱                     | 137 | 6.1.2 外源 DNA                   | 166 |
| 4.6.2.4 Sepharose CL-4B 分级分离 cDNA | 138 | 6.1.3 外源 DNA 片段与载体连接           | 167 |
| <b>第 5 章 RNA 的制备和分析</b>           |     | 6.1.4 重组 DNA 导入 <i>E. coli</i> | 169 |
| 5.1 RNA 的制备                       | 139 | 6.1.5 文库筛选及保存                  | 169 |
| 5.1.1 制备 RNA 时的注意事项               | 139 | 6.2 构建基因组文库                    | 169 |
| 5.1.2 细菌 RNA 的制备                  | 140 | 6.2.1 载体                       | 169 |
| 5.1.2.1 从革兰氏阳性细菌中分离 RNA           | 140 | 6.2.2 外源片段                     | 170 |
| 5.1.2.2 从革兰氏阴性细菌中快速分离 RNA         | 141 | 6.2.2.1 基因组 DNA 文库的构建          | 171 |
| 5.1.3 动物细胞 RNA 制备                 | 142 | 6.2.2.2 磷酸酶处理过的噬菌体臂包装效率的测定     | 171 |
| 5.1.3.1 从培养细胞制备总 RNA              | 142 | 6.2.3 构建基因组文库的特殊方法             | 172 |
| 5.1.3.2 从组织中制备总 RNA               | 143 | 6.2.3.1 部分填补法                  | 172 |
| 5.1.3.3 从培养细胞中制备细胞质 RNA           | 143 | 6.2.3.2 精简基因组文库                | 173 |
| 5.1.4 植物细胞 RNA 制备                 | 144 | 6.2.4 构建基因组文库中常见的问题            | 174 |
| 5.1.5 多聚(A)RNA 的纯化                | 146 | 6.3 构建 cDNA 文库                 | 174 |
| 5.1.5.1 寡聚(dT)纤维素纯化 mRNA          | 146 | 6.3.1 mRNA 的数量和质量              | 174 |
| 5.1.5.2 生物素标记寡聚(dT)纯化 mRNA        | 147 | 6.3.2 cDNA 的合成                 | 175 |
| 5.1.5.3 用 DNA 纯化特定的 mRNA          | 147 | 6.3.2.1 cDNA 第一链的合成            | 175 |
| 5.1.6 分级分离 RNA                    | 148 | 6.3.2.2 cDNA 第二链的合成            | 176 |
| 5.1.6.1 羟甲基汞琼脂糖凝胶电泳               | 148 | 6.3.2.3 cDNA 合成效率的测定           | 179 |
| 5.1.6.2 羟甲基汞蔗糖梯度离心                | 149 | 6.3.3 cDNA 克隆                  | 180 |
| 5.1.7 RNA 制品的质量                   | 150 | 6.3.3.1 利用接头克隆                 | 180 |
| 5.2 RNA 分析                        | 150 | 6.3.3.2 利用引物-转接头克隆             | 180 |
| 5.2.1 S1 分析                       | 151 | 6.3.3.3 同聚尾克隆                  | 180 |
| 5.2.1.1 M13 单链模板法                 | 151 | 6.3.3.4 Okayama-Berg 载体克隆      | 181 |
| 5.2.1.2 质粒双链模板法                   | 154 | 6.3.3.5 单链载体中克隆                | 181 |
| 5.2.1.3 寡核苷酸探针法                   | 154 | 6.3.3.6 mRNA-cDNA 克隆           | 182 |
| 5.2.1.4 mRNA S1 定量分析的条件           | 155 | 6.3.4 精简 cDNA 文库               | 186 |
| 5.2.1.5 S1 分析经常出现的问题              | 156 | 6.3.4.1 精简 DNA 文库的建立           | 187 |
| 5.2.2 RNA 酶保护分析                   | 156 | 6.3.5 cDNA 克隆中常见的问题            | 189 |
|                                   |     | 6.4 文库的扩增和贮存                   | 189 |
|                                   |     | 6.4.1 $\lambda$ 噬菌体文库的扩增       | 189 |
|                                   |     | 6.4.2 粘粒文库的扩增                  | 192 |

|                                                   |     |                               |     |
|---------------------------------------------------|-----|-------------------------------|-----|
| 6.4.2.1 粘粒和质粒基因文库的扩增                              | 192 | 7.5.5 转染方法的优化                 | 218 |
| 6.5 文库的筛选                                         | 193 | 7.6 植物细胞的转化                   | 220 |
| 6.5.1 文库的转移和复制                                    | 193 | 7.6.1 农杆菌介导的植物细胞转化            | 220 |
| 6.5.1.1 $\lambda$ 噬菌体文库的转移                        | 193 | 7.6.1.1 培养法                   | 220 |
| 6.5.1.2 粘粒及质粒文库的转移                                | 194 | 7.6.1.2 叶盘法                   | 221 |
| 6.5.2 杂交筛选                                        | 195 | 7.6.1.3 活体接种与共感染法             | 222 |
| 6.5.2.1 用 DNA 片段作为探针                              | 195 | 7.6.2 利用 PEG 的植物细胞转化          | 224 |
| 6.5.2.2 在甲酰胺溶液中杂交                                 | 195 |                               |     |
| 6.5.2.3 用人工合成的寡核苷酸作为探针                            | 196 | <b>第 8 章 基因表达</b>             |     |
| 6.6 亚克隆                                           | 198 | 8.1 基因在 <i>E. coli</i> 细胞中表达  | 226 |
| 6.6.1 DNA 片段的亚克隆                                  | 199 | 8.1.1 表达载体结构                  | 226 |
| 6.6.2 用低熔点琼脂糖亚克隆                                  | 200 | 8.1.2 融合蛋白表达载体                | 227 |
| <b>第 7 章 重组 DNA 导入宿主</b>                          |     | 8.1.2.1 表达融合蛋白的优点及其载体         | 227 |
| 7.1 <i>E. coli</i> 的转化                            | 201 | 8.1.2.2 表达载体的构建和融合蛋白的检测       | 227 |
| 7.1.1 $\text{CaCl}_2$ 制备感受态 <i>E. coli</i> 细胞及其转化 | 201 | 8.1.2.3 制备用于产生抗体的融合蛋白         | 228 |
| 7.1.2 电激高效转化                                      | 202 | 8.1.3 天然蛋白表达载体                | 229 |
| 7.2 $\lambda$ 噬菌体体外包装                             | 204 | 8.1.3.1 原核基因的表达载体             | 229 |
| 7.2.1 从一种溶源菌中制备包装提取物及包装                           | 205 | 8.1.3.2 真核基因的表达载体             | 231 |
| 7.2.2 从两种溶源菌中制备包装提取物及包装                           | 206 | 8.1.4 其他表达载体                  | 232 |
| 7.2.2.1 超声波提取物的制备                                 | 206 | 8.1.4.1 分泌型表达载体               | 232 |
| 7.2.2.2 冻融裂解物的制备                                  | 207 | 8.1.4.2 切割型表达载体               | 234 |
| 7.2.2.3 体外包装                                      | 207 | 8.1.5 提高表达效率                  | 235 |
| 7.3 单链噬菌体转染                                       | 208 | 8.1.6 检测基因表达                  | 235 |
| 7.3.1 噬菌体 DNA 导入细胞                                | 208 | 8.1.6.1 检测基因表达的方法             | 235 |
| 7.3.2 插入方向的确定                                     | 208 | 8.1.6.2 用 $\beta$ 半乳糖苷酶活性检测表达 | 236 |
| 7.4 酵母细胞的转化                                       | 209 | 8.2 基因在哺乳动物中表达                | 236 |
| 7.4.1 原生质体法转化酵母                                   | 209 | 8.2.1 哺乳动物表达系统的用途             | 236 |
| 7.4.2 乙酸锂法转化酵母                                    | 210 | 8.2.2 哺乳动物表达载体                | 237 |
| 7.5 动物细胞的转化                                       | 210 | 8.2.2.1 原核 DNA 序列             | 237 |
| 7.5.1 磷酸钙转染法                                      | 211 | 8.2.2.2 启动子                   | 237 |
| 7.5.2 DEAE-葡聚糖转染法                                 | 212 | 8.2.2.3 增强子                   | 237 |
| 7.5.2.1 用 DEAE-葡聚糖转染细胞                            | 212 | 8.2.2.4 拼接信号                  | 237 |
| 7.5.2.2 大量细胞的 DEAE-葡聚糖转染                          | 213 | 8.2.2.5 终止信号和多聚腺苷化信号          | 238 |
| 7.5.2.3 悬浮细胞的 DEAE-葡聚糖转染                          | 214 | 8.2.2.6 筛选标记                  | 238 |
| 7.5.3 电激法                                         | 215 | 8.2.2.7 真核病毒序列                | 240 |
| 7.5.3.1 动物细胞电激转染法                                 | 215 | 8.2.3 几种常见的真核病毒载体             | 240 |
| 7.5.3.2 植物原生质体电激转染法                               | 216 | 8.2.3.1 SV40 载体               | 240 |
| 7.5.4 脂质体转染法                                      | 216 | 8.2.3.2 BPV 载体                | 242 |
| 7.5.4.1 用脂质体进行瞬时表达                                | 216 | 8.2.3.3 EBV 载体                | 243 |
| 7.5.4.2 用脂质体进行稳定转化                                | 217 | 8.2.3.4 反转录病毒载体               | 243 |
|                                                   |     | 8.2.3.5 痘病毒载体                 | 244 |
|                                                   |     | 8.2.4 外源 DNA 序列               | 246 |
|                                                   |     | 8.2.5 宿主与载体系统                 | 246 |

|                                 |     |                           |     |
|---------------------------------|-----|---------------------------|-----|
| 8.2.5.1 瞬时表达系统                  | 247 | 9.3.1.1 分子杂交种类            | 278 |
| 8.2.5.2 稳定表达系统                  | 247 | 9.3.1.2 反应条件对杂交的影响        | 278 |
| 8.2.5.3 转染 DNA 的扩增和诱导           | 248 | 9.3.2 Southern 杂交         | 280 |
| 8.2.6 转染方法                      | 250 | 9.3.2.1 简介                | 280 |
| 8.2.7 融合基因的用途                   | 250 | 9.3.2.2 Southern 转移和杂交方法  | 281 |
| 8.3 用杆状病毒载体在昆虫细胞中表达             |     | 9.3.3 Northern 杂交         | 285 |
| 基因                              | 253 | 9.3.4 斑点杂交                | 285 |
| 8.3.1 杆状病毒生活周期                  | 254 | 9.3.5 菌落原位杂交              | 285 |
| 8.3.2 杆状病毒表达系统                  | 255 | 9.3.5.1 菌落原位杂交            | 285 |
| 8.3.3 用杆状病毒表达系统大量表达蛋白质          | 255 | 9.3.5.2 $\lambda$ 噬菌斑原位杂交 | 287 |
| <b>第 9 章 核酸方法筛选鉴定重组子</b>        |     | 9.4 基因在染色体上定位             | 288 |
| 9.1 构建 DNA 酶切图谱                 | 257 | 9.4.1 染色体跳移               | 288 |
| 9.1.1 双酶切法                      | 257 | 9.4.2 染色体步移               | 290 |
| 9.1.2 部分酶切法                     | 258 | 9.4.3 染色体缓移               | 290 |
| 9.1.3 BAL 31 酶切法                | 261 | <b>第 10 章 蛋白质检测和分析</b>    |     |
| 9.1.4 双向电泳末端标记法                 | 262 | 10.1 蛋白质抽提                | 292 |
| 9.2 探针的制备                       | 262 | 10.2 蛋白质定量                | 293 |
| 9.2.1 双链 DNA 探针                 | 263 | 10.2.1 Bradford 方法        | 293 |
| 9.2.1.1 切口平移法                   | 263 | 10.2.2 Lowry 方法           | 293 |
| 9.2.1.2 随机引物合成法                 | 265 | 10.3 常规色谱                 | 294 |
| 9.2.2 单链 DNA 探针                 | 266 | 10.3.1 凝胶过滤               | 294 |
| 9.2.2.1 从 M13 载体衍生序列合成探针        | 266 | 10.3.2 离子交换色谱             | 297 |
| 9.2.2.2 从 RNA 合成单链 cDNA 探针      | 267 | 10.3.3 亲和色谱               | 300 |
| 9.2.3 末端标记 DNA 探针               | 268 | 10.3.4 疏水相互作用色谱           | 302 |
| 9.2.3.1 Klenow 片段标记 3' 末端       | 269 | 10.3.5 纸上分配色谱             | 302 |
| 9.2.3.2 前向反应标记 5' 末端            | 269 | 10.3.6 液液分配色谱             | 302 |
| 9.2.3.3 交换反应标记 5' 末端            | 271 | 10.3.7 共价色谱               | 302 |
| 9.2.4 寡核苷酸探针                    | 272 | 10.3.8 金属螯合色谱             | 303 |
| 9.2.4.1 寡核苷酸探针的类型及标记方法          | 272 | 10.3.9 常规色谱问题处理           | 303 |
| 9.2.4.2 T4 多核苷酸激酶标记寡核苷酸         | 273 | 10.4 高效液相色谱               | 304 |
| 9.2.4.3 乙醇沉淀纯化放射性标记寡核苷酸         | 274 | 10.4.1 反相高效液相色谱           | 304 |
| 9.2.4.4 酸沉淀法测定 DNA 和 RNA 中的放射强度 | 275 | 10.4.2 离子交换高效液相色谱         | 306 |
| 9.2.4.5 柱色谱分离放射性标记的 DNA         | 276 | 10.4.3 体积排阻高效液相色谱         | 308 |
| 9.2.5 RNA 探针                    | 276 | 10.4.4 高效聚焦色谱             | 309 |
| 9.2.6 非放射性探针                    | 277 | 10.4.5 高效疏水相互作用色谱         | 309 |
| 9.2.6.1 生物素标记探针                 | 277 | 10.5 抗体的制备                | 309 |
| 9.2.6.2 地高辛配基标记探针               | 277 | 10.5.1 多克隆抗体的制备           | 310 |
| 9.2.6.3 辣根过氧化物酶标记探针             | 278 | 10.5.1.1 肌肉注射免疫           | 311 |
| 9.3 分子杂交                        | 278 | 10.5.1.2 皮肉免疫             | 312 |
| 9.3.1 简介                        | 278 | 10.5.1.3 皮下免疫             | 312 |
|                                 |     | 10.5.1.4 从耳动脉放血           | 313 |
|                                 |     | 10.5.2 利用合成多肽制备抗体         | 313 |
|                                 |     | 10.5.3 单克隆抗体的制备           | 314 |

|                          |     |                                          |     |
|--------------------------|-----|------------------------------------------|-----|
| 10.5.4 抗体的纯化             | 315 | 11.2.5 化学测序法中常见问题                        | 366 |
| 10.5.4.1 蛋白 A 纯化         | 315 | 11.3 其他测序方法                              | 366 |
| 10.5.4.2 细胞抽提物吸附纯化       | 316 | 11.3.1 化学发光测序                            | 366 |
| 10.6 免疫学测定               | 318 | 11.3.2 多重测序                              | 367 |
| 10.6.1 免疫沉淀              | 318 | 11.3.3 自动测序                              | 367 |
| 10.6.1.1 放射性标记表达目的蛋白质的细胞 | 319 | 11.3.4 用 PCR 测序                          | 367 |
| 10.6.1.2 裂解细胞            | 320 | 11.3.5 磁铁珠分离单链测序                         | 368 |
| 10.6.1.3 收集纯化抗原-抗体复合物    | 322 | <b>第 12 章 定位诱变</b>                       |     |
| 10.6.1.4 凝胶电泳和放射自显影分析    | 323 | 12.1 缺失诱变                                | 369 |
| 10.6.2 酶联免疫吸附测定法         | 324 | 12.1.1 简单缺失                              | 369 |
| 10.6.2.1 辣根过氧化物酶标记抗体     | 325 | 12.1.2 系统缺失                              | 370 |
| 10.6.2.2 ELISA           | 326 | 12.1.2.1 核酸外切酶 III                       | 370 |
| 10.6.3 固相放射免疫测定          | 328 | 12.1.2.2 BAL 31                          | 370 |
| 10.6.3.1 氟胺 T 碘化标记抗体     | 329 | 12.1.2.3 DNA 酶 I                         | 370 |
| 10.6.3.2 双抗体固相放射免疫测定     | 330 | 12.1.2.4 T4 DNA 聚合酶                      | 371 |
| 10.6.4 Western 印迹        | 331 | 12.2 插入诱变                                | 371 |
| 10.6.4.1 Western 印迹      | 332 | 12.2.1 简单插入                              | 371 |
| 10.6.4.2 固定在滤膜上蛋白质的染色    | 333 | 12.2.2 系统插入                              | 372 |
| 10.6.5 荧光标记法             | 334 | 12.2.2.1 在 $Mn^{2+}$ 存在下 DNA 酶 I 酶切后插入诱变 | 372 |
| 10.6.6 免疫检测中常见问题的处理      | 334 | 12.2.2.2 接头扫描诱变                          | 372 |
| 10.7 克隆基因的体外转录和体外翻译      | 337 | 12.2.2.3 TAB 接头诱变                        | 375 |
| <b>第 11 章 核酸测序</b>       |     | 12.3 利用寡核苷酸诱变                            | 376 |
| 11.1 双脱氧链末端终止法           | 341 | 12.3.1 诱变寡核苷酸的设计                         | 376 |
| 11.1.1 简介                | 341 | 12.3.2 目的 DNA 模板的制备                      | 377 |
| 11.1.2 反应前的准备            | 343 | 12.3.2.1 单链目的 DNA 模板的制备                  | 377 |
| 11.1.2.1 反应的设计           | 343 | 12.3.2.2 双链目的 DNA 模板的制备                  | 378 |
| 11.1.2.2 反应的材料           | 343 | 12.3.3 合成 DNA 突变体                        | 378 |
| 11.1.3 测序的策略             | 345 | 12.3.3.1 双引物法                            | 378 |
| 11.1.3.1 随机法             | 345 | 12.3.3.2 异源双链法                           | 379 |
| 11.1.3.2 互套缺失法           | 346 | 12.3.3.3 核酸外切酶法                          | 380 |
| 11.1.3.3 引物延伸法           | 353 | 12.3.3.4 盒式诱变法                           | 381 |
| 11.1.4 模板的制备             | 354 | 12.3.4 筛选突变体                             | 382 |
| 11.1.4.1 单链噬菌体模板的制备      | 354 | 12.3.5 提高诱变效率                            | 383 |
| 11.1.4.2 变性双链模板的制备       | 355 | 12.3.5.1 利用尿嘧啶进行诱变                       | 384 |
| 11.1.5 双脱氧链终止反应          | 355 | 12.3.5.2 利用 $\alpha$ -硫代 dNTP 诱变         | 386 |
| 11.1.6 凝胶电泳和放射自显影        | 356 | 12.4 酶法合成诱变                              | 386 |
| 11.1.7 双脱氧测序法中常见问题       | 358 | 12.5 随机化学诱变                              | 389 |
| 11.2 化学法                 | 360 | 12.5.1 化学诱变剂                             | 389 |
| 11.2.1 简介                | 360 | 12.5.1.1 亚硝酸诱变                           | 390 |
| 11.2.2 反应前的准备            | 361 | 12.5.1.2 羟胺诱变                            | 390 |
| 11.2.3 模板的制备             | 363 | 12.5.1.3 亚硫酸盐诱变                          | 390 |
| 11.2.4 化学裂解反应            | 363 | 12.5.1.4 胍诱变                             | 390 |

|                           |     |                              |     |
|---------------------------|-----|------------------------------|-----|
| 12.5.1.5 弱酸诱变             | 390 | 3.1.1 液体培养基                  | 418 |
| 12.5.2 化学诱变中的注意事项         | 390 | 3.1.2 固体培养基                  | 420 |
| 12.5.2.1 载体损伤             | 390 | 3.2 $\lambda$ 噬菌体工作溶液        | 421 |
| 12.5.2.2 突变的分布            | 391 | 3.3 酵母培养基                    | 422 |
| 12.5.2.3 目的片段的选择          | 391 | 3.4 植物基本培养基                  | 422 |
| 12.5.2.4 载体的选择            | 391 | 3.5 常用 <i>E. coli</i> 菌株及基因型 | 424 |
| <b>第 13 章 聚合酶链反应(PCR)</b> |     | 3.6 常用抗菌素                    | 426 |
| 13.1 PCR 的用途              | 393 | <b>4 常用试剂</b>                | 427 |
| 13.2 PCR 的过程              | 394 | 4.1 常用溶液                     | 427 |
| 13.2.1 原理                 | 394 | 4.2 其他酶制品                    | 430 |
| 13.2.2 反应成分               | 394 | 4.3 常用酶反应缓冲液                 | 431 |
| 13.2.2.1 引物               | 394 | <b>5 常用数据</b>                | 433 |
| 13.2.2.2 Taq DNA 聚合酶      | 395 | 5.1 核酸和蛋白质常数                 | 433 |
| 13.2.2.3 反应缓冲液            | 395 | 5.1.1 常用数据及转换                | 433 |
| 13.2.2.4 模板 DNA           | 396 | 5.1.2 三磷酸核苷酸分子量              | 433 |
| 13.2.2.5 其他成分             | 396 | 5.1.3 氨基酸分子量                 | 434 |
| 13.2.3 反应参数               | 396 | 5.1.4 遗传密码                   | 435 |
| 13.2.4 注意事项               | 398 | 5.1.5 常用核酸和蛋白质分子量标准物         | 435 |
| 13.3 PCR 方法               | 399 | 5.1.6 各种生物基因组长度              | 436 |
| 13.3.1 快速扩增 cDNA 末端       | 399 | 5.2 同位素数据                    | 437 |
| 13.3.2 反向 PCR             | 401 | 5.3 Tris · Cl 缓冲液 pH 值与温度关系  | 437 |
| 13.3.3 用简并引物扩增 cDNA       | 401 | <b>6 常用方法</b>                | 438 |
| 13.3.4 定量 PCR             | 401 | 6.1 细菌的培养和生长                 | 438 |
| 13.3.5 不对称 PCR            | 402 | 6.1.1 细菌的液体培养                | 438 |
| 13.3.6 引物竞争 PCR           | 403 | 6.1.2 细菌的固体培养                | 438 |
| 13.4 利用 PCR 进行分子克隆        | 403 | 6.1.3 菌株保存和复壮                | 439 |
| 13.4.1 利用 PCR 进行重组和诱变     | 403 | 6.1.4 <i>E. coli</i> 细胞常用数据  | 439 |
| 13.4.2 利用 PCR 扩增 RNA      | 406 | 6.2 器皿硅烷化                    | 439 |
| 13.4.3 利用 PCR 测序          | 407 | 6.3 放射自显影                    | 440 |
| 13.4.3.1 常规 PCR 测序        | 407 | 6.4 透析袋的处理                   | 440 |
| 13.4.3.2 不对称 PCR 测序       | 408 | 6.5 核酸常用方法                   | 441 |
| 13.4.4 利用 PCR 定量 DNA      | 409 | 6.5.1 DNA 和 RNA 的定量          | 441 |
| <b>附录</b>                 |     | 6.5.2 核酸的抽提和沉淀               | 441 |
| 1 实验室的安全                  | 411 | 6.5.3 核酸浓缩                   | 441 |
| 2 分子生物学实验室设备              | 416 | 6.5.4 放射性测定                  | 441 |
| 3 常用培养基及菌株                | 418 | <b>参考文献</b>                  | 443 |
| 3.1 细菌培养基                 | 418 |                              |     |

## 第1章 分子克隆的工具酶

限制酶和其他修饰酶是分子生物学家进行 DNA 操作的基本工具, 由于各种限制酶和修饰酶的发现, 使分子克隆的方法不断创新, 克隆工作更简单, 应用范围更广。克隆 (clone) 是指通过无性繁殖从同一个祖先衍生的一群细胞或生物体, 这些细胞和生物体基因型相同。例如由一个 *Escherichia. coli* 细胞衍生的、带有相同插入序列重组 DNA 分子的群体。本章将介绍分子克隆中重要酶类的性质及用途。

### 1.1 限制酶

#### 1.1.1 限制酶的发展和命名

Luria 和 Human (1952) 在研究 T 偶数噬菌体时, 以及 Bertani 和 Weigle (1953) 在研究  $\lambda$  噬菌体和 P2 噬菌体的宿主范围时都发现, 当一个噬菌体从其天然宿主 (如 *E. coli* C 菌株) 转到另一种宿主 (如 *E. coli* K 菌株) 细胞中时, 大多数噬菌体不能生长和扩增, 但个别幸存的噬菌体在第二种宿主 (*E. coli* K 菌株) 中繁殖产生的子代却能够在该宿主中正常生长和扩增。当将这种噬菌体再在第一种宿主 (*E. coli* C 菌株) 中生长一个循环后, 就又不能在该第二种宿主 (*E. coli* K 菌株) 中正常扩增 (图 1.1)。为此人们提出了限制/修饰系统来解释这种现象 (Arber 等, 1963), 人们假设在 *E. coli* K 中存在一对酶: 限制酶 (限制性内切酶) 和修饰酶 (DNA 甲基化酶)。当外源 DNA 进入 *E. coli* K 细胞时, 由于未经 *E. coli* K 中的修饰酶修饰, 故很容易被限制酶切割降解。而 *E. coli* K 本身产生的内源 DNA 由于经过修饰酶修饰, 所以不被限制酶切割降解。例如图 1.1 中在 *E. coli* K 菌株中存在限制/修饰系统, 未经修饰的外源 DNA (来自 *E. coli* C) 会被该限制系统降解。*E. coli* K 本身产生的 DNA 由于经过修饰酶修饰故不会被降解, 因而可大量扩增。在 *E. coli* C 中不存在限制/修饰系统, 它既不能限制切割外源 DNA, 也不能修饰内源的 DNA。故所产生的 DNA 会被其他具限制系统的宿主降解。

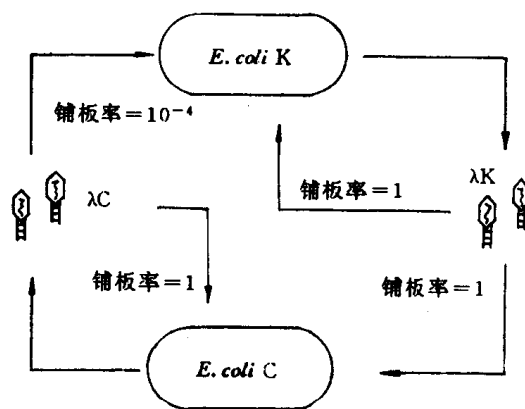


图 1.1 宿主的限制和修饰系统

在 *E. coli* K 宿主和 *E. coli* C 宿主中生长的噬菌体 ( $\lambda K$  和  $\lambda C$ ) 在不同宿主中的铺板率不同。*E. coli* K 具有限制和修饰系统, *E. coli* C 没有限制和修饰系统。

随后, 人们在 *E. coli* K 和 B 菌株中发现了 I 型限制酶 (Meselson 和 Yuan, 1968; Linn 和 Arber, 1968) 和 II 型限制酶 (Smith 和 Wilcox, 1970), 从而使人们的这种假设得到证实。目前