浙 江 农 林 大 学 学 报，2011，**28**(4)：527–532
Journal of Zhejiang A & F University

毛竹大片段双元细菌人工染色体基因组文库的构建

管　雨[1]，杨　洋[2]，张智俊[1]，罗淑萍[2]，汤定钦[1]

（1. 浙江农林大学 亚热带森林培育国家重点实验室培育基地，浙江 临安 311300；2. 新疆农业大学 农学院，新疆 乌鲁木齐 830052）

摘要：从毛竹 *Phyllostachys pubescens* 幼嫩叶片中提取纯化得到高质量的基因组 DNA，经限制性内切酶 BamH I 对它们进行梯度酶切，脉冲场电泳选择合适酶切 DNA 片段，与脱磷酸化处理过的质粒载体 pCLD04541 按质量比 3:1 相互连接，转化大肠杆菌 *Escherichia coli* DH10B 感受态细胞进行蓝白斑筛选，挑取白色克隆，获得重组率较高的阳性克隆，构建了含有 10^4 个克隆的双元细菌人工染色体(BIBAC)基因组文库，并通过脉冲场电泳检测分析后确定，所构建的毛竹 BIBAC 文库平均插入片段为 105 kb，约覆盖 5 倍毛竹基因组。该文库的构建为毛竹基因组研究做好了前期的基础工作。图 8 参 18

关键词：分子生物学；毛竹；双元细菌人工染色体；基因组文库

中图分类号：S718.43　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：2095-0756(2011)04-0527-06

Construction of a large genomic DNA fragments, BIBAC library for *Phyllostachys pubescens*

GUAN Yu[1], YANG Yang[2], ZHANG Zhi-jun[1], LUO Shu-ping[2], TANG Ding-qin[1]

(1. The Nurturing Station for the State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, Zhejiang A & F University, Lin'an 311300, Zhejiang, China; 2. College of Agronomy, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, Xinjiang, China)

Abstract: One plant-transformation-competent binary bacterial artificial chromosome (BIBAC) library was constructed which represents the first large genomic DNA fragment library generated for *Phyllostachys pubescens*. High-quality, genomic DNA extracted from young leaves of *Phyllostachys pubescens* was gradiently enzyme-digested with a gradient using BamH I. Desirable DNA fragments were isolated by pulsed field gel electrophoresis, ligated to the dephosphorylatedion carrier pCLD04541 with a mass ratio of 3:1, and then transformed to *Escherichia coli* DH10B competent cells. This was followed by blue-white screening with establishment of a binary bacterial artificial chromosome (BIBAC) genome library. Results showed a high recombination positive colony from which a BIBAC genome library, consisting of 10^4 clones with an average insert fragment size of about 105 kb after detection with a pulsed field gel electrophoresis, was constructed. The BIBAC library was 5 times larger than the *Phyllostachys pubescens* genome. The construction of this BIBAC genome library laid a good foundation for related genome research. [Ch, 8 fig. 18 ref.]

Key words: molecular biology; *Phyllostachys pubescens*; binary bacterial artificial chromosome (BIBAC); genome library

毛竹 *Phyllostachys pubescens* 是中国竹类植物中分布范围最广的一个材用和笋用竹种[1]，不但具有很

收稿日期：2010-11-02；修回日期：2011-02-01

基金项目：浙江省自然科学基金资助项目(Y307469)；浙江省现代森林培育技术重点实验室开放基金资助项目(200605)

作者简介：管雨，硕士，从事植物分子生物学研究。E-mail：guanyu3650@yahoo.cn。通信作者：张智俊，副教授，博士，从事植物分子生物学、生物信息学研究。E-mail：csfuzzj@yahoo.cn

高的经济价值，还能产生良好的生态效应。因此，开展毛竹功能基因组学研究对于促进毛竹遗传改良，实现毛竹良种化具有重要的现实意义。Hamilton 等[2]结合细菌人工杂色体(BAC)载体和 Ti 质粒的特点，构建了双元细菌人工染色体(BIBAC)载体，能够在农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* 介导下直接将外源基因整合到植物基因组中进行功能验证，是研究基因功能、基因的表达调控以及作物遗传改良的快速可靠途径。BIBAC 已应用于一些植物基因组文库的构建，如 Hamiton 等[3]构建了番茄 *Lycopersicon esculentum* 'Mogeor' 和 *Lycopersicon pennellii* 'LA716' 的大片段 BIBAC 文库，Chang 等[4]构建了拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 的 BIBAC 基因组文库，何瑞峰等[5]构建了药用野生稻 *Oryza officinalis* 的 BIBAC 文库，Wang 等[6]构建了盐芥 *Thellungiella halophila* 的 BIBAC 文库，并在此基础上进行了基因的图位克隆[7]，其中拟南芥 BIBAC 基因组文库的大规模转化已经完成，这对植物功能基因组学的研究具有极其深远的意义[8-9]。目前，彭正华等[10]首次对竹类植物功能基因组学进行了探讨，开发了包括 10 608 个全长 cDNA 片段(FL-cDNAs)和约 3 万个表达序列标签(ESTs)的毛竹基因资源数据库；Gui 等[11]在竹类基因组学的研究中发现水稻 *Oryza sativa*，高粱 *Sorghum bicolor* 与竹类植物有很高的同源性，并认为水稻、高粱对竹类基因组学的研究有很高的参考价值。由于竹类植物遗传背景的研究还比较薄弱，没有建立高密度的遗传图谱，缺乏有效的竹类功能基因组学研究手段，且大规模的毛竹功能基因组研究刚刚起步，其基因组测序须以高质量的基因组文库为基础。因此，构建一个高质量的基因组 BIBAC 文库是毛竹基因组研究必不可少的工作。本研究以双元细菌人工染色体(BIBAC)为载体，建立并完善了毛竹大片段基因组文库的构建体系，构建了高质量、高覆盖率的毛竹基因组 BIBAC 文库，以期为毛竹基因组及功能基因的克隆打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

提取大片段基因组 DNA 的植物材料为毛竹笋，采自浙江省临安市人工毛竹林。双元细菌染色体 pCLD04541(由张宏斌老师馈赠)大小为 23.2 kb，对四环素具有抗性，含有 *LacZ* 基因；大肠杆菌 *Eschrichia coli* DH10B 购自 Invitrogen 公司；限制性内切酶 BamH I，DNA 分子量标准 λ/*Hind* III 购自 TaKaRa 公司；Lambda Ladder PFG Marker 购自 NEB 公司；蛋白酶 K 购自 Merk 公司，T4 连接酶及碱性磷酸酯酶(CIAP)脱磷酸化酶购自 Fermentas 公司；其他常规化学试剂为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 毛竹基因组高分子量核染色体 DNA 的制备 高分子量(high molecular weight，HMW)DNA 的获得是构建大片段基因组文库的基础[12]。本研究根据 Zhang 等[13]的程序分离毛竹基因组高分子量核染色体 DNA。其基本步骤包括细胞核的分离与包埋，细胞核的裂解与 HMW DNA 的脉冲场凝胶电泳，HMW DNA 的大量酶切及脉冲电泳回收。

1.2.2 载体的制备 将含有 pCLD04541 质粒的保存菌株接种于含四环素的 LB(Luria-Bertain)固体培养基上，过夜培养。挑单克隆接种于 LB 液体培养基上，按 1:100 接种菌液，同条件扩繁到 20 L。使用碱裂解法提取质粒[14]，以氯化铯梯度密度离心纯化[15]。将纯化后的质粒用限制性内切酶 BamH I 和 Sam I 分别对质粒进行酶切 1 h 后，再用脱磷酸化酶于 37 ℃保温 1 h 脱磷酸化。根据质粒质量浓度，按 2 × 16.67 mkat·g^{-1} 的量用 BamH I 对 pCLD04541 进行限制性消化，其中酶切反应体系和对酶切后质粒进行脱磷酸化的操作参考张洪斌的方案[16]。酶切产物 8.0 g·kg^{-1} 琼脂糖电泳检测，并调整质粒质量浓度为 10.0 mg·L^{-1}。

1.2.3 电转化感受态大肠杆菌的制备 将 DH10B 菌株划 LB 平板，37 ℃培养过夜；挑单克隆于 5 mL 液体 LB 培养基中，37 ℃ 220 r·min^{-1} 摇菌 8 h；按 1:100 扩繁，同条件继续培养 2 ~ 3 h，期间及时检测菌液吸光度值；$D[\lambda]_{600}$ 值达到 0.6 左右时，将三角瓶取出后迅速置于冰水浴中冷却 20 min；将菌液转入无菌离心瓶，4 000 r·min^{-1} 离心 5 min；弃上清，加入等体积氯化钙缓慢重悬菌体，冰浴 10 min，4 000 r·min^{-1} 离心 10 min，重复 3 次，尽可能弃上清。加入等体积的 100.0 g·kg^{-1} 甘油，20 μL 为单位分装，垂直插入液氮速冻后转入-80 ℃冰箱保存。

1.2.4 感受态与载体的检测 以 T4 连接酶分别对脱磷与未脱磷质粒载体进行自连，各取 1 pg 进行电击转化，通过计算转化所长出的克隆数确定感受态细菌的转化效率以及质粒载体脱磷是否合格。

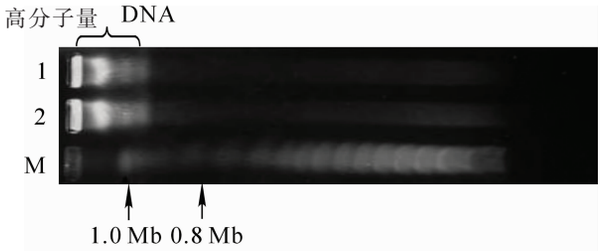
1.2.5　连接与转化　外源片段与载体按照 3∶1 的比例进行混合，50 ℃下加热 1 min，冷却至室温后加入适量T4 连接酶于 16 ℃连接过夜。连接液滴于高分子滤膜上脱盐和浓缩 5~6 h 后用于转化。感受态细胞与连接产物均匀混合后于电激仪上进行电激，然后加入 1 mL super optimal broth with catabolite repression (SOC)液体培养基，混匀后转入另一离心管复苏 1 h。取 200 mL 菌液涂于 LB 固体培养基上，37 ℃培养 16~20 h 进行蓝白斑筛选，并挑取白色克隆。

1.2.6　文库插入片段的检测　随机挑选 36 个单克隆接种于 LB 培养基中，37 ℃ 225 r·min^{-1} 培养过夜。十二烷基硫酸钠(SDS)碱裂解小量法抽提质粒，以脉冲场电泳检测重组质粒的大小。根据 $R=N\times I/G_S$ (R代表覆盖度，N 代表重组克隆的数目，I 代表平均插入片段大小，G_S 为物种基因大小，毛竹基因组大小约为 2 000 MB)计算文库的库容。

2　结果与分析

2.1　大片段基因组 DNA 的获得

2.1.1　高分子量 DNA 的质量检测　本研究以毛竹笋为材料制备高分子量 DNA，通过脉冲场凝胶电泳检测所得 DNA 的分子量大小与浓度，结果如图 1 所示。凝胶栓中毛竹核 DNA 分子量从大到小呈连续分布，其中 1.0 Mb 级以上的高分子量 DNA 占有很高的比例，机械降解的非特异小片段很少，主要分布在 0.8 Mb 以下，残余的糖、酚类等杂质仍留在胶孔中。因此，制备的高分子量 DNA 可以用于文库构建。

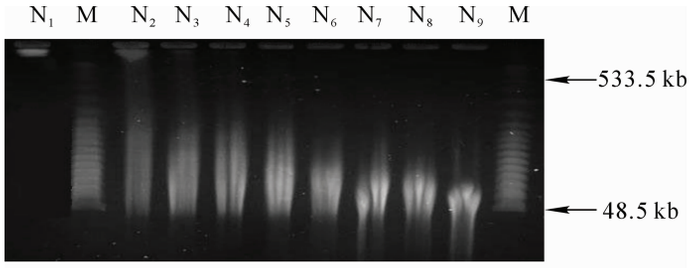


1,2: genomic DNA; M: lambda ladder PFG marker

图1　毛竹基因组高分子量 DNA脉冲场电泳

Figure 1　Pulsed field gel electrophoresis of genomic HMW DNA of *Phyllostachy pubescens*

2.1.2　高分子量 DNA 的预酶切　高分子量 DNA 需经过部分酶切才能用于构建基因组文库，因此，敏感和重复性良好的部分酶切特性是考察高分子量 DNA 质量的一个重要依据。用限制性内切酶 *BamH* Ⅰ对毛竹高分子量 DNA 进行梯度酶切，随着酶用量的增加，所得到的基因组 DNA 限制性酶切片段逐渐减小(图 2)。这与 Zhang 等[13]以梯度酶切番茄高分子量的效果一致。说明此毛竹高分子量 DNA 可以进行酶切操作，能够用于大片段文库构建。



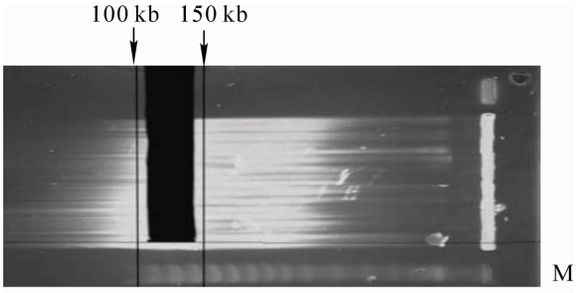
$N_n=\lambda\times16.67$ nkat；$\lambda=0,0.2,0.4,0.8,1.0,1.2,1.4,1.8,2.2$；
$n=1,2,3,\cdots,9$；M: lambda ladder PFG marker

图2　毛竹基因组高分子量 DNA的梯度预酶切

Figure 2　Gradient pre-enzyme digestion of genomic HMW DNA of *Phyllostachy pubescens*

2.1.3　大片段 DNA 的制备　①第 1 次分离回收。按照预酶切所确定的酶量对毛竹基因组 DNA 进行大量的酶切。部分消化的 DNA 经脉冲电泳分离完毕后，将凝胶一侧含 DNA 标记及少量样品的部分切下进行溴化乙锭(EB)染色，在紫外透射仪上用直尺量取 50~100 kb 的位置。用同样规格的直尺量取未染色的凝

胶，切取其上 100 ~ 150 kb 位置的凝胶条。如图 3 所示，缺失部分为切取的含 100 ~ 150 kb 毛竹基因组 DNA 片段的凝胶部分。②第 2 次分离回收。将第 1 次分离切下的胶块埋入凝胶中，脉冲电泳完毕后按第 1 次分离方法切取含有 100~150 kb 大小片段的凝胶块。如图 4 所示，缺失部分为切取了含目的片段胶块的部分。



M: lambda ladder PFG marker

图3 基因组大片段的第1次分离与回收

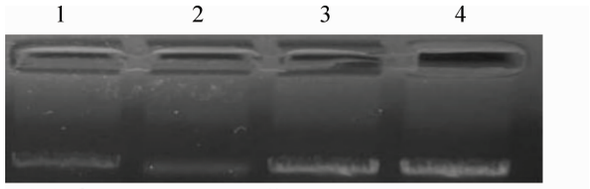
Figure 3 First separation and recycling of Large genomic DNA fragments

M: lambda ladder PFG marker

图4 基因组大片段的第2次分离与回收

Figure 4 Second separation and recycling of large genomic DNA fragments

2.1.4 大片段的浓缩、脱盐与质量浓度测定 把经 2 次分离后切取的含目的片段的凝胶块放入半透膜中，在脉冲电泳仪中进行电洗脱。洗脱完毕后，对得到的大片段 DNA 进行去硼离子处理，因为硼离子会影响后续的连接反应[17]。本研究中的大片段DNA 经过 2 次回收后质量浓度已低于 10 mg·L^{-1}，为了后续连接反应的成功，将回收液在 0.025 μm 的 Millipore 膜上进行浓缩，并以已知浓度的 λDNA 作参照，通过电泳确定浓缩后 DNA 大片段的质量浓度(图 5)。本研究回收大片段 DNA 的质量浓度为 20 mg·L^{-1}。



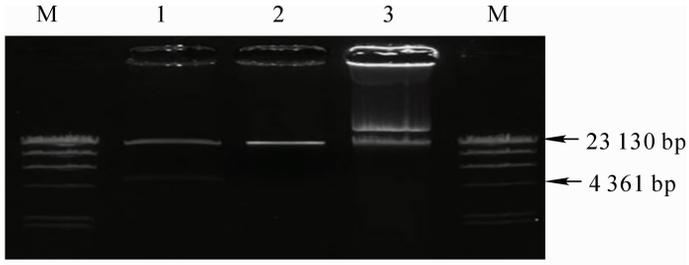
1,3,4: λ DNA corresponding to 5,15,25 ng; 2: 1 μ L large genomic DNA fragments after being concentrated

图5 回收DNA片段的质量浓度

Figure 5 Concentration of recycling DNA fragments

2.2 载体的制备与检测

按照 SDS 碱裂解法制备的 pCLD04541 质粒 DNA 以氯化铯梯度密度离心纯化之后，用限制性内切酶 BamH I 和 Sam I 分别对质粒进行酶切。正确的酶切图谱为：Sam I 酶切为 2 条带；BamH I 酶切为 1 条带。图 6 的结果显示：酶切结果与正确的 pCLD04541 物理图谱吻合。取 10 μg 纯化的质粒用 BamH I 进行酶切，再用 CIAP 将其脱磷酸化，从而得到能够用于和大片段 DNA 连接的载体 DNA。为了验证载体的脱磷效果，用 T4 连接酶分别对脱磷与未脱磷的载体进行自连后，电击转化大肠杆菌 DH10B。结果表明：脱磷后载体自连转化与完整载体转化所产生的克隆数比例小于 1:50，符合 Sambrook 等 [18]的评价标准。因此，载体脱磷效果较好，绝大部分载体无法自连。



1,2: corresponging to pCLD04541 digested by *Sam* Ⅰ and BamH Ⅰ; 3: pCLD04541; M: λ /*Hind* Ⅲ marker

图6 pCLD04541电泳

Figure 6 Electrophoresis of pCLD04541

2.3 大肠杆菌电转化感受态细胞检测

取 1 pg pCLD04541 质粒转化 20 μL 自制的电击感受态细胞，转化结果如图 7 所示，自制的大肠杆菌 DH10B 电转化感受态的效率约在 1×10^4 菌落形成单位·g^{-1}，不仅降低了研究成本，而且基本满足建库的要求。

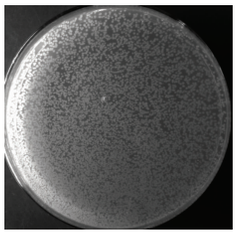
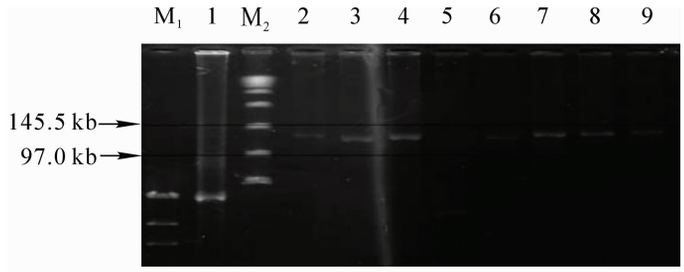


图7　电击感受态细胞转化结果

Figure 7　Results of shock transformation of competent cells



1: control group; 2－9: choose for monoclonal randomly; M_1: λ/*Hind*Ⅲ marker; M_2 lambda ladder PFG marker

图8　重组质粒的脉冲场电泳

Figure 8　Pulsed field gel electrophoresis of recombinant plasmids

2.4　连接与转化

连接产物中盐离子浓度直接关系到电击成功率。将经去除硼离子的高分子量 DNA 与脱磷载体按质量比 3:1 连接后，以自备的 DH10B 感受态对其进行电击转化，37 ℃培养 14 h 后进行蓝白斑筛选挑取白斑，共 10^4 个克隆，保存于细胞培养板中，形成毛竹 BIBAC 基因组文库。

随机挑取 36 个白色克隆，SDS 碱裂解法提取质粒后，以原始空质粒做参照对重组质粒的分子量大小进行脉冲电泳检测。结果表明：32 个克隆含有插入子，且重组克隆的分子量大小介于 100~150 kb(图 8)，而原始质粒的大小为 27 kb。表明重组克隆的插入片段为 90~120 kb，平均长度为 105 kb。按毛竹基因组大小为 2 000 Mb，该文库相当于 5 倍毛竹基因组。

3　讨论

常规 DNA 提取方法由于在操作过程中不可避免的物理剪切及化学试剂和核酸酶对大分子的破坏作用，所获得的 DNA 分子量在 20 kb 左右，无法满足大片段(100~300 kb)文库构建的的要求。本研究利用目前较为通用和方便的制备植物基因组高分子量 DNA 方法提取细胞核，并将其包埋于琼脂糖凝胶栓中固化，之后选择相应试剂浸入栓内，进行细胞核的裂解和蛋白质的去除，从而得到分子量在 1 Mb 以上的核 DNA，最终获得了毛竹基因组高分子量 DNA，为本研究库的构建奠定了良好的基础。

限制性内切酶 BamH I 部分酶切染色体 DNA 成大小不等的 DNA 片段，一般通过脉冲电泳回收 100 kb 以上大小的片段。但是在回收的时候，许多小片段(如 ＜ 100 kb)由于阻滞效应而混在 ＞ 100 kb 以上的片段里，在连接反应时影响大片段的克隆。因此，本研究对酶切得到的大片段 DNA 进行 2 次条件不同的脉冲电泳，第 1 次电泳使不同大小的限制性酶切片段初步得到分离，第 2 次电泳则使初步分离中混杂的小片段得到分离，而 90 kb 以上的大片段在一定区域集中，一方面去除了小片段，另一方面较为集中的大片段有利于提高其回收效率。

体外克隆大片段 DNA 需要高质量载体以增加连接效率和减少载体自连频率。首先适量限制性内切酶处理非常关键素，过大酶量会引起非特异性消化或星活性，少量非特异性酶切产物会使假阳性克隆大大增加。对线性质粒脱磷酸化处理要适度，脱磷酸化如果不充分，则载体容易自连，处理过度会导致载体受到损伤无法同外援片段连接，因此，在对载体进行脱磷酸化处理时，一方面要严格把握碱性磷酸酶(CIAP)的用量，另一方面要精确地控制脱磷酸化反应的时间。本研究使用的 CIAP 酶量为 16.67 $mkat \cdot g^{-1}$，脱磷反应 0.5 h 后迅速以 0.5 $mol \cdot L^{-1}$ 乙二胺四乙酸(EDTA)终止反应，加入蛋白酶 K 和 SDS 后在 56 ℃水浴 0.5 h，以使 CIAP 失活。

在挑取克隆前，将转化平板放在 4 ℃下 24 h 后，使空载菌落充分变蓝，便于识别白色菌落降低空载率。本研究构建的毛竹 BIBAC 文库含有约 1 万个克隆，随机挑取 36 个克隆，通过脉冲场电泳检测分析后确定所构建的毛竹 BIBAC 文库平均插入片段 105 kb，获得重组率较高的阳性克隆，并约覆盖 5 倍基因组。本研究为今后毛竹遗传图谱构建、基因数量性状基因座(QTL)定位与克隆、基因组学的研究打下了坚实基础。

参考文献：

[1] 方伟. 竹子分类学[M]. 北京：中国林业出版社，1995：56 – 59.

[2] HAMILTON C M，FRARY A，LEWIS C，*et al*. Stable transfer of intact high molecular weight DNA into plant chromosomes [J]. *Proc Nal Acad Sci USA*，1996，**93**(18)：9975 – 9979.

[3] HAMILTON C M， FRARY A， XU Y， *et al*. Construction of tomato genomic DNA libraries in a binary-BAC (BIBAC) vector [J]. *Plant J*，1999，**18**(2)：223 – 229.

[4] CHANG Y L，HENRIQUEZ X，PREUSS D，*et al*. A plant-transformation-competent BIBAC library from the *Arabidopsis thaliana* Landsberg ecotype for functional and comparative genomics [J]. *Theor Appl Gen*，2003，**106**：269 – 276.

[5] 何瑞峰，王媛媛，杜波，等. 水稻双元细菌人工染色体载体系统转化体系的建立[J]. 遗传学报，2006，**33** (3)：269 – 276.

HE Ruifeng，WANG Yuanyuan，DU Bo，*et al*. Development of transformation system of rice based on binarybacterial artificial chromosome (BIBAC) vector [J]. *Acta Gen Sin*，2006，**33**(3)：269 – 276.

[6] WANG Weiquan，WU Yaorong，LI Yin，*et al*. A large insert *Thellungiella halophila* BIBAC library for genomics and identification of stress tolerance genes [J]. *Plant Mol Biol*，2010，**72**：91 – 99.

[7] SAWA S，WATANABE K，GOTO K，*et al*. *FILAMENTOUS FLOWER*，a meristem and organ identity gene of *Arabidopsis*，encodes a protein with a zinc finger and HMG-related domains [J]. *Genes & Dev*，1999，**13**：1079 – 1088.

[8] 崔广荣，刘耀光. 可转化人工染色体与植物基因克隆[J]. 生物学通报，2003，**38**(7)：18 – 20.

CUI Guangrong，LIU Yaoguang. Artificial chromosome and plant gene cloning [J]. *Bull Biol*，2003，**38** (7)：18 – 20.

[9] 成志伟，曹孟良，陈良碧. 植物大片段 DNA 的研究进展 [J]. 生命科学研究，2005，**9**(4)；43 – 45.

CHENG Zhiwei，CAO Mengliang，CHEN Liangbi. Progress in large DNA fragment of plant [J]. *Life Sci Res*，2005，**9** (4)：43 – 45.

[10] PENG Zhenhua，LU Tingting，LI Lubin，*et al*. Genome-wide characterization of the biggest grass，bamboo， based on 10，608 putative full-length cDNA sequences [J]. *BMC Plant Biol*，2010，**18**(10)：116.

[11] GUI Yijie，ZHOU Yian，WANG Yu，*et al*. Insights into the bamboo genome: syntenic relationships to rice and sorghum [J]. *Inte Plant Biol*，2010，**52**(11)：1008 – 1015.

[12] WOO S S，JIANG Jiming，GILL B S，*et al*. Construction and characterization of bacterial artificial chromosome library of *Sorghum bicolor* [J]. *Nucl Acids Res*，1994，**22**(23)：4922 – 4931.

[13] ZHANG Honbin，ZHAO Xinping，DING Xiaoling，*et al*. Preparation of megabase-size DNA from plant nuclei [J]. *Plant J*，1995，**7**(1)：175 – 184.

[14] 都艳霞，沙伟，张梅娟. 碱裂解法提取重组质粒 DNA 及 PCR 验证[J]. 生物技术，2009，**19**(2)：35 – 37.

DU Yanxia，SHA Wei，ZHANG Meijuan. Using alkaline lysis method for recombine plasmid DNA extraction and PCR vertification [J]. *Biotechnology*，2009，**19**(2)：35 – 37.

[15] 胡华萃，王进，沈桂芳，等. 氯化铯密度梯度离心法纯化叶绿体 DNA[J]. 杭州大学学报：自然科学版，1985，**12**(3)：370 – 373.

HU Huacui，WANG Jin，SHEN Guifang. Purification of chloroplast DNA by CsCl gradient centifigation [J]. *J Hangzhou Univ Sci Ed*，1985，**12**(2)：370 – 373.

[16] ZHANG Hongbin. *Construction and Manipulation of Lare-Iginsert Bacterial Clone Libraries—Manual* [R]. Texas：Texas A & M University，2000.

[17] ANDERSON C. Genome shortcut leads to problems [J]. *Science*，1993，**259** (5102)：1684 – 1687.

[18] SAMBROOK J. *Molecular Cloning*：A *Laboratory Manual* [M]. New York：CSHL Press，2001.