



普通高等教育“十一五”国家级规划教材



第 2 版

朱旭芬 编著

The Experimental Guide for **Gene** Engineering

基因工程实验指导



高等教育出版社
HIGHER EDUCATION PRESS



普通高等教育“十一五”国家级规划教材

主要内容

本书是普通高等教育“十一五”国家级规划教材，是普通高等院校生物工程专业及相关专业的一门重要课程。本书在编写过程中，力求做到概念清晰、重点突出、由浅入深、循序渐进。本书可作为高等院校生物工程专业及相关专业教材，也可供从事生物工程专业及相关工作的工程技术人员参考。

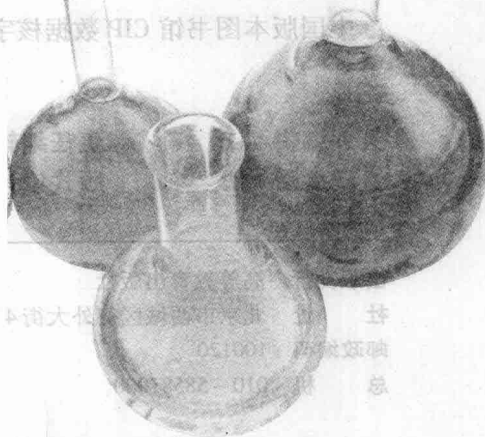
The Experimental Guide for Gene Engineering

基因工程实验指导

Ji Yin Gong Cheng Shi Yan Zhi Dao

第2版

朱旭芬 编著



10-38281118
00-810-0298
www.hep.edu.cn
www.hep.com.cn
www.jandao.com
www.jandao.com.cn
www.widewin.com

2006年1月第1版
2010年4月第2版
2010年4月第1次印刷
29.00元

北京鑫鑫美印务有限公司
1810 252 387 × 787 1/16
210 000 21.2 张
210 000 页



高等教育出版社·北京
HIGHER EDUCATION PRESS BEIJING

28477-00 号书

内容提要

为了适应学科的发展与实际需要,本实验教材在第1版的基础上进行了修改和补充,扩展了部分实验内容,增加了一些最新进展的实验技术,由原来的35个实验增加为49个实验,使其在内容上更加丰富和完善。第2版的编写除了继续保持第1版的写作特点和基本要求外,着重扩充了基因的克隆、鉴定方法以及蛋白质化学分析的一些新技术和新发展,此外还添加了部分真核生物酵母的实验。书中选用了一批新的插图、照片,以使教材内容形象、直观,可读性强。

本教材中所有实验比较系统地介绍了与实验内容相关的基本原理,强调指出了实验中的注意事项,并对与实验相关的内容进行评议,以利于读者更好地理解实验,起到实验指南的作用。书末附录部分还包含了试剂的配制等内容,方便读者参考。本教材可作为本科生或者研究生的基因工程实验教学的参考书。

图书在版编目(CIP)数据

基因工程实验指导/朱旭芬编著. —2版. —北京:高等教育出版社,2010.4

ISBN 978-7-04-028477-5

I. ①基… II. ①朱… III. ①基因-遗传工程-实验-高等学校-教材 IV. ①Q78-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2010)第029740号

策划编辑	王莉	责任编辑	张晓晶	特约编辑	杨霁霜	封面设计	张楠
责任绘图	尹莉	版式设计	范晓红	责任校对	姜国萍	责任印制	朱学忠

出版发行 高等教育出版社
社 址 北京市西城区德外大街4号
邮政编码 100120
总 机 010-58581000

经 销 蓝色畅想图书发行有限公司
印 刷 北京鑫海金澳胶印有限公司

开 本 787×1092 1/16
印 张 21.5
字 数 510 000

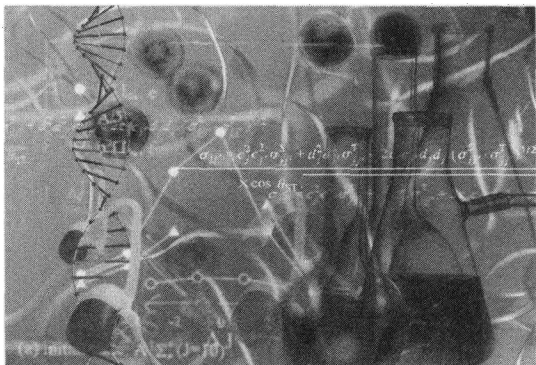
购书热线 010-58581118
咨询电话 400-810-0598
网 址 <http://www.hep.edu.cn>
<http://www.hep.com.cn>
网上订购 <http://www.landaco.com>
<http://www.landaco.com.cn>
畅想教育 <http://www.widedu.com>

版 次 2006年1月第1版
2010年4月第2版
印 次 2010年4月第1次印刷
定 价 29.00元

本书如有缺页、倒页、脱页等质量问题,请到所购图书销售部门联系调换。

版权所有 侵权必究

物料号 28477-00



第2版前言

《基因工程实验指导》第1版自2006年问世以来已有3年多了,本书得到了各位同行的大力支持与关照,被一些高等院校用作实验教材,并已列入“十一五”国家级规划教材。

随着生命科学的发展,基因工程方法与技术已渗透到现代生命科学的各个分支领域,成为生命科学及其相关学科教学和科研不可缺少的部分,并不断被赋予新的内容。为了适应学科的发展与实际需要,本实验教材在第1版的基础上进行了修改和补充,扩展了部分实验内容,增加了一些最新进展的实验技术,由原来的35个实验增加为49个实验,涉及面较广,使第2版在内容上更加丰富和完善。正如第1版前言中所指出的那样,所有实验比较系统地介绍了与实验内容相关的基本原理,强调指出了实验中的注意事项,并对与实验相关的内容进行评议,以利于读者更好地理解实验,起到实验指南的作用。书末附录部分还包含了试剂的配制等内容,方便读者参考。

第2版的编写除了继续保持第1版的写作特点和基本要求外,着重扩充了基因的克隆、鉴定方法以及蛋白质化学分析的一些新技术和新发展;此外还添加了部分真核生物酵母的实验,起到借鉴与引导作用;并对原书图片进行了补充和修改。本书编写过程中既强化基因工程的基本理论知识、研究热点和发展动态,又力求让学生全面了解实际的应用。书中选用了一批新的插图、照片,以使教材内容形象、直观,可读性强,可作为本科生或者研究生的基因工程实验教学的参考书。

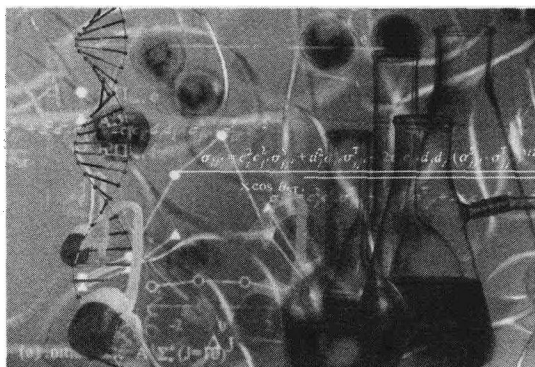
本书在编写过程中参考了国内外已经出版的基因工程技术方面优秀的书籍与文章,并引用其中的部分插图,在此一并向这些作者表示衷心的感谢。

本书在修订过程中得到了高等教育出版社王莉同志的关心、支持和帮助,在此表示衷心的感谢。并谨向一直信任和支持我们的同行、广大师生和读者致以诚挚的谢意。

由于作者的水平有限,书中难免会出现不妥甚至错误,敬请各位同仁和读者批评指正,多提宝贵的意见,谢谢!

朱旭芬

2009年10月于浙江大学紫金港校区



第1版前言

基因工程方法与技术随着分子生物学的迅猛发展,已渗透到现代生命科学的各个分支领域,成为生物工程的核心技术。

本实验教材的编写是基于自己多年来科研实践、教学内容与方法的探索,并汲取了国内外成熟的经验和信息资料,是在2002年7月、2004年7月、2005年7月的实验讲义以及2004年9月全国生物技术实验师资培训教材的基础上进一步修改完善而成的。根据基因工程研究的发展趋势,结合基因操作技术和分子生物学研究中经常使用的基本方法以及从自然界中克隆基因的基本思路,本教材以基因克隆为主线,包含了核酸与质粒的提取,基因文库构建与筛选,基因分离方法的确定,PCR法获得基因,克隆载体和表达载体的重组、重组子的鉴定,基因的表达,表达产物——蛋白质的纯化、鉴定等相关的实验技术内容。同一实验项目提供了多种可供选择的实验方法,并强调指出了实验中的注意事项,还对与实验相关的内容进行评议,附录中还包含试剂的配制等内容。为了能让实验有正确的理论指导,在每个实验前比较系统地介绍了与实验内容相关的基本原理,可为初学者提供有益的帮助,也为科研人员提供参考。

教材中的实验内容衔接紧密,可以根据各自的具体情况串联成一个综合性的大实验,针对不同层次、不同学时数要求的学生开设。为了尽可能全面、直观地了解基因工程的内涵,我们为本科生开设了以几丁质酶基因的克隆和表达为主题的96学时的系列大实验,这些实验既可以用10天时间连续进行,也可以分成10次实验间断完成,实验一环紧扣一环,在实验的间隙适当安排基因工程基本理论方面的专题讲座。旨在使学生对基因工程这一领域的主要技术有一个全方位、比较系统的了解,以便能将这些方法运用于今后的科研实践。为了提高教学效率,我们将实验安排分时段详细地列于实验计划表中,这样可以使教师与学生实验每个环节都做到心中有数。

本实验课程既重视对学生基本实验操作技能的培养和训练,又注重对学生研究能力以及分析和解决问题能力的培养,以激发学生的学习和研究兴趣。通过系统的实验训练,培养学生独立实验、观察问题、分析问题和解决问题的能力,提高学生实验设计、综合运用能力,使学生具备从事分子生物学教学和科研的基本能力。

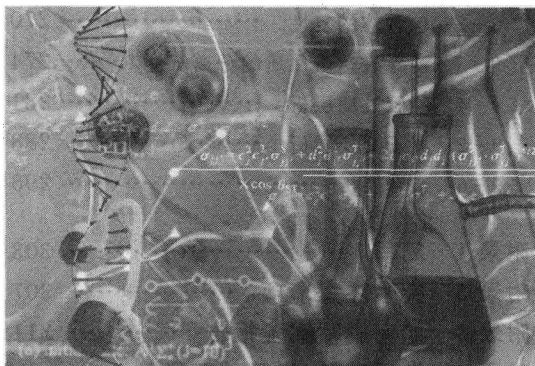
在编写本实验教材的过程中,受到了世界银行贷款的资助,得到了张铭、赵小立、史锋、

朱成钢及金勇丰等老师的热情帮助,也得到了高等教育出版社生命科学分社的王莉老师的大力支持,在此对他们表示由衷的谢意。

限于本人的学识与水平,教材中难免有不妥和错漏之处,敬请大家随时赐教和指正,谢谢!

朱旭芬

2005年8月于浙江大学西溪校区北园



目 录

实验计划表	1
-------------	---

导论	5
----------	---

1 基因文库的构建	25
1-1 染色体 DNA 的提取	25
1-2 总 RNA 和 mRNA 的提取	33
1-3 λ 噬菌体 DNA 的提取	40
1-4 染色体 DNA 的部分消化	46
1-5 基因组文库的构建	48
1-6 cDNA 合成	52
1-7 cDNA 文库的构建	58

2 目的基因的获得	64
2-1 PCR 扩增	64
2-2 核酸电泳	74
2-3 目的基因片段的获得	81
2-4 核酸探针的标记及检测	83
2-5 核酸探针筛选基因文库	92
2-6 反转录 PCR	97
2-7 RACE PCR	103
2-8 反向 PCR	110
2-9 Sitefinding - PCR	114

3 载体质粒的制备	119
3-1 质粒 DNA 的提取与纯化	119

3-2 核酸纯度、浓度与相对分子 质量的测定	128
---------------------------------	-----

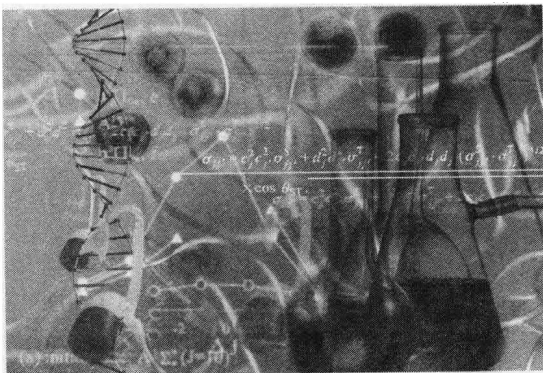
4 扩增质粒的构建	133
4-1 限制性内切酶的酶切反应	133
4-2 凝胶电泳法进行 DNA 的 分离与纯化	140
4-3 DNA 片段的体外连接	143
4-4 T-A 克隆	149

5 重组 DNA 导入宿主细胞	153
5-1 感受态细胞的制备	153
5-2 重组质粒的转化	158
5-3 外源基因在毕赤酵母中的 转化与整合	163

6 重组子的筛选与鉴定	169
6-1 阳性克隆的筛选	169
6-2 DNA 序列测定	175
6-3 序列同源性分析	181
6-4 DNA 印迹	183
6-5 菌落原位杂交	193
6-6 荧光原位杂交	196

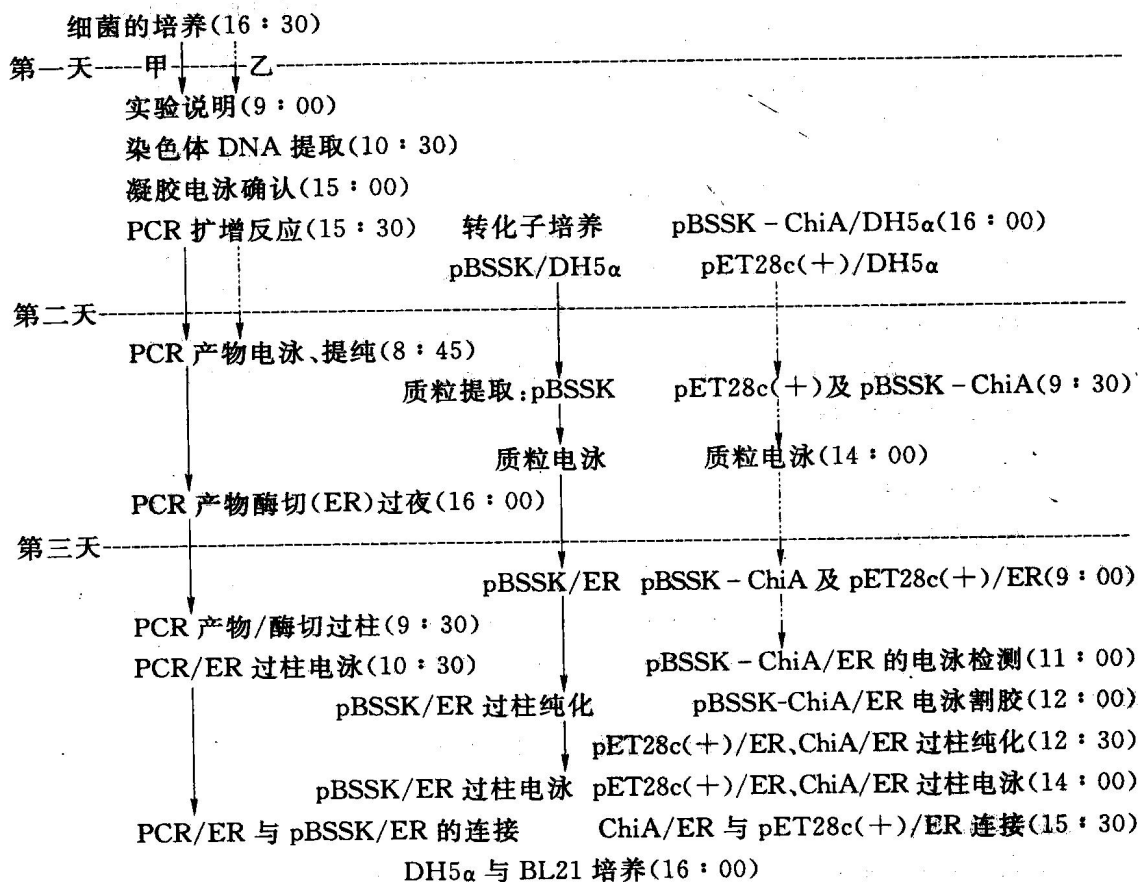
7 表达质粒的构建与诱导表达	201
7-1 表达质粒的构建与转化	201

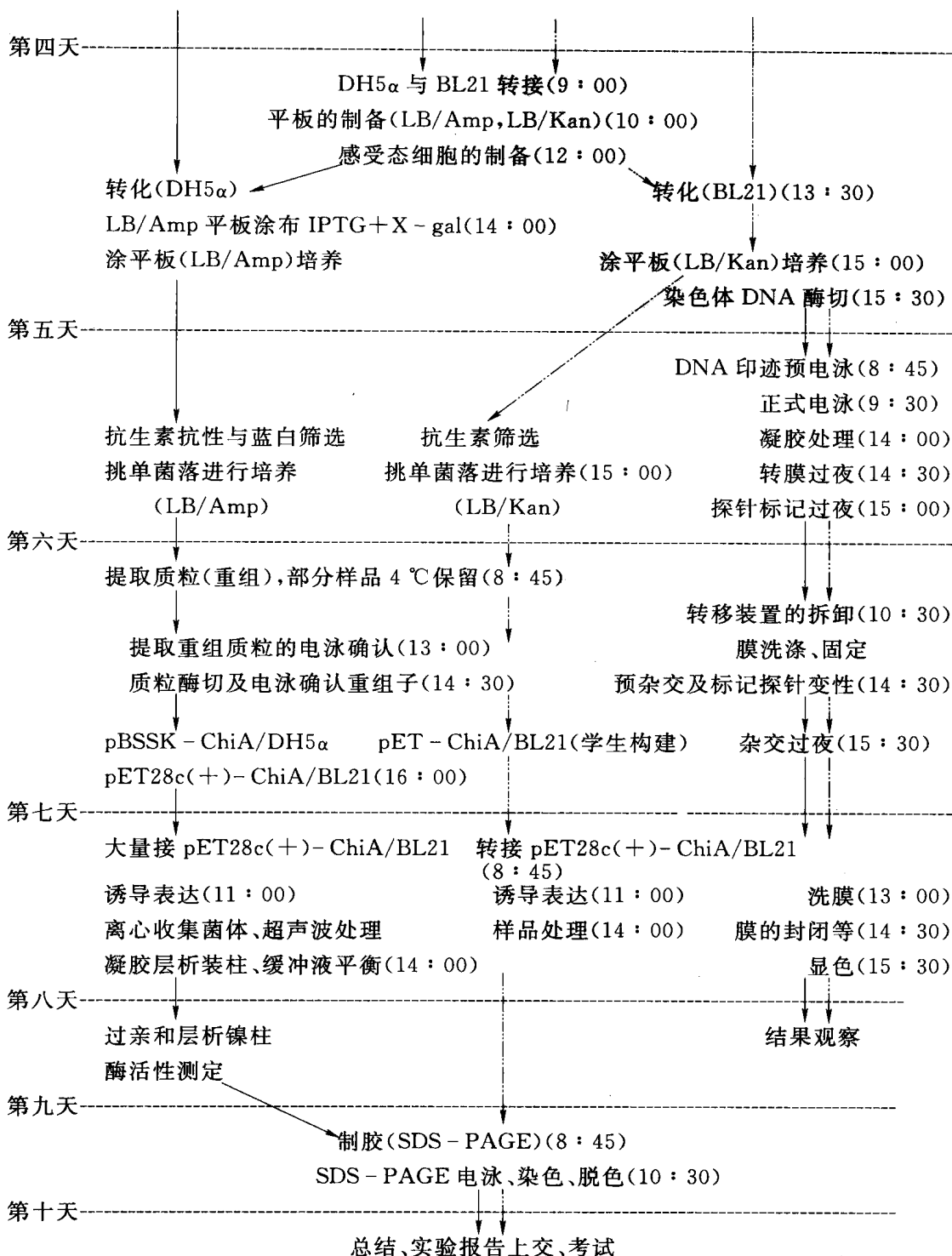
7-2 RNA 印迹	212	9-2 包含体的复性	270
7-3 外源基因的诱导表达	217	9-3 诱导表达蛋白质的分离沉淀	274
7-4 蛋白质浓度的测定	222	9-4 凝胶过滤层析	281
7-5 SDS-PAGE	227	9-5 离子交换层析	288
7-6 蛋白质印迹	236	9-6 亲和层析	295
8 蛋白质样品的分析	243	附录 1 简写	303
8-1 等电聚焦电泳	243	附录 2 实验注意事项	307
8-2 双向电泳	246	附录 3 如何撰写实验报告	311
8-3 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳	257	附录 4 常用碱基、氨基酸符号及 缓冲液	313
8-4 酶联免疫吸附测定(ELISA)	261	附录 5 大肠杆菌基因型	316
8-5 蛋白质生物功能测定	263	附录 6 培养基与试剂的配制	318
8-6 酶活性的测定	264	附录 7 实验仪器	329
9 工程菌的培养与目的产物分离 ...	267	参考文献	331
9-1 发酵条件的优化	267		



实验计划表

方案一:连续 10 天的实验安排





实验结果汇总:

1. 染色体 DNA 提取

2. PCR
3. 质粒提取
4. 质粒的酶切
5. 割胶、过柱提纯
6. 连接、感受态细胞、转化, 抗生素及蓝白斑筛选
7. 重组的扩增与表达质粒提取及酶切情况
8. 转化子的基因诱导表达
9. DNA 印迹
10. 亲和层析过柱

在有限的时间内(10 天为一周期), 为了保证实验的完整性, 两人一组(甲、乙)进行操作, 其中甲构建扩增质粒(↓), 乙构建表达质粒(↓)。最后甲、乙两同学共同完成包括 DNA 印迹、诱导表达、SDS-PAGE 分析以及酶的分离、过柱纯化等实验。要求每个同学在实验过程中, 认真做好自己分内实验的同时, 还应了解对方的实验内容。在实验完成后, 能充分了解整个实验的设计方案。总之, 通过完整的大实验体系, 对基因工程的分离、克隆、扩增、表达以及蛋白质的分离、纯化等一系列的实验过程加深认识, 掌握实验方法, 培养实验技巧, 并对基因工程实验有一个全方位的了解。

方案二: 分散实验的时间安排(如采用双休日的时间)

第一次实验: 染色体 DNA 的提取(实验 1-1)、电泳确认(实验 2-2)、DNA 含量的测定(实验 2-2, 实验 3-2)。

第二次实验: PCR 扩增目的基因(实验 2-1)、电泳确认(实验 2-2)、PCR 产物的纯化(实验 2-1)。

第三次实验: 质粒 pBSSK 及 pET28c 的提取(实验 3-1, 实验 7-1)、电泳确认(实验 2-2)。

第四次实验: PCR 产物、pBSSK-ChiA、pBSSK 及 pET28c 质粒的酶切(实验 4-1)、电泳确认(实验 2-2)、割胶与凝胶过柱纯化(实验 4-2)、电泳确认(实验 2-2)。

第五次实验: 连接反应(实验 4-3, 实验 7-1)、感受态细胞的制备(实验 5-1, 实验 7-1)、重组质粒的转化(实验 5-2, 实验 7-1)。

第六次实验: 抗生素及蓝白斑等筛选、菌落的重组扩增质粒及表达质粒的提取(实验 6-1)、酶切(实验 6-1, 实验 4-1)、电泳确认(实验 2-2)。

第七次实验: 阳性重组表达质粒菌株的诱导表达(实验 7-3)、SDS-PAGE 检测(实验 7-5)、大量诱导表达(实验 7-3)。

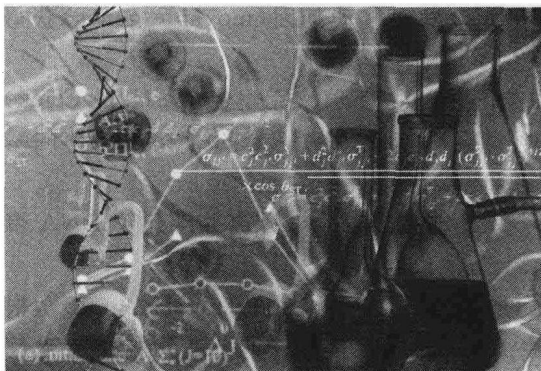
第八次实验: 过亲和层析柱(实验 9-6)、蛋白质浓度的测定(实验 7-4)、酶活性的测定(实验 8-6)、DNA 印迹(酶切)(实验 6-4)。

第九次实验: DNA 印迹(电泳、凝胶、转膜)(实验 2-4, 实验 6-4)。

第十次实验: 杂交、显色(实验 6-4), 总结、实验报告上交、考试。

为了保证实验的完整性, 实验也是分成甲乙两人一组进行, 其中一人构建扩增质粒, 另一人构建表达质粒。要求每个同学在实验过程中, 在认真做好自己分内实验的同时, 还应了解对方的实验内容。在实验完成后, 能充分了解整个实验的设计方案。

虽然这个大实验的设计是分时间段进行的,但从染色体 DNA 的提取,到目的基因的扩增,从载体质粒的制备到扩增质粒、表达质粒的构建,再到重组子的导入鉴定、目的基因的诱导表达,最后进行基因的检测、蛋白质的分离,整个实验却是连续的,一环扣一环。所以每次实验结束后应注意妥善保管各自的实验产物,以便为下次实验提供材料保证。并且有些实验需要前一天进行接种等实验准备。而杂交实验也可以根据具体情况从 3 个杂交实验(DNA 印迹、RNA 印迹、蛋白质印迹)中任意选做一个。



导 论

我们生活的地球大约有 46 亿年的历史,而原始生物体(厌氧的异养生物)的诞生最早在 36 亿年前。从那以后,生物便以其顽强的活力世代繁衍,生生不息,发展成如今数以百万计、种类繁多、千姿百态的生命大千世界。尽管如此,生命活动的本质在不同生物体中却是高度一致的,如构成 DNA 的 4 种脱氧核苷酸、组成蛋白质的 20 种氨基酸,以及核酸结构与蛋白质结构的对应关系、遗传密码等在整个生命世界中都是基本一致的,从而使不同生物的基因之间的转移和表达成为可能。

一、基因工程的研究进程

1860 至 1870 年奥地利科学家孟德尔(G. J. Mendel)根据豌豆杂交实验提出遗传因子的概念,并总结出孟德尔遗传定律。

1869 年瑞士科学家米歇尔(F. Miescher)首次从莱茵河鲑鱼精子中提取了 DNA。

1909 年丹麦植物学家和遗传学家约翰逊(W. Johannsen)首次提出“基因(gene)”名称,用以表达孟德尔的遗传因子。

1910 年美国哥伦比亚大学的遗传学家摩尔根(T. H. Morgan)以果蝇为材料发现了伴性遗传规律,确认遗传物质基础在细胞核和染色体中,证实了染色体与遗传基因的关系,并创立了现代遗传学的基因学说,获得 1933 年诺贝尔生理学或医学奖。

1924 年德国细胞学家福尔根(R. Feulgen)设计福尔根染料发现了核糖核酸(RNA)和脱氧核糖核酸(DNA)。

1928 年英国科学家格里菲斯(F. Griffith)利用肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)作为研究对象发现了转化现象。1944 年三位美国科学家埃弗利(O. T. Avery)以及麦克劳德(C. M. MacLeod)、麦卡蒂(M. McCarty)进行了细菌转化的研究,证实生物体内遗传物质的基础就是 DNA。DNA 有其特定的结构与组织编排,以基因组的形式存在于细胞中。随后又发现一些基因组小、结构简单的生物,如有的病毒是以 RNA 作为遗传物质。

1951 年美国遗传学家麦克林托克(B. McClintock)发现移动基因(movable genes)获得 1983 年诺贝尔生理学或医学奖。

1953 年美国生物学家沃森(J. D. Watson)和英国生物物理学家克里克(F. H. C. Crick)在英国生物学家富兰克林(R. Franklin)以及威尔金斯(M. Wilkins)等人的 X 衍射工作的基础上,提出了 DNA 双螺旋结构的立体模型,并荣获 1962 年诺贝尔生理学或医学奖。

1956 年美国科学家科恩伯格(A. Kornberg)与奥乔亚(S. Ochoa)分离并纯化了 DNA 聚合酶,并人工合成了 DNA,于 1959 年获得诺贝尔生理学或医学奖。

1958 年英国生物物理学家克里克提出了蛋白质合成的“中心法则(central dogma)”,根据这一法则,遗传信息是从 DNA 流向 RNA,再由 RNA 流向蛋白质。同年美国科学家比德尔(G. W. Beadle)和泰特姆(E. L. Tatum)以粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*)为材料进行遗传变异以及生化特性的研究,提出“一个基因一个酶”的假说,获得 1958 年诺贝尔生理学或医学奖。

1966 年美国的科学家尼伦伯格(M. W. Nirenberg)等人破译了全部的遗传密码,编制了一本震惊世界的完整的遗传密码“辞典”——三联体密码(triplet code),并进一步确认了遗传密码具有的特性:① 通用性,② 简并性,③ 偏倚性,④ 不重叠性和阅读方向性。尼伦伯格由于在破译 DNA 遗传密码方面的贡献,获得 1968 年诺贝尔生理学或医学奖。

1967 年世界上有 5 个实验室几乎同时报道发现了 DNA 连接酶(ligase)。

1970 年美国科学家史密斯(H. O. Smith)、威尔考克斯(K. W. Wilcox)等从流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae* Rd)分离出第一种限制性核酸内切酶 *Hind* II,它可以在特定的位点将 DNA 分子切割开。同年内森斯(D. Nathans)等使用此 II 型限制性内切酶首次完成了对基因的切割,史密斯、内森斯与瑞士的阿尔伯(W. Arber),获得 1978 年诺贝尔生理学或医学奖。

1970 年美国科学家特明(H. M. Temin)和巴尔的摩(D. Baltimore)从 RNA 肿瘤病毒中发现反转录酶(reverse transcriptase),揭示了生物遗传中存在由 RNA 形成 DNA 的过程,发展和完善了“中心法则”,获得了 1975 年诺贝尔生理学或医学奖。

1972 年美国斯坦福大学的伯格(P. Berg)等人将猿猴病毒 SV40 DNA 和大肠杆菌 λ 噬菌体 DNA 分别进行 *Eco*R I 酶切(消化),然后用 T4 DNA 连接酶将两个酶切片段进行连接,率先完成了世界上第一个 DNA 体外重组的实验,首创了基因重组技术,得到了包括 SV40 DNA 和 λ DNA 的重组 DNA 分子,获得 1980 年度的诺贝尔化学奖。

1973 年美国斯坦福大学遗传学家科恩(S. Cohen)等人在体外构建出含有四环素和链霉素两个抗性基因的重组质粒,并将其导入大肠杆菌(*Escherichia coli*)中,获得了双抗性的大肠杆菌转化子(transformant),成功完成了第一个基因克隆实验,标志着基因克隆技术的诞生。

1974 年美国科学家科恩和博耶(H. Boyer)将非洲爪蟾编码核糖体基因的 DNA 片段同 pSC101 质粒重组,并导入大肠杆菌细胞,结果表明动物基因已进入大肠杆菌并转录出相应的 mRNA 产物,第一次实现了异源真核基因在原核生物中的表达。

1975 年英国的桑格(F. Sanger)实验室建立了酶法快速测定 DNA 序列的技术,1977 年美国吉尔伯特(W. Gilbert)实验室又建立了化学测定 DNA 序列的技术。分子克隆和测序方

法的建立,使重组 DNA 技术系统得以产生。因此,桑格、吉尔伯特与美国斯坦福大学的伯格分享了 1980 年度的诺贝尔化学奖。

1977 年美国的夏普(P. A. Sharp)和英国的罗伯茨(R. J. Roberts)等两组科学家分别同时发现了割裂基因(split gene)并获得了 1993 年诺贝尔生理学或医学奖。

1978 年和 1981 年美国科学家奥尔特曼(S. Altman)、切赫(T. R. Cech)分别发现了核糖核酸(RNA)自身具有的生物催化作用,不仅为探索 RNA 的复制能力提供了线索,而且说明了最早的生命物质是同时具有生物催化功能和遗传功能的 RNA,打破了蛋白质是生物起源的定论,于 1989 年获得诺贝尔化学奖。

1979 年加拿大科学家史密斯(M. Smith)发明了寡聚核苷酸基因定点突变技术,其可以改变遗传物质中的遗传信息,是生物工程中最重要技术。1985 年美国科学家穆利斯(K. B. Mullis)发明聚合酶链反应(polymerase chain reaction,PCR)方法,利用该技术可从极其微量的样品中合成大量的 DNA 分子,使基因工程又获得了一个新的工具。史密斯与穆利斯获得 1993 年诺贝尔化学奖。

从此,基因工程的发展是日新月异,不论在基础研究领域,还是在生产实际应用方面都取得了惊人的成绩,并带来了巨大的科学价值和经济效益。

基因工程(gene engineering)或称基因操作(gene manipulation)、重组 DNA 技术(recombinant DNA technology)是 20 世纪 70 年代从分子遗传学基础上发展起来的一门新技术,它综合采用了生物化学、遗传学和微生物学等的现代技术,在体外(*in vitro*)试管中对大分子 DNA 进行剪切加工,再与不同亲本来源的 DNA 分子重组(recombination),并将其引入宿主(host)细胞中去,通过复制(replication)、转录(transcription)、翻译(translation)以及表达(expression),使生物获得新的遗传性状。可以说重组 DNA 技术实质上是人类对生物功能的模拟,是人们获取、整理、破译、编辑和表达遗传信息(基因)的一种操作平台与技术。基因工程的两个基本特点是分子水平的操作、细胞水平的表达。

一个典型的 DNA 重组实验通常包含以下几个步骤,如图 1 所示。

① 通过 PCR 扩增等方法获取供体(donor)生物的目的基因(target gene)或称外源靶基因,用限制性核酸内切酶(restriction endonucleases)分别对外源 DNA 和载体(vector)分子进行切割。

② 利用 T4 DNA 连接酶(ligase)将含有目的基因的 DNA 片段连接到另一个称为克隆载体(vector)的 DNA 分子上,构成一个新的重组 DNA 分子。

③ 借助于细胞转化(transformation)等手段,将重组 DNA 分子导入宿主细胞,并在宿主细胞中复制保存。

④ 对那些吸收了重组 DNA 的宿主细胞进行筛选和鉴定。

⑤ 对含有重组 DNA 的细胞进行大量培养,检测外源基因是否表达。

重组 DNA 技术的主题就是外源基因的分离、克隆、扩增和表达。其中最关键的是基因的克隆。

重组 DNA 技术具有以下 3 个特点:① 可以打破生物界种的界限,突破亲缘关系的限制,加快变异的程度和速度。② 可以定向变异、育种,定性改造生物。③ 可以创造出自然界中原本没有的生物。

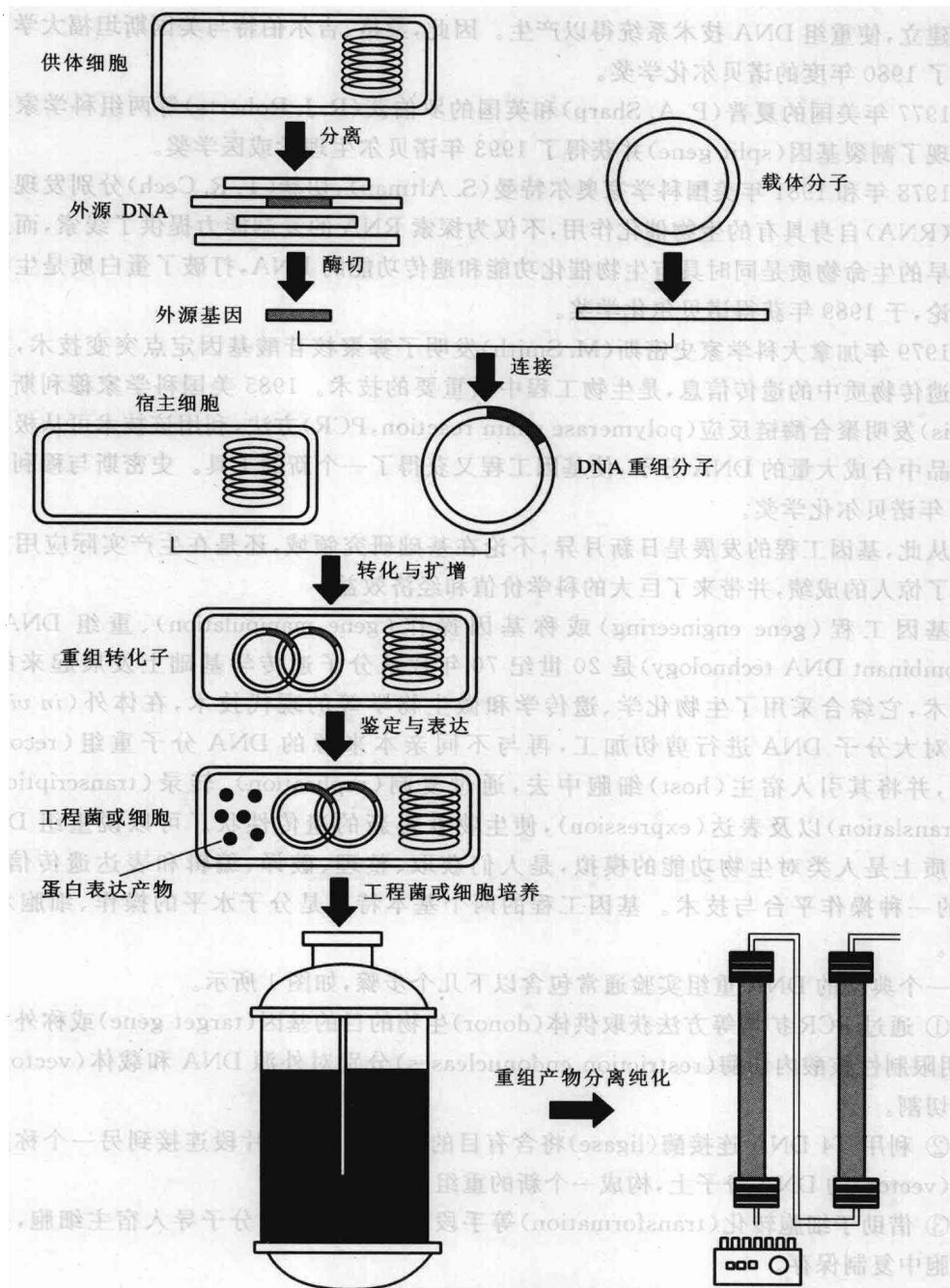


图 1 基因工程基本流程示意图(引自张惠展,1999)

二、基因工程的四大要素

基因工程的四大要素为工具酶、载体、宿主(受体)以及供体(外源基因)。

(一) 工具酶

基因工程的迅猛发展,与工具酶的发现是紧密相关的。1956 年科恩伯格在大肠杆菌

(*E. coli*)中发现了可在试管中合成 DNA 的第一个工具酶——DNA 聚合酶(polymerase)。1962 年阿尔伯等人发现一种可使未甲基化的 DNA 分子断裂的限制性酶的存在,并于 1968 年成功分离出 I 型限制性内切酶。1967 年世界上有 5 个实验室几乎同时发现了 DNA 连接酶(ligase)。1970 年史密斯和威尔考克斯分离出了 II 型限制性内切酶;同年内森斯使用 II 型限制性内切酶首次完成了对基因的切割。此后特明和巴尔的摩从 RNA 肿瘤病毒中发现反转录酶(reverse transcriptase),揭示了生物遗传中存在由 RNA 形成 DNA 的过程,使真核生物基因的制备成为可能。

重组 DNA 技术中常用的工具酶包括:① 限制性内切核酸酶(restriction endonuclease)和甲基化酶(methylase)。② 外切核酸酶(exonuclease)和内切酶。③ DNA 和 RNA 聚合酶(polymerase)。④ 核酸末端转移酶(terminal transferase)。⑤ DNA 连接酶(ligase)。这些工具酶种类不同,功能各异,有的是“手术刀”,专司切割之职,如限制性内切酶、外切核酸酶和内切酶;有的是“缝纫线”,具有连接之功,如 DNA 连接酶;有的像“复印机”,行使复制之责,如 DNA 和 RNA 聚合酶;有的像“搬运工”,带有末端转移之方,如核酸末端转移酶等(表 1)。大多数限制性内切酶和连接酶作用于双链 DNA,而不能作用于单链 DNA。其中基因工程操作中最常用的工具酶是 DNA 聚合酶、限制性内切核酸酶和 DNA 连接酶,具体见实验 2-1、实验 4-1 以及实验 4-3。

表 1 重组 DNA 技术中常见的工具酶

酶 类	功 能
限制性内切核酸酶	识别并在特定的位点上切开 DNA
DNA 连接酶	通过磷酸二酯键把不同的 DNA 片段连接起来
DNA 聚合酶 I	按 5'到 3'方向加入新的核苷酸,补平 DNA 双链中的缺口
反转录酶	按照 RNA 的碱基序列,根据碱基互补原则合成 DNA 链
碱性磷酸酶	除去位于 DNA 链 5'或 3'端的磷酸基团
末端转移酶	在双链核酸的 3'端加上多聚核苷酸
多聚核苷酸激酶	使多聚核苷酸 5'端磷酸化
DNA 外切酶 III	从 DNA 链的 3'端逐个切除单核苷酸

(二) 载体

外源基因往往不能独立地复制,需要借助某种运载工具将其引入宿主(受体)细胞中进行克隆、保存或表达。作为基因载体(vector)的必备条件:① 具有有效的运载能力和遗传标记基因;② 具有 DNA 复制起点(origin),携带外源性目的基因前后均能在宿主细胞内自主复制;③ 具有多克隆位点(multiple cloning site, MCS),能携带大小不同的外源基因,与外源 DNA 连接时不影响载体的正常复制与扩增;④ 在宿主内控制外源基因的表达活动;⑤ 鉴定方便,装卸手续简便,安全可靠。

根据宿主细胞的不同,主要可以将载体分成以下几大类:细菌质粒(plasmid)、λ 噬菌体(phage)、黏粒(cosmid)、酵母穿梭载体(shuttle vector)、植物克隆载体(如 T-DNA 载体)、动物克隆载体和人工染色体载体(artificial chromosome vector)(表 2)。其中细菌质粒是基因工程中最常用的载体,相对分子质量较小,因此易于在宿主间转移和迁移。但是,天然质