

遺傳之程



• 生物学研究概说 •

遗 基 传 因 工 程

——DNA 克隆技术

〔英〕D. M. 格洛弗 著

李 毅 平 译

科 学 出 版 社

1 9 8 6

内 容 简 介

本书为J. M. 阿什沃恩主编的《生物学研究概说》丛书之一。内容包括体外DNA重组技术的酶学、质粒运载体、噬菌体运载体、克隆的DNA在大肠杆菌中的表达、高等真核生物细胞染色体DNA克隆片段的物理鉴定法、真核系统基因表达的研究途径等。

D. M. Glover
Outline Studies in Biology
GENETIC ENGINEERING
—CLONING DNA
Chapman and Hall 1980

· 生物学研究概说 ·
遗 传 工 程
—DNA 克隆技术
(英) D. M. 格洛弗 著
李 毅 平 译
责任编辑 蒋伯宁

科 学 出 版 社 出 版

北京朝阳门内大街 137 号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

1986年1月第一版 开本: 787×1092 1/32

1986年1月第一次印刷 印张: 3 6/16

印数: 9001—4,500 字数: 69,000

统一书号: 13031·3026

本社书号: 3100·14-10

定价: 0.82 元

缩 写

A_p^r	青霉素抗性
A_p^s	青霉素敏感
Cm^r	氯霉素抗性
Cm^s	氯霉素敏感
Kb	千碱基——即单链核酸的1,000个碱基或双链核酸的1,000个碱基对
P_L	λ 噬菌体的左向启动基因
P_R	λ 噬菌体的右向启动基因
$P_{R'}$	λ 噬菌体的右向晚期启动基因
P_{re}	λ 噬菌体的建立溶原态 (lysogeny) 的启动基因
P_{rm}	λ 噬菌体的保持溶原态的启动基因
SV ₄₀	猿猴病毒40
T_c^r	四环素抗性
T_c^s	四环素敏感

引 言

关于原核细胞基因表达分子生物学的知识，以往所取得的进展，很大程度上是基于对噬菌体和细菌质粒的研究。在噬菌体之中，大肠杆菌 λ 噬菌体可能是已了解最透彻的。 λ 噬菌体和宿主细胞之间的相互作用是一个特别富有成果的研究领域。它有一套基因，或可直接导致细胞裂解，或可在溶原态而稳定地与宿主染色体结合在一起，由溶原细胞产生感染性噬菌体时， λ 噬菌体的基因组由大肠杆菌染色体上切出，这个切出通常总是十分准确的。但是，有时这个切出不是那么准确，而产生一个转导的 λ 噬菌体，它带有与噬菌体DNA插入位点相邻的细菌染色体片段。这种特异的转导噬菌体是十分有用的，它提供了用核酸杂交法来检测特异信使RNA的手段，它使大量产生特定的基因产物成为可能。关于细菌质粒的研究也有类似的历史。F因子促进细菌结合的发现及其作用机制的推导曾处于大肠杆菌遗传学发展的中心地位。正像 λ 噬菌体由其溶原态不完整地切出时，能产生一个带有细菌DNA片段的环形的噬菌体基因组一样，当F质粒由Hfr株不完整地切出时，产生一个F'质粒，它也带有细菌DNA片段。这种F'质粒是十分有用的运载体，它可将特异的基因由一菌株大肠杆菌转到另一株。而且在构建局部二倍体株上可能是最为有用的，这种株使许多细菌操纵子的调控线路得以阐明。

本书中讲述的遗传工程的原理和上述自然的过程是相类似的，但是它克服了绝对依赖于大肠杆菌细胞体内重组机制

的限制。离体 DNA 重组技术使任何生物的 DNA 都可以插入一质粒或一病毒复制子，而形成一杂合分子。此杂合分子可以在复制子所属的宿主生物中复制，它可以是原核的也可以是真核的。在绝大多数的克隆实验中，都是先产生一群不均一的 DNA 体外重组体。例如，在用大肠杆菌质粒作运载体时，重组分子必须保留质粒的两个特性：自动复制的能力和标志的功能，利用后者可以对受质粒转化的细胞进行筛选。转化的条件要调节好，使每个细菌细胞仅仅接受一个质粒分子。然后由转化细菌的一个单菌落进行培养，便可得到一群均一的重组质粒的 DNA 分子。在使用病毒运载体，例如 λ 噬菌体的情况，挑出由重组噬菌体 DNA 单分子产生的单个噬斑。由此噬菌体便可得到均一的外源 DNA 片段。

到今天用克隆的 DNA 片段进行的大多数研究，已经使克隆技术发展成为一种可以由复杂的基因组中将某一特定 DNA 顺序进行大量制备的方法。于是，这些特定基因顺序的详细物理图谱便可作出。这种研究已经使我们开始对真核细胞基因组有所了解。一条有待我们充分开展的研究渠道就是利用克隆的 DNA 去测试 DNA 顺序和功能的关系，从而研究真核细胞基因表达的调控机制。离体 DNA 重组技术应用的一个主要的方面，激发了工业家的想像力。这就是它有潜力设计出一些微生物，这些微生物能生产具有工业重要性或药物重要性的多肽来。

这些潜在的好处已经很快地为人们所认识，同时也看到了潜在的危害。有些最早的离体重组体是由带有半乳糖操纵子的大肠杆菌 DNA 片段结合于哺乳动物肿瘤病毒 SV40 DNA 而构成的^[1]。这些分子从未被引入大肠杆菌，因为设想在肠道内存活的细菌中传播肿瘤病毒 DNA 是会有危害的。对这类问题的早期的评议刊于阿西比 (Ashby) 委员会

报告^[2]和有关重组DNA分子的阿西罗马 (Asilomar)会议的总结报告^[3]。由于缺少证据, 各种观点变得很极端, 整个问题引出了很多的争论, 政府及科学团体都出版很多报告^[4-6]。主要怕的是一个有潜在危害的真核基因可能无意中被克隆了。这个大肠杆菌宿主细胞可能进一步在动物肠道内成功地定居下来, 而爆发灾难性的传染病。另一种观点是, 在自然界, 原核生物经常与腐败的动物体和植物体的真核DNA接触并摄取之。这样, 由于地球上存在着庞大的原核生物群体, 现在能离体进行的这种重组, 可能早已有机会发生, 但是重组体生物不具有选择的优势。我们现在知道, 主要由于离体重组技术所得到的结果, 绝大多数的真核基因具有染色体型的组织结构, 因而妨碍了它们在原核细胞中的表达(见第五章)。为了能使真核细胞基因在原核细胞中表达, 一般需要克隆对之感兴趣的mRNA的相辅DNA, 或克隆一个化学合成的基因, 并能将其正确地连接到促进转录和启动翻译的原核信号上去(第四章)。关于这些实验的生物安全性的考虑, 进一步促进了发展‘安全’宿主-运载体系统的工作。由于这类工作, 发现了大肠杆菌标准株在作为实验室生物经历了数十年的培养后, 现在能在人的肠道存活的机率是很低的。已经发展的生物‘安全’的宿主-运载体系统, 将在第二和第三章讲述。对于大肠杆菌, 这种机率就更进一步地降低了。由于最近几年在此领域积累了越来越多的经验, 由于我们对基因组织结构和基因表达调控知识的了解, 对这种实验的危害性已有了一种较为现实主义的观点。现在, 这类实验是在政府机构推荐的、特殊设计的实验室之内进行。现在多数国家都建立了国家的和地区的安全委员会来监视这类工作, 并从实验室安全的角度提出建议。

参 考 文 献

- [1] Jackson, D.A., Symons, R.M. and Berg, P. (1972), *Proc. natn Acad. Sci. USA*, 69, 2904.
- [2] Ashby, Lord (1975), *Cmd. 5880, H.M.S.O. London.*
- [3] Berg, P., Baltimore, D., Brenner, S., Roblin, R. O. and Singer, M.F. (1975), *Science* 192, 938.
- [4] Williams, R.E.O. (1976), *Cmd. 6600, H.M.S.O. London.*
- [5] Revised N.I. H. Guidelines. *United States Federal Register* 44, 69210.
- [6] *Nature* (1978), 276, 104.

目 录

引言	v
第一章 体外DNA重组技术的酶学	1
1.1 限制性核酸内切酶	1
1.2 用DNA连接酶连接限制性酶切片段	2
1.3 通过同聚物的尾端连接DNA	9
第二章 质粒运载体	13
2.1 pSC101	13
2.2 ColE1	14
2.3 带有抗药性标志的 ColE1 衍生质粒	15
2.4 质粒运载体系统的生物防护	20
2.5 含有特异核苷酸顺序的质粒的筛选	22
第三章 λ 噬菌体运载体	25
3.1 λ 噬菌体的生物学	25
3.2 噬菌体运载体	28
3.3 晚期基因——它们在克隆运载体中的应用	33
3.3.1 噬菌体装配	33
3.3.2 生物防护	35
3.3.3 利用体外包装法提高重组体的回收率	36
第四章 克隆DNA在大肠杆菌中的表达	40
4.1 用质粒运载体克隆DNA的表达	40
4.1.1 大肠杆菌营养缺陷型的互补作用	40
4.1.2 新生多肽表达的检测	41
4.1.3 脊椎动物基因在大肠杆菌中的表达	43
4.2 λ 噬菌体启动基因的表达	52
第五章 高等真核生物染色体DNA克隆片段的物理	

	鉴定法.....	56
5.1	克隆的DNA 在其染色体源出点上作图.....	56
5.1.1	原位杂交	56
5.1.2	体细胞杂交	60
5.2	电泳图谱技术	60
5.2.1	限制性酶切图谱	60
5.2.2	凝胶转移杂交法	63
5.2.3	转录体的图谱	66
5.3	用电镜作克隆DNA 的图谱.....	68
5.3.1	变性图谱	69
5.3.2	异源双链图谱	70
5.3.3	RNA 同源区的图谱	71
第六章	真核系统基因表达的研究途径	80
6.1	离体变异	80
6.2	表达系统	82
6.2.1	酵母中的克隆	82
6.2.2	用猿猴病毒40作克隆运载体	85
6.2.3	哺乳动物细胞的直接转化	90
6.2.4	克隆 DNA 进入爪蟾卵母细胞的微 量注射法	91

第一章 体外 DNA 重组技术的酶学

1.1 限制性核酸内切酶

目前DNA分子之所以能够很容易地在体外连接,是由于应用了限制性核酸内切酶的结果。这类酶可以识别DNA上的特异顺序,然后切断双链中的每一条链。在很多原核细胞中发现有这类酶的存在。它们似乎是负责把外源DNA分子降解,而本身的DNA则受到修饰酶的保护而免于被降解,这修饰酶通常是甲基化酶。限制性核酸内切酶是负责宿主控制的噬菌体的修饰现象的,这是五十年代初首先有人提出的(见参考文献1的综述)。假若一个曾在大肠杆菌K株繁殖过的噬菌体,再使其感染大肠杆菌B株,则感染过程的效率是非常低的。但由此感染产生的噬菌体再感染大肠杆菌B株就效率很高。可以检测出有三个基因位点(loci)控制此系统: *hsdS*、*hsdM*和*hsdR*。有一个控制此系统专一性的多肽是由*hsdS*决定的。*hsdM*的基因产物是一修饰酶,在切断核酸的过程中,它也与*hsdR*基因的产物,即限制性核酸内切酶相互作用。在上述例子中,从K株生长出的噬菌体,可能在对K型限制-修饰系统专一的位点被修饰。在大肠杆菌B细胞的第一个感染周期中,用B型限制-修饰系统发现没有B型修饰,便将此感染的DNA降解了。但是有一小部分分子被B型修饰系统甲基化。这些分子在另一感染周期中便可免于被限制而存活下来。当你把离体重组的未经修饰的外源DNA引入大肠杆菌时,必须牢记有此现象存在。为了使这些分子能保

存下来，受体菌株必须是 *hsdS* 或 *hsdR* 基因缺失的。

大肠杆菌的 B-K 型限制修饰酶系统被命名为 I 类酶：它们需要 Mg^{+} ，S-腺苷甲硫氨酸和 ATP 作为辅助因子。它们虽然识别 DNA 上的一些专一性位点，但是并不在这些位点切断它^[2]。已发现第二类的限制性核酸内切酶只要求简单的辅助因子，而且就在专一性顺序上或其附近切断 DNA。这些专一性顺序通常只有数个核苷酸长，并围着中心的核苷酸对呈旋转对称性。已经由广泛种类的原核微生物中抽提出这 II 类酶，它们在 DNA 克隆中十分有价值。

Roberts^[3] 已经发表了一个这类酶和其识别顺序的详尽的表。让我们只看看其中最常用的一些限制性核酸内切酶的识别位点。一般来说，这些酶切断 DNA 产生的切口常带有 5' 磷酸基和 3' 羟基末端。有些时候，在两条链上的切口是错开的，因为识别顺序的对称性，就产生一对有相互粘合性的末端。在质粒上编码的大肠杆菌 *EcoR I* 酶就是这类酶的一个例子，它切在 GAATTC 顺序的 G 和 A 残基之间（参看图 1.1）。在 *EcoR I* 的作用下，伸出的单链末端为 5' 末端。其它的酶，如由 *Providencia stuartii* 抽提出的 *Pst I* 是错位切口，所产生的单链末端为 3' 末端。另外有些酶，如由嗜血杆菌 (*Haemophilus aegypticus*) 得到的 *Hae III*，它产生平头末端。II 类的限制性核酸内切酶为我们提供了用以解析简单基因组或解析由复杂基因组得到克隆片段的手段。在第五章，我将综述介绍限制性核酸内切酶在这方面的应用。在本章则将着重于这些酶在 DNA 离体重组过程中的应用。

1.2 用 DNA 连接酶连接限制性酶切片段

离体 DNA 重组中最广泛使用的方法是利用能使 DNA

产生相互结合末端的限制性核酸内切酶。这种切开方式是 Mertz 和 Davis^[4] 首先发现的, 他们用电镜表明 EcoR I 切过的 DNA 在低温时即趋于环化。他们进而证明利用大肠杆菌 DNA 连接酶可将粘性末端共价键地接起来, 他们还可由细菌质粒 λ dvgal 和 SV40 DNA 构建得到重组 DNA 分子。

表 1.1 常用的产生粘性末端的限制性核酸内切酶

酶	微生物	切开位点
Bam H I	(解淀粉)芽孢杆菌 (<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H)	G ↓ <u>GATCC</u>
Bgl I	芽孢杆菌 (<i>Bacillus globigii</i>)	A ↓ <u>GATCT</u>
EcoR I	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i> RY 13)	G ↓ AATTC
Hind III	流感嗜血杆菌 (<i>Haemophilus influenzae</i> Rd)	A ↓ AGCTT
Mbo I	牛摩氏杆菌 (<i>Moraxella bovis</i>)	↓ <u>GATC</u>
Pst I	<i>Providencia stuartii</i> 164	CTGCA ↓ G
Sal I	白色链霉菌 (<i>Streptomyces albus</i> G)	G ↓ TCGAC

现在已知有一些酶可以产生粘性末端(表1.1)。已经报道有些噬菌体或质粒运载体可用许多这类酶所产生的 DNA 片段, 进行克隆。这些酶中, 有些其识别顺序具有共同的中心四核苷酸, 例如 Bam H I、Bgl II 和 Mbo I。因此, 虽然这些酶对 DNA 具有不同的识别位点, 但它们都产生同样的单链 5' 末端, 因而这一组酶中由不同的酶所产生的片段相互连接。经限制性核酸内切酶酶切产生的任何生物的 DNA 片段, 其末端的同一性正是使各种不同来源的 DNA 能够退火结合并进而连接起来所需要的性质。这个克隆途径的一般原理如图 1.1 所示。这是将果蝇 (*Drosophila*) DNA 的 EcoR I 片段克隆进入细菌质粒 pSC101 的一个例子。在某些实验中, 这种方法的无选择性的连接可能是个缺点。例如, 假若一个人想构建一个 DNA 分子, 希望其中的酶切 DNA 片段要按特定

次序排列而重新产生一个转录单位时，就是这种情况。有一个可能克服这个问题的办法，但是尚未看到广泛的应用。这就是将 DNA 用一种酶，像 Hga I 这种酶来切，然后再退火粘合。这酶的识别顺序是 GACGC，但是它并不在此位点切断 DNA，而是在距离此识别位点以外的依次为第五和第十核苷酸处产生错位的单链切口。这样所产生的一组酶切片段，各有独特的粘性末端，因此它们只能以一个特定的次序重新组装起来。

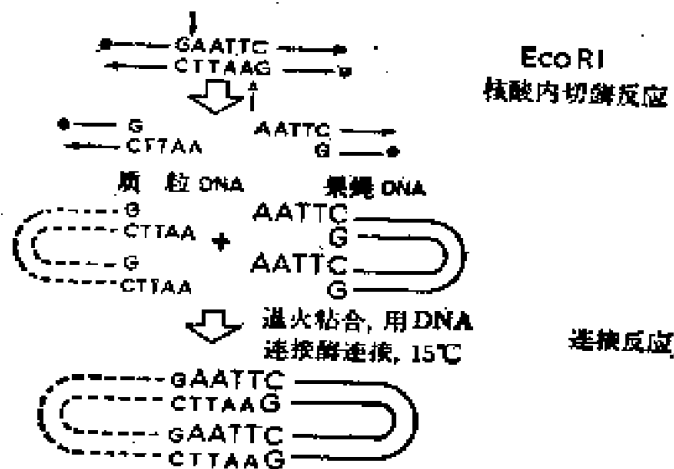


图 1-1 用 DNA 连接酶连接 EcoRI 片段

DNA 连接酶具有将 DNA 上的单链缺口封合起来的生理功能。这 DNA 要具有 5' 磷酸基和 3' 羟基末端，这 DNA 可以是由复制叉上的不连续性所产生的，也可以是在修复过程中产生的。为了将限制性酶切片段用共价键连接起来，有两种酶是最常用的，即大肠杆菌的连接酶和 T4 噬菌体编码的酶。大肠杆菌的酶用 NAD 作为辅助因子，而 T4 酶用 ATP。但不论是哪种辅助因子，都作用于酶的赖氨酸残基上的 ϵ -NH₂ 基使之腺苷酸化。然后 DNA 的 5' 磷酸末端被酶-辅助因子复合物作用而腺苷酸化。最后形成了一个磷酸二酯键同时释放出一个 AMP (图 1-2) [5]。由 T4 感染的大肠杆菌纯化得

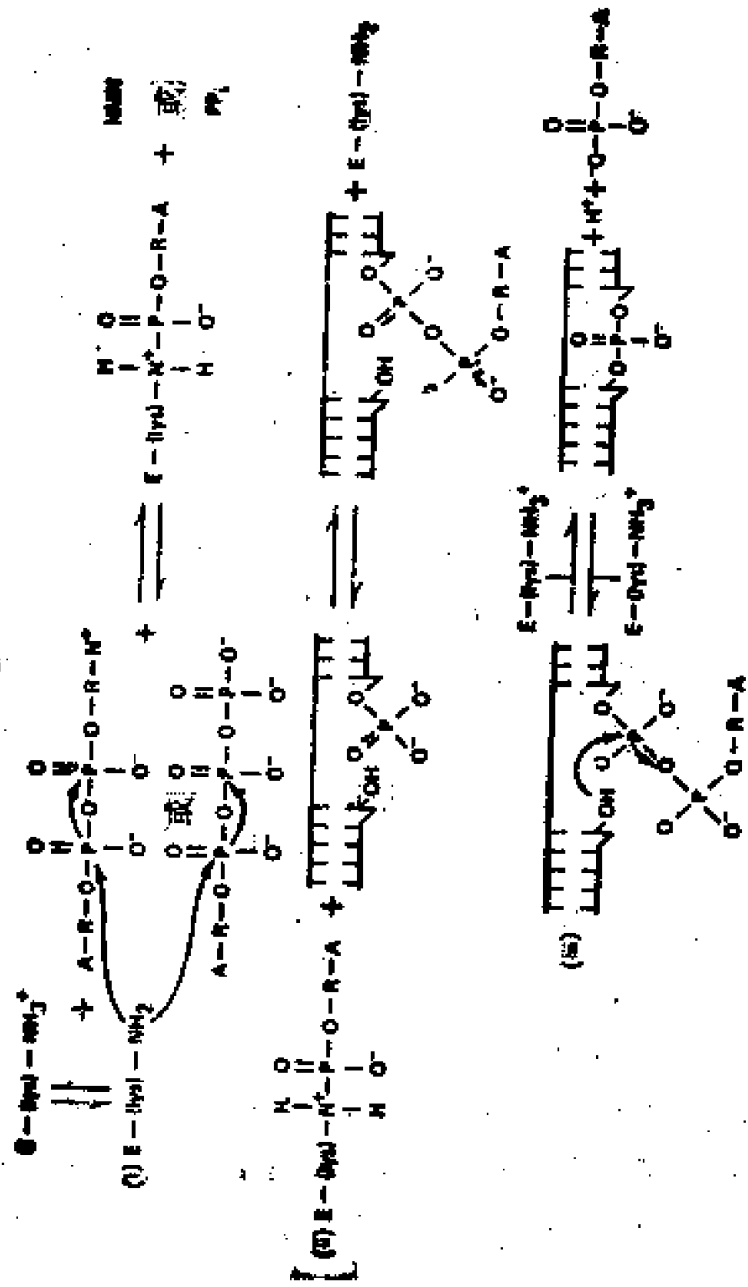


图 1.2 DNA 连接酶反应的机制 (选自参考文献[5])

到的酶使用得最为广泛,因为它更容易制备,而且不同于大肠杆菌的酶,它有商品供应。T4酶还有另外一个优点,就是在高浓度的酶和 ATP 存在下,它也可以把有些由限制性核酸内切酶所产生的完全碱基配对的‘平头末端’的 DNA 片段连接起来。这时,被连接的分子不是通过双方粘性末端之间的氢键而拉到一起的^[6]。把 T4 酶的基因克隆到 λ 噬菌体运载体上,而使此酶很容易制备(见第四章)。

通过限制性核酸内切酶产生的粘性末端,将外源 DNA 与质粒运载体连接起来的方法,有一个主要的缺点,这便是质粒运载体有一定的频率的自身环化。这可导致在转化菌落中出现很多只含有运载体质粒造成的‘背景’。这个缺点可以用细菌的或小牛小肠的碱性磷酸酯酶去处理经限制酶切过的质粒,以除去其 5' 末端的磷酸基团而得到克服。这样,质粒的两个末端就不可能被 DNA 连接酶共价键地连接起来。外源 DNA 的限制性酶切片段并不用磷酸酯酶处理,因此它们的 5' 磷酸基团可以与质粒的 3' 羟基共价键地结合。结果就可以得到一些杂合分子,在其每个连接位点上,运载体和外源 DNA 都是只有一条链相连接,而另一条链上则有一个 3' 和 5' 羟基的缺口。这样的分子可以引入细菌细胞,然后在细胞中这些缺口再修复起来。

利用限制性酶切位点进行 DNA 连接的另一主要缺点时常会出现,当你的兴趣是要克隆一个大的多肽链编码顺序或要克隆染色体 DNA 的一个大片段,而其中却含有若干个酶切位点的时候。早期解决这个问题一个办法是将 EcoR I 部分酶切的染色体 DNA 克隆进入细菌质粒^[7]。这是一个很费事的技术,因为部分酶切的产物和连接起来的 EcoR I 片段都必须仔细地测定其分子大小,以便把它们与含有酶切片段寡聚体的克隆区别开来,而寡聚体中的这些片段原来

在染色体上并不相邻。Maniatis 他们由高等生物的基因组建立了克隆 DNA 的‘库’(图1.3)。虽然这个早期方法中的一些其它缺点,在Maniatis 及其同工作者使用过的一般方法中已加以校正^[8],但这种仔细测定分子大小的步骤是无法回避的。在生物体的基因组中限制性酶切位点的分布并非是随机的,而是由核苷酸顺序的功能排列决定的。因此,如果用 EcoRI 这样的内切酶去切断 DNA 而进行克隆的时候,就会有某些 DNA 要由重组体的池中选择性的丢失。为了克服这个可能发生的问题,Maniatis 等^[8]用 HaeIII 和 Alu I 部分酶解染色体 DNA 来取得随机打断的片段。这两个酶的识别位点分别为四核苷酸顺序 GGCC 和 AGCT。它们切断 DNA 产生平头末端。在 DNA 中专一性四核苷酸顺序存在的频率要比专一性的六核苷酸顺序高得多。因此任何 DNA 片段中含有这两个酶之中的某一酶的切点的可能性是非常大的。然后将此部分酶切的 DNA 用速度沉降分级,选出 20Kb 的片段,将之克隆进入可以接受 EcoRI 片段的 λ 噬菌体。为达到此目的,可将化学合成的、带有 EcoRI 识别顺序的寡聚核苷酸加到 HaeIII

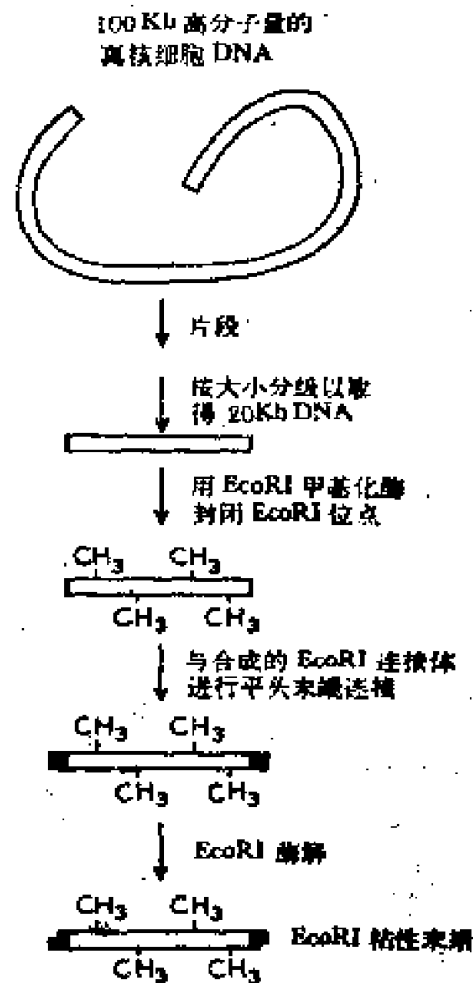


图 1.3 将连接体加合到随机切断的染色体 DNA 上(根据参考文献[8]重新绘制)