

基因操作原理

[英] R. W. 奥尔德

S. B. 普里姆罗斯

中国科学技术翻译出版社

基因操作原理

〔美〕 R.W. 奥尔德
S.B. 普里姆罗斯 著

吴乃虎 陈关君 张树庸 译

中国科学技术翻译出版社

北京朝内大街151号
京华印刷一分厂印刷
北京市新华书店发行

1985年8月第一版 850×1168 1/32

1985年8月第一次印刷 印张：5¹/₄

印数：0001—3100 字数：100,000

统一书号：14292·003

定价：1.35元

前 言

生物学的研究不断地取得激动人心的进展，并且正以持续增长的速度向前发展。本书的主题基因操作，即通常所说的遗传工程，便是现代生物科学的前沿学科之一。由于这一学科非同寻常的进展速度，致使许多生物学家都感到无法跟上当前的发展形势，这一局面由于人们随意使用术语而变得更加严重起来。因此，正像所有迅速发展的领域一样，需要经过一段时间，全面的著述才能问世。我们编写这部书就是为了填补这个空白。

基因操作的现状是，一些基本技术已经日臻完善，而目前的趋势是应用这些技术去解决一些特殊的研究课题。因此，我们尽力为读者提供有关这些基本技术的详尽知识，以便他们能够领会当代的文献和跟上将来的发展。我们希望本书的内容不至于很快过时，而所阐述的一些基本原理，在今后的一段时间内，都将为读者提供有关基因操作的基本知识。

我们曾给 Warwick 大学学习生物学、微生物学及生物化学的学生，开设了二十讲基因操作学位课程。本书是以这个讲稿为基础编写而成的。我们的目的是为高年级学生和已经从事生物学研究的人们，提供一本关于基因操作的入门读物，因此设想这些读者已经掌握了基础分子生物学领域的某些重要知识。写作本书所引用的资料收集到1979年6月底为止。书末收录了参考文献，其本意在于为读者指出本学科发展的主流，并为研究工作者提供一些原始的研究论文线索。当然，在我们这本篇幅有限的书中，要对每一篇论文都作出详尽的介绍显然是不可能的。书中选用了我们认为能够最好地说明某些特殊论题的一些实例，我们希望这

样做不至于伤害其实验未被引用的那些同行们的感情。

最后，我们愉快地感谢熟练的助手 Debbie Bowns 女士和 Dianne Simpson 小姐，在打印这份手稿时，她们花费了许多精力来辨认稿中经常出现的令人费解的字迹。我们也愉快地感谢 Malcolm Davies，他编制并核对了全部的参考文献。

R.W. 奥尔德

S. B. 普里姆罗斯

1979 年 8 月

略语及换算比例尺

am (amber mutation):

琥珀突变

DHFR (dihydrofolate reductase):

二氢叶酸还原酶

lig (gene for DNA ligase)

DNA 连接酶基因

Kb (kilobases)

千碱基对

Mdal. (megadaltons)

兆道尔顿

mol. wt. (molecular weight)

分子量

pfu (plaque-forming unit)

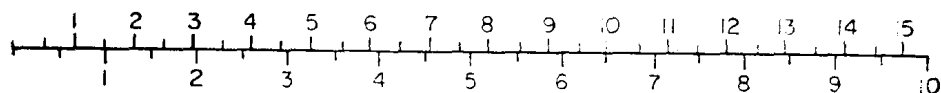
噬菌斑形成单位

ts (temperature-sensitive mutation)

温度敏感突变

双链 DNA 的千碱基对与分子量之间的换算比例尺

千碱基对



兆道尔顿

目 录

前 言	I
略语及换算比例尺	III
第一章 绪论	1
第二章 DNA 分子的切割与连接	10
第三章 作为克隆载体的质粒	29
第四章 噬菌体载体和柯斯质粒载体	56
第五章 基因克隆实验方案	71
第六章 重组体的选择和鉴定	76
第七章 克隆的 DNA 分子的表达	88
第八章 在哺乳动物细胞中克隆	108
第九章 在植物细胞中克隆 DNA 的可能载体	125
第十章 重组 DNA 研究的有关问题	139
附 录	
遗传工程技术语解释	145

第一章 绪 论

对“基因操作”这个词，不同人有不同的理解。例如，一些人认为遗传学家们对大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 日常进行的一些巧妙的基因操作就是“基因操作”。然而大多数人考虑基因操作的含义要广泛得多。事实上，大多数西方国家都用立法手段控制基因操作，使其有明确的法律定义(见第10章)。在英国，基因操作被定义为：把核酸分子(无论以什么方法自细胞中取出)组合到任何病毒、细菌质粒或其他载体系统，并使它整合到原本没有这类重组体的寄主体内，而能继续繁殖。

其他一些国家所作的定义也是相似的，这些定义足够反映出本书的梗概。然而，为了充分理解这个定义，提一提这一领域的早期发展情况是必要的。

早期实验

一些细菌能够通过转化¹⁾得到外源 DNA。大多数有转化能力的菌株并不能区分来自同种的DNA和异种的DNA，因此，把外源DNA引入细菌内将是容易办到的，也许这类实验的第一个报告是 Abel 和 Trautner (1964) 的工作，他们报导了枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*) 能够成功地被痘病毒DNA转化，产生有传染性的病毒粒子。然而，关于痘病毒增殖的现今知识表明，这个结果是一人为假象。

许多科学家小组都曾报导过关于植物细胞和动物细胞吸收外源DNA的工作，而且大多数这类实验步骤类同，都是用有放射性活

1) 具有正常生长特性的动物细胞，突然发生改变而具备了癌细胞的许多生长特性，这叫做细胞转化。细胞转化将在第八章提及，务必不要和这里描述的细菌转化相混淆。

的细菌DNA或病毒DNA（其浮力密度不同于寄主DNA的浮力密度）供给植物或动物细胞。一般说，供体浮力密度的DNA在寄主组织内存留一段时间，就被看作为供体DNA（至少是部分完整的）在植物细胞或动物细胞里继续存在的证据。有时也观察到在寄主DNA浮力密度带出现放射性，这可能说明有少量的供体DNA整合到了寄主的染色体上；但是这更可能代表已经被降解的供体DNA片段又重新结合。

有关真核生物摄取DNA的大多数实验最先来自设在比利时摩尔（Moll）的Ledoux实验室（Ledoux和Huart, 1968; Ledoux等, 1971）。他们的早期实验利用大麦去壳后作表面消毒，然后将每粒种子切成1毫米的薄片（由远端到胚），浸泡于溶壁微球菌（*Micrococcus lysodeikticus*）的带有放射性的DNA中，72小时后，提取有放射性的DNA，它的浮力密度为1.712克/厘米³（大麦DNA是1.702克/厘米³，溶壁微球菌DNA是1.731克/厘米³）。接着，用超声波处理，观察到了具有大麦和微球菌DNA密度的DNA，认为这种杂种DNA由共价连接的供体DNA和受体DNA组成。在相似的实验中，以拟南芥菜（*Arabidopsis thaliana*）籽苗作为寄主组织，用更多的溶壁微球菌DNA处理子一代（它有中等密度的DNA），结果出现较高浮力密度的新的中间峰，这样可以重复几代，每次产生较高密度的峰（图1.1），超声波处理又导致产生有寄主和供体浮力密度的DNA。

人们多次试图重复Ledoux等人的实验，但是大多没有成功。例如，Kleinhofs等人（1975）用无外来污染的植物实验时，未能观察到这样一些中间峰；然而，当被细菌污染时，观察到了明显的中间峰（这是因为根上生长着细菌的缘故），因此，看来外源DNA没有整合进植物细胞的基因组内。像Ledoux和他的同事所做的这一类实验，关键的问题是测定外源DNA的命运。

显然，密度梯度离心不能提供明确的结果。现在有了一些敏感得多的技术（例如“Southern印迹”技术），这些技术的发展大大推进了工作。

基因转移

基因转移一词是由Doy等人（1973）为了叙述遗传信息通过转导噬菌体从细菌人工转移到真核细胞而首先使用的术语。有四个研究组报导了这类实验。Merril等人（1971）从由于缺少半乳糖-1-磷酸尿苷转移酶而患半乳糖血症病人身上采集了人的成纤维细胞。这种细胞用 λ galT⁺或 λ galT⁻（这里T指转移酶）感染，检验被感染细胞的噬菌体专一RNA和半乳糖-1-磷酸尿苷转移酶。在噬菌体感染后4—5天，与 λ DNA杂交的细胞中标记RNA总量达0.2%之多，而未感染细胞的RNA则少于0.005%。Horst等人（1975）用培养的皮肤成纤维细胞作为受体细胞，这种成纤维细胞取自患广泛神经节苷脂沉积症、并以严重缺少 β -半

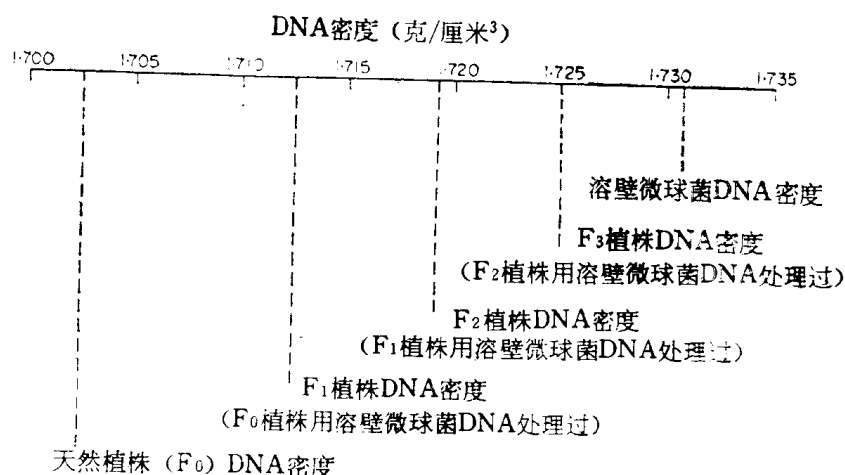


图1.1 拟南芥菜(*Arabidopsis thaliana*)和溶壁微球菌(*Micrococcus lysodeikticus*)“杂种”的DNA密度。

乳糖苷酶为特征的病人。把这种有缺陷的人细胞与噬菌体 λ plac 或 λ plac DNA 混合一起保温。与噬菌体 λ plac 一起保温的19个实验中有3个、用 λ plac DNA 处理的16个实验中有4个都检测到有较高的 β -半乳糖苷酶活性,由此可见,噬菌体基因组在有缺陷的成纤维细胞中得到表达。 λ plac DNA 诱导的酶活性比噬菌体颗粒诱导的酶活性高得多。受感染的成纤维细胞中, β -半乳糖苷酶活性在免疫化学和物理化学性质上与大肠杆菌 β -半乳糖苷酶活性没有什么差别。Doy等人(1973)用 $\phi 80lac^+ \lambda gal^+$ 噬菌体处理番茄(*Lycopersicon esculentum*)和拟南芥菜的单倍体愈伤组织培养物,这些培养物能在含有葡萄糖或蔗糖的限定培养基上生长,但如果以乳糖或半乳糖为唯一碳源时就死亡。用上述噬菌体处理后,产生能在乳糖或半乳糖上生长的培养物,虽然与愈伤组织在葡萄糖上生长速度相比要慢得多。这些培养物的存活能力持续很多代,免疫学试验确证经处理的植物细胞中有细菌酶,但在对照中却没有。与此同时,Johnson等人(1973)利用 λlac 和槭(*Acer pseudoplatanus*)细胞悬浮培养物进行了与Doy等人在概念上类似的实验。用噬菌体处理后的细胞能在乳糖上缓慢生长,但在没有噬菌体或用 λ^+ 时,细胞停止生长并常常死去。然而,他们用检验法或用电泳法都不能检查到细菌的酶。

虽然这些实验可能是使人感兴趣,但还需要相当多的证据方能证实基因转移是一真实的现象。对基因转移的兴趣已经成为历史,因为它没有其他方法所提供的进行大规模基因操作的潜力(见第3、4章),理由将在下面叙述。

基本问题

除了基因转移以外,虽然许多人试图用外源DNA转化原核或真核细胞,但是,他们的实验几乎没有成功。假定细胞摄取了

外源 DNA，则有两个基本原因导致实验失败。第一，有些情况下测定是否已经摄取，要取决于基因表达，那么失败的原因可能是由于缺乏精确的转录或转译；第二，更重要的是，在转化的细胞内，外源DNA可能保留不下来。如果外源DNA整合到了寄主基因组，那么没有问题。但是，这方面仅有两个出色的例子：质粒DNA整合到酵母基因组(Hinnen等,1978, Struhl等, 1979)，质粒DNA和噬菌体DNA并发转化小鼠细胞(Wigler等, 1979)。究竟靠什么发生整合？精确机制不清楚。如果外源DNA不能被整合，那么它将在寄主细胞随后的繁殖过程中丢失。原因很简单，为了复制，DNA分子必须含有复制起点，而在细菌和病毒体内通常每个基因组只有一个复制起点。这样的DNA分子叫做复制子。DNA片段不是复制子，因而在不能复制的情况下便逐渐被稀释出寄主细胞。应该指出，即使DNA分子含有复制起点，在异质的寄主细胞里也可能不表现功能。

基本技术

如果DNA片段不被复制，那么明显的解决方法是把DNA片段结合到合适的复制子上。这样的复制子叫做载体或克隆载体。一些小质粒和噬菌体是最适宜的载体，因为他们本身是复制子，他们不需要整合到寄主的基因组上便能保持下来，并且，他们的DNA很容易完整地分离出来。用作载体的各种质粒和噬菌体将在第3、4章详述，这里只需提及一点，即，适合作为载体的质粒和噬菌体最初仅仅在大肠杆菌内找到。

复合的分子（其中外源DNA已插入到载体分子中）有时被称做嵌合DNA(DNA chimaeras)，因为它们类以希腊神话中的喷火兽（狮头、羊身、蛇尾）。构建这类复合的或人工重组体分子被称为基因工程或基因操作，因为有能力通过生化方法构建新的遗传物质。这个过程也称为分子克隆或基因克隆，因为遗传

上同一的生物品系（它们全部含有复合分子）能够成批繁殖、生长，从而使复合分子及由它指导下合成的任何基因产物增多。

虽然概念非常简单，但是，把一段外源 DNA 插入到载体中，需要有一些有效的技术，它们是：

（1）切割和连接不同来源的DNA分子的技术；

（2）检验上述切割和连接反应的方法；

（3）转化大肠杆菌的手段（因为最初使用的载体是在大肠杆菌内起复制子作用的）。

有趣的是，所有这三种技术差不多同时得以发展，并且很快应用，1972年报导了最先的克隆实验（Jackson等，1972；Lobban 和 Kaiser,1973）。切割和连接 DNA 分子的方法现在是这样巧妙，以至有理由自成一章（第2章）。下面进一步谈谈大肠杆菌转化、利用凝胶电泳作为检验切割、连接 DNA 分子的方法。

琼脂糖凝胶电泳

切割和连接 DNA 分子的最初一些实验是用蔗糖梯度离心沉降法检查的，但是，该法有两个缺点：第一，DNA 分子必须标记，并且只能通过分部收集梯度、分别测定其放射性，才能测定它们的位置；第二，相似大小的 DNA 分子区分不开。应用琼脂糖凝胶电泳却能克服这两个缺点。

早在1966年，Thorne (1966、1967) 就已指出，琼脂糖凝胶电泳能够用来分离不同分子构型的多瘤病毒 DNA，也就是共价闭合环状分子、有缺口的环状分子和线状分子。然而几年之后，Aaij 和 Borst (1972) 表明，琼脂糖凝胶电泳不仅能分离相同分子量而不同构型的分子，而且能够分离不同分子量的分子（图1.2），并能够显示出分子迁移率是和分子量的对数成反比，于是，可以精确地定出 DNA 分子的大小。该法另一

特点是，DNA 不用放射标记，凝胶里的 DNA 带可被嵌入染料溴化乙锭染色，所以很容易检查。通过在紫外灯下直接检查凝胶，可检出少至 0.05 微克的 DNA。

读者如果希望知道更多的关于影响不同构象的 DNA 异构体在琼脂糖凝胶里的电泳迁移率的因素，可以看一看 Johnson 和 Grossman (1977) 的文章。

DNA 片段中什么序列能转录成 RNA？这是经常需要知道的。显然，要是有一个方法能检出琼脂糖凝胶中与已知 RNA 互补的片段，那将是有益的。可以这样做：把凝胶切成薄片，洗脱 DNA，在溶液中与 RNA 杂交（或者先把 DNA 结合到滤膜上，然后杂交）。不过，这一方法费时，并且不可避免地使凝胶电泳分辨率下降，现在已被由 Southern (1975) 描述的一个灵巧的方法所代替。这个方法通常叫做 Southern 印迹技术（图 1.3）。胶上的 DNA 经硷处理变性后，把胶放在经缓冲液饱和的滤纸的上部。胶的上部用硝基纤维膜覆盖，最上面盖着干滤纸。由于受干滤纸的吸引，缓冲液通过凝胶，把 DNA 带到硝基纤维膜上（DNA 对硝基纤维膜有高度的亲和力），然后，结合到膜上的 DNA 片段与标记的 DNA 或 RNA 杂交，用放射自显影观察杂交结果。

大肠杆菌转化

人们早就试图转化大肠杆菌，但是没有成功，所以一般认为大肠杆菌不易转化。然而，Mandel 和 Higa (1970) 发现，经氯化钙处理后能使大肠杆菌细胞吸收噬菌体 DNA。几年后 Cohen 等 (1972) 报导了经氯化钙处理的大肠杆菌也有能力接受质粒 DNA。这大概是由于氯化钙使细胞壁结构起了变化，这些变化对吸收 DNA 是必要的。

几乎任何大肠杆菌菌株都能被质粒 DNA 转化（虽然转化效

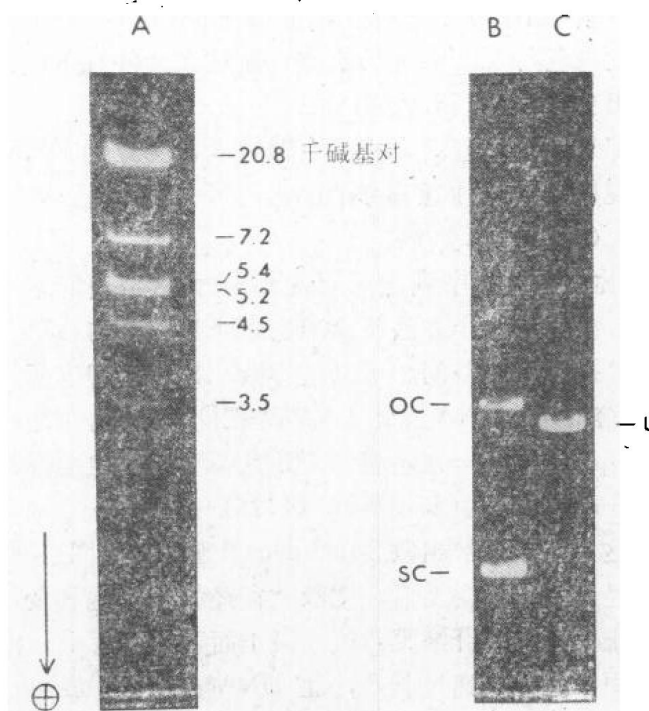


图1.2 DNA的琼脂糖凝胶电泳

箭头表示电泳的移动方向。将凝胶浸泡在溴化乙锭溶液中以显示DNA带（溴化乙锭分子插入到堆积的碱基对之间，而同DNA分子形成复合物），置紫外光下，放射出橙色荧光，并拍摄其照片。(A)用 *Eco* RI 限制性内切酶切割 λ 噬菌体DNA，然后在1%琼脂糖凝胶上电泳。 λ 噬菌体DNA的酶切图如图4.4所示。(B)开环的(OC)和超螺旋的(SC)质粒DNA (6.4千碱基对)。注意，紧密的超螺旋DNA的移动速度要比开环DNA快得多。(C)示于B的质粒DNA经 *Eco* RI 限制性内切酶（只有一个靶位点）处理之后所形成的线形(L) DNA。在本实验所采用的电泳条件下，线形DNA的电泳移动速度刚好在开环DNA分子之前。B和C中的电泳，都是在0.7%的琼脂糖凝胶中进行的。

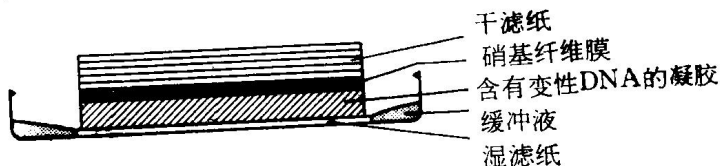


图1.3 “Southern印迹”技术

率不同)，但只有 recBC^- 突变体能被线状的细菌 DNA 转化 (Cosley 和 Oishi, 1973)。 RecBC^- 突变体缺乏核酸酶，后者在 DNA 被整合前就会降解 DNA。线状细菌 DNA 完全不能够转化 RecBC^+ 细胞，而线状 λ DNA 却能感染 RecBC^+ (其效率是 RecBC^- 细胞的 30%)。线状的细菌 DNA 和线状的 λ DNA 为什么会有这样差别呢？推测是， λ DNA 在被吸入时有能力环化，这样得以免受 RecBC 核酸外切酶的攻击 (Benzinger 等, 1975)。

大肠杆菌转化的效率不是很高的。虽然效率可达 10^7 转化子/微克载体 DNA，但是这只是表示了加入 10^8 分子仅仅吸收 1 个 DNA 分子。由于这样低的转化效率，有些克隆实验就做不了。近来在提高转化效率上作了不少努力。从下章起将谈到很多细菌会有限制系统，它能够影响转化效率。虽然这些限制系统的全部功能还不清楚，但是它们确实起的一个作用是识别和降解外源 DNA。为此，通常是利用大肠杆菌“非限制”的突变体 (r^-) 作为转化寄主。

DNA 测序

如果不顺便提一提 DNA 测序的技术，那么，本章就显得不全面。虽然这些技术对克隆实验的成功并不是必不可少的，但是，它们确实提供了很多关于所形成的产物的有用的知识。这些技术的原理过于复杂就不在这里讨论，有兴趣的读者可以读一读 Air 综述文章 (1979)。

第二章 DNA分子的切割与连接

DNA分子的切割

在1970年以前，简直没有办法将双链的DNA分子切割成不连续的分离的片段。DNA的生物化学研究因此受到了限制。后来，由于发现了限制作用是和特异的核酸内切酶有关，因此很显然，寄主控制的限制与修饰相关现象，终归有可能解决这个问题。分子生物学家偏爱的实验材料大肠杆菌K12菌株，首先被用来研究这种现象，但结果证明这是一种不明智的选择。因为大肠杆菌K12菌株的核酸内切酶的行为异常复杂。1970年，在流感嗜血菌 (*Haemophilus influenzae*) 中发现了一种行为比较简单的酶，打破了这种僵局。当今的DNA技术学，完全取决于我们利用核酸内切限制酶，在特定的位点切割DNA分子的能力。因此，在本章先简单地叙述一下寄主控制的限制与修饰作用。

寄主控制的限制与修饰

当噬菌体从一个细菌寄主菌株传染到另一个细菌寄主菌株时，就可容易地观察到寄主控制的限制与修饰现象。例如，用生长在大肠杆菌C株上的 λ 噬菌体母液，在大肠杆菌C株和K株中滴定，测定结果表明，生长在大肠杆菌K株上的噬菌体效价比生长在C株上的要低几个数量级。我们说 λ 噬菌体受到了第二个寄主菌株（大肠杆菌K株）的限制。当用感染了大肠杆菌K株之后释放出来的子代 λ 噬菌体再感染K株，此时就不受限制了。但如果它的头一个生活周期是在寄主大肠杆菌C株上完成的，那末其子代噬菌体感染K株时则仍然受到限制（图2.1）。因此，用 λ 噬菌体涂布在一个特殊的寄主菌上，其感染率是取决于它最后赖以增