



全国高等农业院校教材

全国高等农业院校教材指导委员会审定



# 遗传工程概论

●  
●  
谢友菊 编著

●  
●  
动物植物微生物专业用

北京农业大学出版社

全国高等农业院校教材  
全国高等农业院校教材指导委员会审定

# 遗传工程概论

谢友菊 编著

(动物植物微生物专业用)

418647

北京农业大学出版社

(京)第 164 号

全国高等农业院校教材

遗传工程概论

谢友菊 编 著

责任编辑 高 欣

\*

北京农业大学出版社出版

(北京市海淀区圆明园西路二号)

北京华印印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行

\*

787×1092毫米 16开本 12.75印张 305千字

1992年5月第1版 1992年5月第1次印刷

印数: 1~3000

ISBN 7-81002-287-3/Q·288

定价: 3.40元

**主编** 谢友菊 (北京农业大学)

**主审** 米景九 (北京农业大学)

朱庆麟 (西北农业大学)

**参审** 齐顺章 (北京农业大学)

鲁安太 (西北农业大学)

陈毓荃 (西北农业大学)

## 内 容 简 介

《遗传工程概论》详细地介绍了基因工程的载体、酶切与连接、细菌转化、重组体转化子的鉴定、基因文库的构建、cDNA 的克隆等基本理论与方法，并分别介绍了酵母、高等植物和哺乳动物的遗传工程等。本书反映了当前遗传工程发展的先进水平，内容系统而又全面，文字简明扼要。

本教材适用于动、植物和微生物类各专业的本科生必修和选修课教材，也可作为动、植物和微生物类各专业研究生选修课或参考教材，并可供生物、农业、医学等有关学科的教师、科研人员参考。

## 前 言

遗传工程是一种按人们的构思和设计,在试管内操作遗传物质,并最终实现改造生物的新技术,它是从70年代初在遗传学、生物化学、微生物学、免疫学等多门学科基础上发展起来的新兴学科。遗传工程对生物的改造,可以使生物像工厂似的为人类生产特殊产品,也可以使现有的动植物更符合人类的要求。正因为这门技术的强大生命力,它已在世界范围内从实验室的科研成果发展成为新兴的技术和工业;又因为这门技术通过人工操作基因,打破种间甚至动、植物间的遗传屏障,从而为创造优质、抗逆、高产的动植物新品种提供了有力的手段,为农业科学的发展展示了美好的前景。

为了适应遗传工程技术的飞速发展,北京农业大学从1985年为研究生开设了“遗传工程”课,讲稿主要是在Principles of Gene Manipulation (R. W. OLD等,1980)、Recombinant DNA (J.D. Watson等,1983)和Recombinant DNA Techniques: An Introduction (R. L. Rodriguez等,1983)三本书的基础上综合写成的。在这个基础上,编者又参阅了Molecular Cloning(T. Maniatis等,1984)等有关书籍和文献,编写成今天的书稿。这本教科书主要是从原理上系统地阐述了遗传工程这门技术,全书图文并茂、语言通俗,便于读者理解;每章的最后附有参考书和参考文献,便于读者更深入地学习;全书最后附有索引,便于读者查找遗传工程上常用的名词解释。

书稿曾经米景九、朱庆麟两位教授审阅和修改,齐顺章教授对第16章“哺乳动物的基因工程”作了审阅和修改,鲁安太和陈毓荃两位副教授也对本书的若干章节进行了审阅和修改;刘尔复同志为全书绘制了插图,在此一并表示衷心的感谢。

编者希望这本教科书将有助于高等农业院校的遗传工程教学工作。由于遗传工程这一领域发展非常迅速,本书发稿时,有些资料已略显陈旧,敬希读者鉴谅。

由于编者水平所限,写作和修改的时间仓促,书中肯定有不少缺点和错误,希望有关专家和读者批评指正,以便再版时修改,谨在此表示诚挚的谢意。

谢友菊

1990.10.31

# 目 录

|                               |    |
|-------------------------------|----|
| 第一章 引言 .....                  | 1  |
| 一、遗传工程的概念 .....               | 1  |
| 二、遗传工程的发展概况 .....             | 1  |
| 三、遗传工程所需的微生物学原理 .....         | 3  |
| 第二章 遗传工程的载体 .....             | 6  |
| 一、质粒载体 .....                  | 6  |
| 二、单链噬菌体克隆载体 .....             | 10 |
| 三、双链噬菌体载体 .....               | 13 |
| 四、粘粒载体 .....                  | 20 |
| 第三章 DNA的提取 .....              | 23 |
| 一、原核生物染色体 DNA 的提取 .....       | 23 |
| 二、染色体外 DNA 的分离 .....          | 24 |
| 三、质粒 DNA 的快速提取 .....          | 26 |
| 四、真核生物染色体 DNA 的提取 .....       | 26 |
| 五、DNA 浓度和纯度的光学分析 .....        | 27 |
| 第四章 限制性内切酶 .....              | 29 |
| 一、寄主的限制和修饰 .....              | 29 |
| 二、三类限制性内切酶 .....              | 30 |
| 三、限制性内切酶的纯化 .....             | 35 |
| 四、限制性内切酶反应的终止 .....           | 35 |
| 五、识别序列的增加和改造 .....            | 36 |
| 第五章 凝胶电泳 .....                | 41 |
| 一、电泳的原理 .....                 | 41 |
| 二、DNA 分子的可见性 .....            | 41 |
| 三、电泳图谱 .....                  | 42 |
| 四、凝胶系统 .....                  | 43 |
| 五、凝胶电泳对外界条件的敏感性 .....         | 43 |
| 六、指示染料 .....                  | 44 |
| 七、转移—吸印/杂交分析 .....            | 44 |
| 八、探针的制备——缺口平移法 .....          | 47 |
| 第六章 DNA 的连接 .....             | 49 |
| 一、大肠杆菌和 T4 噬菌体的 DNA 连接酶 ..... | 50 |
| 二、DNA 片段在体内和体外的连接 .....       | 51 |
| 三、影响连接反应的因素 .....             | 52 |
| 四、平齐末端的连接 .....               | 53 |
| 第七章 细菌转化 .....                | 55 |
| 一、细菌转化的原理 .....               | 55 |
| 二、细菌转化的方法 .....               | 57 |

|                                             |     |
|---------------------------------------------|-----|
| 三、转化的评估指标 .....                             | 59  |
| 第八章 重组转化体的鉴定 .....                          | 61  |
| 一、表现型的鉴定 .....                              | 61  |
| 二、质粒的提取、纯化和重新转化 .....                       | 63  |
| 三、限制性酶切图谱的绘制 .....                          | 63  |
| 四、原位(菌落)杂交 .....                            | 65  |
| 五、免疫检测法 .....                               | 65  |
| 六、重组质粒上的基因定位 .....                          | 69  |
| 七、利用翻译系统对目的基因进行深入研究 .....                   | 72  |
| 第九章 克隆的策略 .....                             | 74  |
| 一、目标 DNA 性质对制定克隆策略的主导作用 .....               | 75  |
| 二、选择和筛选方法的可利用性 .....                        | 76  |
| 三、大鼠前胰岛素原基因的克隆 .....                        | 79  |
| 第十章 克隆基因在大肠杆菌 ( <i>E. coli</i> ) 中的表达 ..... | 81  |
| 一、促使外源基因表达的原理和技术 .....                      | 81  |
| 二、强化外源基因表达的原理和技术 .....                      | 84  |
| 三、调控序列的分离及其鉴定 .....                         | 89  |
| 第十一章 cDNA 的合成和克隆 .....                      | 92  |
| 一、cDNA 的合成和克隆 .....                         | 92  |
| 二、cDNA 克隆的鉴定 .....                          | 96  |
| 第十二章 基因文库的构建 .....                          | 102 |
| 一、外源 DNA(即供体 DNA) 的制备 .....                 | 103 |
| 二、载体 DNA 的制备 .....                          | 108 |
| 三、连接、体外包装和扩增 .....                          | 109 |
| 四、用噬菌体 $\lambda$ 和粘粒两种载体构建基因文库的比较 .....     | 110 |
| 第十三章 DNA 的序列分析 .....                        | 111 |
| 一、Maxam 和 Gilbert 的序列分析法 .....              | 112 |
| 二、Sanger 的序列分析法(末端终止法) .....                | 115 |
| 三、Sanger 法与 M13 克隆系统相结合 .....               | 118 |
| 四、DNA 序列连续测定法 .....                         | 119 |
| 第十四章 酵母的遗传工程 .....                          | 124 |
| 一、酵母的质粒 .....                               | 125 |
| 二、酵母基因的克隆 .....                             | 129 |
| 三、利用酵母遗传工程生产乙型肝炎疫苗 .....                    | 132 |
| 四、利用酵母研究分子生物学 .....                         | 134 |
| 第十五章 植物的基因工程 .....                          | 139 |
| 一、Ti 质粒 .....                               | 139 |
| 二、Ti 质粒的改造及其应用 .....                        | 145 |
| 三、嵌合基因(chimaeric genes)的构建 .....            | 150 |
| 四、植物细胞的转化 .....                             | 155 |
| 五、植物基因转移的成就 .....                           | 156 |
| 六、花椰菜花叶病毒 .....                             | 159 |
| 七、单子叶植物遗传工程的进展 .....                        | 160 |

|                                   |     |
|-----------------------------------|-----|
| <b>第十六章 哺乳动物的基因工程</b> .....       | 164 |
| 一、哺乳动物细胞的选择标记 .....               | 164 |
| 二、SV 40 病毒载体 .....                | 167 |
| 三、其他病毒载体系统 .....                  | 172 |
| 四、基因导入的方法 .....                   | 175 |
| 五、外源基因在哺乳动物细胞中的表达 .....           | 177 |
| <b>第十七章 重组 DNA 技术用于医药工业</b> ..... | 181 |
| 一、用重组 DNA 技术生产胰岛素 .....           | 181 |
| 二、用重组 DNA 技术生产干扰素 .....           | 186 |
| <b>索引</b> .....                   | 189 |

# 第一章 引言

从 1900 年孟德尔定律被重新发现迄今, 遗传学已经走过了 80 多年的历程。在这 80 多年中, 工农业生产和科学技术的发展, 不断地促进遗传学的发展; 反过来, 遗传学的发展也为工农业生产和人类健康带来巨大的好处。近 30 年来, 遗传学已经由个体水平、细胞水平发展到分子水平, 特别是近十几年来, 由于遗传学、生物化学、微生物学等多门学科的结合, 开拓出一个新兴的技术领域——重组 DNA 技术, 即遗传工程, 并形成了以遗传工程为基础的生物技术, 为不断揭示生物的奥秘, 定向地改造生物, 为人类社会造福展现了美好的前景。

## 一、遗传工程的概念

一般认为遗传工程的定义可以分为狭义和广义的两种。狭义的遗传工程就是重组 DNA 技术(recombinant DNA techniques), 又称为分子克隆(molecular cloning)或基因工程(gene engineering); 广义的遗传工程还包括细胞工程、染色体工程、细胞器工程等。习惯上所讲的遗传工程多指 DNA 重组技术, 我们这本教材将全部介绍 DNA 重组技术。

重组 DNA 技术就是通过特殊酶的处理, 使遗传物质在体外发生重组, 从而产生自然界从未有过的重组体分子(至少包含两种不同的 DNA 片段)。在他们进入特殊的生物寄主以后, 不仅可以得到维持, 而且可以得到扩增和表达, 从而给人类带来巨大的经济利益或为进一步揭开生命的奥秘提供了强有力的研究手段。

图 1—1 清楚表明了这门技术所包含的几个关键步骤: (a)从原核生物细胞中提取克隆的载体; (b)从真核生物细胞中提取外源 DNA; (c)用限制性内切酶将载体打开, 并用限制性内切酶消化真核生物 DNA; (d)用 DNA 连接酶将真核生物 DNA 片段接到载体上, 获得重组体; (e)用原核或真核生物细胞作为受体, 使重组体进入并得到扩增, 通过特定手段, 能找到含有理想重组体的受体细胞。

由于新基因在受体细胞中的表达, 有可能产生大量人类所需要的某种物质, 或授予受体细胞特定的优良性状, 继而发展成具有某种优良性状的个体, 甚至可以创造出前所未有的超级作物或超级动物。

## 二、遗传工程的发展概况

1972 年美国 D.A.Jackson 和 P.Berg 等首次获得分子克隆实验的成功, 他们利用限制性内切酶和连接酶使猿猴病毒 SV 40 的 DNA 中包含有大肠杆菌噬菌体  $\lambda$  的基因和大肠杆菌半乳糖操纵子。迄今为止, 这门技术也只有近 20 年的历史。尽管有些科学家一开始曾经担心这门技术可能会给人类带来不幸和灾难, 对是否要进行这类实验, 发展这门技术, 发生过科学史上从未有过的争论, 对有些实验也作了种种限制。但实践证明, 这种担心和限制是不必要

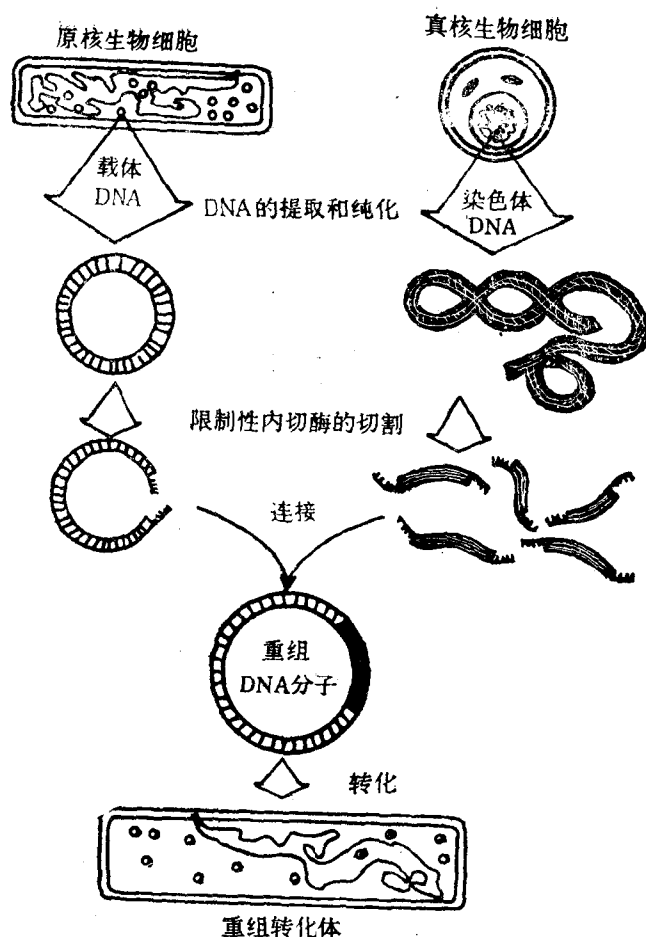


图 1—1 典型的重组 DNA 实验  
(据 R.L. Rodriguez 等的《Recombinant DNA Techniques: An Introduction》  
一书中图 1.1 修改而成)

的，它正在迅速地向前发展，并导致一门新学科——遗传工程的诞生。

目前以遗传工程为主导的生物技术在工农业生产中的作用日益显著，正如英国皇家学会的一份调查报告中所指出的：生物技术在今后 20 年内将在食品、农业、化工、能源和环境保护等部门发挥重要作用，下个世纪将在国民经济中起关键作用。美国科学家们认为生物技术对社会的影响不亚于原子裂变及电子计算机的发展，他们预言，21 世纪将是生物技术的时代。

我们可从下述几个方面来看一下遗传工程的发展概况：

第一，一个新兴的医药工业正在形成。过去有些药品在临床上使用是不可想象的，现在通过遗传工程的手段已使之成为现实。如胰岛素、干扰素(治疗癌症和病毒病)、治疗儿童侏儒症的人生长激素以及肝炎、霍乱、痢疾等流行病的预防疫苗等已投放市场或即将投放市场。

第二，遗传工程在农业上的应用也显示美好的前景。由于重组 DNA 技术的应用和发展，可在体外将目的基因与载体 DNA 进行拼接，然后通过一定的技术，将目的基因送入植物细

胞，再生的植株能表现出理想的性状。如美国孟山都和 Calgene 公司已获得抗除草剂(草甘膦等)的烟草，并正在将这种抗性基因向其他植物中转移。更有趣的是，将有关基因插入作物基因组内，已经使作物具有抗鳞翅目幼虫和病毒病的能力，不久将用基因工程使作物获得抗真菌、细菌和线虫的能力，从而减少或避免使用杀虫或杀真菌剂，既降低了成本，也减少致癌的危险。此外，目前还正在试图利用遗传工程手段提高作物抗逆性和营养价值。

科学家们预言，若能用基因工程将固氮基因插入各种非豆科植物染色体组内，那将是“第二次绿色革命的实现”。这方面的研究工作也正在进行中。

在动物生长激素方面，遗传工程也发挥了巨大威力。如美国孟山都公司正在进行刺激分泌牛奶的牛生长激素的基因工程，现已进入中间试验阶段，再过 1~2 年可在商业上应用。此外，用遗传工程方法已成功地获得猪、鸡的生长激素，对猪、鸡注射这种生长激素，不仅增重快、饲料利用率高，而且猪的瘦肉率增加。

用遗传工程获得的口蹄疫苗将在近期投放市场，可望发挥很大作用。

第三，遗传工程在轻工、化工方面的应用也很有苗头。如利用遗传工程方法，可创造出解毒的细菌，他们含有不同分解能力的质粒，可用于清除三废中的有毒物质。

目前，世界各国对遗传工程都非常重视。美国是遗传工程的创始国，这方面的公司已超过二百家，投资达 50 多亿美元，形成了一门完整的技术和新兴的工业。日本把生物技术作为 70 年代末三大新兴工业之一，给予高度重视，仅政府投资就达 11 亿美元，一些重大研究项目已和美国处于同等水平，成了美国的主要竞争对手，其他竞争对手依次是德国、英国、瑞士及法国。

我国政府对生物技术的发展也非常重视，已将生物技术列为国家高技术研究发展计划中的一个重要领域，从财力、人力、设备和条件等各方面给予保证和支持。可以预期，在不久的将来，我国在遗传工程的研究和应用方面都将会有很大的突破。

### 三、遗传工程所需的微生物学原理

遗传工程需用大量的微生物学技术，现就有关的技术原理介绍如下。

#### 1. 大肠杆菌的一般特性

大肠杆菌(*Escherichia coli*)不仅能液体培养，也能在固体培养基上很好地生长。一种特殊的菌株往往可以通过对某种营养成分的需求或特有的抗生素抗性予以鉴别。指示染料 tetrazolium 或 X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside) 以及基本培养基都可使细菌代谢功能方面的遗传缺陷得以显示，为筛选工作提供了方便。

在细菌培养过程中，由两方面的原因，影响它的纯度：(a)其他细菌造成的细菌污染；(b)遗传的异质性。为了最大程度地减少污染，用于培养的所有药品、器皿必须消毒，全部过程应在无菌条件下操作。遗传上的异质性发生在培养过程中原有细菌株系遗传成分的变异，导致原有标记性状的改变。其原因可能是天然突变的结果；或是在由质粒携带标记性状的情况下，异质性可能来自细胞分裂过程中质粒的丢失或质粒的分离。据目前所知，许多质粒以相当高的频率在寄主细胞分裂时发生分离，从而引起所带性状的变化。

## 2. 抗生素抗性

抗生素阻止细菌生长往往有抑菌或杀菌两种方式。抑菌就是指药物仅仅使细菌生长受阻而未直接引起细胞死亡；而杀菌是指药物引起细胞裂解或死亡。一种抗生素抑菌或杀菌效果取决于细菌接触药物的条件。例如大肠杆菌接触低水平的四环素将会通过四环素与核糖体结合，影响细菌蛋白质的合成而最终抑制细胞生长。然而结合着四环素的核糖体是可恢复的，因为受抑制的细胞被稀释到无药物的培养基上，将会重新恢复正常细胞的生长。这种抑制的可恢复性表明四环素正以抑菌的方式发挥功能。当四环素浓度加大，阻止细菌生长的另一种方式变得明显而不可逆，亦即在高浓度下，四环素以杀菌方式发挥功能。

细菌有 3 种抗生素抗性的机制：(a) 抗生素在细菌中作用的目标位置发生了变化；(b) 阻止药物进入细胞；(c) 改变或钝化药物。例如蛋白质合成抑制剂链霉素的抗性通常是由于细菌合成了一种变化了的核糖体蛋白质，这种蛋白质不再与链霉素相连，因此阻止了链霉素的抑制行为；又如对四环素的抗性是由于细菌合成了阻止四环素进入细胞的膜蛋白，因而四环素的穿透性大为减低所致；对青霉素的抗性通常是由于  $\beta$ -内酰胺酶的分泌，这种酶可切割和钝化抗生素。

抑制细胞生长的最低抗生素浓度称为最小抑制浓度(minimum inhibitory concentration 简称 MIC)。对许多抑菌的抗生素如四环素而言，当培养基中抗生素浓度接近 MIC 时，细菌菌落变得很小。

氨苄青霉素是青霉素的一种衍生物，它有广谱杀菌的效果，主要通过抑制细菌细胞壁的合成和引起细胞裂解而达到杀菌目的。代谢上钝化的细胞或处于细胞生长静止期的细菌不受危害。当抗氨苄青霉素和敏感氨苄青霉素的细菌混合培养在含有氨苄青霉素的固体培养基上，抗性细胞具有大菌落，周围被不同大小的小菌落包围着，由抗性菌落分泌的  $\beta$ -内酰胺酶钝化着大菌落周围的氨苄青霉素，从而允许氨苄青霉素敏感的细胞在降低了氨苄青霉素浓度的区域里缓慢生长。对这些小菌落的进一步钝化表明他们对氨苄青霉素是完全敏感的。通常称这些小菌落叫 饲养菌落，因为他们仅仅能生长在分泌  $\beta$ -内酰胺酶的大菌落周围。

## 3. 细菌细胞的生长

在最佳生长条件下，细菌以每 20 min 分裂一次的速度进行繁殖。然而，这种速度仅能维持很短的一段时间。当细菌被接种到新鲜培养基上，他们通常经历下面 4 个时期：即滞留适应期、对数生长期、最高生长期和衰亡期(图 1—2 a)。在对数生长期中，细菌以最大速度进行生长和繁殖。大多数重组 DNA 实验都是在细菌处于对数生长期进行的。因此研究者经常需要了解每毫升培养物的细菌细胞的浓度和生长的近似速度。细菌总数可以通过计数方法予以确定，当然其中包括活细菌和死细菌。如果仅仅想计数活细菌，可以通过在固体培养基上涂抹经过一定程度稀释的培养物，导致单个菌落的出现。由于每个菌落代表一个细菌，因而从单个菌落数就可算出最初培养物的细菌浓度。但是从一个单细胞形成一个可见菌落，往往需要 8~16 h，因而这种方法在日常细菌浓度的计数上极不方便。目前通用一种非常简便而有效的方法，是将细菌的浊度与活细菌的计数两者联系起来，通过测定浊度，利用事先做好的标准曲线即可得知细菌浓度。

培养物的浊度(turbidity)是指悬浮的细胞颗粒使溶液产生混浊的程度，可用吸光率 A

(或 OD)表示。浊度的产生是光散射的结果,利用光吸收率与光散射比例低的波长,可以精确测出培养物的浊度。通常用于浊度测定的波长幅度是 450~570 nm。浊度的变化,反映了细胞浓度的变化。不同细胞浓度的培养物显然有不同的浊度,但是在同样细胞浓度的情况下,由于不同的细菌株系具有不同的细胞大小,而同一菌系的细胞大小又取决于生理条件,从而影响到浊度的改变。因此只有在标定浊度并使其与活细菌计数两者形成对照的情况下,培养物的浊度才能适用于细胞浓度的估算。具体来说,通过浊度与时间和活细菌计数与时间两种坐标图的结合,取得一个涉及浊度与细菌浓度的标准曲线,从而获得一种测量细胞浓度的快速手段(图 1—2 b)。如果菌株改变了,只有重新制作浊度与细菌浓度的坐标图,才能得到精确可靠的结果。另一点需要注意的是,作图所用的培养物应处于特定培养条件下的对数生长期。

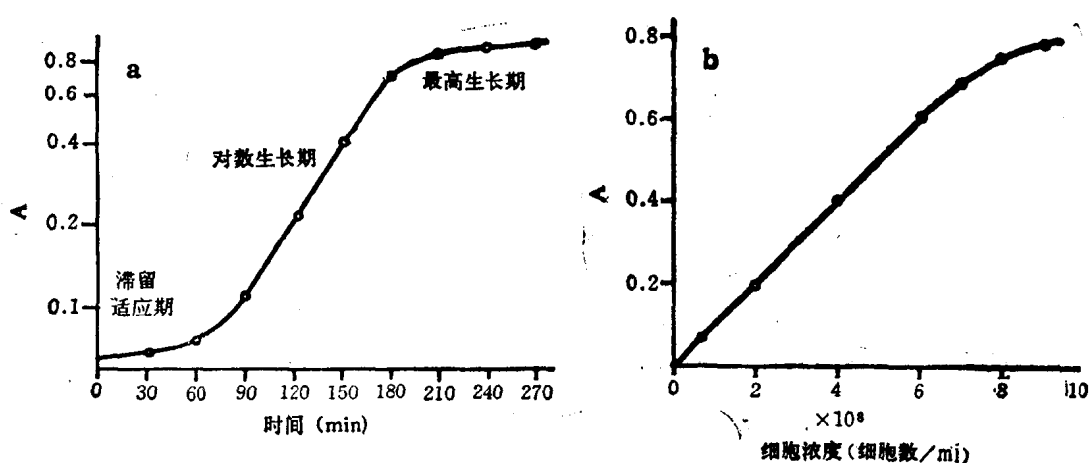


图 1—2 细菌细胞的生长

a. 纵坐标为吸光率(A),横坐标为培养时间;

b. 纵坐标为吸光率(A),横坐标为细胞浓度。

如果实验对精确度要求不高,那么可利用下列公式粗略估算大肠杆菌的细胞浓度:

$$1 \text{ OD}_{600} \approx 8 \times 10^8 \text{ 个细胞/ml}$$

#### 参 考 文 献

1. Rodriguez, R. L. and Robert C. Tait. *Recombinant DNA Techniques: An Introduction*. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., Menlo Park, California 1983.
2. Watson, James D., John Tooze, David T. Kurtz. *Recombinant DNA*. W. H. Freeman and Company, New York 1983.
3. Dillon, Jo-Anne R., Anwar Nasim and Earle R. Nestmann. *Recombinant DNA Methodology*. John Wiley & Sons, Inc. USA 1985.
4. Schleif, R. F. and Pieter C. Wensink. *Practical Methods in Molecular Biology*. Springer-Verlag New York Inc. 1981.
5. Office of Technology Assessment Congress of the United States Washington, DC. *Commercial Biotechnology*. Pergamon Press, New York 1984.

## 第二章 遗传工程的载体

自从人们了解到 DNA 是遗传物质并进而深入研究以来,许多科学家都尝试直接用 DNA 转化原核或真核生物的细胞,但成效甚微,理想重组体分子的发生频率极低。例如用人的 DNA 转化细菌,虽然可以得到包含有人胰岛素基因的细菌质粒,但是频率低到无法分离这种重组体的地步,更谈不上进一步鉴定基因。主要原因是外源 DNA 在寄主细胞连续增殖的情况下,由于不能自我复制而丢失,只有少数被整合到质粒或寄主基因组上的片段才幸存下来,要想得到胰岛素这种特殊基因片段整合到质粒上的机会就更微乎其微了。

DNA 能在寄主细胞中得到复制的一个必要条件是必须具备复制起点。在细菌和病毒中,它们的基因组通常只有一个复制起点,这种能够自我复制,而且仅具有一个复制起点的 DNA 分子称为复制子 (replicon)。大多数 DNA 片段不是复制子,因而不能自我复制。值得强调的是, DNA 分子即使包含复制起点,在外源寄主细胞中也不一定有功能。

DNA 重组技术的优越性在于,它利用在寄主细胞中有复制功能的复制子作载体,接上理想的外源 DNA 片段,然后被送到寄主细胞中,因此理想基因不但没有丢失的问题,而且可以得到大量扩增。理想重组体分子构建成功的机率将比用 DNA 直接转化提高几个数量级,从而使理想基因产品的提取和鉴定在实践上成为可能。

在说明载体重要性的同时,也看出由于体外操作的迅速以及所需重组 DNA 的化学反应专一性,使重组体分子的构建比自然发生的频率高得多。

目前已从噬菌体、病毒和质粒中派生出具有各种特点的分子克隆的载体。

### 一、质粒载体

质粒是一种小的双链环状 DNA 分子,它们在细菌中能独立于染色体外进行自我复制,并包含有各种功能的基因。天然存在的质粒往往不能满足分子克隆对载体的需要,只有按预定目标人工构建的质粒才能成为优良的载体。

构建一种质粒载体通常牵涉到一系列的体内和体外的遗传处理,需要考虑以下几个方面:

第一,质粒载体的分子量应尽可能小。因为当质粒的大小增加到 15 kb 以上,对许多类型的细胞转化效率将逐渐减少。

用分子量小的质粒作载体,还有下述若干优点:容易从寄主细胞中提取;较为抵抗机械(超声波)切割带来的危害;低分子量的质粒通常以多拷贝的形式存在,不仅有利于提取,而且给克隆基因提供了剂量效应;分子量小的质粒对于任何一种限制性内切酶提供多切点的机会将大为减少。

第二,应该了解载体上的基因位置、限制性内切酶的作用位点。如果可能的话,最好还要了解核苷酸序列。

第三,在理想寄主中,载体应该容易繁殖,因而可以得到大量载体和 DNA 重组分子。

第四，载体应该包含一个可供选择的标记性状（基因），从而可以区别含有载体的转化细胞（transformed cells）和不具有载体的非转化细胞（non-transformed cells）。

第五，理想的载体还应该另外有一个遗传标记基因，这个标记基因可以因一段外源 DNA 片段的插入而被钝化，导致表现型的改变，以区别具有 DNA 重组体分子的细胞和不具有 DNA 重组体分子的细胞。图 2—1 显示了 pBR 322 上的四环素抗性基因(Tc<sup>r</sup>) 由于外源 DNA 片段的插入而遭钝化(Tc<sup>s</sup>)的图解。

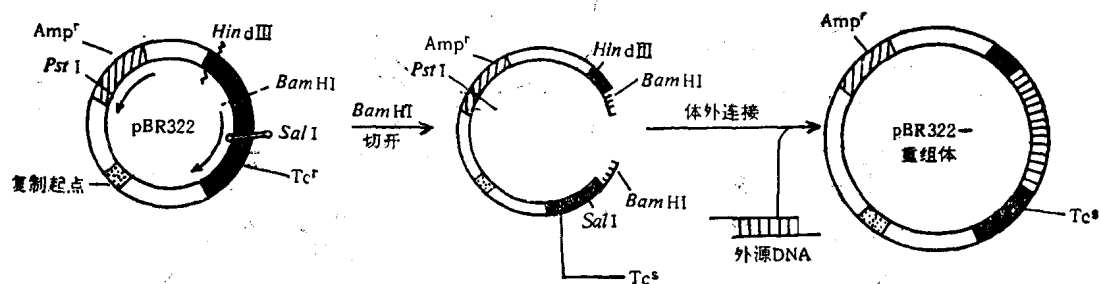


图 2—1 pBR 322 上四环素抗性基因(Tc<sup>r</sup>)的钝化  
Amp<sup>r</sup> 氨苄青霉素抗性基因；Tc<sup>r</sup>：四环素敏感。

第六，在载体的上述两个标记基因中，应最大限度地具有各种限制性内切酶的切割位点，而且这些酶的识别序列仅在载体上出现一次，以保证酶处理后，环状 DNA 只在一处被打开，为克隆不同种的限制性片段提供了最大的可能性。

现以常用的 pBR 322 及其衍生物为例说明载体构建的步骤。构建中的两个突出要求是(a) 建成后的质粒，其复制的控制形式应属于松弛型；(b) 用氨苄青霉素和四环素抗性基因作选择和插入钝化的遗传标记基因。

对于革兰氏阴性细菌，质粒复制一般有两种控制形式：严紧型 (stringent mode) 和松弛型 (relaxed mode)。严紧型质粒 (如 pSC 101) 的复制需要蛋白质的合成和 DNA 聚合酶 III 的活性，这种质粒在每个细胞中通常只有少数 (1~5) 拷贝。松弛型质粒 (如 ColE 1) 的复制需要 DNA 聚合酶 I 的活性，并且可以在没有蛋白质合成的情况下进行。这种质粒在每个细胞中通常有 30~50 个拷贝，在蛋白质合成受抑制、染色体复制停止的情况下，仍然可以进行复制。

图 2—2 表明 pBR 322 的构建步骤。首先从提取可产生大肠杆菌素的 pMB 1 质粒开始，经过两个步骤获得具有松弛型复制起点的 pMB 8，进而从 pSC 101 质粒获得四环素抗性基因 (Tc<sup>r</sup>)，从 pRSF 2124 质粒的转座子 Tn 3 获得氨苄青霉素抗性基因 (Amp<sup>r</sup>)，合成了 pBR 312，接着进行一系列操作，为的是最大程度地增加限制性内切酶切点的种类和最大程度地减少质粒的分子量。例如用 *Eco*RI 处理，除掉了位于 Amp<sup>r</sup> 基因中的 *Bam*HI 识别序列，通过更复杂的手段除掉两个多余的 *Pst*I 识别序列，最终形成图 2—2 中的 pBR 322。它包含 9 种限制性酶的 9 个各自不同的识别序列 (即每一种酶的识别序列仅在质粒上出现一次)，其中一部分分别位于 Tc<sup>r</sup> 或 Amp<sup>r</sup> 基因中。由于 *Hin*cII 也能作用于 *Sal*I 的识别序列，故它不计在内。pBR 322 是遗传工程中常用的质粒载体之一，其大小为 4.3 kb。

将 pBR 322 进一步改造，可以显示出更多的优越性。图 2—3 显示了改造过程的主要步骤。首先将 pBR 322 上不重要的 1089 个碱基对去除，得到 pBR 327，接着进行的工作是

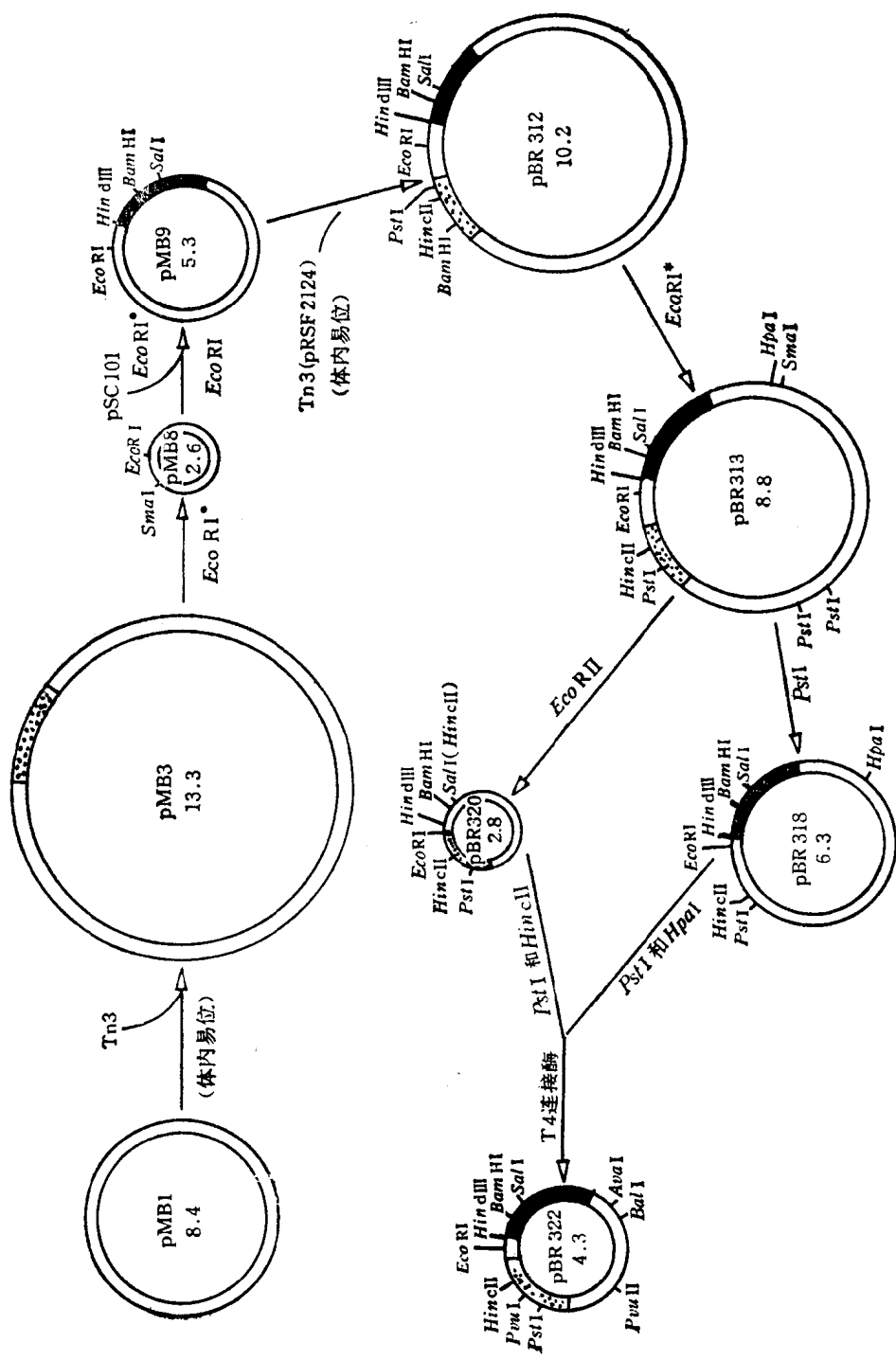


图 2—2 构建 pBR 322 的步骤  
(R.L.Rodriguez 等, Recombinant DNA Techniques, An Introduction, 1983, p.6)  
(全黑部分代表 Tc<sup>r</sup> 基因; 黑点部分代表 Amp<sup>r</sup> 基因)