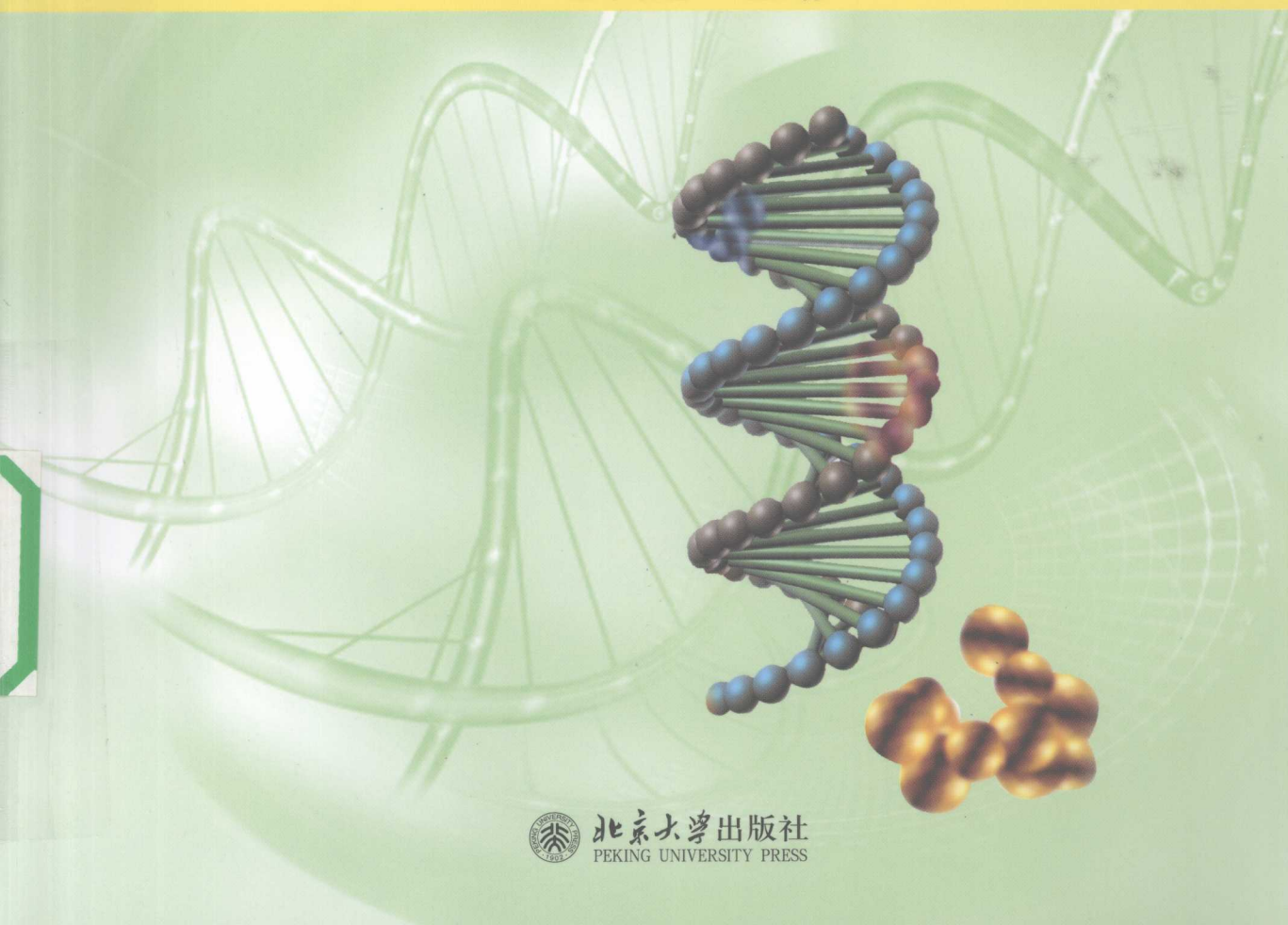


EXPERIMENTS in Molecular Biology

分子生物学实验

■ 汪天虹 主编

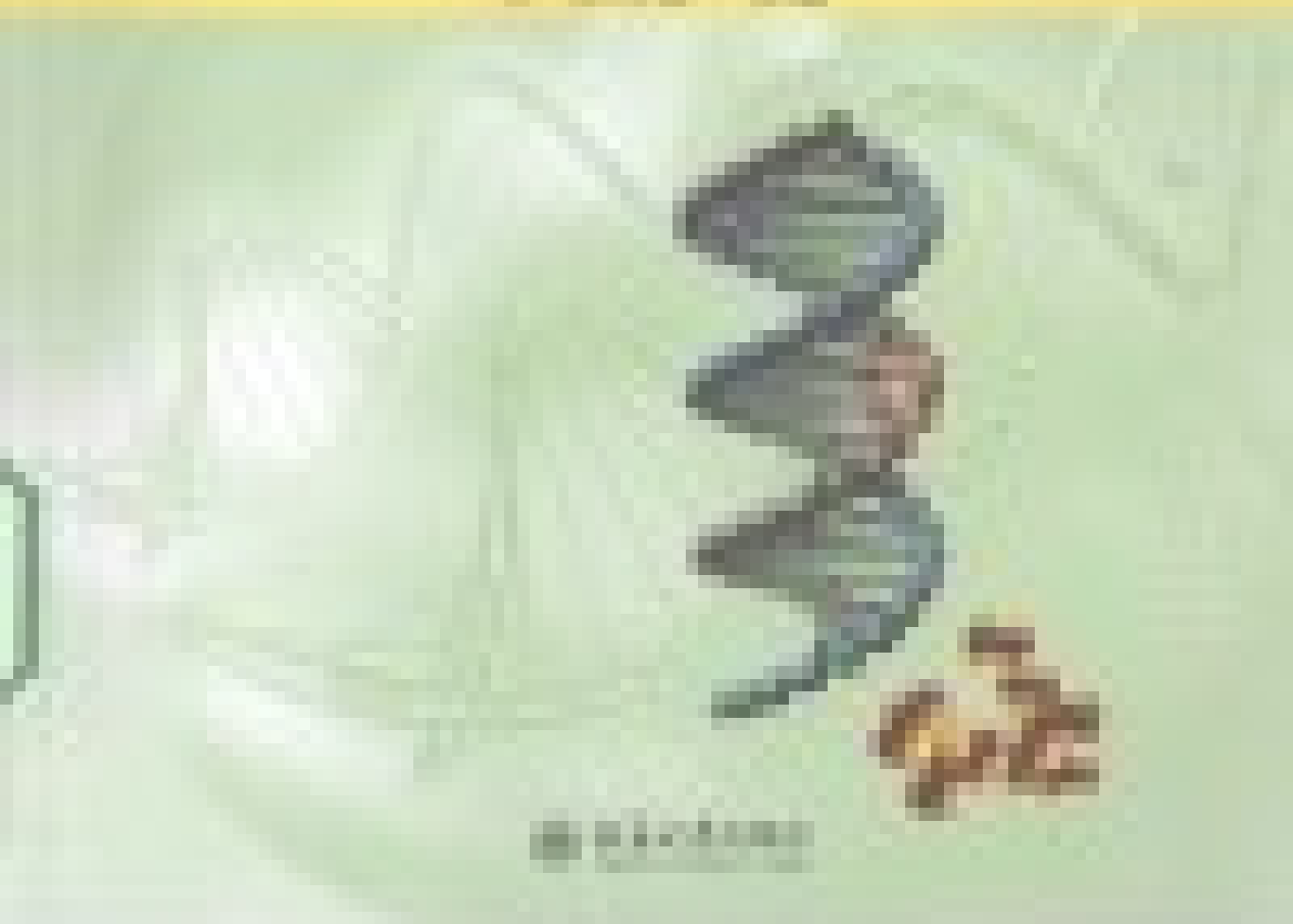


北京大学出版社
PEKING UNIVERSITY PRESS

EXPERIMENTS in Molecular Biology

分子生物学实验

第 2 版



第 2 版

分子生物学实验

主 编 汪天虹
编著者 汪天虹 鲍晓明 孔 健
刘相梅 吴志红 庞 昕



北京大学出版社
PEKING UNIVERSITY PRESS

内 容 简 介

本书首先对分子生物学实验原理与技术进行了概括性介绍。在此基础上,对分子生物学实验的基本技术与方法,包括对来自动植物、微生物细胞的 DNA 和 RNA 样品的制备、克隆和表达载体的制备、重组质粒的构建、重组 DNA 导入各种受体细胞、外源基因的表达和重组子的鉴定、用酵母表达系统克隆和表达基因、丝状真菌遗传转化系统的基本操作、各种 PCR 技术原理与应用、工程菌的培养与目标产物的分离等多方面进行了阐述。每章均在详细介绍相关实验技术基本原理的基础上,将基础性实验内容和部分提高、创新性实验内容的操作过程详细列出,以训练和提升学生和其他相关研究人员的分子生物学实验技能。本书 10 章共涵盖 40 个实验,可供不同需求人员选用。在重点介绍通用的大肠杆菌分子生物学实验技术的基础上,本书对近年来发展迅速的酵母和丝状真菌分子生物学实验技术作了较系统的介绍,希望对从事相关内容科研的研究生和科研人员有所裨益。

本书可作为高等学校生物学科各专业本科生和研究生的分子生物学实验指导教材,同时对从事相关领域的教学、科研人员来说也是一本有益的参考书。

图书在版编目(CIP)数据

分子生物学实验/汪天虹主编. —北京:北京大学出版社,2009.4
ISBN 978-7-301-14436-7

I. 分… II. 汪… III. 分子生物学—实验—高等学校—教材 IV. Q7-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2008)第 170999 号

书 名: 分子生物学实验

著作责任者: 汪天虹 主编

责任编辑: 黄 炜

封面设计: 张 虹

标准书号: ISBN 978-7-301-14436-7/Q · 0117

出版发行: 北京大学出版社

地 址: 北京市海淀区成府路 205 号 100871

网 址: <http://www.pup.cn> 电子信箱: zpup@pup.pku.edu.cn

电 话: 邮购部 62752015 发行部 62750672 编辑部 62752038 出版部 62754962

印 刷 者: 北京宏伟双华印刷有限公司

经 销 者: 新华书店

787 毫米×1092 毫米 16 开本 11.75 印张 285 千字

2009 年 4 月第 1 版 2009 年 4 月第 1 次印刷

定 价: 22.00 元

未经许可,不得以任何方式复制或抄袭本书之部分或全部内容

版权所有,侵权必究

举报电话: (010)62752024 电子信箱: fd@pup.pku.edu.cn

前 言

分子生物学是在分子水平上研究生命结构与功能的学科,主要研究细胞各种系统之间的相互作用,包括 DNA、RNA 和蛋白质合成之间的相互作用以及这些作用是如何被调节的。分子生物学是带动生命科学的前沿学科,许多重大的理论问题和技术问题都依赖于分子生物学的突破而取得进展。鉴于分子生物学具有极强的实验性,使分子生物学实验技术成为 21 世纪高素质生物学人才的必备技能。

本科教学中的分子生物学实验是培养学生具有科研素质和动手能力、创新能力的一个重要环节。为了帮助学生更好地理解分子生物学实验技术基本原理,掌握基本实验技能,培养开展科学研究的能力,我们在多年来为硕士研究生开设的“基因工程原理与实验技术”课程的基础上,结合任课教师自身多年的科研经验,编写了这本《分子生物学实验》教材。本教材的特点是针对初学者的实际情况,对分子生物学实验技术的基本原理和实验的具体方法均有较详细的介绍和描述;在此基础上,结合编者多年来的科研经验,尽可能把各种实验技术列出供读者选用,同时对实验过程中可能出现的现象和问题予以合理的解答。针对研究生和欲涉猎一些特殊领域(如酵母和丝状真菌研究领域)分子生物学家研究人员的需要,我们在重点介绍通用的大肠杆菌分子生物学实验技术的基础上,增加了酵母和丝状真菌分子生物学实验技术相关章节的内容,希望尽可能涵盖一些已经发展成熟的新技术、新方法,以帮助那些准备在这些研究领域开展工作的研究生和其他研究人员尽快地掌握相关实验技能,提高研究素质,能较快地进入和开展相关研究工作。

本教材共分 10 章,列出 40 个实验供选用。读者可针对本科生课时有限、需紧凑地安排实验的特点,自行选择其中若干实验,串联为一套连贯的,内容包括生物体基因组 DNA 和质粒 DNA 的提取和纯化,DNA 的酶切、连接和大肠杆菌转化,重组子的筛选和检测,DNA 或蛋白质凝胶电泳,PCR 技术,杂交技术等在内的一系列分子生物学实验,并在实验内容、方法和技术上进行合理安排,使学生在有限的课时中尽可能多地了解和掌握现代分子生物学基本理论和有关实验的基本原理与方法,培养动手能力和创新能力,具备初步的科研素质。

本书所有编者多年来一直从事分子生物学教学与研究,承担分子生物学实验课理论和实验课的课堂教学,主持与参加了多项科学研究项目并发表了多篇研究论文。但由于知识面有限以及时间仓促,在本书的编写过程中难免存在疏漏和不足之处。恳请同行和读者提出宝贵的意见,赐予批评和指正,帮助我们修改和完善内容,提高本书的质量,同时也希望本书的出版能够促进同行之间的交流与沟通。

编 者

2008-09-30

目 录

第 1 章 分子生物学实验原理与技术概述	(1)
第 2 章 染色体 DNA 和 RNA 的制备	(16)
实验 2.1 细菌染色体 DNA 的提取	(16)
实验 2.2 酵母染色体 DNA 的提取	(20)
实验 2.3 SDS 裂解法提取丝状真菌染色体 DNA	(21)
实验 2.4 RNA 的提取	(23)
实验 2.5 凝胶电泳进行 DNA 分离纯化	(29)
实验 2.6 核酸纯度、浓度与相对分子质量的测定	(35)
第 3 章 载体的制备	(41)
实验 3.1 质粒 DNA 的提取——碱变性提取法	(45)
实验 3.2 λ 噬菌体 DNA 的提取	(49)
实验 3.3 λ DNA 去磷酸化臂的制备	(52)
第 4 章 重组质粒的构建	(55)
实验 4.1 限制性核酸内切酶的酶切反应	(61)
实验 4.2 酶切 DNA 片段的 CIP 处理	(64)
实验 4.3 酶切 DNA 片段的分离与回收	(65)
实验 4.4 载体与外源 DNA 的连接反应	(67)
第 5 章 重组 DNA 导入受体细胞	(73)
实验 5.1 感受态细胞的制备及质粒转化	(74)
实验 5.2 λ 噬菌体载体与外源 DNA 片段的连接、 体外包装与扩增(基因组文库的构建)	(77)
第 6 章 重组子的鉴定和外源基因的表达	(81)
实验 6.1 <i>E. coli</i> 转化子的筛选与验证	(83)
实验 6.2 Southern 印迹杂交	(86)
实验 6.3 Northern 印迹杂交	(89)
实验 6.4 斑点印迹杂交	(92)
实验 6.5 外源基因的诱导表达	(93)
实验 6.6 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测重组蛋白的表达	(96)
实验 6.7 Western 印迹技术检测重组蛋白的表达	(101)
第 7 章 在酿酒酵母中克隆表达外源基因	(104)
实验 7.1 酵母染色体 DNA 的提取	(108)
实验 7.2 木糖还原酶基因的获得	(110)
实验 7.3 重组质粒的构建(酶切连接)	(112)
实验 7.4 酵母质粒的小量提取与插入方向验证	(115)

实验 7.5	酵母菌 LiAc 完整转化酵母细胞	(116)
实验 7.6	酿酒酵母转化子的验证	(118)
实验 7.7	重组酵母木糖还原酶活性的测定	(120)
实验 7.8	重组酵母菌株发酵实验及发酵产物分析	(121)
第 8 章	丝状真菌的转化与转化子的筛选	(123)
实验 8.1	瑞氏木霉原生质体的制备与转化实验	(128)
实验 8.2	瑞氏木霉原生质体电转化实验	(132)
实验 8.3	农杆菌介导的瑞氏木霉转化	(134)
实验 8.4	振荡破壁法快速小量提取瑞氏木霉染色体 DNA	(136)
实验 8.5	瑞氏木霉潮霉素抗性转化子的 PCR 鉴定	(138)
第 9 章	PCR 技术原理与应用	(141)
实验 9.1	PCR 扩增目的片段	(151)
实验 9.2	一步法 RT-PCR	(155)
实验 9.3	两步法 RT-PCR	(158)
第 10 章	工程菌的培养与目标产物的分离	(161)
实验 10.1	重组 <i>E. coli</i> 诱导表达外源内切 β -1,4-葡聚糖酶	(163)
实验 10.2	从 <i>E. coli</i> 中提取纯化目的重组蛋白	(165)
附录		(168)

第1章 分子生物学实验原理与技术概述

分子生物学研究是在分子水平上对基因及其活性,包括基因的转录、翻译、DNA 修复、重组和转位所开展的一系列研究。分子生物学基本技术指重组 DNA 技术(recombinant DNA techniques),也称为基因工程(genetic engineering)技术、基因操作和遗传工程。它是现代生物技术的核心。基因工程的本质是按照人们的设计蓝图,将生物体控制性状的基因进行优化重组,并使其稳定地遗传表达。这一技术在超越生物王国种属界限的同时,简化了生物物种的进化程序,大大加快了生物物种的进化速度。自 20 世纪 70 年代以来,快速发展的基因工程技术直接提供了在基因水平上改造生物性状、生产目的蛋白的方法。重组 DNA 技术的兴起与发展,利用基因工程技术构建具有各种新遗传性状的基因工程重组生物体,不仅推动了基础研究的发展,使生物学进入了分子生物学的全新阶段,而且也促进了各项应用研究的进展,对现代生物技术的发展起到了巨大的推动作用。

基因工程研究史上的第一次重大突破,是把人工合成的生长激素释放抑制素基因转入有乳糖启动子控制的 *Escherichia coli* (*E. coli*) 中表达。这也是第一个在原核细胞中表达的真核基因。由重组 *E. coli* 所产生的嵌合型生长激素释放抑制素多肽在体外用溴化氢处理,便可产生活性蛋白质。通过这种方式,只需要成本为几美元的 9 L 培养液,就可从中得到 50 mg 的生物活性物质。若从羊脑中提取相同数量的生物活性物质,则需要 50 万头羊的脑,由此可见基因工程改造的微生物在生物制药中的辉煌前景。

近年来,随着基因工程技术的快速发展,已经利用具有高生产能力的 *E. coli* 或酵母细胞构建基因工程菌,大量表达有价值的药用蛋白质。继生长激素释放抑制素生产成功之后,陆续又有人胰岛素、生长激素、 α -干扰素、促红细胞生长素、乙型肝炎疫苗、 β -干扰素、 γ -干扰素和白细胞介素等由基因工程微生物生产的多种基因工程药物投放市场。此外,基因工程微生物还用于生产疫苗、传染病和遗传疾病诊断用探针,进行基因治疗等。随着许多基因表达系统和蛋白质纯化方案的发展与不断完善,对异源蛋白的生产和纯化不再是主要的难题。科学家把更多的注意力放在异源蛋白的活性、特异性、正确的折叠和完整性等方面,对这些问题的解决很可能将导致对重组蛋白更加理性和成熟的应用。

近年来,采用基因工程技术对工业用酶进行定点突变和(或)定向进化,在分子水平上改良酶的结构和功能的研究工作已在多个实验室展开。在此基础上构建的许多基因工程微生物已作为工业生产菌株被用于大规模工业发酵生产各种酶制剂。在整个酶制剂产品中,用于洗涤剂、食品和淀粉加工的工业用酶(蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶和纤维素酶)占了市场份额的 75%,而其中 60% 的酶产品都是用基因工程微生物来生产的。基因操作手段的大量应用,改善了酶的分子结构,提高了酶的活性和稳定性,大大提高了酶的整体工作效率。

此外,在环境技术中,基因工程微生物已被应用于治理污染和环境保护。

除以上应用领域外,基因工程微生物还被广泛应用于遗传和基因表达调控等基础理论研究,对阐明各种遗传现象和代谢途径,了解其遗传本质起到了重要的作用。

1.1 重组 DNA 技术概述

重组 DNA 技术是指用生物化学的方法,在体外将各种来源的遗传物质(异源或同源的、原核或真核的、天然的或人工合成的 DNA 片段)与载体系统(病毒、细菌质粒或噬菌体等) DNA 结合成为一个重组子,通过转化或转染宿主细胞,把外源基因运送到另一种生物的活性细胞中,并使之无性繁殖(称之为“克隆”)和行使正常功能(称之为“表达”),使重组基因在细胞内表达并产生特定的基因产物,从而使后一种细胞具有新的遗传性状,甚至创造生物新品种的遗传学技术。因此重组 DNA 的过程通常是:鉴别感兴趣的供体目的基因→在细菌中克隆目的基因→在细菌系统对克隆的基因性质进行分析→修饰目的基因→把基因重新引入供体细胞进行研究(图 1-1)。

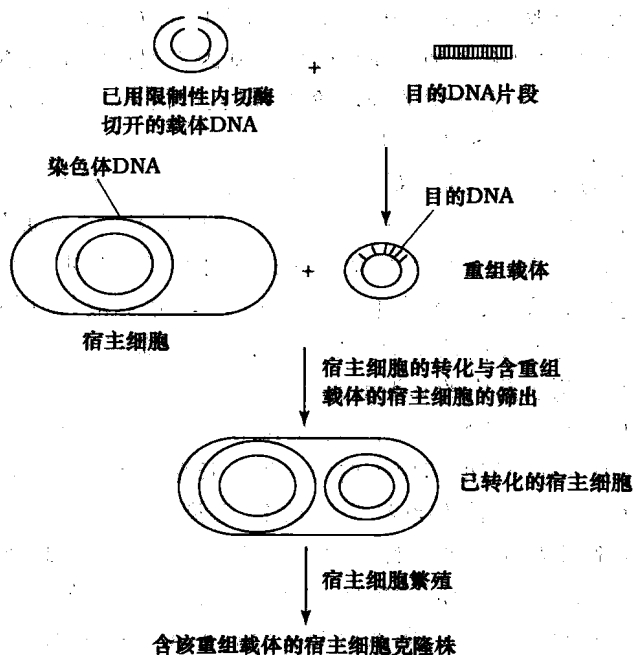


图 1-1 DNA 重组示意图

一般说来,有效的分子克隆需要以下五个方面:

(1) 需要一种宿主生物: *E. coli* 是最常用的细菌宿主,经过几十年的研究对其已有了很好的了解并且可以很方便地进行操作。酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)是一个常用的真核宿主,具有很多便于操作的与 *E. coli* 类似的性质。其他的宿主包括毕赤酵母(如 *Pichia pastoris*)和秋黏虫(*Spodoptera frugiperda*),昆虫杆状病毒 *baculoviruses* 表达系统可在其中表达)。

(2) 需要一种载体,以便携带有效载荷的 DNA 进入宿主细胞并帮助 DNA 在细胞中复制。

(3) 需要有使外源目的 DNA 与载体进行共价连接的有效方式。常采用以下方法:使 DNA 片段与限制酶处理过的载体连接,或通过同源重组使设计的 DNA 交换到载体上。

(4) 需要有在体外把修饰过的重组 DNA 引入宿主细胞的方法。最常用的方法包括:转

化(transformation)、转染(transfection,在体外把DNA包装进噬菌体颗粒用于侵染细胞)和电穿孔(electroporation,把DNA引入细胞的一种物理方法)。

(5) 需要有选择(selection)或者筛选(screening)方法,以便回收含有所需要的重组体DNA的细胞。选择指通过特定条件使所要的细胞或者噬菌体(带有载体或载体和插入片段)能够复制,同时阻止其他细胞或噬菌体的复制。典型的选择条件包括:抗生素敏感性和抗性、营养需求、噬菌斑的形成等。筛选是允许所有的细胞生长,但对得到的克隆的特定性质进行检测,通常有一些指示代表载体上存在有插入片段。常用的筛选特性包括:抗生素敏感性和抗性、营养需求、噬菌斑的类型、蓝/白筛选(β -半乳糖苷酶活性)、专一性(通过核酸杂交或者抗体)筛选等。

分子克隆的目的包括:分离特定的DNA作为探针、进行限制酶图谱绘制、进行核酸测序或者重新引入生物体中;构建含有大的染色体DNA中不同片段的细胞或者病毒的汇集物,收集能代表几乎所有的序列的群体(文库);获得一定数量的特定蛋白质以便进行进一步的研究工作等。

1.2 分子克隆工具酶

在DNA分子克隆技术的发展过程中,有两种类型的酶的发现为其发展提供了机遇:一种是限制性内切酶,它可以把来自任何生物的DNA在含有几个特定碱基的位点切断,产生一组可再生的片段;另一种是连接酶,可以在限制酶切开的DNA片段插入到可复制的DNA分子中后,将二者连接产生重组的DNA分子。重组DNA分子可以被引入适宜的宿主细胞,通过宿主细胞无限量地复制。

1.2.1 限制性核酸内切酶

限制性核酸内切酶(restriction endonuclease)是一类能够识别双链DNA分子中特定的核苷酸序列,并在特定位点切割DNA双链结构的核酸水解酶。该类酶是从原核生物中分离纯化出来,其作用是作为细菌防御体系中的一部分,将侵入细菌的外源DNA分子切割成不同大小的片段。由于细菌具有的甲基化酶可将自身DNA分子中限制性酶切位点位置的碱基甲基化,从而保护自身免受限制性核酸内切酶的降解。限制性核酸内切酶的发现为体外DNA重组技术的发展提供了良好的剪切工具。

根据限制性核酸内切酶的特性可将其分为I、II、III型:I型限制性核酸内切酶由3种不同亚基构成,具有修饰酶活性和限制性核酸内切酶活性,可识别并结合于特定的DNA序列,随机切断识别位点以外的DNA序列;III型限制性核酸内切酶具有核酸内切酶与修饰酶活性,在DNA链上有特异识别切割位点,切割位点在识别序列周围25~30 bp范围内。I、III限制性核酸内切酶均为多亚基蛋白,由于切割位点的不确定性,不利于体外DNA分子重组操作。体外分子操作过程中用到的限制性内切酶主要是II型限制性核酸内切酶。II型限制性核酸内切酶为单亚基蛋白,作为细菌限制性核酸内切酶限制修饰系统(R-M系统)重要的组成部分,可识别特异性切割位点并在识别位点特异性地切断DNA,所识别的DNA序列主要为四核苷酸、六核苷酸和八核苷酸序列,识别的DNA序列一般具有回文结构特征。酶识别和切割后主要产生三种DNA双链末端:3'突出端、5'突出端及平末端。在某些情况下,不同来源的限制性核酸内切酶识别不同的DNA序列,切割DNA后产生相同的黏性末端,这类限制性内切酶

称为同尾酶(isocaudamer),如 *Bam*H I (GGATCC)和 *Bgl* II (AGATCT)。有时不同来源的限制性核酸内切酶识别相同的 DNA 序列,这类限制性核酸内切酶称为同裂酶(isoschizomers),如 *Sma* I 和 *Xma* I (CCCGGG)。

1.2.2 DNA 连接酶

DNA 连接酶(DNA ligase)能够催化两条 DNA 链之间形成磷酸二酯键,即封闭双链 DNA 的某条单链上两个相邻核苷酸之间的磷酸二酯键断裂所形成的缺口(nick),其前提条件是需要一条 DNA 链的 3'端具有游离的羟基(—OH),另一条 DNA 链的 5'端具有磷酸基团,同时,连接反应需要 NAD^+ 或 ATP 提供能量。多数情况下,供体 DNA 和载体 DNA 都用一种产生黏性末端的限制性核酸内切酶切割,然后将二者在试管中混合,在连接酶作用下使供体目的 DNA 和载体 DNA 黏性末端相互连接。T4 噬菌体编码的 DNA 连接酶能连接具有平末端的双螺旋 DNA 片段。

连接好的重组 DNA 通过转化进入细胞。进入宿主细胞后,质粒载体通常具有复制起点,能自主复制。进入细胞的每个重组质粒将以多拷贝形式存在,随着细胞多代分裂,重组质粒也将进行多轮复制。因此,所产生的细菌克隆将含有数以亿计的单个外源 DNA 片段的拷贝。由单个供体 DNA 片段扩增得到拷贝就是 DNA 克隆。

1.2.3 DNA 聚合酶

DNA 聚合酶(DNA polymerase)是指以脱氧核苷三磷酸作为底物催化合成 DNA 的一类酶。它们催化脱氧核苷三磷酸加到复制中的 DNA 链的 3'-OH 末端,DNA 聚合酶合成 DNA 方向为 5'→3'。DNA 聚合酶主要有三种:DNA pol I、pol II 和 pol III。DNA pol I 由一条多肽链组成,用枯草杆菌蛋白酶水解 DNA pol I 得到的大片段称为 Klenow 片段。DNA pol I 有三种活性:(1) 5'→3'聚合酶活性;(2) 3'→5'外切核酸酶活性,即校对功能,有利于确保 DNA 复制的忠实性;(3) 5'→3'外切核酸酶活性,该活性有利于损伤的 DNA 得以修复并可去除 DNA 复制时 5'端的 RNA 引物。DNA pol II 有 5'→3'聚合酶活性和 3'→5'外切核酸酶活性。*E. coli* DNA pol III 是 DNA 复制的主要聚合酶。

1.2.4 其他工具酶

各种工具酶种类不同、功能各异。合理使用这些工具酶,使分子生物学研究人员能在各种类型的分子操作中对 DNA 进行顺利的剪裁、复制、修饰和拼接,达到遗传操作的最终目的。

表 1-1 分子操作中常用的其他工具酶

酶	主要用途
反转录酶	以 RNA 为模板合成 cDNA 链的 DNA 聚合酶
核苷酸激酶	催化多核苷酸 5'-OH 末端磷酸化
末端转移酶	在 3'末端加入同质多聚物尾
S ₁ 核酸酶	降解单链 DNA 或 RNA
绿豆核酸酶	单链 DNA 和 RNA 核酸内切酶
T7 DNA 聚合酶	DNA 聚合酶活性和 3'外切酶活性
RNase H	DNA-RNA 杂交分子中降解 RNA 链
RNase A	RNA 内切核酸酶,可水解 DNA-RNA 杂交分子中未配对的 RNA
碱性磷酸酶	切除核酸末端磷酸基团
蛋白酶 K	水解蛋白质
溶菌酶	水解细菌细胞壁中肽聚糖

1.3 目的基因的获得

目前,利用重组 DNA 技术构建杂合 DNA 时,获取目的基因的途径大致有以下几种:

(1) 基因组文库筛选:分离组织或细胞染色体 DNA,利用限制性核酸内切酶将染色体 DNA 切割成片段后与适当的克隆载体连接成重组 DNA 分子,转入适宜的受体菌中扩增,使每个细菌内都携带一种重组 DNA 分子的多个拷贝。不同克隆所携带的重组 DNA 分子内可能存在不同的染色体 DNA 片段,这样生长的全部细菌所携带的各种染色体片段就代表了整个基因组。存在于细菌内、由克隆载体所携带的所有基因组 DNA 的集合称基因组 DNA 文库(genomic library)。基因组 DNA 文库应该包含基因组全部基因信息。采用适当的筛选方法可以从基因组 DNA 文库中筛选出含有目的基因的克隆。目的克隆经过培养增殖后,可从中分离、回收重组 DNA,进行测序、分析以及进一步的亚克隆和表达研究。

(2) cDNA 基因组文库筛选:提取细胞的总 RNA,进一步从中纯化得到 mRNA。然后以 mRNA 为模板,利用反转录酶合成与 mRNA 互补的 DNA(complementary DNA, cDNA),再复制双链 cDNA 片段,与适当载体连接后转入受体,得到 cDNA 文库(cDNA library)。采用适当的方法从 cDNA 文库中筛选出含有目的 cDNA 的克隆。与基因组 DNA 文库类似,由总 mRNA 制作的 cDNA 文库包括了细胞全部 mRNA 信息,其中包括感兴趣的 cDNA 基因。当前发现的大多数蛋白质的编码基因几乎都是这样分离的。

(3) DNA 化学合成法:如果已知某基因的核苷酸序列,或根据某种基因产物的氨基酸序列推导出该多肽编码基因的核苷酸序列后,再利用 DNA 合成仪通过化学合成原理合成目的基因。利用该法合成的基因有人生长激素释放抑制因子、胰岛素原、脑啡肽及干扰素基因等。

(4) 聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增目的基因:目前,采用 PCR 技术获取目的 DNA 应用十分广泛。采用该技术可以在体外将微量的目的 DNA 片段扩增 100 万倍以上。PCR 的基本工作原理是,以拟扩增的 DNA 分子为模板,以一对分别与模板 5'末端和 3'末端相互补的寡核苷酸片段为引物,在耐热 DNA 聚合酶作用下,按照半保留复制机制沿模板链,在引物上合成新链 DNA,直至完成新链。重复这一过程,即可使目的 DNA 片段得到扩增(PCR 技术详细介绍参见第 9 章)。

1.4 载体

基因载体是可将外源目的 DNA 片段导入受体细胞,并进行复制和增殖的 DNA 分子。载体一般具有一个多克隆位点,一个或多个筛选标记,载体及携带的外源片段对宿主应是无害的。构建载体时需去除载体上的一些非必需的序列,甚至可以采取辅助载体的策略。

载体根据用途可分为基因克隆载体和基因表达载体,基因克隆载体作用主要是扩增基因片段,具有较好的扩增效率及忠实性;基因表达载体除具有基因克隆载体的一般特性外,还有一些特定的序列启动基因的表达,最终产生目的蛋白或 RNA 调控分子。表达载体与克隆载体的主要区别为表达载体添加了部分表达调控序列,比如原核细胞表达载体添加了目的基因表达所需的启动子、终止子、SD 序列、衰减子等序列;真核表达载体除携带有在原核细胞中克隆与复制所需的元件外,还携带有在真核宿主表达所需的元件,如启动子、增强子、终止子序

列、真核细胞筛选标记等。

载体按来源可分质粒、噬菌体、病毒和人工染色体等。病毒载体具有较强的潜在免疫原性,携带的外源片段不长,包装容量一般不超过其自身基因组大小的 110%,但转染效率比较高;非病毒载体具有免疫原性较弱,且易于大规模生产等优点,广泛应用的有质粒、黏粒(cosmid vector)、 λ 噬菌体、人工染色体,其中人工染色体有细菌人工染色体(BAC)、酵母人工染色体(YAC)、P1 人工染色体(P1 artificial chromosomes, PAC)等。

质粒可独立于细菌染色体 DNA 自我复制,通常为小的环状 DNA 分子。基因工程中最常用的是 *E. coli* 的质粒。由于携带大的插入片段的质粒容易自然丢失所插入的片段,因此质粒不适用于克隆大于 20 kb 的 DNA 片段。质粒载体主要存在于细菌,但在酵母菌及古菌中也存在。噬菌体载体主要来自于 λ 噬菌体和 M13 噬菌体, λ 噬菌体为双链 DNA 分子,在 DNA 分子两端有 12 个碱基的黏性末端(cos 位点), λ 噬菌体相关的载体感染效率比较高,有近 100% 的感染率。M13 噬菌体为单链 DNA 分子,可应用于制备基因探针和基因测序,单链 M13 DNA 分子在细菌宿主中可转变为复制性的 DNA 双链(replicative form DNA)。黏粒为携带 λ 噬菌体 cos 位点的质粒,它既可以质粒的方式复制,又可像噬菌体那样被包裹,而且黏粒可携带的 DNA 插入片段长度约 3 倍于 λ 噬菌体载体所能携带的外源片段。酵母人工染色体是根据酵母的染色体结构人工构建的载体,包括两端的端粒(telomeres)以及中间的着丝粒(centromeres),酵母人工染色体可携带长达 2 Mb 的外源 DNA 片段,因此对于较大基因组结构作图很有作用。细菌人工染色体可携带约 300 kb 的外源 DNA 片段,与酵母人工染色体相比较稳定,并且容易转化。

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)载体: RNA 干扰现象发现于 20 世纪 90 年代中期,它是细胞调节基因表达的一种内在机制,长的双链经 Dicer 酶切成 21~23 个碱基对的 siRNA 分子,这些小的 RNA 分子与核糖核酸酶复合物结合形式的 RNA 诱导的基因沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC)结合,siRNA 解链,反义单链引导 RISC 与目的 mRNA 互补结合,并使 mRNA 在相应的位点被切割和降解。RNA 干扰工具主要有:合成的 siRNA 分子,短茎环 RNA(short hairpin RNA, shRNA)分子的质粒载体及病毒载体。合成的 siRNA 分子约为 21 个碱基对,可比较容易地透过生物膜进入细胞内,并且可达到 90% 的转染效率;利用质粒或病毒携带 RNA 干扰盒的载体在 RNA 聚合酶 III(pol III)启动子、U6 或 H1 启动子下启动合成一段茎环 RNA 分子(shRNA),茎环 RNA 结构为一段与目的 RNA 相同或互补的序列,中间连接 7~9 个碱基形成环状,茎环 RNA 可被 Dicer 酶切割成双链 siRNA。RNA 干扰载体可在细胞中产生大量的 siRNA 分子,进而产生 RNA 干扰,沉默相关基因的表达,有利于进行基因功能的研究,同时为基因治疗开辟了一条新的途径。

“穿梭”载体(shuttle vectors):如果把一个真核基因克隆到原核载体上,并在载体加上了一段已知可以作为复制起点的真核序列,则载体有可能在原核和真核细胞中都可以复制。由于它们可以在不同的宿主中穿梭,这种类型的载体又称为“穿梭”载体。在无复制起点的情况下,供体 DNA 必须整合到真核染色体上才能够稳定转化。

1.5 重组 DNA 的转化受体

在基因工程中最常用的重组 DNA 宿主菌是 *E. coli*。随着遗传工程操作在各类植物、动

物细胞和微生物中的展开,根据研究体系和最终表达体系的不同,导入重组 DNA 的宿主菌范围在不断扩展。一般说来,为保证外源基因在细胞中的大量表达和扩增,理想的宿主细胞应该是:① 具有转化亲和性,能够高效吸收外源 DNA 分子;② 如果转化质粒携带营养缺陷型标记,则受体细胞应带有与营养缺陷型标记互补的遗传性状;③ 避免重组 DNA 进入受体细胞后被 DNase 降解,宿主菌应为限制系统或限制与修饰系统缺陷型;④ 为避免克隆载体 DNA 与宿主染色体发生同源重组,宿主菌一般采用重组缺陷型(RecA^-)菌株;⑤ 宿主细胞应该能有效地对外源基因进行转录后加工和翻译后修饰,使重组蛋白具有正确的构象和活性,能被有效地分泌;⑥ 宿主菌不具有感染寄生性,培养方便,便于进行基因操作和筛选等。

长期以来,在生物技术领域,对生产重组人源蛋白非常关注,并开展了一系列相关研究,这也是目前药物开发研究最活跃的领域之一。某些蛋白质,例如胰岛素,其天然状态是不被糖基化的,因此这类蛋白质可以在原核宿主,如 *E. coli* 中进行表达。但是多数药物蛋白则需要翻译的同时在蛋白质特定的氨基酸残基(如天冬酰胺残基、丝氨酸或苏氨酸残基)上加上寡聚糖,寡聚糖的结构在体内与蛋白质正确折叠和在分泌途径中的拣选有关;作为药物,其对该药物的药效和药物代谢动力学行为(组织分配、高峰水平、在人血清中的稳定性等)至关重要。为达到人体用药的目的,所使用的药物糖蛋白糖基化的类型必须是与天然人源糖蛋白类似的糖基化类型。哺乳动物细胞表达系统虽然能够生产人源化糖蛋白,但由于重组蛋白产量低、培养时间长、成本昂贵、载体侵染范围有限、在组织中会同时带有病毒的成分或需要逐个操作每一个细胞等原因,使其应用规模与范围受到很大的限制。

酵母和丝状真菌是最常用的工业发酵用真核微生物,可以在化学成分确定的适宜培养基中以高细胞密度生长,具有易操作、发酵周期短、成本低廉等优点。真菌表达系统所产生的糖蛋白,其 N-糖基化类型与人源糖蛋白不同,为高甘露聚糖。这种过度糖基化赋予其在人体中的免疫原性,因而限制了其药用价值。目前,研究人员在对酵母和丝状真菌的糖基化系统进行改造,以期利用酵母和丝状真菌细胞作为宿主生产人源化糖蛋白。

1.6 构建基因文库

基因文库(DNA library)是将制备的 DNA 片段混合物与特定的载体进行连接,连接后的混合体必须具备原 DNA 片段的完整性及可复制性。根据 DNA 片段来源的不同,基因文库可分为基因组文库和 cDNA 文库(或称互补 DNA 文库)。基因组文库插入片段为基因组经片段化的 DNA 分子,而 cDNA 文库中的插入片段是经 mRNA 反转录而得到的 DNA 分子。因此, cDNA 文库规模比同物种基因组文库的库容小,并且由于不同的细胞生长时期及生长环境所构建的 cDNA 文库之间以及与相应的基因组文库均有一定的差别。

基因组文库插入片段的获得可通过机械剪切法或不完全的限制性内切酶酶切,构建文库所选用的载体主要有 λ 噬菌体、黏粒及人工染色体等。一些小型的基因组文库可以在一些大的基因组文库的基础上进行亚克隆获得,或根据 Southern 印迹杂交结果,获取一定大小的条带与相对应的载体重组获得。

一个基因文库应包含的克隆数目与生物基因组的大小和被克隆 DNA 片段的长度有关。基因组越大,所需克隆数越多;载体所能插入的外源 DNA 片段越长,则所需克隆数越少。某一基因文库中应包含的克隆数目 N 可根据 Charke-Carbon 公式计算:

$$N = \ln(1 - P) / \ln(1 - a/b)$$

其中, P 为文库中包含供体细胞中任何 DNA 序列信息的概率(通常设为 99%), 代表基因文库的完整性; N 是重组子数目, 表示为使细胞中某段 DNA 以 P 概率在文库中出现, 文库所应具有的最少克隆的数目; a 是文库中每个重组子所含外源 DNA 的平均长度; b 是生物体基因组 DNA 的大小(单倍体基因组 DNA 的长度)或所有 mRNA 的总拷贝数。例如, 要建立人的基因组(3×10^9 bp)文库, 插入噬菌体载体的 DNA 片段平均长度为 20 kb, 得到特定 DNA 序列的概率为 99%, 则需要的重组子数目为:

$$N = \ln(1 - 0.99) / \ln(1 - 2 \times 10^4 / 3 \times 10^9) = 1.5 \times 10^5$$

根据载体和 DNA 来源的不同, 可建立不同类型的文库。构建文库时对载体的选择决定了用于建文库的基因组(或其他 DNA 样品)的大小, 不同的克隆载体携带不同大小的 DNA, 质粒和噬菌体载体只能携带小的 DNA 片段, 通常这些载体适用于克隆基因组较小的生物的基因; 而黏粒可以携带长的 DNA 片段, 其他载体, 如 YAC 和 BAC, 可以携带更大量的 DNA 片段。

根据 DNA 来源确定建基因组文库还是 cDNA 文库。基因组较小的生物, 如细菌, 由于缺少内含子, 构建基因组文库是常用的策略。而对于基因组较大的生物, 由于基因组文库过于庞大, 为构建文库带来一定的困难。因此在研究某一特定条件下的基因功能, 以及研究不同组织、器官或者特定条件下的表达差异时, 构建相应条件下的 cDNA 文库显得更为合适。另外, 由于 cDNA 是从 mRNA 合成得到的, 不会带有基因上游或下游的调节序列, 也不带有内含子。这就意味着来自真核生物的 cDNA 在细菌中可以被转译成有功能的蛋白质, 在细菌宿主中表达真核基因时这是一个重要的特征。尽管构建基因组文库工作量和难度较大, 但由于其含有生物体天然状态的全部基因, 包括内含子和调节序列, 因此, 如果构建文库的目的是克隆全部基因, 了解内含子、调节序列的信息, 那么构建基因组文库也是必要的。

噬菌体展示(phage display)文库是以改造过的噬菌体为载体, 将目的基因片段与噬菌体外壳蛋白编码区相连接, 使得在噬菌体的表面呈现外源蛋白质, 然后经过亲和筛选而获得特异蛋白质的重组噬菌体混合物。该文库可用于蛋白质之间的互作、蛋白质与 DNA 分子互作研究。

酵母杂交文库主要有酵母单杂交体系(yeast one-hybrid library)及酵母双杂交体系(yeast two-hybrid library)。酵母单杂交体系的建立始于 20 世纪 90 年代, 用于在酵母细胞中研究真核生物中的 DNA 与蛋白质之间的作用, 该方法具有较高的敏感性及忠实性; 酵母双杂交体系根据真核生物的转录调控因子一般由 DNA 结合结构域(binding domain, BD)和转录激活结构域(activating domain, AD)组成而设计, 利用基因重组技术将外源蛋白基因分别与编码 BD 与 AD 的基因融合, 并分别将外源基因+BD 编码序列和外源基因+AD 编码序列克隆到两个质粒表达载体上, 如果外源基因编码的产物互作, 将使 BD 与 AD 得以靠近, 进而能启动下游标签基因的转录。酵母双杂交系统为研究真核细胞蛋白质的互作提供了良好的平台。酵母杂交文库所用外源基因片段一般为 cDNA 序列, 因此, 酵母杂交文库也是一种 cDNA 表达文库。

1.7 检出特定克隆的方法

1.7.1 利用特殊的探针发现和标记目的克隆

一个文库可能含有数十万个克隆片段, 因此, 必须通过筛选才能找出带有目的基因的重组 DNA 片段。通常可以利用特殊的探针发现和标记所要找的克隆。从广义上说, 探针主要包括两类, 一类用于识别目标 DNA; 一类用于识别目标 DNA 所表达的蛋白质。

1. 检测 DNA 的探针

这一类探针的作用原理是在于一条核酸单链通过碱基互补具有与另一条核酸单链杂交形成双链的倾向。DNA 变性以后,双螺旋解开,产生单链,变性的 DNA 探针即可与文库中相应的变性单链 DNA 结合。

如, DNA 探针:

3'-AAGCCTATTATGGGCAAT-5',

克隆 DNA(方框示可能与 DNA 探针结合的部位):

5'---AGCTAGGGATC: TTCGGATAATACCCGTTA CGTACTATTGGAAGGA---3'

通常,鉴别文库中一个特定的克隆分为两步:①把在平板上的文库菌落或噬菌斑转到一张吸附膜(通常是硝酸纤维素膜或尼龙膜)上,把膜揭起,然后原位裂解吸附在膜表面的菌落或噬菌斑,并使 DNA 变性;②用与所要克隆的基因具专一性的探针在溶液中进行杂交,探针必须用放射性或荧光染料进行标记。一般来说,探针本身是一段克隆的 DNA 片段,其序列与目的基因具有同源性。探针 DNA 必须进行变性,在杂交过程中它只与靶标克隆 DNA 相结合。经过放射自显影后标示的位置就是阳性克隆的位置。

DNA 探针的一个来源是从表达目的基因的组织中得到的 cDNA。由于在这种组织中目的基因 mRNA 很丰富,由这种组织制备并插入载体的 cDNA 很可能就是目的基因。例如,哺乳动物的网状细胞中,90%的 mRNA 是由 β -球蛋白基因转录而来,因此,作为克隆基因组中 β -球蛋白基因的 cDNA 探针,来自网状细胞的 mRNA 就是一个很好的来源。

DNA 探针的另一个来源是由相关生物获得的同源基因。例如,由子囊菌类真菌 *Neurospora* 克隆得到的一个基因,很可能可以用这个基因作探针去克隆亲缘关系较近的真菌 *Podospora*(柄孢壳菌属)的相关基因。使用这种方法主要是基于 DNA 序列进化上的保守性。尽管探针 DNA 和目的克隆 DNA 可能不尽相同,但它们的相似性足以促进杂交的完成。

如果目的基因的蛋白质产物的氨基酸序列已经知道,也可以采用人工合成 DNA 探针。对合成的 DNA 探针的设计是在对遗传密码了解的基础上进行的,把氨基酸序列翻译成原来编码它们的 DNA 序列。但是,由于密码冗余,大多数氨基酸有一个以上的密码,所以编码蛋白质的 DNA 序列可能有几条。要解决这个问题,可以选择具有最小冗余的短的氨基酸序列,利用密码词典计算核苷酸序列。由于 DNA 化学合成反应是一步步进行的,在合成时,应该把每一种可能都考虑到,把所有可能的核苷酸的混合物加到反应体系中,合成所有可能的 DNA 链混合物作为探针。

另外,游离的 RNA 分子也可以作为探针。由于 RNA 是单链分子,它与靶序列的杂交效率很高,因此是一类很有前途的核酸探针。早期采用的 RNA 探针是细胞 mRNA 探针和病毒 RNA 探针,这些 RNA 是在细胞基因转录或病毒复制过程中得到标记的,标记效率不高且受到多种因素的制约。随着体外转录技术的不断完善,近年来已相继建立了单向和双向体外转录系统。如 pSP 和 pGEM 类的新型载体在多克隆位点两侧分别带有 SP6 启动子和 T7 启动子,可以在 SP6 RNA 聚合酶或 T7 RNA 聚合酶作用下转录 RNA。在多克隆位点接头中插入外源 DNA 片段就可以此 DNA 双链中的一条为模板转录生成 RNA。这种体外转录系统反应效率很高,在 1 h 内可以合成近 10 μ g RNA。在底物中加入适量的放射性或生物素标记的 NTP,合成的 RNA 就可得到高效标记。该方法的另一个优点是能有效地控制探针的长度并可提高标记物的利用率。

2. 鉴定蛋白质的探针

如果已知一个基因的蛋白质产物并且已经将其纯化,那么,可以用这种蛋白质制备探针来检测文库中是否含相应基因的克隆:① 制备该蛋白质的一抗和二抗,二抗可用放射性同位素标记也可用产荧光或能发生颜色变化的染料化合物标记。② 用制备的抗体筛选表达文库。注意,构建文库时利用蛋白质高水平表达载体,cDNA 在插入载体时不能破坏正常的阅读框架,使得细胞能正常产生融合蛋白。在检测目标蛋白时,先把吸附膜铺在培养好的培养基表面,揭下后膜上即带有了克隆的“印记”。膜干燥后将其浸泡在抗体溶液中,再依次加入一抗和二抗与之作用,通过抗体与抗原的结合后呈现的放射性、荧光或颜色变化,可有效地鉴别带有合成这种蛋白质的基因的克隆。例如,人的白化病是由于酪氨酸酶缺陷引起,白化病基因的克隆就是用酪氨酸酶抗体筛选表达文库而得到的。

1.7.2 通过功能互补检测克隆

对在细菌或噬菌体文库中的某些特殊克隆可采用功能互补检测,即用 DNA 文库转化供体生物突变株,观察是否由于细胞中存在插入片段而恢复了突变株所丢失的功能,这也称为产生功能互补(functional complementation)作用。具体过程如下:

用野生型供体 DNA 构建细菌或噬菌体文库



用 DNA 文库转化 a^- 供体突变细胞



在转化细胞中选择 a^+ 表型



从上述表型的转化细胞中回收 a^+ 基因

是否采用这一方法取决于供体生物的转化能力。真核生物和原核生物一样,也可以进行转化。在不同的真核生物中转化过程差别很大。一般说来,为了提高转化能力,需要对受体细胞进行特殊处理。如在进行真菌转化时,通常要用酶处理真菌细胞壁。假设我们已经分离到与某一个营养物质代谢途径有关的突变株,欲分离与这种营养缺陷型有关的基因,可用来自野生型菌株的文库 DNA 转化这一营养缺陷型菌株,若转化子含有野生型等位基因,则突变株将转变为原养型,能够在基本培养基上生长。由此即可完成相应克隆的检测。

如果质粒载体在转化的受体菌细胞中能够自主复制(主要是细菌和酵母菌),转化片段可以简单地通过分离质粒而回收。在多数真核生物中,质粒或噬菌体不能复制,这时必须把欲转化片段插入到基因组中以获得稳定的转化,但这样将使得转化的片段很难回收。

用这种方法进行的转化通常在试管或微量滴定板上进行。这些试管或滴定板上分别包含若干组具有一定数量克隆的细菌文库培养物。从特定的文库子集提取质粒 DNA,进行转化。通过逐步减少能成功转化的文库子集中所含克隆的数量,最终可以鉴别文库中能进行成功转化的克隆。例如,*Neurospora trp3* 基因的筛选。筛选这个基因用的是黏粒文库。黏粒必须携带标记基因以便选择转化成功的真菌菌株。真菌通常对潮霉素敏感,因此在真菌转化中常用潮霉素抗性基因。用来自野生型 *Neurospora* DNA 构建的黏粒文库子集去转化 *trp3* 突变株细胞,将转化细胞涂布在含潮霉素但缺乏色氨酸的培养基上,选择 *trp3*⁺ 克隆。能生长的克隆很可能带有 *trp3*⁺ 等位基因。

在多数情况下,转化子所携带的带有野生型等位基因的载体插入染色体上与受体菌突变位点不同的位点,称为异位整合。在少数情况下,则通过一个类似双交换的过程,转化的野生型等位基因可以置换原来的营养缺陷型突变位点。