

基因操纵原理

—— 遗传工程导言

[英] R. W. 奥尔德 著
S. B. 普里罗丝
罗忠训 译

北京师范大学
图书馆
生物系资料室

北京师范大学
生物系
资料室

内 容 简 介

本书是一本遗传工程理论与实践的通俗读物,全书共分十章,主要内容有:限制性内切核酸酶、DNA多聚酶、连接酶的基础知识,各种克隆载体的构成及其应用,克隆DNA片段的准备与克隆计划的制定,重组体的选择方法,如何使克隆的基因得到表达,以及发生在早期的关于遗传工程研究的一场风波。

本书对从事遗传工程研究的科学工作者是必不可少的,对高等学校遗传学的教学是重要的参考书,对一切分子水平的生物学工作者和生物化学工作者都是有价值的读物。

Studies in Microbiology Volume 2

Principles of Gene Manipulation

An introduction to Genetic Engineering

R. W. Old

S. B. Primrose

Blackwell Scientific Publications

基因操纵原理

遗传工作导言

〔英〕R. W. 奥尔 德

S. B. 普里罗丝

著

罗 忠 训

译

武汉师范学院 生物系
科研生产处

译 者 前 言

遗传工程是一门新兴的，正在迅速发展的学科。不论在应用科学方面，还是在分子生物学和分子遗传学的基础理论研究方面，都有十分重大的意义。它与 *DNA* 序列分析技术结合起来，组成了研究基因组的结构与功能的强有力手段，为研究分子遗传学，为揭示生命现象的奥秘开辟了广阔的前景。

本书虽是一本通俗的基础读物，但所选用的资料很新，目前正在广泛使用的理论与技术几乎都涉及到了。它像一面窗户，通过它，我们可以看到当前遗传工程研究的概貌。

本书是译者在国外进修时翻译的。由于水平有限，错误和不当之处在所难免，敬请批评指正。

一九八一年十一月

目 录

序.....	(1)
略语和变换比例尺.....	(1)
1. 导言.....	(2)
2. 切割和连接 <i>DNA</i> 分子.....	(7)
3. 质粒克隆 * 载体.....	(18)
4. 细菌噬菌体和科斯质粒载体.....	(34)
5. 克隆技巧.....	(42)
6. 重组体的选择及其特性.....	(45)
7. 克隆 <i>DNA</i> 分子的表达.....	(52)
8. 哺乳动物细胞中的克隆.....	(62)
9. 可能用于植物细胞的克隆载体.....	(72)
10. 重组 <i>DNA</i> 研究的意义.....	(76)
附录 1 基因操纵所用的酶.....	(82)
附录 2 当我们作手出版时.....	(82)
词汇.....	(83)
参考資料	
* 克隆是 <i>Clone</i> 的译音, 即无性繁殖 译者	(86)

序

生物学正以引人注目的、不断增长的速度继续发展着。而本书的主题，基因操纵，即通常称为遗传工程的，就是其中的一个带头学科。这个领域发展得如此之快，使得许多生物学家发现，赶上当代的发展步伐是不可能的。专门术语的自由使用以及所有迅速发展着的方面需要一些时间才可能在教科书中广泛引用，加剧了这种状况。

目前，基本技术已处于完善阶段，而当前的倾向是运用这些技术来解决特殊的问题。因此，我们尽力给读者以详细的基本技术细节，使他们能跟上当前的文献及将来的发展。在使用这本入门书时，我们希望它的内容不会很快过时，这里解释的原理在一段时间里都将给基因操纵提供一个入门。

本书是在 *Warwick* 大学给生物、微生物、生物化学诸系学生的学位课程的二十节讲稿的基础上写成的。是打算给优秀的学生或已经在从事生物学研究的人提供一个导言。因此，我们假设他们已经有一些分子生物学的基本知识。文献一直引用到 1979 年六月底。引用的参考资料是打算给读者指出这个学科的主流并给研究人员以原始研究成果。然而，在这样一本书中，不可能详细地介绍每一篇论文。我们从那些我们感到能最好地说明某一特殊方面的文献中挑选了一些例子。我们希望，这不会伤害那些其实验未被引用的同行们的感情。

最后，我们荣幸地向熟练的助理 *Debbie* 夫人和 *Dianne Simpson* 小姐致谢，在打印我们的手稿时，他们不得不鉴别有时难于辨认的书写；我们也荣幸地向 *Malcolm Davies* 致谢，他详细地编辑和检查了所有的参考资料。

R. W. 奥布德

S. B. 普里罗丝

一九七九年八月

略语和变换比例尺

琥珀（突变）= *am*

二氢叶酸还原酶 = *DHFR*

DNA 连接酶基因 = *lig*

千碱基 = *Kb*

百万道尔顿 = *Mdal*

分子量 = *mol Wi*

噬菌区形单位 = *Pfu*

温度灵敏（突变）= *ts*

双股 *DNA* 千碱基对与分子量之间的变换比例尺

千碱基对



百万道尔顿

第一章 导 言

导 言

基因操纵这个名词对不同的人有不同的含意。例如,有人把大肠杆菌遗传学家日常进行的高级遗传操纵称为基因操纵。不过,大多数人是在一个更加广泛的程度上来考虑基因操纵的。事实上,在大多数西方国家,由于政府立法进行控制,基因操纵都有一个法定的定义。在联合王国,基因操纵的定义是:不论用什么方法在细胞之外制成的核酸分子,插入到病毒,细菌质粒或其他载体中去,形成一种遗传物质的新组合,从而使它能加到宿主生物中去。在这个宿主中,它不会自然地产生,但却能继续增殖。

其他国家所采用的定义与此类似,都适当地描述了本书的主题。为了完全理解这个定义,考虑一下这个学科的早期发展是必要的。

早期的实验

有些细菌能够通过转化过程来获得外源 DNA。大多数可转化的菌株都不加区别地对待相似物种的 DNA 和完全不同的生物的 DNA。这样,把外源 DNA 引到细菌中去就比较容易。第一个有记载的实验可能是 Abel 和 Trautner 做的。他们曾报告,适当的枯草杆菌 (*Bacillus Subtilis*) 可用天花病毒 DNA 成功地进行转化,并产生一种感染性病毒。不过,当前关于天花病毒操纵的知识表明,这是一个人为的结果。

许多研究小组都报告了植物或动物细胞可以获得外源 DNA。这些实验的大多数都遵循一个相似的方式,把与宿主 DNA 具有不同浮力密度的放射性细菌或病毒 DNA 供给植物或动物细胞。一般来说,具有给体浮力密度的 DNA 在宿主组织中维持一定的时间,被看成是给体 DNA 在植物或动物细胞内至少部分完整地继续存在的证据。有时,在宿主 DNA 浮力密度范围内也观察到了放射性。这可以解释为少量给体 DNA 结合到宿主染色体中去了。但更可能的是,给体 DNA 被降解了,其断裂产物再一次被加到宿主中去。

涉及到真核生物获得 DNA 的实验大多数来至于 Moll 的 Ledoux 实验室 (Ledoux 和 Huart 1968, Ledoux 等 1971)。他们的早期实验使用脱壳的、表面灭菌的大麦粒。从种子靠近胚乳的末端切下一毫米,浸入溶壁微球菌 (*Micrococcus Lysodeikticus*) 的放射性 DNA 中,72 小时之后,可以提取出浮力密度为 $1.712\text{g}/\text{cm}^3$ 的放射性 DNA。而大麦 DNA 的浮力密度为 $1.702\text{g}/\text{cm}^3$,溶壁微球菌 DNA 的浮力密度为 $1.731\text{g}/\text{cm}^3$ 。超声波处理之后,又观察到具有大麦和溶壁微球菌浮力密度的 DNA。这表明,这种杂交 DNA 是由给体和受体 DNA 通过共价键结合而形成的。在利用拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 实生苗作宿主组织的相似实验中,把其 DNA 具有中等密度的 F_1 子代用更多的溶壁微球菌 DNA 进行处理,会产生一种具有更大浮力密度的新的中间峰。这个实验可以重复几代,每一次都得到密度更大的峰。超声波处理后,再次得到宿主和给体密度的 DNA (图 1.1)。

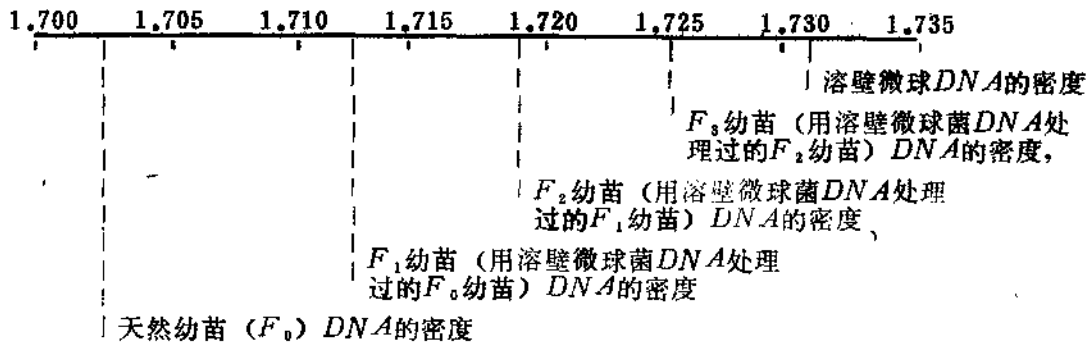


图 1.1, 溶壁微球菌和 *Arabidopsis thaliana* 杂交 DNA 的密度

有许多人都企图重复 *Ledoux* 等人的实验, 但大多数都未成功。例如 *Kleinhofs* 等 (1975) 使用无菌的 (*axenic*) 植物时, 未能观察到这种中间峰。不过, 当防止细菌污染的措施失败时, 却能观察到明显的中间峰。这被认为是细菌在根上生长的结果。这表明, 外部 DNA 并没有结合到植物细胞基因组中去。*Ledoux* 和他的同事们的那种实验的最大问题是决定外源 DNA 的行踪。很明显, 密度梯度离心不会得出不一致的结果。现在, 已有更加灵敏的技术了 (例如 *Southern* 吸脱技术; 它们的发展使得进展变得容易了。

基因转移作用 (*Transgenesis*)

为了描述用噬菌体的方法使遗传讯息从细菌细胞向真核生物细胞的人为转移, *Doy* 等人引入了基因转移作用这个词。四个研究小组报告了这样的实验。*Merril* 等人 (1971) 从由于缺少乳糖-1-磷酸尿苷转移酶的乳糖贫血病人取得成纤维细胞, 这些细胞用 $\lambda gal T^+$ 或 $\lambda gal T^-$ (这里 *T* 指的是转移酶) 进行感染, 然后分析这些细胞的噬菌体专一性的 RNA 和半乳糖-1-磷酸尿苷转移酶。感染后四到五天, 细胞中总的标记了的 RNA 有 0.2% 与 λDNA 杂交, 而未感染的细胞中, 这种 RNA 只有 0.005%。*Horst* (1975) 使用人工培养的皮肤成纤维细胞作为受体细胞, 这种细胞是从患一般神经节苷脂沉积症病人得到的, 这种病人严重地缺乏 β -半乳糖苷酶。将这种细胞与噬菌体 $\lambda plac$ 或 $\lambda plac DNA$ 一起保温。保温之后, 使用噬菌体 *Plac* 的, 19 个实验中有 4 个检查出了更高的 β -半乳糖苷酶活性, 而使用 $\lambda plac DNA$ 的, 16 个实验中有 4 个检查出更高的 β -半乳糖苷酶活性, 这说明噬菌体基因组在有缺陷的成纤维细胞中得到表达, 且 $\lambda plac DNA$ 比噬菌体颗粒诱导出高得多的酶活性。被感染的成纤维细胞中的 β -半乳糖苷酶活性与大肠杆菌中的这种酶活性在免疫化学上和物理化学上是不可区别的。*Doy* 等 (1973) 使用 $\phi 80 Lac^+$ 和 λgal^+ 细菌噬菌体处理 *Lycopersicon esculentum* (蕃茄) 和拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 的单倍体愈伤组织培养物。这些培养物能在含葡萄糖和蔗糖的确定培养基上生长, 但当用乳糖或半乳糖作为唯一碳源时就死去了。用适当的噬菌体加以处理就产生能够在乳糖或半乳糖上生长的培养物, 虽然比生在葡萄糖上的类似愈伤组织生长得更慢。这些培养物在许多代的培养中能生存下来以及免疫学的试验确证, 细菌酶存在于处理过的植物细胞中, 而对比实验中却没有。*Johnson* 等人同时进行了概念上相似的实验, 他们使用的是 λlac 和假挪威槭 (*Acer Pseudoplatanus*) (埃及榕)。用噬菌体处理之后, 细胞能够慢慢地在乳糖上生长, 而当没有细菌体或使用 λ^+ 时,

细胞就停止生长，通常死掉了。不过，他们未能检查出细菌酶，不论用分析还是电泳方法。

这些实验可能是有趣的，然而要证明基因转移作用是一种真实的现象，更多的证据是必须的。观察到的效应可能是由一些微不足道的原因引起的。尽管如此，基因转移作用纯粹是具有历史趣味的事，因为它不可能象其他系统那样（见第2、4章）适用于大规模的遗传操纵。其原因下面将谈到。

基本问题

虽然许多人试图用外来 DNA 转化原核和真核生物细胞，除了基因转移作用之外，他们的实验取得了小小的成功。假设外来 DNA 被细胞获得了，那么看到的失败有两个基本原因。第一，对于检出决定于基因表达的情况，失败可能是由于缺少精确的转录和转译。第二，这是更加重要的，外来 DNA 可能未保留在被转化的细胞中。如果外来 DNA 结合到宿主基因组中去了，那就没有问题。不过，这方面只有两个成文的例子：质粒 DNA 结合到酵母基因组中去了(Hinnen 等 1978, Struhl 等 1979,)以及质粒和噬菌体 DNA 对鼠(mouse)细胞的共同转化(Wigler 等 1979)。发生这种结合的确切机理尚不清楚。如果外来 DNA 不能被结合起来，那么它可能在随后宿主细胞的增殖中失掉。原因是简单的，为了进行复制，DNA 分子必须包括一个复制起始区域，而细胞和病毒中，通常一个基因组只有一个。这种分子称为复制子。不是复制子的 DNA 片段由于缺乏复制作用而将会被稀释出宿主细胞。应该注意到，即使一个 DNA 分子包含一个复制起始区域，它可能在外来宿主细胞中不发挥功能。

基本技术

如果 DNA 片段不能进行复制，明显的解决办法是把它们结合到一个适当的复制子上去。这种复制子就是载体或克隆载体 (Vector or Cloning Vehicle)。小质粒和细菌噬菌体是最适当的载体，因为它们本身就是一个复制子。它们不需要结合到宿主基因组中就保存下来，它们的 DNA 可以容易地以完整的形式分离出来。用来作为载体的不同质粒和噬菌体在第三、四章中有详细的描述。目前只需知道最初适于作载体的质粒和噬菌体仅仅是在大肠杆菌中发现的就够了。

把外来 DNA 加到载体分子中去所构成的合成分子有时叫做 DNA 三不像。因为它与神话中的三不象——一个头像狮子，身体像羊，尾巴像蛇的东西。构成这样一个合成物或人工重组分子的工作称为遗传工程或基因操纵。这是因为利用生物化学的方法有可能创造出一种新的遗传组合来。这个过程也被称为分子克隆 (molecular cloning) 或基因克隆 (Gene Cloning)。因为含有合成分子的遗传上相同的生物能大量繁殖和生长，因此扩大了这种合成分子以及它们指导下合成的基因产物。

虽然概念上非常简单，把一段外来的 DNA 片段插到载体中去要求一些技术，这些技术是：

(1) 切割和连接来源不同的 DNA 分子；

(2) 监控切割和连接反应的方法；

(3) 转化大肠杆菌的方式，因为所使用的第一个载体在这个生物中能发挥复制子功能。

有趣的是，这三种技术都在大约相同的时间内发展起来了，很快就导致了 1972 年的第一批克隆实验 (Jackson 等 1972, Lobban 和 Kaiser 1973)。现在，切割和连接 DNA 分子

的方法发展得如此之好，以致必须单独为之安排一章（见第二章）。转化大肠杆菌的进一步细节以及使用凝胶电泳来监控 *DNA* 分子的切割和连接，将在后面提到。

琼脂糖凝胶电泳 (Agarose)

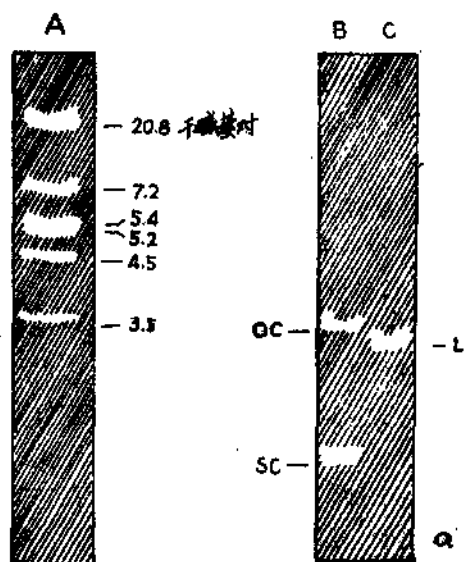
切割和连接 *DNA* 分子的第一个实验是用蔗糖梯度的速度沉降来监控的。然而，通过蔗糖梯度的速度沉降有两个不利方面。首先，*DNA* 分子必须标记，它们的位置只能通过梯度的分步收集，而后测定每个收集部分的放射性才能检查出来。第二，相似体积的 *DNA* 分子不能分开。运用琼脂糖凝胶电泳之后，这两个问题都解决了。

早在 1966 年，Thorne (1969, 11967) 表明，琼脂糖凝胶电泳能够分离多瘤病毒 *DNA* 的不同构型的分子，例如共价闭合的环状分子，有裂口的环状分子和线状分子。不过，几年之后，Aai 和 Borst (1972) 又表明，琼脂糖凝胶电泳不仅可以用来分离分子量相同，构型不同的分子，而且也可以用来分离分子量不同的分子（图 1.2）。他们也证明了，分子的迁移速度与分子量的对数值成反比关系。这样就能够用这种方法来精确地确定 *DNA* 分子的大小。另一个好处是，*DNA* 的迁移情况不需求助于放射性标记就可以容易地检查出来。凝胶中的 *DNA* 带可以用插入性染料溴化乙锭来染色，像 0.05 μg 这样少的 *DNA* 也可以在紫外光下直接检查出来。

图 1.2，*DNA* 在 agarose 凝胶中的电泳，迁移方向由箭头指明。把胶浸泡在溴化乙锭溶液中

（它与 *DNA* 通过插到堆积的碱基中去而复合起来），并对紫外光辐射所引起的橙色荧光进行拍照，*DNA* 带便可看见。(A) λ *DNA* 用 *EcoRI* 切割，然后在 1% 的 agarose 凝胶中电泳。 λ 限制图谱见图 4.4。(B) 6.4 千碱基对质粒的打开的 (OC) 和超级卷曲 (SC) 的形式。注意压缩的超级卷曲形式比打开的环状式迁移得快得多。(C) 线状质粒 (L) *DNA*，它是与 B 相同的 *DNA* 制品用

EcoRI 处理后得来的，因它只有一个靶子部位。在这里所使用的电泳条件下，线状形式比打开的环状形式迁移得稍前一点。B 和 C 是在 0.7% 的 agarose 中电泳的。



希望对不同构型的异构体 *DNA* 在琼脂糖凝胶电泳中的移动性的影响因素作更多了解的读者，请参阅 Johnson 和 Grossman (1977) 的论文。

我们经常需要了解 *DNA* 片段中的什么序列被转录成 *RNA* 了。很明显，如果有一种方法来检查出琼脂糖凝胶中与一个给定的 *RNA* 互补的那些片段，这将是十分有帮助的。可以这样做，把凝胶切成条，将 *DNA* 洗脱下来后，与溶液中的 *DNA* 或 *RNA* 杂交，或者把 *DNA* 结合到一种滤纸上之后再杂交。这种方法费时，又由于凝胶电泳的分辨能力的限制不可避免地会引起一损失，现在已被 Southern 描述的灵巧方法所代替了。这种常常称为

Southern 吸脱 (Southern blotting) 的方法如图1·3 所示:

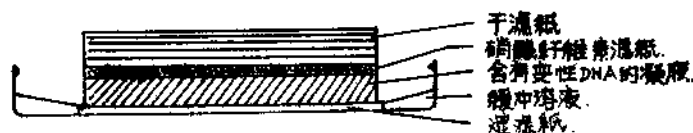


图1·3 “Southern 吸脱”技术, 详见正文。

凝胶中的 DNA 用碱使之变性, 然后把凝胶放在由缓冲溶液饱和滤纸上, 在胶的上表面放一张硝酸纤维素滤纸, 然后再多盖上一些普通干滤纸。由于滤纸对缓冲溶液的 吸收作用, DNA 便随缓冲溶液一起迁移到硝酸纤维素滤纸上, 并牢牢地附着在上面。然后, 键合在硝酸纤维素滤纸上的 DNA 就可以和放射性的 DNA 或 RNA 杂交。杂交产物可用放射性自显影检查出来。

大肠杆菌的转化

转化大肠杆菌的早期工作都是不成功的, 一般认为大肠杆菌难于转化。然而, Mandel 和 Higa (1970) 发现, 用 CaCl_2 来处理, 就可以使它能从细菌噬菌体中获取 DNA。几年之后, Cohen 等人 (1972) 表明, CaCl_2 处理过的大肠杆菌细胞对质粒 DNA 也是非常有效的受体。 CaCl_2 可能对细胞壁结构引起了获得 DNA 所必须的变化, 同时, 几乎所有的大肠杆菌菌株都可以用质粒 DNA 来转化, 虽然效率各不相同。只有 recBC^- 突变体可以被线状细菌 DNA 转化 (Cosly 和 Oishi 1973)。 recBC^- 突变体缺少一种核酸酶, 这种酶能在 DNA 被结合之前把它降解掉。反之, 线状细菌 DNA 完全不能转化 Rec BC^+ 细胞, 线状 λ DNA 对 recBC^+ 细胞的转感*效率是对 recBC^- 细胞转感效率的 30%。为什么线状细菌 DNA 和 λ DNA 之间会有这么大的差别呢? 答案可能在于 λ DNA 被获取[之]后的成环能力——这是避免受 Rec BC 外切核酸酶攻击的诀窍 (Benzinger 等 1975)。

大肠杆菌的转化效率并不高。虽然可以得到 10^7 个转化体/ μg 载体 DNA, 这表明, 每 10^8 个加入的分子中, 只吸收了 1 个 DNA 分子。这样低的转化效率对有些克隆实验是不适用的。目前, 正在作很大的努力来提高这个过程的效率。如我们在下一章看到的, 许多细菌含有能影响转化效率的限制性系统。虽然这些系统的全部功能还不知道, 它确实能发挥的一个作用是识别和降解外来 DNA。因为这个原因, 通常使用没有限制性的(r^-)大肠杆菌突变体作转化宿主。

DNA 序列测定

DNA 序列测定技术需要提及一下, 否则本章是不能算完全的。虽然这项技术对于克隆实验的成功不是必须的, 但它的确可以为形成的产物提供有用的讯息。这种技术的原理太杂, 以致不能在这里讨论。有兴趣的读者可以阅读 Air (1979) 的综述文章。

* 病毒 DNA 对细胞的转化(transformation)有时称为转感(transfection)。这个词用来指明 DNA 是感染性的, 即可以产生子代病毒颗粒。

第二章 切割和连接DNA分子

切割DNA分子

值得提一下的是,在1970年以前,简直没有方法能够把双股DNA分子切割成分离的片段。DNA生物化学被这个僵局难住了。当发现限制作用包括专一性的内切核酸酶,宿主控制的限制和修饰这一相关现象可能导致对这一难题的解决办法时,才变得明朗起来。大肠杆菌K12,这个分子生物学家最喜爱的生物被首先用作这方面的研究。但结果证明这是一个不幸的选择。它的内切核酸酶所表现的复杂性与人们的愿望相反。突破是1970年发生的,在流感嗜血菌(*Haemophilus influenzae*)中发现了一种表现更为简单的酶。当今的DNA技术完全依赖于用限制性内切核酸酶在专一性部位上切割DNA分子。因此,对宿主控制下的限制和修饰作的说明就成为本章的第一部分。

宿主控制的限制和修饰作用

当细菌噬菌体从一种宿主菌株向另一种宿主菌株转移时,宿主控制的限制和修饰作用最容易观察到。例如,如果噬菌体 λ 的贮存制品是在大肠杆菌菌株C上生长制备的,然后把它滴定在大肠杆菌菌株C和K上。在这两个菌株上观察到的滴定度(titre*)将会相差几个数量级,K菌株上的低。我们说,噬菌体被第二种宿主菌株限制了(大肠杆菌K)。当那些由感染大肠杆菌K而生成的噬菌体再次涂布在大肠杆菌K上时,它们就不再被限制了,但若首先在大肠杆菌C上作一次生长循环,而后再涂布在大肠杆菌K上,则它会再一次被限制(图2、1)。这样,噬菌体涂布在一种特殊菌株上的效率决定于该噬菌体上一次增殖时的菌株。这种由第二种细菌给予噬菌体的,使之再次涂布在该菌株上而不会进一步被限制的非遗传性变化,叫做修饰作用。

被限制的噬菌体吸附到限制性宿主上并正常地把其DNA注入宿主。当用 ^{32}P 标记了噬菌体时,明显地看到,它们的DNA进入宿主之后,很快就被降解了(Dussix和Arber 1962)。对这种降解起主要作用的内切核酸酶叫做限制性内切核酸酶或限制性酶。

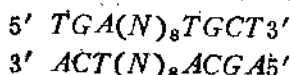
* 此处滴定度是指每毫升噬菌体贮藏液所形成的噬菌区数目。

限制性宿主当然必须保护自身DNA不受限制性内切核酸酶可能的致死影响，所以它的DNA必然受到适当修饰。修饰作用包括对DNA序列中限制性内切核酸酶识别序列上某些碱基中的极少数的甲基化作用。这就解释了为什么残存于限制性宿主一个生长循环中的噬菌体，随后能有效地感染这种宿主。它们的DNA在修饰性甲基化酶存在的情况下进行了复制，所以与宿主DNA一样地被甲基化了，从而不会受限制性系统的影响。

虽然噬菌体感染被选来作为说明限制作用和修饰作用的例子，但是，只要DNA从一个细菌菌株向另一个转移，这些作用就能够发生。结合，转导，转化和转感都受到宿主限制作用的抑制。确定宿主控制的限制和修饰系统的基因可能位于宿主染色体上，也可能位于质粒或P1这样的原噬菌体上。

第一个分离出来并进行了详细研究的是大肠杆菌K的限制性内切酶。Meselson和Yuan (1968) 设计了一个精巧的分析方法。他们把修饰过的和未修饰过的λDNA分别用³H和³²P标记，以便于区别。然后将两者的混合物与细胞提取物一起混合保温。用蔗糖梯度沉降来分析DNA混合物。结果发现，未修饰的DNA被降解了，而修饰过的DNA没有被降解。这表明存在限制性内切酶活性。

人们发现，从大肠杆菌K以及相似的大肠杆菌B中得到的酶具有奇异的特性。除了镁离子之外，它们还需要辅助因子ATP和S-腺苷-甲硫氨酸，DNA的体外降解伴随着ATP的水解，其需要量大大超过根据化学计量学的计算 (Bickle等1978)。此外，现在已经知道，这种酶与双股DNA上的一个未修饰的识别部位相作用，然后令人惊奇地沿着DNA分子移动。已经知道，从大肠杆菌B中得到的酶只移动到其不对称识别序列*的一边，移动了相当于1000—5000个核苷酸的距离之后，在明显随机的位置上仅仅切割DNA中的一股，而且通



*大肠杆菌B的限制性内切酶的识别序列是，

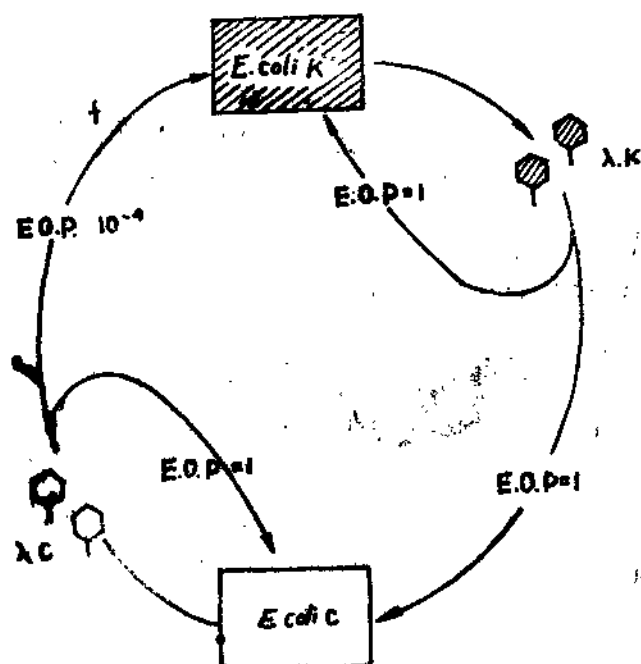


图 2.1. 从涂布效率 (E.O.P) 进行分析的噬菌体λ在大肠杆菌菌株K上的宿主控制的限制和修饰作用。在菌株K或C上生长增殖的噬菌体(即λ、K或λ、C)在这两种菌株上的涂布效率由箭头标明。大肠杆菌C没有已知的限制和修饰系统。

——译者

过释放出酸溶性核苷酸的方法造成一个大约75核苷酸的缺口。没有证据说明这种酶是真正催化性的，以这样的方式作用一次之后，需要第二种酶来完全对双股的断裂（Rosamond 等 1979）。现在已经知道，具有这种性质的酶是第 I 类限制性内切核酸酶。它们的生物化学仍有许多不解的地方。例如 S-腺苷-甲硫氨酸的准确作用仍不清楚。

当第 I 类限制性酶的这些令人费解的性质还未解开时，从流感嗜血菌（*Haemophilus influenzae* Rd）中发现了另一种限制性内切核酸酶（Kelly 和 Smith 1970, Smith 和 Wilcox 1970），它是一大类限制性内切核酸酶——第 II 类酶的一个典型代表。它们没有第 I 类酶那样的奇异特性，它们在 DNA 操纵中具有根本性的意义。第 II 类酶识别双股 DNA 分子上的一个特定的靶子序列。在这个序列内劈开多核苷酸链，产生具有确定长度和序列的分离的 DNA 片段。事实上，这类酶的活性常常是通过对这些 DNA 片段的凝胶电泳来分析研究的（见图 1.2）。如所预期的那样，小质粒或病毒 DNA_S 的降解物的 DNA 带谱是简单而具有特性的。

现在，已经从多种多样的细菌中分离出了许多第 II 类限制性内切核酸酶。在最近的一个综述中，Roberts (1978) 列出了 168 种酶，其特性至少部分地确定了。随着对更多的细菌进行检查，这个数目还在继续增加。值得提出的是，对许多所谓限制性内切核酸酶，还未正式确定它们相当于用来制备这些酶的细菌中的任何一个遗传学上鉴别了的限制和修饰系统。通常的看法是，对宿主 DNA 表现钝化，对外来 DNA 表现活化的具有特殊识别部位的内切酶，事实上就是限制性内切核酸酶。

命名法

大量限制性内切酶的发现需要一个一致的命名法。多数都依照以 Smith 和 Nathans (1973) 的建议为基础的系统，这个建议如下：

- (1) 第一个字母用宿主生物名称的第一个字母，与宿主俗名的前两个字母一起构成三个字母的斜体略语。例如 *Escherichia coli* = Eco, *Haemophilus influenzae* = Hin。
- (2) 菌株和类是用脚注来识别的，例如 Eco_K。在限制和修饰系统遗传上是由病毒或质粒指定的情况下，写出略化的物种名称，而染色体外的元素由脚注来识别。例如 Eco_{PT}, Eco_{RT}。
- (3) 当一个特定的宿主菌株具有几个不同的限制和修饰系统时，就用罗马数字来区别。这样，*H. influenzae* 菌株 Rd 系统将是 Hind I, Hind II, Hind III。
- (4) 所有的限制性酶除有系统名称之外，都有一般的名称内切核酸酶 R。例如 R.Hind III。与此相似，修饰酶称为甲基化酶 M，其后再跟系统名称。从 *H. influenzae* Rd 中得到的，与内切核酸酶 R.Hind III 相当的修饰酶叫做甲基化酶 M.Hind III。

在实际运用中，这个命名系统已经进一步简化了。

- (1) 脚注不便于打印，现在整个略语通常写作 - - 行。
- (2) 当上下文很清楚，只涉及到限制性酶时，内切核酸酶的符号 R 通常略去。这就是表 2.1 所用的系统。那里列了一些使用得比较广泛的限制性内切核酸酶。

表 2.1 一些限制性内切核酸酶的靶子部位。

<i>Anabaena Variabdis</i>	<i>Ava</i> I	$\begin{array}{c} C \quad A \\ C \downarrow (T) C G (G) G \end{array}$
---------------------------	--------------	--

<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H	BamH I	G↓GATCC	
<i>Bacillus globigii</i>	Bgl I	A↓GATCT	
<i>Escherichia coli</i> Rr13	EcoR I	G↓GATTC	1,4
<i>Escherichia coli</i> R245	EcoR I	↓CC(T)GG	2
<i>Haemophilus aegyptius</i>	Hae III	GG↓CC	
<i>Haemophilus gallinarum</i>	Hga I	GACGC	3
<i>Haemophilus haemolyticus</i>	Hha I	GCG↓C	
<i>Haemophilus influenzae</i> Rd	Hind I	GT(T)↓(G)AC	
	Hind III	A↓AGCTT	
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	Hpa I	GTT↓AAC	
	Hpa II	C↓CGG	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Kpn I	GGTAC↓C	
<i>Moraxella bovis</i>	Mbo I	↓GATC	
<i>Providencia Stuartii</i>	Pst I	CTGCA↓G	
<i>Serratia marcescens</i>	Sma I	CCC↓GGG	
<i>Streptomyces stanford</i>	Sst I	GAGCT↓C	
<i>Xanthomonas malvacearum</i>	Xma I	C↓CCGGG	

来源: Roberts(1978)。限制性序列是从5'→3'书写的,只写了一股,切割点用箭头标明。写在括号中的碱基是指两种情况均可占据那个位置。在已知的情况下,由相应的专一性甲基化酶所修饰的碱基用星号表示。 $\dot{A}$ 是N⁶-甲基腺嘌呤, $\dot{C}$ 是5-甲基胞嘧啶。

说明:

1,2.这两种酶的名称是不规则的。确定这些酶的两个基因位于两个抗性转移因子上,它们是分别分类的,因此用RI和RII。

3、Hga I是第III类限制性内切核酸酶,切割方式如下:

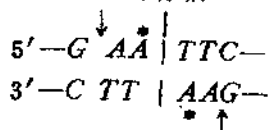
5' GACGCNNNNN↓

3' CTGCGNNNNNNNNNN↑

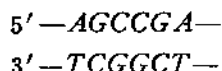
4、在某些条件下(低离子强度,碱性pH或者50%甘油),EcoR I的专一性降低了,规范的六核苷酸中,只有中间的四核苷酸序列对识别和切割是必要的。这叫做EcoR I^{*}(RI—星)活性。这种活性可被对氯苯甲酸汞抑制,同时EcoR I活性不受影响。

第II类限制性内切核酸酶在特殊的,具有旋转对称轴的四、五、六或七个核苷酸的序列内识别并切开DNA。例如,EcoR I在由箭头指示的位置上切割,

对称轴



产生带有5'-磷酸基和3'-羟基的末端。这种序列有时也叫回文序列，这是因为它与一句正读反读都一样的话一样。（不过，这个词也用于这样的序列，



它们在一股键内具有回文结构，但没有旋转对称轴）如果该序列由甲基化作用所修饰，以致在一个或两个星号指出的位置上发现6-甲基腺嘌呤残基，那么这个序列对内切核酸酶 *R*、*EcoRI* 就是抗性的。完全甲基化的限制性部位经过半保留复制之后，一半甲基化的部位的抗性保护细菌宿主自身的双股 DNA 不会立即遭到攻击，直到修饰甲基化酶再一次把子代双股恢复成完全甲基化状态为止。

我们可以看到，*EcoRI* 在靶子序列相对的两股上造成相距四个核苷酸的缺口，如此便产生了具有5'-突出末端的片段。这些片段又能够通过重叠的5'-末端之间的氢键而相互结合，或者由于分子内反应而成环。由于这个原因，这些片段称为粘性或内聚末端（图 2.2）。

原则上，不同来源的 DNA 片段能够通过内聚末端而连接起来，如我们以后会看到的，把两股键上的缺口封起来，构成一个完整的人工 DNA 分子是可能的。

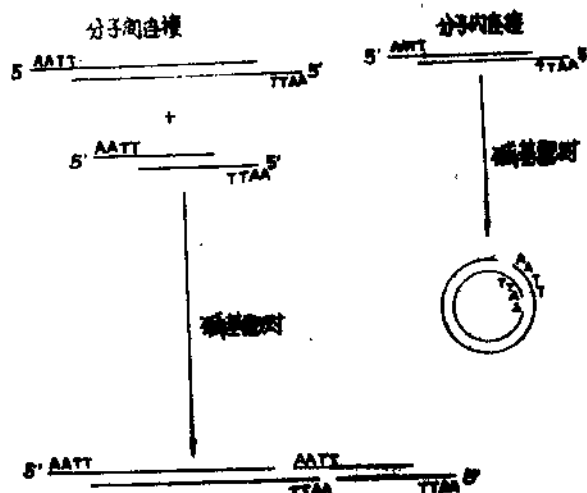


图 2.2 用 *EcoRI* 降解所产生的 DNA 片段的粘性的末端。

从表 2.1 可以清楚看到，并不是所有的第 I 类酶都有 *EcoRI* 那样的靶子部位。有些酶（例 *PstI*）产生带有 3'-粘性末端的片段。其他一些（例 *HaeIII*）酶平滑地切割，产生根本没有内聚末端的所谓充裕或齐平末端片段。有些酶识别四核苷酸序列，其他的识别更长的序列。假设所有碱基都以相等的几率出现，我们可以预期，在一个长的 DNA 随机序列中，任何特殊的四核苷酸靶子大约每 4⁴（即 256）个核苷酸对就出现一次。而任何六核苷酸靶子将是 4⁶（即 4096）个核苷酸对出现一次。有些酶（例如 *MboI*）识别四核苷酸序列，而这个序列又正好包在含另一种酶（例如 *BamHI*）的六核苷酸识别序列之内。第一个发现的第 I 类酶 *HindII* 是一个具有一些含糊不清的识别序列的酶。在这种情况下，相当于表 2.1 中所列结构的三种序列都是作用的基质。也有这样的例子，有些酶来源不同，但却有同样的靶子部位。它们是同功分离体（*isoschizomers*）。有些同功分离体在不同的位置上切割它们的靶子部位（例如 *SmaI* 和 *XmaI*）。

最近，第三种类型的限制性内切核酸酶被鉴别出来。它们在距其靶子序列一端的一定距离上在两股键上造成断裂（例如 *HgaI*）。限制性内切核酸酶所表现出的多种多样的性质为机灵而足智多谋的基因操纵学家提供了广泛的活动余地。

限制性内切核酸酶在体内的功能是什么？显然，宿主控制的限制作用是作为细菌区别自己与非己的机理而发挥作用的。这与免疫系统相似。在限制一些细菌噬菌体感染中，限制作用是比较有效的。可能因为这个原因，T-偶数噬菌体（T2，T4 和 T6）演化出葡萄糖基化的羟甲基胞嘧啶残基来代替其 DNA 中的胞嘧啶，使它对许多限制性内切核酸酶具有抗性。

T-偶数噬菌体 DNA 的限制作用和葡萄糖基化修饰作用超出了本书的范围。读者可参阅 Kornberg (1974) 以求详细的讨论。不过值得提出的是, *T*₄ 的一种突变菌株的 DNA 中确实有胞嘧啶残基。因此它应该服从通常的限制方法学 (Veiten 等 1926)。作为 *T*-偶数噬菌体特异 DNA 结构的一个替换物, 在 *T*₃ 和 *T*₇ 中演化出了其他的机理以克服体内限制性 (Spoorel 等 1979)。不考虑到这个证据, 我们在作出下列结论时可能会犯错误: 对噬菌体感染的免疫性是自然界限制性内切核酸酶唯一或主要的功能; 噬菌体接受器的失落或变更可能是获得免疫性的更加经济的方式。目前我们只能猜测。

DNA 的机械剪切

除了用限制性内切核酸酶降解 DNA, 产生分离的片段之外, 还有许多处理方法可以造成非专一性的断裂。例如使用非专一性内切核酸酶和化学降解。而在基因操纵中应用最多的是机械剪切方法。

组成双股 DNA 分子的长而细的线状物是够僵硬的, 很容易被溶液中的剪切力所断裂。强化的超声波可把其长度减小到大约 300 个核苷酸对。在搅拌器中进行高速搅拌可以得到有控制的剪切力。一个典型例子是: 用 1500 rev/min 的速度搅拌 30 分钟, 可以把高分子量的 DNA 剪切成平均为 8Kb 的分子群 (Wensink 等 1974)。从本质上讲, 断裂作用在 DNA 序列上是随机发生的, 产生由短的单股区域组成的末端。在随后的连接过程中, 可能不得不考虑这一点。

连接 DNA 分子

描述了切割 DNA 分子的方法之后, 我们必须考虑能够把 DNA 分子连接起来, 形成

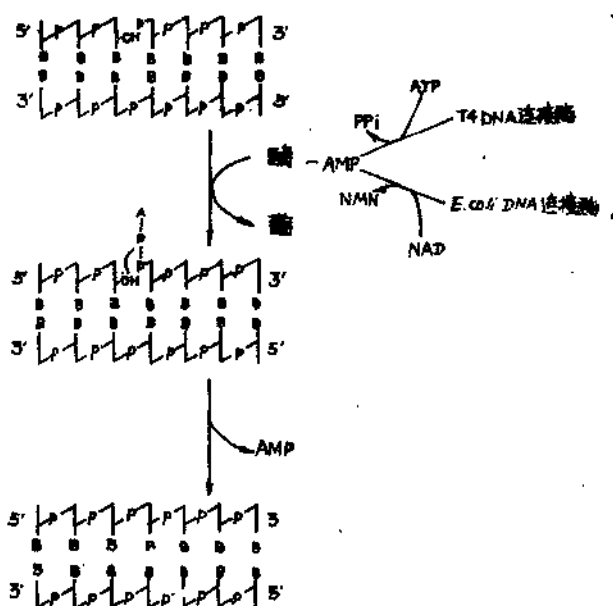


图 2.3 DNA 连接酶的作用。酶—AMP 复合物结合到具有 3'-OH 和 5'-P 基的缺口上。AMP 与磷酸基反应。3'-OH 基进攻这个部分, 产生一个新的磷酸二酯键, 把这个缺口封起来。

在每一种情况下都是辅助因子被劈开, 形成一种酶—AMP 复合物。这个复合物键合到具有 5'-磷酸基和 3'-羟基的缺口上, 在磷酸二酯键上形成一个共价键, 如图 2.3 所示。

人工重组分子的方法。通常用的有三种方法可以在体外连接 DNA 分子。第一种方法是利用 DNA 连接酶, 它可把某些限制性内切核酸酶产生的, 退过火的内聚末端连接起来。第二种方法取决于从噬菌体 *T*₄ 感染的大肠杆菌中得到的连接酶, 它催化具有齐平末端的片段之间形成磷酸二酯键。第三种方法是利用末端脱氧核糖核苷酸转移酶, 它能在片段末端合成同核苷酸的 3' 单股尾巴。现在, 我比较深入一点来看看这些方法。

DNA 连接酶

大肠杆菌和噬菌体 *T*₄ 产生一种酶, 即 DNA 连接酶, 可以封住双股 DNA 链上相邻核苷酸之间的缺口 (Olivera 等 1968, Gumpert 和 Lehman 1971)。虽然大肠杆菌和 *T*₄ 感染的大肠杆菌所产生的这两种酶所催化的反应非常相似, 其不同点在于对辅助因子的需要不同, *T*₄ 酶需要 ATP, 而大肠杆菌酶需要 NAD。在

当由可造成内聚末端的限制性内切核酸酶所切割成的末端相结合时，在连接处的相对两股链上具有几个碱基对的两个缺口。*DNA* 连接酶而后能够修复这些缺口，形成一个完整的双链。这个单纯化的 *DNA* 连接酶体外进行的反应，如图 2.4 所表明的，是许多基因操纵过程的基础。

具有缺口的 *DNA* 的连接反应的最适温度是 37°C ，但是在这个温度下，粘性末端的氢键结合点是不稳定的。*EcoR* I 所产生的末端仅仅通过四个 *AT* 碱基对相结合，这不足以抵抗该温度下的热扩散。因此，连接粘性末端的最佳反应温度是催化反应温度和末端粘合这两者的折衷。实验发现，这个温度大约是 15°C (Dugaiyczk 等 1975)

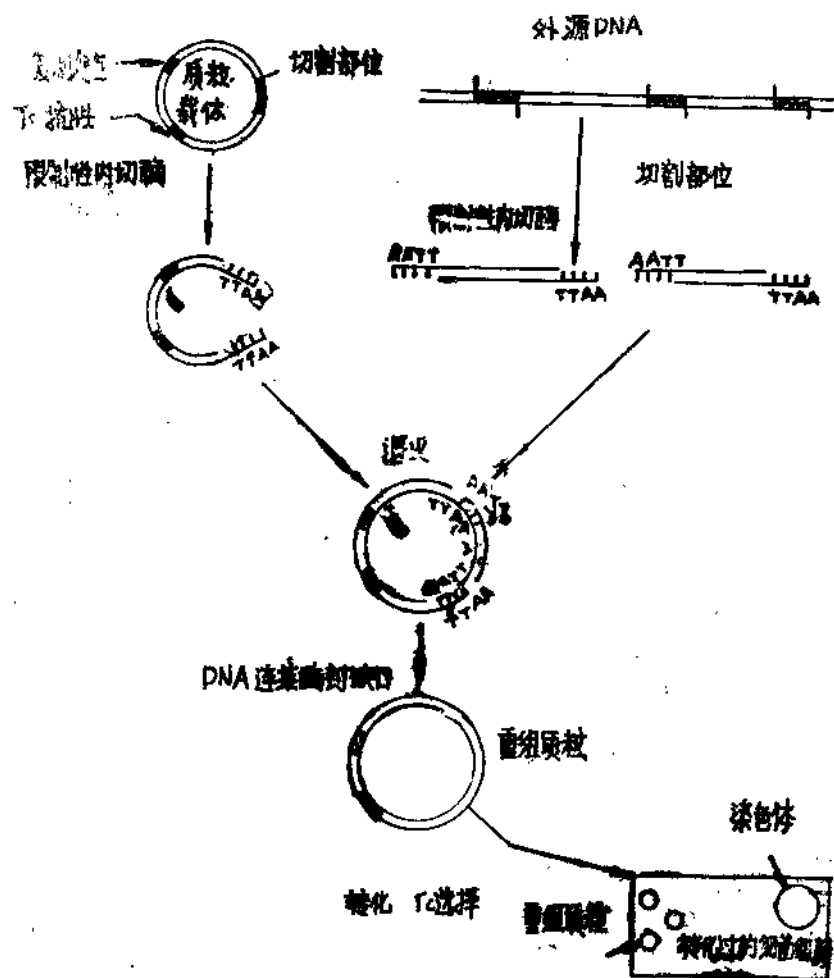


图 2.4 通过 *EcoR* I 产生的末端的结合，用 *DNA* 连接酶造成的共价 *DNA* 重组体。

连接反应能够以一种有利于重组体形成的方式进行。首先，可以通过在高 *DNA* 浓度的条件下进行反应来增加重组体的比例。第二，用碱性磷酸酶处理线性化了的质粒 *DNA*，以除掉其 5' 末端的磷酸基。这样，重新成环作用和质粒二聚体的形成都被限制了(图 2.5)。在这种情况下，载体的环化作用只有插入一个未用碱性磷酸酶处理过的外来 *DNA* 片段才可以进行，因为它在每一个连接点提供了一个 5' 末端磷酸基。在每一个连接部位仍有一个未连接的缺口，不过在对宿主进行转化之后，细胞的修复机制能重新构成完整的双链。

通过内聚末端，用 *DNA* 连接酶来连接 *DNA* 片段相对来说是一个高效率的过程。已经广泛地使用这种方法来构成人工重组体。这个程序的一个改进决定于 *T4DNA* 连接酶连接齐平 *DNA* 分子的能力，而大肠杆菌连接酶无此功能 (Sgaramella 1972)。这个方法最适合于通过接头分子来连接齐平末端片段。例如 Sheller 等 (1977) 合成了含有一个或多个限