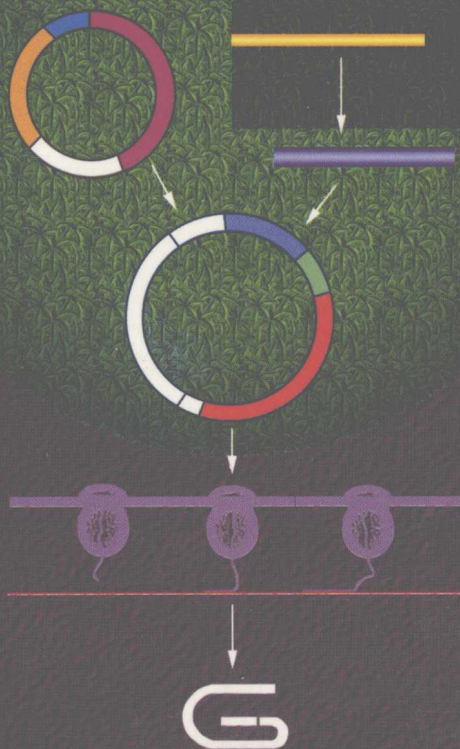


质粒分子生物学 与实验方法

蔡宝立 编著



中国科学技术出版社

Q782
C023:1

质粒分子生物学与实验方法

蔡宝立 编著

中国科学技术出版社

·北 京·

图书在版编目 (CIP) 数据

质粒分子生物学与实验方法/蔡宝立编著. —北京:
中国科学技术出版社, 1999

ISBN 7-5046-2688-0

I. 质… II. 蔡… III. 质粒-分子生物学 IV. 0343

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (1999) 第 24671 号

中国科学技术出版社出版

北京海淀区白石桥路 32 号 邮政编码: 100081

电话: 62179148 62173865

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

北京卫顺印刷厂印刷

*

开本: 850 毫米×1168 毫米 1/32 印张: 12.125 字数: 304 千字

1999 年 9 月第 1 版 1999 年 10 月第 1 次印刷

印数: 1—1000 册 定价: 18.00 元

前 言

质粒是染色体以外能自主复制的遗传因子，根据分子结构可以分成 DNA 质粒和 RNA 质粒两大类。目前，研究最多、应用最广的是细菌双股环状 DNA 质粒。质粒携带着各种各样的遗传信息，例如编码抗菌素或重金属抗性、代谢能力、病原性和共生能力等，而且这些基因一般并不存在于细菌的染色体上，因此，质粒研究是医学微生物学和微生物生态学的重要领域。又因为质粒具有分子量小、结构稳定和容易操作，以及可以在自然或人工条件下进行细胞间转移（接合或转化）等优点，所以又是分子生物学研究的良好材料。尤其是 70 年代初以质粒为载体的重组 DNA 技术的诞生，开创了生物科学的新时代。实际上，质粒已经成为分子生物学家阐明各种生命现象的分子机制以及构建各种工程生物的不可缺少的工具。近年来，有关质粒研究的成果大量涌现。质粒研究大大促进了分子生物学的发展，分子生物学理论的充实和新技术以及新方法的出现，同样也带动了质粒研究的进展。

我国的分子生物学和生物工程技术近年来迅速开展，因此，了解、研究和利用质粒已成为十分普遍的现象。为了介绍国内外关于质粒研究的基本成果以及新进展和新方法，笔者根据近年来国外出版的几本质粒新著（见第 1 章参考文献）和研究文献，以及笔者所在实验室 10 多年来质粒研究的成果和实际经验，编著了这本书。本书的最大特点是理论知识与实验技术相结合。在理论知识方面，尽量利用了截止到 1997 年的最新资料，对质粒分子生物学的主要方面，如质粒的复制、分配、不相容性、接合、

转化、分类和鉴定等，都做了较为详细的介绍。实验技术包括质粒的分离纯化、限制酶分析、拷贝数测定、转座子的利用，以及质粒载体的构建和利用等。

真核质粒的研究是近年来令人瞩目的一个新领域，以酵母质粒和酵母载体的研究成果为最丰。相比之下，其他真核质粒的研究还处于开展初期，许多方面有待进一步深入。本书最后一章简要介绍了真核质粒的情况。

本书的主要内容曾用作南开大学生化与分子生物学、微生物学、遗传学和环境生物学等专业的硕士研究生的选修课程，受到学生的普遍欢迎。所以，本书可用作与分子生物学和生物技术有关的硕士研究生的教学参考书，又可成为上述专业的科研人员的研究参考书。

南开大学分子生物学研究所高才昌教授对本书的编著和出版给了很大的支持和帮助，中国科学技术出版社邓鼎年编审、总编室胡萍副主任和李容、金陵责任编辑也为本书的出版做了大量的工作，在此一并表示衷心的感谢！

恳请读者和同行对本书提出意见和指正。

蔡宝立

1998年3月于南开大学

目 录

第 1 章 质粒概述	(1)
1.1 什么是质粒	(1)
1.2 质粒的基本性质	(3)
1.3 质粒 DNA 的构型和检测	(5)
1.4 质粒控制的性状	(9)
1.5 质粒的命名	(11)
1.6 研究质粒的意义	(11)
第 2 章 质粒 DNA 的制备和琼脂糖凝胶电泳	(15)
2.1 细菌的生长和收获	(15)
2.2 细胞裂解和质粒 DNA 的分离	(17)
2.3 质粒 DNA 的纯化	(28)
2.4 质粒 DNA 的琼脂糖凝胶电泳	(31)
第 3 章 质粒的复制、分配和不相容性	(34)
3.1 质粒的复制	(34)
3.2 质粒的分配	(44)
3.3 质粒的不相容性	(48)
3.4 质粒的拷贝数测定	(53)
第 4 章 质粒与细菌的接合	(59)
4.1 F 质粒的接合转移机制	(59)
4.2 细菌接合转移实验	(66)
4.3 非接合质粒的诱动	(71)
4.4 细菌染色体的诱动	(72)
4.5 革兰氏阳性细菌的接合	(76)

第 5 章 质粒 DNA 的转化	(80)
5.1 导言	(80)
5.2 转化机制	(81)
5.3 质粒转化的应用	(96)
5.4 质粒转化方法	(98)
第 6 章 质粒 DNA 的限制酶分析	(106)
6.1 限制酶	(106)
6.2 限制酶消化	(108)
6.3 限制片段的长度测定	(110)
6.4 限制片段的回收	(112)
6.5 限制片段的转移和杂交	(113)
6.6 质粒的限制酶作图	(118)
第 7 章 质粒的鉴定和分类	(133)
7.1 质粒表型的鉴定	(133)
7.2 质粒的分类	(142)
第 8 章 质粒克隆载体	(156)
8.1 质粒载体的性质和构建方法	(156)
8.2 质粒载体的种类和用途	(163)
8.3 在质粒载体上克隆 DNA 的方法	(178)
8.4 含有重组质粒的细菌菌落的鉴定	(186)
第 9 章 质粒基因产物的检测	(196)
9.1 细菌的小细胞系统	(196)
9.2 细菌的大细胞系统	(203)
9.3 蛋白质的体外合成	(205)
9.4 免疫吸印法和其他免疫学方法	(206)
第 10 章 转座子的检测和利用	(209)
10.1 转座子的种类和性质	(209)
10.2 转座子的检测	(214)

10.3	转座子供体	(219)
10.4	影响转座频率的因素	(226)
10.5	转座子的应用	(228)
第 11 章	抗性质粒	(234)
11.1	抗菌素抗性质粒 (R 质粒)	(234)
11.2	质粒决定的金属抗性	(245)
第 12 章	降解质粒	(256)
12.1	甲苯质粒 pWWO	(257)
12.2	萘质粒 NAH7	(263)
12.3	2,4-D 质粒 pJP4	(268)
12.4	降解性转座子	(274)
第 13 章	毒力质粒	(277)
13.1	定居抗原质粒	(277)
13.2	大肠杆菌肠毒素质粒	(281)
13.3	苏云金芽孢杆菌与 δ 内毒素合成有关的质粒	(285)
13.4	Ti 质粒	(292)
13.5	Ri 质粒	(301)
第 14 章	共生质粒	(308)
14.1	共生质粒中的结瘤基因	(309)
14.2	共生质粒中的固氮基因	(318)
第 15 章	真核质粒	(329)
15.1	DNA 质粒	(329)
15.2	RNA 质粒	(347)
附录		(366)
1.	细菌培养基	(366)
2.	转化溶液和培养基	(368)
3.	抗菌素	(371)

4. λ DNA 限制片段的大小 (bp)	(372)
5. 常用数据和计量单位	(372)
6. 原子量	(373)

第1章 质粒概述

1.1 什么是质粒

Lederberg^[1]于1952年提出“质粒”(plasmid)这个词,用来表示所有的染色体外遗传因子。后来,质粒一词专指细菌染色体以外能自主复制的小环状DNA分子,不包括共生生物、病毒以及叶绿体和线粒体的基因组。50年代,质粒研究只局限于F因子和大肠杆菌素质粒(Col因子)。60和70年代,许多研究都集中于细菌抗药质粒(R因子),特别是关于质粒的复制、转移和抗药机制方面,取得许多重要进展^[2]。在此期间,还有多种决定特殊性状的细菌质粒被发现,如决定各种有机物降解的代谢质粒,使人、动物和植物致病的毒力质粒,以及使植物形成根瘤和固氮的共生质粒等^[3~6]。人们相信,质粒在细菌细胞中的存在是一种较为普遍的现象。

因为细菌质粒都能独立自主地进行复制,并能控制自身的拷贝数,有些质粒还能通过接合作用在同种和不同种甚至不同属的细菌之间转移,所以不能把它们看成是细菌的细胞成分,而应看作是一种寄生于细菌细胞内的亚细胞有机体,即质粒是一种最简单、最原始的分子生物。1984年Data^[3]提出:“噬菌体、质粒和所有的转座因子,甚至更小的IS因子(插入序列),都应当看作是一类有待命名的寄生物家族。它们具有两种繁殖方式,一种是通过寄主的生长和分裂进行垂直遗传,另一种是通过感染在细胞间或细胞内进行水平传播。”这一观点已被大多数学者所接受。

近 20 年来, 质粒的概念不断更新。研究表明, 质粒不仅可能是 DNA, 也可能是 RNA。1976 年 Wickner^[7] 首次称那些能独立于寄主细胞的染色体和细胞器基因组进行复制的非感染性 RNA 分子为 RNA 质粒。后来, 把具有蛋白质壳体的嗜杀 dsRNA, 具有壳体但不具感染能力的真菌病毒和植物隐蔽病毒的 dsRNA, 以及真菌和植物中存在的其他自主复制的非感染性 RNA 分子, 都统称为 RNA 质粒^[8]。另一方面, DNA 质粒也非细菌所独有, 除了在病毒和蓝藻 (亦称蓝细菌) 等原核生物中发现 DNA 质粒以外, 在某些酵母、丝状真菌、植物、动物和人类等真核细胞中都发现有质粒 DNA 存在。但是在这些质粒中, 除少数已鉴定出它们所编码的遗传性状以外, 大多数为不知其功能的隐蔽质粒^[9]。

由于质粒的形式多种多样, 一些质粒的性质在另一些质粒中并不存在, 所以给它下一个完满的定义是非常困难的。从广义上讲, 可以把质粒定义为: 质粒是染色体以外能自主复制的遗传因子, 它不具有胞外期, 对寄主细胞来说是非必需的。符合这三条标准的染色体外的 DNA 或 RNA 分子都可以称为质粒。叶绿体和线粒体的基因组是真核细胞必需的遗传成分, 缺失了就不能生存, 所以不属于质粒的范畴。噬菌体和病毒具有胞外期, 所以也不属于质粒。细菌的环状 DNA 质粒与噬菌体的区别是后者具有蛋白质外壳和胞外期, 前者则没有。RNA 质粒与 RNA 病毒的区别是后者具有可感染的胞外期, 前者一般无感染性和胞外期。但是, 有些学者把温和噬菌体和类病毒也称作质粒。

狭义的质粒概念主要指细菌质粒, 即细菌染色体以外能自主复制的小环状 DNA 分子。由于这类质粒发现的种类最多, 研究得最为深入, 用途也最广泛, 所以本书的前 13 章讲的都是有关细菌质粒的分子生物学及实验方法。真核生物的 DNA 质粒和 RNA 质粒只在最后一章中作简要介绍。

1.2 质粒的基本性质

关于细菌质粒的性质已有许多论述^[6,10]。下面所介绍的 12 条性质,其中 1~8 条是所有质粒都具备的,9~12 条是部分质粒具备的。

(1) 细菌质粒是双股的共价闭合环状 DNA 分子,即 ccc DNA。但也有例外,在硫杆菌属 (*Thiobacillus*) 细菌中曾发现线状 DNA 质粒^[11]。此外,某些双股环状 DNA 质粒在复制过程中出现环状的单股形式,称为单股 DNA 质粒 (ssDNA)^[12]。

(2) 每一种质粒都有它自己特定的核苷酸顺序,所以每一种限制酶对每一种质粒都有固定的切点位置和切点数。标有几种限制酶切割位点的质粒 DNA 环形图,叫做该质粒的限制图 (restriction map)。

(3) 质粒都具有自主复制 (replication) 功能,这主要是指质粒复制的起始和拷贝数是由质粒的 DNA 序列决定的。按复制性质,可以把质粒分成两类:一类是严紧型质粒,当细胞染色体复制一次时,质粒也复制一次,每个细胞内只有 1~2 个拷贝,所以也叫低拷贝数质粒;另一类是松弛型质粒,当染色体复制停止后仍能继续复制,每个细胞内有十几个或几十个拷贝,所以也叫高拷贝数质粒。分子量较大的质粒一般是低拷贝,分子量较小的质粒一般是高拷贝。质粒的复制有时与它们的寄主细胞有关,例如某些质粒在大肠杆菌内的复制属严紧型,而在变形杆菌 (*Proteus*) 内属松弛型。

(4) 质粒不仅能自主复制,而且能平均分配到两个子细胞中去,从而使质粒能够稳定地遗传。质粒分子中特定的 DNA 区域决定这种分配机制 (partition)。

(5) 质粒都具有不相容性 (incompatibility),即亲缘关系较

近的或者说复制子类型相同的两个质粒不能稳定地共存于同一个寄主细胞中。根据不相容性，可以把质粒分成许多不相容组。目前，在肠细菌中已经鉴定出 30 多个不相容组。例如 IncF I、IncF II、IncN、IncP 和 IncQ 等，Inc 代表不相容性。亲缘关系较远的质粒则是相容的，它们可以在同一个寄主细胞中共存，同一个细菌细胞内含有几种分子量不同的质粒是常见的。

(6) 每一种质粒都具有一定的寄主范围。只能在一种或少数几种寄主中复制的质粒，叫窄寄主范围质粒。能够在多种寄主中复制的质粒，叫广寄主范围质粒。

(7) 质粒的功能对于寄主细胞来说不是必需的，有没有质粒细菌都能生存。质粒在复制和分配的过程中可能会出现差错，所以有质粒的细菌其后代可能会出现不含质粒的分离体。可以用物理或化学因素处理细菌，对质粒进行人工消除 (curing)；没有质粒的细菌又可通过接合或转化作用而得到质粒。

(8) 质粒 DNA 能通过转化作用 (transformation) 引入到细菌细胞。但这需要两个条件：一是受体细胞必须包括在该质粒的寄主范围内，否则质粒即使进入细胞也不能复制；二是受体细胞必须处于感受态 (competence)，否则不能转化。转化细胞的感受态，可以是自然出现的，也可以是人工制造的。

(9) 某些质粒为一些特殊的表型编码，例如编码四环素抗性、汞离子抗性、苯甲酸降解、大肠杆菌素产生等等。根据质粒编码的表型，可以称它们为抗性质粒、代谢质粒和毒素质粒等。没有鉴定出表型的质粒称为隐蔽质粒 (cryptic plasmid)。

(10) 分子量较大的质粒一般具有接合转移功能，即借助于细胞间的接触，供体菌的质粒可以转移到受体菌中。接合作用发生时，供体菌质粒 DNA 的一条链向受体细胞转移，在转移过程中供体细胞的保留链和受体细胞的转移链分别合成互补链，接合作用完成之后，供体菌和受体菌都具有质粒。

质粒正是通过这种接合作用，在细菌群体中进行广泛的传播。质粒 DNA 中有一段转移基因区（*tra* 基因区），编码质粒的接合功能。具有这种功能的质粒叫接合性质粒或感染性质粒。不具有上述功能的质粒叫非接合性质粒或非感染性质粒。某些接合性质粒能够引起与其在同一细胞内的特定的非接合性质粒发生转移，称为诱动（mobilization）。

(11) 有些质粒可以以游离于寄主染色体和与染色体整合两种状态存在。F 质粒与染色体整合后形成高频重组菌株（Hfr），能使染色体基因通过接合作用转移到受体菌中。F 质粒从染色体上切离下来时，如果是精确的切离，则产生游离的 F 质粒。如果是不精确的切离，可能带走部分染色体基因，形成 F' 质粒。F' 质粒转移到受体细胞以后能够表达与其结合的染色体基因。

(12) 质粒可以用作基因载体，在体外用同一种限制酶把质粒和外源 DNA 切开，然后用连接酶把它们连接成重组体质粒，转化到受体细胞以后，外源 DNA 能随质粒一起复制，从而得到外源 DNA 的纯制品。如果外源 DNA 与适当的启动子（promoter）连接，还能表达出基因产物。这就是所谓的基因工程，或称遗传工程和重组 DNA 技术。但是，基因工程中所使用的载体质粒一般是人工构建的，很少使用天然质粒。

1.3 质粒 DNA 的构型和检测

质粒 DNA 的大小相差非常悬殊，例如厌氧发酵单胞菌（*Zymomonas anaerobia*）的 pZA2 质粒仅为 1.7kb，而苜蓿根瘤菌（*Rhizobium meliloti*）的巨型质粒 pSym-b 为 1700kb，最为常见的质粒一般为 5~200kb。在 DNA 双螺旋中，每 10 个核苷酸长度旋转一圈，这时双螺旋处于能量最低的状态。如果这种正常的双螺旋 DNA 额外地多转几圈或少转几圈，就会使双螺旋内的

原子偏离正常位置，于是在双螺旋内产生一种额外的张力。因为质粒 DNA 是环状分子，这种额外的张力不能释放到分子之外，而只能在 DNA 内部使原子的位置重排，这样 DNA 分子本身就会扭曲。这种扭曲称为超螺旋。在细胞内部，处于非复制状态的质粒 DNA 都以超螺旋状态存在。这种超螺旋状态的质粒 DNA 常被称为共价闭合环状 (covalently closed circular) DNA，简称 cccDNA。如果双链中的一条单链在某一处形成缺口，和它相对的另一条链就能自由旋转，分子内的张力就会消失，使扭曲的 DNA 分子成为松弛的分子，这常被称为开放环状 (open circular) DNA，简称 ocDNA。如果质粒 DNA 的两条链同时在一处发生断裂，则质粒就变成了线状 DNA 分子。所以，质粒 DNA 有 cccDNA、ocDNA 和线状 DNA 三种构型 (图 1-1)。

三种构型的质粒 DNA 具有不同的性质。第一，它们与溴化乙锭 (ethidium bromide, 简称 EB) 的结合能力不同。EB 是一种红色染料，它能在 DNA 双链的碱基对之间插入。由于 cccDNA 分子是超卷曲的，所以插入其中的 EB 比分子量相同的 ocDNA 或线状 DNA 插入的 EB 要少。又因为 EB 的比重比 DNA 小，所以对于 EB 插入已达饱和状态的 cccDNA 和 ocDNA、线状 DNA 来说，前者的比重 (1.59) 要大于后两者 (1.55)。如果使上述三种构型的质粒 DNA 分子在有 EB 和 CsCl 存在的条件下进行平衡密度梯度超速离心 (40000 转/分钟，40 小时以上)，能在离心管内形成从顶部到底部 CsCl 密度梯度逐渐增加的连续梯度，结合 EB 的质粒 DNA 在到达与它的比重相同的密度梯度时，就会停止移动而形成一个致密的 DNA 带。cccDNA 以重带的形式出现在离心管的较下部位，ocDNA 和线状 DNA 以轻带的形式出现在 cccDNA 带的上部，RNA 在管底形成沉淀 (图 1-2)。这些 DNA 带在紫外光下很容易观察到，有时在可见光下也可观察到。用这种方法可以制备纯的超螺旋构型的质粒 DNA。

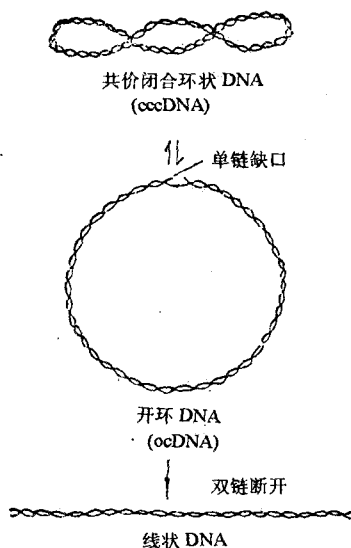


图 1-1 质粒 DNA 分子的三种构型

第二，cccDNA 对高 pH 和高温的耐受力比 ocDNA 和线状 DNA 大得多。在高 pH 和高温条件下 cccDNA 不易变性，或虽然变性但在恢复到 pH8 左右和室温条件下时能迅速复性。ocDNA 和线状 DNA 在高 pH 和高温条件下会发生不可逆变性。利用这一性质，可以通过碱裂解或煮沸裂解选择性地分离 cccDNA。

第三，由于三种构型的质粒 DNA 其分子的紧张状态不同，所以它们在琼脂糖凝胶电泳中所受到的流体力学阻力也不同，其大小顺序是 ocDNA > 线状 DNA > cccDNA，在电泳中 cccDNA 泳动的距离最大，ocDNA 最小，线状 DNA 居中。一般情况下，质粒提取物中只有 cccDNA 和 ocDNA 两种构型，不出现线状质粒 DNA (图 1-3)。

除了可以用上述琼脂糖凝胶电泳和 CsCl-EB 密度梯度离心

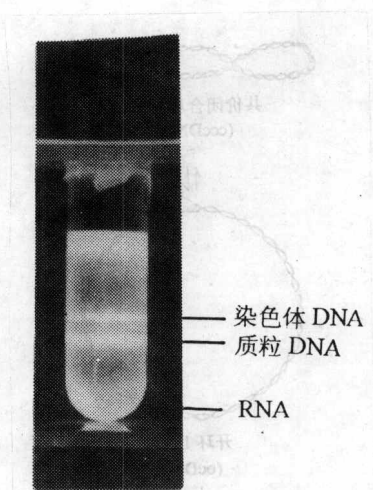


图 1-2 质粒 DNA 的 CsCl-EB 密度梯度离心纯化

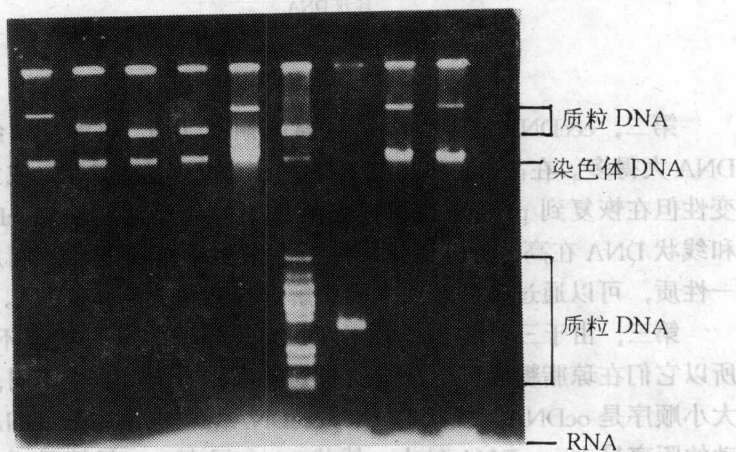


图 1-3 质粒 DNA 的琼脂糖凝胶电泳

检测质粒 DNA 的存在以外，还可以用电镜法证明质粒的存