

生物化学实验技术丛书

# DNA重组技术

实验室操作手册

徐 洵 刘震乾 主编

科学出版社

生物化学实验技术丛书

# DNA 重组技术

实验室操作手册

徐 洵 刘震乾 主编

科 学 出 版 社

1993

(京) 新登字 092 號

## 内 容 简 介

本书系统地介绍了 DNA 重组技术和方法,全书共分十一章,简明地阐述了 DNA 重组技术的基本原理,详细地叙述了方法和步骤,并对操作中可能发生的问题和注意事项作了说明。本书作者根据实际经验,力求按国内条件选择实用易行的方法。最后附有分子生物学或遗传工程实验室常用的资料、通用技术、试剂配制和厂家索引等,可供生物化学、生物技术、遗传工程和分子生物学等方面的研究和教学使用。

生物化学实验技术丛书

## DNA 重组技术

### 实验室操作手册

徐 洵 刘震乾 主编

责任编辑 赵甘泉

科学出版社 出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码: 100707

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

\*

1990年2月第 一 版 开本: 787×1092 1/16

1993年4月第二次印刷 印张: 13 3/4 插页: 2

印数: 2 471—4 488 字数: 319 000

ISBN7-03-001112-0/Q·173

定 价: 13.10 元

## 编 者 的 话

在组织编写《生物化学实验技术丛书》十年之际,科学出版社于1986年底委托中国生物工程开发中心江门单细胞蛋白试验基地,在广东江门市主持召开了《生物化学实验技术丛书》第二次座谈会.出席代表的单位有中国科学院微生物研究所、中国科学院上海脑研究所、中国医学科学院基础医学研究所、中国军事医学科学院放射医学研究所、中山大学、中国科学技术大学、北京大学、北京师范大学、武汉大学、南开大学、南京大学、复旦大学、中国生物工程开发中心江门单细胞蛋白试验基地.

会上回顾了《生物化学实验技术丛书》的出版情况.由于作者的共同努力,已经出版的《生物物质常用化学分析法》、《色谱法(一)》、《色谱法(二)》、《离心沉降分析技术》、《生物化学制备技术》等册,是指导生化实验的重要参考书,起到了工具书的作用,深受广大读者的欢迎.但是,正如第一次座谈会已经预见到的,随着我国生化研究工作的迅速发展,国外新技术的引进,国内独创技术的开展,将不断出现新的内容.为此,除了对已出版的各册进行修订、增补准备再版之外,根据实际需要,对其他未出版的各册进行了调整,扩充成9册,即《电泳技术》、《免疫化学技术》、《生化常用光学分析》、《常用生化数据》、《同位素技术在生化中的应用》、《DNA重组技术》、《酶及细胞固定技术》、《生物大分子及亚细胞颗粒液-液萃取技术》和《生物材料及细胞器分离》.另外,还增添《医学生化实验技术》、《生化技术中微机的应用》、《生化技术在食品工业中的应用》和《生化技术在农业中的应用》等四册.

对各册内容的要求,仍力求做到:

- (1) 理论部分简洁明了,实验部分力求重复性高;
- (2) 直接接触及实验设计的各项要领;
- (3) 指出实验操作中应注意的地方;
- (4) 尽可能多的举例说明.

期望本丛书的出版能使读者有所裨益,为促进生物化学的发展,作出贡献.

## 前 言

近十余年来,由于 DNA 重组技术的发展和运用,生物科学以前所未有的速度迅猛发展.目前, DNA 重组技术已成为生物学领域许多实验室的常用技术.科学家们利用这种技术几乎可以任意重组各种遗传物质,并进一步用于工、农、医各个领域.我国也正在加紧进行生物技术的研 究.国际上有关 DNA 重组技术的书籍种类繁多, T. Maniatis 等编写的《分子克隆——操作指南》一书已有中译本.为了进一步推动我国 DNA 重组技术的应用和发展,我们认为有必要从我国实际情况和条件出发,根据编写者实践经验选择可靠而又简单易行的方法介绍给读者,以期对我国分子生物学的发展起一点作用.

随着 DNA 重组技术的发展和广泛应用,新方法不断提出,原有方法不断被改进.本书不准备对各种方法作全面的评价和介绍,仅选择编写者经过试用并取得成功的方法.同时,在编写中尽可能将新方法和新进展编入,对未编入本书的其他方法也将给出参考文献.

本书重点介绍 DNA 重组的基本操作方法,诸如 DNA 重组常用酶类、载体、电泳方法、DNA 探针的应用、杂交方法、核酸的分离提纯和 DNA 序列测定等.对染色体基因文库、cDNA 文库的构建以及真核生物基因的表达等作了较系统的介绍,以期初学者按本书的操作方法和步骤,可以得到预期的结果.又由于第二代基因工程——蛋白质工程的问世和发展,基因调控研究的需要,我们向读者介绍了“定点突变”一章.最后的附录内容包括:分子生物学实验室常用基础材料、菌种保存、实验室通用技术、试剂和培养基的配制以及有关厂家索引等,以方便读者查阅和使用.

徐 洵 刘震乾

合肥,中国科学技术大学

1988 年 5 月

# 目 录

|                               |                |
|-------------------------------|----------------|
| 第一章 DNA重组常用酶 .....            | 王贤舜 ( 1 )      |
| 第一节 限制性内切酶 .....              | ( 1 )          |
| 第二节 DNA重组常用的其他酶类 .....        | ( 5 )          |
| 第二章 DNA重组常用载体 .....           | 王培之 ( 15 )     |
| 第一节 质粒 .....                  | ( 15 )         |
| 一、大肠杆菌质粒载体 .....              | ( 16 )         |
| 二、枯草杆菌质粒载体 .....              | ( 24 )         |
| 三、酵母细胞的基因克隆载体 .....           | ( 29 )         |
| 四、质粒DNA的快速纯化和检测 .....         | ( 31 )         |
| 第二节 $\lambda$ 噬菌体载体 .....     | ( 33 )         |
| 第三节 cosmid 载体 .....           | ( 35 )         |
| 第四节 单链噬菌体载体 .....             | ( 35 )         |
| 第五节 高等真核细胞的克隆载体 .....         | ( 40 )         |
| 一、植物的克隆载体 .....               | ( 40 )         |
| 二、动物细胞的克隆载体 .....             | ( 41 )         |
| 第三章 凝胶电泳 .....                | 王贤舜 ( 44 )     |
| 第一节 琼脂糖凝胶电泳 .....             | ( 44 )         |
| 第二节 聚丙烯酰胺凝胶电泳 .....           | ( 48 )         |
| 第四章 DNA的分离纯化 .....            | 刘震乾 ( 52 )     |
| 第一节 细菌染色体DNA的纯化 .....         | ( 52 )         |
| 第二节 质粒DNA的提取 .....            | ( 53 )         |
| 一、质粒DNA的小量快速提取 .....          | ( 53 )         |
| 二、质粒DNA的大量提取和纯化 .....         | ( 55 )         |
| 第三节 $\lambda$ 噬菌体DNA的制备 ..... | ( 59 )         |
| 一、 $\lambda$ 噬菌体的增殖与纯化 .....  | ( 59 )         |
| 二、 $\lambda$ DNA的大量制备 .....   | ( 61 )         |
| 三、 $\lambda$ DNA的小量快速提取 ..... | ( 61 )         |
| 第四节 从凝胶中回收和纯化DNA .....        | ( 62 )         |
| 第五章 DNA的切割和连接 .....           | 刘震乾 ( 66 )     |
| 第一节 DNA的切割 .....              | ( 66 )         |
| 第二节 DNA片段的连接 .....            | ( 67 )         |
| 第三节 DNA片段的末端修饰 .....          | ( 69 )         |
| 第六章 核酸分子杂交技术 .....            | 王申五 刘震乾 ( 74 ) |
| 第一节 同位素标记探针的制备 .....          | ( 74 )         |
| 一、缺口平移技术 .....                | ( 74 )         |

|                                            |                    |
|--------------------------------------------|--------------------|
| 二、核酸的 $^{125}\text{I}$ 化学标记 .....          | ( 77 )             |
| 第二节 非同位素标记探针的制备 .....                      | ( 78 )             |
| 第三节 以 SP6 重组体制备 RNA 探针 .....               | ( 82 )             |
| 第四节 Southern 印迹法杂交技术 .....                 | ( 83 )             |
| 第五节 Northern 印迹杂交 .....                    | ( 87 )             |
| 第六节 斑点杂交 .....                             | ( 89 )             |
| 一、DNA 斑点杂交 .....                           | ( 89 )             |
| 二、RNA 斑点杂交 .....                           | ( 91 )             |
| 第七节 菌落原位杂交鉴定重组质粒 .....                     | ( 91 )             |
| 第八节 噬菌斑原位杂交鉴定重组噬菌体 .....                   | ( 92 )             |
| <b>第七章 真核生物染色体基因库的构建 .....</b>             | <b>王玉珍 ( 95 )</b>  |
| 第一节 载体 DNA 的制备 .....                       | ( 95 )             |
| 第二节 插入 DNA 的制备 .....                       | ( 97 )             |
| 一、真核高分子量 DNA 的分离 .....                     | ( 97 )             |
| 二、高分子量 DNA 部分酶解及分离纯化 .....                 | ( 98 )             |
| 第三节 体外包装提取物的制备 .....                       | ( 100 )            |
| 第四节 DNA 连接和体外包装 .....                      | ( 101 )            |
| 第五节 基因文库的扩增、分装及保存 .....                    | ( 103 )            |
| 第六节 从基因库中筛选目的基因 .....                      | ( 105 )            |
| <b>第八章 真核生物 mRNA 的纯化和 cDNA 文库的构建 .....</b> | <b>徐 洵 ( 107 )</b> |
| 第一节 mRNA 的纯化 .....                         | ( 107 )            |
| 一、细胞总 RNA 的制备 .....                        | ( 108 )            |
| 二、从组织中提取总 RNA .....                        | ( 109 )            |
| 三、多聚(A) <sup>+</sup> RNA 的提纯 .....         | ( 111 )            |
| 第二节 cDNA 文库的构建 .....                       | ( 113 )            |
| 一、cDNA 链的合成 .....                          | ( 113 )            |
| 二、cDNA 的分子克隆 .....                         | ( 119 )            |
| 附：mRNA 的体外 翻译 .....                        |                    |
| 一、兔网织红细胞裂解物体外翻译系统 .....                    | ( 124 )            |
| 二、麦胚抽提液无细胞体外翻译系统 .....                     | ( 127 )            |
| <b>第九章 DNA 序列测定 .....</b>                  | <b>刘震乾 ( 132 )</b> |
| 第一节 双脱氧 - M13 系统 DNA 序列测定法 .....           | ( 132 )            |
| 一、由 M13 克隆系统制备单链模板 DNA .....               | ( 132 )            |
| 二、双脱氧链末端终止法序列测定 .....                      | ( 137 )            |
| 第二节 化学裂解法 .....                            | ( 142 )            |
| 一、DNA 片段末端标记 .....                         | ( 142 )            |
| 二、标记末端的分离 .....                            | ( 146 )            |
| 三、化学裂解反应 .....                             | ( 147 )            |
| 四、聚丙烯酰胺凝胶电泳及放射自显影 .....                    | ( 151 )            |
| <b>第十章 重组 DNA 顺序在原核和真核细胞中的表达 .....</b>     | <b>周 强 ( 153 )</b> |

|                                       |                    |
|---------------------------------------|--------------------|
| 第一节 重组 DNA 顺序导入原核和真核细胞的方法 .....       | ( 153 )            |
| 一、大肠杆菌的转化和噬菌体 $\lambda$ DNA 的导入 ..... | ( 153 )            |
| 二、酵母细胞的转化 .....                       | ( 155 )            |
| 三、动物细胞的转化 .....                       | ( 157 )            |
| 四、接受外源基因的哺乳动物细胞的筛选 .....              | ( 161 )            |
| 第二节 重组 DNA 表达产物的检测 .....              | ( 162 )            |
| 一、大细胞技术(Maxicells) .....              | ( 162 )            |
| 二、紫外线照射细胞的噬菌体感染技术 .....               | ( 163 )            |
| 三、免疫沉淀技术检测表达产物 .....                  | ( 164 )            |
| <b>第十一章 用体外诱变方法构建突变体 .....</b>        | <b>崔 涛 ( 167 )</b> |
| 第一节 缺失突变体 .....                       | ( 167 )            |
| 一、简单的缺失突变体构建 .....                    | ( 168 )            |
| 二、精细缺失突变体构建 .....                     | ( 170 )            |
| 第二节 插入突变 .....                        | ( 173 )            |
| 一、位点特异性插入 .....                       | ( 174 )            |
| 二、随机插入 .....                          | ( 175 )            |
| 第三节 寡聚核苷酸定点诱变 .....                   | ( 176 )            |
| 一、制备 DNA 模板 .....                     | ( 177 )            |
| 二、突变的寡聚核苷酸片段特异性测定 .....               | ( 178 )            |
| 三、环状异源双链 DNA 的体外合成 .....              | ( 179 )            |
| 四、富集环状异源双链 DNA .....                  | ( 180 )            |
| 第四节 盒式突变(cassette mutagenesis) .....  | ( 181 )            |
| 一、简并性寡聚核苷酸的设计和合成 .....                | ( 182 )            |
| 二、通过互为引物的寡聚核苷酸合成双链 DNA .....          | ( 183 )            |
| 三、寡聚核苷酸片段克隆 .....                     | ( 184 )            |
| 第五节 转化 .....                          | ( 185 )            |
| 第六节 筛选突变体 .....                       | ( 187 )            |
| <b>附 录 .....</b>                      | <b>( 193 )</b>     |
| 一、常用实验技术 .....                        | ( 193 )            |
| 二、有潜在危险的材料与试剂的安全使用 .....              | ( 199 )            |
| 三、常用名词缩写和简称 .....                     | ( 200 )            |
| 四、常用试剂和培养基的配制 .....                   | ( 202 )            |
| 五、常用实验材料及有关厂家和公司地址 .....              | ( 206 )            |

# 第一章 DNA 重组常用酶

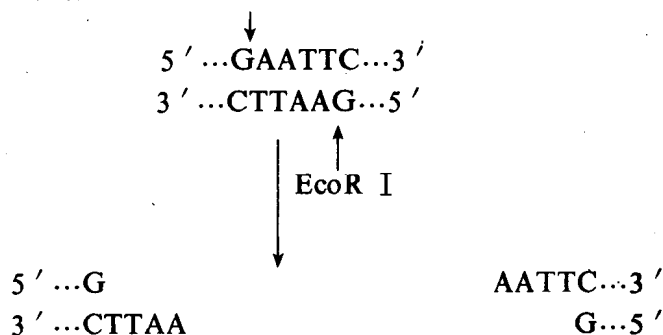
王 贤 舜

DNA 重组常用酶有：限制性内切酶、碱性磷酸酯酶、多核苷酸激酶、DNA 连接酶、DNA 聚合酶、末端转移酶、逆转录酶、外切核酸酶 III、脱氧核糖核酸酶 I、核酸酶 Ba131、核酸酶 S1、核糖核酸酶 A、核糖核酸酶 T<sub>1</sub>、核糖核酸酶 H 和核糖核酸酶 CL3。

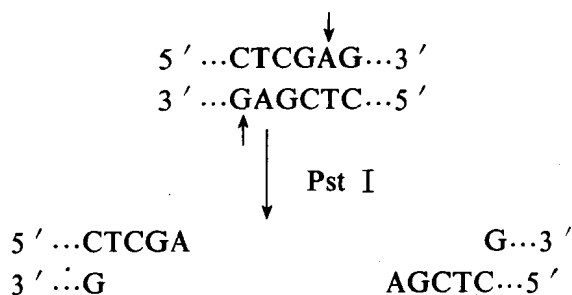
## 第一节 限制性内切酶

限制性内切酶的发现<sup>[1]</sup> 是建立 DNA 重组技术的突破点。限制性内切酶主要来源于原核生物，分为三类，其中类型 II 最为有用，已广泛应用于 DNA 切割。它们识别双链 DNA 中特异序列，其特征为 4 到 6 个核苷酸二元对称结构，并在识别序列内或附近切割 DNA，产生平齐或有粘性末端的 DNA 片段。

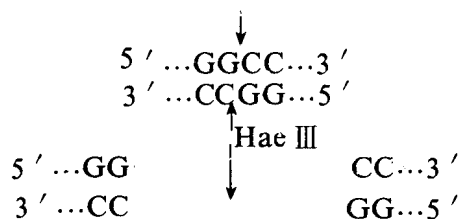
例如限制性内切酶 EcoR I，它识别的序列为 6 核苷酸，切割点位于 6 核苷酸内，产生由 4 个核苷酸组成的 5' 粘性末端。反应如下：



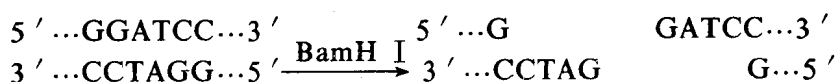
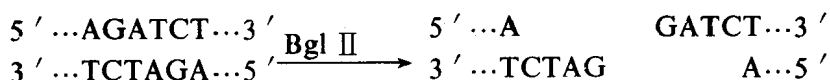
限制性内切酶 Pst I 识别 6 核苷酸序列，切割位点及产生由 4 个核苷酸组成的 3' 粘性末端如下：



限制性内切酶 Hae III 识别 4 核苷酸序列，切割位点及产生的平齐末端情况如下：



从上面列举的例子看出, 限制性内切酶是高度专一性的, 不同酶识别不同的DNA序列。但是现已知道, 一些不同来源的限制性内切酶却有相同的识别序列, 或识别序列虽有差别但产生的粘性末端却是相同的。Nde II 和Sau 3A 属于前者, 而 Bgl II 和 BamH I 属于后者。它们水解 DNA 的情况如下:



为了更多地了解和便于在 DNA 重组中使用这些识别序列上相关的酶: 请参看表1-1。

表 1-1 识别序列相关的限制性内切酶

|               | AATT   | GATC                                       | CATG                | TATA  | AGCT                      | GGCC             | CGCG             | TGCA   | ACGT            | GGCG            | CCGG                                      | TCGA           | ATAT   | GTAC             | CTAG   | TTAA              |
|---------------|--------|--------------------------------------------|---------------------|-------|---------------------------|------------------|------------------|--------|-----------------|-----------------|-------------------------------------------|----------------|--------|------------------|--------|-------------------|
| ↓ □ □ □ □     |        | Sau 3A <sup>+</sup><br>Nde II <sup>+</sup> |                     |       |                           |                  |                  |        |                 |                 |                                           |                |        |                  |        |                   |
| A ↓ □ □ □ □ T |        | Bgl II<br>Xho II                           | Afl III             |       | Hind III                  |                  | Mlu I<br>Afl III |        |                 |                 | Cfr 10 I                                  |                |        |                  |        | Spe I             |
| G ↓ □ □ □ □ C | Eco II | Bam II<br>Xho II                           |                     |       |                           |                  | Bss III          | Apa LI |                 | Ban I           | Cfr 10 I                                  | Scl I          |        | Asp 718<br>Bam I | Nhe I  |                   |
| C ↓ □ □ □ □ G |        |                                            | Nco I<br>Sly I      |       |                           | Xma III<br>Eae I |                  |        |                 |                 | Xma III<br>Ava I                          | Xho I<br>Ava I |        | Sly I            | Avr II | Ara II            |
| T ↓ □ □ □ □ A |        | Bcl I                                      | Bsp III             |       |                           | Eae I            |                  |        |                 |                 |                                           |                |        |                  |        | Xba I             |
| □ ↓ □ □ □ □   |        |                                            |                     |       |                           |                  |                  |        | Mae II          | Hin P1 I        | Hpa II <sup>+</sup><br>Msp I <sup>+</sup> | Taq I          |        |                  |        | Mae I             |
| A □ ↓ □ □ □ T |        |                                            |                     |       |                           |                  |                  |        |                 |                 |                                           | Cla I          |        |                  |        |                   |
| G □ ↓ □ □ □ C |        |                                            |                     | Acc I |                           |                  |                  | Aha II | Nar I<br>Aha II |                 |                                           | Acc I          |        |                  |        |                   |
| C □ ↓ □ □ □ G |        |                                            |                     |       |                           |                  |                  |        |                 |                 |                                           |                | Nde I  |                  |        |                   |
| T □ ↓ □ □ □ A |        |                                            |                     |       |                           |                  |                  |        |                 |                 |                                           | Fsp II         |        |                  |        |                   |
| □ □ ↓ □ □ □   |        | Dpn I                                      |                     |       | Alu I                     | Hae III          | Fnu III          |        |                 |                 |                                           |                |        | Rsa I            |        |                   |
| A □ □ ↓ □ □ T |        |                                            |                     |       |                           | Sfu I<br>Hae I   |                  |        |                 | Eco 47 III      |                                           |                | Ssp I  | Sca I            |        | Hpa I<br>Hind III |
| G □ □ ↓ □ □ C |        |                                            |                     |       |                           |                  |                  |        |                 |                 | Nae I                                     | Hind II        | Eco IV |                  |        |                   |
| C □ □ ↓ □ □ G |        |                                            |                     |       | Pvu II<br>Nsp III         |                  | Nsp III          |        |                 |                 | Sma I                                     |                |        |                  |        |                   |
| T □ □ ↓ □ □ A |        |                                            |                     |       |                           | Bcl I<br>Hae I   | Nru I            |        | Sna III         | Fsp I           |                                           |                |        |                  |        | Dra I             |
| □ □ □ ↓ □ □   |        |                                            |                     |       |                           |                  |                  |        |                 | Cfo I           |                                           |                |        |                  |        |                   |
| A □ □ □ ↓ □ T |        |                                            |                     |       |                           |                  |                  |        |                 |                 |                                           |                |        |                  |        |                   |
| G □ □ □ ↓ □ C |        |                                            |                     |       |                           |                  |                  |        |                 |                 |                                           |                |        |                  |        |                   |
| C □ □ □ ↓ □ G |        | Pvu I                                      |                     |       |                           |                  | Sac II           |        |                 |                 |                                           |                |        |                  |        |                   |
| T □ □ □ ↓ □ A |        |                                            |                     |       |                           |                  |                  |        |                 |                 |                                           |                |        |                  |        |                   |
| □ □ □ □ ↓     |        |                                            | Nla III             |       |                           |                  |                  |        |                 |                 |                                           |                |        |                  |        |                   |
| A □ □ □ □ ↓ T |        |                                            | Nsp 7524 I          |       |                           |                  |                  | Nsi I  |                 | Hae II          |                                           |                |        |                  |        |                   |
| G □ □ □ □ ↓ C |        |                                            | Sph I<br>Nsp 7524 I |       | Sac I<br>Bam II<br>Hgi AI | Apa I<br>Bam II  |                  | Hgi AI | Aat II          | Bbe I<br>Hae II |                                           |                |        | Kpn I            |        |                   |
| C □ □ □ □ ↓ G |        |                                            |                     |       |                           |                  |                  | Pst I  |                 |                 |                                           |                |        |                  |        |                   |
| T □ □ □ □ ↓ A |        |                                            |                     |       |                           |                  |                  |        |                 |                 |                                           |                |        |                  |        |                   |

表 1-1b 识别序列相关的限制性内切酶

|        | AA□TT | GA□TC | CA□TG | TA□TA | AG□CT | GG□CC | CG□CG | TG□CA | AC□GT | GC□GC | CC□GG  | TC□GA                                   | AT□AT | GT□AC  | CT□GA | TT□AA |
|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|-----------------------------------------|-------|--------|-------|-------|
| ↓□□↑□□ |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |        | EcoRII                                  |       |        |       |       |
| ↓□□↓□□ |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |        |                                         |       |        |       |       |
| ↓□□N□□ |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |        |                                         |       | MaeIII |       |       |
| □↓□↑□□ |       |       |       |       |       | AvaII |       |       |       |       |        |                                         |       |        |       |       |
| □↓□↓□□ |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |        |                                         |       |        |       |       |
| □↓□N□□ | HinfI |       |       |       |       | Sau3A |       |       |       |       |        |                                         |       |        | DdeI  |       |
| □□↓↑□□ |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |        | ApyI <sup>+</sup><br>BstXI <sup>+</sup> |       |        |       |       |
| □□↓↓□□ |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |        | NciI                                    |       |        |       |       |
| □□↓N□□ |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       | Fnu4HI | SrfII                                   |       |        |       |       |
| □□↓↑□□ |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |        |                                         |       |        |       |       |
| □□↓↓□□ |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |        | BclI                                    |       |        |       |       |
| □□↓N□□ |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |        |                                         |       |        |       |       |
| □□↓↑□□ |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |        |                                         |       |        |       |       |
| □□↓↓□□ |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |        |                                         |       |        |       |       |
| □□↓N□□ |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |        |                                         |       |        |       |       |
| □□↓↑□□ |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |        |                                         |       |        |       |       |
| □□↓↓□□ |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |        |                                         |       |        |       |       |
| □□↓N□□ |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |        |                                         |       |        |       |       |

到 1986 年为止<sup>[2]</sup> 已发现的限制性内切酶接近 600 种，最常用的也有数十种，如何选用这些酶，这要按实际需要来考虑。

假如我们希望 DNA 酶解片段平均在数百核苷酸对，可采用识别序列为 4 核苷酸的限制性内切酶，如 Sau 3A。要想得到酶解 DNA 片段大小平均在数千核苷酸对则应采用识别序列为 6 核苷酸的限制性内切酶，如 BamH I。

又如，在有些场合下我们要求经限制性内切酶水解的二个 DNA 片段经重组后不再为原来的酶所酶解。这时我们可以选用专一性不同而产生相同粘性末端的二种酶来完成。例如经 Sal I 酶解的粘性末端是  $\frac{5'}{3'} \dots \text{G} \dots \text{CAGCT}$ ，而经 Xho I 酶解的粘性末端是  $\frac{\text{TCGAG} \dots 3'}{\text{C} \dots 5'}$ ，二者经连接酶连接产生的序列为  $\frac{5'}{3'} \dots \text{GTCGAG} \dots 3' \dots \text{CAGCTC} \dots 5'$ 。它既不能被 Sal I 水解，也不能被 Xho I 水解。这在质粒改造上是有用的。

如欲得到大小不同、相互重叠的 DNA 片段，可以采用识别序列为 4 核苷酸的限制性内切酶如 Sau 3A、mbv I 等进行不完全酶解，这在构建染色体基因库等情况下常用。

现将 DNA 重组中常用的限制性内切酶及反应条件归纳于表 1-2。

三、重組成本

4

续表 1-2

| 酶       | 同切口酶           | 盐 <sup>4)</sup> | 酶解温度(℃) | 识别序列 <sup>1)</sup> | 具有相同粘性末端的酶                                         |
|---------|----------------|-----------------|---------|--------------------|----------------------------------------------------|
| Hph I   |                | 低               | 37      | GGTGA(8/7) ↓       | BamH I, Bcl I, Bgl II, Xho II.                     |
| Kpn I   |                | 低               | 37      | GGTAC ↓ C          |                                                    |
| Mbo I   | Sau3A          | 高               | 37      | ↓ GATC             |                                                    |
| Mbo II  |                | 低               | 37      | GAAGA(7/8) ↓       |                                                    |
| Mnl I   |                | 高               | 37      | CCTC(7) ↓          |                                                    |
| Msp I   | Hpa II         | 低               | 37      | C ↓ CGG            |                                                    |
|         |                |                 |         | C ↓ *CGG           |                                                    |
| Mst I   |                |                 | 37      | TGC ↓ GCA          | 平头                                                 |
| Pst I   |                | 中               | 21-37   | CTCGA ↓ G          |                                                    |
| Pvu I   |                | 高               | 37      | CGAT ↓ CG          |                                                    |
| Pvu II  |                | 中               | 37      | CAG ↓ CTG          | 平头                                                 |
| Rsa I   |                | 中               | 37      | GT ↓ AC            | 平头                                                 |
| Sac I   | Sst I          | 低               | 37      | GAGCT ↓ C          |                                                    |
| Sac II  |                | 低               | 37      | CCGC ↓ GG          |                                                    |
| Sal I   |                | 高               | 37      | G ↓ TCGAC          | Ava I <sup>3)</sup> , Xho I                        |
| Sau3A   | Mbo I          | 中               | 37      | ↓ GATC             | BamH I, Bcl I, Bgl II, Mbo I, Xbo II               |
|         |                |                 |         | *GATC              |                                                    |
| Sau961  | Asu I          | 中               | 37      | G ↓ GNCC           |                                                    |
| Sma I   | Xma I          |                 | 37      | CCC ↓ GGG          | 平头                                                 |
| Sph I   |                |                 | 37      | GCATG ↓ C          |                                                    |
| Sst I   | Sac I          | 低               | 37      | GAGCT ↓ C          |                                                    |
| Sst II  | Sac II         | 低               | 37      | CCGC ↓ GG          |                                                    |
| Taq I   |                | 低               | 65      | T ↓ C*GA           | Acc I <sup>3)</sup> , Acy I, Asu II, Cla I, Hpa II |
| Tha I   | FnuD II        | 低               | 60      | CG ↓ CG            | 平头                                                 |
| Xba I   |                | 高               | 37      | T ↓ CTAGA          |                                                    |
| Xho I   |                | 高               | 37      | C ↓ TCGAG          | Ava I <sup>3)</sup> , Sal I                        |
| Xho II  |                |                 | 37      | (A) ↓ GATC(E)      | BamH I, Bcl I, Bgl II, Mbo I, Sau3A                |
| Xma I   | Sma I          | 低               | 37      | C ↓ CCGGG          | Ava I <sup>3)</sup>                                |
| Xma III |                |                 | 37      | C ↓ GGCCG          |                                                    |
| Xor II  | Pvu I<br>Rsh I | 低               | 37      | CGAT ↓ CG          |                                                    |

注: 1) 表中所写的识别序列仅是 5' → 3' 一条链, 而另一条 3' → 5' 链未写出来. 识别序列经酶解产生 3' 粘性末端, 5' 粘性末端及平齐末端. 如 G ↓ GATCC 产生含有 GATC 四个核苷酸的 5' - 粘性末端, 而 CGAT ↓ CG 产生含有 AT 二个核苷酸的 3' - 粘性末端.

2) GACGC(5/10) ↓ 表示 GACGC 后第 5 个核苷酸处或第 10 个核苷酸处有一切口.

3) 表中列有 Acc I<sup>3)</sup>, Ava I<sup>3)</sup> 等, 其含义说明如下:

Acc I 所识别的序列为 GT ↓ (A)(G)AC, Acc I 遇到以下四种序列均可降解: GT ↓ AGAC, GT ↓ ATAC, GT ↓ CGAC, GT ↓ CTAC. 因此 Acc I 酶解而产生的粘性末端对 Acc I 来讲, 出现相同末端的可能性约为 1/4.

4) 盐的组成见附录.

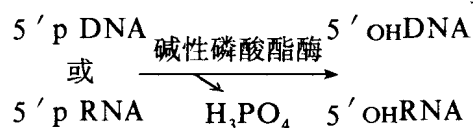
\*代表甲基化位点.

## 第二节 DNA 重组常用的其他酶类

### (一) 碱性磷酸酯酶

来自小牛肠道的碱性磷酸酯酶是由二个分子量为 69 000 的亚基组成, 每个酶分子

含有 4 个  $Zn^{++}$ 。它能水解 DNA 和 RNA 5' 末端和 3' 末端的磷酸根<sup>[3]</sup>。



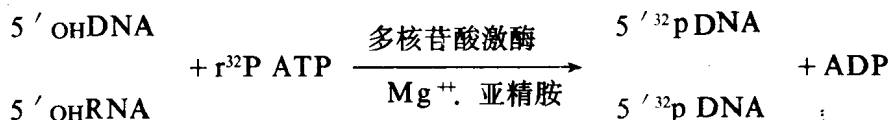
经催化反应后，向反应液中加入螯合剂 EGTA 或 EDTA，螯合掉必需的  $Zn^{++}$ <sup>[4]</sup> 时，碱性磷酸酯酶的活力完全失掉而不伤害多核苷酸。

用 Efstratiadis 等人<sup>[5]</sup> 的方法纯化的碱性磷酸酯酶没有非特异性的核酸内切酶和 RNA 酶活力。

此酶用于 DNA 载体脱磷，防止 DNA 重组时产生自身再环化。它也用于化学法 DNA 序列分析上。化学法序列分析第一步需要在 DNA 5' 末端标上  $^{32}\text{P}$ -磷酸。经碱性磷酸酯酶水解去掉 5' 末端上磷酸根的 DNA 在 T4 多核苷酸激酶的催化下标记上  $^{32}\text{P}$ -磷酸产生  $^{32}\text{P}$ -DNA。

## (二) 多核苷酸激酶

T4 多核苷酸激酶是由四个相同亚基构成，在高离子浓度下或多胺(如亚精胺)存在下有利稳定酶的四级结构。在 pH 7.5 — 8.0 的条件下，T4 多核苷酸激酶催化  $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ -ATP 上  $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ -磷酸转到 DNA 或 RNA 的 5' 末端羟基上<sup>[6]</sup>，其反应如下：



在 pH 5.0 — 6.0 条件下，T4 多核苷酸激酶还有磷酸酯酶活力<sup>[7]</sup>。

此外，此酶还具有催化 DNA 或 RNA 5' 末端磷酸根的交换功能。

经 T4 多核苷酸激酶催化产生 5' 末端标记的  $^{32}\text{P}$ -DNA 能用于化学法序列分析和 DNA 物理图谱分析。

## (三) DNA 连接酶

含有 3' -OH 末端 DNA 和含有 5' 磷酸末端的 DNA，经 DNA 连接酶催化通过磷酸二酯键共价连接起来。由于参加反应的是 DNA 末端，因此连接的动力学与这些末端的浓度有关。DNA 连接既可发生在 DNA 分子之间，也可发生在分子内部。在后一种情况下将形成自身环状 DNA。高浓度 DNA 末端有利于分子间连接，而低浓度则有利环状 DNA 形成。由于 DNA 分子存在一定程度的刚性，小于 200 碱基对的 DNA 片段不易成环。大于 20kb 的长片段 DNA 由于末端浓度相对较低，也不利成环。

DNA 连接酶既能连接含有互补碱基对的粘性末端 DNA 链，也能连接平头末端 DNA 链。不过前者因有粘性末端，能通过互补碱基对之间的氢键结合，比后者容易连接。要想使后者的连接反应达到前者水平，必须提高 DNA 末端浓度或 DNA 连接酶量，因此反应尽可能在小体积中进行。

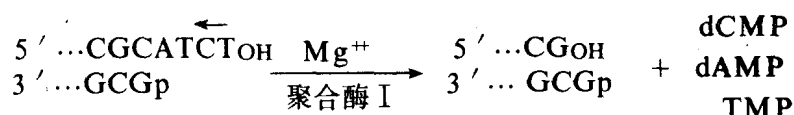
T4DNA 连接酶是分子量为 68 000 的单链蛋白质,  $Mg^{++}$  和 ATP 是辅因子. 它催化连接反应如下:

$$\begin{array}{ccc}
 5' \dots \text{ACG}_{\text{OH}} & + & \text{pAATTCGT} \dots 3' \\
 3' \dots \text{TGCTTAAP} & & \text{OH GCA} \dots 5' \\
 & \downarrow \text{Mg}^{++} & \\
 & \text{ATP} & \text{T4 DNA 连接酶} \\
 5' \dots \text{ACGAATTCGT} \dots 3' & & \\
 3' \dots \text{TGCTTAAGCA} \dots 5' & & 
 \end{array}$$
$$\begin{array}{ccc}
 5' \dots \text{CGA} \text{OH} & & \text{pCGTA} \dots 3' \\
 3' \dots \text{GCT} \text{p} & + & \text{OHGCAT} \dots 5' \\
 & \downarrow & \\
 \text{Mg}^{++}, \text{ATP} & \text{T4DNA 连接酶} & \\
 & \downarrow & \\
 5' \dots \text{CGACGTA} \dots 3' & & \\
 3' \dots \text{GCTGCAT} \dots 5' & & 
 \end{array}$$

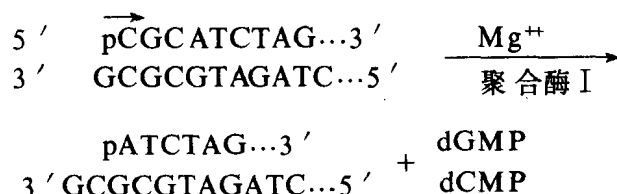
大肠杆菌有三类 DNA 聚合酶, 它们是聚合酶 I、聚合酶 II 和聚合酶 III。DNA 聚合酶 I 和 II 参与 DNA 修复, DNA 聚合酶 III 参与 DNA 复制。这三类聚合酶都有沿模板按 5'→3' 方向合成互补 DNA 链的活力及沿 3'←5' 方向切割核酸的外切核酸酶活力。此外, DNA 聚合酶 I 还具有沿 5'→3' 方向外切核酸的活性, 它参与 DNA 合成过程中切去引物 RNA 的反应。

$$\begin{array}{l} \text{引物 } 5' \dots \text{CCG} \xrightarrow{\quad} \text{OH} \\ \text{模板 } 3' \dots \text{GGCTATCGATG} \dots 5' \end{array} + \begin{array}{c} \text{dATP} \\ \text{dCTP} \\ \text{dGTP} \\ \text{TTP} \end{array} \xrightarrow[\text{聚合酶 I}]{\text{Mg}^{++}}$$


(2) 3' → 5' 核酸外切酶活性.



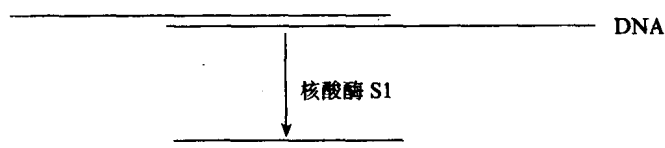
(3) 5' → 3' 外切核酸酶活性.



大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 的分子量是 109 000, 经枯草杆菌蛋白酶水解获得分子量为 76 000 的大片段叫 Klenow 片段<sup>[8]</sup>, 又叫 Klenow 酶. 它具有 5' → 3' 聚合酶和 3' → 5' 外切核酸酶活力, 而失去 5' → 3' 外切核酸酶的活力. 在基因工程中 Klenow 酶用于填平粘性末端、双脱氧法 DNA 序列分析及缺口翻译等.

## (五) 核酸酶 S1

从米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 中得到的核酸酶 S1 是单亚基的糖蛋白, 糖占 18%, 分子量为 38 000<sup>[9]</sup>, 等电点 pI 是 4.3—4.4, 酶的最适 pH 是 4.0—4.3, 实际使用反应液 pH 为 4.6—5.0, 其目的是防止由于脱嘌呤而可能出现缺口底物 DNA. 需 Zn<sup>++</sup> 作为活化剂. 具抗尿素和 SDS 变性能力. 在合适的条件下, 水解单链核酸比双链的活性高 75000 倍<sup>[10]</sup>. 因此, 核酸酶 S1 的主要用途是切去 DNA、RNA 及 DNA · RNA 杂交分子中的单链部分.



核酸酶 S1 广泛用于除去双链 DNA 中的粘性末端产生平齐末端; 除去合成 cDNA 的发夹结构; 分析 RNA 茎环结构和分析 DNA · RNA 杂交分子的杂交情况等.

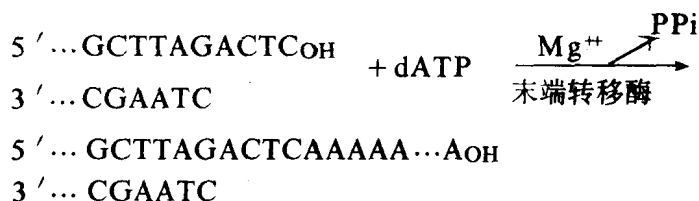
## (六) 末端转移酶

小牛胸腺末端转移酶的分子量是 32 000, 由二个分子量分别为 26 500 和 8 000 的亚基构成<sup>[11]</sup>, 等电点 (pI) 是 8.6, 最适 pH 是 7.2. 在 Mg<sup>++</sup> 存在的条件下, 末端转移酶催化脱氧核苷三磷酸上的脱氧核苷一磷酸 (即脱氧核苷酸) 转移到 DNA 3' 末端羟基上, 放出焦磷酸. DNA 的 3' 末端有自由羟基, 并有至少由三个核苷酸组成的单链是转移脱氧核苷酸在 DNA 3' 末端上聚合的必要条件.

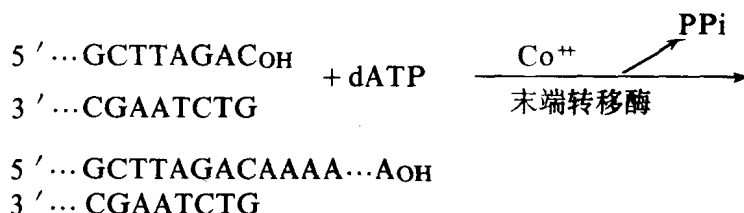
Roychoudhury 等人发现<sup>[12, 13]</sup>, 采用含 Co<sup>++</sup> 的缓冲液时, 具有 3' 平齐末端,

3' - 粘性末端和比 5' 末端短的 3' 末端的 DNA 在末端转移酶的催化下均能在 3' 末端接上脱氧核苷酸。它们反应如下:

(1) 带有 3' 末端羟基的单链 DNA (或 3' 末端单链延伸的双链 DNA)。



(2) 含有 3' 末端羟基平齐 DNA。



除了四种脱氧核苷三磷酸外, 5' - 甲基 dCTP、6-O - 甲基-dGTP、8-(2,4-二硝基苯-2,6-氨基) 氨基-ATP 和 2'-脱氧尿苷-5'-三磷酸-5-丙烯基-氨基-生物素(或叫生物素-11-dUTP)亦可转移到 DNA 3' 末端羟基上<sup>[14]</sup>。后面二种化合物具有结合荧光染料的能力。

末端转移酶主要用来产生 DNA 共聚尾巴, 进行 DNA 体外重组。另外末端转移酶也用来在 DNA 3' 末端进行同位素标记。

### (七) 逆转录酶(RNA 指导的 DNA 聚合酶)

鸟类成髓细胞性白血病病毒(AMV)是逆转录酶的主要来源。逆转录酶的活性形式是  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\alpha\beta$ 。  $\beta$  亚基的分子量是 92000。  $\alpha$  亚基的分子量是 68000。  $\beta$  亚基部分水解放出 p32 后变为  $\alpha$  亚基。 p32 有核酸内切酶的活性。 由  $\alpha$  和  $\beta$  亚基构成的逆转录酶具有 RNA 指导的 DNA 聚合酶、DNA 指导的 DNA 聚合酶和 RNaseH 活性。 其中  $\alpha$  亚基具有 RNA 指导的 DNA 聚合酶和 RNaseH 的活性。 由  $\alpha$ 、 $\beta$  亚基构成的逆转录酶的三种催化活性如下式:

