

微生物和分子遗传学

专集

范云六 陈来成 罗明典 等编译

科学技术文献出版社

遵循这一目标，本着“洋为中用”的精神，我们收集了十六篇有关“微生物和分子遗传学”方面的论文，包括有：基因工程研究进展、细菌质体复制和遗传学问题、抗菌素产生的遗传学分析、烃类化合物降解的遗传学问题，固氮分子遗传学和植物寄生菌分子遗传学问题，体内遗传工程，高等生物激素的微生物合成以及遗传工程载体、工具酶等某些技术问题，此外，还介绍了日本微生物发酵工业近况和离体条件下细菌-植物共生问题研究进展等方面内容。本文集可供高等院校生物科学、微生物学、遗传学教师和高年级学生、工业微生物工作者以及有关研究人员参考。

文集中涉及“**plasmid**”这一专有名称问题，由于目前国内对此名称尚无统一叫法，因此暂仍使用过去沿用的译名《质体》。

由于编辑水平有限，有不妥之处，欢迎批评指正。

编 者



目 录

体外 DNA 重组研究近况及其进展	(1)
细菌质体的复制及转移特性	(22)
细菌质体遗传学	(62)
抗菌素产生的遗传学	(82)
关于烃类降解的微生物遗传学	(114)
细菌质体和烃的降解	(129)
固氮分子生物学	(163)
在根癌病农杆菌转化的植物细胞中原核生物 DNA 的 转移和表达	(168)
体内遗传工程: λ 转导噬菌体和 ColE1 因子间的基因交换 ..	(174)
细菌合成大鼠生长激素	(177)
人胰岛素的合成基因	(183)
用 ColE1 衍生质体对大肠杆菌进行转化的一种改良方法	(185)
质体作为基因无性繁殖的载体: 对基础研究和应用 研究的影响	(190)
限制酶、修饰酶及其识别序列	(197)
日本微生物发酵工业的近况及今后发展方向	(209)
离体条件下细菌-植物共生研究的进展	(234)

bww? / 18



A 748403

体外DNA重组研究近况及其进展

范 云 六

(中国科学院微生物研究所 北京)

一、DNA体外重组技术(基因工程)的特点

遗传重组对于所有的生物都具有重要的意义。遗传重组是遗传学的基础,也是基因工程的核心。两个突变品系之间的遗传重组产生野生型,从分子水平上来看,是由于亲本DNA分子的断裂与重新连接后形成重组体的结果。

基因工程重要特点之一是在体外实行DNA分子的断裂和重新连接:基因工程重要特点之二是,DNA分子水平上的操作,细胞水平上的表达。因此,既不能把有史以来人为改造物种的活动都包括在基因工程之内,也不能将DNA重组只看成是DNA分子上的操作而忽视了操作后的DNA分子在细胞中进行表达。

DNA重组发展的历史不长,1972年Berg用接尾法体外建成SV40和 λ 片段的重组DNA分子,1973年Cohen等建成大肠杆菌二种抗药性质体的重组质体的分子无性繁殖系。70年代初,完成上述DNA重组技术不是偶然的,有其理论和技术前提。基因工程技术是以分子遗传学为理论基础,综合了分子生物学和微生物遗传学的现代方法而发展起来的一门新兴技术科学。基因工程技术涉及的学科面较广,本身就是一个在多学科成就的基础上发展起来的产物。它的进一步发展也必须要求多学科的相互渗透和配合。

二、DNA体外重组技术的若干重要环节及其进展

1. 限制性核酸内切酶

在DNA体外重组中限制性内切酶起着重要作用。早在1953年Luria等发现,寄主细胞控制的限制和修饰现象。寄主细胞控制的限制和修饰的遗传现象是受二种酶的制约,一种酶是限制酶,即降解DNA的内切酶,另一种为修饰酶,即甲基化酶,保护DNA使不受限制酶降解。因为二种酶共同存在同一细胞中,因此细胞自己的DNA由于甲基化酶的作用而不受到限制酶降解得以保护,而对进来的外源DNA由于未经适当修饰,就遭受限制酶的降解。限制-修饰系统的作用是保护细菌细胞不受外源DNA的侵入。许多微生物都是有这样一种保护机构。

限制性核酸内切酶是一类水解DNA的磷酸二酯酶,它分为两大类:Ⅰ类酶如EcoB、EcoK、EcoPⅠ等,为复合功能的酶,具有较高的分子量(约300,000)和许多不同的亚基,作用时需要SAM或ATP的存在,Ⅰ类酶也是甲基化酶和ATPase。在非修饰的DNA分子的结合位点上结合,但不在结合位点上切割,而是在其他合适的位置随机切割,因此产生的产物是异质的。在基因工程中重要的是第Ⅱ类酶,Ⅱ类酶分子量较小(约20,000至100,000),

为一类较简单的酶。作用时不需要SAM或ATP。它们在DNA核苷酸序列的特异位点上切割，称之为生物化学家的分子手术刀，在基因工程上占重要地位广泛地应用。

自1968年以来，迄今已分纯并且定性 100 多种限制性核酸内切酶。目前经常用于分子无性繁殖的限制性核酸内切酶，约10余种（表 1）详见本书 197 页。

表 1 某些常用的限制性核酸内切酶

限制酶	微生物	核苷酸序列	λ 的切点
Alu I	<i>Arthobacter luteus</i>	AG [↓] CT	>50
Bam I	<i>B. amyloliquefaciens</i>	G [↓] GATCC	5
BsuR I	<i>B. subtilis</i> strain R	GG [↓] CC	>50
EcoR I	<i>E. coli</i> RY13	G [↓] AATTC	5
Hae II	<i>Haemophilus aegyptius</i>	GG [↓] CC	>50
Hind I	<i>H. influenzae</i> Rd	GTPy [↓] PuAC	34
Hind II	<i>H. influenzae</i> Rd	A [↓] AGCTT	6
Hpa I	<i>H. parainfluenzae</i> Rd	C [↓] CGG	>50
Sal I	<i>Streptomyces albus</i>	G [↓] TCGAC	2
Pst I	<i>Providencia stuartii</i>	CTGCA [↓] C	18
Xma I	<i>Xanthomonas malvacearum</i>	C [↓] CCGGG	2

限制性核酸内切酶来自不同微生物，除来自好氧性细菌和放线菌等外，最近Leung等人从一种严格嫌气性细菌——有核梭状细菌（*Fusobacterium nucleatum*）中分出不同的限制性核酸内切酶Fnu D II，识别5'-CG[↓]CG-3'

3'-GC₁GC5'

3'-CTA₁G-5'

表 2

某些限制性核酸内切酶及其识别序列

四核苷酸		五核苷酸		六核苷酸	
Alu I	AG [↓] CT	EcoR II	[↓] CC(^A _T)GG	Ava I	C [↓] PyCGPuG
Hae II	GG [↓] CC	Hph I	GGTGA-8bp	Bam I	G [↓] GATCC
Hha I	GCG [↓] C	Mbo I	GAAGA-8bp	Bgl II	A [↓] GATCT
Hpa I	C [↓] CGG			Bal I	TGG [↓] CCA
Mbo I	[↓] GATC			EcoR I	G [↓] AATTC
Taq I	T [↓] CGA			Hind II	A [↓] AGCTT
Hinf I	G [↓] ANTC			Hpa I	GTT [↓] AAC
Dpn I	[↓] GATC (当修饰时)			Pst I	CTGCA [↓] G
				Xma I	C [↓] CCGGG
				Hae I	(^A _T)GG [↓] CC(^T _A)
				Hae II	PuGCGC [↓] Py
				Hind I	GTPy [↓] PuAC

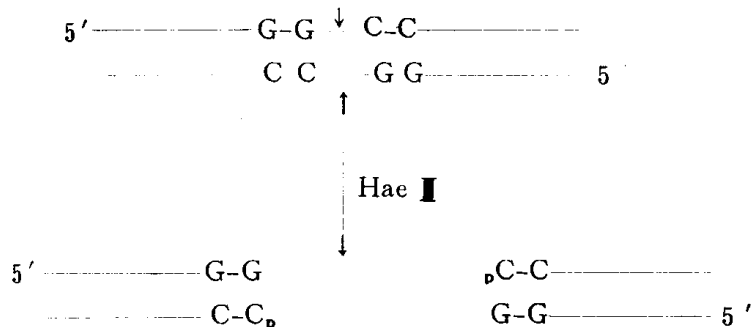
及 Fnu 4 H I 识别 $5'-GC^1NGC-3'$

$3'-CGN^1CG-5'$ 。此外,有的限制性核酸内切酶的基因是在质体上,例如EcoR I, EcoR II 是由带有抗药性质体的大肠杆菌中产生,酶的基因在质体上,有的酶是由染色体编码,例如BsuR I 酶是由枯草杆菌产生,此酶基因在染色体上或在一个隐蔽的原噬菌体上。所有 II 类限制酶不仅对酶切点邻近二个碱基有严格要求,而且对更远的碱基序列也有严格要求。表 2 表明识别四核苷酸、五核苷酸及六核苷酸的一些限制性核酸内切酶。

在产生粘着末端的限制性核酸内切酶中,如EcoR II 产生 $5'-5$ 核苷酸的单链延伸:EcoR I 产生 $5'-4$ 核苷酸的单链延伸:Hinf I 产生 $5'-3$ 核苷酸的单链延伸,而Pst I 产生 $3'-4$ 核苷酸的单链延伸:Hha I 产生 $3'-2$ 核苷酸的单链延伸。

除粘着末端外,某些限制性核酸内切酶切割双链 DNA 后,产生平末端(表 3)。平末端的片段在体外也可经DNA连接酶进行连接。

表 3 Hae III 切DNA后产生平末端 DNA 片段



限制性核酸内切酶应用在分子无性繁殖试验中最重要的问题之一,是关于它们所产生片段的平均长度问题,即切割频率问题。已经测定出,EcoR I 酶平均在 4000 碱基对长度的 DNA 片段切一次,Bam I (GGATCC) 及Sal I (GTCGAC) 切割的频率要低一些,切割后产生片段的长度分别为 6000 及 8000 碱基对。如果需要分离完整的基因,可用 EcoR I 或 BamH I 等酶,用限制性核酸内切酶作DNA物理图谱 (physical map) 时,则宜用产生较短片段的限制性核酸内切酶。常常用切割频率较高的限制性核酸内切酶(如Hpa I) 来切割 DNA,以便得到较短的DNA片段(200个碱基对)进行DNA片段的序列分析。

随着新的限制性核酸内切酶的研究,发现了许多不同来源的限制性核酸内切酶能识别相同的核苷酸序列,这些酶称之为“同功异源酶”。有一些产生相同粘着末端的限制性核酸内切酶,例如:

BamH I	G^1GATC
Bgl II	T^1GATC
Mb I	1GATC

这些酶应用于DNA分子无性繁殖试验中,有利于重组DNA分子的选择。

限制性核酸内切酶在DNA序列分析、遗传工程以及基因结构与功能的研究中取得很大的进展。最近工作表明,限制性核酸内切酶在体内遗传工程中具可能的重要作用。

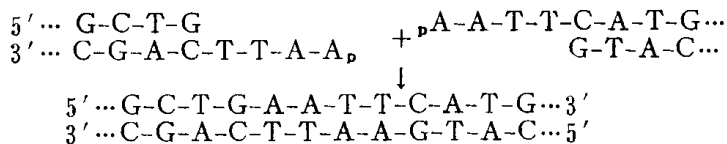
2. 体外重组及联结器 (人工接头)

经限制性核酸内切酶切外源DNA及载体后,用T4DNA 连接酶进行连接,连接的方法有三种(表 4)。

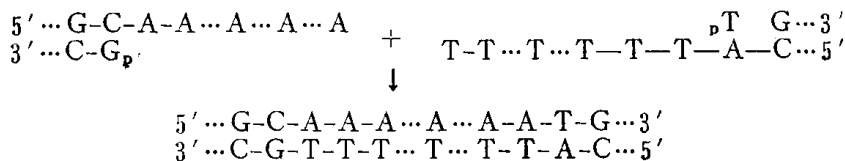
表 4

连接 DNA 片断的方法

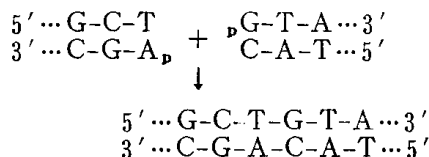
a) 粘着末端



b) dA : dT连接



c) 平末端连接



第(1)种方法技术简便，在重组质体上保留了限制酶切点，容易从重组质体 DNA 分子上回收被插入的外源 DNA 片段，是目前广泛应用的方法之一：这个方法的主要缺点是不易选择重组质体，另外，当外源基因 DNA 片段比运载体分子长时，形成重组质体 DNA 的频率较低。第(2)种方法也是目前常用的一种连接方法，用这种方法形成重组 DNA 频率较高，只有重组质体才能选择。另外，对于长的外源 DNA 片段，重组也很有效。随着限制性核酸内切酶日益发现和增多，人们巧妙地应用一些特定酶的组合，可以克服用粘着末端法进行体外重组不易选择的缺点。例如，上面谈过 BamH I、Bgl I 及 Mb I 这三个酶都产生一个相同的 5'-四核苷酸。末端 GATC，如果用 Bgl I 切质体载体分子，用 BamH I 切外源 DNA，在用 T4 DNA 连接酶连接时，不使限制性核酸内切酶失活，这样，由于杂种质体上只有中央相同的4个核苷酸而无 Bgl I 及 BamH I 切割位点，杂种质体不被切割：相反地，如载体分子形成双聚体或自我成环都将继续遭受 Bgl I 切割，因此，巧妙地应用产生相同粘着末端的限制酶，大大有助于选择重组质体 DNA 分子（图 1）。

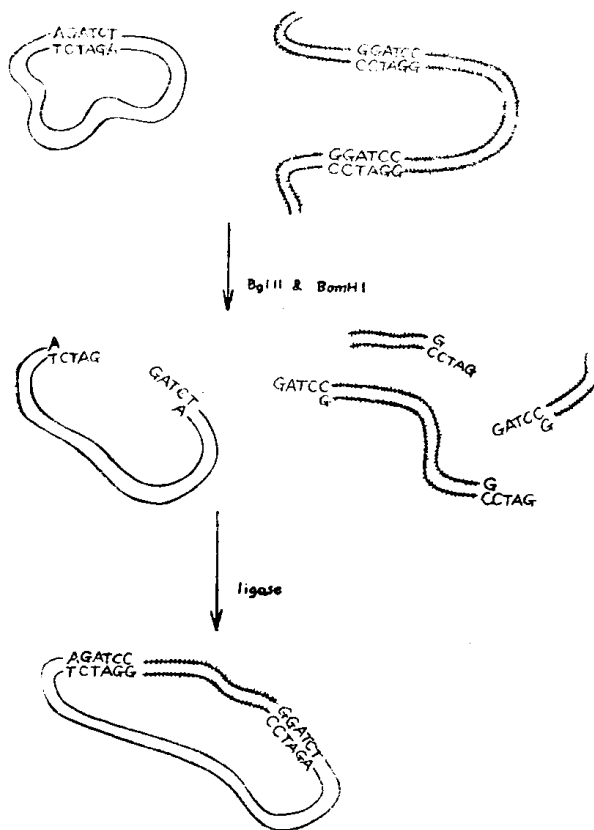


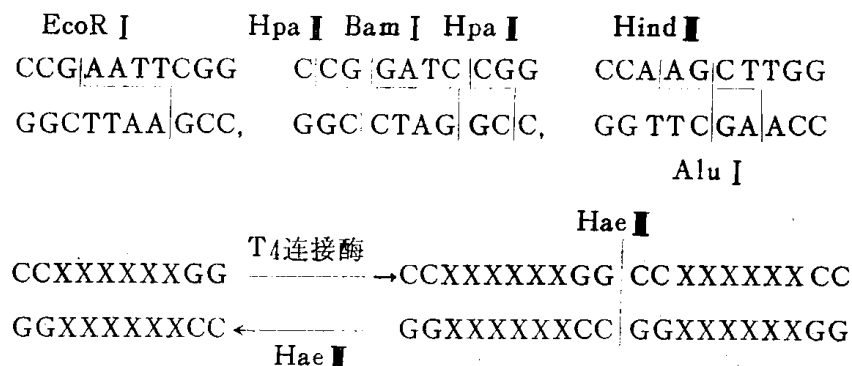
图1 利用Bgl I及Bam I切割外源DNA及载体后建成重组质体示意图

在DNA体外重组的研究中经常碰到一个问题即：感兴趣的DNA片段（如cDNA）不一定有限制性内切酶的识别序列。利用人工合成接头或者现有DNA片段上的限制核酸内切酶的切点，加在外源DNA片段或分子载体上，可使载体或外源DNA片段上创造出限制性核酸内

切酶的新切点，这样，可以克服所感兴趣的 DNA 片段上由于没有限制性核酸内切酶切点而带来分子无性繁殖的困难，还可以克服接尾法连接时难以从杂种质体上回收外源 DNA 片段的困难。这种限制性核酸内切酶识别序列的 DNA 片段称之为联接器或接头。有了联接器或接头可以使几乎所有的 DNA 片段能插入到现有的载体分子中去进行无性繁殖，也有助于建立新的分子载体，因此，它是 DNA 体外重组中一个具有普遍意义的重要工具。

创造限制性核酸内切酶切点的方法有二：

(一) 化学合成限制性核酸内切酶的识别序列，这种序列简称为人工接头，Schelles 报道了十核苷酸的人工接头。这些人工接头的核苷酸序列是



它们一共含有七个不同的限制性切点能被 23 个不同的限制性核酸内切酶切割。用平末端连接法将这些人工接头接在需要进行无性繁殖的外源 DNA 两端。在这个 DNA 片段上便具有限制性内切酶的新切点，然后用某一限制性内切酶处理，外源 DNA 片段便可与用同一酶切的载体进行联结形成重组质体分子，进行无性繁殖（图 2）。例如，在海胆精子的重复 DNA 的两端接上含有 EcoR I 切点的核苷酸十聚体的人工接头。然后用 EcoR I 切割，连结在（RSF-2124）质体上，在大肠杆菌中进行无性繁殖，得到大量的海胆精子重复 DNA，提供了进一步对真核基因组的重复序列研究的足够材料。Heyneker 将一个人工合成的含有 EcoR I 识别位点的 8 脱氧核苷酸片段加在一个人工合成的 lac 操纵基因（21 个碱基对的

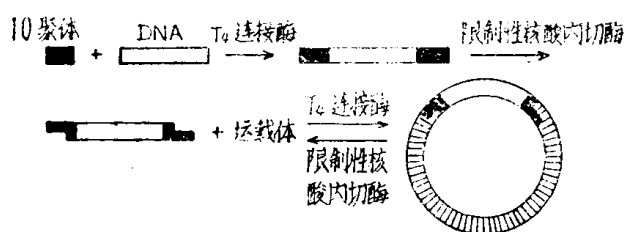


图 2 利用人工接头使 DNA 片段进行无性繁殖示意图

DNA)。然后用 EcoR I 切之。用粘着末端法连接在一个多拷贝的质体上，这个合成的 lac 操纵基因在大肠杆菌中进行无性繁殖。得到无性繁殖的 lac 操纵基因片段，并证明了人工合成的乳糖操纵基因具有正常的功能。生长激素释放抑制素（Somatostatin）、胰岛素基因成功地在大肠杆菌中表达，也都是人工接头成功地被应用而发挥巨大的作用的很好实例。

创造限制性核酸内切酶的第二个方法是：利用现有 DNA 片段上具有多个限制性核酸内切酶识别序列来作为联结器，例如 pSC101 质体上含有许多限制性核酸内切酶切点（如 EcoR I，Hind III，BamH I 及 Sal I），而且这些限制性酶切点彼此非常接近，它们位于一个长约 800 个核苷酸之内的 DNA 片段上，这个特点使得 pSC101 质体成为“联结器”的很好来源。如用 EcoR I 及 Sal I 这二个限制性内切酶来切 pSC101 质体，就可得到一个含 EcoR I，Hind III，BamH I 及 Sal I 四个切点的片段。将这个片段接在一个 DNA 片段上后，除了可将原来的无

酶切点的DNA片段变为有切点的外，还可把DNA片段上原来的限制酶末端直接改换为另一种粘着末端的载体上进行无性繁殖的条件（图3）。

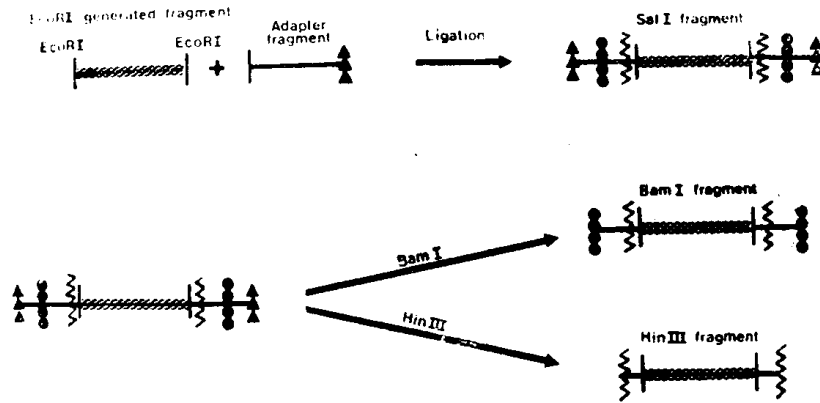


图3 在DNA无性繁殖中联结器的应用

同样，此连接器接在载体上亦可增加新切点，增加对新切点外源DNA片段无性繁殖的条件（图4）。此外，如切开B点后，用末端转移酶结尾法加入其他片段。仍有AA二切点，可用A酶切，回收片段。

3. 分子载体

分子载体的设计和运用是DNA体外重组的一个很重要环节。目前，将外源基因运送到原核中去的载体研究得很多，运送到植物和动物细胞中去的载体还处于比较初步的探索阶段。就原核载体而言，以大肠杆菌的质体(plasmid)和λ噬菌体应用最多最广。因此，建造新的载体包括扩大载体的来源和改造现有载体使之成为更理想的运载工具，是当前研究分子载体的一个重要方面。

作为分子载体，首先要考虑复制子这个基本特性。载体有三个基本条件：（1）有限制性内切酶的一个切点；（2）外来DNA插入后不破坏载体的复制；（3）最好有选择标记。但理想的载体还应从安全性、便于选择、易于制备、具有多种限制性内切酶切点、多拷贝、有利于外源基因表达等诸方面加以设计和建造。

从安全防护出发。选用质体作为载体时应注意的条件是：（1）非感染性；（2）不为传递性载体所诱动或极少诱动；（3）有较小的寄主范围；（4）不与寄主染色体发生重组；（5）具有条件致死突变、如温度敏感质体在哺乳动物正常体温下丧失复制能力。

为了区分受体和重组体表现型之间的区别，最好在质体上有这种的双重标记，即外源DNA片段能插到基因一个标记中去，这样，当外源基因插入后，这个被插入的标记便改变了原来的表型，称之为插入钝化(insertional inactivation)，插入钝化有利于直接选出重组后的杂种质体。

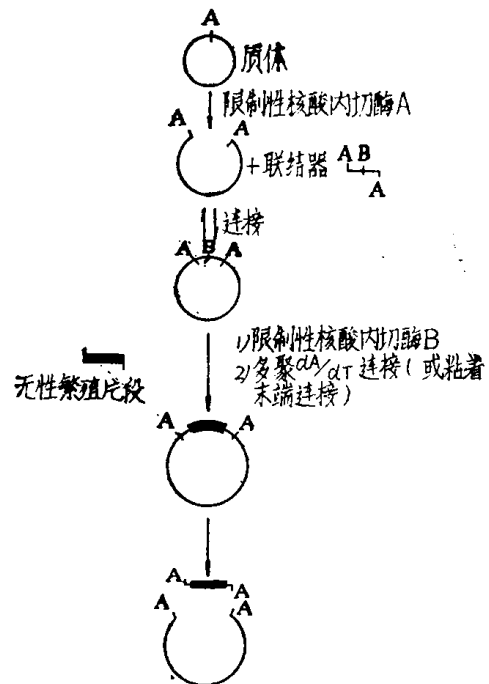


图4 利用连接器后可从运载体上回收外源DNA片段

应该指出,在改造质体分子载体方面,目前值得注意的动向是,围绕着外源基因的表达建造新质体,同时改造质体使它成为多用途的分子载体。

改建为多用途的质体载体主要是通过增加质体上限制性核酸内切酶的切点。例如,在RK 2 分子载体上加上TrpEP片段,既加上选择标记,又加上Bam I 及Hind III 切点。*mμ*噬菌体可随机插入至质体上,如随机插入至RK 2 质体上后,RK 2 DNA分子在不同位置上增加了限制性内切酶的切点,包括Hind III 及EcoR I 切点。使得RK 2 质体能对多种限制性内切酶切后的外源DNA片段进行分子无性繁殖。

为了研究外源基因的表达,应尽可能地除去质体上非重要的遗传区域。最大限度地减少质体本身所带的遗传信息。此外,一个结构基因插入至质体后,并不保证这个基因就能在大肠杆菌中正确地表达,插入的结构基因能否表达还依赖于调控系统,目前已经建成一些允许真核基因在细菌中表达的质体载体。

下面简介几个重要的质体载体:

pBGP120 质体:此质体的建成分二步,第一步是用基因工程的方法将 λ plac5上EcoR I 片段(含有大肠杆菌乳糖操纵子的操纵基因、促进子及半乳糖苷酶Z基因)连接在pSF2124 质体上;第二步是除去 λ DNA/pSF2124 接头处的EcoR I 切点。这样,这个质体既保持了ColE 1对外源DNA扩增的能力,又带有细菌乳糖操纵子的调控系统,同时只保留了靠近Z基因的一个EcoR I 切点,使外源DNA插入后受细菌操纵基因及促进子的调节转录。在这个质体载体分子上插入非洲蟾蜍(*xenopus laevis*) 28S的rDNA片段后,用分子杂交方法证明了,非洲蟾蜍28SDNA是通过细菌乳糖操纵子中的促进子起始通读,在转录水平上得到正确地表达。

ColE 1— λ trp48质体:这个质体是通过 λ trp48转导噬菌体的EcoR I 片段与ColE 1 质体连接而建成。这个质体的特点是带有 λ 噬菌体的高效促进子 P_L 。已经证明,利用此质体上的 λ 促进子使色氨酸结构基因得到正确地表达。 λ 噬菌体 P_L 促进子的效率比大肠杆菌的促进子高十倍。

pBR345质体:除了从细菌或噬菌体中得到有关调节系统(如促进子、操纵基因等)外,也可用人工合成的调节系统加至质体上。pBR345 质体就是一个含有人工合成的乳糖操纵基因的ColE 1衍生质体。这个质体还有一个重要特点是DNA分子很小,为原来ColE 1 质体大小的1/6,分子量为 0.7×10^6 道尔顿,是目前所研究质体中最小的一个质体。

pBR322质体:这个质体是由pBR313 质体衍生而来。建成此质体分四步骤:第一步是用体外重组方法由pSC101质体上Tc^r片段与pMB8质体建成pMB9质体,分子量为 3.5×10^6 道尔顿;第二步是从pSF2124 质体上通过氨苄青霉素易位子(TnA)易位至pMB9后建成pBR312质体,分子量为 6.7×10^6 道尔顿;第三步是pBR312质体经EcoR I 部分降解后连接成分子量为 5.8×10^6 道尔顿的pBR313质体,并除去TnA上Bam I 切点;第四步是用体外重组技术改造pBR313质体使之成为一个在Ap^r区域只有一个Pst I 切点的小质体。

pBR322质体目前是基因工程中一个很有用的分子载体。它具有理想载体的以下几个特点:(1) DNA分子小,分子量为 2.6×10^6 道尔顿;(2) 具有多个限制性内切酶切点,在pBR322的限制性图谱上已确定八个不同限制酶的36个切点的相对位置;(图5)是一个可供多种限制酶切的多用途的运载体工具;(3) 有Ap^r及Tc^r二个选择标记。值得注意的是:Pst I 酶的一个切点处在Ap^r基因之内,Bam I, Hind III 及Sal I 的一个切点处在Tc^r内。利用这个特点,易于选择Tc^rAp^s或Ap^rTc^s的重组体。我们体外建成的 λ -pBR322 重组质体就

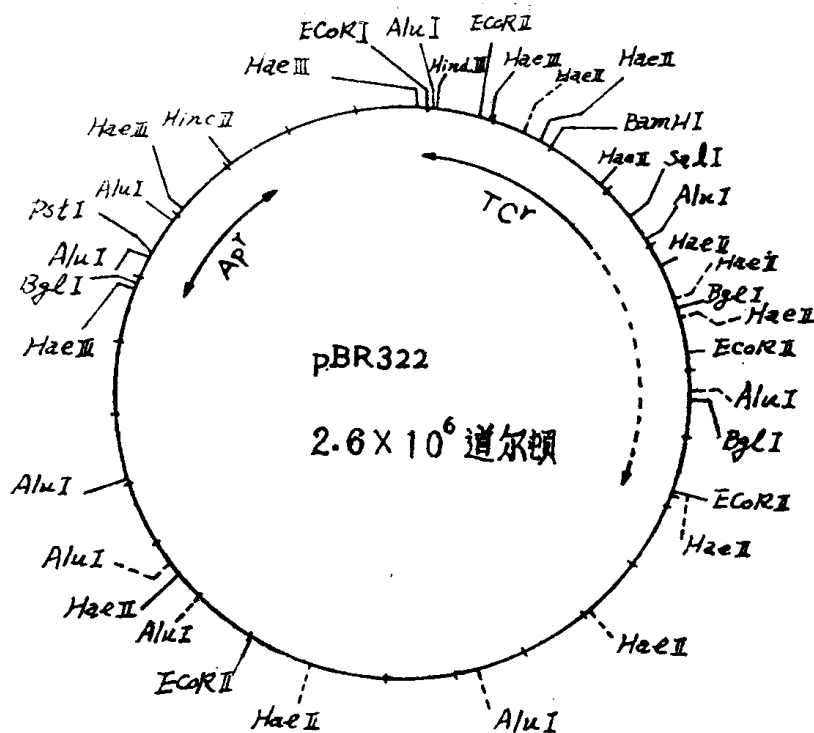


图5 pBR322质体的限制性图谱

是利用插入钝化的方法建成。

pUB110 等质体：从芽孢杆菌中分离质体，引起了许多研究者的重视。但根据最近报道，金黄色葡萄球菌中pUB110质体、pSA2100、pSA0501及pCM194质体能够直接转化至枯草芽孢杆菌的受体中去，转化的频率较高，每微克cccDNA的转化体约为 $10^4 \sim 10^5$ ，如用球形体-聚乙二醇方法 (Spheroplast-polyethylene glycol procedure) 时，转化频率高于10 转化体/微克DNA。这些质体在枯草芽孢杆菌中不仅能够复制，而且质体上的抗药基因也能表达，这是目前用在以枯草芽孢杆菌为受体的基因工程中的重要载体。pUB110质体分子量为 3×10^6 道尔顿，在这个质体上有Bam I、EcoR I、Xba I 及Bgl I 等酶的一个切点，这些切点不破坏抗性基因及质体复制位点。这个质体带有新霉素抗性及卡那霉素抗性基因选择标记，带这个质体的金黄色葡萄球菌 (RN2397) 抗新霉素的抗性水平为5 微克/毫升；抗卡那霉素的抗性水平为5 微克/毫升；用这个质体转化到枯草杆菌受体中时，也可用上述相同的抗性水平来选择。特别值得提出的是，在氯霉素存在的条件下它不能扩增，但在特定的ts菌株中可用来扩增基因，因为特定的ts突变株在非允许的温度下培养数小时后，该质体DNA的量几乎与染色体DNA量相同，这时质体拷贝数可达1000左右。此外，pUB110质体还有一些重要特性，诸如：它与芽孢杆菌属的一些质体是相容的，它在枯草杆菌中即令培养基中不含卡那霉素（或新霉素）也能相当稳定地存在。pUB110质体经EcoR I切后，与Bac. licheniformis, B. pumilus 及 B. subtilis 染色体DNA的EcoR I片段在体外构成杂种质体，转化到枯草芽孢杆菌重组缺陷E突变株中 (B. subt. SCR2165tryC3⁻thre⁻RecE) 用色氨酸基因的互补来选择，得到能互补色氨酸突变的分子无性繁殖系。除pUB110外，pCM194质体也作为分子载体应用于基因工程的研究中。在pCM194质体上编码着氯霉素抗性基因。经Hind III切后，与大肠杆菌pBR313或pBR312构成杂种质体。用这杂种质体转化至大肠杆菌中得到 Δpr^{cmr} 的无性繁殖系，转化至枯草杆菌中 cmr 的转化频率高达 10^6 转化体

表 5

常见的某些质体分子载体及其有关特性

质 体	在无氯霉素存在下 质体拷贝数	分 子 量 ($\times 10^6$)	单个切割位点的 限制 性 酶	质体的选择	杂 种 质 体 的 筛 选
ColE1	16	4.2	EcoR 1 Sma I Hinc II Sal I	对E1免疫性	不产大肠杆菌素E1
ColE1 衍 生 载 体	pSF2124	10	EcoR 1 Sma I Bam I	Ap	同 上
	pCR1	16	EcoR 1 Hind III	Km或E1免疫性 Elimm	同 上 Km ^s
	pVH51 (微ColE1)	60—125	EcoR 1	Elimm	—
	pML21 (pVH51Km)	60	Hind III	Elimm	Km ^s
	pJC301 (ColE1 _{ts})	1—3	EcoR 1	同 上	不产大肠杆菌素E1
	pJC307 (ColE1 _{ts})	10	同 上	同 上	同 上
	pJC701 (ColE1 _{rpoH})	10	Hind III或rif ^r	同 上	同 上
	pJC720 (ColE1 _{rpoH})	10	Hind III Sma I	Elimm或rif ^r	—
	pGM706	10	Sal I	Ap	Tc ^s
	pGM16	10	Bam I	Km	Tc ^s
	pMB 8 (微pMB1)	60	EcoR 1	Elimm	—
	pMB9	60	EcoR 1 Hind III Sal I Bam I	Tc或Elimm Elimm	Tc ^s
	pBR313	60	EcoR 1	Ap/Tc	—
	pBR315		Hind III Sal I Bam I Pst I	Ap Tc	Tc ^s Ap ^s
	pBR322	60	EcoR 1 Hind III Bam I Sal I Pst I	Ap/Tc Ap($\pm$ Tc) Tc	— Tc ^s Tc ^s Tc ^s Ap ^s

续 表

质 体	在无氯霉素存在 下质体拷贝数	分 子 量 ($\times 10^6$)	单个切割位点 的限制性酶	质体的选择	杂 种 质 体 的 筛 选
pBR312	60	6.7	EcoR I Hind III Hpa I Sal I Sma I	Ap/Tc	—
pBR317	60	5.4	Bam I EcoR I Hind III Hpa I Sal I Sma I	Ap/Tc	—
pBR320	60	1.9	Bam I Bgl I EcoR I Hind III Pst I Sal I	Ap ^r	—
pBR318	60	3.8	Bam I EcoR I Hind III Hpa I Pst I Sal I Sma I	Tc	—
pBR321	60	3.2	Bam I EcoR I Hind III Pst I Sal I	Tc ^r Ap ^r	
pBR333	60	1.2	Bgl I EcoR I EcoR I Hae I Hinc I Hind III Pst I	Ap ^r	
pBR341	60	5.1	Hind III Sal I	Kan ^r (op)	
pBR345	60	0.7	EcoR I Hae I	(op)	

续 表

	质 体	在无氯霉素存在下 质体拷贝数	分 子 量 ($\times 10^6$)	单个切割位点的 限制性酶	质体的选择	杂 种 质 体 的 筛 选
	pBR350	60	2.2	Bam I Hinc II Hind III Sal I	Tc ^r	
	pBR351	60	1.7	Bgl I Hae I Hinc II Pst I	Ap ^r	
R1d-rd19B2 衍生载体 F 衍生载体	Rsc10	35	13	EcoR I Hind III Bam I	Ap	—
	Rsc11	50	8	EcoR I Hind III Bam I	Ap	—
	pMF3 (微F _{AP})	2	7.5	Hind III EcoR I Bam I	Ap	—
	pSC101	5	5.8	EcoR I Sal I Bam I Hind III	Tc	—
λ 衍生 噬菌载体	λ dv	单体79 双聚体55 杂种8-12	4.7	EcoR I Bam I Hind III	λ imm	—
P 族 衍 生 载 体	RP1	3	38	EcoR I	Tc, Nm, Cb 或 Cm	—
	RP4	1—3	36	同 上	Tc, Nm, Cb 或 Km	—
	RP4- δ -1		28	同 上	Tc, Nm, Cb 或 Km	
	RK2		37.6	EcoR I Hind III Bam I	Km Ap Tc	
来自金 葡萄菌	pUB110	20—50	3.0	Bam I Bgl II EcoR I Xba I	Km ^r Neo ^r	以枯草杆菌 为受体

续 表

质 体		在无氯霉素存在下 质体拷贝数	分 子 量 ($\times 10^6$)	单个切割位点的 限制性酶	质体的选择	杂种质体的 筛 选
来自金葡萄 菌的质体载 体	pSAO501-Sm ^r	20—50	2.8	EcoR I Hind I Hind II Xba I	Sm	以枯草杆菌为 受体
	pCM194-Cm ^r	20—50	2.0	Hae II Hind II Hpa I	Cm	同 上
	pSA2100-Cm ^r , Sm ^r	20—50	4.69	EcoR I Hae II Hind I Xba I	Cm	同 上

/微克DNA,但是pBR质体上的Ap^r标记在转化体中未得到表达。类似的结果曾在pCD1杂种质体上也有过报道。pCDI质体是由pMB9质体和枯草芽孢杆菌 ϕ 3T噬菌体的thyP基因建成的一个杂种质体。这个杂种质体中的thyP基因不论在大肠杆菌中或在枯草杆菌中均很好地表达了功能,但pMB9上的Ap^r及Tc^r在枯草杆菌中未能表达。关于为什么大肠杆菌质体上的Ap^r或Tc^r在枯草芽孢菌中不能表达的原因,尚待进一步研究。

表5列出目前常见的某些质体载体及其有关的特性。

除质体外, λ 噬菌体也是一个很重要的分子载体,利用 λ 噬菌体作为外源DNA分子无性繁殖的载体其主要的优点是对这个噬菌体累积了深入广泛的生化和遗传知识,借助这些丰富的知识有利于对它进行操作,有利于发展特殊的 λ 分子载体来满足不同DNA片段分子无性繁殖的需要。

λ DNA上有五个EcoR I切点,6个Hind III切点(图6)。 λ 作为载体必须是改造后的 λ 噬菌体,不是野生型的 λ ,同时,必须把位于 λ 基因组中为增殖所需的基因区域内的切点去掉,留下非增殖区域内的切点,同时,例如 λ gt10C(或 λ gt10B)不同于野生型 λ :(1)、它们的DNA比野生型 λ 基因组短;(2)、EcoR I切点的4及5被保护,因而不在此处被EcoR I切割;(3)、在nin5区域有缺失;(4)、它由于缺少C片段,因此不能组入到细菌染色体中,不能重组。

λ 分子载体有二种类型:(1)、置换型载体。 λ DNA中央非重要区域由外源DNA所置换。在 λ 噬菌体基因组的中央,有1/3的DNA可以被外源DNA置换,而不损害它裂解生长的能力(图7)。(2)、插入型载体:是利用染色体上有重要缺失的噬菌体来进行。Hind III有一个切口在 λ 的C I基因内,外来DNA的Hind III片段插入至C I基因中进行分子无性繁殖时,由于C I基因是产生阻遏蛋白的基因,插入外源DNA片段破坏了C I基因,则可利用噬菌斑形态学上的改变,从混浊的亲本噬菌斑中区分出重组体清晰的噬菌体。比起插入型载体来置换型载体所容纳的外源DNA片段更大一些。但总的说来,使用 λ 噬菌体作载体时,外源DNA片段的大小有一定的限制,小于 λ 基因组的75%,小于基因组的109%均不能形成斑。因此外来DNA片段加入后不能小于75%,大于109%。这点,与质体不同,因为能够插入到质体中去的DNA片段大小不受任何实际的限制。

现已建成一些适合用作分子无性繁殖高等生物基因的 λ 噬菌体载体, 诸如Charon噬菌体及 λ gtWES噬菌体等。

最近有人利用经改造后的 λ 载体, 使大肠杆菌连接酶产量提高500。

利用 λ 噬菌体cos位点已建成一系列的cos mid作为新的运载体。含有 λ 噬菌体cos位点并能够被 λ 噬菌体所包裹的质体通称为cosmid。已建成的这些cosmid可运载由Xma I、Bgl I、Bam I、Hind III、Pst I、Kpn I、Sal I及EcoR I等酶切割的外源DNA片段。cosmid载体在氯霉素存在条件下可扩增到细胞DNA总量的50%。利用cosmid已得到大肠杆菌的“基因库”, 每微克E. coli DNA可得 5×10^5 的无性繁殖系。

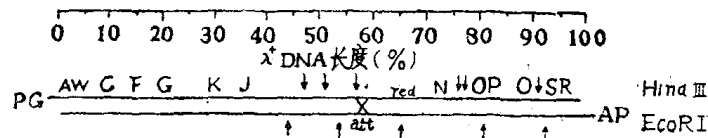


图6 λ 噬菌体基因组上EcoR I及Hind III切点

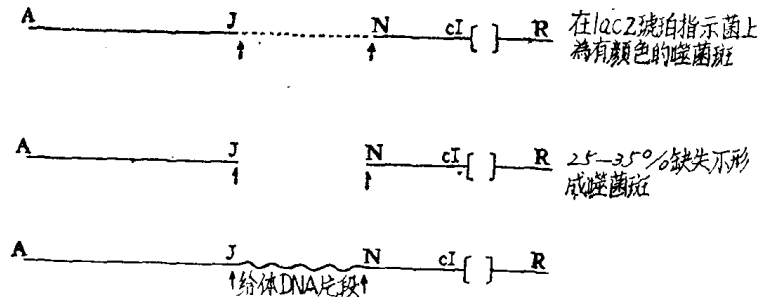


图7 置换型 λ 噬菌体载体

除 λ 噬菌体外, 小的丝状噬菌体M13及fd也可作为运载体将外源DNA运送至大肠杆菌中。M13噬菌体DNA的天然形式是单链环状DNA分子, 约6300个碱基对。经噬菌体感染后的细胞产生大量的超线团的复制型(RF)分子, RF分子类似一个多拷贝的质体。已经知道在M13的RF型DNA上的某些位置经外源DNA插入后不破坏该噬菌体的重要功能。以M13 RF为载体时, 大约可插入12000碱基对的外源DNA。已应用M13复制型DNA来无性繁殖E. coli乳糖操纵子的片段(乳糖操纵子的调控区域及部分 β 半乳糖苷酶基因)。由于M13具有上述的生活周期的特点, 无性繁殖的杂种DNA可以单链DNA或双链DNA的形式而收获之。为了使M13具有选择标记, 可用基因工程方法建成带有卡那霉素抗性的分子载体。最近报道, RSF2124质体上Tn3(氨基青霉素抗性的易位子)易位至M13噬菌体基因组复制区的附近。

将外源基因运送到高等生物细胞中去的分子载体目前为数极少。把外源基因运送至高等植物细胞的载体除根癌病农杆菌Ti质体外, Landridge报道了一个由花椰菜花叶病毒(CMV)DNA和假单胞菌质体构成的杂种质体分子, 在细菌中以及植物细胞中均能繁殖。pBR313质体可插入至豇豆植物原生质体以及细胞核中去。这类有易位基因的大肠杆菌质体, 引起人们的重视是无疑的。最近Fernandez SM等报导pBR313和pCB1构成的重组质体DNA在胡萝卜叶肉原生质体的核中能稳定地保持45小时。

将外源基因运送至动物细胞中去进行无性繁殖的分子载体以SV40病毒研究得较为成熟,

这是因为第一，SV40 的遗传及物理图谱比较清楚；第二，对它的复制和转录研究得也较多，第三，能够组入到寄主染色体中；第四，在猴肾细胞中形成斑，易于检测。

野生型SV40的DNA分子量为 3.2×10^6 道尔顿。现已建成一些小的缺失SV40DNA 并用来作为分子载体。Berg等用 *Hpa* I 及 *Bam* I 相继切SV40 基因组后，从晚期基因区域除去约2000碱基对的DNA，建成了含有复制区的一个小型的SVGT-1 载体。Hamer用EcoR I 及 *Hpa* I 切SV40DNA 后，得到一个具有 3700 碱基对的SV40缺失株的分子载体，通过粘着末端连接法将大肠杆菌酪氨酸转移 RNA 的抑制子 ($tRNA^{Tyr-su^+}$) 插入至它原有的晚期基因位置，并和SV40 早期基因突变株一起混合感染猴肾细胞后，能增殖数代并且对细菌DNA 进行了转录，得到正确的转录产物。

最近报道，由SV40 病毒转化的人细胞株 GM637，与鼠细胞株融合后产生体细胞杂种，在此体细胞杂种中 SV40 基因组稳定地插入在人染色体 8 上面。这方面的研究进展将更进一步促使SV40病毒作为高等动物分子载体的研究。

在高等生物细胞中存在着线粒体、叶绿体这类染色体外的遗传因子，对于这些细胞器的结构、功能及遗传等方面作了许多研究，但是它们是否能用来作为高等生物的分子载体目前尚不清楚。迄今为止，基因转移到真核生物上去还没有成功的报道，基因在真核生物细胞中如何表达是当前生物学上面临的重要课题，同时，研究外源基因运送至高等生物细胞中去进行无性繁殖的分子载体也是极为关键的问题。

三、DNA 体外重组的理论和实践意义

生物学中有许多重大理论问题长期无法解决，例如，从一个受精卵开始怎样发育成组织器官一应俱全的个体以及细胞如何病变等等。重要原因之一是：以往要对高等生物细胞中的基因进行分析，在技术上有很大的困难，以致很少能把哺乳动物基因所在的位置精确地定下来，很少了解它们在染色体上如何编码，也很少了解基因之间相互关系以及它们如何控制性状的表现。换句话说，什么基因，在什么地方，什么时候，起什么作用，如何起作用等等这些基础理论的研究将直接有助于阐明单个细胞、某种组织或器官如何分化发育以及肿瘤发生的遗传机制等一系列重大问题。

遗传工程技术为解决上述基础理论提供了有效手段，首先是它能直接从生物细胞中分离出所需要的基因（特定的 DNA 片段），并通过扩增，获得大量的同质基因。这种方法在生物学史上是前所未有的。有了这种方法不仅能够把生物的一个基因从成千上万个基因中分离出来，并大量繁殖，而且更重要的是，运用繁殖后的 DNA 片段既有利测定基因在染色体上的位置，也有利于分析其结构和功能。

我们知道，染色体的主要信息储存在它的核苷酸序列中，由于有了基因工程技术使得特定DNA片段得以分离和扩增，同时结合Maxam 和 Gilbert及Sanger的核苷酸序列分析的方法，可将特定DNA片段加以迅速和准确地定序。

基因的核苷酸序列分析对于增进遗传密码知识的了解、对于生物进化方面的研究，对于突变和选择理论的探索等均有重要意义。最近十年来，由于 DNA 核苷酸序列的分析，使基因概念有新的进展和重要突破。例如：（1）基因的重迭性的新概念：30年以前对基因的认识，认为一个基因一个酶，后来发展为一个基因一个多肽，最近对 ϕ X174 和 SV40病毒核苷酸序列分析，发现一个基因的密码子可全部在另一基因里；（2）基因的游动性：以前认为基