

生物学研究概说

遗传工程

——DNA 克隆技术

[英] D. M. 格洛弗 著



科学出版社

内 容 简 介

本书为J. M. 阿什沃恩主编的《生物研究概说》丛书之一。内容包括体外DNA重组技术的酶学、质粒运载体、 λ 噬菌体运载体、克隆的DNA在大肠杆菌中的表达、高等真核生物细胞染色体DNA克隆片段的物理鉴定法、真核系统基因表达的研究途径等。

D. M. Glover
Outline Studies in Biology
GENETIC ENGINEERING
—CLONING DNA
Chapman and Hall 1980

• 生物研究概说 •
遗 传 工 程
——DNA 克隆技术
〔英〕D. M. 格洛弗 著
李 载 平 译
责任编辑 蒋伯宁

科 学 出 版 社 出 版
北京朝阳门内大街 137 号

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

*

1986年1月第 一 版 开本: 787×1092 1/32

1986年1月第一次印刷 印张: 3 5/16

印数: 0001—4,500 字数: 69,000

统一书号: 13031·3026

本社书号: 3999·13—10

定价: 0.82 元



缩 写

Ap ^r	青霉素抗性
Ap ^s	青霉素敏感
Cm ^r	氯霉素抗性
Cm ^s	氯霉素敏感
Kb	千碱基——即单链核酸的1,000个碱基或双链核酸的1,000个碱基对
P _L	λ噬菌体的左向启动基因
P _R	λ噬菌体的右向启动基因
P _R '	λ噬菌体的右向晚期启动基因
P _{re}	λ噬菌体的建立溶原态 (lysogeny) 的启动基因
P _{rm}	λ噬菌体的保持溶原态的启动基因
SV ₄₀	猿猴病毒40
Tc ^r	四环素抗性
Tc ^s	四环素敏感

目 录

引言.....	v
第一章 体外DNA重组技术的酶学.....	1
1.1 限制性核酸内切酶	1
1.2 用DNA连接酶连接限制性酶切片段.....	2
1.3 通过同聚物的尾端连接DNA	9
第二章 质粒运载体	13
2.1 pSC101	13
2.2 ColE1	14
2.3 带有抗药性标志的 ColE1 衍生质粒.....	15
2.4 质粒运载体系统的生物防护	20
2.5 含有特异核苷酸顺序的质粒的筛选	22
第三章 λ 噬菌体运载体	25
3.1 λ 噬菌体的生物学.....	25
3.2 噬菌体运载体	28
3.3 晚期基因——它们在克隆运载体中的应用	33
3.3.1 噬菌体装配	33
3.3.2 生物防护	35
3.3.3 利用体外包装法提高重组体的回收率	36
第四章 克隆 DNA 在大肠杆菌中的表达	40
4.1 用质粒运载体克隆DNA的表达.....	40
4.1.1 大肠杆菌营养缺陷型的互补作用... ..	40
4.1.2 新生多肽表达的检测	41
4.1.3 脊椎动物基因在大肠杆菌中的表达	43
4.2 λ 噬菌体启动基因的表达.....	52
第五章 高等真核生物染色体 DNA 克隆片段的物理	

鉴定法.....	56
5.1 克隆的DNA 在其染色体源出点上作图.....	56
5.1.1 原位杂交	56
5.1.2 体细胞杂交	60
5.2 电泳图谱技术	60
5.2.1 限制性酶切图谱	60
5.2.2 凝胶转移杂交法	63
5.2.3 转录体的图谱	66
5.3 用电镜作克隆DNA 的图谱.....	68
5.3.1 变性图谱	69
5.3.2 异源双链图谱	70
5.3.3 RNA 同源区的图谱	71
第六章 真核系统基因表达的研究途径	80
6.1 离体变异	80
6.2 表达系统	82
6.2.1 酵母中的克隆	82
6.2.2 用猿猴病毒40作克隆运载体	85
6.2.3 哺乳动物细胞的直接转化	90
6.2.4 克隆 DNA 进入爪蟾卵母细胞的微 量注射法	91

第一章 体外 DNA 重组技术的酶学

1.1 限制性核酸内切酶

目前DNA分子之所以能够很容易地在体外连接,是由于应用了限制性核酸内切酶的结果。这类酶可以识别DNA上的特异顺序,然后切断双链中的每一条链。在很多原核细胞中发现有这类酶的存在。它们似乎是负责把外源DNA分子降解,而本身的DNA则受到修饰酶的保护而免于被降解,这修饰酶通常是甲基化酶。限制性核酸内切酶是负责宿主控制的噬菌体的修饰现象的,这是五十年代初首先有人提出的〔见参考文献1的综述〕。假若一个曾在大肠杆菌K株繁殖过的 λ 噬菌体,再使其感染大肠杆菌B株,则感染过程的效率是非常低的。但由此感染产生的噬菌体再感染大肠杆菌B株就效率很高。可以检测出有三个基因位点(loci)控制此系统: hsdS、hsdM和hsdR。有一个控制此系统专一性的多肽是由hsdS决定的。hsdM的基因产物是一修饰酶,在切断核酸的过程中,它也与hsdR基因的产物,即限制性核酸内切酶相互作用。在上述例子中,从K株生长出的噬菌体,可能在对K型限制-修饰系统专一的位点被修饰。在大肠杆菌B细胞的第一个感染周期中,用B型限制-修饰系统发现没有B型修饰,便将此感染的DNA降解了。但是有一小部分分子被B型修饰系统甲基化。这些分子在另一感染周期中便可免于被限制而存活下来。当你把离体重组的未经修饰的外源DNA引入大肠杆菌时,必须牢记有此现象存在。为了使这些分子能保

存下来，受体菌株必须是 *hsdS* 或 *hsdR* 基因缺失的。

大肠杆菌的 B-K 型限制修饰酶系统被命名为 I 类酶：它们需要 Mg^{+} ，S-腺苷甲硫氨酸和 ATP 作为辅助因子。它们虽然识别 DNA 上的一些专一性位点，但是并不在这些位点切断它^[2]。已发现第二类的限制性核酸内切酶只要求简单的辅助因子，而且就在专一性顺序上或其附近切断 DNA。这些专一性顺序通常只有数个核苷酸长，并围着中心的核苷酸对呈旋转对称性。已经由广泛种类的原核微生物中抽提出这 II 类酶，它们在 DNA 克隆中十分有价值。

Roberts^[3] 已经发表了一个这类酶和其识别顺序的详尽的表。让我们只看看其中最常用的一些限制性核酸内切酶的识别位点。一般来说，这些酶切断 DNA 产生的切口常带有 5' 磷酸基和 3' 羟基末端。有些时候，在两条链上的切口是错开的，因为识别顺序的对称性，就产生一对有相互粘合性的末端。在质粒上编码的大肠杆菌 *EcoR* I 酶就是这类酶的一个例子，它切在 GAATTC 顺序的 G 和 A 残基之间（参看图 1.1）。在 *EcoR* I 的作用下，伸出的单链末端为 5' 末端。其它的酶，如由 *Providencia stuartii* 抽提出的 *Pst* I 是错位切口，所产生的单链末端为 3' 末端。另外有些酶，如由嗜血杆菌 (*Haemophilus aegypticus*) 得到的 *Hae* III，它产生平头末端。II 类的限制性核酸内切酶为我们提供了用以解析简单基因组或解析由复杂基因组得到克隆片段的手段。在第五章，我将综述介绍限制性核酸内切酶在这方面的应用。在本章则将着重于这些酶在 DNA 离体重组过程中的应用。

1.2 用 DNA 连接酶连接限制性酶切片段

离体 DNA 重组中最广泛使用的方法是利用能使 DNA

产生相互粘合末端的限制性核酸内切酶。这种切开方式是 Mertz和Davis^[4]首先发现的，他们用电镜表明 EcoR I 切过的 DNA 在低温时即趋于环化。他们进而证明利用大肠杆菌 DNA 连接酶可将粘性末端共价键地接起来，他们还可由细菌质粒 λ dvgal 和 SV40 DNA 构建得到重组DNA分子。

表 1·1 常用的产生粘性末端的限制性核酸内切酶

酶	微 生 物	切 开 位 点
BamH I	(解淀粉)芽孢杆菌 (<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H)	G↓GATCC
Bgl I	芽孢杆菌 (<i>Bacillus globigii</i>)	A↓GATCT
EcoR I	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i> RY 13)	G↓AATTC
Hind III	流感嗜血杆菌 (<i>Haemophilus influenzae</i> Rd)	A↓AGCTT
Mbo I	牛摩氏杆菌 (<i>Moraxella bovis</i>)	↓GATC
Pst I	<i>Providencia stuartii</i> 164	CTGCA↓G
Sal I	白色链霉菌 (<i>Streptomyces albus</i> G)	G↓TCGAC

现在已知有一些酶可以产生粘性末端(表1·1)。已经报道有些噬菌体或质粒运载体可用许多这类酶所产生的 DNA 片段，进行克隆。这些酶中，有些其识别顺序具有共同的中心四核苷酸。例如 BamH I、Bgl II 和 Mbo I。因此，虽然这些酶对 DNA 具有不同的识别位点，但它们都产生同样的单链5'末端，因而这一组酶中由不同的酶所产生的片段相互连接。经限制性核酸内切酶酶切产生的任何生物的DNA片段，其末端的同一性正是使各种不同来源的 DNA 能够退火粘合并进而连接起来所需要的性质。这个克隆途径的一般原理如图 1·1 所示。这是将果蝇 (*Drosophila*) DNA 的 EcoR I 片段克隆进入细菌质粒 pSC101 的一个例子。在某些实验中，这种方法的无选择性的连接可能是个缺点。例如，假若一个人想构建一个 DNA 分子，希望其中的酶切 DNA 片段要按一特定

次序排列而重新产生一个转录单位时，就是这种情况。有一个可能克服这个问题的办法，但是尚未看到广泛的应用。这就是将 DNA 用一种酶，像Hga I 这种酶来切，然后再退火粘合。这酶的识别顺序是 GACGC，但是它并不在此位点切断 DNA；而是在距离此识别位点以外的依次为第五和第十核苷酸处产生错位的单链切口。这样所产生的一组酶切片段，各有独特的粘性末端，因此它们只能以一个特定的次序重新组装起来。

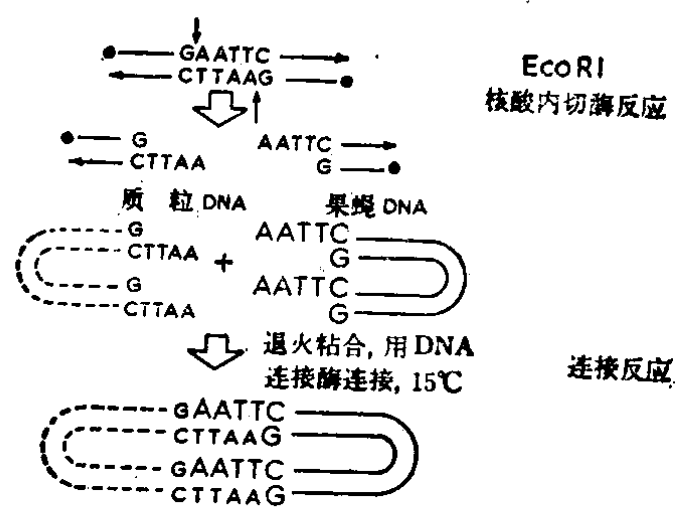


图 1·1 用DNA连接酶连接 EcoR I 片段

DNA连接酶具有将DNA上的单链缺口封合起来的生理功能。这DNA要具有5'磷酸基和3'羟基末端，这DNA可以由复制叉上的不连续性所产生的，也可以是在修复过程中产生的。为了将限制性酶切片段用共价键连接起来，有两种酶是最常用的，即大肠杆菌的连接酶和T4噬菌体编码的酶。大肠杆菌的酶用NAD作为辅助因子，而T4酶用ATP。但不论是哪种辅助因子，都作用于酶的赖氨酸残基上的 ϵ -NH₂基使之腺苷酸化。然后DNA的5'磷酸末端被酶-辅助因子复合物作用而腺苷酸化。最后形成了一个磷酸二酯键同时释放出一个AMP（图1·2）〔5〕。由T4感染的大肠杆菌纯化得

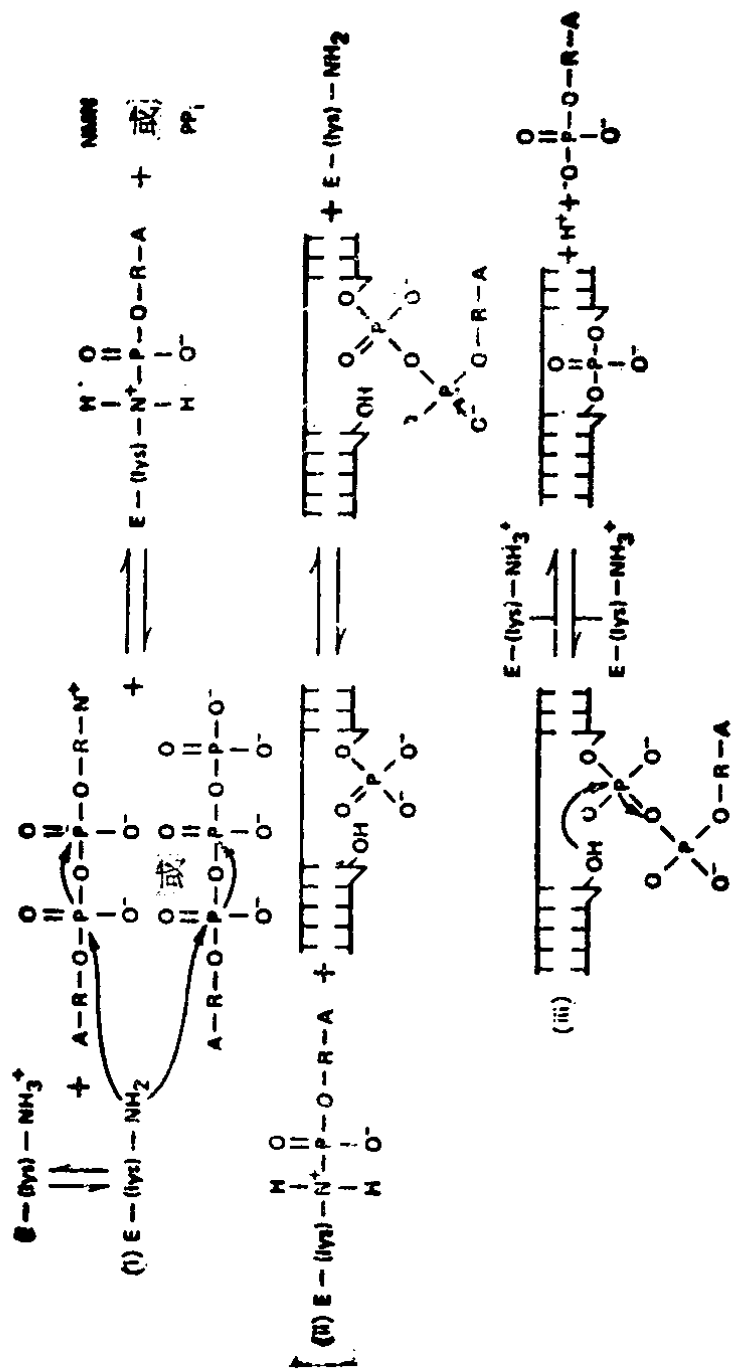


图 1·2 DNA连接酶反应的机制 (选自参考文献[5])

到的酶使用得最为广泛,因为它更容易制备,而且不同于大肠杆菌的酶,它有商品供应。T4酶还有另外一个优点,就是在高浓度的酶和 ATP 存在下,它也可以把有些由限制性核酸内切酶所产生的完全碱基配对的‘平头末端’的 DNA 片段连接起来。这时,被连接的分子不是通过双方粘性末端之间的氢键而拉到一起的^[6]。把 T4 酶的基因克隆到 λ 噬菌体运载体上,而使此酶很容易制备(见第四章)。

通过限制性核酸内切酶产生的粘性末端,将外源 DNA 与质粒运载体连接起来的方法,有一个主要的缺点,这便是质粒运载体有一定的频率的自身环化。这可导致在转化菌落中出现很多只含有运载体质粒造成的‘背景’。这个缺点可以用细菌的或小牛小肠的碱性磷酸酯酶去处理经限制酶切过的质粒,以除去其 5' 末端的磷酸基团而得到克服。这样,质粒的两个末端就不可能被 DNA 连接酶共价键地连接起来。外源 DNA 的限制性酶切片段并不用磷酸酯酶处理,因此它们的 5' 磷酸基团可以与质粒的 3' 羟基共价键地结合。结果就可以得到一些杂合分子,在其每个连接位点上,运载体和外源 DNA 都是只有一条链相连接,而另一条链上则有一个 3' 和 5' 羟基的缺口。这样的分子可以引入细菌细胞,然后在细胞中这些缺口再修复起来。

利用限制性酶切位点进行 DNA 连接的另一主要缺点时常会出现,当你的兴趣是要克隆一个大的多肽链编码顺序或要克隆染色体 DNA 的一个大片段,而其中却含有若干个酶切位点的时候。早期解决这个问题一个办法是将 EcoR I 部分酶切的染色体 DNA 克隆进入细菌质粒^[7]。这是一个很费事的技术,因为部分酶切的产物和连接起来的 EcoR I 片段都必须仔细地测定其分子大小,以便把它们与含有酶切片段寡聚体的克隆区别开来,而寡聚体中的这些片段原来

在染色体上并不相邻。Maniatis 他们由高等生物的基因组建立了克隆 DNA 的‘库’ (图1·3)。虽然这个早期方法中的一些其它缺点,在Maniatis 及其同工作者使用过的一般方法中已加以校正^[8],但这种仔细测定分子大小的步骤是无法回避的。在生物体的基因组中限制性酶切位点的分布并非是随机的,而是由核苷酸顺序的功能排列决定的。因此,如果用 EcoR I 这样的内切酶去切断 DNA 而进行克隆的时候,就会有某些 DNA 要由重组体的池中选择性的丢失。为了克服这个可能发生的问题,Maniatis等^[8]用Hae III和Alu I 部分酶解染色体 DNA 来取得随机打断的片段。这两个酶的识别位点分别为四核苷酸顺序GGCC和 AGCT。它们切断DNA产生平头末端。在 DNA 中 专一性四核苷酸顺序存在的频率要比专一性的六核苷酸顺序高得多。因此任何 DNA 片段中含有这两个酶之中的某一酶的切点的可能性是非常大的。然后将此部分酶切的 DNA 用速度沉降分级,选出 20Kb 的片段, 将之克隆进入可以接受 EcoR I 片段的 λ 噬菌体。为达到此目的,可将化学合成的、带有 EcoR I 识别顺序的寡聚核苷酸加到 Hae III

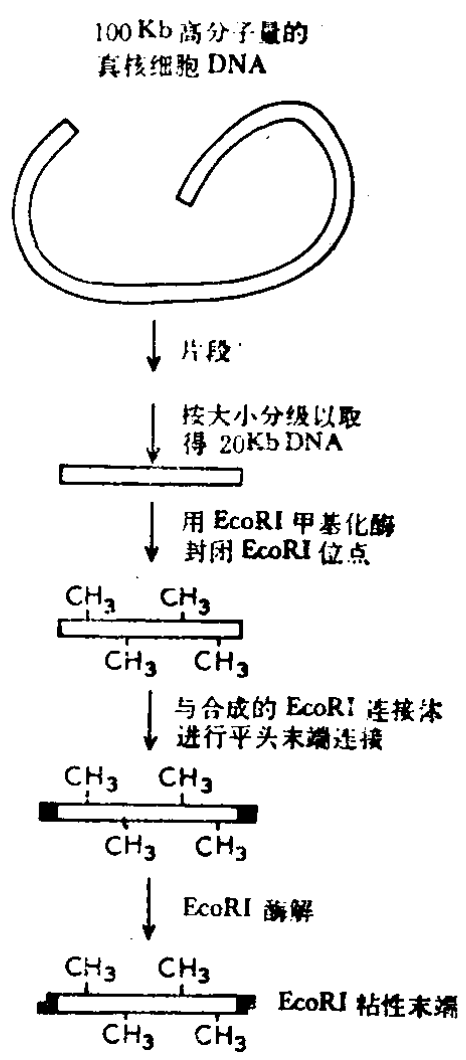


图 1·3 将连接体加合到随机切断的染色体 DNA 上(根据参考文献[8]重新绘制)

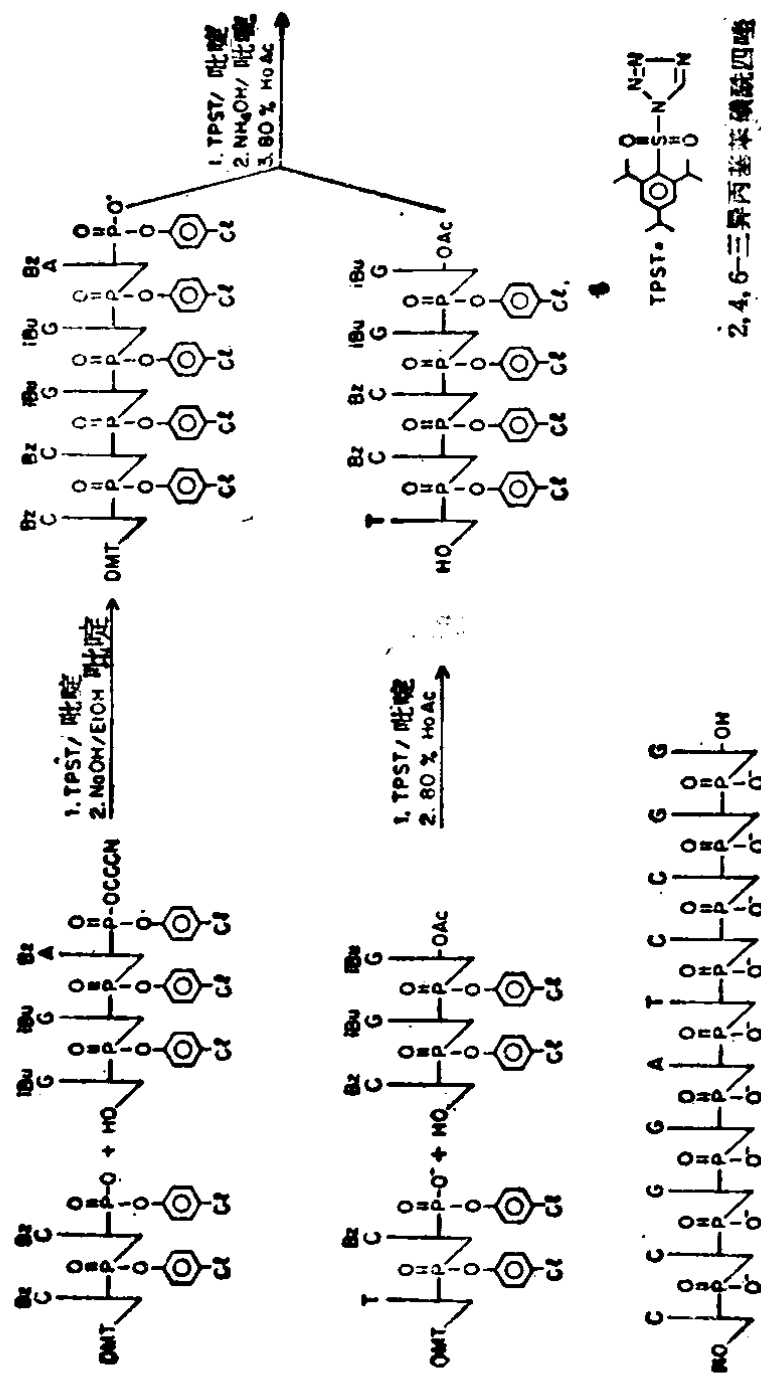


图 1.4 BamHI 连接体化学合成流程图 (选自参考文献[10])

三酯法合成的原理包括了将5'保护的单核苷的3'羟基磷酸化, 再使之与一个3'保护的核苷的5'-一级羟基进行缩合反应。缩合剂为三异丙基苄基磷酸四唑 (TPST) [13]。DMT 是 4,4 双对甲氧三苯甲基 (4,4 dimethoxytrytyl) 的5'保护基团; CCCN- β -氰乙基保护3'磷酸基团的, Ac (乙酰) 是保护3'OH 基团的。详细的合成方法可见参考文献[10-13]。

和Alu I产生的平头末端上。这些‘连接体’是由10个残基构成的自身互补顺序、他们自身退火粘合形成‘平头末端’的十聚体，再用T4连接酶把它们接到20Kb DNA上。然后用EcoR I酶解，即可在20Kb DNA片断上产生EcoR I粘性末端。为了避免在此步切断染色体DNA内部的EcoR I位点，这些DNA片段在加上‘连接体’之前，要先用EcoR I甲基化酶加以修饰。

已经合成了一些十核苷酸和十二核苷酸的连接体，它们带有能产生粘性末端的多种限制酶的识别顺序^[9,10]。图1·4是为BamH I位点使用的连接体的化学合成示意图。很多这类‘连接体’目前都有商品供应。在使用现有运载体进行专一性DNA片段的克隆时利用‘连接体’，增加了很多灵活性。

1·3 通过同聚物的尾端连接DNA

Jackson等^[14]应用Lobban和Kaiser^[15]的技术所作的实验进一步激发了DNA重组热。他们的技术首先被Wensink等^[16]成功地应用于制造一个能自动复制的杂合质粒（图1·5）。这个方法仍然是利用限制性酶在一个专一的非必需的位点上将环形质粒切开。但是供体DNA可以用不同的技术打断。在这个例子中果蝇（*Drosophila melanogaster*）DNA是用流体力学的剪力打断的，产生的片段为15—20Kb。准备进行连接的线形分子先用 λ -外切酶处理。此酶可由双链DNA的5'磷酸末端，连续地切去脱氧单核苷酸，而留下单链的3'OH末端。暴露出的3'OH末端是小牛胸腺末端转移酶的良好引物。这酶可将一个个的脱氧腺苷酸和脱氧胸苷酸的同聚物的残基分别加到不同分子上。然后将

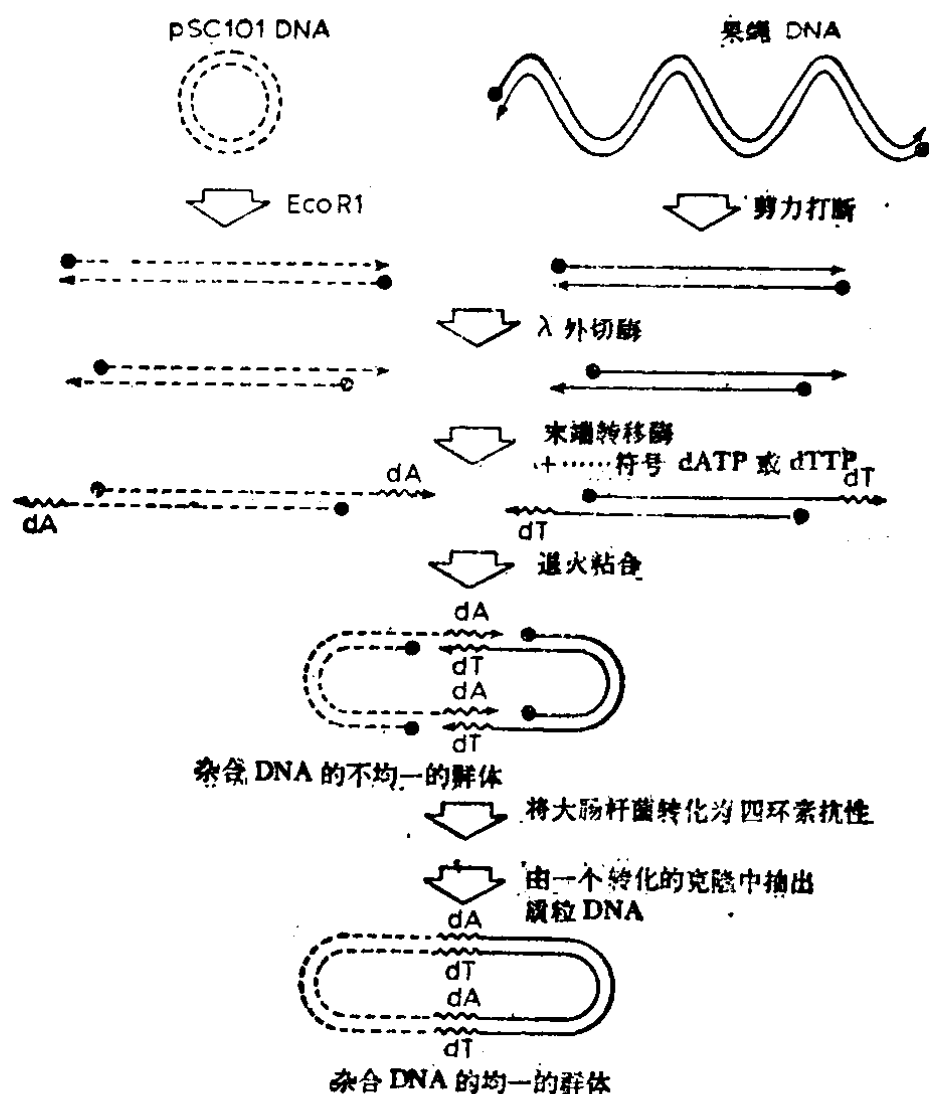


图 1.5 同聚物接尾法技术(选自参考文献[6])

两种 DNA 样品混合并退火粘合，此时它们将通过不同的同聚物尾巴之间的氢键而接起来。按 Lobban 和 Kaiser^[15] 原来的方法，下一步要求外切酶 III、DNA 聚合酶 I 和 DNA 连接酶的协同作用，而将这些分子再共价键地接起来。这个步骤被 Wensink 等^[16] 大大简化了。他们把氢键结合的分子直接引入大肠杆菌，然后根据运载体质粒 pSC101 的特性，筛选四环素抗性的转化体。Roychoudhury 等^[17] 报告了进一步简化的方法。在末端转移酶的反应中，他使用钴代替镁作为二价离子，这样即可能将同聚物的尾巴加到未经 λ

外切酶处理的 DNA 分子上。

用这个连接方法克隆染色体 DNA 的优点是不会有非选择性的连接，不会把来自非邻接区段的 DNA 片段连起来；同时它还可以应用于随机打断的 DNA 片段。还有，具有单链延伸的同聚物运载体质粒 DNA 不能自身环化，结果几乎全部由用这种方式连接起来的 DNA 所转化的细菌都含有杂合分子。这个方法的一个缺点是难以把克隆进去的 DNA 片段由杂合质粒上切出，而与运载体 DNA 分开。有时候，这可以用SI酶消化来完成，因为SI切单链DNA，可以攻击富有AT区段的松散双链。

按照同样的实验步骤也可将多聚脱氧鸟苷酸和多聚脱氧胞苷酸的尾巴加到DNA分子上。若将多聚 dG 的尾巴加到经

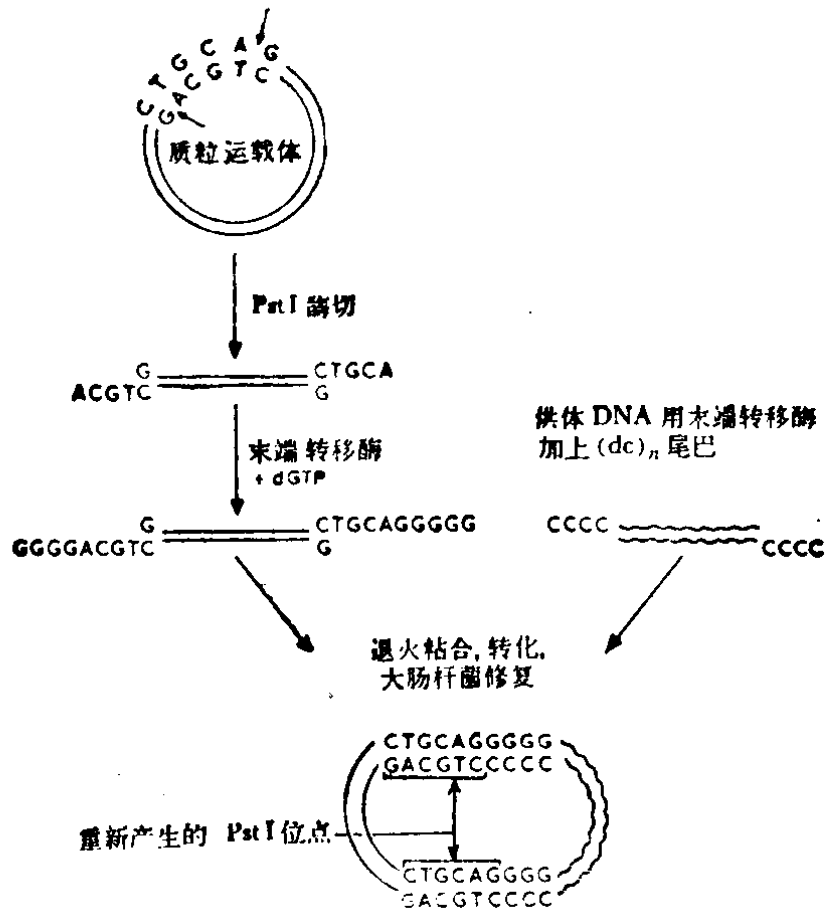


图 1.6 用 dG:dC 接尾法重新产生 Pst I 位点

Pst I 酶切的运载体质粒上, 则在这样的质粒中克隆的、带有多聚dC尾巴的 DNA, 常可用 Pst I 酶将其切出, 因为在这个连接过程中又重新产生了 Pst I 位点 (图1•6)。

参 考 文 献

- [1] Arber, W.(1965), *Ann.Rev.Microbiol.*19, 365.
- [2] Meselson, M., Yuan, R., Heywood, J.(1972), *Ann. Rev. Biochem.*41, 447.
- [3] Roberts, R.J.(1980), *Nucleic Acids Res.*8, r63.
- [4] Mertz, J.E.and Davis, R. W.(1972), *Proc. natn Acad.Sci. USA* 69, 3370.
- [5] Lehman, I.R.(1974), *Science*186, 790.
- [6] Sgaramella, V.and Khorana, H.G.(1972), *J.mol.Biol.*72, 493.
- [7] Glover, D.M., White, R.L., Finnegan, D.J.and Hogness, D.S. (1975), *Cell* 5, 149.
- [8] Maniatis, T., Hardison, R.C., Lacy, E., Lauer, J., O'Connell, C., Quon, D., Sim, G. K. and Efstratiadis, A.(1978), *Cell* 15, 687.
- [9] Bahl, C.P., Marians, K.J., Wu, R., Stavinsky, J. and Narang, S.(1977), *Gene* 1, 81.
- [10] Scheller, R.H., Dickerson, R.E., Boyer, H.W., Riggs, A. D. and Itakura, K.(1977), *Science* 196, 177.
- [11] Itakura, K., Katagiri, N., Bahl, C. P., Wightman, R. H. and Narang, S.A.(1975), *J. Am.chem.Soc.*97, 7327.
- [12] Katagiri, N., Itakura, K. and Narang, S.A.(1975), *J. Am.chem. Soc.*97, 7332.
- [13] Stavinski, J., Hozuni, T. and Narang, S. A.(1976), *Can. J. Chem.*54, 670.
- [14] Jackson, D.A., Symons, R.M. and Berg, P.(1972), *Proc. natn Acad.Sci.USA* 69, 2904.
- [15] Lobban, P. and Kaiser, A.D.(1973), *J.mol.Biol.*78, 453.
- [16] Wensink, P.C., Finnegan, D.J., Donnelson, J.E. and Hogness, D.S.(1974), *Cell* 3, 315.
- [17] Roychoudhury, R., Jay, E. and Wu, R.(1976), *Nucleic Acids Res.*3, 101.