

传热工程

〔美〕A·M·恰克拉巴蒂 主编

078
356

遺 傳 工 程

〔美〕 A. M. Chakrabarty 主 編

姚志建 呂宝璋 馬賢凱 譯

馬 立 人 校

V. 90/23



人 民 卫 生 出 版 社

A

865278

内 容 简 介

遗传工程是近年来人工改造生物方面开始取得成功并正获得巨大发展的一个新兴的研究领域,将为医药学、生物学、遗传学、农业科学和某些工业研究开拓广阔的革命性的发展前景。在我国科学发展规划中列为重点项目之一。

本书共分十章,全面扼要地介绍了遗传工程的基本技术方法和最新进展,并讨论了这些技术方法的优缺点和适用范围。此外,从美国Bethesda研究实验室1979年产品说明中摘译了一些主要工具酶、载体及限制性内切酶作用图谱等实用的参考资料。全书附有近1000篇文献。可供医药学、生物学从事遗传工程的科研人员及教师参考。

GENETIC ENGINEERING

Editor

A. M. Chakrabarty

CRC Press, Inc.

1978

遗 传 工 程

[美] A. M. 恰克拉巴蒂 主编

姚志建 吕宝璋 马贤凯 译

人民卫生出版社出版

(北京市崇文区天坛西里10号)

四川新华印刷厂印刷

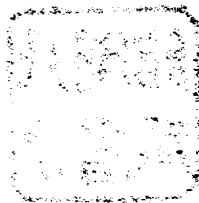
新华书店北京发行所发行

787×1092毫米16开本 15 $\frac{1}{2}$ 印张 345千字

1981年6月第1版第1次印刷

印数: 1—10,350

统一书号: 14048·3929 定价: 1.60元



译 序

遗传工程又称基因工程，是七十年代分子生物学中发展迅速的新领域，具有重大的理论和现实意义，并且看来具有巨大的发展前景。我们在学习这方面资料的过程中，看到了这本由浅入深、理论和实际操作两方面都有比较全面介绍的册子，觉得对初学者很有帮助，遂将它译成中文。同时，我们又从美国Bethesda研究实验室的1979年产品说明中摘译了一些主要的工具酶、无性繁殖载体如质粒和噬菌体及其限制性内切酶作用图谱等较有用的参考数据，作为附录列于书后，以供从事遗传工程科研和教学人员参考。

由于我们在这一领域中还是初学者，国内在这方面采用的专业名词又颇不一致，故译文中难免会有不少不当甚或错误之处，敬请读者批评指正。

本书部分译稿承中国科学院生物化学研究所李载平教授在百忙中给予审阅，并对不少专业名词的译法予以指导，谨表衷心感谢。

序

在过去的几年中，我们对遗传现象的分子基础的了解有了巨大的进展。重组DNA技术问世后，目前已有可能将真核细胞和原核细胞基因的各种片段引入细菌或培养的哺乳动物细胞中。脱氧寡核苷酸化学合成技术的改进和它们在细菌细胞中无性繁殖的成功，使我们已经能够利用这类细菌生产人的激素，并无疑地将可以看到用微生物生产其他具有生物活性的动物蛋白获得成功的报告。初期的对于含重组DNA的有害微生物因偶然事故而扩散以致引起巨大的生物学危害的恐惧，正在逐渐平息。这主要是由于目前已有证据排除了致病特性会不受限制地进入非致病菌的可能性。

本书的主要目的是要使读者熟悉遗传工程研究的基本概念。书中详细阐述了通用的操作技术、限制性酶和载体的本质以及新发展的其他宿主-载体系统。着重介绍了各种可转移因子的功能和无性繁殖哺乳动物信使RNA的DNA拷贝的技术。讨论了未来的重组DNA技术在基因疗法中的作用，以及社会的、道德的和伦理的问题，使读者对这一领域的研究前景有较广泛的了解。作者希望本书不仅能帮助读者了解遗传工程的发展，而且能激发读者的兴趣，为使这一研究领域对人类所具的巨大潜力得以实现而努力。

A. M. Chakrabarty

目 录

第一章	基因的分子无性繁殖——一般操作	1
第二章	λ 噬菌体用作研究重组DNA的载体——优点和缺点	36
第三章	cDNA顺序的无性繁殖——在细菌细胞中扩增	
	真核细胞基因的一项通用技术	61
第四章	质粒无性繁殖载体	91
第五章	限制性酶及其在基因工程中的应用	120
第六章	由插入成份和转座子在体内形成重组DNA分子	128
第七章	枯草杆菌无性繁殖系统的发展	153
第八章	分子无性繁殖在基因治疗中应用的可能性	168
第九章	遗传工程的社会和政治问题	175
第十章	通过天然质粒转移而进行的微生物遗传工程——某些有	
	代表性的好处与生物学危险性	195
附录一	工具酶	204
附录二	分子无性繁殖的载体	226
附录三	几种载体DNA的限制性内切酶作用图谱	228
索 引		233

第一章 基因的分子无性繁殖——一般操作

R. B. Helling和M. I. Lomax

目 录

一、引言	2
二、一般操作	3
(一) 切割和连接DNA 片段	3
1. 切割DNA	3
2. 通过互补单链末端之间的氢键连接DNA分子	4
3. 通过共价键连接DNA分子	5
4. 环与多聚体的形成	6
5. 连接操作的比较	6
6. 连接接头	7
(二) 无性繁殖载体	7
1. 噬菌体载体	7
2. 质粒载体	7
(1) 质粒的生物学	9
(2) 质粒中的无性繁殖基因	10
(3) 纯化质粒DNA	11
3. 可能用于真核细胞的载体	12
(三) 转化作用	12
(四) 分离与纯化拟进行无性繁殖的DNA	14
1. 利用物理学差别从总体DNA分离特异的基因	14
2. 用互补RNA分离特异基因	16
(1) RNA指导的DNA合成	16
(2) 利用核酸杂交性能的层析方法	16
(五) 带有无性繁殖片段的质粒的稳定性	17
(六) 基因库	18
(七) 目标无性繁殖系的选择、检定及鉴定	19
1. 直接检定具特异基因的无性繁殖系	19
(1) 遗传学方法	19
(2) 原位杂交	19
(3) 原位免疫分析	20
2. 无性繁殖系和特异基因的间接富集法	20
(1) 用密度差进行分级分离	20
(2) 按大小进行分级分离	20

(3) 同胞选择.....	20
3. DNA片段数目、大小和次序的测定.....	20
参考文献.....	23

一、引言

人们对大肠杆菌及某些病毒基因的结构、组织和功能的认识，已发展到远远超过对较高等生物基因的认识。这多半是因为细菌和病毒的基因组比较简单，而且小片段DNA的精确遗传操作也仅能用于细菌和病毒。大肠杆菌这种保持选定的外源基因（不管其来源如何）的能力，应当能使这些对大肠杆菌有用的尖端遗传学方法也可应用于任何生物^{1-4a}。但由于种种原因，迄今尚未能做到这一点。

有几方面的障碍阻碍着不同种属间遗传信息的交换。根据定义，较高等生物的交配仅限于同种属各成员。在个别细菌种属中，转化作用（将外界DNA分子引入细胞的能力）是一种熟知的现象；然而，包括大肠杆菌在内的许多细菌，正常情况下并不发生转化。即使能够转化，外源DNA也必须来自同一菌株，否则该DNA将被宿主细胞内的位点专一性限制性核酸内切酶所降解⁵。这些核酸酶能识别DNA中特异的核苷酸顺序，并在这些识别位点上或它的附近切割DNA。含有这种核酸酶的细胞，也含有一种能在核酸酶敏感位点内进行甲基化以修饰新合成的DNA链的甲基化酶（限制性甲基化酶）。任何一根DNA链的甲基化都可使它免遭核酸酶的作用。由于外源DNA在同样的顺序中一般都未经甲基化，故在同核酸酶相遇后就被切割。EcoR1核酸酶似被封在细胞膜外的胞外质中，外源DNA尚未进入细胞就在这里被消化⁶。在真核细胞尚未发现限制和修饰系统。

必须克服更多的困难，才能使外来的DNA稳定地保持于细菌细胞之中。在转化过程中，进入受体细胞的DNA片段，必须结合到“复制子”中去才能被复制。复制子是指任何能自我复制的DNA分子，例如染色体、病毒或质粒。此种掺入作用几乎总是取决于与该复制子中同源部分的基因交换（重组）；非同源DNA不能被交换到复制子中去^{7, 8}。而且，基因交换需要很多专一性重组酶的活性。

近几年来，这些对基因交换的障碍已有所克服。新的操作使科学家们能在体外将非同源DNA加到小的复制子（质粒或病毒）上，并将扩大的复制子转移到细菌细胞中。当细胞生长时，所加入的DNA就被作为复制子的一部分保留了下来⁹。这些操作称之为重组DNA技术，或基因的分子无性繁殖。

基因的分子无性繁殖归功于下列发现：（1）许多限制性酶，它们在特异的位点切割DNA，留下单链的互补末端——粘性末端，由后者将来源完全不同的DNA连接起来¹⁰⁻¹²；（2）用于大肠杆菌的一项转化操作¹³。分子无性繁殖包括下列步骤（图1）：

1. 将目标DNA片段从供体生物的总DNA上切割下来，除去其他无用的片段。另一种方法是在下一步中，将接受目标DNA的细胞从其他细胞中分离出来；
2. 通过其互补末端，将该DNA片段连接到复制子上；
3. 将含有所加入的DNA的复制子转移到一细胞中；

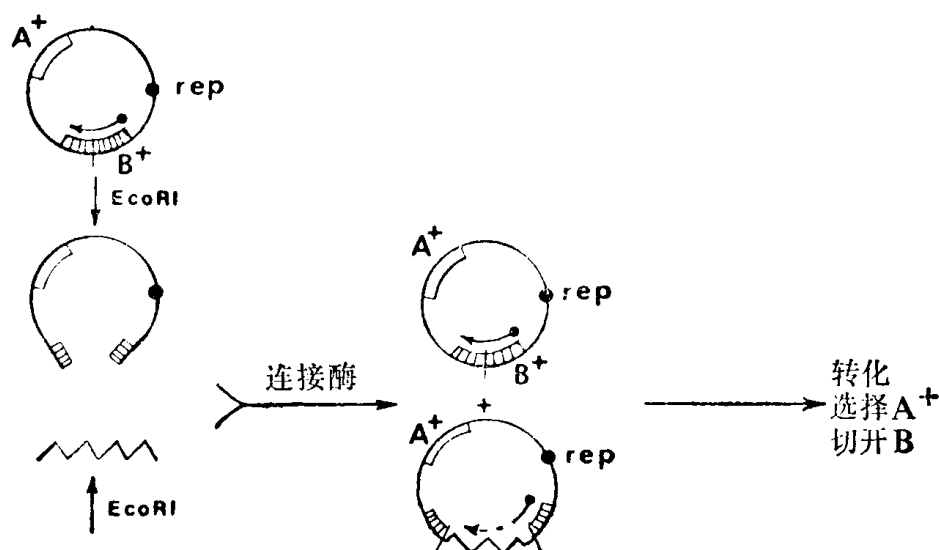


图1 用质粒作无性繁殖载体进行基因的分子无性繁殖

复制子的位置以rep标出。通过基因A来检定并选择含有质粒的细胞。它相当于pSC101中的耐四环素决定子、colE1中的耐大肠杆菌素决定子及pSF2124中的耐氨苄青霉素决定子。基因B代表在无性繁殖操作中失活的一种基因，例如colE1和pSF2124中产生大肠杆菌素的基因。pSC101中等价基因的功能尚未经过鉴定。如图所示，在基因B启动子上所始动的转录作用，可经过所插入的DNA继续进行，这就使得缺少启动子或虽有启动子但未被宿主细胞识别的外源基因能够表达。

4. 分离那些接受了并保持着该复制子的细胞，如系病毒，则通过病毒噬菌斑的出现鉴定该复制子；

5. 验证所需要的外加DNA确已存在。

DNA片段无性繁殖的优点在于：

1. 可以从用常规物理或化学法难以分级分离的DNA复合混合物中，分离出单独的DNA片段；
2. 可以大量和高纯度地制造无性繁殖基因及其产物；
3. 采用大肠杆菌遗传学家已掌握的技术，可以在单纯的大肠杆菌细胞中研究来自任何生物的基因；
4. 在哺乳动物及其他生物细胞中能建立对一限定的小片段DNA进行基因操作的遗传系统。

本章将叙述涉及分子无性繁殖的一般操作。在完成某一特殊步骤时，若有一种以上的技术可资利用，则将它们相对的优缺点加以比较。

二、一般操作

(一) 切割和连接DNA片段

1. 切割DNA

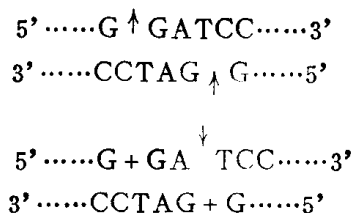
除非很当心，在制备过程中，大多数DNA随机地被断裂成分子量为 $1 \sim 40 \times 10^6$ 的片段。将小心制备的DNA进行有控制的切裂，则能够得到具有一定大小的适于无性

繁殖的较大的DNA片段^{14, 15}。在大多数情况下, 我们要求不是任意地而是在限定的位点上切割DNA, 从而产生独特的不同片段, 这才是有利的。许多位点专一性限制性核酸内切酶可用于此目的(见本书, K. Murray)^{16, 16a}。有几种酶对无性繁殖DNA片段特别有用, 因为它们产生最大的切割片段, 并制造错开的切口, 这对于分子的连接是很重要的。这些酶的识别顺序列于表1。

表1 产生错开切口的限制性核酸内切酶的DNA顺序专一性

酶	专一性	来源
BamH1	5' G ↓ GATCC 3'	液化芽孢杆菌H
Bgl11	5' A ↓ GATCT 3'	球芽孢杆菌
EcoR1	5' G ↓ AATTC 3'	大肠杆菌RY13
Hind111	5' A ↓ AGCTT 3'	流感嗜血杆菌Rd
Sal 1	5' G ↓ TCGAC	白色链霉菌G
Xma 1	5' C ↓ CCGGG 3'	棉角斑病黄杆菌

注意: 仅列出互补DNA链中的一条。对每一个酶来说, 识别位点是对称的, 互补链上的这一点也是相同的。↓指示切断点。兹以BamH1为例, 说明互补链也被切断:



每一识别顺序由六对碱基组成。如果碱基是随机分布的, 那末在消化含有50%G-C碱基对的大分子DNA时, 就应产生平均有4096个碱基对、长度为4.1kb*的片段。实际上, 平均片段的大小是不同的, 因为: (1) DNA的G-C组成可大于或小于50%; (2) 邻近的碱基顺序能影响专一性¹⁷⁻¹⁹; (3) 切割顺序的分布是非随机的。Bam H 1及Sal1产生最大的切割产物, 其平均大小为6和8 kb。其他识别较短顺序的限制酶, 如所预料, 产生较小的片段(见本书, K. Murray)。

2. 通过互补单链末端之间的氢键连接DNA分子

分子可以由氢键接合, 但接头最终需由共价键固定。连接可在体外完成; 不然, 分开的分子或经氢键接合的分子, 也必须在被摄取后由细胞加以连接^{9, 14, 15}。如果在转化以前(而不是在体内)已完成连接, 则转化成功的复制子的回收率更高。

实际上, 通常是通过其单链的粘性末端将DNA片段接合, 并由DNA连接酶以共价键将其闭合。互补末端可由两种不同的途径形成: 一是加接一定的单链顺序(同聚体接尾); 二是用限制性酶切断, 形成错开的切口, 并产生粘性末端。

第一种操作是Lobban和Kaiser²¹及Jackson等²²所发展的(图2)。如果在只有一种核苷三磷酸存在下进行反应, 则得自小牛胸腺的末端转移酶能催化双链DNA上单链同聚体接尾的形成²³。因此, 可将多聚dA接尾加接至一种DNA, 而将多聚dT接

* kb = kilobase pair, 千碱基对。

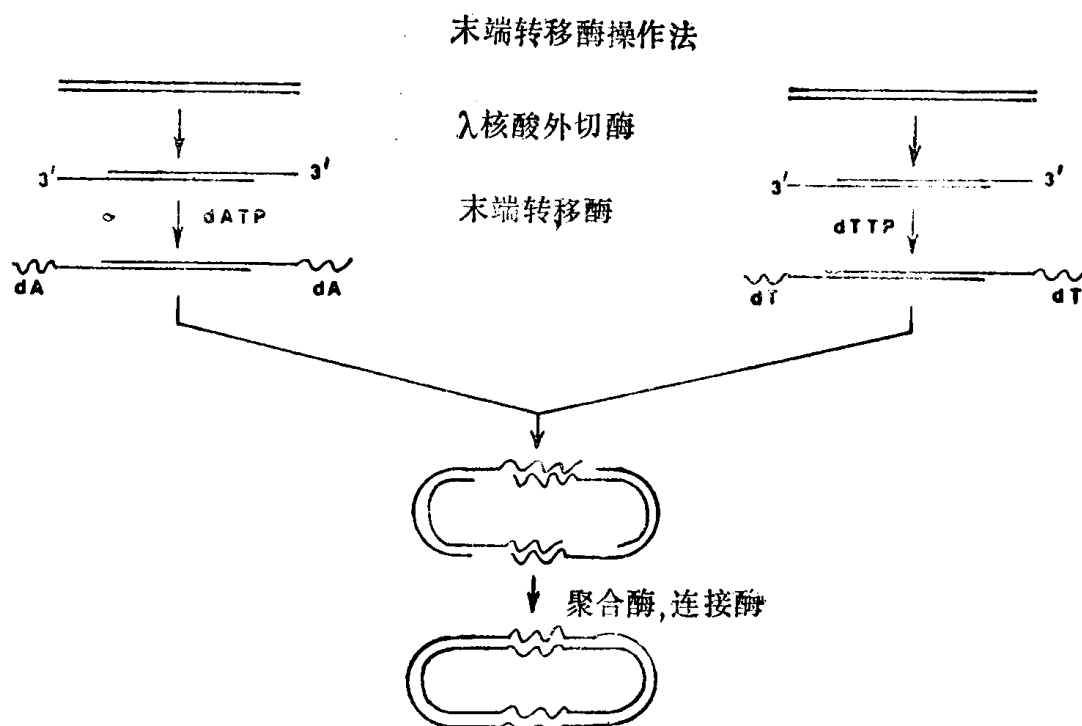


图2 通过多聚dA和多聚dT互补单链末端连接DNA片段

尾加到另一种DNA上。然后, 将这两种DNA通过其互补末端接合。若其顺序含 40个或更多的核苷酸, 则接合是十分稳定的; 而且, 该杂交分子勿须在体外连接就能用于转化^{21, 23a}。

末端转移酶可依次地将脱氧核苷酸加到一条DNA链的3'-OH端。通常, 在以 Mg^{++} 作为辅助因子时, 底物必须有一条含有三个或三个以上碱基的3'单链延伸部分, 才能加接核苷酸。这种延伸部分, 是用λ-核酸外切酶切割双链DNA的5'-末端而产生的^{21, 22} (大多数造成错开切口的限制性酶都产生5'-末端单链而不是3'-末端单链为终止端的DNA片段)。新近发现, 若以 Co^{++} 代替 Mg^{++} 为辅助因子时, 钝端DNA或具有5'-单链末端的DNA, 可作为末端转移酶的引物²⁴, 而不必用核酸外切酶消化。

产生粘性末端的第二种操作, 包括用一适宜的限制性核酸内切酶处理天然的双链DNA。表1所列的每一种核酸酶都切割一对称的核苷酸顺序(回文)。因为该顺序是特异而又交迭的, 那末, 由任何一种限制性酶所产生的DNA片段, 都可通过其相同而又互补的末端连接起来。随后, 可用DNA连接酶将接头牢固地闭合。

EcoRI产生的粘性末端之间所形成的氢键连接的熔解温度(T_m)为 $5 \sim 6^\circ C^{11}$ 。 T_m 为杂交区碱基组成的函数, 并随着G-C含量的增加而上升。可以预期, 由XmaI产生的末端所形成的连接, 比由EcoRI产生的末端的连接更为稳定(T_m 较高)。当然, 交迭部分的碱基对越多, 配对就越稳定。

3. 通过共价键连接DNA分子

如果有两条链都配对在同一模板上, 则DNA连接酶能催化其中一条DNA链的3'-OH末端与另一条链的5'-磷酸末端的共价连接²⁵。因而, 该酶能够闭合像氢键结合的粘性末端那样的单链断裂。已有两种类型的DNA连接酶经过了充分的鉴定²⁵, 并广泛用于无性繁殖DNA分子。从大肠杆菌提取的连接酶, 需NAD为辅助因子; 而如同得自较高等

生物的连接酶一样， T_4 连接酶需ATP为辅助因子。除修复单链断裂外， T_4 连接酶尚能连接已排列在互补DNA模板上的RNA和DNA链。第三种酶，即RNA连接酶，能将单链DNA分子连接在一起，将RNA分子连接在一起，或者将RNA分子与单链DNA分子连接在一起^{26, 26a}。

Sgarbani发现了 T_4 连接酶的另一种不曾预料到的特性²⁷。该酶能连接“平齐”(碱基完全成对的)末端(钝端)的DNA双链，虽然较它闭合单链切口时的速率要低得多。平齐端连接是相当重要的。因为它可以使缺乏粘性末端的DNA得以连接。也就是说，不论用两种不同的限制性酶切割，还是用不能造成错开切口的限制性酶切割，所得到的DNA片段都不必加接单链的“接尾”，就能够加以连接。必要时，可先用DNA聚合酶将末端不平齐的双链补齐，然后由连接酶连接。

4. 环与多聚体的形成

一个末端接头可以是分子内的(形成环)，也可以是分子间的(连接不同的DNA分子)。这两种类型连接的相对速率取决于DNA的浓度及片段的长度^{28, 29}。高浓度DNA分子有利于分子间连接。然而，环状DNA分子所产生的转化效率要比线性DNA大得多³⁰。因此，在高浓度DNA下将DNA片段连接之后，往往须将混合物稀释到可优先进行成环的浓度。双链DNA的刚度阻碍无规卷曲片段那样大小(或更小一些)的片段的成环作用²⁸(无规卷曲片段约为260个核苷酸对，不过它的大小是离子强度的函数)。另一方面，可以预料，当DNA分子长度增加时，因为它的两个末端彼此相遇的可能性减小，成环的速率随着降低。由于此种倾向，以及转化作用明显依赖于大小的倾向^{4, 31}，长DNA片段的无性繁殖就不如短片段有效。

5. 连接操作的比较

连接由限制性酶产生的具有粘性末端的DNA片段，是目前常用方法中最简单的一种。而且，用这种方法制成的、并在适宜的宿主细胞中无性繁殖了的杂种分子，以后还可以用同样的酶切割，以再生原来的DNA片段。这种特性在检定无性繁殖的DNA片段，并将其纯化以作进一步研究或操作中，是十分有用的。

另一方面，无性繁殖完整基因的能力，取决于在该基因内是否出现一限制性靶位。如有这种靶位，则仍有可能无性繁殖由核酸酶不完全消化或由偏端霉素(distamycin)³²存在时消化所产生的较长分子中的基因。此外，也可以用另一种不同的限制性酶。

用 T_4 连接酶所催化的末端连接法很简单，而且能适用于比通常限制性酶处理后所得到的片段更长的DNA分子。倘若切割不发生在特异的顺序上而是随机地进行，每一基因在某些片段上将是完整的，因而能被无性繁殖。任何两个双链DNA分子都能被连接起来，而不论其末端的碱基顺序如何。末端接合，在无性繁殖特定的、化学合成的DNA顺序时尤为重要，因为不能指望在这种顺序上再加接额外的碱基对，例如加接启动子或特异的限制酶切割顺序^{33, 34}，或者接合不同的限制性酶所产生的片段³⁵。平齐端连接的一个缺陷，在于无性繁殖后不能分离已连接的片段，以获得与连接前相同的分子。

末端转移酶处理法很有用，因为它：(1)可连接很长的DNA片段；(2)能连接不论何种末端碱基顺序的DNA分子；(3)限于连接不同来源的分子。如果粘性末端足够长，即或不在体外连接，也能获得相当高产的转化体。一个缺点是，不容易回收那些与原始供体生物无性繁殖所得到的片段相同的片段。只能回收末端改变了的原始DNA³⁶，然

而，在特殊情况下，供体DNA不经改变也能回收^{16,35}。在制备DNA过程中所导致的单链断裂能产生更多的问题：末端转移酶不但向DNA分子的真正末端添加核苷酸，同样也把核苷酸添加到这些断裂的部位；如果再将这种DNA无性繁殖，则在断裂的部位可发生缺失、添加或取代。

6. 连接接头

为把其他的DNA加到一适宜的无性繁殖载体上去，业已用化学法合成了短的、特定顺序的聚核苷酸作为连接接头。例如，EcoR1的靶顺序就可作为连接接头与“另一”DNA钝端连接，然后将其与一无性繁殖载体的EcoR1末端相连接。用这种方法，曾把一个两端为EcoR1位点的、合成的lacO顺序插入到pMB9质粒中³³。当需要的时候，邻接的EcoR1位点使lacO顺序很容易地从质粒上移除。化学合成的lacO区也曾通过稍许不同的步骤无性繁殖过^{34,37}。很可能在不久的将来，可以得到具有启动子、操纵子、核糖体结合位点、新的限制性位点等等各式各样的供无性繁殖的连接接头，在它们的两侧接有EcoR1或其他末端。

(二) 无性繁殖载体

1. 噬菌体载体

用细菌病毒作为接受和传送无性繁殖基因的载体，将在本书其他章节中详加讨论³⁸。马里兰州贝塞斯达国立卫生研究院（NIH）业已核准了一种 λ -衍生物，可用于需要严格生物防范的实验（表2， $\lambda \cdot 1$ ）³⁹；并建成了精心设计的用以进行无性繁殖基因的其他 λ -衍生物^{38,40,41}。正在努力发展其他可用于重组DNA实验的细菌-病毒宿主系统（见本书，F·Young）。

图3描绘了在 λ 衍生物中进行基因无性繁殖操作的梗概。将拟进行无性繁殖的DNA在体外与 λ DNA连接；把这种重组DNA插入细菌细胞中，在其中形成有功能的病毒颗粒。要把 λ DNA成功地包装到 λ 头部中去，需要 λ DNA末端及一总长度相当于野生型 λ 染色体大小的75~109%的DNA⁴²⁻⁴⁴。目前，常用的 λ 载体都没有非必需DNA，以增加可供添加DNA的容量。能接受14kb以下DNA的插入载体，或能接受19kb以下DNA的取代载体，都可以利用（表2）。

2. 质粒载体

一经发现在EcoR1核酸内切酶作用下会产生含有粘性末端的DNA片端，立刻就提出了一种连接来源完全不同的DNA的手段。选择大肠杆菌 λ -噬菌体作为加接外源基因的复制子的理由是显而易见的。它是一种较小的病毒，曾作过广泛的遗传学与生物化学研究。然而，EcoR1能在五个点上切割 λ 。多位点切断就产生了这样的问题：新DNA应如何加接到 λ 基因组上，而同时保持必需 λ 基因于其固有的关系中。这个问题，最终通过除去某些EcoR1限制性位点及非必需基因而顺利解决⁴²⁻⁴⁴。

鉴于以 λ 作为无性繁殖载体的潜在困难，Boyer提出：寻找一种能作为无性繁殖载体的质粒可能会更简单一些。质粒是染色体以外的成分，系胞浆中以共价键闭合的小的环状双链DNA分子，并能自主地复制。原则上，质粒无性繁殖载体只要求必需的复制功能（rep），后者不会因在质粒中唯一的一个EcoR1位点插入DNA而失活。还要求质粒含有这样一种基因，通过它能从大量细胞群体（其大多数细胞缺少这种质粒）中选择出带有

表2 分子无性繁殖的载体

载体	大小 (kb ^a)	拷贝数 ^b	已知的基因 ^c	质粒	有用的限制性位点 ^d	参考文献
pSC101	8.8	1—3	<i>tet</i>		BamHI(tet), EcoRI, HindIII, Sall(tet)	1, 3, 9, 14, 50, 47, 104
ColE1	6.5	20	<i>col, imm</i>		EcoRI(col), HaeI(6), HaeIII (14), Hinc II, Pst I(2), Sall, SmaI	3, 45, 49, 50, 169, 170
pMB9	5.4	20	<i>col, imm, tet</i>		EcoRI, Sall, HindIII	3, 23a, 33, 172
pSF2124	11.3	10	<i>amp, col, imm</i>		BamHI, EclI(3), EcoRI(col), HindII(2), PstI(4), SmaI	3, 20, 53, 136, 148, 173, 174
pBR322	4.0	20 ⁺	<i>amp, tet</i>		BamHI (tet), EcoRI, HindIII (tet), PstI(amp), Sall(tet)	175
PCR1	13.4	10 ⁺	<i>kan, imm</i>		EcoRI, HindIII	3, 176
λ dv1	8.2	80	λ (cIII-Q)		BamHI, EcoRI, HindIII	132, 142, 177
ColE1-cos	33	?	<i>imm, guaA, λ</i> (R-J)		BamHI(λ E), EcoGI (2), SmaI(3)	146, 178—180
λ - <i>guaA</i>						
pPL10	6.8	20	<i>bac</i>		EcoRI(2), HindIII	55
pCD1	7.5	10—20?	<i>col, imm, thy, tet</i>		BamHI, BglII(2), EcoRI (2)	181
RP1(RP4)	55	1—3	<i>car, kan, neo, tet</i>		EcoRI	3, 59, 61—62, 142
RK2	58	1—3	<i>amp, kan, tet</i>		BamHI, BglII, EcoRI, HindIII, PstI, Sall(2), SmaI	3, 58, 62

病 毒

载 体	大小 (kb)	最大插入片段 ^e	有用的限制性位点	参考文献
λ .1(λ gt WES- λ C)	40.6(有效大小) ^f	11	EcoRI(2)	39
λ .2(λ gt WES- λ B)	34.2(有效大小) ^f	17.5	EcoRI(2), SstI(2)	40
λ .3(641)	38	14	EcoRI	41
λ .4(791)	33 (有效大小) ^f	19	EcoRI(2)	41
SV40a	1.67	3.3	BamHI	76, 78, 163
SVGT-1	3	2	HincII (2), Hpa (2), HindIII(3)	78

a kb = 千碱基对 = $1.54 \times 10^{-6} \times$ 分子量。

b 指数生长期间每一染色体的质粒拷贝数。

c 缩写: Col——产生大肠杆菌素E1; imm——对大肠杆菌素E1的免疫性; bac——产生细菌毒素; amp——耐氨苄青霉素; car——耐羧苄青霉素; kan——耐卡那霉素; neo——耐新霉素; tet——耐四环素; thy——胸苷酸合成酶活性。

d 括号中: 缩写——已知被切割的基因; 数字——超过一个的限制性位点数。

e 能够插入并仍可包装到病毒粒子中的最大片段。

f 有效大小系指无性繁殖后所保留的原始病毒部分。

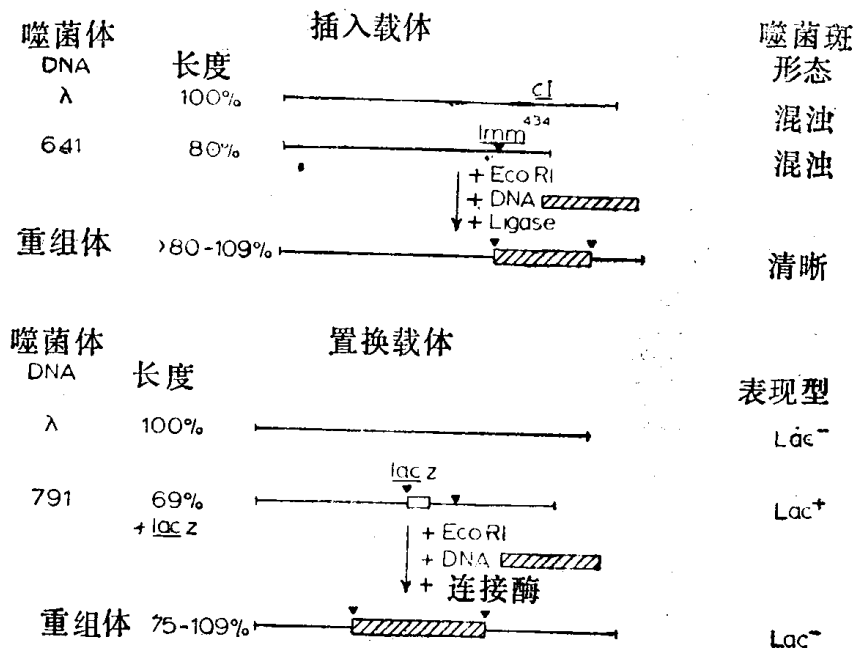


图3 以 λ 病毒作无性繁殖载体进行基因的分子无性繁殖

在载体上只有一个可利用的插入位点接入DNA时,能使该位点的基因破裂;该基因译码活性的丧失可由噬菌斑的形态显现出来。此时,出现的是一个清晰的而不是混浊的噬菌斑。当以置换载体进行无性繁殖时,则由外源DNA取代一段非必需DNA片段。如果这一非必需片段中含有一个在它表达的时候容易检定的基因,则含有新DNA的 λ 衍生物也易于识别。此时,当用恰当的分析方法时,则失去了的 *lacZ* 基因能产生不同颜色的噬菌斑。曾经描述了各种各样的置换载体和插入载体^{41,183,184},其中有几种已获准在需要EK2防范的实验中使用。

该种质粒的细胞。业已检定了数种这样的质粒,其中之一——pSC101,已用于首次分子无性繁殖实验⁹。后来,大多数质粒中的基因无性繁殖实验都是用pSC101和另一种质粒——ColEI⁴⁵或它们的某一种衍生物来做的。

(1) 质粒的生物学

像病毒一样,质粒实际上是同所有种属的细菌都有关的⁴⁶。包括细菌接合作用在内的全部已知的基因传递系统,都取决于质粒所携带的基因。对抗菌素及重金属的抗性、细菌素和毒素的产生、以及降解各种复杂有机化合物的特殊代谢能力,往往都取决于质粒存在与否。然而,在多数情况下,质粒并非细胞生存或生长所必需,因为真正的必需基因是在染色体中。

质粒大小的范围约从1kb至300kb,而大多数细菌的染色体则要大得多(3000~5000 kb)。如所预料,具有复合特性(例如,在接合作用中指导基因转移的能力)的质粒,一般为60kb或更大一些。对于较大的质粒而言,存在的量是每一细菌染色体大概只有1~3个拷贝,就是说,它们复制的控制属于严紧型。由较大质粒(R6-5)中含rep片段衍生而成的一种小质粒(pSC101),也受到严紧型控制(表2)⁴⁷。同大肠杆菌宿主染色体一样,pSC101的复制取决于蛋白质的继续合成。然而,pSC101复制与DNA聚合酶1 (polA)的功能无关⁴⁸。

其他自然出现的小质粒,如ColE1、RSF1030及C10DF13等,它们的复制属松弛型控制,就是说,在指数生长期(表2)每个染色体有许多拷贝⁴⁹。这些质粒的复制取决于聚合酶1的活力,而与蛋白质的继续合成无关。因此,加入氯霉素以阻止蛋白质合成和染色体复制,可得到每个细胞含有1000~3000个拷贝(约为DNA总量的40~50%)的ColE1质粒⁵⁰。用同样方法能得到等量的无性繁殖的含有外加DNA的ColE1质粒。随着质粒大小的增加,拷贝数成比例地减少⁴⁵。这种氯霉素操作法,是由质粒的无性繁殖获取大量DNA片段的一种重要手段。

在同一细胞中,pSC101和ColE1能分别地作为独立的质粒而存在。然而,两种具有同样复制子(rep)功能的质粒是不相容的,因而不能将两者都保留。当将pSC101与ColE1融合以形成单个的质粒时,则在来源于ColE1rep区的控制下,多倍拷贝得以保持。只有当每个细胞的质粒数下降时,才由pSC101来源的rep区进行复制。虽然如此,接合质粒与ColE1和pSC101两者都是不相容的⁵¹。这些结果表明,至少对pSC101来说,复制受到了rep区产物的阻遏。这种阻遏物的水平是很低的,只有在质粒中含有少数拷贝时,才可进行复制。这些结果还表明,某些天然存在的质粒,可能含有一套以上的rep基因,虽然其中只有一套是有功能的^{51,51a,51b}。

(2) 质粒中的无性繁殖基因

无性繁殖载体应当尽可能地小,以减少含有不需要的基因的可能性,并防止与另一细胞接合而自我传递。也只有用较小的DNA分子,才能使无性繁殖基因的获得量与纯度以及连接与转化的效率更大一些。要有rep功能,要有一个基因插入的位点,以及要有一个在转化中可用于选择的基因,这三条决定着一个质粒载体最起码的大小。

一个理想的质粒无性繁殖载体的一些特性示于图1中。除上述基本特征外,另外两个属性亦属必要。一是在某一基因中有这样一个插入位点,它的功能是可以容易地检定的。如从图1中可见,含有插入到基因B并经无性繁殖了的DNA的质粒,缺失一种功能性基因B产物(插入灭活)。如该产物很容易检定,则含有无性繁殖DNA质粒的细胞,就能较容易地从只含未变质粒的细胞中挑选出来。也有可能将它们直接选出。

要求质粒无性繁殖载体具备的第二个性是,要有一个能经过插入的片段而诱导转录的位点。如果外源基因的正常标点符号不曾被恰当地识别,则它们不能被转录。果真如此,则在该无性繁殖载体中若有一个邻接启动子,就可被转录。这种质粒所启动的转录应是可诱导的(或可阻遏的),因为失去控制的转录会抑制或致死细胞⁴⁵。

ColE1及其衍生物兼有这两种属性。ColE1中的单个EcoRI位点位于一个会影响大肠杆菌素产生的基因中。含有在EcoRI位点上有DNA插入物的质粒的细胞,很容易被检定,因为它们不能产生大肠杆菌素——一种蛋白质,它能杀死缺乏这种质粒的其他大肠杆菌。而且,这种外加DNA的转录可被丝裂霉素C所启动⁵²,并且推测还能紫外线照射或其他能诱导ColE1产生大肠杆菌素的场所启动。

由于在基因中获得了带有适于不同限制性酶的单个插入位点的无性繁殖载体,并且这种无性繁殖载体可以插入灭活(例如amp、kan、tet),因而能够选用限制性酶来切割质粒和供体DNA。同样,建造和使用具有特定启动子(如lac、trp或λ)的短连接接头,使人们在控制经过无性繁殖基因的转录上有了较大的灵活性。

图4是当前用于无性繁殖基因的一种质粒——pSF2124的图谱⁵³。该质粒系ColE1的

一种衍生物，含有一耐氨苄青霉素基因（amp）。在体外，能将一些基因插到单个的 EcoRI 位点上。可用这种饰变了的质粒转化细菌细胞，并用氨苄青霉素杀死所有未转化的细胞。含有无性繁殖后 DNA 的转化菌能顺利地识别出来，因为它们不同于带有未饰变质粒的细胞，不能产生大肠杆菌素。pBr 322 是一种很小的质粒，在分子无性繁殖中确实有用⁵⁴。这种质粒含有两个可供选择的基因——amp 和 tet，而且在这种质粒中的无性繁殖基因能被检出。一个 Pst 位点在 amp 基因中，而唯一的 Bam、Hind III 及 Sal 位点在 tet 基因中。在别的地方还有一个 EcoRI 位点。

现在发展到把质粒无性繁殖载体用于大肠杆菌以外的宿主。pPL 10 是芽孢杆菌的一种具有松弛型复制的小质粒（表 2）⁵⁵。它没有现成的可供选择的基因，但能因添加这样一种基因而饰变。pCD1 是大肠杆菌 pMB9 质粒（一种 ColE1 质粒，含有来自芽孢杆菌病毒 Φ3T 的 thy⁺ 基因）的一种衍生物，现在试验将它作为芽孢杆菌的一种可能的无性繁殖载体⁵⁶。然而，关于该质粒能否在芽孢杆菌中保持下去，尚有争议^{56,57}。不论 ColE1 或 pSC101，似乎都不能在与大肠杆菌无近缘的细菌中保持下去^{57,58}。有几种来自金黄色葡萄球菌的质粒已被转化到枯草杆菌中，并可能成为有用的无性繁殖载体^{58a}。

在假单胞菌属中发现的一组相关的质粒——“P”质粒，有相当的重要性，因为它们有广泛的宿主范围。这些质粒与其他已知质粒不同之处，在于能够保持于大多数革兰氏阴性细菌中。为此，将它们作为各种各样细菌的通用无性繁殖载体，是大有前途的⁵⁹。基于同样的原因，要考虑用不能进行接合的变种，以防止无性繁殖基因不受限制地扩散。已经证明，P 质粒能拾带染色体基因，并通过“正常的”重组和交配将它们转移入不相关的细菌中⁶⁰。有几个实验室，正在改造诸如 RP1 及 RK1（表 1）之类的 P 质粒，以减小其大小⁶¹⁻⁶⁴。这样将能除去那些不合需要的耐药基因和接合作用所需要的基因。此外，质粒越小，无性繁殖基因的纯度越高，其他不合需要的基因就越少。

（3）纯化质粒 DNA

为获取没有沾染染色体 DNA 的质粒 DNA，有数种简单的操作可资利用。如果不需

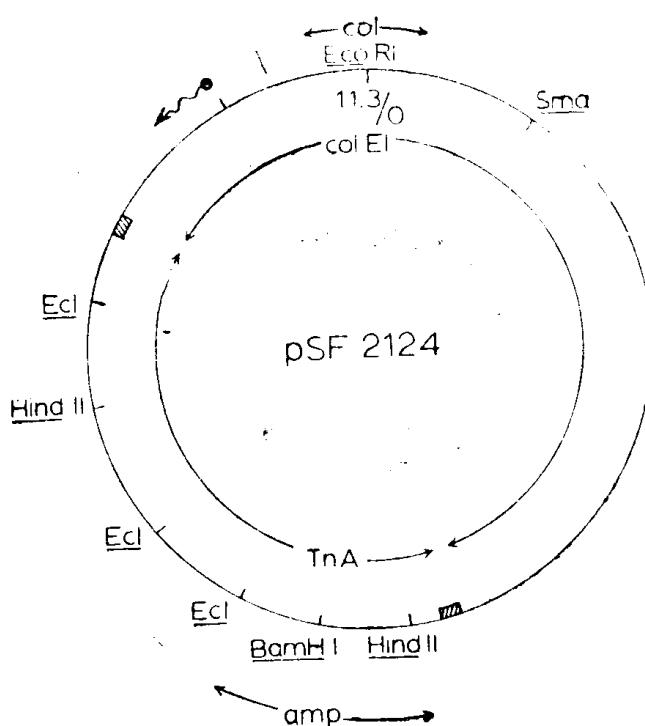


图 4 pSF2124 质粒图

含有 amp 基因并在其两端与颠倒的重复顺序相结合的 TnA 顺序，在体内通过重组插入到 ColE1 之中⁵³。有几个实验室曾测定过限制性酶切位点的位置 139, 148, 166, 170。由于 pSF2124 系 ColE1 的衍生物，复制可能从逆时针方向距 EcoRI 位点 1.25kb 处开始逆时针地进行¹⁸⁵。该质粒不含 Hind III 位点，但含有 Pst I、Hae III 及 Hae III 位点¹⁸⁵。