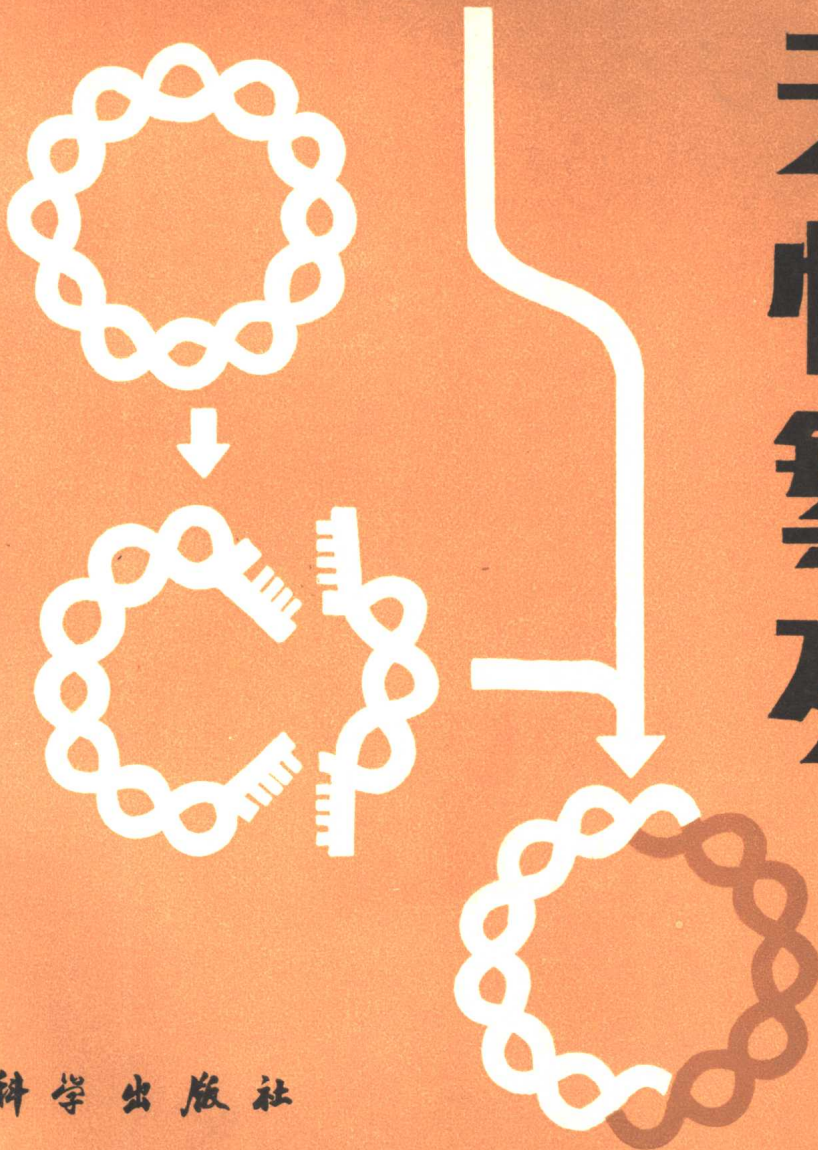


基因无性繁殖



科学出版社

基因无性繁殖

范云六 等编译

科学出版社

1982

内 容 简 介

本书介绍了遗传工程研究及技术的重要进展。内容包括无性繁殖系的建成、基因库的建成、限制性核酸内切酶在遗传工程上的作用、分子载体(质粒及病毒)的改造、真核 DNA 的组构分析以及遗传工程应用在医药及农业方面的成果。

本书可供生物学、遗传学、微生物学、生物化学、生物物理学、医学及农学等方面的科研工作者及高等院校师生参考。

基 因 无 性 繁 殖

范云六 等编译

责任编辑 刘 安 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

*

1982 年 7 月 第 一 版 开本: 787×1092 1/16

1982 年 7 月 第一次印刷 印张: 19 2/4

印数: 0001—6,180 字数: 462,000

统一书号: 13031·1649

本社书号: 2265·13—9

定价: 3.10 元

前 言

遗传工程是六十年代末和七十年代初发展起来的一门新兴学科。它以分子生物学为理论基础，并综合分子生物学和微生物遗传学的现代方法和手段。它不仅对研究生命机体的遗传本质及其控制有着重要的理论意义，而且在工、农、医等方面的遗传操纵有着深远的实践意义。国际上对这一新领域的研究十分活跃，并取得了一些成果，特别是最近以来，对真核基因(如脑激素基因、胰岛素基因)的转移和表达已取得了重要突破，标志着遗传工程研究进入到一个新的阶段。

遗传工程在我国得到了足够的重视，已被列为国家科学技术发展中影响全局的八大领域之一。为了发展这一科学领域，以推动生物科学及其他科学技术和生产领域的发展和变革，加快赶超世界先进科学技术水平，我们本着“洋为中用”的精神，编译了这本文集。

全书分成两部分：第一部分是根据遗传工程研究所取得的成果和发展趋势进行了综述性的介绍及展望，主要内容有：1. 遗传工程研究进展；2. 放线菌质粒的遗传分析；3. 遗传工程和基因治疗；4. 植物原生质体融合和遗传操作，等等；第二部分除了三篇译文外，主要选译自《Recombinant Molecules: Impact on Science and Society》中有关遗传工程技术进展、质粒载体的发展、植物遗传工程、病毒载体、真核 DNA 的无性繁殖及其表达等方面的内容。此外，“重组 DNA 分子研究的准则”作为附录介绍。

本书可供生物学、遗传学、微生物学、生物化学、生物物理学、医学及农学等方面的科研工作者、高等院校的师生参考。

在编译本文集的过程中，由于时间仓促，水平有限，可能出现某些错误和缺点，望读者多多提供宝贵意见并批评指正。

译 者

1978年8月1日

目 录

前言	ii
遗传工程研究进展	1
放线菌质粒的遗传分析	15
遗传工程和基因治疗	38
植物原生质体融合和遗传操作	46
原生质体对异源供体的吸收性和共生固氮研究的现状及其展望	55
分子无性繁殖载体的建成	65
限制性核酸内切酶在遗传工程上的作用	75
枯草芽孢杆菌重组分子技术模拟系统的发展	83
噬菌体 Phi-3-T 胸腺嘧啶核苷酸合成酶基因的无性繁殖	92
质粒无性繁殖载体的建成及其特性	100
大肠杆菌 λ 噬菌体的利用	111
DNA 无性繁殖安全噬菌体载体的建成和实验	120
DNA 无性繁殖是质粒生物学的工具	130
大肠杆菌 K-12 及其在遗传工程上的应用	141
用限制性片段分析和整合至大肠杆菌的质粒来研究啤酒酵母 2 微米 DNA 的特性	152
探索在植物肿瘤中的细菌 DNA	161
固氮遗传学某些可能的应用	168
植物原生质体的融合——在农业上应用的进展和前景	173
遗传工程和作物改良	182
大肠杆菌杂种质粒基因库的建成和使用	188
腺病毒 DNA 片段与 λ 噬菌体载体共价连接后在大肠杆菌中的增殖	204
丝心蛋白基因的研究	212
重组 DNA 无性繁殖法在分析海胆组蛋白基因中的应用	218
非洲蟾蜍和果蝇编码核糖体 RNA 的基因中重复族系组份的组构	225
在猴细胞中 λ 噬菌体 DNA 免疫区的一个片段的无性繁殖	239
含有 SV40 DNA 和 λ 噬菌体 DNA 片段杂种病毒的建成及其在猴组织 培养细胞中的繁殖	252
带大肠杆菌抑制基因的 SV40	262
生长抑制素化学合成基因在大肠杆菌中的表达	276
附录 1 美国国立卫生研究院重组 DNA 分子研究的准则	288
附录 2 体内体外所建成的质粒	310

遗传工程研究进展

范云六

遗传重组是遗传学的基础,也是基因工程的核心^[1]。两个突变菌株之间的重组产生野生型,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。基因工程的重要特点之一,是在体外(而不是在体内)实行 DNA 分子的断裂和重新连接;其二是, 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;也不能将基因工程只看成是 DNA 分子的操作,而忽视了操作的 DNA 分子必须在细胞中进行表达。

限制酶及连接体

在 DNA 体外重组中限制性核酸内切酶起着重要的作用^[2]。Robert 最近报道,从细菌中分离出一些新的限制性核酸内切酶(图中简称限制酶)。现在,已经在 25 种以上不同微生物中发现约 100 种限制性核酸内切酶,其中约 30 种是专一性的,其识别序列已经搞清楚了。很有趣的是,许多微生物具有识别核苷酸相同序列的限制性核酸内切酶。Robert 建议将这些识别相同核苷酸序列,而来自不同微生物的酶称之为同功异源酶。随着新的限制性核酸内切酶不断地发现,人们在操纵特异性 DNA 片段和创造新的重组体方面将得到更多的自由。

表 1 列出目前常用于分子无性繁殖或建造载体的一些限制性核酸内切酶。

限制性核酸内切酶切割双链 DNA 后产生两类不同的末端,一类为粘着末端,另一类为平末端。具有粘着末端的片段容易插入至具有相同粘着末端的载体中而进行无性繁殖。值得注意的是,平末端也可以通过 T4-连接酶进行 DNA 片段的连接^[3-5],同时某些情况下,共价连接不同组合的平末端片段,可创造出新的限制性核酸内切酶的切点。

DNA 体外连接除粘着末端连接法及 polydA、polydT(或 polydC、polydG)结尾法外,平末端连接法为体外连接 DNA 的第三种方法^[5]。这三种方法都有它们独特的用处,但也有各自的局限性。例如,第一种体外连接 DNA 的方法,技术简便,容易从杂种质粒中回收插入的无性繁殖片段,是目前广泛应用的方法之一。但是,用这个方法所产生的各种片段能够自连成环,当外源基因 DNA 片段比载体分子长时,形成重组 DNA 频率较低^[23]。第二种方法是结尾法,也是目前广泛应用的 DNA 连接方法之一,用这种方法形成重组 DNA 的效率较高,特别是对于长的 DNA 片段的重组很有效^[28],但主要缺点是回收杂种质粒上新插入的 DNA 片段(外源基因)有困难,这是由于同源多聚体尾巴加在限制性核酸内切酶识别位点上破坏了限制性核酸内切酶的切点。第三种平末端连接法,需要高浓度的 T4DNA 连接酶,否则效率不高。

表 1 常用于分子无性繁殖或建造载体的限制性核酸内切酶

酶的名称	识别的 DNA 序列	切割后产生的末端
<i>EcoRI</i>	GAATTC	AATT-
<i>EcoRII</i>	CCTGG 或 CCAGG	CCTGG-或CCAGG-
<i>HindIII</i>	AAGCTT	AGCT-
<i>BamI</i>	GGATCC	GATC-
<i>XmaI</i>	CCCGGG	CCGG-
<i>SalI</i>	GTCGAC	TCGA-
<i>PstI</i>	CTGCAG	-TGCA-
<i>BglI</i>	?	
<i>BglII</i>	AGATCT	GATCT
<i>HpaII</i>	CCGG	CGG
<i>HaeII</i>	PuGCGCPy ¹⁾	PuGCGC
<i>SmaI</i>	CCC+GGG	平末端
<i>HincII</i>	GTPy+PuAC	平末端
<i>HindII</i>	GTPy+PuAC	平末端
<i>HpaI</i>	CTT+AAC	平末端
<i>HaeIII</i>	GG+CC	平末端

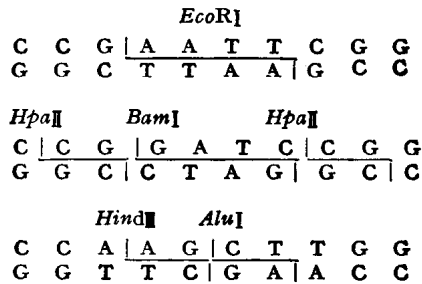
1) Pu——嘌呤; Py——嘧啶。

在 DNA 体外重组的研究中,经常碰到一个问题即:所感兴趣的 DNA 片段(包括外源基因在内)不一定有合适的产生粘着末端的限制性核酸内切酶的识别序列。在 DNA 体外重组技术方面一个重要的进展是,通过人工合成的^[7~9]或者利用现有的 DNA 片段上的限制性核酸内切酶的切点^[10],加在外源基因片段或分子载体上,可使它们创造出限制性核酸内切酶的新切点。它不但可以克服感兴趣的 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,以及克服用 polydT、polydA 或 polydC、polydG 结尾法中难以从杂种质粒上回收无性繁殖片段的困难,而且可以使几乎所有的 DNA 片段能插入到现有的载体分子中去进行无性繁殖,并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。

这种限制性核酸内切酶末端的片段称之为连接体(linkers)或接头。

创造限制性核酸内切酶新切点的方法有二:(1)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连接体,例如, pSC101 质粒上含有许多限制性核酸内切酶(如 *EcoRI*、*HindIII*、*BamI* 及 *SalI*) 的切点,而且这些限制性核酸内切酶切点彼此非常接近,都位于一个长约 800 个核苷酸之内的 DNA 片段上,因此, pSC101 质粒成为连接体的很好来源^[10]。如果用 *EcoRI* 及 *SalI* 这两个限制性核酸内切酶来切 pSC101 质粒,就可得到一个包括 *EcoRI*、*HindIII*、*BamI* 及 *SalI* 4 个切点的片段,可用粘着末端连接法及平末端连接法将这个片段连接在一个外源 DNA 片段(或载体 DNA)上。当用平末端连接时,先要用 DNA 聚合酶方法^[6]或 S1 核酸酶处理^[61]使之成为平末端,然后用

T4DNA 连接酶把它加到平末端的 DNA 片段上去。从 pSC101 来的这个片段接在另一个 DNA 片段上之后,不仅增加了后者的切点,扩大了这个 DNA 片段无性繁殖的可能性,而且可把这个 DNA 片段上原来的限制性核酸内切酶末端直接改换为另一种粘着末端,提供了它在另一个限制性核酸内切酶产生的粘着末端的载体上进行无性繁殖的条件。(2) 化学合成限制性核酸内切酶的识别序列^[9],这种序列简称为人工接头。Scheller 等报道了 3 个含有限制酶识别序列的十核苷酸的人工接头。这些人工接头的核苷酸序列如下:



这些人工接头一共含有 6 个不同的限制性切点(*EcoRI*、*BamI*、*HpaII*、*HindIII*、*AluI* 及 *HaeIII* 等),能被 23 个不同的限制性核酸内切酶切割,用平末端连接方法将这些人工接头接在需要进行无性繁殖的外源 DNA 的两端,在这个 DNA 片段上便具有限制性核酸内切酶的新切点,然后用某一限制性核酸内切酶处理,外源 DNA 片段便可与载体分子相应的粘着末端连接,而形成重组 DNA 分子(图 1)进行无性繁殖。例如,利用含有 *EcoRI* 切点的核苷酸十聚体接在海胆精子重复 DNA 两端,经 *EcoRI* 切后,连接在 RSF2124 质粒的 *EcoRI* 切口处,然后在大肠杆菌中进行无性繁殖,得到大量的海胆精子重复 DNA,以利于进一步对真核基因组的重复序列进行研究^[14]。Shine 等将含有 *BamI* 切点的十聚体通过平末端连接在 cDNA 上,然后用 *BamI* 处理,cDNA 与 pBR313 质粒连接后进行无性繁殖,成功地得到大量无性繁殖系^[9]。Heyneker^[7]等将一个人工合成的含有 *EcoRI* 识别位点的 8-脱氧核苷酸片段加至一个合成的 *lac* 操纵基因上(21 个碱基对的 DNA),然后用 *EcoRI* 酶切之,再用粘着末端连接法接在一个多拷贝的质粒后,使合成的 *lac* 操纵基因在大肠杆菌中进行无性繁殖,这样,他们得到无性繁殖的 *lac* 操纵基因片段,并证明 *lac* 操纵基因的正常功能。1977 年 Itakura 等^[16]报道,人工合成的生长抑制素(somatostatin)基因在大肠杆菌中成功地表达了它的功能,也是应用人工接头的很好的实例。

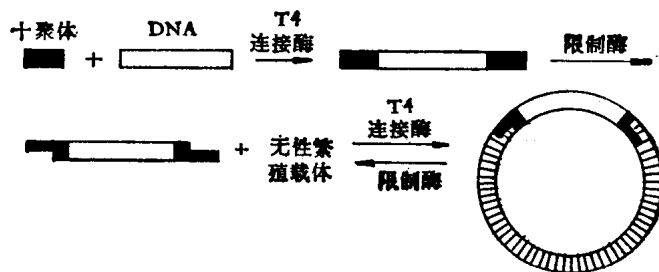


图 1 带有一个限制性核酸内切酶切点的十聚体连接体,接在需要无性繁殖的 DNA 两端,经限制性核酸内切酶切后,用 T4 连接酶连接在分子载体上^[9]。

分子载体

分子载体的设计和运用是 DNA 体外重组的一个重要环节^[11]。任何可以在细胞内进行自我复制的 DNA 分子都可作为异源 DNA 片段的载体^[17]。将外源基因运送到原核中去的载体研究得较多,运送到植物和动物细胞中去的载体目前还处于初步的探究阶段。就原核载体而言,目前主要是利用大肠杆菌的质粒和 λ 噬菌体等^[21]。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。理想的载体还应从安全性、便于选择、易于制备、具有多种限制性核酸内切酶切点、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,选用质粒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,如温度敏感质粒 pJC307^[18](ColE1 衍生质粒)在哺乳动物正常体温下(37°C)就丧失复制能力。

为了区分受体和重组体表现型之间的差别,最好在质粒上有这样的双重标记,即外源 DNA 特定片段能插到其中一个标记中去。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粒。除了用抗药性作为选择标记外,还可用营养缺陷型标记来进行选择,例如,利用 ColE1-*trpEtrpD* 质粒^[19]为载体时就是这种情况。最近,Backman等^[20]报道, λ 噬菌体 *cI* 基因可用来作为质粒分子载体的选择标记,他们建成 pKB158 质粒,这是一个带四环素抗性基因及 λ *cI* 基因的 ColE1 衍生质粒,由于 λ 噬菌体的 *cI* 基因控制着 λ 阻遏物的合成,因此,它使细菌细胞对于 λ 的超感染呈免疫性,这样,便可利用对四环素抗性及 λ 噬菌体的超感染免疫性来选择 DNA 重组体。

应该指出,在改造质粒分子载体方面,目前值得注意的动向是,围绕着外源基因的表达来建造新质粒,并使之成为多用途的分子载体。

建造多用途的质粒分子载体,主要是通过增加质粒上限制性核酸内切酶的切点,使之成为能繁殖具有不同限制性核酸内切酶末端的外源 DNA 片段。在质粒分子载体上,增加限制酶切点的方法诸如(1)人工接头法:由于有了人工接头,人们可以将 *EcoRI*、*BamI*、*HindIII* 等识别序列,按人的需要加到质粒分子上来改造现有载体,使它创造出多种不同限制性核酸内切酶的新切点。这样,可满足分子无性繁殖 DNA 多样性的需要,成为多用途的载体。(2)利用现有 DNA 片段上的限制性核酸内切酶切点加在质粒载体上,使后者增加新切点。例如,在 RK2 分子载体上加上 *trpED* 片段。既加上选择标记,又加上 *BamI* 及 *HindIII* 切点^[24]。在 Mu 噬菌体 DNA 上有某些限制性核酸内切酶切点,包括 *HindIII* 及 *EcoRI* 切点在内。Mu 噬菌体可随机插入至质粒上,例如,随机插入至 RK2 质粒上后,由于它的插入,RK2DNA 分子在不同位置上增加了限制性核酸内切酶的切点,这样,使得 RK2 质粒能对多种限制性核酸内切酶切后的外源 DNA 片段进行分子无性繁殖。

为了研究外源基因的表达,还应尽可能地除去质粒上非重要的遗传区域,最大限度地减少质粒本身所带的遗传信息。目前,已建成一些小质粒,例如在 ColE1 的衍生质粒中 pVH51^[25]称之为 ColE1 微质粒(mini-ColE1 plasmid)。这个质粒缺失原来 ColE1 的 1/2 DNA,分子量为 2.1×10^6 道尔顿,保留了 *EcoRI* 切点。在大肠杆菌细胞中有较多的拷贝数,平均每细胞约 114 个拷贝,它比 ColE1 更不容易被接合性质粒所诱动,因此,是一个比较理想的质粒。另一个有趣的小质粒是 pKB166,是由 pKB158 质粒经 *BamI* 及 *HpaI* 消化后,除去四环素抗性基因片段,剩下的 λcI 基因与 ColE1 的复制区而形成的质粒^[20]。它约含 2,400 碱基对(简称 bp),分子量为 1.6×10^6 道尔顿。

除了质粒应尽量小以外,在质粒上插入外源结构基因以后,要保证它正确表达,还依赖于基因的调控系统。目前已经建成一些允许真核基因在细菌中调控表达的质粒载体。例如:

pBGP120 质粒^[26]

是通过 DNA 体外重组方法由 RSF2124 与 $\lambda plac5$ 上含有乳糖操纵基因、促进子和半乳糖苷酶基因(*Z*)的 *EcoRI* 片段连接后,去掉一个 *EcoRI* 切点而建成的新质粒(图 2)。这个质粒保持了 ColE1 能扩增外源 DNA 的优点,同时带有细菌乳糖操纵子的调控

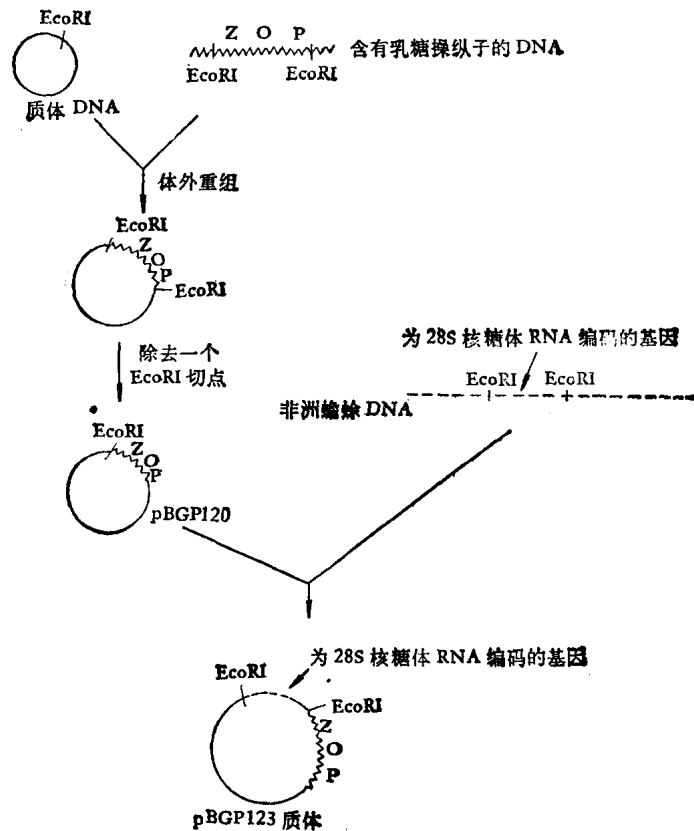


图 2 建成 pBGP120 质粒(图中质体即质粒)载体。在此载体上插入异源 DNA 片段,用细菌的操纵基因和促进子进行转录。直线代表 *EcoRI* 切点, *Z*、*P*、*O* 分别代表乳糖操纵子中, β -半乳糖苷酶基因、促进子及操纵基因^[26]。

系统,并保留了靠近*Z*基因的那个*EcoRI*切点。为了测定在这个质粒上*EcoRI*切点处所插入的外源DNA,在乳糖操纵子调控系统的控制上能否表达,Polisky等在这个质粒的*EcoRI*位点上插入了非洲蟾蜍(*Xenopus laevis*)的一个特定DNA(这个DNA片段为28S核糖体RNA编码),他们成功地得到了杂种质粒分子pBGP123,并且用分子杂交方法证明了杂种质粒中的非洲蟾蜍DNA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的表达。

ColE1- λ trp48 质粒^[24]

这个质粒是通过 λ trp pt190转导噬菌体的*EcoRI*片段与ColE1质粒连接而建成的,这个质粒的特点是带有 λ 噬菌体的高效促进子。已经证明,利用 λ 促进子在此质粒上插入的色氨酸结构基因得到正确表达。 λ 噬菌体的 P_L 促进子的效率比大肠杆菌促进子效率高10倍。

pBR345 质粒^[27]

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粒上。pBR345质粒就是一个含有人工合成的乳糖操纵基因的ColE1衍生质粒。这个质粒还有一个重要特点是DNA分子很小,为原来ColE1质粒大小的1/6,分子量为 0.7×10^6 道尔顿,是迄今为止在所研究的质粒中最小的一个质粒。

pBR322 质粒^[27,63]

这个质粒是ColE1的一个衍生质粒。它的建成分四个步骤:第一步是用体外切割和连接的方法,将pSC101质粒上带有四环素抗性基因(Tc^r)的片段连接在pMB8质粒上,得到pMB9质粒。第二步是从pSF2124质粒上将氨苄青霉素转座子($TnA = Tn2$)移位至pMB9质粒上,得到pBR312质粒。第三步是用*EcoRI*部分降解pBR312质粒后,用连接酶连接得到一个分子量比pBR312小的质粒——pBR313。第四步是用体外切连技术改建pBR313,使之成为在 Ap^r 区域内,只有一个*PstI*切点的小质粒pBR322。pBR322质粒是目前基因工程中一个非常有用的分子载体。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)具有多个限制性核酸内切酶切点,是一个可供多种限制酶切的多用途的运载工具。现在,在pBR322的限制性图谱上已确定11个不同限制性核酸内切酶的36个切点的相对位置;(3)有 Ap^r 及 Tc^r 两个选择标记,值得注意的是,*PstI*的一个切点在 Ap^r 基因之内,*BamI*、*HindIII*及*SalI*的切点在 Tc^r 基因内。利用这个特点,易于选择 $Tc^r Ap^s$ 或 $Ap^r Tc^s$ 的重组体。目前,利用pBR322质粒不仅成功地将生长抑制素基因运至大肠杆菌中,而且由于巧妙的实验设计,第一次实现了高等生物基因在大肠杆菌中正常地表达自己的功能。

这里还应提出值得注意的另外两个质粒,即pBR313质粒和pCD1质粒。

pBR313 质粒

根据Lurquin^[28]报道,pBR313质粒可插入至豇豆植物原生质体以及细胞核中去。这类含有转座基因(transposable genes)的大肠杆菌质粒^[13]将会更多地引起人们的重

视,这是无疑的。

pCD1 质粒

是 pMB9 质粒上带有 $\phi 3T$ 噬菌体中 *thyP* 基因(为胸苷酸合成酶编码的)的杂种质粒,这个杂种质粒不仅在大肠杆菌中表达了枯草杆菌 $\phi 3T$ 噬菌体胸苷酸合成酶的活性,而且在枯草杆菌 168 *thy*⁻中也表达了这个特性。这个质粒引起人们的重视,许多人认为,它有可能成为枯草杆菌受体的运载工具。关于 $\phi 3T$ 的 *thyP* 基因通过大肠杆菌质粒进入枯草杆菌后可以表达,在 Ehrlich 工作中也得到证实^[15]。

大肠杆菌的其它质粒载体可详见 Collins 的综述^[19]。

除质粒外, λ 噬菌体也是一个很重要的分子载体^[29]。利用 λ 噬菌体作为外源 DNA 分子无性繁殖的载体,其主要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 5 个 *EcoRI* 切点,6 个 *HindIII* 切点,必须去掉 λ 增殖所需的基因区域内的切点,留下非增殖区域内的切点,经这样改造后的 λ 噬菌体才能成为外源 DNA 分子的载体。可以用点突变、置换或缺失等方法来改变或消除 λ 基因组中的限制性核酸内切酶切点。

λ 分子载体有两种类型:(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。(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^[30]。置换型载体比插入型所容纳的外源 DNA 片段大。但总的说来,使用 λ 噬菌体作载体时,外源 DNA 片段的大小有一定限度,最大插入 DNA 长度约 14,000~20,000bp 左右,这点与质粒载体不同,因为能够插入到质粒中去的 DNA 片段,在大小上不受任何实际的限制。

λ 载体的改造主要包括下面几方面内容:(1)能对不同大小 DNA 片段进行无性繁殖;(2)能运载多个限制性核酸内切酶切点的 DNA 片段;(3)能用噬菌斑类型来指示是否插入了外源 DNA 片段;(4)能用 λ 基因组中促进子对于插入片段的转录控制;(5)能高产 λ 分子及其在 λ 上繁殖的无性系;(6)具有高度的安全性能等等。

现已建成一些适合于高等生物基因分子无性繁殖的 λ 噬菌体载体,诸如一些 Charon 噬菌体^[31,32]及 λ gtWES 噬菌体^[33]等。

我们知道, λ gtWES 噬菌体是由 3 个琥珀突变——*Wam* 403, *Eam* 1,000 及 *Sam* 100, 导入至 λ gt \cdot λ c 中后而建成的安全性噬菌体载体^[33]。 λ 基因组中 E 基因是控制 λ 噬菌体外壳蛋白的基因; *W* 基因是负责产生连接头部及尾部所需要酶的基因; *S* 基因是负责产生裂解寄主时所需要酶的基因。 λ gt 噬菌体得到 3 个基因的琥珀突变后,对它的敏感寄主菌减少了,在自然界中存活的机会减少了,从而提高了安全性能。

利用 λ 噬菌体的调控系统,特别是利用 λ DNA 左边的一个特别有效的促进子 P_L , 能使插入的外源基因得到充分的表达,同时,由于 *Q* 基因控制 *S*、*R* 基因(裂解基因)以及头部和尾部基因的表现,那么设法使 λ 载体的 *Q* 基因突变,利用 Q^- 来延迟细胞裂解,便可使外源 DNA 重组分子大大扩增,基因产物大大积累^[4]。或用突变方法去掉 λ 基因组中第三个 *EcoRI* 切点,缩短左面 *EcoRI* 片段使保留 λ 的 *red* 基因,这样便形成稳定的溶

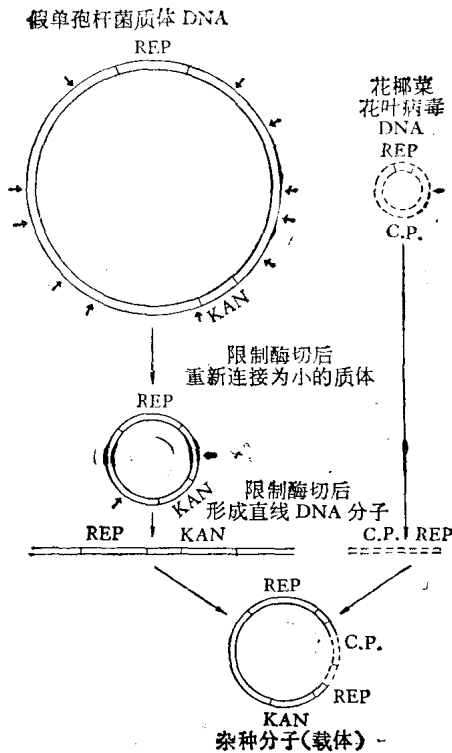


图 3 假单胞杆菌质粒和花椰菜花叶病毒 (CaMV) DNA 形成杂种分子^[59]。

源性, 再在 S 基因中导入 S7 琥珀突变延迟细胞裂解, 这样改造后的 λ 载体使大肠杆菌 DNA 连接酶产量增加 500 倍^[34]。

除把外源基因运送至原核中去的分子载体外, 还有运送到真核细胞中去的分子载体。后者目前为数极少。

把基因送至高等植物细胞的可能载体除 Ti 质粒外, 最近, Langridge^[59] 报道了一个由花椰菜花叶病毒 (CaMV) DNA 和假单胞杆菌质粒构成的杂种质粒分子 (图 3), 它不但可在细菌中, 而且也可在植物细胞中进行繁殖。看来, 寻找合适的植物 DNA 病毒作为这类分子载体的候选者是有希望的。

将外源基因运送到动物细胞中去, 进行无性繁殖的分子载体, 以 SV40 病毒研究得较为成熟^[35-38]。SV40 的遗传及物理图谱比较清楚, 对它的复制及转录研究得也较多, 这些都是 SV40 作载体的有利条件。

Berg 等^[36] 用 *Hpa*I 及 *Bam*I 相继切 SV40 基因组后, 从晚期基因区域除去约 2,000bp 的

DNA, 建成了一个小型的 SVGT-1 载体。用 poly (dA·dT) 连接法将 λ 噬菌体一个含复制区、cI 及 *cro* 结构基因及 4 个转录的促进子的 DNA 片段 (约 1,500 bp) 插入至这个载体的晚期基因区域, 形成杂种 DNA。与一个早期基因突变株 λ A₅₈ 一起混合感染猴肾细胞后, 用异源双链及凝胶电泳等方法, 确定了插入的 λ DNA 片段在 SVGT-1 中的位置、大小及插入方位。但没有观察到 λ 片段的转录及翻译产物。Hamer^[38] 报道了另一个 SV40 的缺失株作为载体, 他是用 *Eco*RI 及 *Hpa*I 切 SV40 DNA 后, 得到一个具有 3,700 bp 的 SV40 缺失株, 通过粘着末端连接法将大肠杆菌 *su*⁺ 基因插入至它的晚期基因位置, SV40 与大肠杆菌的 *su*⁺ 形成重组体分子, 这些重组体分子和 SV40 λ A 助手(helper) 一起对猴细胞进行感染后, 重组体能在猴细胞中增殖数代, 细菌 DNA 在猴细胞中进行了转录。

需要指出的是, SV40 上的 *su*⁺ 基因成功转录是用粘着末端法来形成重组体, 这一点与 Berg 等用 poly(dA·dT) 连接法不同。

Villarreal^[39] 等用 SV40 噬斑原位杂交法检测出带有外源 DNA 的 SV40 重组体, 这个方法简便而且安全, 提供了进一步选择 SV40 重组体的方法。但总的说来, 由于高等生物比较复杂, 以高等生物细胞为受体的分子无性繁殖方面的研究进展较缓慢。

不论对于真核或原核生物, 扩大分子载体的来源是一个重要问题。这个问题必须结合受体细胞一起考虑。特别是高等生物细胞的载体-受体系统有待进一步研究。Fink^[60] 利用酵母原生质体成功地将带有酵母 *leuZ*⁺ 标记的大肠杆菌质粒转化至酵母中。酵母作为受体的重要性, 是无疑的。芽孢杆菌和假单胞杆菌对大肠杆菌来说有其独特的优

点^[40,41],也值得重视。自1973年报道短小芽孢杆菌的质粒^[42]以来,相继在枯草芽孢杆菌(也称枯草杆菌 *Bac. subtilis*)^[43]、巨大芽孢杆菌 (*Bac. megaterium*)^[46]、苏云金杆菌 (*Bac. thuringiensis*)^[45]及蜡状芽孢杆菌 (*Bac. cereus*) 中发现质粒的存在。但截至目前为止,所发现的绝大多数质粒为隐蔽性质粒(cryptic plasmids),人们正在努力寻找功能性质粒。1976年 Lovett^[47]报道了短小芽孢杆菌“杀死活性”质粒,我国也展开了这方面的研究,从国内收集的短小芽孢杆菌中找到了有类似功能的质粒菌^[12]。从长远和安全的观点来看,建立芽孢杆菌(及假单胞杆菌)的载体-受体系统有其重要意义。

应用基因工程技术于遗传结构和功能的分析 以及真核基因在原核中表达的研究

我们知道,染色体的主要信息贮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 片段得到分离和扩增,同时,结合核苷酸序列分析的新方法(例如 Maxam 和 Gilbert^[58] 及 Sanger^[52] 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加遗传密码知识的了解、生物进化方面的研究、突变和选择理论的探索、以及进一步人工合成基因、改造基因和分子无性繁殖基因均有重要的意义。例如,近年来证明了基因的重叠性、基因的易位性以及基因的不连续性,这些都是基因概念的新突破,是基因核苷酸序列分析的重要研究成果。

Ullrich 等报道了鼠胰岛素基因转移到大肠杆菌中获得成功^[48]。通过逆转录酶方法以鼠 mRNA 为模板合成 cDNA,与载体质粒 pMB9 连接获得重组体,转移到大肠杆菌中建立了无性繁殖系。这些无性繁殖系含有从鼠胰岛素 mRNA 制得的 cDNA 的重组质粒共 4 种,其中 3 种含有(1)鼠胰岛素原 I 完整编码区;(2)前胰岛素 I 的前肽;(3) mRNA 未翻译的 3' 末端区。第 4 个重组质粒含有前胰岛素原 IA 链所衍生出来的序列。尽管鼠胰岛素基因在细菌中没有表达,但转移的成功为细菌生产胰岛素迈开了有重要意义的一步。胰岛素基因在大肠杆菌中得到扩增,并对它进行了核苷酸排列次序的测定,这是在高等生物中第一次对基因核苷酸序列的测定。

继胰岛素基因后,Seeburg 及 Shine 又将哺乳动物的两种较复杂的激素基因转移至大肠杆菌中进行扩增,并测定了它们的核苷酸序列。一是 Seeburg 的工作^[49],从培养的垂体细胞中得到鼠生长激素多腺苷酸 RNA,经逆转录酶逆转录而获得 cDNA,通过化学合成的人工接头接到 pBR322 质粒 DNA 上,得到重组质粒 DNA,转化到大肠杆菌中进行扩增后,测出其核苷酸序列,从核苷酸序列演释出鼠生长激素氨基酸序列以及其前体形态。另一个是 Shine 的工作^[50],用相似的方法将人的绒毛催乳生长激素(HCS)的结构基因连接在 pMB9 质粒上,在大肠杆菌中得到了扩增,也成功地进行了核苷酸序列的测定。扩增的基因提供了一个探针,来研究在正常或病理状态下激素基因如何调节。同时,核苷酸序列的分析为进一步研究有关激素基因的结构进化以及在细菌中表达等重要问题创造出新的途径。

最近,Wilson^[51]等成功地测定了人的 β 珠蛋白 mRNA 及大部分 α 珠蛋白 mRNA 核苷酸序列,并用人工合成的人珠蛋白基因插入至细菌质粒中去^[53]。

基因工程技术对遗传结构和功能的分析显示出它的重要作用。除了对高等生物基因

分析的重要性外,对原核中一些重要遗传系统的结构与功能的分析,最近也取得一些进展。

我们知道,目前在调控系统中研究得最清楚的是大肠杆菌乳糖操纵子及 λ 噬菌体调控系统。乳糖操纵基因已人工合成, λ 噬菌体的促进子和操纵基因均已分离纯化,并确定了核苷酸序列和功能,这些均为有效地利用和改造调控系统打下了良好的基础。

λ 噬菌体或质粒作为基因工程分子载体最重要特征是复制子这个特性。因此,对它们的复制机构进行深入的了解具有重要意义。过去对于质粒基因组的遗传结构分析有很大的困难^[62],关于质粒的复制和控制详细机理知道得很少^[62];现在有了基因工程技术,对质粒(以及 λ 噬菌体)的复制机构的研究已成为可能了。

Cohen^[10]通过分子无性繁殖,扩增了质粒非复制区域的DNA片段,用这些片段作探针,鉴别了复合质粒上非复制区域,从而通过不同浮力密度将复合质粒上复制区域分离出来进行研究。同时,他们连接pSC 101及ColE1后得到杂种复制子pSC 134,通过研究它们的复制性能得到关于复合质粒(composite plasmid)有关复制的基本资料。建成的pSC 134杂种质粒上含有两种不同性质的复制子:一种是ColE1复制子,为松弛复制型,ColE1不能在DNA聚合酶I缺失的菌株中进行复制;另一种是pSC 101复制子,为严紧复制型。pSC 101在不能合成蛋白质的细菌中无法复制。根据这个特性,他们在不同的选择条件下,观察哪一套复制功能和复制起源点在杂种质粒中起作用。实验表明,在正常情况下利用ColE1质粒的复制系统,而在polyA_{ts}的菌株中,pSC 101复制机能起作用了。这些研究为验证复合质粒的复制模型提供了重要的依据。

为了了解控制 λ 噬菌体复制的复杂系统以及复制系统中各组分之间的相互关系,Moore^[54]等将 λ ori区域连接在Charon 3噬菌体的非重要区域中及ColE1(pVH51)微质粒中,建造了带有 λ 噬菌体复制起源区(ori)的杂种噬菌体及杂种质粒。Furth^[55]通过对 λ 噬菌体复制起源区的遗传结构分析证明了:从免疫控制区域开始至O基因之内的EcoRI切点为止的这一段,具有复制起源区的全部功能。有7个ori突变就是发生在这个片段上的一个很小区域内——在O基因之内。Thompson等^[56]进一步测定了 λ 噬菌体复制区域的核苷酸序列以及4个ori⁻突变株复制区域核苷酸序列的变化(图4)。ori⁻突变株r 93在复制区中缺失24个bp,ori⁻突变株r 99缺失12个bp,r 96缺失15个bp,而ori⁻突变株ti 12在复制区中第1,504个bp由C·G颠换成A·T。

以上这些工作使我们对 λ 噬菌体复制机构有了深入的了解,为今后更好地发挥 λ 分子载体在扩增基因方面的作用,奠定了必要的理论基础。

除 λ 复制区域的遗传和物理结构分析外,最近Laudy^[57]报道了 λ 噬菌体基因组中参与整合和切离(excision)的DNA核苷酸序列。在确定pop',poB',Bop'及BoB'4个附着点¹⁾的DNA序列的基础上,证明了在 λ 噬菌体附着点与细菌附着点之间,存在着一个长度为15个bp的相同序列的共同区域。正是这个共同区域,为 λ 噬菌体和细菌之间发生交换重组的核心序列;避免在富含G·C区之后,紧接富有A·T区。这些方面的考虑,都有利于基因的表达。根据这些考虑,他们设计了8个寡脱氧核苷酸片段,连接成一个大片段(图5)。在这个片段中含有生长抑制素结构基因(在NH₂-末端氨基酸之前设计

¹⁾ pop'及Bop'分别为 λ 噬菌体及其原噬菌体的附着点;BoB'及poB'分别为在细菌上 λ 噬菌体及原噬菌体的附着点。

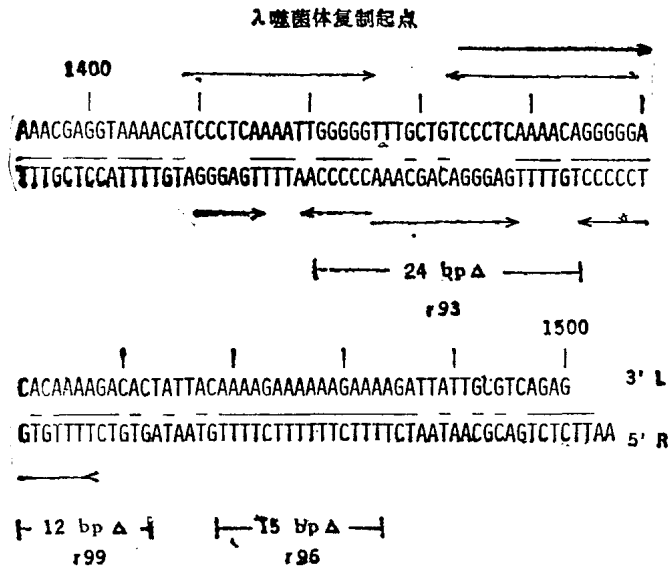


图 4 λ噬菌体复制起源区域的核苷酸序列。图中表明 *ori*⁻ 突变株 r93、r96 及 r99 缺失的核苷酸。*ori*⁻ 突变株 ti 12 是在 1,451 位置上 C·G 颠换为 A·T。

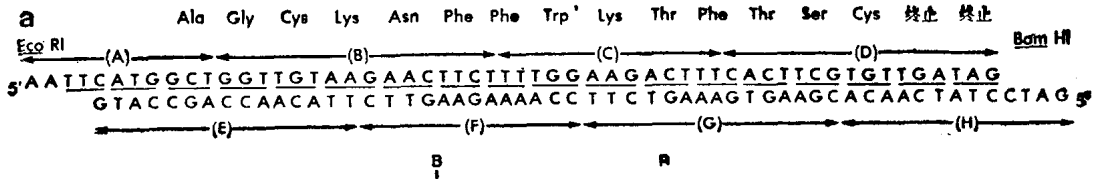


图 5 化学合成的生长抑制素基因^[17]。

为甲硫氨酸密码子，在 COOH-末端密码子之后为两个无意义的密码子)。此外，为了使生长抑制素结构基因容易插在质粒分子载体上，这个 DNA 大片段的 5' 末端是 *EcoRI* 酶及 *BamI* 酶识别的单链粘着末端。应用 pBR 322 及其改造后的 pBH 20 质粒作为分子载体、在载体分子上引入了 λ *plac5* 上的一个 *HaeIII* 片段，即含有乳糖促进子、CAP (降解物基因活化蛋白) 的结合位点、操纵基因、核糖核蛋白体结合位点以及半乳糖苷酶结构基因头 7 个氨基酸的片段，这样，便使得生长抑制素结构基因处于 *lac* 操纵子调控系统的控制下，有利于正确表达。

这一研究成果的重要性，在于真核基因转移到原核中有着功能的表达。其实践意义是可以发酵途径，生产出大量廉价的这类有价值的产品。

自 DNA 体外重组技术问世以来，关于真核基因、特别是高等生物的基因在原核中能否正确表达，一直是研究者们关心和引起注意的问题。随着基因工程技术的日益完善和发展，这个重大问题有了新的突破。Itakura^[16] 报道了一项激动人心的研究成果，这就是人工合成的脑激素(生长抑制素)基因，不仅成功地转移到大肠杆菌中去，而且正常地表达它的功能。为了安全起见，产物是前体多肽，利用溴化氰来切开这前体多肽，即释放出有活性的激素，这是高等生物基因通过基因工程途径，首次在细菌中成功地合成有功能的

产物。

这项工作的成功是与巧妙的实验设计是分不开的。一是基因化学合成的设计；二是运载分子的设计和改造。他们考虑以这种脑激素为对象，主要由于这是一个小多肽激素（14 肽），氨基酸序列清楚，有灵敏的免疫学和生物学测定方法等有利条件。在密码子的选择上他们尽可能地选用有利于 MS 2 基因表达的密码子；尽量排除那些造成分子内或分子间配对的密码子；避免在富含 G·C 区之后，紧接富有 A·T 区。这些方面的考虑，都有利于基因的表达。根据这些考虑，他们设计了 8 个寡脱氧核苷酸片段，连接成一个大片段（图 5）。在这个片段中含有生长抑制素结构基因（在 NH₂-末端氨基酸之前设计为甲硫氨酸密码子，在 COOH-末端密码子之后为 2 个无意义的密码子）。此外，为了使生长抑制素结构基因容易插在质粒分子载体上，这个 DNA 大片段的 5' 末端是 *EcoRI* 酶及 *BamI* 酶识别的单链粘着末端。应用 pBR 322 及其改造后的 pBH 20 质粒作为分子载体、在载体分子上引入了 λ *plac* 5 上的一个 *HaeIII* 片段，即含有乳糖促进子、CAP（降解物基因活化蛋白）的结合位点、操纵基因、核糖核蛋白体结合位点以及半乳糖苷酶结构基因头 7 个氨基酸的片段，这样，便使得生长抑制素结构基因处于 *lac* 操纵子调控系统的控制下，有利于正确表达。

这一研究成果的重要性，在于真核基因转移到原核中有着功能的表达。其实践意义是可以经过发酵途径，生产出大量廉价的这类有价值的产品。但更重要的是理论意义，在理论上它提供了一个依据，通过基因工程利用细菌来研究高等生物基因功能的表达有现实可能性。

继这项工作后，最近又报道了鼠和人的胰岛素基因（前者是由胰岛素 mRNA 逆转录后得到的基因，后者是人工合成的人胰岛素基因 A 链及 B 链）转移到大肠杆菌中实现了功能性的表达^[64]。

据报道^[65]，Berg 通过 SV 40 病毒载体，成功地将编码家兔血红蛋白 β 多肽链的 DNA 片段，转化至非洲绿猴培养细胞株中，而且在猴细胞中得到了表达。这是应用 DNA 体外重组技术，第一次实现把功能性基因从一种哺乳动物转移至另一种哺乳动物细胞中去的实例。这类工作的重要性是毋庸置疑的。

结 语

本文简述了基因工程技术的发展动态及其重要进展。

基因工程技术正在迅速发展与完善中。

限制性核酸内切酶种类日益增多，连接体广泛应用，使得几乎任何一个 DNA 片段，都能够插入到分子载体上进行分子无性繁殖。

建造新的分子载体，包括扩大载体来源和改造现有载体，使之成为更理想的运载工具，是当前载体研究的一个重要方面。目前建成了一些既安全、易于选择的重组体，是利于外源基因表达的多功效的分子载体。

基因工程技术的应用对于基因结构与功能的研究具有重要意义，特别是对于高等生物基因和染色体的研究尤为重要。

目前，利用化学合成的结构基因、人工合成的限制酶识别位点、合理改造的分子载体，