

编号: (77)014

内 部

出国参观考察报告

英 法 遗 传 工 程

58.149
Z65
C.1

科学技术文献出版社

出国参观考察报告

英法遗传工程

(内部发行)

编辑者: 中国科学技术情报研究所

出版者: 科学技术文献出版社

印刷者: 中国科学技术情报研究所印刷厂

新华书店北京发行所发行

各地新华书店经销

开本787·1092· $\frac{1}{16}$ 2.25印张 144千字

统一书号: 13176.24

定价: 0.30元

1977年12月出版

目 录

(一) 概况	(1)
(二) 有关遗传工程方面的主要研究内容	(2)
附录一: 鉴定噬菌体 λ 重组体的方法	(19)
附录二: 分离 Bam 1 限制内切酶的程序	(21)
附录三: 用于蛋白质和核酸分离的制备凝胶电泳装置	(24)
附录四: 限制性酶和修饰酶以及它们所认识的序列	(26)

英 法 遗 传 工 程

分 子 生 物 学 考 察 组

(一) 概 况

我们分子生物学考察组一行六人，于1976年9月7日至10月24日先后考察了英法两国的有关研究单位与大学。在英国应邀参加了英国生化学会举办的第九届哈顿会议——分子生物学中的质体重组。并先后访问了格拉斯哥大学、爱丁堡大学、剑桥 MRC 分子生物学实验室和Sussex大学等14个单位，有将近50人介绍了他们的研究工作。在法国参观了法国科学研究中心所属的吉夫 (Gif) 遗传中心、酶学实验室、马塞生化和分子生物学中心，斯德拉斯堡大学医学院分子生物学系，以及巴斯德研究所等八个单位。介绍工作的有30多人。介绍的内容繁多。我们考察的主要任务是与遗传工程有关的情况。现将所了解的各单位开展遗传工程的工作情况汇报如下。

所参观的单位中，有许多在搞遗传工程或从事与遗传工程有关的研究。如英国的 Glasgow 大学、Edinburgh 大学、MRC 剑桥分子生物学实验室、Sussex 大学、John Innes 研究所等，法国如巴斯德研究所、法国科学研究中心所属的分子遗传中心、巴黎第七大学等。Glasgow 大学病毒系主要研究病毒基因，作病毒基因组的物理图和基因图，研究病毒基因的表达与控制。如 Wilkie、Williams 利用限制酶和温度敏感突变株相结合，分别确定了疱疹病毒和腺病毒的物理图。Williamson 用遗传工程方法，试图确定免疫球蛋白基因区中的恒定部分与可变部分。Glasgow 的 Beatson 肿瘤研究所的 Paul，利用珠蛋白 mRNA 经反转录酶制得 cDNA，再以 cDNA 为探针研究一种贫血病 (Thalassemia) 的病因。

Edinburgh 大学分子生物系的 Murray 和 Brammar 等主要研究噬菌体作为基因载体的设计和应用。Southern 研究应用遗传工程的技术来纯化真核细胞基因和定位的工作。在细胞质体方面，Broda 研究假单胞杆菌在分解木质素中未定分解甲苯类化合物的 TOL 质体。利用遗传工程的方法将 TOL 质体的内切酶裂解片段进行功能定位。Scaife 研究 RNA 聚合酶和基因表达问题。他计划用遗传工程的方法将 E. coli RNA 聚合酶基因通过与 RPI 质体的接合感染假单胞杆菌，观察 E. coli RNA 聚合酶对假单胞杆菌基因表达的作用。

英国医学委员会剑桥分子生物学实验室的 Rabbitts 曾将免疫球蛋白基因与质体重组后转入到 E. coli，研究其表达。Brenner 实验室在搞遗传与发育，试图阐明真核基因如何控制发育。他们以线虫为材料，从追踪每个细胞的发育分化途径来研究肌肉和神经系统的发育及其分子遗传学。也以果蝇为材料，通过体细胞杂交研究基因对发育的控制。Brenner 本人自称研究与上述工作有关的遗传工程方法方面的问题。

英国 John Innes 研究所有一个小组从事根瘤菌的固氮的遗传学研究，通过杂交转移固氮基因，用的是具有性因子功能的质体 R68.45，试图进行根瘤菌的固氮基因分析。并在

进行农杆菌的Ti质体与带固氮基因的R质体相结合（体内结合）的工作。Beringer 还利用 R 68.45 首次做出根瘤菌染色体上几个遗传标记的定位工作。

Sussex大学固氮研究室Kennedy和Dixon主要研究P组质体RP₄与 Nif⁺His⁺ 染色体片段在克氏肺炎杆菌内的重组。同时应用RP41（即RP₄-nif. his）进行nif基因间的互补，定位了nif基因丛中六个基因的位置。Cannon利用遗传工程方法将质体RP41上的 nif his 片段与 ColE1 衍生质体结合，在体外构成DNA重组分子。

法国科学研究中心在巴黎第七大学的分子生物研究所，为开展遗传工程研究已建成一个比较好的P₃级（负压）实验室。Barnerdi介绍了酵母线粒体基因组的构成。这基因组较小，分子量约为 50×10^6 。每个细胞只有 50—100 基因组单位，由含有AT较多的间隙区、基因区和GC群区组成。在DNA上呈重复顺序存在。已发现在酵母线粒体DNA上有60—70个这种顺序样，这个数目相当由线粒体的基因数。GC 群（即限制酶 Hae III、Hpa II 切点群区）相当于原核细胞中的起动机部分，对基因有调控作用。Haenni 在搞爪蛙组蛋白基因的无性系。先分离hn DNA，用¹²⁵I标记，与限制酶切断的DNA片段杂交，找出hn DNA，然后与质体在体外构成重组分子。或者简单地用RI酶切断爪蛙DNA，用凝胶电泳分离，选取分子量相当于 4×10^6 的区带部分DNA，与质体P_{CR1}形成杂种分子转入E. coli。用氯霉素处理使之增殖，用Km作为选择标记选出重组分子进一步繁殖，再鉴定重组体DNA分子。

法国巴斯德研究所，Tiollais 和 Rambach 用他们自己发展的λ载体，与腺病毒 Z DNA 片段重组，用噬菌斑形成法检出重组体，再用分子杂交鉴定所产生的 RNA，并认为转录起始是利用了噬菌体的起动机。Rambach还介绍了他在美国Stanford大学Hogness实验室做的工作，将果蝇片段插入PSC101质体中。并引入E. coli。研究果蝇基因在E. coli中的表达。Kourilsky介绍了将珠蛋白基因接到PCRI上转入E. coli，研究基因表达的工作。还与Strasbourg大学的Chambon合作研究鸡卵白蛋白基因在 E. coli 中的表达。还介绍了研究免疫学鉴定选择重组体的方法。

法国科学研究中心在吉夫（Gif）的分子遗传中心的 Slonimski 在酵母线粒体遗传方面做了大量的工作，他认为真核基因要在原核细胞中表达是不可能的。而酵母倒可能是个理想的受体。他研究用酵母的质体（如2μ的小质体）作载体。目的是建立一个真核细胞的载体——受体系统。

以上只是简单地介绍英、法两国在遗传工程方面的工作概况。下面结合我们在哈顿会议上所了解到的情况，分几个专题介绍。

（二）有关遗传工程方面的主要研究内容

有关遗传工程方面的主要研究内容（包括在英国召开的第九次 Harden 会议上的一些工作介绍）。

（1）细菌质体的遗传特性

质体遗传方面，着重介绍一下 Richmond 教授及 Datta教授关于质体基因易位（Transposition）—易位子（Transposon）的工作。

质体基因的传递可以通过接合转移（conjugal transfer）、转导（transduction）和转化（transformation）途径来实现。最近几年，首先由 Datta及 Richmond 教授发现了质体

基因易位的这个新的遗传现象。这个现象表现在：易位子可以从这个质体易位至另一个质体，也可以从质体上易位至大肠杆菌的染色体上。得到易位子的质体（或染色体）又可作为给体，继续将易位子传递给其他质体。质体基因易位的机理目前尚不清楚，但用我们平日惯用的重组机理不能解释易位现象。了解质体基因易位，有助于进一步了解质体之间、质体与染色体之间基因的关系，对于研究细菌质体在细菌进化中的作用，以及研究R因子的流行病学方面均有较重要的意义。因此，这个新的遗传现象在质体遗传方面是一个引人注意的方面，Richmond教授在Harden会议上专门对这个问题作了介绍。

一、什么是易位子？根据目前的知识，易位子是一个特定的DNA序列，这个序列能从质体上易位至另一质体或染色体上。Datta教授将其具有易位能力的DNA序列叫做易位子，它是一个易位的遗传单位。

发现第一个易位子是Tn A (Transposon A)，是从RP 4质体中发现。RP 4质体是P相容族的典型质体，在此质体上带有抗 α -氨基苄青霉素 (ampicillin)、四环素及苄那霉素的基因。Tn A是指RP 4质体上抗 α -氨基苄青霉素基因的这段DNA序列，这一段DNA序列具有易位的功能。除Tn A外，最近Datta实验室又发现另一个易位子，叫Tn C。这个易位子是在R483质体上发现，是R483质体上为甲氧苄氨嘧啶 (Trimethoprim) 及链霉素编码的这一段DNA序列，这个DNA序列从R483质体上可易位至其他复制子上。

二、Tn A (及Tn C) 易位的质体范围及其频率：根据目前所知，Tn A及Tn C可易位至同一相容族的质体中，也可易位至不同相容族的质体中，具有较广泛的易位范围。以Tn A为例，Tn A易位不仅限于P族，而且可易位至W、N、F II、C、I等不相容族的一些质体中去（表1）这个事实使研究者们很感兴趣，因为在不同相容族的质体之间，例如在P族（RP 4）、Ia族（R483）及W族质体（R388, Sa）之间，DNA同源性很差，Tn A, Tn C在这些不相容的质体之间可以有效地进行传递，这个事实表明：易位子的易位机能不能用一般重组的机理来代替，可能具有新的机理。

表1 Tn A 易位至不相同的质体及其易位频率

接受Tn A 的质体	所属相容族	频率
R 388	W	1.3×10^{-2}
R 751	P	2.0×10^{-2}
R 46	N	4×10^{-4}
R 100—1	F II	2×10^{-6}
R 1—9		2.4×10^{-3}
R 55—1	C	1×10^{-2}
R 64—11	I	7×10^{-4}
R 391	J	未测出

*Tn A易位后接合子占整个接合子的比例。

易位子的易位频率随着不同的受体有所不同，根据Richmond介绍，TnA至不同质体易位频率为 10^{-2} —— 10^{-6} （表1）。特别要指出一点：尽管不同相容族中某些质体可作为TnA（或TnC）易位的受体，但不是所有的质体均能作为易位子的受体。例如：多次测定RP4上 α -氨基苄青霉素抗性基因易位子R391（J族）质体上，均没有成功。同样地，没有观

察到TnC易位至R300A, R300B及R386质体上去。(而TnC可易位至R391质体) 这些事实的原因尚不清楚。但这些事实表明: 由于某种机理使TnA (或TnC) 对受体DNA序列有一定的识别能力。

三、接受了易位子后质体的大小及其分子量:

接受了易位子后, 质体的大小及其分子量增加, 而且同一个易位子易位至不同质体上后, 这些不同的质体 (甚至包括在分类上不相关的质体在内) 所增加的长度及其分子量均相似。例如, 接受TnA后不同质体增加分子量为 $1.7-3.9 \times 10^6$ 道尔顿; 接受了TnC后, 不同质体增加分子量为 9.0×10^6 道尔顿左右。Richmond教授列出资料 (表2) 表明: TnA 易位子至不同质体后, 接受了TnA的质体比原来的质体增加 $4 \mu\text{m}$ 。

接受了易位子的质体与原来质体的DNA进行异源双键 (heteroduplex) 的研究表明, 易位子在异源双键分子中以单键环的形式存在。

易位子易位给不同质体, 这些不同质体所增加的分子量 (及长度) 有如此的一致性, 这个现象不可能是随意重组 (random recombination) 的结果, 用一般重组机理来解释这一事实也是有困难的。

由于一般重组机能无法解释上述事实, 即: 1) 易位子可以在DNA同源性很差的受体中进行易位; 2) 接受易位子的不同质体所增加的分子量具有一致性, 因此, 易位现象可能有特殊机理。这个问题目前不清楚, 也是Datta实验室中重点研究的问题之一。

四、决定易位的遗传基因及易位插入位置的研究: TnA (或TnC) 易位给另一个复制子 (如质体和染色体) 后, 复制子上的TnA (或TnC) 又可第二次易位给其他质体, 这个事实表明: 在易位子易位时决定易位的遗传基因也随之易位过去。

关于易位子在质体上插入的位置问题, 目前主要是遗传学方法结合限制性核酸内切酶及凝胶电泳等技术来进行研究。例如, Datta实验室研究TnC在RP4上插入的位置, 用遗传学方法测定插入的位置, 这三个位置即Tc、km及Tra*基因处。为了证实这个结果, 他们利用不同的限制性核酸内切酶来研究TnC对RP4插入的位置。例如, 已知EcoR1酶对RP4只有一个切点, 他们发现TnC易位至RP4后, 对于EcoR1有两个切点, 可以利用EcoR1切RP4的位置来标记EcoR1在TnC上切点的相对位置。

表2 TnA易位后质体大小的增加

质 体	相 容 族	抗 性 标 记	大小 (μm)	增加片段的大小 (μm)
R388	W	TpSu	21.5	—
R388al		TpSuAP	25.5	4.0
R46		SuSmTc	33.3	—
R46al	N	SuSmTcAp	37.3	4.0
R751		Tp	34.9	—
R751al		TpAp	38.9	4.0

五、易位子易位后在原来的质体上这个易位子是缺失了? 还是继续存在?

• 负责转移的基因

Richmond教授在报告中指出, 当 α -氨基苄青霉素抗性基因易位至一个受体时, 给体并不变为Amp^S, 仍为Amp^R。换句话说, 在给体质体上易位子的这一片段仍继续存在。Richmond教授对这个现象的解释是: DNA复制可能首先从易位子开始, 当易位子的一个拷贝从质体上切割并易位给受体时, 另外的拷贝仍保持在给体菌中。

六、易位的免疫性: Richmond 教授发现在一个质体上有易位子存在时对于第二个易位子的插入有免疫性。例如, tnA易位至R388质体的频率一般为 10^{-2} , 但是tnA易位至已经带TnA的R388质体时, 易位频率降降至小于 10^{-7} 。这个现象的原因还要进一步研究。认为: 在研究时需要将下面二个现象区分开来: 1) 是由于某种插入的原因影响了第二个易位子插入至原来已有易位子的质体上; 还是2) 由于某种原因使第二个易位子不能表达; 尽管第二个易位子已顺利地插入至原来已有易位子的质体上。

七、关于易位子易位至细菌染色体上的问题: TnA、TnC均可易位至大肠杆菌的染色体上。以TnC为例, 易位至染色体上的频率可达4%。TnC易位至染色体上的插入位置只有一个, 是在dnaA基因与ilv基因之间。与整个R483质体组入至染色体是不同的: 它的插入不抑制dnaA基因的表型。还值得特别提出的一点是: 在细菌rec⁺或recA中, TnC易位的情况没有什么差别。这个事实表明: TnC从R483质体上易位至染色体上不需要recA⁺基因的产物—重组酶。

八、目前已知的易位子共九个, 其来源及它们所带的抗性标记列于表3。

表3 已知易位子的来源及其抗性标记

易 位 子 名 称	来 源 于 质 体	抗 性 标 记 *
T _n 1	PP4	AP
T _n 2	RSF1030	AP
T _n 3	R1	AP
T _n 4	R1	AP Sm Su
T _n 5	JR67	Km
T _n 6	JR72	Km
T _n 7	R483	Tp Sm
T _n 9	PSM14	Cm
T _n 10	R100	Tc

* Ap——氨苄西林

Sm——链霉素

Su——磺胺

Km——卡那霉素

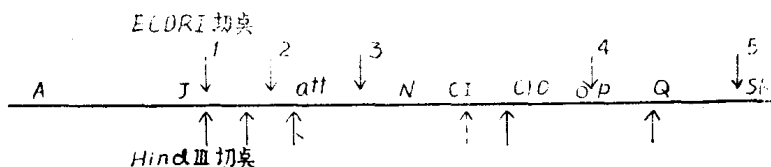
Tp——甲氧卡氮嘧啶 (TMP)

Tc——四环素

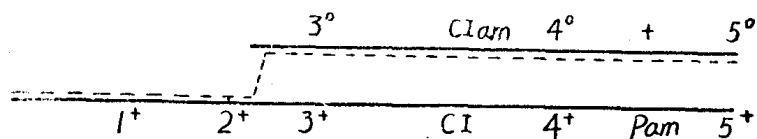
(2) 基因载体cloning vector的设计和应用

λ噬菌体的应用 在英法都趋向于应用λ噬菌体的衍生型作为基因载体，它的优点在于λ噬菌体的遗传知识丰富，而且利于基因的扩增，不易引起生物危害。在改建λ噬菌体成为基因载体时要考虑的问题：一、λ噬体DNA有5个EcoR1切点如何将其减少成一个或二个切点作为引进外源DNA顺序的切口；二、如何使形成的λ-DNA—外源DNA的重组分子具有选择性状；三、如何使λDNA—外源DNA的重组分子在感染细胞中扩增；四、如何使外源DNA顺序从属于λ噬菌体的调控系统或者它自己的调控系统。

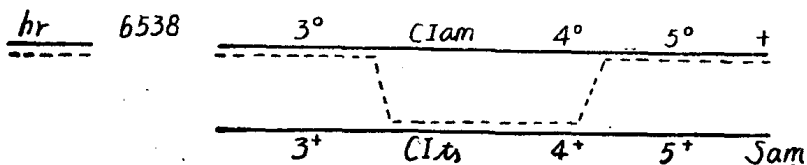
λ噬菌体DNA上EcoR1切点和HindⅢ切点的分布：



已知J-N这一段是λ噬菌体增殖不重要的部分，可以除去，因此可使这部位保持两个切点作为容纳外源DNA之用。而其他切点都可以去掉使保持其不受EcoR1的作用。要做到这一点可以从λ缺失型b538着手，因为这个缺失型只留下3, 4, 5 EcoR1切点（1, 2切点均在缺失部分）。将这个b538缺失型噬菌体不断交替地在E. Coli K和F. Coli K/R₁中繁殖，测定其噬斑，当其限止比率E. Colik效价/E. Colik/R₁效价=1时，表示这个噬菌体已失去其所有EcoR1的切点，成了抗EcoR1的类型。然后将这类抗EcoR1的b538型与对EcoR1呈正常型的λ噬菌体杂交，就可以获得具有1, 2, EcoR1切点，但失去3,



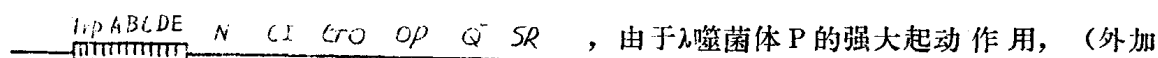
4, 5, EcoR1切点的λ型。如果将抗EcoR1的b538缺失型和另一缺失型h80 3⁺ CI_{ts} 4⁺ 5⁺ Sam, 相杂交，可以获得具有4切点的538型噬菌体，由于切点4与CI_{ts}相连锁，因此



CI_{ts}可以用作选择因子。用前一种λ型作为基因载体时时，外源DNA可以插入噬菌体的1, 2切点之间，也就是外源DNA顺序置换1—2切点之间的λ片断。当以后一种λ型作为基因载体时，外源DNA可插入4切点的切口。英国Edinburgh大学murray等采用λ噬菌体的EcoR1第4切点作为插入组旦白基因的切口，主要因为这个切点正居imm434区，凡从这个切点接合成的DNA重组分子，当感染到E. Coli时能形成十分清晰的噬斑，这就成选择的有利条件。这种载体称之为插入载体。虽然在J-N之间发生缺失的部分对这个噬菌体的增殖

是不重要的，但由于缺失而造成 DNA 的残留长度不足以装配蛋白壳时，就不能形成正常的噬菌体。相对的。如果外源DNA顺序插入后，增加了 λ -DNA 的长度，就可以噬菌体趋于正常发育。因此可以将正常型的噬斑作为选择因子，一般，50—90% 的噬斑将是 λ -DNA-外源DNA的重组分子。murray 等用 E. Coli lacz (β -galactosidase) 基因插入至上述作为基因载体的 λ 噬体，受体为 E. Coli lacz⁻ 菌株，选择 λ -DNA 的重组分子。

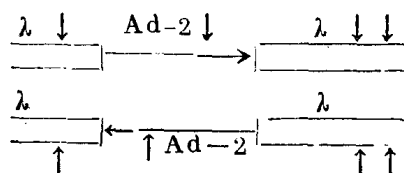
为了提高外源基因的扩增，Brammar等设法使 λ 噬菌体的 S, R, 基因突变为 S⁻R⁻ 或者将 Q 诱变为 Q⁻。因为 Q 控制 S, R 或 J A 的表达，由于 Q⁻ 使 S, R, J, A 不能转录，结果影响 E. Coli 延迟裂介，相对地使 DNA 重组子扩增。在外源基因不含有其起动机 P 的条件下，可以利用 λ 噬菌体 P 的作用。例如当色氨酸操纵子插入 λ 噬菌体后，



Cro⁻的作用）发现产生了过量的色氨酸合成酶。Helinski 又利用 CI_{ts} 突变型载体，合成 —Trp⁺CI_{ts}Cro⁻Q⁻— 重组分子，在变化温度条件下调节 Trp⁺ 基因的表达。

按 N. murray 的报告，应用上述的设计，他们成功地将地衣杆菌 (B. licheniformis) 的 β -内酰胺酶 (β -lactamase) 的基因移入 E. Coli 中去。现在正在做 DNA 联接酶基因，以及几种限止性内切酶基因和 λ -DNA 的重组试验。

法国巴斯德研究所的 Tiollais 等同样应用诱变和重组的方法将 λ 噬菌体设计为基因载体。他们用缺失型 6221 作为基础，分离出一株抗 EcoR1 的突变型，然后同样通过重组试验使其在不主要部位获得保持 2—3 个 EcoR1 切点，作为接受外源 DNA 的部位。Tiollais 等将腺病毒 Ad₂-DNA 与这个载体经 EcoR1 作用形成 λ DNA-Ad₂DNA 的重组分子，然后将这重组分子感染 E. Coli 发现 Ad₂-DNA 片段插入 λ -DNA 时呈两个相反动向。插入的动向可以用限止性内切酶 Bam I 来检定：

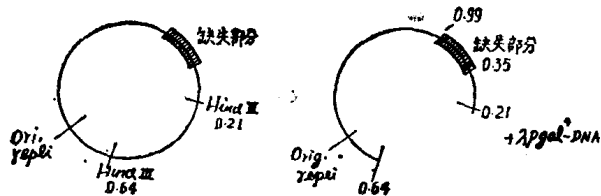


如果 Ad₂-DNA 含有重复性顺序（例如三聚体顺序），当感染 E. Coli 后分离出的 λ DNA-Ad₂DNA 重组子中，Ad₂-DNA 的顺序方向可分成三种（见下图）：推测第三种转向能由于 DNA-顺序内部转位的结果。Tiollais 将 λ DNA-Ad₂DNA 重组分子感染 E. coli 后，发现有 Ad-2RNA 的产生，但是当 λ DNA 保持 CI⁺ 时，即呈溶原性状态时，不形成 Ad-2-RNA，说明 Ad-2DNA 的转录受 λ 噬菌体的调控。



将外源DNA顺序移入到真核细胞内并使之增殖，就必需设计一种能在真核细胞内增殖的基因载体，致癌的猿猴病毒SV40是一个理想的基因载体。美国Stanford大学的P.Berg在英国Handen会议上报告了他们的工作，主要利用缺失型SV40作为基因载体，设计合成一个

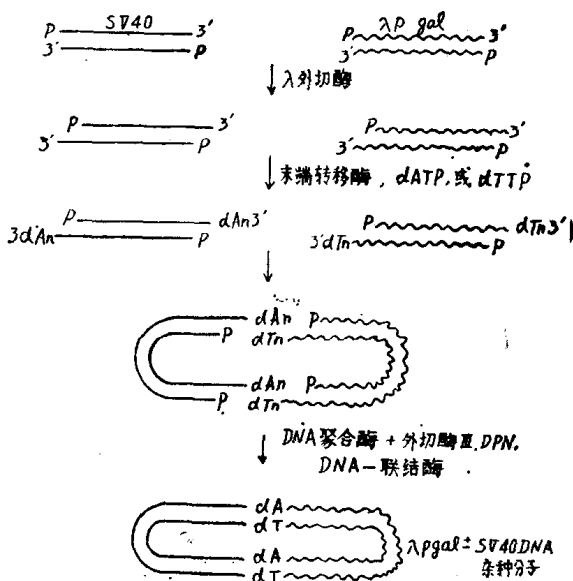
SV40- λ Pgal⁺的杂种分子。



将 λ Pgal-SV40DNA杂种分子和辅助病毒 (helper Virus) Ts突变型感染单层猴子细胞培养物 (在39℃保温时, helper virus ts突变型不能生长), 从感染细胞中提取标记P³²-mRNA, 分别与辅助病毒和 λ Pgal-SV40-DNA进行分子杂交, 根据电子显微镜的异源双链试验表示感染细胞内形成的 m-RNA 仅能与SV40片段相杂交, 说明 λ -Pgal+DNA顺序不能转录。Berg推测可能由于 λ Pgal+-SV40DNA杂种分子间引入 dAn-dTn顺序的缘故。他试验将 dAn-dTn 插入其他转录方向。尚未得到试验结果。(见下图)

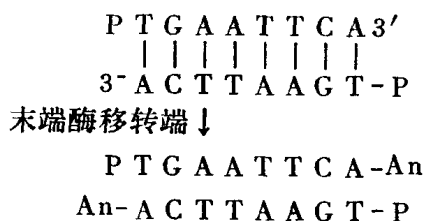
美国冷泉港实验室的 G. Sanbrook, 在 Harden会议上介绍以SV40DNA片段插入 Ad₂缺失型, 感染人体细胞培养, 从转化细胞中分离出DNA, 经限制性内切酶作用, 然后将其片段与SV40DNA杂交经电子显微镜异源双链测定, 证明SV40片段已引入细胞染色体。

将SV40DNA用内切酶Hpa II 和 Bam I 处理, 采用其含有复制起点(O. Rep)的 DNA 片断作为基因载体, 然后会同 λ Pgal⁺片段, 按Beng的方法将 λ 外切酶切去其5'末端, 再用末端转移酶分别加dAn末端或 dTn末端于SVDNA部分和 λ Pgal⁺部分, 再加DNA聚合酶和外切酶, 以补偿或切除其不合适的末端, 最后用DNA联结酶完成其共价键的联接。

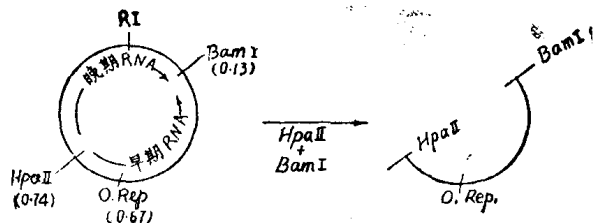


Berg在设计基因载体方面, 用化学方法合成EcoRI切点顺序, $\begin{matrix} T & G & A & A & T & T & C & A \\ | & | & | & | & | & | & | & | \\ A & C & T & T & A & A & G & T \end{matrix}$ 8-核

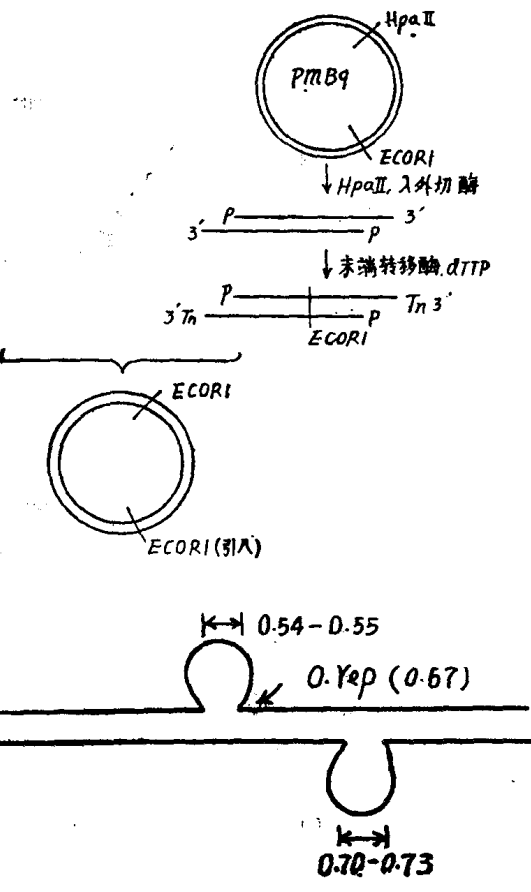
苷酸。然后用末端转移酶的接尾法使与细菌质体PMB9相结合, 使 PMB9 获得两个 EcoRI切点。



Berg将SV40的一个缺失型突变株 (缺失部分在0.54—0.55图位) 与另一株缺失型) 缺



失部分在0.70—0.73图位) 建成异源双链分子, 然后用SI 内切酶处理, 将其不配对的部分切下, 其中有一个DNA片段约占SV40DNA长度的13%包含SV40DNA的复制起点(Orep),



如果将这个片段感染CV-1猴子肾脏细胞 补 加 正常SV40作为辅助, 便可获得许多相当于 原来DNA片段n-倍长度的环形DNA 分子。Berg 认为这种含有复制起点的DNA片段可以象 细菌质体一样作为基因载体使用。

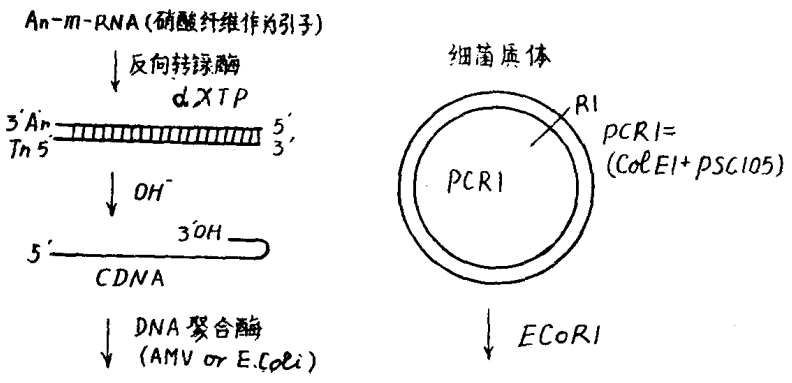
瑞士日内瓦大学的 Mach 和 Rougeon 在 Harden会议上介绍了他们利用m-RNA 使基因 插入载体的设计。主要的过程是将兔子的 β -珠 蛋白 (globin) mRNA经反向转录酶的作为成为C-DNA, 然后将单链C-DNA复制成双链 DNA后再以人工粘接末端法与载体相联结 成 为重组DNA 分子。

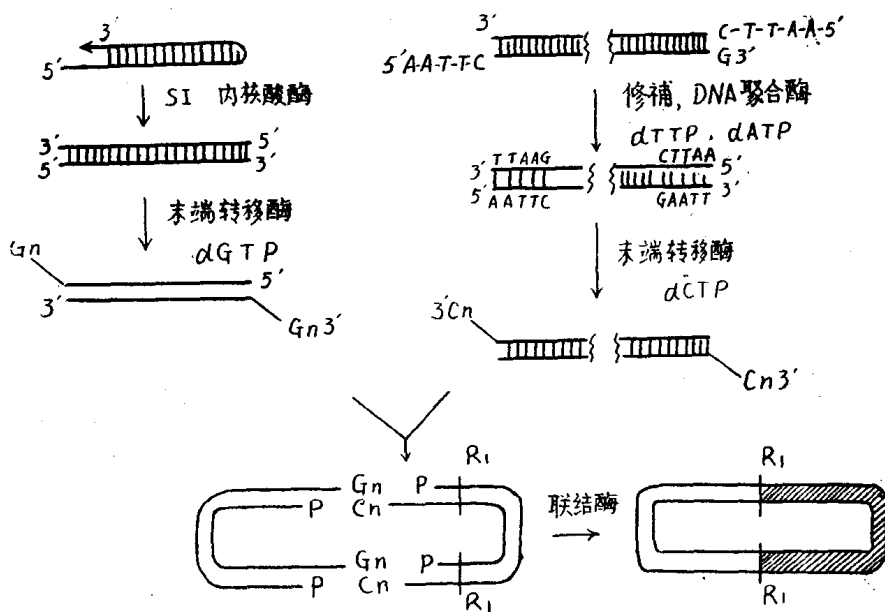
步骤图示 (见下图):

剑桥的T. H. Rollitts将这个 方法改变, 他在钩取 兔子珠蛋白基因时, 将细菌质体 min-ColEI 经 EcoR1 切开后, 用末端转移酶 加上 dTn顺序, 这样加上 Tn 尾的 miniColIEDNA 片 段, 可以作为m-RNA引子, 当经反向转录酶, dXTP作用后合成CDNA。然后分别将CDNA 与mini-ColE DNA片段用末端转移酶加入 Tn 或An顺序, 两者混合后, 退火, 感染E. Col 即在体内形成含有 兔子珠蛋白-DNA 的质体重

组子。

法国Strasberg大学的Chambon 在研究真核基因的调节问题时, 利用同样的原理从鸡的 输卵管细胞分离卵白蛋白 (Ovalbumin) 基因, 他从多核糖体分离这个基因的 m-RNA (约 2kb), 以多聚胸腺嘧啶-纤维 (Poly-dT-cellulose) 作例子, 利用反向转录酶形成C-DNA 再经碱性蔗糖梯度密度层析, 分离出单链C-DNA然后用Kornberg DNA聚合酶 合成双链 C-DNA, 同样用SI内切核酸酶切开其单链部位。最后用接尾法分别将质体PCR1 DNA 和





CDNA接上Gn或Cn顺序，使成环状分子。为了保持PCRI的EcoR1切点，当PCRI经EcoR1切开后，同样用多聚酶将切点顺序补足，然后用接尾法与C-DNA联结。

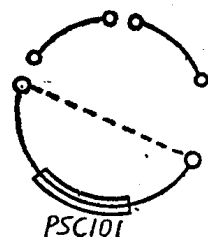
(3) 真核基因的结构，表达和它的调节

应用遗传工程的手段研究真核基因的结构和作用正在广泛展开。由于组蛋白基因的活动在细胞周期和生物发育时期所表现的调节现象，很多实验室都以组蛋白基因作为研究模型。瑞士Zurich大学分子生物研究所的Schaffner在Harden会议上介绍他们应用遗传工程的方法研究海胆 (*Psammechinus miliaris*) 组蛋白基因的结构和表达。已知在海胆染色体上决定组蛋白的DNA顺序 (简称组蛋白-DNA) 以6—7 Kb为一单位，重复地串联着，为了弄清楚在这6—7 Kb单位中组蛋白基因的顺序，先以电泳分离标记的H³-9Sm-RNA，然后用离体翻译系统和制备5种组蛋白基因的m-RNA^o将海胆 (*Psammechinus miliaris*) 的组蛋白DNA 6 Kb片段经ECORI, Hind III和Hind II联合处理，使它分成5个片段。当这5个片段移到微孔滤膜，发现都能显著地与H³-9SmRNA相杂交，说明每一片段均有密码组蛋白的顺序，而且这几种内切酶的切点均不在结构基因之中。作者应用片段的重叠法确定这5个片段的顺序，同时分别将上述制备的5种m-RNA与之进行分子杂交，这样就确定了在6 Kb单位上的5个基因的顺序。Schaffner在Harden会议上介绍用Murray设计的噬菌体或细菌质体PCRI作为载体，来扩增6 Kb的供应，先将组蛋白DNA经Hind III切成6 Kb，同样以λ b538 缺失型DNA作为载体，用Hind III切开，按Murray的方法在imm474切点将6 Kb插入，然后以T₄联结酶使成共价键关闭，根据噬斑的清晰作为选择因子。如以PCRI作为载体时，同样以Hind III切开，PCRI只有一个Hind III切点，而且正在Km^r位点中，当6 Kb片段插入PCRI时Km^r失去作用，因此可以Colicin^r作为选择因子，然后以Km作为反选择因子，选择其Kms菌落。

从这上述两种载体分离出的6 Kb片段再用上述的Hind II, Hind III和EcoR1切成5个片段，分别与各m-RNA杂交，实行组蛋白基因定位。

x染色体39,000Kb, 第二染色体60,000Kb, 第3染色体63,000Kb, 第4染色体6,000Kb, 总共为165—170,000Kb。每个染色体分成约5000染色粒 (Chnosome) 或称染色粒单位, 每个染色粒单位平均约含有26Kb DNA。根据细胞学试验每个染色粒单位只含有一个基因 (如按原核细胞计算, 应有26个基因)。将果蝇染色体DNA用EcoR1进行部分裂介, 获得Dm片段(14Kb左右)。这些片段再与同样经EcoR1裂介的质体PSC101作用, 通过DNA联结酶处理, 即形成共价键的 (Dm) (PSC) 杂种分子, 简称PDm。将其感染E. Coli, 增殖成含有不同Dm片段的PDm杂种分子。Hogness等建立了一个筛选PDm菌落的方法。这个方法的主要步骤是将含有PDm杂种子的菌落培养在铺在洋菜平板上的硝酸纤维滤膜上, 用复印法做好参考菌落平板, 放置在2°—4℃作为备用。将生长在硝酸纤维膜上的菌落, 从培养板底部灌入0.5N NaOH, 经洗涤后再用蛋白酶处理使其自溶, DNA变性, 固定在滤膜上成为“DNA—印迹”。然后用标记³²P-RNA或H³-PNA与之进行分子杂交, 最后用x-光自显影肯定其杂交结果。于是从参考菌落平板挑较适当菌落进行培养, 提取不同的PDm分子做试验。根据PDm-DNA链的再结合动力学 (Reassociation Kinetics) 试验, 测定其DNA顺序的重复程度。再将各种PDm, 经E. Coli RNA聚合酶的作用转录为各自的C-RNA, 然后将标记H³-CRNA与果蝇的多线染色体 (Polytene chromosome) 进行原位杂交, 以测定这些Dm在染色体上的分布位点。结果Hogness等发现有两类Dm片段: 一类是DNA顺序不是重复性的, 限于一个染色粒区, 分布在各个染色体上。另一类Dm片段, 其DNA顺序呈不同程度的重复性, 不在染色粒区内, 其中有一个Dm分布在染色中心 (Chromocenter) 的异染色质部分。还有一个Dm分布在核仁部位, 根据分子杂交试验证明这个Dm含有密码18S和28S YRNA的DNA顺序。作者认为果蝇染色体产生这种重复串联式的顺序可能由于染色体间不平均重组的结果。

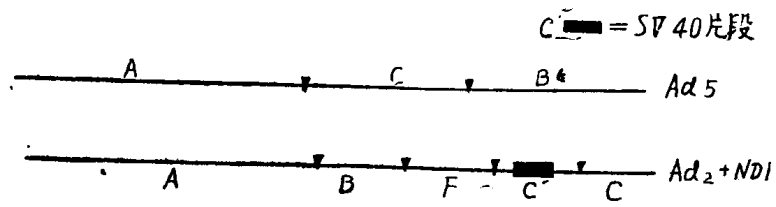
在研究真核基因的表达方面, 法国巴斯德研究所的Rambach在美国Stanford大学 Hogness实验室里将果蝇的DNA片段 (约20Kb) 与细菌质体 PSC 101 联结组成杂种分子, 当引入E. Coli增殖时, 一般常常发现产生5种蛋白质分子 (PSC 101 本身产生5个蛋白分子), 有一种情况却产生6种蛋白质分子, 这种额外发生的蛋白质分子, 其分子量为38,000道尔顿, 于是Rambach将这PDm杂种分子用EcoR1处理, 在离体条件下使成缺失型, 例如再选择不同的缺失型的PDm感染E. coli观察其对蛋白质 (38000道尔顿) 的形成, 发现在Dm片段中有一部分对这个蛋白质的形成是需要的。主要问题是这个蛋白质分子是否确是果蝇DNA片段所密码, 如果它和果蝇细胞内形成的蛋白质结构没有不同才能说真核基因的正确表达。最近美国Davis等人将酵母DNA与λ-DNA做成重组DNA分子后引入E. coliHis缺陷型 (不能合成咪唑-3-磷酸甘油脱水酶 (imidazole-3-phosphoglycerol dehydratase), 结果发现有互补现象。这是第一次说明真核基因在原核的表达, 但这个结果还要进一步的重复肯定。



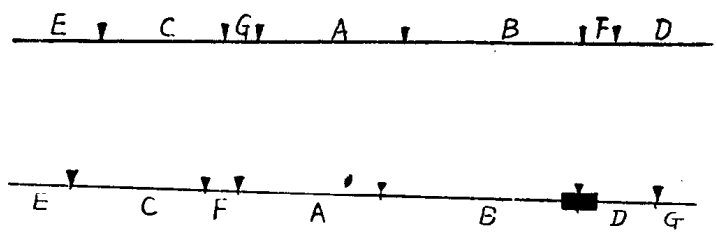
(4) 病毒和线粒体基因组的物理定位和基因定位。

要知道在一些肿瘤病毒中决定引起肿瘤性状的基因所在, 利用不同的限制内切酶分析它的基因组的结构, 进行物理定位和基因定位是一个重要的手段, 这方面的研究逐渐引起重视。英国 Glasgow 大学的病毒研究所开展了关于腺病毒 (Adeno Virus) 和疱疹病毒 (Herpes Virus) 的基因定位研究。在腺病毒方面, J. Williams 等应用不同基因组对限制性内切酶有不同切点的, 温度敏感性Ts突变型进行杂交, 分析其重组子 (Ts⁺), 再用内切酶分析

其基因组内的切点变化，这样就可以从物理图谱断定其重组的部位，同时可以测定 Ts^- 在基因组上的位点。例如腺病毒 Ad_5ts^- 温度敏感型只能在 $32.5^\circ C$ 在人体细胞培养内增殖，但不能在 $38.5^\circ C$ 增殖。而另一种温度敏感型 $Ad_2^+NDI ts^-$ ，是 Ad_2 和 SV40 的杂种病毒，这种病在 Ad 病毒基因组的一端发生 5.5% 的缺失，在这缺失部分插入相当于 SV40 基因组 10% 的 SV40DNA 顺序。因此这两类 Ts^- 病毒的 DNA 顺序是显然不同的。根据应用 $EcoR1$ ， $Hpa I$ 等裂介和部分裂介，以及异源双链 (Heteroduplex) 等测定， Ad_5ts^+ 和 $Ad_2^+NDI ts^+$ 型的 $EcoR1$ 和 $Hpa I$ 切点顺序在基因组上确定下来：



$HpaI$ 切点分布：



将 Ad_5ts_2 不同突变型与 $Ad_2^+NDI ts_4$ 相杂交，选择 ts^+ 重组子，将重组子基因组分别以 $EcoR1$ 处理和 $Hpa I$ 处理，同样将两个亲本也分别用这二种限制性内切酶处理作为对照。将三者的裂介产物经琼脂凝胶电泳进行比较就可以断定重组的部位和 Ts 实变点的部位。

$Ad_5ts_2 \times Ad_2^+NDI ts_4 \rightarrow ts^+$

($EcoR1$ 片段：)

从上列 $EcoR1$ 片段分析，可以看出重组子 Ts^+ 的 A, B, C, 片段与亲本 $Ad_5ts_2^-$ 的 A, B, C, 片段泳动相同，片段 A 在两个亲本基因组相同，但重组子产生了一个新的片段，介乎 Ad_5 的 B 片段与 Ad_2^+NDI B 片段之间。同时将 $Hpa I$ 的裂介产物经琼脂凝胶电泳进行比较分析，同样发现与亲本 Ad_5 的 $Hpa I$ 片断相同，但与另一亲本不同，实验结果说明重组的发生如下：

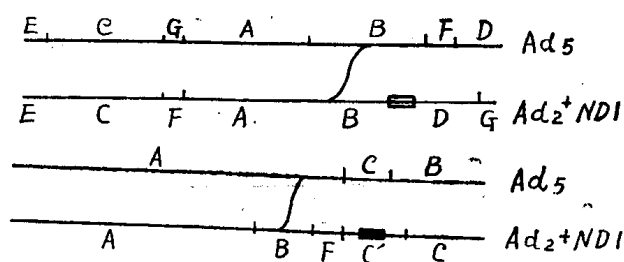
$EcoR1$ 片断间重组 (见下页图)：

因此重组子基因组的右端来自亲本 Ad_5 的 DNA 顺序，而左端含有亲本 Ad_2^+NDI 的 DNA 顺序，由此可以推断 Ad_5ts_2 突变株的 ts_2 基因应相当于 Ad_2^+NDI B, F 段之左的 Ad_5 DNA 顺序上，而 $Ad_2^+NDI ts_4$ 突变株的 ts_4 基因应位于 Ad_2^+NDI 的 A, B 段之右。同样，根据不同 ts 突变型 Ad_5-ts ，与 Ad_2^+NDI 的杂交，将 Ad_5 不同 ts 突变点的顺序定位下来，

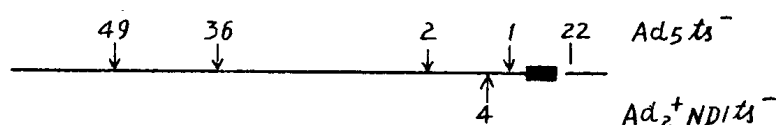
Williams 的这种条件已被广为应用, N. Wilkie 就是应用限制性内切酶等技术研究疱疹病毒 (Herpes simplex) 的物理定位, 证明这个病毒的基因组含有高度重复性的DNA顺序, 而且有些重复性顺序是反向的。他们同样以温度敏感型的遗传标记结合物理定位, 根据ts时的互补确定ts的图位。

线粒体基因图谱的研究, 最近几年来有所突破。法国科学中心分子遗传研究室的 Slonimski做了大量的工作, 其原因一方面由于大量点变式微小缺失型突变型mit⁻的发现, 另一方面由于限制性内切酶技术的应用和线粒体DNA (mit-DNA) 物理图谱的建立。建立 mit-DNA的物理图谱和基因定位的工作,

实质上包括二个步骤: (1) 应用不同限制性内切酶将mit-DNA切成片段, 经琼脂凝胶电泳分离, 然后定位; (2) 应用标记RNA, 如标记的r-RNA 或与mit-DNA片段相互补的标记C-RNA 进行分子杂交。在这里rho⁻突变型就是一个极好的试验材料。因为rho⁻突变型大



多是严重的缺失性突变 (有的达99.9%的DNA缺失), 而残留的顺序却不断扩增以补偿其不足, 因此形成了重复性顺序。如果将带有遗传标记的rho⁻突变型的mit-DNA, 制备成C-DNA, 使与正常型mit-DNA进行分子杂交就可以确定标记基因在物理图谱上的位点。例如下列图示, 一个rho⁻突变型由于mit-DNA的大量缺失形成重复性顺序, 经内切酶Hind II + Hind III作用后, 必然产生在电泳上表示出相当于某些正常型 (rho⁺) 的片段外, 还有一个新产生的接合片段 (junction segment) (见下页图):



将这种Rho⁻mit-DNA制备成C-RNA, 然后与Rho⁺mit-DNA 进行分子杂交。如果 rho⁻C-RNA能与 rho⁺H₂, H₃H₄片段相杂交, 说明这个缺失型仍保持了原来mit-DNA上的H₂, H₃H₄顺序。为了确定某个遗传标记的位点, 就必须选择这个遗传标记的突变型做试验, 制备C-RNA, 或C-DNA, 再与上述的H₂H₃H₄片段进行杂交试验, 如果C-RNA 或 C-DNA 仅能与H₄片段相杂交, 表示这个遗传标记在H₄片段上。例如 Rho⁻突变型F₁₂, 含有除 O₁ (对Oligomycin有抗性) 性状外还有许多其他遗传标记。F₁₂mit-DNA的Hind II + Hind III裂介片段根据在凝胶电泳上的位置相当于Rho⁺mit-DNA的Hind II + Hind III裂介片段 H₄、H₅、H₆、H₇。为了确定O₁的位点, 利用许多只含有O₁标记的 Rho⁻突变型如 Rp6, RP15/A1的mit-DNA制备成C-RNA, 然后按照 Southern 的纸片杂交试验 (Southern, E, M 1975, J. Mol. Biol 98, 503-517) 使与F₁₂突变型的H₄、H₅、H₆、H₇片段杂交, 发现只能与H₅片段杂交, 说明O₁在H₅片段上。利用这种方法Slonimski等将许多遗传标记包括 r-RNA 在 mit-DNA上进行定位。

法国巴黎第七大学分子遗传实验室Bernardi等人对酵母 (S.cerevisiae mit- 基因组的组成应用遗传工程的技术进行系统分析。他们发现酵母细胞的mit-DNA有两个明显不同的顺序部分: (1) A+T较多部位, (G+C少于5%), 呈dAdT; dAdT, dA:dT的重复性