

上篇 技 术 篇

第一章 基因克隆技术概述

基因克隆技术 (gene cloning technique), 又称为分子克隆技术 (molecular cloning technique) 或重组 DNA 技术 (recombinant DNA technique), 通常称为基因工程 (gene engineering)。它是基因分子水平上的遗传工程, 是 20 世纪 70 年代初期在分子遗传学基础上发展起来的一个崭新领域, 是一门能人工地定向改造生物遗传性状的育种新技术。

第一节 基因克隆技术

一、基因克隆技术的诞生和兴起

基因克隆技术这门现代生物技术中最先进、最热门的育种新技术的诞生和兴起并非偶然的事件, 它是在几十年中生物化学、微生物学、分子生物学和分子遗传学等学科取得一系列研究成就的基础上逐渐发展起来的。概括起来, 这些成就主要包括下列几个方面。

(一) 遗传物质基础的证明

1944 年 Avery 等, 在 1928 年 Griffith 所做的肺炎链球菌转化试验的基础上, 采用离体培养的方法, 测定 SⅢ 型细胞中各种分离提纯了的提取物 (包括 DNA、RNA、蛋白质、多糖等) 的转化活性。试验结果发现, 只有从 SⅢ 型菌提出的 DNA, 与 RⅡ 型菌混合于琼脂平板上进行培养时, 才能使 RⅡ 型转化为 SⅢ 型。这就有力地证明了 DNA 是转化因子, DNA 能引起遗传性状的改变。这也就直接证明了遗传信息的物质基础是 DNA 而不是蛋白质。

1945 年以后, 由于研究生物大分子的手段有了重大进展, 又提出了以下四个发现或假说: ① X 射线衍射显示 DNA 立体结构中碱基分子相互靠近; ② DNA 中嘌呤碱基与嘧啶碱基有相互吸引的趋势; ③ 嘌呤与嘧啶碱基的比例为 1:1; ④ DNA 碱基排列顺序应该是不规则的, 才有可能携带极丰富的遗传信息。以上这些发现和假说对于进一步阐明 DNA 的结构起着巨大的作用。

(二) DNA 双螺旋结构和功能的阐明

1953 年 Watson 和 Crick 根据碱基组成的测定和 X 射线衍射分析的结果, 提出了著名的 DNA 双螺旋结构模型的理论 and 半保留复制机理, 圆满地解释了 DNA 的理化性质、自体复制方式和生物遗传现象。这一重大发现使人类对基因的认识有了实质性的突破, 推动了遗传学的迅速发展, 开辟了分子生物学的新纪元。

(三) 遗传信息的流向和表达机制的阐明

在 20 世纪 50 年代末期和 20 世纪 60 年代, 相继提出了中心法则和操纵子学说, 并成功地破译了遗传密码, 从而阐明了遗传信息的流向和表达机制。

人们已认识到, 生物体的遗传信息主要是以密码的形式编码在 DNA 分子上, 表现为特定的核苷酸排列顺序。DNA 通过复制可以将遗传信息传递给子代 DNA 分子, DNA 分子又可以通过转录作用将遗传信息传递给信使 RNA (mRNA), mRNA 进而控制专一蛋白质的

合成，使遗传信息在蛋白质肽链的氨基酸排列顺序上得到体现，即遗传密码的翻译。

DNA→mRNA→多肽链这一 DNA 中心法则的建立，解开了蛋白质合成过程中转录和翻译之谜，指导着人们认识蛋白质的生物合成过程。随着后来反向转录酶的发现，又肯定了某些病毒能够以 RNA 为模板合成互补 DNA，这就更进一步完善和补充了中心法则。遗传信息复制和传递机制的阐明，为人工改变生物 DNA 结构而引起遗传性状的改变，从而创造出生物新品种和新型产物提供了可能性。

（四）限制酶与连接酶等工具酶的发现

早在 20 世纪 50 年代初期，就已发现寄主细胞对噬菌体的限制作用，后来发现这种限制作用是菌株中限制性核酸内切酶（简称限制酶）作用的结果，它专门分解外来的 DNA 而使其失去复制的能力，实际上是寄主细胞抵抗外来 DNA 侵染的一种防御机制。

20 世纪 60 年代末期和 20 世纪 70 年代初期，经详细的研究，人们弄清的限制酶是一类专一性很强的核酸内切酶，它与一般的 DNA 水解酶不同之处，在于它们对碱基作用的专一性上及对磷酸二酯键的断裂方式上，具有一些特殊的性质。这种酶被形象地称为分子剪刀，它们的发现和应用大大促进了基因工程技术的进展，在基因的分离、DNA 结构分析、载体的改造及体外重组中均起着重要作用。

在 1967 年，世界上有 5 个实验室几乎同时发现了 DNA 连接酶。连接酶是另一种对 DNA 重组技术的创立具有重要意义的工具酶。1970 年，当时在威斯康星大学的 H. G. Khorana 实验室，又发现 T4DNA 连接酶具有更高的连接活性，甚至能催化两段 DNA 分子进行平末端的连接。该类酶的发现和分离提纯，使两个 DNA 片段在体外连接形成重组 DNA 分子成为可能，在 DNA 合成、DNA 复制和基因重组中起着十分重要的作用。

限制酶与连接酶等工具酶的发现，从根本上解决了 DNA 分子的体外切割与连接技术难题，它是重组 DNA 的核心技术。除限制酶和连接酶外，还有 DNA 聚合酶、逆转录酶、碱性磷酸酯酶、末端脱氧核苷酸转移酶和 S1 核酸酶等，都是基因操作中必要的工具酶。

（五）质粒等基因克隆载体的发现

多年以来，分子生物学家就选定 λ 噬菌体作为基因克隆的最有希望的载体，并对其进行了最为深入的研究。然而第一个将外源基因导入寄主的载体却不是 λ 噬菌体，而是质粒载体。

其中，最早被发现和研究的质粒是大肠杆菌致育因子（F 因子）。1952 年又发现大肠杆菌能产生一种蛋白质性的抗菌物质，称为大肠杆菌素。后来查明它是由另一种质粒——Col 因子支配产生的，成了第二个研究历史较长的质粒。1959~1960 年，在日本发现了抗药性质粒（R 因子），具有分子量小、易于操作和抗药性选择标记等优点。后来又不断在细菌和放线菌中发现各种各样的质粒。

人们通过对质粒的结构与功能的深入研究，弄清质粒是一种存在于微生物细胞内染色体外的闭合环状双链小型 DNA 分子，是能够进行独立自体复制并保持恒定遗传的复制子。它能从一个微生物细胞转移到另一种微生物细胞中，而且某些质粒能在细胞中大量复制。因而有可能利用质粒作为基因的运载体，将某种外源基因从一个细胞转移至另一个细胞并大量复制该基因的拷贝，从而高产相应的基因产物。

质粒的发现为不同生物细胞间基因的转移开创了新局面。目前已被发展成为基因分子克隆中最常用的载体。如 pBR322 和 pUC18 等质粒载体就是其中突出的代表。

(六) 细胞转化方法的建立

将外源 DNA 分子导入细菌细胞的转化现象，虽然早在 20 世纪 40 年代就已经在肺炎链球菌中发现，但对于大肠杆菌来说，却直到 1970 年才获得成功。

当时，M. Mandel 和 A. Higa 发现用 CaCl_2 处理大肠杆菌，能使该菌对 λ DNA 的吸收有显著的增加。1972 年，斯坦福大学的 S. Cohen 等人报道，经氯化钙处理的大肠杆菌细胞同样也能够摄取质粒 DNA。将该技术应用于质粒 DNA 的转化，结果每微克 DNA 可得到大约 $10^6 \sim 10^7$ 个转化子。从此，大肠杆菌便成了分子克隆的良好转化受体。大肠杆菌转化体系的建立，对基因工程的创立具有特别重要的意义。

(七) 核酸和蛋白质序列分析技术的发明

1965 年 Sanger 发明了氨基酸序列分析测定法，接着又发明了 DNA 分子的核苷酸序列分析测定法，使人们对 DNA 序列分析获得重大突破，一次实验便可确定几百个碱基的排列顺序。知道了某个蛋白质的基因 DNA 的碱基序列，就可根据 3 个碱基决定一个氨基酸的三联体密码子，推知该蛋白质的氨基酸序列，并可用化学方法人工合成基因。因此，核酸和蛋白质序列分析技术的发明，使基因的分析合成成为可能。

综上所述，遗传物质基础的证明、DNA 双螺旋结构和功能的阐明、遗传信息的流向和表达机制的阐明、限制酶与连接酶等工具酶的发现、质粒等基因克隆载体的发现、细胞转化方法的建立、核酸和蛋白质序列分析技术的发明等，为基因克隆技术这一划时代的生物新技术的诞生和兴起，奠定了坚实的理论和技術基础。在 20 世纪 70 年代初期开展的 DNA 重组工作，无论在理论上还是技术上都已经具备了条件。

1972 年，美国斯坦福大学的 P. Berg 博士领导的研究小组，使用核酸内切限制酶 *EcoR* I，在体外对猿猴病毒 SV40 的 DNA 和 λ 噬菌体的 DNA，分别进行酶切消化，然后再用 T4DNA 连接酶将两种消化片段连接起来，结果获得了包括 SV40 和 λ DNA 重组的杂种 DNA 分子。P. Berg 等人率先完成了世界上第一次成功的 DNA 体外重组实验，并因此与 W. Gilbert, F. Sanger 分享了 1980 年度的诺贝尔化学奖。

1973 年，斯坦福大学的 S. Cohen 和 H. Boyer 也成功地进行了另一个体外 DNA 重组实验。他们将编码有卡那霉素抗性基因 (Km^r) 的大肠杆菌 R6-5 质粒 DNA，和编码有四环素抗性基因 (Tc^r) 的另一种大肠杆菌质粒 pSC101 DNA 混合后，加入核酸内切限制酶 *EcoR* I，对 DNA 进行切割，而后再用 T4DNA 连接酶将它们连接成重组的 DNA 分子。

用这种连接后的 DNA 混合物转化大肠杆菌，结果发现，某些转化子菌落的确表现出了既抗卡那霉素又抗四环素的双重抗性特征。从此种双抗性的大肠杆菌转化子细胞中分离出来的重组质粒 DNA，带有完整的 pSC101 分子和一个来自 R6-5 质粒编码卡那霉素抗性基因的 DNA 片段。人们一般认为，这是第一项基因克隆实验，它揭开了基因工程的序幕。

为了说明不同物种的外源 DNA 片段也可以在大肠杆菌细胞中增殖，S. Cohen 等人又应用与上述类似的方法，把非洲爪蟾编码核糖体基因的 DNA 片段同 pSC101 质粒重组，并导入大肠杆菌细胞。转化子细胞分析结果表明，动物的基因的确进入到大肠杆菌细胞，并转录出相应的 mRNA 产物。Cohen 的工作，是第一次成功的基因克隆实验，具有十分重要的意义。

二、基因克隆技术的特点与步骤

基因克隆技术是用人工方法将外源基因与 DNA 载体结合形成重组 DNA，然后引入某一受体细胞中，使外源基因复制并产生相应的基因产物，从而获得生物新品种的一种崭新育

种技术。

基因克隆技术是 20 世纪 70 年代初，在分子遗传学基础上发展起来的一个崭新技术领域。它能将不同来源的遗传物质在体外合成重组 DNA 分子，这种重组 DNA 分子可以被引入受体细胞，进行增殖、繁衍而发育成一个新种。这一过程在自然界演化中一般是不会发生的。

（一）基因克隆技术的特点

基因克隆技术与其他育种技术相比，具有如下特点。

能像工程一样可按人们的意愿来事先设计和控制

基因克隆技术不仅可预知某一基因的改变，而且可以及早纠正，可以有计划、有目的地构建基因，所以基因克隆技术育种是比较定向的。此外，基因克隆技术育种的每步变化均可检测，可保证产品的纯度和安全性。因此，应用基因克隆技术，使生物科学工作者首次能将遗传物质按人们的意愿进行周密设计和人工操纵，为进一步深入研究基因的结构、功能、表达和调控等提供了一个划时代的有效手段。

1. 人工的、离体的、分子水平上所进行的遗传重组

基因克隆技术有能力在极端错综复杂的生物细胞内取出所需基因，并能人为地将此目的基因在试管中进行剪切、拼接、重组并转化到受体细胞中，经无性繁殖能增产出数百数千倍的新型蛋白质（主要是各种多肽和蛋白质类生物药物），这是基因克隆技术最突出的优越性。

3. 能在动植物和微生物间进行任意的、定向的超远缘杂交

基因克隆技术的最大威力在于它能使带有支配各种各样遗传信息的 DNA 片段越过不同生物间特异的细胞壁而组入到完全不同的没有亲缘关系的生物体内，能定向地控制、修饰和改变生物的遗传和变异。因而完全有可能创造出前所未有的具有新的遗传性状的生物新类型，使育种工作产生了革命性变化。

（二）基因克隆技术的步骤

基因克隆技术实际上是将遗传信息（DNA）从一种生物细胞转移到另一种生物细胞中并得以表达的若干实验技术的总称。概括起来，基因克隆技术应包括以下 6 个基本步骤。

1. 外源目的基因的取得

从复杂的生物细胞基因组中，经过酶切消化或 PCR 扩增等步骤，分离出带有目的基因的 DNA 片段，取得所需的基因（外源性 DNA 片段）；或者从特定细胞里提取所需基因的 mRNA 后，在适宜的条件下利用逆（反）转录酶的作用来取得所需基因；或者通过探明目的基因所含的遗传密码及其排列顺序，然后用化学方法人工合成所需的基因。

2. 基因运载体的分离提纯

基因运载体是具有自体复制能力的另一种 DNA 分子，它经过处理后，能与外来基因（外源性 DNA）相结合，并带有必要的标记基因。目前，常用的基因运载体主要有两类：一类是质粒，一类是病毒（包括噬菌体）。以前者为例，首先用溶菌酶分解细菌细胞壁，然后用物理化学的方法，把质粒与其他成分分开，从而得到纯粹的质粒。

3. 重组 DNA 分子的形成

通过专一限制性内切核酸酶的处理或人为的方法，使带有目的基因的外源 DNA 片段和能够自我复制并具有选择标记的载体 DNA 分子，产生互补的黏性末端而相互配对结合，并通过连接酶在体外使两者连接起来，形成一个完整的新的 DNA 分子——重组 DNA 分子。

4. 重组 DNA 引入受体细胞

重组 DNA 即是带有目的基因的运载体（杂种质粒或病毒）。用人工的方法（转化或转导法）将重组 DNA 分子转移到适当的受体细胞（宿主细胞）中，使它能在细胞中“定居”下来。通过自体复制和增殖，形成重组 DNA 的无性繁殖系（即克隆），从而扩增产生大量特定目的基因，并使之得到表达，即能指导蛋白质的合成。

5. 重组菌的筛选、鉴定和分析

从大量受体菌中设法筛选出带有目的基因的重组菌（克隆株系），并进行鉴定。然后培养克隆株系，提取出重组质粒，分离已经得到扩增的目的基因，再分析测定其基因顺序。

6. 工程菌的获得和基因产物的分离

将目的基因克隆到表达载体上，再次导入到受体菌中，经反复筛选、鉴定和分析测定，最终获得较稳定的高产的基因工程菌，然后进行大量培养繁殖，产生出所需要的目的基因产物，再进行分离纯化。

上述仅是基因克隆技术的基本步骤。在实际工作中，其具体操作步骤还要更多，因为很多步骤必须重复进行，必须多次分离和分析测定重组 DNA。

第二节 基因克隆技术早期开创性研究成就

从 1973 年 Cohen 和 Boyer 的第一项基因克隆实验获得成功并标志着基因工程的正式开始之后，由于人们对基因工程安全性的过分担心，人为地制定了各种限制措施，使基因克隆研究受到阻碍而进展缓慢。主要的研究成果有两项。

① 1974 年，Boyer、Helinesski 和 Yamnfsky 等合作构建了扩增拷贝数很高的 ColE1 质粒，为此后的基因扩增研究铺平道路；

1974 年，Cohen、Boyer、Morrow 和 Goodman 等人合作，第一次将一个真核生物基因引入了大肠杆菌中并得到转录。

后来，随着人们认识的不断深入以及采取了必要的安全防范措施，放宽或取消某些过于严厉的限制，使基因克隆研究又得到迅速的发展。

（一）大脑生长激素释放抑制素的克隆与表达

1977 年 11 月，有机化学家 K. Itakura 和 Riggo 等合作，将化学合成的大脑生长激素释放抑制素（somatostatin, 简写 Som.）基因与大肠杆菌 β -半乳糖苷酶基因和 pBR322 质粒重组，转化到大肠杆菌中并表达成功。结果产生含生长抑制素（Som.）的嵌合型蛋白质，经溴化氰处理后，释放出有活性的生长抑制素（14 肽）。

这是真核生物的人造基因首次在原核生物中表达成功，其实践意义是可以通过发酵途径生产出大量廉价的这类有价值的产品。在理论上，它提供了这样一个依据：通过基因克隆技术利用细菌来研究高等生物基因功能的表达有现实可能性。

生长抑制素能抑制包括生长激素、胰岛素和胰高血糖素等多种激素的产生，是一种很有用的药物。它可医治肢端肥大症、急性胰腺炎等。按常规制备法，从 50 万头羊的脑下垂体中才能提取得 5mg 生长抑制素，需亿万美元。采用基因克隆技术，只要用 10L 工程菌培养液就可获得同样的产量，只需 300 美元。这项振奋人心的重大成果的取得，大大地增强了人们对基因工程的兴趣和信心。

（二）胰岛素原前体基因的克隆

1978 年，老鼠胰岛素原前体基因成功地转化进入大肠杆菌，并且得到了表达。这个实验是首先从胰岛瘤提取胰岛素原前体 mRNA，再用逆转录酶合成它的互补 DNA，通过限制

性内切酶的切点，将胰岛素原前体 DNA 转换到 pBR322 质粒 DNA 上，最后将此重组 DNA 再转化到大肠杆菌中表达。

（三）人胰岛素 A 链和 B 链基因的克隆

1978 年 9 月，Goedell 等用人工方法分别合成人胰岛素 A 链和 B 链的基因，并把这两个基因分别与大肠杆菌乳糖操纵子调控基因结合在一起，分别整合到质粒上，再分别转化到大肠杆菌中，一个大肠杆菌专门合成 A 链，另一个专门合成 B 链。随后再用化学方法将 A、B 蛋白链从乳糖操纵子基因蛋白上切下来，分别提纯，得到了 A 链（含有 21 个氨基酸）和 B 链（含有 30 个氨基酸），再通过二硫键把 A、B 两条多肽链结合在一起，成为一个完整的人胰岛素。这样，人胰岛素就可以用基因工程的方法人工地大量合成，为广大的糖尿病患者带来了福音。

（四）人体生长激素基因的克隆

1979 年，美国加州大学 H. Goodman 等用 DNA 克隆技术，进行了人体生长激素基因的研究，发现该基因具有重叠结构，可作为基因的结构、分化和调节的研究材料。当将带有激素基因的杂合质粒插入到另一个基因时，可在受体菌中稳定复制，并可表达得到约占总蛋白 70% 的由人体生长激素基因编码的多肽。

（五）酵母基因工程菌合成干扰素

1980 年 1 月，瑞士生物基因公司首次报道用基因工程菌生产干扰素获得成功。接着，美国旧金山的基因工程公司宣布用酵母基因工程菌合成干扰素也获得成功。

（六）大豆蛋白和人尿激酶基因的克隆

在 1980 年还有两项重要成果，一是日本的科学家使大豆蛋白的遗传基因插入大肠杆菌的质粒中，人工合成大豆蛋白获得成功；二是美国 Abbott 公司用基因克隆技术使大肠杆菌产生出人体尿激酶。

（七）DNA 克隆技术生产口蹄疫苗

1981 年，美国科学杂志报道了从基因工程菌中制备出动物口蹄疫苗。口蹄疫起因于一种微小的 RNA 病毒，其传染力很强，能严重感染包括猪、牛、羊在内的 32 种偶蹄类动物。口蹄疫可引起幼畜死亡，减缓长膘速度，减低牛奶产量，造成严重的经济损失。应用 DNA 克隆技术生产口蹄疫苗，以防治动物口蹄疫将具有重大的经济意义。

1981 年，从基因工程菌中获得的新产物还有乙型肝炎病毒表面抗原和核心抗原以及牛生长激素等。前者对于人的乙型肝炎的诊断和防治，后者对于提高牛肉牛奶的产量均具有重要意义。

（八）真核生物为受体的基因克隆

1982 年，把基因引入实验动物的研究获得重要进展。R. Palmiter 等把从大鼠体内分离到的生长激素基因，在体外与小鼠的开关 DNA 重组，再注射到母小鼠受精卵中。结果，在出生的小鼠中，有些带有大鼠的生长激素基因，个头大且生长速度快（称为巨型小鼠）。这是以真核生物为受体的基因克隆技术所取得的首次突破，具有深远的意义。

（九）狂犬病疫苗的克隆

1983 年，报道了用大肠杆菌产生狂犬病毒糖蛋白类似物获得成功，使人工制造狂犬病疫苗成为可能。也报道了用大肠杆菌生产鸡生长激素，并进行现场应用试验以促进肉鸡的生长。

（十）基因克隆技术改良动植物品种

1983 年，以真核生物为受体的基因克隆技术取得两项新的突破。一是把人的生长激素基因转移给小鼠也获得成功；二是把某些外源基因，通过基因克隆技术引入植物（烟草、胡萝卜、矮牵牛、马铃薯等）的细胞中，都能再生出完整的植株，且外源基因也能随种子遗传下去。这些成果表明，用基因克隆技术来改良动植物品种的日子已为期不远了。

第二章 基因克隆技术制药中常用的工具酶

基因克隆技术的重要特点之一，是在体外实行 DNA 分子的切割和重新连接。因此，要使基因工程得以实施，首先是要为体外操作 DNA 分子提供一系列的工具酶。这些工具酶是分子生物学家在 DNA 操作过程中必不可少的基本工具。

要取得所需药物之目的基因，并要将此特定目的基因与载体 DNA 连接在一起，在很大程度上要依赖于某些工具酶。其中最为重要的是能在特异性的碱基序列部位切割 DNA 分子的限制性核酸内切酶和能将两条 DNA 分子或片段连接起来的 DNA 连接酶。无疑，这两种酶的发现与应用，使 DNA 分子的体外切割与连接成为可能，是重组 DNA 技术赖以创立的重要酶学基础。

随着越来越多的酶分子被人们所发现，这类工具酶的数量和用途不断地增加，而人们对酶反应的细节也有了进一步的了解。另一方面，许多厂商已能生产并广泛供应各种优质的工具酶。这些进展不仅大大简化了分子克隆的操作，而且拓宽了基因工程的研究领域。

使用厂商提供的优质酶制剂时，必须注意维持酶在反应混合液中的稳定性，并提供合适浓度的底物，才能使酶发挥出最高的活性。下面就基因克隆技术制药中常用几种工具酶的特性、功能和用途作一简介。

第一节 限制性核酸内切酶

限制性核酸内切酶 (restriction endonucleases)，简称限制酶，是一类能够识别双链 DNA 分子中的某种特定核苷酸序列，并由此切割 DNA 双链结构的核酸内切酶。

限制性核酸内切酶主要是从原核生物中分离纯化出来的。据统计，仅 II 型限制性核酸内切酶，迄今已从各种不同的微生物当中分离出了 2000 多种，可识别 200 多种不同的 DNA 序列。

限制性核酸内切酶是一类专一性很强的核酸内切酶。与一般的 DNA 水解酶不同之处，在于它们对碱基作用的专一性上，以及对磷酸二酯键的断裂方式上，都具有一些特殊的性质。它们在基因的分离、DNA 结构分析、载体的改造及体外重组中均起着重要作用。

一、限制酶的发现

早在 20 世纪 50 年代初期，就已发现寄主细菌对噬菌体的限制作用。如果将已经在大肠杆菌 K 株上增殖过的 λ 噬菌体，用来感染大肠杆菌 B 株，那么这种感染过程的效率就非常之低，成斑率 (EOP) 只有 10^{-4} ，这表明 λ 噬菌体在 B 株中的繁殖受到限制。然而那些在感染 B 株时幸存下来并进行繁殖所产生的子代噬菌体，当它再重新感染大肠杆菌 B 株时，其成斑率却达到 1。

究其原因，这种限制作用是 B 株中限制性核酸内切酶作用的结果，它专门分解外来的 DNA 而使它失去复制的能力。这是寄主细胞抵抗外来 DNA 侵染的一种防御机制。

寄主细胞中另外还有一种酶称为修饰酶。它能修饰限制酶作用部位的结构，如把它的 DNA 中的腺嘌呤甲基化为 6-N-甲基腺嘌呤，把胞嘧啶甲基化为 5'-甲基胞嘧啶，而使其不为限制酶所分解。正是由于修饰酶的作用，细菌自身的 DNA 可以避免被它自己的限制酶所

分解。而外源 DNA 进入一个细菌细胞时也为这两种酶所作用，或被修饰而免于分解，或是在没有修饰以前就被分解了。

所以，上述原来在大肠杆菌 K 株上增殖过的 λ 噬菌体感染 B 株时，由于它没有为 B 株所修饰，所以它的 DNA 将遭到限制。而能残存下来的少数噬菌体 DNA 分子，是因为限制酶还未来得及起作用，它们就被寄主 B 株的修饰酶所修饰，因而可对抗限制酶系统得以复制增殖。后来在 B 株中复制增殖所产生的子代噬菌体，由于其 DNA 中的限制酶位点已被甲基化了，故在它再度感染 B 株时，便有效地防止了限制酶的作用，从而表现出高效的成斑率。

无论是限制 (restriction) 还是修饰 (modification) 现象，都是由寄主控制的，统称为寄主控制的限制与修饰现象 (简称 R/M 体系)。寄主控制的限制与修饰是一种广泛的过程，它的存在有两方面的作用：一是保护自身的 DNA 不受限制；二是破坏外源 DNA 使之迅速降解。根据限制-修饰现象发现的限制性核酸内切酶，现在已成为基因克隆技术的重要工具酶。

二、限制酶的类型

根据限制性核酸内切酶的限制和修饰活性、分子量大小、酶蛋白结构、切割位点及限制作用所需的辅助因子等，目前已经鉴定出有三种不同类型的限制性核酸内切酶，即 I 型酶、II 型酶和 III 型酶。这三种不同类型的限制酶具有不同的特性。

(一) I 型限制酶

I 型限制酶是早期提取的酶类。例如，EcoK 和 EcoB 是分别从大肠杆菌 K 株和 B 株中分离得到的 I 型酶的 2 个代表。I 型限制酶一般都是大型的多亚基蛋白复合物。酶蛋白分子质量大，约在 $30 \times 10^4 D$ 左右，由 3 种不同的亚基组成，其中特异性亚基具有特异性识别 DNA 序列的活性，修饰亚基具有甲基化酶的活性，限制亚基具有核酸内切酶活性，是一类复杂的多功能酶。

I 型酶除了需要二价金属镁离子之外，还需要 ATP 和 SAM (S-腺苷甲硫氨酸) 辅助因子 (提供能量)，才能表现出正常的限制活性。该类酶对 DNA 分子的切割方式是十分奇特的：它结合在识别位点以滚环形式沿着 DNA 分子转位，而后从距识别位点 5' 一侧数千碱基处随机切割 DNA 分子。

虽然 I 型酶也能够识别 DNA 分子中特定的核苷酸序列，但由于它们的切割位点基本上随机的，因此在基因克隆中没有什么实用价值。

(二) II 型限制酶

II 型限制酶只有一种多肽，并通常以同源二聚体形式存在，分子质量较小，大约 $(2 \sim 10) \times 10^4 D$ ，是简单的单功能酶，作用时无需辅助因子或只需 Mg^{2+} 。II 型酶没有 I 型酶的那些异常特性，其核酸内切酶活性和甲基化作用活性是分开的。它能识别双链 DNA 上特异的核苷酸序列，底物作用的专一性强，而且其识别序列与切割序列相一致，切割后形成一定长度和顺序的分离的 DNA 片段。因而 II 型酶对于 DNA 操作是极为重要的。

1970 年，科学家们从流感嗜血菌 Rd 株中分离纯化出第一个 II 型酶 Hind II，是迄今公认的一种典型 II 型限制性核酸内切酶。后来越来越多的 II 型酶陆续被发现和纯化。几乎所有细菌的属种中都发现至少有一种 II 型限制酶，有的一个属就有好几种，同一品系的菌株中也常有识别不同序列的两种酶。至今已发现和分离成功的 II 型限制酶大约有两千多种，其中有些已商品化。

(三) III型限制酶

除了 I 型酶和 II 型酶之外, 还有一类特性介于两者之间的 III 型酶 (例如 EcoPI), 数量相当少。它是由两个亚基组成的蛋白质复合物, 其中 M 亚基负责位点的识别与修饰, 而 R 亚基则具有核酸酶的活性。

III 型酶也需要在有二价金属镁离子 Mg^{2+} 以及辅助因子 ATP 和 SAM 的条件下, 才能呈现出对 DNA 分子的切割活性。在反应过程中也会沿着 DNA 分子移动, 并从距识别位点一侧约 25bp 处单链切割 DNA 分子。III 型限制酶的识别序列是非对称的, 它如同 I 型限制酶一样, 在基因操作中也没有什么实际的用处。

三、限制酶的命名

限制性核酸内切酶的命名法, 是在 1973 年由 H. O. Smith 和 D. Nathans 提出来的。他们建议的命名原则包括如下几点 (在实际应用上已作了简化)。

以寄主微生物属名的头一个字母 (大写) 和种名的前两个字母 (小写), 组成 3 个字母的略语表示寄主菌的物种名称。例如, 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 用 Eco 表示, *Haemophilus influenzae* 用 Hin 表示。

菌株名加在这三个字母的后面, 例如 BamH。如果限制与修饰体系在遗传上是由病毒或质粒引起的, 则在缩写的寄主菌的种名后附加一个字母, 表示此染色体外成分, 例如 EcoRI。

若一种特殊的寄主菌株, 具有几个不同的限制与修饰体系时, 则以罗马数字加以区分。例如, 流感嗜血菌 Rd 菌株的几个限制与修饰体系分别表示为 Hind I、Hind II、Hind III。

四、II型限制酶的特性

(一) 不同限制酶能专一地识别不同的特异核苷酸序列

各种限制酶对 DNA 识别序列的大小是不同的。有的识别序列由严格而独特的六核苷酸组成, 如 EcoRI 是 5'-GAATTC-3'; 有些是在其序列中的某些部位有不同程度灵活性的六核苷酸, 如 HaeI 是 5'-($\overset{A}{T}$)GGCC($\overset{A}{T}$)-3'; 有些识别五核苷酸序列, 如 AsuI 是 5'-GGNCC-3', EcoRII 是 5'-CC($\overset{A}{T}$)GG-3'; 而另一些则识别四核苷酸序列, 如 MboI 是 5'-GATC-3'。还有的限制酶例如 NotI, 识别的是由 8 个核苷酸组成的序列 (GCGGCCGC)。

有些限制酶 (例如 Sau3A) 识别的一种四核苷酸序列 (GATC), 是包含在另一种限制酶 (例如 BamHI) 识别的六核苷酸序列 (GGATCC) 之内。还有一类限制酶能识别多种核苷酸序列, 例如 HindII, 它识别下列 4 种核苷酸序列: 5'-CTPyPuAC-3' (Py 表示嘧啶碱基 C 或 T, Pu 表示嘌呤碱基 A 或 G)。

限制酶识别序列的大小, 决定着一种给定的 DNA 分子酶解后产生的片段的大小范围。假定所有的 4 种核苷酸都具有同等频率的话, 那么对于一个识别序列是 4 个核苷酸的限制酶来说, 应是平均每 4^4 即 256 个核苷酸长的 DNA 序列中有一个识别位点; 识别序列是 5 个核苷酸的限制酶, 应是平均每 4^5 即 1024 个核苷酸长的 DNA 序列中有一个识别位点; 而识别序列是 6 个核苷酸的限制酶, 则是平均每 4^6 即 4096 个核苷酸长的 DNA 序列中有一个识别位点。

由此可见, 识别序列长度不一样的限制酶, 对 DNA 分子的随机切割频率也不相同。DNA 碱基成分是影响限制酶切割频率的重要因素之一。可通过选用不同大小识别序列的限

制酶来获得不同大小的 DNA 片段，这在 DNA 的分级分离和特异顺序分离上是非常有用的。

(二) 各种限制酶的识别序列一般都具有回文结构

虽然各种限制酶识别的核苷酸序列各不相同，但却有一个共同的地方，那就是所有这些识别序列的核苷酸都作双重旋转对称排列。如果都从 5' 末端向 3' 末端读其碱基顺序，则在识别序列的两条核苷酸链中的碱基排列次序是完全相同的，这种结构形式称为回文结构 (palindromic structure)，即正读与反读都相同。如限制酶 BamH I 的识别序列是：



正读时是 GGATCC，反读时也是 GGATCC。

(三) 各种限制酶的切割类型各异，切后形成各种黏端或平端

各种限制酶对其识别序列的切割位点是不同的 (表 2-1)，它对碱基的专一性要求很严

表 2-1 各种限制酶的特异切点及缓冲液条件

限制酶	缓冲液	特异切点	限制酶	缓冲液	特异切点
Ava I	L	5' C <u>Y</u> C G R G 3' 3' G R G C Y <u>C</u> 5'	Msp I	L	C <u>C</u> G G G G C <u>C</u>
Ava II	L	G <u>G</u> A C C C C A <u>G</u>	Pst I	H(L)	C <u>T</u> G C A G G A C G T <u>C</u>
Bal I	O	T G G C C A A C C G G T	Pvu I	H	C G A T <u>C</u> G G C T A <u>G</u> C
BamH I	H	G <u>G</u> A T C C C C T A G <u>G</u>	Pvu II	L	C A G <u>C</u> T G G T C <u>G</u> A C
Bgl II	H	A <u>G</u> A T C T T C T A G <u>A</u>	Sac I (Sst I)	O	G <u>A</u> G C T C C T C G A <u>G</u>
Cla I	L	A T <u>C</u> G A T T A G C <u>T</u> A	Sac II	L	C C G C <u>G</u> G G G C G <u>C</u> C
EcoR I	H	G <u>A</u> A T T C C T T A A <u>G</u>	Sal I	H	G <u>T</u> C G A C C A G C T <u>G</u>
Hae III	L	G G C C C C G G	Sau3A	L	<u>G</u> A T C C T A G <u>A</u>
Hinc II	L	G T Y R A C C A R Y T G	Sma I	K	C C C G G G G G G C C C
Hind III	L	A <u>A</u> G C T T T T C G A <u>A</u>	Stu I	H	A G G C C T T C C G G A
Hin II	H	G <u>A</u> N T C C T N A <u>G</u>	Taq I	L	T <u>C</u> G A A G C <u>T</u>
Hpa I	L (K)	G T T A A C C A A T T G	Xba I	H	T <u>C</u> T A G A A G A T C <u>T</u>
Hpa II	O	C <u>C</u> G G G G C <u>C</u>	Xho I	H	C <u>T</u> C G A G G A G C T <u>C</u>
Kpn I	O	G <u>G</u> T A C C C C A T G <u>G</u>	Xma I	O	C <u>C</u> C G G G G G G C C <u>C</u>
Mbo I	H (L)	<u>G</u> A T C C T A G <u>A</u>			

注：A—腺嘌呤；C—胞嘧啶；G—鸟嘌呤；T—胸腺嘧啶；N—任何碱基；R—任何嘌呤；Y—任何嘧啶；O—无盐；L—低盐；H—高盐；K—钾盐。

格，不但对切点上两个碱基有一定要求，而且对切点附近几个碱基序列都有严格要求。按其切断双链的方式可分两种。第一种是限制酶错位切断 DNA 双链而形成的具有彼此互补碱基的单链延伸末端，称为黏性末端（cohesive ends）。如限制酶 Pst I 和 EcoR I 的识别序列和切割位点分别是：



它们分别水解 A-G 和 G-A 之间的磷酸二酯键就成为：



形成具有互补碱基序列的单链黏性末端 ACGT 和 AATT。

这种具有黏性末端的 DNA 片段很容易通过单链区的碱基配对联结在一起而产生线状或环状 DNA 分子，这对 DNA 的体外重组是十分有利的。绝大多数限制酶都行这种切割方式而形成黏性末端，但一种是形成具有 3' 单链延伸的黏性末端，例如 Pst I 酶就是属于这种类型，它切割后形成 3'ACGT 黏性末端；另一种则是形成具有 5' 单链延伸的黏性末端，例如 Hind III 酶就是属于这种类型，它切割后形成 5'AGCT 黏性末端（图 2-1）。

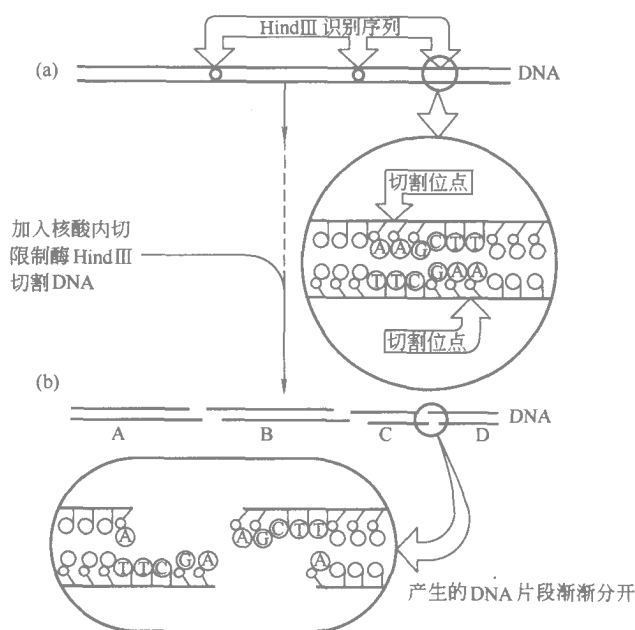


图 2-1 限制酶 Hind III 对双链 DNA 的切割作用

第二种是限制酶在同一位点平齐切断 DNA 两条链而形成的双链末端，称为平整末端（flush ends）。具平整末端的 DNA 片段不易于重新环化。如限制酶 Alu I 的识别序列是：



该酶从中间水解 G-C 的磷酸二酯键就成为具有平末端的两 DNA 片段：



比较限制酶的识别序列和切点位置，还可以发现下列两种情况。

1. 识别序列不同的限制酶，切割后有可能产生相同的黏性末端

有一类限制酶，它们虽然来源各异，识别的靶子序列也各不相同，但都产生出相同的黏性末端，这样一类限制酶称之为同尾酶（isocaudamer）。例如 BamH I、Bcl I、Bgl II、Sau3A、Xho II 和 Mbo I 这六种不同来源的限制酶的识别序列是不同的，分别是：G↓GATCC、T↓GATCA、A↓GATCT、↓GATC、Pu↓GATCPy 和 ↓GATC，但它们切割后都产生相同的 5'-GATC 黏性末端。

这类同尾酶的 DNA 酶解片段能够通过其黏性末端之间的互补作用而彼此结合，在连接酶的作用下，可以在体外重组得到嵌合 DNA，称为异源二聚体。由一对同尾酶分别产生的黏性末端共价结合形成的位点，称之为杂种位点。这类杂种位点的序列，一般是不能够再被原来的任何一种同尾酶所识别的（也有例外情况），这有利于得到大量的重组 DNA 分子，故在基因工程实验中是非常有用的。

2. 来源不同的限制酶，其识别序列可以相同，但其切点位置可不同或相同

有一些来源不同的限制酶识别的是同样的核苷酸靶子序列，这类酶称之为同裂酶（isoschizomer）。同裂酶产生同样的切割，形成同样的末端。

例如 Sau3A I 和 Mbo I 是一对同裂酶，它们都识别四核苷酸序列 ↓GATC，切点位置也相同。但同裂酶当中有些虽然识别序列完全相同，但其切割位点却可以不同，因而产生的切割末端也不同。例如 Xma I 和 Sma I 也是同裂酶，虽然它们都识别六核苷酸序列 CCCGGG，但前者的切点在 C↑CCGGG，形成带有 CCGG 黏性末端的 DNA 片段，而后者切点却在 CCC↓GGG，并不形成黏性末端而是平整末端。

（四）某些限制酶在非标条件下，可能导致酶的识别序列特异性发生改变

在标准反应条件下，每种限制酶都有上述严格的识别序列。但在甘油浓度、离子强度、pH 值、有机溶剂、二价阳离子、酶与 DNA 的比例等参数单独或同时发生改变时，会导致限制酶的识别序列特异性发生改变，在 DNA 内产生附加切割，称为限制酶的第二活性，又称为星活性。因能产生第二活性的酶常在酶名称的右上角加一星号“*”，如 EcoR I*。EcoR I 通常的识别序列是 6 个核苷酸序列 GAATTC，被诱导星活性时为 4 个核苷酸 AATT。

星活性的产生虽然可能为酶提供新识别序列特异性，但星活性却严重干扰了限制酶在 DNA 重组中的正常应用。因此，为了防止星活性的出现，所有限制酶反应均在标准条件下进行，特别是要控制 pH 值、离子强度和二价离子的浓度等反应条件。

五、DNA 的单酶切与限制片段末端连接

用单一限制性内切酶切割 DNA 分子的一般方法是：吸取适量待酶切的 DNA 片段或质粒 DNA 入一洁净的 Eppendorf 管中，65℃ 温育 10min，冷至室温，加入相应的缓冲液和限制性内切酶，在该种酶的最佳反应温度下温育 2~5h；加入等体积 PCI 抽提，乙醇沉淀，烘干，TE 溶解，取 5~10μL 进行琼脂糖凝胶电泳，确定酶切效果，-20℃ 存放备用。

限制酶切割 DNA 分子后形成的短片段，又能够通过互补的黏性末端自发地重新环化起来，而且这些环形分子经过加热之后又会重新线性化。但如果环化之后，马上用 DNA 连接酶处理，使它们的 3'-OH 和 5'-P 之间封闭起来，那么这样形成的环形 DNA 分子将是永久性的。这种连接作用有两种不同的类型，一种是不同 DNA 分子间的连接，另一种是同一 DNA 分子的两个互补末端之间的分子内连接。

限制酶识别的靶子序列同 DNA 的来源无关，也就是说不带有种的特异性，是对各种 DNA 普遍适用的。任何不同来源的 DNA，经过适当限制酶处理之后，都可以通过它们的黏性末端或平末端连接起来。这一特性是重组 DNA 技术的重要基础之一。

第二节 DNA 连接酶

要将不同来源的 DNA 片段组成新的杂种 DNA 分子，必须将它们彼此连接并封闭起来。能将两段 DNA 拼接起来的酶称为 DNA 连接酶 (DNA ligase)。它是在 1967 年发现的一种能够催化双链 DNA 片段紧靠在一起的 3' 羟基末端与 5' 磷酸基团末端之间形成磷酸二酯键，使两末端连接起来的酶。如果是两个或两个以上不同的双链 DNA 片段末端连接，则产生重组 DNA 分子。因此，这类酶的发现，使两个 DNA 片段在体外连接形成重组 DNA 分子变为可能。它在 DNA 合成、DNA 复制和基因重组中的应用，对于基因工程技术的创立与发展具有十分重要的意义。

一、DNA 连接酶连接作用的特点

DNA 连接酶需要在一条 DNA 链的 3' 末端具有一个游离的羟基 (—OH)，而在另一条 DNA 链的 5' 末端具有一个磷酸基 (—P) 的情况下，才能发挥其连接 DNA 分子的功能作用。

DNA 连接酶只有当 3'-OH 和 5'-P 是彼此相邻的，并且是各自位于与互补链上之互补碱基配对的两个脱氧核苷酸末端时，才能将它们连接成磷酸二酯键。

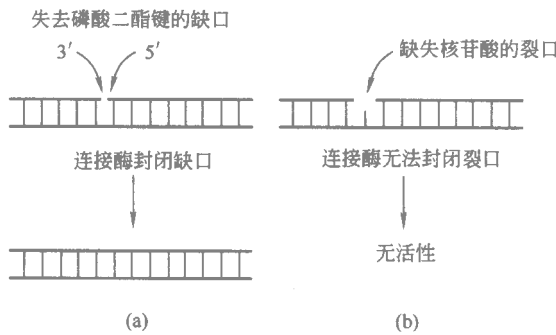


图 2-2 DNA 连接酶的活性

③ DNA 连接酶不能够连接两条单链的 DNA 分子或环化的单链 DNA 分子，被连接的 DNA 链必须是双螺旋 DNA 分子的一部分。

④ DNA 连接酶只能封闭双螺旋 DNA 上失去一个磷酸二酯键所出现的单链缺口 (nick)，而不能封闭双链 DNA 的某一条链上失去一个或数个核苷酸所形成的单链裂口 (gap) (图 2-2)。

由于在羟基和磷酸基团之间形成磷酸二酯键是一种吸能反应，因此，DNA 连接酶在进行连接反应时，还需要提供一种能源分子 (NAD⁺ 或 ATP) (图 2-3)。

二、基因工程中常用的连接酶

(一) T4 噬菌体 DNA 连接酶

从 T4 噬菌体感染的大肠杆菌中纯化而得，是由大肠杆菌 T4 噬菌体 DNA 编码的连接酶，分子质量为 68000D，需 ATP 作能源辅助因子。该酶比较容易制备，在分子生物学研究及基因克隆中有广泛的用途。

T4DNA 连接酶既可用于双链 DNA 片段互补黏性末端之间的连接 (示例一)，也可用于带切口 DNA 的连接。PEG 在低浓度下可促进 DNA 分子间的连接。例如，在 20μL 反应液中，用 0.005U 的 T4DNA 连接酶，于 22℃ 下作用 1h，可使 1μg 被 HindⅢ 完全酶切成黏性末端的 λDNA 片段有 95% 以上重新连接。反应系统中必须加有辅助因子 ATP。反应缓冲液含有 Tris-HCl、MgCl₂、DTE (二硫赤藓糖醇)、ATP，pH 值 7.5。反应温度控制在 4~

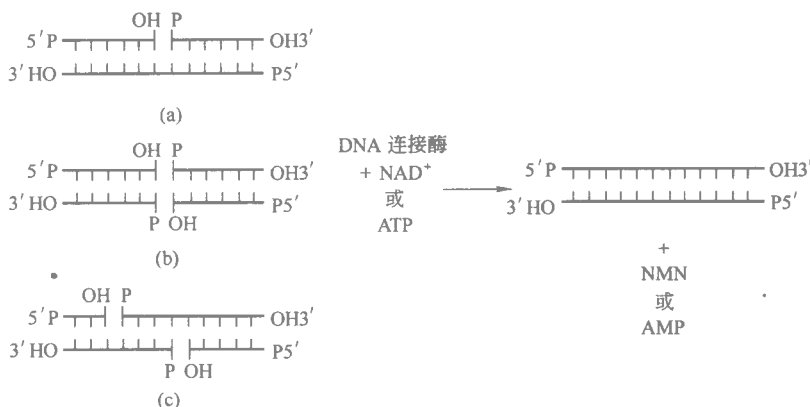
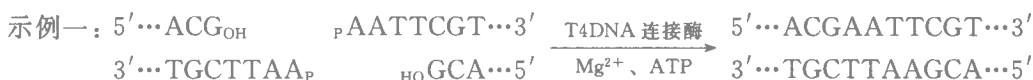


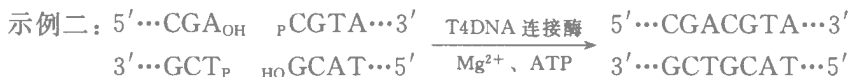
图 2-3 DNA 连接酶的连接作用

(a) 缺口 DNA; (b) 平末端 DNA; (c) 黏性末端 DNA

15℃，但双链 DNA 片段平末端之间连接时，可在 22~30 的较高温度下进行。



T4DNA 连接酶还能够连接两条平末端的双链 DNA 分子（示例二），但反应速率要比上述黏性末端连接慢得多。低浓度 PEG 可提高平末端连接速率。例如，在 30μL 反应液中，用 0.25U 的 T4DNA 连接酶，于 22 下作用 16h 后，可以使 1μg 被完全酶切成平末端的 pBR322DNA 片段有 80% 以上重新连接，若此反应系统中含 15%（质量体积分数）的 PEG，则重新连接的片段可超过 95%。



(二) 大肠杆菌 DNA 连接酶

是由大肠杆菌染色体编码的 DNA 连接酶，只能催化互相匹配黏端的 5' 突出端与 3' 突出端的双链 DNA 之间的连接，不能催化双链 DNA 片段平末端之间的连接。此酶用途较窄，一般并不常用。

反应系统中必须有 NAD⁺（氧化型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸）作能源辅助因子。反应缓冲液中含有 Tris-HCl、MgCl₂、EDTA、DTE、NAD、BSA，pH 值 8.0。最适反应温度为 30℃，但为了提高 DNA 片段两互补黏性末端之间氢键的稳定性和连接效率，实际反应温度一般控制在 4~15℃，反应时间为 2~12h。

(三) 热稳定的 DNA 连接酶

热稳定的 DNA 连接酶，是从嗜热高温放线菌中分离纯化的，一种能够在高温下催化两条寡核苷酸探针发生连接作用的一种核酸酶。这种连接酶在 85 高温下具有连接酶的活性，而且在重复多次升温到 94 之后也仍然保持着连接酶的活性。使用此种 DNA 连接酶进行体外连接，便可明显降低形成非特异性连接产物的概率。现在已经能够从克隆的大肠杆菌中大量制备此种核酸酶。

通过热稳定的 DNA 连接酶的作用所进行的连接酶链式反应（LCR），是一种应用 4 种寡核苷酸探针扩增已知序列靶 DNA 的方法。

三、DNA 连接酶连接作用的分子机理

在反应中，ATP 或 NAD⁺ 提供了激活的 AMP，同 DNA 连接酶生成一种共价结合的酶-

AMP 复合物，同时伴随着释放出焦磷酸（ PPi ）或烟酰胺腺嘌呤单核苷酸（ NMN ）。其中，AMP 是通过一种磷酸酰胺键同 DNA 连接酶的赖氨酸之 ϵ -氨基相连。激活的 AMP 随后从赖氨酸残基转移到 DNA 一条链的 5'末端磷酸基团上，形成 DNA-腺苷酸复合物。最后一步是 3'-OH 对活跃的磷原子进行亲核攻击，结果形成磷酸二酯键，同时释放出 AMP（图 2-4）。

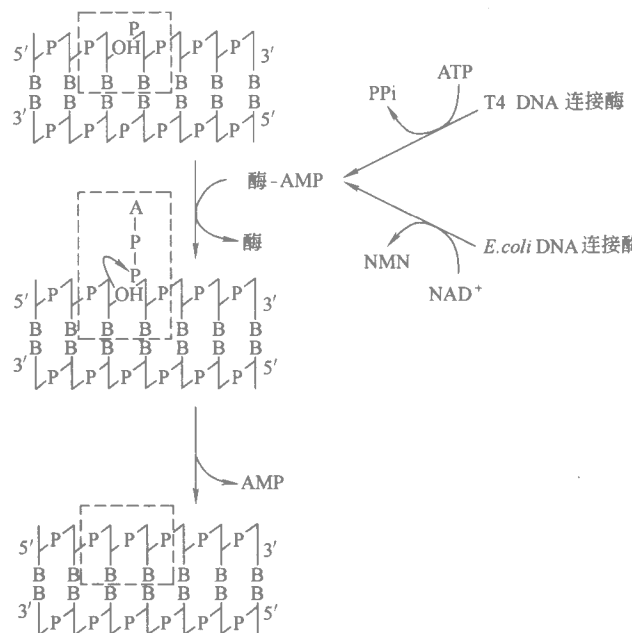


图 2-4 DNA 连接酶连接作用的分子机理

第三节 DNA 聚合酶

DNA 聚合酶（DNA polymerase）是能够催化 DNA 复制和修复 DNA 分子损伤的一类酶，在基因工程操作中的许多步骤都是在 DNA 聚合酶催化下进行的 DNA 体外合成反应。这类酶作用时大多数需要 DNA 模板并且优先作用于 DNA 模板，也可作用于 RNA 模板，但效率较低。最常用的依赖于 DNA 的 DNA 聚合酶有：① 大肠杆菌 DNA 聚合酶 I（全酶）；② 大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 大片段（Klenow 片段）；③ T4 和 T7 噬菌体编码的 DNA 聚合酶；④ 经修饰的 T7 噬菌体 DNA 聚合酶（测序酶）；⑤ 耐热 DNA 聚合酶（TaqDNA 聚合酶和 Ampli TaqTM），有一种聚合酶，即反转录酶，是依赖于 RNA 的 DNA 聚合酶可优先拷贝 RNA。下面是几种在基因工程制药中常用的 DNA 聚合酶。

这些 DNA 聚合酶的共同特点在于：它们都能够把脱氧核糖核苷酸连续地加到双链 DNA 分子引物链的 3'-OH 末端，催化核苷酸的聚合作用，而不发生从引物模板上解离的情况。这种聚合能力，是 DNA 聚合酶的一种重要特性。

一、大肠杆菌 DNA 聚合酶 I

大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 是由大肠杆菌 *polA* 基因编码的一种单链多肽蛋白质，分子质量为 $109 \times 10^3 \text{D}$ ，约有 1000 个氨基酸，酶分子中含有一个双硫键和一个硫氢基，还含有锌离子，基本上是一个椭圆形的结构。现在已经将 *polA* 基因成功地克隆到 A 噬菌体上，通过温度诱发溶原性菌株，就可以获得大量的 DNA 聚合酶 I。

只有在具备了下述三种条件的情况下，DNA 聚合酶才能够催化合成 DNA 的互补链。这些条件包括：全部四种脱氧核苷 5'-三磷酸 dNTPs(dATP、dGTP、dCTP、dTTP) 和 Mg^{2+} 离子；带有 3'-OH 游离基团的引物链，有了引物，DNA 聚合酶才能将脱氧核苷酸加到这段预先存在的 DNA 引物链的 3'-OH 末端；单链或双链 DNA 模板，双链的 DNA 只有在其糖-磷酸主链上有一至数个断裂的情况下，才能是有效的模板。

大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 是一种多功能酶，在其分子活性部位上有几个不同底物的结合位点协同一起完成其各种功能。*E. coli* DNA 聚合酶 I 具有三种酶活性，即 5'→3' 的聚合酶活性、5'→3' 的核酸外切酶活性和 3'→5' 的核酸外切酶活性。

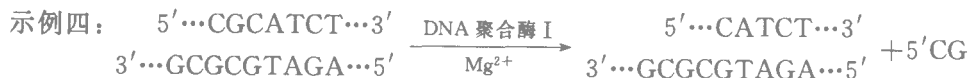
(一) 5'→3' 聚合酶活性

这是 DNA 聚合酶 I 的主要功能，即聚合脱氧核苷酸，使之逐个接到引物上去，最后合成一个新的 DNA 分子。其作用底物是单链 DNA 模板及带 3' 羟基的 DNA 引物，进行聚合作用时，首先是脱氧核苷三磷酸结合到 DNA 聚合酶的相应结合位点上，该结合位点紧挨着引物末端的 3'-OH，并且该脱氧核苷三磷酸直接被引至模板相对的位置上，与模板上对应的脱氧核苷三磷酸就与引物上的 3'-OH 结合成磷酸二酯键，这时整个酶分子就向前移动一步，使得新嵌入的脱氧核苷酸的 3'-OH 末端重新占据聚合酶的引物末端结合位点。如此重复，脱氧核苷酸就一个一个接上去，直至模板用完为止（示例三）。



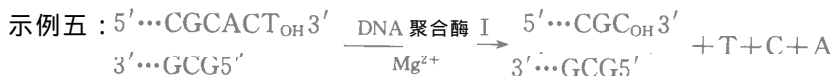
(二) 5'→3' 核酸外切酶活性

该酶活性起 5'→3' 外切核酸降解作用，作用底物是双链 DNA 或 RNA : DNA 杂交体，从 5' 端降解双链 DNA，也降解 RNA : DNA 杂交体的 RNA 成分。此核酸酶的作用方向是从 5'→3'，只对 DNA 上配对部分即双链的磷酸二酯键有切除作用，每次能切除的寡聚脱氧核苷酸可高达 10 个，且 DNA 聚合作用能刺激该外切酶活性的增加。该酶活性的主要功能是切除损伤的 DNA，起 DNA 修复作用（示例四）。



(三) 3'→5' 核酸外切酶活性

该酶活性起 3'→5' 外切核酸降解作用，其作用底物是带有 3' 羟基端的双链 DNA 或单链 DNA，从 3' 羟基端降解 DNA，每次只能切除一个脱氧核苷酸（示例五），对双链 DNA 的外切酶活性可被 5'→3' 聚合酶活性所抑制。该外切酶的主要功能是校对所合成的链是否能与模板精确无误地配对在一起；若在聚合作用中嵌入了错误的脱氧核苷酸，便开始 3'→5' 外切核酸降解作用，将此错误嵌入的脱氧核苷酸降解掉，再重新进行聚合。



切口平移反应：当双链 DNA 的一条链产生缺口时，DNA 聚合酶 I 的 5'→3' 聚合酶将脱氧核苷酸加添到 3'-OH 末端上，与此同时，其 5'→3' 核酸外切酶从缺口的 5'-P 末端切除原有核苷酸，使切口沿着 DNA 平移，此即称为切口平移反应，又称为缺口翻译（图 2-5）。

在迄今已发现的所有聚合酶中只有大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 能够进行这种独立的链的取代反应，因为它具有 5'→3' 核酸外切酶活性，可以在聚合酶沿 DNA 链推进之前从 DNA 链上去除核苷酸。在严格控制的实验条件下，可以做到在单链缺口只发生聚合作用，而并不同