

何俊坤

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

重组 DNA(recombinant DNA), 顾名思义, 即将两种不同的 DNA 分子, 经过裁剪并重新组合, 创造出一种新的、杂合的 DNA 分子, 然后将它转化或转导至受体细胞并在其中进行复制以及表达。这一技术通常叫作基因工程, 广义来讲也称为遗传工程。1972 年, 美国生物化学家 P. Berg 等人首先将 λ DNA 上剪切下来的一段基因, 成功地拼接到 SV₄₀ 病毒 DNA 分子上, 从而开创了这一崭新的技术^[1]。随后, 这一技术在现代生物学的研究和生产实践中得到广泛的重视和使用。我国对这一新技术也给予了高度重视, 不少单位已开展了这方面的工作, 取得了一些可喜的成绩。但由于这一领域发展很快, 国外有关研究十分活跃, 新方法、新成果纷至沓来, 文献之多令人应接不暇, 限于工作能力和知识水平, 不可能详细地、全面地阐述这一方面的工作, 拟就重组 DNA 技术的基本知识并结合我们的一些工作实践作一简略的介绍。

重组 DNA 的方法与步骤

根据 DNA 的来源和受体细胞的属性, 重组 DNA 的实验可分为三大类。一类是将两种原核细胞 DNA (细菌 DNA 或噬菌体 DNA) 重组转移到另一原核细胞中去。例如将噬菌体 DNA 片段嵌入到细菌质粒 DNA 中。另一类是将真核细胞 DNA 和细菌质粒重组转移到原核受体细胞中。第三类是将两种真核细胞 DNA 重组并转移到另一真核细胞中。不管那一类实验, 它都包括以下几个步骤: 载体的制备; 外源 DNA (又称目的基因) 的制备; DNA 的体外重组; 转化或转导; 筛选和鉴

定。现分别叙述如下。

一、工具酶

在重组 DNA 时一些工具酶是必不可少的条件, 常用的工具酶有以下几种:

1. 限制性核酸内切酶(以下简称限制酶)

限制酶是七十年代初发现的一种核酸酶。重组 DNA 中通常使用的属于 II 型限制酶, 它能识别 DNA 分子中特定的硷基序列。有的限制酶如 EcoRI、BamHI 等酶切后产生带粘性末端的 DNA 片段; 有的如 Hae III、Hind II、Hpa I 等产生带平头末端的 DNA 片段。所以它成为分析基因组、分离基因、制作染色体基因图以及体外重组具有生物活性的杂种 DNA 分子等极为有用的工具酶, 通常被分子生物学家称之为“分子手术刀”。1970 年 Smith 等人从嗜血流感杆菌中首先分离和鉴定出一种限制酶以来, 迄今(1980)已发现作用于双链 DNA 分子的限制酶 258 种, 新的限制酶还在不断涌现。国外已有 40 多种限制酶作为商品出售, 国内正在生产或试制的也有 20 多种。重组 DNA 时, 可根据各人的实验要求和条件选用不同的限制酶, 如以大肠杆菌抗药性质粒为载体, 插入外源 DNA 进行重组时, 最好选用在此质粒的抗药性基因上仅有一个切点的限制酶(整个质粒也仅有一个这个酶的切点)酶切, 这样, 外源 DNA 的插入便使质粒的抗药性基因失活, 从而可方便地通过插入失活来筛选重组体。又

* 承蒙施履吉教授审阅本文, 深表谢意。本文是在胡兆庆同志指导下完成的。初稿完成后, 承胡兆庆同志反复修改和补充。张基增同志、王红同志提出了不少有益的建议, 特此一并致谢。

如, 无性繁殖某一不具粘性末端的外源基因(如 cDNA), 可利用 $Hac\text{ III}$ 等限制酶或 S_1 核酸酶使此 DNA 片段产生平头末端(此基因应无 $Hac\text{ III}$ 等限制酶的切点, 否则将此基因切断), 然后接上人工接头, 再用能切这种人工接头的一种限制酶酶切来产生粘性末端与载体重组, 这样便可大量扩增该基因并回收此基因。

2. T4-DNA 连接酶和 T4-RNA 连接酶

T4-DNA 连接酶是基因工程技术中的一个极为重要的工具酶, 它的作用是连接两个不同来源的 DNA 片段成为一个完整的 DNA 分子。在两个片段采用平头末端连接时, 除加 DNA 连接酶外, 加入一定量的 RNA 连接酶, 可大大提高连接效率^[2]。1977 年, Murray 等人利用 DNA 重组技术将 DNA 连接酶基因粘接到大肠杆菌 λ 噬菌体 DNA 上, 获得了一株 DNA 连接酶高产菌株^[3], 国内已有不少实验室从这一菌株中纯化了 DNA 连接酶。

3. 硷性磷酸单酯酶

硷性磷酸单酯酶在分子生物学研究中被广泛使用(如 DNA、RNA 的人工合成, 同位素标记 DNA 等)。在重组 DNA 中它被用来切除载体(主要是大肠杆菌质粒)5' 末端的磷酸基团, 减少载体的自身环化, 提高重组体菌落在总的转化菌落中的比例, 因而增加了重组体的筛选率。

4. 反转录酶、末端转移酶、DNA 多聚酶、 S_1 内切核酸酶等

在重组 DNA 中, 如果需要无性繁殖某一真核生物的某一基因(如胰岛素基因、白蛋白基因等), 方法之一可采取先纯化胰岛素的 mRNA, 然后借助于反转录酶制成互补的 DNA(cDNA), 再用此酶或 DNA 多聚酶 I 制成双链 cDNA。用 S_1 酶(或 $Hac\text{ III}$ 限制酶)将双链 cDNA 链端切平, 并用 λ 外切酶切出突出的 5' 末端, 利用末端转移酶将 PolyA 加到这个双链 cDNA 的 3' 末端上, 将 PolyT 加到载体 DNA 分子 3' 末端上(也可采用 PolyC

和 PolyG 的方法, 目前西欧等国多半采用 PolyC 和 PolyG 的方法, 而美国多半采用 PolyA 和 PolyT 的方法), 最后用 DNA 连接酶将两个 DNA 片段连接成一个重组的 DNA 分子。或者将平头双链 cDNA 用 DNA 连接酶和 RNA 连接酶接上人工接头(Linker), 再和载体 DNA 重组。利用上述步骤可以无性繁殖任何基因或基因片段, 并研究其结构、表达及在各种环境下的控制。

二、载体(Vector)

载体是运载外源基因的 DNA 分子。一个理想的载体, 一般说来必须具备以下几个条件:

1. 能在受体细胞内自主复制;
2. 其裸露的 DNA 能感染受体细胞(转化、转染或转导);
3. 环状 DNA 分子能被限制酶切成线状分子;
4. 外源基因嵌入后不影响其复制能力;
5. 载体分子最好带有能在受体细胞内表现出某种特殊性状的基因(如抗药性基因等)便于筛选。在受体细胞是原核细胞时, 一般选用大肠杆菌质粒、枯草杆菌质粒、Cosmid 质粒、 λ 噬菌体及其各种衍生物(如 Charon 4A 等)为载体。当真核细胞作为受体细胞时, 多用 SV₄₀ 病毒 DNA 为载体。还有一类载体, 如大肠杆菌质粒和酵母 2 μ M DNA 片段或酵母染色体 DNA 片段重组的杂合质粒, 这类载体既可将外源 DNA 运载至原核细胞, 又可运载至低等真核细胞(如酵母细胞), 所以它是一种通用载体。采用大肠杆菌质粒为载体(特别是松弛型质粒, 即培养细胞时, 加入适量的氯霉素, 可大大增加质粒拷贝数的一类质粒)能扩增, 拷贝数多, 表达的产物也多。象 PBR322 质粒, 经氯霉素扩增后, 每个细胞内的质粒拷贝数多达 1000—3000 个。这样, 在短时间内可获得大量基因或基因产物。同时, 这类质粒往往带有多种抗药性基因, 所以可极为方便地利用插入失活来筛选重组体。但这类质粒运载外源基因片段的长度受到很大的限制, 随着外源基因片段长度的增加, 重组的机率越来越小。所以, 运载大片段一般采用 Cosmid 质粒(一种 λ

cos位点和PBR322的杂合体)^[4], 或 λ 噬菌体及其衍生物^[5](Charon 4A)等。此外, 大肠杆菌质粒有自身环化的缺点, 即使采用硷性磷酸单酯酶切除其5'末端的磷酸基团, 重组体在总的转化菌中的比例还不是十分令人满意的。所以最好再用环丝氨酸来富集重组体。若利用Cosmid或Charon 4A等就不存在这些麻烦事, 而且可以运载大片段, 但由于多了体外包装的步骤, 技术上难度较大。因此, 除了做基因库(Gene bank)用它们作为载体外, 一般情况下还是使用大肠杆菌质粒, 特别是pBR322为载体。利用大肠杆菌质粒还有它的特好处, 即可以根据各人的需要, 对载体进行改造。例如, 要使真核生物基因产物在大肠杆菌或酵母菌中大量生产, 除了增加基因数量外, 还需要重组体具有高效率的转录信号(即启动基因)和转译信号(包括起始密码子AUG或GUG及SD片段——与16SRNA3'端互补的硷基序列)。因此, 可以在pBR322上接上适当的启动基因(如 λ 启动基因, 乳糖操纵子的启动基因等)以促进外源基因的表达。下面就以pBR322质粒为例说明大肠杆菌质粒制备的一般方法。

制备质粒的方法多种多样, 常用的有: 超离心法^[6]、酸酚法^[7]、羟基磷灰石柱过滤^[8]、甲基化白蛋白柱分离^[9]等等。国外多半采用超离心法, 此法纯化的质粒纯度较高, 但国内应用多受仪器设备的限制。我们参照Birboim等人的方法, 加以改进, 借助于普通台式离心机可制备出具有一定纯度的多种质粒, 具体步骤如下:

含质粒的菌液10毫升, 经3,500rpm离心10分钟, 弃去上清液, 将菌体悬浮于2毫升含50mM葡萄糖、10mMEDTA、25mM Tris-HCl, pH8.0 2毫克/毫升溶菌酶的溶液中。0℃下搅拌30分钟后加入4毫升0.2N NaOH 1%SDS溶液, 温和地颠倒数次后, 在0℃下放置5分钟, 再加入3毫升3M醋酸钠, pH4.8, 温和地颠倒数次, 0℃下放置60分

钟。3,500rpm离心10分钟, 取2/5上清液加入8毫升冷酒精, 在-20℃下放置1小时以上。3,500rpm离心10分钟, 沉淀溶于20mM Tris-HCl, pH8.0; 1mMEDTA 2毫升中, 再加4毫升冷酒精沉淀DNA, -20℃下放置半小时以上。经3500rpm离心10分钟后, 沉淀再溶于20mM Tris-HCl pH8.0; 1mMEDTA溶液600微升中, 加入160微升RNase溶液(1毫克/毫升, 已在100℃下10分钟, 灭活DNase), 经37℃反应1小时后, 即为已纯化了的质粒溶液(尚有一定量的小分子的RNA, 但在电泳时走出胶外)。以5微升样品进行琼脂糖凝胶电泳可见清晰明亮的质粒DNA带。我们用此法纯化了许多种大肠杆菌质粒、Cosmid质粒、酵母2 μ m质粒(需增加蜗牛酶处理细胞壁步骤)。此法快速、简单, 质粒得率高。所纯化的质粒可用作鉴定分子量的样品和各种限制酶的底物。如需较高纯度的质粒作载体或DNA序列分析等用, 可采取割胶冻融上DE-52柱等方法进一步纯化。

Charon 4A一类载体的制备方法, 可参阅有关文献^[5], 在此不再赘述。

三、外源基因的制备

分离基因的方法很多, 归纳起来主要有如下几种:

1. 超离心法

这种方法分离基因的基础在于DNA双螺旋之间存在着配对的硷基, 而GC碱基对要比AT碱基对重些, 假定某一基因所在的这段DNA含较多的GC对, 那么它的密度就大些, 这种差别虽然微小, 但可用精密的密度梯度离心的方法把这一基因分离出来, 如爪蟾28S rRNA基因的分选。

2. 化学合成及酶促合成

在某一基因的核苷酸排列顺序已清楚的情况下, 可以用单核苷酸为原料, 经化学合成和酶促合成制备该基因。如Somatostatin基因, 人胰岛素基因等。

3. 反转录酶法

这种方法使用较多,有不少用此法制得的基因已在大肠杆菌中得到了表达,如鼠胰岛素基因、鸡卵白蛋白基因等。这种方法首先需要分离出纯的 mRNA 作为模板,在反转录酶的催化下,以四种脱氧核苷酸为原料,合成互补于该 mRNA 的 DNA(即 cDNA),最后再用反转录酶或 DNA 聚合酶 I 合成此基因。

4. 鸟枪射击法(又称榴散弹射击法)

这种方法不需要预先分离出某个特定基因的 mRNA,而是用限制酶把各个基因组切成许多 DNA 片段,与适当的载体重组后去转化缺乏某个特定基因突变的突变型菌株,通过互补法筛选出所需基因。如 Struhl 等人用此法获得了组氨酸基因。另外也可采用某一基因的 mRNA 或 cDNA 作探针,用菌落杂交的方法,从鸟枪法制备的基因库中筛选出该基因,如免疫球蛋白 CK 基因等。此法实验步骤大致如下:①将供体 DNA 及载体以相同限制酶处理后进行重组;②转化受体细菌并使受体细菌在微孔滤膜上生长;③用滤纸印下在滤膜上生长的菌落;④用 0.5M NaOH 处理滤膜上细

菌并使它们的 DNA 变性;⑤加入同位素标记的 mRNA 或单链 cDNA 和变性后的 DNA 单链结合,只有含有相应基因才显示同位素标记;⑥根据同位素标记自显影位置,在滤膜上检出相应菌落,这些细菌中的质粒上带有所需要的基因。

5. 微生物遗传学方法

某种生物基因组基因图清楚的情况下,可利用限制酶切割基因组来获得所需基因。例如切割 F 因子、R 因子、ColEI 质粒,λDNA 等。我们曾用这种方法分离了 λ 的启动基因。在分离特殊的基因如某一操纵基因时,可利用该操纵基因和它的阻遏物相结合后可避免核酸酶作用的原理来分离操纵基因。这方法大致如下:首先把带乳糖操纵子的 λ 噬菌体 DNA 用超声波切成碎片,加入阻遏蛋白并使悬浮液通过硝酸纤维素滤膜。把收集到的阻遏蛋白操纵基因复合物用诱导物异丙基-β-D 硫代半乳糖苷(IPTG)处理以游离出操纵基因。应用此原理也可分离起始基因、启动基因等。

(未完待续)

基础知识

细胞周期浅说

邵 伟

(东北师范大学生物系)

细胞主要以有丝分裂方式复制自己,更新和保持机体各类细胞之间的平衡。人们把每一个体细胞生命活动的周期,称为细胞周期(Cell Cycle)。

本世纪 50 年代以前,人们对细胞生命活动的了解很有限,特别是对处于分裂间期的细胞,长期以来视为细胞的“静止阶段”。近 30 年来由于科学技术的飞速发展和现代研究手段

在生物学研究上的广泛应用,为揭开细胞的微观活动创造了条件。晚近的一些研究进展表明,细胞周期各阶段都发生复杂的生化变化,特别是间期细胞的生命活动,显得更为重要。

本文仅就细胞周期研究进展的某些问题作一简述。

一、细胞周期的划分

本世纪 40 年代初, Caspersson(1941)和