

何俊坤

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

四、DNA的体外重组

DNA重组技术,当用于干扰素、胰岛素、疫苗、免疫球蛋白等物质的生产时,目前多半采用从mRNA反转录成cDNA,然后和载体DNA重组,再转化至大肠杆菌内进行复制和表达。在某一基因结构已清楚的情况下,亦可人工合成该基因(如人胰岛素基因等),再将该基因嵌入载体引进大肠杆菌中。若从基因库中分离出的基因,由于已含有内含子(Intron),大肠杆菌内酶系无法进行加工,故这种基因不能在大肠杆菌内表达。而在研究基因的结构和功能时,则需先建立基因库,再从基因库中筛选出某一基因来。下面叙述两个较有代表性的DNA体外重组实验。

实验1:大鼠白蛋白基因的无性繁殖。

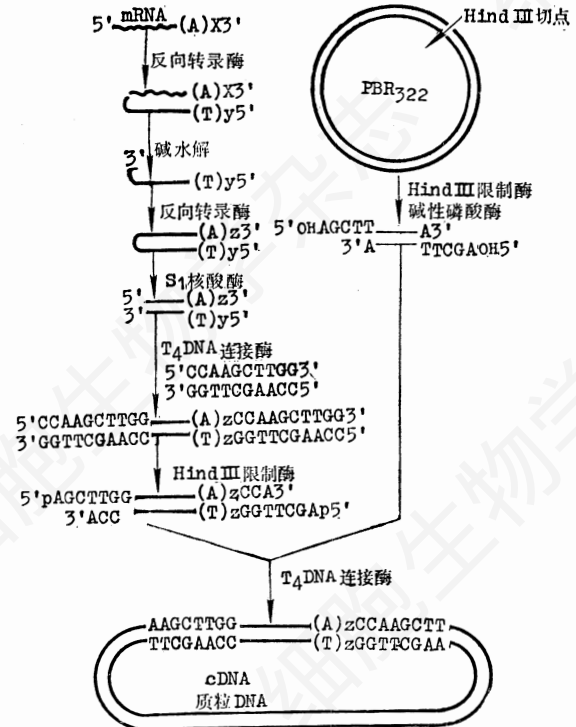
实验设计如图1所示。

1. 大鼠白蛋白 mRNA 的分离

首先制得大鼠肝多核糖体,用双抗体法制备白蛋白多核糖体——双抗体复合物,经SDS处理,酚、氯仿抽提, Oligo-dT 纤维素柱层析。所得 mRNA 用麦胚无细胞系统测活,用琼脂糖电泳检查纯度。

2. 单链 cDNA 的合成

合成体系为: 50mM Tris-HCl pH8.3/10mM DTT/40mM KCl/6mM MgCl₂/10mM ATP/0.5mM dTP/10μCi [³H]dTTP/0.2mg/ml oligodT (12-18)/4mg/ml BSA/0.1mg/ml 放线菌素 D/5μg mRNA/220U/ml 反转录酶。总反应体积为 100μl,于 45℃ 反应 15 分钟后加入 1/10 体积的 0.2M EDTA, pH8.5 终止反应,用等体积的水饱和的酚、氯仿-异戊醇 (50:48:2) 抽提,水相经 Sephadex G-50 柱层析,所得 mRNA-cDNA 杂交体,用 0.3N



NaOH 37℃ 作用 16 小时除去 mRNA, 再经 Sephadex-G50 柱层析, 得单链 cDNA。

3. 平头双链 cDNA 的合成

由单链 cDNA 自体引发合成长发夹结构双链 cDNA。反应系统为: 50mM Tris-HCl, pH8.3/10mM DTT/40mM KCl/6mM MgCl₂/10mM ATP/0.5mM dNTP, 10μCi [³H]-dTTP, 50μg/ml 单链 cDNA/300U/ml 反转录酶。混合液在 37℃ 下反应 4 小时后, 去蛋白, 经 Sephadex-G50 柱层析, 得到的双链 cDNA 经 S₁ 核酸酶处理, 成为平头双链 cDNA。

4. 平头双链 cDNA 与 HindIII 人工接头

的钝端连接

反应系统为: 60mM Tris-HCl, pH7.6/1mM ATP/6.6mM MgCl₂/10mM DTT/3~5μg [³H] 标记的双链平头 cDNA/Hind III 人工接头 1.5μg/T4-DNA 连接酶 8U/RNA 连接酶 10U。于 12°C 反应 16 小时后, 经 65°C 5 分钟灭活连接酶后上 Sephadex-G100 柱层析, 分管收集, 用闪烁计数器测定, 将有同位素部分合并, 浓缩至所需体积。

5. 接上人工接头的 cDNA 的 Hind III 酶解

上述 cDNA 溶液加入 200U 的 Hind III 酶 (反应系统为: 20mM Tris-HCl, pH 8.0/7mM MgCl₂/60mM NaCl) 37°C 反应 1 小时再于 65°C 温育 5 分钟后置冰浴。载体 pBR322 经 Hind III 酶切和硷性磷酸单酯酶处理。

6. cDNA 与 pBR322 质粒重组

反应系统为: 20mM Tris-HCl, pH 7.6/10mM MgCl₂/10mM DTT/0.4mM ATP, Hind III 酶切的 cDNA 75μl (1μg), Hind III 酶切并经硷性磷酸单酯酶处理的 pBR322 5μl (5μg), T4-DNA 连接酶 2.5U, 总反应体积 100 微升, 14°C 16 小时反应后置冰浴。

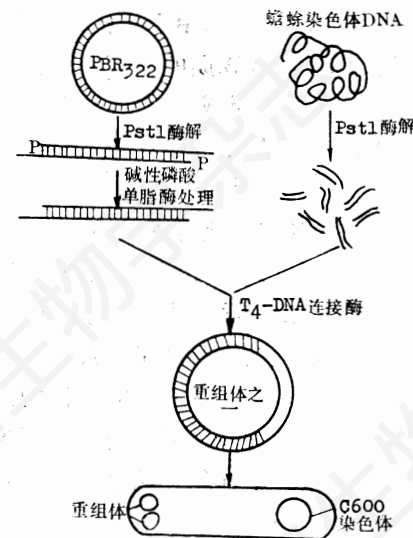
7. 重组体的转化及 Ap^rTc^r 菌落的筛选

(Ap^r——表示抗氨基青霉素, Tc^r——表示对四环素敏感)。因本实验是在 pBR322 抗四环素基因上插入 cDNA, 根据插入钝化原理, 故带 cDNA 重组质粒的菌落必定是 Ap^rTc^r 的。按 Cohen 等人的方法^[10] 转化受体菌 *E. coli* C600, 将转化液用环丝氨酸处理, 取 0.1 毫升转化液铺于含 Ap (50μg/ml) 的 *E. coli* C600 培养基的平皿上, 37°C 培养过夜。用牙签复印法挑取生长菌落, 分别接种于 Ap 及 Ap + Tc (25μg/ml) 成对的平皿上 (两只平皿编号一样), 培养过夜。在 Ap 平皿上长而 Ap + Tc 平皿上不长的菌落, 即为所需的菌株。为了确证此菌株中的重组质粒含有白蛋白 cDNA, 还需用菌落杂交^[11]、或抽提出此质粒进行限制性内切酶的分析及杂交抑制法的鉴定^[12]。如果 cDNA

能在 *E. coli* C 600 中表达, 也可测定其基因产物 (如某些酶的活力或蛋白免疫反应等), 以便对重组体作出明确的结论。

实验 2

利用鸟枪法组建带有蟾蜍染色体 DNA PstI 限制片段的重组体。



1. 载体的制备

pBR322 DNA 用 PstI 酶解, 反应体系为: 90mM Tris-HCl, pH7.5/10mM MgSO₄. 25 微克 pBR322 DNA 和 0.3 毫升 PstI 酶 (1U/微升), 37°C 反应 1 小时, 经 65°C 温育 5 分钟后置冰浴, 然后对 25mM Tris-HCl pH7.5 的缓冲液透析, 浓缩至小体积, 经电泳检查已彻底酶解。将上述 pBR322 在 25mM Tris-HCl pH7.5 的溶液中和 15U 硷性磷酸单酯酶反应 1 小时后, 立即用 0.1M Tris-HCl pH7.5 饱和的酚抽提四次, 取水相对上述缓冲液透析, 加 2 倍体积的酒精沉淀 DNA, 沉淀溶于质粒溶液, 即为载体 DNA。

2. 蟾蜍染色体 DNA PstI 限制片段的制备

先制备蟾蜍总 DNA。将总 DNA 200 微克和 PstI 酶 200U, 在 90mM Tris-HCl, pH 7.5/10mM MgSO₄ 的缓冲液中, 37°C 反应 1

小时,再经65℃温育5分钟后置冰浴。对25 mM Tris-HCl, pH7.5的缓冲液透析后,浓缩至所需体积,即为PstI酶切的蟾蜍染色体DNA片段。

3. DNA的体外重组、转化

载体DNA 3微克和蟾蜍染色体DNA PstI片段15微克进行体外重组。连接步骤与转化方法均按实验1方法进行。

4. 重组体的筛选和鉴定

利用绒布复印法初筛、牙签法复检,将所有Ap^rTc^r的菌落筛出(因外源基因插在pBR322的氨苄青霉素抗性基因中,故带有重组质粒的菌株必定是Ap^rTc^r的菌株)。对部分Ap^rTc^r菌株的质粒分析表明,这些菌株中的质粒均带有蟾蜍染色体DNA片段,至于每个DNA片段各代表什么基因,需按实验1介绍的方法进一步加予鉴定。

结 束 语

七十年代初在分子生物学基础上发展起来的基因工程,经过短短的几年实践,已显示出它强大的生命力。1977年,人工合成的Somatostatin基因(生长激素释放抑制素基因)在大肠杆菌中表达成功。紧接着又有胰岛素基因、干扰素基因等许多基因在大肠杆菌或酵母菌中获得了表达,实现了人们设想将基因工程应用于生产实践的愿望。再者,利用DNA重组技术,可以得到纯的、大量的特定的基因片段,这对于繁杂的、难以着手研究的真核细胞基因提供了一种强有力的手段。此外,基因工程技术和DNA快速分析技术相结合,使得曾经是

极其困难的DNA顺序分析获得了重大突破。迄今已分析了诸如 ϕ X174DNA(5375 bp); pBR322质粒(4362bp); SV40 DNA(5224bp); 以及酵母A364A2 μ M DNA(6318bp)等的核苷酸全序列,极大地推动了基因结构和功能的研究。可以预期,人们可从这一技术中获得巨大的利益。正因为如此,基因工程成为当前最热门的学科之一。它的研究日新月异地向前发展,本文仅仅简介这一技术中的一些基本知识,如读者有兴趣进一步了解这方面的情况可参阅有关文献^[13]。

参 考 文 献

- [1] Jackson, D. A. et al., 1972, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 69: 2904—2909.
- [2] Sugino, A., 1977, J. Biol. Chem., 252: 3987.
- [3] Murray, N. E. et al., 1979, J. Mol. Biol., 132: 492—495.
- [4] Setlow, J. K. et al. Genetic Engineering., 2.
- [5] Rimm, D. L. et al., 1980, Gene., 12: 301—309.
- [6] Engler, J. A. et al., 1981, Gene., 13: 125—132.
- [7] Zasloff, M. et al., 1978, Nucleic Acid Res., 5: 1139—1151.
- [8] Colman, A. et al., 1978, Euro. J. Biochem., 91: 303—305.
- [9] Mandell, J. D. et al., 1960, Anal. Biochem., 1: 66.
- [10] Cohen, N. S. et al., 1972, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 69: 2110—2114.
- [11] Nagahari, K. et al., 1980, Gene., 10: 137—145.
- [12] Struhl, K. et al., 1976, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 73: 1471—1475.
- [13] Ray, Wu., 1979, Methods in Enzymology., 68: 75—90.