

第8章

分子克隆与基因工程

基因本身就是一个产业

- **Rockefeller** 大学将人肥胖基因出售**0.2亿美元**（1995年3月）
- **Amgen**公司将**FKBP**神经免疫因子配体转让达**3.29亿美元**（1997年）
- **Millennium**公司以**4.65亿美元**向**Bayer**公司转让**225种基因**的开发权（1998年9月）

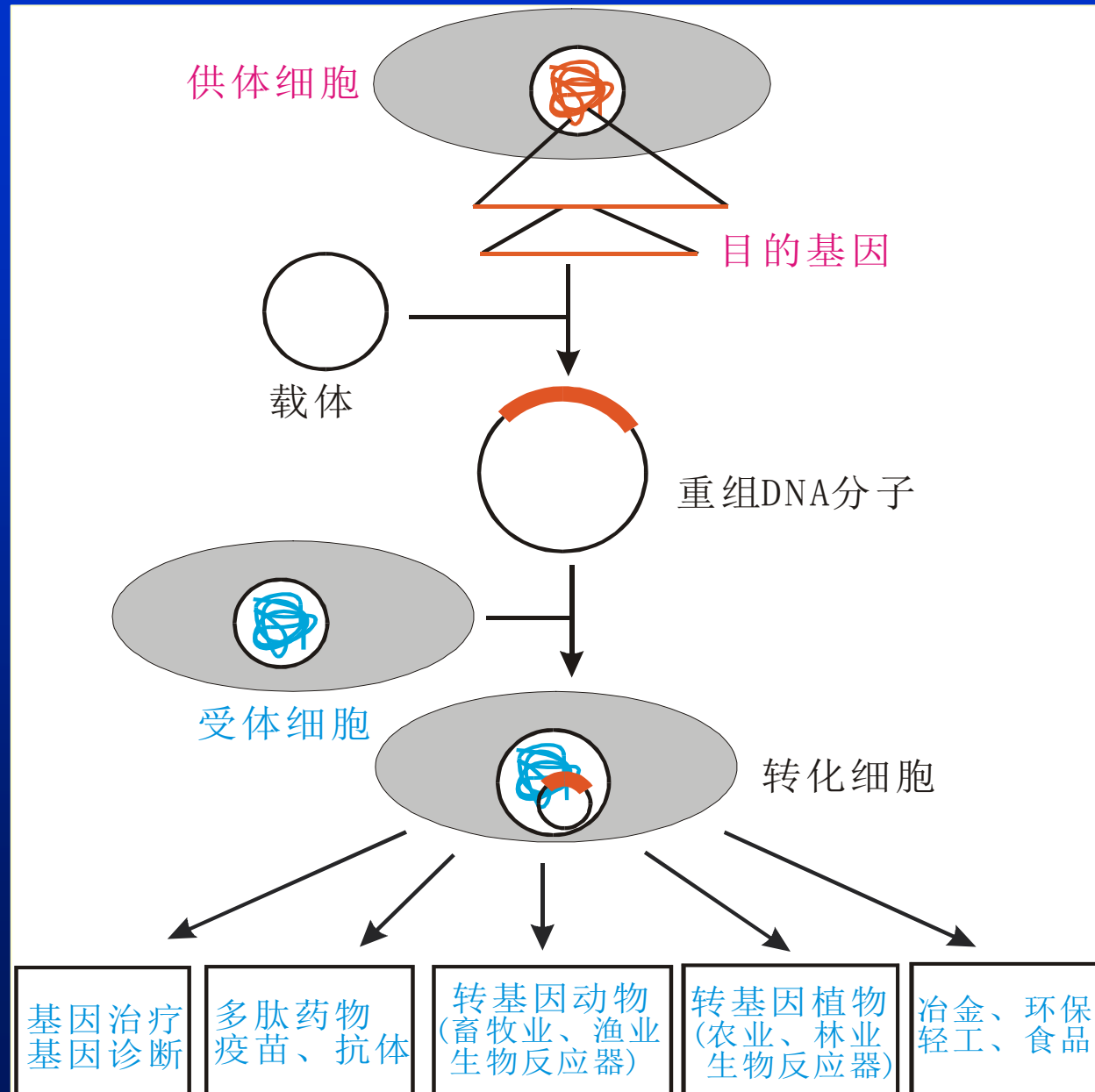
基因工程试剂的高回报

- 碱性成纤维细胞生长因子 231元/ug
- 红细胞生成素 1072元/ug
- 白细胞介素-2 410元/ug
- 巨细胞粒细胞集落刺激因子 1960元/ug
- 胰岛素 10.2元/mg

基因工程的概念

从某种生物基因组中分离感兴趣的基因，或是用人工合成的方法获取基因，利用DNA体外重组，经过一系列切割，加工修饰，连接反应形成重组DNA分子，再将其转入适当的受体细胞，以期获得基因表达的过程。

基因工程技术及其应用



基因工程(gene engineering)常和以下名称混用:

- 遗传工程(genetic engineering);
 - 基因克隆(gene cloning);
 - 分子克隆(molecular cloning);
 - 基因操作(gene manipulation);
 - 重组DNA技术(recombination DNA technique)
-
- 克隆(clone): 作名词时指含有某目的DNA片段的重组DNA分子或含有该重组分子的无性繁殖系。
 - 作动词时是指基因的分离与重组过程。

基因工程的特征与主要步骤

- 两个特征：

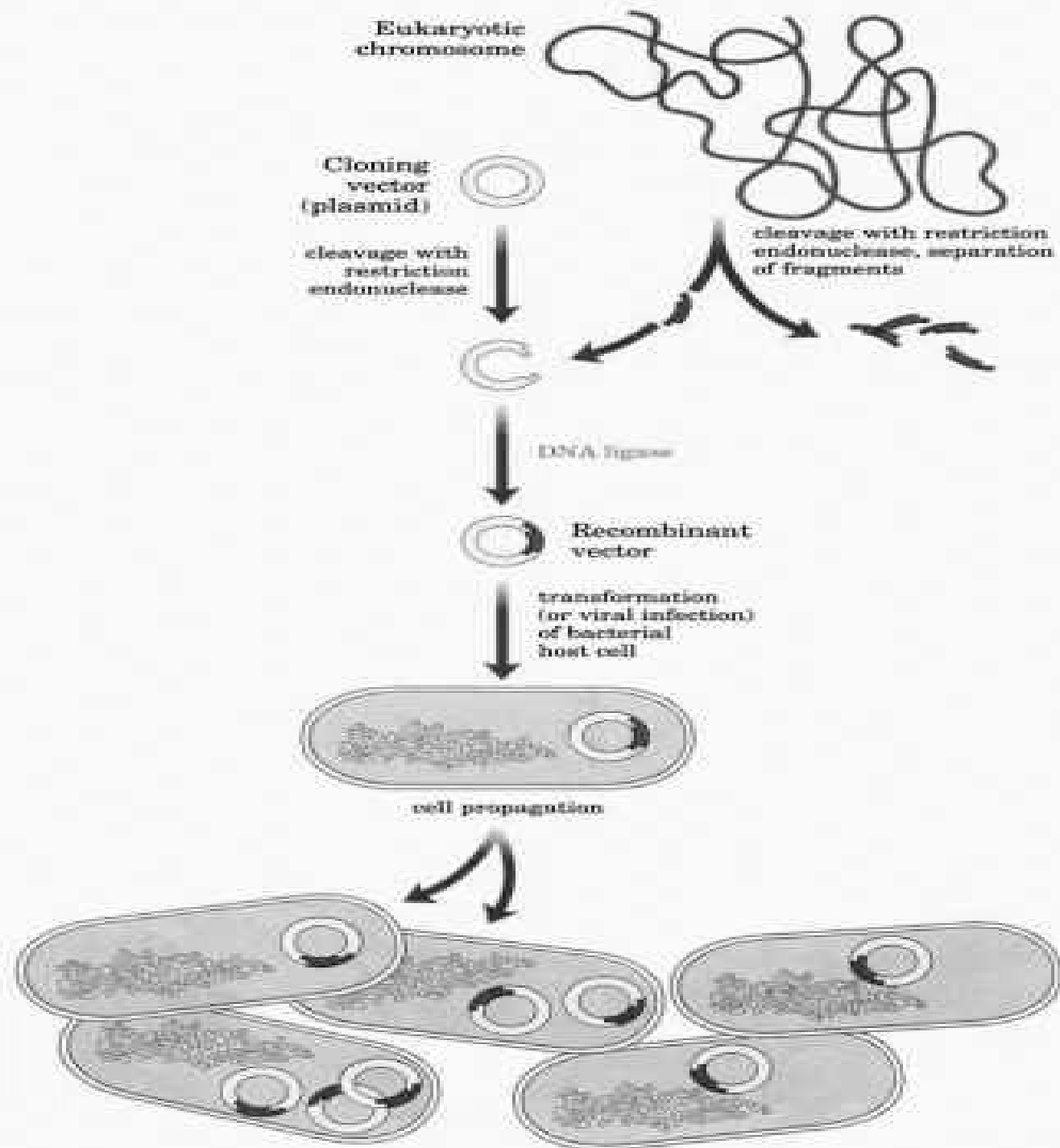
第一，跨越天然物种屏障，克服了固有的生物种间基因交流的限制，

第二，使一种特定的DNA小片段在新寄主细胞中扩增，制备大量纯化的DNA片段，从而拓宽了分子生物学的研究领域

主要步骤

1. 分离出带有目的基因的DNA片段；
2. 构建重组DNA分子；
3. 转化适当的受体细胞（亦称寄主细胞）并与之一起增殖；
4. 筛选出获得了重组DNA分子的受体细胞，并筛选出已经得到扩增的目的基因；
5. 将目的基因克隆到表达载体上，转基因，在新的遗传背景下表达

基因工程流程



目的基因的克隆

- 目的基因：已被或者准备要被分离、改造、扩增或表达的特定基因或DNA片段
- 外源基因：插入到载体内的那个特定的片段基因

目的基因的性质

- 染色体基因组拷贝(genomic copy)
 - 包含着基因的调控区域、内含子及外显子
- cDNA拷贝(cDNA copy)。
 - 利用逆转录酶将经过加工的mRNA逆转录而成cDNA拷贝

基因克隆

- 某种目的基因的分离过程，通常是将生物材料的遗传物质如DNA以酶切成片断，插入到载体中，通过无性繁殖（细菌或细胞的倍增）使其扩增，然后再以某种探针选择、钓取目的基因。
- 化学合成法、分子杂交法、差式杂交、扣除杂交、DDRT-PCR差别显示技术、酶促合成(逆转录)法

DNA分子的切割与连接

细菌限制修饰系统

Werner Arber于1962-1968年发现，1968年分离到I型限制酶。

- 限制性核酸内切酶是该系统的限制组分，负责识别与切割特定的DNA分子
- 甲基化酶是该系统的修饰组分，甲基化修饰，保护自身DNA不被内切酶降解。

限制性酶的类别与活性

	II型酶	III型酶	I型酶
蛋白结构	内切酶亚基和甲基化酶亚基分开	2 亚基的双功能酶	3 亚基的双功能酶
识别位点	4~6bp 序列 常为回文	5~7bp 不对称序列	两侧对称或不对称
剪切位点	在限制位点	限制位点上游 24~26bp 处	离限制位点 >1000 bp 的非特异位点
限制与甲基化	活性分开	同时存在	互相排斥

限制性内切酶的命名

限制酶由三部分构成，即菌种名、菌系编号、分离顺序。

例如：***Hind*III** 前三个字母来自于菌种名称***H. influenzae***，“**d**”表示菌系为d型血清型；“**III**”表示分离到的第三个限制酶。

EcoRI—***Escherichia coli*** **RI**

HindIII—***Haemophilus influenzae*** **d III**

SacI (**II**)—***Streptomyces achromagenes*** **I (II)**

限制酶的特点

识别顺序和酶切位点

1. 识别 4 -8个相连的核苷酸

*Mbo*I N↓GATCN; *Ava*II G↓G(A/T)CC

*Bam*HI G↓GATCC; *Ppu*MI Pu↓GG(A/T)CCPy

Not I G↓CGGCCGC;

*Sfi*I GGCCN↓NNNNGGCC

CCGGN↑N'N'N'N'CCGG

Fok I 5'-GGATG(N)₉-3'

3'-CCTAC(N)₁₃-5' 外侧，产生 5'-端突起

2. 富含 G C

3. 对称性



4. 切点大多数在识别顺序之内，也有例外

5. 限制酶切后产生两个末端，末端结构是
5'-P和3'-OH

基因工程载体

载体：是一类可供外源DNA插入并携带重组DNA分子进入适当宿主细胞的DNA分子。

主要来自于细菌的质粒、噬菌体、动物病毒载体等。

- 克隆载体
- 表达载体
- 穿梭载体

载体

克隆载体： 基因组或cDNA文库的构建;亚克隆或限制酶谱分析；外源DNA扩增。

质粒、噬菌体 λ ，柯斯质粒和噬菌体M13

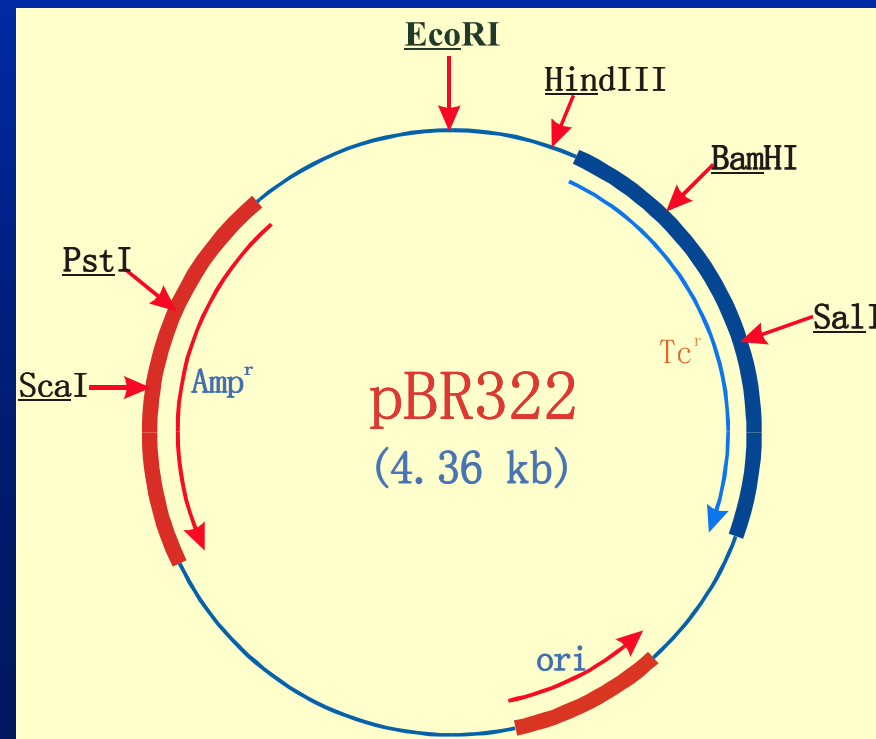
表达载体： 启动子+终止子+翻译信号

穿梭载体： 具有两种不同复制起点和选择标记，可在两种不同寄主细胞中存活与复制的载体，由于这类载体可以携带外源DNA在不同物种之间，特别是原核与真核生物之间往返穿梭，在基因工程中非常有用，大多数真核细胞中使用的载体都被构建为穿梭载体

载体特点

1. 自主复制
2. 有选择性标记、易于识别和筛选
3. 可插入一段较大的外源DNA，而不影响其本身的复制
4. 有合适的限制酶位点便于进行克隆

大肠杆菌载体 pBR322结构图



1. 标记基因的作用

- 1) 指示外源DNA分子（载体或重组分子）是否进入宿主细胞
- 2) 指示外源DNA分子是否插入载体分子形成了重组子。

2. 标记基因的种类

1) 抗性标记基因（可直接用于选择转化子）

a. 抗生素抗性基因

b. 重金属抗性基因: Cu^r , Zn^r , Cd^r

c. 代谢抗性基因: TK, 抗除草剂基因

2) 营养标记基因（可直接用于选择转化子）

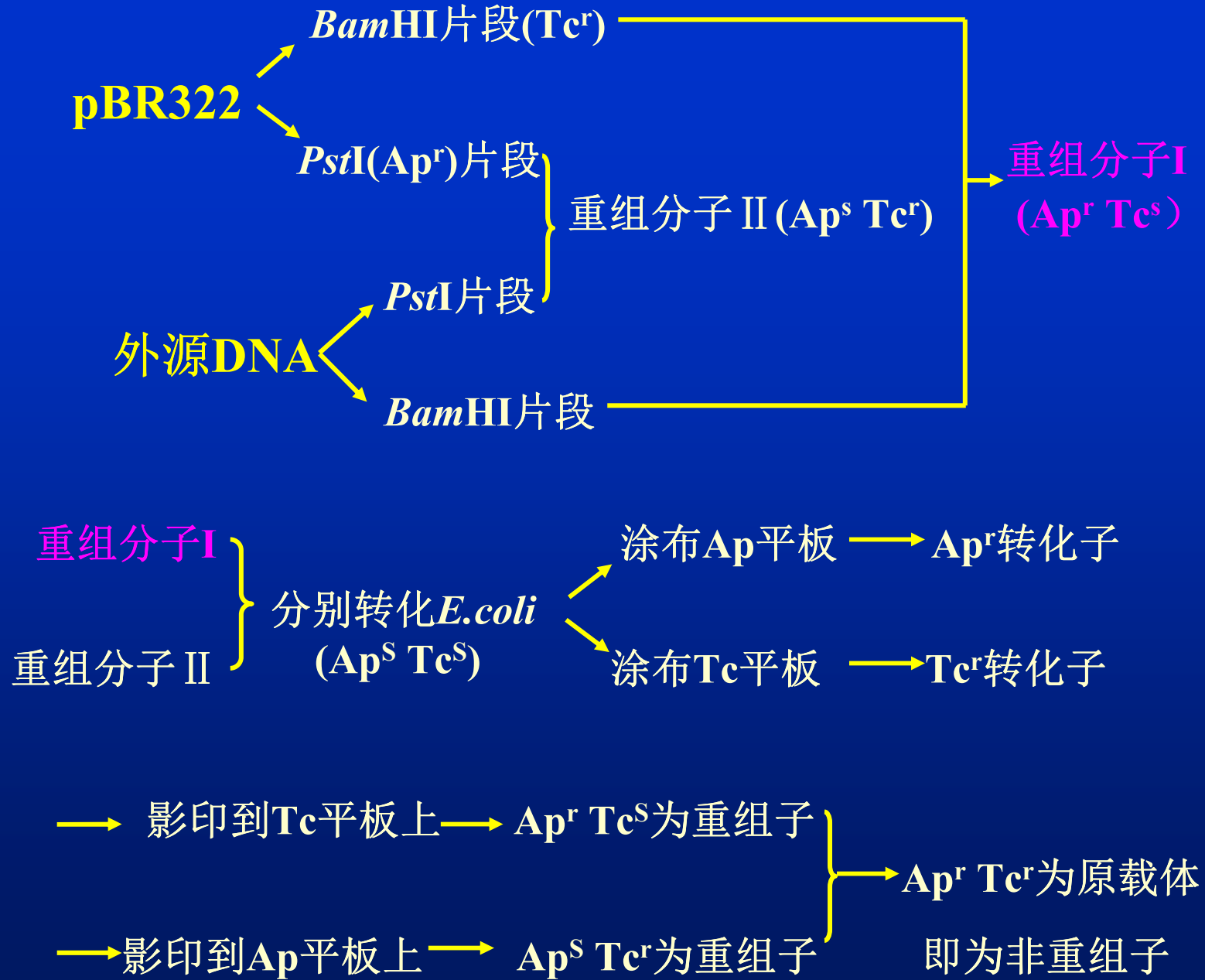
参与氨基酸, 核苷酸及其他必需营养物合成酶类基因

3) 生化标记基因

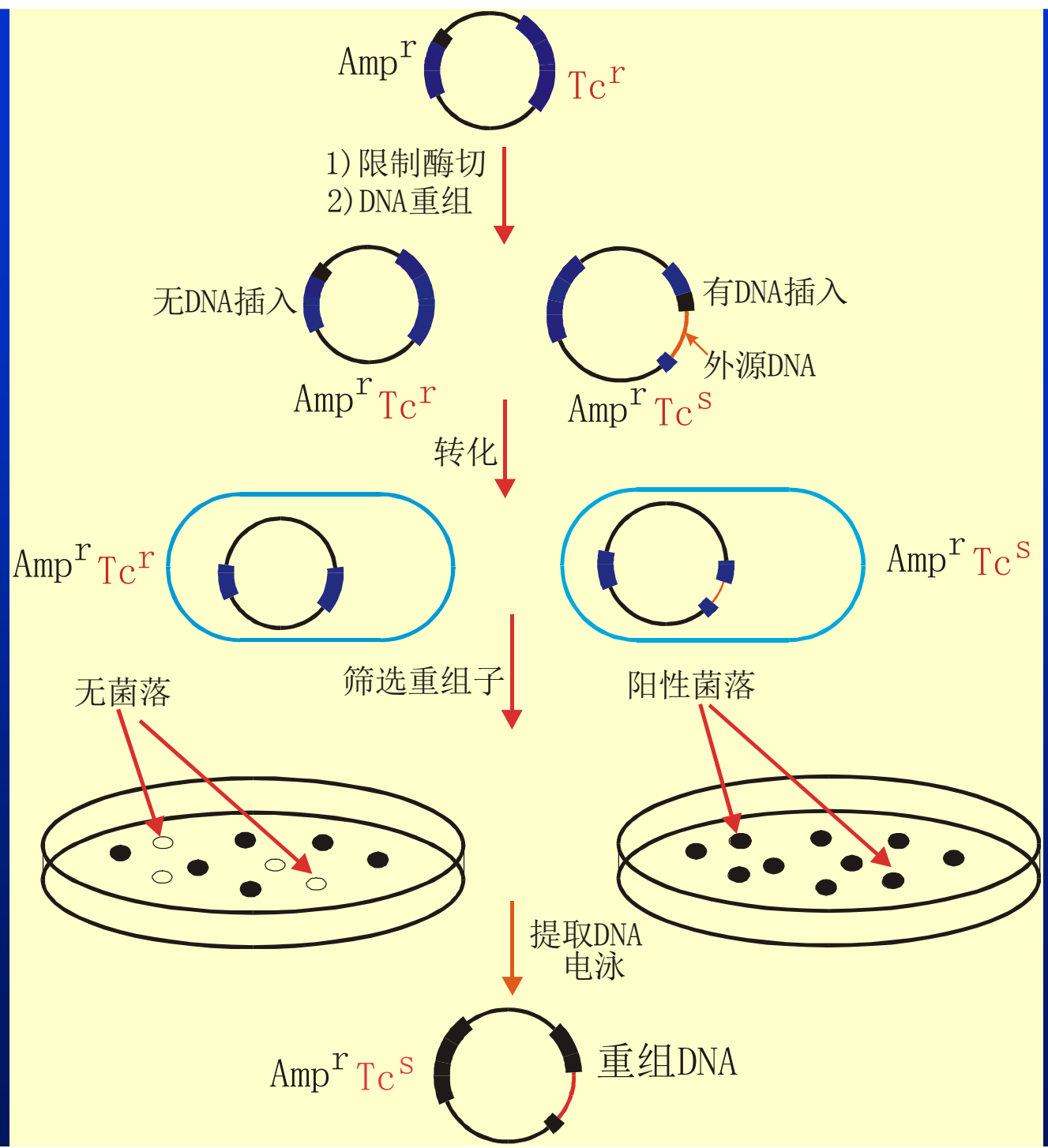
其表达产物可催化某些易检测的生化反应

4) 噬菌斑

利用抗生素抗性基因筛选重组子的过程



筛选重组子的示意图



转化与转基因

转化

- 感受态细菌

细胞能从周围环境中摄取DNA的生理状态叫感受态（competence），感受态比非感受态细胞的转化率高100倍。

CaCl₂处理，人工诱导

化学方法（如PEG），或者物理方法（如电转化）促进DNA转化，然后选择

转基因

- 生物、化学、物理方法以及它们的综合利用。
 - 双子叶植物常用根癌农杆菌介导进行转化
 - 单子叶植物则是基因枪法使用较多
 - 哺乳动物转基因常用磷酸钙转染、基因打靶

大多数化学和物理方法可作用于所有生物，
如显微注射、PEG、脂质体、电穿孔等

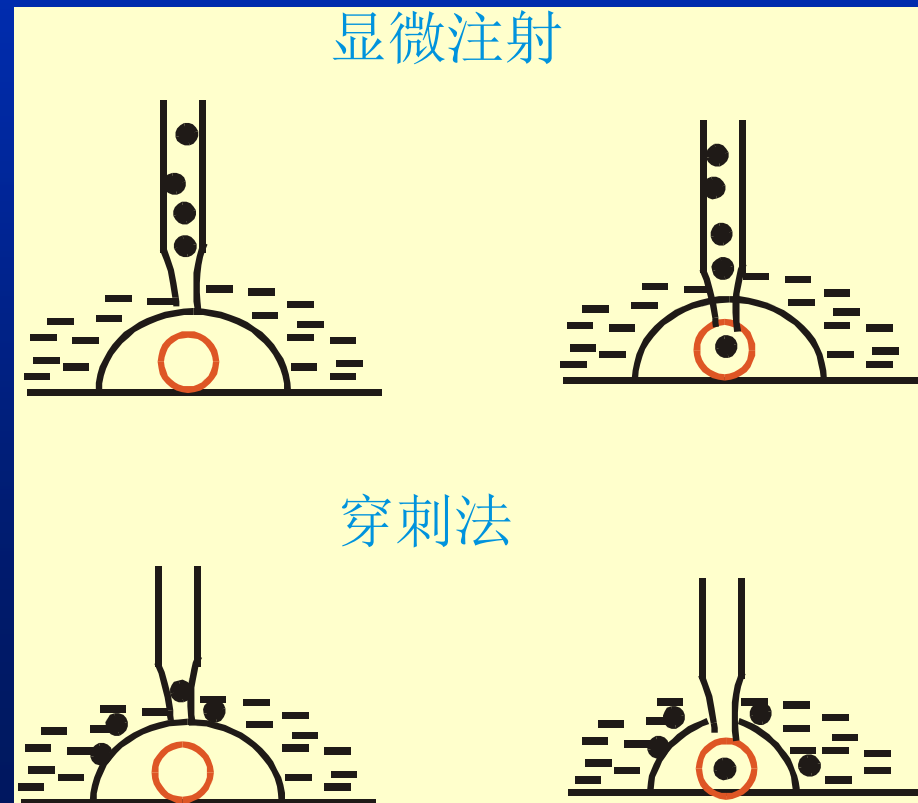
- | | |
|--|-----------------------|
| 1. 细胞融合 | $<10^{-6}$ |
| 2. 微细胞介导的基因转移 | 小于或等于 10^{-6} |
| 3. 染色体介导的基因转移
利用中期染色体DNA进行转移 | $<10^{-6}$ |
| 4. 脂质体介导的基因转移
用脂质体包装DNA，再与细菌，植物原生质体融合 | 约 2×10^{-4} |
| 5. 磷酸钙沉淀介导基因转移 | 10^{-3} — 10^{-7} |
| 6. 原生质体融合术
溶菌酶处理细菌，再与动物细胞，植物原生质体融合 | 约0.1—0.3% |

7. 显微注射法 约1—10%

直接注射入细胞质或细胞核内

显微注射法—利用显微操纵器，将DNA直接注射到细胞核中

穿刺法—利用注射显微镜将微注射针固定，然后穿刺将DNA注入细胞核内



8. 电脉冲介导的基因转移 10^{-4}

利用电脉冲改变生物膜透性，DNA直接进入细胞

9. 重组RNA病毒感染 约10—100%

适用于动植物细胞

10. 重组DNA病毒感染 约100%

适用于各种细胞

11. 直接转化法：完整细胞或原生质体与DNA直接接触，DNA进入细胞内，适用于细菌，酵母菌，真菌和植物细胞。

12. 接合转移法 适用于细菌之间和细菌与植物细胞之间，这种DNA转移是借助于某些质粒上的转移基因产物

13. 超声波法 现已用于植物细胞，可能还可用于其它生物

14. 基因枪法

转移方法的选择

选择方法的依据：

1. 转化频率 取决于以下几个因素：

- 1) 外源DNA能否易于进入宿主细胞；
- 2) 重组DNA分子能否自主复制
- 3) 标记基因表达效率

2. 检测转化体的方法： 是否具有选择压力

3. 生物材料的种类： 细胞大小，有无细胞壁，除去细胞壁后的原生质体能否易于再生

4. 已有实验条件： 仪器，载体种类等

重组体的选择和鉴定

1. 药物抗性检测

如用于细菌, 真菌, 植物和动物细胞的各种抗生素抗性基因: **Amp^r, Kan^r, Hyg^r, G418^r, Tc^r**等

2. 遗传互补检测

如用于酵母菌的各种氨基酸, 核苷酸合成酶基因: **LEU2, TRP1, TRP3, URA3**等

3. 表型选择

如用于细菌, 植物和动物的**LacZ, GUS**等基因; 用于细菌的噬菌斑

4. 分子鉴定:

特异性探针的核酸杂交法、**Southern**、**Western**印迹法、免疫化学法

基因工程的争议

- 政治、经济
- 宗教、文化、伦理
- 生物安全
 - 食品安全
 - 环境安全