DNA重组技术

http://www.shsmu.edu.cn/

重组DNA技术的基本步骤

1. 目的基因的获得和载体的选择

2. 目的基因与载体的连接

3. 重组DNA分子导入受体细胞

4. 筛选出含重组DNA基因分子的受体细胞克隆

5. 克隆基因的表达及表达产物的检测和分离纯化

2009年3月

上海交通大学医学院

❖（一）目的基因的分离

分离目的基因的方法及原理

目的基因分离方法的选择原则

目的基因的序列测定

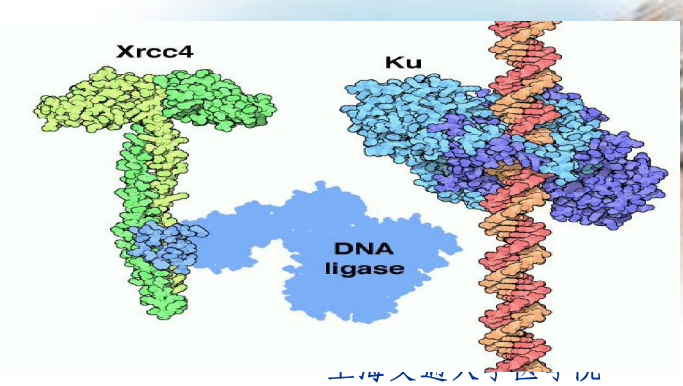
2009年3月

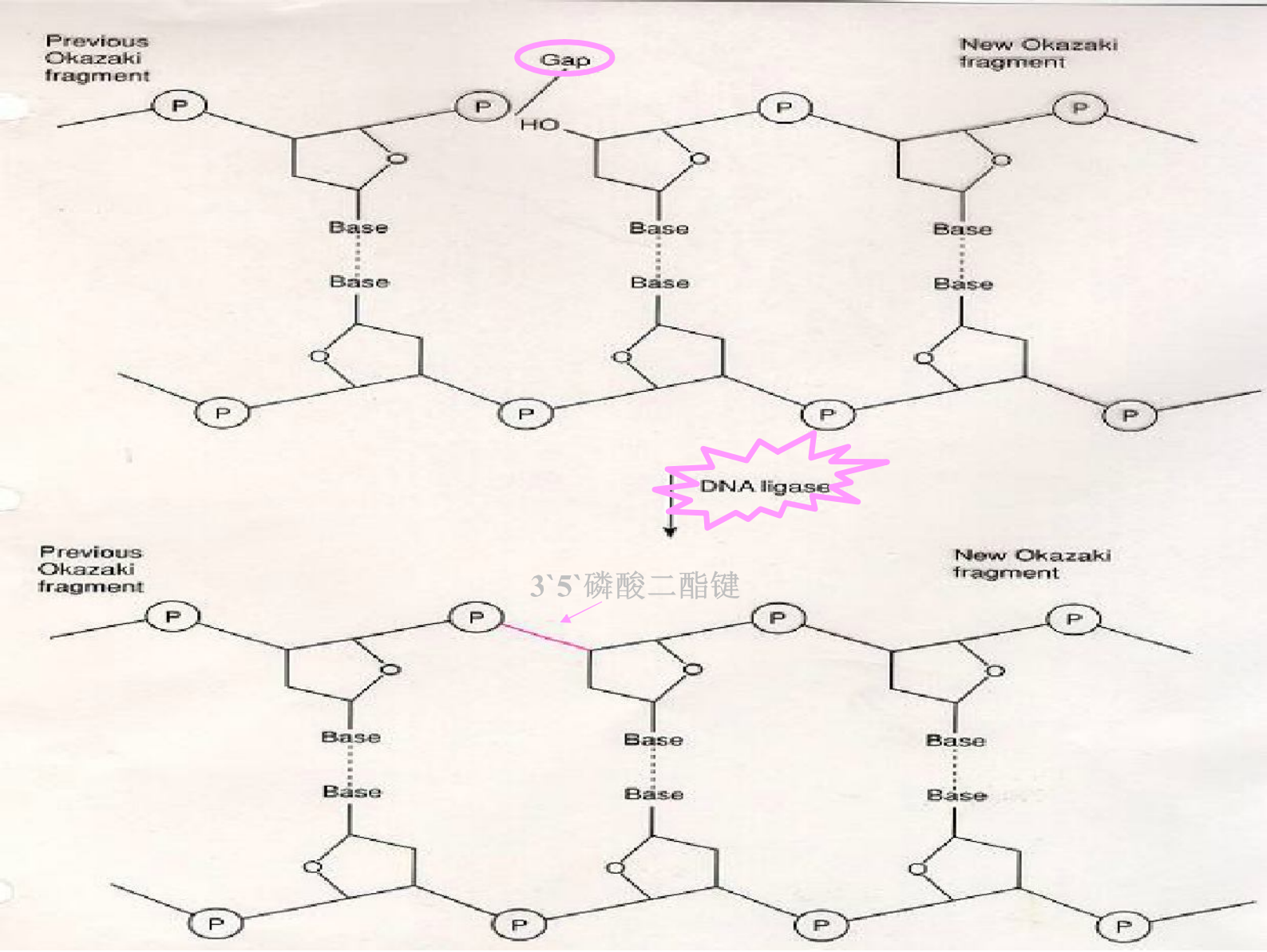
上海交通大学医学院

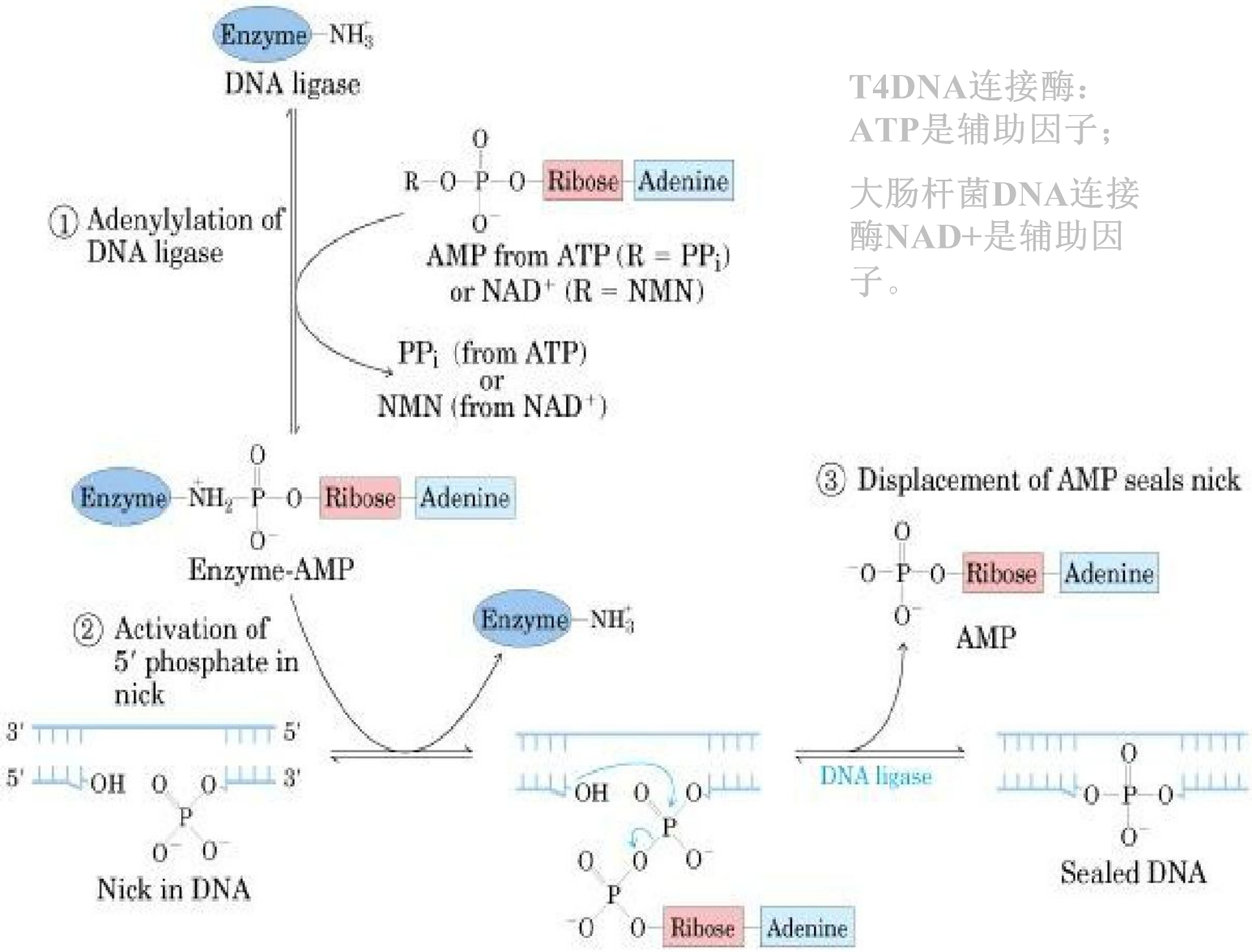
❖（二）目的DNA片段与载体的连接

外源目的基因装入载体的过程，即基因重组

DNA连接酶　　酶促生化反应

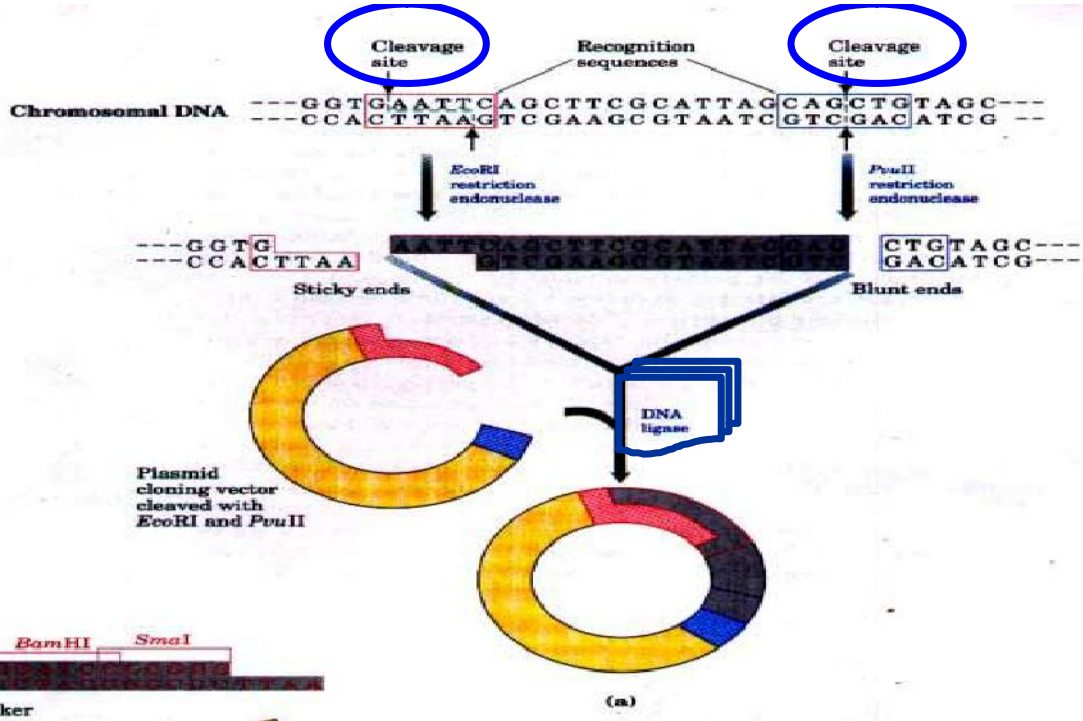



Previous Okazaki fragment
Gap
New Okazaki fragment
HO
P
Base
DNA ligase
3`5`磷酸二酯键

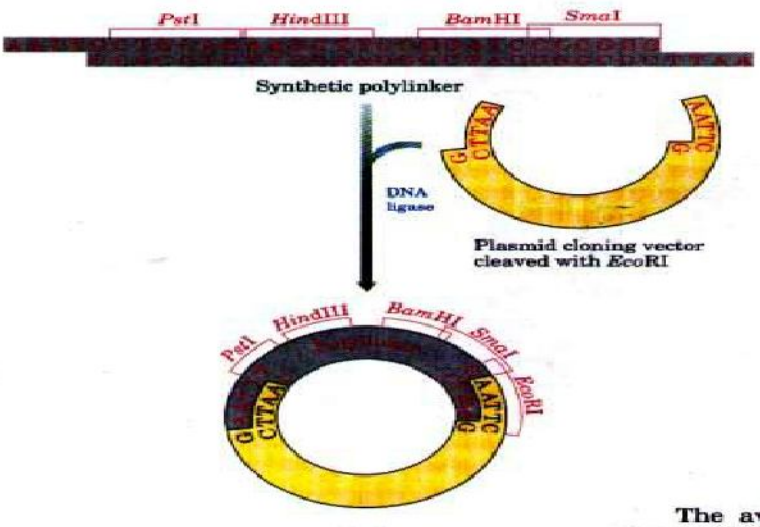


T4DNA连接酶：ATP是辅助因子；

大肠杆菌DNA连接酶NAD+是辅助因子。



(a)

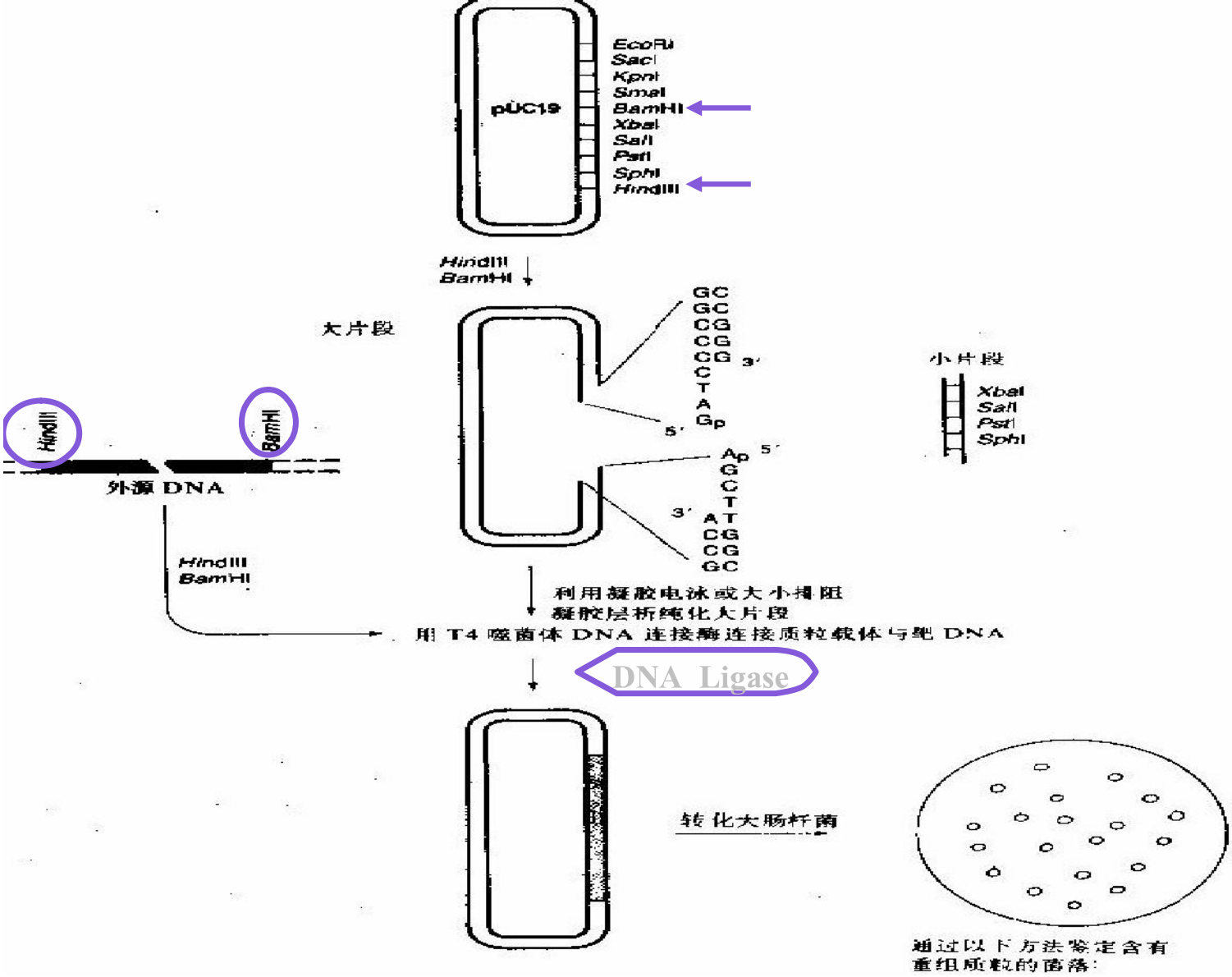


(b)

Figure 28–3 Cleavage of DNA molecules into reproducible fragments by restriction endonucleases. Restriction enzymes recognize and cleave only specific sequences, leaving either sticky ends (with protruding single strands) or blunt ends. (a) Cleavage of a DNA yields a characteristic set of fragments, and these fragments can be ligated to other DNAs such as the cleaved cloning vector (a plasmid) shown here. The ligation reaction is facilitated by the annealing of complementary sticky ends. DNA fragments with blunt ends are ligated at a lower efficiency than those with complementary sticky ends, and DNA fragments with different (noncomplementary) sticky ends generally are not ligated. (b) A synthetic DNA fragment containing the recognition sequences for several restriction endonucleases can be inserted into a plasmid after it has been cleaved by a restriction endonuclease; this creates a polylinker.

The average size of the DNA fragments produced by cleaving genomic DNA with a restriction endonuclease depends upon the frequency with which a particular restriction site occurs in a large DNA

- 粘性末端的DNA分子最容易相互连接，连接效率也是最高的。
- 连接反应的最适合温度是12~16度


pUC19
EcoRI
SacI
KpnI
SmaI
BamHI
XbaI
SalI
PstI
SphI
HindIII
HindIII
BamHI
大片段
小片段
XbaI
SalI
PstI
SphI
HindIII
BamHI
外源 DNA
HindIII
BamHI
利用凝胶电泳或大小排阻
凝胶层析纯化大片段
用 T4 噬菌体 DNA 连接酶连接质粒载体与靶 DNA
DNA Ligase
转化大肠杆菌
通过以下方法鉴定含有
重组质粒的菌落:

克隆载体具备的特征：

1 载体必须具有自我复制和表达的能力

2 载体不能过大

3 载体与宿主细胞容易分离和纯化

4 具有两个以上的遗传选择标记，便于区别阳性和阴性克隆

❖ 特征	功能
在宿主细胞内稳定	允许复制
能控制自身复制	在细胞内复制高拷贝数
大小较小	容易转化，进入宿主细胞
存在限制性内切酶单一酶切位点	允许供体DNA插入和质粒环化
不能通过接合转移	阻止重组DNA进入菌群
易于检测的特性，具有两个以上的检测位点	可以区分转化和未转化细胞
容易从细胞中分离	容易得到高产量重组体

（一）DNA重组的方法

1、分类：

粘端连接法

平端连接法

依据外源DNA片段末端的性质，以及质粒载体与外源DNA上限制酶酶切位点的性质来做选择。

❖1 粘性末端连接法（cohesive end ligation）

最主要的连接方法

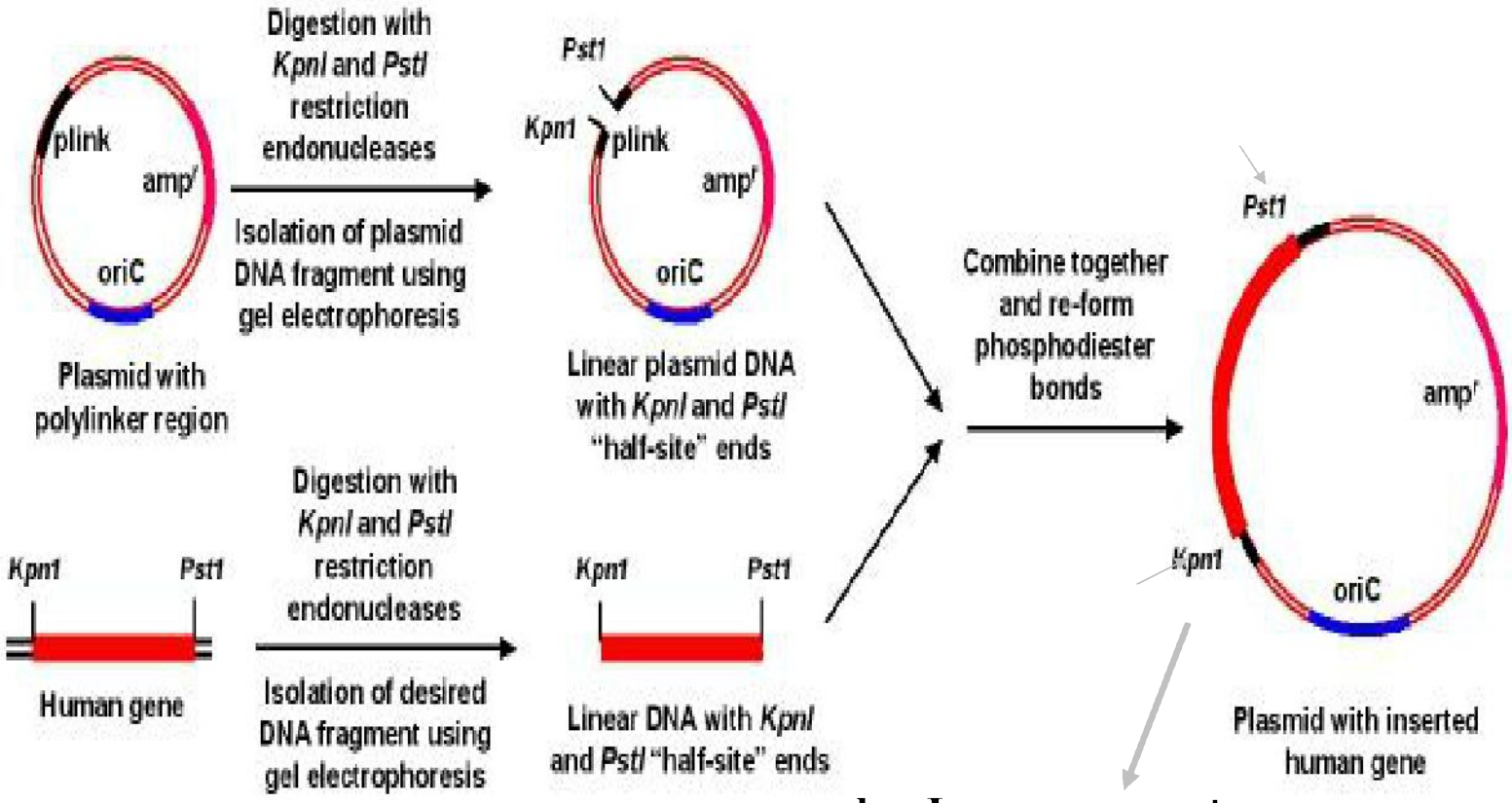
单一限制性内切酶——粘性末端

两个限制性内切酶——互补粘性末端

目的基因或DNA插入片段与适当的载体存在同源粘性末端，通过连接酶将其连接。

◇同源粘性末端：
相同一种内切酶产生的粘性末端或不同的内切酶产生的互补粘性末端。

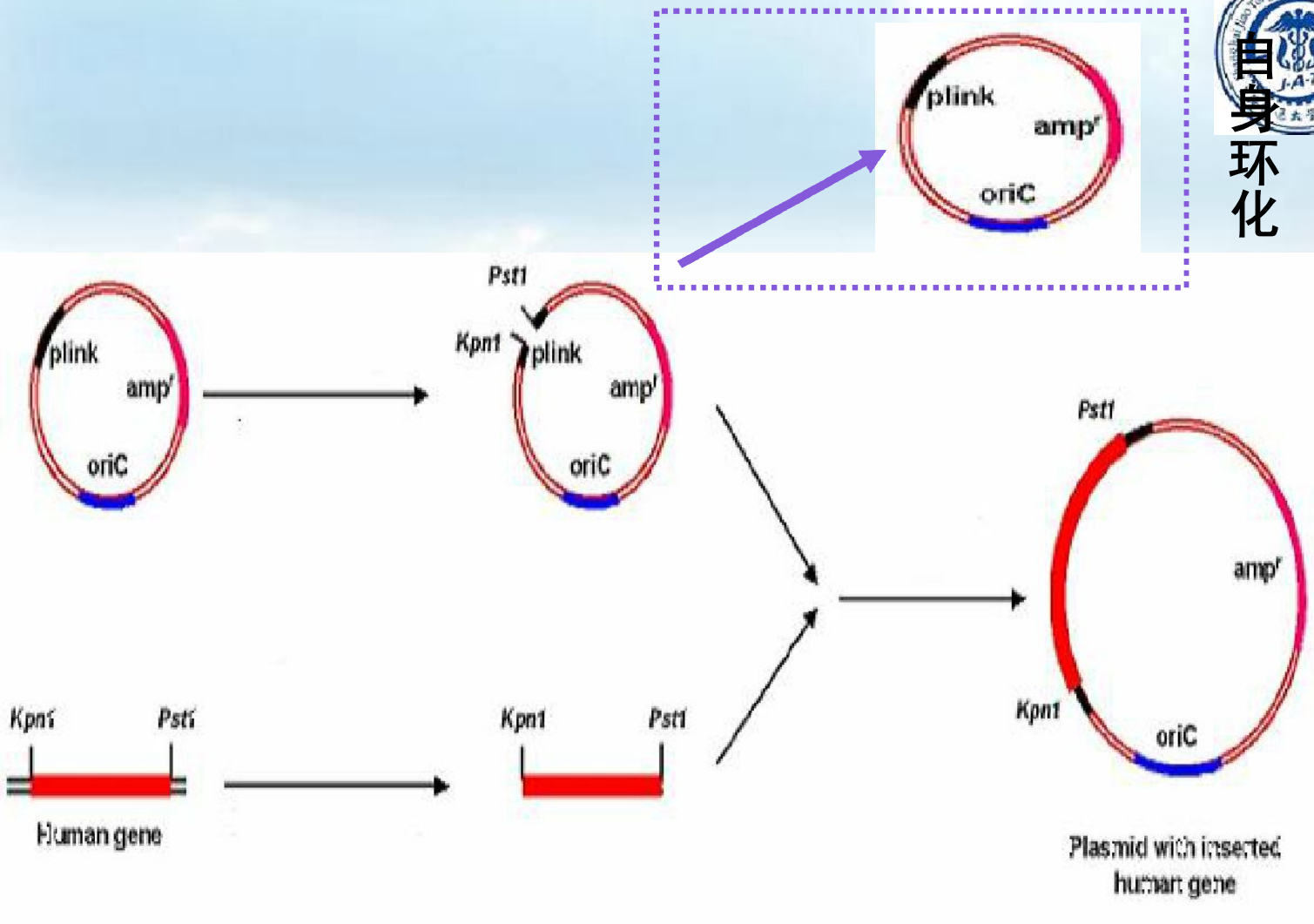
◇特点：
得到的重组质粒能够保留结合处的限制酶切位点，原切割内切酶，重新将插入片段从重组体上完整地切割下来。


Digestion with
KpnI and PstI
restriction
endonucleases
Isolation of plasmid
DNA fragment using
gel electrophoresis
plink
amp'
oriC
Plasmid with
polylinker region
Pst1
Kpn1
plink
amp'
oriC
Linear plasmid DNA
with KpnI and PstI
"half-site" ends
Digestion with
KpnI and PstI
restriction
endonucleases
Isolation of desired
DNA fragment using
gel electrophoresis
Kpn1
Pst1
Human gene
Kpn1
Pst1
Linear DNA with KpnI
and PstI "half-site" ends
Combine together
and re-form
phosphodiester
bonds
Pst1
amp'
Kpn1
oriC
Plasmid with inserted
human gene

kpnI
pstI

❖除了重组体以外，还有质粒分子的自身环化，重新形成完整质粒，这是基因重组中产生了假阳性。

自身环化


plink
amp'
oriC
Pst1
Kpn1
plink
amp'
oriC
Kpn1
Pst1
Human gene
Kpn1
Pst1
Pst1
amp'
Kpn1
oriC
Plasmid with inserted human gene

如何提高连接的效率，防止假阳性的产生？

- 1 连接前使用碱性磷酸酶，去除载体5`端的磷酸抑制质粒的重新环化。
- 2 调节外源DNA 和克隆载体的比例
- 3 定向克隆，使用两个限制性内切酶

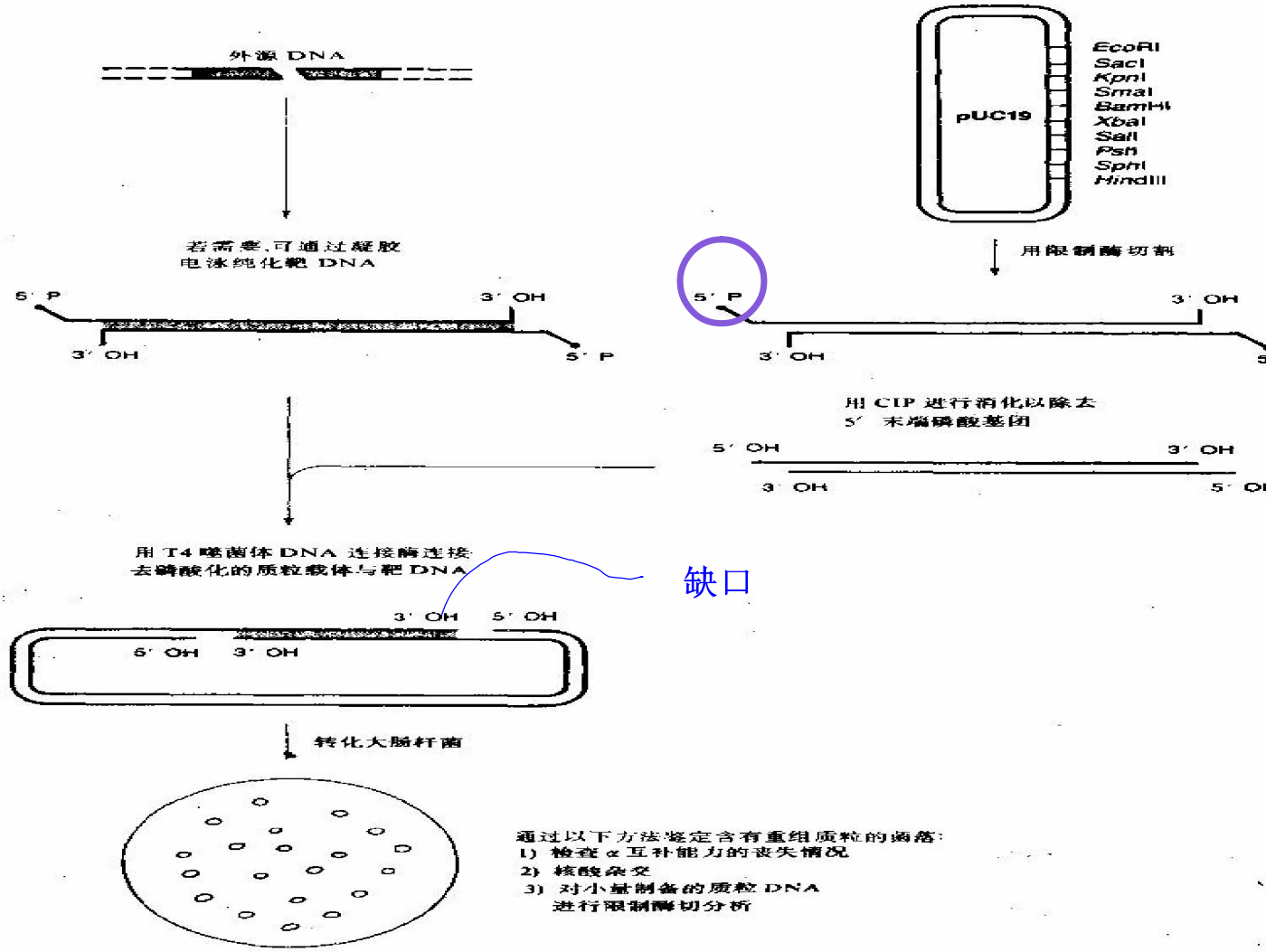


图 1.8　利用磷酸酶防止载体 DNA 的重新环化。

1）一定数量的载体自身环化分子，产生较高的假阳性
在连接前，用牛小肠碱性磷酸酶去除载体的5'磷酸以抑制质粒DNA的自身环化。

2）用一种限制性内切酶切割载体和外源DNA，连接时插入片段可以两个方向插入载体中。

3）片段的多拷贝插入
适当的插入片段与载体分子比率能减少多拷贝插入片段的形成，一般采用插入片段摩尔数：载体摩尔数为3：1

❖2 同聚体加尾部连接法：

（homopolymeric tails ligation）

针对平性末端或者不匹配的末端

利用末端核酸转移酶在一个分子的末端加上poly(A);另一个分子3`末端加上poly(T),在通过DNA连接酶形成重组DNA分子。

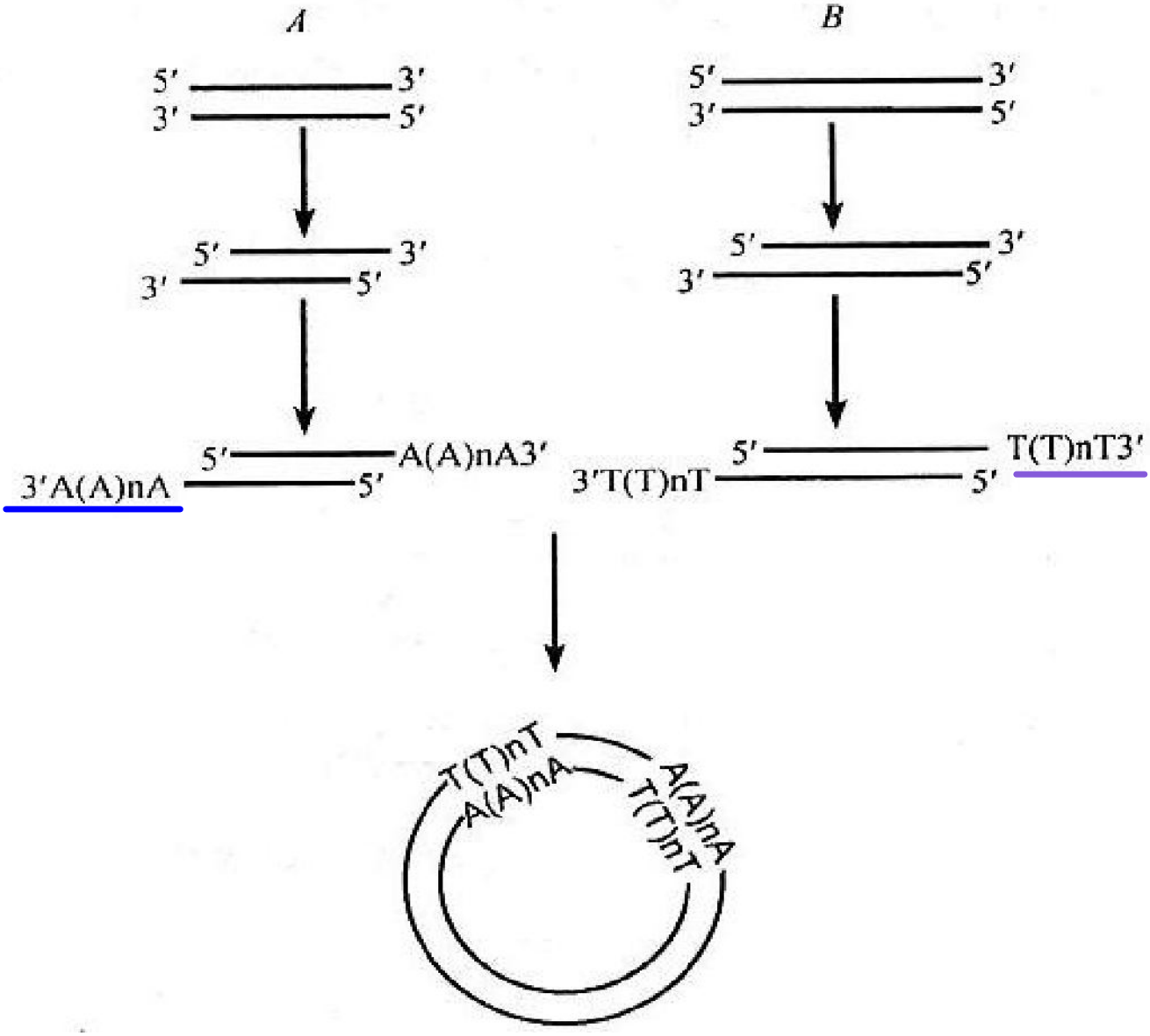
（1）限制性内切酶酶切获得的是平齐末端；或者外源DNA片段和载体是两个不相配的DNA片段；

（2）用末端转移酶使其中的一个DNA分子3’端上接上多聚A，另一个DNA片段3’端上接上多聚T。

（3）使两个DNA分子的尾部可按A-T配对原则相联

（4）DNA聚合酶填补空隙

（5）DNA连接酶封口成重组DNA分子


A
B
5′
3′
3′
5′
5′
3′
3′
5′
5′
A(A)nA3′
3′A(A)nA
5′
3′
3′
5′
5′
3′
3′
5′
5′
T(T)nT3′
3′T(T)nT
5′
T(T)nT
A(A)nA
A(A)nA
T(T)nT

- 3 人工合成接头连接法
- 人为的在目的基因的两端加上酶切位点，使得限制性内切酶酶切后与载体形成相同的粘性末端

（1）目的基因或DNA片段的两端接上能够被某一限制性内切酶识别的DNA序列（接头）

（2）在该内切酶的酶解作用下，与载体获得相同的粘性末端

（3）连接

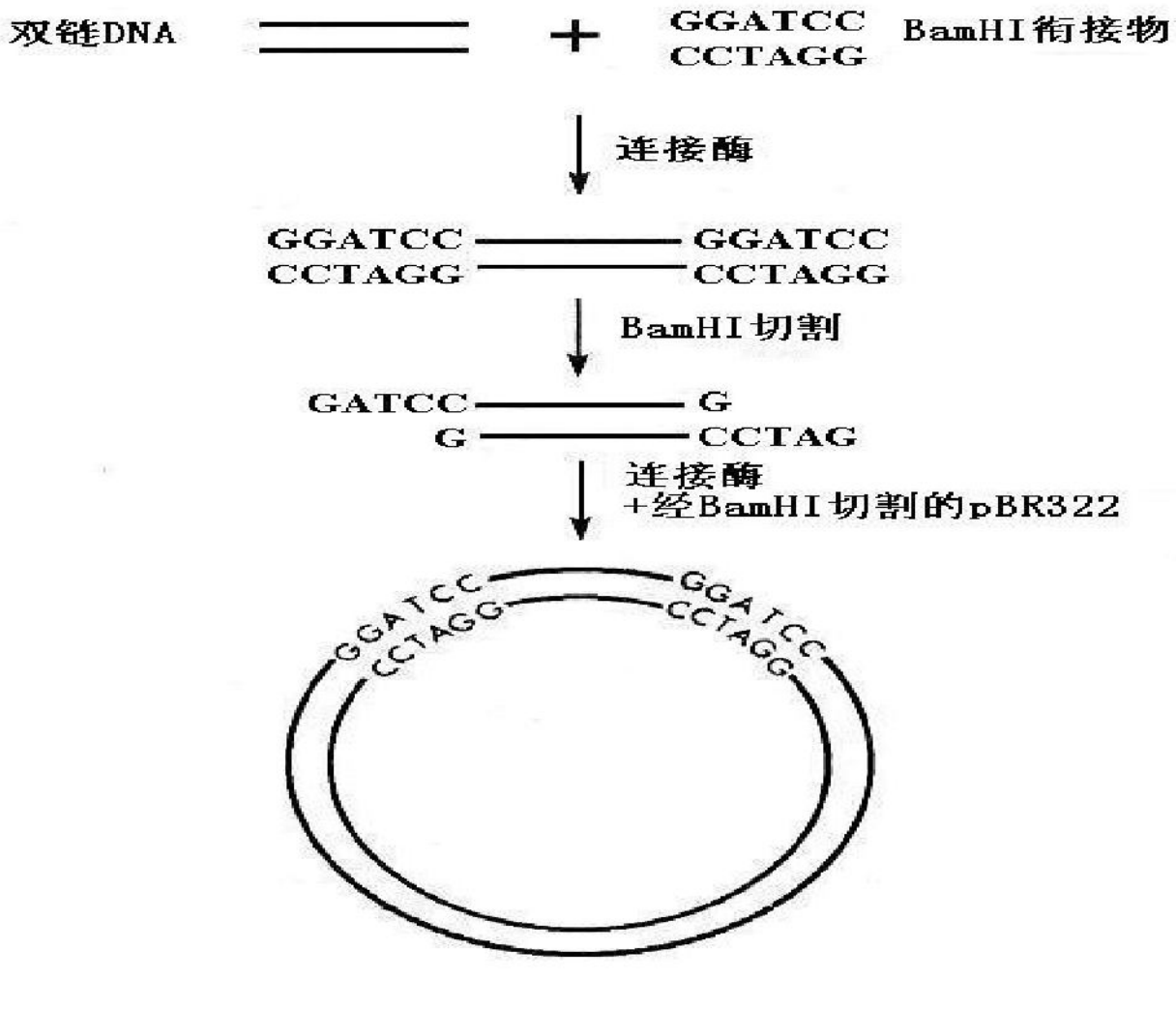
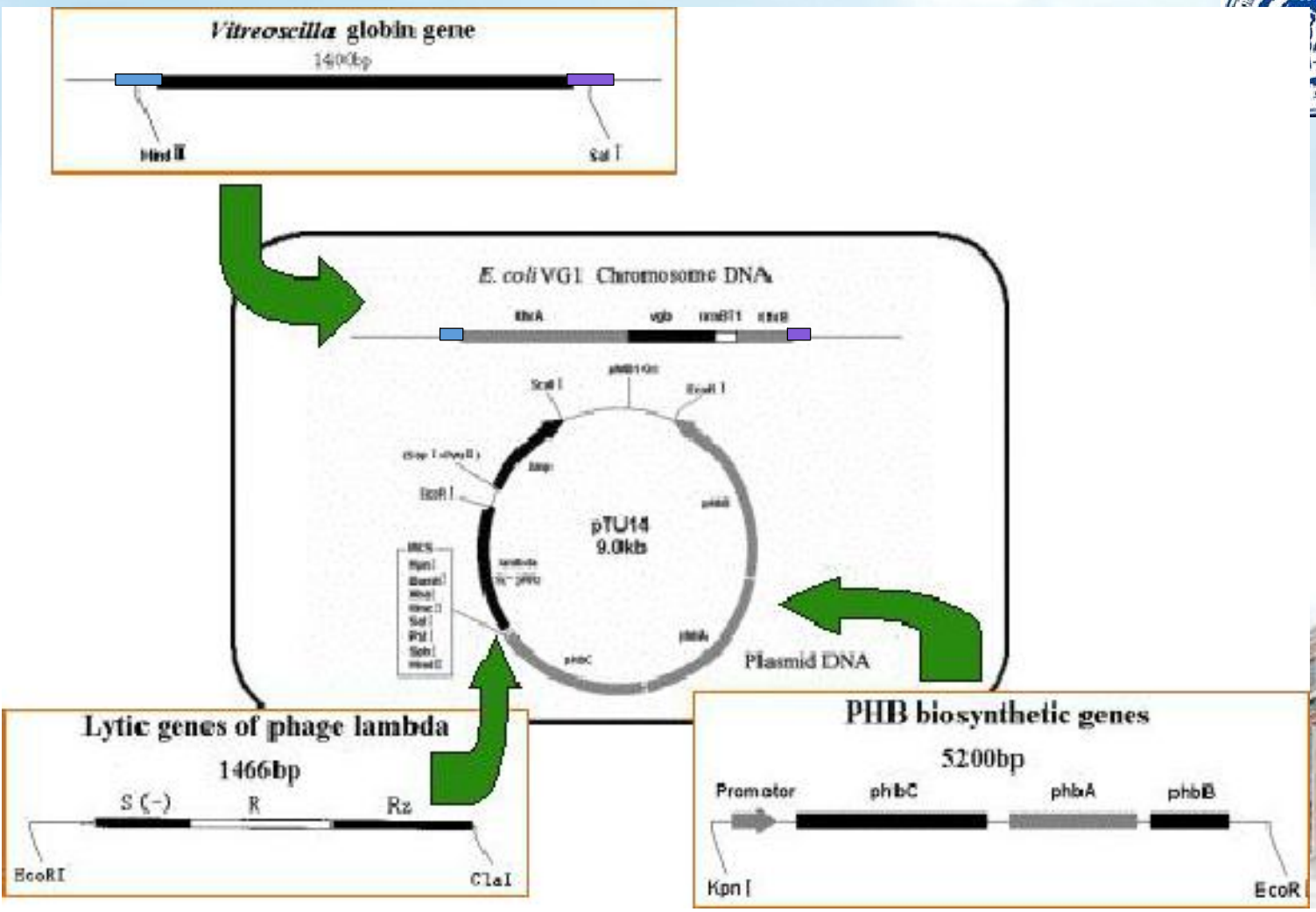


图7－9　人工接头连接法

大学医学院


Vitreoscilla globin gene
1400bp
Hind III
Sal I
E. coli VG1 Chromosome DNA
vgb
pTU14
9.0kb
Plasmid DNA
Lytic genes of phage lambda
1466bp
S (-)
R
Rz
EcoRI
ClaI
PHB biosynthetic genes
5200bp
Promotor
phbC
phbA
phbB
Kpn I
EcoR

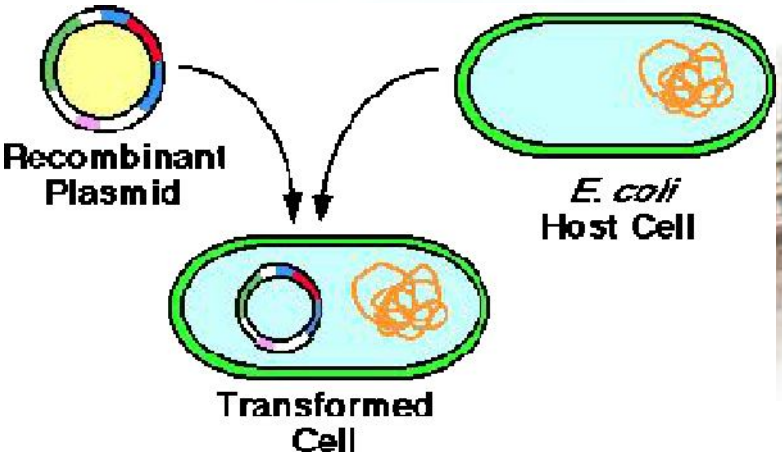
（二）重组DNA分子转入宿主细胞

- ❖什么是转化（transformation）？
- ❖将重组DNA分子引入细菌（原核细胞），使其在细菌体内扩增及表达的过程。
- ❖什么是转染（transfection）？
- ❖将噬菌体、病毒或以它们为载体构建的DNA重组体导入真核细胞的过程。

宿主细胞

原核细胞：大肠杆菌

真核细胞：哺乳类动物细胞、酵母和昆虫细胞



2009年3月

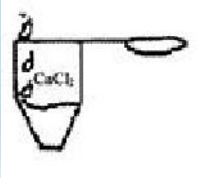
- 1 重组体分子导入原核细胞
- 感受态细菌：细菌表面正电荷增加，细胞壁和膜的通透性增加，利于DNA分子的吸附和吸收

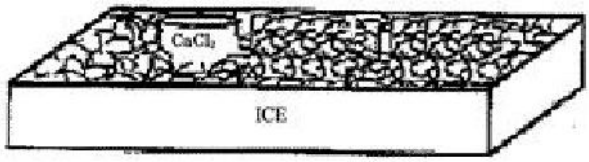
❖ （1）$CaCl_2$转化：

❖ [原理]：

当细菌处于0℃、二价阳离子（如Ca^{2+}、Mg^{2+}等）低渗溶液中时，细菌细胞膨胀成球形，处于感受态；此时转化混合物中的DNA形成抗DNA酶的羟基-钙磷酸复合物粘附于细胞表面，重组DNA在42℃短时间热冲击后吸附在细胞表面，在丰富培养基中生长数小时后，球状细胞恢复原状并繁殖。

- 细菌处于0度，二价阳离子存在的低渗溶液中，细菌膨胀成球形，处于感受态。
- 此时加热在42度的热冲击下进入细胞，在培养基上生长数小时后球形细胞恢复原状并繁殖。
- 转化效率为10^5~10^6/ug



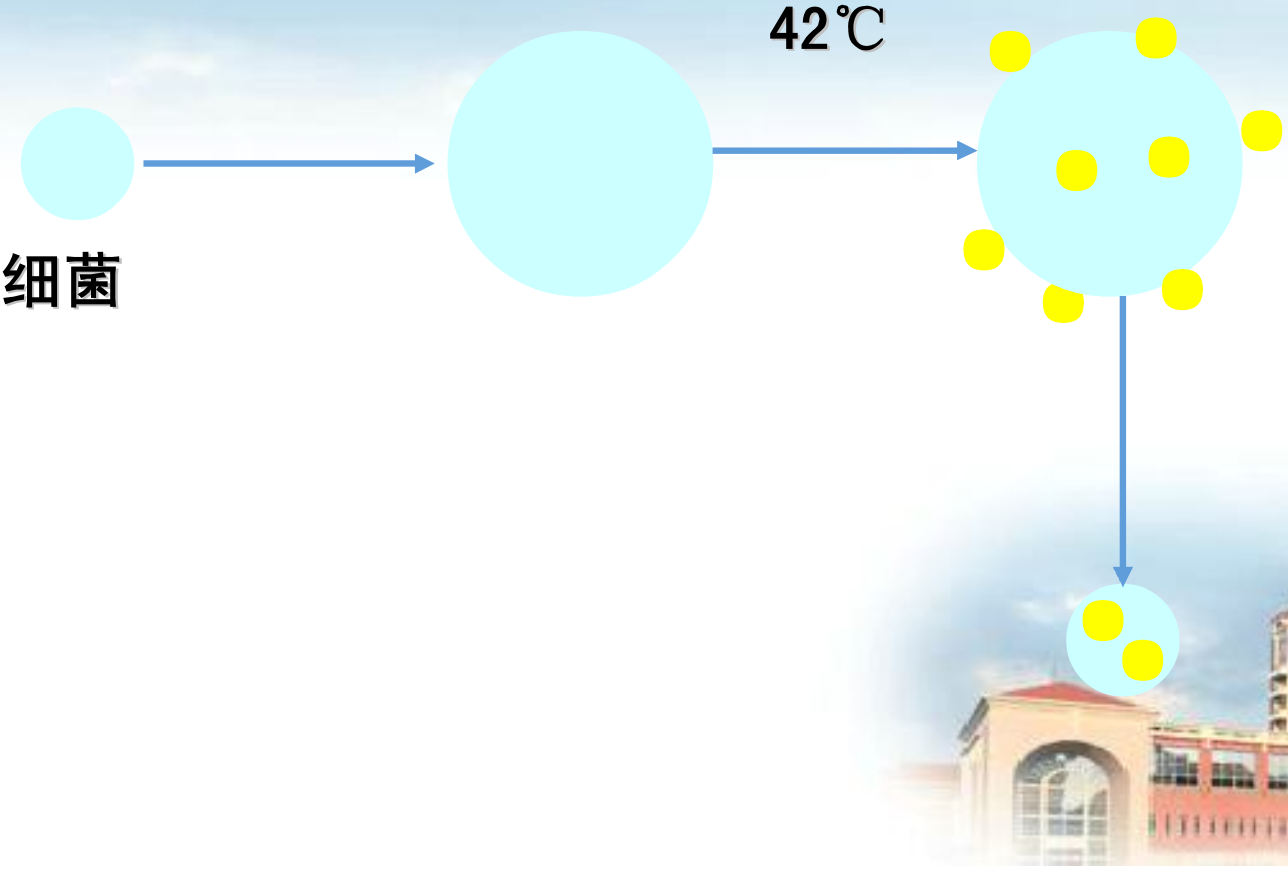


2009年3月

上海交通大学医学院

0℃
二价阳离子Ca^{2+}、Mg^{2+}

42℃



2009年3月

上海交通大学医学院

[关键点]：

细菌必须处于生长对数期

实验操作必须在低温下

设立已知质粒载体的阳性对照

不加任何质粒的空白感受态细菌阴性对照

2009年3月

上海交通大学医学院

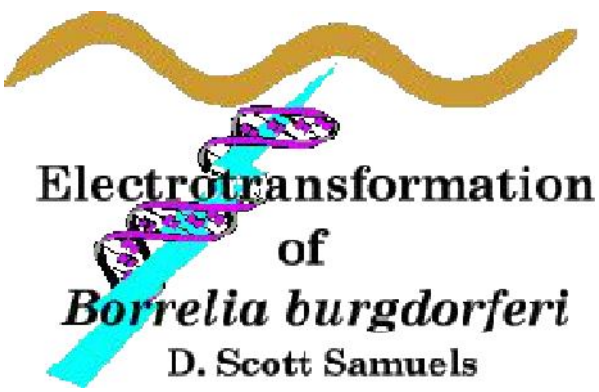
2 电击法（electroporation）：

在高压脉冲下，细菌细胞表面形成暂时性微孔，重组DNA进入微孔后，脉冲结束，细胞恢复。

实验简单，不需要制备感受态菌，转化效率高 10^9~10^{10}/ug

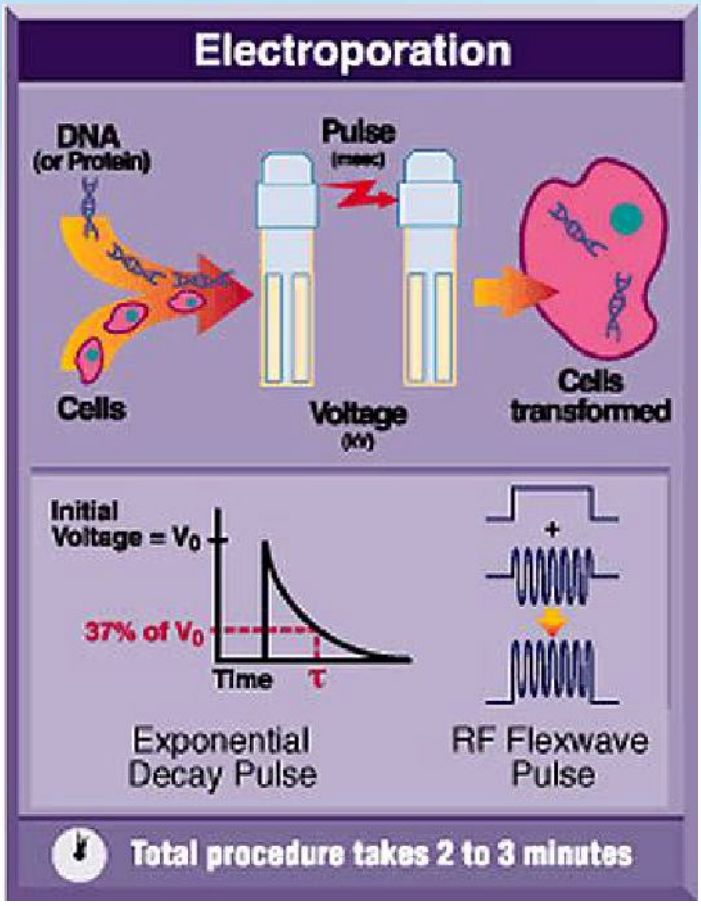
[原理]

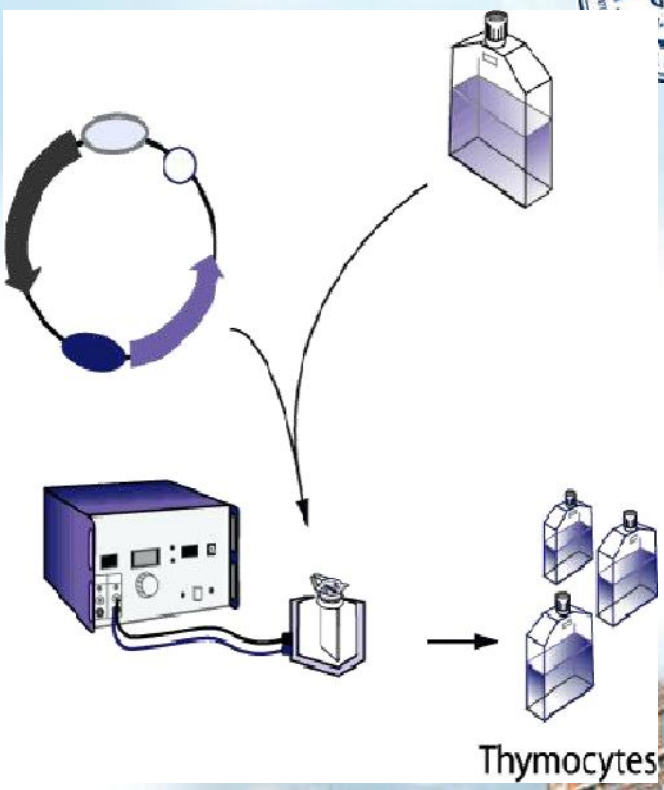
利用高压脉冲，在细菌细胞表面形成暂时性的微孔，重组DNA从微孔中进入，脉冲过后，微孔复原，在丰富培养基中生长数小时后，细胞增殖，重组DNA得到大量复制。

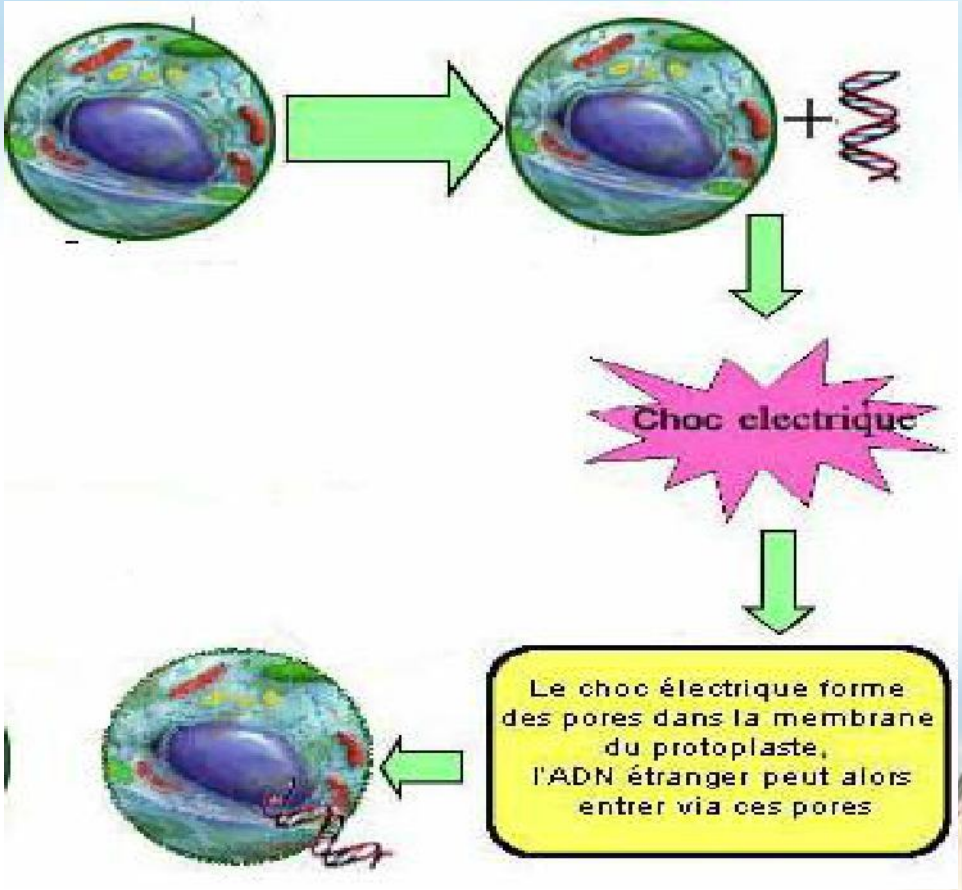


2009年3月

上海交通大学医学院


Electroporation
DNA
(or Protein)
Pulse
(msec)
Cells
Voltage
(kV)
Cells
transformed
Initial
Voltage = V_0
37% of V_0
Time
τ
Exponential
Decay Pulse
RF Flexwave
Pulse
Total procedure takes 2 to 3 minutes


Thymocytes



2009年3月

上海交通大学医学院

❖ 2 重组体导入真核细胞

（1）$CaCl_2$转化

（2）电击法

（3）磷酸钙-DNA共沉淀法

（4）DEAE-葡聚糖介导转染

（5）脂质体法

（6）显微注射法

（1）$CaCl_2$处理以后的转染：

真核细胞一定要经一定浓度的冰冷的$CaCl_2$（50～100mmol/L）溶液处理以后成为感受态细胞，感受态细胞有摄取各种外源DNA的能力。

（2）电击法：

利用脉冲电场将DNA导入受体细胞。

（3）聚乙二醇介导的转染法：

用于转染酵母细胞以及其他真菌细胞。细胞用消化细胞壁的酶处理以后变成球形体，在适当浓度的PEG 6000的介导下，将外源DNA导入受体细胞。

（4）磷酸钙-DNA共沉淀法：

将被转染的DNA和正在溶液中形成的磷酸钙微粒共沉淀后，磷酸钙和外源性DNA形成沉淀颗粒附着在细胞表面，通过细胞脂相收缩时裂开的空隙进入或在钙、磷的诱导下被细胞摄取，通过内吞作用进入受体细胞。

（5）二乙胺乙基（diethyl-aminoethyl, DEAE） -葡聚糖介导的转染：

可能是DEAE-葡聚糖与DNA结合后抑制核酸酶的作用或与细胞结合后促进细胞对DNA的内吞作用。

（6）原生质体融合：

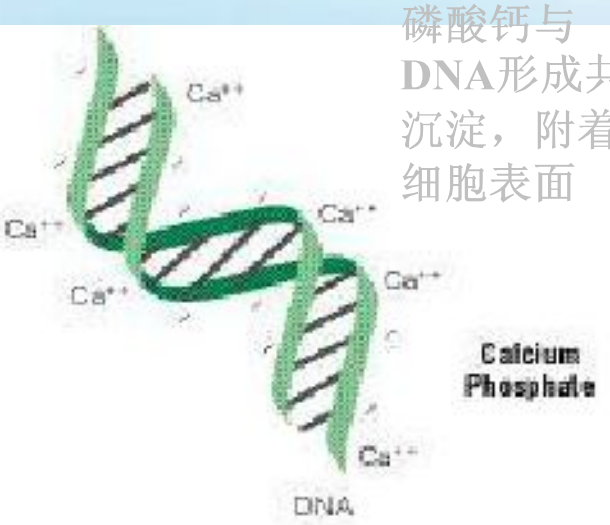
外源性DNA片段与噬菌体DNA载体连接后成为重组噬菌体DNA，经噬菌体外壳蛋白包装完毕以后，成为有感染能力的噬菌体颗粒。

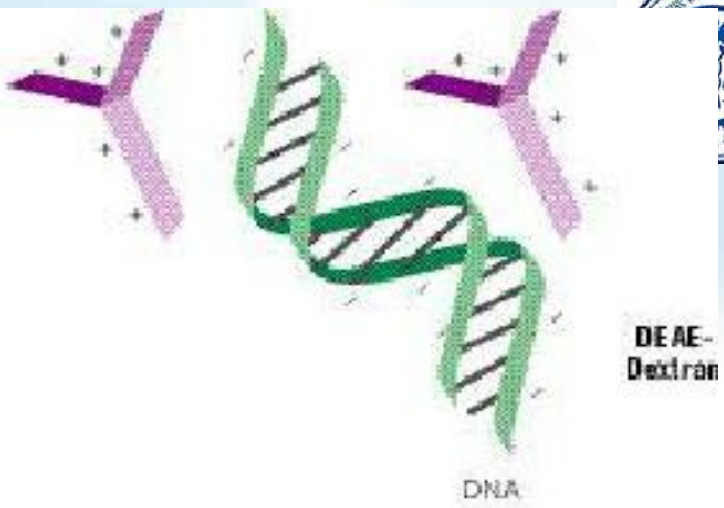
（7）脂质体法（liposomes）：

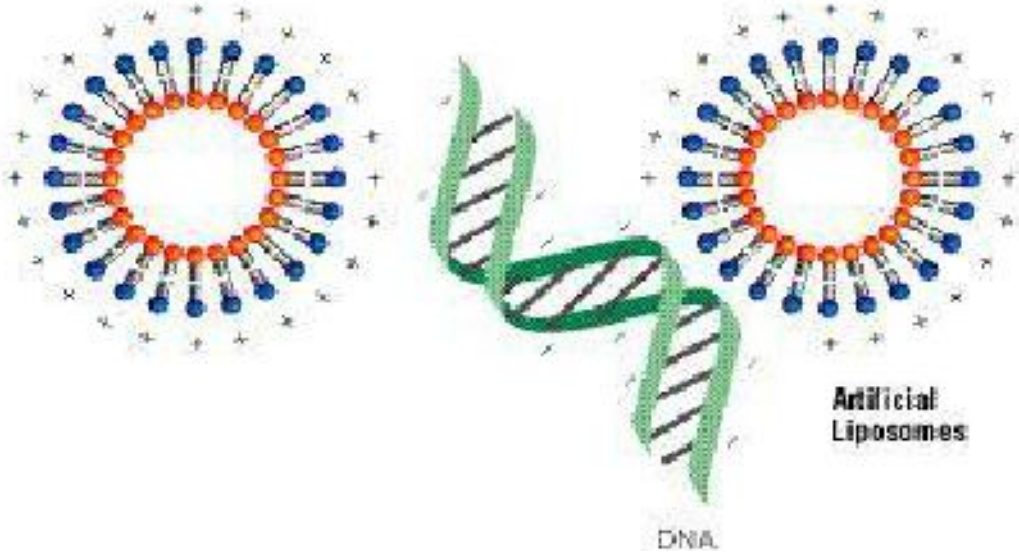
带正电荷的N-[1-（2，3-二油酰氧）丙基]-N，N，N-三甲铵硫酸二甲酯和二油酰磷脂酰乙胺，与DNA或RNA上带负电的磷酸基团结合，形成由阳离子脂质包裹DNA的颗粒，随后脂质体上剩余的正电荷与细胞膜上的唾液酸残基的负电荷结合，通过二者的融合将外源基因导入细胞。

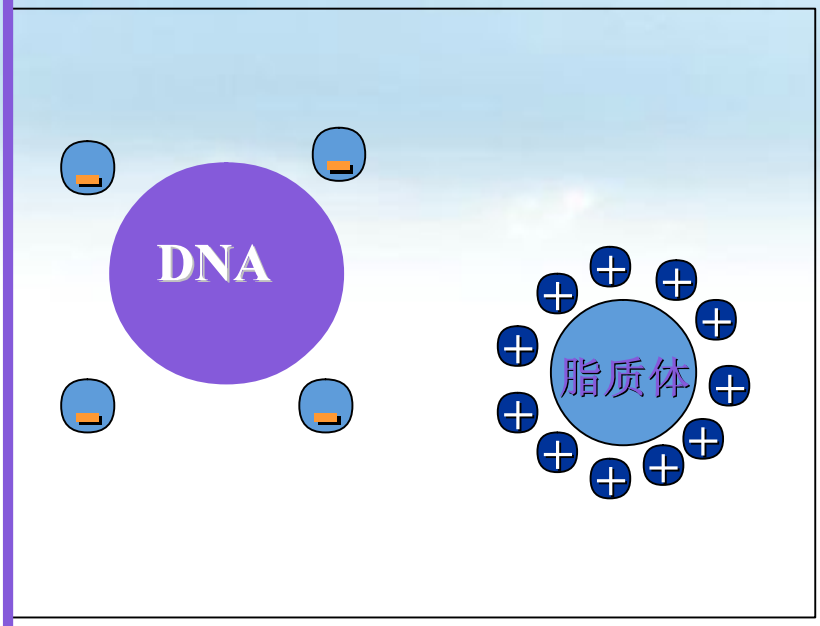
（8）细胞核的显微注射法：

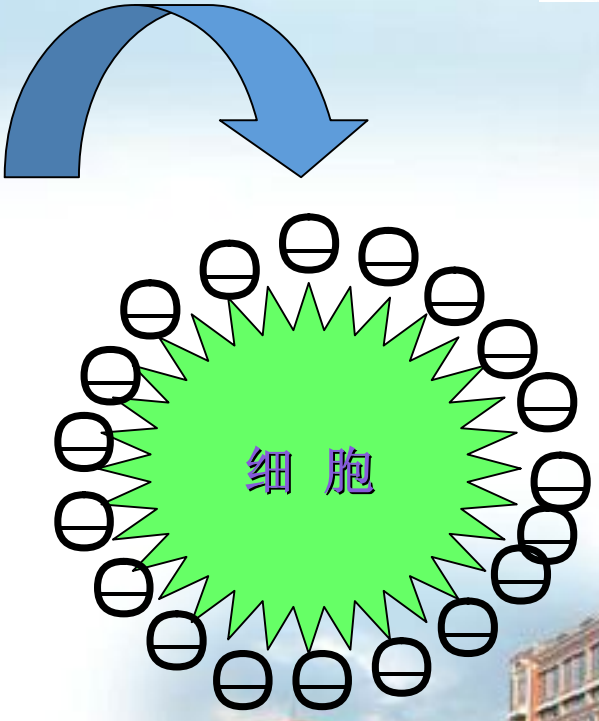
磷酸钙与DNA形成共沉淀，附着细胞表面

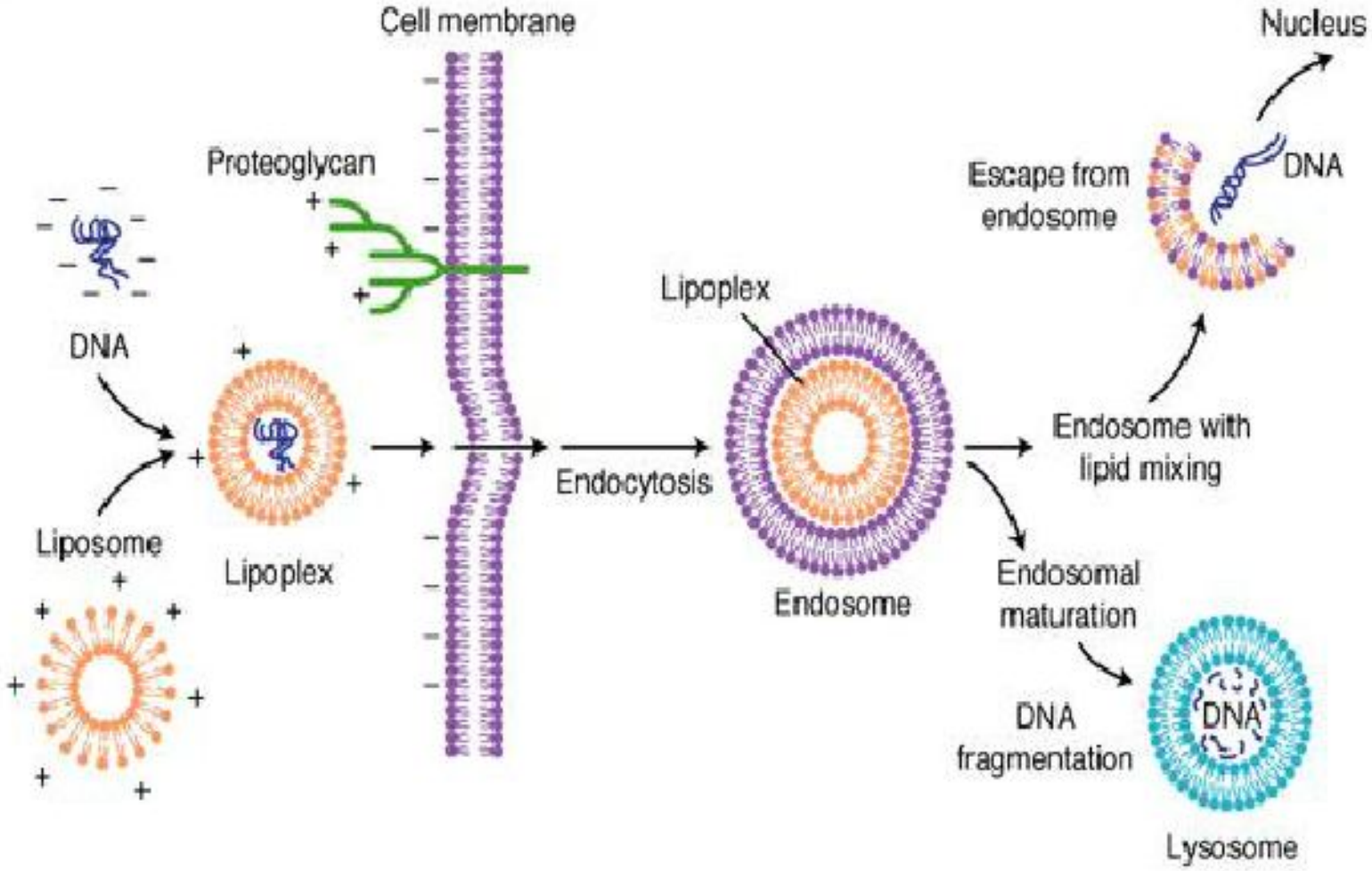






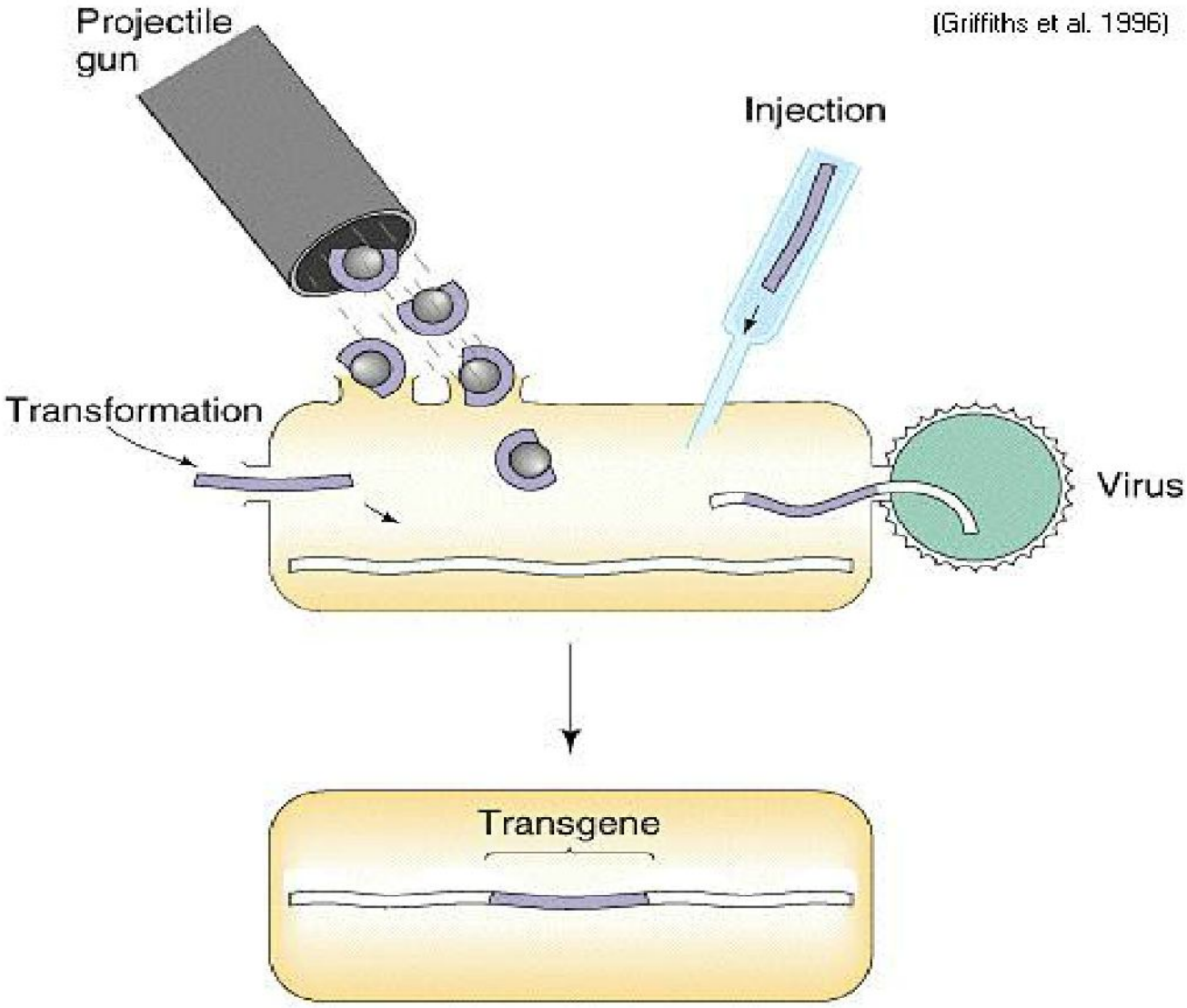

DNA
脂质体


细 胞



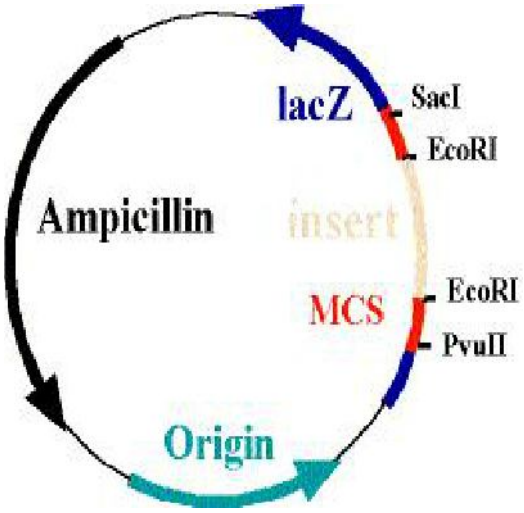
Lipoplex-mediated transfection and endocytosis

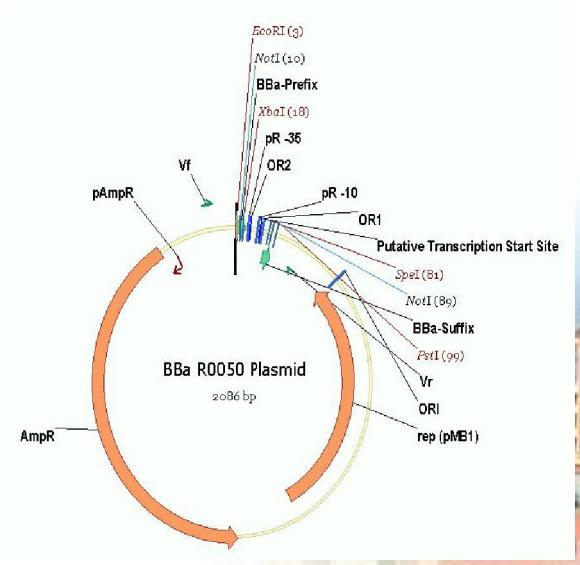
Expert Reviews in Molecular Medicine © 2003 Cambridge University Press


Projectile gun
(Griffiths et al. 1996)
Injection
Transformation
Virus
Transgene

（一）根据载体的性状变化进行筛选

❖ 1 根据载体的抗药性标记进行筛选





❖ 载体上的抗药基因：

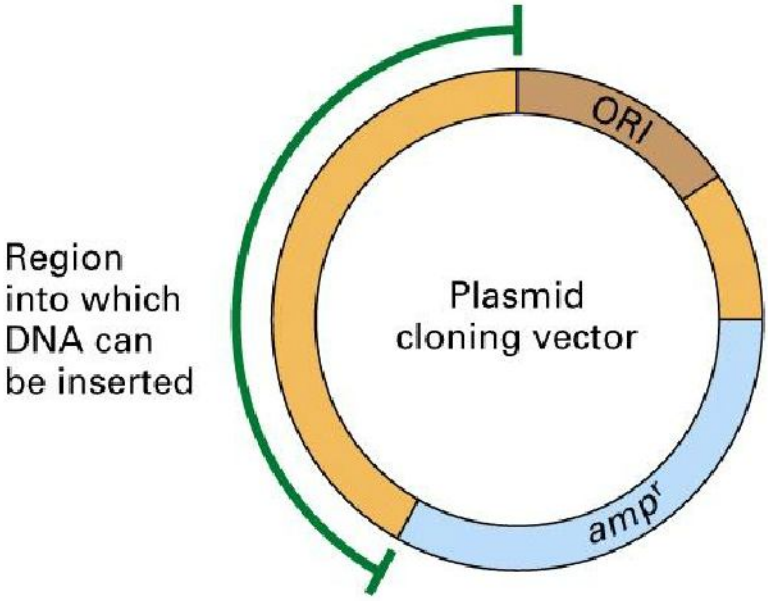
抗氨苄青霉素基因

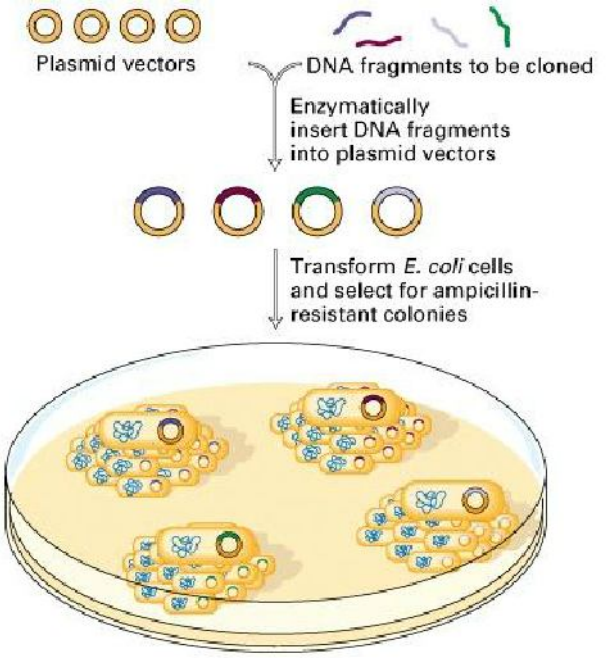
抗四环素基因

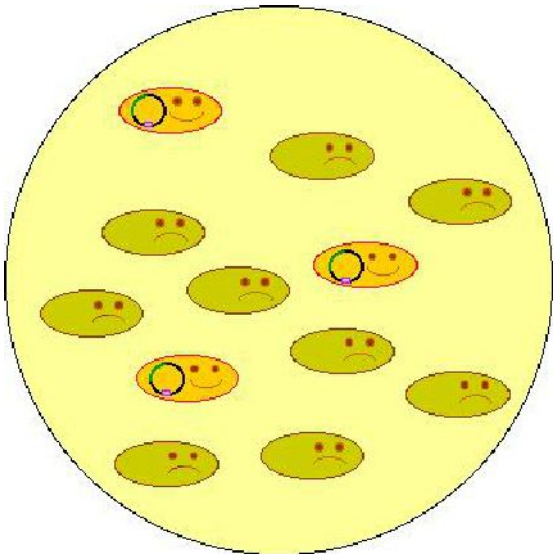
抗卡那霉素基因等

凡是转入了载体的细胞都获得了这种抗药性，可以在平板上生长菌落。

当带有完整抗药性基因的载体转化无抗药性细胞后，凡转入载体的细胞都获得了抗药性，能在含有相应药物的琼脂平板上生长成菌落，而未被转化的宿主细胞不能生长。只带有一种抗药基因的载体组成的重组DNA，在琼脂平板上生长成菌落是不能被区分是否是真正含有重组DNA的抑或是空载体，需要进一步的鉴定。

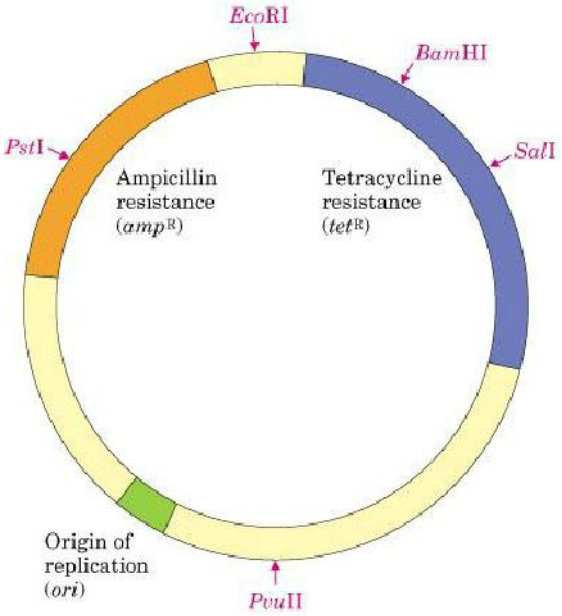

Region
into which
DNA can
be inserted
ORI
Plasmid
cloning vector
ampr


Plasmid vectors
DNA fragments to be cloned
Enzymatically
insert DNA fragments
into plasmid vectors
Transform E. coli cells
and select for ampicillin-
resistant colonies



上海交通大学医学院

❖ 2 根据载体抗药性插入失活选择



根据载体抗药性标志插入失活选择

含有两个以上的抗药基因的载体，外源DNA片段插入其中一个基因，并导致这个基因的失活，就可用两个含不同药物的平板，互相对照，筛选含重组DNA的菌落，这就是插入失活效应。

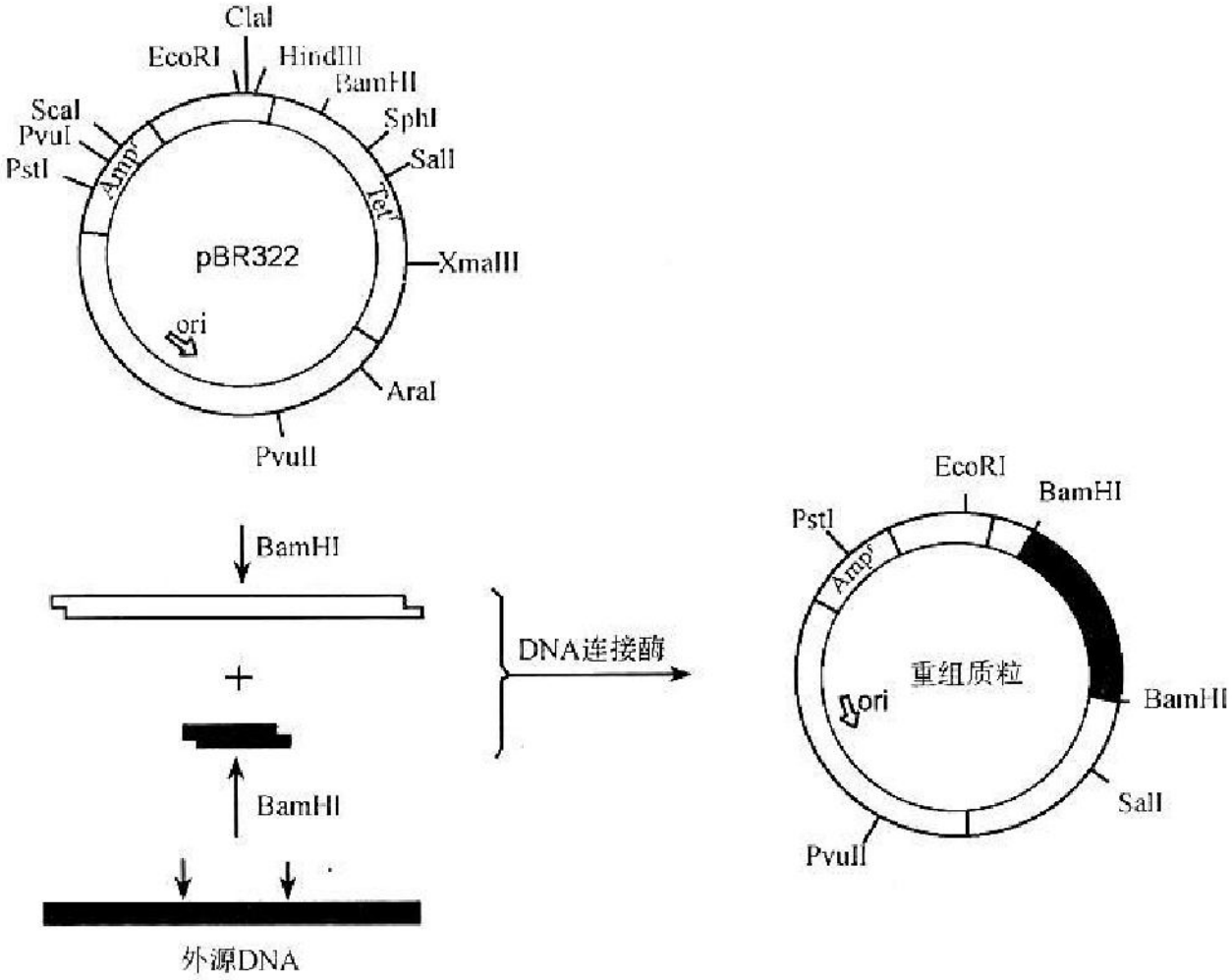
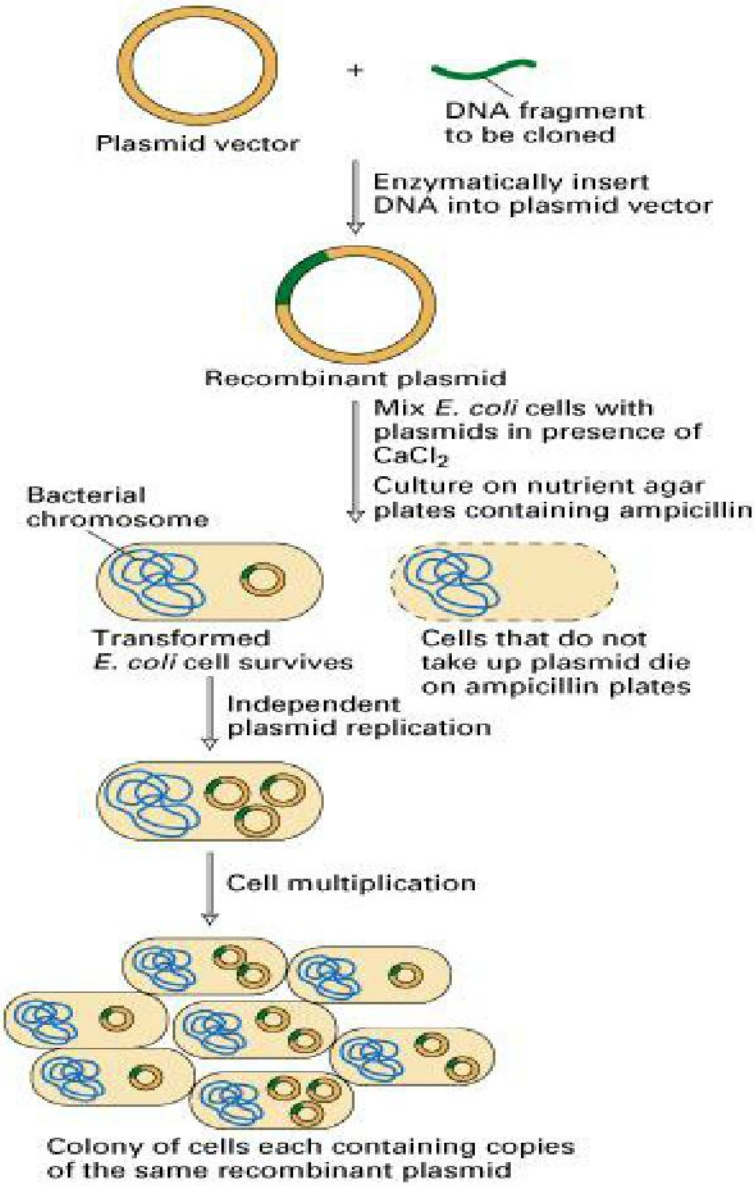


图 4-24　pBR322 质粒载体 tet^r 基因的插入失活效应



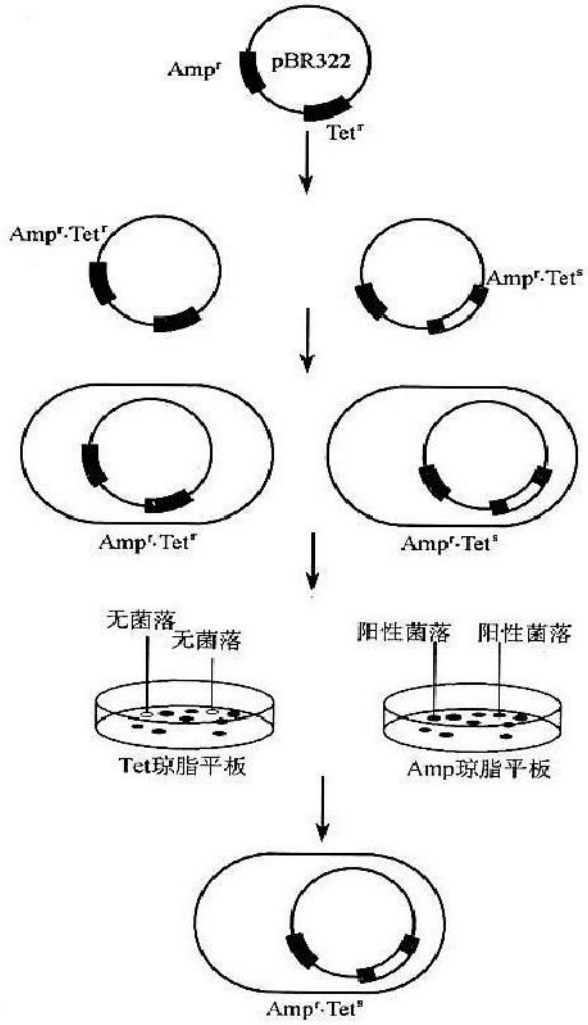
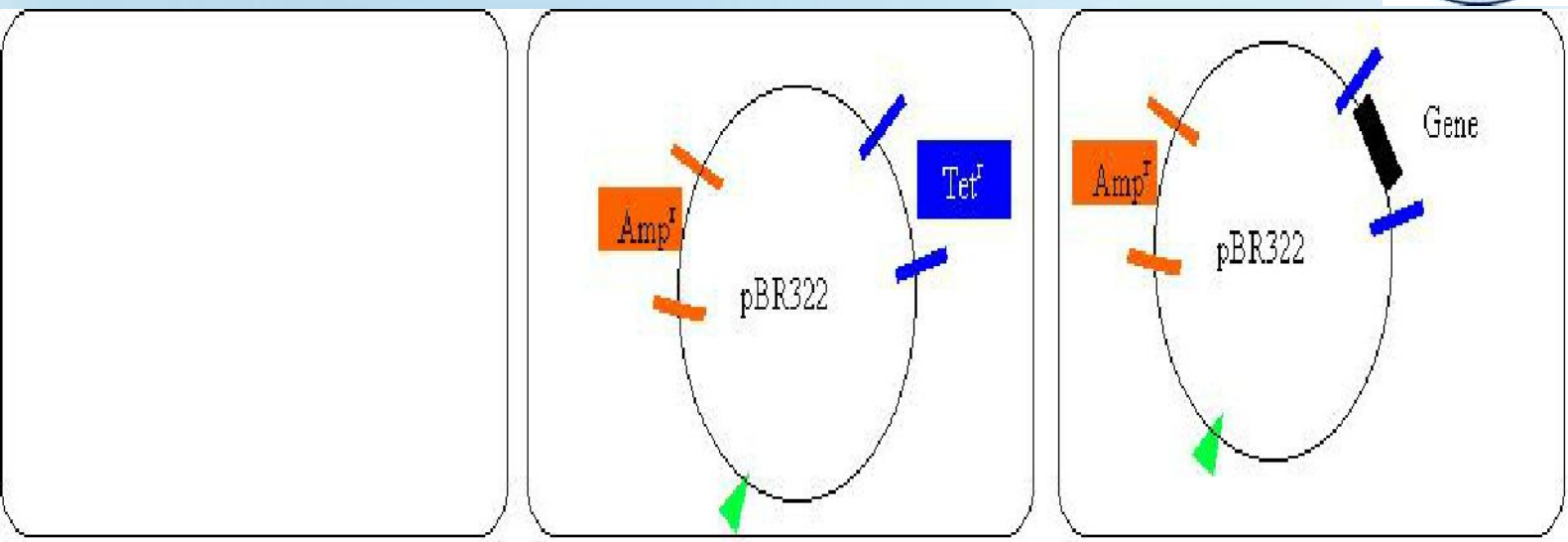


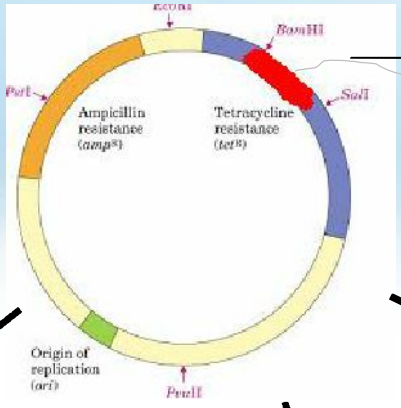
图 6-33　应用插入失活分离带有外源 DNA 片段的重组体质粒



No Plasmid
Cell sensitive to AMP & TET

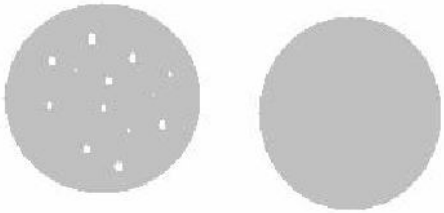
Plasmid only
Cell resistant to AMP & TET

Recombinant Plasmid
Cell resistant to AMP, sensitive to TET



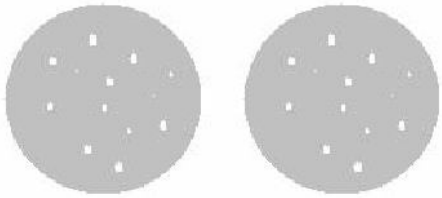
外源基因

抗Amp　抗Tet



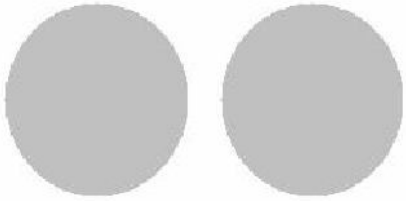
重组DNA

抗Amp　抗Tet



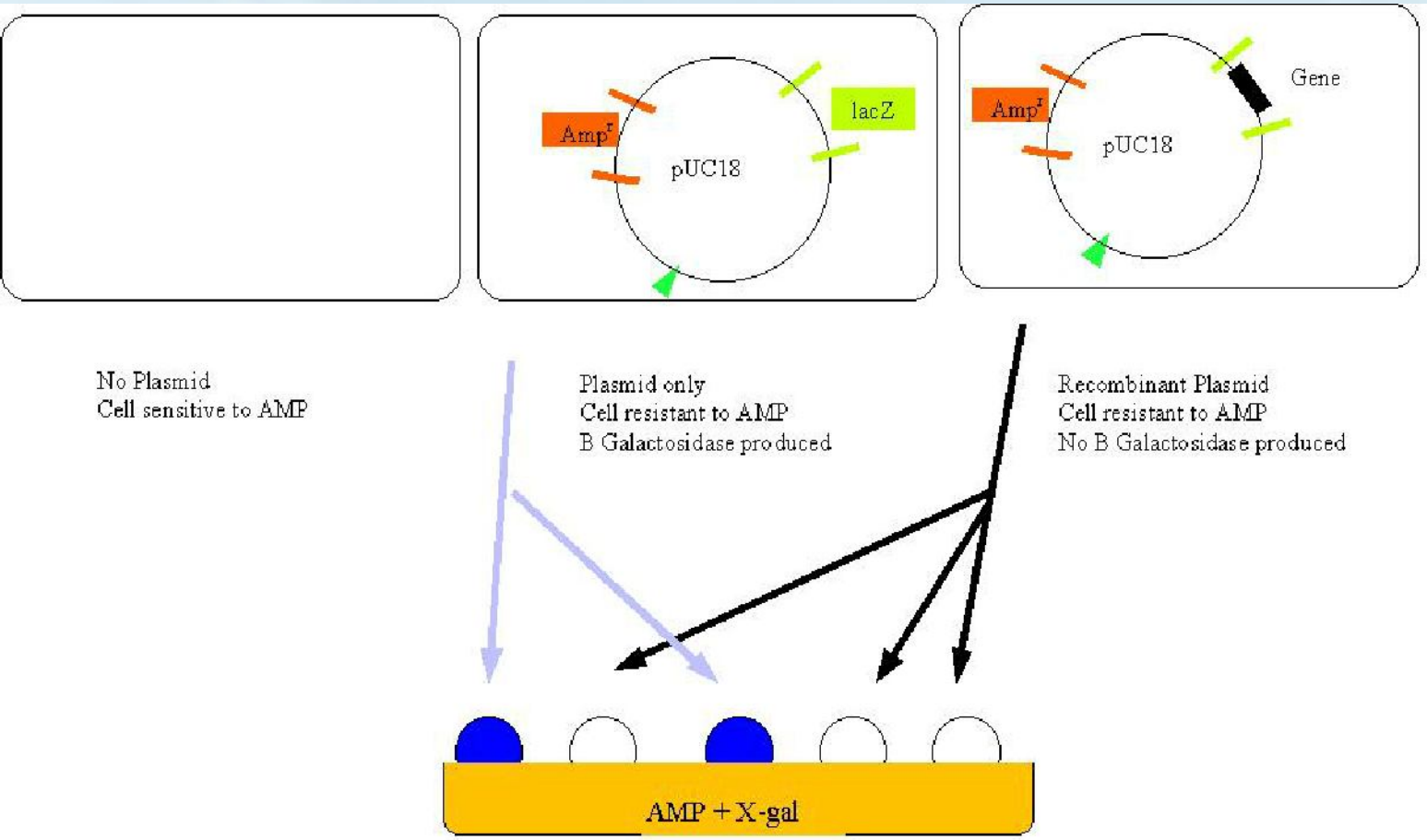
空载体

抗Amp　抗Tet



不含有载体或重组DNA

❖ 3 β-半乳糖苷酶系统


Amp^r
lacZ
pUC18
Amp^r
Gene
pUC18
No Plasmid
Cell sensitive to AMP
Plasmid only
Cell resistant to AMP
B Galactosidase produced
Recombinant Plasmid
Cell resistant to AMP
No B Galactosidase produced
AMP + X-gal

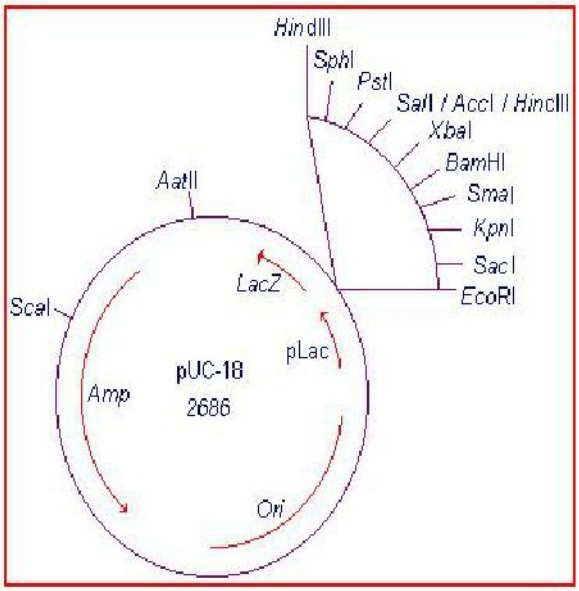
β-半乳糖苷酶系统

载体：pUC、pGEM系列载体等

带有一个来自大肠杆菌DNA的短序列，其中含有编码β-半乳糖苷酶（β- galatosidase）基因（LacZ基因）的调控序列和N端146个氨基酸的编码序列，在编码序列中插入了一个多克隆位点，但不破坏阅读框架，不影响功能。

当这种载体转入的宿主细胞是含有β-半乳糖苷酶C端编码序列时，此酶的N端序列和C端序列可以互补（成为α互补），产生具有酶活性的蛋白质（β-半乳糖苷酶），从而使宿主细菌在含有IPTG,X-gal的培养基上呈蓝色。

当多克隆位点有外源DNA片段插入时，破坏此酶的N端阅读框架，产生无α互补功能的N端片段，因此在带有外源DNA片段的细菌在含有IPTG/X-gal的培养基上呈白色。



LacZ基因

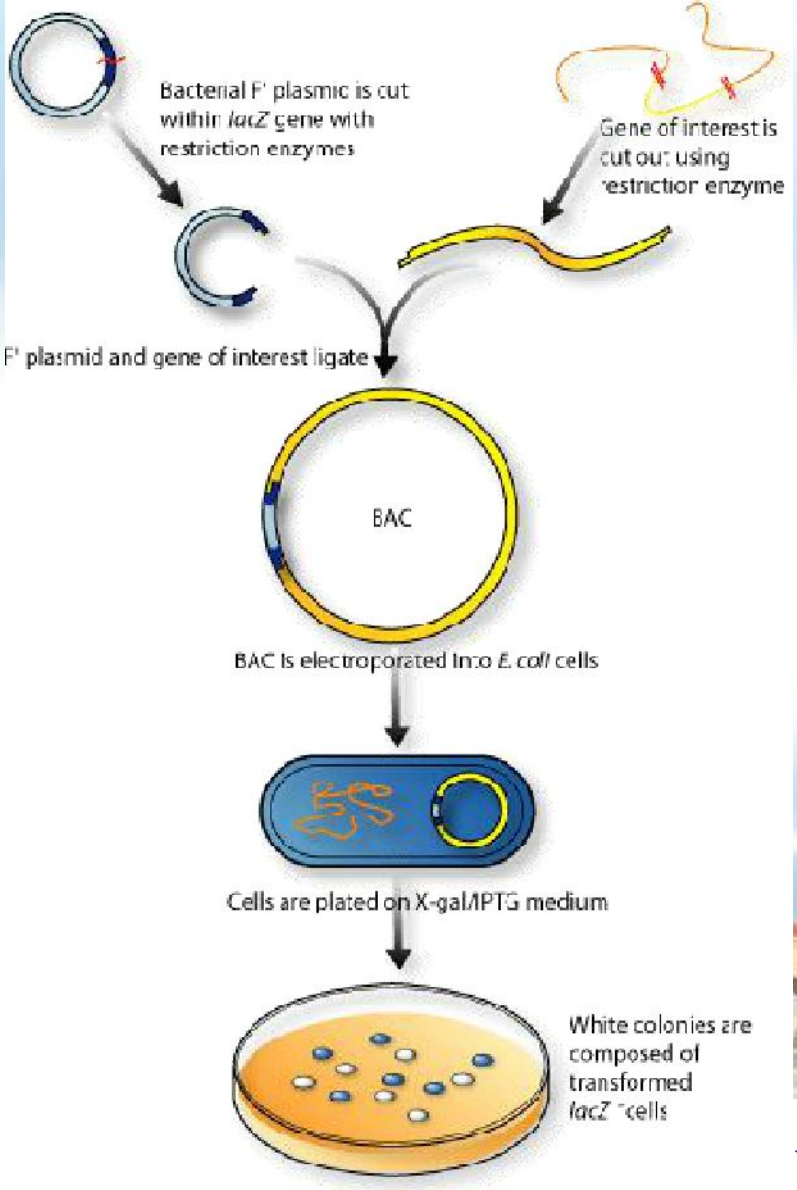
↓

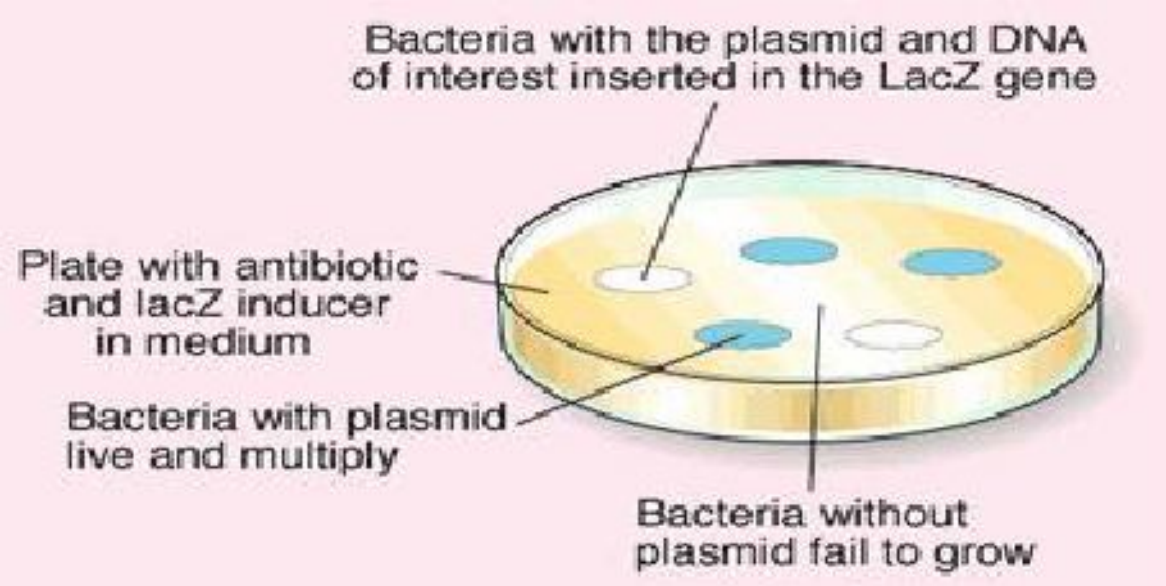
β-半乳糖苷酶

↓

在X/gal培养基上呈现兰色

X-gal $\xrightarrow{\text{β-半乳糖苷酶}}$ **X(发色底物)+gal(半乳糖)**


Bacterial F' plasmic is cut within lacZ gene with restriction enzymes
Gene of interest is cut out using restriction enzyme
F' plasmid and gene of interest ligate
BAC
BAC is electroporated into E. coli cells
Cells are plated on X-gal/IPTG medium
White colonies are composed of transformed lacZ⁻ cells



2009年3月

上海交通大学医学院

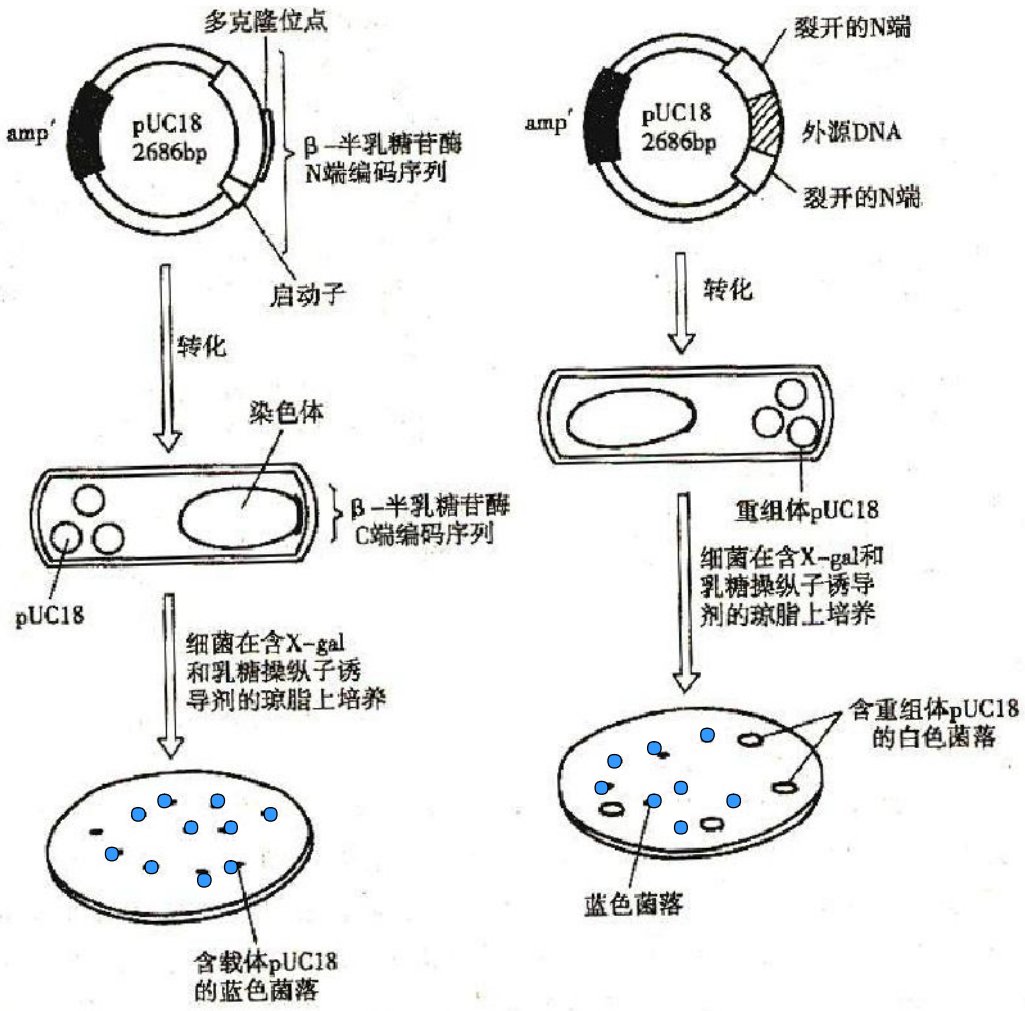


图 15-9　利用 α 互补原理筛选重组体 pUC18

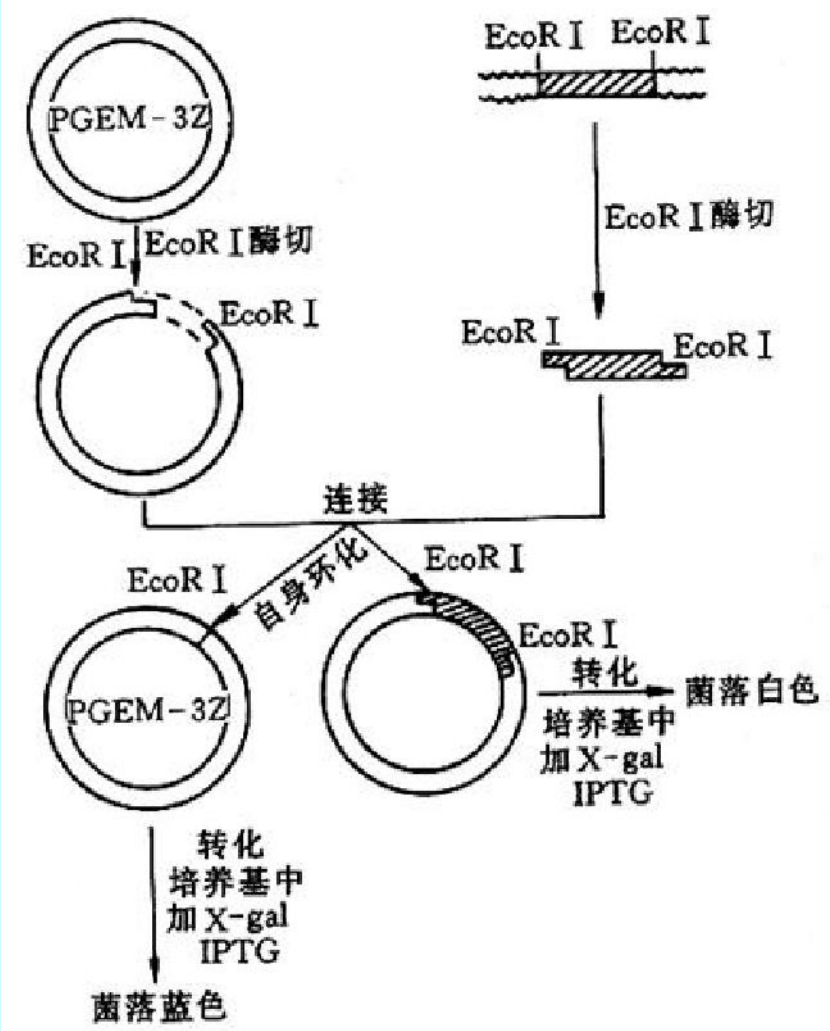
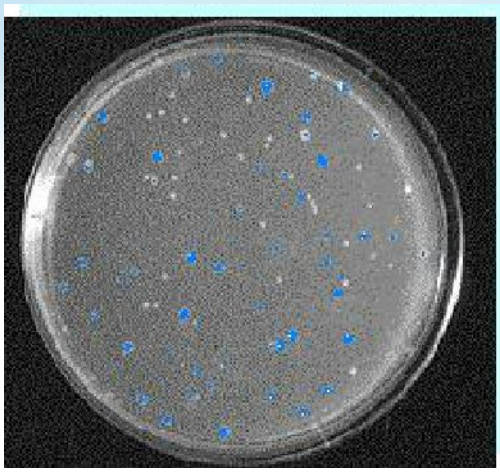


图 8-3　重组子的 α-互补筛选



2009年3月

上海交通大学医学院

❖4 根据外源性DNA片段性状进行筛选

根据外源基因可能表达的蛋白质对缺乏该蛋白的细菌的影响

2009年3月

上海交通大学医学院

如果外源性DNA片段可编码产生蛋白质，并且该蛋白质为细菌生命活动所必需，可利用该蛋白质的性状进行筛选。

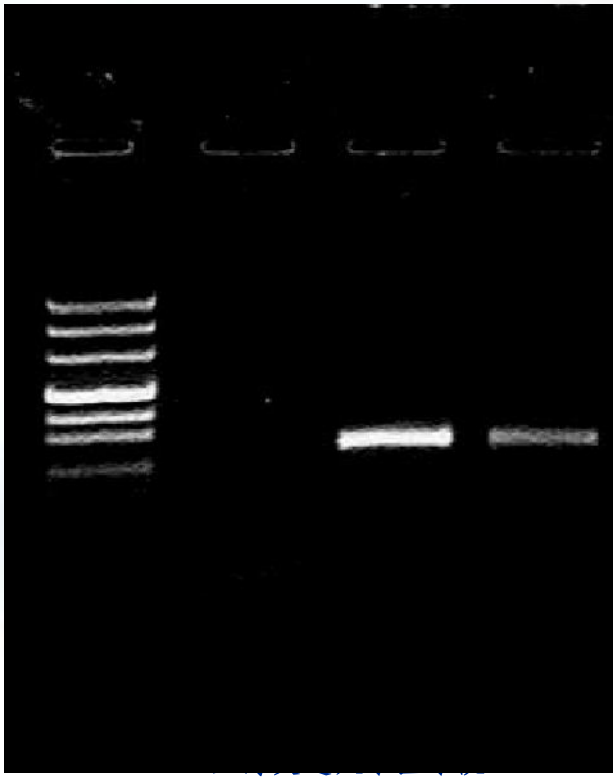
如亮氨酸是细菌生命活动所必需的，当外源性DNA片段含有合成亮氨酸的基因时，将该外源性DNA片段转入亮氨酸缺陷的细菌中，放入仅含亮氨酸的培养基中，只有能利用亮氨酸的细菌才能生长，因此，能生长的细菌即为含有外源性DNA片段。

（二）根据重组DNA的结构特征进行筛选

1、重组DNA的快速裂解、鉴定

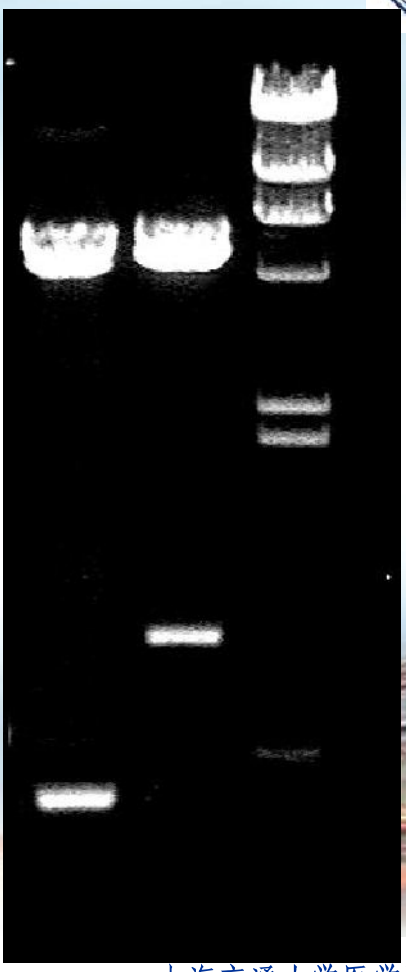
初步筛选方法，根据重组DNA大小和载体DNA大小之间的差别来区分的。

琼脂糖凝胶中进行电泳分离，紫外灯下观察并比较与载体DNA片段迁移率，初步判断是否有外源DNA插入。



2、限制性内切酶图谱进行分析

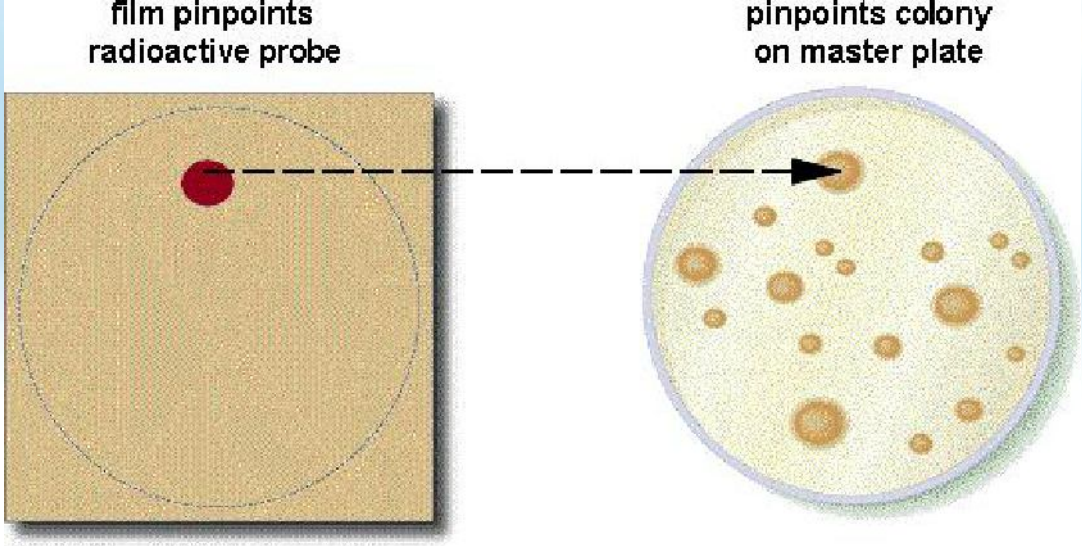
限制性内切酶进行酶切，凝胶电泳分析是否有外源DNA的插入。



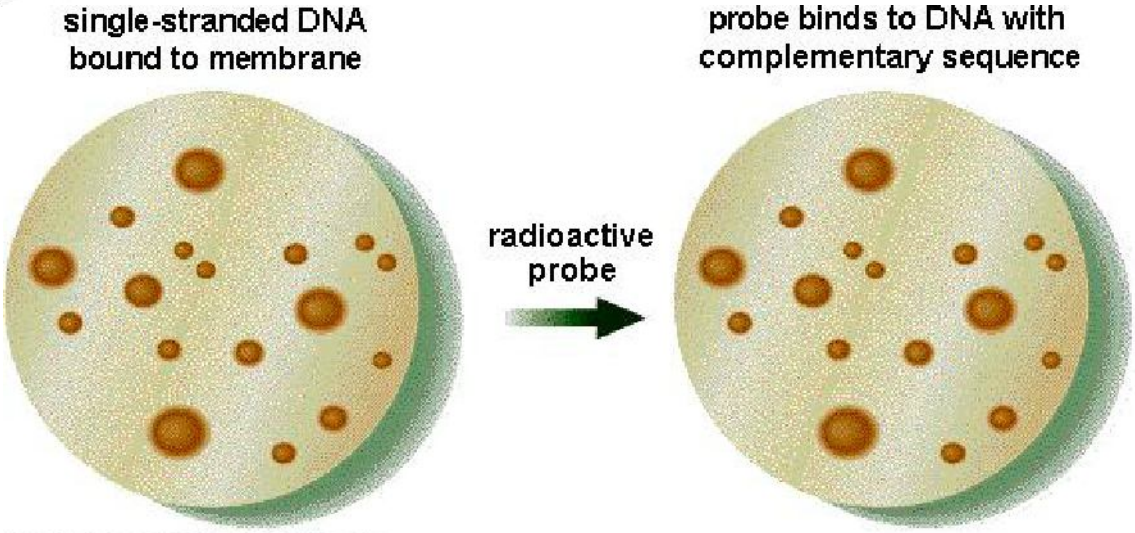
3、核酸分子杂交方法进行鉴定

核酸分子杂交是核酸分析的重要方法，是鉴定重组DNA的最通用方法，

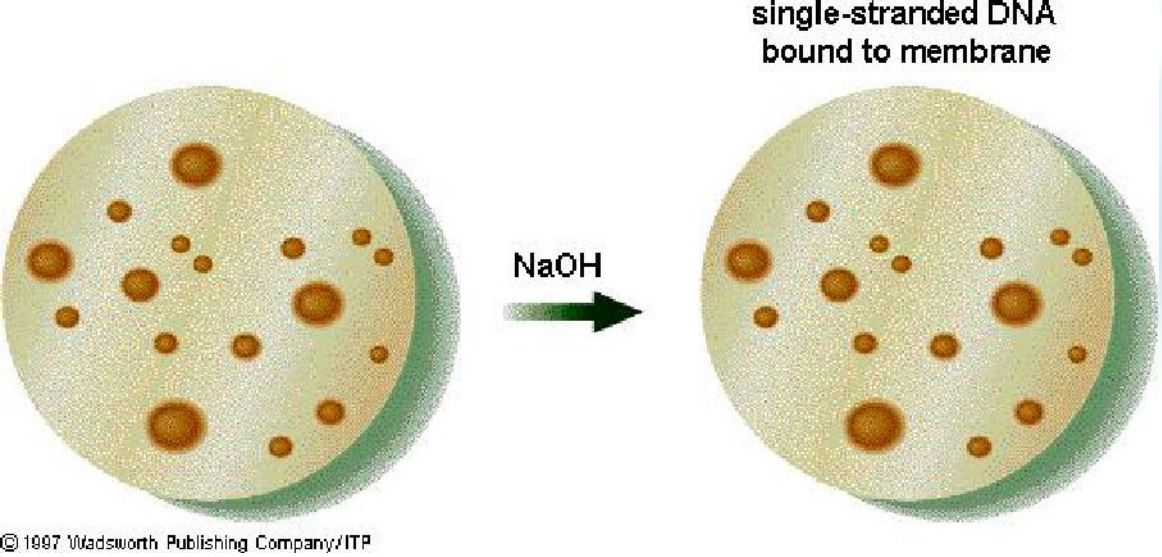
杂交方法	适用范围
菌落印迹杂交	检测细菌体固定在膜上后，经裂解释放的DNA
斑点杂交	检测未经凝胶电泳分离的，固定在膜上的DNA或RNA
原位杂交	直接检测细胞或组织中的DNA或RNA
Southern 印迹杂交	检测经酶切、凝胶电泳分离的，已转移到膜上的DNA
Northern印迹杂交	检测经凝胶电泳分离的，已转移到膜上的RNA

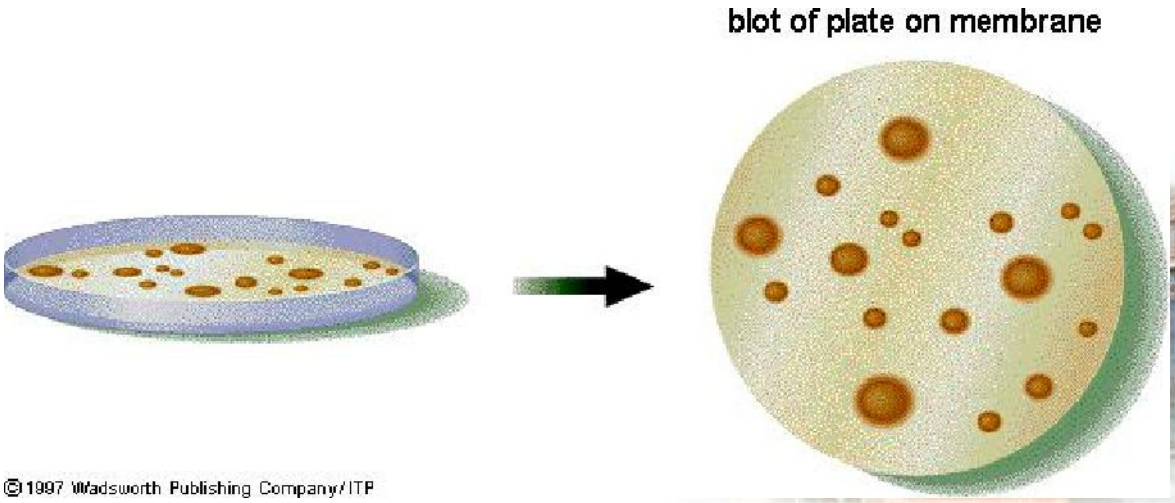


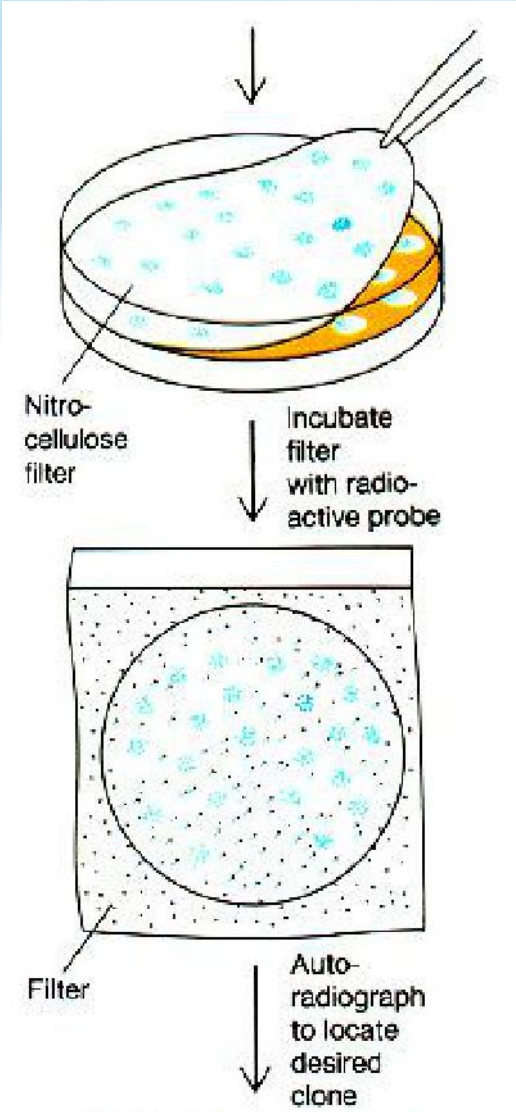
© 1997 Wadsworth Publishing Company/ITP

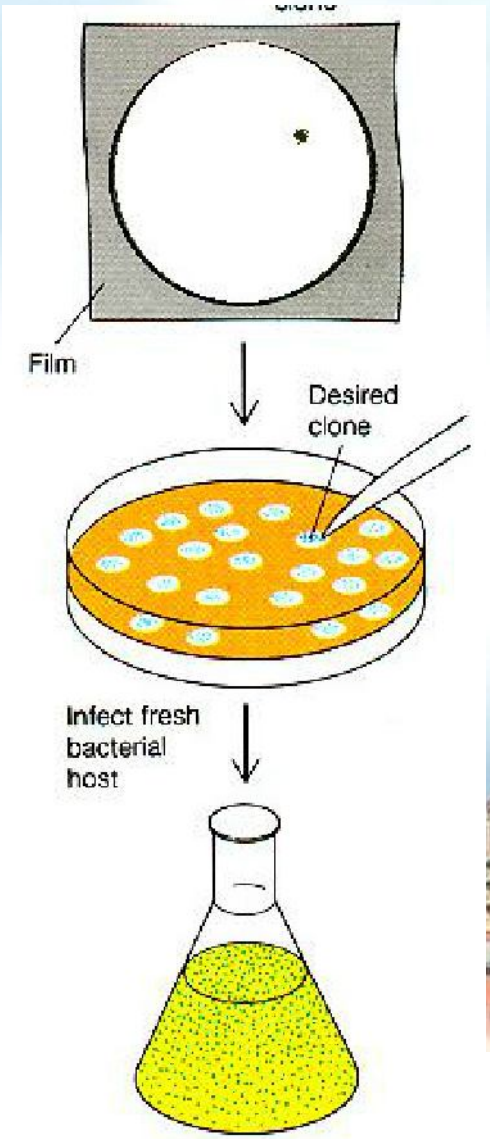


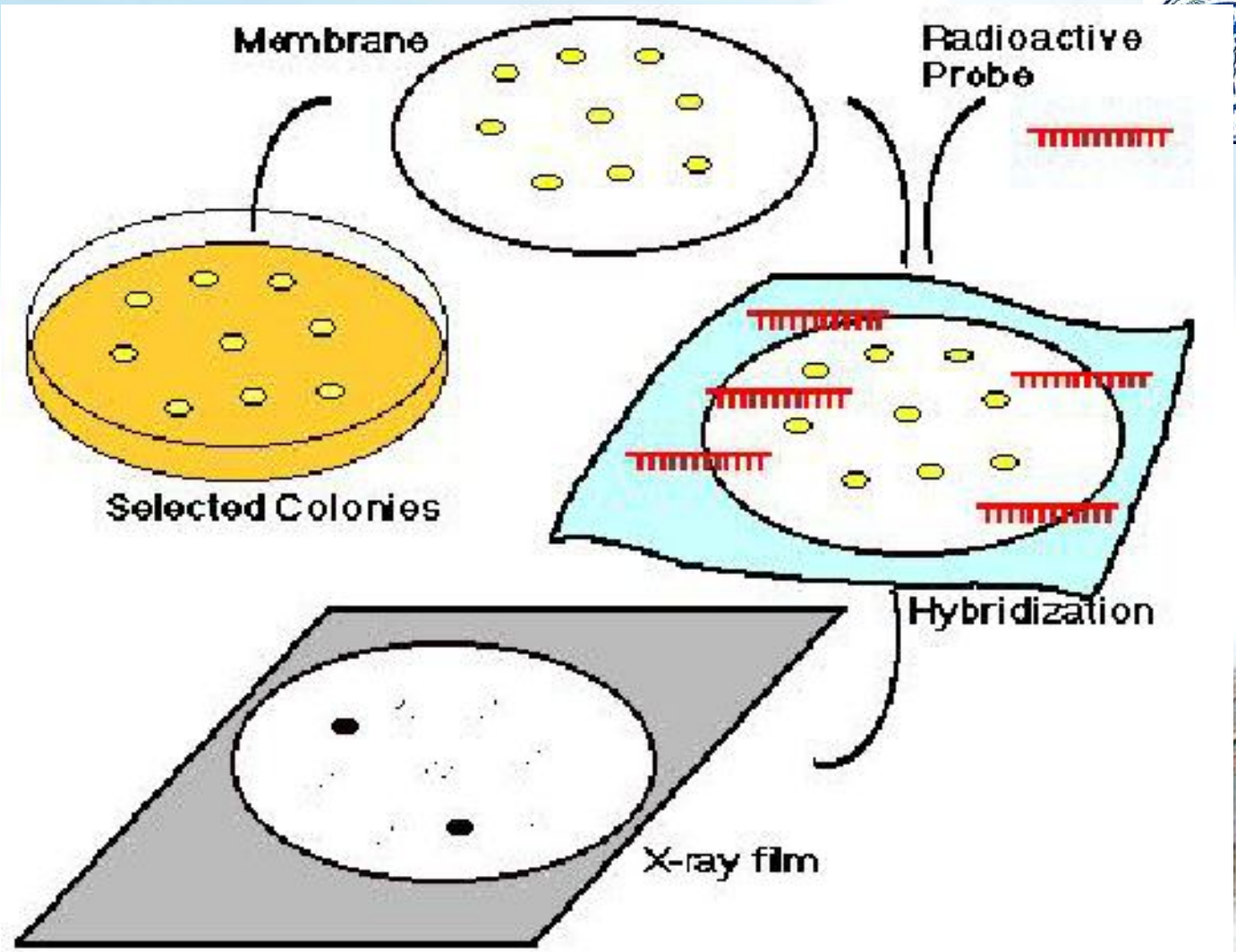
© 1997 Wadsworth Publishing Company/ITP

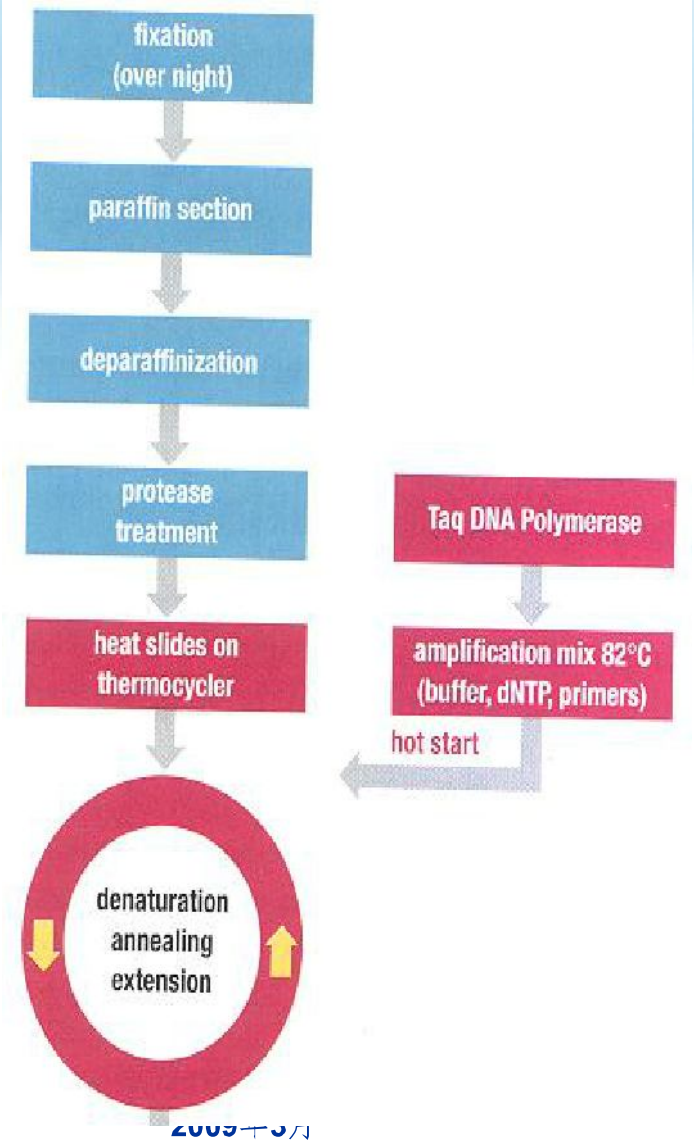

single-stranded DNA
bound to membrane
NaOH
© 1997 Wadsworth Publishing Company/ITP

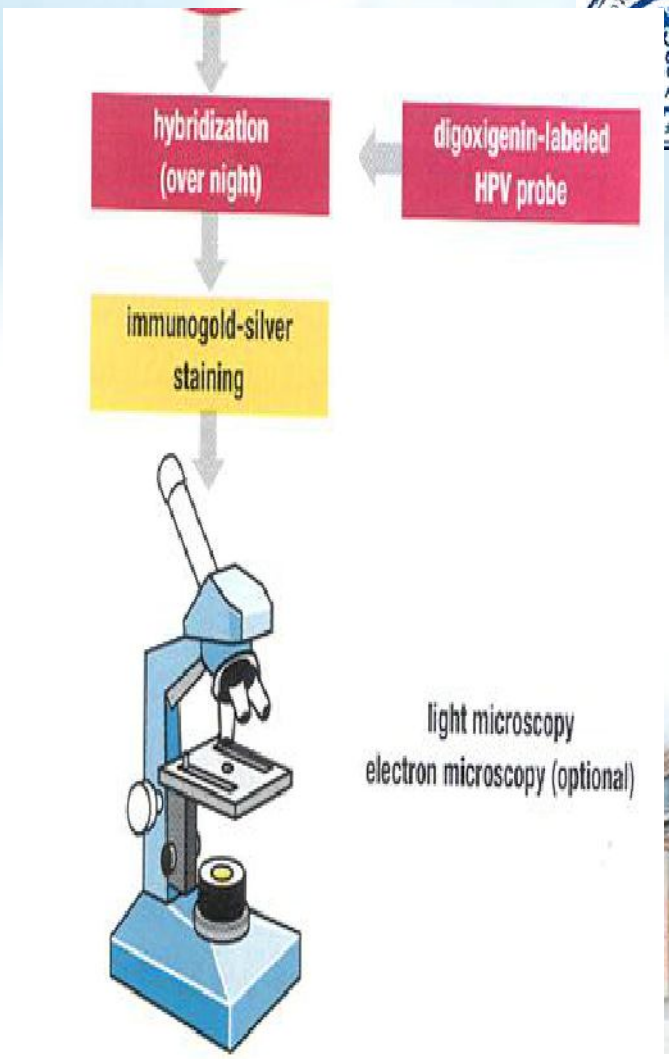

blot of plate on membrane
© 1997 Wadsworth Publishing Company/ITP

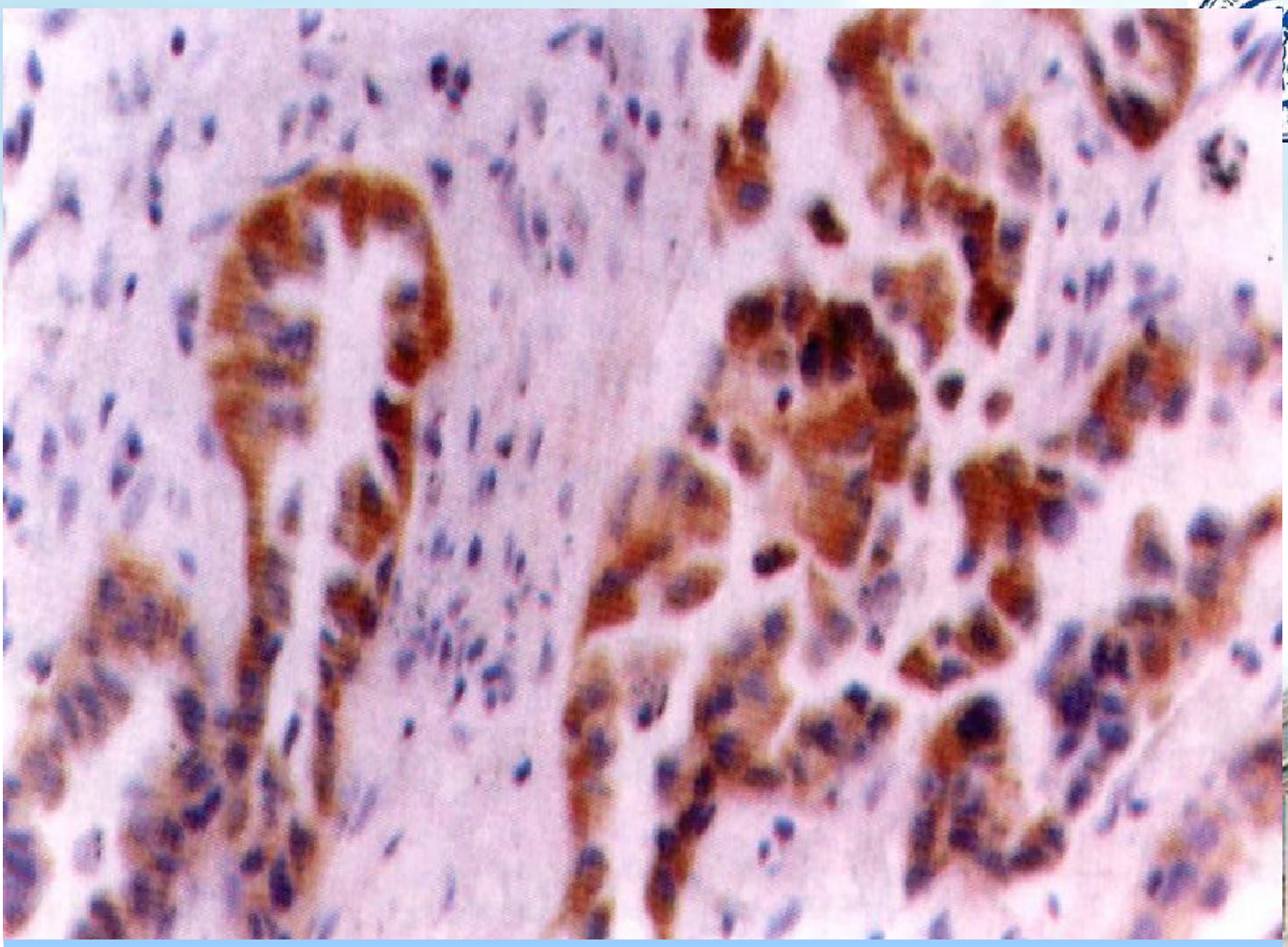

Nitro-
cellulose
filter
Incubate
filter
with radio-
active probe
Filter
Auto-
radiograph
to locate
desired
clone


Film
Desired
clone
Infect fresh
bacterial
host

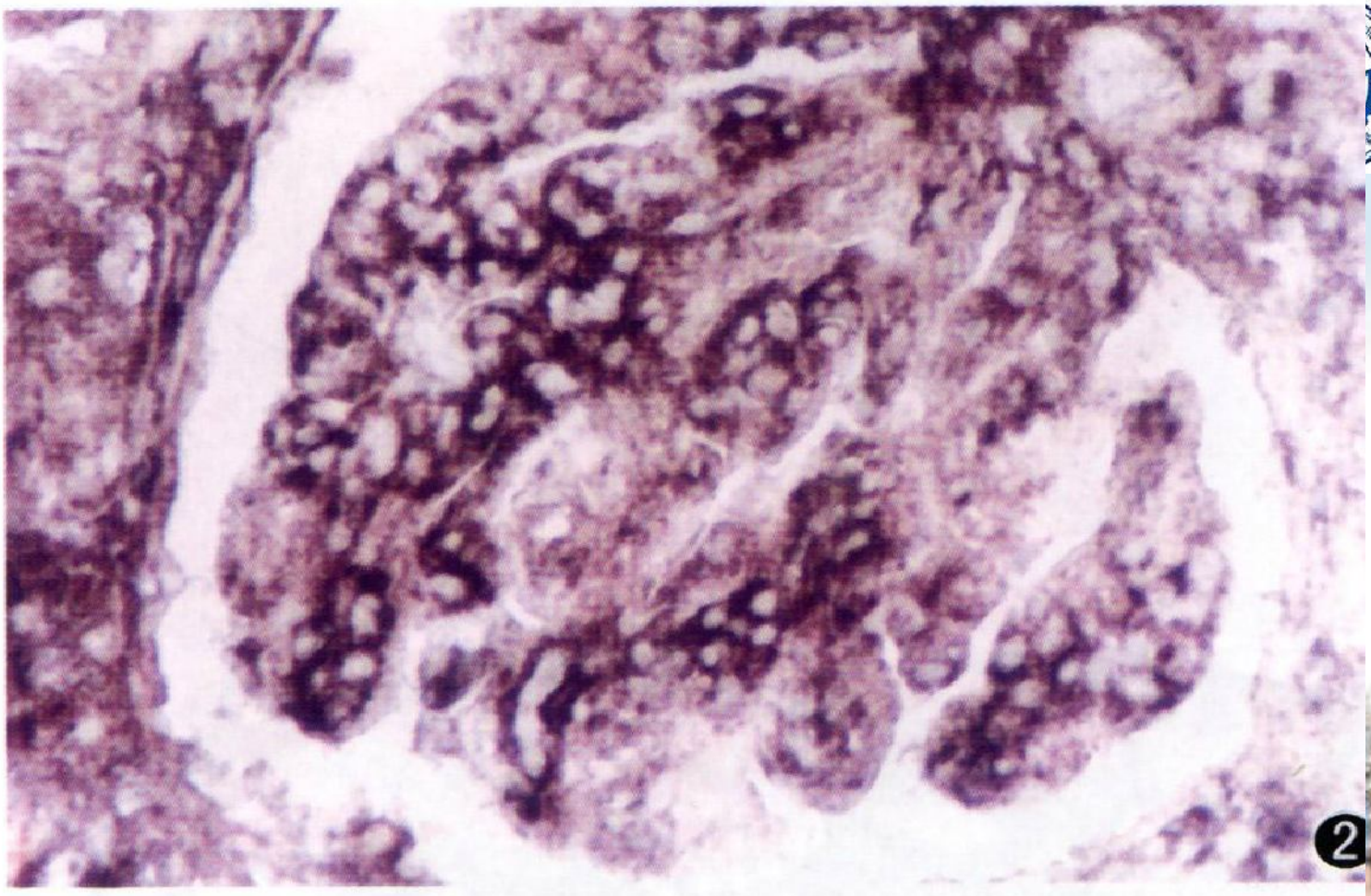

Membrane
Radioactive Probe
Selected Colonies
Hybridization
X-ray film


fixation
(over night)
paraffin section
deparaffinization
protease
treatment
heat slides on
thermocycler
denaturation
annealing
extension
Taq DNA Polymerase
amplification mix 82°C
(buffer, dNTP, primers)
hot start


hybridization
(over night)
digoxigenin-labeled
HPV probe
immunogold-silver
staining
light microscopy
electron microscopy (optional)



肺腺癌β-cat mRNA　原位杂交法×400



Smad2　mRNA在系膜增生型IgA肾病肾小球的表达
原位杂交×200

❖ 4 PCR反应进行鉴定

利用引物直接扩增外源基因进行检测

2009年3月

上海交通大学医学院

复习思考题

名词解释

重组DNA技术
克隆
限制性内切酶
限制性内切酶的星号活力
切口
缺口
DNA连接酶
同工异源酶
同尾酶

2009年3月

上海交通大学医学院

❖ 简答题

1、限制性内切酶对双链DNA进行切割后可能产生的类型

2、产生限制性内切酶星号活力的原因

3、重组DNA技术中可能应用到的工具酶有哪些？

4、CaCl2转化法的原理

5、重组子如何进行鉴定与筛选？