



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



# 一、重组DNA技术的诞生

## (一) 重组DNA技术诞生的理论基础

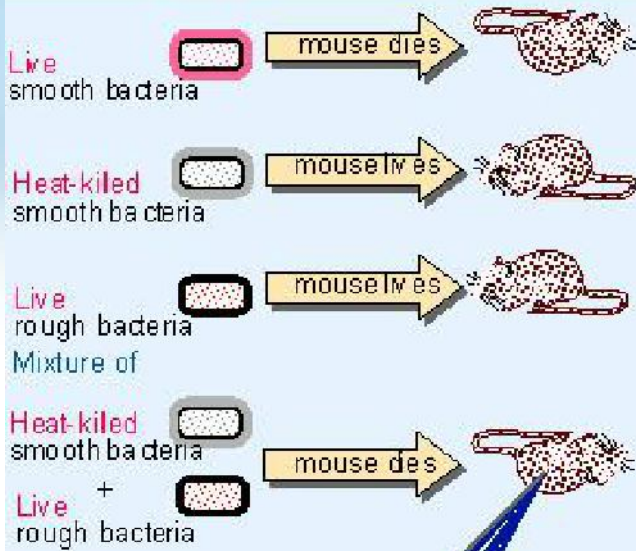
### 1. 40年代明确了遗传的物质基础是DNA

#### 肺炎链球菌

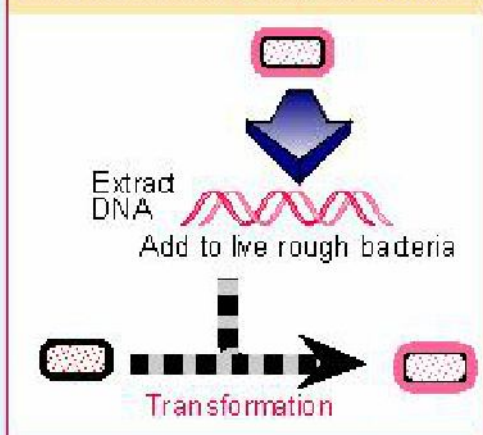


2009年3月

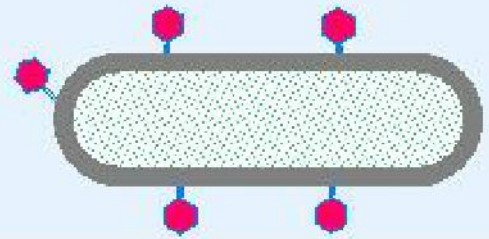
上海交通大学医学院



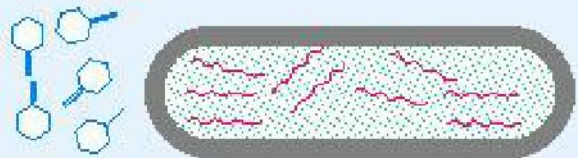
Dead mouse has live smooth bacteria



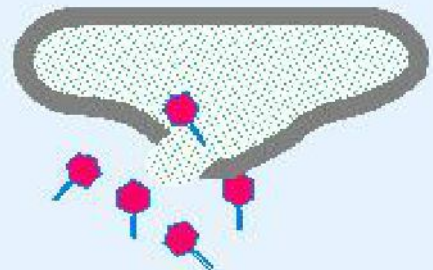
Bacteria are infected with phages labeled with  $^{32}\text{P}$  (●) in DNA or with  $^{35}\text{S}$  (●) in protein



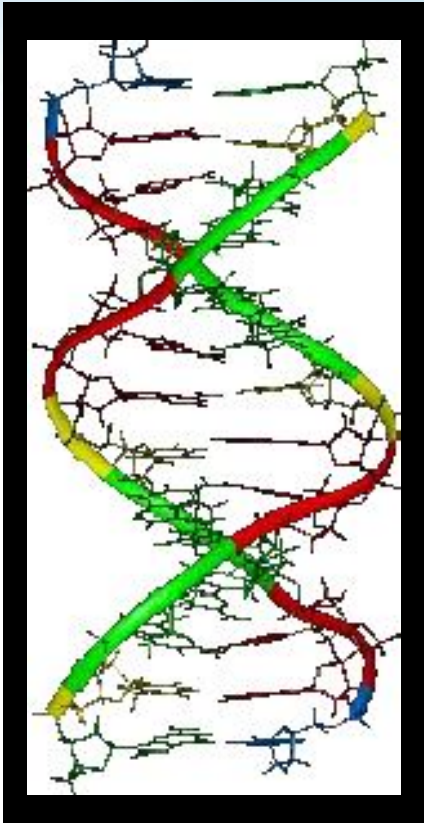
Separate phage coats and infected bacteria  
Phage coats contain 80% of  $^{35}\text{S}$  label  
Infected bacteria contain 70% of  $^{32}\text{P}$  label



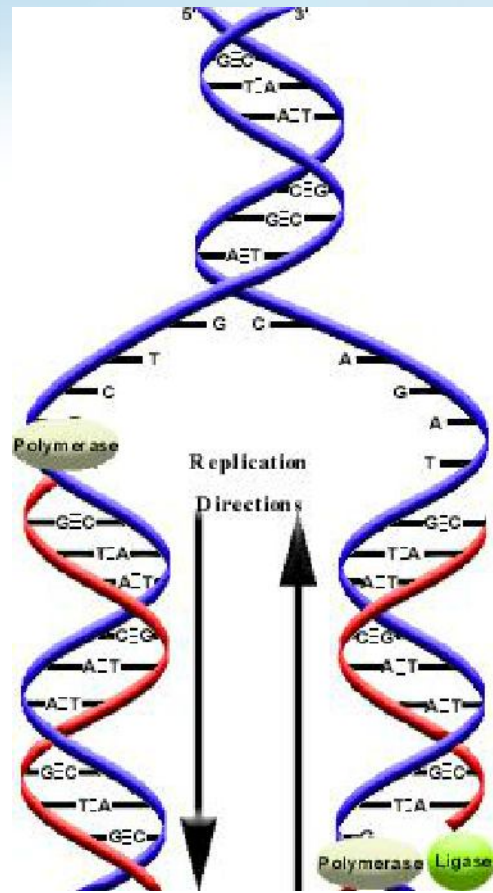
Isolate progeny phage particles  
Progeny phages have 30% of  $^{32}\text{P}$  label  
and <1% of  $^{35}\text{S}$  label



## 2、50年代揭示了DNA分子的双螺旋结构模型和半保留复制



2009年3月

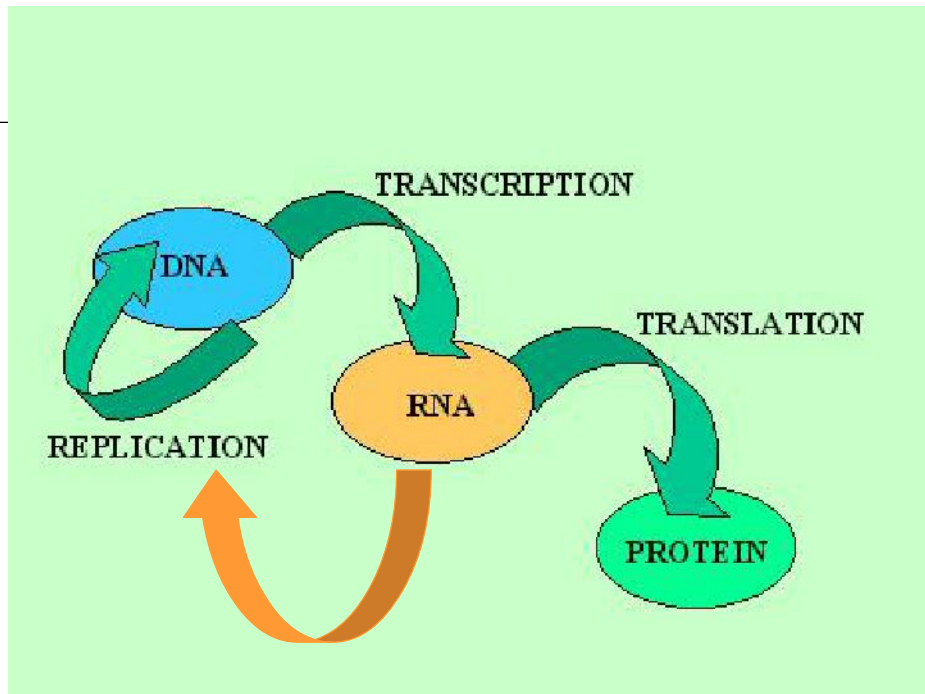


上海交通大学医学院



3、50年代末和60年代提出了“中心法则”和操纵子学说，并成功地破译了遗传密码。

### 中心法则



2009年3月

上海交通大学医学院



# 遗传密码

64个密码子

61个代表各种氨基酸（AUG起始密码）

3个密码子为终止子（UAA、UAG、UGA）



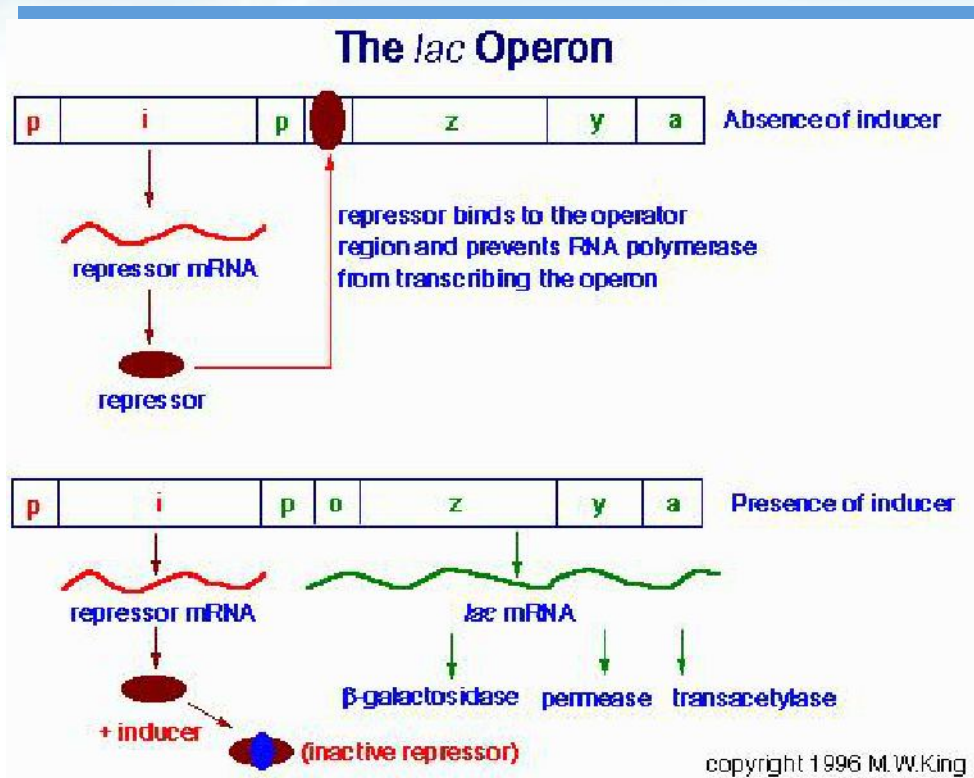
UUU UUC	phenyl alanine	UCU UCC UCA UCG	serine	UAU UAC	tyrosine	UGU UGC	cysteine
UUA UUG	leucine			UAA UAG	stop	UGA UGG	stop tryptophan
CUU CUC CUA CUG	leucine	CCU CCC CCA CCG	proline	CAU CAC CAA CAG	histidine glutamine	CGU CGC CGA CGG	arginine
AUU AUC AUA AUG	isoleucine methionine	ACU ACC ACA ACG	threonine	AAU AAC AAA AAG	asparagine lysine	AGU AGC AGA AGG	serine arginine
GUU GUC GUA GUG	valine	GCU GCC GCA GCG	alanine	GAU GAC GAA GAG	aspartic acid glutamic acid	GGU GGC GGA GGG	glycine



医学院

# 操纵子 (operon)

用基因表达调控的原理解释了酶诱导的本质。



2009年3月

上海交通大学医学院





## (二) 关键性实验技术问世为重组DNA技术奠定基础

1. DNA分子的切割与连接技术

2. 载体构建和大肠杆菌转化体系的建立

3. Southern杂交、DNA序列分析和聚合酶链式反应



2009年3月





## 二. 重组DNA技术的定义及步骤

### (一) 重组DNA技术

#### 1、重组DNA技术 (recombinant DNA technology):

按照人的意愿，在体外对DNA分子进行重组，再将重组分子导入受体细胞，使其在细胞中扩增和繁殖，以获得该DNA分子的大量拷贝，表达相关基因的产物，是进行基因功能研究的基本方法。

2009年3月

上海交通大学医学院

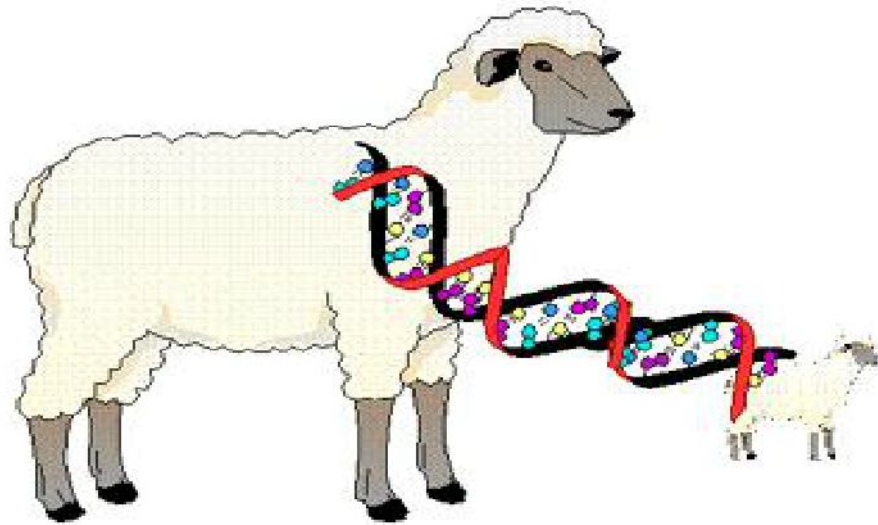


## 2. 克隆 (clone) :

指由一个细胞通过无性繁殖以后形成的与亲代完全相同的子代群体。

### 分子克隆 (molecular cloning) :

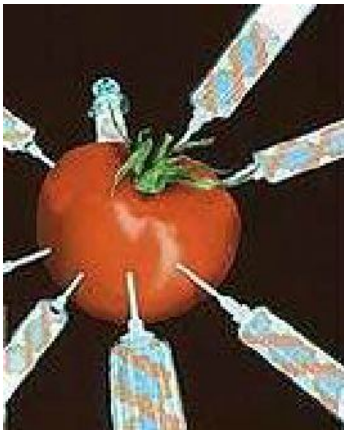
构建DNA重组体并导入宿主细胞建立无性繁殖体系。



2009年3月

## (二) 重组DNA技术的重大意义

1. 填平了生物种属间不可逾越的鸿沟。
2. 缩短了进化时间。
3. 使人能对生物体进行定向构造。



2009年3月



上海交通大学医学院



工具酶 (Tool enzymes) :

**DNA重组技术， 需要利用一些酶在体外对DNA进行切割、 连接等基因操作， 这些酶常被称为工具酶。**

2009年3月

上海交通大学医学院





# 主要工具酶

- ❖ 限制性核酸内切酶
- ❖ DNA连接酶
- ❖ 逆转录酶
- ❖ DNA聚合酶 I
- ❖ 碱性磷酸酶
- ❖ 末端转移酶
- ❖ *Taq* DNA聚合酶

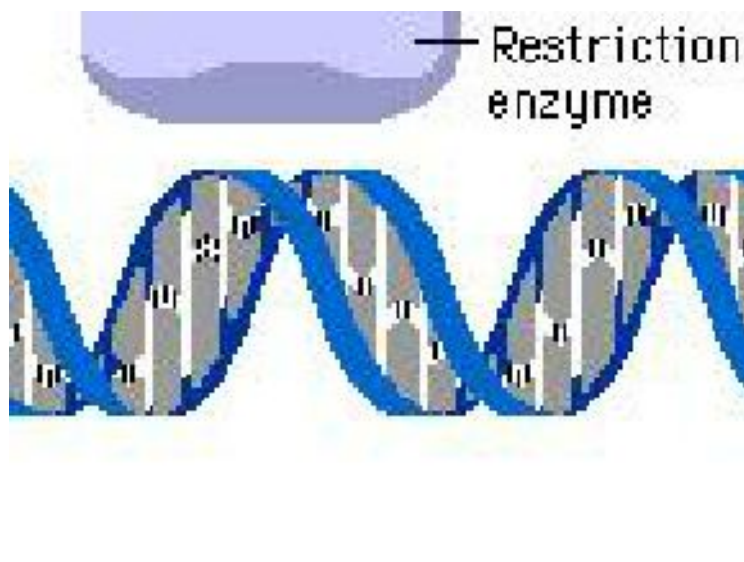
2009年3月

上海交通大学医学院





是一类能识别和切割双链DNA分子中特定碱基顺序的核酸水解酶。



2009年3月

上海交通大学医学院



# 限制性内切酶

1. 简称限制酶，是DNA重组技术的基本工具
2. 能识别和切割双链DNA分子特异序列的核酸水解酶
3. 在细菌体内与相伴存在的修饰酶（甲基化酶）共同构成细菌的限制—修饰体系，起限制外来DNA、保护自身DNA的作用

2009年3月

上海交通大学医学院





## 二. 命名

※第一个字母（大写、斜体）

该酶的微生物属名

※第二、三个字母（小写、斜体）

代表微生物种名

※第四个字母（斜体）

代表寄主菌的株或型

※用罗马数码I、II、III等区分同一株具有不同特异性的酶

2009年3月

上海交通大学医学院







例 流感嗜血杆菌中三个酶的命名:

Haemophilus influenzae d

属名

H

种名

in

株系

d

I

II

III

*Hind* I

*Hind* II

*Hind* III

2009年3月

上海交通大学医学院



### 三. 分类

根据限制酶的识别切割特性、催化条件及是否具有修饰酶活性可分为：

- I型
- II型
- III型



## 1. I型限制酶

属于复合功能酶，兼有修饰和切割DNA两种特性。

### ❖ 功能

### ❖ 核酸内切酶

甲基化酶

ATP酶

DNA解旋酶

### ❖ 特点：

❖ 识别和切割位点不一致

❖ 没有固定的切割位点

❖ 随机切割

❖ 不产生特异片段

2009年3月

上海交通大学医学院





## 2. III型酶

与I型酶特性类似，也有甲基化功能，但无ATP酶和DNA解旋酶活力。

在DNA链上有特异位点切割，其切割位点在识别位点以外。

2009年3月

上海交通大学医学院



### 3. II型酶

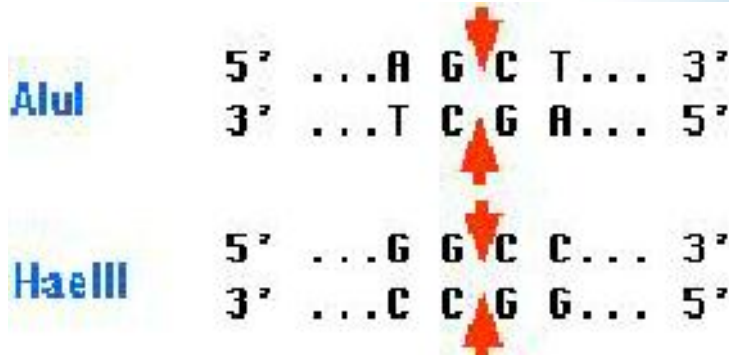
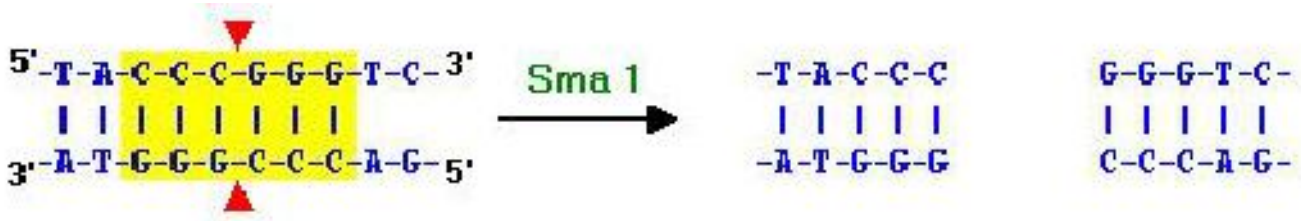
#### (1) II型酶的识别

识别序列一般为4-6个碱基对，通常是反转重复顺序，具有180°的旋转对称性。

#### (2) II型酶的切割功能

★平末端 (blunt end)

在识别顺序的对称轴上，对双链DNA同时切割。

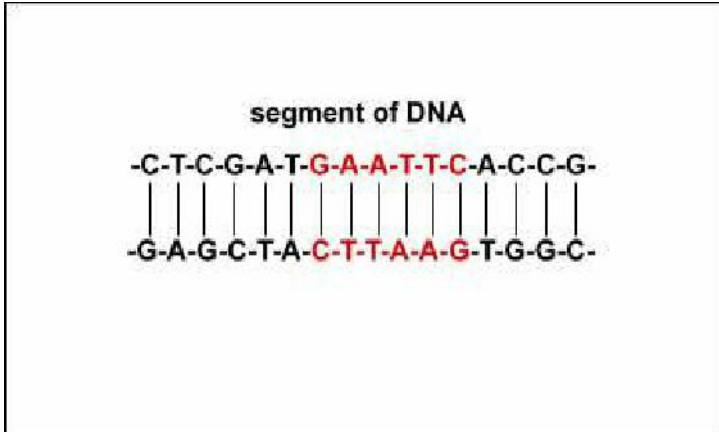
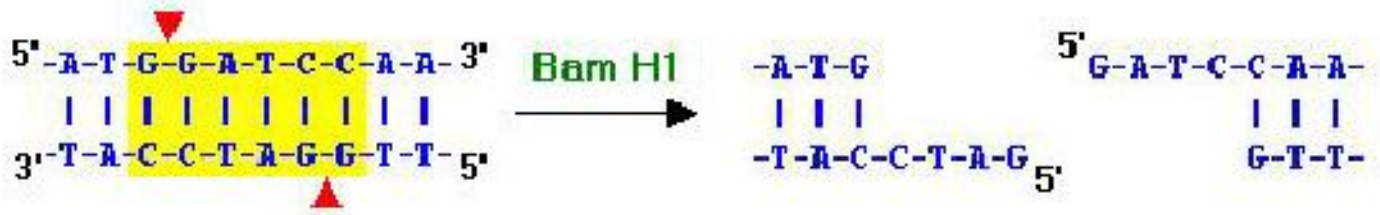


2009年3月

上海交通大学医学院

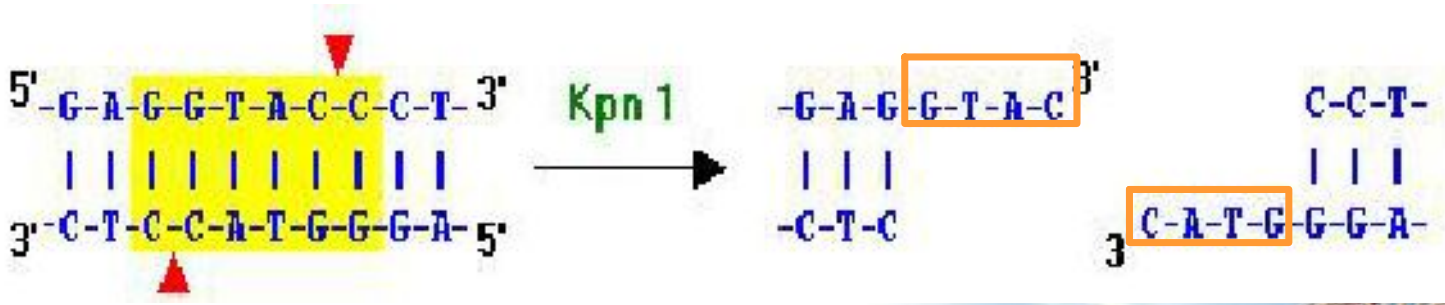
★5'端粘性末端 (cohesive end)

在识别顺序的双侧末端切割DNA双链，于对称轴的5'末端切割。



★ 3'端粘性末端

在识别顺序的双侧末端切割DNA双链，于对称轴的3'末端切割。

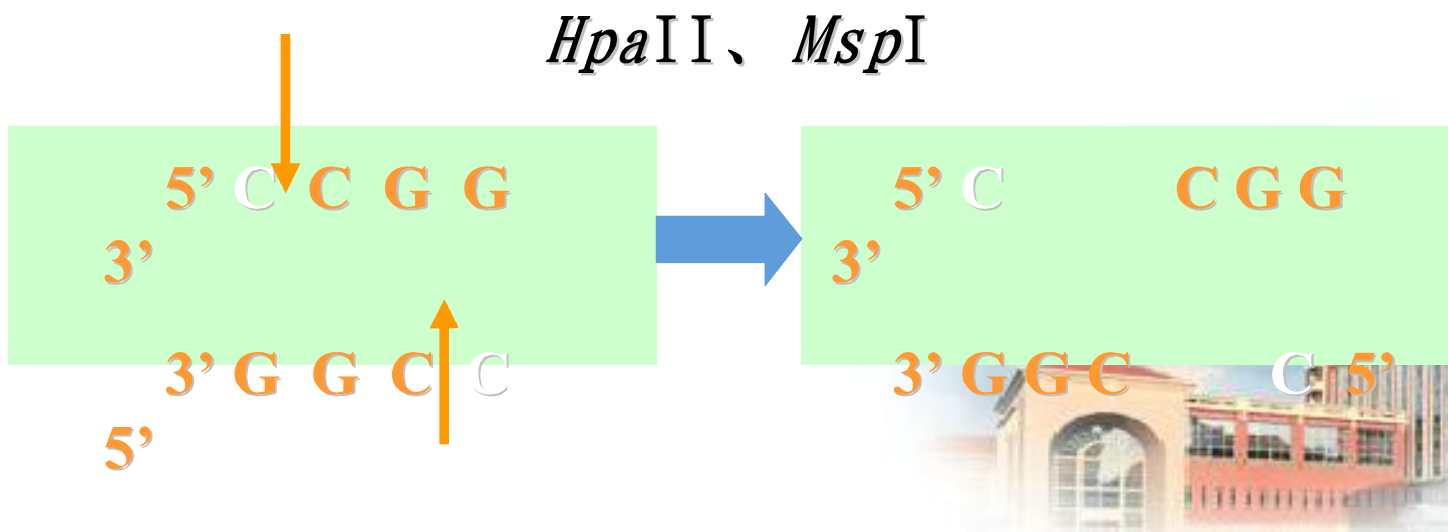


#### 4. 少数有特殊性质的II型酶

##### <1>异源同工酶 (isoschizomer)

定义:

来源不同但能识别和切割同一位点的酶。



2009年3月

上海交通大学医学院



## <2>同尾酶 (isocaudarner)

为识别与切割顺序相互有关的酶。

有些限制酶的识别序列包含在另一些限制酶的识别顺序之中

酶来源不同，但它们作用后能产生相同的粘性末端。

### BamH I



### Bag II





特点:

两个同尾酶消化的DNA片段，可以相互连接，连接后的重组DNA分子，可以被其中一种酶识别，也可能原来的任何一个同尾酶均不能识别。

2009年3月

上海交通大学医学院





## 5. 限制性内切酶活力单位和星号活力

### (1) 酶活力单位

限制性内切酶活力单位规定如下：在合适温度、pH值和离子强度等条件下，1小时内完全消化1  $\mu$ g 特异DNA底物所需的酶量，定义为一个活力单位。



2009年3月

上海交通大学医学院



## (2) 星号活性

- 限制性内切酶在非标准反应条件下，对识别序列的特异性下降，能切割一些与特异识别顺序类似的序列
- 一般在酶的右上角加\*表示。
- 如克隆过程中需同时进行双酶切，应选用二种酶都能接受的反应缓冲体系（可查阅试剂供应商手册获得），否则可能出现星号活性。



2009年3月

上海交通大学医学院



(3) 特点:  
星号活力的识别形式常对标准识别顺序中两侧的碱基没有特异性。



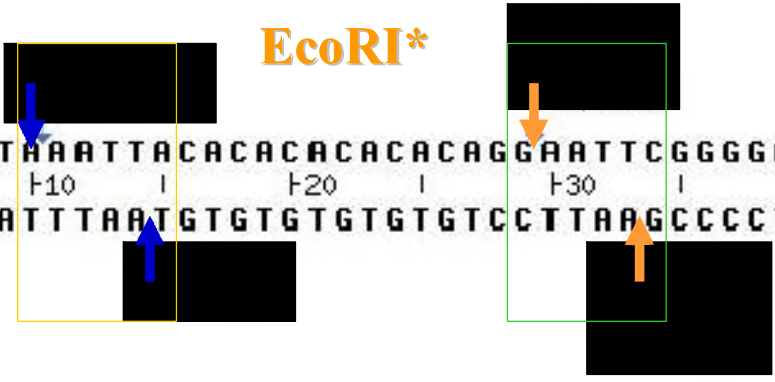
2009年3月

上海交通大学医学院

# EcoRI\*

5'... ATTTGGCATHAATTACACACACACACAGGGAATTCGGGGAAAAACCCCCA ... 3'  
┆1   ┆   ┆10   ┆   ┆20   ┆   ┆30   ┆   ┆40   ┆   ┆50

3'... TAAACCGTATTTAATGTGTGTGTGTCTTAAAGCCCCTTTTGGGGGGT ... 5'



2009年3月

上海交通大学医学院



#### (4) 产生的原因

- a. 高甘油含量 (>5%V/V)
- b. 内切酶用量过大, 一般为> 100U/ $\mu$ g DNA
- c. 低离子强度<25mmol/L
- d. 高pH值 pH8.0
- e. 含有机溶剂: DMSO、乙醇、乙烯二乙醇  
Mn<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Co<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>等非Mg<sup>2+</sup>的离子存在



(5) 常见容量发生星号活力的酶有:

*EcoRI*、*HindIII*、*KpnI*、*PstI*、*ScaI*、*SalI*、*XmnI*、  
*HinfI*、*BssHII*、*EcoRV*



2009年3月

上海交通大学医学院





## (6) 其他注意事项：

- 底物DNA不能含有痕量的酚、氯仿和乙醚
- 溶液不能含大于10mmol/L的EDTA、SDS和过量的盐



2009年3月

上海交通大学医学院



- 反应缓冲体系中一般加入2-巯基乙醇或二硫苏糖醇防止含巯基酶的氧化失活
- 加入牛血清白蛋白稳定酶活性
- 操作时应注意混匀反应体系，这是常见的酶切失败原因之一

2009年3月

上海交通大学医学院





## 6. 甲基化酶

许多细菌有限制—修饰系统

限制（降解）外来DNA，并通过对自身DNA的  
修饰而起保护作用



2009年3月

上海交通大学医学院



## II 类限制 – 修饰系统

- 由两种酶分子组成的二元系统
  - 一种为限制性内切酶，另一种为独立的甲基化酶
  - 这两种酶识别序列相同
  - 如 *Pst* I 甲基化酶使A甲基化形成5' -CTGC<sup>m</sup>AG-3'
- 大肠杆菌株一般有dam甲基化酶和dcm甲基化酶

2009年3月

上海交通大学医学院





## 甲基化酶的应用

- ❖ 甲基化酶亦是分子克隆的重要工具酶
- ❖ 当制备克隆用双链cDNA时，外源DNA片段可用M. *EcoR* I 甲基化酶处理，使双链cDNA内部*EcoR* I 位点则因甲基化受到保护而不被切割

2009年3月

上海交通大学医学院





## 7. II型限制酶的用途

- (1) DNA重组克隆及亚克隆
- (2) DNA杂交与序列分析
- (3) 改建质粒
- (4) 构建基因组DNA物理图谱和文库等

2009年3月

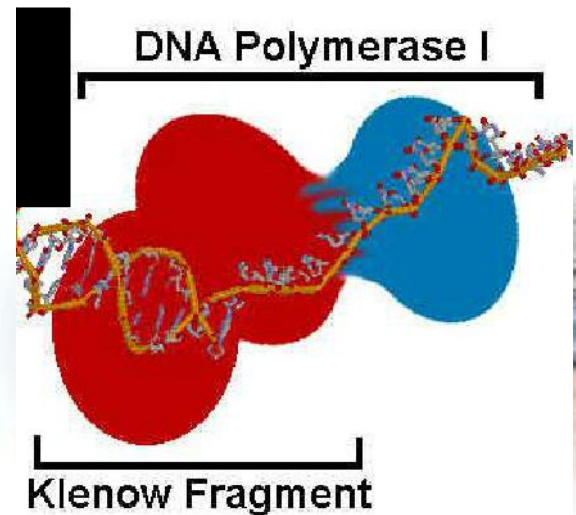
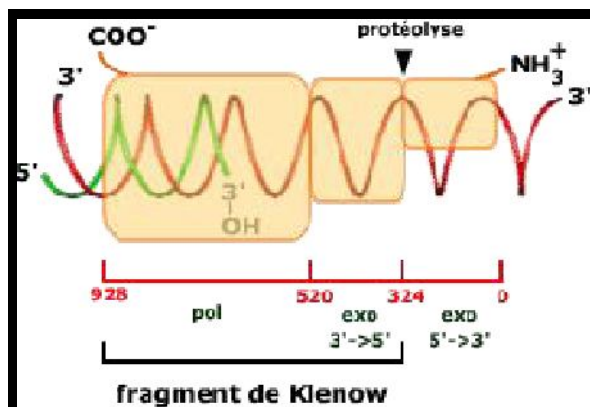
上海交通大学医学院

## 二、DNA聚合酶(DNA polymerase)

### 1、大肠杆菌DNA聚合酶I及其大片段 (Klenow片段)

#### (1) 大肠杆菌DNA聚合酶I

特性：具有3种酶活性

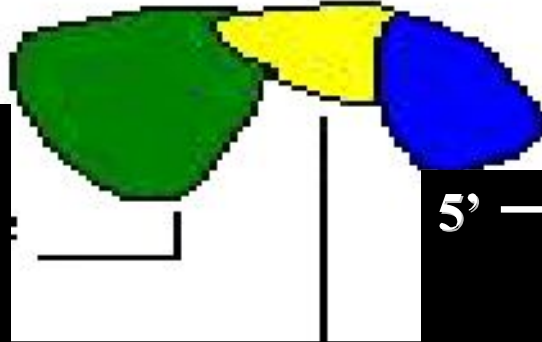


2009年3月

上海交通大学医学院

# DNA polymerase I Holoenzyme

聚合酶功能



5' → 3' 外切功能

3' → 5' 外切功能

2009年3月

上海交通大学医学院

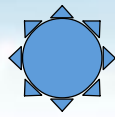






# a. 5'→3'DNA聚合酶活性

底物：单链DNA模板及带3'羟基的DNA引物



聚合酶

5' CCG

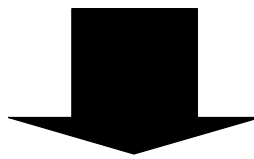
3' GGCTATCGA5'

dATP

dTTP

dGTP

dCTP



5' CCG**ATAG**CT3'

3' GGCTATCGA5'

2009年3月

上海交通大学医学院





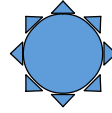
## b. 3'→5'外切酶活性

底物:

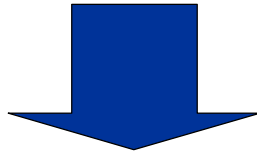
带3'羟基的双链DNA或单链DNA、从3'羟基端降解DNA。对双链DNA链的外切核酸酶活性可被5'→3'DNA聚合酶活性所封闭。

5' CCGATAGCT3'

3' GGC5'



聚合酶



5' CCG3'

3' GGC5'

A T A G C T

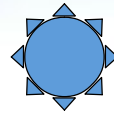
上海交通大学医学院



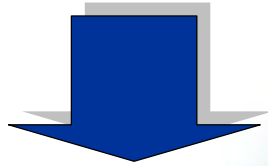
c. 5'→3'外切酶活性:  
能从游离的5'末端降解DNA成为单核苷酸。

5' CCG**ATAGCT**3'

3' GGCTATCG**AT**5'



聚合酶



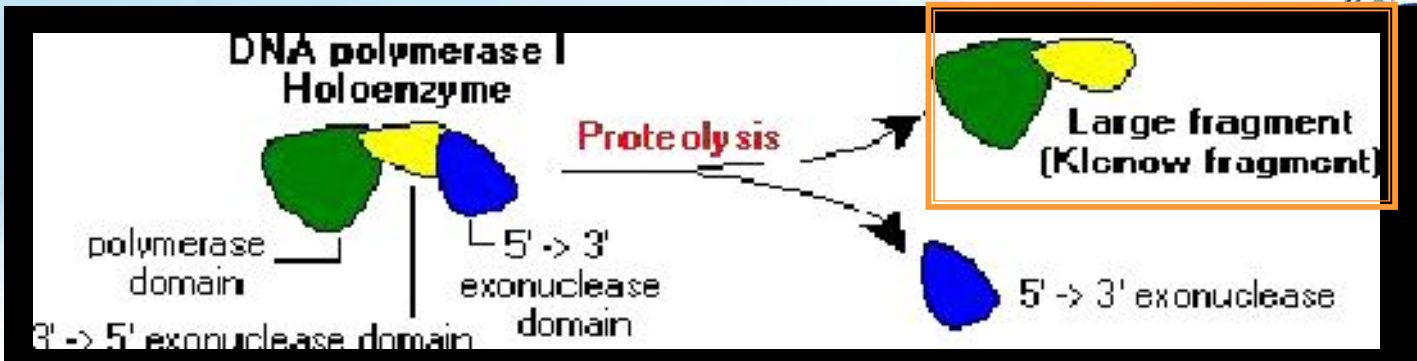
5' CCG**ATAGCT**3'

3' GGCTATCGA5'

2009年3月

T  
A  
TA

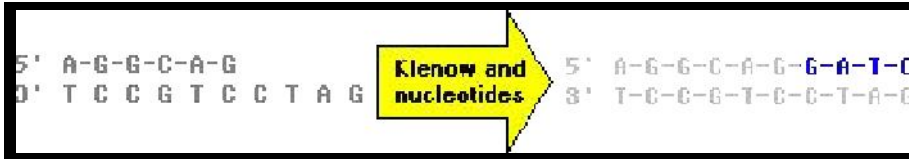
上海交通大学医学院



(2) Klenow片段

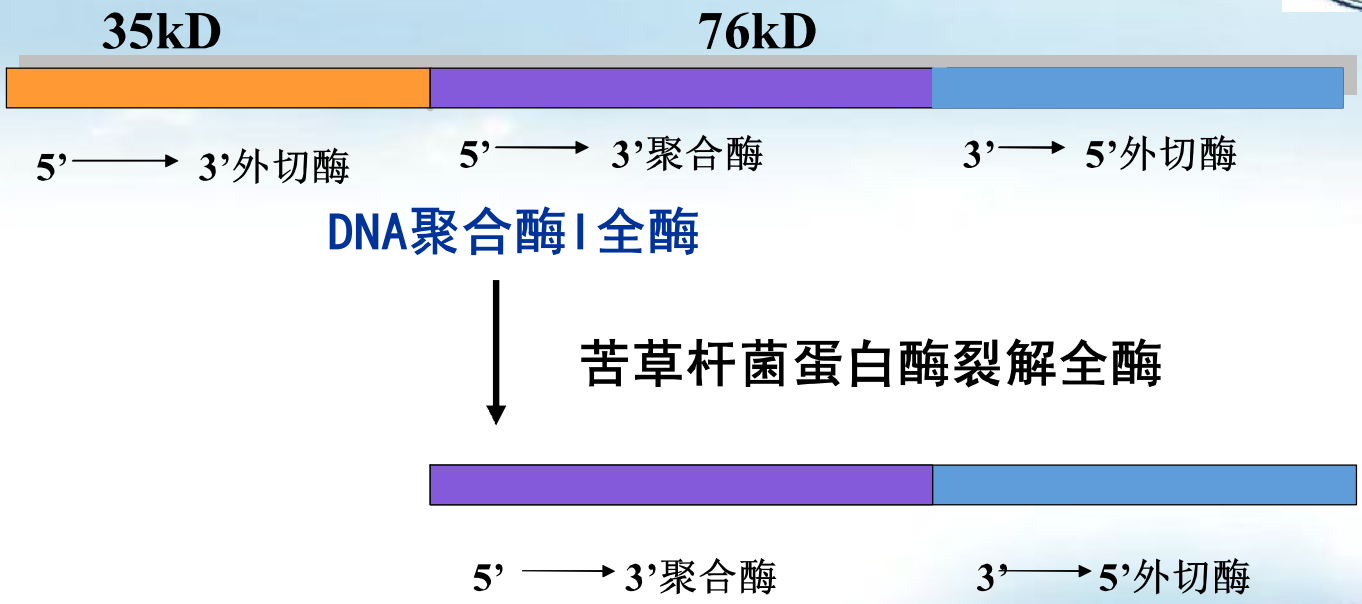
从大肠杆菌DNA聚合酶I中去除5'→3'外切酶活性，即得Klenow片段。其只具有 5'→3'聚合酶活性

3'→5'外切酶活性



2009年3月

上海交通大学医学院



## Klenow片段

2009年3月

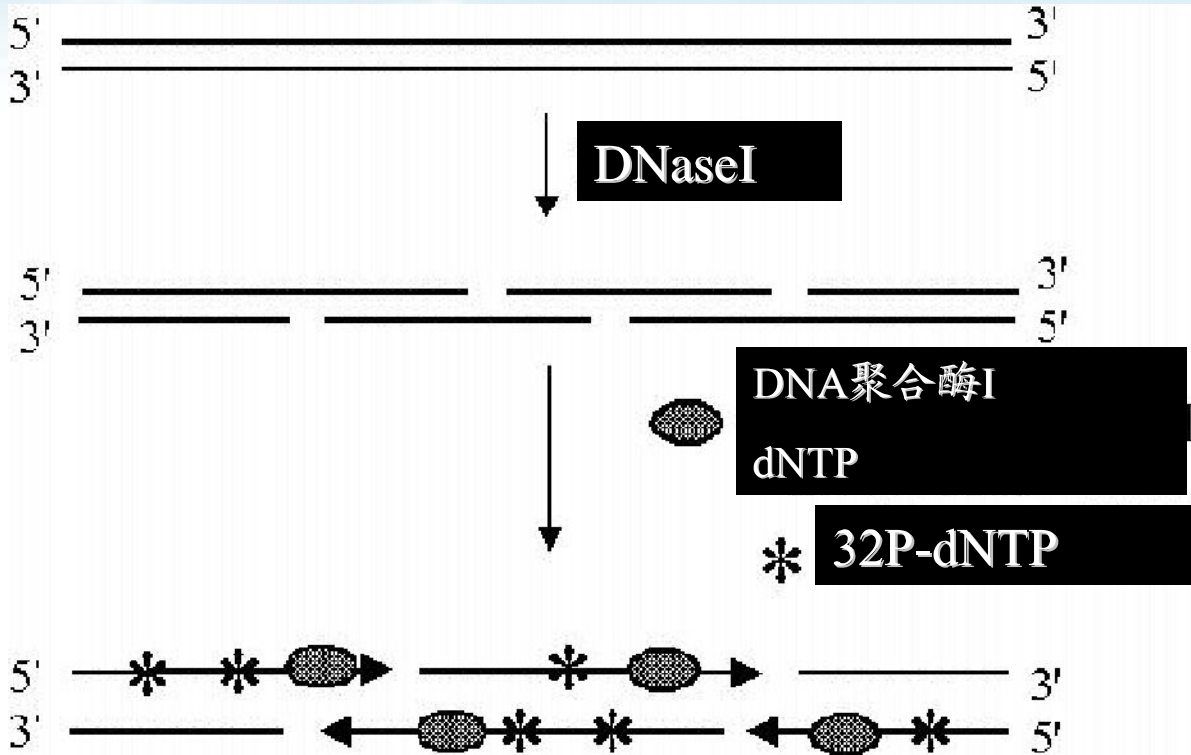
上海交通大学医学院



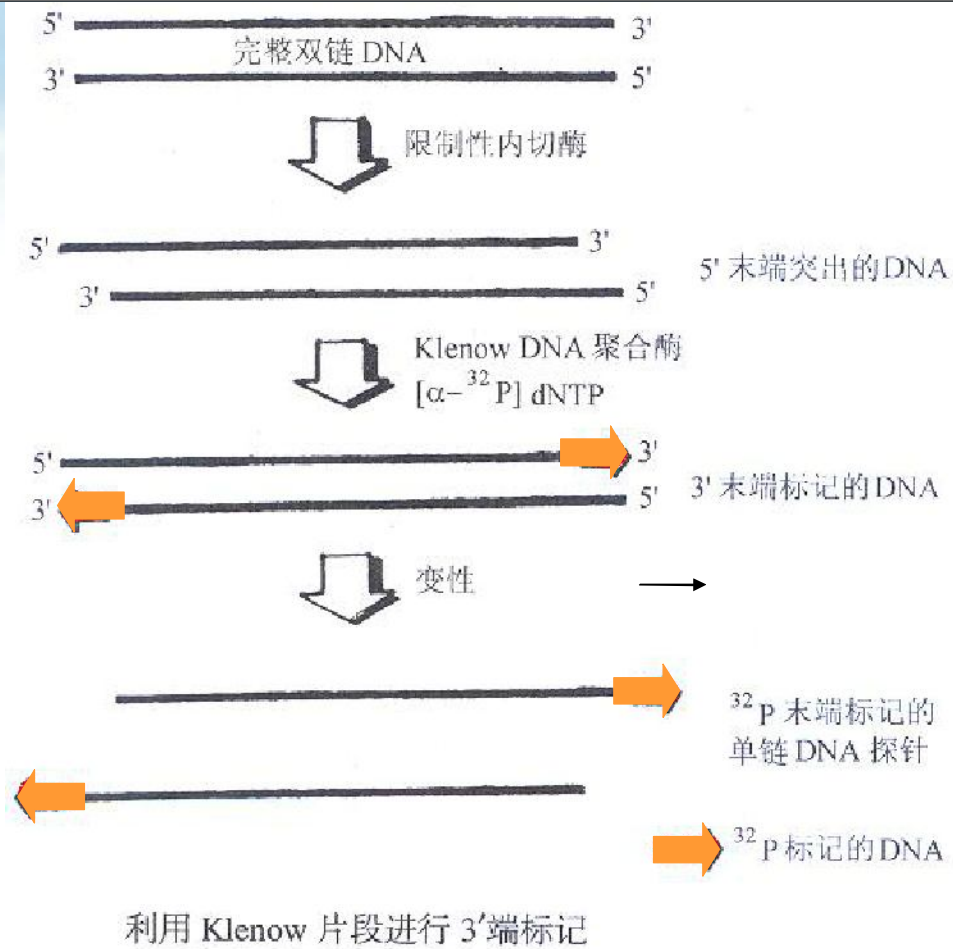


## 应用

1. 催化DNA切口平移反应，置备高比活DNA探针。（大肠杆菌DNA聚合酶I）



## 2. 对DNA分子进行末端标记 (Klenow)



2009

通大学医学院



## 2 . Taq DNA聚合酶

### (1) 特性:

#### ①耐热的DNA聚合酶

来自于嗜热的栖热水生菌*Thermus aquaticus*中纯化而来的。

#### ②5'→3'聚合酶活性

#### ③5'→3'外切酶活性

#### ④最佳作用温度为75-80°C

## (2) 用途

①通过PCR对DNA分子的特定序列进行体外扩增

②对DNA进行测序

2009年3月

上海交通大学医学院



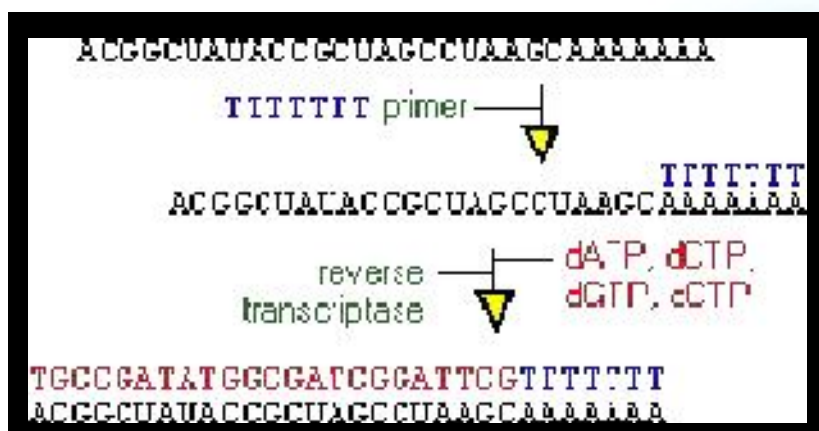


### 3. 反转录酶（依赖于RNA的DNA聚合酶，RDDP）

reverse transcriptase

#### （1）特性

- ①催化从RNA为模板的DNA聚合反应
- ②具3'→5'RNA外切酶活性，能特异性降解RNA— DNA杂交分子中的RNA部分
- ③具DNA指导的DNA聚合酶（DDDP）的功能
- ④能以mRNA为模板催化合成出互补的DNA（cDNA）



2009年3月

上海交通大学医学院





## (2) 分类

### ① 禽源反转录酶

来自禽或骨髓细胞瘤病毒 (AMV)

具有聚合酶活性及强的RNA酶H活性

无3'→5'外切酶活性。

温度42°C

pH8.6时活性较高



2009年3月

上海交通大学医学院



## ②鼠源反转录酶

来自Moloney鼠白血病病毒 (M-MLV)

具有聚合酶活性及相对较弱的RNA酶H活性 无3'→5'外切酶活性

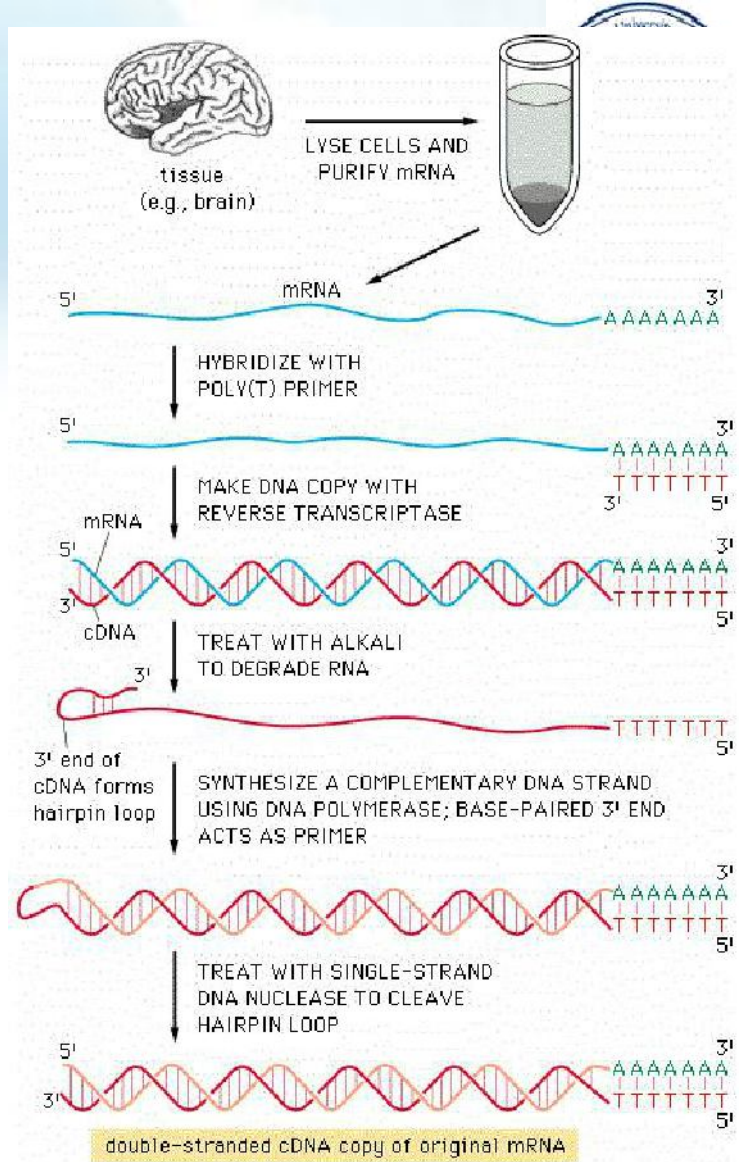
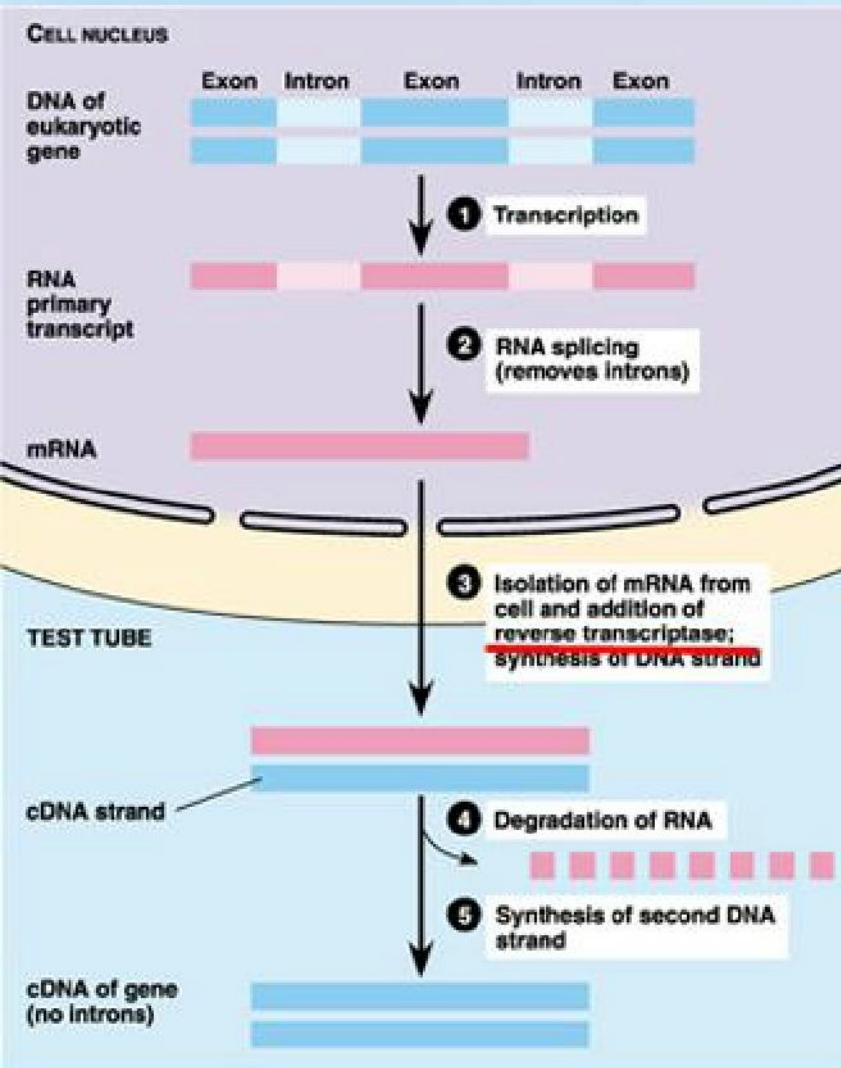
温度37°C

pH7.6时活性较高

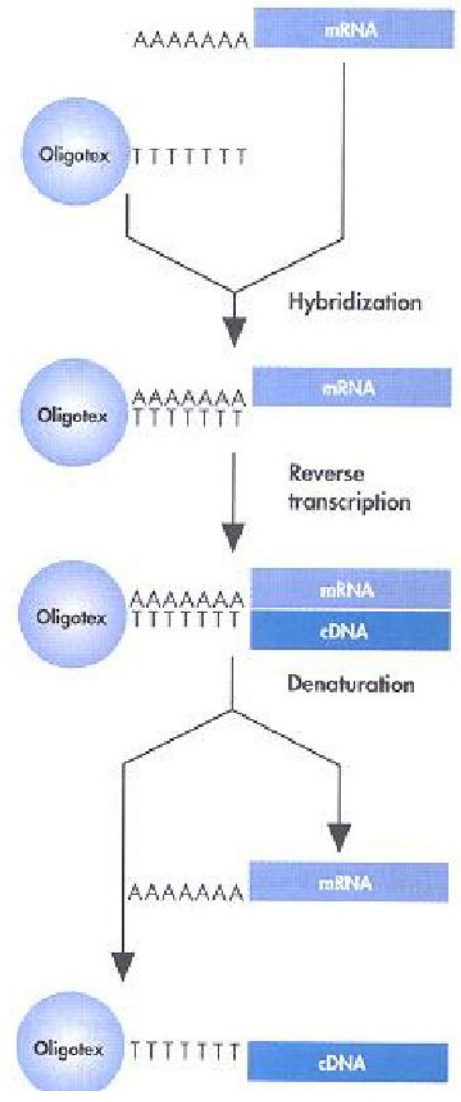
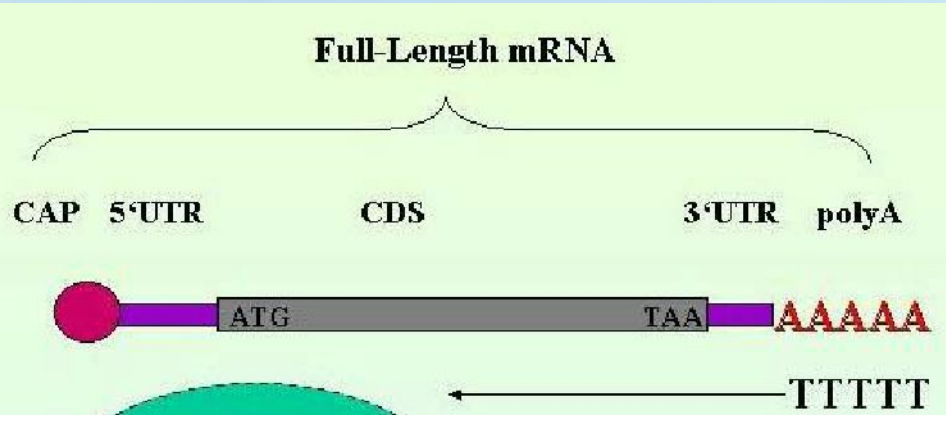


2009年3月

上海交通大学医学院



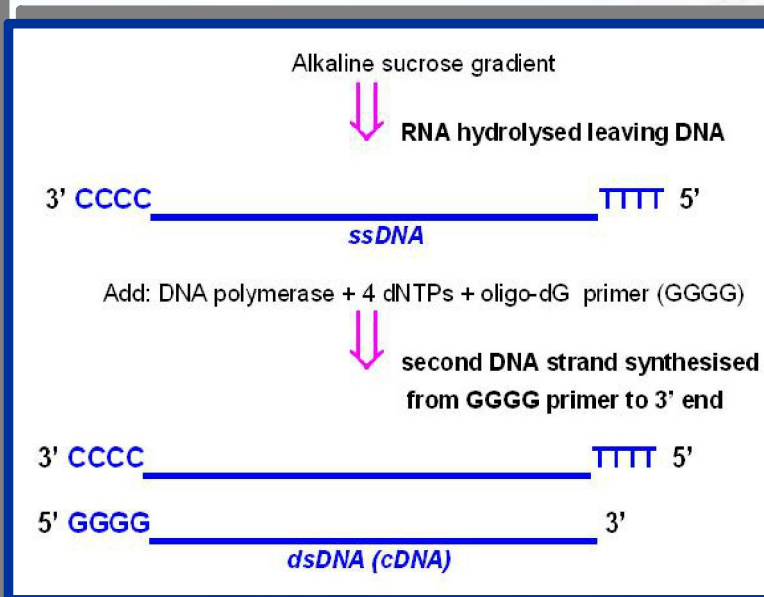
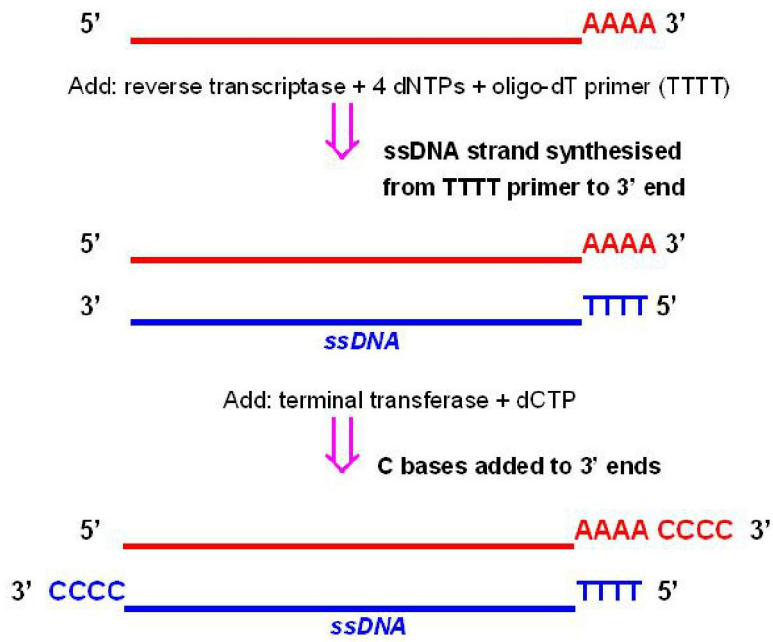
# cDNA Synthesis on Oligotex



2009年3月



#### 4. 末端脱氧核糖核酸转移酶（末端转移酶） 催化dNTP加到DNA分子的3'羟基端

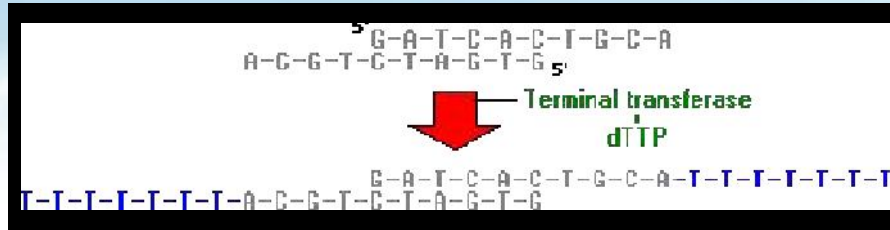


2009年3月

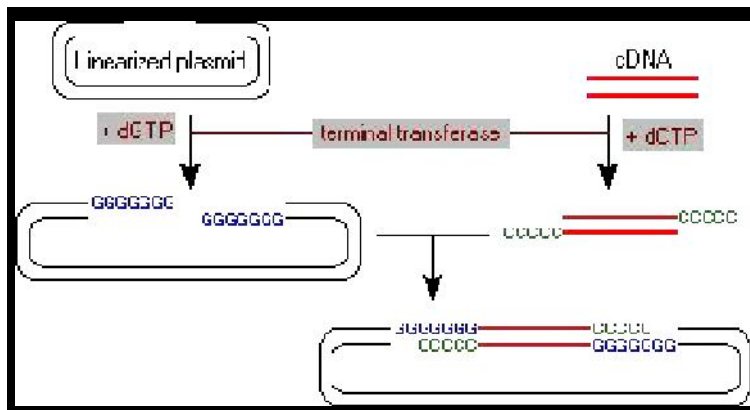
上海交通大学医学院



# 3'末端标记



# 添加多聚体尾



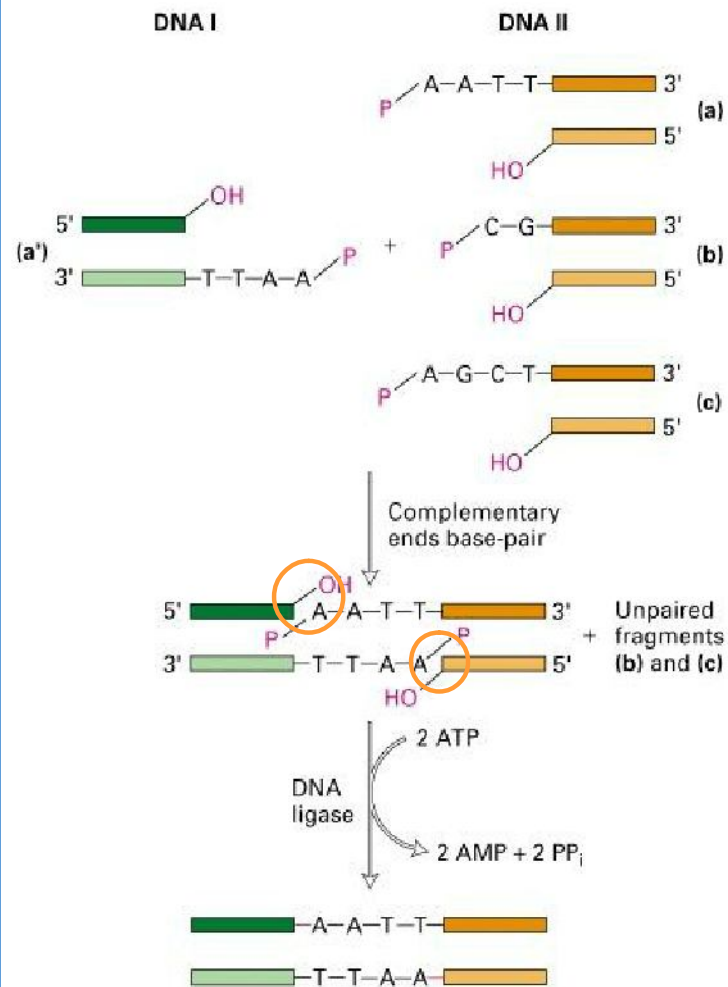
2009年3月

上海交通大学医学院

### 三、DNA连接酶

1. 定义: DNA Ligases are primarily responsible for joining the gaps that form in DNA during replication (i.e., the joining of Okazaki fragments formed by discontinuous or lagging strand replication), DNA repair, and recombination.

催化双链DNA一端的3'OH与另一双链DNA5'的磷酸根形成3',5'-磷酸二酯键, 使具有相同粘性末端或平末端的DNA末端连接起来。







❖ **注意：DNA连接酶只能作用于双链DNA分子而不能将二个单链DNA分子连接。**

❖ **DNA连接酶是重要的基因重组的工具酶**

**应用DNA连接酶将具有相同粘性末端或平端的DNA分子连接起来。**

2009年3月

上海交通大学医学院





## ❖ DNA连接酶的特点:

T4噬菌体DNA连接酶和大肠杆菌DNA连接酶

T4噬菌体DNA连接酶能连接带粘性末端或平末端  
的DNA分子

大肠杆菌DNA连接酶不能连接平末端DNA分子

DNA重组技术常用T4噬菌体DNA连接酶

2009年3月

上海交通大学医学院





T4噬菌体DNA连接酶连接带粘性末端DNA分子的效率远高于连接平末端的DNA分子

连接反应需要ATP、 $Mg^{2+}$ 和二硫苏糖醇，最适pH为7.2~7.4，

ATP为连接反应提供能量，二硫苏糖醇可提高连接效率



2009年3月

上海交通大学医学院



## 2. 分类:

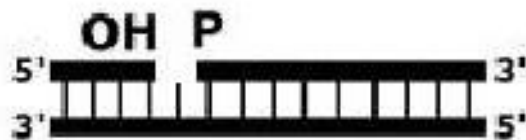
T<sub>4</sub>噬菌体DNA连接酶  
大肠杆菌DNA连接酶

## 3. 特点:

催化DNA 5'磷酸基与3'羟基之间（切口）  
形成磷酸二酯键。

切口 (nick): DNA分子糖-磷酸主键的破坏。

缺口 (gap): DNA分子中核苷酸缺失。

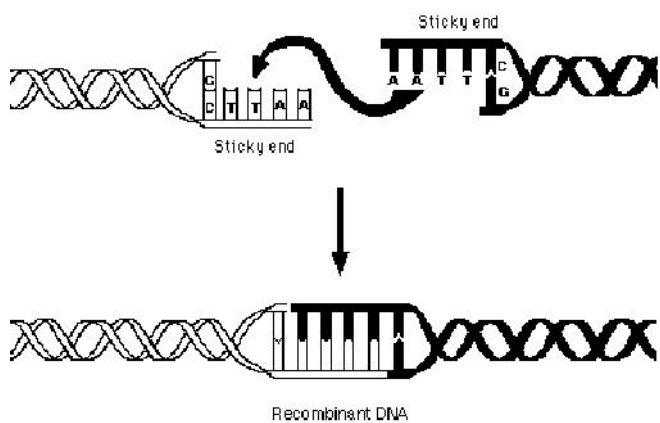


2009年3月

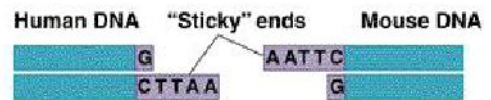
上海交通大学医学院

#### 4. 用途:

- ① 连接带匹配粘端的DNA分子。
- ② 使平端的双链DNA分子互相连接或与合成接头相连接。

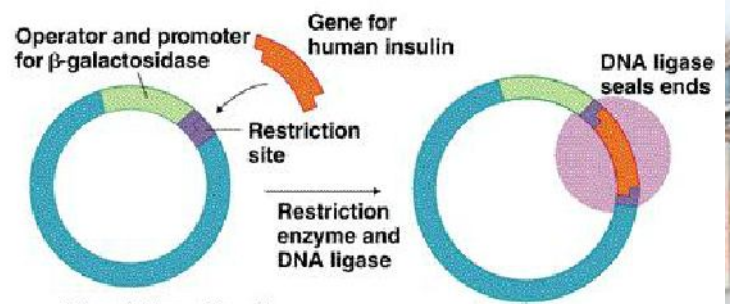


2009年3月



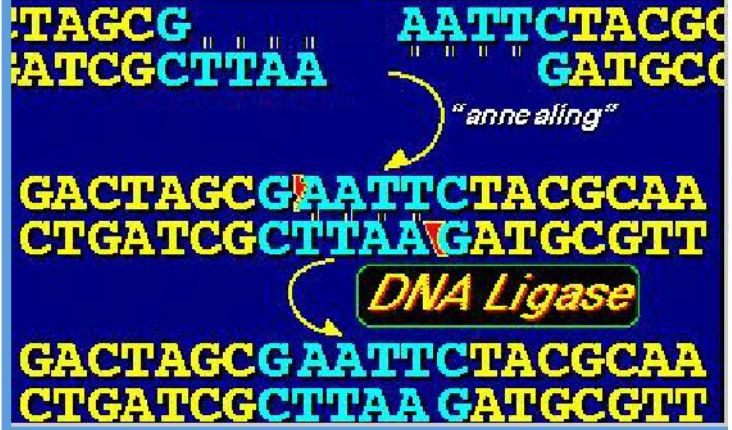
DNA ligase seals ends

A.



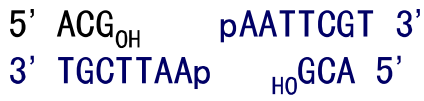
上海交通大学医学院

## DNA Ligase Repairs Breaks in the Sugar-Phosphate Backbone

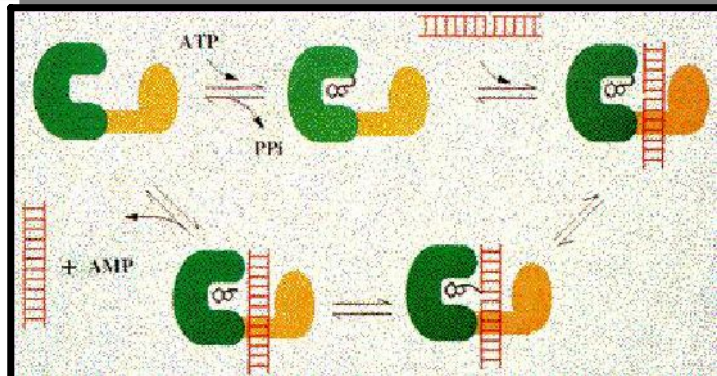


### 5. 反应例解:

(1) 互补粘端DNA  
(或切口间的连接)



ATP、Mg<sup>2+</sup>      T<sub>4</sub>连接酶



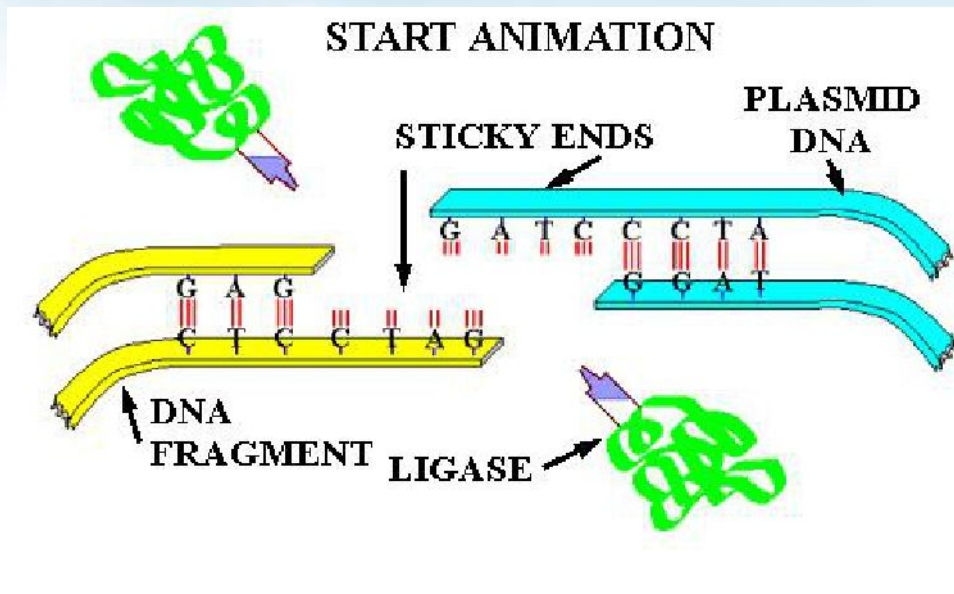
2009年3月

## (2) 平端连接



ATP、 $\text{Mg}^{2+}$  T<sub>4</sub>连接酶





2009年3月

上海交通大学医学院





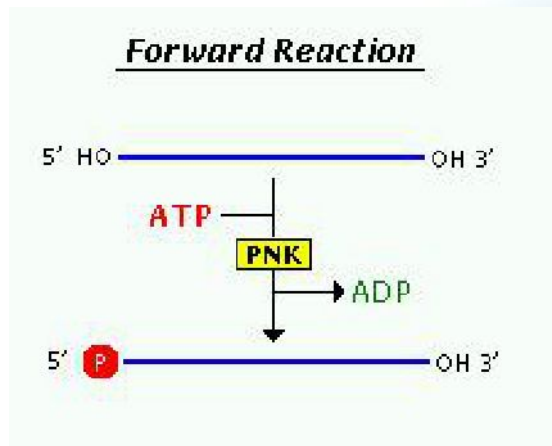
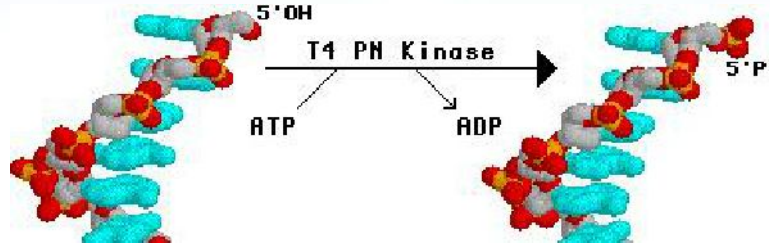
# 四、T<sub>4</sub>多核苷酸激酶T4 polynucleotide kinase (T4 PNK) 催化将ATP的γ-磷酸转移到DNA链的5'末端



## 1. 反应分类

### (1) 前向反应

将ATP的γ-磷酸转移到脱磷酸的DNA链的5'末端

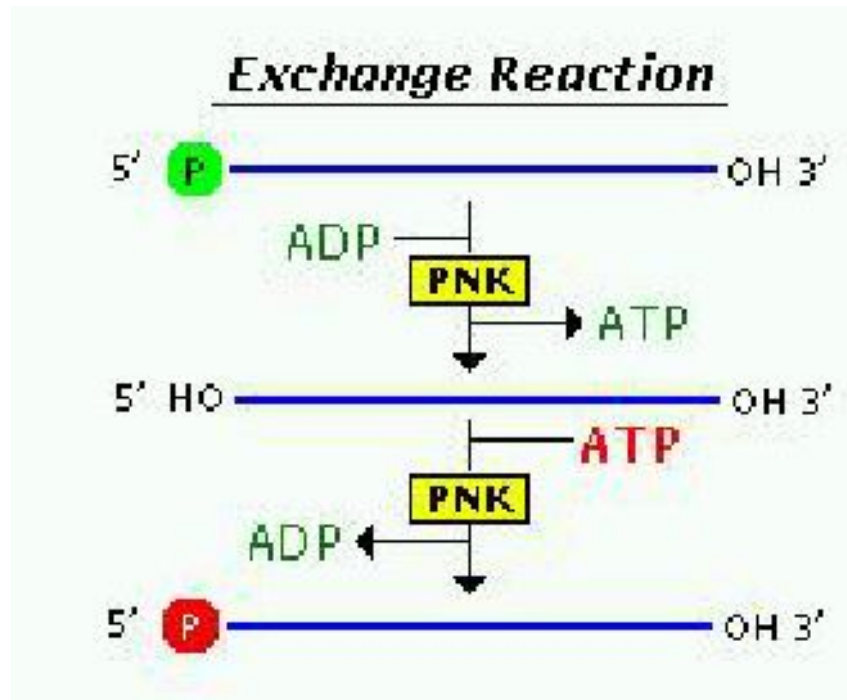


上海交通大学医学院

2009年3月

## (2) 交换反应

过量的ADP使T<sub>4</sub>多核苷酸激酶将5'-末端磷酸从磷酸化的DNA链中转移到ADP上生成ATP，然后再从[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]dATP上将标记的 $\gamma$ 磷酸转移到DNA链上，使其重新磷酸化。



2009年3月

大学医学院





## 用途

①标记DNA链的5'末端

②连接反应

2009年3月

上海交通大学医学院





## 五、碱性磷酸酶alkaline phosphatase (CIAP)

### 1. 特性:

催化去除DNA、RNA和dNTP的5'磷酸的反应。

### 2. 分类

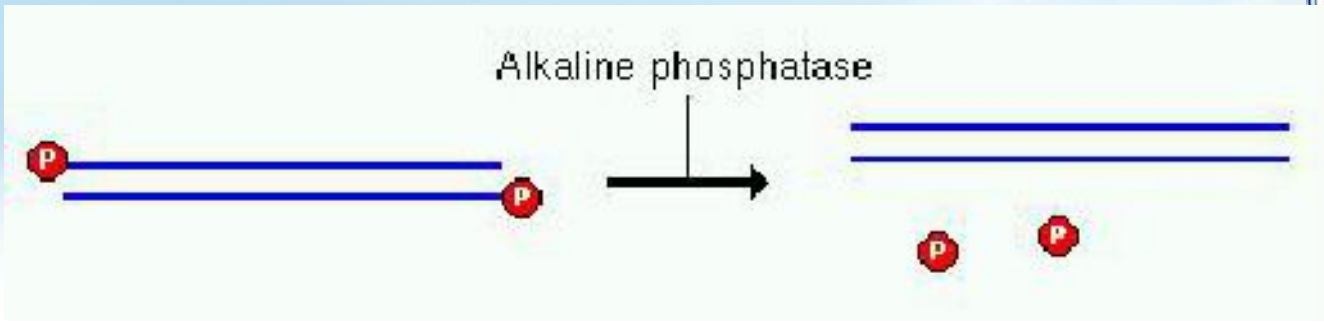
(1) 细菌碱性磷酸酶 (BAP)

(2) 牛小肠碱性磷酸酶 (CIP)

### 3. 用途

(1) 在用 $T_4$ 多核苷酸激酶和 $^{32}P$ 标记5'末端前，去除DNA或RNA的5'磷酸。

(2) 去除DNA片段5'磷酸以防止自身环化。



CIAP is most commonly used to remove 5-phosphates from vector DNA to prevent selfligation during cloning



2009年3月

上海交通大学医学院



AAGCTT

TTCGAA

pAGCTT



A

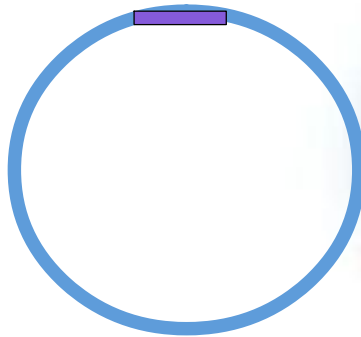
AAGCTT

TTCGAA

A

TTCGAAp

AGCTT  
TCGAA



2009年3月

上海交通大学医学院





AAGCTT

TTCGAA

AGCTT

A

AAGCTT

TTCGAA

A

TTCGA

CIP

不能形成环化



2009年3月

上海交通大学医学院



## 第二节 常用载体

- »» 一、质粒载体
- »» 二、噬菌体载体
- »» 三、穿梭载体
- »» 四、人工染色体

2009年3月

上海交通大学医学院







1. 质粒载体是应用最广的载体
2. 质粒载体大多是在天然松弛型质粒的基础上经人工改造拼接而成
3. 这类质粒在宿主蛋白质合成及染色体复制停止后尚能继续复制。质粒扩增时，通过加入氯霉素抑制大肠杆菌蛋白质合成，达到进一步提高质粒拷贝数的目的

2009年3月

上海交通大学医学院



# 一、质粒载体

理想质粒载体应具备特点

## 1. 松弛型复制子 (如ColE1)

复制子 (replicon) 是质粒自我增殖所必需

## 2. 几个单一的酶切位点 (或多克隆位点)

以便目的DNA片段插入



2009年3月

上海交通大学医学院



# 一、质粒载体

## 3. 插入失活的筛选标记

- 一般应具有两种抗菌素抗性标志
- 如氨苄青霉素抗性基因 ( $Amp^r$ ) 和四环素抗性基因 ( $Tet^r$ ) 等

## 4. 分子量相对较小和较高的拷贝数

## 5. 缺点：容量较小，一般只能接受小于15kb的DNA



2009年3月

上海交通大学医学院



# 一、质粒载体(plasmid vector)

(一) pBR322质粒载体

(二) pUC质粒载体系列

2009年3月



上海交通大学医学院



# 一、质粒载体

## (一) pBR322质粒载体

pBR322载体是最早被广泛应用克隆的载体之一，至今尚在使用。

pBR322载体的组成

- 源于ColE1的派生质粒pMB1的复制起始位点 (ori)
- 来源于pSF2124质粒易位子Tn3的Amp<sup>r</sup>
- 来源于pSC101质粒的Tet<sup>r</sup>



2009年3月

上海交通大学医学院



# 一、质粒载体

## pBR322质粒载体和特点

1. 带有一个复制起始点 (ori)
2. 抗生素抗性基因 ( $Amp^r$ 和 $Tet^r$ ) 作选择标记
3. 数个单一的限制性酶切位点

当外源基因插入这些抗性位点时，就分别成为Amp敏感 (Amps) 或 Tet敏感 (Tets)，即插入失活



2009年3月

上海交通大学医学院



# 一、质粒载体

## 4. 较小的分子量

易于自身DNA的纯化，而且能有效地克隆6kb大小的外源DNA片段。

## 5. 较高的拷贝数

经氯霉素扩增后，每个细胞达1000~3000个拷贝。

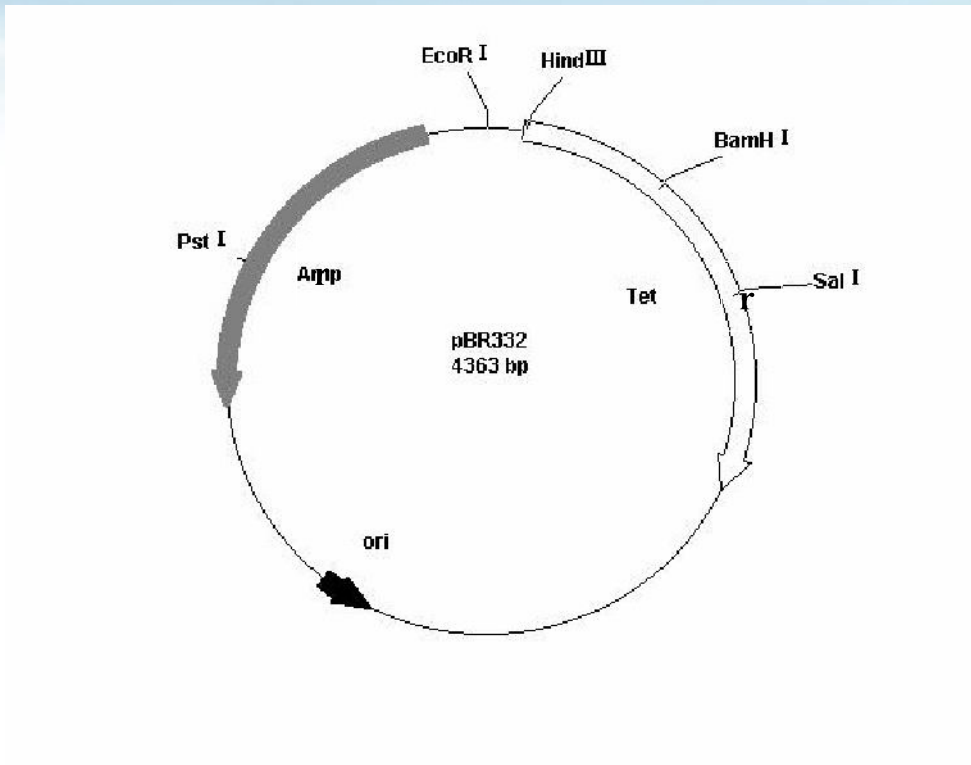


2009年3月

上海交通大学医学院



# 一、质粒载体



pBR332质粒结构示意图

2009年3月

上海交通大学医学院







# 一、质粒载体

## (二) pUC质粒载体系列

❖ 在pBR322基础上改建而成



2009年3月

上海交通大学医学院



## 典型的pUC质粒载体有4个组成部分

- 来自pBR322 质粒的复制起始点
- Amp<sup>r</sup> 基因
- 大肠杆菌  $\beta$ -半乳糖苷酶基因 (LacZ) 的启动子及其编码  $\alpha$ -肽链的DNA序列, 称为LacZ' 基因
- 位于LacZ' 基因中靠近5' -端的一段多克隆位点区段, 但并未破坏该基因的功能



2009年3月

上海交通大学医学院



# 一、质粒载体

## pUC系列的优越性

最通用的大肠杆菌克隆载体之一

### 优点

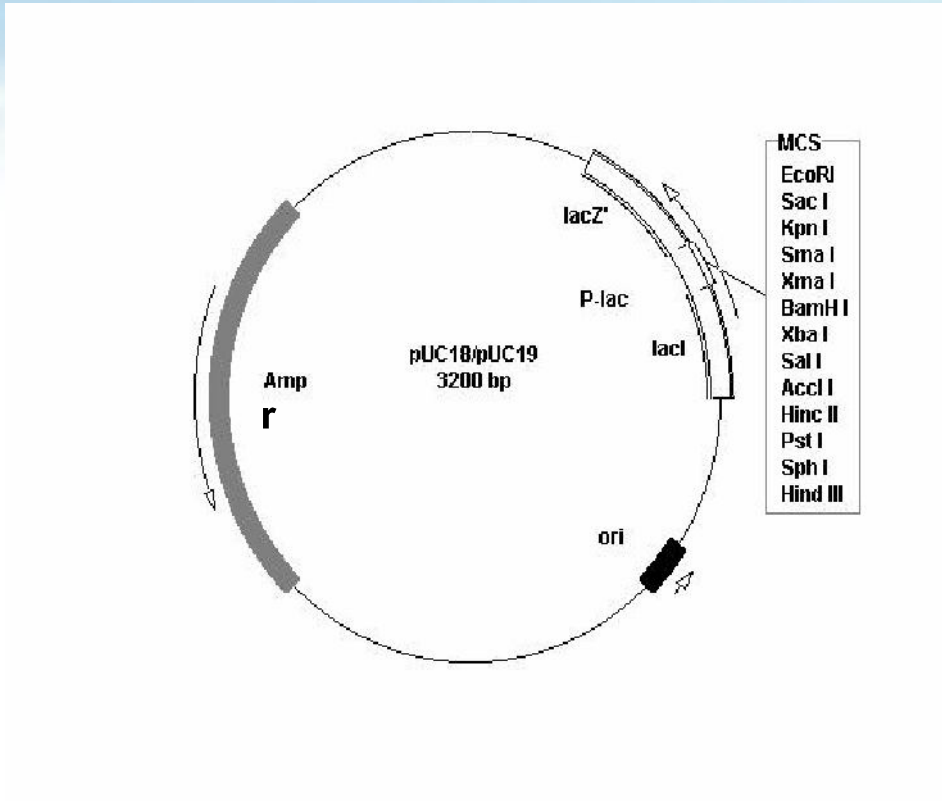
- 具有更小的分子量和更高的拷贝数
- 构建pUC系列时仅保留了pBR322的复制子和Amp<sup>r</sup>
- 具有来自大肠杆菌LacZ操纵子的LacZ' 基因，适应于组织化学筛选重组体



2009年3月

上海交通大学医学院

# 一、质粒载体



pUC18/pUC19质粒载体结构

2009年3月

上海交通大学医学院



## 二、噬菌体载体(phage vector)

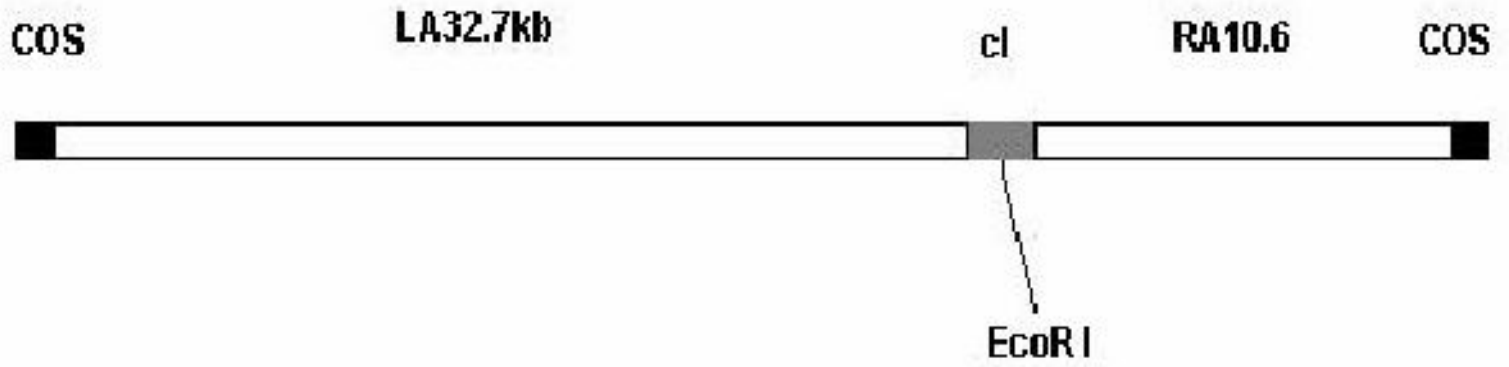
- ❖  $\lambda$  噬菌体载体
- ❖ 粘粒载体称柯斯质粒 (cosmid)
- ❖ 单链丝状噬菌体载体



2009年3月

上海交通大学医学院

$\lambda_{gt10}$



$\lambda_{gt10}$  (插入型) 结构

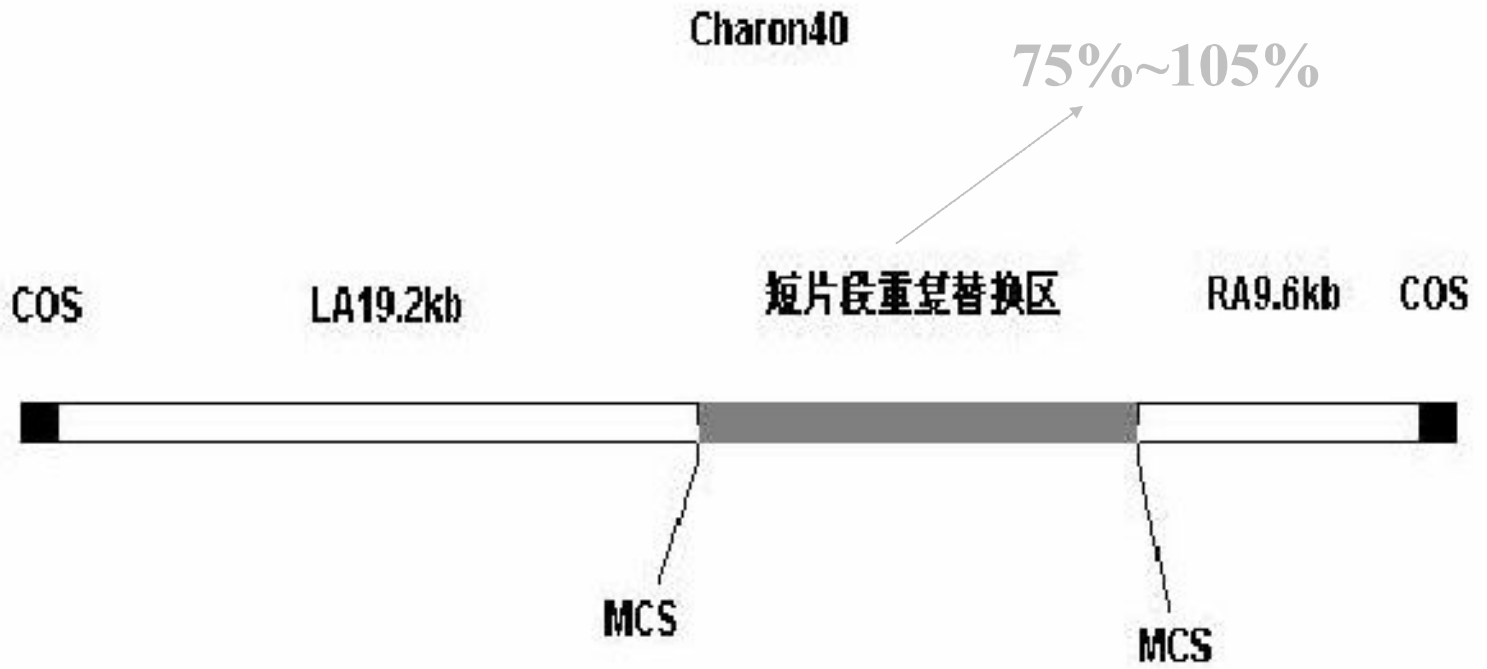


2009年3月

上海交通大学医学院



## 二、噬菌体载体



Charon 40（替换型）结构

2009年3月

上海交通大学医学院



❖ **COS位点:**  $\gamma$ 噬菌体两端存在**12bp**的互补序列.

❖  $\gamma$ 噬菌体载体可以存在两种生长方式:

**溶菌性生长:**  $\gamma$ 噬菌体感染宿主后环化成并大量复制装配成 $\gamma$ 噬菌体颗粒,最终导致宿主裂解.

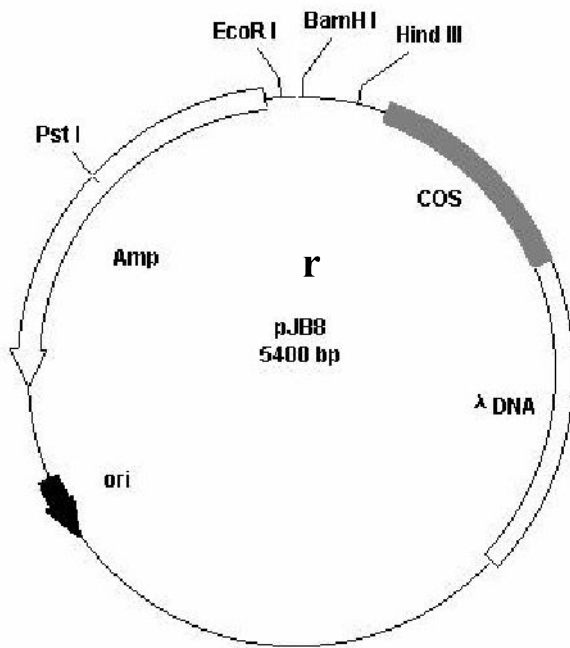
**溶源性生长:**  $\gamma$ DNA整合到宿主染色体基因组中,复制遗传给子代,宿主细胞不破坏.



2009年3月

上海交通大学医学院





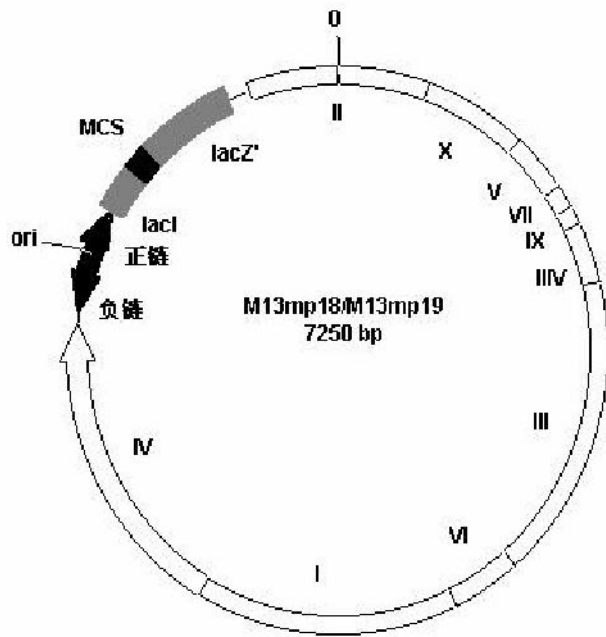
粘粒载体pJB8结构

2009年3月

粘粒载体组成:  
质粒+  $\lambda$  噬菌体  
连接位点:通过COS  
位点形成



上海交通大学医学院



M13mp18/M13mp19 结构

2009年3月

典型丝状噬菌体:

M13噬菌体

主要特点:单链闭环DNA分子

主要优点:可以获得和分离大量单链形式的DNA分子



上海交通大学医学院



- ❖ 带有原核和真核细胞的复制起始点
- ❖ 常将真核生物的克隆载体构建成交叉载体，使其先在大肠杆菌中扩增，将目的基因与之构成合适的重组体后，再转入真核细胞
- ❖ 若加上适当的真核启动子等元件，则成为真核表达载体，能在真核细胞中表达插入载体中的外源基因



2009年3月

上海交通大学医学院



### 三、穿梭载体 (shuttle vector)

真核系统载体还必需具备适当的筛选标记

- 一种筛选标记是，使用遗传缺陷型细胞株与载体的基因产物互补（如TK基因产物）。
- 另一种普遍使用的是抗新霉素基因。因此，真核克隆载体的构成一般由来自噬菌体、质粒和病毒的DNA元件构建而成。

2009年3月

上海交通大学医学院





## 三、穿梭载体 (shuttle vector)

➤ (一) SV40 (猿猴病毒) 载体

➤ (二) 逆转录病毒载体



2009年3月

上海交通大学医学院



### 三、穿梭载体 (shuttle vector)

#### (一) SV40 (猿猴病毒) 载体

真核表达载体中的调控元件大都来源于SV40的调控顺序和复制信号

用SV40作为载体有两种方式

- 用SV40 DNA与外源DNA构建重组子，转染细胞后允许细胞形成含外源DNA的病毒颗粒；
- 重组子不包装成病毒颗粒，而象质粒一样在细胞中复制或整合到染色体组中。



2009年3月

上海交通大学医学院

### 三、穿梭载体 (shuttle vector)



例：PSVK3质粒

- ❖ PSVK3是一类广泛适用于哺乳动物细胞系表达外源基因的穿梭载体。



2009年3月

上海交通大学医学院



PSVK3具有下列构件：

- 原核系统构件：①复制子和丝状噬菌体复制起始位点 $f1$ ；②筛选标志（ $Amp^r$ ）；③启动子（T7启动子）。
- 真核系统构件：① SV40复制起始点；②SV40早期启动子
- RNA修饰信号：①SV40小T抗原拼接信号；②SV40早期区mRNA polyA加尾信号。
- 多克隆位点：SV40启动子下游有8个酶切位点。

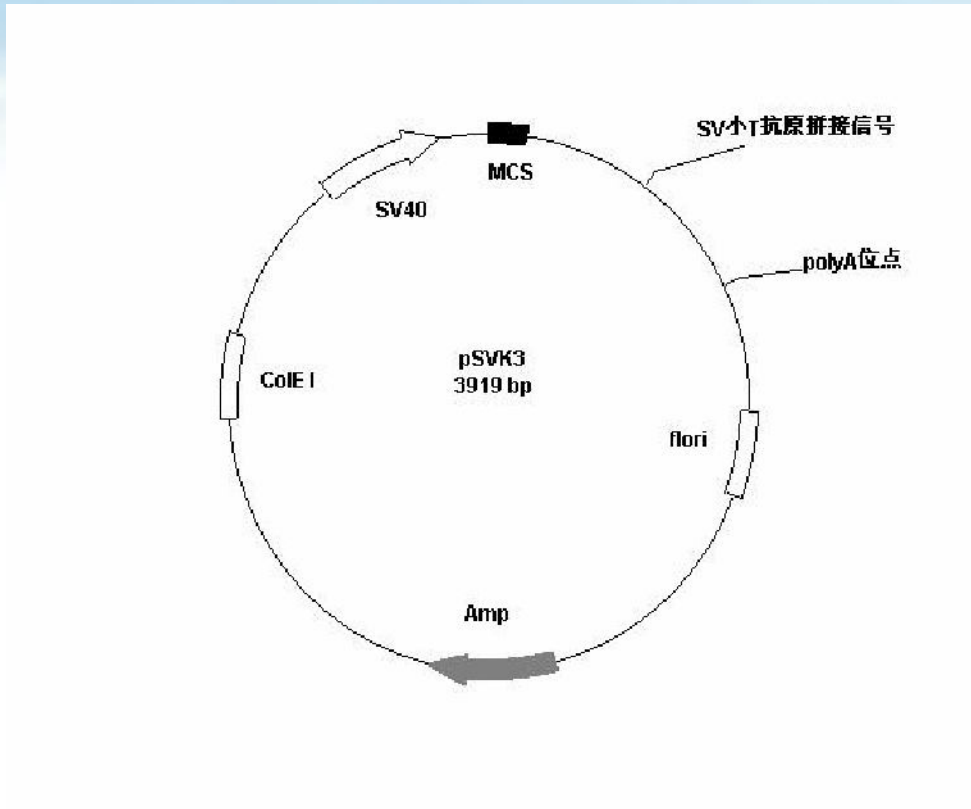
2009年3月

上海交通大学医学院





### 三、穿梭载体 (shuttle vector)



pSVK3质粒

2009年3月

上海交通大学医学院





## 三、穿梭载体 (shuttle vector)

### (二) 逆转录病毒载体

逆转录病毒载体具有几个特点

- 具有广泛的哺乳动物细胞宿主
- 较大的容量，能插入7kb大小甚至更大的外源基因



2009年3月

上海交通大学医学院



- 病毒基因组自身含有完整高效的调控元件
- 病毒可通过主动感染方式进入宿主细胞，并能有效地整合到宿主染色体基因组中，与染色体一起复制、长期存在
- 逆转录病毒作为载体需要相应的外包装，以形成完整的体系



2009年3月

上海交通大学医学院



### 三、穿梭载体 (shuttle vector)

#### 逆转录病毒载体的局限性:

- 逆转录病毒载体进入细胞依赖于细胞表面的受体，并且只能感染并整合到分裂增殖期的细胞；
- 装载容量较小，仅8kb左右，不适用于较大的基因；
- 安性问题，最大的危险是制剂过程中可能存在具有复制能力的野生型病毒



2009年3月

上海交通大学医学院



- 常用外源DNA片段取代病毒中的癌基因，即卸去其致癌性，称为卸甲载体（disarmed vector）。

2009年3月

上海交通大学医学院





## 四、人工染色体 (artificial chromosome)

- ❖ 酵母人工染色体 (YAC)
- ❖ 细菌人工染色体 (BAC)
- ❖ 噬菌体P1衍生的人工染色体 (PAC)
- ❖ 哺乳动物人工染色体 (MAC)

2009年3月

上海交通大学医学院





## 四、人工染色体

### YAC主要调控元件

- ❖ 着丝粒 保证染色体细胞分裂过程中正确分配到子代细胞
- ❖ 端粒 防止染色体被核酸外切酶降解的功能
- ❖ 复制起始点和限制性酶切位点

2009年3月

上海交通大学医学院





- ❖ 筛选标记 YAC载体的两臂均带有选择标记，在酵母中选择标记一般为色氨酸、亮氨酸、组氨酸或尿嘧啶的合成基因产物插入失活而进行筛选
- ❖ 原核序列及调控元件 包括大肠杆菌复制起始点、Amp<sup>r</sup>基因等，以便于在大肠杆菌中操作

2009年3月

上海交通大学医学院







## 四、人工染色体

### YAC作为载体的主要特点

- ❖ 酵母是单细胞真核生物，培养方便；
- ❖ 酵母的真核细胞转录系统，有利于表达真核生物基因；
- ❖ 装载容量巨大，可达Mbp水平；



2009年3月

上海交通大学医学院



- ❖ YAC的克隆程序类似于基因组DNA的常规克隆；DNA在片段连接到YAC载体的（两）臂上形成重组体，随后该重组体可通过常规方法导入酵母；
- ❖ 已广泛应用于各种生物基因组计划。



2009年3月

上海交通大学医学院