第二十一章

DNA重组和重组DNA技DNA

Recombination and Recombinant DNA technology

- DNA重组（DNA recombination）是指不同DNA分子断裂和连接而产生DNA片段的交换并重新组合形成新DNA分子的过程。
- 重组DNA技术（recombinant DNA technology）是指在体外将两个或两个以上DNA分子重新组合并在适当细胞中增殖形成新DNA分子的过程。

第一节

自然界DNA重组和基因转移

DNA Recombination

and Gene Transfer in Nature

DNA重组

同源重组 (homologous recombination)

位点特异的重组(site-specific recombination)

转座重组(transposition recombination)

接合作用 (conjugation)

转化作用 (transformation)

转导作用 (transduction)

一、同源重组是最基本的DNA重组方式

- 发生在同源序列间的重组称为同源重组(homologous recombination)，又称基本重组（general recombination）。是最基本的DNA重组方式，通过链的断裂和再连接，在两个DNA分子同源序列间进行单链或双链片段的交换。
- 以E.coli的同源重组为例，了解同源重组机制的Holliday模型

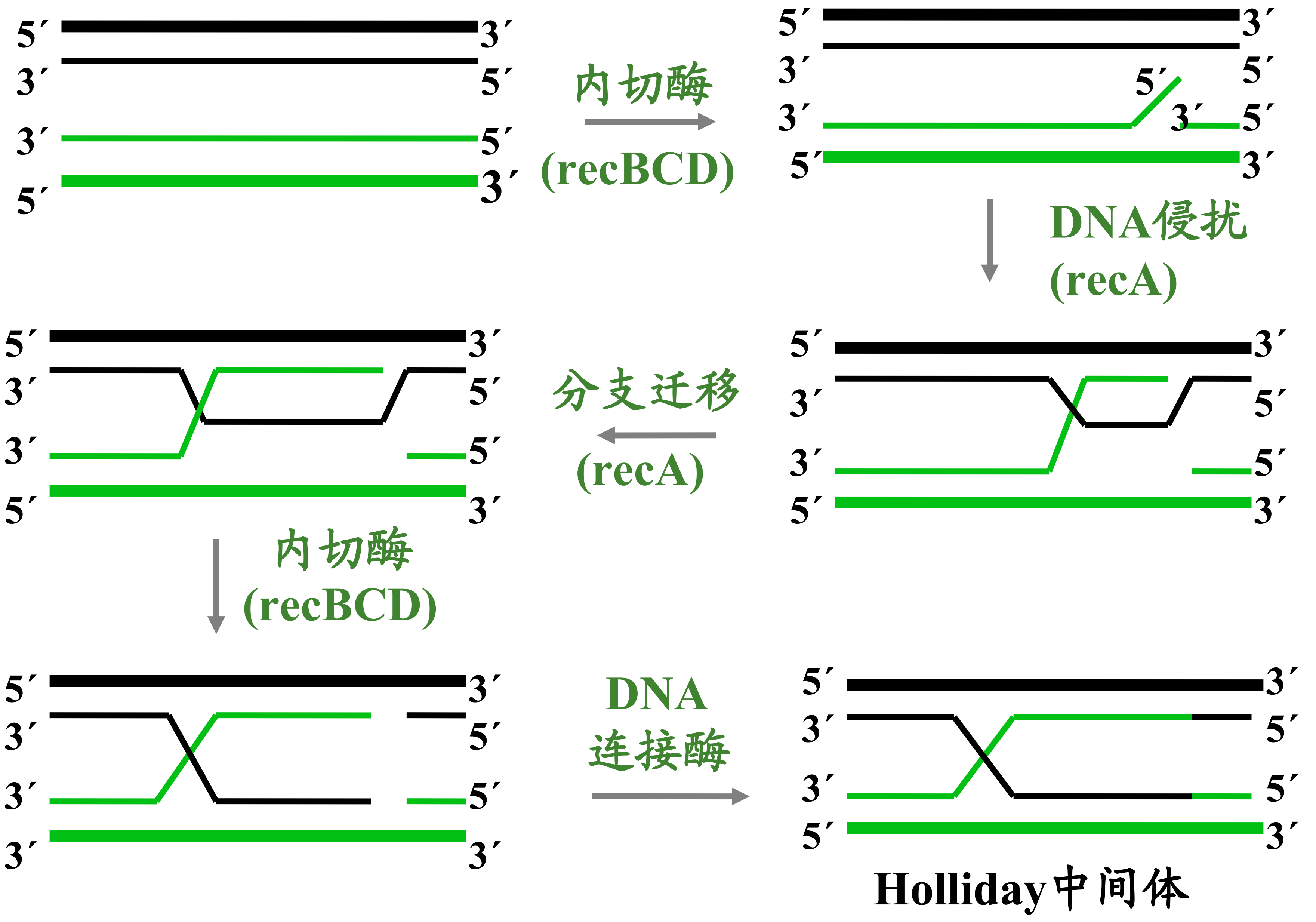
- Holliday模型的4个关键步骤：
  - 两个同源染色体DNA排列整齐；
  - 一个DNA的一条链断裂、并与另一个DNA对应的链连接，形成Holliday中间体；
  - 通过分支移动产生异源双链DNA；
  - Holliday中间体切开并修复，形成两个双链重组体DNA，分别为：
    - 片段重组体(patch recombinant)
    - 拼接重组体(splice recombinant)

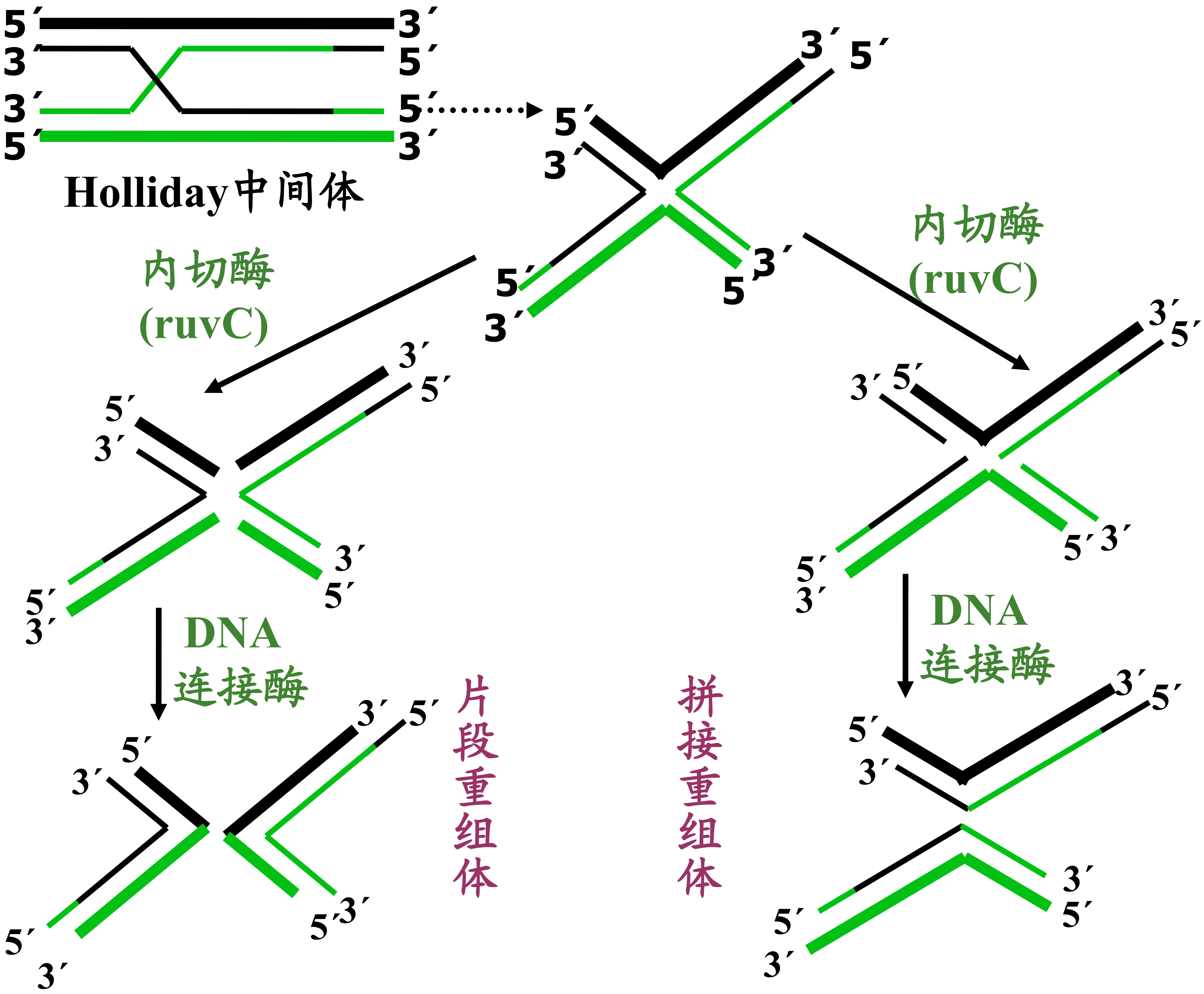
- 片段重组体（见模型图左边产物）：

  切开的链与原来断裂的是同一条链，重组体含有一段异源双链区，其两侧来自同一亲本DNA。

- 拼接重组体（见模型图右边产物）：

  切开的链并非原来断裂的链，重组体异源双链区的两侧来自不同亲本DNA。


5′
3′
3′
5′
3′
5′
5′
3′
内切酶
(recBCD)
5′
3′
3′
5′
5′
3′
3′
5′
5′
3′
DNA侵扰
(recA)
5′
3′
3′
5′
3′
5′
5′
3′
分支迁移
(recA)
5′
3′
3′
5′
5′
3′
内切酶
(recBCD)
5′
3′
3′
5′
3′
5′
3′
3′
DNA
连接酶
5′
3′
3′
5′
3′
5′
5′
3′
Holliday中间体


Holliday中间体
内切酶
(ruvC)
内切酶
(ruvC)
DNA
连接酶
DNA
连接酶
片段重组体
拼接重组体

二、位点特异重组是发生在特异位点间的DNA整合

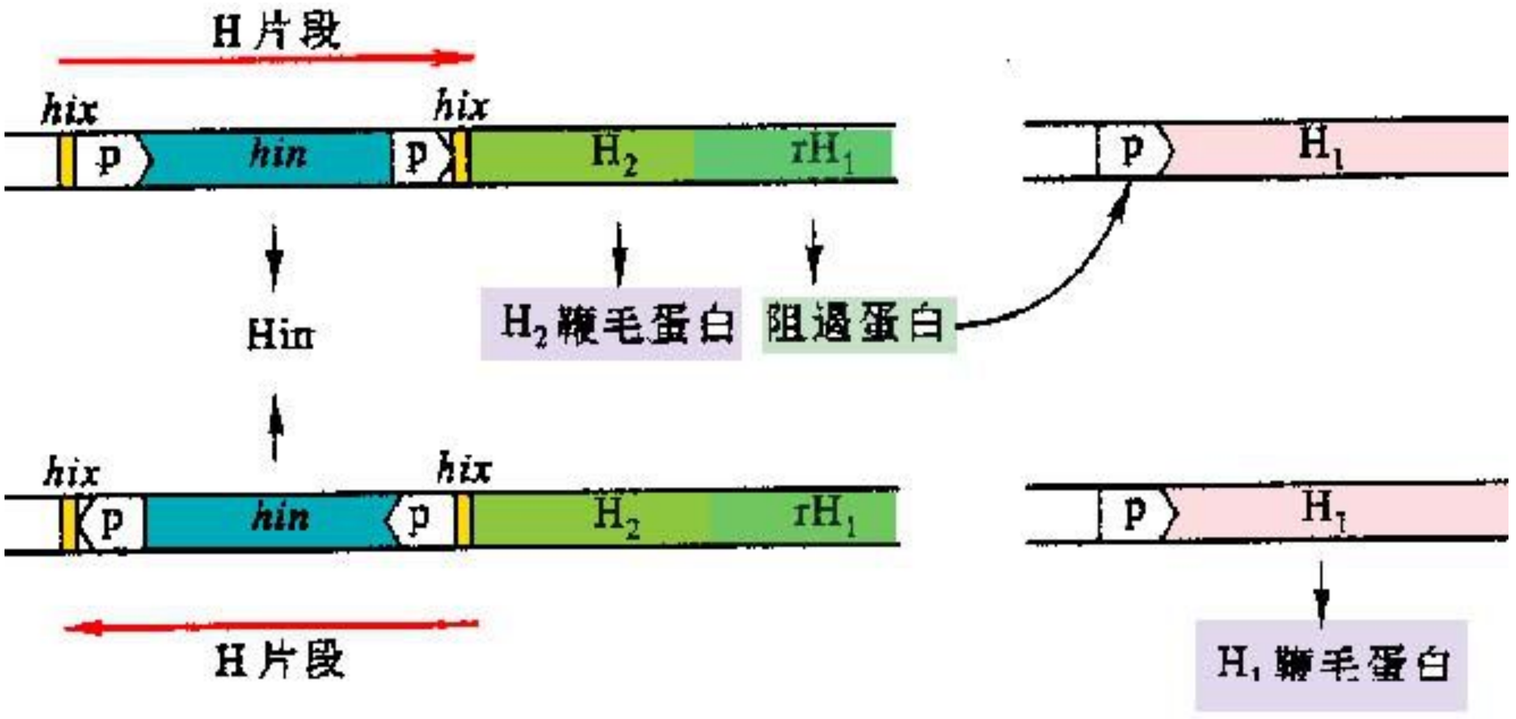
- 位点特异重组(site-specific recombination)是由整合酶催化，在两个DNA序列的特异位点间发生的整合。

（一）λ噬菌体DNA的整合

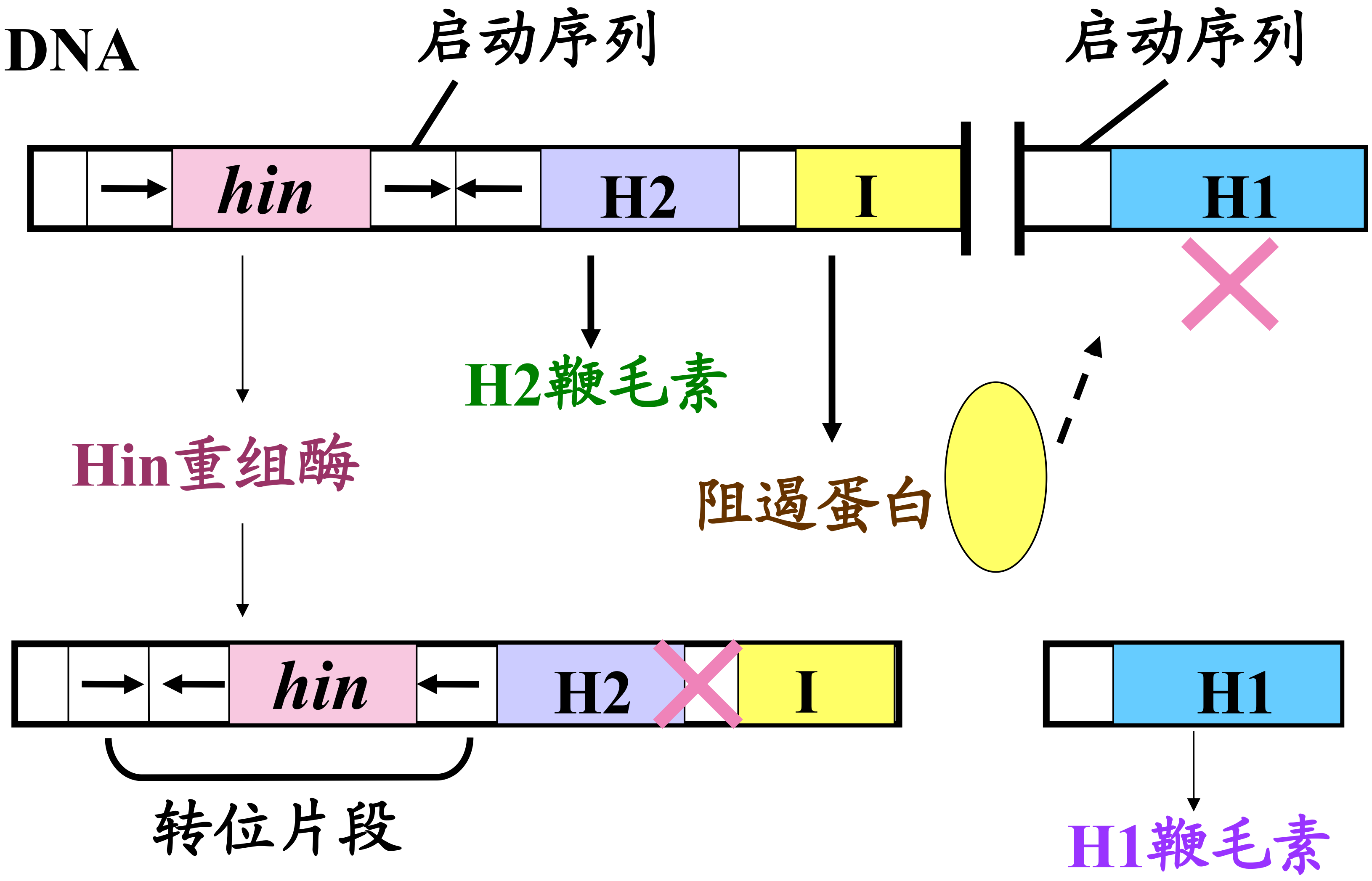
λ噬菌体的整合酶识别噬菌体和宿主染色体的特异靶位点发生选择性整合；反转录病毒整合酶可特异地识别、整合反转录病毒cDNA的长末端重复序列(long terminal repeat, LTR)。

（二）细菌的特异位点重组

沙门氏菌H片段倒位决定鞭毛相转变。



沙门氏菌H片段倒位决定鞭毛相转变



（三）免疫球蛋白基因的重排

- 免疫球蛋白(Ig)，由两条轻链(L链)和两条重链(H链)组成，分别由三个独立的基因族编码，其中两个编码轻链(κ和λ)，一个编码重链。

轻链的基因片段:

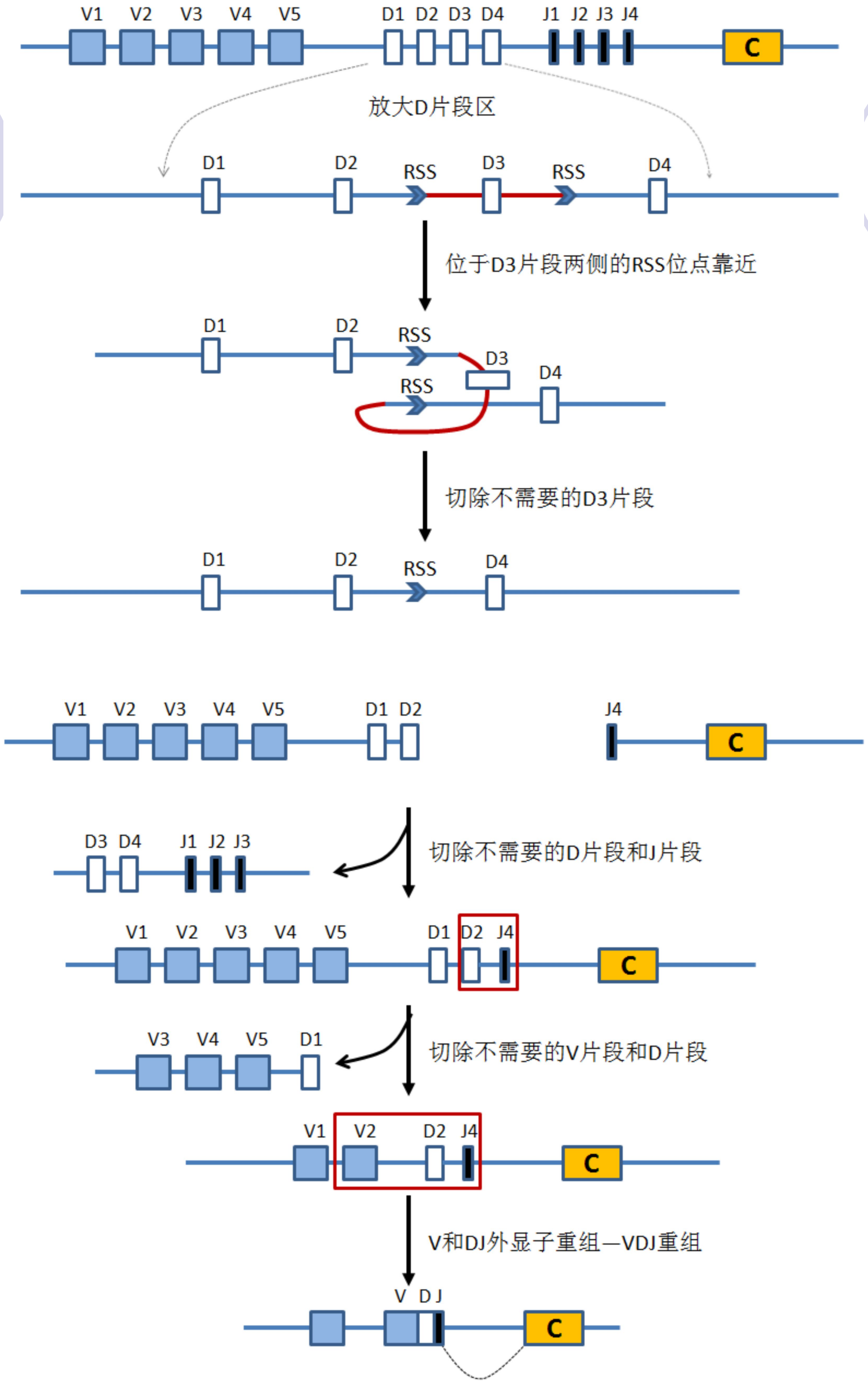
L	V	J	C

重链的基因片段:

L	V	D	J	C

- 重链(IgH)基因的V-D-J重排和轻链(IgL)基因的V-J重排均发生在特异位点上。在V片段的下游，J片段的上游以及D片段的两侧均存在保守的重组信号序列(recombination signal sequence, RSS)。此重排的重组酶基因rag (recombination activating gene)共有两个，分别产生蛋白质RAG1和RAG2。

免疫球蛋白基因重排过程



◀ ▶ 目录

三、转座重组可使基因移位

- 大多数基因在基因组内的位置是固定的，但有些基因可以从一个位置移动到另一位置。这些可移动的DNA序列包括插入序列和转座子。

- 由插入序列和转座子介导的基因移位或重排称为**转座(transposition)**。

（一）插入序列转座

- 插入序列(insertion sequences, IS)组成:
  - 二个分离的反向重复(inverted repeats, IR)序列
  - 特有的正向重复序列
  - 一个转座酶（transposase)编码基因

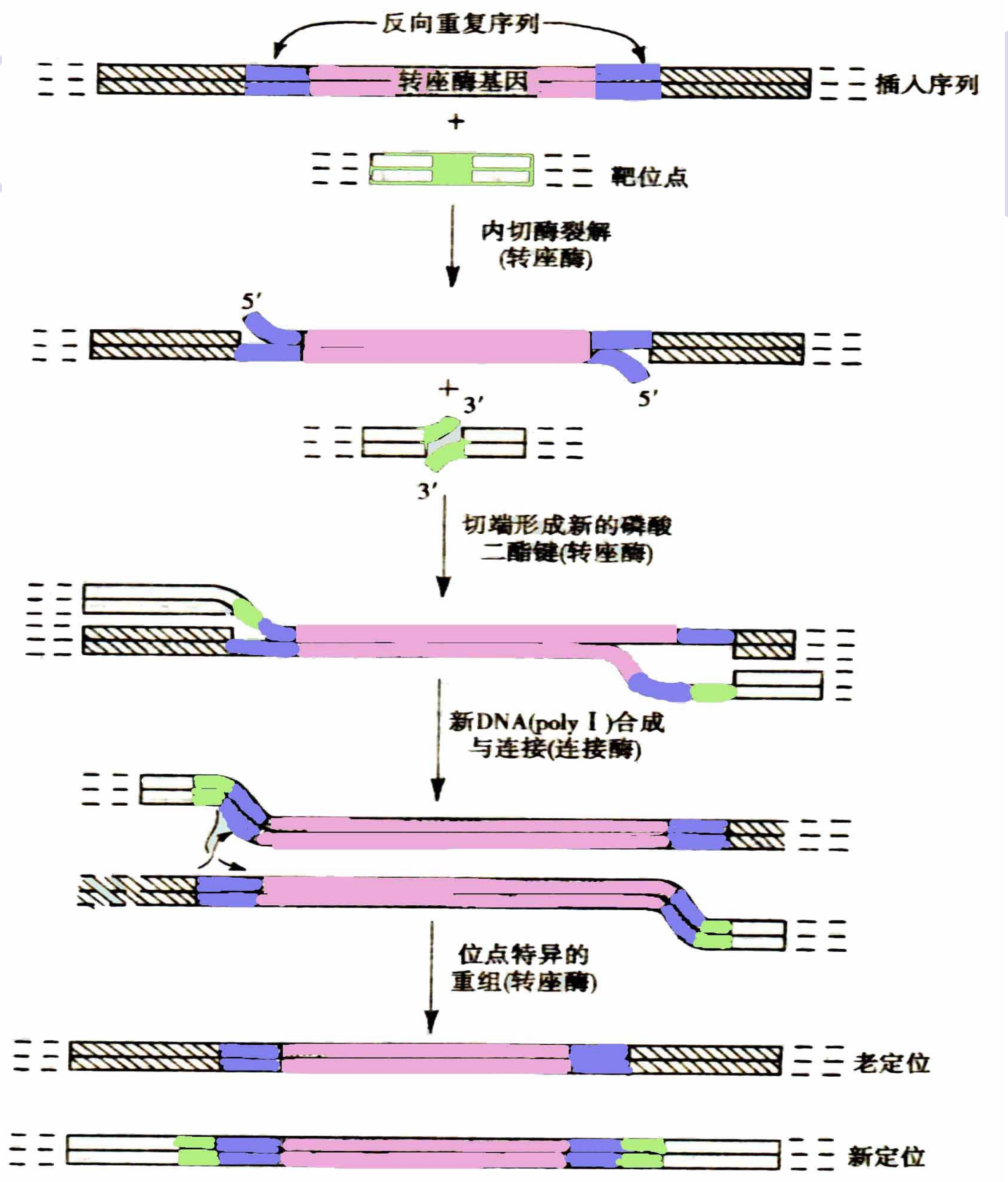
目录

- 插入序列发生转座的形式:

  保守性转座(conservative transposition)

  复制性转座(duplicative transposition)

插入序列的复制性转座



目录

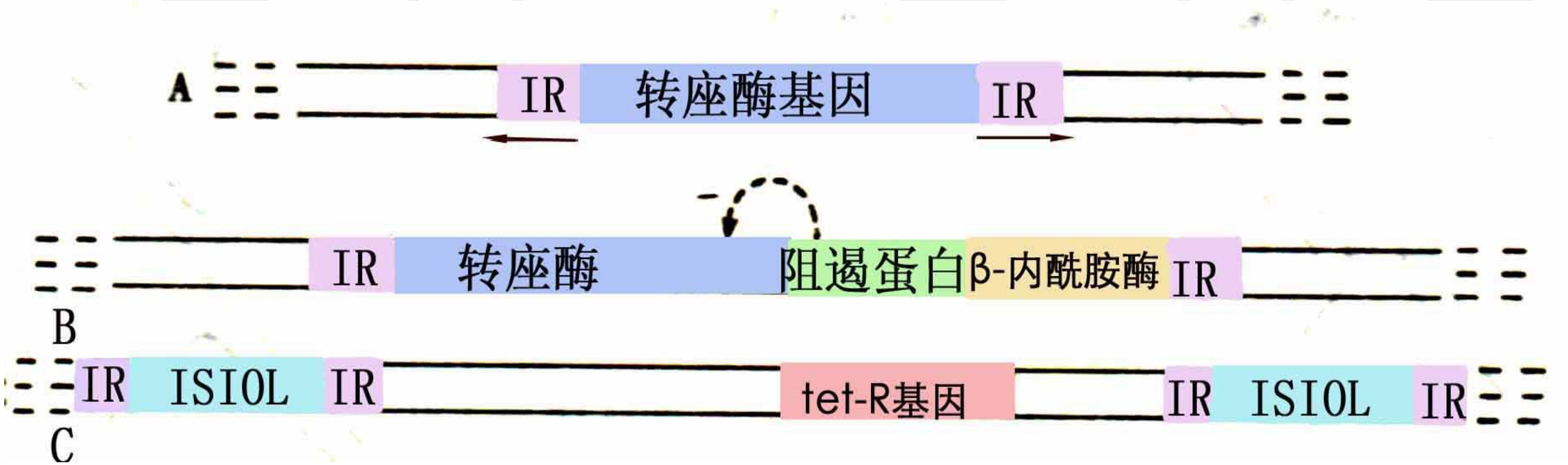
（二）转座子转座

- 转座子(transposons) ——可从一个染色体位点转移到另一位点的分散重复序列。
- 转座子组成:

  反向重复序列

  转座酶编码基因

  抗生素抗性等有用的基因



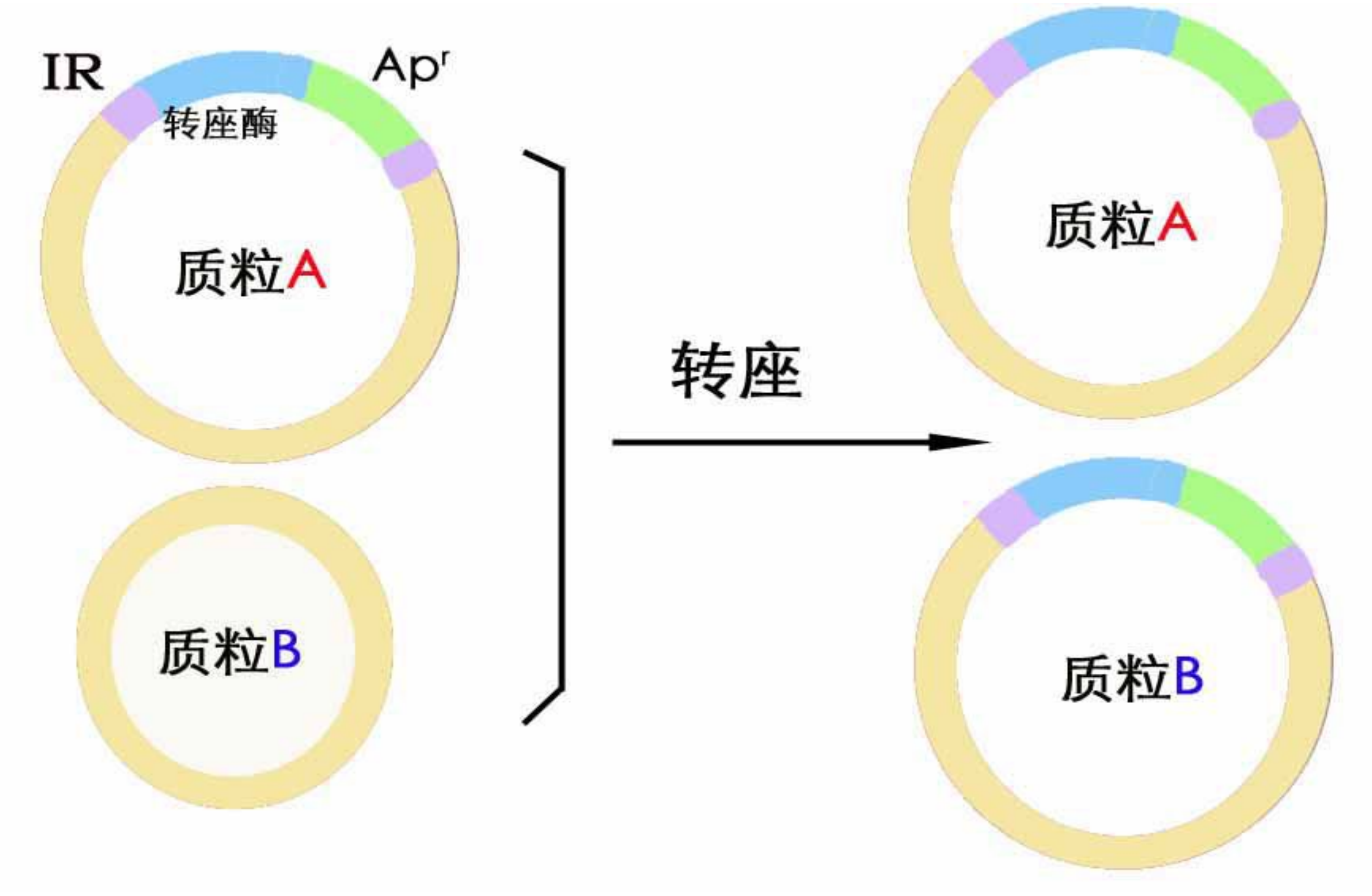
细菌的可流动性元件

A　插入序列：转座酶编码基因两侧连接反向末端重复序列(箭头所示)

B　转座子Tn3：含有转座酶、β-内酰胺酶及阻遏蛋白编码基因

C　转座子Tn10：含四环素抗性基因及两个相同的插入序列IS10L

由转座子介导的转座



四、原核细胞可通过接合、转化和转导进行基因转移或重组

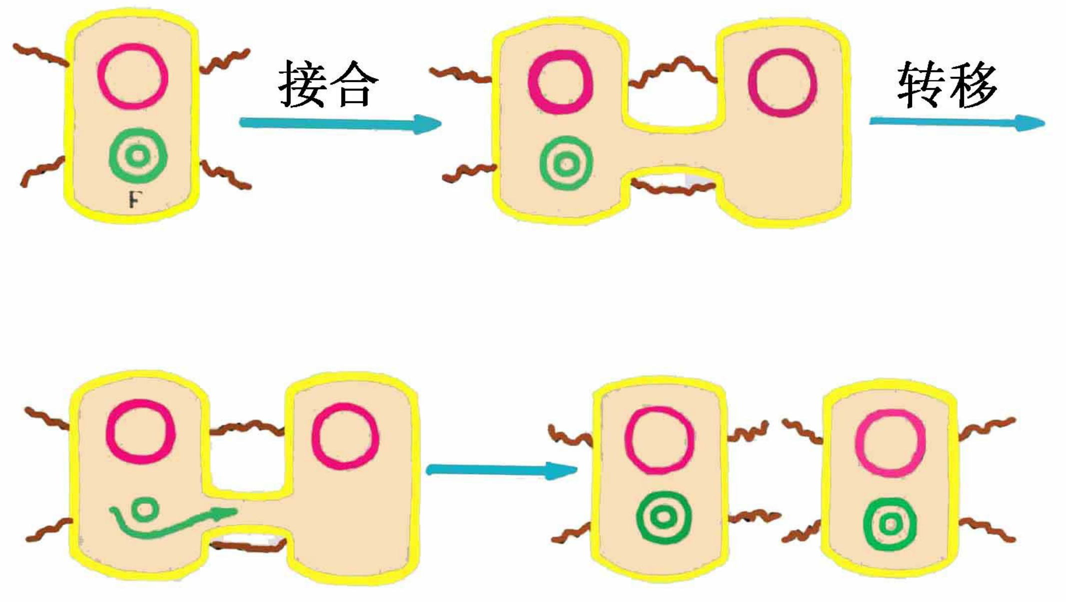
（一）接合作用

当细胞与细胞、或细菌通过菌毛相互接触时，质粒DNA从一个细胞（细菌）转移至另一细胞（细菌）的DNA转移称为**接合作用(conjugation)**。

➢ 质粒

细菌染色体外的小型环状双链DNA分子。

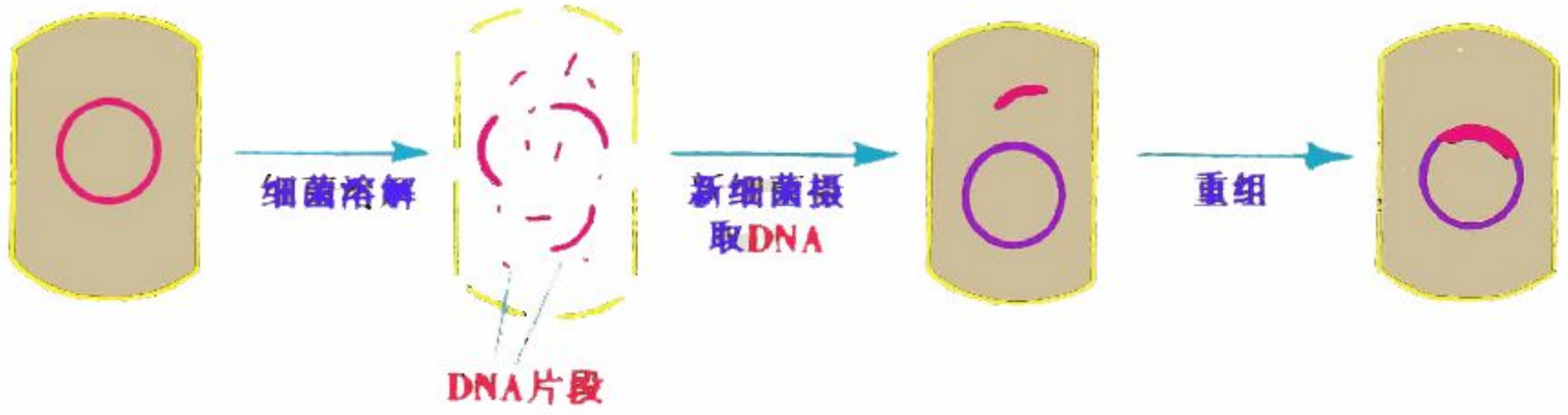
➢ 可接合质粒如 F 因子(F factor)



（二）转化作用

通过自动获取或人为地供给外源DNA，使细胞或培养的受体细胞获得新的遗传表型，称为转化作用(transformation)。

例：溶菌时，裂解的DNA片段被另一细菌摄取。



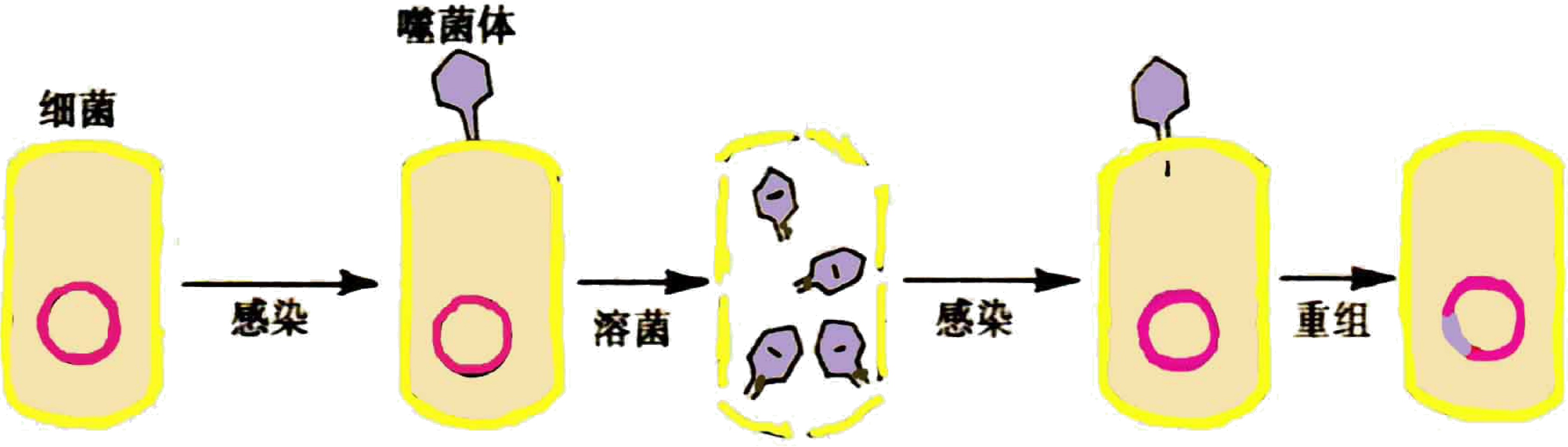
（三）转导作用

当病毒从被感染的（供体）细胞释放出来、再次感染另一（供体）细胞时，发生在供体细胞与受体细胞之间的DNA转移及基因重组即为转导作用(transduction)。

λ噬菌体的生活史

溶菌生长途径 (lysis pathway)

溶源菌生长途径 (lysogenic pathway)



第二节

重组DNA技术

Recombinant DNA Technology

重组DNA技术的发展史

1865年 G.J.Mendel的豌豆杂交试验。

1944年 O.T.Avery的肺炎球菌转化实验。

1973年 美国斯坦福大学的科学家构建第一个重组DNA分子。

1977年 美国南旧金山由博耶和斯旺森建立世界上第一家遗传工程公司，专门应用重组DNA技术制造医学上重要的药物。

1980年 开始建造第一家应用重组DNA技术生产胰岛素的工厂。

1997年 英国罗林研究所成功的克隆了多莉。

重组DNA技术相关概念

DNA克隆

- 克隆(clone):来自同一始祖的相同副本或拷贝的集合。
- 获取同一拷贝的过程称为克隆化(cloning)，即无性繁殖。

- 技术水平：分子克隆(molecular clone)

  （即DNA 克隆）

  细胞克隆

  个体克隆（动物或植物）

- 重组DNA技术，又称分子克隆（molecular cloning）或DNA克隆（DNA cloning）或基因工程（genetic engineering）技术

其主要过程包括：在体外将目的DNA片段与能自主复制的遗传元件（又叫载体）连接，形成重组DNA分子，进而在受体细胞中复制、扩增，从而获得单一DNA分子的大量拷贝。

- 目的:

  ①分离获得某一感兴趣的基因或DNA

  ②获得感兴趣基因的表达产物（蛋白质）

一、重组DNA技术中常用的工具酶

- 限制性核酸内切酶
- DNA聚合酶Ⅰ
- 逆转录酶
- T_4DNA连接酶
- 碱性磷酸酶
- 末端转移酶
- *Taq* DNA聚合酶

重组DNA技术中常用的工具酶

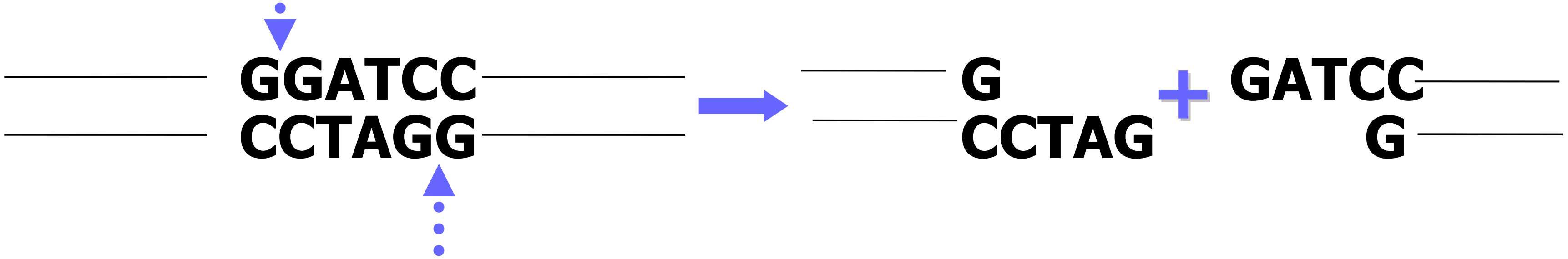
工具酶	功　　能
限制性核酸内切酶	识别特异序列，切割DNA
DNA连接酶	催化DNA中相邻的5´磷酸基和3´羟基末端之间形成磷酸二酯键，使DNA切口封合或使两个DNA分子或片段连接
DNA聚合酶Ⅰ	①合成双链cDNA分子或片段连接；②缺口平移制作高比活探针；③ DNA序列分析；④填补3′末端
Klenow片段	又名DNA聚合酶I大片段，具有完整DNA聚合酶I的5′→3′聚合、3′→5′外切活性，而无5′→3′外切活性。常用于cDNA第二链合成，双链DNA 3′末端标记等
反转录酶	①合成cDNA；②替代DNA聚合酶I进行填补，标记或DNA序列分析
多聚核苷酸激酶	催化多聚核苷酸5′羟基末端磷酸化，或标记探针
末端转移酶	在3′羟基末端进行同质多聚物加尾
碱性磷酸酶	切除末端磷酸基

限制性核酸内切酶(restriction endonuclease)

- 定义：

限制性核酸内切酶(restriction endonuclease, RE)是一类核酸内切酶，能识别双链DNA分子内部的特异序列,并裂解磷酸二酯键。

Bam H Ⅰ：



➢ 分类：

Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ（基因工程技术中常用Ⅱ型）

➢ 作用：

与甲基化酶共同构成细菌的限制修饰系统，限制外源DNA，保护自身DNA。

- 命名：

Hin dⅢ

Haemophilus influenzae d株

流感嗜血杆菌d株的第三种酶

属　　系　　株　　序

第一个字母取自产生该酶的细菌属名，用大写；

第二、第三个字母是该细菌的种名，用小写；

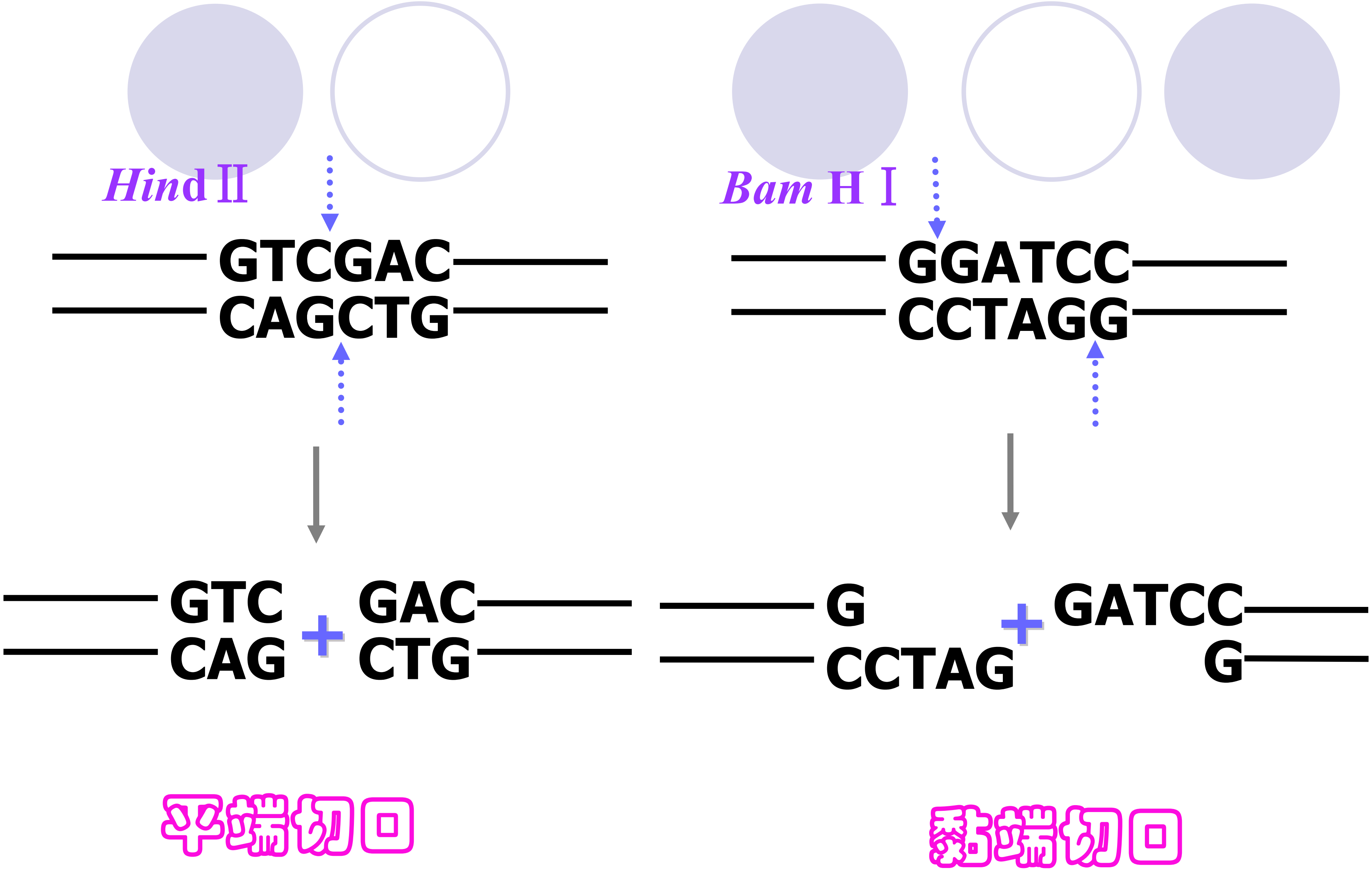
第四个字母代表株；

用罗马数字表示发现的先后次序。

Ⅱ类酶识别序列特点—— 回文结构(palindrome)

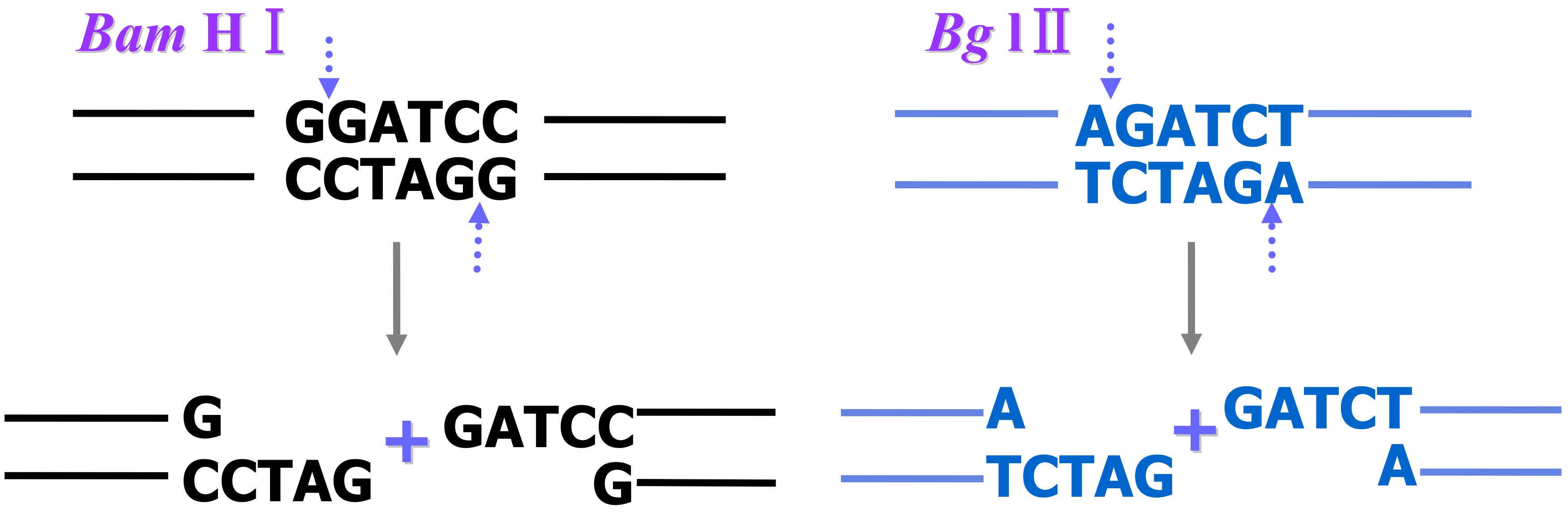
…………GGATCC…………
…………CCTAGG…………

切口 ： 平端切口、粘端切口


Hind II
GTCGAC
CAGCTG
GTC
CAG
+
GAC
CTG
平端切口
Bam H I
GGATCC
CCTAGG
G
CCTAG
+
GATCC
G
黏端切口

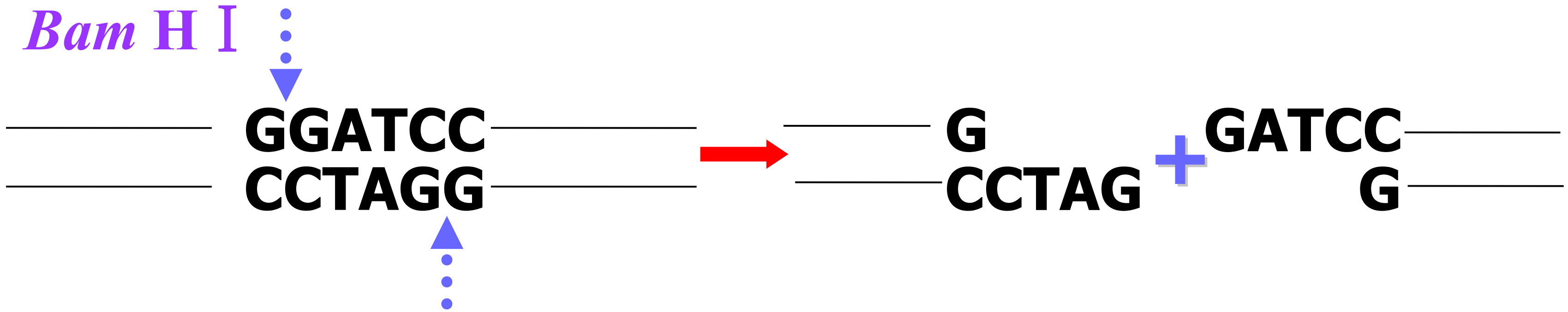
➢ 同尾酶

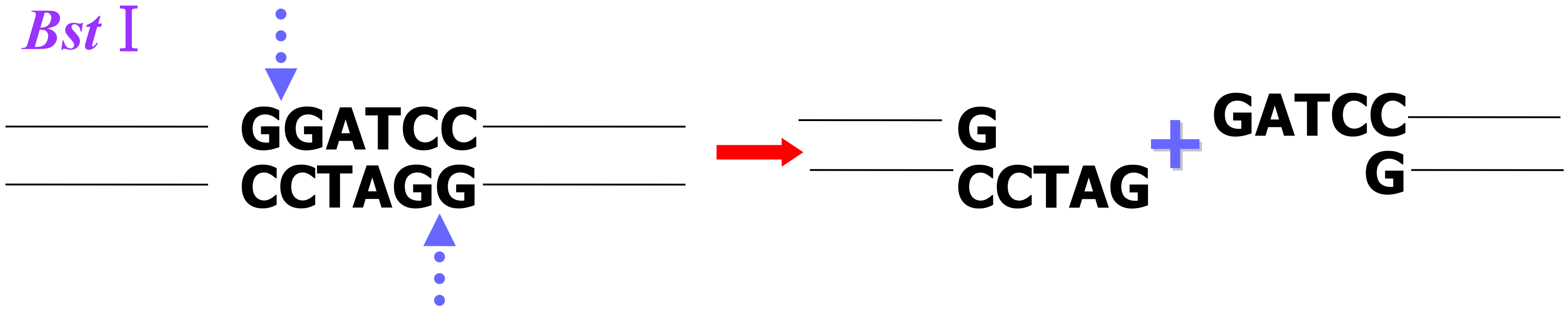
有些限制性内切酶虽然识别序列不完全相同，但切割DNA后，产生相同的粘性末端，称为同尾酶。这两个相同的粘性末端称为配伍末端(compatible end)。



➢同裂酶：

来源不同的限制酶，但能识别和切割同一位点，这些酶称同裂酶或同功异源酶。





二、重组DNA技术中常用的载体

- 定义

为携带目的基因，实现其无性繁殖或表达有意义的蛋白质所采用的一些DNA分子。

- 载体按功能分为

克隆载体(cloning vector)

表达载体(expression vector)

- 克隆载体(cloning vector)

为使插入的外源DNA序列被扩增而特意设计的载体称为克隆载体。

- 表达载体(expression vector)

为使插入的外源DNA序列可转录翻译成多肽链而特意设计的载体称为表达载体。

第三节

重组DNA技术基本原理和操作步骤

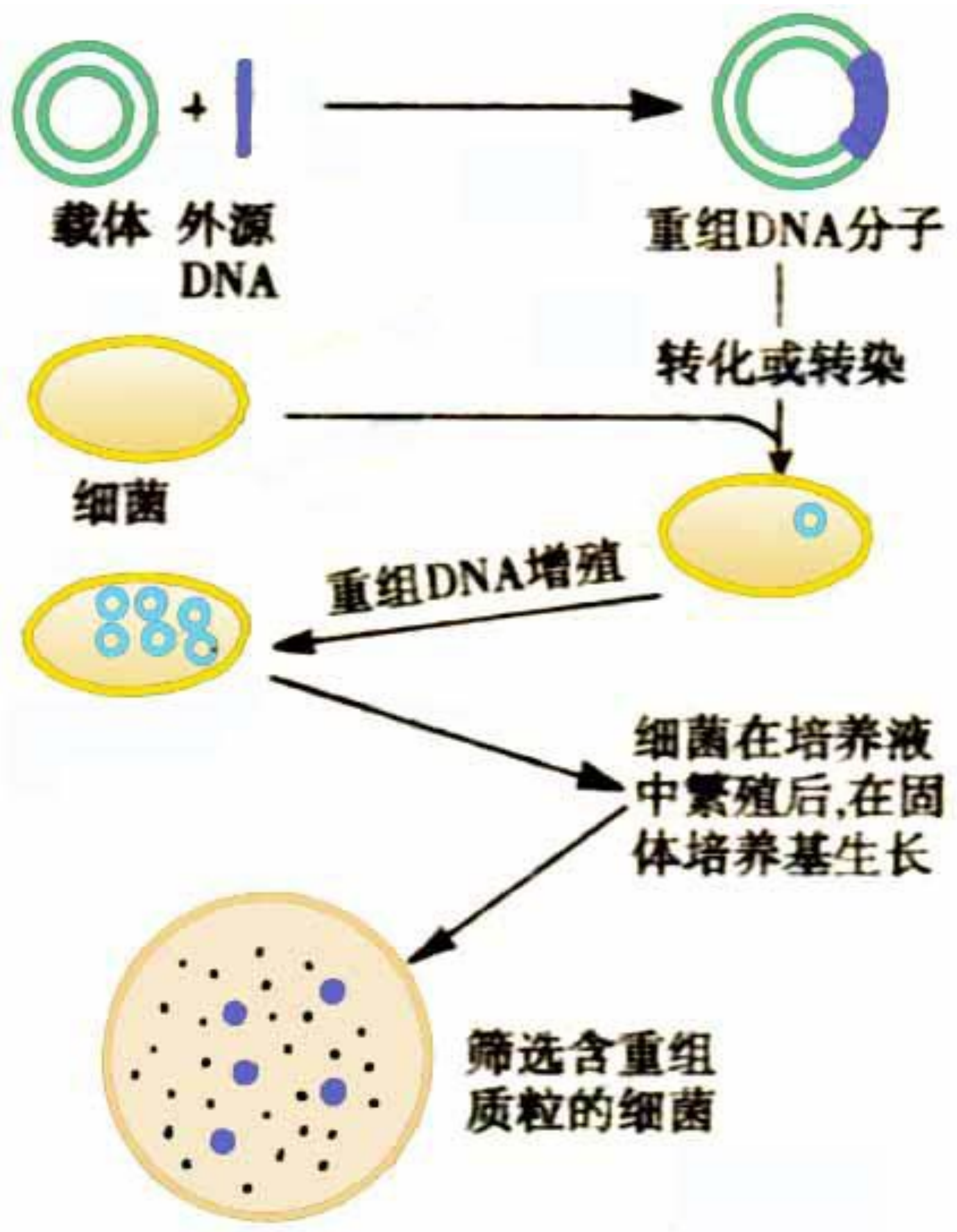
- 基本原理

目的基因的获取 ⟶ 克隆载体的选择和构建

⟶外源基因与载体的连接 ⟶ DNA导入受体细胞

⟶ 重组体的筛选 ⟶ 克隆基因的表达

以质粒为载体的DNA克隆过程



（一）目的基因的分离获取——分

1. 化学合成法

   要求：已知目的基因的核苷酸序列或其产物的氨基酸序列 。

2. 从基因组DNA文库和cDNA文库中获取目的DNA（见第20章）

3. PCR法（见第20章）

4. 其他方法（见第20章）

化学合成法获取目的基因

氨基酸	trp	phe	met	lys
可能的DNA序列	ACC	AAG	TAC	TTT
	ACC	AAA	TAC	TTT
	ACC	AAG	TAC	TTC
	ACC	AAA	TAC	TTC

由已知氨基酸序列推测可能的DNA序列。

➢从基因组DNA文库获取目的基因

组织或细胞染色体DNA

↓ 限制性内切酶

基因片断

↓ 克隆载体

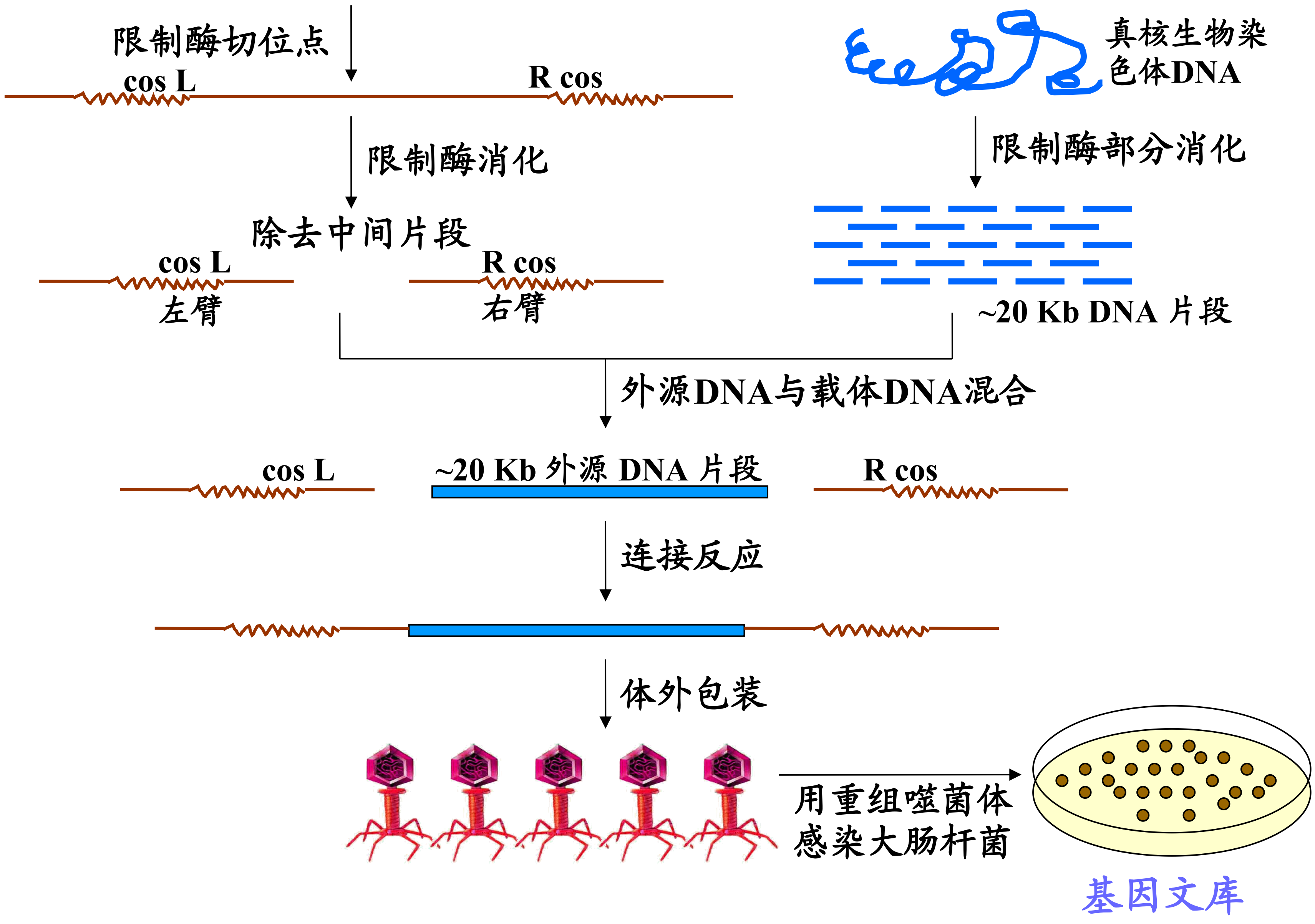
重组DNA分子

↓ 受体菌

含重组分子的转化菌

基因组DNA文库

存在于转化细胞内由克隆载体所携带的所有基因组DNA的集合



用随机切割的真核生物染色体DNA片段构建基因文库

➢ 从cDNA文库获取目的基因

mRNA

↓ 反转录酶

cDNA

↓ 复制

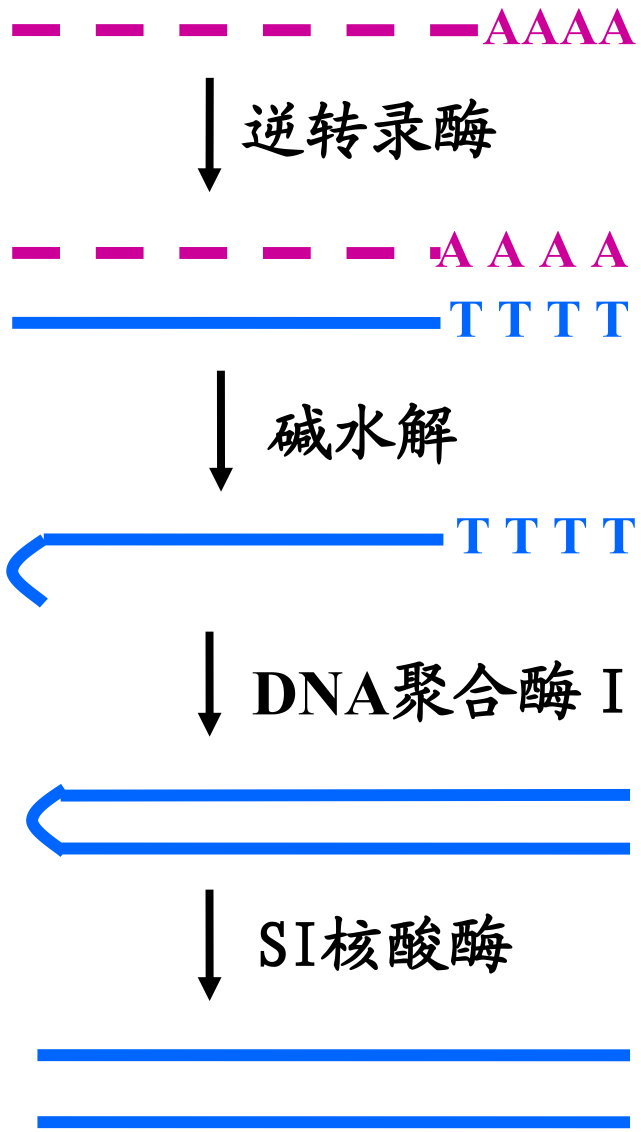
双链cDNA

↓ ← 载体

重组DNA分子

↓ ← 受体菌

cDNA文库



（二）载体的选择与构建——选

目的不同，操作基因的性质不同，载体的选择和改建方法也不同。

- **目的：**

  ① 获得某一目的基因或DNA片段

  ② 获得目的DNA片段所编码的蛋白质

不同载体的克隆容量及适宜宿主细胞

载体	插入DNA片段	宿主细胞
质粒	<5~10kb	细菌，酵母
λ噬菌体载体	~20kb	细菌
黏粒	~50 kb	细菌
BAC	~400kb	细菌
YAC	~3 Mb	酵母

（三）目的DNA与载体连接——接

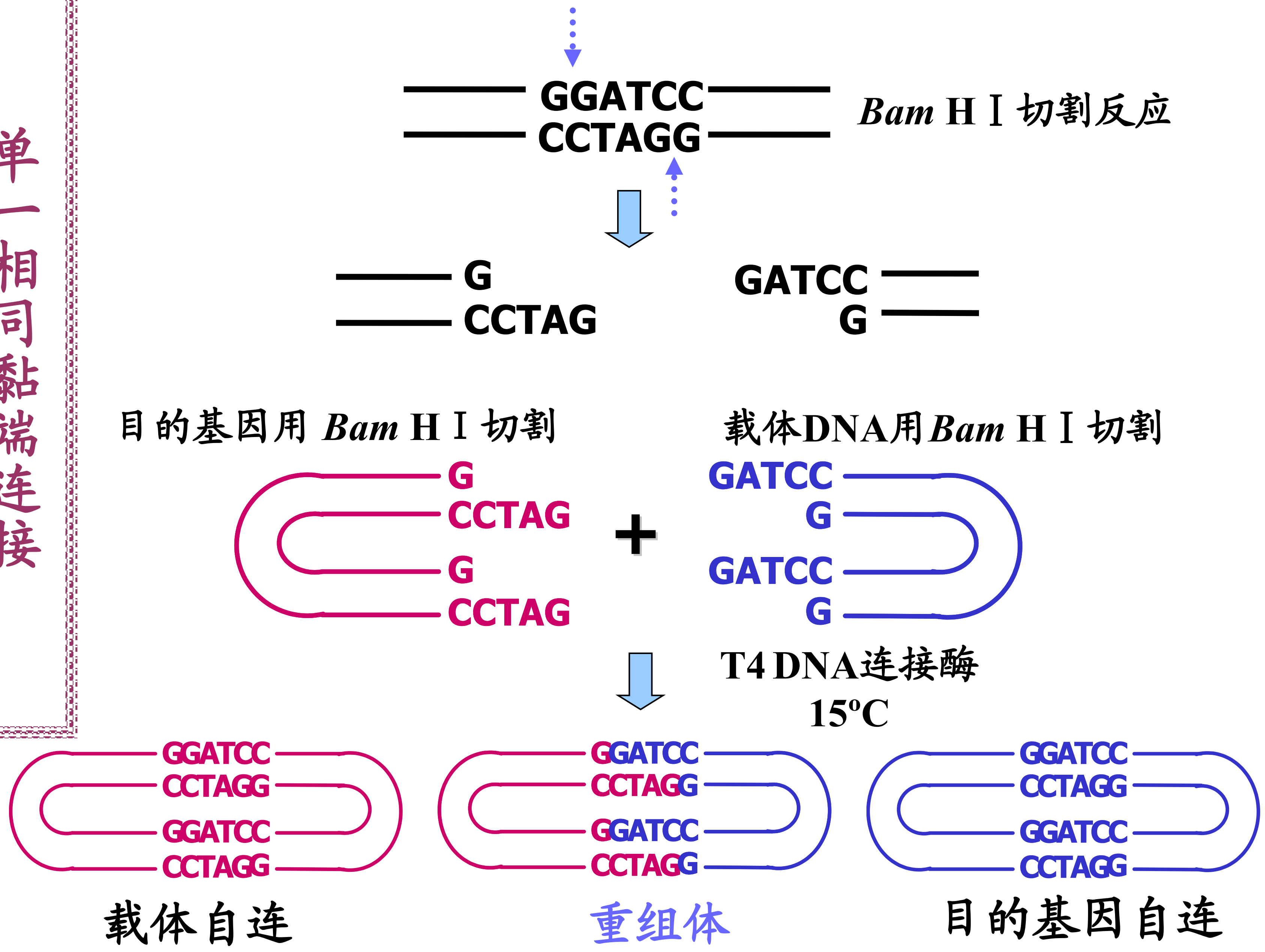
1. 黏端连接

方式：（1）单一相同黏端连接

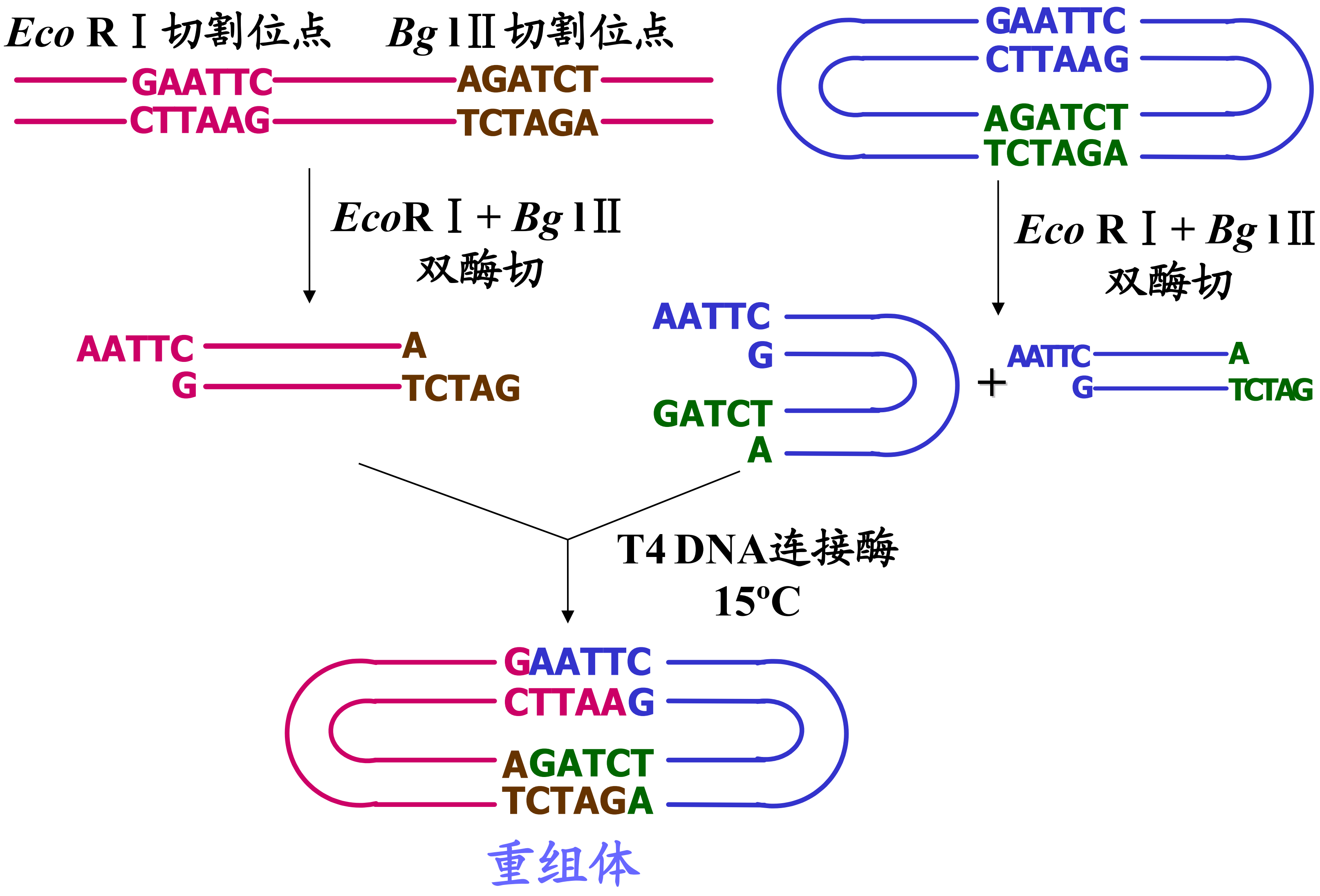
（2）不同黏端连接

（3）通过其他措施产生黏端进行连接

单一相同黏端连接


GGATCC
CCTAGG
Bam H Ⅰ 切割反应
G
CCTAG
GATCC
G
目的基因用 *Bam* H Ⅰ 切割
载体DNA用*Bam* H Ⅰ 切割
G
CCTAG
G
CCTAG
+
GATCC
G
GATCC
G
T4 DNA连接酶
15°C
GGATCC
CCTAGG
GGATCC
CCTAGG
GGATCC
CCTAGG
GGATCC
CCTAGG
GGATCC
CCTAGG
GGATCC
CCTAGG
载体自连
重组体
目的基因自连

不同黏端连接（定向克隆）



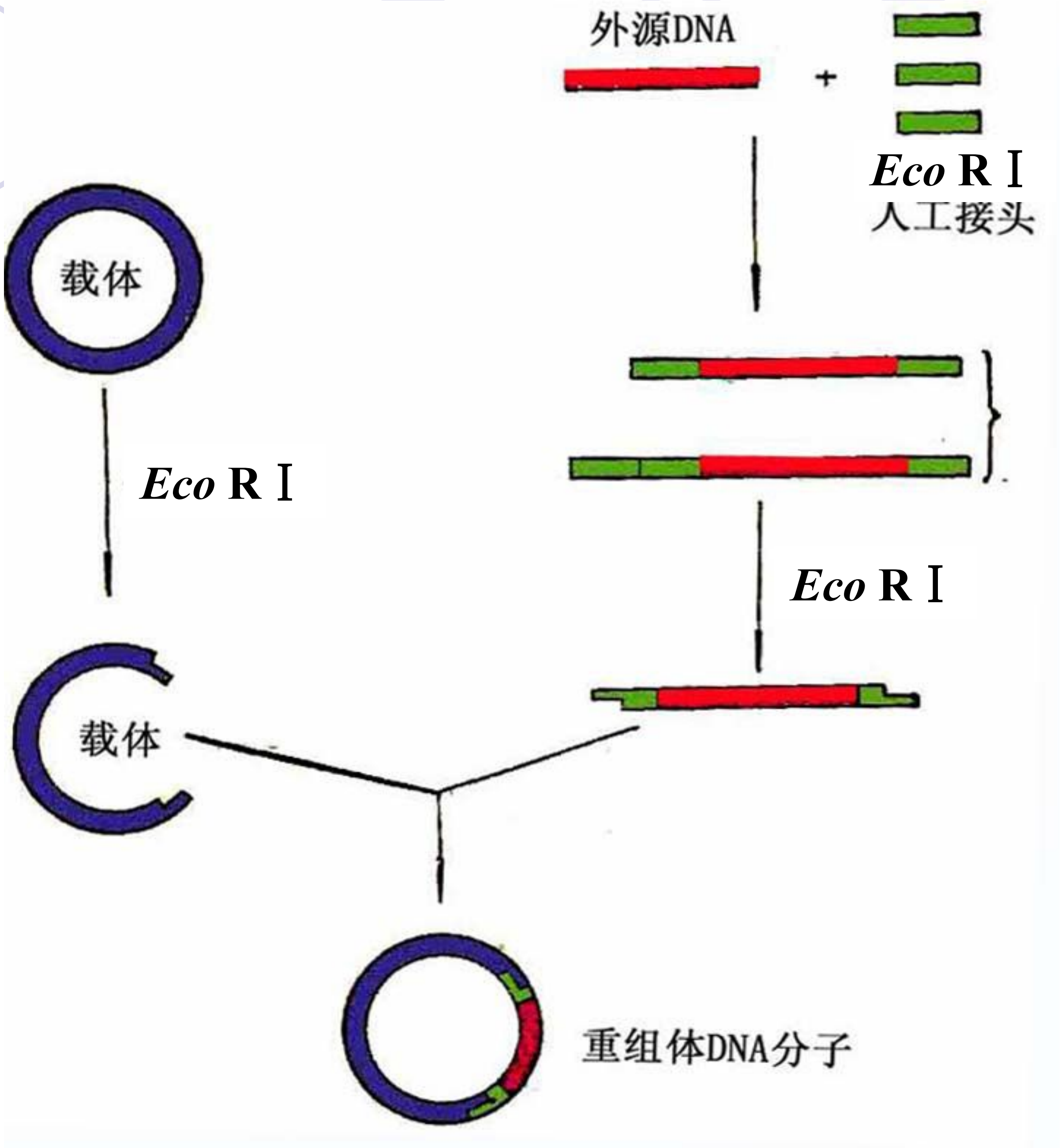
Eco R Ⅰ 切割位点
Bg l Ⅱ 切割位点
GAATTC
CTTAAG
AGATCT
TCTAGA
GAATTC
CTTAAG
AGATCT
TCTAGA
EcoR Ⅰ + Bg l Ⅱ
双酶切
Eco R Ⅰ + Bg l Ⅱ
双酶切
AATTC
G
A
TCTAG
AATTC
G
GATCT
A
+
AATTC
G
A
TCTAG
T4 DNA连接酶
15°C
GAATTC
CTTAAG
AGATCT
TCTAGA
重组体

通过其他措施产生黏端进行连接

人工接头(linker)连接

由平端加上新的酶切位点，再用限制酶切除产生粘性末端，而进行粘端连接。

人工接头及其应用

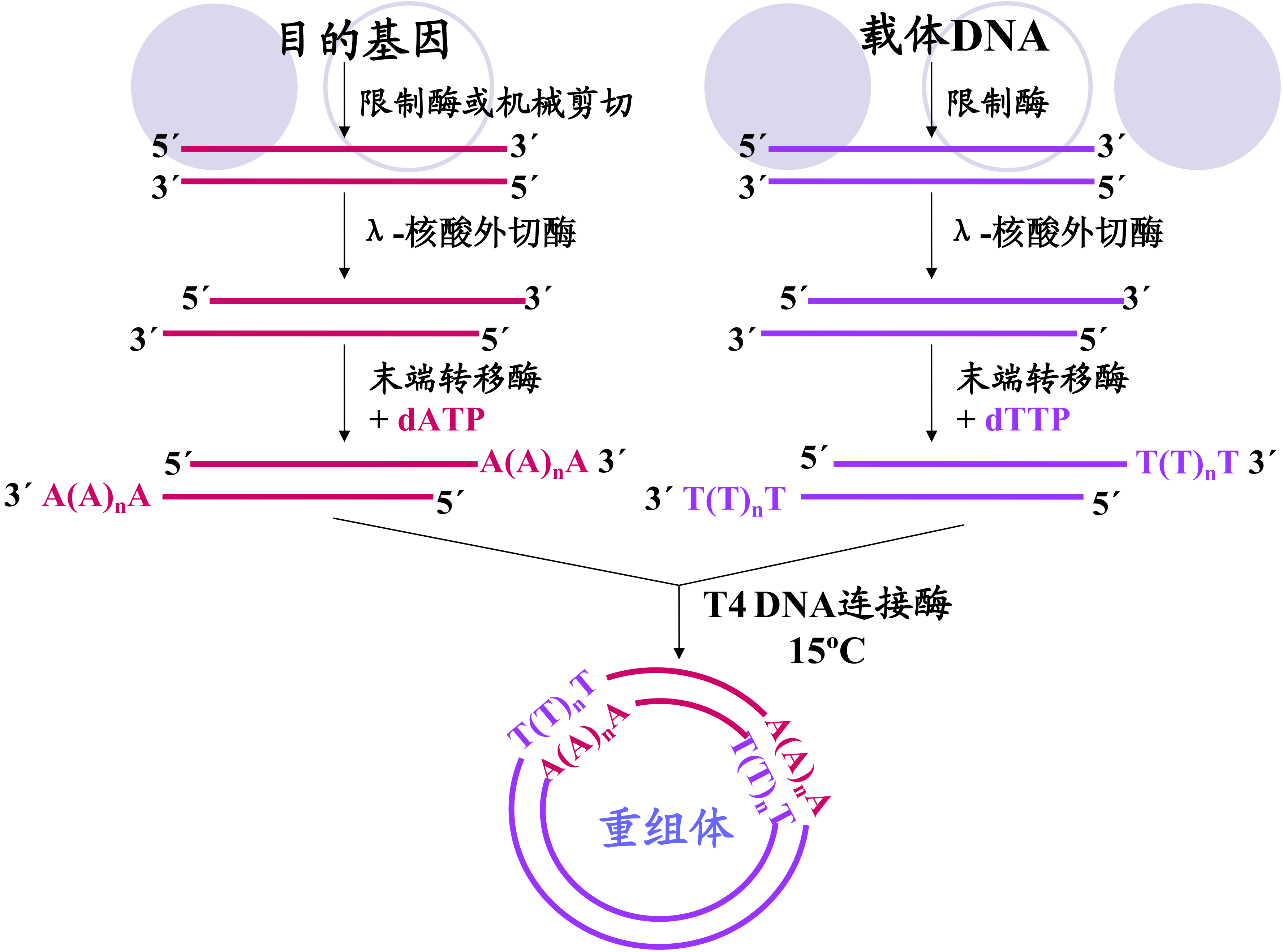


Eco R Ⅰ

5′- **CCGAATTCG**
3′- **GGCTTAAGC**

同聚物加尾连接

在末端转移酶(terminal transferase) 的作用下，在DNA片段末端加上同聚物序列、制造出粘性末端，再进行粘端连接。


目的基因
限制酶或机械剪切
5´ 3´
3´ 5´
λ-核酸外切酶
5´ 3´
3´ 5´
末端转移酶
+ dATP
5´ A(A)nA 3´
3´ A(A)nA 5´
载体DNA
限制酶
5´ 3´
3´ 5´
λ-核酸外切酶
5´ 3´
3´ 5´
末端转移酶
+ dTTP
5´ T(T)nT 3´
3´ T(T)nT 5´
T4 DNA连接酶
15ºC
T(T)nT
A(A)nA
A(A)nA
T(T)nT
重组体

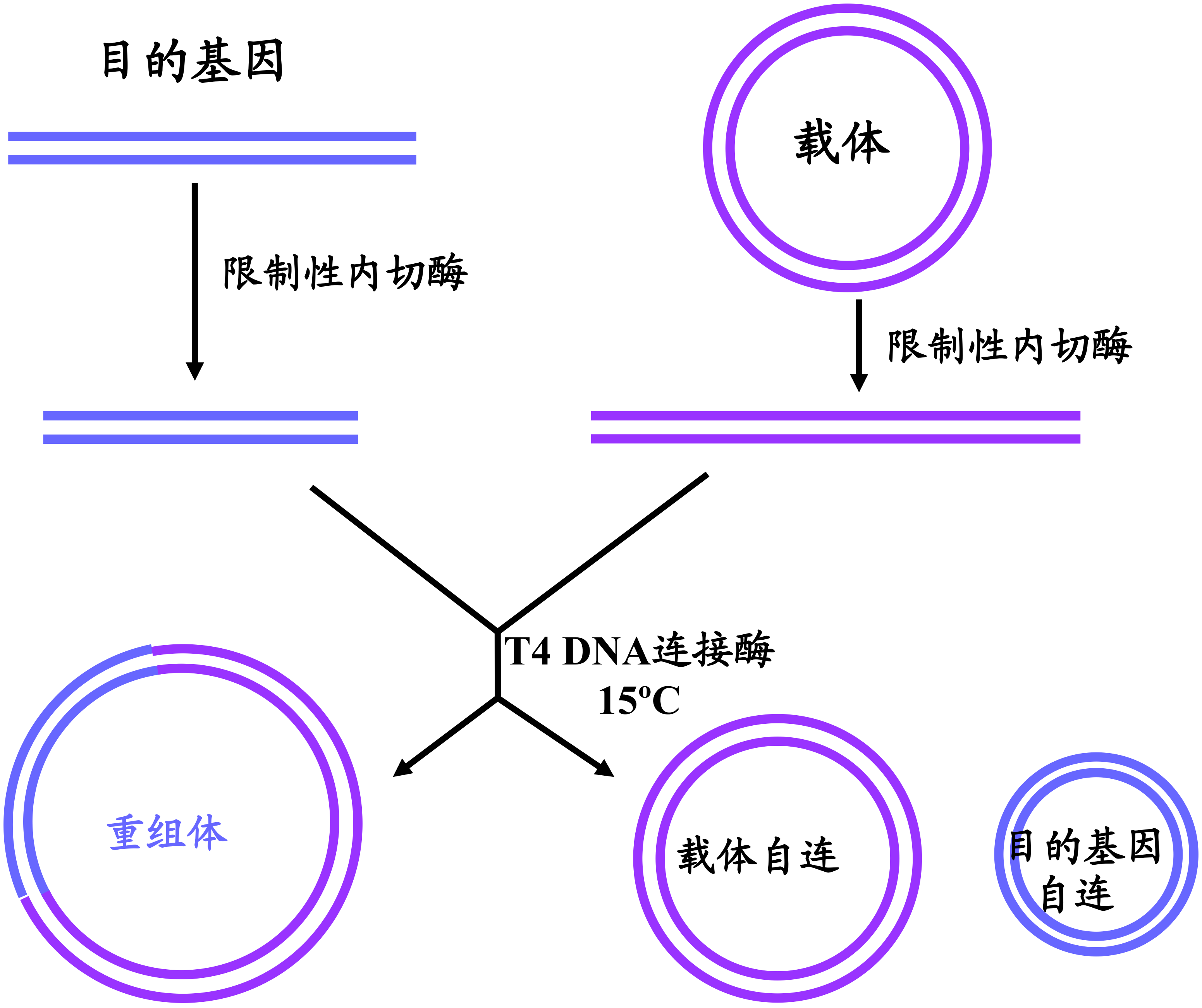
PCR法

- 针对目的DNA的5′-和3′-端，设计一对特异引物，在每条引物的5′-端分别加上不同的RE位点，然后以目的DNA为模板，经PCR 扩增便可得到带有引物序列的目的DNA，再用相应RE切割PCR产物，产生黏端，随后便可与带有相同黏端的线性化载体进行有效连接。

2. 平端连接

适用于:

- 限制性内切酶切割产生的平端
- 粘端补齐或切平形成的平端


目的基因
载体
限制性内切酶
限制性内切酶
T4 DNA连接酶
15ºC
重组体
载体自连
目的基因
自连

3. 粘-平末端连接

- 黏-平末端连接是指目的DNA和载体之间通过一端为黏端、另一端为平端的方式进行连接。
- 属于定向克隆

（四）重组DNA转入受体细胞——转

- 受体菌条件:

  安全宿主菌

  限制酶和重组酶缺陷

  处于感受态(competent)

- 导入方式:

  转化 (transformation)

  转染 (transfection)

  感染 (infection)

（五）重组体的筛选与鉴定——筛

1. 借助载体上的遗传标志进行筛选

(1) 利用抗生素抗性标志筛选

(2) 利用基因的插入失活/插入表达特性筛选

(3) 利用标志补救筛选

(4)利用噬菌体的包装特性进行筛选

2. 序列特异性筛选

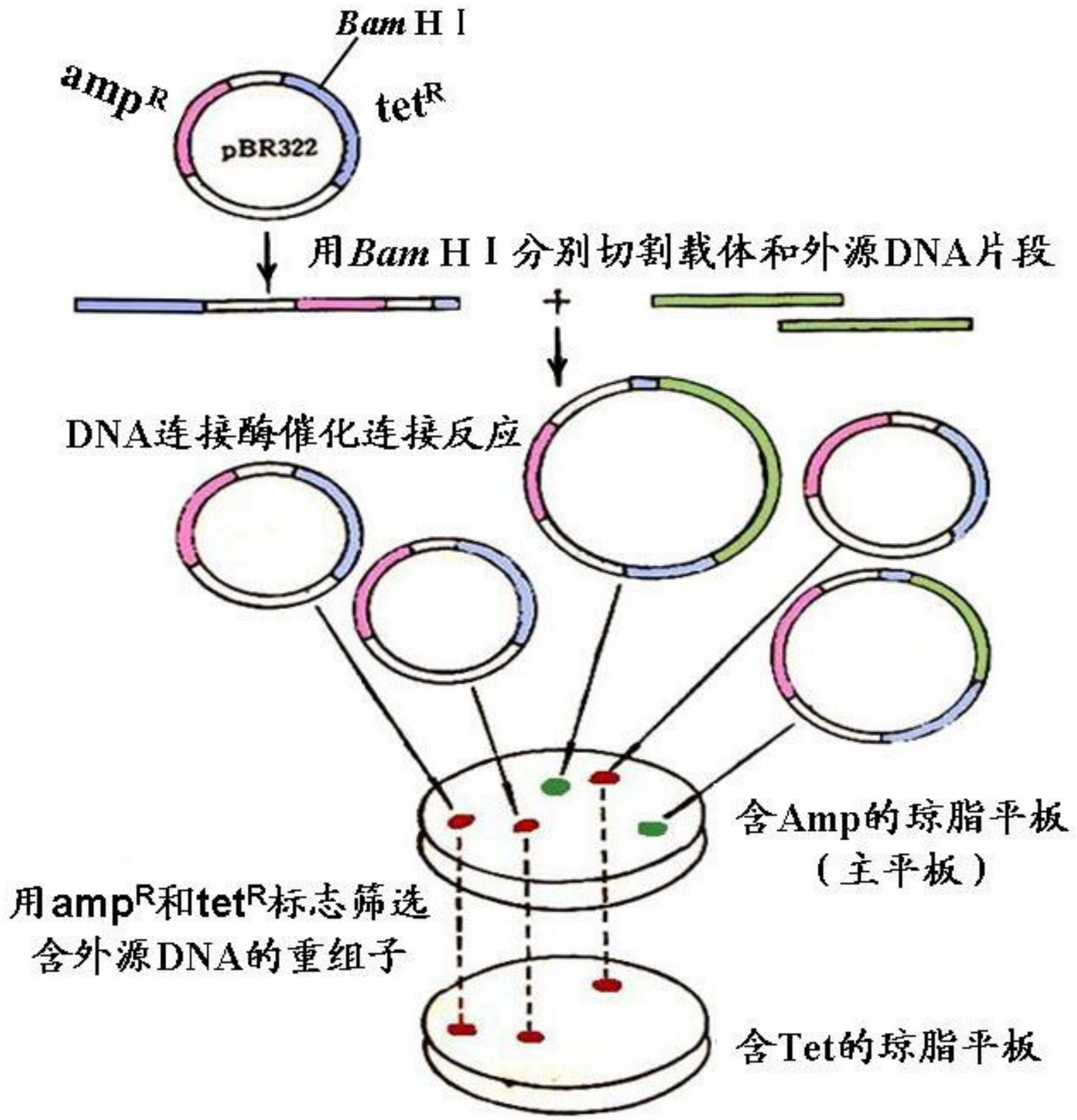
(1) RE酶切法

(2) PCR法

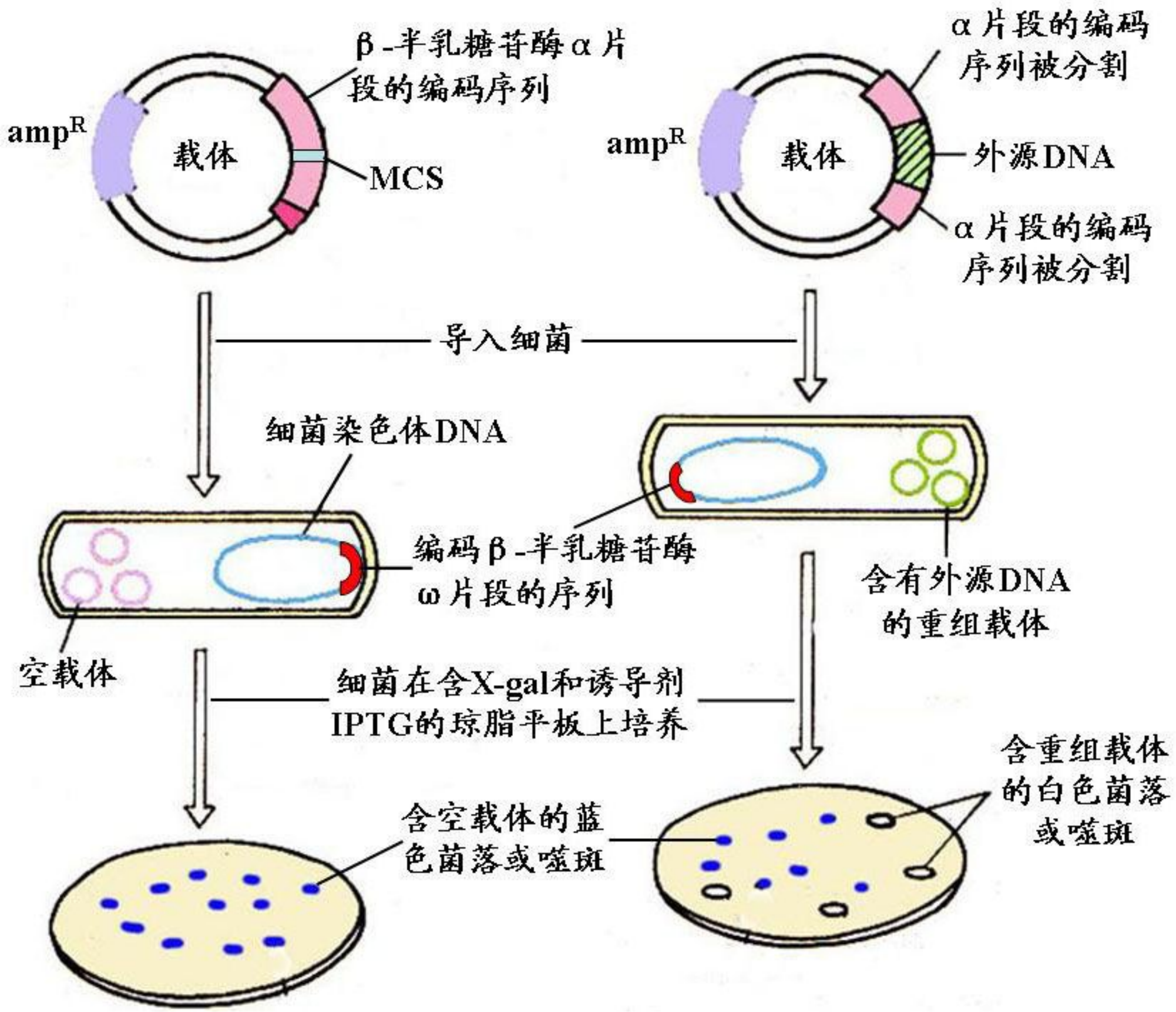
(3) 核酸杂交法

(4) DNA测序法

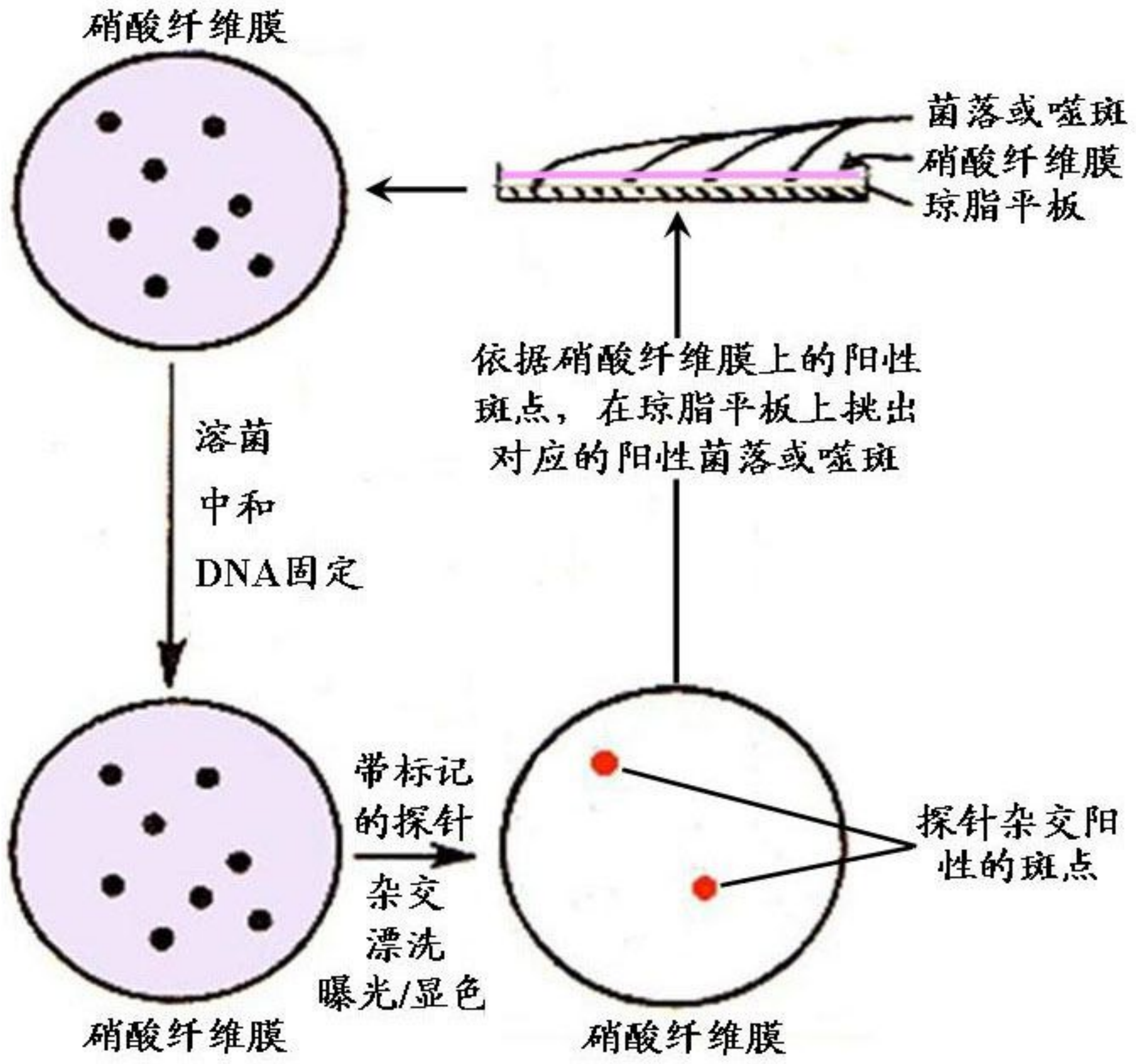
3. 亲和筛选法



插入失活筛选带有重组载体的克隆


β-半乳糖苷酶α片段的编码序列
amp^R
载体
MCS
α片段的编码序列被分割
amp^R
载体
外源DNA
α片段的编码序列被分割
导入细菌
细菌染色体DNA
编码β-半乳糖苷酶ω片段的序列
空载体
含有外源DNA的重组载体
细菌在含X-gal和诱导剂IPTG的琼脂平板上培养
含空载体的蓝色菌落或噬斑
含重组载体的白色菌落或噬斑

α互补筛选（蓝-白筛选）



菌落或噬斑原位杂交筛选重组体

小结

重组DNA技术操作过程可形象归纳为：

分 ———————— 分离获取目的基因

选 ———————— 载体的选择与构建

接 ———————— 目的DNA与载体连接

转 ———————— 重组DNA转入受体细胞

筛 ———————— 重组体的筛选与鉴定

重组DNA技术操作的主要步骤

载体：质粒、噬菌体、病毒

目的基因（外源基因）：基因组DNA、cDNA、人工合成、PCR产物

↓ 限制酶消化

开环载体DNA　　目的基因

↓ 连接酶

重组体

↓ 转化｜体外包装，转染

带重组体的宿主

↓ 筛选

表型筛选　　酶切电泳鉴定　　菌落原位杂交

（六）克隆基因的表达

表达体系的建立：

- 表达载体的构建
- 受体细胞的建立
- 表达产物的分离纯化

1. 原核表达体系 (E.coli表达体系最为常用)

- **标准:** 选择标志　　强启动子
  翻译调控序列　　多接头克隆位点

- **E.coli表达体系的不足:**

  不宜表达真核基因组DNA;

  不能加工表达的真核蛋白质;

  表达的蛋白质常形成不溶性包涵体(inclusion body);

  很难表达大量可溶性蛋白。

2. 真核表达体系（酵母、昆虫、乳类动物细胞）

- 优点：可表达克隆的cDNA及真核基因组DNA
  可适当修饰表达的蛋白质
  表达产物分区域积累
- 缺点：操作技术难、费时、经济
- 转染 —— 将表达载体导入真核细胞的过程

  方法：磷酸钙转染
  DEAE葡聚糖介导转染
  电穿孔
  脂质体转染
  显微注射