

# 第十五章 重组DNA技术

## **Chapter 15**

## **recombinant DNA technology**

# 本章要求

1. 掌握重组DNA技术的基本原理
2. 掌握DNA重组中常用的工具酶及其特点
3. 掌握各种常用载体的性质和特点
4. 掌握下列概念

DNA克隆、工具酶、目的基因、基因载体

# 第一节 概述

## 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

# 一、重组DNA技术相关概念

## （一） 重组DNA技术

又称分子克隆（molecular cloning）或DNA克隆（DNA cloning）

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。

生物工程： 基因工程、蛋白质工程、  
酶工程、细胞工程等

基因工程(genetic engineering) —— 实现基因克隆所用的方法及相关的工作称基因工程，又称重组DNA工艺学。

目的

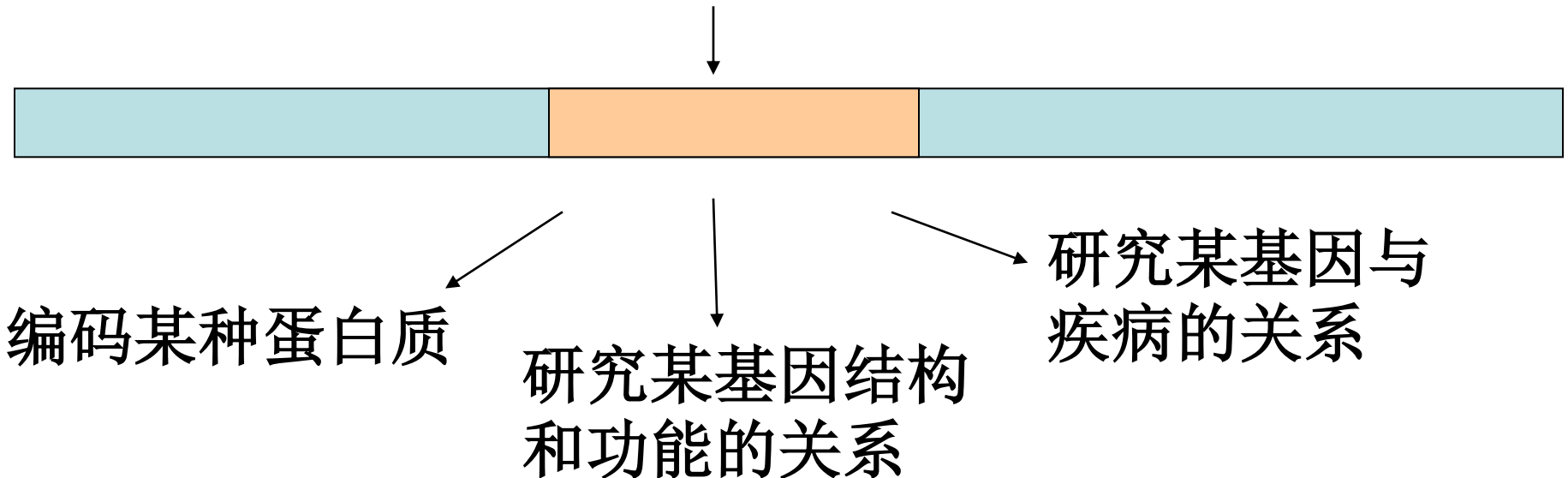
- ① 分离获得某一感兴趣的基因或DNA
- ② 获得感兴趣基因的表达产物（蛋白质）

## （二）目的基因

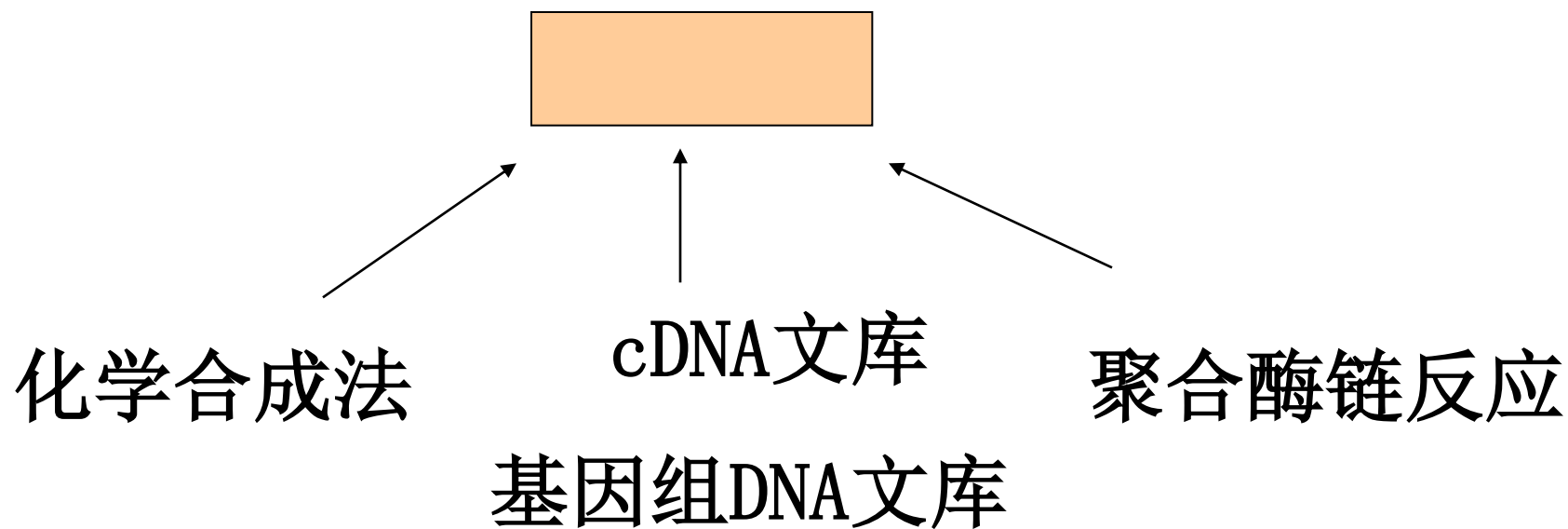
研究某个基因，或者要克隆某个基因用于生产大量DNA和蛋白质分子，首先都要把它从庞大的基因组中分离出来。

你所感兴趣和想研究的基因，称为目的基因。

需要克隆的DNA片段。



# 目的基因的获取



# (三) 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。

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。

常用载体：质粒DNA、噬菌体DNA、病毒DNA



# 载体的选择标准

- 能自主复制；
- 具有两个以上的遗传标记物，便于重组体的筛选和鉴定；
- 有克隆位点（外源DNA插入点），常具有多个单一酶切位点，称为多克隆位点；
- 分子量小，以容纳较大的外源DNA。

## （四）宿主细胞

应该具备以下性能

- ①有较强接纳外源DNA分子的能力；
- ②具有限制性内切核酸酶缺陷，不易降解外源DNA；
- ③具有DNA重组缺陷，保持外源DNA在宿主细胞中的完整性；
- ④不宜在非培养条件下生长，以保证安全。

## 二、常用载体

### (一) 质粒 (plasmid)

质粒是天然存在于细菌染色体外的闭合环状双链DNA分子。

类型： 严紧型、松弛型。

特点：

存在于细菌染色体外的小型环状DNA分子。

具有自我复制功能。

带有抗性基因及表型识别等遗传性标记物。

经改造后具有多克隆位点。

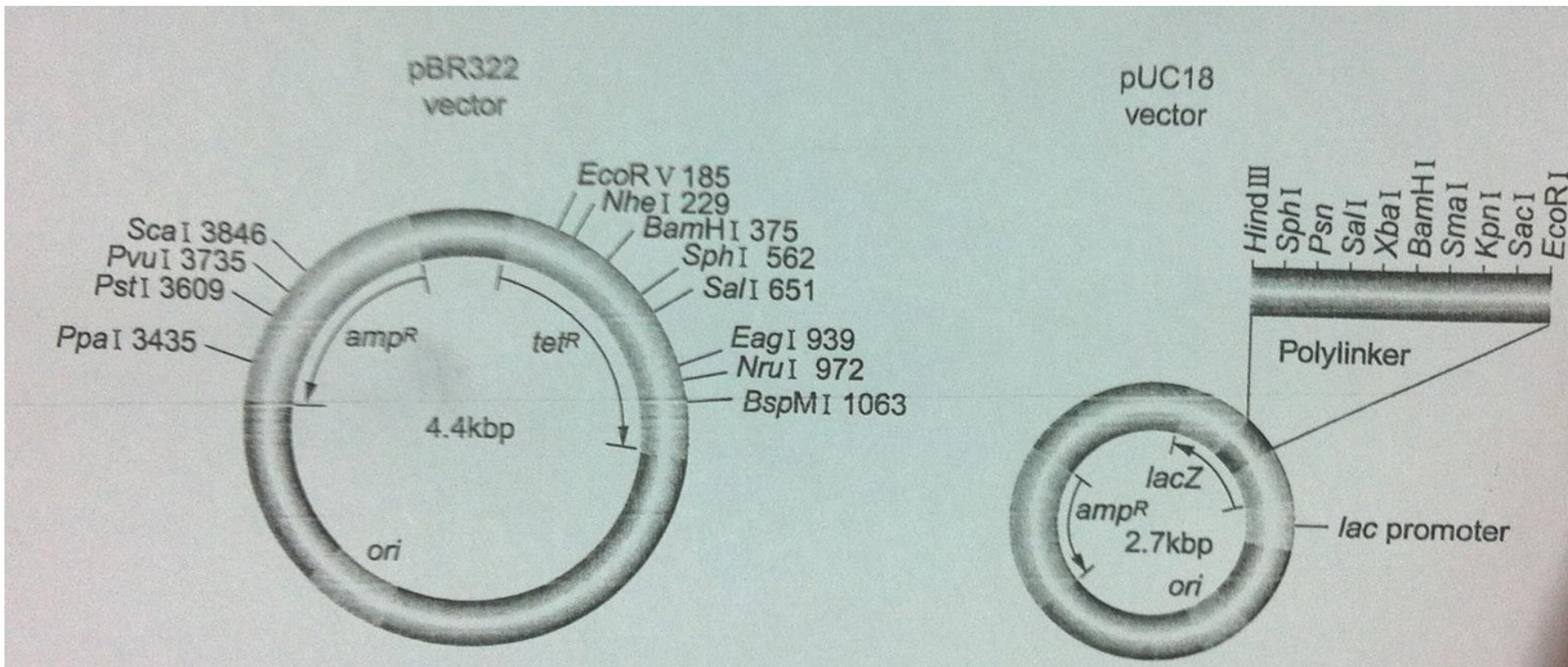


图15-1常用质粒载体pBR322和pUC18

## （二）噬菌体(phage)

### $\lambda$ 噬菌体DNA改造系统

$\lambda$  gt系列（插入型，适用cDNA克隆）

EMBL系列（置换型，适用基因组克隆）

### M13噬菌体DNA改造系统（含lacZ基因）

M13mp系列

pUC系列

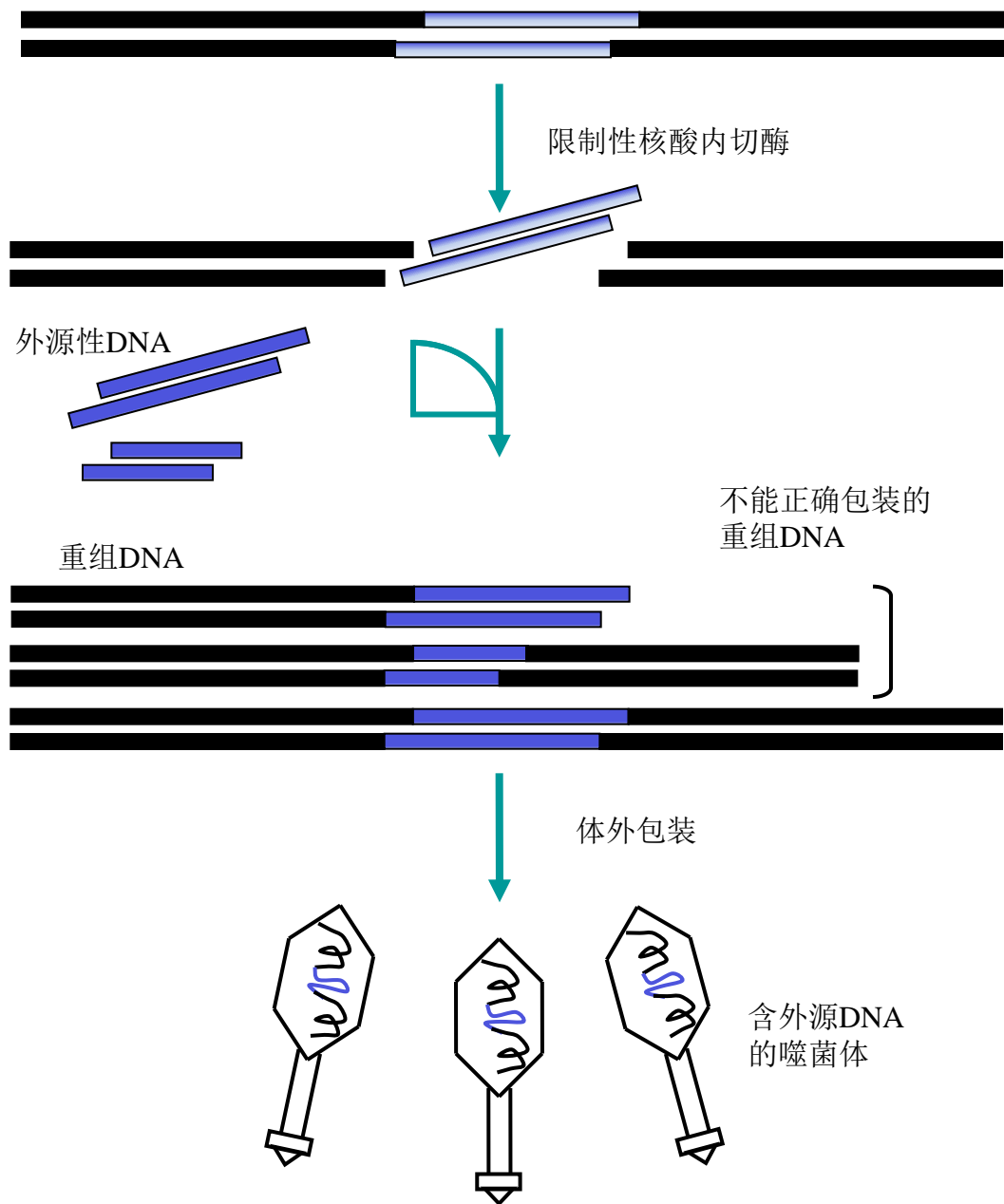


图15-2 噬菌体克隆载体

### (三) 黏粒(cosmid)

又称柯斯质粒，是 $\lambda$  噬菌体DNA与细菌质粒的杂合体，可容纳高达40kbp的DNA片段。

优点：能携带较大的外源DNA片段，能被包装成具有感染能力的噬菌体颗粒。

主要用于真核细胞基因组文库的构建。

## （四）病毒

常用的病毒载体

逆转录病毒

是一类以单链RNA分子为基因组的包装病毒。

腺病毒

结构包含二十面体包囊和线性双链DNA基因组，以附加体的方式单独在宿主细胞核中复制。



## （五）穿梭质粒（shuttle plasmid）

含有不止一个复制起始点的人工质粒，能携带插入序列在不同种类的宿主细胞中繁殖。

优点：能携带较大的外源DNA片段，能被包装成具有感染能力的噬菌体颗粒。

主要用于真核细胞基因组文库的构建。

## (六) 人工染色体

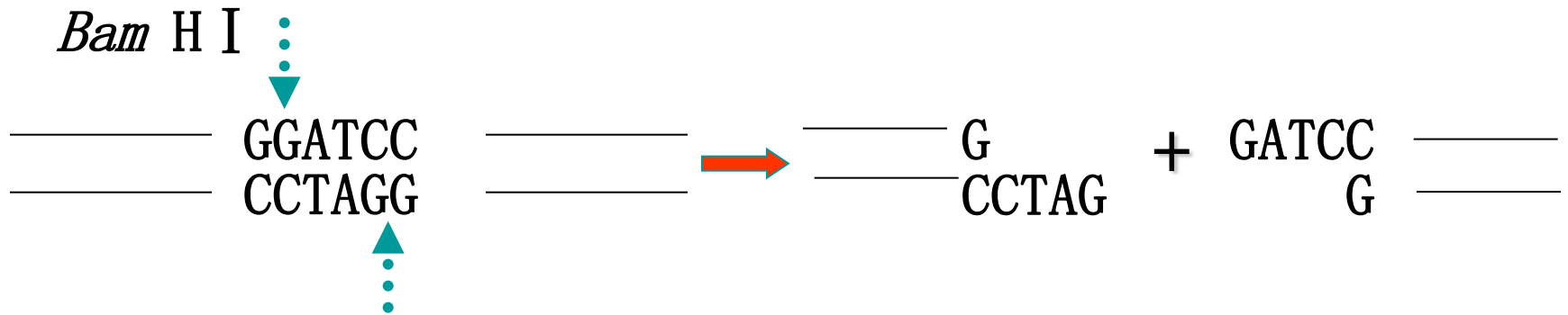
常用：酵母人工染色体（YAC）  
细菌人工染色体（BAC）  
噬菌体人工染色体（PAC）  
哺乳动物人工染色体（MAC）

# 三、 工具酶

- 限制性核酸内切酶
- DNA聚合酶 I
- 逆转录酶
- $T_4$  DNA连接酶
- 碱性磷酸酶
- 末端转移酶
- *Taq* DNA聚合酶

# (一) 限制性内切核酸酶

限制性内切核酸酶(restriction endonuclease, RE)是识别DNA的特异序列, 并在识别位点或其周围切割双链DNA的一类内切酶。

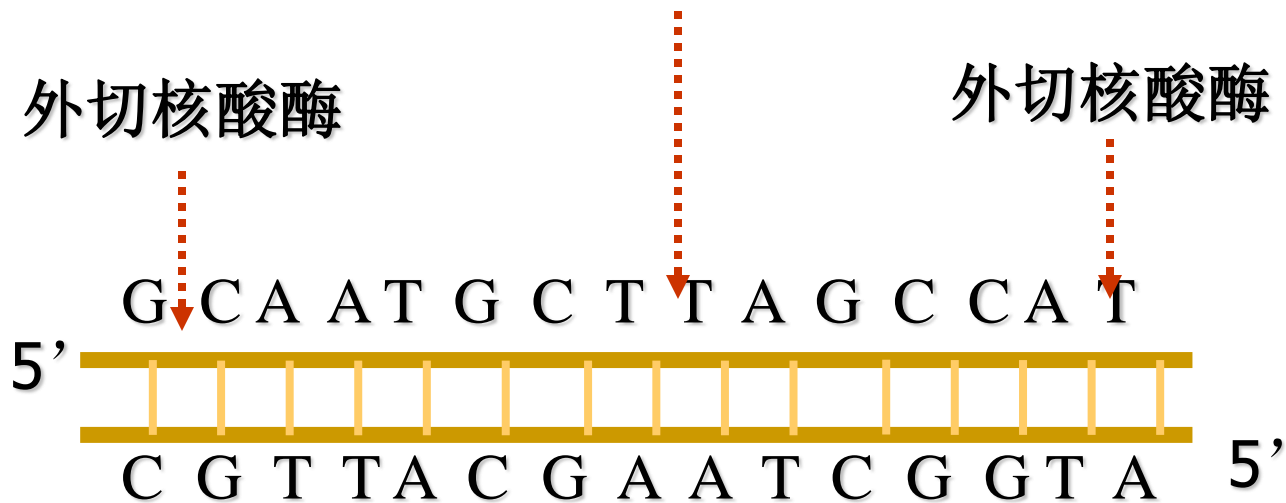


作用：与甲基化酶共同构成细菌的限制修饰系统，  
限制外源DNA， 保护自身DNA。

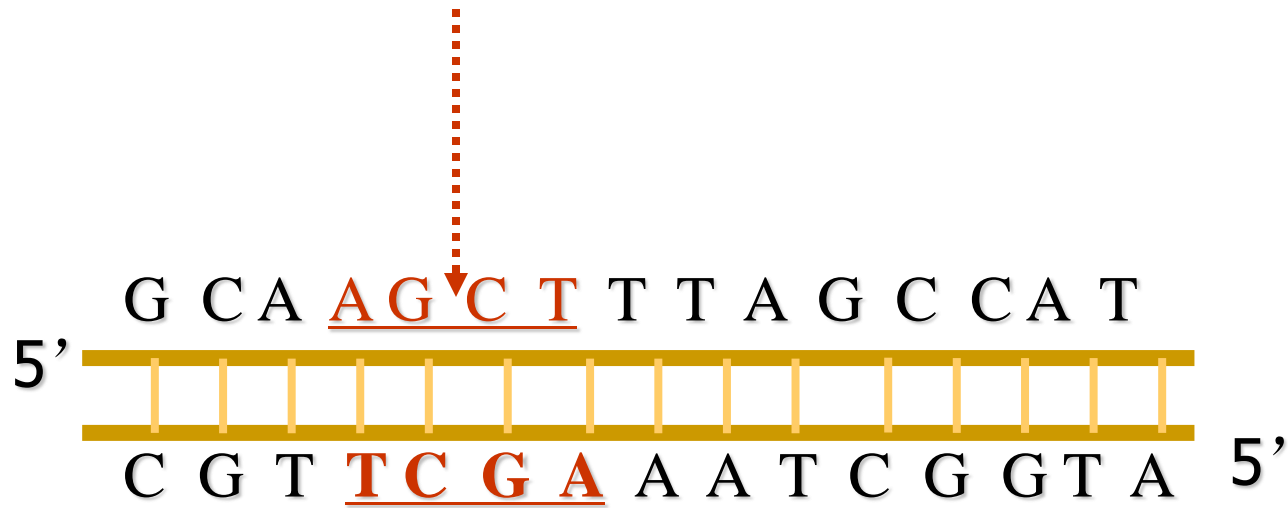
## 内切核酸酶

外切核酸酶

外切核酸酶



## 限制性内切核酸酶

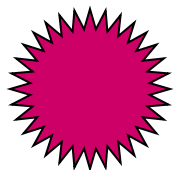


# 限制酶概念提出的背景

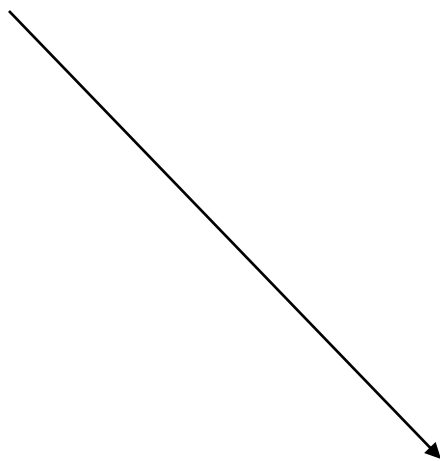
20世纪30年代，微生物学家发现，微生物的噬菌体不能交叉感染，如*E coli* K株的噬菌体只能感染*E coli* K株，不能感染其他株，反之亦然。这种现象称为“限制现象”。

1962年，W. Arber提出一个假设来解释上述现象。他认为这是细菌中有2种以上功能不同的酶，一种是核酸内切酶，能识别并切断外来DNA分子的某些部位，使外来DNA失去活性，限制外来噬菌体的繁殖，把这类酶称为限制性内切核酸酶。

*E coli* K株 噬菌体



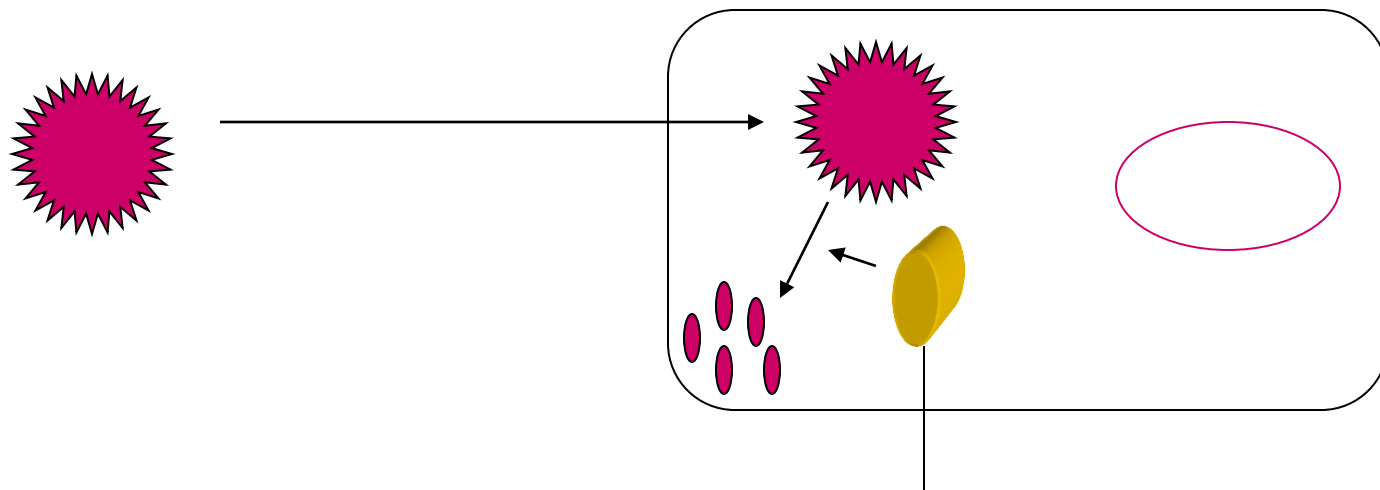
*E coli* K株



其他 *E coli* 菌株

限制现象





## 限制性内切酶

能识别并切断外来DNA分子的某些部位，使外来DNA失去活性，限制外来噬菌体的繁殖，把这类酶称为限制性内切核酸酶。

Bam H I



5'

NNNNNNNNNNNNNNNN**GGATC**NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN

3'

Alu I



5'

NNNNNNNNNNNNNNNN**AGCT**NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN

3'

# 1. 限制性内切核酸酶的命名



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。

## 2. 限制性内切核酸酶的分类

I、II、III

（基因工程技术中常用 II 型）

## 3. 限制性内切核酸酶的识别和切割位点

II 类酶识别序列特点—— 回文结构 (palindrome)

```
.....GGATCC.....  
.....CCTAGG.....
```

切口：平端切口、黏端切口

*Hind* II



平端切口

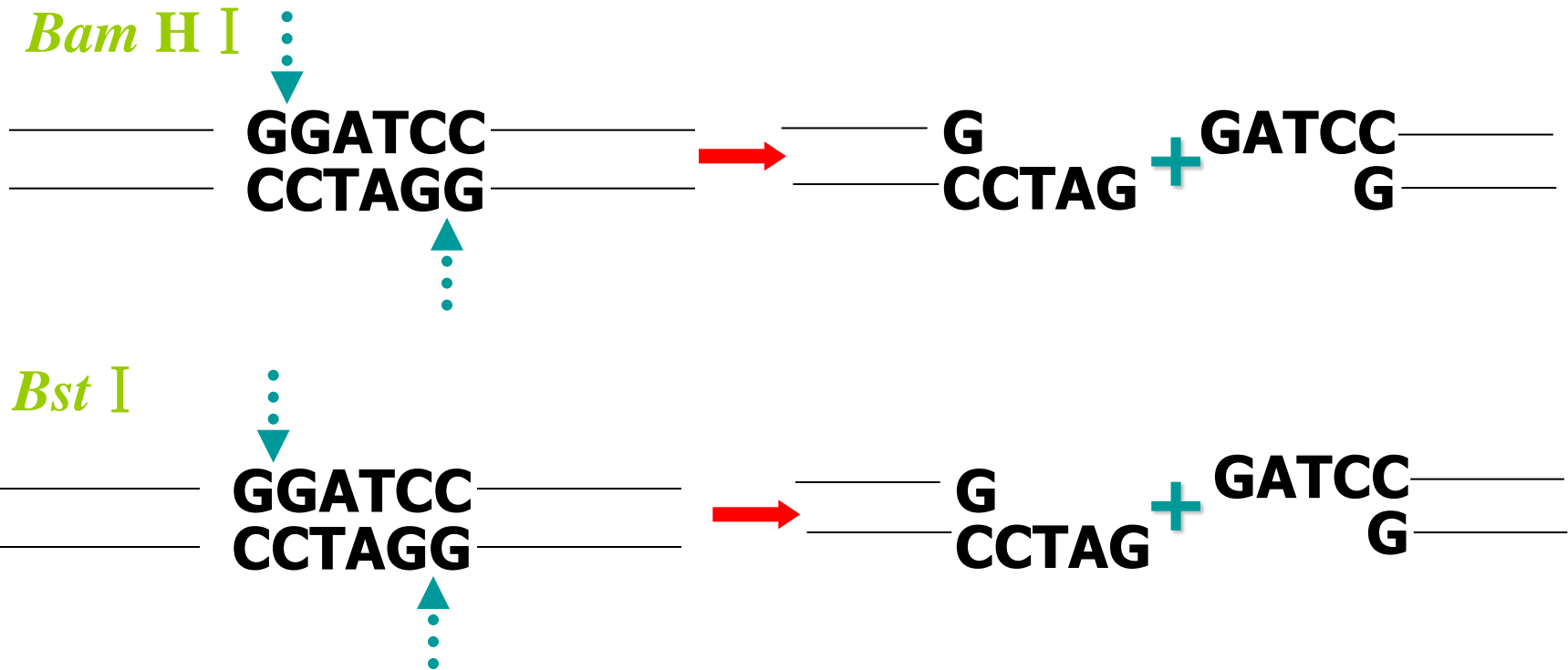
*Bam* H I



黏端切口

# 同切口酶

来源不同的限制酶，但能识别和切割同一位点，这些酶称同切口酶。



## 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，产生相同的黏性末端，称为同尾酶。这两个相同的黏性末端称为配伍末端 (compatible end)。

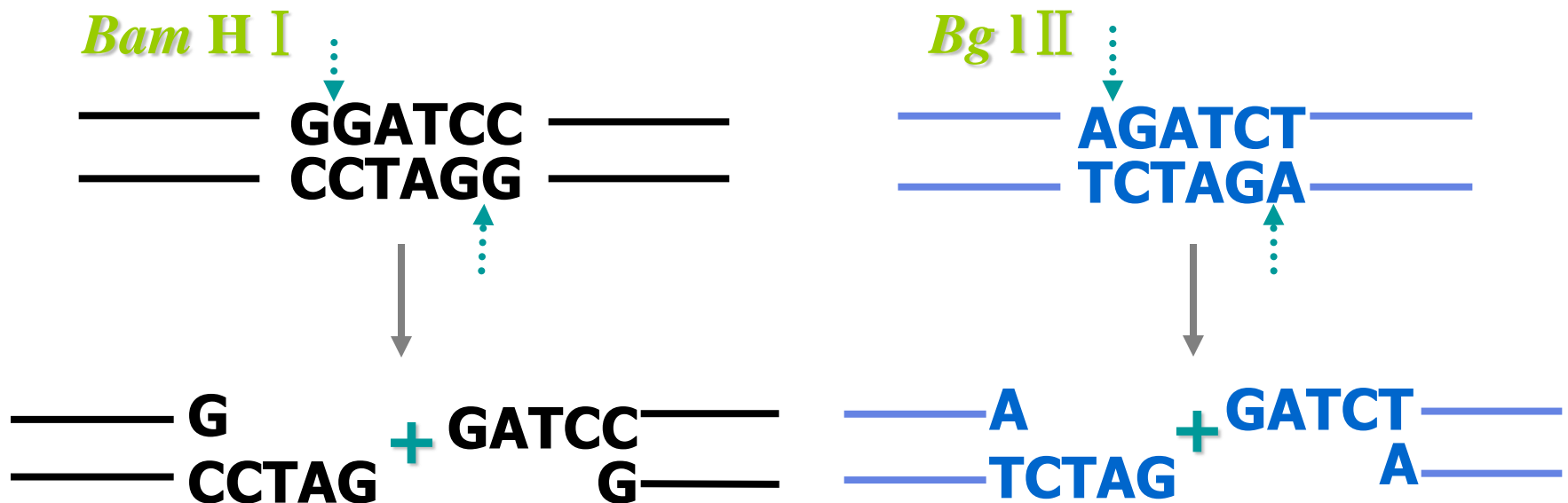


表15-1 限制性内切核酸酶

名 称	识别序列及切割位点	名 称	识别序列及切割位点
切割后产生5' 突出末端：		切割后产生3' 突出末端：	
BamH I	5' . . . G▼GATCC . . . 3'	Apa I	5' . . . GGGCC▼C . . . 3'
EcoR I	5' . . . A▼AATTC . . . 3'	Pst I	5' . . . CTGCA▼G . . . 3'
HindIII	5' . . . A▼AGCTC . . . 3'	切割后产生平末端：	
Hap II	5' . . . C▼CGG . . . 3'	Sma I	5' . . . CCC▼GGG . . . 3'
Cla I	5' . . . AT▼CGAT . . . 3'	EcoR V	5' . . . GAT▼ATC . . . 3'



## （二）DNA连接酶

催化不同DNA分子通过5' -端磷酸基与3' -端羟基之间形成3' , 5' -磷酸二酯键的连接反应。

## （三）DNA聚合酶

以游离的3' -羟基为起始催化脱氧核苷酸的聚合反应。

DNA重组中使用的DNA聚合酶主要有：

DNA聚合酶 I

Klenow片段

Taq DNA聚合酶

## （四）逆转录酶

以RNA为模板合成DNA，合成时需要4种脱氧核苷三磷酸底物及引物，合成方向为 $5' \rightarrow 3'$ ，广泛用于cDNA的合成过程。

## （五）其他工具酶

1. 碱性磷酸酶      能除去 $5'$  -端的磷酸基，可防止载体自身环化，提高重组效率。
2. 多核苷酸激酶  
    能在多核苷酸 $5'$  -端羟基处加入磷酸基团。
3. 末端转移酶  
    能够在DNA片段的 $3'$  -端羟基上加入脱氧核苷酸。

# 重组DNA技术中常用的工具酶

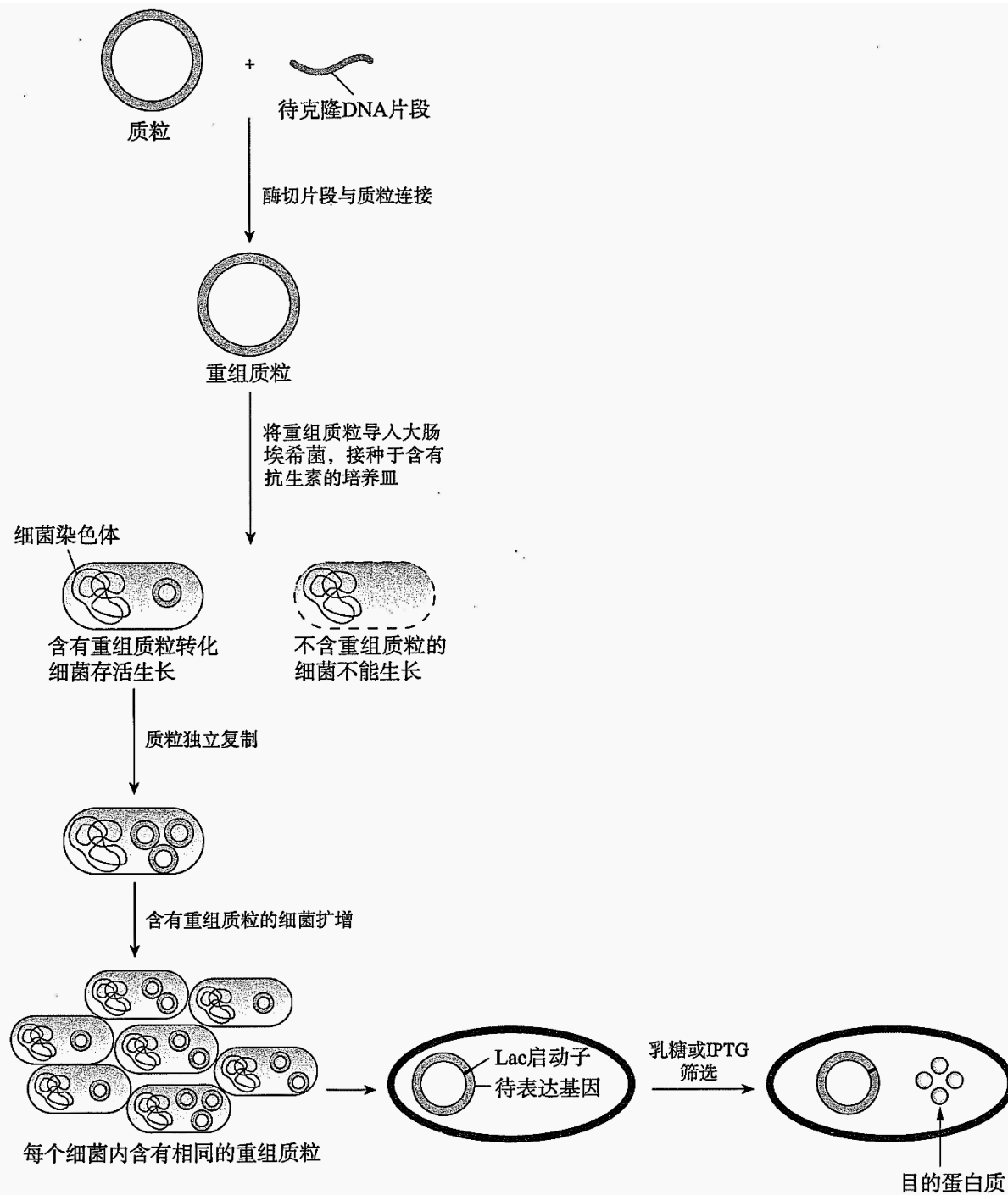
工 具 酶	功 能
限制性内切核酸酶	识别特异序列，切割DNA
DNA连接酶	催化DNA中相邻的5' 磷酸基和3' 羟基末端之间形成磷酸二酯键，使DNA切口封合或使两个DNA分子或片段连接
DNA聚合酶 I	①合成双链cDNA分子或片段连接 ②缺口平移制作高比活探针 ③DNA序列分析 ④填补3' 末端
Klenow片段	又名DNA聚合酶I大片段，具有完整DNA聚合酶I的5'→3'聚合、3'→5'外切活性，而无5'→3'外切活性。常用于cDNA第二链合成，双链DNA 3'末端标记等
反转录酶	①合成cDNA ②替代DNA聚合酶I进行填补，标记或DNA序列分析
多聚核苷酸激酶	催化多聚核苷酸5' 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

# 第二节 重组DNA基本原理

## 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导入受体菌  
→ 重组体的筛选 → 克隆基因的表达

图15-3 基因克隆步骤示意图



# 一、目的基因的分离获取

方法： 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. 基因组DNA文库 (genomic DNA library)

3. cDNA文库 (cDNA library)

4. 聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR)

# (一) 化学合成法获取目的基因

基因的DNA序列已知

DNA合成仪 →



主要用于合成编码小分子活性多肽的基因

# （一）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



## (二) 从基因组文库钓取目的基因

组织或细胞染色体DNA

限制性内切酶

基因片段

克隆载体

重组DNA分子

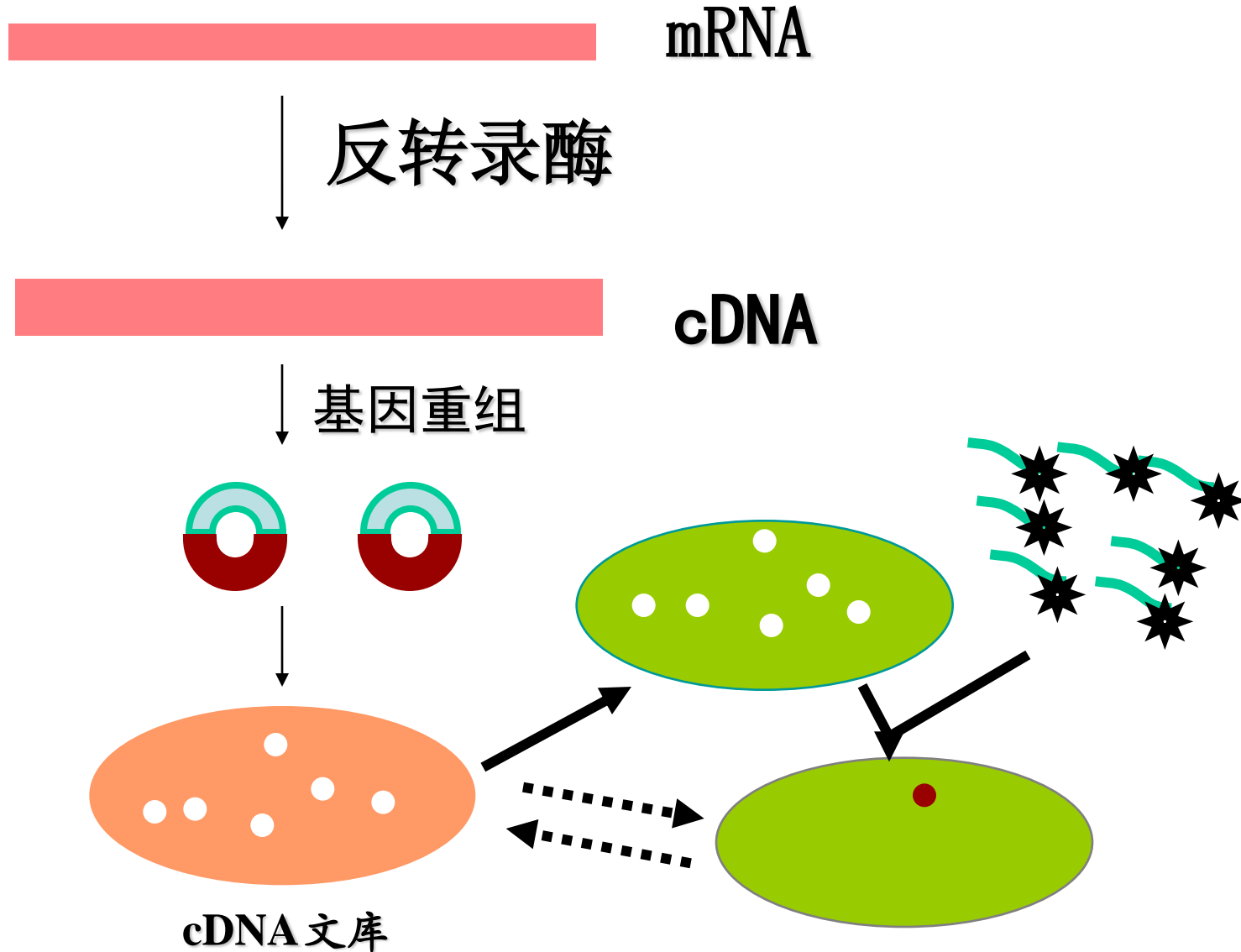
受体菌

含重组分子的转化菌

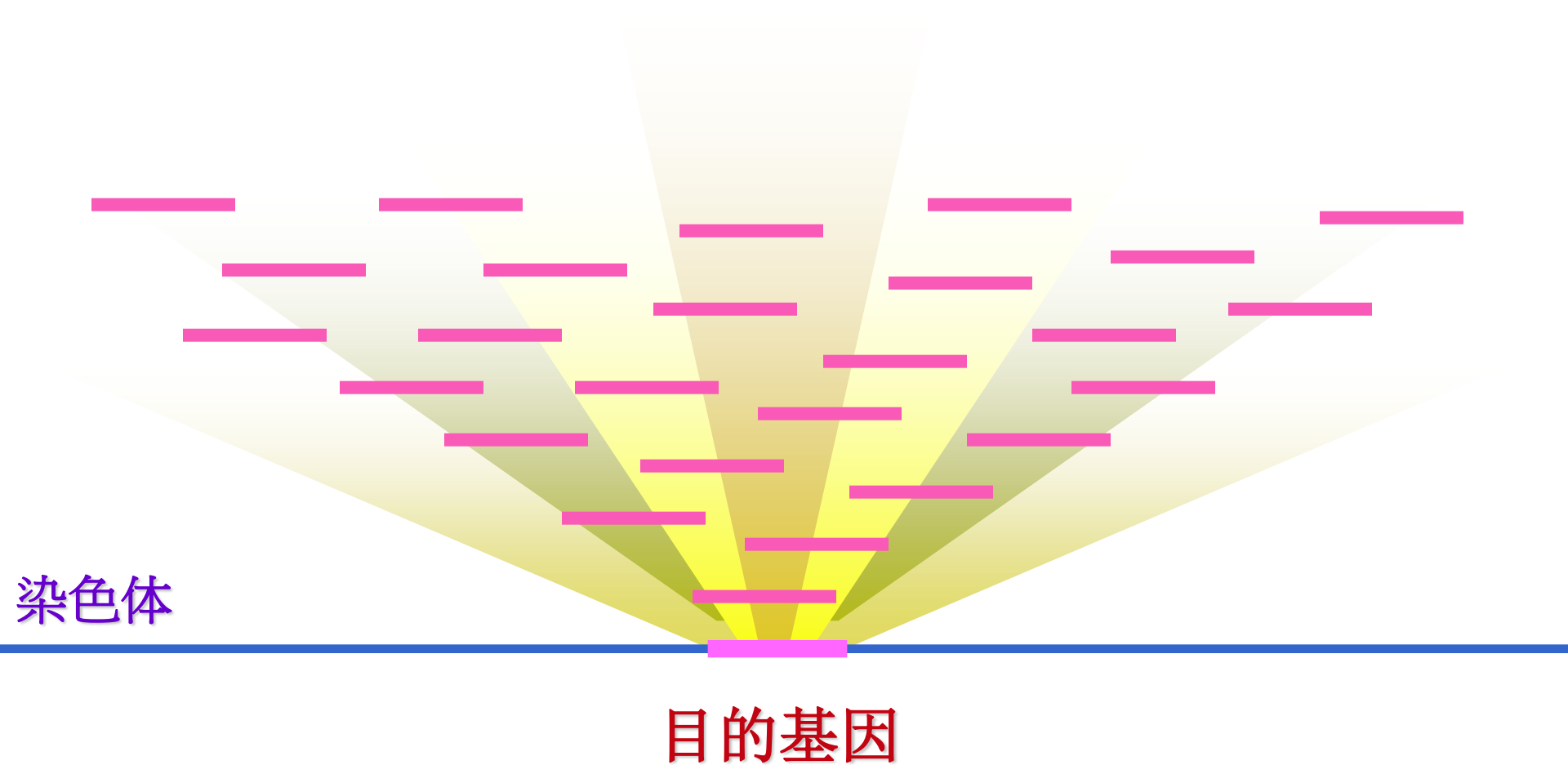
基因组DNA文库

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

### (三) 从cDNA文库钓取目的基因



## (四) 聚合酶链反应



## 二、载体的选择和修饰

## 三、外源基因与载体的连接

### (一) 黏性末端连接

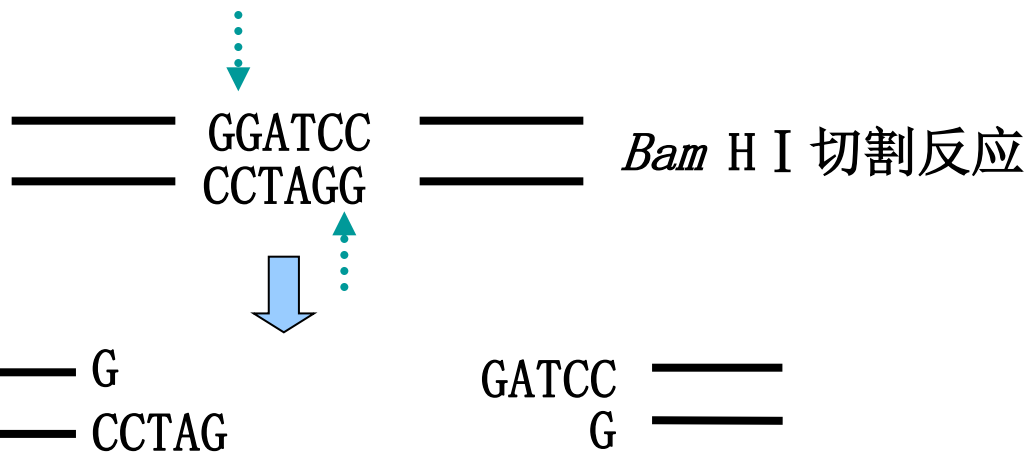
方式：(1) 同一限制酶切位点连接

(2) 不同限制酶切位点连接

配伍末端连接

非配伍末端连接

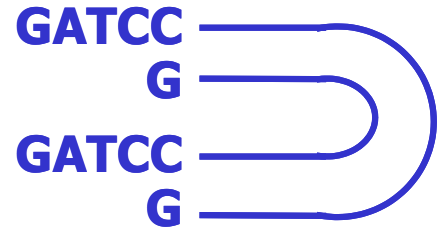
同一限制酶切位点连接



目的基因用 *Bam* H I 切割



载体DNA用 *Bam* H I 切割



+

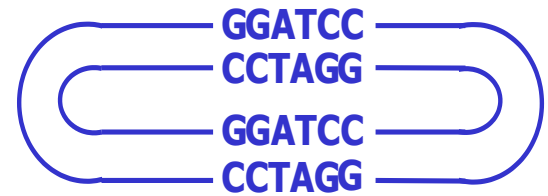
T4 DNA连接酶  
15° C



目的基因自连

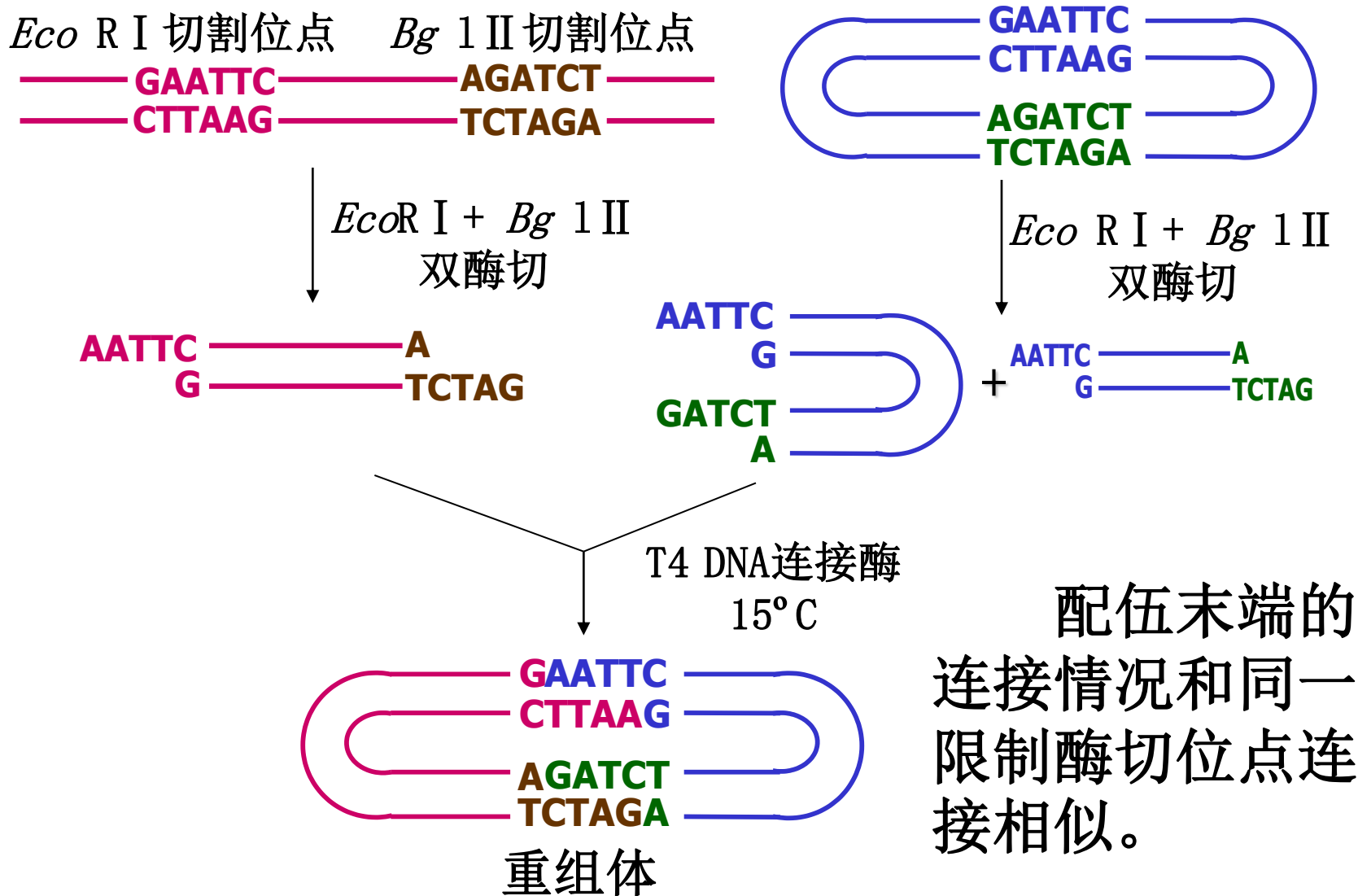


重组体



载体自连

# 不同限制酶切位点（非配伍末端）的连接



## (二) 平末端连接

适用于：限制性内切酶切割产生的平端

黏端补齐或切平形成的平端

目的基因



限制性内切酶



载体



限制性内切酶



T4 DNA 连接酶  
15 °C



载体自连

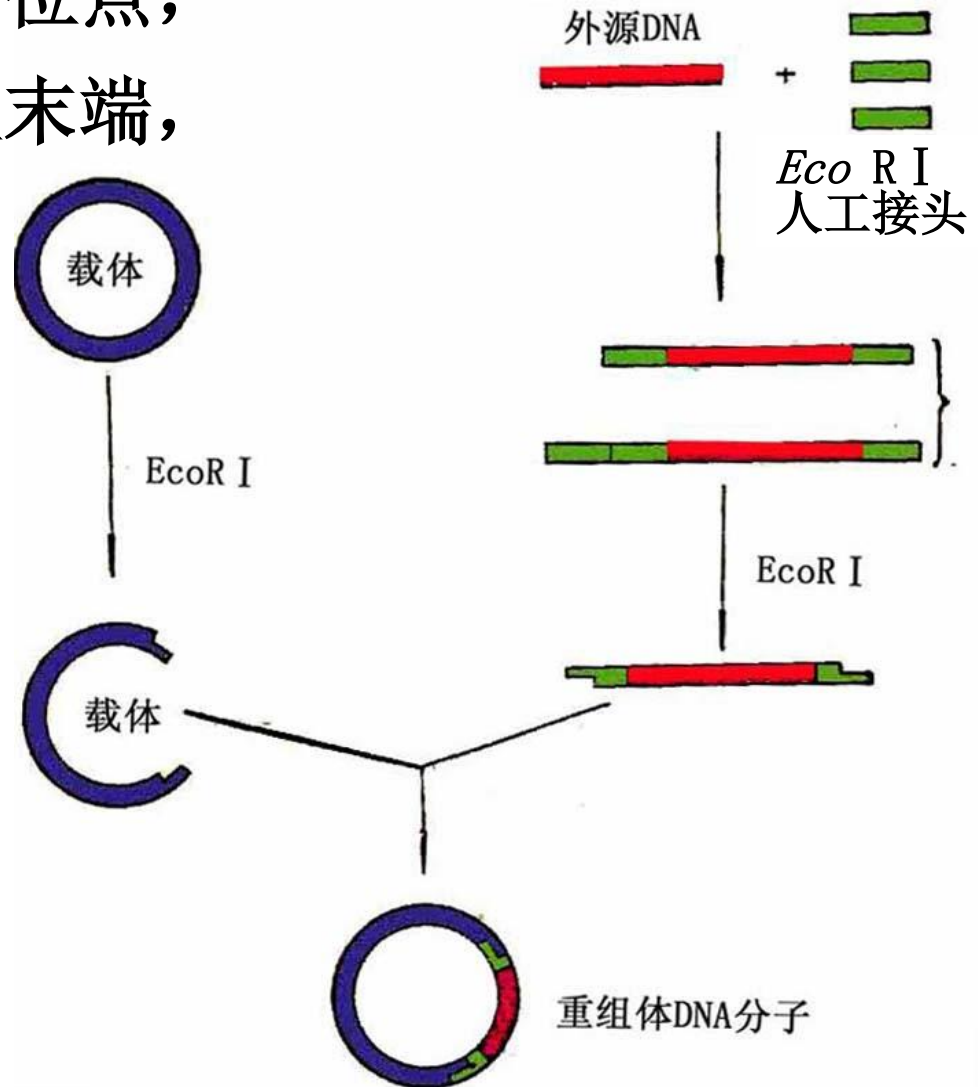
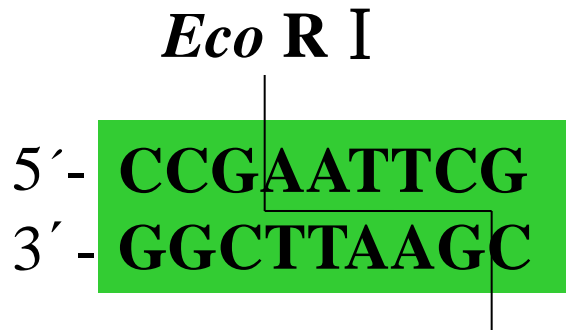


目的基因  
自连



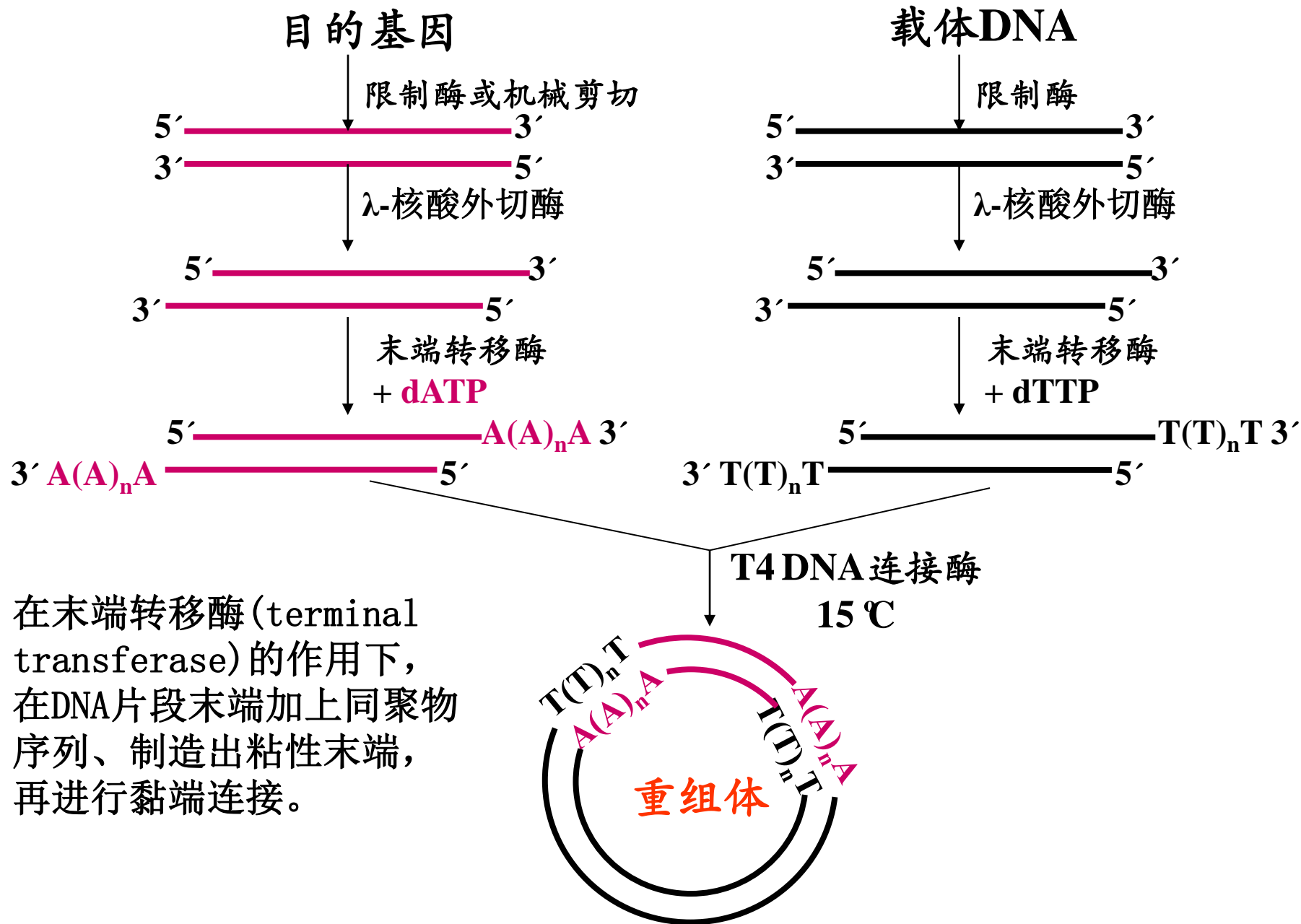
### (三) 人工接头(linker)连接

由平端加上新的酶切位点，  
再用限制酶切除产生黏性末端，  
而进行黏端连接。





## (四) 同聚物加尾连接



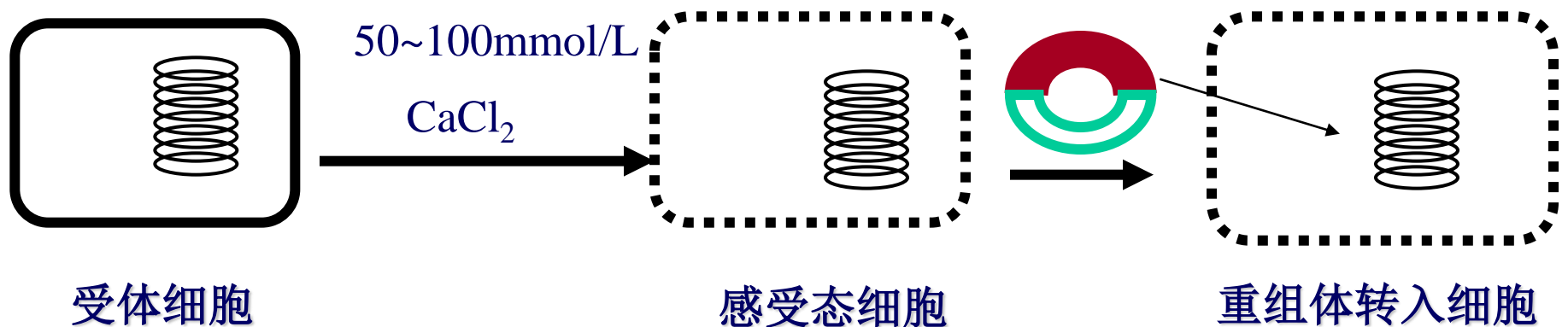
在末端转移酶 (terminal transferase) 的作用下，在DNA片段末端加上同聚物序列、制造出粘性末端，再进行黏端连接。

## 四、重组 DNA 分子导入宿主细胞

方法：（一）转化（transformation）

（二）转染（transfection）

（三）感染（infection）



**$\text{CaCl}_2$  处理**

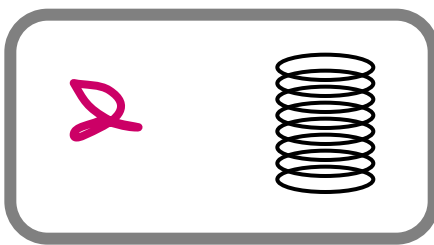
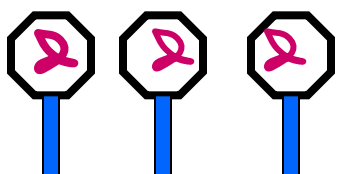
**转化**  
(transformation)

基因重组



噬菌体

体外包装



噬菌体体外包装

转染  
(transfection)

## 五、含有重组DNA宿主细胞的筛选与鉴定

由于重组率和转化率不可能达到理想极限，因此必须借助各种筛选和鉴定方法得到含有重组DNA的阳性克隆。

### (一) 遗传学标志筛选法

1. 抗药性标志筛选
2. 插入失活
3. 营养缺陷型的互补筛选
4.  $\alpha$ -互补

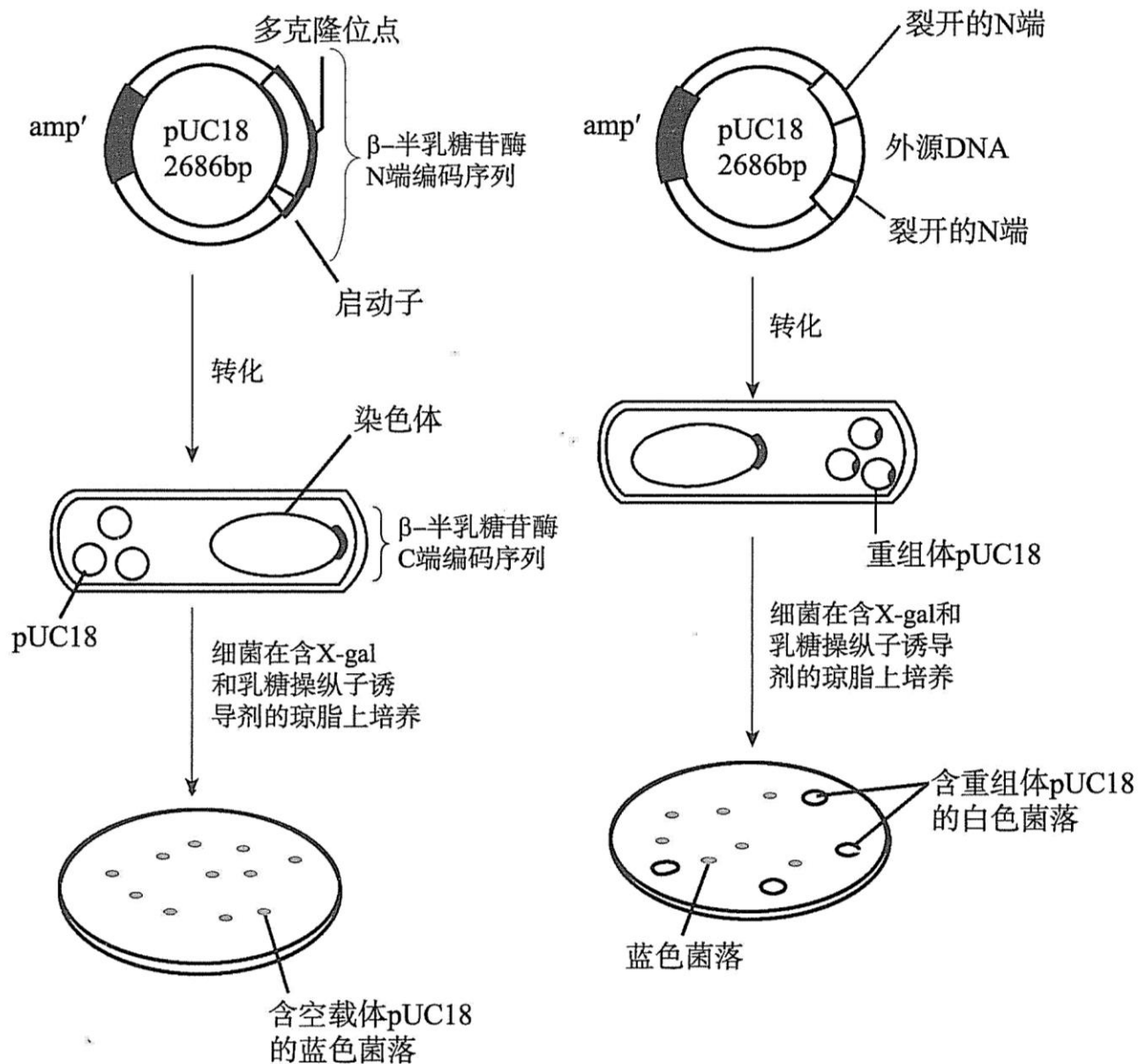


图15-4 利用 $\alpha$ -互补原理筛选重组体

## (二) 核酸杂交筛选法

利用带有放射性同位素或生物素标记的探针与目的DNA片段杂交，从各种重组菌落、cDNA文库或基因组文库中准确筛选出目的基因。

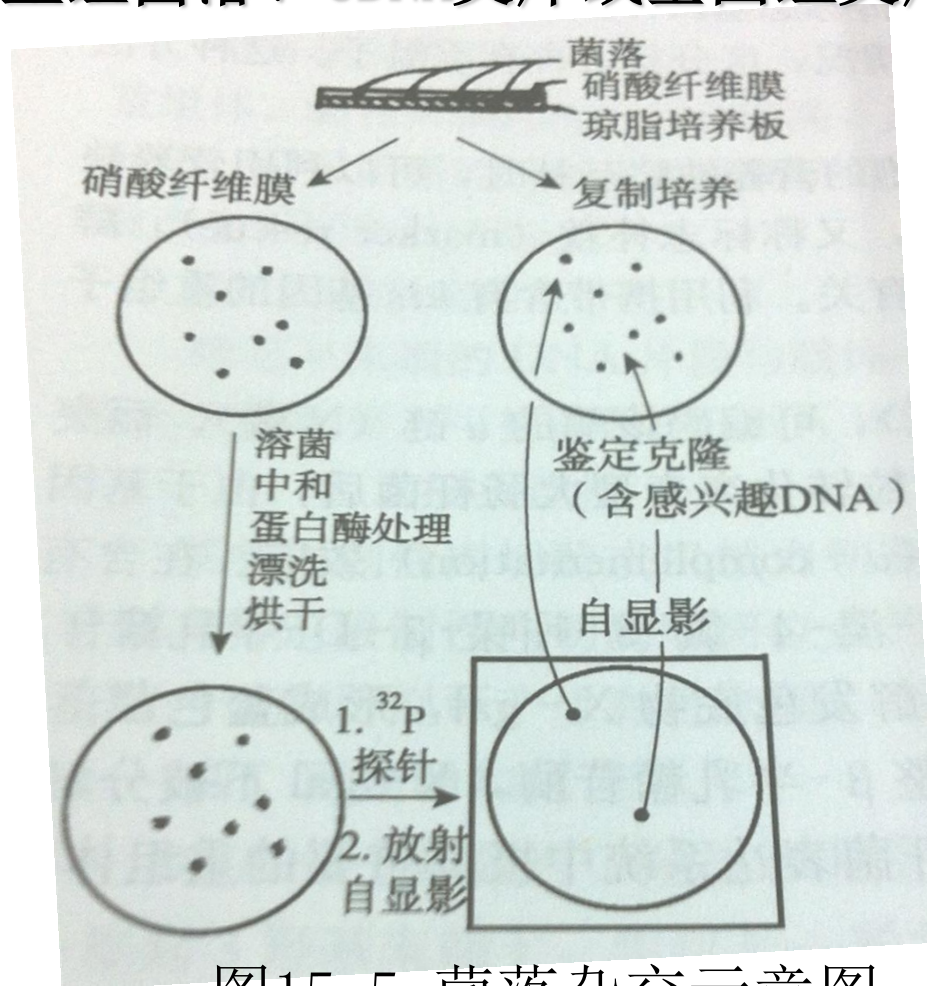


图15-5. 菌落杂交示意图

### (三) PCR/DNA序列测定

重组子中的目的基因可以通过PCR，实现特异扩增而获得，继而进行DNA测序，得到目的基因序列的全部信息。

### (四) 外源基因表达产物鉴定

当外源基因的表达产物已知时，可以使用相应的抗体，结合放射自显影、化学发光和各种显色反应来实现外源基因表达产物的鉴定。

## 六、目的基因的表达

### (一) 外源基因在原核细胞的表达

#### *E. coli*表达体系最为常用

*E. coli*表达体系的优点：积累了充足经验，有数不清的载体可供应用；可因不同载体而选择不同菌种作宿主；操作安全，致病能力低；成本相对低得多。

*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，热原、内毒素不易除去



# 六、目的基因的表达

## (二) 外源基因在真核细胞的表达

真核表达体系：酵母、昆虫、哺乳类动物细胞

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、不经济

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

# 第三节 重组DNA技术在医学中的应用

## 一、基因诊断

基因诊断 (gene diagnosis) 是在基因水平鉴定遗传性疾病所涉及的基因结构及表达水平的改变，从而对疾病进行诊断的技术。

基本过程：

1. 分离、扩增待测的DNA片段
2. 利用PCR和核酸分子杂交等不同分析技术鉴定DNA的异常。

## 二、基因治疗

基因治疗（gene therapy）可从基因水平改变细胞中的缺陷基因，或用正常基因矫正、替代缺陷基因，从而达到治疗目的。

分类： 1. 间接体内疗法  
2. 直接体内疗法

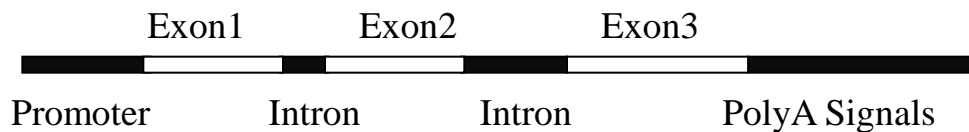
技术： 1. RNA干扰(RNA interference, RNAi)  
2. 反义RNA (antisense RNA)  
3. 三链DNA (triple-strand DNA)

### 三、疾病相关基因功能研究

目的：确定人类疾病发生、发展及转归的机制，进而研发新的诊断技术及治疗干预措施，进行药物开发。

- 手段：
1. DNA序列比对及功能诠释
  2. 利用工程细胞研究基因功能
  3. 研究蛋白质相互作用
  4. 借助基因修饰动物来研究基因功能

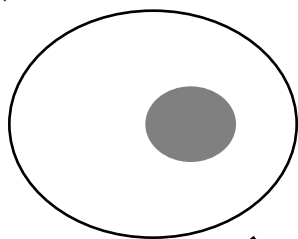
基因打靶（gene targeting）技术通过同源重组定向地从染色体上移除或移入特定基因。在动物（主要是小鼠）受精卵或胚胎干细胞中表达外源性基因、敲入(knockin)或敲除(knockout)基因，即可获得基因修饰动物品系。



**Cloned gene**



将纯化重组的DNA显微注射至鼠受精卵细胞核



受精卵植入母体培育

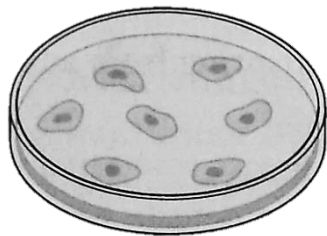
从鼠尾中提取DNA做转基因鉴定



**转基因动物：**  
将外源重组基因转染并整合到动物受体细胞基因组中，从而形成在受体表达外源基因的动物。

图15-6 制备转基因小鼠的原理

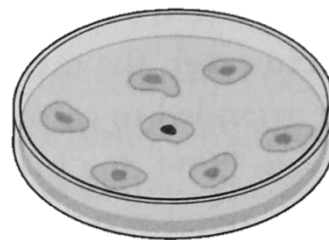
培养黑色小鼠胚胎干细胞



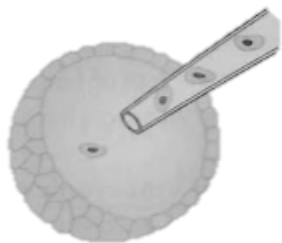
转染克隆突变无功能基因



部分胚胎干细胞通过同源性重组获得无功能基因



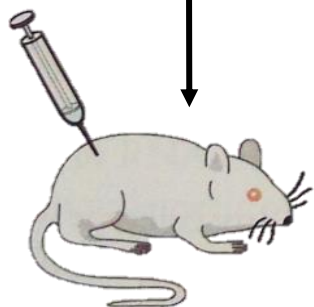
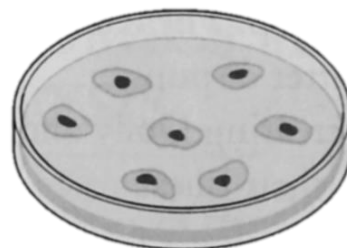
改造的胚胎干细胞显微注射至小鼠囊胚中



筛选并分离



克隆得到同源细胞群



胚胎植入白色母体小鼠发育



嵌合体小鼠

繁殖使得子代小鼠获得基因敲除的胚胎干细胞



黑色基因敲除小鼠

图15-7 制备基因敲除小鼠的原理

## 四、基因工程药物和疫苗研发

表15-2

基因工程医药产品

产品名称	功能及应用
组织胞浆素原激活剂	抗凝
血液因子Ⅷ	促进凝血
粒细胞-巨噬细胞集落刺激	白细胞生成
促红细胞生成素	刺激红细胞生成
白细胞介素	激活刺激各类白细胞
超氧化物歧化酶	抗组织损伤
胰岛素	糖尿病治疗
干扰素	抗病毒及某些肿瘤
单克隆抗体	临床或实验室试验诊断
乙肝疫苗	预防乙肝

# 小 结

重组DNA技术操作过程可形象归纳为

分 ————— 分离目的基因

切 ————— 限制酶切目的基因与载体

接 ————— 拼接重组体

转 ————— 转入受体菌

筛 ————— 筛选重组体

表 ————— 克隆基因的表达



# 表15-3 重组DNA技术的步骤与说明

基本过程		主要技术	说明
分	目的基因获取	化学合成	通过 <b>DNA</b> 合成仪合成目的基因
		基因组 <b>DNA</b> 文库	用限制性内切酶切割染色体获取目的基因
		c <b>DNA</b> 文库	以mRNA为模板合成的互补 <b>DNA</b>
		聚合酶链反应	设计引物， <b>PCR</b> 扩增获取目的基因
切	载体选择与构建	根据实验的需要选择载体，酶切载体和目的基因	
接	外源基因与载体的连接	黏性末端连接	—
		平端连接	—
		同聚物加尾	黏性末端的一种特殊形式
		人工接头连接	黏性末端的一种特殊形式
转	重组 <b>DNA</b> 导入受体菌	根据重组时采用的载体性质不同，有转化、转染、感染等方式	

## 表15-3 重组DNA技术的步骤与说明

筛	重组体的筛选	直接选择法	针对载体携带某种标志基因和目的基因而设计的方法。如抗药性标志选择、标志补救、分子杂交法
		间接选择法	利用特异抗体与目的基因表达产物相互作用进行筛选
表	克隆基因的表达	原核表达体系	<p>载体的条件：①选择标志；②强启动子；③翻译调控序列；④多克隆位点</p> <p>优点：培养简单、迅速、经济、适合大规模生产工艺</p> <p>缺点：①不宜表达真核基因组DNA；②不能加工表达的真核蛋白质；③表达的蛋白质常形成不溶性包涵体；④很难表达大量可溶性蛋白质</p>
		真核表达体系	<p>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、表达产物可分区域积累</p>

## 思考题：

1. 简述DNA重组技术的概念及基本过程。
2. 简要概括各种常用载体的性质和特点。
3. DNA重组中常用的工具酶有哪些？各有何特点？
4. 简述获取目的基因的基本方法。
5. 鉴定和筛选重组子的方法有哪些？
6. 对比目的基因在原核和真核系统中表达的不同。
7. 简述重组DNA技术在医学中的应用。