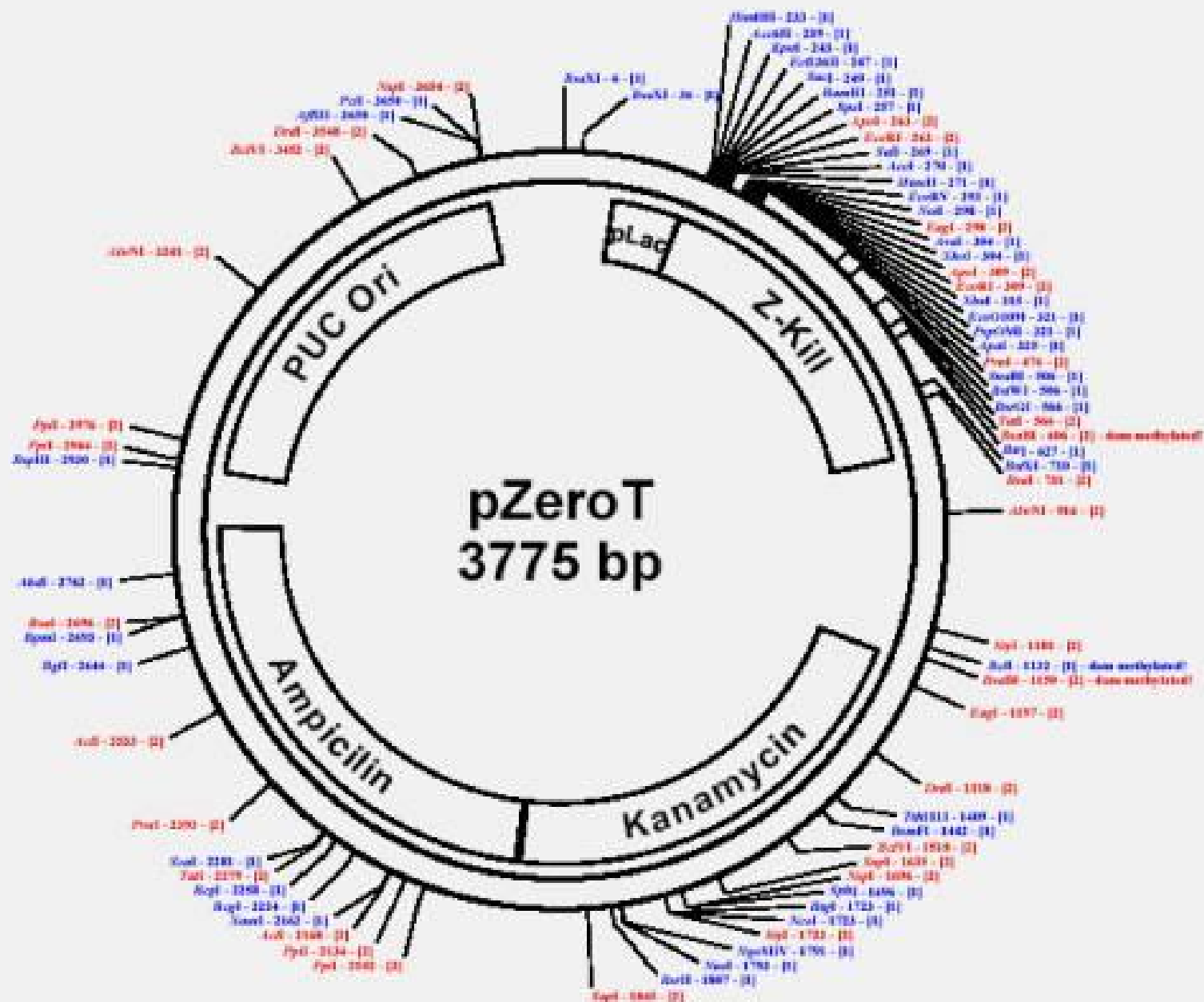


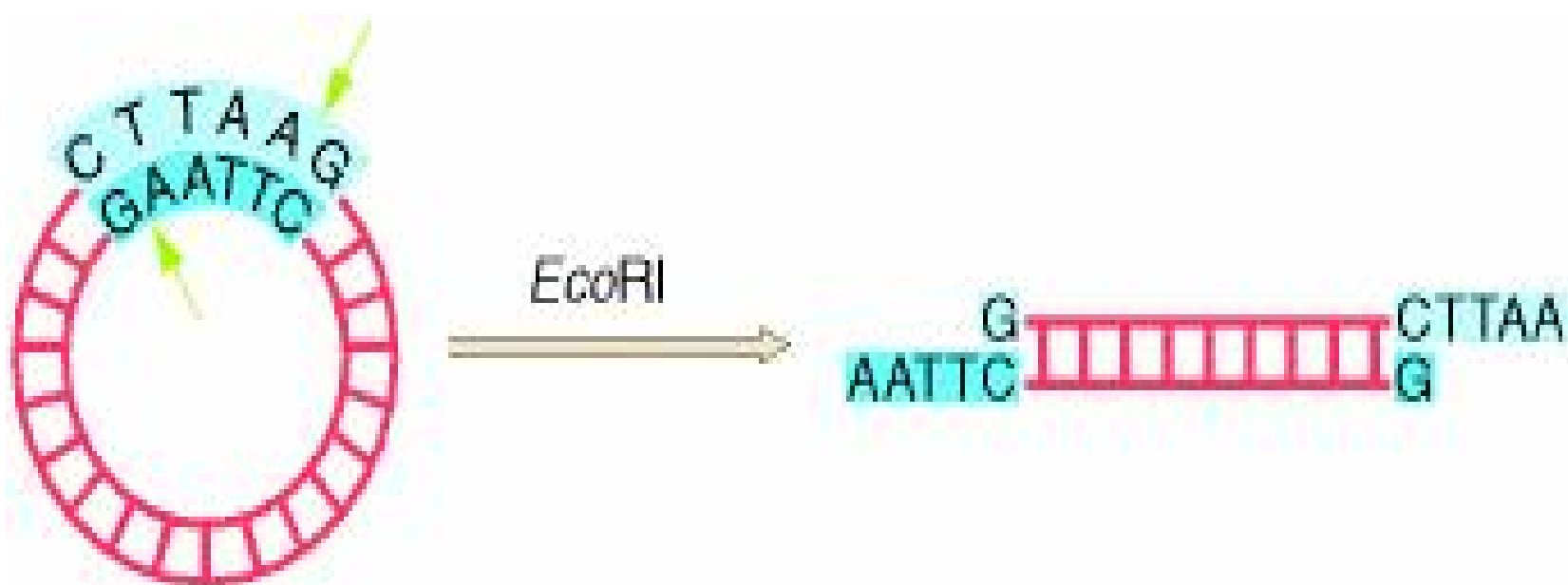
分子克隆载体

周俊宜



基因载体是一类能自我复制的DNA分子，其中的一段DNA被切除而不影响其复制，可用以置换或插入外源（目的）DNA而将目的DNA带入宿主细胞。

常用的载体有质粒、噬菌体、病毒



基因工程的表达体系

操纵子理论在基因工程中的应用

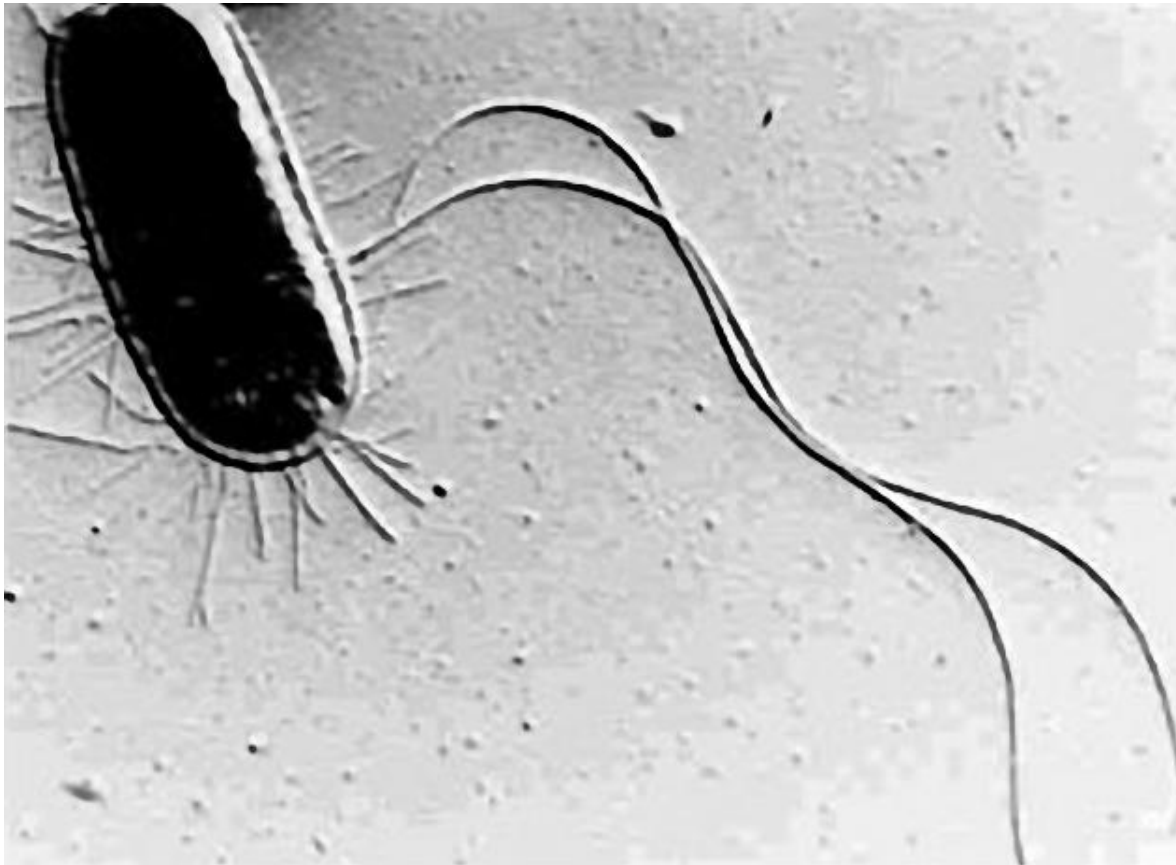
目的基因翻译表达及其准确性

常用基因载体

基因工程的表达体系

原核生物表达体系:

大肠杆菌、枯草杆菌、农杆菌



大肠杆菌表达体系的优点:

- (1) 积累了充足经验, 有数不清的载体可供应用;
- (2) 对其研究充分, 可依载体选择不同菌种作宿主;
- (3) 操作安全, 致病能力低 ;
- (4) 成本相对低得多 。

缺点:

- (1) 原核生物与真核生物有不同的酶系统和基因调控方式;
- (2) 没有加工所需的酶系统;
- (3) 糖基化问题;
- (4) 热源、内毒素不易除去 ;
- (5) 常会形成包涵体。

表达体系的发展

表达体

载体

宿主

第一代 原核生物表达体系

质粒、噬菌体

细菌

第二代 酵母表达体系

穿梭质粒

酵母

第三代 哺乳类细胞表达体系

病毒、脂质体

培养细胞

第四代 基因直接导入

DNA本身

生殖细胞、
体细胞、个体

操纵子理论在基因工程的应用



基因工程的目的是使目的基因能**高效表达**。

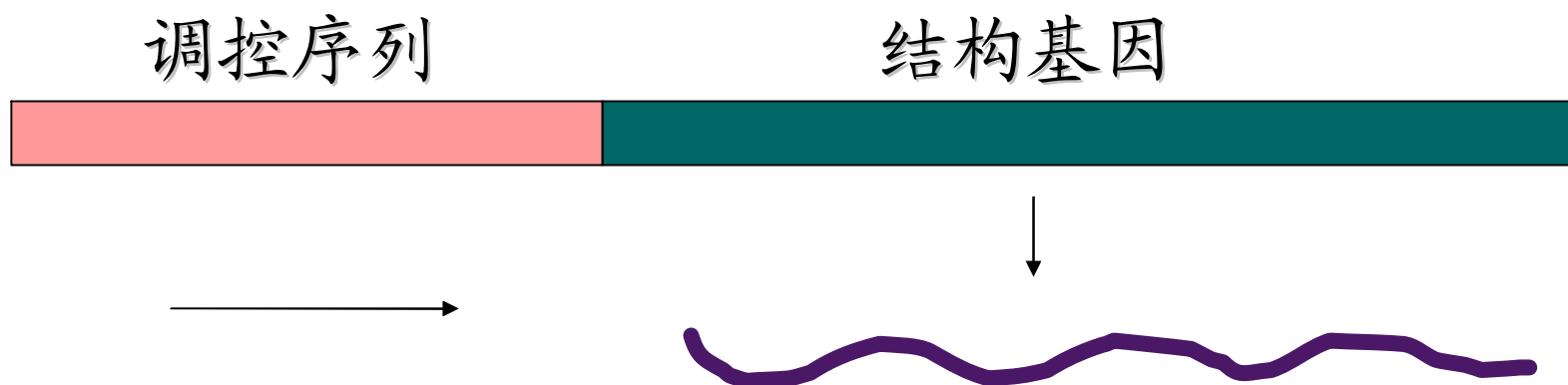
基因表达受DNA结构、蛋白质因子与核酸相互辨认、结合等组成的表达体系的调控。

基因表达调控可在转录、转录后修饰、翻译、翻译后修饰等水平进行

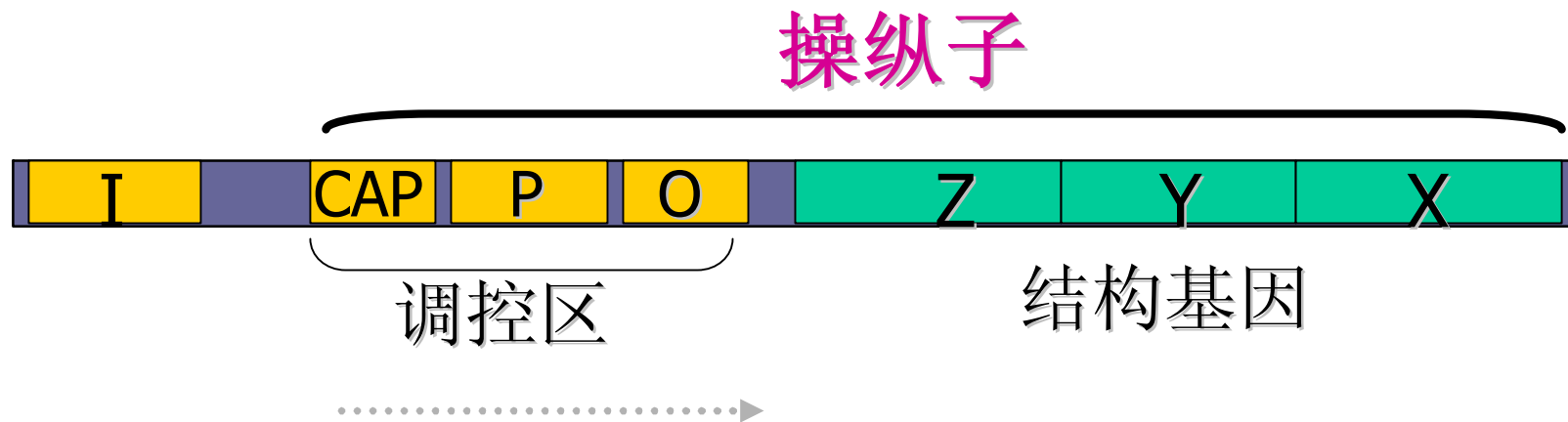
基因工程载体的构建必需应用表达调控的基本理论知识，应用已知的调控序列进行重组、改造。

一、启动子与转录调控

原核生物的转录单位是**操纵子**，操纵子包括相关结构基因及其上游的调控序列。

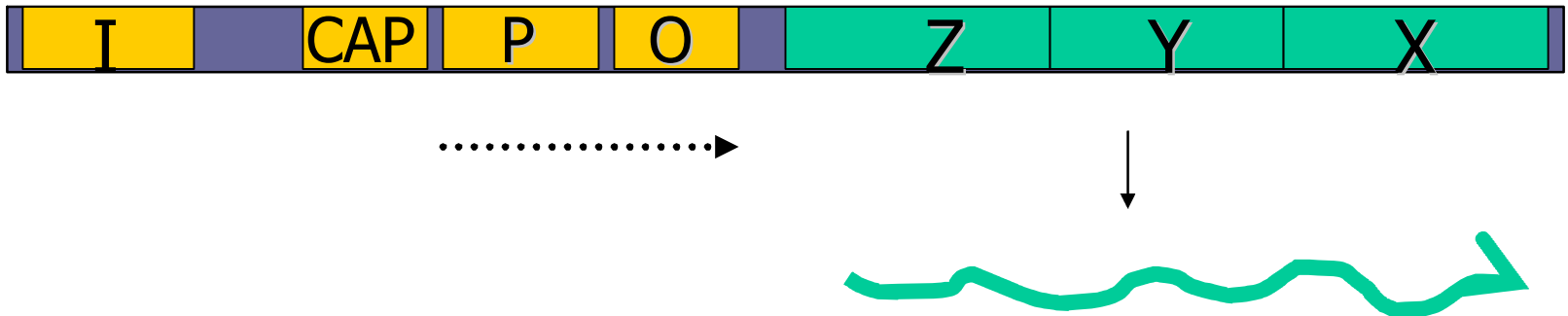
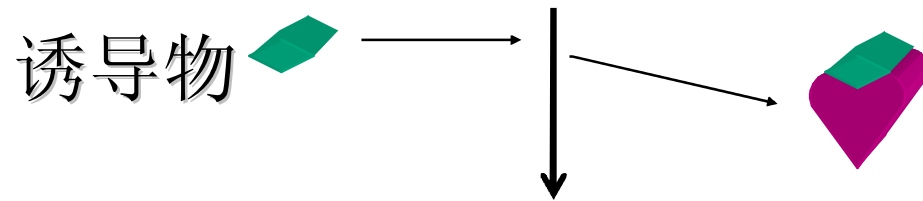
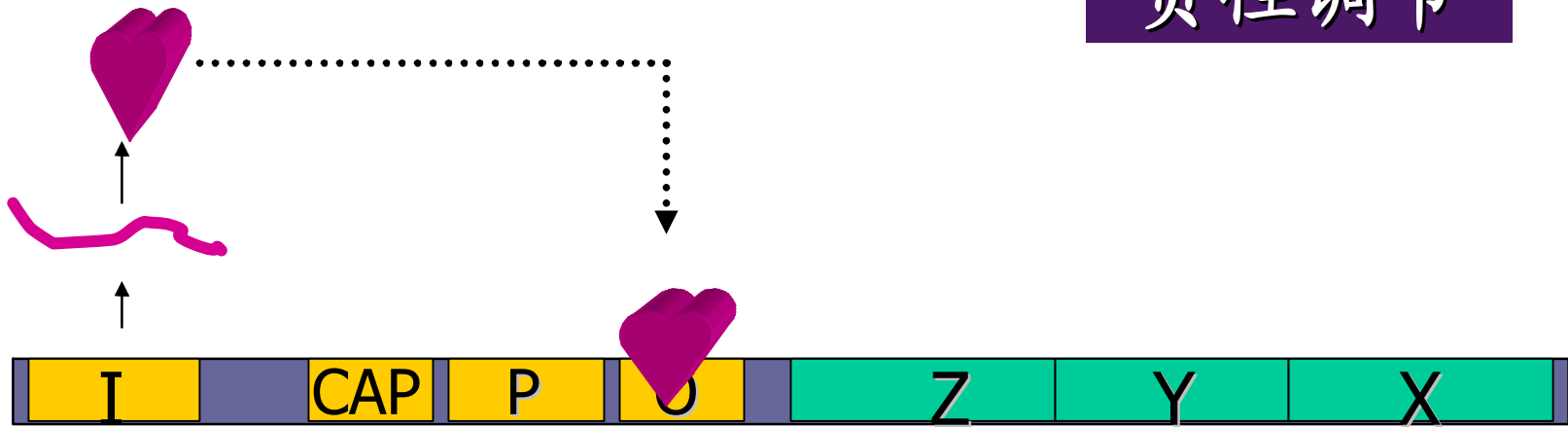


以乳糖操纵子（lac operon）为例：

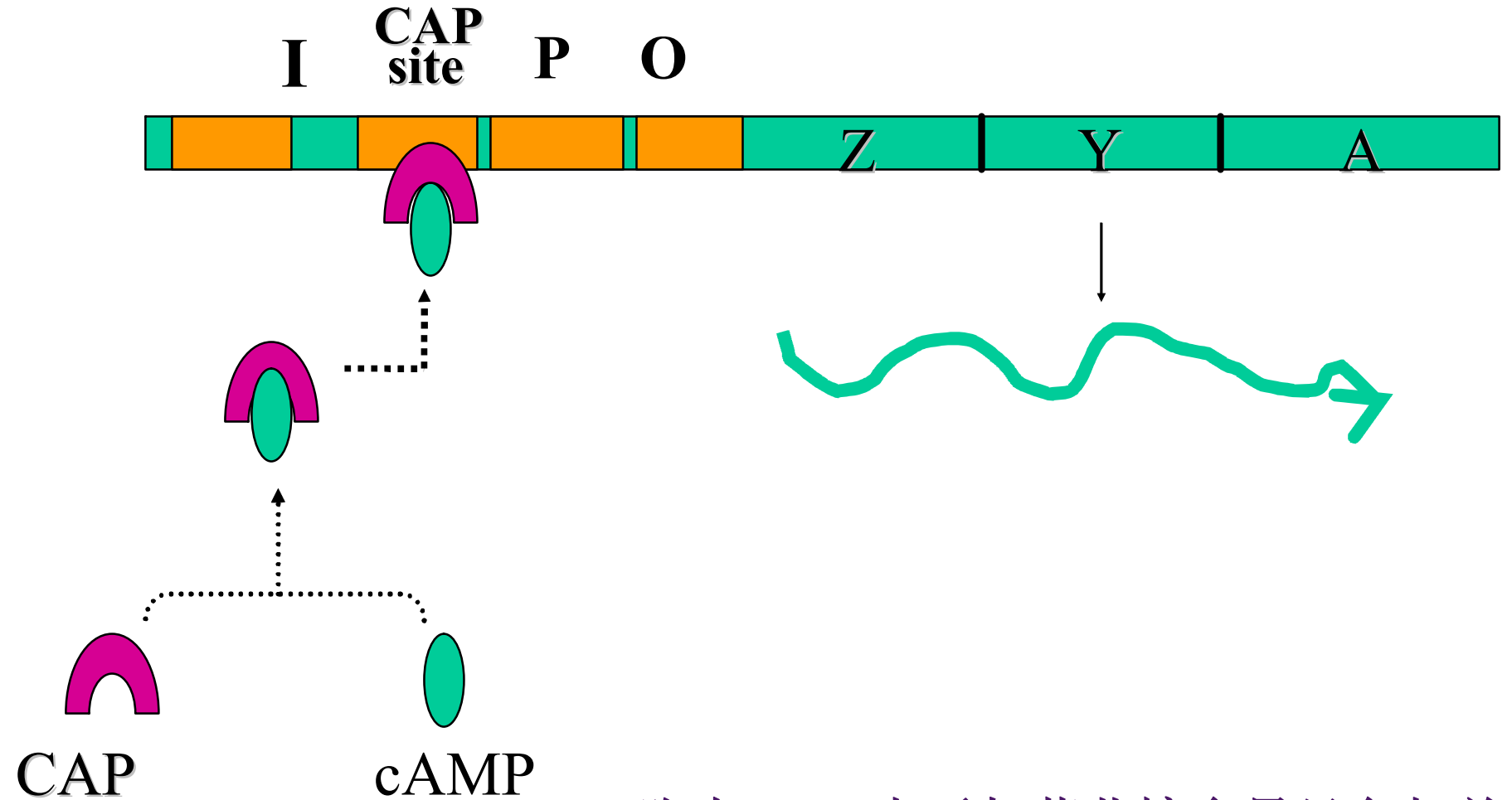


P：启动序列 O：操纵序列 I：调节序列

负性调节

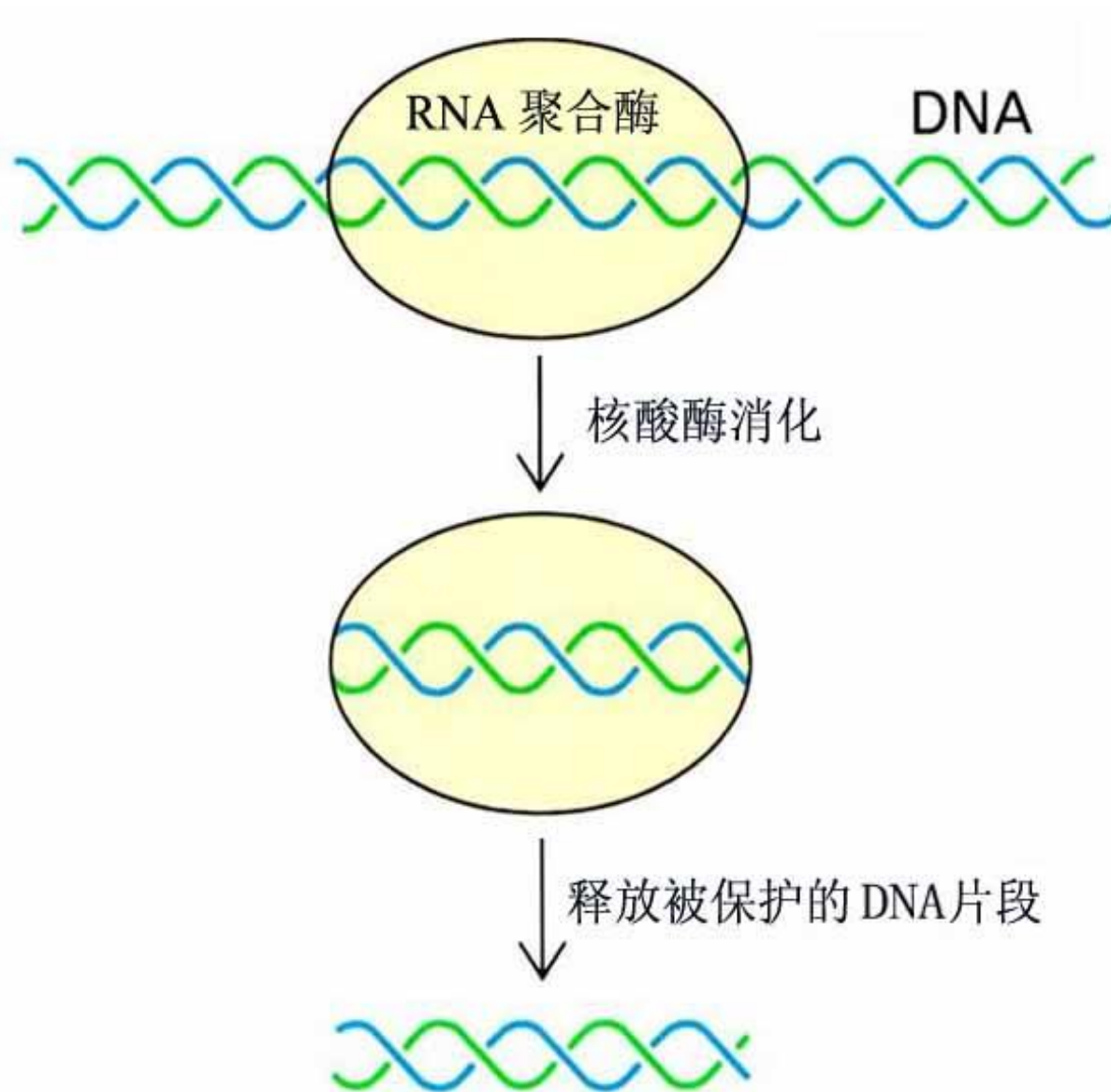


正性调节

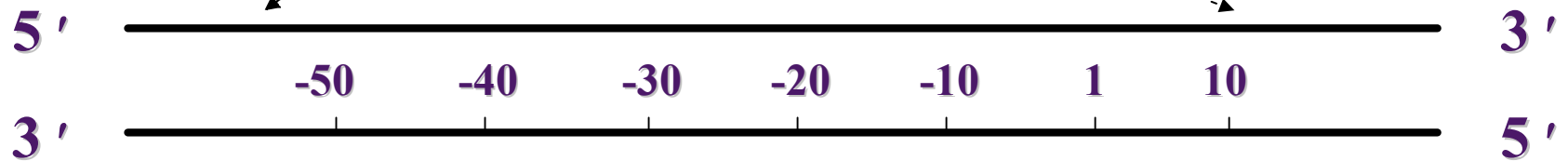
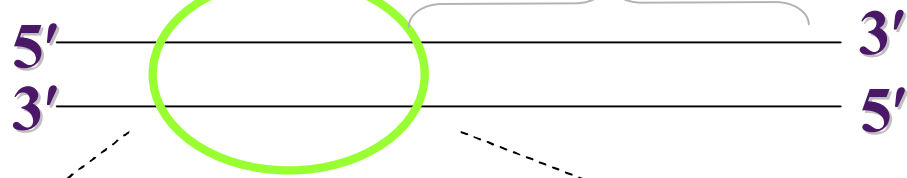


胞内cAMP水平与葡萄糖含量呈负相关

二、强启动子的构建



RNA聚合酶保护区 结构基因



-35 区

TTGACA
AACTGT

RNA-pol 辨认位点
(recognition site)

-10 区

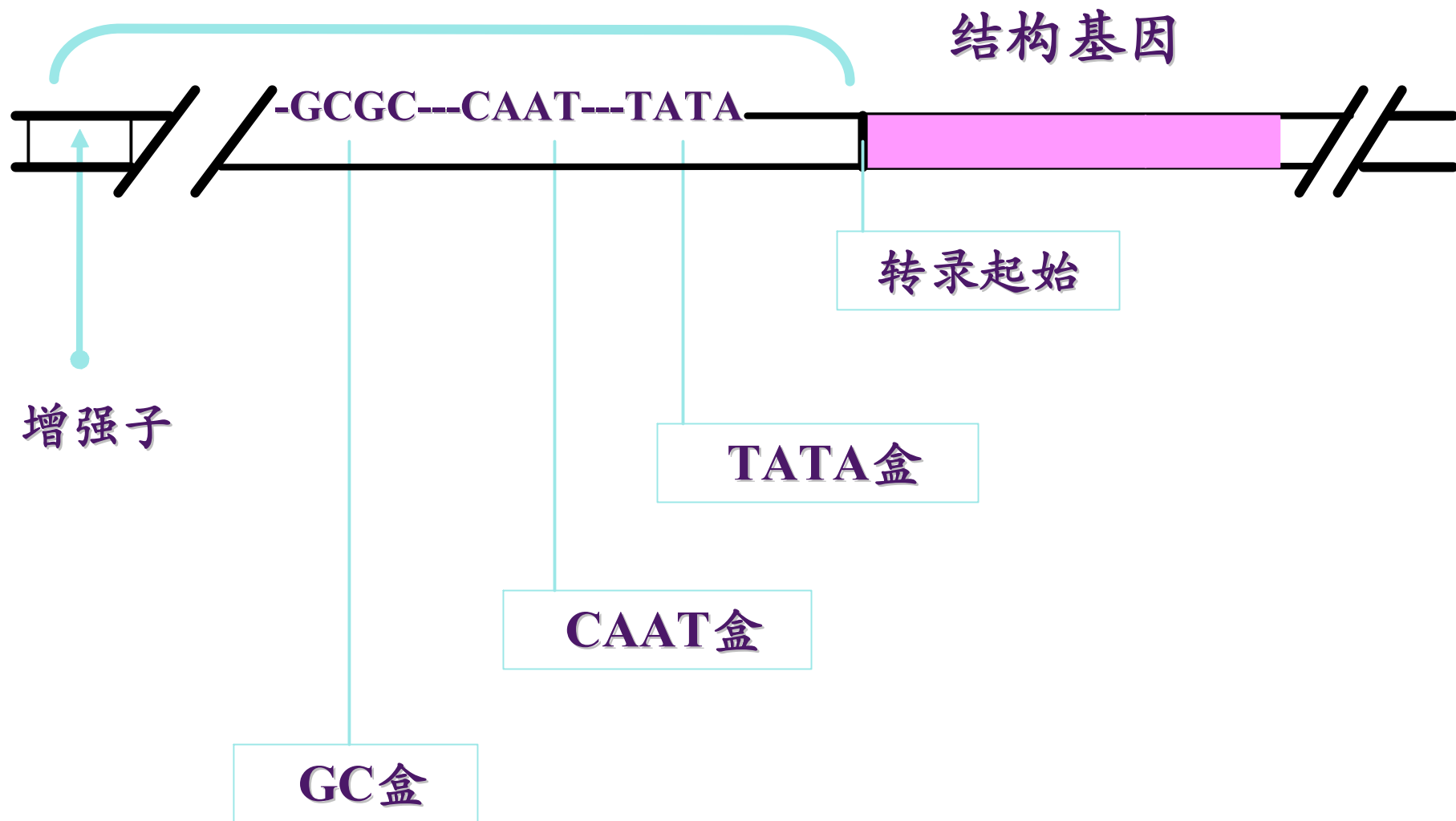
TATAAT Pu
ATATTA Py

(Pribnow box)

原核生物启动子保守序列

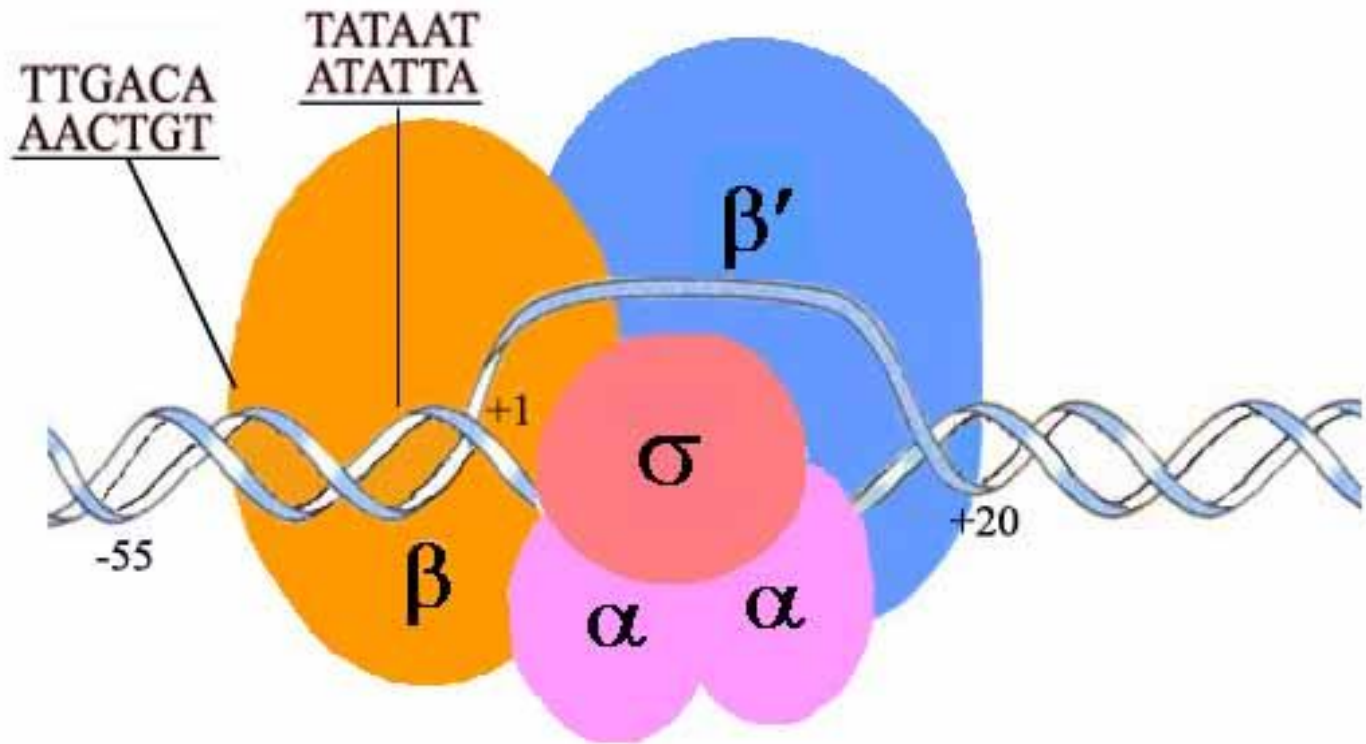
	-35 区		-10 区		RNA 转录起始
<i>trp</i>	TTGACA	N ₁₇	TTAACT	N ₇	A
tRNA ^{Tyr}	TTTACA	N ₁₆	TATGAT	N ₇	A
<i>lac</i>	TTTACA	N ₁₇	TATGTT	N ₆	A
<i>recA</i>	TTGATA	N ₁₆	TATAAT	N ₇	A
<i>Ara BAD</i>	CTGACG	N ₁₆	TACTGT	N ₆	A
共有序列	TTGACA		TATAAT		

顺式作用元件



真核生物启动子保守序列

RNA聚合酶全酶在转录起始区的结合



P_{tac} 启动子

P_{trp} 与 P_{lac} 的杂化产物 P_{tac} 比原来各自的活性强

-35区

-10区

P_{trp}

TTGACA

TTAACT

共有序列

TTGACA

TATAAT

P_{tac17}

TTGACA

TATAAT

三、蓝白斑试验 (IPTG-Xgal 试验)

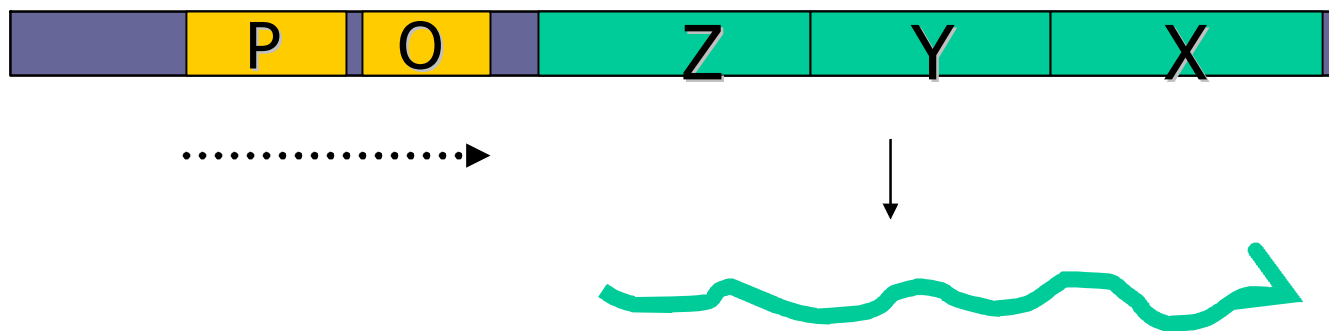
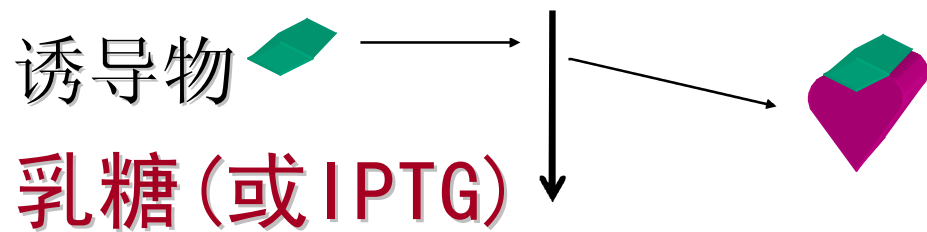
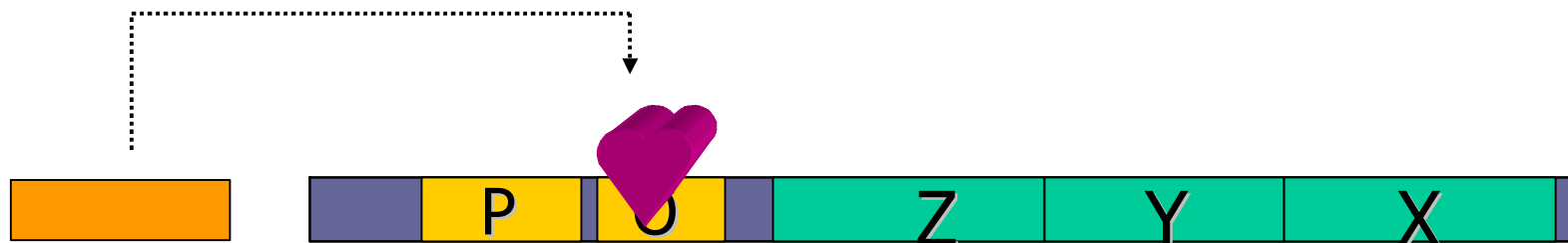
乳糖: 乳糖操纵子的天然诱导物。

IPTG: 乳糖类似物异丙基- β -D-硫代半乳糖苷, 有更强的诱导作用。 (诱导剂)

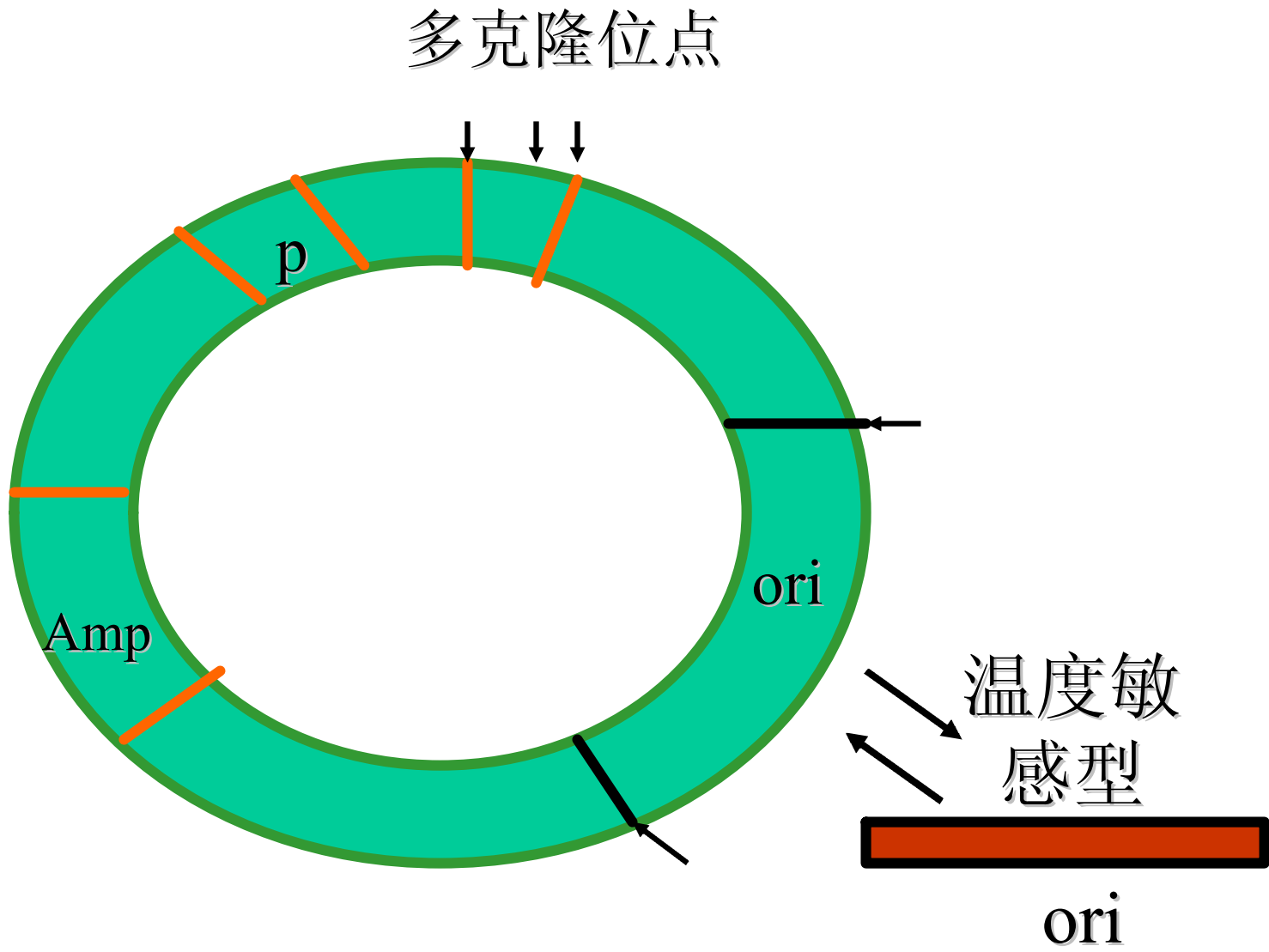
LacZ基因: 编码乳糖苷酶 (表达检测剂)

X-gal  蓝色吲哚产物

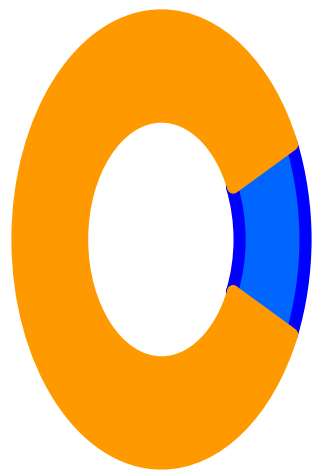
IPTG配合使用在基因工程可作蓝白斑筛选。



举例



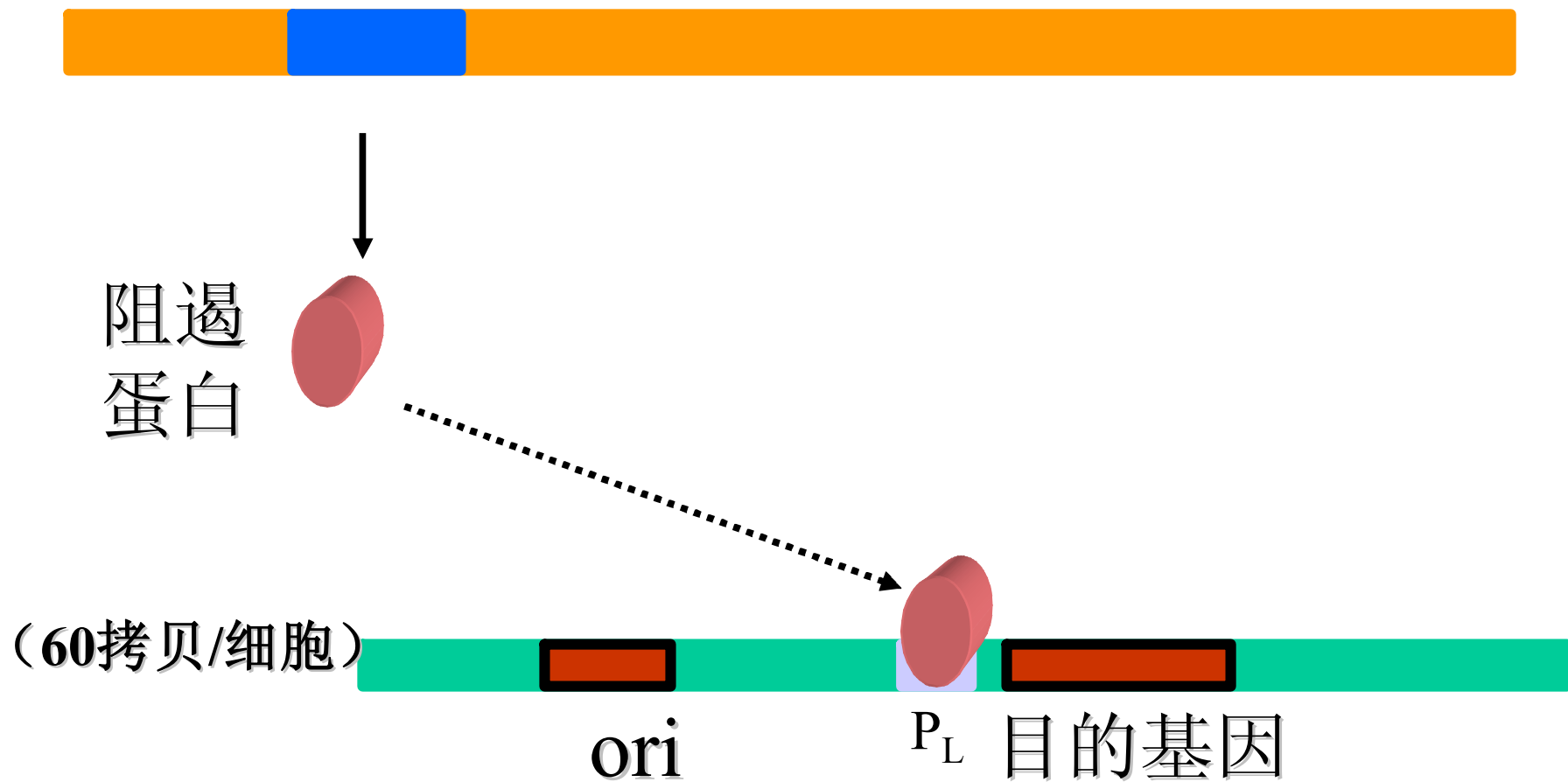
基因载体



阻遏蛋白
基因

宿主细胞

28℃下培养:



42℃下培养:



阻遏
蛋白



失活

目的基因



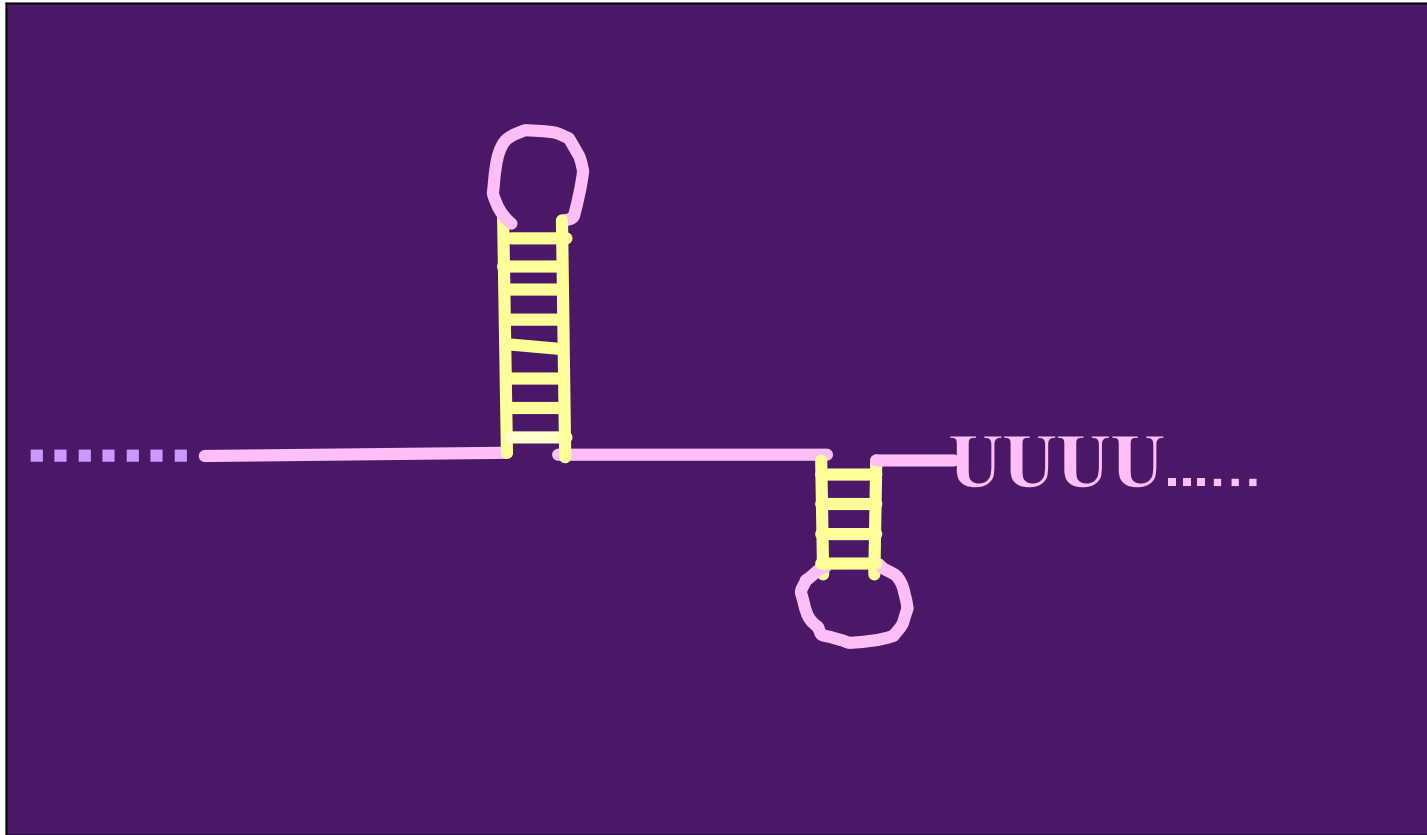
(700拷贝/细胞)

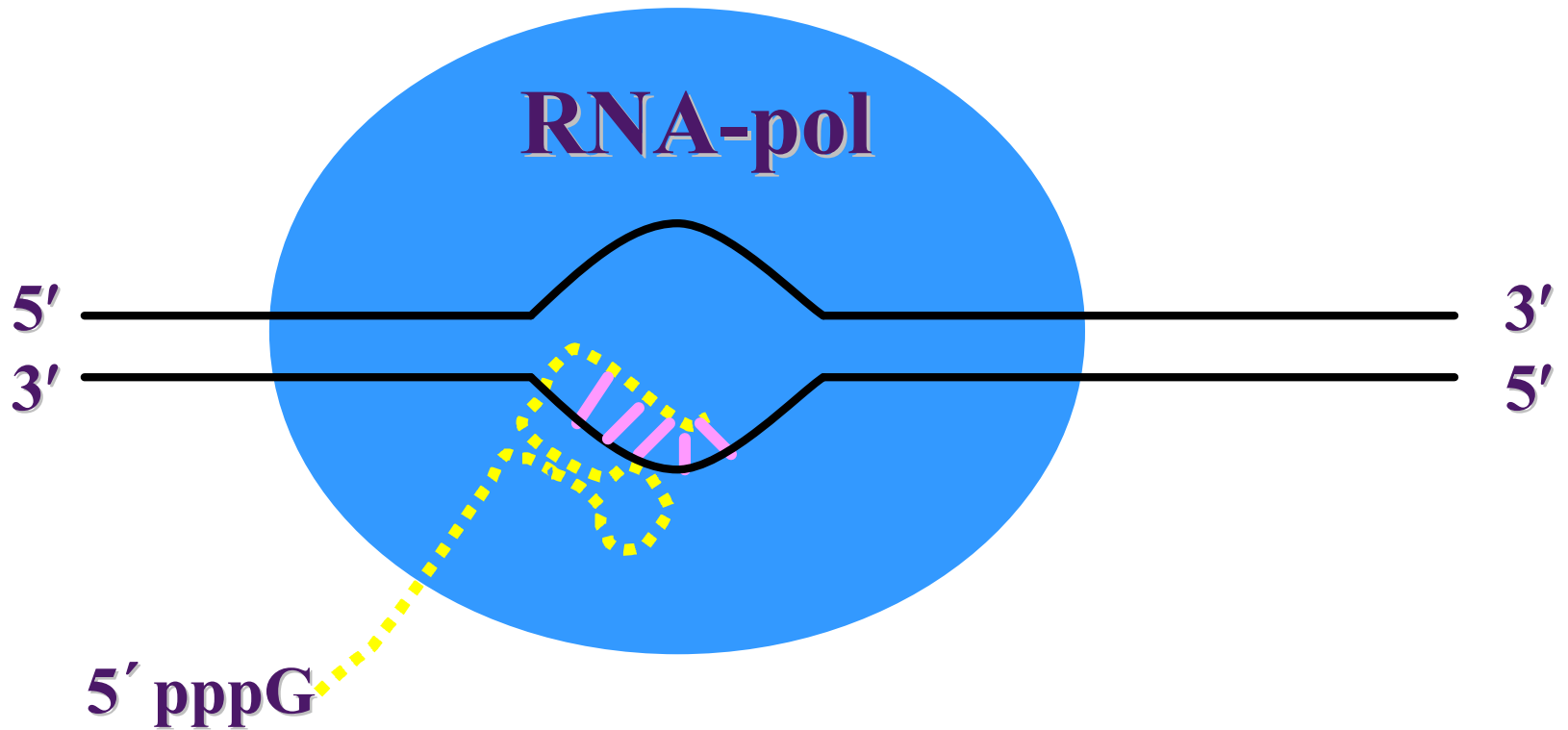


四、转录终止结构的插入

转录终止：非依赖 σ 因子的转录终止需要**茎环结构**，以t (termination) 代表。



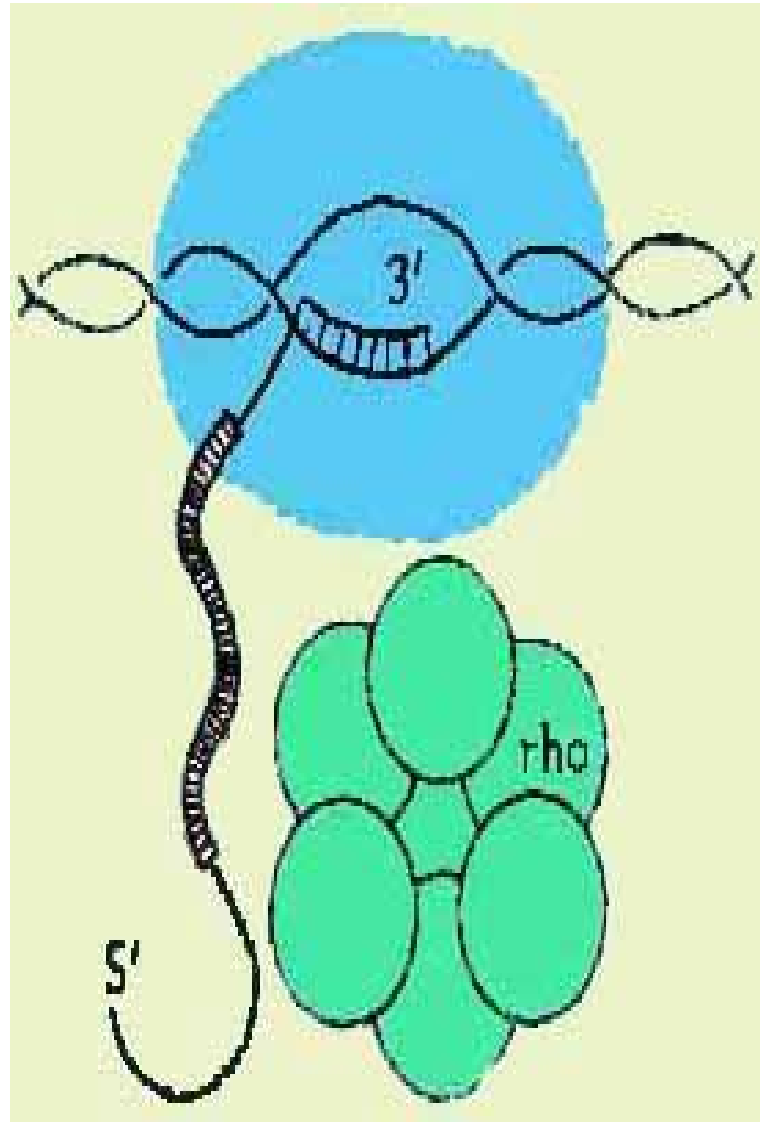


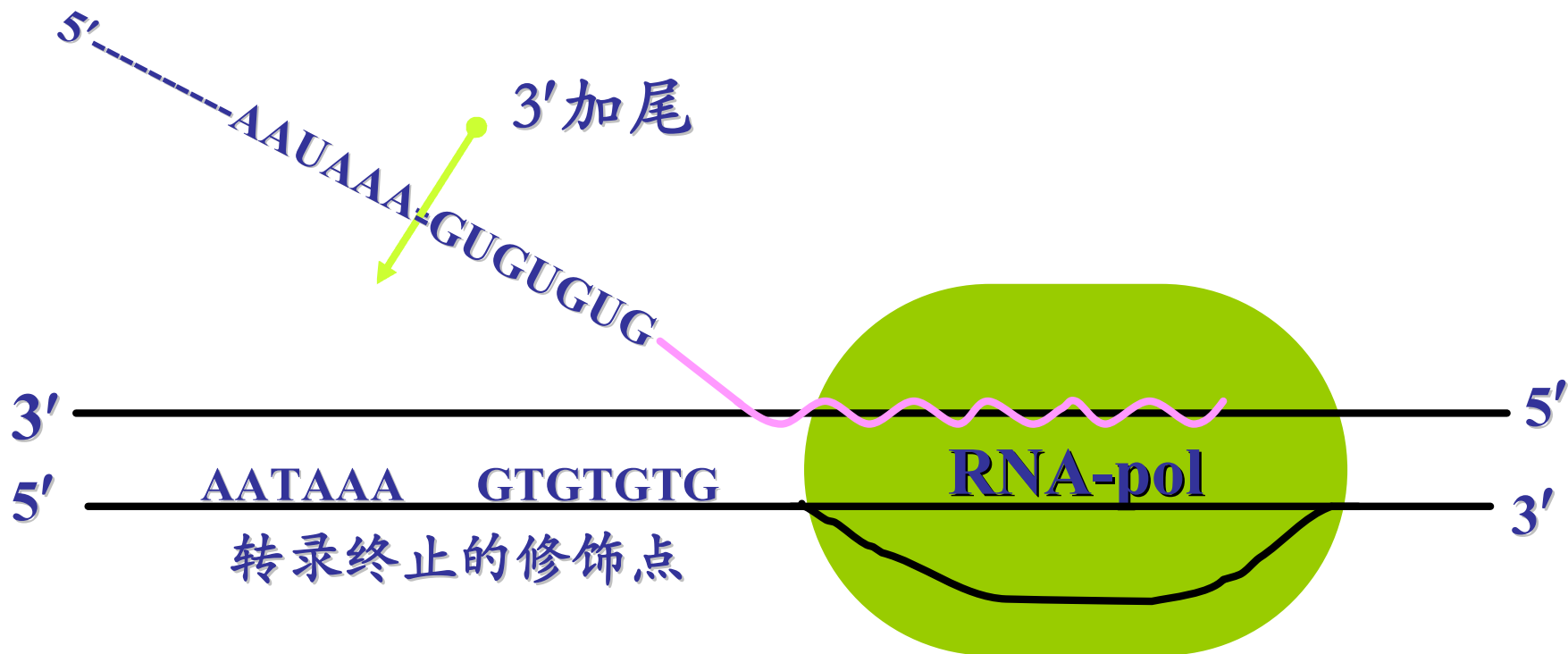


茎环结构使转录终止的机理

- 使RNA聚合酶变构，转录停顿；
- 使转录复合物趋于解离，RNA产物释放。

ρ (Rho) 因子有ATPase和解旋酶活性。能与转录产物RNA结合，使自身和RNApol发生构象改变，RNA pol停顿，DNA-RNA杂化链拆离，利于转录产物释放。



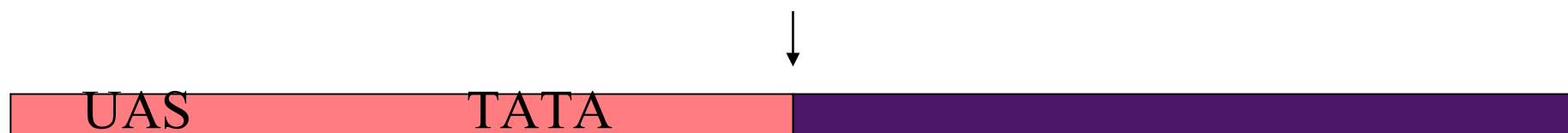
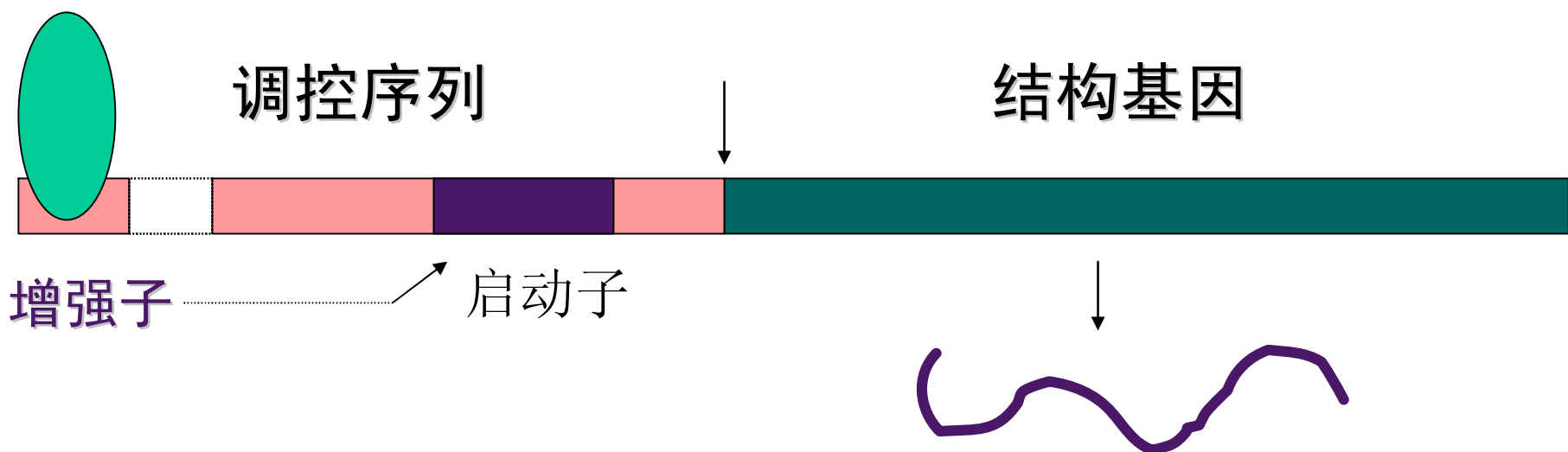


五、增强子

增强子 远距离地、不同方向地控制启动子的活性。增强子的核心序列是TGTGGAATTAG。常有若干功能组件。

增强子的作用特点有：**非特异性远距离操纵、多方向性。**

酵母结构基因的上游还有上游活化序列（upstream activation sequence, UAS）。



酵母

目的基因翻译表达及其准确性

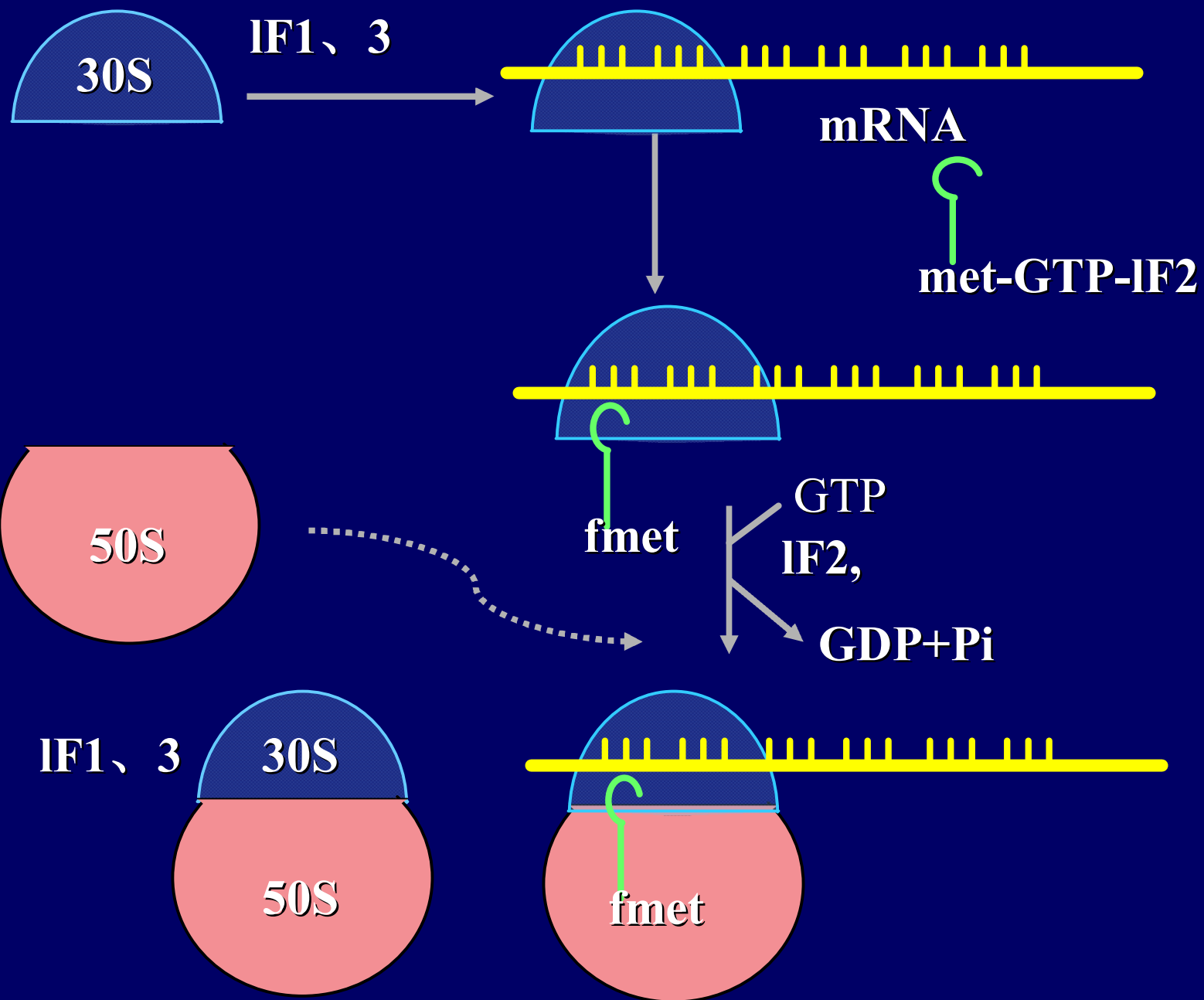
核糖体结合位点 (S-D序列)

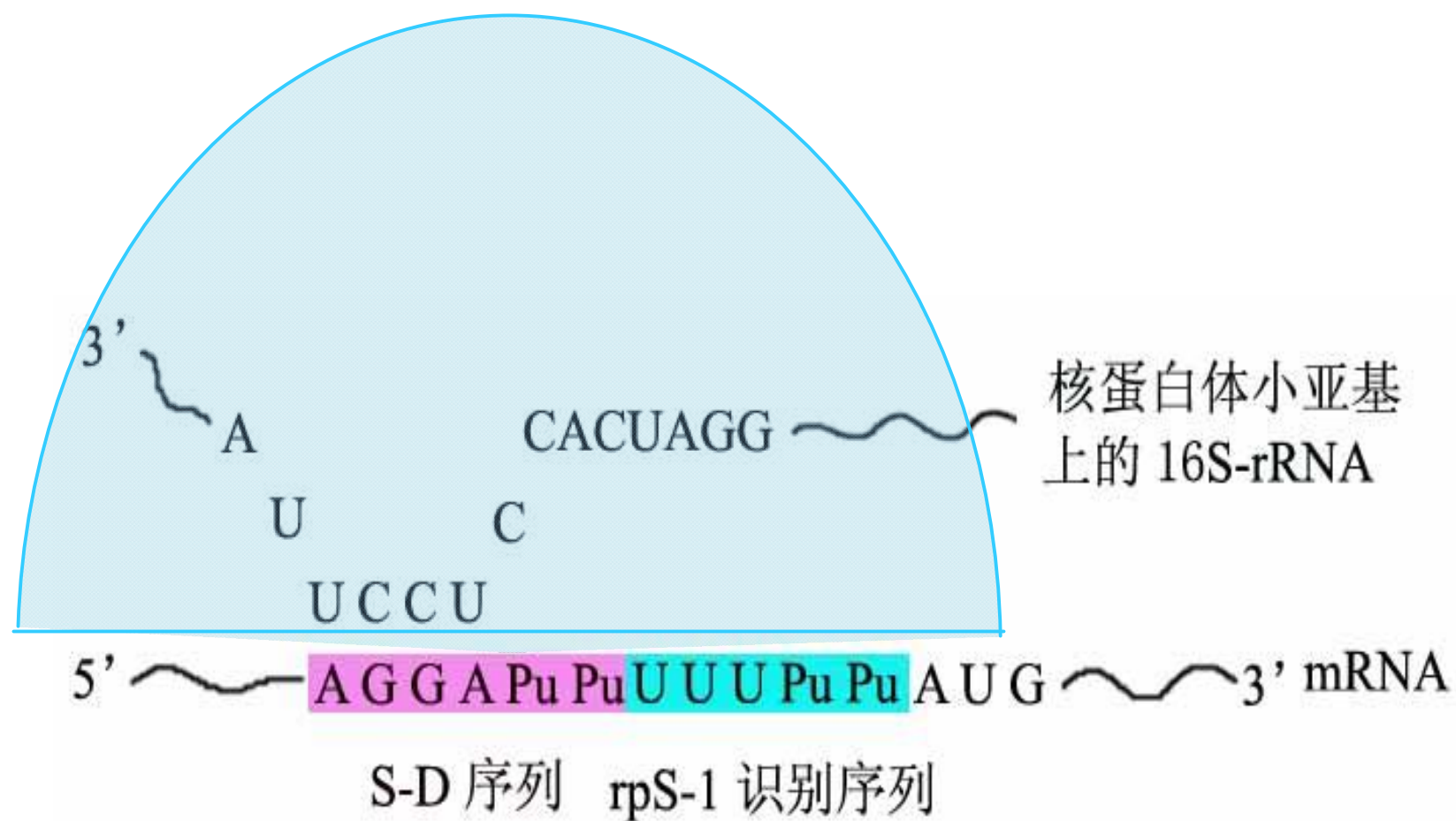
mRNA有与核糖体DNA结合的位点S-D 序列 (Shine-Dalgarno), 又称为核糖体结合点。

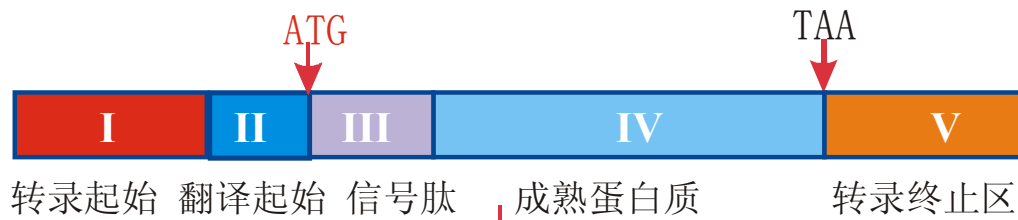
3'... A CACUAGG...5' 16sRNA
 U C
 U-C-C-U

5'.....A G G A PuPuUUUPuPu...AUG mRNA

AGGA后的7个Pu是核糖体小亚基的辨认部位







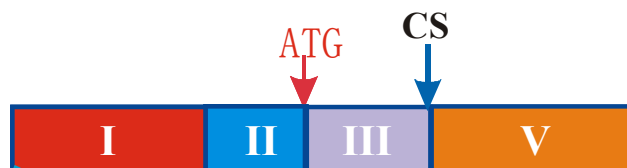
I



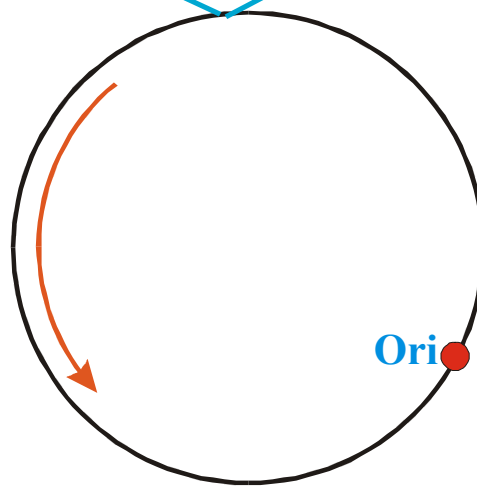
II



III



CS--cloning site



基因载体的基本条件

理想载体的基本条件：

可转移性

合适的复制位点

多克隆位点：广泛、特异

选择标志，便于筛选和鉴定

分子较小，可容纳较大的外源DNA

种类:

质粒

噬菌体

腺病毒载体

逆转录病毒载体

.....

质粒

存在于细菌染色体外的小型环状DNA分子。

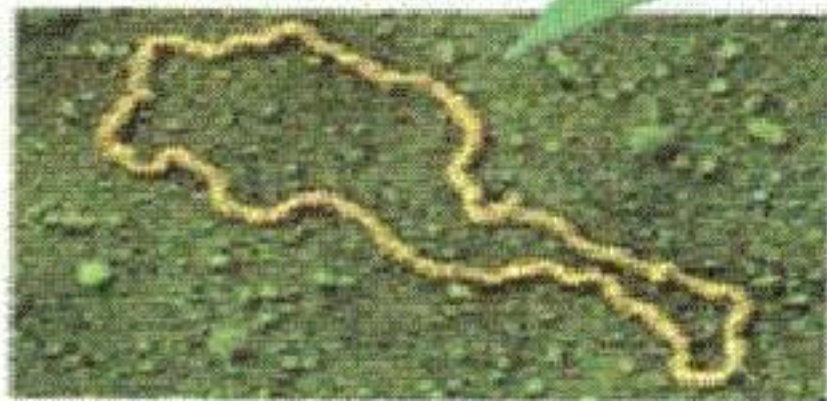
具有自我复制功能。

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。

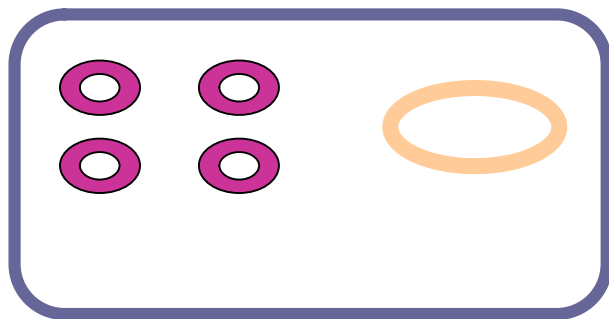
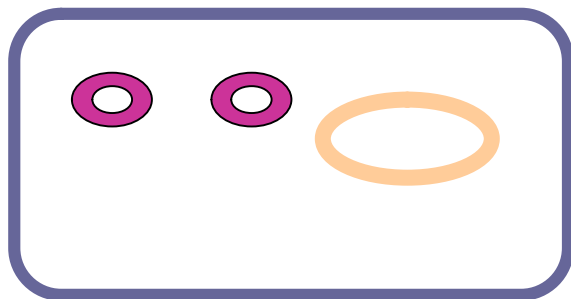
举例：pBR322质粒



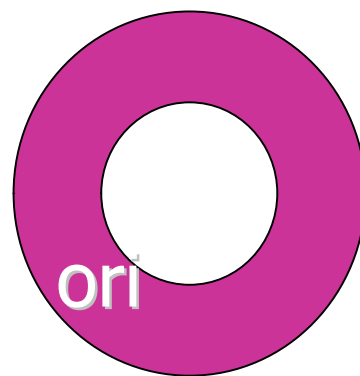


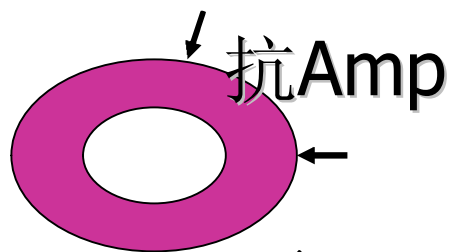
1 micrometer

自我复制



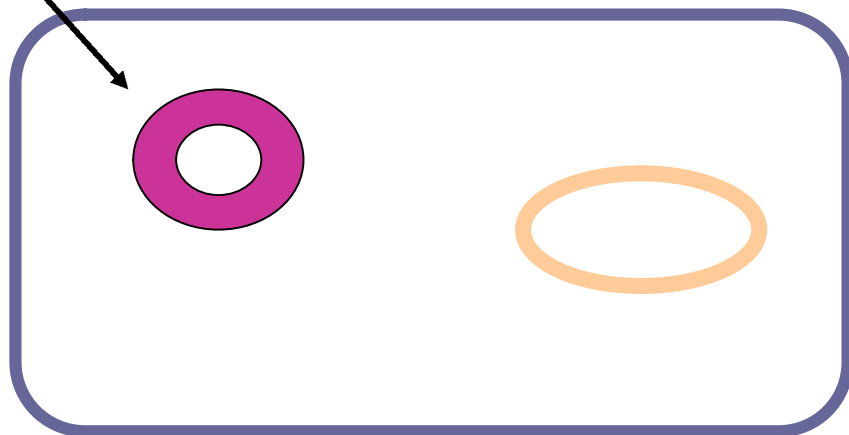
宿主细胞



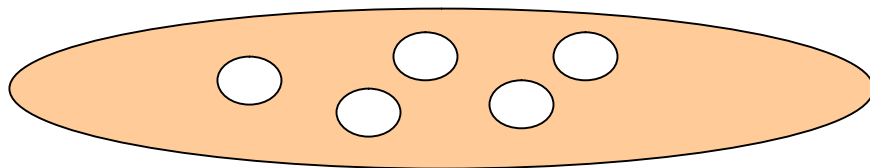


抗Amp

遗传性
标记物

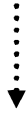


宿主细菌



含**Amp**培养基

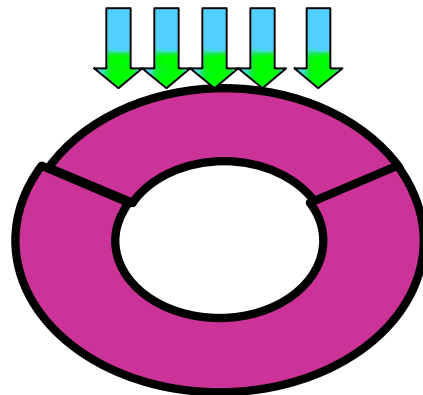
限制性内切酶



多种酶切口

单一酶切口

多克隆位点



多克隆位点



多克隆位点



polylinker

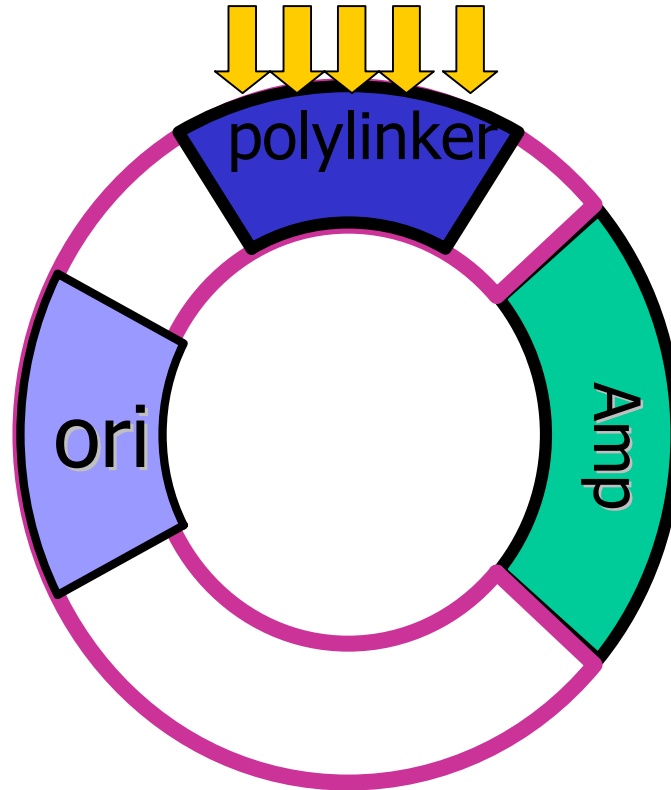
复制起始点

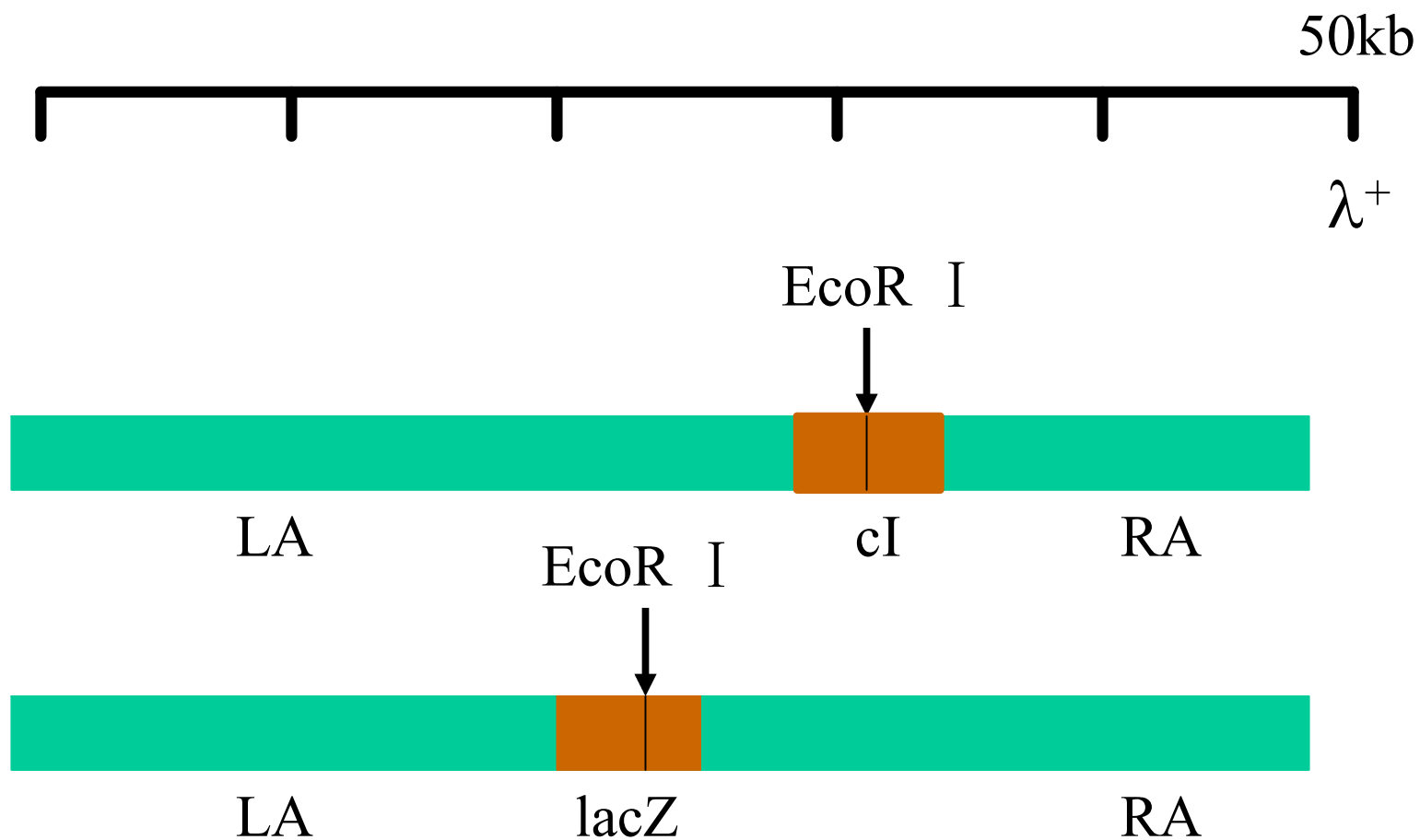
ori

Amp

遗传标记

基因载体





λ 噬菌体载体

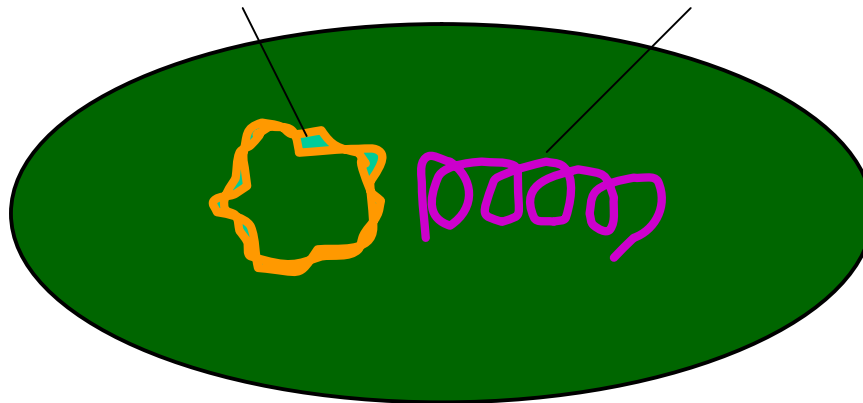
质粒载体

质粒(plasmid)

Plasmid 独立于细菌染色体外的双链环DNA分子。

Plasmid

chromosome



质粒的生物学特性

1 质粒是细菌染色体外能**自主复制**的环形双链DNA分子。质粒DNA可以持续稳定地处于游离状态，但一定条件下又会可逆地整合到寄主染色体上，随染色体复制而复制。

2 编码**抗菌素抗性基因**的质粒叫**R质粒**。质粒DNA在添加真核复制信号和启动子后，可以构建出能在原核和真核细胞中均可复制的**穿梭质粒**，并在真核细胞中表达，因此应用广泛。

3 根据每个寄主细胞中质粒拷贝数的多少，把质粒分为**严紧型复制质粒**（拷贝数少，为1-5个）与**松弛型复制质粒**（拷贝数多，可达10-200个拷贝）。因此，作为载体的质粒应该是松弛型的。

4 质粒的**不亲和性**：两种亲缘关系密切的不同质粒，不能够在同一个寄主细胞系中稳定地共存的现象。

发展概况

第一阶段（1977年前）：天然质粒和重组质粒的利用，如pSC101, colE1, pCR, pBR313和pBR322。

第二阶段：增大载体容量（降低载体长度），建立多克隆位点区和新的遗传标记基因。如pUC系列载体。

第三阶段：完善载体功能以满足基因工程克隆中的不同要求，如M13mp系列载体，含T3, T7, sp6启动子载体，表达型载体及各种探针型载体。

一、pBR322

pBR322为4.36kb的环状双链DNA，其碱基序列已经全部清楚。是最早应用于基因工程的载体之一。

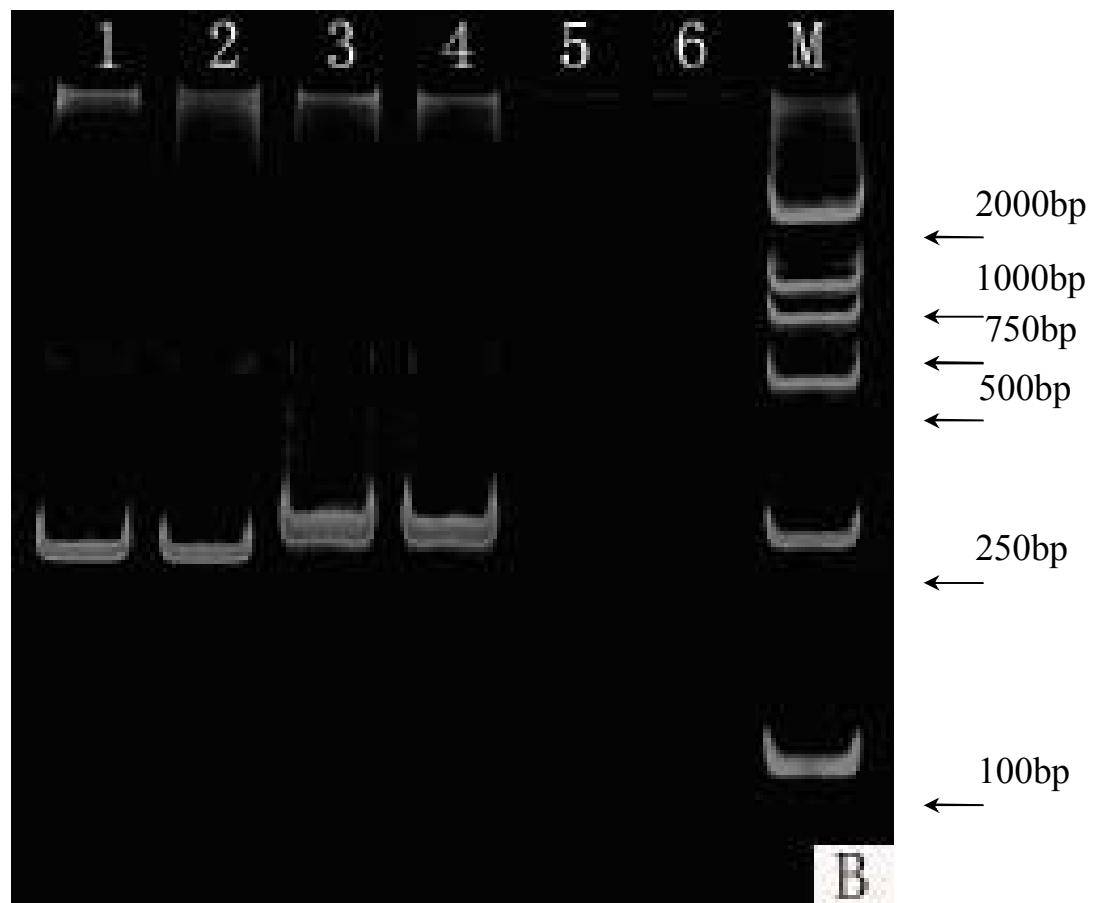
把pBR322用限制性内切酶切去某片段，换上合用的**表达组件**，就可以构建成工作所需的新载体。

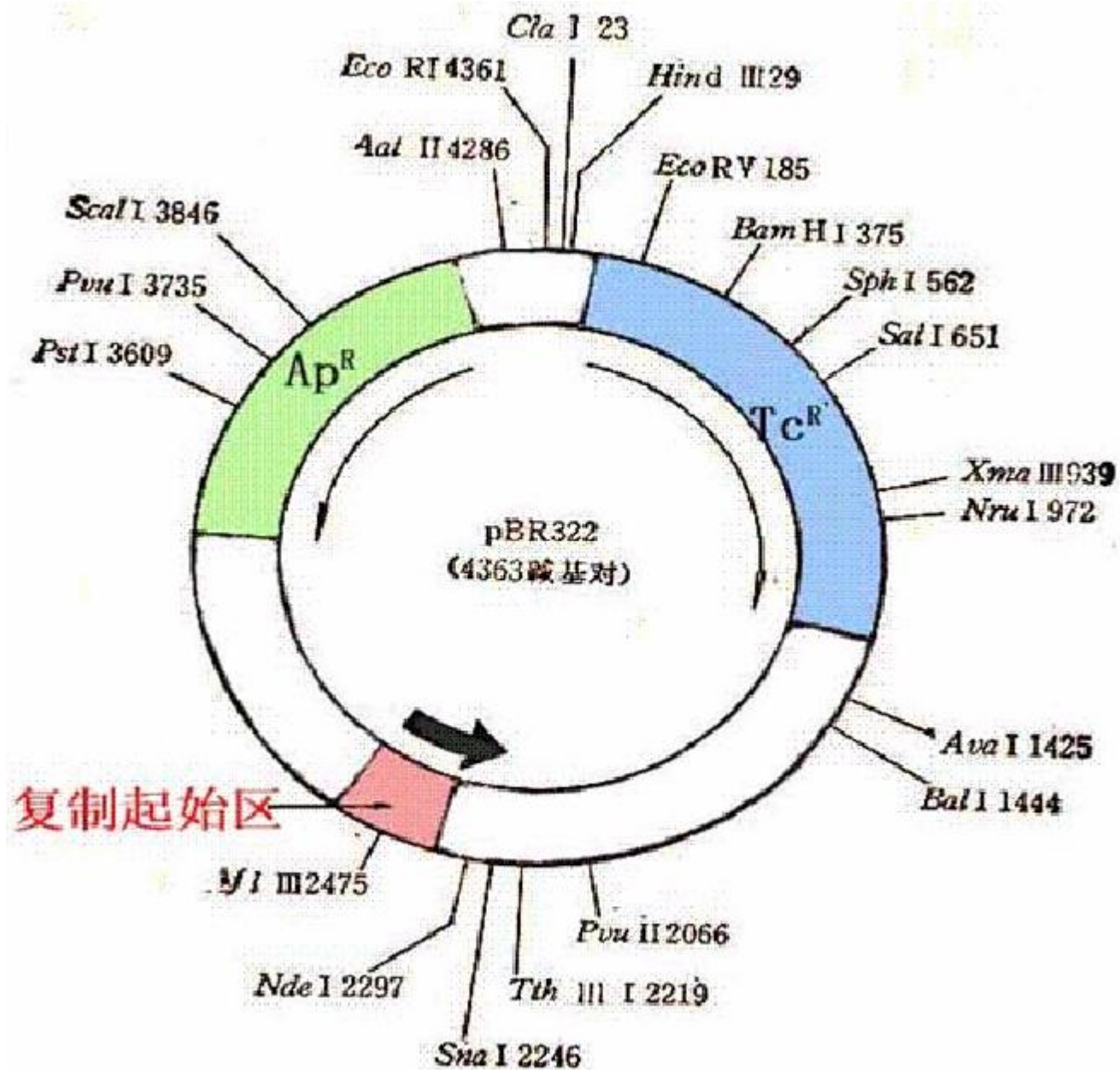
许多实用的质粒载体都是在pBR322的基础上改建而成。可见其原型质粒在使用上有优点。

有过百个限制性内切酶切点，一种限制性内切酶只有单一切口的位点也多达数十个，几乎具备了所有常用限制酶都能切开并插入目的基因的优越条件。

有两个抗药性基因。

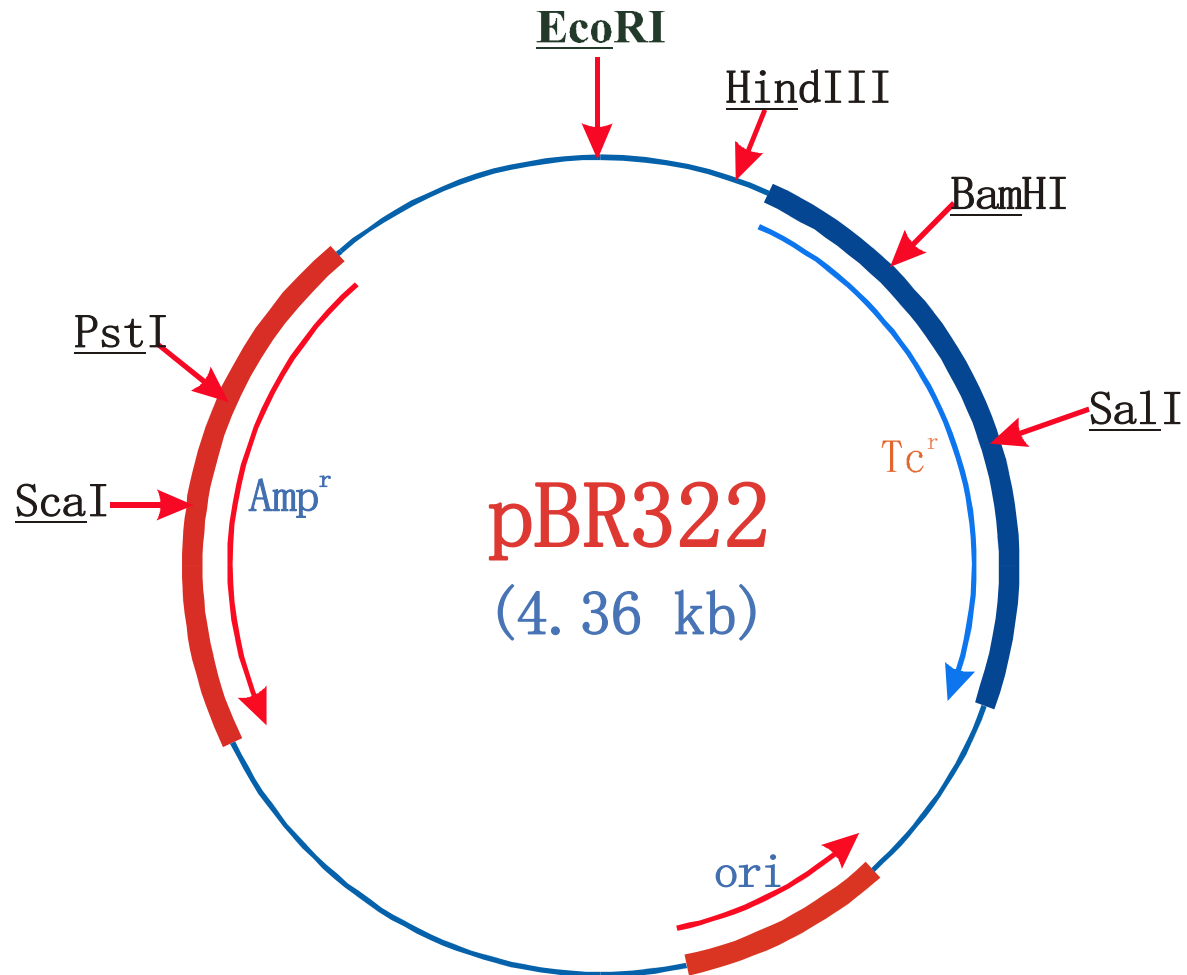
此外，pBR322 DNA被限制性内切酶消化后产生的片段大小均已知道，可以作为核酸电泳的分子质量标准。





PBR322质粒的物理图谱

普通型载体pBR322的结构图



二、pUC质粒系列

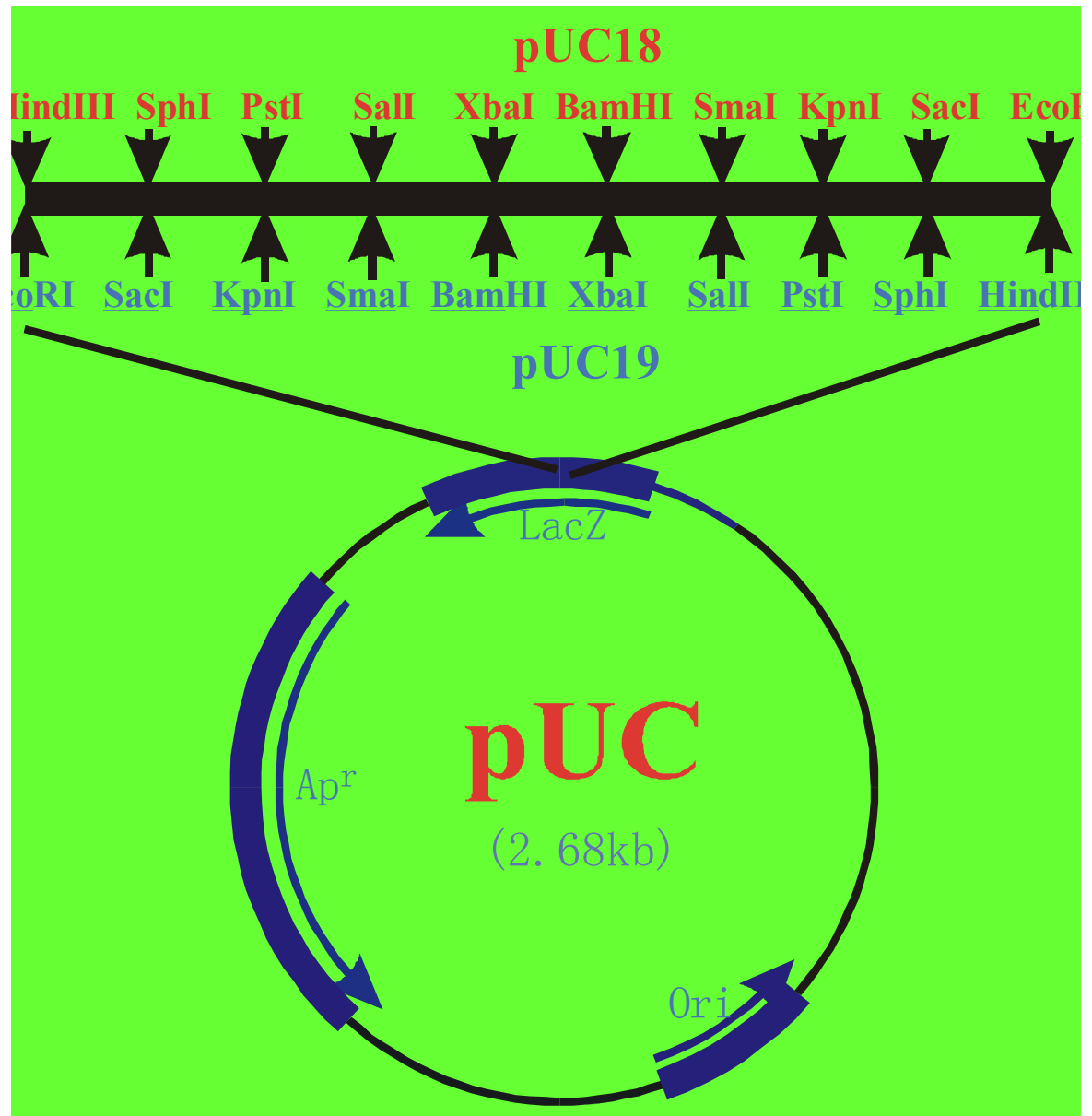
pUC质粒系列是在pBR322基础上改建成的。

它含有pBR322的大部分，包括完整的amp^r基因和复制起始点。去除了pBR322的tet^r区段，换用了M13噬菌体的476bp片段，含*LacZ*基因及其启动子的操纵基因、M13的多聚接头polylinker.

476bp片段含有E.coli的lacZ基因的5'-序列，表达半乳糖苷酶的 α 片段。

LacZ的上游包括乳糖操纵子上的启动子Plac和操纵基因O。

lacZ之内是M13的多功能连接器。



三个显著特点：

(1) 分子量更小，仅为2.7KB，容纳外源DNA量增大；具有更高的拷贝数（每个细胞含500-700个拷贝）。

(2) 含易于检测是否有外源DNA插入的标记基因 $\text{LacZ}\alpha$ ，可利用 α -互补原理进行蓝白筛选。

(3) 多克隆位点区（MCS）由人工合成的多个单一酶切位点构成。

其MCS区与M13mp噬菌体载体的相同，可使pUC上克隆的目的基因直接转移到M13mp载体，进行DNA测序和体外突变等研究。

三、pKO系列

组成：以半乳糖激酶（*Galk*）基因取代pBR322的 *EcoRI-PvuII*位点包括 *ter^r*。

表达产物催化



以¹⁴C标记的半乳糖作底物,检测生成的*Gal-1-P的放射性。

在Galk基因上游插入目的基因，根据基因表达产物半乳糖激酶活性，即 ^{14}C -Gal-1-P的放射性，可定量估算启动子功能的强弱。

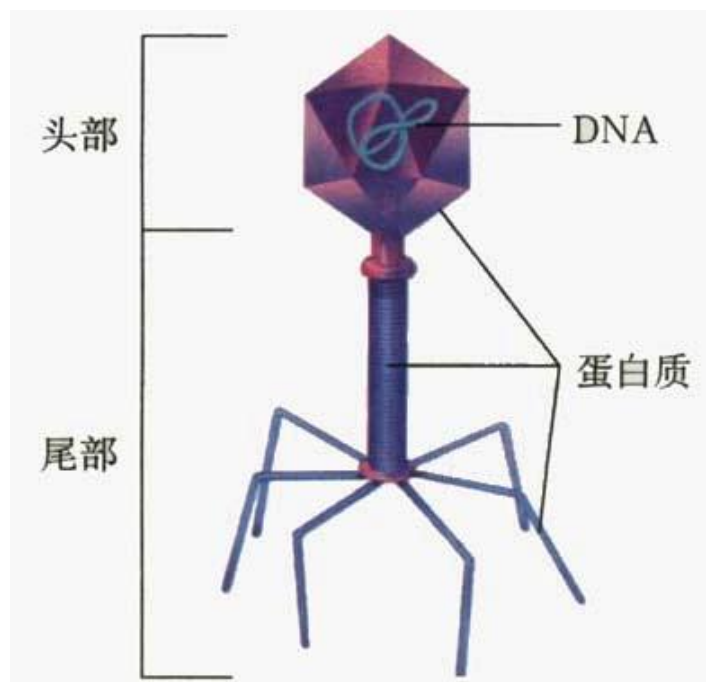
如在Galk基因前插入目的基因，与无插入的空载pKO比较，并无放射活性的增强，则说明插入片段不存在有启动子。

λ 噬菌体载体

λ 噬菌体载体

一、 λ 噬菌体的组成结构和用途

噬菌体是比细菌还小得多的微生物，和病毒侵犯真核细胞一样，噬菌体侵犯细菌，也可以认为它是细菌里的“寄生虫”。它本身是一种核蛋白，核心是一段DNA，结构上有一个蛋白质外壳和尾巴，尾巴上的微丝可以把噬菌体的DNA注入细菌内。



λ 噬菌体的结构和用途

λ 噬菌体**线性双链DNA**病毒，具有末端互补的12 nt，感染细菌后粘端互补成双链环状。全长48531bp，含50多个基因。

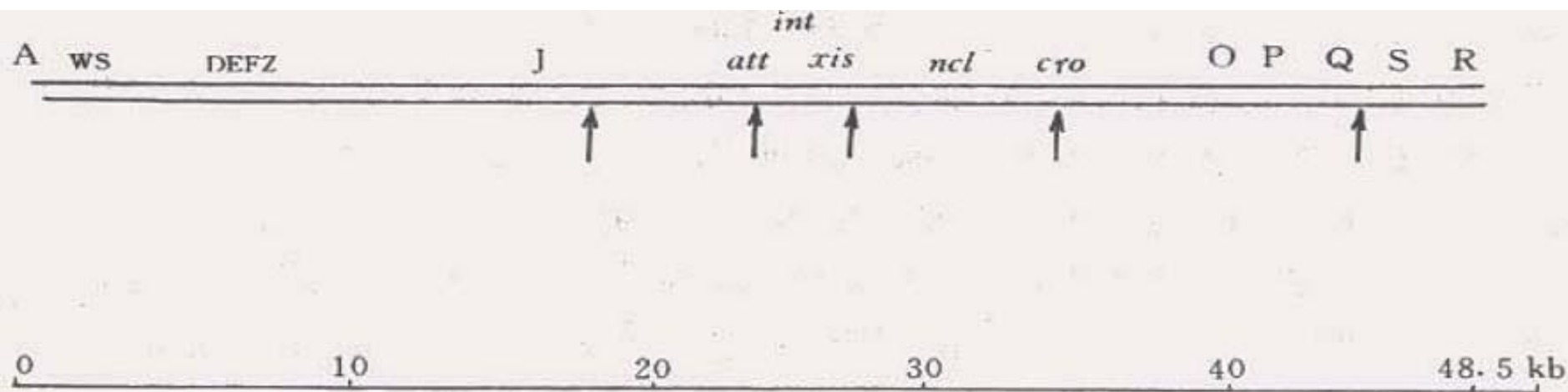
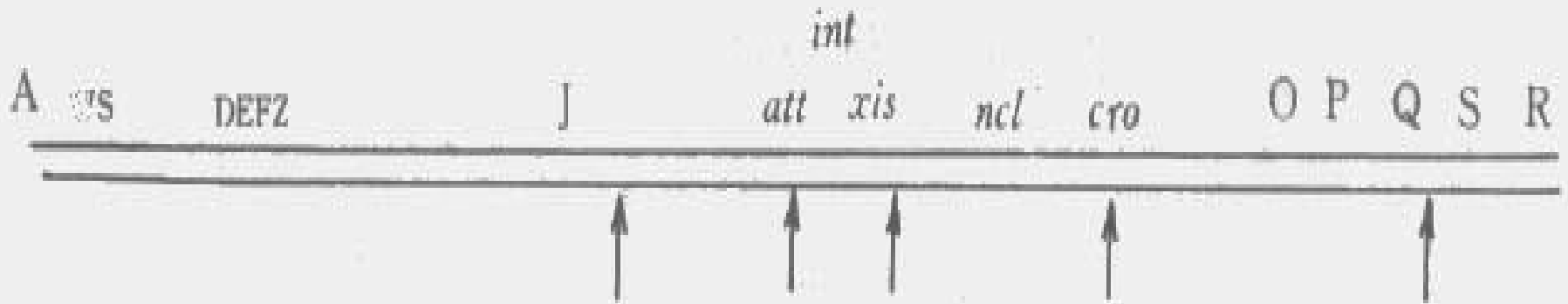


图3-11 λ 噬菌体的基因图及 *Eco* RI 酶切图

按功能分区自左至右为结构区、重组区、调控、复制区及裂解区

λ 噬菌体基因大致分为4个区：

结构区A~J 19个基因，编码头、尾部蛋白质为结构区，重组区 *att* (attachment)、*int* (integrate) 及 *xis* (excision)，调控区启动子、终止子和N、CI基因，Q-R 为裂解区。

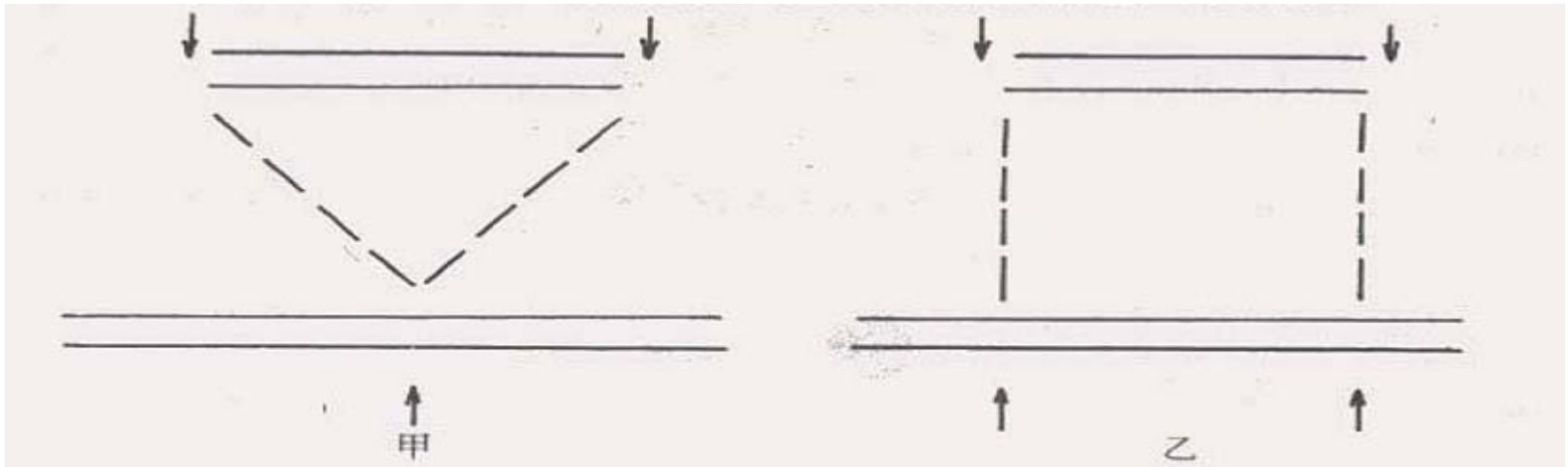


λ 噬菌体及其组件的应用

λ 噬菌体可以容纳较大的目的基因。例如用置换法可去掉长达20kb的 λ DNA，换入相应长度的目的基因。

基因文库构建常使用 λ 载体；

不少先进的质粒应用 λ 组件进行构建。



- 1 获取目的基因的主要方法和原理。
- 2 如何从基因文库中筛选目标基因。
- 3 基因载体在基因工程中的价值。
- 4 基因调控原理怎样应用于基因工程。