

重组 DNA 与 基因 工 程

(综 述)

生物化学教研室 王震熙

1953年Watson和Crick⁽¹⁾发表了DNA双螺旋结构模式至今已有30年了, 1983年4月在英国伦敦、9月在美国纽约举行了《DNA的三十年》^(2,3)学术讨论会, 讨论了分子生物学的今天和明天, 以纪念为开创分子生物学新纪元的这一卓越功勋。DNA双螺旋结构学说的创立使DNA的研究成为生物化学和分子生物学领域的最引人注目的一个分支。

阐明DNA结构的最重大意义在于它是基因的物质基础, 是遗传信息携带者, 正常细胞遗传的信息流动是从DNA $\xrightarrow{\text{转录}}$ RNA $\xrightarrow{\text{翻译}}$ 蛋白质。DNA的复制与转录, mRNA的翻译与表达和蛋白质产物的结构与功能这三者及其相互关系, 构成了生命的活动中心, 称之为“中心法则”(central dogma)。由于人们揭示了这一法则, 对生命的奥秘进行分子水平的研究才有了统一的理论。DNA重组技术的出现是DNA研究的一次飞跃, 人们不仅可以简而易行的得到大量纯的基因片段, 而且可以对基因进行人工合成、设计、重组并转化入适当宿主细胞进行表达。这为基因结构与功能的研究揭开了新的篇章。如真核细胞结构基因内含子(Intron)插入顺序的存在, 某些内含子可能含有增强子(Enhancer), 各种基因功能顺序的发现, 证明基因的结构是动态的。在生物的个体生长、发育, 细胞的分裂、分化及系统的发生和进化中都有基因结构的变

化, 如基因的重复、放大、转位、重排、缺失、变异和修复等, 这些都是当前分子水平深入研究的新领域。总之, 30年来由于对DNA的结构、性质和功能作了广泛而深入的研究, 特别是DNA结构研究的历史性突破, 推动了细胞生物学、分子生物学和分子遗传学的发展。在这些学科的相互渗透和相互促进的基础上而诞生了第四次世界工业革命之一的新兴学科—基因工程⁽⁴⁾, 开始了人类能够改造生物或创建生物而服务于人类和用生物来革新工农业生产的新时代。基因工程又称基因操作, 或重组DNA⁽⁵⁾, 其实质就是对DNA分子进行切割、拼接而重组成新的DNA分子。用分子生物学术语讲, 基因就是一段特定的具有生物学功能的DNA顺序。这个含有功能的区段与非同源DNA分子结合并能进入到其他细胞进行扩增, 这就是分子克隆(Molecular cloning)或基因克隆⁽⁶⁾。这种插入的DNA序列在宿主细胞内若能正确表达就可按人们意愿改造生物或为人们制造象胰岛素、干扰素、胸腺素、生长素等等蛋白质分子而造福于人类。由此可见, 基因工程有二个特点, 一是在体外对DNA分子的断裂切割和重新连接, 二是在分子水平上操作, 在细胞水平上表达。所以基因工程核心则是应用重组DNA技术。DNA重组和细胞融合是近年来生命科学中迅速发展起来的带有革命性的新技术, 它具有广泛的实用价值和对整个生物科学的革新, 从而导致工农

业生产革命的巨大潜力,几乎成了当今世界上学界、商界和政界的一个兴奋中心。本文着重讨论重组DNA技术的基本内容,进展情况及其远景。

重组DNA技术是一套技术而不是单项技术,中心问题就是在试管内用酶及其他物质使不同种间的DNA分子彼此结合,而形成新的遗传物质,然后把它送入到原来没有这类重组体的细胞或宿主体内令其行使功能而继续扩增或表达。所以重组DNA技术包括以下五个方面:即

基因的切连;运载体的转运;受体细胞的转化;重组体的筛选和鉴定和克隆化DNA分子的表达。

一、基因的分离、合成及其限制性内切酶

编码任何蛋白质的三联密码体存在于DNA分子上,要将决定蛋白质一级结构的结构基因拿到手,可以有三种不同途径:

1. 天然细胞中分离筛选:将人细胞基因组DNA用机械或限制性内切酶切割为成千上万个片段,以线性质粒DNA或 λ 噬菌体DNA作运载体转化入大肠杆菌,每一片段以单一克隆而分离出来⁽⁷⁾。

2. 以mRNA为模板经反转录酶及DNA多聚酶合成双链互补cDNA;这种方法适用于分子量大而不知其序列的基因。目前反转录法已成为得到任何mRNA的cDNA的通用方法,把(dT)n引物及AMV反转录酶加入含有四种脱氧核糖核苷酸的反应混合液中就能合成病毒、原核和真核生物等含poly(A)RNA的DNA拷贝。这也为研究真核生物基因组的结构和功能开创了巨大可能性。此外,还广泛采用反转录合成的单链互补DNA用作分子杂交探针。

3. 化学方法合成基因⁽⁸⁾:近年来人工合成DNA片段工作进展很快。目前只要蛋白质的一级结构已知,原则上都可进行基因的人工合成。一般来说这适用于序列较少的基因,

如生长激素释放抑制因子(Somatostatin)基因是两条各为55个核苷酸的双链。其他如舒缓激肽,增血压素、胸腺素 α_1 、脑啡肽、胰岛素、干扰素、生长激素基因等。目前已有87种以上人工合成基因在国外市场上可以买到。此外,合成的寡聚DNA片段可以用作引物,探针或“接头”用于制备cDNA,筛选克隆,样品检测,基因定位,基因突变,DNA序列分析及运载质粒,表达质粒构建等。

4. 限制性内切酶:如何使DNA分子进行切割,而被切割了的DNA分子又如何与运载体分子相连重组,这就要借用一种特殊工具,被誉为生物手术刀的“限制性内切酶⁽⁹⁾”来帮助。这是一种脱氧核糖核酸酶,广泛存在于各种原核生物中,其生物学作用是降解外源DNA分子,而对自己细胞的DNA分子则因甲基化修饰作用可不被分解。该酶能识别DNA分子上4—6个碱基对的特异核苷酸排列顺序,在特定位置切割DNA分子,如图1所示。由于DNA分子是逆平行排列的双股多核苷酸链,该酶的切割方式是从中间将它裁开,这样每条链都留下一段(大约4—6个碱基)伸出来的5'末端的单链片段,这条单链的碱基顺序很有规律,不论那一条链从5'端向3'端读去总是一样的,而且二条单链的碱基彼此互补,人们称之为粘性末端。利用这种酶将不同来源的DNA分子切割开为不同片段,由于这种末端核苷酸的配对性,使它们之间确能“彼此辨认”和“互相粘连”,而把二种不同的DNA分子很好地连接起来,从而实现人为支配下的基因重组,形成新的重组分子。

许多限制性酶,如EcoRI切出5'凸出末端,另一些(如Pst I)能切出3'凸出末端,还有一些则切二重对称轴间键得到齐头末端片段(如Hae III)如图1所示。

DNA分子的连接除上述利用粘性末端

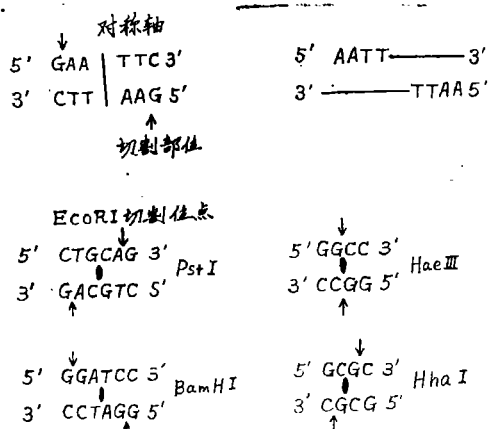


图1 一些限内酶的作用位点

方法外,还可利用DNA连接酶催化平末端片段之间形成磷酸二酯键,或利用末端脱氧核苷转移酶在片段末端合成同聚物的3'—单链尾巴进行同聚物谱尾法。

二、运载体⁽¹⁰⁾

DNA克隆的实质就是将某种有意义的DNA片段与运载体分子结合,运载体使该种DNA在细菌或其他细胞中繁殖、扩增。所以运载体是一种复制子(Replicon),能自我复制,且能结合外来的DNA片段。含有外来DNA片段的运载体DNA能容易地完整地分离出来。对于大肠杆菌常用的运载体是细菌质粒(plasmid)和噬菌体。质粒是独立于染色体外,自我复制的并能稳定遗传的核酸分子。至今从细菌中分离的所有质粒都是双链环状DNA。天然质粒与人工构建的质粒种类很多,不同质粒具有不同作用,如用一般克隆扩增的运载体质粒PBR322是多拷贝质粒,每个染色体质粒数在10以上。若在其培养基中加入蛋白质合成抑制剂如氯霉素,其质粒拷贝数可达数百至1500左右,并能高效地转化进入细胞。它具有抗药性标志Tet^r。(Tetracycline Resistance)和Amp^r。(Ampicillin Resistance)。它们是非转座的,因而很易筛选

出带有重组体的PBR322质粒的大肠杆菌。噬菌体用作载体主要有λ噬菌体和M13,前者为线性双链DNA分子,47Kb长,5'端有天然粘性末端(Cohesive end sit)或称cos位点(cos sit),含有cos位点的λDNA片段的一种新的质粒叫做柯斯体(cosmid),它是一种特殊的运载体。M13是一种丝状单链环状DNA,含有6.4Kb,当它处于感染的细胞中时便转变为双链的复制形式,拷贝数也增加到每个细胞含有50~100个。M13最有用的特性是在噬菌体单链DNA上克隆外源DNA。由于能容易地获得大量单链形式DNA,故至少可用作三种类型的实验:①DNA顺序分析,②位点定向突变(Site-Directed mutagenesis),③核酸杂交研究。洪国藩等用M13作亚克隆建立了DNA序列分析的快速战略,将双脱氧法与M13克隆系统结合使每人每天可获得5000个核苷酸以上的序列图谱⁽¹¹⁾。

此外,猴病毒SV40,牛痘病毒等可运载基因进入哺乳动物细胞,目前正向多样化运载体方向发展。

三、转化

转化⁽¹²⁾是将重组DNA质粒或杂交质粒转入经CaCl₂处理过的大肠杆菌里的过程。转染则是通过噬菌体DNA将外源DNA引导到寄主细胞的过程。目前最广泛使用的受体细胞是大肠杆菌系,外源基因导入大肠杆菌的方法已很成熟而且导入频率也很高。但枯草杆菌、假单胞菌和酵母⁽¹³⁾作为宿主细胞也正大力开展工作,因为大肠杆菌的基因表达产物在细胞内,且含有内毒素必需分离除去。而枯草杆菌合成的蛋白质分泌到细胞外,不含内毒素,安全可靠。至今已从枯草杆菌分离和鉴定了12种以上的启动基因⁽¹⁴⁾,核糖体结合位点序列也含有...AGGA...。枯草杆菌的芽胞启动基因可作分子开关。酵母细胞是真核细胞含有糖基化酶系适合于糖蛋白合成,且生长密度很

高, 突变稳定, 不产生毒素等。已有三种启动基因⁽¹⁴⁾用于基因工程, 故以酵母为寄主的基因工程很有前途。以真核细胞作为无性繁殖受体是基因工程的重要目标, 希望以此作为治疗遗传病的手段。已有人克隆了某种遗传病基因, 将它与人体骨髓细胞在体外培养转化入骨髓细胞内⁽¹⁵⁾, 再将它移植于患者骨髓, 这是有待开发的领域。其它受体细胞因基因工程目的不同而选用, 如假单孢菌与环境净化、放射线菌与抗菌素生产等。

四、重组体的选择和鉴定⁽⁶⁾

从转化的细菌群体中选择被研究的重组体有以下几种方法:

1. 遗传学方法: 质粒载体具有的抗性标志, 噬菌体形成的噬菌斑都是在重组体选择时可供利用的遗传学特性。以质粒载体PBR322为例, 鉴定重组体克隆的第一步是利用丢失了抗菌素耐药性基因, 首先检查这种转化体抗药性的表现型。因为双链cDNA片段插入在PBR322的PstI切割部位(图2)时, 就失活了安苄青霉素(Amp)抗

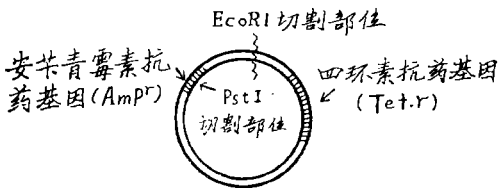


图2 PBR322遗传图谱, 质粒带有二个抗菌素耐药基因

药性基因, 因而重组克隆的表现型为Amp^r-Tet^r。将转化体接种在含有Tet(20μg/ml)及Amp(50μg/ml)加Tet(20μg/ml)的琼脂平板上, 37℃培养过夜, 若在Tet平板上生长而在Tet加Amp平板上不生长者即含有重组体分子的转化体。

2. 核酸杂交法: 用Grunstein和Hogness的原位杂交法来检测转化菌落中的

DNA序列, 这个方法能够迅速地数百个菌落中检出含有所需的DNA序列的菌落(图3)。其法是将被筛选的菌落影印到铺放在

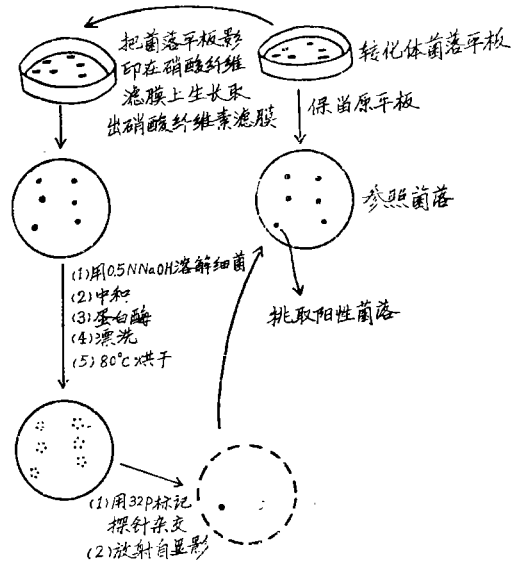


图3 菌落杂交法检测重组体克隆

琼脂表面的硝化纤维素薄膜上, 温育过夜, 取出已长有菌落的硝化纤维素膜。用碱处理, 使细菌在原位溶解, 其DNA变性并同膜结合。由于变性的DNA与硝化纤维素膜有很强的亲和力, 这样便形成了菌落的“DNA一印迹”(DNA-Print)。80℃真空烘烤以固定DNA。再用³²P-cDNA或³²P-RNA探针杂交。基于原位杂交差别, 含有插入互补片段的Amp^r-Tet^r转化体便可获得, 据此可从参照平板上把菌落挑取出来。

3. 重组体cDNA的鉴定: 一旦分离到了携有特别感兴趣的DNA序列的重组体之后, 就必须对这种重组体作进一步的鉴定。并验证所研究的DNA是否的确已经克隆了。其法是将显示很强的原位杂交菌落繁殖, 大量生长, 借CsCl密度梯度离心法或其他方法来分离纯化质粒DNA, 用凝胶电泳测定其大小。

4. 重组cDNA鉴定的另一重要方法

是杂交信使RNA选择翻译法。此法能弄清克隆的cDNA同其编码的蛋白质之间的对应关系。该法是将克隆的cDNA固定于硝酸纤维素膜上与某编码蛋白总mRNA进行DNA—RNA分子杂交,然后加热使mRNA释放出来,再进行体外翻译,用凝胶电泳和放射自显影以检查翻译产物蛋白质的大小。

五、克隆的DNA分子的表达

一旦所设计的基因被克隆和鉴定,则下一个最终目标之一是实现该基因的有效表达以大量生产该基因所编码的蛋白质产品。有效的表达包括高水平的转录与转译及其稳定新合成的蛋白质不使其降解。由于三联密码在生物界是统一的,即结构基因在真核生物到原核生物的转移是没有问题的,但它们的调节元件是不同的。所以一个克隆基因的转录必须有一个适合的能被寄主细胞RNA多聚酶所识别的启动基因序列(Promoter Sequence),而mRNA的有效转译则必需有一个核糖体结合位点的顺序,这二者均在克隆基因的5'非编码区,均可通过限制性内切酶同时引入到克隆基因的适当部位。对于大肠杆菌寄主细胞外源基因表达常用的几个强的启动基因是:Lac, Trp, λ PL及SV₄₀病毒启动基因⁽¹⁴⁾等。Lac的表达效率比其他三种要低5~10倍。表达的分子一般为每个细胞200,000分子,占大肠杆菌可溶蛋白的5~30%。一旦实现高效表达,则可将寄主微生物在大的发酵装置内大量生长,这种发酵罐可大到200~10,000升体积,为了细胞生长在最适条件,蛋白质产量最高,则发酵装置内的pH,氧张力,基质浓度,细胞密度等必需连续监视,自动调节。大规模纯化蛋白质的方法也需要有特殊的技术。

上述就是基因工程的主要技术,用这套技术能够把人或其他动物基因放在原核生物主要是大肠杆菌或真核生物如酵母中表达进行工业生产,如专门为大规模利用重组DNA进行人胰岛素商业性生产而设计的工厂已在

美国印第安那帕尔斯(Indianapolis)⁽¹⁶⁾城及英国利物浦建立起来并于1982年首次在欧美市场上正式出售。其他如抗病毒抗肿瘤的干扰素,提高人体免疫力的胸腺素,治疗矮小病的生长素,很多病毒疫苗如乙型肝炎病毒抗原,小儿麻痹症疫苗,流感疫苗,牲畜用的口蹄疫苗,人血清白蛋白,人血清降钙素,人抗血友病因子等等都已克隆表达成功,处于实验阶段。此外,重组DNA技术用于癌基因研究,固醇类激素作用机理研究,DNA探针用于传染病,遗传病的诊断⁽¹⁷⁾为肠毒素基因诊断腹泻,乙型肝炎、肝癌、 β -地中海贫血产前诊断等不胜枚举。所以基因工程已给许多生产领域带来了新的技术途径,给许多重大课题带来突破,因而近年来国际市场上出现了基因工程热。

从1973年Cohen等在美国生物学会会议上第一次提出基因可以人工重新组合并能在细菌中繁殖的苗头,到1977年第一个脑激素—脑垂体释放抑制素表达成功,仅仅化了四年时间就进入了应用,接着各种基因克隆和表达如雨后春笋,发展迅速。到目前为止,在医药方面就有几十种激素、疫苗、酶和其他生物制剂被生产,但多数尚处于开发试验阶段,这种基础学科的新成就如此之快的走向应用并涉及到国计民生的各个方面,其来势之猛是前所未有的。

参 考 文 献

1. Watson J O and crick F H C. Nature 1953; 171: 737.
2. Nature Conference. Nature 1983; 302: 651.
3. Nature conference. Nature 1983; 305: 383.
4. Smith J E. Biotechnology Edward Arnold, 1991: 25.
5. Glover D M. Genetic Engineeering, Cloning DNA Loudon and New York: Chapman and Hall, 1980: 7.

(下转第178页)

窦性心动过缓14.4%。一般窦性心律不齐或窦性心动过缓的原因,是迷走神经与交感神经的张力强弱不匀所致,但亦有窦房结在供血不足或代谢等的影响下,产生窦性心动过缓、显著窦性心律不齐甚或暂停,即所谓病态窦房结综合征。窦性心律不齐又往往是由于肺脏及其血管中的压力感受器在呼吸运动中受了不同程度的压力,因而向延髓的呼吸中枢传入不同程度的兴奋,反射地影响了迷走神经的张力所引起。一般的慢性放射病在病初往往以中枢神经系统和植物神经机能失调为主。铀对机体造成的辐射损伤主要是氡气的吸入及其子代产物的作用,有认为窦性心动过缓的程度与铀中毒的程度成平行关系⁽¹⁾,且常伴有迷走神经效应。窦性心律不齐与窦性心动过缓虽亦常见于正常人^(2,3),但就我们这次检查来看,程度似较严重,如本组有1例窦性心动过缓的心率为44次/分,似非正常现象。然而,本组窦性心律不齐及窦性心动过缓分别为23.5%与14.4%,与楼福庆⁽⁴⁾等报告的窦性心律不齐与窦性心动过缓分别为69%与45%相比较,显然低得多。本组111例中左心室肥厚仅2例(占1.8%),低电压及电压较低者29例(占26.1%),其原因可能是与本组工人的工作环境中氡气浓度较高引起一般血压较低,以及引起营养不

良性心肌病变致使电压明显较低有关。

T波与R波的关系,在111例中T波小于1/10R波者7例,T波负正双向2例,T波切迹3例,在导联I的R波与T波后肢延长线呈直接交叉现象者1例。Королев在实验报告中认为,铀的裂变产物能够引起冠状动脉营养不良性障碍。本组部分铀矿工人出现心肌变化是否与铀及其子代产物的影响有关,尚待作更进一步的研究。

综合本组心电图变化,较明显窦性心动过缓(44次/分)、低电压、T波变化及局限性室内传导阻滞,我们认为这些变化较正常人有明显差异。历年对该矿区氡气浓度测定均高于非放射性矿区,最低0.01爱曼,最高达128.46爱曼,分别有31.16~19.24%的样品超过国家规定的允许浓度。故这些差异很可能与铀及其子代产物尤其是氡气浓度较高有一定的关系。

参 考 文 献

1. 中华人民共和国卫生部,放射卫生学和放射医学讲义,人民出版社,北京;1961:125.
2. 傅世英,等.中华内科杂志 1954; 3:197.
3. Friedberg C K. Diseases of the heart. Saunders, Philadelphia; 1956:325
4. 楼福庆,等.某地铀矿坑道工人100例的心电图分析.全国放射生物学和放射医学学术会议论文选集;1964:409.

(上接第192页)

6. Chakrabarty A M. Genetic Engineering CRC Press; 1978: 2.
7. Ray Wu, et al. Proceedings of The 1984 Symposium on Genetic Engineering and Biotechnology Beging. 1984: 9.
8. 陈常庆,等.遗传工程 1983; 3: 4.
9. Old R u, et al. Principles of Gene manipulation University of California Press, Berkeley and Los Angeles, 1980: 12.
10. Williamson R. Genetic Engineering 3, Academic Press, 1982: 3~41.
11. Hong, G F. J Mol Biol 1982; 158: 539.

12. Pavis R W, et al. A manual for Genetic Engineering—Advanced bacterial genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, 1980: 140.
13. Abelson P H. Science 1983; 219: 611.
14. Klots L C. Ann N Y Acad Sci 1983; 413: 1.
15. Rawls R L, et al. Chemical Engineering News August 1984; 13: 39.
16. Johnson I S. Science 1983; 219: 632.
17. Engleberg N C. N Engl J Med 1984; 331: 892.