

# 分子克隆技术

克隆 (Clone) 是指通过无性繁殖过程所产生的与亲代完全相同的子代群体。分子克隆 (Molecular Cloning) 是指由一个祖先分子复制生成的和祖先分子完全相同的分子群, 发生在基因水平上的分子克隆称基因克隆 (DNA 克隆)。其基本原理是: 将编码某一多肽或蛋白质的基因 (外源基因) 组装到细菌质粒 (质粒是细菌染色体外的双链环状 DNA 分子) 中, 再将这种质粒 (重组质粒) 转入大肠杆菌体内, 这样重组质粒就随大肠杆菌的增殖而复制, 从而表达出外源基因编码的相应多肽或蛋白质。由于质粒具有不相容性, 即同一类群的不同质粒常不能在同一菌株内稳定共存, 当细胞分裂时就会分别进入到不同的子代细胞中, 所以来源于一个菌株的质粒是一个分子克隆, 而随质粒复制出的外源基因也就是一个分子克隆。

## (一) 质粒 DNA 的制备

质粒是存在于细菌染色体外的能独立复制的双链闭环 DNA 分子, 它能赋予细菌 (宿主细胞) 某些特定的遗传表型。质粒并非细菌生长所必需, 但由于其编码一些对宿主细菌有利的酶类, 从而使宿主细菌具有抵抗不利自身生长的因素如抗药性等的能力。目前发现的质粒主要分为 F 质粒 (性质粒), R 质粒 (抗药性质粒), E.coli 质粒 (大肠杆菌肠毒素质粒)。根据质粒在一个细胞周期内产生拷贝的数量, 可将质粒分为严紧型 (低拷贝, 复制 1-2 次) 和松弛型 (高拷贝, 复制 10-200 次)。由于质粒的不相容性细菌经分裂后就只留下了拷贝数较高的一种质粒, 例如 R1 和 R2 两种抗药性质粒同属于一类, 由于不相容性使它们不能共存于同一细菌中, 但不同类群的质粒可以在一个细菌中共存。

质粒存在于细菌中, 所以制备质粒 DNA 时, 首先应将含有质粒的细菌在含有相应抗生素的液体培养基中生长至对数期, 使质粒在细菌中得到扩增。

通过离心收集细菌, 经碱裂解细菌, 使质粒和细菌染色体 DNA 变性, 然后再加中和液, 使溶液 PH 值恢复到中性, 这样质粒 DNA 又可以复性至天然双链构象状态, 而细菌染色体 DNA 不能或很难复性所以仍处在变性状态, 这些变性的染色体 DNA 与变性蛋白质缠绕在一起, 易被离心去处, 而质粒 DNA 仍存在于水相中, 再用无水乙醇沉质粒 DNA, 最后经离心即可得到质粒 DNA。

## (二) DNA 插入片段的制备

DNA 插入片段是指我们所要研究或应用的基因, 也就是将要克隆或表达的基因。获得 DNA 插入片段是分子克隆过程中的第一步。目前有几种方法, 如限制性内切酶直接分离法、

文库筛选法、体外扩增法、人工合成法等，下面以逆转录-DNA 聚合酶链式反应为例介绍获得外源基因 DNA 插入片段的方法。

## 1、逆转录反应

所谓逆转录，就是以 mRNA 为模板合成一条互补 DNA 链(即 cDNA)的过程，在逆转录反应中所用的是逆转录酶，即以 RNA 为模板的 DNA 聚合酶，它也具有 5'-3'DNA 聚合酶活性，在合成新的核苷酸链时也需要引物。

由于真核基因组 DNA 由内含子和外显子组成，内含子不编码蛋白质，因此体外扩增基因组 DNA 会给某些研究造成困难，以 mRNA 为模板的基因扩增可避免这种问题的发生，因此从某种意义上来说，逆转录反应更具实用性。

制备 cDNA 时，首先要从细胞中提取 mRNA，以 mRNA 为模板，在 mRNA 的 poly(A) 尾上结合 12-18 个寡聚 (dT) 片段作为合成的起始引物，在逆转录酶的作用下合成第一条 cDNA 链。然后用 RNA 酶消化 DNA-RNA 杂交链中的 RNA，剩下的单链 DNA 的 3'端往往有自发回折形成的发夹结构，正好可以作为合成第二条 DNA 链的引物。第二条 DNA 链的合成可以用 DNA 聚合酶 I，也可以用逆转录酶。双链 DNA 合成后，用 S1 核酸酶切去发夹结构，即获得平端的双链 cDNA。

## 2、DNA 聚合酶链式反应 (PCR)

PCR 技术是在模板 DNA、引物和 4 种脱氧核糖核酸存在下，DNA 聚合酶催化的一种体外酶促反应。PCR 技术的特异性取决于引物和模板 DNA 结合的特异性。

反应由三个步骤组成：

- 1、变性：通过加热使 DNA 双螺旋的氢键断裂，双链 DNA 解离成单链 DNA；
- 2、退火：当温度突然降低时，使含量远远多于模板 DNA 的引物与模板 DNA 在局部形成杂交双链；
- 3、延伸：在 4 种 dNTP 底物和  $Mg^{2+}$  存在的条件下，DNA 聚合酶由 5'-3' 方向合成新的与模板 DNA 互补的 DNA 链。以上反应为一个循环，通常进行 25-30 个循环，由此介于两个引物之间的特异性 DNA 片段得到大量复制，数量可达  $2 \times 10^{7-8}$  拷贝。

PCR 引物决定 PCR 的特异性，引物的设计就显得尤为重要。下面以已知 DNA 序列设计引物为例介绍设计引物应考虑的几个方面：

- 1、GC 比值：众所周知，碱基对中的 GC 之间有三条氢键，AT 之间有两条氢键，GC 和 AT 在引物序列中的合理比例是设定 PCR 中退火温度的重要依据。通常在一个引物中 GC 和 AT 各半即可。

2、长度：通常 15-20bp 即可。由于目的不同，有时引物长些，但太短会影响引物的特异性。

3、方向：设计出的引物永远是 5'-3'方向,所以正向引物是与一股模板 DNA 序列相一致的，而反向引物则与这股模板 DNA 序列相互补。

4、酶切位点：如果想克隆所放大的 DNA 片段，通常在引物的 5'端设计适当的限制性酶切位点，使进一步的克隆工作更容易。一对引物可用一种或两种酶切位点，这取决于设计者，两种不同的酶切位点使克隆具有方向性。

5、起始和终止密码：如果想表达所放大的 DNA 片段，所用的克隆载体又不含起始密码和终止密码，应将其设计在引物的酶切位点之后，特异性 DNA 序列之前。

6、其它：如果表达的融合蛋白用亲和层析方法纯化，可将必要的序列设计在引物中以使所表达的融合蛋白易于纯化。

### **(三) 连接反应**

将载体质粒 DNA 和外源基因 DNA 在 DNA 连接酶的作用下，双链 DNA 片段相邻的 5'端磷酸与 3'端羟基之间形成磷酸二酯键，形成重组质粒，这是分子克隆技术的核心步骤。在连接反应进行之前，质粒和外源基因 DNA 分别用同样的限制性内切酶消化，使它们成为含有同样粘性末端或钝端的线性 DNA，这是连接成功的先决条件。下面介绍连接反应的程序。

#### **1、模板 DNA 的准备**

在进行 DNA 重组以前，通常要先将 DNA 分子用限制性内切酶消化，使两种 DNA 分子的末端产生相同的粘性末端或平齐末端。通常按下列比例进行：

1. 双蒸溜水            适量
2. 10× 酶缓冲液      1/10 容量
3. DNA                多少  $\mu\text{l}$
4. 限制性内切酶      1/10 容量（每微克 DNA 用 1-10 单位）

总容量（根据 DNA 分子量来确定，通常 10-100 $\mu\text{l}$ ）。

混合后 37°C 温育 30-120min。

#### **2、连接反应**

在 DNA 连接酶的作用下，将外源基因 DNA 片段和线性质粒 DNA 连接起来构成重组质粒的过程。通常按下列比例进行：

1. 双蒸溜水            适量

2. 10× 酶缓冲液                    1/10 容量
3. 质粒 DNA                        适量
4. DNA 插入片段                   适量
5. 限制性内切酶                   1/10 容量(每微克 DNA 用 1-10 单位)

总容量（根据 DNA 分子量来确定，通常 10-20 $\mu$ l）。

混合后置 14-16 $^{\circ}$ C 水浴 6-12 小时。

#### [注意]

通常 DNA 插入片的量是载体 DNA 的 3 倍，这需根据 DNA 分子量计算，而不取决于浓度。

### （四）重组质粒的转化

DNA 插入片段和质粒 DNA 在体外连接形成重组质粒后，需要被导入到细胞内才能进行扩增和表达。接受重组 DNA 分子的细胞称作受体细胞或宿主细胞。受体细胞分为原核细胞（如大肠杆菌）和真核细胞（如酵母、哺乳动物细胞及昆虫细胞）。原核细胞即可作为基因复制扩增的场所，也可作为基因表达的场所；真核细胞一般用作基因表达系统。

一般将重组 DNA 分子导入原核细胞的过程称为转化（transformation），而将重组 DNA 分子导入真核细胞的过程称为转染（transfection）。

#### 1、感受态细胞的制备

未经处理的大肠杆菌很难容纳重组 DNA 分子，但当将大肠杆菌用物理或化学方法处理后，细胞对摄取外来 DNA 分子变得敏感了，这种经过处理而容易接受外源 DNA 分子的细胞叫做感受态细胞（competent cell）。

将重组 DNA 分子和感受态大肠杆菌细胞相混合，使 DNA 分子进入大肠杆菌细胞中，实现了重组 DNA 分子的转化。

受体细胞是重组基因增殖的场所，对受体细胞也应具有几个要求：

（1）容易接纳重组 DNA 分子；（2）对载体的复制扩增无严格限制；（3）不存在特异的内切酶体系降解外源 DNA；（4）不对外源 DNA 进行修饰。

由于载体的不同，所具备的筛选标志不同，所用的受体细胞也不同，因此可根据所用的载体选择合适的受体细胞。

将大肠杆菌放入低渗的CaCl<sub>2</sub>溶液中，使细胞处于膨胀状态，从而获得大肠杆菌感受态细胞，4 $^{\circ}$ C可保存 1-2 周，若需长期保存，可加甘油至终浓度为 15%，置-70 $^{\circ}$ C备用。

## 2、转化

将重组质粒置于感受态细胞溶液中，使重组质粒吸附于感受态细胞的表面，冰浴一段时间，细胞膜处于收缩状态。然后迅速将感受态细胞置于 42<sup>0</sup>C，使细胞在热环境中膜通道开放，重组质粒由膜外高浓度区向膜内扩散，经过 45 秒时间后，再将感受态细胞放回冰浴中，膜通道关闭，重组质粒转入大肠杆菌。

## 3、转化细胞的筛选和菌株的保存

### (1) 转化细胞的筛选

作为载体的质粒都含有一种或两种抗生素的耐药基因，当把这种质粒转入大肠杆菌后，此菌便获得了抵抗这种抗生素的能力。目前分子克隆所用的克隆载体多含氨苄青霉素的耐药基因，所以涉及最多的是氨苄青霉素筛选。当将氨苄青霉素加入培养基中后，只有含质粒的细菌能够生存,而不含质粒的细菌则死亡。

另外，在某些质粒中含有 *LacZ* 基因，多克隆酶切位点位于 *LacZ* 基因内部，当没有外源基因插入 *LacZ* 基因中时，*LacZ* 基因的启动子可使此基因编码半乳糖苷酶，从而催化底物 X-gal 发生化学反应，菌落变成蓝色；当外源基因与质粒发生连接时，*LacZ* 基因失活，菌落呈白色，同时该质粒还含有氨苄青霉素耐药基因，根据此特性，白色菌落含有重组质粒。

### (2) 质粒和菌株的保存

质粒可以在-20<sup>0</sup>C冰冻长期保存。

菌株可在含 20-50%甘油培养液中-20<sup>0</sup>C或-70<sup>0</sup>C保存。