

A microscopic view of several cells, likely bacteria or yeast, with a glowing green fluorescent signal concentrated in the center of one cell. The background is dark, and the cells are illuminated with a blueish light.

生物技术专业主干课程

基因工程学  
Genetic Engineering

同济大学 杜昌升

# 授课教师

郭占云老师（1、7、8三个章节）

13585745920; zhan-yun.guo@tongji.edu.cn;  
医学楼辅楼3B室



杨桦老师（9、10两个章节）

13816388211; yanghua0712@126.com;  
医学楼辅楼405室



杜昌升老师（主讲；2~6五个章节）

13052297656; duchangsheng@gmail.com;  
医学楼主楼302室



# 课程目录-Contents

绪论	1	Introduction
基因操作的主要技术原理	2	The methodology of gene manipulation
基因克隆的酶学基础	3	Enzymes used in gene cloning
基因克隆的质粒载体	4	Plasmids
噬菌体和柯斯载体	5	Phagemids & cosmids
基因的分离与鉴定	6	Recombinants selection & screening
原核表达蛋白	7	Recombinant eukaryotic expression
重组蛋白表达的其它策略	8	Other strategies for recombinant expression
转基因动物	9	Transgenic animals
基因工程的具体应用	10	Applications of gene manipulation

# 第5章 噬菌体载体和柯斯载体

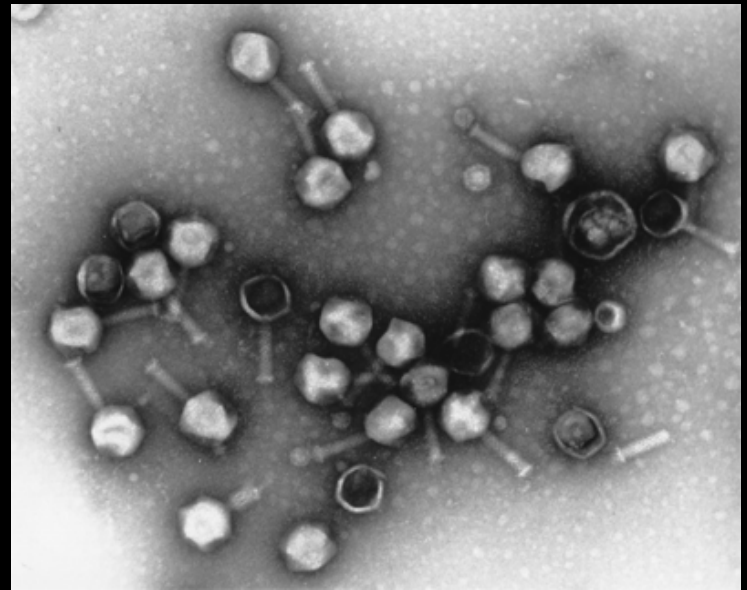
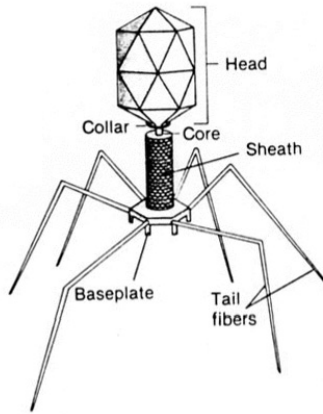
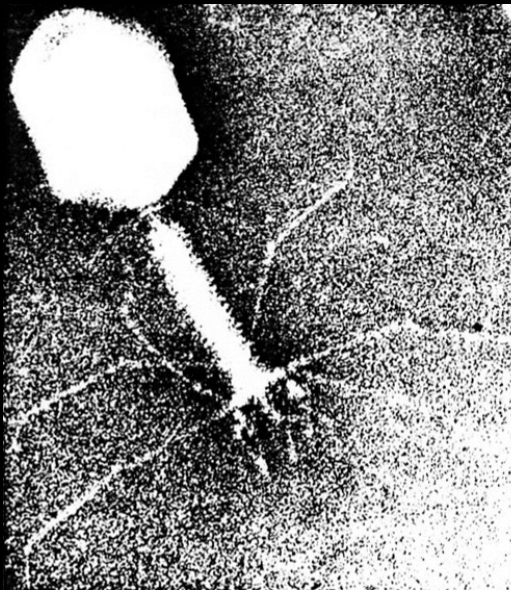
## Phagemids & cosmids

噬菌体的一般生物学特性	1	Characteristics of bacteriophage
λ 噬菌体	2	λ bacteriophage
柯斯质粒载体	3	Cosmids
单链DNA噬菌体载体	4	ssDNA bacteriophage
噬菌粒载体	5	Phagemid
病毒载体及病毒包装	6	Virus vector & virus packaging

# 第1节 噬菌体的一般生物学特性

## Characteristics of bacteriophage

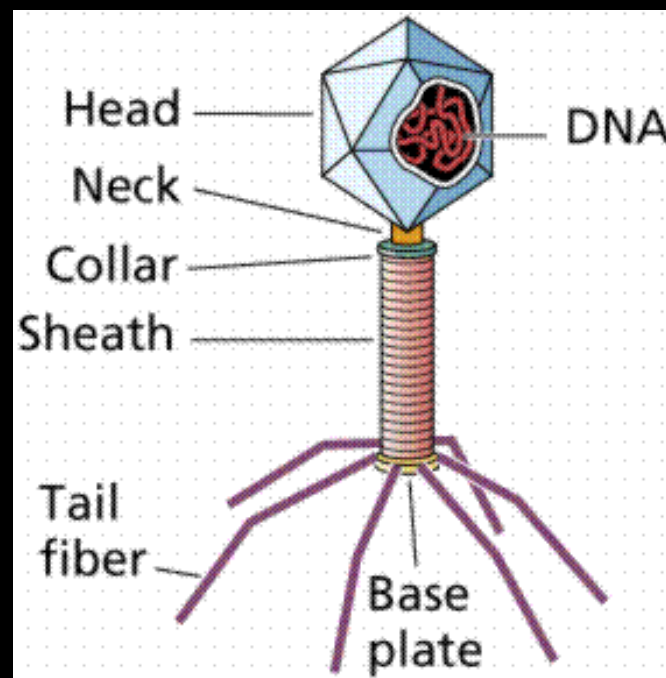
噬菌体是一类细菌病毒的总称，英文名叫做 Bacteriophage（简称 phage）。它的DNA分子除了复制起点之外，还有编码外壳蛋白质的基因。如同质粒分子一样，噬菌体也可以用于克隆和扩增特定的DNA。



# 1. 噬菌体的结构及其核酸类型

三种不同的基本结构：

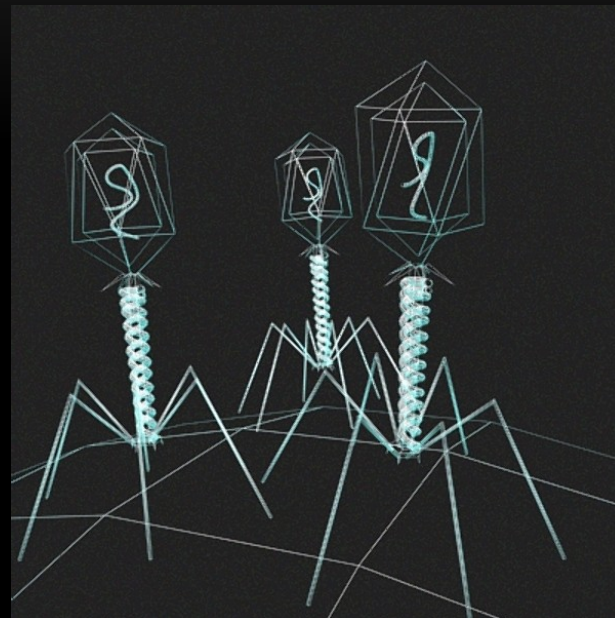
- ✓ 无尾部结构的二十面体
- ✓ 具尾部结构的二十面体（居多）
- ✓ 线状体型。



# 1. 噬菌体的结构及其核酸类型

## 噬菌体的核酸类型

- ✓ 双链线性DNA（最常见）
- ✓ 双链环形DNA
- ✓ 单链环形DNA
- ✓ 单链线性DNA
- ✓ 单链RNA。



噬菌体的DNA碱基不绝对是由标准的A、T、G、C四种碱基组成。

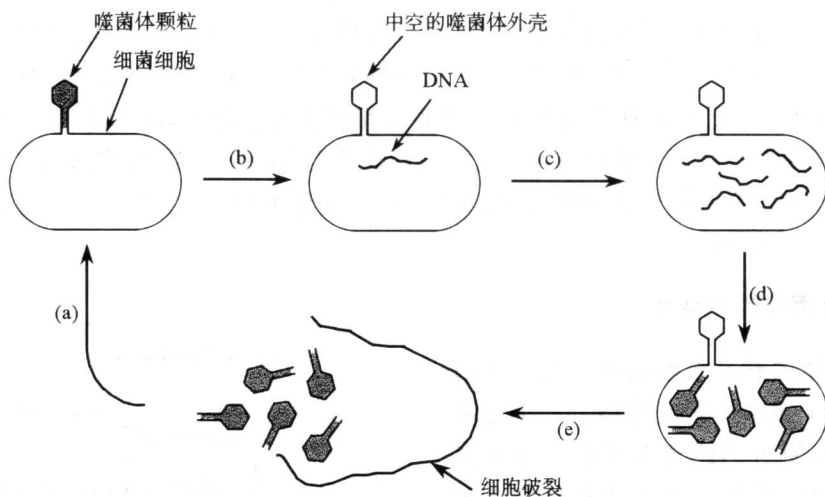
T4噬菌体DNA中没有C碱基，取代的是5-羟甲基胞嘧啶（HMC）；

SSP01噬菌体DNA中T碱基被5-羟甲基尿嘧啶（HMU）取代。



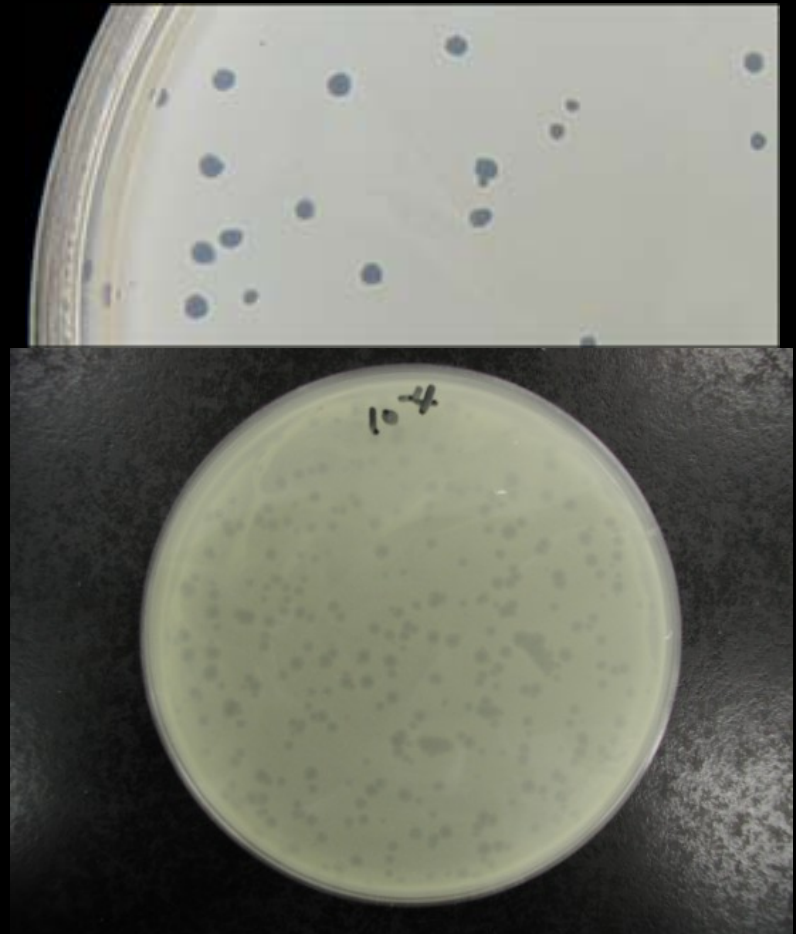
## 2. 噬菌体的感染性

噬菌体极具高效的感染能力，一个噬菌体一代形成数百个子代，经过四代，可以使得数十亿的细菌细胞裂解，形成嗜菌斑。



一种典型的烈性噬菌体的生命周期

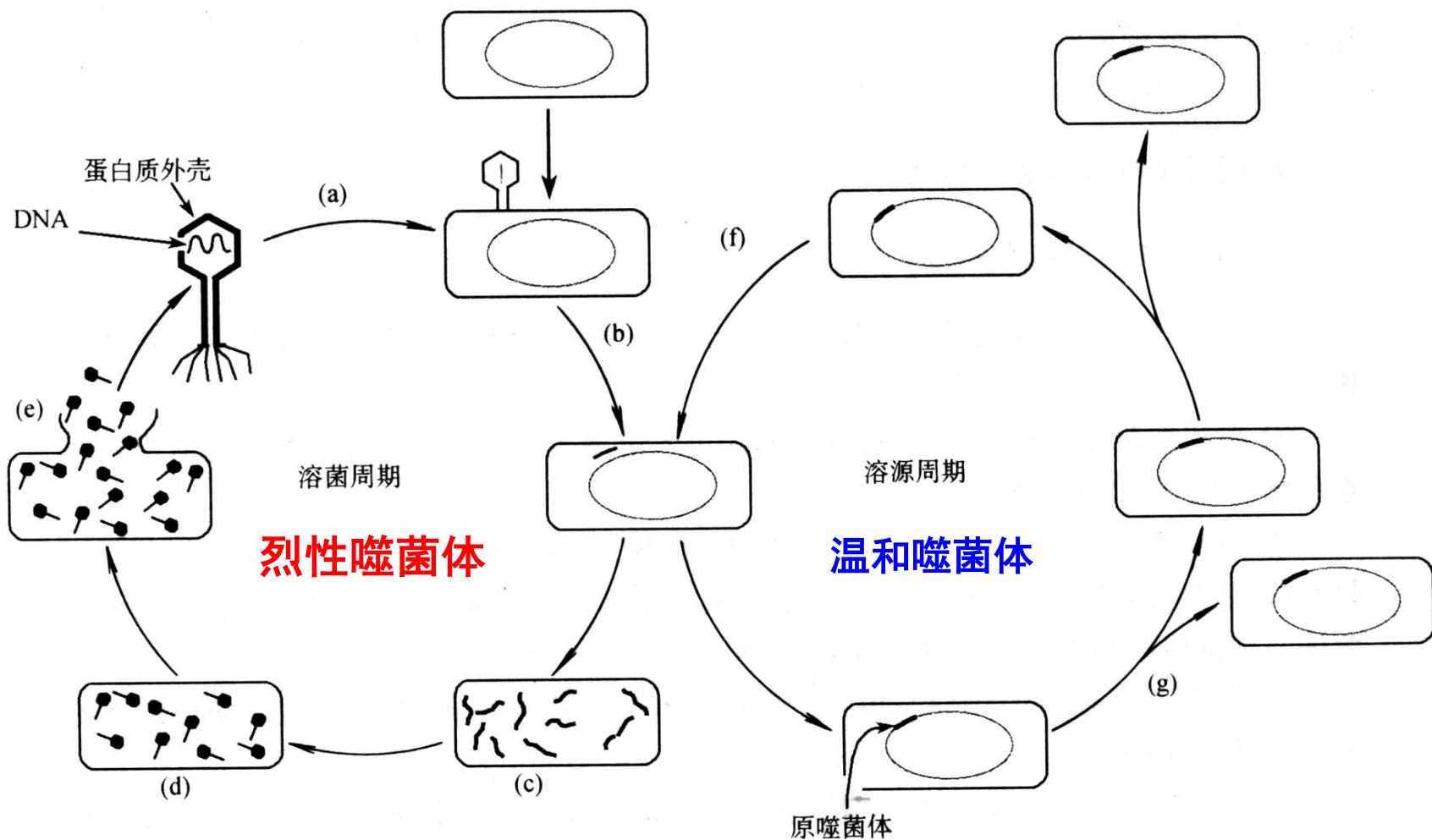
(a)噬菌体颗粒吸附到寄主细胞表面；(b)噬菌体 DNA 注入寄主细胞；(c)噬菌体 DNA 复制及头部蛋白质合成；(d)子代噬菌体颗粒的组装；(e)寄主细胞溶菌释放出子代噬菌体颗粒。





### 3. 噬菌体的生命周期

噬菌体的生命周期分为溶菌周期和溶源周期。



## 噬菌体的溶源生命周期有关的基本概念

①温和噬菌体（temperate phage）：既能进入溶菌生命周期又能进入溶源生命周期的噬菌体，叫做温和噬菌体。

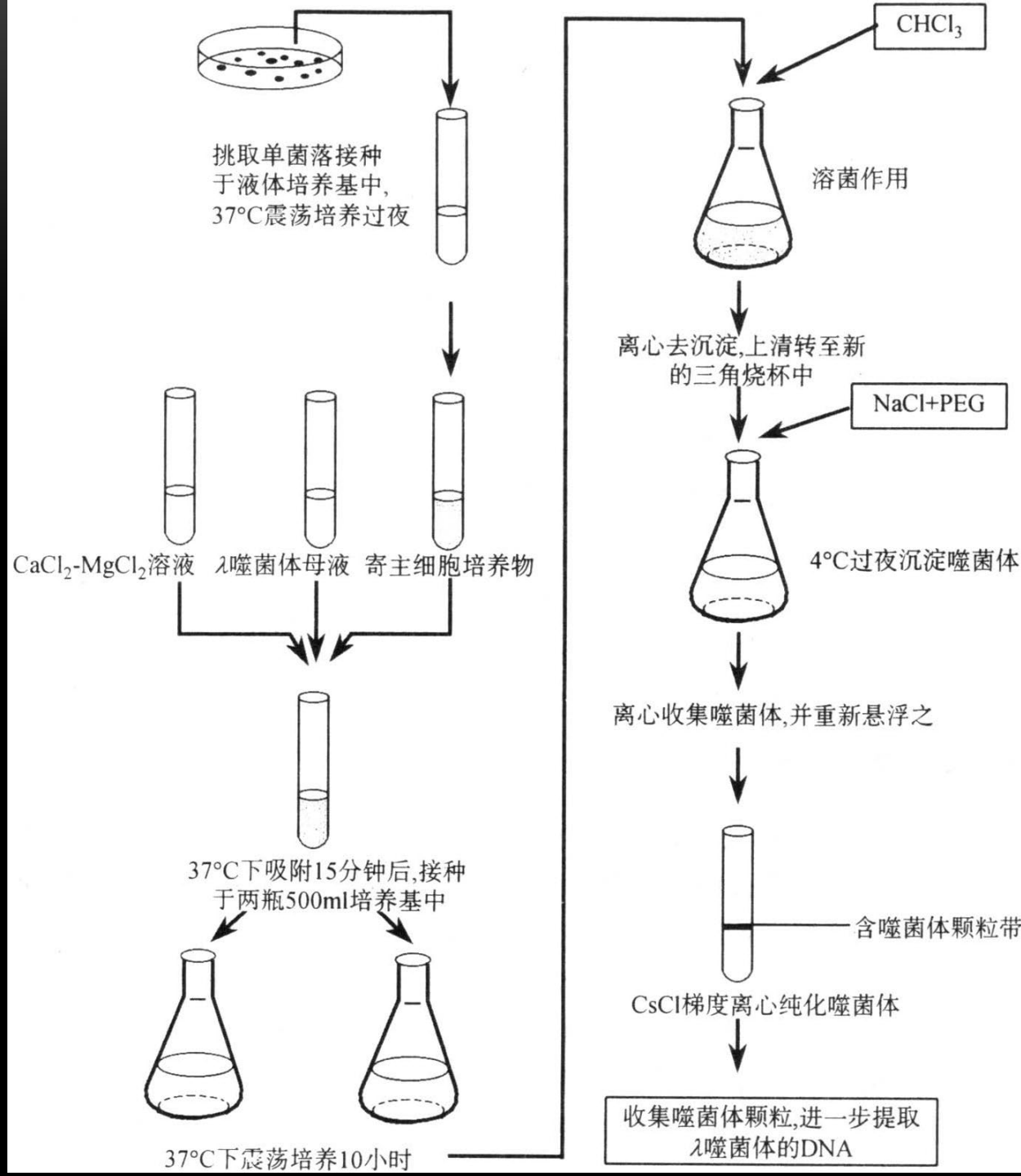
②溶源性细菌（lysogen）：具有一套完整的噬菌体基因组的细菌叫做溶源性细菌。如果有某些噬菌体基因缺失了，那么这样的噬菌体就不能够完成其溶菌周期，故含有这种噬菌体的细菌叫做缺陷性的溶源性细菌。

③溶源化（lysogenization）：用温和的噬菌体感染细菌培养物使之形成溶源性细菌的过程，叫做溶源化。

④整合（integration）：如果噬菌体的DNA是被包容在寄主细菌染色体DNA之中，便叫做整合的噬菌体DNA。这种噬菌体DNA组入细菌染色体DNA的过程，称为噬菌体DNA的整合或插入。以游离DNA分子形式存在的噬菌体DNA，叫做非整合的噬菌体DNA。

⑤原噬菌体（prophage）：在溶源性细菌内存在的整合的或非整合的噬菌体DNA，叫做原噬菌体。原噬菌体中如有某些基因缺失了，便称之为缺陷性的原噬菌体。

# 5. 重组噬菌体的分离

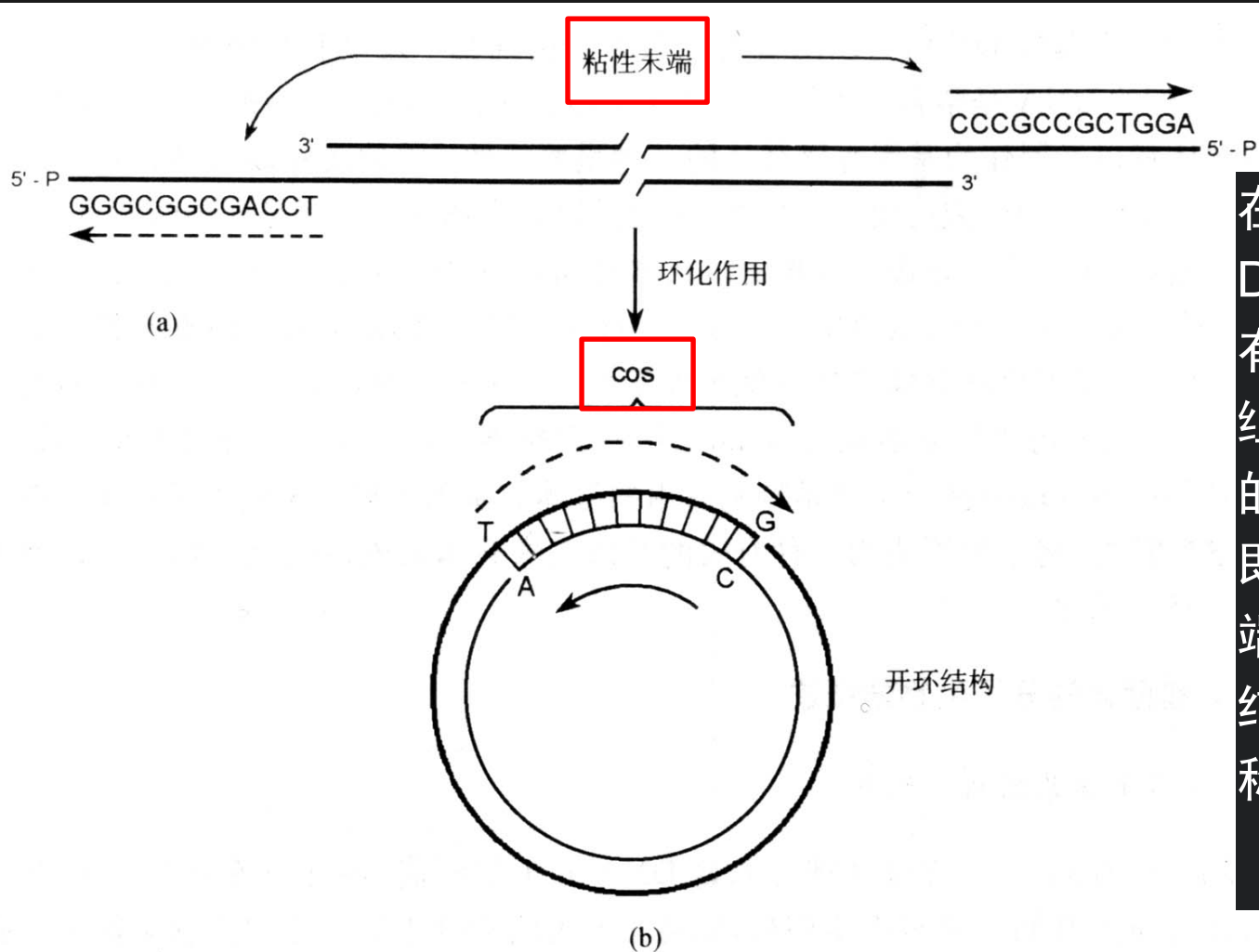


## 第2节 $\lambda$ 噬菌体载体

$\lambda$ 噬菌体，一种大肠杆菌双链DNA噬菌体。

$\lambda$ 噬菌体的分子量为  $31 \times 10^6 \text{dal}$ ，是一种中等大小的温和噬菌体。迄今已经定位的 $\lambda$ 噬菌体的基因至少有61个，其中有一半左右参与了噬菌体生命周期的活动， $\lambda$ 噬菌体的必要基因；另一部分基因，当它们被外源基因取代之后，并不影响噬菌体的生命功能，为非必要基因。

# 1. $\lambda$ 噬菌体基因组的结构



在 $\lambda$ 噬菌体线性双链DNA分子的两端，各有一条由12个核苷酸组成的彼此完全互补的5'单链突出序列，即通常所说的粘性末端。这种由粘性末端结合形成的双链区段称为cos位点 (cohesive-end site)

$\lambda$ 噬菌体线性DNA分子的粘性末端及其环化作用

(a)具有互补单链末端(粘性末端)的 $\lambda$  DNA分子。注意在12个碱基中，有10个是G或C，仅有2个是A或T；(b)通过粘性末端之间的碱基配对作用实现的线性分子的环化作用，由此形成的双链区叫做cos位点

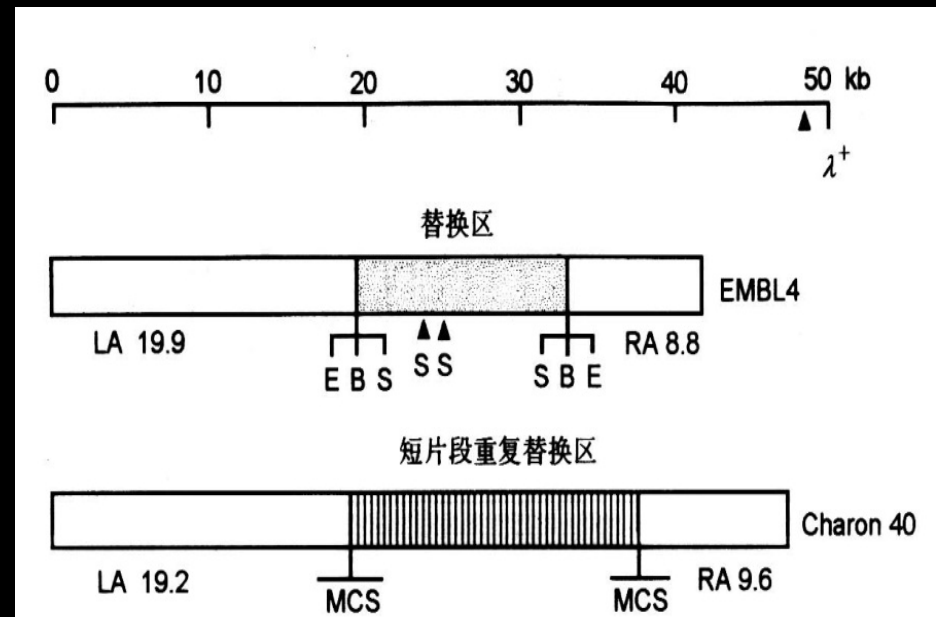
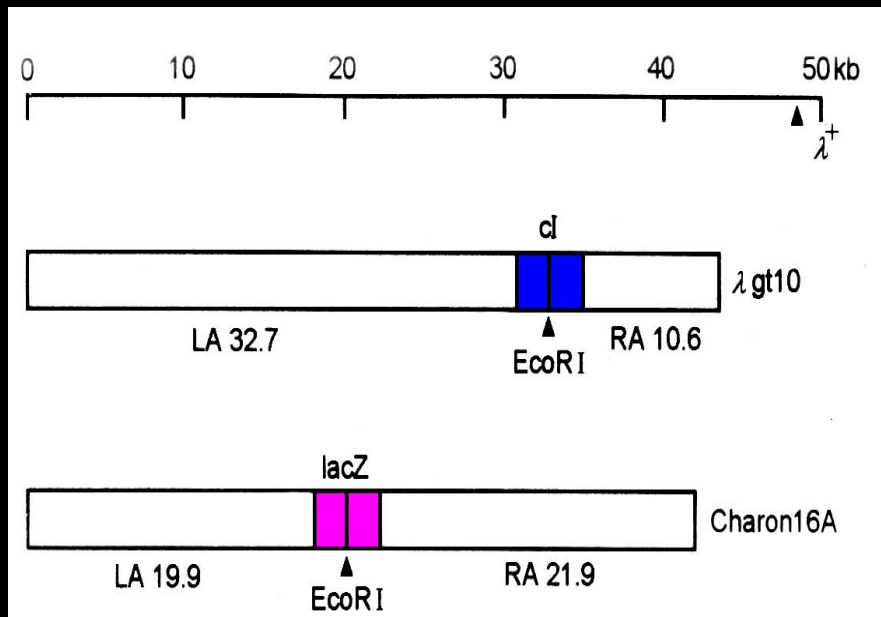
## 2. $\lambda$ 噬菌体载体的构建及其主要类型

构建 $\lambda$ 噬菌体载体的基本原理——存在非必须基因区域

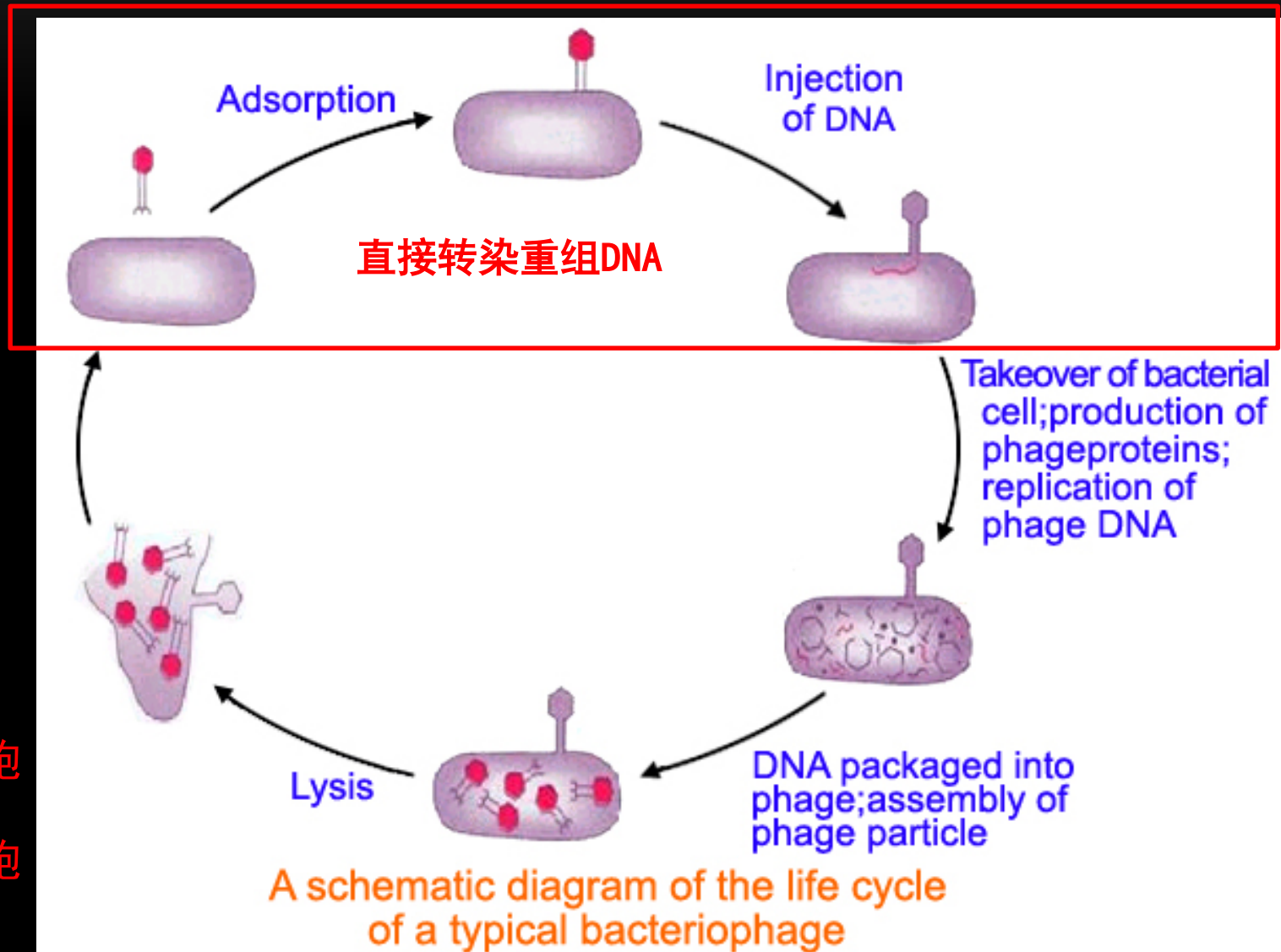
通过限制酶切在非必须基因的位置插入外源基因：

**插入型载体** (insertion vectors)，只具有一个可供外源DNA插入的克隆位点。

**替换型载体** (replacement vectors)，具有成对的克隆位点，在这两个位点之间的DNA区段可以被外源插入的DNA片段所取代。



### 3. $\lambda$ 重组体DNA分子的体外包装



转染：真核细胞

转化：原核细胞



## $\lambda$ 噬菌体DNA的包装容量

$\lambda$ 噬菌体头部外壳蛋白质容纳DNA的能力是有一定限度的。上限不得超过其正常野生型DNA总量的5%左右，而低限又不得少于正常野生型DNA总量的75%。

按野生型 $\lambda$ DNA分子长度为 48kb计算， $\lambda$ 噬菌体的包装上限是 51kb。编码必要基因的DNA区段占28kb，因此 $\lambda$ 载体克隆外源DNA的理论极限值应是23kb。

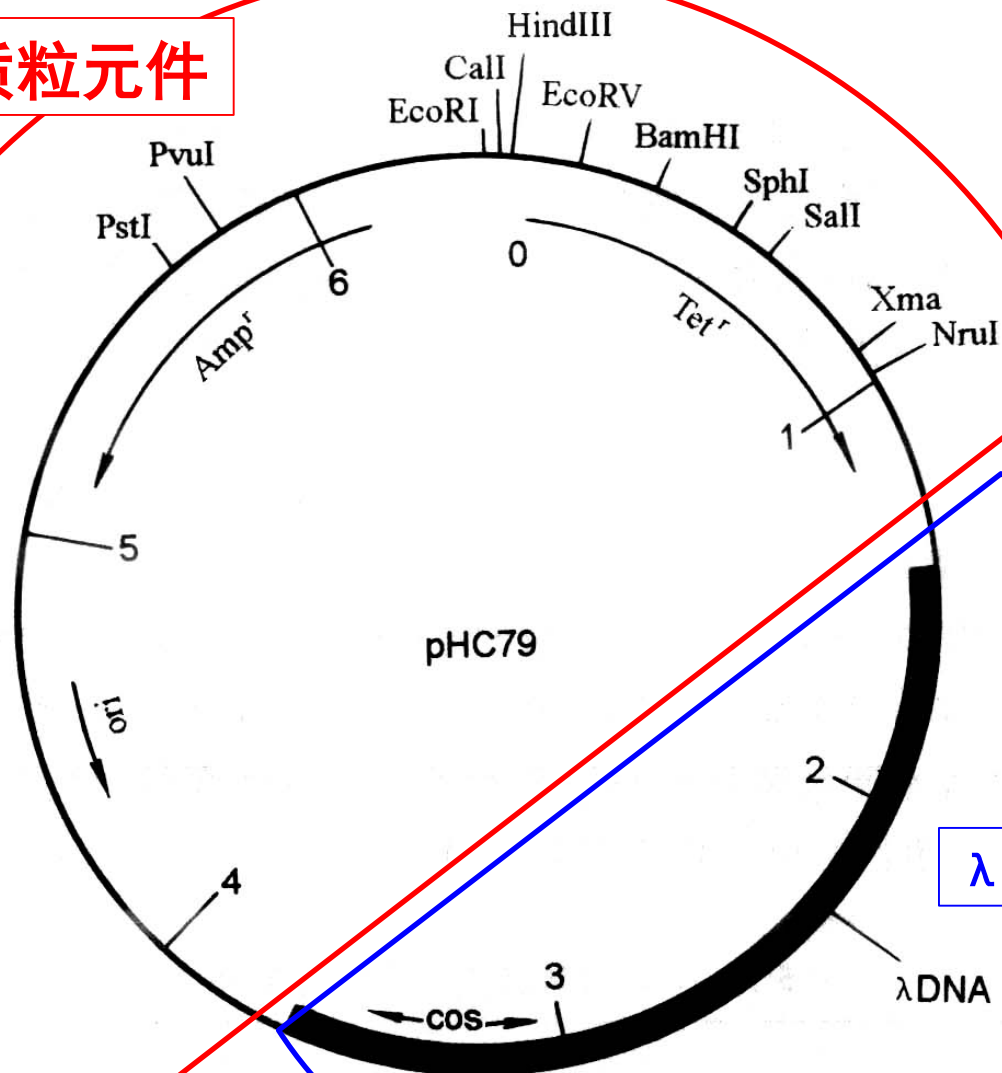
# 第3节 柯斯质粒载体 Cosmids

## 1. 柯斯质粒载体

“cosmid”一词是由英文 “cos site-carrying plasmid”缩写而成的，其原意是指带有粘性末端位点（cos）的质粒。

具体指一类由人工构建的含有 $\lambda$ 噬菌体的 cos序列和质粒复制子的“质粒—噬菌体复合体”。下页所示的柯斯质粒载体pHC79，就是由 $\lambda$  DNA片段和 pBR322质粒DNA联合组成的。

## pBR322质粒元件



λ 噬菌体元件

柯斯质粒载体 pHC79 的形体图

它是由 pBR322 质粒 DNA 与 λ 噬菌体 DNA 的 *cos* 位点及其控制包装作用的序列构成的

## 2. 柯斯质粒载体的特点

第一，具有 $\lambda$ 噬菌体的特性。可直接感染大肠杆菌寄主细胞。

第二，具有质粒载体的特性。可复制、可扩增具抗性筛选标记。

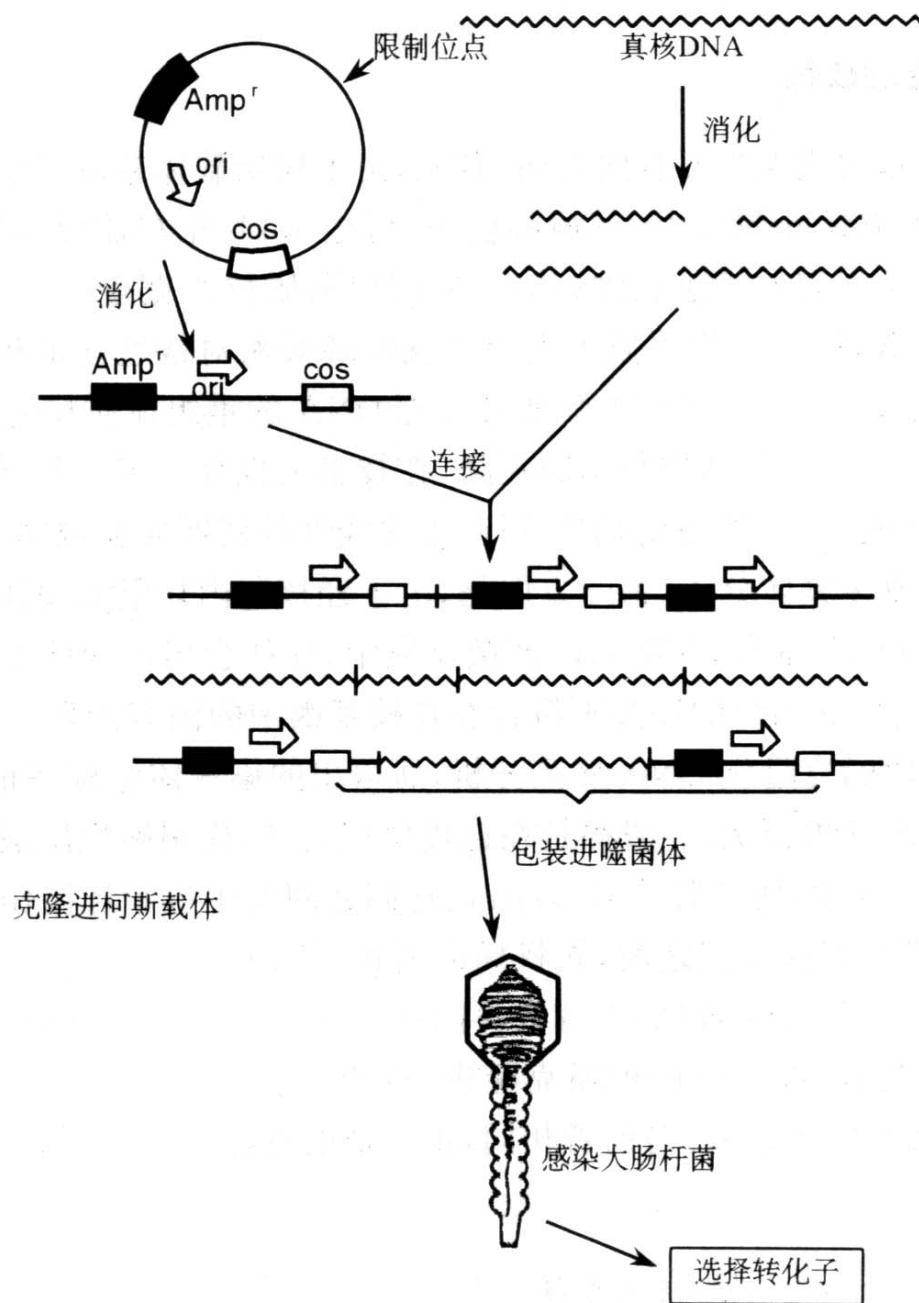
第三，具有高容量的克隆能力。克隆极限可达45kb左右。

第四，具有与同源序列的质粒进行重组的能力。

### 3. 柯斯克隆（cosmid cloning）

**定义：**应用柯斯质粒载体，在大肠杆菌细胞中克隆大片段真核基因组DNA技术，叫做“柯斯克隆”（cosmid cloning）。

**理论依据：**在线性 $\lambda$ 噬菌体DNA分子的每一端，都具有一段彼此互补的单链粘性末端（cos位点）。在 $\lambda$ 噬菌体的正常生命周期中，会产生出由数百个 $\lambda$ DNA拷贝组成的多连体分子。在此种分子中，前后两个 $\lambda$ DNA基因组之间都是通过cos位点连接起来的。 $\lambda$ 噬菌体具有的一种位点特异的切割体系（site-specific cutting system），叫做末端酶（terminase）或Ter体系，能识别两个相距适宜的cos位点，将多连体分子切割成 $\lambda$ 单位长度的片段，并将它们包装到 $\lambda$ 噬菌体头部中去。只有在被作用的 $\lambda$ DNA分子具有两个cos位点，而且它们之间的距离保持在38~54kb的条件下，Ter体系才能对它们发生作用。



应用柯斯质粒作载体进行基因克隆的一般程序

## 柯斯克隆的优点

首先，提高了克隆外源DNA片段的容量，可达45kb左右，因此对于构建真核生物基因文库是一种特别有用的克隆载体；

其次，应用柯斯质粒作克隆载体，所形成的非重组体的克隆本底比较低，从而提高了筛选具外源DNA的重组体质粒的几率。

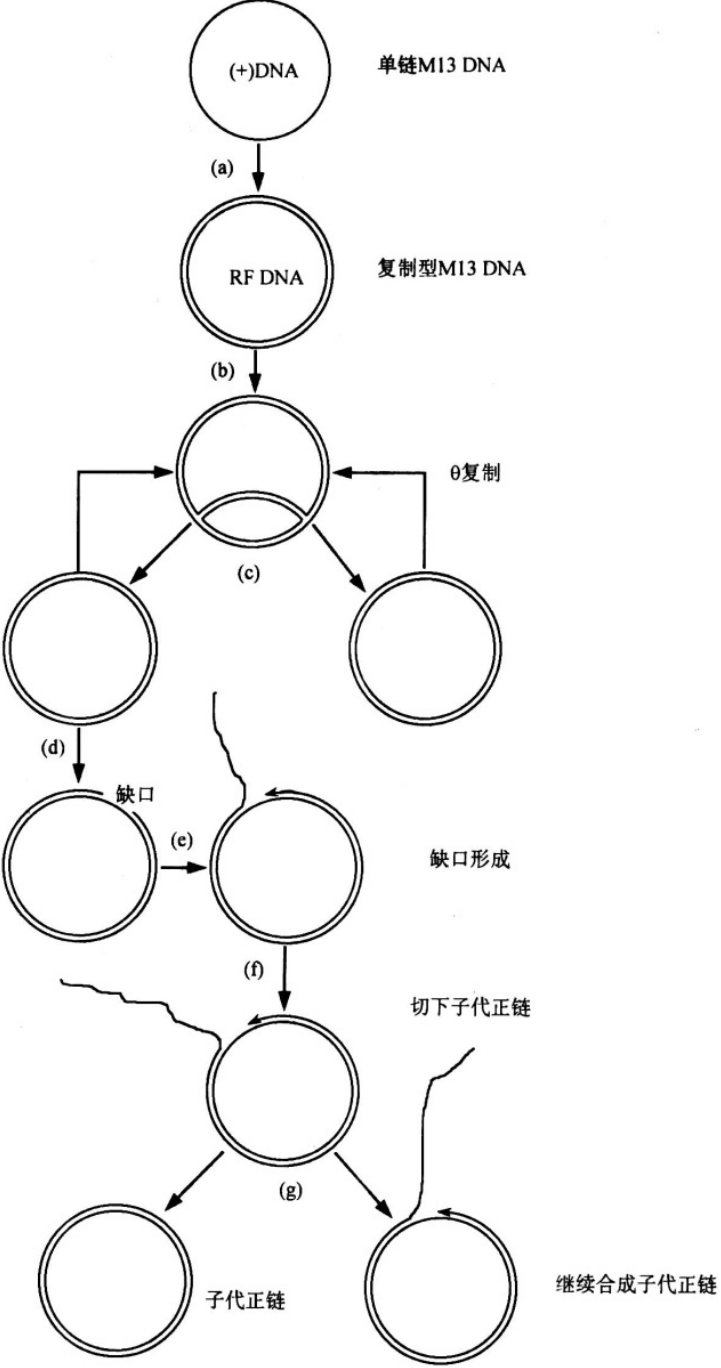
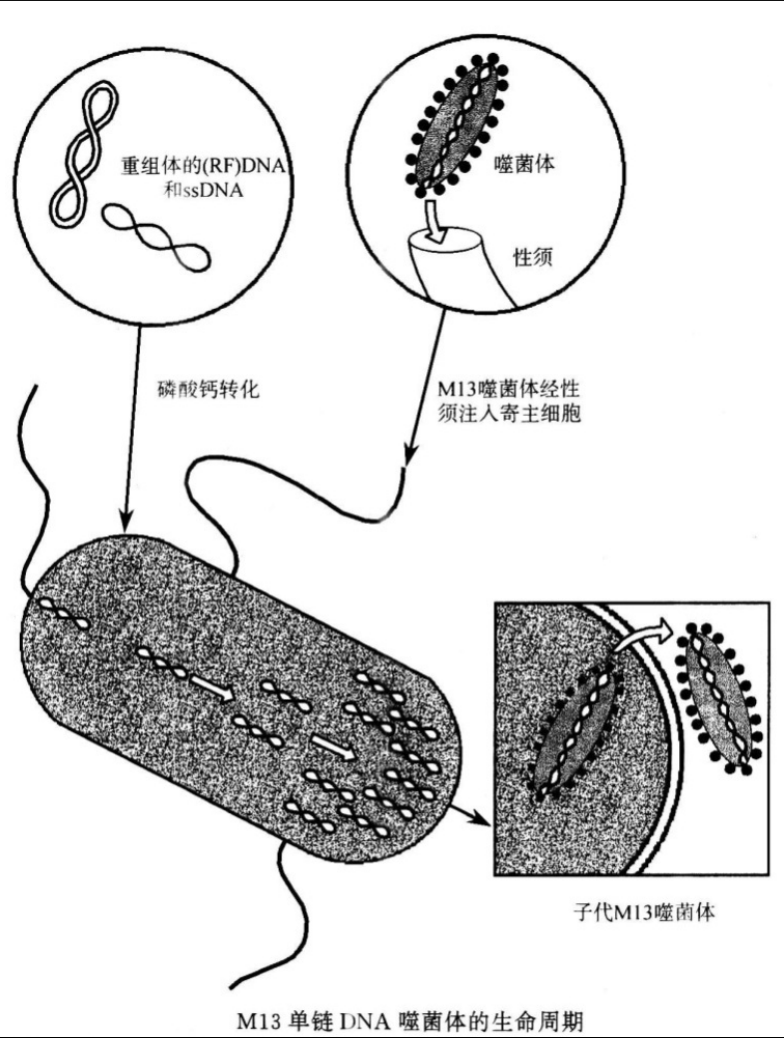
## 第4节 单链DNA噬菌体载体

M13、f1和fd，是一类丝状大肠杆菌噬菌体，它们都含有长度为6.4kb、彼此具有很高同源性的单链环状DNA分子。具备的优越性：

- ✓ 单链DNA噬菌体的复制，是以双链环形DNA为中间媒介的。这种复制形式的DNA（replication form DNA, RFDNA），可以如同质粒DNA一样，在体外进行纯化和操作。
- ✓ 不论是RFDNA还是ssDNA，它们都能够转染感受态的大肠杆菌寄主细胞，或产生出噬菌斑，或形成浸染的菌落。
- ✓ 单链DNA噬菌体颗粒的大小，是与其DNA多寡相关的，不存在包装限制的问题。
- ✓ 可产生大量纯化的含外源DNA片段插入的单链DNA分子。可用于Sanger法测序，也可用于制备DNA探针，还可进行寡核苷酸定点突变。
- ✓ M13载体系列特别适用于克隆单链的DNA分子，或者克隆双链DNA分子中的每一条链



# 1. M13噬菌体的生物学特性



M13 噬菌体颗粒在感染的大肠杆菌细胞中的复制过程

# 第5节 噬菌粒载体 Phagemid

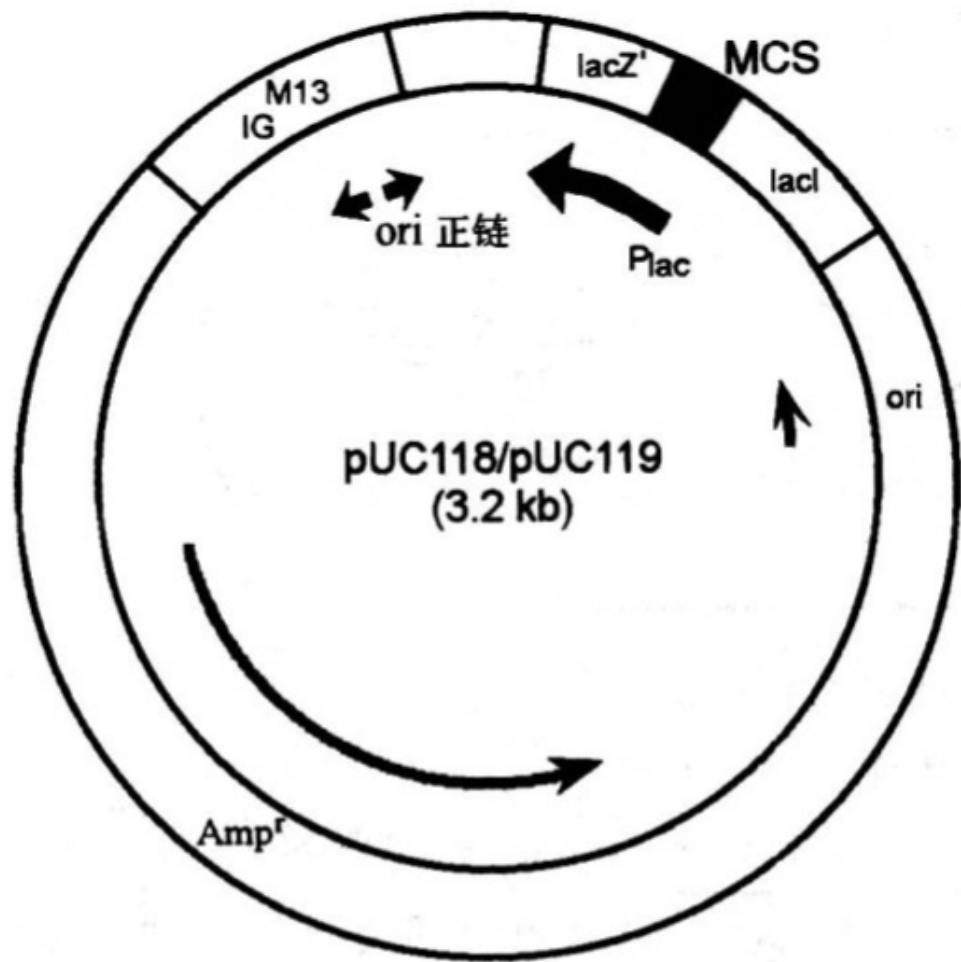
## 1. 噬菌粒载体的概念

一类由质粒载体和单链噬菌体载体结合而成的新型的载体系列，称为噬菌粒（phagemid或phasmid）。

- ✓ 分子量一般都比M13载体的小，约为3kb，易于体外操作。
- ✓ 可得到长达10kb的外源DNA的单链序列。
- ✓ 在大肠杆菌寄主细胞内，可以按正常的双链质粒DNA分子形式复制，形成的双链DNA既稳定又高产。
- ✓ 而当存在着辅助噬菌体的情况时，噬菌粒按滚环模型复制产生单链的DNA，并在包装成噬菌体颗粒之后释放出细菌。

## 2. pUC118和 pUC119噬菌粒载体

(a)pUC118/pUC119噬菌粒载体



pUC118和 pUC119是一对分别由pUC18和pUC19质粒与野生型M13噬菌体的基因间隔区（IG）重组而成的噬菌粒载体。除了多克隆位点区的序列取向彼此相反而外，两者的分子结构完全一样。分别用于克隆同一基因的正义链和反义链。

### 3. pUC118/ pUC119噬菌粒载体的复制模式

**质粒复制模式：**在寄主细胞没有感染上辅助噬菌体M13的情况下，pUC118和 pUC119噬菌粒载体的复制就如同双链质粒载体DNA一样，是受起源于ColE1质粒的LK复制起点控制的。按这种复制模式产生的双链载体DNA分子仍然保留在寄主细胞内。

**噬菌体复制模式：**当寄主细胞被辅助噬菌体M13感染之后，pUC118和pUC119载体便转向按照M13噬菌体的滚环模型进行复制。它是受存在于这两个PUC载体上的M13噬菌体复制起点控制的。所产生的单链载体DNA分子可以被包装进由辅助噬菌体提供的外壳蛋白质中，形成的噬菌体颗粒随后被挤压出寄主细胞，分布在周围的培养基中。

### 3. pUC118和 pUC119噬菌粒载体的优点

1. 可克隆高达10kb的外源DNA片段，并易于进行体外分离与操作；
2. 编码有一个amp<sup>r</sup>基因作为选择记号，便于转化子的选择；
3. 拷贝数每个寄主细胞可高达500个，可制备出大量的载体DNA；
4. 存在多克隆位点
5. 可按照Xgal-IPTG组织化学显色反应试验，筛选重组体分子；
6. 外源基因会以 $\beta$ 半乳糖苷酶与外源蛋白质的融合产物表达；
7. 含有质粒的复制起点和M13噬菌体的复制起点，具两种复制模式；
8. 在两个载体中，多克隆位点彼此相反，一个可转录克隆基因的正链DNA，另一个则可转录负链DNA。
9. 可以直接对克隆的DNA片段进行核着酸序列测定。

# 第6节 病毒载体及病毒包装

## Virus vector & packaging

### 1.病毒载体概述

要求：1、携带外源基因并能包装成感染性病毒颗粒

2、介导外源基因转移和表达

3、对机体不致病

容量：自身基因组大小的105%~110%

组成：1、病毒复制和包装元件

2、病毒基因

3、插入的外源基因或元件

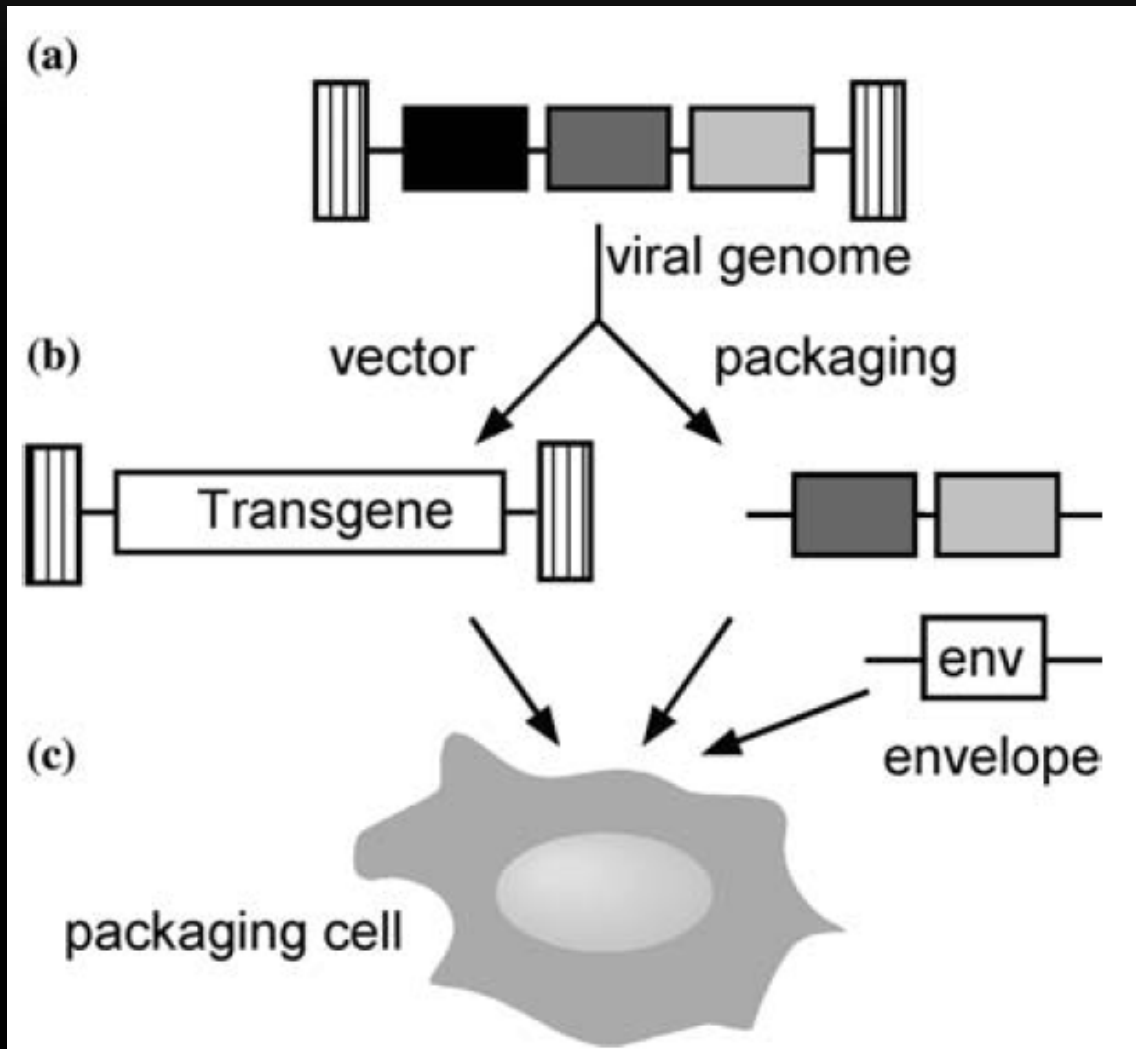
4、病毒外壳/外膜

## 2. 常用的病毒载体的特点:

病毒载体	生物学特性	适用范围
逆转录病毒载体 Retrovirus 单链RNA病毒 8~10kb	可感染分裂细胞; 整合到染色体中; 表达时间较长; 有致癌的危险;	Ex vivo基因治疗; 肿瘤基因治疗。
腺病毒载体 Adenovirus 双链DNA病毒 36kb	可感染分裂和非分裂细胞; 不整合到染色体中; 外源基因表达水平高; 表达时间较短; 免疫原性强;	In vivo基因治疗; 肿瘤基因治疗; 疫苗。
AAV病毒载体 Adeno-associated virus 单链DNA病毒 ~5kb	可感染分裂和非分裂细胞; 整合到染色体中; 无致病性; 免疫原性弱; 可长期表达外源基因; 在骨骼肌、心肌、肝脏、视网膜等组织中表达较高;	In vivo 基因治疗; Ex vivo基因治疗; 遗传病基因治疗; 获得性慢性疾病的基因治疗。
HSV病毒载体 Herpesvirus 双链DNA病毒 152kb	具有嗜神经性; 可逆轴突传递; 可潜伏感染; 容量大; 可感染分裂和非分裂细胞;	神经系统疾病的基因治疗; 肿瘤的基因治疗。



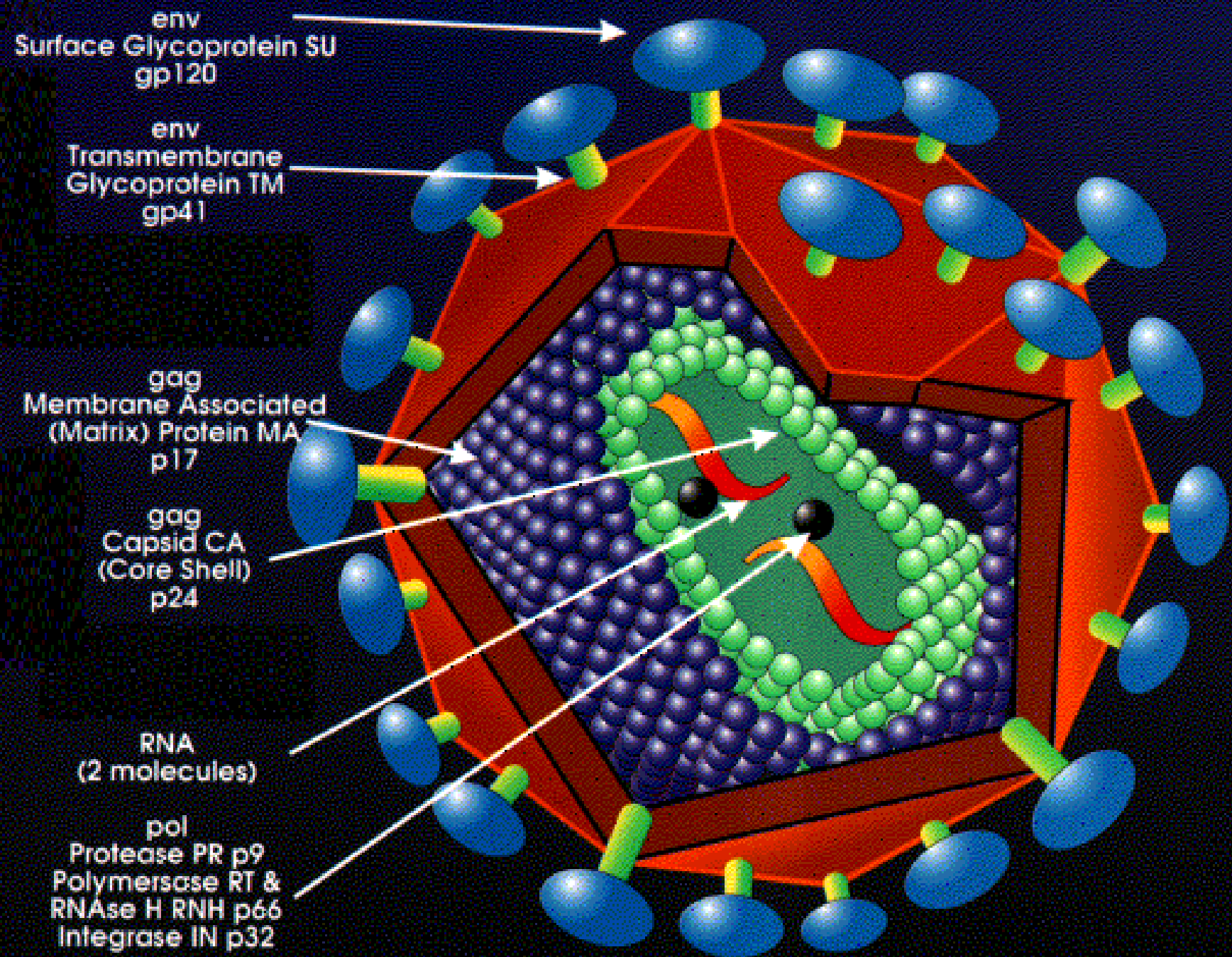
### 3. 病毒载体构建的基本原理



## 4. 逆转录病毒（慢病毒）载体

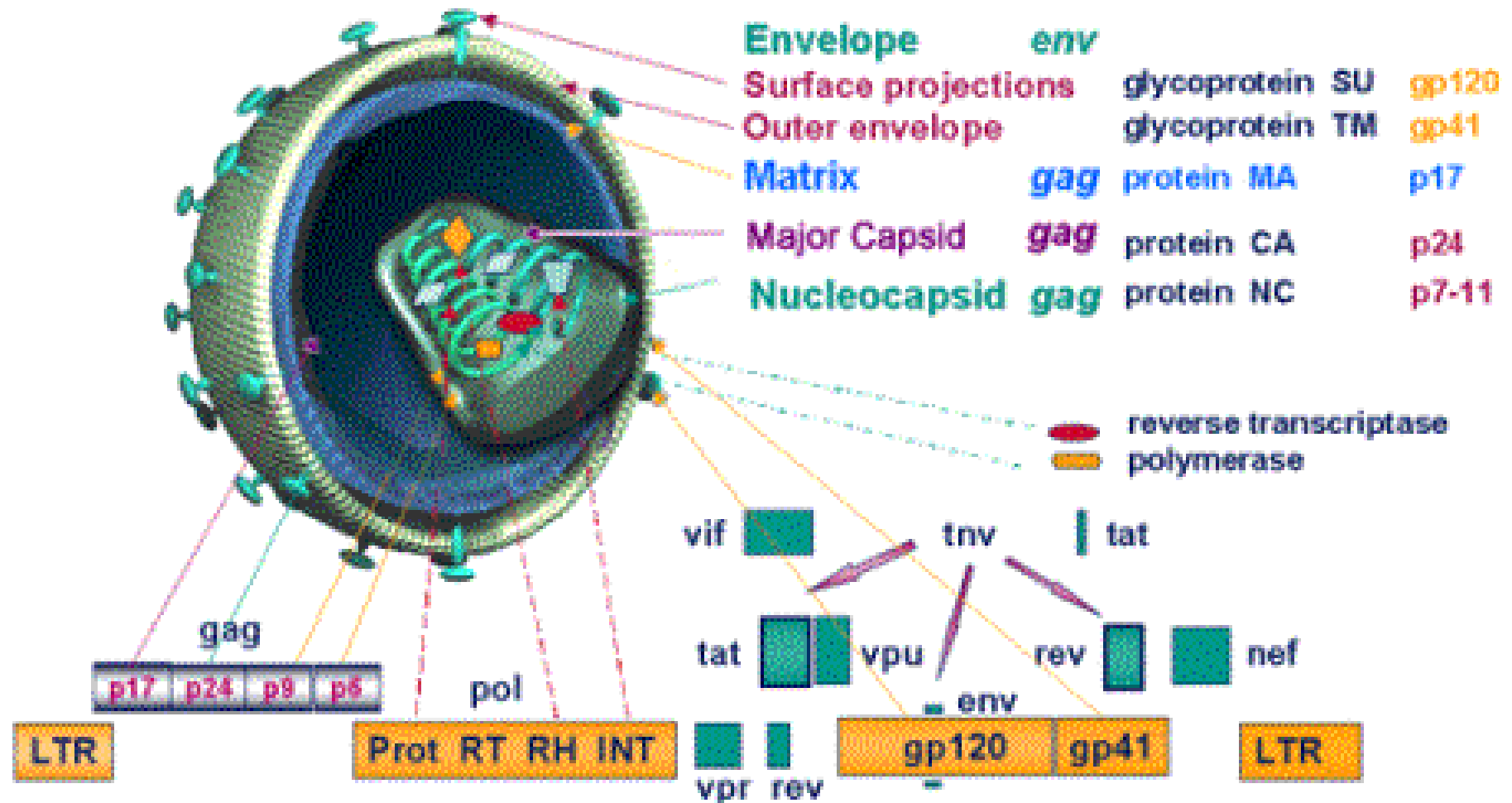
慢病毒属于逆转录病毒家族，属于膜包被病毒，具有正链RNA基因组，其上在两个长末端重复序列（LTR，携带了病毒及基因表达的顺式作用元件）之间排列了逆转录病毒所共有的gag、env、pol三个重要基因，分别编码病毒内部结构蛋白，赋予病毒感染能力的外膜糖蛋白，病毒自我复制和整合所需逆转录酶。除此之外，其基因组中还有vpr、vif、tat、rev、nef、vpu等六个调节基因。在进入宿主细胞后，病毒的基因组RNA被反转录成为双链DNA，后者借助其整合信号在整合酶的作用下整合至宿主染色体中，以原病毒（provirus）的形式得以稳定存在，并作为复制子代病毒基因组的模版，同时借助宿主细胞的分裂进入子代细胞。这种整合机制是该类病毒能够持续感染宿主细胞，以及通过感染生殖细胞而将整合的原病毒基因组传递给子代个体而获得直向遗传的重要基础。

# Structure of HIV

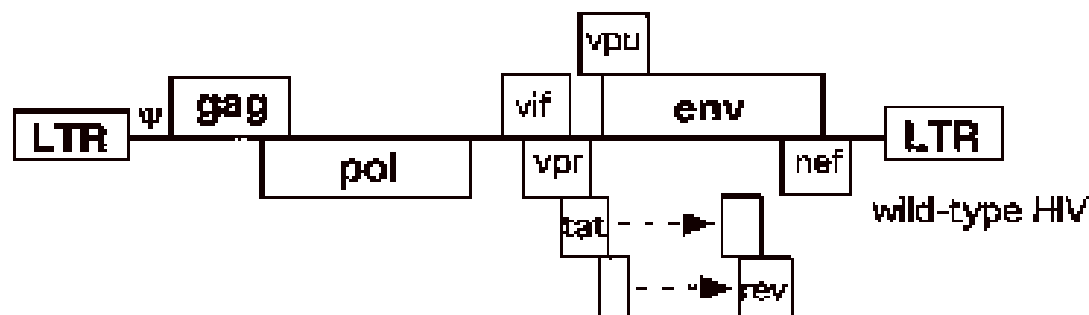


# Genome map of Lentivirus

Linkage - protein, structure + function

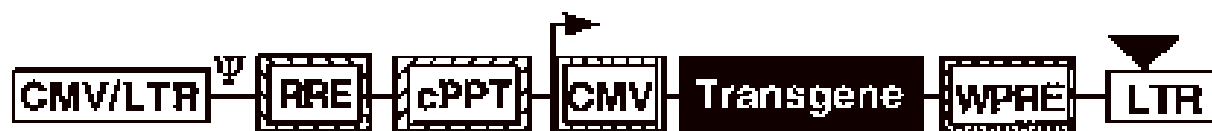


A



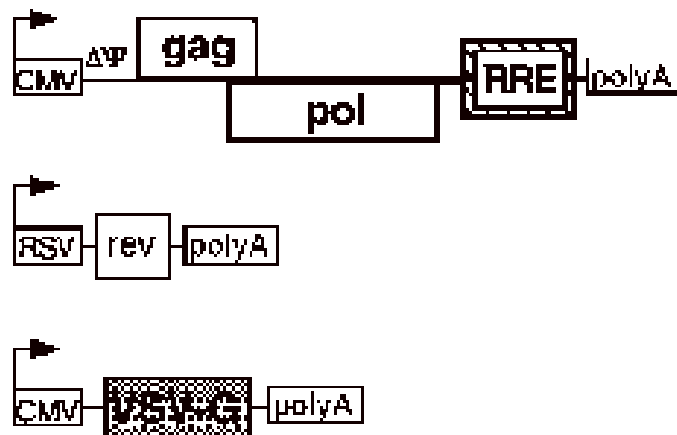
B

### Lentivirus Vector



C

### Packaging Constructs



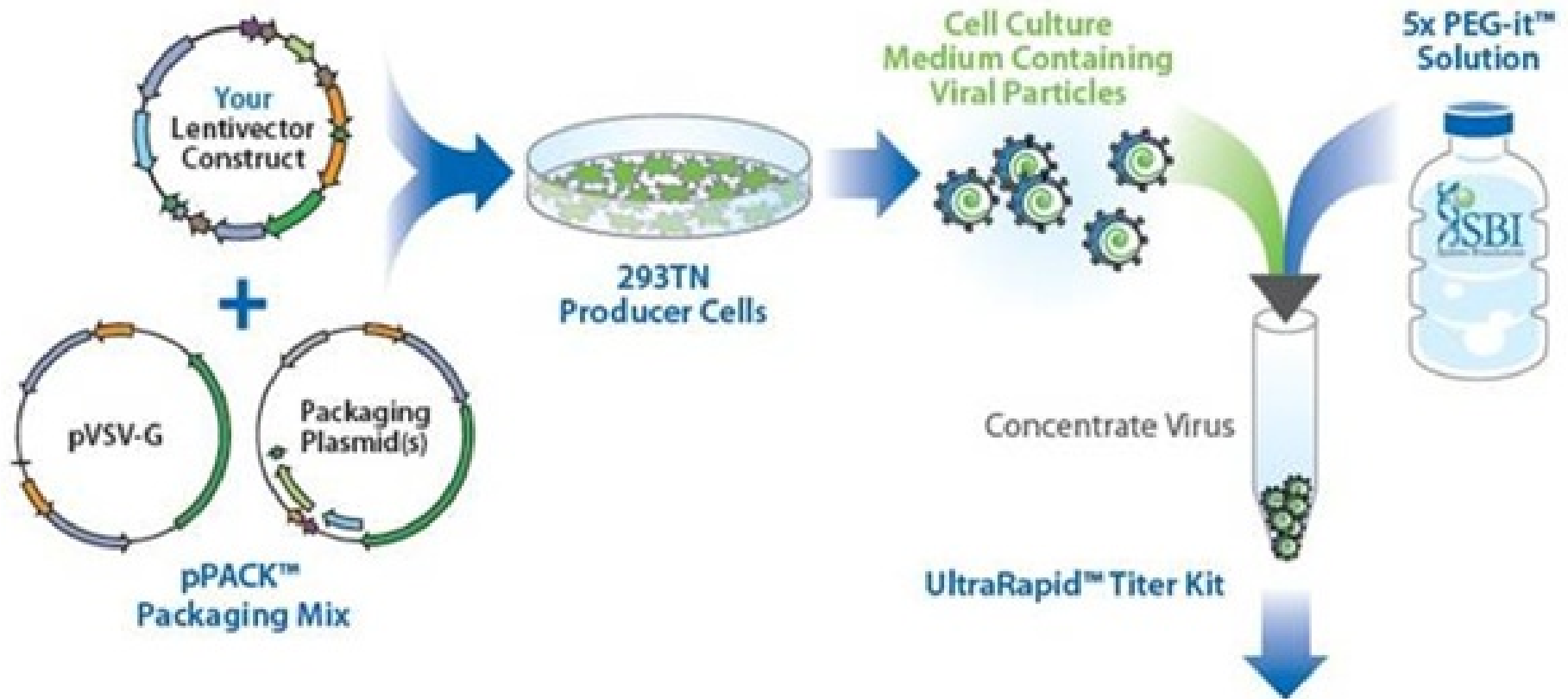
## Lentiviral vectors

**VSV-G**与“假型病毒（pseudotyping）”的概念。

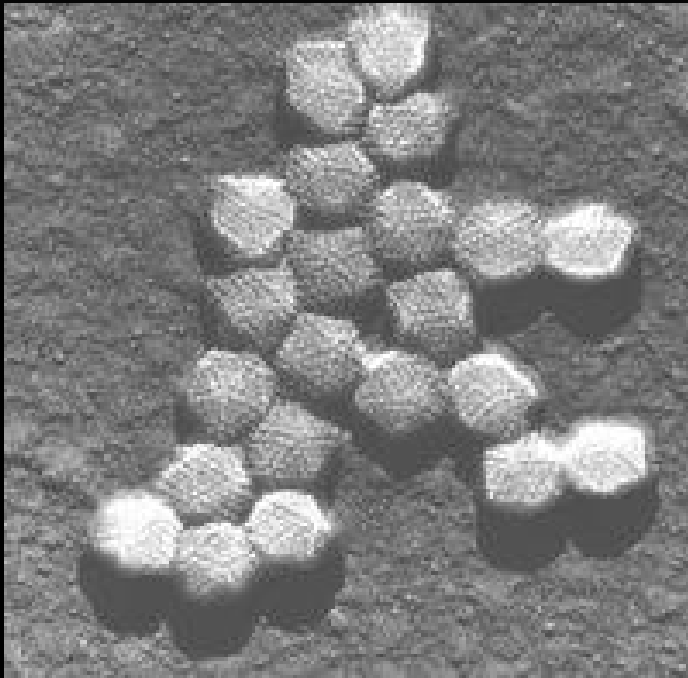
现在大多数慢病毒载体的外膜蛋白已被口炎水泡病毒的G蛋白

（G protein of vesiculostomatitis virus, **VSV-G**）所替代，其最大的优点在于**VSV-G**作用的靶细胞种类广泛，同时**VSV-G**还具有稳定重组慢病毒颗粒的作用，使得释放的病毒颗粒能够通过超速离心进行富集。

## Packaging of lentivirus

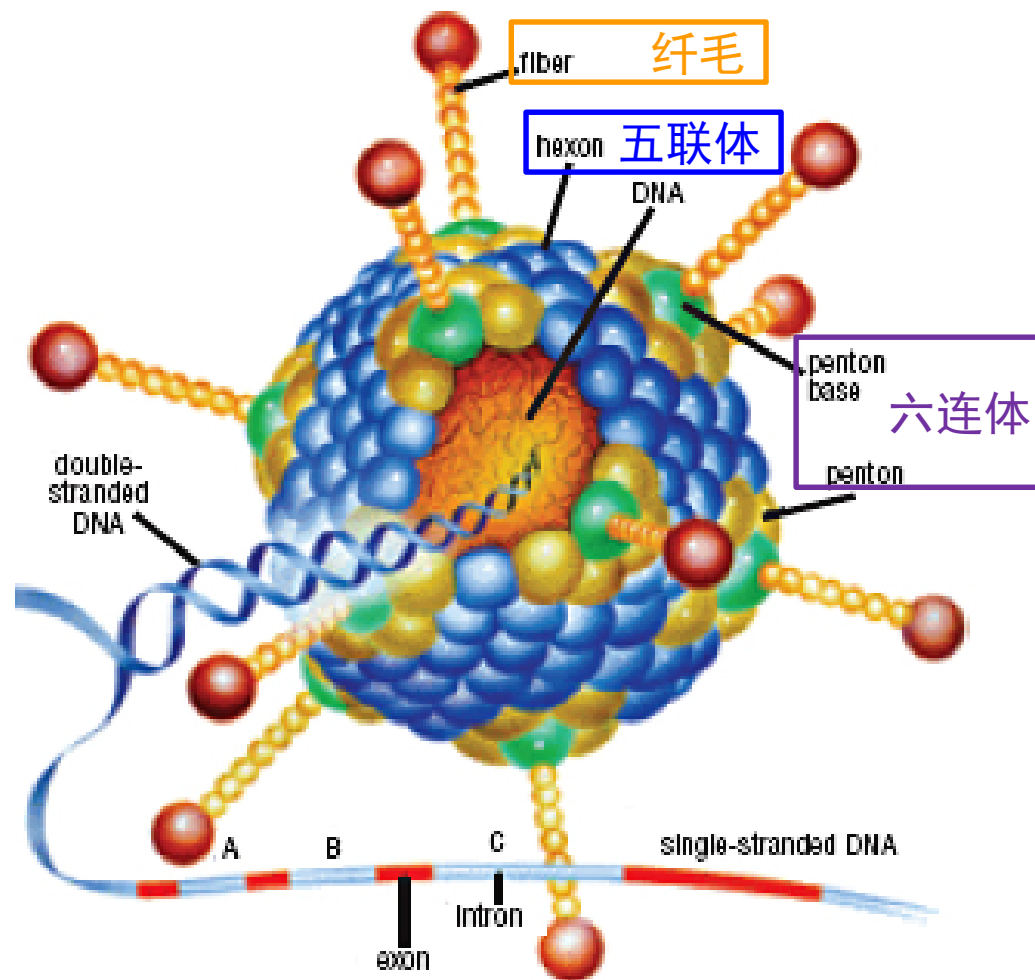


## 5. 腺病毒载体



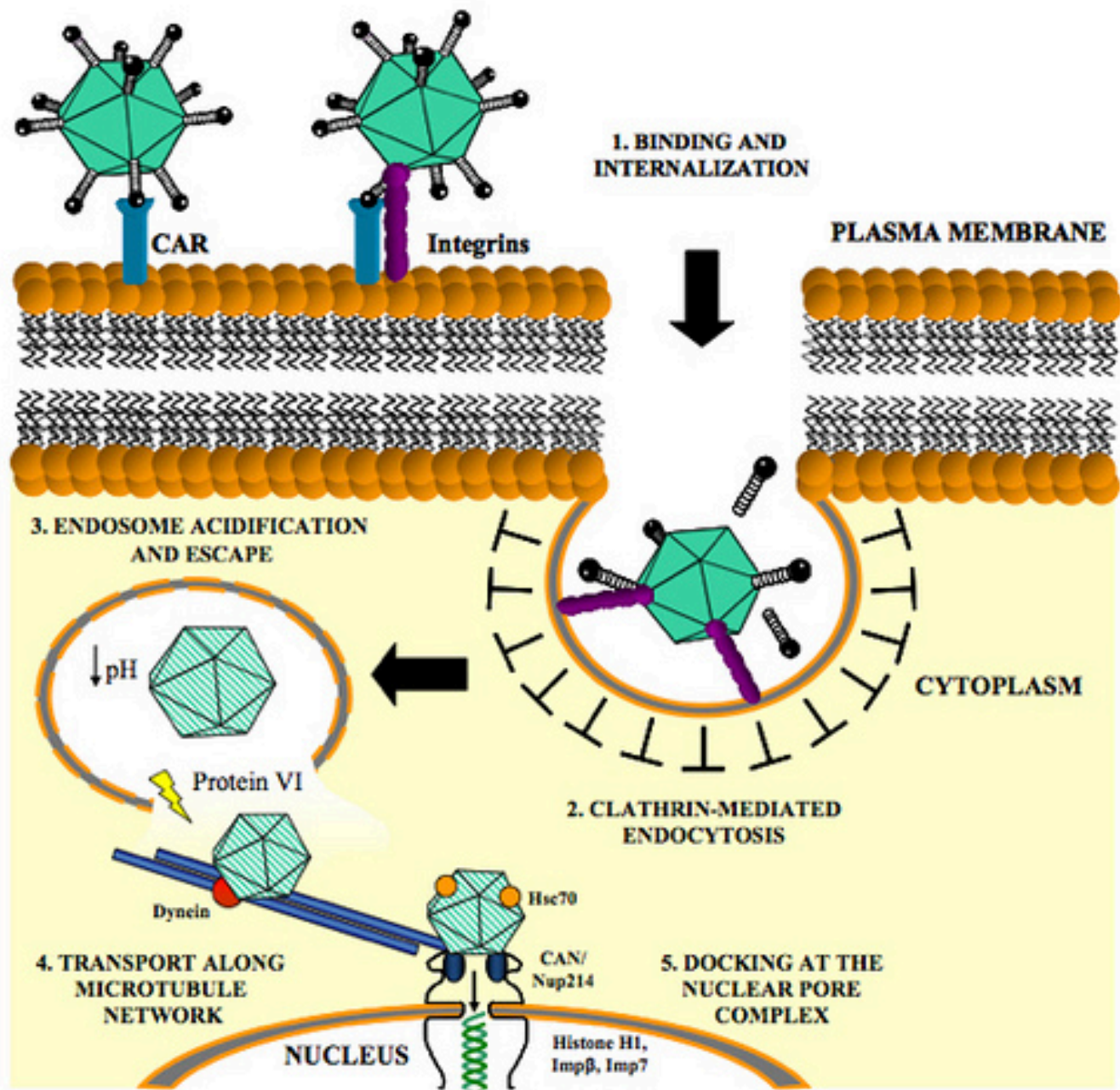
腺病毒(adenovirus)是一种没有包膜的直径为70~90 nm的颗粒，由252个壳粒呈廿面体排列构成。每个壳粒的直径为7~9 nm。衣壳里是线状双链DNA分子，两端各有长约100 bp的反向重复序列。可以出现双链DNA的环状结构。





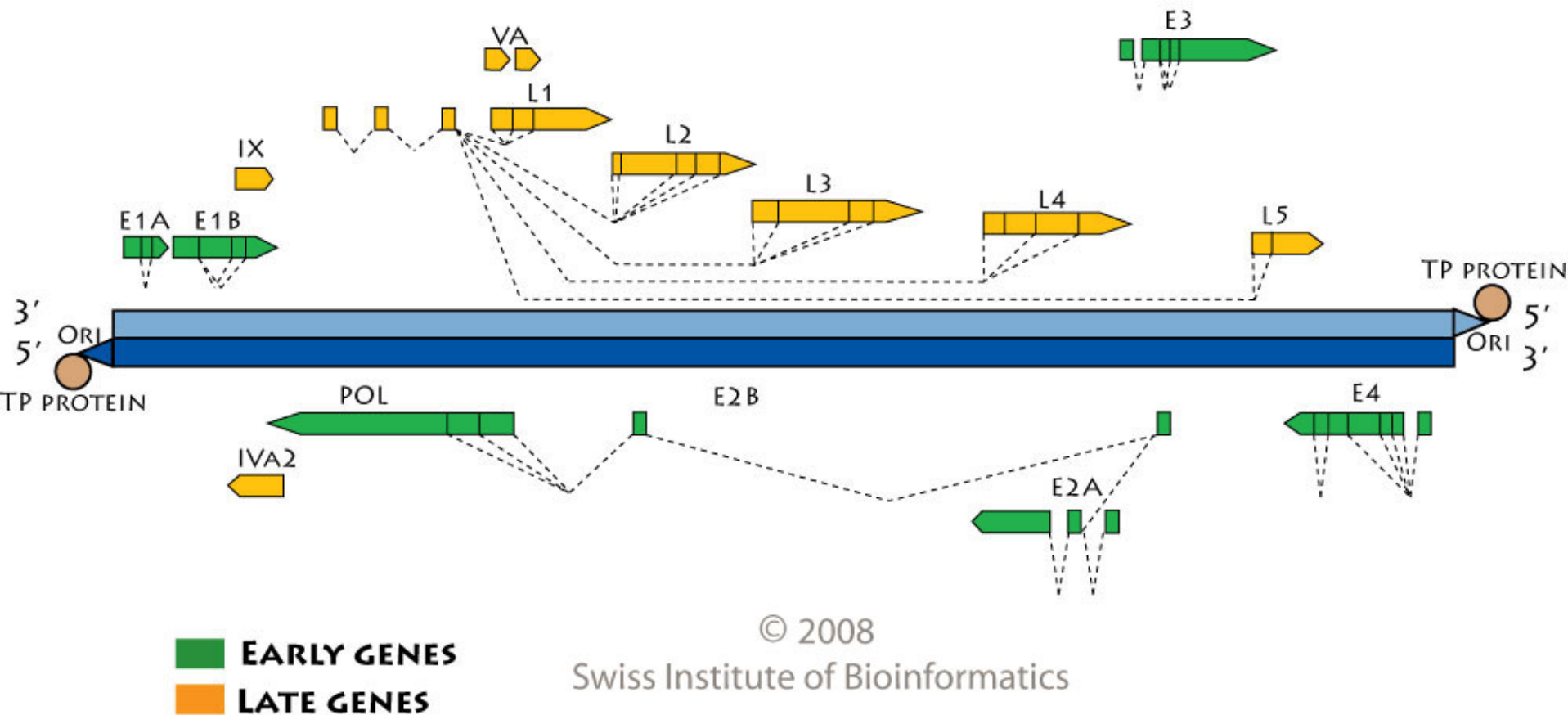
## Basic structure of the adenovirus virion—fiber, penton and hexon.

Fiber and penton base proteins are important in receptor binding and cell internalization, whereas hexon comprises the majority of the viral capsid.

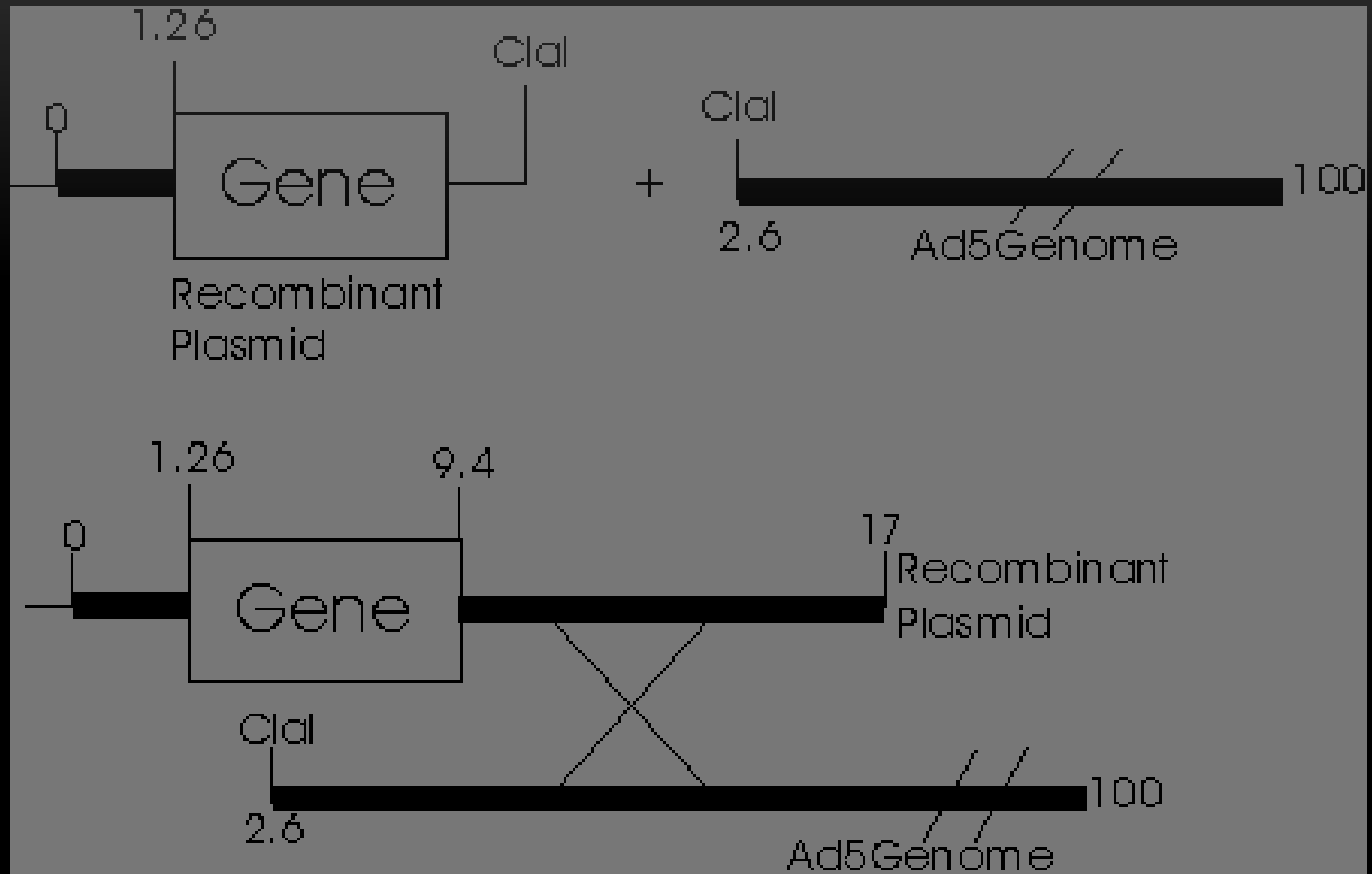


Cell-entry pathway of the adenovirus

# HUMAN ADENOVIRUS TYPE 5 GENOME



**Representative map of the genome of adenovirus**



## Adenoviral vector production

## Outline of Recombinant Adenovirus Systems

Standard Homologous Recombination	pAdEasy Expression System	RAPAd® Expression System
<p>Cotransfect 293 cells with Shuttle Vector and Ad Backbone Vector</p> <p>↓</p> <p>Multiple Plaque Isolations</p> <p>↓</p> <p>Virus Amplification</p> <p>↓</p> <p>Viral Stock</p>	<p>Linearize Shuttle Vector using PmeI</p> <p>↓</p> <p>Cotransform <i>E.coli</i> BJ5183 cells with linearized Shuttle Vector and pAdEasy Vector</p> <p>↓</p> <p>Recombinant selection by restriction enzyme analysis</p> <p>↓</p> <p>Linearize recombinant plasmid using PacI</p> <p>↓</p> <p>Transfect 293 cells</p> <p>↓</p> <p>Viral Stock</p>	<p>Linearize Shuttle Vector and RAPAd® Ad Backbone Vector using PacI</p> <p>↓</p> <p>Cotransfect 293 cells</p> <p>↓</p> <p>Viral Stock</p>
12-18 weeks	8-9 weeks	2-3 weeks

## Why 293 cell line as packaging cell

This is a human kidney cell line which has been stably transfected with the E1A region of the adenoviral genome. This allows the vector to be made and matured within the 293 cell, yet vectors prepared from this cell line will lack the E1A region and remain replication-deficient.

**END**