

第4章 基因克隆的质粒载体

Plasmids

质粒的一般生物学特性	1	Characteristics of plasmids
质粒拷贝数的控制	2	Copy number control
质粒DNA的分离与纯化	3	Purification
质粒载体的构建及类型	4	Construction and classification
重要的大肠杆菌质粒载体	5	Normal plasmids
质粒载体的稳定性问题	6	Stability of plasmids

第1节 质粒的一般生物学特性

Characteristics of plasmids

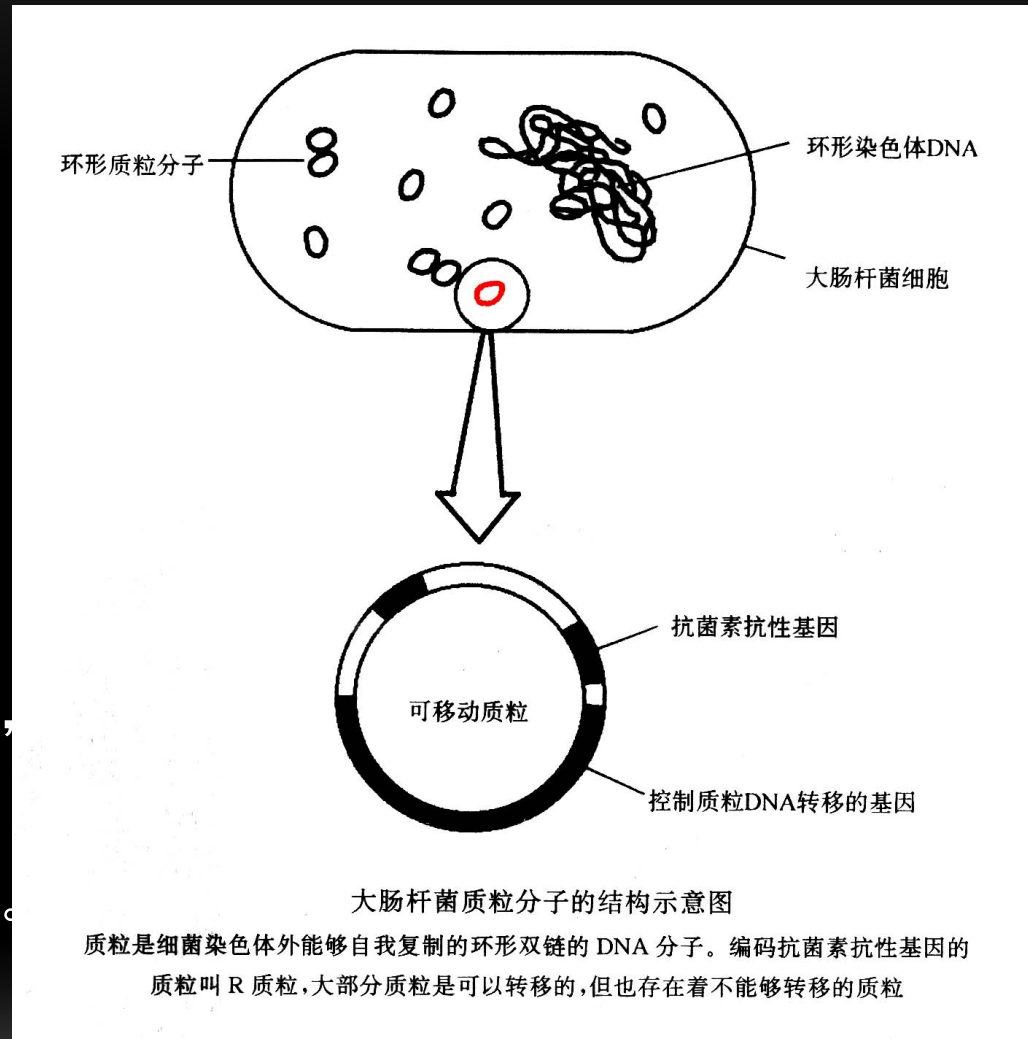
细菌质粒是存在于细胞质中的一类独立于染色体的自主复制的遗传成份。绝大多数的质粒都是由环形双DNA组成的复制子，**有一个例外之一是酵母的杀伤质粒成分是RNA质粒。**

质粒DNA分子可以持续稳定地处于染色体外的游离状，但在一定的条件下又可逆地整合到寄主染色体上，随着染色体的复制而复制，并通过细胞分裂传递到后代。

1. Plasmids DNA

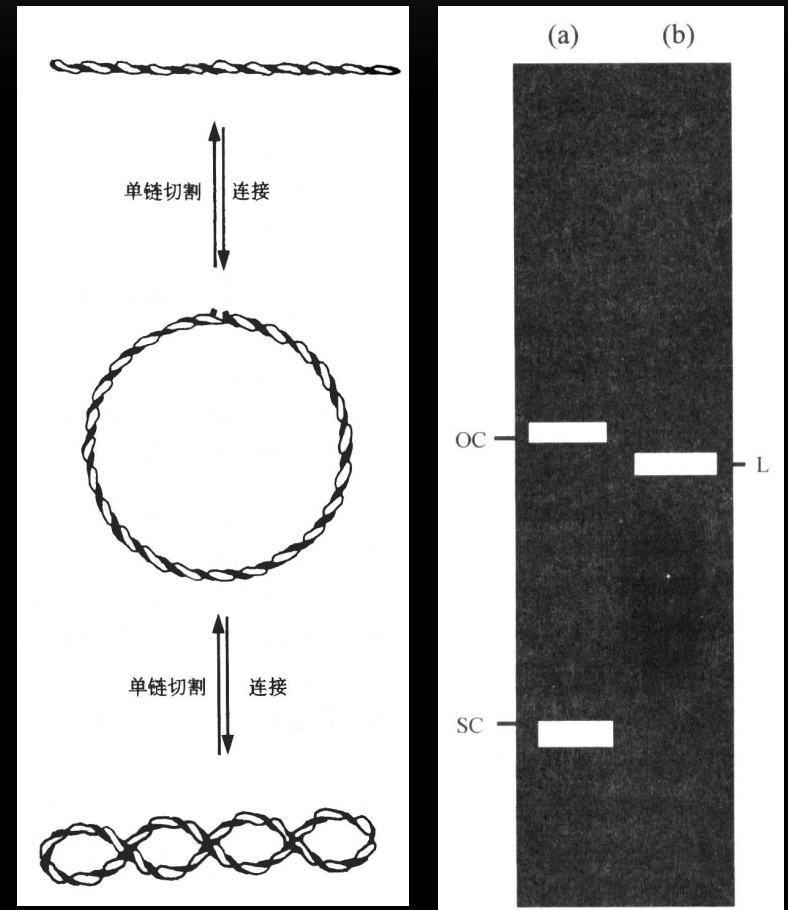
基本特征：

- 独立于宿主染色体
- 自主复制的遗传成份。
- 环形双DNA
- 可以持续稳定地处于外的游离状，但在一定的条件下又可逆地整合到寄主染色体上，随着染色体的复制而复制，并通过细胞分裂传递到后代。



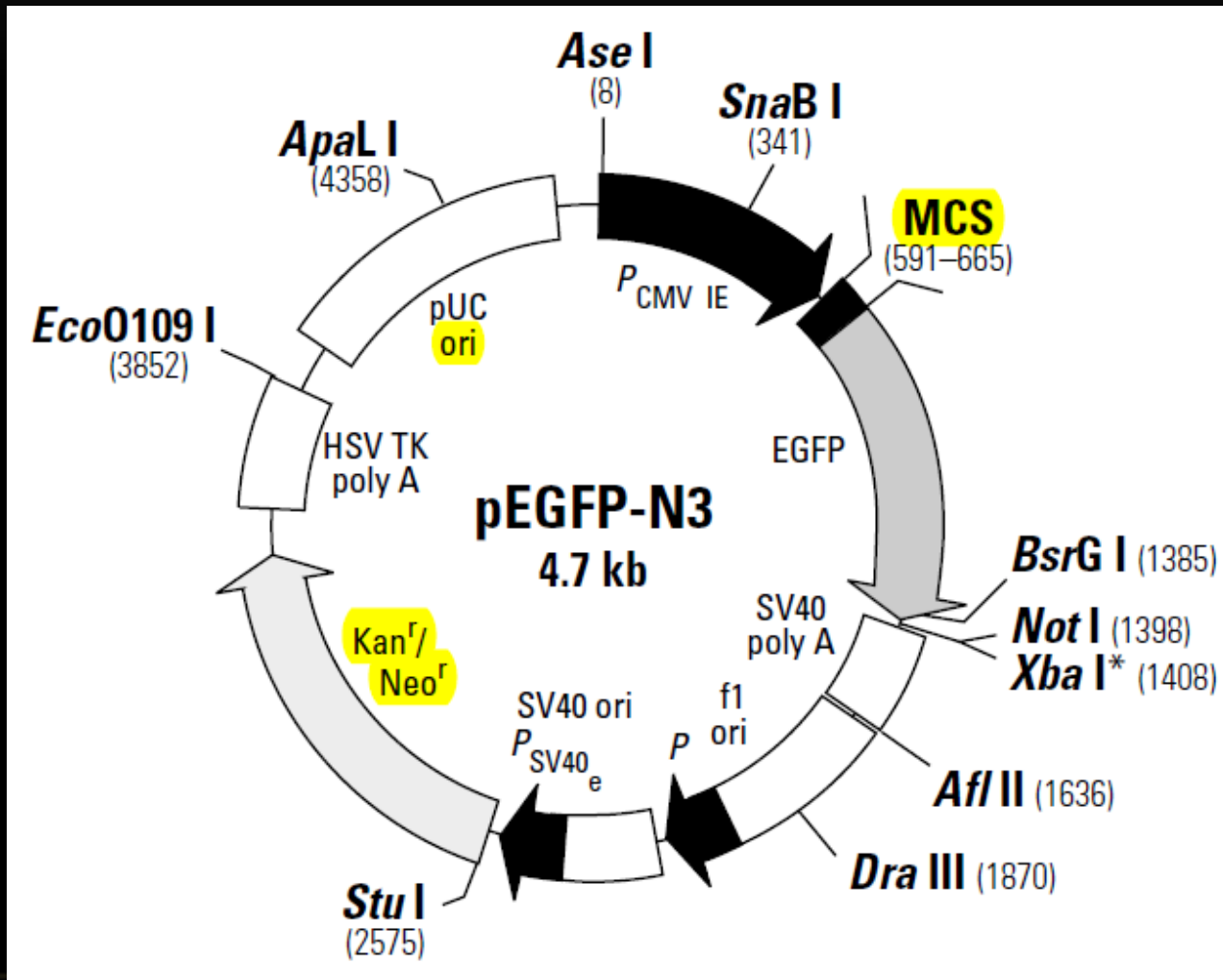
构型:

1. **共价闭合环形DNA (covalent closed circular DNA, cccDNA)**: 两条多核苷酸链均保持着完整的环形结构, 通常呈现超螺旋构型;
2. **开环DNA (open circular DNA, ocDNA)**: 两条多核苷酸链中一条保持着完整的环形结构, 另一条链出现有一至数个缺口, 呈现开环构型;
3. **线性分子 (linear DNA, lDNA)**: 若质粒DNA经过适当的核酸内切限制酶切割之后, 发生双链断裂形成线性, 通称线性构型。



质粒的三个基本原件：

经改建而适于作为基因克隆载体的所有质粒DNA分子，都至少包括三种原件，即复制基因（replicator）、选择性记和克隆位点。



2. 质粒DNA的复制类型

质粒拷贝数：在标准的培养基条件下，每个细菌中所含有的质粒DNA分子的数目。根据寄主细胞所含的拷贝数的多少，可将质粒分成：

- { “严紧型” (stringent plasmid): 1~3份的拷贝
“松弛型” (relaxed plasmid): 10~60份拷贝

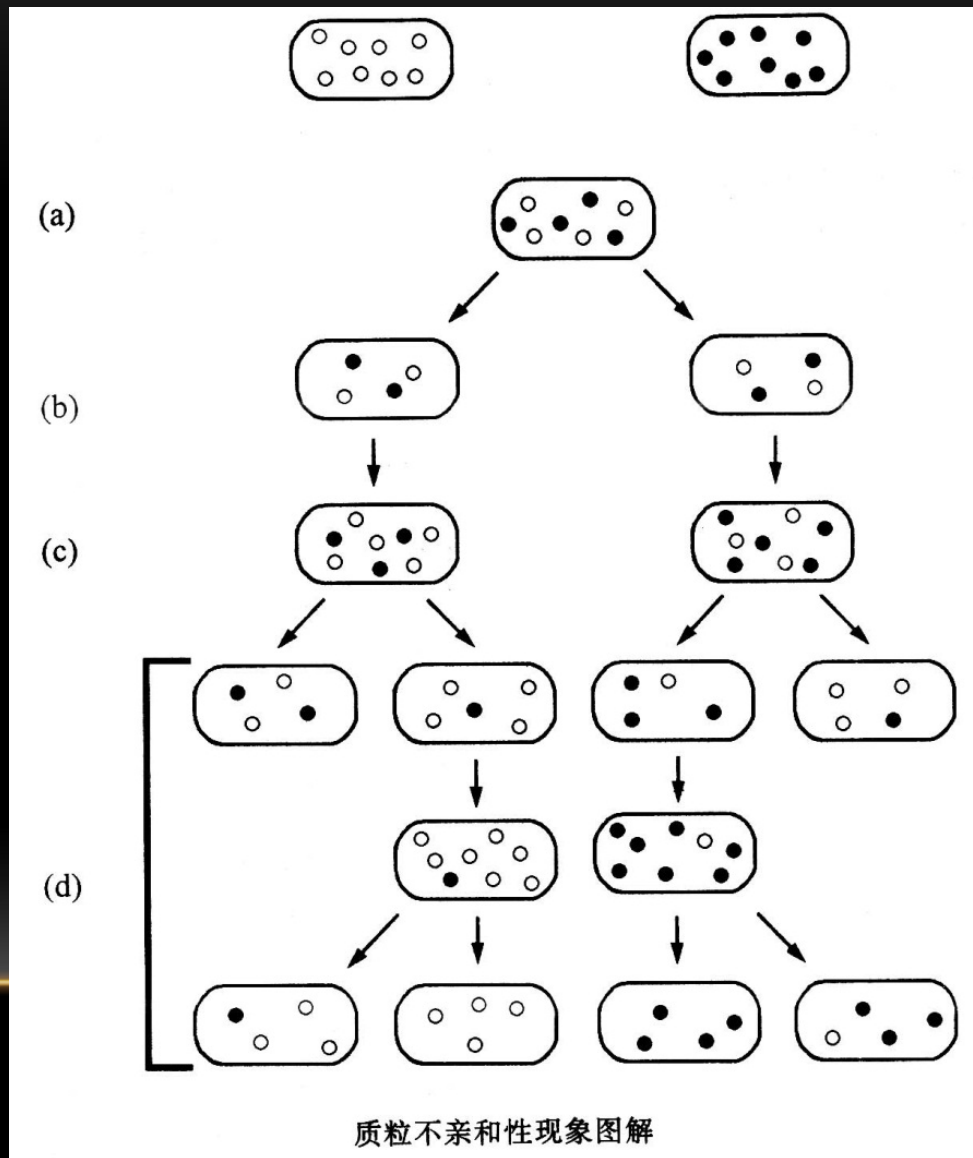
若干种通用的质粒复制基因的特性

复制基因	原型质粒	原型质粒大小(bp)	原型质粒的选择表型	拷贝数
pMB1	pBR322	4 363	Amp ^r 、Ter ^r	高>25
ColE1	pMK16	~4 500	Kan ^r 、Tet ^r 、ColE1 ^{imm}	高>15
p15A	pACYC184	~4 000	Cml ^r 、Tet ^r	高~15
pSC101	pLG338	~7 300	Kan ^r 、Tet ^r	低~6
F	pDF41	~12 800	Trp ⁺	低 1~2
R6K	pRK353	~11 100	Trp ⁺	低<15
R1(R1drd-17)	pBEU50	~10 000	Amp ^r 、Tet ^r	30℃,低拷贝;35℃以上,高拷贝,(1)
RK2	pRK2 501	~11 100	Kan ^r 、Tet ^r	低,2~4
λdv	λdvgal	(2)	Gal ⁺	—

3. 质粒的不亲和性

质粒的不亲和性/不相容性
(plasmid incompatibility)

是指在没有选择压力的情况下，两种亲缘关系密切的质粒，不能够在同一个寄主细胞中稳定地共存。在细胞的增殖过程中，其中必有一种会被逐渐地排斥掉。



第2节 质粒拷贝数的控制

Copy number control

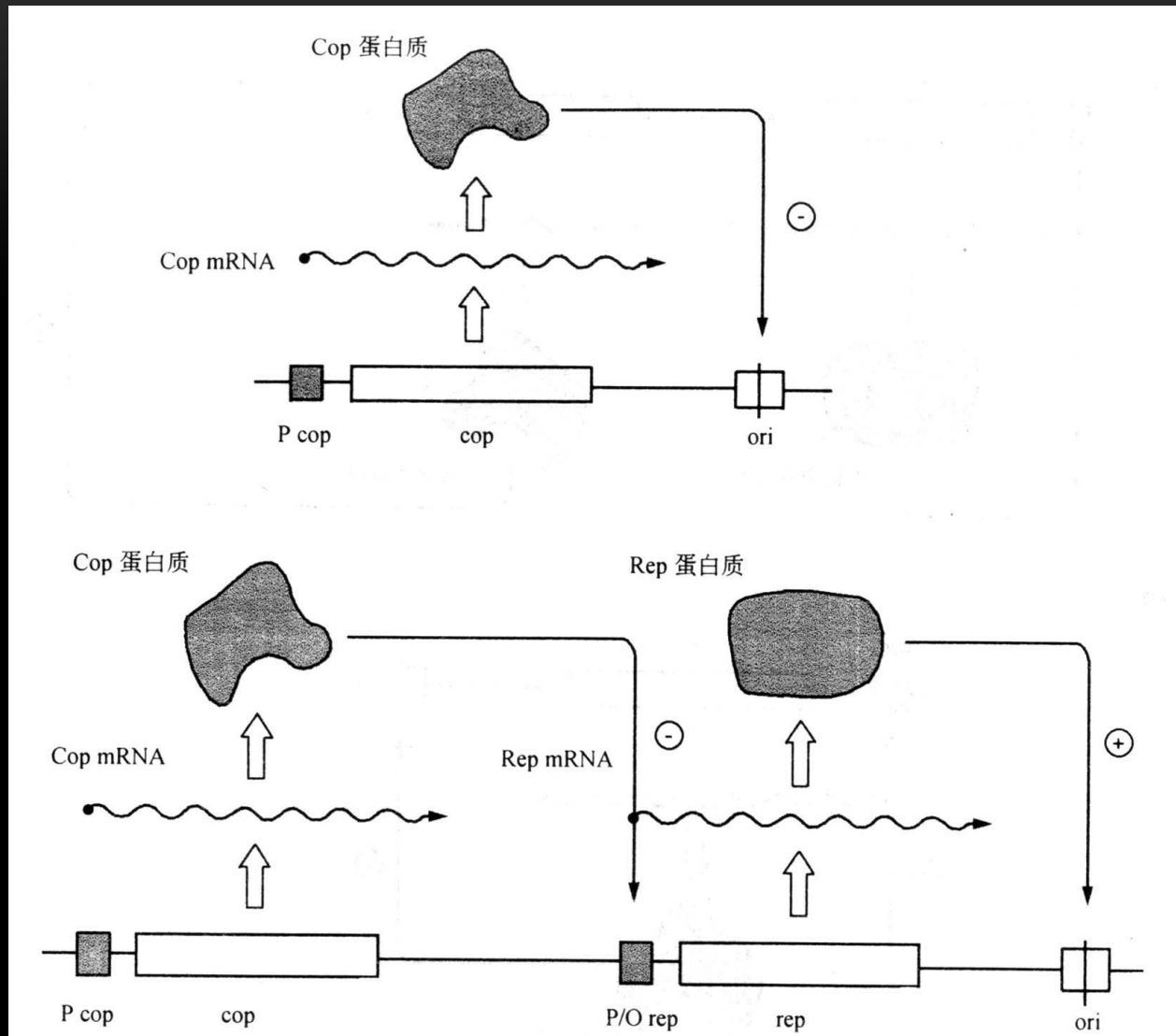
1. 质粒DNA拷贝数的控制：

- ✓ 高拷贝质粒倾向于在松弛控制下进行复制，其复制的启动是由自身编码的蛋白来控制；
- ✓ 低拷贝质粒通常是在严禁控制下进行复制，受到宿主细胞的蛋白（复制起始蛋白）控制，且与宿主细胞染色体同步进行。

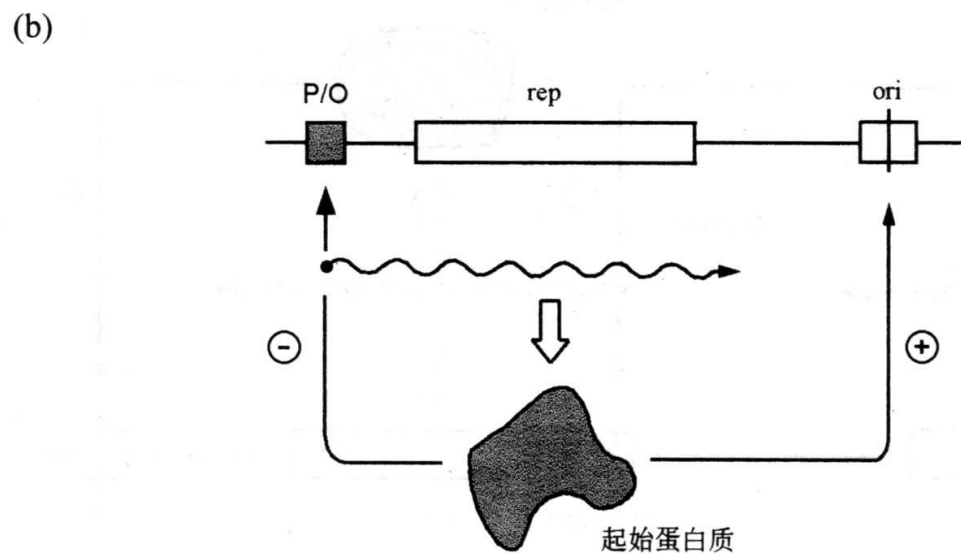
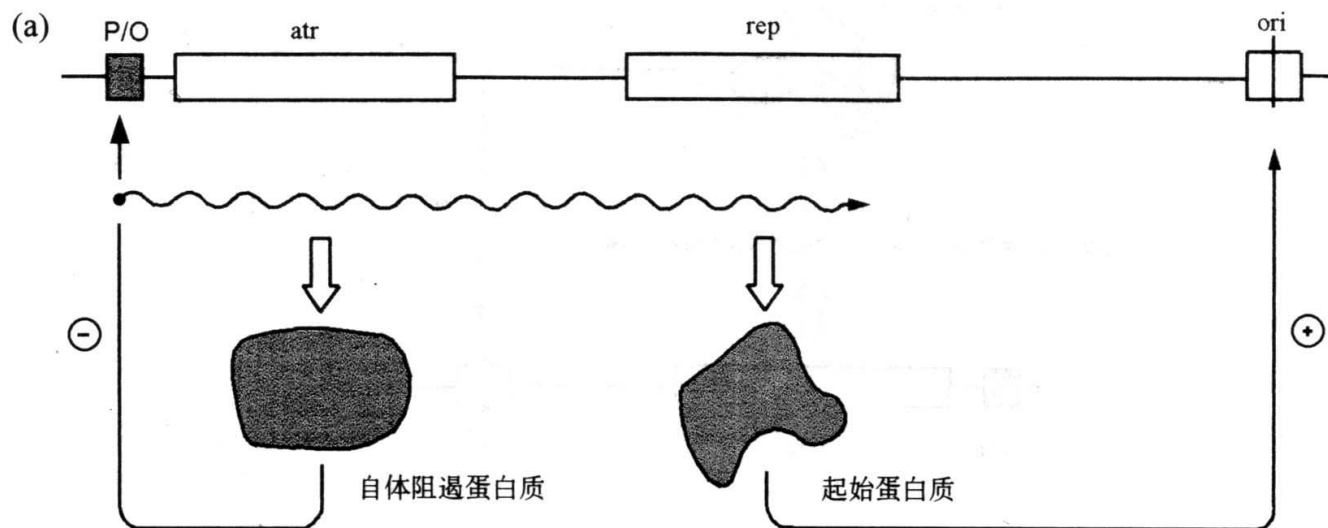
第2节 质粒DNA的复制与拷贝数的控制

2. 质粒复制控制的分子模型

- { 抑制蛋白质稀释模型 (inhibitor dilution model)
- { 自体阻遏蛋白质模型 (autorepressor model)



抑制蛋白质稀释模型



自体阻遏蛋白质模型

第3节 质粒DNA的分离与纯化

Isolation & Purification

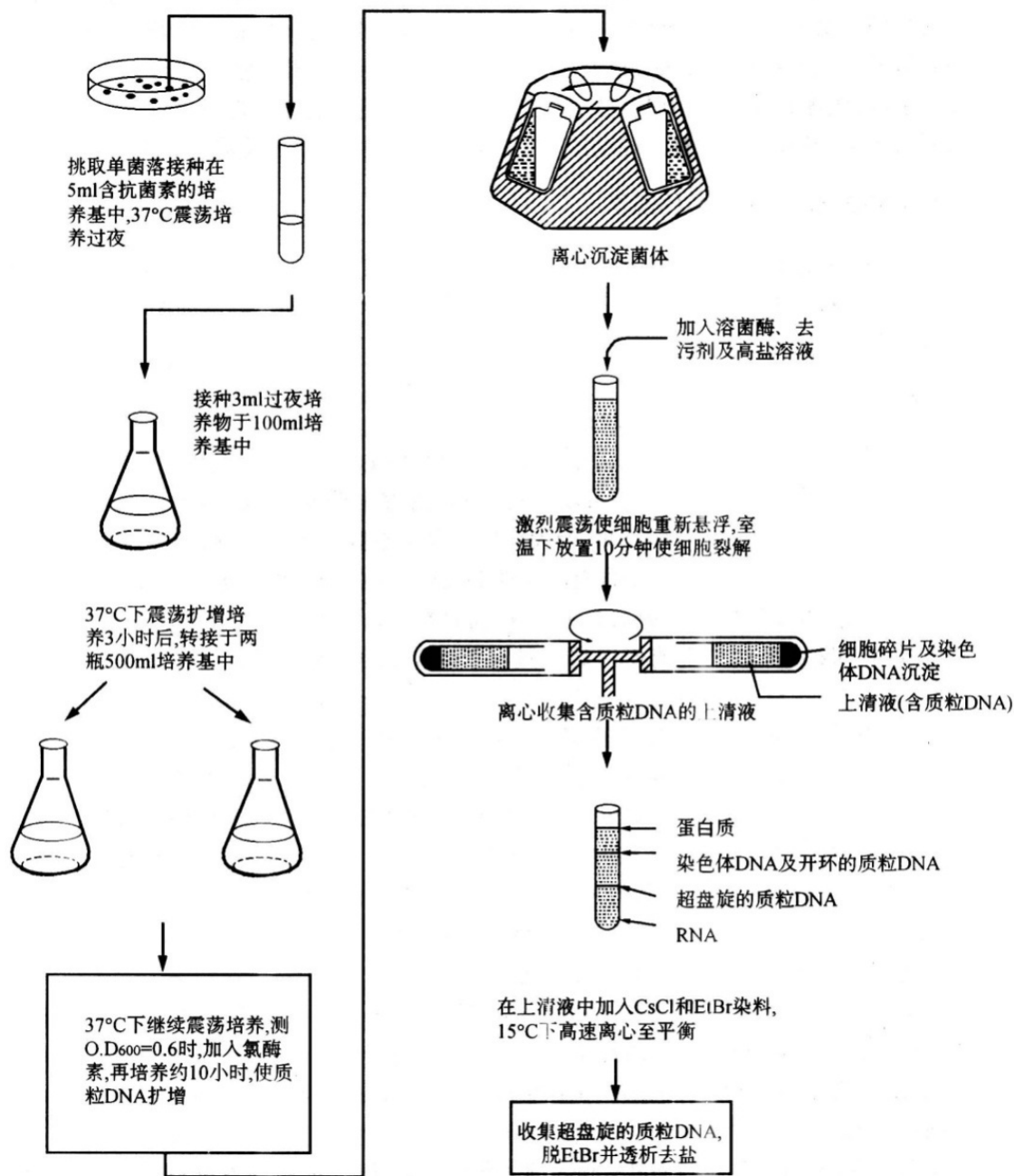
应用质粒作为基因克隆的载体分子，一个重要的条件是要获得批量的纯化的质粒DNA分子。我们通常是加入溶菌酶或十二烷基硫酸钠（SDS）来促使大肠杆菌细胞裂解的，绝大部分的染色体DNA分子都将以高分子量的形式释放出来，这样便可以应用高速离心的方法使之与细胞碎片一起被沉淀除去，得到了比较清亮的裂解液。

目前已发展出了许多种方法，可用来从清亮裂解液中纯化质粒DNA。

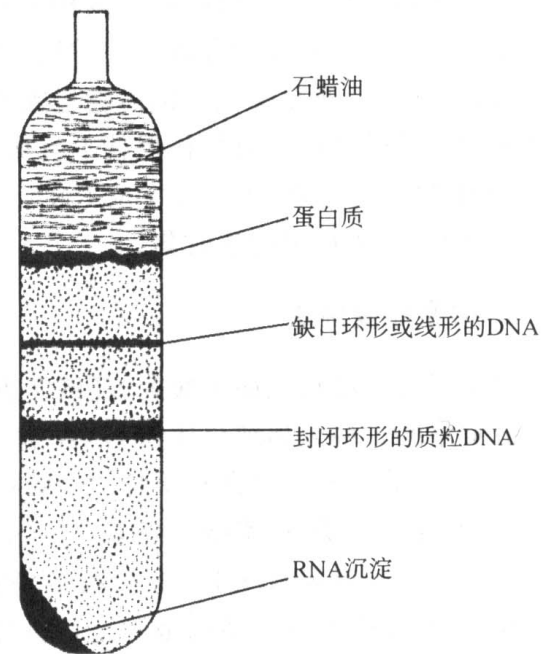
1. 氯化铯密度梯度离心法

在细胞裂解及DNA分离的过程中，大分子量的细菌染色体DNA容易发生断裂形成相应的线性片段，而质粒DNA则由于其分子量较小、结构紧密，因此仍能保持完整的状态。

氯化铯-EtBr密度梯度离心法，就是根据这一差别建立的纯化质粒DNA的经典技术。线性的或开环的大肠杆菌染色体DNA片段，可结合相当大量的EtBr分子而密度降低。而像质粒这样的共价闭合环状的DNA分子，EtBr分子的结合数量相对较少而密度大。通过氯化铯密度梯度离心之后，根据它们的不同密度，就会平衡在不同的位置，从而达到纯化质粒DNA的目的。



分离纯化质粒 DNA 的程序



应用 CsCl-EtBr 密度梯度离心技术

纯化 pBR322 质粒 DNA 分子

照片是在紫外光下拍摄的, 染色体 DNA 带中, 同样也含有一定数量的线性的质粒 DNA 分子。质粒 DNA 带则是 cccDNA, 由于实验中使用了氯霉素扩增技术, 因此质粒 DNA 含量显著地增加

氯化铯密度梯度离心法

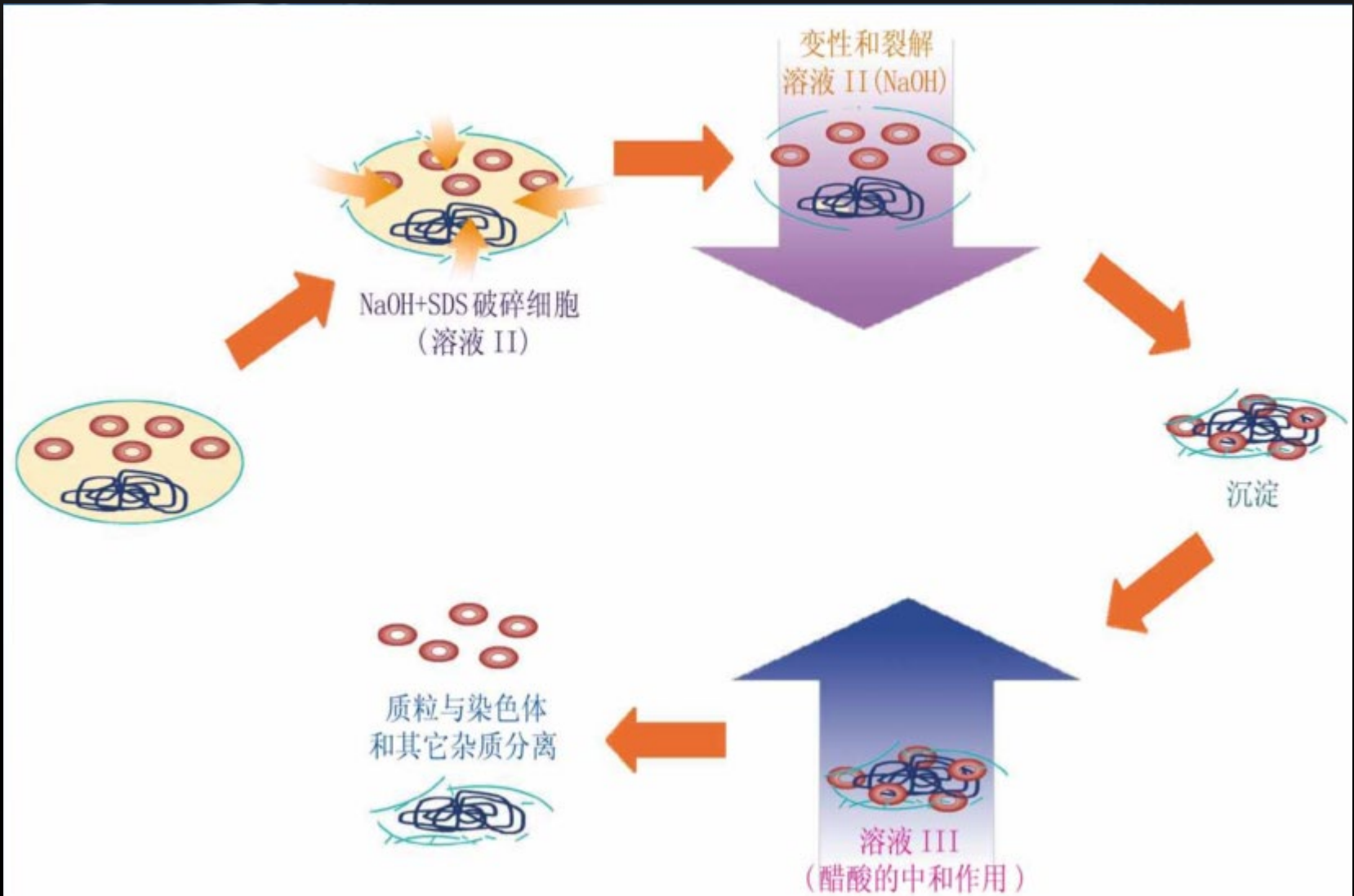
2. 碱变性法

这种方法是根据共价闭合环状质粒DNA与线性染色体DNA片段之间，在拓扑学上的差异而发展出来的。

在pH值介于12.0~12.5这个狭窄的范围内，连接DNA互补链之间的氢键会被断裂，但由于cccDNA的双螺旋主链骨架的彼此盘绕作用，互补的两条链仍然会紧密地结合在一起。通过致冷或恢复中性pH值更会迅速地复性，复性迅速而准确。

线性的染色体DNA分子，在此过程中彼此已经分离开来的互补链之间的复性作用就不会那么迅速而准确。它们聚集形成的网状结构，通过离心分离便会与变性的蛋白质及RNA一道沉淀下来。仍然滞留在上清液中的质粒cccDNA则可用酒精沉淀法收集。

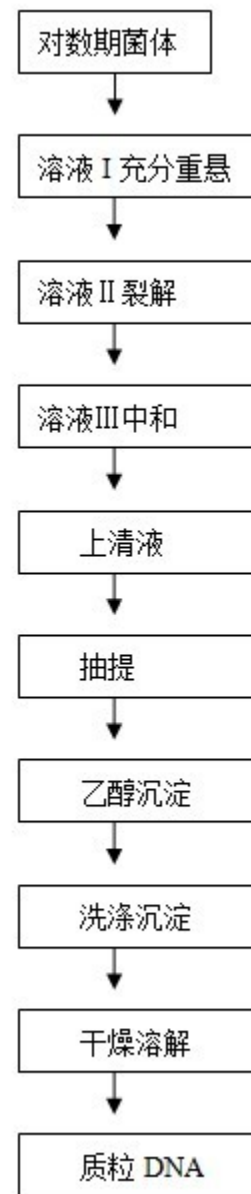
2. 碱变性法



3. 微量碱变性法

微量碱变性法具有简单快速、经济实惠的优点，因工程研究工作中最常用的一种分离纯化质粒程序及其原理简述如下：

第一步，取1.5毫升含有质粒的大肠杆菌过夜培养液中，离心收集细胞沉淀，并用100微升冰冷的溶菌液（10M Tris-HCl (pH8.0)，10Mm EDTA，4~5mg溶菌酶）在室温下静置5分钟，让溶菌酶充分发挥作用，使细胞变得脆弱而易于裂解。溶菌酶对反应液的pH值敏感，在TrisHCl缓冲体系和适量的葡萄糖而有利于pH8.0（EDTA），可抑制核酸酶的活性，从而保护质粒DNA。



第二步，加入200微升冰冷的溶液Ⅱ[0.2N NaOH, 1.0%SDS]，缓缓混匀后，置室温下5分钟。SDS的作用在于使细胞裂解，以释放质粒及染色体的DNA。在高pH值（12.0~12.5）的反应体系中，则会使线性缺口的质粒DNA以及线性的染色体DNA片段被选择性地变性，而共价闭合环状的质粒DNA则不会受影响。

第三步，加入150微升冰冷的pH4.8的3M醋酸钠，缓缓震荡10秒钟后，放置在冰浴中5分钟。PH4.8的醋酸钠溶液降低了反应混合物中的pH值，起到中和作用，从而使线性的质粒及染色体DNA复性，并聚集成不可溶的网络状聚合物。同时高浓度的醋酸钠亦会引起蛋白质-SDS复合物和高分子量的RNA分子发生沉淀。通过离心处理，便可把网络状的DNA聚合物同变性的蛋白质-DNA及RNA等以复合物形式沉淀出来，从而使质粒DNA得到纯化。

第四步，将上述离心所得的主要是含有质粒cccDNA上的清液，用苯酚抽提数次除去蛋白质污染物，最后按酒精沉淀法收集质粒DNA。

按照这种方法制备的质粒DNA，其纯度完全可以满足常规的基因克隆实验要求。如有必要亦可用凝胶过滤法作进一步的纯化。

4. 影响质粒DNA产量的因素

(1) 寄主菌株的遗传背景

一般建议使用endA基因发生突变的（endA1）大肠杆菌寄主菌株，例如DH5α、JM109以及XL1-Blue等。EndA基因突变的结果，使大肠杆菌寄主细胞失去了合成具有功能活性的核酸内切酶I的能力，从而增进了所含有的质粒DNA分子的稳定性。

(2) 质粒的拷贝数及分子大小

质粒分子拷贝数的多寡和质粒分子大小是决定其DNA产量的重要因素之一。

第4节 质粒载体的构建及类型

Construction and classification

天然质粒,一般是指那些没有经过以基因克隆为目标的体外修饰改造的质粒。在大肠杆菌中,常见的可以用于基因克隆的天然质粒有ColE1、RSF2124和pSC101等。

鉴于天然质粒用作基因克隆载体存在着不同程度的局限性,科学工作者便在其基础上进行了修饰改造,首先发展出了一批**低分子量、高拷贝、多选择记号**的质粒载体。

2. 质粒载体必须具备的基本条件

- ✓ 具有复制起点
- ✓ 具有抗菌素抗性基因
- ✓ 具若干限制酶单一识别位点
- ✓ 具有较小的分子量和较高的拷贝数

3. 质粒载体的选择记号

在基因克隆中采用的质粒载体的选择记号，包括有新陈代谢特性、对大肠杆菌素E1的免疫性，但大多灵敏的质粒载体都是使用抗菌素抗性记号。

若干抗菌素的作用方式及其抗性机理

抗菌素名称	作用方式	抗性机理
氨苄青霉素(Amp)	这是一种青霉素的衍生物,它通过干扰细菌胞壁合成之末端反应,而杀死生长的细胞	氨苄青霉素抗性基因(bla 或 amp ^r),编码的一种周质酶,即 β -内酰胺酶,可特异地切割氨苄青霉素的 β -内酰胺环,从而使之失去杀菌的效力
氯霉素(Cml)	这是一种抑菌剂,它通过同核糖体 50S 亚基的结合作用,干扰细胞蛋白质的合成,并阻止肽键的形成	氯霉素抗性基因(cat 或 cml ^r)编码的乙酰转移酶,它特异地使氯霉素乙酰化而失活
卡那霉素(Kan)	这是一种杀菌剂,它通过同 70S 核糖体的结合作用,导致 mRNA 发生错读(misreading)	卡那霉素的抗性基因(kan 或 kan ^r)编码的氨基糖苷磷酸转移酶,可对卡那霉素进行修饰,从而阻止其同核糖体之间发生相互作用
链霉素(Sm)	这是一种杀菌剂,它通过同核糖体的 30S 亚基的结合作用,导致 mRNA 发生错译	链霉素抗性基因(str 或 str ^r)编码的一种特异性酶,可对链霉素进行修饰,从而抑制其同核糖体 30S 亚基的结合
四环素(Tet)	这是一种抑菌剂,它通过同核糖体 30S 亚基之间的结合作用,阻止细菌蛋白质的合成	四环素抗性基因(tet 或 tet ^r)编码的一种特异性的蛋白质,可对细菌的膜结构进行修饰,从而阻止四环素通过细胞膜从培养基中转运到细胞内

4. 不同类型的质粒载体

高拷贝数的质粒载体

适于分离大量的高纯度的克隆基因的DNA片段。如ColE1、pMB1或它们的派生质粒。它们不仅具有低分子量、高拷贝数的优点，而且在没有蛋白质合成的条件下仍能继续复制。因此，若在处于对数生长晚期的含有ColE1一类质粒的大肠杆菌培养物中，加入适量的蛋白质合成抑制剂如氯霉素或壮观霉素处理之后，每个细胞中的质粒拷贝数则可扩增到1000~3000个之多。如果加入高浓度的尿核苷，质粒DNA又可进一步扩增2~3倍。

低拷贝数的质粒载体

这类质粒载体的一个普遍性问题是，由于它们体积小、拷贝数低，与此相应的基因剂量也就较少，因此要制备大量的克隆DNA就很困难。适合于克隆含量过高对寄主代谢有害的DNA。例如，pLG338、pLG339及pHSG415。

失控的质粒载体

失控的质粒载体（runaway plasmid vectors）：是一些低拷贝的质粒，其复制控制是温度敏感型的，也就是说在不同的温度下，拷贝数会有显著的变化。

例如B.E.Uhlin等发展了失控的质粒载体pBEU1和pBEU2。在30°C下，每个寄主细胞中只含有适量的拷贝数，而当培养温度超过35°C时，质粒的复制便失去了控制，每个细胞中的拷贝数便持续上升。

Nature Biotechnology 10, 661 - 666 (1992) doi:10.1038/nbt0692-661

正选择的质粒载体

正选择质粒载体（direct selection vectors）：这种质粒载体具有直接选择记号并赋予寄主细胞相应的表型。通过选择具这种表型特征的转化子，便可大大降低需要筛选的转化子的数量，从而减轻了实验的工作量，提高了选择的敏感性。

表 4-8 若干大肠杆菌的正选择质粒载体

质粒	复制子	大小(kb)	选择的表型	遗传记号	插入失活位点
pNO1523	pMB1	5.2	Amp ^r	rpsL ^①	HpaI, SmaI
pSCC31	pMB1	5.2	Amp ^r	EcoRI	BglII, HindIII
pKN80	ColEI	17.0	Amp ^r	HpaI	BamHI, HindIII, SmaI
pHE3	p15A	4.9	Cml ^r , Phe ^{s②}		PstI
pUH121	pMB1	4.4	Amp ^r , Tet ^r		Bell, EcoRI, HindIII, SmaI
pLV57	pMB1	6.1	Amp ^r , Cml ^r	EcoRI	BglII, HindIII
pAA3	pMB1	13.3	Amp ^r	galK ^③ , galT ^{+④}	HindIII

① rpsL = 大肠杆菌的一种基因，它的表达可使链霉素抗性的寄主细胞(rpsL⁺)变成链霉素敏感的表型(rpsL⁻)。

② Phe = P-氟苯丙氨酸。

③ galK = 半乳糖操纵子(gal operon)的一种基因。

④ galT = 半乳糖操纵子(gal operon)的一种基因。

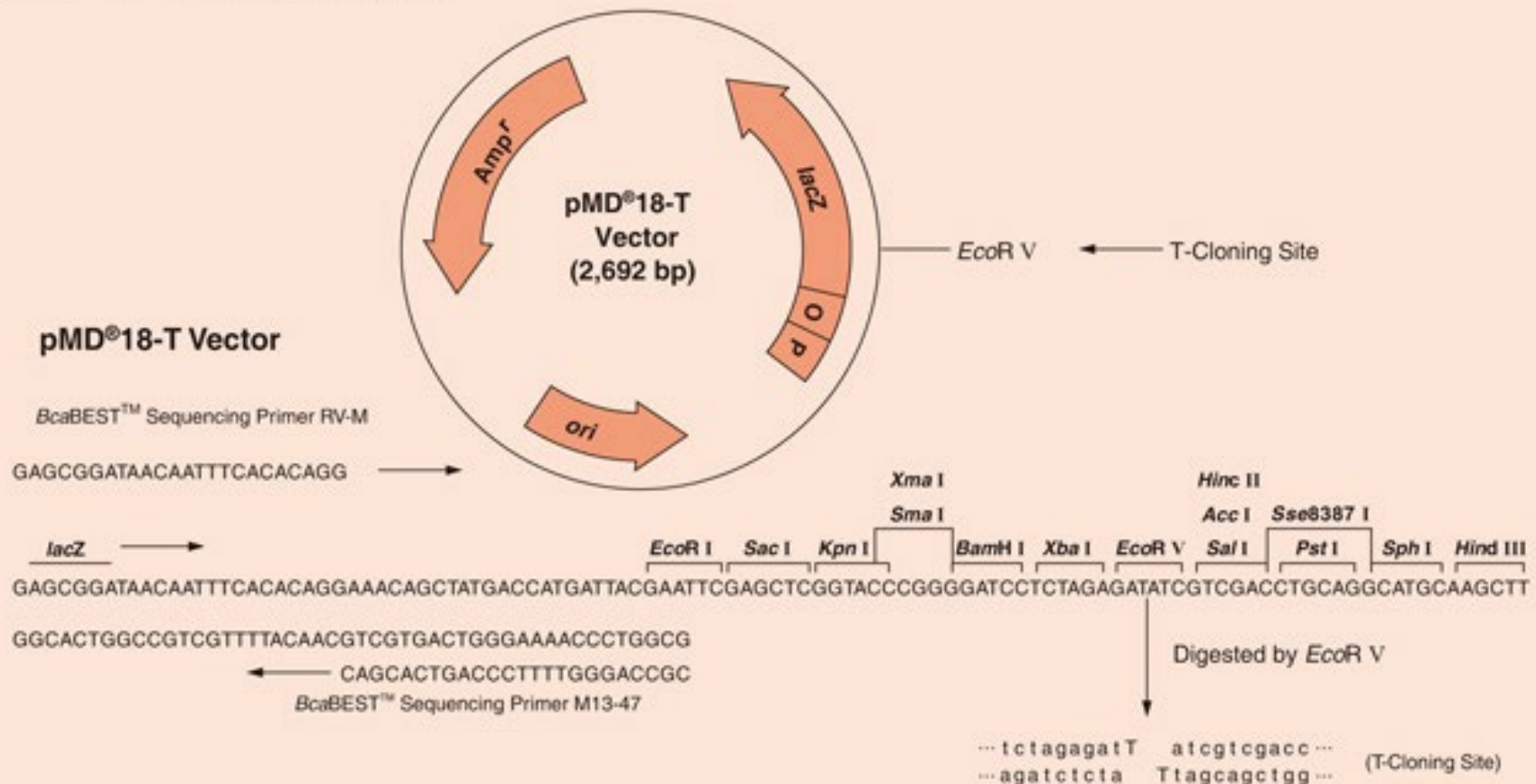
表达型的质粒载体

使克隆在大肠杆菌中特定定位点的外源真核基因的编码序列置于大肠杆菌的转录-翻译信号控制之下，并能在大肠杆菌细胞中正常转录并翻译成相应蛋白质的克隆载体特称为表达载体（expression vectors）。

一种典型的大肠杆菌表达型质粒载体（图4-11）的主要组成部分，包括大肠杆菌的启动子及操纵全点序列、多克隆位点、转录及转译信号、质粒载体的复制起点及抗菌素抗性基因。

表达载体 vs 克隆载体

pMD[®]18-T Vector的结构



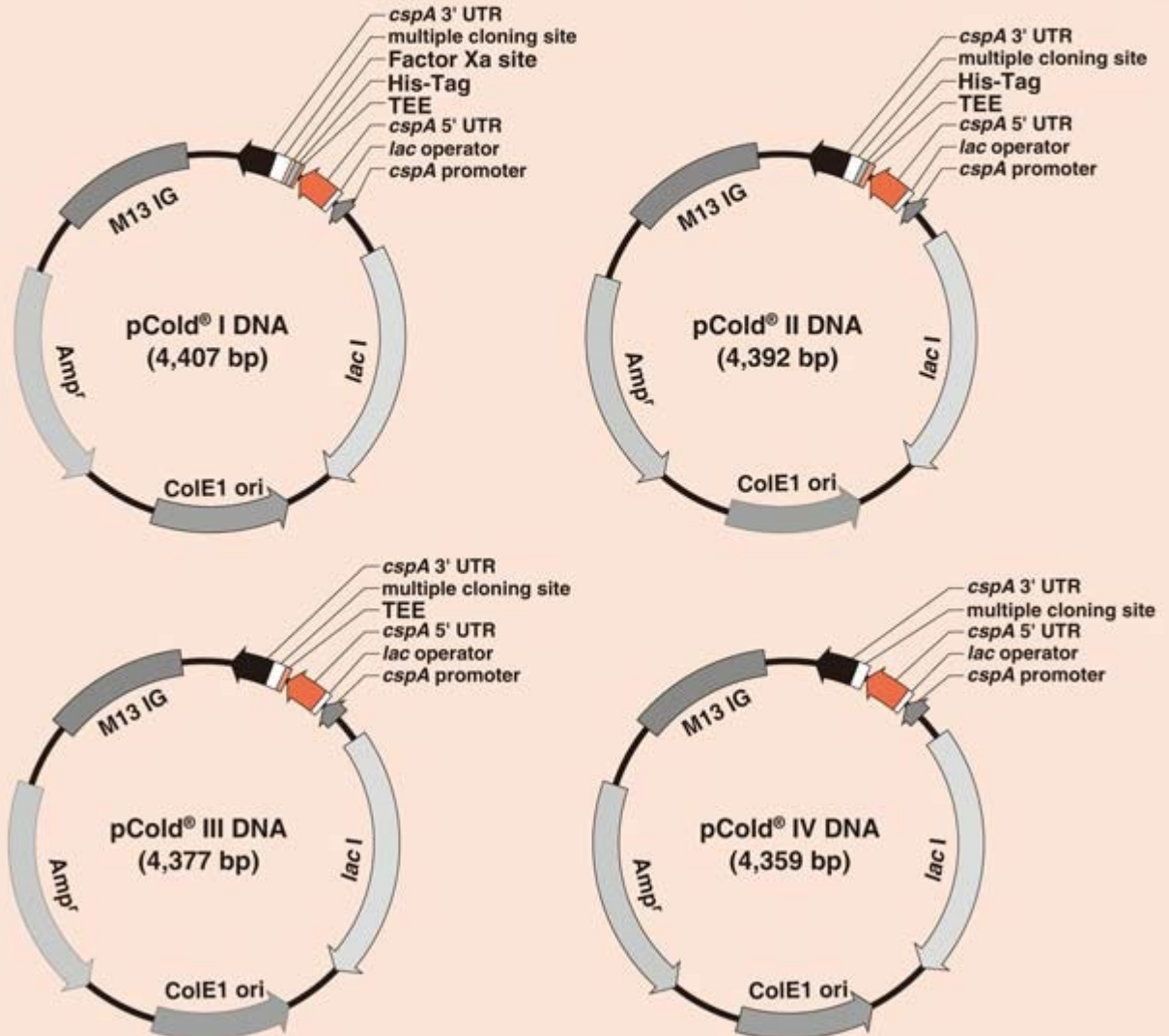
用于基因克隆的载体——T 载体

表达载体 vs 克隆载体

pCold®载体图谱

	TEE*序列	His tag序列	Factor Xa切断序列
pCold® I DNA	O	O	O
pCold® II DNA	O	O	X
pCold® III DNA	O	X	X
pCold® IV DNA	X	X	X

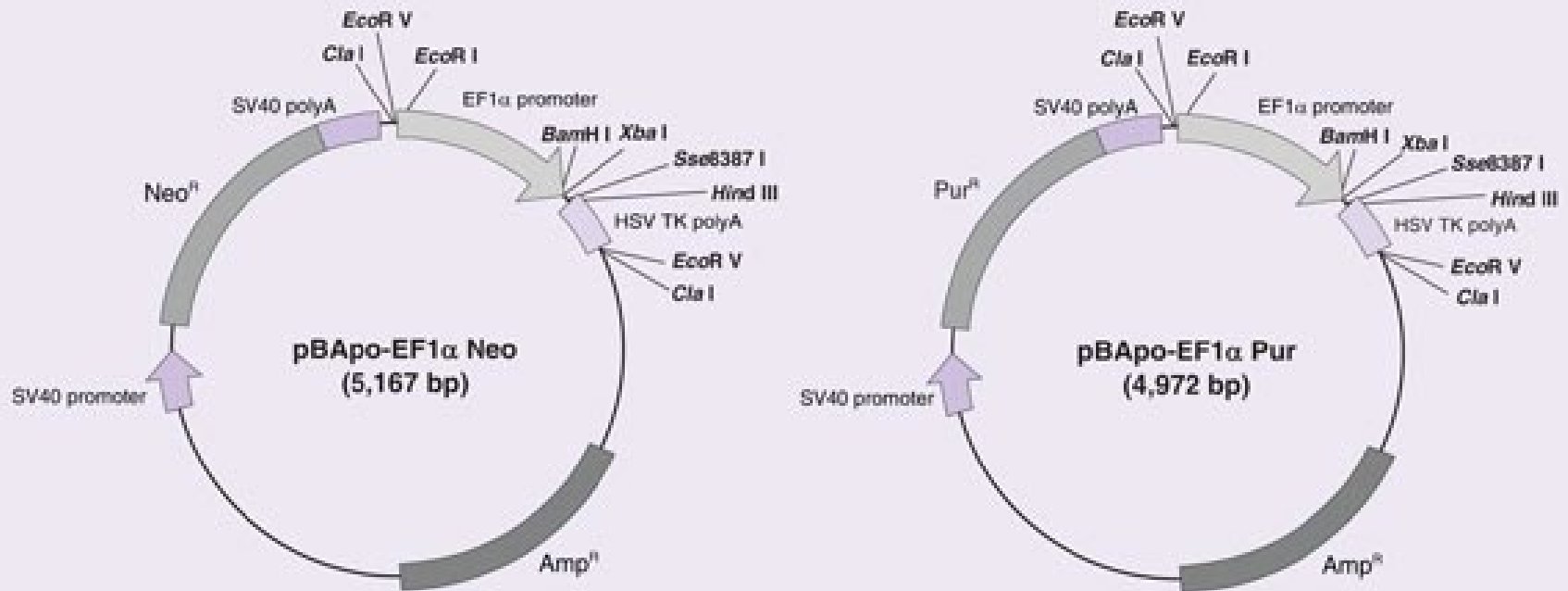
* TEE是translation enhancing element的简称，是一种翻译增强元件，具有促进翻译的功能。



用于基因表达的载体——原核表达载体

表达载体 vs 克隆载体

载体图谱



pBApo-EF1α Neo & pBApo-EF1α Pur DNA Cloning Site



用于基因表达的载体——真核表达载体

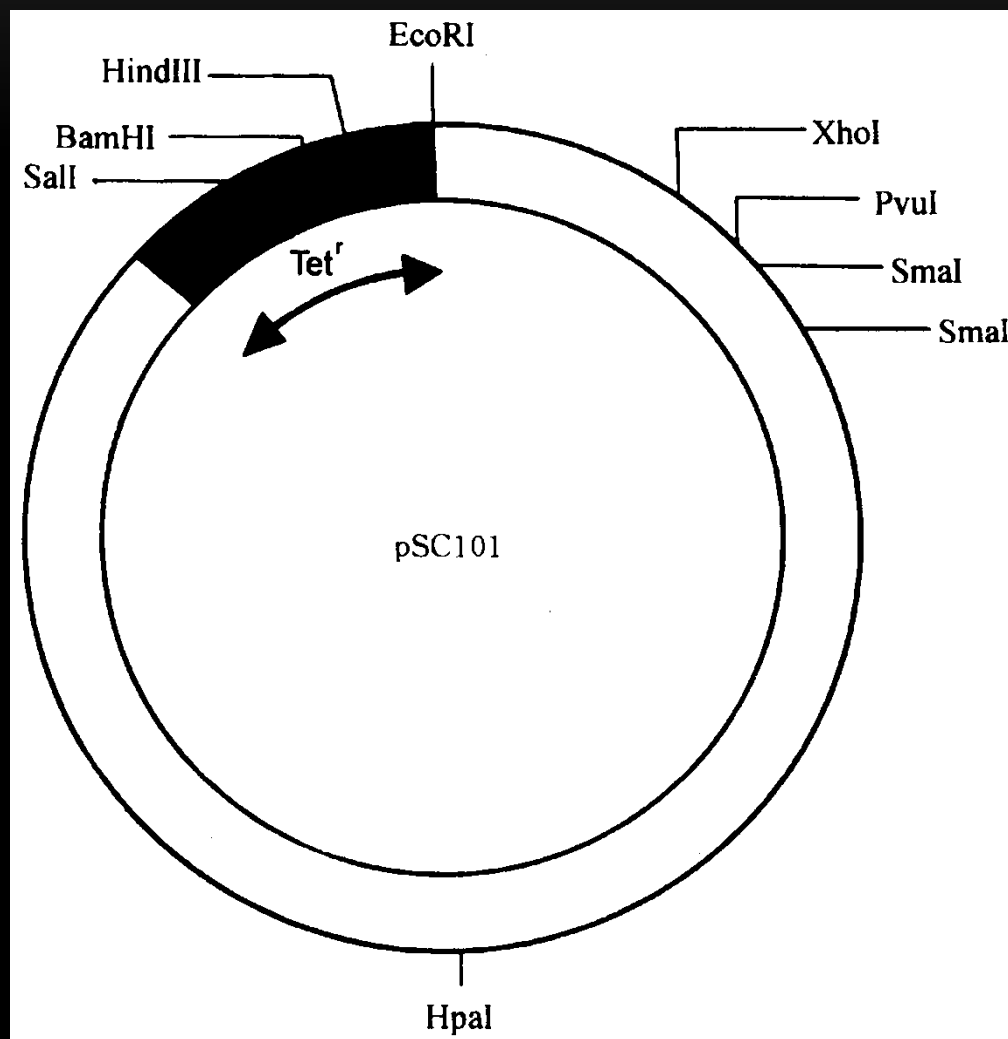
第5节 重要的大肠杆菌质粒载体

Normal plasmids

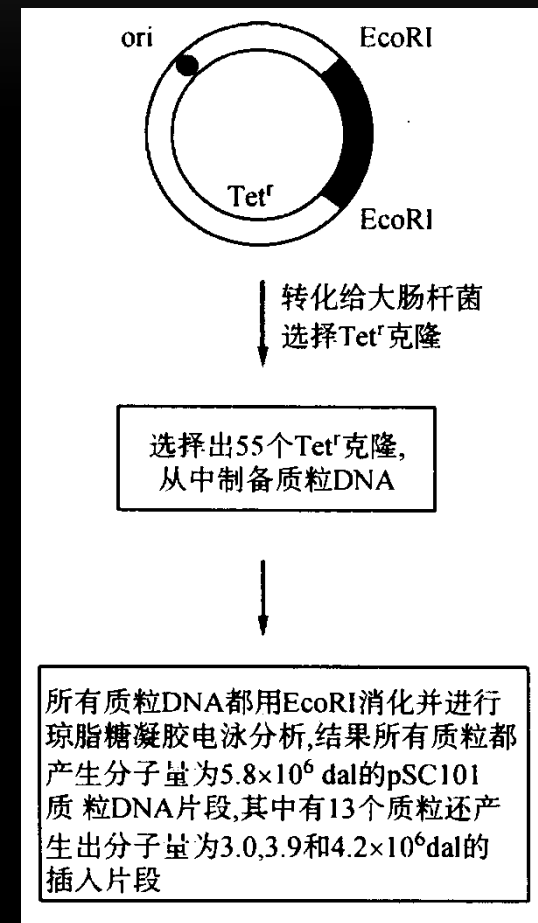
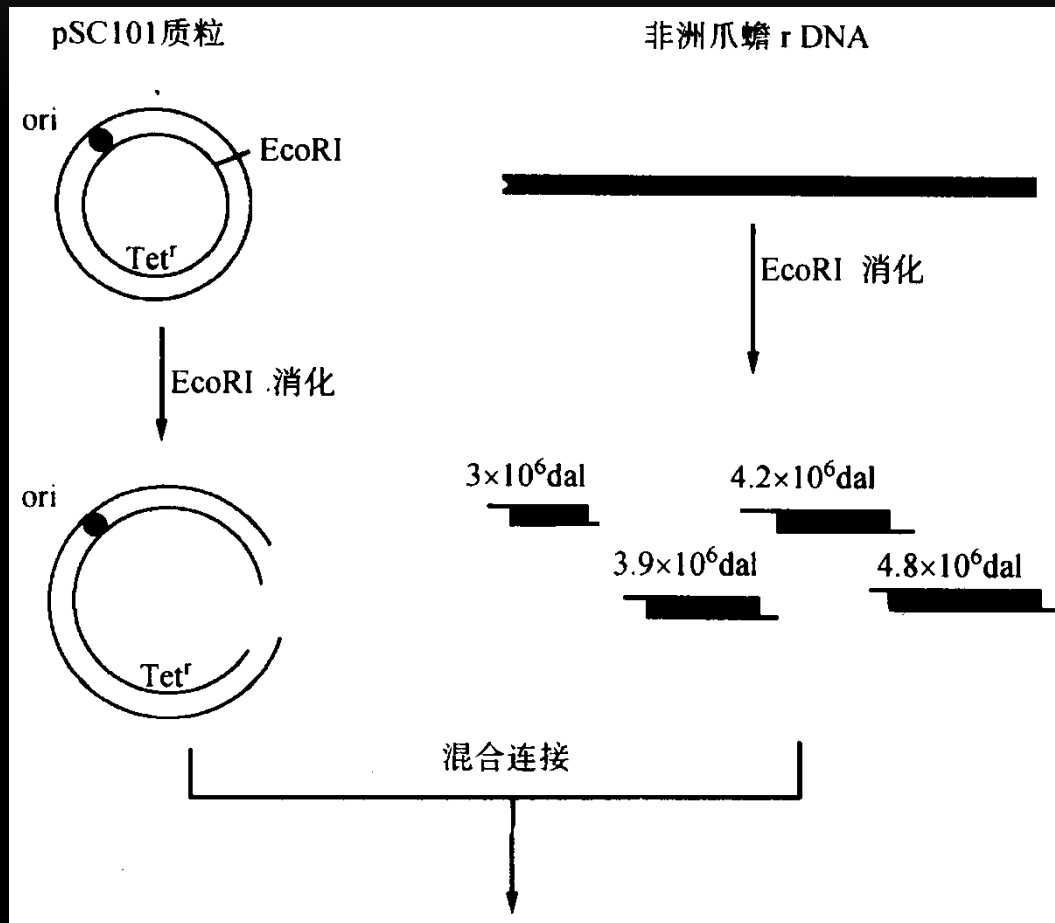
1. pSC101质粒载体

- ✓ 低拷贝数，1~2份，
- ✓ 分子量为9.09Kb
- ✓ 四环素抗性基因（tet）。
- ✓ EcoRI等多个单克隆位点

第一个成功应用于真核DNA克隆的载体（1973）



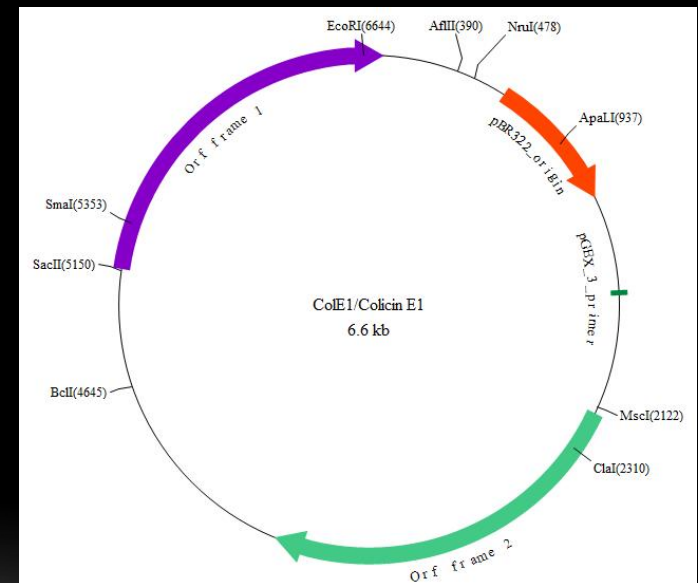
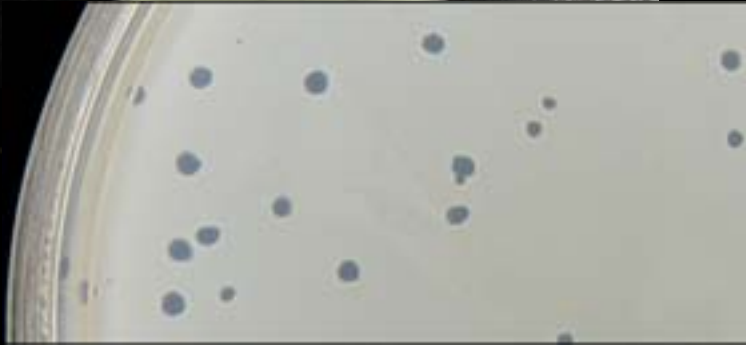
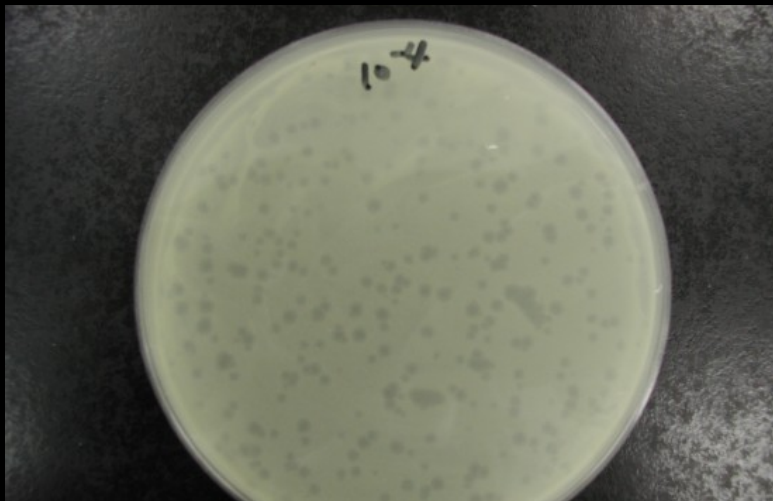
应用pSC101质粒作载体在大肠杆菌细胞中克隆非洲爪蟾的rDNA基因片段



2. ColE1质粒载体

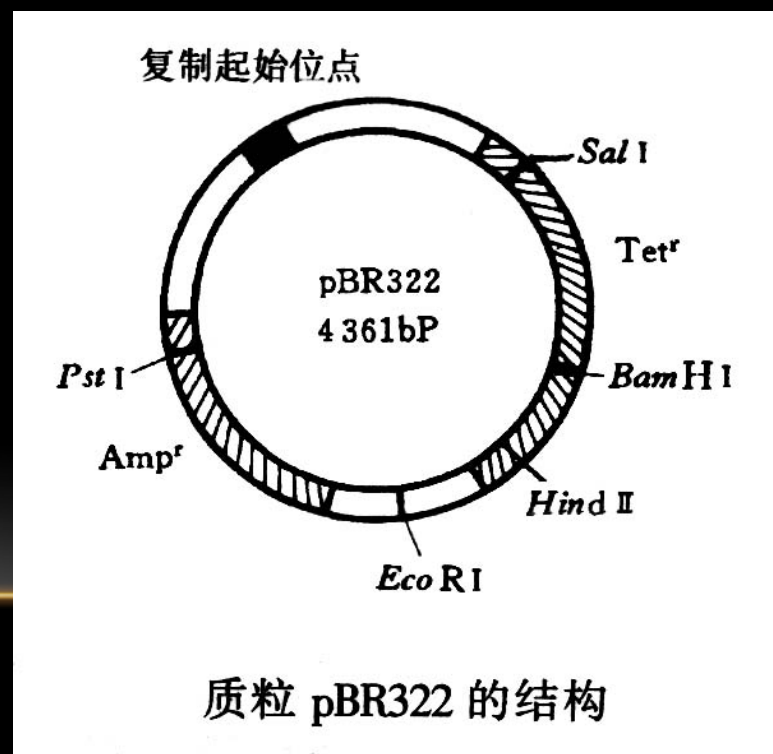
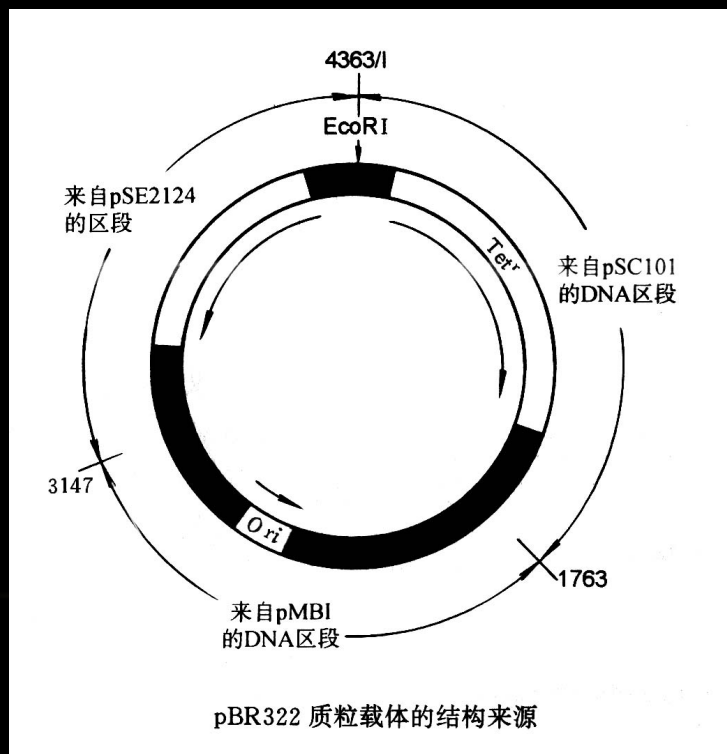
大肠杆菌素筛选标记

松弛型复制控制的多拷贝质粒，可以克服pSC101的低拷贝。



3. pBR322质粒载体

pBR322 质粒由3个不同来源的部分组成：来源于pSF2124的氨苄青霉素抗性基因（amp）；来源于pSC101的四环素抗性基因（tet）；来源于CoLEI的派生质粒pMB1的DNA复制起点。



pBR322质粒载体的优点

- ✓ 具有较小的分子量。4 363bp。
- ✓ 具有两种抗菌素抗性基因可供作转化子的选择记号。
- ✓ pBR322 DNA分子内具有多个限制酶识别位点。
- ✓ 具较高的拷贝数，每个细胞中可累积1000~3000个拷贝。

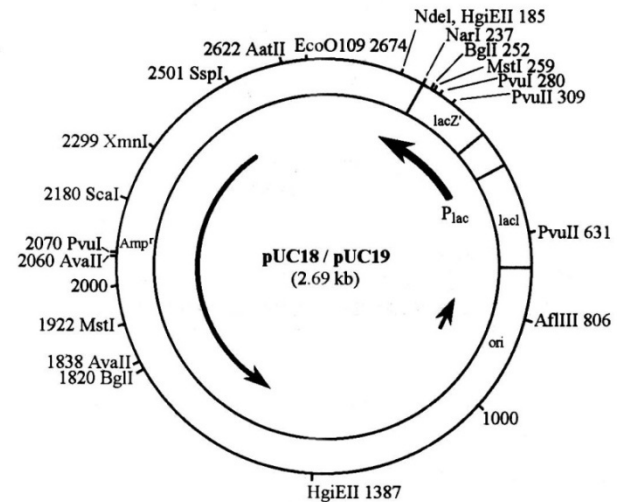
pBR322质粒的改良版本

- ✓ 主要是提高安全性，缺失掉其转移的活性。如pBR327、pAT153等。
- ✓ 对于EcoRI酶插入失活的恢复，例如pBR324、pBR325等。
- ✓ pAT153拷贝数方面也有所增加。

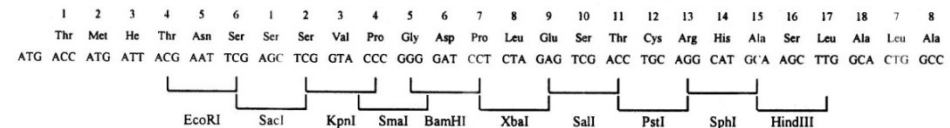
4. pUC质粒载体

pUC载体是在pBR322质粒载体的基础上，组入了一个在其5'-端带有一段多克隆位点的lacZ'基因，而发展成为具有双功能检测特性的新型质粒载体系列。典型的pUC系列的质粒包括：

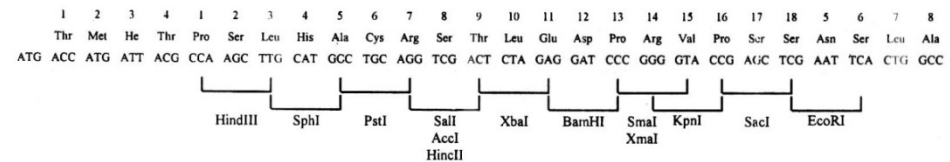
- ✓ 来自pBR322的复制起点（ori）
- ✓ 氨苄青霉素抗性基因（amp^r）
- ✓ lacZ检测系统
- ✓ 多克隆位点（MCS）



多克隆位点
pUC18



pUC19



pUC18 及 pUC19 质粒载体的形图

这是一种小分子量拷贝的大肠杆菌质粒载体。多克隆位点 MCS 序列中含有 EcoRI、SacI、KpnI、SmaI、XmaI、BamHI、XbaI、SalI、AccI、HincII、PstI、SphI、HindIII 等单一识别位点。

pUC18 与 pUC19 相比，两者的差别仅仅在于多克隆位点的插入方向彼此相反。在 pUC18 中，

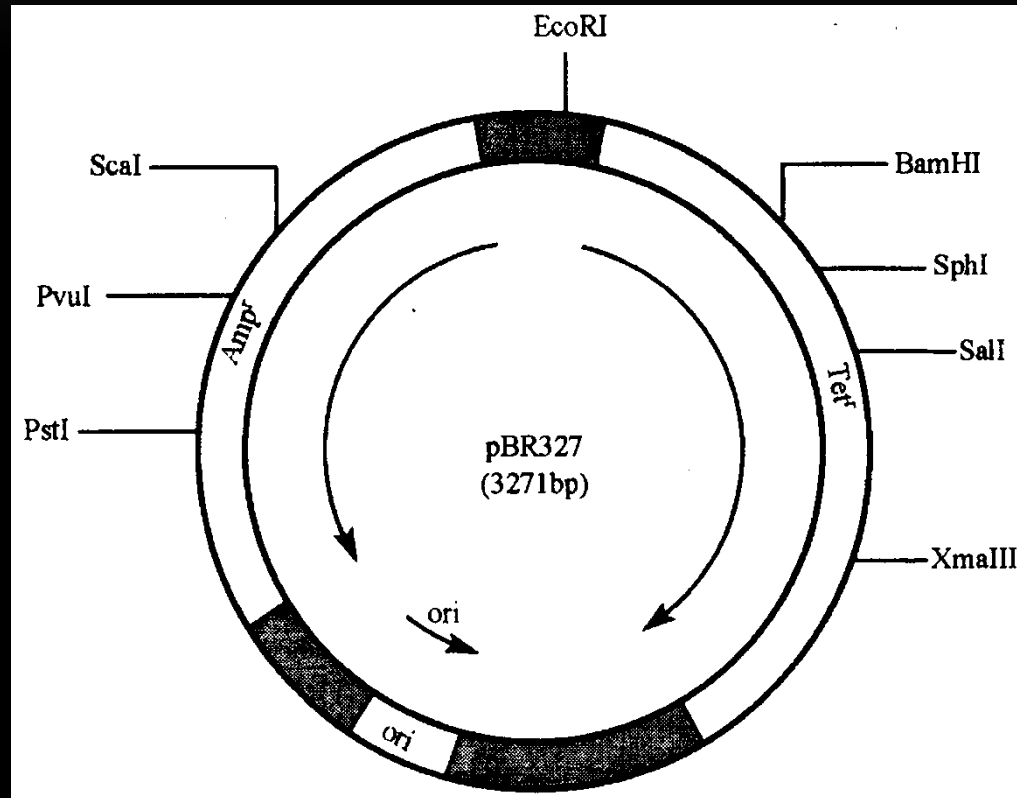
EcoRI 位点紧挨于 P_{lac} 下游；在 pUC19 中，HindIII 位点紧挨于 P_{lac} 下游

5. 其它重要质粒载体

丧失迁移功能的质粒——pBR327

pBR327是从pBR322改建而来，比pBR322缺失了一条1.09kb的DNA片段，导致在复制和结合能力方面发生了改变，但氨苄青霉素抗性和四环素抗性的基因保持完整主要特点：

- ① 拥有较高的拷贝数，平均每个大肠杆菌寄主细胞可达30~45份；
- ② 由于失去了bom位点，不能提高结合而转移，具有更高的安全系数。



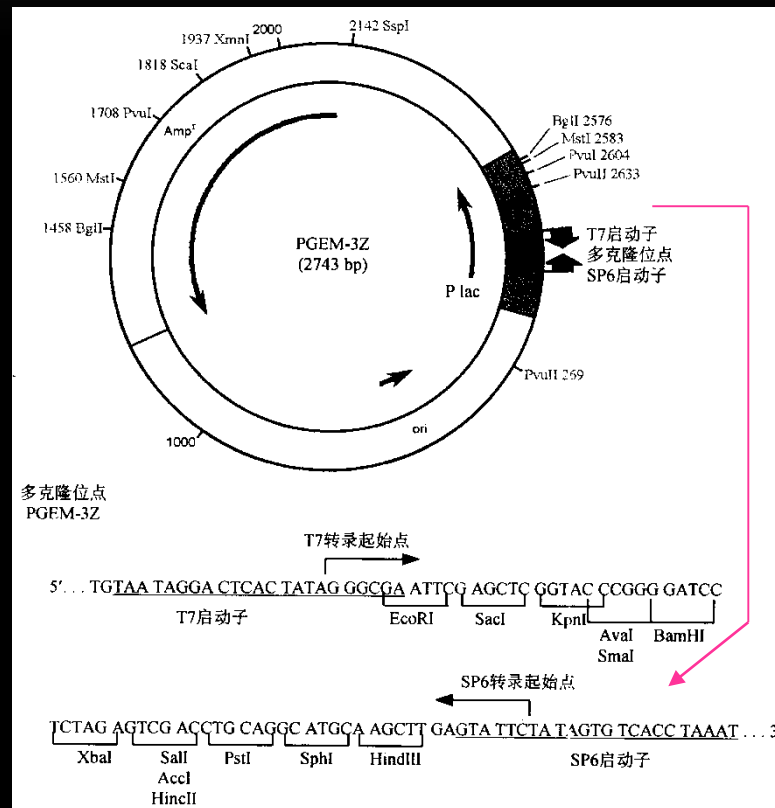
5. 其它重要质粒载体

能在体外转录基因的质粒载体——pGEM-3Z

- pGEM-3Z由pUC系列质粒载体派生而来，与pUC系列十分类似。
- 它具有2个来自噬菌体的启动子——T7启动子和SP6启动子，分别位于MCS位点两侧，取向相反。它们为T7或SP6的RNA聚合酶提供了特异性的识别位点。
- 这样的载体还有pSP64和Psp65质粒载体，也是由pUC系列质粒载体派生而来。这些载体都可以在体外转录体系中进行转录和翻译克隆的外源基因。

5. 其它重要质粒载体

能在体外转录基因的质粒载体——pGEM-3Z



pGEM-3Z 质粒载体及其克隆位点序列图

穿梭质粒载体

所谓的穿梭质粒载体是指一类人工构建的，具有两种不同复制起点和选择标记，可在两种不同的寄主细胞中存活和复制的质粒载体。

- ✓ 大肠杆菌-枯草芽孢杆菌穿梭质粒载体
- ✓ 大肠杆菌-酿酒酵母穿梭质粒载体
- ✓ 大肠杆菌和动物细胞之间的穿梭质粒载体，如利用大肠杆菌和牛乳头瘤病毒构建的pBPV-BV1。

END