

第二章 基因工程的载体和酶

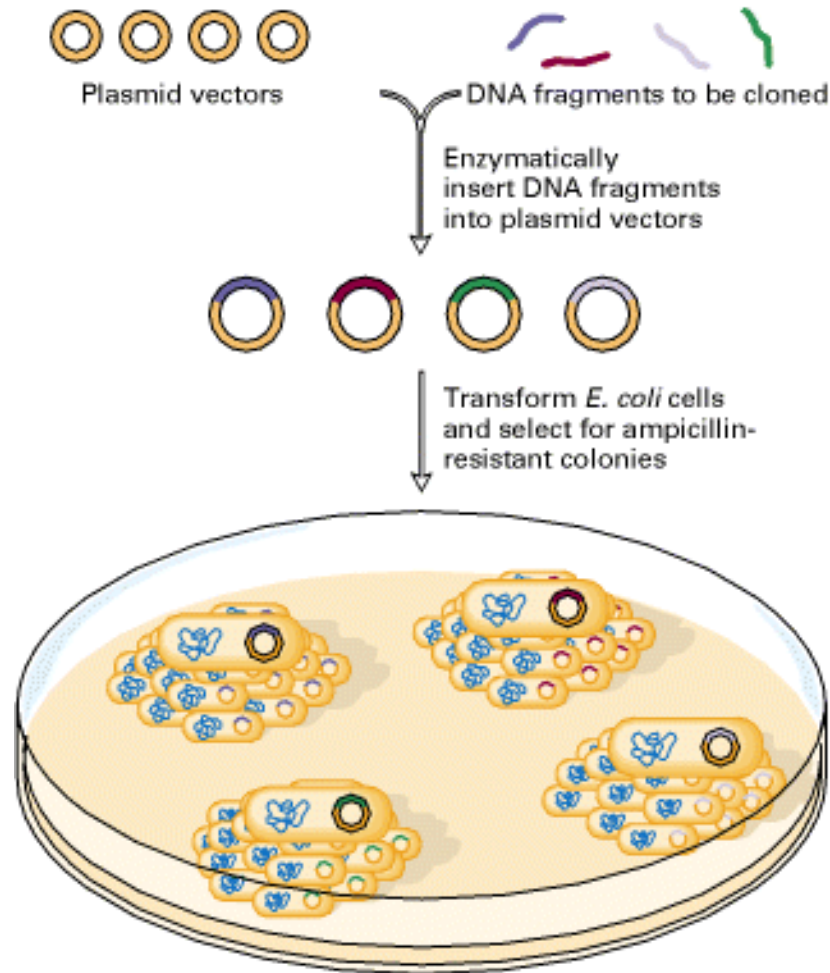
第一节 基因工程载体

自然界中细菌之间的DNA交换

- 转化
- 接合
- 转导

载体

- 在基因工程操作中，把能携带外源DNA进入受体细胞的DNA分子叫**载体（vector）**。



基因工程对载体的要求

(1) 在宿主细胞内能独立复制。

复制子：载体上有特殊的复制起点，使其能够携带外源基因在宿主细胞中独立复制繁殖

(2) 有利于检测筛选的标记。

(3) 有一段多克隆位点。便于外源DNA插入载体而不影响载体的复制。

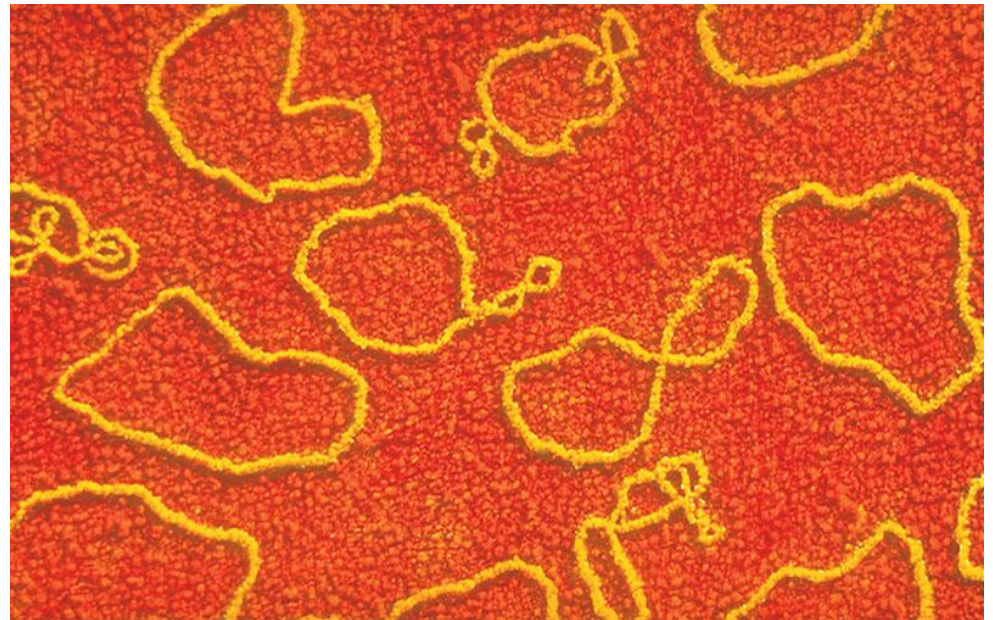
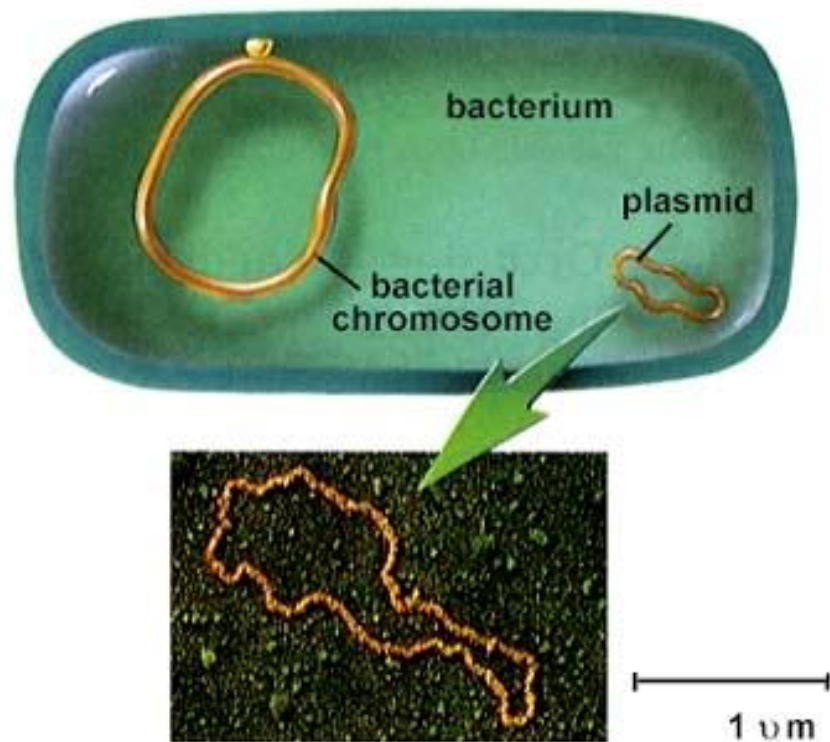
(4) 分子量小，拷贝数多。

(5) 容易从宿主细胞中分离纯化。

载体的分类

分类依据	类	别	举 例
1.按功能分成	(1) 克隆载体		pBR322
	(2) 表达载体		pCDN3
2.按进入受体细胞类型分	(1) 原核载体		pUC18
	(2) 真核载体		pBUDCE41
	(3) 穿梭载体		YEC
3.按载体来源分	质粒 (plasmid)		
	单链 DNA 噬菌体 M13		
	λ 噬菌体的衍生物		
	柯斯质粒 (cosmid)		
	动物病毒 (virus)		
4.按克隆片段得大小 (克隆能力) 分	(1)<1kb		(1) M13
	(2)<10kb		(2) plasmid
	(3)<22kb		(3) λ phage
	(4)<50kb		(4) casmid
	(5)0.1-0.4Mb		(5) BAC
	(6)0.5-2Mb		(6) YAC

一、质粒载体



（一）质粒的一般生物学特性

质粒是生物细胞内固有的、能独立于寄主染色体而自主复制、并被稳定遗传的一类核酸分子

质粒常见于原核细菌和真菌中

绝大多数的质粒是DNA型的

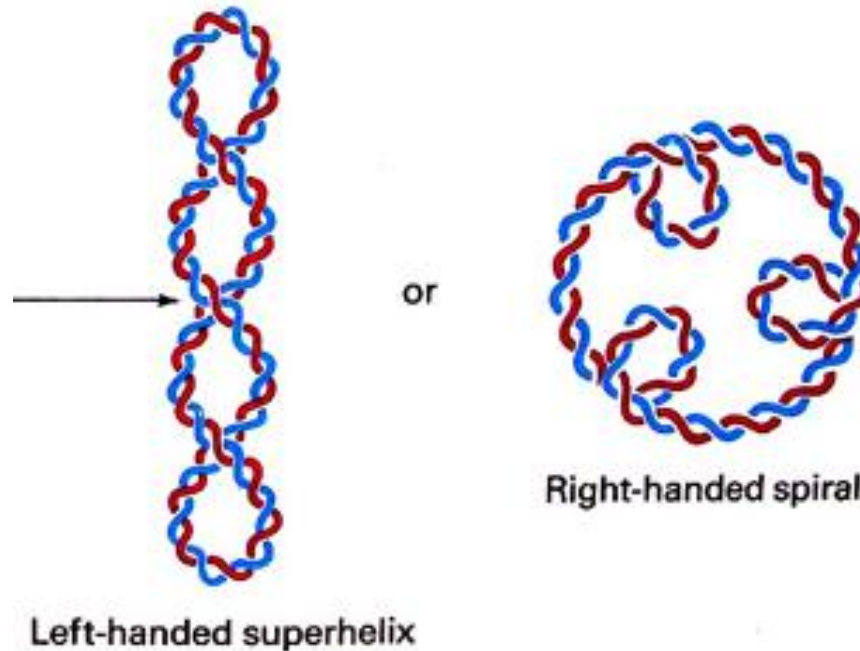
绝大多数的天然DNA质粒具有共价、封闭、环状的分子结构，
即cccDNA

质粒的空间构型

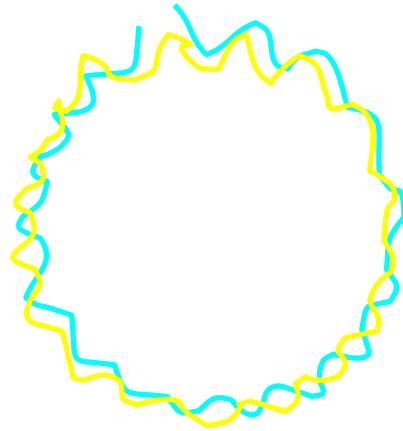
① 共价闭合环状DNA (**cccDNA**)

Covalent **c**lose **c**ircular DNA

呈超螺旋 (SC) (**s**uper **c**oil)



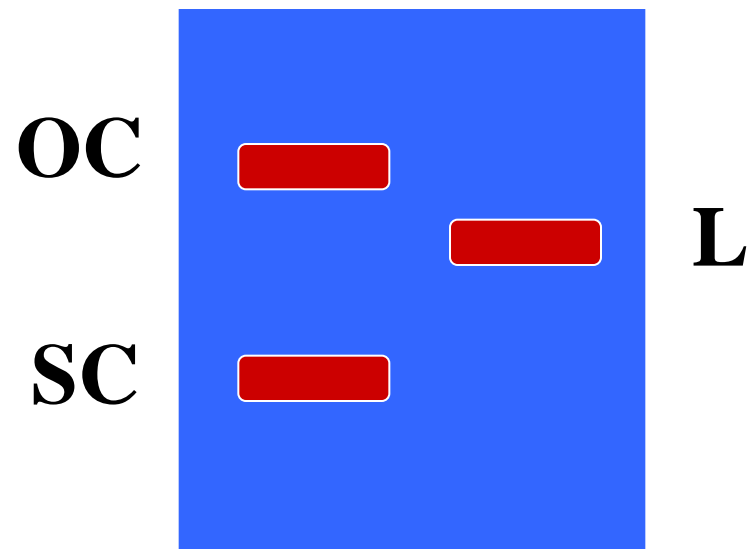
② 开环DNA (**o**pen **c**ircular, **o**cDNA)

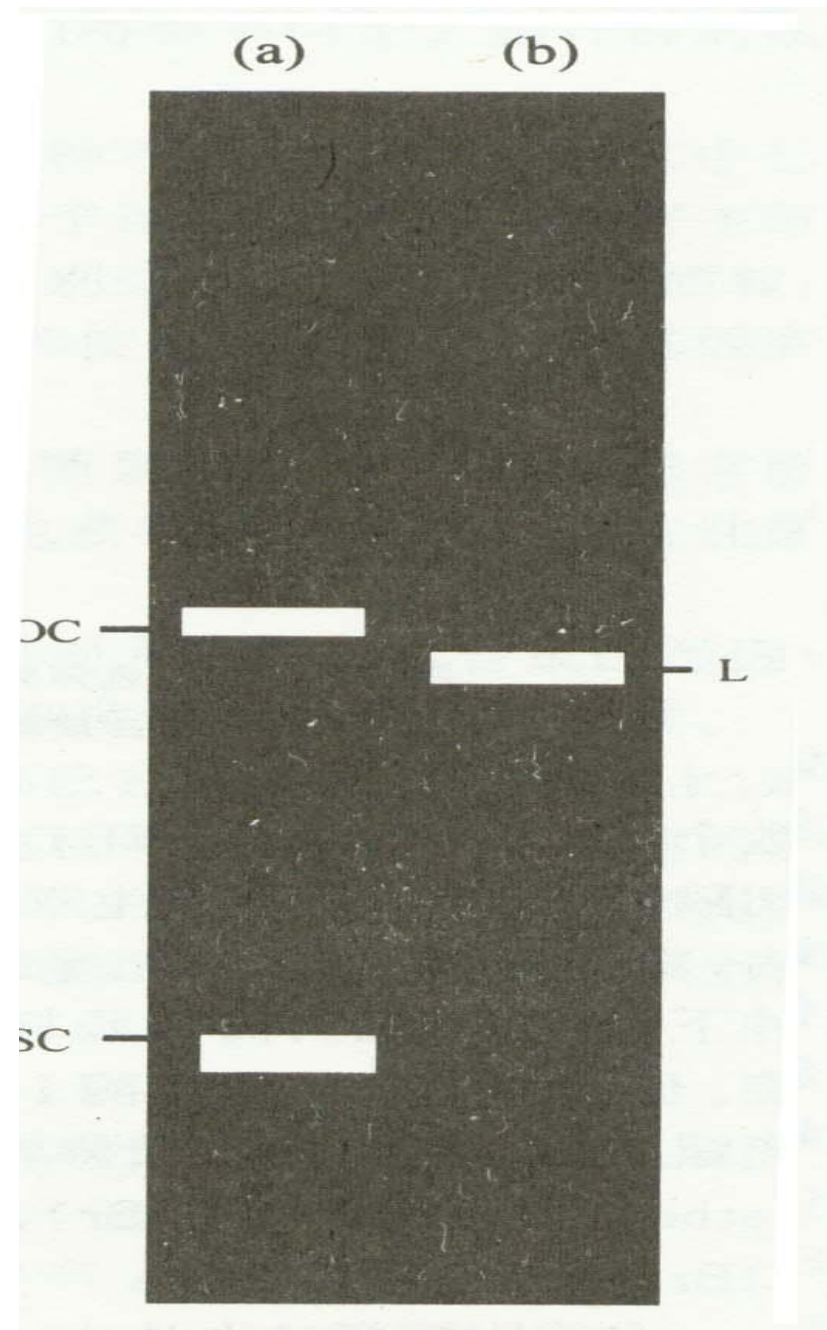


③ 线形DNA (**l**inear , **l**DNA)



质粒空间构型与电泳速率





1 天然质粒的分配机制

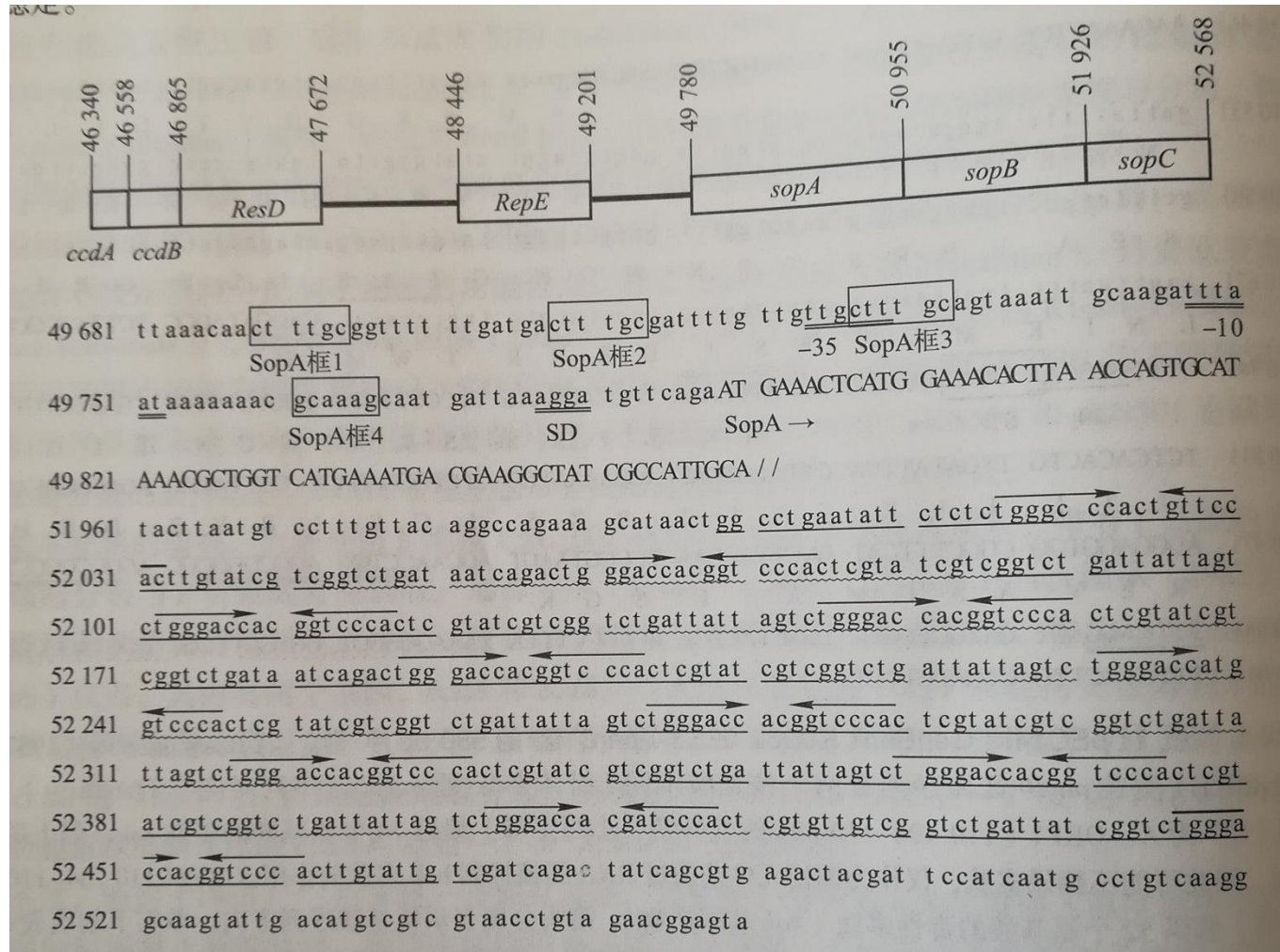
- 低拷贝数质粒的分配
 - 杀伤系统
 - 主动分配系统
- 多拷贝数质粒的分配

杀伤系统

```
110 461 AACAACTCC GGGAGGCAGC GTGATGCGGC AACAAtcaca cggattttccc gtgaacggtc tgaatgagcg
                                     * V S K G H V T Q I L P
110 531 gattattttc agggaaagtg agtgtggtca gcgtgcaggt atatgggcta tgatgtgccc ggcgcttgag
      N N E P F T L T T L T C T Y P S H H A R R K L
110 601 gctttctgcc tcatgacgtg aaggtggttt gttgccggtgt tgtgtggcag aaagaagata gccccgtagt
      S E A E H R S P P K N G H Q T A S L L Y G R L
110 671 aagttaattt tcattaacca ccacgaggca tccctatgtc tagtccacat CAGGATAGCC TCTTACCGCG
      L N I K M L W W S A D R H R T W M -35
110 741 CTTTGCGCAA GGAGAAAGAAG GCCATGAAAC TACCACGAAG TTCCCTTGTC TGGTGTGTGT TGATCGTGTG
      -10 SD M K L P R S S L V W C V L I V C
110 811 TCTCACACTG TTGATATTCA CTTATCTGAC ACGAAAATCG CTGTGCGAGA TTCGTTACAG AGACGGACAC
      L T L L I F T Y L T R K S L C E I R Y R D G H
110 871 AGGGAGGTGG CGGCTTTCAT GGCTTACGAA TCCGGTAAGT AGCAACCTGG AGGCGGGCGC AGGCCCGCCT
      R E V A A F M A Y E S G K *
110 941 TTTCAGGACT GATGCTGGTC TGACTACTGA AGCGCCTTTA TAAAGGGGCT GCTGGTTCGC CGGTAGCCCC
111 011 TTTCTCCTTG CTGATGTTGT
```

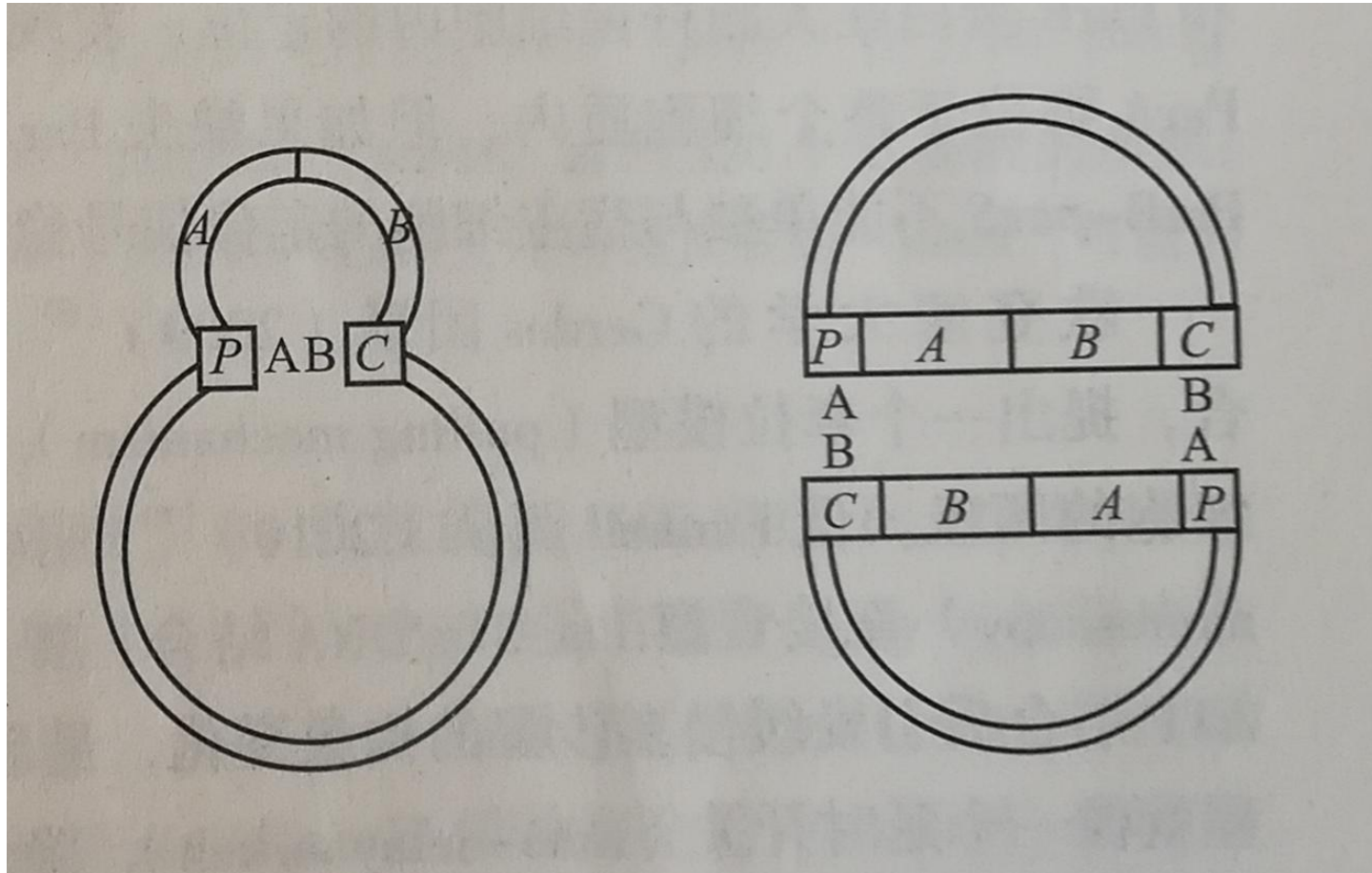
质粒pEC141(GeneBank KU932 025.1)parB+区的580bp序列

主动分配系统



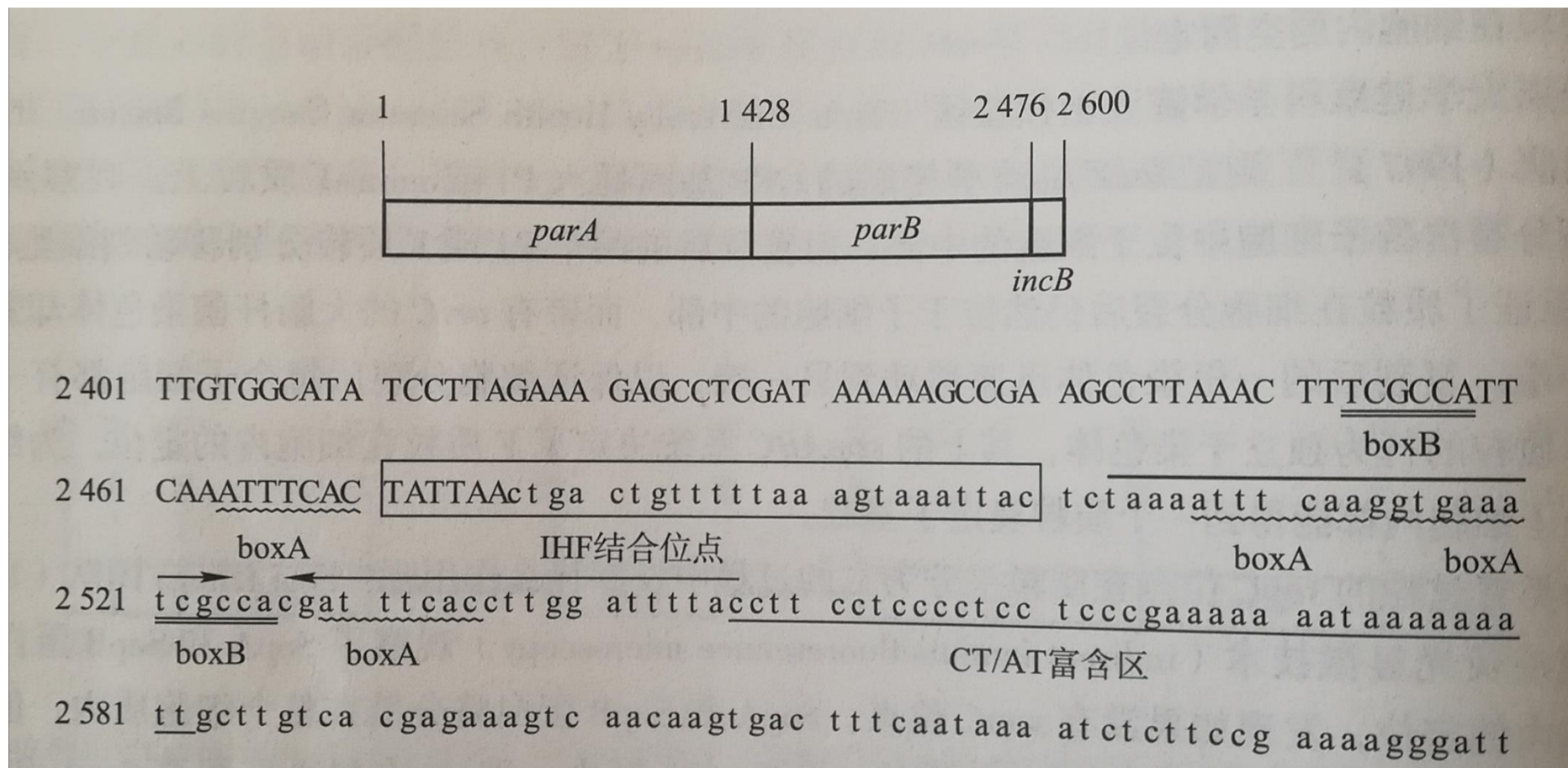
包含复制起点(repE)和质粒分配元件的大肠杆菌K-12的F质粒片段

主动分配系统



sopABC系统对mini-F质粒构型的影响

主动分配系统



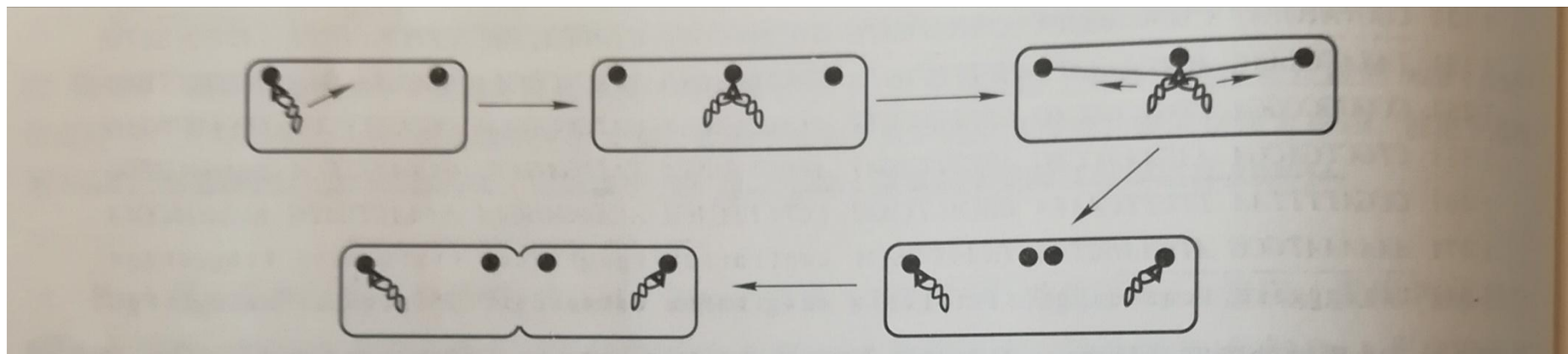
原噬菌体P1的par位点结构（按长度比例）

主动分配系统

```
1 cacttttgtt acccgccaaa caaaacecaa aaacaaceca taccnaaccc aataaaacac caaaacaaga
71 caaataatca ttgattgatg gttgaaatgg ggtaaaccttg acaaacaaaac ccacttaaaa cccaaaacat
-35 -10
141 acceaaacac acaccaaaaa aacaccataa ggagttttat aaATGTTGGT ATTCATTGAT GACGGTTCAA
SD
211 CAAACATCAA ACTACAGTGG CAGGAAAGCG ACGGAACAAT TAAACAGCAC ATTAGCCCGA ACAGCTTCAA
281 ACGCGAGTGG GCAGTCTCTT TTGGTGATAA AAAGGTCTTT AACTACACAC TGAACGGCGA ACAGTATTCA
351 TTTGATCCAA TCAGCCCGGA TGCTGTAGTC ACAACCAATA TCGCATGGCA ATACAGCGAC GTTAATGTCTG
421 TTGCAGTGCA TCACGCCTTA CTGACCAGTG GTCTGCCGGT AAGCGAAGTG GATATTGTTT GCACACTTCC
491 TCTGACAGAG TATTACGACA GAAATAACCA ACCCAATACG GAAAAATTG AGCGTAAGAA AGCAAAC TTC
561 CGGAAAAAAA TTACATTA AAA TGGCGGGGAT ACATTACAA TAAAAGATGT AAAAGTCATG CCTGAATCTA
631 TACCGGCAGG TTATGAAGTT CTACAAGAAC TGGATGAGTT AGATTCTTTA TTAATTATAG ATCTCGGGGG
701 CACCACATTA GATATTTCTC AGGTAATGGG GAAATTATCG GGGATCAGTA AAATATACGG AGACTCATCT
771 CTTGGTGTCT CTCTGGTTAC ATCTGCAGTA AAAGATGCCC TTTCTCTTGC GAGAACAAAA GGAAGTAGCT
841 ATCTTGCTGA CGATATAATC ATTCACAGAA AAGATAATAA CTATCTGAAG CAACGAATTA ATGATGAGAA
911 CAAAATATCA ATAGTCACCG AAGCAATGAA TGAAGCACTT CGTAAACTTG AGCAACGTGT ATTAAATACG
981 CTCAATGAAT TTTCTGGTTA TACTCATGTT ATGGTTATAG GCGGTGGCGC AGAATTAATA TGCGATGCAG
1051 TAAAAAACA CACACAGATT CGTGATGAAC GTTTTTTCAA AACCAATAAC TCTCAATATG ATTTAGTTAA
1121 CGGTATGTAT CTCATAGGTA ATTAATGATG GACAAGCGCA GAACCATTCG CTTCAAACTA AATCCAGATG
1191 TAAATCAAAC AGATAAAATT GTTTGTGATA CACTGGACAG TATCCCGCAA GGGGAACGAA GCCGCCTTAA
1261 CCGGGCCGCA CTGACGGCAG GTCTGGCCTT ATACAGACAA GATCCCGGA CCCCTTTCCT TTTATGTGAG
1331 CTGCTGACGA AAGAAACCAC ATTTTCAGAT ATCGTGAATA TATTGAGATC GCTATTTCCA AAAGAGATGG
1401 CCGATTTTAA TTCTTCAATA GTCACCTCAAT CCTCTTCACA ACAAGAGCAA AAAAGTGATG AAGAGACCAA
1471 AAAAAATGCG ATGAAGCTAA TAAATTAAtt caattattat tgagttccct ttaaccacta tcaggetgga
1541 taaagggaac tcaatcaagt tattttctta ccagtcatta cataatcgtt attatgaaat aatcgtttgc
```

R1质粒的稳定性位点parA+的序列 (GeneBank:X04 268.1)

主动分配系统



大肠杆菌细胞分裂过程中ParM介导的质粒分配模型

多拷贝质粒的分配

```
1 gaattegaca gtaagacggg taagectgtt gatgataccg ctgcettact ggggtgcatta gccagtctga
71 atgacctgtc acgggataat ccgaagtggc cagactggaa aatcagaggg caggaactgc gaacagcaaa
141 aagtcagata gcaccacata gcagaccgc CATAAAACGC CCTGagagcc cgt GACGGGC TTTTctt gta
211 ttatgggtag ttcccttgca tgaat CCATA AAAGGCGCCT Gt agt gccat ttaccccat tccactgccag
281 agccgtgagc gcagcgaact gaatgtcacg aaaaagacag cgactcaggt gcctgatggt cggagacaaa
351 aggaatattc agcgatttgc ccgtg
```

pSC101质粒的par区序列 (M12 801.1)

质粒的复制类型

(1) 严紧型质粒 (stringent plasmid)

拷贝数少，只有1—3份拷贝。

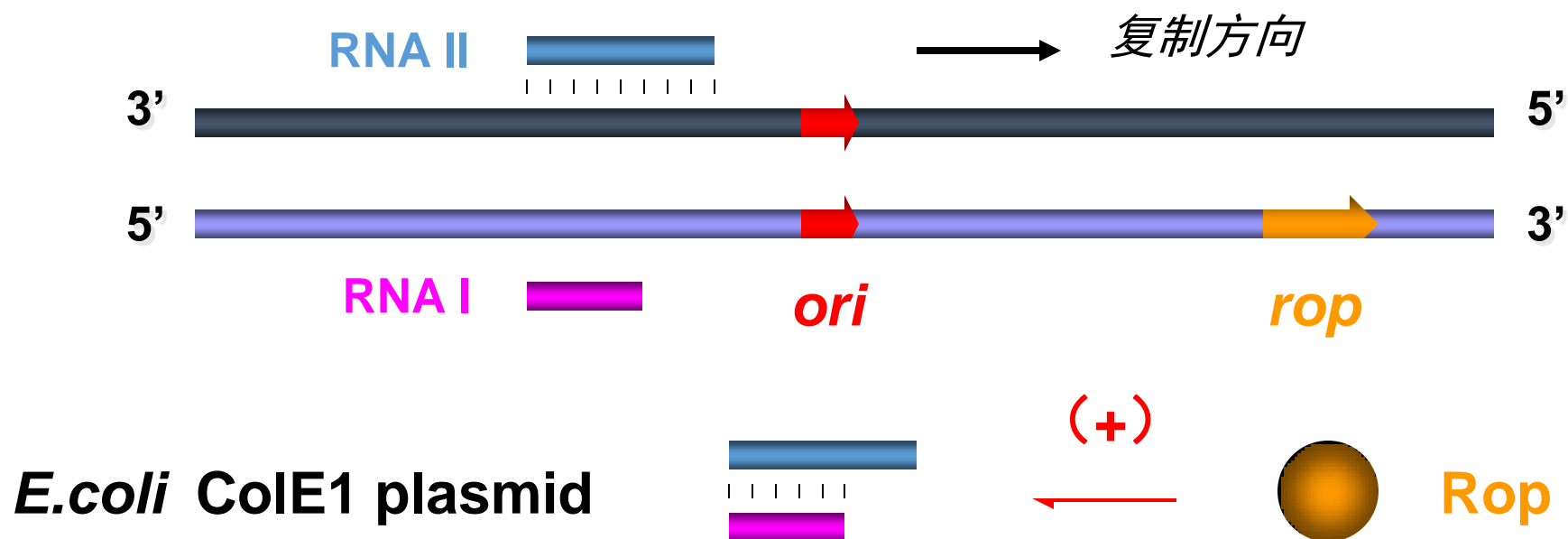
(接合型质粒分子量大，一般属严紧型)。

(2) 松弛型质粒 (relaxed plasmid)

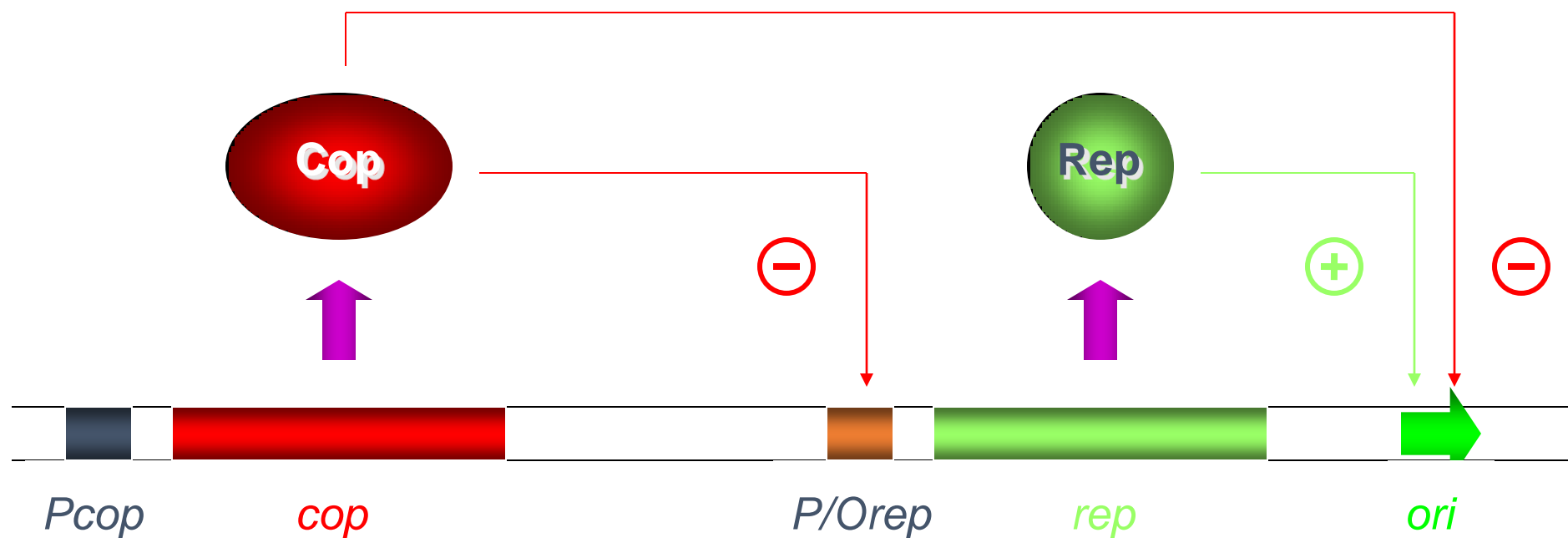
拷贝数多，有20份以上的拷贝。

(非接合型质粒分子量小，一般属松弛型)。

3 质粒的自主复制性



3 质粒的自主复制性



4 质粒的不相容性

5 质粒的可转移性

(1) 革兰氏阴性菌的质粒可分成两大类

- 接合型质粒
- 非接合型质粒

bom

mob

6 携带特殊的遗传标记

- **物质抗性** 抗生素、重金属离子、毒性阴离子、有机物
- **物质合成** 细菌毒素、有机碱