

4 Molecular Cloning Metho

分子克隆方法 (Molecular Cloning Methods)

本章主要介绍了在分子生物学中如何对基因进行操作和研究，核心技术包括基因克隆、PCR 以及表达克隆基因的方法，了解方法逻辑即可，简单。

第四章：分子克隆方法 (Chapter 4: Molecular Cloning Methods)

分子克隆的目的是为了分离基因，将其放入新的生物体中，并通过一系列技术进行复制，以获得大量高纯度的目的基因或其蛋白质产物，用于基础研究和各种应用（如生产人胰岛素 Human insulin、凝血因子 blood clotting factor 等）。

• 4.1 基因克隆 (Gene Cloning / Molecular Cloning)

- **定义：** 克隆 (Clone) 指一组相同的细胞、生物体或分子。基因克隆是将一个 DNA 分子片段（外源基因 foreign gene）插入到 DNA 载体 (vector) 中，并在宿主细胞 (host cell)（如细菌 bacteria）中获得目的 DNA 的多个拷贝的过程。
- **目的：**
 1. 从遗传物质库中分离基因 (Isolation of a gene)。
 2. 扩增基因 (Amplification of a gene)。
 3. 操纵 DNA 片段用于后续实验 (Manipulation of a piece of DNA)。
- **关键工具：**
 - **限制性核酸内切酶 (Restriction Endonucleases):**
 - 概念：“分子剪刀”(The Molecular Scissors)，识别双链 DNA 分子中的特定序列 (specific sequences)，并在链内部进行切割

(make cuts in both strands)。

- 生理意义：细菌产生，用于阻止外源 DNA (foreign DNA)，如病毒 DNA 的入侵，通过切割外源 DNA 来防御。
- 命名规则：根据**来源微生物的拉丁名命名**，前三个字母代表属名和种名，**有时包含菌株号**，后续罗马数字表示该菌株产生的不同限制酶 (如 EcoRI, HindIII)。
- 限制-修饰系统 (Restriction-Modification System, **R-M system**): 限制酶与甲基化酶 (methylases) 配对，甲基化酶识别并甲基化相同的位点，保护宿主 DNA 不被切割。复制后，亲代链已甲基化而受到保护。
- 识别序列特点：通常为 4-8 个碱基对 (bp) 的识别序列，很多是回文序列 (Palindrome)。
- 切割方式：
 - 平末端切割 (Blunt-end cleavage): 两条链在同一位置切割，产生平末端。
 - 交错切割 (Staggered cuts): 在不同位置切割，产生突出的单链末端，称为黏性末端 (sticky ends)。
- 同工酶 (Isoschizomer): 识别相同序列并在相同位点切割的酶。
- 异裂酶 (Neoschizomer / Heteroschizomer): 识别相同序列但在不同位点切割的酶。
- 同尾酶 (Isocaudamer): 来源不同，识别序列不同，但产生相同

黏性末端的酶。

- **连接酶 (Ligase):** 将 DNA 片段连接起来，特别是利用限制酶产生的黏性末端容易连接，形成重组 DNA (recombinant DNA)。
- **载体 (Vector):** 携带重组 DNA 并在宿主细胞中自我复制的 DNA 分子。它们为插入的外源 DNA 提供复制起点 (origin of replication)。
 - 常见类型：
 - **质粒 (Plasmids):** 细菌中常见的环状双链 DNA 分子，具有自我复制能力。pBR 和 pUC 系列是常用质粒载体，pUC 系列具有多克隆位点 (multiple cloning site, MCS)，便于插入外源 DNA，常用于**定向克隆** (directional cloning)。
 - **噬菌体 (Bacteriophage / Phage):** 感染细菌的病毒。噬菌体载体感染细胞效率高于质粒转化。克隆产物不是菌落 (colonies) 而是噬菌斑 (plaques)，是噬菌体裂解细菌形成的透明区域 (clearing of the bacterial lawn)。噬菌体载体可接受较大的外源 DNA 片段 (高达 20 kb)。
 - **粘粒 (Cosmids):** 结合质粒和噬菌体 λ cos 位点的人工载体，用于克隆更大的 DNA 片段 (约 50 kb)。
 - **人工染色体 (Artificial Chromosomes):** 如酵母人工染色体 (Yeast Artificial Chromosome, YAC) 和细菌人工染色体 (Bacteria Artificial Chromosome, BAC)，用于克隆非常大的 DNA 片段。

- 载体通用结构：复制起点、抗生素抗性基因 (Antibiotic-resistant genes, 用于筛选带有载体的宿主细胞)、多克隆位点 (MCS)。

- 宿主细胞 (Host cell): 接受重组 DNA 并在其中进行复制和表达的细胞, 如细菌、真核细胞 (eukaryotes)、植物细胞 (plant cells)。

○ 基因克隆步骤 (以质粒载体为例):

1. 用相同的限制酶切割载体和外源 DNA, 产生黏性末端。
2. 将切割后的载体与外源 DNA 混合, 加入 DNA 连接酶进行连接。
3. 将连接产物导入宿主细胞 (转化 Transformation), 如通过热击 (heat shock) 或电穿孔法 (electroporation)。
4. 筛选含有重组 DNA 的克隆 (Screening)。

○ 筛选方法 (Screening):

- 抗生素筛选 (Antibiotics): 载体上的抗生素抗性基因使含有载体的细菌能在含相应抗生素的培养基上生长。
- 蓝白斑筛选 (β -galactosidase screening): 将多克隆位点插入 lacZ' 基因 (编码 β -galactosidase 的一部分) 中。外源 DNA 插入 MCS 会破坏 lacZ' 基因, 导致宿主细胞无法产生有活性的 β -galactosidase。在含有显色底物 (X-gal) 的培养基上, 无外源 DNA 插入的克隆呈蓝色 (产生有活性的 β -galactosidase), 含有外源 DNA 插入的克隆呈无色或白色 (β -galactosidase 失活)。

○ 基因文库 (Gene Libraries):

- 基因组文库 (Genomic Library): 包含一个物种基因组中所有基因的

克隆。通过限制酶将基因组切割成适当大小的片段（如 16-20 kb），并插入载体（如噬菌体载体）中构建。

- cDNA 文库 (cDNA Library): 包含**给定**细胞类型在**特定**时间所有 mRNA 的 DNA 拷贝（互补 DNA, complementary DNA, cDNA）的克隆集。
 - cDNA 合成：以 mRNA 为模板，通过逆转录酶 (Reverse transcriptase, RTase) 合成单链 cDNA，再通过 RNase H (降解 RNA-DNA 杂合链中的 RNA) 和 DNA 聚合酶合成双链 cDNA。
 - Nick Translation (**缺口平移**): *E. coli* DNA Polymerase I 可以在含有缺口 (nick) 的双链 DNA 上同时进行 5'到 3'的外切酶活性（移除 RNA）和 5'到 3'聚合酶活性（合成 DNA），从而移动缺口。

• 4.2 聚合酶链式反应 (Polymerase Chain Reaction, PCR)

- **概念：** 在试管中扩增 (amplify) 特定 DNA 区域的强大分子生物学技术。
- **原理：** 通过 30-40 个循环的三个步骤实现 DNA 的指数级扩增 (Exponential amplification)。

1. **变性 (Denaturation):** 加热使双链 DNA 解链为单链 (约 94°C)。
2. **退火 (Annealing):** 降低温度使引物 (primers) 与模板 DNA 的互补序列结合 (约 54°C)。需要一对正向 (forward) 和反向 (reverse) 引物。
3. **延伸 (Extension):** 在 DNA 聚合酶 (DNA polymerase) 作用下，以引

物为起点，利用 dNTPs 合成新的 DNA 链 (约 72°C)。

- **产物验证:** 通过琼脂糖凝胶电泳 (agarose gel) 或聚丙烯酰胺凝胶电泳 (separide gel) 验证 PCR 产物的大小和纯度。
- **反转录 PCR (Reverse Transcription PCR, RT-PCR):** 结合逆转录和 PCR 的技术，用于以 RNA 为模板扩增目的基因的 cDNA，常用于检测基因在 RNA 水平的表达。
- **实时荧光定量 PCR (Real-Time PCR / qRT-PCR):** 在 PCR 进行的同时对 DNA 扩增过程进行定量。常用的方法包括使用荧光探针 (fluorescent-tagged oligonucleotide / reporter probe) 或荧光染料 (fluorescent dye, 如 SYBR)。
 - **荧光探针法 (如 TaqMan 探针):** 探针两端分别标记报告荧光基团和淬灭荧光基团。探针完整时荧光被淬灭，PCR 延伸过程中 Taq 酶的 5'-3'外切酶活性降解探针，使报告荧光基团与淬灭基团分离而发出荧光，荧光信号累积与 PCR 产物同步。
 - **荧光染料法 (如 SYBR 染料):** 染料特异性结合双链 DNA 后发出荧光。荧光信号增加与 PCR 产物增加同步。可通过熔解曲线分析确定 PCR 特异性。

• 4.3 表达克隆基因的方法 (Methods for expressing cloned genes)

- **表达载体 (Expression Vector):** 能在宿主细胞中高效表达克隆基因并产生蛋白质产物的载体。
 - **原核表达载体 (Bacterial expression vectors):** 通常包含强启动子 (strong promoter) 和核糖体结合位点 (ribosome binding site, near an

initiating codon), 以确保高效转录和翻译。

- 可诱导表达载体 (Inducible Expression Vectors): 启动子可调控, 可在需要时开启基因表达, 避免外源蛋白过量表达对宿主细胞的毒害作用。 (e.g., 药物诱导 IPTG 或 arabinose, 热诱导 Heat-inducible)。
- **融合蛋白 (Fusion Proteins):** 通过将外源基因与载体上的基因序列融合表达产生的蛋白质。通常在外源基因 N 端或 C 端加上一个**融合标签** (fusion tag), 便于纯化 (affinity purification)。 常见的标签有组氨酸标签 (Histidine-6 tag 或 His-tag)、谷胱甘肽转移酶标签 (Glutathione transferase tag, GST)、麦芽糖结合蛋白标签 (Maltose-binding protein tag, MBP)。
- **真核表达系统 (Eukaryotic expression systems):** 在真核细胞中表达外源基因, 优点是蛋白质产物通常可溶且能进行真核细胞特有的翻译后修饰。
- **植物表达载体 (Plant expression vectors):** 用于将基因导入植物细胞并在其中表达。常用的载体基于 **Ti 质粒** (Ti plasmid), 该质粒来源于可引起植物冠瘿瘤 (crown galls) 的农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*)。Ti 质粒上的 T-DNA 区域可转移到植物细胞基因组中。 利用改造的 Ti 质粒, 将目的基因插入 T-DNA 区域, 通过农杆菌介导转化植物细胞, 实现基因转移和表达。

笔记结构建议

可以按照以下结构整理笔记, 每个部分包含相应的概念、工具、步骤、类型、特点和应用等详细信息:

第四章 分子克隆方法 (Molecular Cloning Methods)

- 引言: 什么是基因克隆? 为什么要克隆基因?

- 定义：基因克隆 (Gene cloning)
- 目的：研究基因结构功能，生产蛋白质产品 (e.g., Human insulin, blood clotting factor)

• 4.1 基因克隆 (Gene Cloning)

- 定义：Clone, Gene cloning
- 目的：Isolation, Amplification, Manipulation
- 关键工具：
 - 限制性核酸内切酶 (Restriction Endonucleases)
 - 概念 ("分子剪刀")
 - 生理意义
 - 命名规则 (e.g., EcoRI, HindIII)
 - 限制-修饰系统 (R-M system)
 - 识别序列 (Palindrome)
 - 切割方式 (Blunt-end, Staggered/sticky ends)
 - Isoschizomer, Neoschizomer, Isocaudamer
 - 连接酶 (Ligase)
 - 载体 (Vector)
 - 概念，功能 (DNA carrier, replication)
 - 通用结构 (Origin of replication, Antibiotic-resistant genes, MCS)
 - 类型：Plasmids (pBR, pUC), Phages, Cosmids, Artificial

Chromosomes (YAC, BAC)

- 宿主细胞 (Host cell)

。 基因克隆步骤 (以质粒为例)

- 切割 (Cutting)
- 连接 (Ligation)
- 导入 (Transformation)
- 筛选 (Screening)
 - 抗生素筛选 (Antibiotics)
 - 蓝白斑筛选 (β -galactosidase, X-gal)

。 基因文库 (Gene Libraries)

- 基因组文库 (Genomic Library)
- cDNA 文库 (cDNA Library)
 - cDNA 合成 (RTase, RNase H, DNA polymerase)
 - Nick Translation

• 4.2 聚合酶链式反应 (Polymerase Chain Reaction, PCR)

。 概念, 目的 (Amplify specific DNA region)

。 原理 (3 steps, 30-40 cycles)

- 变性 (Denaturation)
- 退火 (Annealing), 引物 (primers)
- 延伸 (Extension), dNTPs, DNA polymerase

- 产物验证 (Agarose gel electrophoresis)
- RT-PCR (Reverse Transcription PCR)
 - 区别于常规 PCR, 应用 (detect gene expression at RNA level)
- 实时荧光定量 PCR (Real-Time PCR / qRT-PCR)
 - 概念 (Quantifies amplification)
 - 方法: 荧光探针 (reporter probe), 荧光染料 (SYBR)

• 4.3 表达克隆基因的方法 (Methods for expressing cloned genes)

- 表达载体 (Expression Vector)
 - 概念, 功能 (Yield protein products)
 - 原核表达载体 (Bacterial expression vectors) - Strong promoter, Ribosome binding site
 - 可诱导表达载体 (Inducible Expression Vectors) - Inducible promoter (drug-inducible, heat-inducible), 优点
- 融合蛋白 (Fusion Proteins)
 - 概念, 目的 (Purification)
 - 融合标签 (fusion tag): His-tag, GST, MBP
- 真核表达系统 (Eukaryotic expression systems) - 优点 (soluble, post-translational modification)
- 植物表达载体 (Plant expression vectors)
 - 基于 Ti 质粒 (Ti plasmid)

- *Agrobacterium tumefaciens*, T-DNA
- 转化植物细胞