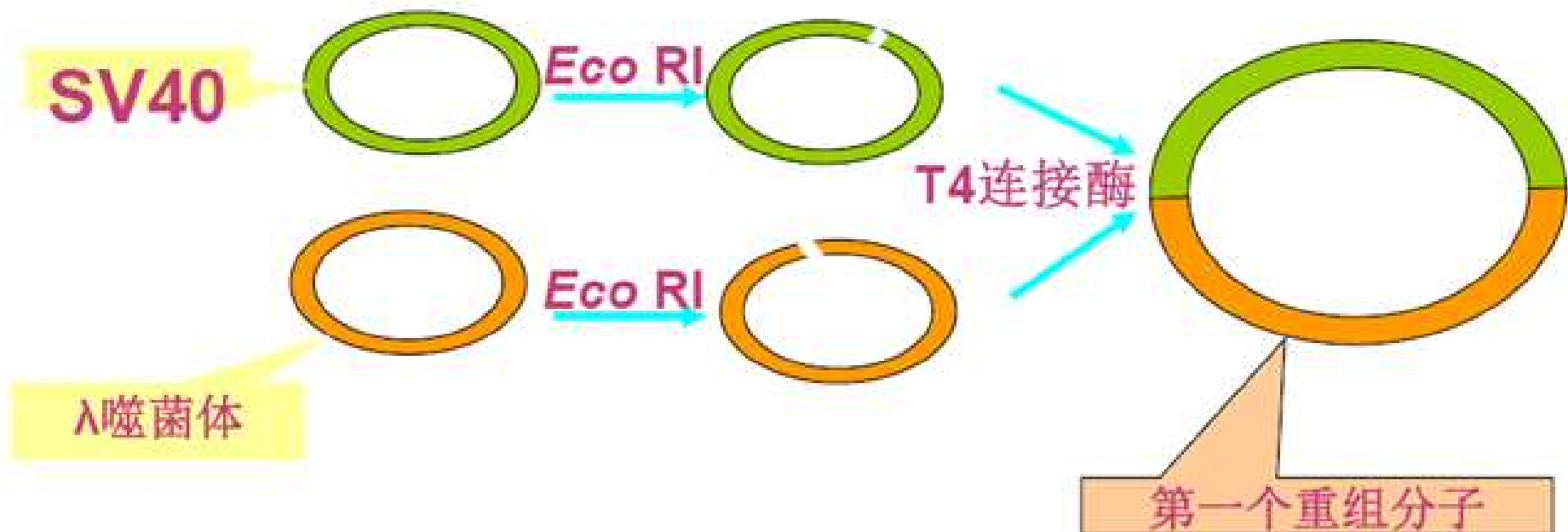
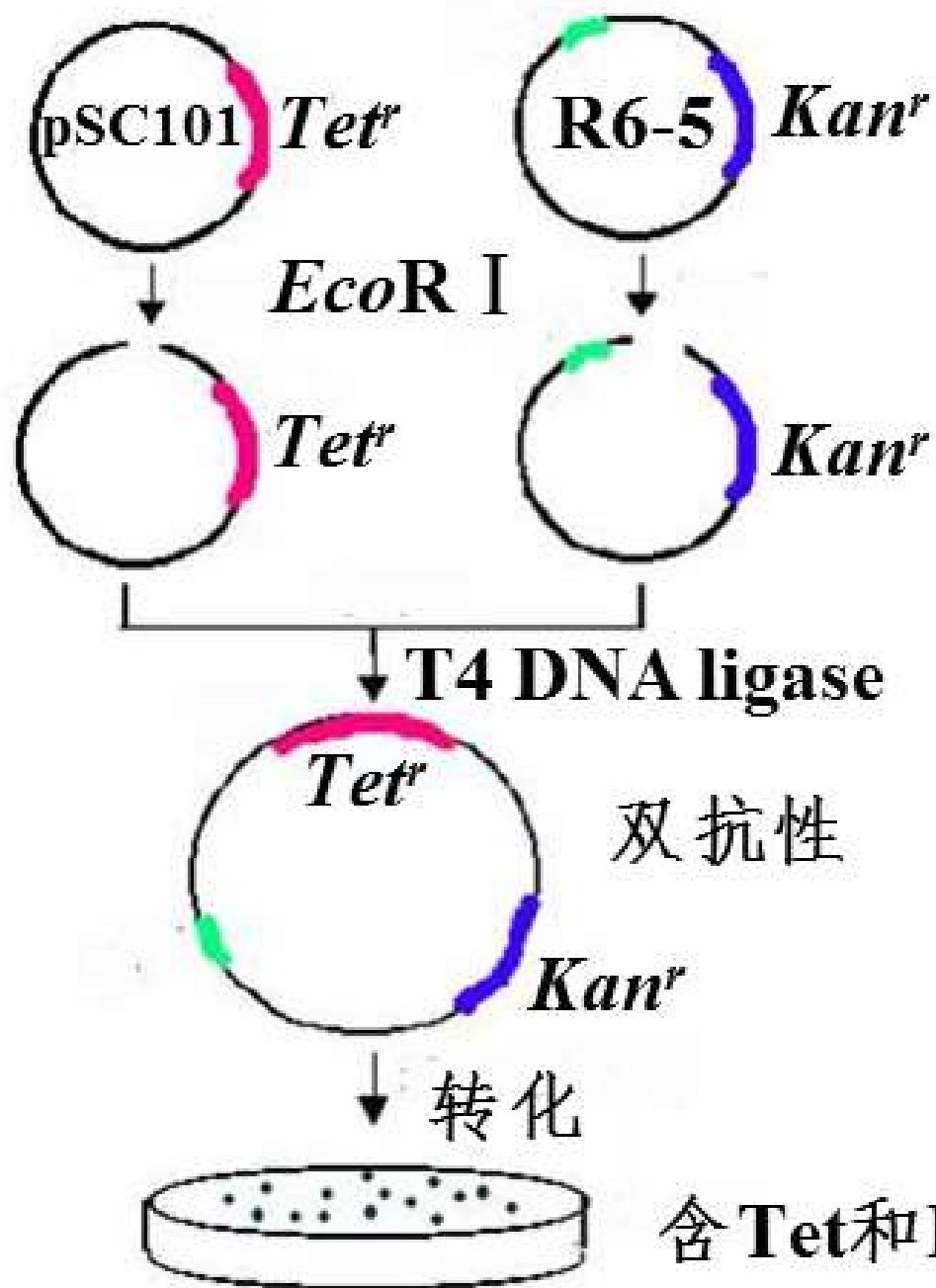


Chapter 4 DNA cloning

- 1972年，斯坦福大学P. Berg小组，世界首例DNA体外重组。



1980 Nobel Prize in Chemistry



- 1973年，斯坦福大学S. Cohen小组，DNA体外重组并转化成功（第一个基因克隆实验）。

基因工程的诞生

- **DNA cloning** is the process that the **foreign DNA** is inserted into an autonomously replicating piece of DNA, known as a **vector**, forming **recombinant DNA** which then is introduced into a **host** cell. Growing the host cell containing the recombinant DNA allows the production of multiple copies of the inserted DNA.

把**外源DNA**片段连接到具有自主复制能力的**载体DNA**中，形成**重组DNA**，再将这种**重组DNA**导入到**宿主细胞**中增殖，从而使插入片段得到扩增，这个过程称为**DNA克隆**。

gene cloning (基因克隆)

molecular cloning (分子克隆)

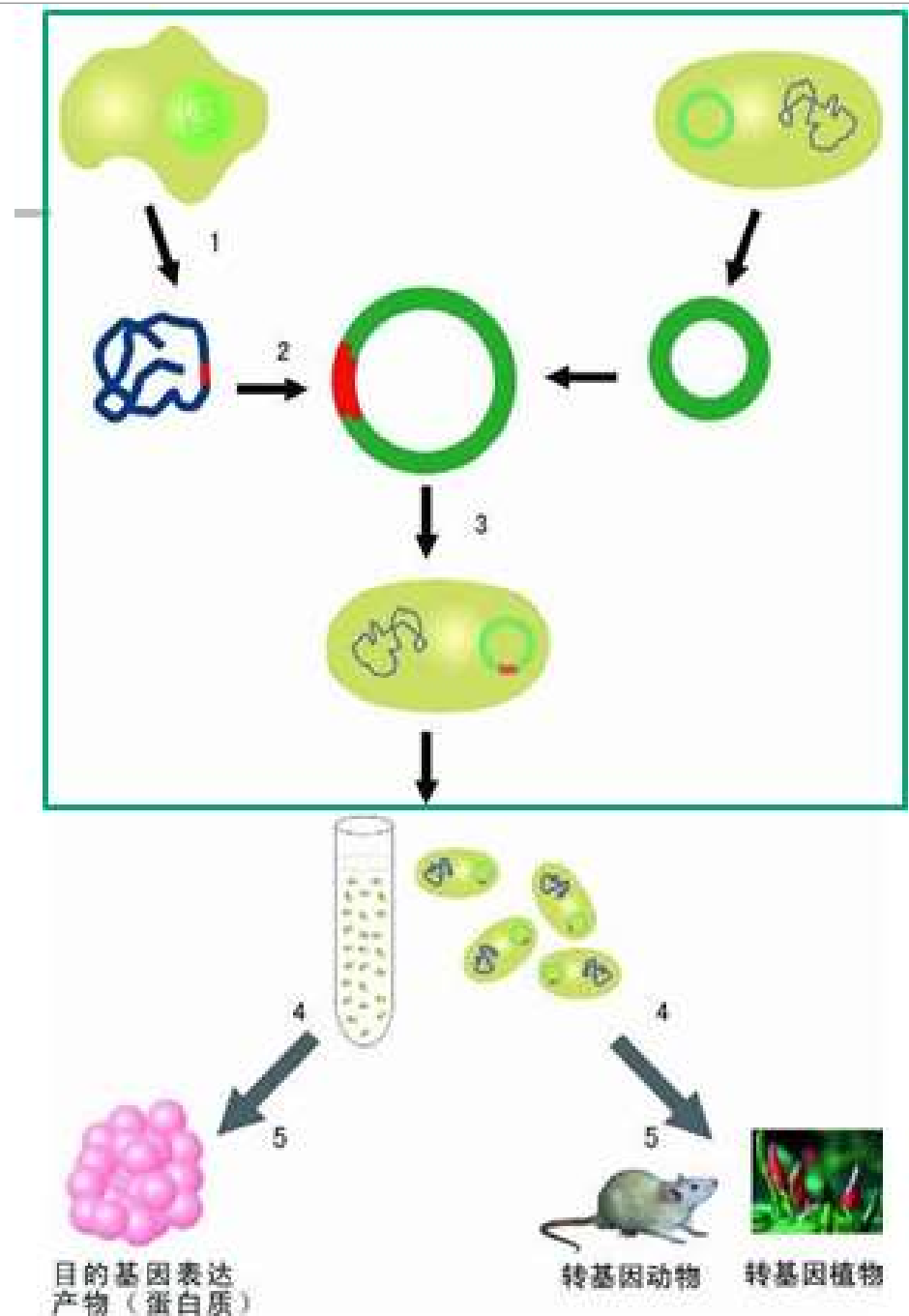
recombinant DNA technology (重组 DNA 技术)

基因工程

(gene engineering)
或遗传工程

(genetic engineering) :

基因工程是指重组DNA技术的产业化设计与应用，包括上游技术和下游技术两大组成部分。上游技术指的是基因重组、克隆和表达的设计与构建（即重组DNA技术）；而下游技术则涉及到基因工程菌或细胞的大规模培养、基因产物的分离纯化以及转基因动植物的应用等。





1. Vectors and enzymes in DNA cloning

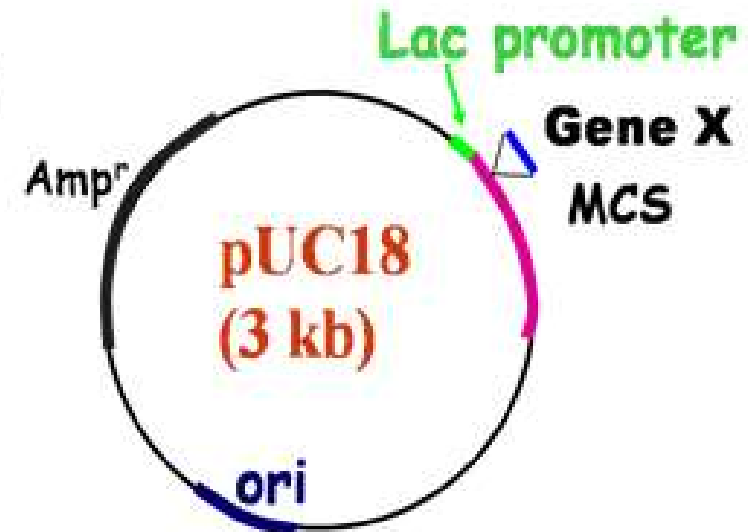
1.1 Vectors

- **Vectors** are **autonomously replicating** pieces of DNA which used to transfer the target gene to a receptor cell.

载体是将DNA片段（目的基因）转移至受体细胞的一种能**自我复制**的DNA分子。

1.1.1 Characteristics of vectors

- (1) Autonomously replicating
(有复制起始点)
- (2) Can be introduced into a host cell
- (3) Have a selectable marker
(筛选标记) 通常是抗性基因
- (4) Have **multiple cloning sites**
(MCS, 多克隆位点) 并且是**多酶单切点**。



如果是表达载体，
还需要启动子等
表达元件。



1.1.2 Types of vectors

(1) Plasmids (质粒)

- Circular plasmid of *E.coli* used in *E.coli* (host, 宿主);
- Yeast episomal (游离型) plasmids: used in yeast;
- Agrobacterium tumefaciens (根瘤农杆菌) Ti plasmid: used in plant.

(2) Bacteriophages (噬菌体)

- Phage λ : also been used in *E.coli*, for cloning larger fragments (10~20 kb)
- Phage M13: used to clone ssDNA used in *E.coli*

(3) Cosmids (粘粒/柯斯质粒)

- Plasmid-bacteriophage hybrids, for cloning large fragments (45~50 kb) in *E. coli*.

(4) Artificial chromosomes

For **cloning huge fragments from humans**.

- BAC: Bacterial artificial chromosomes (in *E. coli*);
- YAC: Yeast artificial chromosomes (in Yeast).

(5) Virus

For other eukaryotic cells in culture

- SV40: Simian virus 40 (猴空泡病毒40);
- Retroviruses

1.2 Restriction endonuclease

限制性内切核酸酶

- Restriction-modification system

防禦外源DNA侵入

{ Restriction endonuclease
Methylase(甲基化酶)

保护宿主DNA
不被内切酶降解



The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1978

"For the discovery of restriction enzymes and their application to problems of molecular genetics"



Werner Arber

🏆 1/3 of the prize

Switzerland

Biozentrum der
Universität
Basel, Switzerland



Daniel Nathans

🏆 1/3 of the prize

USA

Johns Hopkins University
School of Medicine
Baltimore, MD, USA

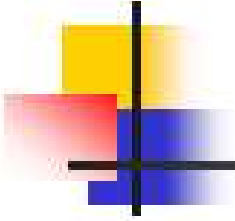


Hamilton O. Smith

🏆 1/3 of the prize

USA

Johns Hopkins University
School of Medicine
Baltimore, MD, USA



- **Restriction endonucleases** cleave **double-stranded DNA** at or near **specific recognition nucleotide sequences** known as **restriction sites**.

限制性内切核酸酶是指能识别一种**特定的核苷酸序列**(即**限制性位点**)，并在该**限制性位点或附近切断双链DNA的核酸酶**。

1.2.1 Denomination (命名) of restriction endonuclease

限制性内切酶的命名是根据Smith和Nathans于1973提议的命名系统



Escherichia coli RY13

大肠埃希菌RY13株中发现的第一种限制性核酸内切酶

1.2.2 Types of restriction endonuclease

	I 型	II 型	III 型
限制和修饰活性	多功能的酶(限制、修饰、ATPase)	只有限制	限制和修饰
组成	不同亚基 $\alpha \cdot \beta \cdot \gamma$ 300KD	单一成分, 2-4个相同亚基 200-100KD	2种不同的亚基
辅助因子	ATP、 Mg^{2+} S-腺苷-Met	Mg^{2+}	ATP、 Mg^{2+} S-腺苷-Met
识别位点和切点	两者不一致, 切点随机距识点一侧数百至上千bp处	旋转对称的识别位点, 两者一致	两者不一致, 切点在识点一侧20bp
克隆中的作用	无用	十分实用	有用(修饰)
实例	<i>EcoB</i> : TGA N_8 TGCT <i>EcoK</i> : AAC N_6 TGC	<i>EcoR</i> I —GAATTC— CTTAAG	<i>EcoP</i> I AGACC—

1.2.3 Characters of Type II restriction endonuclease

(1) Recognition sequences (识别序列)

➤ 4~8 bp

识别序列的频率 = $1/4^n$

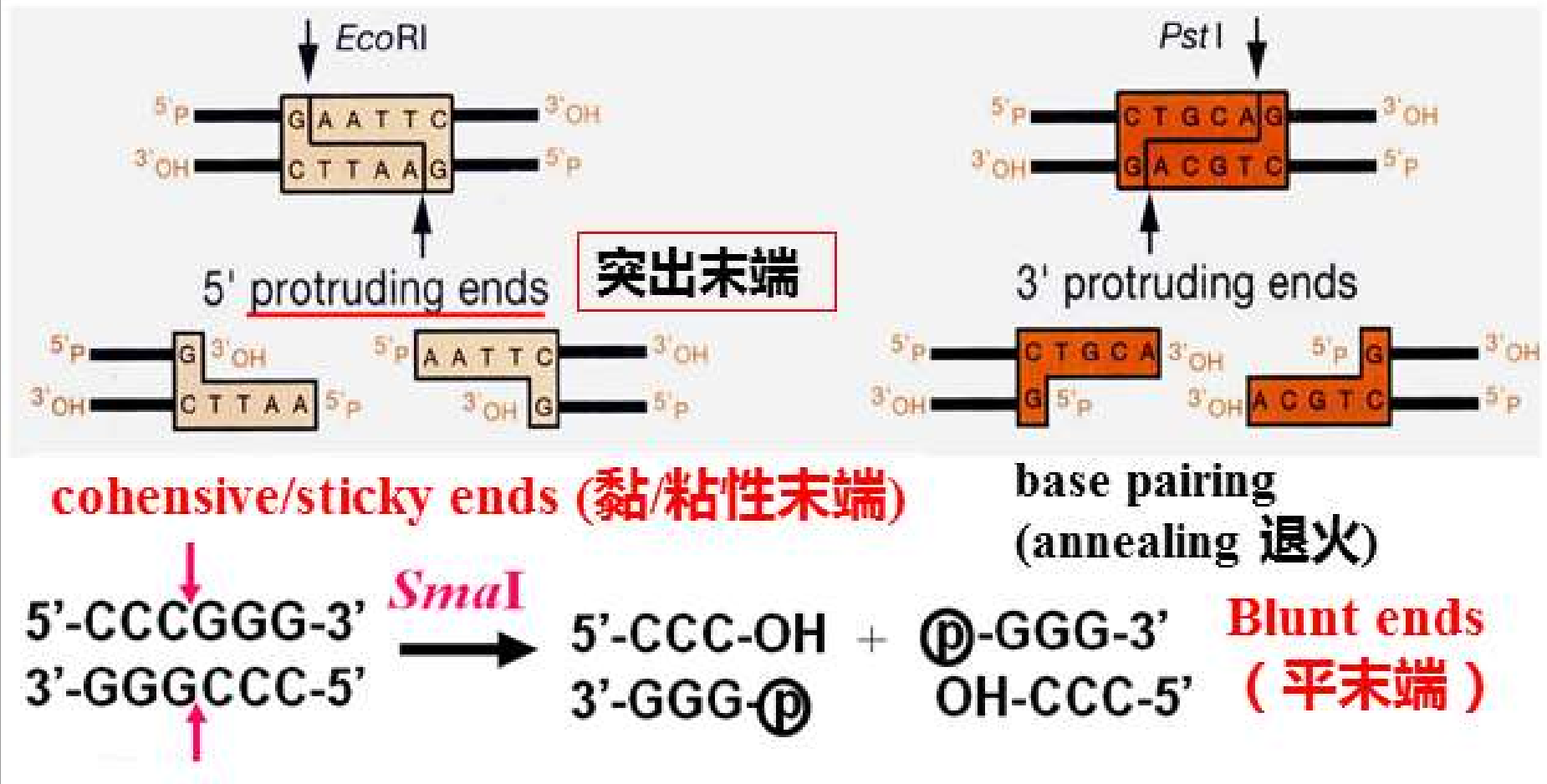
➤ Palindromic (rotational symmetry)



回文结构
(旋转对称)

(2) Restriction fragments (酶切片段)

切割位点在其识别序列上，产生末端的形式有两类：粘性末端片段（5'或3'）、平末端片段。



1.2.4 Isoschizomer and isocaudamer

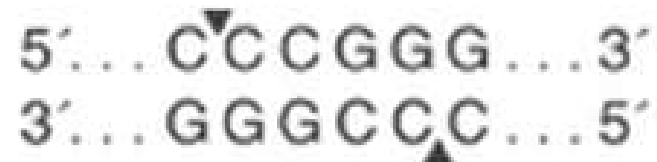
(1) Isoschizomer (同裂酶)

同裂酶：来源不同，但能识别相同的核苷酸序列的限制性酶。

SmaI



XmaI



如果是-CC*GG-则*HpaII*不能切，但*MspI*可切。
*甲基化

(2) Isocaudarmer (同尾酶)

同尾酶：来源不同，识别序列不同，但却能产生相同粘性末端的一类酶。

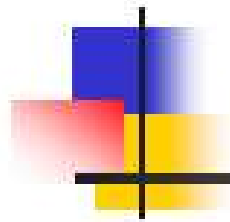


同尾酶产生的片段，因具备相同的粘性末端，故可以通过碱基互补作用而彼此连接起来。但连接后形成的杂种位点往往不能被这两个同尾酶所识别。*Bam*HI和*Sau*3AI两种酶产生的片段连接后其杂种位点能被*Sau*3A所识别，而不能被*Bam*HI所识别（识别机率只有25%）（杂种位点为：NGATCC）



1.2.5 Conditions of restriction digestion

- (1) Require **Mg²⁺** (magnesium) usually up to 10 mM;
- (2) Different enzymes require **different pH**, **NaCl** (sodium chloride) concentrations and other solution constituents.

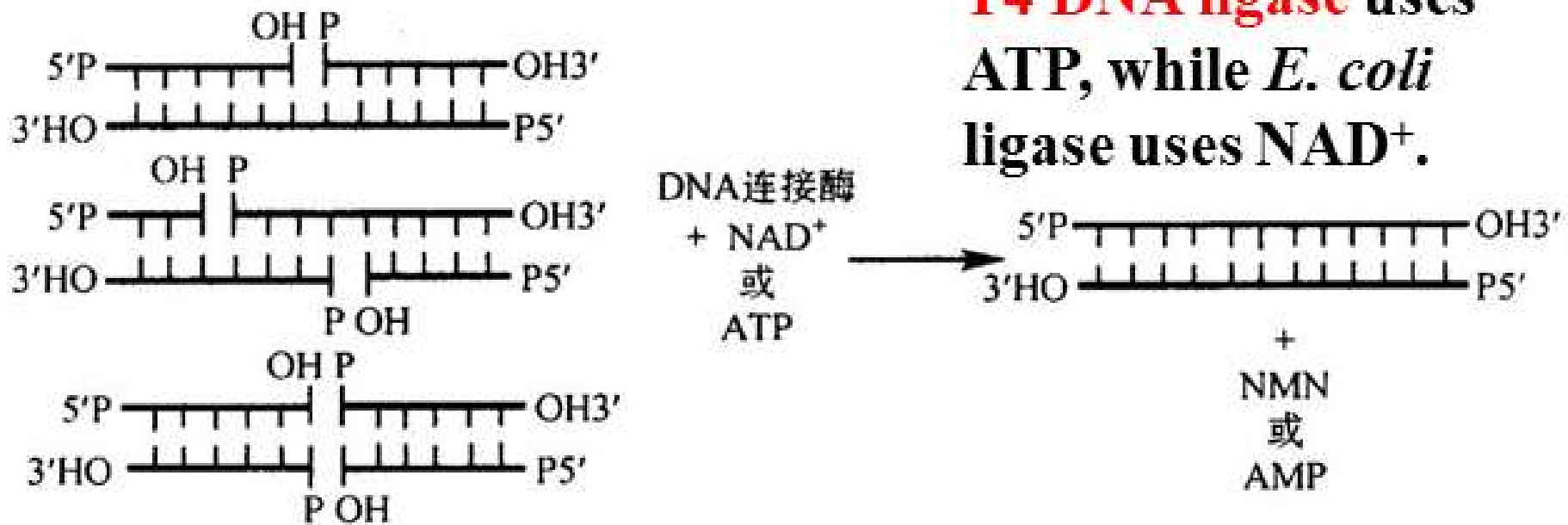


1.2.6 Factors that influence activity of restriction endonuclease

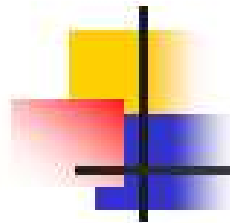
- (1) The purity (纯度) of DNA
- (2) Methylation degree of DNA
- (3) Digestion temperature (37°C)
- (4) Buffer (ion type, concentration, pH, etc.)

在非标准反应条件下,也能切割一些与其特异识别序列类似的序列。在酶的名称右上角加一个星号(*)表示,如*EcoR* I *。这种特性称为**星号活性**。

1.3 Ligase



- Ligases are **efficient** at sealing the broken phosphodiester bonds for **cohesive ends**. T4 ligase can even ligate one **blunt end** to another, but with rather **lower efficiency**.



1.4 Other tool enzymes

DNA聚合酶 I（制备探针）

Taq酶（PCR）

反转录酶（合成cDNA）

末端转移酶（制备探针、人工接头）

核苷酸激酶（制备探针）

碱性磷酸酶（防止载体酶切后重连）

.....