

λ 噬菌体及其在遗传工程中的应用 (三)

劳 为 德

(中国科学院生物物理研究所三室)

五、DNA 繁殖载体的设计

由于对 λ 噬菌体的遗传学和生物化学进行了较为广泛、深入的研究,人们目前已能比较得心应手地将 λ 噬菌体作为基因移植的运载体。这是因为,在 λ DNA 分子中,大约有 1/3 的片段是可以被置换而不致丧失其裂解生长的能力;利用内切酶这种工具刀,可以把这 1/3 “可有可无”的 DNA 片段切去;而加入(或置换上)一个外源 DNA;还可以利用点突变、置换或缺失的方法改变其内切酶位点。因此它在遗传工程中占有很突出的地位。

1. 利用和改造 λ 噬菌体限制性内切酶位点构成能接受外源 DNA 的载体噬菌体

我们知道,利用 II 类内切酶切割 DNA 分子而产生的粘性末端,可以在离体条件下将两种或两种以上的 DNA 分子连接成杂交的 DNA 分子,只要这种杂交分子中含有能自我繁殖的

片段(运载体),该杂交分子就有可能在细胞内进行繁殖。

有一些 λ 突变体缺失了内切酶 $EcoRI$ 中间的两个片段(B 和 C)仍然可以存活。用内切酶 $EcoRI$ 切割 λ DNA,再用 DNA 连接酶随机地进行连接,再把连接后的 DNA 去感染大肠杆菌,可以筛选出缺乏 B, C 片段的存活下来的噬菌体,说明 B, C 片段是裂解生长所不必需的。因此可以在 B, C 片段的地方嵌入外来的 DNA 片段。一般为了有利于这种嵌入,需要通过突变来把最右端的两个 $EcoRI$ 切点消除。

2. 限制位点突变体的筛选

要想得到所希望的噬菌体类型,一般需要进行诱变、杂交和筛选的工作。这里举些例子说明。

图 19 中 (b) 这种噬菌体 $\lambda a200$, b189, bio69, cI857 及 nin5 是通过杂交、重组,最后在 0.1 M Na-Ac 缓冲液 (pH 4.6), 50 mM NaNO₃

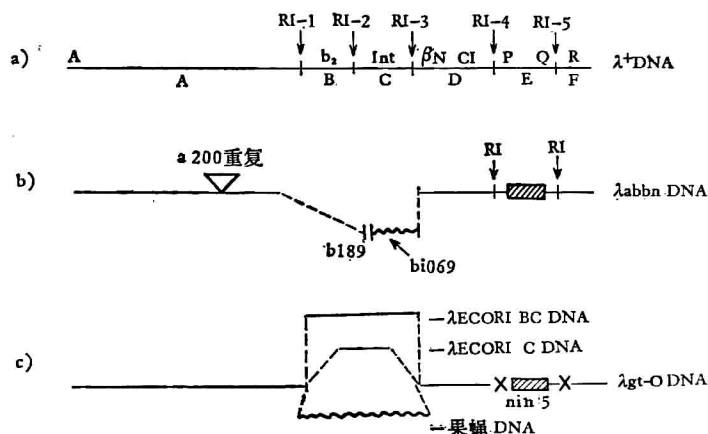


图 19 $\lambda gt-10C$ 的构成

- a) λ DNA 的 $EcoRI$ 位点,线字母 A 至 F 为 $EcoRI$ 片段,线上的字母为 λ 基因;
- b) a200, b189, bio69, cI857, nin5 DNA 的结构(简称 $\lambda abbn$ DNA);
- c) $\lambda gt-10C$, $\lambda gt-10$ 和 $\lambda gt-果蝇$ DNA 的结构

中,25℃下诱变产生的(其存活率减低 10^{-3})。其中 λ b189置换删掉了1和2这两个位点, λ bio69置换删去了3这个位点,这两个取代都没有增加新的限制位点。因此重组体 λ b189, bio69, c1857及nin5中,1、2、3这三个限制位点就都删去了,只剩下4和5位点。但是因为这个噬菌体已经缺失27%,因此不容易繁殖,需要在左臂上嵌入一个重复顺序(a200)以便维持适当的总长度。

现在 λ abbn剩下了4,5这两个位点。这两个位点要一个个地删去。已知要删去限制位点,其限制效率必需是限制位点的函数。在只含有EcoRI限制系统的大肠杆菌中可以测定非修饰的 λ 缺失和置换突变体的平板效价。一般说来,平板效价(E)的对数是EcoRI位点数(R)的线性函数,关系式是

$$\log E = -0.88 R$$

为了要知道并得到限制位点上发生的突变,需要反复用不含限制系统和含限制系统的菌株来繁殖噬菌体。将 5×10^6 的 λ abbn噬菌体在不含限制系统的Ecoli K株上(如W3350)生长,然后在含EcoRI限制系统的K/RI株上生长,测出其限制比率

$$R^{RI}(\text{限制比率}) = \frac{\text{在K株上的效价}}{\text{在K/RI株上的效价}}$$

这样反复多次,直到限制比率增加至1,说明限制位点发生了突变。要消除位点4(4上发生突变),要如此进行八次连续的筛选;删去位点5(或使5位点上发生突变),要进行5次筛选。

λ abbn中,a200, b189, bio69的引入,目的是使遗传选择的压力对着位点4与5。除去位点4,5之后,还需重新引入位点1,2,3,以便构成一个有用的载体。这时,我们可以通过它跟 λN^- 的毒株杂交,选择出在 β 与N发生重组的标志,得到一个野生型置换的重组体,这样就得到通用转导体 $\lambda_{gt}-\lambda BC$;内切酶EcoRI在位点1,2,3上切割得到4个片段。中间两个片段B和C是裂解生长所不必需的,但保留其中一个片段可以使之成斑。因此EcoRI-B片段可以用生化方法除去,这就是在琼脂糖制备电

泳上将左右两端的片段和EcoRI-C片段分离出来,混合后用连接酶进行共价连接,去感染非限制的C600 $rK^- mK^-$ 大肠杆菌细胞,这样,可以得到两种类型的噬菌体。一种是EcoRI-C片段跟 λ^+ 方向相同(称为 $\lambda_{gt}-\lambda C$),另一种是跟EcoRI-C片段相反(称为 $\lambda_{gt}-\lambda C'$)。这两种DNA经EcoRI切割后,其产物在琼脂糖上是区别不出来的。但 $\lambda_{gt}-\lambda C'$ 是 red^- ,噬斑比 $\lambda_{gt}-\lambda C$ 小。 $\lambda_{gt}-\lambda C$ 以及 $\lambda_{gt}-\lambda C'$ 所含的EcoRI-C片段中,因为具有 λ 附着位点,及int和xis基因,所以无论是 $\lambda_{gt}-\lambda C$ 或 $\lambda_{gt}-\lambda C'$ 都可以形成稳定的溶原菌;有趣的是,虽然 $\lambda_{gt}-\lambda C'$ 中附着位点int和xis基因是反向的,仍然能形成稳定的溶原菌,这种反向溶原菌可以诱导形成噬菌体,带有 λ EcoRI-C片段的噬菌体在EMBO(伊红、甲基蓝不加糖)平板上形成浅色菌落,不含 λ EcoRI-C而只含外源DNA片段的 λ_{gt} 杂交噬菌体在EMBO中形成暗色菌落,因为它是一种无效溶原(或流产溶原)。 λ_{gt} 的繁殖容量最大为17000碱基对,一般为1000—14000碱基对。

上面我们通过通用转导体 λ_{gt} 的构成方法说明了用 λ 噬菌体来设计DNA繁殖运载体的方法。目前已经设计出各种各样的 λ 载体噬菌体。从这些 λ 载体中,我们可以归纳几个设计 λ 载体的一般性原则:

(1) 设计 λ 载体时,一般是在 λ 基因组中段上着眼和着手,这一部分约占 λ DNA的三分之一,可以取代而不丧失其裂解生长的能力。

nin缺失在 λ 图右端,也不影响其正常生长,引入nin缺失可以增加载体容纳外源DNA的量约5.4%。

(2) 用遗传学方法,在野生型上引入点突变、取代或缺失来改变限制位点的分布,删除必需区段的限制位点。

(3) 载体的设计要考虑到利于重组噬菌体的鉴定。一般通过以下途径:①成斑能力。已如上述。②引入有功能指示的取代。如引入Lac5取代,Lac5带有大肠杆菌 β -半乳糖苷酶基因。如果在平板上含有成色物5-氯-4-溴-3-吡啶基- β -D半乳糖苷(代号XG,80微克/毫升)

时,带有 Lac5 的噬菌体会显示出亮蓝色(靛蓝)噬斑(在 Lac⁻ 菌上)。

为了利用这一反应来显示纯系繁殖的成效,有必要了解蓝斑形成的机制。在 Lac5 中,促进子、操纵子和 α 基因是左向的, EcoRI 位点是在 α 基因上,即于该取代左端的 200 个碱基对内。用某种方法,将 Lac5 用 EcoRI 切后,反转过来而重新嵌入,这样 α 基因被破坏了。然后用 Lac⁺ 和 Lac⁻ 指示菌铺在 XG 平板上。结果发现,蓝斑取决于指示菌的 Lac 基因型和噬菌体的 Lac 基因型。含有正常排列的 Lac5 的噬菌体总是深蓝色,而 Lac5 除去时是无色。但是 α 基因破坏后的噬菌体在 Lac⁺ 菌上显淡蓝色,在 Lac⁻ 菌上为无色。因此结论是:蓝斑的形成可以是由于噬菌体的 β -半乳糖苷的直接表达所致,也可以是间接地由于噬菌体生长时产生多拷贝的 Lac 操纵子 DNA 跟细胞的 Lac 阻遏物结合,致使细菌 Lac 操纵子去阻遏。

除了 Lac 取代外,也可以用 bio 取代来鉴定 bio 功能。

此外,如果外来 DNA 在 red 基因上嵌入(由于 red 基因正好有一个内切酶位点),则噬菌体就不能在 polA⁻ 的菌上生长。

(4) 安全方面的考虑。从载体设计的角度去考虑安全问题,重要的是使它能高产量地生长,这样可以小体积培养。现在培养方法上有所改进,即用所谓预吸附-稀释-摇荡法(preadsorb-dilute-shake method)进行繁殖。此方法是:将噬菌体(成斑单位为 10⁵ 至 10⁷)跟 0.3 至 1.0 毫升静止期细菌培养物混合,加等体积 0.01M MgCl₂, 然后在 37℃ 保温 10 分钟;混合液稀释进 NZY 或 NZYDT 汤中, 37℃ 摇过夜。

NZY 汤每升含: NZamine (一种水解酪蛋白) 10 克;酵母浸膏 15 克; NaCl 5 克; MgCl₂ · 6H₂O 2 克。

NZYDT 汤是除了 NZY 外,加入 0.04 克胸腺嘧啶核苷, 0.1 克二氨基庚二酸。用 Bactotryptone 代替 NZamine 效果不佳。

其次,在载体噬菌体的关键基因上造成条件致死突变,使之减少它遇到敏感寄主,从而减

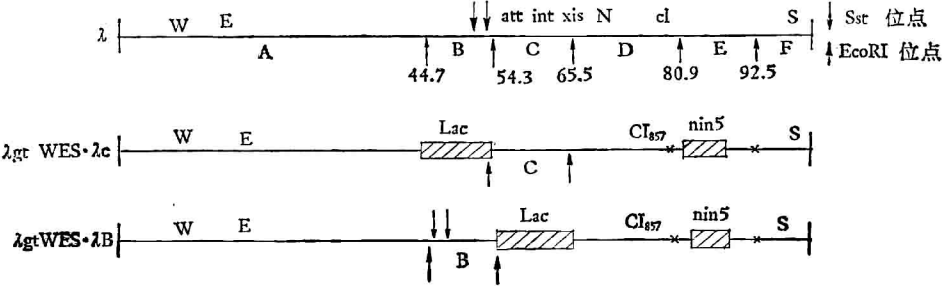


图 20 适于作高等生物 DNA 纯系繁殖的两个 λ 载体

线上的字母代表 λ 基因,线下的字母代表 λ DNA 的 EcoRI 内切酶限制片段。线上的箭头代表 Sst 内切酶作用位点,线下的箭头为 EcoRI 内切酶作用位点。λgtWES-λC 这一载体基本上是在 λgt-λC 中引入了 Wam403, Eam1100 和 Sam100 三个突变,而 λgtWES-λB 也同样地由 λgt-λB 改造而成

少在自然界存活的机会。例如,在上面提到过的通用转导体 λgt 中,引入三个琥珀型突变——Wam 403, Eam 1100, 和 Sam 100 (见图 20)。E 基因在正常情况下是负责合成噬菌体的外壳蛋白质的(图 21),其产物对于已合成的 DNA 切成粘性末端所必需;Eam 1100 突变后,不形成噬菌体头,并且 DNA 也不被切成粘性末端;W 蛋白是负责将头尾连接成一完整的噬菌体, Wam

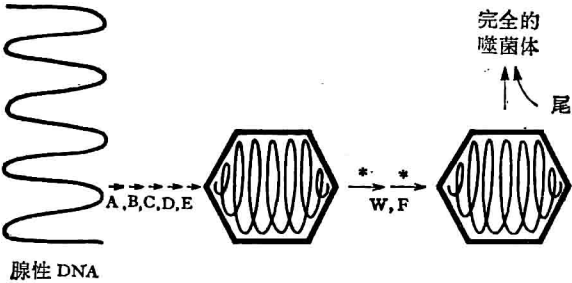


图 21 λ 头部形态发生的步骤 * 为离实验

403 这种突变使头尾无法连接; Sam 100 是我们已知的,它跟 Sam 一样,使细胞不裂解,从而不释放出噬菌体。W和E的琥珀型突变可以被几种削正基因削正(包括 SupE),但S突变用 SupE 则无效,需要专一的削正基因 SupF 才能削正。因此这种载体可以用 SupE 菌株大量繁殖。

另外,正如前面说过的, λ gt- λ C 是带有专一性重组基因的。在引入外来 DNA 时,为了安全起见,一般需把头尾两段单独分出,然后去跟外来 DNA 重组。如果我们把 λ gtWES- λ C 中的 λ C 用 λ B 代替,即可直接进行重组实验而符合安全条例。

结 束 语

多年来,尤其是近十几年来,在遗传、突变的分子机理,核酸与蛋白质的相互作用,基因的表现与阻遏以及结构与功能的研究等分子生物学各领域中, λ 噬菌体已普遍成为选材和研究对象。 λ 噬菌体遗传学的基础研究也日益深入。同时由于 λ 噬菌体的各种突变体和转导体较易于诱导和构成,在基因工程中是一个很好

的运载工具,从而有利于增殖和研究其它生物来源(原核或真核)的特定基因的结构和表现。所以无论是 λ 噬菌体本身,或是作为一个载体所涉及的问题都相当广泛,本文只略涉其一面。成文后又见有不少很好的研究工作报告和文献综述,特别是某些基因或识别位点的结构与功能等方面的研究又有新的进展,这也可见分子生物学发展之迅速。

主要参考文献

- [1] Hershey, A. D.: The Bacteriophage Lambda, Cold Spring Harbor Laboratory, 1971.
- [2] Watson, J. D. et al.: Molecular Biology of the Gene, 3rd edition, 1976.
- [3] Mathews, C. K.: Bacteriophage Biochemistry, Van Nostrand Reinhold Company, New York, 1971.
- [4] Maniatis, T. et al.: Cell, 5, 109, 1975.
- [5] Humayun, Z. et al.: Nucleic Acids Res., 4 (5), 1595, 1977.
- [6] Ranbach, A. et al.: Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 71(10), 3927, 1974.
- [7] Thomas, M. et al.: Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 71(11), 4579, 1974.
- [8] Blattner, F. R. et al.: Science, 196, 161, 1977.

[全文完。本文于1977年10月7日收到]

免 疫 核 糖 核 酸

——转移免疫信息的物质

陈 诗 书 等

(上海第二医学院生化教研组)

致敏淋巴细胞含有两类转移免疫信息的物质,一类为可透析的转移因子(Transfer factor, TF);另一类为不可透析的免疫核糖核酸(Immune RNA, iRNA),这是两类具有重要潜能的免疫触发剂和免疫调节剂。本文介绍 iRNA 的性质、作用原理及实际应用,并讨论 iRNA 与 TF 的关系。

一、免疫核糖核酸的发现与进展

早在1940年, Landsteine 和 Chase 发现致敏

豚鼠的淋巴样细胞能将迟发型变态反应转移给非致敏豚鼠,这是人们首次发现细胞免疫的转移现象。H. S. Lawrence (1949)将结核菌素阳性反应人(供体)的活白细胞,皮下注射于反应阴性人(受体)的身上,能使受体迅速出现结核菌素的阳性反应,说明人的白细胞能转移迟发型变态反应。接着他进一步发现,这种转移免疫信息的物质是一种可透析的小分子物质,称为TF,它可能具有多核苷酸和/或多肽的组成,对脱氧核糖核酸酶(DNase)、胰核糖核酸酶(RNase)