



全国工程硕士专业学位教育指导委员会推荐教材

Genetic Engineering
Principles, Methods and Applications

基因工程

原理、方法与应用

许煜泉 白林泉 黄显清 杨立桃 编著

<http://www.tup.com.cn>

清华大学出版社

全国工程硕士专业学位教育指导委员会推荐教材

Genetic Engineering
Principles, Methods and Applications

基因工程
原理、方法与应用

许煜泉 白林泉 黄显清 杨立桃 编著

清华大学出版社
北京

内 容 简 介

基因工程是建立在基因分子生物学的理论基础上发展起来的一门年轻学科。本教材首先以基因的信息流为线索,对基因的复制、转录、翻译以及基因表达调控的分子生物学理论作了系统介绍。在此基础上,详细讨论基因克隆的工具、基因操纵和重组技术、重组基因导入各种生物体的方法以及转基因生物中目的基因的监测及分析技术;同时,全面地介绍了基因工程对分子生物学的理论研究,在重组蛋白的合成以及医学、农业和法医学等各领域的应用中所取得的最新发展和成就。最后,讨论了转基因产品和生物技术对人体健康、环境安全以及伦理学上可能产生的危害及争论。

本书作为工程硕士专业基因工程的核心教材,也可供各相关专业和学科的教师、学生和科研工作者参考。

版权所有,侵权必究。侵权举报电话:010-62782989 13701121933

图书在版编目(CIP)数据

基因工程:原理、方法与应用/许煜泉等编著. —北京:清华大学出版社,2008.12
(全国工程硕士专业学位教育指导委员会推荐教材)

ISBN 978-7-302-18597-0

I. 基… II. 许… III. 基因—遗传工程—研究生—教材 IV. Q78

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2008)第 145324 号

责任编辑:柳 萍

责任校对:刘玉霞

责任印制:孟凡玉

出版发行:清华大学出版社

地 址:北京清华大学学研大厦 A 座

<http://www.tup.com.cn>

邮 编:100084

社 总 机:010-62770175

邮 购:010-62786544

投稿与读者服务:010-62776969, c-service@tup.tsinghua.edu.cn

质 量 反 馈:010-62772015, zhiliang@tup.tsinghua.edu.cn

印 刷 者:北京季蜂印刷有限公司

装 订 者:北京市密云县京文制本装订厂

经 销:全国新华书店

开 本:185×230 印 张:20.5

字 数:443 千字

版 次:2008 年 12 月第 1 版

印 次:2008 年 12 月第 1 次印刷

印 数:1~4000

定 价:39.00 元

本书如存在文字不清、漏印、缺页、倒页、脱页等印装质量问题,请与清华大学出版社出版部联系调换。

联系电话:010-62770177 转 3103 产品编号:028076-01

序

自 1953 年 Watson 和 Crick 提出 DNA 双螺旋结构模型以来,在生命科学的研究中孕育并发展出了一门崭新的学科——分子生物学。在过去的半个多世纪中,分子生物学家们以独特的创新理念,对生物学领域中的各种现象和运动规律展开了深入细致的研究和探索,极大地加深了人们对生命奥秘的了解,带动了整个生命科学研究的突飞猛进,组成了当今世界知识爆炸的一个主基调,取得了举世瞩目的伟大成就。

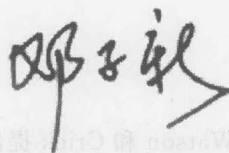
在分子生物学发展的巨大推动下,20 世纪 70 年代以来,诞生了以应用技术为主要研究内容的生物类工程学科——基因工程。基因工程将分子生物学家在实验室中取得的重大理论成果和发现,迅速地转化为生产力,形成了国民经济中新型的产业部门——生物技术产业。以基因工程技术为核心的生物技术已经在全世界范围内取得了伟大的成就,它对人类疾病的诊断和治疗、农业生产的发展、生物能源的开发以及环境保护等多个直接与人类生存休戚相关的领域和产业的变革产生了深远的影响。同时,基因工程技术的发展又为分子生物学的理论研究提供了新的武器和手段,进一步推动了分子生物学的深入发展。

随着科学技术的发展,对自然界客观规律的认识不断加深,人类驾驭自然规律的能力极大地增强,创造出了巨大的生产力和物质财富。但是,随着世界人口膨胀所带来的粮食供应短缺、能源大量消耗,特别是可再生资源的消耗带来的能源危机、环境污染、生态平衡失调和地球变暖等一系列难题,使人类的生存和发展面临着巨大的挑战。这些威胁人类生存和发展所迫切需要解决的难题,为以基因工程为核心的生物技术提出了新的研究课题和机遇,必将大大地推动基因工程技术的进一步发展。可以相信,基因工程技术将对人类生存环境的改变和生活质量的提高作出举足轻重的贡献。

为了满足在基因工程技术相关企业和研究单位中从事基因工程研究和管理人员的要求,由富有教育和科研经验的编写小组完成了《基因工程：原理、方法与应用》教材的编写工作。该教材的编写采用基础理论知识介绍和实际应用技术相结合的方式,在全面介绍基因工程原理的基础上,对基因工程中常用的技术方法做了全面、系统性的论述。教材还简要介绍和讨论了基因工程在药物生产、疾病诊断和治疗、农业生产和法医学等各个技术领域的应

用中取得的成就,分析了基因工程技术在实践中可能出现的难题。相信,该教材的出版将为从事基因工程的研究和管理人员提供一本有用的启蒙教材和工具书,也将为生物工程专业相关的教师和学生提供有价值的参考教材。

我衷心地祝贺全国工程硕士专业学位教育指导委员会推荐教材《基因工程：原理、方法与应用》的问世。感谢编写小组成员为基因工程技术知识的推广与普及作出的贡献和付出的辛勤劳动。



中国科学院院士

上海交通大学生命科学技术学院院长

前言

20 世纪 70 年代诞生的基因工程技术,开创了人类按照自己的意愿在体外操纵生命过程的新纪元。在随后的 30~40 年间,基因工程技术取得了巨大的令人鼓舞的成就。根据全国工程硕士专业学位教育指导委员会的建议,使攻读工程硕士学位的研究生能及时地了解 and 跟踪这一领域的最新进展,促进工程硕士研究生教育质量的提高,加强工程硕士研究生教育的核心教材建设,我们组织了富有基因工程技术教学经验和实际操作能力的教授编写了这本教材。

根据工程硕士研究生现有的知识结构和实际情况,考虑到本课程的系统性,本教材的内容分为上、中、下 3 篇。将基因的信息流作为上篇,系统介绍基因的复制和表达及其调节控制的分子生物学基础理论;中篇重点讲解基因操作的基本技术和相关原理,其中包括目的基因的获得、基因的体外重组、基因的转化、重组体的筛选与检测、基因的扩增与表达等核心内容;下篇系统介绍基因工程技术在医药、食品、农业等领域取得的最新进展和实际应用,并就基因工程的安全性问题进行了简单的论述。

基因工程已被指定为生物工程硕士专业的一门核心课程,本教材力求在介绍基因工程基本原理的基础上,结合基因工程实践中发展起来的最新技术和成果作一全面总结。期望通过本课程的学习,使研究生能掌握并熟悉基因工程的原理和基本操作技术,了解基因工程在植物、动物、微生物、医疗、制药等方面应用的策略、思路和最新进展。

在本教材中,白林泉编写并校对了第 5、6、7 章,黄显清编写了第 13 章以及第 11 章的基因疫苗和基因诊断部分,杨立桃编写了第 3 章中的基因表达调控、第 8 章中基因定位以及第 12 章中的各种植物基因工程等有关内容,其余部分由许煜泉编写。许煜泉教授为本书做了全面的整合、修改和审定。感谢张红艳为本教材的编排做了大量工作。在本教材的编写过程中得到了清华大学出版社柳萍等有关同志的热情指导、帮助和支持,在此表示衷心的感谢。

在本教材中选用了 T. A. Brown 编写的 *Gene Cloning and DNA Analysis: An Introduction* (fourth edition) 和 P. C. Turner, A. G. McInnean, A. D. Bates, M. R. H.

White 编写的 *Instance Notes in Molecular Biology* (second edition) 教材中部分图谱, 在此表示衷心谢意。我们对图谱的标注和内容做了翻译和修改。

近年来, 随着分子生物学的飞速发展, 有关基因工程原理与技术的研究和进展迅猛异常, 加之编写时间仓促和各位编写人员的学术水平、研究领域的局限性, 书中出现错误和不足之处在所难免, 衷心希望使用本书的研究生和同行专家提出宝贵的意见并给予批评、斧正, 以便再版时加以进一步的改正和完善。

编 者

2008 年 6 月于上海交通大学

目 录

第 1 章 导论	/1
1.1 基因的本质是 DNA	1
1.2 基因工程的诞生和发展	1
1.2.1 基因工程的诞生	1
1.2.2 基因工程的发展	3
1.3 基因工程的应用	4
上篇 基因的信息流	
第 2 章 基因信息的复制	/8
2.1 复制的基本概念	8
2.1.1 半保留复制机制	8
2.1.2 复制子和复制起始区	9
2.1.3 半不连续复制	9
2.2 细菌染色体 DNA 的复制	12
2.2.1 复制起始	12
2.2.2 延伸	13
2.2.3 终止和分离	14
2.3 细胞周期及其调控机制	14
2.3.1 细胞周期	14
2.3.2 关卡及其调节	15
2.3.3 细胞周期蛋白和细胞周期蛋白依赖激酶	15
2.3.4 细胞周期的活化和癌症	16
2.4 真核生物 DNA 的复制	17

2.4.1	起始区和复制的起始	17
2.4.2	复制叉	17
2.4.3	端粒的复制	18
2.5	DNA 的突变、修复与重组	19
2.5.1	DNA 的突变与损伤	19
2.5.2	DNA 修复	22
2.5.3	DNA 重组	25

第 3 章 基因信息的转录

/29

3.1	原核生物的基因转录	30
3.1.1	大肠杆菌的 RNA 聚合酶	30
3.1.2	大肠杆菌的 σ^{70} 启动子	31
3.1.3	转录的起始、延伸和终止	32
3.2	原核基因转录的调控	35
3.2.1	乳糖操纵子	36
3.2.2	色氨酸操纵子与衰减子	38
3.2.3	更替 σ 因子调控转录	41
3.2.4	菌群传感	43
3.2.5	小 RNA 分子对基因表达的调控作用	43
3.3	真核生物基因的转录	45
3.3.1	3 种 RNA 聚合酶的特点和功能	45
3.3.2	RNA 聚合酶 I 基因	47
3.3.3	RNA 聚合酶 III 基因	48
3.3.4	RNA 聚合酶 II 基因的启动子和增强子	51
3.3.5	RNA 聚合酶 II 的转录起始和基本转录因子	52
3.4	真核生物基因转录的调控	54
3.4.1	转录因子的特点	58
3.4.2	转录因子与 DNA 结合的结构域	59
3.4.3	转录因子中的转录活化结构域	62
3.4.4	转录因子的抑制作用	62
3.4.5	调节转录的靶位	62
3.5	真核生物基因转录调控的实例	63
3.5.1	构成性转录因子 SP1	63
3.5.2	甾醇类激素及其受体的调节作用	63
3.5.3	信号转递和转录活化(STAT)蛋白的磷酸化调节	64

3.5.4 人类免疫缺损病毒 Tat 蛋白活化转录延伸	64
3.6 RNA 转录本的加工和 RNPs	66
3.6.1 rRNA 的加工和核糖体	66
3.6.2 tRNA 的加工、RNase P 和酶活性 RNA	67
3.6.3 mRNA 的加工、hnRNPs 和 snRNPs	68
3.6.4 mRNA 加工方式的改变	71
3.6.5 RNA 的编辑	71
3.6.6 miRNA 及其加工	72

第 4 章 基因信息的翻译 /74

4.1 遗传密码	74
4.2 tRNA 的结构和功能	77
4.3 原核生物中蛋白质的合成	79
4.3.1 密码子与反密码子的相互作用	79
4.3.2 蛋白质合成的过程	81
4.4 真核生物中的蛋白质合成	84
4.5 翻译的调控机制和翻译后的加工	87

中篇 基因的克隆及其功能分析

第 5 章 DNA 的克隆 /92

5.1 DNA 克隆的载体	93
5.1.1 质粒	93
5.1.2 噬菌体	95
5.2 DNA 的制备	98
5.2.1 制备细菌细胞总 DNA	98
5.2.2 制备质粒 DNA	101
5.2.3 制备噬菌体 DNA	105
5.2.4 DNA 的定性和定量分析	106
5.3 DNA 操作的工具酶	107
5.3.1 限制性核酸内切酶	107
5.3.2 DNA 连接酶和连接反应	112
5.3.3 核酸酶	116
5.3.4 DNA 聚合酶	117

5.3.5	磷酸酶	117
5.3.6	其他工具酶	117
第6章 DNA的导入技术及其载体		/118
6.1	DNA导入法	119
6.1.1	大肠杆菌中的常规转化	119
6.1.2	大肠杆菌的电转化	120
6.1.3	啤酒酵母细胞的转化	121
6.1.4	机械导入法	121
6.2	重组子的识别	122
6.2.1	抗性基因的插入失活	122
6.2.2	基于半乳糖苷酶基因 <i>lacZ</i> 的 α -互补筛选	122
6.2.3	聚果糖蔗糖转移酶基因的筛选	123
6.3	噬菌体 DNA 导入细菌细胞	124
6.3.1	转染	124
6.3.2	噬菌体的转导	124
6.3.3	重组噬菌体的识别	125
6.4	大肠杆菌中的质粒载体	125
6.4.1	质粒 pBR322 的优良性质	126
6.4.2	其他典型的大肠杆菌质粒载体	126
6.5	基于 M13 噬菌体的克隆载体	128
6.5.1	M13mp2 克隆载体的构建	129
6.5.2	具有多克隆位点的 M13mp7	129
6.5.3	复杂的 M13 克隆载体	130
6.5.4	质粒与 M13 杂合的克隆载体	131
6.6	以细菌噬菌体 λ 为基础的克隆载体	132
6.6.1	λ 基因组中的非必需区	132
6.6.2	筛选限制性位点缺失的 λ 噬菌体	133
6.6.3	插入载体和取代载体	133
6.6.4	利用 λ 插入载体和取代载体的克隆试验	134
6.6.5	柯斯质粒	135
6.6.6	大容量载体：BACs 和 PACs	136
6.7	真核生物的克隆载体	137
6.7.1	利用酵母中的载体	137
6.7.2	高等植物的克隆载体	140

6.7.3 动物的克隆载体	142
第7章 目标基因的获得	/145
7.1 筛选克隆基因的两种基本手段	145
7.1.1 直接筛选	145
7.1.2 构建基因组文库	146
7.2 从文库中筛选目标基因	148
7.2.1 DNA 分子探针和杂交	148
7.2.2 制备杂交探针	149
7.2.3 免疫学筛选	151
7.3 目标基因的化学合成	152
7.4 聚合酶链式反应(PCR)	154
7.4.1 PCR 的发展历史	154
7.4.2 PCR 的过程	154
7.4.3 PCR 的温度循环	155
7.4.4 PCR 反应的优化	155
7.4.5 各种不同的 PCR	158
7.4.6 PCR 的后续工作	159
7.4.7 PCR 的应用	160
第8章 基因的结构和功能分析	/164
8.1 基因的定位	164
8.1.1 Southern 转移	164
8.1.2 正交交变电场凝胶电泳	166
8.1.3 原位杂交	167
8.2 基因所属连锁群或染色体的测定	168
8.2.1 系谱分析法	168
8.2.2 非整倍体测交法	169
8.2.3 四分体分析法	170
8.2.4 连锁群法	170
8.2.5 利用染色体易位的基因定位	172
8.3 基因在染色体上的位置测定	173
8.3.1 根据重组频率的基因定位	173
8.3.2 根据所测基因在某一已知染色体区段中是否存在的基因定位	175

8.3.3	根据并发事件的基因定位	176
8.3.4	根据基因行为的定位	176
8.3.5	测定绝对位置的基因定位	177
8.4	基因精细结构分析	179
8.4.1	根据重组频率的基因定位	179
8.4.2	缺失定位法	179
8.4.3	共转导定位法	179
8.4.4	体细胞重组定位法	180
8.4.5	基因转变的梯度定位法	180
8.5	DNA 测序	181
8.5.1	链末端终止法	181
8.5.2	化学裂解法	183
8.5.3	PCR 产物的直接测序	184
8.5.4	自动化测序	184
8.5.5	长序列拼接	185
8.6	基因表达的分析	186
8.6.1	电子显微镜下的核酸分子	187
8.6.2	利用核酸酶分析 DNA-RNA 杂合体	187
8.6.3	引物延伸法分析转录物	188
8.6.4	研究 RNA 转录物的其他技术	188
8.7	基因表达的调节研究	190
8.7.1	DNA 蛋白质复合物的凝胶阻滞	191
8.7.2	足迹法与 DNase I	192
8.7.3	修饰干扰分析	192
8.7.4	缺失分析	193
8.7.5	报道基因	195
8.8	识别目标基因的产物和功能	196
8.8.1	杂交体释放翻译法和杂交体捕获翻译法	196
8.8.2	体外突变分析蛋白质功能	197
8.9	研究目标基因产物的相互关系	200
8.9.1	噬菌体展示	200
8.9.2	酵母双杂交系统	200

第 9 章 基因组学

/203

9.1	基因组序列的测定	204
-----	----------	-----

9.1.1	鸟枪法	204
9.1.2	重叠群克隆法	206
9.1.3	遗传图谱法协助序列装配	207
9.2	后基因组时代——理解基因组序列	208
9.2.1	识别基因组序列中的基因	209
9.2.2	未知基因的功能测定	210
9.3	各种组学的研究	211
9.3.1	转录组学的研究	211
9.3.2	蛋白质组学的研究	212
9.3.3	代谢物组学的研究	213
9.4	系统生物学	213
9.4.1	系统生物学的目标	213
9.4.2	整合是系统生物学的灵魂	214
9.4.3	信息是系统生物学的基础	215
9.4.4	干涉是系统生物学的钥匙	216

下篇 基因工程的应用

第 10 章 利用基因工程生产重组蛋白 /220

10.1	大肠杆菌中表达外源基因的专一性载体	220
10.1.1	表达载体中的启动子	220
10.1.2	基因盒和基因融合	223
10.1.3	大肠杆菌生产重组蛋白的困难	225
10.2	利用真核细胞生产重组蛋白	226
10.2.1	在酵母和丝状真菌中生产重组蛋白	226
10.2.2	在动物细胞和昆虫细胞中生产重组蛋白	228
10.2.3	利用动植物体生产重组蛋白	229

第 11 章 基因工程在医学上的应用 /231

11.1	生产重组药物	231
11.1.1	重组胰岛素	231
11.1.2	在大肠杆菌中合成人体的生长激素	233
11.1.3	重组凝血因子Ⅷ的合成	234
11.1.4	合成其他重组人体蛋白	235

11.2	基因工程疫苗	236
11.2.1	疫苗与基因工程疫苗	236
11.2.2	基因工程亚单位疫苗	238
11.2.3	基因工程减毒疫苗	239
11.2.4	活重组疫苗	240
11.2.5	DNA 疫苗	242
11.2.6	转基因植物口服疫苗	243
11.3	基因诊断	243
11.3.1	基因诊断的概念	243
11.3.2	基因诊断的原理	244
11.3.3	基因诊断的对象	245
11.3.4	基因诊断的特点	246
11.3.5	基因诊断的基本技术	247
11.3.6	识别人类遗传疾病相关的基因	253
11.4	基因治疗	255
11.4.1	基因治疗遗传疾病	255
11.4.2	基因治疗和癌症	256
11.4.3	基因治疗的伦理学	257

第 12 章 基因工程在农业上的应用

/258

12.1	增添基因与植物遗传工程	260
12.1.1	植物体自身生产杀虫剂	262
12.1.2	其他添加基因的课题	262
12.2	删除基因	264
12.2.1	反义技术的原理	264
12.2.2	反义 RNA 和番茄果实成熟的基因工程	265
12.2.3	反义 RNA 在植物基因工程中的其他应用	266
12.3	各种植物基因工程	266
12.3.1	转基因植物作为生物反应器生产药物	266
12.3.2	不断完善转基因植物稳定高效表达技术	267
12.3.3	转基因培育高产作物	269
12.3.4	转基因培育优质作物	270
12.3.5	转基因培育抗真菌病害的作物	271
12.3.6	转基因培育抗除草剂作物	273
12.3.7	转基因培育耐环境胁迫的作物	273

12.4	转基因植物的安全性	275
12.4.1	筛选标记的安全性	275
12.4.2	对环境产生不良后果的可能性	276
第13章	代谢工程	/277
13.1	代谢工程中的一些基本概念	278
13.1.1	代谢途径与网络	278
13.1.2	代谢通量及控制分析	279
13.1.3	初级代谢与次级代谢	280
13.2	代谢工程的基本过程与原理	282
13.2.1	代谢工程的基本过程	282
13.2.2	代谢工程的基本原理	283
13.3	代谢工程的基本技术	283
13.3.1	检测技术	284
13.3.2	分析技术	284
13.3.3	操作技术	284
13.4	代谢工程的应用	284
13.4.1	提高目标产物的产量或产率	285
13.4.2	表达外源蛋白	288
13.4.3	扩大底物利用范围	289
13.4.4	构建新产品生物合成途径	290
13.4.5	构建新的外源毒性化学物质降解途径	290
13.4.6	改良细胞其他生理特性	291
13.5	代谢工程与其他技术的关系	291
13.5.1	代谢工程与“组学”技术	292
13.5.2	代谢工程与计算系统生物学	293
13.5.3	代谢工程与蛋白质工程	294
13.5.4	代谢工程与组合生物学	294
13.5.5	全局转录机器工程技术	295
13.5.6	文库筛选技术	295
13.6	组合生物合成	296
13.6.1	聚酮合酶及聚酮类生物合成机理	296
13.6.2	聚酮类的组合生物合成	298

第 14 章 基因克隆和法医学

/301

- 14.1 DNA 分析和罪犯嫌疑人的识别 301
- 14.1.1 利用分子杂交探针分析遗传指纹 301
- 14.1.2 PCR 短串联重复序列和 DNA 图谱 302
- 14.2 利用 DNA 图谱研究亲属关系 303
- 14.2.1 具有亲缘关系的个人具有相似的 DNA 图谱 303
- 14.2.2 DNA 图谱和罗曼诺夫的遗骸 304
- 14.3 性别的识别研究和 DNA 分析 305

参考文献

/308