

博  
學



JICHU YIXUE XILIE

基础医学系列

# 医用分子遗传学

(第二版)

● 主编 宋后燕 朱运松

复旦博学·基础医学系列

复旦博学·基础医学系列

复旦博学·基础医学系

复旦大学出版社



基础医学系列

# 医用分子遗传学

主编 宋后燕 朱运松

(第二版)

编写者 (以姓氏笔画为序)

马 端 朱运松 宋后燕 顾银良

復旦大學 出版社

图书在版编目(CIP)数据

医用分子遗传学/宋后燕,朱运松主编.—2版.—上海:  
复旦大学出版社,2003.9  
(博学·基础医学系列)  
ISBN 7-309-03738-3

I. 医… II. ①宋…②朱… III. 分子遗传学 IV. Q75

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2003)第 068160 号

医用分子遗传学(第二版)

主编 宋后燕 朱运松

出版发行 复旦大学出版社

上海市国权路 579 号 邮编 200433

86-21-65118853(发行部) 86-21-65109143(邮购)

fupnet@fudanpress.com http://www.fudanpress.com

责任编辑 傅淑娟 宫建平

装帧设计 马晓霞

总编辑 高若海

出品人 贺圣遂

印刷 上海第二教育学院印刷厂

开本 787×1092 1/16

印张 19 插页 2

字数 451 千

版次 2003 年 9 月第二版 2003 年 9 月第一次印刷

印数 1—3 100

书号 ISBN 7-309-03738-3/R·806

定价 32.00 元

如有印装质量问题,请向复旦大学出版社发行部调换。

版权所有 侵权必究

## 内 容 提 要

本书紧密联系医学，系统介绍分子遗传学的基本理论及其在医学中的应用。全书共分10章，以基因工程及其与医学的关系为切入点，较深入地介绍基因的结构与功能，基因组的组织，DNA复制、转录、后加工、翻译，基因表达的调节等分子遗传学的基础理论；以地中海贫血的分子遗传学基础为例介绍基因诊断的基本原理，以t-PA为例介绍基因工程和蛋白质工程等。本书可作为医学研究生和7年制医学本科学生的教材，也可供其他相关学科领域的教学、科研工作者和临床医生参考。

## 第二版前言

医用分子遗传学(含实验指导)于1990年12月出版以来深受研究生和进修生的欢迎,曾多次印刷,并先后被第二军医大学、遵义医学院等兄弟院校引用。

本教材再版时保留了内容选择和编排特色,即按照认识规律先介绍重组DNA基因工程与医学的关系,说明医学分子遗传学已发展到令人振奋的水平,激发学习的积极性和主动性,让学生带着问题深入学习医用分子遗传学涉及的基础理论问题。在掌握基本理论和基本方法的基础上,通过范例介绍基因诊断、基因工程、蛋白质工程和基因治疗,力求使研究生掌握医用分子遗传学的“钥匙”,能够举一反三地理解和运用分子遗传学,提高分析问题和解决问题的能力,从而打开知识宝库的大门,有所发现有所创造。

医用分子遗传学是一门实验性科学,通过实验证明设想、发掘潜在的规律,有利于培养学生思考和创造能力。我们十分重视医用分子遗传学的实验教学,因此将有关实验指导编入本教材。

医用分子遗传学自第一版出版后的10多年中迅猛发展,内容非常丰富,而第一版教材主要反映了20世纪80年代的内容,我们选择有启发性且已经公认的深受重视的进展作为再版充实的内容。参加部分章节编写的还有孙兴会、张宇杲和莫炜等,在此表示感谢。由于再版比较匆忙,敬请读者指出错误和不足之处,谢谢!

宋后燕

2003年8月

## 第一版前言

1953年Watson和Criok发现了DNA的双螺旋结构以后,人们开始用分子生物学语言来解释生物界千变万化的遗传现象,而今分子遗传学的概念、理论和技术已高速、高效地渗入医学领域,诸如发病机制的研究、诊断、治疗、预防保健乃至计划生育等等。我们在惊叹之余,深深感到把这些知识和技能搬到医药院校的课堂上已是当务之急。为此,我们在进行十分紧张的科研工作的同时撰写了这本教材。

本教材首先介绍“重组DNA技术-基因工程与医学的关系”,阐明分子遗传学的方法学及其意义,然后进一步介绍基因的结构和组合,遗传信息的复制、转录、翻译以及它们的调控。在掌握基本方法、基本理论的基础上介绍基因诊断与基因治疗的范例;珠蛋白基因和地中海贫血以及生物高新技术的范例;组织型纤维蛋白溶酶原激活剂(t-PA)的基因工程和蛋白质工程。以便让学生进一步理解和运用分子遗传学的基本理论和基本方法,并能从一斑窥全豹、举一反三地去自学分子遗传学。

参加部分章节编写的有丁皓、傅四清、龚小华、王结义、翁致平。分子遗传学实验内容由上海医科大学分子遗传学研究室顾银良、宋后燕编写。

自1984年起,本教材虽经多次修改和补充,但仍很粗浅,不足之处敬请读者批评指正。

宋后燕 朱运松

1990年4月

## 目 录

|                            |     |
|----------------------------|-----|
| 第一章 重组 DNA 技术-基因工程及其与医学的关系 | 1   |
| 第一节 重组 DNA 技术              | 1   |
| 第二节 基因工程的基本过程              | 7   |
| 第三节 重组 DNA 技术与医学的关系        | 18  |
| 第二章 基因的结构和组合               | 28  |
| 第一节 概述                     | 28  |
| 第二节 DNA 是脱氧核糖核苷酸多聚物        | 33  |
| 第三节 DNA 的双螺旋结构             | 35  |
| 第四节 DNA 的超螺旋结构和其他结构        | 42  |
| 第五节 真核细胞的染色体结构             | 47  |
| 第六节 DNA 的变性与复性             | 48  |
| 第七节 基因组与基因组合               | 53  |
| 第三章 DNA 复制                 | 72  |
| 第一节 DNA 复制的一般特征            | 72  |
| 第二节 DNA 复制的基本过程            | 75  |
| 第三节 参与 DNA 复制的酶类           | 88  |
| 第四节 DNA 复制的调控              | 95  |
| 第四章 基因转录                   | 102 |
| 第一节 RNA 聚合酶                | 102 |
| 第二节 原核生物的 DNA 转录           | 106 |
| 第三节 真核生物的 DNA 转录           | 111 |
| 第四节 用于真核基因转录研究的手段          | 119 |
| 第五章 RNA 转录后的加工和修饰          | 123 |
| 第一节 mRNA 转录后加工             | 123 |
| 第二节 rRNA 转录后加工             | 130 |
| 第三节 tRNA 转录后加工             | 132 |
| 第四节 RNA 编辑                 | 135 |
| 第六章 蛋白质的生物合成               | 139 |
| 第一节 tRNA                   | 139 |

|            |                                      |     |
|------------|--------------------------------------|-----|
| 第二节        | mRNA 及其携带的遗传密码 .....                 | 144 |
| 第三节        | 核糖体 .....                            | 146 |
| 第四节        | 原核生物蛋白质合成过程 .....                    | 149 |
| 第五节        | 真核生物蛋白质合成过程 .....                    | 155 |
| 第六节        | 蛋白质合成后的修饰加工 .....                    | 157 |
| 第七节        | 新合成蛋白质在细胞内的定位 .....                  | 159 |
| 第八节        | 其他蛋白质合成系统 .....                      | 159 |
| 第九节        | 蛋白质合成的抑制剂 .....                      | 160 |
| 第十节        | 蛋白质合成的调节 .....                       | 162 |
| <b>第七章</b> | <b>基因表达的调节</b> .....                 | 167 |
| 第一节        | 概述 .....                             | 167 |
| 第二节        | 原核生物基因表达的调节 .....                    | 172 |
| 第三节        | 真核生物基因表达的调节 .....                    | 183 |
| 第四节        | 基因表达的反义调节 .....                      | 187 |
| <b>第八章</b> | <b>基因诊断</b> .....                    | 189 |
| 第一节        | 常用的基因诊断方法和原理 .....                   | 189 |
| 第二节        | 珠蛋白基因结构和地中海贫血的基因诊断 .....             | 194 |
| <b>第九章</b> | <b>基因治疗</b> .....                    | 212 |
| 第一节        | 基因治疗概述 .....                         | 212 |
| 第二节        | 基因转移技术 .....                         | 215 |
| 第三节        | 反转录病毒载体 .....                        | 218 |
| 第四节        | 腺病毒载体及其他病毒载体 .....                   | 224 |
| 第五节        | 基因治疗的展望 .....                        | 227 |
| <b>第十章</b> | <b>组织纤维蛋白溶酶原激活剂的基因工程和蛋白质工程</b> ..... | 230 |
| 第一节        | 引言 .....                             | 230 |
| 第二节        | t-PA 分子的结构和功能 .....                  | 230 |
| 第三节        | t-PA 溶血栓作用的研究 .....                  | 234 |
| 第四节        | t-PA 基因的结构特征 .....                   | 235 |
| 第五节        | t-PA 的基因工程 .....                     | 237 |
| 第六节        | t-PA 的蛋白质工程 .....                    | 240 |
| 第七节        | 蛋白质工程中的计算机模拟理论与技术 .....              | 244 |
| <b>附</b>   | <b>医用分子遗传学实验指导</b> .....             | 251 |
| 实验一        | 人染色体 DNA 的分离、提取和纯化 .....             | 251 |
| 实验二        | 人珠蛋白基因的无性繁殖 .....                    | 252 |



|     |                             |     |
|-----|-----------------------------|-----|
| 实验三 | 质粒 DNA 的大量制备与纯化 .....       | 263 |
| 实验四 | DNA 序列测定(Sanger 酶学方法) ..... | 269 |
| 实验五 | 核酸分子杂交.....                 | 273 |
| 实验六 | 基因的表达与表达产物的鉴定.....          | 288 |
| 实验七 | 反转录-PCR(RT-PCR)扩增基因 .....   | 292 |

# 第一章 重组 DNA 技术-基因工程 及其与医学的关系

## 第一节 重组 DNA 技术

20 世纪 70 年代初期,核酸分子是生物学中最难研究的对象。因为它的分子结构长得出奇:含有  $10^9 \sim 10^{12}$  个碱基对,但组成单位仅仅含有 A、T、G、C 四种脱氧核苷酸,这种组成单位如此简单的分子却决定着自然界千变万化的遗传现象。当时人们只能从蛋白质或 RNA 结构或宏观的遗传规律来推测遗传信息,无法从分子水平上阐明遗传的本质。10 余年后,人们可以直接检测和分离基因,并研究它们的结构与活动情况,可以通过无性繁殖体系大量制备基因,分离纯净的基因或基因片段,每人每天可以数以万计地分析基因中的核苷酸序列,乃至利用基因工程和基因转移等技术改变生物体遗传特性,使原核生物或真核细胞合成原来不可能合成的多肽或蛋白质,从而按照人们的愿望来组织和安排基因的结构和功能。而今人类基因组测序已完成,并开始进行人类基因组功能研究和疾病基因组研究。

为什么数十年时间内会产生这么巨大的变化? 重组 DNA 技术的发明是促成这个飞跃的关键。重组 DNA 技术主要包括:限制性核酸内切酶等工具酶的应用,核酸的分子杂交技术,基因的无性繁殖、DNA 分子中核苷酸序列分析和 PCR 技术等。

### 一、限制性核酸内切酶

限制性核酸内切酶多数从大肠杆菌中制备,能识别 DNA 分子内部特异性对称序列[通常为 4~8 个碱基对(base pair, bp)],对称部位的一条链旋转  $180^\circ$ ,则两条链序列完全相同。限制性核酸内切酶水解切断每条链的一个磷酸二酯键,形成 5'-HPO<sub>3</sub> 端和 3'-OH 端。有的限制性核酸内切酶在不同的平面上切割 DNA 的两条单链,其切割点在旋转对称轴上,切割后两条单链末端不在同一平面上,使每条链上都留下一段[2~6 个核苷酸(nt)]伸出来的单链,或 5'端伸出,或 3'端伸出。这段单链的序列很有规律,不论哪一条,从 5'→3'端读去,都是相同的结构。因为 DNA 是逆行排列碱基互补的双链,所以这两段单链的碱基彼此互补,可再次形成氢键,重新形成双链结构。这种限制性核酸内切酶切下的末端称为黏性末端。有的限制性核酸内切酶在同一平面上切割 DNA 的双链,切割后,两条单链的末端在同一平面上,末端没有伸出的互补单链末端,两条链末端平齐,称钝性末端(平头末端,表 1-1)。无论黏性末端或钝性末端均必须在连接酶催化下才能在两个末端之间再次形成磷酸二酯键,使 DNA 片断真正稳定地连接起来(图 1-1)。这一性质用于基因的特异切割和连接,是基因工程即 DNA 重组的必需的工具酶。

两份不同的 DNA,用相同的限制性核酸内切酶切割,形成含有相同黏性末端的 DNA 片段,它们的黏性末端碱基互补,可形成氢键,在 DNA 连接酶(DNA ligase)催化下产生一个很稳定的重组 DNA 分子。

表 1-1 限制性核酸内切酶切点及切割后的末端结构

| 内切酶名称    | 识别序列及切割位点                                                                 | 切割后的末端结构                                           |                                                    |      |
|----------|---------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|----------------------------------------------------|------|
| EcoR I   | $\begin{array}{c} \downarrow \\ 5'-GAATTC-3' \\ 3'-CTTAAG-5' \end{array}$ | $\begin{array}{c} 5'-G \\ 3'-CTTAA-5' \end{array}$ | $\begin{array}{c} 5'-AATTC-3' \\ G-5' \end{array}$ | 黏性末端 |
| Hind III | $\begin{array}{c} \downarrow \\ 5'-AAGCTT-3' \\ 3'-TTCGAA-5' \end{array}$ | $\begin{array}{c} 5'-A \\ 3'-TTCGA-5' \end{array}$ | $\begin{array}{c} 5'-AGCTT-3' \\ A-5' \end{array}$ | 黏性末端 |
| Alu I    | $\begin{array}{c} \downarrow \\ 5'-AGCT-3' \\ 3'-TCGA-5' \end{array}$     | $\begin{array}{c} 5'-AG \\ 3'-TC \end{array}$      | $\begin{array}{c} CT-3' \\ GA-5' \end{array}$      | 钝性末端 |
| Pst I    | $\begin{array}{c} \downarrow \\ 5'-CTGCAG-3' \\ 3'-GACGTC-5' \end{array}$ | $\begin{array}{c} 5'-CTGCA-3' \\ 3'-G \end{array}$ | $\begin{array}{c} G-3' \\ 3'-ACGTC-5' \end{array}$ | 黏性末端 |

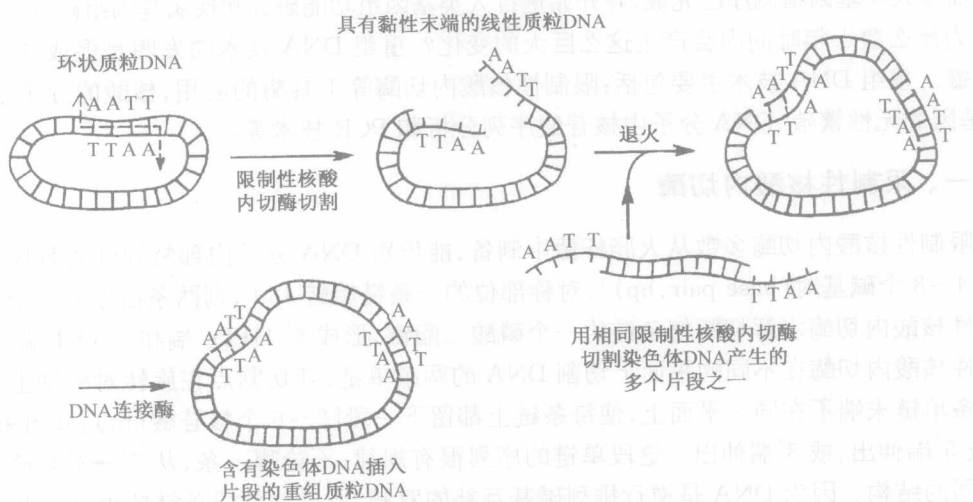


图 1-1 重组 DNA 分子的形成

至今已分离到的限制性核酸内切酶有百种以上,常用的有数十种。各种内切酶都有最适的作用条件,同一酶因生产厂家不同,作用条件有时也不同,可从厂家的说明书上查得作用和保存的条件。

限制性内切酶切割基因组 DNA 产生的片段取决于基因组中存在的该内切酶识别位点的多少,决定于该内切酶识别序列的长短。识别序列长的,位点少,产生的片段长数量少;识别序列短的,位点多,产生的片段短数量多。例如识别序列为 6 bp 的,平均每 4 096 bp 出现该酶的一个切点;识别序列为 4 bp 的,平均每 256 bp 出现该酶的一个切点。所以限制性核酸内切酶分析可以用于鉴定 DNA 的特异性。

## 二、核酸的分子杂交技术

DNA 分子是由两条头尾倒置的脱氧多核苷酸所组成,其中一条链的碱基与另一条的碱基之间有氢键连接,并以 A-T、C-G 互补,整个 DNA 分子呈双螺旋结构。在加热、碱性等条件下,链间氢键断裂,形成两条单链结构,这种现象称为 DNA 变性(denaturation)。在去除变性条件下,两条碱基互补的单链可以回复成双链结构,这种现象称为 DNA 复性(renaturation)。变性与复性过程的发生主要与温度、盐浓度以及变性剂的浓度有关,与两条链之间碱基互补的程度当然更有关系(图 1-2,1-3)。

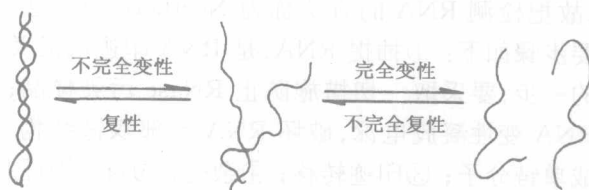


图 1-2 DNA 的变性与复性

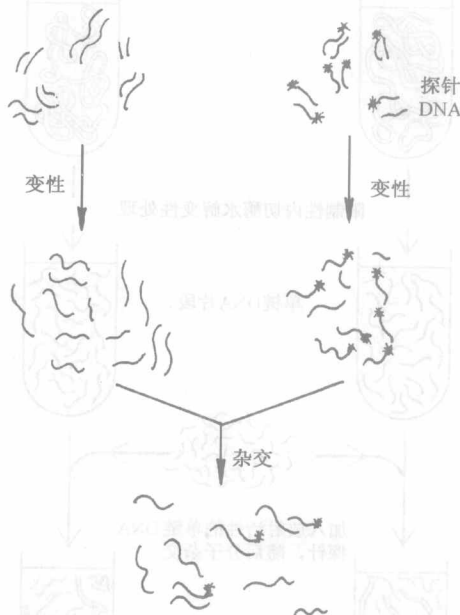


图 1-3 核酸分子杂交示意图

### (一) 最常用的核酸分子杂交技术

#### ● 固相杂交

DNA 印迹法:待测核酸为 DNA,探针可以是 DNA,也可以是 RNA。

RNA 印迹法:待测核酸为 RNA,探针可以是 DNA,也可以是 RNA。

#### ● 液相杂交(图 1-4)

#### ● 菌落或噬斑原位杂交

#### ● 斑点杂交

#### ● 荧光原位杂交(FISH)

无论何种杂交都需要有同位素或其他物质标记的基因或基因片段作为探针。固相分子杂交是在硝酸纤维素膜上进行,因为这种滤膜能吸附变性 DNA 或 RNA 分子,如变性后的探针与滤膜上的核酸之间有一定数量的碱基是互补的,则探针与滤膜上的核酸分子通过互补碱基之间形成氢键而杂交。被测核酸经变性后可以直接点在滤膜上与探针进行杂交,称为斑点杂交。也可以经内切酶水解,琼脂糖凝胶电泳分离、变性、转移到硝酸纤维素膜上,然后再与探针杂交。杂交的结果由 X 线胶片放射自显影反映出来。被测样品自显影条带的位置与标准样品条带的位置相比较,可以算出杂交片段的长短。下面分别简要介绍以上各种杂交技术。

1. DNA 印迹法(Southern blotting) 1975 年英国科学家 Southern 首先提出并利用此方法检查基因组 DNA 的特异序列,故把此方法称为 Southern 印迹法。具体步骤如下:①抽提染色体 DNA,防止剧烈振摇,尽量提取到较大的 DNA 片段;②酶解,用合适的限制

性内切酶水解成 DNA 片段；③电泳，将酶解的 DNA 在琼脂糖凝胶上进行电泳分离；④转

移(印迹)，将电泳后的凝胶用碱处理，使双链 DNA

片段成单链，然后用印迹法(毛细管原理)将按片段

长度分离好的 DNA 印迹(转移)到硝酸纤维素膜上，单链 DNA 分子就会吸附在膜上，干燥固定；⑤杂交，用放射性标记或其他物质标记的已知核酸片段，或寡核苷酸做探针，与固定在膜上的核酸进行分子杂交；⑥放射自显影，凡是与探针能形成杂交分子的核酸片段所在处，会出现自显影条带(图1-5)。

2. RNA 印迹法(Northern blotting) 1977 年 Alwine 根据 DNA 印迹法的基本原理，将 RNA 经电泳分离，转移到硝酸纤维素膜上，用已知 DNA 作探针，分析检测 RNA。因 Southern 又是南方的意思，故把检测 RNA 的方法称为 Northern 印迹法。主要步骤如下：①抽提 RNA，是 RNA 印迹法最关键的一步，要采取一切措施防止 RNase 污染样品；②RNA 变性凝胶电泳，破坏 RNA 局部双链结构，形成单链分子；③印迹转移；④杂交；⑤自显影(图 1-5)。

3. 斑点杂交 直接将提取的 RNA 或酶解后的 DNA 经变性后点样于硝酸纤维素膜上，然后进行分子杂交。

4. 细胞原位杂交 在组织切片或培养细胞上进行分子杂交。

5. 菌落或噬斑原位杂交 将硝酸纤维素膜置于布满细菌菌落或噬斑的平板上(各菌落或噬斑，含有不同的重组 DNA)，使平板上每一个菌落或噬斑粘到硝酸纤维素膜上，形成平板的一个复制品，然后用碱处理，让细菌裂解，DNA 变性，并原位固定于硝酸纤维素膜上，再进行分子杂交。

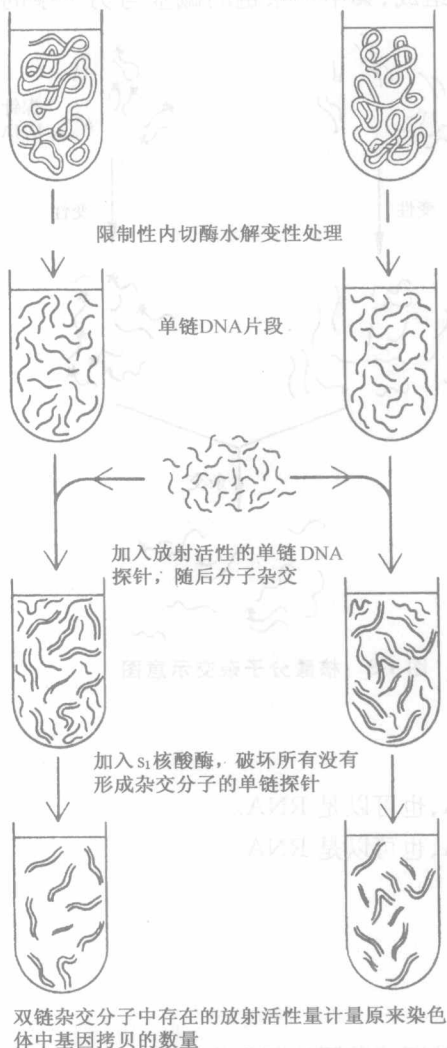


图 1-4 液相核酸分子杂交示意图

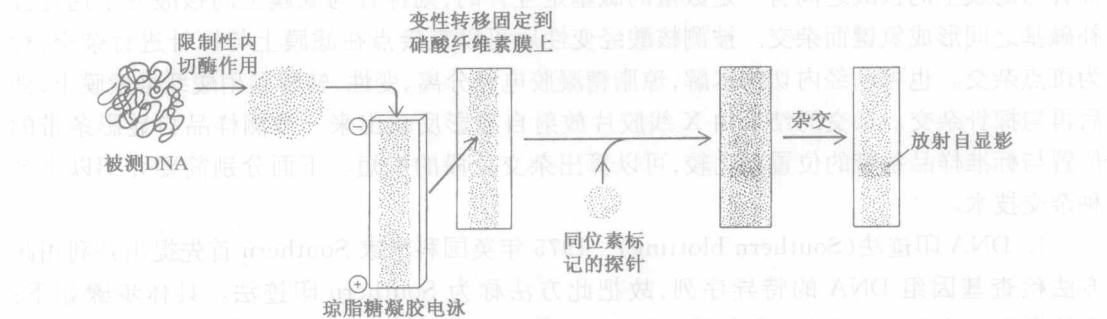


图 1-5 固相核酸分子杂交示意图

## (二) 探针

探针是分子杂交的必需工具,它是带有某种标记的一段碱基序列互补于待测基因序列的 DNA 或 RNA 或寡聚核苷酸。因为各种基因都有自己独特的核苷酸序列,因此,分子杂交的特异性是很高的。探针带有标记,经一定处理后,可看到是否存在与它有互补序列并形成杂交分子的基因。

1. 放射性核素标记的探针 如用 $^{32}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^3\text{H}$  等标记在脱氧单核苷酸相应部位,通过切口平移(nick translation)标记法或末端标记法或随机引物(random primer)标记法,将标记的单核苷酸掺入作为探针的核酸分子中。探测的方法:有放射活性的脉冲计数和放射自显影。放射性标记的优点是灵敏度高,可检测到  $0.03\sim 1\text{ pg}$  的核酸。缺点是半衰期短( $^{32}\text{P}$  为  $14\text{ d}$ ,  $^{35}\text{S}$  为  $85\text{ d}$ ),射线对操作者有损害,要有很好的防护和严格的废物处理。

2. 非放射性标记探针 ①生物素标记探针;②地高辛标记探针;③酶标记探针等。

## (三) 核酸分子杂交的应用

(1) DNA 印迹法分析基因的结构(缺失、突变等)、基因限制性内切酶片段长度多态性、基因同源性及基因拷贝数。

(2) RNA 印迹法检测特异性 mRNA,分析该基因表达的情况及 mRNA 分子的大小。

(3) 菌落或噬菌斑原位杂交主要用于从基因库中筛选某种特异基因克隆。

(4) 细胞原位杂交分析检测特异基因或表达产物在细胞内的定位。

(5) 斑点杂交检测基因缺失和表达水平,根据斑点的灰度可进行相对量的比较。

## 三、基因的无性繁殖

克隆(clone)也称无性繁殖,是从一群细胞中分离单一细胞,然后让其复制自己,产生许多完全相同的细胞。DNA 克隆过程就是基因无性繁殖的过程,是核心技术(图 1-1),包括以下五步操作过程。

1. 制备基因 用限制性内切核酸酶精确地在染色体特定定位点切割 DNA,然后分离基因,或用 PCR 扩增分离基因,也可以人工合成基因。

2. 选择载体 通常为能进行自我复制的小分子 DNA,如细菌中的质粒或病毒,载体含有基因插入的位点。

3. 基因与克隆载体重组 完成这一过程需要 DNA 连接酶。两种或两种以上来源的 DNA 片段,通过共价键连接起来,形成一种嵌合分子,具有复制功能,称重组 DNA 分子。

4. 重组 DNA 转化宿主细胞 外源基因在宿主细胞中进行复制。

5. 培养含有重组 DNA 的宿主细胞 通过细胞扩增,即为无性繁殖所制备的基因,实现基因的无性繁殖。

## 四、DNA 序列分析

有 Maxim-Gilber 化学方法和 Sanger 酶学方法两种。后者的基本原理是:利用 DNA 聚合酶进行多核苷酸的酶促合成。在反应混合液中有模板、引物、DNA 聚合酶、4 种  $2'$ ,  $3'$ -双脱氧核苷三磷酸(ddNTP)以及 4 种脱氧核苷三磷酸(dNTP),其中之一是  $^{32}\text{P}$  标记的 dNTP, DNA 核苷酸序列分析时 ddNTP 是关键物质。例如在多核苷酸合成过程中遇到 dATP 掺入的位置有两种可能情况发生,如果是 dATP 掺入,则链继续延长;如果是 ddATP

掺入,合成反应就停止,链不再延长。因为 ddATP 的 3' 位置没有羟基,不能参加 3'、5' 磷酸二酯键的合成。这样就得到一系列长度不同的、以 ddA 结尾的一组片段。同理,也可以得到以 ddG、ddC、ddT 结尾的片段。在变性条件下,对这些片段进行高分辨率的凝胶电泳分离和放射自显影,可以从 X 线感光片上直接读出 DNA 片段的碱基序列。噬菌体 M<sub>13</sub> 或 pUC 系列质粒作载体与被测 DNA 连接并构建成克隆,以此重组 DNA 为模板,并以互补于外源 DNA 插入口邻近区的序列为引物,通过上述酶促反应和凝胶电泳进行序列分析。由于上述载体与外源 DNA 的克隆、检测以及分离纯化十分方便快捷,又可以运用一个公共的引物测定任何外源 DNA 序列,因此 Sanger 酶学方法人工测定 DNA 序列的效率达到每人每天 5 000 bp(图 1-6)。根据这一原理制造的自动 DNA 测序仪,以更高速度自动进行。

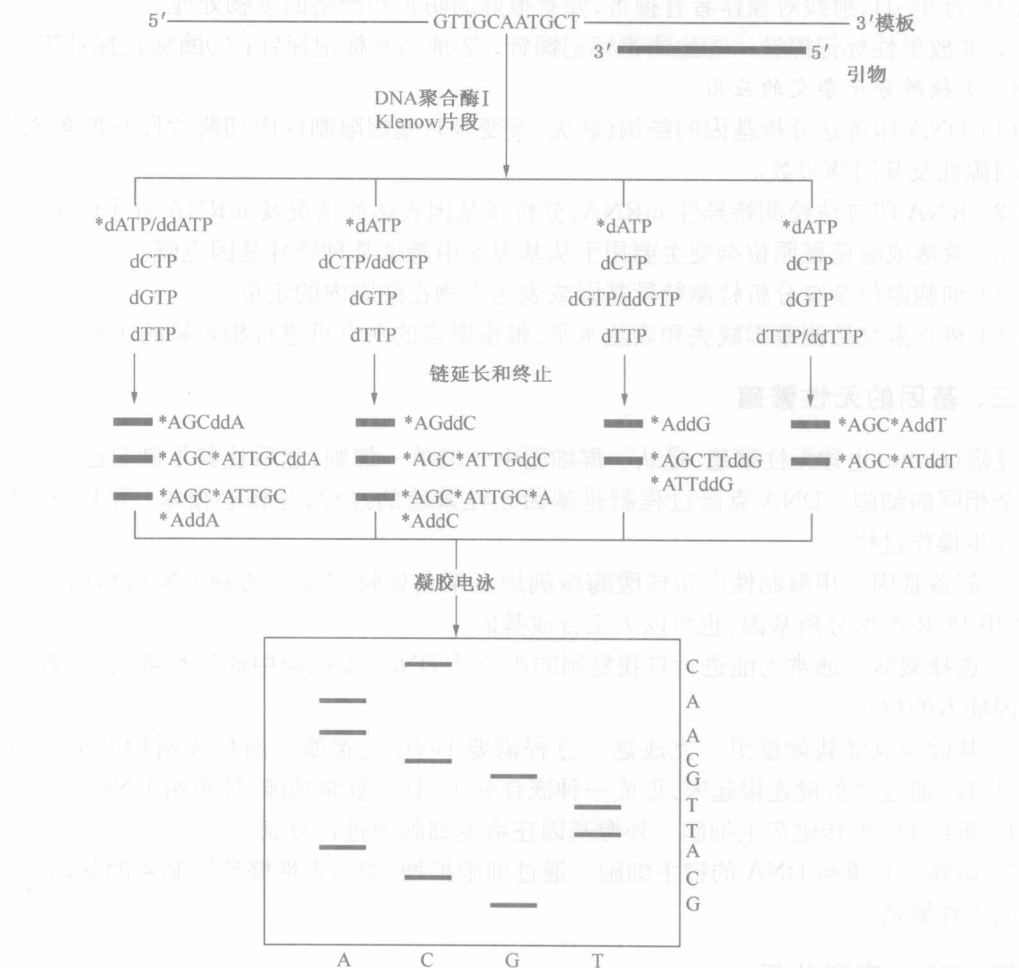


图 1-6 用 Sanger 酶学方法测定 DNA 序列

注: \* 表示放射性核苷酸

## 五、PCR 技术

1985 年美国的 Mullis 创立了一种称为聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 在体外扩增 DNA 的技术。几年后发明了可使 PCR 自动进行的仪器——PCR 扩增

仪。在几小时内可将一段 DNA 序列扩增几百万倍。PCR 可用于分离和克隆基因,也可用于基因诊断及基因多态性分析。

**PCR 的基本原理:**PCR 是一种体外特异性扩增 DNA 的技术。PCR 的特异性决定于一对人工合成的寡核苷酸,称引物。这一对寡核苷酸分别互补于待扩增 DNA 模板 3'端序列。待扩增 DNA 模板加热( $94^{\circ}\text{C}$ )变性和退火后,一对引物分别与两条单链模板的 5'端序列特异性复性( $60^{\circ}\text{C}$ ),在 Taq DNA 聚合酶催化下( $72^{\circ}\text{C}$ ),从引物的 5'端向 3'方向延伸合成新的 DNA 链。从 1 个 DNA 分子产生 2 个 DNA 分子。这种热变性→复性→延伸的过程称一个 PCR 循环(图 1-7)。30~40 次循环,DNA 模板扩增数百万倍。

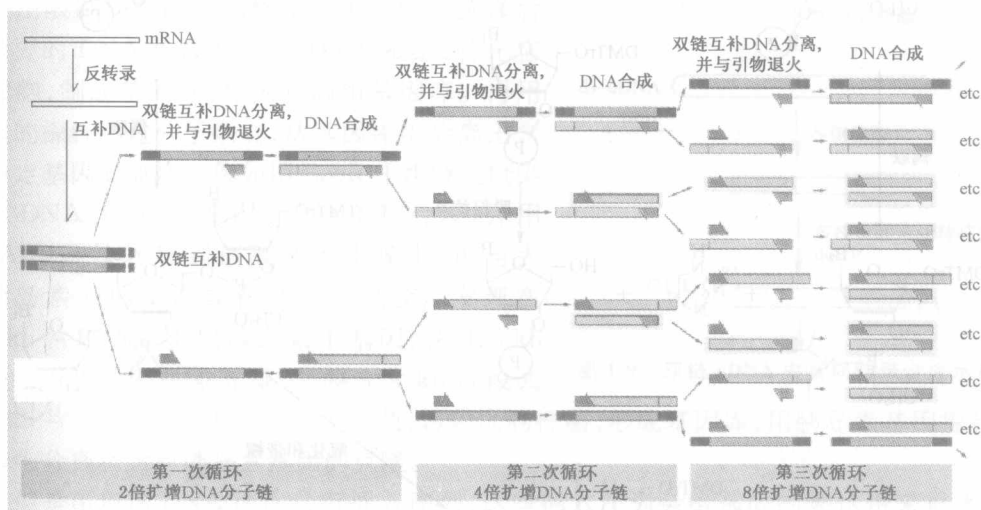


图 1-7 RT-PCR 扩增基因示意图

PCR 技术有很高的灵敏性,可以扩增极微量的 DNA,甚至单个细胞来源的 DNA 就可以作为 PCR 的模板扩增新生链。PCR 技术也有很强的特异性。其特异性取决于引物与模板结合的特异性,引物设计是保证 PCR 特异性的重要环节。PCR 反应中要进行反复的热变性,耐热 DNA 聚合酶(Taq DNA 聚合酶)是保证 PCR 高效率的关键,现已发现多种耐高温的 DNA 聚合酶,并已有商品供应。由于 Taq DNA 聚合酶缺乏校正功能,在 PCR 反应过程中会发生错误配对,虽然发生错误配对的概率不高,但仍是一个不容忽视的问题。

## 第二节 基因工程的基本过程

基因工程是指某种生物细胞的基因或人工合成的基因经重组后,引入另一种生物细胞,在此种细胞内大量合成该基因编码的蛋白质(或多肽),改变此种细胞的基因表型。合成的蛋白质(或多肽)提纯后形成基因工程产品,具有重要的应用价值。

### 一、目的基因的制备

#### (一) 人工合成

利用化学合成基因片段和 DNA 连接酶的催化作用合成基因。自从 DNA 合成仪问世



以来,人工合成的效率更高,一般只需要 4~5 min 就可以延长一个核苷酸长度,化学合成脱氧寡核苷酸多采用固相磷酸三酯法,其基本反应如图 1-8 所示。

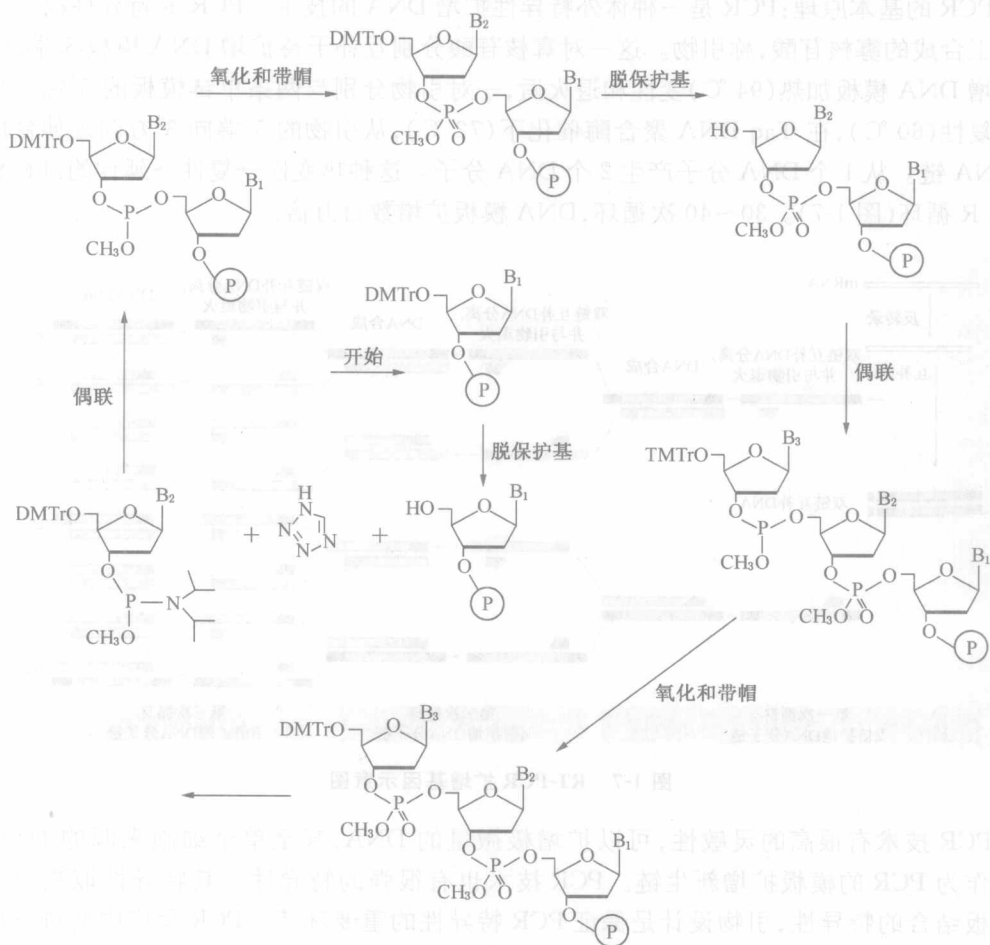


图 1-8 用固相磷酸三酯法合成脱氧寡核苷酸

## (二) 反向转录

如果所需基因比较长,人工合成工作量太大,从组织中分离也不容易,则用反向转录方法合成。以胰岛素为例,先从组织制备信息 RNA(mRNA),再以 mRNA 为模板用 Oligo(dT)为引物,在反向转录酶催化下合成与 mRNA 碱基互补的单链环形 DNA(ss-cDNA)。然后用碱水解除去 mRNA,并以 ss-cDNA 为模板,在 DNA 聚合酶催化下合成互补双链环形 DNA(ds-cDNA)。最后用 S<sub>1</sub> 核酸酶处理,切去发夹结构和单链结构。但由此途径合成的 ds-cDNA 含有该组织细胞内各种各样的遗传信息,不仅仅是某一特定的基因,必须与载体 DNA 重组,转化细菌制备 cDNA 基因库,然后用合适的探针从 cDNA 基因库中筛选分离出带有所需 cDNA 基因的克隆(图 1-9)。

S<sub>1</sub> 核酸酶活力不易控制得适当,往往会过多或过少地切除两端序列,而且使 ds-cDNA 丢失 5'端编码序列,通常阳性克隆中 ds-cDNA 的长度只有 500~600 bp。为此,Okayama-Berg 不用 S<sub>1</sub> 核酸酶,而用 RNase H 和 DNA 聚合酶 I 催化第二条链的合成,然后制备基因