东北师范大学文库

基因工程原理与技术

JIYIN GONGCHENG YUANLI YU JISHU

王 丽 编著

东北师范大学出版社

China需要全本请访问 www.ertongbook.com

DBSFDXWK

北京大学图书出版事业部
DBSDTSCBS

ISBN 7-5602-3216-7

9 787560 232164 >

ISBN 7-5602-3216-7/O · 35

定价：22.00元

China

Q28
W233

东北师范大学文库

基因工程原理与技术

王　丽　编著

A1088863

东北师范大学出版社
长　春

China

图书在版编目（CIP）数据

基因工程原理与技术/王丽编著. —长春：东北师范大学出版社，2002.12

ISBN 7-5602-3216-7

Ⅰ.基... Ⅱ.王... Ⅲ.基因—遗传工程—高等学校—教材 Ⅳ.Q78

中国版本图书馆 CIP 数据核字（2002）第 089496 号

□出 版 人：贾国祥

□责任编辑：尹 辉 □封面设计：李冰彬

□责任校对：李金枝 □责任印制：张允豪

东北师范大学出版社出版发行

长春市人民大街 138 号（130024）

电话：0431—5687213

传真：0431—5691969

网址：http://www.nnup.com

电子函件：sdcbs@mail.jl.cn

东北师范大学出版社激光照排中心制版

吉林省吉新月历制版印刷有限公司印刷

2002 年 12 月第 1 版 2002 年 12 月第 1 次印刷

开本：850mm×1168mm 1/32 印张：9.5 字数：216 千

印数：0 001 - 2 000 册

定价：22.00 元

China

本书系东北师范大学
图书出版基金项目

China需要全本请访问 www.ertongbook.com

前　言

《基因工程原理与技术》是在作者为本科生和研究生开设的“基因工程”课程讲义的基础上，参考了国内外有关资料编写而成的。编写此书的目的是为基因工程课程提供一本简明实用的教学用书。本书内容包括基因工程原理和基因工程技术两部分。本书的特点是加强了对基因工程基本概念的介绍，将重点放在解释“为什么这样做”而不是仅仅告诉读者“怎样做”。学生只有在了解了基因工程的基本原理后，才能有目的地去学习，去实践，去创新。

基因工程是现代生物学重要的组成部分，是一门发展非常迅速的新兴学科。新的成果在不断补充和更新现有的知识内容，新的技术和方法在不断改进和完善已有的实验方法和工艺。所以，一本介绍基因工程的书很难写得既全面又先进。作者在编写时，力求在基础知识和实用性上满足高等院校本科生和研究生的学习需要，尽量使用简单的图表来阐述问题。为了便于学生在学习时掌握重点，在基因工程原理部分的各章末尾列出了思考题，还在书后附了参考书目。另一方面的努力是尽量精炼语言，减少与其他相关书籍知识内容的重复，在保证质量的同时减少字数，降低出版的成本。尽管作者作了很大的努力，但是由于能力和时间的限制，书中的错误在所难免，希望读者及时指出，以便及时修正。

在本书的编写和出版过程中，作者得到了各方面的支持和帮

China

助。东北师范大学出版社出版基金给予经费方面的资助。东北师范大学生命科学学院的吴志学同志为全书绘制了插图。博士研究生房金波协助校对书稿，硕士研究生王晔、陈卫华和97级基地班学生李力帮助录入书稿的文字。英国剑桥大学生物化学系的Gonzalo Domingo博士帮助查找国外资料。在此书即将出版之际，向他们表示衷心的感谢。

王　丽

2002年11月于长春

China

目　录

前　言 …… 1
第一部分　基因工程原理
第一章　绪　论 …… 1
1.1　基因工程的发展史 …… 1
1.1.1　理论上三个重要的发现 …… 1
1.1.2　技术上三个重要的成果 …… 2
1.2　基因工程的研究内容 …… 3
1.2.1　基因工程 …… 3
1.2.2　基因工程的研究内容 …… 4
1.3　基因工程的应用 …… 5
1.3.1　在医药业的应用 …… 5
1.3.2　在农业方面的应用 …… 8
1.3.3　在畜牧业方面的应用 …… 9
思考题 …… 10
第二章　基因工程的基本操作程序 …… 11
2.1　带有目的基因的 DNA 片段的制备 …… 11
2.1.1　从已有的生物基因组中分离 …… 11
2.1.2　人工合成法 …… 13

China

2.2 DNA 片段与载体 DNA 体外重组 …… 15
2.2.1 DNA 分子的剪切 …… 15
2.2.2 DNA 分子的连接 …… 15
2.2.3 碱性磷酸酶的作用 …… 19
2.3 DNA 重组体转入受体细胞 …… 20
2.3.1 受体细胞 …… 20
2.3.2 DNA 重组体转入受体细胞 …… 23
2.4 重组体克隆的筛选与鉴定 …… 24
2.4.1 表型直接筛选法 …… 24
2.4.2 菌落或噬菌斑原位杂交 …… 24
2.5 外源基因的表达 …… 25
2.5.1 启动子 …… 25
2.5.2 核糖体结合位点 …… 27
2.5.3 真核基因在大肠杆菌体系中的表达 …… 28
思考题 …… 29
第三章 基因工程的工具酶 …… 30
3.1 引 言 …… 30
3.2 剪切酶 …… 31
3.2.1 限制性核酸内切酶 …… 31
3.2.2 核酸外切酶 …… 37
3.2.3 DNA 酶 …… 38
3.3 修饰酶 …… 39
3.3.1 磷酸酶 …… 39
3.3.2 甲基化酶 …… 39
3.3.3 聚合酶 …… 40
3.4 连接酶 …… 43
3.4.1 连接反应 …… 43
3.4.2 连接酶 …… 43

China

思考题 …… 44
第四章　基因工程的载体 …… 45
4.1　质　粒 …… 46
4.1.1　一般生物学性状 …… 46
4.1.2　作为载体的特性 …… 47
4.1.3　两种常用的质粒 …… 49
4.1.4　利用质粒进行克隆 …… 54
4.2　噬菌体 λ …… 56
4.2.1　一般生物学特性 …… 56
4.2.2　利用噬菌体 λ 进行克隆 …… 59
4.2.3　λZAP …… 64
4.3　单链噬菌体（M13 系列） …… 65
4.3.1　一般生物学特性 …… 65
4.3.2　丝状噬菌体载体及 M13 载体 …… 67
4.3.3　噬菌体展示系统 …… 70
4.4　粘　粒 …… 72
思考题 …… 73
第五章　基因文库的构建 …… 74
5.1　基因组文库 …… 75
5.1.1　原　理 …… 75
5.1.2　构建的程序 …… 77
5.2　cDNA 文库 …… 82
5.2.1　原　理 …… 82
5.2.2　构建的程序 …… 82
5.3　特殊序列文库 …… 85
5.4　酵母人工染色体 …… 87
思考题 …… 89

China

第六章 聚合酶链反应 …… 90
6.1 基本原理 …… 90
6.1.1 反应过程 …… 91
6.1.2 反应物主要成分 …… 93
6.1.3 基本操作 …… 95
6.2 PCR 的种类 …… 96
6.2.1 反向 PCR …… 96
6.2.2 跳跃 PCR …… 97
6.2.3 锚式 PCR …… 98
6.3 应用 PCR 时的注意事项 …… 99
6.3.1 引物的设计 …… 99
6.3.2 实验操作 …… 101
6.3.3 避免序列的错误扩增 …… 101
6.3.4 污染问题 …… 102
6.4 PCR 的应用 …… 102
6.4.1 在医学方面的应用 …… 102
6.4.2 在基础研究方面的应用 …… 104
思考题 …… 105
第七章 人类基因组计划 …… 106
7.1 人类基因组计划的概述 …… 106
7.1.1 人类基因组计划的由来 …… 106
7.1.2 人类基因组计划的目标 …… 107
7.1.3 人类基因组研究的应用 …… 108
7.2 人类基因组研究的主要内容 …… 113
7.2.1 建立遗传图谱 …… 113
7.2.2 建立物理图谱 …… 114
7.2.3 DNA 序列测定 …… 115
7.2.4 基因的确定和分析 …… 115

China需要全本请访问 www.ertongbook.com

7.3　人类基因组研究的策略 …… 116
7.3.1　人类基因组研究的基本思路 …… 116
7.3.2　确定特定的基因 …… 118
7.3.3　利用染色体特征研究人类基因组 …… 120
7.4　人类基因组研究引发的社会和伦理问题 …… 122
7.4.1　伦理和社会学方面 …… 122
7.4.2　商业与法律方面 …… 124
7.5　人类基因组计划的研究现状与展望 …… 125
7.5.1　研究现状 …… 125
7.5.2　展　望 …… 127
思考题 …… 133
第八章　基因工程的安全防护 …… 134
8.1　生物公害 …… 134
8.2　生物公害的控制 …… 135
8.2.1　实验人员适应性训练 …… 135
8.2.2　生物防护 …… 136
8.2.3　物理防护 …… 137
8.2.4　重组体的保管 …… 137
8.3　植物基因工程的潜在危害和防护 …… 138
8.4　中国的《基因工程安全管理办法》 …… 138
8.4.1　适用范围 …… 139
8.4.2　管理体系 …… 139
思考题 …… 140
第二部分　基因工程常用技术
第九章　质粒 DNA 的提取与纯化 …… 143
9.1　概　论 …… 143
9.1.1　细菌培养物的培养 …… 143
9.1.2　细菌的收获和裂解 …… 144

China

9.1.3 质粒 DNA 的提取和纯化 …… 145
9.2 质粒 DNA 的小量制备 …… 146
9.2.1 细菌的收获 …… 146
9.2.2 细菌的裂解 …… 147
9.3 质粒 DNA 的大量制备 …… 150
9.3.1 在丰富培养基中扩增质粒 …… 150
9.3.2 细菌的收获 …… 151
9.3.3 细菌的裂解 …… 151
9.4 质粒 DNA 的纯化 …… 155
9.4.1 聚乙二醇沉淀法 …… 155
9.4.2 氯化铯—溴化乙锭梯度平衡离心法 …… 157
9.4.3 纯化后的处理 …… 159
第十章 DNA 凝胶电泳技术 …… 165
10.1 琼脂糖凝胶电泳 …… 166
10.1.1 概 论 …… 166
10.1.2 琼脂糖凝胶的制备及检测 …… 171
10.1.3 DNA 的回收与纯化 …… 177
10.2 聚丙烯酰胺凝胶电泳 …… 185
10.2.1 概 论 …… 185
10.2.2 非变性聚丙烯酰胺凝胶 …… 187
10.3 其他类型的凝胶电泳 …… 195
10.3.1 链分离凝胶电泳 …… 195
10.3.2 变性梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳 …… 196
10.3.3 脉冲电场凝胶电泳 …… 196
第十一章 RNA 分析的主要方法 …… 198
11.1 RNA 分析概述 …… 198
11.2 Northern 杂交简介 …… 199
11.3 RNA 电泳 …… 201

China

11.3.1 经乙二醛和二甲基亚砜变性处理后进行的RNA电泳 …… 201
11.3.2 在含有甲醛的凝胶上进行的RNA电泳 …… 203
11.4 转　膜 …… 205
11.4.1 变性RNA转移至硝酸纤维素滤膜 …… 205
11.4.2 变性RNA转移至尼龙膜 …… 209
11.5 转膜前后的RNA染色 …… 210
11.5.1 方法I …… 210
11.5.2 方法II …… 210
11.6 杂交和放射自显影 …… 211
第十二章 Southern杂交 …… 213
12.1 概　述 …… 213
12.2 基因组DNA的分离 …… 214
12.3 将DNA从凝胶转至固相支持体上 …… 215
12.3.1 转移的方法 …… 215
12.3.2 DNA转移至硝酸纤维素滤膜 …… 218
12.3.3 DNA从凝胶转移至尼龙膜 …… 221
12.4 探针与固定化的核酸杂交 …… 223
12.4.1 探针与固定于膜上的DNA杂交 …… 224
12.4.2 放射性标记的寡核苷酸与基因组DNA杂交 …… 229
12.4.3 从杂交膜上除去放射性标记的探针 …… 231
第十三章 Western印迹法 …… 233
13.1 概　述 …… 233
13.2 蛋白样品的制备和电泳 …… 235
13.2.1 裂解哺乳动物细胞和组织 …… 235
13.2.2 电　泳 …… 237
13.3 将蛋白质从凝胶转移至固相支持体 …… 238

China

13.4 对固定化的蛋白质进行染色 …… 241
13.5 封闭杂交膜上的免疫球蛋白结合位点 …… 243
13.6 抗体和靶蛋白的结合 …… 244
13.6.1 第一抗体与硝酸纤维素滤膜共温育的方法 …… 244
13.6.2 二级免疫试剂与硝酸纤维素滤膜共温育的方法 …… 245
13.6.3 酶联抗体生色底物的使用 …… 247
第十四章 DNA 序列测定 …… 250
14.1 概 述 …… 250
14.1.1 Sanger 双脱氧链终止法 …… 251
14.1.2 Maxam-Gilbert DNA 化学降解法 …… 255
14.2 随机测序 …… 256
14.2.1 靶 DNA 的纯化和连接 …… 258
14.2.2 靶 DNA 的断裂 …… 260
14.2.3 DNA 的修补及大小选择 …… 262
14.2.4 载体 DNA 的制备 …… 263
14.2.5 靶 DNA 片段与载体 DNA 连接 …… 264
14.3 定向测序 …… 265
14.3.1 生成若干套嵌套的缺失突变体 …… 265
14.3.2 利用外切核酸酶Ⅲ生成嵌套的缺失突变体 …… 268
14.4 Sanger 双脱氧链终止法测序 …… 271
14.4.1 准 备 …… 271
14.4.2 配制凝胶 …… 274
14.4.3 加样及电泳 …… 277
14.4.4 测序凝胶的放射自显影 …… 278
14.4.5 从凝胶上读取 DNA 序列 …… 279
参考文献 …… 281

China

第一章

绪　论

1.1　基因工程的发展史

基因工程诞生于20世纪70年代初期，是在现代分子生物学领域中的许多理论和技术研究成果基础之上发展起来的。现代分子生物学在理论方面的三个重要的发现和在技术方面三个重要的成果对基因工程的诞生起到了决定性的作用。

1.1.1　理论上三个重要的发现

1. 生物的遗传物质——DNA的发现

1934年，艾弗里（Avery）在一次学术会议上首次报道了有关肺炎球菌转化实验的研究结果。遗憾的是，他的论文在当时并未得到科学界的承认。10年以后，这一重要的科研成果才被公开发表。艾弗里（Avery）工作的意义在于证明了DNA是生物的遗传物质，同时还说明DNA可以将一个细菌的性状传给另一个细菌。可以说艾弗里（Avery）的工作是现代生物科学的开端。

2. DNA双螺旋结构和半保留复制机理的建立

China

1953年，沃森（Watson）和克里克（Crick）首次提出了DNA的双螺旋结构和半保留复制的机理。这一重大的科学发现大大地促进了现代生物科学的发展。

3. 遗传信息传递方式的确立

20世纪60年代，以尼然博格（Nirenberg）、奥科（Ochoa）和霍拉纳（Khorana）等为代表的一批科学家经过大量的工作和艰苦的努力，破译了遗传密码，确定了遗传信息的传递方式。至1966年，全部64个遗传密码被破译，并排出密码字典，提出了中心法则，为基因工程的诞生奠定了理论基础。

1.1.2　技术上三个重要的成果

1. 基因工程的工具酶

基因工程是一门综合性的生物技术。仅有理论上对遗传物质的认识和了解还不够。如何将庞大的DNA分子进行切割并重新组装是生物科学家们遇到的一个大难题。

1966年，科学家发现了DNA连接酶。

1970年，史密斯（Smith）和威尔科克斯（Wilcox）在流感嗜血杆菌（*Haemophilus influenzae*）中分离并纯化了限制性内切酶*Hind* Ⅲ，使DNA分子的切割成为可能

1972年，核酸内切酶*Eco*R I被博耶（Boyer）实验室发现并纯化。

1979年，鲍梯莫尔（Baltimore）和特米恩（Temin）领导的两个研究小组分别在各自的工作中发现了逆转录酶。这一成果的重要意义在于打破了中心法则DNA→RNA→蛋白质的模式，使真核基因的制备成为可能。

2. 基因工程的载体

工具酶的发现和纯化只解决了DNA分子的切割和连接问题。由于大多数DNA片段并不具备自我复制的功能，使DNA的

China需要全本请访问 www.ertongbook.com