

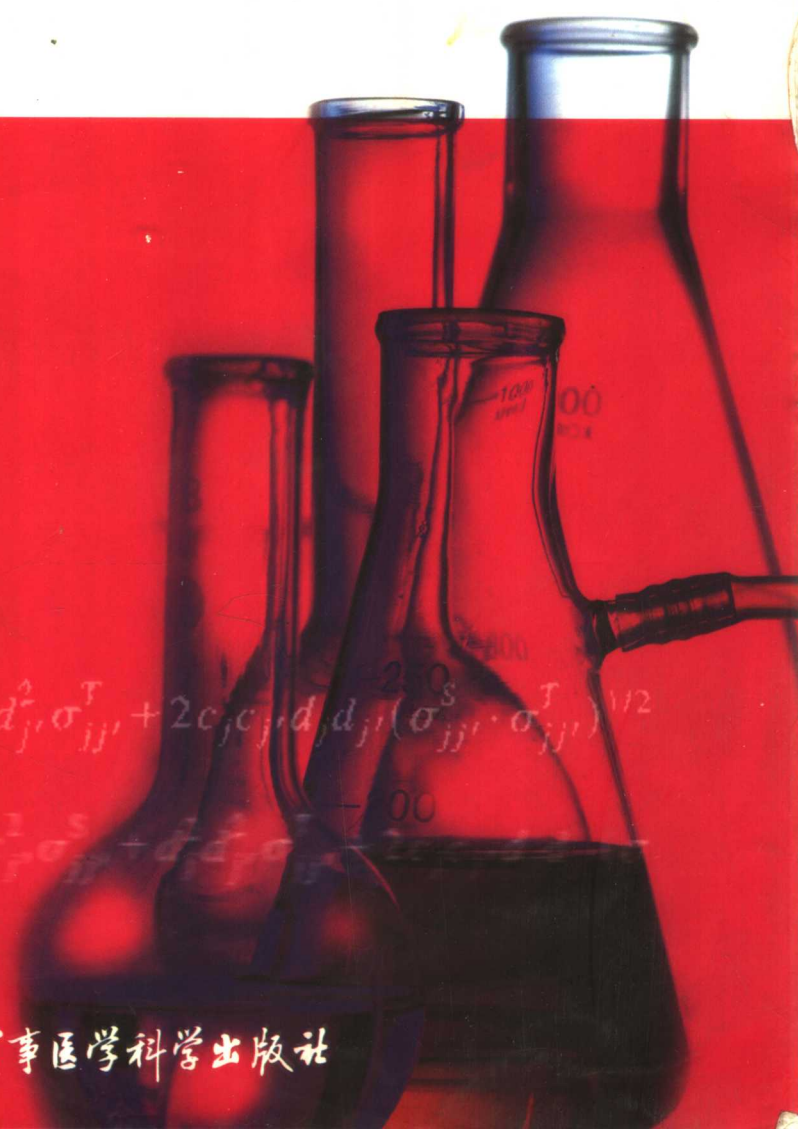
“985工程”兰州大学特色研究方向学科建设项目
国家自然科学基金项目(项目批准号: 30371745)
科技部“中国人口遗传资源共享平台建设项目”

共同资助

现代生物技术概论

XIANDAI SHENGWUJISHU GAILUN

主编 谢小冬



$$\sigma_{jj'} = c_j^2 c_{j'}^2 \sigma_{jj'}^S + d_j^2 d_{j'}^2 \sigma_{jj'}^T + 2c_j c_{j'} d_j d_{j'} (\sigma_{jj'}^S \cdot \sigma_{jj'}^T)^{1/2} \times \cos \theta_{ST}$$
$$\sigma_{jj'} = c_j^2 c_{j'}^2 \sigma_{jj'}^S + d_j^2 d_{j'}^2 \sigma_{jj'}^T + 2c_j c_{j'} d_j d_{j'} (\sigma_{jj'}^S \cdot \sigma_{jj'}^T)^{1/2} \times \cos \theta_{ST}$$



军事医学科学出版社

现代生物技术概论

主 编 谢小冬

副主编 尤崇革 王亚玲

编 者 (以姓氏笔画为序)

马存智	王亚玲	尤崇革	田晓玲	吕奇灵
任振新	张连文	李奇兵	李建锋	邵 伟
林光华	周瑞霞	俞卫平	陕雪梅	钱 瑾
蒋 凡	谢小冬	褚宪明		

军事医学科学出版社

· 北 京 ·

内容提要

本书以现代生物技术的概念和技术原理、技术概况、技术过程和操作、应用及其与人类的关系为主线,结合编者多年讲授研究生课程《现代生物技术》的实践经验的基础加工整理而成。该书的编写旨在介绍最基本的原理、技术及应用,以便读者从更深层次上了解现代生物技术的本质和发展趋势,同时力求语言上通俗易懂,以更适合于广大读者阅读理解。

图书在版编目(CIP)数据

现代生物技术概论/谢小冬主编. - 北京:军事医学科学出版社,2005
ISBN 978-7-80121-676-2

I. 现… II. 谢… III. 生物技术-概论 IV. Q81

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2005)第 131063 号

出 版:军事医学科学出版社

地 址:北京市海淀区太平路 27 号

邮 编:100850

联系电话:发行部:(010)63801284

63800294

编辑部:(010)66884418,66884402 转 6213,6216,6315

传 真:(010)63801284

网 址:<http://www.mmsp.cn>

印 装:北京北方印装厂

发 行:新华书店

开 本:787mm×1092mm 1/16

印 张:23.5

字 数:570 千字

版 次:2007 年 1 月第 1 版

印 次:2007 年 1 月第 1 次

定 价:43.00 元

本社图书凡缺、损、倒、脱页者,本社发行部负责调换

前 言

生物技术是人类科学技术发展史上历史最为悠久的学科之一,也是对人类社会进步具有重大贡献的学科之一。中国是世界文明的发源地之一,中国古代就曾创造了光辉灿烂的生物技术成就。例如:六七千年前,粟已经在中国黄河流域被广泛种植。在河北的安慈山文化区,发现了距今 7800 年的储粮窖穴,内藏大量粟粒。从已发现的 88 个粟米窖藏估算,总量达到 13 万斤以上,可见粟在那时已成为主要的谷物,并已大规模种植。此外,黍、稷、高粱等耐寒植物也先后被生活在古代的北方居民改造为重要的人类食物来源。我国长江流域的早期作物则以稻为主。在余姚河姆渡遗址内则发现了大量的稻粒、稻壳等遗存物,估计总量约 120 吨。在动物方面,马、牛、羊、猪、狗、鸡等都是较早就被驯化的动物。中国是最早把野猪培育成家猪的国家之一,在河姆渡遗址中就出土有陶猪。我国至少在春秋时期就有了马和驴的杂种,异种间可以杂交产生新种早就为我国劳动人民在生产实践中运用了。嫁接技术在我国至迟到战国后期就已经出现。制曲酿酒是我国应用微生物的最早例证。根据历史记载,我国酿酒历史至少有四五千年。在商代的甲骨文中就已经发现“醴”、“酒”等酒名。在殷墟中发现的酿酒作坊遗址,证明早在 3000 多年前,我国的酿酒事业已经相当发达。但是我国的酿酒历史还可以追溯到 5000 年前,从大汶口等遗址出土的陶制品有盛酒的容器,即可证明。关于酿酒的发明人,在文献记载最多的便是夏代的仪狄和杜康。在我国医学史上,免疫的概念很早就有了。《黄帝内经》中“正气内存,邪不可干”、“邪之所凑,其气必虚”就是对免疫概念的最早描述。免疫技术进一步的应用,当推预防天花的种人痘法。大约在公元 16 世纪下半叶,我国的劳动人民发明了预防的方法——人痘接种法。清朱奕梁《种痘心法》说:“其苗传种愈久,则药力之提拔愈清,人工之选炼愈熟,火毒汰尽,精气独存,所以万全而无害也。若时苗能连种七次,精加选炼,即为熟苗。”据此可见,我国人民在人痘苗选种培育上是完全符合现代疫苗的科学原理的。这种对人痘苗“提拔愈清,人工之选炼愈熟,火毒汰尽,精气独存”的选育工作,与今天用于预防结核病的“卡介苗”的定向减毒选育、使菌株毒性汰尽、抗原性独存的原理,是完全一致的。

进入新世纪,人口、粮食、能源、资源、环境成为当前人类生存面临的重大问题。同时我们欣喜地看到,21 世纪将是生命科学的世纪,现代生物技术及其产业将进入快速稳步发展的全新时期。生物技术将在最终解决人口、健康、粮食、能

源、资源、环境等影响人类生存的重大问题中发挥越来越大的作用,因而它将对世界经济的发展和人类生活质量的提高产生重大影响。现代生物技术在可持续发展中将具有不可替代的作用。因此,从国民经济发展的战略需求出发,充分发挥现代生物技术的重要作用,对加速我国传统产业结构的根本性转变,促进可持续发展,加速现代化建设,实现我国经济高速持续发展、人民生活质量稳步提高、资源永续供给和生态环境质量改善的目标,以及提高我国的国际地位和国际竞争力具有十分重要的意义。

世界各国政府在规划战略发展时都十分重视现代生物技术的研究与产业化,把现代生物技术列为优先发展领域,竞相投巨资建立国家级的现代生物技术研究中心或基地,组织精兵强将,以崭新的产业理念、一流的设施仪器、一流的课题、一流的人才、一流的组织管理,获取一流的技术成果,加速抢占现代生物技术产业的制高点。如美国“面向 21 世纪的生物技术计划”;日本“官、产、学一体化推进 21 世纪的生物技术计划”中提出了“生物产业立国”口号;英国政府推出到 2005 年的“发展生物技术”战略报告,目标是保持生物技术位于世界第二的水平;以色列和韩国的农业生物技术发展水平也已处于国际前列,印度也谋求成为生物技术大国,并专门成立了“生物技术部”;新加坡政府计划用 5 年时间跻身生物技术领先行列,建成“生命科学中心”。欧洲“尤里卡计划”也把生物技术作为发展重点。美国先后形成了 5 个生物谷,培育了 1400 多家技术企业,并把每年 4 月 21 至 28 日作为生物技术周;一批资产百亿美元以上或者年经营额数十亿美元的大型企业纷纷成为生物技术产业的巨人,大大加速了现代生物技术产品产业化、市场化的进程。

根据我国未来现代生物技术及其产业化发展的趋势和发展规模,加快基础研究人才、生物技术人才、工程人才、以及管理人才和经营人才的培养,尤其是培养既懂专业业务、又懂管理、经营的复合型人才已迫在眉睫。鉴于现代生物技术对人类经济、科技、政治和社会发展的作用是全方位的,现代生物技术对社会产生了重大影响,它和物理、化学、数学等学科一样,已经成为自然科学乃至社会科学发展的基础。因此,现代生物技术全方位的发展呼唤着培养更多高水平复合型的科技人才,也需要有更多的决策者、管理者、研究者,我们的本科生、研究生对此应予以关注和一定程度的了解。

本书以现代生物技术的概念和技术原理、技术概况、技术过程和操作、应用及其与人类的关系为主线,结合编者多年讲授研究生课程《现代生物技术》的实践经验基础加工整理而成。本书的编写旨在介绍生物技术最基本的原理、技术以及应用,以便读者从更深层次上了解现代生物技术的本质和发展趋势,同时力求语言上的通俗性、科普性,以更适合于广大读者阅读理解。

全书内容共分十六章:绪论介绍生物技术的基本概念和国内外发展现状等;第一章介绍各种常用的 PCR 技术;第二章介绍分子标记技术;第三章简要介绍植物转基因技术的基本原理、操作及其与农业的关系;第四章介绍基因敲除技术和 RNAi 技术的基本原理、操作及其应用;第五章介绍蛋白质组研究技术的原理、操作过程等;第六章介绍结构生物学技术知识等;第七章介绍很有发展潜力的膜片钳技术;第八章介绍生物芯片的构成、制作过程及应用等;第九章介绍生物反应器技术的概念、进展和应用;第十章介绍干细胞技术的基本原理、操作过程及应用;第十一章介绍动物细胞工程技术;第十二章介绍基因制药和基因疫苗;第十三章介绍基因治疗和诊断的基本原理、操作过程及其基因疗法;第十四章介绍中药指纹图技术;第十五章介绍环境科学中的生物技术;第十六章专门介绍和探讨了生物伦理及社会学问题,主要介绍了现代生物技术发展所带来的伦理、社会学问题、基因专利、基因研究的法律控制等。

本书的出版得到了国家自然科学基金项目“广谱抗菌转基因甘草品种的建立”(项目批准号:30371745),国家“985 工程”兰州大学第二批特色研究方向学科建设项目“基因工程制药”项目,甘肃省科技攻关重点项目“利用植物反应器生产溶栓药物的研究”(2GS042-A43-013-04),兰州大学引进人才专项基金“输血相关传染病检测生物芯片的研发与临床应用”的资助。许多专家同行对本书的编写提出了宝贵意见,并给予大力支持,在此一并致以最真诚的谢意!

本书既适合各相关领域工作者(大专院校教师、科研人员、管理人员)阅读,又可供生物学爱好者参考,也可作为高等院校文科和理工科各专业所开设相关选修课的教材,以扩大学生的知识面。

由于时间仓促,加之作者水平所限,书中难免有错讹、疏漏之处,恳请读者批评指正,我们不胜感激。

编者

2005 年 8 月

目 录

绪论	(1)
----------	-----

基础篇

第1章 PCR 技术	(7)
第1节 常规 PCR 技术	(7)
第2节 反转录 PCR	(15)
第3节 扩增已知序列两侧 DNA 的 PCR	(20)
第4节 扩增未知 DNA 序列的 PCR	(24)
第5节 定量 PCR	(31)
第6节 免疫 PCR	(43)
第7节 原位 PCR	(53)
第8节 其他方法的 PCR	(63)
第9节 PCR 在各个领域中的应用总结	(69)
第2章 DNA 分子标记	(77)
第1节 DNA 分子标记概述	(77)
第2节 AFLP 技术	(79)
第3节 STR 技术	(85)
第4节 SNP 技术	(92)
第3章 植物转基因技术	(101)
第1节 植物转基因受体的选择	(101)
第2节 植物转基因	(103)
第3节 转基因植物的鉴定技术	(106)
第4章 基因敲除技术和 RNAi 技术	(128)
第1节 基因敲除	(128)
第2节 RNAi 技术	(133)
第5章 蛋白质组学研究技术	(152)
第1节 蛋白质组学及其研究技术概述	(152)
第2节 蛋白质样品的制备和分离鉴定	(153)
第3节 蛋白质的鉴定	(161)
第4节 蛋白质的定量分析	(162)
第5节 蛋白质的相互作用	(167)

第6节 蛋白质组信息学	(174)
第7节 蛋白质组学的应用	(176)
第6章 结构生物学技术	(181)
第1节 X射线晶体学相关技术	(181)
第2节 核磁共振	(188)
第3节 显微学方法	(195)
第7章 膜片钳技术	(201)
第1节 膜片钳技术概述	(201)
第2节 膜片钳主要技术操作	(206)
第3节 膜片钳技术与其他技术的结合	(209)

应用篇

第8章 生物芯片技术	(213)
第1节 基因芯片	(213)
第2节 蛋白芯片	(220)
第3节 组织芯片和细胞芯片	(225)
第9章 生物反应器	(227)
第1节 植物细胞培养反应器	(227)
第2节 植物生物反应器	(234)
第3节 高等植物叶绿体转化技术	(243)
第4节 动物生物反应器	(246)
第10章 干细胞技术	(260)
第1节 干细胞概论	(260)
第2节 胚胎干细胞	(265)
第3节 成体干细胞	(269)
第4节 干细胞研究的前景	(281)
第11章 动物克隆技术和转基因	(286)
第1节 动物克隆技术	(286)
第2节 克隆技术分析	(291)
第3节 转基因动物	(297)
第12章 基因制药与基因疫苗	(304)
第1节 基因制药	(304)
第2节 基因疫苗	(307)
第13章 基因诊断和治疗技术	(317)
第1节 基因诊断	(317)
第2节 基因治疗	(321)

第 14 章 中药指纹图谱技术 (332)

 第 1 节 概 述 (332)

 第 2 节 中药指纹图谱的主要技术 (334)

第 15 章 环境生物技术 (339)

 第 1 节 环境生物技术的概述 (339)

 第 2 节 环境生物技术的特点和研究内容 (341)

伦理、法律篇

第 16 章 生物技术引发的伦理和法律问题 (349)

 第 1 节 生物技术引发的几个热点话题 (349)

 第 2 节 各国生物安全政策与法规简介 (358)

 第 3 节 生物技术发明的法律保护 (363)

绪 论

21 世纪生物技术革命和产业革命有可能从根本上解决世界人口、粮食、环境、能源等影响人类生存与发展的重大问题,在医药、农业、环境、能源等领域引发新的全方位的产业革命。一是推动医学史上继公共卫生制度建立、麻醉术和疫苗抗生素应用之后的第四次革命,提高人类健康水平;二是推动第二次绿色革命,改善人类膳食水平;三是创造新的生物品种,改善生态环境;四是推动能源革命,全球生物质能量的储量为 18 000 亿吨,相当于 640 亿吨石油;五是推动新军事变革。

1 概念

现代生物技术是指以现代生命科学理论为基础,结合信息学、系统科学、工程控制等理论和方法、手段,通过对生物体及其细胞、亚细胞和分子的组分、结构、功能与作用机理开展研究来制造产品,或改造动物、植物、微生物等并使其具有所期望的品质特性,为社会提供商品和服务的一类高技术。它是源于分子生物学、细胞生物学等基础科学研究成果而发展起来的一门以生产应用为主的综合技术。

2 生物技术及其应用进展

大力发展生物技术及其产业目前已成为世界各国经济发展的战略重点。近十多年是世界生物技术迅速发展时期,无论在基础研究方面还是在应用开发方面,都取得了令人瞩目的成就,生物技术的研究成果越来越广泛地应用于农业、医药、轻工食品、海洋开发及环境保护等多个领域。

2.1 生物学在农业方面的应用进展

近年来,随着动植物转基因技术的不断成熟和发展,农业生物技术也迅速发展起来,并且围绕转基因农作物的竞争越来越激烈,在全世界范围内已掀起了生物技术及产业发展的“第二个浪潮”。

中国作为拥有 12 亿多人口的农业大国,所承受的压力将是巨大的。随着我国人口的增长,资源的短缺与环境的恶化和人民需求的急剧增加,我国持续农业和农村发展面临着越来越严峻的挑战。农业是国民经济和社会稳定发展的基础,随着人民生活的改善,按粮食安全的最基本标准人均 400~450 公斤计算,需要年生产粮食 6.4 亿~7 亿吨,要达到这个目标,就必须将现在的粮食总产量提高 30% 以上,而我国人均耕地面积只有 0.08 公顷,只有世界平均水平的 1/4,因而任务十分艰巨。解决中国农业问题的出路何在? 小平同志早就指出:“中国农业

问题的最终解决,还要依靠科技”,“将来农业问题的出路,最终要由生物工程来解决,要靠尖端技术”。而农业生物技术正是这场农业科技革命最重要的组成部分。

农业生物技术在农业可持续发展中将具有不可替代的作用。因此,从国民经济发展的战略需求出发,充分发挥生物技术在现代农业技术中的重要作用,对加速我国传统农业向现代农业的根本性转变,促进农业可持续发展,加速农业现代化建设,实现我国经济高速持续发展、人民生活质量稳步提高、资源永续供给和生态环境质量改善的目标,以及提高我国的国际地位和国际竞争力具有十分重要的意义。

最近几年来,农业生物技术领域中研究最活跃的是应用转基因技术,将目的基因导入动植物体内,对家畜、家禽及农作物进行品种改良,从而获得高产、优质、抗病虫害的转基因动植物新品种,达到充分提高资源利用效率,降低生产成本的目的。经过长期不断的努力,农业生物技术已取得重大突破,表现在:

(1)提高了农产品的产量和品质:根据人类的需要,把特定基因导入植物体,达到改良品质和增加产量的目的。

如美国每年消费月桂酸油达3.5亿美元。为了满足市场需求,美国生物技术研究人员把月桂树基因导入油菜,生产出含月桂酸油达40%的油菜籽,大大降低了成本并增加了产量。康乃馨花期较短,为了延长花期,澳大利亚的生物技术专家在康乃馨植株中引入一种基因,使花期延长了一倍,提高了观赏性。转基因番茄只有5%发病,基本上不减产,而对照发病率为99%,减产30%左右。中国水稻研究所的一项最新研究成果是应用生物工程技术培育出一种富含 γ -酪氨酸的水稻新品种,食用该大米能补充人体抑制性神经递质,有缓解和预防血压上升的功能。黄大年认为,适时补充微量的 γ -酪氨酸有利于高血压的缓解,又不会打破人体内氨基酸代谢的平衡,所以不必担心会引起低血压症状。

同时,中国科学家创造的两系法杂交水稻技术国际领先,累计增产粮食3500多亿公斤,已经推广到20多个国家;细胞工程技术培育的稻、麦、油菜、大豆、玉米新品种已大面积推广应用。

(2)抗病虫农作物育种:农作物病虫害是造成农业产量下降的主要因素之一。而常规的喷施农药,不但增加成本,而且对环境和产品产生污染。利用转基因育种技术可以把抗病抗虫基因导入植物,避免或减少病虫害。目前应用最广的抗虫基因是将苏芸金杆菌的结晶蛋白基因(Bt基因)导入植物。Bt基因已被转入棉花、玉米、烟草、番茄、马铃薯、水稻等到多种作物,并取得了良好的效果。荷兰一家植物生物技术公司应用转基因技术培育出一种抗真菌草莓新品种,减少了草莓病害,并延长了草莓保鲜期,经济效益明显增加。

我国的转基因抗虫棉研究与产业化达到世界先进水平。由于种植了转基因抗虫棉,每公顷农药施用减少34公斤,节省875元;每公顷产量和产值增加9.6%,每公顷减少劳动用工41个工,从而增加每公顷收入1378元,已经为农民创造了50亿元的收入。

到2003年底止,我国共受理转基因植物生物安全评价申请821项,批准585项。在获批准的项目中,中间试验325项、环境释放154项、生产性试验48项、发放安全证书55项。目前我国转基因作物种植面积210万公顷,占世界转基因作物种植面积约4%。

(3)转基因动物育种:动物基因工程研究不如植物基因工程开展得那样普及,主要集中在改善家畜、家禽的经济性状方面,现已取得了一些显著的成就。

已先后培育出转基因兔、羊、猪、牛、鸡等。美国伊利诺斯大学研究出一种带牛基因的猪,

这种转基因猪生长快、个体大、饲料利用率高、瘦肉多,可为养猪业带来丰厚的经济效益。转入人基因猪的获得,可望能解决人体移植动物器官的异体排斥问题。转基因动物育种技术的进步,不仅可提高畜牧业的生产效率,还可拓展家畜的新用途,为发展高效益畜牧业提供技术力量。目前至少有 29 种人用治疗性蛋白质已在转基因动物中生产,大部分在乳腺中,也有在血、尿和精液中,对其尚有争议。

我国已成功培育克隆羊和克隆牛,成为世界上掌握大型动物成年体细胞克隆技术的国家之一;转基因猪、羊、牛、鱼等动物已培育成功,转基因生物反应器为健康产品提供新的生产途径;胚胎移植技术改良的牛、羊新品种普遍推广,建成了中国特色的胚胎工程良种繁育和生产体系。

2.2 医药生物技术

21 世纪是生命科学的世纪,生物技术及其产业将进入快速稳步发展的全新时期。现代生物技术产业起始于医药领域。在过去的十几年间,生物技术研究开发的 60% ~ 80% 集中在医药领域,占重要地位的是基因工程药物的研究和商品化,被称为生物技术及产业发展的“第一个浪潮”。基因制药已从一个广泛应用的基本实验技术,发展成一个新兴的产业,受到了各方面人士的普遍关注,又被预言为“21 世纪的朝阳产业”。目前的基因工程产品主要包括疫苗、激素、生长因子和酶等,美国是主要生产国。20 世纪 80 年代初世界上第一个基因工程产品胰岛素在美国被批准上市,1986 年干扰素被批准生产。1992 年利用基因工程技术的产品专利在全世界有 2 000 种以上,有 400 多种基因工程药物目前正在临床试验中,处于实验室研制阶段的数以千计。在美国较大的生物技术公司有二三百家,欧洲也有同样数量的生物技术公司,产品的年销售额都以上亿美元计。在国际人类基因组计划基本破译了人类遗传密码之后,世界生命科学研究进入一个以蛋白质和药物基因学为重点的后基因组时代。日本与欧美国家在这一时代的技术争夺战也拉开了序幕,其基础目标是在 4 年内破译人体的 3 万个基因和 15 万个单核苷酸多态性碱基对序列,以发现导致老年痴呆症、癌症、糖尿病、高血压、过敏症等疾病的基因以及与药物反应有关的基因,从而针对不同患者的具体情况制定出最佳治疗方案。

(1) 基因治疗研究取得突破:基因治疗是将基因直接导入人体,通过控制目的基因的表达,抑制替代或补偿缺陷基因,从而恢复受体细胞、组织或器官的生理功能,达到治疗疾病的一种方法。目前,基因治疗已从实验室研究阶段进入临床试验与应用阶段,发达国家的基因治疗技术可谓日新月异,有可能革新整个医学预防和治疗领域。全球基因治疗临床方案数已达 300 多项,病例数超过 3 500 人,其中美国的病例占 80%;原本用于治疗单基因缺陷遗传的基因治疗技术,现已快速扩展到治疗癌症、艾滋病、心血管病等严重疾病,长期困扰人类的某些不治之症,有望得到治愈。现在,61% 的基因治疗病例为恶性肿瘤;24% 为艾滋病。

1996 年医学生物技术已在肥胖病基因治疗、血液替代品开发,把人基因转化的猪器官移植给人体等方面取得重大进展。我国在基因治疗研究方面,如血友病的基因治疗,已进入临床试验,取得了明显的治疗效果。针对肝癌等恶性肿瘤的基因治疗,已开展多方面的实验研究,为通过药审从而进入临床试验奠定技术基础。

(2) 生物技术药物的开发:采用 DNA 重组技术或其他生物技术研制的蛋白质或核酸类药物称为生物技术药物。现在胰岛素、干扰素、细胞因子等为代表的重组药物早已投入市场,并已逐步取代了传统产品,成为市场上的主流产品。重组胰岛素和重组干扰素药物在美国年销

售额均在 10 亿美元以上。1999 年,全球生物技术产品的总销售额就已经达到 500 亿美元,创造的总经济效益高达 3 000 亿美元。

1989 年我国第一个拥有自主知识产权的基因工程药物 α -1b 干扰素获准试生产;2003 年世界上第一个基因治疗药物“重组腺病毒-p53 抗癌注射液”在中国诞生。目前,我国已批准 20 种基因工程药物,5 种基因工程疫苗上市。其中具有自主知识产权的基因工程药物 9 种(含 21 个不同规格的产品),361 个基因工程药物与基因疫苗仿制品。我国已能够利用工程菌生产人胰岛素、重组乙肝疫苗、人干扰素、白细胞介素、人红细胞生成素、碱性成纤维细胞生长因子和链激酶等多种药物,开发出了多种诊断试剂盒应用于临床诊断。全国现有生物企业 11 764 家,2003 年实现工业总产值 4 686 亿元。其中,现代生物企业 2 762 家,实现总产值约 600 多亿元,14 年增长了 100 多倍。

2.3 现代轻工、化工和食品生物技术

轻工、食品行业是生物技术应用的重要领域之一,主要体现在以下三个方面:①是利用生物技术进行农副原料加工直接制成商品,如发酵制品、酿造等产品;②是以生物技术产品为基础,进行二次开发形成的新产业,如低聚糖加酶洗涤剂、高果糖浆等;③是以生物技术为手段对传统工艺进行改造,从而降低消耗、提高产品质量。多年来,食品生物技术产业的平均总产值占食品工业产值 15% 以上。现代生物技术与轻工、化工、食品制造技术相结合,开发新一代的生物技术产品,为这些行业产业结构与产品结构调整提供成熟技术。轻工、食品生物技术重点开发的领域有:

(1) 高产菌株和耐特殊环境微生物的遗传育种:对产量上已占优势的产品,提高生产菌的发酵能力;分离筛选生物合成新资源、新材料的微生物;采用 DNA 重组技术构建适应特殊环境的新菌种。

(2) 新型食品添加剂的开发和应用:当今人们要求食品更加天然、低脂低热、低胆固醇、不用或少用化学合成的添加剂,因此,用生物法代替化学合成法开发新型保鲜剂、香料、防腐剂、天然色素以及具有免疫调节、延缓衰老、抗辐射、调理肠胃的功能性食品添加剂,具有广阔的发展前景。

(3) 化工的开发和应用:微生物发酵法取代传统的化学合成法生产重要的化工原料丙酮酰胺,是我国第一个以生物转化方法替代化学合成方法生产的大宗化工产品。在我国微生物发酵法生产可生物降解塑料与添加剂的原料——乳酸已经接近万吨级的生产规模。发酵法取代传统生化提取法生产的透明质酸及其系列医药制剂,已成为具有国际市场竞争能力的名牌产品。我国化学法制备生物柴油已经基本成熟,实用性更强的生物法制备生物柴油即将进入中试。此外,我国生物制氢也已经初步完成中试。

(4) 新酶种的开发应用:继淀粉水解酶的品种配套和应用开拓取得显著成效以来,洗涤用酶制剂在国际上已成为一门新的产业。三大酶种(淀粉酶、糖化酶、蛋白酶)的活力达到翻番。加酶化妆品产品有皮肤柔软剂、脸部光洁剂、长发剂等,品种繁多,应用效果也很显著。

2.4 现代海洋生物技术

海洋生物学与生物技术相结合,产生了海洋生物技术这一新的领域。海洋生物技术作为加速开发利用海洋生物资源、改良海洋生物品种、提高海产养殖业产量和质量、获取有特殊药

用和保健价值的生物活性物质的新途径,越来越受到人们的重视,许多国家已将海洋生物技术作为 21 世纪发展战略的重要组成部分。目前,在海洋生物技术方面的主要研究工作,一是应用基因工程和细胞工程技术,培养鱼、虾、贝、藻类优良品种,大幅度提高海洋水产养殖的产量与质量;二是从海洋生物中提取生理活性物质。现已在上述两方面取得了大批重要科技成果,部分成果已经产业化。

我国在世界上首次研究成功海带单倍体育种技术、紫菜体细胞育苗技术、对虾三倍体与四倍体育苗技术、对虾精英移植技术等。在海水鱼、贝类的三倍体育苗技术和鱼类性别控制技术的研究方面也取得了重大进展。在代谢产物的研究与开发方面,利用海藻生产褐藻胶、琼胶、卡拉胶在世界上占有重要的地位。利用甲壳素和甲壳胺制成 846 人工皮肤、创伤愈合海绵、生产化妆品用的类透明质酸等新产品。已从软体动物和腔肠动物中初步筛选到抗血凝、降血压、防治心血管病、抗病毒病和抗癌的生物活性物质。

2.5 现代生物技术在其他领域的应用研究

随着世界生物技术的迅速发展,生物技术除广泛应用于农业、海洋、食品、医药等领域外,在其他诸如环境保护、石油化工等领域也开展了大量的研究工作。

环境问题越来越受到各国政府和全人类的关注,生物技术在环境的治理上可发挥其不可替代的作用。美国已将环境生物技术作为 21 世纪生物技术 6 个主要研究领域之一。生物技术在环保方面,主要开展了有关工业污染物的微生物降解和治理研究。今后将重点开展在于:用工程微生物处理原煤脱硫的工艺,高效、多抗转基因微生物农药的研制以及生物来源的可降解的透明膜材料等研究工作。

生物技术在石油工业上,主要有应用微生物提高油田开采率,以及石油脱蜡等方面的研究。将生物技术应用于矿冶工业,开展了生物湿法冶金(即细菌浸矿)研究等。这些研究成果应用于生产后取得了良好的社会效益和经济效益。

我国在污染环境生物资源收集方面取得了一定成绩,建立了全国生物降解菌株库和生物降解质粒库,在有毒有机污染物降解、重金属生物吸附和石油生物降解等研究方面已有一些突破。并针对目前我国石化、医药、农药和造纸等工业废水中最具代表性、对我国生态环境和人民健康危害最大的几类有毒污染物,以构建高效重组降解微生物菌株及其相关降解基因分离为研究重点,开展科技攻关,作必要的技术储备。

3 现代生物技术及其产业发展对我国的特殊战略意义

- (1) 发展现代生物技术及其产业是惠及十几亿人口健康的民生工程。
- (2) 发展现代生物技术及其产业是实现城乡统筹发展,增加农民收入的富民工程。
- (3) 发展现代生物技术及其产业是实现人与自然协调发展,改善生态环境的绿色工程。
- (4) 发展现代生物技术及其产业是保障国家安全,防御生物恐怖的安全工程。
- (5) 发展现代生物技术及其产业是培育新的经济增长点,实现现代化建设第三步战略目标的世纪工程。

4 我国发展现代生物技术及其产业战略性领域

(1)严重危害我国人民生命健康的重大疾病、传染病控制的新型疫苗和基因工程药物。我国人口众多,城市化进程迅速,逐步进入老龄化社会,保障人民生命健康,控制传染病显得十分迫切,必须优先发展。包括防治艾滋病、非典型性肺炎、肝炎等传染病,心脑血管疾病、恶性肿瘤等的新型疫苗和药物。

(2)生物防御应急技术体系及有关新型疫苗、药物。包括,建立健全防御生物恐怖及防治重大疫病的应急技术和标准体系,保障人民健康和社会稳定。建立我国外来入侵生物的监测、预警、评价体系。加强转基因产品进出口管理和生物安全风险评估。建立健全生物治疗、干细胞研究、克隆技术等生命伦理规范,把生物技术的研究、开发、应用纳入法制轨道。建立高级别生物安全实验室监控、检测、评价和预警体系。大力发展生物防御的新型疫苗和药物。

(3)建立良好的吸引人才和培养人才机制。根据我国未来生物、医药产业的发展趋势和发展规模,加快基础研究人才、生物技术人才、工程人才,以及管理人才和经营人才的培养,尤其是既懂专业业务、又懂管理、经营的安全型人才。应鼓励大学开办生物或医药专业与经营管理的双学位课程。设立生物、医药技术人才专项基金,吸引海外留学生回国创业。

5 现代生物技术发展展望

总之,国际上一致认为21世纪科技前沿是:信息科学与技术、生命科学与生物技术、新型材料。生物技术是21世纪关系到国家命运的关键技术和世界经济发展的新的增长点,它将为人类解决疾病防治、人口膨胀、食品短缺、能源匮乏、环境污染等重大问题带来新的希望。

目前生物技术创新不断取得重大突破,世界性的生物科技革命正在形成;现代生物技术的发展已开始进入大规模产业化阶段,生物产业正沿着成长曲线的初期阶段逐步接近“拐点”;在技术推动和市场需求的拉动下,生物产业极有可能成为继信息产业之后世界经济又一个新的主导产业,未来的50年人类必将进入生物技术经济时代!

基础篇

第 1 章 PCR 技术

第 1 节 常规 PCR 技术

1 PCR 发展历史

聚合酶链反应或多聚酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR), 是一种对特定的 DNA 片段在体外进行快速扩增的新方法。该方法一改传统分子克隆技术的模式, 不通过活细胞, 操作简便, 在数小时内可使几个拷贝的模板序列甚至一个 DNA 分子扩增 $10^7 \sim 10^8$ 倍, 大大提高了 DNA 的得率。因此, 现已广泛应用到分子生物学研究的各个领域。

PCR 技术最早由美国 Cetus 公司人类遗传研究室 Kary Mullis 及同事于 1985 年发现并研制成功的; 最早的应用报道是 Saiki 等 1985 年将 PCR 技术应用于 β -珠蛋白基因扩增和镰刀状红细胞贫血的产前诊断。随后使用了 1976 年 Chien 等分离的热稳定性 Taq DNA 聚合酶, 使 PCR 操作大为简化, 并使 PCR 自动化成为可能; 1987 年 Kary Mullis 等完成了自动化操作装置, 使 PCR 技术进行实用阶段。

1991 年, 期刊“PCR 方法与应用”(PCR methods and application) 在美国创刊, 使有关学者有了自己的论坛和参考的专业期刊。PCR 技术作为一种方法学革命, 大大推动了分子生物学各有关学科的研究, 使其达到一个新的高度。

1993 年度诺贝尔化学奖于 10 月 3 日揭晓, Kary Mullis 因发明了“聚合酶链式反应”而获得此殊荣。瑞典皇家科学院说: “PCR 方法已经广泛应用于生物医学中。该方法同 DNA 测序法结合起来很可能将成为研究动植物分类学的一种革新工具。” 另一名加拿大籍英国科学家 Michael Smith 因开创了“寡核苷酸基因定点诱变”的方法而与 Mullis 同享此荣。

PCR 技术以敏感、特异、快速的核酸分析技术而著称, 是分子生物学技术的一项突破。经

不断的改进,现今已发展出了不对称 PCR (asymmetric PCR),反向 PCR (inverse PCR),多重 PCR (multiplex PCR),锚定 PCR (anchored PCR),差异显示 PCR (DD-PCR),定量 PCR (quantity PCR)等多种 PCR 技术。(http://www.bion.com/biology/Class422/200405/30981.html)

2 PCR 的基本原理

2.1 PCR 的基本原理

PCR 扩增 DNA 的原理是:先将含有所须扩增分析序列的靶 DNA 双链经热变性处理解为两个寡聚核苷酸单链,然后加入一对根据已知 DNA 序列由人工合成的,与所扩增的 DNA 两端邻近序列互补的,寡聚核苷酸片段作为引物,即左右引物。此引物范围就在包括所欲扩增的 DNA 片段,一般需 20~30 个碱基对,过少则难保持与 DNA 单链的结合。引物与互补 DNA 结合后,以靶 DNA 单链为模板,经反链杂交复性(退火),在 Taq DNA 聚合酶的作用下以 4 种三磷酸脱氧核苷(dNTP)为原料按 5'到 3'方向将引物延伸、自动合成新的 DNA 链、使 DNA 重新复制成双链。然后又开始第二次循环扩增。引物在反应中不仅起引导作用,而且起着特异性的限制扩增 DNA 片段范围大小的作用。新合成的 DNA 链含有与引物的互补序列,并可作为下一轮聚合反应的模板。如此重复上述 DNA 模板加热变性双链解开—引物退火复性—在 DNA 聚合酶作用下的引物延伸的循环过程,使每次循环延伸的模板又增加 1 倍,亦即扩增 DNA 产物增加 1 倍,经反复循环,使靶 DNA 片段指数性扩增。

PCR 的扩增倍数 $Y = (1 + E)^n$,这里 Y 是扩增量,n 为 PCR 的循环次数。E 为 PCR 循环扩增效率。设 PCR 扩增效率 E 为 100%、循环次数 $n = 25$ 次,靶 DNA 将扩增到 33 554 432 个拷贝,即扩增 3 355 万倍;若 E 为 80%、 $n = 20$,则扩增数量将下降到 1 408 865 拷贝,即扩增产物约丢失 93%,若 E = 100%、 $n = 20$,则扩增数量减少 1 048 576 个拷贝,扩增产物约减少 97%。可见 PCR 循环扩增效率及循环次数都对扩增数量有很大影响。PCR 扩增属于酶促反应,所以,DNA 扩增过程遵循酶促动力学原理。靶 DNA 片段的扩增最初表现为直线上升,随着靶 DNA 片段的逐渐积累,当引物-模板/DNA/聚合酶达到一定比值时,酶的催化反应趋于饱和,此时靶 DNA 产物的浓度不再增加,即出现所谓平台效应。PCR 反应达到平台期的时间,主要取决于反应开始时样品中的靶 DNA 的含量和扩增效率,起始模板量越多到达平台期的时间就越短、扩增效率越高到达平台期的时间也越短。另外酶的含量,dNTP 浓度,非特异性产物的扩增都对到达平台期时间有影响。

2.2 PCR 的特点

2.2.1 特异性高

首次报道的 PCR 所用的 DNA 聚合酶是大肠杆菌的 DNA Polymerase I 的 Klenow 大片段,其酶活性在 90℃ 会变性失活,需每次 PCR 循环都要重新加入 Klenow 大片段,同时引物是在 37℃ 延伸(聚合)易产生模板-引物之间的碱基错配、致特异性较差,1988 年 Saiki 等从温泉水中分离到的水生嗜热杆菌中提取的热稳定的 Taq DNA 聚合酶,在热变性处理时不被灭活,不必在每次循环扩增中再加入新酶,可以在较高温度下连续反应,显著地提高 PCR 产物的特异性,序列分析证明其扩增的 DNA 序列与原模板 DNA 一致。扩增过程中,单核苷酸的错误掺入