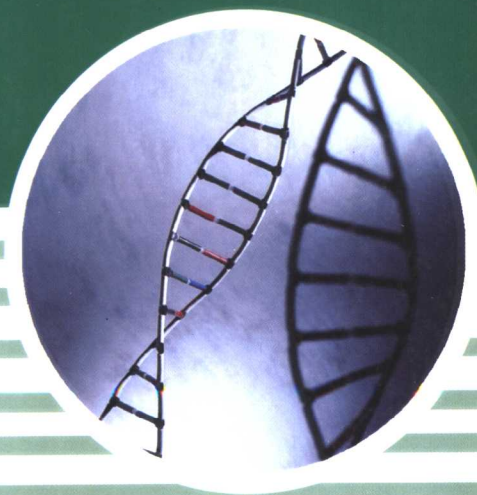


中国科学院教材建设专家委员会规划教材

供医学七年制、八年制、研究生使用

基因工程学

孙汶生
曹英林 主 编
马春红



科学出版社

www.sciencep.com

中国科学院教材建设专家委员会规划教材

供医学七年制、八年制、研究生使用

基因工程学

主 编 孙汶生 曹英林 马春红

副主编 刘素侠 魏 然

编 者 (以姓氏笔画排序)

于学慧	马春红	王晓燕	王 群
石永玉	朱法良	刘素侠	孙汶生
宋 静	张利宁	赵 丽	郭 春
高立芬	高雪芹	曹英林	韩金祥
韩丽辉	魏 然		

科 学 出 版 社

北 京

内 容 简 介

本书是山东大学医学院免疫学研究所和兄弟院校的第一线教师根据多年的教学和科研实践,充分考虑基因工程学及分子生物学在 21 世纪生命科学中的重要地位和新时期医学院校培养目标,坚持理论联系实际的原则编写而成。本书围绕基因工程学的基本理论、基本技术及基因工程学在医学中的应用,系统阐述了基因克隆、基因表达及多种常用基因工程技术的原理及方法。具有简明扼要、可操作性强等特点。本书适合医学院 7 年制、8 年制学生,临床和基础各研究生,以及综合大学相关专业研究生,也可作为本科生选修课及青年医师进修、自学用书。

图书在版编目(CIP)数据

基因工程学/孙汶生等主编. —北京:科学出版社,2004.8

中国科学院教材建设专家委员会规划教材

ISBN 7-03-013199-1

I. 基… II. ①孙… ②曹… ③马… III. 基因—遗传工程—医学院校—教材 IV. Q78

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2004)第 037982 号

责任编辑:夏 宇 吴茵杰 / 责任校对:包志虹

责任印制:刘士平 / 封面设计:卢秋红

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

新 蕾 印 刷 厂 印 刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2004 年 8 月 第 一 版 开本: 787×1092 1/16

2004 年 8 月第一次印刷 印张:21 1/2

印数: 1—4 000 字数:500 000

定价: 32.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换〈环伟〉)

前 言

基因工程技术自 20 世纪 70 年代诞生以来,发展异常迅速,从简单的基因体外“拼接”,逐步形成了关于基因结构、功能研究的一整套理论和方法。

目前,基因工程技术已广泛应用于人类基因组学、生物学、遗传学、肿瘤学、传染病学等与基础医学和临床医学有关的各个研究领域,并大大加快了这些领域的发展,作为 21 世纪的医学生和医学工作者应该了解、掌握和运用基因工程的相关理论和技术。为此,我们感到应该为他们提供一本简明扼要介绍该领域基本理论和相关技术的教材或参考书。

山东大学医学院免疫学研究所自 20 世纪 80 年代开始为研究生开设基因工程学课程,致力于开拓学生科研思路,培养研究生科学思维和训练学生实验技能,深受广大学生的好评。此次,我们在总结 20 年教学经验的基础上,吸收基因工程学最新研究成果和技术,编写此书。本书是山东大学医学院免疫研究所全体教师和研究生共同努力的成果,其主要使用对象是医学院临床和基础各科研研究生,以及综合大学相关专业研究生,也可作为本科生选修课及青年医师进修、自学用书。

基因工程学涉及遗传学、生物化学、分子生物学及微生物学,属于多学科交叉的边缘学科。为了避免与其他学科的重复,本书在编写过程中以基因工程技术为主线,围绕基因克隆、体外重组、基因表达及基因工程学在医学中的应用,重点介绍相关技术的原理、技术和最新发展,突出实用性,注重理论与实验相结合。

全书共分为四篇。第一篇包括第一至第三章,概括介绍基因工程学发展动态及相关基本理论,包括 DNA 大分子的结构、特性、功能及基因工程的基本过程,力图对基因工程学的基本内容和新进展作一个框架式的介绍,其内容也涉及了当前许多崭新的研究领域,如基因组学、功能基因组学等。第二篇基因工程学基本理论与技术,包括第四章至第十二章,主要介绍基因工程常用技术及相关理论,通过这部分的讲述,读者可以了解有关基因克隆、基因表达的基本策略和过程,以及基因工程学中常用的工具酶、载体的概念、种类和当前基因工程中广泛应用的 PCR、测序及芯片技术。第三篇基因工程在医学中的应用,包括第十三章至第十九章,主要介绍目前基因工程学在医学中应用后产生的新技术、新发展,如基因工程抗体、基因表达调控研究、功能基因筛选、基因治疗及利用基因工程技术制备新型实验动物模型等。第四篇是基因工程学实验技术,该

部分内容主要是结合前面介绍的理论,以基因克隆、基因表达为主线设计实验,力图通过这些实验使读者掌握基因工程的基本技术和技能。书后编写了七项附录,提供了一些常用培养基、试剂的配制、基因工程常用数据等,供研究者方便应用。为帮助读者能够更好地阅读、理解相关外文原著,本书收录了基因工程常用词汇及名词解释以供参考。本书编写中,山东省医学科学院韩金祥院长给予了大力支持并撰写“生物芯片的技术原理与应用”一章,泰山医学院魏然教授也为本书的出版给予了大力支持,在此一并表示致谢。

基因工程学是一门飞速发展的交叉学科,本书力图做到实用性和准确性,并尽量将基因工程学的最新成果纳入编写内容,然而,由于学科发展迅猛、编写时间仓促及编者水平所限,可能在内容、文字、编排及图表方面存在疏漏和不足之处,恳切希望读者和同道们指正。

孙汶生

2004年3月于济南

目 录

第一篇 概 论

第一章 基因与基因组	(3)
第一节 基因的概念与特性	(3)
一、基因的概念与分子生物学定义	(3)
二、基因的一般特性	(4)
第二节 DNA 的结构与性能	(4)
一、核酸的化学组成	(4)
二、DNA 的分子结构	(6)
三、DNA 的功能与性质	(7)
第三节 DNA 的复制与表达	(8)
一、DNA 复制	(8)
二、基因表达	(8)
第四节 基因组	(10)
一、病毒基因组	(11)
二、原核生物基因组	(11)
三、真核生物基因组	(13)
四、人类基因组	(16)
第二章 基因工程的基本概念、过程及研究策略	(19)
第一节 基因工程的基本概念	(19)
第二节 基因工程的基本过程及研究策略	(20)
一、目的 DNA 的制备	(21)
二、载体 DNA 及其改造	(22)
三、体外 DNA 重组	(24)
四、重组 DNA 的转化	(25)
五、重组体的筛选鉴定与克隆扩增	(27)
六、目的 DNA 在受体细胞中的表达	(29)
第三章 基因工程的发展与应用	(31)
第一节 基因工程发展的历史背景	(31)
一、基因工程发展的关键性理论	(33)

二、基因工程的重大技术发明	(33)
第二节 基因工程的发展与应用	(34)
一、基因工程疫苗与 DNA 疫苗	(34)
二、基因诊断	(34)
三、基因治疗	(35)
四、基因工程药物	(36)
五、基因工程新技术的开发与应用	(37)
第三节 人类基因组计划与后基因组时代	(38)
一、人类基因组计划	(38)
二、模式生物的基因组计划	(38)
三、人类后基因组计划	(39)

第二篇 基因工程学的基本理论与技术

第四章 基因工程工具酶及其应用	(43)
第一节 限制性核酸内切酶	(43)
一、限制性核酸内切酶的命名原则	(43)
二、限制性核酸内切酶的分类	(44)
三、II 型限制酶的识别与切割序列	(45)
四、影响 II 型限制酶作用的因素	(48)
五、限制性核酸内切酶在基因工程中的应用	(49)
第二节 DNA 连接酶	(50)
一、DNA 连接酶的分类及特性	(50)
二、连接酶催化 DNA 连接的机制	(51)
三、影响连接效率的因素	(51)
四、DNA 连接酶在基因工程中的应用	(52)
第三节 反转录酶	(52)
一、AMV 的生化特性	(53)
二、反转录酶催化 DNA 合成的分子机制	(53)
三、反转录酶在基因工程中的应用	(54)
第四节 DNA 聚合酶	(54)
一、大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 及应用	(54)
二、大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 的 Klenow 大片段酶	(55)
三、耐热 DNA 多聚酶	(56)
四、反转录酶	(56)
五、T4 DNA 聚合酶及 T7 DNA 聚合酶	(56)
六、真核生物的 DNA 聚合酶	(57)
第五节 碱性磷酸酶	(57)

第六节 单链核酸内切酶——S1 核酸酶	(58)
第七节 末端脱氧核苷酸转移酶	(58)
一、末端转移酶的生物学功能	(59)
二、末端转移酶在基因工程中的应用	(59)
第五章 基因工程的克隆载体	(61)
第一节 概论	(61)
第二节 细菌质粒的生物学特性	(62)
一、质粒的定义	(62)
二、质粒的生物学特性	(62)
三、质粒的分类	(63)
第三节 质粒载体	(63)
一、概述	(63)
二、常用的质粒克隆载体	(65)
第四节 λ 噬菌体载体	(69)
一、 λ 噬菌体	(69)
二、 λ 噬菌体载体	(72)
第五节 黏粒	(76)
一、基本特征	(76)
二、技术改进	(77)
第六节 M13 噬菌体载体	(78)
一、野生型 M13 噬菌体的生物学特性	(78)
二、野生型 M13 噬菌体的改造	(78)
三、M13 载体系的优缺点	(79)
四、M13mp18/19 的限制图谱和克隆位点序列	(79)
五、主要应用	(80)
六、受体细菌株	(80)
第七节 噬菌粒载体 pUC118/119	(80)
一、基本特性	(80)
二、噬菌体载体 pUC118 和 pUC119 的主要特性	(80)
三、辅助病毒 M13K07	(81)
四、噬菌体载体 pUC118/119 的优点	(81)
第六章 基因克隆	(83)
第一节 目的基因的获得	(83)
一、已知基因的获得	(83)
二、未知基因的获得	(85)
第二节 基因重组	(88)
一、黏末端连接	(88)

二、平端连接	(89)
三、同聚物加尾法	(89)
四、人工接头连接	(90)
五、T-A 克隆	(91)
第三节 重组子导入受体菌	(91)
一、转化	(92)
二、感染	(92)
三、转染	(92)
第四节 目的基因序列克隆的筛选与鉴定	(92)
一、根据重组载体的标志作筛选	(93)
二、DNA 限制性内切酶图谱分析	(93)
三、核酸杂交法	(94)
四、PCR 法	(94)
五、免疫学方法	(94)
六、核苷酸序列测定	(94)
第七章 原核细胞表达系统	(95)
一、外源基因在原核细胞中的表达	(95)
二、影响外源基因在原核细胞中表达效率的主要因素	(97)
三、原核细胞表达载体的条件及特点	(98)
四、融合型表达载体	(99)
五、非融合型表达载体	(100)
六、分泌型表达载体	(101)
七、表达产物的检测	(103)
八、原核生物表达系统的应用措施及其局限性	(104)
第八章 真核生物表达系统	(106)
第一节 真核生物表达系统概述	(106)
一、真核生物表达系统的优势及必要性	(106)
二、真核生物基因结构及表达调控特点	(106)
三、真核生物表达系统	(110)
第二节 酵母表达系统	(110)
一、酵母载体	(110)
二、外源基因在酵母中的表达策略	(112)
第三节 哺乳动物细胞表达系统	(115)
一、哺乳动物细胞表达系统中的常用遗传标记	(115)
二、哺乳动物细胞表达载体	(116)
三、哺乳动物细胞基因转移方式	(120)
第四节 昆虫杆状病毒表达系统	(122)

一、昆虫杆状病毒载体	(123)
二、在昆虫细胞中表达外源基因	(124)
三、杆状病毒载体系统优势	(125)
第九章 聚合酶链反应	(126)
第一节 PCR 的基本原理和影响因素	(126)
一、PCR 的基本原理	(126)
二、PCR 反应的基本条件及其对 PCR 的影响	(126)
三、PCR 标本的制备	(130)
四、PCR 实验中常见问题及对策	(131)
第二节 常用的几种 PCR 技术	(131)
一、反转录 PCR	(131)
二、定量 PCR	(132)
三、实时荧光定量 PCR	(133)
四、重组 PCR	(135)
五、反向 PCR	(135)
六、多重 PCR	(136)
七、长距离 PCR	(136)
八、不对称 PCR	(136)
第三节 PCR 的应用	(137)
一、PCR 在分子生物学中的应用	(137)
二、PCR 技术在临床医学中的应用	(138)
第十章 核酸杂交	(140)
第一节 核酸分子探针的标记	(140)
一、探针的种类及其选择	(140)
二、各种标记物及其选择	(142)
三、探针标记方法	(144)
第二节 核酸分子杂交的技术	(148)
一、核酸分子杂交的类型	(148)
二、核酸分子杂交的基本过程	(150)
第十一章 DNA 测序	(153)
第一节 DNA 序列测定的策略	(153)
一、从遗传图谱、物理图谱到基因组序列图谱	(153)
二、鸟枪法	(154)
三、引物延伸法	(154)
四、套式缺失法	(154)
第二节 常用的 DNA 测序方法	(155)
一、Sanger 双脱氧链终止法	(155)

二、Maxam-Gilbert 化学法测定 DNA 序列	(157)
三、DNA 序列分析的自动化	(159)
四、其他的 DNA 测序方法	(161)
第三节 DNA 测序中的常见问题	(165)
第四节 测序的意义	(165)
第十二章 生物芯片技术	(166)
一、生物芯片的概念	(166)
二、生物芯片的分类	(166)
三、生物芯片的基本工作原理	(167)
四、生物芯片的应用	(172)
五、存在问题及发展前景	(178)

第三篇 基因工程学的应用

第十三章 基因工程抗体	(183)
第一节 基因工程抗体概述	(183)
第二节 人源化抗体	(184)
一、人-鼠嵌合抗体	(184)
二、改型抗体	(185)
第三节 小分子抗体	(186)
一、Fab 抗体	(187)
二、单链抗体	(187)
三、单域抗体	(188)
第四节 双特异性抗体	(188)
一、双特异性抗体的发展	(188)
二、BsAb 的制备与构建	(188)
第五节 噬菌体抗体	(189)
一、基本原理	(189)
二、噬菌体抗体库的分类	(189)
三、噬菌体抗体的克隆和表达	(190)
四、噬菌体抗体的应用	(191)
五、展望	(192)
第十四章 真核生物基因表达调控	(194)
第一节 真核生物基因表达调控的基本理论	(194)
一、真核生物基因的结构功能特点	(194)
二、真核生物基因表达调控的策略	(195)
第二节 基因表达调控的研究方法	(200)
一、转录前表达调控的研究方法	(200)

二、转录水平调控的研究方法	(201)
第十五章 人类基因诊断与治疗	(206)
第一节 基因诊断	(206)
一、基因诊断的方法	(206)
二、基因诊断的疾病	(207)
第二节 基因治疗	(207)
一、基因治疗的类型	(208)
二、基因转移系统	(208)
三、受体细胞	(211)
四、基因治疗的应用	(213)
五、基因治疗的现状和展望	(216)
第十六章 DNA 多态性	(217)
第一节 DNA 多态性研究概述	(217)
一、限制性片段长度多态性	(217)
二、微卫星 DNA	(217)
三、单核苷酸多态性	(218)
第二节 单核苷酸多态性	(218)
一、单核苷酸多态性的概念	(218)
二、SNP 作为遗传标记的优势	(219)
三、单核苷酸多态性的研究意义	(219)
四、SNP 检测方法	(221)
五、SNP 的网上资源	(222)
第十七章 SEREX 方法筛选功能基因	(223)
第一节 SEREX 方法原理与技术步骤	(223)
一、SEREX 方法原理	(223)
二、SEREX 技术步骤	(223)
第二节 SEREX 方法所筛选的肿瘤相关抗原基因	(226)
第十八章 基因敲除与转基因技术	(227)
第一节 基因敲除的原理	(227)
第二节 基因敲除的策略	(227)
一、基因敲除载体的设计	(228)
二、基因敲除载体的构建	(228)
三、基因敲除载体导入 ES 细胞	(228)
四、阳性细胞的筛选与鉴定	(229)
五、基因敲除动物的产生	(231)
第三节 基因敲除的应用及研究进展	(231)
一、基础研究	(232)

二、应用研究	(232)
三、研究进展	(232)
第四节 转基因技术	(233)
一、转基因技术的基本原理	(233)
二、转基因技术的策略	(233)
三、转基因技术的应用	(236)
第十九章 DNA 疫苗	(239)
第一节 概述	(239)
一、定义	(239)
二、构建 DNA 疫苗的基本条件	(239)
三、DNA 疫苗制备的基本步骤和方法	(241)
四、常用的 DNA 疫苗质粒表达载体	(242)
五、DNA 疫苗的接种	(243)
第二节 DNA 疫苗的免疫原理与应用	(244)
一、DNA 疫苗的免疫原理	(244)
二、DNA 疫苗的评价与优化	(245)
三、DNA 疫苗的应用研究	(246)

第四篇 基因工程实验技术

实验一 碱变性法提取质粒 DNA	(251)
一、质粒 DNA 的小量制备	(252)
二、质粒 DNA 的大量制备	(252)
实验二 DNA 琼脂糖凝胶电泳	(254)
实验三 DNA 酶切及相对分子质量测定	(256)
一、质粒 DNA 的小量酶切反应	(256)
二、相对分子质量测定	(257)
实验四 DNA 的纯化、回收及定量	(258)
一、DNA 的纯化	(258)
二、DNA 的回收	(259)
三、DNA 的定量及纯度测定	(262)
实验五 细胞总 RNA 的抽提	(264)
实验六 聚合酶链反应	(269)
一、HBV 基因扩增试剂盒检测标本中的 HBV DNA	(269)
二、RT-PCR(反转录-聚合酶链反应)	(270)
实验七 DNA 的连接与转化	(272)
一、DNA 连接	(272)
二、重组 DNA 的转化	(273)

实验八 重组子的筛选与鉴定	(275)
一、重组子的筛选法	(275)
二、重组子的鉴定	(276)
实验九 DNA 探针标记及核酸杂交技术	(278)
一、DNA 探针标记与斑点杂交	(278)
二、Southern 印迹杂交	(281)
三、Northern 印迹杂交	(282)
实验十 从组织中提取人基因组 DNA	(284)
实验十一 基因转染哺乳动物细胞	(286)
一、电穿孔法	(286)
二、脂质体介导的转染	(287)
实验十二 蛋白质印迹技术	(289)
实验十三 原位杂交	(292)
实验十四 PCR-SSCP 技术	(294)
实验十五 核酸电泳技术	(296)
实验十六 表达谱 DNA 芯片样品的标记及杂交实验方案	(298)
附录	(302)
附录 I 常用玻璃器皿的处理	(302)
附录 II 常用培养基和溶液	(303)
附录 III 基因工程常用数据和换算计算公式	(305)
附录 IV 人类基因组测序参加单位索引	(309)
附录 V 专业词汇(英中对照)	(310)
附录 VI 常用专业名词与解释(英文)	(315)
附录 VII 参考文献	(328)

第一篇 概 论

Part I . Conspectus

第一章 基因与基因组

Chapter 1. Gene and Genome

第一节 基因的概念与特性

基因(gene)最初是遗传学概念,随着生物学科不断发展及生命科学理论与技术研究的不断深入与完善,人们对基因本质的认识及其定义也在不断深化。

一、基因的概念与分子生物学定义

1926年,Morgan从遗传学的角度提出基因是位于染色体上的基本遗传单位,基因既是携带遗传信息的结构单位,又是控制遗传性状的功能单位。

早期研究曾认为遗传物质是蛋白质,直至1944年Avery等从肺炎链球菌转化实验的研究首次证明,控制某些遗传特性的物质是DNA,而不是蛋白质(见图1-1)。

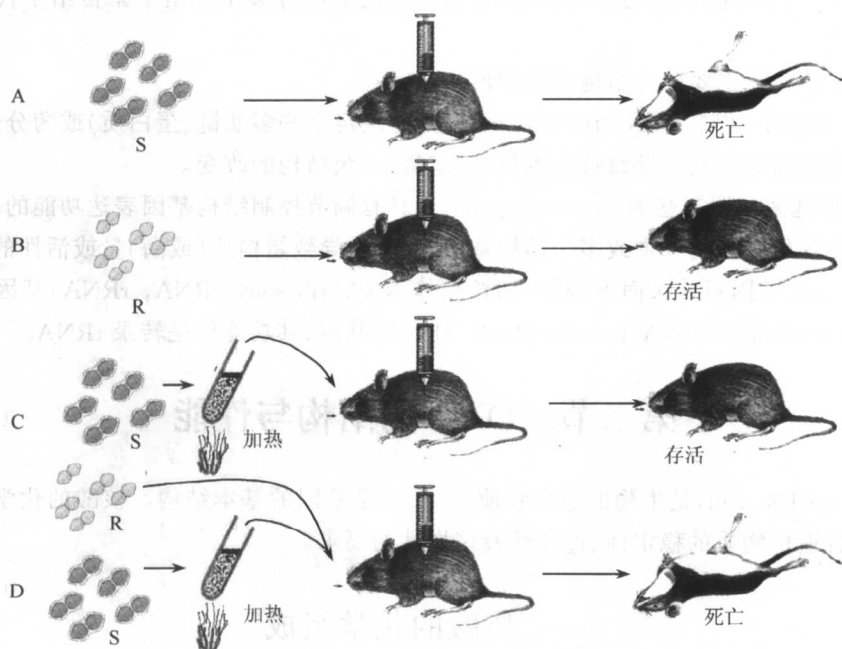


图 1-1 Avery 的肺炎链球菌转化实验(1944 年)

- A. 注射有荚膜(S型)的致病性肺炎链球菌,小鼠死亡 B. 注射突变的(R型)非致病性肺炎链球菌,小鼠存活
C. 注射加热杀死的S型,小鼠存活 D. 注射活的R型与加热杀死的S型的混合物,小鼠死亡