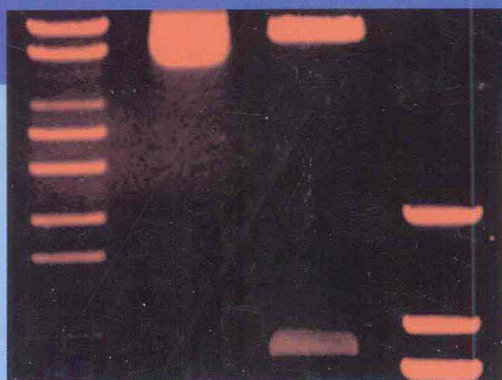


21世纪生物技术系列

基因克隆 理论与技术

Jiyin Kelong
Lilun Yu Jishu

第3版



主编

王廷华

董 坚

习杨彦彬



科学出版社

21 世纪生物技术系列

基因克隆理论与技术

第 3 版

主 编 王廷华 董 坚 习杨彦彬

科 学 出 版 社

北 京

内 容 简 介

本书是《21 世纪生物技术系列》的一个分册,全书分上、下两篇。上篇介绍了基因的结构与功能、蛋白质的结构与功能、基因的调控等分子生物学的基本理论、基因克隆的载体、基因克隆的工具酶等,以及基因克隆技术在诊断、治疗及生物制药中的应用与进展;下篇在基因构建、干细胞转染及纳米载体实验技术基础上还介绍了基于病毒载体的基因克隆、转染及过表达技术。

本书可供生物医学专业研究生、本科生及从事分子生物学研究的科研人员阅读和实验时参考。

图书在版编目(CIP)数据

基因克隆理论与技术 / 王廷华,董坚,习杨彦彬主编. —3 版. —北京:科学出版社,2013

(21 世纪生物技术系列)

ISBN 978-7-03-038011-1

I. 基… II. ①王… ②董… ③习… III. 基因克隆 IV. Q785

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2013)第 136198 号

责任编辑:沈红芬 郑 红 / 责任校对:李 影

责任印制:肖 兴 / 封面设计:范璧合

版权所有,违者必究。未经本社许可,数字图书馆不得使用

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>

双青印刷厂 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2005 年 3 月第 一 版 开本: 787×1092 1/16

2013 年 6 月第 三 版 印张: 17 1/4 插页: 1

2013 年 6 月第四次印刷 字数: 403 000

定价: 69.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

《21 世纪生物技术系列》第 3 版编审委员会

主 审	李云庆		
	(按姓氏笔画排序)		
委 员	王廷华	四川大学	特聘教授, 博导
		昆明医科大学, 云南师范大学, 成都医学院	教授, 博导
	白 洁	昆明理工大学医学院	教授, 博导
	刘 进	四川大学华西医院	教授, 博导
	李云庆	第四军医大学	教授, 博导
	李成云	云南农业大学	教授, 博导
	李兵仓	第三军医大学	教授, 博导
	李官成	中南大学湘雅医学院	教授, 博导
	李建国	上海交通大学医学院	教授, 博导
	张连峰	北京协和医学院	教授, 博导
	陈向东	华中科技大学同济医学院	教授, 博导
	陆 地	昆明医科大学	教授, 博导
	项 鹏	中山大学中山医学院	教授, 博导
	胡幀明	重庆医科大学	教授, 博导
	顾晓松	南通大学医学院	教授, 博导
	曾园山	中山大学中山医学院	教授, 博导
	游 潮	四川大学华西医院	教授, 博导
	Jean Philippe Merlio	法国波尔多第二大学	教授, 博导
	John W. McDonald	美国霍普金斯大学医学院	教授, 博导
	Leong Seng Kee	新加坡国立大学	教授, 博导
	Xin-Fu Zhou	澳大利亚南澳大学	教授, 博导
	Zhi-Cheng Xiao	澳大利亚莫纳什大学	教授, 博导

《基因克隆理论与技术》第3版编写人员

主 编 王廷华 董 坚 刁杨彦彬

副主编 戴 萍 何 沐

编 者 (按姓氏笔画排序)

刁杨彦彬 马绍辉 马秋野 王廷华 王昭君

邓兴力 卢永超 史 进 冯忠堂 朱兴宝

朱榆红 任 玲 刘 佳 刘亚东 刘红亮

羊惠君 李 宏 李甫强 李劲涛 李官成

李琦涵 何 沐 余化霖 沈 翼 邵永祥

范耀东 林 勇 罗华友 郑永唐 胡帧明

徐 丹 符史干 董 坚 戴 萍 魏 鹏

《21 世纪生物技术系列》前言

21 世纪是生命科学飞速发展的时代。如果说 20 世纪后半叶是信息时代,那么 21 世纪上半叶,生命科学将成为主宰。我国加入 WTO 后与世界科技日益接轨,技术的竞争已呈现出其核心地位和作用。正是在此背景下,为适应我国 21 世纪生物技术的发展和需求,科学出版社于 2005 年组织编写了一套融基础理论和实践技术为一体、独具特色、主要面向一线科技人员的学术著作——《21 世纪生物技术丛书》,包括《组织细胞化学理论与技术》、《神经细胞培养理论与技术》、《蛋白质理论与技术》、《分子杂交理论与技术》、《PCR 理论与技术》、《基因克隆理论与技术》、《抗体理论与技术》和《干细胞理论与技术》共 8 个分册。本丛书自 2005 年 3 月问世以来,即受到了广大生物技术科技工作者的喜爱,2006 年 1 月进行了重印;2009 年出版了第 2 版。本丛书对满足我国日益扩大的科研人员及研究生实践需求,以及推动我国 21 世纪生物技术的普及和发展起到了积极的作用。

生物技术发展迅速,为了满足广大科技工作者的需求,本丛书于 2013 年推出第 3 版。在第 2 版的基础上,第 3 版主要对实验技术中的经验体会部分进行了全面增补,同时补充了新的理论技术,包括免疫荧光染色、诱导型干细胞理论与培养、基于病毒载体的转基因及 RNA 干扰技术、免疫共沉淀与蛋白质相互作用、蛋白芯片等实用技术,并对各技术的相关实践经验进行了更全面的总结。重要的是,为了应对和满足前沿技术的发展需要,推出第 3 版的同时还增补了 4 个分册,即《基因沉默理论与技术》、《电生理理论与技术》、《生物信息学理论与技术》和《神经疾病动物模型制备理论与技术》,并将丛书名更改为《21 世纪生物技术系列》。至此,本丛书已达 12 个分册,从行为、形态、细胞、分子生物学、电生理和生物信息等多个层面介绍了目前常用生物技术的基本理论、进展及其相关技术与应用,是我国 21 世纪生物技术著作中覆盖面最广、影响最大的一套著作。本丛书从培养科学思维能力和科研工作能力的目标出发,以实用性和可操作性为目的,面向我国日益增多的研究生和广大一线科研人员。在编写方式和风格方面,力求强调对基本概念和理论进行简明扼要的阐述,注重基本技术实践,认真总结了编者的实验经验和体会,并提供了大量原版彩图,使丛书在兼顾理论的同时更具实用价值。

本丛书由王廷华教授牵头,邀请国内外一批知名专家教授参加编写和审阅。本丛书是全体参编人员实践经验的总结,对从事科研的研究生和一线研究人员有很好的参考价值。

由于编写时间有限,加之科学技术发展迅速,书中的错误和不足之处在所

难免,恳请各位读者批评指正。

值本丛书出版之际,感谢为我国生物技术及科学发展孜孜不倦、奉献一生的老一辈科学家,他们的杰出工作为我国中青年一代的发展奠定了基础;感谢国内外一批知名专家教授对丛书的指导和审阅;感谢编者们所付出的辛勤劳动;感谢中国解剖学会长期以来对本丛书组织工作的支持;感谢各位同道给予的鼓励 and 关心!

《21 世纪生物技术系列》编审委员会

2013 年 4 月 8 日

目 录

上篇 基因克隆理论

第一章 概论	(1)
第一节 基因研究的历史回顾	(1)
第二节 遗传的物质基础	(2)
第三节 基因和基因克隆的概念	(3)
第四节 基因工程的研究内容和安全性	(4)
第二章 基因的结构和功能	(8)
第一节 核酸的结构和功能	(8)
第二节 遗传物质的组织结构	(13)
第三节 基因组的结构和功能	(21)
第三章 蛋白质的结构和功能	(33)
第一节 蛋白质的基本单位和分类	(33)
第二节 蛋白质的分子结构和理化性质	(37)
第三节 蛋白质的生物学功能	(47)
第四章 基因克隆中常用的工具酶	(50)
第一节 限制性核酸内切酶	(50)
第二节 DNA 聚合酶	(54)
第三节 DNA 连接酶	(58)
第四节 修饰酶	(59)
第五章 基因克隆的载体	(63)
第一节 质粒载体	(63)
第二节 噬菌体载体	(77)
第三节 病毒载体	(82)
第四节 其他载体	(89)
第六章 基因的表达和调控	(93)
第一节 原核生物基因的表达调控	(94)
第二节 真核生物基因的表达调控	(110)
第七章 基因克隆在治疗和诊断中的应用与进展	(125)
第一节 基因治疗研究进展	(125)
第二节 基因诊断的研究进展	(128)

第八章 基因克隆技术在生物制药中的应用	(134)
第一节 概况	(134)
第二节 基因工程药物	(135)
第三节 基因工程抗体	(135)
第四节 基因工程疫苗	(136)
第五节 核酸疫苗	(137)
第六节 生物医药的发展方向	(137)

下篇 基因克隆技术

第九章 分子生物实验中的常用仪器及试剂的配制	(139)
第一节 分子生物实验室的常规仪器及设备	(139)
第二节 常用试剂的配制	(141)
第十章 琼脂糖电泳和聚丙烯酰胺凝胶电泳	(145)
第一节 原理	(145)
第二节 琼脂糖电泳	(145)
第三节 聚丙烯酰胺凝胶电泳	(146)
第四节 电泳的影响因素	(147)
第五节 电泳中常用的指示剂和染色剂	(148)
第十一章 目的基因克隆	(149)
第一节 化学合成法获取目的基因	(149)
第二节 PCR 扩增法获取目的基因	(149)
第三节 RT-PCR 法获取目的基因	(154)
第十二章 载体的准备	(157)
第一节 感受态细胞的制备和质粒的转化	(157)
第二节 质粒 DNA 的提取	(158)
第十三章 目的基因与载体的连接	(160)
第一节 目的基因和载体的酶切	(160)
第二节 从凝胶中回收 DNA	(162)
第三节 目的基因和载体的连接	(163)
第十四章 重组载体的检测	(166)
第一节 酶切和电泳检测	(166)
第二节 DNA 序列测序鉴定	(166)
第十五章 重组载体的转染	(172)
第一节 磷酸钙共沉淀法	(172)
第二节 脂质体法	(172)
第三节 反转录病毒感染法	(173)
第四节 腺病毒载体转染法	(174)
第五节 结果和转染方法的选择	(175)

第十六章	重组体插入基因、RNA 和表达产物蛋白质的检测	(177)
第一节	Southern blot	(177)
第二节	Northern blot	(180)
第三节	Western blot	(182)
第十七章	大鼠 BDNF 基因的构建及骨髓间充质干细胞转染	(187)
第一节	实验原理与实验目的	(187)
第二节	实验设备、试剂及配制	(187)
第三节	实验步骤	(193)
第十八章	纳米粒子介导人生存素基因修饰嗅鞘细胞实验	(210)
第一节	实验原理	(210)
第二节	实验所需设备、试剂及其配制	(211)
第三节	实验步骤	(212)
第四节	实验结果	(216)
第五节	结果分析	(218)
第十九章	小鼠 NT-4 基因的体外构建、骨髓间充质干细胞转染和脑内移植	(221)
第一节	实验目的及实验原理	(221)
第二节	小鼠 NT-4 基因的体外构建及骨髓间充质干细胞转染	(221)
第三节	NT-4-GFP 转基因骨髓间充质干细胞脑内移植	(234)
第四节	结果分析与经验体会	(239)
第二十章	慢病毒携带人端粒酶基因 hTERT 的基因克隆技术	(240)
第一节	实验目的	(240)
第二节	实验设备、试剂及其配制	(240)
第三节	实验步骤	(248)
第四节	实验结果	(259)
第五节	结果分析	(262)
第六节	经验体会	(263)

彩图

第二节 遗传的物质基础

一、DNA 是遗传物质

自从 Mendel 提出生命遗传现象的基本单位为遗传因子,生物的每一性状都是由遗传因子负责传递的理论以来,人们对遗传物质是什么的问题进行了不懈的研究和探索,加深了对 DNA 的认识。

自然界中肺炎链球菌有很多不同菌株,肺炎链球菌的许多菌株可以通过形态学和血清学的特征(即通过抗原和抗体的相互作用)来加以区别。在所有菌株的各个菌落之间最明显的差异是决定各菌落外表的糖荚膜。有些菌落具有多糖荚膜,外表光滑;而有些菌落没有荚膜,外表粗糙。荚膜决定了细菌的抗原特异性和毒性,没有荚膜且外表粗糙的菌落没有毒性,有荚膜外表光滑的菌落有毒性。把无毒性的细菌接种在小鼠的体内,不发生感染性疾病;但把有毒性的细菌注射到小鼠或对细菌敏感的哺乳动物体内,可引起严重的感染性疾病。有时,有毒性的细菌因自发突变失去它的荚膜而失去毒性。同样,无毒性的细菌也可能突变为有荚膜的有毒菌。1928 年,Griffith 等以这些资料为基础,为研究有毒性和无毒性的肺炎链球菌设计了各种实验。在实验中,他把加热杀死的毒性细菌注入一组小鼠体内,活的无毒性的细菌注入另一组,活的无毒性的细菌和加热杀死的毒性细菌混合后注入第三组。前两组注射后无反应,但第三组的小鼠产生致命的肺炎。这一研究结果提示,在第三组,某种在死细菌中的物质被转移到活细菌中,并带到小鼠体内发挥了作用。

20 世纪 40 年代,Avery、Macleod 和 Mc. Carty 等经过 10 年艰苦的实验工作,鉴定出 DNA 就是脱氧核糖核酸。他们把从肺炎链球菌的一种菌株中提取出来的 DNA 加以高度纯化后,把它掺入到另一种菌株的细胞中,作为受体的菌株就表现了供体菌株的某些特征,并且这些特征能一代又一代地继承下去。这个现象表明了作为受体的生物体的遗传物质及其表现型都已起了变化,从而证实了体外的转化作用所导致的遗传变化与 Griffith 等在活的小鼠体内所证实的转化作用相类似。由此可推导出两项重要的结论:①DNA 是肺炎链球菌中的遗传物质;②DNA 作为一种介质,起着决定一种终产物和性状(如多糖荚膜的特征)的作用,而它本身不是那个终产物。至此,DNA 作为遗传物质载体的理论被确立起来,进而为从分子水平来研究 DNA 或基因奠定了基础。

二、RNA 也是遗传物质

病毒是一类无细胞结构的最简单的生物,由核酸内核和蛋白质外壳组成。按其所含核酸的不同,可以把病毒分为 DNA 病毒和 RNA 病毒两大类。前者只含 DNA,不含 RNA;而后者只含 RNA,不含 DNA。不管是哪类病毒,它们都不能够独立生存,而必须寄生在动物、植物或微生物的细胞中。已知 DNA 病毒的遗传物质是 DNA,那么 RNA 病毒的遗传物质是什么?

20 世纪 50 年代早期,Fraenkel Conrat 对烟草花叶 RNA 病毒(简称 TMV 病毒)进行研究,他用生物化学方法把两个不同品系的 TMV 病毒(A 和 B)的蛋白质和 RNA 分开,然后使

A 品系的蛋白质与 B 品系的 RNA 混合,形成重组病毒。用这种重组病毒感染烟草叶以后,从病斑中分离出病毒,并把病毒的蛋白质与 RNA 分开,然后对它们进行分析,发现其外壳蛋白的类型与 B 品系的外壳蛋白相同。这说明后代病毒的蛋白质类型与亲代病毒的 RNA 有关,而与亲代病毒的蛋白质无关。也就是说, RNA 病毒的遗传物质是 RNA,而不是蛋白质。

此外,脊髓灰质炎病毒的 RNA、脑炎病毒的 RNA 都可单独地引起感染,故在不含 DNA 而只含有 RNA 的病毒中,复制和形成新病毒颗粒所必需的遗传信息是在 RNA 上。

第三节 基因和基因克隆的概念

生物有产生与亲本相似的复本的繁殖能力,遗传使生物的性状相对稳定地传递,从而使生物的种属得以保存。但大千世界又无绝对相同的两个个体,生物具有在不断变化的环境中适应生存的能力。变异是生物进化的源泉,而变异的物质基础在于基因。在遗传学发展的早期阶段,基因仅仅是一个逻辑推理的概念,而不是一种已经证实了的物质和结构。随着对基因研究的不断深入,基因的概念也在不断地修正补充,对基因的理解也不断深入。

一、基因的概念

从 1910 年到 1925 年,美国 Morgan 等以果蝇为研究对象,对果蝇的遗传基因与染色体的结构关系进行了研究,并于 1926 年发表了《基因论》。该理论阐述了基因不仅是位于染色体上呈直线排列的遗传单位,而且是携带遗传信息的结构单位和控制遗传性状的功能单位。其贡献在于首次将基因和生物体中某一特定的染色体联系起来,但对基因的本质、结构和具体功能等缺乏认识。

1953 年, Watson 和 Crick 提出了 DNA 分子的双螺旋(double helix)结构模型,阐明了 DNA 自我复制的机制,并推测 DNA 分子中的碱基顺序储存了遗传信息。1961 年,法国科学家 Jacob 和 Monod 发表了他们对调控基因的研究,发现了遗传密码信息贮存于核酸之中,信使 RNA(mRNA)携带着从 DNA 到蛋白质合成所需要的信息;在转运 RNA(tRNA)和核糖体 RNA(rRNA)的参与下翻译成为有生物学功能的蛋白质。此时,人们才明确了 DNA 经过转录和翻译来控制蛋白质的合成,并将 DNA 双螺旋结构与 DNA 功能联系起来。

作为一个遗传功能单位,基因被定义为:编码有功能的蛋白质多肽链或 RNA 所必需的全部核酸序列(通常是 DNA 序列)的结构。根据这个定义,一个基因不仅包含编码蛋白质肽链或 RNA 的核酸序列,还包括保证转录所必需的调控序列,以及位于编码上游 5'端的非编码序列、内含子和位于编码区下游 3'端的非编码序列。

二、基因克隆的概念

美国哈佛大学 Beckwith 等 1969 年应用 DNA 杂交技术成功地分离了大肠杆菌的 β -半乳糖苷酶基因,创建了基因分离技术。1973 年, Boyer 等科学家在基因分离技术的基础上,利用重组 DNA 技术得到第一个重组 DNA 分子拷贝——克隆(clone),由此宣告了基因克隆

技术的诞生。克隆是指从一个共同的祖先通过无性繁殖下来的一群遗传上相同的 DNA 分子、细胞或个体所组成的特殊群体。基因克隆是指在体外,通过分子生物学的方法将目的基因与运载载体重组在一起,然后引入受体细胞,使目的基因在受体细胞中得到扩增并借助受体细胞获得目的基因的表达产物——蛋白质,从而达到对目的基因的生物学特性进行研究的技术方法。

第四节 基因工程的研究内容和安全性

一、基因工程的研究内容

(一) 目的基因

基因是一种重要的生物资源,且作为 21 世纪前景广阔的生物产业的研究基础,不仅许多研究机构重视对其研究和开发,而且各国政府也非常关注,倾力予以资助。对基因的研究已从零星的单基因研究发展到大规模的基因组研究,从人类的基因组到其他生物的基因组。这些工作使人们对人类自身和其他生物的生命现象有更深入的认识和了解。

(二) 基因克隆技术

基因克隆技术的发展推动了整个生命科学研究的发展。随着新的技术和新的克隆方法不断涌现,如以 PCR 为基础的差异筛选技术、高通量的基因芯片技术、长片段的 DNA 序列测定技术和生物信息技术等。这些技术的应用将极大提高基因工程的规模和速度,成为基因工程研究中的重要内容。

(三) 基因工程工具

基因工程之所以能够将不同的 DNA 重新组合构建成新的 DNA 分子,并进入宿主细胞表达和扩增,主要依赖于一系列重要的克隆工具。这些工具包括基因工程载体、基因工程工具酶和基因工程的受体系统。载体是目的基因的运载工具,是基因克隆操作中的必备工具。载体的研究与应用,推动基因克隆工作的发展,简化了操作过程,提高了克隆的效率。工具酶的应用是基因克隆技术的保证;一些重要工具酶的发现,使在基因克隆中一些难题迎刃而解。随着基因工程研究的不断深入,寻找更好的基因工程工具将成为新一轮的热点,对基因工程工具研究是基因工程研究的重要内容之一。

(四) 基因工程产品

研究基因除了分析基因的结构和功能以外,最重要的是研究基因的表达产物及其在各领域(如在医药领域)的应用,以为人类的健康长寿和粮食短缺以及生态环境破坏等难题的解决提供新的思路。基因工程的诞生不仅在理论上而且在应用上已经对整个生命世界产生了深刻的影响。对基因工程产品研究和开发,已形成一个巨大的高新技术产业并产生了重要的经济和社会效益。

二、基因工程与生物公害

基因工程技术的发展和应用有可能带来生物公害,主要有以下几个方面:

第一,在 DNA 重组实验时,可能意外地产生一些对人、畜有害的细菌或病毒。这些微生物常有异常旺盛的繁殖力,可能具有高度的传染性、侵袭性、毒性和耐药性。它们进入自然界会引起预想不到的危害。

第二,感染致癌基因的重组体时,可能使人、畜患癌症。

第三,有些重组体虽不直接给人、畜带来危害,但是可能给其他生物(如植物、微生物、昆虫)带来影响,使地球生态平衡受到破坏。

第四,基因工程被用于军事目的,用来制造生物武器,有可能危及大批生命或遗留严重后遗症。

虽然,人们对生物技术给自然和人类带来的危害还只能进行某种程度的预测,但为了对人类负责,一些国家制订了 DNA 重组实验安全规则。最初的规则提出了物理防护和生物防护两大对策,对一些研究项目做出了比较严格的限制。经过十余年的实践,特别是通过专门进行的重组体安全实验证明:重组体比自然界原有的生物表现出更大危险的可能性极低,到现在还没有发现重组体意外地在自然界广泛散布的事例, DNA 重组实验比操作病原体的危险性小得多,也安全得多。然而,近年来,基因工程和基因操作及使用非病原微生物可能引起生物公害正备受关注。对它的危险程度的判定,主要参考所使用的生物材料的性质:①致病性;②毒性;③寄生定居性;④致癌性;⑤耐药性;⑥生成影响代谢的蛋白活性物质的能力;⑦造成生态平衡紊乱的机会、性质和程度;⑧对外界的抵抗力。

危险度是多因素构成的综合概念,它包括生物材料本身的危险性,操作方法,操作的量、次数,工作时间的长短等。

危险度=(生物材料本身的危险性)×(操作方法带来的危险性)×(量)×(操作时间)×(操作次数)。

三、生物公害的控制

(一) 实验人员适应性训练

要防止生物公害,首先要对从事基因操作的实验人员进行生物操作的基本功训练。特别是大量的物理学家、化学家、工程技术专家进入分子生物学和遗传工程的研究领域后,由于他们当中大多数人缺少微生物学的知识,特别是有关病原微生物的知识,因此对这些人员进行基本功训练就显得更加重要。这些训练可包括以下几方面:①不同危险度微生物的操作技术;②生物防护的技术知识;③物理防护的技术知识;④将要开展的实验的安全知识;⑤处理事故的知识。

(二) 生物防护

进行 DNA 重组实验时要选择生物安全性高的载体和受体细胞。使用的载体应当只进

入实验者想把它引入的受体细胞。实验用的受体细胞应当具有在特定的条件下选择生存、繁殖的能力,而在一般自然条件下很难生存和繁殖,如营养缺陷性菌株、低温条件生长菌株等。从事 DNA 重组实验前要多了解载体、受体细胞等涉及安全方面的生物特性,包括自然条件下的生态特性、生理特点、基因交换的范围和结构、致病性、寄生性、腐生性、和人类接触的历史、是否容易消除污染、载体对受体的依存性以及载体、受体细胞的来源等,特别是新获得的 DNA 重组体,在自然条件下对生物体应当是安全无害的。

(三) 物理防护

物理防护的基本目的是在基因操作时把重组体限制在实验室内和特殊的安全设备的空间里,从而防止实验人员本身被感染,也防止了重组体被扩散到外界。物理防护由三部分构成:操作规程、安全防护操作箱、实验室设计。

(四) 重组体的保管

重组体保管的物理防护标准,原则上依据进行该重组体实验时的标准来确定。重组体保管时,一方面要确保克隆不失活,另一方面又要确保安全。含有重组体的材料都要有鲜明的标志。保管的安全条件要有同进行该重组体实验时一致的物理防护条件。应使用专用的登记表对重组体材料详细记录,并配备专人登记保管。

(五) 特殊实验的管理

特殊实验主要是指使用的病原体材料不肯定的因素多、对安全没有把握的实验。这些实验大致包括以下几种:①使用一个新的从来没有用过的载体和宿主进行的 DNA 重组实验;②对脊椎动物具有蛋白毒性的克隆实验;③临床人体实验;④把重组体在自然界散布的实验;⑤重组体人工大量繁殖的实验。因为特殊实验可能对自然环境和人类健康造成比较大的威胁,对实验者更是有可能直接造成危害。在操作中应严格按照相关的规章制度、法律法规及保护措施进行,在实验室中建立一套严格的生物安全管理机制。

(六) 健康监督

对从事 DNA 重组等遗传工程实验人员,要建立保健制度,并进行严格的健康监督。一般在实验前和实验后一年内,对实验人员进行健康检查。

实验前要准备一些疫苗、治疗用血清和抗生素等。实验人员操作病毒、细菌等病原体时,要进行必要的免疫或预防性服药。疑有实验室感染时,马上进行检查,确诊并采取必要的措施。当误吸入重组体材料时,被重组体污染体表或严重污染工作区时,都要立即报告,查清污染状况,并采取应急措施。实验人员要经常注意自己身体的健康状况,如有不适或症状加重时,或症状久而不见好转时,都要尽快报告并采取保护措施。

(董 坚 罗华友)

参 考 文 献

高天祥,田竟生. 2000. 医学分子生物学. 北京:科学出版社

- 黄翠芬. 1987. 遗传工程理论与方法. 北京:科学出版社
- 宋振玉,刘耕陶. 1994. 当代药理学. 北京:北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社
- 吴乃虎. 1998. 基因工程原理. 第2版. 北京:科学出版社
- 张树庸,耿运琪,陈启民等. 1989. 基因工程. 北京:科学普及出版社
- 张勇. 2002. 基因概念之演变. 生物学通报,37(10):53~54
- 加德纳·RJ. 1984. 遗传学原理. 杨纪珂,汪安琦译. 北京:科学出版社
- Dale PJ,Clarke B,Fontes EM. 2002. Potential for the environmental impact of transgenic crops. Nat Biotechnol, 20(6):567~574

第二章 基因的结构和功能

第一节 核酸的结构和功能

核酸(nucleic acid)是由单核苷酸与单核苷酸首尾相连形成的多聚化合物,是遗传信息的物质载体。生物界的核酸有两大类,即脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid, DNA)和核糖核酸(ribonucleic acid, RNA)。核酸分子主要由4种单核苷酸组成。每一种单核苷酸水解后产生碱基、戊糖(DNA为脱氧核糖, RNA为核糖)和磷酸三种成分,碱基主要有腺嘌呤(adenine, A)、鸟嘌呤(guanine, G)、胞嘧啶(cytosine, C)、胸腺嘧啶(thymine, T)和尿嘧啶(uracil, U),化学结构如图2-1。核苷酸排列组合千变万化形成复杂的结构和功能,储存了大量的遗传信息。

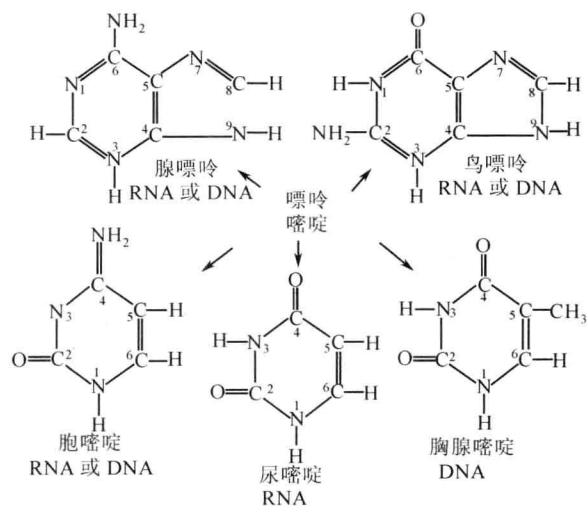


图 2-1 碱基的化学结构

一、DNA 的结构和功能

DNA 的结构可分为一级、二级和三级结构。DNA 的一级结构(primary structure)是 DNA 分子中核苷酸的排列顺序;二级结构(secondary structure)是两条 DNA 单链形成的双螺旋结构、三股螺旋结构以及四股螺旋结构;三级结构(tertiary structure)则是 DNA 双螺旋结构进一步扭曲盘旋形成的超螺旋结构。