遗传工程理论与方法

黄翠芬 主编

科 学 出 版 社

遗传工程理论与方法

黄翠芬 主编

科学出版社

1987

内 容 简 介

本书共两篇二十三章。第一篇是基础理论部分，包括分子遗传学的进展，DNA体外重组，克隆载体，工具酶，重组克隆的筛选与表达，DNA重排与转位因子，DNA序列分析，真核基因的克隆与表达，干扰素、肝炎病毒、腹泻病原菌的遗传工程，以及生物技术的安全防护问题。第二篇介绍了二十三项常用的遗传工程的技术方法。书末还有附录，介绍了几种试剂的配制方法与常用分子生物学名词英汉对照和解释。

可供分子生物学、生物化学、免疫学、医学工作者及有关大专院校的师生阅读参考。

遗传工程理论与方法

黄翠芬 主编

责任编辑 王秀盈

科学出版社出版

北京朝阳门内大街137号

北京市通县印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1987年8月第一版 开本：787×1092 1/16

1987年8月第一次印刷 印张：16 1/4

印数：0001—4,500 字数：369,000

统一书号：13031·3468

本社书号：5020·13—6

定价：4.25元

本书编委

主　编　黄翠芬

编　委　王嘉玺　马清钧　刘　逵

执笔人　黄翠芬　黄耀煊　黄培堂　王嘉玺　张兆山　马清钧

徐文连　苏国富　丁广治　方继明　陈添弥　马贤凯

刘　逵　于秀琴　周建光　于公义　李秀珍　王光荣

俞炜源　唐红娣　逯好英　徐永强　熊凌霜　李淑琴

朱跃先　刘传暄　石成华　赵立权　张林元

前　言

我们的祖先早在几千年前就懂得发酵、酿酒、制醋和酱油等传统的生物技术。近年来，由于分子生物学、细胞生物化学、计算机等基础学科的迅速发展，推动着生物科学前进，使新兴的生物技术成为当今三大前沿学科之一。生物技术包括遗传工程、细胞工程、酶工程和发酵工程。这些技术中，遗传工程起着领头的作用。遗传工程是指在人工可以控制的条件下，将基因剪接或重新组合，然后导入另一个生物个体中，使所需要的某种基因性状能在其中表达，并能遗传下去的技术。这是生命科学的一个重大飞跃，使人们从只会利用天然存在的生物资源的时代，走向按人们需要而定向地创造具有新的性能的生物品种的时代。预计在今后一、二十年内，生物工程将会在医药、食品、农业、化工、能源、环境保护等方面取得更大的进展。这些新技术的应用，将对下一世纪世界经济的各方面产生关键性的影响，它将成为世界经济的重要支柱。

遗传工程技术问世不久，即在医药工业方面显出其美好的前景。分析目前的进展，我认为在医药方面至少将得到如下几点好处：（1）解决来源缺乏的药物的生产。例如生长激素，能促进蛋白质合成和脂肪的利用，给任何畜类注射其本身的生长激素，均可促进牲畜生长。但用经典的方法约4,000头猪的垂体只能提取约1.5克的生长激素，这些量仅能供一头猪注射之用。然而，通过遗传工程技术，于1983年从每升细菌培养液中成功地获得了1.5克生长激素。此后，许多其他激素均已成功地在细菌中产生。（2）提供大量高质量产品进行临床试验。例如干扰素类物质，临床应用至少已有二、三十年，但其应用价值长期得不出准确的评价。这主要是由于尚未得到足够的使用量，而且产品纯度还只有0.1％。自从各种干扰素基因克隆获得成功，并能在E.coli中生产，其纯度高达100％，且可较大量的供应，从而使临床观察得以顺利地进行。此后，干扰素的药用价值的评价及使用方法才较正确。（3）发展新的治疗药物。单克隆抗体由于具有极强的特异性，除在临床诊断方面有良好的作用外，尚可与适当药物偶联，直接使药物作用于靶组织，可望发展成功一系列新的治疗药物。（4）制备安全而高效的新疫苗。疫苗是人畜免疫预防疾病最有效的制剂，已经有一百多年的制备与使用的历史，但效价、安全、生产工艺等方面，均有待改进。有些抗原性物质，如乙型肝炎病毒不能在体外培养，影响了疫苗的制备，现已将其表面抗原基因在E.coli中表达，但产量低，免疫原性差。后改用酵母菌体为受体菌，表达水平有所提高，但还存在产物的分泌、改构、纯化等问题，如何提高表达水平，研究基因的调控是十分必要的。另外，采用牛痘病毒作为载体，对制备多价疫苗提供了一条新途径。经过这一系列研究，发掘了遗传工程技术的潜力，使我们对利用遗传工程技术来提高免疫制剂的质和量，以及改进生产工艺等方面，得到了一个较清晰较具体的设想。以上几点，是遗传工程技术目前在医药方面应用所提供的一些线索，随着实践的不断深入，其在各个学科的应用前景将会是更广阔的。

我们研究所自1980年开始从事遗传工程医药方面的研究，几年来在有关方法的建立及临床诊断试剂、疫苗、药物等方面进行了一些探索。我们认为在国内目前条件下，是

此为试读，需要完整PDF请访问：www.ertongbook.com

可以开展此项研究的。只要更好的组织起来，完全有条件加速研究进度，并向各方面推广。关键问题之一是让更多的同志熟识这方面的理论和技术，敞开思想，大胆实践。因此，我们在总结过去几年工作经验的基础上，于1983年办了一期遗传工程短期训练班，虽然我们的经验及技术不足，但我们组织了较多有实践经验的同志编写此书，尽可能地介绍我们的一些想法和做法，对促进此项技术的推广可能有一定好处。由于新技术的发展迅速，加之遗传工程技术的内容广泛，掌握技术又各有体会，因此本书的内容可能已跟不上新的发展形势。但作为一些初步的体会，我们愿意把这些工作内容公之于众，希望得到读者们的批评、指正。

在本书手稿的编写过程中，孙苏华、高仲恬等同志协助抄写与绘图工作，在此，向他们致谢。

中国人民解放军
军事医学科学院基础医学研究所

黄 翠 芬

1985年6月于北京

目　录

第一篇　基础理论

第一章　分子遗传学进展

一、DNA 的组成……（1）

二、DNA 是双螺旋……（3）

三、双螺旋结构的多种形式……（5）

四、基因的分子结构……（6）

五、DNA分子能变性也能复性……（6）

六、基因的作用……（7）

七、基因的性能……（7）

八、突变的分子基础……（10）

九、DNA重组与疾病……（13）

小结……（14）

第二章　DNA体外重组

一、DNA体外重组的主要步骤……（15）

二、带有目的基因的DNA片段的获得……（16）

三、DNA片段与载体DNA体外人工重组……（18）

四、DNA重组体转入受体细胞及重组体克隆的筛选……（20）

五、外源基因的表达与表达产物……（21）

第三章　克隆载体的性质及应用

一、质粒的特性及其作为合适载体的条件……（26）

二、大肠杆菌质粒载体……（27）

三、枯草杆菌克隆载体……（32）

四、噬菌体载体……（33）

五、真核细胞的克隆载体……（36）

第四章　分子克隆工具酶

一、限制性核酸内切酶及其反应条件……（39）

二、同裂酶(同切口限制内切酶)……（42）

三、DNA连接酶……（46）

四、DNA 聚合酶 I……（47）

五、末端转移酶……（49）

六、逆转录酶……（50）

七、核酸酶S1……（51）

八、核酸酶*Bal*31……（51）

九、核酸外切酶Ⅶ……（51）

第五章　重组克隆的筛选和检测

一、直接筛选法……………………………………………………………………………………(53)
二、间接筛选法……………………………………………………………………………………(55)
第六章　克隆基因的表达
一、克隆基因表达的基本条件……………………………………………………………………(63)
二、在大肠杆菌中为获得有效表达采取的一些设计和方法……………………………………(65)
三、克隆基因表达的检测…………………………………………………………………………(71)
四、大肠杆菌以外的其他宿主……………………………………………………………………(72)
第七章　DNA重排与转位因子
一、DNA 重 排……………………………………………………………………………………(74)
二、转位因子………………………………………………………………………………………(76)
小结…………………………………………………………………………………………………(82)
第八章　DNA序列分析
一、加减法…………………………………………………………………………………………(84)
二、化学降解法……………………………………………………………………………………(85)
三、末端终止法……………………………………………………………………………………(87)
四、M13克隆 单 链DNA……………………………………………………………………………(88)
五、DNA序 列连续测 定法………………………………………………………………………(89)
六、电子计算机的应用……………………………………………………………………………(91)
第九章　真核基因的克隆及其在真核细胞中的表达
一、真核细胞基因组的特征………………………………………………………………………(93)
二、真核细胞基因的获得…………………………………………………………………………(95)
三、真核基因的克隆及筛选………………………………………………………………………(100)
四、真核基因在真核宿主细胞中的表达…………………………………………………………(103)
第十章　基因工程的应用
一、基因工程在研制生物制剂和制药工业中的应用……………………………………………(108)
二、基因工程在医学基础研究方面的应用………………………………………………………(114)
三、基因工程在临床上的应用……………………………………………………………………(114)
第十一章　人的干扰素基因及其遗传工程的研究
一、干扰素及其基因的类型和特性………………………………………………………………(116)
二、干扰素cDNA的克隆和表达……………………………………………………………………(117)
三、干扰素“合成-天然杂合基因”的克 隆 和表达……………………………………………(118)
四、干扰素化学合成基因的克隆和表达…………………………………………………………(119)
五、从人的基因组DNA直接分离 干扰 素基因……………………………………………………(121)
六、干扰素基因的核苷酸序列……………………………………………………………………(121)
七、克隆基因产生的干扰素的特性………………………………………………………………(122)
第十二章　腹泻病原菌的遗传工程
一、用遗传工程技术进行研究的意义……………………………………………………………(124)
二、对粘附素的研究………………………………………………………………………………(125)
三、对肠毒素的研究………………………………………………………………………………(129)
四、对侵袭因子的研究……………………………………………………………………………(140)
第十三章　肝炎病毒的分子生物学
一、病毒性肝炎的概述……………………………………………………………………………(143)

二、HBV的结构……(145)
三、HBV基因的表达……(150)
四、HBV感染与肝癌的关系……(154)
小结……(155)
第十四章 遗传工程的安全防护
一、遗传工程与生物公害……(157)
二、对生物公害危险度的评价……(158)
三、生物公害的控制……(160)

第二篇 技术与方法

第十五章 质粒DNA的提取与纯化
一、氯化铯-溴化乙锭密度梯度离心纯化质粒DNA……(168)
二、酸酚法纯化质粒DNA……(171)
三、羟基磷灰石和Sephacryl S-1000凝胶柱层析制备质粒DNA……(172)
四、简便快速检测质粒DNA的方法……(174)
第十六章 工具酶的制备
一、限制性核酸内切酶*EcoR* Ⅰ的制备……(175)
二、限制性核酸内切酶*Bam*H Ⅰ的分离和纯化……(177)
三、T4-DNA连接酶的制备……(179)
第十七章 真核细胞mRNA的制备、鉴定与ds-cDNA的合成
一、哺乳类细胞poly(A)$^+$RNA的制备……(183)
二、以poly(A)$^+$RNA为模板逆转录合成ds-cDNA……(185)
三、mRNA在兔网织红细胞溶胞物体系中的转译……(189)
第十八章 DNA体外重组技术
一、粘末端连接法……(193)
二、同聚物接尾连接法……(194)
三、平端连接法……(195)
四、人工接头连接法……(195)
五、转化试验方法……(196)
第十九章 核酸分子杂交技术
一、菌落原位杂交……(197)
二、Southern吸印法……(199)
第二十章 重组体的筛选和检测
一、^{125}I-SPA固相放射免疫检测技术……(202)
二、pBR322Pst Ⅰ位点插入失活快速碘化检测法……(205)
三、应用微细胞检测克隆基因的表达……(206)
第二十一章 DNA的限制性内切酶图谱绘制法
一、一次和多次酶解法制图……(208)
二、部分酶解法制图……(209)
第二十二章 DNA序列分析
一、双脱氧链终止法……(211)
二、化学降解法……(219)

第二十三章　乙型肝炎病毒快速免疫电镜检查
附录
一、常用母液的配制……………………………………………………………………(226)
二、抗菌素溶液的制备…………………………………………………………………(227)
三、常用电泳缓冲液的制备……………………………………………………………(227)
四、常用凝胶加样缓冲液的制备………………………………………………………(228)
五、常用参考书…………………………………………………………………………(228)
六、名词解释……………………………………………………………………………(229)

第一篇　基础理论

第一章　分子遗传学进展

生物技术是本世纪七十年代初期，在分子遗传学和细胞生物学基础上发展起来的一门新兴技术，是当代前沿学科之一。由于基因重组、细胞融合和杂交瘤、固定化酶和固定化细胞、动植物细胞的大规模培养和分离及分析新技术的出现，结合发酵和生化工程原理，定向设计组建新物种，加工生物材料，在医药、食品、化工、能源、农业和环境保护等领域中为社会提供商品服务，从而形成了现代生物技术。这项新技术对发达国家或发展中国家都是十分重要的，国际上估计，到公元2000年，将有80％的工业产品与生物技术有关。

十九世纪中期，孟德尔定律(Mendel's Law)假设"遗传因子"的存在来解释亲代的特性如何传至子代。四十年代，美国生物学家Morgan证明了孟德尔定律是动、植物界普遍的遗传规律，"遗传因子"就是在细胞内染色体上呈线性排列着的"基因"(Gene)。1944年，O. T. Avery用肺炎双球菌证明毒力及型别的转化与DNA(脱氧核糖核酸)有关，如用脱氧糖核酸酶(DNase)处理，转化性便丧失。1952年，A.D.Hershey及M.Chase证明，用放射性同位素^{35}S和^{32}P标记的T2噬菌体感染大肠杆菌后，能将其DNA传至子代噬菌体。随后在真核细胞的研究中，将从一个细胞中制备的染色体与另一种染色体混合。转染后，受体细胞能表现供体细胞的性能，以后用纯化的DNA做同类试验，亦证实这些结果。因此，遗传物质在原核细胞和真核细胞中都以核酸的形式存在，均得到理论与实践的证明。

一、DNA的组成

1930年，Caspesson证明DNA是很大的分子，远较蛋白质为大。Chargaff继续分析，认为DNA的四个碱基含量在不同种属细胞中各不相同。这个见解导致认识到DNA的碱基序列是遗传信息的携带者，即这些序列编码蛋白质中氨基酸的序列这一事实。

核酸是以化学键连接起来的核苷酸序列。每一个核苷酸含一个碳及氮原子的杂环(含氮基团)，5-碳糖和一个磷酸基团。

核酸中有二种类型的5-碳糖，这就是DNA和RNA的差别所在。在DNA中5-碳糖是2-脱氧核糖，而RNA则是核糖，其差别是在糖环第二个碳上是否含-OH基团。

含氮碱基有两类：嘧啶和嘌呤。嘧啶是6-环，嘌呤融合五和六杂环。每一核酸只由四种碱基合成。DNA及RNA中均含有相同的嘌呤——腺嘌呤(A)和鸟嘌呤(G)。DNA中两个嘧啶是胞嘧啶(C)和胸腺嘧啶(T)。在RNA中胸腺嘧啶为尿嘧啶(U)所取代，U与T的差别是T的C_5中含甲基替代物。因此，DNA含的碱基是ATGC，而RNA含AUGC。核苷

此为试读，需要完整PDF请访问：www.ertongbook.com

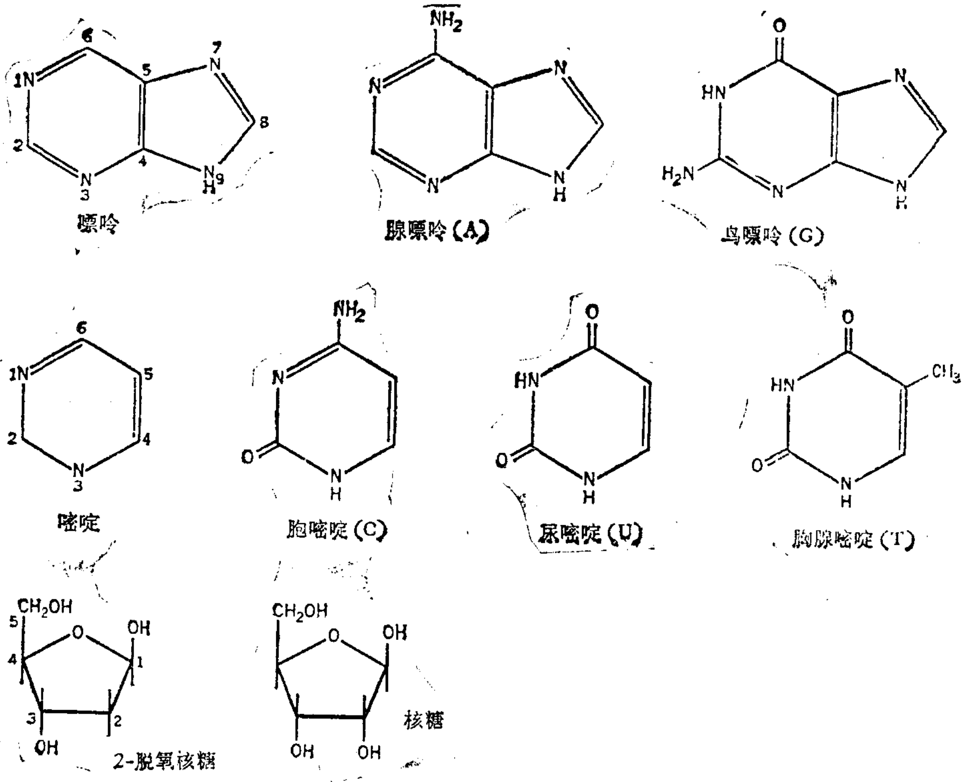

图1-1　核酸的组分

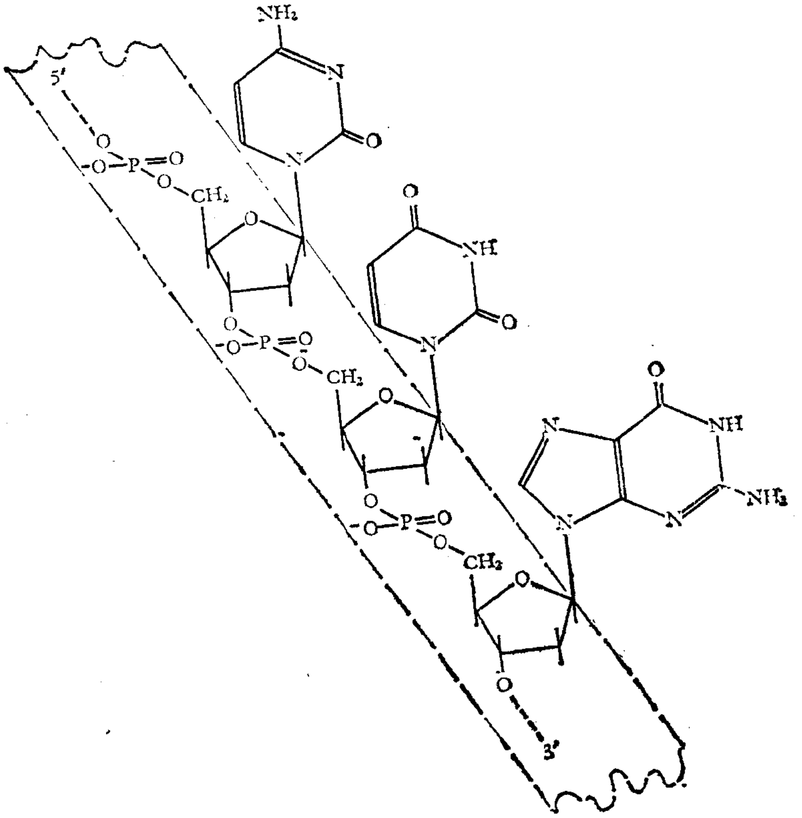

图1-2　多核苷酸链含一系列5′⟶3′糖-磷酸基团链组成的骨架形式，碱基通过这些结构连接起来

(nucleoside)指不包括磷酸在内的含氮碱基和糖的化合物，如腺苷、鸟苷、胞苷、胸苷和尿苷。核苷和磷酸基团连接组成核苷酸(nucleotide)。核苷酸通过交错的糖和磷酸残基组成的骨架连接为多核苷酸链。5-碳糖的5′碳原子与另一5-碳糖的3′碳原子通过磷酸基团连接。因此磷酸二酯-糖骨架称为5′-3′链，链的一端为游离5′磷酸基团，另一端为游离3′羟基基团，一般的写法是5′→3′(图1-1和图1-2)。

二、DNA是双螺旋

分子生物学的一个伟大发现是1953年J.D.Watson和F.H.C.Crick发现DNA是双螺旋结构。X射线衍射证明DNA是一种规则的螺旋，每34Å完成一环，直径约为20Å，相邻的核苷酸距离是3.4Å。因此，每一环必含十个核苷酸。

从DNA密度分析，其螺旋一定含有两条多核苷酸链。螺旋直径恒定，可能由于每一链的内侧为嘌呤与嘧啶相对，而不是嘌呤与嘌呤(太厚)，或嘧啶与嘧啶(太薄)相对的关系。

第二个关键是，证明了G和C的比例与A和T的比例在DNA中常常是相同的。任何DNA的(G+C)/(A+T)的比例都有其特点，各种属间比例变化在26—74%范围内。

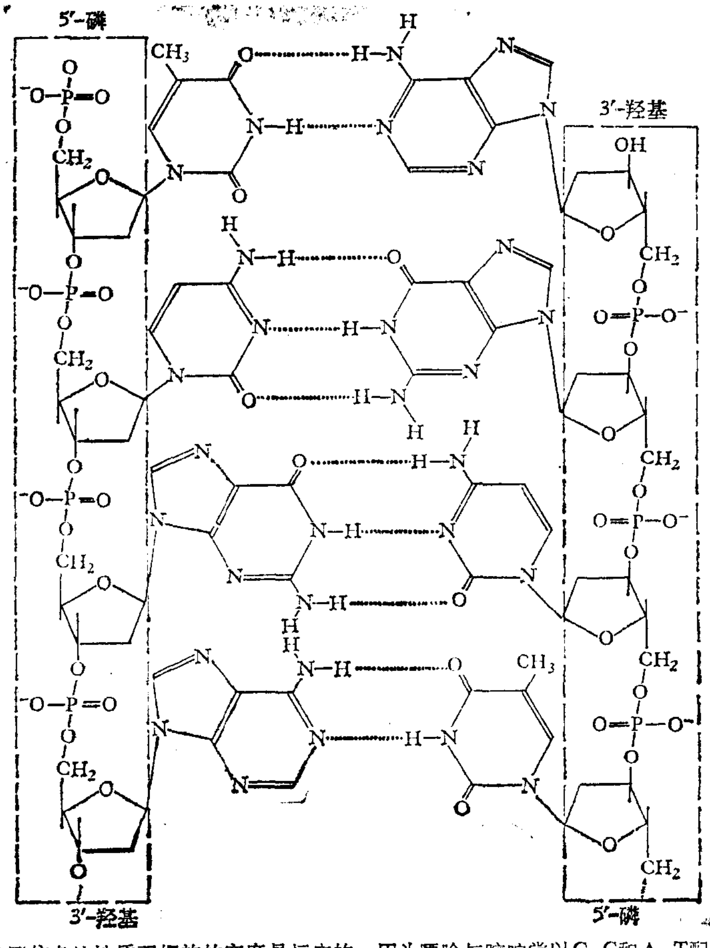

图1-3　基因信息的性质双螺旋的宽度是恒定的，因为嘌呤与嘧啶常以G-C和A-T配对的形式存在

Watson及Crick认为，双螺旋的两条多核苷酸链不是共价连接，而是由氢键将碱基连接的。G只与C通过氢键相连，A只与T通过氢键相连，此称为碱基配对(base pairing)，这种配对方式称为互补(complementary)。

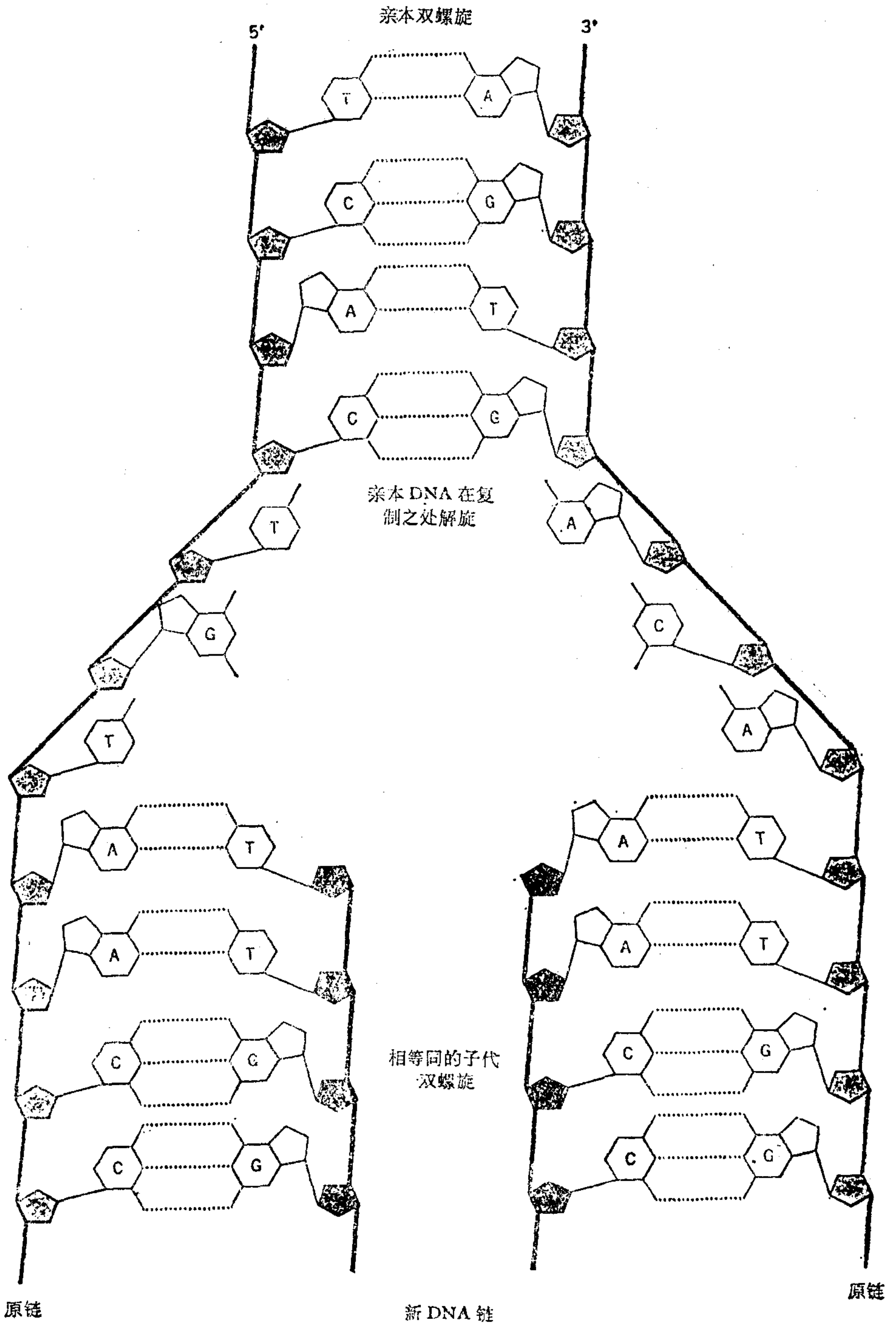

图1-4 碱基配对是DNA复制的机理

这个模型需要两条多核苷酸链以相反方向进行，即一股从5′→3′，另一股从3′→5′。由于只用氢键相连，两股链可相互分离。又由于碱基配对的特异性，每一股可作为互补链合成的模板(template)。这种机制称半保留合成，亦即DNA的结构携带着构成其序列的信息，通过模板、互补、半保留合成机制复制，将亲代信息传至子代(图1-3和图1-4)。

三、双螺旋结构的多种形式

新近发现除经典的B型螺旋外，DNA还具有其他的双螺旋结构形式。一般把DNA分子描述为长的双股结构。但事实上，它紧密地卷曲起来才能装配在细胞核内。经典的分析是每环绕一圈的碱基对是10.0，但实际测量是10.4。因此，相邻碱基对的旋转角度应为34.6°，完成一个完整的360°环，所含的碱基对应略长一些。这样，有些DNA分子的结构就不完全相同，有些应紧密一些。因此，DNA分子只有一种构型的概念要更正为具有一系列的结构形式，各结构均有其特型，其差别在于控制参数n(每一环所含的核苷酸数)和h(相邻的重复单位间的距离)。在DNA结构的每一家族中，控制参数各异。例如，B型DNA的n值为10.0—10.6。

B型螺旋是Watson和Crick提出的模型，测定时所采用的条件是纤维中相对湿度高(92%)，溶液的离子强度低，这是仿照活细胞的条件。从结构来说，B型螺旋的碱基与糖-磷酸骨架垂直，层叠而成。

A型DNA螺旋测定时所采用的相对湿度为75%，正离子是Na^+、K^+和Cs^+。其碱基与糖-磷酸骨架以略倾斜的角度连接，所含的碱基略高于B型，可能是五碳糖核酸含两个羟基，连接的空间略宽，这种结构适于解释RNA·RNA及RNA·DNA的杂交结构。

C型DNA螺旋采用的条件维持于66%相对湿度，在Li^+存在条件下测定，每一环的碱基对较B型螺旋少(为$9\frac{1}{3}$)。

D型和E型螺旋每环所含的碱基对最少，各为8和$7\frac{1}{2}$，此种螺旋型较少见，可能是鸟嘌呤较缺乏所致。

Z型螺旋最特殊，属左旋螺旋，上述各型属右旋螺旋。该螺旋的走向有如Z字型，每一环含碱基对最多，扭曲度最小，与B型螺旋比较要瘦长得多。有人认为Z型螺旋的构型与基因活性有关，对此型DNA分子的研究已进入基因调控研究新阶段。

一般认为DNA均属线性双股分子，可是DNA也有环状的形式，如同扭曲的橡皮圈，

表1-1 DNA双螺旋结构的多种形式

螺旋型	每转的碱基对	每碱基对旋转度	每碱基对垂直上升距离(Å)	螺旋直径(Å)
A	11	+32.7°	2.56	23
B	10	+36.0°	3.38	19
C	$9\frac{1}{3}$	+38.6°	3.32	19
Z	12	+30.0°	3.71	18

当解旋时成环状。例如有些小病毒，其基因组只含环状DNA。

关于DNA双螺旋结构的多种形式列于表 1－1 中。

四、基因的分子结构

染色体(chromosome)含有一个长的不间断的线状DNA分子，其上含许多基因，细菌细胞约有4,000个基因，真核细胞的基因为其十倍以上。遗传物质的位点(site)通过突变，产生碱基对序列(sequence)的改变而得以识别。过去分析染色体结构的方法是采用基因重组频率。但这种方法不够精细，基因距离太近，重组频率太低，有些位点不能发生突变，都不能进行测定。

现在采用限制性核酸内切酶消化基因DNA(或基因组DNA)，使DNA序列在特定位点上断裂，绘制成酶切图谱，以此来代表DNA序列。位点间的距离以DNA碱基对来测定(短距离以bp表示，长距离以千碱基对kb表示)。通过酶切DNA片段，分析DNA序列，即可得知基因的分子结构。

五、DNA分子能变性也能复性

DNA或RNA的双螺旋氢键结构能被加热所破坏，当所有氢键被破坏时，双股DNA的多核苷酸链能完全分离，分离过程称为变性作用(denaturation)或解链作用(melting)。

变性作用在很窄的温度范围中发生，并反映在DNA的许多物理性状的变化中。特别值得利用的是光密度的改变，因为核苷酸杂环在紫外光范围内有强烈的吸收光谱(260 nm)作用。

DNA双股分离的温度范围的中间点称为解链温度Tm(melting temperature)。图 1－5 示出用光吸收跟踪的解链曲线。各DNA的曲线形式大体相同，但Tm的位置受DNA组成及变性条件的影响。

当溶液中的DNA近似生理条件时，Tm范围在85—95°C，其值依赖于碱基组分。组

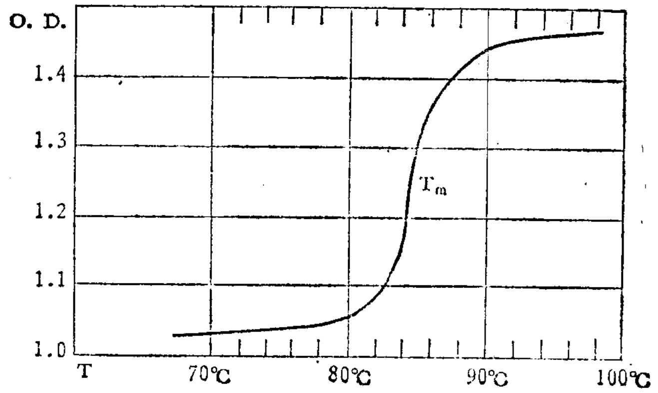

图 1－5　DNA的变性作用以光密度增加来表示

成3－H键的G－C对的自由能较大，因而对温度的耐受力较2－H键的A－T碱基对为强。依赖碱基组分的Tm是线性的，G-C含量每增加1%，温度随之增加0.4°C。，例如典型哺乳动物基因组的DNA含40%G-C的Tm在正常条件下约为87°C，而60%G-C在同样条件下的Tm为95°C。

对Tm的主要影响是溶液中的离子强度。单价阳离子浓度每增加10倍，Tm即增加16.6°C。一般的反应条件在0.12mol磷酸缓冲液中进行，Na^+浓度为0.18mol。如在某些试剂（甲酰胺等）中进行Tm测定，由于氢键不稳定而变化很大，Tm可降至40°C。在这种温度下，DNA结构较稳定，不致被其他因素（如增加温度）所破坏。

DNA变性最有用的性能是在合适的条件下其反应能恢复，使两条分离的互补链能重新组合为双螺旋，此称为复性（renaturation）。这种作用有赖于互补链间碱基配对的特异性。反应分两步进行，首先，两条短的互补链随机相连，配对形成双螺旋区，然后碱基配对的区域沿分子延伸，形成长的双股分子，重新组构成双螺旋状（图1－6）。

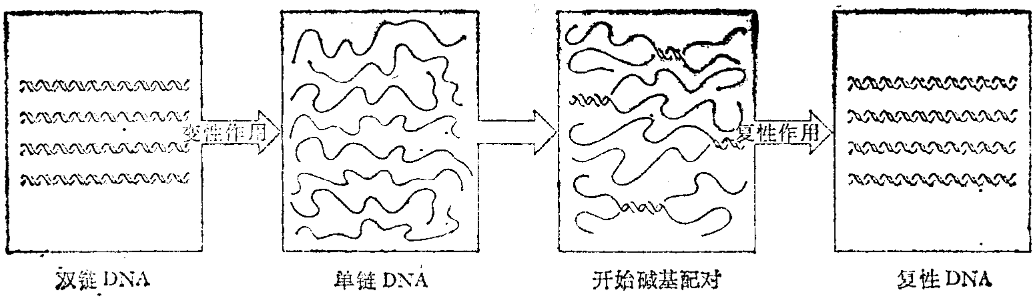

图1－6 已变性的单链DNA能复性为双股链

六、基因的作用

现代遗传学主要是在分子水平上研究生物信息系统，这种生物信息系统是最先进的计算机也无法比拟的。在DNA上的遗传信息是以线性形式编码，四个碱基按次序排列：ATG序列代表一种意义，TATAAT代表另一种意义，如此等等。正如在一个计算机上，信息是可以编码的，在DNA中信息也是编码的。计算机由于本身功能的错误或由于外界的影响（如动力不足）而失误。同样，DNA也可由于环境的变化或误差而发生错误。但是与计算机不同：有秩序、在适当的时间、适当的部位以及适当的组合解码的程序在DNA中是可以遗传的，不需要来自生物体以外的指令。与计算机还有不同之处是遗传程序还包括对信息及细胞本身的复制的指令，并且DNA能使其自身重新排列，因而使信息和程序形成新的组合。利用错误和重排，DNA就能适应各种变化，并按生物体的需要启动某些程序或关闭某些程序，排斥某些程序或接受某些程序。因此，DNA分子本质是动态的，经过长期的适应与变化而形成现在的变化万千、丰富多采的自然界。

七、基因的性能

在一个细胞内，所有的基因并不同时表达。不同的基因在细胞生命过程不同的时间

此为试读，需要完整PDF请访问：www.ertongbook.com