

高职高专系列教材

GAOZHI GAOZHUAN
XILIE JIAOCAI

基因操作技术

JIYIN CAOZUO JISHU

高勤学 主 编
朱善元 副主编

中国环境科学出版社

高职高专系列教材

基因操作技术

JIYIN CAOZUO JISHU

高勤学 主 编
朱善元 副主编

中国环境科学出版社·北京

图书在版编目 (CIP) 数据

基因操作技术/高勤学主编. —北京: 中国环境科学出版社, 2007.5

(高职高专系列教材)

ISBN 978-7-80209-317-1

I. 基… II. 高… III. 基因—技术—高等学校: 技术学校—教材 IV. Q78

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2007) 第 050947 号

责任编辑 张玉海 任海燕

责任校对 刘凤霞

封面设计 陆 臻

出版发行 中国环境科学出版社
(100062 北京崇文区广渠门内大街 16 号)
网 址: <http://www.cesp.cn>
联系电话: 010-67112765 (总编室)
发行热线: 010-67125803

印 刷 北京东海印刷有限公司
经 销 各地新华书店
版 次 2007 年 5 月第一版
印 次 2007 年 5 月第一次印刷
印 数 1—3000
开 本 787×960 1/16
印 张 21.25
字 数 400 千字
定 价 26.00 元

【版权所有。未经许可请勿翻印、转载，侵权必究】

如有缺页、破损、倒装等印装质量问题，请寄回本社更换

高 职 高 专 系 列 教 材
编 写 委 员 会

北京农业职业学院

赵晨霞 李玉冰 王晓梅 周珍辉

江苏畜牧兽医职业技术学院

葛竹兴 刘 靖 曹 斌 高勤学 朱善元

锦州医学院畜牧兽医学院

曲祖乙 王玉田

黑龙江生物科技职业学院

王 鹏 蔡长霞 马贵民

广西农业职业技术学院

杨昌鹏

杨凌职业技术学院

马文哲

江西生物科技职业学院

徐光龙

上海农林职业技术学院

张 江

高 职 高 专 系 列 教 材
审 读 委 员 会

江苏食品职业技术学院	贡汉坤
杨凌职业技术学院	陈登文 陈淑茗
黑龙江农业经济职业学院	杜广平 张季中
苏州农业职业技术学院	潘文明 夏 红
吉林农业科技学院	孙艳梅
扬州大学兽医学院	秦爱建
复旦大学生命科学学院	黄伟达
中国农业大学实验动物中心	张 冰
中国绿色食品发展中心	张志华
国家环保总局有机食品发展中心	周泽江
江苏省兽药监察所	王苏华
江苏省农业科学院兽医研究所	戴鼎震

前 言

基因工程问世以来,大批科学家不断投身于这一领域并作出了杰出的贡献。基因工程的成果也不断应用于医学及农业两大生命科学领域,极大地推动了社会的进步和经济的发展。21 世纪是生物经济时代,高等职业教育肩负着培养高级应用型人才的重任,近年来先后在高职院校开设了《生物技术应用》或者《基因工程》相关课程,然而高等职业院校的学生文化基础与本科院校不同,培养目标亦有根本区别。如何教会学生掌握基因工程的理论与技术,急需一本合适的教材。大多数本科教材或过于深,或过于理论化,并不适合高职教学,中国环境科学出版社组织全国八所高等职业院校相关专业教师在总结各自教学经验的基础上,编写了这本《基因操作技术》,希望能起到促进教学、增强学生技能的作用。

本书由江苏畜牧兽医职业技术学院高勤学任主编,朱善元任副主编。全书共分为十章,广西农业职业技术学院蒋益敏编写第一章和第四章;朱善元编写第二章和第三章;上海农业职业技术学院刘影编写第五章和第十章;北京农业职业技术学院田锦编写第六章和第八章;高勤学编写第七章和第九章。

本书编写过程中,要特别感谢各位编写者认真负责的编写态度,圆满地实现了本书的编写目标。同时,承蒙扬州大学兽医学院秦爱健教授在百忙之中主

审本书，在此深表谢意！

基因操作技术本身是一门飞速发展的学科，新技术与新方法日新月异，由于我们知识水平有限，同时也考虑到高职教学的特点，我们仅选择基因操作中通用的基本技术与方法加以介绍，理论与实验并重是本书的重要特点。由于时间仓促，水平有限，我们尚不能充实实用的例子，使教材、教学、教育更加贴近实际应用。本书只能起到抛砖引玉的作用，我们将在以后的教学工作中，不断完善，恳请同行和师生批评、指正。

主编 高勤学
2006.5

目 录

第一章 基因与基因组	1
第一节 核酸的结构	1
一、核酸的化学结构	1
二、DNA 的结构	4
三、RNA 的结构	5
四、核酸的合成	5
五、DNA 超螺旋结构	6
第二节 基因的结构特征	6
一、基因概念的发展	6
二、基因的结构特征	9
第三节 染色体与细胞周期	11
一、染色质化学组成	11
二、染色质结构模型	11
三、染色体形态结构及数目	12
四、细胞周期	13
五、有丝分裂	14
六、减数分裂	15
第四节 遗传信息的传递	17
一、复制	18
二、转录	27
三、翻译	31
第五节 基因表达调控原理	42
一、启动子调控模型	42
二、操纵子调控模型	45
三、感受应答调控模型	48
四、RNA 结构调控模型	48

五、RNA 剪切编辑调控模型	49
第六节 基因组	49
一、基因组的概念	49
二、病毒与噬菌体基因组	50
三、细菌基因组	50
四、真核生物基因组	51
第二章 基因操作的单元过程	52
第一节 基因操作的基本概念	52
第二节 基因操作的基本过程	53
一、目的 DNA 的克隆策略	54
二、载体及其改造	61
三、体外 DNA 重组	63
四、重组 DNA 的转化	65
五、重组体的筛选鉴定与克隆扩增	66
第三章 核酸提取技术	70
第一节 基本原理	70
一、细胞的破碎	70
二、酶处理	71
三、酚-氯仿处理	71
四、乙醇沉淀	72
五、梯度离心	72
六、碱变性	73
第二节 基因组 DNA 的提取	73
一、概述	73
二、从植物组织提取基因组 DNA	74
三、从动物组织及血液中提取基因组 DNA	75
四、线粒体 DNA 的提取	77
五、细菌基因组 DNA 的制备	78
六、病毒 DNA 的提取	79
七、质粒 DNA 的纯化	80
八、注意事项	80
第三节 RNA 的提取	81
一、概述	81

二、动、植物组织 mRNA 的提取	82
三、动、植物病毒 RNA 的提取	83
四、注意事项	84
第四节 核酸定量与保存	85
一、核酸的检测	85
二、核酸的保存	88
第四章 基因扩增技术	90
第一节 基本原理	90
第二节 反应体系	92
一、聚合酶链式反应编程	92
二、聚合酶链式反应的体系	92
三、影响聚合酶链式反应的因素	92
第三节 引物设计	95
一、引物设计的一般原则	95
二、限制性内切酶保护碱基	97
三、引物设计软件	98
第四节 常用技术类型	107
一、反转录 PCR	107
二、定量 PCR	109
三、快速扩增末端技术	111
四、单链构象多态性 PCR	113
五、其他	114
第五节 PCR 技术应用	118
一、遗传病诊断	118
二、性别鉴定	119
三、转基因检测	119
四、疾病诊断	120
第五章 电泳技术	121
第一节 基本原理	121
一、电泳技术发展简史	121
二、电泳基本原理	122
三、影响电泳分离的主要因素	123
四、电泳的分类	123

第二节 琼脂糖电泳	124
一、琼脂糖电泳概述	124
二、琼脂糖凝胶电泳操作步骤	125
三、影响电泳迁移率的因素	126
四、注意事项	126
第三节 聚丙烯酰胺凝胶电泳	127
一、聚丙烯酰胺凝胶电泳概述	127
二、操作过程	128
三、注意事项	129
第四节 其他电泳技术	131
一、醋酸纤维素薄膜电泳	131
二、等电聚焦电泳	133
三、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳	136
四、IEF/SDS-PAGE 双向电泳	140
五、毛细管电泳	144
第六章 基因重组技术	148
第一节 重组 DNA 分子的构建	148
一、重组 DNA 的概念	148
二、黏性末端 DNA 分子间连接	150
三、平末端 DNA 分子间连接	151
四、同聚物加尾法	152
五、人工接头连接法	154
六、其他连接方式	157
第二节 基因转移	158
一、重组 DNA 向细菌细胞转入	158
二、外源目的基因向真核细胞转入	165
第三节 重组子筛选与鉴定	168
一、遗传学检测法	168
二、核酸分子杂交检测法	169
三、物理检测法	170
四、免疫学检测法	172
五、核酸序列分析	175

第七章 常用载体	176
第一节 质粒载体	177
一、质粒载体的生物学特性	177
二、插入失活	181
三、转化	181
四、常见的质粒载体类型	183
第二节 基于 λ 噬菌体的载体	189
一、 λ 噬菌体的生物学	189
二、 λ 噬菌体载体	193
第三节 柯斯质粒	197
一、柯斯质粒的特点	197
二、超级载体: YACs 与 BACs	198
第四节 M13 载体	198
一、丝状大肠杆菌噬菌体的生物学	199
二、M13 噬菌体的基因组结构	200
三、M13 噬菌体的主要用途	200
第五节 表达载体	201
一、表达载体的类型	201
二、表达载体构建的一般原则	204
第六节 真核细胞中的克隆与表达载体	206
一、酵母	206
二、哺乳动物细胞	208
三、总结	209
第八章 常用工具酶	210
第一节 限制性核酸内切酶	211
一、限制性核酸内切酶的发现	211
二、限制性核酸内切酶的类型	213
三、限制性核酸内切酶的命名	214
四、限制性核酸内切酶的性质	215
五、限制性核酸内切酶的反应条件	221
六、限制性核酸内切酶的影响因素	223
七、双酶切	230
第二节 DNA 连接酶	231
一、连接酶的概念	231

二、DNA 连接酶的类型	232
三、DNA 连接酶的反应体系	233
四、影响连接酶的因素	235
第三节 DNA 聚合酶	235
一、大肠杆菌聚合酶 I	236
二、Klenow 片段	239
三、T4 噬菌体 DNA 聚合酶	240
四、T7 噬菌体 DNA 聚合酶	242
五、Taq DNA 聚合酶	243
六、逆转录酶	246
第四节 核酸酶	248
一、核糖核酸酶	248
二、脱氧核糖核酸酶	249
三、S1 核酸酶	249
四、核酸外切酶	251
第五节 其他酶	254
一、碱性磷酸酶	254
二、T4 噬菌体多核苷酸激酶	256
三、末端转移酶	257
 第九章 基因操作相关技术	 259
第一节 测序技术	259
一、DNA 序列测定的原理	259
二、DNA 序列测定的策略	263
三、DNA 序列测定存在的问题	266
第二节 分子标记技术	267
一、基本概念	267
二、限制性酶切片段长度多态性	268
三、随机引物扩增片段长度多态性	270
四、扩增片段长度多态性	271
五、微卫星	275
六、补充技术	277
第三节 生物信息技术	280
一、生物信息学概念	280
二、生物信息数据库	281

三、数据的查询与提交	283
四、序列比对与数据库搜索	288
五、核酸结构预测策略	290
第十章 基因操作技术应用	294
第一节 质粒的提取与酶切电泳鉴定	294
实验一 质粒的小量制备	294
实验二 质粒 DNA 的酶切	299
第二节 目的基因克隆与重组载体构建	301
实验三 PCR 扩增目的基因	301
实验四 琼脂糖凝胶中回收 DNA 片段	305
实验五 DNA 片段连接	307
第三节 感受态细胞制备和转化子筛选鉴定	309
实验六 感受态细胞的制备	310
实验七 重组质粒转化	312
实验八 转化克隆的筛选与鉴定	314
第四节 目的基因在原核细胞中表达与 SDS-PAGE 鉴定	318
实验九 外源基因的诱导与表达	319
实验十 SDS-PAGE 检测表达蛋白	320
参考文献	325

第一章 基因与基因组

【知识目标】

- 熟悉遗传信息的传递过程;
- 理解基因表达调控原理;
- 掌握核酸的结构;
- 了解基因组特点。

【能力目标】

- 能运用核酸及基因的知识;
- 能运用核酸复制及调控的基本原理。

第一节 核酸的结构

核酸是遗传物质，它们能从亲代传递到子代。绝大多数生物的遗传物质是脱氧核糖核酸（DNA）。少数细菌噬菌体、许多植物病毒和一些动物病毒的遗传物质是核糖核酸（RNA）。

一、核酸的化学结构

核酸是核苷酸的多聚体，核苷酸是基本结构单元。每个核苷酸均含有碱基、戊糖和磷酸三种成分。环状五碳糖，有核糖和脱氧核糖，核糖存在于核糖核酸（RNA）中，脱氧核糖存在于脱氧核糖核酸（DNA）中。这两种核糖的区别在于脱氧核糖 2'-碳原子上的羟基被脱了氧，只剩下 H。这个区别使得 DNA 比 RNA 更具化学稳定性。

DNA 中的四种碱基是：A（腺嘌呤）、G（鸟嘌呤）、C（胞嘧啶）和 T（胸腺嘧啶）（图 1-1），RNA 中有四种碱基：A、G、C 和 U（尿嘧啶）。U 跟 T 结构相似，U 在 5-碳原子上连接的是 H，而 T 在 5-碳原子上连接的是一 CH_3 。

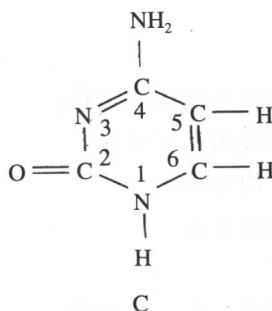
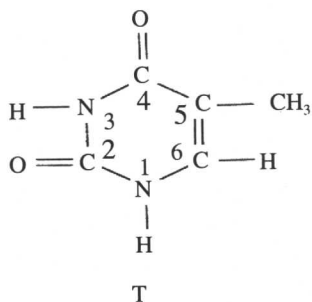


图 1-1 碱基

核糖的 1'-碳原子上通过 N-糖苷键连接有嘌呤或嘧啶碱基成为核苷 (图 1-2)。

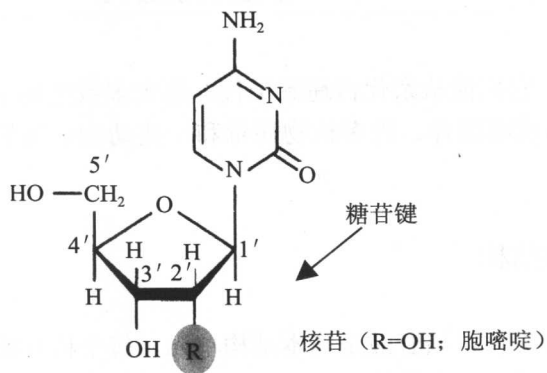


图 1-2 核苷

核苷再磷酸化后叫核苷酸（图 1-3）。核酸中核苷酸的连接方式是一个核苷酸的 5'-磷酸和另一个核苷酸中的 3'-OH 形成第二个磷酸酯键而共价连接，3' 和 5'-碳原子上的磷酸都是酯化的，这样的单位常被称为磷酸二酯键，磷酸二酯键相连而成的链状聚合物即

为多聚核苷酸（图 1-4）。

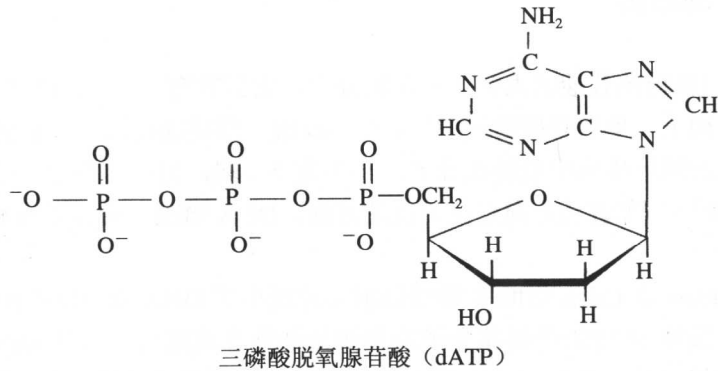
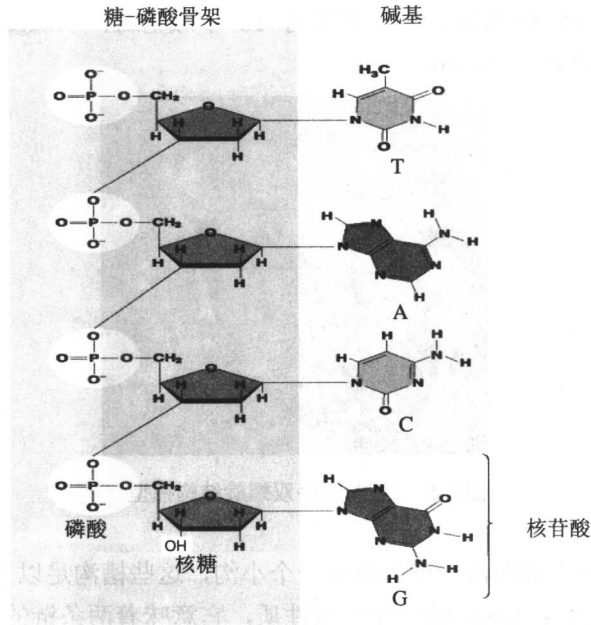


图 1-3 核苷酸



嘌呤和嘧啶碱基彼此之间不形成任何共价键，因此，一个多聚核苷酸含有一条糖与磷酸交替出现的骨架，这一骨架具有一个 3'-OH 末端和一个 5'-P 末端。