

Biotechnology:
Applying the Genetic Revolution

DNA重组技术, DNA体内与
体外合成技术, RNA技术

David P. Clark, Nanette J. Pazdernik



原 版 引 进



科 学 出 版 社

www.sciencep.com

Biotechnology

Applying the Genetic Revolution

生物技术提高②

DNA重组技术, DNA体内与体外 合成技术, RNA技术

Authors

David P. Clark

Department of Microbiology
Southern Illinois University
Carbondale, Illinois

Nanette J. Pazdernik

Math and Science Division
Southwestern Illinois College
Belleville, Illinois

科学出版社

北京

图字：01-2009-2602

This is an annotated version of
Biotechnology: Applying the Genetic Revolution
By David P. Clark, Nanette J. Pazdernik
ISBN 13: 978-0-12-175552-2
Copyright © 2009, Elsevier Inc. All rights reserved.

Authorized English language reprint edition published by the Proprietor.
ISBN 13: 978-9-81-272358-1

Copyright © 2009 by Elsevier (Singapore) Pte Ltd. All rights reserved.

Elsevier (Singapore) Pte Ltd.

3 Killiney Road

08-01 Winsland House 1

Singapore 2139519

Tel: (65) 6349-0200

Fax: (65) 6733-1817

First Published 2009

<2009>年初版

Printed in China by Science Press under special arrangement with Elsevier (Singapore) Pte Ltd.
This edition is authorized for sale in China only, excluding Hong Kong SAR, Macao SAR and Taiwan.
Unauthorized export of this edition is a violation of the Copyright Act. Violation of this Law is subject to
Civil and Criminal Penalties.

本书英文影印版由Elsevier (Singapore) Pte Ltd. 授权科学出版社在中国大陆境内独家发行。本版权在
中国境内（不包括香港和澳门特别行政区以及台湾）出版及标价销售。未经许可之出口，视为违反著作权
法，将受法律之制裁。

图书在版编目 (CIP) 数据

DNA重组技术, DNA体内与体外合成技术, RNA技术: 英文/ (美)
克拉克 (Clark, D. P.) 主编. —影印本. —北京: 科学出版社, 2009

(生物技术提高; 2)

ISBN 978-7-03-024505-2

I. D… II. 克… III. ①脱氧核糖核酸-重组-生物技术-英文 ②脱氧核糖
核酸-生物合成-生物技术-英文 ③核糖核酸-生物技术-英文 IV. Q523 Q552

中国版本图书馆CIP数据核字 (2009) 第065271号

责任编辑: 孙红梅 李小汀 / 责任印制: 钱玉芬 / 封面设计: 耕者

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>

骏杰印刷厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2009年5月第 一 版 开本: 787×1092 1/16

2009年5月第一次印刷 印张: 9 1/2

印数: 1—2 000

字数: 290 000

定价: 70.00元

(如有印装质量问题, 我社负责调换〈环伟〉)

《生物技术提高》导读版编委会

张义正 教 授 四川大学

袁 生 教 授 南京师范大学

黄 鹰 教 授 南京师范大学

高 福 研究员 中国科学院微生物研究所

景新明 研究员 中国科学院植物研究所

生物技术：遗传革命的应用

生物技术的迅速发展，无论在基础研究领域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也越来越广泛地应用于农业、医药、食品、能源及环境保护等多个领域。毋庸置疑，生物技术和生物技术产业将是21世纪的主导技术和产业之一，对人类的生产和生活和伦理等各个方面必将产生全面而深刻的影响。大力发展生物技术及其产业已成为世界各国经济发展的战略重点。

目前，生物技术不仅仅是对单个基因进行遗传操作，而是可以在实验室进行人工进化，获得具有新功能的蛋白质编码基因。现代分子生物学和遗传学的快速发展使我们获得了多种生物的基因组序列及其结构，包括从病毒、细菌到植物、动物和人，这些知识的应用已导致了生命科学和生物技术的革命，我们现在甚至还可以根据基因组数据提供的信息，改造原有的生化途径，建立起能够生产不同产物的新生化途径，从而为人类提供更多的新产品，如药物、疫苗和食物。对于衰老和癌症发展过程中的分子机理的深入研究，使我们在不久的将来，就有可能找到延缓衰老和治疗癌症的方法。对于细菌和病毒致病机理和进化规律的研究，不仅可以治疗和预防由它们所引起的传染病，而且还能找到对付生物武器和生物恐怖的办法。生物技术与其他学科和技术的交叉融合亦有可能带来新的革命，比如纳米颗粒的更小尺寸和特殊结构，可以使治疗癌症更具有靶向性和对癌细胞具有更大的杀伤力，而DNA和某些蛋白质的特殊结构，又可以用于制造许多新的纳米材料和纳米装置。

正是因为生物技术的迅猛发展，催生了“生物技术：遗传革命的应用”一书的出版。该书是由美国南伊利诺斯大学的Clark教授和西南伊利诺斯大学的Pazdernik博士共同撰写的，它是Clark教授所著的“分子生物学：遗传革命的领悟”(Molecular Biology: Understanding the Genetic Revolution, 此书的注解版已于2007年由科学出版社出版)的后续技术篇。本书描述了来自遗传革命的信息如何被用来开发出新的生物技术，告诉读者有关生物技术已经拓展的研究领域和途径，及其最新进展。

本书共有25章，涉及到生物技术的基础知识，基本技术，最新技术以及它们的应用领域等各个方面。为了便于不同领域的读者对自己感兴趣的或所从事的研究领域有较深入的了解，我们将本书相关的内容(章节)进行了重新编排，共划分成6个分册，每个分册的篇幅大致相当，内容相近，读者可以根据自己的需求进行选择阅读。

第1分册(原书的第1、2、7、25章)的主要内容有分子生物学基础知识，纳米生物技术和生物伦理学。第1、2章为读者提供了解生物技术所必需的分子生物学基础知识，包括DNA结构、基因表达、蛋白质合成以及用于生物技术研究的各种模式生物。第7章的纳米生物技术包括了科学家怎样利用新的纳米结构释放药物，原位鉴定生物分子和制造抗菌材料。同时也展示了纳米生物技术如何将DNA的自组装能力开发成纳米装置，如何用DNA控制蛋白质的形状。对于这个新领域的研究才刚刚开始，有可能会引起新一轮的生物技术革命。现代生物技术的进展引发了许多生物伦理学问题(第25章)，如我们是否应该利用现

代生物技术去克隆人类，创制转基因作物，研究人类干细胞？我们的遗传学信息应该向公众公开吗？

第2分册（原书第3、4、5章）的主要内容有重组DNA技术，DNA的合成技术和RNA技术。最基础的DNA重组技术包括核酸的分离，电泳、酶切和重组到分子克隆载体，最后导入模式生物中作深入分析；核酸的检测技术不论用于筛选基因，还是分析基因功能都是非常有用的，它包括利用不同的核酸标记方法所进行的DNA、RNA和差减杂交以及原位荧光杂交等。DNA的体内复制和修复错误对基因生物、原核生物和真核生物都是十分重要的，它们都遵循同样的复制过程；DNA的体外合成技术则包括化学合成和聚合酶链式反应（PCR技术）。RNA技术包括反义技术、RNA干扰技术和核酶技术，除RNA核酶外，也可以通过人工进化的方法获得DNA核酶。这些RNA技术不仅可用于基因功能的研究，而且在不同的应用领域具有广泛的用途。

对第1、2分册内容的熟悉是了解本书其他内容的基础和关键。从第3分册开始，就进入了不同的研究或应用领域。

第3分册（原书第8~11章）的主要内容有基因组学和蛋白质组学技术，重组蛋白质技术和蛋白质工程。在基因组水平上的研究技术包括各种作图法，基因组测序和生物信息学分析，以及利用DNA芯片技术分析基因的表达。在蛋白质组水平上的研究技术包括了不同的分析方法，如蛋白质凝胶电泳，Western印迹，高效液相色谱法，质谱法，蛋白质标识系统，噬菌体展示技术，酵母双杂交技术，免疫共沉淀，蛋白质芯片技术等。重组蛋白质技术就是通过DNA重组技术，使感兴趣的基因能在高效的表达系统中大量表达出有生物学活性的蛋白质。目前所使用的主要表达系统有细菌、酵母、昆虫细胞和哺乳动物细胞，不同的基因需要不同的表达系统。此外，还需要注意基因的密码子偏爱性，表达蛋白质的稳定性和分泌以及糖基化等问题。蛋白质工程是为了使酶获得新的特性，可以采用基因直接进化，DNA重组装等不同分子进化方法改变蛋白质的氨基酸序列，使酶更加稳定，抗逆能力更强，酶的底物范围更宽等。

第4分册（原书第12~15章）的主要内容涉及到环境生物技术，代谢途径工程和转基因动植物。由于环境中的绝大多数微生物至今还难于分离纯化，但它们在净化环境的过程中起着非常重要的作用，因此发展了新兴的元基因组学技术，它不必像传统方法那样每次在实验室里从模式生物中鉴定出一个新基因，而是直接从环境中分离基因组序列，而不必先鉴定是何种生物。利用DNA重组技术可以改变生物的生化途径，使之更加适用于人类的需求。这些新途径包括淀粉和纤维素的降解，环境污染物的降解，石油的生物炼制以及生物合成等。转基因植物技术包括所用的Ti载体、转化方法和鉴定方法等。目前转基因植物的重点是抗虫、抗逆和抗除草剂。转基因动物包括了诸多技术：用于基础和医学研究的转基因小鼠及其基因敲除，转基因家畜，转基因昆虫，转基因人，以及动物克隆，即转移细胞核。RNA干扰技术在转基因动物中也得到了广泛应用。事实上，自然界中也在不停地发生着转基因和DNA的吞食作用。

第5分册(原书第16~20章)主要内容是与人类健康相关的非传染性疾病的生物技术,包括遗传缺陷和基因治疗,癌症的分子生物学基础,非传染性疾病,衰老和细胞凋亡。人类遗传缺陷的鉴定、定位及缺陷基因的克隆对于遗传病的治疗至关重要。在遗传缺陷和肿瘤的基因治疗中,逆病毒,腺病毒以及一些其他病毒常被用作转运基因的主要载体,也可以利用质粒载体直接注射或用脂质体包裹后导入细胞。癌症的发生与癌基因、原癌基因、肿瘤抑制基因的表达和调控相关,病毒也可以导致癌症发生。非传染性疾病是由基因与环境相互作用所引起的,比如肥胖症、糖尿病。衰老与细胞的程序化死亡是相互关联的,与癌症也有关联。衰老是随着端粒结构的逐步缩短和线粒体功能的衰退而逐渐发生的。

第6分册(原书第6章、第21~24章)重点介绍了免疫技术,由细菌和病毒所引起的疾病以及利用病原菌和病毒作为生物武器,和法医诊断生物技术。免疫技术包括制作研究和疫苗用的抗体新技术,如单克隆抗体,载体疫苗和DNA疫苗。细菌感染的分子诊断方法至关重要,细菌可以产生许多可致病的毒素,如细菌毒素,ADP-核糖基化毒素,霍乱毒素,炭疽毒素等。病毒和朊病毒所引起的疾病以及治疗方法,不管是流感病毒或艾滋病毒所引起的疾病,还是朊病毒所引起的疯牛病,都尤为引人关注。可用于制造生物武器的有细菌毒素和病毒(如炭疽毒素、肉毒素、天花病毒,核糖体失活蛋白等),用于生物武器的探测器和检测方法尤为重要。法医鉴定的生物技术包括DNA指纹图谱分析,PCR技术,这些方法不仅可用于鉴别罪犯,而且也可用于亲子鉴定。

本书有以下几个特点:

1. 内容众多, 范围广泛。本书从最基础的相关分子生物学知识(如核酸的结构, 基因的转录和翻译, DNA的复制等)到专门的分子生物学理论(如癌症和衰老的机理, 病毒和细菌的致病机理); 从最基础的生物技术(如重组DNA技术)到最新的生物技术(如RNAi技术、基因芯片技术、基因治疗等); 从主要依赖于分子生物学的生物技术到多学科交叉的生物技术(纳米生物技术); 从实验室技术到各个应用领域的生物技术(如农业、工业、医学、环境生物技术等)均有所涉及, 内容十分全面。

2. 层次清楚, 系统性强。尽管本书所涉及的知识面广量大, 但作者尽量把最基础的理论和技术进行集中介绍, 然后把不同应用领域的生物技术单独进行描述, 并预先将涉及到的专门理论知识加以解释。作为一本专门的生物技术教科书, 每章都附有进一步的阅读材料, 以便于感兴趣的读者更深入地学习。此外, 全书还附有重要术语的解释。

3. 图文并茂, 易于理解。为了便于读者理解分子生物学和生物技术中难懂的术语和方法学原理, 作者尽量使用浅显易懂的文字描述和大量的彩色图片并配以说明。此外, 每章末尾都有多重选择题, 并在书后附有答案, 便于读者对各章内容的理解程度进行自我评价。

4. 提出问题, 启发思考。现代生物技术所取得的巨大进展也引发了众多的讨论和生物伦理学问题。作者为此专门撰写了一章: 生物技术的生物伦理学。在这一章中, 作者提出了100多个问题, 但没有给出确切的答案, 而是陈述了大量的事实, 引发读者自己去思考, 去解答。现代生物技术的发展, 目前还主要依赖于分子生物学的进展; 而生物技术与其他



学科的交叉和融合，将孕育着新的突破性进展，作者为此也专门撰写了一章：纳米生物技术。尽管该项技术的研究刚刚开始，但它会启发我们不断思考和探索。

因此，本书不仅对生命科学领域的本科生和研究生具有很高的阅读价值，使他们了解到最新的生物技术进展，而且对其他研究领域的科研人员也有十分重要的参考意义，特别是那些拟在多学科交叉领域开展工作的研究者。

该书惟一存在的遗憾是缺乏专门的一章对生物信息学技术进行介绍。作为主要由生物学、数学和计算机科学的交叉和融合而成的技术，就像纳米生物技术一样，它不仅对未来的生物技术发展具有重要意义，而且对新兴的基因组学、系统生物学等学科的发展也具有不可替代的作用。

张义正

2009年4月



第2分册共有3章，其主要内容有3个：一是有关现代生物技术的一些基础性技术，如DNA的重组技术，DNA的杂交技术，分子克隆载体和文库的构建等；二是有关DNA的复制机制和过程，以及DNA的体外合成技术；三是近年来才发展起来的最新生物技术，即基于RNA的生物技术。

在第1章，作者描述了许多基本的DNA重组技术，包括DNA的分离、电泳、酶切和连接技术，核酸的标记和杂交技术，基因文库的构建和基因的筛选技术，以及差减杂交技术等。

作为DNA重组技术的第一步，就是要分离和纯化DNA分子。不管是分离何种生物的DNA，都可以利用RNA酶除去RNA分子，苯酚抽提除去蛋白质，离心除去不溶性物质，用乙醇沉淀除去可溶性小分子物质等。纯化后的DNA经过限制性内切酶酶切后，所产生的DNA片段可以通过凝胶电泳进行观察。不同来源的酶切DNA片段可用连接酶连接成重组DNA分子。

DNA片段可以进行各种方式的标记，包括放射性标记、生物素标记和化学标记等。标记的DNA分子可用于不同的杂交过程中，如荧光原位杂交（FISH），Southern杂交、Northern杂交，斑点杂交等。

作为分子克隆载体，必须能够自主复制，具有可供外源基因重组的克隆位点，要有可供选择转化子的标记基因，还要有易于检测是否有外源DNA插入的标记基因。此外，载体的分子量要小，易于操作（包括易于分离纯化和导入宿主细胞等），拷贝数高等。由于几种不同类型的分子克隆载体（如质粒载体、噬菌体载体、COS质粒载体以及人工染色体载体等）所具有的各自特征，因此它们可用于不同生物的基因组文库的构建。穿梭质粒载体是一类可以在两种生物中自主复制的载体，并且具备在两种生物中用于选择转化子的遗传标记基因。表达型载体除具有上述载体的特征外，它们还具有高活性的基因启动子，以利于外源基因的高表达。

对于基因组文库的构建，首先是将某种生物的全部DNA分离出来，经过限制酶切后克隆到载体中，然后将重组的DNA分子转入宿主菌中。由于真核生物的基因中存在内含子，无法在大肠杆菌中表达成蛋白质，因此需要构建表达文库（即cDNA文库）。对于表达文库的构建，首先就是要分离特定条件下的mRNA分子，经过反转录成cDNA后，插入克隆载体后转化宿主菌而得。最后可以通过斑点杂交或免疫筛选方法获得感兴趣的基因。

差减杂交技术是利用两种不同来源的DNA分子进行过量杂交，即其中一种DNA过量，使另一种DNA分子能形成互补双链的分子全部复性，从而筛选出感兴趣的基因。该技术可以用来筛选突变基因，也可以用来筛选在特定条件下表达的基因。

在第2章里，作者首先概述了生物体内DNA的复制过程。为了复制DNA，超螺旋的双链DNA必须经过DNA解旋酶和DNA解链酶的作用后，复制体才能在复制起点处装配，而解链后的单链DNA要与单链结合蛋白结合，以保证单链DNA的稳定。接着引物酶在复制起



点处开始合成引物，为DNA聚合酶提供3'-OH。DNA聚合酶只能按5'→3'方向合成新的DNA链，因此先导链是一条完整的DNA链，而滞后链的合成则产生被称之为冈崎片段的小DNA片段，这些小片段在DNA连接酶的作用下连接成完整的DNA链。

体外的DNA合成是由纯化的DNA聚合酶或化学连接核苷酸完成的。由于化学合成DNA的效率很低，获得的DNA分子常是很短的单链分子，因此化学合成法主要用于合成引物或寡核苷酸。

由DNA聚合酶完成的体外DNA合成则是种类繁多，用途颇广。其中最重要的用途就是可以利用不同的DNA聚合酶进行DNA的序列测定和扩增DNA片段。在DNA测序反应中，由DNA聚合酶产生的最后一个碱基可用两种方法来决定。在原有的测序方法中，DNA链的最后一个碱基是用4种双脱氧核苷酸和放射性同位素标记的核苷酸在4个独立的反应中测定的。在循环测序方法中，最后一个碱基是由4种不同荧光标记物分别标记的双脱氧核苷酸在同一个反应中测定的。体外扩增DNA片段的方法就是聚合酶链式反应，即PCR技术。该技术的用途十分广泛，比如可用于扩增任何已知序列的基因片段，可在RAPD分析中用于评价2种生物的亲缘关系，改进的PCR方法包括利用简并引物和反转录PCR来扩增未知的DNA区域。反转录PCR（RT-PCR）利用的是mRNA分子，而不是DNA分子，因为mRNA分子中已不含非编码的内含子序列。在克隆基因片段时，PCR还可用于TA克隆或在DNA的两端加上限制酶识别序列。PCR也可用于基因突变，包括插入、缺失和点突变。

在第3章里，作者主要介绍了3种基于RNA分子的生物技术，它们是反义技术，RNA干扰技术和核酶技术。过去一直认为RNA只是在合成蛋白质分子过程中的一个中间体，但是现在发现RNA分子控制着基因表达的许多不同过程。

由于反义基因的转录产物和反义寡核苷酸RNA分子与靶mRNA分子序列互补，因而可以与mRNA形成互补的双链RNA分子。这种双链RNA分子不能与核糖体结合，从而阻止了蛋白质的翻译过程。这种双链RNA分子也会激活RNaseH降解双链RNA分子的酶活性，因此导致靶mRNA分子的消失。反义基因在不同的生物中控制着各种基因的表达，如大肠杆菌ColE1质粒的复制，X-染色体的失活，细菌的铁代谢，脉胞菌的生物节律，HIV-1基因表达，RNA编辑，RNA拼接，真核生物转录因子等。因此，反义RNA技术可以用来抑制许多引起疾病的基因表达。利用反义寡核苷酸技术的难点包括：如何克服靶mRNA的复杂高级结构，使反义寡核苷酸能找到靶结合位点；如何克服反义寡核苷酸的非特异性反应所导致的非靶mRNA的降解；如何克服反义寡核苷酸进入细胞后的不稳定性。对于第1个问题，可以通过反义寡核苷酸序列的精心设计来解决；至于第2个问题，可以通过合成嵌合反义核苷酸来解决；解决第3个问题，则是通过改变磷酸-糖骨架来实现。反义寡核苷酸分子可以用不同的方法释放到细胞中去，包括脂质体法和碱性肽连接法；这些反义寡核苷酸也可以穿过由链球菌溶血素O产生的孔，或是由于膜的离体机械剪切作用所产生的孔。与寡核苷酸直接导入细胞不同的是，可以将反向靶基因插入到载体中，当重组载体导入细胞后就可以表达出反义RNA，从而调节靶基因的表达。这种方法还可用来确定未知基因的功能。

RNAi即RNA干扰是一项非常重要的最新生物技术。RNA干扰现象实际上是一个细胞过程，广泛存在于不同的生物中。双链RNA可以激活Dicer将RNA分子切割成21-23个核苷酸长的片段，即短干扰RNA（siRNA）。双链siRNA分子与一种称之为RNA诱导沉默复合物（RISC）结合，然后解链，产生的单链RNA在细胞质中寻找互补的靶RNA分子。一旦发现靶RNA分子，RISC复合物就将其切割，从而阻止蛋白质翻译过程。在许多生物的胚胎发育过程中还发现一类非编码RNA，即miRNA，它们的功能也是调节不同基因的表达。由RNA干扰这种细胞过程发展起来的RNAi生物技术具有十分广泛的用途，由于siRNA分子可以阻止蛋白质的合成，因此可以用来确定未知蛋白质的功能。siRNA分子可以直接合成，然后利用不同的方法导入细胞或生物体内。如巨大线虫，可以将其直接浸泡在dsRNA溶液中，它可以吸收dsRNA分子；也可以直接将dsRNA注射到虫卵中；或是直接喂食可以表达靶dsRNA的大肠杆菌。为了在基因组水平上研究基因的功能，可以利用不同的方法构建RNAi文库，巨大线虫和果蝇的RNAi文库已经建立。

核酶是可以催化酶反应的天然RNA。I型和II型内含子就是两类核酶，它们在RNA的拼接过程中可以催化自身的剪接作用而不需要任何其他酶。可以根据核酶的分子量大小划分为大核酶和小核酶。小核酶只有200-500个核苷酸长，包括锤头和发夹两类核酶。小核酶都有一个可以催化反应的紧凑基序，因此对于设计摧毁引起疾病的mRNA的核酶是十分有用的。例如：锤头基序可以设计到识别病毒mRNA的反义寡核苷酸中去，一旦反义寡核苷酸识别病毒mRNA，锤头基序就可将其切割。构建随机RNA序列库，可用来发现已有核酶的新底物，或是发现可用作核酶的新序列。除RNA核酶外，人们发现DNA也具有催化功能。

除了上述的dsRNA可以调控基因的表达外，在原核生物中还发现mRNA分子中存在可以控制基因表达的保守序列，称之为核糖开关。它们在结合了一些小的效应分子（如cAMP）后可以改变茎环结构，从而终止转录作用或阻止蛋白质的翻译，由此控制不同基因的表达。

张义正

2009年4月



生物技术改变了世界，它使许多遗传疾病的病因得到鉴定已成为可能，使人类可以在更高人口密度下生存，因为每公顷土地上能提供更多的食品。现代分子生物学和遗传学的快速发展使我们获得了很多种生物的基因组，包括从病毒和细菌到树和人，这些知识的应用已导致了科学的革命，使其由原来的描述性改变成多种学科，并为人类提供许多新产品，如药物、疫苗和食物。

生物技术为生产具有新功能的蛋白质，甚至具有不同产物的新生化途径开启了大门，有了新的蛋白质和新的生化途径，这就符合逻辑地将这些新功能加入到作物、动物以及患有遗传病的人体中。前不久农学家还主要依赖于绿色指纹获得高产，而今天他们可以利用绿色荧光蛋白来分析转基因作物中的基因表达。产生这些变化的能力将会导致将来更大的变化。生物技术会因为发现了衰老或癌症发展过程中的分子变化而找到长生不老之路吗？这会改变我们治疗疾病的方法吗？会由于发展了新的生物因子而改变战争方式吗？

“生物技术：遗传革命的应用”这本书解释了来自遗传革命的信息如何用于回答上述问题。它告诉读者许多有关生物技术已改变原有研究领域的途径。本书的前几章主要简明扼要地提供了分子生物学基础知识。这些内容在本系列丛书的“分子生物学：遗传革命的领悟”中已作了详细的解释。它使学生回顾基础知识，包括DNA结构、基因表达、蛋白质合成以及大致了解用于生物技术研究的各种生物。接着让学生了解一些用于生物技术研究的基础方法学。第3章（第2分册第1章）解释了核酸是如何分离和克隆到人造的遗传载体，然后引入模式生物作深入分析。接下来的两章更详细讨论了用于研究基因功能的各种技术。第4章（第2分册第2章）侧重于DNA技术，包括体内和体外的DNA合成，以及聚合酶链式反应。第5章（第2分册第3章）侧重于RNA技术，包括反义技术、RNA干扰和核酶。对这几章内容的熟悉是了解本书其他内容的关键。

本书其他各章则是侧重于不同的研究领域，介绍了遗传革命已经彻底改变了这些领域的途径。第6章（第6分册第1章）介绍了产生用作研究和疫苗抗体新技术。第7章（第1分册第3章）则进入了一个不同的领域，即基于纳米尺度的领域。这一章评价了分子生物学将如何会为工作在纳米世界的科学家所改变，如科学家怎样利用新的纳米结构释放药物，原位鉴定生物分子和制造抗菌材料。这一章还展示了纳米生物技术如何将DNA的自组装能力开发成纳米装置，如何用DNA控制蛋白质的形状。这个新的研究领域与分子生物学结合才刚刚开始，在未来的分子生物学课程中将成为重要的内容。

接下来的内容又回到所熟悉的基因组学和蛋白质组学。这些章节强调它们的应用领域和讨论基因组学和蛋白质组学的医学应用进展。蛋白质组学这一章包括了各种分离和鉴定蛋白质的方法，包括新发展起来的质谱技术。蛋白质组学还为下一章作了很好的铺垫，即概述了如何在不同的生物和组培细胞中表达蛋白质来研究它们的功能，接着还介绍了利用蛋白质工程产生具有新特性的蛋白质。

由于单个遗传修饰的蛋白质具有局限性，第12章（第4分册第1章）从实验室转向环境，介绍了新兴起的元基因组学技术。该技术不必像传统方法那样，在实验室里每次从模式生物中只鉴定出一个新基因，而是直接从环境中分离基因组序列，而不必事先鉴定是来自何种生



物。第13章（第4分册第2章）继续介绍新基因功能的研究。这一章介绍了几种利用DNA重组技术改变生化途径的新方法。构建新的蛋白质和新生化途径，只有将它们整合到植物和动物中去才有意义，接下来的两章向学生介绍了转基因植物和动物的最新进展。

接下来的几章侧重于医学领域。第16章（第5分册第1章）介绍了造成遗传缺陷的分子基础，接着进入17章（第5分册第2章）的基因治疗。接下来的几章则分别介绍了癌症的分子基础和非传染性疾病，如勃起功能障碍、糖尿病、肥胖症和衰老。最后，介绍分子生物学在了解细菌病和病毒病方面取得的巨大进展。第21和22章（第6分册第2~3章）使学生知道细菌和病毒是如何使我们的细胞生病，对非同寻常的朊病毒病的最新研究进展也作了介绍，如疯牛病和早老痴呆症。第23章（第6分册第4章）则是基于细菌和病毒致病的知识而对生物战争和生物恐怖进行了概述。

第24章（第6分册第5章）概述了遗传革命如何改变了法医学领域，通过分子生物学鉴定罪犯的方法已不可逆地改变了司法系统。不管是新案、旧案还是未破之案，都可以用DNA测试方法进行鉴定，而且比现有的鉴定方法更准确更可靠。DNA在犯罪侦破中的应用已制作成电视系列片广为传播。作为本书的结尾，第25章（第1分册第4章）介绍了生物伦理学问题。与讨论科学方法不一样的是，本章提出了有关这些方法的社会作用问题。我们是否应该利用遗传革命去克隆人类，创制转基因作物，研究人类干细胞？我们的遗传学证据应该向公众公开吗？

“生物技术：遗传革命的应用”一书展示了技术进步和分子生物学革命融合的许多不同途经。将大量信息的加工与对我们人类和其他生物的无穷小的精确分析能力相结合，已经和将要不断改变我们的社会，伦理和个人环境。本书为学生提供了这些已经发生变化的基础知识，希望他们能将这些知识应用于将来的发展。

（张义正 译）

致谢

我们真诚地感谢为本书出版提供资料和建议的个人：Laurie Achenbach, Rubina Ahsan, Phil Cunningham, Donna Mueller, Dan Nickrent, Holly Simmonds, 和 Dave Pazdernik。特别感谢Alex Berezow和Michelle McGehee为本书编写的问题和Karen Fiorino所创作的绝大多数美术作品。



现代生物技术依赖于分子生物学和计算机技术的进步

传统生物技术可以回溯到几千年前，它包括家畜和作物的选择育种，以及酒、牛奶制品、纸、丝绸及其他天然产品的发明。遗传学仅在几个世纪前才作为一个科学研究领域。该领域近来的快速发展，使作物和家畜的育种可以通过精细的遗传操作而不是误差试验来进行。1960—1980年间的绿色革命就是将遗传知识应用到自然育种工作中，特别是在提高粮食产量上取得巨大成功。今天，可以利用遗传工程技术直接改造植物和动物。

目前已构建了几种植物和动物的新变种，有的已在农业中应用。用作人类食物来源的动物和植物正在进行工程改造，使其能适应它们以前不适应的条件。抗病动物和抗虫植物品种也正在开发，以便增加产量和降低成本。这些遗传改造的生物对其他物种和环境的影响是目前争论的问题。

现代生物技术不仅利用了现代遗传学，而且也利用了其他科学领域的进展。例如，处理大量的遗传信息就依赖于计算能力方面的进展。实际上，要是没有更复杂计算机和软件的发展，人类基因组的测序是不可能完成的。有时说我们是处在两个科学革命的中间，一个是信息技术革命，另一个是分子生物学革命。两者都包括处理大量的编码信息，一种是人造的信息，即以任意速率人工编码，其机制是人为的；另一种则是依赖于生命的遗传信息处理。

然而，第三次革命正在发生，即纳米生物技术。这些技术可以观察和操作单个或成小簇的原子，从而为生命系统更精细的分析开启了新途径。纳米技术在生物技术的许多领域正起着重要作用。

这就提出了一个如何精确定义生物技术的问题，对此尚无真正的答案。以前把酿造啤酒和烘焙面包看作是生物技术。今天，现代遗传学或其他相关现代技术的应用常被看作是生物技术的必需过程。因此，生物技术的定义已部分成为一种时尚。在本书中，我们将现代生物技术看作是由传统生物技术与现代遗传学，分子生物学，计算机技术和纳米技术融合而成的技术。

生物技术这个领域的确很大，难于定义。它不仅仅包括农业，它也影响了许多诸如人类健康的医学，如疫苗开发和基因治疗等各个方面。我们已试图提供一种基于遗传信息的融合方法，与此同时，说明生物技术是如何开始扩展到许多人类努力的相关领域，而这种扩展常常是意想不到的。

(张义正 译)

PREFACE

Biotechnology has made the world a different place. Biotechnology has made it possible to identify the genetic causes behind many different inherited diseases. Biotechnology has made it possible for people to survive to a much higher population density by providing more food per acre. The advent of modern molecular biology and genetics has advanced our understanding of the genomes of a wide range of organisms from viruses and bacteria to trees and humans. The application of this knowledge has revolutionized the sciences, changing them from a descriptive nature to a variety of disciplines that provide new products such as drugs, vaccines, and foods.

Biotechnology has opened doors to making proteins with new functions, and even new biochemical pathways with altered products. With new proteins and new biochemical pathways, it seems only logical to find ways to incorporate the new functions into crops, into animals, and, it is hoped, into people with genetically based illnesses. Only a short time ago, agriculturists largely relied on green fingers to get good yields; today they use green fluorescent protein to assess gene expression in transgenic crops. The ability to make such direct changes will result in major changes for the future. Will biotechnology find the proverbial fountain of youth by identifying the molecular changes that cause us to age or develop cancer? Will it change the way we treat diseases? Will the way we wage war change with the development of new biological agents?

Biotechnology: Applying the Genetic Revolution explains how the information from the genetic revolution is being used to answer some of these questions. It informs the reader about the many avenues where biotechnology has changed the original field of study. The first few chapters provide a clear and concise review of the basics of molecular biology. These topics are explained in more detail in the first book of this series, entitled *Molecular Biology: Understanding the Genetic Revolution*. This review will take the student through the basics, including DNA structure, gene expression, and protein synthesis, as well as survey the variety of organisms used in biotechnology research. The student is then presented with the basic methodologies used in biotechnology research. Chapter 3 explains how nucleic acids are isolated, cloned into humanmade genetic vehicles, and then reinserted into one of the model organisms for in-depth analysis. The next two chapters discuss in more detail various techniques that have been developed to investigate the function of genes. Chapter 4 focuses on DNA, dealing with both *in vivo* and *in vitro* synthesis of DNA and the polymerase chain reaction. Chapter 5 focuses on RNA, explaining antisense technology, RNA interference, and ribozymes. Familiarity with these chapters is critical to understanding the rest of the textbook.

The remaining chapters focus on different fields of research, presenting some of the ways the genetic revolution has irreversibly changed these areas. Chapter 6 begins this approach by presenting newer techniques to generate antibodies for genetic research and for creating new vaccines. Chapter 7 delves into a different realm, one based on the nanoscale. This chapter evaluates how molecular biology will be changed by the ability of scientists to work in the nanoscale world. It discusses how scientists are using novel nanoscale structures to deliver drugs, identify biological molecules *in situ*, and manufacture antibacterial materials. The chapter illustrates how nanobiotechnology exploits the self-assembly property of DNA to create nanodevices. It shows how DNA can physically control the shape of proteins. This new field of research is intimately intertwined with molecular biology and will only become a stronger component of molecular biology courses in the future.

The next section returns to the more familiar world of genomics and proteomics. These chapters emphasize the applied aspect of these topics and discuss the medical applications of advances in genomics and proteomics. The proteomics chapter includes a variety of techniques used to isolate and characterize proteins, including the more recent developments in mass spectrometry. Proteomics provides a nice segue to the next chapter, which surveys how proteins are studied by expressing them in various organisms and cultured cells. The creation of proteins with novel properties by protein engineering follows.

Because single genetically modified proteins have their limitations, Chapter 12 moves from the lab to the environment and presents the emerging field of metagenomics. This approach bypasses the traditional method of identifying new genes one at a time from model organisms in the laboratory. Instead, metagenomics skips directly to isolating genomic sequences from the environment without identifying the organism from which they originate. The investigation of novel gene functions continues in Chapter 13. Biochemical pathways may be altered using recombinant DNA technology, and this chapter presents a few of these novel pathways. Construction of novel proteins and biochemical pathways is pointless unless they can be inserted into plants and animals. So the next two chapters present the student with the latest advances in creating transgenic plants and animals.

The next block of chapters focuses on the medical arena. First, in Chapter 16, the molecular basis for inherited defects is examined. This leads into the following chapter on gene therapy. Several chapters then present the molecular basis of cancer, a selection of noninfectious diseases, such as erectile dysfunction, diabetes, and obesity, and then aging. Last, molecular biology has made huge strides in our understanding of bacterial and viral diseases. In Chapter 21 and Chapter 22, the student will learn how bacteria and viruses exploit our cellular machinery to cause disease. The latest research on the unusual prion diseases, such as mad cow disease and Creutzfeldt-Jakob disease, is also covered. Chapter 23 builds on the knowledge of bacterial and viral pathogenesis to present a survey of biowarfare and bioterrorism.

Chapter 24 surveys how the field of forensics has been altered by the genetic revolution. The way criminals are identified via molecular biology has changed the penal system irreversibly. New cases, old cases, and unsolved cases are all now examined with DNA testing which is more accurate and reliable than previous identification methods. The use of DNA in criminal investigation has even spawned popular television series that showcase these advances and their effect on society. As the book comes to a close in Chapter 25, the subject of bioethics is presented. Rather than discussing scientific methodology, this chapter asks questions about the role of these methodologies in society. Should we use the genetic revolution to clone a human, create transgenic crops, do research on human stem cells? Should our genetic identity be open to the public domain?

Biotechnology: Applying the Genetic Revolution demonstrates many different ways in which advances in technology and the revolution in molecular biology have merged. The combined ability to process large volumes of information along with analyzing our bodies and other organisms with infinitesimal precision has and will continue to change our society, our ethics, and our personal surroundings. This book gives the student a basic knowledge of some of those changes that have already occurred, with the hope that they will be able to apply this knowledge toward future advances.