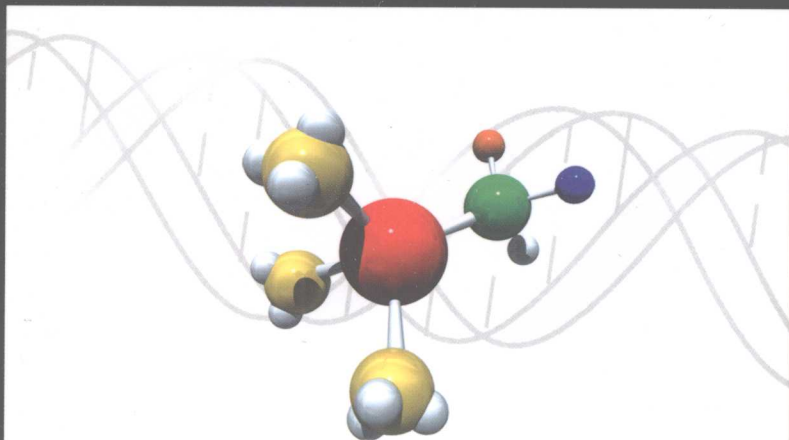




◎ 贺淹才 编著

基因工程 概论

OUTLINE OF GENETIC ENGINEERING

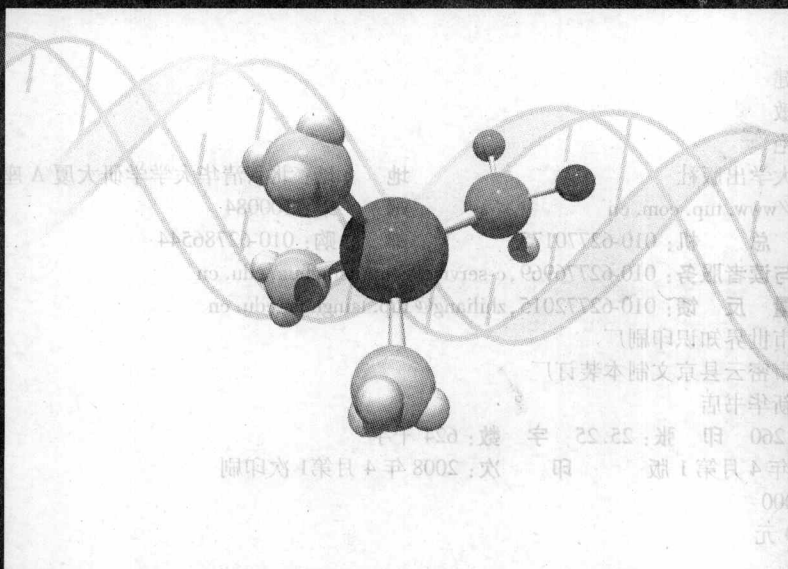


清华大学出版社

© 贺淹才 编著

基因工程 概论

OUTLINE OF GENETIC ENGINEERING



清华大学出版社
北京

内 容 简 介

本书共分 16 章,系统地阐述了基因工程的原理与技术。全书条理清晰,文笔流畅,图文并茂,内容实用,适合作为高等院校生命科学相关专业本科生教材,也可供相关专业研究人员参考。

版权所有,侵权必究。侵权举报电话:010-62782989 13701121933

图书在版编目(CIP)数据

基因工程概论 / 贺淹才编著. —北京:清华大学出版社, 2008. 4

ISBN 978-7-302-16494-4

I. 基… II. 贺… III. 基因—遗传工程 IV. Q78

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2007) 第 179527 号

责任编辑:罗 健

责任校对:赵丽敏

责任印制:杨 艳

出版发行:清华大学出版社

<http://www.tup.com.cn>

社 总 机:010-62770175

投稿与读者服务:010-62776969, c-service@tup.tsinghua.edu.cn

质 量 反 馈:010-62772015, zhiliang@tup.tsinghua.edu.cn

地 址:北京清华大学学研大厦 A 座

邮 编:100084

邮 购:010-62786544

印 刷 者:北京市世界知识印刷厂

装 订 者:北京市密云县京文制本装订厂

经 销:全国新华书店

开 本:185×260 印 张:25.25 字 数:624 千字

版 次:2008 年 4 月第 1 版 印 次:2008 年 4 月第 1 次印刷

印 数:1~3000

定 价:45.00 元

本书如存在文字不清、漏印、缺页、倒页、脱页等印装质量问题,请与清华大学出版社出版部联系调换。联系电话:(010)62770177 转 3103 产品编号:026313-01

基因工程是近年来最引人注目的生物工程技术的一个分支，它和细胞工程、酶工程、蛋白质工程和微生物工程共同组成了生物工程。基因工程是在现代生物学、化学和化学工程学以及其他数理科学的基础上产生和发展起来的。基因工程的出现是 20 世纪生物科学具有划时代意义的重大事件，它使得生物科学获得迅猛发展并带动了生物技术产业的兴起。它的出现标志着人类已经能够按照自己意愿进行各种基因操作，大规模生产基因产物，并自主设计和创建新的基因、新的蛋白质和新的生物物种，这也是当今新技术革命的重要组成部分。

基因工程技术日新月异，介绍该领域的书籍也很多。为了适应当今新技术革命的需要，各高等学校，尤其是生物工程技术类专业和生命科学类专业，纷纷开设了有关基因工程的课程。各种形式的基因工程的教材也纷纷涌现，各有各的特色。本书作者从事基因工程教学多年，在“百花齐放”精神指导下，本人将多年来的教学经验以及在国外留学进修的心得，结合以往编写的有关书籍和讲义，参考国内外资料，以教材的形式编写了本书，希望能够起到抛砖引玉的作用。书中可能存在一些陈旧或者错误的观点，敬请各位读者批评指正。本书还引用了国内其他作者的著作和论文，由于编写过程疏忽，可能有个别出处没有列入书后的附录参考文献，特此致歉（如能来信指出，以后必添加在参考文献中）。

本书得到华侨大学教材出版基金的资助，作者在此深表感谢。

贺淹才

2007 年 10 月于华侨大学

CONTENTS

目 录

第一章 绪论 /1

第一节 基因与基因工程的概念 /1

- 一、基因 /1
- 二、人类基因组计划 /5
- 三、基因工程的概念 /6

第二节 基因工程发展史 /7

第三节 基因工程的巨大意义 /8

第四节 生物技术与基因工程 /10

第五节 中国基因工程的现状与前景 /10

第六节 基因工程的安全性问题 /13

第七节 我国的《基因工程安全管理办法》 /15

第八节 基因工程的基本过程 /16

第九节 基因工程上游和下游 /16

第十节 基因工程的上游工程——基因克隆 /17

第十一节 基因工程的流程 /17

复习思考题 /18

第二章 各种工具酶 /19

第一节 基因工程工具酶的概念 /19

第二节 限制性内切核酸酶 /20

- 一、寄主细胞控制的限制与修饰 /20
- 二、限制性核酸内切酶的种类 /21
- 三、影响限制性内切酶活性的因素 /24
- 四、限制性内切酶命名法 /24
- 五、限制性内切酶的作用特点与应用 /25
- 六、DNA的限制酶分析及物理图谱 /25

第三节 DNA 聚合酶 /27

- 一、大肠杆菌 DNA 聚合酶 I /28
- 二、DNA 聚合酶 I 大片段 /30
- 三、大肠杆菌 DNA 聚合酶 II /31
- 四、大肠杆菌 DNA 聚合酶 III /31
- 五、T4-DNA 聚合酶 /32
- 六、T7 噬菌体 DNA 聚合酶及测序酶 /33
- 七、耐热 DNA 聚合酶 (Taq DNA 聚合酶) /33
- 八、末端转移酶 /35
- 九、反转录酶 /35
- 十、真核生物的 DNA 聚合酶 /37

第四节 DNA 连接酶 /37

- 一、DNA 连接酶的一般性质 /37
- 二、DNA 连接酶的作用机制 /38
- 三、真核生物的 DNA 连接酶 /40

第五节 S1 核酸酶 /40

第六节 Bal 31 核酸酶 /41

第七节 碱性磷酸酶 /41

第八节 T4 多聚核苷酸激酶 /42

复习思考题 /42

第三章 基因载体的选择与构建 /43

第一节 基因载体、报告基因与载体的致死效应 /43

- 一、基因载体的概念 /43
- 二、载体的报告基因 (标记基因) /44
- 三、载体的致死效应 /44

第二节 细菌质粒载体 /45

- 一、质粒的概念 /45
- 二、质粒的复制和遗传 /46
- 三、质粒的种类 /46
- 四、质粒的相容性 /47
- 五、质粒的报告基因 /48
- 六、质粒的改造 /49
- 七、质粒载体的多克隆位点 /50
- 八、质粒 DNA 的提取 /50
- 九、常用的质粒载体 /52
- 十、质粒的用途与发展的质粒克隆载体 /56

第三节 噬菌体载体 /60

一、噬菌体和噬菌体载体	/60
二、 λ 噬菌体的生物学	/60
三、野生型 λ 噬菌体的改造	/64
四、 λ 噬菌体的包装与克隆	/65
五、单链噬菌体载体和噬菌粒	/68
六、黏性质粒载体	/70
第四节 酵母细胞克隆载体与酵母人工染色体	/72
一、酵母附加体型质粒 (YEps)	/73
二、酵母整合型质粒 (YIps)	/74
三、酵母复制型质粒 (YRps) 与酵母着丝粒质粒 (Ycps)	/75
四、酵母人工染色体 (YAC)	/75
五、细菌人工染色体 (BAC) 和噬菌体人工染色体 (PAC)	/77
六、穿梭质粒	/79
第五节 动物病毒载体	/81
一、动物病毒载体的特点	/81
二、杆状病毒载体	/81
三、SV40 载体	/84
四、痘苗病毒载体	/86
五、反转录病毒载体	/86
六、其他动物病毒载体	/88
第六节 植物病毒载体	/88
复习思考题	/89
第四章 目的基因的制取	/91
第一节 目的基因制取的策略	/91
一、外源基因与目的基因	/91
二、目的基因制取的策略	/91
第二节 鸟枪法制取目的基因	/92
一、“鸟枪法”的概念	/92
二、“鸟枪法”制取目的基因的特点	/93
三、“鸟枪法”的主要步骤	/94
四、枯草杆菌鸟枪法基因克隆	/94
第三节 物理化学法分离目的基因	/95
第四节 化学合成基因	/95
一、聚核苷酸化学合成的历史	/96
二、磷酸二酯法合成 DNA	/97
三、固相亚磷酸胺法	/98
四、DNA 合成在基因工程和分子生物学研究中的应用	/100

第五节 反转录合成 DNA /102

复习思考题 /104

第五章 基因与载体的连接 /105

第一节 基因重组克隆与亚克隆 /105

第二节 基因重组对载体的要求与载体类型 /106

一、克隆载体 /106

二、表达载体 /106

第三节 连接前的处理 /107

第四节 黏性末端连接 /108

一、单酶切位点的黏端连接 /108

二、双酶切片段的定向克隆 /111

三、不同限制酶切位点的黏端连接 /112

第五节 平端连接 /114

第六节 人工接头连接 /116

第七节 同聚寡核苷酸末端连接 /118

复习思考题 /120

第六章 重组 DNA 导入受体细胞 /121

第一节 克隆与导入方法 /121

第二节 转化 /122

一、大肠杆菌宿主菌 /122

二、受体细菌的感受态 /123

三、转化反应 /123

四、枯草芽孢杆菌的转化反应 /124

第三节 转染 /125

一、磷酸钙沉淀法 /125

二、体外包装转染法 /126

第四节 共转化 /126

第五节 电转化 /127

第六节 基因枪法(微弹技术) /129

第七节 微注射技术 /130

第八节 脂质体导入法 /131

第九节 转化酵母菌 /132

第十节 植物细胞的基因转移方法 /133

第十一节 哺乳动物细胞基因导入法 /133

第十二节 反转录病毒载体的转染 /135

复习思考题 /136

第七章 聚合酶链式反应 /137

第一节 PCR 技术基本原理 /137

第二节 PCR 反应体系与引物设计 /141

一、PCR 反应体系 /141

二、设计 PCR 引物时的一般原则 /143

第三节 PCR 一般循环参数 /144

第四节 影响 PCR 反应结果的因素 /145

第五节 PCR 技术用于基因克隆 /146

一、目的基因的直接克隆 /146

二、目的基因的 cDNA 的克隆 /146

三、PCR 技术用于基因克隆的其他方式 /147

第六节 发展中的各种 PCR 应用技术 /147

一、反转录 PCR /147

二、反向 PCR /149

三、复合 PCR /150

四、定量 PCR /153

五、不对称 PCR /153

六、嵌套 PCR /154

七、免疫 PCR /154

八、长 PCR /155

九、热启动 PCR /155

十、标记 PCR (彩色 PCR) /155

十一、重组 PCR /156

十二、差向显示 PCR /156

十三、降落 PCR /156

十四、兼并引物 PCR /157

十五、原位 PCR /157

十六、玻片 PCR /158

十七、连接酶链反应 (LCR) /158

十八、MSP 甲基化特异 PCR /160

第七节 各种 PCR 突变检测技术 /160

第八节 关于 PCR 技术应用的小结 /162

复习思考题 /162

第八章 基因文库的构建 /163

第一节 基因文库的概念与文库的类别 /163

一、基因文库的概念 /163

- 二、基因文库的类别 /163
- 三、基因文库的大小 /165
- 第二节 基因文库的构建 /167
 - 一、基因组文库的构建 /167
 - 二、cDNA 文库的构建 /171
- 第三节 利用 PCR 技术构建 cDNA 文库 /176
- 第四节 全长 cDNA 文库的构建 /178
 - 一、cDNA 文库的质量与全长 cDNA /178
 - 二、RACE 构建 cDNA 文库 /179
 - 三、用 oligo-capping 法构建全长 cDNA 文库 /181
 - 四、SMART 技术 /183
- 第五节 差示文库与消减文库 /186
 - 一、mRNA 差别显示 /186
 - 二、差别杂交法与差示文库 /188
 - 三、消减杂交法与消减文库 /190
 - 四、代表性差异显示 (RDA) /192
 - 五、抑制消减杂交 /194
- 第六节 染色体或区域特异性 cDNA 文库 /197
- 第七节 人工染色体文库 /198
 - 一、酵母人工染色体 (YAC) 文库 /198
 - 二、细菌人工染色体 (BAC) 文库 /200
- 复习思考题 /202

第九章 重组体的鉴定与文库筛选 /203

- 第一节 重组体转化子的鉴定与文库筛选 /203
- 第二节 遗传检测筛选法 /204
 - 一、根据载体表型特征的直接选择法 /204
 - 二、根据插入序列表型特征的直接选择法 /205
- 第三节 物理检测法 /205
 - 一、凝胶电泳检测法 /205
 - 二、限制酶切分析法 /208
 - 三、异源双链杂交检测法与 R-环检测法 /208
- 第四节 核酸杂交法 /209
 - 一、以寡核苷酸探针筛选目的基因 /209
 - 二、原位杂交与寡核苷酸探针筛选文库 /212
 - 三、Southern 印迹杂交 /213
 - 四、Northern 印迹杂交 /214
- 第五节 免疫化学检测法 /214

一、各种标记的免疫化学检测法	/215
二、以单克隆抗体探针筛选目的基因	/216
三、表达载体产物免疫化学检测法	/217
第六节 检测蛋白质筛选克隆基因	/217
第七节 体外表达筛选技术(表达检测系统)	/220
第八节 cDNA 文库筛选的方法	/223
第九节 cDNA 文库的标准化	/225
第十节 BAC 文库鉴定和筛选	/229
复习思考题	/230

第十章 目的基因的表达 /231

第一节 原核生物基因表达调控的生物学	/231
一、原核细胞表达的特点	/231
二、原核生物的转录调控	/231
三、原核生物基因的转录后调控	/233
第二节 真核生物基因表达的调控	/234
一、DNA 染色质结构的调控与顺反子的概念	/234
二、转录调控	/234
三、RNA 对基因表达的调控	/235
四、翻译过程的调控	/235
第三节 基因工程中的基因表达	/235
一、制约目的基因表达的因素	/235
二、阅读框架	/236
三、启动子及其保守序列的影响	/236
四、终止子和衰减子的影响	/237
五、翻译过程对表达的影响	/238
第四节 融合基因与融合蛋白的表达	/239
第五节 以大肠杆菌为代表的原核表达体系	/240
一、大肠杆菌表达系统的特点	/240
二、大肠杆菌表达融合蛋白	/240
三、大肠杆菌细胞包涵体	/241
四、提高克隆基因在大肠杆菌中表达效率的途径	/242
第六节 表达型载体	/243
第七节 真核表达体系的特点与外源基因在真核细胞表达	/248
第八节 酵母表达体系	/248
一、酿酒酵母中外源基因的表达	/249
二、甲醇酵母中外源基因的表达	/249
三、出芽酵母中外源基因的表达	/249

四、常用的酵母转化方法 /250

五、酵母表达外源基因的缺陷和改进方法 /250

第九节 昆虫或昆虫细胞表达体系 /251

第十节 哺乳动物细胞表达体系 /254

第十一节 新型的胞浆表达体系 /254

复习思考题 /255

第十一章 转座子在基因工程中的应用 /256

一、DNA 的转座现象与转座子 /256

二、质粒的转座子 /259

三、转座作用的机制 /259

四、转座的遗传学效应 /260

五、控制转座与监测转座子 /261

六、转座子基因标签法 /261

七、标签的策略 /264

八、标签基因的分离和克隆 /265

九、转座子技术的发展与应用前景 /268

复习思考题 /269

第十二章 核苷酸序列测定 /270

一、Sanger 酶法 (双脱氧链终止法) /270

二、Maxam-Gilbert DNA 化学降解法 /273

三、定向测序法 /276

四、鸟枪法测序 /278

五、人工转座子法 /282

六、杂交测序技术 /282

七、PCR 测序 /285

八、自动化测序法 /286

九、几种正在发展的测序方法 /287

十、DNA 序列测定的策略与发展方向 /291

复习思考题 /292

第十三章 基因克隆的策略和技术 /293

第一节 基因克隆方法的种类 /293

第二节 经典文库克隆与特异抗体克隆技术 /294

第三节 定位克隆策略 /295

一、定位克隆的基本原理 /295

二、定位克隆的三个主要步骤 /297

三、定位克隆的主要操作过程 /299

- 四、定位克隆的主要策略 /303
- 五、大片段 DNA 克隆文库的载体 /305
- 六、功能互作研究与定位克隆的应用与发展 /305
- 第四节 表型克隆的策略 /308**
 - 一、基因组错配筛选 (GMS) /308
 - 二、随机引物 PCR /310
 - 三、外显子扩增技术 (exon-PCR) /311
 - 四、表型克隆与定位克隆策略的比较 /311
- 第五节 cDNA 克隆策略 /312**
- 第六节 生物信息基因克隆技术 /313**
- 复习思考题 /317**

第十四章 基因打靶、反义技术与核酶技术 /318

- 第一节 基因打靶技术 /318**
 - 一、基因打靶的主要实验系统 /318
 - 二、基因打靶的主要步骤 /319
 - 三、筛选基因打靶命中的细胞株 /320
 - 四、基因打靶技术的策略与技术 /321
 - 五、大规模随机基因剔除——基因捕获 /324
 - 六、基因敲入法研制转基因小鼠 /325
 - 七、基因打靶技术的特点 /326
 - 八、基因打靶技术的应用 /326
- 第二节 反义技术 /327**
 - 一、反义链与反义寡核苷酸 /327
 - 二、反义技术的原理 /329
 - 三、人工设计反义 RNA 的策略 /329
 - 四、反义技术的特点 /331
 - 五、ASON 的改造与反义药物 /331
- 第三节 核酶技术 /331**
 - 一、核酶的特性与作用 /331
 - 二、核酶的设计 /332
 - 三、核酶的克隆和应用 /333
- 第四节 反义技术与核酶技术的应用 /333**
- 复习思考题 /336**

第十五章 蛋白质工程 /337

- 第一节 蛋白质工程与基因工程 /337**
- 第二节 蛋白质结构分析、功能的设计与改造 /338**
 - 一、蛋白质结构分析 /338
 - 二、蛋白质结构、功能的设计 /338

三、蛋白质结构改造	/338
第三节 蛋白质工程的一般流程	/341
第四节 功能克隆策略——噬菌体展示技术	/341
一、丝状噬菌体展示系统	/342
二、T4 噬菌体展示系统	/343
三、 λ 噬菌体展示系统	/344
四、噬菌体展示基本操作过程	/347
五、抗体表面展示	/351
第五节 细菌表面展示生物技术	/352
一、革兰阴性菌表面展示	/353
二、革兰阳性菌表面展示	/353
第六节 酵母表面展示系统	/354
第七节 其他体外展示技术	/354
第八节 蛋白质工程的新策略——分子定向进化	/355
一、易错 PCR	/355
二、DNA 改组技术	/355
三、交错延伸技术	/357
四、体外随机引发重组	/358
五、杂合酶技术	/359
六、蛋白质分子定向进化技术的发展	/359
第九节 蛋白质工程的应用与发展前景	/360
复习思考题	/361

第十六章 基因工程下游工程的分化 /363

第一节 下游常用的分离、纯化、分析鉴定技术	/363
一、DNA 合成粗产物的提纯	/363
二、蛋白质产品常用的分离提取技术	/364
第二节 原核细胞表达系统与发酵工程	/366
第三节 植物基因工程	/366
第四节 昆虫或动物细胞表达系统	/368
第五节 动物基因工程	/368
第六节 基因工程与产业化	/369
第七节 基因工程药物与疫苗	/371
第八节 基因治疗	/372
复习思考题	/373

索引 /374

参考文献

第一章

Chapter 1 Introduction

绪论

第一节 基因与基因工程的概念

一、基因

基因是 DNA 分子中含有特定遗传信息的一段核苷酸序列，是遗传物质的最小功能单位。对于编码蛋白质的结构基因来说，基因是决定一条多肽链的 DNA 片段。根据其是否具有转录和翻译功能可以把基因分为三类。第一类是编码蛋白质的基因，它具有转录和翻译功能，包括编码酶和结构蛋白的结构基因以及编码阻遏蛋白的调节基因；第二类是只有转录功能而没有翻译功能的基因，包括 tRNA 基因和 rRNA 基因；第三类是不转录的基因，它对基因表达起调节控制作用，包括启动基因和操纵基因。启动基因和操纵基因有时被统称为控制基因。

基因是表现其遗传性状的物质基础。研究基因组的所有基因，就有可能揭开生命的所有奥秘。人的一切外观和行为都是基因的外在表现。不同人种之间长相、头发、肤色、眼睛、鼻子、声音等的不同，便是基因差异所在，即使孪生子，也是如此。法国科学家发现了长寿基因。他们研究了三万名长寿人，发现不少研究对象体内均带有两种基因的特定变体。这两种基因能帮助他们对抗致命的老年疾病，特别是心脏病和老年性痴呆症。带有这两种特定基因的人，无疾而终的机会比普通人高 2 倍。离婚问题也不完全是感情问题，还有基因起作用，英国科学家发现，离婚原因的一大半取决于配偶的性格，而女人的性格比男人更有决定因素。他们发现，父母离婚的孩子结婚后，离婚的危险要比常人高出 10 倍。

利用基因，人们可以改良果蔬品种，提高农作物的品质，更多的转基因植物和动物、食品将问世，人类可能在新世纪里培育出超级作物。通过控制人体的生化特性，人类将能够恢复或修复人体细胞和器官的功能，甚至改变人类的进化过程。

随着分子生物学研究的深入，人们能够在分子水平认识基因的结构与功能，发现了基因结构中存在有“移动基因”、“断裂基因”、“重叠基因”、“假基因”等，提出了有关基因结构与功能的新概念。

移动基因 (movable gene): 又叫跳跃基因 (jumping gene) 或转座子 (transposon)，详见第十一章转座子部分的内容。

断裂基因: 20 世纪 70 年代中期，法国生物化学家 Chamobon 和 Berget 在研究鸡卵清蛋

白基因的表达中发现,细胞内的结构基因并非全部由编码序列组成,而是在编码序列中间插入了无编码作用的碱基序列,这类基因被称为间隔基因或断裂基因(图1.1)。真核生物无操纵子,基因是不连续的,同一基因的编码序列被数量不等的非编码间隔隔成多个较小的片段,编码蛋白的片段叫外显子(exon),非编码蛋白的片段叫内含子(intron)。近年来的研究发现,原核生物的基因一般是连续的,在一个基因的内部没有非遗传密码的序列(即不含内含子),而真核生物的绝大多数基因都是不连续的断裂基因。断裂基因的表达程序是:整个基因先转录成一条长RNA前体,其中的非编码序列被一种剪接酶切除,两端再相互连接成一条连续的密码顺序,以形成成熟的mRNA。DNA分子断裂基因的存在为基因功能的发展赋予了更大的潜力(图1.2)。

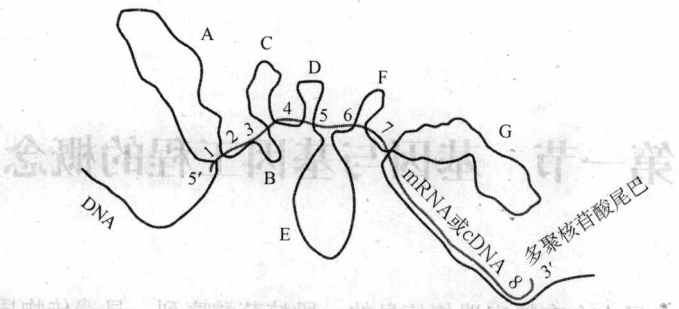


图 1.1

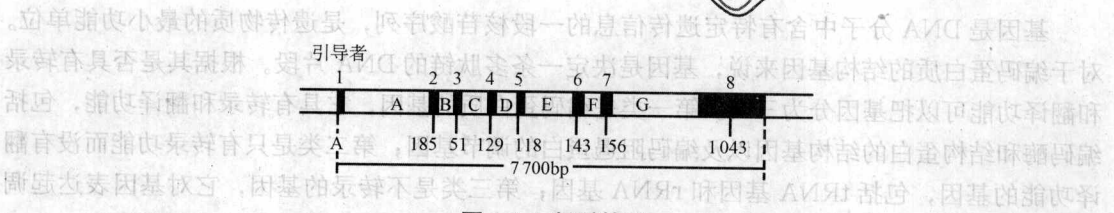


图 1.1 断裂基因

以卵清蛋白 mRNA 制备 cDNA 探针与卵清蛋白 DNA 杂交结果(上),证明该 DNA 是断裂基因,外显子(1~7)与内含子(A~G 突出环)位置的示意图(下)(引自 Russell, 1992)

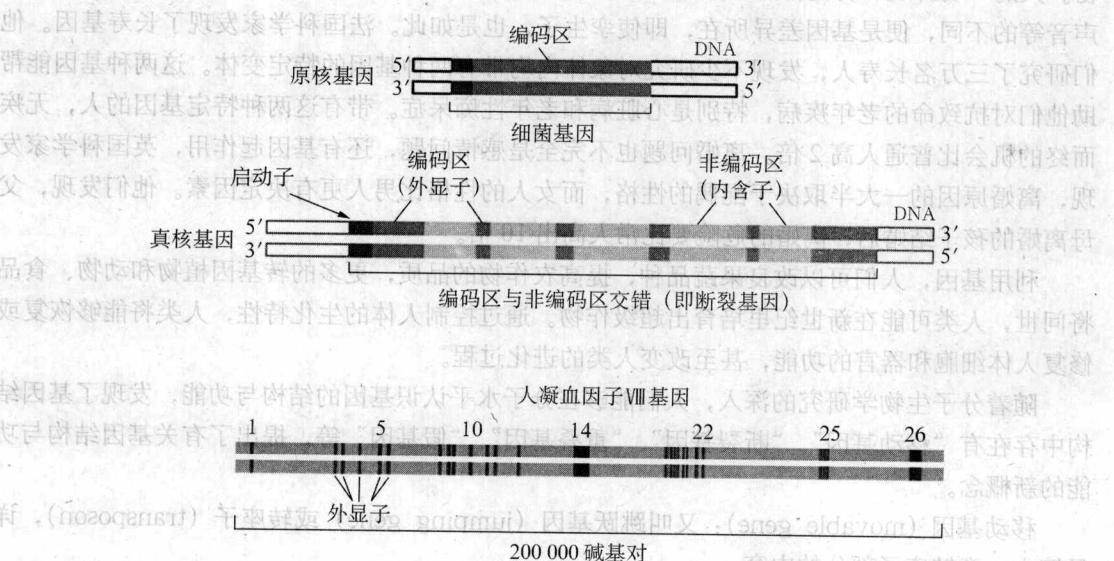


图 1.2 原核基因与真核基因的区别及断裂基因的概念

