



国外优秀生命科学教材译丛

基因克隆和DNA分析

(第5版) 中文版

Gene Cloning and DNA Analysis

An Introduction

● (英) T. A. Brown 著

● 魏 群 等译



高等教育出版社
Higher Education Press



国外优秀生命科学教材译丛

主要内容

基因克隆和DNA分析

(第5版) **中文版**

Gene Cloning and
DNA Analysis
An Introduction

- (英) T.A. Brown 著
- 魏 群 黄 弢 姚斯研 李 欣 译
胡丽娅 毕 波 林伟林



高等教育出版社
Higher Education Press

图字: 01 - 2006 - 4340

译自

T. A. Brown

Gene Cloning and DNA Analysis: An Introduction, 5th ed.

ISBN: 1 - 4051 - 1121 - 6

©2001 by Blackwell Science Ltd

©2006 T. A. Brown

The right of the Author to be identified as the Author of this Work has been asserted in accordance with the Copyright, Designs and Patents Act 1988.

All Rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording or otherwise, except as permitted by the UK copyright, Designs and Patents Act 1988, without the prior permission of the publisher.

This edition is published by arrangement with Blackwell Publishing Ltd, Oxford. Translated by Higher Education Press from the original English language version. Responsibility of the accuracy of the translation rests solely with Higher Education Press and is not the responsibility of Blackwell Publishing Ltd.

图书在版编目(CIP)数据

基因克隆和 DNA 分析: 第 5 版/(英)布朗(Brown, T. A.)

著; 魏群等译. —2 版. —北京: 高等教育出版社, 2007. 12

书名原文: Gene Cloning and DNA Analysis

ISBN 978 - 7 - 04 - 022085 - 8

I. 基… II. ①布…②魏… III. ①无性系 - 遗传工程 - 研究
②脱氧核糖核酸 - 研究 IV. Q785 Q523

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2007)第 172050 号

出版发行 高等教育出版社
社 址 北京市西城区德外大街 4 号
邮政编码 100011
总 机 010 - 58581000

经 销 蓝色畅想图书发行有限公司
印 刷 中青印刷厂

开 本 850 × 1168 1/16
印 张 20.75
字 数 530 000

购书热线 010 - 58581118
免费咨询 800 - 810 - 0598
网 址 <http://www.hep.edu.cn>
<http://www.hep.com.cn>
网上订购 <http://www.landaco.com>
<http://www.landaco.com.cn>
畅想教育 <http://www.widedu.com>

版 次 2003 年 8 月第 1 版
2007 年 12 月第 2 版
印 次 2007 年 12 月第 1 次印刷
定 价 37.00 元

本书如有缺页、倒页、脱页等质量问题, 请到所购图书销售部门联系调换。

版权所有 侵权必究

物料号 22085 - 00



译者序言

当前以分子生物学技术为代表的生物技术日新月异。它已成为研究各生命学科的工具并渗透到生命科学的各个领域,极大地推动了生命科学的发展,深刻地影响到人类的生活和社会。特别是人类基因组、后基因组研究的迅速发展,人类将从分子水平上认识自身,全面揭示生命现象的本质。

我们在给高等学校的学生讲授分子生物学理论和指导分子生物学实验的同时,深感一本对各学科学生讲述分子生物学技术基本原理及应用书籍的重要性。英国曼彻斯特大学分子生物学系 Terry Brown 教授的《基因克隆和 DNA 分析》正好为生命科学的初学者提供了一本这个领域的入门书籍。而本书的第一个版本《基因克隆》在 20 年前就是生物科学领域中一本广为流传的入门读物。3 年前我们翻译的《基因克隆和 DNA 分析》第 4 版深受生命科学各领域,甚至非生命科学领域广大读者的喜爱。第 5 版的内容拓展到公众所关心的生物制药、基因治疗、基因改良作物等方面。

全书分为三个部分。第一部分阐述了基因克隆和 DNA 分析的基本原理。包括基因克隆,基因操作,基因克隆的载体、酶类,DNA 的纯化,将 DNA 引入活细胞,PCR 技术等。第二部分阐述了基因克隆和 DNA 分析在研究中的应用。包括基因定位的研究、基因结构的预测,基因表达和功能的研究,基因组的研究等。第三部分阐述了基因克隆和 DNA 分析在生物技术中的应用,在医学、农业、法医学、考古学等学科中的应用等。全书深入浅出,即使读者在没有太多分子生物学基础知识的情况下,也能够理解这些知识。

本书适合作为大专院校生物学系及农林医药工院校教学参考用书,也可供生命科学有关研究人员、企业人员和中学生物教师及有兴趣了解当代生命科学人士阅读。

魏 群

2006 年 12 月于北京师范大学

第 5 版序言

编写基因克隆第 5 版,使我有机会对全书进行细微但希望是有教益的改变。第 5 版重点对最后 4 章中关于基因克隆和 DNA 分析应用方面进行了更新和拓展。这些应用大都是近些年来最新进展,而且这些章节覆盖了 3 个领域:制药、基因治疗和基因改良作物,而不只是对科学事实的简单陈述。公众对这些内容的理解(虽然有些只是讨论而缺乏理解)已经上升到这样一个阶段,即学生必须像重视理论知识一样重视伦理。在大约 10 年前编写第 3 版时,我就开始尝试阐述更多的问题;在这一新版中,我开始试着阐述公众所关心的这些特殊内容。

本书的最后两章对科学方面的内容进行了两点重要补充。关于农业方面的章节,我已经进行了拓展:在上一版中遗传工程的两个例子(关于 δ -内毒素和成熟延迟植物)中加入了更多的信息,包括草甘膦抗性植物和当今市场上最重要的基因改良作物的相关内容。我还扩展了最后的章节,加入了基因克隆和 PCR 在考古学中的相关应用。希望读者能原谅我对自己研究兴趣方面描述方式的放任,但我们对 DNA 操作的能力已经在很多研究方面产生了革命性的冲击,古遗传学就是一个极好的例子。

再一次感谢 Blackwell Science 的 Nigel Balmforth 对我的帮助,使得第 5 版能够顺利出版。

同样也要感谢我的妻子 Keri 对我的不懈支持,这使得我下决心用尽晚上和周末时间写这本书和其他书籍。

T. A. Brown

于曼彻斯特大学

第4版序言

15年前,当这本书第1版发行的时候,基因克隆还是一门崭新的技术,并立刻成为了几乎所有的DNA研究的基础。而现今,非克隆手段——聚合酶链反应(PCR)——也变得同样重要了,第4版的新标题就反映出了这些改变,但这并不意味着本书所秉承的理念也会随之变化。它仍旧是一本介绍性的入门书籍,而且在阅读本书之前并不需要读者对研究基因和基因组的技术耳熟能详。

与1996年的标题相比,这个新标题含义的广度得到了拓展。新版本加入了两个全新的章节,同时也作了一些结构上的调整。第一个新章节中将介绍测序基因组的方法以及目前人们对其序列的理解。这一章中不仅仅是介绍大批量测序的方法和结果,它还将系统阐述组装毗连序列的策略、从基因组中鉴定基因的方法、研究转录物组学和蛋白质组学的技术等。第二个新章节是全书的最后一章,其中我们将谈及基因克隆和DNA分析在法医学中的应用,这些内容不仅是当前学生中流行的话题,而且还对DNA分析的实际应用做出了很好的诠释。

有关PCR技术的章节,在结构上作了较大的调整,它们将出现在本书的第一部分中,这样,在第二、三部分中我们就能更为从容地阐释PCR技术的研究,以及其在生物技术中的应用。同时,我还对其他一些小段落作了调整,希望这样能够使文章更为流畅易懂。与以往一样,新版本中更新了某些概念和信息,并订正以前版本中的错误。

曾经有一段时间,我怀疑本书的第4版是否有必要出版。在我疑虑重重的时候,是Blackwell Science的Nigel Balmforth让我最终下定决心继续工作,在这里我要感谢他。同时还要感谢我的同事Lubomira Stateva和Keri Brown,他们慷慨地提供了多年的教学资料供我参考,本书第三部分中某些新内容的框架就来源于此。在序言的最后,我似乎总是要提及撰写新版本的工作有多么的辛苦,但是说真心话,我一直是乐在其中的。

T. A. Brown

于曼彻斯特大学

目 录

第一部分 基因克隆和 DNA 分析的基本原理	1
第 1 章 为什么说基因克隆与 DNA 分析非常重要	3
1.1 遗传学的早期发展	3
1.2 基因克隆和聚合酶链反应 (PCR) 的出现	3
1.3 什么是基因克隆	4
1.4 什么是 PCR	5
1.5 为什么基因克隆和 PCR 如此重要	7
1.6 如何使用这本书	10
推荐阅读材料	11
第 2 章 基因克隆的载体——质粒和噬菌体	12
2.1 质粒	12
2.2 噬菌体	16
推荐阅读材料	24
第 3 章 从活细胞中纯化 DNA	25
3.1 全细胞 DNA 的制备	25
3.2 质粒 DNA 的制备	36
3.3 噬菌体 DNA 的制备	41
推荐阅读材料	46
第 4 章 DNA 纯化后的利用	48
4.1 DNA 操作酶的范围	48
4.2 切割 DNA 的酶——限制性内切酶	54
4.3 连接——将 DNA 分子连接到一起	68
推荐阅读材料	75
第 5 章 将 DNA 引入活细胞	76
5.1 转化——使细菌细胞获取 DNA	78
5.2 重组体的鉴定	81

5.3	将噬菌体 DNA 引入细菌细胞	85
5.4	重组噬菌体的鉴别	88
5.5	将 DNA 引入非细菌细胞	90
	推荐阅读材料	92
第 6 章	大肠杆菌的克隆载体	93
6.1	基于大肠杆菌质粒的克隆载体	93
6.2	基于 M13 噬菌体的克隆载体	99
6.3	基于 λ 噬菌体的克隆载体	105
6.4	λ 载体和其他高容量的载体使基因组文库得以建立	112
6.5	其他细菌的克隆载体	113
	推荐阅读材料	113
第 7 章	真核生物的克隆载体	114
7.1	酵母和其他真菌的载体	114
7.2	高等植物的克隆载体	120
7.3	动物的克隆载体	129
	推荐阅读材料	133
第 8 章	怎样获得特定基因的克隆	134
8.1	筛选的难题	134
8.2	直接筛选目的基因	136
8.3	从基因文库中鉴定克隆	138
8.4	鉴定克隆的方法	142
	推荐阅读材料	153
第 9 章	聚合酶链反应(PCR)	154
9.1	PCR 简介	154
9.2	PCR 的更多细节	156
9.3	<i>Taq</i> 聚合酶的错误率问题	164
	推荐阅读材料	166
第二部分	基因克隆和 DNA 分析在研究中的应用	167
第 10 章	基因的位置和结构的研究	169
10.1	如何定位一个基因	169
10.2	DNA 测序——预测基因的结构	175
	推荐阅读材料	184
第 11 章	基因表达和功能的研究	186
11.1	克隆基因转录的研究	186
11.2	基因表达调控的研究	195
11.3	鉴定和研究克隆基因的翻译产物	202
	推荐阅读材料	212

第 12 章 基因组研究	214
12.1 基因组学——怎样进行基因组测序	214
12.2 后基因组学——试着理解基因组的序列	224
12.3 转录物组和蛋白质组的研究	228
推荐阅读材料	231
第三部分 基因克隆和 DNA 分析在生物技术中的应用	233
第 13 章 克隆基因的表达	235
13.1 在大肠杆菌中的外源基因表达载体	237
13.2 在大肠杆菌中表达重组蛋白存在的问题	245
13.3 真核细胞中重组蛋白的表达	247
推荐阅读材料	252
第 14 章 基因克隆和 DNA 分析在医学中的应用	254
14.1 重组药物的生产	254
14.2 人类疾病相关基因的识别和鉴定	263
14.3 基因治疗	267
推荐阅读材料	269
第 15 章 基因克隆和 DNA 分析在农业中的应用	271
15.1 植物基因工程中的基因添加	271
15.2 基因消减	280
15.3 转基因植物的问题	284
推荐阅读材料	287
第 16 章 基因克隆和 DNA 分析在法医学和考古学中的应用	289
16.1 利用 DNA 分析鉴定犯罪嫌疑人	289
16.2 利用 DNA 指纹图谱分析血缘关系	292
16.3 通过 DNA 分析进行性别鉴定	295
16.4 古遗传学——利用 DNA 研究人类进化	297
推荐阅读材料	300
术语表	302
索引	315

第一部分

基因克隆和 DNA 分析的 基本原理

为什么说基因克隆与 DNA 分析非常重要

19 世纪中叶, Gregor Mendel 通过阐明一组法则来解释生物性状的遗传现象。而这些法则都建立在这样一个基本假设下, 即: 生物体的每个可遗传的性状都是由一个被称作“基因”(gene)的、以物质颗粒的形式存在于细胞的某个部位的因子所控制。Mendel 法则在 1900 年被重新发现, 标志着遗传学(genetics)的诞生, 从这以后, 理解并掌握这些控制遗传性状的基因的结构和功能就成为了这门学科前进的方向。

1.1 遗传学的早期发展

在最初的 30 年里, 这门新出现的学科以令人吃惊的速度向前发展着: W. Sutton 首先于 1903 年提出了基因是定位于染色体(chromosome)上的假设, 随后在 1910 年, 这一假设得到了 T. H. Morgan 的实验证实; 接下来, Morgan 和他的同事们开发出了基因作图(gene mapping)技术, 并通过这一技术于 1922 年取得了对果蝇全部 4 条染色体上的 2 000 多个基因相对位置的全面分析。

但除了这些经典遗传学研究的辉煌成果外, 直到 20 世纪 40 年代, 人们仍然没有认识到基因的分本质。事实上, 直到 Avery, MacLeod 和 McCarty 在 1944 年的试验以及 Hershey 和 Chase 在 1952 年的试验出现前, 没有任何人会相信脱氧核糖核酸(DNA)是遗传物质, 因为在这之前, 人们普遍认为基因是由蛋白质构成的。DNA 所扮演的角色的发现给遗传学研究带来了巨大的促进, 这个时期许多著名的生物学家(Delbrück, Chargaff, Crick 以及 Monod 是其中最有力影响的)都为遗传学的第二个发展高峰做出了杰出的贡献。这一时期的成果是惊人的: 在 1952—1966 年这 14 年间, DNA 的结构被精确地表述, 遗传密码被破解、转录和翻译的过程也得到了描述。

1.2 基因克隆和聚合酶链反应(PCR)的出现

经过一段时间的活跃发展之后, 遗传学迎来了一个平静的发展时期, 因此一些分子生物学家(一些新的年轻遗传学家这样称呼自己)对这一时期没有出现非常重要的进展感到无法理解。实际上,

在当时 20 世纪 60 年代的后几年,实验技术的精确性不足以满足对基因的更加细致的研究,这成为了当时遗传学发展的最大“瓶颈”。

然而,在 1971—1973 年间,遗传学研究又重新开始了新一轮的迅猛发展,这一切都要归功于当时实验生物学上的革命性进展。一整套全新的实验技术方法论被提了出来,使得原来不可能进行的实验可以被设计和实施,尽管这些实验也不是轻而易举的,但至少可以获得成功。这些新的方法,有时被称作**重组 DNA 技术**(recombinant DNA technology),有时也被称作**基因工程**(genetic engineering),其核心就是基因克隆,它们的出现标志着另一个遗传学伟大时代的到来。由基因工程发展而来的快速有效的 DNA 测序技术使得个体基因的结构确定成为可能,而这一切发展因为大规模基因组测序计划的出现而达到了顶峰,其中也包括已于 2000 年完成的人类基因组计划。而由基因工程发展出来的研究个体基因调控的方法,也使得分子生物学家们了解到基因调控的失常将有可能导致一系列的人体疾病,比如癌症。由重组 DNA 技术衍生出了**生物工程学**(biotechnology),从而使得利用基因生产蛋白质及其他医药和工业过程所需的化合物变成了现实。

在 20 世纪 80 年代,当人们还沉浸在基因克隆革命所带来的激动之中的时候,谁也不会想到,另一个同样新颖、同样革命性的实验技术已出现在眼前。据说,1985 年某一天晚上,Kary Mullis 在驾车沿着 California 海岸线兜风时,灵机一动,发明了**聚合酶链反应**(polymerase chain reaction,PCR)。这一灵感所带来的结果就是:这项非常简单的技术,作为基因克隆的完美补充,在分子生物学的发展上发挥了关键的作用。PCR 相对于许多传统的基因克隆方法,把可能实现但相当困难的实验变得相对简单。它拓展了 DNA 分析的研究范围,使得分子生物学在其传统的应用领域如医学、农业、生物工程学之外找到了新的位置,就像分子生态学、生物分子考古学以及 DNA 法医学应用一样,很多新兴学科都随着 PCR 的诞生而出现,并且分子生物学家们正在设计一些新的利用 DNA 的方法,来解释人类进化以及外界环境变化对生物圈的冲击等问题。在基因克隆革命后的 30 年间,就像一直踩着溜冰鞋高速向前滑行一样,令人激动的事情始终都在眼前不断发生。

1.3 什么是基因克隆

基因克隆实验的基本步骤如下(图 1.1):

- (1) 一段包含有需要克隆的目的基因的 DNA 片段,被插入到一个被称作**载体**(vector)的环状 DNA 分子中,即产生**重组 DNA 分子**(recombinant DNA molecule)。
- (2) 载体将目的基因转运到一个宿主细胞中,通常是一个细菌,但也能够使用其他种类的活细胞。
- (3) 载体在宿主细胞内增殖,产生大量同一的拷贝,不仅包括载体本身的基因,也包括它所携带的外源基因。
- (4) 宿主细胞繁殖时,重组 DNA 分子的拷贝转移到子细胞中,随着载体进行进一步复制。
- (5) 在多次细胞分裂后,一个由相同细胞组成的细胞群体,或称作一个**克隆**,被生产出来,每一个细胞都包含一个或多个重组 DNA 分子的拷贝,此时我们说重组分子所携带的目的基因就被克隆了。

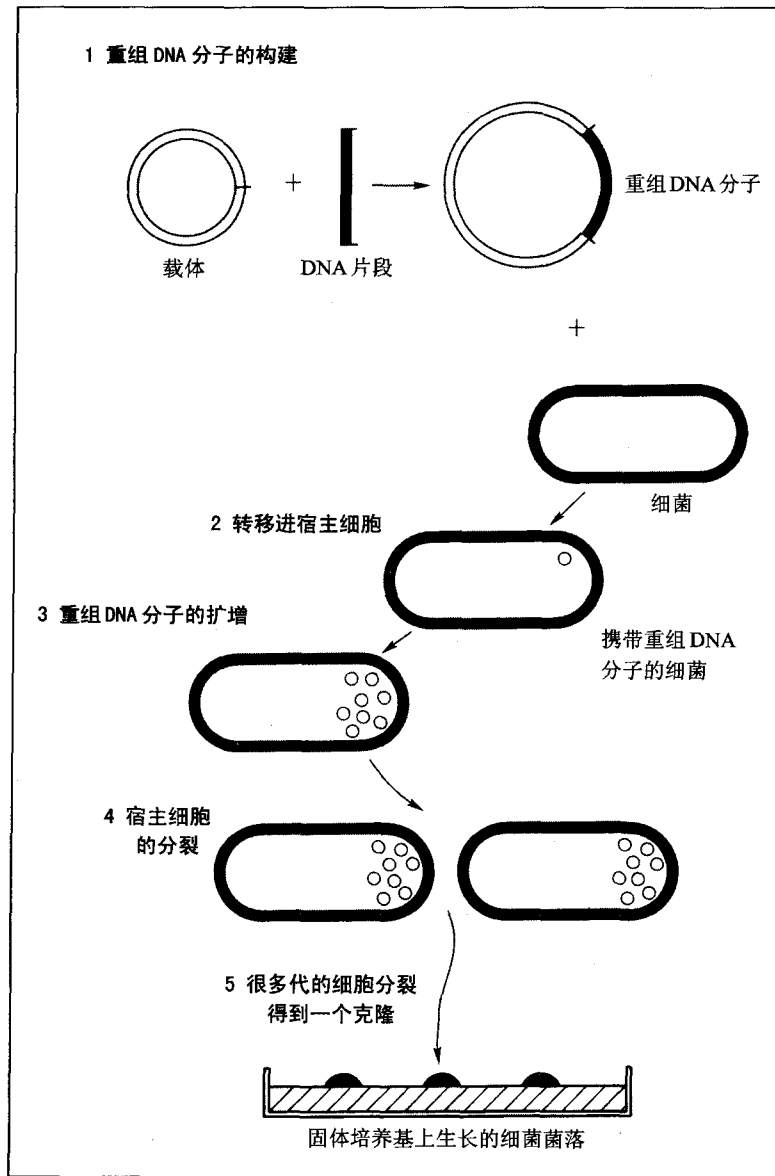
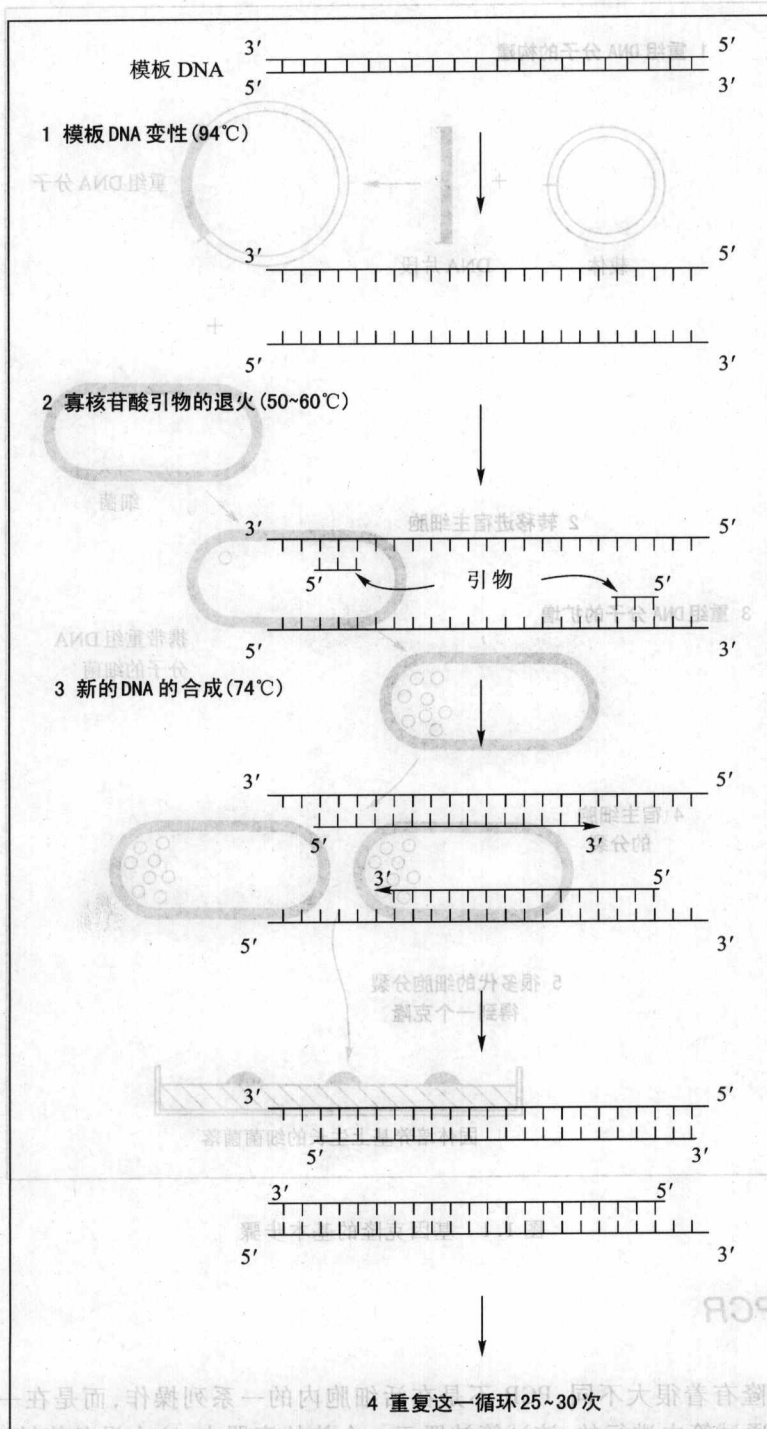


图 1.1 基因克隆的基本步骤

1.4 什么是PCR

PCR 与基因克隆有着很大不同,PCR 不是在活细胞内的一系列操作,而是在一个仅仅混有 DNA 和一组反应物的普通试管中进行的:该试管被置于一个热的容器中,这个设备能够以一种预先设定好的方式使反应混合物在一系列变化的温度中进行反应。PCR 实验的基本步骤如下(图 1.2):

(1) 混合物被加热到 94°C ,在该温度下,原本使 DNA 双螺旋的两条链结合在一起的氢键被打破,导致 DNA 分子变性(denature)。



1.4 什么是 PCR

PCR 是一种在体外模拟 DNA 复制的过程。它通过反复加热和冷却，使 DNA 模板变性、引物退火、新 DNA 合成，从而实现 DNA 的指数扩增。图 1.2 聚合酶链反应的基本步骤 (图 1.2) 展示了这一过程的四个主要步骤：(1) 模板 DNA 变性 (denaturation)：将模板 DNA 加热至 94°C，使其双链解离成单链；(2) 寡核苷酸引物的退火 (annealing)：将反应体系冷却至 50~60°C，使特异性引物与模板 DNA 单链结合；(3) 新的 DNA 的合成 (extension)：将反应体系加热至 74°C，DNA 聚合酶在引物的 3' 端延伸，合成新的 DNA 链；(4) 重复这一循环 25~30 次：通过反复进行上述三个步骤，实现目标 DNA 序列的指数级扩增。

(2) 混合物被冷却到 50 ~ 60℃, 每个分子的两条双链能够在该温度下重新结合, 但这种情况不大可能发生, 因为混合物中含有大量的短 DNA 分子, 称作寡核苷酸 (oligonucleotide) 或引物 (primer), 它们与长链 DNA 分子在特殊位点发生退火 (anneal)。

(3) 接着温度又被升高到了 74℃。这是混合物中所加 *Taq* DNA 聚合酶 (*Taq* DNA polymerase) 的最适工作温度。本书 4.1.3 将介绍更多有关 DNA 聚合酶 (DNA polymerase) 的知识。这里所要知道的就是: *Taq* DNA 聚合酶能够连接到每条引物的某一端并合成与模板 (template) DNA 互补的新链。这样与刚开始的两条链相比, 我们就有了 4 条 DNA 链, 实现了一次倍增。

(4) 接下来温度又被升到了 94℃。每一个双链 DNA 分子, 都同时含有一条原来的链, 而另一条链是新合成的。这些双链 DNA 分子变性成为单链, 又开始了第二轮变性—退火—合成的循环, 并随之产生 8 条 DNA 链。在重复这一循环达 25 次后, 我们在反应开始时用到的双链 DNA 分子将变成超过 5 000 万的新的双链分子, 其中每一个双链都是初始分子某个区段的拷贝, 具体是哪个区段是由退火时引物所处的位点决定的。

1.5 为什么基因克隆和 PCR 如此重要

从图 1.1 和图 1.2 可以看出, 无论是基因克隆还是 PCR 的实验步骤都相当地简单和容易掌握, 可为什么这样简单的实验技术却在生物学研究中占有如此重要的地位呢? 答案主要是因为这两项实验技术都提供了一种纯净的基因样品, 这种基因样品来源于个体细胞并且能够和细胞中的其他基因相区别。

1.5.1 通过克隆对基因进行分离

要想确切了解基因克隆是怎样提供出纯净的基因样品的, 需要再次提到图 1.1 的实验并且稍做改动 (图 1.3)。在这个例子中所要克隆的 DNA 片段来源于一个由不同片段组成的混合物, 每个片段都带有不同的基因或同一基因的不同部分。这个混合物甚至也可以是一个机体 (比如人) 的全部遗传互补序列。每个片段都会被连接到不同的载体分子, 产生一个重组 DNA 分子家族, 其中的一个重组分子携带有我们所感兴趣的目基因。通常情况下, 每个宿主细胞只能够被一个重组 DNA 分子所转化, 因此尽管最后所得到的克隆产物可能包含有许多不同的重组 DNA 分子, 但所形成的每一个克隆所包含的是单一分子的多个拷贝, 这样一来, 基因就从最初的混合物中与其他基因实现了分离, 也就能够对它的特殊性质进行更加详细的分析。

实际上, 决定基因克隆实验是否成功的关键, 在于能否从最初得到的许多不同基因中鉴别出感兴趣的特定基因。比如说, 当拿到一个包含有超过 4 000 个不同基因的大肠杆菌基因组 (genome) 的时候, 我们也许就会对如何从这么多可能的克隆中找到一个基因感到困扰 (图 1.4)。而当我们想到细菌只是相对简单的生物, 人类的基因组所包含的基因数量更是 10 倍之多时, 问题似乎就变得更加严峻了。然而, 就像在第 8 章我们将要解释的那样, 通过种种不同的措施, 能够帮助我们确保在克隆实验结束的时候获得正确的基因克隆。这些措施中包含了对基础克隆步骤的改进, 使得只有包含所需要的重组 DNA 分子的细胞才能够分裂并且所需的克隆能够自动被筛选 (selected)。还有其他一些方法可以从一大堆不同基因克隆混合物中鉴定出目的克隆。

一旦一个基因被克隆出来, 我们就可以几乎不受限制地得到关于这个基因结构和功能方面的相

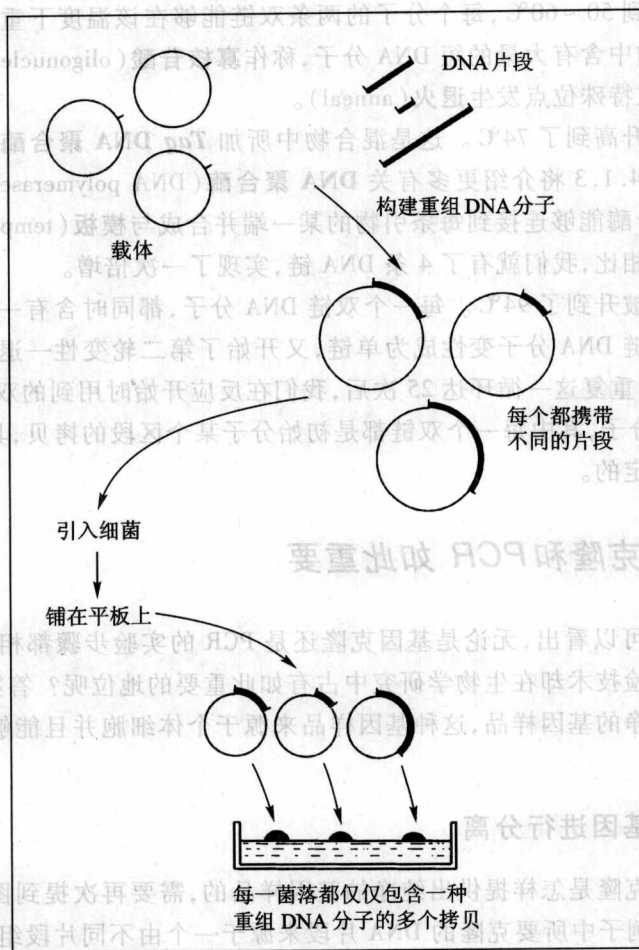


图 1.3 克隆使个体基因片段被纯化

关信息。克隆产品在运用中使用到的一系列新的实验技术也刺激了基因研究分析方法学的进步。关于研究克隆基因产物的结构和功能的方法将在第 10 和 11 章分别进行介绍。

1.5.2 通过 PCR 对基因进行分离

PCR 也能够被用来获得纯净的基因样品。这是因为,在 PCR 过程中被复制的初始 DNA 片段是一个两端由两条寡核苷酸链引物退火位点所标记的片段。如果引物在目的基因的两端都发生了退火,那么目的基因的大量拷贝就会被合成出来(图 1.5),结果就会产生与基因克隆相同的效果。而同时在对目的基因进行选择时所遇到的问题也并没有增加,因为在引物退火过程中进行位置选择时,就已经实现了目的基因的筛选。

一次 PCR 可以在数小时内完成,相对于即使用不了一个月也要花好几周才能完成的基因克隆要方便得多,但是,为什么基因克隆仍然在被人们使用呢?这里就不得不提到 PCR 的两个局限性:

(1) 为了使引物能够在正确的位置与模板 DNA 实现退火,我们必须清楚目的基因两端将要发生退火的位点的序列。在已知序列的情况下,合成引物是件很容易的事(参见 8.4.3),但是如果对要进