

# 现代分子生物学实验技术

卢圣栋 主编

高等教育出版社

# 现代分子生物学实验技术

卢圣栋 主 编

李尹雄 胡晓年 刘德培 于 文

于英杰 杜 恺 敖朝晖 刘强远

吴晓林 余 跃 李德春

高等教育出版社

(京)112号

## 内 容 提 要

本书是目前国内较为全面、系统的分子生物学实验技术教材,并配有录像片。作者均为参与国家“八六三”研究课题的中青年科研教学人员。全书包括绪论、分子生物学实验室常规仪器设备、分子生物学实验室常用技术、核酸的分离与纯化、核酸分子探针的标记、核酸分子杂交、基因克隆、基因组文库、cDNA库、DNA序列测定、外源基因在原核细胞中的表达、外源基因在真核细胞中的表达、多聚酶链式反应(PCR)技术、DNA的化学合成、真核基因表达调控、转基因动物、人类基因治疗等17章。可作为理、工、农、医、药、林、牧等专业研究生用书,也可供从事分子生物学专业的科研人员参考。

责任编辑:谭丽霞

特邀编辑:高正光、汤国星

现代分子生物学实验技术

卢圣栋主编

高等教育出版社出版发行

北京昌平星城印刷厂印装

\*

开本787×1092 印张42.25 字数1050000

1993年7月第1版 1993年7月第1次印刷

印数0001—2200

书号ISBN 7-04-004571-0/Q.215 定价35.00元

# 前 言

分子生物学研究，对于认识生命本质和国计民生都具有重大意义。本院校一批青年科学家为推动分子生物学在我国的发展，在老一辈科学家的扶持下，编写了本书并以电教的方式拍摄了教学片。

参加本书写作的青年科学家，主要由近年毕业的分子生物学博士组成，部分是分子生物学硕士，一位是分子生物学副研究员。他们是李尹雄（第二、三、四、七章）、胡晓年（第五、六、十五章）、刘德培（第十六、十七章）、于文（第八章）、杜恺（第十章）、于英杰（第十一章）、敖朝晖（第十三、十四章）、刘强远（第十二章）、吴晓林（第九章）、余跃（第二章，与李尹雄合作）、李德春（第六章，与胡晓年合作）。

这些青年科学家选择了现代分子生物学研究中最重要和最常用的技术方法做了比较详细的介绍。本书的写作和教学片的摄制的指导思想是：既介绍取得实验成功的关键，也分析可能导致实验失败的因素。在国内外现行的为同一个实验目的而设计的不同技术方法中，选择被认为最佳的一种方法作为重点加以介绍。这些，对于初学者是可贵的。上述种种也是本书的特点。本书及教学片所提供的实验技术已初步经受了实践的考验。1992年盛夏，这些青年科学家举办了一期大约有200人参加的全国性讲习班。讲习班上所有分组所进行的14种研究方法的技术练习均取得了成功。我们希望，本书的出版对于同行科学家和初学者小有裨益。

青年科学家朝气蓬勃、精力旺盛；思想活跃、心灵手巧，是一支攻克科学堡垒的劲旅。只要引导得当，在我国科学技术发展的道路上，他们是有可能成就大事业的。为他们提供崭露头角、大显身手的机会，是时代的需要和要求。

本院校基础医学研究所分子生物学研究室梁植权、强伯勤、方福德、王琳芳、缪时英、沈翔珩、琦祖和、邱长春、袁建刚等中老年专家审改了本书的有关章节；石淑贞、秦瑶、杨钧、刘巨洪等同志绘制了本书的插图；吕向东、穆修前、侯忠诚、王明生等同志校对了本书；王安、关淑启、张立新、王茹、曲虹等同志承担了书稿的打字与复印工作；王家腾、江沪沪、王影、岳颖、栾童林、李景和等同志承担了编务工作；高等教育出版社生物学编辑室的编辑们，在本书形成与出版过程中给予了热情的指教、帮助与支持，在此一并表示深切的谢意。

本书的缺点与错误在所难免，欢迎指正。

卢 圣 栋

1993年6月于

中国医学科学院

中国协和医科大学，北京

# 目 录

1. 绪论.....	1	2.4 分析仪器室的设置.....	38
1.1 分子生物学与基因工程一瞥.....	1	2.4.1 电泳装置.....	38
1.1.1 Watson和Crick的DNA模板学说.....	1	2.4.2 层析装置.....	40
1.1.2 Monod和Jacob的操纵子学说.....	4	2.4.3 光密度仪.....	42
1.1.3 基因工程的工具酶和载体.....	6	2.4.4 真空印迹系统.....	42
1.1.4 基因工程的基本程序.....	7	2.4.6 DNA合成仪.....	42
1.2 基因工程与分子生物学进展一览.....	8	2.4.7 DNA测定仪.....	43
1.2.1 基因工程的研究成就.....	9	2.4.8 PCR仪.....	44
1.2.2 分子生物学的研究成就.....	20	2.5 核素实验室.....	44
1.3 基因工程与分子生物学的发展趋势及展望.....	25	2.5.1 放射性核素操作实验室.....	45
1.3.1 蛋白质工程, 改造基因、改造蛋白质、改造生命.....	25	2.5.2 放射性核素测定室.....	45
1.3.2 分子生物电子学的兴起, 以及不同学科的相互渗透.....	26	2.6 细胞培养室.....	46
1.3.3 走向海洋, 走向宇宙空间.....	27	2.6.1 无菌操作设施.....	46
1.3.4 大规模深入研究的重大战略部署的出现.....	29	2.6.2 温育和贮存区.....	47
1.4 不结束语.....	30	2.6.3 观察和研究室.....	47
2. 分子生物学实验室常规仪器设备.....	33	2.6.4 清洗和消毒.....	48
2.1 实验室的基本要求.....	33	2.7 暗室.....	48
2.2 实验室的常规仪器及设备.....	34	2.8 冷室.....	49
2.2.1 温度控制系统.....	34	3. 分子生物学实验室常用技术.....	50
2.2.2 水的净化装置.....	35	3.1 核酸的纯化.....	50
2.2.3 消毒设备.....	35	3.1.1 酚/氯仿抽提核酸溶液的制备.....	50
2.2.4 计量系统.....	35	3.1.2 酚的重蒸馏与水饱和.....	51
2.2.5 其它设备.....	36	3.2 核酸的浓缩.....	52
2.3 离心机室的装备.....	37	3.2.1 固体聚乙二醇吸水浓缩法.....	52
		3.2.2 丁醇抽提浓缩法.....	53
		3.3 核酸的沉淀.....	53
		3.3.1 核酸沉淀的盐类及浓度.....	53
		3.3.2 核酸沉淀的温度与时间.....	54
		3.3.3 离心力与时间.....	55
		3.3.4 有机沉淀剂.....	55
		3.3.5 核酸沉淀的操作方法.....	56
		3.4 核酸的定量.....	58
		3.4.1 分光光度法测定核酸的浓度.....	59
		3.4.2 荧光分光光度法测定核酸浓度.....	59

3.5	核酸的贮存 .....	60	4.	核酸的分离与纯化 .....	95
3.6	限制性内切酶及其应用 .....	61	4.1	核酸分离提取的原则 .....	95
3.6.1	限制性内切酶的功能、分类及命名 .....	61	4.2	真核细胞染色体DNA的制备 .....	96
3.6.2	限制性内切酶的数量单位及质量控制 .....	62	4.3	质粒和噬菌体DNA的提取与纯化 .....	105
3.6.3	限制性内切酶酶解体系的建立 .....	63	4.3.1	质粒DNA的提取与纯化 .....	105
3.6.4	限制性内切酶酶解中常见的问题和解决措施 .....	65	4.3.2	质粒DNA的小量制备 .....	107
3.6.5	限制性内切酶的星号活力 .....	67	4.3.3	质粒DNA的大量制备 .....	111
3.6.6	限制性内切酶的底物位点优势效应 .....	68	4.3.4	质粒DNA的纯化 .....	113
3.6.7	琼脂糖包埋完整染色体DNA的内切酶酶解 .....	69	4.3.5	噬菌体DNA的提取与纯化 .....	118
3.6.8	限制性内切酶对单链DNA的切割 .....	70	4.4	DNA片段的分离及纯化 .....	124
3.6.9	限制性内切酶位点上的甲基化 .....	70	4.4.1	从琼脂糖凝胶中回收DNA片段的原则 .....	124
3.7	电泳 .....	71	4.4.2	DEAE纤维素纸插片电泳法 .....	124
3.7.1	原理 .....	71	4.4.3	电泳洗脱法 .....	126
3.7.2	影响电泳动率的四大因素 .....	72	4.4.4	低熔点琼脂糖凝胶挖块回收法 .....	131
3.7.3	核酸电泳的指示剂与染色剂 .....	74	4.4.5	玻璃粉末洗脱DNA .....	131
3.7.4	电泳装置 .....	77	4.4.6	琼脂糖凝胶中回收DNA片断的纯化 .....	132
3.7.5	聚丙烯酰胺凝胶电泳 .....	77	4.4.7	聚丙烯酰胺凝胶中回收DNA片段 .....	133
3.7.6	琼脂糖凝胶电泳 .....	80	4.4.8	蔗糖梯度超速离心分离DNA片段 .....	134
3.7.7	脉冲场凝胶电泳 .....	84	4.5	RNA的分离与纯化(真核细胞RNA的制备) .....	135
3.7.8	双相电泳 .....	86	4.5.1	创造一个无RNase的环境 .....	136
3.8	超速离心分离技术 .....	87	4.5.2	RNA提取的方法 .....	139
3.8.1	离心分离物质的原理 .....	87	4.5.3	mRNA的分离与纯化 .....	149
3.8.2	超速离心的分类 .....	88	5.	核酸分子探针的标记 .....	155
3.8.3	超速离心在核酸分离中的应用 .....	89	5.1	概述 .....	155
3.9	柱层析 .....	90	5.1.1	探针的种类及其选择 .....	155
3.9.1	排阻层析 .....	91	5.1.2	各种标记物及其选择 .....	159
3.9.2	亲和层析 .....	92	5.1.3	放射性核素的探测 .....	162
3.9.3	羟基磷灰石柱层析 .....	93	5.1.4	放射性核素的卫生防护 .....	162
3.9.4	离子交换层析 .....	93	5.1.5	各种标记方法及其选择 .....	163
3.9.5	反相层析 .....	93			

5.2	探针的放射性核素标记法	163	7.2.1	通过建立基因库分离靶基因	240
5.2.1	切口平移法	163	7.2.2	通过载体在适当宿主中扩增	240
5.2.2	随机引物法	167	7.3	目的基因的来源与产生	241
5.2.3	单链 DNA 探针的标记	170	7.4	克隆的载体	242
5.2.4	cDNA 探针的标记	172	7.4.1	质粒载体	242
5.2.5	RNA 探针的制备与标记	175	7.4.2	$\lambda$ 噬菌体载体	248
5.2.6	DNA 探针的末端标记	178	7.4.3	粘粒	252
5.2.7	寡核苷酸探针的标记	187	7.4.4	丝状噬菌体载体	256
5.2.8	碘放射性核素标记法	188	7.4.5	真核细胞的克隆载体	258
5.3	非放射性标记法	189	7.5	DNA 分子的体外连接	264
5.3.1	酶促标记法	189	7.5.1	DNA 连接酶及连接机制	264
5.3.2	化学标记法	189	7.5.2	DNA 浓度对连接产物构型的影响	267
5.4	探针的纯化	194	7.5.3	DNA 分子连接的策略与方案	270
5.4.1	凝胶过滤柱层析法	194	7.5.4	一种快速 DNA 连接技术	286
5.4.2	反相柱层析法	195	7.6	重组子导入受体细胞	287
5.4.3	乙醇沉淀法	196	7.6.1	概述	287
5.5	探针比放射活性的测定	196	7.6.2	转化方法	288
5.5.1	三氯乙酸沉淀法	196	7.7	重组子的筛选与鉴定	292
5.5.2	DE-81 滤膜吸附法	197	7.7.1	针对遗传表型改变筛选方法	293
7.7.2	分析重组子结构特征的筛选法	291	7.8	亚克隆技术	298
6.	核酸分子杂交	198	8.	基因组文库	303
6.1	膜上印迹杂交	198	8.1	构建基因组文库的载体	303
6.1.1	印迹技术	198	8.2	$\lambda$ 噬菌体载体	304
6.1.2	固-液相杂交技术	211	8.2.1	应用 $\lambda$ 噬菌体构建基因文库的基本步骤	304
6.1.3	杂交信号的检测	218	8.2.2	几种 $\lambda$ 噬菌体载体	305
6.1.4	滤膜的重复使用	222	8.3	载体 DNA 的制备	310
6.2	液相杂交技术	222	8.3.1	载体 DNA 的酶解	310
6.2.1	核酸酶 S1 保护分析法	222	8.3.2	酶切后载体的再连接及包装后的滴度检测	312
6.2.2	RNA 酶保护分析法	224	8.3.3	载体臂的纯化	312
6.3	核酸原位杂交及其应用	225	8.3.4	载体的脱磷处理	314
6.3.1	核酸原位杂交的基本原理	225	8.3.5	Lam $\delta$ GEM1/Lam $\delta$	
6.3.2	核酸原位杂交的基本操作方法	229			
6.4	新技术简介	236			
6.4.1	亲和捕捉法	236			
6.4.2	夹心杂交法	237			
6.4.3	链取代法	238			
7.	基因克隆	239			
7.1	基因工程诞生的历史背景	239			
7.2	基因克隆的策略与技术路线	240			

GEM12 BamHI, XhoI 酶切后载体臂的部分填充 .....	314	10.2 末端终止法测定DNA核苷 酸序列.....	343
8.4 真核细胞DNA的制备.....	315	10.2.1 末端终止法测定DNA 序列所需的关键试剂.....	343
8.4.1 几种染色体DNA的提取 法方.....	315	10.2.2 末端终止法测定DNA 序列方法的选择.....	344
8.4.2 限制性内切酶部分酶解高 分子量真核DNA.....	318	10.2.3 大片段待测DNA片段 的定向连续次级克隆.....	344
8.5 连接和包装.....	320	10.2.4 用噬菌体M13克隆待测 DNA片段.....	349
8.5.1 连接浓度.....	320	10.2.5 双脱氧末端终止法.....	352
8.5.2 连接条件的确定.....	322	10.2.6 变性聚丙烯酰胺凝胶制 备.....	355
8.5.3 包装抽提物的制备和体外 包装.....	323	10.2.7 测序产物的凝胶电泳.....	356
8.6 基因组文库的保存和扩增 .....	327	10.2.8 Taq DNA聚合酶催化 的测序反应及凝胶的银 染色法.....	357
8.7 粘性质粒为载体的基因文库 .....	328	10.3 Maxam-Gilbert 化学法测 定DNA序列.....	360
9. cDNA文库.....	330	10.3.1 待测DNA的纯化.....	360
9.1 概述.....	330	10.3.2 碱基的特异性修饰及裂 解.....	361
9.1.1 mRNA的分离.....	330	10.3.3 测序图谱的识读.....	364
9.1.2 cDNA第一链的合成.....	331	11. 外源基因在原核细胞中的表达 .....	365
9.1.3 cDNA第二链的合成.....	331	11.1 原核生物基因表达的特点.....	365
9.1.4 cDNA与载体连接.....	332	11.2 外源基因在原核细胞中表 达的重要调控元件.....	366
9.1.5 噬菌体的包装、转染及质 粒DNA的转化.....	334	11.2.1 启动子.....	366
9.2 cDNA库的构建.....	335	11.2.2 SD顺序.....	369
9.2.1 mRNA分离.....	335	11.2.3 终止子.....	370
9.2.2 第一链的合成.....	335	11.3 几种类型的原核表达载体 .....	371
9.2.3 第二链的合成.....	336	11.3.1 非融合型表达蛋白载体 pKK223-3.....	371
9.2.4 cDNA的甲基化.....	336	11.3.2 分泌型克隆表达载体 • PIN III系统.....	372
9.2.5 cDNA与连接子的连接 .....	337	11.3.3 融合蛋白表达载体pG- EX系统.....	373
9.2.6 cDNA的分分离.....	337	11.4 用于原核细胞表达的外源基 因.....	374
9.2.7 cDNA的克隆.....	338	11.5 提高外源基因表达的措施.....	374
9.2.8 计算克隆的效率.....	338		
9.2.9 cDNA库的扩增.....	339		
10. DNA序列测定.....	340		
10.1 概述.....	340		
10.1.1 末端终止法.....	340		
10.1.2 化学裂解法.....	341		



11.5.1	提高翻译水平.....	374			
11.5.2	减轻细胞的代谢负荷, 提高外源基因的表达水 平.....	375			
11.5.3	提高表达蛋白的稳定 性,防止其降解.....	376			
11.6	关于包含体.....	377			
11.7	有关的实验.....	378			
11.7.1	外源基因的诱导表达...	379			
11.7.2	细菌的裂解.....	379			
11.7.3	包含体的分离.....	380			
11.8	蛋白质的SDS-聚丙烯酰胺 凝胶电泳.....	381			
11.9	表达产物的免疫学及生物活 性检测.....	387			
<b>12.</b>	<b>外源基因在真核细胞中的表达</b> .....	<b>389</b>			
12.1	哺乳动物基因转移的遗传 选择标记.....	389			
12.1.1	胸苷激酶基因(tk)选 择系统.....	389			
12.1.2	二氢叶酸还原酶基因 (dhfr)选择系统.....	390			
12.1.3	新霉素抗性选择系统...	390			
12.1.4	氯霉素乙酰转移酶基因 检测系统.....	390			
12.2	外源基因导入哺乳动物细胞 的载体.....	390			
12.2.1	SV40载体.....	391			
12.2.2	其它病毒载体.....	392			
12.3	外源DNA导入哺乳动物细 胞的方法.....	393			
12.3.1	磷酸钙转染技术.....	394			
12.3.2	电穿孔转染技术.....	396			
12.3.3	基因显微注射技术.....	397			
12.3.4	脂质体载体法.....	397			
12.3.5	DEAE-葡聚糖转染技 术.....	398			
12.4	基因表达产物的检测.....	399			
12.4.1	免疫荧光抗体法检测表 达蛋白.....	399			
12.4.2	免疫沉淀法检测表达蛋 白.....	400			
12.4.3	Western印迹检测表达 蛋白质.....	403			
<b>13.</b>	<b>多聚酶链式反应(PCR)技术</b> .....	<b>408</b>			
13.1	PCR技术的原理.....	408			
13.2	PCR反应的成分和作用...	409			
13.2.1	PCR反应的缓冲液...	409			
13.2.2	底物浓度.....	410			
13.2.3	PCR反应的酶及其浓 度.....	410			
13.2.4	引物.....	411			
13.2.5	PCR反应条件的选择...	411			
13.2.6	PCR反应的产物积累规 律.....	412			
13.3	PCR反应的自动化.....	412			
13.4	PCR反应引物设计.....	412			
13.5	耐热DNA多聚酶.....	413			
13.6	PCR反应模板的准备.....	415			
13.7	几种特殊的PCR.....	417			
13.7.1	锚定PCR.....	417			
13.7.2	不对称PCR.....	417			
13.7.3	反向PCR.....	418			
13.7.4	多重PCR.....	418			
13.7.5	着色互补PCR.....	419			
13.8	PCR技术的应用.....	419			
13.8.1	遗传性疾病的基因诊 断.....	419			
13.8.2	PCR反应在检测艾滋病 中的应用.....	423			
13.8.3	检测癌基因.....	425			
13.8.4	PCR在法医学上的应 用.....	427			
13.8.5	PCR技术在分子生物学 中的其它应用.....	429			
<b>14.</b>	<b>DNA的化学合成</b> .....	<b>435</b>			
14.1	DNA化学合成原理.....	437			
14.2	DNA的合成纯化及鉴定...	438			
14.2.1	DNA合成仪的操作...	438			
14.2.2	DNA的切落及去保护 .....	440			

14.2.3	寡核苷酸片段的纯化	440	cDNA克隆的筛选	513
14.2.4	寡核苷酸片段的鉴定	440	16. 转基因动物	518
14.2.4	合成产物中DNA含量的测定	440	16.1 转基因方法	518
14.3	DNA化学合成的应用	441	16.2 微注射DNA的制备与纯化	520
14.3.1	DNA合成在基因工程和分子生物学研究中的应用	444	16.2.1 DNA影响基因转移的因素	520
14.3.2	DNA合成在基因表达和调控方面的应用	443	16.2.2 显微注射DNA样品的制备	520
14.3.3	合成基因在医学中的应用	443	16.3 鼠的种类与饲养	521
15. 真核基因表达调控	445	16.3.1 鼠的种类	521	
15.1 真核基因表达调控基本理论	445	16.3.2 鼠的安置与饲养	522	
15.1.1 真核基因结构功能特点	445	16.4 超排卵与取卵	523	
15.1.2 真核基因表达调控的策略	446	16.4.1 超排卵	523	
15.1.3 转录前的表达调控	446	16.4.2 取卵	523	
15.1.4 转录水平的调控	450	16.5 显微注射	525	
15.1.5 转录后水平的调控	462	16.5.1 制备持卵管与注射针	525	
15.1.6 翻译水平的调控	464	16.5.2 显微注射操作	527	
15.1.7 翻译后水平的调控	465	16.6 卵的转移	529	
15.2 基因表达调控研究方法	465	16.6.1 输卵管转移	529	
15.2.1 DNase I超敏感性分析	465	16.6.2 子宫转移	531	
15.2.2 DNA甲基化分析	466	16.7 转基因鼠系的建立	532	
15.2.3 转录起始位点的测定	468	16.7.1 取鼠胚胎	532	
15.2.4 体外转录	470	16.7.2 从胎鼠肌肉或幼鼠尾巴提取大分子量DNA	532	
15.2.5 进行中的核转录分析	472	16.7.3 转基因鼠中外源DNA的分析	532	
15.2.6 差示文库	473	16.7.4 转基因鼠系	533	
15.2.7 氯霉素乙酰转移酶分析	475	16.8 卵培养液的配制与保存	533	
15.2.8 凝胶滞留法	479	16.8.1 配制M2与M16的培养液的贮存液	533	
15.2.9 滤膜结合法	483	16.8.2 由贮存液配制M <sub>2</sub>	534	
15.2.10 Southwestern印迹	485	16.8.3 由贮存液配制M16	535	
15.2.11 足纹法	490	16.9 转基因动物的应用	535	
15.2.12 蛋白-核酸紫外交联法	509	16.9.1 基因表达调控	535	
15.2.13 DNA结合蛋白的分离纯化	511	16.9.2 转基因动物模型	539	
15.2.14 编码DNA结合蛋白的		16.9.3 用转基因动物生产生物活性物质与药物	540	
		17. 人类基因治疗	542	
		17.1 基因治疗概述	542	
		17.2 基因转移系统	543	
		17.2.1 反转录病毒	543	

17.2.2	腺病毒.....	545	5.1	常用缓冲液的pKa值 .....	571
17.2.3	腺病毒伴随病毒.....	545	5.2	各种pH值的Tris缓冲液的 配制 .....	572
17.2.4	单纯疱疹病毒.....	546	5.3	常见的市售酸碱的浓度 .....	573
17.2.5	脂质体.....	546	5.4	各种浓度的酸碱贮存液的近 似pH值.....	573
17.2.6	受体介导的蛋白.....	546	5.5	分子克隆常用缓冲液 .....	574
17.3	受体细胞与转移基因的表 达.....	547	5.6	磷酸缓冲液 .....	574
17.3.1	造血细胞.....	547	5.7	电泳缓冲液 .....	575
17.3.2	肌肉细胞.....	548	6.	常用贮存液的配制.....	578
17.3.3	成纤维细胞.....	548	7.	常用酶的配制.....	585
17.3.4	肝细胞.....	548	7.1	溶菌酶 .....	585
17.3.5	其它细胞.....	549	7.2	蛋白水解酶 .....	585
17.4	人类基因治疗的审批程序.....	549	7.3	无DNA酶的RNA酶 .....	585
17.5	基因标记与基因治疗.....	550	7.4	无RNA酶的DNA酶 .....	585
17.6	遗传病基因治疗.....	551	8.	常用层析数据.....	587
17.6.1	腺苷脱氨酶缺陷.....	552	9.	细菌培养基、抗生素和菌株.....	590
17.6.2	血友病.....	553	9.1	液体培养基 .....	590
17.7	肿瘤基因治疗.....	553	9.2	含有琼脂或琼脂糖的培养 基 .....	592
17.8	临床基因治疗概览.....	554	9.3	保存培养基 .....	593
17.9	伦理学安全性与社会效应.....	556	9.4	抗生素.....	594
17.10	问题与展望.....	557	9.5	用于λ噬菌体操作的溶液.....	594
			9.6	细菌菌株一览表 .....	595
			9.7	常见大肠杆菌菌株遗传标 记 .....	603
附录	.....	560	英汉分子生物学词汇.....	605	
1.	常用限制性内切酶酶切位点.....	560	索引.....	650	
2.	放射性核素数据.....	563			
3.	离心机转速与离心力的换算.....	564			
4.	核酸及蛋白质数据.....	565			
5.	分子克隆中使用的试剂与常用 缓冲液的配制.....	571			

# 1. 绪 论

## ——基因工程与分子生物学的进展及展望

20世纪50年代J.D. Watson和F. Crick关于DNA双螺旋模板学说的提出, 60年代J. Monod和F. Jacob关于基因调节控制的操纵子学说的出现, 以及70年代初期DNA限制性内切酶的发现和一整套DNA体外重组技术——基因工程技术的发展, 推动了分子生物学在广度和深度两个方面以空前的高速度蓬勃发展。基因工程研究成果的实际应用, 基因治疗技术在治疗遗传性疾病方面的初步成功, 意味着生物技术相关产业和生命科学已经发生划时代的突破和历史性的变革。这样的科技进步震撼了人类社会。人们预言, 21世纪将是生命科学的世纪。以基因工程为主导的生物技术将可能左右一个国家经济前途的命运。生物技术引起了科学革命。生物技术可能会对世界的重大问题——饥饿、疾病、能源、污染等提供切实的解决办法。世界各国都看到, 以分子生物学为理论基础、以基因工程为主导的生物技术, 正以其巨大的活力推动着社会生产力的飞速发展, 并成为国与国之间、特别是大国之间竞争的主要手段之一。世界各国都把发展分子生物学与生物技术, 当作本国的强国之道和新的国策之一。

本文将深入浅出地介绍一些分子生物学与基因工程方面的最起码的知识以及这一领域的当代进展与发展前景, 并期望引起读者对本领域研究的兴趣。

### 1.1 分子生物学与基因工程一瞥

这一节仅涉及分子生物学与基因工程的最基本的知识。

#### 1.1.1 Watson和Crick的DNA模板学说

这个学说指的是作为主要的遗传物质的生物大分子DNA(脱氧核糖核酸)的结构及其自我复制的模式, 同时也说明了基因与蛋白质生物合成的关系。

这一学说指出, 构成DNA的基本单位是脱氧核糖、核苷酸和磷酸。核苷酸碱基主要有4种: A(腺嘌呤)、T(胸腺嘧啶)、G(鸟嘌呤)和C(胞嘧啶)。在DNA结构中A-T、G-C是严格配对的。DNA大分子以反向互补的两条单链形成双螺旋的立体结构, 如图1-1和图1-2所示。其形状多少有点象人们常见的小食品“麻花”。DNA的复制过程即如图1-3所示: 先是两链分开, 然后两条亲代链均以各自为模板复制另一条互补链, 之后再形成子1代的双螺旋结构, 继之再以同样的方式复制成子2代、子3代、子4代……。这样的复制方式称为半保留复制。DNA存在于染色体中。因此上述过程是与一对亲代染色体复制成两对子代染色体过程同时发生的。这样的过程也是与1个亲代细胞分裂成两个子代细胞的过程同时发生的。DNA是基因的物质基础, 从化学结构看, 1个基因就是DNA长链上的1个结构单位。每一个物种都有各自独特的DNA结构; 每一个基因也都有各自独特的DNA结构。因此, DNA的半保留复制方式保证了遗传的稳定性。这就是“种瓜得瓜, 种豆得豆”的缘故。DNA上A-T、G-C排列顺序的无穷无尽的变化, 便是物种多样性无可穷尽的原因。

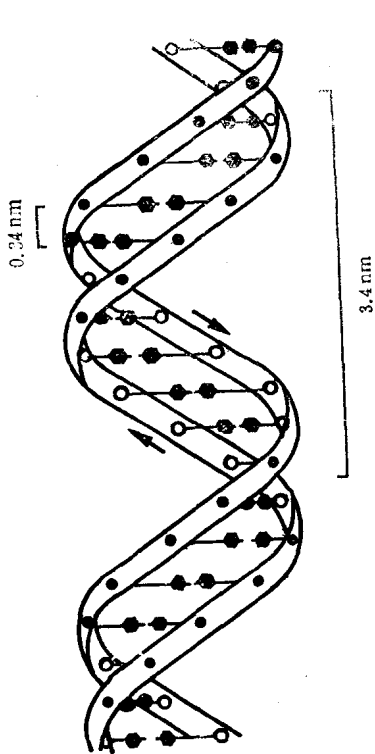


图1-1 双螺旋DNA分子立体模式

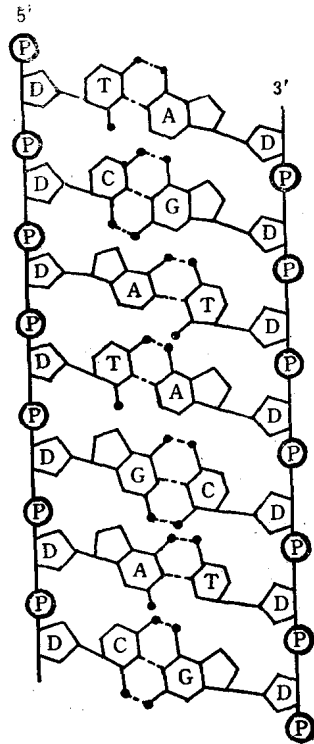


图1-2 双螺旋DNA分子平面结构图

P. 磷酸, D. 脱氧核糖, 4种碱基.  
A、T、G、C .....(虚线)表示氢键

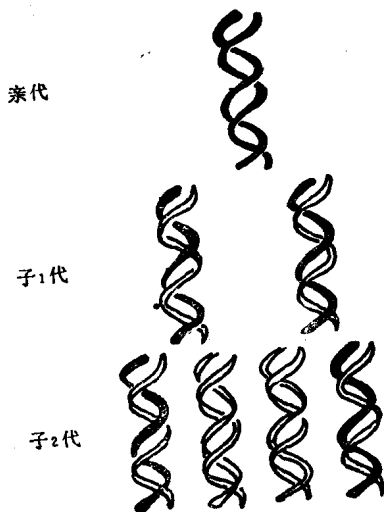


图1-3 DNA半保留复制

每一种三联密码指使一种特定的氨基酸同毗邻的氨基酸连接起来, 变成了一种肽链(蛋白质)。这个过程称为转译。如果所合成的肽链很长的话, 也可以形成有立体结构的蛋白质。

至于基因(DNA)与蛋白质合成的关系, 便是 Watson和 Crick所指出的中心法则:

DNA  $\xrightarrow{\text{转录}}$  mRNA  $\xrightarrow{\text{转译}}$  蛋白质。大家知道, 核酸有两大类: 一是脱氧核糖核酸, 即DNA; 另一是核糖核酸, 即RNA。后者与前者在化学结构上的不同有二: 一是RNA的核糖是不脱氧的五碳糖; 二是在4种碱基方面, RNA为A、U、G、C。U是尿嘧啶。RNA有好几种, mRNA是其中的1种, 称信使RNA。中心法则的意思是DNA(基因)指导了蛋白质的合成, 如表1-1和表1-2所示。一般说来, 先由在细胞核中的DNA(基因)的碱基以3个为1组(三联密码)转录成mRNA的三联密码之后, mRNA来到在细胞核外的核糖体(蛋白质合成的场所)上, 且

表1-1 遗传密码

第一位 (5'端)	第 二 位				第三位 (3'端)
	U	C	A	G	
U	苯丙氨酸	丝氨酸	酪氨酸	半胱氨酸	U
	苯丙氨酸	丝氨酸	酪氨酸	半胱氨酸	C
	亮氨酸	丝氨酸	终止	终止	A
	亮氨酸	丝氨酸	终止	色氨酸	G
C	亮氨酸	脯氨酸	组氨酸	精氨酸	U
	亮氨酸	脯氨酸	组氨酸	精氨酸	C
	亮氨酸	脯氨酸	谷氨酰胺	精氨酸	A
	亮氨酸	脯氨酸	谷氨酰胺	精氨酸	G
A	异亮氨酸	苏氨酸	天冬酰胺	丝氨酸	U
	异亮氨酸	苏氨酸	天冬酰胺	丝氨酸	C
	异亮氨酸	苏氨酸	赖氨酸	精氨酸	A
	甲硫氨酸	苏氨酸	赖氨酸	精氨酸	G
G	缬氨酸	丙氨酸	天冬氨酸	甘氨酸	U
	缬氨酸	丙氨酸	天冬氨酸	甘氨酸	C
	缬氨酸	丙氨酸	谷氨酸	甘氨酸	A
	缬氨酸	丙氨酸	谷氨酸	甘氨酸	G

表1-2 关于中心法则的图示

DNA <sub>1</sub>	ATG	AAG	AGT	↓	GTC	CAT	CAC	TAA
mRNA <sub>1</sub>	AUG	AAG	AGU	↓	GUC	CAU	CAC	UAA
蛋白质	甲硫氨酸	赖氨酸	丝氨酸	缬氨酸	组氨酸	组氨酸	组氨酸	(无意义)

表1-1是三联密码的关系表。表中的U是尿嘧啶。由此我们可以认识到，这个表讲的是mRNA三联密码同所编码的氨基酸的关系。U在DNA中的对应的碱基是T（胸腺嘧啶）。怎样看懂这张表呢？我们可以从5'端看到3'端，即按第一位——第二位——第三位的不看：如UCU（在DNA中则为TCT）是丝氨酸；CCC（在DNA中也是CCC）是脯氨酸；AAG（在DNA中也是AAG）是赖氨酸；GGU（在DNA中是GGT）是甘氨酸；如此类推。表中所确定的关系是经过严格的科学论证的，是固定不变的。这样，只要知道了任何1个三联密码（不管是RNA的、还是DNA的），你便可以从图表中查到这个三联密码所编码的那个氨基酸了。

表1-2讲的是1个假定的基因（DNA）所编码的蛋白质（肽）的例子。表中ATG（AUG）是转译的起始密码；TAA，是1个无意义的密码，它使1条肽链的合成到此为止，也称为终止密码。终止密码还有两种：TAG和TGA。表1-2中两个组氨酸的三联密码有所不同。这说明一种氨基酸可以有多个的三联密码（这一点从表1-1中也可以看到）。这样的密码称简并密码。但是，必须明确指出，20多种天然氨基酸都有各自特定的三联密码，即使是简并密码也是特定的。三联密码一变，所编码的氨基酸也必定发生改变，除非属于简并密码。当然，

这些仅仅是图解式的简明的解释。实际过程要比这样的说明复杂得多。这样的过程有点象打电报的过程：人们把语言文字变成数字编码之后从一地发到另一地，之后另一地再将数字编码转译成语言文字。这样的过程与电脑的工作过程、无线电播出与接收过程以及电视的播出与接收过程都有相似之处。由此也可以看到生命的基本现象——遗传密码的转录和转译现象的奥妙之处。

还必须指出，中心法则发现后，科学家们还发现了反中心法则。人们在研究只有RNA而无DNA的病毒时发现了1种酶，称为逆转录酶，该酶能以RNA为模板合成DNA。这样就把中心法则反转了过去。但在这种情况下，在以病毒RNA为模板反转为DNA之后，依然要遵循中心法则去合成蛋白质。逆转录现象是一种例外，而不是说中心法则不正确。

Watson和Crick使遗传学的研究从细胞、染色体的水平深入到了分子水平。DNA（基因）的自我半保留复制解释了遗传性状代代相传的稳定性；中心法则所阐明的基因与蛋白质合成的关系深刻地揭示了基因型与表现性、遗传与代谢（生理现象）的关系。事实上，基因所提供的是一种潜在的可能性，而只有基因所编码并合成的蛋白质才是代谢活动的主要角色。例如酶，生物体内一切代谢过程都有酶的参与，体内不存在无酶参与的生化过程。而酶是蛋白质。一切酶的合成都受基因的控制。“一个基因——一种酶”的理论是人们所熟知的。同时，Watson和Crick的理论，还从分子水平上解开了基因突变之谜，而且分析可以精细到1个碱基。例如ATG编码的是甲硫氨酸，但如果发生了基因突变，使ATG中的T变成了A，则该三联密码变成AAG，在所合成的蛋白质长链上与甲硫氨酸对应的位置上就只能是赖氨酸，而不再是甲硫氨酸了。这就是点突变的本质。有时人体就因此而得病了。这就从分子水平上说明了经典遗传学经常谈论的“变异”的主要实质。由于Watson和Crick理论的出现，人们可从分子水平上十分具体地看到遗传对代谢的控制：可以了解到一切生理现象和病理现象都直接或间接地受到了遗传基因的控制。

### 1.1.2 Monod和Jacob的操纵子学说

Watson和Crick的伟大理论，其重要性无论怎样高估也不过分，但它仅仅是揭开了生命基本现象的一部分本质，而不是全部。而揭开生命基本现象另一部分本质的是Monod和Jacob。他们从60年代至70年代提出的操纵子学说几乎同Watson和Crick的DNA模板学说具有同样的重要性。两个理论在说明生命基本现象实质方面可以成为姐妹篇。由于操纵子学说的出现，人们在认识生命基本现象的实质方面才有了基因的调节与控制的概念，有了基因调控的思想。

这里仅以Monod和Jacob研究得比较透彻的大肠杆菌乳糖操纵子为例，对操纵子学说的基本思想作一简要的介绍。如图1-4所示，所谓操纵子就是那些决定酶系的氨基酸顺序的、串连在一起的和转录协调一致的DNA区段。乳糖操纵子是由调节顺序（基因）和结构基因两部分组成的。调节顺序又分为：抑制基因（I），它是阻遏物编码区；启动基因（P或称启动子），此区段内有cAMP受体蛋白（CRP）的结合位点和RNA聚合酶的结合位点；操纵基因（O），为阻遏物结合位点。结构基因部分包括了编码3种酶的3个结构基因：β-半乳糖苷酶结构基因，透过酶结构基因和转乙酰酶的结构基因。乳糖操纵子的转录分为3个步骤：①当培养基中乳糖浓度增加而葡萄糖浓度降低时，菌体内cAMP含量增高，cAMP与CAP（即分解产物激活剂蛋白）结合成CRP，该复合物与启动基因上对应的位点结合后，使DNA双链不稳定；②随后RNA聚合酶则容易与启动基因紧密结合；③若此时操纵基因上无阻遏

物，则基因被打开，RNA聚合酶沿 DNA 5'端滑动，即转录开始。若培养基中葡萄糖浓度增高，因葡萄糖中间代谢产物抑制腺苷酸环化酶的活性并激活磷酸二酯酶活性，导致菌体内 cAMP含量和 CRP含量减少，RNA聚合酶则不能与启动基因紧密结合，进而结构基因不能转录， $\beta$ -半乳糖苷酶等 3 种酶也不能合成了。在另一种情况下，若是由抑制基因转录和转译生成阻遏蛋白，并与操纵基因结合，同样会阻止酶滑动而抑制转录，这称为负调节。如果阻遏蛋白与诱导物（此处为乳糖）结合，则这个复合物不能和操纵基因结合，诱导反应就能进行，3 种酶的结构基因则可以转录进而转译生成该 3 种酶，也就是说，基因得到了表达。

人们看到，操纵子学说扩大了基因的概念。人们从 Watson和 Crick的理论中了解到了基因的自我复制功能，并从中心法则中了解到了基因指导和编码蛋白质的一级结构（氨基酸排列顺序），但并不了解基因的其他功能；或是说，人们并不了解除了能够编码蛋白质一级结构这么一类基因之外，还有具备其他功能的基因。操纵子学说揭示出，还有一类专门起调节和控制蛋白质合成作用的基因，如调节基因（对乳糖操纵子而言，包括了抑制基因、启动基因和操纵基因）。人们理解到，结构基因只提供了编码某种蛋白质一级结构（氨基酸排列）

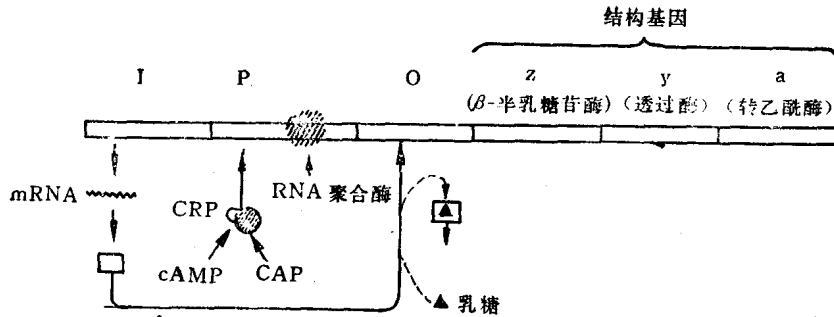


图1-4 乳糖操纵子结构

CRP: cAMP受体; CAP: 分解产物激活剂蛋白; I: 抑制基因; P: 启动基因; O: 操纵基因

的潜在可能性，而它是否能够真正地起作用，真正编码并生成某种特定的蛋白质，则受到调节基因的控制。而调节基因如何发挥作用，是否让结构基因编码生成蛋白质，则取决于细胞内外环境因素（如是否有乳糖来诱导）。由此，人们形成了基因调控和表达的概念。象乳糖操纵子这样一套协调一致的基因，也称基因组。这样的过程，又与无线电发报、无线电广播、电视或电脑等的工作方式相类似：它们也是可以调节和控制的——是开、是关，要哪一频道、不要哪一波段等，都是可以控制的。

当然，乳糖操纵子仅仅是 1 个例子。此外，尚有色氨酸操纵子、组氨酸操纵子等。真核细胞中也存在着基因的调控与表达的机制。自从 Monod和 Jacob的理论提出后，科学家们进行了广泛深入的研究，了解到真核细胞基因调节和控制要比大肠杆菌等原核细胞基因的调控机制复杂得多。生长和发育的基因调控问题，细胞癌变过程中的基因调控问题，都是一些十分复杂又十分有兴趣的研究课题。

这里，必须补充一点，经典遗传学虽因其研究层次（只涉及细胞和染色体）的局限性而在应用方面不尽人意，但不是说，遗传学发展到了今天的分子水平就不再需要经典遗传学了。操纵子学说的建立，首先是从经典遗传学的技术方法入手的，主要是运用一些突变型及其杂



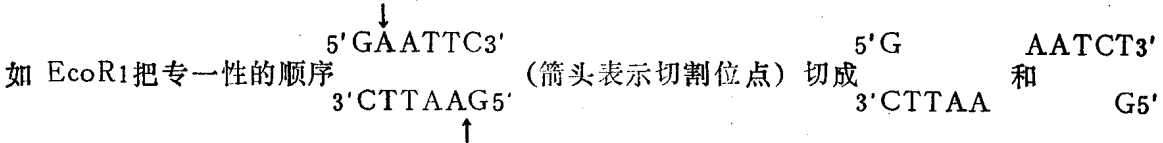
交的手段得出明确的结果，推理认为细胞内存在着起调节和控制作用的基因，存在着作用协调一致的基因组，即乳糖操纵子。之后用生物化学的方法提取和纯化了乳糖操纵子，才完成了该学说的建立。

总之，DNA模板学说和操纵子学说，二者相辅相成地从分子水平上揭开了遗传密码的复制、转录、转译、突变、调节与控制的奥秘，使人们对于生命基本现象实质的认识大大地具体和深入了一步，这些理论也成为基因工程研究的理论基础，堪称划时代的成就。

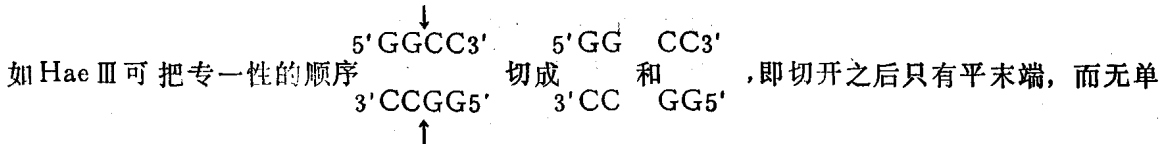
### 1.1.3 基因工程的工具酶和载体

显然，仅有上述这些理论，人们还无法自如地得到基因，更无法随心所欲地移动和改造基因。只有在DNA限制性内切酶（简称内切酶）、载体质粒、连接酶及其他修饰酶的发现之后，人类才有可能实现这一理想。DNA和蛋白质顺序测定方法、基因体外快速突变、DNA人工合成等方法的出现，则加快了基因工程在研究技术方面的成熟和发展。

70年代初期发现，许多细菌都能产生内切酶，但种类不同。现在已经知道的内切酶有数百种。内切酶的共同特点是，它们都有专一性的DNA识别顺序，都能在DNA链当中（而不是末端）切开DNA，故称“内切”的酶。但切开的方式又分为两种：主要的一种是切成粘性末端，



当切开之后，双链的DNA留有单链的末端。这些具有互补的核苷酸顺序的末端相遇时可以重新连接成为双链，这样的末端称为粘性末端。基因工程研究也就是利用了内切酶可以专一性地把DNA切割成特定的粘性末端的特点，根据研究工作的实际需要，把一些不同来源的、具有相同粘性末端的DNA片段重新连接或组合起来。这就是DNA体外重组技术的来由。内切酶切开DNA的另一种方式是切成平末端。这些内切酶同样具有专一性的识别顺序，



链末端，但这样的末端相遇时在连接酶（另一类酶）的帮助下仍然可以再连接起来，虽然连接的效率远比粘性末端低得多。总之，由于DNA限制性内切酶的发现，才有可能发展出DNA体外重组的新技术，进而导致了基因工程这一生物高新技术的产生。由于基因工程技术在生物学理论研究和实际应用两个方面的极端重要性，它把生命科学研究推上了一个新的高峰，因而DNA限制性内切酶的发现也是一个划时代的突破。

就基因工程研究而言，DNA限制性内切酶等一类酶统称为工具酶（基因工程研究的技术工具），它还包括DNA连接酶、末端转移酶、单链核酸酶、反转录酶等。

虽然内切酶的发现解决了异源DNA体外重组的技术问题，但是重组之后的异源DNA还必须回到细胞内（生物体中）才能显示出其生物活性。这就要求有一种运送载体（简称载体）来充当这样的角色。研究工作发现，在微生物中有1种非染色体（或称染色体外）的环状DNA（称为质粒）以及一些噬菌体（寄生在细菌中的病毒）、动植物病毒等可以作为这样的载体。这样的载体的共同特点是：① 它们都是环状DNA；② 都能专一性地感染某一类细胞，如大肠杆菌、枯草杆菌、放线菌、酵母或哺乳动物细胞等；③ 都具有某种选择性标记，如耐某种抗生素