

ZHUANJIYIN JISHU LILUN YU YINGYONG

转基因技术理论 与应用

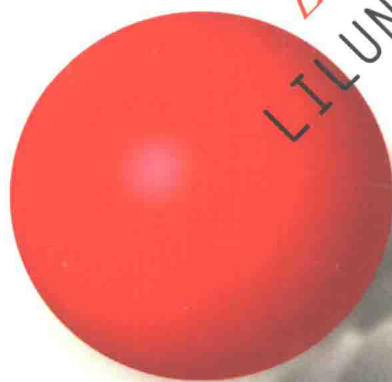
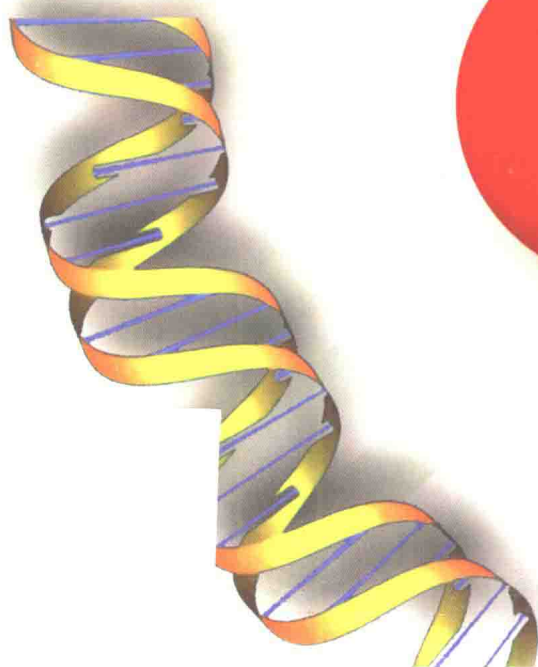
主 编 孙晗笑 陆大祥 刘飞鹏

河南医科大学出版社

转基因技术理论 与应用

主 编 孙晗笑 陆大祥 刘飞鹏

ZHUANJIYIN JISHU
LILUN YU YINGYONG
河南医科大学出版社



图书在版编目(CIP)数据

转基因技术理论与应用 / 孙晗笑等主编. — 郑州: 河南医科大学出版社, 2000. 9

ISBN 7-81048-364-1

I. 转… II. 孙… III. 基因转移-遗传工程 IV. Q785

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2000) 第 14982 号

河南医科大学出版社出版发行

郑州市大学路 40 号

邮政编码 450052 电话 (0371) 6988300

河南医版激光照排中心照排

河南第二新华印刷厂印刷

开本 787×1092 1/16 印张 36 字数 854 千字 彩页 1

2000 年 9 月第 1 版 2000 年 9 月第 1 次印刷

印数 1~3 000 册 定价: 78.00 元

编者名单

主 编

孙晗笑	暨南大学副教授、博士后、硕士生导师
陆大祥	暨南大学教授、副校长、博士生导师
刘飞鹏	暨南大学教授、硕士生导师

副主编

刘明志	暨南大学副教授、博士后、硕士生导师
李月白	河南医科大学副教授、硕士生导师
利奕成	暨南大学助理研究员
王秀清	暨南大学医学院附属二院副教授、博士后
曹孟德	河南医科大学副教授、博士后

编 委

毛文付	中山大学博士后
崔蕴霞	中山医科大学博士后
陈 伟	暨南大学医学院附属二院教授、硕士生导师

内 容 提 要

本书主要论及现代生物技术的精髓部分——转基因技术的相关理论、方法及其在现代生物领域的应用前沿。全书分为基因分子生物学、转基因技术方法、转基因技术与人类重大疾病、转基因动物、转基因植物及蛋白组学研究共 6 篇。除传统的基因转移技术定义的基因工程技术外,着重于近年基因工程的发展如新型表达载体等内容;书中还主要介绍了近年来发展较快的基因芯片技术、反义技术、DNA 疫苗、人工诱变技术、差异显示技术等;也论述了人类基因组研究的成果及蛋白质组研究方法、进展以及转基因动、植物的研究方法与发展等。本书内容首次将转基因技术理论及应用进展系统、全面、有机的结合起来,突出了新、全、实用三大特点。

前 言

生命科学研究生命现象的本质、活动规律及其与环境的关系,解决与人类生存、发展和提高生活质量密切相关的许多重大问题。在现代科学飞速发展的今天,知识爆炸引起科学体系大动荡、大分化、大整合,出现了各门科学整体化、整个科学数字化、科学技术一体化以及科学中心转移的大趋势,生命科学由于自身的重要性,学科人才迅速增加,理论和技术不断出现重大突破,各学科的生物技术产业群迅速崛起,人类基因组计划快速进展等。这些知识和技术的迅速积累,正孕育着整体性的重大突破。总之,生命科学突飞猛进的势头远远超过其他学科,在当前的科学大动荡中逐渐走向主导地位,成为科学界的新中心。

生物医学是现代生命科学的重要组成部分,也是多个相关学科相互融合、相互渗透的中心。预防和控制疾病、维护和促进健康、调节和优化生育等,这些与人类的生存、繁衍、发展、昌盛息息相关的问题都已有长足的发展。生物医学之所以有如此快速、如此纵深的发展,受益于近年来人们对基因的了解和各种基因技术的逐渐形成。实际上人类基因组计划、基因重组、生物技术、转基因技术等这些划时代的名词几乎成了现代生命科学包括生物医学、农学等的概言。

基因重组技术的诞生导致了相关生物技术如基因工程、蛋白质工程、酶工程、单克隆抗体技术等迅速形成,这些生物技术群也提供了进一步了解生命本质的支撑,由此实施了人类基因组计划,目前也基本完成人类基因的破译,最终人们将了解大约 10 万个活性基因在染色体上的位置和 33 亿对核苷酸序列以及这些基因的功能,找到 7 000 多种单基因遗传病的致病基因以及癌症、心血管疾病、糖尿病和艾滋病等许多慢性病的易感基因以及许多重要生命活动有关的基因。与此同时,密切相关的人工合成人类染色体体细胞克隆技术及基因改造移植器官技术的发展完善,必将使人们对生命的认识彻底改变。

今日的生物医学,已经普遍使用基因研究结果和基因操作技术。转基因技术(基因转移技术)在这些众多基因操作中已成为中心平台,转基因技术可以突破物种壁垒,从而提供无限杂交的机会,可用于培育能产生各种人类生命活动所需生物物质。因此,培育具有某些特殊性状,或用于实验研究和疾病治疗需要的转基因动、植物是转基因技术的重要用武之地;转基因技术也已被广泛应用于许多疾病的基因诊断、基因治疗的研究之中。有鉴于转基因技术的重要作用及潜在的经济价值,其正导致新兴的生物技术产业群的形成,这无疑将是 21 世纪的支柱产业之一,成为重要支柱经济。

陆大祥

2000-06-18

序

转基因技术是当代分子生物学领域的一项核心和具有广泛应用价值的新技术,该理论和技术已在基础研究和应用研究方面做出了巨大的贡献。在基础研究方面科学家们正在应用转基因技术,将基因转入真核细胞进行表达和调控,用以观察基因表达和基因表达产物之间的相互调节与作用,阐明了基因及其产物之间作用的机制,弄清了过去无法研究和观察的许多生命现象,以及基因和蛋白质作用的本质。在应用方面现在科学家可以将基因转入植物,改造作物的性状,创造出多种崭新的品种如抗腐烂性的转基因西红柿,抗寒冷性的植物品种,能够产生治疗作用的水果和蔬菜,能够提高产量的转基因作物等,转基因植物现在已在发达国家成为一项高新产业技术,取得了巨大的经济效益。在转基因动物方面,科学家可以将基因转入动物,产生非常贵重的基因产品,如科学家将有治疗作用的基因转入羊、牛、猪等家畜,产生对人类疾病有治疗作用的药物。现在转基因鱼、转基因家禽和家畜以及濒临灭种的转基因动物已取得成功,人类正在运用这项技术开展组织工程研究,以最终解决人体器官、人体组织无排斥反应的组织和器官移植。

《转基因技术理论与应用》一书不但系统、全面地介绍基因转移、基因工程、转基因动植物的原理和研究技术,还着重论述了与基因转移密切相关的一些新技术的理论、应用和发展趋势,如基因芯片技术、反义技术、差异显示、蛋白质空间结构模拟以及分子设计、基因组成果应用、基因工程进展等。本书内容由浅入深、循序渐进,以基因转移为主线,充分体现了各章内容的系统性和完整性,是目前我国生命科学领域中较为系统全面的一本新技术、新发展的综合书籍,实为广大生命科学研究者和技术人员使用和参考的一本好书。

暨南大学生命工程研究所所长 赵立淦
研究员、博士生导师

2000-06-15



孙哈笑，副教授，硕士生导师，1963年生。1984年毕业于河南医科大学医学系，并留校任教。1986~1989年攻读病理学祝庆蕃教授硕士研究生，主要研究细胞凋亡与肿瘤关系。1992年考取河南医科大学沈琼教授和中国医学科学院程书钧研究员联合培养博士研究生，在中国医学科学院肿瘤研究所完成博士论文，主要内容为人支气管上皮恶性转化过程中凋亡相关基因的改变。1996年赴加拿大蒙特利尔大学生化系从事博士后研究，主要研究人疱疹病毒8在艾滋病相关Kaposi肉瘤发生中的作用。1998年回国后在暨南大学医学院病理教研室任教。近年来，在国内外杂志上发表论文近30篇；获得省部级、厅局级成果奖5项；申报国家发明专利2项。目前主要从事病毒基因用于疾病生物防治方面的研究，主持有国家“863”计划项目、国家自然科学基金等科研课题多项。



陆大祥，病理生理学教授，博士生导师，1953年生。1985年获硕士学位，同年起在暨南大学医学院工作，现任暨南大学副校长。兼任中国病理生理学会理事，中国病理生理学会炎症发热感染低温专业委员会副主任委员，《中国病理生理杂志》副主编，广东省病理生理学会常务理事兼秘书长，广东省继续医学教育委员会委员等。主要研究方向：神经内分泌免疫网络、内毒素与疾病、发热与体温调节。已主持和参与国家级课题5项、省部级课题6项、主持其他课题5项。发表学术论文40余篇、参编专著6部。曾被评为广东省科协省级学会先进工作者，并获暨南大学优秀教学成果奖一项、国务院侨办科技进步一等奖、1998年广东省医药科技进步一等奖、1998年广东省自然科学三等奖、1999年卫生部科技进步三等奖等。



刘飞鹏，教授，硕士生导师，1938年生。1963年毕业于暨南大学生物系。1984年公派到英国曼彻斯特大学进修分子生物学和基因工程技术2年。1994年公派到美国和加拿大进行真核生物基因表达调控研究。曾任暨南大学生物系遗传教研室主任、系副主任、系主任等职务。兼任中华预防医学会微生态学分子生态专业委员会副主任常务委员，广东省生物工程学会常务理事，广东省高等院校高级职称评审委员，香港国际教育交流中心理事，香港中国国际交流出版社特约顾问编委等。是我国较早开始从事分子生物学技术研究的学者之一。1976年研究质粒载体，发现芽胞杆菌中的抗药性质粒，并首次拍出清晰的质粒DNA电镜照片。1986年从事特大DNA分子的脉冲电泳分离研究，将啤酒酵母的完整染色体DNA分子在胶上清晰分带。1987年从事DNA合成及基因的设计和合成工作。克隆与表达成功的基因有血清胸腺因子基因、碱性成纤维细胞生长因子基因、几种抗菌抑癌杂合肽基因，并开展下游工艺和开发试验。发表学术论文40余篇。

目 录

第一篇 基因分子生物学

第一章 基因的一般特性	(1)
第一节 基因和基因组.....	(1)
第二节 核苷、核苷酸、核酸.....	(4)
第三节 DNA 分子构象的变化	(11)
第二章 原核细胞基因组结构	(17)
第一节 原核基因组特性	(17)
第二节 原核细胞与真核细胞基因组区别	(18)
第三节 可移动基因	(19)
第四节 质粒 DNA	(23)
第五节 质粒复制及质粒不相容性	(26)
第三章 病毒基因组及病毒载体	(28)
第一节 病毒基因组结构特点	(28)
第二节 病毒基因组复制特点	(30)
第三节 噬菌体	(31)
第四节 SV40 病毒及 SV40 载体	(35)
第五节 逆转录病毒及其载体	(36)
第六节 腺病毒及其载体	(39)
第七节 其他作为载体的病毒	(40)
第四章 真核生物基因组结构	(43)
第一节 真核生物基因组特征	(43)

第二节 编码蛋白质的结构基因	(45)
第三节 卫星 DNA 和中度重复 DNA	(49)
第四节 基因的可移动性	(51)
第五节 真核基因组的特殊 DNA 结构	(52)
第六节 当今人类基因组计划及成就	(54)
第五章 原核生物基因的表达和调控	(64)
第一节 原核生物基因表达特点	(64)
第二节 原核生物基因表达调控元件	(65)
第三节 正调控和负调控	(74)
第四节 其他调控方式	(76)
第五节 利用原核启动子表达真核基因	(77)
第六章 真核基因表达调控	(82)
第一节 真核生物基因表达调控的特点	(82)
第二节 转录前水平的调控	(83)
第三节 转录水平的调控	(90)
第四节 转录后水平的调控	(112)
第五节 翻译及翻译后加工水平的调控	(117)
第七章 染色体基因组	(125)
第一节 人类染色体	(125)
第二节 人类主要基因定位	(127)
第三节 端粒和端粒酶	(136)
第八章 抗体基因和 MHC 基因	(143)
第一节 抗体的结构及多样性	(143)
第二节 抗体的基因结构及重排	(146)
第三节 组织相容性复合物(MHC)基因	(151)
第四节 改型抗体	(157)

第二篇 转基因研究技术

第一章 核酸制备及检测	(162)
--------------------------	--------------

第一节 核酸分离与纯化	(162)
-------------------	-------

第二节	核酸电泳	(168)
第三节	核酸的酶解	(174)
第四节	PCR 技术	(180)
第五节	DNA 测序	(187)
第六节	基因人工合成	(202)
第七节	核酸印迹杂交	(210)
第二章	蛋白质检测及分析技术	(220)
第一节	蛋白质提取及含量测定	(221)
第二节	蛋白质印迹分析	(225)
第三节	蛋白质等电聚焦和双向电泳技术	(229)
第四节	蛋白质的层析分离	(234)
第五节	蛋白质色谱分离技术	(240)
第六节	蛋白质序列分析	(242)
第七节	蛋白质抗体技术	(245)
第三章	基因转移及蛋白质生成技术	(251)
第一节	目的基因的获取	(251)
第二节	基因重组	(258)
第三节	基因重组中常用的酶及载体	(265)
第四节	重组 DNA 的转化、筛选及制备	(281)
第五节	目的基因的表达	(284)
第六节	昆虫杆状病毒表达体系	(289)
第七节	重组基因在哺乳动物细胞的表达	(297)
第八节	新型报告基因技术	(303)
第九节	几种新型真核表达体系及分子耦联载体	(310)
第十节	基因工程下游技术	(317)

第三篇 转基因技术与人类疾病防治进展

第一章	基因芯片技术	(329)
第一节	基因芯片技术原理	(329)
第二节	基因芯片的主要类型	(331)
第三节	基因芯片的制备和用法	(332)
第四节	基因芯片的应用	(337)

第五节 基因芯片的现状和问题	(341)
第二章 反义技术	(346)
第一节 反基因技术	(346)
第二节 反义脱氧核糖核酸	(352)
第三节 反义 RNA 和核酶	(358)
第四节 肽核酸	(362)
第五节 反义肽	(364)
第三章 人工诱变技术	(369)
第一节 基因突变	(369)
第二节 基因诱变策略	(372)
第三节 诱变技术的应用	(378)
第四章 差异显示	(387)
第一节 mRNA 差异显示	(387)
第二节 代表性差异分析	(393)
第三节 其他差异显示法	(396)
第五章 DNA 疫苗及重大疾病疫苗进展	(399)
第一节 DNA 疫苗的特点	(400)
第二节 DNA 疫苗的研究方法	(402)
第三节 DNA 疫苗的应用和进展	(404)
第四节 肿瘤疫苗进展	(407)
第五节 艾滋病疫苗进展	(411)

第四篇 转基因动物技术

第一章 转基因动物的基因整合表达特征	(422)
第一节 转基因动物的研究基础	(422)
第二节 转入基因调控元件及整合表达	(424)
第三节 转基因动物的诱导表达系统	(427)
第二章 转基因动物的研究方法	(431)
第一节 显微注射法制备转基因鼠	(432)

第二节	提高显微注射 DNA 表达的成功率	(437)
第三节	胚胎干细胞法转基因	(441)
第四节	精子载体法转基因	(446)
第五节	胚胎分割与细胞核移植	(448)
第三章	转基因动物的应用	(452)
第一节	人类疾病的转基因动物模型	(452)
第二节	转基因鼠与基因操作	(453)
第三节	转基因哺乳动物表达系统	(457)
第四节	转基因动物与动物改造	(462)

第五篇 转基因植物表达系统

第一章	植物外源基因载体系统	(468)
第一节	植物转基因技术的内容与概念	(468)
第二节	目的基因的分离和克隆方法	(471)
第三节	农杆菌载体构建	(477)
第四节	植物病毒载体的构建	(485)
第二章	植物基因转移方法	(492)
第一节	农杆菌介导的遗传转化	(492)
第二节	DNA 直接转移到植物细胞	(495)
第三节	转化实验基本方法	(501)
第四节	转入基因的表达和分析	(507)
第三章	转基因植物的应用	(512)
第一节	作物品种改良	(512)
第二节	植物基因工程工业	(517)

第六篇 蛋白质工程及蛋白质组学

第一章	蛋白质结构与图形分析	(521)
第一节	蛋白质结构	(521)

第二节	蛋白质结构层次与功能关系	(530)
第三节	蛋白质分子结构的计算机图像分析	(533)
第二章	蛋白质分子模拟和分子设计	(536)
第一节	蛋白质分子模拟	(536)
第二节	蛋白质分子模拟的应用及分子设计	(540)
第三节	蛋白质结构模拟相关的分析软件	(543)
第三章	蛋白质组学及蛋白质组计划	(549)
第一节	蛋白质组学的产生	(549)
第二节	蛋白质组研究技术	(550)
第三节	蛋白质组信息学	(553)
第四节	蛋白质组研究进展	(558)

第一篇 基因分子生物学

第一章 基因的一般特性

第一节 基因和基因组

一、基 因

Gene, 中文译为基因, 是当今生命科学研究的主战场。

基因在大分子结构方面是指生物体内存在的生物大分子之一——核酸, 是生物遗传最重要、最根本的物质基础。核酸有脱氧核糖核酸(DNA)和核糖核酸(RNA)2类, 在生物体的生命活动全过程中都起着多种极其重要的作用。

二、基因组

(一)基因组概念

细胞或生物体一套完整单体的全部染色体遗传物质的总和称为基因组, 包括全部的基因与调控元件等核酸分子。

具体地讲, 绝大多数遗传物质是 DNA, 基因组主要指不同的 DNA 功能区域在整个 DNA 分子中的分布情况。进一步来说, DNA 结构应指总体 DNA 核苷酸顺序。个别生物的遗传物质为 RNA, 如 RNA 病毒。

不同生物基因组大小及复杂程度不同, 具有差异性。一般来说, 生物进化高低与基因组大小、含量及复杂程度有关。不同生物基因组有一定相关性, 表现为基因特性的相似、结构及组成的雷同、遗传信息的传递方式及遗传密码的趋同等。

(二)基因组遗传功能的发现

1928 年英国微生物学家 Fred Griffith 在研究引起肺炎的肺炎双球菌的致病力时, 意外地观察到热灭活的致病细菌与活的非致病细菌混合, 能够使一小部分非致病细菌转变成病原体。在这种转变成病原体的过程中, 无致病力的细胞获得了厚的富含多糖的细胞外壁(荚膜), 正是这种荚膜以某种方式使细菌产生了致病性。因此, Griffith 发现存在着一个活性物质(遗传物质), 在致病细菌被加热灭活后, 该物质仍然未受损害, 它可转移到非致

病细菌中,使这些细菌产生荚膜。

Griffith 本人并不曾认真地鉴定这个活性物质。当在纽约洛克菲勒研究所工作的 Oswald Avery 开始研究这个“转化因子”时,他还以为这种活性物质可能就是一种复杂的多糖,这种多糖又以某种方式引发了同样多糖的大量合成。在最初阶段,Avery 发现这个活性因子可以从破碎的热灭活细菌中抽提出来,这是下一步将活性因子与其他物质分离开的必要前提。经过 10 年的努力研究,最后 Avery 和他的同事 Maclyn McCarty 及 Colin Macleod 得出转化因子是 DNA 分子的结论。在他们的最纯的转化因子制剂中,DNA 不仅是主要的分子,而且这种转化活性可被高度纯化的 DNA 酶制剂特异地破坏。相反,转化活性不被蛋白酶降解或 RNA 酶降解所破坏。Avery 在 1944 年才首次宣布 DNA 是转化因子这一结论。大多数科学家认为这是无可争辩的。然而,一些怀疑者宁可相信 Avery 和他的同事不知怎么没有看到“遗传蛋白质”。而 DNA 之所以有转化活性仅仅是因为这些 DNA 的功能是作为非特异的骨架,而真正的“蛋白质基因”则固定在其上面。可是,只要认真思考一下,似乎确定 DNA 是遗传物质应该是意料中的。在 Avery 进行实验的期间,人们就知道 DNA 是一个非常大的分子,包含数百个核苷酸。如果发现这 4 种主要核苷酸的序列是不规则的话,那么各种 DNA 序列潜在的数目将是 4^n 个那么大的天文数字(n 等于链上的核苷酸数)。

Avery 的观察是否有普遍性?是否所有的基因都是由 DNA 构成的?或者是否还有别的遗传分子在其他情况下有此功能?如果能够证明通过加入特异的 DNA 分子来改变其他生物的遗传性是可能的,这些疑点就能很快解开。当时还没有办法从多数植物和动物中分离未受损伤的 DNA 分子,并且在当时还不能使转化方法扩大到其他生物上。法国的一个研究小组声称他们能将 DNA 注射进鸭卵中,使孵出的鸭子在羽毛上发生变化。但这些卵是从地方农贸市场获得的,其品系完全不清楚。结果,没有人会承认这是一种“转导”作用。

由于对 DNA 的兴趣,人们发现在一些高度纯化的病毒中也存在这种物质。这些引起疾病的极其微小的颗粒,仅在活细胞中增殖。其后使用许多不同的突变体进行实验,表明每个病毒颗粒都含有几个不同的基因,这些基因沿着病毒染色体直线排列。然而,通过纯遗传学实验,科学家们还无法确定携带遗传特异性的是 DNA 还是一种蛋白质成分。

1951 年,Herriott 发现噬菌体 T2 感染大肠杆菌时,蛋白外壳从不进入细胞,而是通过尾部与宿主细胞接触,释放酶消化其外膜,然后将核酸成分注入该细胞。为此,1952 年 Hershey 和 Chase 用 ^{32}P 和 ^{35}S 进行了同位素掺入实验,结果证实 DNA 是遗传物质这一结论的正确性。

从分子生物学角度看,基因是合成一个功能多肽或 RNA 全部核苷酸序列,主要是指 DNA 序列,但在逆转录病毒为 RNA 序列。由此可见,基因可以分为 2 类,即编码蛋白的基因和非蛋白的基因,后者主要转录为 rRNA(rRNA 基因)和 tRNA(tRNA 基因)。

广义上,基因即是核酸,是生命遗传的基本物质。

三、基因研究内容

自 20 世纪中叶以来,核酸研究发展之快,涉及范围之广,影响之大,内容之丰富,在生物科学领域内是前所未有的,概括为以下几个方面:

(1)核酸的生物合成,包括 DNA 的复制,DNA 转录成 RNA 和转录后的加工以及 RNA 反转录成 DNA 等。

(2)DNA 不仅存在于细胞核内,而且在核外的细胞器中也可找到,如真核生物的线粒体、叶绿体、原核生物的质粒等。RNA 病毒、DNA 病毒和噬菌体的发现。

(3)RNA 和蛋白质生物合成的关系,tRNA、mRNA 和 rRNA 的发现,三联密码的确定,蛋白质生物合成的过程等。

(4)核酸的新陈代谢,嘌呤和嘧啶核苷酸的生物合成。

(5)重要核酸工具酶的相继发现,如核酸酶、聚合酶、限制性内切酶和连接酶等。

(6)核酸分子中核苷酸排列顺序(一级结构)的测定。

(7)核酸高级结构的测定。

(8)基因表达和调节控制的机制。

(9)真核生物 DNA 和 RNA 与原核生物 DNA 和 RNA 的差异,真核生物结构基因的不连续性,剪接现象的发现等。

(10)修饰核苷酸和具有重要生物功能小分子活性核苷酸的发现。

(11)不同核酸之间以及核酸和蛋白质之间的相互作用,核酸蛋白质复合体(如染色体、核糖体、复制体、病毒、噬菌体等)结构的研究。

(12)细胞核内和其他小分子 RNA 的结构和特殊功能。

(13)核酸的人工合成。

(14)发现 RNA 也有催化活性,命名为核酶(ribozyme),打破了酶为蛋白质的传统概念。

(15)综合利用上述核酸研究的成就衍生出分子生物学、分子遗传学和基因工程,为医学、农业、工业和环保打开了新局面。

(16)人类基因组计划描绘了人类基因的图谱,人类基因表达序列标签(ESTs)库等的建立大大简化了对基因组功能的研究。

(17)DNA 芯片技术的高度并行性、多样性、微型性和自动化,已成为后基因组时代基因功能分析的重要技术之一。

(18)伴随后基因组时代——功能基因组时代、功能蛋白质组计划应运而生,包括蛋白质结构模拟与功能相关的一组蛋白质功能与结构关系等。

(19)各类核酸、蛋白相关的数据库对功能基因组学、功能蛋白质组学提供了必要的基础。