

高新技术科普丛书

基因工程 技术

冯斌
谢先芝
编著

化学工



高新技术科普丛书

基因工程技术

冯 斌 谢先芝 编著

化学工业出版社

·北 京·

(京)新登字 039 号

图书在版编目 (CIP) 数据

基因工程技术/冯斌, 谢先芝编著. —北京: 化学工业出版社, 2000. 11
(高新技术科普丛书)
ISBN 7-5025-3000-2

I. 基… II. ①冯…②谢… III. 基因-遗传工程-普及读物 IV. Q78

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2000) 第 49168 号

高新技术科普丛书

基因工程技术

冯斌 谢先芝 编著

责任编辑: 叶露

责任校对: 李丽 李林

封面设计: 田彦文

*

化学工业出版社出版发行

(北京市朝阳区惠新里 3 号 邮政编码 100029)

发行电话: (010) 64982511

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

*

新华书店北京发行所经销

北京市云浩印制厂印刷

北京市同文印刷厂装订

开本 850×1168 毫米 1/32 印张 5 $\frac{1}{2}$ 字数 137 千字

2000 年 11 月第 1 版 2000 年 11 月北京第 1 次印刷

印数: 1-4000

ISBN 7-5025-3000-2/TQ·1310

定价: 12.00 元

版权所有 违者必究

该书如有缺页、倒页、脱页者, 本社发行部负责退换

序

数万年来，人类一直在了解、开发、利用我们周围的自然界，同时不断地认识着自身，科学技术也从一开始就随着人类的生存需求而产生和发展着。人类发展史充分验证了邓小平“科学技术是第一生产力”的论断。科学技术的发展，促进了人类文明和社会的发展。

21世纪是信息时代，21世纪是生命科技的世纪，21世纪是新材料和先进制造技术迅速发展和广泛应用的世纪，21世纪是高效、洁净和安全利用新能源的世纪，21世纪是人类向空间、海洋、地球内部不断拓展的世纪，21世纪是自然科学发生重大变革、取得突破性进展的时代。科学技术的发展、新技术的不断涌现，必将引起新的产业革命，对我国这样的发展中国家来说，既是挑战，也是机遇，而能否抓住发展机遇，关键在于提高全民族的科学文化水平，造就一支具有科学精神、懂得科学方法、具有知识创新和技术创新能力的高素质劳动者队伍。所以，发展教育和普及科学知识、弘扬科学精神、提倡科学方法是我们应对世纪挑战的首要策略。为此，1999年8月，江总书记在视察中国科学院大连化学物理研究所时进一步强调了科普工作的重要性：“在加强科技进步和创新的同时，我们应该大力加强全社会的科学普及工作，努力提高全民族的科学文化素质。这项工作做好了，就可以为科技进步和创新提供广泛的群众基础。”

为了普及和推广高新技术，化学工业出版社组织几位两院院士和专家编写了《高新技术科普丛书》。本套丛书的特点是：介绍当今科学产业中的一些高新技术原理、特点、重要地位、应用及产业化的现状与发展前景；突出“新”，介绍的新技术、新理论和新方法不仅经实践证明是成熟、可靠的，而且是有应用前景的实用技术；力求深入浅出，图文并茂，知识性、科学性与通俗性、可读性及趣味性的统一，并充分体现科学思想和科学精神对开拓创新的重要作用。

《高新技术科普丛书》涉及与我国经济和社会可持续发展密切相关的高新技术，第一批9个分册包括绿色化学与化工、基因工程技术、纳米技术、高效环境友好的发电方式——燃料电池、最新分离技术（如超临界流体萃取、吸附分离技术、膜技术）、化学激光、生物农药等。本套丛书以后还将陆续组织出版多种高新技术分册。相信该套科普丛书对宣传普及科技知识、科学方法和科学精神，正确地理解、掌握科学，提高全民族的素质将会起到积极的作用。

洛角祥

2000年9月

前 言

近十几年来，分子生物学的发展产生了许多分支学科和先进有效的技术，其中基因工程是正在发展中的新兴前沿学科之一，而基因工程技术是一种按照人们的构思和设计，在体外操作遗传物质，并最终实现改造生物的新技术。基因工程技术通过人工操作基因，打破了生物种间以及动、植物间的遗传屏障，阐明了有关代谢、发育、调控及亚细胞结构方面的信息，在动、植物改良，化学工业，医疗卫生，生态环境，资源利用等方面都将引发新的革命。

基因工程从诞生至今，不过才近30年的历史，然而，无论是在基础理论研究领域，还是在生产实际应用方面，都已取得了惊人的成绩。首先，基因工程给生命科学自身的研究带来了深刻的变化。通过各种基因操作技术的发展与应用，人们对基因的结构和功能都有了深入详尽的了解，从而为全面透彻地理解生命过程的本质开辟了新的研究途径。关于基因组核苷酸全序列的测定与分析，是基因操作技术促进基础生物学研究的又一范例。目前科学家已完成了多种生物细胞器的基因组全序列测定工作。然而，最令世界瞩目的是《人类基因组计划》，这项被新闻界喻为“基因圣战”的规模空前的科研计划已经提前完成。这个与阿波罗登月计划一样具有重要意义和深远影响的计划将从最基本层面深入对人类生物特征的认识，同时基因与疾病的对应关系也会逐步查清楚，从而达到基因治疗和改造人类有害基因的目的。其次，基因工程给工农业生产的发展带来了巨大的经济效益。转基因技术能使动、植物具有它们原来所没有的全新的特征，改良食品的特征、扩充食品的内容；减少合成杀虫剂的使用，使粮食更有利于人体健康；培育出具有生物反应器功能的工程动、植物。基因工程技术应用最成功的方面是用于生物治疗的新型药物的研制，它在医药领域中显示了巨大的生命力，并很快

在医药工业中形成一支新的产业。目前已有 30 多种基因工程药物投入市场，产生了巨大的社会效益和经济效益。

由于生命科学与人口问题、人类生存和健康问题、粮食问题、资源问题、生态环境保护问题等密切相关，所以世界各国都把生命科学作为 21 世纪的主导科学。生命科学研究中所采取的手段和途径是生物技术，而生物技术的核心是基因工程技术。可以预期，在不久的将来，基因工程的研究和应用将会给世界带来更加深刻的变革。

本书从基因工程的原理及基本技术，包括目的基因的分离、基因的转化和表达调控、转基因技术的应用等几个方面阐明了基因工程技术的发展现状及应用前景，以期使读者对基因工程技术有一个全面、基础的了解。

在本书的编写过程中，我们参阅了大量的专著和国内外文献，特别是我们的导师吴乃虎研究员编著的《基因工程原理》对本书的构思及写作具有重要的指导意义。

本书的第一、二、四章由冯斌博士编写，第三、五章由谢先芝博士编写。在本书的编写过程中还得到了中国科学院发育生物学研究所植物发育分子生物学研究室的全体老师和同学的帮助，在此一并致谢！

由于编者水平有限，书中疏漏和错误在所难免，衷心期待读者的批评指正和提出宝贵建议。

编者

2000 年 8 月

《高新技术科普丛书》编委会

主任

路甬祥 中国科学院院长，中国科学院院士，
中国工程院院士

委员

汪家鼎 清华大学教授，中国科学院院士
闵恩泽 中国石油化工集团公司石油化工科学研究院
教授，中国科学院院士，中国工程院院士
袁 权 中国科学院大连化学物理研究所研究员，
中国科学院院士
朱清时 中国科学技术大学教授，中国科学院院士
孙优贤 浙江大学教授，中国工程院院士
张立德 中国科学院固体物理研究所研究员
徐静安 上海化工研究院（教授级）高级工程师
冯孝庭 西南化工研究设计院（教授级）高级工程师

内 容 提 要

本书包含三部分内容：第一部分（第一章）介绍基因工程的产生、发展及基因工程赖以创建的理论和背景；第二部分（第二、三、四章）较详细地介绍了基因工程的一些基本原理和主要技术，主要有核酸分子的提取，电泳技术，基因克隆所需的工具酶与克隆载体，目的基因的分离方法与鉴定手段，外源基因导入动、植物的方法及基因表达调控等；第三部分（第五章）介绍基因工程在医学、农业、工业及环境保护等方面的应用。

本书注重语言的科学性与通俗性、知识的先进性与系统性，图文并茂，不仅可以作为基因工程研究者和大专院校相关专业师生的参考书，而且能使广大读者对基因工程有一个全面基础性认识。

目 录

第 1 章 绪论	1
1.1 基因工程的诞生	2
1.1.1 理论上的三大发现	2
1.1.2 技术上的三大发明	4
1.2 基因工程的定义及主要研究内容	6
1.2.1 基因工程的定义	6
1.2.2 基因工程的主要研究内容	8
1.3 基因工程的发展概况	9
1.4 基因工程的安全性问题	12
第 2 章 基因工程的基本技术	14
2.1 核酸分子的提取	14
2.1.1 总 DNA 的提取	15
2.1.2 RNA 的提取	16
2.1.3 质粒 DNA 的提取	18
2.2 电泳技术	21
2.2.1 琼脂糖凝胶电泳	22
2.2.2 聚丙烯酰胺凝胶电泳	25
2.2.3 脉冲电泳凝胶电泳	26
2.3 基因的分子克隆	27
2.3.1 基因克隆所需的核酸酶	27
2.3.1.1 核酸内切限制酶	29
2.3.1.2 DNA 连接酶	32
2.3.1.3 DNA 聚合酶	33
2.3.1.4 DNA 分子克隆中所使用的其他工具酶	34
2.3.2 基因克隆的主要载体类型	35
2.3.2.1 质粒载体	35
2.3.2.2 噬菌体载体	39

2.3.2.3	柯斯质粒载体	44
2.3.2.4	单链 DNA 噬菌体载体	45
2.3.2.5	噬菌粒载体	48
2.3.2.6	真核细胞的克隆载体	50
2.3.3	DNA 的体外重组	51
2.3.3.1	外源 DNA 片段同载体分子的重组	51
2.3.3.2	重组体分子导入受体细胞的途径	54
2.4	重组体的筛选与鉴定	56
2.4.1	遗传检测法	56
2.4.1.1	根据载体表型特征选择重组体分子的直接选择法	56
2.4.1.2	根据插入序列的表型特征选择重组体分子的直接 选择法	57
2.4.2	物理检测法	58
2.4.2.1	凝胶电泳检测法	58
2.4.2.2	R-环检测法	58
2.4.3	菌落或噬菌斑杂交筛选法	59
2.4.4	免疫化学检测法	60
2.4.5	DNA-蛋白质筛选法	60
2.4.6	转译筛选法	61
2.4.6.1	杂交抑制的转译	61
2.4.6.2	杂交选择的转译	61
第 3 章	目的基因的分离	63
3.1	基本概念	64
3.1.1	cDNA 文库	64
3.1.1.1	cDNA 文库构建的基本步骤	64
3.1.1.2	cDNA 表达文库	65
3.1.2	基因组文库	66
3.1.2.1	λ 噬菌体载体构建基因组文库的步骤	67
3.1.2.2	柯斯质粒构建基因组文库及其优缺点	68
3.1.3	PCR 技术	69
3.2	根据特异蛋白分离目的基因	71
3.3	根据特异 mRNA 分离目的基因	72
3.3.1	差别杂交	72

3.3.1.1	差别杂交的原理	72
3.3.1.2	差别杂交技术的局限性	73
3.3.2	mRNA 减法杂交技术	74
3.3.2.1	减法杂交的原理	74
3.3.2.2	减法杂交技术的优缺点	76
3.3.3	mRNA 差别显示技术	76
3.3.3.1	mRNA 差别显示技术的一般原理	77
3.3.3.2	mRNA 差别显示技术的优越性及应用	78
3.3.3.3	mRNA 差别显示技术的缺陷	79
3.3.4	cDNA 代表性差别分析技术	80
3.3.4.1	cDNA 代表性差别分析技术原理	80
3.3.4.2	代表性差别分析技术的操作流程	80
3.3.4.3	代表性差别分析技术的优缺点	82
3.3.5	抑制性减法杂交技术	82
3.3.5.1	抑制性减法杂交技术的原理	82
3.3.5.2	抑制性减法杂交技术的操作流程	84
3.3.5.3	抑制性减法杂交技术的优缺点	85
3.4	利用 DNA 插入法分离目的基因	86
3.4.1	转位子标签法	86
3.4.1.1	转位子标签法的一般概念	86
3.4.1.2	转位子标签法分离基因的程序	88
3.4.1.3	转位子标签法的局限性	90
3.4.2	T-DNA 标签法	90
3.5	染色体步行法分离目的基因	91
3.5.1	染色体步行法的基本原理	91
3.5.2	染色体步行法的基本操作步骤	91
3.6	表达序列标签法分离目的基因	92
3.6.1	表达序列标签法的定义	92
3.6.2	表达序列标签法分离基因的基本步骤	92
3.6.3	表达序列标签法的应用	92
3.7	基因表达系列分析法	93
3.7.1	基因表达系列分析法的原理	93
3.7.2	基因表达系列分析法的具体过程	94

3.8	酵母双杂合系统	94
3.8.1	酵母双杂合系统的原理及应用	95
3.8.2	酵母双杂合系统的实验程序	95
3.8.3	酵母双杂合系统分离目的基因的优缺点	97
3.9	目的基因的分离方法总结	97
第4章	克隆基因的表达体系	99
4.1	表达体系与表达产物	99
4.2	大肠杆菌表达体系	100
4.2.1	原核生物基因表达的特点	100
4.2.2	外源基因在原核细胞中表达的调控元件	100
4.2.2.1	启动子	100
4.2.2.2	SD序列	101
4.2.2.3	终止子	102
4.2.3	几种类型的原核表达载体	102
4.3	提高外源基因表达水平的措施	103
4.4	植物表达体系与植物基因工程	103
4.4.1	植物基因工程的目的基因	104
4.4.2	植物基因工程的载体——Ti质粒	106
4.4.2.1	Ti质粒的遗传特性、结构及功能	106
4.4.2.2	T-DNA的结构与功能	107
4.4.2.3	Vir区操纵子的基因结构与功能	108
4.4.2.4	植物基因转化的载体系统	108
4.4.3	植物组织培养与基因转化的受体系统	109
4.4.4	植物基因工程中常用的报告基因	110
4.4.5	植物基因转化方法	112
4.4.5.1	共培养法	113
4.4.5.2	病毒介导的基因转移	116
4.4.5.3	基因枪法介导的基因转化	119
4.4.5.4	PEG诱导的基因转化	122
4.4.5.5	脂质体介导的基因转化	123
4.4.5.6	电激法介导的基因转化	124
4.4.5.7	超声波介导的基因转化	125
4.4.5.8	显微注射介导的基因转化	125

4.4.5.9	激光微束介导的基因转化	126
4.4.5.10	种质系统介导的基因转化	126
4.4.6	外源基因在转基因植物中的表达调控	127
4.4.6.1	高等植物基因表达调控特点	128
4.4.6.2	转化外源基因的瞬时表达与稳定表达	129
4.4.6.3	DNA 序列对转化外源基因的表达调控	130
4.4.6.4	DNA 甲基化对转化外源基因表达的调控作用	131
4.4.7	提高转化外源基因表达的策略	132
4.4.8	植物基因工程中存在的问题及新策略	133
4.5	动物表达体系与动物基因工程	135
4.5.1	外源基因导入动物细胞的载体	135
4.5.2	动物基因转移中的遗传选择标记	136
4.5.3	外源 DNA 导入动物细胞的方法	137
4.5.4	动物的转基因技术及建立途径	137
4.5.5	转基因动物研究中存在的主要问题	140
第 5 章	转基因技术的应用	141
5.1	转基因技术在医学上的应用	141
5.1.1	基因治疗	142
5.1.1.1	基因治疗的原理	142
5.1.1.2	基因治疗的应用	142
5.1.1.3	基因治疗中所面临的几个问题	143
5.1.2	转基因技术与药用蛋白的生产	143
5.1.2.1	疫苗、抗原、抗体	144
5.1.2.2	药用酶类	145
5.1.2.3	生长因子	145
5.1.2.4	其他药用化合物	146
5.2	转基因技术在农业中的应用	147
5.2.1	转基因农作物	147
5.2.1.1	抗虫农作物	147
5.2.1.2	抗病毒农作物	148
5.2.1.3	抗除草剂农作物	149
5.2.1.4	抗胁迫农作物	149
5.2.1.5	转基因技术与细胞质雄性不育	149

5.2.2 转基因植物与日常生活	150
5.2.2.1 服装	150
5.2.2.2 园艺植物	151
5.2.2.3 食品和饮料	151
5.2.3 转基因动物	153
5.3 转基因技术在环境保护中的应用	155
5.4 转基因技术在工业中的应用	155
5.4.1 生物能源和燃料	155
5.4.2 木质素和造纸	156
5.4.3 塑料	156
主要参考书目	157

第 1 章 绪 论

2000年6月26日是人类历史上值得载入史册的一天，美、英、法、德、日、中六国科学家向全世界宣布：人类基因组工作草图绘制成功。这项在1990年正式启动的国际人类基因组计划（Human Genome Project，简称HGP）被誉为生命的“登月计划”，由6个国家的16个中心共上千名科学家参加，历时10年，耗资数十亿美元。值得骄傲的是：1999年中国科学家加入了这个绘制人类生命蓝图的计划，承担并完成了1%（3号染色体上3000万个碱基对）的测序工作。

不过，科学家们认为，呈现在我们面前的人类基因组全序列仍是一本遗传结构的“天书”，科学家还只能看懂其中的一点点内容。就完全理解人类基因系统而言，绘制出基因组草图只是第一步，相当于马拉松只跑出1km。美国某基因研究所所长则作了这样的一个比喻：有了基因图，就好比有了波音777的全部零部件目录，可还不知道怎样装配这些零件，也不知道怎样让飞机飞起来。华盛顿大学的一位基因研究人员说：“需要搞懂的东西还很多，逐段解释这部厚厚的‘生命天书’是件枯燥乏味的事，离开高功率计算机根本办不到，因为即使每秒读10个字，也要11年才能读完。”

毫无疑问，基因图将揭开人体奥秘，造福于全人类，无论是编写这部“天书”还是读懂这部“天书”，将它变成人类遗传信息的“活字典”，都离不开基因工程技术。

基因工程从其产生至今只经历了短短的几十年时间，几十年在人类的历史长河中只是短短的一瞬，但基因工程对人类的贡献却是目前无法估量的。我们还是从基因工程的产生谈起，带领大家走入基因工程之门。

1.1 基因工程的诞生

基因工程的发展道路并不是一帆风顺的。它是数十年来无数科学家辛勤劳动的成果和智慧的结晶。从20世纪40年代开始,由于受到分子生物学和分子遗传学发展的影响,基因分子生物学的研究取得了前所未有的进步,而这些学科的综合成就,又为基因工程的诞生奠定了坚实的理论基础。现在人们公认基因工程诞生于1973年。概括起来,从40年代到70年代初基因工程的诞生,其中现代分子生物学领域理论上的三大发现及技术上的三大发明起了决定性的作用。

1.1.1 理论上的三大发现

第一,40年代确定了遗传信息的携带者(即基因的分子载体)是DNA(脱氧核糖核酸)而不是蛋白质,从而明确了遗传的物质基础问题。1934年Avery在美国的一次学术会上首次报道了肺炎球菌(*Diprococcus pneumouas*)的转化,不仅证明DNA是生物的遗传物质,而且也证明了DNA可以把一个细菌的性状转给另一个细菌,理论意义十分重大。正如诺贝尔奖获得者Lederbevg指出的,Avery的工作是现代生物科学的革命开端,也可以说是基因工程的先导。

第二,在50年代揭示了DNA分子的双螺旋结构模型(图1-1)和半保留复制机理,解决了基因的自我复制和传递的问题。1953年,Walson和Crick提出了DNA结构的双螺旋模型,即DNA分子是由A(腺嘌呤核苷酸)、G(鸟嘌呤核苷酸)、C(胞嘧啶核苷酸)、T(胸腺嘧啶核苷酸)四种核苷酸按一定的顺序排列而成的,呈双螺旋结构,Walson和Crick因此获得了诺贝尔奖。这一发现对于生命科学的发展,足以和达尔文的生物进化学说、孟德尔的遗传定律相提并论。

第三,在50年代末期和60年代,相继提出了“中心法则”和操纵子学说,并成功地破译了遗传密码,从而阐明了遗传信息的流向和表达问题。1961年Monod和Jacob提出了操纵子学说。以Nireberg等为代表的一批科学家,经过艰苦的努力,确定遗传信息是以