

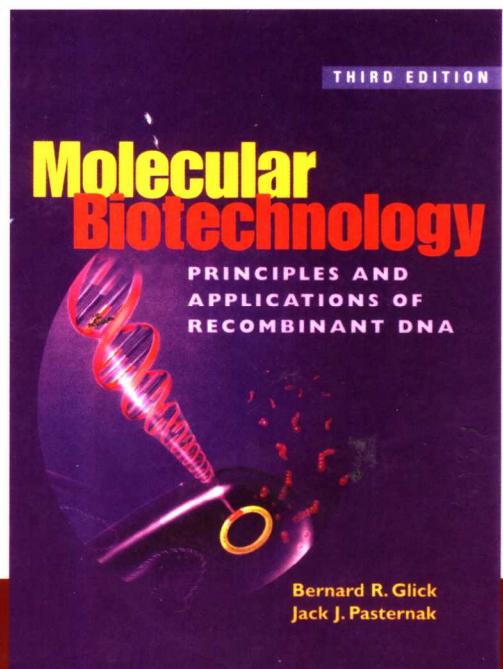
分子生物技术

—重组DNA的原理与应用

(原著第三版)

[美] B.R.格利克 J.J.帕斯捷尔纳克 编
陈丽珊 任大明 主译

Chemical Industry Press



化学工业出版社
现代生物技术与医药科技出版中心



分子生物技术 ——重组 DNA 的原理与应用

(原著第三版)

Molecular Biotechnology
Principles and Applications of Recombinant DNA

[美]B. R. 格利克 J. J. 帕斯捷尔纳克 编

Bernard R. Glick Jack J. Pasternak

陈丽珊 任大明 主译



化学工业出版社
现代生物技术与医药科技出版中心

(京)新登字039号

图书在版编目(CIP)数据

分子生物技术——重组DNA的原理与应用：第三版/[美]格利克(Glick, B. R.), [美]帕斯捷尔纳克(Pasternak, J. J.)编；
陈丽珊,任大明主译。—北京：化学工业出版社，2005.1

书名原文：Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA

ISBN 7-5025-6171-4

I. 分… II. ①格…②帕…③陈…④任… III. ①分子生物学-应用
②生物技术-应用 IV. ①Q7②Q819

中国版本图书馆CIP数据核字(2004)第101968号

Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA, 3rd Edition/Edited by Bernard R. Glick, Jack J. Pasternak

ISBN 1-55581-224-4

Copyright © 2003 by ASM Press. All rights reserved.

Authorized translation from the English language edition Published by American Society for Microbiology (ASM) Press, 1752 N St. NW, Washington, DC 20036-2904.

本书中文简体字版由American Society for Microbiology (ASM) Press授权化学工业出版社独家出版发行。

未经许可，不得以任何方式复制或抄袭本书的任何部分。

北京版权局著作权合同登记号：01-2003-5528

**分子生物技术
——重组DNA的原理与应用**

(原著第三版)

[美] B. R. 格利克 J. J. 帕斯捷尔纳克 编

陈丽珊 任大明 主译

责任编辑：莫小曼 麻雪丽

文字编辑：李瑾

责任校对：陶燕华

封面设计：关飞

*

化 学 工 业 出 版 社 出 版 发 行
现代生物技术与医药科技出版中心

(北京市朝阳区惠新里3号 邮政编码100029)

发行电话：(010) 64982530

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

*

新华书店北京发行所经销
北京永鑫印刷有限责任公司印刷
三河前程装订厂装订

开本 787mm×1092mm 1/16 印张 37 1/4 字数 909 千字

2005年3月第1版 2005年3月北京第1次印刷

ISBN 7-5025-6171-4/Q·118

定 价：80.00 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

中文版序言

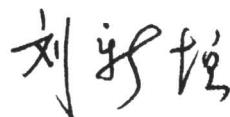
在世界生物技术进入大规模产业化、生物经济时代即将来临之际，B. R. 格利克和 J. J. 帕斯捷尔纳克两位学者于 2003 年撰写的《分子生物技术——重组 DNA 的原理与应用》(原著第三版)，经过复旦大学生命科学学院陈丽珊讲师和任大明教授等人的辛勤劳动以及出版社同仁的努力工作，同中国生命科学和生物技术领域学术界、教育界和企业界等广大的同仁见面了。在此，我表示衷心的祝贺。

《分子生物技术——重组 DNA 的原理与应用》是美国微生物学会向学术界推荐的一部好书。此书以深入浅出的方式阐述了分子生物技术的先进理论和发展前景；运用最新的范例，评述了微生物分子生物技术在预防、治疗、诊断、环保、生物质利用、菌肥和杀虫剂的制造等方面的应用进展，提出了利用基因工程菌进行大规模发酵生产的若干关键问题，描述了植物和动物的分子生物技术发展，介绍了利用重组 DNA 技术分离人类致病基因和基因治疗的状况；还说明了分子生物技术的操作规范和专利申请。因此，此书具有内容较全面、应用事例较新颖和理论与实际应用结合较紧密的特点。

大家知道，生物技术产业是当今世界经济中极富活力的先导性产业和战略性产业。生命科学研究的一系列突破和生物技术开发成果的不断涌现，将持续促进生物技术产业乃至整个国民经济的发展。因而，加速生物技术产业的发展，抢占新一轮国际竞争的制高点，已经成为世界各国的经济社会发展战略的重点之一。我国作为世界上最大的发展中国家，理应抓住生物经济发展所带来的跨越式发展的历史机遇，通过加强专业人才培养、生命科学的研究和生物技术开发，不断加速生物技术产业的发展，推进以知识经济和循环经济为主的新型经济的发展。

有鉴于此，从加强生物技术专业人才培养、有利于生物技术产业发展和适应生物经济发展的角度看，我认为《分子生物技术——重组 DNA 的原理与应用》一书可充实我国生物技术领域工作人员的专业知识，既可作为生命科学学院或生物工程学院大学生的选修教材，又可作为生物技术企业的科技人员和管理人员的参考书籍。

中国科学院院士、第三世界科学院院士、乌克兰科学院外籍院士



2004 年 6 月

译者的话

现在已有许多分子生物学方面的参考书可供选择，而这本书有着独特的风格，首先它是加拿大沃特卢大学针对生物和工程学科的高年级本科生及研究生开设的生物技术课程的一本教学用书。不仅内容全面丰富，资料详实新颖，用词生动有趣；而且在形式的编排方面，也充分注重可读性。比如它具有纲要式的开头与结尾，并附有复习题，有助于读者总结和思考。同时插图很多，使人一目了然。其次，本书自始至终贯穿理论结合实际这一基本思路，这使读者不仅掌握了技术，而且了解如何在实践中正确地应用这些技术。在此方面，此书可谓独具匠心。

分子生物技术无疑是发展迅速的成长型学科，短短两三年内就会涌现许多新的技术和新的名词。即使在国内最新出版的专业词汇中，这些内容也难以全部囊括。为了把握准确的意思，有时常常需要查阅许多书籍，每一章节的翻译都要经过2~3遍的校对。因此，翻译此书无疑经历了一次学习和锻炼的艰难旅程。尽管如此，错误仍在所难免，衷心企盼有关专家、学者能不吝赐教，批评指正。

本书的翻译过程，得到了许多老师与同学的大力关心与支持。感谢刘新垣院士为本书所作的序言，他在百忙之中关心青年工作者的成长，使人深为敬仰。感谢导师任大明教授自始至终的关心和指导。感谢张伯生、王磊副教授为相关章节所作的审校。感谢参与此书翻译工作的孙嘉康、陈肖楚、符薇、严奇、李凤梅、李晓晖、王校、黄路标、周孟宁、兰和魁、黄建生、王荫榆、郭晓凌、李盛华、刘高峰等，正是他们的无私帮助，使我顺利克服翻译过程中遇到的困难，在此还要感谢马奎蒙副教授在本书翻译完成之时提供的支持。感谢我的家人给予精神上的鼓励和生活上的照顾，使我免去后顾之忧，全心全意投入这项工作。

热切希望本书的出版能对广大读者有所裨益，理论联系实际，加速发展祖国的生物产业，使21世纪真正成为生物技术的世纪。

陈丽珊
2004年5月28日
于复旦大学遗传所

前 言

自从 1998 年《分子生物技术——重组 DNA 的原理与应用》第二版面世以来，分子生物技术取得了突破性的进展。若非如此，本书就没有再版的必要。分子生物技术不再是建立在人们希望有朝一日能够利用重组 DNA 技术产生有价值的“产品和服务”的美好愿望之上。近四年 来，许多分子生物产品已经普遍应用于医药、农业和工业方面。分子生物技术最终实现了当初的预言。随着技术的发展成熟，不断有新的进展和革命性的技术需要完善。新版《分子生物技术——重组 DNA 的原理与应用》在保留原来框架的基础上，对所有方面都进行了更新。许多章节重新纳入了新的信息，有些章节与其他章节合并，并加入许多新的图形以阐述原理和概念，除此之外，采用许多新的例子代替了旧版中 1990 年前后或更早的例子。正如旧版的前言所说，我们努力做到既不混淆科学名词，又尽可能将例子解释清楚。

衷心感谢 ASM 出版社的 Jeff Holtmeier 主任的支持及鼓励。感谢 Mary McKenney 以娴熟的技术理解能力编辑了书稿。特别要感谢 ASM 出版社的 Ken April，他以认真的态度自始至终指导我们工作，重新组织毫无关联的部分，最后完成这一新的版本。

SBJ78/06

第一版前言

分子生物技术作为新的研究领域出现，源于 20 世纪 70 年代重组 DNA 技术与传统工业微生物学的结合。不管你是在电影院里观看《侏罗纪公园》这部富有独创性但缺乏科学依据的克隆恐龙的电影，还是阅读报纸上关于延长保存周期的“生物技术”番茄商品化的文章，或者听到人们就遗传工程可能产生的可怕后果而对生物技术提出的批评，这都证明重组 DNA 技术已引起人们的普遍关注。本书介绍及解释分子生物技术究竟是一门什么样的学科，如何进行这些领域的研究以及这些技术将如何影响我们未来的生活。

我们编写的《分子生物技术——重组 DNA 的原理与应用》，已作为讲授生物技术、重组 DNA 技术、遗传工程或任何介绍现代分子生物学方法的原理及应用的课程教材。本书以 12 年来我们为沃特卢大学（Waterloo University）生物和工程学科的高年级本科生及研究生开设的生物技术课程为基础。这一教材面向初步了解生物化学、遗传学和微生物学的学生。我们也意识到，在选修生物技术这门课之前，学生不可能已经上过所有这些课程，因此在深入讨论分子的细节之前，我们提出概念，并解释其延伸的生物学内涵。

这一教材重点讲述如何利用重组 DNA 技术产生不同的有用产品。我们尽可能引用实验结果及真实的方法策略来阐述基本概念，并设法通过分子生物技术操作获得科学探险的体验和感受。本书从快速增多的大量文献中选择一些例子，不仅说明特定的要点，还为读者理解目前分子生物技术某些专业领域的研究奠定了坚实的基础。尽管这样，我们认为本书出版时有些例子可能会过时，因为分子生物技术是发展如此迅速的学科。

为了方便研究人员的日常工作，每一学科都常常形成一些专业词汇及术语。本书中我们尽量减少使用专业术语，并在很多时候，特意使用一些简单的短语来描述一个现象或过程，虽然应用专业术语来表达可能更为简洁。任何领域都存在解释相同现象的同义词，分子生物技术中如重组 DNA 技术、基因克隆和基因工程在广义上意思相同。如果第一次出现一个重要的术语或概念，则同时附上同义词或类似的表达。书后附有内容广泛的词汇表，帮助读者掌握分子生物技术词汇。

每章都有提纲挈领的开头和结尾，并附有复习题培养学生论述和思考的能力。书中通过大量图例来详细阐述所有重要的观点，因为教学法认为，一幅图胜过千言万语。第一章介绍了分子生物技术作为一种科学对经济的影响，随后的五章（第二章至第六章）讲述有关分子生物技术的方法学。第一部分的章节是全书其他章节的基础。第二部分的第七章至第十二章列举微生物分子生物技术的例子，涵盖了代谢产品、疫苗、治疗、诊断、生物修复、生物质利用、细菌肥料和微生物杀虫剂等主题。第十三章描述了利用基因工程（重组）微生物进行大规模发酵的一些关键组成部分。第三部分描述植物及动物的分子生物技术（第十四章及第十五章）。第十六章和第十七章介绍利用重组 DNA 技术来分离人类致病基因以及如何试图通过遗传操作治疗人类遗传疾病，虽然其研究还处在早期阶段。第四部分包括分子生物技术的规范及专利申请。

每章末附有简单的参考文献。大部分章节引自不同研究者发表的论文。虽然正文并未直接标注参考文献，但都在后面列出。有些时候，因为我们手持“教学执照”，所以可以从原始论文中直接选取数据或者重新组合。显然，我们是对这些简化过程产生的误解和错误负责的，尽力避免这种情况发生。文献部分也包括我们一般引用的其他论文，读者可以参考以进一步了解详细的专题。

致谢

感谢本书编写过程中参与审阅书稿不同章节的人们。这些专家和老师的意见给予我们极大的帮助：普度大学的 Arthur I. Aronson；路易斯维尔大学的 Ronald M. Atlas；马萨诸塞州总医院的 Fred Ausubel；康涅狄格大学的 David R. Benson；宾夕法尼亚州立大学的 Jean E. Brenchley；伊利诺伊大学芝加哥分校的 A. M. Chakrabarty；普度大学的 Stan Gelvin；伊利诺伊大学厄本那-香槟分校的 Janet H. Glaser；剑桥神经生物学的 David Gwynne；印第安纳大学的 George D. Hegeman；马里兰大学巴尔的摩分校的 James B. Kaper；位于臣尼市和斯波坎市的东华盛顿大学的 Donald R. Lightfoot；华盛顿大学的 Cynthia Moore；维吉尼亚理工学院的 William E. Newton；多伦多大学米西索加分校的 Danton H. O'Day；华盛顿大学的 Richard D. Palmiter；梅约医学中心的 David H. Persing；威斯康星大学的 William S. Reznikoff；沃特卢大学的 Campbell W. Robinson 和 Marc Siegel；Genentech 公司的 Aaron J. Shatkin；鲁特哥大学先进生物科技与医药中心的 Jim Schwartz；马里兰大学的 Daniel C. Stein；堪萨斯州立大学的 Dean A. Stetler 以及康涅狄格大学的 Robert T. Vinopal。

我们也对参与本书出版的 ASM 出版社员工表示感谢：Susan Birch，高级制作编辑；Ruth Siegal，策划编辑；Jodi Simpson，文字编辑；Susan Schmidler，设计及美术总监；Ruttle, Shaw & Wetherill 公司的高级项目经理 Peg Markow 以及图像的绘制者。最后，我们衷心感谢 ASM 出版社主任 Patrick Fitzgerald，他尽可能地帮助我们把最初的努力变成最终人们可以接受的形式。他的鼓励就像一种永恒而友好的“磨砺”，使我们深为感激。

B. R. 格利克
J. J. 帕斯捷尔纳克

目 录

第一部分 分子生物技术基础

第一章 分子生物技术的革命	3
重组 DNA 技术	3
分子生物技术的出现	5
分子生物技术的商业化	8
关注和影响	9
总结	11
参考文献	11
复习题	11
第二章 分子生物技术中的生物系统	13
原核生物和真核生物	13
大肠杆菌	14
酿酒酵母	15
原核生物和真核生物的分泌途径	16
真核生物细胞的培养	18
总结	18
参考文献	19
复习题	19
第三章 DNA、RNA 及蛋白质的合成	20
DNA 的结构	20
DNA 的复制	23
解码遗传信息：RNA 和蛋白质	25
翻译	29
细菌中 mRNA 转录的调控	32
真核生物中 mRNA 转录的调控	35
总结	37
参考文献	38
复习题	38
第四章 重组 DNA 技术	40
限制性内切核酸酶	41
质粒克隆载体	48

质粒克隆载体 pBR322	49
转化和筛选	50
其他质粒克隆载体	52
构建和筛选基因文库	54
建立基因文库	54
DNA 杂交筛选	57
免疫学检测法筛选	60
蛋白质活性法筛选	61
克隆编码真核生物蛋白质的 DNA 序列	62
克隆大片段 DNA 的载体	66
λ 噬菌体载体	66
黏性质粒	68
大容量的细菌载体系统	69
原核生物基因转移	71
将 DNA 转入大肠杆菌	71
电穿孔	71
接合作用	71
总结	72
参考文献	73
复习题	74
第五章 DNA 的化学合成、测序和扩增	75
DNA 的化学合成	75
亚磷酰胺法	75
应用合成的寡核苷酸	79
DNA 测序技术	85
双脱氧法进行 DNA 测序	85
DNA 自动化测序	87
M13 噬菌体作为测序载体	88
引物步移法	89
PCR	90
PCR 进行基因合成	92
循环测序	94
总结	94
参考文献	95
复习题	96
第六章 原核生物基因表达的调控	97
调节型强启动子控制下的基因表达	97
调节型启动子	98
增加蛋白质产量	100
大规模系统	100

其他微生物中的表达	102
融合蛋白	103
融合蛋白的切割	103
融合蛋白的应用	104
表面展示	106
单向串联基因排列	108
翻译表达载体	109
增强蛋白质的稳定性	112
蛋白质折叠	112
克服缺氧	114
应用蛋白酶缺陷的宿主品系	114
细菌的血红蛋白	114
宿主染色体 DNA 整合	115
去除选择性标记基因	117
增加分泌	118
L 型细菌	119
代谢负荷	121
总结	123
参考文献	124
复习题	126
第七章 异源蛋白在真核生物细胞中的表达	128
酿酒酵母表达系统	130
酿酒酵母载体	131
外源蛋白在酿酒酵母中的细胞内表达	133
酿酒酵母分泌表达异源蛋白质	134
巴斯德毕赤酵母及其他酵母表达系统	135
杆状病毒——昆虫细胞表达系统	137
杆状病毒表达载体系统	138
提高重组杆状病毒的产量	139
大肠杆菌-昆虫细胞杆状病毒穿梭载体的构建	140
昆虫细胞中哺乳动物前体蛋白的糖基化和加工	141
哺乳动物细胞表达系统	142
哺乳动物细胞表达载体的选择性标记系统	144
总结	146
参考文献	147
复习题	149
第八章 定向诱变及蛋白质工程	150
定向诱变过程	151
利用 M13 DNA 进行的寡核苷酸定向诱变	151
利用质粒 DNA 进行寡核苷酸定点诱变	153

PCR 扩增进行寡核苷酸诱变	154
利用简并寡核苷酸引物随机诱变	155
核苷酸类似物随机诱变	156
易错 PCR	157
DNA 重排	158
含有特殊氨基酸的突变蛋白	159
蛋白质工程	159
加入二硫键	160
将天冬酰胺改变为其他氨基酸	162
减少自由巯基的数目	163
增加酶活力	163
改变金属辅助因子的需求	165
降低酶的敏感性	166
改变蛋白质特异性	167
增加酶的稳定性和专一性	169
改变多重性质	169
总结	171
参考文献	172
复习题	173

第二部分 微生物系统的分子生物技术

第九章 分子诊断	177
免疫诊断方法	178
酶联免疫吸附分析	178
单克隆抗体	179
杂交细胞的形成与筛选株的鉴定	180
产生特异性抗体杂交细胞株的鉴定	181
DNA 诊断系统	182
杂交探针	182
疟疾的诊断	183
检测克氏锥虫	185
非放射性杂交方法	185
分子信标	186
DNA 指纹	187
随机扩增 DNA 多态性	189
细菌生物传感器	190
遗传疾病的分子诊断	191
筛选囊肿性纤维化	191
镰刀状细胞贫血	191
PCR/OLA 方法	192

挂锁探针.....	194
荧光标记的 PCR 引物作遗传图	194
总结.....	195
参考文献.....	196
复习题.....	197
第十章 治疗药剂.....	199
药物.....	201
分离干扰素的 cDNA	201
人干扰素.....	201
人生长激素.....	202
TNF- α	203
优化基因表达.....	204
通过肠道细菌产生和传递药物.....	205
酶.....	205
DNA 酶 I	205
藻酸盐裂解酶.....	206
苯丙氨酸氨裂合酶.....	207
α_1 -抗胰蛋白酶	208
单克隆抗体作为治疗药物.....	208
抗体的结构和功能.....	210
防止器官移植的排斥.....	211
治疗脑肿瘤.....	211
化学连接单克隆抗体.....	211
人单克隆抗体.....	213
人-鼠杂合的单克隆抗体	214
在大肠杆菌中产生抗体.....	216
噬菌体组合文库.....	216
CDR 序列重排	219
单链抗体.....	219
核酸作为治疗药物.....	220
反义 RNA	221
反义寡核苷酸.....	222
核酶.....	224
RNA-DNA 杂合分子	226
RNA 干扰	226
抗体基因.....	227
遗传性疾病的治疗.....	228
人类基因治疗.....	231
药物前体激活疗法.....	235
总结.....	236

参考文献	237
复习题	240
第十一章 疫苗	242
亚单位疫苗	244
单纯疱疹病毒	244
口蹄疫	245
多肽疫苗	245
基因免疫：DNA 疫苗	248
减毒疫苗	251
霍乱	251
沙门菌	252
利什曼原虫	253
单纯疱疹病毒	254
疫苗载体	255
抗病毒疫苗	255
抗细菌疫苗	258
细菌作为抗原呈递系统	260
总结	261
参考文献	261
复习题	263
第十二章 重组微生物生产商业化产品	265
限制性内切酶	265
生物小分子	268
L-抗坏血酸的合成	268
靛蓝的微生物合成	271
氨基酸的合成	272
油脂的清除	274
抗生素	275
克隆抗生素合成基因	276
合成新抗生素	278
聚酮类抗生素	279
改进抗生素生产	283
抗菌肽	284
生物高分子	284
野油菜黄单胞菌工程化进行黄原胶的廉价生产	285
分离黑色素合成基因	286
在微生物细胞中生产动物黏附聚合物	287
橡胶的微生物合成	288
微生物合成聚羟基脂肪酸酯	288
总结	290

参考文献	290
复习题	292
第十三章 生物修复和生物量利用	294
异型生物质的微生物降解	294
生物降解途径中的基因操作	298
通过质粒转换的操作	298
通过基因变异的操作	299
淀粉和糖的利用	304
商业产品：果糖和乙醇	305
改进乙醇的生产	306
改进果糖的生产	308
运动发酵单胞菌	310
青饲料发酵	312
纤维素的应用	313
木质纤维素的组分	313
原核生物纤维素酶基因的分离	315
真核生物纤维素酶基因的分离	316
纤维素酶基因的操作	318
总结	319
参考文献	320
复习题	321
第十四章 植物促生菌	323
固氮作用	324
固氮酶	325
固氮酶的组分	325
固氮酶基因簇的基因工程	326
糖原合成酶突变体	329
控制含氧量	330
氢化酶	330
氢的代谢	330
氢化酶基因的遗传工程	331
结瘤	332
结瘤生物之间的竞争	332
结瘤基因的遗传工程	332
依靠自由生长细菌促进植物生长	337
降低植物压力	338
植物修复	340
病原体的生物控制	341
铁载体	342
抗生素	343

酶类	345
冰核形成和抗冻蛋白	345
乙烯	347
根部定殖作用	348
总结	348
参考文献	349
复习题	351
第十五章 微生物杀虫剂	352
苏云金芽孢杆菌的杀虫毒素	353
作用方式及其用途	353
分离毒素基因	356
苏云金芽孢杆菌毒素基因工程	357
防止耐受的形成	363
遗传工程改良生物防治	364
作为生物防治剂的杆状病毒	365
作用方式	365
遗传工程改良生物防治	366
总结	368
参考文献	369
复习题	371
第十六章 重组微生物大规模生产蛋白质	373
微生物培养的原理	374
批式发酵	374
补料批式发酵	376
连续发酵	376
发酵过程效率的最优化	378
高密度细胞培养	379
生物反应器	380
典型的大规模发酵系统	382
串联气升式反应器中的两步法发酵	383
单个搅拌槽式反应器的两步发酵法	384
批式与补料批式发酵	385
微生物细胞的收获	386
微生物细胞的破碎	387
下游加工	389
蛋白质溶解	390
质粒 DNA 的大规模生产	390
总结	391
参考文献	392
复习题	393

第三部分 真核生物系统

第十七章 植物基因工程：方法篇	397
利用土壤农杆菌的 Ti 质粒进行植物转化	397
Ti 质粒衍生的载体系统	400
植物转基因的物理方法	403
微粒轰击	404
报告基因在转化植物细胞中的应用	406
植物基因表达的操作	407
不同启动子的分离和应用	407
定向诱变植物的 DNA	409
定向诱变植物的 RNA	409
外源 DNA 插入叶绿体的基因组	410
分泌外源蛋白	411
无标记转基因植物的培育	412
从核 DNA 中剔除标记基因	413
从叶绿体 DNA 中剔除标记基因	414
总结	414
参考文献	415
复习题	417
第十八章 植物基因工程：应用篇	418
培育抗虫、抗病和抗除草剂的植物	418
抗虫植物	418
抗病毒植物	425
抗除草剂植物	430
抗真菌、抗细菌植物	432
抗胁迫和抗衰老植物的培育	434
氧化胁迫	435
盐胁迫	436
果实催熟和花朵枯萎	438
花色素基因的操作	439
植物营养成分的改变	442
氨基酸	442
脂类	443
维生素	444
铁	446
食用植物味道和外观的改变	447
防止褪色	447
甜度	448
淀粉	449