



面向 21 世纪 课 程 教 材
Textbook Series for 21st Century

基因工程原理与应用

陈 宏 主 编

中 国 农 业 出 版 社

Principle and Application of Genetic Engineering

ISBN 7-109-08557-0



9 787109 085572 >

定价：37.30 元

面向 21 世纪课程教材
Textbook Series for 21st Century

基因工程原理与应用

陈 宏 主编

中国农业出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

基因工程原理与应用 / 陈宏主编. —北京: 中国农业出版社, 2003.12
面向 21 世纪课程教材
ISBN 7-109-08557-0

I. 基... II. 陈... III. 基因-遗传工程-高等学校-教材 IV. Q78

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2003) 第 113408 号

中国农业出版社出版
(北京市朝阳区农展馆北路 2 号)
(邮政编码 100026)
出版人: 傅玉祥
责任编辑: 李国忠

中国农业出版社印刷厂印刷 新华书店北京发行所发行
2004 年 1 月第 1 版 2004 年 1 月北京第 1 次印刷

开本: 850mm×1168mm 1/16 印张: 26.75

字数: 635 千字

定价: 37.30 元

(凡本版图书出现印刷、装订错误, 请向出版社发行部调换)

主 编 陈 宏(西北农林科技大学)

副 主 编 易自力(湖南农业大学)

张金文(甘肃农业大学)

编写人员 (按姓氏拼音顺序排列)

陈 宏(西北农林科技大学)

范三红(西北农林科技大学)

李碧春(扬州大学)

李浩戈(沈阳农业大学)

李景鹏(东北农业大学)

李莉云(河北农业大学)

林自斌(云南农业大学)

潘庆杰(华南农业大学)

孙怀昌(扬州大学)

王永清(四川农业大学)

易自力(湖南农业大学)

张金文(甘肃农业大学)

朱苏文(安徽农业大学)

主 审 郭蔼光(西北农林科技大学)

前 言

近 30 年来,现代生物科学迅速发展,一系列新技术、新方法不断涌现,生物学家在揭示生命奥秘和改造生物方面已经做出了重大贡献,同时也开拓了不少新的研究领域,从而全面地改变了生物科学的研究现状。其中,最引人注目并被公认的是以重组 DNA 为中心的基因工程学。基因工程学是以生物化学、分子生物学和分子遗传学等学科为基础而发展起来的一门新兴技术学科,它的应用已广泛涉及医学、农业、工业、水产、环保等行业。

本书共 16 章,可分为 4 大块,第一部分是基因工程的基本原理和操作步骤,包括第二章(基因工程工具酶)、第三章(基因工程载体)、第六章(基因组文库的构建与目的基因的获得)、第七章(DNA 体外重组与基因转移)、第八章(重组子的筛选与鉴定)和第九章(外源基因的表达);第二部分主要讲述基因工程的应用,包括第十章(微生物基因工程)、第十一章(植物基因工程)和第十二章(动物基因工程);第三部分主要讲述以核酸为主的各种分子操作技术,包括第四章(核酸操作的基本技术)、第五章(聚合酶链式反应)、第十三章(分子标记及基因芯片技术与应用)和第十四章(差异显示技术及其应用);第四部分主要讲述生物信息学和基因工程的安全性问题,包括第十五章(生物信息学)和第十六章(基因工程规则、专利及安全性)。陈宏编写第一章;李莉云编写第二章;林良斌编写第三章;王永清编写第四章;李景鹏编写第五章;孙怀昌编写第六章;朱苏文、陈宏编写第七章和第八章;李浩戈编写第九章;张金文编写第十章;易自力编写第十一章;潘庆杰、陈宏编写第十二章;李碧春、陈宏编写第十三章;李碧春、李景鹏编写第十四章;范三红编写第十五章和第十六章;全书由主编统稿和定稿。

本书可作为高等院校生物技术、生物工程、医学、农学、园艺、畜牧、兽医、植保等生命学科各有关专业本科生和研究生教材,同时对从事基因工程的教学、科研人员也是一本有益的参考书。考虑到本课程的系统性,全书按 80 学时编写,根据专业需要,课堂讲授时可有所取舍。

郭蔼光教授审阅了全书,为本书提出了不少宝贵的修改意见。西北农林科技大学教务处和中国农业出版社的同志在本教材出版过程中给予了热情的指导、帮助与支持,在此一并表示衷心的感谢。此外,本书的部分插图引自书后相关参考文献,在此向原书作者表示感谢。

由于基因工程的发展异常迅速，加之编写人员时间仓促，水平有限，缺点和错误在所难免，敬请各位读者批评指正，以便将来进一步修改完善。

陈 宏
2003 年 10 月

目 录

前言

第一章 绪论	1
第一节 基因工程的概念	1
第二节 基因工程的诞生与发展	2
一、基因工程诞生的理论基础	2
二、基因工程的诞生	3
三、基因工程的发展	4
第三节 基因工程研究的主要内容	5
一、基因工程研究的主要内容	5
二、基因工程的基本操作程序	7
三、基因工程的基本操作内容	7
第四节 基因工程的意义与发展前景	8
一、基因工程研究的意义	8
二、基因工程发展前景	8
本章小结	8
思考题	9
第二章 基因工程工具酶	10
第一节 限制性核酸内切酶	10
一、宿主的限制和修饰现象	10
二、限制性核酸内切酶的类型	11
三、限制性核酸内切酶的命名	12
四、II型限制性核酸内切酶的基本特性	13
五、II型限制性核酸内切酶的反应条件	17

六、影响限制性核酸内切酶活性的因素	18
第二节 DNA 连接酶	20
一、概念与机理	20
二、DNA 连接酶的种类	22
三、DNA 连接酶的反应体系	23
四、影响连接反应的因素	23
第三节 DNA 聚合酶	24
一、大肠杆菌 DNA 聚合酶 I	25
二、Klenow 片段	26
三、T4 噬菌体 DNA 聚合酶	27
四、T7 噬菌体 DNA 聚合酶与测序酶	28
五、Taq DNA 聚合酶	28
六、逆转录酶	29
第四节 末端脱氧核苷酸转移酶	29
第五节 核酸酶	30
一、核糖核酸酶	30
二、脱氧核糖核酸酶 I	32
三、S1 核酸酶	32
第六节 核酸外切酶	33
一、大肠杆菌核酸外切酶 VII	34
二、大肠杆菌核酸外切酶 III	34
三、Bal 31 核酸酶	35
第七节 T4 噬菌体多核苷酸激酶	35
一、T4 噬菌体多核苷酸激酶的性质	35
二、多核苷酸激酶用途	37
第八节 碱性磷酸酶	37
一、碱性磷酸酶的性质	37
二、碱性磷酸酶用途	37
本章小结	38
思考题	40
第三章 基因工程载体	41
第一节 质粒载体	41
一、质粒的一般生物学特性	41
二、理想质粒载体的必备条件	44
三、质粒载体的构建	45
四、常用的质粒载体类型	48

第二节 λ 噬菌体载体	52
一、 λ 噬菌体的生物学特性	52
二、 λ 噬菌体载体的构建	53
三、常用的 λ 噬菌体载体	55
第三节 单链 DNA 噬菌体载体	57
一、M13 噬菌体的生物学特性	57
二、M13 噬菌体载体的构建	58
三、M13 噬菌体载体的主要用途	59
四、噬菌粒载体	60
第四节 黏粒载体	60
一、黏粒载体的基本特点	61
二、黏粒载体的构建	62
三、黏粒载体在基因克隆中的应用	62
四、常用的黏粒载体及应用	63
第五节 其他载体	64
一、人工染色体	64
二、植物基因工程载体	65
三、动物基因工程载体	68
第六节 表达载体	74
一、表达载体构建的一般原则	74
二、植物表达载体	77
本章小结	82
思考题	83
第四章 核酸操作的基本技术	84
第一节 核酸的提取与纯化	84
一、基本原理	84
二、微生物 DNA 的提取	86
三、动物细胞 DNA 的提取	88
四、植物细胞核 DNA 的提取	90
五、核外 DNA 的提取	92
六、RNA 的提取	94
第二节 核酸的检测与保存	97
一、核酸的检测	97
二、核酸的保存	100
第三节 核酸的凝胶电泳	101
一、琼脂糖凝胶电泳	101

二、聚丙烯酰胺凝胶电泳	103
三、脉冲电场凝胶电泳	104
第四节 核酸分子杂交	104
一、探针的制备	105
二、核酸杂交	106
本章小结	109
思考题	109
第五章 聚合酶链式反应	110
第一节 聚合酶链式反应扩增原理	110
第二节 聚合酶链式反应体系	112
一、聚合酶链式反应操作程序	112
二、聚合酶链式反应的成分	112
三、聚合酶链式反应的条件	114
第三节 聚合酶链式反应引物设计原则	115
一、引物设计的一般原则	116
二、引物 3' 端的末位碱基	116
三、引物设计软件	116
第四节 聚合酶链式反应技术类型	118
一、已知 DNA 序列的聚合酶链式反应扩增	118
二、逆转录聚合酶链式反应	120
三、已知 cDNA 一端序列获得全长 cDNA 的聚合酶链式反应	121
四、已知侧翼序列聚合酶链式反应扩增	123
五、未知序列聚合酶链式反应扩增	125
六、定量聚合酶链式反应	128
七、免疫相关聚合酶链式反应	128
八、聚合酶链式反应技术衍生的分子标记	129
第五节 聚合酶链式反应技术应用	129
一、核酸的基础研究	130
二、序列分析	130
三、检测基因表达	130
四、从 cDNA 库中放大特定序列	131
五、研究已知片段邻近基因或未知 DNA 片段	131
六、进化分析	131
七、医学应用	131
八、分析生物学证据	132
九、性别控制	132

十、转基因检测	132
本章小结	133
思考题	133
第六章 基因文库的构建与目的基因的获得	134
第一节 真核基因组 DNA 文库的构建	134
一、用于构建基因组文库的载体	134
二、基因组 DNA 克隆片段的制备	137
三、重组 DNA 分子的构建	138
四、重组 DNA 分子导入受体细胞	139
五、基因文库的大小及代表性	140
六、基因文库的扩增、分装及保存	140
第二节 cDNA 文库的构建	141
一、mRNA 的提取及其完整性的确定	141
二、cDNA 克隆载体的选择	143
三、cDNA 克隆片段的获得	143
四、cDNA 克隆的操作流程	147
五、cDNA 克隆片段的分析	148
六、完整 cDNA 文库的生成	148
七、cDNA 文库的扩增、分装及保存	148
第三节 目的基因的获得	149
一、对已知序列基因的分离	149
二、对未知序列基因的分离	151
三、基因的人工合成	153
本章小结	153
思考题	154
第七章 DNA 体外重组与基因转移	155
第一节 重组 DNA 分子的构建	155
一、重组 DNA 的概念	155
二、载体 DNA 与外源基因片段的连接	156
第二节 基因转移	162
一、重组 DNA 向细菌细胞转入	163
二、外源目的基因向真核细胞转入	164
本章小结	166
思考题	166

第八章 重组子的筛选与鉴定	167
第一节 遗传学检测法	168
一、根据载体表型特征的筛选	168
二、根据插入基因遗传性状的筛选	169
第二节 核酸分子杂交检测法	170
一、菌落印迹原位杂交	170
二、斑点印迹杂交	170
三、Southern 印迹杂交	171
第三节 物理检测法	171
一、直接凝胶电泳检测法	171
二、限制性核酸内切酶酶切片段分析法	172
第四节 免疫化学检测法	172
一、放射性抗体检测法	173
二、免疫沉淀检测法	173
三、Western 印迹分析法	174
第五节 核酸序列分析及其他方法	174
一、核酸序列分析	174
二、PCR 法	174
三、Northern 印迹分析	174
本章小结	175
思考题	175
第九章 外源基因的表达	176
第一节 外源基因在大肠杆菌中的表达	176
一、正确表达的基本条件	177
二、常用的大肠杆菌表达载体	177
三、外源蛋白质表达部位	183
四、提高外源基因表达效率的方法	184
五、表达产物的检测	188
六、表达实例：人生长素基因在大肠杆菌中的表达	188
第二节 真核细胞表达系统概述	191
一、酵母表达体系	191
二、昆虫细胞表达体系	192
三、哺乳动物细胞表达体系	193
本章小结	194
思考题	194

第十章 微生物基因工程	195
第一节 细菌基因工程	195
一、实现外源基因表达的基本操作	196
二、大肠杆菌工程菌的构建策略	198
三、基因工程菌遗传不稳定性及其对策	208
四、细菌表达异源蛋白的流程	211
第二节 酵母菌基因工程	212
一、酵母菌宿主系统	212
二、酵母菌的载体系统	214
三、酵母菌的转化系统	218
四、酵母菌的表达系统	218
五、酵母菌的蛋白修饰分泌系统	220
第三节 其他微生物系统在基因工程中的利用	222
一、芽孢杆菌在基因工程中的应用	223
二、棒状杆菌在基因工程中的应用	226
三、假单胞杆菌在基因工程中的应用	226
四、链霉菌在基因工程中的应用	226
第四节 微生物基因工程的应用	227
一、重组微生物工程菌与人类药物生产	227
二、重组微生物工程菌与疫苗生产	231
三、重组微生物工程菌与食品、饲料工业	234
四、重组微生物工程菌与环境保护	238
五、重组微生物工程菌与农业生产	240
本章小结	245
思考题	246
第十一章 植物基因工程	248
第一节 农杆菌及其转化体系	248
一、根癌农杆菌的生物学特征	248
二、Ti 质粒的结构和功能	249
三、Ti 质粒的转化机理	250
四、Ti 质粒载体的改造与表达载体的构建	253
五、Ri 质粒载体系统	256
第二节 目的基因的导入	256
一、植物转化的受体系统及其考虑因素	257
二、基因的导入方法	258

第三节 外源基因的表达、检测与遗传特性	264
一、转基因植物外源基因的表达及其调控	264
二、外源基因的检测	267
三、转基因植物的遗传特性	269
第四节 植物基因工程的应用	270
一、植物基因工程在植物分子生物学研究中的应用	270
二、改良植物品种	273
三、转基因植物作为生物反应器	277
本章小结	281
思考题	282

第十二章 动物基因工程

284

第一节 动物基因工程的概念与发展	284
第二节 动物目的基因的选择与表达载体的构建	285
一、动物转基因操作的一般程序	285
二、目的基因的选择	286
三、表达载体的构建	287
四、外源基因的组织特异性表达	293
第三节 基因导入的方法	293
一、DEAE-葡聚糖转染法	293
二、显微注射法	294
三、病毒转染法	295
四、胚胎干细胞介导法	296
五、精子载体法	297
六、基因同源重组法	297
第四节 转基因动物的鉴定	299
一、DNA 水平的检测	299
二、RNA 水平的检测	300
三、目的蛋白的检测	301
第五节 动物基因工程技术的应用	301
一、动物基因工程技术的应用	301
二、动物转基因技术存在的问题	307
三、提高转基因动物外源基因表达水平的方法与途径	308
四、转基因动物的应用前景	311
第六节 基因诊断	311
一、基因诊断的基本方法	312
二、基因芯片与疾病诊断	313

第七节 基因治疗	314
一、基因治疗概述	314
二、基因治疗的方式	315
三、基因治疗的前景	318
本章小结	318
思考题	319
第十三章 分子标记及基因芯片技术与应用	320
第一节 分子标记技术和应用	320
一、分子标记的概念	320
二、分子标记的类型	321
三、标记系统在选择时的选择	331
四、分子标记的应用	334
第二节 基因芯片技术和应用	336
一、概念	336
二、基因芯片类型	337
三、基因芯片的实验操作	338
四、基因芯片的应用	339
五、使用基因芯片时应注意的问题	340
本章小结	342
思考题	342
第十四章 差异显示技术及其应用	343
第一节 mRNA 差异显示技术	343
一、mRNA 差异显示的基本原理	343
二、mRNA 差异显示实验的基本过程	344
三、差异显示方法的优缺点	345
四、差异显示的应用	345
第二节 扣除杂交技术	346
第三节 代表性差异分析技术	349
一、代表性差异分析技术原理	350
二、代表性差异分析技术主要步骤	350
三、代表性差异分析技术的优缺点	350
第四节 抑制性衰减杂交技术	350
一、原理	350
二、抑制性衰减杂交操作程序	352
三、抑制性衰减杂交的优缺点	353

第五节 基因表达系列分析	353
一、基本原理	353
二、操作步骤	354
三、基因表达系列分析的优缺点	355
第六节 差异显示技术的应用	355
一、分析基因表达差异	355
二、寻找遗传标记	355
三、绘制染色体表达图谱	356
四、分离特异表达的基因	356
五、检查 cDNA 文库的质量	356
六、鉴定种属特异性	356
七、临床诊断遗传疾病	357
本章小结	357
思考题	357
第十五章 生物信息学	358
第一节 生物信息学概论	358
一、蛋白质和核酸序列的测定	358
二、生物大分子空间结构的测定	359
三、生物学信息的迅猛增长	359
四、生物信息学的基本概念及研究内容	360
五、生物信息学研究的热点领域	361
第二节 生物信息数据库	363
一、核酸序列数据库	363
二、蛋白质序列数据库	369
三、大分子空间结构数据库	373
四、基因组数据库	376
第三节 数据的查询和提交	377
一、Entrez 查询系统	377
二、SRS 数据库查询系统	379
三、数据提交	384
第四节 序列比对和数据库搜索	384
一、序列比对原理	384
二、Blast	387
第五节 多序列比对及系统发育分析	389
一、多序列比对分析	389
二、系统发育分析	390