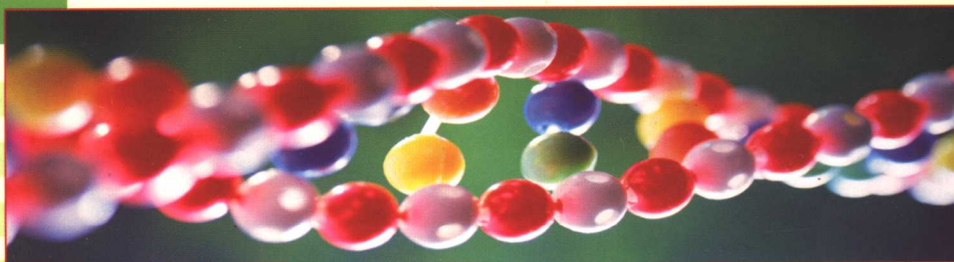


21
世纪生物技术丛书

基因克隆 理论与技术

王廷华 董 坚 Petrik X Lee 主编



 科学出版社
www.sciencep.com

21 世纪生物技术丛书

基因克隆理论与技术

主编 王廷华 董 坚 Petrik X Lee

科学出版社

北 京

内 容 简 介

《基因克隆理论与技术》是《21世纪生物技术丛书》的一个分册,全书分上、下两篇,共16章,是国内生物科学领域中较全、较新的一本全面阐述基因克隆的基本理论和实验技术的学术专著。上篇介绍了基因的结构与功能、蛋白质的结构与功能、基因的调控等分子生物学基本理论,并介绍了基因克隆的载体、基因克隆的工具酶等基因克隆的基本理论以及基因克隆技术在诊断、治疗及生物制药中的应用与进展。下篇重点介绍了基因克隆的实验技术。

本书可供各高校、研究所从事基因克隆研究及医疗卫生领域的研究生、科研人员学习和参考。

图书在版编目(CIP)数据

基因克隆理论与技术/王廷华等主编. —北京:科学出版社,2005.3

(21世纪生物技术丛书)

ISBN 7-03-014645-X

I. 基… II. 王… III. 无性系-遗传工程 IV. Q785

中国版本图书馆CIP数据核字(2004)第122610号

责任编辑:吴茵杰 夏 宇 / 责任校对:宋玲玲

责任印制:刘士平 / 封面设计:卢秋红

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

丽 源 印 刷 厂 印 刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

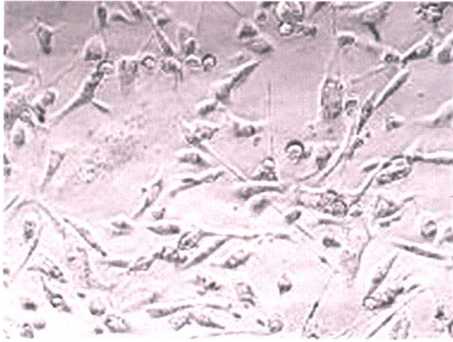
2005年3月第一版 开本:787×1092 1/16

2005年3月第一次印刷 印张:12 3/4 插页:1

印数:1—3 000 字数:285 000

定价:34.80元

(如有印装质量问题,我社负责调换〈新欣〉)



a. 普通光源下观察到的转染后的乳腺癌细胞



b. 荧光光源下观察到的转染后的乳腺癌细胞

彩图 15 - 1 用脂质体转染法转染一带有 GFP 荧光蛋白基因载体后的乳腺癌细胞

《21 世纪生物技术丛书》编审委员会

主 审 蔡文琴 吴良芳 余 哲

委 员 (按姓氏笔画为序)

王廷华	昆明医学院神经科学研究所 四川大学	教授 特聘教授
方秀斌	中国医科大学基础医学院	教授
冯忠堂	昆明医学院神经科学研究所	教授
齐建国	四川大学华西医学中心	教授
羊惠君	四川大学华西医学中心	教授
李云庆	第四军医大学解剖教研室	教授
李建国	复旦大学医学院	教授
李官成	中南大学湘雅医学院	教授
吴良芳	四川大学华西医学中心	教授
吴承远	山东大学齐鲁医院	教授
余 哲	四川大学华西医学中心	教授
应大君	第三军医大学基础医学院	教授
沈馨亚	复旦大学医学院	教授
胡长林	重庆医科大学附属医院	教授
施 静	华中科技大学同济医学院	教授
徐群渊	首都医科大学神经科学研究所	教授
姜保国	北京大学人民医院	教授
曾园山	中山大学中山医学院	教授
蔡文琴	第三军医大学神经科学中心	教授
Jean Philippe Merlio	法国波尔多第二大学医学院	教授
John W. McDonald	美国华盛顿大学	教授
Leong Seng Kee	新加坡国立大学	教授
Eng-Ang Ling	新加坡国立大学	教授
Petrik X Lee	英国伦敦大学	教授
Pierre Dubus	法国波尔多第二大学	教授
Xiong-Zhong Ruan	英国伦敦大学	教授
Xin-Fu Zhou	澳大利亚 Flinders 大学	教授

《基因克隆理论与技术》编委会

主 编 王廷华 董 坚 Petrik X Lee

副主编 冯忠堂 李官成

编著者 (按姓氏笔画为序)

马绍辉 邓兴力 王廷华 卢永超

史 进 冯忠堂 刘红亮 刘亚东

齐建国 任 玲 羊惠君 李琦涵

张 彦 吴林艳 李 宏 李官成

李甫强 邵永祥 沈 翼 罗华友

郑永唐 余化霖 范耀东 符史干

董 坚 Petrik X Lee

总 序

21 世纪是生命科学取得革命性进展和医学飞速发展的时代。如果说 20 世纪后半叶是信息时代,那么 21 世纪上半叶生命科学将成为主宰。随着我国加入 WTO 和与世界科技日益接轨,生命科学领域里生物技术的竞争已日益呈现出其核心地位和作用。正是在此背景之下,科学出版社组织了这套《21 世纪生物技术丛书》。该套丛书共八本,包括《组织细胞化学理论与技术》、《神经细胞培养理论与技术》、《蛋白质理论与技术》、《分子杂交理论与技术》、《PCR 理论与技术》、《基因克隆理论与技术》、《抗体理论与技术》、《干细胞理论与技术》。

本套丛书从形态、细胞、分子生物学三个层面介绍了 21 世纪常用生物技术的基本理论、进展及其相关技术与应用。从培养科学思维能力和科研工作能力的目标出发,以实用性和可操作性为目的,面向我国日益扩大的研究生招生规模和广大的一线科研人员。在技术章节提供了大量原版彩图及实验经验体会,使丛书更具实用价值。在编写方式和风格方面,力求强调科学史的沿革及基本概念、基本技术和理论的阐述,基本反映了 21 世纪常用生物技术和理论的现状与进展。

丛书由我国青年神经科学专家王廷华教授牵头,邀请国内、外一批知名专家、教授参加编写和审阅。丛书是全体参编人员实践经验的总结,对一线从事科研的研究生和科研人员有较好的参考价值。由于时间有限,加之科学技术发展迅猛,错误、不足之处在所难免,恳请各位前辈、老师、同道及广大读者批评指正。

值本套丛书出版之际,感谢为我国生物技术与科学发展孜孜不倦、奉献一生的老一辈科学家,是他们的指导、培养和杰出工作为我国中青年一代的发展奠定了基础,并为本套丛书提供了参考。感谢国内、外一批知名专家、教授组成的编审委员会对丛书的认真审阅和编者们的辛勤劳动。感谢科学出版社的同志们对丛书出版所付出的辛勤劳动和支持。感谢各位同道给予的鼓励和关心。

《21 世纪生物技术丛书》

编审委员会

2004 年 12 月 8 日

目 录

上篇 基因克隆理论

第一章 概论	(3)
第一节 基因研究历史回顾	(3)
第二节 遗传的物质基础	(3)
第三节 基因和基因克隆的概念	(5)
第四节 基因工程的研究内容和安全性	(6)
第二章 基因的结构和功能	(10)
第一节 核酸的结构和功能	(10)
第二节 遗传物质的组织结构	(15)
第三节 基因组的结构和功能	(23)
第三章 蛋白质的结构和功能	(35)
第一节 蛋白质的基本单位和分类	(35)
第二节 蛋白质的分子结构和理化性质	(39)
第三节 蛋白质的生物学功能	(49)
第四章 基因克隆中常用的工具酶	(52)
第一节 限制性核酸内切酶	(52)
第二节 DNA 聚合酶	(56)
第三节 DNA 连接酶	(60)
第四节 修饰酶	(61)
第五章 基因克隆的载体	(65)
第一节 质粒载体	(65)
第二节 噬菌体载体	(79)
第三节 病毒载体	(84)
第四节 大容量载体	(91)
第六章 基因的表达和调控	(95)
第一节 原核生物基因的表达调控	(96)
第二节 真核生物基因的表达调控	(112)
第七章 基因克隆在治疗和诊断中的应用与进展	(127)
第一节 基因治疗研究进展	(127)
第二节 基因诊断的研究进展	(130)

第八章 基因克隆技术在生物制药中的应用	(136)
第一节 概况	(136)
第二节 基因工程药物	(137)
第三节 基因工程抗体	(137)
第四节 基因工程疫苗	(138)
第五节 核酸疫苗	(139)
第六节 生物医药的发展方向	(139)

下篇 基因克隆技术

第九章 分子生物实验中的常用仪器及试剂的配制	(143)
第一节 分子生物实验室的常规仪器及设备	(143)
第二节 常用试剂的配制	(145)
第十章 琼脂糖电泳和聚丙烯酰胺凝胶电泳	(149)
第一节 原理	(149)
第二节 琼脂糖电泳	(149)
第三节 聚丙烯酰胺凝胶电泳	(150)
第四节 电泳的影响因素	(151)
第五节 电泳中常用的指示剂和染色剂	(152)
第十一章 目的基因克隆	(154)
第一节 化学合成法获取目的基因	(154)
第二节 PCR 扩增法获取目的基因	(154)
第三节 RT-PCR 法获取目的基因	(159)
第十二章 载体的准备	(162)
第一节 感受态细胞的制备和质粒的转化	(162)
第二节 质粒 DNA 的提取	(163)
第十三章 目的基因与载体的连接	(165)
第一节 目的基因和载体的酶切	(165)
第二节 从凝胶中回收 DNA	(168)
第三节 目的基因和载体的连接	(169)
第十四章 重组载体的检测	(172)
第一节 酶切和电泳检测	(172)
第二节 DNA 序列测序鉴定	(172)
第十五章 重组载体的转染	(178)
第一节 磷酸钙共沉淀法	(178)
第二节 脂质体法	(178)
第三节 反转录病毒感染法	(179)
第四节 腺病毒载体转染法	(180)
第五节 结果和转染方法的选择	(181)

第十六章	重组体插入基因、RNA 和表达产物蛋白质的检测	(183)
第一节	Southern blot	(183)
第二节	Northern blot	(186)
第三节	Western blot	(188)

彩 图

上 篇
基因克隆理论

第一章 概 论

基因克隆是一门新兴的研究生命现象的科学。由于其研究对象为决定生命活动的最小的遗传物质单位——DNA,而广泛应用于与生命活动有关的领域。可以说从植物、微生物、低等动物一直到人类,基因克隆技术不仅应用于物种的起源进化,个体物种的生理和病理变化的物质基础的研究中,而且在疾病的发生、发展等方面的研究中发挥了重要的作用。在基因克隆的基础上,生命科学的研究内容已经从结构联系到功能、从现象深入到本质、从宏观扩展到微观。特别是20世纪20年代到50年代的研究证实遗传物质是DNA分子,并建立了DNA双螺旋结构模型,从分子结构解释了基因复制的机制,为生物学研究进入分子生物学时代揭开了新的一页。可见,对基因的研究是20世纪生命科学发展的主要内容,该项工作极大地推动了分子生物学、分子遗传学特别是基因工程学的发展。1997年,英国爱丁堡罗斯林研究所的科学家应用转基因技术首次培育克隆羊成功,是以基因克隆技术为基础的分生物学发展的一个新的里程碑。2000年,人类基因组计划DNA测序草图的完成标志着基因研究进入后基因组时代。了解基因克隆的基本理论与技术,不仅对了解人类疾病的发生发展的机制,进而探讨疾病的防治方法、手段、改善生命质量有重要价值,而且还可将基因克隆技术应用于生物医学工程,直接为人类的健康服务。

第一节 基因研究历史回顾

1868年,瑞士科学家Miescher从脓细胞中通过脱脂、消化和酸碱沉淀得到了一种含磷高的新物质,称为核素(unclein)。几乎同时奥地利科学家孟德尔(Mendel)提出生物的每一性状都是由遗传因子负责传递的。1909年,丹麦遗传学家Johannsen根据希腊文“给以生命”一词,将孟德尔提出的遗传因子(hereditary factor)碱基改称为基因(gene)。然而当时并没有人将Miescher的核素与Johannsen的基因联系在一起。直到1944年微生物学家Avery在肺炎链球菌转化实验中,揭示了DNA是细菌的遗传物质之后,才将核素和基因联系在一起。与此同时,Chargaff用纸层析和紫外分光光度法证明了DNA由四种碱基组成,并根据不同来源的DNA中碱基的组成推断出碱基的配对理论,从而为基因的深入研究和遗传规律研究奠定了基础。

第二节 遗传的物质基础

一、DNA是遗传物质

自从Mendel提出生命遗传现象的基本单位为遗传因子,生物的每一性状都是由遗传因

子负责传递的理论以来,人们对遗传物质是什么的问题进行了不懈的研究和探索,加深了对 DNA 的认识。

自然界中肺炎链球菌有很多不同菌株,肺炎链球菌的许多菌株可以通过形态学和血清学的特征(即通过抗原和抗体的相互作用)来加以区别。在所有菌株的各个菌落之间最明显的差异是决定各菌落外表的碳水化合物荚膜。有些菌落具有多糖荚膜,外表光滑;而有些菌落没有荚膜,外表粗糙。荚膜决定了细菌的抗原特异性和毒性,没有荚膜且外表粗糙的菌落没有毒性,有荚膜外表光滑的菌落有毒性。把无毒性的细菌接种在小鼠的体内,不发生感染性疾病。但把有毒性的细菌注射到小鼠或对细菌敏感的哺乳动物体内,可引起严重的感染性疾病。有时,有毒性的细菌因自发突变失去它的荚膜而失去毒性。同样,无毒性的细菌也可能突变为有荚膜的有毒菌。1928年,Griffith等以这些资料为基础,为研究有毒性和无毒性的肺炎链球菌设计了各种实验。在实验中,他把加热杀死的毒性细菌注入一组小鼠体内,活的无毒性的细菌注入另一组,活的无毒性的细菌和加热杀死的毒性细菌混合后注入第三组。前两组注射后无反应,但第三组的小鼠产生致命的肺炎。这一研究结果提示,在第三组,某种在死细菌中的物质被转移到活细菌中,并带到小鼠体内。

20世纪40年代,Avery、Macleod和Mc. Carty等经过10年艰苦的实验工作,鉴定出DNA就是脱氧核糖核酸。他们把从肺炎链球菌的一种菌株中提取出来的DNA加以高度纯化后,把它掺入到另一种菌株的细胞中,作为受体的菌株就表现了供体菌株的某些特征。并且这些特征能一代又一代地继承下去,这个现象表明了作为受体的生物体的遗传物质及其表现型都已起了变化。从而证实了体外的转化作用所导致的遗传变化与Griffith等在活的小鼠体内所证实的转化作用相类似。由此可推导出两项重要的结论:①DNA是肺炎链球菌中的遗传物质;②DNA作为一种介质,起着规定一种终产物和性状(例如多糖荚膜的特征)的作用,而它本身不是那个终产物。至此,DNA作为遗传物质载体的理论被确立起来,进而为从分子水平来研究DNA或基因奠定了基础。

二、RNA也是遗传物质

病毒是一类无细胞结构的最简单的生物,由核酸内核和蛋白质外壳组成。按其所含核酸的不同,可以把病毒分为DNA病毒和RNA病毒两大类。前者只含DNA,不含RNA;而后者只含RNA,不含DNA。不管是哪类病毒,它们都不能够独立生存,而必须寄生在动物、植物或微生物的细胞中。已知DNA病毒的遗传物质是DNA,那么RNA病毒的遗传物质是什么?

20世纪50年代早期,Fraenkel Conrat对烟草花叶RNA病毒(简称TMV病毒)进行研究,他用生物化学方法把两个不同品系的TMV病毒(A和B)的蛋白质和RNA分开,然后使A品系的蛋白质与B品系的RNA混合,形成重组病毒。用这种重组病毒感染烟草叶以后,从病斑中分离出病毒,并把病毒的蛋白质与RNA分开,然后对它们进行分析,发现其外壳蛋白的类型与B品系的外壳蛋白相同。这说明后代病毒的蛋白质类型与亲代病毒的RNA有关,而与亲代病毒的蛋白质无关。也就是说,RNA病毒的遗传物质是RNA,而不是蛋白质。

此外,脊髓灰质炎病毒的RNA、脑炎病毒的RNA,都可单独地引起感染。故在不含DNA

而只含有 RNA 的病毒中,复制和形成新病毒颗粒所必需的遗传信息是在 RNA 上。

第三节 基因和基因克隆的概念

生物有产生与亲本相似的复本的繁殖能力,遗传使生物的性状相对稳定地传递,从而使生物的种属得以保存。但大千世界又无绝对相同的两个个体,生物具有在不断变化的环境中适应生存的能力。变异是生物进化的源泉,而变异的物质基础在于基因。在遗传学发展的早期阶段,基因仅仅是一个逻辑推理的概念,而不是一种已经证实了的物质和结构。随着对基因研究的不断深入,基因的概念也在不断地修正补充,对基因的理解也不断深入。

一、基因的概念

从 1910 年到 1925 年美国 Morgan 等以果蝇为研究对象,对果蝇的遗传基因与染色体的结构关系进行了研究,并于 1926 年发表了《基因论》。该理论阐述了基因不仅是位于染色体上呈直线排列的遗传单位,而且是携带遗传信息的结构单位和控制遗传性状的功能单位。其贡献在于首次将基因和生物体中某一特定的染色体联系起来,但对基因的本质、结构和具体功能等缺乏认识。

1953 年, Watson 和 Crick 提出了 DNA 分子的双螺旋(double helix)结构模型,阐明了 DNA 自我复制的机制,并推测 DNA 分子中的碱基顺序储存了遗传信息。1961 年,法国科学家 Jacob 和 Monod 发表了他们对调控基因的研究,发现了遗传密码信息贮存于核酸之中,信使 RNA(mRNA)携带着从 DNA 到蛋白质合成所需要的信息;在转运 RNA(tRNA)和核糖体 RNA(rRNA)的参与下翻译成为有生物学功能的蛋白质。此时人们才明确了 DNA 经过转录和翻译来控制蛋白质的合成,并将 DNA 双螺旋结构与 DNA 功能联系起来。

作为一个遗传功能单位,基因被定义为:编码有功能的蛋白质多肽链或 RNA 所必需的全部核酸序列(通常是 DNA 序列)的结构。根据这个定义,一个基因不仅包含编码蛋白质肽链或 RNA 的核酸序列,还包括保证转录所必需的调控序列,及位于编码上游 5'端的非编码序列、内含子和位于编码区下游 3'端的非编码序列。

二、基因克隆的概念

美国哈佛大学 Beckwith 等 1969 年应用 DNA 杂交技术成功地分离了大肠杆菌的 β -半乳糖苷酶基因,创建了基因分离技术;1973 年,Boyer 等科学家在基因分离技术的基础上,利用重组 DNA 技术得到第一个重组 DNA 分子拷贝——克隆(clone),由此宣告了基因克隆技术的诞生。克隆是指从一个共同的祖先通过无性繁殖下来的一群遗传上相同的 DNA 分子、细胞或个体所组成的特殊群体。基因克隆是指在体外,通过分子生物学的方法将目的基因与运载载体重组在一起,然后引入受体细胞,使目的基因在受体细胞中得到扩增并借助受体细胞获得目的基因的表达产物——蛋白质,从而达到对目的基因的生物特性进行研究的的技术方法。一般来说,基因克隆和基因工程二者含义相近,并无大的区别,前者强调目的基

因的克隆过程,而后者着重于克隆工作的全局和整体。

第四节 基因工程的研究内容和安全性

一、基因工程的研究内容

(一) 基因工程工具

基因工程之所以能够将不同的 DNA 重新组合构建成新的 DNA 分子,并进入宿主细胞表达和扩增,主要依赖于一系列重要的克隆工具。这些工具包括基因工程载体、基因工程工具酶和基因工程的受体系统。载体是目的基因的运载工具,是基因克隆操作中的必备工具。载体的研究与应用,推动基因克隆工作的发展,简化了操作过程,提高了克隆的效率。工具酶的应用,是基因克隆技术的保证;一些重要工具酶的发现,使在基因克隆中一些难题迎刃而解。随着基因工程研究的不断深入,寻找更好的基因工程工具将成为新一轮的热点,对基因工程工具研究是基因工程研究的重要内容之一。

(二) 基因克隆技术

基因克隆技术的发展,推动了整个生命科学研究的发展。随着新的技术和新的克隆方法不断涌现,如以 PCR 为基础的差异筛选技术、高通量的基因芯片技术、长片段的 DNA 序列测定技术和生物信息技术等,这些技术的应用将极大提高基因工程的规模和速度,成为基因工程研究中的重要内容。

(三) 目的基因

基因是一种重要的生物资源,且作为 21 世纪前景广阔的生物产业的研究基础,不仅许多研究机构重视对其研究和开发,而且各国政府也非常关注,倾力予以资助。对基因的研究已从零星的单基因研究发展到大规模的基因组研究,从人类的基因组到其他生物基因组。这些工作使人们对人类自身和其他生物的生命现象有更深入的认识和了解。

(四) 基因工程产品

研究基因除了分析基因的结构和功能以外,最重要的是研究基因的表达产物及其在各领域(如在医药领域)的应用,以为人类的健康长寿和粮食短缺以及生态环境破坏等难题的解决提供新的思路。基因工程的诞生不仅在理论上而且在应用上已经对整个生命世界产生了深刻的影响。对基因工程产品研究和开发,已形成一个巨大的高新技术产业并产生了重要的经济和社会效益。

二、基因工程与生物公害

基因工程技术的发展和應用有可能带来生物公害,主要有以下几个方面:

第一,在 DNA 重组实验时,可能意外地造出一些对人、畜有害的细菌或病毒,这些微生物常有异常旺盛的繁殖力,可能具有高度的传染性、侵袭性、毒性和耐药性。它们进入自然界会引起预想不到的危害。

第二,感染致癌基因的重组体时,可能使人、畜患癌症。

第三,有些重组体虽不直接给人、畜带来危害,但是可能给其他生物(如植物、微生物、昆虫)带来影响,使地球生态平衡受到破坏。

第四,基因工程被用于军事目的,用来制造生物武器,有可能危及大批生命或遗留严重后果。

虽然,人们对生物技术给自然和人类带来的危害还只能进行某种程度的预测,但为了对人类负责,一些国家制订了 DNA 重组实验安全规则。最初的规则提出了物理防护和生物防护两大对策,对一些研究项目做出了比较严格的限制。经过十余年的实践,特别是通过专门进行的重组体安全实验证明:重组体比自然界原有的生物表现出更大危险的可能性极低,到现在还没有发现重组体意外地在自然界广泛散布的事例, DNA 重组实验比操作病原体的危险性小得多,也安全得多。然而,近年来,基因工程和基因操作及使用非病原微生物可能引起生物公害正备受关注。对它的危险程度的判定,主要参考所使用的生物材料的性质:①致病性;②毒性;③寄生定居性;④致癌性;⑤耐药性;⑥生成影响代谢的蛋白活性物质的能力;⑦造成生态平衡紊乱的机会、性质和程度;⑧对外界的抵抗力。

危险度是多因素构成的综合概念,它包括生物材料本身的危险性,操作方法,操作的量、次数,工作时间的长短等。

危险度 = (生物材料本身的危险性) × (操作方法带来的危险性) × (量) × (操作时间) × (操作次数)。

三、生物公害的控制

(一) 实验人员适应性训练

要防止生物公害,首先要对从事基因操作的实验人员进行生物操作的基本功训练。特别是大量的物理学家、化学家、工程技术专家进入分子生物学和遗传工程的研究领域后,由于他们当中大多数人缺少微生物学的知识,特别是有关病原微生物的知识,因此对这些人员进行基本功训练就显得更加重要。这些训练可包括以下几方面:①不同危险度微生物的操作技术;②生物防护的技术知识;③物理防护的技术知识;④将要开展的实验的安全知识;⑤处理事故的知识。

(二) 生物防护

进行 DNA 重组实验时要选择生物安全性高的载体和受体细胞。使用的载体应当只进入实验者想把它引入的受体细胞。实验用的受体细胞应当具有在特定的条件下选择生存、繁殖的能力,而在一般自然条件下很难生存和繁殖。如营养缺陷性菌株、低温条件生长菌株等。从事 DNA 重组实验前要多了解载体、受体细胞等涉及安全方面的生物特性,包括:自然