



普通高等教育“十一五”国家级规划教材

# 林业生物技术

尹伟伦 王华芳 主编



科学出版社

[www.sciencep.com](http://www.sciencep.com)

普通高等教育“十一五”国家级规划教材

# 林业生物技术

尹伟伦 王华芳 主编

科学出版社

北京

## 内 容 简 介

本书内容主要包括林业生物技术概论、细胞工程(工厂)原理、植物细胞工程、林木良种繁育工程、基因工程原理、林木基因工程技术、林木转基因新品种培育、转基因生物安全性及其评价与管理、林木分子标记辅助育种、有用次生代谢生物技术共10章。全书内容根据教学规律,循序渐进、由浅入深,总结和融入了作者多年从事教学与科研的经验和成果,既有普通生物技术的共同规律,也有林木生物技术中特殊方法。

本书适合作为普通高等院校林学、林业工程、资源与环境等专业本科生教材,也可供相关专业的研究生、教师及科研人员参考使用。

### 图书在版编目(CIP)数据

林业生物技术/尹伟伦,王华芳主编. —北京:科学出版社,2009

(普通高等教育“十一五”国家级规划教材)

ISBN 978-7-03-025955-4

I. 林… II. ①尹…②王… III. 木本植物-生物技术-森林植物-高等学校-教材 IV. S722

中国版本图书馆CIP数据核字(2009)第200395号

责任编辑:甄文全 李晶晶/责任校对:李奕莹

责任印制:张克忠/封面设计:北极光世界

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>

双青印刷厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

\*

2009年12月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2009年12月第一次印刷 印张:21 1/4

印数:1—4 000 字数:580 000

定价:38.00元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

# 《林业生物技术》编者名单

**主 编** 尹伟伦 王华芳  
**副主编** 卢孟柱 汤浩茹 杨敏生 夏新莉

**编 者** (按姓氏拼音排序)

黄坚钦 (浙江林学院, 教授)  
黄丽春 (台湾中央研究院植物暨微生物学研究所, 研究员, 教授)  
李颖章 (中国农业大学, 教授)  
梁 机 (广西大学, 副教授)  
刘玉军 (北京林业大学, 教授)  
卢孟柱 (中国林业科学研究院林业研究所, 教授)  
裴 东 (中国林业科学研究院林业研究所, 教授)  
齐力旺 (中国林业科学研究院林业研究所, 教授)  
沈 昕 (北京林业大学, 副教授)  
汤浩茹 (四川农业大学, 教授)  
田砚亭 (北京林业大学, 教授)  
王华芳 (北京林业大学, 教授)  
魏建华 (北京市农林科学院, 教授)  
夏新莉 (北京林业大学, 教授)  
谢耀坚 (中国林业科学研究院桉树研究中心, 教授)  
杨敏生 (河北农业大学, 教授)  
尹伟伦 (北京林业大学, 教授)  
张柏林 (北京林业大学, 教授)  
张德强 (北京林业大学, 教授)

# 前 言

林学 (forestry),《简明大不列颠百科全书》(中美联合编审委员会,1996)解释为是经营林地及有关的荒地和水面为人类谋福利的科学。林业为国民经济的一个行业,按其分类(GB/T4754-2002)涵盖林木的培育和种植、木材和竹材的采运、林产品的采集等。传统林业也在随着对森林多功能的深入认识及人类应对全球气候变化的需要而与时俱进地发展和拓宽。现代林业涵盖生态建设,指导思想也在与时俱进,它的有两个重要观点是:多效用观点和永续利用观点。其经营目标有两个:一是为人类的生存和发展提供生态环境和生态产品,二是为人类的生产和生活提供木材和林特产品。随着人口的增长和生活质量的提高,人们对环境质量和可再生产品的需求越来越大,我国林业走高效能、可持续发展的战略地位越来越重要。为满足经济社会发展对林业的多样化需求,亟须加强林业高新技术的研发与示范,用林业生物技术手段解决我国林业所面临的生态建设和林产品生产中亟待解决的生物学关键理论和技术问题,促进林业产业发展。

我国十分重视林业生物技术的创新和人才培养。国家高技术研究发展计划(“863”计划)于“十五”期间确立现代农业主题以来,持续资助林业生物技术研究项目;《国家科学与技术中长期发展规划纲要(2006—2020年)》已将生物技术作为前沿技术;《林业科学和技术中长期发展规划(2006—2020年)》将林业生物技术与良种培育作为重点发展领域和重大科技工程。林业生物技术既具有普通生物技术的共同规律,也具有林木木质化程度高、生长发育周期长的特殊性。因此,教育部不失时机计划、组织编写“十一五”国家规划教材《林业生物技术》。这是一本融普通生物学生物技术和林木生物技术为一体的专著,是培养林业生物技术人才所需的理论联系实际、学以致用的高等院校教材。

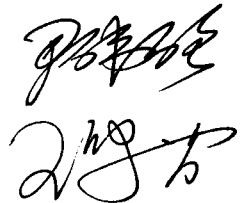
我们承担本教材的编写任务,深知肩负责任之重大而不敢懈怠;于2006年12月在北京召开了《林业生物技术》教材编审研讨会;讨论并通过了本书的编写原则、编写大纲和编写任务。根据林业科学技术和生产实际需要,本书注重吸收已发表的模式植物和农作物的相关成果,以林业细胞工程和基因工程为重点,分别就基本原理、基本技术与应用、分子标记、次生代谢产物生产等内容分章编写,以及时反映国内外林业生物技术的最新研究成果。

本书共10章,各章编者文责自负,分工如下:第1章由尹伟伦教授编写。第2章由李颖章教授组织编写,夏新莉教授编写形态建成基础,王华芳教授补充细胞生长分化与全能性的部分内容。第3章由汤浩茹教授编写。第4章由杨敏生教授组织编写,梁机副教授编写林木良种微型快速繁育工艺设施;王华芳教授编写影响木本植物组织培养的内外因子、松树体细胞胚胎发生,谢耀坚教授编写桉树组织培养,田砚亭教授编写四倍体刺槐组织培养,裴东教授编写核桃组织培养和体细胞胚胎发生,夏新莉教授编写美国红杉与沙棘体细胞胚胎发生,黄丽春教授编写老树复幼。第5章由沈昕副教授编写。第

6章由王华芳教授、卢孟柱教授、王天祥博士编写。第7章由杨敏生教授组织编写，魏建华教授编写调控木质素生物合成的杨树转基因育种，梁机副教授编写促进林木生根的转基因育种，裴东教授编写核桃转基因育种，王华芳教授编写林木耐旱基因工程，夏新莉教授编写林木耐盐和耐寒基因工程，黄坚钦教授编写花卉基因工程。第8章由卢孟柱教授、王华芳教授、朱莉飞博士编写。第9章由张德强教授编写。第10章由刘玉军教授和张柏林教授组织编写，黄坚钦教授编写生物反应器。附录由研究生严晓丹整理。全书由尹伟伦教授和王华芳教授统稿整编，卢孟柱教授审阅。

我们特别感谢北京林业大学教务处、生物学院等领导单位对本书的编撰给予了高度重视、指导和支持；中国林业科学研究院林业研究所孙振元教授、齐力旺教授等也给予许多帮助。我们还特别感谢科学出版社编辑甄文全博士，自始至终关心和支持本书的编写。我们的研究生们为资料的搜集整理做了大量工作。还有许多恕未提及但对本书编撰给予莫大支持、帮助和提供参考资料的同仁。正是他们无私地大力支持和帮助，才使得本书的编撰和出版得以顺利完成。在此，一并表示感谢。

近些年来，生物工程技术类图书和教材不时有出版，这些先前之作为我们编写这本《林业生物技术》教材提供了宝贵的参考和借鉴。本书主要内容基本上是编者在多年从事教学和研究工作的经验和总结基础上编写而成。我们希望编撰本教材，为林业生物技术人才的培养稍尽绵薄之力。与此同时，生物技术文献的迅猛发展，加之我们的知识水平有限，尽管我们在编写过程中已反复审校，疏漏和错误在所难免，恳请读者能给予批评指正。



2008年6月2日

# 目 录

## 前言

<b>第1章 概论</b> .....	1	2.2.7 植物细胞衰老及其调控	34
1.1 林业生物技术的基本含义	1	2.3 形态建成基础	36
1.1.1 生物技术的基本概念	1	2.3.1 植物细胞的形态建成	36
1.1.2 生物技术与其他学科的关系	1	2.3.2 植物再分化途径	38
1.1.3 生物技术的学科属性	2	2.3.3 植物形态发生	39
1.2 林业生物技术及其基本特征	7	2.3.4 植物离体器官形态建成的分子生理基础	40
1.2.1 林业生物技术的基本含义	7	2.4 小结	47
1.2.2 林业生物技术的基本特征	8	<b>第3章 植物细胞工程</b>	48
1.3 林业生物技术发展史上的重大事件	9	3.1 器官培养、组织培养与细胞培养	48
1.4 我国林业生物技术发展战略	13	3.1.1 器官培养	48
1.5 林业生物技术应用领域	14	3.1.2 组织培养	52
1.5.1 优质、高抗、速生林木良种培育	14	3.1.3 细胞培养	54
1.5.2 良种苗木工厂化繁育	15	3.2 体细胞胚胎发生	60
1.5.3 有益天然产物离体生产	15	3.2.1 体细胞胚胎发生的概念及特点	60
1.5.4 其他林业生物技术	15	3.2.2 体细胞胚胎发生的方式	62
1.6 小结	15	3.2.3 体细胞胚胎发生的机制	62
<b>第2章 细胞工程(细胞工厂)原理</b>	16	3.2.4 影响体细胞胚胎发生的因素	63
2.1 细胞生长分化	16	3.2.5 诱导体细胞胚胎发生的一般程序	66
2.1.1 细胞生长与分化进程	16	3.2.6 体细胞胚的成熟与转化	67
2.1.2 细胞分裂、伸长与分化	16	3.3 人工种子的研制与种质保存	67
2.1.3 细胞分化的调节	19	3.3.1 人工种子	67
2.2 植物细胞全能性	26	3.3.2 种质保存	70
2.2.1 细胞全能性现象	26	3.4 体细胞无性系变异诱导与筛选	73
2.2.2 植物表皮细胞的全能性	28	3.4.1 体细胞无性系变异的概念和特点	73
2.2.3 导管、管胞分化	29	3.4.2 体细胞无性系变异的来源	73
2.2.4 筛管、筛胞分化	32		
2.2.5 植物维管束组织的分化	32		
2.2.6 植物细胞全能性的保持与丧失	33		

3.4.3 体细胞无性系变异的类型·····	74	5.2 基因工程的四大要素·····	132
3.4.4 影响体细胞无性系变异的因素 ·····	74	5.2.1 工具酶·····	132
3.4.5 体细胞无性系诱变方法·····	75	5.2.2 基因工程载体·····	135
3.4.6 突变体的筛选·····	76	5.2.3 基因工程受体·····	146
3.4.7 突变细胞再生植株及突变体的 遗传学鉴定·····	76	5.2.4 目的基因克隆·····	148
3.5 原生质体培养和体细胞杂交 ·····	77	5.3 RNA 干扰·····	155
3.5.1 原生质体培养·····	77	5.3.1 导言·····	155
3.5.2 体细胞杂交·····	82	5.3.2 siRNA 介导的 RNA 干扰机制 ·····	156
3.6 小结·····	87	5.3.3 miRNA 介导的 RNA 干扰 ·····	157
<b>第4章 林木良种繁育细胞工程</b> ·····	88	5.4 小结·····	160
4.1 林木良种微型快速繁育·····	88	<b>第6章 林木基因工程技术</b> ·····	161
4.1.1 林木良种微型快速繁育工艺 设施·····	88	6.1 目的基因的获得·····	162
4.1.2 影响木本植物组织培养的内外 因子·····	94	6.1.1 化学合成目的基因·····	163
4.1.3 毛白杨组织培养工厂化育苗 ·····	97	6.1.2 PCR 扩增目的基因·····	163
4.1.4 桉树组培工厂化育苗·····	99	6.1.3 基因文库技术分离目的基因 ·····	168
4.1.5 四倍体刺槐组织培养快速繁育 技术·····	105	6.1.4 基因芯片技术发现新基因···	172
4.1.6 核桃组织培养研究·····	109	6.1.5 蛋白质组学技术发现新基因 ·····	173
4.2 林木体细胞胚胎发生·····	112	6.1.6 目的基因功能鉴定·····	174
4.2.1 林木体细胞胚胎发生的一般 程序·····	112	6.2 林木表达载体构建·····	174
4.2.2 火炬松体细胞胚胎发生·····	113	6.2.1 植物表达载体的种类和特性 ·····	174
4.2.3 落叶松体细胞胚胎发生·····	118	6.2.2 农杆菌的 Ti 质粒·····	175
4.2.4 北美红杉体细胞胚胎发生···	118	6.2.3 Ti 质粒改造策略·····	178
4.2.5 沙棘植物体细胞胚胎发生···	121	6.2.4 Ti 质粒衍生的植物表达载体 构建·····	179
4.3 老树复幼·····	125	6.3 林木转基因技术·····	186
4.3.1 概述·····	125	6.3.1 林木转基因受体系统·····	186
4.3.2 老树复幼方法·····	126	6.3.2 植物基因转化系统·····	186
4.3.3 老树复幼结果及其相关问题 ·····	128	6.3.3 农杆菌介导的外源基因转化 ·····	187
4.4 小结·····	130	6.3.4 DNA 的直接转移法·····	191
<b>第5章 基因工程原理</b> ·····	131	6.4 转基因植株筛选鉴定·····	194
5.1 基因工程的含义·····	131	6.4.1 外源基因整合的检测·····	194
		6.4.2 生物学检测·····	201
		6.5 转基因沉默·····	201



6.5.1 位置效应 .....	202	性评价 .....	254
6.5.2 转录水平的基因沉默 .....	202	8.3 转基因植物安全评价、管理	
6.5.3 转录后水平的基因沉默 .....	203	.....	256
6.5.4 转基因沉默的对策 .....	204	8.3.1 转基因植物生物安全管理的必要性	
6.6 小结 .....	207	.....	256
<b>第7章 林木转基因新品种培育</b> .....	208	8.3.2 转基因植物安全性评价原理	
7.1 优质林木基因工程 .....	208	.....	256
7.1.1 调控木质素生物合成的杨树转		8.3.3 转基因植物受体安全性评价	
基因育种 .....	208	.....	257
7.1.2 促进林木生根的转基因育种		8.3.4 转基因植物稳定表达安全性评价	
.....	213	.....	257
7.1.3 核桃转基因育种 .....	216	8.3.5 转基因植物环境安全性评价	
7.2 耐逆境基因工程 .....	217	.....	257
7.2.1 耐旱基因工程 .....	218	8.3.6 转基因植物产品安全性评价	
7.2.2 耐盐基因工程 .....	221	.....	258
7.2.3 耐寒基因工程 .....	223	8.3.7 转基因生物安全管理 .....	259
7.3 抗病虫基因工程育种 .....	225	8.4 转基因生物安全相关法规	
7.3.1 抗病 .....	225	介绍 .....	261
7.3.2 抗虫 .....	227	8.4.1 国外 .....	261
7.4 花卉基因工程 .....	232	8.4.2 国内 .....	262
7.4.1 花卉基因工程研究内容 .....	232	8.5 展望 .....	263
7.4.2 花色基因工程研究策略 .....	233	8.6 小结 .....	264
7.4.3 改变花期基因工程研究策略		<b>第9章 林木分子标记辅助育种技术</b>	
.....	237	.....	265
7.5 小结 .....	239	9.1 分子标记 .....	265
<b>第8章 转基因生物安全性及其评价</b>		9.1.1 限制性片段长度多态性 .....	265
<b>与管理</b> .....	240	9.1.2 随机扩增多态性 DNA .....	266
8.1 生物安全问题提出 .....	241	9.1.3 扩增性片段长度多态性 .....	267
8.1.1 全球转基因植物生产概况 ..	241	9.1.4 简单序列重复 .....	269
8.1.2 国内外转基因林木概况 .....	241	9.1.5 表达序列标签 .....	270
8.1.3 转基因生物安全性问题的由来		9.1.6 单核苷酸多态性 .....	271
.....	242	9.2 分子标记技术在林木遗传育	
8.2 转基因植物安全性评价 ..	244	种中的应用 .....	273
8.2.1 受体安全性 .....	245	9.2.1 林木遗传图谱构建 .....	274
8.2.2 目的基因安全性 .....	246	9.2.2 重要经济性状相关基因的定位	
8.2.3 转化系统的安全性 .....	247	.....	285
8.2.4 基因操作安全性 .....	250	9.2.3 质量性状基因定位 .....	290
8.2.5 安全转基因技术介绍 .....	251	9.2.4 基于候选基因的联合遗传学	
8.2.6 转基因森林植物及其产品安全		研究 .....	291

---

9.2.5	重要经济性状的图位克隆 ...	293	10.2.2	植物细胞悬浮培养生物反应器技术.....	308
9.2.6	分子标记辅助选择育种 .....	293	10.2.3	功能基因组学技术在植物次生代谢物开发中的应用 ...	312
9.3	小结 .....	296	10.2.4	代谢组学技术在植物次生代谢研究中的应用 .....	313
<b>第 10 章</b>	<b>有用次生代谢物及其生物技术 .....</b>	<b>297</b>	10.3	林业植物资源的开发和利用.....	314
10.1	植物有用次生代谢物的种类及生物合成途径.....	297	10.3.1	生物反应器在林业上的应用 .....	314
10.1.1	萜类化合物 .....	298	10.3.2	森林天然代谢产物细胞工程 .....	319
10.1.2	生物碱.....	300	10.4	林业植物资源现状及其面临问题.....	322
10.1.3	苯丙烷类化合物 .....	302	10.5	小结.....	324
10.1.4	影响植物细胞次生代谢物形成的因素及其调控 .....	305			
10.2	生物技术在植物次生代谢物研究和生产中的应用...	308			
10.2.1	利用植物细胞培养技术生产次生代谢物 .....	308			

# 光盘内容目录

第1章 补充资料	1	参考文献	27
思考题	1	第8章 补充资料	37
课外读物	1	思考题	37
参考文献	1	课外读物	37
第2章 补充资料	8	参考文献	37
思考题	8	第9章 补充资料	40
课外读物	8	思考题	40
参考文献	8	课外读物	40
第3章 补充资料	12	参考文献	40
思考题	12	第10章 补充资料	46
课外读物	12	思考题	46
参考文献	12	课外读物	46
第4章 补充资料	17	参考文献	46
思考题	17	附录	54
课外读物	17	附录1 常用试剂浓度及配制方法	54
参考文献	17	附录2 电泳缓冲液、染液和凝胶 上样液的制备方法	58
第5章 补充资料	23	附录3 常用培养基及制备方法	60
思考题	23	附录4 常用抗生素浓度及配制 方法	61
课外读物	23	附录5 植物组织培养常用的基 本培养基	62
参考文献	23	附录6 针叶树组织培养的几种 基本培养基	64
第6章 补充资料	24		
思考题	24		
课外读物	24		
参考文献	24		
第7章 补充资料	27		
思考题	27		
课外读物	27		

# 第 1 章 概 论

## 1.1 林业生物技术的基本含义

### 1.1.1 生物技术的基本概念

生物技术 (biotechnology) 这一名词由匈牙利的工程师 Ereky 在 1917 年首次提出, 用以表述以甜菜作为饲料大规模养猪的一个综合过程。根据 Ereky 的意思, 生物技术是指借助于生物, 将原材料生产为产品的全过程 (all lines of work by which products are produced from raw materials with the aid of living thing)。该定义的准确性现在已经或多或少有些被忽略了。因为经过多年的变化, 生物技术被用以表述两个不同的工程学科: 工业发酵 (industrial fermentation) 和工场 (workplace) 效率——现在叫做生物工程学 (ergonomics)。这种概念上的歧义于 1961 年得到统一, 瑞典微生物学家 Hedén 建议将应用微生物和工业发酵的学术期刊《微生物与生物化学工程技术》(*Journal of Microbiological and Biochemical Engineering and Technology*) 更名为《生物技术与生物工程》(*Biotechnology and Bioengineering*)。从此生物技术已经清楚地和不可取代地被定义为关于以生物有机体、生物系统和生物过程工业化生产工业原料和生活必需品的科学技术, 并且已经坚实地建立在微生物学、生物化学、化学工程学的专业知识基础上。1982 年, 国际合作及发展组织对生物技术这一名词的含义重新作了定义: 生物技术是应用自然科学及工程学原理, 依靠微生物、动物、植物体作为反应器将物料加工转化为产品和服务社会的技术。

国际合作及发展组织重新定义的生物技术概念包括 3 个基本含义: ①生物技术的科学基础是自然科学 (数学、物理学、化学、天文学、地质学、生物学和信息科学等) 的基本理论和工程学原理。②生物技术的生产过程是将原料通过微生物、动物和植物的生物反应体系加工为产品的过程。③生物技术生产的产品是社会必需品。这一概念诠释了 21 世纪是生物世纪。随着人口的迅速增加, 人类生存和发展的必需品需求迅速增加, 而人类赖以生存的大多数物品 (如衣、食、住、行、医等生活必需品) 几乎都是生物产品。生物科学技术研究所需的试剂、仪器、人力和物力资源中, 生物及其产品所占的比例也是相当可观的。实际上, 我们已经生活在一个朝气蓬勃的生物技术时代里。

### 1.1.2 生物技术与其他学科的关系

现代生物技术凝聚了多个学科多年形成的基本原理和技术, 成为最典型的综合性学科, 其中最基本的学科是生物学、化学和工程学。生物学与工程学的结合产生了生物工程学, 与化学的结合产生了生物化学, 化学与工程学的结合产生了化学工程学, 而生物化学、生物工程学和化学工程学的结合形成了生物技术 (图 1-1)。以生物学、化学、工程学为基础发展的其他学科也无不参与和渗透到生物技术之中。正因为多学科、

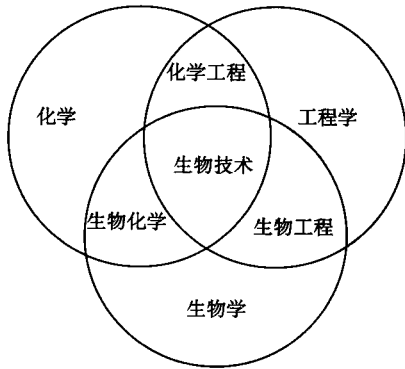


图 1-1 生物技术与其他学科的关系  
(俞俊棠等, 2004)

多途径、多方向对生物技术的贡献,使得该学科具有两个典型特征:一是不同学科对生物技术的渗透使得学科之间的界限变得越来越模糊;二是生物技术的发展一开始就和生产密切联系。从来没有哪一个学科像生物技术学科这样产学研结合如此密切,一个生物产品的研发、生产到应用的周期越来越短,以至带动整个生物产业链的快速发展。

生物技术与生物化学有着密切联系,生物技术最直接的理论基础是生物化学与分子生物学;反之,生物化学与分子生物学最直接的应用科学是生物技术。而生物化学与分子生物学的关系根

据《简明大不列颠百科全书》(第七卷)(中美联合编审委员会,1986)的解释,生物化学是研究生物体内物质及其在生命过程中的变化的科学。其中,研究生物大分子(如蛋白质、核酸)的化学及其功能的分支称为分子生物学。生物技术与分子生物学之间犹如应用学科与其理论基础的姊妹关系。

### 1.1.3 生物技术的学科属性

生物技术的发展非常迅速而且井然有序,并派生出一些新的分支学科。根据中华人民共和国学科分类与代码国家标准(GB/T 13745—92),生物技术属于自然科学门类(A),学科代码为110-180,是生物学(180)一级学科下的二级学科,而生物技术包括6个三级学科,其分类名称和代码如表1-1所示。

表 1-1 生物技术学科分类 (摘自 GB/T 13745—92)

分类号	学科名称
A	自然科学
180	生物学
180.71	生物工程(亦称生物技术)
180.7110	基因工程
180.7120	细胞工程
180.7130	蛋白质工程
180.7140	酶工程
180.7150	发酵工程
180.7199	生物工程其他学科

注:分类号栏目下三位数字的为一级学科,小数点后两位数字的为二级学科,小数点后三位数字的为三级学科。如“基因工程”为自然科学门类、生物学一级学科、生物工程(生物技术)二级学科下的三级学科。

#### 1.1.3.1 基因工程

基因工程(gene engineering)记载着生物技术领域至少3个发展里程碑。首先是

1952年, Watson和Crick发现了DNA双螺旋结构,他们在*Nature*杂志上发表了简短的研究报告(图1-2),奠定了现代分子生物学乃至基因工程的基础。他们于1962年获得诺贝尔生理学或医学奖,这篇研究报告是瑞典皇家科学院授予的同类奖项中最简短的研究报告。

第二个里程碑是1973年,美国加利福尼亚大学旧金山分校的Herbert Boyer教授和斯坦福大学的Stanly Cohen教授共同完成的一项著名实验,建立了DNA重组技术。他们将只含有单一限制性内切核酸酶(*EcoR* I)作用位点的两个质粒载体,用*EcoR* I酶切为线性分子,然后与DNA连接酶混合,一个质粒的DNA结合到另一个质粒的DNA分子中(这个过程称为重组)形成新的质粒DNA。将该新组成的质粒导入大肠杆菌,发现在该转基因大肠杆菌中有新的蛋白质产生。这表明该重组质粒在转化的大肠杆菌中能够表达(图1-3)。该实验说明了两个问题:①首次在理论上证实不同生物体的DNA能够在人工条件下重组形成新的遗传物质,具有重大科学意义。②他们敏锐地意识到该实验的重大实际意义,并提出了“基因克隆”策略。生物学家们立刻敏锐地认识到DNA重组技术对生命科学的重大作用和对生物产业发展的重大意义。基因工程因此而诞生,并根据Boyer和Cohen的DNA重组实验,将外源基因通过体外重组后导入受体细胞,使之能在受体细胞内复制、转录、翻译表达的操作过程叫做基因工程。因此,基因工程也可以称为DNA重组技术(recombinant DNA technology)。

基因工程的第三个里程碑是,1984年美国Cetus公司人类遗传研究室Kary Mullis等在Cetus科学年会上以墙报(poster)形式提出了聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR),使得基因的分析检测更为容易。PCR通常需要两个位于待扩增片段两侧的寡聚核苷酸引物,分别与待扩增的两条互补链结合,使两引物之间的区域得以通过



equipment, and to Dr. G. E. R. Deacon and the captain and officers of R.R.S. *Discovery II* for their part in making the observations.

<sup>1</sup> Young, F. B., Gerrard, H., and Jovons, W., *Phil. Mag.*, 40, 149 (1920).

<sup>2</sup> Loewel-Higgins, M. S., *Mon. Not. Roy. Astro. Soc., Geophys. Supp.*, 6, 285 (1948).

<sup>3</sup> Von Arx, W. S., *Woods Hole Papers in Phys. Oceanogr. Meteor.*, 11 (3) (1950).

<sup>4</sup> Ekman, V. W., *Arkiv. Mat. Astron. Fysik. (Stockholm)*, 2 (11) (1906).

## MOLECULAR STRUCTURE OF NUCLEIC ACIDS

### A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid

WE wish to suggest a structure for the salt of deoxyribose nucleic acid (D.N.A.). This structure has novel features which are of considerable biological interest.

A structure for nucleic acid has already been proposed by Pauling and Corey<sup>1</sup>. They kindly made their manuscript available to us in advance of publication. Their model consists of three intertwined chains, with the phosphates near the fibre axis, and the bases on the outside. In our opinion, this structure is unsatisfactory for two reasons: (1) We believe that the material which gives the X-ray diagrams is the salt, not the free acid. Without the acidic hydrogen atoms it is not clear what forces would hold the structure together, especially as the negatively charged phosphates near the axis will repel each other. (2) Some of the van der Waals distances appear to be too small.

Another three-chain structure has also been suggested by Fraser (in the press). In his model the phosphates are on the outside and the bases on the inside, linked together by hydrogen bonds. This structure as described is rather ill-defined, and for this reason we shall not comment on it.



This figure is purely diagrammatic. The two ribbons symbolize the two phosphate-sugar chains, and the horizontal rods the pairs of bases holding the chains together. The vertical line marks the fibre axis.

We wish to put forward a radically different structure for the salt of deoxyribose nucleic acid. This structure has two helical chains each coiled round the same axis (see diagram). We have made the usual chemical assumptions, namely, that each chain consists of phosphate diester groups joining  $\beta$ -D-deoxy-ribofuranose residues with 3',5' linkages. The two chains (but not their bases) are related by a dyad perpendicular to the fibre axis. Both chains follow right-handed helices, but owing to the dyad the sequences of the atoms in the two chains run in opposite directions. Each chain loosely resembles Furberg's<sup>2</sup> model No. 1; that is, the bases are on the inside of the helix and the phosphates on the outside. The configuration of the sugar and the atoms near it is close to Furberg's 'standard configuration', the sugar being roughly perpendicular to the attached base. There

is a residue on each chain every 3-4 A. in the z-direction. We have assumed an angle of 36° between adjacent residues in the same chain, so that the structure repeats after 10 residues on each chain, that is, after 34 A. The distance of a phosphorus atom from the fibre axis is 10 A. As the phosphates are on the outside, cations have easy access to them.

The structure is an open one, and its water content is rather high. At lower water contents we would expect the bases to tilt so that the structure could become more compact.

The novel feature of the structure is the manner in which the two chains are held together by the purine and pyrimidine bases. The planes of the bases are perpendicular to the fibre axis. They are joined together in pairs, a single base from one chain being hydrogen-bonded to a single base from the other chain, so that the two lie side by side with identical x-co-ordinates. One of the pair must be a purine and the other a pyrimidine for bonding to occur. The hydrogen bonds are made as follows: purine position 1 to pyrimidine position 1; purine position 6 to pyrimidine position 6.

If it is assumed that the bases only occur in the structure in the most plausible tautomeric forms (that is, with the keto rather than the enol configurations) it is found that only specific pairs of bases can bond together. These pairs are: adenine (purine) with thymine (pyrimidine), and guanine (purine) with cytosine (pyrimidine).

In other words, if an adenine forms one member of a pair, on either chain, then on these assumptions the other member must be thymine; similarly for guanine and cytosine. The sequence of bases on a single chain does not appear to be restricted in any way. However, if only specific pairs of bases can be formed, it follows that if the sequence of bases on one chain is given, then the sequence on the other chain is automatically determined.

It has been found experimentally<sup>3,4</sup> that the ratio of the amounts of adenine to thymine, and the ratio of guanine to cytosine, are always very close to unity for deoxyribose nucleic acid.

It is probably impossible to build this structure with a ribose sugar in place of the deoxyribose, as the extra oxygen atom would make too close a van der Waals contact.

The previously published X-ray data<sup>5,6</sup> on deoxyribose nucleic acid are insufficient for a rigorous test of our structure. So far as we can tell, it is roughly compatible with the experimental data, but it must be regarded as unproved until it has been checked against more exact results. Some of these are given in the following communications. We were not aware of the details of the results presented there when we devised our structure, which rests mainly though not entirely on published experimental data and stereochemical arguments.

It has not escaped our notice that the specific pairing we have postulated immediately suggests a possible copying mechanism for the genotic material.

Full details of the structure, including the conditions assumed in building it, together with a set of co-ordinates for the atoms, will be published elsewhere.

We are much indebted to Dr. Jerry Donohue for constant advice and criticism, especially on inter-atomic distances. We have also been stimulated by a knowledge of the general nature of the unpublished experimental results and ideas of Dr. M. H. F. Wilkins, Dr. R. E. Franklin and their co-workers at

B

图 1-2 Watson (1928~) (左) 和 Crick (1916~2004) (右) 发现 DNA 双螺旋结构; B. 发表于 *Nature* 上的论文

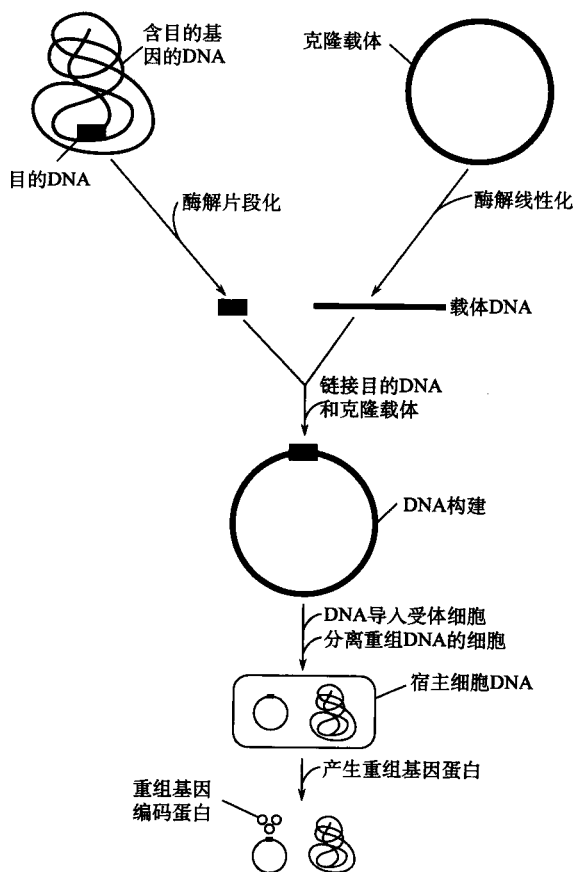


图 1-3 Boyer 和 Cohen 的 DNA 重组实验 (Branum, 1998)

聚合酶扩增。标准的 PCR 过程分为三个步骤 (图 1-4): ①DNA 变性: 双链 DNA 模板在热 ( $90\sim 96^{\circ}\text{C}$ ) 作用下氢键断裂, 形成单链 DNA。②退火: 系统温度降低 ( $55\sim 65^{\circ}\text{C}$ ), 引物与 DNA 模板结合, 形成局部双链。③延伸: 在适当温度 ( $70\sim 75^{\circ}\text{C}$ ) 下, *Taq* 酶使 DNA 序列从引物的  $5'\rightarrow 3'$  端延伸, 合成与模板互补的 DNA 链。每循环一次, DNA 含量增加一倍, 多次循环的 DNA 片段含量呈指数式递增 (约为  $2^n$ ,  $n$  为循环次数), 使目的 DNA 序列扩增放大从而容易被

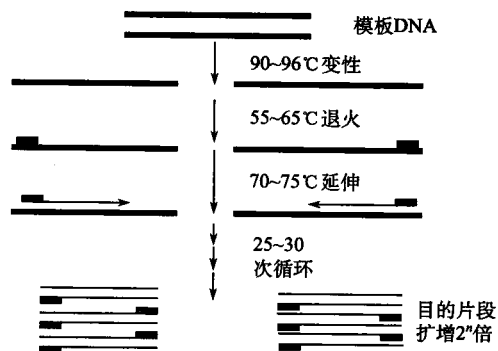


图 1-4 PCR 原理示意图

检测到。因为导入生物体内的目的基因往往是单个基因或几个拷贝, 在复杂的基因组中难以寻觅和测定, 但是有了 PCR 技术就可以通过设计目的基因的特定引物、特异性扩增目的基因片段, 再通过琼脂糖凝胶电泳将扩增片段分离鉴定出来, 达到检测的目的。



这种方法使得检测转基因生物中的目的基因片段成为可能。Mullis 本人由于发明了 PCR 方法而获得 1993 年诺贝尔奖。

总之，基因工程是建立在关于 DNA 双螺旋结构的认识、DNA 重组技术和体内目的基因检测技术的基础上发展形成的。特别是，若没有 DNA 重组技术的发展便不可能有基因工程。

### 1.1.3.2 细胞工程

细胞工程 (cell engineering) 是以细胞作为生物反应器，将物料加工，生产人们所需的生物产品并服务社会的科学技术。根据生物技术的定义，细胞工程可追溯到 1000 多年前，19 世纪人们已经利用微生物发酵技术大规模生产人们所需的生物产品。奶酪、乳酸、乙醇、柠檬酸、蛋白酶、啤酒、青霉素、味精等的生产均属于微生物发酵生物技术。从这个意义上讲，细胞工程在生物技术概念提出之前已经存在几百甚至上千年。因此，有人认为生物技术是非常古老又年轻的科学。

### 1.1.3.3 蛋白质工程

蛋白质工程 (protein engineering) 是基因工程与蛋白质物理化学及生物学相结合的一种现代生物技术。蛋白质是基因编码的产物，理论上通过基因工程 (即 DNA 重组技术) 将编码特定蛋白质的基因导入宿主细胞中表达，再通过分离、纯化等生物化工过程便可获得具有商业价值的蛋白质产品。很多天然的蛋白质，其物理、化学性质可能不适合工业化生产，需要经过人工改良和修饰，从而设计和创造出自然界没有而又具有优良性质的全新蛋白质。蛋白质工程首先是由美国基因公司的 Ulmer 于 1981 年提出，其含义是通过蛋白质分子结构的合理设计，再通过基因工程手段生产出具有更高生物活性或独特性质的蛋白质。蛋白质结构的分子设计和编码基因的改良两个方面：①通过蛋白质化学、晶体学和动力学的研究获得蛋白质物理和化学性质方面的信息。②对编码该蛋白质的基因进行定向设计、改造，再通过基因工程等手段生产蛋白质。这一步骤包括基因工程的全过程。由此可见，基因工程是实现蛋白质工程的先决条件。而蛋白质工程的实现必须具有扎实的生物化工基础，即蛋白质的分离、纯化、结构分析和功能鉴定能力。

### 1.1.3.4 酶工程

酶工程 (enzyme engineering) 是利用酶学理论和催化作用与化工技术相结合，通过生物反应器 (动物、植物、微生物细胞) 工业化生产人类所需产品的生物技术。其中，常用的酶主要有 6 类：氧化还原酶类、转移酶类、水解酶类、裂解酶类、连接酶类和异构酶类。常用的技术包括各类天然酶的开发和生产技术，如酶的分离、纯化和鉴定技术；固定化技术；多酶反应器的研制和应用；与其他生物技术的交叉渗透等。所生产的产品主要用于食品、轻工业和医药等领域，如  $\alpha$ -淀粉酶、葡萄糖淀粉酶、纤维素酶、壳聚糖、尿激酶、蛋白酶等。