

分子生物学技术原理

—— 基因工程入门

周昌奎 编著

西北大学出版社

学技术原理

基因工程入门

周昌奎 编著

西北大学出版社



内 容 提 要

本书在介绍分子生物学基本知识的基础上, 简明扼要地论述了分子生物技术的核心——基因工程的设计和操作的原理, 可供生物学及医学专业人员参考。

分子生物技术原理

——基因工程入门

周昌奎 编著

西北大学出版社出版发行

(西安市太白路)

新华书店经销 西安工业学院印刷厂印刷

787×1092 毫米 1/32 开本 印张: 4.125 字数: 64 千

1990 年 12 月 第 1 版 1990 年 12 月 第 1 次印刷

印数: 1—1,000

ISBN 7-5604-0218-6/Q·5 定价: 2.00 元

前 言

分子生物学的目标在于揭示生命过程的本质。目前已知，完成生命过程依赖于核酸和蛋白质分子之间的相互作用，因此，研究这两种分子的相互作用是揭示生命过程的关键。自从1973年DNA重组技术创建以来，经过十余年的发展，现在已建立起成套的基因工程技术，这一技术正是研究核酸与蛋白质分子之间相互作用的现代工具。可以说分子生物学技术是以基因工程为核心的。当前基因的研究正以前所未有的速度迅猛发展，并已从实验室的基础理论研究，发展为以生产基因重组所表达的产物的实际应用的研究。由于现有的重组产物作为商品投入工业生产，吸引了医药工业、化学工业的投资，因此在科学较发达的国家纷纷成立生物工程公司，竞相生产医药上更多、更急需的重组产品。

基因工程的研究在我国起步较晚，目前在乙型肝炎疫苗、干扰素重组技术等方面已取得了一些进展。国际上近几

年植物基因工程研究发展迅速，最近我国在这方面有重大突破。为了适应生命科学新技术迅猛发展的形势，让更多的人掌握高新技术知识，作者编写了这本《分子生物学技术原理——基因工程入门》，目的在于阐明基因工程设计和操作的基本原理及植物基因工程的一般原理。该书内容简明扼要，图文并重，初学者易于理解和接受，可作为生物专业及基础医学专业的参考读物。内容有不妥之处，请读者指正。书中插图系郭旗同志所绘，在此表示感谢。

编 者

目 录

第一章 绪论	(1)
一、DNA 重组技术发展大事纪	(1)
二、分子生物学技术的应用	(3)
第二章 核酸结构	(6)
一、核酸成分及一级结构	(6)
二、核酸二级结构	(9)
第三章 核酸功能	(16)
一、RNA 分类	(16)
二、DNA 复制	(17)
三、转录	(19)
四、翻译	(21)
第四章 核酸分离与分析	(24)
一、核酸分离	(24)
二、DNA 分析	(27)

三、蛋白质序列分析	(37)
四、复性动力学	(42)
第五章 用于遗传控制的酶	(44)
一、遗传控制概要	(44)
二、用于遗传控制的酶	(44)
第六章 克隆载体	(56)
一、质粒	(56)
二、病毒 DNA	(64)
三、粘尾质粒	(65)
四、用于真核生物的载体	(68)
第七章 特异核酸序列分离	(70)
一、cDNA	(70)
二、基因库	(75)
三、克隆杂交	(75)
四、缺口平移法	(78)
五、寡核苷酸探针	(78)
第八章 基因表达	(81)
一、基因表达基本条件	(81)
二、表达载体	(82)
三、正确翻译	(83)

第九章 植物基因工程的分子生物学特征	(86)
一、载体 DNA 转移到植物细胞的基本过程 ...	(87)
二、细菌与植物细胞相互作用的启动	(89)
三、T-DNA 转移、整合和表达	(92)
四、将基因导入 T-DNA 的特异位点工程	(100)
五、被转化组织再生植株及寄主细胞范围	(102)
第十章 克隆实验的安全性	(105)
英汉名词对照	(107)

第一章 绪 论

一、DNA 重组技术发展大事纪

1973 年美国 S.Cohen 等人将大肠杆菌两种质粒 DNA 片段重组，并引入 *E.coli* 中进行分子纯系扩增，在国际上创立了 DNA 体外重组技术。当时由于对新兴技术前景缺乏科学预见，曾引起公众对 DNA 重组过程潜在危险性的关注，忧虑有可能产生致病的新微生物。

1974 年有人呼吁在世界范围暂时禁止某些 DNA 重组试验。

1975 年英国在政府报告中叮嘱专门实验室要慎重从事重组 DNA 的研究。同年在美国加利福尼亚的 Asilomar 国际会议上，有人强烈要求正式通过一个关于管理 DNA 重组实验的准则，要求保证重组质粒和转化细胞不得从实验室逃逸。

1976 年美国国家卫生研究院 (NIH) 颁布了第一个禁止多种 DNA 重组实验的条例，公众密切关注这些条例的生

效。纽约时代杂志发表文章强烈要求禁止对 DNA 重组研究授予诺贝尔奖。

1977 年在美国成立了第一个遗传工程公司 (Genentech)，拨专款用于通过 DNA 重组技术制造重要医用药物。同年第一次创建了断裂基因 (Split gene)，并在 1977 年发展了对长片段 DNA 分子进行迅速序列测定的实验方法。

1978 年限制性内切酶的发现和应用获得了诺贝尔医学奖。同年第一个 DNA 重组产物——人生长激素释放因子 (Somatostatin) 问世。

1979 年美国 NIH 放宽了 1976 年制订的“条例”，允许用 DNA 重组技术研究病毒 DNA。

1980 年美国着手建立通过 DNA 重组技术生产胰岛素的大工厂。同年诺贝尔化学奖授予了第一个进行重组 DNA 分子克隆的科学家 S.Cohen 和发明高效 DNA 序列方法的科学家 F.Sanger。

1981 年美国政府提供超过 2 亿美元的投资，为遗传工程公司筹建了第一个重组 DNA 贮备库。

1983 年国际上首次大规模工业生产重组生长激素 (1.5 克/升培养液)。

1984 年以来，通过基因工程生产的重组产物，除前面提到的生长激素释放因子、胰岛素、生长激素外，还有血栓溶解素、凝血因子Ⅷ、各型干扰素、多种细胞因子及乙型肝炎病毒外壳蛋白等。据 1988 年资料，基因工程产物已达 26 种之多。

由上述发展过程可看出，70 年代初 DNA 重组只限于实验室研究，虽几经波折，仍发展迅速；到 70 年代末，基因工程技术已应用到重组产物的商品生产，把科学技术转变为生产力，走上商业化道路。目前不仅发达国家积极开展此项研究，发展中国家或地区也急起直追开展了这方面研究。

我国近年来十分重视重组技术的研究，研究队伍不断壮大，在国家大力支持下，在乙肝疫苗、细胞因子等遗传工程方面先后获得成果，正为实现重组产物商品化生产努力奋斗。

二、分子生物学技术的应用

(一) 应用于核酸分子结构的研究。运用 DNA 克隆到序列分析的一整套技术，可揭示出基因结构和功能的关系。例如通过对起动子区、控制位点、核糖体结合位点，核酸与其他蛋白质结合点的序列分析，可深刻地了解这些区域或位

点的结构，这对于解释这些区域的作用很有帮助。

(二) 通过分子生物学技术，已经发现了癌基因，这使对肿瘤的研究不只限于发病机制，而且也有可能进行预防。

(三) 由于脉冲凝胶电泳 (PFGE) 系统的发展，现已能分离和分析 DNA 巨片段，分离的 DNA 可转移到杂交膜上，再用特异探针检测遗传基因，测定出基因在染色体上的位置，从而可确定基因组总图，从中发现遗传病基因。应用此技术还可将每个人的 DNA 作特有的指纹图谱。每个人的重复 DNA (染色体 DNA 中的小随体 DNA) 的数量和结构都不同，因此基因组 DNA 杂交中，用小随体 DNA 作探针，可形成每个人所特有的图样，成为 DNA 个体指纹图谱。与通常指头上的指纹比较，DNA 指纹图更为精细。法医上可用此技术判定个体及亲缘关系；也可用于遗传进化及分子分类。

(四) 在诊断遗传疾病方面，可穿刺腹壁，从羊膜腔吸取羊水，分离胚胎细胞，通过 Southern 印迹法，以标记同位素的 cDNA 或寡核苷酸探针，探查基因突变以发现遗传疾病。目前在 500 多种遗传病中，有 40 种以上可用上述技术早期测定。例如镰刀状红血细胞贫血病和 β 地中海贫血症，是由单个基因突变引起的，可用 cDNA 或寡核苷酸探

针测定。

(五) 如前所述，分子生物学技术，通过遗传工程已生产出多种多肽及病毒外壳蛋白重组产物，并取得了巨大的经济效益和社会效益。这些重组产物在细菌中表达比用组织材料提取更易大规模生产，流程短且节约投资。此外，若按需要在体外修饰基因以生产酶，可以提高酶稳定性，这对工业规模生产酶具有重要的意义。

(六) 在农业方面，遗传工程已引入培育抗病作物品种和提高作物产量。畜牧业亦应用此技术于品种改良，目前正在研究之中，预期得到突破。

第二章 核酸结构

一、核酸成分及一级结构

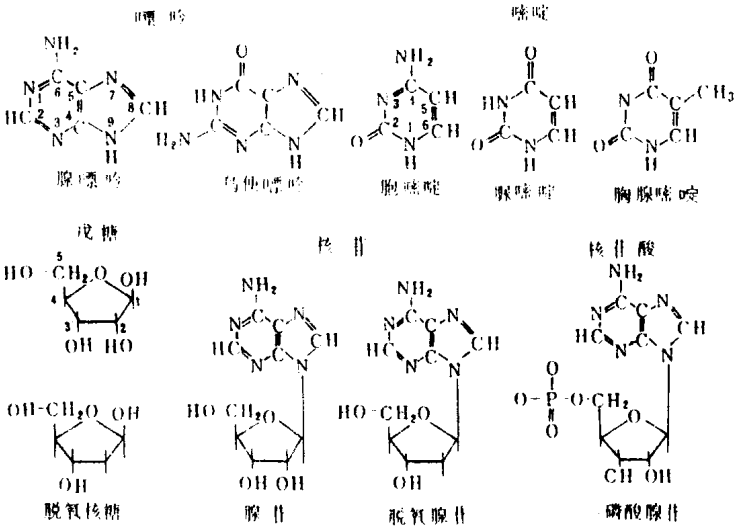


图1 碱基、核苷、核苷酸的结构

核酸是细胞中遗传信息的载体和传递者，是一类大分子聚合物。它的单体叫核苷酸。核苷酸分子包含三个成分：戊糖、磷酸及碱基。细胞中存在两种不同的核酸，即核糖核酸 (RNA) 和脱氧核糖核酸 (DNA)。RNA 和 DNA 的区别为：RNA 的戊糖为核糖 (ribose)，DNA 的戊糖为脱氧核糖 (2'-deoxyribose)；碱基中 RNA 存在尿嘧啶 (U)，DNA 存在胸腺嘧啶 (T)；腺嘌呤 (A)，鸟嘌呤 (G) 和胞嘧啶 (C) 同时存在于 RNA 和 DNA。新近发现 RNA 中出现胸腺嘧啶，DNA 中也出现了尿嘧啶。一个戊糖与一个碱基结合形成一个核苷 (nucleoside)，核苷再连接上磷酸成为核苷酸 (nucleotide)。各种碱基、核苷及核苷酸的结构见图 1 所示。

核苷酸中碱基、核糖 (脱氧核糖) 及磷酸连接的位置是一定的，碱基结合到戊糖第 1 碳原子 (1') 位置上，磷酸通过磷酸酯键连接到核苷的糖的第 5 位碳原子 (5') 上。应注意 (') 只表示糖的原子数目，而不是嘌呤或嘧啶碱的碳原子位置。在后面章节中常出现 5' 或 3' 符号，均指糖的碳原子位置。

由一个核苷酸的磷酸和另一个核苷酸的 3' 羟基结合形

成第 2 个磷酸酯键，把两个核苷酸连接在一起，延续成 5'→3'磷酸二酯键，该磷酸二酯键处于两个相邻的糖之间。这一连接方式连续进行，可形成很长的多核苷酸 (polynucleotide) 分子。每个多核苷酸都有一个游离的磷酸末端和另一端的一个 3' 游离—OH 末端，因此核苷酸分子存在两极性 (polarity)。这两个末端称为 5' 和 3' 末端 (图 2)。

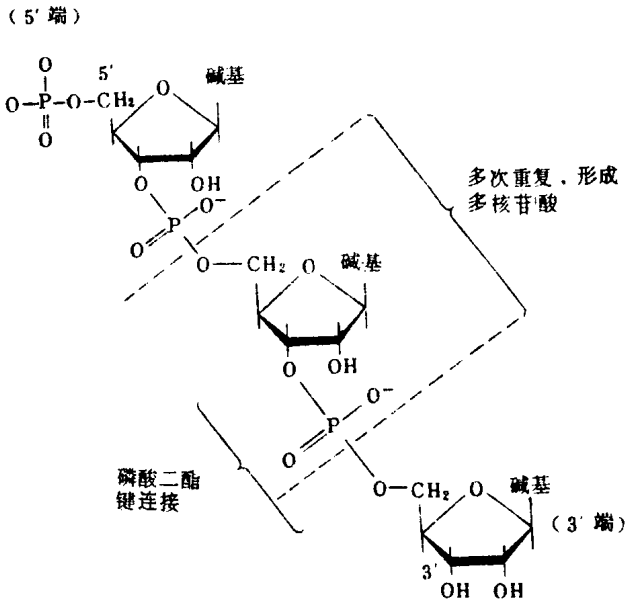


图 2 多核苷酸结构

核苷酸分子的碱基序列为核酸的一级结构。一般从核苷酸分子的 5'端开始测定核酸序列，然后用大写字母表示，例如 CGGATCT。由于在分子的全长中糖和磷酸的结构和位置是一致的，只是碱基有所不同，因此应注意，加点 (·) 不表示糖和磷酸基团，在必要的时候，磷酸基团可用字母表示，例如 5'pCGGATCT3'，其意义为磷酸存在于分子的 5'末端。

二、核酸二级结构

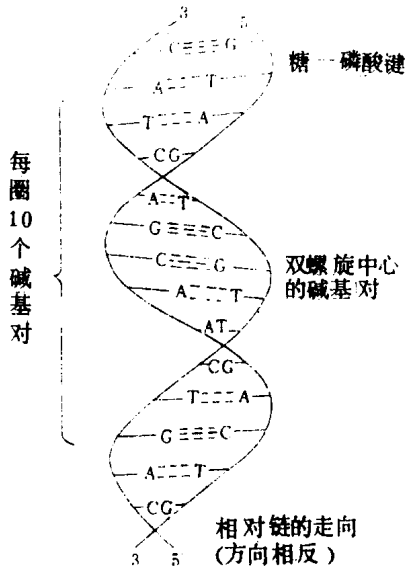


图3 DNA 双螺旋结构

(一) DNA 双股螺旋：DNA 通常不以单链形式存在，而以双股形式存在，成对的碱基在分子中间，外面为糖—磷酸键（图 3）。DNA 结构的基本性质取决于双股螺旋中互补的碱基序列。图 4 示出胸腺嘧啶与腺嘌呤的氢键形成互补，胞嘧啶与鸟嘌呤形成互补。

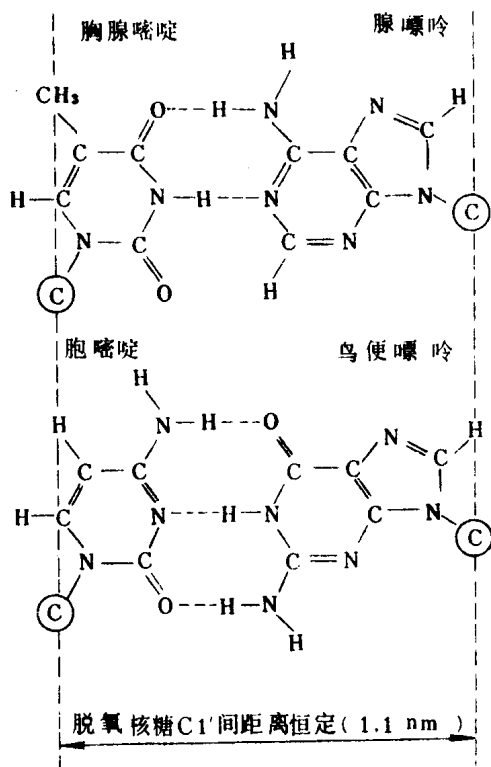


图 4 DNA 中的碱基对

⊙ 为脱氧核糖 c₁' 存在位置