



国外优秀生命科学教材译丛

基因操作原理

(第6版)

中文版

Principles of Gene Manipulation

● (英) Sandy Primrose Richard Twyman Bob Old
● 瞿礼嘉 顾红雅 译



高等教育出版社
Higher Education Press



国外优秀生命科学教材译丛

基因操作原理

(第6版) **中文版**

Principles of Gene Manipulation

- (英) **Sandy Primrose Richard Twyman Bob Old**
- 瞿礼嘉 顾红雅 译



高等教育出版社
Higher Education Press

图字:01-2002-3319号

译自

Sandy Primrose, Richard Twyman and Bob Old

Principles of Gene Manipulation, Sixth Edition

© 2001 by Blackwell Science Ltd

All Rights Reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, except as permitted by the UK Copyright, Designs and Patents Act 1988, without the prior permission of the copyright owner.

This edition is published by arrangement with **Blackwell Publishing**, Oxford.

图书在版编目(CIP)数据

基因操作原理:第6版/(英)普里默罗斯(Primrose, S.), (英)特威曼(Twyman, R.), (英)欧德(Old, B.)著;瞿礼嘉,顾红雅译. —北京:高等教育出版社, 2003.12

书名原文:Principles of Gene Manipulation

ISBN 7-04-012192-1

I. 基... II. ①普... ②特... ③欧... ④瞿... ⑤顾...

III. 基因-遗传工程 IV. Q78

中国版本图书馆CIP数据核字(2003)第079289号

出版发行 高等教育出版社

社 址 北京市西城区德外大街4号

邮政编码 100011

总 机 010-82028899

购书热线 010-64054588

免费咨询 800-810-0598

网 址 <http://www.hep.edu.cn>

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

经 销 新华书店北京发行所

印 刷 北京市鑫霸印务有限公司

开 本 787×1092 1/16

印 张 26.75

字 数 670 000

版 次 2003年12月第1版

印 次 2003年12月第1次印刷

定 价 41.80元

本书如有缺页、倒页、脱页等质量问题,请到所购图书销售部门联系调换。

版权所有 侵权必究

内 容 提 要

本书较全面地介绍了植物、动物和微生物基因工程领域的内容:前半部分,包括了不少与基因操作早期工作相关的内容,因为在当今的很多出版物中一般都假定读者已经对这些材料理解了,而要理解较早的文献都要用到这些材料;后半部分,重点是在真核生物尤其是高等真核生物中进行克隆操作,并且反映了当今科学研究的热点。全书共分为 14 章,内容包括:基因操作——一种全能技术,基本的技术,DNA 分子的切割与连接,质粒和噬菌体载体的基础生物学,柯斯质粒、质粒和其他先进的载体,克隆策略,测序和诱变,在大肠杆菌以外的其他细菌中的克隆,在酿酒酵母和其他真菌中克隆,动物细胞的基因转移,动物的基因操作,植物基因转化,转基因技术的进展,重组 DNA 技术的应用等。书后包含大量有用的参考文献,供读者参阅。本书并未把基因组分析的方法包括在内,因为它们不属于“基因操作”的范畴。本书适合生物科学和生物技术专业具有遗传学背景的生物技术专业高年级本科生和研究生学习选用。

前 言

从《基因操作原理》的第一版发行至今,已有 22 年的时间了。撰写第一版时,我们的目标是要解释一种崭新的并且正在迅速发展的技术。我们遵循的基本原则是要尽可能详细地阐明基因操作及其相关技术的原理,使非专业读者也能够理解。在本新版中依然坚持了我们最初的原则,因为过去的时光已证明了这一原则的正确性。虽然我们原本只是想写一本适用于本科生的高级教材,但据我们所知,有不少经验丰富的研究人员也将以前的那些版本作为他们有用的参考资料。在撰写本版时,我们特别注意了为这两类读者的需求提供服务,但却存在这样一个问题,即现在有经验的研究人员的要求和本科生或低年级研究生的要求有着很大的差异,而以前就没有这个问题。我们不想改变本书的难度及其通俗易懂的风格,所以采取了这样一种解决方法,即在本书的前半部分讲述专用于在大肠杆菌中进行克隆的基本方法,而在后半部分展示先进的技术。阅读并理解了前半部分内容的读者,或者早已了解的读者,理解本书后半部分的内容就不会有任何困难了。在最后一章中,我们以一种引人入胜的形式向读者概括介绍了重组 DNA 技术的一些重要应用。

在撰写本书的前半部分时,我们把不少与基因操作早期工作相关的内容包括在内。虽然年纪较大的读者可能会认为这部分材料“过时”了,但我们依然采用,因为在当今的很多出版物中一般都假定读者已经了解这些内容了,而要理解较早的文献都要用到这些材料。在本书的后半部分,重点是在真核生物尤其是高等真核生物中进行克隆操作,并且反映了当今科学研究的热点。本书并未把基因组分析的方法包括在内,因为它们不属于“基因操作”的范畴。但是,我们的另一本姊妹书《基因组分析和基因组学的原理》第三版中包含了这些内容。

要感谢我们的朋友和同事阅读了此新版中的很多章节并提出宝贵意见。尤其要感谢 Dylan Sweetman, Jane Pritchard, James Drummond, Roz Drummond, Phil Gardner, Gavin Craig, Ajay Kohli, Eva Stoger, Mark Leech, Victoria James, Paul Christou, Bruce Whitelaw, 和 Sue Goddard 以及她在 CAMR 的工作人员为我们在图书馆查阅资料提供的极大帮助。

Richard Twyman 想将本书献给他的父母 Peter 和 Irene,以及他的孩子 Emily 和 Lucy。

S. B. Primrose

R. M. Twyman

R. W. Old

(牛蔚然、瞿礼嘉译)

目 录

第 1 章	基因操作:一项全能技术	1
	导言	1
	序列分析	1
	体内生物化学	2
	新药物	3
	生物技术:一个新兴产业	4
	大肠杆菌扮演核心角色	6
	全书概览	6
第 2 章	基本技术	9
	导言	9
	基本问题	9
	解决方法:基本技术	10
	琼脂糖凝胶电泳	10
	核酸印迹	12
	对大肠杆菌的转化	18
	多聚酶链式反应(PCR)	20
第 3 章	DNA 分子的切割与连接	27
	切割 DNA 分子	27
	连接 DNA 分子	37
第 4 章	质粒和噬菌体载体的基础生物学	45
	质粒生物学和简单的质粒载体	45
	质粒 DNA 的纯化	51
	质粒克隆载体的理想特性	52
	噬菌体 λ	57
	用单链 DNA 载体进行 DNA 克隆	63
第 5 章	柯斯质粒,质粒和其他先进的载体	67
	导言	67

用于克隆大片段 DNA 的载体	67
特殊用途载体	74
合而为一:组合了多种特性的载体	88
第 6 章 克隆策略	90
导言	90
克隆基因组 DNA	91
cDNA 克隆	98
筛选的策略	109
差异克隆	120
第 7 章 测序和诱变	126
导言	126
DNA 测序的基本策略	126
全基因组测序	133
分析序列数据	133
改变基因:定点诱变	140
第 8 章 在大肠杆菌以外的其他细菌中的克隆	147
导言	147
将 DNA 转入细菌细胞中	147
在大肠杆菌以外的其他革兰氏阴性菌中进行克隆	153
在革兰氏阳性菌中进行克隆	156
部分同源重组	165
第 9 章 在酿酒酵母和其他真菌中克隆	166
导言	166
导入真菌的 DNA 的命运	167
应用于真菌的质粒载体	168
类似反转录病毒的载体	171
克隆基因的表达	175
蛋白在真菌中的过量表达	176
专用载体	179
酵母表面展示	180
识别编码特殊细胞活性的基因	184
确定特定基因的功能	184

第 10 章 动物细胞的基因转移	188
导言	188
DNA 介导的转化	189
经由病毒转导的基因转移	201
动物细胞表达系统总结	211
第 11 章 动物的基因操作	215
导言	215
哺乳动物的基因操作	216
对其他脊椎动物进行 DNA 转移	227
无脊椎动物的 DNA 转移	230
第 12 章 植物基因转化	234
导言	234
农杆菌介导的转化	238
DNA 直接转化植物	251
整株 (in planta) 转化	253
叶绿体转化	253
植物病毒载体	254
第 13 章 转基因技术的进展	260
导言	260
诱导表达系统	260
位点特异性重组的运用	266
用于基因抑制的转基因策略	273
功能基因组学中的转基因技术	279
第 14 章 重组 DNA 技术的应用	288
导言	288
主题 1 核酸序列可以作为诊断工具	289
可变数目串联重复 (VNTR) 多态性	294
主题 2 用于遗传疾病的新药与新疗法	298
主题 3 与传染病的斗争	308
主题 4 蛋白质工程	315
主题 5 代谢工程	319
主题 6 21 世纪的植物育种	327
结束语: 从基因到基因组	334

msh 10-57

参考文献	336
索引	413

基因操作：一项全能技术

导言

科学上的技术进步有时会使我们的认识产生飞跃,从而促进创新。随着基因操作技术的发展,分子生物学和生物医学研究在 20 世纪 70 年代中期经历了革命性的变化。虽然最初的实验产生了许多惊喜,但这一领域的早期工作者们谁都没有预测到这一技术会有如此广泛的应用,也不可能预见到他们开发的方法会催发形成一个崭新的产业,仅在美国就包含数百家大小不一的公司。

基因操作这一术语可应用于数种复杂的活体遗传学,也可指体外技术。实际上,在大部分西方国家的法律中都有对基因操作的精确定义,以便政府对此进行监控。在英国,基因操作定义为:将在细胞外用各种方法产生的核酸分子插入病毒、细菌质粒或其他载体系统,形成遗传物质的新组合,最终整合掺入到本来不包含这些核酸分子的宿主生物中,并进行复制繁衍。其他国家所采用的定义与此类似,而且都恰当地描述出了本书的主题。简单地说,基因操作是从原宿主生物中分离出一段 DNA 来,使其在同种或不同种的宿主中得以复制,这种技术称为克隆(cloning)。这种对 DNA 进行克隆的能力具有深远的意义,我们下面将加以介绍。

序列分析

克隆技术使我们可以分离并扩增某个基因组中的片段,进而可以测定该段 DNA 的序列。通过对某些遗传特性已经很清楚的基因进行序列分析,我们可以鉴定出控制基因表达的关键元件的特定序列和结构,如启动子、核糖体结合位点等。有了这些信息,我们就有可能搜索出新的 DNA 序列,鉴定出可能的新基因,或开放阅读框(open reading frame),因为它们的边界都有特定的基序。最初这种序列分析是手动进行的,但对肉眼来说大段的核苷酸序列没有多少意义,而且很难识别出什么模式。幸运的是,在基因克隆技术不断发展的同时,计算机技术也获得了飞速发展,软件技术日臻完善,这些都大大简化了这种序列分析。现在利用互联网上现有的程序,可以迅速从序列中检索出一整套系列的

结构特征,如限制性酶识别位点、转录起始和终止信号、反向回文序列、序列重复以及 Z-DNA 等等。

从一个基因的核酸序列我们可以轻易地推断其编码蛋白的序列。不幸的是,我们还无法总结出一个通用法则,从蛋白质多肽链的氨基酸序列预测出蛋白质的三维结构。但是,根据 300 多个蛋白质的晶体结构数据,人们仍然可以预测出某些结构基序。氨基酸序列本身也不能提供任何有关其功能的信息。解决这一问题的方法是:可以将该蛋白的氨基酸序列与其他性质更清楚的蛋白质的氨基酸序列进行比较;序列高度同源意味着在功能上具有相似性。同样,计算机技术在此也要发挥极大的作用,因为在计算机上有比较两个序列或将一个序列与一组其他序列同时进行比较的算法。互联网的发展使这样的比较变得十分方便,因为研究者可以从中央数据库中获取其中储存的所有蛋白质序列数据,而这些数据都是每日更新。

体内生物化学

任何活细胞,无论其来源如何,都要执行繁多的生化反应。为了分析这些不同的反应,生物化学家们破开细胞,分离出他们所感兴趣的关键组分,测定它们的含量。他们将这些组分纯化,确定它们的作用特性。例如,对酶而言,他们会确定它的底物特异性和动力学参数,如 K_m 和 V_{max} ,以及鉴定其抑制物并分析它们的作用模式。根据这些数据,他们想构建起一个细胞内反应的画面。但是,一个纯化后的酶在试管中的性质可能与它在细胞质中或在一个细胞区室中与上千种其他的酶和化合物共存时的性质完全不同。通过研究突变体,我们更易于理解细胞内发生的事件。我们可以通过突变体来确定改变对某个特定组分的调控作用,或是缺失该组分或使之丧失活性而产生的后果。突变体在阐明大分子的结构和功能方面也同样作用巨大。然而,由于使用传统技术,人们往往很难对突变的类型和/或突变的位点进行控制,因而突变体的使用受到了限制。

基因克隆为以上问题提供了完美的解决方案。一旦分离到某个基因或一组基因,都可以将它们引入原来的细胞类型或是不同的细胞类型中,甚至引入完全不同的生物中,例如将细菌基因引入到植物或动物中。基因表达的水平可以直接测定或者利用报告基因来测定,而且可以根据实验者的要求调高或调低。同样,人们可以在基因的任意位置引入特定的突变,从单碱基对突变到大片段的删除或插入增加,然后进行各种结构和功能分析。人们还可以分析基因或蛋白质在不同细胞类型中的功能,例如,某些酵母蛋白质具有的结构特征使之可以从酵母细胞中分泌出来,那么这些结构是否也能使之运到细菌或高等真核细胞之外呢?像这样的实验使我们可以对大分子过程进行比较研究,而且在某些情况下,基因克隆和序列测定是研究诸如有丝分裂、细胞分裂、端粒结构、内含子剪切等等过程的唯一途径。互联网再次为这种比较提供了便利,因为研究者可以从中央数据库中获取其中储存的所有蛋白质序列数据,而中央数据库是每日更新的。

测序的最初目标是确定一个基因的核苷酸精确序列。后来目标变为测定一个小基因组的序列。最初选择的是一个小病毒的基因组(ϕ X174, 5 386 个核苷酸)。之后目标变为较大的质粒和病毒基因组,然后是染色体和微生物基因组,最终目标是高等真核生物(人、拟南芥)的全基因组(表 1.1)。现在测定大基因组的序列已很常见,但仅限于专业的测序实验室中。获得一种生物全基因组的序列,将为我们研究其生物学的某些特定方面提供诱人的前景。例如,我们可以在对一种新微生物的生理学一无所知的情况下,确定其生化特性。但是,细胞生物学中还有许多方面的信息是不可能仅通过序列分析数据来获得的。例如,在细胞周期和生物体生活周期中,何时合成了哪些 RNA? 它们循环的速

率如何?何时合成了哪些蛋白质?同一细胞中的不同蛋白质如何相互作用?环境对基因表达有何影响?基因组学、蛋白质组学和环境组学等新学科正在探索这些问题的答案,这些新学科都大大依赖于基因操作技术,我们对此将在后面进行讨论。在 Primrose 和 Twyman(2002)中可以找到关于全基因组测序、基因组学和蛋白质组学的详细介绍。

表 1.1 测序基因组大小的增加

测序基因组	年份	基因组大小	注释
噬菌体 ϕ X174	1977	5.38 kb	第一个测序的基因组
pBR322 质粒	1979	4.3 kb	第一个测序的质粒
λ 噬菌体	1982	48.5 kb	第一个测序的染色体
EB 病毒	1984	172 kb	
酵母第三号染色体	1992	315 kb	
流感杆菌	1995	1.8 Mb	第一个测序的细胞生物的基因组
啤酒酵母	1996	12 Mb	第一个测序的真核基因组
线虫	1998	97 Mb	第一个测序的多细胞生物基因组
果蝇	2000	165 Mb	第一个测序的哺乳动物基因组
人	2000	3000 Mb	
拟南芥	2000	125 Mb	第一个测序的植物基因组

新药物

基因操作在过去 25 年中的发展已经使生物学发生了革命性的变化。在生物学中已经没有什么领域不使用重组 DNA 技术,因此传统的领域划分(如植物学、动物学、遗传学、生物化学等)正在迅速崩解。其中医药领域受到重组 DNA 技术的冲击比任何其他领域都更大。

重组 DNA 技术产生的第一个医药用途是提供了大量的治疗用蛋白质,如人类生长激素(HGH)。这种蛋白质用于治疗脑下垂体萎缩的青少年,使他们能达到正常高度。最初 HGH 是从尸体上切除的脑下垂体中纯化而来的,但是生产足够治疗一个儿童所需的 HGH 就需要大量的脑下垂体。此外,用从垂体中纯化的 HGH 治疗的一部分儿童还患上了 Creutzfeld - Jakob 综合征。当人们克隆了 HGH 基因并将它放在大肠杆菌中表达后,一个 10 L 的发酵罐中生产的 HGH 就足以医治上百个儿童。从此以后,人们第一次用上了许多种治疗用蛋白质,它们中许多也是在大肠杆菌中生产的,而另一些则用酵母或动物细胞生产,还有一些是通过植物或动物的乳汁生产的。它们之间的惟一共性就是利用基因操作技术克隆了相关的基因,然后使其过量表达。

医药的其他方面同样也从重组 DNA 技术中受益(图 1.1)。人们已经开发出了新的疫苗生产方法。现在的乙肝疫苗就是在酵母细胞表面表达一个乙肝病毒的抗原,而人们在欧洲的大部分地区使用了一种重组的疫苗消灭狐狸的狂犬病。基因操作还可用于提高微生物细胞中小分子的水平,其做法是克隆某个特定生化合成途径的所有基因,并过量表达。与之相反,也可以关闭某些特定的代谢途径,从而将特定的中间代谢物导入其他的途径,变成我们的目标终产物。这种方法已经在促进手性中

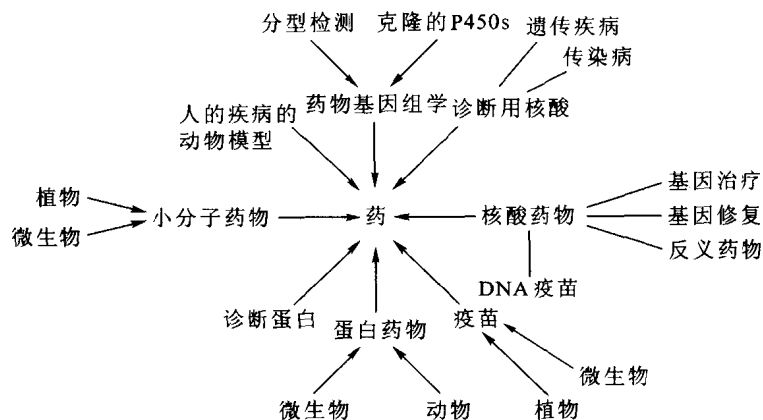


图 1.1 基因操作对医药的影响

间代谢物和抗生素的生产中得到应用。通过对从产生不同但相似分子的生物中克隆的基因进行混合和配合,人们还有可能创造出新型的抗生素,这种技术叫做组合型生物合成。

基因克隆使核酸探针的合成变得很容易,而这样的探针在医药上有许多用途。例如,它们可用于判断或确认某种微生物病原的种类,或者用于在出生前或初生时诊断遗传疾病。人们还越来越多地用探针来确定药物是否可能导致不良反应,或选择治疗某一特定疾病的最适合的药物种类(药物基因组学)。这种技术的一个改进,就是用克隆的细胞色素 P450 来确定新药物的代谢方式,以及它是否会产生任何潜在的有毒副产物。

核酸本身也可用于治疗。例如,人们用反义核酸来下调某些疾病基因的表达水平。另外,人们还用核酸来纠正或修复遗传的基因缺陷(基因治疗/基因修复)或把核酸用作疫苗。与基因修复相反,人们也可培育出拥有与给人造成疾病的相同的遗传突变的动物。注意使用反义核酸和基因疗法/修复都必须首先了解准确的病因。在大多数情况下,我们缺乏这样的信息,而现有的药物只是针对症状。这种情况在下一个 10 年将得到很大的改善。

生物技术:一个新兴产业

由于早期在大肠杆菌中过量表达哺乳动物蛋白获得了成功,少数有创业精神的人就想到应该成立新的公司来充分发挥重组 DNA 技术的潜力,这样 Genentech 公司就诞生了(文框 1.1)。从此以后,数以千计的生物技术公司在世界各地建立起来了。基因操作领域内新的重大突破一旦公布于世,就会立刻涌现出大批新的公司来使新技术商业化。例如:许多最近新成立的公司都期望人类基因测序计划获得的数据可以有助于鉴定出大量可用于治疗的新蛋白;另一些公司则利用基因操作技术来了解特定基因的转录调控,他们的观点是用小相对分子质量的口服活性药物来调节这一过程会取得更好的治疗效果。

虽然有数以千计的生物技术公司,但其中只有不到 100 个公司销售自己的产品,盈利的就更少了。有许多生物技术公司已经倒闭了,但生物技术飞速发展,不断有新的公司出现来取代他们的位置。获得发展的是那些为在实验室里进行基因操作的研究者们提供特殊试剂的一类生物技术公司。

最初,研究者们必须自己生产限制性内切酶,因而只有具有蛋白质化学技术的人才能使用基因操作技术。不久就有一些公司成立了,它们为研究者们提供高质量的酶以供基因操作之需。但尽管有了这些酶,许多人还是感到克隆 DNA 很困难,原因是准备克隆 DNA 所用试剂中的所有成分都需要严格的质量控制,而这是研究者们并不擅长的!因此公司就设计了使用方便的克隆试剂盒。今天,这些供给公司能提供克隆、表达和分析 DNA 所需的几乎一切用品,促进了重组 DNA 技术在生物学各个领域中的广泛应用。在重组 DNA 技术发展早期,方法开发本身就是许多研究者的目标。现在情况不同了。研究者们开始使用这些方法来深化我们对生物学的认识,而新方法的开发则主要变成供给公司的任务了。

文框 1.1 一个行业的诞生

生物技术并不是最近才有的。奶酪、面包和酸奶都是生物技术的产品,人们已经认识它们几百年了。但是,股票市场对生物技术的热情则是源于对基因进行操作的可能性,这就是本书的主题。现代版本的生物技术的诞生可以追溯到 Genentech 这个公司的建立。

1976 年,一个叫 Robert Swanson 的 27 岁的投机资本家与一个加州大学的教授 Herb Boyer 讨论了有关几种啤酒的问题。讨论集中在基因操作的商业潜力。Swanson 对该技术的热情和信心具有很强的感染性。到会议结束时,两人决定成立 Genentech(遗传工程技术)公司。尽管 Swanson 和 Boyer 面对来自学术界和商业界的双重怀疑,但他们还是按他们的想法前进了。很快,他们就获得了巨大成功(见表 B1.1),几年时间他们就证明了他们的反对者是错误的。在 Genentech 建立之后,仅美国就成立了 1 000 家以上的生物技术公司,但成功的极少。

表 B1.1 Genentech 公司的关键性事件

1976 年	Genentech 公司成立
1977 年	Genentech 公司在微生物中生产出第一种人类蛋白(促生长素抑制素)
1978 年	Genentech 公司的科学家克隆到人类胰岛素
1979 年	Genentech 公司的科学家克隆到人类生长激素
1980 年	Genentech 公司上市,身价提高了 35 000 000 美元
1982 年	第一种重组 DNA 药物(人类胰岛素)面市(Genentech 公司的产品,经营许可证属于 Eli Lilly & Co.)
1984 年	首个因子 VII 的实验室产品,这种因子用于治疗血友病。许可证授予了 Cutter Biological
1985 年	Genentech 上马该公司的首个产品,protropin(人类生长激素),用于治疗儿童的生长激素缺陷
1987 年	Genentech 上马 Activase(纤溶酶原激活物),该药物用于溶解心脏病患者的血栓
1990 年	Genentech 上马 Actimmune(干扰素 - Y1B),该药物用于治疗肉芽肿性疾病
1990 年	Genentech 和瑞士 Pharmaceutical 公司的 Roche 分公司完成价值 21 亿美元的合并

大肠杆菌扮演核心角色

大肠杆菌一直是分子遗传学家们乐于使用的模式系统。在重组 DNA 技术发展之前,就已有大量性质清楚的大肠杆菌的突变体存在,其基因调控也搞得很清楚,而且还有许多质粒可供选择。与其他微生物系统相比,它简直是无与伦比的。因此,第一个克隆实验在大肠杆菌中进行是意料之中的事。随后,人们把克隆技术推广到一系列其他微生物(例如枯草芽孢杆菌、假单胞菌、酵母和丝状真菌)中以及高等真核生物中。有趣的是,在大肠杆菌中克隆比在其他生物中克隆从技术上讲更简单一些。因此研究者们很少直接将 DNA 克隆到其他生物中。通常的做法是,首先在大肠杆菌中对所选生物的 DNA 进行操作,而后转移回到原来的宿主生物中。如果没有在大肠杆菌中克隆和操作 DNA 的技术,在其他生物中应用重组 DNA 技术将变得很困难。

全书概览

如上所述,大肠杆菌在重组 DNA 技术中扮演着关键角色。因此,本书前半部分用于讨论在大肠杆菌中基因操作的方法(图 1.2)。第二章涵盖了在所有克隆实验中通用的方法,这些方法是该技术成功的基础。第三章讨论有选择地将 DNA 分子酶切成片段,使之易于重新连接的技术。做不到这

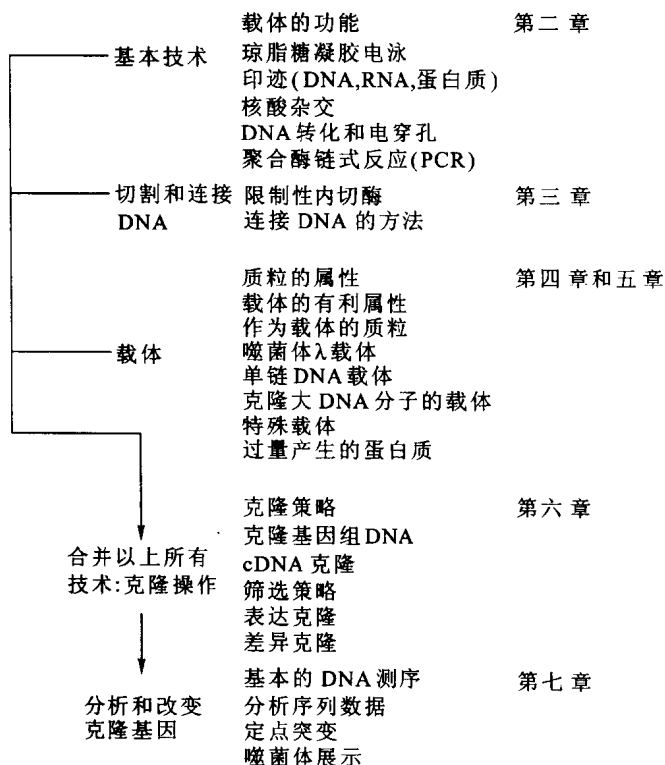


图 1.2 概括基因操作基本技术和它们之间关系的示意图

点,就根本不可能有重组 DNA 技术。如果将 DNA 片段插入细胞,它们不会复制,除非在极罕见的情况下,它们整合到染色体上去了。为使这些片段得到延续,它们要插入到能在染色体外进行复制的 DNA 分子(载体)中。这些载体是从质粒、噬菌体衍生而来的,它们的基本性质在第四章中有阐述。最初,载体的目的是复制克隆的 DNA,但现在载体能完成许多其他的任务,如方便测序、促进克隆基因的表达以及方便纯化克隆基因的表达产物等等。有这些作用的专门载体在第五章中阐述。掌握了这些背景知识后,就可以详细地介绍如何克隆所需的特定 DNA 序列了。有两种基本策略。一种策略是克隆某种生物所有的 DNA,然后筛选极少数感兴趣的克隆;另一种方法是扩增感兴趣的 DNA 序列,然后克隆这些序列。在第五章中讲述了这两种策略。一旦克隆到感兴趣的 DNA,就可以测定它的序列,这将提供有关其编码蛋白和所有可能的调控信号的信息。研究者们还可能希望修饰 DNA 和/或蛋白质的序列,并确定这种修饰产生的生物学效应。测序和改变克隆基因的技术将在第七章中讲述。

在本书的后半部分讲述的是在大肠杆菌以外的其他生物中进行克隆的专门技术(图 1.3)。该部分每章都可以与其他章分开来单独阅读,前提是对本书前半部分的内容有了彻底的了解。第八章详细介绍了在其他细菌中进行克隆的方法。起初人们曾认为其中某些细菌(如枯草芽孢杆菌)将取代大肠杆菌的地位,但最终未能实现。人们还利用基因操作技术了解这些细菌的生物学特征。第九章

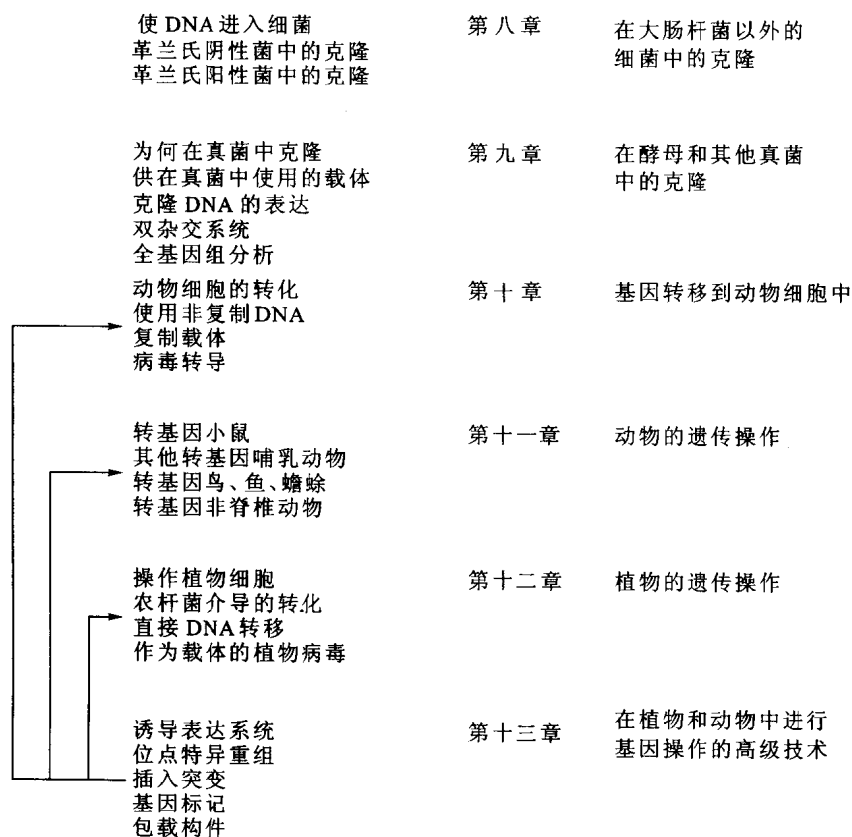


图 1.3 基因操作高级技术以及它们在大肠杆菌以外的其他生物中的应用示意图

集中讨论真菌中的克隆,但重点放在酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)上。真菌是真核生物,而且是研究有丝分裂、减数分裂和细胞分裂调控等问题的极为有用模式系统。动物细胞也可以像微生物一样进行培养,在第十章中阐述了在动物细胞中的克隆。第十一章和第十二章用于讨论在高等真核动植物中进行克隆的复杂性,第十三章则囊括了这些系统中的尖端技术。

最后一章是对重组 DNA 技术在生物技术产业中各种应用的一个概述。我们没有按一项应用接一项应用的顺序进行讨论,而是集中于以下 6 个主题,以突出不同技术之间的相互作用:

1. 核酸序列作为诊断工具;
2. 治疗遗传疾病的新药物和新疗法;
3. 抵御传染病;
4. 蛋白质工程;
5. 代谢工程;
6. 21 世纪的植物育种。

通过这样处理主题,我们可以阐明一些基本技术与基因组序列信息带来的复杂分析之间的相互作用。

(白蕾、瞿礼嘉译)