

Ji Yin gong cheng

邱泽生 主编

基因工程



首都师范大学出版社

基因工程

邱泽生 刘祥林 吴晓强 编著

首都师范大学出版社

(京)新208号

图书在版编目 (CIP) 数据

基因工程/邱泽生主编.-北京:首都师范大学出版社,
1993.8 (1998.重印)
ISBN 7-81039-010-4

I.基… II.邱… III.基因-遗传工程 IV.Q78

中国版本图书馆CIP数据核字 (96) 第06898号

首都师范大学出版社

(北京西三环北路105号 邮政编码 100037)
北京银祥福利印刷厂印刷 全国新华书店经销
1993年8月第1版 1998年7月第3次印刷
开本 787×1092 1/16 印张 13.25
字数 300 千 印数 4,001—7,000
定价: 14.40 元

前 言

基因工程是 70 年代初诞生的一门新学科。在不到 20 年的时间里，已经取得了许多令人惊叹的成果，并以迅猛的势头向前发展，成为当今生物学领域中最有生命力的、最引人注目的前沿学科之一。

基因工程的出现，对社会发生了很大的影响。它的发展，已经使工业、农业、医疗卫生等事业以及生物科学本身发生了深刻的变革。目前，基因工程已经被许多国家（包括我国）列为高科技项目。可以说，基因工程既是生物领域高科技的基础，又是高科技项目本身，它的发展潜力是不可估量的。为了培养人材和普及基因工程方面的知识，许多大专院校（包括高等师范院校）已经开设了基因工程课，也出版了几种教材。本书是根据我们对四届生物系本科生的讲授内容和方法，并参阅有关国内外教材和文献的基础上编写的。内容侧重于基因工程的基本原理和基本技术，力图简明扼要。并且，对于难于理解的部分用图解加以说明，力争做到图文并茂。读者对象是师范院校的学生。师范院校培养的学生大多数不可能在毕业后从事基因工程的研究，开设本课的目的是使他们了解基因工程方面的知识并把基因工程与生物科学的研究联系起来。为此，在第七章专门讲述基因工程在生物科学研究上的应用。

本书第一、二、四章由邱泽生教授执笔，第三、五章由刘祥林讲师执笔，第六、七章由吴晓强讲师执笔。

由于时间仓促、水平有限，缺点与错误在所难免，请多加批评指正。

首都师范大学 生物系
邱泽生、刘祥林、吴晓强
1992年 2 月

目 录

第一章 导论	1
一、基因工程的诞生及其研究内容	1
(一) 基因工程的诞生	1
1. 理论上的三大发现	1
2. 技术上的三大发明	2
(二) 基因工程研究的内容	3
二、基因操作的基本技术	5
(一) 凝胶电泳	5
(二) 核酸分子杂交	8
1. Southern 吸印技术	9
2. Northern 吸印技术	10
(三) 细菌转化	11
三、基因工程的成就与展望	13
第二章 基因操作的工具酶	16
一、限制性核酸内切酶与 DNA 分子的切割	16
(一) 寄主控制的限制与修饰现象和内切酶的发现	16
(二) 限制性核酸内切酶的分类和命名	18
1. 分类	18
2. 命名法	19
(三) I 型核酸内切限制酶的基本特征	22
1. 粘性末端与平末端	22
2. 识别序列在 DNA 分子上出现的频率	24
(四) 内切酶限制消化反应条件	26
1. 限制消化的操作过程	26
2. 影响核酸内切限制酶活性的因素	26
二、连接酶和 DNA 分子的连接	29
(一) DNA 连接酶	29
1. 连接酶的作用机理	29
2. DNA 连接酶的反应条件	31
(二) DNA 片段的连接	31
1. 粘性末端 DNA 片段的连接	31
2. 平末端 DNA 片段的连接	32
3. 同聚物谱尾连接平末端 DNA 片段	33
4. 用衔接物连接平末端 DNA 分子	34
三、DNA 聚合酶	34
(一) 大肠杆菌 DNA 聚合酶 I	35

(二) 大肠杆菌DNA聚合酶 I 的Klenow片段与DNA末端标记	37
(三) T ₄ DNA 聚合酶	39
(四) 逆转录酶	39
四、DNA 和 RNA 的修饰酶	40
(一) 核酸酶S ₁	40
(二) 末端脱氧核苷酰转移酶	41
(三) 外核酸酶Ⅲ	41
(四) 外核酸酶Ba131	42
(五) T ₄ 多核苷酸激酶	42
(六) 碱性磷酸化酶	43
第三章 基因克隆载体	45
一、质粒载体	45
(一) 质粒的一般生物学特性	45
1. 质粒 DNA	45
2. 质粒的类型	46
3. 质粒的复制类型	47
4. 质粒的不亲和性	47
5. 质粒的存在形式和分离	49
(二) 质粒载体的选择	49
1. 理想质粒载体的基本条件	49
2. 不同载体类型的选用	50
(三) 大肠杆菌质粒载体	51
1. PSC101质粒载体	51
2. ColEI质粒载体	51
3. pBR322质粒载体	52
4. 部分大肠杆菌质粒载体的基本性质	56
二、噬菌体载体	56
(一) 噬菌体的一般生物学特性	57
(二) λ 噬菌体载体	59
1. λ DNA分子	59
2. λ 噬菌体载体的构建	61
3. λ 噬菌体载体的应用	64
4. 常用入噬菌体载体	66
(三) 柯斯质粒载体	67
1. 柯斯质粒载体的组成	68
2. 柯斯质粒载体的特点	68
3. 柯斯质粒载体的应用	69
(四) 单链DNA噬菌体载体	71
1. M13噬菌体的一般生物学特性	71
2. M13载体	73
3. M13载体的特点及应用	73
三、真核细胞的克隆载体	78

(一) 在酵母细胞中克隆基因常用的载体	78
1. 整合型载体	78
2. 复制型载体	79
3. 附加体型载体	79
(二) 植物基因克隆的载体——Ti质粒	80
1. Ti质粒的结构和特性	80
2. Ti质粒的作用	81
(三) 动物细胞基因克隆的载体	83
1. SV40病毒	83
2. SV40病毒载体	84
四、各级载体的简表	87
第四章 基因分离与重组及重组体向宿主细胞的导入	88
一、目的基因的获得	89
(一) 化学合成基因	89
(二) 基因文库的构建及基因分离	92
(三) 从真核生物分离纯化目的基因的一般方法——逆转录法	95
1. 总RNA提取	95
2. mRNA的分离与纯化	96
3. mRNA转译活性的鉴定	96
4. 逆转录合成双链 cDNA	96
5. cDNA 基因文库的建立	98
二、重组体的构建	100
(一) 质粒DNA 的分离纯化	100
(二) 目的基因与载体的连接	100
1. 外源DNA片段定向插入载体分子	101
2. 非互补粘性末端DNA分子的连接	101
3. 连接反应的条件	103
三、重组体向宿主细胞的导入	104
(一) 重组体DNA分子的转化或转染	105
(二) 重组体的体外包装及 λ 噬菌体的转导	107
第五章 重组体克隆的筛选与鉴定	109
一、利用表型特征筛选	110
(一) 利用载体提供的表型特征筛选重组体分子	110
1. 抗药性标记插入失活筛选法	110
2. β -半乳糖苷酶显色反应选择法	112
(二) 利用插入序列提供的表型特征筛选	115
(三) 利用噬菌斑形成筛选	117
二、利用核酸杂交筛选	117
(一) 原位杂交筛选过程	118
(二) 核酸杂交检测的探针	119
三、利用免疫学方法筛选	121

(一) 放射性抗体检测法	122
(二) 免疫沉淀检测法	124
四、转译筛选法	125
(一) 阻断转译杂交法	126
(二) 杂交释放转译法	127
五、物理筛选法	128
(一) 电泳法筛选	128
(二) R-环检测法	129
第六章 克隆基因的表达	130
一、基因表达的基本条件	131
(一) 有效转录	131
1. 启动子	132
2. 终止子	132
3. RNA合成的不同阶段	133
4. 真核生物与原核生物转录的区别	134
(二) 正确转译	137
1. 起始密码子	137
2. 核糖体结合位点	137
3. 转译的三个步骤	137
4. 转译后的修饰与加工	138
二、启动子的性质及克隆基因的高效表达	138
(一) 启动子的性质	138
(二) 常用于表达载体的启动子	140
1. Lac启动子	140
2. trp启动子	140
3. tac启动子	140
4. λ PL启动子	140
(三) 提高克隆基因表达效率的途径	141
1. 启动子结构对表达效率的影响	141
2. 转译起始序列对表达效率的影响	142
3. 启动子同克隆基因间隔距离对表达效率的影响	142
4. 转录终止区对克隆基因表达效率的影响	145
5. 质粒拷贝数及稳定性对表达效率的影响	145
三、原核有效表达载体的构建	146
(一) 只带E.coli启动子的最简单表达载体	148
(二) 启动子的选择	148
(三) 转录表达载体的应用	149
1. 可提供全部表达信号的盒式载体	149
2. 合成融合蛋白的盒式载体	150
3. 几种常用的表达载体	151
(四) 大肠杆菌生产重组蛋白的共同问题	157
1. 转录水平	157

2. 转录和转译之间的情况	157
3. 转译水平	157
4. 转译之后	157
5. 细胞水平	158
四、真核基因在原核生物中表达的实现	158
(一) 胰岛素基因在大肠杆菌细胞中的表达	158
(二) 生长激素释放抑制因子基因在大肠杆菌中的表达	162
第七章 基因工程在生物学研究中的应用	165
一、怎样研究克隆的基因	165
(一) 基因定位	165
1. 遗传重组值定位	166
2. 家系分析定位	166
3. 非整倍体定位	166
4. 细胞学定位	167
5. 体细胞杂种定位	167
6. 基因转移定位	167
7. 物理学定位	169
(二) 基因序列分析	173
1. Sanger—coulson方法——M13单链终止法	173
2. Maxam—Gilbert 化学降解法	176
3. DNA序列连续测定法	178
4. DNA长序列的拼接	179
5. DNA 测序的能力及新方法	180
(三) 基因表达的调控	182
1. 转译水平的调控	182
2. 转录水平的调控	183
二、基因工程在生物学研究中的应用	191
(一) 线粒体基因研究	191
1. 用标准技术定位线粒体基因	192
2. 线粒体基因组DNA测序	192
3. 线粒体DNA测序的几个惊人发现	194
(二) 叶绿体基因工程研究	195
1. 光合作用基因工程的主要目标	196
2. 叶绿体基因工程的研究进展	197
(三) 种子储藏物质的生物合成	200
1. 种子具重要的营养价值	200
2. 氨基酸缺乏问题	200
(四) 基因克隆的未来展望	202
1. 重组方法生产非蛋白产物	202
2. 转基因动、植物	202
3. 植物和动物细胞培养	202
主要参考书目	202

第一章 导 论

在研究生物演化的过程中，遗传和变异是两个重要的概念。遗传性赋予生物种的稳定，保证生物种的延续不断。变异性赋予生物种的进化，保证生物种对各种环境的适应。遗传和变异是在一个生物体内统一起来的。在生物演变的长河中，自然发生的变异是非常缓慢的，随着生物学的发展，人类开始学会干预生物的变异，经典遗传学的出现，使人们在几年至几十年内便可实现在自然界中需要千百万年才能出现的变异，从而改变了某些物种，有利于人类。从本世纪 70 年代初，基因工程学诞生，在短短不过 20 年的时间内已经取得了许多激动人心的成果。它的最大特点，就是以重组 DNA 的技术，开辟了在短时间内改造生物遗传性的新天地。它填补了生物种属间不可逾越的鸿沟，克服了常规育种的盲目性，使人类有可能按照需要定向培育生物新品种、新类型乃至创造自然界从未有过的新生物。基因工程正以新的势头迅猛发展，成为当今生物科学研究领域中最有生命力、最引人注目的前沿科学之一。

一、基因工程的诞生及其研究内容

(一) 基因工程的诞生

基因工程发展的道路并不是一帆风顺的。现在人们公认，基因工程诞生于 1973 年，它是数十年来无数科学家辛勤劳动的成果、智慧的结晶。从 40 年代开始，科学家们从理论和技术两方面为基因工程的产生奠定了坚实的基础。概括起来，从 40 年代到 70 年代初的基因工程诞生，在现代分子生物学领域理论上的三大发现及技术上的三大发明对基因工程的诞生起到了决定性的作用：

1. 理论上的三大发现

首先，40 年代发现了生物的遗传物质是 DNA。Avery 1934 年在美国的一次学术会上首次报道了肺炎球菌 (*Diprococcus pneumoniae*) 的转化。超越时代的科学成就，往往不容易很快被人接受，Avery 的论文没有得到公认。事隔十年，这一成果才得以公开发表。事实上，Avery 不仅证明 DNA 是生物的遗传物质，而且也证明了 DNA 可以把一个细菌的性状转给另一个细菌，理论意义十分重大。正如诺贝尔奖金获得者 Lederberg 指出的，Avery 的工作是现代生物科学的革命开端，也可以说是基因工程的先导。

第二，50 年代搞清楚了 DNA 的双螺旋结构和半保留复制机理。1953 年，Watson 和 Crick 提示了 DNA 结构的双螺旋模型。对生命科学的发展，足以和达尔文学说、孟德尔定律相提并论。

第三，60 年代确定了遗传信息的传递方式。于 1961 年 Monod 和 Jacob 提出了操纵子学说。以 Nirenberg 等为代表的一批科学家，经过艰苦的努力，确定遗传信息是以密码方式传递的，每三个核苷酸组成一个密码子，代表一个氨基酸。到了 1966 年全部破译

了64个密码，编排了一本密码字典，叙述了中心法则，提出遗传信息流是DNA→RNA→蛋白质。从此，千百年来神秘的遗传现象，在分子水平上得到了揭示。

2. 技术上的三大发明

表 1-1 若干种生物基因组的大小范围

生物种	大小范围 (kb)
猴肾病毒40 (SV40)	5.1
痘苗病毒	190
大肠杆菌	4 000
酿酒酵母	13 500
黑腹果蝇	165 000
人	2 900 000
南美洲肺鱼	102 000 000

从40年代到60年代，虽然从理论上已经确立了基因工程的可能性，科学家们也为基因工程设计了一幅美好的蓝图。但是，基因工程是门内容广泛的、综合性的生物技术学科。科学家们面对着庞大的双链DNA(ds DNA)，尤其是真核生物，其DNA分子是相当巨大的(表1-1)，仍然是束手无策，不能把它切成单个的基因片段。尽管那时酶学知识已得到相当的发展，但没有任何一种酶能对DNA进行有效的切割。

1970年，Smith和Wilcox在流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)中分离并纯化了限制性核酸内切酶HindⅠ，使DNA分子的切割成为可能。1972年Boyer实验室又发现了名叫EcoRI的核酸内切酶，这种酶每遇到GAATTC序列，就会将双链DNA分子切开形成DNA片段。以后，又相继发现了大量类似于EcoRI这样的限制性核酸内切酶，这就使研究者可以获得所需的DNA特殊片段，为基因工程提供了技术基础。对基因工程技术的突破的另一发现是DNA连接酶。1967年，世界上有五个实验室几乎同时发现了DNA连接酶。这种酶能够参与DNA裂口的修复。1970年，美国的Khorana实验室发现了一种叫T₄ DNA连接酶，具有更高的连接活性。

科学家有了对DNA切割与连接的工具(酶)，还不能完成DNA体外重组的工作。因为大多数DNA片段不具备自我复制的能力。所以，为了能够在寄主细胞中进行繁殖，必须将DNA片段连接到一种特定的、具有自我复制的DNA分子上。这种DNA分子就是基因工程载体(Vector)。基因工程的载体研究先于限制性核酸内切酶。从1946年起，Lederberg开始研究细菌的性因子——F因子，经过50和60年代，相继发现其它质粒，如抗药性因子(R因子)，大肠杆菌素因子(CoE)。到1973年，Cohen将质粒作为基因工程的载体使用。这是基因工程诞生的第二项技术发明。

1970年，Baltimore等人和Temin等人同时各自发现了逆转录酶，打破了中心法则，使真核基因的制备成为可能。

具备了以上的理论与技术基础，基因工程诞生的条件已经成熟。两位科学的“助产士”——Berg和Cohen把基因工程接到了人间。

1972年，美国斯坦福大学的P. Berg领导的研究小组，在世界上第一次成功地实现了DNA体外重组。他们使用限制性内切酶EcoRI，在体外对猴肾病毒SV40的DNA和λ噬菌体的DNA分别进行酶切，然后再用T₄ DNA连接酶把两种酶切的DNA片段连接起来，结果获得了包含有SV40和人DNA重组的杂种DNA分子。1973年，斯坦福大学的S. Cohen等人，也成功地进行了另一个体外重组实验并实现了细菌间性状的转移。他们将大肠杆菌(E. Coli)的抗四环素(TC^r)质粒PSC101和抗新霉素(Ne^r)及抗磺胺(s^r)的质粒R6—3，在体外用限制性内切酶EcoRI切割，连接成新的重组质

粒，然后转化到大肠杆菌中。结果在含四环素和新霉素的平板中，选出了抗四环素和抗新霉素的重组菌落，即表型为 $Tc^r Ne^r$ 的菌落。这是基因工程发展史上第一次实现重组体转化成功的例子（图1-1）。基因工程从此诞生，这一年被定为基因工程诞生的元年。

从基因工程诞生之日起，受到人类的极大关注。其理论和实践的意义都非常重大，但和任何新生事物一样，其成长过程中也遇到了强大的阻力。基因工程刚诞生的头几年，人们对它有不少争论。争论的焦点是害怕基因工程创造的杂种生物会从实验室逸出，在自然界造成难以控制的危害。有害的杂种细菌或病毒与化学物质不同，它们会在自然界不断增殖，造成的危害更大。于是许多社会人士、政府官员、甚至科学家发出呼吁，要求制定法规，限制基因工程的研究。美国国立卫生研究院（NIH）成立了一个专门委员会处理这些诉愿事宜，并于1975年制定了“通用重组DNA分子研究准则”，尽管已经对基因工程的安全防护作了许多规定，仍有不少科学家联名要求取消危险的实验。面对着强大的阻力，一批科学家仗义执言，Cohen 等人写文章，一方面指出基因工程具有强大的生命力，另一方面告诫人们，所谓基因工程的危险都是估计的，根本无法断言，是人们对新生事物不理解所造成的恐惧。另一个基因工程学家 A. Kornberg 也指出，如大多

数人不能区分原子和分子，病毒和细胞，细胞和生物一样，由于对基因工程缺乏理解，造成恐惧。以后，情况渐渐缓和。更重要的是，研究人员通过事实消除了人们恐惧的心理。开始，人们用大肠杆菌 K_{12} 作为宿主菌。人们担心通过研究者的消化道带出实验室。经过连续两年对研究人员的粪便检查，均未发现大肠杆菌 K_{12} 和质粒。1977年，Itakura 等人用人工合成的生长激素释放抑制素（Somatostatin, SMT）基因，第一次实现了真核基因在原核细胞中表达，轰动了全世界，各种指责逐渐消失，基因工程以它旺盛的生命力向前发展。

（二）基因工程研究的内容

基因工程产生以来，还没有一个统一的公认定义。一般认为基因工程是指：把体外核酸分子（无论采取什么方法从细胞中取得）组合到任何病毒、细菌质粒或其它载体系统（分子），形成遗传物质的新组合，并使之进入到原来没有这类分子的宿主体内，而能持续稳定地繁殖。或者说，它是对 DNA 大分子上的遗传单元（基因）进行体外操作，把不同来源的基因按照设计的蓝图，重新构成新的基因组（即重组体），再把它引入细

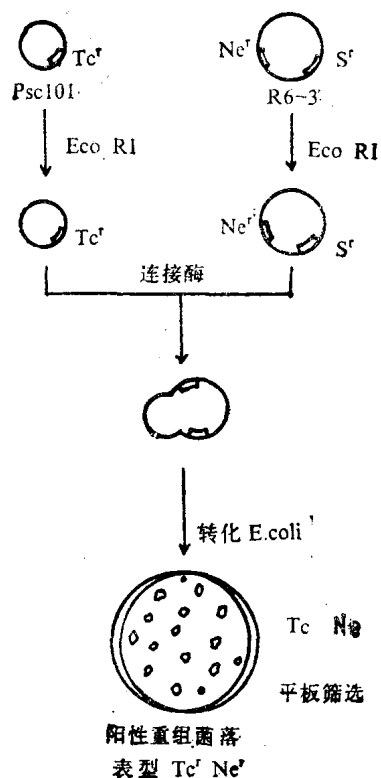


图 1-1 Cohen DNA 重组、转化与阳性重组体筛选示意

胞中，构成具有新的遗传特性的生物。

从实质上讲，基因工程的定义强调了外源 DNA 分子的新组合被引入到一种新的寄主生物中进行繁殖。这种 DNA 分子的新组合是按照工程学的方法进行设计和操作的。这就赋予基因工程跨越天然物种屏障的能力，克服了固有的生物种间的限制，扩大和带来了定向创造新生物的可能性，这是基因工程的最大特点。

基因工程问世以来，各种名称相继问世。在文献中常见的有遗传工程 (Genetic engineering)、基因工程 (Gene engineering)、基因操作 (Gene manipulation)、重组 DNA 技术 (Recombinant DNA technique)、分子克隆 (Molecular cloning)、基因克隆 (Gene cloning) 等，这些术语所代表的具体内容彼此具有相关性，在许多场合下被混同使用，难以严格区分。不过它们之间还是存在一定的区别的。例如，遗传工程比基因工程有更广泛的内容，凡是人工改造生物遗传性的技术如物理化学诱变、细胞融合、花粉培育、常规育种、有性杂交等，还包括基因工程在内。因此，遗传工程包括基因工程，遗传工程不等于基因工程。又如重组 DNA 技术，它是基因工程的核心内容，但严格地说，基因工程除上述的定义所阐明的内容以外，还应包括体外 DNA 突变，体内基因操作以及基因的化学合成等。总之，凡是在基因水平上操作而改变生物遗传性的技术都属于基因工程。而重组 DNA 技术不等于就代表基因工程。

至于生物工程，它是更大范围内改造生物并生产生物产品的工程技术，是现代生物学中一切工程技术的总称，除遗传工程、基因工程外，还有酶学工程、细胞工程、发酵工程、农业工程等。

克隆 (Clone) 一词有必要加以解释。当它作为名词使用时，是指从一个祖先通过无性繁殖方式产生的后代，或具有相同遗传性状的 DNA 分子、细胞或个体所组成的特殊的生命群体；当克隆作动词使用时，是指从同一祖先生产这类同一的 DNA 分子群或细胞群的过程。因为体外重组 DNA 的过程中，是通过能够独立自主复制的载体或噬菌体为媒介，把外源 DNA (片段) 引入宿主细胞进行繁殖，实质上是从一个 DNA 片段增殖了结构和功能完全相同 DNA 分子群的过程，也是为遗传同一的生物品系 (它们都带有重组 DNA 分子) 成批地繁殖和生长提供了有效的途径。因此，基因工程也可称为基因克隆或 DNA 分子克隆。

基因工程研究的内容包括以下几个主要内容或步骤 (图1-2)。

- (1) 从生物有机体复杂的基因组中，分离出带有目的基因的 DNA 片段。
- (2) 在体外，将带有目的基因的 DNA 片段连接到能够自我复制并具有选择标记的载体分子上，形成重组 DNA 分子。
- (3) 将重组 DNA 分子引入到受体细胞 (亦称宿主细胞或寄主细胞)。
- (4) 带有重组体的细胞扩增，获得大量的细胞繁殖群体 (菌落)。
- (5) 从大量的细胞繁殖菌落中，筛选出具有重组 DNA 分子的细胞克隆。
- (6) 将选出的细胞克隆的目的基因进行进一步研究分析，并设法使之实现功能蛋白的表达。

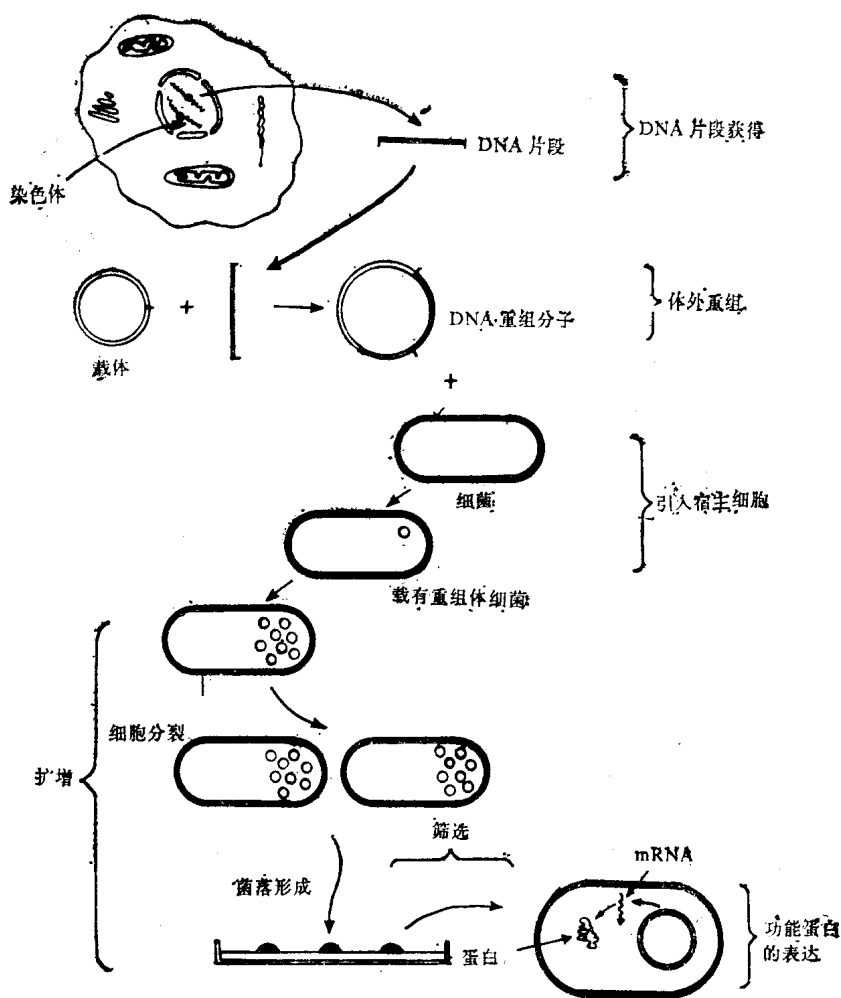


图 1-2 基因工程的基本步骤

二、基因操作的基本技术

基因工程的发展与科学技术的发展是分不开的,重组体 DNA 研究的基本实验方法,除了密度梯度超速离心和电子显微技术之外,还包括 DNA 分子的切割与连接、核酸分子杂交、凝胶电泳、细胞转化以及 DNA 序列结构分析和基因的人工合成等多种新技术新方法。DNA 分子的切割与连接,是基因操作的核心部分,由于是同核酸内切限制酶及连接酶密切相关的,因此,将这方面的内容安排在第二章进行讨论。而 DNA 序列分析将在最后一章介绍。基因人工合成将在第四章作简单介绍。这里只介绍最基本的三方面技术。

(一) 凝胶电泳

自从琼脂糖凝胶和聚丙烯酰胺凝胶被引入核酸研究以来,凝胶电泳已经发展成为一种分析鉴定重组 DNA 分子的重要技术手段,同时也被广泛地应用于 DNA 的核酸内切

限制酶消化片段的分析、分离和纯化等方面的工作。

当一种分子被放置在电场当中时，它们就会以一定的速度移向适当的电极。这种电泳分子在电场作用下的迁移速度，叫做电泳的迁移率，它是同电场的强度和电泳分子本身所携带的净电荷数成正比。也就是说，电场强度越大，电泳分子所携带的净电荷数量越多，其迁移的速度也就越快，反之则较慢。由于在电泳中使用了一种无反应活性的稳定的支持介质，如琼脂糖凝胶和聚丙烯酰胺凝胶等，从而降低了对流运动，故电泳的迁移率又是同分子的摩擦系数成反比。已知摩擦系数是分子的大小、极性及介质粘度的函数，因此根据分子大小的不同，构型或形状的差异，以及所带的净电荷的多寡，便可以通过电泳将一群分子混合物中的各种成分彼此分离开来。

在生理条件下，核酸分子之磷酸—糖骨架中的磷酸基团，是呈离子化状态的。从某种意义上讲，DNA 和 RNA 的多核苷酸链可叫做多聚阴离子。因此当核酸分子被放置在电场当中时，它们就会向正电极的方向迁移。由于磷酸—糖骨架在结构上的重复性质，相同数量的双链 DNA 几乎具有等量的净电荷，所以它们能以同样的速度向正电极方向迁移。在一定的电场强度下，DNA 分子的这种迁移速度，亦即电泳的迁移率，是取决于核酸分子本身的大小和构型。分子量较小的 DNA 分子，比分子量较大的 DNA 分子更容易通过凝胶介质，故其电泳迁移率也快些；共价闭合螺旋状环形的质粒 DNA 分子即超螺旋分子，具有较紧密的构型，所以其电泳迁移率也就比同等分子量的松散型的开环 DNA 分子或线性 DNA 分子（图1-4）要快些。这就是应用凝胶电泳技术分辨 DNA 片段的基本原理。所以，琼脂糖凝胶电泳不仅可以分离 DNA 分子的大小，而且可以鉴定其分子构型。

凝胶的分辨能力同凝胶的类型和浓度有关。琼脂糖凝胶分辨 DNA 片段的范围为几百个碱基对到 2 万个碱基对之间；而要分辨较小分子量的 DNA 片段，则要用聚丙烯酰胺凝胶，其分辨范围为 6 个碱基对到 1000 个碱基对之间。凝胶浓度的高低影响凝胶介质孔隙的大小，浓度越高，孔隙越小，其分辨能力也就越强；反之，浓度降低，孔隙就增大，其分辨能力也就随之减弱。例如，20% 的聚丙烯酰胺凝胶的分辨力可达 6bp DNA 小片段，而要分离 1000bp 的 DNA 片段，则要用 3% 的聚丙烯酰胺的凝胶。再如，2% 的琼脂糖凝胶可分辨小到 500bp 的双链 DNA 分子，而对于大片段的 DNA，则要用低浓度（0.3~1%）的琼脂糖凝胶。

凝胶电泳的优点在于它不单是一种分析的手段，同时也可以用来制备和纯化特定的 DNA 片段。在这方面，使用低熔点（LMP）的琼脂糖凝胶较为方便。实验室中通用的有两种不同类型的琼脂糖凝胶，一种是常熔点的，另一种是低熔点的，后者的价格相当昂贵。它们都是琼脂的衍生物，具有很高的聚合强度和很低的电内渗，因此都是良好的电泳支持介质。LMP 琼脂糖是一种熔点为 62~65°C 的琼脂衍生物，它一旦熔解，便可在 37°C 下持续保持液体状态达数小时之久，而在 25°C 下也可持续保持液体状态约 10 分钟。LMP 琼脂糖可以不经电洗脱或破碎凝胶即可用来回收 DNA。具体操作是将凝胶在 65°C 下加热几分钟，然后向液态琼脂糖溶液中加入过量的酚液抽提 DNA，这样在离心所得的上相清液中便含有除去了琼脂糖的 DNA 分子。另外，一旦 LMP 琼脂糖已经溶化，并保持在 37°C 下，那么就可以直接进行一定的酶催反应。据此，人们对已经电泳分离的 DNA 酶催化片段进行第二种酶切消化反应。将这种混合物加到另一个凝胶

槽上，待凝固之后，再进行第二次电泳。由于 LMP 琼脂糖凝胶具有以上这些突出的优点，因此在现代分子生物学研究及基因克隆实验中具有十分广泛的用途。

在凝胶电泳中，加入溴化乙锭(ethidium bromide, 简称 EB) 染料对核酸分子染色之后，将电泳标本放置在紫外光下观察，便可以十分敏感而方便地检测出凝胶介质中 DNA 的谱带部位，即使每条 DNA 带中只含有 $0.05\mu\text{g}$ 的微量 DNA，也可以被清晰地显现出来。这是因为溴化乙锭是一种具扁平分子的核酸染料，可以插入到 DNA 或 RNA 分子的碱基之间，并在 300nm 波长的紫外光照射下放射出荧光，所以可以用来显现琼脂糖凝胶和聚丙烯酰胺凝胶中的核酸分子(图1-3)。当把含有 DNA 分子的凝胶浸泡在溴化乙锭的溶液中，或是将溴化乙锭直接加到 DNA 的凝胶介质中，此种染料便会在一切可能的部位同 DNA 分子结合，然而却不能同琼脂糖凝胶或聚丙烯酰胺凝胶结合，因此在紫外光的照射下，只有 DNA 分子通过发射荧光而变成可见的谱带(图1-5)。而且在适当的染色条件下，荧光的强度是同 DNA 片段的大小(或数量)成正比。在包含有数种 DNA 片段的电泳谱带中，每一条带的荧光强度是随着从最大的 DNA 片段到最小的 DNA 片段方向逐渐降低的。换言之，在一定程度上，电泳谱带的荧光强度是同 DNA 片段的大小成比例的。这是溴化乙锭—凝胶电泳体系的一种重要的特性。据此，研究工作者们便能够通过同已知分子量的标准 DNA 片段之间的比较，测定出共迁移的 DNA

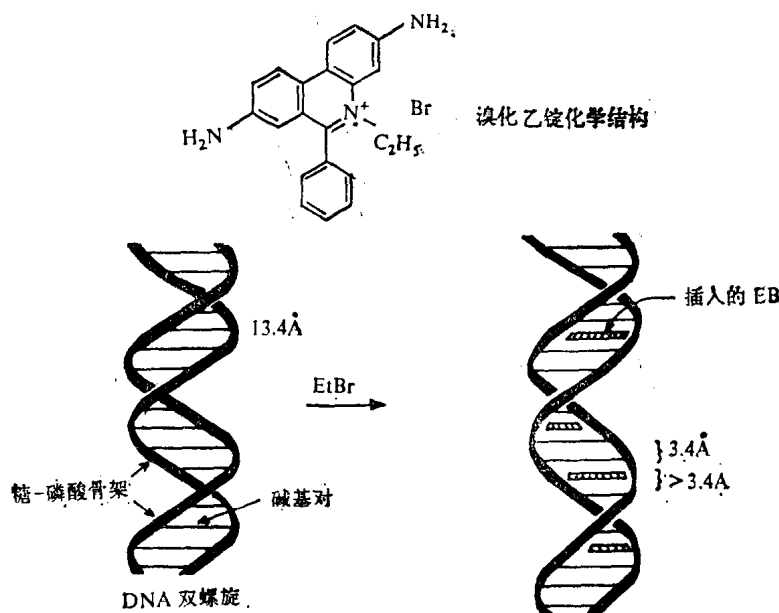


图 1-3 EB插入DNA双螺旋结构示意图

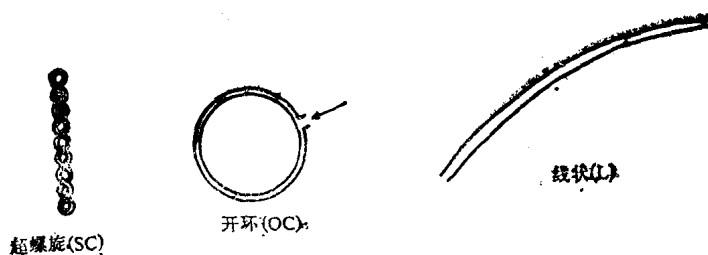


图 1-4 PBR322 (4.3Kb) DNA的三种构象

片段的分子量，并对经核酸内切限制酶局部消化产生的 DNA 片段作出鉴定。或者，从电泳的迁移率推断出其分子的构象（图1-5）。

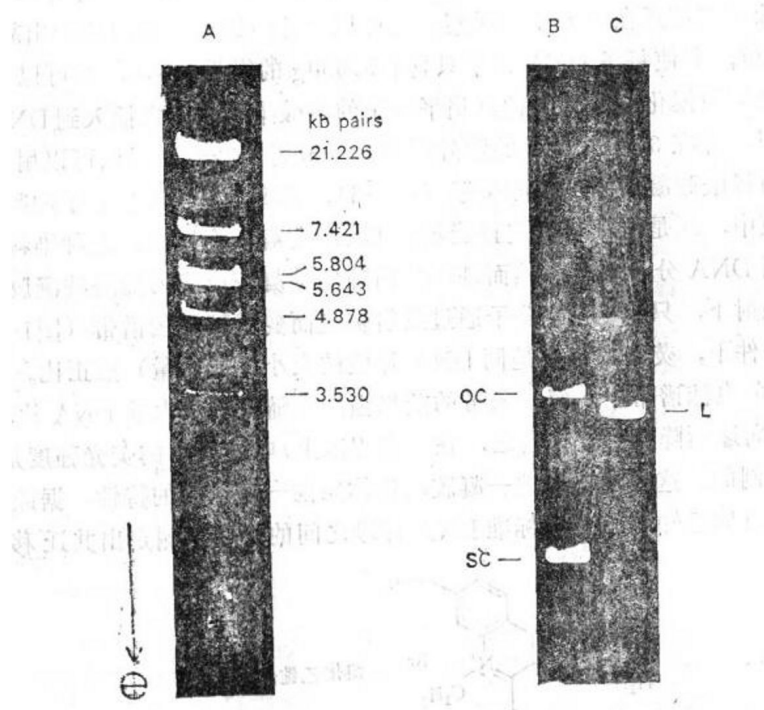


图 1~5 DNA琼脂糖凝胶电泳

Kb, 千碱基对 A. λ DNA用Eco RI内切酶消化后，在1%琼脂糖凝胶上电泳，然后用EB浸染，在黑暗中用紫外灯观察的橙色荧光带 B. C. PBR322 (4.3Kb) 的三种构象的电泳

(二) 核酸分子杂交

核酸分子杂交技术，是在1968年由华盛顿卡内几学院 (Carnegie Institute of Washington) 的 Boy Britten 及其同事发明的。所依据的原理是，带有互补的特定核苷酸序列的单链 DNA 或 RNA，当它们混合在一起时，其特定的同源区段将会退火形成双链的结构。如果彼此退火的核酸来自不同的生物有机体，那么如此形成的双链分子就叫做杂种核酸分子。能够杂交形成杂种分子的不同来源的 DNA 分子，其亲缘关系较为密切，反之，其亲缘关系则比较疏远。因此，DNA/DNA 的杂交作用，可以用来检测特定生物有机体之间是否存在着亲缘关系。而形成 DNA/DNA 或 DNA/RNA 杂种分子的这种能力，更重要的是可以用来揭示核酸片段中某一特定基因的位置。这种核酸杂交技术，如同 DNA 快速分离法，以及凝胶电泳技术一样，都是分子生物学中 DNA 分析方法的基础。

在大多数的核酸杂交反应中，经过凝胶电泳分离的 DNA 或 RNA 分子，都是在杂交之前，通过毛细管作用或电导作用，被转移到滤膜上，而且是按其在凝胶中的位置原封不动地“复印”上去的。常用的滤膜有硝酸纤维素滤膜，叠氮苯氧甲基纤维滤膜