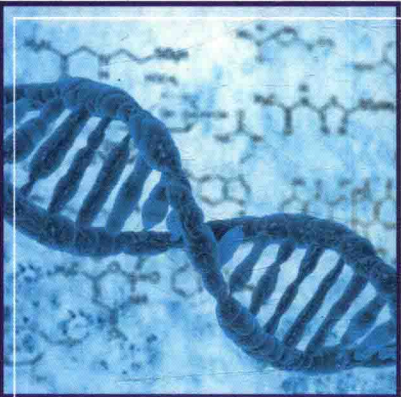


JYIN GONGCHENG JISHU FANGFA
JIQI DIANXING YINGYONG YANJIU

基因工程技术方法 及其典型应用研究

李修平◎著



国家一级出版社”



中国纺织出版社

“全国百佳图书出版单位”

2015年度黑龙江省博士后资助经费 (LBH-Z15203)

基因工程技术方法 及其典型应用研究

李修平◎著

图书在版编目(CIP)数据

基因工程技术方法及其典型应用研究 / 李修平著.

-- 北京: 中国纺织出版社, 2018.1

ISBN 978-7-5180-3927-2

I. ①基… II. ①李… III. ①基因工程—研究 IV.

①Q78

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2017)第 204796 号

责任编辑:姚 君

责任印制:储志伟

中国纺织出版社出版发行

地址:北京市朝阳区百子湾东里 A407 号楼 邮政编码:100124

销售电话:010-67004422 传真:010-87155801

<http://www.c-textilep.com>

E-mail:faxing@c-textilep.com

中国纺织出版社天猫旗舰店

官方微博 <http://www.weibo.com/2119887771>

虎彩印艺股份有限公司印刷 各地新华书店经销

2018 年 1 月第 1 版第 1 次印刷

开本:710×1000 1/16 印张:14

字数:253 千字 定价:59.50 元

凡购本书,如有缺页、倒页、脱页,由本社图书营销中心调换

前 言

生命科学在 20 世纪有了惊人的发展,并已经成为新世纪发展最快的领头学科之一。以生命科学领域中的基因工程技术为代表的新兴生物技术,已成为推动生命科学发展的主要动力。生物技术犹如一顶王冠,而基因工程技术则是这顶王冠上的一颗明珠。

基因工程技术以 DNA 重组技术为核心,实现了按人类意图跨物种基因交流以定向改良生物性状,不但酝酿着一场对自然界和人类社会发展产生深刻影响的产业革命,而且必将极大地促进人类对生命奥秘的探索进程。可以预期,21 世纪必将成为基因工程技术等众多新兴生物技术推动的生命科学的世纪。

本书根据目前生命科学领域中基因工程技术的研究与应用现状,主要论述了基因工程的基本原理与技术方法,及其在相关领域的应用。全书共 7 章,主要内容包括引言、基因工程的工具酶与克隆载体、基因工程中的典型技术研究、目的基因的获取途径分析、外源基因的表达、转基因动植物、基因治疗等。

本书在撰写过程中,参考了大量有价值的文献与资料,吸取了许多人的宝贵经验,在此向这些文献的作者表示敬意。此外,本书的撰写还得到了学校领导的支持和鼓励,在此一并表示感谢。由于基因工程技术发展的日新月异,加之作者自身水平及时间有限,书中难免有错误和疏漏之处,敬请广大读者和专家给予批评指正。

编 者

2017 年 5 月

目 录

第 1 章 引言	1
1.1 基因工程的概念	1
1.2 基因工程的研究内容	2
1.2.1 基因克隆工具的研究	2
1.2.2 基因克隆技术的研究	3
1.2.3 克隆对象——目的基因的研究	3
1.2.4 基因工程产品的研究	4
1.3 基因工程的研究意义	4
1.3.1 创造出新的生物类型	4
1.3.2 按意愿进行设计和控制	5
1.3.3 推动着生物学与医学研究的发展	5
1.3.4 蕴藏着巨大的潜在生产力	5
1.4 基因工程的安全性研究	6
第 2 章 基因工程的工具酶与克隆载体	7
2.1 基因工程的工具酶	7
2.1.1 基因工程常用的工具酶	7
2.1.2 限制性内切核酸酶	8
2.1.3 DNA 连接酶	15
2.1.4 DNA 聚合酶	21
2.1.5 末端转移酶	25
2.1.6 T4 多聚核苷酸激酶	27
2.1.7 碱性磷酸酶	27
2.1.8 S1 核酸酶	28
2.1.9 Bal 31 核酸酶	29
2.1.10 外切核酸酶	30
2.2 基因工程的克隆载体	32

2.2.1	质粒载体	32
2.2.2	噬菌体载体	41
2.2.3	噬菌粒载体	45
2.2.4	柯斯质粒载体	47
2.2.5	人工染色体载体	52
2.2.6	病毒表达载体	59
2.2.7	反转录病毒载体	65

第3章 基因工程中的典型技术研究 69

3.1	核酸的提取与纯化	69
3.1.1	DNA 的提取与纯化	69
3.1.2	RNA 的提取与纯化	73
3.2	凝胶电泳技术	75
3.2.1	DNA 凝胶电泳	75
3.2.2	脉冲场凝胶电泳	77
3.2.3	蛋白质双向凝胶电泳	78
3.2.4	变性梯度凝胶电泳	79
3.3	分子杂交技术	80
3.3.1	核酸探针	81
3.3.2	Southern 印迹杂交	86
3.3.3	Northern 印迹杂交	87
3.3.4	菌落(或噬菌斑)印迹杂交	88
3.3.5	斑点印迹杂交和狭线印迹杂交	88
3.4	PCR 技术	89
3.4.1	PCR 技术的基本原理	89
3.4.2	PCR 反应体系	90
3.4.3	PCR 反应条件	93
3.4.4	PCR 反应的应用模式	94
3.5	DNA 序列分析	98
3.5.1	Maxam-Gilbert 化学降解法	99
3.5.2	Sanger 双脱氧链终止法	101
3.5.3	DNA 的自动化测序	103
3.5.4	新一代测序技术	104
3.6	研究蛋白质与 DNA 相互作用的方法	107
3.6.1	酵母双杂交系统	107

3.6.2	酵母单杂交系统	110
3.6.3	凝胶阻滞试验	111
3.6.4	DNase I 足迹试验	113
3.6.5	甲基化干扰试验	114
第 4 章	目的基因的获取途径分析	116
4.1	化学合成法获得目的基因	116
4.1.1	寡核苷酸化学合成	116
4.1.2	基因的半合成(酶促合成)	118
4.1.3	短片段直接连接法组装 DNA	119
4.2	筛选基因文库获取目的基因	119
4.2.1	基因组文库的构建与筛选	120
4.2.2	cDNA 文库的构建与筛选	123
4.3	图位克隆获得目的基因	131
4.3.1	染色体步移法筛选目的基因	131
4.3.2	染色体登陆法筛选目的基因	132
4.4	转座子标签法获得目的基因	132
4.5	根据基因差异表达获得目的基因	135
4.5.1	mRNA 差异显示技术	135
4.5.2	抑制性差减杂交技术	138
第 5 章	外源基因的表达	141
5.1	外源基因在原核细胞中的表达	141
5.1.1	原核生物基因表达载体	141
5.1.2	原核表达的受体系统	143
5.2	外源基因在真核细胞中的表达	147
5.2.1	酵母表达系统	147
5.2.2	昆虫细胞表达系统	153
5.2.3	哺乳动物细胞表达系统	156
第 6 章	转基因动植物	161
6.1	转基因动物	161
6.1.1	转基因动物的概念	161
6.1.2	外源基因导入动物细胞的方法	162
6.1.3	转基因动物的检测	170

6.1.4	转基因动物的应用	174
6.2	转基因植物	177
6.2.1	外源基因导入植物细胞的方法	177
6.2.2	转基因植物的筛选与检测	183
6.2.3	转基因植物的应用	188
第7章	基因治疗	192
7.1	基因治疗概述	192
7.1.1	基因治疗的定义	192
7.1.2	基因治疗的基本程序	192
7.2	基因的转移载体	194
7.2.1	病毒载体	194
7.2.2	非病毒载体	201
7.3	基因治疗的应用	203
7.3.1	遗传病的基因治疗	203
7.3.2	肿瘤的基因治疗	206
7.3.3	艾滋病的基因治疗	207
参考文献		213

第 1 章 引 言

基因工程是一种可以按照人们的意愿设计、改造和组建生物品种的新技术。它虽然问世不久,但已充分显示出无限的生命力,将对自然界和人类社会生活产生广泛而深远的影响。

1.1 基因工程的概念

基因工程是通过基因操作,将目的基因或 DNA 片段与合适的载体连接转入目标生物细胞,通过复制、转录、翻译外源目的基因以及蛋白质的活性表达,使转基因生物获得新的遗传性状的操作。

供体、受体和载体是基因工程的三大要素。

基因工程的目标是实现转基因生物性状的定向改良,技术上包括基因或 DNA 的体外重组、转基因、重组子筛选与扩大繁殖等多个环节,目的性和技术性都很强,需要严密的实验设计。

基因工程技术的使用填补了生物种属间不可逾越的鸿沟。它的显著特点是开辟了在短时间内改造生物遗传性的新领域,打破了常规育种难以突破的物种界限,克服了育种的盲目性。

基因工程使原核生物与真核生物之间、动物与植物之间,以至人与其他生物之间的遗传信息进行重组和转移。基因工程可以按照人类的愿望进行严密的设计,通过一系列类似工程技术的方法手段,有目的地改造生物种性,使现有的物种在较短的时间内得以改变,趋于完善,创造出更符合人们需求的新的生物类型。

有时,人们把基因工程称为基因操作、遗传工程或基因克隆,但严格来说,它们的意义是有差别的,它们各自有不同的内涵。

基因操作泛指对基因进行酶切、连接、转化等分子生物学操作,是基因工程的技术基础。

遗传工程比基因工程有更广泛的内容,广义的遗传工程是指所有能改变生物体遗传性状的技术,包括常规的有性杂交育种、染色体工程、细胞工

程以及基因工程等。

基因克隆是指对基因进行分离和扩大繁殖等操作过程,其目的在于获得大量的基因拷贝,它在技术上主要包括载体构建、大肠杆菌遗传转化、重组子筛选和扩大繁殖等环节,很多时候并不涉及动物、植物等的转化及性状的遗传改良,显然与基因工程不完全一致。

1.2 基因工程的研究内容

1.2.1 基因克隆工具的研究

基因工程技术需要依赖一系列重要的克隆工具,如装载目的基因的载体系统、操作核酸分子的工具酶类及接受外源基因的受体系统等才能够得以实现。

1.2.1.1 载体系统的研究

载体是外源基因的运载工具,它能使携带的外源基因随自身 DNA 的复制而得以复制,或使外源基因插入整合到宿主细胞的染色体上,随宿主 DNA 的复制而得以复制,并可启动目的基因在宿主细胞内完成转录。

利用载体上特殊的选择标记,在相应的选择压力下,筛选阳性转化子的细胞克隆。

目前已构建了数以千计的各类载体:有原核载体和真核载体;有克隆载体和表达载体;有质粒载体、噬菌体载体、病毒载体及其他 BAC、PAC、YAC 等人工构建的载体等。

结构不断优化的载体分子,不仅简化了复杂的克隆操作程序,提高了转化效率,而且能装载的目的 DNA 片段可大至数千碱基对(kbp)。

1.2.1.2 工具酶类的研究

限制性内切核酸酶、DNA 连接酶、DNA 聚合酶及各种修饰酶等都是基因工程操作中必需的工具酶,它们对于实施体外 DNA 切割、连接、修饰及合成等程序都起到重要作用。

限制性内切核酸酶可对 DNA 分子实施定点切割,并多数产生便于连接的黏性末端。

连接酶可通过催化磷酸酯键的形成,使不同来源的 DNA 片段相互连接。

耐高温 DNA 聚合酶的发现使 DNA 分子扩增的聚合酶链式反应 (PCR) 过程实现了程序化、自动化, 成为使用领域最广的 DNA 扩增技术。

1.2.1.3 受体系统的研究

基因工程的受体与载体是一个完整系统的两个方面, 二者严格配套、前后衔接。受体是载体及其携带的目的基因的宿主, 是外源基因扩增和表达的场所。在真核生物宿主细胞内具有完成 mRNA 加工的酶系统, 以确保外源目的基因的最终表达。受体的选择需根据工程设计的目的、转化所用的载体以及工程实施所采用的技术和方法而定。

大肠杆菌受体系统和酵母受体系统是目前最为常用的微生物受体系统, 它们分别是原核受体与真核受体的典型代表。此外, 还有链霉菌、芽孢杆菌、丝状真菌等受体系统。动物受体系统多为受精卵、干细胞以及乳腺组织、胚胎组织等。植物受体系统常用未成熟胚、愈伤组织或生长点、丛生芽等。

1.2.2 基因克隆技术的研究

基因工程发展至今, 其技术体系获得了长足发展的理论支撑和创新平台, 并已成为渗透甚广、分支众多的一门综合性应用技术学科, 全面推动着整个生命科学的发展。

这一新兴的工程技术体系也在探索与创新中应用并推广, 在研发与实践中完善并成熟。例如, 以聚合酶链式反应为基础的 DNA 片段扩增与差异筛选技术、核酸序列的全自动化学合成技术、第二代高通量核酸序列分析技术、定制的特殊基因芯片检测技术、借助计算机和互联网的生物信息技术、组织工程技术、动植物生物反应器技术等, 以及转录组、降解组、代谢组、蛋白质组等各种“组学”研究技术的发展与应用, 对基因工程技术体系的发展都起着重要的推动作用。

1.2.3 克隆对象——目的基因的研究

基因是一种重要的生物资源和有限的战略资源。世界各国政府与科学家都非常重视从已拥有的生物种质中开发基因资源, 并且不断进行各种没有硝烟的基因资源争夺战。获得的基因专利多证明在基因工程应用领域拥有了主动权。可见, 发现、定位并最终获得目的基因是基因工程研究极为重要的内容。

以功能基因克隆为主要目标的研究工作,已经从零敲碎打的“钓鱼”策略发展到全基因组分析的“捕鱼”策略。人类基因组计划的研究策略与方法已广泛在其他多种生物的基因组计划中得以利用和完善。我国 100 多位科学家参与的国际水稻基因组计划的研究成果举世瞩目。此后,我国独立完成的玉米、小麦、棉花、柑橘、家猪、家蚕等大基因组生物的基因组计划研究结果相继频频报道,功能基因的定位与克隆已经屡见不鲜,大量的基因专利也宣告获准保护。

1.2.4 基因工程产品的研究

人类“探索基因奥秘”的研究不但是要认识基因的结构、功能和调控性状表达的网络体系,更重要的是获得目标基因的表达产物,并合理、有效地将其利用在工、农、医、药等各个领域。

仅以医、药行业为例,从 1982 年美国 Lilly 公司将第一例重组胰岛素的基因工程产品投放市场以来,迄今全球已有 50 多种基因工程药物上市,近千种处于研发阶段,业已形成一个新兴的高新技术产业,产生了巨大的社会效益和经济效益。

相信随着我国国力的不断增强,生物技术药业研发水平的迅速提升,加之我国独特的人类基因资源和广阔的需求市场,基因工程药物的开发在不久的将来会赶上和超过世界先进水平。我国生命科学与生物技术领域充满前景和希望。

1.3 基因工程的研究意义

生物技术的发展和应用能够在不同程度上解决人类社会所面临的人口增加、食品缺乏、资源匮乏、环境污染加剧、疑难病的诊断和治疗等重大问题。当今以基因工程为核心的生物技术已成为世界高技术浪潮的重要组成部分。这是一场正在蓬勃发展的高技术革命,基因工程不仅推动这场革命的进程,而且正以前所未有的技术冲击着人们的原有观念。

1.3.1 创造出新的生物类型

基因克隆技术的最大威力在于它能使带有支配各种遗传信息的 DNA 片段具有跨越天然物种屏障的能力和把来自任何一种生物基因放置在与

其毫无关系的新的宿主生物细胞中去的能力,能定向控制、修饰和改变生物的遗传和变异,因而就有可能按照人们的主观愿望创造出自然界中原先并不存在的新的生物类型。

1.3.2 按意愿进行设计和控制

基因克隆技术是比较定向的,它不仅可预知某一基因的改变,而且可以及早纠正,可以有计划、有目的地构建基因。此外,基因克隆技术的每步变化均可检测,可保证产品的纯度和安全性。因此,应用基因克隆技术,使生物科学工作者首次能将遗传物质按人们的意愿进行周密设计和人工操纵,使人类从单纯地认识生物和利用生物的传统模式进入随心所欲地改造生物、创造生物的新时代,为进一步深入研究基因的结构、功能、表达和调控等提供了一个划时代的有效手段。

1.3.3 推动着生物学与医学研究的发展

基因或一些具有特殊功能的 DNA 片段的分离因为基因工程技术的发展而变得十分容易。这些基因或特殊 DNA 片段的一级结构(即核苷酸序列)的测定,以及由基因的核苷酸序列去推测蛋白质的氨基酸残基的序列都变得非常简单。利用生物信息学技术可以很容易地对预测的蛋白质进行高级结构分析,可以对来自不同生物种类的基因序列进行同源性分析。所有这些方法或技术的广泛使用,不仅推动了分子生物学的迅猛发展,而且也推动了生命科学各个分支领域的迅速发展。

在发育生物学中,精细胞的分化及受精过程所发生的变化、基因表达的发育调控的研究与基因工程技术的应用是密不可分的。在神经生物学方面,利用基因工程技术对脑结构与功能研究结果显示,脑中约有 3 万个基因处于表达状态,其中脑特异的 mRNA 占总 mRNA 的 6.5%,长度为 2640bp,这些 mRNA 编码的蛋白质承担着神经系统的特异功能。研究脑组织不同功能区的 mRNA 分布,从 cDNA 推知其表达蛋白质的结构,用结合抗体标记这些蛋白质在脑中的分布,将最终导致在分子水平上揭示脑思维、记忆功能的机制。

1.3.4 蕴藏着巨大的潜在生产力

可以说,基因工程既是现实的生产力,更是巨大的潜在生产力,也将是

下一代新产业的基础技术,对国民经济起着重要的支撑作用。基因克隆技术有能力在极端错综复杂的生物细胞内取出所需基因,并能人为地将此目的基因在体外进行剪切、拼接、重组并转化到受体细胞中,经无性繁殖能增产出数百倍、数千倍的产物。基因工程使生命科学、生物技术进入一个新的时代,传统的生物技术与基因工程相结合,焕发出无限生机。

1.4 基因工程的安全性研究

当人类看到基因工程带来的希望的同时,也对基因工程产品的安全性一直喋喋不休,悬而未果。已有的问题主要集中在以下几个方面:

①用于筛选的标记基因或报告基因是否会对人、畜有害,同时导致病原菌抗药性的提高。

②抗除草剂基因会不会使转基因植物变成不可控制的杂草,或漂移到杂草上使杂草泛滥。

③外源基因插入位置效应是否会引起有害的沉默基因表达。

④转基因动物是否会演变成对人类有极大威胁的新品种。

⑤基因治疗是否会对人体的正常功能产生不良影响。

科学家若能用科学数据去解释上述这些担忧,相信公众能坦然地接受基因工程产品。为此,在基因工程操作中除按生物安全管理办法操作外,应加强基因工程产品的安全性跟踪和分析。

第 2 章 基因工程的工具酶与克隆载体

基因工程是一项比较复杂的生物技术,从制备 DNA 或 RNA 开始直至获得转基因生物,需要经过一系列操作。而基因工程工具酶与克隆载体是基因工程操作的两大基本工具,因此本章就对其展开讨论。

2.1 基因工程的工具酶

2.1.1 基因工程常用的工具酶

基因工程的工具酶是应用于基因工程的各种酶的总称,包括核酸序列分析、标记探针制备、载体构建、目的基因选取、重组体 DNA 制备等程序中所需的酶类。基因工程常用的工具酶,主要是限制性内切核酸酶、DNA 连接酶和 DNA 聚合酶等(表 2-1)。

表 2-1 基因工程常用的工具酶

工具酶名称	主要功能
限制性内切核酸酶	在 DNA 分子内部的特异性的碱基序列部位进行切割
DNA 连接酶	把两条以上的线性 DNA 分子或片段催化形成磷酸二酯键连接成一个整体
DNA 聚合酶	通过向 3'端逐一增加核苷酸以填补双链 DNA 分子上的单链裂口,即 5'→3'DNA 聚合酶活性与 3'→5'及 5'→3'外切酶活性
反转录酶	以 RNA 分子为模板合成互补的 cDNA 链
多核苷酸激酶	催化将把一个磷酸分子加到多核苷酸链的 5'-OH 末端上
DNA 末端转移酶	将同聚物尾巴加到线性双链或单链 DNA 分子的 3'-OH 末端或 DNA 的 3'-末端标记 dNTP
外切核酸酶 III	降解 DNA3'-OH 末端的核苷酸残基

续表

工具酶名称	主要功能
S1 核酸酶	降解单链 DNA 或 RNA,产生带 5'磷酸的单核苷酸或寡聚核苷酸,同时也可切割双链核酸分子的单链区
核酸酶 <i>Bal</i> 31	降解双链 DNA、RNA 的 5'及 3'末端
碱性磷酸酶	去除 DNA、RNA、dNTP 的 λ 磷酸基团
<i>Taq</i> DNA 聚合酶	能在高温(72℃)下以单链 DNA 为模板,从 5'→3'方向合成新生的互补链
核糖核酸酶	专一性降解 RNA
脱氧核糖核酸酶	内切核酸酶,水解单链或双链 DNA

2.1.2 限制性内切核酸酶

2.1.2.1 限制性内切核酸酶的发现

早在 20 世纪 50 年代初期,科学家就开始了噬菌体的限制性-修复现象的研究。最早进行该项研究的课题组是 Luria 和 Human 的课题组,他们在研究 T 偶数噬菌体时发现了该现象。

随后,在 1953 年 Bertani 和 Weigle 研究 λ 和 P2 噬菌体的宿主范围时也发现了该现象的存在。实验发现,当一个噬菌体从其天然的大肠埃希菌(大肠杆菌)品系中转移到另一个大肠埃希菌品系中,往往不能生长;而在大量进行感染时,个别的噬菌体能够以一定的概率存活下来,并且具有大量繁殖和再感染的能力(图 2-1)。Bertani 等人将该现象称为宿主控制性的限制性现象。

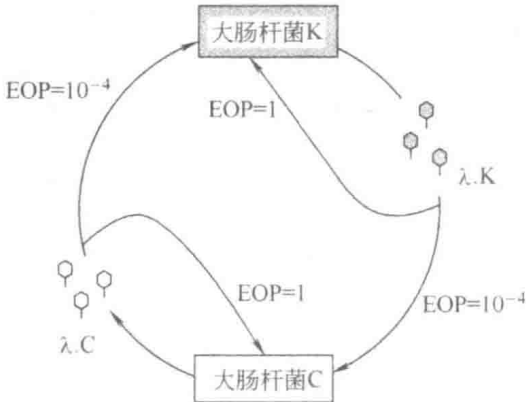


图 2-1 大肠杆菌宿主控制的限制与修饰系统

1962 年,Arber 等人提出了限制-修饰酶假说。

1968 年,Meselson 等人最早报道从大肠埃希菌的 B 菌株和 K 菌株中分离出限制性的内切核酸酶,这就是后来称为 I 型的限制性内切核酸酶。

1970 年,Smith 等人以及 Wilcox 的研究小组发现并分离了 II 型的限制性内切核酸酶,它们是从嗜血菌 Rd 株中分离出来的,现在该限制性内切核酸酶被命名为 *Hind*III,它是 II 型限制性内切核酸酶类中的一个典型。II 型限制性内切核酸酶的发现和分离完全证实了限制-修饰现象。

可以用两种方式对限制-修饰现象进行解释,即宿主细菌能够利用自身的酶系统同时对外源的 DNA 分子进行切割和修饰。对于不同类型的酶而言,这种切割和修饰作用不同。

对于 I 型的限制性内切核酸酶,限制和修饰现象是通过同一个酶的不同功能亚基完成的,或者说是通过两种不同的酶活性来完成的。完成切割功能和修饰功能的部分分别称为内切核酸限制性酶类和核酸修饰性酶类。通常通过甲基转移酶来完成修饰作用,它能够催化甲基(CH₃-/Me)从硫腺苷甲硫苷酸(SAM)转移给限制性内切酶所识别的 DNA 序列分子,使其成为甲基核苷酸分子,从而抵抗限制性内切酶的作用。一般地,被甲基化作用的核苷酸为 C 或 G。

同样的道理,对于 II 型的限制性修饰系统来说,可以利用图 2-2 来表示限制和修饰过程。

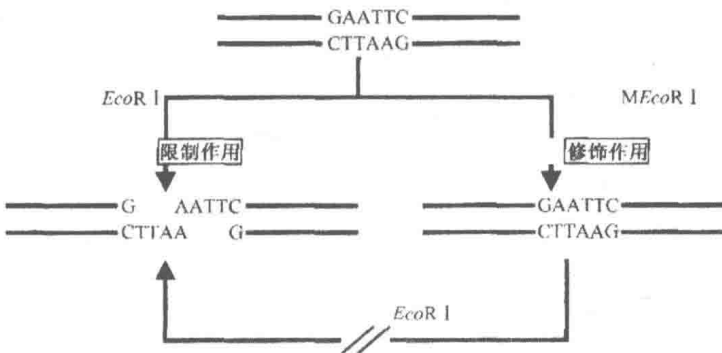


图 2-2 限制性内切核酸酶 *Eco*R I 和甲基化转移酶进行限制和修饰作用图解

2.1.2.2 限制性内切核酸酶的分类

根据限制性内切核酸酶的识别序列和切割位置的一致性,可以把它们分为三类——I 型、II 型和 III 型,其主要特性的比较见表 2-2。