

简明

基因工程与应用

吴建平 主编



科学出版社

www.sciencep.com

简明基因工程与应用

吴建平 主编

科学出版社

北 京

内 容 简 介

本书概述了国内外在基因工程技术领域取得的最新科研成果、技术资料和实践成就,通俗易懂,可读性强。全书共20章,其中第1章至第10章系统地介绍了基因工程的基础理论以及技术原理,是本书的理论部分,包括:基因工程的物质基础及DNA重组、聚合酶链反应、基因克隆、基因打靶、基因沉默、转基因、蛋白质纯化以及分子遗传标记等技术原理;第11章至第16章主要介绍了国内外关于基因工程应用的最新成果、现状与进展,主要涉及转基因作物研究、转基因动物研究以及动物克隆研究等,是本书的应用部分;第17章至第20章主要介绍了目前基因工程的研究热点、发展趋势,并就基因工程技术所引起的有关生态学、生物学、营养卫生学、社会伦理学等方面的问题以及世界各国在转基因生物安全管理方面的一些规定进行了阐述,是本书关于基因工程的展望部分。另外,书末附有专业术语、参考文献及名词索引,以供读者在进一步学习或研究时参考。

本书可供所有从事生命科学研究或热衷于生命科学研究的广大读者、生物技术研究人员、大中专院校的教师参考,亦可作为生物技术专业研究生和本专科学生的教材。

图书在版编目(CIP)数据

简明基因工程与应用/吴建平主编. —北京:科学出版社, 2005.

ISBN 7-03-014410-4

I. 简… II. 吴… III. 基因—遗传工程 IV. Q78

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2004)第 097022 号

责任编辑:王 静 彭克里 孙晓洁/责任校对:赵桂芬

责任印制:钱玉芬/封面设计:耕者设计工作室

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>

源海印刷有限责任公司印刷

科学出版社编务公司排版制作

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2005年9月第 一 版 开本:B5(720×1000)

2005年9月第一次印刷 印张:21

印数:1—3 500 字数:392 000

定价:45.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换(环伟))

主 编 吴建平

副主编 马彬云 张利平 李发弟

审 校 高翼之

前言

近代科学技术的发展带有明显的多学科协同促进的特点。20 世纪生命科学的迅猛发展包含了无数学科的研究成果,从而使生命科学取得了令人瞩目的进步,并带动了生物技术相关产业的发展。

遗传学先后经历了孟德尔遗传规律的发现、Watson-Crick DNA 双螺旋结构模型的提出、DNA 重组技术的诞生、PCR 技术的发明以及质粒提取技术、基因转移技术的发展等重大的生命科学事件,为基因工程的诞生打下了坚实的理论基础,开创了从分子水平研究生命活动的新纪元,标志着在分子水平上揭示生物世界的真正奥秘,并由被动适应自然界开始转向主动改造和重组自然界。

基因工程是 20 世纪 70 年代发展起来的一门新兴学科,是现代生物技术的核心,占有重要的地位。现代生物技术是以生命科学为基础,利用生物学和工程技术原理创造新生物种的综合性科学技术,故又称生物工程,主要包括基因工程、细胞工程、蛋白质工程、酶工程和发酵工程等领域。

自 1977 年科学家成功地用大肠杆菌生产生长激素释放抑制因子以来,基因工程发展迅速。1980 年,肯普(J. D. Kemp)和霍尔(T. H. Hall)将大豆种子的储藏蛋白基因引入向日葵中,得到“向日葵”(sunbean)。近年来威尔默特(I. Wilmut)将人的 AAT 蛋白基因导入绵羊体内,使羊奶中含有人的 AAT 蛋白。目前,人胰岛素、人生长激素、胸腺素、干扰素、尿激酶、口蹄疫疫苗、腹泻疫苗和肿瘤坏死因子等数十种基因工程产品相继问世。

基因工程技术的出现,彻底改变了传统生物学的内涵,使得人们可以克服物种间的遗传屏障,按照人们的愿望和要求,定向培养或创造自然界所没有的新的生命形态,以满足人们的要求。

20 世纪是生命科学迅猛发展的时代,其发展速度之快令人瞩目。通过转基因技术培育的具有各种抗性的转基因作物已经大量种植;利用基因技术生产的转基因食品已经摆上了普通百姓的餐桌;基因操作技术、转基因动物异种器官移植技术、新的基因疗法和转基因药物疗法的出现,已经成为现代医学的重要手段;克隆技术取得的重大突破,已使动物的复制成为可能;特别是随着人类基因组计划的最后完成,人类能够弄清自身全部基因的位置、结构和功能,从而揭开了有关生长、发育、衰老、患病和死亡的秘密,最终将有助于攻克诸如癌症、艾滋病、肝炎、肺结核等许多疑难病症。

可以预料,在崭新的 21 世纪,生命科学将成为自然科学的领头学科;分子生

生物学将在生命科学中占据主导地位,基因组计划、基因工程、细胞工程、酶工程、蛋白质工程和发酵工程将带来农业、食品、医药和化工等领域的革命,产生不可估量的社会效益和经济效益。生物技术的飞速发展及其广泛的应用前景,将使生物技术产业成为全社会的产业支柱。同时,我们还需要认识到,基因工程技术也会带来一系列环境问题和伦理问题,基因工程应以促进人类社会、文化进步和经济繁荣为目标,同时必须以保护自然资源、生物多样性和人类生存环境以及遵循伦理道德为准则。相信在 21 世纪,随着生物安全管理工作的不断完善和发展,生物技术必将同其他科技发展一道,为人类更好的生存做出前所未有的贡献。

本书参阅了大量的文献和信息资料,既从科技工作者的角度系统全面地阐述了基因工程技术的理论原理、发展趋势和所取得的成就,又从社会公众的立场解释了基因工程技术将可能带来的益处、忧虑和困惑,以求全面、系统地反映新的理论方法和科技成果。

在本书的撰写和出版过程中,得到了敖光明、高翼之教授等专家的指导与帮助,在此表示衷心的感谢!蔡欣、万红玲、杨联等同志参与了本书的初期撰写及后期校对工作,科学出版社生命科学编辑部在本书的出版过程中给予了大力的帮助与关心,在此一并表示衷心的感谢!

编 者

2005 年 3 月

目 录

前言

第 1 章 基因工程的物质基础	1
1.1 DNA 的结构与功能	1
1.1.1 染色体	1
1.1.2 DNA 的结构	3
1.1.3 DNA 的生物学功能	6
1.1.4 DNA 的复制	7
1.2 RNA 的结构与功能	12
1.2.1 RNA 的结构	12
1.2.2 RNA 的种类与生物学功能	14
1.2.3 RNA 合成	17
1.3 蛋白质的化学组成、结构与功能	19
1.3.1 蛋白质的化学组成与分类	19
1.3.2 蛋白质的结构与生物学功能	20
1.3.3 蛋白质合成	22
1.3.4 蛋白质与基因功能研究	23
1.4 基因	27
1.4.1 基因的基本结构	27
1.4.2 基因组	29
1.4.3 基因表达	34
1.5 基因工程的酶学基础	39
第 2 章 DNA 重组技术原理	47
2.1 DNA 重组的分子基础	48
2.1.1 核酸的制备	48
2.1.2 限制酶	49
2.1.3 分子杂交	50
2.1.4 载体	51
2.1.5 宿主细胞	57
2.2 外源 DNA 片段与质粒载体连接的依据	58
2.2.1 外源 DNA 片段末端的性质	58

2.2.2 质粒载体和外源 DNA 中限制酶切位点的性质	59
2.3 DNA 重组技术的基本过程	59
2.3.1 目的基因的获得	60
2.3.2 重组	61
2.3.3 重组 DNA 分子的转化与转染	61
第 3 章 聚合酶链反应技术原理	64
3.1 PCR 技术的基本原理	64
3.2 PCR 反应的基本要素	65
3.3 PCR 技术的基本操作过程	68
3.4 PCR 技术的扩展	68
3.5 PCR 产物克隆的方法	72
3.6 PCR 扩增产物的分析	73
第 4 章 基因克隆技术原理	74
4.1 基因克隆的技术路线	74
4.2 DNA 材料的制备及载体的构建	76
4.2.1 核酸的提取与纯化	76
4.2.2 基因文库的构建	76
4.2.3 载体的构建	81
4.3 目的 DNA 片段与载体分子的体外连接	82
4.4 重组 DNA 分子导入受体细胞	82
4.5 目的基因单克隆的分离和筛选	85
4.6 目的基因测序分析	86
4.6.1 质粒提取	86
4.6.2 DNA 测序分析	87
第 5 章 基因打靶技术原理	89
5.1 基因打靶技术的基本原理	89
5.2 基因打靶基本操作	91
5.2.1 基因打靶的必要条件	91
5.2.2 靶细胞的选择	91
5.2.3 基因打靶载体的构建和同源重组	92
5.2.4 重组表型筛选及打靶后生物学效应的鉴定	93
5.3 动物基因的敲除	93
5.4 基因打靶技术的应用	95
第 6 章 基因沉默技术原理	96

6.1 基因沉默的机制	97
6.1.1 转录水平上的基因沉默	97
6.1.2 转录后的基因沉默	98
6.2 RNA 干扰	100
6.2.1 RNA 干扰的发展	100
6.2.2 RNA 干扰的分子机制	101
6.2.3 RNA 干扰研究的基本操作流程	102
6.3 基因沉默是获得性免疫的新途径	103
6.4 基因沉默的克服技术	104
6.5 基因沉默的应用	105
6.5.1 在动、植物育种中的应用	105
6.5.2 在医学中的应用	106
6.5.3 在功能基因组学上的应用	106
6.5.4 抑制效应的利用	107
第 7 章 转基因技术原理	108
7.1 基因转移方法	108
7.1.1 基因转移的物理方法	109
7.1.2 基因转移的化学方法	113
7.1.3 基因转移的生物学方法	115
7.2 植物转基因	118
7.2.1 转基因植物研究	118
7.2.2 转基因植物	118
7.2.3 植物组织培养	119
7.2.4 细菌载体	120
7.2.5 病毒侵染和基因调控	121
7.3 转基因动物	123
7.3.1 转基因动物研究	123
7.3.2 胚胎干细胞研究	124
7.3.3 动物转基因	127
7.4 动植物间的转基因	131
第 8 章 蛋白质纯化技术原理	133
8.1 材料的选择及预处理	133
8.2 细胞的破碎	134
8.3 蛋白质的分离纯化	135
8.3.1 蛋白质(酶)的提取	135

8.3.2 蛋白质的分离纯化	136
8.4 样品的浓缩、干燥及保存	138
8.4.1 浓缩	138
8.4.2 干燥	139
8.4.3 储存	139
第9章 分子遗传标记技术原理	141
9.1 分子遗传标记技术	142
9.1.1 限制性片段长度多态分析技术	142
9.1.2 DNA 指纹分析技术	143
9.1.3 随机引物扩增多态性 DNA 技术	144
9.1.4 扩增片段长度多态性分析技术	144
9.1.5 聚合酶链反应-单链构象多态技术	145
9.1.6 染色体原位杂交	146
9.2 分子遗传标记在遗传工程中的应用	146
9.2.1 基因定位	146
9.2.2 构建基因图谱	147
9.2.3 选择背景基因型	147
9.2.4 杂交选育	147
9.3 分子遗传标记技术在农业中的应用	148
9.3.1 分子遗传标记技术在作物育种中的应用	148
9.3.2 分子遗传标记技术在动物改良中的应用	151
第10章 动物克隆技术原理	155
10.1 哺乳动物克隆研究	155
10.2 哺乳动物克隆的技术路线	158
10.3 细胞核供体	158
10.4 细胞核移植	159
10.5 重组胚胎的培养	160
10.6 供体细胞核与受体细胞质的兼容性	160
10.7 哺乳动物克隆的应用	161
第11章 遗传改良技术的应用和发展	163
11.1 人工选择	163
11.2 遗传学的发展与基因工程	164
11.3 农业绿色革命	165
11.4 植物基因工程	166

11.5	转基因作物	167
11.6	动物基因工程	167
11.7	转基因动物的应用	169
11.7.1	人类疾病模型	169
11.7.2	药物蛋白的目标性生产	169
11.7.3	对动物解剖学和生理学特征的改良	170
11.8	微生物基因工程	170
11.9	生物医药和生物疫苗	171
第 12 章	耐除草剂转基因作物	173
12.1	杂草控制	173
12.2	耐除草剂转基因作物	174
12.3	Monsanto 公司的耐除草剂转基因作物	177
12.4	耐除草剂转基因作物与环境	178
第 13 章	抗虫害转基因作物和转基因病毒防虫	181
13.1	苏云金芽孢杆菌	181
13.2	转 <i>bt</i> 基因玉米	182
13.3	蛋白酶抑制剂和外源凝集素	185
13.4	表达多种性状的多功能基因	186
13.5	利用转基因技术控制虫害	188
13.6	转基因病毒防虫	189
第 14 章	其他转基因作物的研究	191
14.1	基因工程技术对食品加工和食品风味的改善	191
14.2	转基因技术改善作物蛋白质的组成	195
14.3	转基因技术培育抗病毒性状	196
14.4	转基因技术培育抗真菌作物	197
14.5	转基因技术提高作物的抗线虫能力	198
14.6	转基因技术改善作物的光合作用和固氮作用	199
14.7	基因工程技术与抗逆性作物	201
14.8	转基因技术可提高作物的抗旱性能	202
14.9	基因工程技术提高作物抗寒力	202
第 15 章	动物基因工程	206
15.1	重组牛生长激素	206
15.1.1	基因工程产品 BST	206
15.1.2	BST 对家畜生产性能的影响	207
15.1.3	BST 对人类健康的影响	208

15.2	医药用型转基因家畜	209
15.3	动物生物反应器	211
15.4	异种器官移植	212
第 16 章	克隆动物的研究	215
16.1	动物克隆的理论基础	215
16.2	多莉羊的克隆	216
16.2.1	发育生物学的相关知识	216
16.2.2	青蛙细胞带给多莉羊克隆的启示	217
16.2.3	克隆多莉羊	218
16.2.4	多莉羊克隆带来的思考	222
16.3	其他动物的克隆	223
16.4	体细胞克隆的成功使得克隆人类在技术上更为可行	226
16.4.1	多莉是真正的克隆	226
16.4.2	克隆小鼠的成功使得克隆人类在技术上更为可行	226
16.5	动物克隆的应用前景	228
第 17 章	基因组研究与后基因组时代	230
17.1	人类基因组研究	230
17.1.1	人类基因组计划	231
17.1.2	人类基因组研究	232
17.2	其他物种的基因组研究	234
17.3	后基因组时代	235
17.3.1	后基因组计划	236
17.3.2	后基因组时代的生物科学	237
17.4	后基因组时代生命科学的发展趋势	240
第 18 章	基因工程带来的生态风险	242
18.1	风险分析	242
18.2	跨越种间障碍的转基因风险	243
18.3	抗病毒转基因作物带来的风险	244
18.4	转基因动物克隆带来的风险	245
18.5	转基因微生物可能产生的风险	246
18.6	转基因给其他生物所带来的负面影响	247
18.7	基因工程产品带来的风险	248
18.8	基因工程药物风险	252
18.9	转基因的扩散风险	254

第 19 章 基因工程引起的有关争论	257
19.1 伦理敏感性基因	257
19.2 动物权益保护	257
19.3 生物安全管理	259
19.4 DNA 的生命属性	260
第 20 章 转基因生物的安全管理	262
20.1 转基因生物的安全性	262
20.2 转基因生物的安全管理	262
20.2.1 中国转基因生物的安全管理	265
20.2.2 美国转基因生物的安全管理	268
20.2.3 欧盟(附英国)转基因生物的安全管理	271
20.2.4 其他国家转基因生物的安全管理	275
专业术语	278
主要参考文献	307
名词索引	312

第1章 基因工程的物质基础

基因工程(genetic engineering)又称重组 DNA 技术(recombinant DNA technique),即在体外将不同来源的 DNA 进行剪切和重组,形成镶嵌 DNA 分子(chimeric DNA molecule),然后将其导入宿主细胞,使其扩增表达,从而使宿主细胞获得新的遗传特性,形成新的基因产物。基因工程就是遗传工程,即利用生物技术引入或删除生物的特异遗传性状,实现生物体遗传特性(DNA)改变的基本过程。

1.1 DNA 的结构与功能

基因是编码蛋白质或 RNA 分子遗传信息的遗传单位,从化学角度观察,基因则是 DNA(deoxyribonucleic acid)上一段具有特定功能和结构的连续的脱氧核糖核苷酸序列,是构成染色体的重要组成部分。一种生物的所有 DNA 即为该生物的基因组。基因工程或 DNA 重组就是人为地使基因在生物体之间转移。在这里,我们有必要从染色体即遗传物质的主要载体讲起。

1.1.1 染 色 体

1. 染色体的结构

染色体(chromosome)是真核细胞核中由 DNA、组蛋白、非组蛋白及少量 RNA 构成的易被碱性染料着色的一种杆状物,是遗传物质的载体。一切生物的遗传信息都以染色体的形式组织在一起,并由染色体负责遗传信息的传递。通常所说的染色体多指真核染色体。

一个典型的染色体主要有这样几个部分:着丝粒(centromere)、臂(arm)、端粒(telomere)、染色单体(chromatid)等(图 1.1)。

真核细胞染色体是脱氧核糖核酸(DNA)和蛋白质(protein)的复合物,其中 DNA 紧密结合到蛋白质中,形成染色质的核蛋白纤丝。电子显微镜下观察染色质呈串珠状,基本单位是核小体(nucleosome)。通过各种分析已知每个核小体由核小体核心(nucleosome core)和接头(linker)组成。接头位于相邻的核小体核心之间,由约含有几十个碱基对的 DNA 链和 1 个组蛋白分子(H_1)组成。核小体核心由组蛋白

八聚体及约含有 140 个碱基对的 DNA 链组成，形状为扁珠形结构(图 1.2)。

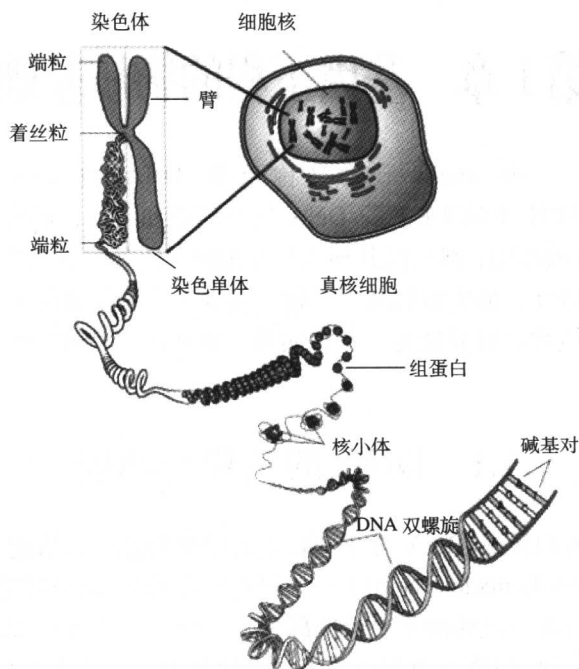


图 1.1 染色体结构

(引自 Access Excellence)

1888 年瓦尔德耶(W. Waldeyer)第一次提出了染色体这一名词。染色体为细胞中最重要的遗传结构。在细胞分裂中期，染色体由两条姐妹染色单体组成，它们仅在着丝粒处相连。每一条染色单体是由一个 DNA 分子的一条染色线盘绕而成。两条染色单体相连处的着丝粒部位称为初缢痕。着丝粒是染色体的一个重要组成部分，它在染色体上的位置是固定的。由于着丝粒位置的不同，可把染色体分为中着丝粒染色体、近中着丝粒染色体、近端着丝粒染色体和端着丝粒染色体四种类型。着丝粒对细胞分裂过程中染色体移向两极起重要作用。染色体上还有一个与核仁的形成有关的缢缩区，称次缢痕。有些染色体的大小可因不同生物或同一个体的不同组织、同一组织不同外界条件而差别很大。染色体的长度变异范围为 $0.2\sim 50\mu\text{m}$ ，直径 $0.2\sim 2\mu\text{m}$ 。同一物种内每条染色体上所带 DNA 的核苷酸碱基对数量和种类是一定的，但不同染色体、不同物种之间变化很大，从上百万到几亿个核苷酸不等。此外，组成染色体的组蛋白的含量也是十分稳定的。在体细胞中染色体成对存在，而在配子细胞中，染色体数目是体细胞中的一半。染色体的数目可作为不同物种的特征之一，因此可用染色体作为一个指标进行物种分类并探

索物种之间的亲缘关系。在物种的进化和发展过程中,亲代将自己的遗传物质以染色体的形式传递给后代,从而保持了物种的稳定性和连续性。由于 DNA 主要存在于细胞内染色体上,所以说遗传物质的载体是染色体。

2. 染色质与核小体

典型的真核细胞的直径约为 $1\mu\text{m}$,但却含有总长度达 $1\sim 2\text{m}$ 的 DNA 分子,这些 DNA 分子必须被有序地包装起来,才能保证遗传信息的有效储藏与表达。真核基因组 DNA 总是被多种蛋白质包装形成核蛋白复合物(nucleoprotein complex),即所谓的染色质(chromatin)。由 DNA 和组蛋白组成的染色质纤维细丝是由许多核小体连成的念珠状结构。核小体(nucleosome)是组成染色体的基本结构单位。核小体核心(nucleosome core)是一个组蛋白八聚体(histone octamer),由两个分子的组蛋白 H2A、H2B、H3 和 H4 组成,呈扁珠状(图 1.2)。

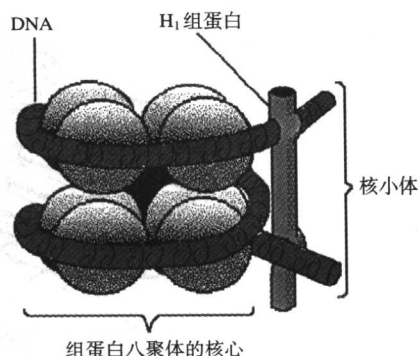


图 1.2 核小体结构
(引自 Access Excellence)

在 DNA 包装成染色体的过程中,核小体的形成只是 DNA 压缩的第一步,接着,核小体便串联成染色体纤维细丝,从而使缠绕在组蛋白八聚体外周的两圈 DNA 保持稳定。

1.1.2 DNA 的结构

染色体是位于真核生物细胞核内的一个构造,真核细胞内的 DNA 主要存在于细胞染色体上。

1953 年,沃森(J.D.Watson)和克里克(F.H.Crick)首先提出了 DNA 的双螺旋结构。他们指出, DNA 的结构是由两条多核苷酸链组成的互补双螺旋链(图 1.3),犹如一条螺旋上升的楼梯,每一个碱基对是一个台阶,因此形成了所谓的互补链。由于 DNA 双链之间是互补的,因此,一旦得知 DNA 双链中的一条链的碱基组成,根据互补原理,另一条链的碱基组成就可以推理而得。DNA 链上能决定特定氨基酸的三个连续的核苷酸称为密码子(codon)。20 种氨基酸的密码子构成了遗传密码(genetic code)。遗传密码具有通用性,在所有生物中都是相同的,而基因是遗传的基本单位,它占据 DNA 链上的特定位置,并控制特定的遗传性状。因此,这

就可利用基因工程技术进行物种之间基因的转移,转基因有机体就是由此产生的。

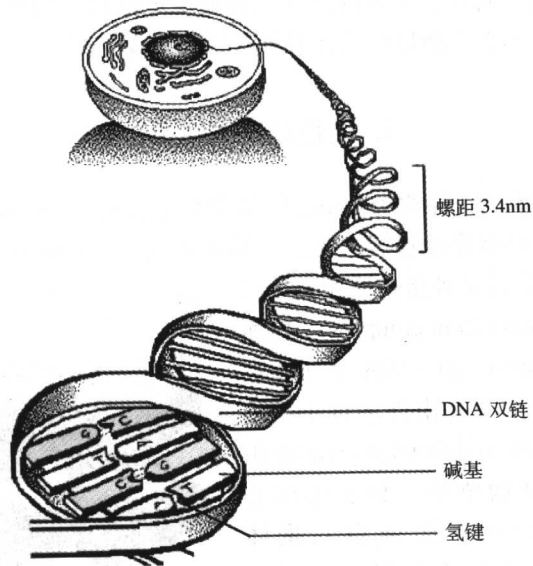


图 1.3 细胞、细胞核和 DNA 双链

(引自 Access Excellence)

1. DNA 的一级结构

DNA 主要集中在细胞核内,线粒体、叶绿体中也含有少量的 DNA。DNA 的基本结构单位是脱氧核苷酸(deoxynucleotide),脱氧核苷酸可以进一步分解成脱氧核苷(deoxynucleoside)和磷酸,而脱氧核苷是由碱基(base)和脱氧核糖(D-2-deoxyribose)组成的,碱基有两类,即嘌呤碱和嘧啶碱。此外有的 DNA 分子中还存在有少量稀有碱基。DNA 分子在一级结构上有数量极其庞大的四种脱氧核苷酸(dNTP),即腺嘌呤脱氧核苷酸、鸟嘌呤脱氧核苷酸、胸腺嘧啶脱氧核苷酸、胞嘧啶脱氧核苷酸,通过 3', 5'-磷酸二酯键连接起来,呈线形或环形多聚体。DNA 一级结构的重要意义不仅在于它蕴藏了遗传信息(以密码子的方式),而且还在于它决定了 DNA 的空间结构。

2. DNA 的二级结构

DNA 的二级结构即沃森和克里克在 1953 年 4 月提出的由 X 射线衍射结构分析得出的 DNA 右手双螺旋结构。他们指出,组成 DNA 的两条脱氧核苷酸链反向