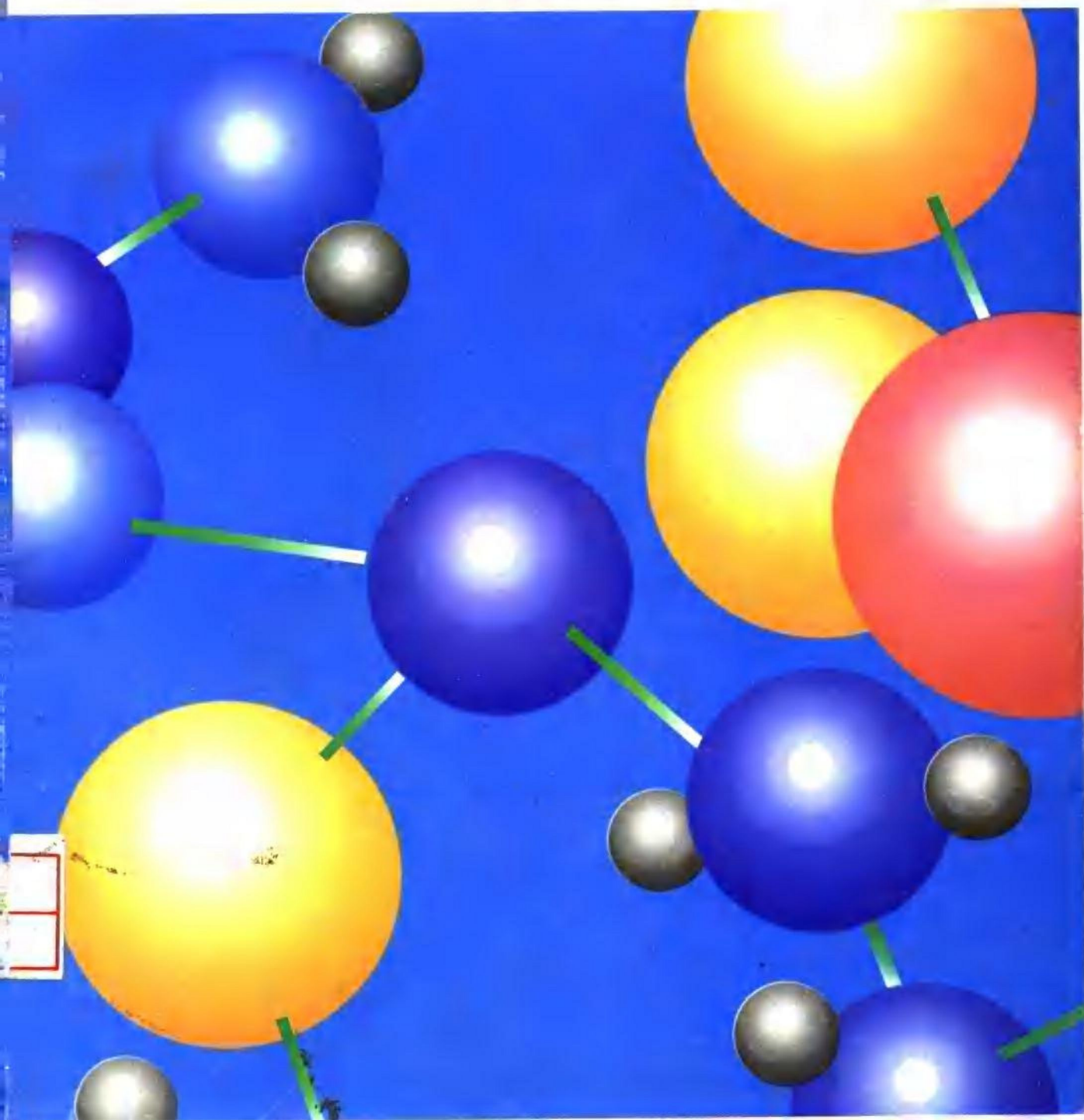




基因及其操作原理

GENES AND PRINCIPLE OF
GENE MANIPULATION 武汉大学出版社

齐义鹏 编著 QI YIPENG



基因及其操作原理

齐义鹏 编著

武汉大学出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

基因及其操作原理/齐义鹏编著. —武汉: 武汉大学出版社, 1998. 12
ISBN 7-307-02622-8

I. 基… II. 齐… III. 基因—遗传工程 IV. Q78

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (98) 第 20356 号

武汉大学出版社出版

(430072 武昌 珞珈山)

湖北科学技术出版社黄冈印刷厂印刷

(436100 湖北省黄冈市宝塔大道 85 号)

新华书店湖北发行所发行

1998 年 12 月第 1 版 1998 年 12 月第 1 次印刷

开本: 787×1092 1/16 印张: 24.125

字数: 579 千字 印数: 1—3000

ISBN 7-307-02622-8/Q·65 定价: 26.50 元

本书如有印装质量问题, 请寄承印厂调换

内 容 简 介

本书是据作《基因工程原理和方法》的姊妹篇。和原书比较,作者大幅度增加了基因分子生物学,如基因的概念和发展、基因的表达和调控等基础知识,专门增设了杆状病毒载体和基因的PCR扩增两章,对DNA序列测定和分子克隆两章作了大范围的改动,这样使全书仍然保持12章建制,即基因工程的工具酶、基因工程的载体、DNA物理图谱、DNA的同位素标记、分子杂交、DNA的序列测定、分子克隆、PCR扩增和基因的表达调控等。本书的特点是基础性、系统性、新颖性和创造性,全书有图表约300余幅,语言流畅,书后有分子生物学实验技术的必备附录和近200篇参考文献。

希望这本书能像她的大姐姐一样继续得到专家学者和研究生的厚爱。本书可作为从事生物工程、生物化学、遗传学、微生物学、动植物学、农学、医学、药学等高等学校有关专业研究生的教材,也可供以上专业科学研究人员参考,为我国分子生物学和基因工程的发展再次起到一颗铺路石子的作用。

前 言

基因是现代分子生物学研究中举足轻重的领域,70年代初“基因工程”诞生,它是在基因水平上进行操作的一门新兴学科。国外关于基因的研究有上百年历史,成果辉煌,内容丰富,各种版本的著作层出不穷,国内的基因研究工作有着辛酸的经历,走过曲折的道路,学术界一度读基因色变,全盘否定了基因学说。然而,基因是实实在在的物质,生物的遗传性状和特性以及许多遗传疾病都由基因决定,人体有10万多种基因,记忆基因、学习基因、肥胖基因、生长基因的发现进一步证明了基因的物质属性和主导特性。生物学、医学、农学、轻工、农药、环保等学科和国民经济的许多部门都从基因和基因工程学说得到直接或间接的利益,基因和基因工程学说之重要性可与原子裂变和宇宙航行相媲美。自改革开放以来我国的基因和基因工程研究起步高,进展快,部分领域达到了国际先进水平。然而有关基因和基因工程的著作仍寥寥无几,与我国科学事业和高等教育的发展,与我国的大国地位大相径庭。我在1989年出版了我国第一本基因工程专著《基因工程原理和方法》,印书4000册,当年销售一空,受到许多专家学者特别是研究生的很高评价,不断收到要求再版的信件。由于种种原因,1994年再版6000册的计划搁浅,我决定重写新书《基因及其操作原理》,和原书比较本书减少了四章,增添了四章,其余章节作了较大改动,4增4减,使本书仍保持12章的篇幅。

“基因的概念及其发展”是作者增加的重要章节。作者从真核基因的比较入题,详细介绍了基因的现代概念和发展,从70年代断裂基因的发现起一直写到最近几年发现的一类新的可移动基因 retron(反转子),比较全面地反映了基因现代概念的全貌。

第二个新增章节是“杆状病毒载体及表达系统”。在基因工程领域杆状病毒载体及表达系统是一支突起异军,其经典的克隆策略是1983年创立的同源重组系统,到90年代,相继发展了线型化策略、大肠杆菌策略、酵母策略和体外定点转导策略。这些方法的建立意义十分重大,使100多年来传统的主要用生活细胞增殖病毒基因组DNA的技术在大肠杆菌和酵母细胞中就可实现。杆状病毒在原核细胞中是一个可以复制的质粒,在真核细胞中则是一个有生命特征的机体。鉴于杆状病毒载体系统在现代分子生物学中的重要性和应用的广泛性,我认为增加这一章是必成之理。我从事杆状病毒分子生物学研究十多年,有一定的学术积累和较多的经验,对这一章的写作虽不敢说笔走龙蛇,也可说得心应手,因此,这一章成了本书的特色和重点。

“基因表达的调控”是作者为本书新增的又一章节。研究者们都知道,基因的表达与调控是分子生物学的核心,当然也是本书介绍的核心。作者通过各种调控类型的介绍,探讨基因为什么表达?怎样表达?如何有效表达?启迪学者们更有效地利用基因工程促进科学的发展。

新增的最后一章是第十二章“DNA扩增的PCR技术”,PCR是多聚酶链反应的缩写,是80年代后期发展起来的新技术,其应用十分广泛,显示了强大的生命力,详细介绍PCR原理和策略是本书的又一特色。

此外,作者还对本书中“基因工程载体”、“同位素和 DNA 标记”、“DNA 序列测定”,以及“分子克隆”等 4 章作了大的改动。经过这样的策划与实施,和原书比较,本书即有相似,也有修正,即有保留,也有创新。有的章节相似乃尔,有的章节“面目全非”,《基因及其操作原理》和《基因工程原理和方法》两本著作是相隔 9 年诞生的一对姊妹。

和原书比较,本书更注重基础知识和基本概念的介绍,因此,本书仍然是一本基因工程基础理论和应用技术的专著,而不是一本由操作程序组合成的实验指南。本书的特点在于系统性,基础性,新颖性,经验性和通用性;图文并茂,以图释义,形象生动,语言流畅;读后有清香满口、回味悠长之感,无索然寡味、如同嚼蜡之嫌。

基因工程几乎成了现代高新技术的代名词,不管是生物学的何种二级学科,还是医学、农学、轻工发酵等一级学科,都可利用基因工程技术创造出本门学科的奇迹。因此,本书可作为综合大学、师范、医学、农学、化工、轻工等高等学校的有关教师、研究生、大学生以及生化、遗传、微生物、病毒、动物、植物、细胞、发酵、生物制品、生物工程等研究院所的科学工作者的有力助手。

本书在很大程度上得益于我所引用的国内外专家发表的论文、出版的著作和取得的成果,没有前人和今人知识的积累,就不可能有本书的问世。本书的出版,很好地证明了科学是无国界的,科学成果是人类共同的财富这一真理。作者对本书引用的国内外认识和不认识的科学家们的业绩表示敬意,对他们提供的资料表示谢忱。

在本书的写作过程中作者得到武汉大学研究生院和武汉大学出版社领导和同志们热情鼓励和帮助,特别是我的博士研究生齐兵同学,硕士生林宏同学以他们娴熟的计算机技术为本书绘图,实验员杨芳女士为本书打字复印,他们付出了智慧和劳动,我对他们表示由衷的谢意。最后,由于作者学识所限,在本书中疏忽遗漏在所难免,缺点错误事出有因,仅以本书作为引玉之砖,大胆抛出,以求各位专家学者的斧正,谢之再三。

齐义鹏

1998 年 5 月于武昌珞珈山

缩写符号英汉对照(按字母顺序)

AcNPV, *Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*, 苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒.
att, attachmet site, 接受位点.
Ap^r, Ampicillin resistant gene, 氨苄青霉素抗性基因.
ARS, Autonomous replication sequence, 自主复制序列.
Adv, Adenovirus, 腺病毒.
atRNA, Antisense RNA, 反意 RNA.
BmNPV, *Bombyx mori nuclear polyhedrosis virus*, 家蚕核型多角体病毒.
Bacmid, Baculovirus plasmid, 杆状病毒质粒.
BAS, Bovine serum albumin, 牛血清白蛋白.
BAP, Bacteria alkaline phosphase, 细菌碱性磷酸酶.
bp, Base pair, 碱基对.
BV, budded virus, 出芽病毒.
Bt, *Bacillus thuringiensis*, 苏芸金芽孢杆菌.
BsNPV, *Buzura suppressaria NPV*, 大尺蠖核型多角体病毒.
cry, crystal protein gene, 晶体蛋白基因.
cDNA, complementary DNA, 互补 DNA.
cccDNA, covalent close circle DNA, 共价闭合环状 DNA.
CAP, calf alkaline phosphase, 小牛碱性磷酸酶.
CAP, Catabolic activative protein, 分解代谢活化蛋白.
Cm^r, Chloramphenicol resistant gene, 氯霉素抗性基因.
ChDNA, chromosome DNA, 染色体 DNA.
CEN, centromer, 着丝粒、端粒.
CaMN, *Caullinus mozic virus*, 花叶菜花叶病毒.
CAT, Chloramphnicol acetyltransferase, 氯霉素乙酰转移酶基因.
CBP, Cap binding protein, 帽子结合蛋白.
DNA, Deoxy ribonucleic acid, 脱氧核糖核酸.
ddH₂O, doble distilled water, 双蒸水.
dsDNA, Double strand DNA, 双链 DNA.
DTT, Dithiothreitol, 二硫苏糖醇.
DNase I, DNA enzyme I, DNA 酶 I.
DNA pol, DNA polymerase, DNA 聚合酶.
ddNTP, dideoxy NTP, 双脱氧 NTP.
dsRNA, double strand RNA, 双链 RNA.

dNTP, deoxy NTP, 脱氧核苷三磷酸.
 ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay, 酶联免疫分析.
E. coli, *Escherichia coli*, 大肠杆菌.
 EDTA, ethylenediamine tetraacetic acid, 二乙胺四乙酸.
 EB, ethidium bromide, 溴化乙锭.
 EBV, Epstein barr virus, EB 病毒.
 FG, foriegn gene, 外源基因.
 GV, Granulosis virus, 颗粒体病毒.
 egt, ecdysteroid UDP-glucosyl transferase gene, 蜕皮激素 UDP 葡萄糖基转移酶基因.
 eif, extension initiation factor, 延伸起始因子.
 env, envelope gene, 囊膜糖蛋白基因.
 exoIII, exonuclease III, 外核酸酶 III.
 GFP, Green fluorescent protein, 绿色荧光蛋白(gfp).
 gag, nucleocapsid gene, 核衣壳蛋白基因.
 HBV, Hepetitis B virus, 乙型肝炎病毒.
 HBeAg, HBV e antigen, 乙型肝炎病毒 e 抗原.
 HBcAg, HBV c antigen, 乙型肝炎病毒核心抗原.
 HBsAg, HBV s antigen, 乙型肝炎病毒表面抗原.
 HIV, Human immunodeficiency virus, 人免疫缺陷型病毒.
 HSV, Human simple virus, 单纯疱疹病毒.
 HCV, Hepatitis C virus, 丙型肝炎病毒.
 hr, homologous region, 同源重复序列.
 hnRNA, Heterologous nuclear RNA, 核不均一 RNA.
 int, Integration enzyme gene, 整合酶基因.
 IS, initiation site, (转录)起始位点.
 ITF, induction transcription factor, 诱导转录因子.
 IE, immediate early gene, 极早期基因.
 iap, inhibiting apoptose gene, 凋亡抑制基因.
 Ka^r, kanamycin resistant gene, 卡那霉素抗性基因.
 kb, kilobase pair 千碱基对.
 IFN, interferon, 干扰素.
 IPTG, Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside, 异丙醇 β -硫代半乳糖苷.
 LsNPV, Leucania separata NPV, 粘虫核型多角体病毒.
 LTR, Long terminal repeat, 长末端重复序列.
 LacZ, β -galactosidase gene, β -半乳糖苷酶基因 Z.
 Luc, Luciferase gene, 荧光素酶基因.
 Lef, late expression factoc gene, 晚期表达因子基因.
 MW, molecular weight, 分子量.
 mRNA, messanger RNA, 信息 RNA.
 miDNA, mitochondral DNA, 线粒体 DNA.

msDNA, multi copy ssDNA, 多拷贝单链 DNA.
 MCS multip cloning site, 多克隆位点.
 MOI multiple of infection, 感染复数.
 micRNA, mRNA interfering complementary RNA, 干扰 mRNA 的互补 RNA.
 Ne^r, Neomycin resistant gene, 新霉素抗性基因.
 NCS, non coding sequence, 非编码序列.
 NC nitrocellulose, 硝酸纤维素膜.
 NTP, Nucleotide triphosphate, 核苷三磷酸.
 opu, polyhedrin gene 多角体蛋白基因.
 onc, cancer gene 致癌基因.
 omp, outermembrane protein gene, 外膜孔蛋白.
 ORF, open reading frame, 开放阅读框.
 ori, origin, 复制起始点.
 PCR, Polymerase chain reaction, 多聚酶链反应.
 PDH, pyruvate dehydrogenase, 丙酮酸脱氢酶.
 PEG, Polyethyleneglycol 聚乙二醇.
 pfu, plaque forming units, 空斑形成单位.
 PAGE, polyacrymide gel eletrophoresis, 聚丙烯酰胺凝胶电泳.
 PE(pe), polyhedra envelope, 多角体外膜蛋白(基因).
 PDV, polyhedra derived virus, 多角体衍生病毒.
 P_R prometer right, 右向启动子.
 P_L prometer left, 左向启动子.
 RNasin, RNA enzyme inhibitor, RNA 酶抑制剂.
 RNA, Ribonucleic acid, 核糖核酸.
 RNase, RNA ensyme, RNA 酶.
 rRNA, Ribosomal RNA, 核糖体 RNA.
 RT, reverse transcriptase, 逆转录酶.
 rNTP, ribo NTP, 核糖核苷三磷酸.
 RNA pol, RNA polymerase, RNA 聚合酶.
 SDS, Sodium dodecyl sulfate, 十二烷基硫酸钠.
 SV40, Simian virus 40, 猴病毒 40.
 ssRNA, single strand RNA, 单链 RNA.
 snRNA, small nuclear RNA, 小核 RNA.
 sDNA, satellite DNA, 卫星 DNA:
 Sf9, sodoptera frugiperda 9, 昆虫草地夜蛾(细胞)9.
 Tc^r, Tetracyclin resistant gene, 四环素抗性基因.
 Tn, Transposon, 转座子.
 TMV, tobacco mozic virus, 烟草花叶病毒.
 tRNA, transfer RNA, 转移 RNA.
 tk, thymidine kinase gene, 胸腺激酶基因.

TCID₅₀, Tissue culture infective dose, 半数组织培养感染剂量.

Ti, tumor inducing plasmid, Ti 质粒.

UV, ultraviolet light, 紫外光.

UTR, un-translation region, 非翻译区.

wt, wild type, 野生型.

Xgal, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside, 5-溴 4-氯, 3-吲哚 β -D 半乳糖苷.

目 录

第 1 章 绪 论	1
第 2 章 基因的概念及其发展	10
2.1 原核和真核基因组的比较	10
2.1.1 基因组的表观差异	10
2.1.2 DNA 的重复序列	10
2.1.3 卫星 DNA(s-DNA)	12
2.1.4 DNA 插入顺序	12
2.1.5 内含子	12
2.1.6 DNA 的非编码序列	14
2.1.7 基因组中的非表达基因	14
2.1.8 功能上相似的基因族	15
2.2 基因特性的理解	15
2.3 原核和真核基因的类型	17
2.4 基因的现代概念	17
2.4.1 可移动基因	18
2.4.2 断裂基因	19
2.4.3 重叠基因	20
2.4.4 假基因	21
2.4.5 反转子及反转录基因	22
第 3 章 基因工程的工具酶	31
3.1 限制性核酸内切酶	31
3.1.1 限制性核酸内切酶的发现和生物功能	31
3.1.2 I 型和 III 型限制性核酸内切酶	33
3.1.3 II 型限制性核酸内切酶	34
3.2 大肠杆菌 DNA 聚合酶 I	48
3.3 T ₄ DNA 聚合酶	49
3.4 T ₄ DNA 连接酶	50
3.5 逆转录酶	51
3.6 核酸酶 SI	52
3.7 末端脱氧核苷酸转移酶	53
3.8 脱氧核糖核酸酶 I (DNaseI)	53
3.9 外核酸酶 III	54

3.10	外核酸酶 Bal31	54
3.11	T ₄ 多核苷酸激酶	55
3.12	碱性磷酸化酶	57
第 4 章	基因工程的载体	58
4.1	质粒	58
4.1.1	质粒的一般性质和研究意义	58
4.1.2	质粒的研究历史	60
4.1.3	质粒的类型	60
4.1.4	大肠杆菌质粒载体	61
4.1.5	枯草杆菌质粒载体	69
4.1.6	农杆菌 Ti 质粒载体	69
4.1.7	质粒的复制	73
4.2	细菌噬菌体 λ	79
4.2.1	噬菌体 λ 的一般性质	79
4.2.2	λ 噬菌体载体	82
4.2.3	噬菌体 λ 重组 DNA 分子的体外包装	85
4.3	Cosmid(科斯质粒)	85
4.4	单链 DNA 噬菌体 M13	88
4.5	Phagemid 载体系列	91
4.6	酵母质粒载体	94
4.7	人和动物病毒载体	95
4.7.1	猴病毒 40(SV40)	96
4.7.2	牛乳头瘤病毒(BPV)	98
4.7.3	RNA 肿瘤病毒	99
4.7.4	腺病毒(ADV)	101
4.7.5	单纯疱疹病毒(HSV)	102
4.7.6	痘苗病毒(VCV)	102
4.8	植物病毒载体	103
第 5 章	杆状病毒载体及其表达系统	105
5.1	杆状病毒的生物学	105
5.1.1	杆状病毒的分类与基本结构	105
5.1.2	杆状病毒的生活史	105
5.1.3	杆状病毒的体外复制系统	107
5.2	杆状病毒的分子生物学	107
5.2.1	杆状病毒的基因组结构	107
5.2.2	杆状病毒的基因概述	107
5.3	杆状病毒基因的表达与调控	111
5.3.1	极早期基因的反式调控	112
5.3.2	早期基因的启动子结构	112
5.3.3	迟晚期基因启动子及高效表达调控机制	112

5.3.4 杆状病毒增强子的顺式调控	113
5.3.5 杆状病毒重叠 RNA 的调控	113
5.4 杆状病毒表达系统评价	114
5.4.1 杆状病毒表达系统的优越性	114
5.4.2 杆状病毒表达系统的缺点	115
5.4.3 影响靶基因在昆虫细胞中表达的因素	116
5.5 杆状病毒克隆表达的经典策略	116
5.6 杆状病毒载体	116
5.6.1 多角体基因转移载体	118
5.6.2 p10 基因转移载体	122
5.6.3 其它基因构建的转移载体	126
5.6.4 双基因转移载体	129
5.6.5 多基因转移载体	133
5.6.6 以绿色荧光蛋白基因作标记构建的转移载体	133
5.7 杆状病毒表达系统中阳性重组病毒的筛选	137
5.7.1 β -半乳糖苷酶基因(β -galactosidase gene, 简称 LacZ)	137
5.7.2 斑点杂交和原位杂交	138
5.7.3 PCR 技术	139
5.7.4 胸腺核苷激酶基因(thymidine kinase gene, 简称 tk)	139
5.7.5 新霉素抗性基因(neomycin resistance gene, 简称 neo)	140
5.7.6 细胞凋亡抑制基因(p35 基因)	143
5.8 杆状病毒克隆表达的新策略	144
5.8.1 高频重组策略(线型化技术)	144
5.8.2 转座子介导的重组策略(Bac to Bac 系统)	145
5.8.3 体外酶促定位重组策略	152
5.8.4 酵母 YAC 介导的重组策略	152

第 6 章 放射性同位素和 DNA 的标记	155
6.1 放射性同位素的基本知识	155
6.2 放射性同位素的衰变	156
6.2.1 放射性同位素的衰变类型	156
6.2.2 分子生物学中常用的放射性同位素	157
6.3 放射性同位素的衰变定律	158
6.4 放射性的探测与测量	159
6.4.1 盖革计数管(Geiger counter tuber)	159
6.4.2 闪烁计数器	161
6.4.3 放射自显影	164
6.5 DNA 的放射性同位素标记	165
6.5.1 外切法标记 DNA 的 3' 平头末端	165
6.5.2 填充法(fill-in)标记 DNA 的 3' 平头末端	166
6.5.3 外切法标记 DNA 3' 不等末端(recessed end)	167
6.5.4 末端转移法标记 dsDNA 的 3' 末端	167
6.5.5 dsDNA 的 5' 磷酸末端标记	167

6.5.6	dsDNA 的 5'-OH 末端标记	168
6.5.7	限制性消化法制备探针	168
6.5.8	缺刻转移法制备探针	169
6.5.9	随机引物标记法制备探针	169
6.5.10	DNA 全链的逆转录酶标记法	170
6.5.11	DNA 大片段的链终止法标记	171
6.5.12	RNA 标记	171
6.6	放射性同位素实验室的安全及防护	171
第 7 章	DNA 的物理图谱	173
7.1	概述	173
7.2	部分消化法	174
7.3	双酶消化法	176
7.4	顺序消化法	179
7.5	交叉消化法	181
7.6	末端标记法	181
7.7	内切外切混合消化法	181
7.8	分子杂交法	185
7.9	Southern 十字杂交法	188
7.10	组建 DNA 物理图谱的三三规则	189
第 8 章	分子杂交	195
8.1	分子杂交的原理	195
8.2	Southern blot	198
8.2.1	DNA 片段的转移	198
8.2.2	Southern 薄膜杂交	199
8.3	凝胶薄膜杂交	200
8.3.1	凝胶薄膜的制备	200
8.3.2	杂交	201
8.4	原位杂交(Hybridization in situ)	201
8.4.1	菌落生长	202
8.4.2	DNA 的释放与固定	202
8.4.3	杂交	202
8.5	斑点杂交(Dot blot)	203
8.6	Northern blot	203
8.7	Western blot	204
8.8	Southern 十字吸附杂交法(Cross blot)	205
第 9 章	DNA 的序列测定	210
9.1	引言	210
9.2	DNA 序列测定的 ddNTP 链终止法	211

9.2.1 ddNTP 链终止法原理	211
9.2.2 DNA 链终止法测定系统	212
9.2.3 DNA 大片段序列的测定战略	232
9.3 DNA 序列测定的“加减法”	240
9.3.1 DNA 的不同步合成	240
9.3.2 “减”系统	241
9.3.3 “加”系统	241
9.4 DNA 序列测定的化学直读法	242
9.5 DNA 序列的激光测定法	244
第 10 章 多聚酶链反应(PCR)	247
10.1 PCR 原理	247
10.2 PCR 的扩增过程	249
10.2.1 用于 PCR 扩增的 Taq DNA 聚合酶	249
10.2.2 用于 PCR 扩增的引物	250
10.2.3 用于 PCR 扩增的 dNTP	252
10.2.4 PCR 缓冲液中的 Mg^{2+} 浓度	253
10.2.5 DNA 样品	253
10.2.6 矿物油	253
10.2.7 循环次数	253
10.2.8 PCR 反应的温度和时间	254
10.2.9 扩增产物的大小和结构	255
10.3 PCR 的类型	256
10.3.1 套组 PCR(Nested PCR)	256
10.3.2 表达 PCR(Expression PCR)	258
10.3.3 锅柄 PCR(Panhandle PCR)	260
10.3.4 行军 PCR(Walking PCR)	261
10.3.5 反向 PCR(Inverse PCR)	262
10.3.6 不对称 PCR(Asymmetric PCR)	262
10.3.7 序列 PCR(Sequencing PCR)	263
10.3.8 等位特异性 PCR(Arbitrary-Specific Amplification, ASA)	263
10.3.9 Alu PCR	264
10.3.10 差异 PCR(Differential PCR)	264
10.4 超长 DNA 片段的 PCR 扩增	264
10.4.1 扩增超长 DNA 片段的要点	265
10.4.2 扩增超长 DNA 片段的 PCR 策略	267
10.5 反转录 PCR(RT-PCR)	270
10.5.1 连续 RT-PCR(两阶段单管式)	270
10.5.2 长距离 RT-PCR(两阶段双管式)	271
10.5.3 一步 RT-PCR	272

第 11 章 分子克隆	274
11.1 基因的分离与合成	274
11.1.1 DNA 的提取	274
11.1.2 从原核生物分离纯化目的基因	280
11.1.3 从真核生物分离纯化目的基因	280
11.2 外源基因与载体 DNA 的连接反应原理	285
11.3 外源基因与载体 DNA 的连接反应	291
11.3.1 引言	291
11.3.2 连接反应的类型	294
11.3.3 cDNA 与载体的连接反应	299
11.4 重组 DNA 分子导入原核细胞	300
11.4.1 感受态细胞(Competance Cells)	302
11.4.2 转化程序	303
11.4.3 阳性重组菌落的筛选	303
11.5 重组 DNA 分子导入真核细胞	306
第 12 章 外源基因的表达与调控	309
12.1 基因工程的表达系统	309
12.2 外源基因在转录起始水平的调控	310
12.2.1 RNA 聚合酶(RNA polymrase, 反式作用正调控因子)	311
12.2.2 启动子(Promoter, 顺式作用正调控元件)	313
12.2.3 基因工程常用启动子	315
12.2.4 操纵元(Operon, 顺式作用正调控元件)	319
12.2.5 增强子(Enhancer, 顺式作用正调控元件)	321
12.2.6 减弱子(Dehancer, 顺式作用负调控元件)	322
12.3 外源基因在转录终止水平上的调控	323
12.3.1 终止子(Terminator, 顺式作用负调控元件)	323
12.3.2 衰减子(Attenuator, 顺式作用负调控元件)	324
12.4 外源基因在转录后的调控	327
12.5 外源基因表达在翻译水平上的调控	327
12.5.1 偶联翻译与非偶联翻译	327
12.5.2 原核 mRNA 的 Shine-Dalgarno 序列(SD 序列, 顺式作用正调控元件)	328
12.5.3 原核钥匙蛋白(Key protein, 反式作用负调控因子)	329
12.5.4 真核 mRNA 的 Kozak 序列(顺式作用正调控元件)	329
12.5.5 真核 mRNA 翻译的起始因子(反式作用正调控因子)	330
12.5.6 反义 RNA(Antisence RNA, 简称 at-RNA)	332
12.6 高效表达外源基因的措施	333
12.6.1 最适 SD 序列	333
12.6.2 融合蛋白的表达及载体阅读框架的修饰	334
12.6.3 减轻宿主细胞的代谢负荷, 提高外源基因的表达水平	337

附 录	340
一、常用数据和参数	340
二、某些基因组 DNA 的限制片段和大小(bp)	348
三、遗传密码	351
四、常用培养基和抗菌素	352
五、常用溶液和缓冲液	355
参考文献	360