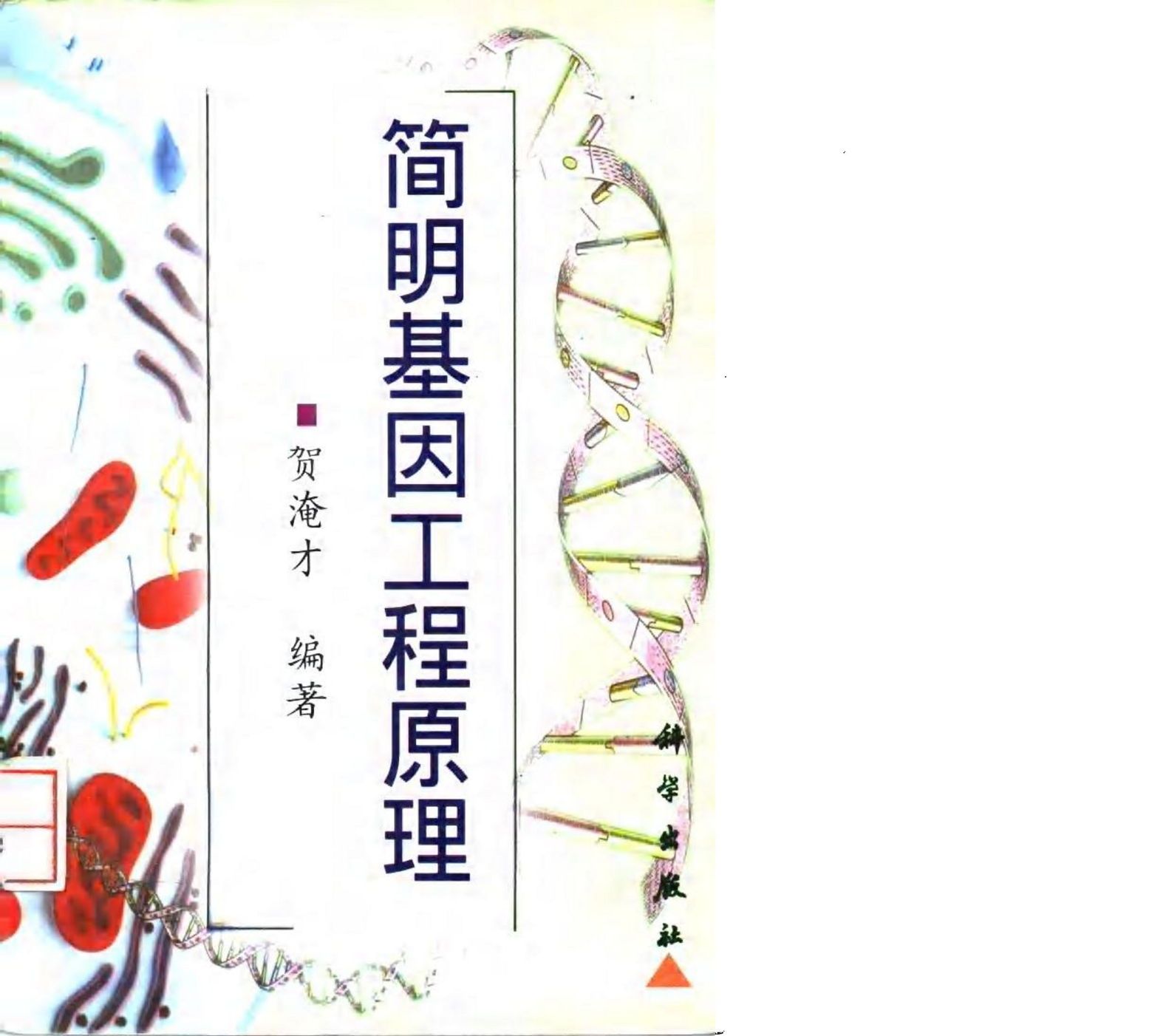


简明基因工程原理

■ 贺淹才 编著

科学出版社



简明基因工程原理

贺淹才 编著

科学出版社

1998

内 容 简 介

本书简明扼要地介绍了分子遗传学的基本知识, 基因工程的最新成就与前景, 基因工程的基本过程, 基因工程载体, 酶切与连接, 重组体 DNA 的导入与重组体转化子的鉴定, 目的基因的表达与检测, 克隆 DNA 的定向诱变, 基因打靶技术, 反义技术等内容。书后附有详细名词索引, 因而又可把本书作工具书来使用。

本书可作为有关专业的研究生及本科学生的选修课教材, 并可供生物、农业、医学等方面有关的科研与教学的参考。

图书在版编目 (CIP) 数据

简明基因工程原理/贺淹才编著. -北京: 科学出版社, 1998
ISBN 7-03-006193-4

I. 简… I. 贺… III. 基因-遗传工程 IV. Q78

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (97) 第 17476 号

科学出版社出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码: 100717

北京科地亚印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1998 年 4 月第 一 版 开本: 787×1092 1/32

1998 年 4 月第 一 次印刷 印张: 9 1/8

印数: 1—3 500 字数: 197 000

定价: 21.00 元

目 录

第一章 绪论	(1)
一、基因工程的概念	(1)
二、基因工程发展史	(2)
三、基因工程的巨大意义 <small>与医学关系</small>	(3)
四、生物技术与基因工程	(4)
五、我国的基因工程	(9)
六、基因工程的安全性问题	(10)
七、我国的《基因工程安全管理办法》	(12)
第二章 基因工程的流程	(15)
一、基因工程的基本步骤	(15)
二、基因工程的上游工程——基因克隆	(15)
三、基因工程的流程	(16)
四、基因工程下游工程的分化	(16)
五、原核细胞表达系统	(18)
六、植物基因工程	(19)
七、昆虫或动物细胞表达系统	(21)
八、动物基因工程	(22)
九、基因治疗	(23)
第三章 DNA 的分子特性与利用	(25)
一、脱氧核糖核酸	(25)
二、DNA 变性	(26)
三、复性与杂交	(27)

四、DNA 的复制	(28)
五、DNA 的修复	(29)
六、生物的基因重组	(29)
七、基因	(30)
八、基因表达及其调控	(31)
九、启动子和增强子	(33)
十、DNA 的分离和提取	(34)
十一、基因突变	(39)
十二、转座子及其在基因工程中的应用	(42)
第四章 各种工具酶	(45)
一、工具酶与基因工程	(45)
二、限制酶	(46)
三、DNA 聚合酶	(51)
四、DNA 连接酶	(54)
五、S1 核酸酶	(55)
六、 <i>Bal31</i> 核酸酶	(55)
七、碱性磷酸酶	(56)
八、逆转录酶	(56)
第五章 目的基因的制取	(58)
一、目的基因	(58)
二、鸟枪法	(60)
三、物理化学法	(61)
1. 物理化学法分离基因的基本原理	(61)
2. 物理化学法分离基因的主要方法	(61)
四、化学合成基因	(62)
五、酶促逆转录合成法	(63)
六、聚合酶链式反应	(63)

七、基因文库的概念	(68)
八、基因文库的大小	(68)
九、基因组文库	(70)
十、cDNA 文库	(72)
第六章 基因载体的选择与构建	(75)
一、基因克隆与基因重组	(75)
二、基因载体	(75)
三、载体的报告基因 (标记基因)	(76)
四、细菌质粒载体	(79)
1. 质粒的概念	(79)
2. 质粒 DNA 的分子特性	(79)
3. 质粒的复制和遗传	(80)
4. 质粒的报告基因	(81)
5. 质粒的转座子	(82)
6. 质粒的改造	(82)
7. 质粒载体的条件	(82)
8. 质粒载体的多克隆位点	(83)
9. 辨色鉴别重组克隆的质粒载体	(84)
10. 常用的质粒载体	(84)
11. 质粒 DNA 的提取	(85)
五、噬菌体载体	(87)
1. 噬菌体和噬菌体载体的特点	(87)
2. λ 噬菌体	(88)
3. 溶菌性反应与溶源性反应	(90)
4. λ 噬菌体的包装	(91)
5. 野生型 λ 噬菌体的改造	(92)
6. 单链噬菌体载体	(95)

7. 粘性质粒载体	(96)
六、动物病毒载体	(97)
1. 动物病毒载体的特点	(97)
2. 杆状病毒载体	(98)
3. SV40 载体	(100)
4. 痘苗病毒载体	(103)
5. 逆转录病毒载体	(104)
6. 其他动物病毒载体	(107)
七、酵母质粒载体	(107)
1. 酵母质粒载体的特点	(107)
2. 整合载体	(108)
3. 自我复制载体	(108)
4. 酿酒酵母载体系统	(109)
第七章 基因与载体连接 (重组与克隆)	(112)
一、基因重组的概念	(112)
二、亚克隆	(113)
三、基因重组对载体的要求	(114)
四、连接前的处理	(116)
五、粘性末端连接	(118)
六、平端连接	(121)
七、人工接头连接	(122)
八、同聚物加尾连接	(124)
九、人生长激素基因的克隆	(126)
第八章 重组 DNA 导入受体细胞	(132)
一、克隆与导入方法	(132)
二、受体细胞	(133)
三、大肠杆菌宿主菌	(133)

四、受体细菌的感受态	(134)
五、转化反应	(135)
六、磷酸钙沉淀法	(137)
七、体外包装转染法	(138)
八、共转化	(139)
九、电转化	(141)
十、微弹技术	(142)
十一、微注射技术	(143)
十二、脂质体导入法	(144)
十三、转化酵母菌	(146)
第九章 重组体的筛选	(148)
一、转化子与筛选的概念	(148)
二、筛选方法的类型	(148)
1. 快速细胞破碎法	(149)
2. 煮沸法	(150)
3. 基因定位法	(150)
4. DNA 序列测定	(156)
5. 依赖具有筛选性的载体	(161)
6. mRNA 翻译检测	(163)
7. 核酸探针与菌落原位杂交	(163)
8. Southern 印迹杂交试验	(167)
9. 免疫化学方法	(167)
10. 酶免疫检测分析	(172)
第十章 目的基因的表达	(174)
一、基因工程的目的	(174)
二、制约目的基因表达的因素	(174)
三、阅读框架	(175)

四、启动子与转录的影响	(175)
五、翻译过程对表达的影响	(177)
六、表达体系与表达产物的形式	(179)
七、大肠杆菌表达体系	(180)
八、人生长素基因在大肠杆菌中表达	(181)
九、构建分泌型表达载体	(186)
十、真核细胞表达体系的特点	(187)
十一、酵母表达体系	(188)
十二、昆虫或昆虫细胞表达体系	(190)
十三、哺乳动物细胞表达体系	(192)
十四、新型的胞浆表达体系	(193)
十五、表达检测系统	(194)
第十一章 克隆的策略	(199)
一、克隆方法的分类	(199)
二、用质粒载体进行克隆	(202)
三、用 λ 噬菌体进行克隆	(204)
四、用粘粒载体进行克隆	(204)
五、Northern 杂交法	(205)
六、cDNA 文库筛选法克隆	(206)
七、杂交筛选法	(207)
八、磁珠捕捉法	(208)
九、产物导向法	(210)
十、岛屿获救 PCR 法	(211)
十一、NotI 连锁片段筛选法	(213)
十二、外显子捕捉法与外显子扩增法	(214)
十三、动物园杂交法 (zoo blot)	(216)
十四、剪接位点筛选法	(216)

十五、作图克隆法	(217)
十六、利用杂种细胞克隆法	(220)
十七、消减杂交法	(221)
十八、相同序列克隆法	(223)
十九、差异显示法	(224)
二十、显微切割与微克隆法	(226)
二十一、互补克隆法	(227)
二十二、插入诱变法	(228)
二十三、其他克隆方法	(230)
第十二章 克隆 DNA 的定向诱变	(232)
一、基因突变与人工诱变技术	(232)
二、缺失突变和插入突变	(234)
三、碱基置换	(236)
四、寡核苷酸的定向诱变	(239)
五、定向诱变与蛋白质工程	(242)
第十三章 基因打靶、遗传标记与检测	(243)
一、基因打靶技术	(243)
二、限制性片段长度多态性	(247)
三、随机扩增多态 DNA 技术	(248)
四、单链 DNA 构象多态性技术	(249)
五、扩增阻滞突变系统	(250)
六、表面呈现技术	(253)
七、原位 DNA 合成技术	(256)
八、连接酶链反应	(257)
九、双标记寡核苷酸捕获分析法	(260)
第十四章 反义技术与 ribozyme 的应用	(261)
一、反义寡核苷酸	(261)

二、反义技术的原理	(262)
三、ASON 的改造与反义药物	(263)
四、核酶 (ribozyme)	(263)
1. ribozyme 的克隆和应用价值	(264)
2. 用于兽医和畜禽抗病育种	(266)
3. 用于植物基因工程	(267)
4. 用于基因治疗	(268)
主要参考文献	(271)
索引	(274)

第一章 绪 论

一、基因工程的概念

基因工程 (genetic engineering), 也叫基因操作、遗传工程, 或重组体 DNA 技术。它是一项将生物的某个基因通过基因载体运送到另一种生物的活性细胞中, 并使之无性繁殖 (称之为“克隆”) 和行使正常功能 (称之为“表达”), 从而创造生物新品种或新物种的遗传学技术。一般说来, 基因工程是专指用生物化学的方法, 在体外将各种来源的遗传物质 (同源的或异源的、原核的或真核的、天然的或人工合成的 DNA 片段) 与载体系统 (病毒、细菌质粒或噬菌体) 的 DNA 结合成一个复制子。这样形成的杂合分子可以在复制子所在的宿主生物或细胞中复制, 继而通过转化或转染宿主细胞、生长和筛选转化子, 无性繁殖使之成为克隆。然后直接利用转化子, 或者将克隆的分子自转化子分离后再导入适当的表达体系, 使重组基因在细胞内表达, 产生特定的基因产物。

基因工程中内外源 DNA 插入载体分子所形成的杂合分子又称为嵌合 DNA 或 DNA 嵌合体 (DNA chimera)。构建这类重组体分子的过程, 即对重组体分子的无性繁殖过程又称为分子克隆 (molecular cloning), 基因克隆 (gene cloning) 或重组 DNA (recombinant DNA)。

在典型的基因工程实验中, 被操作的基因不仅能够克隆, 而且能够表达。但是在另外一种情况下, 为了制备和纯化一

段 DNA 序列,我们只需这一段 DNA 在受体细胞中克隆就可以了,无需让它表达,这也是一种基因工程实验。

二、基因工程发展史

1972 年,美国斯坦福大学的学者首先在体外进行了 DNA 改造的研究,他们把 SV40(一种猴病毒)的 DNA 和 λ 噬菌体 DNA 分别切割,又将两者连接在一起,成功地构建了第一个体外重组的人工 DNA 分子。1973 年 Cohen 等人首次在体外将重组的 DNA 分子导入大肠杆菌中,成功地进行了无性繁殖,从而完成了 DNA 体外重组和扩增的全过程。在这个工作的基础上,基因工程就诞生了。仅仅经历二十多年的时间,有关领域的科学家已能使异源基因在受体细胞成功地表达具有特异生物学活性的蛋白质。通过体外基因重组,可以人工创造出新的生物物种。

基因工程技术经历了安全问题的争论和改造载体阶段,当前已将突破点集中于外源基因在受体细胞内的表达问题上,确切地说,更集中于真核基因在原核细胞表达的基因工程技术。使外源基因在受体细胞内表达出有生物学活性的蛋白质,不仅涉及对基因工程的许多细节的认识,还广泛涉及到人们对受体细胞、基因结构与功能的关系以及基因表达调控的认识。

基因工程技术的迅速发展得益于现代遗传学和生物化学成果的积累和运用。限制性内切核酸酶的发现、对噬菌体和细菌质粒的生物学研究成果以及 Southern 印迹技术、聚合酶链式反应(PCR),脉冲场凝胶电泳技术等重大的发现和技术革新都给基因工程带来新的进展和突破。现在,已经有了快

速、自动化的 DNA 序列分析技术和 DNA 合成技术，以及灵敏度极高的基因检测和基因表达检测技术，一些原先非常繁杂的基因工程技术在一定程度上自动化或常规化了。

21 世纪是生物科学和生物工程时代。基因工程是生物工程的主要内容之一。目前世界各国对基因工程技术高度的重视，新的大型的基因工程公司不断涌现。

三、基因工程的巨大意义

基因工程为生物学、医药学、遗传学、农业科学、环境科学和某些工业研究开拓了广阔的、革命性的发展前景。

生物学中长期无法解决的许多问题：如生物怎样从一个受精卵发育成个体？细胞如何病变？人类如何有癌症、如何攻克癌症？等等。主要原因之一是以往对高度复杂而又极其微小的生物细胞的基因分析技术上有困难，很少对基因的结构与功能进行深入研究。基因工程技术为解决基础理论研究提供了有效手段。首先，基因工程能直接从生物细胞中分离出所需的基因（特定的 DNA 片段），并使其增殖得到大量同质基因。这种方法在生物学史上前所未有。基因工程技术还能运用克隆得到的大量 DNA 片段，测定基因在染色体上的位置，分析基因的结构与功能，并进而能用人工方法来合成基因、改造基因。

基因工程技术已经完全突破了经典的研究方法和研究内容，它形成了一个内容广泛而崭新的新领域。自然界创造的新的生物物种一般需要几十万乃至几百万年，但是在实验室用基因工程技术可能在几天之内完成这个过程。自然界从未有过的新型蛋白质也可能会通过基因工程技术创造出来。基

因工程使人类从单纯地认识生物和利用生物的传统模式跳跃到随心所欲改造生物和创造生物的新时代。

人类已经能够利用基因工程,其潜力几乎是不可估量的。基因工程技术能把珍贵的人类激素基因插入到可以用工业规模生长的微生物中,来生产大量的人类激素,如生长激素、胰岛素、促红细胞生成素等等。农业科学已能利用基因工程技术来改良甚至创造新的作物新品种,例如用适当的基因转移来增加玉米的赖氨酸含量,或使某些作物增加维生素含量并提高产量,把生长快的动物基因转移到家畜使其快速生长,等等。医学上除了用基因工程来制药外,还在研究用简单的DNA转染来治疗某些癌症或某些遗传疾病。

基因工程既是现实的生产力,更是巨大的潜在生产力,必定无疑是下一代新产业的基础技术,成为世界各国,特别是发达国家国民经济的重要支柱。在能源短缺、食品不足和环境污染这三大危机已开始构成全球社会问题的今天,基因工程及其伴随的细胞工程、酶工程、发酵工程和生化工程(统称生物工程)将是帮助人类克服这些难关的有力武器,是关系到各国经济乃至影响人类社会发展的关键因素之一。

四、生物技术与基因工程

生物技术(biotechnology)是研究怎样利用生物体、生命体系或生命过程,来制造产品和造福人类社会的一门新兴技术科学。图1.1归纳了由生物技术生产的物质和应用生物技术的过程。图中将微生物技术的利用分为三类,即以获取微生物菌体为目的的应用技术、利用物质代谢的技术以及灭菌技术。利用物质代谢反应,使由微生物产生的酶来催化特定

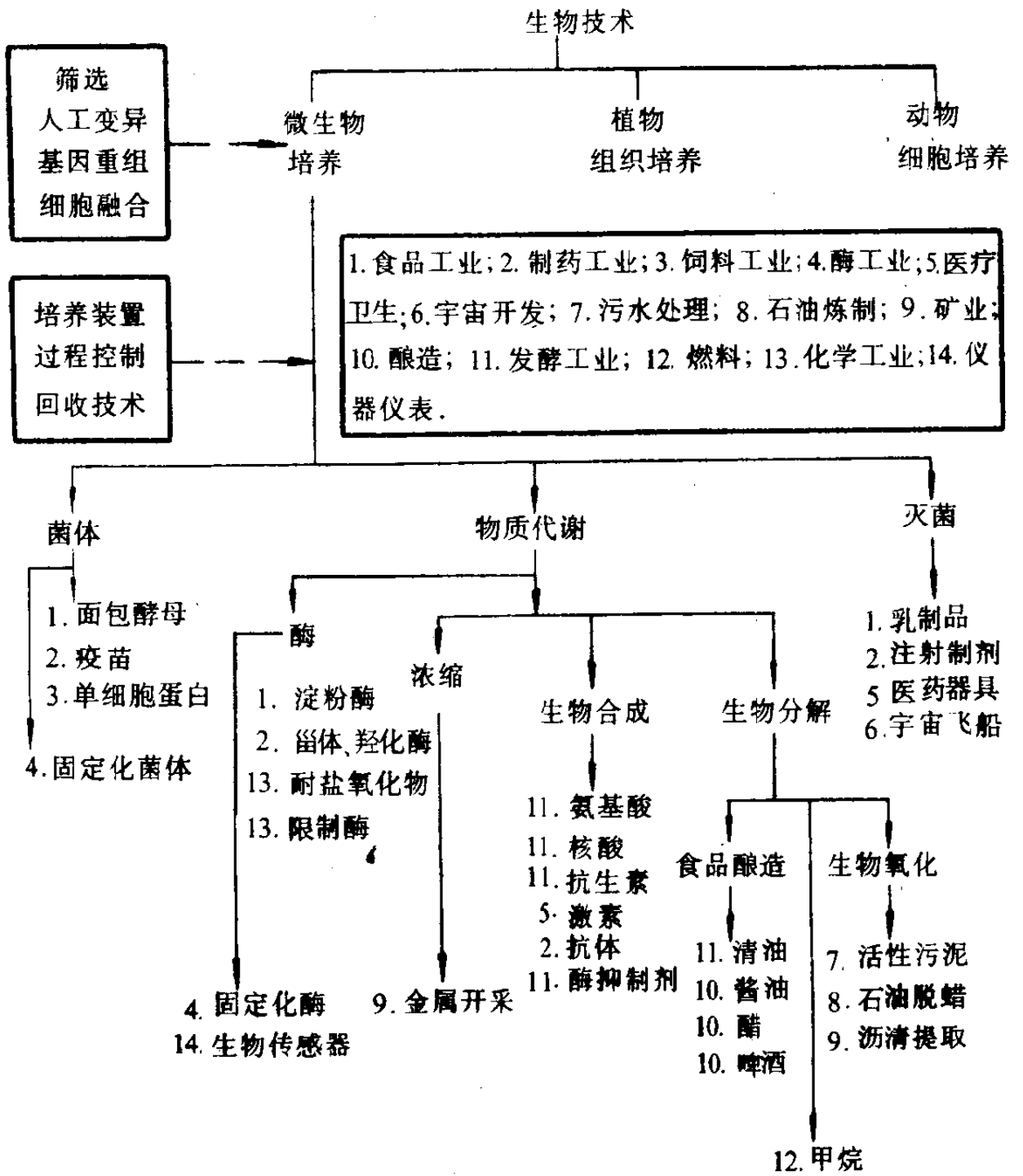


图 1.1 生物技术概况及其应用领域

的反应。或者将其应用于自动分析的领域，近年来已归为一类，称为酶工程。由于使用了微生物这类具有高度活性的生物，使氨基酸、核酸、抗生素、酶等有用物质的合成，能在很高的效率下进行。这样利用微生物生产单一有机物质的工业，称为发酵工业。在这类工业中，将大米和大豆等的成分在微生物的作用下分解，生成复合物，制造为人们所喜爱的饮料和酱油、醋一类调味食品等传统的利用微生物的工业，称为酿造工业。此外，还有利用微生物的分解作用、生物氧化作用以除去污水中的有机物及溶解矿石（细菌冶金）等。

人类利用生命过程可以在不同的层次上进行。例如，从分子水平（酶和抗生素）、亚细胞水平（染色体和染色体组及细胞器），直到细胞、组织器官和生物体水平。因此，一般认为生物工程应包括基因工程、细胞工程、以发酵为主的微生物工程和酶工程等四大部分。其生产产品的程序大体是：开始以创建具有新生产性能的新生物体为目的的基因工程（通过重组体 DNA 技术、细胞融合技术、染色体或染色体组工程技术），经过发酵工程或动、植物细胞悬浮培养技术，达到生产酶、维生素、抗生素、激素、蛋白质和其他次生物质产品的目的，以及通过酶工程（包括酶固定化和细胞固定化）生产酶催化过程的产物，如图 1.2 所示。

生物工程是分子遗传学、微生物学、细胞生物学、生物化学、化学工程和加工工艺学等学科的结合，其应用范围十分广泛，包括医药、食品、农林、园艺、化工、冶金、采油、能源和环保等方面。许多现有的以微生物学为基础的工业，依靠基因工程、发酵罐新技术和新底物的利用而得以改进，还可缓解环境污染等社会问题。不久的将来，光生物反应器和生物燃料将会变为现实，像木质素纤维素这类结构复杂但能