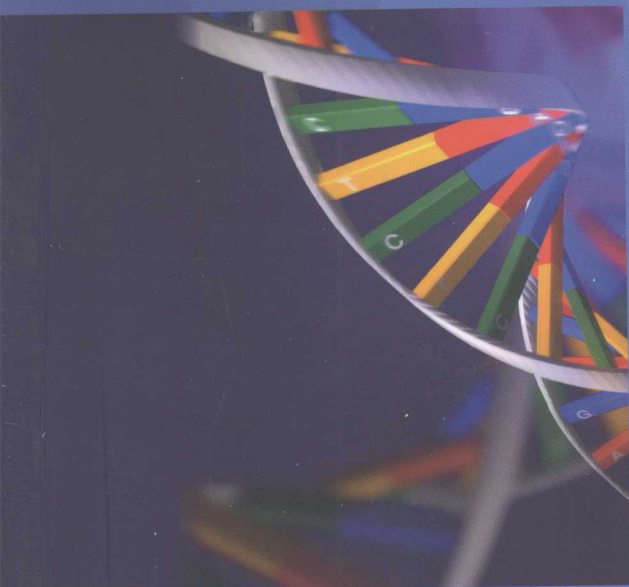


Gene  
Engineering



# 基因工程

第2版

主编 孙明

 高等教育出版社  
HIGHER EDUCATION PRESS

014003627

Q78-43  
03  
2

# Gene Engineering

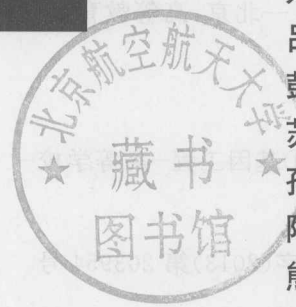
# 基因工程 第2版

JIYIN GONGCHENG

主 编 孙 明

编 委 (按姓氏拼音排序)

- 陈雯莉 (华中农业大学)
- 储昭辉 (华中农业大学)
- 连正兴 (中国农业大学)
- 林拥军 (华中农业大学)
- 刘克德 (华中农业大学)
- 吕颂雅 (武汉大学)
- 彭东海 (华中农业大学)
- 苏 莉 (华中科技大学)
- 孙 明 (华中农业大学)
- 陶美凤 (上海交通大学)
- 熊立仲 (华中农业大学)
- 姚伦广 (南阳师范学院)
- 袁德军 (华中农业大学)
- 张桂敏 (湖北大学)
- 赵昌明 (武汉大学)
- 周 菲 (华中农业大学)



Q78-43  
03-2



 高等教育出版社·北京  
HIGHER EDUCATION PRESS BEIJING

## 内容简介

《基因工程》是国家精品课程“基因操作原理”配套教材,第1版为“普通高等教育十五国家级规划教材”。本书全面、系统介绍了基因工程的原理、策略和技术方法,具有较好的先进性、前瞻性和实践性,得到使用院校的广泛好评。在保持第1版风格和特色基础上,第2版结合学科发展,对基因操作技术和基因工程技术进展做诸多补充、修订,主要包括:将原第六章“基因操作中大分子的分离和分析”拓展为2章;原第七章“基因芯片技术”有关操作技术和原理合并到第六章中,作为分子杂交技术的内容;原第九章“DNA序列分析”增加高通量测序技术、单分子测序技术;原第十二章“基因组研究技术”补充了基因组研究、相互作用研究的新技术,以及最新发展的基因组编辑技术;重新撰写第十九章;在第二篇“基因工程应用”对各种基因工程实践做了更新和完善。

第2版主要分为基因操作原理、基因工程应用2篇,全书合计19章,分别是:基因工程概述、分子克隆工具酶、分子克隆载体、人工染色体载体、表达载体、基因操作中大分子的分离和检测、基因操作中的核酸分析技术、PCR技术及其应用、DNA序列分析、DNA诱变、DNA文库的构建和目的基因的筛选、基因组研究技术、植物基因工程、动物基因工程、酵母基因工程、细菌基因工程、病毒基因工程、医药基因工程、基因工程产品的安全评价及其管理。

本书可为高等院校生物技术、生物工程、生物制药相关专业教学使用,也可供相关的科研、技术和管理人员参考。

## 图书在版编目(CIP)数据

基因工程/孙明主编. -- 2版. -- 北京:高等教育出版社,2013.8

ISBN 978-7-04-038217-4

I. ①基… II. ①孙… III. ①基因工程—高等学校—教材 IV. ①Q78

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2013)第 203954 号

策划编辑 王 莉 责任编辑 单冉东 封面设计 姜 磊 责任印制 刘思涵

出版发行 高等教育出版社  
社 址 北京市西城区德外大街4号  
邮政编码 100120  
印 刷 北京人卫印刷厂  
开 本 889mm×1194mm 1/16  
印 张 26.5  
字 数 630千字  
购书热线 010-58581118  
咨询电话 400-810-0598

网 址 <http://www.hep.edu.cn>  
<http://www.hep.com.cn>  
网上订购 <http://www.landraco.com>  
<http://www.landraco.com.cn>  
版 次 2006年5月第1版  
2013年8月第2版  
印 次 2013年8月第1次印刷  
定 价 46.00元

本书如有缺页、倒页、脱页等质量问题,请到所购图书销售部门联系调换  
版权所有 侵权必究  
物料号 38217-00



· 014003627

数字课程（基础版）

# 基因工程 第2版

登录方法：

1. 访问 <http://res.hep.com.cn/hep/plugin/38217>
2. 输入数字课程帐号（见封底明码）、密码
3. 点击“LOGIN”
4. 进入学习中心

登录以获取更多学习资源！

帐号自登陆之日起一年内有效，过期作废。  
使用本帐号如有任何问题，  
请发邮件至：[lifescience@pub.hep.cn](mailto:lifescience@pub.hep.cn)

普通高等教育“十五”国家级规划教材

## 基因工程（第2版）

孙明 主编

[内容介绍](#) | [纸质教材](#) | [版权信息](#) | [联系方式](#)

4e 学习中心

欢迎登录

账号   
密码

LOGIN

### 内容介绍

这是一个开放式的网络教学平台，与《基因工程》（第2版）教材配套使用。该网站资源是教材内容的引申和补充，包括演示文稿、思考题、技术案例、拓展知识等，可供学生学习和教师教学参考。

高等教育出版社版权所有 2013

<http://res.hep.com.cn/hep/plugin/38217>

## 第2版前言

时光飞逝,本教材自第1版面世至今已经7年。在此期间,基因操作技术发生了许多巨大的变化,特别是以“组学”为主的技术在基因的研究中大规模应用。由此,也带来了许多操作方式和观念的变化。

本书仍保持第1版的撰写风格,主要在原版本的基础上进行更新、修订和完善。这样能很好地保留基因操作原理和基因工程应用的基础内涵,并保持基础知识的系统性和完整性。

2006年以来,高通量测序技术发展迅猛,导致基因组序列大量涌现。这些变化对基因的操作来说也带来了相应的变化。其一,在基因组学的基础上,高通量的其他组学得到快速发展,并逐渐成为基因操作的常规技术手段;其二,传统的基因操作技术的重要性和牢固地位受到挑战,有些甚至被淘汰。其中最主要的变化是,人们获取基因的方式和观念发生了重要变化。在传统操作技术中获得新基因的方式主要是通过构建基因文库并从文库中筛选而获得。为此,前一版教材强调以文库构建为主线的分子克隆方式。而由于基因组序列大量的涌现以及生命科学知识的爆炸式增长,人们已经不再依赖于文库的构建和筛选,在很多情况下可通过信息学分析和组学分析并通过PCR相关技术将目标基因克隆出来。当然,新技术和新方法的出现,并不意味着传统和经典方法会过时和淘汰。现代技术几乎都是传统技术的进一步延伸或组合,因此掌握好基础性的传统知识对认识、领会和掌握现代技术的原理有重要帮助甚至是决定性的。对于基因文库的构建,虽然不再像以前那样主要用于新基因的筛选,但仍然大量用于基因和基因组功能、蛋白质相互作用网络、大型基因簇等的研究,以及高通量基因组测序和基因组序列拼接等相关的操作和实施。而对于传统的单链DNA制备、U法定点诱变和常规DNA序列测定等基因操作技术,人们已经不常使用了,相关的技术或应用被PCR有关的技术所取代。尽管如此,本教材仍然保留了这部分内容,一来现有的许多技术中常常携带这些技术成分,如现有的许多质粒载体中都含有单链噬菌体载体的间隔区,用于RNA端点分析的primer extension技术和用于检测DNA中与蛋白质相互作用区域的DNase I footprinting技术都用到了常规DNA测序技术;其二,这些传统的技术展示了丰富的基因操作技巧和智慧,有助于读者对基因操作原理和基因工程应用的深刻认识和领会,从而有助于读者自主设计更好的基因操作方案和路线。

随着经济和技术的发展,越来越多的商业化试剂盒应用于基因操作的实践中。试剂盒的应用,一方面给用户提供了极大的方便和成功率,节省了大量的时间,同时也蕴含一种风险,即对试剂盒应用原理的认识和掌握变得越来越弱,从而有可能导致自主设计实验的能力减弱。本教材希望通过基因操作原理的阐述,尽可能地降低这种风险。

在这次修订中,对于基因操作中的基础性技术和原理的有关章节,变动不大,修改的重点在于增加新的基因操作技术和原理以及基因工程技术进展。将原第六章“基因操作中大分子的分离和分析”拆分成两章,即侧重于生化性质的“基因操作中大分子的分离和检测”和侧重于相互作用的“基因操作中的核酸分析技术”。原第七章“基因芯片技术”不再保留,其

中相关的操作技术和原理放入到新的第六章中,作为分子杂交技术的内容。第九章“DNA 序列分析”一章,保留了原有的传统测序技术,重点增加了高通量测序技术有关的原理细节以及单分子测序技术简要原理的介绍。在第十二章“基因组研究技术”中增加了基因组研究的新技术和相互作用的研究技术,以及最新发展的基因组编辑技术,如 TALEN 和 CRISPR-Cas 技术。在第二篇“基因工程应用”,对各种基因工程实践做了更新和完善,对“基因工程产品的安全评价及其管理”一章按照新的思路和架构进行了重新撰写。

在编写过程中,除了参考第1版中提到的资料和文献外,还参考并引用了最新的 *Molecular Cloning* 第4版、相关生物试剂和仪器公司的产品说明书和网络百科知识中的部分资料,此处不再一一列举相关的公司和网站名称。由于撰写内容的变化和编写人员工作性质的变化,本次再版的编写人员稍有变化,主要变化是彭东海博士大范围参与到撰写和修订工作中。本书能够成功完成第2版的撰写,有赖于各位编委的大力支持和配合及其不懈努力和耐心,在此表示衷心感谢。感谢高等教育出版社的长期支持和鼓励,不仅让本教材能及时更新,同时也促进相关课程的发展和建设。感谢为我们提供各种资料、信息和图表的同行、友人以及相关公司的销售代表。

对于本教材的扩充资源、进展更新和意见反馈,可访问中国大学精品开放课程“爱课程”网站(<http://www.icourse.cn>)、国家精品课程“基因操作原理”网站(<http://nhjy.hzau.edu.cn/kech/jycz/>),以及登录与教材配套的数字课程网站。

生命科学和基因工程技术正在迅猛发展,新的技术和方法不断涌现和更新,本教材定有疏漏和把握不准确的地方,衷心希望读者提出宝贵意见并批评和指正,以便及时更新和再版时修正。

孙 明

2013年5月初于武汉

# 第 1 版前言

21 世纪是生命科学的世纪。分子生物学作为最前沿的生命科学学科之一,主要从分子水平研究生命活动的现象与本质,如 DNA 的复制、基因的表达与调控、遗传与变异等。随着分子生物学研究的深入与发展,除了在分子水平上了解生命的特征外,在分子水平进行更有效的生物学研究以及在分子水平进行物种改造是生物学界共同关心并十分重视的问题。

国内外已出版了许多有关基因工程的书籍,各自展现出不同的内涵和风格。本教材所指的基因工程是一个广义的概念,包括基因操作原理和基因工程应用两部分。其中后者是指基因工程的狭义概念,以转基因技术为主线,以构建不同类型的基因工程体(或称遗传修饰生物体,genetically modified organism,GMO)及其应用为主要内容,包括植物、动物和微生物基因工程体的创制和应用,以及基因工程在生物医药中的综合应用。自 1973 年美国斯坦福大学的 Stanley Cohen 和 Herbert Boyer 第一次实现基因的异源表达,基因工程就开始蓬勃发展,并在工业、农业、医疗等领域创造了巨大的价值,同时改善了人们的生活,提高了人类与疾病抗争的能力。在历史的长河中,人类从来没有比现在更像是世界的“主宰者”,因为基因工程赋予了人类改造物种、创造物种的能力。当然,这一切都必须是在法律和伦理允许的范围内。本书基因工程应用部分从植物基因工程、动物基因工程、酵母基因工程、细菌基因工程、病毒基因工程和医药基因工程以及基因工程的安全管理等方面,分别介绍各基因工程体的研究现状、发展趋势和应用前景,详细阐述其表达系统,方便读者了解基因工程的实质及发展状况。

基因操作原理是本书的重要基础内容,不仅包括指导基因工程体构建的基因工程原理,还包括用于指导分子生物学研究的,对基因进行操作的基本原理。后者是前者乃至基因工程实践的基础,前者是后者在应用领域的延伸和发展。因此本书重点突出基因工程的最基本原理,即基因操作原理。基因操作原理部分基于分子生物学理论基础,以分子克隆为主线,介绍与此相关的载体、工具酶、文库的构建与筛选、基因的各种分析手段(包括分子杂交、PCR 和序列分析)和基因改造等研究技术和方法的原理。它承载着衔接上游分子生物学与下游狭义基因工程的任务,并为之服务。没有分子生物学的理论基础支撑,基因操作就成为无本之木;没有基因操作技术的推动,分子生物学将成为无源之水,匮乏前进的动力。

本书是在华中农业大学分子生物学系列课程讲义的基础上,经过 10 年的试用、修订、补充和完善而形成的,是国家生物学理科基地班和国家生命科学技术基地班的核心教材,同时适合生物科学、生物技术、生物工程和生物制药专业的本科生,以及遗传学、微生物学和生物化学与分子生物学专业或相关专业的研究生使用。本书的编写人员主要由教学和科研一线的年轻博士组成,具有丰富的本科教学经验和科学研究经历,保证了本教材在学术上的先进性。所有编写人员在编写过程中均表示出极大的热情,充分发挥各自教学和科研优势,使本教材能最大限度满足教学需求。

本教材的编写还得到了教育部生物科学与工程教学指导委员会和高等教育出版社的大

力支持。编写过程中主要参考了 *Molecular Cloning* 第 1 至第 3 版和 *Principles of Gene Manipulation* 第 5 版和第 6 版。生物试剂公司是基因工程技术发展的重要推动者,它们设计、发明和完善了许多技术方法。因此,本书借鉴了许多生物试剂公司的产品目录和操作手册,包括 New England Biolabs、Promage、Roche、Stratagene、Invitrogen、Qiagen、Novagen、Eastwin 和 Bio-Rad 等公司。本书还参考了许多科研论文和互联网的资料以及编写人员的科研成果。赵昌明等研究生在资料收集、图片绘制和书稿整理等方面做了大量工作。在此,对所有参与编写、提供资料和给予帮助,以及关心和支持本书编写的人员和单位表示衷心的感谢。

对于本教材的扩充参考资料、知识更新、课后练习和意见反馈,可访问教学网站:

<http://nhjy.hzau.edu.cn/kech/jycz/index.htm>

随着生命科学技术的发展,基因工程也在迅速发展。本书难以囊括所有的知识点,加之时间紧迫,作者水平有限,疏漏之处在所难免,我们诚挚地欢迎读者批评指正。

孙 明

2005 年 12 月于武汉



## 郑重声明

高等教育出版社依法对本书享有专有出版权。任何未经许可的复制、销售行为均违反《中华人民共和国著作权法》，其行为人将承担相应的民事责任和行政责任；构成犯罪的，将被依法追究刑事责任。为了维护市场秩序，保护读者的合法权益，避免读者误用盗版书造成不良后果，我社将配合行政执法部门和司法机关对违法犯罪的单位和个人进行严厉打击。社会各界人士如发现上述侵权行为，希望及时举报，本社将奖励举报有功人员。

反盗版举报电话 (010) 58581897 58582371 58581879

反盗版举报传真 (010) 82086060

反盗版举报邮箱 dd@hep.com.cn

通信地址 北京市西城区德外大街4号 高等教育出版社法务部

邮政编码 100120

## 短信防伪说明

本图书采用出版物短信防伪系统，用户购书后刮开封底防伪密码涂层，将16位防伪密码发送短信至106695881280，免费查询所购图书真伪。

## 反盗版短信举报

编辑短信“JB, 图书名称, 出版社, 购买地点”发送至10669588128

短信防伪客服电话

(010) 58582300

# 目 录

<b>第一章 基因工程概述</b> .....	1	因工程的诞生和发展	7
<b>第一节 基因操作与基因工程</b> .....	1	四、基因工程的内容	9
一、基因操作与基因工程的关系	1	<b>第三节 基因的结构——基因操作</b>	
二、基因工程的诞生与发展	2	的理论基础	10
<b>第二节 基因工程是生物科学发展的必然产物</b> .....	4	一、基因的结构组成对基因操作的影响	10
一、基因是基因重组的物质基础	4	二、基因克隆的通用策略	11
二、DNA 的结构和功能	5	思考题	12
三、基因操作技术的发展促进基		主要参考文献	12

## 第一篇 基因操作原理

<b>第二章 分子克隆工具酶</b> .....	17	五、耐热 DNA 聚合酶	34
<b>第一节 限制性内切酶</b> .....	17	六、反转录酶	34
一、限制与修饰	17	七、末端转移酶	35
二、限制酶识别的序列	20	<b>第四节 其他分子克隆工具酶</b> .....	35
三、限制酶产生的末端	21	一、依赖于 DNA 的 RNA 聚合酶	35
四、DNA 末端长度对限制酶切割的影响	25	二、连接酶	36
五、位点偏爱	26	三、T4 多核苷酸激酶	37
六、酶切反应条件	27	四、碱性磷酸酶	37
七、星星活性	28	五、核酸酶	37
八、单链 DNA 的切割	29	六、核酸酶抑制剂	39
九、酶切位点的引入	29	七、琼脂糖酶	39
十、影响酶活性的因素	29	八、DNA 结合蛋白	39
十一、酶切位点在基因组中分布的不均一性	30	九、其他酶	39
<b>第二节 甲基化酶</b> .....	30	思考题	40
一、甲基化酶的种类	30	主要参考文献	40
二、依赖于甲基化的限制系统	31	<b>第三章 分子克隆载体</b> .....	41
三、甲基化对限制酶切的影响	31	<b>第一节 质粒载体</b> .....	41
<b>第三节 DNA 聚合酶</b> .....	32	一、质粒的基本特性	41
一、大肠杆菌 DNA 聚合酶 I	32	二、标记基因	43
二、Klenow DNA 聚合酶	33	三、质粒载体的种类	45
三、T4 噬菌体 DNA 聚合酶	34	<b>第二节 λ 噬菌体载体</b> .....	48
四、T7 噬菌体 DNA 聚合酶	34	一、λ 噬菌体的分子生物学	48
		二、λ 噬菌体载体的选择标记	53

三、代表性 $\lambda$ 噬菌体载体 .....	54	三、利用大肠杆菌固有基因启	
四、 $\lambda$ 噬菌体载体的克隆原理		动子的表达载体 .....	94
及步骤 .....	59	四、表达融合蛋白的表达载体 .....	95
五、 $\lambda$ 噬菌体位点特异性重组系统		五、无细胞体系蛋白质表达	
在基因克隆中的应用 .....	62	系统 .....	99
第三节 单链丝状噬菌体载体 .....	63	六、表达产物的纯化 .....	100
一、M13 噬菌体的生物学 .....	64	七、蛋白表达中可能存在的	
二、M13 噬菌体载体 .....	65	问题 .....	101
三、M13 噬菌体载体的宿主菌 .....	67	第二节 穿梭载体 .....	102
四、丝状噬菌体载体克隆中经		一、大肠杆菌/革兰氏阳性细菌	
常遇到的问题 .....	70	穿梭载体 .....	103
五、噬菌粒 .....	71	二、大肠杆菌/酵母菌穿梭	
六、M13KO7 辅助噬菌体 .....	71	载体 .....	103
思考题 .....	72	三、其他穿梭载体 .....	104
主要参考文献 .....	72	第三节 整合载体 .....	104
第四章 人工染色体载体 .....	74	一、基因插入/基因敲除 .....	104
第一节 黏粒载体 .....	75	二、随机插入突变载体 .....	105
一、黏粒的结构特征和用途 .....	75	思考题 .....	108
二、黏粒载体的工作原理 .....	75	主要参考文献 .....	108
三、黏粒克隆载体 .....	77	第六章 基因操作中大分子的分离和	
四、黏粒文库的扩增和贮存 .....	78	检测 .....	109
五、构建黏粒文库应注意的		第一节 DNA 的分离、检测和	
问题 .....	79	纯化 .....	109
第二节 酵母人工染色体载体 .....	80	一、大肠杆菌质粒 DNA 的分离	
一、YAC 载体的复制元件和		和纯化 .....	109
标记基因 .....	80	二、基因组 DNA 的分离 .....	110
二、YAC 载体的工作原理 .....	81	三、DNA 的琼脂糖凝胶电泳 .....	112
第三节 细菌人工染色体载体 .....	82	四、聚丙烯酰胺凝胶电泳 .....	113
一、BAC 载体及其结构组成 .....	83	五、脉冲场凝胶电泳 .....	113
二、BAC 载体工作原理 .....	83	六、紫外吸收法检测 DNA 的	
三、控制拷贝数的 BAC 载体		浓度和纯度 .....	114
和 Fosmid 载体 .....	84	七、DNA 片段的纯化 .....	115
第四节 P1 噬菌体载体和 P1 人		第二节 RNA 的分离、检测和	
工染色体载体 .....	84	纯化 .....	116
一、P1 噬菌体的分子遗传特征 .....	85	一、控制潜在 RNA 酶的活性 .....	116
二、P1 噬菌体载体 .....	86	二、RNA 的抽提和纯化 .....	116
三、P1 人工染色体载体 .....	87	三、mRNA 的纯化 .....	117
思考题 .....	89	四、RNA 的电泳检测 .....	117
主要参考文献 .....	89	第三节 分子杂交 .....	118
第五章 表达载体 .....	90	一、Southern 杂交 .....	118
第一节 大肠杆菌表达载体 .....	90	二、Northern 杂交 .....	119
一、大肠杆菌表达载体的结构 .....	90	三、Western 杂交 .....	119
二、利用 T7 噬菌体启动子的		四、其他分子杂交 .....	119
表达载体 .....	92	五、DNA 微阵列分析 .....	120

六、探针的标记 .....	121	片段 .....	151
第四节 重组 DNA 分子导入大肠杆菌 .....	124	一、反向 PCR .....	151
一、CaCl <sub>2</sub> 转化法 .....	124	二、利用接头的 PCR .....	151
二、电转化法 .....	125	三、热不对称交错 PCR .....	153
思考题 .....	126	第四节 与反转录相关的 PCR .....	154
主要参考文献 .....	126	一、cDNA 末端的快速扩增 .....	154
<b>第七章 基因操作中的核酸分析技术</b> .....	127	二、差异显示 PCR .....	155
第一节 DNA 和蛋白质相互作用分析 .....	127	第五节 PCR 产生 DNA 指纹 .....	157
一、凝胶阻滞实验 .....	127	一、多重 PCR .....	158
二、DNase I 足迹实验 .....	128	二、随机扩增多态性 DNA .....	158
三、体内足迹实验 .....	129	三、扩增片段长度多态性 .....	158
四、酵母单杂交技术 .....	130	第六节 实时定量 PCR .....	159
五、染色质免疫沉淀法 .....	131	一、实时荧光定量 PCR 的定量方式 .....	159
六、DNA-蛋白质相互作用研究技术的新进展 .....	132	二、荧光标记方式 .....	160
第二节 RNA 作图和端点分析 .....	133	思考题 .....	162
一、RNA 的 S1 核酸酶作图 .....	134	主要参考文献 .....	162
二、S1 核酸酶作图分析 mRNA 的端点 .....	135	<b>第九章 DNA 序列分析</b> .....	164
三、引物延伸法分析 mRNA 的端点 .....	135	第一节 第一代 DNA 测序技术 .....	164
第三节 RNA 干扰技术 .....	136	一、Maxam-Gilbert 化学降解法测序技术 .....	164
一、RNAi 现象的发现 .....	136	二、Sanger 双脱氧链终止法 .....	166
二、RNAi 的作用机制 .....	137	第二节 第二代测序技术 .....	171
三、RNAi 技术中的关键问题 .....	137	一、454 测序技术 .....	171
四、RNAi 技术的应用 .....	139	二、Solexa 测序技术 .....	172
思考题 .....	139	三、SOLiD 测序技术 .....	174
主要参考文献 .....	140	四、离子阱测序技术 .....	177
<b>第八章 PCR 技术及其应用</b> .....	141	第三节 单分子测序技术 .....	177
第一节 PCR 技术原理和工作方式 .....	141	一、Heliscope 单分子测序技术 .....	178
一、PCR 的基本原理 .....	141	二、SMRT 单分子测序技术 .....	178
二、PCR 反应体系 .....	142	三、纳米孔单分子测序技术 .....	178
三、PCR 反应程序 .....	145	四、现代测序技术的发展趋势和展望 .....	179
第二节 PCR 产物的克隆 .....	146	第四节 DNA 片段序列测定的策略 .....	180
一、在 PCR 产物两端添加限制性酶切位点 .....	147	一、通用引物指导未知序列的测定 .....	180
二、A/T 克隆法 .....	147	二、引物步移 .....	180
三、平末端 DNA 片段的克隆 .....	148	三、随机克隆测序 .....	180
四、长片段 DNA 的 PCR 扩增 .....	149	四、缺失克隆测序 .....	181
第三节 PCR 扩增未知 DNA .....	149	第五节 转录组测序 .....	182
		一、RNA-seq 技术简介 .....	182
		二、mRNA-Seq 技术流程 .....	182



三、mRNA 的富集 .....	182	一、基因组 DNA 文库的类型和	
四、mRNA 的测序 .....	184	发展 .....	210
第六节 核苷酸序列的生物信息		二、文库的代表性和随机性 .....	211
分析 .....	184	三、基因组 DNA 文库的构建	
一、序列分析和生物信息学的		流程 .....	212
应用 .....	185	第二节 cDNA 文库的构建 .....	212
二、基因数据库和分析工具 .....	185	一、cDNA 文库的特征和发展 .....	212
思考题 .....	186	二、cDNA 文库的构建 .....	213
主要参考文献 .....	186	三、cDNA 文库均一化处理 .....	218
<b>第十章 DNA 诱变 .....</b>	<b>188</b>	四、扣除杂交 cDNA 文库 .....	218
第一节 随机诱变 .....	188	五、全长 cDNA 文库 .....	221
一、错误掺入诱变 .....	189	六、其他 cDNA 文库 .....	222
二、盒式诱变 .....	190	第三节 基因克隆的筛选策略 .....	224
三、增变菌株的诱变作用 .....	191	一、表型筛选法 .....	225
四、化学诱变 .....	191	二、杂交筛选和 PCR 筛选 .....	225
第二节 DNA 体外重组 .....	192	三、免疫筛选 .....	225
一、DNA 洗牌法 .....	193	四、酵母双杂交系统 .....	226
二、交错延伸重组 .....	193	五、克隆基因的验证和分析 .....	226
三、随机引发重组 .....	194	第四节 DNA 文库的保存 .....	227
第三节 寡核苷酸介导的定点		思考题 .....	227
诱变 .....	195	主要参考文献 .....	228
一、寡核苷酸介导定点诱变的		<b>第十二章 基因组研究技术 .....</b>	<b>229</b>
基本流程 .....	196	第一节 传统基因组研究技术 .....	229
二、诱变寡核苷酸的设计 .....	196	一、基因组遗传图谱的构建 .....	230
三、不依赖于 PCR 的 DNA 定点		二、基因组物理图谱的构建 .....	231
诱变 .....	196	三、基因组测序 .....	234
四、PCR 介导的定点诱变 .....	199	第二节 现代基因组研究技术 .....	241
第四节 嵌套缺失 .....	204	一、基因组序列的解读 .....	242
一、嵌套缺失的制备 .....	205	二、基因功能的预测和验证 .....	244
二、嵌套缺失的应用 .....	206	三、功能基因组学研究技术 .....	245
思考题 .....	207	第三节 基因组工程 .....	250
主要参考文献 .....	207	一、基因工程与基因组工程 .....	250
<b>第十一章 DNA 文库的构建和目的</b>		二、基因组工程研究中的遗传	
<b>基因的筛选 .....</b>	<b>209</b>	同源重组系统 .....	251
第一节 基因组 DNA 文库的		思考题 .....	256
构建 .....	210	主要参考文献 .....	257
<b>第二篇 基因工程应用</b>			
<b>第十三章 植物基因工程 .....</b>	<b>261</b>	三、根瘤农杆菌介导法 .....	267
第一节 植物基因工程的发展		四、基因枪法与根瘤农杆菌介	
现状 .....	261	导法的比较 .....	272
第二节 植物基因工程方法 .....	263	五、植物基因工程新技术 .....	272
一、原生质体介导法 .....	263	第三节 转化子细胞的筛选 .....	272
二、基因枪法 .....	265	一、植物基因工程中的选择	

基因 .....	273	二、转基因动物中外源基因表达	
二、报告基因 .....	273	水平检测 .....	301
第四节 转化体的鉴定与证实 .....	274	三、转基因动物中目标基因的蛋	
一、PCR 检测外源基因的		白水平测定 .....	301
整合 .....	275	四、转基因动物传代与检测 .....	302
二、Southern 杂交检测外源基因		五、转基因动物及其产品的安全性	
的整合 .....	275	评价 .....	302
三、RT-PCR 检测外源基因的		第五节 转基因动物的应用与	
表达 .....	275	展望 .....	303
四、Northern 杂交检测外源基因		一、转基因动物的应用 .....	303
的表达 .....	275	二、转基因动物的展望 .....	305
五、Real-time PCR 实时荧光		思考题 .....	305
定量 PCR 检测外源基因的		主要参考文献 .....	305
表达 .....	276	<b>第十五章 酵母基因工程</b> .....	307
六、Western 杂交检测外源基因		第一节 酵母基因工程的发展现	
表达的产物 .....	276	状和发展趋势 .....	307
第五节 植物基因工程研究的应		一、酵母基因工程的优点 .....	307
用和展望 .....	276	二、酵母基因工程的发展现状 .....	308
一、抗性基因工程 .....	276	三、酵母基因工程的发展趋势 .....	309
二、植物品质改良基因工程 .....	279	第二节 酵母表达系统 .....	311
三、植物杂种优势的利用 .....	280	一、酵母表达系统概述 .....	311
四、植物代谢工程 .....	280	二、常用酵母表达系统 .....	313
五、生物反应器 .....	280	第三节 酵母基因工程的应用 .....	319
六、复合性状 .....	281	一、酵母基因工程的应用情况 .....	319
七、筛选标记基因的去除 .....	281	二、酵母基因工程的应用举例 .....	321
思考题 .....	282	思考题 .....	323
主要参考文献 .....	282	主要参考文献 .....	323
<b>第十四章 动物基因工程</b> .....	283	<b>第十六章 细菌基因工程</b> .....	325
第一节 动物基因工程的发展现		第一节 细菌基因工程的发展现	
状与趋势 .....	283	状和发展趋势 .....	325
一、精细与安全的动物遗传修饰		一、细菌基因工程的发展简史 .....	325
新技术 .....	284	二、细菌基因工程的发展现状 .....	325
二、转基因动物将成为有限自然		三、细菌基因工程的发展趋势	
资源高效利用的主力军 .....	285	及前景展望 .....	327
第二节 动物转基因技术 .....	285	第二节 细菌基因工程的表达	
一、动物基因工程载体 .....	285	系统 .....	327
二、载体相关调控元件 .....	293	一、细菌基因工程的表达系统 .....	327
三、基因转移技术 .....	294	二、表达载体构建原则 .....	328
第三节 转基因动物制备 .....	297	三、外源基因表达的方式 .....	328
一、转基因动物的制备方法 .....	297	四、常见细菌表达系统 .....	329
第四节 转基因动物鉴定与安全		第三节 细菌基因工程的应用 .....	332
评价 .....	300	一、农业领域的基因工程细菌 .....	332
一、外源基因的基因组水平		二、食品和工业基因工程菌 .....	336
鉴定 .....	300	三、重组 DNA 技术生产医用抗	

生素 .....	339	五、基因工程抗体 .....	380
四、环境微生物基因工程菌的 应用 .....	342	第三节 基因工程抗体 .....	380
思考题 .....	346	一、抗体的结构 .....	380
主要参考文献 .....	346	二、天然抗体的局限性 .....	381
<b>第十七章 病毒基因工程</b> .....	348	三、基因工程抗体的种类 .....	382
第一节 病毒载体 .....	349	第四节 基因工程核酸类药物 .....	385
一、动物病毒载体 .....	349	一、反义核酸药物 .....	386
二、植物病毒载体 .....	358	二、核酸疫苗 .....	388
三、噬菌体载体 .....	358	三、RNA 干扰 .....	389
第二节 病毒与基因工程 .....	359	四、基因治疗 .....	390
一、基因工程病毒疫苗 .....	359	思考题 .....	392
二、病毒与基因治疗 .....	362	主要参考文献 .....	392
三、溶瘤病毒与癌症治疗 .....	363	<b>第十九章 基因工程产品的安全评价 及其管理</b> .....	393
四、病毒与生物防治 .....	364	第一节 基因工程产品的安全 评价 .....	393
思考题 .....	368	一、DNA 重组生物安全准则 .....	393
主要参考文献 .....	369	二、转基因生物产品的安全评价 原则 .....	393
<b>第十八章 医药基因工程</b> .....	370	第二节 基因工程产品的安全性 管理类型 .....	394
第一节 基因工程药物的开发现状 与发展趋势 .....	371	第三节 基因工程技术安全性探讨 及其产品的发展前景 .....	396
一、基因工程药物的种类 .....	371	附录 转基因农作物产品的安全性 争论事件 .....	398
二、基因工程药物的产业化 状况 .....	372	一、食用安全争议事件 .....	398
三、基因工程药物的发展趋势 .....	372	二、生态安全事例 .....	399
第二节 基因工程蛋白和多肽 药物 .....	374	思考题 .....	400
一、基因工程胰岛素 .....	375	主要参考文献 .....	400
二、基因工程人红细胞生成素 .....	376	<b>索引</b> .....	401
三、基因工程干扰素 .....	377		
四、基因工程疫苗 .....	378		

# 第一章

## 基因工程概述

### 第一节 基因操作与基因工程

#### 一、基因操作与基因工程的关系

20世纪是生物学发展最为迅速的时期,在1953年由于认识了DNA的双螺旋结构,从而掀起了分子生物学研究的热潮。从整个生物学研究进程或研究层次来说,其发展过程涉及个体、组织器官、细胞和亚细胞水平,并将朝向更深的领域以及交叉领域发展。同时由于遗传学的兴起与发展,DNA作为生命遗传信息的物质基础被确定下来,从而导致分子生物学的诞生。

随着生物科学的快速发展和广泛延伸,人们对分子生物学的认识也发生了重要变化。分子生物学严格来说应是从分子水平或核酸水平上对生命现象和本质进行阐述和研究的生物学,如DNA的结构、复制、表达、调控、遗传及变异等。由于分子生物学已经延伸到生物学的各个分支学科,因此分子生物学就是一个包罗万象的学科,大的可以说动物、植物以及微生物的分子生物学,小的可以说某些物种的分子生物学,如水稻的分子生物学、链霉菌的分子生物学、芽胞杆菌的分子生物学等。传统的分子生物学就好像是高级生物化学,阐述基因或者DNA(核酸)的静态和动态化学本质。目前的分子生物学正朝着发育生物学、结构生物学和遗传生物学的方向发展。如果说传统的分子生物学是静态分子生物学的话,那么这些学科可以说是动态分子生物学,即在分子水平(核酸)上,阐述生物的生长、分化、死亡以及遗传和变异的内在规律。

在阐述生物的基本规律过程中,均涉及在基因水平或DNA水平的操作,即通常所说的分子生物学研究。分子生物学研究主要是通过基因操作(gene manipulation)以及基因重组(gene recombination)来实现的。

基因操作是一个外延较广的概念,是指对基因进行分离、分析、改造、检测、表达、重组和转移等操作的总称。对基因的操作可以是静态的也可以是动态的。仅仅将基因作为一段DNA分子来操作,进行分析、修饰或转移,属于生物化学或遗传学的范畴,只有当基因能够进行大量、可操作性的扩增时才进入基因操作的范畴。基因的扩增可以是体内扩增也可以是体外扩增,前者的基础就是基因重组和基因克隆(gene cloning),所以基因操作与基因克隆是密不可分的。PCR(聚合酶链反应,polymerase chain reaction)技术的应用为基因的体外扩增提供了强大工具。基因的扩增又是通过复制来实现的,因此在整个基因操作过程中,



时伴随着复制事件的发生。对复制本质的深刻理解,是认识基因工程和实施基因工程的有效保证。

基因操作不仅能用于研究生物的本质和规律,同样也能够用来改造生物,并为人类的需求服务。我们把通过基因操作来定向改变或修饰生物体或人类自身,并具有明确应用目的的活动称为基因工程(gene engineering)。基因工程是通过基因的操作并实现基因重组来完成的,被操作的对象一般会发生遗传信息或遗传性状的变化,对大多数对象来说这种变化可以稳定遗传给下一代。

虽然基因工程是通过基因重组来实现的,但基因重组并不都是严格意义上的基因工程。基因重组是基因操作范畴的概念,包括实验研究和生物技术中的基因重组事件。而基因工程则专指为实践应用而进行的基因重组事件,产生的基因工程体可以用做生物反应器,如生产酶或活性物质等,也可以是改变了生物性状的工程体,如改良生物体的品质和性能,包括获得杀虫或抗病活性,提高杀虫、抗病、固氮和免疫等活性,产生更多的代谢产物,改变生理、代谢或发育性状等。通过基因工程技术产生的基因工程体一般可以产生经济或社会效益,或具有明显的产生经济或社会效益的潜力。

因此,基因工程可用具体的生产实践作为例子,其内容涉及基因工程体的构建方式和策略,包括目的基因、载体、基因转移方式和受体的选择,预期产生的效果,目前已经获得的种类,进入批量生产的种类和数量等。

## 二、基因工程的诞生与发展

基因工程是从基因重组开始的。第一个创造重组 DNA 分子的是美国斯坦福大学的 Paul Berg 及其同事,他们于 20 世纪 70 年代早期用限制性内切酶将大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E. coli*) 的 DNA 切开,并艰难地与病毒 DNA 连接,从而获得第一个重组 DNA 分子,由此拉开了基因重组的序幕。但这个重组 DNA 分子的产生还不是生物学意义上的基因重组,只是在化学水平上将不同来源的 DNA 进行了重新组合,并没有实现生物学意义上的可遗传和可增殖的目的。Stanley Cohen 和 Herbert Boyer 在基因重组方面做出了突出贡献,其主要的基础工作源自 *EcoR* I 限制性内切酶的分离以及质粒载体的构建。Boyer 分离的 *EcoR* I 限制性内切酶可以将 DNA 切割成具有黏末端的片段,按照现在的认识,具有黏末端的 DNA 片段很容易连接。Cohen 对大肠杆菌的质粒(plasmid)做了大量研究,并在 1972 年构建了具有实用价值的质粒载体,例如用其名字的缩写命名的 pSC101。同时提出了作为克隆载体的三大要素的雏形,即可用的酶切位点,如单一的 *EcoR* I 位点;复制单位,能够指导载体在宿主细胞中复制;具有选择标记,如抗生素抗性标记。

当时他们发现质粒还有一个重要特征,就是能够转移到宿主细胞中去。一旦质粒进入细胞,单个质粒就会自我复制出大量的复制体。如果质粒上带有外源基因,外源基因就可以随质粒的复制而得到增殖。同时带有质粒的细菌细胞也会增殖,每 20 min 左右就会增殖一次,从而产生大量的后代,这样一来位于质粒上的外源基因也就被克隆了。从这样一个亲本细胞增殖而来的细胞群体就称为一个克隆(clone)。

在这一思想的指导下,Cohen 和 Boyer 于 1973 年开展了两个具有划时代意义的基因重组实验。首先,将质粒 pSC101 与质粒 pSC102 连接起来并转移到大肠杆菌。由于这两个质粒分别带有四环素抗性基因和卡那霉素抗性基因,该重组大肠杆菌获得了同时抗这两种抗生素的遗传性状。其次,他们把蟾蜍的 DNA 用 *EcoR* I 酶切以后将编码核糖体 RNA 的基因片段与质粒 pSC101 连接,并转移到大肠杆菌中去(图 1-1)。实验结果表明,重组