



普通高等教育“十一五”国家级规划教材

基因工程

GENE (第2版)
ENGINEERING

● 张惠展 贾林芝 编著



高等教育出版社
Higher Education Press

基因工程

GENE (REAR)
ENGINEERING

• 1999 1998 1997

G ENE ENGINEERING

基因工程 (第2版)

Jiyin Gongcheng

张惠展 贾林芝 编著



高等教育出版社 北京
HIGHER EDUCATION PRESS BEIJING

图书在版编目(CIP)数据

基因工程/张惠展, 贾林芝编著. —2 版. —北京: 高等教育出版社, 2010.1
ISBN 978-7-04-028349-5

I.基… II.①张…②贾… III.基因—遗传工程—高等学校—教材 IV.Q78

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2009) 第 232701 号

内容提要 /

本书主要论述基因工程的基本原理、单元操作和应用战略。基本原理涉及基因的高效表达原理、重组表达产物的活性回收原理、基因工程菌(细胞)的稳定生产原理;单元操作包括 DNA 的切接反应、重组 DNA 分子的转化、转化子的筛选与重组子的鉴定;应用战略部分以大肠杆菌、酵母、高等动物及高等植物等基因工程受体系统为主线,结合具体的产业化案例,归纳出基因工程技术的实际应用战略。书中还简要述及了蛋白质工程和途径工程的原理与应用。

本书可作为高等院校生物工程、生物技术、生物科学专业本科“基因工程”课程的专业教材,课堂教学建议学时为 32;也可供从事生物工程技术研究和开发的人员参考。

策划编辑 王 莉 责任编辑 张晓晶 王 莉
书籍设计 张志奇 责任印刷 毛斯璐

| | | | |
|------|----------------|------|---|
| 出版发行 | 高等教育出版社 | 购书热线 | 010-58581118 |
| 社 址 | 北京市西城区德外大街 4 号 | 咨询电话 | 400-810-0598 |
| 邮政编码 | 100120 | 网 址 | http://www.hep.edu.cn |
| 总 机 | 010-58581000 | | http://www.hep.com.cn |
| 经 销 | 蓝色畅想图书发行有限公司 | 网上订购 | http://www.landaco.com |
| 印 刷 | 北京中科印刷有限公司 | | http://www.landaco.com.cn |
| | | 畅想教育 | http://www.widedu.com |
| 开 本 | 850×1168 1/16 | 版 次 | 1999 年 1 月第 1 版 |
| 印 张 | 20.75 | | 2010 年 1 月第 2 版 |
| 字 数 | 530 000 | 印 次 | 2010 年 1 月第 1 次印刷 |
| | | 定 价 | 43.00 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 28349-00

G ENE ENGINEERING

前 言

诞生于20世纪70年代初的DNA重组技术是一种获取、整理、破译、编辑和表达生物遗传信息的现代生物技术，它以细胞生物学、分子生物学和分子遗传学的基本理论体系为基石，在基因的分离克隆、基因编码产物的产业化、生物遗传性状的改良、基因功能及其表达调控机制的诠释等方面日益显示出极高的实用价值。作为DNA重组技术产业化应用的基因工程，正在驱动着人类社会生活方式的重大变革。

本书将DNA重组和克隆的实验流程分为“切、接、转、增、检”五大单元操作；在简要阐述目的基因四大分离克隆策略的基础上，分别以大肠杆菌、酵母、高等动植物等典型的受体系统为主线，逐一论述基因工程应用的设计思想；同时，与高效表达多肽和蛋白质编码基因的第一代基因工程以及通过基因水平上的遗传操作表达蛋白变体的第二代基因工程（蛋

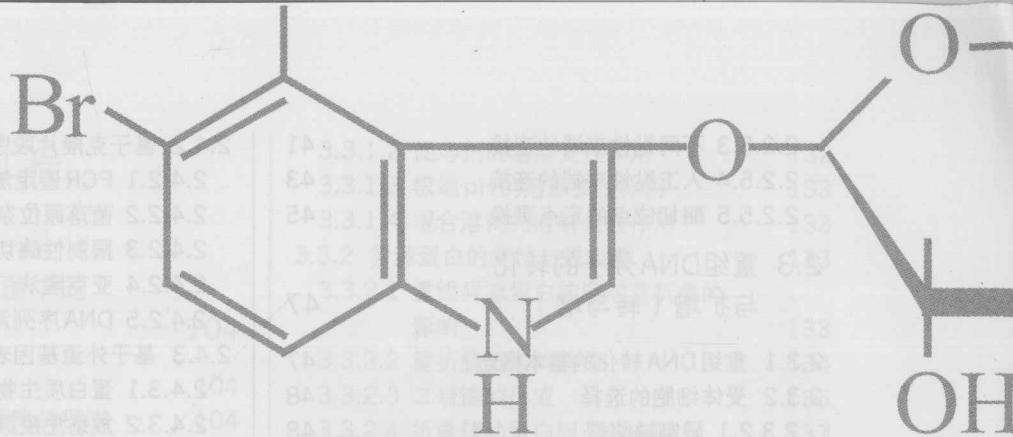
白质工程）相呼应，将在基因水平上局部修饰细胞固有代谢途径和信号转导途径的设计表征为第三代基因工程，由此构成本书的基本理论框架。

本书所涉及的基本理论、应用策略及实验技术主要基于著者20多年来不断充实的教学讲义和经验体会，编撰的侧重点是基因工程应用的设计思路，并力求以图解的方式加深理解和记忆，因而较为适合作为全日制大学生生物工程、生物技术、生物科学专业本科生“基因工程”课程的教科书，同时也可作为有关研究人员的参考书。

真诚欢迎专家和读者对本书提出宝贵意见。

张惠展

2009年5月于尚湖



目 录

1/概述

| | |
|---------------------|---|
| 1.1 基因工程的基本概念 | 2 |
| 1.1.1 基因工程的基本定义 | 2 |
| 1.1.2 基因工程的基本过程 | 2 |
| 1.1.3 基因工程的基本原理 | 3 |
| 1.1.4 基因工程在生物工程中的地位 | 3 |
| 1.2 基因工程的发展历史 | 5 |
| 1.2.1 基因工程的诞生 | 5 |
| 1.2.2 基因工程的成熟 | 5 |
| 1.2.3 基因工程的腾飞 | 6 |
| 1.3 基因工程的研究意义 | 7 |
| 1.3.1 第四次工业大革命 | 7 |
| 1.3.2 第二次农业大革命 | 8 |
| 1.3.3 第四次医学大革命 | 8 |

2/DNA重组克隆的单元操作

| | |
|------------------|----|
| 2.1 DNA重组的载体 | 12 |
| 2.1.1 质粒载体 | 12 |
| 2.1.1.1 质粒的基本特性 | 12 |
| 2.1.1.2 质粒的改造与构建 | 13 |
| 2.1.1.3 质粒的分类及用途 | 15 |

| | |
|---------------------------------|----|
| 2.1.1.4 质粒的分离与纯化 | 16 |
| 2.1.2 λ 双链噬菌体 DNA 载体 | 17 |
| 2.1.2.1 λ 噬菌体的生物学特征 | 17 |
| 2.1.2.2 λ -DNA 载体的构建 | 19 |
| 2.1.2.3 λ -DNA 载体的分类及用途 | 20 |
| 2.1.2.4 λ -DNA 的分离与纯化 | 22 |
| 2.1.3 M13 单链噬菌体 DNA 载体 | 22 |
| 2.1.3.1 M13 噬菌体的生物学特性 | 22 |
| 2.1.3.2 M13-DNA 的改造 | 23 |
| 2.1.4 噬菌体-质粒杂合载体 | 24 |
| 2.1.4.1 黏粒载体 | 24 |
| 2.1.4.2 噬菌粒载体 | 25 |
| 2.1.5 人造染色体载体 | 26 |
| 2.2 DNA 的体外重组 (切与接) | 26 |
| 2.2.1 限制性核酸内切酶 | 26 |
| 2.2.1.1 限制性核酸内切酶的发现 | 26 |
| 2.2.1.2 I 和 III 类限制-修饰酶的基本特征 | 27 |
| 2.2.1.3 II 类限制性核酸内切酶的基本特征 | 28 |
| 2.2.1.4 甲基化酶的基本特征 | 31 |
| 2.2.2 T4-DNA 连接酶 | 32 |
| 2.2.3 其他用于 DNA 重组的工具酶 | 32 |
| 2.2.3.1 Klenow 酶 | 32 |
| 2.2.3.2 末端脱氧核苷酰转移酶 | 34 |
| 2.2.3.3 S1 核酸酶 | 35 |
| 2.2.3.4 Bal31 核酸酶 | 35 |
| 2.2.3.5 T4-多核苷酸磷酸激酶 | 36 |
| 2.2.3.6 碱性磷酸单酯酶 | 36 |
| 2.2.3.7 T4-DNA 聚合酶 | 36 |
| 2.2.4 DNA 切接反应的影响因素 | 36 |
| 2.2.4.1 限制性核酸内切酶的切割反应 | 36 |
| 2.2.4.2 T4-DNA 连接酶的连接反应 | 38 |
| 2.2.4.3 重组率及其影响因素 | 38 |
| 2.2.5 DNA 分子重组的方法 | 39 |
| 2.2.5.1 相同黏性末端的连接 | 39 |
| 2.2.5.2 平头末端的连接 | 41 |

| | | | |
|-------------------------------|----|------------------------|-----|
| 2.2.5.3 不同黏性末端的连接 | 41 | 2.4.2 基于克隆片段序列的筛选与鉴定 | 58 |
| 2.2.5.4 人工黏性末端的连接 | 43 | 2.4.2.1 PCR 鉴定法 | 58 |
| 2.2.5.5 酶切位点的定点更换 | 45 | 2.4.2.2 菌落原位杂交法 | 59 |
| 2.3 重组DNA分子的转化 | | 2.4.2.3 限制性酶切图谱法 | 62 |
| 与扩增(转与增) | 47 | 2.4.2.4 亚克隆法 | 64 |
| 2.3.1 重组DNA转化的基本概念 | 47 | 2.4.2.5 DNA序列测定法 | 66 |
| 2.3.2 受体细胞的选择 | 48 | 2.4.3 基于外源基因表达产物的筛选与鉴定 | 71 |
| 2.3.2.1 限制缺陷型 | 48 | 2.4.3.1 蛋白质生物功能检测法 | 71 |
| 2.3.2.2 重组缺陷型 | 48 | 2.4.3.2 放射免疫原位检测法 | 73 |
| 2.3.2.3 转化亲和型 | 49 | 2.4.3.3 蛋白凝胶电泳检测法 | 73 |
| 2.3.2.4 遗传互补型 | 49 | 2.5 目的基因的克隆 | 75 |
| 2.3.2.5 感染寄生缺陷型 | 49 | 2.5.1 鸟枪法 | 75 |
| 2.3.3 转化方法 | 50 | 2.5.1.1 鸟枪法的基本程序 | 76 |
| 2.3.3.1 Ca ²⁺ 诱导转化 | 50 | 2.5.1.2 非随机鸟枪法战略 | 77 |
| 2.3.3.2 PEG 介导的细菌原生质体转化 | 51 | 2.5.1.3 鸟枪法克隆目的基因的限制性 | 78 |
| 2.3.3.3 电穿孔驱动的整体细胞转化 | 51 | 2.5.2 cDNA 法 | 79 |
| 2.3.3.4 接合转化 | 52 | 2.5.2.1 mRNA 的分离纯化 | 79 |
| 2.3.3.5 λ 噬菌体的转染 | 53 | 2.5.2.2 双链cDNA的体外合成 | 81 |
| 2.3.4 转化率及其影响因素 | 53 | 2.5.2.3 双链cDNA的克隆 | 83 |
| 2.3.4.1 转化率的定义 | 53 | 2.5.2.4 cDNA重组克隆的筛选 | 85 |
| 2.3.4.2 转化率的用途 | 54 | 2.5.3 PCR 扩增法 | 85 |
| 2.3.4.3 转化率的影响因素 | 54 | 2.5.3.1 PCR 扩增DNA的基本原理 | 86 |
| 2.3.5 转化细胞的扩增 | 55 | 2.5.3.2 PCR 扩增产物的克隆 | 89 |
| 2.4 转化子的筛选与重组子的 | | 2.5.3.3 PCR 扩增技术的应用 | 92 |
| 鉴定(检) | 55 | 2.5.4 化学合成法 | 93 |
| 2.4.1 基于载体遗传标记的筛选与鉴定 | 55 | 2.5.4.1 寡聚核苷酸单链的化学合成 | 93 |
| 2.4.1.1 抗药性筛选法 | 56 | 2.5.4.2 目的基因的化学合成 | 95 |
| 2.4.1.2 营养缺陷性筛选法 | 57 | 2.5.5 基因文库的构建 | 96 |
| 2.4.1.3 显色模型筛选法 | 57 | 2.5.5.1 基因文库的完备性 | 97 |
| 2.4.1.4 噬菌斑筛选法 | 58 | 2.5.5.2 基因文库的构建战略 | 97 |
| | | 2.5.5.3 基因组文库重组克隆的排序 | 99 |
| | | 2.5.5.4 基因文库的筛选 | 100 |

3/大肠杆菌基因工程

| | | | |
|--------------------------------|-----|-----------------------------|-----|
| 3.1 外源基因在大肠杆菌中的 高效表达原理 | 104 | 3.3.1.2 促溶剂的溶解变性作用 | 132 |
| 3.1.1 启动子 | 104 | 3.3.1.3 极端pH的溶解变性作用 | 133 |
| 3.1.1.1 启动子最佳作用距离的探测 | 104 | 3.3.1.4 混合溶剂的溶解变性作用 | 133 |
| 3.1.1.2 启动子的筛选与构建 | 104 | 3.3.2 异源蛋白的复性与重折叠 | 133 |
| 3.1.1.3 启动子的可控性 | 106 | 3.3.2.1 重组异源蛋白纯度对重折叠的 影响 | 133 |
| 3.1.1.4 依赖于噬菌体RNA聚合酶 的启动子系统 | 108 | 3.3.2.2 重折叠方法的选择 | 134 |
| 3.1.2 终止子 | 108 | 3.3.2.3 二硫键的形成 | 135 |
| 3.1.3 SD序列 | 109 | 3.3.2.4 折叠辅助蛋白因子的应用 | 137 |
| 3.1.4 密码子 | 110 | 3.4 大肠杆菌工程菌培养的 最优化控制 | 138 |
| 3.1.5 质粒拷贝数 | 111 | 3.4.1 细菌生长的动力学原理 | 138 |
| 3.2 大肠杆菌工程菌的构建策略 | 113 | 3.4.1.1 分批式发酵 | 138 |
| 3.2.1 包含体型异源蛋白的表达 | 113 | 3.4.1.2 流加式发酵 | 139 |
| 3.2.1.1 包含体的性质 | 113 | 3.4.1.3 连续式发酵 | 139 |
| 3.2.1.2 包含体的形成机制 | 114 | 3.4.2 发酵过程的最优化控制 | 140 |
| 3.2.1.3 包含体的分离 | 115 | 3.4.2.1 工程水平的优化控制 | 140 |
| 3.2.1.4 重组异源蛋白表达系统的构建 | 115 | 3.4.2.2 分子水平的优化控制 | 142 |
| 3.2.2 分泌型异源蛋白的表达 | 118 | 3.4.2.3 细胞水平的优化控制 | 142 |
| 3.2.2.1 分泌型异源蛋白表达的特性 | 118 | 3.4.3 大肠杆菌工程菌的高密度发酵 | 143 |
| 3.2.2.2 蛋白质的传输和分泌机制 | 118 | 3.4.3.1 高密度发酵培养基的设计 | 143 |
| 3.2.2.3 分泌型异源蛋白表达系统的构建 | 120 | 3.4.3.2 高密度发酵的温度控制 | 144 |
| 3.2.3 融合型异源蛋白的表达 | 121 | 3.4.3.3 高密度发酵的溶氧控制 | 144 |
| 3.2.3.1 融合型异源蛋白表达的特性 | 121 | 3.5 基因工程菌的遗传不稳 定性及其对策 | 145 |
| 3.2.3.2 融合型异源蛋白表达系统的构建 | 121 | 3.5.1 工程菌遗传不稳定性的表现与机制 | 145 |
| 3.2.3.3 异源蛋白从融合蛋白中的回收 | 123 | 3.5.2 改善工程菌不稳定性的对策 | 146 |
| 3.2.4 寡聚型异源蛋白的表达 | 124 | 3.5.2.1 改进载体宿主系统 | 146 |
| 3.2.5 整合型异源蛋白的表达 | 128 | 3.5.2.2 施加选择压力 | 147 |
| 3.2.6 蛋白酶抗性或缺陷型表达系统的 构建 | 129 | 3.5.2.3 控制外源基因过量表达 | 147 |
| 3.2.6.1 细胞内蛋白质降解的基本特征 | 129 | 3.5.2.4 优化培养条件 | 148 |
| 3.2.6.2 蛋白酶缺陷型受体细胞的改造 | 130 | 3.6 利用重组大肠杆菌生产 医用蛋白或多肽 | 149 |
| 3.2.6.3 抗蛋白酶的重组异源蛋白 序列设计 | 130 | 3.6.1 胰岛素的结构及其生物合成 | 149 |
| 3.3 重组异源蛋白的体外复性活化 | 131 | 3.6.2 人胰岛素的生产方法 | 150 |
| 3.3.1 包含体的溶解与变性 | 131 | 3.6.3 产人胰岛素大肠杆菌工程菌 的构建策略 | 152 |
| 3.3.1.1 清洗剂的溶解变性作用 | 132 | 3.6.3.1 AB链分别表达法 | 152 |
| | | 3.6.3.2 人胰岛素原表达法 | 152 |
| | | 3.6.3.3 AB链同时表达法 | 153 |

4/酵母基因工程

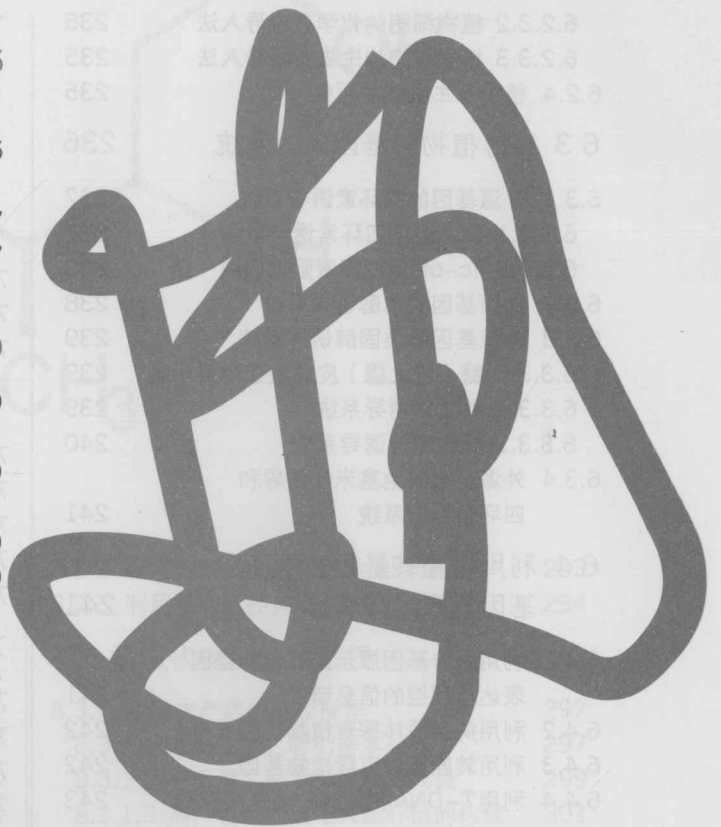
| | |
|----------------------------------|-----|
| 4.1 酵母的宿主系统 | 158 |
| 4.1.1 提高重组异源蛋白产率的突变宿主 | 158 |
| 4.1.2 抑制超糖基化作用的突变宿主 | 159 |
| 4.1.3 减少泛素依赖型蛋白降解作用的突变宿主 | 159 |
| 4.1.4 内源性蛋白酶缺陷型的突变宿主 | 161 |
| 4.2 酵母的载体系统 | 161 |
| 4.2.1 酿酒酵母中的2 μ 环状质粒 | 161 |
| 4.2.2 乳酸克鲁维酵母中的线状质粒 | 162 |
| 4.2.3 果蝇克鲁维酵母中的环状质粒 | 163 |
| 4.2.4 含有ARS的YRp和YE ρ 质粒及其构建 | 163 |
| 4.2.5 含有CEN的YCp载体及其构建 | 164 |
| 4.2.6 含有TEL的YAC载体及其构建 | 164 |
| 4.3 酵母的转化系统 | 166 |
| 4.3.1 酵母的转化程序 | 167 |
| 4.3.2 转化质粒在宿主细胞中的命运 | 167 |
| 4.3.3 用于转化子筛选的标记基因 | 168 |
| 4.4 酵母的表达系统 | 170 |
| 4.4.1 酵母启动子的基本特征与选择 | 170 |
| 4.4.2 酵母启动子的可调控表达系统 | 171 |
| 4.4.2.1 温度控制表达系统 | 171 |
| 4.4.2.2 超诱导表达系统 | 172 |
| 4.4.2.3 严紧控制表达系统 | 173 |
| 4.4.3 外源基因在酵母中表达的限制性因素 | 173 |
| 4.4.4 酵母表达系统的选择 | 174 |
| 4.4.4.1 乳酸克鲁维酵母表达系统 | 174 |
| 4.4.4.2 巴斯德毕赤酵母表达系统 | 175 |
| 4.4.4.3 多型汉逊酵母表达系统 | 177 |
| 4.5 酵母菌的蛋白修饰分泌系统 | 177 |
| 4.5.1 蛋白质的分泌运输机制 | 177 |
| 4.5.2 信号肽及其剪切系统 | 178 |
| 4.5.3 分泌型蛋白的糖基化修饰 | 180 |
| 4.6 利用重组酵母生产乙肝疫苗 | 182 |
| 4.6.1 乙肝病毒的结构 | 182 |

| | |
|-----------------------------|-----|
| 4.6.2 产乙肝表面抗原的酿酒酵母重组菌的构建 | 183 |
| 4.6.3 产乙肝表面抗原的巴斯德毕赤酵母重组菌的构建 | 183 |
| 4.7 利用重组酵母生产人血清清蛋白 | 184 |

5/高等动物基因工程

| | |
|---------------------------|-----|
| 5.1 动物转基因技术的基本概念 | 188 |
| 5.1.1 动物转基因的效率 | 188 |
| 5.1.2 动物转基因的结构 | 188 |
| 5.1.3 动物转基因的表达特性 | 189 |
| 5.1.3.1 转基因的时空特异性表达 | 189 |
| 5.1.3.2 转基因的可控性表达 | 189 |
| 5.1.3.3 转基因的共抑制效应 | 189 |
| 5.1.4 动物转基因的生物学效应 | 190 |
| 5.2 转基因导入动物体内的方法 | 190 |
| 5.2.1 转基因的动物受体细胞系统 | 190 |
| 5.2.2 动物细胞物理转化法 | 192 |
| 5.2.2.1 磷酸钙共沉淀法 | 192 |
| 5.2.2.2 电击法 | 192 |
| 5.2.2.3 脂质体包埋法 | 192 |
| 5.2.2.4 DNA显微注射法 | 192 |
| 5.2.3 动物病毒转染法 | 193 |
| 5.2.3.1 腺病毒 | 193 |
| 5.2.3.2 猴肿瘤病毒 | 194 |
| 5.2.3.3 牛痘病毒 | 195 |
| 5.2.3.4 反转录病毒 | 196 |
| 5.2.4 工程胚胎干细胞法 | 198 |
| 5.2.5 体细胞转基因克隆法 | 200 |
| 5.3 利用动物转基因技术研究基因的表达与功能 | 200 |
| 5.3.1 利用报告基因探测动物基因组的调控序列 | 200 |
| 5.3.2 利用同源基因灭活细胞内源基因 | 202 |
| 5.3.3 利用Cre-loxP系统条件性敲除基因 | 203 |
| 5.3.4 利用反义基因抑制细胞基因表达 | 203 |
| 5.3.5 利用干扰RNA阻断特定基因表达 | 203 |

| | |
|--------------------------------------|-----|
| 5.4 利用转基因动物或细胞 生产生物大分子 | 205 |
| 5.4.1 动物细胞高效表达异源蛋白 的基本原理 | 205 |
| 5.4.2 利用哺乳动物细胞大规模培养技术 生产结构复杂的人体蛋白 | 207 |
| 5.4.3 利用动物乳腺组织生产蛋白药物 | 207 |
| 5.5 转基因技术在动物遗传 性状改良中的应用 | 209 |
| 5.5.1 转基因鼠 | 209 |
| 5.5.1.1 转基因鼠在揭示人类 分子病病理中的应用 | 209 |
| 5.5.1.2 转基因鼠在研究高等哺乳动物 发育机制中的应用 | 210 |
| 5.5.2 转基因兔、猪、羊 | 210 |
| 5.5.3 转基因牛 | 211 |
| 5.5.4 转基因鸡 | 211 |
| 5.5.5 转基因鱼 | 212 |
| 5.6 基因治疗 | 212 |
| 5.6.1 基因治疗的基本战略思想 | 212 |
| 5.6.1.1 基因治疗的基本概念 | 212 |
| 5.6.1.2 基因治疗的基本内容 | 213 |
| 5.6.1.3 基因转移的基本方式 | 213 |
| 5.6.1.4 基因治疗的分子机制 | 214 |
| 5.6.2 肿瘤的基因治疗 | 214 |
| 5.6.2.1 增强肿瘤细胞的免疫原性 | 215 |
| 5.6.2.2 提高人体的免疫机能 | 215 |
| 5.6.2.3 改变癌基因和抑癌基因的 表达特性 | 216 |
| 5.6.2.4 修饰肿瘤细胞和正常细胞的 药物敏感性 | 217 |
| 5.6.3 囊性纤维变性症的基因治疗 | 217 |
| 5.6.4 杜兴肌营养不良症的基因治疗 | 218 |
| 5.6.5 重度联合免疫缺陷症的基因治疗 | 218 |
| 5.6.6 糖尿病的基因治疗战略 | 219 |
| 5.6.7 骨髓细胞的转基因研究 | 219 |
| 5.6.8 基因治疗的副反应及其对策 | 220 |

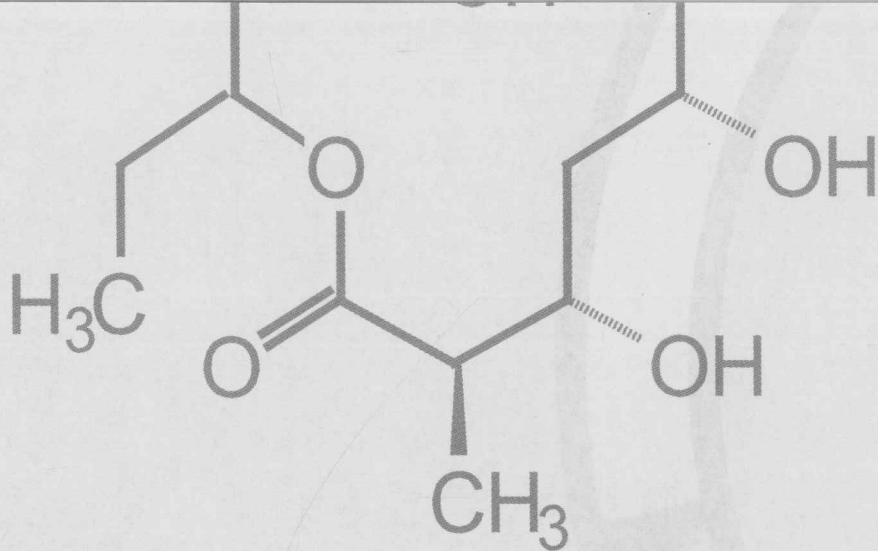


6/高等植物基因工程

| | |
|------------------------------|-----|
| 6.1 高等植物的遗传学特性 | 224 |
| 6.2 高等植物的基因转移系统 | 225 |
| 6.2.1 Ti质粒介导的整合转化系统 | 225 |
| 6.2.1.1 Ti质粒的分子遗传学特性 | 225 |
| 6.2.1.2 野生型Ti质粒的改造 | 227 |
| 6.2.1.3 Ti质粒介导的共整合转化系统 | 227 |
| 6.2.1.4 Ti质粒介导的二元整合转化系统 | 228 |
| 6.2.1.5 Ti质粒介导的整合转化程序 的特点 | 228 |
| 6.2.2 植物病毒介导的转染系统 | 230 |
| 6.2.2.1 植物病毒载体的基本性质 | 230 |
| 6.2.2.2 植物重组病毒的操作战略 | 232 |
| 6.2.2.3 植物病毒介导的转染系统的特点 | 233 |
| 6.2.3 植物细胞的直接转化方法 | 234 |
| 6.2.3.1 植物细胞的物理直接导入法 | 234 |

7/第二代基因工程 ——蛋白质工程

| | |
|-------------------------------|-----|
| 6.2.3.2 植物细胞的化学直接导入法 | 235 |
| 6.2.3.3 植物细胞的生物直接导入法 | 235 |
| 6.2.4 植物原生质体的再生 | 235 |
| 6.3 高等植物的基因表达系统 | 236 |
| 6.3.1 外源基因的四环素诱导系统 | 237 |
| 6.3.1.1 Tc-on型四环素诱导系统 | 237 |
| 6.3.1.2 Tc-off型四环素阻遏系统 | 238 |
| 6.3.2 外源基因的乙醇诱导系统 | 238 |
| 6.3.3 外源基因的美固醇诱导系统 | 239 |
| 6.3.3.1 糖(肾上腺)皮质激素诱导系统 | 239 |
| 6.3.3.2 雌激素诱导系统 | 239 |
| 6.3.3.3 蜕皮激素诱导系统 | 240 |
| 6.3.4 外源基因的地塞米松诱导和四环素抑制系统 | 241 |
| 6.4 利用植物转基因技术研究基因的表达与调控 | 241 |
| 6.4.1 利用报告基因展示高等植物基因表达与调控的信息谱 | 241 |
| 6.4.2 利用病毒载体探查植物基因重排 | 242 |
| 6.4.3 利用转座元件克隆植物基因 | 242 |
| 6.4.4 利用T-DNA构建植物遗传突变株 | 243 |
| 6.5 利用转基因植物生产重组异源蛋白和工业原料 | 243 |
| 6.5.1 利用植物生物反应器生产医用蛋白 | 243 |
| 6.5.2 利用植物生物反应器生产食品或饲料添加剂 | 245 |
| 6.5.3 利用植物生物反应器生产工业原料 | 245 |
| 6.6 转基因技术在植物品种改良中的应用 | 246 |
| 6.6.1 控制果实成熟的转基因植物 | 246 |
| 6.6.2 抗虫害的转基因植物 | 246 |
| 6.6.2.1 含毒晶蛋白编码基因的转基因植物 | 247 |
| 6.6.2.2 含蛋白酶抑制剂编码基因的转基因植物 | 247 |
| 6.6.3 抗病原体的转基因植物 | 248 |
| 6.6.4 抗除草剂的转基因植物 | 248 |
| 6.6.5 改变花型花色的转基因植物 | 249 |
| 6.6.6 抗环境压力的转基因植物 | 250 |
| 6.6.7 产生高品质产物的转基因植物 | 250 |
| 6.6.8 转基因植物的安全性 | 251 |
| 7.1 蛋白质工程的基本概念 | 254 |
| 7.1.1 蛋白质工程的基本特征 | 254 |
| 7.1.2 蛋白质工程的研究内容及应用 | 255 |
| 7.1.3 蛋白质工程实施的必要条件 | 255 |
| 7.2 基因的体外定向突变 | 256 |
| 7.2.1 局部随机掺入法 | 256 |
| 7.2.2 碱基定点转换法 | 257 |
| 7.2.3 部分片段合成法 | 258 |
| 7.2.4 引物定点引入法 | 259 |
| 7.2.5 PCR扩增突变法 | 260 |
| 7.3 基因的体外定向进化 | 262 |
| 7.3.1 易错PCR | 263 |
| 7.3.2 DNA改组 | 264 |
| 7.3.3 体外随机引发重组 | 266 |
| 7.3.4 交错延伸 | 267 |
| 7.3.5 过渡模板随机嵌合生长 | 267 |
| 7.3.6 渐增切割杂合酶生成 | 268 |
| 7.3.7 同源序列非依赖性蛋白质重组 | 269 |
| 7.3.8 突变文库的筛选模型 | 269 |
| 7.4 蛋白质工程的设计思想与应用 | 271 |
| 7.4.1 提高蛋白质或酶的稳定性 | 271 |
| 7.4.1.1 引入二硫键以提高蛋白质或酶的稳定性 | 271 |
| 7.4.1.2 转换氨基酸残基以提高蛋白质或酶的稳定性 | 272 |
| 7.4.2 减少重组多肽链的错误折叠 | 274 |
| 7.4.3 改善酶的催化活性 | 274 |
| 7.4.3.1 转换氨基酸残基以改善酶的催化活性 | 274 |
| 7.4.3.2 随机改组肽段以改善酶的催化活性 | 275 |
| 7.4.3.3 删除末端部分氨基酸序列以改善酶的催化活性 | 275 |
| 7.4.4 消除酶的被抑制特性 | 276 |
| 7.4.4.1 转换氨基酸残基以消除酶的被抑制特性 | 276 |
| 7.4.4.2 删除肽段以消除酶的被抑制特性 | 277 |



| | | | |
|-----------------------------|-----|--------------------------------------|-----|
| 7.4.5 修饰酶的催化特异性 | 277 | 8.2.2 在现存途径中改变物质流的性质 | 293 |
| 7.4.5.1 共价结合寡核苷酸以修饰酶的催化特异性 | 277 | 8.2.3 利用已有途径构建新的代谢旁路 | 294 |
| 7.4.5.2 转换氨基酸残基以修饰酶的催化特异性 | 278 | 8.3 初级代谢的途径工程 | 296 |
| 7.4.6 强化配体与其受体的亲和性 | 279 | 8.3.1 乙醇生产菌的途径操作 | 297 |
| 7.4.6.1 随机点突变以强化配体与其受体的亲和性 | 279 | 8.3.1.1 发酵生产乙醇的基本战略 | 297 |
| 7.4.6.2 基因家族改组以强化配体与其受体的亲和性 | 281 | 8.3.1.2 酵母属乙醇发酵途径的改良 | 299 |
| 7.4.7 降低异源蛋白药物的免疫原性 | 282 | 8.3.1.3 高产乙醇的重组大肠杆菌的构建 | 301 |
| | | 8.3.1.4 直接利用太阳能合成乙醇的光合细菌途径设计 | 302 |
| | | 8.3.2 辅酶Q生产菌的途径操作 | 303 |
| | | 8.3.2.1 辅酶Q的生物合成途径 | 304 |
| | | 8.3.2.2 辅酶Q ₁₀ 的医疗保健功能 | 305 |
| | | 8.3.2.3 辅酶Q ₁₀ 的大规模产业化现状 | 307 |
| | | 8.3.2.4 高产辅酶Q ₁₀ 工程菌构建的战略 | 309 |
| | | 8.3.3 氢气生产菌的途径操作 | 309 |
| | | 8.4 次级代谢的途径工程 | 310 |
| 8.1 途径工程的基本概念 | 286 | 8.4.1 聚酮生物合成的分子机制 | 310 |
| 8.1.1 途径工程的基本定义 | 286 | 8.4.2 聚酮合酶各组成模件的操作战略 | 311 |
| 8.1.2 途径工程的基本过程 | 287 | 8.4.2.1 缺失或增加模件以控制链长 | 312 |
| 8.1.2.1 靶点设计 | 288 | 8.4.2.2 置换定位结构域以拓宽起始单位的使用范围 | 312 |
| 8.1.2.2 基因操作 | 289 | 8.4.2.3 置换酰基转移酶结构域以产生杂合衍生物 | 312 |
| 8.1.2.3 效果分析 | 289 | 8.4.2.4 还原环的遗传操作 | 313 |
| 8.1.3 途径工程的基本原理 | 290 | 8.4.2.5 人工合酶和聚酮文库的构建 | 313 |
| 8.2 途径工程的研究战略 | 291 | 8.4.2.6 聚酮内和聚酮接头的设计 | 314 |
| 8.2.1 在现存途径中提高目标产物的代谢流 | 291 | 8.4.3 聚酮生物合成基因的异源表达 | 314 |

8 / 第三代基因工程 ——途径工程

1 / 概述

100多年前，在捷克莫勒温镇一个修道院里沉醉于豌豆杂交实验的Mendel也许根本就没有想到，他提出的遗传因子在半个世纪后被Morgan称为基因；而且1944年Avery证明了基因的物质基础是DNA；1953年Watson和Crick又揭示了DNA的双螺旋分子结构；到了1973年，DNA已能在体外被随意剪接并转回到细菌体内复制和表达。生命科学的飞速发展孕育了现代分子生物学技术——基因工程的诞生。今天，人们在超市货架上可以买到保质期较长的转基因番茄和土豆，克隆羊“多利”走出实验室使人们不再将《失落的世界》视为科幻影片，基因工程正在使整个人类生活方式发生重大变革。

1.1 基因工程的基本概念

1.1.1 基因工程的基本定义

基因工程原称遗传工程 (genetic engineering)。从狭义上讲, 基因工程是指将一种或多种生物体 (供体) 的基因与载体在体外进行剪接重组, 然后转入另一种生物体 (受体) 内, 使之按照人们的意愿遗传并表达出新的性状。因此, 供体、受体、载体称为基因工程的三大要素, 其中相对于受体而言, 来自供体的基因属于外源基因。除了少数RNA病毒外, 几乎所有生物的基因都存在于DNA结构中, 而用于外源基因重组剪接的载体也都是DNA分子, 因此基因工程亦称为重组DNA技术 (DNA recombination)。另外, DNA重组分子大都需在受体细胞中复制扩增, 故还可将基因工程表征为分子克隆 (molecular cloning)。

广义的基因工程定义为DNA重组技术的产业化设计与应用, 包括上游技术和下游技术两大组成部分。上游技术指的是外源基因重组、克隆、表达的设计与构建 (即狭义的基因工程); 而下游技术则涉及含有重组外源基因的生物细胞 (基因工程菌或细胞) 的大规模培养, 以及外源基因表达产物的分离纯化过程。因此, 广义的基因工程概念更倾向于工程学的范畴。值得注意的是, 广义的基因工程是一个高度统一的整体。上游DNA重组的设计必须以简化下游操作工艺和装备为指导, 而下游过程则是上游基因重组蓝图的体现与保证, 这是基因工程产业化的基本原则。

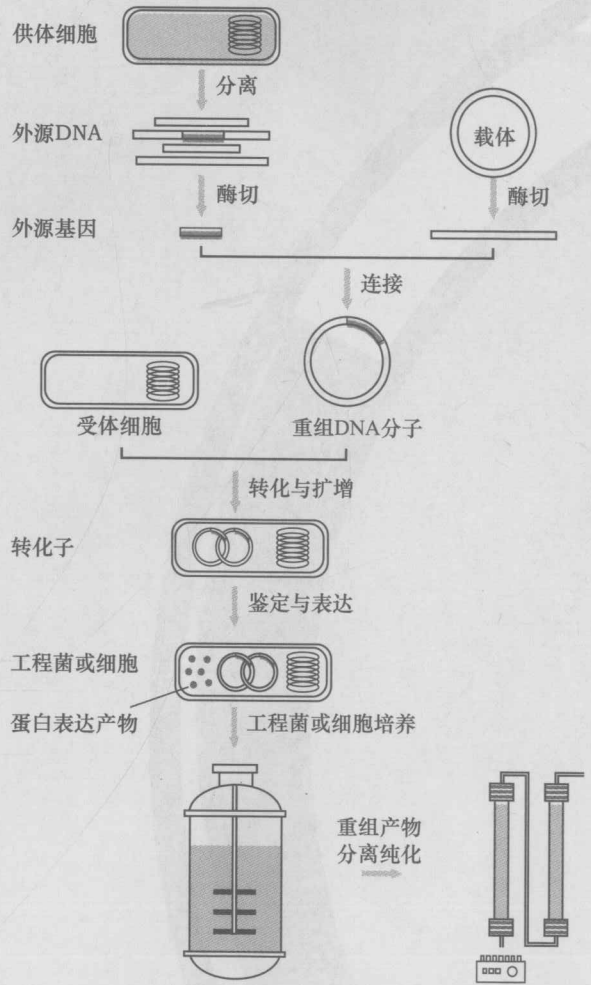


图1-1 基因工程基本流程示意图

1.1.2 基因工程的基本过程

依据定义, 基因工程的整个过程由工程菌 (细胞) 的设计构建和基因产品的生产两大部分组成 (图1-1)。前者主要在实验室里进行, 其单元操作过程如下:

(1) 从供体细胞中分离出基因组DNA, 用限制性核酸内切酶分别将外源DNA (包括外源基因或目的基因) 和载体分子切开 (简称切)。

(2) 用DNA连接酶将含有外源基因的DNA片段接到载体分子上, 构成DNA重组分子 (简称接)。

(3) 借助于细胞转化手段将DNA重组分子导入受体细胞中 (简称转)。

(4) 短时间培养转化细胞, 以扩增DNA重组分子或使其整合到受体细胞的基因组中 (简称增)。

(5) 筛选和鉴定经转化处理的细胞, 获

得外源基因高效稳定表达的基因工程菌或细胞（简称检）。

由此可见，基因工程的上游操作过程可简化为：切、接、转、增、检。

1.1.3 基因工程的基本原理

作为现代生物工程的关键技术，基因工程的主体战略思想是外源基因的稳定高效表达。为达到此目的，可从以下四个方面考虑：

（1）利用载体DNA在受体细胞中独立于染色体DNA而自主复制的特性，将外源基因与载体分子重组，通过载体分子的扩增提高外源基因在受体细胞中的剂量（或拷贝数），借此提高其宏观表达水平。这里涉及DNA分子高拷贝复制以及稳定遗传的分子遗传学原理。

（2）筛选、修饰、重组启动子、增强子、操作子和终止子等基因的转录调控元件，并将这些元件与外源基因精确剪接，通过强化外源基因的转录而提高其表达水平。

（3）选择、修饰、重组核糖体结合位点及密码子等mRNA的翻译调控元件，强化受体细胞中目标蛋白质的生物合成过程。上述两点均涉及基因表达调控的分子生物学原理。

（4）基因工程菌（细胞）是现代生物工程中的微型生物反应器，在强化并维持其最佳生产效能的基础上，从工程菌（细胞）大规模培养的工程和工艺角度切入，合理控制微型生物反应器的增殖速度和最终数量，也是提高外源基因表达产物产量的重要环节，这里涉及的是生化工程学的基本理论体系。

因此，分子遗传学、分子生物学、生化工程学是基因工程原理的三大基石。

1.1.4 基因工程在生物工程中的地位

生物工程的学科体系建立在微生物学、遗传学、生物化学和化学工程学的基本原理与技术之上，但其最古老的产业化应用可追溯到公元前40世纪至公元前30世纪期间的酿酒技术。20世纪40年代，抗生素制造业的出现被认为是微生物发酵技术成熟的标志，同时也孕育了传统生物工程的诞生。30年之后，以分子遗传学和分子生物学研究成果为理论基础的基因工程技术则将生物工程引入了现代生物技术的高级发展阶段。

生物工程与化学工程同属化学产品生产技术，但两者在基本原理、生产组织形式以及产品结构等方面均有本质的区别。在化学工业中，产品形成或者化学反应发生的基本场所是各种类型的物理反应器，在那里反应物直接转变成产物；而在生物技术产业中，生化反应往往发生在生物细胞内，作为反应物的底物按照预先编制好的生化反应程序，在催化剂酶的作用下形成最终产物。在此过程中，反应的速度和进程不仅仅依赖于底物和产物的浓度，而且更重要的是受到酶含量的控制，后者的变化又与细胞所处的环境条件和基因的表达状态直接相关联。虽然在一个典型的生物工程生产模式中，同样需要使用被称为细菌发酵罐或细胞培养器的物理容器，但它们仅仅用于细胞的培养和维持，真正意义上的生物反应器却是细胞本身。因此，就生产方式而言，生物工程与化学工程的显著区别在于：首先，生物工程通常需要两种性质完全不同的反应器，细胞实质上是一种特殊的微型生物反应器（microbioreactor）；其次，在一般生产过程中，微型反应器（细胞）的数量与质量随物理反应器内的环境条件变化而变化，因此在物理反应器水平上施加的工艺和工程参数控制种类更多、程度更精细；再次，每个微型反应器（细胞）内的生物催化剂的数量和质量也会增殖或跌宕，而且这种变化受制于更为复杂的机制，如酶编码基因的表达调控程序、蛋白质的加工成熟程序、酶的活性结构转换程序、蛋白质的降解

程序等；最后，如果考虑产品的结构，生物工程则不仅能生产品理活性和非活性分子，而且还能培育和制造生物活体组织。

上述分析表明，现代生物工程的基本内涵包括：用于维持和控制细胞微型反应器（即细菌或细胞）数量和质量的发酵工程（细菌培养）和细胞工程（动植物细胞培养）、用于产物分离纯化的分离工程、用于实施细胞外生化反应的酶工程、用于生产生物活体组织的组织工程，以及用于构建高品质细胞微型反应器的基因工程（图1-2）。值得注意的是，根据酶工程原理和技术组织的产物生产方式表面上看起来似乎与细胞微型反应器无关，但从生物催化剂概念拓展和酶制剂来源的角度上考察，这种生产方式在很大程度上也依赖于细胞微型反应器的使用，因为目前工业上使用的大部分酶制剂实际上是发酵工程的中间产品，而且酶工程产业中相当比例的生物催化剂形式是微生物细胞，后者也同样来自发酵过程。

菌种诱变筛选程序和细胞工程中的细胞融合技术分别是微生物和动植物微型反应器品质改良的传统手段，而DNA重组技术则是定向创建所有类型细胞微型反应器（即工程菌或工程细胞）的强有力现代化工具。其中，第一代基因工程是将单一外源基因导入受体细胞，使之高效表达外源基因编码的蛋白质或多肽，它们基本上以天然的序列结构存在；第二代基因工程（即蛋白质工程）通过基因水平上的操作修饰改变蛋白多肽的序列结构，产生生物功能更为优良的突变蛋白（muted protein）；而作为第三代基因工程的途径工程则在基因水平上局部设计细胞内固有的代谢途径和信号转导途径，以赋予细胞更为优越甚至崭新的产物生产品质。

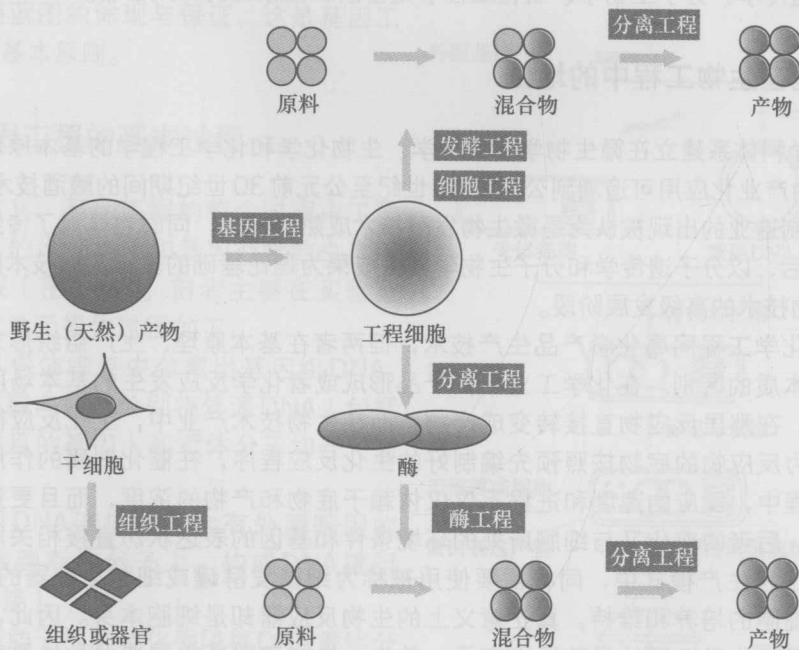


图1-2 现代生物工程的基本流程