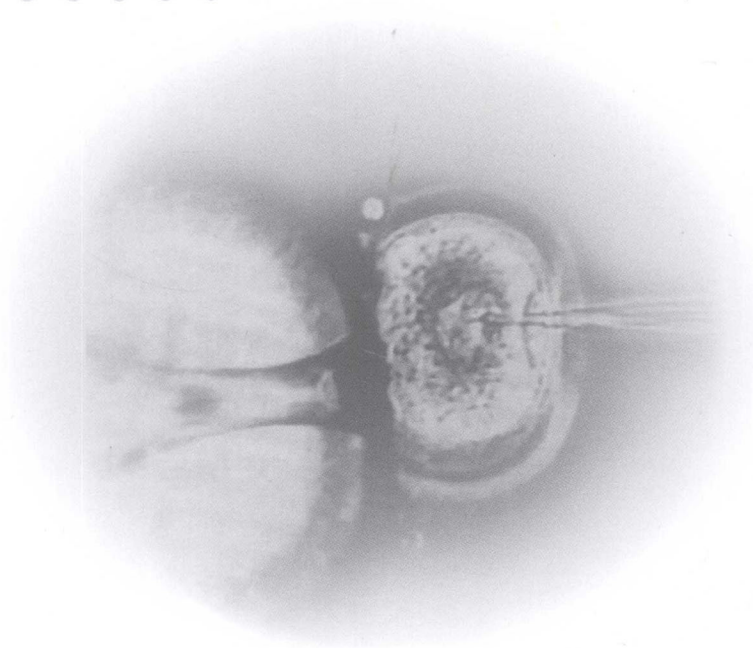




生命科学核心课程系列教材

# 基因工程

常重杰 主编



科学出版社

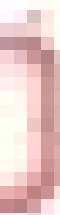
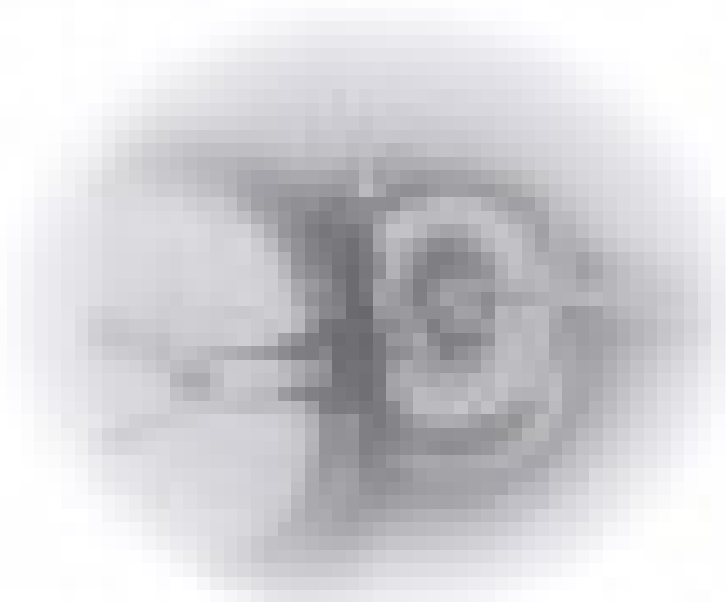


# 基因工程

2003.11.18

1. 1973年 孟德尔定律

2. 1953年 沃森和克里克发现DNA双螺旋结构



3. 1978年 基因工程诞生

4. 1982年 第一个基因工程药物问世

5. 1983年 第一个转基因食品上市

6. 1985年 第一个转基因动物问世

7. 1986年 第一个转基因植物上市

8. 1987年 第一个转基因微生物问世



9. 1989年 第一个转基因食品上市

10. 1990年 第一个转基因动物问世

11. 1991年 第一个转基因植物上市

12. 1992年 第一个转基因微生物问世

生命科学核心课程系列教材

# 基因工程

主 编 常重杰  
副主编 杜启艳 彭仁海 郑振宇

科学出版社

北 京

## 内 容 简 介

基因工程技术是现代生物技术的集中体现,该技术自诞生以来取得的杰出成就深刻影响和促进了生命科学的发展和人类社会的进步。基因工程不仅是生物技术专业和生物工程专业的主要专业课,也是生物科学专业必须学习和掌握的基本理论知识和基本研究技能之一,因此该课程在所有相关学科中占有重要地位。本书本着“重视基础、拓展眼界、联系实际”的原则,对基因工程的基本概念和重要研究技术原理进行了系统、翔实的介绍。同时,部分内容结合教学实践需要,介绍了该学科最新进展,并提供了重要文献和进一步阅读指南。

本书以基因工程的研究步骤及实际操作中的需要为主线,共分12章,包括基因工程的基本概念、基因工程基本技术原理、基因克隆的酶学基础、载体、目的基因的克隆、外源基因的原核细胞表达系统、外源基因的真核细胞表达系统、转基因动物、转基因植物、人类疾病的基因治疗和合成生物学等。每章都有内容提要、思考题和参考文献,书后配有考研模拟复习题以利于巩固知识、进一步延伸阅读之用。

本书可作为师范院校、综合性大学、农林院校相关专业本科生教材,同时也可作为相关专业研究生和科技工作者的参考用书。

### 图书在版编目(CIP)数据

基因工程/常重杰主编. —北京: 科学出版社, 2012

生命科学核心课程系列教材

ISBN 978-7-03-035293-4

I. ①基… II. ①常 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 (2012) 第 187549 号

责任编辑: 席 慧 / 责任校对: 钟 洋

责任印制: 阎 磊 / 封面设计: 迷底书装

**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>

**北京市安泰印刷厂** 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

\*

2012年8月第 一 版 开本: 787×1092 1/16

2012年8月第一次印刷 印张: 22 3/4

字数: 577 000

**定价: 48.00 元**

(如有印装质量问题, 我社负责调换)

## 《基因工程》编委会名单

主 编 常重杰

副主编 杜启艳 彭仁海 郑振宇

编写人员 (按姓氏汉语拼音排序)

常重杰 陈建军 陈玉栋

杜启艳 姬俊华 孟超敏

南 平 彭仁海 王凤羽

王 兰 夏晓华 燕帅国

郑振宇

# 前 言

20 世纪 70 年代以来，生物技术以前所未有的速度迅猛发展，一批新兴的生物技术产业已经形成，并对生命科学的发展和人类社会产生了极其深远的影响。生物技术将会成为 21 世纪最具有发展前景的高新技术领域和国民经济的支柱产业之一。生物技术犹如一顶王冠，而基因工程技术则是这顶王冠上的一颗明珠。它的进一步发展必将为人类认识生命的本质，揭示生命现象的奥秘开辟一个全新的领域，对 21 世纪的生物制药、现代农业、疾病治疗、环境保护以及国民经济的可持续发展产生重大的影响。因此，基因工程始终是高校生物技术专业或生物工程专业本科生的专业基础课程。

高等师范院校是我国生物技术专业或生物工程专业本科生培养的主力军之一，在基因工程教学中普遍存在课时偏少、合适的教材难于寻找、课程内容与其他课程重叠而难于取舍等难题和困惑。在科学出版社的号召下，我们多个学校多年从事基因工程教学的主讲教师组织编写了这本教材。

本书编者遵从“重视基础、拓展眼界、联系实际”的原则，结合高等师范院校对学生知识的要求和培养性质与特点，充分把握中学生物学教学的实际，结合生物工程企业用人单位的需求，对教学体系和内容进行了有机的整合编写了本教材。本书从基因的基本概念出发，以基因工程技术体系为主线，对实际操作过程中所涉及的基本技术和基本概念进行了重点阐述；同时把基因工程的技术成就和学科发展动态结合到每一章节中，使学生在掌握基本技术原理和技能的基础上，了解基因工程技术的光明前景。

本书共分 12 章，各章具体分工如下：第 1 章由河南师范大学常重杰老师编写；第 2 章由河南师范大学南平老师编写；第 3 章由河南洛阳师范大学姬俊华老师编写；第 4 章由安阳工学院彭仁海老师编写；第 5 章由河南科技大学孟超敏老师编写；第 6 章由河南师范大学王兰老师编写；第 7 章前 3 节由信阳师范大学陈玉栋老师编写，第 4 和 5 节由河南师范大学杜启艳老师编写；第 8 章由河南农业大学郑振宇老师编写；第 9 章由河南师范大学夏晓华老师编写；第 10 章由河南师范大学陈建军老师编写；第 11 章由河南计划生育研究院王凤羽老师编写；第 12 章由河南师范大学燕帅国老师编写；附录由河南师范大学杜启艳老师编写。在写作过程中得到了河南师范大学生命科学学院许多领导和老师的支持和帮助，各位编委也对本书的结构体系、内容取舍等提出了十分宝贵的建议；科学出版社的编辑也对本书的编写和顺利出版花费了大量的心血。在此一并表示最诚挚的感谢！

限于编者水平有限，书中的错漏和缺点在所难免，竭诚希望广大读者批评指正！

常重杰

河南师范大学生命科学学院

2012 年 6 月

# 目 录

## 前言

<b>第 1 章 绪论</b> .....	1
1.1 基因工程的基本概念 .....	1
1.2 基因工程的研究内容 .....	2
1.3 基因工程诞生的基础 .....	2
1.3.1 基因工程诞生的理论基础.....	2
1.3.2 技术上的三大突破.....	3
1.4 基因工程技术的诞生 .....	3
1.5 基因工程的应用 .....	5
1.5.1 原核细胞基因工程.....	5
1.5.2 植物基因工程.....	7
1.5.3 动物基因工程.....	8
1.5.4 基因治疗.....	8
1.5.5 理论研究.....	9
1.6 基因工程的安全性 .....	9
1.7 我国的《基因工程安全管理办法》 .....	11
思考题 .....	12
参考文献 .....	13
<b>第 2 章 基因工程的基本技术</b> .....	14
2.1 凝胶电泳技术.....	14
2.1.1 基本原理 .....	15
2.1.2 琼脂糖凝胶电泳 .....	15
2.1.3 聚丙烯酰胺凝胶电泳 .....	17
2.1.4 脉冲场凝胶电泳 .....	18
2.1.5 双向电泳技术 .....	20
2.1.6 凝胶电泳片段的回收与纯化 .....	21
2.2 分子杂交技术.....	22
2.2.1 分子杂交的原理 .....	22
2.2.2 分子杂交的类型 .....	24
2.3 PCR 技术 .....	26
2.3.1 PCR 基本原理和反应过程 .....	26
2.3.2 PCR 反应的体系及其设计和优化 .....	28
2.3.3 PCR 产物的克隆 .....	31

2.3.4	PCR 技术的发展及其应用 .....	36
2.4	DNA 序列分析 .....	47
2.4.1	Maxam-Gibert 化学降解法 .....	47
2.4.2	Sanger 双脱氧链终止法 .....	49
2.4.3	DNA 序列分析的自动化 .....	50
2.4.4	DNA 序列的生物信息学分析 .....	52
2.5	基因芯片及数据分析 .....	53
2.5.1	基因芯片概念 .....	54
2.5.2	技术原理 .....	54
2.5.3	基因芯片的制备 .....	54
2.5.4	基因芯片的应用 .....	55
2.6	研究蛋白质与 DNA 相互作用的主要方法 .....	57
2.6.1	酵母单杂交系统 (可延伸双杂交) .....	57
2.6.2	凝胶阻滞试验 (Gel-shift) .....	57
2.6.3	DNase I 足迹法 .....	58
2.6.4	噬菌体展示技术 .....	58
	思考题 .....	59
	参考文献 .....	59
<b>第 3 章</b>	<b>基因工程的工具酶 .....</b>	<b>61</b>
3.1	限制性内切核酸酶 .....	62
3.1.1	限制性内切核酸酶的发现与种类 .....	62
3.1.2	限制性内切核酸酶的命名 .....	63
3.1.3	II 型限制性内切核酸酶的基本特性 .....	63
3.1.4	影响限制性内切核酸酶活性的因素 .....	66
3.1.5	限制性内切核酸酶酶切 DNA 的方法 .....	68
3.2	DNA 连接酶 .....	68
3.2.1	DNA 连接酶的发现 .....	68
3.2.2	DNA 连接酶的种类 .....	69
3.2.3	黏性末端 DNA 片段的连接 .....	69
3.2.4	平末端 DNA 片段的连接 .....	71
3.2.5	影响连接反应的因素 .....	73
3.3	DNA 聚合酶和反转录酶 .....	74
3.3.1	大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 及其应用 .....	75
3.3.2	<i>E. coli</i> DNA 聚合酶 I 的 Klenow 大片段酶及其应用 .....	76
3.3.3	T <sub>4</sub> 噬菌体 DNA 聚合酶 .....	77
3.3.4	T <sub>7</sub> 噬菌体 DNA 聚合酶与测序酶 .....	77
3.3.5	反转录酶 .....	78
3.4	修饰酶类 .....	79
3.4.1	末端脱氧核苷酸转移酶 .....	79
3.4.2	T <sub>4</sub> 多核苷酸激酶 .....	79



3.4.3 碱性磷酸酶 .....	79
3.5 其他工具酶 .....	80
3.5.1 S1 核酸酶 .....	80
3.5.2 Bal 31 核酸酶 .....	81
3.5.3 核酸外切酶 .....	82
3.5.4 RNA 酶 .....	83
思考题 .....	84
参考文献 .....	84
<b>第4章 基因工程的克隆载体 .....</b>	<b>85</b>
4.1 质粒载体 .....	86
4.1.1 质粒的一般生物学特性 .....	86
4.1.2 质粒 DNA 的复制与拷贝数的控制 .....	89
4.1.3 质粒 DNA 的分离与纯化 .....	91
4.1.4 质粒载体的构建及类型 .....	92
4.1.5 重要的大肠杆菌质粒载体 .....	95
4.1.6 质粒载体的稳定性问题 .....	99
4.2 噬菌体载体 .....	100
4.2.1 噬菌体的一般生物学特性 .....	100
4.2.2 $\lambda$ 噬菌体载体 .....	103
4.2.3 单链 DNA 噬菌体载体 .....	107
4.3 柯斯质粒载体 .....	112
4.3.1 柯斯质粒载体的构建及其特点 .....	112
4.3.2 柯斯克隆 .....	113
4.3.3 柯斯克隆的改良 .....	114
4.4 噬菌粒载体 .....	116
4.4.1 噬菌粒载体的概念 .....	116
4.4.2 pUC118 和 pUC119 噬菌粒载体 .....	117
4.4.3 pBluescript 噬菌粒载体 .....	118
4.5 人工染色体克隆载体 .....	119
4.5.1 构建大容量载体的必要性 .....	119
4.5.2 人工染色体的必需成分 .....	120
4.5.3 酵母人工染色体载体 .....	120
4.5.4 细菌人工染色体载体 .....	122
4.5.5 P1 人工染色体 .....	123
4.5.6 人类人工染色体 .....	123
4.5.7 植物人工染色体 .....	124
思考题 .....	124
参考文献 .....	125
<b>第5章 目的基因的获取与改造 .....</b>	<b>126</b>
5.1 DNA 的人工合成 .....	126

5.1.1	人工合成 DNA 的原理 .....	126
5.1.2	人工合成 DNA 的应用 .....	128
5.2	从基因文库获取目的基因 .....	130
5.2.1	基因组文库的构建与筛选 .....	130
5.2.2	cDNA 文库的构建与筛选 .....	136
5.2.3	基因组文库与 cDNA 文库的区别 .....	140
5.3	PCR 技术与目的基因的分离 .....	141
5.3.1	目的基因的直接扩增和克隆 .....	141
5.3.2	目的基因的 cDNA 的克隆 .....	141
5.4	电子克隆获取目的基因 .....	141
5.4.1	电子克隆的基本原理 .....	142
5.4.2	利用 EST 数据库进行电子克隆 .....	142
5.4.3	利用基因组数据库进行电子克隆 .....	143
5.4.4	全长 cDNA 的判断 .....	143
5.5	根据基因差异表达获得目的基因 .....	143
5.5.1	mRNA 差异显示技术 .....	143
5.5.2	cDNA 代表性差异分析 .....	145
5.5.3	抑制差减杂交技术 .....	145
5.6	目的基因的改造 .....	147
5.6.1	基因突变与人工诱变技术 .....	147
5.6.2	基因定点诱变 .....	149
5.6.3	基因随机突变 .....	151
	思考题 .....	153
	参考文献 .....	153
<b>第 6 章</b>	<b>目的基因的导入与重组体的鉴定</b> .....	<b>155</b>
6.1	重组 DNA 向原核细胞的导入 .....	155
6.1.1	原核受体细胞的种类及特点 .....	155
6.1.2	转化 .....	156
6.1.3	重组质粒 DNA 分子转化大肠杆菌 .....	157
6.1.4	重组 $\lambda$ 噬菌体 DNA 分子转导大肠杆菌 .....	160
6.2	重组 DNA 导入真核细胞 .....	161
6.2.1	真核受体细胞 .....	161
6.2.2	重组 DNA 分子导入酵母细胞 .....	162
6.2.3	重组 DNA 分子导入植物细胞 .....	162
6.2.4	重组 DNA 分子导入哺乳动物细胞 .....	164
6.3	重组体克隆的筛选与鉴定 .....	167
6.3.1	载体遗传标记筛选法 .....	167
6.3.2	依赖于重组子结构特征分析的筛选法 .....	171
6.3.3	核酸分子杂交检测法 .....	172
6.3.4	免疫化学检测法 .....	174

6.3.5	翻译筛选法	175
6.3.6	亚克隆法	176
6.3.7	插入失活法	176
6.3.8	电子显微镜作图检测法	177
6.3.9	转录产物作图	177
6.3.10	基因表达产物分析法	177
6.3.11	DNA 序列测定法	178
	思考题	179
	参考文献	179
<b>第 7 章</b>	<b>外源基因的原核表达系统</b>	<b>180</b>
7.1	原核表达系统的特点	180
7.1.1	原核生物的转录	180
7.1.2	原核生物的翻译	181
7.2	原核细胞表达体系	182
7.2.1	大肠杆菌表达体系	182
7.2.2	芽孢杆菌表达体系	185
7.2.3	链霉菌表达体系	186
7.2.4	蓝藻表达体系	188
7.3	提高外源基因表达水平的措施	190
7.3.1	优化表达载体的设计	190
7.3.2	避免使用稀有密码子	190
7.3.3	提高外源基因 mRNA 的稳定性	190
7.3.4	提高表达蛋白的稳定性, 防止其降解	191
7.3.5	减轻细胞的代谢负荷, 提高外源基因的表达水平	191
7.3.6	优化发酵条件	191
7.4	利用原核细胞生产真核蛋白质的实例	191
7.4.1	干扰素基因工程	191
7.4.2	生长激素基因工程	192
7.4.3	生长激素释放抑制因子基因工程	193
7.4.4	胰岛素基因工程	194
7.4.5	$\alpha$ -淀粉酶基因工程	195
7.5	目的蛋白的纯化	197
7.5.1	组氨酸标签	197
7.5.2	GST-标签	198
7.5.3	MBP 标签	199
7.5.4	IMPACT	199
7.5.5	TAP-标签	200
	思考题	201
	参考文献	201
<b>第 8 章</b>	<b>外源基因的真核表达系统</b>	<b>202</b>

8.1	真核细胞表达体系的特点	202
8.1.1	利用真核细胞作宿主系统的优点	202
8.2	酵母表达系统	203
8.2.1	酵母基因表达载体的构成	203
8.2.2	酵母基因表达载体的种类	204
8.2.3	酵母基因表达系统宿主菌	207
8.2.4	在酵母中高效表达外源基因的策略	207
8.3	昆虫或昆虫细胞表达体系	208
8.3.1	以重组杆状病毒为载体的昆虫表达体系	209
8.3.2	杆状病毒表达系统的效率与加工能力	209
8.3.3	一类稳定转化的昆虫表达系统	211
8.4	哺乳动物细胞基因表达系统	212
8.4.1	哺乳动物基因表达载体的组成特征	213
8.4.2	哺乳动物基因表达载体	214
8.4.3	哺乳动物基因表达宿主细胞	220
8.4.4	提高哺乳动物基因表达系统表达效率的因素	221
	思考题	221
	参考文献	222
<b>第9章</b>	<b>转基因动物</b>	<b>223</b>
9.1	转基因动物发展简史	223
9.2	转基因动物技术	225
9.2.1	外源基因导入动物细胞的方法	225
9.2.2	转基因动物技术的新发展	234
9.3	转基因动物的制备和检测	240
9.3.1	以显微注射小鼠为例介绍转基因动物的制备	240
9.3.2	转基因的鉴定和表达水平检测	241
9.4	转基因动物研究中出现的问题及其对策	243
9.4.1	转基因动物效率极低	243
9.4.2	难以控制转基因在寄主基因组的行为	244
9.4.3	大部分转基因表达水平极低	244
9.4.4	转基因表达特征及提高转基因表达的策略	245
9.5	转基因动物的应用	246
9.5.1	在生产和生活中的应用	246
9.5.2	在生物制药方面的应用——动物生物反应器	247
9.5.3	在疾病研究中的应用	249
9.5.4	在基础研究中的应用	250
9.6	转基因动物的安全性及其未来	250
9.6.1	食品安全性	251
9.6.2	环境安全性	251
	思考题	252

参考文献	252
<b>第 10 章 转基因植物</b>	254
10.1 转基因植物概述	254
10.2 转基因植物的基因转化方法	255
10.2.1 转基因植物受体系统	255
10.2.2 农杆菌介导的植物基因转化技术	256
10.2.3 DNA 直接导入的基因转化技术	262
10.2.4 花粉管通道法介导的基因转化技术	264
10.3 转基因植物的检测方法	265
10.3.1 基于报告基因/选择标记基因的转基因植物检测方法	265
10.3.2 基于报告基因的转基因植物的外源基因表达检测	266
10.3.3 外源目的基因整合的鉴定	267
10.4 抗虫转基因植物	268
10.4.1 来源于微生物的抗虫基因	268
10.4.2 来源于植物的抗虫基因的应用	270
10.5 抗细菌转基因作物	272
10.5.1 裂解细菌细胞壁	272
10.5.2 破坏细菌细胞膜	273
10.5.3 解除细菌毒素的毒性作用	274
10.5.4 引入对细菌毒素不敏感的靶酶	274
10.5.5 增强植物本身的防卫蛋白合成	274
10.6 抗病毒转基因作物	275
10.6.1 利用非病毒来源的抗病毒基因策略	275
10.6.2 利用病毒来源基因的抗病毒策略	276
10.7 抗除草剂转基因作物	279
10.7.1 增加靶标酶或靶标蛋白的拷贝数	279
10.7.2 作用靶标酶的修饰	279
10.7.3 分离能解除除草剂毒性的酶基因	280
10.7.4 新型除草剂的发展方向	280
10.8 抗逆境转基因作物	280
10.8.1 抗干旱胁迫策略	280
10.8.2 抗寒冻胁迫策略	281
10.8.3 抗盐碱胁迫策略	282
10.9 植物生物反应器	282
10.9.1 植物生物反应器的优点	282
10.9.2 植物生物反应器的研究现状	283
10.9.3 植物生物反应器存在的问题	283
10.10 转基因沉默的原因及对策	284
10.10.1 转基因沉默的原因	284
10.10.2 控制转基因沉默的策略	285

10.11 转基因植物的安全性评价 .....	285
10.11.1 转基因植物食品的安全性评价 .....	286
10.11.2 转基因植物生态环境的安全性评价 .....	288
思考题 .....	290
参考文献 .....	290
<b>第 11 章 基因治疗</b> .....	<b>291</b>
11.1 基因治疗的基本概念 .....	291
11.2 基因治疗的发展简史与现状 .....	291
11.3 基因治疗的策略 .....	294
11.3.1 根据基因导入体内的方式 .....	294
11.3.2 根据导入基因发生作用的方式 .....	295
11.4 基因治疗的流程 .....	295
11.4.1 目的基因的准备 .....	295
11.4.2 靶细胞 .....	295
11.4.3 载体的选择 .....	295
11.4.4 转移技术 .....	296
11.5 基因治疗的应用 .....	304
11.5.1 肿瘤的基因治疗 .....	305
11.5.2 单基因病的基因治疗 .....	312
11.5.3 艾滋病等感染性疾病的基因治疗 .....	315
11.6 基因治疗的前景 .....	316
11.6.1 基因治疗面临的问题和挑战 .....	316
11.6.2 基因治疗的发展方向 .....	317
思考题 .....	317
参考文献 .....	317
<b>第 12 章 合成生物学与基因工程</b> .....	<b>319</b>
12.1 合成生物学 .....	319
12.1.1 合成生物学的定义 .....	319
12.1.2 合成生物学的研究内容 .....	320
12.1.3 合成生物学的工程本质 .....	325
12.1.4 合成生物学的意义 .....	327
12.1.5 合成生物学的应用 .....	328
12.2 合成生物学与基因工程 .....	331
12.2.1 合成生物学与基因工程的差异 .....	332
12.2.2 合成生物学与基因工程相似之处 .....	333
思考题 .....	334
参考文献 .....	334
<b>附录 总复习题</b> .....	<b>335</b>

# 第1章 绪论

基因工程是在体外将目的基因与载体分子重组后转化受体细胞，并在受体细胞中表达，从而获得基因产品或培育生物新品种的一种技术。基因工程诞生于20世纪70年代，遗传物质的发现、DNA双螺旋结构模型的确立以及遗传信息流动的中心法则是其诞生的理论基础；各种工具酶的分离纯化、载体的开发以及基因转化技术是其诞生的技术基础。自从基因工程诞生之后，已经在现代生物学的理论研究中发挥了巨大的作用，同时也在生产实践中获得了广泛的应用，在生物制药、动植物新品种培育、环境污染治理等方面取得了巨大的成就，对人类社会和人类健康产生了巨大影响。关于基因工程和转基因生物的安全性，目前仍没有科学性共识。尽管如此，作为基因工程技术的参与者必须对其安全性保持高度的警惕。

## 1.1 基因工程的基本概念

人类已经有数千年的种、养殖历史。在生产实践中人们认识到生物具有遗传和变异的特性。遗传性赋予生命物种的稳定性，保证物种的延绵不断；变异性赋予生物种的进化，保证生物对环境的适应。因而遗传和变异在一个生物体内有机地统一起来。在生物演变的历史长河中，自然发生的变异是相当缓慢的。随着生物学的发展，人们开始干预生物变异，经典遗传学使自然界中需几百、几千、几万年才能积累出现的有利变异，在几年、几十年的时期内便可实现。20世纪70年代初期，基因工程诞生，重组DNA技术兴起，开辟了在短时间内改造生物遗传性的新天地。生物学的发展将以千万年为进化单位的自然变异缩短到以几十年为进化单位的常规育种，再缩短到以几年为进化单位的基因工程。生物种属间不可逾越的鸿沟被彻底填平，在生物进化的阶梯上，一步跨过了几千年。自然变异不以人的意志为转移，常规育种也带有一定程度的盲目性，人类尚难以驾驭，只有基因工程才是主动地按人的意志定向培育生物新品种、新类型乃至创造自然界从未有过的新生物的最佳途径。基因工程把生物学推到了分子生物学的一个新阶段。

在现代分子生物学领域里，除了基因工程以外，各种其他工程也相继问世。有些人将遗传工程、基因工程和重组DNA技术等往往不加区别地使用，造成混乱。事实上它们有不同的内涵，我们有必要加以澄清。

重组DNA技术是用酶学方法将不同来源的DNA在体外切割、连接、组成一个杂合DNA分子的技术。

基因工程是指在体外将目的基因插入病毒、质粒或其他载体分子中，构成遗传物质的新组合，并使之掺入到原先没有这些基因的寄主细胞内，且能稳定地遗传。因此，供体、受体和载体是基因工程的三大要素。

遗传工程比基因工程有更广泛的内容。遗传工程包括基因工程、基因工程并不等于遗传工程。凡是人工改造生物遗传特性的技术都可称为遗传工程，它包括基因工程、物理化学诱变、细胞融合、花粉培育、常规育种、有性杂交等。其中有个体水平的、细胞水平的，也有

分子水平的。

## 1.2 基因工程的研究内容

通过基因工程技术,把来自不同生物的外源 DNA 插入到载体分子上,所形成的杂种 DNA 分子与神话传说中的那种具有狮首、羊身、蛇尾的怪物颇为相似,故在早期发表的有关文章中常常称这种重组 DNA 分子为嵌合体(chimaera)。构建这类嵌合体 DNA 分子的中心环节是,在体外将不同来源的 DNA 片段,通过限制性内切核酸酶和 DNA 连接酶等的作用,重新组合成杂种的 DNA 分子。在体外重新组合 DNA 分子的实验过程中,是通过能够独立自主复制的载体分子如质粒或噬菌体为媒介的,将外源 DNA 引入到寄主细胞进行繁殖,从而为遗传上同一生物品系成批地繁殖和生长提供了有效的途径。概括起来,基因工程应包括以下几个主要的内容或步骤。

(1) 目的基因的克隆:从复杂的生物有机体基因组中,经过酶切或 PCR 扩增等步骤,分离出带有目的基因的 DNA 片段。

(2) 与载体分子的连接重组:在体外,将带有目的基因的外源 DNA 片段连接到能够自我复制的,并具有选择标记的载体分子上,形成重组 DNA 分子。

(3) 重组子的筛选:将重组 DNA 分子转移到适当的受体细胞并与之一起增殖,从大量的细胞繁殖群体中筛选出获得了重组 DNA 分子的受体细胞克隆。

(4) 检测:从这些筛选出来的受体细胞克隆,鉴定出那些获得了目的基因的克隆。目的基因在新的遗传背景下实现功能表达,产生人类所需要的物质。

## 1.3 基因工程诞生的基础

基因工程诞生于 1973 年,它是数十年无数科学家智慧的结晶,成果的融汇。总结起来,从 20 世纪 40 年代开始,科学家们在理论和技术方面为基因工程的诞生奠定了雄厚的基础。

### 1.3.1 基因工程诞生的理论基础

首先,在 20 世纪 40 年代,人类发现了生物的遗传物质是 DNA。Avery,在 1934 年美国的一次学术会议上,首次报道了肺炎双球菌(*Diplococcus pneumonas*)的转化。超越时代的科学成就往往不容易很快被人们接受,Avery 成就的命运也是一样,当时并没有引起阵阵掌声,事隔 10 年,他的论文才公开发表。Avery 的工作意义深远,他不仅证明 DNA 是遗传物质,还证明 DNA 可以把一个细菌的特性转给另一个细菌,理论意义十分重大。正如诺贝尔奖获得者 Lederberg 指出的,Avery 的工作是现代生物学革命性的开端。

其次,20 世纪 50 年代搞清了 DNA 的双螺旋结构。1953 年,Watson 和 Crick 提出了 DNA 结构的双螺旋模型。这一成就是生命科学史上划时代的里程碑,是与达尔文进化论和孟德尔定律齐名的贡献。

第三,20 世纪 60 年代确定了遗传信息的传递方式——中心法则。从 1961 年开始,以 Nirenberg 等为代表的一批科学家,经过不倦的努力,确定遗传信息是以密码方式传递的,每 3 个核苷酸组成一个密码子,代表一种氨基酸。到 1966 年全部破译了 64 个密码,编排了一个震惊世界的密码表。中心法则阐述了遗传信息传递的方向是 DNA→RNA→蛋白质。从



此,千百年以来使人迷惑不解的种瓜得瓜,种豆得豆的遗传现象,在分子水平上到了合理解释。

### 1.3.2 技术上的三大突破

经过了从20世纪40年代到60年代漫长的萌芽时期,科学家们虽然为基因工程设计了一幅美丽的蓝图,但是面对庞大的双链DNA(dsDNA),科学家们束手无策,不能对它进行有效的控制性操作。尽管酶学知识得到了相当的发展,还是没有任何一种已发现的酶能执行这样的使命。突破是在1968年出现的。Smith和Wilcox在流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)中分离纯化了限制性内切核酸酶Hind II,为基因工程专家提供了切割工具,迎来了改造生物的新纪元,为基因工程的诞生奠定了最为重要的技术基础。除限制性内切核酸酶之外,其他众多工具酶的分离和纯化(如连接酶、聚合酶等)都是基因工程操作中必不可少的工具。

第二个突破是关于基因工程载体方面。所谓载体就是运送重组DNA分子到寄主细胞中的工具。基因工程的载体是质粒和病毒。早在1940年,Lederberg等在研究细菌的致育因子——F因子时就已经发现了质粒的存在。经过20世纪50年代和60年代,相继又现了其他质粒,如抗药性因子、大肠杆菌因子(ColE1)等。到1973年,Cohen才将质粒作为基因工程的载体使用。这是基因工程诞生的第二个技术准备。

基因转化技术的确立是基因工程诞生又一重要的技术基础。外源DNA片段同上述这些载体分子重组而成的杂种DNA分子,需要重新导入大肠杆菌寄主细胞后才能进行正常的增殖。这种将外源DNA分子导入细菌细胞的转化现象虽然早在20世纪40年代就已经在肺炎双球菌中发现,但对于大肠杆菌来说,却直到1970年才获得成功。当时Mandel和Higa发现,大肠杆菌的细胞经过氯化钙的适当处理之后,便能够吸收 $\lambda$ 噬菌体的DNA。两年之后,即1972年,斯坦福大学的Cohen等报道,经氯化钙处理的大肠杆菌细胞同样能够摄取质粒的DNA。从此,大肠杆菌便成了分子克隆的良好转化受体。大肠杆菌转化体系的建立,对基因工程的创立具有特别重要的意义。因为早期使用的克隆载体都携带有在大肠杆菌中增殖的复制子。

除了上述这些有关DNA分子的切割与连接以及外源DNA对感受态的大肠杆菌细胞的转化技术之外,在20世纪60年代还发展出了琼脂糖凝胶电泳和Southern转移杂交技术,它们对于DNA片段的分离和检测同样也是十分有用的。这些技术差不多同时得到发展,并很快地被运用到基因操作实验。于是在20世纪70年代初开展DNA重组工作,无论在理论上还是技术上都已具备了条件。

## 1.4 基因工程技术的诞生

1972年,美国斯坦福大学的Berg博士领导的研究小组,率先完成了世界上第一例成功的DNA体外重组实验,并因此与Gilbert、Sanger分享了1980年的诺贝尔化学奖。Berg等使用限制性内切核酸酶EcoR I,在体外对猿猴病毒40(Simian vacuolating virus 40或Simian virus 40,SV40)的DNA和 $\lambda$ 噬菌体的DNA分别进行消化,然后再用T<sub>4</sub>DNA连接酶将两种消化片段连接起来,结果获得了包括SV40和 $\lambda$ DNA的重组杂种DNA分子。1973年,斯坦福大学的Cohen等成功地进行了另一个体外DNA重组实验。他们将编码有