面向21世纪高等院校规划教材·生物技术与生物工程系列



PRINCIPLES AND TECHNOLOGY
OF GENE ENGINEERING

基因工程原理和技术

主　编　邹克琴
副主编　叶子弘

ZHEJIANG UNIVERSITY PRESS
浙江大学出版社

■面向 21 世纪高等院校规划教材·生物技术与生物工程系列

PRINCIPLES AND TECHNOLOGY OF GENE ENGINEERING

基因工程原理和技术

主　编　邹克琴
副主编　叶子弘

ZHEJIANG UNIVERSITY PRESS
浙江大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

基因工程原理和技术/邹克琴主编. —杭州:浙江大学出版社,2009.1
ISBN 978-7-308-06477-4

Ⅰ.基… Ⅱ.邹… Ⅲ.基因—遗传工程—教材
Ⅳ.Q78

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2008)第 203114 号

内容简介

本书系统阐述了基因工程的基本原理与技术,并将生命科学的最新研究成果融入其中,将基因克隆的技术与原理紧密结合,适应生命科学的飞跃发展与高等院校相关课程教学的需要。

全书共分为 12 章,第 1 章介绍基因工程的发展概况,使学生全面了解这一门学科;第 2 章介绍基因工程操作中涉及的工具酶;第 3 章介绍基因工程载体;第 4 章阐述基因工程基本操作技术;第 5 章阐述聚合酶链反应技术;第 6 章介绍基因文库构建技术;第 7 章介绍重组 DNA 的连接和筛选鉴定方法;第 8 章介绍大肠杆菌基因工程;第 9 章介绍酵母菌和丝状真菌基因工程;第 10 章介绍植物基因工程;第 11 章介绍动物基因工程;第 12 章介绍基因工程的专利以及安全性。

本书理论与实际相结合,在内容安排上注重科学性、系统性、条理性、实用性,可以作为高等院校生物工程、生物技术、应用生物技术等专业的教材,也可作为基因工程科研人员的参考书。

基因工程原理和技术
主　编　邹克琴

责任编辑　阮海潮(ruan100@yahoo.cn)
封面设计　刘依群
出版发行　浙江大学出版社
(杭州天目山路 148 号　邮政编码 310028)
(E-mail:zupress@mail.hz.zj.cn)
(网址:http://www.zjupress.com
http://www.press.zju.edu.cn)
电话:0571-88925592,88273066(传真)
排　　版　杭州大漠照排印刷有限公司
印　　刷　德清县第二印刷厂
开　　本　787×1092　1/16
印　　张　14.75
字　　数　378 千
版 印 次　2009 年 1 月第 1 版　2009 年 1 月第 1 次印刷
书　　号　ISBN 978-7-308-06477-4
定　　价　24.00 元

版权所有 翻印必究　印装差错 负责调换
浙江大学出版社发行部邮购电话(0571)88925591

面向 21 世纪高等院校规划教材·生物技术与生物工程系列

《基因工程原理和技术》

编委会成员

主　编　邹克琴

副主编　叶子弘

编　者　（按姓氏拼音顺序排列）

陈忠正（华南农业大学食品学院）

刘　献（哈尔滨学院）

王　兰（华南农业大学农学院）

王为民（中国计量学院生命科学学院）

叶子弘（中国计量学院生命科学学院）

赵彦宏（鲁东大学）

张海燕（新疆塔里木大学）

邹克琴（中国计量学院生命科学学院）

前　言

生命科学是当今发展十分迅速的科学领域。由生命科学领域中的生物化学、分子生物学、细胞生物学以及分子遗传学的发展所催生的基因克隆技术，已经广泛渗透到医学、农业、工业、食品、环保等众多学科领域。基因工程诞生已近 40 年，它的飞速发展正改变着世界经济。这使得越来越多的人想了解基因克隆的相关理论和技术，尤其是近几年来新技术、新应用不断涌现，例如转基因技术、荧光定量 PCR 技术、RNAi 干扰技术、Gateway 通路克隆技术等，而这些新技术、新理论在相关的教科书中还未曾见到。为此，我们感到编写一本既能系统地阐明基因克隆的基本原理知识，又能详细介绍基因克隆的新技术、新应用，将基础理论与技术相结合的教科书显得十分必要和迫切。

本书第 1、12 章由叶子弘编写，第 2、3 章由邹克琴编写，第 4 章由王兰、邹克琴编写，第 5 章由陈忠正、邹克琴编写，第 6 章由叶子弘、邹克琴编写，第 7 章由叶子弘、赵彦宏编写，第 8 章由张海燕编写，第 9 章由刘献编写，第 10、11 章由王为民编写，全书由主编统稿和定稿。

鉴于基因工程的发展非常迅速，基因克隆的新技术、新进展不断涌现，资料浩瀚，编写时间仓促，水平有限，难免会有疏漏和错误之处，敬请读者批评指正，不胜感激。

邹克琴

目　录

第 1 章　基因工程概述 …… 1

1.1　基因工程的定义 …… 2
1.2　基因工程的诞生和发展 …… 2
1.2.1　基因工程的诞生 …… 2
1.2.2　基因工程的发展 …… 3
1.3　基因工程研究的主要内容 …… 4
1.3.1　基因工程的基本过程 …… 4
1.3.2　基因工程研究的主要内容 …… 5
1.4　基因工程的研究意义 …… 5
1.4.1　基因工程技术在医学领域中的应用 …… 5
1.4.2　基因工程在农业领域中的应用 …… 7
1.4.3　基因工程在工业领域中的应用 …… 8

第 2 章　基因工程操作的工具酶 …… 10

2.1　限制性核酸内切酶 …… 10
2.1.1　限制性核酸内切酶的发现 …… 10
2.1.2　限制性核酸内切酶的分类 …… 11
2.1.3　限制性核酸内切酶的命名以及识别特点 …… 11
2.1.4　Ⅱ型限制性核酸内切酶的切割方式 …… 12
2.1.5　Ⅱ型限制性核酸内切酶的反应条件 …… 14
2.1.6　影响限制性核酸内切酶活性的因素 …… 14
2.2　DNA 连接酶 …… 15
2.2.1　连接机理 …… 15

2.2.2 DNA 连接酶的种类 …… 16
2.2.3 DNA 连接酶的反应体系 …… 16
2.2.4 影响连接反应的因素 …… 16
2.3 DNA 聚合酶 …… 17
2.3.1 大肠杆菌 DNA 聚合酶Ⅰ …… 17
2.3.2 Klenow 片段 …… 17
2.3.3 T4 噬菌体 DNA 聚合酶 …… 18
2.3.4 T7 噬菌体 DNA 聚合酶与测序酶 …… 18
2.3.5 Taq DNA 聚合酶 …… 18
2.3.6 逆转录酶 …… 18
2.4 末端脱氧核苷酸转移酶 …… 19
2.5 S1 核酸酶 …… 19
2.6 核酸外切酶 …… 19
2.7 T4 噬菌体多核苷酸激酶 …… 20
2.8 碱性磷酸酶 …… 20

第 3 章 基因工程载体 …… 22

3.1 质粒载体 …… 22
3.1.1 质粒的基本特性 …… 23
3.1.2 质粒载体的必备条件 …… 24
3.1.3 常用的质粒载体类型 …… 25
3.2 λ噬菌体载体 …… 27
3.2.1 λ噬菌体的生物学特性 …… 27
3.2.2 常见的λ噬菌体载体的构建 …… 28
3.2.3 常见的λ噬菌体载体 …… 29
3.3 单链 DNA 噬菌体载体 …… 29
3.3.1 M13 噬菌体的生物学特性 …… 30
3.3.2 常见的 M13 噬菌体载体 …… 31
3.4 噬菌粒载体 …… 31
3.5 黏粒载体 …… 31
3.5.1 黏粒载体的基本特点 …… 32
3.5.2 黏粒载体的构建 …… 32
3.5.3 黏粒载体在基因克隆中的应用 …… 32
3.5.4 常用的黏粒载体及应用 …… 33
3.6 人工染色体 …… 33
3.6.1 酵母人工染色体 …… 33
3.6.2 细菌人工染色体 …… 34

3.6.3　哺乳动物人工染色体…… 34
3.7　植物基因工程载体…… 34
3.7.1　质粒转化载体…… 35
3.7.2　植物病毒转化载体…… 35
3.8　动物基因工程载体…… 36
3.8.1　SV40 病毒载体 …… 36
3.8.2　反转录病毒载体…… 37
3.8.3　痘苗病毒载体…… 37
3.8.4　腺病毒载体…… 38

第 4 章　基因工程基本操作技术 …… 39

4.1　核酸的提取与纯化…… 39
4.1.1　核酸提取与纯化的基本原理…… 40
4.1.2　植物细胞核 DNA 的提取 …… 41
4.1.3　核外 DNA 的提取 …… 43
4.1.4　RNA 的提取 …… 45
4.1.5　核酸的纯化…… 47
4.2　核酸的检测与保存…… 48
4.2.1　核酸的检测…… 48
4.2.2　核酸的保存…… 49
4.3　核酸的凝胶电泳…… 50
4.3.1　琼脂糖凝胶电泳…… 51
4.3.2　聚丙烯酰胺凝胶电泳…… 53
4.4　分子杂交技术…… 55
4.4.1　变性和复性…… 55
4.4.2　探针与探针的制备…… 56
4.4.3　Southern 杂交 …… 58
4.4.4　Northern 杂交 …… 60
4.4.5　Western 杂交 …… 61
4.5　核酸的序列分析技术…… 62
4.5.1　Maxam-Gilbert 碱基顺序分析法 …… 62
4.5.2　Sanger 碱基顺序分析法 …… 63
4.5.3　自动化测序法…… 65
4.6　核酸和蛋白互作研究技术…… 65
4.6.1　酵母双杂交技术…… 65
4.6.2　酵母单杂交技术…… 67
4.6.3　噬菌体展示技术…… 68

4.6.4 DNA 迁移率变动试验 …… 68
4.6.5 DNase Ⅰ足迹试验 …… 69
4.7 通路克隆—Gateway 技术 …… 69
4.8 RNA 干扰技术 …… 70
4.8.1 siRNA 干扰机理 …… 70
4.8.2 siRNA 的合成 …… 71
4.8.3 细胞和整体生物导入 siRNA 的方法 …… 71

第 5 章 聚合酶链反应及其相关技术 …… 73

5.1 PCR 技术的原理 …… 73
5.1.1 聚合酶链反应操作过程 …… 74
5.1.2 参与 PCR 反应的成分及其作用 …… 75
5.1.3 聚合酶链反应的条件 …… 79
5.1.4 聚合酶链反应引物设计原则 …… 80
5.2 聚合酶链反应技术类型 …… 81
5.2.1 已知 DNA 序列的聚合酶链反应扩增 …… 81
5.2.2 逆转录聚合酶链反应 …… 81
5.2.3 已知 cDNA 一段序列获得全长 cDNA 的聚合酶链反应 …… 83
5.2.4 已知序列侧翼聚合酶链反应扩增 …… 84
5.2.5 未知序列聚合酶链反应扩增 …… 86
5.3.6 聚合酶链反应技术应用 …… 90
5.4 荧光定量 PCR 技术 …… 90
5.4.1 荧光 PCR 的特点 …… 90
5.4.2 实时荧光定量 PCR 技术原理 …… 91
5.4.3 荧光探针和荧光染料 …… 92

第 6 章 基因文库的构建 …… 97

6.1 基因组 DNA 文库的构建 …… 97
6.1.1 基因组文库的完备性 …… 98
6.1.2 基因组 DNA 文库的构建 …… 98
6.2 cDNA 文库的构建 …… 99
6.2.1 cDNA 文库的构建 …… 100
6.3 DNA 文库的保存 …… 101

第 7 章 DNA 体外重组与重组体的筛选鉴定 …… 103

7.1 目的基因与质粒载体的连接 …… 103
7.1.1 黏性末端的 DNA 片段的连接 …… 103

7.1.2　平末端连接法 …… 104
7.2　重组克隆载体引入受体细胞 …… 105
7.3　重组克隆载体导入哺乳动物细胞的转染 …… 106
7.3.1　磷酸钙和 DNA 共沉淀物转染法 …… 106
7.3.2　DEAE-葡聚糖介导转染法 …… 106
7.3.3　利用聚季铵盐的 DNA 转染法 …… 106
7.3.4　电穿孔法 DNA 转染 …… 107
7.4　重组子的筛选与鉴定 …… 107
7.5　物理检测法 …… 110
7.5.1　凝胶电泳检测法 …… 111
7.5.2　R-环检测法 …… 112
7.6　核酸分子杂交检测法 …… 112
7.6.1　菌落印迹原位杂交 …… 113
7.6.2　斑点印迹杂交 …… 113
7.6.3　Southern 印迹杂交 …… 113
7.7　免疫化学检测法 …… 114
7.7.1　放射性抗体检测法 …… 114
7.7.2　免疫沉淀检测法 …… 115
7.8　核酸序列测序分析法 …… 115
7.9　报告基因检测法 …… 115
7.9.1　新霉素磷酸转移酶基因 …… 116
7.9.2　双氢叶酸脱氢酶基因 …… 116
7.9.3　潮霉素磷酸转移酶基因 …… 116
7.9.4　氯霉素乙酰转移酶基因 …… 116
7.9.5　冠瘿碱合成酶基因 …… 116
7.9.6　β-葡萄糖苷酸酶基因 …… 117
7.9.7　荧光素酶基因 …… 117

第 8 章　外源基因在大肠杆菌中的表达 …… 119

8.1　外源基因正确表达的基本条件 …… 120
8.1.1　启动子 …… 120
8.1.2　转录终止子 …… 123
8.1.3　核糖体结合位点 …… 123
8.1.4　密码子偏好 …… 124
8.2　常用的大肠杆菌表达载体 …… 125
8.2.1　Lac 启动子的表达载体 …… 126
8.2.2　trp 启动子和 tac 启动子的表达载体 …… 127

8.2.3 P_L 启动子表达载体 …… 129
8.2.4 T7 噬菌体 RNA 聚合酶/启动子表达载体系统 …… 132
8.3 外源蛋白质表达部位 …… 133
8.3.1 细胞质表达 …… 133
8.3.2 细胞外周质表达 …… 136
8.3.3 细胞外分泌 …… 137
8.3.4 融合蛋白 …… 138
8.4 提高外源基因表达效率的方法 …… 140
8.4.1 外源基因的有效转录与外源基因高效表达 …… 140
8.4.2 转录的有效延伸和终止与外源基因高效表达 …… 141
8.4.3 有效的翻译起始与外源基因高效表达 …… 141
8.4.4 终止密码子选择与外源基因高效表达 …… 142
8.4.5 外源蛋白的稳定性与外源基因高效表达 …… 142
8.5 表达产物的检测 …… 143
8.5.1 含有报告基因的融合蛋白表达的检测 …… 143
8.5.2 免疫技术 …… 143
8.5.3 Western 杂交 …… 144

第 9 章 酵母菌和丝状真菌基因工程 …… 145

9.1 酵母菌的基因工程 …… 145
9.1.1 酵母菌的宿主系统 …… 145
9.1.2 酵母菌的载体系统 …… 149
9.1.3 酵母菌的转化系统 …… 151
9.1.4 常用的酵母表达系统 …… 154
9.1.5 酵母菌的蛋白修饰分泌系统 …… 158
9.2 丝状真菌的基因工程 …… 161
9.2.1 丝状真菌 …… 161
9.2.2 丝状真菌的 DNA 遗传转化系统 …… 162
9.2.3 丝状真菌载体质粒的构建 …… 164
9.2.4 外源蛋白在丝状真菌的表达 …… 166

第 10 章 转基因植物 …… 168

10.1 目的基因的分离和鉴定 …… 168
10.1.1 人工合成 …… 168
10.1.2 序列克隆法 …… 168
10.1.3 功能克隆法 …… 169
10.1.4 差异表达分析法 …… 170

10.2　植物表达载体——启动子…… 170
10.2.1　组成型启动子…… 170
10.2.2　组织特异性启动子…… 171
10.2.3　诱导型启动子…… 172
10.3　目的基因的转化方法…… 173
10.3.1　间接转化法…… 173
10.3.2　直接转化法…… 174
10.4　转基因植物的筛选与检测…… 175
10.4.1　转基因植物的筛选…… 176
10.4.2　外源基因表达的检测…… 176
10.5　转基因植物中外源基因的沉默…… 179
10.5.1　转录水平上的外源基因沉默(TGS) …… 179
10.5.2　转录后水平上外源基因的沉默(PTGS) …… 180
10.6　植物转基因沉默防止与抑制策略…… 181
10.6.1　转化前防止策略…… 181
10.6.2　转化后抑制策略…… 183
10.7　转基因植物的安全性和对策…… 183
10.7.1　抗性标记基因的剔除技术…… 184
10.7.2　安全标记基因…… 185
10.7.3　无标记基因的安全策略…… 185
10.8　转基因植物的应用…… 186
10.8.1　转基因植物的应用…… 186
10.8.2　转基因植物研究发展趋势…… 187

第 11 章　转基因动物 …… 190

11.1　生产转基因动物的关键技术…… 190
11.1.1　原核显微注射法…… 190
11.1.2　胚胎干细胞法…… 191
11.1.3　逆转录病毒感染法…… 191
11.1.4　精子载体法…… 192
11.1.5　体细胞核移植法…… 193
11.1.6　转基因技术与其他生物新技术的结合…… 193
11.2　转基因动物的检测…… 194
11.2.1　染色体和基因水平…… 194
11.2.2　转录水平…… 194
11.2.3　翻译水平…… 195
11.2.4　其他…… 196

11.3 转基因动物技术存在的问题…… 196
11.3.1 外源目的基因在宿主基因组中的行为难以控制…… 196
11.3.2 转基因动物技术给动物带来的危害…… 197
11.3.3 转基因动物的成功率和成活率极低,生产成本高 …… 197
11.3.4 转基因动物的安全性问题…… 197
11.4 提高外源目的基因的整合效率和表达水平的方法…… 198
11.4.1 外源目的基因的整合效率和定位…… 198
11.4.2 外源目的基因的高效表达及调控元件…… 199
11.5 转基因动物乳腺生物反应器…… 200
11.6 转基因动物的应用…… 201
11.6.1 建立诊断和治疗人类疾病的动物模型…… 201
11.6.2 用转基因动物生产药用蛋白…… 201
11.6.3 生产可用于人体器官移植的动物器官…… 202
11.6.4 基因动物在培养家畜新品种方面的应用…… 202
11.6.5 展望…… 202

第 12 章 转基因生物安全 …… 204

12.1 基因工程实验室安全性的基本要求…… 204
12.1.1 基因工程实验室重组 DNA 存在的潜在危害 …… 204
12.1.2 基因工程安全等级的划分及安全控制措施…… 205
12.2 基因工程产品释放的规则及要求…… 206
12.2.1 基因工程药物投放的规则和要求…… 206
12.2.2 转基因植物品种的释放要求…… 207
12.2.3 ISO 认证…… 208
12.3 现代生物技术专利…… 208
12.4 基因工程产品的安全性问题…… 210
12.4.1 环境安全性…… 210
12.4.2 转基因食品安全性问题…… 212

主要参考文献…… 214

第1章

基因工程概述

人们对基因的认识经历了长时间的发展过程，而且随着生命科学的发展，基因的概念还在不断深化。

19世纪中叶，Gregor Mendel通过阐明分离和独立分配规律来解释生物性状的遗传现象，提出了遗传因子(hereditary factor)的概念，他将控制豌豆性状的遗传因素称为遗传因子，形成了基因的雏型。1909年，丹麦遗传学家W. Johanssen根据希腊语“给予生命”之义，创造了“gene”一词。之后，随着T.H.Morgan、O.T.Avery、J.Watson和F.Crike等人的工作，人们对基因的概念逐渐形成。基因(gene)是一段可以编码具有某种生物学功能物质的核苷酸序列。基因的研究为基因工程的创立奠定了坚实的理论基础，基因工程的诞生是基因研究发展的必然结果；而基因工程技术的发展和应用，又深刻并有力地影响着基因的研究，使我们对基因的研究提到了空前的高度。随着研究的进一步深入，科学家提出了移动基因(又称为转位因子，transposable elements)、断裂基因(split gene)、假基因(pseudogene)、重叠基因(overlapping genes)或嵌套基因(nested genes)等基因的现代概念。

基因具有以下特点：① 不同基因具有相同的物质基础。原则上，所有生物的DNA都是可以重组互换的，因为地球上的一切生物，无论是高等还是低等，它们的基因都是一个具有遗传功能的特定核苷酸序列的DNA片断，而所有生物的DNA结构都是一样的。有些病毒的基因定位在RNA上，但这些病毒RNA可以通过反转录产生cDNA，并不影响不同基因的重组互换。② 基因是可以切割的。基因在染色体上的存在形式是直线排列。大多数基因彼此之间存在着间隔，少数基因是重叠排列的。③ 基因是可以转移的。生物体内有的基因是可以在染色体上移动的，甚至可以在不同的染色体上跳跃，插入到靶DNA分子中。基因在转移的过程中就完成了基因间的重组。④ 多肽与基因之间存在对应关系。现在普遍认为，一种多肽就有一种相对应的基因。因此，基因的转移或重组可以根据其表达产物多肽的性质来检查。⑤ 遗传密码是通用的。一系列的三联密码子(除极少数外)同氨基酸之间的对应关系，在所有生物中都是相同的。⑥ 基因可以通过复制把遗传信息传递给下一代。经重组的基因一般来说是能传代的，可以获得相对稳定的转基因生物。

1.1 基因工程的定义

基因工程(genetic engineering)也叫基因操作、遗传工程或重组 DNA 技术,是按着人们的科研或生产需要,在分子水平上,用人工方法提取或合成不同生物的遗传物质(DNA 片段),在体外切割、拼接形成重组 DNA,然后将重组 DNA 与载体的遗传物质重新组合,再将其引入到没有该 DNA 的受体细胞中,进行复制和表达,生产出符合人类需要的产品或创造出生物的新性状,并使之稳定地遗传给下一代。广义的基因工程,是指 DNA 重组技术的产业化设计与应用,分为上游和下游技术。上游技术包括外源基因重组、克隆和表达的设计与构建,即狭义的基因工程。下游技术包括含有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的表达、分离、纯化过程。按目的基因的克隆和表达系统的不同,基因工程分为原核生物基因工程、酵母基因工程、植物基因工程和动物基因工程。

基因工程有两个重要的特征,一是可以通过一定的技术手段把来自供体的基因转移到受体细胞中,因此可以实现按照人们的愿望,改造生物的遗传特性,创造出生物的新性状;二是某一段 DNA 可在受体细胞内进行复制,为准备大量纯化的 DNA 片段提供了可能,拓宽了分子生物学的研究领域。

1.2 基因工程的诞生和发展

1.2.1 基因工程的诞生

由于分子生物学和分子遗传学发展的影响,基因分子生物学的研究也取得了前所未有的进步,为基因工程的诞生奠定了坚实的理论基础。这些成就主要包括 3 个方面:第一,在 20 世纪 40 年代确定了遗传信息的携带者,即基因的分子载体是 DNA 而不是蛋白质,从而明确了遗传的物质基础问题;第二,是在 20 世纪 50 年代揭示了 DNA 分子的双螺旋结构模型和半保留复制机制,解决了基因的自我复制和传递的问题;第三,是在 20 世纪 50 年代末和 60 年代初,相继提出了中心法则和操纵子学说,并成功地破译了遗传密码,从而阐明了遗传信息的流向和表达问题。随着 DNA 的内部结构和遗传机制的秘密一点一点呈现在人们的眼前,特别是当人们了解到遗传密码是由信使 RNA 转录表达以后,生物学家不再仅仅满足于探索、揭示生物遗传的秘密,而是开始跃跃欲试,设想在分子水平上去干预生物的遗传特性。如果将一种生物的 DNA 中的某个遗传密码片断连接到另外一种生物的 DNA 链上去,将 DNA 重新组织一下,不就可以按照人类的愿望,设计出新的遗传物质并创造出新的生物类型吗?这与过去培育生物新品种的传统做法完全不同,它很像技术科学的工程设计,即按照人类的需要把这种生物的这个“基因”与那种生物的那个“基因”重新“施工”,“组装”成新的基因组合,创造出新的生物。这种完全按照人的意愿,由重新组装基因到新生物产生的生物科学技术,就被称为“基因工程”,或者称为“遗传工程”。

由于基因工程是一门内容广泛、综合性的生物技术学科,在 20 世纪 60 年代科学发展的水平下真正实施基因工程,还存在许多问题,特别是在技术方面。生物有机体,尤其是具有复杂结构的真核生物,其 DNA 含量是十分庞大的。首先要解决的是 DNA 核苷酸序列的整体结构问题,能否有效地分离单基因,以实现在体外对它的结构与功能进行深入的研究,是进行基因

操作的重要环节。在20世纪70年代两项关键技术(DNA分子的切割与连接技术、DNA的核苷酸序列分析技术)从根本上解决了DNA的结构分析问题。基因操作的第二大技术是载体的使用。在20世纪70年代,将外源DNA分子导入大肠杆菌的转化获得成功,1972年美国斯坦福大学的S. Cohen等人报道,经氯化钙处理的大肠杆菌细胞同样也能够摄取质粒的DNA。从此,大肠杆菌便成了分子克隆的良好的转化受体。不到四年,世界上第一家基因工程公司"Genetech"注册登记,意味着基因工程的实际应用已跨入商业运作的门槛。随着1970年逆转录酶的发现,无论在理论上还是技术上都已经具备了开展DNA重组工作的条件。1972年,美国斯坦福大学的P. Berg博士领导的研究小组,率先完成了世界上第一次成功的DNA体外重组实验,并提出了体外重组的DNA分子进入宿主细胞的过程,以及在其中进行复制和有效表达等问题。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,这对于DNA片断的分离、检测十分有用,并很快被应用于基因操作实验。1973年,Cohen等首次完成了重组质粒DNA对大肠杆菌的转化,同时与S. Boyer合作,将非洲爪蟾含核糖体基因的DNA片段与质粒pSC101重组,转化大肠杆菌,转录出相应的mRNA。此研究成果表明基因工程已正式问世,并说明了质粒分子可以作为基因克隆的载体能携带外源基因导入宿主细胞,也说明了真核生物的基因可以转移到原核生物细胞中并在其中实现功能表达。

1.2.2　基因工程的发展

自基因工程问世以后的这二十几年是基因工程迅速发展的阶段。如果说20世纪八九十年代是基因工程基础研究趋向成熟,那么21世纪初将是基因工程应用研究的鼎盛时期。基因工程诞生和发展大事记见表1.1所示。

表1.1　基因工程诞生和发展大事记

时　间	事　件
1866年	提出了遗传因子(hereditary factor)的概念
1909年	创造了"gene"一词
1910年	发现了连锁交换定律并提出遗传粒子学说
1944年	首次证实遗传物质的基础是DNA,基因位于DNA上
1953年	创立DNA双螺旋模型
1955年	正式使用"顺反子(cristron)"这个术语
1956年	发现DNA聚合酶I
1960年	提出了操纵元(操纵子)的概念
1967年	发现了DNA连接酶
1970年	发现T4DNA连接酶具有更高的连接活性
1972年	发现*Eco*R I核酸内切限制酶
1972年	发现经氯化钙处理的大肠杆菌细胞同样也能够摄取质粒的DNA
1972年	完成了世界上第一次成功的DNA体外重组实验
1973年	完成DNA的切割与连接

续 表

时 间	事 件
1977 年	提出了基因测序方法
1978 年	人重组胰岛素被生产
1980 年	将 α-干扰素基因成功引入细菌
1981 年	首个转基因小鼠完成
1982 年	大鼠生长激素基因转入小鼠
1983 年	Ti 质粒导入植物细胞,完成首个植物转基因
1984 年	获得人重组白细胞介素-2(IL-2)
1990 年	腺苷脱氨酶(ADA)基因治疗重度联合免疫缺陷症(SDID)
1991 年	提出人类基因组计划,计划利用 15 年时间,投入 30 亿美元
1995 年	嗜血流感菌 *Hemophilus influenzae* 全基因序列测定首次完成
1997 年	完成首个从体细胞克隆的动物:“多莉”绵羊
1998 年	首个动物基因组完成测序:线虫(*C. elegans*)
2000 年	首个植物基因组图谱:拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)
2001 年	首个粮食作物基因组图谱:水稻(*Oryza Sativa* L.)
2002 年	人类基因组草图完成

1.3 基因工程研究的主要内容

1.3.1 基因工程的基本过程

对于整个基因操作过程来讲,目的基因的获取是关键,它直接涉及产物,而且还影响到产物的量。在基因操作过程中,目的基因是很难获得的,所以通常采取先生成基因文库的方法,然后从基因文库中筛选。如果目的基因的序列以及它的调控等信息很清楚,可以直接通过 PCR 或 cDNA 获取,这样就大大减少了选择目的基因的盲目性。基因工程主要包括以下过程:

(1)材料准备:包括目的基因的制备、受体细胞(宿主)的准备;

(2)制备重组载体 DNA:包括选择合适的载体,用限制性内切酶分别将外源 DNA 和载体分子切开,将目的基因与载体于体外重组,形成重组载体 DNA 分子;

(3)重组的 DNA 分子引入受体细胞,并建立起无性繁殖系;

(4)筛选出所需要的无性繁殖系,并保证外源基因在受体细胞中稳定遗传、正确表达;

(5)表达的外源蛋白的分离纯化。

概括地说,基因工程的过程包括目的基因的获得、载体制备、重组体制备、基因转移、基因表达、产品分离纯化等。