

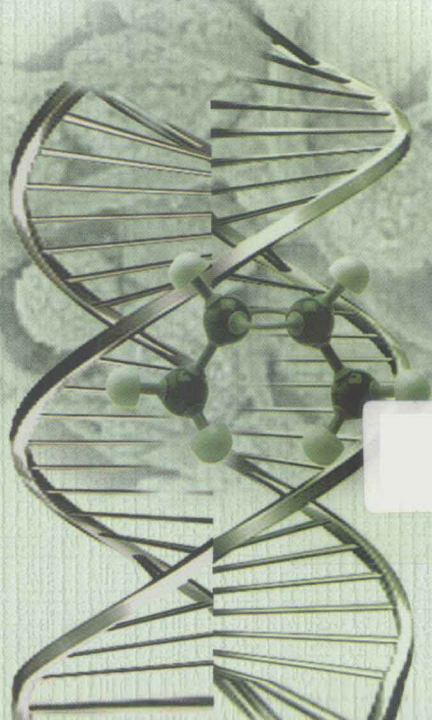


西安交通大学本科“十二五”规划教材

基因工程学原理

(第3版)

马建岗 编著



西安交通大学出版社
XI'AN JIAOTONG UNIVERSITY PRESS



西安交通大学 本科“十二五”规划教材

基因工程学原理

(第3版)

马建岗 编著



西安交通大学出版社
XI'AN JIAOTONG UNIVERSITY PRESS

内 容 简 介

本书较为全面、系统地阐述了基因工程的基本理论和基本概念,并力求反映该学科的最新进展。全书共14章,包括基因工程的基础理论,如生物大分子、基因工程的工具酶、目的基因的获得、基因扩增、基因的体外重组、基因的转移与重组体的检测、克隆基因的表达;基因工程在不同领域的应用,如酵母菌的基因工程、植物的基因工程、哺乳动物的基因工程、医药工业的基因工程、遗传检测与基因治疗;以及基因工程与社会伦理道德等有关问题。

本书可作为生物工程专业基因工程课程的教材,也可供相关学科各专业的教师、学生和科研工作者参考。

图书在版编目(CIP)数据

基因工程学原理/马建岗编著. —3版. —西安:西安
交通大学出版社,2013.2
ISBN 978-7-5605-5036-7

I. ①基… II. ①马… III. ①基因工程 IV. ①Q78

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2013)第 018513 号

书 名 基因工程学原理(第3版)
编 著 马建岗
责任编辑 吴 杰

出版发行 西安交通大学出版社
(西安市兴庆南路10号 邮政编码 710049)
网 址 <http://www.xjtpress.com>
电 话 (029)82668357 82667874(发行中心)
(029)82668315 82669096(总编办)
传 真 (029)82668280
印 刷 陕西元盛印务有限公司

开 本 727mm×960mm 1/16 印张 22.5 字数 400千字
版次 2013年2月第1版 2013年2月第1次印刷
书 号 ISBN 978-7-5605-5036-7/Q·11
定 价 36.00元

读者购书、书店添货、如发现印装质量问题,请与本社发行中心联系、调换。
订购热线:(029)82665248 (029)82665249
投稿热线:(029)82665546 (029)82668502
读者信箱:xjtpress@163.com

版权所有 侵权必究

目 录

第 1 章 绪论

1.1 基因与基因工程	(1)
1.1.1 基因的概念	(1)
1.1.2 基因工程的诞生与发展	(3)
1.1.3 基因工程的研究内容	(4)
1.1.4 基因工程与生物工程的关系	(8)
1.2 基因工程的操作和应用	(9)
1.2.1 基因工程的操作流程	(9)
1.2.2 基因工程的应用	(9)
1.3 基因工程的安全性	(15)
1.3.1 基因工程的安全隐患	(15)
1.3.2 重组 DNA 研究的安全措施	(15)
1.3.3 转基因产品的消费安全性	(17)
思考题	(17)

第 2 章 生物大分子——核酸与蛋白质

2.1 核酸的结构与性质	(19)
2.1.1 核苷酸	(19)
2.1.2 DNA 的结构	(20)
2.1.3 RNA 的结构	(22)
2.1.4 核酸的性质	(24)
2.1.5 核酸的定量和纯度测定	(25)
2.2 蛋白质的结构和性质	(30)
2.2.1 蛋白质的一级结构	(30)
2.2.2 蛋白质的二级结构	(31)
2.2.3 蛋白质的三级结构	(33)
2.2.4 蛋白质的性质	(33)
2.3 基因的组织	(34)

2.3.1 原核生物基因的结构·····	(35)
2.3.2 真核生物基因的结构·····	(35)
2.4 大分子间的信息传导·····	(37)
2.4.1 DNA 的复制 ·····	(37)
2.4.2 遗传信息的转录·····	(38)
2.4.3 RNA 的翻译 ·····	(42)
思考题 ·····	(47)

第3章 基因工程的工具酶

3.1 限制性核酸内切酶·····	(48)
3.1.1 寄主的限制和修饰现象·····	(48)
3.1.2 限制性核酸内切酶的类型·····	(50)
3.1.3 限制性核酸内切酶的命名·····	(56)
3.1.4 影响限制性核酸内切酶活性的因素·····	(57)
3.1.5 限制性核酸内切酶对 DNA 的消化作用 ·····	(59)
3.1.6 限制性核酸内切酶反应的终止·····	(60)
3.2 DNA 修饰酶 ·····	(61)
3.2.1 核酸酶·····	(61)
3.2.2 聚合酶·····	(62)
3.2.3 修饰 DNA 分子末端的酶 ·····	(64)
3.3 DNA 连接酶 ·····	(65)
3.3.1 大肠杆菌和 T4 噬菌体的 DNA 连接酶 ·····	(65)
3.3.2 影响连接反应的因素·····	(67)
思考题 ·····	(68)

第4章 目的基因的获得

4.1 从基因组 DNA 中获得目的基因 ·····	(70)
4.1.1 碱抽提法提取质粒 DNA ·····	(70)
4.1.2 层析法获得细胞总 RNA ·····	(74)
4.2 从基因文库中筛选目的基因·····	(75)
4.2.1 基因组文库的构建·····	(75)
4.2.2 cDNA 文库的构建·····	(78)
4.3 化学法合成目的基因·····	(84)

4.3.1	磷酸二酯法	(84)
4.3.2	亚磷酸三酯法	(84)
4.3.3	寡核苷酸的连接	(86)
4.4	通过 PCR 获得目的基因	(87)
	思考题	(87)

第 5 章 基因扩增

5.1	PCR 技术	(89)
5.1.1	PCR 技术的发明	(89)
5.1.2	PCR 技术的原理	(90)
5.1.3	PCR 技术的特点	(92)
5.2	聚合酶链式反应的最适条件	(93)
5.2.1	Taq DNA 聚合酶	(93)
5.2.2	引物	(98)
5.2.3	模板	(101)
5.2.4	dNTP	(102)
5.2.5	Mg ²⁺ 浓度	(102)
5.2.6	PCR 系统中的其他成分	(102)
5.2.7	PCR 的热循环计划	(102)
5.3	聚合酶链式反应技术的应用	(104)
5.3.1	基因克隆	(104)
5.3.2	反向 PCR 与染色体步移	(105)
5.3.3	不对称 PCR 与 DNA 序列测定	(106)
5.3.4	RT-PCR 与 RNA 分析	(108)
5.3.5	实时定量 PCR 与基因表达分析	(109)
	思考题	(110)

第 6 章 基因的体外重组

6.1	基因克隆策略	(111)
6.2	克隆载体	(112)
6.2.1	质粒载体	(112)
6.2.2	噬菌体载体	(128)
6.2.3	柯斯质粒载体	(144)

6.2.4 人工染色体载体	(148)
6.3 DNA 的连接	(152)
6.3.1 DNA 片段在体内和体外的连接——黏性末端的连接	(152)
6.3.2 平齐末端的连接	(153)
6.3.3 TA 克隆	(158)
思考题	(160)

第 7 章 基因的转移与重组体的检测

7.1 重组体向寄主细胞的导入	(162)
7.1.1 重组体 DNA 分子的转化或转染	(162)
7.1.2 λ DNA 的体外包装	(164)
7.1.3 体外包装的 λ 噬菌体的转导	(166)
7.2 重组体克隆的筛选与鉴定	(168)
7.2.1 遗传检测法	(169)
7.2.2 物理检测法	(175)
7.2.3 核酸杂交筛选法	(176)
7.2.4 免疫化学检测法	(179)
7.2.5 DNA-蛋白质筛选法	(185)
思考题	(185)

第 8 章 外源基因在原核细胞中的表达

8.1 原核生物基因表达的特点	(187)
8.2 原核基因表达的调控序列	(189)
8.3 原核表达载体	(195)
8.4 提高克隆基因表达效率的途径	(198)
思考题	(208)

第 9 章 酵母的基因工程

9.1 酵母基因的克隆	(210)
9.1.1 酵母基因克隆载体——穿梭质粒	(211)
9.1.2 利用大肠杆菌突变互补法克隆酵母生物合成基因	(216)
9.1.3 用简单的互补法克隆酵母基因	(218)
9.2 以酵母为材料对真核生物功能的研究	(220)

9.2.1 酵母的同源重组	(220)
9.2.2 用酵母研究高等生物基因的信号通路	(224)
9.2.3 用酵母研究真核细胞核内小分子 RNA U2 的功能	(227)
9.2.4 用酵母研究真核细胞蛋白质-蛋白质相互作用	(228)
思考题	(229)

第 10 章 转基因植物

10.1 植株再生	(230)
10.1.1 植物在遗传工程方面的优缺点	(230)
10.1.2 原生质体再生植株	(231)
10.1.3 叶盘再生植株	(233)
10.2 植物基因转移的途径	(234)
10.2.1 土壤农杆菌的 Ti 质粒引起冠瘿瘤	(234)
10.2.2 Ti 质粒的 T-DNA 部分转移至植物细胞	(235)
10.2.3 T-DNA 经过改造后作为基因工程载体	(236)
10.2.4 植物基因转移的方式	(238)
10.2.5 用报告基因证明转移基因在植物组织中的表达	(241)
10.2.6 病毒作为植物基因转移的载体	(242)
10.2.7 用基因枪和电击法将 DNA 转移入植物细胞	(244)
10.2.8 用 DNA 包裹的粒子轰击可产生转基因细胞器	(245)
10.3 转基因植物基因的表达	(247)
10.3.1 植物表达抗感染的病毒外壳蛋白	(247)
10.3.2 植物表达微生物毒素以阻止昆虫蚕食	(249)
10.3.3 抗除草剂植物	(251)
10.3.4 转基因花卉植物	(253)
10.3.5 利用转基因植物生产有重要价值的蛋白质	(254)
思考题	(255)

第 11 章 哺乳动物细胞的基因工程与转基因动物

11.1 哺乳动物细胞的基因转移	(257)
11.1.1 永久性细胞系的建立与基因转移	(257)
11.1.2 哺乳动物细胞的选择性标记	(257)
11.1.3 哺乳动物细胞基因转移的途径	(259)

11.1.4	转基因哺乳动物细胞基因的表达	(266)
11.2	转基因小鼠	(276)
11.2.1	转基因小鼠的微注射途径	(276)
11.2.2	转基因小鼠的胚胎干细胞途径	(278)
11.2.3	转基因的组织特异性表达	(281)
11.2.4	转基因小鼠的应用	(281)
11.3	转基因家畜	(285)
11.3.1	重组牛生长激素促进动物泌乳和改善饲料利用率	(285)
11.3.2	转基因家畜	(286)
11.3.3	用转基因动物生产药物蛋白	(287)
11.3.4	通过转基因表达病毒外壳蛋白以保护家畜免受病毒感染	(289)
	思考题	(289)

第 12 章 基因工程与药物蛋白生产

12.1	利用基因工程技术生产胰岛素和生长激素	(291)
12.1.1	生产重组蛋白的表达系统	(291)
12.1.2	重组人胰岛素的产生	(292)
12.1.3	重组人生长激素的产生	(293)
12.2	利用基因工程技术生产疫苗和其他复杂蛋白质	(295)
12.2.1	乙型肝炎病毒疫苗的生产	(295)
12.2.2	用哺乳动物细胞大规模生产人的复杂蛋白质	(297)
12.3	利用基因工程技术生产抗体	(298)
12.3.1	单克隆抗体	(298)
12.3.2	对识别特异性抗原的抗体直接克隆和选择	(300)
12.3.3	单克隆抗体的人源化	(301)
12.3.4	双特异性抗体	(303)
12.3.5	小分子抗体	(304)
	思考题	(306)

第 13 章 基因诊断与基因治疗

13.1	基因诊断	(307)
13.1.1	基因诊断的特点和对象	(307)
13.1.2	基因诊断技术	(308)

13.1.3 基因诊断的应用示例.....	(311)
13.2 基因治疗.....	(313)
13.2.1 基因治疗的发展过程及基本策略.....	(313)
13.2.2 反义核酸技术与基因治疗.....	(318)
13.2.3 RNA 干扰与基因治疗	(321)
13.2.4 核酶与基因治疗.....	(323)
思考题.....	(328)
第 14 章 基因工程与社会伦理道德	
14.1 基因工程与宗教信仰和非政府组织的冲突.....	(329)
14.2 基因工程在医学领域的伦理道德问题.....	(330)
14.3 基因工程技术本身的社会伦理道德问题.....	(331)
14.3.1 转基因食品的安全问题.....	(332)
14.3.2 转基因的环境安全问题.....	(334)
14.3.3 克隆技术的安全问题.....	(334)
14.3.4 基因工程的其他社会和伦理道德问题.....	(335)
思考题.....	(336)
参考文献	(337)

控制性状的遗传因素称为遗传因子,并且用大写字母代表显性性状,用小写字母表示隐性性状。虽然当时孟德尔对遗传的物质基础一无所知,但事实上他所讲的遗传因子已经形成了基因的雏形。时至今日,在遗传学的分析上我们还经常用这些字母来表示所分析的基因。

1909年,丹麦的遗传学家 W. L. Johanssen 首次提出用“gene”来代替孟德尔的遗传因子(我国著名遗传学家谈家桢先生首先将“gene”翻译为“基因”),提出了基因型与表现型的区别,指出前者是一个生物的基因成分,后者是这一基因表现的性状。当时提出的基因概念仅仅是一代表遗传性状符号的改变,并未涉及遗传的物质概念。

1910年以后,美国遗传学家以果蝇为材料进行杂交实验,第一次把代表某一个性状的特定基因与某一特定染色体上的特定位置联系起来,发现了连锁交换定律。摩尔根(T. H. Morgan)提出了遗传粒子理论,认为基因是一粒一粒在染色体上呈直线排列的,且互不重叠,就像连在线上的佛珠一样。摩尔根理论的重要性在于基因已不再是一个抽象的符号,而是与染色体紧密相关的一个实体。

20世纪40年代初,物理学家和化学家把研究方向转移到对基因本质问题的探讨上。1944年,O. Avery等首次证实遗传的物质基础是DNA,把基因位于染色体上的理论进一步推进到基因位于DNA上。1953年,J. Watson和F. Crick提出了DNA双螺旋结构模型,这时,人们接受了基因是具有一定遗传效应的DNA片段的概念。

1955年,S. Benzer基于T4噬菌体的顺反互补试验,提出了顺反子的概念。过去人们认为基因是三合一体,即既是一个功能单位,也是一个突变单位和一个交换单位。S. Benzer通过研究证实,一个基因内部的许多位点可以发生突变,并且可以在这些位点之间发生交换,说明一个基因并不是一个突变单位或一个交换单位。实际上顺反子要比突变单位或重组单位大得多。一个顺反子内部可以发生突变或重组,即包含着许多突变子和重组子。到此为止,已经从功能单位的意义上把顺反子和基因统一起来了,顺反子实际上成为基因的同义词。

20世纪60年代,法国遗传学家F. Jacob和J. Monod在研究细菌基因调控中证实:基因是可分的,功能上是有差别的,即既有决定合成某种蛋白质的结构基因,又有阻遏或激活结构基因转录和合成蛋白质的调节基因,还有其他无翻译产物的基因。操纵基因的发现修正了一个基因就有一条多肽,或决定一个蛋白质功能的结构单位的说法,同时也提出了顺反子代替基因概念的不确切性。

20世纪70年代以后,人们陆续发现了断裂基因、重叠基因、跳跃基因,对基因的认识更进一步深化。

科学家们在比较 DNA 序列与相应的 mRNA 序列以后发现:一个基因往往由几个互不相邻的段落组成;它的内部还包含一段或几段最终不相应出现在成熟 mRNA 中的片段,这些不相应出现在成熟 mRNA 中的片段称为内含子,而相应出现在成熟 mRNA 中的片段则称为外显子;有时一个基因可被几百个至几千个碱基所间隔,经过转录加工后在成熟的 mRNA 中这些碱基被除去。在珠蛋白基因、卵清蛋白基因、rDNA、tRNA 等的基因中均发现了这种间隔的片段。

1977 年, F. Sanger 在测定噬菌体 Φ X174 全部核苷酸序列时发现 D 基因中包含着基因 E。基因 E 的第一个密码子从基因 D 的中央一个密码子 TAT 的中间开始,因此,两个部分重叠的基因所编码的两个蛋白质大小不等,氨基酸的组成也不同。

可移动遗传因子(mobile genetic element)的发现动摇了基因是带有一定遗传信息的稳定结构的概念,使人们认识到也有跳跃的遗传因子。

综上所述,我们对基因的认识可以肯定以下几点:基因是实体,它的物质基础是 DNA(或 RNA)。基因是具有一定遗传效应的 DNA 分子中的特定核苷酸序列。基因是遗传信息传递和性状分化发育的依据。基因是可分的。根据基因的产物可将其分为编码蛋白质的基因(包括编码酶和结构蛋白的结构基因以及编码作用于结构基因的阻遏蛋白或激活蛋白的调节基因),无翻译产物的基因(如转录成为 RNA 以后不再翻译成为蛋白质的转运核糖核酸 tRNA 基因和核糖体核酸 rRNA 基因)以及不转录的 DNA 区段(如启动区、操纵基因等)。概括说来,基因是一个含有特定遗传信息的核苷酸序列,它是遗传物质的最小功能单位。

1.1.2 基因工程的诞生与发展

基因工程是在生物化学、分子生物学和分子遗传学等学科的研究成果基础上逐步发展起来的。基因工程的诞生与发展大致可分为以下三个阶段。

1. 基因工程的准备阶段

理论上的准备:上述基因概念的确立及其发展,特别是 1944 年细菌转化研究,证明 DNA 是基因载体;1953 年 DNA 双螺旋模型的建立;1958 年至 1971 年先后确立了中心法则,破译了 64 种密码子,成功地揭示了遗传信息的流向和表达问题。这些研究成果为基因工程问世提供了理论上的准备。

技术上的准备:20 世纪 60 年代末至 70 年代初,限制性核酸内切酶和 DNA 连接酶等的发现使 DNA 分子进行体外切割和连接成为可能。1972 年首次构建了一个重组 DNA 分子,提出了体外重组的 DNA 分子是如何进入宿主细胞,并在其中进行复制和有效表达等问题。经研究发现,质粒分子(DNA)是承载外源 DNA 片

段的理想载体,病毒、噬菌体的 DNA(或 RNA)也可改建成载体。至此,基因工程问世在技术上的准备已完成。

2. 基因工程问世

在理论上和技术上有了充分准备后,1973 年,S. Cohen 等人首次完成了重组质粒 DNA 对大肠杆菌的转化,同时又与他人合作,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,不仅宣告质粒分子可以作为基因克隆载体,能携带外源 DNA 导入宿主细胞,并且证实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。

3. 基因工程的迅速发展阶段

自基因工程问世后的二十年间是基因工程迅速发展的阶段。不仅发展了一系列新的基因工程操作技术,构建了多种供转化(或转导)原核生物和动物、植物细胞的载体,获得了大量转基因菌株,而且于 1980 年首次通过显微注射培育出世界上第一个转基因动物——转基因小鼠,1983 年采用农杆菌介导法培育出世界上第一例转基因植物——转基因烟草。基因工程基础研究的进展,推动了基因工程应用的迅速发展。用基因工程技术研制生产的贵重药物至今已上市的有 50 种左右,上百种药物正在进行临床试验,更多的药物处于前期实验室研究阶段。转基因植物的研究也有很大的进展,自从 1986 年首次批准转基因烟草进行田间试验以来,至 1994 年 11 月短短几年,全世界批准进行田间试验的转基因植物就有 1467 例。又过 4 年,至 1998 年 4 月已达 4387 项。转基因动物研究的发展虽不如转基因植物研究的发展那样快,但也获得了转生长激素基因鱼、转生长激素基因猪和抗猪瘟病转基因猪等。

如果说 20 世纪 80~90 年代是基因工程基础研究趋向成熟,应用研究初露锋芒的阶段,那么 21 世纪初将是基因工程应用研究的鼎盛时期,农、林、牧、渔、医的很多产品上都会打上基因工程的标记。

1.1.3 基因工程的研究内容

基因工程问世以来,研究人员始终十分重视基础研究,包括构建一系列克隆载体和相应的表达系统,建立不同物种的基因组文库和 cDNA 文库,开发新的工具酶,探索新的操作方法等,在各方面取得了丰硕的研究成果,使基因工程技术不断趋向成熟。

1. 基因工程克隆载体的研究

基因工程的发展是与克隆载体构建密切相关的,由于最早构建和发展了用于原核生物的克隆载体,所以以原核生物为对象的基因工程研究首先得以迅速发展。Ti质粒的发现以及成功构建了Ti质粒衍生的克隆载体后,植物基因工程研究随之迅速发展起来。动物病毒克隆载体的构建成功,使动物基因工程研究也有一定的进展。可以说构建克隆载体是基因工程技术路线中的核心环节。迄今为止已构建了数以千计的克隆载体。但是构建新的克隆载体仍是今后研究的重要内容之一。尤其是适用于高等动植物转基因的表达载体和定位整合载体还须大力发展。

2. 基因工程受体系统的研究

基因工程的受体与载体是一个系统的两个方面。前者是克隆载体的宿主,是外源目的基因表达的场所。受体可以是单个细胞,也可以是组织、器官、甚至是个体。用作基因工程的受体可分为两类,即原核生物和真核生物。

原核生物大肠杆菌是早期被采用的最好受体系统,应用技术成熟,几乎是现有一切克隆载体的宿主。以大肠杆菌为受体建立了一系列基因组文库和cDNA文库,以及大量转基因工程菌株,开发了一批已投入市场的基因工程产品。蓝细菌(蓝藻)是进行植物型光合作用的原核生物,兼具植物自养生长和原核生物遗传背景简单的特性,便于基因操作和利用光能进行无机培养。因此,近年来蓝细菌开始被用作廉价高效表达外源目的基因的受体系统。

酵母菌是十分简单的单细胞真核生物,具有与原核生物很多相似的性状。酵母菌营异养生长,便于工业化发酵;基因组相对较小,有的株系还含有质粒,便于基因操作。因此酵母菌是较早被用作基因工程受体的真核生物。有人把酵母菌同大肠杆菌一起看作是第一代基因工程受体系统。酵母菌不仅是外源基因(尤其是真核基因)表达的受体,建立了一系列工程菌株,而且成为当前建立人和高等动物、植物复杂基因组文库的受体系统。真核生物单细胞小球藻和衣藻也被用于研究外源基因表达的受体系统。

随着克隆载体的发展,迄今高等植物也已用作基因工程的受体,一般用其愈伤组织、细胞和原生质体,也用部分组织和器官。目前用作基因工程受体的植物有双子叶植物拟南芥、烟草、番茄、棉花等,单子叶植物水稻、玉米、小麦等,并已获得了相应的转基因植物。

动物鉴于体细胞再分化能力差,目前主要以生殖细胞或胚细胞作为基因工程受体,获得了转基因鼠、鱼、鸡等动物。动物体细胞也用作基因工程受体,获得了系列转基因细胞系,用作基础研究材料,或用来生产基因工程药物。随着克隆羊的问

世,对动物体细胞作为基因工程受体的研究越来越被重视,将成为21世纪初重要研究课题之一。

人的体细胞同样可作为基因工程的受体,转基因细胞系用于疾病研究。近年来还有研究以异常生长的细胞作为受体,通过转基因使其回复正常生长状态(基因治疗)。

3. 目的基因的研究

基因是一种资源,而且是一种有限的战略性资源。因此开发基因资源已成为发达国家之间激烈竞争的焦点之一,谁拥有基因专利多,谁就在基因工程领域占主导地位。基因工程研究的基本任务是开发人们特殊需要的基因产物,这样的基因统称为目的基因。具有优良性状的基因理当然是目的基因。而致病基因在特定情况下同样可作为目的基因,具有很大的开发价值。即使是那些今天尚不清楚功能的基因,随着研究的深入,也许以后将会成为具有很大开发价值的目的基因。

获得目的基因的途径很多,主要是通过构建基因组文库或 cDNA 文库,从中筛选出特殊需要的基因。近年来也广泛使用 PCR 技术直接从某生物基因组中扩增出需要的基因。对于较小的目的基因也可用人工化学合成。现在已获得的目的基因大致可分为三大类:第一类是与医药相关的基因;第二类是抗病虫害和恶劣环境的基因;第三类是编码具特殊营养价值的蛋白或多肽的基因。

近年来越来越重视基因组的研究工作,试图搞清楚某种生物基因组的全部基因,为全面开发各种基因奠定基础。据统计,至1998年完成基因组测序的生物有11种,如嗜血流感杆菌(1 830 137 bp, 1 743 个基因),产甲烷球菌(1 664 976 bp, 1 682 个基因),大肠杆菌 K-12(4 639 221 bp, 4 288 个基因),啤酒酵母(12×10^6 bp, 5 882 个基因),枯草杆菌(4.21×10^6 bp, 4 100 个基因)等。

早在20世纪80年代就有人对人类基因组产生了兴趣,提出人类基因组研究计划。从1990年开始,先后由美国、英国、日本、德国、法国等国实施“人类基因组计划”,我国于1999年9月也获准参加这一国际性计划,在北京和上海分别成立了人类基因组研究中心,承担人类基因组1%的测序任务。这些国家聚集了一批科技人员,经过十年的辛勤工作,于2000年6月宣告人类基因组“工作框架图”已经绘制完毕。同时已破译了近万个基因。至1999年,美国对6500个人类基因提出了专利申请。一般认为人类基因组含有数万个基因,各司其职,控制着人的生长、发育、繁殖。一旦人类基因组全部被破译,就可了解人类几千种遗传性疾病的病因,为基因治疗提供可靠的依据,并且将保证人类的优生优育,提高人类的生活质量。

除“人类基因组计划”以外,我国还实施了“水稻基因组计划”。以稻米为主食

我国早在1992年8月正式宣布实施“水稻基因组计划”，并且是目前国际“水稻基因组计划”的主要参加者。2001年10月12日，中国科学院、国家计委、科技部联合召开新闻发布会，宣布具有国际领先水平的中国水稻基因组“工作框架图”和数据库在我国已经完成。这一成果标志着我国已成为继美国之后，世界上第二个能够独立完成大规模全基因组测序和组装分析能力的国家，表明我国在基因组学和生物信息学领域不仅掌握了世界一流的技术，而且具备了组织和实施大规模科研项目开发的能力。籼稻全基因组“工作框架图”的完成，将带动小麦、玉米等所有粮食作物的基础与应用研究。

此外，中国、美国合作的“家猪基因组计划”也已接近完成。

4. 基因工程工具酶的研究

基因工程工具酶指体外进行DNA合成、切割、修饰和连接等系列过程中所需要的酶，包括DNA聚合酶、限制性核酸内切酶、修饰酶和连接酶等。

限制性核酸内切酶用于有规律地切割DNA，把提供的DNA原材料切割成具有特定末端的DNA片段。现已从不同生物中发现和分离出上千种限制性核酸内切酶，基本上可满足按不同目的切割各种DNA分子的需要。

耐热性限制性核酸内切酶和长识别序列稀切酶仍是当前研究的热门课题。

DNA连接酶用于连接各种DNA片段，使不同基因重组。现在常用的DNA连接酶只有两种，即大肠杆菌DNA连接酶和T4 DNA连接酶，前者只能连接具有黏性末端的DNA片段；后者既能连接具有黏性末端的DNA片段，也能连接具有平齐末端的DNA片段。

DNA聚合酶用于人工合成引物、DNA小片段以及较小基因的DNA片段，还用于制备DNA探针。多种耐热性DNA聚合酶的发现使PCR技术迅速发展，给当今生命科学提供了先进的研究手段。

5. 基因工程新技术的研究

围绕外源基因导入受体细胞，发展了一系列用于不同类型受体细胞的DNA转化方法和病毒转导方法，特别是近年来研制的基因枪和电激仪克服了某些克隆载体应用的物种局限性，提高了外源DNA转化的效率。

围绕基因的检测方法，在放射性同位素标记探针的基础上，近年来又发展了非放射性标记DNA探针技术和荧光探针技术，如生物素标记DNA探针、地高辛标记DNA探针、荧光素标记DNA探针等。

PCR技术的发展不仅大大提高了基因检测的灵敏度，而且为分离基因提供了快速简便的途径。PCR技术自从1985年建立以来，发展很快，除一般采用的常规

PCR 技术外,还发展了多种特殊的 PCR 技术,如长片段 PCR 技术、反转录 PCR 技术、免疫 PCR 技术、嵌套引物 PCR 技术、反向 PCR 技术、标记 PCR 技术、复合 PCR 技术、不对称 PCR 技术、定量 PCR 技术、锚定 PCR 技术、重组 PCR 技术、加端 PCR 技术,等等。

凝胶电泳技术可以在凝胶板上把不同分子大小的 DNA 分子或 DNA 片段分开,但是只能分辨几万碱基的 DNA 分子或片段。脉冲电泳技术的问世,不仅能分开上百万碱基的 DNA 分子或片段,而且能够使完整的染色体彼此分开。

1.1.4 基因工程与生物工程的关系

生物工程亦称生物技术,是 20 世纪 70 年代初在分子生物学、细胞生物学和遗传学基础上发展起来的一个新兴领域。它主要包括以下 5 个方面。

(1)基因工程 对不同生物的遗传物质——基因,在体外进行剪切、组合和拼接,使遗传物质重新组合,然后通过载体(质粒、噬菌体或病毒等)转入微生物、植物或动物细胞内,进行无性繁殖,并使所需要的基因在细胞中表达,产生出人类所需要的产物或组成成新的生物类型。

(2)细胞工程 包括细胞融合、细胞大规模培养以及植物组织培养快速繁殖技术。细胞融合技术是指将两种不同种类的细胞,通过化学、生物学或物理学手段使之融合在一起,从而产生出兼备两个亲本遗传特性的新的细胞。细胞大规模培养技术是以工业化生产为目的,摆脱气候、产地、季节的限制,从大量培养的细胞中获得药物或其他有用物质。植物组织培养快速繁殖技术是利用植物细胞的全能性由扩增的细胞分化再生成植株,这样就有可能用细胞器官和组织的再生苗来代替种子实生苗,无限地扩大繁殖系数。

(3)酶工程 包括酶的生产应用、酶和细胞的固定化以及酶的分子修饰技术。酶是生物体内产生的具有催化作用的蛋白质。其催化效率超出化学催化千百倍,而且是在常温、常压下进行,专一地催化某一反应。所谓酶工程,就是在一定的生物反应器中,利用酶的催化作用将相应的原料转化成有用物质的技术。

(4)微生物发酵工程 包括菌种选育、菌体生产利用、代谢产物的生产利用以及微生物机能的利用技术。微生物发酵工程是利用微生物的特定性状,通过现代化工程技术,生产有用物质或直接应用于工业生产的一种技术体系。

(5)生化工程 包括生物反应器设计制造、传感器的研制以及产物的分离提取和精制技术。

以上 5 个方面的工程技术系统是相互依赖、相辅相成的,但在这些技术系统中,基因工程占主导地位。因为,只有用基因工程改造过的微生物和细胞,才能真