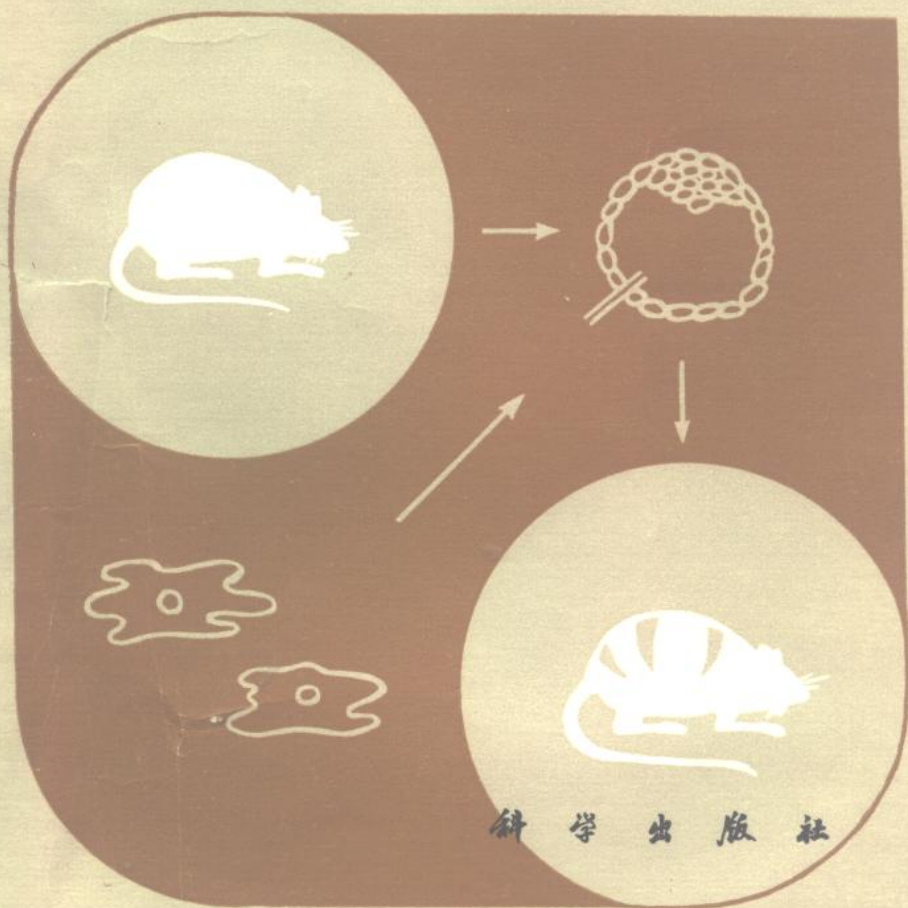


高等生物的遗传工程

〔英〕J. R. 瓦尔 著



高等生物的遗传工程

〔英〕J. R. 瓦尔 著

张任培 译

黄华標 校

科学出版社

1986

内 容 简 介

本书概述了近年来在高等动植物遗传工程方面的最新进展。作者深入浅出地介绍了将外源遗传物质导入动植物培养细胞和动植物体的几种途径,并对其应用前景和存在问题作出有信服力的分析。使读者不仅对这一领域所取进展有清晰的概念,同时也明确今后的研究方向。可供中学以上文化程度的读者及从事分子生物学、遗传学、细胞学、微生物学、医学、畜牧学和植物育种学的科研和教学人员参考。

Warr, J. Roger

GENETIC ENGINEERING IN HIGHER ORGANISMS

Edward Arnold (Australia) Pty Ltd 1984

中国科学院图书馆印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

1986年8月第一版 开本: 787×1092 1/32
1986年8月第一次印刷 印张: 2 1/2
印数: 00001—5,000 字数: 53,000

统一书号: 13031·3268

本社书号: 4972·13-10

定 价: 0.62 元

丛 书 前 言

鉴于当前已不再可能在一本教科书中既包括整个生物学领域，同时又充分地反映了它的最新成就，因此生物研究所计划出版这一丛书，以使教师和学生能够了解生物学中的若干重要进展。“生物学研究”丛书大受欢迎，这表明它正在向读者提供有关生物学中各个专题的权威性意见。

本丛书的特点是注重方法，选出可供进一步阅读的书目，以及尽可能对实际工作提出建议。

本研究所欢迎读者的批评。

生物研究所

伦敦，1984。

前 言

由于遗传学家们选用了极简单的生物进行工作,使得近年来分子遗传学得以迅速发展。又由于在技术上,处理细菌和病毒远比处理高等动植物要容易得多,因此研究工作一度集中于这些低等生物。然而,单细胞的原核生物和多细胞的真核生物之间,在分子生物学上存在着许多根本的差异,因此我们从集中于前者的工作中,仅能得到一个不完整的图象。所以,问题在于,是否存在将微生物遗传学技术应用于高等生物的途径?本书探讨了遗传学实验中,将动植物培养细胞作为“名誉微生物”使用的可能性,同时也探讨了在这些动植物细胞中产生遗传物质新的组合的几种方式。这些研究工作导致能够向整体动物和整株植物中导入新的遗传物质。这些方面的进展,不仅提供了有关高等生物的遗传学知识,而且对医学和农业也会有意义深远的影响。

感谢John Sparrow博士为本书手稿提供的建设性意见。

J. Roger Warr

1984.

目 录

丛书前言	(iii)
前言	(iv)
第一章 导言	(1)
1.1 遗传学中应用简单实验系统的趋势	(1)
1.2 微生物遗传学技术	(3)
1.3 细胞培养在遗传学和分子生物学中的 应用	(5)
第二章 哺乳动物细胞的杂交	(9)
2.1 细胞株中的突变体	(9)
2.2 细胞融合和杂种中的染色体丢失	(12)
2.3 人类基因定位	(16)
2.4 人类基因图的应用	(19)
第三章 利用细胞融合生产纯抗体	(20)
3.1 导言	(20)
3.2 杂交瘤的产生	(21)
3.3 单克隆抗体的某些应用	(23)
第四章 哺乳动物细胞摄入外源DNA	(27)
4.1 导言	(27)
4.2 哺乳动物细胞摄入染色体	(28)
4.3 哺乳动物细胞摄入DNA.....	(31)
4.4 转化在癌症研究中的应用.....	(33)
第五章 哺乳动物细胞的基因克隆	(37)
5.1 细菌的基因克隆	(37)

5.2	哺乳动物细胞摄入细菌质粒	(41)
5.3	在哺乳动物细胞中克隆基因的病毒 载体	(42)
5.4	在哺乳动物细胞中克隆基因的合成 载体	(44)
第六章	基因掺入动物体	(46)
6.1	导言	(46)
6.2	动物骨髓细胞的置换	(47)
6.3	将培养细胞掺入胚胎	(49)
6.4	利用病毒将DNA插入胚胎	(51)
6.5	利用显微注射将DNA插入胚胎	(52)
6.6	人类基因疗法的展望	(55)
第七章	植物细胞的遗传操作	(59)
7.1	植物细胞培养技术	(59)
7.2	再生植株的遗传变异性	(60)
7.3	在培养中直接筛选突变体	(62)
7.4	原生质体的融合	(64)
7.5	外源基因掺入植物体	(65)
参考文献		(70)
英汉术语对照 (包括拉丁学名)		(71)

第一章 导 言

1.1 遗传学中应用简单实验系统的趋势

凡是研究遗传学历史的学生都会立刻感觉到，遗传学家们越来越倾向于采用更为简单的生物作为研究材料。早期的遗传学家们对人类及其驯养的动植物感兴趣。但是，由于果蝇生活周期短，能够在给定的环境中繁殖大量后裔，在技术上，为人们提供了宝贵的有利条件，因而自1920年以来，引起了人们的广泛重视。出于同样的原因，自五十年代以来，许多遗传学家纷纷开始应用细菌及其病毒进行研究。目前，随着重组DNA技术（这一技术的许多工作都要对各种DNA分子进行操作）的建立，这种使用更简单的、技术上更方便的系统的趋势，还在继续发展。

这种转向选择简单实验系统去解决疑难问题的趋势，对遗传学家们来说，始终是很有价值的。毫无疑问，没有简单实验系统的有效利用，就没有分子遗传学近年来的发展。然而，应用这些简单系统进行工作，也有一个不利之处：即人们不再注意这样一些生物*，它们的集群社会作为一个整体是特别令人感兴趣的。

实际上，许多人可能更乐于研究人类和高等动植物的分子遗传学，而不是大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 的分子遗传学。这一偏爱的原因大致可以分为“应用上”的和“纯理

* 作者在此处指的可能是蜜蜂、蚂蚁等社会性昆虫。——译注

论”上的两大类。应用上的理由是显而易见、易于说明的。首先，高等动植物的分子遗传学方面的知识可能会对农业有深远的影响。考虑到世界人口的30%仍处于营养不良，寻找新的粮食增产途径，对于科学界来说，必然是至关紧要的事情。是否能够利用新的途径来处理家畜和农作物的遗传物质，从而增加它们的产量和抗病能力呢？又是否能够通过遗传修饰来改善作物的营养素质，例如：增加重要氨基酸的含量，从而提高植物蛋白的质量呢？

其次，对人类分子遗传学的进一步了解，会有助于对付某些类型的人类疾病。许多人类疾病带有遗传的成分，对它们的治疗方案，只能建立在对病因有正确了解的基础上。

至于为什么人们的注意力势必会移到高等生物的分子遗传学，还有一个重要的科学上的原因，即在现代生物学中，最引人注目的问题之一，就是要弄明白在发育过程中基因表达是如何调控的。弄清细菌中基因表达的调控，对研究高等生物确实提供了有价值的起点。但在近十年中，越来越清楚，原核生物和真核生物之间基因表达的调控有着根本的差异。概括地说，发育主要限于多细胞生物，也只有利用多细胞生物才能真正地研究发育。

尽管生物学研究是由对生物的好奇心所推动：细菌分子遗传学又是生物学中最吸引人的领域之一，但人类对自身和与己有关的物种具有特殊兴趣，这一本能的倾向依然是存在的。

我们怎样才能使人类和家养动植物的分子遗传学知识达到对细菌那样的深度呢？利用高等生物的培养细胞进行遗传学实验和操作，可以解决或至少部分解决这一问题。培养细胞的遗传学正在迅速发展，并在可预见的将来仍将保持这一势头。本书的目的，就是鸟瞰这一领域中几方面的发展，我

们会从中了解到，试图将微生物遗传学技术应用于高等生物遗传学的共同的基本途径。

某种基础知识或许是有用的。本章的其余两节，打算作为本书后续章节的开场白。

1.2 微生物遗传学技术

哪些微生物遗传学技术可以应用于培养中生长的动植物细胞呢？很明显，培养细胞没有任何形式的有性过程。因而也就不可能利用减数分裂中配子融合这一有性过程，来进行基本的遗传学分析。为了得到研究所需的遗传物质新组合，就必须找出某种替代性别的办法。

细菌遗传学家们面临着与三十年前相类似的问题。在任何形式的减数分裂中，细菌遗传物质在线状染色体中均是不分离的，并且“单倍体”配子也不融合形成“二倍体”后裔。不过，在细菌中还是有几种重要的、导致遗传物质交换的途径。

表1-1 在微生物中能够引起遗传物质交换并能用于动植物培养细胞的方法

细 菌	
转化	把游离DNA从供体细胞输入受体细胞
转导	通过病毒（细菌噬菌体）把DNA从供体细胞输入受体细胞
基因克隆	把DNA插入载体，然后载体插入细菌细胞。 载体是一种能够复制的小分子DNA
真 菌	
准性世代	菌丝体融合，随后核融合，后来在有丝分裂过程中染色体丢失

第一条交换途径是接合。接合时，一些遗传物质以线性DNA分子的形式从供体菌转到受体菌。尽管这并不涉及同型配子的融合，但可以把它看作有性过程。在动植物培养细胞中，没有与之对应的途径，因而也就不在本书中作进一步探讨了。

然而，另外两种在细菌中已经建立了很久的、导致遗传物质交换的途径，在培养细胞中可能有同样的价值。这两种细菌学技术称为转化和转导（表1-1）。转化时，DNA通过供体细胞裂解而释放出来，并被受体细胞摄入。若干细小的DNA片段可以掺入到受体DNA上。这样就改变了受体的基因型和表现型。细胞之间的接触并不是必需的。转导时，DNA在一个细菌病毒（通常称为细菌噬菌体或简称噬菌体）的蛋白质外壳内从供体菌带到受体菌。结果供体菌的DNA片段转移到受体菌内，从而导致后者基因型的改变。

第四种（也是最广为宣传的一种）在细菌中产生新的遗传物质组合的方法，是基因克隆。把长度不等的DNA（可以来自不相关的物种）插入到细菌内有复制能力的DNA分子（载体）中。载体既可以是称为质粒的染色体外环状DNA（见Day, 1982），也可以是病毒DNA。在实验室中，将外来的DNA（亦即要克隆的基因）插入载体的工作，是用切断和重接DNA分子的生物化学方法完成的，这些方法通常统称为“重组DNA技术”。由于载体复制自身及插入的DNA，因此用这种方法就能获得大量插入的DNA的拷贝（有时候还可以获得大量的由该DNA编码的蛋白质）。

最后一种在微生物中实现遗传交换的途径，完全不涉及细菌，而是在某些真菌，例如在构巢曲霉（*Aspergillus nidulans*）中发生的。它叫做准性世代（图1-1）。如果同一物种的两个遗传性相异的株系混合生长，这一过程就会开

始。菌丝体偶尔会融合产生出...的核共存于同一细胞质中。在异核体中，细胞核会融合成二倍染色体组。有各种方法可以用来分离发生上述过程的真菌培养物。曲霉正常的核是单倍体的，而核融合产生的新品系是二倍体的。这样的曲霉二倍体品系的染色体组是不稳定的，在有丝分裂时期（注意，不是减数分裂时期）有些染色体不能运动到两极，因而发生丢失，直至重新达到单倍染色体数目。这样得到的曲霉品系虽然在所包含的遗传物质总量上与原来亲代细胞相同，但却是以新的组合形式存在的。分析这些准性杂交的后裔，就能获得关于染色体上基因重排的资料。

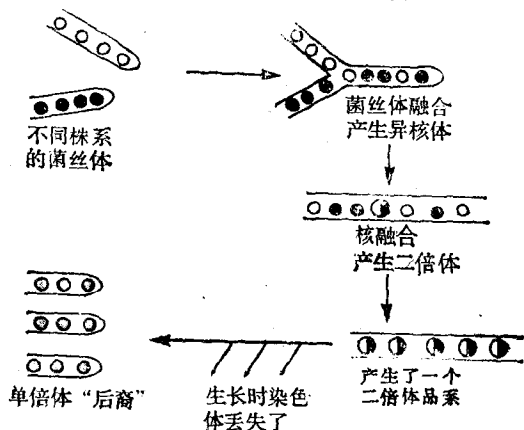


图1-1 曲霉 (*Aspergillus*) 中的准性世代 (详见正文)。

1.3 细胞培养在遗传学和分子生物学中的应用

把微生物遗传学技术应用于高等生物时，首先必须找到一些类似于在微生物中使用的操作细胞的方法。很幸运的

是,动植物细胞培养技术已经建立有一段时间了。本书中谈及的许多工作,就是将遗传学技术应用于培养细胞的。动植物细胞培养技术已由Sharp(1977), Butcher和Ingram (1976)作了综述。关于动物细胞培养的某些基本特点,将在后面章节论述;而有关植物细胞培养的某些特点,也将在第七章一开始就加以概述。

鉴别“原代的”和“确立的”动物细胞培养物之间的差异是重要的。细胞首次从人体或其它哺乳动物组织中分离出来,进入培养基后,它们通常经过大约20次分裂,就停止生长了。这些寿命有限的初始培养物就叫作原代培养细胞。原代培养细胞偶尔会产生一个寿命无限长的细胞株,它可以象微生物那样不断地继代培养。这就叫做确立的细胞培养物或细胞系。这也就是在第二、四、五章中将谈到的工作中,大多数人所使用的那一类培养物。关于原代细胞和确立的细胞培养物之间发生了什么性质的变化,现在还不清楚,它可能与癌细胞发生早期的某些特征相同。

应用细菌和应用确立的动物细胞培养物进行工作,它们之间有些相似和不同之处,也是值得注意的。两者之间最明显的差异是,在平皿培养时,细菌生长在凝固的琼脂培养基表面,而动物细胞却附着于液体培养基中的玻璃或塑料表面上生长。而且动物细胞的生长速度要低得多(加倍的时间为10—20小时,与此成为对照,在细菌却为20—60分钟),它们的培养基也必须丰富得多(主要是由于有外加的血清,其中含有若干难以说清楚的,但又为生长所必需的因子)。尽管如此,在很多情况下,可以把确立的细胞培养物当作细菌一样,进行操作和分离克隆(图1-2)。

遗传学家们一经认识到哺乳动物细胞能够象细菌那样进行操作,他们就开始探求在细胞系之间以某种杂交方式进行

遗传物质交换的可能途径。正如在1.1节中对细菌所论及的那样，这并不是简单地由两个单倍体配子融合就能做到的。现已清楚，有几种完全不同的方法，可以使培养细胞的遗传物质重新排列。这里将对某些主要的技术作扼要的概述。

(a) **细胞融合** 哺乳动物的培养细胞偶尔会发生融合，并经历一系列与曲霉的准性世代相当类似的变化(1.2节)。细胞融合之后，细胞核也会融合，其染色体数约为亲代细胞的二倍。如果是不同细胞系的细胞融合，便形成了杂种，在随后的有丝分裂中，某些染色体就会发生丢失，从而产生具有不同染色体组合的后裔克隆。研究这些后裔克隆，就能够对培养物进行某种方式的遗传分析。现在正利用这种方法，获得关于人类基因在染色体上排列的宝贵信息(第二章)。出于完全不同的原因，人们对某些类型产生抗体的细胞的融合，具有特殊的兴趣。这种由融合形成的杂种细胞系，能够产生大量高纯度的抗体。这一发现具有重要的医学意义(第三章)。

(b) **转化** 可以把DNA以纯DNA的形式或以分离的染色体的形式导入培养的动物细胞。这样就有了一种雷同于细菌转化的遗传学研究方法(1.2节)。现已证明，在一些基本的生物学问题研究中，转化是十分有用的。例如，人们正用它来鉴定人类的癌基因，现在普遍认为，这是多年来癌症研究中最有意义的进展(第四章)。

(c) **基因克隆** 可以用生物化学方法把基因插入到能在动物细胞里复制的载体DNA中。这就使得基因克隆的方法，能够用类似于细菌基因克隆的途径在动物细胞中实现。从而开辟了科学上和实践上的新天地(第五章)。

上述技术，都是在培养细胞中产生新的遗传组合的方法。近年来，人们对将新的遗传物质掺入整个动物体，甚而掺入

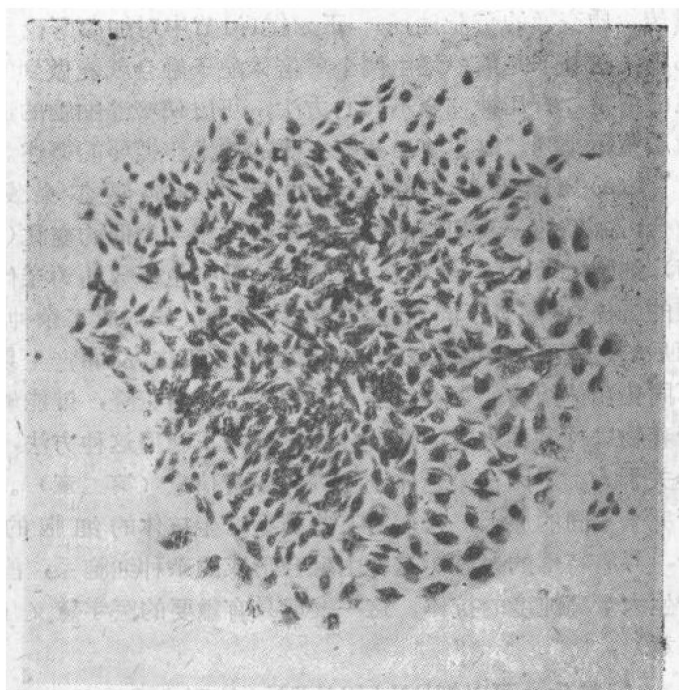


图1-2 一个在塑料培养皿中生长的中国仓鼠细胞克隆。这个克隆是由一个大约分裂了9次之后的细胞产生的。(蒙Mr M.Anderson, 允诺借用)。

人体的可能性越来越感兴趣。这对于动物育种可能会有重大影响，并可以想见，它会导致对人类的遗传疾病进行基因治疗（第六章）。

植物细胞培养物可以用几种方式操作。这些操作方式与在动物细胞遗传学中所使用的技术大致相同。但也有若干重要差别。最主要的差别是：经过操作的培养细胞能够再生出整个植株。这可能会对植物育种学家乃至对全世界的农业产生极深远的影响（第七章）。

第二章 哺乳动物细胞的杂交

2.1 细胞株中的突变体

为了对哺乳动物培养细胞进行遗传学分析，就必须有某些供研究用的突变体。如果所有的豌豆都是一样高，孟德尔在豌豆高度方面所进行的遗传学研究，就不会得到那么大的成就。他就是在作高豌豆和矮豌豆的杂交时，从高度性状上，开始捕捉到了与基因遗传方式有关的、令人感兴趣的信息。出于同样的原因，在讨论哺乳动物细胞的遗传操作时，也需要考虑细胞培养中有用的突变体的来源和性质。

在哺乳动物细胞遗传学中使用的许多突变体，都与细菌中所发现的那些突变体相类似。在这二者中，可能最易分离出的突变体，都是那些对特定药物增加了抗性的突变体（图2-1）。当把正常的“野生型”细胞接种在逐步提高浓度的药液中时，就可得到一条存活曲线。在培养中产生出自发突变体，它们可以在足以杀死“野生型”细胞的药物浓度下生长

（以 10^{-6} 左右的频率发生，如用化学诱变剂处理细胞，这一频率可能升高）。因此，只要简单地将大量的细胞（约 10^7 ）接种在适当浓度的药物培养液中进行培养，就能够将这些抗性突变体从通常的群落中分离出来（图2-1中浓度A）。

氮鸟嘌呤（azaguanine）抗性这一特例已在培养细胞中得到广泛研究，并且正如后面将谈到的，它具有的一些特征使得它在哺乳动物细胞遗传学中显得特别有用。氮鸟嘌呤是一种嘌呤化合物鸟嘌呤的结构类似物（图2-2）。如果氮

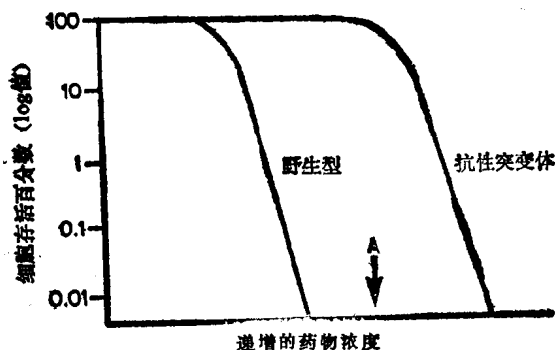


图2-1 在递增的药物浓度中，接种培养的野生型（左）和一个抗性突变体（右）的存活曲线。浓度A是可用于筛选抗性突变体的药物浓度。

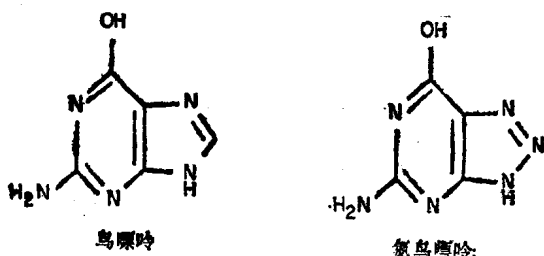


图2-2 DNA的一种正常组分鸟嘌呤的结构式，以及它的碱基结构类似物氮鸟嘌呤的结构式。

鸟嘌呤在培养基中存在，细胞就将它吸收入自己的DNA，结果会被杀死。与这一系列变化有关的许多酶中，有一种叫次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶，或简写成HGPRT。这种酶通常将嘌呤（如鸟嘌呤）转变成核苷酸（如鸟苷酸），这些核苷酸随后被用来合成DNA。然而在氮鸟嘌呤抗性细胞中，该酶发生的变构阻碍它执行正常的功能，因此氮鸟嘌呤不能掺入到细胞的DNA中，所以突变体细胞能够在有氮鸟嘌呤