

基因工程原理 及实验操作技术

谭骏 刘昕 主编



JIYIN
GONGCHENG
YUANLI
JISHIYAN
CAOZUO
JISHU

科学技术文献出版社

DE33/15

基因工程原理及实验操作技术

主 编	谭 骏	刘 昕	
编 著	王 燕	毛琼国	易绍萱
	梁 红	纪贤文	郭华阳
	谭 骏	刘 昕	

科学技术文献出版社

一九九四

(京)新登字130号

5.5 124.3
8.0
261.67

图书在版编目 (CIP) 数据

基因工程原理及实验操作技术/谭骏等主编.-北京:
科学技术文献出版社, 1994

ISBN 7-5023-2395-3

I.基… II.谭… III.遗传工程 IV.Q78

中国版本图书馆CIP数据核字(94)第08256号

科学技术文献出版社出版

(北京复兴路15号 邮政编码100038)

中国科学技术信息研究所重庆分所印刷厂印刷 新华书店重庆发行所发行

1994年12月第1版 1994年12月第1次印刷

787×1092毫米 16开本 8.5印张 210千字

科技新书目: 338—93 印数: 1—3000册

定价: 8.00元

目 录

第一部分 基因工程原理	(1)
第一章 导论	(1)
第一节 基因工程的诞生及其研究内容.....	(1)
第二节 基因工程的成果与展望.....	(5)
第二章 工具酶	(19)
第一节 DNA限制性内切酶.....	(19)
第二节 甲基化酶.....	(21)
第三节 DNA分子的限制酶分析.....	(22)
第四节 分子克隆化用的另一些酶.....	(24)
第三章 分子克隆载体	(27)
第一节 质粒.....	(28)
第二节 噬菌体和病毒载体.....	(31)
第三节 柯斯质粒.....	(33)
第四节 人工微小染色体.....	(35)
第四章 重组DNA实验中常用的技术	(36)
第一节 DNA的提取与纯化.....	(36)
第二节 转移基因.....	(37)
第三节 DNA标记放射性同位素.....	(39)
第四节 分子印迹杂交.....	(41)
第五节 构建文库和筛检.....	(43)
第六节 染色体步移.....	(47)
第七节 DNA顺序测定.....	(47)
第八节 足迹法——研究DNA-蛋白质相互作用的技术.....	(49)
第九节 变性剂梯度凝胶电泳检测DNA中单个碱基的置换.....	(50)
第五章 DNA重组技术在医学中的应用	(51)
第一节 遗传病基因诊断的研究——以DMD为例.....	(51)
第二节 遗传病的基因治疗.....	(55)
第三节 肿瘤基因治疗的研究.....	(60)
第四节 反义技术的原理及应用.....	(69)
第五节 转基因动物.....	(73)
第二部分 基因工程实验操作技术	(78)
实验一 质粒DNA的提取.....	(78)
实验二 λ 噬菌体DNA的提取.....	(80)
实验三 哺乳动物细胞高分子量DNA的提取.....	(83)
实验四 回收DNA限制性酶切片段.....	(85)
实验五 RNA的分离纯化.....	(88)

实验六 琼脂糖凝胶电泳.....	(91)
实验七 质粒 DNA 片段的亚克隆	(94)
实验八 DNA探针的标记.....	(97)
实验九 核酸的印迹法杂交.....	(103)
实验十 λ 噬菌体DNA体外包装.....	(107)
实验十一 哺乳动物细胞基因组基因文库的构建.....	(109)
实验十二 cDNA文库的简易构建法.....	(111)
实验十三 基因文库的筛检.....	(114)
实验十四 M13克隆和DNA顺序分析.....	(117)
实验十五 磷酸钙介导的基因转移.....	(121)
实验十六 基因表达产物的检测法.....	(122)
实验十七 组织切片原位杂交.....	(126)
实验十八 PCR技术.....	(129)

第一部分 基因工程原理

第一章 导 论

在研究生物演化的过程中，遗传和变异是两个重要的概念。遗传性赋予生物种的稳定，保证生物种的延续。变异性赋予生物种的进化，保证生物种对各种环境的适应。遗传和变异是在一个生物体内统一起来的。在生物演变的长河中，自然发生的变异是非常缓慢的，随着生物科学的发展，人类开始学会干预生物的变异，经典遗传学的出现，使人们在几年至几十年内便可实现在自然界中需要千百万年才能出现的变异，从而改变了某些物种，有利于人类。从本世纪70年代初，基因工程学诞生，在短短不过20年的时间内已经取得了许多激动人心的成果。它的最大特点，就是以重组DNA技术，开辟了在短时间内改造生物遗传性的新天地。它填补了生物种属间不可逾越的鸿沟，克服了常规育种的盲目性，使人类有可能按照需要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。基因工程正以新的势头迅猛发展，成为当今生物科学研究领域中最有生命力、最引人注目的前沿科学之一。

第一节 基因工程的诞生及其研究内容

一、基因工程的诞生

基因工程发展的道路并不是一帆风顺的。现在人们公认，基因工程诞生于1973年，它是数10年来无数科学家辛勤劳动的成果、智慧的结晶。从40年代开始，科学家们从理论和技术两方面为基因工程的产生奠定了坚实的基础。概括起来，从40年代到70年代初的基因工程诞生，在现代分子生物学领域理论上的三大发现及技术上的三大发明对基因工程的诞生起到了决定性的作用。

（一）理论上的三大发现

首先，40年代发现了生物的遗传物质是DNA。1934年Avery在美国的一次学术会议上首次报道了肺炎球菌 (*Diplococcus pneumoniae*) 的转化。超越时代的科学成就，往往不容易很快被人接受，Avery的论文没有得到公认。事隔10年，这一成果才得以公开发表。事实上，Avery不仅证明DNA是生物的遗传物质，而且也证明了DNA可以把一个细菌的性状传给另一个细菌，理论意义十分重大。正如诺贝尔奖金获得者Lederberg指出的，Avery的工作是现代生物科学的革命开端，也可以说是基因工程的先导。

第二，50年代明确了DNA的双螺旋结构和半保留复制机理。1953年，Watson和Crick提出了DNA结构的双螺旋模型，这对生命科学的意义来说，足以和达尔文学说、孟德尔定律相提并论。

启动

第三, 60年代确定了遗传信息的传递方式。Monod和Jacob于1961年提出了操纵子学说。以Nirenberg等为代表的一批科学家, 经过艰苦的努力, 确定遗传信息是以密码方式传递的, 每三个核苷酸组成一个密码子, 代表一个氨基酸。到了1966年全部破译了64个密码, 编排了一本密码字典, 叙述了中心法则, 提出遗传信息流是DNA→RNA→蛋白质。从此, 千百年来神秘的遗传现象, 在分子水平上得到了揭示。

(二) 技术上的三大发明

从40年代到60年代, 虽然从理论上已经确立了基因工程的可能性, 科学家们也为基因工程设计了一幅美好的蓝图。但是, 基因工程是门内容广泛的、综合性的生物技术学科。科学家们面对着庞大的双链DNA(ds DNA), 尤其是真核生物, 其DNA分子是相当巨大的(表1-1), 仍然是束手无策, 不能把它切成单个的基因片段。尽管那时酶学知识已得到相当的发展, 但没有任何一种酶能对DNA进行有效的切割。

表 1-1 若干种生物基因组的大小范围

生物种	大小范围 (kb)
猴肾病毒40 (SV40)	5.1
痘苗病毒	190
大肠杆菌	4 000
酿酒酵母	13 500
黑腹果蝇	165 000
人	2 900 000
南美洲肺鱼	102 000 000

1970年, Smith和Wilcox在流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)中分离并纯化了限制性核酸内切酶 Hind II, 使DNA分子的切割成为可能。1972年Boyer实验室又发现了名叫EcoRI的核酸内切酶, 这种酶每遇到GAATTC序列, 就会将双链DNA分子切开形成DNA片段。以后, 又相继发现了大量类似于EcoR I这样的限制性核酸内切酶, 这就使研究者可以获得所需的DNA特殊片段, 为基因工程提供了技术基础。对基因工程技术的突破的另一发现是DNA连接酶。1967年, 世界上有五个实验室几乎同时发现了DNA连接酶。这种酶能够参与DNA裂口的修复。1970年, 美国的Khorana实验室发现了一种叫T₄ DNA连接酶, 具有更高的连接活性。

科学家有了对DNA切割与连接的工具(酶), 还不能完成DNA体外重组的工作。因为大多数DNA片段不具备自我复制的能力。所以, 为了能够在寄主细胞中进行繁殖, 必须将DNA片段连接到一种特定的、能自我复制的DNA分子上。这种DNA分子就是基因工程载体(vector)。基因工程的载体研究先于限制性核酸内切酶。从1946年起, Lederberg开始研究细菌的性因子——F因子, 经过50和60年代, 相继发现其它质粒, 如抗药性因子(R因子)、大肠杆菌素因子(CoE)。到1973年, Cohen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项技术发明。

1970年, Baltimore等人 and Temin等人同时各自发现了逆转录酶, 打破了中心法则, 使真核基因的制备成为可能。

具备了以上的理论与技术基础, 基因工程诞生的条件已经成熟。两位科学的“助产士”——Berg和Cohen把基因工程接到了人间。

1972年, 美国斯坦福大学的P. Berg领导的研究小组, 在世界上第一次成功地实现了DNA体外重组。他们使用限制性内切酶EcoR I, 在体外对猿猴病毒SV40的DNA和λ噬菌体的DNA分别进行酶切, 然后再用T₄ DNA连接酶把两种酶切的DNA片段连接起来, 结果获得了包含有SV40和人DNA重组的杂种DNA分子。1973年, 斯坦福大学的S. Cohen等人, 也成功地进行了另一个体外重组实验并实现了细菌间性状的转移。他们将大肠杆菌 (*Escherichia coli*)

的抗四环素(Tc^r)的质粒PSC101和抗新霉素(Ne^r)及抗磺胺(s^r)的质粒R6-3,在体外用限制性内切酶EcoRI切割,连接成新的重组质粒,然后转化到大肠杆菌中。结果在含四环素和新霉素的平板中,选出了抗四环素和抗新霉素的重组菌落,即表型为Tc^rNe^r的菌落。这是基因工程发展史上第一次实现重组体转化成功的例子(图1-1)。基因工程从此诞生,这一年被定为基因工程诞生的元年。

基因工程从诞生之日起,就受到人们的极大关注。其理论和实践的意义都非常重大,但和任何新生事物一样,其成长过程中也遇到了强大的阻力。基因工程刚诞生的头几年,人们对它有不少争论。争论的焦点是害怕基因工程创造的杂种生物会从实验室逸出,在自然界造成难以控制的危害。有害的杂种细菌或病毒与化学物质不同,它们会在自然界不断增殖,造成的危害更大。于是许多社会人士、政府官员、甚至科学家发出呼吁,要求制定法规,限制基因工程的研究。美国国立卫生研究院(NIH)成立了一个专门委员会处理这些诉讼事宜,并于1975年制定了“通用重组DNA分子研究准则”,尽管已经对基因工程的安全防护作了许多规定,仍有不少科学家联名要求取消危险的实验。面对着强大的阻力,一批科学家仗义执言,Cohen等人写文章,一方面指出基因工程具有强大的生命力,另一方面告诫人们,所谓基因工程的危险都是估计的,根本无法断言,是人们对新生事物不理解所造成的恐惧。另一个基因工程学家A.Kornberg也指出,如大多数人不能区分原子和分子、病毒和细胞、细胞和生物一样,由于对基因工程缺乏理解,造成恐惧。以后,情况渐渐缓和。更重要的是,研究人员通过事实消除了人们的恐惧心理。开始,人们用大肠杆菌K₁₂作为宿主菌。人们担心通过研究者的消化道带出实验室。经过连续两年对研究人员的粪便检查,均未发现大肠杆菌K₁₂和质粒。1977年,Itakura等人用人工合成的生长激素释放抑制素(somatostatin,SMT)基因,第一次实现了真核基因在原核细胞中表达,轰动了全世界,各种指责逐渐消失,基因工程以它旺盛的生命力向前发展。

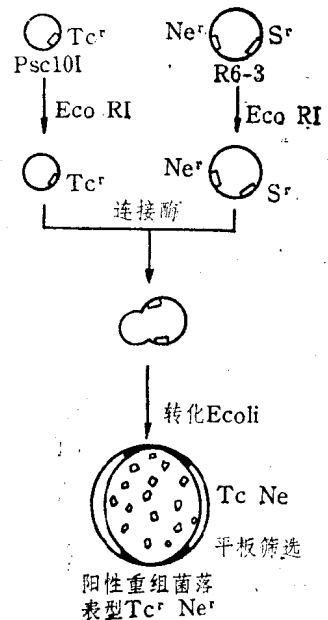


图1-1 Cohen DNA重组、转化与阳性重组体筛选示意

二、基因工程研究的内容

基因工程诞生以来,还没有一个统一的公认定义。一般认为基因工程是指:把体外核酸分子(无论采取什么方法从细胞中取得)组合到任何病毒、细菌质粒或其它载体系统(分子),形成遗传物质的新组合,并使之进入到原来没有这类分子的宿主体内,而能持续稳定地繁殖。或者说,它是对DNA大分子上的遗传单元(基因)进行体外操作,把不同来源的基因按照设计的蓝图,重新构成新的基因组(即重组体),再把它引入细胞中,构成具有新的遗传特性的生物。

从实质上讲,基因工程的定义强调了外源DNA分子的新组合被引入到一种新的寄主生物中进行繁殖。这种DNA分子的新组合是按照工程学的方法进行设计和操作的,这就赋予基因工程跨越天然物种屏障的能力,克服了固有的生物种间的限制,扩大和带来了定向创造新生物的可能性,这是基因工程的最大特点。

基因工程问世以来,各种名称相继问世。在文献中常见的有遗传工程(genetic engineering)、基因工程(gene engineering)、基因操作(gene manipulation)、重组DNA技术(recombinant DNA technique)、分子克隆(molecular cloning)、基因克隆(gene cloning)等,这些术语所代表的具体内容彼此具有相关性,在许多场合下被混同使用,难以严格区分。不过它们之间还是存在一定的区别的。例如,遗传工程比基因工程有更广泛的内容,凡是人工改造生物遗传性的技术如物理化学诱变、细胞融合、花粉培育、常规育种、有性杂交等,还包括基因工程在内。因此,遗传工程包括基因工程,遗传工程不等于基因工程。又如重组DNA技术,它是基因工程的核心内容,但严格地说,基因工程除上述的定义所阐明的内容以外,还应包括体外DNA突变,体内基因操作以及基因的化学合成等。总之,凡是在基因水平上操作而改变生物遗传性的技术都属于基因工程。而重组DNA技术不等于就代表基因工程。

至于生物工程,它是更大范围内改造生物并生产生物产品的工程技术,是现代生物学中一切工程技术的总称,除遗传工程、基因工程外,还有酶学工程、细胞工程、发酵工程、农业工程等。

克隆(clone)一词有必要加以解释。当它作为名词使用时,是指从一个祖先通过无性繁殖方式产生的后代,或具有相同遗传性状的DNA分子、细胞或个体所组成的特殊的生命群体;当克隆作动词使用时,是指从同一祖先生产这类同一的DNA分子群或细胞群的过程。因为在体外重组DNA的过程中,是通过能够独立自主复制的载体或噬菌体为媒介,把外源DNA(片段)引入宿主细胞进行繁殖,实质上是从一个DNA片段增殖成结构和功能完全相同的DNA分子群的过程,也是为遗传同一的生物品系(它们都带有重组DNA分子)成批地繁殖和生长提供了有效的途径。因此,基因工程也可称为基因克隆或DNA分子克隆。

基因工程研究的内容包括以下几个主要内容或步骤(图1-2):

(1) 从生物有机体复杂的基因组中,分离出带有目的基因的DNA片段。

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

(3) 将重组DNA分子引入到受体细胞(亦称宿主细胞或寄主细胞)。

(4) 带有重组体的细胞扩增,获得大量的细胞繁殖群体(菌落)。

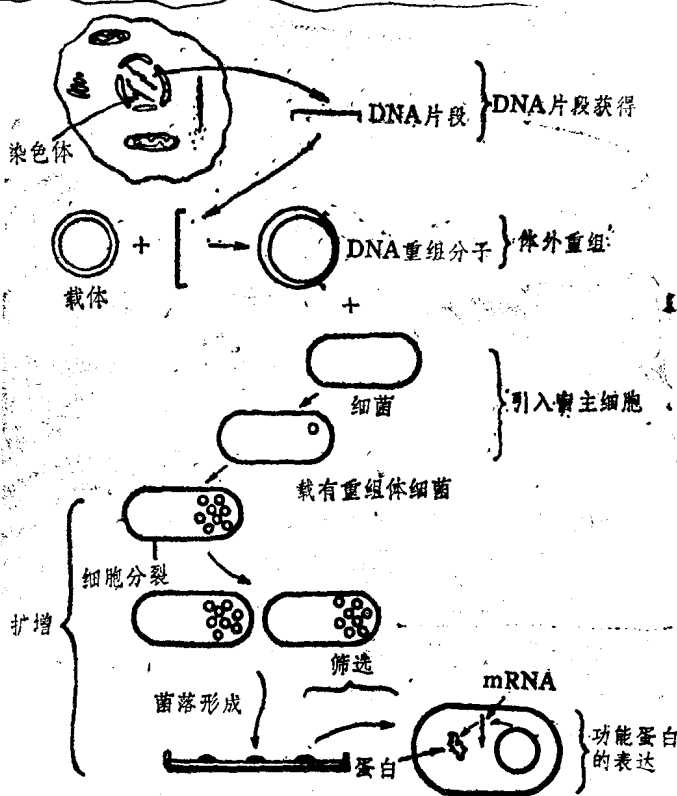


图1-2 基因工程的基本步骤

(5) 从大量的细胞繁殖菌落中, 筛选出具有重组DNA分子的细胞克隆。

(6) 将选出的细胞克隆的目的基因进一步进行研究分析, 并设法使之实现功能蛋白的表达。

第二节 基因工程的成果与展望

目前, 大多数人认为生物工程由基因工程、细胞工程、酶工程和发酵工程所组成, 而基因工程又是生物工程的首要技术。下面将先概要介绍生物工程的重大经济意义, 然后着重介绍基因工程的现有成果, 并展示其光辉的前景。

一、生物工程的重大经济意义

国外学者认为, 能源科学、信息科学、材料科学和生物工程是第四次产业革命的四大技术支柱, 而特别是生物工程将会在解决全人类所面临的能源危机、粮食紧缺和环境污染问题及疑难病的治疗中扮演主角。

(一) 生物工程对农牧业的巨大影响

地球上人口不断增加, 食品短缺成了大问题。国外一个由5名诺贝尔奖金获得者和19名世界著名科学家组成的“未来行动委员会”预测: 到2015年时, 世界人口可能增长到80亿, 在今后几十年中要满足人类对食品的需求, 则包括粮食、畜产品和水产品在内的食品生产, 至少必须翻一番。

生物工程技术的应用可以提高粮食作物的产量并降低其生产费用。要增加粮食作物产量除去选育优良品种外, 还要增产化肥。估计到2000年, 化肥产量要增加三倍才能满足需要。豆科植物依赖根瘤菌固氮, 能固定、吸收和利用空气中游离的氮。于是科学家们就想通过基因工程把固氮基因转移到其它作物根际周围的细菌体内, 使它们也能固定氮素。更进一步的作法是设想把固氮基因直接转移到禾本科(诸如稻、麦)作物的根上, 使之直接固氮。这样不施氮肥或少施氮肥也能丰产。

70年代末, 科学家们已把肺炎克氏杆菌的固氮基因转入大肠杆菌, 使大肠杆菌也能直接利用空气中的氮。日本把固氮基因转移到水稻根际微生物中, 结果可使这种微生物给水稻提供1/5的需氮量。有的科学家试图采用细胞融合技术来使各类作物自行固氮。

通过生物工程还能培育出抗寒、抗旱、抗盐碱、抗病的新品种, 最终将能使荒凉的沙漠上长出绿油油的牧草, 使未开垦的不毛之地长出金黄色的庄稼。美国和比利时的科学家分别把细菌中抗卡那霉素的基因转移到向日葵、烟草、胡萝卜等细胞中, 结果这些作物抗卡那霉素的能力比同类作物高8倍以上。这是细菌基因在高等植物体内表达的第一个实例。研究证实, 植物细胞中的脯氨酸含量高时, 则抗盐、抗旱能力也高, 并且已找到与合成脯氨酸有关的基因, 即调渗基因。这个基因已被科学家成功地转入固氮菌中, 这样将可能创造出又固氮又抗盐的根瘤菌。

科学家们还准备转移叶绿体基因, 将叶绿体中的高光效基因转移到另一种品种中去, 以增加光合效率而大幅度增加产量。英国剑桥的植物育种所正在进行这方面的研究, 目的在于使绿色植物为世界提供更多的粮食。

应用生物工程技术还能制造除草剂。美国农业部、农业研究局的南方杂草科学研究室从

能杀死杂草的真菌中分离出毒素，将此毒素喷施在大豆田中，可以杀死98%的杂草，而不伤害农作物。该研究室将与Mycogen公司合作，使这种真菌毒素成为商业除草剂。

应用细胞和组织培养（也叫试管苗）技术选育优良品种进行快速繁殖已取得了显著成绩。例如，荔枝常规育种的选育期为7年，而试管苗技术只需要1年。花药培养技术与人工诱导结合更能大大缩短常规育种时间。如大麦新品种的选育用常规法需要15年，而应用花药培养技术选育只需5年。目前，我国在这方面的工作是领先的。美国孟山都公司提出要和我国在这方面进行全面合作。目前，快速繁殖法已被用于一些经济作物（如人参、烟草等）和一些观赏作物（如兰花等）的选育，都取得了巨大的经济效益。另外，组织培养法还可应用于作物的防病。例如植物的茎尖组织常常是无病毒的，用茎尖组织培养技术可得到无毒种苗，从而达到防治病毒病的目的。例如我国利用这项技术已控制了马铃薯的退化。当前，世界上通过植物细胞培养再生植株的约有600种植物，已使很多种有重要经济价值的果树、药材、蔬菜、花卉等实现了商品化生产。

随着植物细胞培养技术的发展，尤其是固定化细胞技术的改进，细胞大量培养技术已被直接应用于生物工业之中。因此，已能在发酵罐内生产有用物质，以满足社会的需要。例如，烟草细胞大量培养已可在20吨罐的规模上进行，而单细胞蛋白的生产已可在上千吨级罐的规模上进行。细胞繁殖一倍只需12小时，用细胞大量培养技术来培养人参细胞生产生物碱（人参皂苷）也只要4个星期就能完成。

应用基因工程技术可以改善粮食中的蛋白质含量。例如，科学家们设想把大豆蛋白基因转移到水稻里，这将会大大改善水稻的品质。美国威斯康星大学把菜豆的储藏蛋白基因转移到向日葵里并使该基因得到了表达。美国明尼苏达大学也已把玉米醇溶蛋白基因转移到向日葵根部的细胞中。这些实验都为改良作物品种开辟了广阔的前景。

生物工程在发展畜牧生产上蕴藏着巨大的潜力。如良种母牛一般一生只能产10头左右的小牛。若用良种公牛冷藏精液给母牛人工受精，在胚胎细胞发育到8个细胞前，用显微手术将胚胎细胞分离开，再将分离开的胚胎细胞移植到其它母牛体内，可得到50头以上的小牛。也可用类似的方法繁殖其它牲畜。

应用基因工程技术生产的畜用生长激素已投入批量生产。在不增加饲料消耗的情况下，生长激素可提高奶牛的产奶量15%~20%，奶羊的平均产奶量8%~12%，并使猪每日增重提高15%左右，瘦肉比例也增大。

在畜用饲料生产上也离不开生物工程。例如饲料添加剂氨基酸的生产，在采用效率高的工程菌生产之后，仅赖氨酸每年产量就接近1亿磅，价格由20年前的每磅25美元，下降到1980年的每磅2美元。应用基因工程技术组建的生产色氨酸的大肠杆菌新菌株，使产量提高一倍；如用连续发酵法，生产效率可提高10倍左右。畜用维生素B₁₂改用工程菌生产之后，产量可增至2~5倍，售价也大幅度降低。

1982年，荷兰和英国的科学家应用基因工程技术制取了猪牛幼畜腹泻疫苗，美国科学家也制取了类似疫苗并已投放市场。原联邦德国、英国、美国的科学家都在应用基因工程技术生产口蹄疫病毒蛋白。1984年，美国基因技术公司已开始销售安全、便宜、无需冷藏的口蹄疫新疫苗。随着这种廉价疫苗的使用，美国每年可由此取得20~30亿美元的经济收入。

生物工程在动物育种方面的潜力更大。1983年，美国华盛顿大学和宾夕法尼亚大学的学者把大鼠的生长激素基因与小鼠一段管开关的基因组成重组体，把这个重组体注射到小鼠的受精卵里，再把受精卵移植到雌鼠体内，生下来的小鼠的生长速度要比普通小鼠的平均生长

速度快50%。而且,其中一只小鼠已经把移植的基因遗传给下一代。

生物工程技术还可以开辟人类所需的新的食品源。据报道,250克的微生物每天可生产250吨蛋白。而一只体重250公斤的牛,每天增重蛋白仅为200克左右。同时,微生物还可以为人类生产碳水化合物、脂肪、维生素等产物。

利用微生物发酵生产的单细胞蛋白,可用作食品和饲料蛋白的重要来源。原苏联是世界上单细胞蛋白产量最大的国家。生产单细胞蛋白的原料为纤维素和石油副产品(各占50%)。1985年,原苏联的单细胞蛋白年产量达200万吨,计划若干年后年产量增至1100~1200万吨,到时可完全停止进口大豆。英国帝国化学工业公司已投资1亿英镑,建造了以甲醇为原料的单细胞蛋白工厂,年产量为75000吨。它是目前世界上最大的工厂,并采用电子计算机控制。

未来获取蛋白的另一条途径可能是应用基因工程技术使大肠杆菌能产生没有蛋壳的鸡蛋(卵清蛋白)。美国厄普约翰公司和法国巴斯德研究所已分别将鸡的卵清蛋白基因转移到大肠杆菌和酵母菌中并表达成功。这就告诉我们,有朝一日人们可能会通过在发酵罐中培养含有卵清蛋白基因的大肠杆菌和酵母来生产人类所需要的卵清蛋白,而再也不用花费很大力气去养鸡了。

(二) 借助生物工程开发新能源和消除环境污染

地球上的化石燃料终将枯竭,代之而起的是生物能。现在通过微生物发酵法已用甘蔗、木薯粉、玉米渣等来生产酒精。据报道,目前估计全世界发酵酒精的产量约在1000万吨左右。巴西用甘蔗作原料,计划到90年代初发展到1200万吨,以实现不进口石油的目标。美国所用原料95%为玉米,其余5%为小麦、大麦及农业废料。在生产工艺方面连续发酵已非常普遍,真空发酵、减压蒸馏、固定化细胞、生淀粉发酵技术等也不断涌现。科学家们还在研究通过基因工程创造出多功能的超级工程菌,使之分解纤维素和木质素,以便利用稻草、木屑、植物秸秆、食物的下脚料等生产酒精。这种酒精有“绿色石油”的美称。目前,美国已将此项计划列为能源部的重点科研项目。1979年,美国投资1.5亿美元用于生物能研究。1981年,美国14个州建立了15个利用纤维素生产酒精的工厂,年产2.5亿加仑,计划到本世纪末每年可生产40亿加仑。苏联是目前唯一用酸水解木材大规模生产酒精的国家,年产量为50万吨。日本通产省于1980年制定了生物能燃料化的7年计划,投资260亿日元,用于研究开发代替石油的新能源——酒精。1990年,日本计划生产酒精330万千升,达能量总供应量的4.3%。

通过固定化酶的方法可以将农林和工业废弃物变成沼气和氢气(又叫生物气)。这是一种取之不尽、用之不竭的能源。美国计划用此法解决全国能源需要量的10%。日本普遍采用甲烷发酵处理酒精、食品、制药等工业废水。英国、美国、原联邦德国和原苏联已建成许多大型沼气发酵厂。伦敦的沼气厂每年年产沼气8800万立方米。美国波多黎哥酒厂的沼气厌气反应器,每天处理40多万加仑污水,可得200多万立方英尺沼气,相当于60多万加仑汽油,已能提供全厂所需燃料的40%。

在石油开采上也离不开生物工程。目前的石油开采是一次采油,仅能开采出储藏量的30%。二次采油需要加压注水也只能获取储藏量的20%。深层的原油由于吸附在岩石空隙间,难以开采,这就需要加入“工程菌”使之分解原油中的蜡,结果能降低原油的粘度和增高油层内的压力,因而增加了石油流出量,这称为三级开采。1981年,美国用工程菌进行三级石油开采,产量达2000万桶,价值6亿美元。

传统的化学工业过程几乎都是在高温高压下进行,这是一个典型的高耗能过程。在化学工业中若采用生物工程法,不仅能节约能源,还能避免环境污染。例如用常规的方法进行农

药生产就是典型的一例,不仅投资大,耗能多而且严重污染环境。已知苏云金杆菌产生的毒性蛋白能杀死鳞翅目害虫。70年代末,国外把毒性蛋白基因转移到大肠杆菌和枯草杆菌中。这些菌株经过进一步改造,即可大量生产这种天然杀虫剂。美国的伊克金(Ecogen)公司将8个类型的苏云金芽孢杆菌置于一种辐射过的溶液中,促进细胞之间基因的天然交换,获得了天然的重组细菌。美国环保署已批准该公司在美国南方5个州的棉田和另外3个州的菜田做小规模试验。1989年这种重组细菌杀虫剂投入市场。

美国迈克金公司研究出产生苏云金杆菌毒素的假单胞杆菌。假单胞菌在植物体表和土壤中广泛存在,对环境适应性强,可望成为一种遗传修饰的良好的细菌杀虫剂,环保署已批准其田间试验。日本住友化学工业公司把苏云金杆菌 δ -内毒素基因克隆到大肠杆菌中。大肠杆菌很容易培养,从该菌的每升发酵液中可获取1克多重的毒素蛋白。该公司计划把苏云金杆菌29个亚种的毒素基因一起克隆在大肠杆菌中,以期开发出一种广谱的细菌杀虫剂。

除去用生物工程技术对传统的化学工业进行改造,以降低能耗和减轻环境污染外,美国的科学家还将把能够降解不同石油组分的几种质粒,经结合转移到一株假单胞菌中,从而构建出能分解多种原油组分的“超级菌”,用其去消除海洋的石油污染。国外还正在开展利用固定化生物反应器处理工业废水的研究。美国正在研究利用固定化多酚氧化酶从工业废水中除去酚。英国正在研究和利用固定化细胞除去废水中的氰化物,其含量可从30%降到1ppm。法国利用不同形式的固定化酶(单独使用或混合使用),处理工业废水效果良好。

(三) 生物工程的潜在工业经济意义

目前国外对细菌浸矿的研究非常重视。美、日、俄、英、加拿大、澳大利亚等国正研究用细菌浸出铜、铀、钴、锰、锌、铝等十多种金属。例如加拿大用细菌浸提出的铀已达230万吨。美国用细菌浸矿所得到的铜占本国铜产量的10%以上。全世界用此法生产的铜达20万吨。目前研究的重点是选育新菌种,改革工艺设备,回收贵重金属。

近年来,国外利用微生物合成高分子聚合物的研究,正在不断取得成果。用基因工程改良的菌种,能通过发酵生产醋酸、丙烯酸等重要化工原料。目前英国帝国化学公司利用基因转移法,利用产碱杆菌生产聚羟基丁酸。预测到1990年,聚羟基丁酸年产量将从目前的12吨上升到10000吨。聚羟基丁酸可由固氮菌属和产碱菌属利用葡萄糖来制造。聚羟基丁酸用途很广,可作为理想的外科塑料,食品包装材料,电话送话器的膜材料和合成纤维等。英国帝国化学公司还可能用微生物合成的高分子聚合物有聚酰胺、聚丙烯酸、聚异戊二烯等化工原料。

在食品工业方面,利用微生物发酵法生产的产品种类繁多。除去高果糖浆的生产最为突出外,主要还有氨基酸、有机酸、人工甜味剂、食品色素和各种酒类的生产。

高果糖浆在酶工程领域内应用效果最大,美国1985年总产量为472万吨(干基)。国外用发酵法和酶法生产的氨基酸达18种。目前全世界总产量为每年50万吨。1979年世界市场的销售额为16.5亿美元,1985年超过25亿美元。日本是最大的氨基酸生产国,产量最大的氨基酸为谷氨酸和赖氨酸。目前国外正在积极利用基因工程和细胞融合技术改造产生苏氨酸和色氨酸的生产菌。经改造的工程菌已正式投产,产量大大超过了一般菌的生产能力。日本味精公司也利用了细胞融合和基因工程的方法改造菌株,使氨基酸的产量提高了几十倍。

柠檬酸是食品工业中一种很重要的酸味剂。目前世界年产量为30万吨。美国年产量为18万吨。目前柠檬酸生产菌主要是黑曲霉。国外正大力研究用酵母和细菌来生产柠檬酸。在食品酸味剂方面,国外的一个新动向是运用复合酸味剂(即同时使用几种酸味剂)。因此,近年来乳酸、苹果酸等有机酸的产量在逐年增加。

在轻工业方面,科学家正在努力使蚕的丝心蛋白基因在大肠杆菌中获得表达,以便能从发酵罐中提取蚕丝。

二、基因工程的现有成果与展望

在叙述生物工程的重大经济意义时,实际上已经介绍了许多基因工程的技术成果。这些实例已足以说明:基因工程技术确实是生物工程中的一门首要技术;基因工程已对农牧业、食品工业、环境保护、能源开发和医药卫生等领域产生巨大影响。人们预计,随着科学技术的发展,生物工程必然会愈益显示其巨大的威力。

人们之所以优先重视将基因工程技术应用于药品生产和疾病诊治,是因为基因工程确实为制药业带来了新的生机。由于采用了基因工程技术,使一些紧缺昂贵药品的产量大大提高,成本则大大降低,从而为实业家带来了巨大的经济效益。另外,必须指出的是一些疑难病症——糖尿病、侏儒症、乙型肝炎或癌症的诊断与治疗,只有依赖分子水平的科学手段才能见诸有效。基因工程恰好能为此而提供分子药物(激素、抗体或酶)和分子检测手段(例如DNA探针)。

(一) 基因工程在制药业中崭露头角

人们熟知激素、淋巴因子、神经多肽、调节蛋白、酶类、凝血因子等人体活性多肽以及某些疫苗对疾病的诊断、预防和治疗有着重要价值。但由于材料来源困难、技术难度大、造价高使之不能付诸应用,造成患者望而却步。

自从1973年基因工程问世以来,1977年至1978年基因工程在医药上的研究接二连三的取得了重大突破。可以说基因工程在医药上的研究是捷足先登,使得人们对昂贵药品的需求正在付诸于实现。

1. 生产生长激素释放抑制素的基因工程

人生长激素释放抑制素(somatostatin)是一种多肽激素。它由14个氨基酸组成,可在脑、肠道及胰脏中合成。这种激素有广泛的生理功能,最主要的是参与生长的调节。它能抑制生长素、胰岛素和胰高血糖素的分泌,可用来治疗肢端肥大症和急性胰腺炎等疾病。

目前生长激素释放抑制素的制造是应用化学合成法,因为它由14个氨基酸组成,所以合成起来至少要有13步操作程序。用化学合成法生产每克售价为50000美元。若用牛、羊、猪的脑提取,因为其中含有异体蛋白,注射到人身上后会引起过敏反应。因此,美国加州希望城医学中心的博耶(Herbert Boyer)和板仓等四人以及加州大学的三人合作,他们打算应用基因工程技术使细菌产生这种激素。

博耶等人认为,可以用化学合成法人工合成这种激素的编码基因,这样可以避免从复杂的人类基因库里分离这种基因的复杂工作。但是他们已经有过鼠的胰岛素基因移到大肠杆菌中不能表达的教训,明确了关键在于如何促使大肠杆菌的分子机构听命于这种外来的人类基因。博耶等人首先把大肠杆菌染色体中的启动子(lac promoter)分离出来,把它连接到人工合成的生长激素释放抑制素基因上,而后再把这个基因和大肠杆菌的质粒拼接在一起成为一个重组体,再把重组体引入大肠杆菌。当启动子被自然力量开动时,生长激素释放抑制素基因也被大肠杆菌当作是它的一个基因,而充分表达功能。应用这种方法,终于于1977年11月第一次用大肠杆菌生产出了人脑激素——生长激素释放抑制素。这个成就引起了世界范围的震动,美国科学院院长汉德勒为此而欢呼说:“这是科学上头等重大的胜利。”因为这一实验的成功提供了进一步阐明高等生物基因表达的理论基础。另一个重要意义是它具有重大的经

济价值。用常规的方法,需要用10万只羊的下丘脑才能得到1毫克激素,而用大肠杆菌生产生长激素释放抑制素,价格可降低到每克300美元。同时,应用化学合成的基因可使细菌生产的激素比较纯且没有副作用。美国于1976年成立的基因技术(genetech)公司已用遗传工程的方法生产出这种生长激素释放抑制素,并已于1983年投放市场。

2. 利用细菌制造胰岛素

胰岛素是从胰脏的胰岛细胞里分泌出来的,它是治疗糖尿病的特效药。胰岛素能调节血液里的糖分的含量,保持血糖平衡。

据不完全统计,全世界约有6000万人患糖尿病,用猪和牛的胰脏提取的胰岛素已不能满足需要。于是科学家们打算应用基因工程的方法利用大肠杆菌来生产胰岛素。

据1977年报道,美国的尤尔利奇(Ullrich A.)和古德曼(Goodman H. M.)把鼠的胰岛素基因转移到大肠杆菌中获得成功。他们应用逆转录酶方法以鼠的信息RNA(mRNA)为模板合成互补DNA(cDNA),再用T₄DNA连接酶使cDNA与载体质粒(pMB₉)DNA连接获得重组体,将其转移到大肠杆菌中建立了无性繁殖系。鼠胰岛素基因在大肠杆菌中得到了扩增,并对它进行了核苷酸序列的测定。这是第一次对高等生物基因核苷酸序列的测定。尽管鼠胰岛素基因在细菌中没有表达,但其转移成功为利用细菌生产人胰岛素迈开了有重要意义的一步。

到了1977年6月,美国哈佛大学、波士顿裘斯林(Joslin)基金公司的科学家以吉伯特(Gilbertw.)博士为首的8人联合小组,利用人工合成的基因转移到大肠杆菌中,结果大肠杆菌能制造鼠的胰岛素。虽然糖尿病患者不能使用这种鼠的胰岛素,但这项成果表明,人类已有可能利用“细菌工厂”去生产这种激素。同时还表明,利用基因工程技术可以制造出人类所需要的其他产品。例如,更加复杂的激素也可能利用细菌制造出来。因为鼠胰岛素基因的结构要比生长激素释放抑制素的复杂得多。这种人脑激素只有14个氨基酸组成,而胰岛素是由51~70个氨基酸组成的蛋白质。

到了1978年9月,美国加州大学的科学家板仓(Itakuna)和霍普市医学中心研究组用人工合成的人造人胰岛素基因拼接到大肠杆菌的质粒上组成重组体。通过大肠杆菌的质粒为运载体把人工合成的人胰岛素基因与乳糖操纵子调节基因一起植入大肠杆菌中去。此杂种质粒随着大肠杆菌的繁殖而复制和扩增。新加入的人工合成的人胰岛素基因便操纵着大肠杆菌大量产生人胰岛素。这是继人脑激素和鼠胰岛素在细菌中实现生物合成获得成功后的又一次重要突破。

目前,象莱莉公司生产的人胰岛素的成本比目前从猪、牛体内提取的要便宜30%~50%。因为大肠杆菌增殖一代只需30~40分钟,这样可以快速生产胰岛素。如用2000升培养液就能提取100克胰岛素,相当于从一吨猪胰脏中提取的产量。据报道,当今国外已用计算机操作细菌生产胰岛素,产量的增加一定更为惊人。

3. 利用细菌制造生长激素

1978年1月,加利福尼亚大学研究组和南旧金山基因技术公司宣布,已把鼠的生长激素基因转移到大肠杆菌中,并表达了功能。1979年7月,加利福尼亚大学和南旧金山的基因技术公司宣布,用基因工程技术使细菌产生人生长激素首次获得成功,得到了0.2毫克的生长激素。

他们所用的基因工程技术也有新的进展。他们用化学法先合成长激素基因的前69个核苷酸,其余的部分用酶促法合成,然后将两个片断连接起来通过载体引入大肠杆菌。

这一成果在经济上也有重大的意义。据推算,假若要获得从6万具尸体的人脑垂体中提

取的人脑激素量，改用基因工程法使细菌产生生长激素，只要275公斤细菌发酵液就够了。若要治疗一个脑下垂体机能不全的儿童侏儒症，需要从50具尸体的脑中提出的生长激素量。生长激素是治疗烧伤、骨折、胃出血，加速伤口愈合以及预防老年患者肌肉萎缩等症的必需药物。用基因工程技术使细菌产生的人生长激素已投放市场。

4. 用基因工程技术生产血球凝集素

1979年5月，英国高威开比的舍利实验室的研究组宣布，已成功地用基因工程技术在细菌内由流感病毒基因制造出血球凝集素。科学家们先用人工合成法合成血球凝集素基因序列，并将它连到1800个核苷酸链上，然后插入大肠杆菌的质粒上再引入大肠杆菌内。结果被植入的基因象在病毒机体内那样完整地表达功能。血球凝集素是病毒抗原，是流感疫苗的主要成分。

这一成就在疫苗生产上有重大的医学意义。血球凝集素是利用生物技术合成的化合物中分子量很大的化合物。这种蛋白分子量达到249000道尔顿，远较分子量为43000道尔顿的鸡卵清蛋白分子要大。

5. 利用细菌生产尿激酶

人体尿激酶对分解血栓起着重要的作用。以前，尿激酶的生产是通过人体细胞培养或从新鲜的人尿中提取，价钱昂贵，生产工艺复杂。

1980年，美国艾博特（Abbott）公司用基因工程的方法使大肠杆菌产生人体尿激酶的试验获得了成功。用细菌合成尿激酶不仅简便省钱，而且产品溶解血栓的作用与天然尿激酶相比毫不逊色。

6. 用基因工程法生产松弛素

松弛素是妇女顺产的必备药品，有了它可大大减少剖腹产的比例。人们发现，在临床上使用松弛素时，孕妇的关节炎也往往会随之消失，但产后，关节炎又会复发。那么是不是它对关节炎也有疗效呢？这个令人极感兴趣的问题，却由于常规方法生产松弛素成本高、产量低，因而难以用足够量松弛素去试验，以便最终确定其对关节炎的疗效。为了能尽快提供价廉质优数量充足的松弛素，美国基因技术公司与澳大利亚霍华特·弗洛莱（Howard Florey）实验生理研究室和医学研究所合作，成功地用基因工程法使细菌产生了这种药品。用基因工程法生产的松弛素投放市场后，既可满足产妇的需要，也为探讨松弛素在医学上的进一步应用创造了有利条件。

7. 用细菌生产人体血浆蛋白质

血浆蛋白是人体血液里的重要成分。它可以粗略地分为白蛋白、球蛋白和纤维蛋白原三大类，而以球蛋白最为复杂，其中包括有凝血因子、抗体、多种酶、酶的抑制物或抗胰酶等。近些年来，人体血浆蛋白在医学临床上的应用越来越重要。对此，世界各国给予了足够的重视。科学工作者们竞相研究用基因工程技术生产人体血浆蛋白，并且取得了引人注目的进展。

比如， α_1 -抗胰蛋白酶是血液中一个重要的蛋白酶抑制因子，起着保护身体组织、对抗多种蛋白水解酶的作用，主要抑制对象是弹性蛋白酶、胰蛋白酶、糜蛋白酶和凝血酶等。1981年，仓知（Kurachi）等人经过苦心钻研，终于用基因工程技术把 α_1 -抗胰蛋白酶基因在细菌中克隆成功。

血清白蛋白是人血浆中的主要蛋白质，对维持血液正常渗透压有重要作用。同时，这种蛋白还可以携带铁、脂肪酸、胆色素、药物和激素等多种小分子物质随血液输送到身体的各个部分。1981年，美国拉温（Lawn）首先把血清白蛋白基因转移到细菌中克隆成功。一年

后，杜加辛克 (Dugaizyk) 等人也取得了类似的成果。

8. 组织型血纤维蛋白溶酶原激活因子

它是哺乳类动物血浆中溶解血凝块纤维蛋白的酶促系统组分。它是一种强力和专一的血栓溶化剂。1983年，美国彭宁科 (Pennico) 等人从黑色素瘤细胞培养物中分离出组织型血纤维蛋白溶酶原激活因子的信息RNA，并通过反转录酶得到了它的互补DNA (cDNA)，然后组成重组体，将其转移到大肠杆菌中成功地实现了克隆和表达。在临床上，用细菌产生的组织型血纤维蛋白溶酶原激活因子治疗突发性心脏病、肺血栓和深部静脉血栓等疾病的日子也已为期不远了。

9. 抗血友病因子IX

它是一种依赖维生素K的血浆糖蛋白，在血凝中起重要作用。抗血友病因子IX功能的遗传缺陷将导致种种出血性疾病，称为血友病B。这种抗血友病因子IX在血浆中的含量极低，每毫升只有2~4微克。能不能用基因工程的方法来生产这种药物呢？

1982年，英国的科学家首先进行了尝试。他们使用牛的抗血友病IX cDNA克隆片段作为探针，从人的基因库中筛选出人的抗血友病因子IX基因，将其克隆成功。同年美国库瓦柴 (Kuvachi) 等人用狒狒的因子IX cDNA片段及人工合成的14寡核苷酸作探针，在人肝cDNA库中进行筛选，同样把基因转移到细菌中克隆成功。1983年，法国杰伊 (Jaye) 等用人工合成的一个52个核苷酸探针筛选人肝cDNA库，也获得了人抗血友病因子IX cDNA克隆。

抗凝血酶III是一种天然抗凝剂，它专一地抑制一系列参与血凝过程的丝氨酸蛋白酶。现在，美国基因工程公司已经使抗凝血酶基因在大肠杆菌中表达成功。

由于抗凝血酶III的功能缺陷也是一种遗传性疾病，所以抗凝血酶III基因的克隆成功，也可根据基因图谱方法用于分析家族性的基因缺陷，进行遗传病的产前诊断（这部分内容将在DNA探针中详细叙述）。

10. 乙型肝炎疫苗的制备

乙型肝炎是由乙型肝炎病毒 (HBV) 引起的，这种病不仅难以医治，而且严重影响了人类的健康。据统计，全世界患乙型肝炎的人数达两亿之多。

人们知道，病毒是由脱氧核糖核酸 (DNA) 和外壳蛋白构成。乙型肝炎病毒颗粒含有核心抗原 (HBcAg) DNA和DNA聚合酶的部分具有感染作用，而它的外壳蛋白不具有感染作用，称为HBsAg颗粒。这个颗粒最早在澳大利亚发现，所以也叫澳大利亚抗原。

虽然乙型肝炎病毒 (HBV) 的外壳蛋白 (HBsAg) 没有感染作用，然而外壳上的某些蛋白是主要抗原，它能刺激机体产生免疫物质。这种免疫物质能够抵抗乙型肝炎病毒的感染。于是，科学工作者们便试图利用这种抗原来制造乙型肝炎疫苗，以杜绝乙型肝炎病毒的传播。经过几年的努力，这种设想终于成为现实。科学家从乙型肝炎病毒携带者的血清中分离并纯化了HBsAg颗粒，并用它制成了乙型肝炎疫苗。

他们首先把这种疫苗注射到黑猩猩体内进行试验，结果使黑猩猩产生了抵抗力，当接触肝炎病毒时而未染上乙型肝炎。另外，科学家也在乙型肝炎高发区给人进行预防注射，结果，同样大大降低了乙型肝炎的发病率，而尤以对新生儿的预防效果为佳。

但是，要从乙型肝炎患者血液中分离纯化病毒外壳蛋白，在技术上是较困难的，因而使得疫苗价格昂贵。另外也容易感染其它疾病，十分不安全。根据此情况，科学家们又试图应用基因工程技术通过细菌发酵来制造这种疫苗。他们将乙型肝炎病毒DNA中控制乙型肝炎病