

厦门大学新世纪教材大系

基因工程

● 楼士林 杨盛昌 龙敏南 章军 编著

新

世

纪

教

材

大

系

科学出版社

内 容 简 介

本书首先介绍了基因工程的发展概况,然后按基因工程基本技术路线分别阐述了DNA制备、克隆载体构建、目的基因克隆、重组DNA导入受体细胞、克隆子筛选和表达产物检测,以及基因工程在相关产业中的应用,最后讨论了基因工程的安全性问题和解决措施。

本书可作为高等院校生物技术各有关专业本科生和研究生教材,同时对从事基因工程的教学、科研人员来说也是一本有益的参考书。

图书在版编目(CIP)数据

基因工程/楼士林等编著. —北京:科学出版社,2002.7
(厦门大学新世纪教材大系)
ISBN 7-03-010183-9

I. 基… II. 楼… III. 基因-遗传工程-高等学校-教材 IV. Q78

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2002)第 010132 号

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>

源 海 印 刷 厂 印 刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2002年7月第一版 开本:720×1000 1/16
2002年7月第一次印刷 印张:33 1/2
印数:1—3 000 字数:622 000

定价:43.00元

(如有印装质量问题,我社负责调换〈新欣〉)

前 言

自基因工程问世近 30 年来, 有大批不同学科的科学家居身于此领域工作, 研究成果推动了生命科学的迅速发展, 促进了医、农、林、畜、渔等产业结构的调整, 给人类进步带来了新的契机。但是, 基因工程的发展也引起了一些人的忧虑, 甚至有人出于种种原因极力反对基因工程。

基因工程是以遗传学、生物化学和分子生物学等学科为基础, 引入了工程学的一些概念, 通过周密的实验设计, 进行精确的实验操作, 高效率地达到预期的目标。目前基因工程仍处于发展的初级阶段, 随着其他学科的发展和社会新的需求, 将会进一步完善和发展。

基因工程作为一门新的技术, 吸引着一部分人急于了解和掌握它。这部分人中, 有的准备今后直接参与这一领域的教学、研究和开发; 有的为了扩大知识面, 提高科学素养, 更有效地完成自己承担的工作; 有的是政府部门和企业的决策者, 他们为了更好地考察基因工程的发展动向, 从国家总体发展战略出发, 拟订远近发展规划。为了满足这部分人的需要, 编写和出版与基因工程相关的书籍是从事该领域工作的学者不可推卸的责任。本人在高校承担基因工程的教学和科研工作近 20 年, 对基因工程有了一些领悟, 特此编写本书, 希望能对渴望了解和掌握基因工程的这部分人有所帮助。

为了便于读者比较全面地了解基因工程, 应用基因工程的知识去分析和解决相关的问题, 本书既阐述了基因工程的基本原理和一些常用方法, 也介绍了基因工程在某些产业部门的应用, 还讨论了基因工程的安全性问题和解决措施。

我们在编写此书的过程中, 为了反映近年来基因工程的研究成果和更好地说明基因工程的基本原理, 引用了多位学者公开发表的实验结果和著作成果, 特此对这些为基因工程发展做出很大贡献的学者表示真诚的感谢。同时真诚感谢厦门大学教务处和生命科学学院对编写此书的大力支持以及生命科学学院实验师楼斌女士在图文电脑处理方面的帮助。

基因工程是一门发展十分迅速的新兴学科, 天天有新研究成果发表, 并且它涉及的知识十分广泛。囿于我们知识面和学术水平, 疏漏和错误在所难免, 恳请同行和读者批评、指正。

楼士林

2001 年 11 月于厦门大学

目 录

1 绪论——基因工程概况	1
1.1 引言	1
1.1.1 基因工程含义	1
1.1.2 基因工程理论依据	1
1.1.3 基因工程研究的基本技术路线	3
1.1.4 基因工程研究发展史	3
1.2 基因工程研究内容	4
1.2.1 基础研究	4
1.2.2 应用研究	8
1.3 基因工程的安全性问题	14
1.4 基因工程研究发展前景	15
2 DNA 重组	16
2.1 DNA 的组成和结构	16
2.1.1 DNA 的组成	16
2.1.2 DNA 的空间结构	17
2.1.3 DNA 复制起始位点和复制子的结构	20
2.1.4 DNA 转录启动子和转录区的结构	22
2.2 天然 DNA 的制备	25
2.2.1 天然 DNA 的来源和用度	25
2.2.2 天然 DNA 的提取	26
2.2.3 DNA 的纯化	30
2.2.4 DNA 的浓缩	33
2.3 限制性核酸内切酶和 DNA 片段化	34
2.3.1 限制性核酸内切酶	34
2.3.2 限制性核酸内切酶作用机制	35
2.3.3 限制性核酸内切酶的识别序列	36
2.3.4 限制性核酸内切酶切割 DNA 的位点	39
2.3.5 限制性核酸内切酶反应系统	41
2.3.6 限制性核酸内切酶的 Star 活性	46

2.3.7	DNA 分子片段化	47
2.3.8	DNA 分子的限制性图谱	49
2.4	特异性 DNA 片段的 PCR 扩增	54
2.4.1	PCR 基本原理	54
2.4.2	PCR 扩增特异性 DNA 片段的主要条件	56
2.4.3	PCR 扩增 DNA 片段的方法	59
2.4.4	常用的 DNA 片段 PCR 扩增系统	60
2.5	DNA 片段的化学合成	60
2.5.1	寡核苷酸片段的化学合成的方法	60
2.5.2	化学方法合成的 DNA 片段	66
2.6	DNA 片段大小的凝胶电泳检测	68
2.6.1	琼脂糖凝胶电泳参数	69
2.6.2	DNA 片段 (分子) 大小的估算	71
2.6.3	非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳参数	73
2.6.4	脉冲场凝胶电泳 (CHFE) 参数	74
2.7	DNA 片段的连接重组	76
2.7.1	DNA 连接酶	76
2.7.2	DNA 片段之间的连接	77
2.7.3	DNA 重组类型	83
3	基因克隆载体	85
3.1	质粒克隆载体	86
3.1.1	与构建克隆载体相关的质粒性质	86
3.1.2	构建质粒克隆载体的基本策略	89
3.1.3	质粒克隆载体的构建	90
3.2	病毒 (噬菌体) 克隆载体	104
3.2.1	λ 噬菌体克隆载体	106
3.2.2	cosmid 克隆载体	112
3.2.3	M13 噬菌体克隆载体	115
3.2.4	CaMV 克隆载体	118
3.2.5	烟草花叶病毒 (TMV) 克隆载体	123
3.2.6	SV40 克隆载体	124
3.2.7	反转录病毒克隆载体	127
3.2.8	腺病毒克隆载体	131
3.2.9	痘苗病毒克隆载体	136

3.2.10 杆状病毒表达克隆载体	138
3.3 染色体定位整合克隆载体	138
3.3.1 定位整合克隆载体的几种模式	139
3.3.2 定位整合克隆载体的定位整合效率	141
3.3.3 定位整合克隆载体	142
3.4 人工染色体克隆载体	146
3.4.1 人工染色体克隆载体含义和特点	146
3.4.2 人工染色体克隆载体的构建	147
3.4.3 人工染色体克隆载体的应用	148
3.5 特殊用途克隆载体	149
3.5.1 启动子探针型克隆载体	149
3.5.2 诱导型表达克隆载体	150
3.5.3 反义表达克隆载体	152
3.5.4 组织特异性表达克隆载体	153
3.5.5 分泌型表达克隆载体	156
3.5.6 双启动子表达克隆载体	156
3.5.7 串联启动子表达克隆载体	157
3.5.8 含增强子表达克隆载体	158
4 目的基因的制备	159
4.1 目的基因	159
4.1.1 结构基因组成	159
4.1.2 基因的排列	162
4.2 目的基因的制备	164
4.2.1 直接分离法	164
4.2.2 构建基因组文库分离法	166
4.2.3 cDNA 基因文库的构建及目的基因分离	178
4.2.4 利用聚合酶链式反应技术扩增目的基因	195
4.2.5 基因的化学合成	204
4.3 目的基因的分​​离	207
4.3.1 目的基因的功能克隆	207
4.3.2 序列克隆法	210
4.3.3 筛选目的基因片段的差别杂交及减法杂交技术	215
4.3.4 利用差示分析法分离目的基因克隆	221
4.3.5 功能结合法筛选目的基因	235

4.3.6	DNA 插入诱变法分离目的基因	237
4.3.7	应用基因定位克隆技术分离筛选目的基因	240
4.3.8	基因的定位候选克隆法	248
4.3.9	染色体显微切割与微克隆法	249
4.3.10	根据生物大分子间的相互作用分离目的 cDNA 克隆	251
5	目的基因导入受体细胞	257
5.1	受体细胞	257
5.1.1	原核生物细胞	258
5.1.2	真菌细胞	259
5.1.3	植物细胞	260
5.1.4	动物细胞	260
5.2	重组 DNA 分子转入原核生物细胞	261
5.2.1	重组质粒 DNA 分子转化大肠杆菌	261
5.2.2	重组 λ 噬菌体 DNA 分子转导大肠杆菌	269
5.2.3	受体细胞的选择	271
5.2.4	重组 DNA 分子转入真核细胞	274
5.3	重组子的筛选	285
5.3.1	遗传表型直接筛选法	286
5.3.2	依赖于重组子结构特征分析的筛选法	296
5.3.3	核酸分子杂交检测法	297
5.3.4	免疫化学检测法	313
5.3.5	转译筛选法	317
5.3.6	亚克隆法	318
5.3.7	插入失活法	319
5.3.8	电子显微镜作图检测法	321
5.3.9	转录产物作图	322
5.3.10	基因表达产物分析法	324
5.3.11	DNA 序列测定法	326
6	外源基因的表达	342
6.1	基因表达的机制	342
6.1.1	外源基因的起始转录	342
6.1.2	mRNA 的延伸与稳定性	342
6.1.3	外源基因 mRNA 的有效翻译	343

6.1.4	表达蛋白在细胞中的稳定性	344
6.1.5	目的基因沉默	345
6.2	基因表达的调控元件	346
6.2.1	启动子	346
6.2.2	增强子	352
6.2.3	终止子	353
6.2.4	衰减子	354
6.2.5	绝缘子	354
6.2.6	反义子	355
6.3	外源基因表达系统	355
6.3.1	大肠杆菌基因表达系统	356
6.3.2	芽孢杆菌表达系统	364
6.3.3	链霉菌表达系统	367
6.3.4	蓝藻表达系统	371
6.3.5	酵母表达系统	374
6.3.6	哺乳动物细胞基因表达系统	378
6.3.7	植物细胞基因表达系统	385
6.4	基因表达产物的检测与分离纯化	389
6.4.1	基因表达产物的检测	389
6.4.2	基因表达产物的分离纯化	394
7	基因工程应用	399
7.1	基因工程药物	399
7.1.1	基因工程激素类药物	399
7.1.2	基因工程细胞因子类药物	400
7.1.3	基因工程抗体	403
7.1.4	基因工程受体	404
7.1.5	基因工程疫苗	405
7.2	转基因植物	408
7.2.1	抗病虫害转基因植物	408
7.2.2	抗逆转基因植物	413
7.2.3	药用转基因植物	414
7.2.4	转基因植物食品	415
7.2.5	其他转基因植物	417
7.3	转基因动物	418

7.3.1	利用转基因动物改良动物品种·····	418
7.3.2	转基因动物作为生物反应器·····	419
7.3.3	转基因动物筛选药物·····	420
7.3.4	转基因动物应用于人体器官移植·····	422
7.4	基因治疗·····	423
7.4.1	肿瘤的基因治疗·····	424
7.4.2	分子遗传病的基因治疗·····	430
7.4.3	心血管病的基因治疗·····	433
7.4.4	艾滋病的基因治疗·····	435
7.5	基因芯片·····	437
7.5.1	基因芯片原理及技术·····	437
7.5.2	基因芯片的应用·····	440
8	基因工程的争论和安全措施·····	443
8.1	对基因工程的争论·····	444
8.2	生物安全的争论带来的全球关注和影响·····	449
8.3	基因工程安全措施·····	451
8.4	我国的生物技术发展及其安全问题·····	455
附录	·····	461
2-1	限制性核酸内切酶酶族的识别序列和切割位点 (一) ·····	461
2-2	识别序列甲基化对限制性核酸内切酶切割活性的影响·····	463
2-3	无磷酸化的寡核苷酸连杆·····	473
2-4	部分 MCS 连杆·····	475
3-1	λ DNA 上的限制性核酸内切酶识别位点·····	477
8-1	1993 年 12 月 24 日中华人民共和国国家科学技术委员会第 17 号令发布的《基因工程安全管理办法》·····	479
8-2	我国 1997 年颁布的《农业生物基因工程安全管理实施办法》 ·····	485
8-3	我国 2001 年 6 月 6 日颁布的《农业转基因生物安全管理条例》 ·····	506
参考文献	·····	517

1 绪论——基因工程概况

1.1 引言

1.1.1 基因工程含义

在漫长的生物进化过程中，基因重组从来没有停止过。在自然力量以及人的干预下，通过基因重组、基因突变、基因转移等途径，推动生物界无止境地进化，不断使物种趋向完善，出现了今天各具特色的繁多物种，有的能耐高温，有的不怕严寒，有的适应干旱的沙漠，有的能在高盐度海滩上或海水中不断生繁，有的能固定大气中的氮气等等。种种生物的特殊性状成为今天定向改造生物、创造新物种的丰富遗传资源。但是没有一种完善无缺的生物，有待科技工作者有目的地去进一步改造。按照人们的愿望，进行严密的设计，通过体外 DNA 重组和转基因等技术，有目的地改造生物种性，使现有的物种在较短时间内趋于完善，创造出更符合人们需求的新的生物类型，这就是基因工程。

基因工程最突出的优点，是打破了常规育种难以突破的物种之间的界限，可以使原核生物与真核生物之间、动物与植物之间、甚至人与其他生物之间的遗传信息进行重组和转移。人的基因可以转移到大肠杆菌中表达，细菌的基因可以转移到植物中表达。

1.1.2 基因工程理论依据

①不同基因具有相同的物质基础。地球上的一切生物，从细菌到高等动物和植物，直至人类，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 片段。而所有生物的 DNA 的基本结构都是一样的。因此，不同生物的基因（DNA 片段）原则上是可以重组互换的。

虽然某些病毒的基因定位在 RNA 上，但是这些病毒的 RNA 仍可以通过反转录产生 cDNA，并不影响不同基因的重组或互换。

②基因是可切割的。基因直线排列在 DNA 分子上。除少数基因重叠排列外，大多数基因彼此之间存在着间隔序列。因此，作为 DNA 分子上一个

特定核苷酸序列的基因，允许从 DNA 分子上一个一个完整地切割下来。即使是重叠排列的基因，也可以把指定的基因切割下来，尽管破坏了其他基因。

③基因是可以转移的。基因不仅是可切割下来的，而且发现生物体内有的基因可以在染色体 DNA 上移动，甚至可以在不同染色体间进行跳跃，插入到靶 DNA 分子之中。由此表明基因不仅是可转移的，而且也证明基因组是可以重组的。

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。一系列三联密码子（除极少数的几个以外）同氨基酸之间的对应关系，在所有生物中都是相同的。也就是说遗传密码是通用的，重组的 DNA 分子不管导入什么样的生物细胞中，只要具备转录翻译的条件，均能合成出原样的氨基酸。即使人工合成的 DNA 分子（基因）同样可以转录翻译出相应的氨基酸。现在，基因是可以人工合成的。

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。

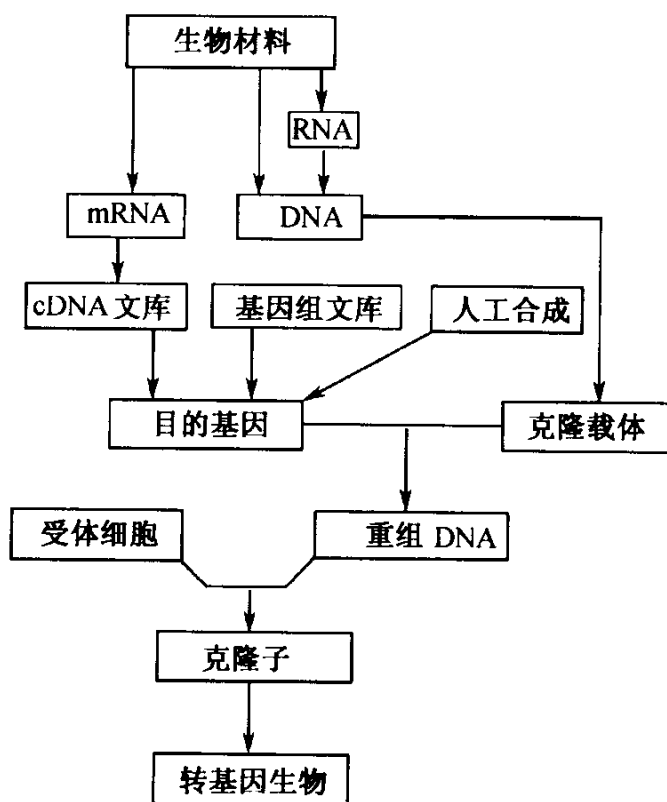


图 1-1 基因工程基本技术路线

1.1.3 基因工程研究的基本技术路线

基因工程研究的成败，很大程度上取决于技术路线的严密设计。当研究目标确定后，必须根据前人研究成果和自己新的研究思路，严密设计可行的实验技术路线。基因工程研究的基本技术路线见图 1-1，在此基础上根据自己研究的目的要求进行增删和具体化。

1.1.4 基因工程研究发展史

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。基因工程研究的发展大致可分为以下几个阶段：

①基因工程的准备阶段。1944 年，美国微生物学家 Avery 等通过细菌转化研究，证明 DNA 是基因载体。从此之后，对 DNA 构型开展了广泛研究，至 1953 年 Watson 和 Crick 建立了 DNA 分子的双螺旋模型。在此基础上进一步研究 DNA 的遗传信息，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。以上研究成果为基因工程问世提供了理论上的准备。

20 世纪 60 年代末 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，为基因工程问世在技术上做好了准备。

②基因工程问世。在理论上和技术上有了充分准备后，于 1973 年，Cohen 等首次完成了重组质粒 DNA 对大肠杆菌的转化，同时又与别人合作，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。自基因工程问世以来的这二十几年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那样快, 但也已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世纪八九十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。

1.2 基因工程研究内容

1.2.1 基础研究

基因工程问世以来, 科技工作者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, 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。

1.2.1.1 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地构建了Ti质粒衍生的克隆载体后, 植物基因工程研究随之就迅速发展起来。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。可以认为构建克隆载体是基因工程技术路线中的核心环节。至今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。尤其是适合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。

1.2.1.2 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。

随着克隆载体技术的发展，至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，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，转基因细胞系用于病理研究。近年来还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）。

1.2.1.3 目的基因研究

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所当然的是目的基因。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、虫害和恶劣生境的基因；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, 1743 个基因)、产甲烷球菌 (1 664 976 bp, 1682 个基因)、聚胞藻 *Synechocystis* PCC 6803 (3 573 407 bp, 3168 个基因)、幽门螺旋杆菌 (1 667 867 bp, 1590 个基因)、大肠杆菌 K-12 (4 639 221 bp, 4288 个基因)、啤酒酵母 ($\sim 12 \times 10^6$ bp, 5882 个基因)、*Aquifex aeolicus* (1 551 335 bp, 1512 个基因)、*Borrelia burgdorferi* (0.9×10^6 bp, 843 个基因)、闪烁古生球菌 (*Archaeoglobus fulgidus*) (2.18×10^6 bp, 2436 个基因)、*Methanococcus thermoautotrophicum* (1.75×10^6 bp, 1855 个基因)、枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*) (4.21×10^6 bp, 4100 个基因)。

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，目前正在实施“水稻基因组计划”。以稻米为主食的我国早在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，并于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（籼稻）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、英国合作的“家猪基因组计划”也已经启动。

1.2.1.4 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。

限制性核酸内切酶和连接酶是基因工程关键的工具酶，由于这两种酶的发现和分离纯化，使体外基因重组得以实现。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。根据限制性核酸内切酶识别序列的规律性，还有一些能识别某些识别序列的限制性核酸内切酶没有被发现，今后随着研究的深入将会逐步填补这些空白。此外，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，前者只能连接具黏性末端的DNA片段；后者既能连接具黏性末端的DNA片段，也能连接具平末端的DNA片段。是否有更好用的DNA连接酶，有待进一步研究。

DNA聚合酶用于人工合成连杆、引物等DNA小片段以及含基因的较大的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, 给当今生命科学很多学科提供了先进的研究手段。用于 PCR 的耐热性 DNA 聚合酶有 *Taq* DNA 聚合酶、*Tth* DNA 聚合酶、*Bst* DNA 聚合酶、*Pwo* DNA 聚合酶、*pfu* DNA 聚合酶等。DNA 修饰酶用于 DNA 分子或 DNA 片段的修饰。修饰 DNA 分子的有甲基化酶, 修饰 DNA 片段末端的有碱性磷酸酯酶、末端脱氧核苷酸转移酶、核酸外切酶 III、 λ 核酸外切酶、核酸外切酶 VII 等。

1.2.1.5 基因工程新技术研究

自从基因工程问世以来, 用于基因工程的技术不断出现, 不断更新。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、Dig 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、套式引物 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。

基因工程研究新技术层出不穷的发展, 推动了基因工程的迅速发展。同时随着基因工程研究的不断深入, 将会出现新的研究技术。

1.2.2 应用研究

基因工程技术已广泛应用于医、农、牧、渔等产业, 甚至与环境保护也有密切的关系。研究成果最显著的是基因工程药物, 转基因植物的研究也取得了喜人的成果。