

# 遗传工程参考资料

(内部参考)

(五)

中国科学院图书馆

一九七八年十月

## 目 录

### 一 综述

|                        |     |   |
|------------------------|-----|---|
| 遗传工程研究的动向及其发展的趋势 ..... | 罗朝典 | 1 |
|------------------------|-----|---|

### 二 译文

|                       |     |    |
|-----------------------|-----|----|
| 美国关于DNA重组体的研究现状 ..... | 陆子宏 | 13 |
|-----------------------|-----|----|

|                        |     |    |
|------------------------|-----|----|
| 关于德国质体的研究及其控制的现状 ..... | 林玉章 | 29 |
|------------------------|-----|----|

|                |     |    |
|----------------|-----|----|
| 病毒的整合与摘出 ..... | 陆子宏 | 34 |
|----------------|-----|----|

|                       |    |    |
|-----------------------|----|----|
| 限制性核酸内切酶在体内的新作用 ..... | 郭芳 | 61 |
|-----------------------|----|----|

### 三 消息、简讯

|                |     |    |
|----------------|-----|----|
| 细菌基因接入酵母 ..... | 李锦芳 | 64 |
|----------------|-----|----|

|           |     |    |
|-----------|-----|----|
| 简 讯 ..... | 张树庸 | 66 |
|-----------|-----|----|

|            |    |    |
|------------|----|----|
| 学术活动 ..... | 柯为 | 67 |
|------------|----|----|

### 四 会议动态

|                        |     |    |
|------------------------|-----|----|
| 日本学术会议关于DNA分子重组的意见 ... | 李 晔 | 68 |
|------------------------|-----|----|

|                 |     |    |
|-----------------|-----|----|
| 遗传工程国际讨论会 ..... | 张树庸 | 71 |
|-----------------|-----|----|

## 遗传工程研究的动向及其发展趋势

罗 明 典

遗传工程学不仅在细胞水平上而且在分子水平上来研究遗传的物质基础——基因的分离、合成、鉴别、重组、转移、表达以及与生境相互关系的机理。从而按照人类的需要对任何生命有机体实行革命性的改造和控制，以及定向地创造新的生物类型。从它们当中最经济地索取人类所需要的有价值的产品，因此，它作为一门新型的技术学在生物科学中的发展必将产生深远的影响。

近几年来，即使是遗传工程不论从细胞水平或是分子水平上在某些方面的研究均取得可喜的进展。如有效融合剂（PEG等）在原生质体融合的应用，基因的分离，人工合成基因及其在寄主细胞中的功能表达，各种工具酶（去胞壁酶类、限制性核酸内切酶、连接酶）的获得及其应用，以及各种分子载体（如质体和病毒等）的遗传学及其利用的研究所取得的成果等等，这一切均为深入开展遗传工程学的研究及其完成所提出的任务奠定了可靠的基础。

生物体细胞融合及其新遗传性的表现引起了注意。一种没有细胞壁的植物细胞如烟草、矮牵牛等通过融合途径具有全能性地发育成完整植株。某些植物如烟草、水稻等花粉培养发育成完整植株。近年已发展成为植物遗传育种的一项行之有效的手段，也为制药工业、生物制品工业等方面开辟了另一条新途径。目前，科学工作者正在设计从原生质体水平创造具有自身共生固氮能力的新型植物类型（包括粮食植物）的美好蓝图，尽管工作难度大，但研究活动积极地开展着。

最近，美国 Giles K (Iowa 大学)<sup>(1)</sup>想通过原生质体融合途径使一种原来不具共生固氮力的菌根真菌获得固氮能力，新型菌

根而建立起共生固氮系统。这一设想已在松树 (*Pinus radiata*) 菌根中获得成功。人们已知须腹菌 (*Rhizopogon* sp.) 与松树形成菌根而建立共生联系, 这种菌为该植物吸收磷酸盐类起着良好作用, 但不能使  $N_2$  还原成  $NH_3$ 。因此, 这种菌根真菌在共生中只能在供应磷素营养, 而不能在供应氮素营养方面发挥作用, 为此, 借助真菌原生质体融合途径使得菌根而建立起一种新的共生固氮体系, 实验结果表明, 虽则真菌细胞从小的百分比吸收细菌, 但在人工培养基上显示其固氮能力。分离到 5 株固氮真菌菌株, 与 50 株植物实生苗进行共生固氮实验, 证明 40 株植物生长健康, 与真菌建立共生联系, 并具有固氮力。这一事实有力地说明真菌通过原生质体融合途径从固氮细菌获得固氮特性, 然而, 这种新固氮特性能否稳定地持续下去, 需要做进一步实验。可以看出, 这项研究成果尽管是初步的, 但反映出一个新的苗头, 它不仅对农业、林业有一定价值, 而且对于开展经济作物共生固氮问题的研究提供了极其重要的启示。

近几年来, 从分子水平上所进行的遗传工程研究, 严格地说就是指分子水平上的基因工程研究, 这是七十年代发展起来的一门新兴的技术科学, 它是建立在分子生物学理论上而得到蓬勃的发展。已经历了一个重要的准备阶段, 现在开始进入实际操作阶段。这里面有两大核心问题: 一是如何把高等生物特定基因转移到细菌中去获得功能性的表达? 一是如何把原核生物某一特定基因转移到真核生物中去获得功能性表达? 这两大问题正是遗传工程所要攻克的堡垒。就头一个问题来说, 任何遗传物质要通过某种分子载体如质体等进行体外重组, 而后将重组体转移到细菌细胞中使之在那里表现新的功能, 即新的遗传物质能转录, 并翻译成蛋白质。这样, 人们一方面有可能利用这种“基因工程菌”用于生产实践, 另一方面有可能利用原核的遗传结

构和功能这个较清楚的已知体系来研究高等生物的未知体系。还必须开展对其生理生化和生态的研究以便更有效地、定向地控制它的遗传性及其变异性、稳定性及其适应性；同时还必须开展实际应用的研究以加快实行工业化生产，若真能做到这点，毫无疑义，所必需的产品必将成倍地增长。

1974年来，已经证明真核生物DNA片段借助基因工程技术转移到原核生物中去，並表现一定功能而得到了实验科学论据。如南非蟾蜍(*Xenopus laevis*)的 $\gamma$  DNA与pSC101联结，得到重组质体在*E. coli*中稳定地传代复制(2-4)用另一种蛙的DNA插入pSC101也得到类似结果(5)，重要的是这一过程是在*E. coli*小细胞(Minicells)中发生，而在这小细胞中不存在染色体，也不合成DNA，仅含有质体，其中有杂种质体分子，这对研究杂种质体分子的行为是有重要意义的。

普通果蝇(*Drosophila melanogaster*) DNA通过酶切连的处理，与pSC101或RSF=1010或ColE1质体形成嵌合体或杂种质体分子(如pDm)转移到*E. coli*中获得无性增殖(6-9)。

海胆(如*Strongylocentrotus purpuratus*)组蛋白基因通过聚核苷酸连接酶实现了与pSC101的“缝合”，得到了带组蛋白基因的重组分子，在*E. coli*中实行了无性增殖，用放射性标记组蛋白的mRNA来探查细菌无性繁殖系，确实含有组蛋白基因(10)。

鼠线粒体DNA( $m\pm$ DNA)通过酶切连的处理，与pSC101建立了重组体，此重组质体在大肠杆菌K12中表现复制，带有重组质体的细菌所分离出来的小细胞不含DNA，而产生 $m\pm$ 信息的质体，用放射性追踪识别这种杂种质体制造新的蛋白质，而在小细胞中的线粒体蛋白质链比鼠线粒体蛋白质链短得多(11-12)。

兔 $\beta$ 珠蛋白序列插入到 *E. coli* 质体上, 建立起杂种质体, 是以 mRNA 为模板借助逆转录酶合成单链 DNA, 再借助 DNA 多聚酶建成互补链 DNA, 而得到双链 DNA (ds DNA), 被认为是珠蛋白基因, 引入 *E. coli* 中, 不参与染色体重组, 而与染色体外遗传因子——质体 (pCR1) 结合, 形成杂种质体 (pCR1- $\alpha$ G1) 转入 *E. coli* 中后, 表现无性增殖, 用放射性珠蛋白 cDNA 杂交实验得以证实, 重组质体所携带的珠蛋白序列相当于兔珠蛋白  $\beta$ -链编码基因序列的部分 (13)。另一些研究者采用另一些质体 miniColE1 或 pSC101

或 pCR1 与珠蛋白 cDNA 建立重组质体在大肠杆菌中表现一定复制能力 (14—15)。最近用人体珠蛋白基因合成拷贝插入 pMB9 质体上, 并转到大肠杆菌 1776 菌株中获得成功。通过①<sup>32</sup>P 标记的  $\alpha$ 、 $\beta$  及  $\gamma$  cDNA 杂交试验, ②用不同限制性核酸内切酶切割杂种质体后所产生片段, 并对它们的大小及性质进行分析, ③对限制性核酸内切酶所产生的某些片段的核苷酸序列的分析, 分离并鉴别出带人体珠蛋白基因  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  cDNA 序列在质体中的存在 (16)。

除了上述来自无脊椎、脊椎、冷血、热血真核生物多细胞体系 DNA 与载体所建立的重组体转移至原核生物细胞中以外, 对真核生物单细胞系——酵母 (如 *Saccharomyces cerevisiae*) 在基因转移方面引起了兴趣。例如酵母 DNA 片段, 其中有 *hisB*, 已通过载体 ( $\lambda$ 噬菌体或 ColE1 质体) 建成杂种  $\phi$  质体分子, 把它组入到 *E. coli* 组氨酸缺陷型突变株中具有功能的表现 (18), 即不能合成组氨酸的 *E. coli* 在没有组氨酸培养基上不生长, 当培养基加了这种氨基酸才能很好生长, 用它作受体, 带组氨酸 (*hisB*) 的酵母做给体, 通过  $\lambda$  DNA 与酵母 DNA 连接, 建成杂种分子组入到 *E. coli* 组氨酸缺陷型突变株染色体上, 使得这个突变株在没有组氨酸培养基上

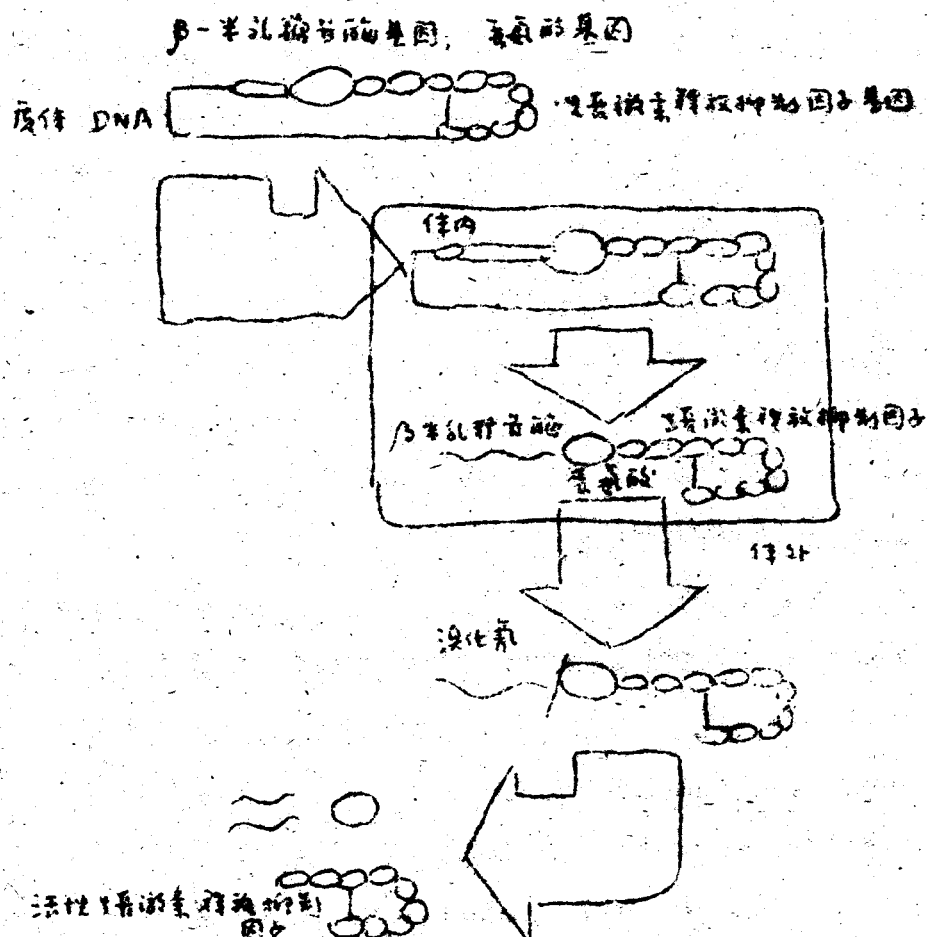
生长, 这说明“工程菌”具有功能性表达。在Ratizkin R 等(1977)(19)工作中用poly(dA dT)“连接法”于体外建成 Colel 一酵母 DNA 重组质体并转移到 E. coli 营养缺陷型突变株而得到类似的结果; 另外人工合成酵母基因(如酪氨酸转移 RNA 基因), 这个基因具有双链分子结构, 含有 199 个核苷酸对(大多数基因有 1000 个以上的核苷酸对), 开头的 52 个核苷酸对是促进子(决定基因产物自然形成及其过程如何或何时再重复进行), 紧接着 126 个核苷酸对是控制该基因产物(即酪氨酸转移 RNA), 最后 21 个核苷酸对是终止子(命令停止一个新分子形成及其他更复杂的作用)(20)(1977)。全合成的促进子和终止子连接成基因, 引入到 E. coli 病毒(即噬菌体)DNA 上表现了基因活性: 1)、制造酪氨酸<sup>t</sup>RNA<sub>2</sub>, 2)、这种病毒(指杂种噬菌体)能够增殖。最近报导(1978)(43)把大肠杆菌的亮氨酸基因捻接到一种面包酵母染色体基因上去, 使得酵母体内承受了重组 DNA, 认为细菌基因在酵母中的存在并不妨碍酵母基因的表达! 但细菌基因在酵母中的完全表达还未完成, 有待进一步研究。

近年发现酵母(*S. cerevisiae*)细胞中有质体 DNA 分子存在(17), 其中有的质体带抗药性基因, 如一个带 2.2 $\mu$ 的质体环状 DNA 上带有寡霉素抗性因子, 这样的质体在每个单倍体基因组上有 50—80 拷贝数, 占酵母整个 DNA 的 3%, 这个 2.2 $\mu$ 质体含有二个倒装重复序列(inverted repeat sequences), 这个序列含 600 个碱基对(44), 这些事实证明高等生物单细胞系中有类似原核生物质体的存在, 并表现一定功能。至于这种质体能否做为遗传信息的运载工具以及在生物进化中占有怎样的地位, 需要做进一步研究。

1976年曾报导了 Anderson J. 等<sup>(21)</sup> (明尼苏达州大学) 把人体产胰岛素基因转移到酵母细胞中去, 实现了真核之间的基因转移。转移的结果, 导致酵母产生胰岛素, 这一消息对科学界引起了巨大的反响。但后来另一些科学家对此项结果表示怀疑, 实验重复不出来 (1976), 直至1977年5月, Goodman M 和 Rutter WJ 等<sup>(22)</sup> (加州大学) 把鼠胰岛素基因转移到大肠杆菌中去获得成功。他们是以鼠 mRNA 为模板通过逆转录酶合成 cDNA, 再通过 T. DNA 连接酶与 pMB9 质体 DNA 连接获得重组体, 转移到大肠杆菌中去, 建立无性繁殖系。这些无性繁殖系, 含有从鼠胰岛素 mRNA 制得的 cDNA 重组质体, 共有四种, 其中三种是含有: ①、鼠胰岛素 I 完整密码区; ②、前胰岛素 I 前体肽; ③、mRNA 未翻译的 3' 末端区, 第四个重组质体含有前胰岛素 II A 链所衍生出来的序列。其后, 随细菌的无性繁殖, 胰岛素基因在寄主细胞中得到扩增, 并且对其核苷酸排列顺序进行了测定, 这是第一次对高等生物基因核苷酸序列的测定, 尽管胰岛素基因在寄主中还没有表达, 但胰岛素基因转移的成功是朝向细菌生产胰岛素的方向迈开了有意义的一步。对于胰岛素基因在细菌中的表达问题, 当时该作者自信地认为, 需要半年时间有可能解决这个表达问题, 后一直没有取得突破。据报导, 研究者使用的质体 (pMB322) 未经美国卫生研究院批准, 有违章行为而使此项研究未能按预期计划完成 (1977) <sup>(24)</sup>。然而遗传工程研究工作不停顿地进行着! 研究工作者又采用了另外的途径, 使胰岛素 mRNA 通过逆转录酶作用制得的 cDNA, 然后把它与细菌质体 (pBR 322 或 pBN9) 捻合, 再组入到细菌中去, 获得杂种无性繁殖系, 5 个这样的“无性繁殖系”已编排 DNA 序列, 分析这 5 个 DNA 是含有胰岛素序列的一部分或完整的胰岛素序列。毫无疑问, 这项研究

成果为进一步研究胰岛素特别是人胰岛素在细菌中的合成提供了可能。一旦人体胰岛素基因真能通过“基因工程菌”获得完全功能性表达，那通过这种菌可进行发酵生产，这不仅对医药工业做出重大贡献，而且对世界上约六千万糖尿病患者痛苦的解除会得到欢呼！

时隔几个月，美国加利福尼亚遗传工程师Boyer H.W 等人 (1977) (25, 26) 把人工合成的人胰岛素基因通过人工合成的限制酶联结器插入到大肠杆菌质体中去，然后转移至大肠杆菌中，並



图：细菌合成活性人胰岛素模式图。

• 据称印度于1976年从苦瓜 (*Momordica charantia*) 果实及其根状用乙醇抽提了胰岛素。

在那产生少量的生长激素释放抑制因子前体，经溴化氰在蛋氨酸多肽链切断，得游离活性生长激素释放抑制因子 (Somatostatin ) (27) (见图) (28)，这是第一次成功地利用重组 DNA 技术使大肠杆菌生产高等生物的功能性的产物。这种激素产生菌是通过大肠杆菌 pBR 3 2 2 质体上嵌合了一段来自大肠杆菌的乳糖操纵子，使得人工合成的生长激素释放抑制因子基因在乳糖操纵子的调控系统下进行表达。选择特定的大肠杆菌 K-1 2 作为受体菌，使得在实验室以外的条件下这种激素产生菌不能生存，这就不必担心实验菌逃出室外的危险；同时在实验设计上，使菌产生生长激素释放抑制因子前体，也是有利于安全的措施。根据研究者的实验结果表明，这种带杂种质体的“工程菌”培养物能够产生毫克量生长激素释放抑制因子，即 2 加仑（英制：1 加仑 = 4.546 立升）的培养液可制取 5 毫克的产量 (30)。这是基因工程进入实际操作的良好开端，扩大发酵生产时，如果在控制所必需的生态条件的同时，又保持“工程菌”所具新的遗传性之稳定及其适应，那么用这种“工程菌”来实行成倍地工业化生产则成为现实。这样，就可以使生产达到“多快好省”的目的。无怪乎美国科学院院长宣称，这项研究成果是“头等的科学大胜利”！

继生长激素释放抑制因子基因在细菌中的表达取得重大突破之后，美国科学工作者对比生长激素释放抑制因子更复杂的激素如鼠生长激素 (Somatotropin，简称 GH) 和人体绒膜催乳生长激素 (Human chorionic somatomammotropin，简称 HCS)，结构基因的转移及其在细菌中的核苷酸序列的扩增开展了研究 (Seeburg P.H 等, 1977, Shine J 等, 1977) (31-32)，都是由 mRNA 得 cDNA 然后把 cDNA 连接到质体 (pBR 3 2 2 或 pMB9) 上，建成重组质体，转化大肠杆菌，得到无性繁殖系和扩增。HCS

一级结构与人体生长激素极为相似，含有191个氨基酸的多肽。如果通过遗传工程途径能使这种复杂的激素基因在原核生物中有所功能表达的话，那么这种产品实现微生物工业化生产成为可能，其意义无疑是重大的。

人们知道，生长激素释放抑制因子是一种含有14个氨基酸的多肽，是一种化学信使，它不仅对调节机体生长和在体内抑制其他激素的释放起着重要作用，而且对糖尿病和生长失调起着重要的治疗作用。但是如何得到这种激素呢？有三条途径：1）、从高等动物脑、肠、胰器官提取，据称过去第一次要得5毫克这种激素时，就需要抽提50万头羊脑组织，可谓繁矣！2）、人工化学合成方法，成本高，据称合成一克这样的激素需要30000美元，可谓贵矣！3）、当今创造的“遗传工程菌”有可能建立活的细菌“工厂”，这样所得产品无疑是要便宜得多了。据称1克这样的激素，仅需300美元，或更少些，比人工合成激素的价格降至100倍以上。由此可见，目前生长激素释放抑制因子在细菌中实现了生物合成所取得这一新的成就对当今遗传工程研究及其发展是个巨大推动。

上面所谈到的是真核生物基因转移到原核生物中去所取得的一些令人可喜的成果，然而原核基因进入到高等生物及其功能表达又是如何呢？这是一个极其复杂的问题。继1971年第一次报导细菌基因转移到人体细胞之后，最近又报导通过病毒做载体把细菌 $\beta$ -半乳糖苷酶基因（人体有一种缺 $\beta$ -半乳糖苷酶的先天性遗传病）转入到缺乏该酶的人体细胞中去，实验结果证明人体细胞确实制造了细菌 $\beta$ -半乳糖苷酶，然后，从转化了的人体细胞中分离出这种酶，确实证明它具有细菌酶的特性（Fox J., 1976）（33）。如果这种酶基因在人体细胞正常工作的话，那无疑对人体某种遗传病的“基因治疗”

是有重要意义的，这就有可能通过“遗传工程”手段人工控制人类某些难治之症带来希望。

利用SV40晚期基因缺失病毒作为分子载体研究外来基因在动物单细胞组织培养中的表达有了一些进展。Berg P (1976) (45)首次报导 $\lambda$ 片段与SVGT-1组成了杂种病毒，与助手病毒 $t_sA58$ 一起混合感染猴肾细胞，用异源双链及凝胶电泳等方法确证 $\lambda$  DNA片段插入的方位及大小，但未观察到 $\lambda$ 片段的转录及翻译产物。

Hamer D.H. (1977) (46)报导了另一种SV40的晚期基因缺失株作分子载体，通过粘着末端连接法，将大肠杆菌 $SU^+$ 基因连接之，感染猴细胞后，证明重组病毒不仅在猴细胞中增殖数代，并检测到细菌DNA转录产物。看来至目前为止，外来基因由原核生物转移到高等真核生物所用SV40病毒作为运载工具算是一个成功的载体。

至于原核基因转移到高等植物中去的问题，有种种设想，如nif基因转移到某些根食植物中实行其自身共生固氮，植物某些病害的消除以及创建抗病性植物类型等等，但至目前为止，还没有找到更理想的载体把原核生物某些有益基因引入到植物细胞中去以实现正常功能性表达。但有四种情况值得特别注意：1)、把原核中具有广泛寄主范围的质体如RP4与nif体外重组(34-35)，得重组体后，再与致癌Ti质体实行重组，通过它携带nif基因由根癌病农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)引起植物“结瘤”(36)，并分析是否具有共生固氮行为，如果nif基因在新宿主中真能发挥作用的话，那既可获得固氮的有益性，又可消除病害的危害性，一举两得；2)、通过原生质体融合途径有可能把原核生物有益基因转入到高等植物以实现其共生作用。有一些基本事实得以证明，①。植物原生质体具有吸收异源DNA以及其他生命体的能力(27)，②。某些植物

(如烟草等)原生质体具有“全能性”发育成植株(38),有可能在这些植株建立其共生固氮体系;③、已获得行共生固氮根瘤原生质体(带有nif的根瘤菌)(39),有可能通过不同种原生质体融合得到带nif的融合体,最后发育成“全能性”植株的可能性,至目前为止,某些粮食作物原生质体及杂种融合体还没有实现“全能性”发育成单个植株。3)、花椰菜花叶病毒(CMV)\*DNA(双链环状, MW  $4.4 \times 10^6$ )和细菌(*Ps. aeruginosa*)质体(双链环状, MW  $3.6 \times 10^6$ )DNA建成杂种质体分子(40),这种环状杂种分子含有病毒复制序列、质体复制序列和卡那霉素抗性基因,仅有这种杂种分子才有可能在细菌和植物细胞中进行无性繁殖,基因表达,这就为基因从任何植物插入其他植物以及使它转移到其他植物提供了一个遗传载体(Langridge J. 1977)对CMV用作载体是值得注意的,4)、所谓体内遗传工程(Kleckner N等, 1977)(41),其实质就是质体基因如抗药性因素于宿主细胞内的易位,它可以在DNA同源性很差的受体中易位,凡具有易位能力的DNA序列,即所谓易位子,系一个特定的DNA序列,也是易位的遗传单位,它可以从一个质体易位到另一个质体,也可以易位到染色体上去,所得到的带易位子的质体或染色体又可以传给体继续其易位子的传递(1977)(42),R因子在细菌中广泛的易位,有的R因子(如RP4)具有广泛的寄主范围,携带某一特定基因片段,通过它有可能转入到高等植物细胞的载体如T1质体和CMV病毒建立杂种分子系。而这种基因究竟在寄主植物细胞中的相互关系以及有不易位行为?在新的内部环境里能否保持其稳定性及其适应性?对这些问题尚不清楚,值得深入研究。

\* 已知100种植物病毒接近全部是单链RNA,几种是双链RNA,6种病毒包括CMV是DNA,已证明此病毒以DNA形式携带遗传信息。-11-

## 结 束 语

遗传工程研究所取得的成果及其发展,不仅在理论上或是在实践上必将对生物科学产生深远影响。随着研究的深入和实验手段的现代化,遗传工程作为一门新兴技术科学的存在,不仅在农业上为经济植物解决自身元素营养、抗病性等方面带来希望,而且在医工方面大量生产医药产品展现了美好的前景。真核基因转移到原核生物中已实现其功能表达,特别是最近人脑激素——生长激素释放抑制因子在细菌中实现了生物合成,所取得这项鼓舞人心的新成果,这是遗传工程中一次重大突破,它的成功标志着人类掌握基因操纵技术对自然界生命有机体进行有计划的改造已有了良好开端。通过基因体外重组及基因转移方法所取得一系列成果不断地启示着人们在不久将来有可能把生物细胞某一特定基因直接或间接地转移到高等生物体中去以根治某种疾病,如人的糖尿病、植物肿瘤病等等,或者使机体获得它本身原来不具有某种新的特性,如非豆科共生固氮、植物的抗害性等等,总之,基于上述两方面的问题——真核到原核、原核到真核的基因转移正是遗传工程学所面临的、长期需要探究的战斗任务。

(参考文献从略)

1978. 4. 14.

# 美国关于DNA重组体的研究现状

原著：大岛靖美

## I. 引言

在试管内制作不同性质的DNA重组体和利用这种方法研究基因，在美国可以说是从1971年开始的。这样的研究也叫作遗传工程 (gene technology 或 genetic engineering) 或基因操作 (gene manipulation)，作为遗传学划时代的发展，遗传工程正在生物学、医学及工业中开辟新的领域。美国到目前为止已占已经发表的这个领域全部研究的2/3，而且该领域的研究数目仍然还在飞跃地增加。现在笔者于美国波鲁吉木阿的卡耐基研究所与铃木义昭氏一同正在从事对家蚕的丝纤蛋白基因有关的研究，并已卷入遗传工程的怒涛般之进展旋涡中。由于考虑到目前进程中有许多发表的研究，不可只靠笔者一人就正确地抓住研究的现状，所以想只限所知的范围内叙述现状以供读者参考。

## II. 有关DNA重组的技术

在目前的研究中，研究的要旨是在试管内把作为目标的基因 (DNA) 和大肠杆菌的质体 (细胞质性遗传因子) 或 SY 40 等动物病毒的DNA结合，用它侵染质体或病毒的寄主细胞并使其增殖。用种种方法选择具有目标基因的细胞，然后取出这个基因并加以研究。接着又分别设想出这些过程的新方法。

### 1. 限制酶

现在大都已知道限制酶即是只在双链DNA某些特定碱基序列 (3—6对碱基) 上切开的酶。这种酶在基因DNA的提纯及构造分析、DNA相互结合等DNA重组体研究的许多方面起着必不可少的作用，如果没有限制酶则谈不上这个领域研究的发展。关于限制酶的提纯和切

断部分的碱基序列之论文仅在美国就发表了数十篇,而且在这方面最近还日益不断地增加<sup>1~3</sup>。在需要限制内切酶文献表(Restriction Endonuclease Reference Chart)时,可向 Bethesda 研究实验室(BRL)申请领取。而且在上述的BRL与新西兰的Biolabs 还出售十数种限制酶。在 Miles 公司也出售几种限制酶。而且还有在单链DNA之特异部位切断的限制酶的报告<sup>4~7</sup>。

## 2 基因的提纯

一般情况下目标基因在该生物的全部DNA中所占比例不很大,在高等生物的不重复基因中占 $10^{-5} \sim 10^{-7}$ 。可以说含量很低。在这种情况下为了获得有关特定基因的DNA重组体,把从该生物当中提取的全部DNA作为直接的资料是不恰当的,因此有必要预先对这个基因进行某种程度的提纯(对于微生物基因、高等生物有许多重复的基因、或可能进行下述大量筛选的场合下则不必提纯)。为了提纯基因必须给这个基因定量,最普遍的方法是借助于用这个基因的信使RNA(MRNA)或从mRNA由反转录酶合成的互补的DNA形成杂种分子<sup>5</sup>。最近已有合成了与RNA全长大体对应的互补DNA的报告<sup>6,1~7</sup>。以前使用的基因提纯法汇总在文献(5)中。目前最常使用的基因提纯法是用限制酶消化与琼脂凝胶电泳根据分子量而分离。在依靠限制酶所得的DNA片断之大量提纯方面,最近则以RPC-5树脂作为支架体通过逆相色层分离来完成。在手中有特定的信使RNA或者由它通过反转录酶而制成的互补DNA时,依靠单独分离与它们形成杂种的DNA则可以极高的效率提纯对应的基因。虽然实际上这种方法在以前也用于微生物的各种互补DNA的提纯,然而最近使用把与鸡的卵白肽信使RNA对应互补的DNA负链与纤维素结合的柱层析成功地高效率地提纯了卵白肽基因的正链(分子量约为300万的物质进行了300倍的浓缩,回收率为60~70%。O'malley 等(得克萨斯的Baylor 学院)

依靠聚合酶由负链合成了正链，使用结合两条链的柱层析，从鸡的DNA中提纯了卵白肽基因的正链及负链，而且依靠两者间的退火把双链的卵白肽基因（含有外侧的DNA）提纯了大约1万倍<sup>11</sup>）。

上述方法有只能直接应用于单链DNA之缺点，但是在引起DNA局部变性的高浓度甲酰胺的条件下RNA、DNA杂种分子则比DNA的双链构造要稳定，因此可以看到RNA与负链形成杂种，并把DNA的正链挤出而形成一个单链环（R-R-loop）（M. Thomas 等<sup>12</sup>），White 与 Hogness<sup>12</sup>）及斯坦福大学。含有这个R-环的三条链的构造在除去甲酰胺的情况下还能保持稳定，依靠比DNA两条链的密度高的氯化铯中离心可以把它从DNA双链中分离出来。由于这个方法，在具备信使RNA的情况下可以用来高效率地提纯基因DNA，所以已经使用在几个实验室中，图1所示的是P. Wellaner 和I. David的例子（Carnegie 研究所、Baltimore）（<sup>3</sup>）。再者，如果把用于形成R环的RNA与汞结合，我认为即使在具有一SH基的亲合层析柱中也能分离<sup>14、15</sup>），而且，假如使与汞结合的单链DNA或mRNA和上述的层析柱结合则可如上述方法那样提纯DNA的互补链。

还可以合成基因，象红血蛋白基因等那样的基因提纯是很困难的，在容易得到mRNA的情况下则可使用通过酶从mRNA合成的基因（参照文献（7）与第四节）。还有用化学合成大肠杆菌乳糖操纵子的操纵基因<sup>16、17</sup>）与抑制子RNA等<sup>18</sup>）已知构造的基因的例子。

### 3. 载体

在目标基因的插入中担任搬运这种基因的质体或病毒称为载体或运载工具。大肠杆菌等细菌的病毒称为噬菌体。现在使用在已发表的研究中的载体几乎全是以大肠杆菌为寄主的几种质体与入噬菌体<sup>19</sup>），其它则只有少数几例使用动物病毒<sup>40</sup>的缺失变异性<sup>20、21、21</sup>）。