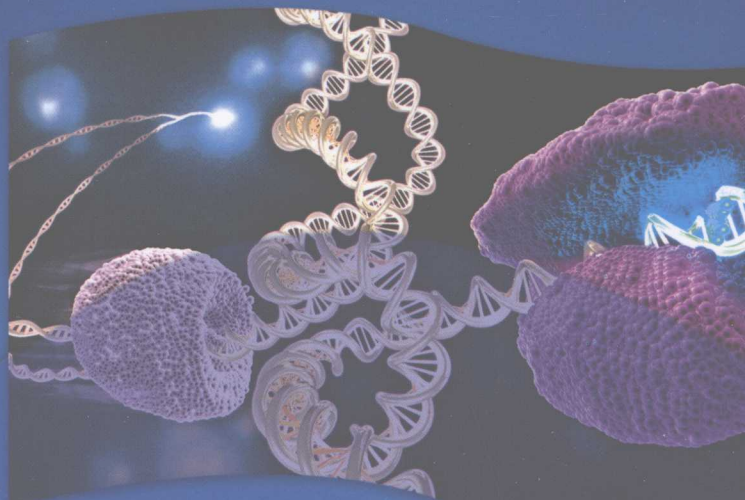




普通高等教育“十一五”规划教材

基因工程

何水林 主编



科学出版社

www.sciencep.com

内 容 简 介

普通高等教育“十一五”规划教材

基因工程

何水林 主编

ISBN 7-03-019255-9

2008年1月第1版第1次印刷

(“十一五”国家重点图书出版项目)



科学出版社

定价：30.00元

北京 100071

内 容 简 介

本书共十章,重点阐述基因工程概论、基因工程条件、基因工程的主要技术、目的基因的获得、重组子构建及其转化,外源基因表达的分子机制及提高其表达的技术策略、外源基因表达产物的分离和纯化、植物、动物和微生物基因工程的技术流程与应用和基因工程的安全性评价与管理等内容。本书坚持基础性、通用性和教学实用性相结合,在重点阐述基本理论、原理和方法的同时,尽可能反映基因工程领域的一些新进展。

本书的基础性和实用性强,突出了农林院校生物学专业偏向应用的特点,适合用作全国农林院校生物学及生物工程等相关专业本科教材。

图书在版编目(CIP)数据

基因工程/何水林主编. —北京:科学出版社,2008

(普通高等教育“十一五”规划教材)

ISBN 978-7-03-021228-3

I. 基… II. 何… 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(2008)第 027560 号

责任编辑:甄文全 / 责任校对:邹慧卿
责任印制:张克忠 / 封面设计:耕者设计工作室

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>

铭浩彩色印装有限公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2008年5月第一版 开本:787×1092 1/16

2008年5月第一次印刷 印张:16 3/4

印数:1—4 000 字数:375 000

定价:28.00元

(如有印装质量问题,我社负责调换(环伟))

编写人员名单

主 编 何水林 (福建农林大学)

副主编 仪治本 (中北大学)

余丽芸 (黑龙江八一农垦大学)

张学文 (湖南农业大学)

编写成员 (以姓氏汉语拼音排序)

艾育芳 (福建农林大学)

何水林 (福建农林大学)

黄天培 (福建农林大学)

马洪丽 (福建农林大学)

马 慧 (沈阳农业大学)

牟少亮 (福建农林大学)

牛颜冰 (山西农业大学)

潘大仁 (福建农林大学)

施碧红 (福建师范大学)

王桂华 (黑龙江八一农垦大学)

徐 波 (江西农业大学)

仪治本 (中北大学)

余丽芸 (黑龙江八一农垦大学)

张 涛 (陕西理工学院)

张学文 (湖南农业大学)

前 言

21 世纪是生物科学的世纪, 其中基因工程是发展最为迅猛、最为引人注目的学科, 它以 DNA 重组技术为核心, 实现了按人类意图跨物种基因交流以定向改良生物性状, 不但酝酿着一场对自然界和人类社会产生深刻影响的产业革命, 而且必将极大地促进人类对生命奥秘的探索进程。近年来, 包括人类基因组计划在内的各种模式生物基因组计划的相继开展或完成, 使得基因操作技术和基因组学不断地融合在一起, 基因工程在生物科学与技术中的核心地位日显突出, 在任何领域都已显示出广阔的应用前景, 相应地, 也给基因工程的教学提出了更高的要求。基因工程课程建设和教学改革无论对于生物学专门人才的培养, 还是对于开展科技普及都是高等教育十分重要的任务。

近 20 年来, 已出版了多部基因工程方面的专著或教材, 对促进学科发展起到了积极的作用。这些专著或教材的内涵和形式均各具特点, 但是作为大学本科教材的局限性也很明显, 在实际课程教学过程中明显感到较难把握。主要原因有三: 一是基因工程是在分子生物学、微生物学、细胞生物学、细胞工程学、分子遗传学等多门学科基础上诞生的应用学科, 基础理论知识和技术原理复杂, 内容与多学科知识交叉性强, 信息量丰富, 课程体系把握上比较困难; 二是基因工程发展势头迅猛, 理论的不断突破和技术上的不断进步, 新的成果大量涌现, 在课程教学中体现这些新进展的随意性很强; 三是大多数农林高校基因工程课程的学时数只有 40 个左右, 讲授的内容和时间都有限, 如何既能体现课程特有的基本理论、基本技术原理和方法, 又能反映其作为生物学应用科学分支的应用和实践, 体现高等农业院校生物科学专业的特点, 确实面临着较多的矛盾。编写一部适应农业院校生物专业本科教学的使用教材, 一直是我们多年来的心愿。

本书在内容安排上注意与其他系列教材内容上的分工和界定, 在章节安排上遵循基因工程技术流程各个环节的内在逻辑关系。第一章绪论主要介绍基因工程的内容和步骤、基因工程的理论基础、发展历程, 学习基因工程的重要性以及学好基因工程课程的方法, 让学生对基因工程有一个概括性的认识; 第二章到第四章, 主要介绍基因工程的两大重要工具——酶和载体以及基因工程的主要技术原理, 为后续章节的重组 DNA 技术奠定基础; 第五章为基因的制备, 为开展重组 DNA 技术准备材料; 第六章为 DNA 重组的操作过程, 是基因工程的核心内容; 第七章为基因的表达, 是基因工程成功与否的决定因素, 这一章是分子生物学内容在基因工程上的应用, 重点介绍要提高外源基因表达效率技术策略及其理论依据; 第八章介绍基因工程表达产物的分离和纯化; 第九章是基因工程的应用, 分别介绍植物、动物和微生物基因工程的技术流程, 有利于学生对前面章节内容的回顾并使之系统化, 同时着重介绍植物、动物和微生物基因工程的应用的领域、策略和成功的例子; 第十章为基因工程产品安全与管理, 培养学生对基因工程以及基因工程产品有一个正确的认识和科学严谨的态度。在具体编写上坚持基础性、通

用性和教学实用性相结合，重点阐述基本理论、方法和原理，同时尽可能反应基因工程领域的一些新进展，努力突出以下特点：一是基础性，力求较为全面地介绍基因工程基本概念、基本理论和基本方法原理，满足农业院校生物专业及其他相关专业本科生学习的需要；二是实用性，在内容上进行适当的精简和提炼，减少与分子生物学、分子遗传学等相关基础课程内容上的过多重复，在章节内容安排上也力求科学合理，尽量减少重复；三是尽量突出农林院校生物专业偏向应用的特点，在植物基因工程、动物基因工程、微生物基因工程等基因工程的应用部分内容、范例安排上，突出农业生物基因工程的应用性特点。

本书在编写过程中，得到了科学出版社甄文全博士的热情帮助和指导，得到了福建农林大学教务处以及各参编学校有关领导的支持。博士生邱爱连，硕士生刘文菊、黄本坤、王梅、赖燕、黄定全、熊海清、黄国栋、杨健等研究生在图表的绘制和文字的校对等方面付出了辛勤的汗水。此外，在编写中，引用或参考了不少学者的研究成果以及相关的教材中的部分内容。在此一并致以衷心的感谢。

虽然在本书的编写上进行了不懈的努力，但是由于时间紧迫，加上作者们知识和水平的局限，书中欠妥和错误之处在所难免，衷心希望广大读者提出宝贵修改意见，以便今后进一步完善和提高。

编者

2007年12月

本书共分十章。第一章绪论，介绍基因工程的概念、发展历史、应用现状及前景。第二章基因工程的基本原理，介绍基因工程的基本原理、基本方法和基本程序。第三章植物基因工程，介绍植物基因工程的基本原理、基本方法和基本程序。第四章动物基因工程，介绍动物基因工程的基本原理、基本方法和基本程序。第五章微生物基因工程，介绍微生物基因工程的基本原理、基本方法和基本程序。第六章基因工程的安全问题，介绍基因工程的安全问题、安全评价和安全法规。第七章基因工程的伦理问题，介绍基因工程的伦理问题、伦理评价和伦理法规。第八章基因工程的知识产权问题，介绍基因工程的知识产权问题、知识产权保护和管理。第九章基因工程的产业化问题，介绍基因工程的产业化问题、产业化评价和产业化法规。第十章基因工程的未来展望，介绍基因工程的未来展望、未来发展趋势和未来挑战。

目 录

前言

第一章 绪论	1
第一节 基因工程的内容与应用	1
一、基因工程的概念	1
二、基因工程的技术流程	1
三、基因工程的基本条件	2
四、基因工程的技术策略	3
五、基因工程的作用与影响	4
第二节 基因工程的发展历史和理论基础	5
一、基因工程的发展历史	5
二、基因工程理论基础和技术支撑	8
第三节 学习基因工程课程的意义和方法	9
一、学习和研究基因工程的意义	9
二、学习基因工程的方法	10
思考题	11
第二章 基因工程的酶学基础	12
第一节 限制性内切核酸酶	12
一、限制-修饰系统	12
二、限制性内切核酸酶的类型	13
三、限制性内切核酸酶的命名	14
四、II型限制内切核酸酶的基本特性	14
五、影响限制性内切核酸酶活性的因素	18
六、限制性内切核酸酶对DNA的消化作用	19
第二节 DNA连接酶	21
一、DNA连接酶的发现	21
二、DNA连接酶的特点	21
三、DNA连接酶的作用机理	22
四、影响连接反应的因素	23
第三节 DNA聚合酶和反转录酶	25
一、DNA聚合酶	25
二、反转录酶	29
第四节 DNA修饰酶	29
一、末端脱氧核苷酸转移酶	29

二、T4 多核苷酸激酶	30
三、碱性磷酸酶	31
第五节 外切核酸酶	32
一、大肠杆菌外切核酸酶 VII	32
二、双链外切核酸酶	33
第六节 单链内切核酸酶	34
一、S1 核酸酶	34
二、Bal 31 核酸酶	34
三、脱氧核糖核酸酶 I	35
第七节 RNA 酶	36
一、核糖核酸酶 A	36
二、核糖核酸酶 H	36
三、核糖核酸酶 T1	36
思考题	37
第三章 载体	38
第一节 克隆载体	38
一、质粒载体	38
二、噬菌体载体	41
三、噬菌体-质粒杂合载体	46
四、人工染色体及其应用	48
第二节 表达载体	50
一、质粒表达载体	50
二、病毒表达载体	55
三、大片段表达载体	59
第三节 特殊用途的载体	60
一、插入或定点整合突变载体	60
二、启动子探针型表达载体	61
三、RNAi 载体	62
思考题	64
第四章 基因工程的主要技术及其原理	65
第一节 DNA 和 RNA 的提取和纯化	65
一、DNA 提取的基本原理与方法	65
二、RNA 提取的基本原理与方法	68
三、DNA 或 RNA 浓度、纯度和相对分子质量的测定	69
第二节 凝胶电泳	70
一、琼脂糖凝胶电泳	71
二、琼脂糖变性胶电泳	72
三、聚丙烯酰胺凝胶电泳	72

四、脉冲电场凝胶电泳	73
五、凝胶电泳中 DNA 的检测	74
第三节 核酸和蛋白质的分子杂交	74
一、探针的标记	74
二、Southern 杂交	76
三、Northern 杂交	77
四、菌落(或噬菌斑)杂交	77
五、斑点印迹杂交和狭线印迹杂交	78
六、Western 杂交	78
七、液相杂交	79
第四节 聚合酶链式反应技术	79
一、PCR 技术原理	79
二、PCR 反应体系	80
三、PCR 技术的应用	83
第五节 DNA 序列分析	86
一、Maxam-Gilbert 化学降解法	86
二、Sanger 双脱氧链终止法	87
三、DNA 的自动测序	88
四、DNA 的测序策略	88
五、核苷酸序列的生物信息学分析	89
第六节 基因定点诱变	90
一、盒式诱变	90
二、寡核苷酸引物诱变	90
三、PCR 诱变	91
第七节 DNA 与蛋白质互作分析	92
一、酵母单杂交系统	92
二、凝胶阻滞试验	93
三、DNase I 足迹试验	94
四、DNA 与蛋白质互作的免疫沉淀分析	94
思考题	95
第五章 目的基因的获得	97
第一节 PCR 扩增获得目的基因或 cDNA	97
一、已知序列基因的 PCR 扩增	97
二、常规 PCR 衍生的几种基因克隆技术	98
第二节 基因组文库的构建与基因分离	104
一、基因组文库的类型	104
二、构建基因组文库应满足的条件	105
三、基因组文库的构建	106

87	四、其他载体基因组文库的构建	112
87	五、基因组文库的扩增筛选	113
87	第三节 cDNA 文库的构建与筛选	116
87	一、cDNA 文库的特征及发展	116
87	二、构建 cDNA 文库应满足的条件	117
87	三、cDNA 文库的构建	118
87	四、cDNA 文库的筛选	122
87	第四节 根据基因差异表达获得目的基因	124
87	一、差异显示 PCR	124
87	二、cDNA 代表性差异分析	125
87	三、抑制性削减杂交	126
87	四、RNA 任意引物 PCR	127
88	第五节 基因的化学合成	127
88	一、寡聚核苷酸单链的化学合成	127
88	二、探针的化学合成	128
88	三、连接子和接头的合成	128
88	四、基因的半合成(酶促合成)	128
88	五、全长基因化学合成	128
88	思考题	129
	第六章 DNA 重组的操作	130
88	第一节 DNA 的体外重组	130
88	一、黏性末端的连接	130
88	二、平末端的连接	132
88	三、PCR 产物的连接	135
88	四、Gateway 载体构建系统	136
88	第二节 重组体导入受体细胞的原理与技术	139
88	一、重组 DNA 导入大肠杆菌的方法	139
88	二、重组 DNA 导入真核细胞的方法	143
88	三、转化率及其影响因素	150
88	第三节 重组子的筛选与鉴定	152
88	一、载体表型选择法	152
88	二、根据插入基因的表型选择法	153
88	三、DNA 电泳检测法	153
88	四、PCR 检测法	154
88	五、核酸杂交检测法	154
88	六、免疫化学检测法	154
88	七、DNA 序列分析	155
88	思考题	156

第七章 外源基因的表达及其优化策略	157
第一节 影响外源基因表达的因素	157
一、阅读框架对转化基因表达的影响	157
二、顺式作用元件对基因表达的影响	157
三、翻译过程对表达的影响	160
四、表达系统对表达产物的影响	161
第二节 外源基因在原核细胞中的表达	161
一、原核生物基因表达与调控的特点	162
二、原核生物基因表达载体的组成特征	162
三、原核生物基因表达的受体系统	164
四、优化外源基因在原核细胞中表达的策略	165
第三节 外源基因在真核细胞中的表达	168
一、真核生物基因表达与调控的特点	169
二、真核生物基因表达载体的组成特征	169
三、真核表达的受体系统	173
四、优化外源基因在真核细胞中表达的策略	174
思考题	176
第八章 外源基因表达产物的分离纯化	177
第一节 重组蛋白分离纯化方法选择的基本原则	177
一、纯化策略的制定	177
二、层析类型的选择	179
三、多种分离纯化技术的联合应用	180
四、合适分离纯化介质的选择	181
五、分离纯化过程的规模	182
第二节 不同表达形式的蛋白质分离纯化	183
一、分离纯化的一般步骤	183
二、大肠杆菌表达的重组蛋白质的分离纯化	190
三、哺乳动物细胞表达的重组蛋白质的分离纯化	200
第三节 重组蛋白质的质量检测	203
一、重组蛋白质的质量控制指标	203
二、重组蛋白的质量检测项目与方法	206
三、重组蛋白质的保存	207
思考题	207
第九章 基因工程的应用	209
第一节 植物基因工程的应用	209
一、植物基因工程技术流程	209
二、植物基因工程的应用	213
三、基因工程与常规育种相结合进行作物遗传改良	221

781	第二节 动物基因工程的应用	222
781	一、动物基因工程的技术流程	222
781	二、动物基因工程的应用	224
781	第三节 微生物基因工程的应用	226
781	一、微生物基因工程的技术流程	226
781	二、微生物基因工程的应用	226
781	思考题	232
801	第十章 基因工程及其产品安全性管理	233
801	第一节 基因工程的安全性问题	233
801	一、基因工程产品对人类健康的安全性	233
801	二、基因工程对生态系统的安全性	234
801	三、转基因生物与农业生产的安全性	235
801	四、基因工程与伦理道德	236
801	五、基因工程与动物权益保护	238
821	第二节 基因工程的安全性评价	239
821	一、基因工程生态安全性评价	239
821	二、基因工程食品安全性评价	240
841	第三节 基因工程安全管理	244
841	一、生物安全管理	244
841	二、中国转基因生物的安全管理	246
841	思考题	248
861	主要参考文献	249
861	1. 基因工程的安全性问题	249
861	2. 基因工程的安全性评价	249
861	3. 基因工程的安全管理	249
861	4. 基因工程的安全性问题	249
861	5. 基因工程的安全性评价	249
861	6. 基因工程的安全管理	249
861	7. 基因工程的安全性问题	249
861	8. 基因工程的安全性评价	249
861	9. 基因工程的安全管理	249
861	10. 基因工程的安全性问题	249
861	11. 基因工程的安全性评价	249
861	12. 基因工程的安全管理	249
861	13. 基因工程的安全性问题	249
861	14. 基因工程的安全性评价	249
861	15. 基因工程的安全管理	249
861	16. 基因工程的安全性问题	249
861	17. 基因工程的安全性评价	249
861	18. 基因工程的安全管理	249
861	19. 基因工程的安全性问题	249
861	20. 基因工程的安全性评价	249
861	21. 基因工程的安全管理	249
861	22. 基因工程的安全性问题	249
861	23. 基因工程的安全性评价	249
861	24. 基因工程的安全管理	249
861	25. 基因工程的安全性问题	249
861	26. 基因工程的安全性评价	249
861	27. 基因工程的安全管理	249
861	28. 基因工程的安全性问题	249
861	29. 基因工程的安全性评价	249
861	30. 基因工程的安全管理	249
861	31. 基因工程的安全性问题	249
861	32. 基因工程的安全性评价	249
861	33. 基因工程的安全管理	249
861	34. 基因工程的安全性问题	249
861	35. 基因工程的安全性评价	249
861	36. 基因工程的安全管理	249
861	37. 基因工程的安全性问题	249
861	38. 基因工程的安全性评价	249
861	39. 基因工程的安全管理	249
861	40. 基因工程的安全性问题	249
861	41. 基因工程的安全性评价	249
861	42. 基因工程的安全管理	249
861	43. 基因工程的安全性问题	249
861	44. 基因工程的安全性评价	249
861	45. 基因工程的安全管理	249
861	46. 基因工程的安全性问题	249
861	47. 基因工程的安全性评价	249
861	48. 基因工程的安全管理	249
861	49. 基因工程的安全性问题	249
861	50. 基因工程的安全性评价	249
861	51. 基因工程的安全管理	249
861	52. 基因工程的安全性问题	249
861	53. 基因工程的安全性评价	249
861	54. 基因工程的安全管理	249
861	55. 基因工程的安全性问题	249
861	56. 基因工程的安全性评价	249
861	57. 基因工程的安全管理	249
861	58. 基因工程的安全性问题	249
861	59. 基因工程的安全性评价	249
861	60. 基因工程的安全管理	249
861	61. 基因工程的安全性问题	249
861	62. 基因工程的安全性评价	249
861	63. 基因工程的安全管理	249
861	64. 基因工程的安全性问题	249
861	65. 基因工程的安全性评价	249
861	66. 基因工程的安全管理	249
861	67. 基因工程的安全性问题	249
861	68. 基因工程的安全性评价	249
861	69. 基因工程的安全管理	249
861	70. 基因工程的安全性问题	249
861	71. 基因工程的安全性评价	249
861	72. 基因工程的安全管理	249
861	73. 基因工程的安全性问题	249
861	74. 基因工程的安全性评价	249
861	75. 基因工程的安全管理	249
861	76. 基因工程的安全性问题	249
861	77. 基因工程的安全性评价	249
861	78. 基因工程的安全管理	249
861	79. 基因工程的安全性问题	249
861	80. 基因工程的安全性评价	249
861	81. 基因工程的安全管理	249
861	82. 基因工程的安全性问题	249
861	83. 基因工程的安全性评价	249
861	84. 基因工程的安全管理	249
861	85. 基因工程的安全性问题	249
861	86. 基因工程的安全性评价	249
861	87. 基因工程的安全管理	249
861	88. 基因工程的安全性问题	249
861	89. 基因工程的安全性评价	249
861	90. 基因工程的安全管理	249
861	91. 基因工程的安全性问题	249
861	92. 基因工程的安全性评价	249
861	93. 基因工程的安全管理	249
861	94. 基因工程的安全性问题	249
861	95. 基因工程的安全性评价	249
861	96. 基因工程的安全管理	249
861	97. 基因工程的安全性问题	249
861	98. 基因工程的安全性评价	249
861	99. 基因工程的安全管理	249
861	100. 基因工程的安全性问题	249

第一章 绪 论

基因工程是 20 世纪 70 年代在分子遗传学、细胞生物学基础上发展起来的,是一种可以按照人们的意愿设计、改造和组建生物品种的高新技术。虽然问世不久,但已充分显示出无限的生命力,它将对自然界和人类社会生活产生广泛而深远的影响。

第一节 基因工程的内容与应用

一、基因工程的概念

基因工程是通过基因操作,将目的基因或 DNA 片段与合适的载体连接转入目标生物细胞,通过复制、转录、翻译外源目的基因以及蛋白质的活性表达,使转基因生物获得新的遗传性状的操作。基因工程的目标是实现转基因生物性状的定向改良,技术上包括基因或 DNA 的体外重组、转基因、重组子筛选与扩大繁殖等多个环节,目的性和技术性都很强,需要严密的实验设计。

基因工程具有以下几个重要特征:①打破物种的界限,实现跨物种的基因转移;②通过已知功能基因的遗传转化,可进行物种的定向改良;③可以创造出自然界中原本没有的生物。

在不严格的情况下,有时又把基因工程称为基因操作、遗传工程或基因克隆,但严格来说它们的意义是有差别的。基因操作泛指对基因进行酶切、连接、转化等分子生物学操作,是基因工程的技术基础;基因克隆是指对基因进行分离和扩大繁殖等操作过程,其目的在于获得大量的基因拷贝,它在技术上主要包括载体构建、大肠杆菌遗传转化、重组子筛选和扩大繁殖等环节,很多时候并不涉及动物、植物等的转化及性状的遗传改良,显然与基因工程不完全一致;广义的遗传工程是指所有能改变生物体遗传性状的技术,包括常规的有性杂交育种、染色体工程、细胞工程以及基因工程等。

二、基因工程的技术流程

基因工程的技术流程包括以下几个基本环节。

1. 目的基因克隆

从特定的生物基因组或 cDNA 中通过各种方法分离和扩大繁殖获得足够量的目的基因或 cDNA 序列。

2. 载体的准备

选择合适的载体,并对载体 DNA 进行克隆,制备足够量的达到一定纯度的载体 DNA。

3. 目的基因与载体的连接

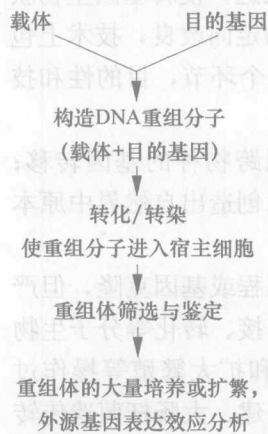
选择适当的克隆策略，将目的基因连接于载体的多克隆位点或启动子和终止子之间，实现 DNA 重组。

4. 重组 DNA 转化/转染

通过各种方法，将重组 DNA 转化/转染进入大肠杆菌细胞、酵母菌细胞、植物外植体或动物细胞。

5. 重组体的筛选与鉴定

利用载体上提供的选择标记基因进行抗性筛选，获得大肠杆菌或酵母菌等抗性细胞系，或通过植株再生、胚移植等手段获得转基因植株或转基因动物。对所获得的转化细胞、转基因植株或转基因动物进行分子鉴定。



6. 重组体的大量培养，外源基因表达效应分析与开发应用

将经筛选和鉴定出来的大肠杆菌、酵母转化细胞进行大量扩大繁殖，对外源基因的表达蛋白进行分离与纯化并进行后续结构与功能的研究；分析外源基因表达及其对植物和动物性状的影响（图 1-1）。

三、基因工程的基本条件

从技术流程来看，基因工程包括四个基本条件：目的基因、载体、工具酶和宿主细胞。

（一）目的基因

图 1-1 基因工程流程图

目的基因是开展基因工程的目标和物质基础。生物性状在很大程度上是由遗传物质控制的，而遗传的结构和功能的基本单位是基因。因此，应根据基因工程的目标，确定基因工程的技术策略和选择特定的基因。一旦获得控制某一性状的基因，就可以应用该基因对生物性状实施定向遗传改良。基因可以分为结构基因和调节基因两种类型。研究表明，调节基因可控制多种不同的结构基因或代谢途径，对生物性状遗传改良的效果比结构基因更为显著。近几十年来，人类在有价值基因资源进行挖掘、分离、鉴定和应用上不遗余力，各种模式生物的基因组计划及其功能基因组学研究蓬勃开展，基因资源已成为各国竞相争夺的有限战略资源。

（二）载体

外源基因往往不能自行复制、很难进入细胞，需要特殊的运载工具将其引入宿主细胞才能进行复制或表达，这种运载工具就是载体。根据其来源可分为质粒载体、噬菌体载体、cosmid 载体、人工染色体载体等；根据用途可分为克隆载体和表达载体。新载

体的研制和开发是推动基因工程研究和应用不断向前发展的重要研究内容之一。

(三) 工具酶

以 DNA 重组技术为核心的基因工程的诞生和发展是以各种核酸酶的发现和应用为基础的,特别是限制性内切核酸酶和 DNA 连接酶的发现和应用,才真正使 DNA 分子的体外切割与连接真正成为可能。此外, DNA 聚合酶、反转录酶、外切核酸酶以及末端脱氧核苷酸转移酶、T4 多核苷酸激酶、碱性磷酸酶等核酸修饰酶的发现和使用,为分子克隆和转基因技术策略的制定和实施提供了十分便利的工具。新的工具酶的研究和开发是促进基因工程技术进步的重要基础领域之一。

(四) 宿主细胞

受体细胞是能摄取外源重组 DNA 并使其稳定维持和表达,或有待于实施遗传改良的细胞。

原核生物中的大肠杆菌、真核生物中的酵母等细胞具有繁殖快、生命周期短、基因组简单、便于培养和基因操作等诸多优点,普遍被用作基因克隆、融合蛋白表达、基因组文库或 cDNA 文库构建的宿主菌,或者用来建立生产目标产物的生物反应器。由于大肠杆菌等原核细胞不具备对真核基因表达产物的糖基化等加工机制,一般采用酵母细胞表达真核生物蛋白质。

植物细胞也被用来转化外源 DNA,利用特定的载体系统(如 T-DNA 等)可将外源 DNA 整合进入植物基因组。转化的植物细胞在合适的培养条件下可再生成完整的植株,外源基因在转基因植株及其后代株系中能够表达并稳定遗传。一般用植物的愈伤组织、器官、细胞或原生质体作为转基因的外植体,但真正接受外源基因的还是具体的细胞。基因工程在植物遗传改良上的应用已取得了较大的进展,已在大豆、棉花、水稻、玉米、番茄等重要农作物上已获得了大量的转基因植株或株系,棉花、大豆、番茄等作物的部分转基因品系甚至已经商品化了。

动物细胞也已被用作基因工程的受体细胞,但由于体细胞不易再分化成个体,所以通常以受精卵为受体,通过显微注射和胚胎移植相结合获得转基因动物;或以干细胞为受体,利用电激等方法将外源基因转入干细胞,再通过囊胚注射获得转基因动物;或以体细胞为受体,将外源基因转入体细胞,并将体细胞核移植到去核的卵母细胞,通过重构胚体外培养最终获得转基因动物。转基因鼠、鱼、鸡、牛等已获得了成功。此外,以动物体细胞作为基因工程受体,也已获得了转基因细胞系,这些细胞系可用作基础研究的材料,或用作生物反应器生产基因工程药物。

人的体细胞同样也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人体细胞作为受体,通过转基因使其恢复正常生长状态(基因治疗)。

四、基因工程的技术策略

(一) 强化基因的表达,改善生物性状

(1) 增加目标性状有关的代谢途径中限速酶基因的拷贝数,提高表达酶的活性,达

到改善特定代谢途径的限速步骤以提高目标产物的含量,实现目标性状的改良。

(2) 使用强启动子驱动目标基因,使目标基因转录合成更多的 mRNA,并翻译出更多的关键酶分子,进而提高目标产物的合成量。

(3) 提高目标途径激活因子的表达。生物性状的形成往往涉及众多基因的表达及相应的多条代谢途径,这些基因的表达又受其上游少数重要转录因子或信号传递途径中的重要分子开关的控制。通过这些激活因子表达的增强来提高其所触发相关基因的表达,最终实现生物性状的改良。

(二) 关闭特定基因的表达,改善生物性状

(1) 关闭目标代谢途径的抑制蛋白的编码基因或应用不受反馈抑制的突变基因。这种策略是去除代谢途径中具有反馈抑制作用的某些因子或这些因子作用的 DNA 靶位点(如操纵子),从而解除其对代谢途径的反馈抑制,提高目标代谢流。

(2) 阻断与目标途径相竞争的代谢途径。细胞内各相关代谢途径彼此偶联以代谢网络的形式存在,任何目标途径必定与多个相关途径共享同一底物分子和能量形式。因此,在不影响细胞基本生理状态的前提下,阻断或降低竞争途径的代谢流,使更多的底物和能量进入目标途径,无疑对目标途径产物产量的提高是有益的。

(3) 基因治疗。将正常的基因转入患者的细胞中取代病变基因,从而表达所缺乏的产物,或者通过关闭或降低异常表达的基因等途径,达到治疗某些遗传病的目的。

(三) 基因的异源表达赋予生物新的功能

(1) 具有特定功能的蛋白质编码基因的异源表达,使转基因生物能合成目标蛋白。大部分的生物反应器都是这种类型。例如,利用酵母工程菌、转基因植物或转基因动物合成人胰岛素蛋白,或者将苏云金芽孢杆菌的杀虫蛋白转入棉花、水稻等作物中,提高转基因作物的抗虫水平等。

(2) 利用已有的途径构建新的代谢支路。例如,将白藜芦醇合成酶基因转入番茄、烟草、胡萝卜等作物中,可利用该酶将存在于植物中的苯丙烷途径的底物转化为芪类次生代谢物,提高转基因植物的抗病水平。

(3) 转移特定途径多个酶的编码基因,使转基因生物获得新的目标产物合成的能力。例如, ζ -胡萝卜素脱饱和酶、八氢番茄红素脱饱和酶和番茄红素 β -环化酶是合成维生素 A 前体(β -胡萝卜素)所必需的关键酶,德国、瑞士、英国等科学家通过农杆菌介导法成功地将相关外源基因(*psy*、*lcy*、*crtI*)整合到水稻基因组中,培育出胚乳中富含 β -胡萝卜素(1.6 $\mu\text{g/g}$)的转基因水稻品种。我国中山大学生物工程研究中心应用多个基因的转化策略,获得了几十个含有 3~10 个外源基因的多基因表达载体,并应用农杆菌法或基因枪法,通过转化或共转化,获得了几千个转有多个外源抗病、抗虫基因的水稻株系。

五、基因工程的作用与影响

基因工程的诞生,标志着人类打破历经数十亿年所形成的自然界固有的秩序,可跨

物种进行基因交流,从源头上对生命进行控制或修饰,使人类从认识生命、探索生命奥秘的必然王国进入到改造生命的自由王国。基因工程对自然界和人类社会生活的影响之广、之深,是任何其他技术所无法比拟的。

(一) 基因工程为人类解决当今所面临的人口、粮食、资源和环境问题带来了曙光

20世纪经济的飞速发展使人类在取得辉煌成果的同时,也带来了严峻的人口、粮食、资源和环境等问题,危及人类的可持续发展。利用微生物、植物、动物的基因工程,在提高农业生物产量、改善品质、增强抗性的遗传改良,在环境保护、医药生产和资源的高效利用和资源的替代等方面的应用效果已经初步显现。

(二) 基因工程将对生态环境带来深远的影响

当人类看到基因工程带来希望的同时,也对基因工程及其产品环境效应感到担忧。例如,基因工程对地球的生物多样性到底意味着什么?转基因生物释放到环境是否会导致“超级杂草”、“超级细菌”等。由于诞生仅仅三十多年,目前断然评价似乎还为时尚早,对此人类应采取审慎、科学的态度,加强安全性问题及对策的研究,建立基因工程产品的安全管理机制,促进基因工程的健康发展。

(三) 基因工程将给人类生活和文化、观念产生深刻的影响

基因工程利用微生物、植物或动物作为受体,通过基因的转移和表达,将农业生产、医药生产、环境治理等方面有机地统一起来,模糊了传统的工业、农业、医药、环境保护等行业的界限,这将使人类生产活动产生深刻的变革;基因工程是生物学发展的产物,又反过来促进人类对生命起源规律、生命世界奥秘的探索;基因工程在药品生产、基因治疗以及克隆动物、克隆人方面的应用,将不仅影响到人类的身体健康水平,还会冲击人类传统的道德伦理,影响人类世界观的形成和人类文化发展。

第二节 基因工程的发展历程和理论基础

一、基因工程的发展历程

基因工程是分子生物学、分子遗传学理论以及现代基因操作技术发展的必然结果,人类对未知世界探索的热情以及对基因工程的巨大需求又为基因工程的迅猛发展注入了强大的动力。基因工程的发展经历了理论和技术的酝酿、诞生和快速发展等几个阶段。

(一) 基因工程诞生前的理论和技術准备阶段

1. 理论上的准备

1860~1870年孟德尔根据豌豆杂交实验提出了遗传因子的概念以及孟德尔遗传规律;1909年约翰逊首次提出“gene”名词;1910年摩尔根的实验结果第一次将代表某