

阮 红 杨岐生 ©编著

基因工程原理

PRINCIPLES OF GENE ENGINEERING

ZHEJIANG UNIVERSITY PRESS
浙江大学出版社

Q78
R862.1

基因工程原理

阮红 杨岐生 编著

浙江大學出版社

内容简介

基因工程是生物科学的重要技术领域,在基础理论研究及应用研究中都占有重要地位。它是一门实验操作性非常强的技术,但需要在领会基本原理、思路的基础上学会实验的设计、操作方法。本书力图阐明这些原理和实验技术方法。全书分11章,涉及了基因工程技术的基本方面,包括基因工程概述、基因操作中的工具酶、基因工程载体、核酸的分离纯化和制备、DNA克隆、DNA序列测定、DNA文库、克隆的筛选和检测、外源目的蛋白质的表达和筛选、蛋白质工程原理、基因工程药物等。本书适用生命科学各专业的本科和研究生教学,可作为教材或教学参考书。

图书在版编目(CIP)数据

基因工程原理 / 阮红, 杨岐生编著. —杭州: 浙江大学出版社, 2007.9
ISBN 978-7-308-05500-0

I.基… II.①阮…②杨… III.基因—遗传工程 IV.Q78

中国版本图书馆CIP数据核字(2007)第134496号

基因工程原理

阮红 杨岐生 编著

责任编辑 邹小宁

封面设计 刘依群

出版发行 浙江大学出版社

(杭州天目山路148号 邮政编码310028)

(E-mail: zupress@mail.hz.zj.cn)

(网址: <http://www.zjupress.com>)

排版 浙江大学出版社电脑排版中心

印刷 富阳市育才印刷有限公司

开本 889mm×1194mm 1/16

印张 13.5

字数 390千

版印次 2007年9月第1版 2007年9月第1次印刷

印数 0001—3000

书号 ISBN 978-7-308-05500-0

定价 22.00元

版权所有 翻印必究 印装差错 负责调换

浙江大学出版社发行部邮购电话 (0571)88072522

前 言

在 20 世纪 70 年代初,发展起了一门崭新的技术即基因工程。基因工程是把生物的 DNA 通过载体 DNA 导入到特定受体细胞内,保持稳定存在和表达的过程,也就是有目的地通过分子克隆技术,人为地改造基因的结构、改变生物遗传性状的系列过程。基因工程使生物科学经历了革命性变化,其出现是 20 世纪生物科学的重大事件。基因工程的诞生是生物化学、分子生物学、遗传学、微生物学等基础学科发展的结果。分子生物学乃至整个现代生物科学许多学科的进展,都得益于基因工程技术的进步。基因工程技术已经渗透到医学、农学、药物、环保和工程技术领域。可以说,以分子克隆为核心的基因工程是人类掌握的许许多多技术中对人类影响最深远的技术之一,它的出现使人类进入了改造生物和创建新型物种的新时代,对社会发展有着深远的影响。

基因工程作为一种技术,已经与生物科学、医、农密切融合,成为这些领域非常重要的技术和基本知识。因此学习和掌握基因工程的基本理论和实验技术是许多专业领域的需要。本书是为适应这些要求而为相关专业编写的教材,主要适用于生物学、医、药和农林等专业。本教材共 11 章,围绕着分子克隆技术,介绍外源目的基因的表达、蛋白质产物的分离分析、蛋白质工程原理、重组基因药物等重要知识。在学习生物化学、分子生物学等基础课程的基础上,为本科生或研究生建立起基因工程的知识框架,满足教学的需要。我们在以往教学中体会到,在教材中仅仅给学生介绍基因工程的原理是远远不够的,学生在学习之后仍不了解这些原理与实验操作之间如何联系起来,结果使这门实践性很强的课程在学习后仍难以动手。因此在编写时注重原理和相应的操作过程,使本书在有限的篇幅内做到两者兼顾。我们尽量把有关的实验方法、实验操作的主要环节甚至设计思路写清楚,有助于学生进入实验室后能尽快上手。

在编写过程中,我们参考了作为分子克隆技术经典之作的《分子克隆实验指南》(第 3 版),同时参考了国内目前较好的教材,如楼士林先生的《基因工程》和孙明先生的《基因工程》等,并采用了其中的部分插图,在此向这些作者表示感谢。

目 录

1 基因工程概述	1
1.1 基因工程概念	1
1.1.1 基因工程的基本定义	1
1.1.2 基因工程的基本原理和流程	1
1.2 基因工程发展简史	3
1.2.1 早期准备	3
1.2.2 基因工程的诞生	3
1.2.3 基因工程的成熟	3
1.2.4 进入第二代基因工程	3
1.3 基因工程技术研究的主要内容	4
1.3.1 基因工程的基础性研究	4
1.3.2 基因工程的应用性研究	5
2 基因操作中的工具酶	7
2.1 限制性内切酶	7
2.1.1 限制性内切酶的识别序列	7
2.1.2 限制性内切酶的命名	8
2.1.3 限制性内切酶的酶切片断	8
2.1.4 限制性内切酶的类型	8
2.1.5 限制性内切酶的反应系统	9
2.2 DNA 聚合酶	9
2.2.1 大肠杆菌 DNA 聚合酶 I	9
2.2.2 DNA 聚合酶 I 的大片段(Klenow 片段)	10
2.2.3 T4 噬菌体 DNA 聚合酶	10
2.2.4 T7 噬菌体 DNA 聚合酶	11
2.2.5 热稳定的 DNA 聚合酶	11
2.2.6 逆转录酶	12
2.2.7 末端转移酶	12
2.3 DNA 连接酶	13
2.3.1 T4 DNA 连接酶	13
2.3.2 大肠杆菌的 DNA 连接酶	14
2.4 RNA 聚合酶	14
2.5 其他工具酶类	15

2.5.1	碱性磷酸酶	15
2.5.2	T4 多核苷酸激酶	15
2.5.3	核酸酶	15
3	基因工程载体	17
3.1	载体的基本要求和特性	17
3.1.1	载体的基本要求	17
3.1.2	载体具有与使用目的相一致的结构	18
3.2	质粒载体	18
3.2.1	质粒载体的生物学特性	18
3.2.2	质粒载体构建的思路	19
3.2.3	pBR322 质粒载体	21
3.2.4	pUC 质粒载体	21
3.2.5	pGEM 系列载体质粒	23
3.2.6	pBluescript II KS	24
3.3	λ 噬菌体载体	24
3.3.1	λ 噬菌体的生物学特性	24
3.3.2	λ 噬菌体构建载体的依据	26
3.3.3	构建 λ 噬菌体载体的基本策略	26
3.3.4	λ 噬菌体载体的举例	28
3.3.5	λ 噬菌体载体的应用	32
3.4	M13 噬菌体载体	32
3.4.1	M13 噬菌体与载体有关生物学特性	32
3.4.2	构建 M13 载体	32
3.4.3	噬菌粒载体	33
3.4.4	M13 载体的应用	34
3.5	cosmid 载体	35
3.5.1	cosmid 载体的概况	35
3.5.2	cosmid 载体的特性	35
3.5.3	cosmid 载体使用的基本程序	36
3.6	酵母人工染色体	36
3.7	细菌人工染色体	37
3.8	哺乳动物细胞的载体	38
3.8.1	SV40 载体	39
3.8.2	腺病毒载体	40
3.8.3	痘苗病毒	41
3.8.4	逆转录病毒载体	41
4	核酸的分离纯化和制备	43
4.1	质粒 DNA 的制备	43
4.1.1	质粒 DNA 提取方法的选择	43
4.1.2	质粒提取的共同步骤	44

4.1.3	SDS 碱裂解法小量制备质粒 DNA	44
4.1.4	SDS 碱裂解法大量制备质粒 DNA	45
4.1.5	提取质粒 DNA 的其他方法	46
4.1.6	质粒纯化的氯化铯-溴化乙锭梯度平衡超离心法	46
4.1.7	DNA 制备中几项常规操作	47
4.2	λ 噬菌体 DNA 的制备	48
4.2.1	λ 噬菌体颗粒的制备	48
4.2.2	λ 噬菌体 DNA 的制备	48
4.3	真核基因组 DNA 的分离	49
4.3.1	制备高分子量 DNA 的方法	49
4.3.2	基因组 DNA 酶切片段化	49
4.4	用于 cDNA 克隆的 mRNA 分离纯化	50
4.4.1	细胞内 mRNA 丰度的差异	50
4.4.2	制备 mRNA 之前需要考虑的问题	50
4.4.3	真核细胞 mRNA 的提纯	51
4.4.4	mRNA 的检测	52
4.4.5	mRNA 的富集	52
4.5	基因的化学合成和片段设计	53
4.5.1	寡核苷酸化学合成的方法	53
4.5.2	核苷酸单体修饰基团和固相载体	54
4.5.3	寡聚核苷酸化学合成的基本步骤	55
4.5.4	DNA 大片段合成的策略	56
4.5.5	DNA 化学合成的应用	57
4.6	聚合酶链式反应	57
4.6.1	PCR 反应的原理	57
4.6.2	PCR 反应过程	57
4.6.3	PCR 反应循环参数的设定	58
4.6.4	耐高温的 DNA 聚合酶	58
4.6.5	PCR 的引物	59
4.6.6	PCR 的应用	60
4.7	核酸的定量和检测	61
4.7.1	DNA 或 RNA 的分光光度法测定	62
4.7.2	用 Hoechst33258 进行荧光测定	62
4.7.3	用溴化乙锭定量测定双链 DNA	62
4.7.4	SYERGOLD 染色	62
4.8	凝胶电泳技术	63
4.8.1	琼脂糖凝胶电泳的原理	63
4.8.2	琼脂糖凝胶电泳的影响因素	63
4.8.3	聚丙烯酰胺凝胶电泳	64
4.8.4	脉冲场凝胶电泳	64

5	DNA 克隆	66
5.1	DNA 克隆的策略和技术路线	66
5.1.1	DNA 克隆的概念	66
5.1.2	DNA 克隆的要素	66
5.1.3	DNA 克隆的技术路线	67
5.2	目的基因的来源	68
5.3	DNA 分子片段化	68
5.3.1	DNA 分子经限制性内切酶酶切的末端结构	68
5.3.2	确定单一酶切或双酶酶切	69
5.3.3	DNA 的部分酶切	69
5.3.4	影响 DNA 片段化的反应条件	69
5.3.5	DNA 片段的回收	70
5.4	DNA 片段的体外重组	71
5.4.1	DNA 连接酶催化 DNA 的连接	71
5.4.2	同源粘性末端之间的连接	71
5.4.3	平头末端之间的连接	72
5.4.4	定向重组和定向克隆	72
5.4.5	DNA 末端的修饰改造	73
5.5	重组 DNA 导入受体细胞	76
5.5.1	受体细胞	76
5.5.2	重组 DNA 导入原核生物细胞	77
5.5.3	重组 λ 噬菌体 DNA 转导大肠杆菌	78
5.5.4	重组 DNA 导入哺乳动物细胞	78
5.6	亚克隆技术	79
6	DNA 序列测定	81
6.1	概述	81
6.1.1	DNA 测序的发展	81
6.1.2	DNA 测序的策略	82
6.2	双脱氧末端终止法	82
6.2.1	双脱氧末端终止法的原理	82
6.2.2	双脱氧末端终止法的要素	83
6.2.3	双脱氧末端终止法的试剂条件	84
6.2.4	DNA 测序的放射性标记	85
6.2.5	双脱氧末端终止法测序的载体系统	85
6.2.6	T7 DNA 聚合酶进行双脱氧测序反应	88
6.2.7	Taq 酶进行双脱氧测序	90
6.2.8	PCR 进行双脱氧测序	90
6.2.9	测序凝胶上分离 DNA 序列	90
6.3	大规模 DNA 测序	91
6.3.1	双脱氧末端终止法测定 DNA 序列方法的选择	91

6.3.2	大片的随机重叠 DNA 文库	91
6.3.3	大片段测序的引物步移策略	93
6.3.4	待测 DNA 大片段定向连续次级克隆	94
6.4	DNA 测序自动化和测序技术的发展	95
6.4.1	DNA 测序技术的进展	95
6.4.2	基于凝胶电泳的两种测序系统	96
6.4.3	荧光标记的两种方式	96
6.4.4	其他测序方法	97
7	DNA 文库	98
7.1	两类 DNA 文库	98
7.1.1	DNA 文库的概念	98
7.1.2	基因组文库包含一种生物的全部遗传信息	99
7.1.3	cDNA 文库反映了特定细胞的转录组	99
7.1.4	构建 DNA 文库的一般程序	100
7.2	构建 cDNA 文库的常用方法	100
7.2.1	polyA-mRNA 逆转录合成单链 cDNA	100
7.2.2	运用不同引物合成 cDNA 第二链	101
7.2.3	cDNA 第二链的合成条件	104
7.2.4	DNA 的人工接头或插口	104
7.2.5	cDNA 克隆载体的比较	105
7.2.6	cDNA 与人工接头或插口的连接	106
7.2.7	双链 cDNA 与 λ 噬菌体臂的连接和体外包装	107
7.2.8	cDNA 文库的改进	107
7.3	基因组文库的概况	108
7.3.1	构建基因组文库的基本步骤	108
7.3.2	基因组文库的大小	108
7.4	λ 噬菌体载体构建真核基因组 DNA 文库的	109
7.4.1	DNA 片段的分离	109
7.4.2	λ 载体臂的制备	109
7.4.3	基因组 DNA 片段与 λ 载体臂的连接	110
7.4.4	基因组文库的扩增	110
7.5	大容量载体构建基因组 DNA 文库	111
7.5.1	cosmid 构建基因组文库的优缺点	111
7.5.2	cosmid 质粒载体的制备	112
7.5.3	真核 DNA 片段的制备	113
7.5.4	cosmid 载体与外源 DNA 片段的重组	113
7.5.5	cosmid 文库的有效性分析	113
7.5.6	YAC 文库的构建	113
8	克隆筛选与检测	116
8.1	重组克隆的初步筛选	116

10	8.1.1	重组克隆的遗传学检测法	116
10	8.1.2	报告基因技术的原理	117
10	8.1.3	基因工程中常用的报告基因	118
20	8.1.4	依赖于重组子结构特征分析的筛选方法	119
20	8.2	目的克隆的鉴定	120
20	8.2.1	分子杂交	120
20	8.2.2	免疫学检测	120
20	8.2.3	蛋白质活性和功能互补筛选	120
80	8.3	核酸分子杂交探针的概述	121
80	8.3.1	核酸探针的种类	121
80	8.3.2	寡核苷酸探针的序列要求	122
80	8.3.3	标记物的选择	123
90	8.3.4	核酸探针标记的两种基本方法	123
90	8.3.5	核酸探针的放射性标记	123
100	8.3.6	探针比放射活性的测定	129
100	8.3.7	非放射性探针标记方法	129
100	8.3.8	非放射性探针显色反应的检测	132
100	8.4	核酸分子杂交	132
100	8.4.1	膜上印迹杂交	133
100	8.4.2	Southern 杂交	133
200	8.4.3	Northern 杂交	135
200	8.4.4	其他杂交形式	135
300	8.5	获得目的基因的一些基本技术	136
300	8.5.1	根据特异蛋白质分离目的基因	137
300	8.5.2	用同源序列和已知基因序列分离目的基因	137
300	8.5.3	表达序列标签法分离目的基因	137
300	8.5.4	差异杂交法	139
400	8.5.5	cDNA 扣除杂交和扣除文库	140
400	8.5.6	mRNA 差异显示法	140
400	8.5.7	基因表达系列分析法	142
400	8.5.8	抑制差减杂交	143
400	8.5.9	DNA 微阵列	144
400	8.5.10	噬菌体显示	145
400	8.5.11	酵母双杂合系统分析	146
500	9	外源目的蛋白质表达及其筛选	148
500	9.1	外源基因在 <i>E. coli</i> 中表达所必需的调控元件	148
500	9.1.1	外源基因表达要求一个复杂的系统	148
500	9.1.2	复制起始位点	149
500	9.1.3	调控型启动子	149
500	9.1.4	终止子	150
500	9.1.5	翻译调控元件	150

9.2	常见的 <i>E. coli</i> 表达载体的类型	150
9.2.1	非融合型表达的载体	150
9.2.2	分泌型表达载体	151
9.2.3	融合蛋白型表达载体	152
9.3	外源基因在大肠杆菌中表达形式	152
9.3.1	包涵体蛋白	153
9.3.2	融合蛋白	153
9.3.3	分泌型外源蛋白	153
9.4	外源基因在 <i>E. coli</i> 中的表达文库	154
9.4.1	λ 载体构建外源基因的表达文库	155
9.4.2	受体菌	155
9.5	表达型克隆的筛选	155
9.5.1	筛选用的探针	155
9.5.2	放射免疫学检测	156
9.5.3	免疫荧光抗体法检测表达蛋白	157
9.5.4	免疫沉淀法检测表达蛋白	157
9.5.5	表达蛋白的 Western 印迹检测	157
9.5.6	外源基因瞬间表达的检测	158
9.5.7	通过双链 DNA 与表达产物相互作用来检测	159
9.5.8	翻译筛选法	159
9.5.9	利用蛋白质相互作用鉴定表达的 cDNA 克隆	160
9.5.10	进一步确定 cDNA 表达克隆	160
9.6	大肠杆菌表达系统	161
9.6.1	利用 <i>lacZ</i> 的 pET 表达系统	161
9.6.2	谷胱甘肽-S-转移酶融合蛋白表达系统	163
9.6.3	用碱性磷酸酯酶启动子和信号序列表达分泌蛋白	164
9.7	融合蛋白的分离和切割	165
9.7.1	化学裂解法	165
9.7.2	连接子设计有酶切位点和纯化序列	166
9.7.3	在谷胱甘肽-S-转移酶下游的酶切	166
9.7.4	麦芽糖结合融合蛋白的亲亲和层析分离	167
9.7.5	固定化的 Ni^{2+} 吸附层析纯化含寡组氨酸标签的蛋白质	168
9.8	提高外源基因表达水平的措施	169
9.8.1	提高翻译水平	169
9.8.2	减轻宿主细胞的代谢负荷	170
9.8.3	提高表达蛋白的稳定性	170
9.9	包涵体重组蛋白的分离纯化	171
9.9.1	包涵体内蛋白质的分离	171
9.9.2	复性蛋白质的纯化	171
9.10	真核细胞表达系统	172
9.10.1	酿酒酵母表达系统	172
9.10.2	巴斯德毕赤酵母表达系统	173

9.10.3	昆虫细胞的杆状病毒表达系统	174
9.10.4	哺乳动物细胞表达系统	175
10	蛋白质工程原理	178
10.1	蛋白质工程的基本概念	178
10.1.1	蛋白质工程的定义	178
10.1.2	蛋白质工程的特性	178
10.1.3	蛋白质工程与相关领域的区别	179
10.1.4	蛋白质工程的主要难点	179
10.2	蛋白质工程设计原理	180
10.2.1	蛋白质突变体设计的一般步骤	180
10.2.2	蛋白质工程的流程	180
10.3	寡核苷酸引物介导的位点特异性定向突变	180
10.3.1	寡核苷酸引物介导的诱变	181
10.3.2	寡核苷酸介导的突变分子的富集	181
10.4	利用 PCR 产生定点突变	182
10.4.1	在基因序列的 3'端和 5'端区域产生突变	182
10.4.2	重叠延伸 PCR	182
10.4.3	重叠延伸 PCR 导入取代、插入或缺失突变	183
10.5	基因片段取代突变	183
10.6	基因的体外分子进化	183
10.6.1	随机突变的盒式取代	184
10.6.2	易错 PCR	185
10.6.3	基因 DNA 改组	185
10.7	蛋白质工程的设计和应用	186
10.7.1	蛋白质工程设计中一些重要的解决方案	186
10.7.2	提高蛋白质的稳定性	186
10.7.3	减少重组多肽的错误折叠	188
10.7.4	改变酶或蛋白质的结合特性	188
10.7.5	酶催化特异性的修饰	189
10.7.6	改善酶的催化活性	189
11	基因工程药物	191
11.1	基因工程蛋白质药物	191
11.1.1	重组人胰岛素	191
11.1.2	重组人生长激素	192
11.1.3	重组人干扰素	192
11.1.4	人白细胞介素	194
11.2	基因工程疫苗	195
11.2.1	基因工程疫苗的原理	195
11.2.2	重组乙肝疫苗	195
11.2.3	疫苗载体	196

11.3 基因工程抗体.....	196
11.3.1 天然抗体的局限性和基因工程抗体的策略.....	196
11.3.2 重组单克隆抗体.....	197
11.3.3 抗体基因片段的组合文库.....	197
11.3.4 人源性 CDR 序列重排建立免疫文库	198
11.3.5 小分子抗体.....	198
11.4 核酸类药物.....	199
11.4.1 反义核酸药物.....	200
11.4.2 RNA 干扰	200
主要参考书目.....	202

基因工程概述

随着生物化学、遗传学和分子生物学等基础学科的发展,以及物理学、化学等实验技术深入地与生命科学结合和交叉,在 20 世纪 70 年代初发展起了一门崭新的技术即基因工程。基因工程使生命科学经历了革命性变化,其出现是 20 世纪生物学的重大事件。综观科学的发展史,生命科学的发展与技术的发展密切相关,分子生物学甚至整个现代生物科学的各种进展,都得益于技术的进步。可以说,以分子克隆为核心的基因工程是许许多多的技术中对人类影响最深远的一项,因为它的出现使人类进入了按照自己的意愿改造生物和创建新生物的时代,对社会有着深远影响。因此有人预言 21 世纪是生命科学的世纪。

1.1 基因工程概念

1.1.1 基因工程的基本定义

一般认为,基因工程是把生物的 DNA 通过载体导入到特定受体细胞,保持稳定存在和表达的过程。也就是有目的地通过分子克隆技术,人为地改造基因的结构、改变生物遗传性状的系列过程。

根据侧重点的不同,基因工程的概念有狭义和广义两个层面的含义。狭义的基因工程侧重于基因重组、分子克隆和克隆基因的表达,即所谓的上游技术。广义的基因工程更侧重于以产品为目标,指基因重组技术的产业化设计和应用,即所谓的下游技术。早期,人们主要从狭义方面理解基因工程,因此对分子克隆、DNA 重组、基因工程等名词区分得并不严格。随着基因工程应用方向的发展,基因工程与分子克隆、DNA 重组的概念才明显区分开来。但是基因工程的核心仍然是分子克隆技术。

1.1.2 基因工程的基本原理和流程

(1) 基因工程的要素

基因工程的操作使基因从一种生物转移到另一种生物,涉及供体、受体和载体等 3 种基本要素。①供体是来自某一生物的 DNA 或人工合成的 DNA,一般称为外源 DNA。②受体是指接受外源 DNA 的细胞,如细菌、酵母或哺乳动物细胞。③载体是运输 DNA 的工具,是经过遗传学改造的质粒、噬菌体或病毒。载体的 DNA 与外源 DNA 在体外构成重组体的形式,把外源 DNA 运送到受

体细胞。

(2)基因工程的基本流程

一个完整的基因工程操作过程(如图 1-1 所示)一般包括 DNA 的获得、载体的制备、重组体的制备、DNA 的转移、克隆的获得、基因的表达、表达产物的获得等几个阶段。

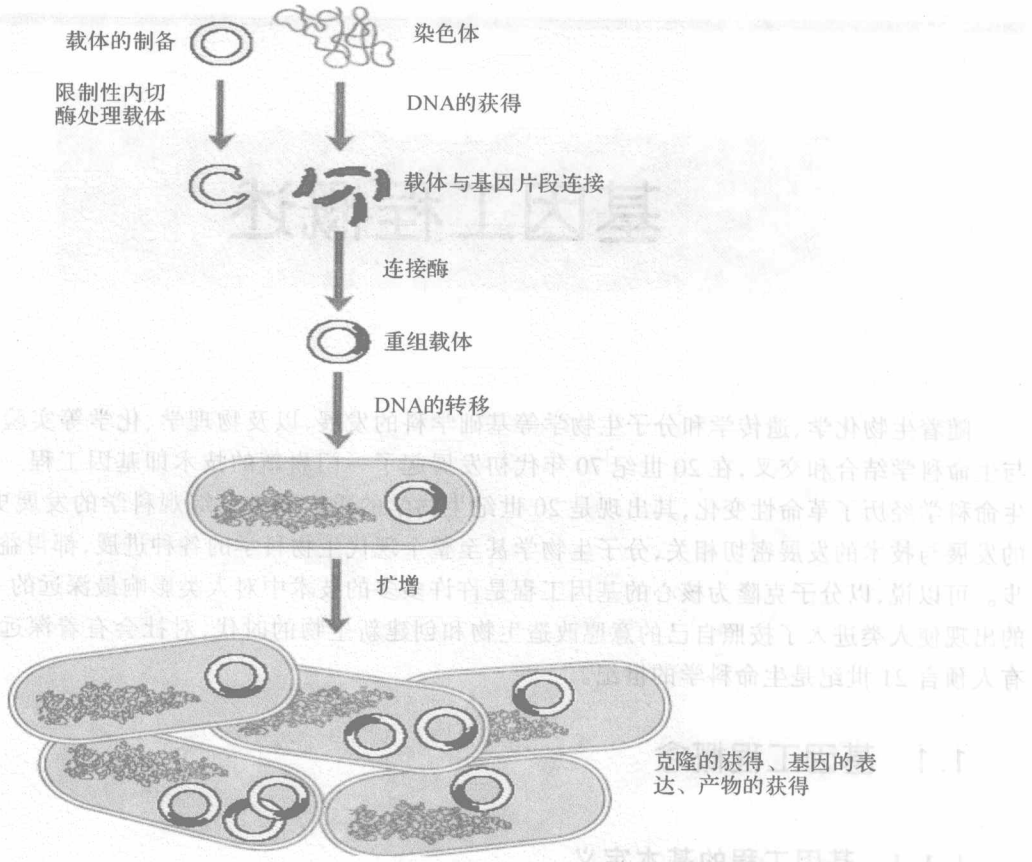


图 1-1 基因工程的基本流程

(3)基因工程的原理

根据基因工程的定义,外源 DNA 被载体导入到受体后要稳定存在和表达,因而涉及几个基本点:①载体起着关键作用。载体具有复制、在单一酶切位点重组外源 DNA、携带选择性标记并使受体细胞显示标记活性的能力。表达型载体有驱动外源基因表达的能力。②外源 DNA 在受体细胞内进行 DNA 合成,甚至 RNA 和蛋白质的合成,是构成重组细胞区别于非重组细胞的基础,也是克隆筛选的基础。受体细胞不是被动的,只有匹配的细胞才能承担受体的角色。③DNA 的碱基配对原则构成分子杂交、cDNA 合成、DNA 修饰和连接、PCR 反应、DNA 标记等技术的基础。④外源基因的表达不仅要求其 DNA 保持稳定,还要满足转录和翻译的条件,基因要在启动子、各种调控元件的有效控制和驱动之下。可控制的细胞复制和外源基因高效表达是基因工程产业化的基本要求。

1.2 基因工程发展简史

1.2.1 早期准备

基因工程的出现是建立在生物学特别是生物化学、遗传学和分子生物学发展的基础上,在一系列理论基础和技术条件的准备后诞生的。早期的理论基础有 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 结构开展了深入的研究。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。1955 年, S. Benzer 提出顺反子学说,这时,作为功能单位的顺反子与基因的概念一致了。1956 年, Crick 提出了中心法则。1961 年, Jacob 和 Monod 提出了操纵子学说,阐述了基因是可分的,在功能上是有差别的,基因受可逆调控。60 年代中期, Nirenberg 等破译了 64 种遗传密码子,成功地揭示了遗传信息的流向和表达问题。以上一系列研究成果为基因工程技术的问世提供了理论上的准备。

在 70 年代初之前,生物学家作了一系列技术上的准备。对噬菌体结构和繁殖、质粒及其抗药性已作了大量研究。1972 年, P. Berg 首次构建了第一个重组 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 DNA 分子是承载外源 DNA 片段的理想载体,病毒、噬菌体的 DNA(或 RNA)也可以改建成载体。至此,生物学已经在技术上为基因工程的问世做好了准备。

1.2.2 基因工程的诞生

对 DNA 操作起关键作用的两种酶,即限制性内切酶 *EcoR* I 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, Berg 等使用限制性内切酶 *EcoR* I,在体外对猿猴病毒 SV40 DNA 和 λ 噬菌体 DNA 分别进行酶切,然后用 T4 DNA 连接酶将两种酶切片段连接起来,第一次在体外获得了包括 SV40 和 λ DNA 的重组分子。1973 年, Cohen 和 Boyer 将两种分别含编码卡那霉素(kanamycin)和四环素(tetracycline)抗性基因的质粒相连接,构建成重组 DNA 分子,然后转化大肠杆菌,获得了既抗卡那霉素又抗四环素的双重抗性特征的转化子菌落,这是第一次成功的基因重组和克隆的操作。由此,基因工程这种新技术宣告诞生。Cohen 和 Boyer 因此分享了 1980 年的诺贝尔化学奖。

1.2.3 基因工程的成熟

基因工程是在分子生物学等学科基础上发展起来的,它和学科的发展是紧密联系的,反过来它也渗透到生物学和生命科学的各个领域,促进着各学科的研究与应用。1981 年,转基因小鼠问世。1982 年,基因工程胰岛素产品上市和转基因烟草获得成功。1985 年,基因工程微生物杀虫剂得到批准。1990 年,基因治疗获准进入临床。1986 年,人类基因组计划(Human Genome Project, HGP)被提出。1990 年,这一被誉为生命科学领域“阿波罗登月计划”的国际人类基因组计划开始启动,试图用基因工程来揭示人类的遗传结构,包括所有的基因(特别是疾病相关基因)和非编码序列,历经 10 余年时间,耗资约 30 亿美元,到 2000 年的 6 月,人类基因组工作框架图得以正式发布,这一框架图包含了人类基因组 97% 以上的信息。所有这些进展都标志着基因工程已从创立阶段开始走向成熟。

1.2.4 进入第二代基因工程

通常说的分子克隆仅操作单个或数个完整的基因,在操作中尽可能保持 DNA 序列的完整性。基因操作是在 DNA 和基因的层面,基因编码具有天然属性的蛋白质,操作的层次基本上没有深入

到基因内部。随着计算机技术的发展,基因工程技术和计算机技术结合是一种必然的趋势。蛋白质结构的研究及其与基因工程相结合,这使人们能直接操作或改造单个或几个单核苷酸,甚至改变一个肽段的编码序列,生产出结构发生了改变的新型蛋白质。这称为蛋白质工程。蛋白质工程被认为是第二代基因工程。

1.3 基因工程技术研究的主要内容

基因工程作为一门实验技术,其研究内容有两个方面,或者说向两个方向发展,其一是基础性的研究,其二是产业化的应用性研究。

1.3.1 基因工程的基础性研究

基础性研究的目的是提高基因工程自身的水平,实现技术上的改进和创新,特别是构建一系列克隆载体和相应的表达系统,研究新的标记技术,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。目前,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) 新克隆载体的研究

可以认为构建克隆载体是分子克隆和基因技术的核心环节。至今已构建了数以千计的克隆载体。构建新的克隆型和表达型载体仍是今后研究的重要内容之一,尤其是那些适合于高等动植物外源目的基因的表达载体和定位整合载体。

(2) 受体系统的研究

基因操作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细胞,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。用于基因操作的受体可分为两类,即原核生物和真核生物。

传统的受体系统以大肠杆菌为主。大肠杆菌是早期被采用的最好的受体系统,其遗传背景比较清楚,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,为应用研究提供了基因的来源。酵母菌也是极重要的受体细胞,它作为一类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,是较早被用作分子克隆受体的真核细胞,有人把酵母菌同大肠杆菌一起看作是第一代基因操作的受体系统,为外源基因(尤其是真核基因)的表达建立了一系列工程菌株。

然而,至今认识的受体系统还十分有限,它严重地制约了基因工程技术在高等生物中的发展和应用。目前,原核生物的植物型光合作用的蓝细菌(蓝藻)、低等真核生物的单细胞小球藻、衣藻等都是人们关注的受体。高等植物的细胞、组织都是研究的对象。动物主要以生殖细胞或胚细胞作为受体细胞,人的体细胞培养物同样可作为基因操作的对象。由于动物细胞的再生能力差,以及应用上的巨大潜在性能,以动物细胞作为基因操作受体的研究越来越受到重视,是今后一段时期重要的研究课题。

(3) 目的基因的研究

基因工程的最主要任务是研究基因和应用基因。目的基因的研究包括:①认识基因,例如测定该物种基因组的全部序列;②分离目的基因,目前已存在许许多多筛选特异性基因的方法,从基因库中筛选所需的基因。所要研究和分离的目的基因一般是理论上具有重要生物学功能的基因,例如各种调控因子、受体蛋白的基因,或者具有临床药物价值的相关基因,以及具有抗病、抗逆、提高产量和改良性状相关的基因。因此,在某种意义上,基因是国家的一种资源。分子克隆的发展需要不断地寻找和开发新的基因。