

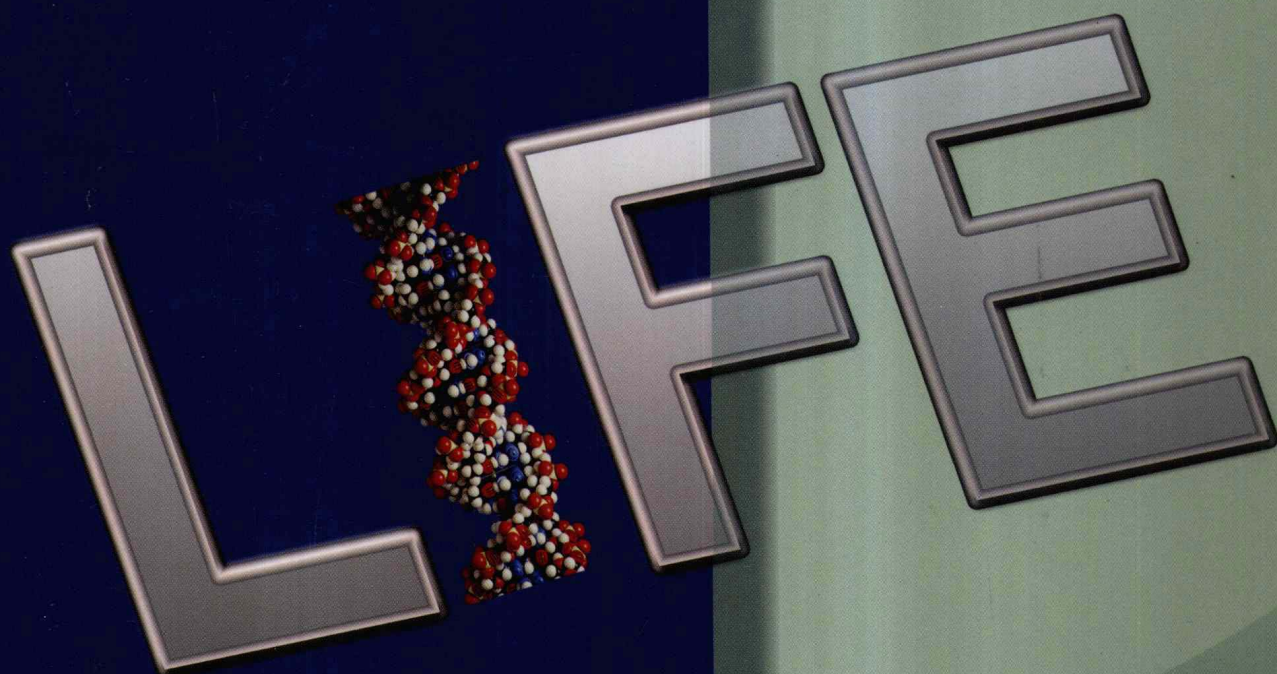
An Introduction to Genetic Engineering

遗传工程

(第2版)

谢友菊 王国英 林爱星 编著

概论



中国农业大学出版社

遗传工程概论

(第2版)

谢友菊 王国英 林爱星 编著

中国农业大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

遗传工程概论/谢友菊,王国英,林爱星编著. —2版. —北京:中国农业大学出版社,2005.4
ISBN 7-81066-826-9

I. 遗… I. ①谢… ②王… ③林… III. 遗传工程 IV. Q78

中国版本图书馆CIP数据核字(2004)第120699号

书 名 遗传工程概论

作 者 谢友菊 王国英 林爱星 编著

策划编辑 高欣 宋俊果

责任编辑 王艳欣

封面设计 郑川

责任校对 王晓凤

出版发行 中国农业大学出版社

社 址 北京市海淀区圆明园西路2号

邮政编码 100094

电 话 发行部 010-62731190,2620

读者服务部 010-62732336

编辑部 010-62732617,2618

出版部 010-62733440

网 址 <http://www.cau.edu.cn/caup>

E-mail caup@public.bta.net.cn

经 销 新华书店

印 刷 涿州市星河印刷有限公司

版 次 2005年4月第2版 2005年4月第1次印刷

规 格 787×1092 16开本 19.5印张 482千字 彩插1

印 数 1~4050

定 价 26.00元

图书如有质量问题本社发行部负责调换

编者的话

由于遗传工程技术和相关学科的飞速发展,1992年出版的《遗传工程概论》(第1版)已显得内容匮乏,部分内容显得陈旧,远远不能满足教学和读者的需要,这就迫使编者下决心克服困难,完成本书的第2版。新版仍沿用《遗传工程概论》的名称,但在第1版的基础上增加了3章,即聚合酶链式反应、克隆化DNA的定点诱变和图位克隆法,并对其他16章作了大量修改,增添了许多新内容,力求使本书能比较全面而系统地介绍遗传工程的原理和技术。为了便于读者的理解,新版对全书的图表作了增删,在阐述方式上也力求通俗易懂,特别是对书中的要点和难点尽力讲深讲透。为了提供更多的信息,每章之后都附有相关的参考文献。

本书是专门为农业院校研究生课程编写的,也可供高年级大学生、教师及相关专业人员选用。全书共19章,其中的第二、九、十七章由王国英完成,第四、六、七章由王国英和谢友菊共同完成,第十八章由林爱星完成,其余12章均由谢友菊完成。

李建生教授、曹永国博士审阅和修改了第十五章图位克隆法,全书大部分的插图由李乐民、焦香香和高剑波协助绘制,丁群星博士远在国外,为本书提供了宝贵的资料和插图,在此一并表示衷心的感谢。有19张图表引自其他文献,已征得有关出版社或作者的同意,并在图表下方作了说明,在此向这些出版社和作者表示感谢。

由于本门学科发展很快,新的文献和资料浩如烟海,加之编者水平有限,书中定有遗漏和不周,甚至还有错误,敬请读者批评指正。

编者

2004年9月30日

目 录

第一章 引言	(1)
一、遗传工程的概念	(1)
二、遗传工程的发展概况	(2)
三、遗传工程所需的微生物学原理	(8)
(一)大肠杆菌的一般特性	(8)
(二)抗生素抗性	(9)
(三)细菌细胞的生长	(9)
第二章 遗传工程的载体	(12)
一、质粒载体	(12)
(一)质粒的复制	(12)
1. 质粒的复制起始和控制	(12)
2. 质粒的不相容性	(13)
(二)质粒的改造	(14)
(三)目前常用的质粒载体	(14)
1. 带有多克隆位点的质粒	(15)
2. 带有噬菌体启动子的质粒	(15)
3. 表达质粒	(15)
二、单链噬菌体克隆载体	(17)
(一)M13 噬菌体	(17)
(二) α 互补	(18)
(三)M13 及其寄主的改造	(18)
(四)噬菌粒	(19)
三、双链噬菌体克隆载体	(19)
(一) λ 噬菌体的基因组结构与侵染	(20)
1. λ 噬菌体的生活周期	(20)
2. λ 噬菌体的基因组结构	(20)
3. λ 噬菌体的侵染	(20)
(二) λ 噬菌体载体的构建	(22)
1. 生物学制约	(24)
2. 载体的通用性	(24)
3. 体外包装	(24)
四、粘粒载体	(25)
第三章 DNA 的提取	(28)
一、原核生物染色体 DNA 的提取	(28)
二、原核生物染色体外 DNA 的分离	(28)

三、质粒DNA 的快速提取	(31)
四、真核生物染色体DNA 的提取	(31)
五、DNA 浓度和纯度的光学分析	(32)
第四章 遗传工程的酶学基础	(34)
一、限制性内切酶	(34)
(一)寄主的限制和修饰	(34)
(二)限制性内切酶的分类	(36)
1. 第一类限制性内切酶	(36)
2. 第二类限制性内切酶	(36)
3. 第三类限制性内切酶	(40)
(三)限制性内切酶的纯化	(40)
(四)限制性内切酶反应的终止	(41)
二、DNA 聚合酶	(41)
(一) <i>E. coli</i> DNA 聚合酶 I	(41)
(二) <i>E. coli</i> DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片段	(42)
(三)T4 DNA 聚合酶	(43)
(四)天然的 T7 DNA 聚合酶	(45)
(五)修饰的 T7 DNA 聚合酶	(45)
(六) <i>Taq</i> DNA 聚合酶和反转录酶	(46)
三、依赖于DNA 的RNA 聚合酶	(46)
四、DNA 及RNA 的修饰酶	(47)
(一)末端脱氧核苷酸转移酶	(47)
(二)T4 多核苷酸激酶	(47)
(三)碱性磷酸酶	(48)
五、核酸酶	(48)
(一)DNA 酶 I	(48)
(二)Bal 31 核酸酶	(49)
(三)S1 核酸酶	(50)
(四)外切核酸酶 III	(50)
(五)核糖核酸酶 H	(51)
第五章 凝胶电泳和杂交分析	(52)
一、凝胶电泳	(52)
(一)基本原理	(52)
(二)DNA 的可见性	(53)
(三)电泳图谱	(53)
(四)凝胶系统	(54)
(五)实验条件对凝胶电泳的影响	(54)
(六)指示染料和加样缓冲液	(55)
(七)DNA 分子大小的确定	(55)

(八)DNA 的回收	(56)
二、杂交分析	(57)
(一)Southern 吸印和杂交分析	(57)
(二)Northern 吸印和杂交分析	(59)
(三)Western 印迹检测技术	(59)
(四)DNA 的斑点杂交	(59)
(五)探针的制备	(60)
1. 缺口平移法	(60)
2. 随机引物法	(61)
3. 液体闪烁计数	(61)
4. 非放射性探针	(62)
(六)DNA 芯片技术	(63)
第六章 DNA 的连接	(67)
一、大肠杆菌DNA 连接酶和T4 DNA 连接酶	(67)
二、DNA 片段在体外的连接	(69)
(一)粘性末端的连接	(70)
(二)平齐末端的连接	(70)
(三)非互补末端的连接	(70)
(四)接头的使用	(72)
1. linker	(72)
2. adaptor	(73)
三、影响连接反应的因素	(74)
四、提高连接反应效率的两项措施	(75)
第七章 细菌转化	(77)
一、细菌转化的原理	(77)
二、细菌转化的方法	(79)
(一)简便、快速的感受态制备和转化方法	(79)
(二)标准的高效转化法	(80)
(三)“超级感受态”细胞的制备和转化	(80)
(四)菌落转化法	(80)
(五)X1776 的转化方法	(81)
(六)电击转化	(81)
三、转化的评估指标	(82)
(一)转化效率(转化频率)	(82)
(二)感受态细胞的比例	(82)
第八章 理想克隆的鉴定	(83)
一、表现型的鉴定	(83)
(一)利用抗生素进行筛选	(84)
(二)利用显色进行筛选	(84)

二、限制性作图分析	(86)
(一)限制性作图	(86)
(二)限制性分析与 Southern 杂交相结合	(88)
三、菌落和噬菌斑的原位杂交	(88)
(一)菌落原位杂交	(88)
(二)噬菌斑原位杂交	(88)
(三)原位杂交的优越性和进一步的鉴定	(90)
四、用 PCR 扩增目的片段	(90)
五、免疫检测法	(90)
(一)用免疫检测法筛选表达文库的过程	(91)
1. 筛选噬菌斑构成的表达文库	(91)
2. 筛选菌落构成的表达文库	(91)
(二)关于免疫检测法的几个问题	(91)
1. 多克隆抗体和单克隆抗体	(91)
2. 多克隆抗体的来源	(92)
3. 第一抗体的检测	(92)
4. 第二抗体的来源	(92)
5. 对酶促发色法和放射化学法进行比较	(93)
6. 对碱性磷酸酶与抗体的偶联物和辣根过氧化物酶与抗体的偶联物进行比较	(93)
7. 诱导外源蛋白表达的时间	(93)
六、酵母人工染色体文库的筛选	(93)
(一)YAC 基因组文库的保存	(94)
(二)YAC 基因组文库的筛选方法	(94)
(三)构建、贮存和筛选的分工	(95)
(四)筛选 YAC 文库的流程	(95)
第九章 克隆基因在大肠杆菌细胞中的表达	(97)
一、外源基因在大肠杆菌细胞中表达的原理和技术	(97)
(一)表达系统的选择	(97)
1. 蛋白质的大小	(97)
2. 蛋白质的活性	(97)
3. 蛋白质的需要量	(97)
(二)启动子的选择	(97)
1. 乳糖操纵子的启动子(<i>lac</i> UV5 启动子)	(97)
2. 色氨酸启动子(<i>trp</i> 启动子)	(98)
3. 乳糖操纵子和色氨酸操纵子的复合启动子(<i>tac</i> 或 <i>trc</i> 启动子)	(98)
4. 噬菌体 T7 启动子	(98)
(三)融合蛋白质的表达	(98)
1. 融合蛋白质表达的特点和载体	(98)

2. 融合蛋白质的分离	(99)
(四)促使基因表达“天然的”蛋白质产物	(99)
(五)提高外源蛋白质的稳定性	(100)
二、优化外源基因在大肠杆菌中表达的原理和技术	(100)
(一)构建最合适的启动子	(100)
(二)使翻译起始尽可能完善	(101)
(三)密码子的选择	(101)
1. 密码子的选择与细胞中 tRNA 的丰度相关	(101)
2. 在嘧啶结尾密码子中,对第三位上嘧啶的非随机选择	(101)
(四)质粒的拷贝数及其稳定性	(101)
(五)寄主细胞的生理状态	(102)
第十章 cDNA 文库技术	(103)
一、cDNA 文库的构建	(104)
(一)对 cDNA 文库的要求	(104)
(二)mRNA 的分离纯化	(105)
(三)cDNA 第一链的合成	(105)
(四)cDNA 第二链的合成	(106)
(五)cDNA 的克隆	(107)
(六)cDNA 的载体引导合成法	(110)
(七)构建 cDNA 文库的载体系统	(111)
二、cDNA 文库的筛选	(113)
(一)菌落和噬菌斑的原位杂交	(113)
1. 差示杂交筛选	(113)
2. 扣除 cDNA 探针	(114)
3. 合成寡聚核苷酸探针或引物	(114)
(二)用 PCR 的方法筛选 cDNA 文库	(116)
(三)特异配体与蛋白质相结合的方法	(117)
(四)酵母双杂分析法	(117)
1. 工作原理	(118)
2. 做法	(119)
第十一章 基因组文库的构建	(121)
一、用于 λ 载体的外源 DNA 的制备	(123)
(一)机械切割	(123)
(二)限制性内切酶的部分消化	(124)
二、 λ 载体 DNA 的制备	(126)
(一)双酶消化法	(127)
(二) λ Charon 4A 载体 DNA 的制备	(128)
三、连接、体外包装和侵染大肠杆菌	(128)
四、噬菌体 λ 和粘粒两种载体构建的基因组文库的比较	(129)

五、YAC、BAC、PAC 文库	(129)
(一)YAC 文库	(129)
(二)BAC 文库	(131)
(三)PAC 文库	(132)
第十二章 DNA 的序列分析	(136)
一、Maxam 和 Gilbert 的化学测序法	(137)
(一)方法	(137)
(二)原理	(138)
(三)专门用于化学测序的载体	(140)
二、Sanger 的双脱氧测序法	(142)
(一)原理	(142)
(二)过程	(142)
(三)关于双脱氧测序法的若干问题	(142)
三、双脱氧测序与 M13 克隆系统相结合	(144)
四、自动化测序和热循环测序	(146)
(一)自动化测序	(146)
(二)热循环测序	(147)
五、双脱氧测序法和化学测序法的比较	(147)
六、DNA 大片段的测序	(147)
(一)随机测序法	(147)
(二)利用嵌套式缺失体进行测序	(148)
1. 利用外切核酸酶 III 构建嵌套式缺失体并测序	(148)
2. 利用 Bal 31 核酸酶构建嵌套式缺失体并测序	(149)
3. 洪国藩的 DNA 系统测序策略	(151)
(三)引物步移法	(152)
七、基因组测序	(153)
第十三章 聚合酶链式反应	(155)
一、聚合酶链式反应的原理	(155)
二、聚合酶链式反应的必要条件	(157)
(一)引物设计	(157)
(二)PCR 的温度	(158)
(三)PCR 的反应体系	(159)
三、聚合酶链式反应的应用	(160)
(一)原位 PCR	(160)
(二)RT-PCR	(160)
(三)差异显示反转录酶 PCR	(162)
(四)单侧 PCR	(164)
1. 3'RACE	(164)
2. 5'RACE	(164)

(五)反向 PCR	(166)
(六)鉴定甲基化的 PCR	(167)
第十四章 克隆化 DNA 的定点诱变	(169)
一、盒式诱变	(169)
二、寡核苷酸介导的诱变	(172)
(一)Kunkel 定点诱变法	(172)
(二)硫代核苷酸负链诱变法	(173)
三、PCR 诱变	(174)
(一)重叠延伸诱变法	(174)
(二)大引物诱变法	(176)
(三)掺入诱变引物的 PCR 扩增	(179)
(四)基于 PCR 的诱变鉴定	(180)
第十五章 图位克隆法	(184)
一、遗传连锁图	(184)
(一)DNA 分子标记	(185)
1. RFLP	(185)
2. RAPD	(188)
3. AFLP	(189)
4. SSR	(191)
5. STS	(192)
(二)植物遗传图谱的构建	(194)
1. 亲本的选择和作图群体的建立	(194)
2. 作图程序	(195)
(三)近等基因系和集团分离分析	(196)
1. 近等基因系	(196)
2. 集团分离分析	(197)
3. 近等基因系和集团分离分析的作用	(198)
(四)主效基因的定位	(198)
1. 利用已有的遗传图谱进行定位	(198)
2. 在构建分子图谱的同时进行定位	(198)
二、物理图	(199)
(一)物理图的类型	(199)
1. 限制性酶切图谱	(199)
2. 重叠群图谱	(199)
3. DNA 序列图谱	(203)
(二)长距离物理作图	(203)
三、图位克隆法的主要策略和相关技术	(203)
(一)染色体步移	(203)
1. 图位克隆法中的染色体步移	(204)

2. YAC 末端的遗传作图	(204)
3. 目标基因的鉴定	(205)
4. 有关染色体步移的几个问题	(205)
(二)染色体登陆	(206)
1. 染色体登陆的含义	(206)
2. 染色体登陆对分子标记的要求	(206)
3. 染色体登陆的具体步骤	(206)
4. 染色体登陆的实例	(207)
5. 染色体登陆的优越性及其应用前景	(207)
(三)相关技术	(207)
1. 质粒挽救法	(207)
2. 反向PCR 法	(208)
3. TAIL-PCR 法	(209)
第十六章 酿酒酵母的遗传工程	(214)
一、酵母菌的质粒	(215)
(一)天然的酵母菌质粒	(215)
(二)人工构建的酵母菌质粒	(216)
1. 酵母菌的整合型质粒	(217)
2. 酵母菌的游离型质粒	(218)
3. 酵母菌的复制型质粒	(218)
4. 酵母菌的着丝粒质粒	(218)
5. 酵母菌的线状质粒	(219)
二、酵母菌基因的克隆	(219)
(一)酵母菌基因在大肠杆菌中的表达	(219)
(二)利用大肠杆菌突变体克隆酵母菌基因	(220)
(三)利用酵母菌突变体克隆酵母菌基因	(220)
(四)酵母菌的转化	(221)
1. 利用乙酸锂进行转化	(221)
2. 利用原生质体进行转化	(221)
三、外源基因在酵母菌中的表达	(222)
(一)酵母菌的表达载体	(222)
(二)影响表达的因素	(223)
(三)蛋白质的分泌	(223)
(四)内含子切除问题	(224)
四、利用酵母菌研究分子生物学	(224)
(一)基因融合系统	(224)
(二)克隆化基因与酵母染色体的整合	(225)
(三)基因置换技术	(226)
1. 基因破坏一步法	(226)

2. PCR 介导的基因破坏一步法	(226)
3. 移换	(226)
4. 用一步整合置换创造修饰基因	(228)
(四)回收者载体的应用	(230)
第十七章 植物基因工程	(233)
一、概论	(233)
(一)植物基因工程的受体	(233)
(二)植物基因工程载体	(233)
二、农杆菌介导的基因转移	(235)
(一)农杆菌转化载体的改造	(236)
1. Ti 质粒的一般特性	(236)
2. 整合载体	(237)
3. 双元载体	(237)
(二)农杆菌转化技术	(237)
1. 农杆菌的寄主范围	(237)
2. 农杆菌转化的方法	(237)
三、其他植物转基因方法	(239)
(一)基因枪转化系统	(239)
1. 基因枪转化的原理和特点	(239)
2. 影响基因枪转化的因素	(240)
(二)原生质体转化系统	(241)
1. 电击法	(241)
2. PEG 介导法	(242)
3. 脂质体介导法	(242)
(三)生殖细胞转化	(242)
1. 花粉介导的遗传转化	(242)
2. 子房作为受体	(243)
(四)病毒载体法	(243)
四、转化体的鉴定和分析	(243)
(一)转化体的选择	(243)
(二)转化体的鉴定	(244)
(三)外源基因的整合特性	(245)
(四)外源基因在转化体中的表达情况	(245)
(五)外源基因在转化体中的传代分离及其稳定性	(246)
五、转基因技术在植物育种上的应用	(247)
(一)抗病毒基因工程	(247)
(二)抗虫性基因工程	(247)
(三)抗除草剂基因工程	(247)
(四)抗真菌、细菌病害的基因工程	(248)

第十八章 哺乳动物的基因工程	(249)
一、动物基因工程载体系统	(249)
(一)反转录病毒载体	(249)
1. 一般特性	(249)
2. 反转录病毒载体的构建	(250)
(二)SV40 病毒载体	(253)
1. 一般特性	(253)
2. SV40 载体的构建	(255)
(三)腺病毒载体	(257)
1. 一般特性	(257)
2. 腺病毒载体的构建方法	(258)
(四)腺相关病毒载体	(258)
(五)单纯疱疹病毒载体	(258)
(六)牛痘病毒载体	(259)
(七)牛乳头瘤病毒载体	(259)
(八)非病毒载体	(260)
二、动物基因工程的标记基因	(260)
(一)选择标记基因	(260)
1. 胸苷激酶基因	(261)
2. 黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(XGPRT)基因	(262)
3. 氨基葡萄糖苷 3'-磷酸转移酶基因	(262)
4. 二氢叶酸还原酶基因	(263)
(二)报告基因	(263)
1. 氯霉素乙酰转移酶基因	(263)
2. β -半乳糖苷酶基因	(264)
3. 碱性磷酸酶基因	(264)
4. 萤光素酶基因	(264)
5. 绿色荧光蛋白基因	(264)
6. 红色荧光蛋白基因	(265)
三、外源基因的导入与表达	(265)
(一)哺乳动物细胞的基因导入方法	(265)
1. 磷酸钙沉淀法	(265)
2. 脂质体介导法	(266)
3. 电击法	(266)
(二)动物转基因技术	(266)
1. 胚胎显微注射	(267)
2. 反转录病毒载体	(267)

3. 胚胎干细胞方法	(268)
4. 精子介导基因转移法	(268)
(三)外源基因在哺乳动物细胞中的表达	(268)
1. 瞬时表达	(268)
2. 外源基因整合后的表达	(269)
(四)外源基因在转基因动物中的表达	(269)
四、基因打靶与体细胞克隆技术	(269)
(一)基因打靶的分子生物学基础	(270)
(二)基因打靶载体	(270)
1. 插入型载体	(271)
2. 置换型载体	(271)
(三)基因打靶的策略	(271)
1. 基因敲除	(271)
2. 进退策略	(272)
3. 标记和交换策略	(272)
4. 双置换法	(273)
5. Cre/loxP 重组系统策略	(273)
(四)基因打靶的筛选和选择系统	(274)
1. 物理筛选	(275)
2. 遗传选择	(275)
(五)体细胞基因打靶	(276)
(六)体细胞克隆技术	(277)
1. 受体细胞的选择与去核	(278)
2. 供体细胞的选择	(278)
3. 核移植与重构胚的激活	(278)
五、转基因动物的应用	(279)
(一)动物乳腺生物反应器	(279)
(二)动物血液生物反应器	(280)
(三)抗病育种	(280)
(四)生产性能的改良	(281)
(五)异种器官移植	(281)
第十九章 用重组 DNA 技术生产药物	(285)
一、胰岛素	(285)
(一)人胰岛素的结构	(286)
(二)胰岛素“基因”的人工合成	(287)
(三)利用胰岛素原 cDNA 生产胰岛素	(288)
(四)细菌分泌胰岛素	(288)

二、干扰素	(288)
(一)人干扰素的结构与功能.....	(288)
(二)人干扰素 α cDNA 的克隆和表达	(289)
(三)人干扰素 γ 基因的高效表达	(290)
三、乙型肝炎病毒疫苗	(291)

第一章 引言

从1900年孟德尔定律被重新发现迄今,遗传学已经走过了100多年的历程。在这100多年中,工农业生产和科学技术的发展,不断地促进遗传学的发展;反过来,遗传学的发展也为工农业生产和人类健康带来了巨大的好处。近50年来,遗传学已经由个体水平、细胞水平发展到分子水平,特别是近30年来,由于遗传学、生物化学、微生物学等多门学科的结合,开拓出一个新兴的技术领域——重组DNA技术,即遗传工程,并形成了以遗传工程为主导的生物技术,这门技术在揭示生物的奥秘、定向地改造生物、操纵生命等诸多方面做出了巨大贡献。生物技术的强大生命力,生物技术成果的产业化及其惊人的效益,为人类创造了难以估量的辉煌业绩,给整个人类社会带来了深远影响。在21世纪,人类将进入生物经济时代。

一、遗传工程的概念

遗传工程(genetic engineering)即重组DNA技术(recombinant DNA technique)就是通过特殊酶的处理,使遗传物质在体外发生重组,从而产生自然界从未有过的重组DNA分子(至少包含两种不同生物的DNA片段)。在它们进入一定的生物寄主以后,不仅可以得到维持,而且可以得到扩增,其上的外源基因甚至可以得到表达,从而给人类带来巨大的经济利益或为进一步揭开生命的奥秘提供强有力的研究手段。遗传工程又可称为分子克隆(molecular cloning)或基因工程(gene engineering)。

图1-1清楚表明了这门技术所包含的几个关键步骤:(a)从原核生物细胞中提取克隆的载体;(b)从真核生物细胞中提取外源DNA;(c)用限制性内切酶将载体打开,并用限制性内切酶消化真核生物DNA;(d)用DNA连接酶将真核生物DNA片段接到载体上,获得重组体(recombinant,即重组DNA分子);(e)用原核或真核生物细胞作为受体,使重组体进入并得到扩增,通过特定手段,能找到含有理想重组体的受体细胞。

外源基因在受体细胞中的表达,有可能产生大量人类所需要的某种物质,或赋予受体细胞特定的优良性状,继而发展成具有某种优良性状的个体,甚至可以创造出前所未有的超级作物或超级动物。

一般认为,遗传工程的定义可以分为狭义的和广义的两种。狭义的遗传工程就是指重组DNA技术,广义的遗传工程不仅包括重组DNA技术,还包括重组DNA技术产品的产业化所需要的技术,即含有外源基因的基因工程菌或细胞的大规模培养及外源基因表达产物的分离纯化等技术。重组DNA技术及其产品产业化的技术也可分别被称为上游技术和下游技术,它们应相互配合,成为统一整体。此外,广义的遗传工程还包括细胞工程、染色体工程、细胞器工程等。我们这本教材主要介绍重组DNA技术。