

生物科学动态

工艺学

集

增刊

出版社重庆分社

《生物科学动态》1984年

生物工艺学专集

中国科学技术情报研究所重庆分所  
科学技术文献出版社重庆分社  
重庆市市中区胜利路91号  
新华书店重庆发行所  
科学技术文献出版社重庆分社印刷厂

开本:787×1092毫米1/16 印张:5.875  
1984年10月第一版 1984年10月  
科技新书目: 83—249 印

书号:13176·118

定

# 生物工艺学专集

1984年

(生物科学动态)

增刊

## 目 录

基因工程进展·····	钱 标 (1)
纤维素利用的生物工程新进展·····	陆师义 (10)
遗传工程与医药的发展·····	黄胜炎 (13)
单克隆抗体技术在发展中国家生物医学和生物学上的应用·····	W. C. Davis等 (18)
新兴生物量工业概论·····	Henry R. Bungay (33)
农业概况·····	Lowell Lewis (42)
植物细胞和组织培养——综述·····	G. B. Collins (49)
植物遗传工程的展望·····	Kenneth A. Barton等 (59)
何谓卡里克隆植物——培制和利用·····	大泽腾次 (64)
烟草细胞工业培养生产的研究·····	加藤 阳 (69)
用植物基因作为遗传工程的对象·····	Ю. П. Винецкий (77)
真核细胞基因调控水平的多样性·····	James E. Darnell Jr (81)

## 简 讯

遗传工程的农业应用·····	(91)
分子生物学与植物育种的交界面·····	(91)
编码大豆蛋白质的基因的调节·····	(92)
脂质体在遗传工程上的应用·····	(93)
用重组DNA技术检验马铃薯纺锤体类病毒·····	(94)
基因工程的又一重大突破——蚕豆基因已成功地移入到向日葵细胞内·····	(80)

# 基因工程进展\*

钱 标

(中国科学院上海生物化学研究所)

一九八二年基因工程在以下几方面获得新的成果：一、乙型肝炎病毒的基因工程研究继续取得进展；二、免疫干扰素基因在大肠杆菌和哺乳类细胞中表达成功；三、人类肿瘤细胞的转化基因被分离和克隆，它们与病毒肿瘤基因之间的序列同源性被证实；四、又一批动物（包括人类）、植物、细菌及病毒的种种cDNA或基因被克隆或表达，扩大了基因工程的研究领域，为进一步开展理论和实际应用研究打下了基础。现分别综述如下。

**一、乙型肝炎病毒的基因工程** 乙型肝炎病毒 (HBV) 是一个大小为42nm的颗粒，称为Dane颗粒。它有一个核心，包括病毒基因组及结合着的核心蛋白和DNA聚合酶，核心的外面是含表面抗原和磷脂的蛋白外壳。表面抗原含有含糖基和无糖基两种形式，分子量分别为27000~29000和23000~25000。HBV的感染不仅产生Dane颗粒，而且产生含表面抗原的22nm大小的颗粒。这种颗粒比未聚集的表面抗原蛋白的抗原性高一千倍。动物实验及志愿者试验表明，表面抗原在注射体内后能产生相应的抗体，从而使受试者获得抵抗病毒感染的免疫力。近年来，各国科学工作者在探索用HBV表面抗原 (HBsAg) 制取疫苗的研究方面已取得不少进展，但克隆在细菌中的HBsAg基因即使利用强力的起动机，也未能产生高水平的HBsAg有关的免疫物质。最近美国加州大学和华盛顿大学的科学家们<sup>[1]</sup>成功地利用酵母作为宿主系统，使HBsAg基因表达取得重大突破，为乙型肝炎疫苗的研制开辟了一条很有希望的途径。酵母系统的优点是它有复杂的膜系统和有在高等动物细胞中所观察到的类似的分泌和糖基化蛋白质的功能。用于这项研究的HBsAg编码序列是重组的HBV基因组质粒中TaqI/HpaI的酶解片段，共有835个

碱基对，在编码成熟HBsAg N-端甲硫氨酸密码子AUG前面有26个碱基对，但切去了其余的信号肽序列，将这个片段的两端接上EcoRI人工接头后，插入pBR322的EcoRI位置，得到重组质粒pHBS-5，扩增后可获得大量HBsAg基因片段。用作表达载体的是一个来自人工组建的酵母-大肠杆菌通用质粒YRp7的衍生物——pMA-56，它由下述步骤的体外重组获得：1. 除去YRp7中两个EcoRI切点中的一个；2. 将含有酵母2 $\mu$ 质粒复制起点的PstI-EcoRI片段代替酵母的ars-1复制起点；3. 用含酵母醇脱氢酶I (ADHI) 起动子的EcoRI-BamHI片段 (有1500个碱基对) 代替原质粒中最小的EcoRI-BamHI片段。HBsAg基因片段就连接在ADHI起动机和2 $\mu$ 质粒复制起点 (ori) 之间 (见图1略)。组建后的HBsAg重组质粒用于转化酵母细胞XV610-8C，筛选出两种不同性质的克隆株：pHBS-16和pHBS-20；前者所含的重组质粒中HBsAg基因片段和ADHI起动机有相同的方向，而后者则方向相反。只有含质粒pHBS-16的酵母细胞具有产生HBsAg的能力。根据放射免疫测定的结果计算，每200毫升中对数期的酵母培养物可以抽提到2—5微克HBsAg。一个意外的发现是酵母中产生的HBsAg竟与人肝炎患者血

\* 本文承李载平教授指导和审阅，特此致谢。

清中的一样以颗粒状聚合体形式存在。电子显微镜鉴定表明这种颗粒的直径为20nm,结构与22nm颗粒相似。这些颗粒具有抗原性,在试验动物中诱导抗体产生。另外,由酵母合成的HBsAg其分子的化学组成已被确定,在SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳中为单一区带,分子量23000,相当于无糖基的表面抗原蛋白。与一九八一年干扰素在酵母中的表达成功相似,HBV疫苗在酵母中的生产也将进入实用阶段,这无疑基因工程研究的重大成果。

除美国外,对HBV基因克隆和表达的研究工作,在中国、法国和瑞士等国家也取得新的进展。中国科学院上海生物化学研究所与上海市卫生防疫站协作,在一九八二年四月首次获得HBV adr亚型在大肠杆菌中的克隆成功,同时开始对此亚型的HBV核苷酸序列分析及表面抗原基因表达的研究。在法国巴斯德研究所Tiollais实验室<sup>[2]</sup>,他们最近利用小鼠L-细胞(tK<sup>-</sup>)系统,使HBsAg在真核细胞中获得表达。他们将二个HBV拷贝的质粒pCP10与克隆的单疱疹病毒(HSV) I的tK基因共转化小鼠L-细胞,结果在细胞培养物的上清部分得到分泌出来的22nm颗粒,它在形态、大小及抗原性上都与人血清颗粒有同样性质。这种从L-细胞纯化的HBsAg颗粒在小鼠中有很高的免疫性。另外他们还研制了新的HBsAg基因表达,即将它与大肠杆菌的lac Z基因融合,融合基因在噬菌体系统中产生一分子量为138000的融合多肽,他们认为这种蛋白最终能用于第二代疫苗的生产。瑞士生物基因公司(Biogen S. A.)和英国爱丁堡大学对HBV核心抗原(HBcAg)在大肠杆菌系统中表达和诊断应用上获得进展<sup>[9]</sup>。他们为了提高HBsAg在大肠杆菌中的表达水平,又组建了许多质粒,在这些质粒中HBcAg基因融合在 $\beta$ -半乳糖苷酶基因的起始位置,受lacUV5起动子的控制,从而获得几个与亲本质粒pHBV-139a比较有较高合成HBcAg

水平的质粒,从中制备的细胞抽提物已被成功地用作诊断试剂,应用固相放射免疫法检出人血清中HBcAg的抗体。

## 二、免疫干扰素基因在大肠杆菌和猴细胞中表达

干扰素(IFN)是一类分泌蛋白,它们能在其靶细胞中诱导一种抗病毒状态,并有抗肿瘤和调节免疫的性质。根据抗原性,化学和生物学的性质,人的干扰素可分为三类:白细胞干扰素(IFN- $\alpha$ )、成纤维细胞干扰素(IFN- $\beta$ )和免疫干扰素(IFN- $\gamma$ )。IFN- $\alpha$ 和- $\beta$ 能由病毒诱导,对酸稳定。关于它们的结构和性质已有相当多的认识,IFN- $\beta$ 和几个IFN- $\alpha$ 已在大肠杆菌或酵母中克隆并有效表达<sup>[4,5]</sup>。但对IFN- $\gamma$ 则了解较少,它一般是在各种促细胞分裂剂的刺激下由淋巴细胞产生的,IFN- $\gamma$ 对酸不稳定,与抗IFN- $\alpha$ 和- $\beta$ 的抗血清无交叉反应,分子量范围在35000—70000,IFN- $\gamma$ 的mRNA已被分离<sup>[6]</sup>。IFN- $\gamma$ 有广泛的生物学活性,除了抗肿瘤活性外,它的主要作用是作为一种免疫调节因子,它对转化细胞(即肿瘤细胞)的抗增殖作用要比IFN- $\alpha$ 或- $\beta$ 强10—100倍。实验证明鼠类的IFN- $\gamma$ 制剂对小鼠肉瘤有相当大的抗性。因此它在治疗肿瘤上可能有更大的用途。1982年美国基因工程公司和国家癌症研究所联合研究人IFN- $\gamma$ 的cDNA在大肠杆菌和猴细胞中克隆及表达获得成功<sup>[7]</sup>,这为取得大量可利用的纯IFN- $\gamma$ ,明确分析其物理化学和生物学性质创造了条件。他们的实验方法和结果简述如下:首先按Svedersky的方法用链球菌内毒素B(SEB)和去乙酰胸腺素 $\alpha_1$ 处理健康人外周血的淋巴细胞,48小时后收集细胞培养物制备polyA<sup>+</sup>RNA。在琼脂糖凝胶电泳中鉴定指导合成IFN- $\gamma$ 的mRNA与18s rRNA共迁移,将此mRNA用于制备双链cDNA,然后用多聚dG-dC尾化技术将cDNA插入pBR322的PstI位置,转化大肠杆菌,从8300个细菌克隆中最后筛选出22个菌落,其质粒DNA能专一地与诱导后的polyA<sup>+</sup>RNA

探针杂交。当用PstI酶切回克隆的cDNA片段时，发现质粒p69有最大的插入片段，约1250碱基对。他们测定了这个片段的全部核苷酸序列，其编码区编码166个氨基酸（包括20个氨基酸的可能的信号肽），其中有27个碱性氨基酸，19个酸性氨基酸，呈较强的碱性，这与IFN- $\gamma$ 有一碱性等电点（pH8.6~8.7）是一致的。编码序列中还有两个可能的糖基化位置。为了在大肠杆菌系统中表达p69中克隆的IFN- $\gamma$  cDNA，他们采用了类

似以前用于表达人生长激素<sup>[8]</sup>、IFN- $\beta$ <sup>[9]</sup>和几个IFN- $\alpha$ <sup>[10]</sup>的系统，即组建一个含大肠杆菌trp启动子的表达质粒pIFN- $\gamma$  trp48（见图2），其中IFN- $\gamma$ 基因在一个有300个碱基对的大肠杆菌操纵子片段的控制下被转录。这个操纵子片段含有trp启动子、操纵基因和trp前导肽的Shine-Dalgarno序列。用pIFN- $\gamma$  trp48和p69分别转化大肠杆菌并培养，对培养物的抽提液进行干扰素活性试验，结果是含pIFN- $\gamma$  trp48的有活性（~

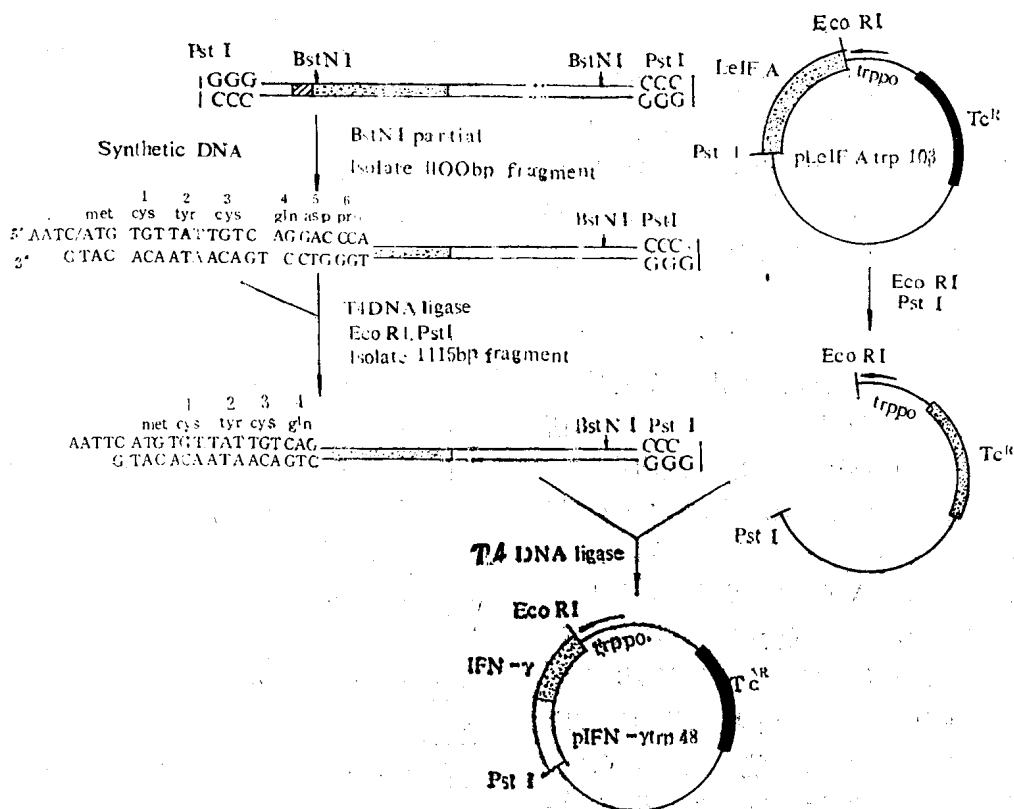


图2 免疫干扰素 (IFN- $\gamma$ ) 在大肠杆菌中表达的质粒pIFN- $\gamma$  trp48的构建

250单位/毫升抽提液)，而含p69的则没有活性（小于3单位）。为了在哺乳动物细胞中表达IFN- $\gamma$ 基因，他们组建了另一个表达载体质粒 pSVr69（见图3），它有以下三个组分：（1）质粒pML-1<sup>[11]</sup>是pBR322的衍生物，含有Ap<sup>r</sup>标记及一个大肠杆菌的复制起点；（2）一个342个碱基对的SV40-Pvu II-Hind III片段，提供SV40的复制起点及早期和晚期转录单位的启动子；（3）来自p69的

全部cDNA插入片段。在质粒pSVr69中，只有与SV40启动区同一方向的cDNA插入物才能在上述启动子的控制下进行转录。用DNA转染方法将这个质粒引入转化了的猴细胞株COS-7，第三或第四天就可在培养液中检出50~100单位/毫升的干扰素活性，这说明干扰素已被COS-7细胞合成并分泌到培养液中。用相反方向插入cDNA的质粒转染同样的细胞则没有干扰素合成。上述由大肠杆菌

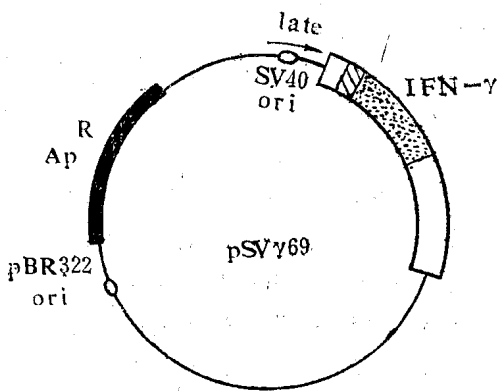


图3  $\gamma$ -干扰素在猴细胞中的表达质粒 pSV r69

和猴细胞产生的干扰素活性，通过比较鉴定证明它有与人IFN- $\gamma$ 同样的化学和免疫学性质，即能与人的IFN- $\gamma$ 抗血清发生免疫反应而与IFN- $\alpha$ 或- $\beta$ 抗血清则不能，它对酸不稳定，在pH 2或用0.1%SDS处理会完全失活。

除了上述IFN- $\gamma$ 表达成功外，1982年在对人IFN- $\alpha$ 和- $\beta$ 在哺乳动物细胞中的克隆和表达方面继续取得进展<sup>[12-16]</sup>。许多作者研究了人IFN- $\alpha$ 和- $\beta$ 基因在小鼠L-细胞克隆中的可诱导性。西德生物技术公司Hauser等报导<sup>[12]</sup>，一个含人IFN- $\beta$ 基因的科斯质粒 pCOS IFN- $\beta$  DNA (36000碱基对)与质粒 pHC792COS/tK<sup>+</sup>DNA (含有单疱疹病毒的tK基因)应用磷酸钙沉淀技术共转移进入小鼠LtK<sup>-</sup>细胞，得到的含干扰素基因的细胞克隆有稳定的低水平的干扰素合成(10~100单位/毫升)，这种合成可被多聚(rI)-多聚(rC)或新城疫病毒诱导而提高4~1000倍，例如在一细胞克隆2中，当用多聚(rI)-多聚(rC)诱导4小时后，IFN- $\beta$ 的合成从50提高到12000单位/毫升，而用新城疫病毒诱导1小时后可提高到60000单位/毫升)。其他作者也有类似的结果<sup>[13,14]</sup>。看来用细胞培养方法大量制备干扰素是很有希望的。

三、人类肿瘤细胞的转化基因(即癌基因)的分离和克隆，发现和证实它们与病毒

癌基因及正常细胞的基因之间有序列同源性，给致癌机理研究开辟了新的途径。癌症日益成为严重威胁人类健康和生命的常见病，世界各国均极为重视癌症的防治和致癌机理的研究。自从1976年美国Bishop等首次分离出劳氏肉瘤病毒(RSV)癌基因src以来，从种种致癌的还原病毒(retrovirus)基因组中至少已有12种这类癌基因被分离或克隆<sup>[10]</sup>，它们已成为探测人类或动物癌基因的重要手段。1981年开始有人报导某些非病毒诱导的肿瘤细胞株(它们来自化学诱导的动物肿瘤或自发起源的人类肿瘤)，其DNA也象某些还原病毒一样，能在体外转化小鼠成纤维细胞NIH/3T3，即使细胞发生癌变。细胞的癌变可能涉及到一个或多个基因的突变或活化，肿瘤细胞株DNA中导致正常细胞转化的转化基因(即癌基因)可能在肿瘤的发生上起关键作用。因此，能不能分离出人或动物肿瘤细胞中的转化基因，这些基因与正常细胞的基因以及与病毒的癌基因之间存在着什么样的关系，这些问题就成为肿瘤研究中十分重要和令人感兴趣的课题。基因工程技术的发展给这些研究提供了新的分析方法和检出手段，因而取得了前所未有的重大进展。1982年美国冷泉港实验室Wigler等<sup>[17]</sup>首先报导应用分子克隆技术从膀胱癌细胞株T24中分离出人的转化基因，他们的主要方法和结果简述如下：首先从一含有T24转化基因的NIH/3T3细胞转化株T24-a2中分离出DNA(它比T24 DNA有更高的转化活性)，在用Hind III酶解后(试验证明Hind III酶解不影响T24或T24-a2 DNA的转化活性)DNA片段与含大肠杆菌tRNA<sup>amber</sup>校正基因SupF的DNA-Hind III片段连接，得到的连接了的DNA用以转化NIH/3T3细胞，二周后挑出形态上转化的细胞集落(Foci)，细胞的转化说明已有转化基因进入。这些转化细胞株培养后分离出DNA，再进行基因转移产生新的集落。在上述实验中Sup F基因是作为可检出的标记物，含转化

基因的DNA片段依靠与它相连接而被检出。为此他们根据克隆的tRNA *Sup F*校正基因校正amber突变的能力进行生物学筛选,他们组建了一个噬菌体 $\lambda$ 变种— $\lambda$  1059 *Sam 7*,这是一个克隆载体,能接受7~18千碱基对的具有GATC3'-OH粘性末端的DNA片段,同时由于它的溶菌基因上引入了一个amber突变*Sam 7*,所以必需一个*Sup F*<sup>+</sup>宿主才能完成溶菌循环。来自上述转化细胞的DNA用限制酶*Sau 3A*部分消化,然后与载体 $\lambda$ 1059*Sam 7*重组,在*Sup*<sup>0</sup>和*Sup F*两种宿主系统中涂平板,在*Sup*<sup>0</sup>宿主上生长的噬菌体,由它们使*lacZ*<sup>am</sup>*Sup*<sup>0</sup>宿主转化为*lacZ*<sup>+</sup>的能力而进一步鉴定为含*Sup F*基因。从这样的筛选过程中,他们获得了4株*Sup F*噬菌体重组体。而当用这些重组体DNA去转化N1H/3T3细胞时只有一个命名为 $\lambda$ *Sup 2.9*的DNA有诱导转化的活性,其转化效率达每微克DNA产生约300个细胞集落,其余三个均无活性。将 $\lambda$  *Sup 2.9* DNA用限制酶*Bam*H I, *Bgl* II, *Eco* R I或*Hind* III酶切时,其转化活性没有改变,但用*Xba* I酶切时则使活性消失。这和用T24 DNA的同样试验有相同的结果。说明 $\lambda$ *Sup 2.9* DNA中具有转化活性的序列与T24 DNA中的是同一的。为了进一步确定 $\lambda$ *Sup 2.9*中转化序列的部位,他们用*Bam*H I和*Hind* III酶将DNA酶解,获得的各个限制酶片段分别在质粒pBR322中进行次级克隆,通过对这些克隆DNA对N1H/3T3细胞转化能力的筛选,鉴定出只有一个质粒pTB-1具有转化活性。pTB-1 DNA含有一个9800碱基对的插入片段,其中5000碱基对为 $\lambda$  DNA序列,因此具有转化活性的部分仅是一个不大于4800碱基对的片段。这个片段中有许多个丛集在一起的*Pst* I酶切口,但没有*Eco* R I, *Hind* III, *Bgl* II等酶切口(见图4)。转化试验表明pTB-1具有比 $\lambda$  *Sup 2.9*更高的转化比活性。Southern转移杂交技术进一步证明来自T24膀胱癌细胞株的转化基因已在质粒pTB-1中克隆。Wigler他们用<sup>32</sup>p-标记

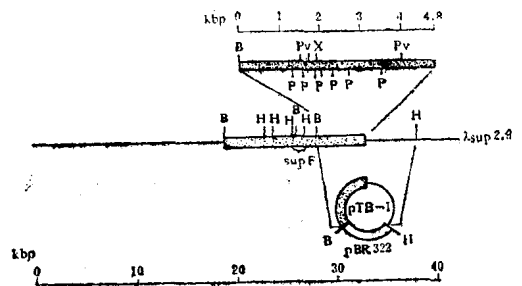


图4  $\lambda$ *Sup 2.9*和质粒pTB-1的限制性内切酶图谱

图中的限制酶: B, *Bam*H I; H, *Hind* III; P, *Pst* I; Pv, *Pvu* I; X, *Xba* I。

的pTB-1 DNA作探针,与种种DNA的*Hind* III酶解片段杂交,发现它与N1H/3T3细胞DNA及用各种人肿瘤细胞株(来自T24膀胱癌、肺癌和神经母细胞瘤)的DNA转化的N1H/3T3细胞DNA均有一微弱的杂交带,它也能与正常大鼠DNA的限制性片段杂交,除了这种种间的同源性外,pTB-1还有强烈地与T24转化株的一个*Hind* III片段杂交,而与N1H/3T3及其他转化株DNA都没有这一额外的杂交带,这说明pTB-1中含有存在于T24 DNA中的专一的转化序列。此外杂交试验还表明pTB-1还能与来自正常人胎盘DNA的*Hind* III, *Bam*H I, *Bgl* II或*Eco* R I酶解片段有杂交带,并且这些片段的大小与T24 DNA的同种限制酶片段一样,这说明T24转化基因来源于人的基因信息,并与正常的DNA序列没有大的重排。然而从正常细胞和转化细胞分离出polyA<sup>+</sup> RNA,分别用pTB-1 DNA作探针进行Northern杂交,发现只有转化细胞中有与pTB-1杂交的RNA,大小为1500~1800个核苷酸,而正常细胞中则没有。同样在T24细胞中也有与pTB-1杂交的大小为1100~1200个核苷酸的polyA<sup>+</sup> RNA,而正常人胎盘细胞中则没有。这表明只有在肿瘤细胞或转化的细胞中转化基因才被表达,而在正常细胞中则不能表达,显然,转化基因的表达是与肿瘤的发生有密切关系的。

应用类似的技术,美国国家癌症研究所



的Pulciani等<sup>[18]</sup>也分离了人膀胱癌细胞的转化基因,克隆载体是 $\lambda$ 噬菌体的charon9A株,在大肠杆菌K-12 DP50SupF中繁殖,含转化基因的重组 $\lambda$ 噬菌体AT24-15A,其DNA在1ng时就能诱导NIH/3T3细胞形态的转化,比活性达 $\sim 20000$ FFU/pmol。

美国国家卫生研究院 Santos 等<sup>[19]</sup>进一步利用分子克隆的膀胱癌转化基因,他们命名为T24癌基因,考察了它与各种有转化作用的还原病毒癌基因之间的关系。他们使用许多不同病毒癌基因的克隆DNA探针,进行Southern杂交分析,结果发现含人T24癌基因的一个6.6Kbp DNA-BamH I片段特异地与BALB鼠类肉瘤病毒的癌基因v-bas(有675bp) DNA探针杂交,当用Sac I酶将此片段进一步酶解时,产生三个大小分别为3.0, 2.7和0.85Kbp的片段,其中能与v-bas DNA探针杂交的只有3.0Kbp这个片段。T24癌基因和其他被试的各种病毒癌基因之间没有序列同源性,除了MC29病毒的v-myc外,它与T24癌基因的杂交程度较v-bas至少小20—50倍,而且它的同源序列是在三个Sac I片段中的0.85Kbp片段上。在确定了T24癌基因与v-bas之间的同源性后,Santos他们又研究了它与正常人基因之间的关系。已经知道正常人DNA中含有包括v-bas和v-myc在内的各种还原病毒的有关序列<sup>[20]</sup>,他们将正常人的DNA用BamHI消化,然后期Southern杂交法分析它们与T24癌基因,v-bas及v-myc的有关序列,结果发现T24癌基因和v-bas都与一大大小为6.6Kbp的人DNA BamHI片段杂交,这表明正常人的v-bas有关序列可能是T24癌基因的正常等位基因。v-myc探针与人DNA在不同的位置有杂交带,说明T24癌基因的v-myc有关片段—0.85Kbp Sac I片段与人的C-myc位点是不一致的。然后他们又从正常胎儿肝的DNA基因库中分离出C-bas(人)——一个含19Kbp DNA插入物的重组 $\lambda$  Charon 4A, 其中的一个6.4 Kbp DNA-BamHI片段特异地与v-bas杂交,将这个片

段在质粒pBR 322中次级克隆,得到质粒p344,当用各种限制酶对p344中的C-bas(人)和T24癌基因DNA(次级克隆pT24-C3)的酶切位置进行比较时发现,两者的图谱非常一致(见图5),只是在人的C-bas中Sph I和Cla I切点之间有200个碱基对的缺失,而且这一缺失区域是在T24癌基因和v-bas的转化序列之外。这些结果表明正常人的C-bas与T24癌基因在结构序列上十分相似,但在诱导细胞转化(即癌变)活性上又怎样呢?当他们将这两个十分相似的基因都用来进行NIH/3T3细胞的转化试验时,却发现了极其巨大的差别,T24癌基因仅使用1ng时就能容易地诱导转化,比活性达 $\sim 5 \times 10^4$ FFU/pmol,这与Pulciani等的结果一致,而克隆的C-bas(人)DNA即使用1 $\mu$ g也没有可检出的转化活性。因此Santos他们认为T24癌基因是正常人的C-bas序列的活化形式,从C-bas序列改变成具有转化活性或致癌活性的T24癌基因是一种相当微妙的基因改变的结果,但并不需要与病毒序列重组的机制。

美国的另一些研究单位<sup>[21,22]</sup>及苏联、法国等的科学家们<sup>[23,24]</sup>也有与Santos等类似的工作,他们从不同的肿瘤病毒癌基因和人或动物的基因杂交分析,证实了它们之间的同源性。

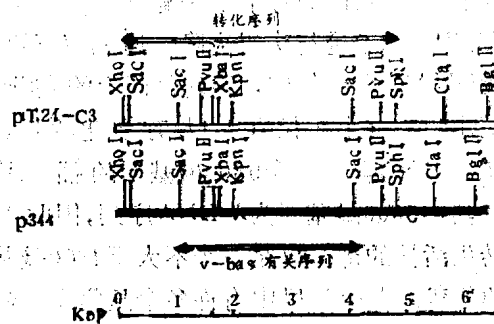


图5 T24癌基因和C-bas(人)的限制酶图谱比较

在致癌机理上与Santos他们不同的观点是美国Chang等提出的<sup>[25]</sup>,他们根据病毒诱导细胞转化时必须具备两个成份:即病毒的

表1 各种克隆的生物基因及其载体-宿主系统

克隆的基因或cDNA	载体	宿主	表达与否	文献
1 人甲状腺球蛋白基因	pBR322	E. coli C600	-	26
2 人降血钙素基因	"	E. coli K-12(SF8)	-	27
3 人组蛋白基因	$\lambda$ Charon4A		-	28
4 人胶原 $\alpha_1$ (I) 基因	pJB8			29
5 人脑啡肽前体基因				30
6 人免疫球蛋白IgE $\epsilon$ 链基因	$\lambda$ Charon4A $\lambda$ gtwES- $\lambda$ B	E. coli DP50 SupF	-	31
7 人血清白蛋白基因	pBR322	E. coli K12-294	+	32, 33
8 人角蛋白基因				34
9 牛凝乳酶原cDNA	pBR322	E. coli C600	-	35
10 牛甲状腺球蛋白基因	pBR322	E. coli	-	36
11 牛脑啡肽前体基因	"	E. coli x1776, HB101	-	37, 38
12 猪促胃酸激素基因	"	E. coli HB101	-	39
13 猪脑啡肽前体基因	"			40
14 大鼠免疫球蛋白IgE $\epsilon$ 链基因	pBR322	E. coli K-12-259	-	41
15 大鼠羧肽酶A前体基因				42
16 大鼠 $\beta$ -葡萄糖醛酸酶cDNA	pBR322	E. coli HB101	-	43
17 大鼠酪氨酸羟化酶基因	"	E. coli C600	-	44
18 小鼠 $\gamma$ -晶状体蛋白基因	pBR322	E. coli LE392	-	45
19 小鼠胰激肽(Kallikrein)基因	"	" RR1	-	46
20 鸡溶胶原基因	"			47
21 鸡肌球蛋白H链基因	charon4A	E. coli DP50SupF		48
22 鸡组蛋白H5cDNA	pBR322	E. coli 5K	-	49
23 鸟类脂肪酸合成酶基因	"	" HB101	-	50
24 蛙 $\gamma$ -晶状体蛋白基因	"	" HB101	-	51
25 冬蟻抗冻蛋白前体基因	pBR322	" HB101	-	52
26 酵母精氨酸专一氨甲酰磷酸合成酶基因	YEpl3	" RR1	-	53
27 C. fimi 纤维素酶基因	pBR322	" C600	+	54
28 大肠杆菌K-12谷氨酸脱氢酶基因	"	" PA340	+	55
29 大肠杆菌二氢叶酸脱氢酶基因		" C600	+	56
30 乳酸杆菌二氢叶酸脱氢酶基因	pBR322	" EQ82r <sup>+</sup> -m <sup>+</sup>	+	57
31 烟草花叶病毒cDNA	"	" HB101	-	58
32 人乳头瘤病毒Ia DNA	"	" 490A	-	59
33 核多角体病(AcNPV)DNA	"	" HB101	-	60
34 Rous肉瘤病毒src基因	pBR322	E. coli K-12-294	+	61
35 SV40 T 抗原基因	"	小鼠LTK <sup>-</sup> 细胞	+	62
36 单疱疹病毒tk基因	"	E. coli HB101	+	63
37 口蹄疫病毒衣壳蛋白结构基因	pAT153	E. coli HB101	-	64
38 猿猴肉瘤病毒转化基因v-sis	Charon16A		-	65
29 人细胞巨病毒(CMV)基因组	CosmidpHC79	E. coli K-12MRC-1	+	66
40 鸟类肿瘤病毒DNA	pBR322	E. coli HB101		67
41 大豆肌幼蛋白基因				68
42 甜味蛋白Thaumatococcus前体基因	pBR322	E. coli HB101	-	69
43 玉米醇溶蛋白cDNA				70
44 植物贮存蛋白前体cDNA	pBR322	E. coli K-12RecA <sup>-</sup>	-	71

癌基因 (v-onc) 和病毒的LTR (长末端重复) 序列, 后者是v-onc转录的控制元件, 用实验证明了一个正常人的C-onc基因(即与病毒的onc基因同源的序列) 与病毒的LTR序列连接后会诱导产生致癌的转化活性。他们将一正常人的与哈维鼠肉瘤病毒癌基因v-Ha-ras同源的基因C-Ha-ras1用Sac I酶解, 获得的2.9Kbp Sac I片段, 与含有病毒LTR序列的pBR322重组后, 重组质粒DNA-Ha-MuSVLTR-C-Ha-ras1能使NIH/3T3细胞转化, 并有高水平的p21 ras蛋白的表达, 这种现象已在两个鼠类的C-onc基因中被证实。

**四、一批动物(包括人类)、植物、细菌及病毒的基因或cDNA被克隆, 扩大了基因工程的研究领域, 为进一步的理论和应用研究打下了基础** 表1总结了主要在1982年发表的克隆基因, 它们的载体和宿主系统, 以及它们在克隆后的表达情况。从表中不完整的统计中看出, 人类和动物基因的克隆工作占一半以上, 而其中研究较多地集中在蛋白质激素的基因及前体基因方面, 如甲状腺球蛋白、降血钙素、促胃酸素、胰激肽和脑啡肽前体等。日本沼正作(S. Numa)等连续在《自然》杂志上发表关于人、牛和猪脑啡肽前体基因的克隆和序列分析工作<sup>[30,37,40]</sup>, 他们提出了两种脑啡肽前体结构, 一种来自小牛肾上腺髓质mRNA的cDNA克隆, 称为前脑啡肽原A, 它含有四个甲啡肽及一个亮啡肽, 还有一个甲啡肽·Arg·phe 和一个甲啡肽·Arg·Gly·Leu, 另一种他们称为前脑啡肽原B, 是从猪下丘脑mRNA的cDNA克隆中分析出来的, 它含有β-新内啡肽、强啡肽(Dy-

norphin) 和亮啡肽三个多肽, 其前两个多肽中也有亮啡肽的五肽序列。这两种前体结构与以前发表过的ATCH-β-LPH前体一样都是多激素前体, 它们可由蛋白酶加工而释出多种生物活性多肽, 去完成中枢神经系统及外周组织中的协同功能。在许多病毒的特异基因或基因组克隆中, 有的可作为真核基因在哺乳类细胞中表达的载体, 有些为致癌的转化基因, Rous肉瘤病毒的Src基因就是一典型例子<sup>[61]</sup>, 它已在大肠杆菌中表达, 其基因产物pp60<sup>Src</sup>有一蛋白激酶的活性。口蹄疫病毒在克隆的基础上又有新的进展, 英国Boothroyd等<sup>[64]</sup>测定了编码其衣壳多肽结构基因的全部核苷酸序列, 共2820个, 编码4个多肽, 它们的排列次序为NH<sub>2</sub>-VP<sub>1</sub>-VP<sub>2</sub>-VP<sub>3</sub>-VP<sub>1</sub>-COOH, 其中VP<sub>1</sub>是病毒的主要免疫抗原, 他们的工作为人工合成口蹄疫病毒免疫活性多肽创造了条件。事实上Bittle等<sup>[72]</sup>已根据核苷酸序列用化学合成方法合成了两个相应于VP<sub>1</sub>不同区域的多肽, 一个20肽, 一个19肽, 它们都具有在牛、豚鼠和兔中产生高水平血清型专一抗体的能力, 用它们接种一次就有防止病毒感染的作用。

植物基因的克隆研究一直比较少, 最近的一个令人感兴趣的工作是荷兰科学工作者Edens等的研究<sup>[66]</sup>, 他们将一个从一种西非灌木的果实假种皮中分离出来的甜味蛋白(Thaumatococcus) 结构基因, 应用分子克隆技术使在大肠杆菌中获得表达, 它是一种碱性蛋白, 分子量22000, 在1克分子的基础上, 它比蔗糖甜十万倍。关于其他种种克隆的真核或细菌的基因就不再一一叙述了。

## 参 考 文 献

- (1) Valenzuela, P. et al., 《Nature》, 1982, 298, 347
- (2) Wain-Hobson, S. et al., 《Dev. Biol. Stand.》, 1982, 50, 293
- (3) Stahl, S. et al., 《Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.》, 1982, 79, 1606
- (4) Yeverton, E. et al., 《Nucleic Acids Res.》, 1981, 9, 731
- (5) Hitzemen, R. et al., 《Nature》, 1981, 293, 717
- (6) Wallace, D.M. et al., 《Biochem. Biophys. Res. Commun.》, 1981, 100, 865
- (7) Gray, P.W. et al., 《Nature》, 1982, 295, 503

- (8) Goeddel, D.V. et al., «Nature», 1979, 281, 544
- (9) Goeddel, D.V. et al., «Nucleic Acids Res.», 1980, 8, 4057
- (10) Goeddel, D.V. et al., «Nature», 1980, 287, 411
- (11) Lusky, M. et al., «Nature», 1981, 293, 29
- (12) Hauser, H. et al., «Nature», 1982, 297, 650
- (13) Ohno, S. et al., «Nucleic Acids Res.», 1982, 10, 967
- (14) Mantei, N. et al., «Nature», 1982, 297, 128
- (15) Reyes, C.R. et al., «Nature», 1982, 297, 598
- (16) Parada, L.E. et al., «Nature», 1982, 297, 474
- (17) Goldfarb, M. et al., «Nature», 1982, 296, 404
- (18) Pulciani, S. et al., «Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.», 1982, 79, 2845
- (19) Santos, E. et al., «Nature», 1982, 298, 343
- (20) Eva, A. et al., «Nature», 1982, 295, 116
- (21) Channing, J.D. et al., «Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.», 1982, 79, 3637
- (22) McDougall, J.K. et al., «Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.», 1982, 79, 3853
- (23) Chumakov, I.M. et al., «Gene», 1982, 17, 19
- (24) Sergeant, A. et al., «EMBO.J.», 1982, 1, 237
- (25) Chang, E.H. et al., «Nature», 1982, 297, 497
- (26) Brocas, H. et al., «FEBS Lett.», 1982, 137, 189
- (27) Rosenfeld, M.G. et al., «Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.», 1982, 79, 1717
- (28) Rickles, R. et al., «Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.», 1982, 79, 749
- (29) Weiss, E.H. et al., «Nucleic Acids Res.», 1982, 10, 1981
- (30) Noda, M. et al., «Nature», 1982, 297, 431
- (31) Nishida, Y. et al., «Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.», 1982, 79, 3833
- (32) Lown, R.M. et al., «Nucleic Acids Res.», 1981, 9, 6103
- (33) Dugaiczky, A. et al., «Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.», 1982, 79, 71
- (34) Fuchs, E.V. et al., «Cell», 1981, 27, 75
- (35) Nishimori, K. et al., «J. Biochem. (Tokyo) », 1982, 91, 1058
- (36) Christophe, D. et al., «Eur. J. Biochem.», 1982, 122, 461
- (37) Noda, M. et al., «Nature», 1982, 295, 202
- (38) Gubler, U. et al., «Nature», 1982, 295, 206
- (39) Yoo, O. J. et al., «Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.», 1982, 79, 1049
- (40) Kakidani, H. et al., «Nature», 1982, 298, 245
- (41) Hellman, L. et al., «Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.», 1982, 79, 1246
- (42) Quinto, C. et al., «Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.», 1982, 79, 31
- (43) Hieber, V.C. et al., «Biochem. Biophys. Res. Commun.», 1982, 104, 1271
- (44) Lamouroux, D. et al., «Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.», 1982, 79, 3881
- (45) Shinohara, T. et al., «Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.», 1982, 79, 2783
- (46) Richards, R.J. et al., «J. Biol. Chem.», 1982, 257, 2758
- (47) Yuorio, E. et al., «Nucleic Acids Res.», 1982, 10, 1175
- (48) Robbins, J. et al., «J. Biol. Chem.», 1982, 257, 549
- (49) Ruiz-Vazquez, R. et al., «Nucleic Acids Res.», 1982, 10, 2093
- (50) Morris, S.M. et al., «J. Biol. Chem.», 1982, 257, 3225
- (51) Tomarev, S.I. et al., «Gene», 1982, 17, 131
- (52) Davies, P.L. et al., «Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.», 1982, 79, 335
- (53) Lusty, C.J. et al., «Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.», 1982, 79, 2240
- (54) Whittle, D.J. et al., «Gene», 1982, 17, 139
- (55) Sanchez-Pescador, R. et al., «Gene», 1982, 17, 1
- (56) Iwakura, M. et al., «J. Biochem. (Tokyo) », 1982, 91, 1025
- (57) Davies, R. et al., «Gene», 1982, 17, 229
- (58) Meshi, T. et al., «Virology», 1982, 118, 64
- (59) Clad, A. et al., «Virology», 1982, 118, 254
- (60) Cochran, M.A. et al., «J. Virol.», 1982, 41, 940

(下转48页)

# 纤维素利用的生物工程新进展

陆师义

(中国科学院微生物研究所)

纤维素是植物细胞壁的主要成分,农林副产品及城市垃圾中含有大量纤维素。纤维素是一种复杂的多糖,通过纤维素酶的作用可把它水解成单体——葡萄糖。大量废弃纤维素的利用将在解决能源、饲料和粮食等重大问题中起重要作用。纤维素的水解靠三种酶组分作用: C<sub>x</sub>把纤维素切一些裂口,继由 C<sub>1</sub>酶切成短段,主要为纤维二糖,最后由纤维二糖酶分解成葡萄糖。很多真菌和细菌能产生纤维素酶,因而利用纤维素分解菌使大量废弃的纤维素变为宝贵的燃料、饲料、工业发酵原料和食品一直是受到重视的重大课题。长期以来由于纤维素水解预处理需较高成本以及纤维素酶的产量和活性不高,在经济上不易过关,因而一直被认为是老大难问题,甚至曾出现过低潮。由于生产上的迫切需要,这方面的研究仍在第三世界国家大量进行,而且已成为国际性的重要课题。最近瑞典Karolinska研究所的资料反映了这种情况。事实上纤维素的利用在常规的发酵工业、糖化罐和遗传工程等方面已出现了一些可喜的成果,兹择要说明并评述这些方面的新进展。

## (一) 直接转化纤维素的进展

寻找适当的生物体系直接转化纤维素,使之变为单体的五碳糖和六碳糖,进而生产酒精,可避免耗资较多的预处理和不用考虑不同酶组分的逐一生产过程。嗜热纤维梭状芽孢杆菌(*Clostridium thermocellum* LQ8)能分解纤维素和半纤维素而产生酒精,特别

是与嗜热解糖梭状芽孢杆菌(*Clostridium thermosaccharolyticum* ZC)混合培养可把五碳糖变为酒精,获得更好效果。这种混合培养可把磨碎的玉米秆分解而产生酒精、醋酸和乳酸。通过菌种选育还可提高酒精产量,降低醋酸和乳酸的产量,最终的混合产量高达0.57克/每克纤维素。白杨的硬木纤维经适当预处理亦可通过同样的发酵过程而产生酒精、醋酸和可溶性的糖。木霉(*Trichoderma*)的纤维素酶在木质素的存在下可水解纤维素产生葡萄糖,继经酵母菌发酵生产酒精,在一过程中不须预处理。水解过程中连续取出葡萄糖可避免终产物反馈抑制,从而提高产量。所用的基质现已扩展到城市的固体废料、纸浆厂废液、蒸煮器废料及农林废料。

木霉和酵母菌混合培养或是纤维杆菌和能利用纤维二糖的产碱杆菌(*Alcaligenes*)混合培养可生产微生物蛋白。

半纤维素可从玉米秸秆、蔗渣、种子稃壳、碎木屑、木质废料、稻麦秆和花生壳中经成本低的稀酸处理而获得,其来源广,可用作嗜热解糖梭状芽孢杆菌的发酵原料生产酒精,这种细菌能把水解液中的木糖转化成酒精。转化芽孢杆菌(*Bacillus macerans*)从木糖转化酒精的效率为27%,*Aeromonas hydrophilia*的转化率高达48%(包括酒精和二丁醇)。利用克氏肺炎杆菌(*Klebsiella pneumoniae*)能从半纤维素水解液生产二丁醇作为液体燃料,从木糖的转化率高达90%。酒精发酵一向用酵母菌把从淀粉得来的葡萄糖作为原料。目前正发展用酵母菌把纤维素

发酵成酒精，丝孢酵母证明能产生相当多的纤维素酶、木聚糖酶和果胶酶。多孢丝孢酵母 (*Trichosporon cutaneous*) 和出芽丝孢酵母 (*Tr. pullulans*) 降解纤维素和葡聚糖的活性与绿色木霉 (*Trichoderma viride*) 和疣孢漆斑菌 (*Myrothecium verrucaria*) 相比反映酵母菌和真菌的纤维素酶有多方面差异，不同的基质特异性反映了酶的调节、生物合成和组分的差异。在相同的生长条件下出芽丝孢酵母 (*Tr. pullulans* C. 35) 和绿色木霉 (*T. viride* CS 12) 的纤维素酶和木聚糖酶的活性可以伦比，说明酵母菌在直接转化纤维素的工艺中将有一定地位。用能插入核酸分子的染料或使蛋白质变性的化合物诱变可得到  $\rho^-$  或小菌落的呼吸缺陷酵母突变体，提高酒精产量。这些突变体无细胞色素氧化酶，不能氧化不可发酵的基质如酒精、醋酸、乳酸或甘油，而且在发酵过程中二氧化碳的产生不受氧的抑制，即不显示巴斯德效应。 $\rho^-$  突变体在糖酵解途径中磷酸化酶的水平较高，因为所有能代谢全赖糖酵解的氧化磷酸化。近年来酿酒酵母的固定化细胞作连续发酵已相当成功，使90%以上的葡萄糖转变为酒精，柱形反应器可维持13—24天。霉菌亦可采用此种技术，真菌反应柱可使五碳糖和六碳糖转化为酒精，也可水解工业废水中的淀粉、纤维素、或半纤维素的寡聚体。

## (二) 纤维素酶生产的新进展

近年来对纤维素酶进行了大量研究，目的为获得成本低而活性高的酶制剂应用于大量糖化。通过对李氏木霉 (*T. reesei*) 的集约研究，纤维素酶的产量有很大提高。由于对纤维素酶生物合成的调节、酶的分泌、产物抑制等方面的了解以及菌种选育方法和环境控制技术的改进，为纤维素酶的大量生产和应用重振了信心。进一步对酶生物合成调节的遗传和生化机制的了解，将有助于得到可重复应用的酶，使结晶纤维素转化为可用于

发酵工业的相当纯的葡萄糖浆。纤维素酶生物合成的调节受诱导和分解代谢物阻遏机制的控制。诱导物为纤维素及其衍生物、纤维二糖、槐糖和乳糖。葡萄糖及其它易代谢的糖类引起阻遏作用(分解代谢阻遏)。

选择性的筛选方法证明对提高木霉菌种纤维素酶的产量有效。愈来愈多的证据表明李氏木霉  $\beta$ -葡萄糖苷酶(纤维二糖酶的水平是纤维素酶转化的限速因素；增补枣曲霉 (*Aspergillus phoenicis*) 的  $\beta$ -葡萄糖苷酶可增进纤维素酶的转化作用。 $\beta$ -葡萄糖苷酶亦受终产物葡萄糖的严重抑制。在反应罐流化层中这一酶的固定化可克服这些困难。更好的办法是选育高产这一酶而减少终产物抑制的李氏木霉菌株，这方面已取得一定成效。提高纤维素酶产量的木霉菌种的选育由于这个菌无有性时期而不得限于凭经验诱变筛选。用原生质体进行体细胞杂交将为这些菌种的选育提供新的途径。

环境条件和营养物的控制亦可显著提高纤维素酶的产量。一种办法是利用嗜热的产生纤维素酶的真菌地毛梭孢壳 (*Thielevia terrestris*)，它能产生热稳定的纤维素酶(60—65℃)，并可在60—90℃培养。在较高温度下进行纤维素酶的糖化作用能加快反应。

通过固体培养、培养基中加葡萄糖以增加细胞数量、和连续培养已成功地提高了纤维素酶的产量(单位/升/小时)，生长和纤维素酶产生的条件不同。李氏木霉菌株的特性酶的产量已达90单位/升/小时。李氏木霉纤维素酶的优点为组分全和产量高，但相对比活较低。

目前利用纤维素酶在糖化罐中糖化纤维素成功的例子是在 pH4 和 45℃ 下经 5—6 天可把原来含 20—25% 纤维素的反应液转化成为含 15—20% 糖的糖浆。

## (三) 纤维素酶基因的遗传工程

大幅度提高纤维素酶产量的最好方法是

用遗传工程的新技术把纤维素酶基因进行克隆,使一个细胞中具有大量的基因,并使之有效地表达,产生过量纤维素酶。这方面的研究近年来已有很好的开端。1975年美国通用电气公司的研究和发展中心的 Chakrabarty 成功地把纤维素酶基因在大肠杆菌中克隆,使之具有分解纤维素的能力;但他考虑到如果这个菌扩散传播则会引起人类 肚胀腹泻等肠道严重疾病,因而把这个新型的菌消减了。加拿大的安大略造纸公司等单位亦在应用基因工程技术研制“超级酵母”,正在把细菌和真菌的纤维素酶基因引入酵母菌,以充分利用纸浆废液中的纤维素、半纤维素和木质素,使之转化为酒精。在酵母菌或枯草杆菌中克隆纤维素酶基因都不会有利用大肠杆菌克隆可能的有害作用。

事实上加拿大的不列颠哥伦比亚大学 Whittle 等在1982年又报道了在大肠杆菌中克隆了纤维杆菌(*Cellulomonas fimi*)的纤维素酶基因。他们以PBR 322质粒为载体,克隆 Bam I 酶切的纤维杆菌的DNA片段,用敏感和简便的免疫检测法鉴定和筛选带有纤维素酶基因的克隆。免疫检测法的原理是利用抗原和抗体的复合体可与金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的A蛋白相结合的特点。先把纤维素酶注射兔,获得含有抗体的血清。转化体的菌落经溶菌酶原位裂解后将其蛋白质用印影法转移到 CNBr 活化的滤纸上,再用纤维素酶的抗体处理,抗体结合的地方示明相应的克隆菌落带有纤维素酶基因。所得到的带有纤维素酶基因的克隆证明

都有纤维素酶活性。这是克隆纤维素酶基因的又一成功的例子。问题还在于使所得克隆产生大量的高活性的纤维素酶。提高产量的关键为基因扩增的数量,即载体在受体菌中的拷贝数,以及基因高效表达的调控结构;酶的活性则涉及纤维素酶基因本身的结构和功能。这些方面尚应深入研究。

#### (四) 结束语

综上所述,纤维素利用的生物工程是一个复杂而艰巨的重要课题,目前已有一些可喜的成就。已可看出在解决能源、饲料、食品和粮食问题中起重要作用是可以实现的。经过一定努力在5—10年内可以逐步实现这一目的。较为困难的基因克隆也一再出现了初步成功的例子。当然要生产高效的纤维素酶还须对不同来源的纤维素酶组分和活性进行比较分析和选择,使所克隆的基因能产生对特定基质有高比活的纤维素酶,同时还须利用高效启动子及改变引起阻遏作用的遗传结构,使纤维素酶基因得到高效表达。这些也是改良现有菌种的常规育种中重现的问题。基因克隆也为基因及酶的结构与功能以及调控机制的了解提供有利条件。显然,需要研究的范围是较为广泛的,包括细胞工程、发酵工程、酶工程和基因工程。应靠各方面有机结合才能更快地达到预期目的。新菌种的创造是关键,除了诱变育种外还可应用原生质体融合、DNA转化以及体外DNA重组和基因克隆等技术,办法较多,前景乐观。

#### 主要参考文献

- (1) M. C. Flickniger, «Biotechnology and Bioengineering», 1980, 22, Sup. I, 27—48
- (2) M. Mangels, «Ann. Rep. Fermentation», 1982, 15, 35—78
- (3) Chakrabarty's Work, In Science et Vie, 1977, N211, 22
- (4) D. J. Whittle et al., «Gene», 1982, 17, 139—145
- (5) D. J. Kemp, A. F. Cowman, «Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.», 1981, 78, 4520—4524

# 遗传工程与医药的发展

黄胜炎

(上海医药工业研究院)

遗传工程的科学进展,将对医疗实践的许多领域发生重大的影响,而对药物合成、抗生素发酵和药物制剂等科研和工业生产的影响尤为重要<sup>[1,2]</sup>。DNA重组技术对药品生产部门,特别是生物制品部门的生产将产生巨大的推动作用,继而这些部门生产的价廉、高效的药品又将影响医学领域——促进DNA重组技术成果应用于临床、开发新药和提高医疗水平。

## 药品生产面貌焕然一新

遗传工程是用人工方法把我们所需要的某一供体生物的遗传物质——DNA大分子提取出来,在离体条件下进行切割后,把它和作为载体的DNA分子连接起来,然后导入某一受体细胞中,以让外来的遗传物质在其中进行正常的复制和表达,从而获得大量新物种的一种崭新的技术。该技术应用于制药工业,将使药品生产面貌焕然一新。目前,一些短缺的重要药品由于新技术的引入而变得价格低廉、品种繁多和数量充裕。

DNA重组技术也常称为“基因拼接”技术,利用大肠杆菌等微生物生产按人类所设计的物质。大肠杆菌为革兰氏阴性细菌,具有良好的生物特性,DNA重组技术广泛使用其突变体来研制药品,例如生产人用胰岛素。DNA重组技术使发酵生产人用胰岛素、人体生长激素及乙型肝炎疫苗成为可能。1982年Eli Lilly公司已出售DNA重组的人用胰岛素,商品名为“Humulin”<sup>[1]</sup>。采用DNA重组技术不仅使以往难以制备的胰岛素能大量生产,而且使药品的质量也大为提高,给全世界数百万糖尿病患者带来了福音。

目前正采用DNA重组技术培育诸如放线菌类(*Actinomycetes*)的菌株<sup>[1]</sup>,以期产生抗生素药品。在研制新抗生素中,最有发展

前途的基因重组方法有<sup>[3]</sup>:

1. 原生质体融合,以选择生产新抗生素的种内重组菌株。以此方法已获得了能大量生产头孢菌素C的支顶孢属黄青霉种。

2. 根据半随机(semirandom)的自身和散弹枪式基因克隆化繁殖(self and shotgun gene cloning),以产生新抗生素的合成途径。如放线菌和真菌的基因克隆化繁殖,并采用该技术已在链霉菌属培养了抗生素的抗性基因。

3. 采用特殊和严密控制的方法,在抗生素合成途径增添的步骤或各步骤上使基因定向克隆化繁殖。

DNA重组技术的迅速发展,提供了一条制备抗生素的崭新途径<sup>[3]</sup>。该途径可顺利地将对乙酰氨基转移酶基因从青霉属转移到支顶孢属,因而产生合成时可以溶媒抽提的头孢菌素菌株,将羟基氨基丁酸酰基转移酶基因从环状芽孢杆菌能产生丁酰菌素菌株直接转移到卡那霉素链霉菌,可导致直接、有效地合成重要的半合成氨基糖苷抗生素——氨基羟丁基卡那霉素。

DNA重组技术广泛地应用链霉菌属生产了60%已知的抗生素<sup>[3]</sup>。因而,链霉菌属DNA克隆化繁殖和自身克隆化繁殖系统,有利于特种抗生素合成途径中的基因分析和研究其分化的分子机制。Katz等<sup>[3]</sup>利用一些质



粒来转化*S. lividans* 1326的原生质体,并使合成酪氨酸的基因密码获得表达。

此外, DNA重组技术提供了设计和生产抗病毒菌苗的方法。此种抗病毒菌苗可作用于微生物的细胞壁上,无当前广泛使用的减毒菌苗对人体健康的影响。不久的将来,有可能采用DNA重组技术工业生产如下药品<sup>[4]</sup>:

**药品:** 人用胰岛素(已上市)、人体生长激素(或同系物)、人体降钙素、胸腺素、促肾上腺皮质激素、生长激素释放抑制因子、内啡肽、DNA、人体耻骨松弛激素。

**生物制品:** 干扰素、疫苗(包括乙型肝炎和流感疫苗)、血清白蛋白、尿激酶、DNA、组织血纤维蛋白溶酶原。

**化验试剂:** 用于体外诊断化验(如鉴定地中海贫血、镰状细胞性贫血)。

**兽药:** 干扰素、牛(或其他动物)生长激素、疫苗(包括口蹄疫病毒、牛乳头状瘤病毒和猪细小病毒)。

DNA重组技术将改进目前药品的生产工艺,此涉及处理能生产抗生素的微生物、药物化学合成生产中增加应用发酵法生产工艺等。这一切均预示了DNA重组技术对医药的发展将产生巨大作用和影响。

## 提供有效的人用生物制品

Tarmowski<sup>[6]</sup>介绍了以DNA重组技术制备人用蛋白质类药品的方法。DNA重组技术将提供各种有效的人用蛋白质类药品,例如干扰素、尿激酶、凝血因子、抗体和各种蛋白质激素等。此类生物制品的实际有效性将导致其在医疗实践中的广泛应用。

DNA重组技术的提高和发展,使最有发展前途的生物制品之一——干扰素成为新药开发和临床研究的重点。1957年首次发现的干扰素是由细胞分泌的。将干扰素加至细

胞上,能抑制多种病毒的复制,在某些实验中还抑制了癌细胞组织的生长和某些正常细胞的迅速繁殖。1979年秋, Roche 开始采用从KG-1细胞获得的基因信息进行DNA重组试验,以培养能生产比目前通用的工艺获得产量大、疗效高和价格低的人体白细胞干扰素。后来, Roche 制备了供临床试验用于癌症患者的白细胞干扰素A<sup>[6]</sup>。美国Genentech和Hofman-La Roche生产的白细胞干扰素A和D已分别进入第Ⅱ期和第Ⅰ期临床试验,不久即将投入市场。

Hitzeman等<sup>[7]</sup>在酿酒酵母内,改造了直接合成干扰素( $\alpha_1$ -干扰素、 $\alpha_2$ -干扰素和 $\gamma$ -干扰素)的质粒。含有分泌信号密码顺序的干扰素基因的表达在于干扰素活性的隐匿程度。自酵母细胞培养基分离得到的大部分 $\alpha_1$ -干扰素和 $\alpha_2$ -干扰素,如去除与人体内的干扰素同一顺序的密码,则具有天然成熟干扰素相同的氨基酸端基。此结果说明可将象酵母等真核生物利用来加工成人体密码顺序的生物制品。

干扰素将对药物制剂生产发生重大的影响,其产品可大量用来预防和可能治疗许多病毒感染。例如,干扰素可制成气雾剂来预防诸如流感等呼吸道病毒感染。近来,干扰素的抗癌治疗作用受到了医药研究人员的注重,正在全力研究中,而且其肿瘤化疗制剂获得前所未有的重视<sup>[8]</sup>。

干扰素抗癌作用主要依据大剂量干扰素能抑制细胞生长的原理。干扰素已在以下的肿瘤治疗中取得了某些效果:骨原发性肉瘤、多发性骨髓瘤、乳房癌、肺癌、喉乳头状瘤、急性白血病、结节性淋巴组织瘤和恶性黑色素瘤<sup>[8]</sup>。

医疗保健事业和制药工业可从DNA重组技术得益的另一种类型的人体蛋白质为单克隆抗体。

用单克隆抗体作诊断工具是首批研究出来的产品之一,如Hybritech已获得食品药物管理局(FDA)批准的诊断试剂有:人体生长