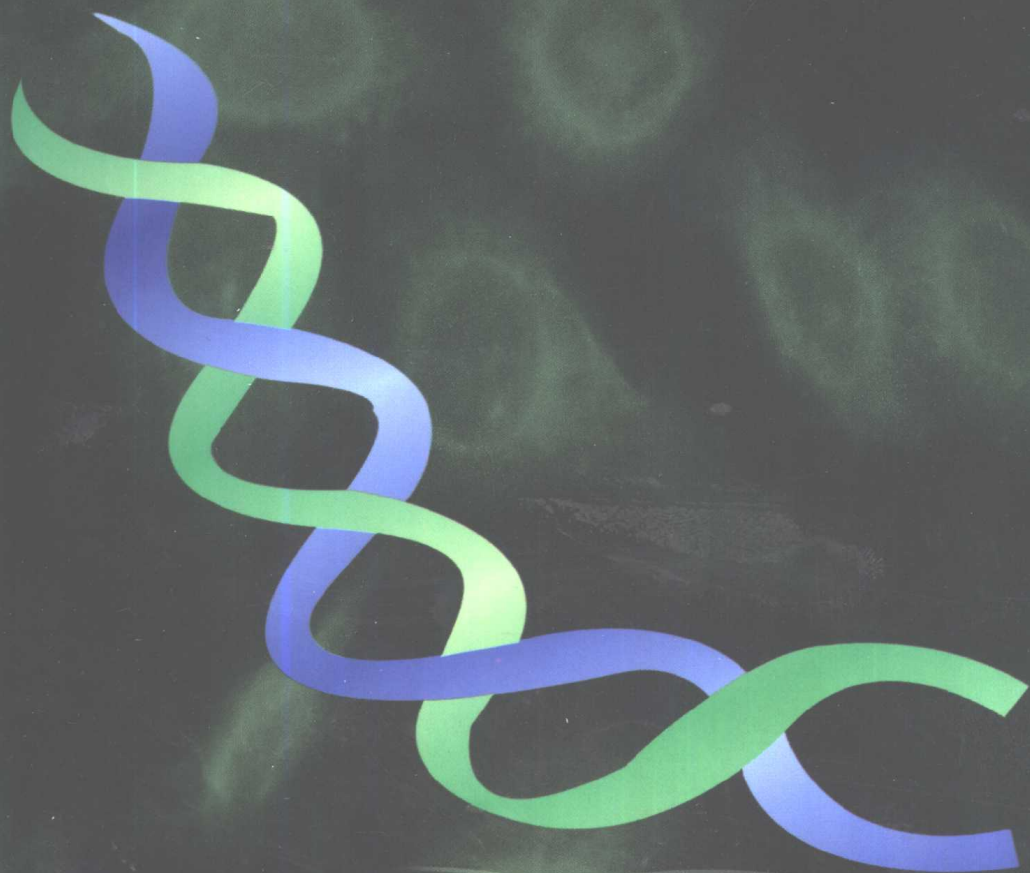


基因工程学原理

马建岗 主编



西安交通大学出版社

基因工程学原理

马建岗 主编

西安交通大学出版社

内 容 提 要

本书较为全面、系统地阐述了基因工程的基本理论和基本概念,并力求反映该学科的最新进展。全书共12章,包括绪论、生物大分子、DNA的提取与纯化、目的基因的获得、基因扩增、基因的体外重组、基因的转移与重组体的检测、克隆基因的表达、酵母菌的基因工程、植物的基因工程、哺乳动物的基因工程、医药工业的基因工程。

本书可作为生物工程专业基因工程学原理课程的教材,也可供相关学科各专业的教师、学生和科研工作者参考。

图书在版编目(CIP)数据

基因工程学原理/马建岗主编. —西安:西安交通大学出版社, 2001.11

ISBN 7-5605-1434-0

I. 基… II. 马… III. 基因—遗传工程
IV. Q78

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2001) 第 043769 号

*

西安交通大学出版社出版发行

(西安市兴庆南路 25 号 邮政编码: 710049 电话: (029) 2668315)

西安建筑科技大学印刷厂印装

各地新华书店经销

*

开本: 787 mm×1 092 mm 1/16 印张: 16.125 字数: 385 千字

2001 年 11 月第 1 版 2001 年 11 月第 1 次印刷

印数: 0 001~2 000 定价: 21.00 元

发行科电话: (029) 2668357, 2667874

前 言

20 世纪 70 年代初诞生的基因工程，开创了人类按照自己的意愿在体外操纵生命过程的新纪元。在随后的 30 年间，基因工程的基本理论已日趋完善，而以此理论为指导的基因工程操作，也出现了令人振奋的成就。为了跟踪这一研究领域的最新进展，并将有关的研究成果及时介绍给勇于接受新事物的莘莘学子们，我们为本科生和研究生开设了基因工程学原理课程，并逐渐形成和完善了本课程的教材。

本书编写的具体分工为：马建岗编写第 1 章、第 6 章～第 12 章；王健编写第 2 章；林淑萍编写第 3 章；刘莉扬编写第 4 章；刘欣洁编写第 5 章。全书由马建岗统稿。

本课程理论授课时间为 48 学时。考虑到本课程的系统性，安排了生物大分子一章。由于学生对该章的内容在生物化学课程上已有所了解，可不作课堂讲解，留作阅读内容即可。此外，由于本教材未配专门的实验指导书，故有关章节（如 DNA 的提取与纯化、基因扩增）内容叙述较为详细，课堂讲授时可有所取舍。

赵文明教授、董兆麟教授审阅了全书，为本书的修改和定稿提出了不少宝贵的意见。西安交通大学教务处和出版社的同志在本教材出版过程中给予了热情的指导、帮助与支持，在此一并表示衷心的感谢。此外，本书的部分插图引自《Recombinant DNA》、《Molecular Cloning》和《基因工程原理》，在此向原书作者 James D. Watson, Michael Gilman, Jan Witkowski, Mark Zoller; J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis 和吴乃虎表示感谢。

由于基因工程的发展异常迅速，加之编写人员时间仓促，水平有限，缺点和错误在所难免，热忱欢迎使用本书的同学和同行专家指正，以便将来进一步完善。

马建岗
2001 年 7 月于
西安交通大学

目 录

第1章 绪论

1.1 基因与基因工程	(1)
1.1.1 基因的概念	(1)
1.1.2 基因工程与生物工程的关系	(2)
1.2 基因工程的操作和应用	(3)
1.2.1 基因工程的操作流程	(3)
1.2.2 基因工程的应用	(3)
参考文献	(8)

第2章 生物大分子

2.1 蛋白质的结构	(9)
2.1.1 蛋白质的一级结构	(9)
2.1.2 蛋白质的二级结构	(10)
2.1.3 蛋白质的三级结构	(11)
2.2 核酸的结构	(12)
2.2.1 核苷酸	(12)
2.2.2 DNA 的结构	(12)
2.2.3 RNA 的结构	(14)
2.3 蛋白质和核酸的性质	(16)
2.3.1 蛋白质的性质	(16)
2.3.2 核酸的性质	(16)
2.4 大分子间的信息传导	(17)
2.4.1 DNA 的复制	(18)
2.4.2 遗传信息的转录	(18)
2.4.3 RNA 的翻译	(22)
参考文献	(25)

第3章 DNA 的提取与纯化

3.1 碱抽提法提取 DNA	(27)
3.1.1 碱抽提法所用各类试剂的生化作用	(27)

3.1.2 碱抽提法抽提 DNA 过程中应注意的问题	(29)
3.2 提取 DNA 的其他方法	(30)
3.2.1 质粒 DNA 的分离纯化	(30)
3.2.2 基因组或其他 DNA 的抽提	(40)
3.3 DNA 的定量和纯度测定	(44)
3.3.1 紫外光谱分析法	(45)
3.3.2 EB 荧光分析法	(45)
3.3.3 水平式琼脂糖凝胶电泳法检测 DNA	(46)
参考文献	(48)

第 4 章 目的基因的获得

4.1 基因文库的构建	(50)
4.2 cDNA 的合成和克隆	(52)
4.2.1 mRNA 的提取及其完整性的确定	(53)
4.2.2 cDNA 的合成与克隆	(54)
4.3 化学法合成目的基因	(57)
4.3.1 磷酸二酯法	(57)
4.3.2 亚磷酸三酯法	(58)
4.3.3 寡核苷酸连接法	(58)
参考文献	(59)

第 5 章 基因扩增

5.1 PCR 技术	(61)
5.1.1 PCR 技术的发明	(61)
5.1.2 PCR 技术的原理	(61)
5.1.3 PCR 技术的特点	(63)
5.2 聚合酶链式反应的最适条件	(64)
5.2.1 Taq DNA 聚合酶	(64)
5.2.2 引物	(68)
5.2.3 模板	(69)
5.2.4 dNTP	(70)
5.2.5 Mg^{2+} 浓度	(70)
5.2.6 PCR 系统中的其他成分	(70)
5.2.7 PCR 的热循环计划	(70)
5.3 聚合酶链反应技术的应用	(71)
5.3.1 基因组克隆	(72)
5.3.2 反向 PCR 与染色体步移	(73)
5.3.3 不对称 PCR 与 DNA 序列测定	(73)
5.3.4 RT-PCR 与 RNA 分析	(74)

5.3.5 基因的体外诱变与突变的检测	(75)
5.3.6 基因组的比较研究	(76)
参考文献	(76)

第6章 基因的体外重组

6.1 限制性核酸内切酶	(78)
6.1.1 寄主的限制和修饰现象	(78)
6.1.2 限制性核酸内切酶的类型	(79)
6.1.3 限制性核酸内切酶的命名	(84)
6.1.4 影响限制性核酸内切酶活性的因素	(85)
6.1.5 限制性核酸内切酶对 DNA 的消化作用	(86)
6.1.6 限制性核酸内切酶反应的终止	(87)
6.2 克隆载体	(88)
6.2.1 质粒载体	(88)
6.2.2 噬菌体载体	(100)
6.2.3 柯斯质粒载体	(114)
6.3 DNA 的连接	(118)
6.3.1 大肠杆菌和 T4 噬菌体的 DNA 连接酶	(118)
6.3.2 DNA 片段在体内和体外的连接	(120)
6.3.3 平齐末端的连接	(121)
6.3.4 影响连接反应的因素	(124)
参考文献	(125)

第7章 基因的转移与重组体的检测

7.1 重组体向寄主细胞的导入	(127)
7.1.1 重组体 DNA 分子的转化或转染	(127)
7.1.2 体外包装的 λ 噬菌体的转导	(129)
7.2 重组体克隆的筛选与鉴定	(130)
7.2.1 遗传检测法	(130)
7.2.2 物理检测法	(135)
7.2.3 核酸杂交筛选法	(136)
7.2.4 免疫化学检测法	(139)
7.2.5 DNA-蛋白质筛选法	(144)
7.2.6 转译筛选法	(144)
参考文献	(146)

第8章 克隆基因的表达

8.1 外源基因在原核细胞中的表达	(148)
8.1.1 原核生物基因表达的特点	(148)

8.1.2 基因表达的调控序列	(149)
8.1.3 几种类型的原核表达载体	(154)
8.1.4 提高克隆基因表达效率的途径	(156)
8.2 外源基因在真核细胞中的表达	(164)
8.2.1 真核细胞基因克隆载体	(164)
8.2.2 哺乳动物基因转移的选择标记	(171)
8.2.3 外源基因导入真核细胞的方法	(172)
参考文献	(176)

第 9 章 酵母的基因工程

9.1 酵母基因的克隆	(179)
9.1.1 利用大肠杆菌突变互补法克隆酵母生物合成基因	(179)
9.1.2 穿梭质粒在大肠杆菌和酵母中的复制	(179)
9.1.3 用简单的互补法克隆酵母基因	(181)
9.2 以酵母为材料对真核生物功能的研究	(183)
9.2.1 酵母的同源重组	(183)
9.2.2 酵母基因与高等生物基因具有相似的信号途径	(185)
9.2.3 用酵母遗传实验解答某些生化难题	(188)
9.2.4 用酵母遗传分析鉴别和研究高等生物基因	(190)
参考文献	(192)

第 10 章 植物的基因工程

10.1 再生植株	(193)
10.1.1 植物在遗传工程方面的优缺点	(193)
10.1.2 单个细胞可生长成完整植株	(194)
10.1.3 用叶盘再生植株	(195)
10.2 植物基因转移的途径	(195)
10.2.1 土壤农杆菌的 Ti 质粒引起冠瘿瘤	(195)
10.2.2 Ti 质粒的 T-DNA 部分转移至植物细胞	(196)
10.2.3 T-DNA 经过改造后作为基因载体	(197)
10.2.4 用报告基因证明转移基因在植物组织中的表达	(199)
10.2.5 病毒可用作所有植物基因转移的载体	(200)
10.2.6 用基因枪和电击法将 DNA 转移入植物细胞	(201)
10.2.7 用 DNA 包裹的粒子轰击可产生转基因细胞器	(203)
10.3 植物基因的表达	(204)
10.3.1 植物表达抗感染的病毒外壳蛋白	(204)
10.3.2 植物表达微生物毒素以阻止昆虫蚕食	(205)
10.3.3 抗除草剂植物	(207)
10.3.4 转基因花卉植物	(208)

10.3.5 利用转基因植物生产有重要价值的蛋白质	(208)
参考文献	(209)

第 11 章 哺乳动物的基因工程

11.1 将基因转移入哺乳动物细胞	(211)
11.1.1 永久性细胞系的建立使基因转移变得实际	(211)
11.1.2 基因转移首先用于对肿瘤病毒的研究	(212)
11.1.3 在哺乳动物细胞中起作用的选择性标记使得可通过共转染进行基因转移	(213)
11.1.4 外源 DNA 在转染入细胞后的瞬时表达	(216)
11.1.5 用基因扩增使蛋白质高水平表达	(217)
11.1.6 应用于特殊细胞类型的转染方法	(218)
11.1.7 用病毒载体将外源 DNA 引入细胞	(219)
11.1.8 牛痘病毒和杆状病毒用于蛋白质的高水平表达	(221)
11.1.9 逆转录病毒作为基因转移的高效载体	(222)
11.2 转基因小鼠	(224)
11.2.1 外源基因整合入受体动物的染色体	(225)
11.2.2 外源 DNA 可稳定地整合入生殖系细胞	(225)
11.2.3 胚胎干细胞可携带外源基因	(226)
11.2.4 可调节转基因的组织特异性模式	(228)
11.2.5 转基因可在特异性组织定向表达	(228)
11.2.6 转基因可用以杀死特异性细胞类型	(228)
11.2.7 用反转录病毒追踪细胞来源	(229)
11.2.8 转基因可扰乱内源性基因的功能	(229)
11.2.9 通过同源重组进行基因剔除能说明基因系统的复杂性	(230)
11.3 转基因家畜	(231)
11.3.1 重组牛生长激素促进动物泌乳和改善饲料利用率	(231)
11.3.2 转基因家畜	(231)
11.3.3 用转基因动物生产药物蛋白	(232)
11.3.4 通过转基因表达病毒外壳蛋白以保护家畜免受病毒感染	(233)
参考文献	(233)

第 12 章 医药工业的基因工程

12.1 利用基因工程技术生产胰岛素和生长激素	(236)
12.1.1 生产重组蛋白的表达系统有了很大改进	(236)
12.1.2 胰岛素是第一个获准用于人类疾病治疗的重组体药物	(237)
12.1.3 通过两种方法生产人的重组生长激素	(238)
12.2 利用基因工程技术生产疫苗和其他复杂蛋白质	(240)
12.2.1 乙型肝炎病毒疫苗的生产	(240)
12.2.2 用哺乳类培养细胞大规模生产人的复杂蛋白质	(241)

12.3 利用基因工程技术生产抗体	(243)
12.3.1 单克隆抗体	(243)
12.3.2 对识别特异性抗原的抗体直接克隆和选择	(244)
12.3.3 人源化单克隆抗体保持免疫活性但失去免疫原性	(245)
12.3.4 蛋白质工程使抗体具有特殊用途	(246)
参考文献	(247)

第 1 章 绪 论

20 世纪 70 年代初,在生命科学发展史上发生了一个伟大的事件,美国科学家 S.Cohen 第一次将两个不同的质粒加以拼接,组合成一个杂合质粒,并将其引入大肠杆菌体内表达。这种被称为基因转移或 DNA 重组的技术立即在学术界引起了很大的震动。很多科学家深刻认识到这一发现所包含的深层含义以及将会给生命科学带来的巨大变化,惊呼生命科学一个新时代的到来,并且预言 21 世纪将是生物科学的世纪。由于基因转移是将不同的生命元件按照类似于工程学的方法组装在一起,生产出人们所期待的生命物质,因此也被称为基因工程。基因工程的出现使人类跨进了按照自己的意愿创建新生物的伟大时代。虽然从它的诞生至今不足 40 年,但这一学科却获得了突飞猛进的发展。本书将着重介绍基因工程学的基本原理以及它的一些应用。

1.1 基因与基因工程

1.1.1 基因的概念

人们对基因的认识经历了长时间的发展过程,而且随着生命科学的发展,基因的概念还在不断深化。

1866 年,遗传学的始祖孟德尔(G. J. Mendel)在他的豌豆杂交实验论文中,将控制性状的遗传因素称为遗传因子,并且用大写字母代表显性性状,用小写字母表示隐性性状。虽然当时孟德尔对遗传的物质基础一无所知,但事实上他所讲的遗传因子已经形成了基因的雏形。时至今日,在遗传学的分析上我们还经常用这些字母来表示所分析的基因。

1909 年,丹麦的遗传学家 W. L. Johanssen 首次提出用“gene”来代替孟德尔的遗传因子(我国著名遗传学家谈家桢先生首先将 gene 翻译为基因),提出了基因型与表现型的区别,指出前者是一个生物的基因成分,后者是这一基因表现的性状。当时提出的基因概念仅仅是一代表遗传性状符号的改变,并未涉及遗传的物质概念。

1910 年以后,美国遗传学家以果蝇为材料进行杂交实验,第一次把代表某一个性状的特定基因与某一特定染色体上的特定位置联系起来,发现了连锁交换定律。摩尔根(T. H. Morgan)提出了遗传粒子理论,认为基因是一粒一粒在染色体上呈直线排列的,且互不重叠,就像连在线上的佛珠一样。摩尔根理论的重要性在于基因已不再是一个抽象的符号,而是与染色体紧密相关的一个实体。

20 世纪 40 年代初,物理学家和化学家把研究方向转移到对基因本质问题的探讨上。1944 年, Avery 等首次证实遗传的物质基础是 DNA,把基因位于染色体上的理论进一步推进到基因位于 DNA 上。1953 年, Watson 和 Crick 提出了 DNA 双螺旋结构模型,这时,人们接受了基因是具有一定遗传效应的 DNA 片段的概念。

1955年, Benzer 基于 T4 噬菌体的顺反互补试验, 提出了顺反子的概念。过去人们认为基因是三合一体, 即既是一个功能单位, 也是一个突变单位和一个交换单位。Benzer 通过研究证实, 一个基因内部的许多位点可以发生突变, 并且可以在这些位点之间发生交换, 说明一个基因并不是一个突变单位或一个交换单位。实际上顺反子要比突变单位或重组单位大得多。一个顺反子内部可以发生突变或重组, 即包含着许多突变子和重组子。到此为止, 已经从功能单位的意义上把顺反子和基因统一起来了, 顺反子实际上成为基因的同义词。

20 世纪 60 年代, 法国遗传学家 F. Jacob 和 J. Monod 在研究细菌基因调控中证实: 基因是可分的, 功能上是有差别的, 即既有决定合成某种蛋白质的结构基因, 又有编码阻遏或激活结构基因转录和合成蛋白质的调节基因, 还有其他无翻译产物的基因。操纵基因的发现修正了一个基因就有一条多肽, 或决定一个蛋白质功能的结构单位的说法, 同时也提出了顺反子代替基因概念的不确切性。

20 世纪 70 年代以后, 人们陆续发现了断裂基因、重叠基因、跳跃基因, 使对基因的认识更进一步深化。

科学家在比较 DNA 序列与相应的 mRNA 序列以后发现: 一个基因往往由几个互不相邻的段落组成; 它的内部还包含一段或几段最终不相应出现在成熟 mRNA 中的片段的基因, 这些不相应出现在成熟 mRNA 中的片段称为内含子, 而相应出现在成熟 mRNA 中的片段则称为外显子; 有时一个基因可被几百个至几千个碱基所间隔, 经过转录加工后在成熟的 mRNA 中被除去。在珠蛋白基因、卵清蛋白基因、rDNA、tRNA 等的基因中均发现这种间隔的片段。

1977 年, F. Sanger 在测定噬菌体 Φ X174 全部核苷酸序列时发现 D 基因中包含着基因 E。基因 E 的第一个密码子从基因 D 的中央一个密码子 TAT 的中间开始, 因此, 两个部分重叠的基因所编码的两个蛋白质大小不等, 氨基酸的组成也不同。

可移动遗传因子(mobile genetic element)的发现动摇了基因是带有一定遗传信息的稳定结构的概念, 使人们认识到也有跳跃的遗传因子。

综上所述, 我们对基因的认识可以肯定以下几点: 基因是实体, 它的物质基础是 DNA(或 RNA)。基因是具有一定遗传效应的 DNA 分子中的特定核苷酸序列。基因是遗传信息传递和性状分化发育的依据。基因是可分的。根据基因的产物可将其分为编码蛋白质的基因(包括编码酶和结构蛋白的结构基因以及编码作用于结构基因的阻遏蛋白或激活蛋白的调节基因), 无翻译产物的基因(如转录成为 RNA 以后不再翻译成为蛋白质的转运核糖核酸 tRNA 基因和核糖体核酸 rRNA 基因)以及不转录的 DNA 区段(如启动区、操纵基因等)。概括说来, 基因是一个含有特定遗传信息的核苷酸序列, 它是遗传物质的最小功能单位。

1.1.2 基因工程与生物工程的关系

生物工程亦称生物技术, 是 20 世纪 70 年代初在分子生物学、细胞生物学和遗传学基础上发展起来的一个新兴领域。它主要包括以下 5 个方面。

(1) 基因工程 对不同生物的遗传物质——基因, 在体外进行剪切、组合和拼接, 使遗传物质重新组合, 然后通过载体(质粒、噬菌体或病毒等)转入微生物、植物或动物细胞内, 进行无性繁殖, 并使所需要的基因在细胞中表达, 产生出人类所需要的产物或建成新的生物类型。

(2) 细胞工程 包括细胞融合、细胞大规模培养以及植物组织培养快速繁殖技术。细胞融合技术是指将两种不同种类的细胞, 通过化学、生物学或物理学手段使之融合在一起, 从而产

生出兼备两个亲本的遗传特性的新的细胞。细胞大规模培养技术是以工业化生产为目的,摆脱气候、产地、季节的限制,从大量培养的细胞中获得药物或其他有用物质。植物组织培养快速繁殖技术是利用植物细胞的全能性由扩增的细胞分化再生成植株,这样就有可能用细胞器官和组织的再生苗来代替种子实生苗,无限地扩大繁殖系数。

(3)酶工程 包括酶的生产应用、酶和细胞的固定化以及酶的分子修饰技术。酶是生物体内产生的具有催化作用的蛋白质。其催化效率超出化学催化千百倍,而且是在常温、常压下进行,专一地催化某一反应。所谓酶工程,就是在一定的生物反应器中,利用酶的催化作用将相应的原料转化成有用物质的技术。

(4)微生物发酵工程 包括菌种选育、菌体生产利用、代谢产品的生产利用以及微生物机能的利用技术。微生物发酵工程是利用微生物的特定性状,通过现代化工程技术,生产有用物质或直接应用于工业生产的一种技术体系。

(5)生化工程 包括生物反应器设计制造、传感器的研制以及产物的分离提取和精制技术。

以上5个方面的工程技术系统是相互依赖、相辅相成的,但在这些技术系统中,基因工程占主导地位。因为,只有用基因工程改造过的微生物和细胞,才能真正按照人们的意愿进行工程设计,产生出特定的生物工程产品。而微生物发酵工程又常常是基因工程的基础和必备条件。生化工程是其他生物工程技术转化为生产力时所必不可少的重要环节。正是由这5个工程技术系统,共同组成了现代生物工程学。从图1-1我们可以更清楚地理解它们之间的关系。

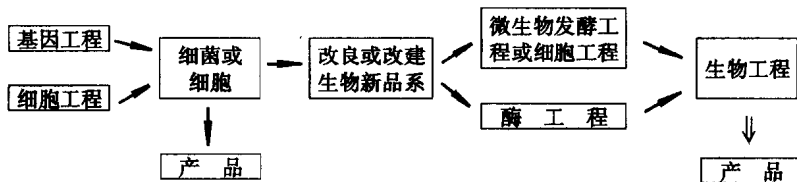


图 1-1 基因工程与生物工程的关系

1.2 基因工程的操作和应用

1.2.1 基因工程的操作流程

一个完整的基因工程流程一般包括目的基因的获得、载体的制备、重组体的制备、基因的转移、基因的表达、基因工程产品的分离提纯等过程。

传统的基因工程操作是将真核生物细胞的基因在原核生物细胞内表达。这一过程包括真核细胞基因的分离、目的基因与载体分子在细胞外的重组、重组体分子转化原核细胞等环节(图1-2)。

1.2.2 基因工程的应用

尽管基因工程出现后的一段时间内带给人们的是猜疑和恐惧,但它还是以迅猛的速度发展。实践表明,基因工程会给人类带来难以估量的经济效益和社会效益。特别是对人类所面

临的能源、粮食、人口、环境和疾病等日趋严重的社会问题,基因工程正在并且将要发挥越来越大的作用。

1.2.2.1 基因工程与农业

基因工程在农业中的应用主要包括提高植物光合作用效率、扩展植物的固氮能力、生产转基因植物和转基因动物等。

(1)光合作用 光合作用是指绿色植物将大气中的二氧化碳转化为碳水化合物,并向周围环境释放氧气的过程。这一过程是在叶绿体中进行的,叶绿体是绿色植物特有的细胞器,其功能与生存是受核基因组控制的。

绿色植物光合作用的产物约占植物干重的95%以上,它是地球上一切动物(包括大多数微生物)的生命源泉,同时也是人类社会的主要物质和能量的来源。然而,地球上的植物利用太阳能的效率相当低。据统计,农作物的产量还不到转变为生物量的太阳能的5%。因此,提高光合作用效率具有重要意义。应用基因工程技术,已经克隆了许多种参与光合作用的基因并分析了光对基因表达的调节作用。目前的工作主要有

如下两个方面:一是深入研究在 CO_2 的固定反应中起关键作用的二磷酸核酮糖羧化酶(RuBisCo),以便提高其与 CO_2 的亲合力,以及取消或减少光呼吸的竞争反应。实验表明,通过交换 RuBisCo 亚基的基因,将不同来源的基因导入同一种植物,形成具有异源亚基的 RuBisCo 基因;或是采用定点突变技术,改变 RuBisCo 的活性,增加其同 CO_2 的亲合力;甚至用更为有效的突变基因,取代正常的 RuBisCo 基因等办法,将有可能提高植物对 CO_2 的固定效率。二是提高光能吸收及转化效率。实验表明,通过在不同植物之间交换光系统的组合,或是利用体外定点突变技术改变光系统的组分并实现优化组合,便有可能使其转能效率达到最佳的水平,从而提高光合作用的效率。

(2)固氮作用 固氮作用通常是指豆科植物(如蚕豆、豌豆和三叶草等)将空气中的氮(N_2)转变为氨(NH_3)的过程。它是通过与其共生的根瘤菌属(*Rhizobium*)细菌实现的。

大多数植物都需要大量的可溶性氮才能很好生长。虽然地球上每年由微生物固定的 N_2 的总量约 200 Mt 左右,但只有豆科植物能与根瘤菌共生固氮。如果禾谷类作物及其他非豆科植物都能够具有天然固氮的能力,或转变为根瘤菌的宿主,那么,在农业生产上将节省大量的化肥,具有重大意义。要使普通的非固氮植物的细胞从遗传上转变为具有固氮功能的特殊细胞,必须具备如下 5 个条件:①根瘤菌的全部 nif 基因都能在同一植物细胞中适当地表达;②固氮酶复合体能正确地加工和组装;③具有一个厌氧的环境;④提供足够的 ATP;⑤提供 NADPH。这是一项十分复杂而艰巨的工作。总的来说,目前主要有如下两种方法:一种是用带有 nif 基因的质粒转化植物细胞的叶绿体,从而有可能使用正常的原核信号进行表达,而不

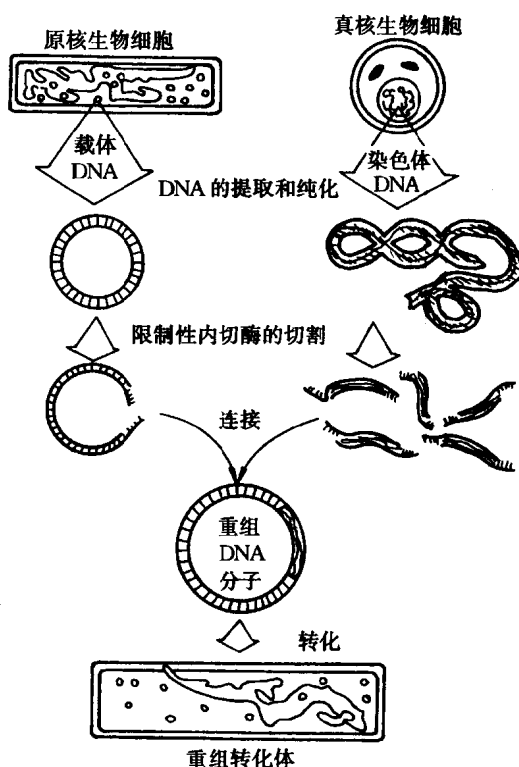


图 1-2 典型的重组 DNA 实验

必将 17 个 *nif* 基因都置于植物细胞核基因组启动子的控制之下;另一种是把豆科植物的固氮基因转移到其他植物中,使其对固氮菌的感染产生相应的反应。到目前为止,已有许多植物的根瘤蛋白基因(*nodulin gene*)被克隆出来,而且还建立了一种三叶草(*Lotus corniculatus*)的根瘤形成模型。

(3)转基因植物 转基因植物是指将克隆到的一些编码特殊性状的基因,通过生物、物理和化学等方法,导入到受体植物细胞,然后进行组织培养而培育出再生植株。它是农业生物技术的主要内容,为农业育种提供了一条十分有用的途径。人们可以在一定范围内根据自己的意愿来改造植物的一些性状,从而获得高产、稳定、优质和抗逆性强的品种。自从 20 世纪 80 年代初首次从细菌中分离到一些分解抗生素的基因,并转移到植物细胞中获得第一株能在抗生素培养基上生长的植株以来,已有近百种转基因植物相继问世,这些植物有烟草、番茄、马铃薯、矮牵牛、胡萝卜、向日葵、油菜、苜蓿、亚麻、甜菜、棉花、芹菜、荷花、黄瓜、拟南芥、大白菜、大豆、水稻、玉米、莴苣、红豆以及稗麦等等。

应用转基因植物技术,不但可以培育出抗病毒、抗真菌、抗虫害、抗逆性、抗辐射或抗除草剂的植物,而且可以获得雄性不育植株或增加种子的营养价值,此外,还可以应用转基因植物技术使植物果实变硬便于储运,或改变花卉的颜色提高观赏价值,以及在转基因植物中生产一些医药上应用的多肽。

(4)转基因动物 转基因动物是指用实验方法导入的外源基因在染色体基因组内稳定整合并能遗传给后代的一类动物。自从 20 世纪 80 年代初美国首次将大鼠生长激素基因导入小鼠受精卵的雄原核中,获得了个体比对照组大一倍的转基因“超级鼠”后,转基因昆虫、猪、鱼、兔、羊和牛等相继问世,不但为动物基因工程育种提供了新的途径,而且可以作为生物反应器生产各种有用的蛋白质,特别是医用活性肽。此外,还可以通过转基因技术培育抗病的转基因家畜,使其免遭传染病的危害。

(5)产生次生代谢产物 植物提供了全世界 25% 的药物资源,并产生出化学物质(如生物碱等)及生化物质(如各种必需氨基酸等)。应用基因工程技术,结合植物组织培养方法有可能对其编码的药物基因进行改造,以提高有效成分的合成效率并确保其生物活性,甚至可以生产出崭新性质的植物生化药物。

1.2.2.2 基因工程与工业

基因工程在工业中的应用主要包括纤维素的开发利用、酿酒工业、食品工业、制药工业和新型蛋白质的生产等方面。

(1)纤维素的开发利用 纤维素是植物的主要组成部分。据估计,全世界的纤维素资源总量约为 7×10^{11} t,而每年经绿色植物光合作用合成的纤维素又可高达 4×10^{10} t,因此,纤维素被认为是地球上数量最丰富的有机物质。从化学分子结构上看,纤维素是一种无水葡萄糖的线性多体分子,其重复单位叫纤维二糖。纤维素完全降解后的产物葡萄糖是食品、燃料和化学原料的重要来源。

由于纤维素通常是以不溶性的纤维成晶状排列形式存在的,再加上纤维素分子与其他多糖(如半纤维素和果胶等)结合在一起,而其外又包裹上木质素,致使消化酶分子难以接近,因此,纤维素是很难降解的。植物材料中纤维素的天然降解主要是由丝状真菌发酵引起的。现在已从细菌和丝状真菌中克隆出了各种纤维素分解酶的基因。如果通过基因工程方法,把这些基因导入酿酒酵母(*S. cerevisiae*),并使酿酒酵母具备分泌纤维素酶的能力,那么就有可能

将纤维素降解成葡萄糖,再发酵成酒精,从而实现酒精生产流程一步化的新工艺。

(2)酿酒工业 酿酒酵母不仅是一种在酿酒工业中广泛使用的发酵微生物,而且是一种很有用的基因操作菌株之一。如果把面包酵母(*S. diastaticus*)基因组中编码淀粉 α -1,4-葡萄糖苷酶的 DEX 基因引入到酿酒酵母细胞,产生出一种新的酵母菌株,就可以克服酿酒酵母不能发酵糊精(含 22%的碳水化合物)的缺点,生产出碳水化合物含量低、味道好的优质啤酒。如果把能够降解具有极高相对分子质量的分枝糊精(branched dextrins)的淀粉酶基因导入酿酒酵母,则可进一步改良啤酒的质量。还有,如果把木瓜蛋白酶基因引入酿酒酵母,则可保持啤酒的清晰度。此外,还可以应用体外突变技术主动改变这些酶的特性,使其稳定性增加。总之,在酿酒工业中,基因工程技术是大有可为的。

(3)食品工业 在食品工业中,干酪的生产离不开凝乳酶对乳蛋白-酪蛋白的切割。凝乳酶是从哺乳小牛的第四个胃中提取的,很不经济。现在已经将小牛的凝乳酶基因克隆出来,并在酿酒酵母中实现了表达,生产出高产量的、具有全部天然活性的凝乳酶,它能够使牛奶凝固。

干酪生产过程中的废物乳清含有 4%~5%的乳糖、少量蛋白质、大量矿物质和维生素。其中的乳糖若被降解成葡萄糖和半乳糖,便能被酿酒酵母发酵,生产出酒精和单细胞蛋白质。现已把克鲁维酵母乳酸菌(*Kluyveromyces lactis*)的 β -半乳糖苷酶基因和乳糖透性酶基因转移到酿酒酵母中,虽然仍需改进表达这两种酶的方法,但经过遗传变异后的酵母最终能够用乳清做底物生产出燃料酒精、饮用酒精和生物饮料,从而达到底物综合利用的目的。

此外,近年来也开始利用基因工程技术提高酿酒过程废弃酵母的经济价值。其办法是将带有高度调节性能启动子的表达载体导入酿酒酵母,使其在发酵过程中关闭,而当废弃酵母重新悬浮在诱导培养基时启动起来,从而生产出需求量很大的蛋白质,例如凝乳酶和血清蛋白等。

(4)制药工业 传统的制药工业,要么依靠化学合成,要么从自然界中筛选药物产生菌,然后通过发酵分离提取获得,这两者都费时费力。应用基因工程技术,不但可以提高药物的产量,而且可以创造药物新品种。目前已商品化生产的基因工程药物有各种抗生素和多肽药物,多达百种以上。我国已能自行生产基因工程干扰素、红细胞生成素(EPO)、白介素和心钠素等。

(5)新型蛋白质的生产 利用基因工程技术,不仅能生产真核基因编码的蛋白质,而且还能够生产出新型的蛋白质。其最简单的途径是,利用定点突变技术重新设计酶分子的结构,以增加酶的稳定性,改变酶作用底物的稳定性,以及把有关联的酶构成一种多酶复合物,这对酶制剂工业生产显然具有相当重要的意义。

1.2.2.3 基因工程与环境保护

基因工程在环境监测与净化领域的研究与应用中已经发挥了重大作用,预示着十分光明的前景。

(1)环境监测 已有报道,可应用基因探针检测出水中,特别是饮用水中的病毒。使用一个特定的核酸片段(DNA 或 RNA)作为探针,使之同被检测的病毒 DNA 互补的碱基结合,从而把病毒检测出来。这种方法的特点是快速灵敏。传统的方法检测一次需耗时数天或几周,准确性也差;而用探针只需不到一天,且能在 1 000 升水中检测出 10 个病毒来。现在已有用于检测 10 种病毒的不同探针。使探针同从环境中分离出来的细菌 DNA 杂交,从而确定某种有危害性细菌的存在。有人应用 DNA 探针在 400 个不同地方检测沙门氏杆菌获得成功,说

明在鉴定带菌者及预防流行病方面可应用基因跟踪法。

(2)环境污染净化 有报道称,把4种不同假单胞杆菌的质粒重组成一个“超级质粒”,由OCT(降解辛烷、己烷、癸烷)、XYL(降解二甲苯和甲苯)、CAM(分解樟脑)和NAH(降解萘)构建成一个质粒并送入细菌,获得了“超级菌”。这种“超级菌”能在原油中迅速繁殖,因为它代谢碳氮化合物的活性比任何一种含单个质粒的细菌都强大得多。这种“超级菌”能够在浮游过程中除去污染了水面的石油,几小时就可以降解 $2/3$ 的烃类物质,而天然菌则需耗时一年以上才能达到同样的效果。把嗜油酸单胞杆菌的耐汞基因转移入腐臭假单胞杆菌中,该菌能把剧毒的汞化合物吸收到细胞内,还原成金属汞,然后可通过气化的方法从菌体中回收金属汞,此法可用于净化汞污染。有报道称,用以下方法消除镉污染:把原在中国仓鼠中的屏蔽基因(即可将重金属离子排去的基因)植入一种十字花科植物——芜菁的体内,此种植物便可将土壤中的镉留在植物根部,阻止它到达植物的茎、叶、果实部位。这对保护人、畜的健康很有好处。关于净化农药DDT残留问题,可从抗DDT的害虫中分离出抗DDT基因,然后将此基因转移入细菌体内,将这种“超级菌”投入到土壤中可把农田中残留的DDT降解掉。

关于分解四氯联苯乙烷(TGE,它可引起癌症和肝病),一种假单胞菌(*Pseudomonas cetacia*)能产生一种酶,可使TGE分解成单盐离子和二氧化碳。另外,科学家还培育出可作为降解氯化物溶剂、表面活性剂、硫化物和多氯联苯的新菌种。已发现一种细菌的突变株能够“吃”矿山产生的含氰废物。还开发出一种磷的浓缩(phostrip)技术,即利用微生物浓缩磷,可清除废水中99.3%的磷。已分离出一种微生物能清除地下储罐溢出的原油。在加入营养物和空气后,在6个月内该微生物能把溢油分解成二氧化碳和水。生物降解法比污染土壤的填埋法可节省75%的费用。运用基因工程的方法已构建了能分解煤炭中硫成分的微生物和能降解四氯联苯乙烷的微生物。

还有一些科学家通过基因重组构建新的生物杀虫剂以取代化学农药。现在已有多种生物杀虫剂进入了大田试验。

1.2.2.4 基因工程与医学

基因工程在医学中的应用极其广泛,除上述利用转基因植物生产生化药物和基因工程多肽药物外,还可以利用基因工程技术生产疫苗并进行诊断和治疗疾病等。

(1)基因工程疫苗的研制与生产 以基因工程疫苗为主体的新型疫苗的研制是现代生物技术热点之一,其主要对象是:①不能或难以培养的病原体,如乙肝(HBV)、丙肝(HCV)、戊肝(HEV)、EB病毒(EBV)、巨细胞病毒(CMV)、人乳头瘤病毒(HPV)、麻风杆菌、疟原虫和血吸虫等。②有潜在致癌性或免疫病理作用的病原体,前者如I型嗜人T淋巴细胞病毒(HTLV-I)、人免疫缺陷病毒(HIV)、单疱疹病毒(HSV),后者如呼吸道合胞病毒(RSV)、登革热病毒(DGV),可能还有肾综合征出血热病毒(HFRSV)。③常规疫苗效果差,如霍乱和痢疾;或反应大,如百日咳和伤寒等疫苗。④可大大节约成本、简化免疫程序的多价疫苗,如以痘苗病毒、腺病毒、卡介苗或沙门氏菌属为载体的多价活疫苗。此外,利用基因工程技术还可能为目前尚无有效疫苗的某些疾病(例如艾滋病)生产出有效的疫苗。目前已商品化生产的基因工程疫苗共达数十种。基因工程疫苗研制的新进展是双特异性抗体和多价卡介苗(BCG)。

(2)基因诊断 基因诊断是指在基因水平上对疾病的诊断。其主要特点是:特异性强、灵敏度高、简便和快速。应用DNA探针技术,可以对遗传病、传染病(包括艾滋病)、心血管疾病、癌症和职业病等进行基因诊断。此外,目前还发展出DNA指纹图分析法和限制性片段长