

863

生物高技术丛书

基因表达技术

李育阳 主编



科学出版社

“863” 生物高技术丛书

基因表达技术

李育阳 主编

科学出版社

2001

内 容 简 介

本书是“863”生物高技术丛书中的一本。全书共分13章,系统地介绍了当前基因工程技术中采用的各类基因表达系统、表达元件以及与基因表达相关的发酵技术及序列数据分析技术。其中包括作者对这些领域最新进展的介绍以及这些领域今后发展方向的看法。

读者对象:从事基因工程研究的科研人员,高等院校有关专业师生及生物技术科研工作管理人员。

图书在版编目(CIP)数据

基因表达技术/李育阳主编. —北京:科学出版社, 2001.2

(“863”生物高技术丛书)

ISBN 7-03-008612-0

I. 基… II. 李… III. 基因表达 IV. Q753

中国版本图书馆CIP数据核字(2000)第63409号

科学出版社 出版

北京东黄城根北街16号
邮政编码:100717

新蕾印刷厂 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2001年2月第 一 版 开本: 787 × 1092 1/16
2001年2月第一次印刷 印张: 18 1/2
印数: 1—3 000 字数: 411 000

定价: 38.00 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换〈北燕〉)

“863”生物高技术丛书编辑委员会

丛书主编：

侯云德 强伯勤 沈倍奋

丛书编委会(按汉语拼音排序)：

陈永福	陈章良	陈 竺	丁 勇	顾健人	侯云德
黄大昉	贾士荣	李育阳	刘 谦	卢兴桂	马大龙
强伯勤	沈倍奋	唐纪良	许智宏	杨胜利	赵国屏

《基因表达技术》编著者名单

主 编:

李育阳 (复旦大学遗传学研究所, 上海 200433)

编著者:

龚 毅 (中国科学院上海生物工程研究中心, 上海 200233)

汤懋竑 (中国科学院遗传研究所, 北京 100101)

汤岗松 (百胜斯基因工程公司, 北京 102209)

王以光 (中国医学科学院医药生物技术研究所, 北京 100050)

吴淑华 (中国预防医学科学院病毒学研究所, 北京 100052)

李育阳 (复旦大学遗传学研究所, 上海 200433)

霍克克 (复旦大学遗传学研究所, 上海 200433)

朱春宝 (上海医药工业研究院, 上海 200040)

朱宝泉 (上海医药工业研究院, 上海 200040)

吴祥甫 (中国科学院上海生物化学研究所, 上海 200031)

张志芳 (农业部家蚕生物技术重点开放实验室, 江苏, 镇江
212018)

钱 锋 (中国军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100071)

肖成祖 (中国军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100071)

陈永福 (中国农业大学, 北京 100094)

许政暄 (中国科学院上海植物生理研究所, 上海 200032)

谈 峥 (中国科学院上海植物生理研究所, 上海 200032)

庄磊隽 (中国科学院上海植物生理研究所, 上海 200032)

何 龙 (第二军医大学免疫学教研室, 上海 200433)

曹雪涛 (第二军医大学免疫学教研室, 上海 200433)

叶 勤 (华东理工大学, 上海 200237)

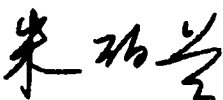
吴加金 (中国军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850)

丛书序 I

生物技术是 20 世纪末期,在现代分子生物学等生命科学的基础上发展起来的一个新兴独立的技术领域,已被广泛应用于医疗保健、农业生产、食品生产、生物加工、资源开发利用、环境保护,对农牧业、制药业及其相关产业的发展有着深刻的影响,成为全球发展最快的高技术之一。在近 20 余年的时间里,各种生物新技术不断涌现。70 年代创建了重组 DNA 技术和杂交瘤技术之后,动植物转基因技术、细胞大规模培养技术,以及近几年的基因组学、蛋白组学、生物信息学、组合化学、生物芯片技术和自动化药物筛选技术等相继发展起来。可以说,生物技术的范围在不断地扩展,进入了蓬勃发展的新阶段。

我国的生物技术在“国家高技术研究与发展(863)计划”的支持下,经过 15 年全国生物技术科技人员的努力拼搏,在农业生物技术和医药生物技术的研究和开发方面都取得了很大的进展。一方面,我们在研究上取得了一批国际影响的创新成果,并获得一批拥有了自己知识产权的专利;另一方面,在开发上已有一批生物技术产品进入市场,还有相当一批产品正在研究开发中;海洋生物技术和环境生物技术也已起步。目前,生物技术研究产业化已引起了全社会的关注,并将成为我国 21 世纪的一个新兴支柱产业。

在辞别 20 世纪,迈入 21 世纪之际,“863”计划生物领域专家委员会回顾我国生物技术的发展历程,展望生物技术发展前景,编写了“‘863’生物高技术丛书”。借此机会,我希望所有从事生物技术研究 and 开发的科技人员,要进一步团结拼搏,增强创新意识,注重成果转化,为我国生物技术不断发展壮大做出新的贡献!

科学技术部 部长 

2000 年 7 月 15 日

丛书序 II

生物技术是 20 世纪末人类科技史中最令人瞩目的高新技术,为人类解决疾病防治、人口膨胀、食物短缺、能源匮乏、环境污染等一系列问题带来了希望。国际上科学家和企业家公认,信息技术和生物技术是 21 世纪关系到国家命运的关键技术和作为创新产业的经济发展增长点。

生物技术是指有机体的操作技术。它从史前时代起就一直为人类所开发利用,造福于人类。在我国的悠久历史中,传统的生物技术在经济的发展中一直起重要作用,特别是农业。据传,在石器时代的早期,神农氏曾传授人民如何种植谷物,并实行轮作制度;在石器时代的后期,我国早就善于酒精发酵;在公元前 221 年的周代后期,我国就能做豆腐并酿制酱油和醋,其所用的基本技术沿用至今。公元前 200 年,在我国最早的诗集——《诗经》中就提到过采用厌氧菌进行亚麻浸渍处理。早在 16 世纪,我国的医生就知道,被疯狗咬可以传播狂犬病。公元 10 世纪,就有了预防天花的活疫苗,到了明朝(1368~1644),这种疫苗就广泛用于大量人群接种,此后,这种疫苗接种技术通过有名的丝绸之路传入欧洲国家。

1953 年 Watson 和 Crick 提出了脱氧核糖核酸(DNA)的双螺旋结构模型,阐明了它是遗传信息的携带者,从而开辟了现代分子生物学的新纪元。DNA 分子是所有生命机体发育和繁殖的蓝本。众所周知,一切生命活动主要是蛋白质的功能,而蛋白质是由基因编码的。60 年代初就破译了“遗传密码”。生命现象千姿百态,但生命体的本质却有高度的一致性。它们的蛋白质都是由 20 种氨基酸以肽链连接而成,核酸都由 4 种核苷酸以磷酸链构成,其遗传密码在整个生物界也基本一致。于 70 年代,科学家们发展了一种新技术,也就是众所周知的 DNA 重组技术。它向人们提供了一种手段,人们可以在试管内,根据人们的意愿来操作基因、改造基因,新的基因信息可以转入一种简单的生命体中,如大肠杆菌,或转入另一种机体,借以提供一种手段来改造谷物和家畜品种,或生产有效药物,制作疫苗和一系列自然蛋白质,或进行基因治疗。显然,新生物技术是一场革命,是生产力的一次解放,被认为是 20 世纪人类的一项最伟大贡献,它必将深刻地促进世界经济的发展。

广义的新生物技术包括基因工程、细胞工程、发酵工程和酶工程,但新技术的核心是基因工程技术,它能带动其他生物技术的发展,最具有革命性。

近 20 年来,国际上生物技术飞跃发展,特别是基因操作技术、生物治疗技术、转基因动植物技术、人类和其他生命体基因组工程、基因治疗技术、蛋白质工程技术、生物信息技术、生物芯片技术等。生物技术的创新正在带动着生物技术巨大产业的发展,它包括基因药物、重组疫苗、生物芯片、生物反应器、基因工程抗体、基因治疗与细胞治疗、组织工程、转基因农作物、兽用生物制品、生物技术饲料、胚胎移植工程、基因工程微生物农药、环保、海洋生物技术,以及现代生物技术对发酵、制药、轻工食品等传统产业的改造等领域。

目前,生物技术产业与信息产业相比较还处于发展初期,至 1998 年全世界共有生物技术公司 3600 余家,主要集中在美国和欧洲,其中年产值超过 10 亿美元的有约 20 家。

生物技术产业在 20 年中市场总值增加了 50 多倍;涨幅最快是在近 10 年,例如美国在 1980 年生物技术产品的销售额还处于零增长,1991 年达到 59 亿美元,1996 年为 101 亿美元,1998 年增至 147 亿美元;目前,生物技术仍保持 25% 左右的增长速度,20% 左右的融资率和 12.5% 就业增长率以及 8.76% 平均股市涨幅。另一方面,也要看到,美国的 1300 余家生物技术公司中上市公司为 300 家,而赢利的公司约为 20 家,这是由于生物技术产品的研究和开发周期较长,因此从整体看生物技术产业还处在投入阶段。从另一方面来看,尽管美国公司的赢利公司不多,但赢利公司的数量却在稳步上升。

1999 年全球生物技术产品的总销售额约为 500 亿美元,而产生的间接经济效益超过 3000 亿美元,全球有一半以上的人直接享用过生物技术产品。其主要产品为医药产品、农产品和食品。

我国自 1986 年实施“863”计划以来的 15 年中,现代生物技术的开发研究与产业化进入飞速发展阶段:二系法杂交稻的开发与推广对我国的粮食增产起了重要作用,2000 年已推广 5000 万亩以上。1993 年我国第一例转基因作物抗病毒烟草进入了大田试验。1997 年第一例转基因耐贮存番茄获准进行商品化生产,至 1999 年 5 月共有 6 种转基因作物其产品投放市场。2000 年我国转基因抗虫棉花种植面积超过 550 万亩。1990 年我国研制了第一例转基因家畜,1991 年山羊克隆获得成功,生物技术饲料添加剂已经实现了规模化生产。我国自 1989 年第一种基因药物——重组 $\alpha 1b$ 干扰素获准投放市场以来,至 1999 年我国已有 18 种基因药物和疫苗获准进行商业化生产,另有 26 种基因药物处于临床前或临床 I、II 期试验,我国生物技术医药产业已初具规模。我国已列为人类基因组计划国际大协作的成员国,承担完成 1% 的任务,美、英、日、法、德、中科学家于 2000 年 6 月 26 日宣布人类基因组全部 DNA 序列的工作框架图已经完成。我国在国际上首先发现神经性耳聋的基因,基因治疗已有 4 个项目进入临床试验阶段;生物芯片技术的开发研究与产业化正在与国际上同步发展。15 年来我国在生物技术领域中取得的成就是举世瞩目的,同时还培养了一大批中青年科技人才,为下世纪初 S-863 计划的实施和生物高技术产业化奠定了扎实的基础,也将为下世纪初我国的经济建设做出应有的贡献。

本丛书是在科学技术部中国生物工程开发中心、“863”计划生物技术领域专家委员会的领导下,由在第一线从事“863”生物高技术研究开发的科技人员撰写的系列丛书。本丛书包括了农、医生物技术的各个方面,不仅基本上概括了近 10 年来国际上的研究进展和发展趋势,而且还全面反映了我国“863”计划实施 15 年来在生物技术领域取得的进展和成果。本丛书的出版无疑将进一步推动我国生物技术开发研究和产业化的进程,促进我国经济的持续发展。同时,本丛书也是培养新一代青年生物技术科学家的重要教科书。



2000 年 1 月 16 日

前 言

在遗传学、分子生物学、生物化学、微生物学等学科发展的基础上,70年代初形成了基因工程技术(又被称为重组DNA技术)。这项技术为任何一种生物接受另一种生物的遗传物质并在其细胞内表达功能和稳定遗传提供了可能性,也为我们在试管内直接操作遗传物质改变基因功能、调节基因表达方式创造了条件。经过近30年的发展,基因工程技术已被广泛应用于生命科学各个学科的基础研究,成为微观生物学,甚至宏观生物学有力的研究手段。这项技术也在农业、医药、食品、化工和环保等领域结出了丰硕的应用成果。在基因工程技术的基础上已出现了蛋白质工程、基因治疗、DNA药物和新一代的代谢工程等多个生物技术生长点。基因工程技术展现了越来越广阔的应用前景。

基因工程技术的核心是基因表达技术。至今,人们已建立了许多基因表达系统,既有原核生物基因表达系统,也有真核生物基因表达系统。不同的表达系统各有特点,有它们的优势,也有它们的不足。另外,由于人们对不同系统的研究深度很不一样,因此,它们的成熟程度和应用范围也很不一样。“863”计划十分重视基因表达技术的研究,在这世纪之交的时刻,回顾这项技术的发展历程,了解其现状,从而明确进一步研究的方向应该是十分必要的。

本书主要通过介绍不同的基因表达系统来介绍基因表达技术。介绍的原核生物基因表达系统有:大肠杆菌表达系统(第一章),芽胞杆菌表达系统(第二章)和链霉菌表达系统(第三章)。原核生物的转录增强子的发现不仅说明原核生物也有类似真核生物的转录调控机制,也为我们提高外源基因在大肠杆菌中的表达提供了新措施(第四章)。介绍的真核生物基因表达系统有:酵母表达系统(第五章),丝状真菌表达系统(第六章),昆虫表达系统(第七章),哺乳动物细胞表达系统(第八章),转基因动物和基因表达(第九章)和植物生物反应器(第十章)。基因治疗是在基因工程技术基础上发展起来的新的生物技术,但是在某种程度上,我们也可以把基因治疗看成是一种基因表达系统,只是在基因治疗中外源基因导入的宿主是人类细胞。只有当外源基因在人类细胞中得到表达,才能发挥其对疾病的治疗作用(第十一章)。此外,本书还包括对与基因表达密切相关的两项技术的介绍。其中一项是基因表达与发酵(第十二章)。因为,外源基因的表达是在细胞生长繁殖过程中进行的,所以,培养条件会给外源基因的表达以极大的影响,不注意这个因素,最好的表达系统也无法取得满意的表达结果。另一项与基因表达密切相关的技术是基因表达技术中的序列数据分析方法(第十三章)。这是生物信息学的一部分,主要涉及核苷酸序列对基因表达的影响,通过序列数据分析可以辅助表达载体的设计。

本书各章作者均系该领域在国内的知名专家。为了拓展读者的范围,照顾到各种读者的水平,各章除了着重介绍和评述该领域的最新进展外,还适当介绍有关的背景资料。由于全书各章所属领域研究工作的深度不同,不同作者的写作风格也有差别,全书

在文字上难免有较大的差异。另外，由于撰稿时间短促，所以在内容上也难免有各种错误，欢迎读者批评指正。

李育阳

2000年4月31日

复旦大学遗传学研究所

目 录

丛书序 I

丛书序 II

前 言

第一章 大肠杆菌表达系统	(1)
一、表达载体的构成	(1)
(一) 复制子	(1)
(二) 筛选标记	(2)
(三) 启动子和终止子	(3)
(四) 核糖体结合位点	(3)
二、各种类型表达系统的构成及特点	(4)
(一) Lac 和 Tac 表达系统	(4)
(二) P_L 和 P_R 表达系统	(5)
(三) T7 表达系统	(6)
(四) 其他表达系统	(7)
三、目标蛋白表达的形式和在细胞中的位置	(8)
四、高效表达目标基因的战略和技术	(9)
(一) 表达质粒的优化设计	(10)
(二) 共表达大肠杆菌稀有密码子 tRNA 基因	(11)
(三) 提高目标基因 mRNA 和目标基因产物的稳定性	(11)
(四) 高密度发酵和工程化宿主细胞	(13)
五、大肠杆菌表达系统研究的发展趋势	(14)
第二章 芽孢杆菌表达系统	(20)
一、发展简史	(20)
二、表达概述	(21)
(一) 特点	(21)
(二) 宿主菌株	(21)
(三) 载体	(22)
三、基因表达	(25)
(一) 基因表达的特点	(25)
(二) 已表达的克隆基因	(26)
(三) 蛋白质工程	(29)
四、存在问题及今后发展方向	(29)
(一) 关于表达真核基因方面	(29)
(二) 关于表达酶的方面	(30)
(三) 关于表达杀虫菌晶体蛋白 (ICP) 方面	(30)
(四) 关于致病菌炭疽芽孢杆菌方面	(31)

(五) 利用芽孢杆菌基因工程技术扩大和加强芽孢杆菌在各方面的应用	(31)
第三章 链霉菌基因表达系统	(39)
一、链霉菌的生物学特征	(39)
二、链霉菌基因克隆系统	(40)
(一) 链霉菌的载体	(40)
(二) 链霉菌基因转移的方法	(43)
三、链霉菌基因的调控和蛋白质的分泌表达	(43)
(一) RNA 聚合酶基因多样性	(43)
(二) 调节基因	(44)
(三) 调节因子	(44)
(四) 链霉菌基因的转录调控	(45)
(五) 链霉菌中的蛋白外泌系统	(46)
四、外源基因在链霉菌中的表达	(48)
(一) 同种异源基因的表达	(48)
(二) 异种外源基因的表达	(51)
五、影响链霉菌中基因表达的因素	(52)
(一) 启动子对外源基因表达的影响	(52)
(二) 信号肽对外源蛋白分泌的影响	(52)
(三) 密码子、SD 序列和终止子等对基因表达的影响	(54)
(四) DNA 扩增序列对基因表达的影响	(55)
(五) 发酵条件对外源基因表达的影响	(55)
六、链霉菌基因表达翻译的后修饰	(56)
(一) 对外源蛋白的糖基化	(56)
(二) 对外源蛋白的降解	(56)
七、链霉菌作为表达系统的优缺点及研究发展趋势	(57)
第四章 原核生物增强子样序列	(65)
一、基因转录调节的两类基本元件	(65)
(一) 启动子元件	(65)
(二) 增强子元件	(66)
二、原核基因表达调节的一些见解	(66)
三、来源于动物病毒基因序列和大肠杆菌染色体的大肠杆菌增强子 (V-EE 和 E-EE)	(67)
四、 λ PL 和 <i>trp</i> 启动子上游 AT 丰富区的增强子样效应	(68)
五、hylR 增强子	(69)
六、固氮基因的原核增强子	(69)
七、T4 噬菌体晚期基因转录增强子	(71)
八、原核增强子样序列的应用	(73)
第五章 酵母表达系统	(77)
一、酵母基因表达系统的概况	(77)

(一) 酵母载体的基本结构	(77)
(二) 酵母表达系统中载体的种类	(79)
(三) 酵母菌基因表达系统的宿主	(81)
(四) 酵母的 DNA 转化	(82)
二、酵母表达系统研究进展	(83)
(一) 外源基因在酵母中的高表达	(83)
(二) 提高外源基因表达产物的质量	(86)
(三) 酵母表达系统的新应用	(88)
三、结束语	(91)
第六章 丝状真菌基因工程	(96)
一、载体和转化方法	(96)
(一) 载体	(96)
(二) 转化方法	(99)
(三) 提高转化频率的方法	(100)
(四) 转化 DNA 的归宿	(100)
二、基因的结构和功能	(101)
(一) 转录	(102)
(二) 翻译起始和终止	(106)
(三) 密码子利用度	(106)
(四) 基因的染色体排列和定位	(106)
(五) 基因表达的调控	(107)
三、次级代谢产物的生产	(107)
(一) β -内酰胺抗生素	(107)
(二) 多肽代谢物	(113)
四、外源蛋白在真菌中的表达	(114)
(一) 工业用酶	(115)
(二) 医疗用蛋白酶	(118)
五、展望	(119)
第七章 昆虫表达系统	(125)
一、历史回顾	(125)
二、最新进展	(127)
(一) 重组病毒获得的技术途径及转移载体的发展	(127)
(二) 病毒载体的改进	(130)
(三) 昆虫细胞培养技术和稳定表达系统	(131)
(四) 自主式昆虫宿主反应器	(132)
(五) 杆状病毒在蛋白质结构和功能上的研究	(132)
(六) 昆虫病毒表达系统用于多肽药物和疫苗研制	(133)
三、今后方向	(134)

第八章 哺乳动物细胞表达系统	(139)
一、概 述	(139)
二、哺乳动物细胞表达系统	(140)
(一) 宿主细胞	(140)
(二) 表达载体的构建和常用的细胞表达系统	(142)
(三) 高表达细胞株的基因共扩增和筛选方法	(149)
三、展 望	(150)
(一) 改进表达载体, 提高表达水平和产量	(150)
(二) 利用代谢工程, 改进培养工艺, 降低生产成本	(152)
(三) 抑制细胞凋亡, 延长培养周期	(153)
(四) 采用“糖基化”工程, 提高产品质量	(154)
第九章 转基因动物与基因表达	(159)
一、转基因动物概述	(159)
(一) 转基因动物发展简史	(159)
(二) 什么是转基因动物	(160)
(三) 有关转基因动物的伦理学问题	(160)
二、转基因方法	(160)
(一) 显微注射	(161)
(二) 通过动物体细胞克隆生产转基因动物	(162)
(三) 其他转基因方法	(164)
三、基因整合	(165)
(一) 随机整合	(165)
(二) 同源重组	(168)
四、动物基因表达的基础知识	(169)
(一) 组织特异性表达	(169)
(二) 染色质的结构	(170)
(三) 真核基因的表达过程	(171)
五、外源基因的表达	(175)
(一) 真核基因表达的调控序列	(175)
(二) 表达结构的构建和功能域转移	(178)
六、转基因动物在生物工程产业中的应用前景	(179)
(一) 提高家畜的生长速度和饲料转化效率	(179)
(二) 生产药用蛋白质	(179)
(三) 人工改良牛奶	(180)
(四) 器官供应来源	(180)
第十章 植物生物反应器	(184)
一、引 言	(184)
二、基本原理、方法	(184)
(一) 转化方法	(184)

(二) 转基因的构建	(185)
三、进展、问题与对策	(186)
(一) 国内外研究、应用进展	(186)
(二) 问题与对策	(190)
四、总 结	(194)
第十一章 基因治疗中的基因表达问题	(196)
一、基因治疗概况	(196)
(一) 基因治疗的概念和适应症	(196)
(二) 基因治疗的策略	(197)
(三) 临床项目的现状与评价	(197)
二、基因治疗载体系统的种类和特点	(198)
(一) 病毒载体	(198)
(二) 非病毒载体	(201)
(三) 基因导入体内新途径	(202)
三、靶向性问题	(203)
(一) 靶向导入型载体	(203)
(二) 靶向性表达	(206)
四、基因表达调控问题	(207)
(一) 可诱导表达系统	(207)
(二) 特异反应性启动子诱导表达系统	(209)
(三) 调控序列对基因表达的影响	(210)
(四) 目的基因体内长期表达的问题	(211)
五、小结与展望	(212)
第十二章 基因表达与发酵	(215)
一、基因重组菌的稳定性	(215)
(一) 培养过程中重组菌稳定性对群体组成变化的影响	(216)
(二) 培养条件对稳定性的影响	(217)
二、影响外源基因表达的因素	(221)
(一) 培养基	(221)
(二) 比生长速率	(221)
(三) 溶 氧	(223)
(四) 温 度	(224)
(五) 外源基因表达的诱导强度	(224)
(六) 代谢副产物的影响	(224)
(七) 重组菌的稳定性	(225)
三、发酵过程的优化和控制	(225)
(一) 高密度培养	(225)
(二) 代谢副产物生成的防止	(227)
(三) 发酵过程的控制	(230)

(四) 培养的操作方式	(232)
(五) 展 望	(233)
第十三章 基因表达技术中的序列数据分析方法	(237)
一、前 言	(237)
二、序列数据分析方法的概述	(238)
(一) 基因工程实验中的模拟	(240)
(二) PCR 的计算机设计方法	(241)
(三) 序列比较方法	(248)
(四) 外源基因表达水平的分析	(263)
(五) 蛋白质性质的分析	(267)

大肠杆菌表达系统

大肠杆菌表达系统是基因表达技术中发展最早,目前应用广泛的经典表达系统。大肠杆菌表达系统的发展历史可追溯到二十多年前,Struhl 等(1976)、Vapnek 等(1977)和 Chang 等(1978)分别将酿酒酵母 DNA 片段,粗糙链孢霉 DNA 片段和哺乳动物 cDNA 片段导入大肠杆菌,引起其表型的改变,证明了外源基因在大肠杆菌中可以实现有功能的活性表达。这些研究作为大肠杆菌表达系统的发展奠定了理论基础。Guarante 等(1980)在《科学》杂志上发表了以质粒、乳糖操纵子为基础建立起来的大肠杆菌表达系统,这一发明构成了大肠杆菌表达系统的雏形。随着 80 年代后期分子生物学技术的不断发展,大肠杆菌表达系统也不断得到发展和完善。与其他表达系统相比,大肠杆菌表达系统具有遗传背景清楚,目标基因表达水平高,培养周期短,抗污染能力强等特点。在基因表达技术中占有重要的地位,是分子生物学研究和生物技术产业化发展进程中的重要工具。

一、表达载体的构成

大肠杆菌质粒是一类独立于染色体外自主复制的双链、闭环 DNA 分子,大肠杆菌质粒可分为结合转移型和非结合转移型二种,非结合转移型质粒在通常培养条件下不在宿主间转移,整合到染色体上的频率也很低,具有遗传学上的稳定性和安全性。又因其大小一般在 2~50 kb 范围内,适合于制备和重组 DNA 的体外操作,因此几乎所有的大肠杆菌表达系统都选用质粒作为运载外源基因的载体,这些表达载体通过对天然质粒的改造获得。理想的大肠杆菌表达载体要求具有以下特征:①稳定的遗传复制、传代能力,在无选择压力下能存在于大肠杆菌细胞内。②具有显性的转化筛选标记。③启动子的转录是可以调控的,抑制时本底转录水平较低。④启动子的转录的 mRNA 能够在适当的位置终止,转录过程不影响表达载体的复制。⑤具备适用于外源基因插入的酶切位点。复制子、筛选标记、启动子。终止子和核糖体结合位点是构成表达载体的最基本元件,它们的类型、结构与功能以及适用范围简述如下:

(一) 复制子

复制子是一段包含复制起始位点、反式因子作用区在内的 DNA 片段,其功能是通过复制使质粒能稳定存在于大肠杆菌内。在常用的大肠杆菌质粒载体中,根据其复制子类型的不同,可以分为 pMB1 类、p15A 类、ColE1 类和 pSC101 类。其中 pMB1 类、p15A 类、