

现代生物化学工程丛书

(第4版)

基因工程

GENETIC ENGINEERING

张惠展 / 编著



华东理工大学出版社
EAST CHINA UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY PRESS

基因工程

(第4版)

张惠展 编著

图书在版编目(CIP)数据

基因工程/张惠展编著. —4 版. —上海: 华东理工大学出版社, 2017. 1

ISBN 978-7-5628-4808-0

I. ①基… II. ①张… III. ①基因工程 IV. ①Q78

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2016)第 248774 号

项目统筹 / 崔婧婧

责任编辑 / 陈新征

出版发行 / 华东理工大学出版社有限公司

地址: 上海市梅陇路 130 号, 200237

电话: 021-64250306

网址: www.ecustpress.cn

邮箱: zongbianban@ecustpress.cn

印 刷 / 江苏省句容市排印厂

开 本 / 787 mm × 1092 mm 1/16

印 张 / 36.25

字 数 / 968 千字

版 次 / 2005 年 8 月第 1 版

2017 年 1 月第 4 版

印 次 / 2017 年 1 月第 1 次

定 价 / 78.00 元

版权所有 侵权必究

第 4 版前言

诞生于 20 世纪 70 年代初的重组 DNA 技术是一种获取、整理、破译、编辑和表达生物遗传信息的大型综合操作平台,它以细胞生物学、分子生物学和分子遗传学的基本理论体系为基石,在基因分离克隆、基因编码产物产业化、生物遗传性状改良、基因功能及其表达调控机制诠释等方面日益显示出极高的实用价值;而作为重组 DNA 技术产业化应用的基因工程正在驱动着人类社会的生活方式发生重大变革。

早在 1984 年,华东理工大学就为其生物化学和生化工程专业的本科生开设了“基因工程概论”的专业选修课。本书所涉及的基本理论、实验技术和应用策略主要基于百余篇相关综述以及编者三十多年来不断充实的教学讲义和心得,编撰侧重基因工程应用的设计思路,并力求以图解的方式加深读者对本书内容的理解和印象。鉴于现代生命科学理论与技术的飞速发展,本书对第一版(华东理工大学出版社,2005 年)内容进行了大幅度更新;并在第三版(高等教育出版社,2015 年)的基础上增设了“原核细菌基因工程”“真菌基因工程”“昆虫基因工程”等章节,因而适于作为生命科学类各专业本科生和研究生的课程教材,同时也可作为有关人员的参考书。

真诚欢迎专家和读者对本书提出宝贵意见。

编 者

2016 年 4 月于黄浦江畔

第 1 版前言

本书系华东理工大学出版社策划编辑的高等院校现代生物化学工程丛书中的一部。

严格地讲,基因工程是获取、整理、破译、编辑和表达生物体遗传信息的一种操作平台与技术,它以细胞生物学、分子生物学和分子遗传学的基本理论体系为指导,在基因的分离克隆、基因表达调控机制的诠释、基因编码产物的产业化以及生物遗传性状的改良等方面日益显示出极高的实用价值。作为二十世纪生命科学最辉煌的成就,诞生于七十年代的基因工程技术正在驱动着人类社会生活方式的重大变革。

早在 1984 年,华东理工大学就已为其生物化学和生化工程专业的本科生开设了“基因工程概论”的专业选修课。本书所涉及的基本理论部分主要参照了 20 年来不断充实的教学讲义和《GENE VIII》(Benjamin Lewin 著,2004 年出版);应用战略部分来自《Molecular Biotechnology》(Bernard R. Glick 和 Jack J. Pasternak 著,1994 出版)及近年来发表的相关综述;实验技术部分则由《Recombinant DNA》(James D. Watson、Michael Gilman、Jan Witkowski 和 Mark Zoller 著,1992 出版)、《Molecular Cloning》(J. Sambrook、E. F. Fritsch 和 T. Maniatis 著,1989 出版)以及著者长期积累的经验体会组成。本书撰写的侧重点是基因工程应用的设计思路,并力求以图解的方式加深理解和印象,因而较为适合于作为生命科学各专业本科生和研究生的课程教材,同时也可作为有关人员的参考书。

本书部分内容的参考资料由吴海珍博士负责收集整理,叶江硕士设计制作了本书的全部图表,著者在此对她们的辛勤劳动表示衷心的感谢。

真诚欢迎专家和读者对本书提出宝贵意见。

著 者

2005 年夏于黄浦江畔

第 2 版前言

诞生于 20 世纪 70 年代初的 DNA 重组技术是一种获取、整理、破译、编辑和表达生物遗传信息的现代生物技术,它以细胞生物学、分子生物学和分子遗传学的基本理论体系为基石,在基因的分离克隆、基因编码产物的产业化、生物遗传性状的改良、基因功能及其表达调控机制的诠释等方面日益显示出极高的实用价值。作为 DNA 重组技术产业化应用的基因工程,正在驱动着人类社会生活方式的重大变革。

本书将 DNA 重组和克隆的实验流程分为“切、接、转、增、检”五大单元操作;在简要阐述目的基因四大分离克隆战略的基础上,分别以大肠杆菌、酵母、高等动植物等典型的受体系统为主线,逐一论述基因工程应用的设计思想;同时,与高效表达多肽和蛋白质编码基因的第一代基因工程以及通过基因水平上的遗传操作表达蛋白变体的第二代基因工程(蛋白质工程)相呼应,将在基因水平上局部修饰细胞固有代谢途径和信号转导途径的设计表征为第三代基因工程,由此构成本书的基本理论框架。

本书所涉及的基本理论、应用战略及实验技术主要基于著者二十多年来不断充实的教学讲义和经验体会,编撰的侧重点是基因工程应用的设计思路,并力求以图解的方式加深理解和印象,因而较为适合作为全日制大学生物工程、生物技术、生物科学专业本科生《基因工程》课程的教科书,同时也可作为有关研究人员的参考书。

真诚欢迎专家和读者对本书提出宝贵意见。

著 者

二〇〇九年红五月于尚湖

第3版前言

诞生于20世纪70年代初的DNA重组技术是一种获取、整理、破译、编辑和表达生物遗传信息的现代生物技术,它以细胞生物学、分子生物学和分子遗传学的基本理论体系为基石,在基因的分离克隆、基因编码产物的产业化、生物遗传性状的改良、基因功能及其表达调控机制的诠释等方面日益显示出极高的实用价值。作为DNA重组技术产业化应用的基因工程,正在驱动着人类社会生活方式的重大变革。

本书将DNA重组、克隆和表达的实验流程分为“切、接、转、增、检”五大单元操作;在简要阐述目的基因四大分离克隆战略的基础上,分别以大肠杆菌、酵母、高等动植物等典型的受体系统为主线,逐一论述基因工程应用的设计思想;同时,与高效表达多肽和蛋白质编码基因的第一代基因工程以及通过基因水平上的遗传操作表达蛋白变体的第二代基因工程(蛋白质工程)相呼应,将在基因水平上局部修饰细胞固有代谢途径和信号转导途径的设计表征为第三代基因工程,由此构成本书的基本理论框架。

本书所涉及的基本理论、应用战略及实验技术主要基于著者30年来不断充实的教学讲义和经验体会,编撰的侧重点是基因工程应用的设计思路,并力求以图解的方式加深理解和印象,因而较为适合作为全日制大学生物工程、生物技术、生物科学专业本科生《基因工程》课程的教科书,同时也可作为有关研究人员的参考书。

除了对第二版内容进行多处增删和修订外,为了便于读者自主性和扩展性阅读,本版在各章中还增设了“关键词”和“知识导图”;并按照iCourse教材的标准新置了数字配套资源,其中包括:教学课件(603张PPT)、彩色插图(197幅PDF格式)、自测试题(409道标准化试题)、术语扩展(5例)、科技史话(8段)。

本书彩色附图由李竹青配色,著者在此对她的辛勤劳动表示衷心感谢。

真诚欢迎专家和读者对本书提出宝贵意见。

著者

二〇一四年八月于黄浦江畔

目 录

第 1 章 概述	1
1.1 基因工程的基本概念	1
1.1.1 基因工程的基本定义	1
1.1.2 基因工程的基本过程	1
1.1.3 基因工程的基本原理	2
1.1.4 基因工程的基本体系	2
1.2 基因工程的发展历史	4
1.2.1 基因工程的诞生	4
1.2.2 基因工程的成熟	5
1.2.3 基因工程的腾飞	5
1.3 基因工程的研究意义	6
1.3.1 第四次工业革命	6
1.3.2 第二次农业大革命	7
1.3.3 第四次医学大革命	7
第 2 章 DNA 重组克隆单元操作	9
2.1 DNA 重组的载体	9
2.1.1 质粒载体	9
2.1.2 病毒或噬菌体载体	13
2.1.3 噬菌体-质粒杂合载体	19
2.1.4 人造染色体载体	21
2.2 DNA 的体外重组(切与接)	21
2.2.1 限制性核酸内切酶	22
2.2.2 T4-DNA 连接酶	26
2.2.3 其他用于 DNA 重组的工具酶	26
2.2.4 DNA 切接反应的影响因素	30
2.2.5 DNA 分子重组的方法	34
2.3 重组 DNA 分子的转化与扩增(转与增)	41
2.3.1 重组 DNA 转化的基本概念	42
2.3.2 细菌受体细胞的选择	43
2.3.3 细菌受体细胞的转化方法	44
2.3.4 转化率及其影响因素	47
2.3.5 转化细胞的扩增	48
2.4 转化子的筛选与重组子的鉴定(检)	48
2.4.1 基于载体遗传标记的筛选与鉴定	49
2.4.2 基于克隆片段序列的筛选与鉴定	51

2.4.3	基于外源基因表达产物的筛选与鉴定	66
2.5	目的基因的克隆	68
2.5.1	鸟枪法	68
2.5.2	cDNA 法	71
2.5.3	PCR 扩增法	79
2.5.4	化学合成法	85
2.5.5	基因文库的构建	88
第 3 章	大肠杆菌基因工程	93
3.1	外源基因在大肠杆菌中的高效表达原理	93
3.1.1	大肠杆菌表达系统的启动子	93
3.1.2	大肠杆菌表达系统的终止子	98
3.1.3	大肠杆菌表达系统的核糖体结合位点	99
3.1.4	大肠杆菌表达系统的密码子	100
3.1.5	大肠杆菌表达系统的 mRNA 稳定性	101
3.1.6	大肠杆菌表达系统的质粒拷贝数	101
3.2	大肠杆菌基因工程菌的构建策略	102
3.2.1	包涵体型重组异源蛋白的表达	102
3.2.2	分泌型重组异源蛋白的表达	105
3.2.3	融合型重组异源蛋白的表达	108
3.2.4	寡聚型重组异源蛋白的表达	112
3.2.5	整合型重组异源蛋白的表达	116
3.3	重组异源蛋白的体内修饰与体外复性	117
3.3.1	重组异源蛋白的稳定性维持	117
3.3.2	重组异源蛋白的糖基化修饰	119
3.3.3	包涵体型重组异源蛋白的体外溶解与变性	121
3.3.4	包涵体型重组异源蛋白的体外复性与重折叠	122
3.4	大肠杆菌工程菌培养的工程化控制	126
3.4.1	细菌生长的动力学原理	127
3.4.2	发酵过程的最优化控制	129
3.4.3	大肠杆菌工程菌的高密度发酵	131
3.4.4	基因工程菌的遗传不稳定性及其机制	133
3.4.5	改善基因工程菌遗传不稳定性的对策	134
3.5	利用重组大肠杆菌生产人胰岛素	136
3.5.1	胰岛素的结构及其生物合成	137
3.5.2	人胰岛素的生产方法	138
3.5.3	产重组人胰岛素大肠杆菌工程菌的构建策略	138
3.6	利用重组大肠杆菌生产人抗体及其片段	141
3.6.1	重组抗体的生产策略	141
3.6.2	由大肠杆菌生产重组抗体片段的优越性	143
3.6.3	产重组抗体片段大肠杆菌工程菌的构建	145
3.6.4	重组抗体及其片段表达产物的分离纯化	149

第 4 章 原核细菌基因工程	150
4.1 芽孢杆菌基因工程	150
4.1.1 芽孢杆菌的载体克隆系统	150
4.1.2 芽孢杆菌的宿主转化系统	154
4.1.3 芽孢杆菌的基因表达系统	155
4.1.4 芽孢杆菌的分泌折叠系统	161
4.1.5 重组芽孢杆菌在耐热性酶制剂大规模生产中的应用	165
4.1.6 重组芽孢杆菌在人体蛋白药物生产中的应用	169
4.1.7 重组芽孢杆菌在昆虫毒素蛋白生产中的应用	171
4.2 棒状杆菌基因工程	174
4.2.1 棒状杆菌的载体克隆系统	175
4.2.2 棒状杆菌的基因表达系统	179
4.2.3 棒状杆菌的宿主转化系统	183
4.2.4 赖氨酸基因工程菌的构建	184
4.2.5 精氨酸基因工程菌的构建	188
4.3 链霉菌基因工程	192
4.3.1 链霉菌的载体克隆系统	192
4.3.2 链霉菌的宿主转化系统	198
4.3.3 链霉菌的基因表达系统	200
4.3.4 链霉菌的蛋白分泌系统	205
4.3.5 利用重组链霉菌分泌表达哺乳动物蛋白	207
4.3.6 利用 DNA 重组技术改良抗生素生产菌	208
4.4 梭菌属基因工程	214
4.4.1 梭菌属的载体克隆系统	215
4.4.2 梭菌属的宿主转化系统	221
4.4.3 利用 DNA 重组技术改良有机溶剂的羧菌生产菌	223
4.4.4 利用 DNA 重组技术改良羧菌属的纤维素分解酶系	226
4.5 乳酸菌基因工程	228
4.5.1 乳酸菌的载体克隆系统	229
4.5.2 乳酸菌的诱导表达系统	235
4.5.3 乳酸菌的宿主转化系统	236
4.5.4 利用 DNA 重组技术改良食用乳酸菌	238
4.5.5 利用 DNA 重组技术构建非食用乳酸菌工程株	242
4.6 假单胞菌基因工程	243
4.6.1 假单胞菌的载体克隆系统	243
4.6.2 假单胞菌的宿主转化系统	245
4.6.3 假单胞菌生物降解基因的克隆与鉴定	246
4.6.4 假单胞菌生物降解途径的分子设计	247
第 5 章 真菌基因工程	253
5.1 丝状真菌基因工程	253
5.1.1 丝状真菌的载体克隆系统	253

5.1.2	丝状真菌的宿主转化系统	258
5.1.3	丝状真菌的表达分泌系统	262
5.1.4	丝状真菌重组异源蛋白的表达优化策略	267
5.1.5	重组曲霉属在异源蛋白生产中的应用	269
5.1.6	重组丝状真菌在次级代谢物生产中的应用	271
5.2	酵母基因工程	276
5.2.1	酵母的宿主系统	276
5.2.2	酵母的载体系统	279
5.2.3	酵母的转化系统	286
5.2.4	酵母的表达系统	291
5.2.5	酵母的蛋白修饰分泌系统	307
5.2.6	利用重组酵母生产乙肝疫苗	315
5.2.7	利用重组酵母生产人血清白蛋白	316
第 6 章	昆虫基因工程	320
6.1	果蝇的基因转化系统	320
6.1.1	果蝇转座元件的结构及特征	320
6.1.2	P 元件介导的果蝇杂交不育	321
6.1.3	P 元件介导的果蝇经典转化程序	322
6.1.4	果蝇体细胞的转化程序与表达系统	324
6.2	蚊虫和农业害虫的基因改造系统	325
6.2.1	用于非果蝇类昆虫转化的载体	326
6.2.2	用于非果蝇类昆虫转化株筛选的标记基因	331
6.2.3	农业害虫的基因工程	332
6.2.4	蚊虫的基因工程	339
6.3	家蚕的基因表达系统	346
6.3.1	家蚕的分子生物学	347
6.3.2	家蚕的杆状病毒基因表达系统	348
6.3.3	家蚕生物反应器的构建	354
6.3.4	抗病毒型转基因家蚕的构建	359
第 7 章	高等动物基因工程	362
7.1	高等动物细胞的基因转移系统	362
7.1.1	用于基因转移的动物受体细胞	362
7.1.2	动物细胞的物理转化程序	364
7.1.3	动物细胞的化学转化程序	365
7.1.4	动物细胞的病毒转染程序	366
7.1.5	动物细胞的慢病毒载体系统	372
7.2	利用动物转基因技术研究基因的表达与功能	377
7.2.1	基于报告基因探测动物基因组中的调控序列及染色质转录活性 状态	377
7.2.2	基于同源重组敲除靶基因或敲入转基因	379

7.2.3	基于位点特异性整合条件性敲除靶基因或敲入转基因	379
7.2.4	基于位点特异性断裂条件性编辑基因组	383
7.2.5	基于序列特异性互补条件性敲低靶基因	386
7.3	利用动物转基因技术生产重组蛋白多肽	389
7.3.1	高等动物转基因的表达特征	389
7.3.2	高等动物转基因的表达元件	391
7.3.3	利用高等动物工程细胞系生产医用蛋白	394
7.3.4	利用高等动物细胞瞬时表达技术生产医用蛋白	399
7.3.5	利用转基因动物的组织或器官生产医用蛋白	401
7.4	利用转基因技术改良动物遗传性状	404
7.4.1	转基因动物生成的原理与技术	404
7.4.2	转基因动物生成的特征与应用	410
7.4.3	转基因动物生成的挑战与前景	416
7.5	基因治疗	416
7.5.1	基因治疗的基本策略	416
7.5.2	间接体内基因治疗	418
7.5.3	直接体内基因治疗	423
7.5.4	基因治疗面临的挑战与对策	428
第 8 章	高等植物基因工程	430
8.1	高等植物的基因转移系统	430
8.1.1	Ti 质粒介导的整合转化	431
8.1.2	植物病毒介导的转染	440
8.1.3	植物的物理转化方法	443
8.1.4	植物细胞的化学转化法	445
8.1.5	植物原生质体的再生	445
8.2	高等植物的基因表达系统	447
8.2.1	植物转基因的启动子/增强子	447
8.2.2	植物转基因的非翻译区	453
8.2.3	植物转基因的编码序列	455
8.2.4	植物转基因的装配	455
8.3	利用植物转基因技术研究基因的表达与调控	457
8.3.1	利用 T-DNA 或转座子元件原位克隆鉴定植物功能基因	457
8.3.2	利用病毒诱导型基因沉默机制鉴定植物功能基因	459
8.3.3	利用增强子或启动子元件原位激活鉴定植物功能基因	461
8.3.4	利用 cDNA 或 ORF 表达序列鉴定植物功能基因	462
8.3.5	利用报告基因展示高等植物基因表达与调控的信息谱	465
8.3.6	利用 CRISPR/Cas 系统编辑植物基因组	466
8.4	利用转基因技术改良植物品种	466
8.4.1	抗生物胁迫型转基因农作物的生成	468
8.4.2	耐非生物胁迫型转基因农作物的生成	471
8.4.3	提升光合效能型转基因农作物的生成	474

8.4.4	改善品质型转基因农作物的生成	478
8.4.5	转基因农作物的安全性	482
8.5	利用转基因植物或细胞生产重组异源蛋白和工业原料	482
8.5.1	植物生物反应器的构建策略	483
8.5.2	利用植物生物反应器生产医用蛋白	485
8.5.3	利用植物生物反应器生产食品或饲料添加剂	486
8.5.4	利用植物生物反应器生产工业原料	487
第 9 章	第二代基因工程——蛋白质工程	488
9.1	蛋白质工程的基本概念	488
9.1.1	蛋白质工程的基本特征	488
9.1.2	蛋白质工程的研究内容及应用	489
9.1.3	蛋白质工程实施的必要条件	490
9.2	基因的体外定向突变	490
9.2.1	局部随机掺入法	490
9.2.2	碱基定点转换法	491
9.2.3	部分片段合成法	491
9.2.4	引物定点引入法	494
9.2.5	PCR 扩增突变法	496
9.3	基因的体外定向进化	497
9.3.1	易错 PCR	497
9.3.2	DNA 改组	498
9.3.3	体外随机引发重组	498
9.3.4	交错延伸	501
9.3.5	过渡模板随机嵌合生长	501
9.3.6	渐增切割杂合酶生成	501
9.3.7	同源序列非依赖性蛋白质重组	502
9.3.8	突变文库高通量筛选模型的建立	503
9.4	蛋白质工程的设计思想与应用	505
9.4.1	提高蛋白质或酶类分子的稳定性	505
9.4.2	减少重组多肽链的错误折叠	508
9.4.3	改善酶的催化活性	508
9.4.4	消除酶的被抑制特性	511
9.4.5	修饰酶的催化特异性	511
9.4.6	改造配体与其受体的亲和性	512
9.4.7	降低异源蛋白药物的免疫原性	515
第 10 章	第三代基因工程——途径工程	518
10.1	途径工程的基本概念	518
10.1.1	途径工程的基本定义	518
10.1.2	途径工程的基本过程	519
10.1.3	途径工程的基本原理	521

10.2	途径工程的研究策略	523
10.2.1	在现存途径中提高目标产物的代谢流	523
10.2.2	在现存途径中改变物质流的性质	523
10.2.3	利用已有途径构建新的代谢旁路	526
10.3	初级代谢的途径工程	527
10.3.1	乙醇生产菌的途径操作	528
10.3.2	辅酶 Q 生产菌的途径操作	534
10.3.3	氢气生产菌的途径操作	541
10.4	次级代谢的途径工程	542
10.4.1	聚酮生物合成的分子机制	542
10.4.2	聚酮合酶各组成模块的操作策略	542
10.4.3	聚酮生物合成基因的异源表达	545
10.5	信号转导的途径工程	547
10.5.1	信号转导途径的构成与功能	547
10.5.2	信号转导途径的性能修饰	549
10.5.3	信号转导途径的动力学行为修饰	552
	参考文献	558

第1章 概述

一百多年前,在捷克莫勒温镇一个修道院里沉醉于豌豆杂交实验的孟德尔(Mendel)根本就不会想到,他提出的遗传因子在半个世纪后被摩尔根(Morgen)定义为基因;而且1944年艾弗瑞(Avery)证明了基因的物质基础是DNA;1953年沃森(Watson)和克里克(Crick)又揭示了DNA的双螺旋分子结构;到了1973年,DNA已能在体外被随意拼接并转回至细菌体内遗传和表达。生命科学的飞速发展孕育了现代分子生物学技术——基因工程的诞生。今天,人们在超市货架上可以买到保质期较长的转基因番茄和土豆,以“多利”绵羊为代表的体细胞克隆动物走出实验室,使人们不再将《失落的世界》视为科幻影片,基因工程正驱动着整个人类生活方式发生重大变革。

1.1 基因工程的基本概念

1.1.1 基因工程的基本定义

基因工程(Genetic engineering)原称遗传工程。从狭义上讲,基因工程是指将一种或多种生物(供体)的基因与载体在体外进行拼接重组,然后转入另一种生物(受体)体内,使之按照人们的意愿遗传并表达出新的性状。因此,供体、受体、载体称为基因工程的三大要素,其中相对于受体而言,来自供体的基因属于外源基因。除了RNA病毒外,几乎所有生物的基因都存在于DNA序列中,而用于外源基因重组拼接的载体也都是DNA分子,因此基因工程亦称为DNA重组技术(DNA recombination)。另外,DNA重组分子大都需在受体细胞中复制扩增,故还可将基因工程表征为分子克隆(Molecular cloning)技术。

广义的基因工程定义为DNA重组技术的产业化设计与应用,包括上游技术和下游技术两大组成部分。上游技术指的是外源基因重组、克隆、表达的设计与构建(即狭义的基因工程);而下游技术则涉及含外源基因型重组生物细胞(基因工程菌或细胞)的大规模培养以及外源基因表达产物的分离纯化过程。因此,广义的基因工程概念更倾向于工程学的范畴。值得注意的是,广义的基因工程是一个高度统一的整体。上游DNA重组的设计必须以简化下游操作工艺和装备为指导,而下游过程则是上游基因重组蓝图的体现与保证,这是基因工程产业化的基本原则。

1.1.2 基因工程的基本过程

依据定义,基因工程的整个过程由工程菌(细胞)的设计构建和基因产物的生产两大部分组成(图1-1)。前者主要在实验室里进行,其基本单元操作过程如下:

(1) 从供体细胞中分离出基因组DNA,用限制性核酸内切酶分别将外源DNA(包括外源基因或目的基因)和载体分子切开(简称“切”)。

(2) 用DNA连接酶将含有外源基因的DNA片段接到载体分子上,形成DNA重组分子(简称“接”)。

(3) 借助于细胞转化手段将DNA重组分子导入受体细胞中(简称“转”)。

(4) 短时间培养转化细胞,以扩增DNA重组分子或使其整合到受体细胞的基因组中(简称“增”)。

(5) 筛选和鉴定经转化处理的细胞,获得外源基因高效稳定表达的基因工程菌或细胞

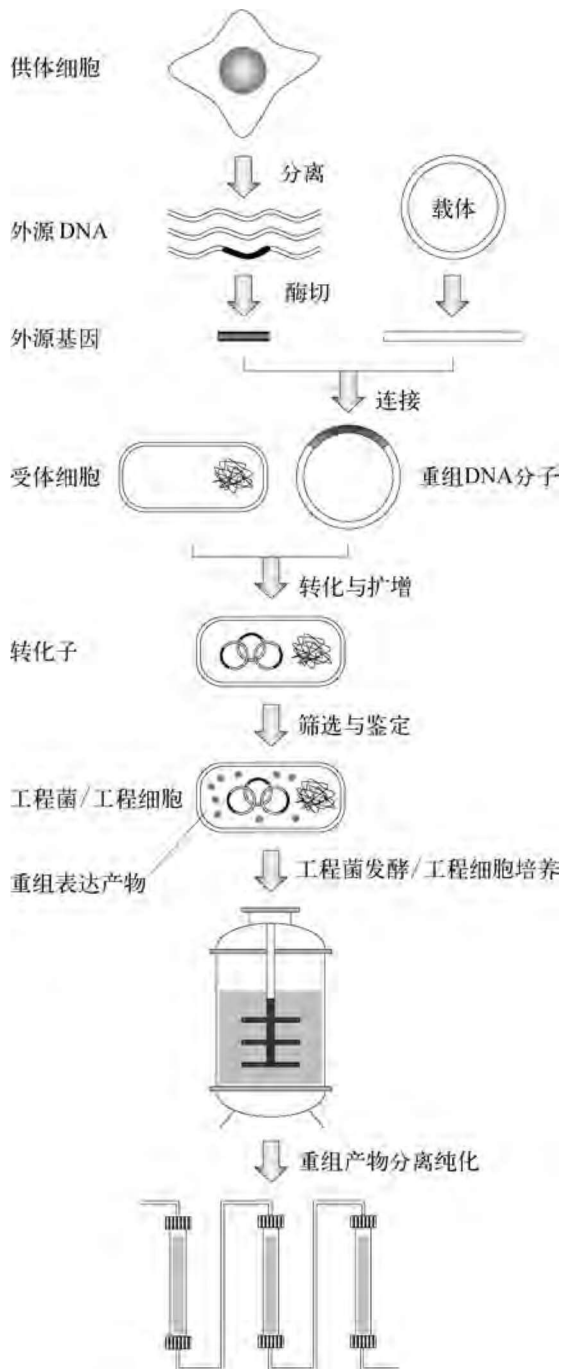


图 1-1 基因工程基本流程示意图

业的出现被认为是微生物发酵技术成熟的标志,同时也孕育了传统生物工程。30年之后,以分子遗传学和分子生物学研究成果为理论基础的基因工程技术则将生物工程引至现代生物技术的高级发展阶段。

生物工程与化学工程同属于化学产品生产技术,但两者在基本原理、生产组织形式以及产品结构等方面均有本质的区别。在化学工业中,产品形成或者化学反应发生的基本场所

(简称“检”)。

由此可见,基因工程的上游操作过程可简化为:切、接、转、增、检。

1.1.3 基因工程的基本原理

作为现代生物工程的主导性技术,基因工程的核心是外源基因的稳定高效表达。为达到此目的,可从以下四个方面考虑:

(1) 利用载体 DNA 在受体细胞中独立于染色体 DNA 而自主复制的特性,将外源基因与载体分子重组,通过载体分子的扩增提高外源基因在受体细胞中的剂量(即拷贝数),借此提高其宏观表达水平。这里涉及 DNA 分子高拷贝复制以及稳定遗传的分子遗传学原理。

(2) 筛选、修饰和重组启动子、增强子、操作子、终止子等基因的转录调控元件,并将这些元件与外源基因精确拼接,通过强化外源基因的转录而提高其表达水平。

(3) 选择、修饰、重组核糖体结合位点和密码子等 mRNA 的翻译调控元件,强化受体细胞中目标蛋白质的生物合成过程。

上述(2)和(3)两点均涉及基因表达调控的分子生物学原理。

(4) 基因工程菌(细胞)是现代生物工程中的微型生物反应器,在强化并维持其最佳生产效能的基础上,从工程菌(细胞)大规模培养的工程和工艺角度切入,合理控制微型生物反应器的增殖速度和最终数量,也是提高外源基因表达产物产量的重要环节,这里涉及的是生化工程学的基本理论体系。

因此,分子遗传学、分子生物学和生物化学工程是基因工程原理的三大基石。

1.1.4 基因工程的基本体系

生物工程的学科体系建立在微生物学、遗传学、生物化学和化学工程学的基本原理与技术之上,但其最古老的产业化应用可追溯到公元前 40 世纪~公元前 30 世纪期间的酿酒技术。20 世纪 40 年代,抗生素制造

是各种类型的物理反应器,在那里反应物直接转变成产物;而在生物工程产业中,生化反应往往发生在生物细胞内,作为反应物的底物按照预先编制好的生化反应程序,在催化剂酶的作用下形成最终产物。在生化反应过程中,反应的速度和进程不仅依赖于底物和产物的浓度,而且更重要的是受到酶含量的控制,后者的变化又与细胞所处的环境条件和基因的表达状态直接相关联。虽然在一种典型的生物工程生产模式中,同样需要使用被称为细菌发酵罐或细胞培养罐的物理容器,但它们仅仅用于细胞的培养和维持,真正意义上的生物反应器却是细胞本身。因此,就生产方式而言,生物工程与化学工程的显著区别在于:① 生物工程通常需要两种性质完全不同的反应器进行产品的生产,细胞实质上是一种特殊的微型生物反应器(Mircobioreactor);② 在一般生产过程中,微型反应器(细胞)的数量与质量随物理反应器内的环境条件变化而变化,因此在物理反应器水平上施加的工艺和工程控制参数种类更多、控制程度更精细;③ 每个微型反应器(细胞)内的生物催化剂的数量和质量也会增殖或跌宕,而且这种变化受制于更为复杂的机理,如酶编码基因的表达调控程序、蛋白质的加工成熟程序、酶的活性结构转换程序、蛋白质的降解程序等;④ 如果考虑产品的结构,生物工程则不仅能生产生理活性和非活性分子,而且还能培育和制造生物活体组织或器官。

上述分析表明,现代生物工程的基本内涵(图 1-2)包括:用于维持和控制细胞微型

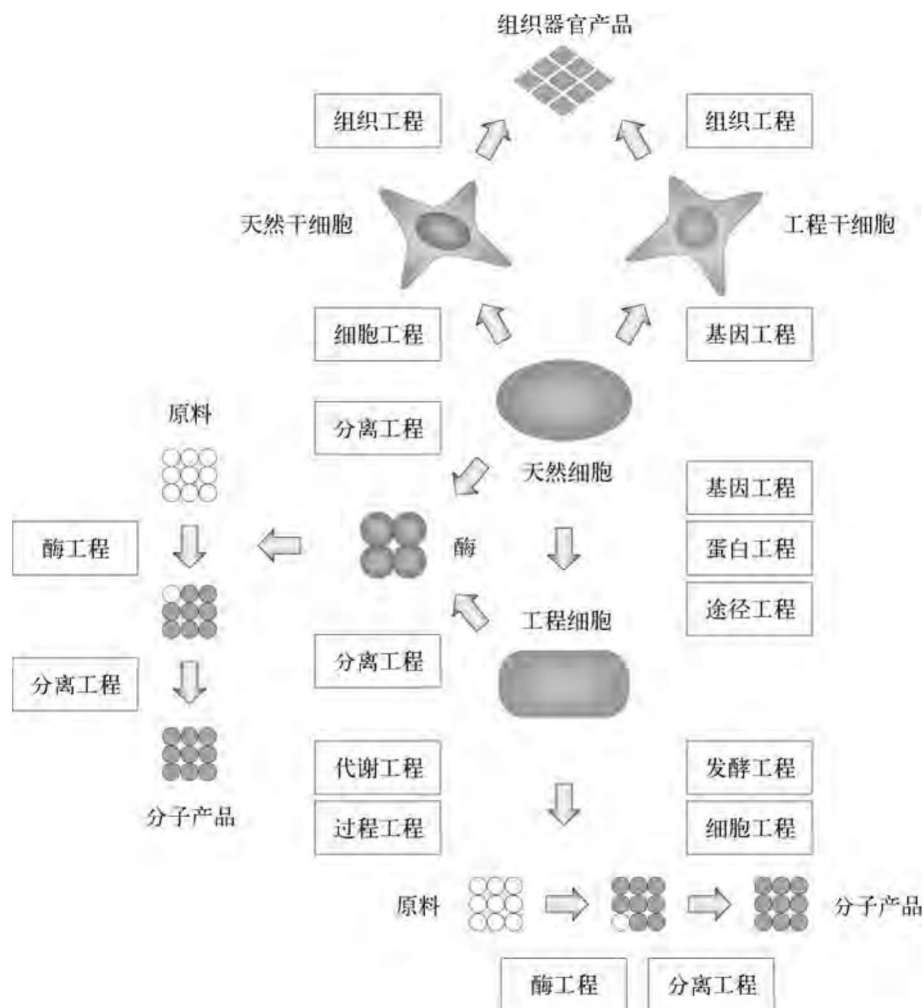


图 1-2 现代生物工程的基本内涵