



普通高等教育“十五”国家级规划教材

基因工程

Gene Engineering

主编 孙明



高等教育出版社
Higher Education Press



普通高等教育“十五”国家级规划教材

基因工程

Gene Engineering

主 编 孙 明

编 者 (按姓氏拼音顺序排序)

- | | |
|--------------|--------------|
| 陈雯莉 (华中农业大学) | 程新耀 (武汉大学) |
| 储昭晖 (华中农业大学) | 连正兴 (中国农业大学) |
| 林拥军 (华中农业大学) | 刘克德 (华中农业大学) |
| 吕颂雅 (武汉大学) | 苏 莉 (武汉大学) |
| 孙 明 (华中农业大学) | 陶美凤 (华中农业大学) |
| 熊立仲 (华中农业大学) | 姚伦广 (湖北大学) |
| 袁德军 (华中农业大学) | 张桂敏 (湖北大学) |



高等教育出版社
Higher Education Press

内容简介

本书是普通高等教育“十五”国家级规划教材。书中全面、系统介绍了基因工程的原理、策略和技术方法,具有较好的先进性、前瞻性和实践性。全书分基因操作原理和基因工程应用 2 篇共 19 章,内容包括分子克隆工具酶、分子克隆载体、人工染色体载体、表达载体、基因操作中大分子的分离和分析、基因芯片技术、PCR 技术及其应用、DNA 序列分析、DNA 诱变、DNA 文库的构建和目的基因的筛选、基因组研究技术、植物基因工程、动物基因工程、酵母基因工程、细菌基因工程、病毒基因工程、医药基因工程、基因工程产品的安全及其管理。

本书是作者们长期教学和科研经验的凝练,可作为高等院校生物科学、生物技术、生物工程、生物制药等相关专业本科生和研究生的教学用书,也可供相关的科研、技术和管理人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

基因工程 / 孙明主编. —北京: 高等教育出版社, 2006. 5

ISBN 7-04-014588-X

I. 基... II. 孙... III. 基因-遗传工程-高等学校-教材 IV. Q78

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2006)第 052625 号

策划编辑 王 莉 责任编辑 王 莉 封面设计 张 楠 责任绘图 朱 静
版式设计 王 莹 责任校对 王 超 责任印制 朱学忠

出版发行 高等教育出版社
社 址 北京市西城区德外大街 4 号
邮政编码 100011
总 机 010-58581000

经 销 蓝色畅想图书发行有限公司
印 刷 煤炭工业出版社印刷厂

开 本 889×1194 1/16
印 张 24
字 数 600 000

购书热线 010-58581118
免费咨询 800-810-0598
网 址 <http://www.hep.edu.cn>
<http://www.hep.com.cn>
网上订购 <http://www.landaco.com>
<http://www.landaco.com.cn>
畅想教育 <http://www.widedu.com>

版 次 2006 年 5 月第 1 版
印 次 2006 年 5 月第 1 次印刷
定 价 32.00 元

本书如有缺页、倒页、脱页等质量问题,请到所购图书销售部门联系调换。

版权所有 侵权必究

物料号 14588-00

前 言

21 世纪是生命科学的世纪,分子生物学作为最前沿的生命科学,主要从分子水平研究生命活动的现象与本质,如 DNA 的复制、基因的表达与调控、遗传与变异等。随着分子生物学研究的深入与发展,除了在分子水平上了解生命的特征外,在分子水平进行更有效的生物学研究以及在分子水平进行物种改造是生物学界共同关心并十分重视的问题。

国内外已出版了许多有关基因工程的书籍,各自展现出不同的内涵和风格。本教材所指的基因工程是一个广义的概念,包括基因操作原理和基因工程应用两部分。其中后者是指基因工程的狭义概念,以转基因技术为主线,以构建不同类型的基因工程体(或称遗传修饰生物体,genetically modified organism,GMO)及其应用为主要内容,包括植物、动物和微生物基因工程体的创制和应用,以及基因工程在生物医药中的综合应用。自 1973 年美国斯坦福大学的 Stanley Cohen 和 Herbert Boyer 第一次实现基因的异源表达,基因工程就开始蓬勃发展,并在工业、农业、医疗等领域创造了巨大的价值,同时改善了人们的生活,提高了人类与疾病抗争的能力。在历史的长河中,人类从来没有比现在更像是这个世界的主宰者,因为基因工程赋予了人类改造物种、创造物种的能力。当然,这一切都必须是在法律和伦理允许的范围内。本书基因工程应用部分从植物基因工程、动物基因工程、酵母基因工程、细菌基因工程、病毒基因工程和医药基因工程以及基因工程的安全管理等方面,分别介绍各基因工程体的研究现状、发展趋势和应用前景,详细阐述其表达系统,方便读者了解基因工程的实质及发展状况。

基因操作原理是本书的重要基础内容,不仅包括指导基因工程体构建的基因工程原理,还包括用于指导分子生物学研究的,对基因进行操作的基本原理。后者是前者乃至基因工程实践的基础,前者是后者在应用领域的延伸和发展。因此本书重点突出基因工程的最基本原理,即基因操作原理。基因操作原理部分基于分子生物学理论基础,以分子克隆为主线,介绍与此相关的载体、工具酶、文库的构建与筛选、基因的各种分析手段(包括分子杂交、PCR 和序列分析)和基因改造等研究技术和方法的原理。它承载着衔接上游分子生物学与下游狭义基因工程的任务,并为之服务。没有分子生物学的理论基础支撑,基因操作就成为无本之木;没有基因操作技术的推动,分子生物学将成为无源之水,没有任何前进的动力。

本书是在华中农业大学分子生物学系列课程讲义的基础上,经过 10 年的试用、修订、补充和完善而形成的,是国家生物物理科基地班和国家生命科学技术基地班的核心教材,同时适合生物科学、生物技术、生物工程和生物制药专业的本科生,以及遗传学、微生物学和生物化学与分子生物学专业或相关专业的研究生使用。本书的编写人员主要由教学和科研一线的年轻博士组成,具有丰富的本科教学经验和科学研究经历,保证了本教材在学术上的先进性。所有编写人员在编写过程中均表示出极大的热情,充分发挥各自教学和科研优势,使本教材能最大限度满足教学需求。

本教材的编写还得到了教育部生物科学与工程教学指导委员会和高等教育出版社的大

力支持。编写过程中主要参考了 *Molecular Cloning* 第 1 至第 3 版和 *Principles of Gene Manipulation* 第 5 版和第 6 版。生物试剂公司是基因工程技术发展的重要推动者,它们设计、发明和完善了许多技术方法。因此,本书借鉴了许多生物试剂公司的产品目录和操作手册,包括 New England Biolabs、Promage、Roche、Stratagene、Invitrogen、Qiagen、Novagen、Eastwin 和 Bio-Rad 等公司。本书还参考了许多科研论文和互联网的资料以及编写人员的科研成果。赵昌明等研究生在资料收集、图片绘制和书稿整理等方面做了大量工作。在此,对所有参与编写、提供资料和给予帮助,以及关心和支持本书编写的人员和单位表示衷心的感谢。

对于本教材的扩充参考资料、知识更新、课后练习和意见反馈,可访问教学网站:

<http://nhjy.hzau.edu.cn/kech/jycz/index.htm>

随着生命科学技术的发展,基因工程也在迅速发展。本书难以囊括所有的知识点,加之时间紧迫,作者水平有限,疏漏之处在所难免,我们诚挚地欢迎读者批评指正。

孙 明

2005 年 12 月于武汉

郑重声明

高等教育出版社依法对本书享有专有出版权。任何未经许可的复制、销售行为均违反《中华人民共和国著作权法》，其行为人将承担相应的民事责任和行政责任，构成犯罪的，将被依法追究刑事责任。为了维护市场秩序，保护读者的合法权益，避免读者误用盗版书造成不良后果，我社将配合行政执法部门和司法机关对违法犯罪的单位和个人给予严厉打击。社会各界人士如发现上述侵权行为，希望及时举报，本社将奖励举报有功人员。

反盗版举报电话：(010) 58581897/58581896/58581879

传 真：(010) 82086060

E - mail：dd@hep.com.cn

通信地址：北京市西城区德外大街4号

高等教育出版社打击盗版办公室

邮 编：100011

购书请拨打电话：(010)58581118

目 录

第一章 基因工程概述	1	三、基因操作技术的发展促进基因工程的诞生和发展	7
第一节 基因操作与基因工程	1	四、基因工程的内容	9
一、基因操作与基因工程的关系	1	第三节 基因的结构——基因操作的理论基础	9
二、基因工程的诞生与发展	2	一、基因的结构组成对基因操作的影响	10
第二节 基因工程是生物科学发展的必然产物	4	二、基因克隆的通用策略	11
一、基因是基因重组的物质基础	4		
二、DNA 的结构和功能	5		

第一篇 基因操作原理

第二章 分子克隆工具酶	15	四、T7 噬菌体 DNA 聚合酶	32
第一节 限制性内切酶	15	五、耐热 DNA 聚合酶	32
一、限制与修饰	15	六、反转录酶	32
二、限制酶识别的序列	18	七、末端转移酶	33
三、限制酶产生的末端	19	第四节 其他分子克隆工具酶	33
四、DNA 末端长度对限制酶切割的影响	23	一、依赖于 DNA 的 RNA 聚合酶	33
五、位点偏爱	24	二、连接酶	34
六、酶切反应条件	24	三、T4 多核苷酸激酶	35
七、星星活性	26	四、碱性磷酸酶	35
八、单链 DNA 的切割	26	五、核酸酶	35
九、酶切位点的引入	26	六、核酸酶抑制剂	36
十、影响酶活性的因素	27	七、琼脂糖酶	37
十一、酶切位点在基因组中分布的不均一性	27	八、DNA 结合蛋白	37
第二节 甲基化酶	28	九、其他酶	37
一、甲基化酶的种类	28	第三章 分子克隆载体	39
二、依赖于甲基化的限制系统	28	第一节 质粒载体	39
三、甲基化对限制酶切的影响	29	一、质粒的基本特性	39
第三节 DNA 聚合酶	29	二、标记基因	41
一、大肠杆菌 DNA 聚合酶 I	30	三、质粒载体的种类	43
二、Klenow DNA 聚合酶	31	第二节 λ 噬菌体载体	46
三、T4 噬菌体 DNA 聚合酶	31	一、λ 噬菌体的分子生物学	46
		二、λ 噬菌体载体的选择标记	51

三、代表性 λ 噬菌体载体	52	二、大肠杆菌/酵母菌穿梭载体 ...	95
四、 λ 噬菌体载体的克隆原理 及步骤	57	三、其他穿梭载体	95
第三节 单链丝状噬菌体载体	60	第三节 整合载体	95
一、M13 噬菌体的生物学	60	一、基因插入/基因敲除	95
二、M13 噬菌体载体	62	二、随机插入突变载体	96
三、M13 噬菌体载体的宿主菌	64	第六章 基因操作中大分子的分离和 分析	100
四、丝状噬菌体载体克隆中经 常遇到的问题	66	第一节 DNA 的分离、检测和 纯化	100
五、噬菌粒	67	一、大肠杆菌质粒 DNA 的分离 和纯化	100
六、M13KO7 辅助噬菌体	68	二、DNA 的琼脂糖凝胶电泳	102
第四章 人工染色体载体	70	三、聚丙烯酰胺凝胶电泳	102
第一节 黏粒载体	71	四、脉冲场凝胶电泳	103
一、黏粒的结构特征和用途	71	五、DNA 片段的纯化	104
二、黏粒载体的工作原理	71	第二节 RNA 的分离、检测和 纯化	105
三、黏粒克隆载体	72	一、控制潜在 RNA 酶的活性	105
四、黏粒文库的扩增和贮存	75	二、RNA 的抽提和纯化	106
五、构建黏粒文库应注意的 问题	75	三、mRNA 的纯化	106
第二节 酵母人工染色体载体	76	四、RNA 的电泳检测	107
一、YAC 载体的复制元件和 标记基因	77	第三节 分子杂交	107
二、YAC 载体的工作原理	77	一、Southern 杂交	108
第三节 细菌人工染色体载体	79	二、Northern 杂交	108
一、BAC 载体及其结构组成	79	三、Western 杂交	108
二、BAC 载体工作原理	79	四、其他分子杂交	109
第四节 P1 噬菌体载体和 P1 人 工染色体载体	80	五、探针的标记	109
一、P1 噬菌体的分子遗传特征 ...	80	第四节 RNA 作图和端点分析	112
二、P1 噬菌体载体	81	一、RNA 的 S1 核酸酶作图	112
三、P1 人工染色体载体	84	二、S1 核酸酶作图分析 mRNA 的端点	112
第五章 表达载体	86	三、引物延伸法分析 mRNA 的 端点	113
第一节 大肠杆菌表达载体	86	第五节 重组 DNA 分子导入大肠 杆菌	115
一、大肠杆菌表达载体的结构	86	一、CaCl ₂ 转化法	115
二、利用 T7 噬菌体启动子的 表达载体	88	二、电转化法	115
三、表达融合蛋白的表达载体	90	第七章 基因芯片技术	118
四、表达产物的纯化	93	第一节 生物芯片简介	118
第二节 穿梭载体	94	一、生物芯片的定义	118
一、大肠杆菌/革兰氏阳性细菌 穿梭载体	94	二、基因芯片分析流程	119

三、基因芯片技术的发展史	119	二、A/T 克隆法	139
四、基因芯片技术的特点	120	三、平末端 DNA 片段的克隆	140
第二节 生物芯片的分类	120	四、长片段 DNA 的 PCR 扩增	142
一、按载体材料分类	120	第三节 PCR 扩增未知 DNA 片段	142
二、按点样方式分类	120	一、反向 PCR	143
三、按芯片固定的生物分子类型 分类	121	二、利用接头的 PCR	144
四、按芯片使用功能分类	121	三、热不对称交错 PCR	144
第三节 基因芯片的制作	122	第四节 与反转录相关的 PCR	146
一、DNA 样品的来源	122	一、cDNA 末端的快速扩增	146
二、生物芯片的制作方法	123	二、差异显示 PCR	148
三、制作生物芯片常用的工具	124	第五节 PCR 产生 DNA 指纹	149
四、DNA 分子在刚性表面的 固定	125	一、多重 PCR	149
第四节 基因芯片的杂交及结果 分析	126	二、随机扩增多态性 DNA	150
一、探针的标记	126	三、扩增片段长度多态性	150
二、杂交	127	第六节 实时定量 PCR	151
三、芯片结果读取与扫描仪	128	一、实时荧光定量 PCR 的定量 方式	151
四、生物芯片的软件系统与数据 处理	128	二、荧光标记方式	152
第五节 基因芯片的应用	129	第九章 DNA 序列分析	155
一、基因表达分析	129	第一节 Maxam-Gilbert 化学降 解法	155
二、基因型及多态性分析	130	一、基本原理	155
三、杂交测序	130	二、化学降解测序法的基本 步骤	155
四、核酸和蛋白质相互作用 的研究	130	三、化学修饰试剂	157
五、疾病的诊断与治疗	131	四、化学降解测序法的应用	157
六、药物开发	131	第二节 Sanger 双脱氧链终 止法	157
七、在营养与食品卫生领域 的应用	131	一、基本原理	157
八、在环境科学领域中的应用	131	二、序列分析的基本步骤	160
第八章 PCR 技术及其应用	133	三、序列分析的工作模式	161
第一节 PCR 技术原理和工作 方式	133	第三节 DNA 片段序列测定的 策略	163
一、PCR 的基本原理	133	一、通用引物指导未知序列 的测定	163
二、PCR 反应体系	134	二、引物步移	163
三、PCR 反应程序	137	三、随机克隆测序	163
第二节 PCR 产物的克隆	138	四、缺失克隆测序	164
一、在 PCR 产物两端添加限制 性酶切位点	138	第四节 核苷酸序列的生物信息	

分析	165	二、cDNA 文库的构建	193
一、序列分析和生物信息学的 应用	165	三、cDNA 文库均一化处理	198
二、基因数据库和分析工具	165	四、扣除杂交 cDNA 文库	199
第十章 DNA 诱变	168	五、全长 cDNA 文库	202
第一节 随机诱变	168	六、其他 cDNA 文库	203
一、错误掺入诱变	169	第三节 基因克隆的筛选策略	205
二、盒式诱变	170	一、表型筛选法	206
三、增变菌株的诱变作用	171	二、杂交筛选和 PCR 筛选	206
四、化学诱变	171	三、免疫筛选	206
第二节 DNA 体外重组	173	四、酵母双杂交系统	207
一、DNA 洗牌法	173	五、克隆基因的验证和分析	208
二、交错延伸重组	174	第四节 DNA 文库的保存	208
三、随机引发重组	175	第十二章 基因组研究技术	211
第三节 寡核苷酸介导的定点 诱变	176	第一节 基因组遗传图谱的构建	211
一、寡核苷酸介导定点诱变的 基本流程	176	一、遗传作图标记	211
二、诱变寡核苷酸的设计	176	二、遗传作图的方法	212
三、经典 DNA 定点诱变	177	第二节 基因组物理图谱的构建	213
四、PCR 介导的定点诱变	178	一、限制性作图	213
五、野生型 DNA 的筛选排除	182	二、DNA 大片段重叠克隆的基 因组作图	213
第四节 嵌套缺失	183	三、荧光标记原位杂交作图	214
一、嵌套缺失的制备	183	四、序列标签位点作图	214
二、嵌套缺失的应用	184	第三节 基因组测序	215
第十一章 DNA 文库的构建和目的		一、大规模基因组测序方法 学改进	215
基因的筛选	187	二、基因组 DNA 序列的确定	215
第一节 基因组 DNA 文库的 构建	188	三、人类基因组测序	220
一、基因组 DNA 文库的类型和 发展	188	第四节 基因组功能分析	220
二、文库的代表性和随机性	189	一、鉴定基因组序列中的基因	220
三、基因组 DNA 文库的构建 流程	190	二、基因功能的确定	221
第二节 cDNA 文库的构建	192	三、基因组功能体现	222
一、cDNA 文库的特征和发展	192	第五节 基因组工程	223
		一、基于 Cre-loxP 重组系统 的基因组工程	223
		二、病毒基因组工程	223
第二篇 基因工程应用			
第十三章 植物基因工程	229	第二节 植物基因工程方法	230
第一节 植物基因工程的发展 现状	229	一、原生质体介导法	231
		二、基因枪法	233

三、根瘤农杆菌介导法	235	未来	270
四、基因枪法与根瘤农杆菌介 导法的比较	239	一、转基因动物的应用	270
第三节 转化子细胞的筛选	240	二、转基因动物的生物安全性	271
一、植物基因工程中的选择 基因	240	三、动物转基因的未来	272
二、报告基因	240	第十五章 酵母基因工程	274
第四节 转化体的鉴定与证实	241	第一节 酵母基因工程的发展现 状和发展趋势	274
一、PCR 检测外源基因的 整合	242	一、酵母基因工程的优点	274
二、Southern 杂交检测外源基因 的整合	242	二、酵母基因工程的发展现状	275
三、RT-PCR 检测外源基因的 表达	242	三、酵母基因工程的发展趋势	276
四、Northern 杂交检测外源基因 的表达	243	第二节 酵母表达系统	277
五、Western 杂交检测外源基因 表达的产物	243	一、酵母表达系统概述	277
第五节 植物基因工程研究的应 用和展望	243	二、常用酵母表达系统	279
一、抗性基因工程	243	第三节 酵母基因工程的应用	285
二、植物品质改良基因工程	246	一、酵母基因工程的应用情况	285
三、植物杂种优势的利用	247	二、酵母基因工程的应用举例	287
四、植物代谢工程	247	第十六章 细菌基因工程	290
第十四章 动物基因工程	249	第一节 细菌基因工程的发展现 状和发展趋势	290
第一节 动物基因工程的发展现 状与趋势	249	一、细菌基因工程的发展简史	290
一、转基因方法的升级换代	250	二、细菌基因工程的发展现状	290
二、转基因动物打破了传统的 农业生产格局	251	三、细菌基因工程的发展趋势 及前景展望	292
三、转基因动物及其产品的生 物安全性	252	第二节 细菌基因工程的表达 系统	293
第二节 转基因动物技术	252	一、细菌基因工程的表达系统	293
一、动物基因工程载体	252	二、表达载体构建原则	293
二、基因转移技术	260	三、外源基因表达的方式	294
第三节 转基因动物制备	262	四、常见细菌表达系统	295
一、转基因动物的制备程序	262	第三节 细菌基因工程的应用	298
二、转基因鉴定	266	一、农业领域的基因工程细菌	298
三、表达水平检测	268	二、食品和工业基因工程菌	302
四、转基因动物传代与检测	269	三、重组 DNA 技术生产医用抗 生素	307
第四节 转基因动物的应用与 未来	270	四、环境微生物基因工程菌的 应用	309
		第十七章 病毒基因工程	314
		第一节 病毒载体	315
		一、动物病毒载体	315
		二、植物病毒载体	323
		三、噬菌体载体	324

第二节 病毒与基因工程	324	二、核酸疫苗	348
一、基因工程病毒疫苗	325	三、RNA 干扰	350
二、病毒与基因治疗	326	四、基因治疗	351
三、病毒与生物防治	328	第十九章 基因工程产品的安全及其	
第十八章 医药基因工程	333	管理	354
第一节 基因工程药物的开发		第一节 基因工程产品的安全	
状况	333	性争论	354
一、基因工程药物的分类	333	一、DNA 重组的安全性争论	354
二、基因工程药物的发展	334	二、基因工程产品的安全性	
三、基因工程药物的产业化		争论	355
状况	335	三、与基因工程产品的安全性	
第二节 基因工程蛋白和多肽		有关的重要事件	355
药物	336	第二节 基因工程产品与人类	356
一、基因工程胰岛素	336	一、基因工程产品与人类健康	356
二、基因工程人红细胞生成素	337	二、基因工程产品与农业生产	357
三、基因工程干扰素	338	三、基因工程产品与生态平衡	357
四、基因工程疫苗	339	第三节 基因工程产品的安全性	
五、基因工程抗体	341	管理	357
第三节 基因工程抗体	341	一、基因工程产品的安全性管理	
一、抗体的结构	341	类型	358
二、天然抗体的局限性	342	二、中国基因工程产品的安全性	
三、基因工程抗体的种类	343	管理	358
第四节 核酸类药物	346	第四节 基因工程技术及其产品的	
一、反义核酸药物	346	发展前景	359
索引	361		

第一章

基因工程概述

第一节 基因操作与基因工程

一、基因操作与基因工程的关系

20 世纪是生物学发展最为迅速的时期,在 1953 年由于认识了 DNA 的双螺旋结构,从而掀起了分子生物学研究的热潮。从整个生物学研究进程或研究层次来说,其发展过程涉及到个体、组织器官、细胞和亚细胞水平。同时由于遗传学的兴起与发展,DNA 作为生命遗传信息的物质基础被确定下来,从而导致分子生物学的诞生。

分子生物学严格来说应是从分子水平或核酸水平上对生命现象和本质进行阐述和研究的生物学,如 DNA 的结构、复制、表达、调控、遗传及变异等。由于分子生物学的进一步发展,生物学的各个分支学科都延伸到了分子水平。在这种情况下,传统分子生物学就是一个包罗万象的学科,大的可以说动物、植物以及微生物的分子生物学,小的可以说某些物种的分子生物学,如水稻的分子生物学、链霉菌的分子生物学、芽胞杆菌的分子生物学等。

在这种情况下,传统的分子生物学就好像是高级生物化学,阐述基因或者 DNA(核酸)的静态和动态化学本质。目前的分子生物学正朝着发育生物学、结构生物学和遗传生物学的方向发展。如果说传统的分子生物学是静态分子生物学的话,那么这些学科可以说是动态分子生物学,即在分子水平(核酸)上,阐述生物的生长、分化、死亡以及遗传和变异的内在规律。

在阐述生物的基本规律过程中,均涉及在 DNA 水平上的操作,即通常所说的分子生物学研究。分子生物学研究是通过基因操作(gene manipulation)以及基因重组(recombination)来实现的。同时,对基因的操作不仅能用于研究生物的本质和规律,同样也能够用来改造生物,并为人类的需求服务。我们把通过基因操作来定向改变或修饰生物体或人类自身,并具有明确应用目的的活动称为基因工程。基因工程是通过对基因的操作并实现基因重组来完成的,被操作的对象一般会发生遗传信息或遗传性状的变化,对大多数对象来说这种变化可以稳定遗传给下一代。

基因操作是一个外延较广的概念,是指对基因进行分离、分析、改造、检测、表达、重组和转移等操作的总称。对基因的操作可以是静态的也可以是动态的。仅仅将基因作为一段 DNA 分子来操作,进行分析、修饰或转移属于生物化学或遗传学的范畴,只有当基因能够进行大量、可操作性的扩增时才进入基因操作的范畴。基因的扩增可以是体内扩增也可以是

体外扩增,前者的基础就是基因重组和基因克隆(gene cloning),所以基因操作与基因克隆是密不可分的。PCR(聚合酶链反应,polymerase chain reaction)技术的应用为基因的体外扩增提供了强大工具。基因的扩增又是通过复制来实现的,因此在整个基因操作过程中,时时伴随着复制事件的发生。对复制本质的深刻理解,是认识基因工程和实施基因工程的有力保证。

基因工程是通过基因重组来实现的,但基因重组并不都是严格意义上的基因工程。基因重组是基因操作范畴的概念,包括实验研究和生物技术中的基因重组事件。而基因工程则专指为实践应用而进行的基因重组事件,产生的基因工程体可以用作生物反应器,如生产酶或活性物质等,也可以是改变了生物性状的工程体,如改良生物体的品质。这些改良的品质包括获得杀虫或抗病活性,提高杀虫、抗病、固氮和免疫等活性,产生更多的代谢产物,或产生新型代谢产物等。通过基因工程技术产生的基因工程体一般可以产生经济或社会效益,或具有明显的产生经济或社会效益的潜力。

因此,基因工程可用具体的生产实践作为例子,其内容涉及基因工程体的构建方式和策略,包括目的基因、载体、基因转移方式和受体的选择,预期产生的效果,目前已经获得的种类,进入批量生产的种类和数量等。

二、基因工程的诞生与发展

基因工程是从基因重组开始的。第一个创造重组 DNA 分子的是美国斯坦福大学的 Paul Berg 及其同事,他们于 20 世纪 70 年代早期用限制性内切酶将大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E. coli*)的 DNA 切开,并艰难地与病毒 DNA 连接,从而获得第一个重组 DNA 分子,由此拉开了基因重组的序幕。但这个重组 DNA 分子的产生还不是生物学意义上的基因重组,只是在化学水平上将不同来源的 DNA 进行了重新组合,并没有实现生物学意义上的可遗传和可增殖的目的。Stanley Cohen 和 Herbert Boyer 在基因重组方面做出了突出贡献,其主要的基础工作源自 *EcoR* I 限制性内切酶的分离以及质粒载体的构建。Boyer 分离的 *EcoR* I 限制性内切酶可以将 DNA 切割成具有黏性末端的片段,按照现在的认识,具有黏性末端的 DNA 片段很容易连接。Cohen 对大肠杆菌的质粒(plasmid)做了大量研究,并在 1972 年构建了具有实用价值的质粒载体,例如用其名字的缩写命名的 pSC101。同时提出了作为克隆载体的三大要素的雏形,即可用的酶切位点,如单一的 *EcoR* I 位点;复制单位,能够指导载体在宿主细胞中复制;具有选择标记,如抗生素抗性标记。

当时他们发现质粒还有一个重要特征,就是能够转移到宿主细胞中去。一旦质粒进入细胞,单个质粒就会自我复制出大量的复制体。如果质粒上带有外源基因,外源基因就可以随质粒的复制而得到增殖。同时带有质粒的细菌细胞也会增殖,每 20 min 左右就会增殖一次,从而产生大量的后代,这样一来位于质粒上的外源基因也就被克隆了。从这样一个亲本细胞增殖而来的细胞群体就称为一个克隆(clone)。

在这一思想的指导下,Cohen 和 Boyer 于 1973 年开展了两个具有划时代意义的基因重组实验(图 1-1)。首先,将质粒 pSC101 与质粒 pSC102 连接起来并转移到大肠杆菌。由于这两个质粒分别带有四环素抗性基因和卡那霉素抗性基因,该重组大肠杆菌获得了同时抗这两种抗生素的遗传性状。其次,他们把蟾蜍的 DNA 用 *EcoR* I 酶切以后将编码核糖体 RNA 的基因片段与质粒 pSC101 连接,并转移到大肠杆菌中去。实验结果表明,重组大肠杆菌能够产生蟾蜍的 RNA,这说明真核基因能在原核细胞中表达。这两个实验是人类第一次真正实现的基因工程实践。

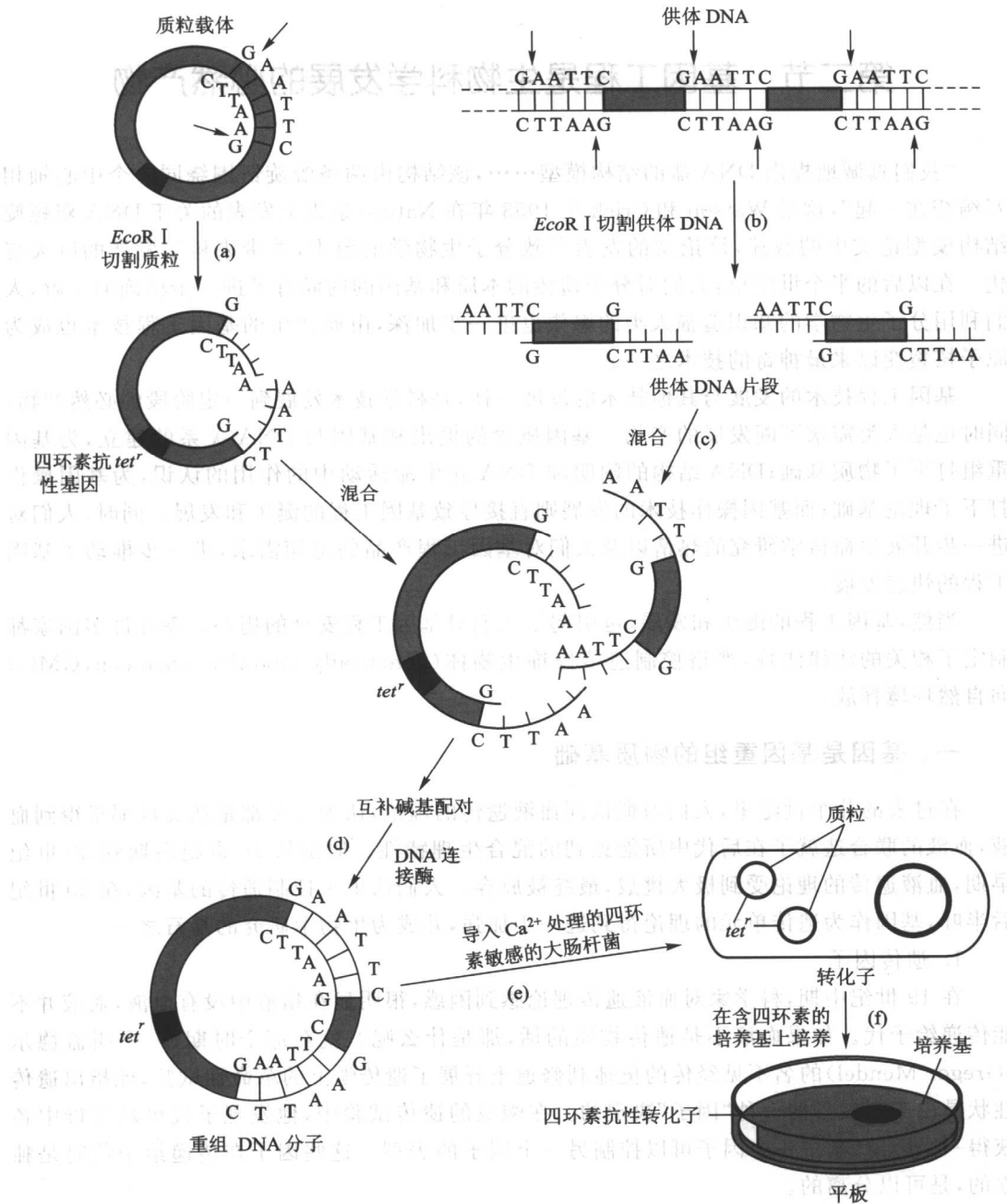


图 1-1 1973 年 Cohen 和 Boyer 开展的基因重组实验示意图

此后基因工程迅速发展。1981年第一个转基因哺乳动物小鼠在美国问世；1982年基因工程胰岛素商品在美国由Eli Lilly公司投向市场，同年转基因烟草获得成功并能按孟德尔方式遗传给后代；1985年基因工程微生物杀虫剂通过美国环保署的审批；1990年基因治疗开始进入临床试验。现在基因工程技术已经广泛用于生物的遗传改良、生物反应器、基因治疗和基因疫苗等，并带来了巨大的科学价值和经济效益。

第二节 基因工程是生物科学发展的必然产物

“我们真诚地提出 DNA 盐的结构模型……,该结构由两条螺旋链围绕同一个中心轴相互缠绕在一起”,这是 Watson 和 Crick 于 1953 年在 Nature 杂志上发表的关于 DNA 双螺旋结构模型论文中的叙述,该论文的发表导致分子生物学的诞生,并带来科学发展的巨大变化。在以后的半个世纪里,人们对分子遗传的本质和基因的内涵有了进一步精确的了解,人们利用分子生物学的知识造福人类的愿望也进一步加深,由此产生的基因工程技术也成为原子核裂变以来最神奇的技术之一。

基因工程技术的发展与其他技术的发展一样,是科学技术发展到一定阶段的必然产物,同时也是人类需求不断发展的产物。基因概念的提出和基因与 DNA 关系的建立,为基因重组打下了物质基础;DNA 结构的阐明和 DNA 在生命活动中的作用的认知,为基因操作打下了理论基础;而基因操作技术的发展则直接导致基因工程的诞生和发展。同时,人们对进一步开展生命科学研究的热情以及人们对基因工程产品的迫切需求,进一步推动了基因工程的快速发展。

当然,基因工程的诞生和发展,也引起了人们对基因工程安全的担心。现在许多国家都制定了相关的法律法规,严格控制遗传修饰生物体(genetically modified organism, GMO)向自然环境释放。

一、基因是基因重组的物质基础

在过去的几个世纪里,人们习惯认同血液遗传的理论,认为人类都是从父母那里得到血液,血液的联合造就了在后代中所能见到的混合生理特性。但是从 19 世纪后期到 20 世纪早期,血液遗传的理论受到极大挑战,最终被放弃。人们认识了控制遗传的基因,在 20 世纪后半叶,基因作为遗传单元的理论得到进一步加强,并成为生物学研究的基石之一。

1. 遗传因子

在 19 世纪中期,科学家对血液遗传理论感到困惑,很明显在精液中没有血液,血液并不能传递给子代。如果血液不是遗传物质的话,那是什么呢?就在那个时期,一个叫孟德尔(Gregor Mendel)的名不见经传的奥地利修道士开展了遗传学上的革命性试验,他指出遗传性状是由来自父母的一种“因子”决定的。在豌豆的遗传试验中,他发现子代可从父母中各获得一个因子,其中一个因子可以控制另一个因子的表型。这些因子在传递给子代时是独立的,是可以分离的。

尽管这些理论在当时并不被看好,但在 20 世纪初,孟德尔的试验得到了重复和验证。美国科学家 W. H. Sutton 于 1902 年根据孟德尔定律和细胞生物学家们的观察,猜测这个遗传因子就是染色体。1910 年哥伦比亚大学的摩尔根(Thomas Hunt Morgan)的试验表明果蝇眼睛的颜色和性别由单一一个染色体决定,也就是说一条染色体决定一个性状。

但是单一的染色体假说并不能解释所有的性状,遗传学家倾向于认为染色体上的“基因”(gene)是遗传因子,从而根据 Willard Johnsen 的提议第一次引出了基因的概念。

1869 年瑞士研究人员 Johnn Miescher 从细胞中分离到细胞核,并用核素(nuclein)一词来描述细胞核的组成。20 世纪 20 年代是染色体和核酸化学发展迅速的时期,Phoebus Levene 证实核素的化学本质就是 DNA;德国化学家 Robert Feulgen 设计的富尔根染料可

以将 DNA 染成粉红色,从而可以对 DNA 在细胞中定位并可观察 DNA 在细胞不同生长期数量的变化;Alfred Mirsky 及其同事发现除了精子和卵子细胞外,所有体细胞中的 DNA 含量实际上是一样的,而且这些生殖细胞中的 DNA 含量正好是非生殖细胞的一半。所有这些试验进一步证明染色体是由脱氧核糖核酸,即 DNA 组成的。

2. DNA 与遗传的关系

在 20 世纪 20 年代末期,有关基因是遗传因子,基因是由 DNA 组成的理论已经变得越来越明确,但提供的证据都是间接的或通过实验观察提出的猜测。1928 年,一名英国的卫生官员 Frederick Griffith 用细菌转化(transformation)所做的工作,报告了一个令人惊奇的结果,即细菌的某些性状可以通过与另一种细菌的碎片混合而发生改变,以后 Oswald Avery 及其同事证实碎片中的转化物质就是 DNA。1952 年 Alfred Hershey 和 Martha Chase 设计了著名的 Hershey-Chase 实验,通过用噬菌体感染细菌表明 DNA 可以独立指导子代噬菌体的复制,噬菌体 DNA 包含了合成噬菌体蛋白和噬菌体 DNA 的遗传信息,从而直接证明 DNA 是遗传物质。

二、DNA 的结构和功能

在 20 世纪 50 年代,DNA 是遗传分子已经变得越来越明确了。随着证据的大量累积,科学家们意识到必须知道 DNA 的结构,只有知道 DNA 的结构才能解释 DNA 在遗传过程中是如何发挥功能的,才能进一步洞察在细胞增殖过程中 DNA 是如何复制自己的。由于遗传和细胞增殖是生物学中最基本的概念,而且,如果 DNA 确实与此密切相关,那么有理由进一步开展全面彻底的工作去研究 DNA 的性质。然而这些工作并没有如期进行,部分原因是科学家们并没有认识到 DNA 在遗传和细胞增殖中的作用,所做的研究只是试探性的,并没有针对性。相关的数据在累积,但速度很慢。1953 年 Watson 和 Crick 通过收集已有的资料和数据,根据直觉和想像,提出了 DNA 的双螺旋结构模型,并将结果发表在 *Nature* 杂志上(图 1-2)。DNA 结构的解析是 20 世纪最伟大的成就之一。在生物学的发展史上有许多重要的里程碑,如生命的细胞本质、疾病的病原学说、生物的进化学说、遗传的化学本质,其中 DNA 结构的解析是遗传的化学本质的核心内容。

1. DNA 的结构

(1) DNA 的组成成分 Phoebus Levene 及其同事在 DNA 中鉴定出 3 种成分:① 五碳糖,即脱氧核糖(deoxyribose);② 磷酸基团(phosphate group);③ 4 种含氮碱基,即腺嘌呤(adenine)、胸腺嘧啶(thymine)、鸟嘌呤(guanine)和胞嘧啶(cytosine)。这 3 种成分联合组成核苷酸(nucleotide),DNA 就是由脱氧核苷酸组成的链状结构。在不同的生物体中,DNA 的碱基数量是不同的。但是不管 DNA 的来源如何,腺嘌呤的数量总是与胸腺嘧啶的数量相等,鸟嘌呤的数量总是与胞嘧啶的数量相等。

(2) DNA 的三维结构 通过使用 Franklin 和 Wilkins 获得的 X-衍射照片并应用其他的数据资料,Watson 和 Crick 于 1953 年推导出 DNA 的结构是双链缠绕的双螺旋结构(图 1-2),其中脱氧核糖和磷酸基团彼此交错连接在一起形成链状结构,碱基在双链内部相互配对排列,腺嘌呤碱基与胸腺嘧啶碱基配对,鸟嘌呤碱基与胞嘧啶碱基配对。碱基之间通过氢键配对。

2. DNA 的复制

DNA 双螺旋结构有助于揭示 DNA 的复制方式。由于碱基的严格配对,其中一条链的序列可以决定另一条链的序列,任何一条链都是另一条链的镜像互补链。1955 年 Watson