

生物科学
生物技术
系 列

GENETIC ENGINEERING

普通高等教育“十三五”规划教材

基因工程

金红星 编著



化学工业出版社

普通高等教育“十三五”规划教材

基因工程

金红星 编著



化学工业出版社

· 北京 ·

本书主要阐述了基因、工具酶、载体、重组 DNA 分子的转化与重组子筛选、大肠杆菌基因工程、酵母菌基因工程、核酸的分离纯化与目的基因的克隆、基因组、蛋白质工程和途径工程等内容。

本书的特色：①讲解了基因和基因组；②重点讲述了原核微生物的代表——大肠杆菌和真核微生物的代表——酵母菌的基因工程；③简要介绍了第二代基因工程——蛋白质工程和第三代基因工程——途径工程；④介绍了实验过程中的注意事项和实例，在附录中罗列了一些补充内容；⑤详细讲述了三代 DNA 测序和多种基因组定点编辑（同源重组、RecET/Red 重组系统、ZFN、TALEN 和 CRISPR-Cas 系统）的原理；⑥详细讲述了分离纯化核酸与克隆基因的基本原理。

本书是针对生物工程专业的本科生编写的教材，可供生物技术和生物科学专业的本科生使用，也可供研究生和有关科研人员参考。

图书在版编目 (CIP) 数据

基因工程/金红星编著. —北京：化学工业出版社，
2016.8
普通高等教育“十三五”规划教材
ISBN 978-7-122-27442-7

I. ①基… II. ①金… III. ①基因工程-高等学校-教材
IV. ①Q78

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2016) 第 143320 号

责任编辑：魏 巍 赵玉清
责任校对：吴 静

文字编辑：焦欣渝
装帧设计：关 飞

出版发行：化学工业出版社（北京市东城区青年湖南街 13 号 邮政编码 100011）
印 装：三河市延风印装有限公司
787mm×1092mm 1/16 印张 22 字数 566 千字 2016 年 10 月北京第 1 版第 1 次印刷

购书咨询：010-64518888（传真：010-64519686） 售后服务：010-64518899
网 址：<http://www.cip.com.cn>
凡购买本书，如有缺损质量问题，本社销售中心负责调换。

定 价：39.80 元

版权所有 违者必究

谨以此书

献给母校——东北师范大学、
东北农业大学和哈尔滨工业大学

前 言

1973年,美国的科恩(S. Cohen)等将体外重组的DNA分子导入到大肠杆菌进行了复制,从此拉开了基因工程的序幕。基因工程在过去的40多年中以惊人的速度飞速发展,其应用成果已经渗透到农业、工业、医学、药学、国防、能源和环保等诸多领域,成为生物学中发展速度最快、创新成果最多、应用前景最广的一门核心技术。基因工程课也已成为国内外高校生物工程(bioengineering)、生物技术(biotechnology)和生物科学(bioscience)专业本科生的一门专业主干课程。

基因工程是以遗传学、生物化学和分子生物学等学科为基础,引入工程学的一些概念,通过周密的实验设计,进行精确的实验操作,高效率地达到预期的目标。为了配合高等学校基因工程的教学,并促进我国生物工程、生物技术相关专业人才的培养,特此编写了这部教材。本书具有以下几个特色。

① 教育部的生物工程专业(083001)本科教学质量国家标准中要求基因工程课程为32学时,而很多高校的生物工程专业不讲授遗传学,且分子生物学的学时短,因此在基因工程中有必要讲解基因和基因组的相关内容,从而为学生今后的学习和应用奠定坚实的理论基础。

② 开设生物工程的高校主要是工科院校,而他们多以微生物作为研究对象,因此重点讲述了原核微生物的代表——大肠杆菌和真核微生物的代表——酵母菌的基因工程。

③ 简要介绍了第二代基因工程——蛋白质工程(有时称为DNA诱变)和第三代基因工程——途径工程,为遗传育种工作打下理论基础。

④ 在每个基因操作单元都介绍了实验过程中的注意事项,大肠杆菌和酵母菌的基因工程里列举了实例,在附录中罗列了细菌和酵母的遗传命名指南、常见的克隆方法、工具酶和PCR的相关问答等内容。

⑤ 在基因组中详细讲述了三代DNA测序和多种基因组定点编辑(同源重组、RecET/Red重组系统、ZFN、TALEN和CRISPR-Cas系统)的原理,为遗传育种工作奠定了理论基础。

⑥ 详细讲述了分离纯化核酸与克隆基因的基本原理。

编者希望本书能够成为生物工程专业本科生的教科书,并能够成为生物技术和生物科学专业本科生和相关专业研究生、工作者的参考书。

在编写过程中编者参考了一些前人的成果与论述,同时也得到了许多朋友和家人的支持,在此表示衷心的感谢!

河北工业大学化工学院的成文玉为本书绘制插图出力不少,在此表示衷心感谢!

编者怀着一种为基因工程的教学工作尽心尽力的心情编写了本书。但是,编者的水平有限,加之时间仓促,书中难免存在疏漏之处,恳请读者和同行批评指正!

编 者

2016年春于北运河畔

目 录

第 1 章 绪论	1
1.1 基因工程的基本概念	1
1.2 基因工程的理论和技术	1
1.2.1 基因工程所依赖的核心理论	1
1.2.2 基因工程所依赖的核心技术	2
1.3 基因工程的建立与发展	2
1.3.1 基因工程的建立	2
1.3.2 基因工程的发展	3
1.4 基因工程的产业化及应用	6
1.4.1 产业化	6
1.4.2 基因工程的应用	7
1.5 转基因生物的安全性与伦理	9
1.5.1 转基因生物的安全性	9
1.5.2 转基因生物的伦理	11
1.6 应用事例	12
1.6.1 问题的提出	12
1.6.2 生化产品生产中的问题	12
1.6.3 基因工程的用途	13
1.6.4 实例	13
第 2 章 基因	14
2.1 “遗传因子”——生物性状遗传的符号	14
2.2 基因——位于染色体上的遗传功能单位	14
2.2.1 等位基因	14
2.2.2 复等位基因	15
2.3 顺反子——一个基因一条多肽	17
2.4 操纵子——遗传信息传递和表达的统一体	18
2.5 超基因	20
2.6 假基因	21
2.7 断裂基因	22
2.7.1 RNA 剪接	22
2.7.2 内含子的类型	24

2.8	重叠基因	27
2.9	可动基因	29
2.9.1	<i>Ac-Ds</i> 系统	29
2.9.2	插入序列	29
2.9.3	转座子	31
2.9.4	<i>P</i> 因子	34
2.9.5	反转录转座子	35
2.10	癌基因和抑癌基因	36
2.11	染色体外基因	37
2.11.1	质粒	37
2.11.2	线粒体基因	37
2.11.3	叶绿体基因	39
2.11.4	非孟德尔遗传	39

第3章 工具酶 41

3.1	限制性核酸内切酶	41
3.1.1	宿主的限制和修饰现象	41
3.1.2	限制性核酸内切酶的类型	42
3.1.3	限制性核酸内切酶的命名	46
3.1.4	影响限制性核酸内切酶活性的因素	46
3.1.5	限制性核酸内切酶对 DNA 的消化作用	48
3.1.6	限制性核酸内切酶反应的终止	49
3.1.7	限制性核酸内切酶酶切反应的操作步骤和注意事项	49
3.2	DNA 聚合酶	50
3.2.1	DNA 聚合酶 I (<i>E. coli</i>)	51
3.2.2	大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片段	52
3.2.3	T4DNA 聚合酶	52
3.2.4	依赖于 RNA 的 DNA 聚合酶	53
3.2.5	T7DNA 聚合酶	53
3.2.6	修饰的 T7DNA 聚合酶	53
3.3	DNA 连接酶	54
3.3.1	大肠杆菌和 T4 噬菌体的 DNA 连接酶	54
3.3.2	影响连接反应的因素	55
3.3.3	DNA 片段在体内和体外的连接——黏性末端的连接	55
3.3.4	平齐末端的连接	57
3.3.5	连接反应的注意事项	59
3.4	DNA 及 RNA 的修饰酶	59
3.4.1	末端脱氧核苷酸转移酶	59

3.4.2	T4 多核苷酸激酶	60
3.4.3	碱性磷酸酶	61
3.5	核酸外切酶	61
3.5.1	核酸外切酶 VII	62
3.5.2	核酸外切酶 III	62
3.5.3	λ 核酸外切酶和 T7 基因 6 核酸外切酶	63
3.6	单链核酸内切酶	63
3.6.1	S1 核酸酶	63
3.6.2	Bal31 核酸酶	64
3.7	细胞裂解酶	65
3.7.1	溶菌酶	65
3.7.2	蛋白酶 K	65
3.7.3	纤维素酶	65
3.7.4	其他裂解酶	66
3.8	其他	66
3.8.1	琼脂糖酶	66
3.8.2	核酸酶抑制剂	66

第 4 章 载体 67

4.1	质粒载体	67
4.1.1	质粒的一般生物学特性	67
4.1.2	质粒载体的选择	71
4.1.3	常用的大肠杆菌质粒载体	72
4.2	噬菌体载体	79
4.2.1	单链噬菌体载体	80
4.2.2	双链噬菌体载体	83
4.3	柯斯质粒载体	89
4.3.1	柯斯质粒载体的组成	89
4.3.2	柯斯质粒载体的特点	89
4.3.3	柯斯质粒载体的应用	90
4.4	噬菌粒载体	91
4.4.1	噬菌粒载体的概念	91
4.4.2	pUC118 和 pUC119 噬菌粒载体	92
4.4.3	pBluescript 噬菌粒载体	92
4.5	人工染色体载体	93
4.5.1	酵母人工染色体载体	93
4.5.2	细菌人工染色体载体	95
4.5.3	P1 人工染色体载体	96

第 5 章 重组 DNA 分子的转化与重组子筛选	98
5.1 DNA 分子的转化与扩增	98
5.1.1 DNA 重组转化的基本概念	98
5.1.2 受体细胞的选择	99
5.1.3 转化方法	101
5.1.4 转化率及其影响因素	104
5.1.5 转化细胞的扩增	105
5.1.6 进行转化时的注意事项	105
5.2 重组体克隆的筛选与鉴定	105
5.2.1 遗传检测法	106
5.2.2 物理检测法	110
5.2.3 核酸杂交法	112
5.2.4 PCR 检测法	115
5.2.5 克隆基因定位法	115
5.2.6 测序检测法	117
5.2.7 外源基因表达产物检测法	117
第 6 章 大肠杆菌基因工程	120
6.1 外源基因在大肠杆菌高效表达的原理	120
6.1.1 启动子	120
6.1.2 终止子	125
6.1.3 核糖体结合位点	126
6.1.4 密码子	127
6.1.5 质粒拷贝数	128
6.2 大肠杆菌工程菌的构建策略	130
6.2.1 包涵体型异源蛋白的表达	130
6.2.2 分泌型异源蛋白的表达	133
6.2.3 融合型异源蛋白的表达	135
6.2.4 寡聚型异源蛋白的表达	138
6.2.5 整合型异源蛋白的表达	142
6.2.6 蛋白酶抗性或缺陷型表达系统的构建	143
6.3 重组异源蛋白的体外复性活化	145
6.3.1 蛋白质变性的动力学原理	145
6.3.2 折叠中间状态分子的集聚作用	146
6.3.3 包涵体的溶解与变性	147
6.3.4 异源蛋白的复性与重折叠	149
6.4 基因工程菌的遗传不稳定性及其对策	154

6.4.1	基因工程菌遗传不稳定性的表现与机制	155
6.4.2	改善基因工程菌不稳定性的策略	156
6.5	大肠杆菌基因工程的案例	158
第7章	酵母菌基因工程	163
7.1	酵母菌的宿主系统	163
7.1.1	提高重组蛋白表达产率的突变宿主菌	163
7.1.2	抑制超糖基化作用的突变宿主菌	164
7.1.3	减少泛素依赖型蛋白降解作用的突变宿主菌	164
7.1.4	内源性蛋白酶缺陷型的突变宿主菌	165
7.2	酵母菌的载体系统	166
7.2.1	酿酒酵母的 2μ 环状质粒	166
7.2.2	乳酸克鲁维酵母的线型质粒	167
7.2.3	果蝇克鲁维酵母的环状质粒	168
7.2.4	含ARS的YRp和YEp	169
7.2.5	含CEN的YCp	169
7.2.6	穿梭载体	170
7.3	酵母菌的转化系统	171
7.3.1	酵母菌的转化程序	172
7.3.2	转化质粒在酵母细胞中的命运	172
7.3.3	用于转化子筛选的标记基因	173
7.4	酵母菌的表达系统	175
7.4.1	酵母菌启动子的基本特征与选择	175
7.4.2	酵母菌启动子的可调控表达系统	176
7.4.3	外源基因在酵母菌中表达的限制因素	178
7.4.4	酵母菌表达系统的选择	178
7.5	酵母菌基因工程的案例	180
第8章	核酸的分离纯化与目的基因的克隆	184
8.1	核酸的分离纯化	184
8.1.1	核酸分离提取的原则	184
8.1.2	核酸的分离提取	185
8.1.3	质粒DNA的提取	188
8.1.4	RNA的提取	189
8.1.5	核酸的检测	190
8.2	目的基因的克隆	192
8.2.1	鸟枪法	192
8.2.2	cDNA法	195

8.2.3	PCR 扩增法	198
8.2.4	化学合成法	208
8.2.5	基因文库的构建	210
第 9 章	基因组	214
9.1	基因组剖析	214
9.1.1	基因组序列复杂性	214
9.1.2	原核生物基因组	216
9.1.3	真核生物基因组	220
9.2	基因组测序	227
9.2.1	DNA 测序方法	227
9.2.2	基因组测序	234
9.2.3	序列组装	236
9.3	基因组序列注释	239
9.3.1	搜寻基因	239
9.3.2	基因注释	246
9.3.3	基因功能检测	248
9.3.4	高通量基因功能研究方法	249
9.4	功能基因组学	251
9.4.1	组学简介	251
9.4.2	转录物组	251
9.4.3	蛋白质组	252
9.4.4	基因本体	253
9.5	基因组表观遗传	256
9.5.1	什么是表观遗传	256
9.5.2	位置效应	258
9.5.3	DNA 甲基化	259
9.5.4	染色体重建	259
9.6	基因组编辑	260
9.6.1	遗传重组	260
9.6.2	基因敲除	265
9.6.3	新一代的基因组定点编辑技术	269
第 10 章	蛋白质工程	282
10.1	蛋白质工程的基本概念	282
10.1.1	蛋白质工程的基本特征	282
10.1.2	蛋白质工程的研究内容 and 应用	283
10.1.3	蛋白质工程实施的必要条件	283

10.2	基因的体外定向突变	284
10.2.1	局部随机掺入法	284
10.2.2	碱基定点转换法	285
10.2.3	部分片段合成法	286
10.2.4	引物定点引入法	287
10.2.5	PCR 扩增突变法	289
10.3	基因的体外定向进化	290
10.3.1	易错 PCR	291
10.3.2	DNA 改组	291
10.3.3	体外随机引发重组	291
10.3.4	交错延伸	292
10.3.5	过渡模板随机嵌合生长	292
10.3.6	渐增切割杂合酶生成	294
10.3.7	同源序列非依赖性蛋白质重组	295
10.3.8	突变文库的筛选模型	296
10.4	蛋白质工程的设计思想与应用	297
10.4.1	提高蛋白质或酶的稳定性	297
10.4.2	减少重组多肽链的错误折叠	297
10.4.3	改善酶的催化活性	297
10.4.4	消除酶的被抑制特性	297
10.4.5	修饰酶的催化特异性	298
10.4.6	强化配体与其受体的亲和性	298

第 11 章 途径工程 299

11.1	途径工程的基本概念	299
11.1.1	途径工程的基本定义	299
11.1.2	途径工程的基本过程	300
11.1.3	途径工程的基本原理	302
11.2	途径工程的研究战略	303
11.2.1	在现存途径中提高目标产物的代谢流	303
11.2.2	在现存途径中改变物质流的性质	304
11.2.3	利用已有途径构建新的代谢旁路	305
11.3	初级代谢的途径工程	305
11.3.1	发酵生产乙醇的基本战略	306
11.3.2	酵母菌属乙醇发酵途径的改良	308
11.3.3	高产乙醇的重组大肠杆菌的构建	309
11.3.4	直接利用太阳能合成乙醇的光合细菌途径设计	311
11.4	次级代谢的途径工程	312

11.4.1	提高次级代谢产物的手段	312
11.4.2	红霉素（聚酮类抗生素）的生物合成	313
11.4.3	提高红霉素 A 产量的策略	315

附录	318
-----------------	-----

参考文献	336
-------------------	-----

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 50 年,但这一学科却获得了突飞猛进的发展。

1.1 基因工程的基本概念

基因工程 (gene engineering), 也称为基因修饰 (genetic modification), 是指按照人们的设计, 用生物技术 (biotechnology) 直接操作生物的基因组。首先分离目的基因或人工合成外源基因, 在体外将外源基因插入到载体分子中, 成为重组 DNA, 再导入到宿主细胞内, 进行扩增和表达。此过程所涉及的方法学称为重组 DNA 技术 (recombinant DNA technology), 也称为分子克隆 (molecular cloning) 或基因操作 (gene manipulation)。

基因工程的操作过程可简化为: 切、接、转、增、检。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筛选和鉴定转化细胞, 获得使外源基因高效稳定表达的基因工程菌或细胞, 简称检。

通过基因工程技术改变了遗传物质的生物称为遗传修饰生物 (genetically modified organism, GMO)。转基因生物 (transgenic organism) 是指染色体基因组中含有外源基因的生物, 而遗传修饰生物除可能含有外源基因外, 还包括基因组中的基因被修饰, 例如基因敲入 (gene knock-in)、基因敲除 (gene knock-out)、基因敲落 (gene knock-down)、基因打靶 (gene targeting)、外显子删除和定点突变 (point mutation) 等。所以遗传修饰生物的范围更为广泛。

基因工程特点: ①不受亲缘关系的限制, 即打破了物种的界限; ②可以定向地改变生物的遗传特性; ③增加目的基因的剂量。

1.2 基因工程的理论和技术

1.2.1 基因工程所依赖的核心理论

基因工程所依赖的核心理论是: ①1953 年美国的 J. D. Watson 和 F. H. C. Crick 建立的

DNA 的双螺旋模型；②1946 年美国的 J. L. Lederberg 等相继发现在细菌和噬菌体中遗传物质横向传递的一系列现象和规律；③1961 年法国的 F. Jacob 和 J. Monod 建立的操纵子模型；④美国的 M. W. Nirenberg (1964 年) 和 H. G. Khorana (1967 年) 分别破译了全部遗传密码子。

1.2.2 基因工程所依赖的核心技术

基因工程所依赖的核心技术是：①1977 年英国 F. Sanger 等建立的 DNA 测序技术；②一系列重要工具酶的发现，特别是 1956 年美国 A. Kornberg 发现 DNA 聚合酶、1966 年 B. Weiss 和 C. C. Richardson 分离出 DNA 连接酶、1968 年美国 H. O. Smith 发现 II 类限制性内切核酸酶、1970 年 H. M. Temin 等发现反转录酶；③1973 年 S. N. Cohen 和 H. W. Boyer 等建立的质粒转化技术；④1987 年由美国的 K. B. Mullis 等建立的 PCR 体外扩增技术；⑤1989 年 M. R. Capecchi 等建立的“基因打靶”技术等使基因工程更是如虎添翼；⑥基因组编辑核酸酶的应用，能够定位和准确修饰生物基因组。这为研究基因功能、基因治疗创造了新的途径。

1.3 基因工程的建立与发展

1.3.1 基因工程的建立

基因工程的产生是生命科学发展的必然。自从遗传学诞生之后，随着对基因功能不断深入的研究，人们不仅想了解基因，而且还希望能改变它们，从而提高农作物的产量，改善生物体的性状，甚至用来防治遗传缺陷。早在 1927 年，H. J. Muller 就用 X 射线照射果蝇，诱导果蝇发生了突变。这是人类第一次主动改变生物体基因，但这种诱变及诱变育种仅能提高基因的突变频率，而不能按照人们的意愿改变基因突变的方向，得到预期的结果。

在 20 世纪 60 年代后期，分子遗传学的帷幕已经拉开，人们逐步掌握了微生物众多基因的功能，甚至可将噬菌体像手表一样进行拆卸和组装。因此，一些遗传学家们误认为遗传学的发展已达到了“巅峰状态”，似乎很难有新的突破，因此有的遗传学家便改弦更张，转移到其他生命科学领域去寻找新的契机。例如，1955 年建立了染色体的精细作图方法和互补测验，并提出了“顺反子”概念的美国著名遗传学家 S. Benzer 于 20 世纪 60 年代后期改变了原来的研究方向，从事研究昆虫的神经生物学。此时，遗传学似乎已处在一个“山重水复疑无路”的状态。正当遗传学家们感到彷徨的时期，基因工程异军突起，石破天惊，震撼了整个世界，也冲击了人们的生活和观念，使遗传学的发展进入了一个“柳暗花明又一村”的新时代。

体外重组 DNA 这个设想首先是由斯坦福大学的 P. Lobban 于 1970 年提出的。1971 年，R. H. Jensen 等率先运用末端转移酶 (terminal transferase) 在试管中将寡聚“A”或寡聚“T”连接到 DNA 分子末端上；但这样的互补端还是无法以共价键连接。1972 年，斯坦福大学的 P. Lobban 和 D. Kaiser 采用 λ 噬菌体的外切酶可回切噬菌体 P22 DNA 5' 端而造成 3' 端突出 (3'-extension)；他们运用核酸外切酶 III 及 DNA 聚合酶 I 将噬菌体 P22 的两段 DNA 成功地连接了起来 (论文发表于 1973 年)。

1972 年，美国斯坦福大学的 P. Berg 采用了与 P. Lobban 等的相同方法，将猿猴病毒 (simian virus 40, SV40) 的 DNA 和 λ 噬菌体的 DNA 片段及大肠杆菌乳糖发酵相关基因 (λ svgal) 的操纵子 DNA 三者进行了重接，开创了体外重组之先河，标志着一个新的科学时

代的到来。由于此项杰出贡献, P. Berg 获得 1980 年的诺贝尔化学奖。

P. Berg 等的工作方法和策略与 P. Lobban 的完全相同, 所不同的是 P. Lobban 的工作是将同种生物的 DNA 进行了“体外连接”, 称为顺化基因 (cisgenic) 连接, 而不是转基因 (transgenic) 重组, 后者是指将不同物种的外源基因转入受体细胞的过程。而 Berg 等的工作是首次在体外将不同物种的 DNA 进行了重组, 与 P. Lobban 的工作相比, 有了本质上的飞跃和升华。尽管如此, P. Lobban 的创新思维仍然是功不可没的。

1973 年, S. N. Cohen 和 H. W. Boyer 等用限制性内切核酸酶 *EcoR* I 切割含有抗四环素基因的质粒 pSC101 和来自鼠伤寒沙门氏菌的质粒 RSF1010 (带有抗链霉素和磺胺基因), 用连接酶进行拼接, 构建成为一个新的杂种质粒。用它转化大肠杆菌后, 转化子既能抗四环素, 又能够抗链霉素, 从而建立了转化技术。1974 年, 他们又将非洲爪蟾的 DNA 切成片段, 连接到质粒 pSC101 上并转移到大肠杆菌中, 使体外重组技术又向前推进了一步, 基因工程技术从此诞生, 遗传学也随之发生了新的飞跃, 一个新的“基因工程”时代展现在人们的面前。虽然 S. N. Cohen 和 H. W. Boyer 未能获得诺贝尔奖, 可是他们的丰功伟绩在人们的心中建立了一座无形的丰碑。

1.3.2 基因工程的发展

基因工程的发展可分为两个时期。20 世纪 70~90 年代是转基因时代, 通过转基因产生了转基因动、植物和生物反应器。此后便开始进入了基因工程发展的新时期, 基因组测序、体细胞克隆、干细胞技术及基因修饰和重编程技术相继问世, 将基因工程推向新高潮。

1.3.2.1 转基因植物

通过基因转移技术获得的整合有外源基因的植物体称为转基因植物 (transgenic plant)。以植物作为生物技术的实验材料有其特定的优点, 那就是植物细胞大部分都有全能性, 可以用单个细胞分化发育出整个植株。这样, 经过基因工程改造的单个植物细胞有可能再生成一棵完整的转基因植株。

1983 年, 美国的 K. A. Barton 等 4 组科学家几乎同时开展了转基因植物的研究工作, 利用 Ti 质粒将卡那霉素抗性基因转到烟草中, 诞生了世界上第一种转基因植物。此后, 转基因植物的研究工作在世界各地蓬勃发展, 对农作物的优良性状进行了大量深入的研究, 培育了具有各种抗性的农作物, 如抗病虫、抗除草剂、抗倒伏、抗寒、耐干旱、抗盐碱, 并对人们梦寐以求的高光效、固氮等相关基因群进行了探索。科学家们也构建了生产外源基因表达产物的植物生物反应器, 尝试用转基因植物来生产人的生长激素、胰岛素、干扰素、白细胞介素 II、表皮生长因子、乙型肝炎疫苗等。随着基因工程技术的发展, 越来越多的具有优良性状的转基因植物在全球范围内得到广泛种植。

1.3.2.2 转基因动物

1974 年, R. Jaenisch 等用显微注射 (microinjection) 将 SV40 的 DNA 导入到小鼠的囊胚 (blastocyst) 中, 在子代小鼠的肝、肾组织中检测到了 SV40 的 DNA, 建立了世界上第一例转基因动物。

1980 年, 美国的 J. W. Gordon 和 F. H. Ruddle 等采用前核显微注射 (pronuclear microinjection) 将疱疹病毒和 SV40 的 DNA 片段首次成功地注入到小鼠受精卵前核中, 获得了 2 只整合有外源基因的转基因小鼠, 并首创了“转基因” (transgenic) 一词, 这种小鼠就被称为“转基因鼠” (transgenic mice, TG mice), 从而建立了转基因动物技术。

1982 年, 美国的 R. D. Palmiter 等用微注射法将大鼠生长激素 (rGH) 基因与小鼠金属

硫蛋白 (MT) 基因启动子连接后, 导入到小鼠受精卵中, 并得到了表达, 使小鼠发育成比正常小鼠大 1 倍的“超级小鼠” (super mouse)。并且, 他们还提出了从转基因动物中提取药物蛋白的设想。这是外源基因首次在动物体内得到表达。

1983 年, J. W. Gordon 和 F. H. Ruddle 将携带了外源基因的动物称为“转基因动物” (transgenic animal), 这是学术界首次使用这一术语。一系列转基因动物的成果引起了众多研究者对培育转基因经济动物的浓厚兴趣, 其后多种转基因动物陆续诞生。至今人们已经成功获得了转基因大鼠、鸡、山羊、绵羊、猪、兔、牛、蛙及多种鱼类。目前转基因哺乳动物如猪、牛、羊等方面的研究已显示出很大的优势。用它们生产有药用价值的产品产量高、成本低。目前已将人蛋白质 C (hPC)、人血清白蛋白、鸡法氏囊疫苗、人乳铁蛋白、人溶菌酶、转乳清蛋白、人岩藻糖转移酶、乳糖分解酶等基因转入到动物体内并得到表达, 其中人乳铁蛋白和人 α -乳清白蛋白基因是国际上首次利用转基因克隆牛而获得的。

1.3.2.3 生物反应器

生物反应器 (bioreactor) 是指以活细胞或酶为生物催化剂进行细胞增殖或为生化反应提供适宜环境的设备, 能产生特定产物的转基因动物的器官也称为生物反应器。这种新型生物反应器, 也许就是生物技术产业梦寐以求的蛋白质来源。

1985 年, 英国的 R. Lovell-Badge 第一次提出利用乳腺生物反应器 (mammary gland bioreactor) 生产重组蛋白质。乳腺生物反应器的原理是应用重组 DNA 技术, 将外源目的基因和乳腺特异性表达的蛋白质基因启动子及调控区重组, 培育转基因哺乳动物, 以期在动物乳腺中表达分泌特定重组蛋白。转基因动物生产基因药物最理想的表达场所是乳腺。

真正意义上的哺乳动物乳腺生物反应器是由 J. W. Gordon 等于 1987 年开创的。他们将组织型纤溶酶原激活剂 (tissue plasminogen activator, tPA) 基因与小鼠乳清酸蛋白 (WAP) 基因的启动子进行体外重组。成功地培育出了 37 只在乳汁中能表达 tPA 的转基因小鼠。tPA 是一种丝氨酸蛋白酶。为最主要的生理性纤溶酶原激活剂, 可通过其赖氨酸残基选择性地与血栓表面的纤维蛋白结合, 激活血栓中已与纤维蛋白结合的纤溶酶原 (PLG) 并使之转变成纤溶酶 (PL)。随后, α 1-抗胰蛋白酶 (α 1-antitrypsin, α 1-AT)、 γ -乳球蛋白-凝血因子 IX (BLG-F-IX)、人抗胰蛋白酶 (AT)、凝血因子 IX (F-IX)、牛的 β -酪蛋白 (β -CN)、 κ -酪蛋白 (κ -CN)、人抗凝血酶 III (ATryn)、促红细胞生成素 (EPO)、人乙型肝炎表面抗原 (HbsAg) 基因、人 β ₁ 抗-胰蛋白酶等重组基因先后在动物乳腺中表达, 其中 ATryn 是世界上第一个动物乳腺生物反应器重组蛋白药物。

1.3.2.4 基因组测序

人类基因组计划 (HGP) 是由美国科学家于 1985 年率先提出, HGP 的目标是要揭开人类基因组的秘密。1986 年, 美国的诺贝尔奖获得者 R. Dulbecco 在“Science”上发表题为《肿瘤研究的转折点: 人类基因组测序》的短文, 引起了全世界的强烈反响。HGP 与曼哈顿原子弹计划、阿波罗登月计划并称为三大科学计划。

HGP 于 1990 年正式启动, 由美国、英国、日本、德国、法国、中国六国科学家联合攻关。2000 年, 六国科学家共同宣布人类基因组工作草图绘制成功。2001 年六国科学家联合科研组和美国塞莱拉 (Sequencing) 公司将各自测定的人类基因组工作框架图分别同时发表在“Nature”和“Science”上, 这宣告 HGP 进入了一个崭新的阶段。2003 年六国科学家完成了人类基因组序列图的绘制, 实现了人类基因组计划的所有目标。发现人类基因组由 30 亿对碱基组成, 含有约 2.5 万个基因。

1995 年 R. D. Fleischmann 和 J. V. Venter 等完成了流感嗜血杆菌 (*Haemophilus influ-*