

生物工程专业综合素质培养型系列教材

基因工程

Gene Engineering

郭江峰 于 威 主编



科学出版社

生物工程专业综合素质培养型系列教材

基 因 工 程

Gene Engineering

郭江峰 于 威 主编

科 学 出 版 社

北 京

内 容 简 介

本书系统介绍了基因工程的原理、策略、技术方法和应用等方面的内容,具有较强的前瞻性和实用性。全书分为基因工程基础、基因工程操作方法和基因工程应用技术3篇,共13章,内容包括基因工程的概况、核酸操作技术、工具酶、载体与宿主系统、DNA的克隆策略、聚合酶链反应、DNA序列分析、重组子的筛选、目的基因在受体细胞中的表达、目的蛋白的纯化与分析、基因操作技术在医学与法医学上的应用、转基因生物和基因工程的安全性与发展前景。

本书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/郭江峰,于威主编. —北京:科学出版社,2012.6

生物工程专业综合素质培养型系列教材

ISBN 978-7-03-034564-6

I. ①基… II. ①郭… ②于… 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(2012)第112499号

责任编辑:单冉东 刘 晶 / 责任校对:朱光兰
责任印制:阎 磊 / 封面设计:科地亚盟图文设计

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

化学工业出版社印刷厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2012年6月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2012年6月第一次印刷 印张:15 3/4

字数:370 000

定价:35.00元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

编委名单

主编 郭江峰 于 威

编者 (按姓氏笔画排序)

丁先锋 (浙江理工大学)	于 威 (浙江理工大学)
付彩云 (浙江理工大学)	吴元锋 (浙江科技学院)
邹克琴 (中国计量学院)	宋 力 (浙江理工大学)
郑青亮 (浙江理工大学)	郑蔚虹 (温州大学)
郭江峰 (浙江理工大学)	舒特俊 (浙江理工大学)

前 言

基因工程是生命科学各专业中的一门非常重要的专业课，是在遗传学、分子生物学和细胞生物学等课程的基础上开设的，是理论性、实践性、应用性很强的课程之一。《基因工程》课程内容庞杂，基本原理与《生物化学》、《遗传学》、《细胞生物学》和《分子生物学》等课程内容有一定的重复，并涉及很多新技术，信息量大，富于启迪性。因此，在教学取材和体系上要有所选择地取舍。针对理工院校特点和高校教学改革的需要，我们组织相关教师编写了本书。

基因工程主要是指重组 DNA 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。上游技术指的是基因的重组、克隆和表达的设计与构建（即重组 DNA 技术）；而下游技术则涉及基因工程菌或细胞的大规模培养，以及基因产物的分离纯化过程。因此，本书在体系结构上，以基因工程基本操作步骤为主线，主要介绍基因工程的基本原理、基本流程、常规技术及其应用，力求将工程与理论、技术与原理有机地结合起来，为学生今后继续深造和从事研究工作奠定基本的理论和技术基础。本书在涵盖基因工程上游、下游技术及其应用的同时，还兼顾了近几年基因工程领域的最新进展。

本书由浙江理工大学、中国计量学院、浙江科技学院和温州大学等高校的在一线从事相关教学和科研的教师编写。全书分基因工程基础、基因工程操作方法和基因工程应用技术 3 篇，共 13 章。其中第一章由郑蔚虹编写，第二、十一章由于威编写，第三、十章由吴元锋编写，第四章由付彩云编写，第五章由邹克琴编写，第六章由郑青亮编写，第七、十二章由丁先锋编写，第八章由宋力编写，第九章由舒特俊编写，第十三章由郭江峰编写。编写人员在编写过程中表现出极高的工作热情，充分发挥了各自在教学和科研上的优势。他们在教学和科研上的丰富经验与经历，保证了本书的系统性和先进性，使本书能较好地满足教学需求。

在本书的编写过程中，得到了科学出版社的精心指导与大力支持，在此表示衷心的感谢。

由于我们水平和经验有限，加之时间紧迫，书中难免存在缺点和错误，我们真诚地欢迎同行专家、使用本书的师生和热心读者给予批评指正。

编 者

2012 年 1 月于杭州

目 录

前言

第一篇 基因工程基础

第一章 基因工程概况	1	三、引物原位标记法	22
第一节 基因与基因工程	1	第四节 核酸的处理、定量与保存	23
一、基因的概念	1	一、核酸的分离纯化	23
二、基因工程的概念	3	二、凝胶电泳法分离核酸	23
三、基因工程的操作流程	4	三、核酸的定量和保存	24
四、人类基因组计划	5	参考文献	24
第二节 基因工程的发展与意义	7	第三章 工具酶	26
一、基因工程的发展	7	第一节 限制性内切核酸酶	26
二、基因工程的研究意义	10	一、限制性内切核酸酶的发现	26
参考文献	11	二、限制性内切核酸酶的命名方法	27
第二章 核酸操作技术	12	三、限制性内切核酸酶的识别特点	27
第一节 核酸操作的基本原理	12	四、限制性内切核酸酶的切割方式	28
一、DNA 双螺旋的变性与复性	13	五、内切酶星号活性	30
二、基因操作的工具	15	六、内切酶反应的影响因素	30
第二节 DNA 和 RNA 的分离提取	17	第二节 其他常用工具酶	34
一、DNA 的提取	17	一、DNA 连接酶	34
二、RNA 的提取	20	二、DNA 聚合酶	36
第三节 核酸标记	20	三、修饰性工具酶	40
一、末端标记	21	参考文献	42
二、缺口平移	21		

第二篇 基因工程操作方法

第四章 载体与宿主系统	43	参考文献	58
第一节 载体的种类	44	第五章 DNA 的克隆策略	59
一、质粒载体	44	第一节 化学法合成 DNA	59
二、噬菌体载体	48	一、短片直接连接法组装 DNA	60
三、动物细胞载体	55	二、长片段部分重叠法组装 DNA	60
第二节 宿主系统	56	第二节 构建文库法克隆基因	61
一、原核宿主	57	一、构建基因组文库克隆目的基因	61
二、真核宿主	57	二、构建 cDNA 文库克隆目的基因	63

第三节 依据特定的 DNA 序列或表达产物	六、加端 PCR	87
特性克隆基因	七、锚定 PCR	87
一、用核酸探针筛选目的 DNA	八、玻片 PCR	87
二、用寡核苷酸探针筛选目的 DNA ...	九、标记 PCR 和彩色 PCR	88
三、表达序列标签 (EST) 法筛选目的	十、反转录 PCR	88
DNA	十一、定量 PCR	89
四、转座子标签法克隆 DNA	参考文献	89
五、依据表达产物特性筛选目的 DNA	第七章 DNA 序列分析	91
.....	第一节 传统的 DNA 测序方法	91
第四节 基于 mRNA 反转录的差异的基因	一、Sanger 双脱氧链终止法	91
分离	二、Maxam-Gilbert 化学降解法	94
一、RACE 方法分离基因	第二节 DNA 的自动化测序	97
二、差异杂交筛选目的 DNA	一、DNA 自动化测序的基本原理	98
三、mRNA 差异显示技术	二、DNA 自动测序的步骤	98
四、代表性差别分析法分离目的基因	三、DNA 自动分析仪	98
.....	第三节 DNA 测序策略	100
五、抑制差减杂交法分离目的基因 ...	一、定向测序策略	100
第五节 DNA 微阵列法分离基因	二、随机测序策略	101
一、DNA 微阵列的分类	三、多路测序策略	101
二、DNA 微阵列法分离基因的原理	四、引物步移测序策略	101
.....	第四节 新一代测序仪	101
参考文献	一、SOLiD 测序仪	103
第六章 聚合酶链反应 (PCR)	二、454 测序仪	103
第一节 概述	三、Solexa 高通量测序仪	105
一、PCR 反应中的主要成分	四、HeliScope 测序仪	105
二、PCR 反应过程	五、新型纳米孔测序技术	106
三、PCR 产物的克隆	六、新一代测序技术的前景	106
第二节 影响 PCR 的主要因素	第五节 其他 DNA 测序技术	106
一、循环温度设计	一、质谱法	106
二、引物设计	二、杂交测序法	107
三、DNA 聚合酶	三、原子探针显微镜测序法	107
四、扩增平台期	四、流式细胞仪测序法	108
第三节 PCR 反应的应用模式	五、超薄水平凝胶电泳测序法	108
一、兼并引物 PCR	参考文献	108
二、套式引物 PCR	第八章 重组子的筛选	110
三、复合 PCR	第一节 载体表型选择法	110
四、反向 PCR	一、抗药性标记及其插入失活选择法	
五、不对称 PCR		110

二、 β -半乳糖苷酶显色反应选择法	113	六、mRNA 的二级结构	141
三、噬菌斑筛选法	114	七、RNA 的加工	141
第二节 根据插入基因的表型选择	114	八、mRNA 序列上终止密码子的选择	141
第三节 DNA 电泳检测法	114	九、表达质粒的拷贝数及稳定性	142
一、快速裂解菌落鉴定法	115	十、外源蛋白的稳定性	142
二、酶切电泳筛选法	115	十一、减少基因沉默	142
三、PCR 扩增检测法	117	第二节 目的基因在大肠杆菌细胞中的	
第四节 核酸杂交检测法	118	表达	142
一、核酸探针	118	一、大肠杆菌表达系统的优缺点	143
二、核酸杂交检测方法	120	二、大肠杆菌表达载体的构成	143
三、DNA-蛋白质筛选法	125	三、目的基因在大肠杆菌中的表达形式	145
第五节 免疫化学检测法	125	四、影响目的基因表达的因素	148
一、放射性抗体测定法	125	五、pET 系统	149
二、免疫沉淀测定法	126	第三节 目的基因在酵母中的表达	150
三、酶联免疫吸附测定法	127	一、酵母系统的生物学特性	150
四、免疫印迹	131	二、酵母表达系统的组成	150
第六节 转译筛选法	132	三、酵母表达载体的类型和宿主菌	151
一、无细胞翻译系统	132	第四节 目的基因在昆虫细胞中的表达	154
二、转译筛选	133	一、昆虫表达系统的优势	154
第七节 几种常用的真核生物重组基因		二、昆虫表达系统的构成	155
选择方法	134	三、重组病毒载体的筛选和改进	156
一、利用遗传选择标记筛选哺乳动物		四、外源基因在 BEVS 中的表达水平	157
转基因细胞	134	及影响因素	157
二、利用报告基因筛选植物转化细胞	136	五、杆状病毒表达系统的缺点	158
参考文献	138	六、家蚕生物反应器	158
第九章 目的基因在受体细胞中的		第五节 目的基因在哺乳动物细胞中的	
表达	139	表达	159
第一节 目的基因表达的条件	139	一、哺乳动物细胞的表达载体	159
一、启动子与转录起始	139	二、哺乳动物宿主细胞	161
二、mRNA 的有效延伸和转录终止	139	三、提高哺乳动物细胞表达的策略	162
三、mRNA 的稳定性	140	参考文献	163
四、有效的翻译起始	140		
五、遗传密码应用的偏倚性	141		

第三篇 基因工程技术

第十章 目的蛋白的纯化与分析	165	一、离心法	166
第一节 目的蛋白的分离纯化	165	二、沉淀法	168

三、膜分离	171	第二节 转基因植物	214
四、电泳法	174	一、转基因植物技术的基本原理	214
五、色谱法	179	二、植物转基因的常用方法	215
第二节 目的蛋白的分析	184	三、转基因植物的筛选与检测	216
一、紫外-可见分光光度法	185	四、转基因植物的应用	216
二、HPLC 法和 CE 法	187	第三节 转基因生物食品	220
三、质谱法	188	一、转基因食品分类	221
参考文献	190	二、转基因食品的发展状况	222
第十一章 基因操作技术在医学与法		参考文献	222
医学上的应用	191	第十三章 基因工程的安全性与发展	
第一节 基因治疗	191	前景	224
一、基因治疗的概念和策略	191	第一节 基因工程的安全性	224
二、基因治疗的基本过程	192	一、转基因生物的安全性	224
三、基因治疗的临床应用研究	194	二、与基因工程产品安全性有关的	
第二节 基因诊断	195	重要事件	226
一、基因诊断的概念及特点	196	三、生物安全政策、法规与风险评估	
二、基因诊断的主要技术方法	196		228
三、基因诊断的应用	197	四、转基因生物与国际贸易和社会	
第三节 基因工程制药	198	经济问题	230
一、基因工程药物的分类	198	五、转基因生物的社会伦理问题	231
二、基因工程药物的发展	200	第二节 基因工程的发展前景	233
三、基因工程药物产业化状况	201	一、基因工程在农业中应用的发展	
参考文献	202	前景	233
第十二章 转基因生物	203	二、基因工程在生物医药中应用的	
第一节 转基因动物	203	发展前景	235
一、转基因动物技术的基本原理	204	三、基因工程在工业中应用的发展	
二、常用转基因动物的方法	205	前景	236
三、转基因动物的检测	209	四、基因工程在其他领域中应用的	
四、转基因动物的应用	209	发展前景	237
五、转基因动物研究中存在的问题与		参考文献	239
展望	213		

第一篇 基因工程基础

第一章 基因工程概况

第一节 基因与基因工程

一、基因的概念

1. 基因概念的提出与发展

基因概念的提出已有 100 多年的历史，在这期间我们逐渐认识、深化了这个概念。

遗传学奠基人 Mendel 于 1865 年 2 月在奥地利自然科学学会会议上报告了自己植物杂交试验的研究结果，次年在该学会期刊上发表了著名的《植物杂交试验》的论文。文中指出，生物的每一个性状都是通过遗传因子来传递的，遗传因子是独立的遗传单位。这样就把可观察的遗传性状和控制其内在的遗传因子区分开来，遗传因子作为基因的雏形名词诞生了。

1909 年，丹麦遗传学家 Johansen 首先提出“基因 (gene)”的概念，它不包含特殊的物质基础，只是用来描述传递和表达特定的生物性状的可遗传因子，以此替代孟德尔假定的“遗传因子”。

1911 年，Morgan 指出基因定位于染色体上，建立了著名的基因学说，还绘制了果蝇的基因位置图，首次完成当时最新的基因概念的描述，即基因以直线形式排列，它决定着某一特定的性状，而且能发生突变，并随着染色体同源节段的互换而交换。它不仅是决定性状的功能单位，而且是一个突变单位和交换单位。

20 世纪 40 年代末至 50 年代初，基因的化学本质被证实。1944 年，Avery 及其同事 MacLeod 和 McCarty 在肺炎链球菌转化研究中，首次通过实验证实 DNA 是遗传信息的载体。1952 年，Hershey 和 Chase 用放射性同位素标记噬菌体注入细菌细胞的实验，进一步证明遗传物质是 DNA 而不是蛋白质。

1953 年，美国分子生物学家 Watson 和英国分子生物学家 Crick 根据 X 射线衍射分析，提出了 DNA 双螺旋结构模型，进一步说明基因的成分就是 DNA，它控制着蛋白质合成。在基因位于染色体上，并且能用重组方法作图定位的概念建立后，人们逐渐认识到单个基因是遗传信息结构和功能的基本且不可分割的单位；从结构和功能来看，它们以线性的形式相互连接（串珠理论，the beads on a string theory）。

1957 年，法国遗传学家 Benzer 以 T4 噬菌体作为研究材料，分析了基因内部的精细结构，提出顺反子学说。该学说打破了过去关于基因是突变、重组、决定遗传性状的

“三位一体”概念及基因是最小的不可分割的遗传单位的观点。Benzer 认为顺反子为基因功能不可分割的单位。能产生一种多肽的是一个顺反子，顺反子也就是基因的同义词。但一个顺反子可以包含一系列突变单位——突变子。突变子是 DNA 中构成基因的一个或若干个核苷酸。由于基因内的各个突变子之间有一定距离，所以彼此间能发生重组，重组频率与突变子之间的距离成正比，距离近，重组频率低；距离远，重组频率就高。

顺反子概念把基因具体化为 DNA 分子的一段序列，它负责遗传信息传递，是决定一条多肽链的完整性的功能单位；但它又是可分的，组成顺反子的核苷酸可以独自发生突变或重组，而且基因与基因之间还有相互作用。基因排列的位置不同，会产生不同的效应。

1961 年，法国科学家 Jacob 和 Monod 在研究大肠杆菌乳糖代谢的调节机制中，发现有些基因不起蛋白质合成模板的作用，只起调节或操纵作用，提出了操纵子学说。从此，根据基因功能把基因分为结构基因、调节基因和操纵基因。

2. 基因的现代概念

20 世纪 70 年代以后，随着分子生物学研究的深入，人们能够在分子水平上认识基因的结构与功能，陆续发现了移动基因、断裂基因、重叠基因及假基因等，对基因的认识有了进一步深化。

(1) 移动基因 (movable gene)

1951 年，美国遗传学家 McClintock 提出了可移动的遗传基因学说，即跳跃基因 (jumping gene)。该学说认为基因可从染色体的一个位置跳跃到另一个位置，甚至从一条染色体跳跃到另一条染色体上，为研究遗传信息的表达与调控、生物进化与癌变提供了线索。

(2) 断裂基因 (splitting gene)

断裂基因最初是 Roberts 和 Sharp 在腺病毒研究中发现的 (图 1-1)。过去人们认为，基因的遗传密码子连续不断地排列在一起，形成一条没有间隔的完整的基因实体。事实上，一个基因可分隔成不连续的若干区段，我们称这种编码序列不连续的间断基因为断裂基因。根据当前的研究，所有哺乳动物、脊椎动物和高等植物以及简单的真核生物 (如酵母)，甚至少数原核生物中都存在断裂基因。

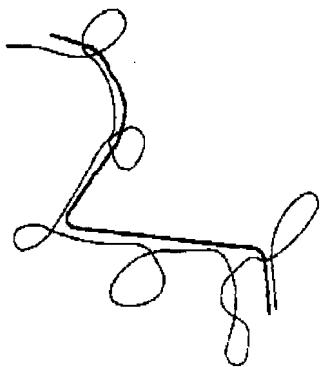


图 1-1 腺病毒 DNA 与 mRNA
分子杂交的电子显微镜图像

(3) 重叠基因 (overlapping gene)

传统的基因概念把基因看成是互不重叠、单个分离的实体。在人们的观念中，一直认为同一段 DNA 序列内不存在重叠的读码结构。1973 年，哈佛大学的 Weiner 等在研究感染大肠杆菌的 Q β 病毒时，发现有两个基因在编码生成蛋白质时是从同一起始点开始的。1977 年，Sanger 等测定了噬菌体 Φ X174 DNA 全序列的 5735 (现为 5737) 个核苷酸，最多能编码 1795 个氨基酸，所合成的全部蛋白质的总相对分子质量最多为 197 000 (以每个氨基酸平均相对分子质量为 110 计算)，可实际测定相对分子质量却是 262 000。这是因为不同基因的核苷酸序列有时是可以共用的，同一段 DNA 能够编码两种甚至三种蛋白质分子

(图 1-2)，我们称这样的两个基因为重叠基因。

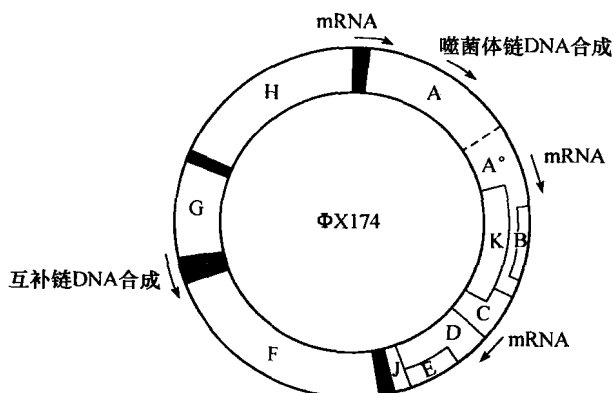


图 1-2 单链 DNA 噬菌体 $\Phi X174$ 的重叠基因图

(4) 假基因 (pseudogene)

1977 年, Jacq 等根据对非洲爪蟾 5S rRNA 基因簇的研究, 首次提出假基因的概念, 该基因的 5' 端有 16bp 的缺失以及另外 14bp 的错配。随着大量不同家族的假基因的发现, 假基因被明确限定为与功能基因相关的、有缺陷的核苷酸序列。假基因一度由于与正常基因存在结构上的差异, 或不能转录或翻译, 或产生有缺陷的蛋白质而失去原有功能, 被认为是“死亡基因”。随着对非表达序列的深入研究, 假基因的重要性比我们想象的要大, 有的对生存至关重要。

随着生命科学日新月异的发展, 更多新的基因存在形式不断被发现, 基因的内涵也在不断发生变化, 我们对基因的理解也在不断地发展和深化。但基因的本质仍然是遗传信息的结构与功能单位, 有人用基因就是一套与转录相关的顺式遗传指令来概括基因的概念。这类顺式遗传指令可以转录, 也可以不转录; 在 DNA 结构上可连续, 也可不连续; 转录本可以是一种, 也可以是几种 (表现在转录的起始、终止或剪辑的差异上); 翻译后的加工也会造成产物的多样性, 强调了基因编码产物形式的多样性。基因有如此多的内涵和形态, 与生命的进化和满足不同生理活动的需要是分不开的。

二、基因工程的概念

基因工程 (gene engineering) 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, 在体外通过人工“剪切”和“拼接”等方法将核酸分子进行改造, 然后插入病毒、质粒或其他载体分子, 构成遗传物质的新组合, 并使之掺入原先不含有该分子的宿主细胞内, 而且能持续稳定地繁殖, 高效率地达到预期目的。

基因工程在理论上可自成体系, 称为基因工程学, 从方法上又是一门成熟、应用广泛的实验技术, 正是由于其双重性, 相关术语很繁杂, 未很好地统一, 在文献中常见的有遗传工程 (genetic engineering)、基因工程 (gene engineering)、基因操作 (gene manipulation)、重组 DNA 技术 (recombinant DNA technology) 以及基因克隆 (gene cloning)、分子克隆 (molecular cloning) 等。这些术语所代表的具体内容都是彼此相

关的,在许多场合下被混用,很难严格区分。从某种意义上讲,它们之间的差别,仅仅是各自考虑的角度和强调的侧重点不同。

在英语中“clone (克隆)”一词当名词使用时,是指从一个共同祖先经无性繁殖得到的一群遗传上同一的 DNA 分子、细胞或个体所组成的特殊的生命群体;而当“clone”作动词使用时,则是指从同一个祖先产生这类同一的 DNA 分子群体、细胞群体或个体群体的过程。所以要注意在不同的场合,克隆一词有不同的含义。在体外重新组合 DNA 分子的过程中,是通过能够独立自主复制的载体分子质粒或噬菌体为媒介,将外源 DNA 引入宿主细胞进行增殖,从而为遗传上同一的生物品系(它们都带有同样的重组 DNA 分子)成批地繁殖和生长提供了有效的途径。故此,习惯上也把基因工程称为基因克隆或 DNA 分子克隆。

在中文文献中,曾将“DNA cloning”直接译为 DNA 纯系繁殖,实质上它是特指利用微生物制备大量纯一的特定 DNA 片段的一种方法。由于运用重组 DNA 技术能够按照人们预先的设计创造出许多新的遗传结合体、具有新奇遗传性状的新型生物,因此有时人们又把基因工程笼统地称为遗传工程或遗传操作。其实这种将“遗传工程”和“基因工程”两个术语不加区分地使用,甚至认为两者完全等同的认识是不准确的。严格地说,遗传工程是指以改变生物有机体性状特征为目标的遗传信息的操作(the manipulation of the information content),它既包括常规的选择育种,也包括相对复杂的基因克隆等不同的技术层次。因此,遗传工程虽然包括了基因工程的内容,但它所涉及的内容却比基因工程要广泛得多,两者之间是有差别的。

三、基因工程的操作流程

基因工程的主要步骤为:切—接—转—选—表达(图 1-3),具体操作流程如下。

(1) 分离或合成基因(isolation or synthesis of gene)

从复杂的生物有机体基因组中,经过酶切消化或 PCR 扩增等步骤,分离出带有目的基因的 DNA 片段,这种 DNA 片段被称为“目的基因”。

(2) 体外重组(recombination of DNA *in vitro*)

在体外,将带有目的基因的外源 DNA 片段连接到能够自我复制并具有选择标记的载体分子上,形成重组 DNA 分子。

(3) 外源 DNA 导入细胞中(introduction of foreign DNA into cell)

将重组 DNA 分子转移到适当的受体细胞(亦称宿主细胞),并与之一起增殖。

(4) 筛选(selection of recombinant DNA)

从大量的细胞繁殖群体中,筛选出获得重组 DNA 分子的受体细胞克隆。目的基因的导入过程是肉眼看不到的,因此,要知道导入是否成功,应事先找到特定的标志。例如,我们用一种经过改造的抗四环素质粒 pSC100 作载体将一种基因转入自身无抗性的大肠杆菌时,如果基因转入后大肠杆菌不能被四环素杀死,就说明转入获得成功。

(5) 鉴定(identification and analysis of cloned gene)

从筛选出来的受体细胞克隆中提取出已经得到扩增的目的基因,供进一步分析研究使用。

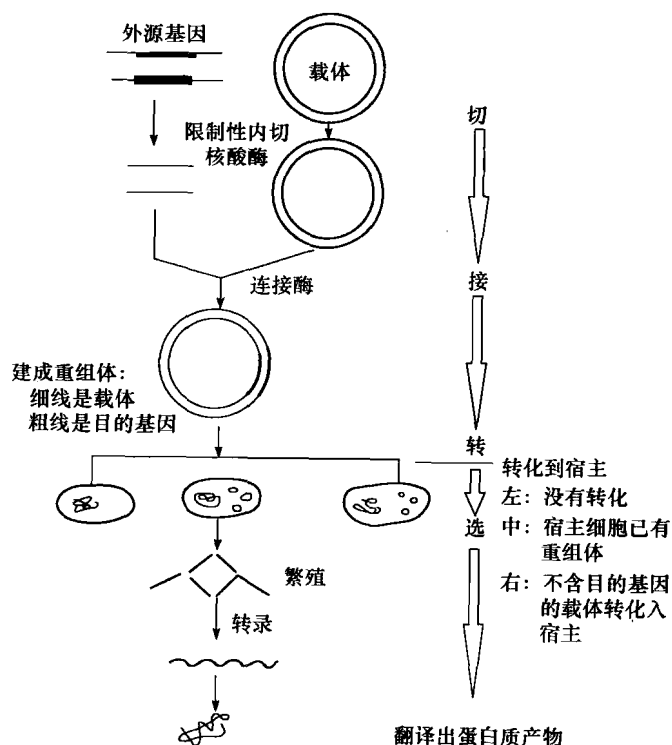


图 1-3 基因工程的主要操作步骤

(6) 表达 (expression of cloned gene)

将目的基因克隆到表达载体上，导入高效、稳定的具有功能性表达能力的基因工程细胞，使之在新的遗传背景下实现功能表达，产生出所需要的目标产物。

(7) 分离表达产物 (isolation of product)

利用工程技术大规模培养上述基因工程细胞，获得大量的外源基因表达产物并分离、纯化，获得所需的基因工程产品。

上述步骤可归并为两大部分，分属上游技术（步骤 1~5）和下游技术（步骤 6、7）。上游技术具有一定的共性，下游技术具有较强的个性，两大部分有机结合成为一个整体。上游技术是基因克隆的核心与基础，但必须与下游技术密切联系才有生命力，所以上游设计中应以简化下游工艺和装备为指导思想。下游技术必须依赖上游技术才能不断开拓、发展、壮大，下游技术是上游基因克隆蓝图的体现和保证，是克隆基因产业化的关键，两者必须兼顾。我国在上游技术方面与发达国家差距较小，下游技术方面差距较大。加强下游技术的创新研究是今后努力的方向。

四、人类基因组计划

1. 人类基因组计划 (human genome project, HGP)

对基因组核苷酸全序列的测定与分析，是重组 DNA 技术促进基础生物学研究的出色范例。英国分子生物学家 Sanger 领导的研究小组，于 1977 年首先完成了全长 5387bp 的 Φ X174 噬菌体基因组全序列测定工作，揭开了大规模基因组测序工作的序

幕。日本科学家先后于 1987 年完成了全长 155 844bp 的烟草叶绿体基因组全序列的测定, 1988 年完成了全长 121 024bp 的地钱叶绿体基因组全序列的测定, 1989 年又完成了全长 134 525bp 的水稻叶绿体基因组全序列的测定。然而这些细胞器的基因组无论在大小还是在复杂性方面, 都是无法同人类基因组相比拟的。

1985 年, 美国科学家首先提出了研究人类基因组的设想。在经过长达 4 年的调查和论证的基础上, 1988 年, 美国国会批准了人类基因组作图和测序计划。同年 9 月, DNA 双螺旋结构发现者之一 Watson 在众望所归之下, 接受了美国卫生研究院的邀请, 出任人类基因组计划的负责人, 开始了令全世界瞩目的基因组研究。该计划旨在阐明人类基因组 30 亿个碱基对的序列, 发现所有的人类基因, 并明确其在染色体上的位置, 破译人类全部遗传信息, 使人类第一次在分子水平上全面地认识自我。该项被新闻界喻为“基因圣战”的、规模空前的科研计划总投资达 30 亿美元。

由于人类基因组计划具有的重要意义和深远影响, 其一经提出, 便立即引起许多国家科技界与政府机构的高度重视和强烈反响。特别是西欧和日本等一些经济发达的国家, 纷纷表示要独立开展或参与国际合作研究。著名的遗传学家谈家桢教授等人也积极倡议中国迅速参与人类基因组的国际合作研究。美国于 1990 年正式启动人类基因组计划后, 德国、日本、英国、法国、中国 5 个国家的科学家先后正式加入, 中国的人类基因组计划是于 1994 年初在吴旻院士、强伯勤院士、陈竺院士和杨焕明教授的倡导下启动的, 1999 年 9 月正式加入该计划, 承担了 1% 的人类基因组 (约 3000 万 bp) 的测序任务, 是参与该计划唯一的发展中国家。有科学家认为, 人类基因组计划是与曼哈顿原子计划、阿波罗登月计划并列的人类科学史上的重大工程, 是一项改变世界、影响到每一个人的科学计划。

人类基因组计划的科学宗旨与“定时、定量、定质”的具体目标, 是测定组成人类基因组的上亿个核苷酸的序列, 从而阐明人类基因组及所有基因的结构与功能、解读人类的全部遗传信息、揭开人体奥秘的基础, 将把人类带入基因医学的新时代。生命物质的一致性与生物进化的连续性以及人类基因组计划所建立的策略与技术的通用性, 意味着人类基因组计划可以奠定揭开生命最终奥秘的基础, 由此带动生物信息学等一批相关学科的形成和发展, 促进学科交叉与重组, 其带来的潜在经济效益也是惊人的。

2003 年 4 月, 美国人类基因组研究项目首席科学家 Collins 博士在华盛顿隆重宣布, 美国、英国、日本、法国、德国和中国科学家经过 13 年努力共同绘制完成了人类基因组序列图, 人类基因组计划的所有目标全部实现, 标志人类基因组计划胜利完成。

2. 基因组学 (genomics)

1920 年, 德国汉堡大学教授 Hans Winkler 首次使用基因组 (genome) 这一名词。一个生物体的基因组是指整套染色体所含有的完整的 DNA 序列, 包括编码序列和非编码序列在内的全部 DNA 序列。基因组一词可以特指整套核 DNA (如核基因组), 也可以特指细胞器基因组, 如线粒体基因组或叶绿体基因组。所有生命都具有指令其生长与发育、维持其结构与功能所必需的遗传信息, 现在认为, 基因组包含生物所具有的携带遗传信息的遗传物质的总和。

基因组学 (genomics) 一词系由 1986 年美国科学家 T. Roderick 首创, 当年即被用作一本新杂志的名字。它着眼于研究并解析生物体整个基因组的所有遗传信息。基因组学依据其研究的侧重点, 可分为结构基因组学、功能基因组学和比较基因组学。随着 1990 年人类基因组计划启动, 才真正有系统地研究基因组, 解码生命。2001 年人类基因组计划公布了人类基因组草图, 为基因组学研究揭开新的一页, 生命科学已进入研究基因组功能为主的后基因组学时代。

第二节 基因工程的发展与意义

一、基因工程的发展

1. 基因工程理论与技术的准备阶段

(1) 基因工程建立的三大理论基础

基因工程建立的三大理论基础, 一是 20 世纪 40 年代确立了遗传信息的携带者, 即基因的分子载体是 DNA 而不是蛋白质; 二是 1953 年揭示 DNA 分子的双螺旋结构和半保留复制机理, 解决了基因的自我复制和传递问题; 三是 20 世纪 50 年代末和 60 年代, 提出中心法则和操纵子学说, 成功地破译了遗传密码, 阐明了遗传信息的流向和表达问题。

(2) 基因工程建立的技术基础

三大理论发现虽然从理论上确立了基因工程的可行性, 但在进行基因工程技术操作时, 还面临着基本技术问题。

DNA 分子很小, 其直径只有 $20\text{\AA}$, 即 $2 \times 10^{-9}\text{m}$, 在其上进行“手术”是非常困难的。因此, 基因工程实际上是一种“超级显微工程”, 对 DNA 的切割、缝合与转运, 必须有特殊的工具。要把目的基因从供体 DNA 长链上准确地剪切下来, 不是一件容易的事。1968 年, Arber、Nathans 和 Smith 第一次从大肠杆菌中提取出限制性内切核酸酶, 它能在 DNA 上寻找特定的“切点”, 将 DNA 分子的双链交错地切断。人们把这种限制性内切核酸酶称为“分子剪刀”, 它可以完整地切下个别基因。目前已经分离提取了 400 多种“分子剪刀”。有了形形色色的“分子剪刀”, 就可以进行 DNA 分子长链的切割了。

DNA 的分子链被切开后, 还需缝接起来, 以完成基因的拼接。1976 年, 5 个实验室的科学家们几乎同时发现并提取到一种酶, 这种酶可以将两个 DNA 片段连接起来, 修复好 DNA 链的断裂口, 这种酶叫做 DNA 连接酶。从此, DNA 连接酶成为名符其实的“缝合”基因的“分子针线”。只要在用同一种“分子剪刀”剪切的两种 DNA 碎片中加上“分子针线”, 就可把两种 DNA 片段重新连接起来。

把“拼接”好的 DNA 分子运送到受体细胞中去, 必须寻找一种分子小、能自由进出细胞而且在装载外源 DNA 片段后仍能正常复制的运载体。理想的运载体是质粒, 因为质粒能自由进出细菌细胞, 用“分子剪刀”把它切开, 再给它安装上一段外源 DNA 片段后, 它依然能自我复制。限制性内切核酸酶、DNA 连接酶、质粒等基因克隆载体的发现以及细胞转化方法的建立、核酸和蛋白质序列分析技术的发明等, 为基因克隆技术这一划时代的生物新技术的诞生和兴起奠定了坚实的技术基础。

在 20 世纪 70 年代初期开展的 DNA 重组工作，无论在理论上还是技术上都已经具备了条件。

2. 基因工程的诞生与发展

(1) 诞生及初期阶段 (1973~1976 年)

1972 年，斯坦福大学 Berg 博士的研究小组成功进行了第一次 DNA 体外重组实验，他们使用限制性内切核酸酶 *EcoR* I，在体外对猿猴病毒 SV40 的 DNA 和 λ 噬菌体的 DNA 分别进行酶切消化，然后再用 T4 DNA 连接酶将两种消化片段连接起来，结果获得了包括 SV40 和 λ DNA 的重组杂交 DNA 分子。Berg 因此与 Gilbert、Sanger 分享了 1980 年度的诺贝尔化学奖。

但基因工程的“开山鼻祖”应是斯坦福大学的 Cohen。1973 年，他和加州大学的 Boyer 等成功地进行了体外 DNA 重组实验。他们将编码有卡那霉素 (kanamycin) 抗性基因的大肠杆菌 R6-5 质粒与编码有四环素 (tetracycline) 抗性基因的另一种大肠杆菌质粒 pSC101 DNA 混合后，加入限制性内切核酸酶 *EcoR* I，对 DNA 进行切割，而后再用 T4 DNA 连接酶将它们连接成重组的 DNA 分子。将这种连接后的 DNA 混合物转化大肠杆菌，发现某些转化子菌落表现出既抗卡那霉素又抗四环素的双重抗性特征。这是第一次在基因水平上人工创造了细菌间性状的转移，标志着基因工程的诞生。

人们质疑他是在同种生物间进行实验，于是 Cohen 又将非洲爪蟾的 DNA 与大肠杆菌的质粒“拼接”，获得成功，拼接后的杂合质粒转入大肠杆菌，产生了非洲爪蟾的核糖体核糖核酸 (rRNA)。该研究表明，基因工程可以不受生物种类的限制而按照人类的意愿去拼接基因。Cohen 随后以 DNA 重组技术发明人的身份向美国专利局申报了世界上第一个基因工程的技术专利。Cohen 的实验首次打破了不同物种在亿万年中形成的天然屏障，他的成功标志着任何不同种类生物的基因都能通过基因工程技术重组到一起，人类可以根据自己的意愿定向改造生物的遗传特性，甚至创造新的生命类型。

基因工程在已经“旗开得胜”的情况下本应“乘胜追击”，但是由于人们对这门新的学科缺乏了解，持保守意见的人暂时占了上风，在 1974~1976 年间美国、日本和西欧的一些国家先后制订出不同的安全条例，对基因工程实验加以严格的限制。

(2) 发展阶段 (1977~1981 年)

Cohen 获得专利技术的消息引起了全球轰动，在短短几年中，世界上有上百个实验室开展了基因工程的研究。

1973~1976 年，对宿主细胞的遗传重组、感染、寄生进行了安全性改造，技术逐步完善。

1978 年，利用大肠杆菌合成了人胰岛素。

1979 年，人生长激素 (hGH) 基因在大肠杆菌中表达成功。

1980 年，人干扰素基因在大肠杆菌中表达成功。

1980 年，表达系统转向枯草杆菌与酵母菌的研究。

(3) 突飞猛进的应用阶段 (1982 年至今)

随着 Cohen 及其同事利用重组 DNA 技术从哺乳动物基因组中切割一个基因植入大