

刘志国 屈 伸 编著 ●

基因克隆的分子基础 与工程原理



化学工业出版社
现代生物技术与医药科技出版中心

基因克隆的分子基础 与工程原理

刘志国 屈 伸 编著

化 学 工 业 出 版 社
现代生物技术与医药科技出版中心
·北 京·

(京)新登字 039 号

图书在版编目 (CIP) 数据

基因克隆的分子基础与工程原理/刘志国, 屈伸编著.
北京: 化学工业出版社, 2003.7

ISBN 7-5025-4616-2

I. 基… II. ①刘… ②屈… III. 无性系-遗传工程 IV. Q785

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2003) 第 052882 号

基因克隆的分子基础
与工程原理

刘志国 屈伸 编著
责任编辑: 郎红旗 周旭
责任校对: 蒋宇
封面设计: 蒋艳君

*

化学工业出版社 出版发行
现代生物技术与医药科技出版中心

(北京市朝阳区惠新里 3 号 邮政编码 100029)

发行电话: (010)64982530

<http://www.cip.com.cn>

*

新华书店北京发行所经销

北京管庄永胜印刷厂印刷

三河市延风装订厂装订

开本 787 毫米 × 1092 毫米 1/16 印张 16 $\frac{3}{4}$ 字数 408 千字

2003 年 8 月第 1 版 2003 年 8 月北京第 1 次印刷

ISBN 7-5025-4616-2/Q·63

定 价: 32.00 元

版权所有 违者必究

该书如有缺页、倒页、脱页者, 本社发行部负责退换

前 言

生命科学是当今发展最迅速的科学领域,已经成为新世纪科学研究与发展的领头学科。由生命科学领域中的生物化学、分子生物学与遗传学的发展所催生的具有蓬勃生机的高新技术,已成为推动生命科学持续发展的主要动力。基因克隆技术作为众多新兴生物技术中的代表与基础,已经渗透到众多学科领域,成为各学科研究与应用的基本工具与技术。近十年来,新克隆技术的不断涌现,有力地推动了对复杂生命现象的活动规律及其本质的研究与探索;同时,利用这些新技术开发生物药物、生物制品、生物材料及改良物种等方面的工程应用研究也蓬勃发展,对相关产业的发展呈现出前所未有的巨大引力和推力。可以预期,21世纪必将成为生物技术推动的生命科学的世纪。

为了紧跟生命科学的发展步伐,适应新时期高等教育改革与发展的需要,充分体现学科发展与学科交叉融合的现状,围绕高素质、宽口径、厚基础的人才培养目标,提高教学水平和教学质量,我们尝试着将基因克隆基本技术与工程应用原理有机地结合成为一体,打破传统的理科与工科教学割裂的现状,并将教学内容拓宽和深入,编写出《基因克隆的分子基础与工程原理》一书,作为新的“分子克隆”或“基因工程”等课程的教材,以适应21世纪生命科学及其他相关学科发展的需要。

全书共十六章,包括三方面的主要内容,即基因克隆的理论及其结构与技术基础(1~6章);基因克隆的原理与技术(7~10章);基因克隆的工程原理及应用(11~16章)。本书以分子生物学的基本理论、基本知识和基本技术为基础,结合最新进展,力求深入浅出地反映当代基因克隆技术领域的研究与发展状况,并将克隆技术与工程应用的原理结合在一起,满足学生多方面知识的需要,并有利于学生树立对该学科的全局观念。

本教材适合作为生命科学领域各相关专业教学与研究使用,也可作为其他学科生物技术或生物工程类课程的教材或参考书。

本书在编写过程中,得到各方的大力支持。武汉工业学院、华中科技大学同济医学院、桂林医学院、江汉大学、湖北大学、郑州工程大学的有关教师对本书的编写给予了大力支持和帮助。除参加编写的教师以外,武汉工业学院的宋光森教授、何东平教授、陈运中教授,华中科技大学的王宇哲博士、田俊博士、王燕博士,湖北大学的熊万斌老师,郑州工程大学的常共宇老师等都为本书的编写做了大量的工作,在此一并表示衷心的感谢。由于基因克隆技术的不断更新及迅速发展,更由于我们水平和经验所限,本书难免存在缺点和错误,恳请同行专家、使用本教材的师生及其他读者批评指正。

刘志国 屈伸
2003年5月

内 容 提 要

本书紧跟生命科学的发展步伐，打破传统的理科与工科教学割裂的现状，将基因克隆基本技术与工程应用原理有机地结合为一体，适应 21 世纪生命科学及其他相关学科发展的需要。

全书共十六章，三个方面内容。包括基因克隆的理论及其结构与技术基础；基因克隆的原理与技术；基因克隆的工程原理与应用。本书力求深入浅出地反映当代基因克隆技术领域的研究与发展状况，适合作为生命科学领域各相关专业教学与研究使用，也可作为其他学科生物技术或生物工程类课程的教材或参考书。

目 录

第一章 概论	1
一、基因的概念及其分子与结构基础.....	1
二、基因克隆的概念与基本步骤.....	3
三、基因工程的研究内容.....	4
四、基因工程的安全性问题.....	6
第二章 核酸分子的结构与功能	9
第一节 核酸的化学	9
一、核酸的化学组成.....	9
二、碱基与核糖.....	9
三、核苷与核苷酸.....	10
四、核苷酸之间的连接.....	11
第二节 DNA 的结构与功能	11
一、DNA 的一级结构.....	11
二、DNA 的二级结构.....	11
三、DNA 的三级结构.....	16
第三节 RNA 的结构与功能	17
一、核糖体 RNA.....	17
二、mRNA 与不均一核 RNA (hnRNA).....	18
三、转运 RNA (tRNA).....	20
四、其他 RNA 分子.....	21
第四节 核酸的变性、复性与杂交	22
一、变性.....	22
二、复性.....	23
三、核酸杂交.....	23
第三章 基因与基因组的结构与功能	25
第一节 基因的结构与功能	25
一、转位因子.....	25
二、断裂基因.....	27
三、假基因.....	29
四、重叠基因.....	29
第二节 基因组的结构与功能	30
一、病毒基因组的结构与功能特点.....	30
二、原核生物基因组.....	31
三、真核生物基因组.....	33
四、人类基因组.....	37

第四章 基因的表达与调控	41
第一节 基因表达调控的基本概念与原理	41
一、基因表达调控的概念及方式	41
二、基因表达调控的基本原理	41
第二节 原核生物的基因表达调控	44
一、操纵子的调控模式	44
二、翻译水平的调控	48
第三节 真核生物的基因表达调控	49
一、DNA 水平的调控	50
二、转录水平的调控	50
三、转录后水平调控	53
四、翻译水平的调控	54
五、翻译后水平的调控	55
第五章 克隆操作中使用的工具酶	57
第一节 限制性核酸内切酶	57
一、限制性核酸内切酶的发现和生物功能	58
二、限制性核酸内切酶的命名与分类	58
第二节 DNA 连接酶	62
第三节 DNA 聚合酶	63
一、DNA 聚合酶 I	63
二、Klenow 聚合酶	64
三、Taq DNA 聚合酶	65
四、逆转录酶	65
五、T4 DNA 聚合酶	65
六、T7 DNA 聚合酶	67
第四节 修饰酶	67
一、碱性磷酸酶	67
二、末端转移酶	68
三、T4 多核苷酸激酶	69
四、S1 核酸酶	69
第六章 基因工程相关技术	71
第一节 PCR 技术	71
一、PCR 技术基本原理	71
二、PCR 技术的特点	73
三、引物的设计	74
四、PCR 反应体系的组成及其条件的优化	75
五、扩增产物的检测分析	78
六、PCR 常见问题及解决办法	80
第二节 DNA 序列测定	80
一、Sanger 双脱氧链终止法	81

二、Maxam-Gilbert 化学修饰法	82
三、DNA 序列分析自动化	83
第三节 DNA 合成	84
一、化学合成法	84
二、酶促合成法	85
三、基因的自动化合成	86
四、化学合成寡聚核苷酸片段连接成完整基因的方法	86
五、人工合成的寡聚核苷酸片段的应用	86
六、人工合成基因的局限性	86
第四节 核酸分子杂交技术	87
一、核酸分子杂交技术的原理	87
二、核酸探针的制备	87
三、核酸探针的标记	88
四、核酸分子杂交技术	89
五、DNA 芯片技术	93
第七章 基因克隆载体	95
第一节 质粒载体	95
一、质粒 DNA 的基本特性	95
二、质粒载体的基本要求	96
三、几种常用的质粒载体	96
第二节 噬菌体载体	102
一、噬菌体的一般生物学特性	103
二、 λ 噬菌体	103
三、M13 噬菌体	106
四、噬菌粒	106
五、黏粒	108
第三节 酵母载体	108
一、酵母载体	108
二、酵母人工染色体	110
第四节 病毒载体	110
一、SV40 病毒及 SV40 病毒载体	110
二、逆转录病毒载体	111
三、腺病毒及其载体	112
第八章 目的基因克隆	113
第一节 克隆基因的一般方法	113
一、化学合成法	113
二、逆转录 PCR 克隆目的基因	115
三、其他 PCR 方法克隆目的基因	115
第二节 目的基因片段与载体的连接	117
一、黏性末端 DNA 片段的连接	117

第三节	构建文库克隆目的基因	121
一、	构建 cDNA 文库克隆目的基因	121
二、	构建基因组文库克隆目的基因	126
第九章	目的基因克隆的其他方法	131
第一节	mRNA 差异显示技术	131
一、	基本原理和方法	131
二、	DDRT-PCR 的特点	132
第二节	差别杂交和扣除杂交克隆的目的基因	134
一、	差别杂交	134
二、	扣除杂交	134
第三节	代表性差别分析技术克隆目的基因	136
一、	基本原理	136
二、	RDA 和 cDNA-RDA 的特点	137
第四节	抑制性减法杂交技术	139
一、	SSH 的主要原理	139
二、	SSH 的基本过程	140
三、	SSH 技术的优越性	141
四、	SSH 的主要缺陷	142
第十章	重组体的筛选与鉴定	143
第一节	重组 DNA 导入受体细胞	143
一、	自然条件下的转化现象	143
二、	受体细胞的选择	144
三、	转化方法	145
四、	转化率及其影响因素	147
第二节	重组体的筛选与鉴定	148
一、	根据遗传表型的筛选方法	148
二、	依赖重组子结构特征的筛选法	151
第十一章	外源基因在原核细胞中的表达	154
第一节	原核生物基因表达的特点	154
第二节	大肠杆菌表达系统	155
一、	大肠杆菌表达载体的表达元件	155
二、	大肠杆菌表达载体的选用	159
三、	重组 DNA 表达载体的构建和表达	162
四、	提高外源基因表达水平的措施	164
五、	包涵体	165
第三节	芽孢杆菌表达系统	166
一、	芽孢杆菌基因表达的特点	166
二、	芽孢杆菌表达系统	167
三、	存在的问题	169
第四节	链霉菌基因表达系统	169

一、链霉菌的生物学特征	170
二、链霉菌基因表达的特点	170
三、链霉菌基因表达系统	172
四、影响链霉菌中基因表达的因素	174
五、链霉菌作为表达系统的优缺点及发展趋势	175
第十二章 外源基因在真核细胞中的表达	177
第一节 酵母表达系统	177
一、酵母表达系统	177
二、酵母表达系统的应用	180
三、酵母表达系统新的应用方向	182
第二节 昆虫表达系统	183
一、杆状病毒表达系统	183
二、家蚕核型多角体病毒 (BmNPV) 表达系统	188
第三节 哺乳动物细胞表达系统	189
一、哺乳动物细胞表达系统的构成	189
二、常用的细胞表达系统	194
三、基因的导入方法	194
四、外源基因在哺乳细胞的表达和基因表达产物的检测	197
五、进展与展望	198
第十三章 基因工程菌的大规模培养	202
第一节 基因工程菌发酵的特点	202
一、发酵产物生成的代谢途径不同	202
二、基因工程菌遗传不稳定性	202
三、基因工程菌发酵的其他特点	204
第二节 基因工程菌的深层培养方式	204
一、分批培养	204
二、补料分批培养	205
三、连续培养	205
四、透析培养	206
五、固定化培养	206
第三节 基因工程菌发酵生物反应器	206
一、机械搅拌发酵罐	206
二、气升式发酵罐	208
第四节 基因工程菌的发酵条件和控制	210
第十四章 转基因动物细胞的大规模培养	214
第一节 动物细胞培养特点	214
第二节 规模培养用动物细胞的要求与特性	215
一、规模培养用动物细胞的要求	215
二、常用动物细胞的特性	216
第三节 动物细胞培养条件与培养基	217

一、动物细胞培养条件·····	217
二、培养基·····	218
第四节 动物细胞的大规模培养方法与操作方式·····	220
一、动物细胞的大规模培养方法·····	220
二、动物细胞培养的操作方式·····	222
第五节 动物细胞生物反应器·····	223
第十五章 外源基因表达产物的分离纯化与质量控制·····	226
第一节 分离纯化的目标和策略·····	226
一、产品的纯度、安全性和成本考虑·····	226
二、纯化策略·····	226
第二节 分离纯化的一般过程·····	227
一、细胞抽提与重组蛋白质的回收·····	228
二、包涵体的溶解和重组蛋白质的复性·····	229
三、分泌蛋白质的浓缩·····	229
四、柱层析分离方法·····	230
五、选择分离纯化方法的依据·····	233
六、分离纯化工艺的放大·····	234
第三节 重组蛋白质的分析鉴定和质量控制·····	235
一、定量分析·····	235
二、纯度分析·····	236
三、重组蛋白质的鉴定·····	237
四、基因工程药物的质量控制·····	238
第十六章 转基因动物·····	240
第一节 转基因动物的原理与方法·····	240
一、转基因动物的原理·····	240
二、制备转基因动物的方法·····	240
三、各种转基因动物研究现状·····	244
四、转基因动物的应用·····	245
五、转基因动物研究存在的问题·····	247
附录 基因工程安全管理办法·····	249
主要参考文献·····	253
一些有用的网址·····	253

第一章 概 论

19世纪中叶，当西方世界普遍流行着创世说，相信上帝主宰生命现象的时候，英国生物学家达尔文经过数年的环球考察，提出了著名的进化论观点。在其发表的《物种起源》一书中，达尔文用大量事实证明“物竞天择，适者生存”的进化论思想，将生命现象纳入科学的轨道。

与此同时，生物学家 Schleiden 和 Schwann 经过多年的研究观察，提出了细胞学说，认为所有生命组织的基本组成单位是形态相似分化不同的细胞，从而将宏观的生命现象带入微观世界，将生命活动归结为组成生物体的细胞活动的总和。而直接观察研究生物遗传现象的 Mendel，经多年的豌豆杂交实验，分析归纳得出两条基本的遗传规律，并提出了真正主宰生命遗传现象的基本单位——遗传因子 (hereditary factor)。此后，Morgan 进一步发展和完善了遗传规律，提出了基因学说，将遗传现象与细胞内的特定物质——基因联系起来，并特别指出基因是组成物种的独立要素。至此基因成为遗传研究的重要内容。

1944年，美国微生物学家 Avery 发表了细菌转化的研究报告，证明了基因的物质基础是 DNA 而不是蛋白质或其他物质。20世纪50年代初，Watson 和 Crick 揭示了 DNA 的分子结构，随后，DNA 的半保留复制机制被阐明，基因研究进入到分子水平。20世纪70年代初，DNA 的体外重组获得成功。从此，不同来源的 DNA 可以在体外重新组合，成新的 DNA 分子，这一新的 DNA 分子能在细菌或其他生物细胞中表达或表现出新的遗传性状，由此诞生了现代重要的生物技术——基因工程技术。如今，这项以基因为主要研究对象的综合性生物技术已经成为现代生物技术的核心和基础，并已广泛渗透到其他学科领域，深刻影响着整个生命科学的研究与发展，成为当今科学领域最具影响力的技术之一。

一、基因的概念及其分子与结构基础

1. 基因的概念与化学本质

1909年，丹麦生物学家 W. Johannsen 根据希腊文“给予生命”之义，创造了“基因 (gene)”一词，并用基因来代替 Mendel 提出的“遗传因子”。但是他所说的基因并不代表任何具体的物质形态，而只是一种抽象的遗传单位或符号。Morgan 等人经过多年的果蝇杂交实验研究，将基因与生物体中某一特定的染色体联系起来。但在 DNA 双螺旋结构提出之前，人们对基因的理解仍然缺乏具体的物质内涵，对基因的化学本质、结构特征以及基因如何控制遗传性状等仍一无所知。

最早用实验证明基因化学本质的是微生物学家 Avery。在他所进行的肺炎球菌的转化实验中，将有毒的肺炎球菌的 DNA 与无毒的肺炎球菌混合培养，能使无毒的肺炎球菌获得有毒的性状。这一实验有力地证明了 DNA 是细菌性状发生转化的原因，从而在理论上确立了 DNA 是遗传信息及基因的载体。几年之后，Hershey 等进一步证实了这一观点。在 Hershey 等进行的噬菌体实验中，他们用放射性同位素³²P 和³⁵S 分别标记 T2 噬菌体的内部 DNA 和外壳蛋白质，然后用这种噬菌体感染大肠杆菌宿主细胞，结果发现只有³²P 标记的 DNA 进入到了宿主细胞，并重新繁殖出子代噬菌体。在宿主细胞内新组装的噬菌体的外壳蛋白质中

并无放射性标记, 进一步表明: 噬菌体中的遗传物质是 DNA, 而不是蛋白质。上述实验过程如图 1-1 所示。

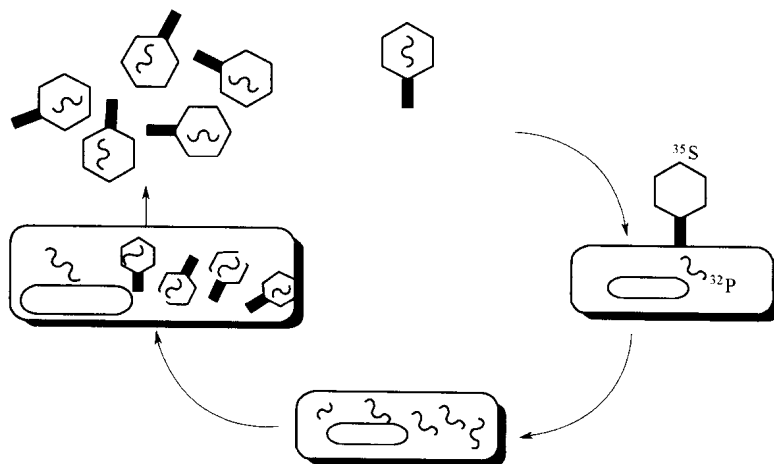


图 1-1 同位素标记法证实 DNA 是遗传信息的载体

2. 基因的分子基础

现代分子生物学研究已经证实 DNA 是遗传信息的主要载体, 基因的化学本质就是一段 DNA。Watson 和 Crick 提出的 DNA 双螺旋结构模型为遗传信息传递提供了物质结构基础。根据这个模型, DNA 分子是由 2 条互补的多核苷酸链相互缠绕而成, 2 条链之间通过碱基配对结合在一起。当 DNA 复制时, DNA 螺旋解开形成单链, 然后以每条单链为模板, 在酶的催化下, 按照碱基互补配对原理合成新的子代 DNA。子代 DNA 中保留了一条完整的亲代 DNA 链, 另一条链则是新合成的, 如图 1-2 所示。通过这样准确地复制, 基因便能代代相传, 一直保留下去。尽管现在知道 RNA 也可以作为遗传物质 (如某些病毒或噬菌体), 但是绝大多数生物还是以 DNA 的形式携带遗传信息。

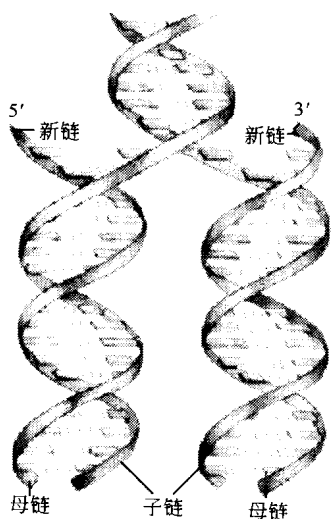


图 1-2 DNA 的半保留复制模型

基因作为一个遗传功能单位, 它所对应的核苷酸序列被称为顺反子 (cistron)。显然, 一个顺反子编码一种完整的多肽, 因此, 顺反子是一个功能单位。它由许多可以突变的位点组成, 这些位点之间可以发生交换。根据 Benzer 的计算, 在功能 DNA 中, 最小交换单位约为 1~3 个核苷酸, 因此, 理论上顺反子中的最小交换单位 (又称交换子) 和最小突变单位 (又称突变子) 都应该是 DNA 分子中的一个核苷酸对。过去认为的基因是一个交换单位和突变单位的观点并不正确。在一般文献中, 常将基因和顺反子这两个术语等同使用, 但仔细分析, 两者是有区别的: 在原核细胞和低等真核细胞中, 基因和顺反子是等价的; 而在高等真核细胞中, 由于基因中内含子的存在, 此时顺反子等价于真核基因的外显子。

3. 基因的结构

基因是编码蛋白质和 RNA 的基本遗传单位。化学组成上, 基因是一段具有特定结构与功能的连续脱氧核糖核苷酸序

列；结构上，基因由多个不同的区域组成。无论是原核基因还是真核基因，都可划分为编码区和非编码区两个基本组成部分。编码区是可以被转录的区域，由连续的密码子组成，其中包括起始密码子（通常是 AUG）和终止密码子（UAA、UAG 和 UGA）。同时，编码区中包含 5'端的非翻译区（5'UTR）和 3'端的非翻译区（3'UTR），它们是基因表达所必需的结构。非编码区则位于转录区以外，包含调控序列。

基因的另一重要结构成分是启动子（promoter），是位于基因 5'端上游紧靠转录起点的一段非编码序列，其功能是引导 RNA 聚合酶与基因相应部位的正确结合，启动基因的转录。一般来说，原核基因的启动子比较简单，只有数十个碱基组成，而真核基因的启动子较大，可能涉及数千个碱基。在基因 3'端下游与终止密码子相邻的一段非编码核苷酸短序列叫做终止子（terminator），有终止转录的功能，即一旦 RNA 聚合酶完全通过基因的转录单位后，聚合酶就不能继续向前移动，使转录活动终止。典型的原核基因与真核基因的基本结构如图 1-3 和图 1-4 所示。

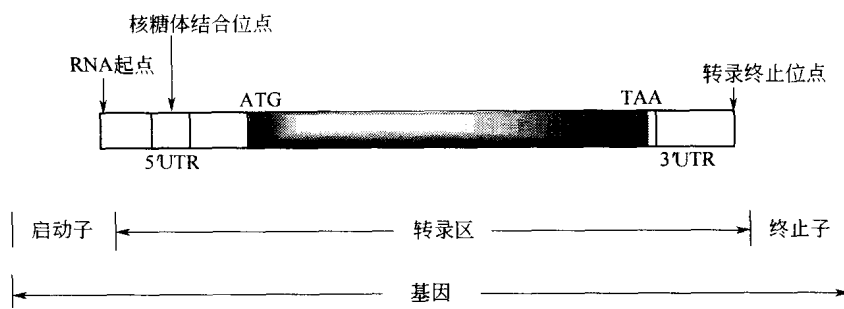


图 1-3 典型的编码蛋白质的原核基因结构示意图

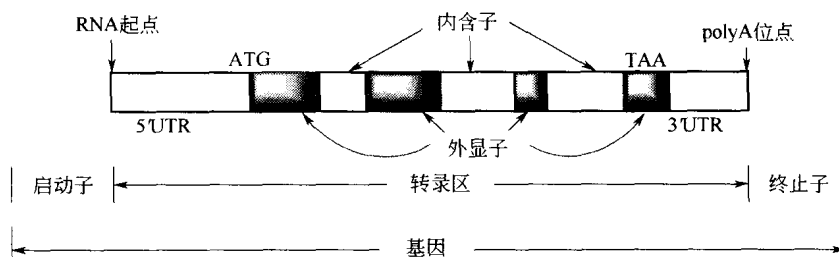


图 1-4 典型的编码蛋白质的真核基因结构示意图

二、基因克隆的概念与基本步骤

1. 基因克隆的概念

1969 年美国哈佛大学的 R. Beckwith 博士领导的研究小组运用 DNA 杂交技术成功地分离了大肠杆菌的 β -半乳糖苷酶基因，开创了基因分离的成功先例，从而激发了人们从不同角度分离基因的积极性。1972 至 1973 年，以 H. Boyer 和 P. Berg 等人为代表的一批科学家发展了有关重组 DNA 的技术，并于 1972 年得到了第一个重组 DNA 分子，于 1973 年完成了第一个基因的克隆，由此宣告了基因克隆技术的诞生。

“克隆”（clone）一词作名词使用时是指从一个共同祖先无性繁殖下来的一群遗传上同一的 DNA 分子、细胞或个体所组成的特殊群体；作动词使用时，是指产生这一群体的过

程。文献中一般所说的基因克隆是指在体外，借助于能自我复制的载体，将目的基因引入到宿主细胞中进行增殖，以获得大量的特定 DNA 片段，或以此为基础，通过工程方法表达出大量相应的蛋白质产物。习惯上，基因克隆与基因工程含义相近，并未严格区分，在本书中也将它们视为同义词（文献中常用的其他同义词包括：重组 DNA、分子克隆、遗传工程等），但细分起来，这两个名称之间存在细微的差别：基因克隆强调目的基因的克隆过程，而基因工程则着重于克隆工作的全局和整体。

2. 基因工程的基本步骤

基因工程技术自诞生以来已经取得了巨大的成就，特别是一些现代技术和先进仪器的不断涌现，进一步推动了基因工程技术的发展。但其基本研究步骤仍主要包括以下几个方面。

- ① 采用各种方法从复杂的生物体基因组中分离获得带有目的基因的 DNA 片断。
- ② 在体外，将带有目的基因的外源 DNA 片段连接到具有自我复制功能及筛选标记的载体分子上，构建成重组 DNA 分子（也称为重组体）。
- ③ 将重组体转移到宿主细胞，并随宿主细胞的繁殖而扩增。
- ④ 从细胞繁殖群体中筛选获得重组体的受体细胞克隆（称为重组子）。
- ⑤ 从筛选出来的受体细胞中提取扩增的目的基因，以做进一步的分析鉴定。
- ⑥ 将目的基因克隆到合适的表达载体上，导入宿主细胞，构建成高效、稳定的具有功能性表达能力的基因工程细胞。
- ⑦ 利用工程技术大规模培养上述的基因工程细胞，获得大量的外源基因表达产物。
- ⑧ 工程细胞表达产物的分离纯化，并最终获得所需的基因工程产品。

上述 8 个步骤也可归并为两大部分，分属上游技术和下游技术。其中上游技术包括①~⑤；下游技术包括⑥~⑧。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，上游设计中应以简化下游工艺和装备为指导思想；下游技术则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。

三、基因工程的研究内容

1. 基因克隆工具的研究

基因工程之所以能够在体外将不同来源的 DNA 重新组合构成新的 DNA，并在宿主细胞扩增和表达，主要依赖一系列重要的克隆工具，主要包括：基因工程载体、基因工程的工具酶及基因工程的受体系统。对基因工程技术中这些重要工具的研究是基因工程研究的重要内容之一。

(1) 基因工程载体的研究 载体是外源基因的运载工具，它能带动外源基因在宿主细胞内复制和表达，并能利用载体上特殊的筛选标记获得含有重组体的细胞克隆，因此是基因克隆操作中必备的工具。目前已构建了数以千计的各类载体：有原核载体和真核载体；有克隆载体和表达载体；有质粒载体、噬菌体载体、病毒载体及其他人工构建的载体等。这些载体的研究与应用极大地推动了基因克隆工作的发展，简化了过去复杂的操作过程，提高了克隆的效率，因此基因工程载体的研究目前依然是基因工程研究的重要内容之一。

(2) 工具酶的研究 基因工程工具酶是指体外进行 DNA 切割、连接、修饰及合成等过程中所需要的酶，主要包括：限制性核酸内切酶、DNA 连接酶、DNA 聚合酶及各种修饰酶等。正是由于这些工具酶的发现与应用，才使得基因克隆操作在技术上成为可能。例如限制性核酸内切酶的出现使 DNA 的体外切割成为现实；连接酶的应用使不同来源的 DNA 片段

可以相互连接；耐高温的 DNA 聚合酶的发现使聚合酶链式反应（PCR）成为最广泛使用的克隆技术等。因此开展工具酶的研究对基因工程技术的进一步发展起着重要的作用。

(3) 基因工程受体系统的研究 基因工程受体与基因工程载体是相配套的一个系统的两个方面。受体是载体的宿主，是外源基因表达的场所。受体可以是单个细胞，也可以是组织、器官、甚至是整个个体。受体的选择需要根据实验的目的、实验中所用的载体以及所采用的实验方法而定。目前最为常用的受体系统是大肠杆菌受体系统和酵母受体系统，它们分别是原核受体与真核受体的代表。除此以外，也发展了其他受体系统，如链霉菌、芽孢杆菌、丝状真菌及动物细胞受体系统。还有的利用动物的组织（如乳腺组织、胚胎组织等）作为受体进行基因表达的研究等，由此可见基因工程受体系统的研究也是克隆工作的一项重要内容。

2. 基因克隆技术的研究

基因工程诞生至今只有短短 30 年左右的时间，但这项技术已经取得了巨大的发展，并广泛渗透到各个学科，推动着整个生命科学的发展。在这期间基因克隆技术自身的发展起到了重要的作用，新的克隆方法不断涌现，如以 PCR 为基础的差异筛选技术、长片段的 DNA 序列测定技术、高通量的基因芯片技术、借助计算机和互联网的生物信息技术等，这些研究技术的运用彻底改变了基因克隆研究的规模和速度，成为基因工程研究中的重要内容。

3. 克隆对象——目的基因的研究

基因是一种重要的生物资源，而且是一种有限的战略性资源。目前各国都十分重视基因资源的开发，倾力资助基因研究。人类基因组计划中科学家们的最新研究结果，表明人类基因总数比预期的低，初步定位在 2.6 万~4.0 万个之间。如此少的基因自然成为激烈竞争的对象，谁拥有的基因专利多，谁就在基因工程领域占据了主动地位。由此可见，获得目的基因也同样是基因工程研究的重要内容，这方面的研究工作已经从零星的单个基因的研究发展到大规模的基因组研究；从人类基因组延伸到其他生物基因组。我国的水稻基因组计划目前也已经取得重要进展，在 2002 年 4 月 5 日出版的知名科学杂志“Science”上发表了由 100 多位中国科学家署名的突破性论文《水稻（籼稻）基因组的工作框架序列图》，这篇论文被“Science”杂志称为“这一领域里具有重要意义的里程碑”，这一成就标志着我国已经进入世界生物技术的前沿。

4. 基因工程产品的研究

研究基因除了分析基因的结构与功能以外，更具魅力的是研究基因的表达产物及其在各领域里的应用，其中最突出的是在医药领域的应用。从 1982 年美国 Lilly 公司首先将重组胰岛素投放市场以来，迄今已有 50 多种基因工程药物上市，近千种处于研发状态，形成一个巨大的高新技术产业，产生了不可估量的社会效益和经济效益。据不完全统计，美国的生物技术公司已有 2000 多家，欧洲共有约 1000 家，其中以英、德、法为主。到 2000 年，基因工程药品全世界的年销售额已突破 600 亿美元。另外有 400 多个生物技术药物处于不同的研究开发阶段，这些正在开发的生物药物按分子类别归类，排在前九位的分别是单克隆抗体、疫苗、基因治疗、白介素、干扰素、生长因子、重组可溶性受体、反义药物和人生长激素。目前基因工程药物的发展正在带来一场新的药业革命，它将成为 21 世纪药业的支柱。我国的基因工程药物发展也十分迅速，据不完全统计，我国已经产业化的基因工程药物约有 20 多种，还有很多正在进行临床实验和上游研发状态，相信随着我国生物技术水平的迅速提高以及我国独特的人口基因资源和广阔的市场优势，基因药物的开发将会赶上和超过世界先进水平。

四、基因工程的安全性问题

1. 基因工程技术可能给自然环境和人类健康带来潜在威胁

基因工程技术的不断发展,已经为解决人类的粮食、医药以及环境问题带来了美好前景。利用这一技术对农作物、畜禽品种和水产品的遗传基因进行修饰,可以改良品种、增加产量。在转基因研究中,转基因牛、羊、鱼、虾及转基因粮食、蔬菜、水果等都相继培育成功并已部分投入市场,为人类带来更多实惠和机遇。但这些转基因产品是否会对人类和环境造成危害尚不清楚。因此,学者们提出运用克隆技术时应该关注以下几个方面。

(1) 生态环境方面 存在于转基因植物中的具有某种抗性的基因有可能通过杂交转移到其野生或半驯化种中去,这种转移的结果是在特定条件下将增强这些植物杂草化的特性,并最终造成生态环境的破坏;一些具有抗虫特性的转基因植物,除了能对害虫产生毒害而使其死亡外,对许多有益生物也可产生直接或间接的影响,如曾经有报道转基因抗虫玉米花粉可导致蝴蝶死亡。

(2) 生物多样性方面 转基因动物一般都具有某种普通动物所不具备的优势特征,因此在自然环境中,将有可能通过改变物种间的竞争关系而破坏原有自然生态平衡,如一棵抗吃种子害虫的转基因松树会由于种子抗虫而大量保留下来,最终在数量上大大超过其他物种,导致森林群落遭到破坏;又如在转基因植物中,病毒载体的使用会导致病毒基因在所有细胞普遍存在,其重组的风险大大高于普通植物,因此当转基因作物大面积种植时,将难以预料会出现什么问题;转基因微生物也存在取代其他物种的可能性,并导致生物多样性发生无法挽回的损失。

(3) 影响人体健康方面 转基因生物产品作为商品对人体健康可能带来的影响,一直是人们关心的问题。转基因生物作为食品进入人体,很有可能出现某些毒理作用和过敏反应。国外已有儿童饮用转基因大豆豆浆产生过敏反应的报道,美国报道过转基因西红柿导致厨师过敏的事件;德国报道的转基因猪虽然比正常猪大一倍,出肉量也多一倍,但百病缠身,患有胃肿瘤、肺炎、心力衰竭和关节畸形,因此人食用后也存在患病的可能;在进行转基因作物实验时,一般使用抗生素抗性基因作为标记基因,也可能使人体对很多抗生素产生抗性;食用转入生长激素类基因的动植物可能对人体生长发育产生重大影响,而这些影响,一般需要经过很长时间才能表现和监测出来。另外,转基因微生物可能与其他生物交换遗传物质,产生新的有害生物或增强有害生物的危害性,最终引起疾病的流行。

2. 对生物安全性的担忧

基于生物技术发展有可能带来的不利影响,人们提出了生物安全的概念。所谓生物安全一般指由现代生物技术开发和应用所能造成的对生态环境和人体健康产生的潜在威胁,及其所采取的一系列有效预防和控制措施。生物技术产品到底能给人类造成多大的影响和危害,是人们一直在讨论的问题,但迄今为止各界对生物安全问题仍存在一些不同看法。

有人认为转基因植物与杂交水稻没有什么区别,都是改变了某种生物的个别基因,因此不应该有什么危害;也有人认为转入的基因在食用后必然会被消化系统分解掉,而对人体无害;还有人认为生物安全概念的提出不过是由于西方人对环保的过分重视,以及其宗教上的观念太过强烈所致。有学者指出,在自然界有很多谷物、蔬菜和水果都会经常受到植物病毒侵染,实际上人们每天都在大量摄入病毒外壳蛋白,但多年来人们食用后并没有见到明显的不良反应。那些从事生物技术研究与公司或研究单位也纷纷拿出证明其生物技术产品