

实用生物技术丛书

基因克隆技术 在制药中的应用

杨汝德 主编



化学工业出版社

实用生物技术丛书

基因克隆技术在制药中的应用

杨汝德 主编

化学工业出版社
· 北 京 ·

(京) 新登字 039 号

图书在版编目 (CIP) 数据

基因克隆技术在制药中的应用/杨汝德主编. —北京:
化学工业出版社, 2003.12
(实用生物技术丛书)
ISBN 7-5025-4987-0

I. 基… II. 杨… III. 无性系-遗传工程-应用-生
物制品: 药物-制造 IV. TQ464

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2003) 第 117940 号

实用生物技术丛书
基因克隆技术在制药中的应用

杨汝德 主编
责任编辑: 梁 虹
文字编辑: 周 倜
责任校对: 李 林
封面设计: 郑小红

*

化学工业出版社出版发行
(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
北京市彩桥印刷厂印刷
北京市彩桥印刷厂装订

开本 787 毫米×1092 毫米 1/16 印张 18 字数 434 千字
2004 年 1 月第 1 版 2004 年 1 月北京第 1 次印刷
ISBN 7-5025-4987-0/Q·77
定 价: 45.00 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

《实用生物技术丛书》编委会

编委会主任：郭 勇

编委会委员：（以姓氏笔画为序）

杨汝德 华南理工大学 教授

赵树进 广州军区广州总医院 教授，博士生导师

郭 勇 华南理工大学 教授，博士生导师

梁世中 华南理工大学 教授，博士生导师

彭志英 华南理工大学 教授，博士生导师

序

生物技术 (biotechnology) 又称为生物工程, 是生物科学与工程技术相结合而形成的新学科, 是 20 世纪后半叶迅速发展起来的新技术。

回顾 20 世纪, 生物工程迅速崛起, 已在理论与应用领域取得举世瞩目的成果, 为新物种的形成和新物质的生产开辟了崭新的途径。

展望 21 世纪, 伴随着人类基因组计划取得划时代的成果、基因组学和蛋白质组学的诞生以及生物信息学的迅速发展, 生物工程可望以更快的速度腾飞, 将在世界科技与经济的发展中起支柱与骨干的作用。

生物工程主要包括基因工程、细胞工程、酶工程和发酵工程。

一、基因工程

基因工程又称为重组 DNA 技术, 是通过人工操作, 在分子水平上进行基因重组、改造和转移, 以获得具有新的遗传特性的细胞, 合成人们所需物质的技术过程。1973 年, 科亨 (Cohen) 和波伊尔 (Boyer) 发明了克隆技术, 成功地将外源基因转入大肠杆菌细胞并得以表达, 宣告了基因工程的诞生。其后各种基因工程药物层出不穷, 转基因动物和转基因植物不断涌现, 取得了激荡人心的丰硕成果。

21 世纪基因工程的发展前沿是基因组和功能基因组的研究和开发。1990 年启动的“人类基因组计划”已经于 2003 年 4 月完成, 已经全部阐明了人类染色体 DNA 的约 30 亿对碱基的排列顺序, 接着将继续进行功能基因组的研究, 以阐明其中的 3 万多个基因的序列、位置及其功能。到时人们对疾病的诊断和治疗将在基因水平上进行, 这对提高人体素质、保障人体健康有着划时代的意义。同时还将逐步开展对其他物种的基因组研究, 这将使人们对物种的改良和对所需物质的生产提高到一个前所未有的高度。

二、细胞工程

细胞工程是在细胞水平上改变细胞的遗传特性或通过大规模细胞培养以获得人们所需物质的技术过程。1975 年, 科勒 (Kohler) 和米尔斯坦 (Milstein) 首创杂交瘤技术, 开创了细胞工程的新纪元。细胞融合技术、植物组织培养技术、植物细胞培养技术、动物体细胞克隆技术、杂交瘤细胞培养技术、干细胞培养技术等都在世界范围内发出夺目的光彩。

21 世纪细胞工程发展的重点是动植物细胞培养技术。动物细胞和植物细胞都可以如同微生物细胞那样, 在人工控制条件的生物反应器中培养, 以获得各种所需的产物。

动物细胞培养主要用于生产激素、疫苗、单克隆抗体、酶、多肽等功能性蛋白质以及皮肤、血管、心脏、大脑、肝、肾、胃、肠等组织器官。在医药工业和医学工程的发展中占有重要的地位。

植物细胞培养主要用于色素、香精、药物、酶等次级代谢物的生产。具有缩短周期、提高产率等显著特点, 不占用耕地, 并且可以不受地理环境和气候条件等的影响, 对于农业产品的工业化生产具有深远的意义。

三、酶工程

酶工程是酶的生产与应用的技术过程。即是通过人工操作, 获得人们所需的酶, 并通过各

种方法使酶发挥其催化功能的技术过程。1969 年,固定化氨基酰化酶首次在工业上成功地用于氨基酸的拆分,有力地推动了酶工程的发展。其后,酶分子修饰技术,酶、细胞、原生质体固定化技术,有机介质中酶的催化技术等的发展,为酶的生产和应用开辟了崭新的途径。

21 世纪酶工程的发展焦点是新酶的研究与开发应用。随着生物工程的发展,被研究和开发的新酶将越来越多,其中最令人注目的有核酸类酶(ribozyme)、抗体酶(abzyme)和端粒酶(telomerase)等。此外,酶的优化生产和高效应用也将进一步发展到前所未有的水平。

四、发酵工程

发酵工程又称为微生物工程,是在人工控制的条件下,通过微生物的生命活动而获得人们所需物质的技术过程。1944 年,青霉素液体深层发酵的成功,标志着现代发酵工程时代的到来。随后各种抗生素、氨基酸、核苷酸、维生素等的发酵生产蓬勃发展,使发酵工程进入了全盛时期。

21 世纪发酵工程的发展策略是利用 DNA 重组技术获得更加符合人们需要的优良的微生物细胞,并进行全面的代谢调节控制。由于传统的从自然界直接获得的微生物或者经过筛选、诱变得到的微生物已难以满足人们的需要,21 世纪用于发酵工程的微生物大多数都是经过基因重组、改造、转移而获得的具有优良特性的工程菌。利用这些工程菌进行发酵,需要进行一系列的代谢调节控制,才能获得理想的发酵效果。故此,21 世纪的发酵工程将根据代谢工程的理论对优良的工程菌进行全面的代谢调控,以获得人们需要的各种代谢产物。

由此可见,生物工程不仅对于物种的改良和进化具有极其重大的意义,而且在医药、食品、工业、农业、环保、能源等方面有重要的应用价值,将对人类的健康、长寿和世界科技、经济、社会的发展产生深远的影响。

为了加速我国生物工程的发展,使生物技术的研究成果尽快产业化,加速生物技术在各个领域的应用,特组织有关专家学者编写《实用生物技术丛书》。

本丛书的编写宗旨是以实用生物技术为特色,以生物技术在医药、食品、轻工、化工、环保、能源等领域的应用为主线,理论与实际紧密结合,推动生物技术和产业化的进程。为此,本丛书不是面面俱到地介绍各种生物技术的基本理论和基本知识,而是有重点地选择介绍一些实用性强、前景看好,与产业化关系密切的生物技术的原理、方法及其应用的最新研究进展与发展趋势。本丛书由下列各分册组成:

- 《基因克隆技术在制药中的应用》
- 《细胞融合技术与应用》
- 《植物细胞培养技术与应用》
- 《动物细胞培养技术与应用》
- 《酶的生产与应用》
- 《固态发酵技术与应用》
- 《非热杀菌技术与应用》

各分册均由有实践经验的在职专家撰写,在简明介绍基本理论和基本知识的基础上,重点阐述技术的原理和方法及其应用的最新研究进展和发展趋势。期望本丛书的出版对我国生物技术研究、开发和产业化能够起到积极的推动作用。

郭 勇

2003 年 5 月于广州

前 言

1973年,斯坦福大学的 S. Cohen 和 H. Boyer 成功地进行了第一项基因克隆实验,从而揭开了基因工程的序幕,至今基因工程学已整整经过了 30 年的发展历程。30 年来,基因克隆技术已经在制药、食品、化工、轻工、农业、能源和环保等实际应用方面,取得了许多激动人心的成就,为国民经济发展带来了巨大的效益,给人类进步带来了新的契机。

目前,基因工程学正以新的势头继续向前迅猛发展,成为当今生物科学研究诸领域中最具生命力、最引人注目的前沿学科之一,特别是基因克隆技术在医药领域中的研究和应用,其意义之深远、潜力之巨大,更是无法估量。

基因克隆技术的一个显著特点,是它可以使一个生物体获得与之原有性状完全无关的新性能,从而使人们可以在大量扩增的细胞中,生产出某种珍贵的新型生物药物,其意义无疑是相当重大的。如今,我们可以应用基因克隆技术,将控制这些药物合成的目的基因克隆出来,转移到大肠杆菌或其他生物细胞内进行高效表达,可以方便地经提取纯化得到大量的珍贵药物。实际上,基因克隆技术最成功的成就,是用于治疗 and 预防的新型生物药物的研制、生产和应用。

由于基因克隆技术研究和应用的迅猛发展,不但急需大批的专业人才,也要求培养足够的后备力量。编写本书的目的,是希望为高等院校相关专业的本、专科生和低年级的硕士研究生,以及从事生物药物研制和生产的专业技术人员提供一本比较实用的参考书。

《基因克隆技术在制药中的应用》一书由杨汝德主编,其中下篇第十七章由陈惠音编写。全书分为上下两篇:技术篇和应用篇。技术篇共有九章,在内容上加重了基因克隆技术基本原理的系统论述,较适应作为初学者的本、专科生使用,故这部分也可作为有关专业“基因工程”课程的教学用书;应用篇共有八章,主要介绍基因克隆技术在制药中的应用,并列举各种生物药物基因的克隆与表达实例,以及各种基因工程药物的发酵生产实例,较适应从事生物药物研制和生产的人员使用。

本书在撰写过程中,参阅了国内外学者的著作和登载在刊物中的有关研究论文,同时也努力反映国内学者的研究成果,并尽量保持其原作。在此,谨向原作者表示真诚的谢意,并衷心感谢周世水博士、黄明博士、黄志立博士和张丽君博士等的帮助和支持。

基因克隆技术是一门发展十分迅速的高新技术,新理论和新的研究成果层出不穷,加之其涉及的知识面十分广泛,限于编者的学识和水平,书中疏漏和错误之处在所难免,恳请同行和读者批评指正。

编 者

2003 年 8 月

内 容 提 要

本书论述了基因克隆技术的基本原理，基因克隆技术在生物制药中的研究和应用。全书分为上下两篇：技术篇和应用篇。技术篇在内容上加重了基因克隆技术基本知识的系统论述，内容包括：基因克隆技术概述，基因克隆技术制药常用的工具酶，基因克隆技术制药常用质粒载体和噬菌体载体，基因工程药物目的基因制取，目的基因与克隆载体的体外重组，重组克隆载体引入受体细胞，目的重组克隆的筛选、鉴定与分析，目的基因在宿主细胞中的表达等。应用篇主要介绍基因克隆技术在制药中的应用，并列举各种生物药物基因的克隆与表达实例，以及各种基因工程药物的发酵生产实例，内容包括：基因克隆技术制药概述，生物药物基因的克隆及其在大肠杆菌、酵母菌、昆虫和动物细胞中的表达，基因工程菌和工程细胞的培养与发酵，基因工程药物的分离纯化，基因工程药物的分析与检验等。本书理论加实例，内容反映前沿科学，实用。

本书可供从事生物技术、制药的科研和生产的技术人员及高等院校相关专业的师生使用。

目 录

上篇 技术篇

第一章 基因克隆技术概述	1
第一节 基因克隆技术	1
一、基因克隆技术的诞生和兴起	1
二、基因克隆技术的特点与步骤	3
第二节 基因克隆技术早期开创性研究成就	5
第二章 基因克隆技术制药中常用的工具酶	8
第一节 限制性核酸内切酶	8
一、限制酶的发现	8
二、限制酶的类型	9
三、限制酶的命名	10
四、II型限制酶的特性	10
五、DNA的单酶切与限制片段末端连接	13
第二节 DNA连接酶	14
一、DNA连接酶连接作用的特点	14
二、基因工程中常用的连接酶	14
三、DNA连接酶连接作用的分子机理	15
第三节 DNA聚合酶	16
一、大肠杆菌DNA聚合酶I	16
二、Klenow大片段酶	18
三、T4噬菌体DNA聚合酶	19
四、经修饰的T7噬菌体DNA聚合酶	19
五、TaqDNA聚合酶及Ampli Taq™DNA聚合酶	20
六、反转录酶	20
第四节 DNA修饰酶	21
一、末端脱氧核苷酸转移酶	21
二、碱性磷酸酶	21
三、T4噬菌体多核苷酸激酶	22
第五节 单链核酸内切酶	22
一、S1核酸酶	22
二、Bal31核酸酶	23
第六节 核酸外切酶	24
一、核酸外切酶Ⅶ	24
二、核酸外切酶Ⅲ	24

三、 λ 核酸外切酶	25
第三章 基因克隆技术制药常用质粒载体	26
第一节 质粒概述	26
第二节 质粒 DNA 分子的基本特性	28
一、质粒的构型、特性与大小	28
二、质粒 DNA 的复制	29
三、质粒 DNA 的提取与纯化	31
四、质粒 DNA 浓度和纯度的测定	32
第三节 主要质粒载体的改造和构建	33
一、理想质粒需满足的条件	33
二、质粒载体发展阶段	34
三、pBR322 质粒载体	35
四、pUC 质粒载体	38
五、其他重要的质粒载体	41
第四章 基因克隆技术制药常用噬菌体载体	43
第一节 λ 噬菌体载体	43
一、 λ 噬菌体的基本特性	43
二、 λ 噬菌体基因组的结构与功能	45
三、 λ 噬菌体载体的改造与构建	46
四、常用的 λ 噬菌体载体	49
五、改良型 λ 噬菌体载体	52
第二节 黏粒载体	54
一、黏粒载体的构建	54
二、黏粒载体的特点	55
三、常用的黏粒载体	55
第三节 M13 噬菌体载体	57
一、M13 噬菌体的基本特性	57
二、M13 噬菌体载体的构建	58
三、M13 噬菌体载体系列的优点	61
第四节 噬菌粒载体	61
一、pUC118 和 pUC119 噬菌粒载体	61
二、pBluescript 噬菌粒载体	62
第五节 哺乳动物细胞载体系统	64
第五章 基因工程药物目的基因制取	65
第一节 目的基因的化学合成	65
第二节 构建基因文库法分离目的基因	68
一、构建基因文库法分离目的基因的基本步骤	68
二、真核基因组 DNA 文库的构建过程	71
第三节 酶促合成法制取目的基因	73
一、真核生物细胞中的 mRNA	73

二、从构建的 cDNA 文库中筛选目的 cDNA	74
三、RT-PCR 法合成目的 cDNA	79
第六章 目的基因与克隆载体的体外重组	83
第一节 目的基因与质粒载体的连接	83
一、黏性末端连接法	83
二、定向克隆法	85
三、平末端连接法	87
四、同聚物加尾法	88
五、加人工接头连接法	90
六、加 DNA 衔接物连接法	91
七、其他转换末端形式连接法	91
第二节 目的基因与 λ 噬菌体载体的连接	93
一、 λ 噬菌体载体臂 DNA 的制备	93
二、 λ 噬菌体载体臂与目的 DNA 片段的连接	94
第七章 重组克隆载体引入受体细胞	95
第一节 受体细胞概述	95
一、基因克隆的受体细胞	95
二、重组体分子导入受体细胞的途径	96
第二节 重组体 DNA 分子的转化或转染	97
一、用氯化钙制备新鲜的感受态细胞转化法	97
二、用复合剂制备感受态细胞转化法	98
三、高压电穿孔转化法	99
第三节 重组 λ 噬菌体 DNA 的体外包装与转导	99
一、 λ 噬菌体体外包装的基本原理	100
二、 λ 噬菌体 DNA 的体外包装	100
三、包装提取物的制备	101
四、重组 λ DNA 的体外包装与感染方法	101
第四节 重组克隆载体导入哺乳动物细胞的转染	102
第八章 目的重组克隆的筛选、鉴定与分析	104
第一节 含目的基因重组克隆的筛选	104
一、抗生素抗性基因插入失活法	104
二、 β -半乳糖苷酶基因插入失活法	105
三、快速细胞破碎与凝胶电泳筛选法	105
四、放射性标记核酸探针杂交筛选法	106
五、免疫化学筛选法	112
第二节 目的重组克隆的鉴定	114
一、酶切及凝胶电泳鉴定法	114
二、Southern 印迹杂交法	116
三、Northern 印迹法	117
四、电镜 R-环检测法	117

五、免疫学检测法·····	118
六、基因产物鉴定法·····	121
第三节 重组 DNA 的序列分析·····	121
一、Sanger 双脱氧链终止法 DNA 测序·····	122
二、Maxam-Gilbert 化学修饰法 DNA 测序·····	125
三、快速自动化 DNA 测序·····	126
第九章 目的基因在宿主细胞中的表达·····	127
第一节 外源目的基因在原核细胞中的表达·····	127
一、原核基因表达载体的构成·····	127
二、常见的原核细胞表达载体系统·····	131
三、外源目的基因在原核细胞中的表达形式·····	132
四、在原核细胞中高效表达目的基因·····	134
五、基因定点诱变技术·····	136
第二节 外源目的基因在真核细胞中的表达·····	139
一、真核细胞表达载体的功能元件·····	139
二、酵母菌表达系统·····	141
三、昆虫细胞表达系统·····	145
四、哺乳动物细胞表达系统·····	146

下篇 应用篇

第十章 基因克隆技术制药概述·····	151
第一节 基因克隆技术的应用与发展趋势·····	152
一、全球性的基因工程争夺战·····	152
二、蛋白质工程的研究开发飞速发展·····	153
三、转基因动植物生产药物的研究迅速崛起·····	154
四、医学科学研究取得巨大成就·····	155
五、基因治疗技术取得重大进展·····	155
六、国际“人类基因组计划”提前完成·····	155
第二节 基因克隆技术与生物制药·····	157
一、基因克隆技术制药发展态势·····	157
二、主要基因工程药物简介·····	158
第十一章 生物药物基因的克隆及其在大肠杆菌中的表达·····	163
第一节 人白细胞介素基因的克隆与表达·····	163
一、人白细胞介素-2 融合蛋白工程菌的组建·····	163
二、人白细胞介素-11 的克隆及其融合蛋白表达·····	164
第二节 集落刺激因子基因的克隆与表达·····	167
一、GM-CSF 重组表达载体与工程菌的组建·····	167
二、GM-CSF/IL-3 融合蛋白基因的克隆与表达·····	167
第三节 纤溶酶原激活剂基因的克隆与表达·····	170
第四节 碱性成纤维细胞生长因子基因的克隆与表达·····	171

第五节	胰岛素样生长因子-I 基因的克隆与表达	175
一、hIGF-I 在大肠杆菌蛋白酶缺陷株中的可溶性表达		175
二、重组高效表达载体的构建及 rhIGF-I 的可溶性表达		177
第六节	纳豆激酶基因的克隆及其表达	178
第七节	人血管生成素基因的克隆及其表达	182
一、人血管生成素 cDNA 的克隆与融合表达		182
二、人血管生成素-PE40 融合蛋白基因的克隆及表达		184
第八节	单链抗体- γ 干扰素基因的克隆与表达	186
第十二章	生物药物基因的克隆及其在酵母菌中的表达	188
第一节	纳豆激酶基因的克隆及其在毕赤酵母中的表达	188
第二节	双功能抗体基因的克隆及其在毕赤酵母中的表达	192
第十三章	生物药物基因的克隆及其在昆虫中的表达	194
第一节	红细胞生成素基因的克隆及在家蚕体中的表达	194
第二节	人白细胞介素-12 基因的克隆及在昆虫细胞中的表达	196
第十四章	生物药物基因的克隆及其在动物细胞中的表达	200
第一节	红细胞生成素的克隆及其在 CHO-dhfr ⁻ 细胞中的表达	200
第二节	bFGF 基因的克隆及在成纤维和成骨细胞中的表达	202
第三节	tPA 突变体基因的克隆及其在 CHO 细胞中的表达	204
第四节	以细胞因子重组质粒为佐剂的乙肝 DNA 疫苗的克隆及在 COS-7 细胞表达	205
第五节	乙型肝炎表面抗原 preS2S DNA 疫苗的克隆及其在 COS-1 细胞表达	210
第六节	融合 HBcAg 基因和 IL-2 基因 DNA 疫苗的克隆及其在 COS-7 细胞表达	211
第十五章	基因工程菌和工程细胞的培养与发酵	215
第一节	基因工程细菌的培养与发酵	215
一、rhANG 基因工程菌发酵条件的研究		215
二、治疗型乙型肝炎病毒 DNA 疫苗工程菌的培养与发酵生产		217
三、重组大肠杆菌的高密度发酵技术		220
第二节	基因工程酵母的培养与发酵	221
一、工程酵母表达 HBscFv-IFN γ 的发酵工艺优化		221
二、重组酵母表达纳豆激酶最佳发酵条件研究		223
三、基因工程酵母菌的高密度发酵		226
第三节	工程细胞的培养与发酵	227
第十六章	基因工程药物的分离纯化	229
第一节	影响分离纯化工艺设计的主要因素	229
第二节	各种产物表达形式采用的分离纯化方法	230
一、细胞内不溶性表达产物——包涵体		230
二、分泌型的表达产物		231
三、大肠杆菌细胞内可溶性表达产物		232
四、大肠杆菌细胞周质表达蛋白		232
第三节	基因工程药物的分离纯化实例	232

一、以包涵体形式表达的 rGM-CSF 中试分离纯化	232
二、重组人血管生长素包涵体的分离纯化	234
三、以分泌型表达的人 α_1 干扰素的分离纯化	236
四、以可溶性形式表达的 rhG-CSF 的分离纯化	237
五、在酵母中表达的 HBsAg 的分离纯化	237
六、在酵母中表达 HBscFv-IFN γ 融合蛋白的分离纯化	238
第十七章 基因工程药物的分析与检验	241
第一节 基因工程药物的质量控制	241
一、主要的基因工程药物	241
二、基因工程药物的特点	241
三、基因工程药物的质量要求	242
四、基因工程药物的质控要点	243
五、基因工程药物的制造及检定规程	247
第二节 基因工程药物常用的检验方法	248
一、化学检定法	248
二、肽图分析法	248
三、外源性 DNA 残留量的测定	249
四、宿主细胞蛋白杂质的检测	250
五、无菌试验	252
六、内毒素试验	254
七、异常毒性试验	255
八、热原质试验	256
九、生物学活性（效价）检定	257
第三节 基因工程药物的分析检验举例	257
一、重组人干扰素的分析检验	257
二、重组人白细胞介素的分析检验	258
三、重组人红细胞生成素的分析检验	259
四、重组人集落刺激因子的检验	261
附录 1 干扰素效价测定（细胞病变抑制法）	263
附录 2 重组人白细胞介素-2 效价测定（CTLL-2 依赖细胞株/MTT 比色法）	265
附录 3 EPO 体内活性测定（网织红细胞法）	266
附录 4 EPO 纯度测定（HPLC-SEC 法）	267
附录 5 CHO 细胞蛋白残留量测定（ELISA 法）	268
附录 6 rhG-CSF 效价测定（NFS-60 依赖株/MTT 比色法）	269
主要参考文献	270

上篇 技 术 篇

第一章 基因克隆技术概述

基因克隆技术 (gene cloning technique), 又称为分子克隆技术 (molecular cloning technique) 或重组 DNA 技术 (recombinant DNA technique), 通常称为基因工程 (gene engineering)。它是基因分子水平上的遗传工程, 是 20 世纪 70 年代初期在分子遗传学基础上发展起来的一个崭新领域, 是一门能人工地定向改造生物遗传性状的育种新技术。

第一节 基因克隆技术

一、基因克隆技术的诞生和兴起

基因克隆技术这门现代生物技术中最先进、最热门的育种新技术的诞生和兴起并非偶然的事件, 它是在几十年中生物化学、微生物学、分子生物学和分子遗传学等学科, 取得一系列研究成就的基础上逐渐发展起来的。概括起来, 这些成就主要包括下列几个方面。

(一) 遗传物质基础的证明

1944 年 Avery 等, 在 1928 年 Griffith 所做的肺炎链球菌转化试验的基础上, 采用离体培养的方法, 测定 SⅢ型细胞中各种分离提纯了的提取物 (包括 DNA、RNA、蛋白质、多糖等) 的转化活性。试验结果发现, 只有从 SⅢ型菌提出的 DNA, 与 RⅡ型菌混合于琼脂平板上进行培养时, 才能使 RⅡ型转化为 SⅢ型。这就有力地证明了 DNA 是转化因子, DNA 能引起遗传性状的改变。这也就直接证明了遗传信息的物质基础是 DNA 而不是蛋白质。

1945 年以后, 由于研究生物大分子的手段有了重大进展, 又提出了以下四个发现或假说: ①X 射线衍射显示 DNA 立体结构中碱基分子相互靠近; ②DNA 中嘌呤碱基与嘧啶碱基有相互吸引的趋势; ③嘌呤与嘧啶碱基的比例为 1:1; ④DNA 碱基排列顺序应该是不规则的, 才有可能携带极丰富的遗传信息。以上这些发现和假说对于进一步阐明 DNA 的结构起着巨大的作用。

(二) DNA 双螺旋结构和功能的阐明

1953 年 Watson 和 Crick 根据碱基组成的测定和 X 射线衍射分析的结果, 提出了著名的 DNA 双螺旋结构模型的理论 and 半保留复制机理, 圆满地解释了 DNA 的理化性质、自体复制方式和生物遗传现象。这一重大发现使人类对基因的认识有了实质性的突破, 推动了遗传学的迅速发展, 开辟了分子生物学的新纪元。

(三) 遗传信息的流向和表达机制的阐明

在 20 世纪 50 年代末期和 20 世纪 60 年代, 相继提出了中心法则和操纵子学说, 并成功地破译了遗传密码, 从而阐明了遗传信息的流向和表达机制。

人们已认识到, 生物体的遗传信息主要是以密码的形式编码在 DNA 分子上, 表现为特定的核苷酸排列顺序。DNA 通过复制可以将遗传信息传递给子代 DNA 分子, DNA 分子又可以通过转录作用将遗传信息传递给信使 RNA (mRNA), mRNA 进而控制专一蛋白质的

合成,使遗传信息在蛋白质肽链的氨基酸排列顺序上得到体现,即遗传密码的翻译。

DNA→mRNA→多肽链这一 DNA 中心法则的建立,解开了蛋白质合成过程中转录和翻译之谜,指导着人们认识蛋白质的生物合成过程。随着后来反向转录酶的发现,又肯定了某些病毒能够以 RNA 为模板合成互补 DNA,这就更进一步完善和补充了中心法则。遗传信息复制和传递机制的阐明,为人工改变生物 DNA 结构而引起遗传性状的改变,从而创造出生物新品种和新型产物提供了可能性。

(四) 限制酶与连接酶等工具酶的发现

早在 20 世纪 50 年代初期,就已发现寄主细胞对噬菌体的限制作用,后来发现这种限制作用是菌株中限制性核酸内切酶(简称限制酶)作用的结果,它专门分解外来的 DNA 而使其失去复制的能力,实际上是寄主细胞抵抗外来 DNA 侵染的一种防御机制。

20 世纪 60 年代末期和 20 世纪 70 年代初期,经详细的研究,人们弄清了限制酶是一类专一性很强的核酸内切酶,它与一般的 DNA 水解酶不同之处,在于它们对碱基作用的专一性上及对磷酸二酯键的断裂方式上,具有一些特殊的性质。这种酶被形象地称为分子剪刀,它们的发现和应用大大促进了基因工程技术的进展,在基因的分离、DNA 结构分析、载体的改造及体外重组中均起着重要作用。

在 1967 年,世界上有 5 个实验室几乎同时发现了 DNA 连接酶。连接酶是另一种对 DNA 重组技术的创立具有重要意义的工具酶。1970 年,当时在威斯康星大学的 H. G. Khorana 实验室,又发现 T4DNA 连接酶具有更高的连接活性,甚至能催化两段 DNA 分子进行平末端的连接。该类酶的发现和分离提纯,使两个 DNA 片段在体外连接形成重组 DNA 分子成为可能,在 DNA 合成、DNA 复制和基因重组中起着十分重要的作用。

限制酶与连接酶等工具酶的发现,从根本上解决了 DNA 分子的体外切割与连接技术难题,它是重组 DNA 的核心技术。除限制酶和连接酶外,还有 DNA 聚合酶、逆转录酶、碱性磷酸酯酶、末端脱氧核苷酸转移酶和 S1 核酸酶等,都是基因操作中必要的工具酶。

(五) 质粒等基因克隆载体的发现

多年以来,分子生物学家就选定 λ 噬菌体作为基因克隆的最有希望的载体,并对其进行了最为深入的研究。然而第一个将外源基因导入寄主的载体却不是 λ 噬菌体,而是质粒载体。

其中,最早被发现和研究的质粒是大肠杆菌致育因子(F 因子)。1952 年又发现大肠杆菌能产生一种蛋白质性的抗菌物质,称为大肠杆菌素。后来查明它是由另一种质粒——Col 因子支配产生的,成了第二个研究历史较长的质粒。1959~1960 年,在日本发现了抗药性质粒(R 因子),具有分子量小、易于操作和抗药性选择标记等优点。后来又不断在细菌和放线菌中发现各种各样的质粒。

人们通过对质粒的结构与功能的深入研究,弄清质粒是一种存在于微生物细胞内染色体外的闭合环状双链小型 DNA 分子,是能够进行独立自体复制并保持恒定遗传的复制子。它能从一个微生物细胞转移到另一种微生物细胞中,而且某些质粒能在细胞中大量复制。因而有可能利用质粒作为基因的运载体,将某种外源基因从一个细胞转移至另一个细胞并大量复制该基因的拷贝,从而高产相应的基因产物。

质粒的发现为不同生物细胞间基因的转移开创了新局面。目前已被发展成为基因分子克隆中最常用的载体。如 pBR322 和 pUC18 等质粒载体就是其中突出的代表。

（六）细胞转化方法的建立

将外源 DNA 分子导入细菌细胞的转化现象，虽然早在 20 世纪 40 年代就已经在肺炎链球菌中发现，但对于大肠杆菌来说，却直到 1970 年才获得成功。

当时，M. Mandel 和 A. Higa 发现用 CaCl_2 处理大肠杆菌，能使该菌对 λ DNA 的吸收有显著的增加。1972 年，斯坦福大学的 S. Cohen 等人报道，经氯化钙处理的大肠杆菌细胞同样也能够摄取质粒 DNA。将该技术应用于质粒 DNA 的转化，结果每微克 DNA 可得到大约 $10^6 \sim 10^7$ 个转化子。从此，大肠杆菌便成了分子克隆的良好转化受体。大肠杆菌转化体系的建立，对基因工程的创立具有特别重要的意义。

（七）核酸和蛋白质序列分析技术的发明

1965 年 Sanger 发明了氨基酸序列分析测定法，接着又发明了 DNA 分子的核苷酸序列分析测定法，使人们对 DNA 序列分析获得重大突破，一次实验便可确定几百个碱基的排列顺序。知道了某个蛋白质的基因 DNA 的碱基序列，就可根据 3 个碱基决定一个氨基酸的三联体密码子，推知该蛋白质的氨基酸序列，并可用化学方法人工合成基因。因此，核酸和蛋白质序列分析技术的发明，使基因的分析 and 合成成为可能。

综上所述，遗传物质基础的证明、DNA 双螺旋结构和功能的阐明、遗传信息的流向和表达机制的阐明、限制酶与连接酶等工具酶的发现、质粒等基因克隆载体的发现、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，奠定了坚实的理论和技術基础。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。

1972 年，美国斯坦福大学的 P. Berg 博士领导的研究小组，使用核酸内切限制酶 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 T4DNA 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 重组的杂种 DNA 分子。P. Berg 等人率先完成了世界上第一次成功的 DNA 体外重组实验，并因此与 W. Gilbert, F. Sanger 分享了 1980 年度的诺贝尔化学奖。

1973 年，斯坦福大学的 S. Cohen 和 H. Boyer 也成功地进行了另一个体外 DNA 重组实验。他们将编码有卡那霉素抗性基因 (Km^r) 的大肠杆菌 R6-5 质粒 DNA，和编码有四环素抗性基因 (Te^r) 的另一种大肠杆菌质粒 pSC101 DNA 混合后，加入核酸内切限制酶 EcoR I，对 DNA 进行切割，而后再用 T4DNA 连接酶将它们连接成重组的 DNA 分子。

用这种连接后的 DNA 混合物转化大肠杆菌，结果发现，某些转化子菌落的确表现出了既抗卡那霉素又抗四环素的双重抗性特征。从此种双抗性的大肠杆菌转化子细胞中分离出来的重组质粒 DNA，带有完整的 pSC101 分子和一个来自 R6-5 质粒编码卡那霉素抗性基因的 DNA 片段。人们一般认为，这是第一项基因克隆实验，它揭开了基因工程的序幕。

为了说明不同物种的外源 DNA 片段也可以在大肠杆菌细胞中增殖，S. Cohen 等人又应用与上述类似的方法，把非洲爪蟾编码核糖体基因的 DNA 片段同 pSC101 质粒重组，并导入大肠杆菌细胞。转化子细胞分析结果表明，动物的基因的确进入到大肠杆菌细胞，并转录出相应的 mRNA 产物。Cohen 的工作，是第一次成功的基因克隆实验，具有十分重要的意义。

二、基因克隆技术的特点与步骤

基因克隆技术是用人工方法将外源基因与 DNA 载体结合形成重组 DNA，然后引入某一受体细胞中，使外源基因复制并产生相应的基因产物，从而获得生物新品种的一种崭新育