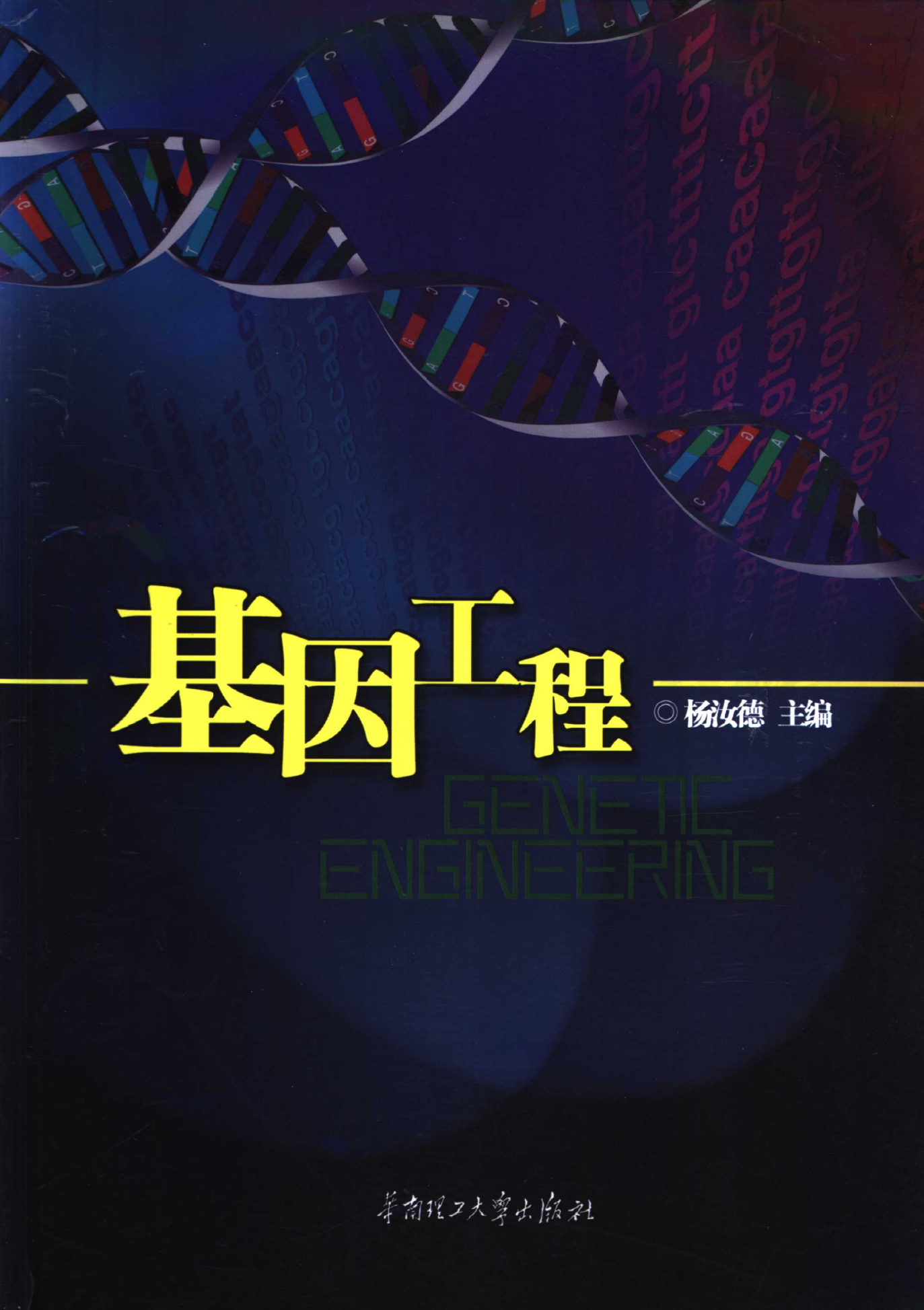




基因工程

◎ 杨汝德 主编

GENETIC
ENGINEERING

华南理工大学出版社

内 容 简 介

本书论述了基因工程技术的基本原理和基因工程在生物制药中的研究和应用。全书内容包括基因工程概述, 基因工程中常用的工具酶, 基因工程常用的基因克隆载体, 目的基因的制取, 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, 含目的基因重组体的筛选、鉴定与分析, 目的基因在宿主细胞中的表达, 无性繁殖系的组建, 基因工程药物的生产和基因工程药物的检验等。

本书在内容上除了对有关基因工程基本原理部分的论述外, 还详细介绍了基因工程在生物制药领域的研究和应用。本书既适合于作为生物工程、生物技术、生物制药和相关专业本科生的教材, 也适合于作为发酵工程、生物化工专业硕士研究生的教材, 同时也可供从事生物技术工作的人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

基因工程/杨汝德主编. —广州: 华南理工大学出版社, 2003.8
ISBN 7-5623-1977-4

I. 基… II. 杨… III. 基因-遗传工程 IV. Q78

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2003)第 054224 号

总 发 行: 华南理工大学出版社(广州五山华南理工大学 17 号楼, 邮编 510640)

发行部电话: 020-87113487 87111048(传真)

E-mail: scut202@scut.edu.cn

<http://www2.scut.edu.cn/press>

责任编辑: 张 颖

印 刷 者: 中山市新华印刷厂有限公司

开 本: 787×1092 1/16 印张: 15 字数: 365 千

版 次: 2003 年 8 月第 1 版第 1 次印刷

印 数: 1~3000 册

定 价: 24.00 元

版权所有 盗版必究

前 言

自 1973 年斯坦福大学的 S.Cohen 和 H.Boyer 成功地进行了第一项基因工程实验,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,无论是在基础理论研究领域,还是在生产实际应用方面,基因工程学都取得了许多激动人心的成就。特别是在生物制药、食品、化工、轻工、农业、能源和环保等方面取得了重大突破。

重组 DNA 技术不仅使整个生命科学的研究发生了前所未有的深刻变化,而且也极大地促进了工农业生产和国民经济的发展,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。特别是基因工程在医药生物技术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。

重组 DNA 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功能,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。因为尽管有些生物体能够合成一些重要的天然药物,但是要从这些生物体中分离纯化此类药物,不仅成本昂贵,而且技术上也相当困难。如今,我们可以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体内进行高效表达,就可以方便地提取到大量的有用药物。目前,在基因工程制药这个领域中,已经取得了许多成功的事例。实际上,基因工程技术最大的成就,是新型生物药物的研制、生产和应用。

教育是发展科学的基础。由于基因工程的迅猛发展,国内许多高等院校的有关学科,都先后为本科生和研究生开设了有关课程。华南理工大学生物工程系从 1986 年就开始为本科生开设基因工程课程,1998 年又新开设基因工程制药课程。近年来,虽然国外相继出版了相当数量的有关基因工程的论著及实验技术手册,国内也有若干译本及专著问世,但对于作为初学者的本科生来说,大部分出版物并不太适宜作为教科书使用,况且其编写的体例与内容也不尽符合教学要求。

作者曾于 1998 年编写了《基因工程制药》讲义,迄今已将近 5 年,期间基因工程学科的发展异常迅速,先进的技术不断涌现,整个基因工程的面貌又

发生了很大的变化。为了能够适时引进新的资料，反映新的动态，故在原讲义的基础上，参阅了大量的文献和著作，补充了大量的新内容。目的是为生物工程、生物技术、生物制药专业及其他相关专业的本科生，为发酵工程、生物化工、微生物学、生物化学与分子生物学等学科专业中未系统修过该门课程的硕士研究生，以及从事生物技术工作的人员提供一本比较全面系统的教学用书。

在撰写本书的过程中，作者在有关资料的编排与取舍方面，注重科学性、先进性、系统性和条理性，参阅了国内学者的著作和登载在刊物中的有关文章，同时也努力反映国内学者的研究成果，在此特向原作者表示真诚的谢意。

本书由杨汝德主编。全书共分 11 章，其中第一章至第十章由杨汝德编写，第十一章由陈惠音编写。基因工程是一门发展十分迅速的新兴学科，新理论和新的研究成果层出不穷，加之其涉及的知识面也十分广泛，限于编者的学识和水平，本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

2003.5

目 录

1 基因工程概述	(1)
1.1 基因工程概貌	(2)
1.1.1 基因工程的诞生和兴起	(2)
1.1.2 基因工程的特点与基本步骤	(4)
1.1.3 基因工程早期的开创性研究成就	(6)
1.2 基因工程技术的应用与发展趋势	(8)
1.2.1 全球性的基因工程争夺战	(8)
1.2.2 蛋白质工程的研究开发飞速发展	(11)
1.2.3 转基因动植物生产药物的研究迅速崛起	(12)
1.2.4 医学科学研究取得巨大成就	(13)
1.2.5 基因治疗技术取得重大进展	(13)
1.2.6 规模空前的国际《人类基因组计划》提前完成	(14)
1.3 基因工程与生物制药	(15)
1.3.1 基因工程制药发展态势	(15)
1.3.2 主要基因工程药物简介	(16)
2 基因工程常用的工具酶	(21)
2.1 限制性核酸内切酶	(21)
2.1.1 限制酶的发现	(21)
2.1.2 限制酶的种类	(22)
2.1.3 限制酶的命名	(23)
2.1.4 II型限制酶的特性	(23)
2.1.5 限制片段末端连接	(27)
2.2 DNA连接酶	(27)
2.2.1 DNA连接酶连接作用的特点	(27)
2.2.2 基因工程中常用的连接酶	(29)
2.2.3 DNA连接酶连接作用的分子机理	(30)
2.3 DNA聚合酶	(30)
2.3.1 大肠杆菌DNA聚合酶I	(31)
2.3.2 Klenow大片段酶	(33)
2.3.3 T4噬菌体DNA聚合酶	(33)
2.3.4 经修饰的T7噬菌体DNA聚合酶	(34)
2.3.5 TaqDNA聚合酶及Ampli Taq™DNA聚合酶	(34)
2.3.6 反转录酶	(35)
2.4 DNA修饰酶	(36)
2.4.1 末端脱氧核苷酸转移酶	(36)
2.4.2 碱性磷酸酶	(36)

2.4.3	T4 噬菌体多核苷酸激酶	(37)
2.5	单链核酸内切酶	(38)
2.5.1	S1 核酸酶	(38)
2.5.2	Bal31 核酸酶	(38)
2.6	核酸外切酶	(39)
2.6.1	核酸外切酶 VII	(39)
2.6.2	核酸外切酶 III	(40)
2.6.3	λ 核酸外切酶	(40)
3	基因工程常用的克隆载体	(41)
3.1	质粒载体	(41)
3.1.1	质粒概述	(41)
3.1.2	质粒 DNA 分子的特性	(43)
3.1.3	质粒载体的改造和构建	(47)
3.1.4	pBR322 质粒载体	(49)
3.1.5	pUC 质粒载体	(53)
3.1.6	其他重要的质粒载体	(55)
3.2	λ 噬菌体载体	(57)
3.2.1	λ 噬菌体的基本特性	(57)
3.2.2	λ 噬菌体基因组的结构与功能	(59)
3.2.3	λ 噬菌体载体的构建	(61)
3.2.4	常用的 λ 噬菌体载体	(64)
3.2.5	改良型 λ 噬菌体载体	(68)
3.3	粘粒载体	(70)
3.3.1	粘粒载体的构建	(70)
3.3.2	粘粒载体的特点	(70)
3.3.3	常用的粘粒载体	(71)
3.4	M13 噬菌体载体	(73)
3.4.1	M13 噬菌体的基本特性	(73)
3.4.2	M13 噬菌体载体的构建	(74)
3.4.3	M13 噬菌体载体系列的优点	(77)
3.5	噬菌粒载体	(77)
3.5.1	pUC118 和 pUC119 噬菌粒载体	(77)
3.5.2	pBluescript 噬菌粒载体	(78)
3.6	哺乳动物细胞载体系统	(80)
3.6.1	SV40 载体	(80)
3.6.2	牛乳头瘤病毒 (BPV) 载体	(80)
3.6.3	EBV 病毒载体	(81)
4	目的基因的制取	(82)
4.1	目的基因的化学合成	(82)

4.1.1	目的基因的设计	(82)
4.1.2	寡聚核苷酸片段的合成	(83)
4.1.3	寡核苷酸片段的分离和纯化	(84)
4.1.4	用寡核苷酸片段组装目的基因	(85)
4.1.5	化学合成寡核苷酸的其他用途	(86)
4.2	构建基因文库法分离目的基因	(87)
4.2.1	构建基因文库法分离目的基因的基本步骤	(87)
4.2.2	真核基因组 DNA 文库的构建过程	(87)
4.3	酶促合成法制取目的基因	(91)
4.3.1	真核生物细胞中的 mRNA	(91)
4.3.2	从构建的 cDNA 文库中筛选目的 cDNA	(91)
4.3.3	RT-PCR 法合成目的 cDNA	(97)
5	目的基因与克隆载体的体外重组	(101)
5.1	目的基因与质粒载体的连接	(101)
5.1.1	粘性末端连接法	(101)
5.1.2	定向克隆法	(104)
5.1.3	平末端连接法	(107)
5.1.4	同聚物加尾法	(107)
5.1.5	加人工接头连接法	(109)
5.1.6	加 DNA 衔接物连接法	(110)
5.1.7	其他转换末端形式连接法	(112)
5.2	目的基因与 λ 噬菌体载体的连接	(112)
5.2.1	λ 噬菌体载体臂 DNA 的制备	(113)
5.2.2	λ 噬菌体载体臂与外源目的 DNA 片段的连接	(114)
6	重组克隆载体引入受体细胞	(115)
6.1	基因工程受体细胞	(115)
6.1.1	受体细胞的特性	(115)
6.1.2	重组体分子导入受体细胞的途径	(116)
6.2	重组体 DNA 分子的转化或转染	(117)
6.2.1	用氯化钙制备新鲜的感受态细胞转化法	(117)
6.2.2	用复合剂制备感受态细胞转化法	(118)
6.2.3	高压电穿孔转化法 (电转化法)	(118)
6.3	重组 λ 噬菌体 DNA 的体外包装与转导	(119)
6.3.1	λ 噬菌体体外包装的基本原理	(119)
6.3.2	λ 噬菌体 DNA 的体外包装	(120)
6.3.3	包装提取物的制备	(120)
6.3.4	重组 λ DNA 的体外包装与感染方法	(121)
6.4	重组克隆载体导入哺乳动物细胞的转染	(122)
6.4.1	磷酸钙和 DNA 共沉淀物转染法	(122)

6.4.2	DEAE-葡聚糖介导转染法	(122)
6.4.3	利用 Polybrene (聚季铵盐) 的 DNA 转染法	(122)
6.4.4	利用原生质体融合的 DNA 转染法	(123)
6.4.5	电穿孔法 DNA 转染	(123)
7	含目的基因重组体的筛选、鉴定与分析	(124)
7.1	重组体 (菌) 的筛选	(124)
7.1.1	抗生素抗性基因插入失活法	(124)
7.1.2	β -半乳糖苷酶基因插入失活法	(124)
7.1.3	快速细胞破碎与凝胶电泳筛选法	(125)
7.1.4	放射性标记核酸探针杂交筛选法	(126)
7.1.5	免疫化学筛选法	(135)
7.2	重组体的鉴定	(136)
7.2.1	酶切及凝胶电泳鉴定法	(137)
7.2.2	Southern 印迹杂交法	(138)
7.2.3	电泳 R-环检测法	(140)
7.2.4	基因产物鉴定法	(140)
7.3	重组 DNA 的序列分析	(141)
7.3.1	Sanger 双脱氧链终止法 DNA 测序	(141)
7.3.2	Maxam-Gilbert 化学修饰法 DNA 测序	(144)
7.3.3	快速自动化 DNA 测序	(146)
8	目的基因在宿主细胞中的表达	(148)
8.1	外源目的基因在原核细胞中的表达	(148)
8.1.1	原核基因表达载体的构成	(148)
8.1.2	常见的原核细胞表达载体系统	(152)
8.1.3	外源目的基因在原核细胞的表达形式	(153)
8.1.4	在原核细胞中高效表达目的基因	(155)
8.1.5	基因定点诱变技术	(157)
8.2	外源目的基因在真核细胞中的表达	(161)
8.2.1	真核细胞表达载体的功能元件	(162)
8.2.2	酵母菌表达系统	(164)
8.2.3	哺乳动物细胞表达系统	(166)
9	基因工程药物无性繁殖系的组建	(170)
9.1	人胰岛素原融合蛋白重组菌的组建	(170)
9.1.1	重组表达质粒 pJG202 的构建与鉴定	(170)
9.1.2	重组质粒 pJG202 在大肠杆菌中的表达	(171)
9.1.3	融合蛋白后处理成为人胰岛素原	(171)
9.2	人 α_2b 型干扰素工程菌的组建	(171)
9.2.1	hIFN- α_2b 基因的获得	(171)
9.2.2	重组表达质粒 pMZI ₂ B 的构建	(171)

9.2.3	人 α_2 b 型干扰素工程菌的形成与基因的表达	(172)
9.3	集落刺激因子工程菌的组建	(173)
9.3.1	细胞总 RNA 的提取	(173)
9.3.2	PCR 引物的设计与合成	(173)
9.3.3	RT-PCR 法制备 GM-CSF cDNA	(173)
9.3.4	GM-CSF 重组表达载体与工程菌的组建	(173)
9.4	白细胞介素融合蛋白工程菌的组建	(174)
9.4.1	质粒与 PCR 引物	(174)
9.4.2	人 IL-2 cDNA 和 PE 基因的末端改造	(175)
9.4.3	IL2-PE-pLY5 重组质粒的构建	(175)
9.5	乙型肝炎表面抗原重组酵母的组建	(176)
9.5.1	BsAg 基因重组表达质粒 pLS1 和 pLS2 的构建	(176)
9.5.2	重组表达质粒的转化及 HBsAg 的表达	(176)
9.5.3	重组表达质粒在酵母细胞中的稳定性	(176)
9.6	人组织型纤溶酶原激活剂细胞株的组建	(177)
9.6.1	真核表达质粒 pLFrGGI 的构建	(178)
9.6.2	高效表达 FrGGI (tPA 突变体) 的 CHO 细胞株的获得	(178)
9.6.3	去除 dhfr 基因转录增强子的作用	(178)
9.7	红细胞生成素 CHO 细胞株的组建	(179)
9.7.1	质粒与细胞株	(179)
9.7.2	EPO 真核重组表达质粒 pMGL4 的构建	(179)
9.7.3	重组表达质粒转染 COS-7 细胞及产物表达	(179)
9.7.4	重组表达质粒转染 CHO-dhfr-细胞及 EPO 表达	(179)
9.8	人肿瘤坏死因子昆虫细胞株的组建	(180)
9.8.1	含 hTNF- α 基因的重组质粒的构建	(181)
9.8.2	共转染与重组病毒的获得	(182)
9.8.3	重组病毒感染 Sf21 细胞及 hTNF- α 的表达	(182)
10	基因工程药物的生产	(183)
10.1	基因工程菌(细胞)的培养与发酵	(183)
10.1.1	工程细菌的培养与发酵	(183)
10.1.2	工程酵母的培养与发酵	(185)
10.1.3	工程细胞的培养与发酵	(185)
10.2	基因工程药物的分离纯化	(186)
10.2.1	影响分离纯化工艺设计的主要因素	(187)
10.2.2	各种产物表达形式采用的分离纯化方法	(187)
10.3	基因工程药物的分离纯化实例	(189)
10.3.1	以包涵体形式表达的 rGM-CSF 中试分离纯化	(189)
10.3.2	以分泌型表达的人 α_1 -干扰素的分离纯化	(191)
10.3.3	以可溶性形式表达的 rhG-CSF 的分离纯化	(191)

10.3.4	在酵母中表达的 HBsAg 的分离纯化	(192)
11	基因工程药物的检验	(194)
11.1	基因工程药物的质量控制	(194)
11.1.1	主要的基因工程药物	(194)
11.1.2	基因工程药物的特点	(195)
11.1.3	基因工程药物的质量要求	(195)
11.1.4	基因工程药物的质控要点	(196)
11.1.5	基因工程药物的制造及检定规程	(200)
11.2	基因工程药物常用的检验方法	(202)
11.2.1	化学检定法	(202)
11.2.2	肽图分析法	(202)
11.2.3	外源性 DNA 残留量的测定	(203)
11.2.4	宿主细胞蛋白杂质的检测	(204)
11.2.5	无菌试验	(205)
11.2.6	内毒素试验	(208)
11.2.7	异常毒性试验	(209)
11.2.8	热原质试验	(210)
11.2.9	生物学活性 (效价) 检定	(211)
11.3	主要基因工程药物的检验	(211)
11.3.1	重组人胰岛素的检验	(211)
11.3.2	重组人生长激素的检验	(213)
11.3.3	重组人干扰素的检验	(215)
11.3.4	重组人白细胞介素的检验	(217)
11.3.5	重组人红细胞生成素的检验	(218)
11.3.6	重组人集落刺激因子的检验	(219)
11.3.7	重组人组织型纤溶酶原激活剂的检验	(221)
11.3.8	重组人肿瘤坏死因子的检验	(222)
11.3.9	重组乙型肝炎疫苗的检验	(222)
	附录	(224)
	参考文献	(230)

1 基因工程概述

基因工程 (Gene Engineering), 又称体外重组 DNA 技术, 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。

基因工程的最大威力在于它能使带有各种遗传信息的 DNA 片段, 越过不同生物间特异的细胞壁而组入到完全不同的生物体内, 定向地控制、修饰和改变生物体的遗传和变异, 从而创造出自然界没有的具有新遗传性状的生物新品种, 并合成出人们必需的新产物。因而, 基因工程一诞生, 就显示出它无比的生命力, 展示出它在生产应用上无量的发展前景。30 多年来, 已在生物制药、食品、化工、轻工、农业、能源和环保等方面取得了重大突破, 特别是基因工程在医药生物技术领域中的应用, 更是备受国内外生物技术界的广泛关注。实际上, 基因工程技术最大的成就是用于生物治疗的新型生物药物的研制。

虽然一些内源生理活性物质作为药物使用已有多年, 但是在其生产和应用中存在很多难以解决的问题, 这主要是:

①许多在疾病诊断、预防和治疗中有重要价值的内源生理活性物质以及某些疫苗, 由于材料来源困难或制造技术问题而无法研制出产品付诸应用;

②即使应用传统技术从动物脏器中提取出内源生理活性物质来, 也因造价太高而使患者望而却步, 或因来源困难而供不应求;

③由于免疫抗原等缘故, 使某些生理活性物质在使用上受到很大限制;

④在提取过程中难免有病毒感染, 可能会对病人造成严重后果。

应用基因工程技术生产生物药品, 就可以从根本上解决上述问题。其优点主要有:

①可大量生产过去难以获得的生理活性蛋白和多肽, 为临床使用提供有效的保障;

②可提供足够数量的生理活性物质, 以便对其生理、生化和结构进行深入的研究, 从而扩大这些物质的应用范围;

③可以发现、挖掘出更多的内源性生理活性物质;

④可以改造和去除内源生理活性物质作为药物使用时所存在的不足之处;

⑤可获得新型化合物, 扩大药物筛选来源。

基因工程、细胞工程、酶工程和发酵工程都是组成医药生物技术的主体, 而且这几个技术体系是相互依赖、相辅相成的。就生产某种新的生物药物而言, 往往需要综合应用这几个技术体系。但在这些技术体系中, 基因工程无疑将起着主导的作用, 因为只有用基因工程 (包括蛋白质工程) 改造过的生物细胞, 才能赋予其他技术体系以新的生命力, 才能真正按照人们的意愿, 生产出特定的新型高效的生物药物。

1.1 基因工程概貌

1.1.1 基因工程的诞生和兴起

基因工程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：

(1) 遗传物质基础的证明

1944 年 Avery 等在 1928 年 Griffith 所做的肺炎双球菌转化试验的基础上，采用离体培养的方法，测定 S Ⅲ 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 S Ⅲ 型菌提出的 DNA，与 R Ⅱ 型菌混合于琼脂平板上进行培养时，才能使 R Ⅱ 型转化为 S Ⅲ 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 光衍射显示 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。

(2) 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 光衍射分析的结果，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。

(3) 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 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。

(4) 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 70 年代初期,经过详细的研究,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 S_1 核酸酶等,都是基因操作中必要的工具酶。

(5) 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),具有相对分子质量小、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。

(6) 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 年代就已经在肺炎双球菌中发现,但对于大肠杆菌来说,一直到 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的 DNA。将该技术应用于质粒 DNA 的转化,结果每微克 DNA 可得到 $10^6 \sim 10^7$ 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。

(7) 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 DNA 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该基因。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, 为基因工程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 (Tc^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, 这是第一项基因工程实验, 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。

1.1.2 基因工程的特点与基本步骤

基因工程通常称为重组 DNA 技术 (recombinant DNA technique), 又称为基因克隆 (gene cloning) 或分子克隆 (molecular cloning)。它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种技术。

基因工程技术能将不同来源的遗传物质在体外合成重组 DNA 分子, 这种重组 DNA 分子可以被引入受体细胞, 进行增殖繁衍而发育成一个新种。这一过程在自然界演化中一般是不会发生的。

1.1.2.1 基因工程的特点

基因工程技术与其他育种技术相比，具有如下特点：

(1) 能像工程一样按人们的意愿事先设计和控制

基因工程不仅可预知某一基因的改变，而且可以及早纠正，可以有计划、有目的地构建基因，所以基因工程育种是比较定向的。此外，基因工程育种的每步变化均可检测，保证了产品的纯度和安全性。因此，应用基因工程技术，使生物科学工作者能将遗传物质按人们的意愿进行周密设计和人工操纵，为进一步深入研究基因的结构、功能、表达和调控等提供了一个划时代的有效手段。

(2) 是人工的、离体的、分子水平上所进行的遗传重组

基因工程技术有能力在极端错综复杂的生物细胞内取出所需基因，并能人为地将此目的基因在试管中进行剪切、拼接、重组并转化到受体细胞中，经无性繁殖能增产出数百数千倍的新型蛋白质（主要是各种多肽和蛋白质类生物药物），这是基因工程最突出的优越性。

(3) 能在动植物和微生物间进行任意的、定向的超远缘杂交

基因工程的最大威力在于它能使带有支配各种各样遗传信息的 DNA 片段越过不同生物间特异的细胞壁而组入到完全不同的没有亲缘关系的生物体内，能定向地控制、修饰和改变生物的遗传和变异。因而完全有可能创造出前所未有的具有新的遗传性状的生物新类型，使育种工作产生革命性变化。

1.1.2.2 基因工程的基本步骤

基因工程实际上是一包括能将遗传信息（DNA）从一种生物细胞转移到另一种生物细胞中并得以表达的若干实验技术的总称。概括起来，基因工程应包括以下 6 个基本步骤：

(1) 外源目的基因的取得

从复杂的生物细胞基因组中，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，取得所需的基因（外源性 DNA 片段）；或者从特定细胞里提取所需基因的 mRNA 后，在适宜的条件下利用逆（反）转录酶的作用来取得所需基因；或者通过探明目的基因所含的遗传密码及其排列顺序，然后用化学方法人工合成所需的基因。

(2) 基因运载体的分离提纯

基因运载体是具有自体复制能力的另一种 DNA 分子，它经过处理后能与外来基因（外源性 DNA）相结合，并带有必要的标记基因。目前，常用的基因运载体主要有两类：一类是质粒，一类是病毒（包括噬菌体）。以前者为例，首先用溶菌酶分解细菌细胞壁，然后用物理化学的方法，把质粒与其他成分分开，从而得到纯粹的质粒。

(3) 重组 DNA 分子的形成

通过专一限制性内切核酸酶的处理或人为的方法，使带有目的基因的外源 DNA 片段和能够自我复制并具有选择标记的载体 DNA 分子，产生互补的粘性末端而相互配对结合，并通过连接酶在体外使两者连接起来，形成一个完整的新的 DNA 分子——重组 DNA 分子。

(4) 重组 DNA 引入受体细胞

重组 DNA 即是带有目的基因的运载体（杂种质粒或病毒）。用人工的方法（转化或

转导法), 将重组 DNA 分子转移到适当的受体细胞(宿主细胞)中, 使它能在细胞中“定居”下来。通过自体复制和增殖, 形成重组 DNA 的无性繁殖系(即克隆), 从而扩增产生大量特定目的基因, 并使之得到表达, 即能指导蛋白质的合成。

(5) 重组菌的筛选、鉴定和分析

从大量受体菌中设法筛选出带有目的基因的重组菌(克隆株系), 并进行鉴定。然后培养克隆株系, 提取出重组质粒, 分离已经得到扩增的目的基因, 再分析测定其基因顺序。

(6) 工程菌的获得和基因产物的分离

将目的基因克隆到表达载体上, 再次导入到受体菌中, 经反复筛选、鉴定和分析测定, 最终获得较稳定的高产的基因工程菌, 然后进行大量培养繁殖, 产生出所需要的目的基因产物, 再进行分离纯化。

上述仅是基因工程的基本步骤。在实际工作中, 其具体操作步骤还要更多, 因为很多步骤必须重复进行, 必须多次分离和分析测定重组 DNA。

1.1.3 基因工程早期的开创性研究成就

从 1973 年 Cohen 和 Boyer 的第一项基因工程实验获得成功并标志着基因工程的正式开始之后, 由于人们对基因工程安全性的过分担心, 人为地制定了各种限制措施, 使基因工程研究受到阻碍而进展缓慢。主要的研究成果有两项:

①1974 年, Boyer、Helinesski 和 Yamnfsky 等合作构建了扩增拷贝数很高的 col El 质粒, 为此后的基因扩增研究铺平道路。

②1974 年, Cohen、Boyer、Morrow 和 Goodman 等人合作, 第一次将一个真核生物基因引入了大肠杆菌中并得到转录。

后来, 随着人们认识的不断深入以及采取了必要的安全防范措施, 放宽或取消某些过于严厉的限制, 使基因工程研究又得到迅速的发展。

①1977 年 11 月, 有机化学家 K.Itakura 和 Riggo 等合作, 将化学合成的大脑生长激素释放抑制素(Somatostatin, 简写 Som.) 基因与大肠杆菌 β -半乳糖苷酶基因和 pBR322 质粒重组, 转化到大肠杆菌中并表达成功。结果产生含生长抑制素(Som.) 的嵌合型蛋白质, 经溴化氰处理后, 释放出有活性的生长抑制素(14 肽)。

这是真核生物的人造基因首次在原核生物中表达成功, 其实践意义是可以通过发酵途径生产出大量廉价的这类有价值的产品, 但更重要的是理论意义。在理论上, 它提供了这样一个依据: 通过基因工程, 利用细菌来研究高等生物基因功能的表达有现实可能性。

生长抑制素能抑制包括生长激素、胰岛素和胰高血糖素等多种激素的产生, 是一种很有用的药物。它可医治肢端肥大症、急性胰腺炎等。按常规制备法, 从 50 万头羊的脑下垂体中才能提取得 5mg 生长抑制素, 其价值需亿万美元。采用基因工程方法, 只要用 10L 工程菌培养液就可获得同样的产量, 其价格只需 300 美元。

这项振奋人心的重大成果的取得, 大大地增强了人们对基因工程的兴趣和信心。

②1978 年, 老鼠胰岛素原前体基因成功地转化进入大肠杆菌, 并且得到了表达。这个实验是首先从胰岛瘤提取胰岛素原前体 mRNA, 再用逆转录酶合成它的互补 DNA, 通过限制性内切酶的切割, 将胰岛素原前体 DNA 转换到 pBR322 质粒 DNA 上, 最后将此重

组 DNA 再转化到大肠杆菌中表达。

③1978 年 9 月, Goedell 等用人工方法分别合成人胰岛素 A 链和 B 链的基因, 并把这两个基因分别与大肠杆菌乳糖操纵子调控基因结合在一起, 分别整合到质粒上, 再分别转化到大肠杆菌中, 一个大肠杆菌专门合成 A 链, 另一个专门合成 B 链。随后再用化学方法将 A、B 蛋白链从乳糖操纵子基因蛋白上切下来, 分别提纯, 得到了 A 链 (含有 21 个氨基酸) 和 B 链 (含有 30 个氨基酸), 再通过二硫键把 A、B 两条多肽链结合在一起, 成为一个完整的人胰岛素。这样, 人胰岛素就可以用基因工程的方法人工地大量合成, 为广大的糖尿病患者带来了福音。

④1979 年, 美国加州大学 H. Goodman 等用 DNA 重组技术进行了人体生长激素基因的研究, 发现该基因具有重叠结构, 可作为基因的结构、分化和调节的研究材料。当将带有激素基因的杂合质粒插入到另一个基因时, 可在受体菌中稳定复制, 并可表达得到约占总蛋白 70% 的由人体生长激素基因编码的多肽。

⑤1980 年 1 月, 瑞士生物基因公司首次报导用基因工程菌生产干扰素获得成功。接着, 美国旧金山的基因工程公司宣布用酵母基因工程菌合成干扰素也获得成功。

⑥在 1980 年还有两项重要成果, 一是日本的科学家使大豆蛋白的遗传基因插入大肠杆菌的质粒中, 人工合成大豆蛋白获得成功。二是美国 Abbott 公司用基因工程技术使大肠杆菌产生出人体尿激酶。

⑦1981 年, 美国《科学》杂志报导了从基因工程菌中制备出动物口蹄疫疫苗。口蹄疫起因于一种微小的 RNA 病毒, 其传染力很强, 能严重感染包括猪牛羊在内的 32 种偶蹄类动物。口蹄疫可引起幼畜死亡, 减缓长膘速度, 减低牛奶产量, 造成严重的经济损失。应用重组 DNA 技术生产口蹄疫疫苗以防治动物口蹄疫将具有重大的经济意义。

同年, 从基因工程菌中获得的新产物还有乙型肝炎病毒表面抗原和核心抗原以及牛生长激素等。前者对于人的乙型肝炎的诊断和防治, 后者对于提高牛肉牛奶的产量均具有重要意义。

⑧1982 年, 把基因引入实验动物的研究获得重要进展。R. Palmiter 等把从大鼠体内分离到的生长激素基因, 在体外与小鼠的开关 DNA 重组, 再注射到母小鼠受精卵中。结果, 在出生的小鼠中, 有些带有大鼠的生长激素基因, 个头大且生长速度快 (称为巨型小鼠)。这是以真核生物为受体的基因工程所取得的首次突破, 具有深远的意义。

⑨1983 年, 报导了用大肠杆菌产生狂犬病毒糖蛋白类似物获得成功, 使人工制造狂犬病疫苗成为可能。也报导了用大肠杆菌生产鸡生长激素, 并进行现场应用试验以促进肉鸡的生长。

⑩同年, 以真核生物为受体的基因工程取得两项新的突破。一是把人的生长激素基因转移给小鼠也获得成功; 二是把某些外源基因, 通过基因工程技术引入植物 (烟草、胡萝卜、矮牵牛、马铃薯等) 的细胞中, 都能再生出完整的植株, 且外源基因也能随种子遗传下去。这些鼓舞人心的成果表明, 用基因工程技术来改良动植物品种的日子已为期不远了。