



“十二五”普通高等教育本科国家级规划教材

Gene Engineering

基因工程 (第3版)

张惠展 欧阳立明 叶江 编著



高等教育出版社



“十二五”普通高等教育本科国家级规划教材

Gene Engineering

基因工程 (第3版)

张惠展 欧阳立明 叶江 编著

高等教育出版社·北京

J I Y I N G O N G C H E N G

内容提要

本书主要论述基因工程的基本原理、单元操作和应用战略。基本原理涉及基因的高效表达原理、重组表达产物的活性回收原理、基因工程菌(细胞)的稳定生产原理;单元操作包括DNA的切接反应、重组DNA分子的转化、转化子的筛选与重组子的鉴定;应用战略部分以大肠杆菌、酵母、高等动物及高等植物等基因工程受体系统为主线,结合具体的产业化案例,归纳出基因工程技术的实际应用战略。书中还简要述及了蛋白质工程(第二代基因工程)和途径工程(第三代基因工程)的原理与应用。

全书纸质内容与数字化资源一体化设计,数字课程涵盖彩色插图、教学课件、科技史话、术语扩展及自测试题等板块,在提升课程教学效果的同时,为学生学习提供思维与探索的空间,利于学生自主学习。

本书可作为高等院校生物工程、生物技术专业本科“基因工程”课程的教材,课堂教学建议学时为32~48;也可供从事生物工程技术研究和开发的人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

基因工程 / 张惠展, 欧阳立明, 叶江编著. --3 版.

-- 北京: 高等教育出版社, 2015.3

ISBN 978-7-04-041762-3

I. ①基… II. ①张…②欧…③叶… 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(2015)第014108号

策划编辑 王莉 责任编辑 高新景 封面设计 张楠 责任印制 张泽业

出版发行 高等教育出版社
社址 北京市西城区德外大街4号
邮政编码 100120
印刷 北京市大天乐投资管理有限公司
开本 787mm×1092mm 1/16
印张 21.75
字数 520千字
购书热线 010-58581118
咨询电话 400-810-0598

网 址 <http://www.hep.edu.cn>
<http://www.hep.com.cn>
网上订购 <http://www.landaco.com>
<http://www.landaco.com.cn>
版 次 1999年1月第1版
2015年3月第3版
印 次 2015年3月第1次印刷
定 价 43.00元

本书如有缺页、倒页、脱页等质量问题,请到所购图书销售部门联系调换
版权所有 侵权必究
物料号 41762-00

数字课程 (基础版)

基因工程

(第3版)

张惠展 欧阳立明 叶江 编著

登录方法:

1. 访问<http://abook.hep.com.cn/41762>
2. 输入数字课程用户名 (见封底明码)、密码
3. 点击“进入课程”

账号自登录之日起一年内有效, 过期作废
使用本账号如有任何问题
请发邮件至: lifescience@pub.hep.cn



“十二五”普通高等教育本科国家级规划教材

基因工程 (第3版) 张惠展 欧阳立明 叶江 编著

用户名

密码

验证码

4582

进入课程

内容介绍

纸质教材

版权信息

联系方式

基因工程 (第3版) 数字课程与纸质内容一体化设计, 紧密配合。数字课程包括彩色插图 (197幅)、教学课件 (600余张PPT)、科技史话 (8篇)、术语扩展 (5例) 及自测试题 (400余道标准化试题) 等板块, 希望在提升课程教学效果的同时, 丰富知识呈现形式, 为学生学习提供思维与探索的空间。

使用说明



用户名: 输入教材封底的16位明码; 密码: 刮开“增值服务”涂层, 输入16位暗码; 输入正确的验证码后, 点击“进入课程”开始学习。

相关教材



代谢工程

赵学明 陈涛 王智文 等编著

高等教育出版社

<http://abook.hep.com.cn/41762>

前 言

诞生于 20 世纪 70 年代初的 DNA 重组技术是一种获取、整理、破译、编辑和表达生物遗传信息的现代生物技术，它以细胞生物学、分子生物学和分子遗传学的基本理论体系为基石，在基因的分离克隆、基因编码产物的产业化、生物遗传性状的改良、基因功能及其表达调控机制的诠释等方面日益显示出极高的实用价值。作为 DNA 重组技术产业化应用的基因工程，正在驱动着人类社会生活方式的重大变革。

本书将 DNA 重组、克隆和表达的实验流程分为“切、接、转、增、检”五大单元操作；在简要阐述目的基因四大分离克隆策略的基础上，分别以大肠杆菌、酵母、高等动植物等典型的受体系统为主线，逐一论述基因工程应用的设计思想；同时，与高效表达多肽和蛋白质编码基因的第一代基因工程以及通过基因水平上的遗传操作表达蛋白质变体的第二代基因工程（蛋白质工程）相呼应，将在基因水平上局部修饰细胞固有代谢途径和信号转导途径的设计表征为第三代基因工程，由此构成本书的基本理论框架。

本书所涉及的基本理论、应用策略及实验技术主要基于著者 30 年来不断充实的教学讲义和经验体会，编撰的侧重点是基因工程应用的设计思路，并力求以图解的方式加深理解和记忆，因而较为适合作为全日制大学生物工程、生物技术、生物科学专业本科生“基因工程”课程的教科书，同时也可作为有关研究人员的参考书。

本书对第 2 版内容进行了全面细致的修订，各章增设“关键词”和“思维导图”。同时，本书纸质内容与数字化资源一体化设计，配套数字课程涵盖彩色插图（197 幅）、教学课件（600 余张 PPT）、科技史话（8 篇）、术语扩展（5 例）及自测试题（400 余道标准化试题）等，希望在提升课程教学效果的同时，为学生学习提供思维与探索的空间。

本书彩色插图由李竹青配色，著者在此对她的辛勤劳动表示衷心感谢。

真诚欢迎专家和读者对本书提出宝贵意见。

著 者

2014 年 8 月于黄浦江畔

目 录

1 概述

1.1 基因工程的基本概念 / 3

1.1.1 基因工程的基本定义 / 3

1.1.2 基因工程的基本过程 / 3

1.1.3 基因工程的基本原理 / 3

1.1.4 基因工程的基本体系 / 4

1.2 基因工程的发展历史 / 6

1.2.1 基因工程的诞生 / 6

1.2.2 基因工程的成熟 / 7

1.2.3 基因工程的腾飞 / 8

1.3 基因工程的研究意义 / 8

1.3.1 第四次工业革命 / 8

1.3.2 第二次农业大革命 / 9

1.3.3 第四次医学大革命 / 10

2 DNA 重组克隆单元操作

2.1 DNA 重组的载体 / 13

2.1.1 质粒载体 / 13

2.1.2 λ 双链噬菌体 DNA 载体 / 18

2.1.3 M13 单链噬菌体 DNA 载体 / 23

2.1.4 噬菌体/质粒杂合载体 / 25

2.1.5 人造染色体载体 / 27

2.2 DNA 的体外重组(切与接) / 27

2.2.1 限制性核酸内切酶 / 28

2.2.2 T4-DNA 连接酶 / 33

2.2.3 其他用于 DNA 重组的工具酶 / 35

2.2.4 DNA 切接反应的影响因素 / 38

2.2.5 DNA 分子重组的方法 / 41

2.3 重组 DNA 分子的转化与扩增 (转与增) / 50

2.3.1 重组 DNA 转化的基本概念 / 50

2.3.2 受体细胞的选择 / 51

2.3.3 转化方法 / 53

2.3.4 转化率及其影响因素 / 56

2.3.5 转化细胞的扩增 / 58

2.4 转化子的筛选与重组子的鉴定 (检) / 58

2.4.1 基于载体遗传标记的筛选与鉴定 / 58

2.4.2 基于克隆片段序列的筛选与鉴定 / 61

2.4.3 基于外源基因表达产物的筛选与鉴定 / 75

2.5 目的基因的克隆 / 77

2.5.1 鸟枪法 / 78

2.5.2 cDNA 法 / 81

2.5.3 PCR 扩增法 / 89

2.5.4 化学合成法 / 95

2.5.5 基因文库的构建 / 98

3 大肠杆菌基因工程

3.1 外源基因在大肠杆菌中的高效 表达原理 / 107

- 3.1.1 启动子 / 107
- 3.1.2 终止子 / 112
- 3.1.3 SD序列 / 112
- 3.1.4 密码子 / 113
- 3.1.5 质粒拷贝数 / 115
- 3.2 大肠杆菌工程菌的构建策略 / 116**
 - 3.2.1 包含体型异源蛋白的表达 / 117
 - 3.2.2 分泌型异源蛋白的表达 / 120
 - 3.2.3 融合型异源蛋白的表达 / 124
 - 3.2.4 寡聚型异源蛋白的表达 / 129
 - 3.2.5 整合型异源蛋白的表达 / 132
 - 3.2.6 蛋白酶抗性或缺陷型表达系统的构建 / 133
- 3.3 重组异源蛋白的体外复性活化 / 136**
 - 3.3.1 包含体的溶解与变性 / 136
 - 3.3.2 异源蛋白的复性与重折叠 / 138
- 3.4 大肠杆菌工程菌培养的最优化控制 / 142**
 - 3.4.1 细菌生长的动力学原理 / 143
 - 3.4.2 发酵过程的最优化控制 / 145
 - 3.4.3 大肠杆菌工程菌的高密度发酵 / 148
- 3.5 基因工程菌的遗传不稳定性及其对策 / 150**
 - 3.5.1 工程菌遗传不稳定性的表现与机制 / 150
 - 3.5.2 改善工程菌不稳定性的对策 / 152
- 3.6 利用重组大肠杆菌生产人胰岛素 / 154**
 - 3.6.1 胰岛素的结构及其生物合成 / 155
 - 3.6.2 人胰岛素的生产方法 / 156
 - 3.6.3 产人胰岛素大肠杆菌工程菌的构建策略 / 156
- 4 酵母基因工程**
 - 4.1 酵母的受体系统 / 163**
 - 4.1.1 提高重组异源蛋白产率的突变型受体 / 163
 - 4.1.2 抑制超糖基化作用的突变型受体 / 164
 - 4.1.3 减少泛素依赖型蛋白质降解作用的突变型受体 / 165
 - 4.1.4 内源性蛋白酶缺陷型的突变型受体 / 166
 - 4.2 酵母的载体系统 / 166**
 - 4.2.1 酿酒酵母中的 2μ 环状质粒 / 166
 - 4.2.2 乳酸克鲁维酵母中的线状质粒 / 167
 - 4.2.3 果蝇克鲁维酵母中的环状质粒 / 168
 - 4.2.4 含有ARS的YRp和YEp质粒及其构建 / 168
 - 4.2.5 含有CEN的YCp载体及其构建 / 169
 - 4.2.6 含有TEL的YAC载体及其构建 / 170
 - 4.3 酵母的转化系统 / 172**
 - 4.3.1 酵母的转化程序 / 172
 - 4.3.2 转化质粒在宿主细胞中的命运 / 173
 - 4.3.3 用于转化子筛选的标记基因 / 174
 - 4.4 酵母的表达系统 / 176**
 - 4.4.1 酵母启动子的基本特征与选择 / 176
 - 4.4.2 酵母启动子的可调控表达系统 / 177
 - 4.4.3 外源基因在酵母中表达的限制性因素 / 179
 - 4.4.4 酵母表达系统的选择 / 180
 - 4.5 酵母的蛋白质修饰分泌系统 / 184**
 - 4.5.1 酵母的蛋白质分泌运输机制 / 184
 - 4.5.2 酵母的信号肽及其剪切系统 / 185
 - 4.5.3 酵母分泌型蛋白的糖基化修饰 / 187

4.6 利用重组酵母生产乙肝疫苗 / 189

- 4.6.1 乙肝病毒的结构 / 189
- 4.6.2 产乙肝表面抗原的重组酿酒酵母的构建 / 190
- 4.6.3 产乙肝表面抗原的重组巴斯德毕赤酵母的构建 / 191

4.7 利用重组酵母生产人血清清蛋白 / 192**5 高等动物基因工程****5.1 动物转基因技术的基本概念 / 197**

- 5.1.1 动物转基因的效率 / 197
- 5.1.2 动物转基因的结构 / 197
- 5.1.3 动物转基因的表达特性 / 198
- 5.1.4 动物转基因的生物学效应 / 199

5.2 转基因导入动物体内的方法 / 199

- 5.2.1 转基因的动物受体细胞系统 / 199
- 5.2.2 动物细胞物理转化法 / 201
- 5.2.3 动物病毒转染法 / 202
- 5.2.4 工程胚胎干细胞法 / 207
- 5.2.5 体细胞转基因克隆法 / 209

5.3 利用动物转基因技术研究基因的表达与功能 / 209

- 5.3.1 利用转报告基因探测动物基因组中的调控序列 / 210
- 5.3.2 利用同源基因灭活细胞内源基因 / 212
- 5.3.3 利用 Cre/loxP 系统条件性敲除基因 / 213
- 5.3.4 利用 CRISPR/Cas 系统条件性敲除基因 / 214
- 5.3.5 利用反义基因抑制细胞基因表达 / 215

- 5.3.6 利用干扰 RNA 阻断特定基因表达 / 217

5.4 利用转基因动物或细胞生产生物大分子 / 217

- 5.4.1 动物细胞高效表达异源蛋白的基本原理 / 217
- 5.4.2 利用哺乳动物细胞大规模培养技术生产结构复杂的人体蛋白 / 219
- 5.4.3 利用动物乳腺组织生产蛋白药物 / 220

5.5 转基因技术在动物遗传性状改良中的应用 / 222

- 5.5.1 转基因鼠 / 222
- 5.5.2 转基因兔、猪、羊 / 223
- 5.5.3 转基因牛 / 224
- 5.5.4 转基因鸡 / 224
- 5.5.5 转基因鱼 / 224

5.6 基因治疗 / 225

- 5.6.1 基因治疗的基本战略思想 / 225
- 5.6.2 肿瘤的基因治疗 / 227
- 5.6.3 囊性纤维变性症的基因治疗 / 230
- 5.6.4 杜兴肌营养不良症的基因治疗 / 231
- 5.6.5 重度联合免疫缺陷症的基因治疗 / 231
- 5.6.6 糖尿病的基因治疗战略 / 232
- 5.6.7 骨髓细胞的转基因研究 / 232
- 5.6.8 基因治疗的副反应及其对策 / 233

6 高等植物基因工程**6.1 高等植物的遗传学特性 / 237****6.2 高等植物的基因转移系统 / 238**

- 6.2.1 Ti 质粒介导的整合转化系统 / 238
- 6.2.2 植物病毒介导的转染系统 / 243

6.2.3 植物细胞的直接转化方法 / 247

6.2.4 植物原生质体的再生 / 249

6.3 高等植物的基因表达系统 / 249

6.3.1 外源基因的四环素诱导系统 / 250

6.3.2 外源基因的乙醇诱导系统 / 252

6.3.3 外源基因类固醇诱导系统 / 253

6.3.4 外源基因的地塞米松诱导和四环素抑制系统 / 255

6.4 利用植物转基因技术研究基因的表达与调控 / 255

6.4.1 利用报告基因展示高等植物基因表达与调控的信息谱 / 255

6.4.2 利用病毒载体探查植物基因重排 / 256

6.4.3 利用转座元件克隆植物基因 / 256

6.4.4 利用T-DNA构建植物遗传突变株 / 257

6.5 利用转基因植物生产重组异源蛋白和工业原料 / 257

6.5.1 利用植物生物反应器生产医用蛋白 / 257

6.5.2 利用植物生物反应器生产食品或饲料添加剂 / 259

6.5.3 利用植物生物反应器生产工业原料 / 259

6.6 转基因技术在植物品种改良中的应用 / 260

6.6.1 控制果实成熟的转基因植物 / 260

6.6.2 抗虫害的转基因植物 / 261

6.6.3 抗病原体的转基因植物 / 262

6.6.4 抗除草剂的转基因植物 / 263

6.6.5 改变花型花色的转基因植物 / 264

6.6.6 抗环境压力的转基因植物 / 264

6.6.7 产生高品质产物的转基因植物 / 265

6.6.8 转基因植物的安全性 / 266

7 第二代基因工程——蛋白质工程

7.1 蛋白质工程的基本概念 / 269

7.1.1 蛋白质工程的基本特征 / 269

7.1.2 蛋白质工程的研究内容及应用 / 270

7.1.3 蛋白质工程实施的必要条件 / 271

7.2 基因的体外定向突变 / 271

7.2.1 局部随机掺入法 / 271

7.2.2 碱基定点转换法 / 272

7.2.3 部分片段合成法 / 274

7.2.4 引物定点引入法 / 275

7.2.5 PCR扩增突变法 / 277

7.3 基因的体外定向进化 / 279

7.3.1 易错PCR / 279

7.3.2 DNA改组 / 279

7.3.3 体外随机引发重组 / 281

7.3.4 交错延伸 / 282

7.3.5 过渡模板随机嵌合生长 / 283

7.3.6 渐增切割杂合酶生成 / 284

7.3.7 同源序列非依赖性蛋白质重组 / 285

7.3.8 突变文库的筛选模型 / 285

7.4 蛋白质工程的设计思想与应用 / 287

7.4.1 提高蛋白质或酶的稳定性 / 287

7.4.2 减少重组多肽链的错误折叠 / 290

7.4.3 改善酶的催化活性 / 291

7.4.4 消除酶的被抑制特性 / 293

7.4.5 修饰酶的催化特异性 / 293

7.4.6 强化配体与其受体的亲和性 / 296

7.4.7 降低异源蛋白药物的免疫原性 / 296

8 第三代基因工程——途径工程

8.1 途径工程的基本概念 / 303

8.1.1 途径工程的基本定义 / 303

8.1.2 途径工程的基本过程 / 304

8.1.3 途径工程的基本原理 / 307

8.2 途径工程的研究战略 / 307

8.2.1 在现存途径中提高目标产物的代谢流 / 308

8.2.2 在现存途径中改变物质流的性质 / 311

8.2.3 利用已有途径构建新的代谢旁路 / 312

8.3 初级代谢的途径工程 / 314

8.3.1 乙醇生产菌的途径操作 / 314

8.3.2 辅酶Q生产菌的途径操作 / 321

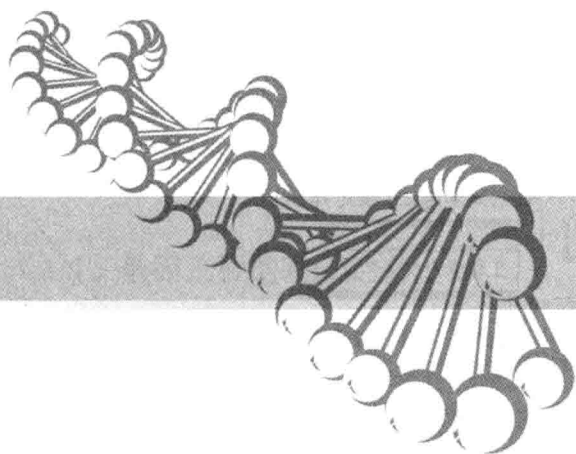
8.3.3 氢气生产菌的途径操作 / 328

8.4 次级代谢的途径工程 / 329

8.4.1 聚酮生物合成的分子机制 / 329

8.4.2 聚酮合酶各组成模件的操作战略 / 330

8.4.3 聚酮生物合成基因的异源表达 / 333



概述

100多年前，在奥地利莫勒温镇一个修道院里沉醉于豌豆杂交实验的孟德尔（Mendel）也许根本就没有想到，他提出的遗传因子在半个世纪后被摩尔根（Morgan）称为基因；而且1944年艾弗瑞（Avery）证明了基因的物质基础是DNA；1953年沃森（Watson）和克里克（Crick）又揭示了DNA的双螺旋分子结构；到了1973年，DNA已能在体外被随意剪接并转回到细菌体内复制和表达。生命科学的飞速发展孕育了现代分子生物学技术——基因工程的诞生。今天，人们在超市货架上可以买到保质期较长的转基因番茄和土豆，以“多利”绵羊为代表的体细胞克隆动物走出实验室，使人们不再将《失落的世界》视为科幻影片，基因工程正驱动着整个人类的生活方式发生重大变革。

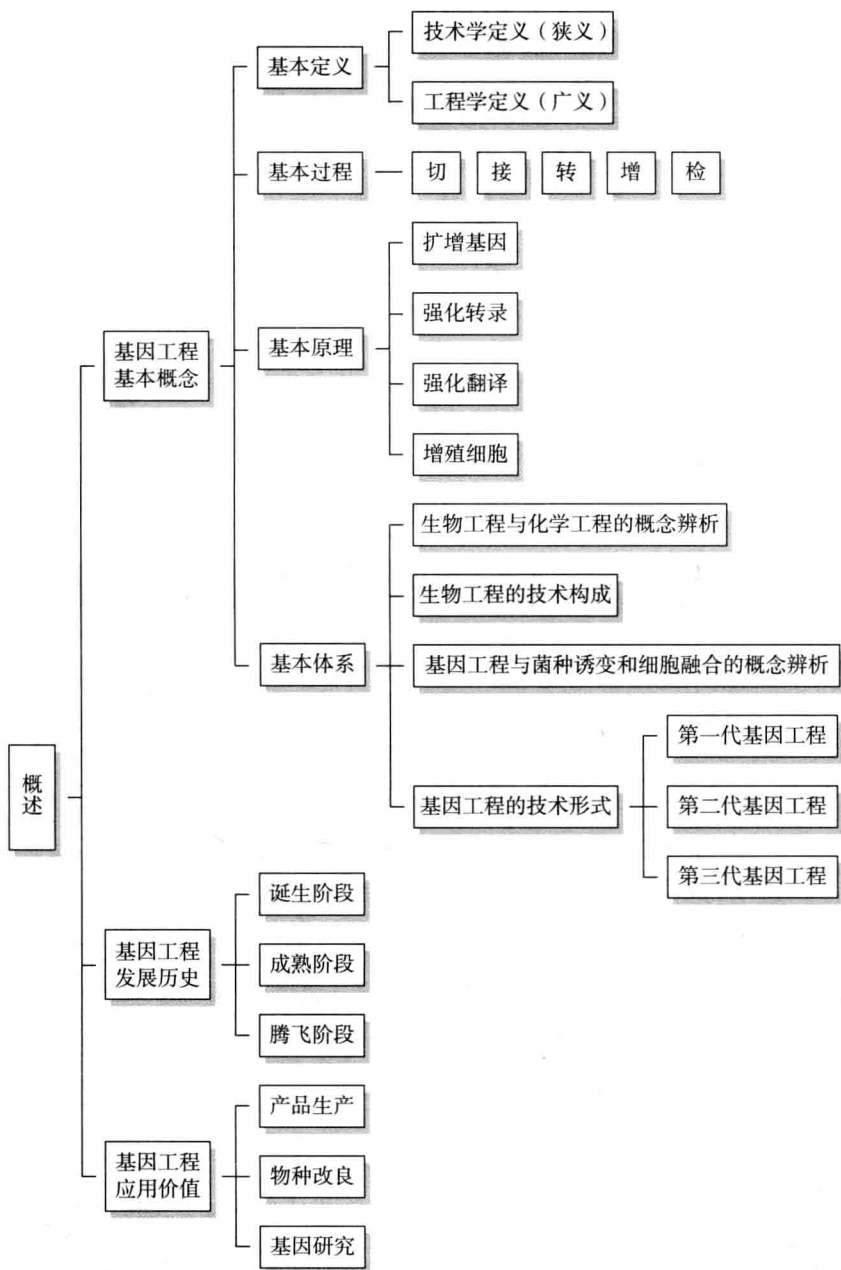
【关键词】

基因工程 重组DNA技术 分子克隆技术 供体 受体 载体 操作单元 生物工程
微型生物反应器

【科技史话】

基因工程之父

知识导图



1.1 基因工程的基本概念

1.1.1 基因工程的基本定义

基因工程原称遗传工程 (genetic engineering)。从狭义上讲, 基因工程是指将一种或多种生物体 (供体) 的基因与载体在体外进行剪接重组, 然后转入另一种生物体 (受体) 内, 使之按照人们的意愿遗传并表达出新的性状。因此, 供体、受体、载体称为基因工程的三大要素, 其中相对于受体而言, 来自供体的基因属于外源基因。除了 RNA 病毒外, 几乎所有生物体的基因都存在于 DNA 结构中, 而用于外源基因重组剪接的载体也都是 DNA 分子, 因此基因工程亦称为重组 DNA 技术 (DNA recombination)。另外, DNA 重组分子大都需在受体细胞中复制扩增, 故还可将基因工程表征为分子克隆技术 (molecular cloning)。

广义的基因工程定义为 DNA 重组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。上游技术指的是外源基因重组、克隆、表达的设计与构建 (即狭义的基因工程); 而下游技术则涉及含有重组外源基因的生物细胞 (基因工程菌或细胞) 的大规模培养, 以及外源基因表达产物的分离纯化过程。因此, 广义的基因工程概念更倾向于工程学的范畴。值得注意的是, 广义的基因工程是一个高度统一的整体。上游 DNA 重组的设计必须以简化下游操作工艺和装备为指导, 而下游过程则是上游基因重组蓝图的体现与保证, 这是基因工程产业化的基本原则。

1.1.2 基因工程的基本过程

依据定义, 基因工程的整个过程由工程菌 (细胞) 的设计构建和基因产物的生产两大部分组成 (图 1-1)。前者主要在实验室里进行, 其基本单元操作过程如下:

(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, 构成 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) 筛选和鉴定经转化处理的细胞, 获得外源基因高效稳定表达的基因工程菌或细胞 (简称检)。

由此可见, 基因工程的上游操作过程可简化为: 切、接、转、增、检。

1.1.3 基因工程的基本原理

作为现代生物工程的关键技术, 基因工程的主体战略思想是外源基因的稳定高效表达。为达到此目的, 可从以下四个方面考虑:

(1) 利用载体 DNA 在受体细胞中独立于染色体 DNA 而自主复制的特性, 将外源基因与载体分子重组, 通过载体分子的扩增提高外源基因在受体细胞中的剂量 (或拷贝数), 借此提高其宏观表达水平。这里涉及 DNA 分子高拷贝复制以及稳定遗传的分子遗传学原理。

(2) 筛选、修饰、重组启动子、增强子、操作子和终止子等基因的转录调控元件, 并将这些元件与外源基因精确剪接, 通过强化外源基因的转录而提高其表达水平。

(3) 选择、修饰、重组核糖体结合位点及密码子等 mRNA 的翻译调控元件, 强化受体细胞中目标蛋白质的生物合成过程。上述两点均涉及基因表达调控的分子生物学原理。

(4) 基因工程菌 (细胞) 是现代生物工程中的微型生物反应器, 在强化并维持其最佳生产效能的基础上, 从工程菌 (细胞) 大规模培养的工程和工艺角度切入, 合理控制微型生物反应器的增殖速度和最终数量, 也是提高外源基因表达产物产量的重要环节, 这里涉及的是生化工程学的基本理论体系。

因此, 分子遗传学、分子生物学、生化工程学是基因工程原理的三大基石。

1.1.4 基因工程的基本体系

生物工程的学科体系建立在微生物学、遗传学、生物化学和化学工程学的基本原理与技术之上, 但其最古老的产业化应用可追溯到公元前 40 世纪至公元前 30 世纪期间的酿酒技术。20 世纪 40 年代, 抗生素制造业的出现被认为是微生物发酵技术成熟的标志, 同时也孕育了传统生物工程的诞生。30 年之后, 以分子遗传学和分子生物学为理论基础的基因工程技术则将生物工程引至现代生物技术的高级发展阶段。

生物工程与化学工程同属化学产品生产技术, 但两者在基本原理、生产组织形式以及产品结构等方面均有本质的区别。在化学工业中, 产品形成或者化学反应发生的基本场所是各

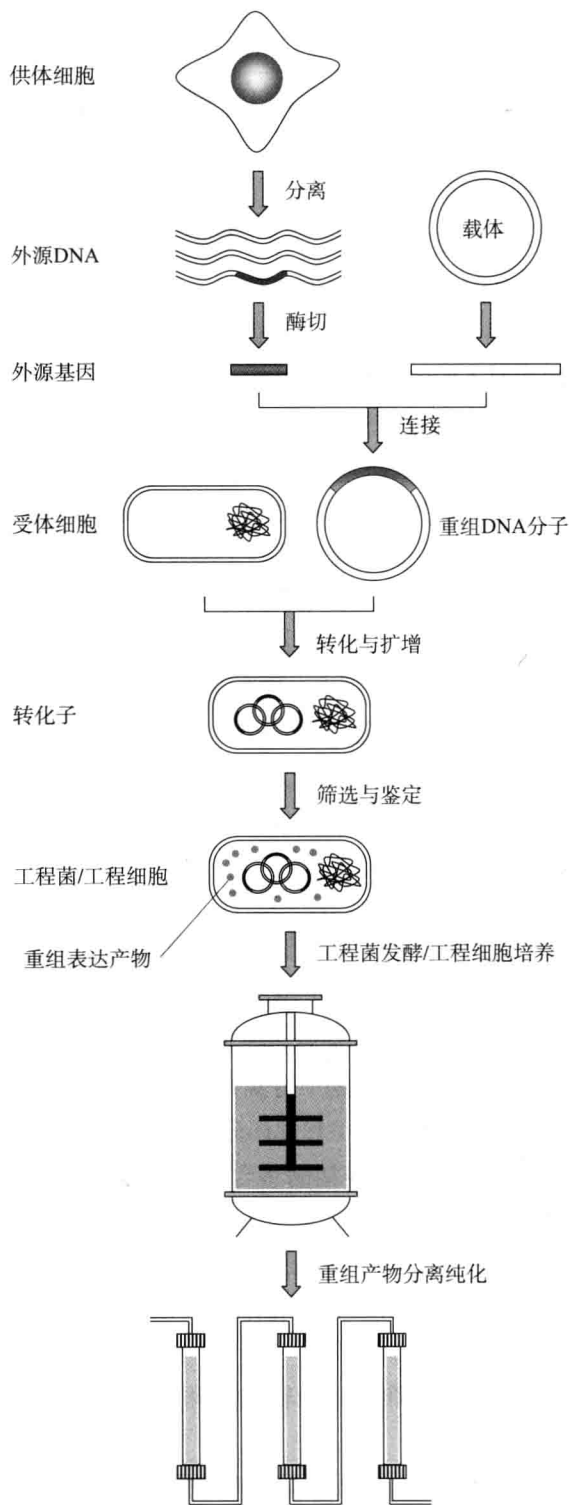


图 1-1 基因工程基本流程示意图

种类型的物理反应器，在那里反应物直接转变成产物；而在生物工程产业中，生化反应往往发生在生物细胞内，作为反应物的底物按照预先编制好的生化反应程序，在催化剂酶的作用下形成最终产物。在此过程中，反应的速度和进程不仅仅依赖于底物和产物的浓度，而且更重要的是受到酶含量的控制，后者的变化又与细胞所处的环境条件和基因的表达状态直接相关联。虽然在一个典型的生物工程生产模式中，同样需要使用被称为细菌发酵罐或细胞培养器的物理容器，但它们仅仅用于细胞的培养和维持，真正意义上的生物反应器却是细胞本身。因此，就生产方式而言，生物工程与化学工程的显著区别在于：首先，生物工程通常需要两种性质完全不同的反应器，细胞实质上是一种特殊的微型生物反应器（microbioreactor）；其次，在一般生产过程中，微型反应器（细胞）的数量与质量随物理反应器内的环境条件变化而变化，因此在物理反应器水平上施加的工艺和工程控制参数种类更多、控制程度更精细；再次，每个微型反应器（细胞）内生物催化剂的数量和质量也会增殖或跌宕，而且这种变化受制于更为复杂的机制，如酶编码基因的表达调控程序、蛋白质的加工成熟程序、酶的活性结构转换程序、蛋白质的降解程序等；最后，如果考虑产品的结构，生物工程则不仅能生产生理活性和非活性分子，而且还能培育和制造生物活体组织或器官。

上述分析表明，现代生物工程的基本内涵包括：用于维持和控制细胞微型反应器（即细菌或细胞）数量和质量的发酵工程（细菌培养）和细胞工程（动植物细胞培养）、用于产物分离纯化的分离工程、用于实施细胞外生化反应的酶工程、用于生产生物活体组织的组织工程，以及用于构建高品质细胞微型反应器的基因工程（图 1-2）。值得注意的是，根据酶工

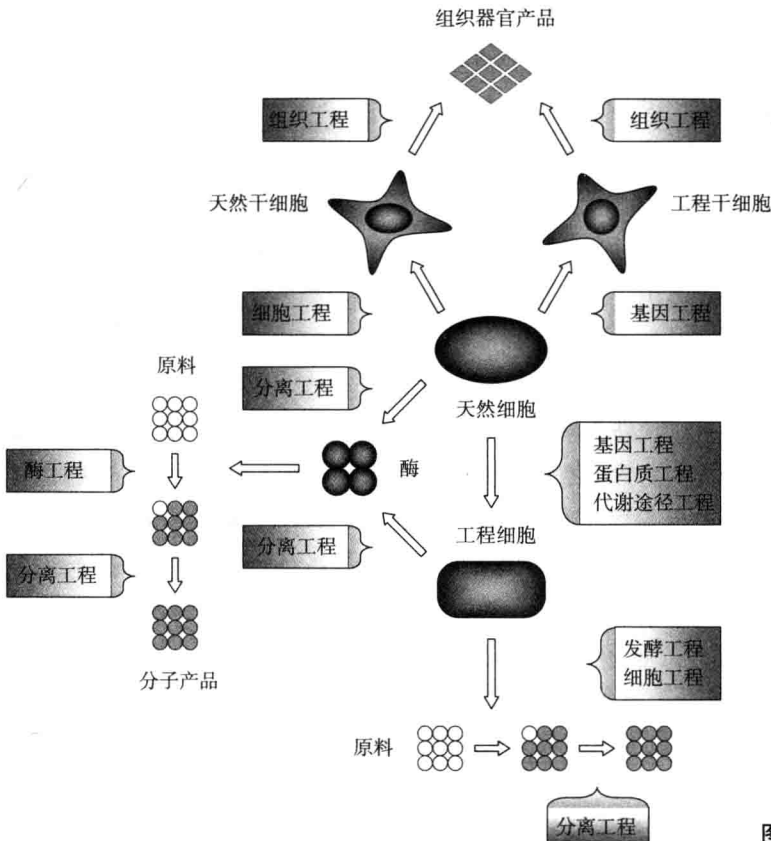


图 1-2 现代生物工程基本内涵

程原理和技术组织的产物生产方式表面上看起来似乎与细胞微型反应器无关,但从生物催化剂概念拓展和酶制剂来源的角度上考察,这种生产方式在很大程度上也依赖于细胞微型反应器的使用,因为目前工业上使用的大部分酶制剂实际上是发酵工程的中间产品,而且酶工程产业中相当比例的生物催化剂形式是微生物细胞,后者也同样来自发酵过程。

菌种诱变筛选程序和细胞工程中的细胞融合技术分别是微生物和动植物微型反应器品质改良的传统手段,而 DNA 重组技术则是定向创建所有类型细胞微型反应器(即工程菌或工程细胞)的强有力现代化工具。其中,第一代基因工程是将单一外源基因导入受体细胞,使之高效表达外源基因编码的蛋白质或多肽,它们基本上以天然的序列结构存在;第二代基因工程(即蛋白质工程)通过基因水平上的操作修饰改变蛋白多肽的序列结构,产生生物功能更为优良的突变蛋白(mutein);而作为第三代基因工程的途径工程则在基因水平上局部设计细胞内固有的代谢途径和信号转导途径,以赋予细胞更为优越甚至崭新的产物生产品质。

1.2 基因工程的发展历史

从基本流程来看,基因工程的操作并不复杂,但其中涉及许多关键性技术,如 DNA 分子的切割与连接、DNA 切接反应的检测以及重组 DNA 分子导入受体细胞的程序等。有趣的是,这三项基本技术几乎同时于 20 世纪 70 年代初发展起来,并迅速导致了第一个 DNA 体外重组实验的诞生。

1.2.1 基因工程的诞生

1972 年,美国学者伯格(Berg)和杰克森(Jackson)等人将猿猴病毒 SV40 基因组 DNA、大肠杆菌 λ 噬菌体基因以及大肠杆菌半乳糖操纵子在体外重组获得成功。翌年,美国斯坦福大学的考恩(Cohen)和鲍耶(Boyer)等人在体外构建出含有四环素和链霉素两个抗性基因的重组质粒分子,将之导入大肠杆菌后,该重组质粒得以稳定复制,并赋予受体细胞相应的抗生素抗性,由此宣告了基因工程的诞生。正如考恩在评价其实验结果时指出的那样,基因工程技术完全有可能使大肠杆菌具备其他生物物种所固有的特殊生物代谢途径与功能,如光合反应和抗生素合成等。

出人意料的是,当时科学界对这项新技术诞生的第一个反应竟是应当禁止有关实验的继续开展,其严厉程度远大于今天人们对人体克隆的关注。包括考恩本人在内的分子生物学家们都担心,两种不同生物的基因重组有可能为自然界创造出一个不可预知的危险物种,致使人类遭受灭顶之灾。于是,1975 年西欧几个国家签署公约,限制基因重组的实验规模,第二年美国政府也制订了相应的法规。至今世界上仍有少数国家坚持对基因重组技术的使用范围进行严格的限制。

然而,分子生物学家们毕竟不愿看到先进的科学技术葬送在自己手中。从 1972 年到 1976 年短短的四年里,人们对 DNA 重组所涉及的载体和受体系统进行了有效的安全性改造,包括噬菌体 DNA 载体的有条件包装以及受体细胞遗传重组和感染寄生缺陷突变株的筛选,同时还建立了一套严格的 DNA 重组实验室设计与操作规范。众多安全可靠的相关技术支撑

以及巨大的应用诱惑力，终于使 DNA 重组技术走出困境并迅速发展起来。

1.2.2 基因工程的成熟

早在基因工程发展的初期，人们就已开始探讨将该技术应用于大规模生产与人类健康密切相关的生物大分子，这些物质在人体内含量极少，但却具有非常重要的生理功能。1977年，日本学者板仓（Itakura）及其同事首次在大肠杆菌中克隆并表达了人的生长激素释放抑制素基因。几个月后，美国的乌尔维希（Ullrich）随即克隆表达了人的胰岛素基因。1978年，美国 Genentech 公司开发出利用重组大肠杆菌合成人胰岛素的先进生产工艺，从而揭开了基因工程产业化的序幕。

这一时期主要基因工程产品的研制开发简况列在表 1-1 中。除此之外，近 10 年来又有数以百计的新型基因工程药物问世，另有数千种药物正处于研制开发中。DNA 重组技术已逐渐取代经典的微生物诱变育种程序，大大推进了微生物种群的非自然有益进化的进程。

表 1-1 主要基因工程产品的上市时间

产品	用途	首次进入市场时间	国家 / 地区
人生长激素释放抑制素 (SRM)	治疗巨人症		
人胰岛素	治疗糖尿病	1982	欧洲
人生长激素 (hGH)	治疗侏儒症，预防衰老	1985	美国
人 α -干扰素 (α -IFN)	治疗病毒感染症	1986	欧洲
乙肝疫苗 (HBsAgV)	预防乙型肝炎	1986	欧洲
人组织纤溶酶原激活剂 (t-PA)	治疗急性心肌梗死	1987	美国
人促红细胞生成素 (EPO)	治疗贫血症	1989	欧洲
人 γ -干扰素 (γ -IFN)	治疗慢性粒细胞增生症	1990	
人粒细胞集落刺激因子 (G-CSF)	治疗中性白细胞减少症	1991	美国
人白细胞介素-2 (IL-2)	治疗肾细胞瘤	1992	欧洲
人凝血因子 VIII	治疗 A 型血友病	1992	
人 β -干扰素 (β -IFN)	治疗多重硬化症	1993	
葡糖脑苷脂酶	治疗高歇氏症	1994	
人凝血因子 IX	治疗 B 型血友病	1997	
人白细胞介素-10 (IL-10)	预防血小板减少症	1997	
可溶性肿瘤坏死因子 (TNF) 受体	治疗类风湿关节炎	1998	美国
白介素 2 融合毒素	治疗皮肤 T 细胞淋巴瘤	1999	美国
聚乙二醇干扰素 α -2b	治疗慢性丙型肝炎	2001	欧洲
人甲状旁腺激素 (1-34) [hPTH (1-34)]	治疗骨质疏松	2002	美国
β -半乳糖苷酶 (β -GAL)	治疗法布莱氏病	2003	美国