

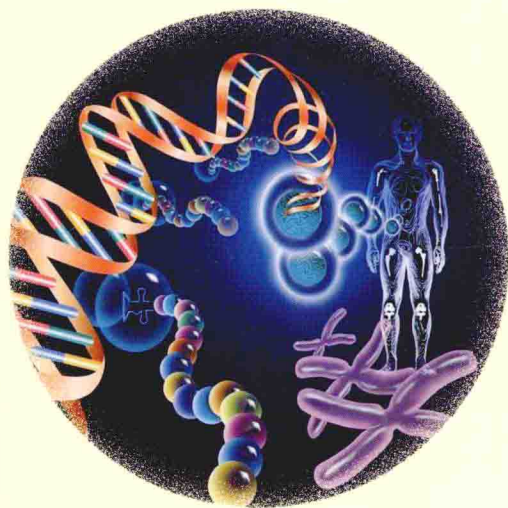
全国普通高等院校
生命科学类“十二五”规划教材



基因工程

郑振宇 王秀丽 主编

Gene Engineering



华中科技大学出版社
<http://www.hustp.com>

全国普通高等院校生命科学类“十二五”规划教材

基因工程

主 编 郑振宇 王秀丽
副主编 (按姓氏笔画排序)
刘丹梅 宋运贤
邵 燕 胡沂淮
参 编 韩凤桐 孙新城
张 锐 王彦芹



华中科技大学出版社

内 容 简 介

本书对基因工程的基本概念和重要研究技术原理进行了系统、翔实的介绍,还援引了许多最新研究成果,力求内容基础而又新颖,简洁而又通俗易懂。同时,部分内容结合教学实践需要,介绍了该学科最新进展,并提供了重要文献和进一步阅读指南。

本书以基因工程的研究步骤及实际操作中的需要为主线,共分12章,包括基因工程的基本概念、基因工程基本技术原理、基因工程的工具酶和克隆载体、目的基因的克隆、外源基因的原核表达系统、外源基因的真核表达系统、转基因植物、转基因动物、基因治疗和蛋白质工程等。每章都有本章简介、思考题和参考文献。

本书可作为高等院校生物类专业本科生教材,也可作为相关专业研究生和从事基因工程的教学、科技工作者的参考用书。

图书在版编目(CIP)数据

基因工程/郑振宇,王秀利主编. —武汉:华中科技大学出版社,2014.7
ISBN 978-7-5609-9718-6

I. ①基… II. ①郑… ②王… 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(2014)第 147222 号

基因工程

郑振宇 王秀利 主编

策划编辑:王新华

责任编辑:王新华

封面设计:刘 卉

责任校对:张 琳

责任监印:周治超

出版发行:华中科技大学出版社(中国·武汉)

武昌喻家山 邮编:430074 电话:(027)81321915

录 排:华中科技大学惠友文印中心

印 刷:武汉市籍缘印刷厂

开 本:787mm×1092mm 1/16

印 张:24

字 数:628千字

版 次:2015年3月第1版第1次印刷

定 价:52.00元



本书若有印装质量问题,请向出版社营销中心调换
全国免费服务热线:400-6679-118 竭诚为您服务
版权所有 侵权必究

全国普通高等院校生命科学类“十二五”规划教材 编委会



主任委员

余龙江 华中科技大学教授,生命科学与技术学院副院长,2006—2012 教育部高等学校生物科学与工程教学指导委员会生物工程与生物技术专业教学指导分委员会委员,2013—2017 教育部高等学校生物技术、生物工程类专业教学指导委员会委员

副主任委员(排名不分先后)

胡永红 南京工业大学教授,南京工业大学研究生院副院长

李 钰 哈尔滨工业大学教授,生命科学与技术学院院长

任国栋 河北大学教授,2006—2012 教育部高等学校生物科学与工程教学指导委员会生物科学基础课程教学指导分委员会委员,河北大学学术委员会副主任

王宜磊 菏泽学院教授,2013—2017 教育部高等学校大学生物学课程教学指导委员会委员

杨艳燕 湖北大学教授,2006—2012 教育部高等学校生物科学与工程教学指导委员会生物科学专业教学指导分委员会委员

曾小龙 广东第二师范学院教授,副校长,学校教指委主任

张士瑾 中国海洋大学教授,2006—2012 教育部高等学校生物科学与工程教学指导委员会生物科学专业教学指导分委员会委员

委员(排名不分先后)

| | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 陈爱葵 | 胡仁火 | 李学如 | 刘宗柱 | 施文正 | 王元秀 | 张 峰 |
| 程水明 | 胡位荣 | 李云玲 | 陆 胤 | 石海英 | 王 云 | 张 恒 |
| 仇雪梅 | 贾建波 | 李忠芳 | 罗 充 | 舒坤贤 | 韦鹏霄 | 张建新 |
| 崔韶晖 | 金松恒 | 梁士楚 | 马 宏 | 宋运贤 | 卫亚红 | 张丽霞 |
| 段永红 | 李 峰 | 刘长海 | 马金友 | 孙志宏 | 吴春红 | 张 龙 |
| 范永山 | 李朝霞 | 刘德立 | 马三梅 | 涂俊铭 | 肖厚荣 | 张美玲 |
| 方 俊 | 李充璧 | 刘凤珠 | 马 尧 | 王端好 | 徐敬明 | 张彦文 |
| 方尚玲 | 李 华 | 刘 虹 | 马正海 | 王金亭 | 薛胜平 | 郑永良 |
| 耿丽晶 | 李景蕙 | 刘建福 | 毛露甜 | 王伟东 | 闫春财 | 周 浓 |
| 郭晓农 | 李 梅 | 刘 杰 | 聂呈荣 | 王秀丽 | 杨广笑 | 朱宝长 |
| 韩曜平 | 李 宁 | 刘静雯 | 彭明春 | 王永飞 | 于丽杰 | 朱长俊 |
| 侯典云 | 李先文 | 刘仁荣 | 屈长青 | 王有武 | 余晓丽 | 朱德艳 |
| 侯义龙 | 李晓莉 | 刘忠虎 | 邵 晨 | 王玉江 | 昝丽霞 | 宗宪春 |

全国普通高等院校生命科学类“十二五”规划教材 组编院校

(排名不分先后)

北京理工大学
广西大学
广州大学
哈尔滨工业大学
华东师范大学
重庆邮电大学
滨州学院
河南师范大学
嘉兴学院
武汉轻工大学
长春工业大学
长治学院
常熟理工学院
大连大学
大连工业大学
大连海洋大学
大连民族学院
大庆师范学院
佛山科学技术学院
阜阳师范学院
广东第二师范学院
广东石油化工学院
广西师范大学
贵州师范大学
哈尔滨师范大学
合肥学院
河北大学
河北经贸大学
河北科技大学
河南科技大学
河南科技学院
河南农业大学
菏泽学院
贺州学院
黑龙江八一农垦大学

华中科技大学
华中师范大学
暨南大学
首都师范大学
南京工业大学
湖北大学
湖北第二师范学院
湖北工程学院
湖北工业大学
湖北科技学院
湖北师范学院
湖南农业大学
湖南文理学院
华侨大学
华中科技大学武昌分校
淮北师范大学
淮阴工学院
黄冈师范学院
惠州学院
吉林农业科技学院
集美大学
济南大学
佳木斯大学
江汉大学文理学院
江苏大学
江西科技师范大学
荆楚理工学院
军事经济学院
辽东学院
辽宁医学院
聊城大学
聊城大学东昌学院
牡丹江师范学院
内蒙古民族大学
仲恺农业工程学院

云南大学
西北农林科技大学
中央民族大学
郑州大学
新疆大学
青岛科技大学
青岛农业大学
青岛农业大学海都学院
山西农业大学
陕西科技大学
陕西理工学院
上海海洋大学
塔里木大学
唐山师范学院
天津师范大学
天津医科大学
西北民族大学
西南交通大学
新乡医学院
信阳师范学院
延安大学
盐城工学院
云南农业大学
肇庆学院
浙江农林大学
浙江师范大学
浙江树人大学
浙江中医药大学
郑州轻工业学院
中国海洋大学
中南民族大学
重庆工商大学
重庆三峡学院
重庆文理学院

前 言

20 世纪 70 年代以来,生物技术这门激动人心的技术正在改变着人们的生活方式,促进了国民经济的发展,而基因工程又是生物技术中最吸引人的、最重要的、发展最迅速的技术。生物技术犹如一顶王冠,而基因工程则是这顶王冠上的一颗明珠。基因工程的进一步发展必将为人类认识生命的本质,揭示生命现象的奥秘开辟一个全新的领域,对 21 世纪的生物制药、现代农业、疾病治疗、环境保护以及国民经济的可持续发展产生重大的影响。因此,基因工程始终是高等院校生物技术专业或生物工程专业本科生的专业基础课。

根据生物技术专业或生物工程专业本科生学时缩短、合适的教材难以寻找、课程内容与其他课程重叠而难以取舍等现状,来自多所学校多年从事基因工程教学的教师共同编写了本教材。

基因工程以遗传学、生物化学和分子生物学等学科为基础,引入了工程学的一些概念,通过周密的实验设计,进行精确的实验操作,高效率地达到预期的目标。本书编者遵从“重视基础、拓展眼界、联系实际”的原则,结合高等院校对学生知识的要求和培养性质与特点,结合生物工程企业等用人单位的需求,同时融合了我们长期教学和科研经验,对教学体系和内容进行了有机的整合,编写了本教材。本书从基因的基本概念出发,以基因工程技术体系为主线,对实际操作过程中所涉及的基本技术和基本概念进行了重点阐述;同时把基因工程的技术成就和学科发展动态结合到每一章节中,使学生在掌握基本技术原理和技能的基础上,了解基因工程技术的光明前景。

本书共分 12 章,具体编写分工如下:第 1 章由河南农业大学郑振宇编写;第 2 章由滨州学院邵燕编写;第 3 章由哈尔滨工业大学韩凤桐编写;第 4 章由延安大学陈国梁编写;第 5 章由合肥学院阚劲松编写;第 6 章由大连海洋大学王秀丽编写;第 7 章由淮阴工学院胡沂淮编写;第 8 章由重庆工商大学李宏编写;第 9 章由淮北师范大学宋运贤编写;第 10 章由辽东学院刘丹梅编写;第 11 章第 1~3 节由郑州轻工业学院孙新城编写,第 4~6 节由塔里木大学王彦芹编写;第 12 章由塔里木大学张锐编写。在写作过程中得到了各作者所在院校领导和老师们的大力支持和帮助,华中科技大学出版社的编辑也对本书的编写和顺利出版花费了大量的心血,在此表示最诚挚的感谢!

基因工程是一门发展十分迅速的新兴学科,每时每刻都有新研究成果发表,并且它涉及的知识十分广泛,由于编者水平有限,书中的不足之处在所难免,恳请同行和广大读者批评指正!

编 者

目 录

第 1 章 绪论 /1

- 1.1 基因工程的基本概念 /2
- 1.2 基因工程的发展历史 /5
- 1.3 基因工程的研究意义 /7
- 1.4 基因工程的应用 /8
- 1.5 基因工程的安全性 /12
- 1.6 我国的基因工程安全管理办法 /15

第 2 章 基因工程的工具酶 /18

- 2.1 限制性核酸内切酶 /18
- 2.2 DNA 连接酶 /27
- 2.3 DNA 聚合酶和逆转录酶 /35
- 2.4 修饰酶类 /39
- 2.5 其他工具酶 /43

第 3 章 基因工程的克隆载体 /47

- 3.1 质粒载体 /48
- 3.2 噬菌体载体 /63
- 3.3 柯斯质粒载体 /75
- 3.4 噬菌粒载体 /76
- 3.5 病毒载体 /77
- 3.6 人工染色体克隆载体 /85

第 4 章 基因工程的基本技术 /91

- 4.1 核酸的提取、鉴定与保存 /91
- 4.2 凝胶电泳技术 /97
- 4.3 分子杂交技术 /102
- 4.4 PCR /105
- 4.5 DNA 序列分析 /114
- 4.6 基因芯片及数据分析 /117
- 4.7 研究蛋白质与 DNA 相互作用的主要方法 /121

-
- 第 5 章 目的基因的获取** /130
- 5.1 基因的人工化学合成 /130
 - 5.2 PCR 扩增目的基因 /135
 - 5.3 从基因组文库获取目的基因 /135
 - 5.4 从 cDNA 文库获得目的基因 /138
 - 5.5 其他基因分离技术 /144
- 第 6 章 目的基因的导入与重组体的鉴定** /156
- 6.1 重组 DNA 导入原核细胞 /156
 - 6.2 重组 DNA 导入真核细胞 /164
 - 6.3 重组体克隆的筛选与鉴定 /172
- 第 7 章 外源基因的原核表达系统** /189
- 7.1 原核表达系统的特点 /189
 - 7.2 原核细胞表达系统 /198
 - 7.3 提高外源基因表达水平的措施 /216
- 第 8 章 外源基因的真核表达系统** /226
- 8.1 真核表达系统的特点 /226
 - 8.2 酵母表达系统 /227
 - 8.3 昆虫或昆虫细胞表达系统 /237
 - 8.4 哺乳动物表达系统 /244
- 第 9 章 转基因植物** /254
- 9.1 转基因植物概述 /254
 - 9.2 植物基因转化受体系统 /256
 - 9.3 植物基因遗传转化方法 /261
 - 9.4 转基因植物的筛选与鉴定 /281
 - 9.5 提高外源基因在转基因植物中表达效率的途径 /291
 - 9.6 转基因植物的应用和展望 /295
 - 9.7 转基因植物的安全性评价 /301
- 第 10 章 转基因动物** /308
- 10.1 转基因动物发展简史 /308
 - 10.2 转基因动物技术 /310
 - 10.3 转基因动物的制备和检测 /315
 - 10.4 转基因动物研究中出现的问题及其对策 /317
 - 10.5 转基因动物技术的应用 /319
 - 10.6 转基因动物的安全性及其未来 /323

第 11 章 基因治疗 /325

- 11.1 分子病与基因治疗的基本概念 /325
- 11.2 基因治疗的发展简史与现状 /326
- 11.3 基因治疗的策略 /328
- 11.4 基因治疗的基本程序 /330
- 11.5 基因治疗的应用 /335
- 11.6 基因治疗的前景 /339

第 12 章 蛋白质工程 /343

- 12.1 蛋白质工程的理论基础、诞生和发展 /344
- 12.2 蛋白质工程的关键技术 /358
- 12.3 蛋白质工程的设计思想 /369

第1章

绪论

【本章简介】 基因工程是在体外将目的基因与载体分子重组后转化受体细胞,并在受体细胞中表达,从而获得基因产品或培育生物新品种的一种技术。基因工程诞生于20世纪70年代,遗传物质的发现、DNA双螺旋结构模型的确立以及遗传信息流动的中心法则是其诞生的理论基础;各种工具酶的分离纯化、载体的开发以及基因转化技术是其诞生的技术基础。基因工程诞生之后,已经在现代生物学的理论研究中发挥了巨大的作用,同时也在生产实践中获得了广泛的应用,在生物制药、动植物新品种培育、环境污染治理等方面取得了巨大的成就,对人类社会和人类健康产生了巨大影响。关于基因工程和转基因生物的安全性,目前仍未达成共识。尽管如此,作为基因工程技术的参与者必须对其安全性保持高度的警惕。

1857年孟德尔(Mendel)开始豌豆杂交试验,并在1865年发表了著名的论文《植物杂交试验》。他以敏锐的观察能力和科学的统计分析方法,发现了“遗传因子”,从而奠定了遗传科学的基础。可惜孟德尔的重大发现被埋没了35年。1900年,三位欧洲植物学者几乎同时从各自的植物杂交试验证实了孟德尔发现的遗传定律,从此揭开了遗传学研究的新纪元。整个20世纪,遗传学以前所未有的速度向深度和广度发展。1910年,摩尔根(Morgan)通过果蝇白眼突变研究,确证基因在染色体上,以后又创立了基因论。1933年,由于对基因理论的重大贡献,摩尔根成为首位获得诺贝尔生理学或医学奖的遗传学家。1941年,美国遗传学家Beadle通过红色面包霉营养突变体研究,发现基因的功能是制造各种各样的蛋白质,提出“一种基因产生一种酶”学说,并因此而获诺贝尔奖。1950年,诺贝尔奖得主McClintock通过对玉米斑駁性状遗传研究,发现了转座遗传因子,又称为“跳跃基因”。它们可以在染色体之间自由转移位置,调控基因的表达。这一重要发现导致了10年以后法国科学家Jacob和Monod从原核生物研究中得到的另一项重大发现:存在3种不同的基因,即结构基因、操纵基因和调节基因。他们也因此而分享了诺贝尔奖。

1953年Watson和Crick通过X射线衍射实验,创立脱氧核糖核酸(DNA)双螺旋模型,第一次揭示了DNA分子的结构、组成及功能,开创了从分子水平揭示生命现象本质的新纪元。随后20年,分子生物学突飞猛进。1958年Crick证明了DNA半保留复制和中心法则。1961年,Crick和Nirenberg发现DNA携带的遗传密码是由3个碱基组成的三联体。1967年Khorana和Nirenberg破译了遗传密码。他们制定的密码子与氨基酸之间对应的密码子表,适用于所有生物。

1970年,Smith、Wilcox和Kelly分离到第一种有特异性识别和切割位点的限制性核酸内切酶,使得有目的地切割DNA有了可能。1972年,Jackson和Berg利用限制性核酸内切酶和连接酶,得到了第一个体外重组的DNA分子,从而建立了重组DNA技术。1973年,斯坦福

大学的 Cohen 等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的大肠杆菌 R6-5 质粒 DNA 和编码有四环素抗性基因的另一大肠杆菌质粒 pSC101 DNA 混合后,加入限制性核酸内切酶 *EcoR* I,对 DNA 进行切割后,再用 T₄ DNA 连接酶将它们连接起来,形成重组 DNA 分子,转化大肠杆菌。在含有四环素和卡那霉素的平板上获得了对两种抗生素都有抗性的杂合重组菌落。这是基因工程发展史上第一个克隆转化并取得成功的例子。人类从此掌握了一项按自己意愿设计和构建生物体的关键技术,或用来创造新的生物种、品系,或用来诊断、治疗疾病。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。Cohen 是其创始人。

20 世纪 70 年代出现重组 DNA 技术和淋巴细胞杂交瘤技术,加上 90 年代兴起的基因组学技术,再加上 60 年代以来相继出现、近 20 年迅速崛起的其他各类生物技术,构成了缤纷多彩的现代生物技术群。它们包括:酶或细胞固定化技术、细胞或原生质体融合技术、细胞大规模培养技术、生物反应器技术、花药和小孢子培养双单倍体育种技术、植物茎尖脱毒技术、离体快速繁殖技术、动植物转基因技术、蛋白质工程技术、胚胎工程技术、组织工程技术、动植物生物反应器技术、动物克隆技术、基因组测序分析技术、基因治疗技术、PCR 扩增技术、DNA 分子标记技术、蛋白质组学技术、生物芯片技术、生物信息学技术等。建立在这样一群技术基础上的生物技术产业,其范围遍及农业食品、医药卫生、化工环保、资源能源、海洋开发等许多领域,日益显示出在解决人类面临的食物、健康、资源、环境等重大问题的巨大威力与潜力,基因工程正在使整个人类生活方式发生重大变革。

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(genetic engineering)原称遗传工程。从狭义上讲,基因工程是在分子水平上,提取(或合成)不同生物的遗传物质,在体外切割,再和一定的载体拼接重组,然后把重组的 DNA 分子引入细胞或生物体内,使这种外源 DNA(基因)在受体细胞中进行复制与表达,按人们的需要繁殖扩增基因或生产不同的产物或定向地创造生物的新性状,并能稳定地遗传给后代。因此,供体、受体和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。除了少数 RNA 病毒外,几乎所有生物的基因都存在于 DNA 结构中,而用于外源基因重组拼接的载体也都是 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(molecular cloning)或基因的无性繁殖。基因工程的核心内容包括基因克隆和基因表达。

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、克隆和表达的设计与构建(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(图 1-1)。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思想,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。

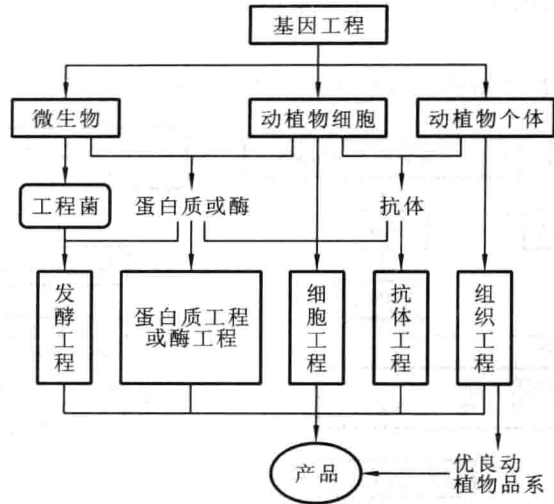


图 1-1 生物工程体系之间的相互关系

(引自焦炳华等,2006)

在现代分子生物学领域里,基因工程又名遗传工程(genetic engineering)、DNA 重组技术(recombinant DNA technique)、分子克隆或基因克隆(gene cloning)。有些人将遗传工程、基因工程和重组 DNA 技术等往往不加区别地使用,造成混乱。事实上它们有不同的内涵,我们有必要加以澄清。

重组 DNA 技术是用酶学方法将不同来源的 DNA 在体外切割、连接、组成一个杂合 DNA 分子的技术。

基因工程是指在体外将目的基因插入病毒、质粒或其他载体分子中,构成遗传物质的新组合,并使之掺入原先没有这些基因的宿主细胞内,且能稳定地遗传。因此,供体、受体和载体是基因工程的三大要素。

遗传工程比基因工程有更广泛的内容。遗传工程包括基因工程,基因工程并不等于遗传工程。凡是人工改造生物遗传特性的技术都可称为遗传工程,它包括基因工程、物理化学诱变、细胞融合、花粉培育、常规育种、有性杂交等。其中有个体水平的、细胞水平的,也有分子水平的。

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。前者主要在实验室里进行,其单元操作过程如下:

(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,形成 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)筛选和鉴定转化细胞,获得使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(图 1-2)。

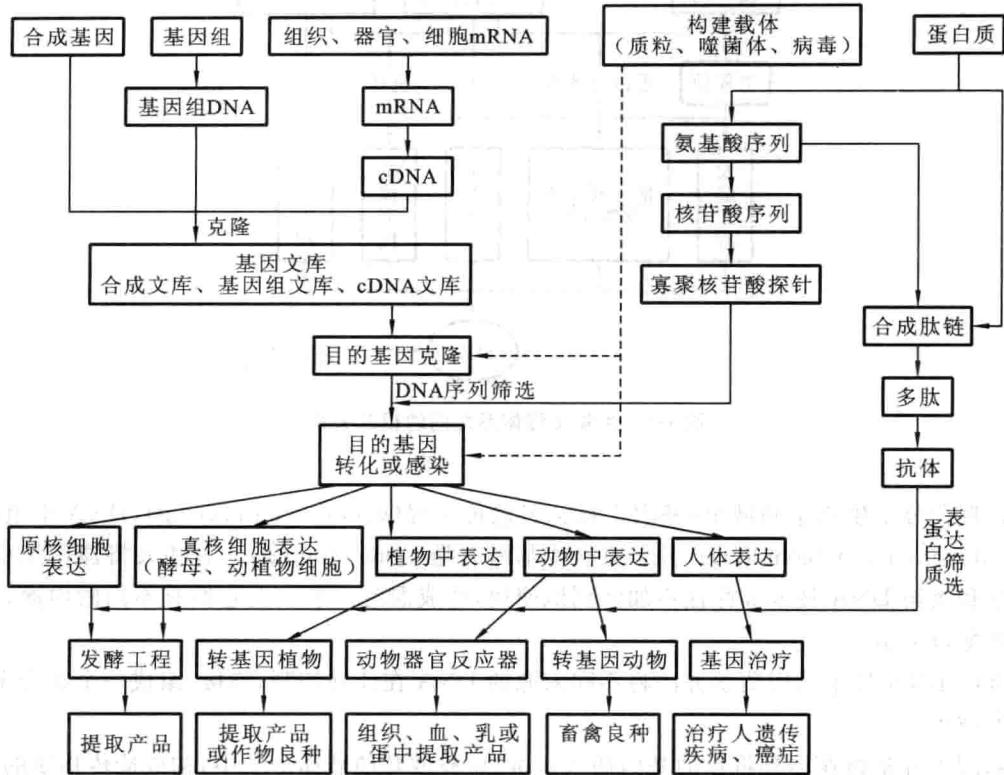


图 1-2 基因工程的流程示意图

(引自贺淹才,2007)

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,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、修饰和重组启动子、增强子、操作子、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细拼接,通过强化外源基因的转录提高其表达水平。

(3)选择、修饰和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主要环节,这里涉及的是生物化学工程的基本理论体系。

因此,分子遗传学、分子生物学以及生化工程学是基因工程原理的三大基石。

1.2 基因工程的发展历史

1.2.1 基因工程的诞生

基因工程的出现是建立在几个重大发现和发明基础上的。1953年,Watson和Crick发现了主要遗传物质DNA的双螺旋结构,阐明了遗传信息传递的中心法则,使得人们对基因的本质有了越来越多的认识,也奠定了基因工程的理论基础;细菌学、病毒学的发展,限制性核酸内切酶和连接酶的发现也为基因工程提供了必要的工具。

1972年,美国斯坦福大学的P. Berg博士的研究小组使用限制性核酸内切酶EcoR I,在体外对猿猴病毒SV40 DNA和 λ 噬菌体DNA分别进行酶切,然后用T₄ DNA连接酶将两种酶切片段连接起来,第一次在体外获得了包括SV40和 λ DNA的重组DNA分子,并因此分享了1980年的诺贝尔化学奖。1973年,S. Cohen等将两种分别编码卡那霉素(kanamycin)和四环素(tetracycline)的抗性基因相连接,构建出重组DNA分子,然后转化大肠杆菌,获得了既抗卡那霉素又抗四环素的双重抗性特征的转化子菌落,这是第一次成功的基因克隆实验,也由此宣告了基因工程的诞生。正如Cohen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种类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。

基因工程从诞生到现在仅40余年,但其发展迅猛,无论是在基础研究方面,还是实际应用中,都取得了惊人的成绩,从根本上改变了传统生物科学技术的被动状态,使得人们可以按照自己的愿望,克服物种间的遗传屏障,定向培养或创造出新的生物形态,以满足人们的需求。基因工程也因此被公认为20世纪最伟大的科学成就之一,标志着人类主动改造自然界的能力进入一个新的阶段。

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便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程度。包括Cohen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定了相应的法规。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,为了消除人们对这一技术的恐慌和忧虑,科学家们对重组DNA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、质粒载体的转移性改造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,这些改造工作实际上加速了基因工程的发展。众多安全可靠的相关技术支撑以及巨大的潜在诱惑力,终于使DNA重组技术走出困境并迅速发展起来。基因工程是在分子生物学等学科基础上发展起来的,基因工程的发展和这些学科的发展相联系的,反过来它也渗透到生命科学的各个领域,促进着生命科学各学科的研究与应用。同时这门技术巨大的潜在的商业价值引来众多的投资者,终于使DNA重组应用技术迅速发展起

来,使它很快走出实验室,进入商业化应用。所以基因工程的大发展也就是它在多学科以及商业上的应用发展。

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水平密切相关的生物大分子,这些物质在人体内含量极小,但具有非常重要的生理功能。1977年,日本的 Tfhura 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 Ullvich 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。

除此之外,最近十年来又有数以百计的新型基因工程药物问世,另有 400 余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。

基因工程中要有基因才能实现基因工程化以应用于研究和生产,而基因的分离和认识又需要基因工程的手段。基因是遗传信息的载体,而遗传信息决定了生物的特征与形态,可以说没有基因就没有生命,但时至今日人们对其认识仍然不够。在基因工程研究发展中值得一提的是 1985 年提出的人类基因组计划(Human Genome Project, HGP)。这一计划是试图用基因工程技术来揭示人类所有的遗传结构,包括所有的基因(特别是疾病相关基因)和非编码序列。1990年,这一被誉为生命科学领域“阿波罗登月计划”的国际人类基因组计划开始启动,历经 10 余年时间,耗资约 30 亿美元,到 2000 年 6 月,人类基因组工作框架图得以正式发布。这一框架图包含了人类基因组 97% 以上的信息,医学专家通过分析每个基因的功能及其在染色体上的位置,将能从分子水平深入了解各种疾病的发生机制,从根本上获得治疗的方法;同时也有助于认识正常的生物结构和功能,解释一系列生命现象的本质。中国作为参与此计划唯一的发展中国家,测定了人类基因组全部序列的 1%,也就是 3 号染色体上短臂端粒区的 3000 万个碱基对的 DNA 序列,为这一研究计划作出了重要贡献。人类基因组计划的实施就是利用基因工程手段来进行的,反过来也极大地推动对基因和基因组结构和功能的认识,加速了基因工程的发展和应用。

随着计算机技术的发展,基因工程和计算机结合是一种必然的趋势。通常说的基因工程是操作单个或数个完整的基因。其产品是由外源基因编码的具有天然属性的蛋白质,操作的层次基本上没有深入基因内部。而蛋白质结构的研究及与计算机相结合使人们能直接操作或改造单个或几个单核苷酸来生产出结构发生了改变的新型蛋白质,这样其功能也完全不一样,能满足人们的不同需求。

1.2.3 基因工程的腾飞

20 世纪 80 年代以来,基因工程已开始朝着高等动植物物种的遗传特征改良以及人体基因治疗等方向发展。1982 年,美国科学家将大鼠的生长激素基因转入小鼠体内,培育出具有大鼠雄健体魄的转基因小鼠及其子代。1983 年,携带有细菌新霉素抗性基因的重组 Ti 质粒转化植物细胞获得成功,高等植物转基因技术问世。1990 年美国首次批准一项人体基因治疗临床研究计划,对一名因腺苷脱氨酶基因缺陷而患有重度联合免疫缺陷症的儿童进行基因治疗获得成功,从而开创了分子医学的新纪元。1991 年,美国倡导在全球范围内实施雄心

勃勃的人类基因组计划,完成 125000 个人类基因的全部测序工作。1997 年,英国科学家利用体细胞克隆技术复制出“多莉”(Dolly)绵羊,如果借助于某种限制巧妙地避开伦理道德方面的社会学问题,那么人类在实验室里复制自身的尝试必将产生无法估量的社会、经济价值。

1.3 基因工程的研究意义

近半个世纪的分子生物学和分子遗传学研究结果表明,基因是控制一切生命运动的物质形式。基因工程的本质是按照人们的设计蓝图,将生物体内控制性状的基因进行优化重组,并使其稳定遗传和表达。这一技术在超越生物王国种属界限的同时,简化了生物物种的进化程序,大大加快了生物物种的进化速度,最终卓有成效地将人类生活品质提高到一个崭新的水平。因此,基因工程诞生的意义毫不逊色于有史以来的任何一次技术革命。

概括地讲,基因工程研究与发展的意义体现在以下三个方面。第一,大规模生产生物分子。利用细菌(如大肠杆菌和酵母菌等)基因表达调控机制相对简单和生长速度较快等特点,令其超量合成其他生物体内含量极微但具有较高经济价值的生化物质。第二,设计构建新物种。借助于基因重组、基因定向诱变甚至基因人工合成技术,创造出自然界中不存在的生物新性状乃至全新物种。第三,搜寻、分离和鉴定生物体尤其是人体内的遗传信息资源。

随着时间的推移,基因工程在农业、林业、医药、食品、环保等行业和领域的研究和应用都取得了很大的进展,既为工农业生产和医药卫生等开拓了新途径,又给高等生物的细胞分化、生长发育、肿瘤发生等基础研究提供了有效的实验手段。在传统工业中,基因工程的运用可降低损耗、提高产量,同时还能减少污染,如今生物工业成为现代产业革命的重要组成部分。在农业生产中,转基因植物在抗病毒、抗虫、抗除草剂和品种改良等方面都取得了引人注目的成果,有的已被广泛应用于生产实践,使得相关农作物的产量得以显著提高。在生命科学领域,人们可以利用基因工程技术探明致病基因的结构和功能,了解其致病机制;建立基因诊断、治疗技术,并已开发出基因工程药物和疫苗广泛应用于临床,为疾病的预防、治疗提供了新方法,给患者带来了福音。目前,日趋成熟的 DNA 重组技术已能使人们获得全部生物的基因组,并迅速确定其相应的生物功能。

应用重组体 DNA 技术可以克隆和扩增某些原核生物和真核生物的基因,从而可以进一步研究它们的结构和功能。重组体 DNA 技术的成就和提出的问题促进了遗传学、生物化学、微生物学、生物物理学和细胞学等学科的发展,并且有助于这些不同学科的结合。目前正在形成一门新兴的学科——生物工艺或生物工程学,就是这种趋势的反映。基因工程是创造奇迹的科学,有着惊人的发展潜力和极其广阔的应用前景。基因工程诞生之初,Lederberg 和 Cohen 等就预言:“把基因连接到工业微生物的 DNA 中促使它们生产大量的生命所必需的蛋白质……这是生物和医学的真正大革命。到 2000 年,人类的疾病都将由杂种微生物生产的对疾病特异的人工蛋白质处理而得到治疗。”因此,基因工程为人们展现了美好前景。

事实上,基因工程最大的意义还在于生物科学基础理论研究方面。如前所述,重组 DNA 技术彻底打破了常规育种中种属间不可逾越的鸿沟;动物、植物、细菌及人类的基因都可缝合在一起,形成杂种生物,这是以往任何科学家都难以想象的奇迹。基因工程为研究基因的结构、功能、调节提供了新途径,重组 DNA 技术为人们彻底认识生命的本质,揭示生命现象的奥秘开辟了一个全新的领域。

1.4 基因工程的应用

1.4.1 第四次工业革命

1980年11月15日,美国纽约证券交易所开盘的二十分钟内,Genentech(基因泰克)公司的新上市股票价格从3.5美元飙升到89美元,这是该证券交易所有史以来增值最快的股票。股市的铃声分明是在为一个伟大的产业技术革命而欢呼,因为上市前两年,该公司的科学家们克隆了编码胰岛素的基因。含有人胰岛素基因的大肠杆菌细胞就像一个个高效运转的生产车间,制造出足以替代市面上短缺的猪胰岛素的重组人胰岛素产品。这在当时被认为是医药界的一个惊人奇迹,然而在今天看来,这种类型的基因工程产业似乎过于小儿科了。目前,已经投放市场以及正在研制开发的基因工程药物几乎触及到医药的各个领域,包括各种抗病毒剂、抗癌因子、新型抗生素、重组疫苗、免疫辅助剂、抗衰老保健品、心脑血管防护急救药、生长因子以及诊断试剂等。

DNA重组技术在食品工业中有广泛的应用。通过DNA重组技术进行转基因植物,能使食品原料得以改良,营养价值大为提高,而且谷氨酸、调味剂、人工甜味剂、食品色素、酒类和油类等也都能通过基因工程技术生产。豆油中富含反式脂肪酸或软脂酸,摄入后都会增加冠心病的发生率。美国研究人员利用基因工程技术,挑选出合适的基因和启动子,以此来改造豆油中的组分构成。不含软脂酸的豆油可用作色拉油,富含80%油酸的豆油可用于烹饪,而含30%硬脂酸的豆油则适于做人造黄油及使糕饼松脆的油。现在市场中有多种这类基因工程产品,利用基因工程改造的豆油的品质和商品价值都大大提高。在食品酸味剂方面,柠檬酸是食品工业中很重要的一类。目前柠檬酸生产菌主要是黑曲霉。国外正大力研究通过基因工程手段用酵母和细菌来生产柠檬酸,工程菌的使用使乳酸、苹果酸等有机酸的产量也在逐年增加。现在国外用发酵法和酶法生产的氨基酸多达数十种。产量最大的氨基酸为谷氨酸和赖氨酸。目前国外正在积极利用基因工程和细胞融合技术改造产生苏氨酸和色氨酸的生产菌,经改造的工程菌已正式投产,其氨基酸产量大大超过了一般菌的生产能力。日本的味精公司也利用了细胞融合和基因工程的方法改造菌株,使谷氨酸的产量提高了几十倍。传统化学工业中难以分离的混旋对映体,借助于基因工程菌可有效地进行生物拆分。

化学工业中涉及大量的有机物生产,如丙酮、丁醇、乙酸、丙烯酸、乙醇、甘油等都可以通过发酵技术生产,而通过基因工程技术培养的微生物能大大提高这些产品的转化效率。Picataggio等构建的*Candida tropicalis*工程菌使长链二羧酸的转化率和化学选择性均有所提高。地球上可供使用的能源毕竟有限,为了解决这一难题,科学家把目光转向了生物能,已有利用重组DNA技术来生产乙醇等石油替代品。研究人员发现,细菌、酵母中的一些菌种可利用淀粉、植物多糖及纤维素类物质生产乙醇。Ingram从*Zymomonas mobilis*中提取编码乙醇的基因(*pdc*、*adhB*),将其导入大肠杆菌K011得到的工程菌可生产乙醇;Kim构建的菌株FSCSa-R10-6也可使马铃薯淀粉发酵而得到乙醇。Roessler等则从微藻中分析提取了乙酰辅酶A羧化酶的全基因,这种酶是用于柴油的脂类物质合成的关键酶。而甘蔗、木薯粉、玉米渣等原料都可通过微生物发酵法来生产乙醇。科学家们还在研究利用基因工程创造出多功能的超级工程菌。这种菌能分解纤维素和木质素,从而使得稻草、木屑、植物秸秆、食物的下脚料等