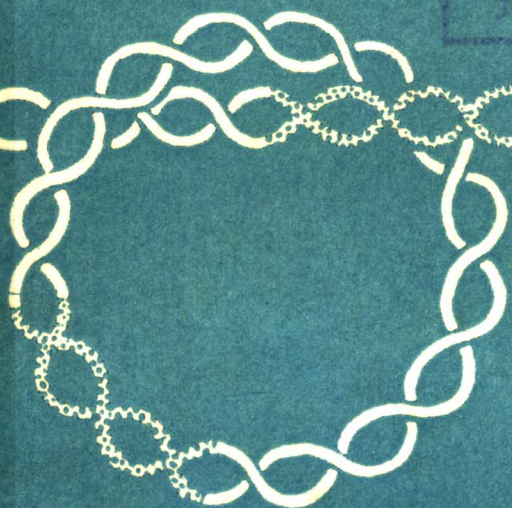


遗传工程



39807

3

1981

中国科学院图书馆

《遗传工程》

1981年 3 期 (总14)

编 辑 者: 中国科学院图书馆推广组

出 版 者: 中国科学院图书馆出版组

印 刷 者: 中国科学院图书馆印刷厂

出版日期: 1981 年12月 24 日

(内部发行)

收成本费 0.50元

目 录

综 述

- 固氮基因转移的研究进展.....柯 为 (1)
转录调控水平上的基因多效性.....王身立 (4)

译 文

- 遗传工程技术公司基因拼接研究的几项重大成就和最新突破*.....N. Stebbing (9)
- 细菌基因在哺乳动物细胞中的表达.....P. Berg等 (14)
- 高等植物细胞的遗传操作回顾与展望.....S. C. Maheshwari等 (21)
- 单疱疹 I 型病毒胸腺嘧啶核苷激酶基因在大肠杆菌中的表达.....A. C. Garapin 等 (29)
- 电泳后琼脂糖凝胶中DNA的洗脱...Ray Wu等 (34)
- 分子无性繁殖在基因治疗上应用的可能性.....R. O. Roblin (39)
- 动物细胞特定基因的分离和鉴定.....M. Courtney 等 (42)

国内研究消息

- 国际稻 IR26 核基因组基因文库
建成.....蔡以欣 等 (47)

基础知识介绍

基因操作原理 (续)R. W. Old
第三章 作为克隆载体的质粒 (48)

国外研究动态

①外源基因引入高等植物 (64); ②获得控制细菌固氮的基因 (65); ③美国遗传工程技术公司总经理斯旺森等来华访问 (65); ④杜帮公司参加遗传工程研究 (66); ⑤美国工业进入生物工艺学, 杜帮公司建立新的实验室, 其他公司也积极行动 (67); ⑥应用遗传工程的新方法 (68); ⑦分解代谢质粒 (68); ⑧申请工程菌专利 (69); ⑨遗传工程学及其边缘学科讨论会 (70); ⑩存在于细胞质因子上的豆科植物根瘤菌的nif基因 (70) ⑪迄今最长的合成基因 (72);

专业词汇

(续) 遗传工程术语解释 (73)

综 述

固氮基因转移的研究进展

柯 为

生物学家特别是微生物学家、生物化学家、分子遗传学家十分注视生物固氮和固氮基因转移问题。目标是：如何把原核生物系统的固氮基因转移到高等植物特别是粮食作物中去，使它们能自主地进行共生固氮作用。实现这个目标还不是眼前的事，有的科学家认为，需要10年左右的时间才能达到这一目标。美国哈佛大学(F.M. Ausubel)、Cornell大学(A. A. Szalay)等已成功地将固氮基因(来自土壤中能够固氮的 *Klebsiella*)转移到酵母细胞中，尽管酵母比农作物简单得多，但酵母与作物同属真核生物，这样有可能使固氮基因转移到农作物细胞中去，为实现非豆科植物自主共生固氮提供了一个新的启示。

一、为什么要取酵母作受体菌？

最主要的是：有可能用酵母作为高等植物细胞的模式。不仅仅因为它是最简单的真核生物，具有真核系统所特有的真正的核，而且还在于它具有类似于高等动植物某些特征。可是原核生物如细菌就不具备上述特征，但它具有固定大气氮素的能力，像自生固氮细菌和共生固氮的根瘤菌是最典型的代表。

然而，原核生物如克氏杆菌(*Klebsiella*)的固氮基因转移到酵母中去，这仅仅是很重要的第一步，下一步就是固氮基因在酵母中能否表达以及如何表达？也就是说如何使酵母如同克氏杆菌一样具有固氮能力？这是要建造真核固氮模式细胞的关键，这里面会有许多障碍的，但需要研究它，克服它，整个过程是在扎实的科学基础上进行人类从来没有作过的这样一项有意义的基础工作。Ausubel F.M. 有两个希望：1)、把菌体中与固氮有关的17个基因进行移植；2)、把根瘤中能固氮的基因移植到酵母中去。

二、基因群的移转

现已知道，固氮基因是多基因组成的，如肺炎克氏杆菌(*Kl. pneumoniae*)的固氮基因至少有15个基因组成(图1)^{[1][9]}，A. A. Szalay 把克氏杆菌的15个基因移植到酵母中，他自己对移植这么大的遗传物质片段在新的寄主环境中保持稳定感到惊奇！他发现，当酵母细胞在有性繁殖之前，经受减数分裂后，细胞染色体减半时，新拼接的基因片段能

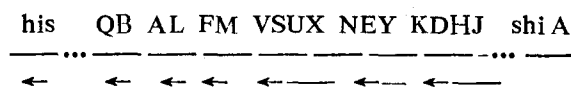


图 nif 基因的现代图谱

线底下的图示转录单位，箭头示转录方向

够自我繁殖(复制),法国研究者Elmerich C.等(巴斯德研究所)^[3]也获得类似结果。同样也是把克氏杆菌固氮基因群移植到酵母中,然而这些移植的基因究竟是否能表达自己,也就是说是否具有固氮能力?仍然不清楚,工作在进行之中。假若把这些固氮基因移植到禾本科植物细胞中去的话,从经济效益来看也不见得很有用,因为这些细菌在土壤中也能固氮,但产生固氮的产物很少。如自生固氮细菌每消耗一克碳只能固定不到50毫克的氮素^[2]。之所以要选用这个自生固氮细菌来研究,主要是因为它在有氧条件下能够固氮,不涉及固氮酶的保护系统,可是需要大量碳水化合物用于呼吸作用,这样以保持固氮酶活力。如果用根瘤菌固氮基因转移到非豆科植物中的话,那当然是最理想的,因为它能产生较多的固氮产物,如豌豆根瘤菌每消耗一克碳能固定270毫克氮素^[2]。但必须看到:研究根瘤菌固氮基因转移较为困难,因为它们是在无氧条件下进行固氮, Szalay A.正在从根瘤菌中获得与固氮有关的基因,力图把它转移到酵母中。

三、固氮基因保护层问题

即便是拼接的固氮基因在酵母细胞中实现了固氮作用,或者说以同样的方法使谷类细胞也能获得固氮作用,这里面确实也存在一些障碍,氧是其中之一,必须有隔绝氧系统,以保护由根瘤菌得来的固氮基因免受氧的损害。Szalay及其同事正在研究根瘤菌对豇豆植物形成根瘤的特异性因子,一旦对这些因子有所了解的话,则有希望获得降低这些基因特异性,这样使它们最终有可能在谷类作物上形成根瘤。应该说,从豇豆根瘤菌为基点来探究特异性基因的问题是可行的,也是很值得注意的一条途径。另一条途径就是Chiton M.(华盛顿大学)利用根癌病农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)作为载体菌,有可能把固氮基因插入该菌的Ti质体中,由于根癌病农杆菌对许多植物细胞的转化十分有效,而且重演性也好,所以,这种经过改造的Ti质体有可能做为植物遗传工程的工具。据报导,三叶草根瘤菌(*Rh. trifolii*)固氮力可以转移到根癌病农杆菌中,也能使寄主植物如三叶草获得正常的根瘤^[3],这就说明这种经过改造的根癌病农杆菌在豆科植物上结瘤固氮的潜在可能性,氧是否由根瘤中的豆血红蛋白所转运,未见进一步报导。

至于根瘤菌固氮基因能否引入谷类植物中去,问题是相当复杂的。1、要寻找引起该植物结瘤的微生物,确诊它的有益性和有害性以及它们受何种遗传因子所控制。查明这些因素的存在,必将为固氮基因转移提供有利条件;2、通过细胞融合途径有可能将nif基因带入宿主菌中,其功能之表达仍然是个核心问题,其中氧的隔绝对nif基因的保护及其表达至关重要。Ausubel F.M.坚信他自己的观点:根瘤菌细胞中可能存在隔绝氧、保护Nif的蛋白质,他正在试图鉴别这些蛋白质以及担负合成这种蛋白质的基因,其目的就是在遗传上控制这些基因以制造大量保护蛋白使根瘤菌在有氧条件下也能固氮,这里有两点值得注意:1)、1975年三个实验室各自报导根瘤菌纯培物(豇豆根瘤菌32 H1菌系及他豇豆根瘤菌菌系)在人工培养基*上能够独立固氮,也就是说,在没有植物的条件下能够固氮,而Evans H.J.等和Keister D.等用液体培养基做实验也得到类似结果^{[4][5]}。不可避免地也涉及氧的问题,从这一点而言,Ausubel的想法并不是一种空想,也许是

*一种戊糖(如阿拉伯糖)和一种羧酸(如琥珀酸)为固氮所需要。

可能的；2）、人们都知道，传统的观点认为，根瘤菌隔绝氧以保护固氮酶活性，主要是由于来自豆科根瘤的豆血红蛋白起着重要作用，通过它转运氧的危害，这完全是另一个绝然不同的隔氧系统。

四、能量的供应

即便是固氮基因转移到谷类作物中获得成功，上面提到的氧的障碍也排除了……，问题还未完全解决，要使谷类作物能进行自主固氮，还必须解决一个能量供应问题。否则固氮基因转入谷类作物并不是有益而是有害，所以能量的充分供应，是谷类作物旺盛自主固氮的重要保证。固氮需要的能量非常之大，也就是说，需要足够量的ATP，固定每克分子氮（ N_2 ）需要12—24克分子ATP^[2]，ATP的提供主要来自葡萄糖及其他糖类之分解产生的，用于 $N \equiv N$ 原子稳定键的断裂和 N_2 还原成 NH_3 的过程，这两方面需要耗出大量的能，唯有从光合作用获得更多的糖类而得到能量的补充，这样就必定增加谷类作物的负担，但是如何强化光合作用也是一个很相关的问题；另一方面自主固氮的谷类作物所产生的蛋白质比施化肥的作物少得多，主要因为固氮过程需要消耗大量化学能。Schubert K. (Michigan 大学) 的实验证明，“自主固氮谷的作物比利用硝酸盐（转化为可用 NH_3 ）的谷类作物需要更多的能量”。如果能量得到充分保证的话，那么这种新型固氮作物的收成应该说是喜人的，作物蛋白质的质和量就大大地提高了。

从上面介绍和分析的情况来看，要实现谷类作物自主固氮作用，确实存在种种困难，尽管如此，但随着固氮微生物及其分子遗传学研究工作的逐步深入，科学技术的发展，特别是基因工程研究所取得巨大的成就和进展，致使人们不可避免地以极大的注意力注视农作物自主固氮的发展趋势。Padwa D. (农业遗传学主任，Santa Fe, N.M.) 预计，这种发展需要10年以上的时间，但 Ausubel F.M. 说：“五年内我们应当获得转移固氮基因保护层，并初步证明它们在高等植物中起作用”^{[6][7]}。也就是说，这种新型非豆科经济作物能够进行自主固氮了，关键之所在就是要综合性地解决上述提出的问题，只有这样，才有可能发挥这种新型的固氮作物的优势，还必须加强对共生体两者的生物学特性和生态学特性研究，应该说这也是一项极其重要的任务。

参 考 文 献

1. Hill S. et al.
Nature, 1981, 290 (5805): 424—426
2. Day J.M.
Outlook on agricul., 1977, 9 (4): 180—185
3. Rorsch A. et al.,
Genetic engineering, 1980, P.189—196
4. 罗明典, 生物科学动态, 1977, 1—2: 29—34
5. Skinner K. J.
CEN., 1976, 54 (41): 22—35
6. Ireland C.R.

- Abstract Meeting ASM—1980, p.119.
7. C. W. 1980, 127 (21): 44—45.
 8. Elmerich C. et al.,
“Current Perspectives in nitrogen fixation” (ed. Gibson
A.H. et al.), 1981, Canberra P. 157—160.
 9. Zamir A. et al, PNAS USA. 1981, 78 (6) 3496—3500.

转录调控水平上的基因多效性

王 身 立

(复旦大学 遗传研究所)

基因多效性的研究丰富了人们对于基因型和表现型辩证关系的认识。国内外许多遗传学教科书中常常以翻毛鸡作为基因多效性的例子。不完全显性基因 F 导致翻毛性状的出现(杂合子 Ff 表现轻度翻毛),并通过这一性状而影响一系列的性状。这是表现型(性状)水平上基因多效性的一个经典例子。此外,在人类医学遗传学中还有一个值得研究的基因多效性例子,即血红蛋白 H 病。患者的血红蛋白 α 链的合成减少,致使 β 链相对过多,过多的 β 链聚合为四聚体而引起贫血。这可能是一个控制 α 链合成的调控基因发生了突变。这个基因不仅引起头晕、心悸、手足经常发麻和多汗、脸色黄、脾脏肿大等贫血症状,而且还早在胚胎期即可影响患者面部的形态发育。例如导致眉间距宽、颧骨突出、鼻梁较塌等^[1]。该基因影响形态发育的机理尚待研究。

本文讨论转录调控水平上、亦即分子生物学水平上的基因多效性。

一、腺苷酸环化酶及其受体蛋白基因

腺苷酸环化酶催化三磷酸腺苷(ATP)环化而生成环单磷酸腺苷(cAMP)。cAMP 与其受体蛋白的复合物作用于细菌诱导型操纵子中的起动基因部位,对操纵子 DNA 转录 mRNA 的活动进行调控。cAMP 是一种非特异性的基因调控物,它可以在细胞质中扩散,作用于许许多多、形形色色的操纵子中的起动基因,因而具有极为广泛的生理作用^[2,3]。这样,编码腺苷酸环化酶的基因(*cya*⁺)以及编码受体蛋白的基因(*cap*⁺)就成为典型的和极端的多效性基因。它们不仅调控着细菌染色体上的操纵子,而且对染色体外质粒基因的转录和质粒复制也有调控作用,甚至对侵入细菌的噬菌体的操纵子也有调控作用^[4]。

对于细菌的操纵子,其中的起动基因与操纵基因这两个调控开关在性质上有很大差异。起动基因由 cAMP 与其受体蛋白的复合物所启动,从正的方面促进结构基因的转录;而操纵基因则由调节基因所编码的阻遏蛋白所关闭,从负的方面抑制结构基因的转录^[3]。操纵基因具有较为严格的特异性,与此相应,阻遏蛋白的作用也具有较为严格

的特异性。一种阻遏蛋白只调控与其相应的某一个特定的操纵基因，因而每一个操纵子都必有一个特定的调节基因来调控它的活动。但起动基因则不然，几乎没有特异性，许许多多的操纵子，它们的起动基因都共同受cAMP与其受体蛋白复合物的调控。这样，大自然就没有必要给每一个操纵子都安排一个cya⁺基因和一个cap⁺基因，或者说，通过自然选择而决定的生物进化方向不会使细菌产生多个cya⁺和cap⁺基因。实验证明，在所研究过的细菌中，一个细胞中也的确只有一个cya⁺和cap⁺基因，因而很容易选择到腺苷酸环化酶或受体蛋白的功能缺陷型菌株（cya或cap隐性突变型）。通过研究测知，大肠杆菌的cya⁺基因在染色体的75分钟处，cap⁺基因在64分钟处。鼠伤寒沙门氏菌的cya⁺基因在123分钟处，cap⁺基因在108分钟处。

cya⁺和cap⁺基因通过它们的产物而调控众多的操纵子从而调控众多的生化反应，表现出极为广泛的多效性(图1)。我们把cya⁺和cpa⁺基因的多效性作用总结于表1中。许许多多的微生物中都存在着cya⁺和cap⁺基因，它们是来自共同祖先的同源基因。它们的生理效应在不同的微生物中有不同的表现。同源基因在不同的物种中表现不同的效应，这也可以看成是一种广义的基因多效性。

二、调控基因的多效性

调控基因包括调节基因和控制基因两类。调节基因编码的阻遏蛋白能结合到它所调控的特定的操纵基因上，从而阻遏整个操纵子的转录活动。控制基因即操纵子中的开关基因，包括起动基因和操纵基因。对于阻遏型操纵子，则除上述之外，还另有一个弱化基因。控制基因作为操纵子的总开关，也调控着整个操纵子的活动。如果操纵子中不只包含一个结构基因，则这些结构基因都同时受同一套调控基因的调控。因此，调控基因也是多效性基因。例如乳糖操纵子(lac)的调控基因就同时调控着y、z和a这三个结构基因的活动，从而调控着乳糖透膜酶、半乳糖苷酶和转乙酰酶这三种不同的酶的产生。当然，调控基因的多效性范围，比起cya⁺和cap⁺基因来，就要小得多。

控制基因本身并不编码任何蛋白质，仅当它们与结构基因同处于一个顺反子之中（在同一条染色体的邻近位置）时，才能起调控作用。调节基因则由于它所编码的阻遏蛋白的特异性，也只能调控一个特定的操纵子。因此，它们的调控范围都只限于一个操纵子中的那么几个结构基因。cya⁺和cpa⁺基因则不同，它们调控着众多的、形形色色的操纵子，其多效性的广泛程度，是遗传学中迄今最突出的例子。

高等生物中编码组蛋白的基因也是调节基因。但组蛋白几乎能关闭所有的结构基因，阻遏结构基因的转录和复制，除非另有基因激活剂（例如激素、cAMP和酸性非组蛋白等）的作用，使得结构基因的阻遏被解除而开启。高等生物的组蛋白与原核生物的阻遏蛋白不同，组蛋白没有特异性。因此，编码组蛋白的调节基因也是一种范围极广的多效性基因。由于高等生物许许多多的结构基因都受组蛋白的调控，与此相应，染色质中的组蛋白含量亦甚高。这就需要编码组蛋白的基因加强活动，但高等生物是采取组蛋白基因的多拷贝方式来解决这个问题的。

三、四磷酸鸟苷基因^[5,6]

四磷酸鸟苷(ppGpp)作用于细菌阻遏型操纵子中的弱化基因(attenuator)部位。阻遏型操纵子中的控制基因区有一小段核苷酸序列，起着减弱结构基因转录活动的作

用,被称为弱化基因。弱化基因缺失时,转录活动即可增强。实验表明,弱化基因也是一个重要的调控开关,它受ppGpp的调控。ppGpp能开启弱化基因,解除它的弱化作用,从正的方面促进结构基因的转录。ppGpp也是一种非特异性的基因调控物,它能开启众多的、形形色色的阻遏型操纵子中的弱化基因。这些操纵子包括大肠杆菌的组氨酸合成操纵子、色氨酸、异亮氨酸、缬氨酸合成操纵子、以及 λ 噬菌体中包含N基因的左向操纵子……等等。因而,对催化ppGpp生成的酶编码的基因也是一种典型的多效性基因。

现在已知relA⁺基因与细菌中ppGpp的浓度有关。不论relA⁺基因是否编码着催化ppGpp生成的酶,它是一个典型的多效性基因,则是毫无疑问的(因为它能导致ppGpp的水平升高)。relA⁺基因在大肠杆菌中位于染色体的54分钟处^[5]。至于ppGpp与弱化基因的调控机制,我们已发表专文详述^[6],这里就不多占篇幅了。

(盛祖嘉审校)

参 考 文 献

- [1]曾溢滔,黄淑顿:上海医学,2(1):1,1979。
- [2]Greengard P & Robison GA: Advances in Cyclic Nucleotide Reseach, pp.1~48 Raven Press, New York, 1976。
- [3]王身立,戴君惕:生物化学与生物物理进展,(3):49,1976。
- [4]王立身:生物化学与生物物理进展,(2):42,1980。
- [5]Silverman R H & Atherly AG: Microbiol. Rev., 43(1):27,1979。
- [6]王身立:国外医学分子生物学分册,2(4):183,1980。

表1。

微 生 物	cya ⁺ 和cap ⁺ 基因的多效性
大 肠 杆 菌 E. coli	解除葡萄糖效应。促进诱导酶合成,例如: β-半乳糖苷酶,乳糖透膜酶,阿拉伯糖透膜酶, 麦芽糖透膜酶,磷酸甘油透膜酶,甘油激酶, 麦芽糖糊精磷酸化酶,胸苷磷酸化酶,色氨酸酶, d-丝氨酸脱氨酶,d-苏氨酸脱氨酶,……等等。 促进糖代谢和氨基酸代谢。促进吡嗪产生。 促进鞭毛生成,促进运动性和趋化性。 在W. 2252菌株中引起木糖致死效应。 促进细胞表面λ噬菌体受体的生成。 促进侵入菌体的λ噬菌体的溶源化。 促进质粒基因的表达和质粒复制。

(续上表)

鼠伤寒沙门氏菌 <i>Sal. typhimurium</i>	解除葡萄糖效应。促进 β -半乳糖苷酶、半乳糖激酶等等诱导酶的合成。促进糖代谢。 促进鞭毛生成，促进运动性和趋化性。 促进细胞表面 O 抗原的生成。 促进 P ₂₂ 噬菌体的溶源化。
	促进糖代谢。促进氨基酸代谢和产生吡嗪。 促进鞭毛生成，促进运动性和趋化性。 促进细胞表面 S 型 O 抗原的生成。 促进保温条件 (37°C) 下合成细胞壁，以保持菌体的正常形态和增殖能力。
粘质赛氏杆菌 <i>Serratia marcescens</i>	促进 β -半乳糖苷酶等诱导酶的合成。促进糖代谢。
变形杆菌 <i>Proteus incostance</i>	促进 β -半乳糖苷酶等诱导酶的合成。促进糖代谢。
产气气杆菌 <i>Aerobacter aerogenes</i>	促进 β -半乳糖苷酶等诱导酶的合成。促进糖代谢。
枯草杆菌 <i>Bac. subtilis</i>	促进 α -淀粉酶合成。
根瘤菌 <i>Rhizobium. sp</i>	促进与宿主植物的共生固氮作用
克氏杆菌 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	促进自生固氮作用。促进抗药性的表现。
绿脓杆菌 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	促进对氨基糖苷类抗菌素的抗药性。
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	促进对氨基糖苷类抗菌素的抗药性。
费氏发光杆菌 <i>Photobacterium fisheri</i>	促进萤光酶合成，促进发光。
盘基网柄菌 (粘菌) <i>Dictyostelium discoideum</i>	促进细胞的凝聚和运动。

(续上表)

啤酒酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	恢复被葡萄糖抑制的形成孢子的能力。 促进线粒体的酶合成。
总状毛霉 <i>mucor racemosus</i>	抑制菌丝状的形态发生而促进酵母状的形态发育。
米曲霉 <i>Aspergillus oryzae</i>	促进胞外蛋白酶的生成和分泌。
链孢霉 <i>Neurospora crassa</i>	促进酪氨酸酶的合成 刺激菌丝的延长和气生菌丝的分化
玉米赤霉菌 <i>Gibberella zeae</i>	促进一种类似激素的次级代谢产物——二羟苯酸 内酯 (Zearalenone) 的合成。
稻纹枯病菌 <i>Pellicularia sasakii</i>	促进菌核形成。
美味牛肝菌 <i>Boletus edulis</i>	促进子实体形成。
大根鬼伞 <i>Coprinus macrorhizus</i>	促进子实体形成。

图1. cya^+ 和 cap^+ 基因的多效性原理 (从略)

遗传工程技术公司基因拼接研究 的几项重大成就和最新突破*

N. Stebbing

近几年来,随着重组 DNA 技术或者叫基因拼接技术的发展,提出了许多新的方法来生产有治疗作用的人类蛋白质。这些方法都是基于将编码蛋白质的基因片段拼入细菌的正常 DNA 内,然后进行无性增殖,以微生物发酵法生产大量的人类蛋白质或其它有用物质。不仅如此,用基因拼接技术,还可对自然界中的天然药物进行鉴定,并将其中有明显用处的那些天然药物以更新更有效的基因拼接方法进行大量生产。

基因拼接技术的一般原则 由现代分子生物学的知识,我们知道,一个基因的表达,即某种蛋白质的合成过程是 DNA 转录成 mRNA,再由 mRNA 翻译成蛋白质。像酶、血清因子和激素这类生物活性物质的结构是由直线排列在染色体内的基因所决定的。所谓基因,即由四种脱氧核苷酸碱基所组成的特定 DNA 顺序。编码特定蛋白质氨基酸顺序的 DNA 片段,目前既能天然分离,也能人工合成。把用这些方法获得的 DNA 片段拼入异源 DNA 的某一位点也是可能的。但是,插入之后,能否表达,其关键是看插入的位置是否合适。如果插入的位置合适,那么这个基因就有可能很好地表达,合成大量的所需蛋白质。为了使基因得到最好的表达,在其前面必须有一个控制区,这个控制区必须包括核糖体结合区、起始区和促进区。控制 β -半乳糖苷酶合成基因的控制区和色氨酸操纵子的控制区是目前用于基因拼接系统最为理想的控制区。在基因结构区之前有一个控制区,就可使基因得到有效的表达。插入的外源基因必须以编码甲硫氨酸的密码子 AUG 起始工作,细菌的蛋白质合成都是以甲硫氨酸起始的。

为了把某一基因引入某个受体表达系统,还要借助于一些运载工具。质粒就是一种很有用的运载体。因为它们是很小的 DNA 分子,而且其中有许多已经研究得相当透彻。为了得到目的基因并把它插入质粒,继而组入受体 DNA 内,必须借助于特异的工具酶—限制性内切酶。用各种不同的限制性内切酶将 DNA 切开,即得到带有粘末端顺序的各种特定 DNA 片段。用另外一些特异酶—DNA 连接酶可把得到的特定基因接到质粒切开的特定定位点上。然后用这种重组质粒转化细菌或其它细胞并在琼脂平皿上筛选所需要的单

* 根据美国遗传工程技术公司 N. Stebbing 博士的来华文稿和1981年6月在遗传研究所的报告综合整理。

个菌落。将挑选出的单菌落再扩大培养，这样，就会由原来的一个特定基因的 DNA 小片段，通过在受体细胞中的大量增殖而合成大量的所需蛋白质，而且这些蛋白质都是纯质的。

因此，基因拼接过程，也即基因的克隆化，通常包括这样几步：分离或人工合成某一基因，把蛋白质合成的控制区和基因的编码区插入质粒，然后把质粒转入受体细胞进行表达。

被用来克隆化的 DNA 片段，目前有两个来源，一是通过化学方法人工合成；二是天然分离，即从组织或培养细胞中分离 mRNA，再用反转录酶反向合成 cDNA。在后一种情况下，可以得到一级结构尚不清楚的蛋白质基因。这是非常有意义的。这就表明，对于基因拼接来说，并不需要什么复杂条件和一些新的特殊技术，仅就目前已有的这些工具酶就足够了。

诚然，DNA 的化学合成和测序技术的进一步发展，必将导致基因拼接技术的发展使其更为迅速和更为有效。大肠杆菌系统已普遍用于基因的克隆化。现在已开始研究其它的微生物系统。枯草杆菌能把蛋白质分泌到胞外的培养基中，这是很有利的，象酵母这样的较高等生物细胞也许是很有用的基因克隆系统。

基因拼接方法在细菌细胞中生产的人类蛋白质与天然合成的人体蛋白质并不完全相同。很多蛋白质在天然合成后，往往都发生某种修饰，例如，进行糖基化而变为糖蛋白，而基因拼接技术生产的蛋白质在受体细胞中就没有这一过程。然而，这并不是不可逾越的障碍，把基因克隆到人的细胞培养物就可达到这一目的。如何在人细胞培养物中最好地生产人体蛋白质虽然还需要进行大量的研究，但是，基因拼接技术当今所获得的一个个成就本身就显示了能够达到这一目的实际可能。

遗传工程技术公司的成就 基因克隆化已成为一种广泛使用的研究技术，但是，证明基因的表达，即证明合成了有用数量的蛋白质，则比较困难。遗传工程技术公司在这方面一直处于领先地位。到目前为止，该公司已宣告表达成功的产品有脑生长激素释放抑制素（1977年），人胰岛素（1978年），胸腺素 α_1 和人生长激素（1979年），干扰素的一个家族（1980年），牛生长激素（1981年）和口蹄疫疫苗（1981年）。还有很多其它研究项目尚在不同的发展阶段。

遗传工程的最终目的是通过基因拼接得到有实际应用价值的产品，因此，仅仅能使微生物生产某些人类蛋白质或其它有用物质，这是不够的。检查基因拼接产物的生物学活性是非常重要的问题，因为在细菌中合成的这些产物很可能不能真实地反映其原来的正确结构和特性。下面就讲讲我们公司在人生长激素和干扰素基因拼接研究的一些新情况。

人生长激素 人生长激素是由人脑垂体产生的一个多肽，它由191个氨基酸组成，分子内有两个二硫键。应该指出的是，由细菌合成的人生长激素总带有一段引导顺序，即在 N- 端有额外的实际上并不需要的由甲硫氨酸起始的顺序。因此，人生长激素的克隆化，是通过把人工合成的一段 DNA 和用人脑垂体生长激素的 mRNA 反转录的 cDNA 连接起来。在人生长激素基因中第一个限制性内切酶切点是在第 24—25 核苷酸之间，因此，前面的顺序是化学合成的，后面的顺序是由 mRNA 转录的。这样，化学合成的这段

顺序可直接和起始密码子 AUG 及控制区连接。我现在报告的人生长激素的结构与过去发表的资料有些不同,即在这一蛋白质分子的结构中,第74、107和109位的氨基酸和以前发表的不同。但是,我们确信,现在的结构是对的,因为这是阅读 DNA 的两条链分析到的结果。目前通过基因拼接方法可对 DNA 测序来直接更有效更准确的确定蛋白质的氨基酸顺序。

已知,大肠杆菌细胞内所有蛋白质的合成都是从甲硫氨酸开始的,但是,这些蛋白质合成以后,甲硫氨酸都被切掉。而用基因拼接方法合成的人生长激素中的甲硫氨酸并不被切掉。这样,在基因拼接产生的人生长激素中就多了一个甲硫氨酸,因此,它是天然生长激素的类似物,对其生物学活性进行鉴定是非常重要的。

用脑垂体切除的大鼠检验了大肠杆菌细胞合成的人生长激素的生物学活性。实验表明,细菌合成的人生长激素与天然的脑垂体生长激素具有同等效能。而未经该激素处理的垂体切除的大鼠根本就不生长。因此,细菌合成的人生长激素是有生物学活性的。有趣的是,把细菌合成的人生长激素与人脑垂体天然产生的该蛋白质等量混合起来处理大鼠,效果也一样。这进一步表明,大肠杆菌合成的人生长激素实际上是和人产生的生长激素以同样的方式发挥作用的。

干扰素基因拼接及其生物学活性 在没有基因拼接方法以前,干扰素的一级结构是不清楚的。用克隆人生长激素的方法,由干扰素mRNA完成了干扰素基因的克隆化。把诱导后分离的干扰素mRNA用反转录酶反向合成cDNA,再把该cDNA 插入质粒 pBR322的pSt^I切点。插入的所有干扰素基因片段,其两侧都各有一个pSt^I切点。因此,干扰素基因顺序有无插入,可用这样三个指标来鉴定:1)这种插入DNA与从诱生细胞分离的干扰素mRNA进行退火杂交,必须产生阳性反应;2)而与未经诱导的细胞的mRNA进行杂交,应显阴性反应;3)通过翻译抑制实验证明,该片段含有260个碱基对,它是含有Bgl^{II}酶切点的一段顺序。

这样,通过基因拼接就得到了这样一个基因,它的一端带有pSt^I切点,而且,确实是为干扰素分子编码的干扰素基因。

这一工作的关键问题,是怎么样使干扰素基因在大肠杆菌细胞内实现高效表达。就其原则来说,是和人生长激素的表达是一样的。在干扰素基因区上,第一个限制性内切酶切点,经过寻找,发现是Sau^I3a切点。用该限制性内切酶切割的DNA和合成的DNA连在一起,合成的DNA起始序列先是为半胱氨酸编码,后是AUG密码子,再是Eco^{RI}切点。我们选的第一个切点是在干扰素第一个氨基酸产生的后面,这样,将两个DNA分子用连接酶连接起来,并插入pBR322质粒,经过修饰使其具备Eco^{RI}的切点。把这样的重组质粒插入大肠杆菌的色氨酸操纵子的控制区后,细胞就不再合成色氨酸而合成大量干扰素了。

通过基因拼接技术,在白细胞干扰素中做出了惊人的新发现。我们发现白细胞干扰素是由许多亚型组成的一个家族。我们发现的白细胞干扰素八个亚型,每个亚型都有165—166个氨基酸,它们的起始氨基酸都是半胱氨酸,而且所有白细胞干扰素至少都含有四个半胱氨酸。通过氨基酸顺序分析,发现它们的氨基酸顺序也十分相似。这是我们基因工程公司的重大发现之一。发现干扰素已有24年了,但是,至今得不到足够量的干扰

素供结构分析用，因而也始终不能破译干扰素基因的结构。我们用基因拼接技术得以生产大量干扰素，因而解决了这一难题。

公司克隆出的第一个干扰素亚型是第8号亚型，它有两个二硫键。通过顺序分析证明，分子前面多含一个甲硫氨酸。通过分离出A、B、C、D等各干扰素亚型基因，进行比较，可知相应基因编码的蛋白质的频率。在天然干扰素中，发现A、D两个亚型是最重要的，这两类基因分别构成所有干扰素的42%和27%。

发现了干扰素的这些亚型，我们就开始组成杂合型干扰素分子。A、D两亚型干扰素分子的基因DNA顺序的前后两段都有一个pSti切点、中部都有Bgl II切点和Pur II切点，而且这两个切点的位置在A、D两亚型中是完全相同的。用相应的酶将A、D分别切割后，把A基因的前半段与D基因的后半段连接起来，就构成了杂合型AD基因。但是，我们在成纤维细胞中发现了另一种完全不同的情况。把人成纤维细胞的干扰素基因分离出来，然后与人的脾脏DNA进行退火杂交，把人脾的各个基因用各种不同的限制性内切酶进行切割，再在凝胶电泳中进行分离，最后，将电泳分离到的条带组份转到硝酸纤维素滤膜上进行杂交。实验证明，不管用哪种酶切割，纤维细胞的干扰素基因被切割后，凝胶电泳片上只出现一条带，与此不同的是白细胞干扰素的基因经各种酶切割后，可跑出许多带，我们发现16条不同的带。假设每个白细胞内都有杂合性，我们估计，每个白细胞可能含有八个干扰素基因拷贝。

我们试验了这八种干扰素亚型的抗病毒活性。总的来说，在小鼠细胞中的抗病毒活性表现得最低，在兔细胞中的抗病毒活性表现得最高。人白细胞干扰素的每个亚型在不同的细胞株中的抗病毒活性是很不相同的。各个亚型在小鼠细胞中的抗病毒作用普遍表现低，但其中有一些在兔细胞中也表现不出活性。然而各个亚型都有独自的特点，例如，A型干扰素在兔细胞中的活性很低，天然的白细胞干扰素在兔细胞的抗病毒活性却很高。AD杂合型干扰素在人细胞中的活性比天然干扰素高，在小鼠细胞中的活性也高，因此，杂合型干扰素的能力更强，AD杂合干扰素比A或D这两种纯合型干扰素的活性要高得多。就同一种干扰素来说，在同一种细胞中对不同的病毒抗性也表现不一。因此，干扰素的各亚型的生物学活性的高低，既与所用细胞的种类有关，也取决于攻击病毒的类型。

已知，干扰素生物学作用的发挥要通过两条途径，一条途径是通过2',5'A激活RNA酶，降解病毒的mRNA，从而抑制病毒核酸的复制；另一条途径是通过将eIF-2磷酸化，抑制病毒蛋白质的合成。发现，干扰素的不同亚型对这两条途径的影响方式是不同的。

我们用两类实验研究了干扰素亚型对不同病毒的抵抗作用。一种实验是用A型干扰素治疗猴子的病毒病；另一种实验是对人眼疱疹病毒的抗病毒作用，用兔子作实验材料，以兔眼为研究对象。人眼疱疹病毒感染兔眼后，可破坏其巩膜，用干扰素治疗眼睛是很有效的，但是通过肌肉注射的方式则无效。感染之后，许多右眼巩膜损伤很严重的兔子，经过干扰素治疗后，巩膜的破坏程度就大大减轻了。

我们现在已把第八号亚型白细胞干扰素用于临床试验。另外还有两个亚型很快可投入临床使用。对非常严重的癌症患者也正在进行临床试验。就剂量来说，一般用天然干

扰素治疗时，使用剂量是每天 3×10^6 单位，我们第一期临床试验用的剂量是每天 2×10^8 单位。从毒性学角度来说，这是很危险的，但是，我们得到了喜剧性结果，尤其是在淋巴瘤中，效果非常好。近来正对其它癌症进行试验。

就像其它任何药物一样，我们生产的干扰素也有某些副作用。对猴子进行的试验表明，纯度高达95%的干扰素，对猴子的白细胞和中性细胞计数也有明显的抑制作用，但是在用药72小时以后，计数又恢复了正常水平。通常用药要持续五天，问题是是不是有一个临时性的抑制作用，我们观察到9—70周之后，白细胞抑制作用就一点也没有了。因此，副作用是临时性的，而且只抑制白细胞。干扰素的临床应用可能会因它的副作用而受到影响，但因为这种抑制作用是临时性的，而且可以恢复，因此，在许多情况下，还是可以使用。况且，没有任何一种药物是没有副作用的。所以，干扰素的副作用不应成为其广泛使用的一种限制。

除了以上这些蛋白质和多肽激素外，还有很多人类蛋白质可用基因拼接方法生产，例如白蛋白和血液Ⅷ因子；用基因拼接方法生产新型疫苗是很有用的，因为可使其既不带病毒RNA，也没有DNA的副作用。除了人生长激素之外，我们正在研究用基因拼接方法得到调节代谢或调节免疫反应的许多新的人类多肽，像淋巴细胞活素和单核细胞活素以及胸腺产生的许多蛋白质。这些蛋白质的结构和作用，就像转移抑制因子一样，还不很清楚。但是，基因拼接方法为根本解决这一问题并使其大量生产以供临床广泛使用提供了现实可能性。

不难看出，基因拼接方法对于生产治疗药物是很有希望的，它为新型天然药物的发现和大量生产提供了新的有效手段。这一方法无论在基础研究，还是在实际应用中的意义会越来越明显。

梁志国 整理。

1981.年8月10日。