

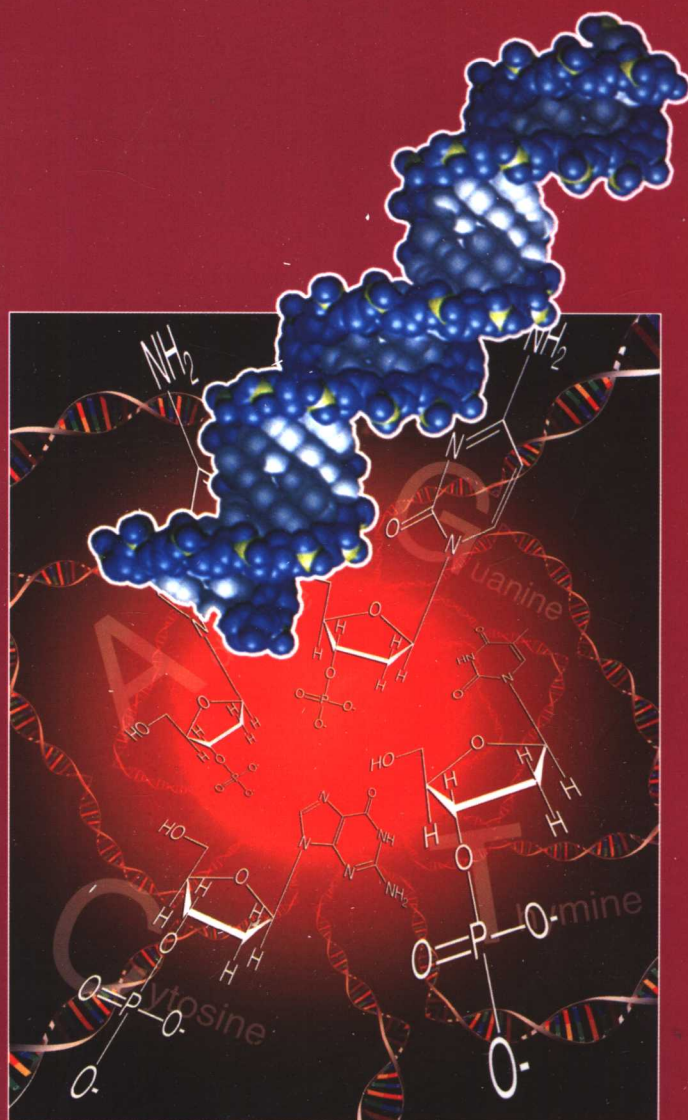


高等师范院校新世纪教材

刘祥林 聂刘旺 主编

# 基因工程

# Gene engineering



科学出版社

www.sciencep.com

高等师范院校新世纪教材

# 基 因 工 程

刘祥林 聂刘旺 主编

科 学 出 版 社

北 京

## 内 容 简 介

本书着重介绍基因工程的基础知识、基本原理和技术。在工具酶和克隆载体的基础上,以原核生物基因克隆和表达作为主体,系统介绍外源基因片段的获得、体外重组、导入技术、阳性克隆的筛选与鉴定、克隆基因的高效表达以及获取目的基因的多种途径。第7和第8章是主体内容的延伸,有利于教师为学生拓展更为生动的基因工程知识。全书力求简明扼要、深入浅出、图文并茂,突出了实用性和通用性。

本书适用于大专院校生命科学领域本科生、研究生的教材,也可作为其他相关专业课程的参考书。

---

### 图书在版编目(CIP)数据

基因工程/刘祥林,聂刘旺主编. —北京:科学出版社,2005

高等师范院校新世纪教材

ISBN 7-03-015767-2

I. 基... II. ①刘... ②聂... III. 基因-遗传工程-师范大学-教材 IV. Q78

中国版本图书馆CIP数据核字(2005)第067217号

---

责任编辑:陈 露 张 臻 / 责任校对:连秉亮  
责任印制:刘 学 / 封面设计:一 明

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

南京展望文化发展有限公司排版

江苏省句容市排印厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

\*

2005年9月第 一 版 开本:A4(890×1240)

2005年9月第一次印刷 印张:15 3/4

印数:1—4 500

字数:512 000

定价:28.00元

## 《高等师范院校新世纪教材·生命科学系列》

### 教材筹备委员会

主任委员 王全喜

副主任委员 安利国 张飞雄

委员 (按姓氏笔画排序)

王全喜 王曼莹 刘家尧 刘祥君

安利国 杨 玲 张飞雄 张红绪

张恒庆 林跃鑫 聂刘旺 郭水良

黎维平 魏学智

### 《基因工程》编辑委员会

主 编 刘祥林 聂刘旺

编 委 (按姓氏笔画排序)

万 平 印莉萍 祁小廷 刘祥林

刘维仲 郭卫东 聂刘旺 袁金铎

常重杰 裴凌鹏

主 审 邱泽生

## 前 言

作为 21 世纪生物技术和生物工程专业的骨干课程之一,基因工程已经广泛地渗透到众多的学科领域,为生命科学的基础研究提供方法和思路,为生物工程的研制开发提供技术和途径,在生物学科中已占据着重要位置并发挥着重要作用。近 10 余年来,基因工程自身的发展以及克隆新技术、研究新方法的不断涌现,更加有力地推动了生命科学的研究与探索。同时,运用基因工程新技术,开拓和促进了生物医药、物种改良、生物制品等领域应用研究的蓬勃发展。

为了适应高等学校新时期教育、教学改革的需要,配合师范类院校转型的发展开拓新领域,科学出版社上海办事处协同 10 余所地方高师院校组织编写了这套适应 21 世纪的新教材,本书孕育而生。本教材为突显简明、精练、通俗之特点而使内容浓缩,强调基础但不求面面俱到,涉及的理论、方法与技术不易表述的则力求深入浅出、图文并茂。为了加强教学的实效性,教材在注重工具酶、载体应用的基础上,以 DNA 克隆和获取目的基因的完整过程为主线,带动基因工程知识与技术的学习。我们力求将工程与理论、技术与原理有机地结合起来,从而使学生建立基因工程的整体概念。教材中的“简介部分(指第 7、第 8 章)”是基因工程核心内容的延伸,有利于学生扩展知识或为教师提供选择,结合研究专长为学生拓展更为生动的内容。

本书由首都师大、安徽师大、河南师大、浙江师大、山西师大、山东师大和北京联大文理学院的一线教师编写。全书共九章,绪论、第 2 和第 4 章的第 4 节由刘祥林编写、袁金铎参与,第 1 章由印莉萍编写,第 3 章由聂刘旺编写,第 4 章的 1~3 节和第 5 章由祁小廷编写,第 6 章由郭卫东编写、刘祥林参与,第 7 章第 1 节由万平编写,第 7 章第 2 节和第 8 章的 2、3 节由常重杰编写,第 8 章第 3 节由刘维仲编写,第 8 章第 4 节由裴凌鹏编写。全书由刘祥林统筹并与聂刘旺共同主编,其中,第 1 至第 6 章由刘祥林统稿,第 7 和第 8 章由聂刘旺统稿。首都师范大学邱泽生教授为本教材主审,并提出了宝贵的意见和建议。

在本书的编写工作中,首都师范大学生命科学学院研究生靳硕、李鹏等做了许多工作,在此表示衷心的感谢。

由于我们水平和经验所限,本书不免存在缺点和错误,恳请同行专家、使用教材的师生和热心读者批评指正。

编 者

2005 年 1 月

# 目 录

|                                 |    |
|---------------------------------|----|
| 绪 论 .....                       | 1  |
| 0.1 基因工程的诞生及其发展史 .....          | 2  |
| 0.1.1 基因工程产生的基础 .....           | 2  |
| 0.1.2 基因工程的诞生 .....             | 3  |
| 0.1.3 基因工程的快速发展 .....           | 4  |
| 0.2 基因工程的研究内容及其应用 .....         | 5  |
| 0.2.1 基因工程的研究内容 .....           | 5  |
| 0.2.2 基因工程的应用 .....             | 6  |
| 0.3 基因工程的安全性 .....              | 10 |
| 0.3.1 基因工程早期的安全性争论 .....        | 10 |
| 0.3.2 基因工程的安全性问题 .....          | 11 |
| 0.3.3 基因工程技术的的社会管理 .....        | 12 |
| 思考题 .....                       | 13 |
| 推荐参考书 .....                     | 13 |
| 附 基因工程安全管理办法 .....              | 14 |
| 第 1 章 基因工程的基础知识与基本技术 .....      | 17 |
| 1.1 基因工程的基础知识 .....             | 17 |
| 1.1.1 基因的结构特点 .....             | 17 |
| 1.1.2 从 DNA 到蛋白质 .....          | 21 |
| 1.1.3 基因研究进展 .....              | 27 |
| 1.2 基因工程的基本技术 .....             | 29 |
| 1.2.1 电泳技术 .....                | 29 |
| 1.2.2 PCR 技术 .....              | 31 |
| 1.2.3 分子杂交 .....                | 33 |
| 1.2.4 DNA 序列分析 .....            | 36 |
| 1.2.5 基因突变技术 .....              | 37 |
| 思考题 .....                       | 40 |
| 推荐参考书 .....                     | 40 |
| 第 2 章 基因操作的工具酶 .....            | 41 |
| 2.1 限制性核酸内切酶 .....              | 41 |
| 2.1.1 宿主控制的限制与修饰作用 .....        | 42 |
| 2.1.2 限制性核酸内切酶的分类与命名 .....      | 43 |
| 2.1.3 II 型限制酶的特性与 DNA 的切割 ..... | 45 |
| 2.1.4 影响限制性核酸内切酶活性的因素 .....     | 49 |
| 2.2 DNA 连接酶类 .....              | 50 |
| 2.2.1 DNA 连接酶 .....             | 50 |
| 2.2.2 连接酶对 DNA 分子的连接作用 .....    | 50 |

|                                   |           |
|-----------------------------------|-----------|
| 2.2.3 影响连接反应的因素 .....             | 52        |
| 2.3 DNA 聚合酶类 .....                | 52        |
| 2.3.1 大肠埃细菌 DNA 聚合酶 I .....       | 52        |
| 2.3.2 Klenow 聚合酶 .....            | 53        |
| 2.3.3 T4DNA 聚合酶 .....             | 54        |
| 2.3.4 T7DNA 聚合酶 .....             | 54        |
| 2.3.5 Taq DNA 聚合酶 .....           | 54        |
| 2.3.6 逆转录酶 .....                  | 55        |
| 2.4 修饰酶类 .....                    | 55        |
| 2.4.1 S1 核酸酶 .....                | 56        |
| 2.4.2 碱性磷酸酶 .....                 | 56        |
| 2.4.3 T4 多核苷酸激酶 .....             | 57        |
| 2.4.4 末端脱氧核苷酸转移酶 .....            | 57        |
| 思考题 .....                         | 58        |
| 推荐参考书 .....                       | 58        |
| <b>第3章 基因克隆的载体</b> .....          | <b>59</b> |
| 3.1 质粒载体 .....                    | 60        |
| 3.1.1 质粒的生物学特性 .....              | 60        |
| 3.1.2 理想质粒载体构建的基本原理和方法 .....      | 63        |
| 3.1.3 大肠埃细菌的几种克隆载体的构建 .....       | 69        |
| 3.2 噬菌体载体 .....                   | 77        |
| 3.2.1 噬菌体的生物学特性 .....             | 77        |
| 3.2.2 $\lambda$ 噬菌体载体的构建 .....    | 78        |
| 3.2.3 $\lambda$ 噬菌体载体的类型 .....    | 82        |
| 3.3 柯斯质粒载体 .....                  | 85        |
| 3.3.1 柯斯质粒载体的组成 .....             | 85        |
| 3.3.2 柯斯质粒载体的特性 .....             | 85        |
| 3.3.3 使用柯斯质粒克隆载体的基本程序 .....       | 86        |
| 3.4 单链 DNA 噬菌体(M13 噬菌体)克隆载体 ..... | 87        |
| 3.4.1 M13 噬菌体的生物学特性 .....         | 87        |
| 3.4.2 构建 M13 噬菌体克隆载体的策略和途径 .....  | 88        |
| 3.4.3 M13 克隆载体的应用 .....           | 89        |
| 3.5 噬菌粒载体 .....                   | 90        |
| 3.5.1 噬菌粒载体的概念 .....              | 90        |
| 3.5.2 pUC118 和 pUC119 噬菌粒载体 ..... | 90        |
| 3.6 人工染色体克隆载体 .....               | 94        |
| 3.6.1 人工染色体克隆载体的含义和特点 .....       | 94        |
| 3.6.2 酵母人工染色体克隆载体的构建 .....        | 94        |
| 3.6.3 细菌人工染色体的构建 .....            | 95        |
| 3.6.4 哺乳动物人工染色体 .....             | 96        |
| 3.6.5 人工染色体克隆载体的应用 .....          | 97        |
| 思考题 .....                         | 98        |
| 推荐参考书 .....                       | 98        |

|                                  |     |
|----------------------------------|-----|
| <b>第 4 章 DNA 分子克隆</b>            | 99  |
| 4.1 基因克隆方案                       | 99  |
| 4.1.1 含目的基因的 DNA 片段获得            | 99  |
| 4.1.2 载体与目的 DNA 片段的体外重组          | 100 |
| 4.1.3 重组 DNA 分子导入宿主细胞            | 100 |
| 4.1.4 重组子的筛选                     | 100 |
| 4.2 重组体的构建                       | 102 |
| 4.2.1 黏末端连接                      | 102 |
| 4.2.2 平末端连接                      | 103 |
| 4.2.3 修饰黏末端连接                    | 104 |
| 4.2.4 连接条件的优化                    | 108 |
| 4.2.5 重组体构建的修饰                   | 108 |
| 4.3 重组体导入宿主细胞                    | 109 |
| 4.3.1 重组 DNA 分子的转化或转染            | 109 |
| 4.3.2 重组体的体外包装及 $\lambda$ 噬菌体的转导 | 110 |
| 4.3.3 直接转化技术                     | 111 |
| 4.4 重组体克隆的筛选与鉴定                  | 112 |
| 4.4.1 表型特征筛选(遗传检测法)              | 113 |
| 4.4.2 菌落(噬菌斑)原位杂交筛选              | 120 |
| 4.4.3 免疫学方法筛选                    | 124 |
| 4.4.4 结构分析筛选                     | 127 |
| 4.4.5 转译筛选                       | 129 |
| 思考题                              | 131 |
| 推荐参考书                            | 131 |
| <b>第 5 章 目的基因的获取</b>             | 132 |
| 5.1 化学合成法获得目的基因                  | 132 |
| 5.1.1 亚磷酸三酯法                     | 132 |
| 5.1.2 基因的组装                      | 133 |
| 5.2 PCR 技术获取目的基因                 | 134 |
| 5.2.1 反转录 PCR                    | 134 |
| 5.2.2 依据基因部分序列信息获得基因全长序列         | 136 |
| 5.3 筛选基因文库获取目的基因                 | 139 |
| 5.3.1 基因文库的构建                    | 139 |
| 5.3.2 cDNA 文库的构建                 | 141 |
| 5.3.3 筛选基因文库获取目的基因               | 143 |
| 5.4 转座子标签法获得目的基因                 | 144 |
| 5.4.1 转座子标签法的基本原理                | 144 |
| 5.4.2 转座子标签法的应用                  | 144 |
| 5.5 图位克隆获得目的基因                   | 145 |
| 5.5.1 染色体步移                      | 146 |
| 5.5.2 染色体登陆                      | 146 |
| 5.6 mRNA 差别显示技术获得差异表达的基因         | 147 |
| 5.6.1 mRNA 差别显示技术原理              | 147 |
| 5.6.2 mRNA 差别显示技术的应用分析           | 147 |

|                        |            |
|------------------------|------------|
| 5.7 酵母双杂交系统分离目的基因      | 147        |
| 5.7.1 酵母双杂交技术的基本原理     | 147        |
| 5.7.2 酵母双杂交系统的组成成分     | 149        |
| 5.7.3 酵母双杂交技术的实验程序     | 150        |
| 5.8 生物信息技术分离和鉴定目的基因    | 150        |
| 5.8.1 利用 EST 数据库发现新基因  | 150        |
| 5.8.2 通过蛋白家族的保守性分离目的基因 | 150        |
| 5.9 获取目的基因方法的选择策略      | 151        |
| 思考题                    | 152        |
| 推荐参考书                  | 152        |
| <b>第 6 章 克隆基因的表达</b>   | <b>153</b> |
| 6.1 克隆基因表达的基本规律        | 154        |
| 6.1.1 克隆基因表达的过程        | 154        |
| 6.1.2 克隆基因表达的调控元件      | 156        |
| 6.2 克隆基因的表达系统          | 161        |
| 6.2.1 大肠埃细菌表达系统        | 161        |
| 6.2.2 酵母表达系统           | 165        |
| 6.3 克隆基因高效表达的策略        | 169        |
| 6.3.1 影响克隆基因表达的因素      | 169        |
| 6.3.2 大肠埃细菌高效表达外源基因的策略 | 171        |
| 6.3.3 克隆基因表达产物的利用      | 174        |
| 思考题                    | 176        |
| 推荐参考书                  | 177        |
| <b>第 7 章 基因工程相关技术</b>  | <b>178</b> |
| 7.1 基因信息分析技术           | 178        |
| 7.1.1 核酸序列的检索          | 178        |
| 7.1.2 核酸序列的基本分析        | 180        |
| 7.1.3 基因的电子表达谱分析       | 183        |
| 7.1.4 核酸序列的电子基因定位分析    | 185        |
| 7.1.5 基于核酸序列比对分析的功能预测  | 186        |
| 7.1.6 cDNA 序列的开放读码框分析  | 188        |
| 7.1.7 引物设计             | 188        |
| 7.2 基因芯片技术             | 190        |
| 7.2.1 基因芯片的技术原理        | 191        |
| 7.2.2 基因芯片的制备          | 191        |
| 7.2.3 靶序列的标记和杂交        | 195        |
| 7.2.4 基因芯片的应用          | 196        |
| 思考题                    | 198        |
| 推荐参考书                  | 198        |
| <b>第 8 章 转基因生物技术简介</b> | <b>199</b> |
| 8.1 转基因植物技术            | 200        |
| 8.1.1 植物基因转化系统         | 200        |

|                                  |     |
|----------------------------------|-----|
| 8.1.2 转基因植物的筛选与检测·····           | 204 |
| 8.1.3 植物基因工程表达载体的改进和优化·····      | 205 |
| 8.1.4 植物基因工程应用·····              | 206 |
| 8.2 转基因动物技术·····                 | 210 |
| 8.2.1 培育转基因动物的基本操作过程·····        | 210 |
| 8.2.2 外源基因导入动物细胞的方法·····         | 211 |
| 8.2.3 转基因动物的研究成果及应用·····         | 217 |
| 8.3 杆状病毒与昆虫细胞表达系统·····           | 224 |
| 8.3.1 杆状病毒的分子生物学特性·····          | 224 |
| 8.3.2 杆状病毒表达系统的优点·····           | 226 |
| 8.3.3 杆状病毒载体·····                | 226 |
| 8.3.4 昆虫培养细胞表达系统在外源蛋白生产上的应用····· | 229 |
| 8.3.5 利用虫体生产重组蛋白·····            | 229 |
| 8.4 蓝藻基因工程·····                  | 230 |
| 8.4.1 蓝藻基因工程的概况·····             | 230 |
| 8.4.2 蓝藻基因工程的载体构建·····           | 231 |
| 8.4.3 蓝藻遗传转化·····                | 233 |
| 8.4.4 用作外源基因表达的宿主蓝藻·····         | 233 |
| 8.4.5 基因筛选与检测·····               | 234 |
| 8.4.6 蓝藻基因工程的应用·····             | 234 |
| 思考题·····                         | 235 |
| 推荐参考书·····                       | 235 |
| 参考文献·····                        | 236 |
| 英文专业名词索引·····                    | 237 |

# 绪 论

## 提 要

本章简要描述了基因工程产生的基础和过程,重点表述并图示了基因工程的研究内容和基本途径,介绍了基因工程的应用领域,同时讨论了基因工程安全性问题以及安全应用的管理。

生命科学的研究已经从描述生物学、实验生物学进入了创造生物学的时代。以生物技术和分子生物学为主体的现代生命科学起到了核心作用,担当了 21 世纪的主导学科,成为带动和影响其他学科发展的领头学科。在生命科学中,新兴的基因工程异军突起,以类似于工程学的方法与技术,对生命元件进行设计、构建、组装和应用,有目的地改造生物物种生产出人们所期望的生命物质,在分子生物学和生物工程中占有重要位置,成为生命科学的核心学科之一(图 0.1)。

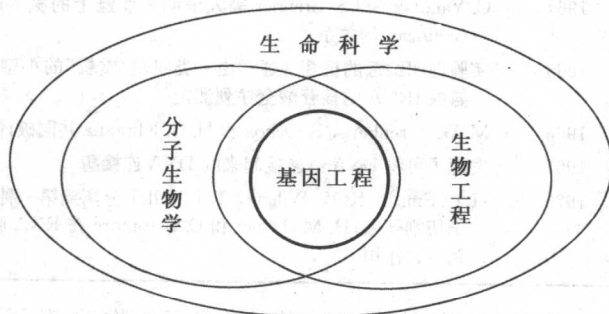


图 0.1 基因工程的地位

遗传与变异是研究生物演化过程中两个重要的概念。遗传性赋予生物物种的稳定,保证物种的延续。变异性赋予物种的进化,保证物种对其环境的适应。在漫长的生物进化过程中,基因重组从来没有停止过。在自然力量的作用下,通过基因重组、基因突变、基因转移等众多途径,构成遗传与变异的统一,推动生物界无止境地进化,使自然界展现绚丽多彩的生物多样性。基因工程是人类的高度智慧奉献给自然界的一部杰作,它的神奇之处是把人类的意愿融入自然,开创生物的新天地。大自然千奇百怪各具特色的生命现象,如耐寒耐旱、耐高温、耐盐碱等极端生境中的特殊物种,种类繁多的生物遗传性状,成为定向改造生物、创造新物种的丰富资源。基因工程可以按着人类的愿望进行严密的设计,通过一系列类似工程技术的方法手段,有目的地改造生物种性,使现有的物种在较短的时间内得以改变、趋于完善,创造出更符合人们需求的新的生物类型。

基因工程技术的使用填补了生物种属间不可逾越的鸿沟。它的显著特点是开辟了在短时间内改造生物遗传性的新领域,打破了常规育种难以突破的物种界限,克服了育种的盲目性。基因工程使原核生物与真核生物之间、动物与植物之间,以至人与其他生物之间的遗传信息进行重组和转移。例如,人的基因可以转移到 *E. coli* 中表达而造福于人类,细菌的基因也可以转

移到植物中表达有利于植物。基因工程已经成为当今生命科学研究领域中最具生命力、最引人注目的前沿学科之一。

Note

0.1 基因工程的诞生及其发展史

0.1.1 基因工程产生的基础

回顾基因工程的发展过程,不难看出,它是无数科学工作者数十年辛勤劳动的成果和集体智慧的结晶。现以简表 0.1 归纳孕育基因工程诞生相关的重要事件。

表 0.1 与基因工程诞生相关的重要事件

| 年 份       | 重 要 事 件                                                                                                                                    |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1869      | F. Miescher 首次从莱茵河鲑鱼精子中分离到 DNA                                                                                                             |
| 1909      | W. Jonhannsen 创造了基因(gene)一词                                                                                                                |
| 1944      | O. T. Avery 等人在肺炎链球菌转化实验中发现遗传信息的携带者是 DNA 而不是蛋白质                                                                                            |
| 1952      | A. D. Hershey 和 M. Chase 证明 T <sub>2</sub> 噬菌体的遗传物质是 DNA                                                                                   |
| 1953      | J. D. Watson 和 F. H. C. Crick 提出了关于 DNA 分子结构的双螺旋模型                                                                                         |
| 1957      | A. Kornberg 在 <i>E. coli</i> 中发现 DNA 聚合酶 I, 现在这种酶已在基因工程中广泛应用制备探针                                                                           |
| 1958      | M. Meselson 和 F. W. Stahl 提出了 DNA 半保留复制模型;Crick 提出了遗传信息流,即“中心法则”                                                                           |
| 1959~1960 | S. Ochoa 发现 RNA 聚合酶,它可在单链 DNA 表面合成 RNA 分子;发现信使 RNA,并证明它携带的遗传信息决定蛋白质分子中的氨基酸顺序;J. Marmur 和 P. Doty 发现 DNA 复性现象,确立了核酸杂交反应的特异性和可行性             |
| 1961      | M. W. Nirenberg 等人应用合成的信使 RNA 分子[poly(U)]破译出第一批遗传密码;F. Jacob 和 J. Monod 提出了调节基因表达的操纵子模型                                                    |
| 1964      | C. Yanofsky 和 S. Brenner 等人证明多肽链上的氨基酸顺序同其编码基因中的核苷酸顺序存在着共线性(colinear)的关系                                                                    |
| 1965      | 实验证明细菌的抗药性通常由一类叫做“质粒”的小型额外染色体携带;S. W. Holley 完成了第一个酵母丙氨酸 tRNA 的核苷酸全序列测定                                                                    |
| 1966      | M. W. Nirenberg, S. Ochoa 和 H. G. Khorana 共同破译了全部的遗传密码                                                                                     |
| 1967      | 发现了可将 DNA 链连接起来的 DNA 连接酶                                                                                                                   |
| 1970      | H. O. Smith, K. W. Wilcox, T. J. Kelley 分离到第一种限制性核酸内切酶,它可以在特定的位点将 DNA 分子切割开来;H. M. Temin 和 D. Baltimore 在 RNA 肿瘤病毒中发现逆转录酶,在真核生物基因工程中起到巨大作用 |

基因工程得以诞生完全依赖于分子生物学、分子遗传学、微生物学等多学科研究的一系列重大突破。概括起来,从 20 世纪 40 年代开始到 70 年代初,在现代分子生物学研究领域,理论上的三大发现和技术上的三大发明对基因工程的诞生起到了决定性的作用。

1. 理论上的三大发现

第一,发现了生物的遗传物质是 DNA 而不是蛋白质。1934 年 Avery 等人在美国的一次学术会议上首次报道了肺炎链球菌(*Streptococcus pneumonias*)的转化。超越时代的科学成就往往不容易很快被人们接受,当时 Avery 的成果没有得到公认。事隔 10 年,1944 年这一论文才得以公开发表。事实上,Avery 的工作不仅证明 DNA 是生物的遗传物质,而且还证明了 DNA 可以转移,能把一个细菌的性状传给另一个细菌,理论意义十分重大。正如诺贝尔奖金获得者 Lederberg 指出的,Avery 的工作是现代生物科学的革命开端,也可以说是基因工程的先导。

第二,明确了 DNA 的双螺旋结构和半保留复制机制。1953 年,Watson 和 Crick 提出了 DNA 结构的双螺旋模型,这对生命科学的意义来说足以和达尔文学说、孟德尔定律相提并论。DNA 半保留复制和蛋白质合成的中心法则提出了遗传信息流是 DNA→RNA→蛋白质,从分子水平上揭示了神秘的遗传现象,为遗传和变异提供了理论依据。

第三,遗传密码子的破译。1961 年 Monod 和 Jacob 提出了操纵子学说,为基因表达调控提

出了新理论。以 Nirenberg 等为代表的一批科学家,经过艰苦的努力确定遗传信息是以密码方式传递的,每三个核苷酸组成一个密码子,代表一个氨基酸。1966 年全部破译了 64 个密码,编排了一本密码字典,除线粒体、叶绿体存在个别特例外,遗传密码在所有生物中具有通用性,为基因的可操作性奠定理论基础。

## 2. 技术上的三大发明

从 20 世纪 40 年代到 60 年代,虽然从理论上已经确立了基因工程的可能性,科学家们也为基因工程设计了一幅美好的蓝图,但是科学家们面对庞大的双链 DNA(dsDNA),尤其是真核生物 DNA 分子是相当巨大的(表 0.2),仍然是束手无策、难于操作。尽管那时酶学知识已得到相当的发展,但没有任何一种酶能对 DNA 进行有效的切割。在细胞外发现和使用工具酶和载体为基因工程的实际操作奠定了基础。

表 0.2 若干种生物基因组的大小

| 生物种            | 大小/kb   | 生物种 | 大小/kb       |
|----------------|---------|-----|-------------|
| $\lambda$ 噬菌体  | 48.5    | 人   | 3 100 000   |
| <i>E. coli</i> | 4 640   | 玉米  | 15 000 000  |
| 啤酒酵母           | 12 000  | 贝母  | 120 000 000 |
| 黑腹果蝇           | 165 000 |     |             |

第一,利用限制酶和连接酶体外切割和连接 DNA 片段。1970 年 Smith 和 Wilcox 在流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)中分离并纯化了限制性核酸内切酶 *Hind* II,使 DNA 分子的切割成为可能。1972 年 Boyer 实验室又发现了一种叫 *EcoR* I 的核酸内切酶,这种酶每当遇到 GAATTC 序列,就会将双链 DNA 分子在该序列中切开形成 DNA 片段。以后,又相继发现了大量类似于 *EcoR* I 这样的能够识别特异核苷酸序列的限制性核酸内切酶,使研究者可以获得所需的 DNA 特殊片段。对基因工程技术突破的另一发现是 DNA 连接酶。1967 年世界上有五个实验室几乎同时发现了 DNA 连接酶,这种酶能够参与 DNA 缺刻的修复。1970 年美国的 Khorana 实验室发现了一种叫做 T4DNA 连接酶,具有更高的连接活性,为 DNA 片段的重组连接提供了技术基础。

第二,质粒改造成载体以携带 DNA 片段克隆。科学家有了对 DNA 切割与连接的工具(酶),还不能完成 DNA 体外重组的工作,因为大多数 DNA 片段不具备自我复制的能力。为了使 DNA 片段能够在受体细胞中进行繁殖,必须将获得的 DNA 片段连接到一种能自我复制的特定 DNA 分子上。这种 DNA 分子就是基因工程的载体(vector)。基因工程的载体研究先于限制性核酸内切酶。从 1946 年起, Lederberg 开始研究细菌的性因子——F 质粒。20 世纪 50~60 年代,相继发现其他质粒,如抗药性因子(R 质粒)、大肠埃细菌素因子(Col 质粒)。1973 年 Cohen 将质粒作为基因工程的载体使用,获得基因克隆的成功。

第三,逆转录酶的使用打开真核生物基因工程的一条通路。1970 年 Baltimore 等人和 Temin 等人同时各自发现了逆转录酶,逆转录酶的功能不但打破了早期的中心法则,也使真核基因的制备成为可能。

具备了以上的理论与技术基础,基因工程诞生的条件已经成熟。两位科学的“助产士”——Berg 和 Cohen 把基因工程接到了人间。

### 0.1.2 基因工程的诞生

1972 年美国斯坦福大学的 Berg 博士领导的研究小组,在世界上第一次成功地实现了 DNA 体外重组。他们使用限制性核酸内切酶 *EcoR* I,在体外对猿猴病毒 SV40 的 DNA 和  $\lambda$  噬菌体的 DNA 分别进行酶切,然后再用 T4DNA 连接酶把两种酶切的 DNA 片段连接起来,结果获得了含有 SV40 和  $\lambda$  DNA 连接重组的杂合 DNA 分子。1973 年斯坦福大学的 Cohen 等人

也成功地进行了另一个体外重组实验并实现了细菌间性状的转移。他们将编码有卡那霉素(kanamycin, Kn 或 Kan)抗性基因的大肠埃细菌 R6-5 质粒和编码有四环素(tetracycline, Tc 或 Tet)抗性基因的另一种大肠埃细菌质粒 pSC101 用限制性核酸内切酶 *EcoR* I 消化切割,再用 T4DNA 连接酶进行作用,将两种质粒连接重组,形成杂合 DNA 分子。在此基础上,Cohen 等人又将这种杂合的质粒 DNA 分子导入 *E. coli* 进行无性繁殖,发现某些转化子菌落表现出既抗卡那霉素又抗四环素的双重抗性特征,标志着转化的 *E. coli* 获得了原本不具有的新性状。

Cohen 等在 Berg 博士工作的基础上,不仅在体外成功地获得了重组 DNA 的杂合分子,还使这一重组分子在 *E. coli* 内得到繁殖。综合 Cohen 和 Berg 创造性的研究成果,“在细胞外把目的核酸分子与载体核酸分子组合成新的遗传物质,再把它导入原本没有这种物质的细胞内,并使这种重组遗传物质在细胞内的无性繁殖获得成功”这一工作内容被定义为基因工程。世界上第一次完成这项工作的 1973 年被公认为基因工程诞生的元年。

### 0.1.3 基因工程的快速发展

自问世到现在的 30 年间,基因工程得到飞速发展。1974 年 Cohen 和 Boyer 等人合作,把非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)编码核糖体的 DNA 片段同 pSC101 质粒重组导入 *E. coli*。经分析转化子细胞,结果表明非洲爪蟾的基因确实进入了 *E. coli* 并转录出相应的 RNA 产物,说明真核生物的基因可以转移到原核细胞并能实现功能的表达。这一研究结果极大地冲击了人们对生物种间界限的传统认识,由此形成对新事物不理解而产生的恐惧心理,进而引发人们的关注和种种争论。1977 年 Itakura 又将人工合成的生长激素释放抑制素(somatostatin)基因在原核细胞中获得真核基因的表达,充分体现出基因工程这一新生事物强大的生命力。

近 20 年基因工程得到充分发展。20 世纪末全世界范围最普及的学术词汇就是“基因”和“克隆”。基因工程不仅发展了一系列新的基因操作技术,构建了大量的实用载体,极大地扩展了研究领域和成果,而且“反向生物学”的研究方法已被广大生命科学工作者所接受和采纳,其方法、技术、策略与思路正发散、渗透到各个学科,促进了以应用性成果不断涌现为特点的科技进步。1997 年 2 月“多莉”(Dolly)克隆羊的报道轰动世界。2001 年 6 月人类基因组计划 DNA 测序草图完成,得出“人类结构基因可能仅有 3 万余个”的推论。2002 年 12 月中国科学家宣布绘制出全世界最重要的口粮——水稻基因组的“精细图”。这是由 6 万余个基因组成的世界上第一张农作物的基因组精细图谱,不仅为阐明水稻生物学遗传本质及识别、筛选具有经济价值的遗传基因打下了坚实基础,同时也确定了我国的基因组研究已进入世界先进行列。

基因工程的发展带动和促进了众多的相关学科。随着人类基因组计划的完成,从低等到高等生物的基因组不断被揭秘,由此孕育产生了基因组学。面对 30 亿个字符组成的人类遗传密码,以及自动测序仪中源源不断涌出的其他生物的基因组信息,在生物信息数据急剧膨胀的压力下又诞生了生物信息学。生物技术领域所包括的基因工程、细胞工程、酶工程、生化工程等诸方面虽然相互依赖、相辅相成,但基因工程占有主导地位,基因工程的研究可以为酶或蛋白质工程提供分子修饰(突变)技术、为发酵工程提供特异的工程菌和改造过的细胞以及转基因植物和转基因动物等(图 0.2)。

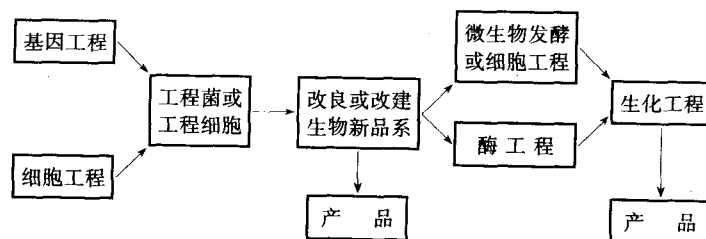


图 0.2 基因工程与其他生物技术的关系

基因工程的发展开创和促进了实验技术与方法。20 世纪 80 年代发明了聚合酶链式反应(即 PCR 技术),90 年代创造了基因芯片技术,DNA 合成技术、DNA 序列测定方法也不断地改良和完善。由此产生的 PCR 仪、DNA 合成仪、DNA 测序仪以及成套的基因芯片制作设备等,又有利地促进了生命科学的研究与发展。

如果说 20 世纪末是基因工程基础研究趋向成熟、应用研究初露锋芒的阶段,那么 21 世纪初将是基因工程应用研究的鼎盛时期,为人类解决粮食、能源、环境等社会问题发挥巨大作用,使农、林、牧、渔、医的很多产品上都会打上基因工程的标记。

## 0.2 基因工程的研究内容及其应用

概括地讲,基因工程就是把目的核酸分子与载体核酸分子在体外连接形成重组体,使新的重组体导入受体细胞并得到繁殖。基因工程的重要特征之一就是能够使一个外源核酸分子(几乎都是 DNA)在另一种不同的受体细胞中进行繁殖。这一技术具有跨越天然物种屏障的能力,其中心环节是在体外将不同来源的 DNA 片段通过限制性核酸内切酶和 DNA 连接酶等的作用重新组合成杂合的 DNA 分子,因而也称为重组 DNA 技术。运用重组 DNA 技术能够按照人们预先的设计操作遗传物质(DNA)形成许多新的遗传结合体,创造出具有新奇遗传性状的新型生物,这是基因工程另一个重要特征。

### 0.2.1 基因工程的研究内容

结合所表述的基因工程定义和特征,基因工程包括以下几个主要步骤:

- 1) 从现有的生物有机体基因组中,利用酶切消化或 PCR 扩增等方法,获得带有目的基因的 DNA 片段;
- 2) 在体外将带有目的基因的外源 DNA 片段连接到具有选择标记的载体分子上,形成能够自主复制的重组 DNA 分子;
- 3) 将重组 DNA 分子转移到适宜的受体细胞,并使其一起增殖;
- 4) 从大量的细胞繁殖群体中筛选出获得了重组 DNA 分子的受体细胞克隆;
- 5) 从筛选出来的受体细胞克隆中提取出已经得到扩增的目的基因,供进一步分析研究使用;
- 6) 将分离到的目的基因克隆到表达载体上,导入受体细胞,使之在新的遗传背景下实现功能表达,产生出人类所需要的物质(图 0.3)。

以上 6 个步骤从基因工程定义角度包括了这项技术的完整过程。若从基因工程的最终目的来讲,上述 6 个步骤还不是全部内容。作为人类所需要的物质,基因工程产品的完成至少还涉及表达产物的纯化、复性、规模化生产工艺等内容的探索。因此,常把以上 6 个步骤的主体称为基因工程的上游研究。为便于深化基因工程研究内容的理解,以图 0.4 归纳概括出基因工程研究的主要流程模式。

基因工程的发展历史虽然只有 30 年,但 20 世纪末的几项卓越成果使其名声大噪。基因、DNA、基因工程成为人们熟悉的学术词汇。1997 年“多莉”羊的报道又使“克隆”一词变得家喻户晓。由英语音译的克隆(clone)当作名词使用时,是指从一个共同祖先无性繁殖下来的一群遗传上同一的 DNA 分子、细胞或个体所组成的特殊的生命群体;而当“clone”作动词使用时,则是指从同一个祖先产生这类同一的 DNA 分子群体、细胞群体或个体群体的过程。所以,在不同的场合要注意克隆一词有不同的含义。

基因工程在理论上能够自成体系,可称为基因工程学。从方法学角度看,它也是一门内容繁多、应用广泛的实验技术,所以常常把基因工程研究所涉及的分子生物学技术统称为基因工程技术。正因它所具有的双重属性,加上学科历史相对较短,与其相关的名词术语繁杂而缺少严格的规范,在文献中常见的有遗传工程(genetic engineering)、基因工程(gene engineering)、

Note

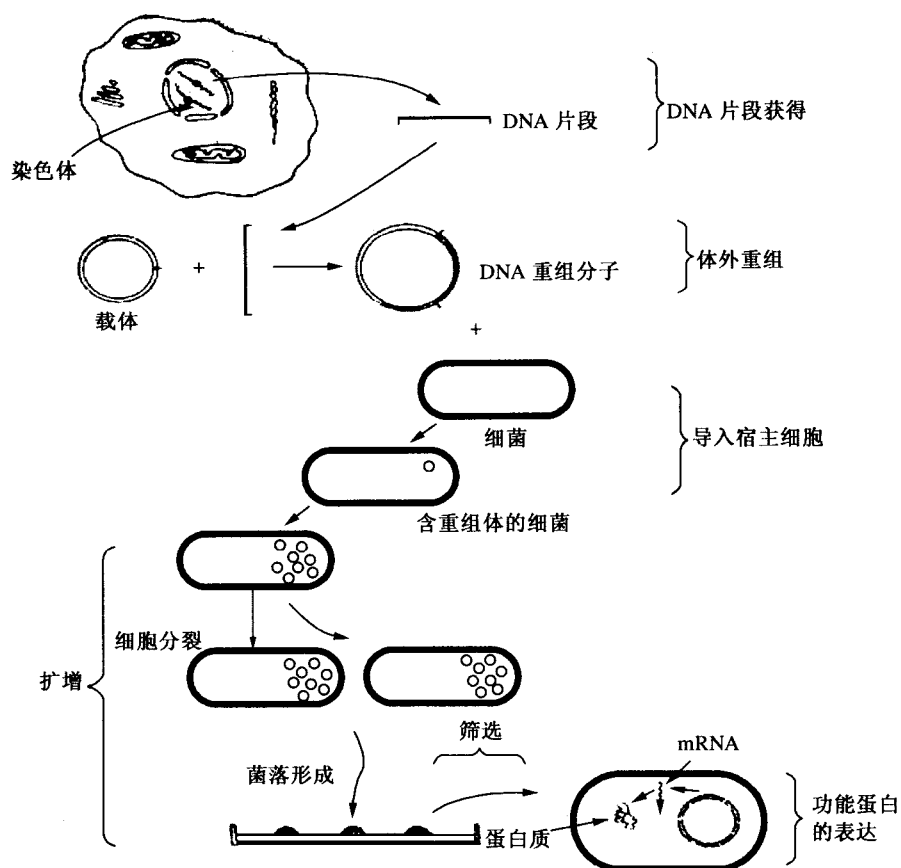


图 0.3 基因工程基本过程

基因操作(gene manipulation)、重组 DNA 技术(recombinant DNA technique)以及基因克隆(gene cloning)、分子克隆(molecular cloning)等。这些术语所代表的具体内容都是彼此相关的,在许多场合下被混同使用,很难做出严格的区分。从某种意义上讲,它们之间的差别只不过是各自考虑的角度和强调的侧重点不同罢了。

## 0.2.2 基因工程的应用

### 1. 基因工程在生物学研究领域得到广泛应用

基因工程属于分子生物学的一个分支或是一个生长点,分子生物学的理论与技术是基因工程的基础。随着分子生物学的深入发展,生命现象的多样性与生命本质的一致性得到辨证的统一。透过千差万别的生命现象,其内含的核苷酸、氨基酸的分子基础是一致的,核苷酸排列顺序转换成氨基酸排列顺序也是一致的。除极个别生物外,脱氧核糖核酸构成了地球上千百万生灵共同的遗传物质,遗传密码的通用性也体现着生命本质的一致性。基因工程正是对涉及生命本质的遗传物质进行操作,模拟工程技术的方式,对生命物质设计操作方案(计划),按着一定的步骤(途径),达到预期的目标(结果)。基因工程在生物学中的应用直接作用于遗传物质——DNA,通过基因功能的研究,进而阐明生命现象的表型特征。相对于孟德尔的皱皮豌豆和圆粒豌豆子代分离实验并由此推断出遗传规律,基因工程开拓出“反向生物学”的研究途径,即通过生物基因型获得表现型的研究路线。

随着基因工程研究的不断深入和完善,为研究基因的结构与功能提供了有效的方法和手段。现在人们广泛应用 DNA 重组、定点突变、核酸杂交、序列分析、反义抑制、基因敲除等技术,直接从生物样品的基因入手,通过解析蛋白质的结构与功能,进而阐明复杂的生命表征。由此也使许多生物学原理或规律得到分子水平的验证或在分子水平上给予解释,一些来自于试验

Note

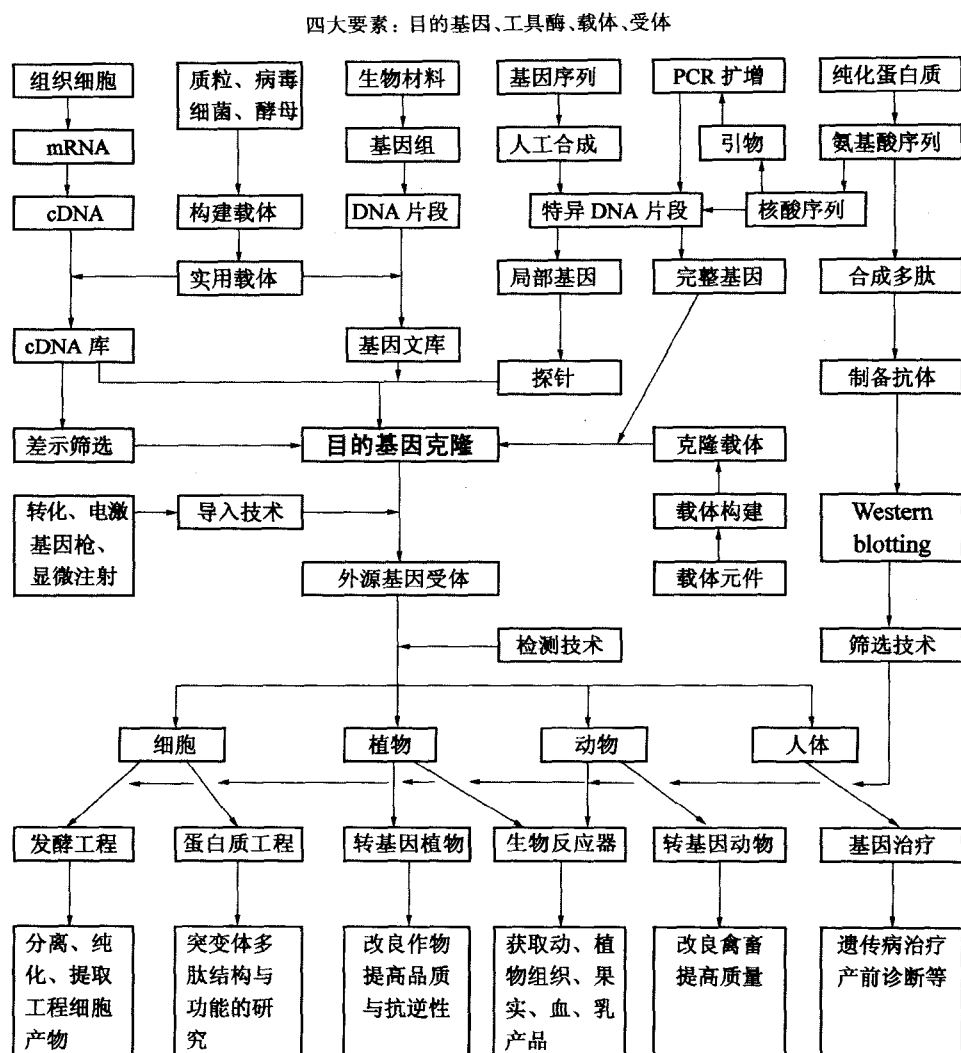


图 0.4 基因工程流程模式图

或经验的生理生化指标可以发现分子水平的依据,生物间在分类或进化中的亲缘关系也可通过更为本质的核酸、蛋白质序列间的比较给予确定。与“中心法则”相匹配的基因工程技术有着广泛的应用前景,正在迅速渗透到生物研究的各个学科并发挥着越来越大的作用。

## 2. 基因工程在医药领域中的应用

基因工程在医药领域中的应用前景深远。利用基因工程的方法和技术在基因治疗(gene therapy)、基因诊断(gene diagnosis)、基因制药、基因疫苗等方面应用成果显著。

### (1) 基因治疗

基因治疗常称为基因疗法(gene therapeutics)是将有功能的基因转移到患者的细胞中,用以纠正或置换致病基因,希望有功能的目的基因与宿主细胞内的基因发生整合,或成为宿主细胞遗传物质的一部分,目的基因的表达产物起到对疾病的治疗作用。若目的基因未与宿主细胞基因组整合,也可通过暂时表达产物发挥治疗作用。基因治疗从设想到临床试验只经历了很短的发展历程。早在 1980 年就首次试用磷酸钙介导的 DNA 转移技术治疗  $\beta$ -地中海贫血病(即  $\beta$ -珠蛋白基因),但由于准备不充分而告失败。1989 年第一例被批准采用 NeoR(新霉素)标记基因进行基因转移的临床试验获得成功。1990 年 9 月第一例获准用腺苷脱氨酶(ADA)基因转移到淋巴细胞中,扩增后回输患者体内,用于治疗重症联合免疫缺陷病(SCID)。随后对单基因缺损引起的遗传病,如血友病(Ⅷ因子或Ⅸ因子基因)、高胆固醇血症(低密度脂蛋白受体基因)、苯丙酮尿症(苯丙氨酸羟化酶)、 $\beta$ -地中海贫血病、镰型细胞贫血( $\beta$ -珠蛋白基因第 6 密码子)、高氨血症(鸟氨酸转氨甲酰基酶)等展开广泛的临床试验。随着基因治疗研究的发展和安全有