

Principles of Genetic
Engineering

(Second Edition)



基因工程原理

(第二版)



徐晋麟 陈 淳 徐 沁 编著



科学出版社

014031873

Q78
35-2

基因工程原理

(第二版)

Principles of Genetic Engineering
(Second Edition)

徐晋麟 陈 淳 徐 沁 编著



科学出版社

北京



北航 C1720119

Q78
35-2

014031873

内 容 简 介

本书是作者在多年教学和科研经验的基础上参考大量文献精心编写而成,力求内容新颖,方法先进,脉络清晰,原理分明,术语规范,图文并茂。本书除绪论外,共分9章:基因工程的分子遗传学基础,原核生物分子克隆的宿主和载体系统,基因文库的构建和筛选,基因组DNA的分析,聚合酶链反应与连接酶反应,培养细胞中克隆基因的表达,转基因动植物,人类基因鉴定和基因诊断,基因治疗。在每章后都配有习题,供读者练习,并在书后附有索引,供读者查阅。

本书适合作为高等院校生物科学、生物技术、生物工程专业和农林、医药院校相关专业的教材,也可供相关科学研究人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

基因工程原理/徐晋麟,陈淳,徐沁编著. —2版. —北京:科学出版社, 2014. 2

ISBN 978-7-03-039677-8

I. ①基… II. ①徐…②陈…③徐… III. ①基因工程 IV. ①Q78

中国版本图书馆CIP数据核字(2014)第018961号

责任编辑:席 慧 / 责任校对:桂伟利
责任印制:阎 磊 / 封面设计:迷底书装

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>

北京市文林印务有限公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2007年8月第一版 开本:787×1092 1/16

2014年2月第二版 印张:19 1/2 插页:4

2014年2月第五次印刷 字数:511 000

定价:39.80元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

第二版前言

时间的推移真是加速的,随着年龄的增大,感到时间过得越来越快。2007年拙作《基因工程原理》出版至今已有7年了,此间已印刷了四次,但我总感到有些缺憾,那就是这些年来,很多新技术、新方法层出不穷,使人目不暇接。每当我读到一份新技术的资料时,那种构思的睿智、设计的精巧令我产生一种冲动,迫切地希望将这些新的内容纳入教材中,和大家分享,特别是锌指核酸酶(ZFN)、转录激活因子样效应物(TALE)和归巢核酸内切酶技术的问世,令我激动不已。这些技术能够靶向切除碱基,准确改变生物基因组,这为研究基因功能、治疗遗传缺陷创造了新的可能性。这组技术被 *Nature Methods* 杂志评选为2011年“年度实验室技术”,被 *Science* 杂志网站公布为该刊评选的2012年十大科学进展之一。也正是在2007年,山中伸弥创建了诱导性多能干细胞(iPSC)技术,时隔短短的6年,山中伸弥便荣获了2012年度的诺贝尔生理学或医学奖,这在科学史中还是十分罕见的,表明科学界对这项新技术的肯定和推崇。

临渊羡鱼,不如退而结网,于是在我风烛残年之际,鼓起勇气,着手编写《基因工程原理》第二版。在初版的基础上,去粗取精,吐故纳新。将原第三、四章拆分并整合,新编了绪言和第八章,更换和重新加工了部分插图,精简文字,压缩篇幅,除基因组编辑核酸酶新技术外,还添加了诸如连接酶链反应(LCR)、解链酶扩增(HDA)、错配固相化学剪切(SpCCM)、PCR-高效液相色谱(PCR-DHPLC)技术、染色体特殊位点特异性探针(LSI)、多重连接探针扩增(MLPA)、甲基化特异性聚合酶链反应(MSPCR)、实时荧光定量 RT-PCR_r、支链 DNA 检测法(bDNA)、依赖核酸序列的扩增技术(NASBA)、异源双链体迁移率测定法(HMA)、PCR-核糖核酸酶 A 错配剪切法(PCR-RMCM)、PCR-序列特异性引物(PCR-SSP)、碱基切割序列扫描(BESS)、无创 DNA 检测技术、小片段同源序列的更换技术(SFHR)、RNA 激活(RNAa)、细胞穿透肽(CPP)、微环 DNA(minicircle DNA)等新技术。这些新的技术像是原野上一丛从鲜艳的花,我们将这些花小心摘下,精心编制一个美丽花环,奉献给读者、家人和朋友。

在编写的过程中得到科学出版社席慧编辑的鼓励和帮助,在此表示衷心的感谢。

徐沁和陈淳两位博士科研繁忙,我已进入古稀之年,力不从心,书中不妥之处在所难免,请读者指正。

徐晋麟

2013年8月

第一版前言

自从 20 世纪 70 年代初美国斯坦福大学的伯格(P. Berg)、加州大学的博耶(H. W. Boyer)和斯坦福大学的科恩(S. N. Cohen)开创了基因工程技术以来,生命科学像是装上了巨大的引擎,迅猛向前发展,遗传学迅速地进入了一个崭新的“基因组时代”。正是基因工程技术提供了很多新的克隆策略和技术,使得人类完成了两大创举,一是体细胞克隆,二是人类基因组计划的完成。

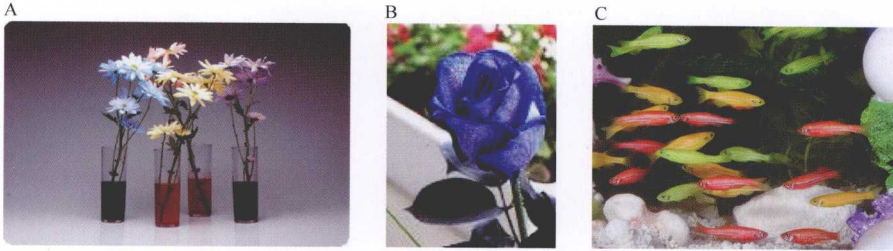
基因工程技术不仅是一门应用学科,也是研究生命科学极为重要的工具,不懂得生物工程技术也就很难进入生命科学实验室。目前基因工程实验手册之类的书已出版了很多,最有影响的可能是 J. 萨姆布鲁克、E. F. 弗理奇和 T. 曼尼阿蒂斯编著的《分子克隆实验指南》。该书近乎成为与现代生命科学研究有关的实验室中的必备参考手册。1993 年出版的卢圣栋主编的《现代分子生物学实验技术》(高等教育出版社),是国内出版的第一本分子生物学方面的实验指南,深受读者的欢迎。尽管相关书籍陆续问世,但有关基因工程的教材出版得很少。1987 年科学出版社出版的黄翠芬院士主编的《遗传工程理论与方法》是我国第一本基因工程教材,刚一出版就一售而空。同年,科学出版社组织翻译出版了由 J. D. 沃森, J. 图泽, D. T. 库尔茨著(沈孝宇等译,王培楠校)的《重组 DNA 简明教程》。这是沃森所编著的四本名著之一,弄得一时洛阳纸贵。接着 1988 年四川大学出版社出版了齐义鹏等编著的《基因工程原理与方法》,这是国内第一本系统介绍基因工程原理和方法的教科书,从事基因工程教学的老师们如获至宝。1989 年吴乃虎主编《基因工程原理》(第一版)问世,掀起了一股绿色的冲击波(书的封面为绿色),几乎占据了全国的教材市场,并在专业领域连续多年被采用。1998 年吴乃虎先生出版了《基因工程原理》(第二版)上册,2001 年出版了下册,和第一版相比内容更为丰富,装帧更为精美。可惜的是各高校本科生的“基因工程原理与方法”这门课一般都只安排 36 个学时,也就无法再用这上、下两册精装书作为教材。

多年来我一直从事遗传学、分子生物学和基因工程原理与方法的教学,前两门课都有很多国外著名教材可参考,亦有较多的国内编写的教材可选用,唯独感到困难的就是“基因工程原理与方法”。为了适应教学的需要,我们参考了 Roger L. Miesfeld 编著的 *Applied Molecular Genetics* 等书和近期的一些文献资料,编写了本书,共分 9 章,适合于 36~54 个学时的教学。我们在编写过程中,力求内容新颖,系统明了,原理清楚,方法先进,深入浅出,有一定的启发性。在每章的后面都附有习题,供读者练习,以便于读者把握重点,加深理解。希望这本教材对读者在学习基因工程原理和方法方面有所帮助。

徐晋麟

于上海交通大学
2007 年 6 月 15 日

彩 图



绪图-2 通过基因工程培养出神奇的动植物。A. 彩色康乃馨;B. 蓝色玫瑰;C. 会发光的鱼

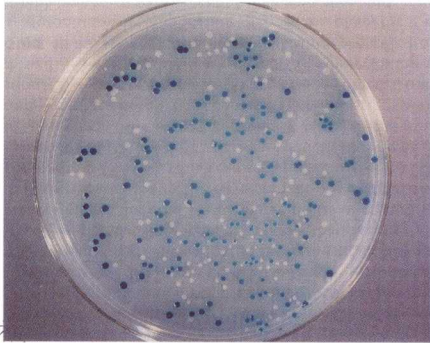


图 1-5 用 X-gal 来鉴别含有(蓝色)或缺乏 β -半乳糖苷酶活性的大肠杆菌菌落的图解照片(引自 Snustad and Simmons, 2010)。在本例中,外源 DNA 片段已经插入到多克隆位点内部的 Puc119 菌落显示白色,未插入的菌落为蓝色

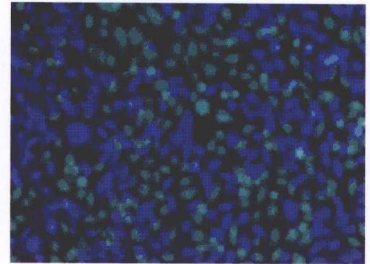


图 6-5 用荧光显微镜或荧光激活细胞分选术鉴别 β -内酰胺酶表达的细胞(蓝色)和未表达的细胞(绿色)

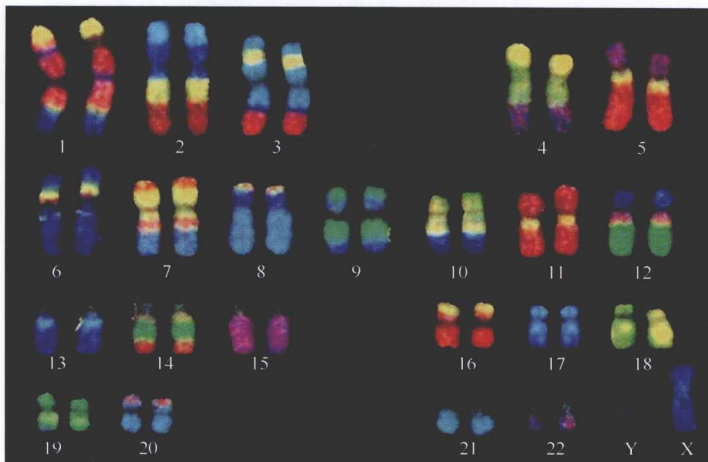


图 1-13 染色体涂染(转引自 Griffiths et al., 1999)。用不同颜色的荧光染料标记不同的探针,再和染色体进行原位分子杂交,使染色体不同区域出现不同的颜色

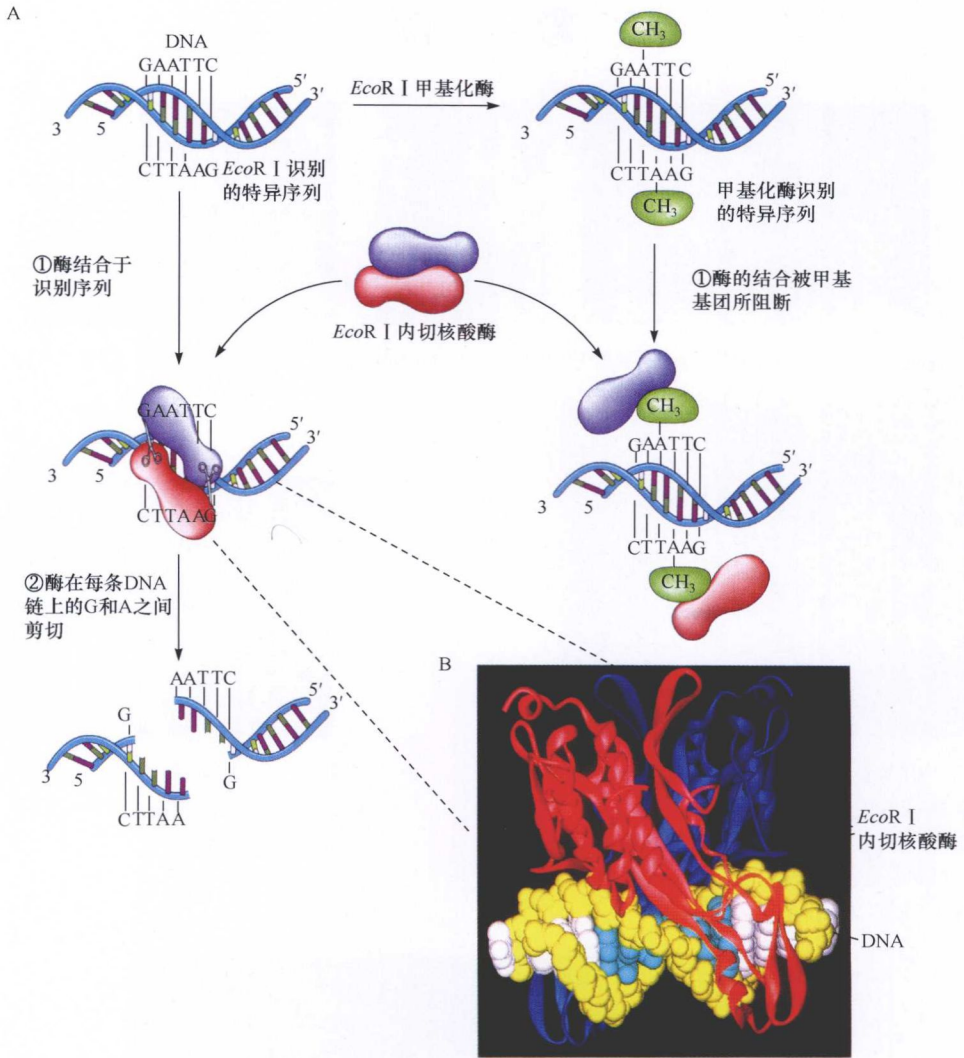


图 1-18 *EcoR* I 限制-修饰系统(引自 Snustad and Simmons, 2010)。A. *EcoR* I 限制性内切核酸酶在非甲基化 *EcoR* I 识别序列的剪切, 以及识别序列被 *EcoR* I 甲基化酶甲基化而受到保护以至不被剪切。B. 图示根据 X 射线的衍射资料作出的 *EcoR* I -DNA 复合体的结构。结构图中红色和深蓝色表示 *EcoR* I 限制性内切核酸酶

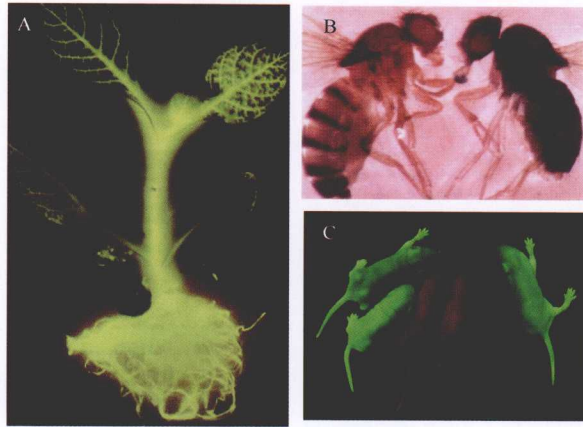


图 6-2 常用的几种报道基因。A. 以萤火虫的 LUC (荧光素酶)为报道基因,用 Ti 质粒转入烟草后,以荧光素为底物时,产生生物荧光(转引自 Griffiths et al.,1999)。B. 细菌的 *lacZ* 转入果蝇后得到了表达,转基因果蝇(右)身体呈蓝色,作对照的果蝇体色正常(转引自 Griffiths et al.,1999)。C. 用 GFP 标记小鼠的精原干细胞发育成的小鼠在 UV 照射下发出绿色荧光,而未用 GFP 标记的小鼠不发出绿色荧光(引自 Chudakov et al.,2005)



图 7-15 2001 年第一只克隆猫“茜茜”诞生。其供体是一只三色猫(A),其代理母亲是一只灰色带黑色条纹的猫(B),而“茜茜”的花色模式和其供体相同,但仅有黑和白两种毛色。表明其来自单克隆细胞

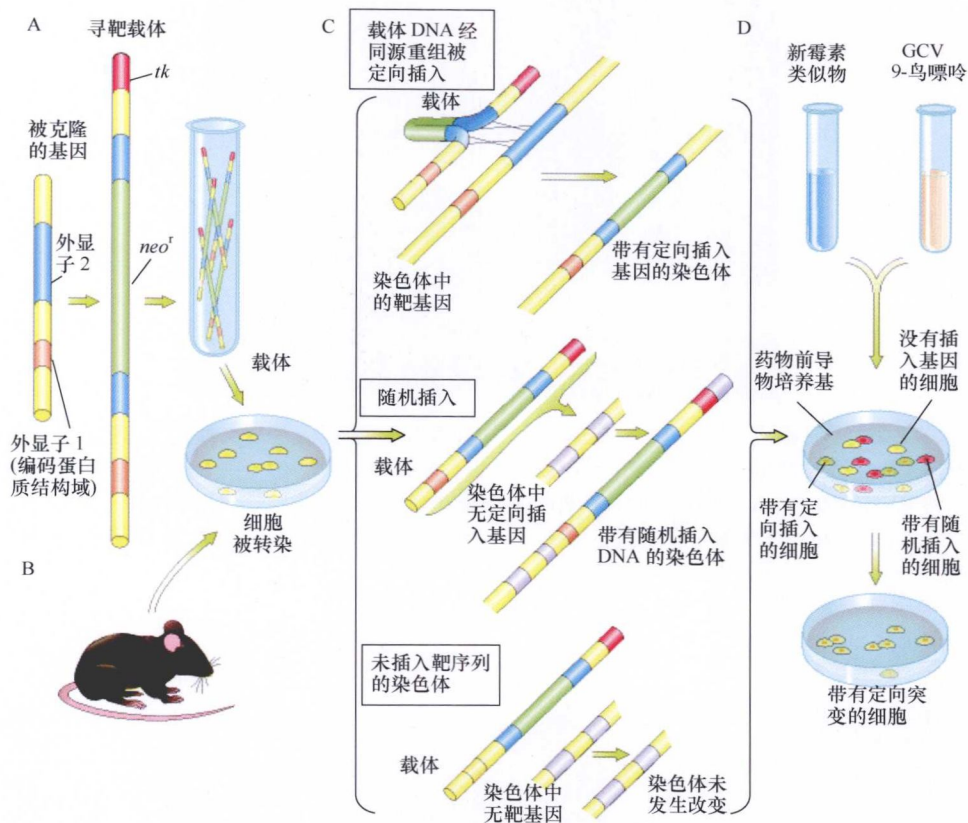


图 7-10 产生含有特定基因突变体的细胞,称为定向突变(targeted mutation)或敲除(引自 Griffiths, 1999)。

A. 在体外将 neo^r 基因插入克隆基因蛋白质编码区中,使其失去活性,构建成寻靶载体(targeting vector)。 neo^r 作为标记基因,在晚些时候将指示载体 DNA 插入染色体上的具体位置。该载体的末端还带有第二个标记—— tk 基因,这些标记是标准的,但也可以用其他适当的标记基因来取代它们。B. 将带有双标记的载体导入从小鼠胚分离出的细胞中。C. 结果会发生 3 种情况:一是载体上插入了 neo^r 标记的外源基因与细胞内正常的同源基因发生同源重组,使染色体上带有了定向插入基因,同时也插入了 neo^r 标记基因,而 tk 基因仍然留在载体上,未能插入到染色体上(上);二是整个的载体随机地整合到染色体上,未发生同源重组,但将双标记都带到了染色体上(中);三是载体未能插入染色体上,更不会产生同源重组,双标记都留在载体上(下)。D. 筛选定向突变的细胞。将各种细胞都铺在含有选择剂新霉素类似物(G418)和 GCV(9-鸟嘌呤)的培养基上。G418 可使细胞致死,但含有 neo^r 基因的细胞具有抗 G418 的功能。因此可以排除未被靶基因取代的细胞。而 GCV 是有毒的物质,当单纯性疱疹病毒的 tk 基因存在时,胸苷激酶可催化 GCV 作为底物参与 DNA 的合成,使细胞致死。因此用它可以排除随机整合载体的细胞。结果只有定向插入外源 DNA 的细胞才能在培养基上存活增殖

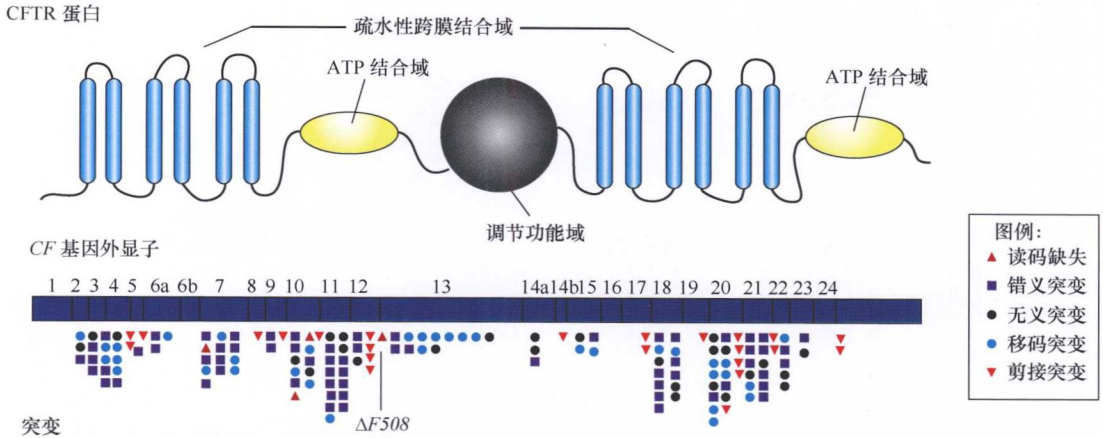


图 8-2 导致囊性纤维化的 CF 基因突变(引自 Snustad and Simmons, 2010)。CF 基因突变的分布极其分类图示于基因外显子的下方。外显子上方的 CFTR 蛋白结构图表示突变可能影响到的蛋白质功能域。约 70% 的病例是由于 CF 基因 $\Delta F508$ 突变所致, 它在正常的 CFTR 蛋白 508 位缺失了苯丙氨酸

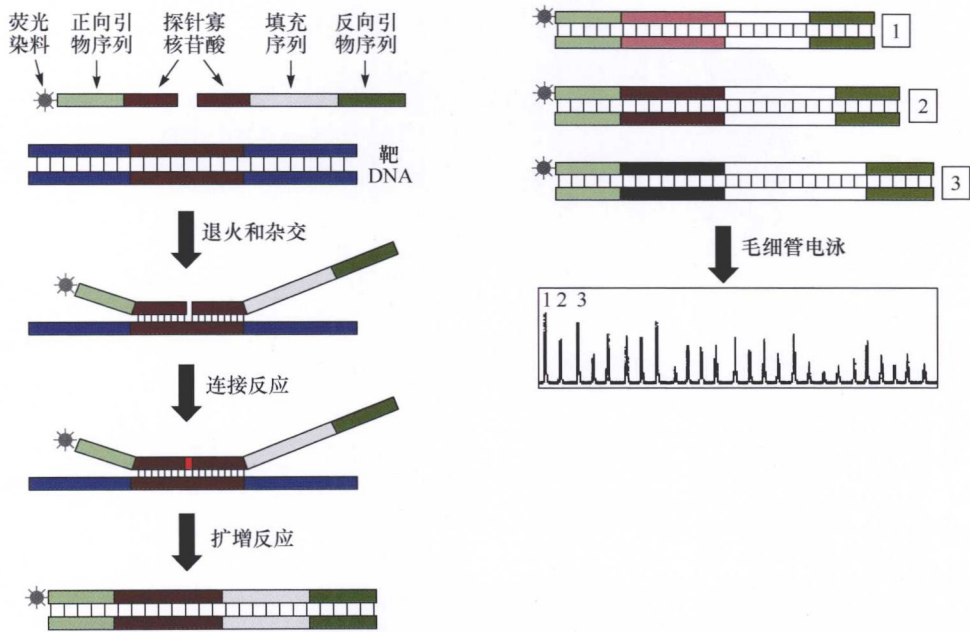


图 8-18 MLPA 流程。MLPA 分为 5 步:①MLPA 探针退火和杂交;②连接反应;③PCR 反应;④通过电泳分离扩增产物;⑤资料分析。由于只有连接的探针才能在随后的 PCR 中以指数的形式扩增, 探针连接反应的产物数量为样品中靶序列的数量, 扩增产物可通过毛细管电泳分离; 不能连接的探针仅含一个引物, 是不能以指数的形式扩增的, 在毛细管电泳中也就不会产生峰值

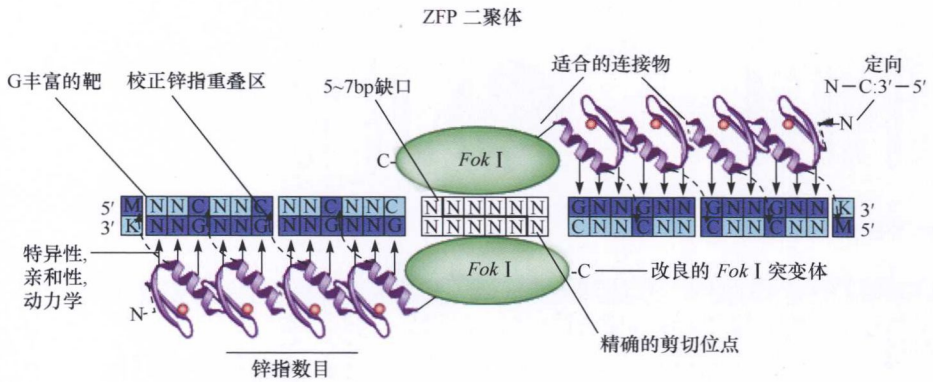


图 9-14 表示 ZFN 为二聚体,每个单体由 4 个锌指蛋白串联而成,特异地与靶位点两侧的 DNA 结合,锌指蛋白的 C 端与限制酶 *Fok I* 连接,由 *Fok I* 进行剪切 DNA 的靶位点。锌指结合位点以蓝色表示(深蓝色表示主要接触的 DNA 碱基)(引自 Isalan,2012)

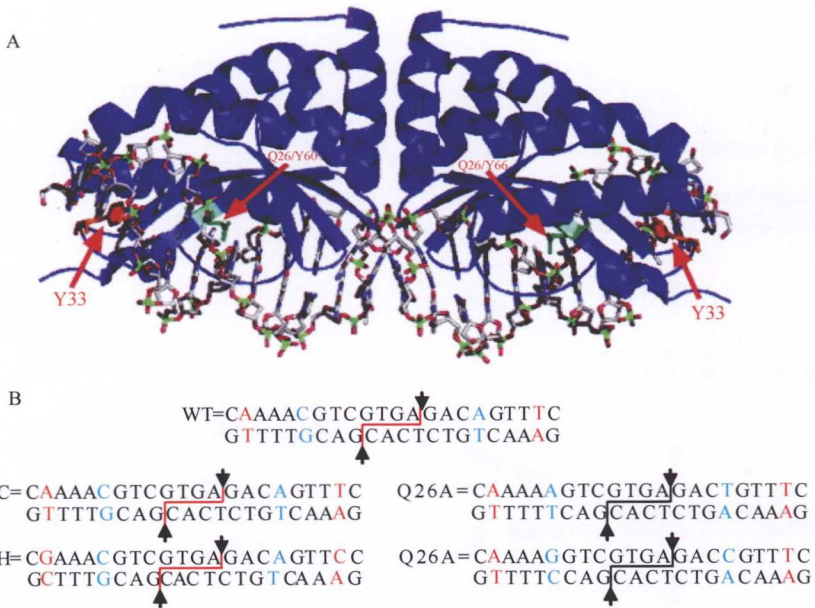


图 9-15 I-Cre I 的结构和识别剪切 DNA 的靶位点(引自 Sussman et al.,2004)。A. 结合于 DNA 上的野生型 I-Cre I 的结构。红色标记和箭头表示选择的靶位点。B. 野生型和突变型酶的 DNA 结合和剪切位点,碱基±6 和±10,Q26/Y66 和 Y33 相互作用,序列中碱基用的颜色和结构图用的颜色一致

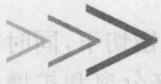
目 录

101	····· 因基油白蛋号奇肉	83	····· 类分始
101	····· 的目交概	07	····· 的究向致
101	····· 的究原身前油用概可	07	····· 的究原花南第
101	····· 的带本基	07	····· 中 3.00 5.00 因基白蛋
第二版前言	····· 的并 四	07	第六节 实例 1: 鉴别特定基因
第一版前言	····· 的里路步参均可 正	07	转录物的转录起始点 ····· 45
绪论 ····· 1		07	一、研究目的 ····· 45
一、基因工程的理论和技术基础	····· 1	07	二、已知的信息和试剂 ····· 45
及工作程序 ····· 1		07	三、基本策略 ····· 45
二、基因工程技术的建立与发展 ····· 2		07	四、注释 ····· 46
三、基因工程的产业化及应用 ····· 6		07	五、可供参考的思路 ····· 48
四、转基因生物的安全性 ····· 9		07	习题 ····· 48
第一章 基因工程的分子遗传学基础 ··· 12		第二章 原核生物分子克隆的宿主	
第一节 基因和信息流 ····· 12		和载体系统 ····· 51	
一、基因的概念 ····· 12		第一节 应用广泛的宿主菌 ····· 51	
二、遗传的中心法则 ····· 12		一、 <i>E. coli</i> K-12 的生物学 ····· 51	
三、基因表达的调节——操纵子		二、细菌的限制与修饰系统 ····· 51	
模型 ····· 14		三、大肠杆菌的克隆载体 ····· 53	
第二节 核酸的生物化学 ····· 18		第二节 质粒载体 ····· 53	
一、核酸大分子的结构 ····· 18		一、质粒生物学 ····· 53	
二、DNA 双螺旋的变性与复性 ····· 19		二、质粒上常编码抗生素抗性基因 ··· 54	
第三节 分子杂交 ····· 21		三、质粒 DNA 克隆载体 ····· 55	
一、原位分子杂交 ····· 21		四、通过转化将 DNA 转移到	
二、芯片技术 ····· 23		大肠杆菌中 ····· 56	
三、印迹杂交 ····· 23		第三节 噬菌体克隆载体 ····· 58	
四、异源双链定位法和 R 环定位法 ··· 26		一、λ 噬菌体的生物学 ····· 58	
第四节 基因工程中常采用的		二、λ 噬菌体克隆载体 ····· 59	
酶类 ····· 27		三、M13 噬菌体克隆载体 ····· 60	
一、序列特异的 DNA 限制性酶 ····· 27		第四节 基因组 DNA 克隆载体 ··· 63	
二、连接酶和激酶 ····· 29		一、黏粒载体 ····· 63	
三、DNA 聚合酶和 RNA 聚合酶 ····· 30		二、酵母人工染色体载体 ····· 64	
第五节 研究 DNA 和 RNA		三、细菌人工染色体载体 ····· 65	
的方法 ····· 30		四、P1 噬菌体载体和 P1 人工	
一、核酸的分离纯化 ····· 30		染色体 ····· 66	
二、电泳 ····· 30		五、哺乳动物人工染色体载体 ····· 68	
三、DNA 测序 ····· 36		第五节 外源 DNA 和载体连接	
四、体外突变 ····· 39		的方法 ····· 68	

一、外源 DNA 和载体连接方法 的分类	68	第六节 实例 3:体外克隆编码细胞 内信号蛋白的基因	101
二、定向克隆	70	一、研究目的	101
第六节 实例 2:拟南芥肌钙网 蛋白基因在 <i>E. coli</i> 中 的调节表达	70	二、可利用的信息和资源	102
一、研究目的	70	三、基本策略	102
二、已知的信息和试剂	70	四、注释	102
三、基本策略	71	五、可供参考的思路	102
四、注释	73	习题	104
五、可供参考的思路	73	第四章 基因组 DNA 的分析	106
习题	73	第一节 基因组作图	106
第三章 基因文库的构建和筛选	75	一、遗传图和细胞学图	106
第一节 基因文库的构建	75	二、物理图	108
一、基因组文库和 cDNA 文库	75	三、基因定位	116
二、构建基因文库的克隆载体 和筛选策略	77	第二节 基因组长 DNA 片段的 操作	120
三、亚克隆	80	一、用荧光激活细胞分选法来分选 染色体	121
第二节 cDNA 文库的构建 和筛选	81	二、标签克隆法	121
一、mRNA 的分离纯化	82	三、用 DNA 池来筛选基因组文库	122
二、cDNA 合成	83	第三节 基因调节序列作图	123
三、cDNA 克隆载体	86	一、用体外表达进行基因调节 序列作图	123
第三节 cDNA 文库的筛选	88	二、定位蛋白质结合位点的 分析方法	124
一、简并寡核苷酸探针	88	三、电泳迁移率变动分析	126
二、抗体探针	90	第四节 实例 4:通过定点克隆分离 一个人人类致病基因	127
三、差示杂交	92	一、研究目的	127
四、扣除杂交	92	二、已知的信息和试剂	127
第四节 cDNA 表达文库的 功能筛选	94	三、基本策略	128
一、蛋白质活性分析	94	四、注释	128
二、酵母双杂交系统	95	五、供参考的思路	128
三、cDNA 噬菌体展示技术	97	习题	128
第五节 用克隆 cDNA 作为 反应物	99	第五章 聚合酶链反应与连接酶反应	135
一、RNA 印迹	99	第一节 基本的 PCR 方法	135
二、RNase 保护法	100	一、PCR 扩增循环	136
三、核连缀(转录)分析	100	二、PCR 需用的 DNA 聚合酶	137
		三、PCR 引物设计	138

818	四、两个引物间的最佳距离	139	808	一、基因转染的策略	172
818	五、PCR 实验的最优化	140	808	二、瞬时转染	172
818	第二节 反转录 PCR	141	808	三、稳定转染	173
818	一、cDNA 末端快速扩增	141	808	第三节 用酵母作为模式真核	
178	二、定量 RT-PCR	142	808	细胞	176
178	三、差异表达基因的扩增	144	118	第四节 蛋白质在培养细胞中的	
178	四、抑制性消减杂交	145	118	表达	177
828	五、肠道细菌基因间重复保守		118	一、 <i>E. coli</i> 表达系统	177
178	序列-聚合酶链反应	147		二、杆状病毒表达系统	177
178	第三节 PCR 用于诊断	147	118	第五节 实例 6: 启动子选择转录	
828	一、在组织样本中检测病原体	148	118	因子的研究	180
828	二、用序列标签位点进行基因型		818	一、目的	180
828	分型	148	818	二、可利用的信息和试剂	180
828	第四节 PCR 在实验室中的应用	149	818	三、基本策略	180
828	一、用 PCR 亚克隆靶 DNA	149	818	四、注释	181
828	二、PCR 介导产生融合基因	151		五、可供参考的思路	183
828	第五节 其他的 DNA 扩增和靶		188	习题	183
828	序列的检测方法	152	第七章 转基因动植物	184	
828	一、连接酶链反应	152	828	第一节 果蝇发育的分子生物学	184
828	二、连接酶检测反应	153	828	一、P 因子介导的转化	184
878	三、缺口-连接酶链反应	153	828	二、P 因子增强子拼接载体	185
178	四、不对称缺口连接酶链反应	154	828	三、可介导转化的其他真核	
878	五、解链酶扩增	156	828	转座因子	187
178	第六节 实例 5: 用 RT-PCR 克隆		828	第二节 构建转基因的农作物	188
878	细胞特异转录本	156	828	一、根癌农杆菌介导的基因转移	189
878	一、研究目的	156	828	二、用基因枪制备转基因水稻	
828	二、可利用的信息和试剂	156	828	和玉米	191
108	三、基本策略	157	828	第三节 转基因小鼠	193
108	四、注释	157	828	一、用受精卵细胞制备转基因	
108	五、可供参考的思路	158	828	小鼠	193
108	习题	159	828	二、通过干细胞的同源重组进行	
第六章 培养细胞中克隆基因的表达	161		828	基因敲除	195
808	第一节 基因调控的研究	161	118	三、人类疾病的转基因小鼠模型	199
808	一、表达载体	161	818	第四节 转基因家畜	200
808	二、报道基因	162	818	一、用转基因动物制备药物	201
808	三、反义技术	167		二、动物的体细胞克隆	202
108	四、RNA 干扰	169	818	第五节 实践 7: 敲除转基因鼠	
708	第二节 基因在细胞系中表达	169	818	产生特异基因	206
	的方法	171	818	一、研究目的	206

二、可利用的信息和试剂	206	三、基本策略	248
三、基本策略	206	四、注释	248
四、注释	207	五、思路扩展	249
五、可供参考的思路	208	习题	249
习题	208	第九章 基因治疗	251
第八章 人类基因鉴定和基因诊断	211	第一节 基因治疗的策略	251
第一节 内源基因突变引起的		一、体细胞基因治疗的策略	251
人类疾病	211	二、基因治疗的关键步骤	253
一、基因点突变和移码突变所导致		三、基因治疗的靶细胞选择	254
的遗传病	211	四、体细胞基因治疗的途径	254
二、基因的缺失、重复和重排导致的		第二节 基因转移的方法	256
遗传病	212	一、基因转移的非生物方法	256
三、动态突变	214	二、基因转移的病毒方法	257
四、癌基因突变和人类的肿瘤	216	第三节 基因治疗药物	262
五、基因印记	219	一、p53 基因	262
第二节 病毒感染引起的人类		二、siRNA	263
严重疾病	221	三、反义 RNA	265
一、禽流感	221	四、核酶	265
二、SARS	222	五、肽核酸	268
三、艾滋病	222	六、三链 DNA	269
四、普里昂病	223	七、自杀基因	271
第三节 基因定位、鉴别和诊断	225	八、短片段同源序列的更换技术	271
一、致病基因的定位	225	九、激活小 RNA	272
二、不同类型基因突变的检测	227	第四节 基因治疗的安全性	274
三、缺失和重复的检测	233	第五节 基因治疗的新方法	275
四、基因重排的检测	235	一、基因组编辑核酸酶	275
五、基因印记变异的检测	236	二、干细胞介导重编程	283
六、DNA 三核苷酸扩增的检测	237	三、通过核抑制治疗线粒体病	291
七、病原体的基因检测	237	第六节 实例 9: 利用 iPSC 治疗	
八、癌基因和抗癌基因突变的		艾滋病	291
检测	242	一、研究目的	291
第四节 产前诊断和设计婴儿	244	二、可利用的信息和试剂	292
一、产前诊断	244	三、基本策略	292
二、设计婴儿	246	四、注释	292
第五节 携带者的检出	247	五、可供参考的思路	293
第六节 实例 8: 奥尔波特综合征		习题	293
基因的检测	248	主要参考文献	294
一、研究目的	248	索引	297
二、可利用的信息和试剂	248	彩图	



绪 论

基因工程(gene engineering),也称为**基因修饰(genetic modification)**,是指按照人们的设计,用生物技术(biotechnology)直接操作生物的基因组。首先通过分离和拷贝目的基因或人工合成外源基因,在体外将外源基因插入到载体分子中,成为重组 DNA,再导入宿主细胞内,进行扩增和表达。此过程所涉及的方法学称为**重组 DNA 技术(recombinant DNA technology)**,也称为**分子克隆(molecular cloning)**或**基因操作(gene manipulation)**。

通过基因工程技术改变了遗传物质的生物称为**遗传修饰生物(genetically modified organism, GMO)**,也称为**转基因生物(transgenic organism)**。其实这两个概念是有差别的,转基因生物是指基因组中含有外源基因的生物,而遗传修饰生物除可能含有外源基因外,还包括基因组中的基因被修饰。例如,基因敲入(gene knockin)、基因敲除(gene knockout)、基因敲落(gene knockdown)、基因打靶(gene targeting)、外显子删除和定点突变(point mutation)等。所以遗传修饰生物的范围更为广泛。

基因工程通常不包括传统的动植物育种、体外受精、诱导多倍体、诱发突变及细胞融合技术。这些技术都不使用体外重组 DNA。而欧盟委员会曾定义基因工程包括选择育种。

体细胞克隆(somatic cell cloning)和干细胞(stem cell)技术虽不属于基因工程,但和基因工程密切相关,常用于基因工程。特别是 2007 年山中伸弥成功地实现了诱导多能细胞(iPSC)以来,干细胞诱导已成为基因治疗中一种新的策略。

一、基因工程的理论和技术基础及工作程序

(一) 基因工程所依赖的核心理论

基因工程所依赖的核心理论是:①1953 年美国的 J. D. Watson 和 F. H. C. Crick 建立的 DNA 的双螺旋模型;②1946 年美国的 J. L. Lederberg 等相继发现在细菌和噬菌体中遗传物质横向传递的一系列现象和规律;③1961 年法国的 F. Jacob 和 J. Monod 建立的操纵子模型;④美国的 M. W. Nirenberg(1964 年)和 H. G. Khorana(1967 年)分别破译了全部有义密码子。

(二) 基因工程所依赖的核心技术

基因工程所依赖的核心技术是:①1977 年英国 F. Sanger 等建立的 DNA 测序技术;②一系列重要工具酶的发现,特别是 1956 年美国 A. Kornberg 发现 DNA 聚合酶;1966 年 B. Weiss 和 C. C. Richardson 分离出 DNA 连接酶;1968 年美国 H. O. Smith 发现 II 类限制性内切核酸酶;1970 年 H. M. Temin 等发现反转录酶;③1973 年 S. N. Cohen 和 H. W. Boyer 等建立的质粒转化技术;④1987 年由美国的 K. B. Mullis 等建立的 PCR 体外扩增技术;⑤1989 年 M. R. Capecchi 等建立的“基因打靶”技术等使基因工程更是如虎添翼;⑥基因组编辑核酸酶的应用,能够定位和准确修饰生物基因组,这为研究基因功能、基因治疗创造了新的途径。

(三) 基因工程的工作程序

基因工程可分为五步:①“剪切”,即通过限制性内切核酸酶将目的基因交错切下,同时在精确位置上切开载体分子。通过凝胶电泳分离目的基因。PCR 技术也可用来分离和扩增目的基因片段。②“连接”。使用连接酶将切下的目的基因连接到载体分子中。③“转化”。将重组 DNA 分子导入能提供复制酶系的宿主活细胞中。④“扩增”。重组 DNA 分子在宿主细胞中通过自我复制增加拷贝数。⑤“表达和检测”。选择或鉴别含有重组 DNA 的宿主细胞,并以最佳的转录和翻译条件,以获得较多的基因产物。为了正常表达,基因插入到遗传修饰生物体需要和其他的基因元件组合。一个被插入的基因主要的结构不仅含有启动子和终止子,还需要连锁选择标记基因。检测是用 DNA 印迹杂交(Southern blot hybridization)和 DNA 测序来检验生物体是否含有新基因。这些检测能探明外源基因插入的位置和拷贝数,也可用来定位和测量基因产物(RNA 和蛋白质)。这些方法还包括 RNA 杂交(Northern hybridization)、定量反转录 PCR、蛋白质印迹(Western blot)、荧光免疫法、酶联免疫吸附实验(ELISA)及表型分析。

基因敲入是以 ES 细胞培养技术和同源重组为基础,通过转基因将外源基因整合到特定的靶位点,利用靶位点全套的表达调控元件以实现特异性的异位表达。基因敲除是将一个特地设计的 DNA 片段导入生物体中,通过同源重组使靶基因失活的实验技术。基因敲落是用反义技术、RNAi 等降低或抑制靶基因的表达活性。基因打靶是用同源重组来瞄准希望改变的特定内源基因。基因组重编程是用基因组编辑核酸酶,如锌指核酸酶(ZFN)、归巢核酸内切核酸酶(engineered meganuclease)、转录激活子样效应物(TALE)进行剪切。基因组编辑核酸酶也能用来介导内源基因的突变、损伤修复和敲除。

二、基因工程技术的建立与发展

(一) 基因工程的建立

基因工程的产生是生命科学发展的必然。自从遗传学诞生之后,随着对基因功能不断深入的研究,人们不仅想了解基因,而且还希望能改变它们,从而提高农作物的产量,改善生物体的性状,甚至用来防治遗传缺陷。早在 1927 年, H. J. Muller 就用 X 射线照射果蝇,诱导果蝇发生了突变。这是人类第一次主动改变生物体基因,但这种诱变及诱变育种仅能提高基因的突变频率,而不能按照人们的意愿改变基因突变的方向,得到预期的结果。

在 20 世纪 60 年代后期,分子遗传学的帷幕已经拉开,人们逐步掌握了微生物众多基因的功能,甚至可将噬菌体像手表一样的拆卸和组装。因此,一些遗传学家们误认为遗传学的发展已达到了“巅峰状态”,似乎很难有新的突破,因此有的遗传学家便改弦更张,转移到其他生命科学领域去寻找新的战机。例如,1955 年建立了染色体的精细作图方法和互补测验,并提出了“顺反子”概念的美国著名遗传学家 S. Benzer 于 20 世纪 60 年代后期改变了原来的研究方向,从事研究昆虫的神经生物学。此时,遗传学似乎已处在一个“山重水复疑无路”的状态。正当遗传学家们感到彷徨的时期,基因工程异军突起,石破天惊,震撼了整个世界,也冲击了人们的生活和观念,使遗传学的发展进入了一个“柳暗花明又一村”的新时代。

体外重组 DNA 这个设想首先是由斯坦福大学的 P. Lobban 于 1970 年提出的。1971 年, R. H. Jensen 等率先运用末端转移酶(terminal transferase)在试管中将寡聚“A”或寡聚“T”连接到 DNA 分子末端上;但这样的互补端还是无法以共价键连接。1972 年,斯坦福大学的