

普通高等教育“十三五”规划教材
国家精品课程建设教材
国家精品资源共享课教材

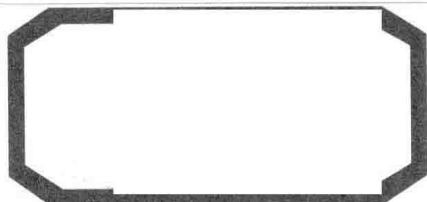
GENE ENGINEERING 基因工程

第二版

袁葵洲 编著



化学工业出版社



普通高等教育“十三五”规划教材
国家精品课程建设教材
国家精品资源共享课教材

GENE ENGINEERING
基因工程

第二版

袁葵洲 编著

范雄伟 邓云 李东屏 参编



化学工业出版社

· 北京 ·

《基因工程》第二版为国家精品课程建设教材、国家精品资源共享课教材，与教材配套有慕课视频可供学习。系统阐述基因工程的基本概念、基本原理、转基因技术的完整流程、基因工程操作的主要工具和关键技术及其最新进展，尤其是基因工程在组学和基因功能研究中的应用进展。

本教材主要内容包括三部分：一是基因工程的基本原理与基本技术，涉及工具酶和基因工程载体及常用的基因表达系统，目的基因获取、制备、扩增、导入与鉴定的各种方法，包括最新的高通量测序和单细胞测序技术等基因检测方法。二是基因工程用于功能基因组学的技术，包括基因表达谱研究技术、全基因组化学诱变和转座子饱和诱变技术、基因敲除与基因敲减技术、过表达和异位表达技术、染色质沉淀等基因相互作用研究技术等，这部分一直是本教材的特色和重点，第二版还大篇幅增加了TALEN和CRISPR基因编辑技术的发展历史和最新进展。三是基因工程在工农业生产和医学研究中的应用，包括转基因植物、转基因动物的制备与应用，转基因安全评价与监管，基因治疗的原理、策略与研究进展，尤其是免疫治疗的最新研究进展等。扫描书中二维码可见精美彩图。

本教材可用作国内高等院校及科研院所生物科学、生物技术、生物工程及基础医学和制药专业的本科生、研究生及科研人员学习的教材和参考书，也可作为对转基因技术和基因工程感兴趣的其他领域人士科普学习的参考书。

图书在版编目 (CIP) 数据

基因工程/袁葵洲编著.—2版.—北京：化学工业出版社，
2019.7

ISBN 978-7-122-34330-7

I. ①基… II. ①袁… 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 (2019) 第 071267 号

责任编辑：傅四周 赵玉清

文字编辑：向 东

责任校对：宋 玮

装帧设计：王晓宇

出版发行：化学工业出版社（北京市东城区青年湖南街13号 邮政编码100011）

印 装：大厂聚鑫印刷有限责任公司

787mm×1092mm 1/16 印张24½ 字数635千字 2019年9月北京第2版第1次印刷

购书咨询：010-64518888 售后服务：010-64518899

网 址：<http://www.cip.com.cn>

凡购买本书，如有缺损质量问题，本社销售中心负责调换。

定 价：69.00 元

版权所有 违者必究

《基因工程》第一版教材已经使用九年了。九年的时间，基因工程技术的发展日新月异，某些新技术和新进展甚至出现井喷式的发展与更替。早该将这些新技术和新进展写进教材，但由于各种原因，《基因工程》第二版的修订和编写工作较为缓慢，在这里对支持和热爱本教材的读者们致以深深的歉意。

《基因工程》第二版的修订和撰写工作主要从三个方面着手。一是订正第一版的错误。由于第一版教材编写匆忙，教材付印后发现有几处明显的小错误，在第二版已经得到更正。二是重新绘制了教材中原有的全部插图，并增加了较多原创的新插图，统一了插图的风格。对于教材中涉及的基因工程原理和技术，力求用更直观易懂的插图形式进行诠释，让读者更容易理解并加深印象。全部插图的电子版都可以在数字课程网站获取。其中基因工程载体一章，在教材中呈现的大多是载体的结构示意图，数字课程网站还补充了许多载体的详细结构图电子版，供学习者使用参考。第二版教材内容更新的第三个方面，是增加了基因工程技术最近几年的最新进展和应用，如“Golden Gate”一步克隆法、无缝连接克隆快线、新一代 DNA 测序技术、iPS 与体细胞克隆技术、TALEN 和 CRISPR 基因编辑技术、CAR-T 免疫治疗等。尤其是对有关高通量测序、基因编辑和免疫治疗技术的发展历程和最新进展，本教材进行了较全面的阐述和展望，“新”意十足，也饶有趣味。

教材第二版的架构略有调整，共分 10 章，主要是根据转基因操作的程序为主线，先介绍了基因工程操作的两大工具，接着阐述了目的基因获取的主要途径以及目的基因导入受体细胞和阳性转化子鉴定的主要方法，最后介绍了基因工程在基因功能研究、转基因植物、转基因动物和基因治疗等方面的应用及最新进展，其中以基因功能研究技术为重点。参加第二版教材编写的人员依然是湖南师范大学“基因工程”教学团队，其中邓云教授修改了第 2 章和第 3 章的部分内容，李东屏教授修改了第 8 章，范雄伟副教授倾情撰写了第 7 章、第 9 章和第 10 章的内容，其中 CRISPR 系统和 CAR-T 免疫治疗部分的综述让本教材妙趣横生。万永奇副教授提供了部分参考文献。袁葵洲教授修订和撰写了第二版教材的全部章节以及每章的章前导读与章后小结，并负责全书的提纲、统筹、组织、修订、插图绘制、创作与整理、书稿审查和校对等工作。在此对所有编写人员表示感谢！

第二版教材的插图绘制经过了几年时间的积累，其中湖南师范大学 2013 届生物科学专业和 2015 级生物技术专业及基地班的许多本科生同学参与了部分创作与绘制工作，在此也对这些同学的付出表示感谢！

本教材的编写和出版是在化学工业出版社的大力支持下完成的，感谢化学工业出版社的信任与支持。

本教材的出版也得到基因工程国家精品课程建设项目、基因工程国家精品资源共享课建设项目以及基因工程湖南省精品在线开放课程建设项目和湖南师范大学精品在线开放课程建设项目的资助和支持。

与教材内容配套的慕课短视频也制作完成，由袁葵洲教授、范雄伟副教授以及万永奇副教授讲授，已在智慧树和爱课程网在线开放。欢迎读者同步使用教材和慕课短视频进行学习。

限于经验、学识和水平，尽管已反复校订，但书中不足之处在所难免，恳请读者和同行继续不吝指教为谢。

袁葵洲

2019年6月于岳麓山下

基因工程技术自 1973 年诞生之后,以惊人的速度飞速发展,其应用成果已经渗透到人们生活和工农业生产的各个领域,成为生物技术中发展速度最快、创新成果最多、应用前景最广的一门核心技术。基因工程课程也已成为国内外高校生物技术和生物科学专业本科生的专业主干课程。

湖南师范大学生命科学学院自 1997 年开始为硕士研究生开设基因工程课程,是全院唯一一门硕士研究生的专业基础课程。2002 年开始为生物技术专业和国家生命科学技术人才培养基地的本科生开设基因工程专业课,现在授课对象已经扩展到了生物科学专业和树达学院生物技术专业的本科生。2008 年,湖南师范大学基因工程本科教学项目相继获得学校和湖南省教育厅的精品课程建设立项,2009 年获得国家教育部的精品课程建设立项。2006 年之前,我们一直使用马建岗编写的《基因工程原理》作为教材,2006 年以后选用了李立家和肖庚富编著的《基因工程》教材。为了配合《基因工程》国家精品课程的建设,及时跟踪学科发展前沿,我们于 2009 年底开始着手编写这一本新的《基因工程》教材。

如今,生命科学已经进入功能基因组时代。基因工程在现阶段的主要特色就是基因工程技术与功能基因组学的完美结合与相互促进,因此本教材的主要特点就是第一次详细介绍了基因工程在基因功能研究中的应用,而功能基因组研究的需求又促使基因工程技术不断向前发展。对于师范类高校和综合性大学的生命科学相关专业的本科生来说,目前国内的就业去向主要有两个,一是去国内外高校和科研院所继续深造、读研和攻博,二是去大专院校、科研院所以及生物制剂和制药公司从事教学、科研、研发和销售工作。不管哪一种去向,大部分的工作内容都会或多或少与基因工程及功能基因组学的研究技术打交道,因此本教材将基因工程技术与功能基因组学结合起来也适应了大学生就业的市场需求。

本教材共 8 章,由湖南师范大学生命科学学院基因工程本科教学团队的教师们编写完成。袁葵洲教授负责全书的提纲拟定、统筹、组织、编写、修订、图片收集、扫描、绘制与整理、章前导读与章后小结的撰写、书稿审查和校对等工作,并独立编写了教材第 1 章、第 3 章、第 7 章和第 8 章的内容,第 2 章由邓云副教授编写,第 5 章由李东屏副教授编写,第 4 章由万永奇博士编写,第 6 章由唐文岷讲师编写,博士研究生周军媚参与了第 3 章计算机克隆目的基因内容的编写工作。教材编写过程中得到

了吴秀山教授和生命科学学院领导的支持。在此对所有编写人员及支持本书编写的所有老师和同学表示感谢!

本书的编写和出版是在化学工业出版社刘畅编辑的督促下启动和完成的,与刘畅编辑的多次愉快的交流让本书由设想变为现实。感谢刘畅编辑的信任与支持!

本书的出版得到基因工程国家精品课程建设项目、基因工程湖南省精品课程建设项目、湖南师范大学精品课程建设项目以及湖南师范大学出版基金的资助。同时感谢化学工业出版社的大力支持!

限于经验和水平,加之时间仓促,书中错漏定有不少,恳请读者和同行批评指正!

袁葵洲

2010年5月于岳麓山下

1 基因工程概述 / 001

- 1.1 基因工程的概念与基本流程 / 001
 - 1.1.1 基因工程的概念 / 001
 - 1.1.2 基因工程的基本流程 / 002
- 1.2 基因工程的发展简史 / 003
 - 1.2.1 基因工程诞生的背景 / 003
 - 1.2.2 基因工程的诞生 / 004
 - 1.2.3 基因工程的发展 / 006
- 1.3 基因工程的研究意义和应用 / 007
 - 1.3.1 基因工程在功能基因组学研究中的应用 / 007
 - 1.3.2 基因工程在工业领域的应用 / 008
 - 1.3.3 基因工程在农业领域的应用 / 009
 - 1.3.4 基因工程在医药领域的应用 / 011

本章小结 / 013

复习题 / 013

2 基因工程工具酶 / 014

- 2.1 限制性核酸内切酶 / 014
 - 2.1.1 限制性核酸内切酶的发现和种类 / 014
 - 2.1.2 限制性核酸内切酶的命名 / 016
 - 2.1.3 限制性核酸内切酶的特征 / 016
 - 2.1.4 限制性核酸内切酶的同尾酶 / 018
 - 2.1.5 影响限制性核酸内切酶酶切反应的因素 / 020
 - 2.1.6 限制性核酸内切酶酶切位点的引入与消失 / 022
- 2.2 DNA 连接酶 / 023
 - 2.2.1 DNA 连接酶的作用 / 023
 - 2.2.2 不同末端的连接策略 / 025
 - 2.2.3 影响 DNA 连接反应的因素 / 027
- 2.3 DNA 聚合酶类 / 029
 - 2.3.1 大肠杆菌 DNA 聚合酶 I / 029
 - 2.3.2 Klenow 大片段酶 / 030
 - 2.3.3 耐热的 DNA 聚合酶 *Taq* / 030

2.3.4 T₄ 噬菌体 DNA 聚合酶 / 031

2.3.5 逆转录酶 / 032

2.4 碱性磷酸酶 / 033

2.4.1 碱性磷酸酶防止载体自连 / 033

2.4.2 获得 5' 末端磷酸基团标记的探针 / 036

2.5 末端脱氧核苷酸转移酶 / 036

2.6 其他工具酶 / 037

2.6.1 II s 型限制性核酸酶 / 038

2.6.2 Cas 核酸内切酶 / 039

2.6.3 Dicer 酶 / 039

2.6.4 重组酶 / 040

本章小结 / 043

复习题 / 043

3 基因工程载体 / 044

3.1 克隆载体 / 044

3.1.1 质粒载体 / 045

3.1.2 噬菌体载体 / 053

3.1.3 黏粒载体 / 057

3.1.4 人工微小染色体 / 058

3.2 表达载体 / 060

3.2.1 原核表达载体 / 060

3.2.2 真核表达载体 / 072

本章小结 / 076

复习题 / 076

4 目的基因的获取与制备 / 077

4.1 从基因文库获取目的基因 / 078

4.1.1 基因组文库的构建与筛选 / 078

4.1.2 cDNA 基因文库的构建与筛选 / 083

4.2 电子克隆法获取目的基因 / 092

4.2.1 利用 EST 数据库进行电子克隆 / 093

4.2.2 利用基因组数据库进行电子克隆 / 093

4.2.3 全长 cDNA 的判断 / 094

4.2.4 电子克隆基因的生物信息学分析 / 095

4.3 PCR 获取与扩增目的基因 / 095

4.3.1 常规 PCR / 095

4.3.2 反向 PCR / 102

4.3.3 反转录 PCR / 104

- 4.3.4 实时荧光定量 PCR / 105
- 4.3.5 多重 PCR / 110
- 4.3.6 巢式 PCR / 113
- 4.3.7 不对称 PCR / 113
- 4.3.8 RACE-PCR / 114
- 4.3.9 原位 PCR / 114
- 4.4 通过蛋白质工程改建目的基因 / 116
 - 4.4.1 蛋白质工程的概念 / 116
 - 4.4.2 蛋白质工程的定点突变技术 / 117
 - 4.4.3 蛋白质工程的定向进化技术 / 121
- 本章小结 / 123
- 复习题 / 124

5 目的基因导入受体细胞的方法 /125

- 5.1 把目的基因导入大肠杆菌 / 126
 - 5.1.1 自然条件下的转化过程 / 126
 - 5.1.2 感受态受体细胞的选择 / 128
 - 5.1.3 外源目的基因转化进入大肠杆菌细胞的方法 / 129
 - 5.1.4 外源基因通过噬菌体转导进入受体细胞 / 131
- 5.2 把目的基因导入酵母细胞 / 133
 - 5.2.1 聚乙二醇介导的酵母转化 / 133
 - 5.2.2 金属阳离子介导的酵母转化 / 134
- 5.3 把目的基因导入植物细胞 / 134
 - 5.3.1 DNA 直接转移法 / 135
 - 5.3.2 农杆菌 Ti 质粒载体介导法 / 137
- 5.4 把目的基因导入动物细胞 / 141
 - 5.4.1 外源基因导入离体培养的动物细胞 / 142
 - 5.4.2 外源基因导入在体动物细胞 / 144
- 本章小结 / 147
- 复习题 / 147

6 阳性转化子的鉴定 /148

- 6.1 遗传表型检测法 / 148
 - 6.1.1 利用载体提供的表型特征筛选和鉴定重组 DNA 分子 / 149
 - 6.1.2 利用外源目的基因本身的序列提供的表型特征筛选 / 153
- 6.2 酶切电泳检测 / 155
 - 6.2.1 凝胶电泳检测筛选 / 155
 - 6.2.2 限制性核酸内切酶酶切分析筛选 / 156
- 6.3 核酸分子杂交 / 158

- 6.3.1 Southern 印迹杂交 / 159
- 6.3.2 Northern 印迹杂交 / 164
- 6.3.3 蛋白质印迹分析 / 167
- 6.4 PCR 扩增鉴定筛选 / 168
- 6.5 DNA 序列测定 / 169
 - 6.5.1 Sanger 双脱氧末端终止法 / 169
 - 6.5.2 化学降解法 / 171
 - 6.5.3 自动测序法 / 172
 - 6.5.4 二代测序技术 / 173
 - 6.5.5 三代测序技术 / 176
 - 6.5.6 单细胞测序技术 / 179
 - 6.5.7 高通量测序在组学研究中的应用 / 180
- 本章小结 / 184
- 复习题 / 184

7 基因工程在基因功能研究中的应用 /185

- 7.1 基因的表达谱研究技术 / 185
 - 7.1.1 胚胎原位杂交技术 / 186
 - 7.1.2 胚胎抗体染色技术 / 190
 - 7.1.3 基因芯片技术 / 194
- 7.2 基因的突变研究技术 / 199
 - 7.2.1 化学诱变 / 199
 - 7.2.2 转座子全基因组诱变 / 200
- 7.3 基因敲除技术 / 204
 - 7.3.1 完全基因敲除技术 / 204
 - 7.3.2 条件基因敲除技术 / 209
- 7.4 基因编辑技术 / 214
 - 7.4.1 锌指核酶基因敲除技术 / 215
 - 7.4.2 TALEN 基因编辑技术 / 218
 - 7.4.3 CRISPR 基因编辑技术 / 221
- 7.5 基因敲减技术 / 241
 - 7.5.1 RNA 干扰技术 / 241
 - 7.5.2 Morpholino 干扰技术 / 244
- 7.6 基因过表达与异位表达技术 / 246
 - 7.6.1 GAL4/UAS 系统的构建 / 247
 - 7.6.2 GAL4/UAS 定时开启系统 / 248
- 7.7 基因的相互作用研究技术 / 249
 - 7.7.1 凝胶迁移率阻滞技术 / 250
 - 7.7.2 染色质免疫沉淀技术 / 250

7.7.3 酵母双杂交技术 / 253

7.7.4 免疫共沉淀技术 / 256

本章小结 / 257

复习题 / 258

8 转基因植物 /259

8.1 转基因植物研究和生产现状 / 260

8.1.1 转基因植物的研究概况 / 260

8.1.2 抗除草剂转基因作物 / 261

8.1.3 抗虫转基因作物 / 263

8.1.4 提高作物产量和品质的转基因作物 / 266

8.1.5 其他转基因作物 / 268

8.1.6 植物生物反应器 / 273

8.2 转基因植物的筛选与检测 / 275

8.2.1 报告基因 / 275

8.2.2 分子生物学检测方法 / 277

8.3 转基因植物的安全性 / 278

8.3.1 转基因安全性的由来 / 279

8.3.2 转基因安全性的争论 / 279

8.3.3 转基因作物安全性评价程序 / 284

8.3.4 转基因作物安全性的监管 / 285

本章小结 / 287

复习题 / 287

9 转基因动物 /288

9.1 动物转基因技术 / 289

9.1.1 显微注射法 / 289

9.1.2 逆转录病毒感染法 / 294

9.1.3 胚胎干细胞介导法 / 297

9.1.4 体细胞核移植法 / 299

9.2 转基因动物的筛选与检测 / 305

9.2.1 报告基因 / 305

9.2.2 分子生物学检测方法 / 306

9.2.3 转基因动物整体表型的观察 / 309

9.3 转基因动物的现状与应用 / 309

9.3.1 转基因动物的现状 / 309

9.3.2 转基因动物在基因功能研究中的应用 / 310

9.3.3 转基因技术在动物育种中的应用 / 311

9.3.4 转基因动物在医学研究中的应用 / 313

9.3.5 动物生物反应器 / 314

本章小结 / 318

复习题 / 318

10 基因治疗 /319

10.1 基因治疗的概念与策略 / 319

10.1.1 基因治疗的途径与策略 / 320

10.1.2 基因治疗的基本程序 / 321

10.1.3 基因治疗的发展、现状与问题 / 323

10.2 基因治疗的载体 / 328

10.2.1 逆转录病毒载体 / 328

10.2.2 腺病毒载体 / 329

10.2.3 腺相关病毒载体 / 332

10.2.4 单纯疱疹病毒载体 / 333

10.2.5 非病毒载体 / 335

10.3 重要疾病的基因治疗 / 336

10.3.1 遗传病的基因治疗 / 336

10.3.2 肿瘤的基因治疗 / 342

10.3.3 艾滋病的基因治疗 / 358

本章小结 / 367

复习题 / 367

参考书目与文献 /368

1

基因工程概述

□ 本章导读

基因工程是发展最快的一种生物技术，在生物技术中处于核心地位。本章介绍了基因工程的基本概念、基本流程以及基因工程诞生与发展的历史背景与简要过程。基因工程具有巨大的应用前景，在生命科学基础研究领域、工农业生产领域以及医药领域都取得了丰硕的应用成果。

21 世纪是生命科学的世纪，而生命科学的核心则是生物技术。以生物技术和分子生物学为主体的现代生命科学已经成为带动和影响其他学科发展的领头学科。建立在分子生物学和遗传学基础之上的基因工程则是生物技术中发展速度最快、创新成果最多、应用前景最广的一门核心技术，它的显著特点是能够跨越生物种属之间不可逾越的鸿沟，打破常规育种难以突破的物种界限，开辟在短时间内改造生物遗传特性的新领域。基因工程使得原核生物与真核生物之间、动物与植物之间以及人和其他生物之间的遗传信息可以进行重组和转移，因而基因工程成为当今生命科学领域中最具生命力、最引人注目的学科之一。

1.1 基因工程的概念与基本流程

1.1.1 基因工程的概念

基因工程 (gene engineering) 是指采用类似于工程设计的方法，根据人们事先设计的蓝图，人为地在体外将外源目的基因插入质粒、病毒或其他载体中，构建重组载体 DNA 分子，并将重组载体分子转移到原先没有这类目的基因的受体细胞中去扩增和表达，从而使受体或受体细胞获得新的遗传特性，或形成新的基因产物。基因工程又叫遗传工程 (genetic engineering)、分子克隆 (molecular cloning)、基因克隆 (gene cloning)、重组 DNA 技术 (recombinant DNA technique) 或转基因技术 (transgenic technique)。

通俗地说，基因工程就是指将一种供体生物体的目的基因与适宜的载体在体外进行拼接重组，然后转入另一种受体生物体内，使之按照人们的意愿稳定遗传并表达出新的基因产物或产生新的遗传性状的 DNA 体外操作技术。所以供体基因、受体细胞和载体是基因工程技术的三大基本元件。

随着基因工程技术的不断发展，对基因工程概念的理解也包含狭义和广义两个层面。狭

义的基因工程侧重于基因重组和将外源目的基因“转入”受体生物的操作。而广义的基因工程则不仅包括把外源基因“转入”生物，也包括把生物的内源基因进行修饰和剔除，就好比将内源基因“转出”，使生物获得基因被修饰了的新性状。两者都是对生物体的基因或基因组进行人工修饰和操作，所以基因工程也被称为基因修饰（gene modification）或基因编辑（gene editing），转基因生物也被称为基因修饰生物或遗传修饰生物（genetic modified organism, GMO）。

1.1.2 基因工程的基本流程

根据基因工程的概念，目前通常把基因工程的基本流程分为如下五个环节（图 1.1）。

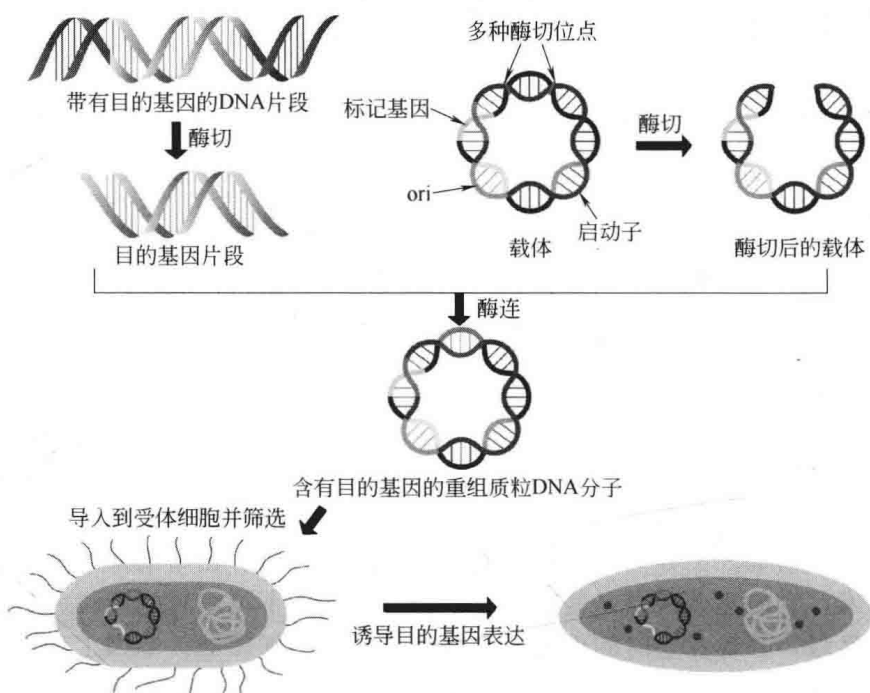


图 1.1 基因工程的基本流程

(1) 目的基因的分离、获取与制备

目的基因是基因工程操作的核心对象。所以基因工程的第一步是获取与制备目的基因。可以将复杂的生物体基因组经过酶切消化等步骤，先构建基因组文库，再从文库中分离带有目的基因的 DNA 片段；或利用逆转录的方法，从 mRNA 出发，逆转录获得 cDNA 作为目的基因；也可以用酶学或化学合成的方法人工合成序列比较短的目的基因；还可以利用目前应用非常普遍的 PCR（聚合酶链反应）技术从供体生物基因组或已有的目的基因的克隆中直接体外扩增一个目的基因，等等。

(2) 目的基因与载体连接构建成为重组载体分子

目的基因只是一段 DNA 片段，可能往往不是一个完整的复制子，它自身不太可能以高效率直接进入受体细胞中去扩增和表达，因此必须借助于运输和转移目的基因的工具即基因工程载体（vector）才能导入到受体细胞中。基因工程载体包括质粒、噬菌体、病毒、黏粒及人工微小染色体等。选择什么类型的载体要根据基因工程的目的和受体细胞的性质来决定。只有将目的基因与载体在体外连接形成重组载体 DNA 分子，才能将目的基因有效地导入到受体细胞进行扩增和表达。

(3) 重组 DNA 分子导入到受体细胞

体外构建的重组 DNA 分子必须导入受体细胞中才能扩增和表达。重组 DNA 分子导入受体细胞的方法根据载体及受体细胞的不同而不同。若受体细胞为细菌和酵母细胞,则主要采取化学转化和电场转化的方法导入重组载体;若受体细胞为植物细胞,则主要采用基因枪法或 Ti 质粒导入的方法;若受体细胞为动物细胞,则重组载体的导入可采用显微注射法、逆转录病毒法、ES 细胞(即胚胎干细胞)法及体细胞核移植等方法;若受体细胞为人体细胞,则主要采取逆转录病毒、腺病毒或腺相关病毒等载体导入法。

(4) 外源目的基因阳性克隆的鉴定和筛选

外源目的基因通过重组载体转移到受体细胞后,重组载体是否构建成功、是否构建正确、是否成功转入受体细胞以及外源基因是否插入到受体细胞的基因组、是否能够完整复制与表达是必须一步一步经过筛选和鉴定的。含有外源目的基因的受体细胞繁殖的后代叫阳性克隆或阳性转化体。阳性克隆的筛选和鉴定方法可以根据载体上的遗传筛选标记基因或目的基因本身的表达性状来鉴定,也可以通过酶切检测、PCR、核酸分子杂交及 DNA 测序等分子生物学的方法来鉴定。

(5) 外源目的基因的表达

让外源目的基因表达是基因工程操作的终极目的。通过上一步骤筛选和鉴定到阳性细胞克隆后,最后一个步骤就是让外源目的基因实现表达。根据基因工程不同的操作目的及不同的受体细胞类型,选择不同的表达载体,分别将目的基因导入原核细胞或导入真核细胞,通过表达载体的调控元件使目的基因在新的背景下实现功能表达,产生人们所需要的物质;或使受体细胞获得新的遗传特性。

对于受体细胞是酵母、植物、动物或人类等真核细胞的基因工程操作,含有目的基因的重组载体在最终导入这些真核受体细胞之前,一般都会先被导入原核细胞进行复制扩增和重组载体的筛选和鉴定,确认重组载体构建成功并构建正确后,再转入真核细胞内让目的基因表达,获得基因工程产品或制备转基因动植物以及实现人类基因治疗等。

1.2 基因工程的发展简史

1.2.1 基因工程诞生的背景

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,在微生物遗传学和分子遗传学研究领域中的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

① 发现了生物的遗传物质是 DNA 而不是蛋白质。1934 年, Avery 等在美国的一次学术会议上首次报道了肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 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 的工作不仅证明了 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。正如诺贝尔奖获得者 Lederberg 指出的, Avery 的工作是现代生物技术革命的开端,也可以说是基因工程的先导。

② 明确了 DNA 的双螺旋结构和半保留复制机制。1953 年, J. D. Watson 和 H. C. Crick 提出了 DNA 分子的双螺旋结构模型,这对生命科学的意义足以和达尔文学说、孟德尔定律

相提并论。1958年，M. Meselson 和 F. W. Stahl 提出的 DNA 的半保留复制模型及随后提出的蛋白质合成的中心法则证明遗传信息是从 DNA→RNA→蛋白质，从而在分子水平上揭示了神秘的遗传现象，为遗传和变异的操作提供了理论依据。

③ 遗传密码子的破译。1961年，Monod 和 Jacob 提出了操纵子 (operon) 学说，为基因表达调控提供了新理论。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年破译了全部 64 个密码，编排了一本密码子字典，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了理论基础。

(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定了基因工程操作的可能性，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，尤其是真核生物相当巨大的基因组 DNA，仍然是束手无策、难以操作。在细胞外发现和使用工具酶及载体为基因工程的实际操作奠定了基础。

① 利用限制性核酸内切酶和 DNA 连接酶体外切割和连接 DNA 片段。1970年，H. O. Smith 和 K. W. Wilcox 报道在流感嗜血菌 (*Haemophilus influenzae*) Rd 菌株中发现了第一种 II 型限制性核酸内切酶，Hind II，使 DNA 分子在体外切割成为可能。1972年，Boyer 实验室又发现了一种叫 EcoR I 的限制性核酸内切酶，这种酶每当遇到 GAATTC 这样的 DNA 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的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特殊的 DNA 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 5 个实验室几乎同时发现了 DNA 连接酶，这种酶能参与 DNA 切口的修复。1970年，美国的 Khorana 实验室发现的 T₄ DNA 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。

② 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 片段连接到一种能够自我复制的特定 DNA 分子上。这种 DNA 分子就是基因工程的载体 (vector)。基因工程载体的研究先于限制性核酸内切酶。从 1946 年起，Lederberg 就开始研究细菌的致育因子 F 质粒，到 20 世纪 50~60 年代相继在大肠杆菌中发现抗药性 R 质粒和大肠杆菌素 Col 质粒。1973年，Cohen 将质粒作为基因工程的载体使用，获得基因工程实验的成功。

③ 逆转录酶的使用打开了真核生物基因工程的一条通路。1970年，Baltimore 等和 Temin 等同时各自发现了逆转录酶，逆转录酶功能的发现不但打破了早期的中心法则，也使真核生物目的基因的制备成为可能。

1.2.2 基因工程的诞生

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 分别进行酶切消

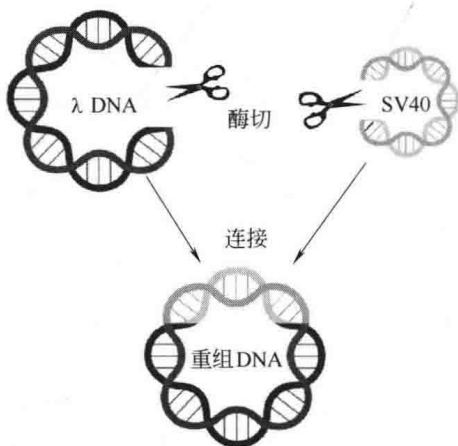


图 1.2 1972 年，P. Berg 与他的学生构建的世界上第一个体外重组的 DNA 分子