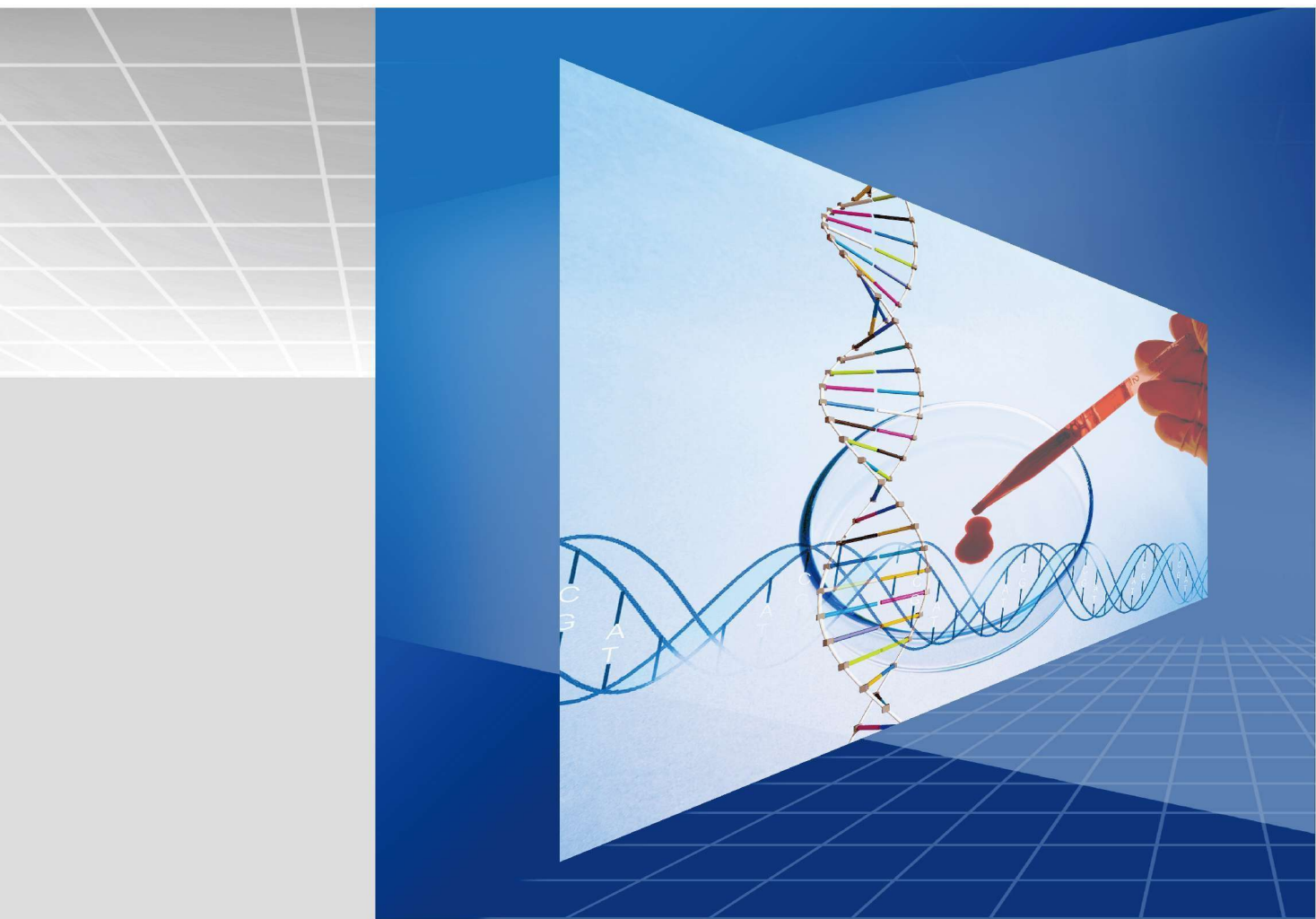


现代生物化学工程丛书

基因工程简明教程

叶江 张惠展 / 编著



华东理工大学出版社
EAST CHINA UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY PRESS

现代生物化学工程丛书

基因工程简明教程

叶江 张惠展 编著

 華東理工大學出版社
EAST CHINA UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY PRESS

· 上海 ·

图书在版编目(CIP)数据

基因工程简明教程 / 叶江, 张惠展编著. —上海:
华东理工大学出版社, 2015.8

ISBN 978-7-5628-4347-4

I. ①基… II. ①叶… ②张… III. ①基因工程—
教材 IV. ①Q78

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2015)第 175172 号

内 容 提 要

本书以基因表达调控原理与基因工程的支撑技术为前提,主要论述了三部分内容:涉及基因高效表达、重组表达产物活性回收、基因工程菌(细胞)稳定生产等基因工程基本原理;包括 DNA 的切接反应、重组 DNA 分子的转化、转化子的筛选与重组子的鉴定五大基因工程单元操作;以大肠杆菌和酵母两个典型的基因工程受体系统为主线,结合具体的产业化案例,归纳出基因工程技术的实际应用战略。

本书可作为高等院校生物工程、生物技术、食品工程等专业本科生学习“基因工程”课程的教材,课堂教学建议学时为 32 学时,也可供从事生物工程技术研究和开发的人员参考。

现代生物化学工程丛书

基因工程简明教程

编 著 / 叶 江 张惠展

责任编辑 / 焦婧茹

责任校对 / 李 晔

出版发行 / 华东理工大学出版社有限公司

地 址:上海市梅陇路 130 号, 200237

电 话:(021)64250306(营销部)

(021)64252344(编辑室)

传 真:(021)64252707

网 址:press.ecust.edu.cn

印 刷 / 常熟市新骅印刷有限公司

开 本 / 787 mm × 1092 mm 1/16

印 张 / 14.75

字 数 / 374 千字

版 次 / 2015 年 8 月第 1 版

印 次 / 2015 年 8 月第 1 次

书 号 / ISBN 978-7-5628-4347-4

定 价 / 38.00 元

联系我们:电子邮箱 press@ecust.edu.cn

官方微博 e.weibo.com/ecustpress

天猫旗舰店 <http://hdlgdxcb.tmall.com>



前 言

20 世纪 70 年代,新兴技术基因工程的诞生标志着人类开启了深入认识生命本质并能改造生命的新时期。作为一项操作生物遗传信息的现代生物技术,基因工程以细胞生物学、分子生物学和分子遗传学的基本理论体系作为指导,在基因的分离克隆、基因表达调控机制的诠释、基因编码产物的产业化、生物遗传性状的改良乃至基因治疗等方面日益显示出极高的实用价值。基因工程正以其迅猛发展和层出不穷的成果驱动着人类社会生活方式发生重大变革。

本书从基因表达调控的基本原理和基因工程的支撑技术入手,在介绍基因工程基本条件的前提下,将 DNA 重组技术流程分为切、接、转、增、检五大单元操作;在简要阐述目的基因分离克隆战略的基础上,分别以大肠杆菌和酵母两个典型的基因工程受体系统为主线,结合具体的产业化案例,逐一论述基因工程应用的设计思想。

编者在已编著的《基因工程概论》和《基因工程》的基础上,结合不断充实的教学讲义和经验体会,另外参考了 *Molecular Biology* (Fifth Edition, Robert F. Weaver 著,2011 年),*Molecular Biology of the Gene* (Seventh Edition, James D. Watson 等著,2013 年)等书籍,对相关内容进行了删减、修订与增补,因而更适合供高等院校生物工程、生物技术、食品工程等专业的本科生学习“基因工程”课程时作为教材,也可供从事生物工程技术研究和开发的人员参考。

在本书的编写过程中张玉琛和林岩威帮助收集了部分资料,夏慧和侯兵兵帮助校对书稿,编者在此对他们的辛勤劳动表示衷心的感谢。

真诚欢迎专家及其他读者朋友们对本书提出宝贵意见。

编者

2015 年 5 月

目 录

CONTENTS

第 1 章 概述

- 1.1 基因工程的基本概念 1
- 1.2 基因工程的发展历史 5
- 1.3 基因工程的研究意义 7

第 2 章 基因表达调控的原理与技术

- 2.1 启动子调控模型 10
 - 2.1.1 启动子的组成及其功能 10
 - 2.1.2 启动子的顺式增强作用 14
 - 2.1.3 启动子的反式协同作用 16
 - 2.1.4 启动子结构的多样性 19
- 2.2 操纵子调控模型 22
 - 2.2.1 操纵子基因表达调控的基本原理 22
 - 2.2.2 乳糖操纵子 24
 - 2.2.3 半乳糖操纵子 28
 - 2.2.4 阿拉伯糖操纵子 29
 - 2.2.5 色氨酸操纵子 30
 - 2.2.6 λ 噬菌体的操纵子 31
- 2.3 感受应答调控模型 34
 - 2.3.1 感受应答调控模型的基本原理 34
 - 2.3.2 真核生物转录调控元件的相互作用 37
 - 2.3.3 真核生物转录调控因子的激活方式 39

2.4 RNA 结构调控模型	40
2.4.1 终止子的工作原理	40
2.4.2 衰减子的工作原理	42
2.4.3 反义子的工作原理	44
2.5 RNA 剪切编辑调控模型	46
2.6 基因工程的支撑技术	47
2.6.1 核酸凝胶电泳技术	47
2.6.2 核酸分子杂交技术	49
2.6.3 细菌转化转染技术	55
2.6.4 聚合酶链反应技术	59
2.6.5 DNA 序列分析技术	64
2.6.6 寡核苷酸合成技术	67
2.6.7 基因定点突变技术	70
第 3 章 基因工程的单元操作	
3.1 工具酶	74
3.1.1 限制性核酸内切酶	74
3.1.2 T4 DNA 连接酶	79
3.1.3 DNA 聚合酶	79
3.1.4 核酸酶	82
3.1.5 核酸修饰酶	83
3.2 载体	84
3.2.1 质粒载体	85
3.2.2 λ 双链噬菌体 DNA 载体	90
3.2.3 M13 单链噬菌体 DNA 载体	95
3.2.4 噬菌体/质粒杂合载体	97
3.2.5 人造染色体载体	99
3.3 受体细胞	99
3.4 DNA 的体外重组(切与接)	101
3.4.1 DNA 切接反应的影响因素	102
3.4.2 DNA 分子重组的方法	105
3.5 重组 DNA 分子的转化与扩增(转与增)	112
3.5.1 转化率及其影响因素	112
3.5.2 转化细胞的扩增	114
3.6 转化子的筛选与重组子的鉴定(检)	114

3.6.1	基于载体遗传标记的筛选与鉴定	114
3.6.2	基于克隆片段序列的筛选与鉴定	117
3.6.3	基于外源基因表达产物的筛选与鉴定	123
3.7	目的基因的克隆	126
3.7.1	鸟枪法	126
3.7.2	cDNA 法	129
3.7.3	PCR 扩增法	137
3.7.4	化学合成法	141
3.7.5	基因文库的构建	142
第 4 章 大肠杆菌的基因工程		
4.1	外源基因在大肠杆菌中的高效表达原理	147
4.1.1	启动子	147
4.1.2	终止子	152
4.1.3	SD 序列	153
4.1.4	密码子	154
4.1.5	质粒拷贝数	155
4.2	大肠杆菌工程菌的构建策略	157
4.2.1	包涵体型异源蛋白的表达	157
4.2.2	分泌型异源蛋白的表达	161
4.2.3	融合型异源蛋白的表达	164
4.2.4	寡聚型异源蛋白的表达	168
4.2.5	整合型异源蛋白的表达	171
4.2.6	蛋白酶抗性或缺陷型表达系统的构建	173
4.3	重组异源蛋白的体外复性活化	175
4.3.1	包涵体的溶解与变性	175
4.3.2	异源蛋白的复性与重折叠	177
4.4	大肠杆菌工程菌培养的最优化控制	182
4.4.1	细菌生长的动力学原理	182
4.4.2	发酵过程的最优化控制	184
4.4.3	大肠杆菌工程菌的高密度发酵	187
4.5	基因工程菌的遗传不稳定性及其对策	189
4.5.1	工程菌遗传不稳定性的表现与机制	189
4.5.2	改善工程菌不稳定性的对策	190
4.6	利用重组大肠杆菌生产人胰岛素	193

4.6.1 胰岛素的结构及其生物合成	193
4.6.2 人胰岛素的生产方法	194
4.6.3 产人胰岛素大肠杆菌工程菌的构建策略	195
第5章 酵母的基因工程	
5.1 酵母的受体系统	198
5.1.1 提高重组异源蛋白产率的突变型受体	198
5.1.2 抑制超糖基化作用的突变型受体	199
5.1.3 减少泛素依赖型蛋白降解作用的突变型受体	200
5.1.4 内源性蛋白酶缺陷型的突变型受体	201
5.2 酵母的载体系统	202
5.2.1 酿酒酵母中的 2 μ 环状质粒	202
5.2.2 乳酸克鲁维酵母中的线状质粒	203
5.2.3 果蝇克鲁维酵母中的环状质粒	203
5.2.4 含有 ARS 的 YRp 和 YEp 质粒及其构建	204
5.2.5 含有 CEN 的 YCp 载体及其构建	205
5.2.6 含有 TEL 的 YAC 载体及其构建	205
5.3 酵母的转化系统	207
5.3.1 酵母的转化程序	207
5.3.2 转化质粒在宿主细胞中的命运	208
5.3.3 用于转化子筛选的标记基因	209
5.4 酵母的表达系统	211
5.4.1 酵母启动子的基本特征与选择	211
5.4.2 酵母启动子的可调控表达系统	212
5.4.3 外源基因在酵母中表达的限制性因素	214
5.4.4 酵母表达系统的选择	215
5.5 酵母的蛋白修饰分泌系统	219
5.5.1 酵母的蛋白质分泌运输机制	219
5.5.2 酵母的信号肽及其剪切系统	220
5.5.3 酵母分泌型蛋白的糖基化修饰	221
5.6 利用重组酵母生产乙肝疫苗	224
5.6.1 乙肝病毒的结构	224
5.6.2 产乙肝表面抗原的重组酿酒酵母构建	225
5.6.3 产乙肝表面抗原的重组巴斯德毕赤酵母构建	225
5.7 利用重组酵母生产人血清清蛋白	226

第 1 章 概 述

分子生物学从 1953 年诞生以来,建立了以 DNA 复制、转录和遗传密码翻译为内容的中心法则,开创了分子遗传学基本理论建立和发展的黄金时代。分子生物学理论和技术发展的积累使得基因工程技术的出现成为必然。20 世纪 70 年代,基因工程技术的问世成为分子生物学发展的新里程碑,标志着人类深入认识生命本质并能动改造生命的新时期开始。基因工程对生物、医药和农业等领域都产生了革命性的影响,它正驱动着人类生活方式发生重大变革。

1.1 基因工程的基本概念

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,基因工程是指将一种或多种生物体(供体)的基因与载体在体外进行拼接重组,然后转入另一种生物体(受体)内,使之按照人们的意愿遗传并表达出新的性状。因此,供体、受体、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 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 重组分子大都需要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技术(molecular cloning)。

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、表达的设计与构建(即狭义的基因工程);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。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,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。

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(图 1-1)。前者主要在实验室里进行,其基本单元操作过程如下:

(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,构成 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”);

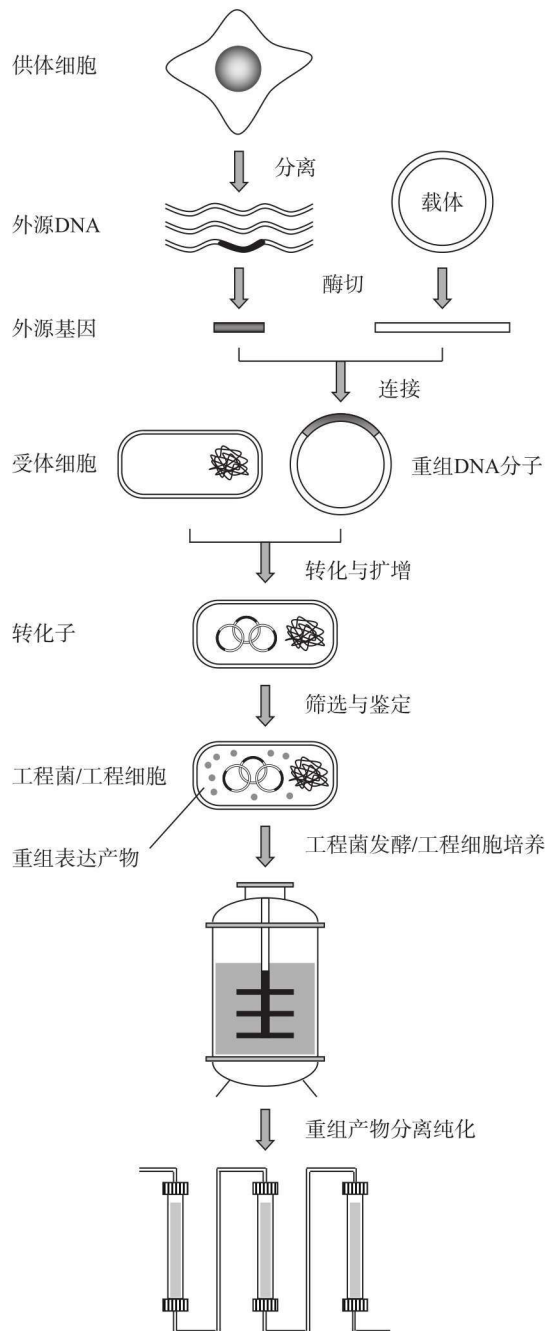


图 1-1 基因工程基本流程示意图

(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) 筛选和鉴定经转化处理的细胞,获得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。

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(或拷贝数),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、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确拼接,通过强化外源基因的转录而提高其表达水平。

(3) 选择、修饰、重组核糖体结合位点及密码子等 mRNA 的翻译调控元件,强化受体细胞中目标蛋白质的生物合成过程。

上述(2)和(3)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率的基础上,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重要环节,这里涉及的是生物化学工程学的基本理论体系。

因此,分子遗传学、分子生物学、生物化学工程学是基因工程原理的三大基石。

4. 基因工程的基本体系

生物工程的学科体系建立在微生物学、遗传学、生物化学和化学工程学的基本原理与技术之上,但其最古老的产业化应用可追溯到公元前 40 世纪至公元前 30 世纪期间的酿酒技术。20 世纪 40 年代,抗生素制造业的出现被认为是微生物发酵技术成熟的标志,同时也孕育了传统生物工程的诞生。30 年之后,以分子遗传学和分子生物学为理论基础的基因工程技术则将生物工程引至现代生物技术的高级发展阶段。

生物工程与化学工程同属化学产品生产技术,但两者在基本原理、生产组织形式以及产品结构等方面均有本质的区别。在化学工业中,产品形成或化学反应发生的基本场所是各种类型的物理反应器,在那里反应物直接转变成产物;而在生物工程产业中,生化反应往往发生在生物细胞内,作为反应物的底物按照预先编制好的生化反应程序,在催化剂酶的作用下形成最终产物。在此过程中,反应的速度和进程不仅仅依赖于底物和产物的浓度,而且更重要的是受到酶含量的控制,后者的变化又与细胞所处的环境条件和基因的表达状态直接相关联。虽然在一个典型的生物工程生产模式中,同样需要使用被称为细菌发酵罐或细胞培养器的物理容器,但它们仅仅用于细胞的培养和维持,真正意义上的生物反应器却是细胞本身。因此,就生产方式而言,生物工程与化学工程的显著区别在于:①生物工程通常需要两种性质完全不同的反应器,细胞实质上是一种特殊的微型生物反应器(microbioreactor);②在一般生产过程中,微型反应器(细胞)的数量与质量随物理反应器内的环境条件变化而变化,因此在

物理反应器水平上施加的工艺和工程控制参数种类更多、控制程度更精细；③每个微型反应器(细胞)内的生物催化剂的数量和质量也会增殖或跌宕,而且这种变化受制于更为复杂的机理,如酶编码基因的表达调控程序、蛋白质的加工成熟程序、酶的活性结构转换程序、蛋白质的降解程序等；④如果考虑产品的结构,生物工程则不仅能生产具有生理活性和非活性分子,而且还能培育和制造生物活体组织或器官。

上述分析表明,现代生物工程的基本内涵(图 1-2)包括:用于维持和控制细胞微型反应器(即生产菌或生产细胞)数量和质量的发酵工程(细菌培养)和细胞工程(动植物细胞培养)、用于产物分离纯化的分离工程、用于实施细胞外生化反应的酶工程、用于生产生物活体组织的组织工程,以及用于构建高品质细胞微型反应器的基因工程。值得注意的是,根据酶工程原理和技术组织的产物生产方式表面上看起来似乎与细胞微型反应器无关,但从生物催化剂概念拓展和酶制剂来源的角度上考察,这种生产方式在很大程度上也依赖于细胞微型反应器的使用,因为目前工业上使用的大部分酶制剂实际上是发酵工程的中间产品,而且酶工程产业中相当比例的生物催化剂形式是微生物细胞,后者也同样来自发酵过程。

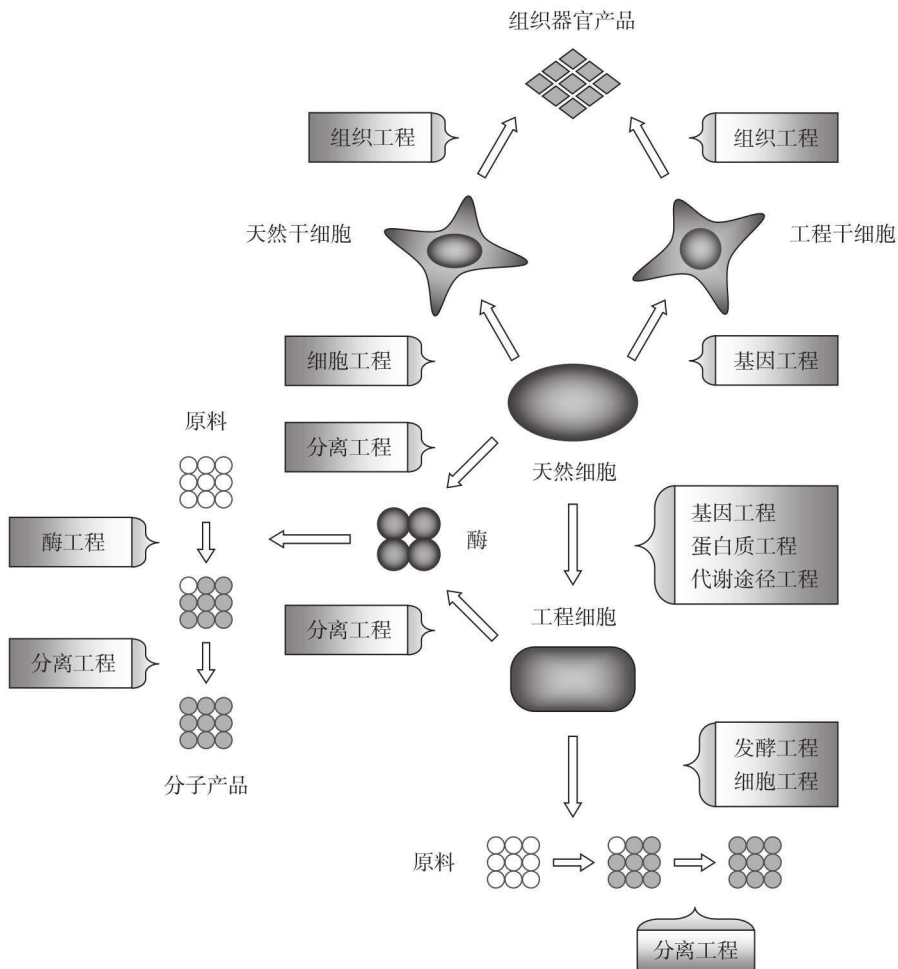


图 1-2 现代生物工程基本内涵

菌种诱变筛选程序和细胞工程中的细胞融合技术分别是微生物和动植物微型反应器品

质改良的传统手段,而 DNA 重组技术则是定向创建所有类型细胞微型反应器(即工程菌或工程细胞)强有力的现代化工具。其中,第一代基因工程是将单一外源基因导入受体细胞,使之高效表达外源基因编码的蛋白质或多肽,它们基本上以天然的序列结构存在;第二代基因工程(即蛋白质工程)通过基因水平上的操作修饰改变蛋白多肽的序列结构,产生生物功能更为优良的非天然蛋白变体(mutein);而作为第三代基因工程的途径工程则在基因水平上局部设计细胞内固有的代谢途径和信号转导途径,以赋予细胞更为优越甚至崭新的产物生产品质;被誉为第四代基因工程的基因组工程是一项强大的技术,利用它可以特异性地对内源性染色体 DNA 进行改造,用于破坏或失活一个基因,修复不利突变,或增加微生物种群的多样性。

1.2 基因工程的发展历史

从基本流程来看,基因工程的操作并不复杂,但其中涉及许多关键性技术,如 DNA 分子的切割与连接、DNA 切接反应的检测以及重组 DNA 分子导入受体细胞的程序等。有趣的是,这三项基本技术几乎同时于 20 世纪 70 年代初发展起来,并迅速导致了第一个 DNA 体外重组实验的诞生。

1. 基因工程的诞生

1972 年,美国学者 Berg 和 Jackson 等将猿猴病毒 SV40 基因组 DNA、大肠杆菌 λ 噬菌体基因以及大肠杆菌半乳糖操纵子在体外重组获得成功。翌年,美国斯坦福大学的 Cohen 和 Boyer 等在体外构建出含有四环素和链霉素两个抗性基因的重组质粒分子,将其导入大肠杆菌后,该重组质粒得以稳定复制,并赋予受体细胞相应的抗生素抗性,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。

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竟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。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。在 1972—1976 年这短短的四年里,人们对 DNA 重组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 载体的有条件包装以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。DNA 重组技术凭借众多安全可靠的相关技术支撑以及巨大的应用诱惑力,终于走出困境并迅速发展起来。

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密切相关的生物大分子,这些物质在人体内含量极少,但却具有非常重要的生理功能。1977 年,日本学者 Itakura 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 Ullrich 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。

这一时期主要基因工程产品的研制开发生产简况列在表 1-1 中。除此之外,近十年来又有数以百计的新型基因工程药物问世,另有数千种药物正处于研制开发阶段中。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。

表 1-1 主要基因工程产品的上市时间

产 品	用 途	首次进入市场时间/年	国家/地区
人生长激素释放抑制素(SRM)	治疗巨人症		
人胰岛素	治疗糖尿病	1982	欧洲
人生长激素(hGH)	治疗侏儒症,延缓衰老	1985	美国
人 α -干扰素(α -IFN)	治疗病毒感染症	1986	欧洲
乙肝疫苗(HBsAgV)	预防乙型肝炎	1986	欧洲
人组织纤溶酶原激活剂(t-PA)	治疗急性心肌梗死	1987	美国
人促红细胞生成素(EPO)	治疗贫血症	1989	欧洲
人 γ -干扰素(γ -IFN)	治疗慢性粒细胞增生症	1990	
人粒细胞集落刺激因子(G-CSF)	治疗中性白细胞减少症	1991	美国
人白细胞介素-2(IL-2)	治疗肾细胞瘤	1992	欧洲
人凝血因子Ⅷ	治疗 A 型血友病	1992	
人 β -干扰素(β -IFN)	治疗多重硬化症	1993	
葡糖脑苷脂酶	治疗高歇氏症	1994	
人凝血因子Ⅸ	治疗 B 型血友病	1997	
人白细胞介素-10(IL-10)	预防血小板减少症	1997	
可溶性肿瘤坏死因子(TNF)受体	治疗类风湿关节炎	1998	美国
白介素 2 融合毒素	治疗皮肤 T 细胞淋巴瘤	1999	美国
聚乙二醇干扰素 α -2b	治疗慢性丙型肝炎	2001	欧洲
人甲状旁腺激素(1-34)(hPTH(1-34))	治疗骨质疏松	2002	美国
β -半乳糖苷酶(β -GAL)	治疗法布莱氏病	2003	美国

3. 基因工程的腾飞

20 世纪 80 年代以来,基因工程开始朝着高等动植物物种的遗传性状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,美国政府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,从而开创了基因疗法的新纪元。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,用 15 年时间斥资 30 亿美元,完成人类基因组近 30 亿对碱基的全部测序工作,目前这项计划已提前完成,并迅速进入后基因组时代。1997 年,英国科学家利用体

细胞克隆技术复制出“多利”绵羊,为哺乳动物优良品种的维持提供了一条崭新的途径。2006年,美国和日本两个研究小组借助转基因技术几乎同时实现了分化终端的细胞向干细胞的转换,人类复制或定制自身组织器官的时代为期不远了。2010年,美国的一个研究团队将人工合成的基因组植入另一个内部被掏空的山羊支原体的细菌体内,从而获得第一个“人造细胞”,它向“人造生命”形式迈出了关键的一步,也有望在未来为人类解决食品短缺、能源危机等一系列问题。

1.3 基因工程的研究意义

整整 60 年的分子生物学和分子遗传学的研究表明,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升到一个崭新的层次。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,大规模生产生物活性分子。利用细菌(如大肠杆菌和酵母等)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却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、鉴定生物体尤其是人体内的遗传信息资源。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。

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20min内,Genentech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一种股票。闹市的铃声分明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奇迹,然而在今天看来,这种类型的基因工程产业似乎有些普通。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遍布医药的各个领域,包括各种抗病毒剂、抗癌因子、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、诊断试剂等。

在轻工食品产业,与传统的诱变育种技术相比,基因工程在氨基酸、助鲜剂、甜味剂等食品添加剂的大规模生产中日益显示出强大的威力。高效表达可分泌型淀粉酶、纤维素酶、脂肪酶、蛋白酶等酶制剂的重组微生物也已分别在食品制造、纺织印染、皮革加工、日用品生产中大显身手。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。

能源始终是严重制约人类生产活动的主要因素。以石油为代表的传统化石能源开采利用率的提高以及新型能源的产业化是解决能源危机的希望所在。利用DNA重组技术构建的新型微生物能大幅度提高石油的二次开采率和利用率,并能将难以利用的纤维素分解为可发酵生产燃料乙醇的葡萄糖,使太阳能有效地转化为化学能和热能。

环境保护是人类可持续生存与发展的大课题。一些能快速分解吸收工业有害废料、生物转化工业有害气体以及全面净化工业和生活废水的基因工程微生物种群已从实验室走向“三废”聚集地。

在迅速发展的信息产业中,基因工程技术的应用也已崭露头角。利用基因定向诱变技术可望制成运算速度更快、体积更小的蛋白芯片,人们装备并使用生物电脑的时代指日可待。

1983年,美国注册了大约200家以基因工程为主导的生物技术公司,今天这类公司已数以万计。1986年全球基因工程产业的总销售额才600万美元,到1993年已增至34亿美元,20世纪末已突破600亿美元,难怪日本政府将基因工程命名为“战略工业”。基因工程作为20世纪最后一次伟大的工业革命,必将对21世纪产生深远的影响。

2. 第二次农业大革命

基因工程技术在农林畜牧业中的应用广泛且意义重大。烟草、棉花等经济作物极易遭受病毒害虫的侵袭,严重时导致绝产。利用重组微生物可以大规模生产对棉铃虫等有害昆虫具有剧毒作用的蛋白类农用杀虫剂,由于这类杀虫剂是可降解的生物大分子,不污染环境,故有“生物农药”之称。将某些特殊基因转入植物细胞内,再生出的植株可表现出广谱抗病毒、真菌、细菌和线虫的优良性状,从而减少或避免使用化学农药,达到既降低农业成本,又杜绝谷物、蔬菜和水果污染的目的。

基因工程也可用来改良农作物的品质。作为人类主食的水稻、小麦和土豆蛋白含量相对较低,其中必需氨基酸更为匮乏,选用适当的基因操作手段提高农作物的营养价值正在研究之中。一些易腐烂的蔬菜水果如番茄、柿子等也能通过DNA重组技术改变原来的性状,从而提高货架存放期。利用基因工程方法还可在暖房里按照人们的偏爱改变花卉的造型和颜色,使之更具观赏性。

自然环境压力对农作物生长影响极为严重。细胞分子生物学研究结果表明,对某些基因进行结构修饰,提高植物细胞内的渗透压,可在很大程度上增强农作物的抗旱、耐盐能力,提高单位面积产量,同时扩大农作物的可耕作面积。

在家畜品种改良方面,基因工程技术同样大有用武之地,其中最主要的成果是动物生长激素的广泛使用。注射或喂养由基因工程方法生产的生长激素,可使奶牛大量分泌高蛋白乳汁,鱼虾生长期大幅度缩短且味道鲜美,猪鸡饲料的利用率提高且瘦肉的比重增加。

近20年来,豆科植物固氮机制的研究方兴未艾,科学家们试图将某些细菌中的固氮基因移植到非豆科植物细胞内,使其表达出相应的性状。由于固氮基因组结构庞大,表达调控机制复杂,目前尚未取得突破性进展,但这项宏伟计划一旦实现,无疑将是第二次绿色大革命。

3. 第四次医学大革命

如果说麻醉外科手术是一次医学革命,那么基因疗法则为医学带来了又一次大革命。目前临床上已鉴定出2000多种遗传病,其中相当一部分在之前还是不治之症,如血友病、先天性免疫缺陷综合征等。随着医学和分子遗传学研究的不断深入,人们逐渐认识到,遗传病其实只是基因突变综合征(分子病)中的一类。从更广泛的含义上讲,目前一些严重威胁人类健康的“文明病”或“富贵病”,如心脑血管病、糖尿病、癌症、肥胖综合征、老年痴呆症、骨质疏松症等,均属分子病范畴。分子病的治疗方法主要有两种:一是定期向患者体内输入病变基因的原始产物,以对抗由病变基因造成的危害;二是利用基因转移技术更换病变基因,达到标本

兼治的目的。目前上述两大领域均取得了突破性的进展。

基因疗法实施的前提条件是对人类病变基因的精确认识,因而揭示人体两万多个蛋白质编码基因的全部奥秘具有极大的诱惑力。美国一家生物技术公司不惜花费几千万美元的重金从分子生物学家手中买断刚刚克隆鉴定的肥胖基因,其意义可见一斑。随着 20 世纪第二个曼哈顿工程——人类基因组计划的实施,一本厚达几百万页的人类基因大词典已经问世,这些价值连城的人类遗传信息资源的所有权究竟归谁,必是人们关注的热点之一。

新陈代谢是生物界最普遍的法则,然而细胞乃至生命终结的机制却是一个极有价值的命题。近来有迹象表明,科学家们可能已经找到了控制细胞寿命的关键基因——端粒酶编码基因。也许有一天,人们借助于基因工程手段可以巧妙地操纵该基因的开关,使得日趋衰老的细胞、组织、器官甚至生命重新焕发出青春的光彩。