

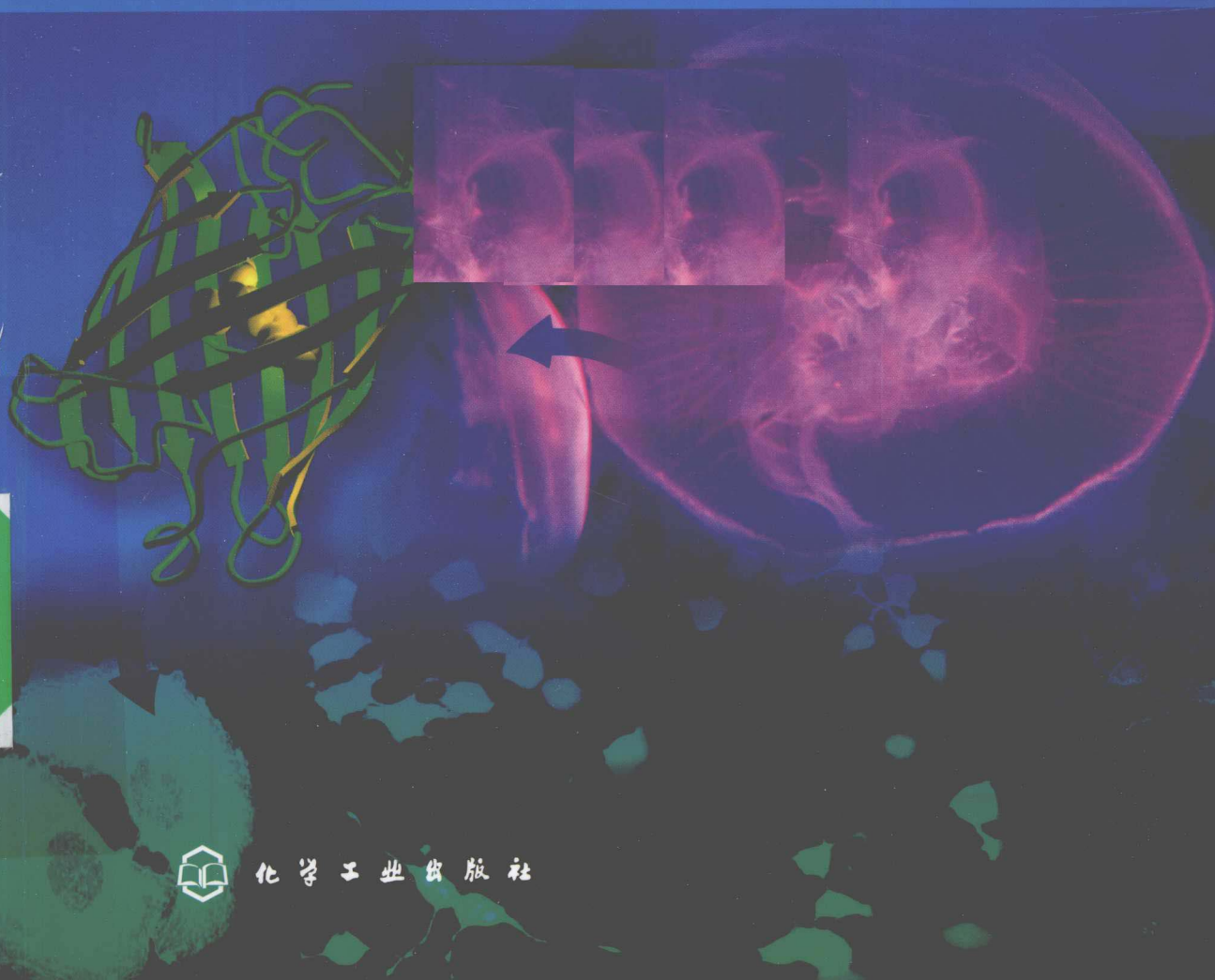
生物科学
生物技术
系 列

GENE ENGINEERING

普通高等教育规划教材
国家精品课程教材

基因工程

袁蓂洲 主编



化学工业出版社

普通高等教育规划教材
国家精品课程教材

ISBN 978-7-132-09102-2

普通高等教育规划教材
国家精品课程教材

普通高等教育规划教材
国家精品课程教材

ISBN 978-7-132-09102-2

基因工程

袁葵洲 主编
袁葵洲 邓云 万永奇
李东屏 唐文岷 周军媚 编写

责任编辑：刘...
封面设计：...

责任编辑：刘...
封面设计：...

化学工业出版社... 北京... 100071

化学工业出版社... 北京... 100071

ISBN 978-7-132-09102-2

化学工业出版社... 北京... 100071



化学工业出版社

北京... 100071

北京

化学工业出版社

ISBN 978-7-132-09102-2

图书在版编目 (CIP) 数据

基因工程/袁葵洲主编. —北京: 化学工业出版社,
2010.9

普通高等教育规划教材·国家精品课程教材
ISBN 978-7-122-09105-5

I. 基… II. 袁… III. 基因-遗传工程-高等学校-
教材 IV. Q78

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2010) 第 132781 号

基 工 因 基

主 编 袁 葵 洲
参 审 袁 葵 洲 袁 葵 洲 袁 葵 洲
参 审 袁 葵 洲 袁 葵 洲 袁 葵 洲

责任编辑: 刘 畅 赵玉清
责任校对: 陶燕华

装帧设计: 史利平

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: 化学工业出版社印刷厂

787mm×1092mm 1/16 印张 18 $\frac{1}{4}$ 字数 488 千字 2010 年 9 月北京第 1 版第 1 次印刷

购书咨询: 010-64518888(传真: 010-64519686) 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: 35.00 元

版权所有 违者必究

前 言

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一门专业主干课程。

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。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,二是面向大专院校、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的结合也适应了大学生就业市场的需求。

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、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的支持下启动和完成的。与责任编辑的多次愉快的交流让本书由设想变为现实。感谢化学工业出版社的信任与支持!

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。

限于编写者的经验和水平,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

目 录

第 1 章 基因工程概述	1
1.1 基因工程的概念与基本流程	1
1.1.1 基因工程的概念	1
1.1.2 基因工程的基本流程	1
1.2 基因工程的发展简史	3
1.2.1 基因工程诞生的背景	3
1.2.2 基因工程的诞生	4
1.2.3 基因工程的发展	4
1.3 基因工程的研究意义和应用	5
1.3.1 基因工程在功能基因组学研究中的应用	5
1.3.2 基因工程在工业领域的应用	6
1.3.3 基因工程在农业领域的应用	7
1.3.4 基因工程在医药领域的应用	9
1.4 趣味讨论: 基因工程与克隆人的争论	10
本章小结	13
复习题	13
第 2 章 基因工程的工具酶与载体	14
2.1 工具酶	14
2.1.1 限制性核酸内切酶	14
2.1.2 DNA 连接酶	18
2.1.3 DNA 聚合酶类	21
2.1.4 碱性磷酸酶	22
2.1.5 末端脱氧核苷酸转移酶	23
2.1.6 其他工具酶	23
2.2 克隆载体	24
2.2.1 质粒载体	24
2.2.2 噬菌体载体	29
2.2.3 黏粒载体	32
2.2.4 人工微小染色体	33
2.3 表达载体	34
2.3.1 原核表达载体	34
2.3.2 真核表达载体	43
2.4 实例分析: 一个表达双色荧光的转基因斑马鱼载体的构建	47
本章小结	50
复习题	50
第 3 章 目的基因的制备与鉴定	52
3.1 从基因文库获取目的基因	53
3.1.1 基因组文库的构建与筛选	53

3.1.2	cDNA 基因文库的构建与筛选	56
3.2	从 GENBANK 基因组数据库获取目的基因	65
3.2.1	基因组数据库	66
3.2.2	计算机克隆目的基因	67
3.3	PCR 获取与扩增目的基因	69
3.3.1	常规 PCR	70
3.3.2	反向 PCR	75
3.3.3	反转录 PCR	76
3.3.4	实时荧光定量 PCR	77
3.3.5	RACE-PCR	80
3.3.6	多重 PCR	81
3.3.7	原位 PCR	84
3.4	通过蛋白质工程改建目的基因	85
3.4.1	蛋白质工程的概念	85
3.4.2	蛋白质工程的定点突变技术	86
3.4.3	蛋白质工程的定向进化技术	88
3.5	目的基因的鉴定	90
3.5.1	目的基因导入受体细胞的方法	90
3.5.2	遗传表型检测法	91
3.5.3	酶切电泳检测法	96
3.5.4	核酸分子杂交	98
3.5.5	PCR 扩增鉴定筛选	105
3.5.6	DNA 序列测定	105
3.6	实例分析: 一个人类新基因 hhole 的克隆与分析	109
3.6.1	人类新基因 hhole 的克隆	109
3.6.2	人类新基因 hhole 的生物信息学分析	113
	本章小结	117
	复习题	117
第 4 章	基因工程在基因功能研究中的应用	118
4.1	基因的表达谱研究技术	118
4.1.1	胚胎原位杂交技术	119
4.1.2	胚胎抗体染色技术	123
4.1.3	基因芯片技术	127
4.1.4	蛋白质组学技术	131
4.2	基因的突变研究技术	134
4.2.1	化学诱变	134
4.2.2	转座子全基因组诱变	135
4.3	基因敲除与基因敲减技术	138
4.3.1	基因敲除技术	138
4.3.2	RNA 干扰技术	145
4.3.3	Morpholino 干扰技术	149
4.4	基因过表达与异位表达技术	151
4.4.1	GAL4-UAS 系统的构建	151

4.4.2	GAL4/UAS 定时开启系统	152
4.5	基因的相互作用研究技术	153
4.5.1	凝胶迁移率阻滞技术	154
4.5.2	染色质免疫沉淀技术	155
4.5.3	酵母双杂交技术	155
4.5.4	免疫共沉淀技术	157
4.6	实例分析: HDAC1 基因在小鼠心脏发育中的功能研究	159
	本章小结	164
	复习题	165
第 5 章 转基因植物		166
5.1	植物的转基因技术	166
5.1.1	目的基因的克隆	166
5.1.2	植物表达载体的选择	167
5.1.3	植物转化受体系统	167
5.1.4	外源基因导入植物的方法	168
5.2	转基因植物的筛选与检测	173
5.2.1	报告基因	174
5.2.2	分子生物学检测方法	176
5.3	转基因植物研究和生产现状	177
5.3.1	抗除草剂转基因作物	177
5.3.2	抗虫转基因作物	178
5.3.3	提高作物产量和品质的转基因作物	180
5.3.4	其他转基因作物	181
5.3.5	植物生物反应器	183
5.4	转基因植物的安全性	185
5.4.1	转基因安全性的由来	185
5.4.2	转基因安全性的争论	186
	本章小结	190
	复习题	191
第 6 章 转基因动物		192
6.1	动物的转基因技术	193
6.1.1	显微注射法	193
6.1.2	逆转录病毒法	199
6.1.3	胚胎干细胞法	201
6.1.4	体细胞核移植法	203
6.2	转基因动物的筛选与检测	207
6.2.1	报告基因	207
6.2.2	分子生物学检测方法	208
6.2.3	转基因动物整体表型的观察	210
6.3	转基因动物的现状与应用	210
6.3.1	转基因动物的现状	210
6.3.2	转基因动物在基因功能研究中的应用	210
6.3.3	转基因技术在动物育种中的应用	211

6.3.4	转基因动物在医学研究中的应用	212
6.3.5	动物生物反应器	213
	本章小结	215
	复习题	215
第7章 基因治疗		217
7.1	基因治疗的概念与策略	217
7.1.1	基因治疗的途径与策略	217
7.1.2	基因治疗的基本程序	218
7.1.3	基因治疗的现状与问题	220
7.2	基因治疗的载体	222
7.2.1	逆转录病毒载体	223
7.2.2	腺病毒载体	225
7.2.3	腺伴随病毒载体	227
7.2.4	单纯疱疹病毒载体	228
7.2.5	非病毒载体	229
7.3	重要疾病的基因治疗	230
7.3.1	遗传病的基因治疗	230
7.3.2	肿瘤的基因治疗	235
7.3.3	艾滋病的基因治疗	242
	本章小结	246
	复习题	246
第8章 基因工程药物		247
8.1	基因工程药物的发展概况	247
8.1.1	基因工程药物的发展简史与现状	247
8.1.2	基因工程药物的特点	254
8.1.3	基因工程药物的研发过程	255
8.2	基因工程制药的下游技术	256
8.2.1	基因工程菌的规模化培养	256
8.2.2	基因工程菌细胞的破碎	258
8.2.3	基因重组蛋白的分离与纯化	259
8.3	几种重要基因工程药物的研发概况	262
8.3.1	基因工程激素类药物	262
8.3.2	基因工程细胞因子类药物	265
8.3.3	基因工程抗体	270
8.3.4	基因工程疫苗	275
	本章小结	281
	复习题	281
参考文献		282

第1章 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。克隆技术也为人类繁殖方式及疾病治疗带来了一场革命。

21世纪是生命科学的世纪，而21世纪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，开辟了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、以至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，构成遗传物质的新组合即重组载体 DNA 分子，并将这种含有目的基因的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)、重组 DNA 技术 (recombinant DNA technique)、分子克隆 (molecular cloning) 或基因克隆 (gene cloning)。

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 体外操作程序。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。

根据侧重点的不同，对基因工程概念的理解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、分子克隆和克隆基因的表达，即所谓的上游技术。这是为什么基因工程又被称作分子克隆和 DNA 重组技术的原因。广义的基因工程更侧重于以产品为目标，指基因重组技术的产业化设计和应用，即所谓的下游技术，包括基因工程制药、转基因动植物以及基因治疗等。

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，如图 1.1 所示。

1.1.2.1 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。

可以从复杂的生物体基因组中, 经过酶切消化等步骤, 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, 反转录获得 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 技术从供体生物基因组直接体外扩增一个目的基因等等。

1.1.2.2 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。

1.1.2.3 重组 DNA 分子导入到受体细胞

体外构建的重组 DNA 分子必须导入到受体细胞中才能扩增和表达。重组 DNA 分子导入到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、腺病毒或腺伴随病毒等载体导入法。

1.1.2.4 外源目的基因阳性克隆的鉴定和筛选

外源目的基因转移到受体细胞后, 是否转移成功、是否插入到受体细胞的基因组以及能否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及 PCR 和核酸分子杂交等分子生物学的方法来鉴定。

1.1.2.5 外源目的基因的表达

通过上一步骤筛选和鉴定到阳性受体细胞克隆后, 根据不同的操作目标及不同类型的载体, 选择直接通过诱导使目的基因在原受体细胞中表达, 或再将目的基因克隆到其他特异的表达载体上, 导入到真核受体细胞, 以便在新的背景下实现功能表达, 产生人们所需的物质; 或使受体系统获得新的遗传特性。

对于受体细胞是酵母、植物、动物或人类等真核受体细胞的基因工程操作, 目的基因在最终导入到这些真核受体系统之前, 一般都先被导入到原核细胞进行扩增和酶切、测序等鉴定, 然后再通过特异的表达载体克隆到真核细胞, 使之高效表达产生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。

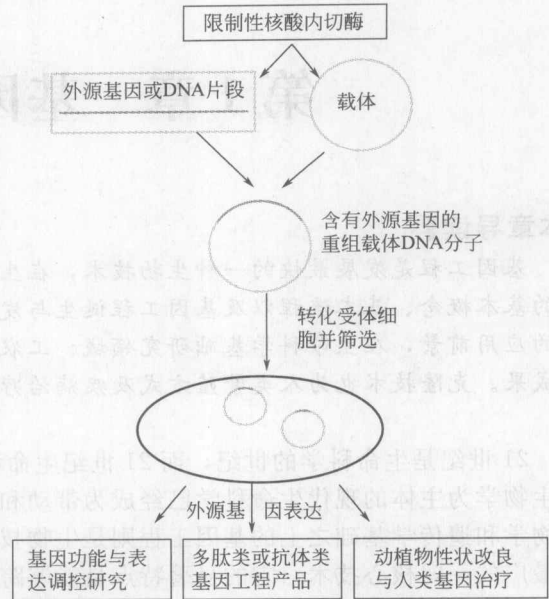


图 1.1 基因工程的基本流程

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。

1.2.1.1 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。正如诺贝尔奖获得者Lederberg指出的,Avery的工作是现代生物科学技术革命的开端,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,从而从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。

1.2.1.2 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、难于操作。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。

(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, K. W. Wilcox, T. J. Kelly等在流感嗜血菌(*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实验室发现了一种叫做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)。基因工程的载体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 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, 获得基因克隆的成功。

(3) 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 and 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 分别进行酶切消化, 然后用 T4 DNA 连接酶将两种酶切片段连接起来, 第一次在体外获得了包括 SV40 和 λ DNA 的重组 DNA 分子, 并因此与 W. Gilbert, F. Sanger 分享了 1980 年的诺贝尔化学奖。1973 年, 斯坦福大学的 S. Cohen 等人将编码有卡那霉素 (kanamycin) 抗性基因的大肠杆菌 R6-5 质粒和编码四环素 (tetracycline) 抗性基因的另一种大肠杆菌质粒 pSC101 DNA 混合后, 加入限制性核酸内切酶 *EcoR* I, 对 DNA 分别进行切割, 再用 T4 DNA 连接酶将它们连接成为重组 DNA 分子, 然后转化大肠杆菌, 获得了既抗卡那霉素又抗四环素的双重抗性特征的转化子菌落, 这是第一次重组 DNA 分子转化成功的基因克隆实验, 因此标志着基因工程诞生了!

1.2.3 基因工程的发展

基因工程技术一经诞生即取得了迅速发展。1976 年 4 月 7 日, 美国基因泰克公司 (Genentech) ——全球第一家生物技术公司成立, 并迅速于 1977 年 1 月成功利用大肠杆菌细胞生产了第一个基因工程药物——生长激素抑制素 (Somatostatin)。1978 年, 他们再次利用基因工程技术生产了人重组胰岛素, 并于 1982 年以专利转让形式授权给美国莉莉公司 (Eli Lilly and Company) 进行大规模生产并正式投放市场。从此开启了基因工程药物新时代, 包括生长激素、 α 干扰素、白细胞介素、凝血因子 VIII、血纤维蛋白溶酶原激活素 (t-PA) 等在内的一批基因工程药物迅速生产出来并在市场上推广。1982 年, 含有大鼠生长激素基因的转基因小鼠——超级巨鼠问世。1983 年, 利用 Ti 质粒获得了含有细菌新霉素抗性基因 (*Neor*) 第一个转基因植物——转基因烟草。1985 年, 基因工程微生物杀虫剂通过美国环保署的审批。1988 年, PCR 技术问世。1990 年, 美国国立卫生研究院 (NIH) 的 French Anderson 医生利用逆转录病毒将正常腺苷脱氨酶 (ADA) 基因导入到四岁女孩 Ashanti de Silva 的淋巴细胞内, 第一次成功实现了重度联合免疫缺陷症 (SDID) 的基因治疗。1996 年, 利用体细胞核移植技术, 英国爱丁堡罗斯林研究所伊恩·维尔穆特研究小组第一次成功获得了克隆绵羊多莉。2000 年, 含有绿色荧光蛋白 (GFP) 的第一只转基因猴在美国诞生。2009 年, 含有红色荧光蛋白的第一批转基因狗“鲁比-珀皮” (Ruby Puppy) 在韩国诞生 (图 1.2)。同年, 第一只具有较强的学习和记忆功能的 NR2B 转基因“聪明大鼠”“哈卜杰” (Hobbie-J) 在中国上海诞生。现在基因工程技术已经广泛应用于生物的遗传改良、生物反应器、基因治疗和基因疫苗的生产等, 并带来了巨大的科学价值和经济效益。

在基因工程发展史上值得一提的另一重大事件是 1985 年提出的、1990 年启动的人类基因组计划 (Human Genome Project, HGP)。这一被誉为生命科学领域“阿波罗登月计划”的国际人类基因组计划的主要研究内容是: ①对人类染色体 DNA 约 30 亿个碱基进行全长测序; ②确定人类染色体 DNA 中大约 3 万个编码基因并绘制基因图谱; ③构建 DNA 测序信息数据库; ④开发数据库分析技术; ⑤探讨由人类基因组计划可能引发的道德、法律和社



图 1.2 转基因小鼠 (1982)、转基因猴子 (2000) 及转基因狗 (2009)

会问题。到 2000 年的 6 月, 人类基因组工作框架图得以正式发布。这一框架图包含了人类基因组 97% 以上的信息, 医学专家通过分析每个基因的功能及其在染色体上的位置, 将从分子水平深入了解各种疾病的发生机制, 从根本上获得治疗的方法; 同时也有助于认识正常的生物结构和功能, 解释一系列生命现象的本质。中国作为参与此计划唯一的发展中国家, 测定了人类基因组全部序列的 1%, 也就是 3 号染色体上短臂端粒区的 3000 万个碱基对的 DNA 序列, 为这一研究计划做出了重要贡献。2006 年 5 月 18 日, 美国和英国科学家在《自然》杂志网络版上发表了人类最后一个染色体——1 号染色体的基因测序, 至此, 人类基因组序列已全部测序完成, 标志着生命科学已进入后基因组时代, 即功能基因组时代。基因工程技术必将在基因功能的广袤研究领域继续发挥强大的作用。

1.3 基因工程的研究意义和应用

基因工程技术诞生以后, 迅速应用于工业、农业、医药、食品、环保等行业和领域, 显示了生命科学这一核心新生技术的强大生命力和巨大的应用前景。在传统工业中, 基因工程技术的引入可降低损耗、提高产量, 同时还能减少污染, 如今生物工业成为现代产业革命的重要组成部分。在农业生产中, 转基因植物在抗病毒、抗虫、抗除草剂和品种改良等方面都取得了引人注目的成果, 有的已被广泛应用于生产实践, 使得相关农作物的产量得以显著提高。在医药科学领域, 人们可以利用基因工程技术探明致病基因的结构和功能, 了解其致病机制; 建立基因诊断、治疗技术, 并已开发出基因工程药物和疫苗广泛应用于临床, 为疾病的预防、治疗提供了新方法, 给患者带来了福音。

1.3.1 基因工程在功能基因组学研究中的应用

如前所述, 人类基因组计划完成后, 如今生命科学已进入了功能基因组时代。功能基因组学研究的主要任务是: ①基因定位和基因功能研究; ②基因表达调控的顺式元件和反式因子的鉴定和转录调控机制的研究; ③发育的遗传学和基因组学; ④非编码 DNA 与 RNA 的类型、含量、分布及所包含的信息与功能; ⑤基因转录、蛋白质合成和翻译后事件的相互协调; ⑥在大分子功能复合体中蛋白质间的相互作用; ⑦人类蛋白质组学研究; ⑧个体间单核苷酸多态性变异 (SNPs, Single-based DNA variations among individual) 与健康 and 疾病之间的关系; ⑨基因突变与疾病发生和发展之间的关系; ⑩药理基因组学等等。目前研究基因的功能主要采用“反向遗传学”的策略, 即在正常个体中由于全部基因的存在, 很难区分单个基因的具体功能, 但如果将某个特定的基因突变、删除或失活后, 导致个体某个性状丧失或发育异常或疾病产生, 则可推知该基因具有决定某性状或参与某一生化途径的功能。而实

施基因定点突变 (Site-directed mutagenesis)、基因敲除 (Gene knock-out)、基因敲减 (Gene knock-down) 及基因沉默 (Gene silencing) 等“基因失活”技术以及转基因等“基因过表达技术” (over expression) 或“异位表达技术” (ectopic expression) 都要运用基因工程的手段, 因此基因工程在功能基因组学的研究中发挥了不可或缺的作用。各种基因工程技术在基因功能研究中的应用将在本书第 4 章详细阐述。

1.3.2 基因工程在工业领域的应用

1.3.2.1 环保工业

随着化学工业的迅速发展, 产生了为数众多的化合物, 其中不少都是能持久存在的有毒物质, 如各种塑料组成的“白色垃圾”, 这些物质的存在对人们所处的环境造成了极大的威胁。基因工程技术则有望解决这一难题。科学家通过 DNA 重组技术得到分解性能较高的工程菌种和具有特殊降解功能的菌株, 从而大大提高有机物的降解效率, 同时也扩大了可降解的污染物种类。

含有降解质粒的细菌在某些环境污染物的降解中发挥着重要的作用, 如假单胞菌属的石油降解质粒, 此类质粒编码的酶能降解各种石油组分或它们的衍生物, 像樟脑、辛烷、萘、水杨酸盐、甲苯和二甲苯等, 如 Charabarty 博士将 XYL (降解二甲苯和苯)、NAH (降解萘)、CAM (分解樟脑) 和 OCT (降解辛烷、己烷、癸烷) 的 4 种质粒组合形成一种“超级质粒”转移到一株假单胞菌中, 产生的“超级菌”在短时间内就可分解 60% 的原油脂肪烃。农药降解质粒上则含有能降解杀虫剂六六六和烟碱等农药的基因, 如马里兰大学的 Coppella 博士等将能降解硫磷的水解酶基因 *opd* 转化到一种链霉菌 (*Streptomyces livdians*) 中, 得到的工程菌能稳定地水解硫磷, 可用于农药厂的废水处理。还有一些工业污染物降解质粒, 如对-氯联苯降解质粒、尼龙低聚体降解质粒和洗涤剂降解质粒等。

越来越多的报道显示目前许多地方水质和土壤受重金属污染严重, 利用基因工程技术也可以有效治理重金属污染的废水。例如通过转基因技术, 让细菌高效表达金属结合蛋白或金属结合肽的基因可使菌体结合重金属的能力提高数倍到数十倍。如 Weon Bae 等 (2001) 利用基因工程技术在大肠杆菌细胞壁上直接表达人工合成的植物螯合肽 (Glu-Cys)₂₀Gly (EC20) 与麦芽糖结合蛋白 (MBP) 的融合蛋白 (EC20-MBP), 得到的基因工程菌对 Hg^{2+} 的富集能力达到 46mg Hg^{2+} /g 干细胞, 比对照野生型菌提高数十倍。而 Carolina Sousa (1998) 等人构建表达外膜蛋白 LamB 与酵母金属硫蛋白 (CUP-1) 及哺乳动物金属硫蛋白 (HMT-1A) 的融合蛋白的基因工程菌, 对 Cd^{2+} 的结合能力提高了 15~20 倍。这些数据表明人工构建的基因工程菌可以修复与净化被重金属污染的水源。转基因植物在修复被重金属污染的土壤方面也有巨大的应用潜力。研究表明, 过表达哺乳动物或酵母的金属硫蛋白 (MTs) 基因的转基因植物能耐受 200~400 $\mu\text{mol/L}$ 的 Cd 浓度, 而野生型植株在 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 Cd 浓度下便不能正常生长。转基因植株在 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 Cd 浓度下比对照野生型植物在 25 $\mu\text{mol/L}$ 的 Cd 浓度下上部叶片中多积累 10%~70% 的 Cd。

1.3.2.2 能源工业

能源是国民经济和社会发展以及人们日常生活不可缺少的物质基础, 随着经济的高速发展, 能源大量消耗, 世界各国均面临着化石能源资源枯竭和因大量化石能源的开采、使用而造成的地质灾害频繁发生、温室效应引起的全球气候变暖、酸雨等严重的环境问题。因此, 如何开发新型的、对环境友好的可再生能源成为一项重要课题。以能源植物为主的生物质能是指利用生物可再生原料和太阳能生产的清洁和可持续利用的能源, 包括燃料酒精、生物柴油、生物制氢和生物质气化及液化燃料等, 将是人类利用新型的可再生能源的理想选择。

酒精 (乙醇) 是清洁汽油生产的主要替代物, 目前酒精生产涉及的能源植物主要有糖类作物、淀粉类谷物和纤维植物。研究表明, 目前普通植物对于阳光的利用效率不到 4%, 利用植

物基因工程技术调控光合作用途径来提高植物对光能的捕获和利用效率已成为能源植物改良的重要目标。目前已将 C4 植物光合作用途径中磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 (PEPC)、丙酮酸磷酸双激酶 (PPDK) 及磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶 (PEPCK) 等基因转入水稻、马铃薯和番茄等 C3 植物中,以期利用植物基因工程技术降低植物的光呼吸、提高植物最初光能捕捉效率。如 Ku (2001) 报道将玉米 C4 途径的两个酶 PEPC 及 PPDK 的基因在各自启动子的控制下同时引入水稻,可使水稻的光合能力提高 35%,稻谷产量增加 22%。也可利用细菌、酵母等菌种生产乙醇。Ingram 从发酵单胞菌 (*Zymomonas mobilis*) 中提取编码乙醇的基因 (*pdc*、*adhB*),将其导入大肠杆菌 K011 得到的工程菌可生产乙醇。Kim 构建的菌株 FSCSa-R₁₀₋₆ 也可使马铃薯淀粉发酵而得到乙醇。科学家们还在研究利用基因工程创造出能分解纤维素和木质素的多功能的超级工程菌,从而使得稻草本屑、植物秸秆、食物的下脚料等都可用来生产乙醇。

纤维素原料则是地球上最丰富的可再生资源。据统计,全球光合作用产生的植物生物量每年高达 1.1×10^{12} t,纤维素原料即占总生物量的 60%~80%。但由于纤维素原料中的纤维素主要以木质纤维素的形式存在,必须经化学或高温处理去除木质素和半纤维素,才能分离出纤维素。通过基因工程改变木质素合成途径中不同基因的表达来降低木质素的含量是提高纤维素含量的有效办法。例如在转基因杨树中,下调木质素合成途径中的一个主要酶基因 *p4CL1* 的表达,可使其木质素的含量下降 45%,纤维素含量则提高了 15%,纤维素/木质素的比值升高了一倍。

生物柴油是清洁的可再生能源,是优质石油柴油代用品。柴油分子由 15 个左右的碳原子形成的碳链组成的,而植物油分子一般由 14~18 个碳链组成,与柴油分子的碳原子数相近,因此可利用油菜籽等可再生植物油加工制取生物柴油。目前生物柴油的主要问题是原料少而成本高,美国已开始通过基因工程方法研究高油含量的植物。如 Roesler(1997) 报道拟南芥的一个乙酰-CoA 羧化酶同源基因导入油菜的质体,这个基因在种子特异性启动子的控制下表达,产生了更高的乙酰-CoA 羧化酶活性,提高了质体中丙酰-CoA 的含量,同时使转基因油菜的种子产油量提高了 3%~5%。

1.3.2.3 食品工业

基因工程技术在食品工业中有广泛的应用。通过 DNA 重组技术制备转基因植物,能使食品原料得以改良,营养价值大为提高,而且谷氨酸、调味剂、人工甜味剂、食品色素、酒类和油类等也都能通过基因工程技术生产。

豆油中富含反式脂肪酸或软脂酸,摄入后都会增加冠心病的发生率。美国研究人员利用基因工程技术,挑选出合适的基因和启动子,以此来改造豆油中的组分构成。不含软脂酸的豆油可用作色拉油,富含 80% 油酸的豆油可用于烹饪,而含 30% 硬脂酸的豆油则适于作人造黄油及使糕饼酥脆的油。现在市场中有多种这类基因工程产品,利用基因工程改造的豆油的品质和商品价值都大大提高。

在食品酸味剂方面,柠檬酸是食品工业中很重要的一类。目前柠檬酸生产菌主要是黑曲霉。国外正大力研究通过基因工程手段用酵母和细菌来生产柠檬酸。工程菌的使用使乳酸、苹果酸等有机酸的产量也在逐年增加。

现在国外用发酵法和酶法生产的氨基酸多达数十种,产量最大的氨基酸为谷氨酸和赖氨酸。目前国外正在积极利用基因工程和细胞融合技术改造产生苏氨酸和色氨酸的生产菌,经改造的工程菌已正式投产,其氨基酸产量大大超过了一般菌的生产能力。日本的味精公司也利用了细胞融合和基因工程的方法改造菌株,使谷氨酸的产量提高了几十倍。

1.3.3 基因工程在农业领域的应用

1.3.3.1 转基因农作物

随着人口的不断增加,在世界上不少地方的粮食供给成了大问题。转基因技术的应用为

最终解决这一问题提供了有效的途径。科学家利用基因工程技术培育出上百种具备抗寒、抗旱、抗盐碱、抗病虫害、抗除草剂及增加种子中的蛋白质含量或含油量、增加果实的耐储藏性等优良性状的新品种,包括烟草、番茄、马铃薯、胡萝卜、向日葵、油菜、亚麻、甜菜、棉花、黄瓜、水稻、玉米、大豆等等(图 1.3)。这些转基因农作物的制备与应用将在本书第 5 章详细介绍。这里只就提高植物光合作用效率与固氮能力的设想作一讨论。

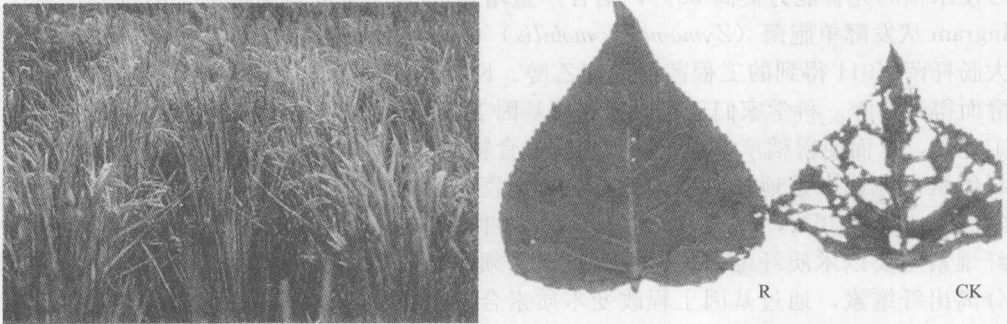


图 1.3 抗除草剂的转基因水稻(左)与抗虫的转基因杨树

我们知道,农作物的产量是由光合作用效能决定的。绿色植物光合作用的产物约占植物干重的 95% 以上,它是地球上一切动物的生命源泉,同时也是人类社会的主要物质和能量的来源。然而,地球上的植物利用太阳能的效率相当低,农作物的产量还不到转变为生物量的太阳能的 5%。因此提高光合作用效率具有重要的意义。利用基因工程技术已经克隆了许多种参与光合作用的基因并分析了光对基因的表达作用。目前的工作主要有两方面,一是深入研究在 CO_2 的固定反应中起关键作用的二磷酸核酮糖羧化酶(RuBisCo),以便提高其与 CO_2 的亲合力,取消或减少光呼吸的竞争反应。实验表明,通过交换 RuBisCo 亚基的基因,将不同来源的基因导入同一种植物,形成具有异源亚基的 RuBisCo 基因;或是采用定点突变技术,改变 RuBisCo 的活性,增加其同 CO_2 的亲合力;等等,将有可能提高植物对 CO_2 的固定效率。二是提高光能吸收及转化效率。例如,通过在不同植物之间交换光系统的组合,或利用体外定点突变技术改变光系统的组合并实现优化组合,便有可能使其转能效率达到最佳水平,从而提高光合作用的效率,提高主要农作物的产量。

我们也知道,大多数植物都需要大量的可溶性氮才能很好地生长。虽然地球上每年由微生物固定的 N_2 的总量达到 200Mt 左右,但只有豆科植物能与根瘤菌共生固氮。如果禾谷类作物及其他非豆科植物都能够具有天然固氮的能力,或转变为根瘤菌的宿主,那么在农业生产上将节省大量的化肥,具有重大意义。要使普通的非固氮植物的细胞从遗传上转变为具有固氮功能的特殊细胞,必须具备以下 5 个条件:①根瘤菌的全部 *nif* 基因都能在同一植物细胞中适当地表达;②固氮酶复合体能正确地加工和组装;③具有一个厌氧的环境;④提供足够的 ATP;⑤提供 NADPH。这是一项十分复杂而艰巨的工作。目前主要有两种工作思路:一是用带有 *nif* 基因的质粒转化植物细胞的叶绿体,从而有可能使用正常的原核调控信号进行表达,而不必将 17 个 *nif* 基因都置于植物细胞核基因组的启动子之下;二是把豆科植物的固氮基因转移到其他植物中,使其对固氮菌的感染产生相应的反应。到目前为止,已有许多植物的根瘤蛋白基因被克隆出来,而且还建立了一种三叶草的根瘤形成模型。

1.3.3.2 转基因动物

转基因动物在畜、牧、渔业中得到广泛应用。科学家利用胚胎显微注射技术将生长激素基因注入动物的受精卵或胚胎中,使其发生基因重组,可使子代特性改变。若将牛的生长激素基因在乳牛或羊羔体内表达后,能够改善食物的转换效率,提高蛋白质对脂肪的比例,产

生瘦肉类型。有人将生长激素基因转入小鼠、鱼、猪、兔的受精卵中，其子代生长速度明显加快，并将此特性传给下一代，进而产生了巨鼠、巨鱼、巨猪、巨兔的子代，改变了原有的特性，产生了新品种。1985年，科学家第一次将人的生长激素基因导入猪的受精卵获得成功，转基因猪与同窝非转基因猪比较，生长速度和饲料利用效率显著提高，胴体脂肪率也明显降低。

转基因动物也可当作“生物工厂”，用来生产一些特殊的药品。例如经培养可使乳腺能够分泌新型多肽或蛋白质，如能够表达促红细胞生成素（EPO）、血清蛋白素（HSA）、组织纤溶酶原激活剂（TPA）等的转基因牛或羊，进而可经乳汁治疗疾病，也可从中提纯纯品药物。转基因动物还能提供皮肤、角膜、心、肝、肾等器官，为挽救众多危重病人提供帮助。转基因动物具体过程将在本书第6章具体讲述。

1.3.4 基因工程在医药领域的应用

1.3.4.1 制药行业

1982年在美国诞生了世界上第一种基因工程药物——重组人胰岛素。这以后，基因工程药物成为世界各国政府和企业投资研究开发的热点领域，现已研制出的基因工程药物主要有三类：生物活性多肽、疫苗和单克隆抗体。生物活性多肽类药物如干扰素（ α 、 β 、 γ ）、人生长激素、白细胞介素、促红细胞生成素、表皮生长因子、血小板生长因子、人胰岛素、肿瘤坏死因子、尿激酶原、链激酶、天冬酰胺酶、超氧化物歧化酶等。开发成功的50多个药品已广泛应用于治疗癌症、肝炎、发育不良、糖尿病、囊性纤维病变等一些遗传病中，并形成了一个独立的新型高科技产业。疫苗类有（甲、乙、丙型）肝炎疫苗、疟疾疫苗、伤寒和霍乱疫苗、出血热疫苗、登革热疫苗等等。单克隆抗体技术自20世纪70年代创建开始，在临床疾病的诊断治疗、预防和蛋白质提纯等方面取得了巨大成绩。基因工程抗体技术的应用为解决鼠源性单抗对人体所具有的免疫源性开拓了新路，有利于克服鼠源性单抗易引起人体过敏反应的困难，使单克隆抗体作为生物导向治疗剂发挥有效功能。

我国这方面的研究虽然起步较晚，但经过20多年的发展，也开发出了多种基因工程药物，并已形成产业化。有代表性的产品如重组人干扰素 α -1b，是从人脐血白细胞经NDV-F病毒诱生后，提取其mRNA，反转录成cDNA，构建质粒pBV867，转化到大肠杆菌N6405株中表达成功的。它是我国批准的第一种国内生产的基因工程药物。到目前，我国已有20余种基因工程药物批准上市，包括 γ -干扰素、重组人白细胞介素-2和新型白细胞介素-2、重组人粒细胞集落刺激因子（G-CSF）和粒细胞巨噬细胞集落刺激因子（GM-CSF）、重组人促红细胞生成素（EPO）等。

1.3.4.2 基因诊断和基因治疗

基因工程技术除了可用于生产预防、治疗疾病的疫苗和药品之外，在疾病的基因诊断与基因治疗方面也正发挥着日益重要的角色。基因诊断是利用重组DNA技术作为工具，直接从DNA水平确定病变基因及其定位，因而比传统的诊断手段更加可靠。目前已经建立起多种病变基因的诊断和定位方法，如基因探针法、PCR扩增靶序列法、限制性片段长度多态性分析法（RFLP）、单链构象多态性分析法（SSCP）、DNA与DNA芯片杂交病变图谱法等等，它们都是以病人的DNA或RNA为材料，通过检验基因的存在、缺陷与异常表达，从而对人体健康状况和疾病做出诊断的方法。基因诊断的临床意义在于对疾病作出早期确切的诊断，来确定患者对疾病的易感性以及疾病的分期分型、疗效监测和预后判断等。

目前基因诊断主要着眼于遗传性疾病的基因诊断、感染性疾病的基因诊断和肿瘤的基因诊断等三个方面。遗传性疾病是由于患者某种基因完全缺失、部分缺失或存在点突变，使其体内相应的蛋白质的数量和质量与正常人不同，不能执行正常的功能而表现的疾病。基因诊断对明确遗传性疾病的基因定位、基因缺陷的类别和程度以及对遗传相关疾病或有遗传倾向