




普通高等学校“十四五”规划生命科学类创新型特色教材



# 基因工程 (第二版)

Gene Engineering

宋运贤 王秀利 主编

 华中科技大学出版社  
<http://www.hustp.com>

## 内 容 提 要

本书对基因工程的基本概念和重要研究技术原理进行了系统、翔实的介绍,还援引了许多最新研究成果,力求内容基础而又新颖,简洁而又通俗易懂。同时,部分内容结合教学实践需要,介绍了该学科最新进展。

本书以基因工程的研究步骤及实际操作中的需要为主线,共分13章,包括基因工程的基本概念、基因工程基本技术原理、基因工程的工具酶和克隆载体、目的基因的克隆、外源基因的原核表达系统、外源基因的真核表达系统、转基因植物、转基因动物、基因工程技术在基因功能研究中的应用、基因治疗和蛋白质工程等。每章都有本章简介、思考题、扫码做习题和参考文献。

本书可作为高等院校生物类专业本科生教材,也可作为相关专业研究生和从事基因工程的教学、科技工作者的参考用书。

### 图书在版编目(CIP)数据

基因工程/宋运贤,王秀利主编.—2版.—武汉:华中科技大学出版社,2022.5  
ISBN 978-7-5680-8172-6

I. ①基… II. ①宋… ②王… 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(2022)第067071号

### 基因工程(第二版)

Jiyin Gongcheng (Di-er Ban)

宋运贤 王秀利 主编

策划编辑:王新华

责任编辑:王新华

封面设计:原色设计

责任校对:刘竣

责任监印:周治超

出版发行:华中科技大学出版社(中国·武汉)

电话:(027)81321913

武汉市东湖新技术开发区华工科技园

邮编:430223

录排:华中科技大学惠友文印中心

印刷:湖北恒泰印务有限公司

开本:787mm×1092mm 1/16

印张:26.25

字数:683千字

版次:2022年5月第2版第1次印刷

定价:69.80元



华中出版

本书若有印装质量问题,请向出版社营销中心调换  
全国免费服务热线:400-6679-118 竭诚为您服务  
版权所有 侵权必究



# 普通高等学校“十四五”规划生命科学类创新型特色教材

## 编委会



### 主任委员

陈向东 武汉大学教授,2018—2022年教育部高等学校大学生物学课程教学指导委员会秘书长,中国微生物学会教学工作委员会主任

### 副主任委员(排名不分先后)

胡永红 南京工业大学教授,食品与轻工学院院长  
李钰 哈尔滨工业大学教授,生命科学与技术学院院长  
卢群伟 华中科技大学教授,生命科学与技术学院副院长  
王宜磊 菏泽学院教授,牡丹研究院执行院长

### 委员(排名不分先后)

陈大清	郭晓农	李 宁	陆 胤	宋运贤	王元秀	张 明
陈其新	何玉池	李先文	罗 充	孙志宏	王 云	张 成
陈姿暄	胡仁火	李晓莉	马三梅	涂俊铭	卫亚红	张向前
程水明	胡位荣	李忠芳	马 尧	王端好	吴春红	张兴桃
仇雪梅	金松恒	梁士楚	聂呈荣	王锋尖	肖厚荣	郑永良
崔韶晖	金文闻	刘秉儒	聂 桓	王金亭	谢永芳	周 浓
段永红	雷 忻	刘 虹	彭明春	王 晶	熊 强	朱宝长
范永山	李朝霞	刘建福	屈长青	王文强	徐建伟	朱德艳
方 俊	李充璧	刘 杰	权春善	王文彬	闫春财	朱长俊
方尚玲	李 峰	刘良国	邵 晨	王秀康	曾绍校	宗宪春
冯自立	李桂萍	刘长海	施树良	王秀利	张 峰	
耿丽晶	李 华	刘忠虎	施文正	王永飞	张建新	
郭立忠	李 梅	刘宗柱	舒坤贤	王有武	张 龙	



# 普通高等学校“十四五”规划生命科学类创新型特色教材

## 作者所在院校

(排名不分先后)

- |           |          |            |          |
|-----------|----------|------------|----------|
| 北京理工大学    | 华中科技大学   | 云南大学       | 辽宁大学     |
| 广西大学      | 南京工业大学   | 西北农林科技大学   | 燕山大学     |
| 广州大学      | 暨南大学     | 中央民族大学     | 临沂大学     |
| 哈尔滨工业大学   | 首都师范大学   | 郑州大学       | 山西医科大学   |
| 华东师范大学    | 湖北大学     | 新疆大学       | 宁夏大学     |
| 重庆邮电大学    | 湖北工业大学   | 青岛科技大学     | 重庆第二师范学院 |
| 滨州学院      | 湖北第二师范学院 | 青岛农业大学     | 齐鲁理工学院   |
| 河南师范大学    | 湖北工程学院   | 青岛农业大学海都学院 | 六盘水师范学院  |
| 嘉兴学院      | 湖北科技学院   | 山西农业大学     | 河西学院     |
| 武汉轻工大学    | 湖北师范大学   | 陕西科技大学     | 广西贵港工业学院 |
| 长春工业大学    | 汉江师范学院   | 陕西理工大学     |          |
| 长治学院      | 湖南农业大学   | 上海海洋大学     |          |
| 常熟理工学院    | 湖南文理学院   | 塔里木大学      |          |
| 大连大学      | 华侨大学     | 唐山师范学院     |          |
| 大连工业大学    | 武昌首义学院   | 天津师范大学     |          |
| 大连海洋大学    | 淮北师范大学   | 天津医科大学     |          |
| 大连民族大学    | 淮阴工学院    | 西北民族大学     |          |
| 大庆师范学院    | 黄冈师范学院   | 北方民族大学     |          |
| 佛山科学技术学院  | 惠州学院     | 西南交通大学     |          |
| 阜阳师范大学    | 吉林农业科技学院 | 新乡医学院      |          |
| 广东第二师范学院  | 集美大学     | 信阳师范学院     |          |
| 广东石油化工学院  | 济南大学     | 延安大学       |          |
| 广西师范大学    | 佳木斯大学    | 盐城工学院      |          |
| 贵州师范大学    | 江汉大学     | 云南农业大学     |          |
| 哈尔滨师范大学   | 江苏大学     | 肇庆学院       |          |
| 合肥学院      | 江西科技师范大学 | 福建农林大学     |          |
| 河北大学      | 荆楚理工学院   | 浙江农林大学     |          |
| 河北经贸大学    | 南京晓庄学院   | 浙江师范大学     |          |
| 河北科技大学    | 辽东学院     | 浙江树人学院     |          |
| 河南科技大学    | 锦州医科大学   | 浙江中医药大学    |          |
| 河南科技学院    | 聊城大学     | 郑州轻工业大学    |          |
| 河南农业大学    | 聊城大学东昌学院 | 中国海洋大学     |          |
| 石河子大学     | 牡丹江师范学院  | 中南民族大学     |          |
| 菏泽学院      | 内蒙古民族大学  | 重庆工商大学     |          |
| 贺州学院      | 仲恺农业工程学院 | 重庆三峡学院     |          |
| 黑龙江八一农垦大学 | 宿州学院     | 重庆文理学院     |          |

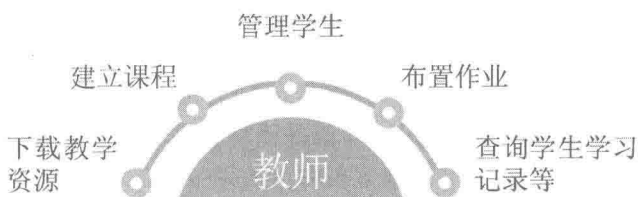
# 网络增值服务使用说明

## 1. 教师使用流程

(1) 登录网址：<http://yixue.hustp.com> (注册时请选择教师用户)



(2) 审核通过后，您可以在网站使用以下功能：



## 2. 学员使用流程

建议学员在PC端完成注册、登录、完善个人信息的操作。

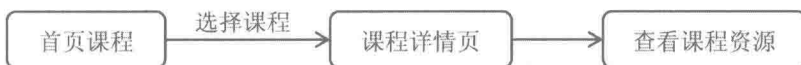
(1) PC端学员操作步骤

① 登录网址：<http://yixue.hustp.com> (注册时请选择普通用户)

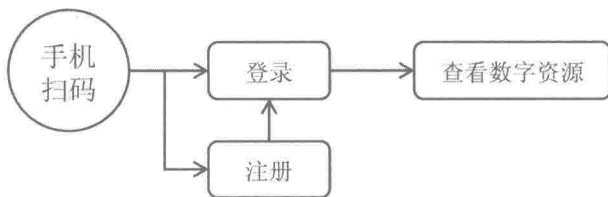


② 查看课程资源

如有学习码，请在个人中心-学习码验证中先验证，再进行操作。



(2) 手机端扫码操作步骤



(3) 要阅读用户（学员）使用手册，请扫下面的二维码：



# 第二版前言

---

基因工程是按照人们愿望进行 DNA 分子设计,通过体外重组和转基因等,使生物体获得符合人们需要的、新的生物特性。它代表着现代生物工程的发展前沿,在生命科学、农业、医药、食品、生物资源与环境保护等领域发挥着越来越重要的作用。基因工程是生物工程、生物技术等相关专业的核心课程。

基因工程学科发展迅速,新技术、新方法层出不穷。为使教材内容紧跟学科前沿,及时补充学科发展的前沿动态,在第一版教材的基础上,多所学校从事基因工程教学的教师共同编写了本教材。第二版基本延续了第一版的结构体系和写作风格,遵从“重视基础、拓展眼界、联系实际”的原则,以基因工程原理和操作流程为主线,编写工作主要包括以下几个方面:一是修改了第一版中个别错误之处,同时删除了部分前后重叠的内容;二是增加了部分插图,使教材更加直观易懂;三是增加了部分应用实例,如原核细胞生产蛋白质;四是增加了第 11 章“基因工程技术在基因功能研究中的应用”,包括基因敲除、过表达、基因敲减、基因编辑等研究方法与技术。同时为加深读者对基因工程原理与技术的理解,除将主观题附于各章后面,配合“一书一码”,还编写了各章的客观题,以期进一步培养学生的应用意识和创新能力。

本书是在第一版的基础上修订而成的,共 13 章,主要编写分工如下:第 1 章由宿州学院张兴桃编写;第 2 章由滨州学院邵燕编写;第 3 章由哈尔滨工业大学韩凤桐编写;第 4 章由延安大学陈国梁编写;第 5 章由中南民族大学李晓华编写;第 6 章由大连海洋大学王秀丽编写;第 7 章由山西医科大学孙要军编写;第 8 章由辽宁大学何剑为、杨哲编写;第 9 章由淮北师范大学宋运贤编写;第 10 章由燕山大学李健编写;第 11 章由中南民族大学刘新琼,山西医科大学孙要军、杨爽编写;第 12 章由郑州轻工业大学孙新城编写;第 13 章由塔里木大学包建平编写。宋运贤、王秀丽负责拟定提纲、统稿、审校,陈国梁、韩凤桐、何剑为、李晓华、张兴桃协助审校样稿。

本书编写过程中参考了大量的文献,因篇幅所限,所列文献可能有疏漏,对原作者表示诚挚的谢意!华中科技大学出版社编辑等为本书的出版付出了大量的心血,在此一并感谢!同时感谢第一版各位编委的付出及对第二版教材编写的支持!

与课程配套的慕课短视频及部分参考资料在安徽省网络课程学习中心(e 会学)网站开放,欢迎读者使用过程中访问。

希望通过本次修订,能给读者带来更好的学习体验,但由于时间及编者水平有限,书中不足之处在所难免,恳请各位读者多提宝贵意见,以便不断改进。

编者

2022 年 2 月 25 日

# 第一版前言

---

20世纪70年代以来,生物技术这门激动人心的技术正在改变着人们的生活方式,促进了国民经济的发展,而基因工程又是生物技术中最吸引人的、最重要的、发展最迅速的技术。生物技术犹如一顶王冠,而基因工程则是这顶王冠上的一颗明珠。基因工程的进一步发展必将为人类认识生命的本质,揭示生命现象的奥秘开辟一个全新的领域,对21世纪的生物制药、现代农业、疾病治疗、环境保护以及国民经济的可持续发展产生重大的影响。因此,基因工程始终是高等院校生物技术专业与生物工程专业本科生的专业基础课。

根据生物技术专业与生物工程专业本科学时缩短、合适的教材难以寻找、课程内容与其他课程重叠而难以取舍等现状,来自多所学校多年从事基因工程教学的教师共同编写了本教材。

基因工程以遗传学、生物化学和分子生物学等学科为基础,引入了工程学的一些概念,通过周密的实验设计,进行精确的实验操作,高效率地达到预期的目标。本书编者遵从“重视基础、拓展眼界、联系实际”的原则,结合高等院校对学生知识的要求和培养性质与特点,结合生物工程企业等用人单位的需求,同时融合了我们长期教学和科研经验,对教学体系和内容进行了有机的整合,编写了本教材。本书从基因的基本概念出发,以基因工程技术体系为主线,对实际操作过程中所涉及的基本技术和基本概念进行了重点阐述;同时把基因工程的技术成就和学科发展动态结合到每一章节中,使学生在掌握基本技术原理和技能的基础上,了解基因工程技术的光明前景。

本书共分12章,具体编写分工如下:第1章由河南农业大学郑振宇编写;第2章由滨州学院邵燕编写;第3章由哈尔滨工业大学韩凤桐编写;第4章由延安大学陈国梁编写;第5章由合肥学院阚劲松编写;第6章由大连海洋大学王秀丽编写;第7章由淮阴工学院胡沂淮编写;第8章由重庆工商大学李宏编写;第9章由淮北师范大学宋运贤编写;第10章由辽东学院刘丹梅编写;第11章第1~3节由郑州轻工业学院孙新城编写,第4~6节由塔里木大学王彦芹编写;第12章由塔里木大学张锐编写。在写作过程中得到了各作者所在院校领导和老师们的大力支持和帮助,华中科技大学出版社的编辑也对本书的编写和顺利出版花费了大量的心血,在此表示最诚挚的感谢!

基因工程是一门发展十分迅速的新兴学科,每时每刻都有新研究成果发表,并且它涉及的知识十分广泛,由于编者水平有限,书中的不足之处在所难免,恳请同行和广大读者批评指正!

编者

2014年3月16日

# 目 录

---

## 第 1 章 绪论 /1

- 1.1 基因工程的基本概念 /2
- 1.2 基因工程的发展历史 /4
- 1.3 基因工程的应用 /6
- 1.4 基因工程的安全性 /10
- 1.5 我国的基因工程安全管理办法 /12

## 第 2 章 基因工程的工具酶 /16

- 2.1 限制性核酸内切酶 /16
- 2.2 DNA 连接酶 /25
- 2.3 DNA 聚合酶和逆转录酶 /33
- 2.4 修饰酶类 /38
- 2.5 其他工具酶 /41

## 第 3 章 基因工程的克隆载体 /45

- 3.1 基因工程载体的功能 /45
- 3.2 质粒载体 /46
- 3.3 噬菌体载体 /63
- 3.4 柯斯质粒载体 /74
- 3.5 噬菌粒载体 /75
- 3.6 病毒载体 /77
- 3.7 人工染色体克隆载体 /84

## 第 4 章 基因工程的基本技术 /92

- 4.1 核酸的提取、鉴定与保存 /92
- 4.2 凝胶电泳技术 /98
- 4.3 分子杂交技术 /104
- 4.4 PCR /107
- 4.5 DNA 序列分析 /117
- 4.6 基因芯片及数据分析 /120
- 4.7 研究蛋白质与 DNA 相互作用的主要方法 /124

## 第5章 目的基因的获取 /134

- 5.1 基因的人工化学合成 /134
- 5.2 PCR 扩增目的基因 /138
- 5.3 从基因组文库获取目的基因 /139
- 5.4 从 cDNA 文库获得目的基因 /142
- 5.5 其他基因分离技术 /151

## 第6章 目的基因的导入与重组体的鉴定 /164

- 6.1 重组 DNA 导入原核细胞 /164
- 6.2 重组 DNA 导入真核细胞 /172
- 6.3 重组体克隆的筛选与鉴定 /180

## 第7章 外源基因的原核表达系统 /198

- 7.1 原核表达系统的特点 /198
- 7.2 原核细胞表达系统 /207
- 7.3 提高外源基因表达水平的措施 /228
- 7.4 利用原核细胞生产蛋白质实例 /236

## 第8章 外源基因的真核表达系统 /242

- 8.1 真核表达系统的特点 /242
- 8.2 酵母表达系统 /243
- 8.3 昆虫或昆虫细胞表达系统 /253
- 8.4 哺乳动物表达系统 /261

## 第9章 转基因植物 /271

- 9.1 转基因植物概述 /271
- 9.2 植物基因转化受体系统 /273
- 9.3 植物基因遗传转化方法 /275
- 9.4 转基因植物的筛选与鉴定 /297
- 9.5 提高外源基因在转基因植物中表达效率的途径 /308
- 9.6 转基因植物的应用和展望 /311
- 9.7 转基因植物的安全性评价 /317

## 第10章 转基因动物 /324

- 10.1 转基因动物发展简史 /324
- 10.2 转基因动物技术 /326
- 10.3 转基因动物的制备和检测 /332
- 10.4 转基因动物研究中出现的问题及其对策 /334
- 10.5 转基因动物技术的应用 /335

10.6 转基因动物的安全性及其未来 /339

## 第 11 章 基因工程技术在基因功能研究中的应用 /342

11.1 基因敲除技术 /342

11.2 基因过表达技术 /346

11.3 基因敲减技术 /348

11.4 基因编辑技术 /350

## 第 12 章 基因治疗 /360

12.1 分子病与基因治疗的基本概念 /360

12.2 基因治疗的发展简史与现状 /361

12.3 基因治疗的策略 /364

12.4 基因治疗的基本程序 /366

12.5 基因治疗的应用 /371

12.6 基因治疗的前景 /376

## 第 13 章 蛋白质工程 /381

13.1 蛋白质工程的理论基础、诞生和发展 /382

13.2 蛋白质工程的关键技术 /394

13.3 蛋白质工程的设计思想 /404

**【本章简介】** 基因工程是在体外将目的基因与载体分子重组后转化受体细胞,并在受体细胞中表达,从而获得基因产品或培育生物新品种的一种技术。基因工程诞生于 20 世纪 70 年代,遗传物质的发现、DNA 双螺旋结构模型的确立以及遗传信息传递的中心法则是其诞生的理论基础;各种工具酶的分离纯化、载体的开发以及基因转化技术是其诞生的技术基础。基因工程诞生之后,已经在现代生物学的理论研究中发挥巨大的作用,同时也在生产实践中获得广泛的应用,在生物制药、动植物新品种培育、环境污染治理等方面取得巨大的成就,对人类社会和人类健康产生了巨大影响。关于基因工程和转基因生物的安全性,目前仍未达成共识。尽管如此,基因工程技术的参与者必须对其安全性保持高度的警惕。

孟德尔(Mendel)在 1865 年发表了著名的论文《植物杂交试验》提出了“遗传因子”的概念,奠定了遗传科学的基础。可惜孟德尔的重大发现被埋没了 35 年。1900 年,三位欧洲植物学者几乎同时从各自的植物杂交试验证实了孟德尔发现的遗传定律,从此揭开了遗传学研究的新纪元。整个 20 世纪,遗传学以前所未有的速度向深度和广度发展。1910 年,摩尔根(Morgan)通过果蝇白眼突变研究,确证基因在染色体上,此后又创立了基因论。1933 年,由于对基因理论的重大贡献,摩尔根成为首位获得诺贝尔生理学或医学奖的遗传学家。1941 年,美国遗传学家 Beadle 通过红色面包霉营养突变体研究,发现基因的功能是制造各种各样的蛋白质,提出“一种基因产生一种酶”学说,并因此而获诺贝尔奖。1950 年,诺贝尔奖得主 McClintock 通过对玉米斑驳性状遗传研究,发现了转座遗传因子,又称为“跳跃基因”。它们可以在染色体之间自由转移位置,调控基因的表达。这一重要发现导致了 10 年以后法国科学家 Jacob 和 Monod 从原核生物研究中得到的另一项重大发现:存在三种不同的基因,即结构基因、操纵基因和调节基因。他们也因此而分享了诺贝尔奖。

1953 年,J. D. Watson 和 F. H. C. Crick 提出脱氧核糖核酸(DNA)双螺旋结构模型,第一次揭示了 DNA 分子的结构、组成及功能,开创了从分子水平揭示生命现象本质的新纪元。随后分子生物学突飞猛进。1958 年 Crick 证明了 DNA 半保留复制机制,提出中心法则。1968 年,Holley、Khorana 和 Nirenberg 因破译遗传密码而获得诺贝尔生理学或医学奖。

1970 年,Smith、Wilcox 和 Kelly 分离到第一种有特异性识别和切割位点的限制性核酸内切酶 *Hind* II,使得有目的地切割 DNA 有了可能。1967 年,世界上有 5 个实验室几乎同时发现了 DNA 连接酶。1972 年,Jackson 和 Berg 利用限制性核酸内切酶和连接酶,得到第一个体外重组的 DNA 分子,从而建立了重组 DNA 技术。1973 年,斯坦福大学的 Cohen 等成功地进行了另一个体外 DNA 重组实验。他们将编码有卡那霉素抗性基因的大肠杆菌 R6-5 质粒 DNA 和编码有四环素抗性基因的另一大肠杆菌质粒 pSC101 DNA 混合后,加入限制性核

酸内切酶 *EcoR* I, 对 DNA 进行切割后, 再用  $T_4$  DNA 连接酶将它们连接起来, 形成重组 DNA 分子, 转化大肠杆菌。在含有四环素和卡那霉素的平板上获得了对两种抗生素都有抗性的重组菌落。这是基因工程发展史上第一个克隆转化并取得成功的例子。人类从此掌握了一项按自己意愿设计和构建生物体的关键技术, 或用来创造新的生物种、品系, 或用来诊断、治疗疾病。生命科学的飞速发展孕育了现代分子生物学技术——基因工程。

## 1.1 基因工程的基本概念

### 1.1.1 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, 基因工程是在分子水平上, 提取(或合成)不同生物的遗传物质, 在体外切割, 再和一定的载体拼接重组, 然后把重组的 DNA 分子引入细胞或生物体内, 使这种外源 DNA(基因)在受体细胞中进行复制与表达, 按人们的需要繁殖扩增基因、生产不同的产物或定向地创造生物的新性状, 并能稳定地遗传给下一代。

广义的基因工程定义为重组 DNA 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、克隆和表达的设计与构建(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(图 1-1)。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思想, 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。

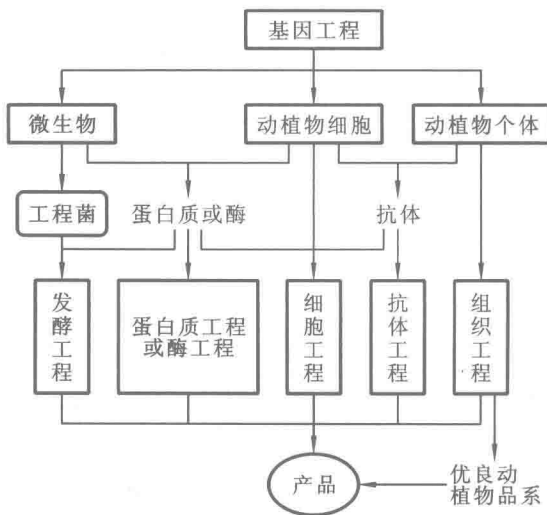


图 1-1 生物工程体系之间的相互关系

(引自焦炳华等, 2006)

在现代分子生物学领域里,在不严格的前提下,基因工程又名遗传工程(genetic engineering)、重组 DNA 技术(recombinant DNA technique),但它们在内涵上还是有一定的区别:重组 DNA 技术是指将一种生物体(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稳定遗传并可以表达出新产物或新性状的 DNA 体外重组技术,也称为分子克隆;基因工程将不同来源的基因按预先设计的蓝图在体外构建重组 DNA 分子,然后导入活细胞,以改变生物原有的遗传特性,获得新品种、生产新产品;遗传工程是指按照预先设计的蓝图对生物的遗传物质进行加工和改造,产生符合人类需要的新的遗传特性,定向地创造生物新类型。由于对遗传物质的改造采用了体外施工的方法,类似于工程设计,它具有很高的预见性、准确性和严密性。

基因工程和遗传工程都需要以重组 DNA 技术为基础。遗传工程的范畴比基因工程要大,在一定程度上,基因工程属于遗传工程的研究范围。

### 1.1.2 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。前者主要在实验室里进行,其单元操作过程如下:

(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,形成重组 DNA 分子(简称“接”);

(3)借助于细胞转化手段将重组 DNA 分子导入受体细胞中(简称“转”);

(4)短时间培养转化细胞,以扩增重组 DNA 分子或使其整合到受体细胞的基因组中(简称“增”);

(5)筛选和鉴定转化细胞,获得使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(图 1-2)。

### 1.1.3 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,借此提高其宏观表达水平。这里涉及 DNA 分子高拷贝数复制以及稳定遗传的分子遗传学原理。

(2)筛选、修饰和重组启动子、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细拼接,通过强化外源基因的转录提高其表达水平。

(3)选择、修饰和重组核糖体结合位点及密码子等 mRNA 的翻译调控元件,强化受体细胞中蛋白质的生物合成过程。上述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能的基础上,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

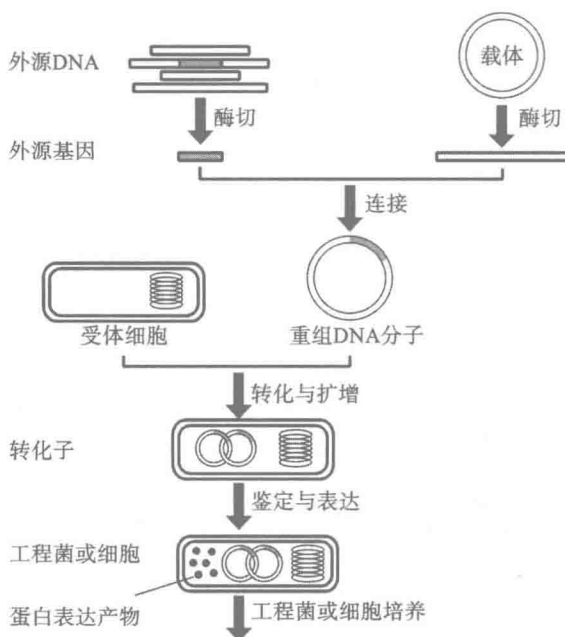


图 1-2 基因工程的流程示意图

(引自张惠展, 2010)

增殖速度和最终数量,也是提高外源基因表达产物产量的主要环节,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、分子生物学以及生化工程学是基因工程原理的三大基石。

## 1.2 基因工程的发展历史

### 1.2.1 基因工程的诞生

基因工程的出现是建立在几个重大发现和发明基础上的。Watson 和 Crick 在 1953 年发现了主要遗传物质 DNA 的双螺旋结构,Crick 在 1958 年提出中心法则,并于 1970 年进行更新,使得人们对基因的本质有了越来越多的认识,也奠定了基因工程的理论基础;细菌学、病毒学的发展,限制性核酸内切酶和连接酶的发现也为基因工程提供了必要的工具。

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,在体外对猿猴空泡病毒 40(SV40) DNA 和  $\lambda$  噬菌体 DNA 分别进行酶切,然后用  $T_4$  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  $\lambda$  DNA 的重组 DNA 分子,并因此分享了 1980 年的诺贝尔化学奖。1973 年,S. Cohen、H. Boyer 等将两种分别编码卡那霉素(kanamycin)和四环素(tetracycline)的抗性基因相连接,构建出重组 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具有双重抗性特征的转化子菌落,这是第一次成功的基因克隆实验,也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。

基因工程从诞生到现在仅 50 年左右,但其发展迅猛,无论是在基础研究方面,还是在实际应用中,都取得了惊人的成绩,并从根本上改变了传统生物科学技术的被动状态,使得人们可以按照自己的愿望,克服物种间的遗传屏障,定向培养或创造出新的生物形态,以满足人们的需求。基因工程也因此被公认为 20 世纪最伟大的科学成就之一,标志着人类主动改造自然界的能力进入一个新的阶段。

### 1.2.2 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水平密切相关的生物大分子,这些物质在人体内含量极小,但具有非常重要的生理功能。1977 年,日本的 Tfhura 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,美国的 Ullvich 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。

除此之外,最近十年来又有数以百计的新型基因工程药物问世,另有 400 余种药物正处于研制开发中。重组 DNA 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。

基因工程中要有基因才能实现基因工程化以应用于研究和生产,而基因的分离和认识又需要基因工程的手段。基因是遗传信息的载体,而遗传信息决定了生物的特征与形态,可以说没有基因就没有生命,但时至今日人们对其认识仍然不够。在基因工程研究发展中值得一提的是 1985 年提出的人类基因组计划(Human Genome Project, HGP)。这一计划是试图用基因工程技术来揭示人类所有的遗传结构,包括所有的基因(特别是疾病相关基因)和非编码序列。1990 年,国际人类基因组计划开始启动,历经 10 年时间,耗资约 30 亿美元,到 2000 年 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在染色体上的位置,将能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,为这一研究计划作出了重要贡献。人类基因组计划的实施就是利用基因工程手段来进行的,反过来也极大地推动对基因和基因组结构和功能的认识,加速了基因工程的发展和应用。

随着计算机技术的发展,基因工程 and 信息技术结合是一种必然的趋势。通常说的基因工程是操作单个或数个完整的基因。其产品是由外源基因编码的具有天然属性的蛋白质,操作的层次基本上没有深入基因内部。而蛋白质结构的研究及与计算机相结合使人们能直接操作或改造单个或几个单核苷酸来生产出结构发生了改变的新型蛋白质,这样其功能也完全不一样,能满足人们的不同需求。

### 1.2.3 基因工程的腾飞

20 世纪 80 年代以来,基因工程已开始朝着高等动植物物种的遗传特征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症联合免疫缺陷病的儿童进行基因治疗获得成功,从而开创了分子医学的新纪元。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,完成人类基因组近 30 亿碱基对的全部测序工作。

基因工程技术彻底打破了常规育种中种属间不可逾越的鸿沟,动物、植物、细菌的基因都可以重新组合,为生物育种等提供了新的途径。基因工程为研究基因的结构、功能、调节提供了新途径,也为人们彻底认识生命的本质,揭示生命现象的奥秘开辟了一个全新的领域。

## 1.3 基因工程的应用

基因工程自 20 世纪 70 年代初问世以来,经过近 50 年的发展,无论是在基础研究领域,还是在生产应用方面,都取得了惊人的成就,几乎所有的生命科学领域都受到它的直接或间接的影响。

### 1.3.1 基因工程在工业中的应用

基因工程技术在食品工业中有广泛的应用。利用基因工程技术进行微生物菌种改造生产酶制剂和食品添加剂。通过重组 DNA 技术培育转基因植物,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做人造黄油及使糕饼松脆的油。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,工程菌的使用使乳酸、苹果酸等有机酸的产量在逐年增加。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。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。

化学工业中丙酮、丁醇、乙酸、丙烯酸、乙醇、甘油等有机物都可以通过发酵技术生产,而通过基因工程技术培养的微生物能大大提高这些产品的转化效率。Picataggio 等构建的 *Candida tropicalis* 工程菌使长链二羧酸的转化率和化学选择性均有所提高。地球上可供使用的能源毕竟有限,为了解决这一难题,科学家把目光转向了生物能,已利用重组 DNA 技术来生产乙醇等石油替代品。研究人员发现,细菌、酵母中的一些菌种可利用淀粉、植物多糖及纤维素类物质生产乙醇。Ingram 从 *Zynomonas mobilis* 中分离乙醇合成相关基因(*pdc*、*adhB*),将其导入大肠杆菌 K011 得到的工程菌可产生乙醇;Kim 构建的菌株 FSCSa-R10-6 也可使马铃薯淀粉发酵而得到乙醇。Roessler 等则从微藻中分析提取了乙酰辅酶 A 羧化酶的基因,这种酶是合成生物柴油脂类物质的关键酶。而甘蔗、木薯粉、玉米渣等原料都可通过微生物发酵法来生产乙醇。科学家还在研究利用基因工程创造出多功能的超级工程菌。这种菌

能分解纤维素和木质素,从而使得稻草、木屑、植物秸秆、食物的下脚料等都用来生产乙醇。通过基因工程技术利用工业废弃物、农林业副产品制造沼气,将极大满足人们对能源的需求。

酶是活细胞产生的具有高度催化活性和高度专一性的生物催化剂,常温常压下就可以催化各种生化反应,在食品生产和化学工业中占有重要的地位。随着基因工程技术的发展,科学家能够运用基因工程技术按照需要来定向改造或生产不同工业用酶,甚至创造出新的酶种,蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶、糖化酶和果胶酶等工业用酶均可利用基因工程技术进行生产。目前生产的酶还存在一些不足之处,如在长时间或高温下反应容易失活、不能在有机溶剂中或气体中进行反应,以及由于杂菌污染使酶腐败,某些微生物的产酶能力不高等。基因工程技术有可能解决这些难题,其解决途径包括:用基因工程技术从具有耐热、耐压、耐盐、耐溶剂等特性,或能在气态条件下发挥作用的微生物中取得具有特殊功能的基因,并加以利用。美国科学家将淀粉液化芽孢杆菌的淀粉酶基因转移到枯草芽孢杆菌中,使受体菌产酶能力提高 2500 倍。日本科学家把耐热的  $\alpha$ -淀粉酶基因转移到枯草芽孢杆菌后,增加了耐热的  $\alpha$ -淀粉酶的产量。基因工程本身所需要的酶,也可以通过基因工程来大幅度提高产量,这种技术已使 DNA 连接酶的产量提高了 500 倍。

能源始终是制约人类生产活动的主要因素。以石油为代表的传统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。利用重组 DNA 技术构建的新型微生物在不久的将来可望大幅度提高石油的二次开采率和利用率,并将太阳能有效地转化为化学能和热能。深层的原油吸附在岩石空隙间,难以开采,通过加入基因工程菌就可分解原油中的蜡,降低原油的黏度,并增大油层内的压力,从而增加石油流出量。

环境保护是人类可持续生存与发展的大课题。随着化学工业的迅速发展,产生了为数众多的化合物,其中不少是能持久存在的有毒物质,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。科学家通过重组 DNA 技术得到分解性能较好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,也扩展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。例如: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;农药降解质粒,这些质粒上具有能降解杀虫剂六六六和烟碱等农药的基因;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。人们通过能降解有害有毒有机物的质粒转移、质粒突变和降解基因克隆来构建基因工程菌。马里兰大学的 Coppella 等将在研究对硫磷降解时得到的水解酶基因 *opd* 转化到 *Streptomyces lividans* 中,最后得到的转化菌株能稳定地水解对硫磷,此菌株发酵液可用于农药厂废水的处理;Charabarty 将降解性质粒 XYL、NAH、CAM 和 OCT 结合后转移到一株假单胞菌中,该工程菌在短时间内就可分解 60% 的原油脂肪烃;日本学者藤田构建的重组体 PHF400 能在 15 h 内完全分解掉 400 mg/L 的邻羟基苯甲酸。一批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、体积更小的蛋白质芯片,人们使用生物计算机的时代为期不远了。

基因工程作为一次伟大的工业革命,必将产生深远的影响。