

《实用生物技术丛书》编委会

编委会主任：郭摇勇

编委会委员：(以姓氏笔画为序)

杨汝德摇华南理工大学摇教授

赵树进摇广州军区广州总医院摇教授，博士生导师

郭摇勇摇华南理工大学摇教授，博士生导师

梁世中摇华南理工大学摇教授，博士生导师

彭志英摇华南理工大学摇教授，博士生导师

实用生物技术丛书

基因克隆技术在制药中的应用

杨汝德摇主编

化学工业出版社

· 北摇摇京 ·

(京)新登字 0432号

图书在版编目 (CIP) 数据

基因克隆技术在制药中的应用 杨汝德主编 北京 :

化学工业出版社, 1999

(实用生物技术丛书)

I. 基... II. 杨... III. 无性系 遗传工程 应用 生物制品 : 药物 制造 IV. 医药工业

I. 基... II. 杨... III. 无性系 遗传工程 应用 生物制品 : 药物 制造 IV. 医药工业

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (1999) 第 0432 号

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (1999) 第 0432 号

实用生物技术丛书
基因克隆技术在制药中的应用

杨汝德主编

责任编辑：梁彩虹

文字编辑：周摇偶

责任校对：李摇林

封面设计：郑小红

*

化学工业出版社出版发行
(北京市朝阳区惠新里 1 号 摇号 摇邮政编码 100029)

发行电话：(010) 64912300

网址：http://www.cip.com.cn

*

新华书店北京发行所经销

北京市彩桥印刷厂印刷

北京市彩桥印刷厂装订

开本 787 毫米 × 1092 毫米 1/32 摇印张 6.5 摇字数 160 千字

1999 年 1 月第 1 版 摇 1999 年 1 月北京第 1 次印刷

陈月 陈月 陈月 陈月 陈月 陈月 陈月 陈月 陈月 陈月

定摇价：15.00 元

版权所有 摇违者必究

该书如有缺页、倒页、脱页者，本社发行部负责退换

序

生物技术（~~遗传工程~~）又称为生物工程，是生物科学与工程技术相结合而形成的新学科，是 20 世纪后半叶迅速发展起来的新技术。

回顾 20 世纪，生物工程迅速崛起，已在理论与应用领域取得举世瞩目的成果，为新物种的形成和新物质的生产开辟了崭新的途径。

展望 21 世纪，伴随着人类基因组计划取得划时代的成果、基因组学和蛋白质组学的诞生以及生物信息学的迅速发展，生物工程可望以更快的速度腾飞，将在世界科技与经济的发展中起支柱与骨干的作用。

生物工程主要包括基因工程、细胞工程、酶工程和发酵工程。

一、基因工程

基因工程又称为重组 ~~DNA~~ 技术，是通过人工操作，在分子水平上进行基因重组、改造和转移，以获得具有新的遗传特性的细胞，合成人们所需物质的技术过程。1973 年，科亨（~~Stanley Cohen~~）和波伊尔（~~Herbert Boyer~~）发明了克隆技术，成功地将外源基因转入大肠杆菌细胞并得以表达，宣告了基因工程的诞生。其后各种基因工程药物层出不穷，转基因动物和转基因植物不断涌现，取得了激荡人心的丰硕成果。

20 世纪基因工程的发展前沿是基因组和功能基因组的研究和开发。1990 年启动的“人类基因组计划”已经于 2003 年 6 月完成，已经全部阐明了人类染色体 ~~约 30 亿~~ 对碱基的排列顺序，接着将继续进行功能基因组的研究，以阐明其中的 ~~约 3 万~~ 多个基因的序列、位置及其功能。到时人们对疾病的诊断和治疗将在基因水平上进行，这对提高人体素质、保障人体健康有着划时代的意义。同时还将逐步开展对其他物种的基因组研究，这将使人们对物种的改良和对所需物质的生产提高到一个前所未有的高度。

二、细胞工程

细胞工程是在细胞水平上改变细胞的遗传特性或通过大规模细胞培养以获得人们所需物质的技术过程。1975 年，科勒（~~Georg Kohler~~）和米尔斯坦（~~César Milstein~~）首创杂交瘤技术，开创了细胞工程的新纪元。细胞融合技术、植物组织培养技术、植物细胞培养技术、动物体细胞克隆技术、杂交瘤细胞培养技术、干细胞培养技术等都在世界范围内发出夺目的光彩。

21 世纪细胞工程发展的重点是动植物细胞培养技术。动物细胞和植物细胞都可以如同微生物细胞那样，在人工控制条件的生物反应器中培养，以获得各种所需的产物。

动物细胞培养主要用于生产激素、疫苗、单克隆抗体、酶、多肽等功能性蛋白质以及皮肤、血管、心脏、大脑、肝、肾、胃、肠等组织器官。在医药工业和医学工程的发展中占有重要的地位。

植物细胞培养主要用于色素、香精、药物、酶等次级代谢物的生产。具有缩短周期、提高产率等显著特点，不占用耕地，并且可以不受地理环境和气候条件等的影响，对于农业产品的工业化生产具有深远的意义。

三、酶工程

酶工程是酶的生产与应用的技术过程。即是通过人工操作，获得人们所需的酶，并通过各

种方法使酶发挥其催化功能的技术过程。1959年，固定化氨基酰化酶首次在工业上成功地用于氨基酸的拆分，有力地推动了酶工程的发展。其后，酶分子修饰技术，酶、细胞、原生质体固定化技术，有机介质中酶的催化技术等的发展，为酶的生产和应用开辟了崭新的途径。

20世纪酶工程的发展焦点是新酶的研究与开发应用。随着生物工程的发展，被研究和开发的新酶将越来越多，其中最令人瞩目的有核酸类酶（~~限制性内切酶~~）、抗体酶（~~抗体酶~~）和端粒酶（~~端粒酶~~）等。此外，酶的优化生产和高效应用也将进一步发展到前所未有的水平。

四、发酵工程

发酵工程又称为微生物工程，是在人工控制的条件下，通过微生物的生命活动而获得人们所需物质的技术过程。1928年，青霉素液体深层发酵的成功，标志着现代发酵工程时代的到来。随后各种抗生素、氨基酸、核苷酸、维生素等的发酵生产蓬勃发展，使发酵工程进入了全盛时期。

20世纪发酵工程的发展策略是利用 ~~基因~~重组技术获得更加符合人们需要的优良的微生物细胞，并进行全面的代谢调节控制。由于传统的从自然界直接获得的微生物或者经过筛选、诱变得到的微生物已难以满足人们的需要，20世纪用于发酵工程的微生物大多数都是经过基因重组、改造、转移而获得的具有优良特性的工程菌。利用这些工程菌进行发酵，需要进行一系列的代谢调节控制，才能获得理想的发酵效果。故此，20世纪的发酵工程将根据代谢工程的理论对优良的工程菌进行全面的代谢调控，以获得人们需要的各种代谢产物。

由此可见，生物工程不仅对于物种的改良和进化具有极其重大的意义，而且在医药、食品、工业、农业、环保、能源等方面有重要的应用价值，将对人类的健康、长寿和世界科技、经济、社会的发展产生深远的影响。

为了加速我国生物工程的发展，使生物技术的研究成果尽快产业化，加速生物技术在各个领域的应用，特组织有关专家学者编写《实用生物技术丛书》。

本丛书的编写宗旨是以实用生物技术为特色，以生物技术在医药、食品、轻工、化工、环保、能源等领域的应用为主线，理论与实际紧密结合，推动生物技术的发展和产业化的进程。为此，本丛书不是面面俱到地介绍各种生物技术的基本理论和基本知识，而是有重点地选择介绍一些实用性强、前景看好，与产业化关系密切的生物技术的原理、方法及其应用的最新研究进展与发展趋势。本丛书由下列各分册组成：

- 《基因克隆技术在制药中的应用》
- 《细胞融合技术与应用》
- 《植物细胞培养技术与应用》
- 《动物细胞培养技术与应用》
- 《酶的生产与应用》
- 《固态发酵技术与应用》
- 《非热杀菌技术与应用》

各分册均由有实践经验的在职专家撰写，在简明介绍基本理论和基本知识的基础上，重点阐述技术的原理和方法及其应用的最新研究进展和发展趋势。期望本丛书的出版对我国生物技术研究、开发和产业化能够起到积极的推动作用。

郭摇勇

2008年 缘月于广州

前摇摇言

1973年，斯坦福大学的科恩和梅洛成功地进行了第一项基因克隆实验，从而揭开了基因工程的序幕，至今基因工程学已整整经过了30年的发展历程。30年来，基因克隆技术已经在制药、食品、化工、轻工、农业、能源和环保等实际应用方面，取得了许多激动人心的成就，为国民经济发展带来了巨大的效益，给人类进步带来了新的契机。

目前，基因工程学正以新的势头继续向前迅猛发展，成为当今生物科学研究诸领域中最具生命力、最引人注目的前沿学科之一，特别是基因克隆技术在医药领域中的研究和应用，其意义之深远、潜力之巨大，更是无法估量。

基因克隆技术的一个显著特点，是它可以使一个生物体获得与之原有性状完全无关的新性能，从而使人们可以在大量扩增的细胞中，生产出某种珍贵的新型生物药物，其意义无疑是相当重大的。如今，我们可以应用基因克隆技术，将控制这些药物合成的目的基因克隆出来，转移到大肠杆菌或其他生物细胞内进行高效表达，可以方便地经提取纯化得到大量的珍贵药物。实际上，基因克隆技术最成功的成就，是用于治疗 and 预防的新型生物药物的研制、生产和应用。

由于基因克隆技术研究和应用的迅猛发展，不但急需大批的专业人才，也要求培养足够的后备力量。编写本书的目的，是希望为高等院校相关专业的本、专科生和低年级的硕士研究生，以及从事生物药物研制和生产的技术人员提供一本比较实用的参考书。

《基因克隆技术在制药中的应用》一书由杨汝德主编，其中下篇第十七章由陈惠音编写。全书分为上下两篇：技术篇和应用篇。技术篇共有九章，在内容上加重了基因克隆技术基本原理的系统论述，较适应作为初学者的本、专科生使用，故这部分也可作为有关专业“基因工程”课程的教学用书；应用篇共有八章，主要介绍基因克隆技术在制药中的应用，并列举各种生物药物基因的克隆与表达实例，以及各种基因工程药物的发酵生产实例，较适应从事生物药物研制和生产的人员使用。

本书在撰写过程中，参阅了国内外学者的著作和登载在刊物中的有关研究论文，同时也努力反映国内学者的研究成果，并尽量保持其原作。在此，谨向原作者表示真诚的谢意，并衷心感谢周世水博士、黄明博士、黄志立博士和张丽君博士等的帮助和支持。

基因克隆技术是一门发展十分迅速的高新技术，新理论和新的研究成果层出不穷，加之其涉及的知识面十分广泛，限于编者的学识和水平，书中疏漏和错误之处在所难免，恳请同行和读者批评指正。

编摇者

1998年 愿月

摇摇三、 λ 核酸外切酶	圆缘
第三章摇基因克隆技术制药常用质粒载体	圆苑
摇第一节摇质粒概述	圆苑
摇第二节摇质粒 阅读分子的基本特性	圆愿
摇摇一、质粒的构型、特性与大小	圆愿
摇摇二、质粒 阅读的复制	圆愿
摇摇三、质粒 阅读的提取与纯化	猿
摇摇四、质粒 阅读浓度和纯度的测定	猿
摇第三节摇主要质粒载体的改造和构建	猿
摇摇一、理想质粒需满足的条件	猿
摇摇二、质粒载体发展阶段	猿
摇摇三、质粒质粒载体	猿
摇摇四、质粒质粒载体	猿
摇摇五、其他重要的质粒载体	源
第四章摇基因克隆技术制药常用噬菌体载体	源
摇第一节摇 λ 噬菌体载体	源
摇摇一、 λ 噬菌体的基本特性	源
摇摇二、 λ 噬菌体基因组的结构与功能	源
摇摇三、 λ 噬菌体载体的改造与构建	源
摇摇四、常用的 λ 噬菌体载体	源
摇摇五、改良型 λ 噬菌体载体	缘
摇第二节摇黏粒载体	缘
摇摇一、黏粒载体的构建	缘
摇摇二、黏粒载体的特点	缘
摇摇三、常用的黏粒载体	缘
摇第三节摇 ϕ 噬菌体载体	缘
摇摇一、 ϕ 噬菌体的基本特性	缘
摇摇二、 ϕ 噬菌体载体的构建	缘
摇摇三、 ϕ 噬菌体载体系列的优点	远
摇第四节摇噬菌粒载体	远
摇摇一、质粒质粒和质粒质粒噬菌粒载体	远
摇摇二、质粒质粒噬菌粒载体	远
摇第五节摇哺乳动物细胞载体系统	远
第五章摇基因工程药物目的基因制取	缘
摇第一节摇目的基因的化学合成	缘
摇第二节摇构建基因文库法分离目的基因	愿
摇摇一、构建基因文库法分离目的基因的基本步骤	愿
摇摇二、真核基因组 阅读文库的构建过程	苑
摇第三节摇酶促合成法制取目的基因	苑
摇摇一、真核生物细胞中的 阅读	苑

摇摇二、从构建的 糯粳文库中筛选目的 糯粳	苑源
摇摇三、噬菌体法合成目的 糯粳	苑怨
第六章摇目的基因与克隆载体的体外重组	愿猿
摇摇第一节摇目的基因与质粒载体的连接	愿猿
摇摇一、黏性末端连接法	愿猿
摇摇二、定向克隆法	愿缘
摇摇三、平末端连接法	愿苑
摇摇四、同聚物加尾法	愿愿
摇摇五、加人工接头连接法	愿园
摇摇六、加 阅粳衔接物连接法	愿员
摇摇七、其他转换末端形式连接法	愿员
摇摇第二节摇目的基因与 λ 噬菌体载体的连接	愿猿
摇摇一、 λ 噬菌体载体臂 阅粳的制备	愿猿
摇摇二、 λ 噬菌体载体臂与目的 阅粳片段的连接	愿源
第七章摇重组克隆载体引入受体细胞	怨缘
摇摇第一节摇受体细胞概述	怨缘
摇摇一、基因克隆的受体细胞	怨缘
摇摇二、重组体分子导入受体细胞的途径	怨远
摇摇第二节摇重组体 阅粳分子的转化或转染	怨苑
摇摇一、用氯化钙制备新鲜的感受态细胞转化法	怨苑
摇摇二、用复合剂制备感受态细胞转化法	怨愿
摇摇三、高压电穿孔转化法	怨怨
摇摇第三节摇重组 λ 噬菌体 阅粳的体外包装与转导	怨怨
摇摇一、 λ 噬菌体体外包装的基本原理	员园园
摇摇二、 λ 噬菌体 阅粳的体外包装	员园园
摇摇三、包装提取物的制备	员园员
摇摇四、重组 λ 阅粳的体外包装与感染方法	员园员
摇摇第四节摇重组克隆载体导入哺乳动物细胞的转染	员园园
第八章摇目的重组克隆的筛选、鉴定与分析	员源
摇摇第一节摇含目的基因重组克隆的筛选	员源
摇摇一、抗生素抗性基因插入失活法	员源
摇摇二、 β 半乳糖苷酶基因插入失活法	员缘
摇摇三、快速细胞破碎与凝胶电泳筛选法	员缘
摇摇四、放射性标记核酸探针杂交筛选法	员远
摇摇五、免疫化学筛选法	员园
摇摇第二节摇目的重组克隆的鉴定	员源
摇摇一、酶切及凝胶电泳鉴定法	员源
摇摇二、杂粳膜印迹杂交法	员远
摇摇三、晕粳膜印迹法	员苑
摇摇四、电镜 噬斑检测法	员苑

摇摇五、免疫学检测法	员愿
摇摇六、基因产物鉴定法	员员
摇第三节 摇重组 阅粤的序列分析	员员
摇摇一、 杂合双链终止法 阅粤测序	员圆
摇摇二、 配管老那德刚化学修饰法 阅粤测序	员缘
摇摇三、快速自动化 阅粤测序	员苑
第九章 摇目的基因在宿主细胞中的表达	员苑
摇第一节 摇外源目的基因在原核细胞中的表达	员苑
摇摇一、原核基因表达载体的构成	员苑
摇摇二、常见的原核细胞表达载体系统	员员
摇摇三、外源目的基因在原核细胞中的表达形式	员圆
摇摇四、在原核细胞中高效表达目的基因	员源
摇摇五、基因定点诱变技术	员苑
摇第二节 摇外源目的基因在真核细胞中的表达	员怨
摇摇一、真核细胞表达载体的功能元件	员怨
摇摇二、酵母菌表达系统	员员
摇摇三、昆虫细胞表达系统	员缘
摇摇四、哺乳动物细胞表达系统	员苑

下篇 摇应用篇

第十章 摇基因克隆技术制药概述	员员
摇第一节 摇基因克隆技术的应用与发展趋势	员圆
摇摇一、全球性的基因工程争夺战	员圆
摇摇二、蛋白质工程的研究开发飞速发展	员猿
摇摇三、转基因动植物生产药物的研究迅速崛起	员源
摇摇四、医学科学研究取得巨大成就	员缘
摇摇五、基因治疗技术取得重大进展	员缘
摇摇六、国际“人类基因组计划”提前完成	员缘
摇第二节 摇基因克隆技术与生物制药	员苑
摇摇一、基因克隆技术制药发展态势	员苑
摇摇二、主要基因工程药物简介	员愿
第十一章 摇生物药物基因的克隆及其在大肠杆菌中的表达	员猿
摇第一节 摇人白细胞介素基因的克隆与表达	员猿
摇摇一、人白细胞介素 圆融合蛋白工程菌的组建	员猿
摇摇二、人白细胞介素 圆的克隆及其融合蛋白表达	员源
摇第二节 摇集落刺激因子基因的克隆与表达	员苑
摇摇一、 员云重组表达载体与工程菌的组建	员苑
摇摇二、 员云融合蛋白基因的克隆与表达	员苑
摇第三节 摇纤溶酶原激活剂基因的克隆与表达	员园
摇第四节 摇碱性成纤维细胞生长因子基因的克隆与表达	员员

摇摇一、以包涵体形式表达的 重组人干扰素中试分离纯化	圆缘
摇摇二、重组人血管生长素包涵体的分离纯化	圆缘
摇摇三、以分泌型表达的人 α 干扰素的分离纯化	圆缘
摇摇四、以可溶性形式表达的 重组人干扰素的分离纯化	圆缘
摇摇五、在酵母中表达的 匀质物的分离纯化	圆缘
摇摇六、在酵母中表达 匀质物与融合蛋白的分离纯化	圆缘
第十七章 摇基因工程药物的分析与检验	圆缘
摇摇第一节 摇基因工程药物的质量控制	圆缘
摇摇一、主要的基因工程药物	圆缘
摇摇二、基因工程药物的特点	圆缘
摇摇三、基因工程药物的质量要求	圆缘
摇摇四、基因工程药物的质控要点	圆缘
摇摇五、基因工程药物的制造及检定规程	圆缘
摇摇第二节 摇基因工程药物常用的检验方法	圆缘
摇摇一、化学检定法	圆缘
摇摇二、肽图分析法	圆缘
摇摇三、外源性 杂质残留量的测定	圆缘
摇摇四、宿主细胞蛋白杂质的检测	圆缘
摇摇五、无菌试验	圆缘
摇摇六、内毒素试验	圆缘
摇摇七、异常毒性试验	圆缘
摇摇八、热原质试验	圆缘
摇摇九、生物学活性（效价）检定	圆缘
摇摇第三节 摇基因工程药物的分析检验举例	圆缘
摇摇一、重组人干扰素的分析检验	圆缘
摇摇二、重组人白细胞介素的分析检验	圆缘
摇摇三、重组人红细胞生成素的分析检验	圆缘
摇摇四、重组人集落刺激因子的检验	圆缘
附录 员 重组人干扰素效价测定（细胞病变抑制法）	圆缘
附录 圆 重组人白细胞介素 效价测定（ ^{51}Cr 依赖细胞株 培养比色法）	圆缘
附录 猿 重组人干扰素体内活性测定（网织红细胞法）	圆缘
附录 源 重组人干扰素纯度测定（ ^{35}S 标记法）	圆缘
附录 缘 重组人干扰素细胞蛋白残留量测定（ ^{35}S 标记法）	圆缘
附录 远 重组人干扰素效价测定（ ^{51}Cr 依赖株 培养比色法）	圆缘
主要参考文献	圆缘

上篇摇技摇术摇篇

第一章摇基因克隆技术概述

基因克隆技术（~~早~~），又称为分子克隆技术（~~早~~）或重组 DNA 技术（~~早~~），通常称为基因工程（~~早~~）。它是基因分子水平上的遗传工程，是 20 世纪 70 年代初期在分子遗传学基础上发展起来的一个崭新领域，是一门能人工地定向改造生物遗传性状的育种新技术。

第一节摇基因克隆技术

一、基因克隆技术的诞生和兴起

基因克隆技术这门现代生物技术中最先进、最热门的育种新技术的诞生和兴起并非偶然的事件，它是在几十年中生物化学、微生物学、分子生物学和分子遗传学等学科，取得一系列研究成就的基础上逐渐发展起来的。概括起来，这些成就主要包括下列几个方面。

（一）遗传物质基础的证明

1952 年 赫尔希等，在 1951 年 艾弗里所做的肺炎链球菌转化试验的基础上，采用离体培养的方法，测定 S 型细胞中各种分离提纯了的提取物（包括 DNA、RNA、蛋白质、多糖等）的转化活性。试验结果发现，只有从 S 型菌提出的 DNA，与 R 型菌混合于琼脂平板上进行培养时，才能使 R 型转化为 S 型。这就有力地证明了 DNA 是转化因子，DNA 能引起遗传性状的变化。这也就直接证明了遗传信息的物质基础是 DNA 而不是蛋白质。

1953 年以后，由于研究生物大分子的手段有了重大进展，又提出了以下四个发现或假说：①载射线衍射显示 DNA 立体结构中碱基分子相互靠近；② DNA 中嘌呤碱基与嘧啶碱基有相互吸引的趋势；③嘌呤与嘧啶碱基的比例为 1:1；④ DNA 碱基排列顺序应该是不规则的，才有可能携带极丰富的遗传信息。以上这些发现和假说对于进一步阐明 DNA 的结构起着巨大的作用。

（二）DNA 双螺旋结构和功能的阐明

1953 年 沃森和 克里克根据碱基组成的测定和载射线衍射分析的结果，提出了著名的 DNA 双螺旋结构模型的理论 and 半保留复制机理，圆满地解释了 DNA 的理化性质、自体复制方式和生物遗传现象。这一重大发现使人类对基因的认识有了实质性的突破，推动了遗传学的迅速发展，开辟了分子生物学的新纪元。

（三）遗传信息的流向和表达机制的阐明

在 20 世纪 50 年代末期和 60 年代，相继提出了中心法则和操纵子学说，并成功地破译了遗传密码，从而阐明了遗传信息的流向和表达机制。

人们已认识到，生物体的遗传信息主要是以密码的形式编码在 DNA 分子上，表现为特定的核苷酸排列顺序。DNA 通过复制可以将遗传信息传递给子代 DNA 分子，DNA 分子又可以通过转录作用将遗传信息传递给信使 RNA（mRNA），mRNA 进而控制专一蛋白质的合成，使遗传信息在蛋白质肽链的氨基酸排列顺序上得到体现，即遗传密码的翻译。

阅读 → 转录 → 多肽链这一 阅读中心法则的建立，解开了蛋白质合成过程中转录和翻译之谜，指导着人们认识蛋白质的生物合成过程。随着后来反向转录酶的发现，又肯定了某些病毒能够以 阅读为模板合成互补 阅读，这就更进一步完善和补充了中心法则。遗传信息复制和传递机制的阐明，为人工改变生物 阅读结构而引起遗传性状的变化，从而创造出生物新品种和新型产物提供了可能性。

(四) 限制酶与连接酶等工具酶的发现

早在 20 世纪 50 年代初期，就已发现寄主细胞对噬菌体的限制作用，后来发现这种限制作用是菌株中限制性核酸内切酶（简称限制酶）作用的结果，它专门分解外来的 阅读而使其失去复制的能力，实际上是寄主细胞抵抗外来 阅读侵袭的一种防御机制。

20 世纪 50 年代末期和 20 世纪 60 年代初期，经详细的研究，人们弄清了限制酶是一类专一性很强的核酸内切酶，它与一般的 阅读水解酶不同之处，在于它们对碱基作用的专一性上及对磷酸二酯键的断裂方式上，具有一些特殊的性质。这种酶被形象地称为分子剪刀，它们的发现和应用大大促进了基因工程技术的进展，在基因的分离、 阅读结构分析、载体的改造及体外重组中均起着重要作用。

在 1967 年，世界上有缘个实验室几乎同时发现了 阅读连接酶。连接酶是另一种对 阅读重组技术的创立具有重要意义的工具酶。1970 年，当时在威斯康星大学的 阅读实验室，又发现 阅读连接酶具有更高的连接活性，甚至能催化两段 阅读分子进行平末端的连接。该类酶的发现和分离提纯，使两个 阅读片段在体外连接形成重组 阅读分子成为可能，在 阅读合成、 阅读复制和基因重组中起着十分重要的作用。

限制酶与连接酶等工具酶的发现，从根本上解决了 阅读分子的体外切割与连接技术难题，它是重组 阅读的核心技术。除限制酶和连接酶外，还有 阅读聚合酶、逆转录酶、碱性磷酸酯酶、末端脱氧核苷酸转移酶和 阅读核酸酶等，都是基因操作中必要的工具酶。

(五) 质粒等基因克隆载体的发现

多年以来，分子生物学家就选定 λ 噬菌体作为基因克隆的最有希望的载体，并对其进行了最为深入的研究。然而第一个将外源基因导入寄主的载体却不是 λ 噬菌体，而是质粒载体。

其中，最早被发现和研究的质粒是大肠杆菌致育因子（云因子）。1952 年又发现大肠杆菌能产生一种蛋白质性的抗菌物质，称为大肠杆菌素。后来查明它是由另一种质粒——悦因子支配产生的，成了第二个研究历史较长的质粒。1953~1954 年，在日本发现了抗药性质粒（砸因子），具有分子量小、易于操作和抗药性选择标记等优点。后来又不断在细菌和放线菌中发现各种各样的质粒。

人们通过对质粒的结构与功能的深入研究，弄清质粒是一种存在于微生物细胞内染色体外的闭合环状双链小型 阅读分子，是能够进行独立自体复制并保持恒定遗传的复制子。它能从一个微生物细胞转移到另一种微生物细胞中，而且某些质粒能在细胞中大量复制。因而有可能利用质粒作为基因的运载体，将某种外源基因从一个细胞转移至另一个细胞并大量复制该基因的拷贝，从而高产相应的基因产物。

质粒的发现为不同生物细胞间基因的转移开创了新局面。目前已被发展成为基因分子克隆中最常用的载体。如 阅读和 阅读等质粒载体就是其中突出的代表。

(六) 细胞转化方法的建立

将外源 阅读分子导入细菌细胞的转化现象，虽然早在 20 世纪 30 年代就已经在肺炎链

球菌中发现，但对于大肠杆菌来说，却直到 1970 年才获得成功。

当时，**威尔逊**和 **梅里尔**发现用 **氯化钙**处理大肠杆菌，能使该菌对 λ 噬菌体的吸收有显著的增加。1970 年，斯坦福大学的 **伯格**等人报道，经氯化钙处理的大肠杆菌细胞同样也能够摄取质粒 λ 噬菌体。将该技术应用于质粒 λ 噬菌体的转化，结果每微克 λ 噬菌体可得到大约 $10^5 \sim 10^6$ 个转化子。从此，大肠杆菌便成了分子克隆的良好转化受体。大肠杆菌转化体系的建立，对基因工程的创立具有特别重要的意义。

(七) 核酸和蛋白质序列分析技术的发明

1959 年 **桑格**发明了氨基酸序列分析测定法，接着又发明了 λ 噬菌体分子的核苷酸序列分析测定法，使人们对 λ 噬菌体序列分析获得重大突破，一次实验便可确定几百个碱基的排列顺序。知道了某个蛋白质的基因的碱基序列，就可根据 **三个碱基决定一个氨基酸**的三联体密码子，推知该蛋白质的氨基酸序列，并可用化学方法人工合成基因。因此，核酸和蛋白质序列分析技术的发明，使基因的分析合成成为可能。

综上所述，遗传物质基础的证明、 λ 噬菌体双螺旋结构和功能的阐明、遗传信息的流向和表达机制的阐明、限制酶与连接酶等工具酶的发现、质粒等基因克隆载体的发现、细胞转化方法的建立、核酸和蛋白质序列分析技术的发明等，为基因克隆技术这一划时代的生物新技术的诞生和兴起，奠定了坚实的理论和技術基础。在 20 世纪 70 年代初期开展的 λ 噬菌体重组工作，无论在理论上还是技术上都已经具备了条件。

1972 年，美国斯坦福大学的 **博伊伦**博士领导的研究小组，使用核酸内切限制酶 **EcoRI**，在体外对猿猴病毒 **SV40** 的 λ 噬菌体和 λ 噬菌体的 λ 噬菌体，分别进行酶切消化，然后再用 **碱性磷酸酶**连接酶将两种消化片段连接起来，结果获得了包括 **SV40** 和 λ 噬菌体重组的杂种 λ 噬菌体分子。**博伊伦**等人率先完成了世界上第一次成功的 λ 噬菌体体外重组实验，并因此与 **吉尔伯特**和 **威尔逊**分享了 1978 年度的诺贝尔化学奖。

1973 年，斯坦福大学的 **伯格**和 **科恩**也成功地进行了另一个体外 λ 噬菌体重组实验。他们将编码有卡那霉素抗性基因 (**kan^r**) 的大肠杆菌 **质粒** λ 噬菌体，和编码有四环素抗性基因 (**tet^r**) 的另一种大肠杆菌质粒 **质粒** λ 噬菌体混合后，加入核酸内切限制酶 **EcoRI**，对 λ 噬菌体进行切割，而后再用 **碱性磷酸酶**连接酶将它们连接成重组的 λ 噬菌体分子。

用这种连接后的 λ 噬菌体混合物转化大肠杆菌，结果发现，某些转化子菌落的确表现出了既抗卡那霉素又抗四环素的双重抗性特征。从此种双抗性的大肠杆菌转化子细胞中分离出来的重组质粒 λ 噬菌体，带有完整的 **kan^r** 分子和一个来自 **EcoRI** 质粒编码卡那霉素抗性基因的 λ 噬菌体片段。人们一般认为，这是第一项基因克隆实验，它揭开了基因工程的序幕。

为了说明不同物种的外源 λ 噬菌体片段也可以在大肠杆菌细胞中增殖，**伯格**等人又应用与上述类似的方法，把非洲爪蟾编码核糖体基因的 λ 噬菌体片段同 **质粒** λ 噬菌体重组，并导入大肠杆菌细胞。转化子细胞分析结果表明，动物的基因的确进入到大肠杆菌细胞，并转录出相应的 **mRNA** 产物。**伯格**的工作，是第一次成功的基因克隆实验，具有十分重要的意义。摇

二、基因克隆技术的特点与步骤

基因克隆技术是用人工方法将外源基因与 λ 噬菌体载体结合形成重组 λ 噬菌体，然后引入某一受体细胞中，使外源基因复制并产生相应的基因产物，从而获得生物新品种的一种崭新育种技术。

基因克隆技术是 20 世纪 70 年代初，在分子遗传学基础上发展起来的一个崭新技术领

域。它能将不同来源的遗传物质在体外合成重组 DNA 分子，这种重组 DNA 分子可以被引入受体细胞，进行增殖、繁衍而发育成一个新种。这一过程在自然界演化中一般是不会发生的。

（一）基因克隆技术的特点

基因克隆技术与其他育种技术相比，具有如下特点。

1. 能像工程一样可按人们的意愿来事先设计和控制

基因克隆技术不仅可预知某一基因的改变，而且可以及早纠正，可以有计划、有目的地构建基因，所以基因克隆技术育种是比较定向的。此外，基因克隆技术育种的每步变化均可检测，可保证产品的纯度和安全性。因此，应用基因克隆技术，使生物科学工作者首次能将遗传物质按人们的意愿进行周密设计和人工操纵，为进一步深入研究基因的结构、功能、表达和调控等提供了一个划时代的有效手段。

2. 人工的、离体的、分子水平上所进行的遗传重组

基因克隆技术有能力在极端错综复杂的生物细胞内取出所需基因，并能人为地将此目的基因在试管中进行剪切、拼接、重组并转化到受体细胞中，经无性繁殖能增产出数百数千倍的新型蛋白质（主要是各种多肽和蛋白质类生物药物），这是基因克隆技术最突出的优越性。

3. 能在动植物和微生物间进行任意的、定向的超远缘杂交

基因克隆技术的最大威力在于它能使带有支配各种各样遗传信息的 DNA 片段越过不同生物间特异的细胞壁而组入到完全不同的没有亲缘关系的生物体内，能定向地控制、修饰和改变生物的遗传和变异。因而完全有可能创造出前所未有的具有新的遗传性状的生物新类型，使育种工作产生了革命性变化。

（二）基因克隆技术的步骤

基因克隆技术实际上是将遗传信息（DNA）从一种生物细胞转移到另一种生物细胞中并得以表达的若干实验技术的总称。概括起来，基因克隆技术应包括以下四个基本步骤。

1. 外源目的基因的取得

从复杂的生物细胞基因组中，经过酶切消化或 PCR 扩增等步骤，分离出带有目的基因的 DNA 片段，取得所需的基因（外源性 DNA 片段）；或者从特定细胞里提取所需基因的总 DNA 后，在适宜的条件下利用逆（反）转录酶的作用来取得所需基因；或者通过探明目的基因所含的遗传密码及其排列顺序，然后用化学方法人工合成所需的基因。

2. 基因运载体的分离提纯

基因运载体是具有自体复制能力的另一种 DNA 分子，它经过处理后，能与外来基因（外源性 DNA）相结合，并带有必要的标记基因。目前，常用的基因运载体主要有两类：一类是质粒，一类是病毒（包括噬菌体）。以前者为例，首先用溶菌酶分解细菌细胞壁，然后用物理化学的方法，把质粒与其他成分分开，从而得到纯粹的质粒。

3. 重组 DNA 分子的形成

通过专一限制性内切核酸酶的处理或人为的方法，使带有目的基因的外源 DNA 片段和能够自我复制并具有选择标记的载体 DNA 分子，产生互补的黏性末端而相互配对结合，并通过连接酶在体外使两者连接起来，形成一个完整的新的 DNA 分子——重组 DNA 分子。

4. 重组 DNA 引入受体细胞

重组 DNA 即是带有目的基因的运载体（杂种质粒或病毒）。用人工的方法（转化或转

导法)将重组 阅读分子转移到适当的受体细胞(宿主细胞)中,使它能在细胞中“定居”下来。通过自体复制和增殖,形成重组 阅读的无性繁殖系(即克隆),从而扩增产生大量特定目的基因,并使之得到表达,即能指导蛋白质的合成。

重组菌的筛选、鉴定和分析

从大量受体菌中设法筛选出带有目的基因的重组菌(克隆株系),并进行鉴定。然后培养克隆株系,提取出重组质粒,分离已经得到扩增的目的基因,再分析测定其基因顺序。

工程菌的获得和基因产物的分离

将目的基因克隆到表达载体上,再次导入到受体菌中,经反复筛选、鉴定和分析测定,最终获得较稳定的高产的基因工程菌,然后进行大量培养繁殖,产生出所需要的目的基因产物,再进行分离纯化。

上述仅是基因克隆技术的基本步骤。在实际工作中,其具体操作步骤还要更多,因为很多步骤必须重复进行,必须多次分离和分析测定重组 阅读。

第二节 基因克隆技术早期开创性研究成就

从 1973年 悦霖社和 月霖社的第一项基因克隆实验获得成功并标志着基因工程的正式开始之后,由于人们对基因工程安全性的过分担心,人为地制定了各种限制措施,使基因克隆研究受到阻碍而进展缓慢。主要的研究成果有两项。

① 1978年,月霖社 匀霖社和 再霖社合作构建了扩增拷贝数很高的 悦霖质粒,为此后的基因扩增研究铺平道路;

② 1978年,悦霖社 月霖社 配霖社和 则霖社等人合作,第一次将一个真核生物基因引入了大肠杆菌中并得到转录。

后来,随着人们认识的不断深入以及采取了必要的安全防范措施,放宽或取消某些过于严厉的限制,使基因克隆研究又得到迅速的发展。

(一) 大脑生长激素释放抑制素的克隆与表达

1978年 11月,有机化学家 运霖社和 砸霖社合作,将化学合成的大脑生长激素释放抑制素(译霖社,简写 杂霖)基因与大肠杆菌 β 半乳糖苷酶基因和 责霖质粒重组,转化到大肠杆菌中并表达成功。结果产生含生长抑制素(杂霖)的嵌合型蛋白质,经溴化氰处理后,释放出有活性的生长抑制素(11肽)。

这是真核生物的人造基因首次在原核生物中表达成功,其实践意义是可以透过发酵途径生产出大量廉价的这类有价值的产品。在理论上,它提供了这样一个依据:通过基因克隆技术利用细菌来研究高等生物基因功能的表达有现实可能性。

生长抑制素能抑制包括生长激素、胰岛素和胰高血糖素等多种激素的产生,是一种很有用的药物。它可医治肢端肥大症、急性胰腺炎等。按常规制备法,从 缘万头羊的脑下垂体中才能提取得 缘生长抑制素,需亿万美元。采用基因克隆技术,只要用 责霖工程菌培养液就可获得同样的产量,只需 猿亿美元。这项振奋人心的重大成果的取得,大大地增强了人们对基因工程的兴趣和信心。

(二) 胰岛素原前体基因的克隆

1978年,老鼠胰岛素原前体基因成功地转化进入大肠杆菌,并且得到了表达。这个实验是首先从胰岛瘤提取胰岛素原前体 身霖,再用逆转录酶合成它的互补 阅读,通过限制性内切酶的切点,将胰岛素原前体 阅读转换到 责霖质粒 阅读上,最后将此重组 阅读再