第一部分

基因工程原理

需要全本请访问 www.ertongbook.com

第一章

绪　论

1.1　基因工程的发展史

基因工程诞生于 20 世纪 70 年代初期，是在现代分子生物学领域中的许多理论和技术研究成果基础之上发展起来的。现代分子生物学在理论方面的三个重要的发现和在技术方面三个重要的成果对基因工程的诞生起到了决定性的作用。

1.1.1　理论上三个重要的发现

1. 生物的遗传物质——DNA 的发现

1934 年，艾弗里（Avery）在一次学术会议上首次报道了有关肺炎球菌转化实验的研究结果。遗憾的是，他的论文在当时并未得到科学界的承认。10 年以后，这一重要的科研成果才被公开发表。艾弗里（Avery）工作的意义在于证明了 DNA 是生物的遗传物质，同时还说明 DNA 可以将一个细菌的性状传给另一个细菌。可以说艾弗里（Avery）的工作是现代生物科学的开端。

2. DNA 双螺旋结构和半保留复制机理的建立

1953年，沃森(Watson)和克里克(Crick)首次提出了DNA的双螺旋结构和半保留复制的机理。这一重大的科学发现大大地促进了现代生物科学的发展。

3. 遗传信息传递方式的确立

20世纪60年代，以尼然博格(Nirenberg)、奥科(Ochoa)和霍拉纳(Khorana)等为代表的一批科学家经过大量的工作和艰苦的努力，破译了遗传密码，确定了遗传信息的传递方式。至1966年，全部64个遗传密码被破译，并排出密码字典，提出了中心法则，为基因工程的诞生奠定了理论基础。

1.1.2 技术上三个重要的成果

1. 基因工程的工具酶

基因工程是一门综合性的生物技术。仅有理论上对遗传物质的认识和了解还不够。如何将庞大的DNA分子进行切割并重新组装是生物科学家们遇到的一个大难题。

1966年，科学家发现了DNA连接酶。

1970年，史密斯(Smith)和威尔科克斯(Wilcox)在流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)中分离并纯化了限制性内切酶*Hind* Ⅲ，使DNA分子的切割成为可能。

1972年，核酸内切酶*Eco*R Ⅰ被博耶(Boyer)实验室发现并纯化。

1979年，鲍梯莫尔(Baltimore)和特米恩(Temin)领导的两个研究小组分别在各自的工作中发现了逆转录酶。这一成果的重要意义在于打破了中心法则DNA→RNA→蛋白质的模式，使真核基因的制备成为可能。

2. 基因工程的载体

工具酶的发现和纯化只解决了DNA分子的切割和连接问题。由于大多数DNA片段并不具备自我复制的功能，使DNA的

体外重组仍然存在问题。为了使 DNA 片段能在宿主细胞中得以扩增，必须将其接到一个特定的能够进行自我复制的载体分子上。

莱德博格(Lederberg) 从 20 世纪 40 年代开始便从事细菌的性因子（F）因子的研究。20 世纪 50 年代和 20 世纪 60 年代，相继发现了其他质粒，比如抗药性因子（R 因子）和大肠杆菌因子(CoE)。这些工作都为基因工程载体系统的建立打下了基础。

3. 基因的体外重组

1972 年，美国斯坦福大学的博格 (Berg) 研究小组利用限制性内切酶 *Eco*R Ⅰ和 T4DNA 连接酶成功地进行了首例基因体外重组实验，获得了包含有猿猴病毒 SV40 和人 DNA 重组的杂种分子。

1973 年，科恩（Cohen)等人用 *Eco*R Ⅰ内切酶处理大肠杆菌的抗四环素和抗新霉素及磺胺的质粒，并连接成一个新的重组质粒。将这种工程化的质粒转入到大肠杆菌之中，在含有四环素和新霉素的平板中筛选到了重组菌落。同年，加利福尼亚的博耶(Boyer) 小组也进行了类似的工作。重组子转化的成功标志着基因工程的诞生。

1.2 基因工程的研究内容

1.2.1 基因工程

什么是基因工程？关于基因工程并没有一个统一的定义。广义上是指核酸分子经体外加工，将不同来源的基因按照设计组成新的基因组，再把它引入宿主细胞中，使之表达的技术。简单地可归纳为：通过体外基因操作，引起生物遗传性状改变的技术。基

因工程也可称为基因克隆或 DNA 分子克隆。

1.2.2 基因工程的研究内容

基因工程的研究内容或操作程序为：

1. 特定目的基因的分离或合成

所谓目的基因是指人们想要改造的基因。基因工程的第一步就是要获得目的基因片段。使用的方法有分离法和合成法。

2. 构建重组 DNA 分子

在体外，用限制性内切酶处理目的基因片段和载体 DNA 片段。在连接酶的作用下将两个片段连接起来，形成重组 DNA 分子，又称为重组子。

3. 转化宿主细胞

将重组 DNA 分子转入宿主细胞。重组 DNA 分子在细胞中利用其中的物质来进行自身繁殖。

4. 筛选重组 DNA 菌落

转化后的宿主细胞经过培养可产生大量细胞繁殖群体，即菌落。其中，有一部分菌落带有重组体，一部分是未被转化的原细胞菌落。必须将带有重组体的菌落用某种方法分离出来。

5. 目的基因的有效表达

目的基因在宿主细胞中得到了增殖并不意味着实验的成功。最终目的是获得目的基因的表达产物。而目的基因的表达产物很容易被降解或出现低表达率，特别是真核基因在原核生物中的表达。这方面，还有许多问题有待解决。

需要全本请访问 www.ertongbook.com

1.3 基因工程的应用

基因工程已在医药业、农牧业、食品工业、环境保护、能源开发等领域得到了广泛的应用，产生了巨大的经济效益，展示了无限广阔的应用前景。

1.3.1 在医药业的应用

1. 基因工程在制药业中应用的成果

许多人体活性多肽和某些疫苗，比如激素、淋巴因子、神经多肽和调节蛋白等，对疾病的诊断、预防及治疗有着重要的价值，但由于材料来源困难、技术难度大或造价高而不能付诸使用。基因工程在医药研究方面的重大突破使这些昂贵的药品产量大幅度提高，成本大大降低。下面简单地介绍几种基因工程药物。

(1) 生长激素释放抑制素

人生长激素释放抑制素 (somatostatin) 是一种具有重要生理功能的多肽激素。它能抑制生长素、胰岛素和胰高糖素的分泌，可用来治疗肢端肥大症和急性胰腺炎等疾病。如用化学法合成这个14个氨基酸的多肽，操作程序繁琐，价格昂贵，每克售价为5万美元。若从动物的脑组织中提取，因含异体蛋白，会引起过敏反应。以博耶(Boyer) 为代表的美国科学家们联合攻关，于1977年11月首次用基因工程技术生产出了这种激素，这在世界范围内引起了震动。它不仅为研究高等动物基因的表达打下了基础，而且大大地降低了生产成本（每克为300美元），已于1983年投放市场。

(2) 生长激素

1979 年 7 月加利福尼亚大学和南旧金山的基因技术公司宣布，利用基因工程技术生产人生长激素获得成功。从 275kg 细菌发酵液中提取出的生长激素相当于从 6 万具尸体的人脑垂体中提取的总量，经济效益十分明显。

(3) 胰岛素

基因工程生产胰岛素的成功是在众多的科学家们的努力下实现的。

1977 年，美国的尤尔利奇（Ullrich）和古德曼(Goodman)利用大肠杆菌获得了鼠的胰岛素基因转移。这次实验尽管未获得目的基因的表达，但在技术上为细菌生产人胰岛素打下了基础。

1977 年 6 月，美国哈佛大学和波士顿（Joslin）的基因公司联手攻关。以吉伯德（Gilbert）博士为首的研究小组，利用大肠杆菌生产出了鼠的胰岛素。尽管这种胰岛素不能用于人类糖尿病的治疗，但是它表明人类在利用细菌生产胰岛素方面又前进了一步。

1978年 9 月，美国加州大学的板仓（Itakuna）和霍普市医学中心研究组成功地利用大肠杆菌生产出了人胰岛素。基因工程生产的胰岛素比从动物器官中提取的胰岛素便宜了 30%～50%，而且又非常快速，因为大肠杆菌增殖一代只需 30 min ～40 min。2000 L 培养液提取的胰岛素相当于从 500 kg 猪胰脏中提取的产量。

(4) 乙型肝炎疫苗

乙型肝炎是一种在世界范围内传播的传染病。由于这种肝炎病毒不能用动物细胞培养，无法制造疫苗。传统的方法是从患者血液中分离病毒颗粒，灭活后作为疫苗，使应用受到限制。基因工程问世以来，科学家们开始了生产基因工程乙肝疫苗的研究，取得了成果。美国默克公司生产的乙肝病毒重组 DNA 疫苗已于 1986 年获准开始生产。我国在这方面的研究也取得了进展，已经能够利用基因工程方法生产乙肝疫苗。

除了以上提到的几种产品外，还有许多基因工程产品已研制成功并投放市场，如血球凝聚素、尿激酶、松弛素、抗血友病因子等。另据报道，计算机在基因工程药物生产中的应用，使生产工艺和产量都得到惊人的提高。

2. 遗传病的预防与治疗

基因工程技术已被应用于人类遗传病的预防和治疗中。医生利用基因工程技术可鉴别出有缺陷的基因，建议孕妇终止妊娠以达到优生的目的。人们还试图用功能基因取代有缺陷的基因，从根本上治疗遗传性疾病。

(1) 单基因缺陷的诊断

许多遗传病都是由单基因缺陷造成的。现在，人们已有可能对某些单基因缺陷病（比如唐氏综合症）作产前诊断。有一种方法是将正常人的 DNA 和胎儿细胞 DNA 制成指纹图谱，经过比较，可准确地作出诊断。

(2) 基因治疗

真正地治疗遗传性疾病需要采用一种叫做基因疗法的技术。虽然迄今为止尚无成功的例子，但是科学家们已进行了大量的工作，取得了一些进展。

1980 年，美国科学家克莱恩博士将目的基因转入小鼠体内获得成功。耶鲁大学的拉德尔博士将病毒基因注射入小鼠的受精卵中，解剖由这些受精卵发育成的小鼠发现，外源基因已使小鼠原有的基因组分发生了变化。

1983 年，美国科学家帕米特和布林斯将大鼠的生长激素基因与小鼠的一组基因拼接成重组体。含有这种重组 DNA 的小鼠受精卵发育正常，有一只小鼠已经将移植基因传给了后代。这一工作使人们相信，比小鼠高级的动物和人类也有可能接受外来基因。

3. DNA 探针诊断疾病

DNA 探针是一小段能识别特定基因序列 DNA 片段，使用

它可以在分子水平上诊断疾病。

(1) 诊断遗传病

有些遗传病很难进行诊断，特别是隐性遗传病。比如一种叫囊性纤维变性病基因的携带者没有任何症状，但两个携带者的后代患此病的机会为 25%，这种病人通常在 20 岁之前死亡。人们正在努力研究利用 DNA 探针来检测这类遗传性疾病。

(2) 诊断遗传损伤

DNA 探针可以探测出由于各种原因造成的遗传损伤。据报道，美国将开发出各种专门探测由于一些化学诱变剂造成的遗传损伤。

(3) 诊断癌症

肿瘤细胞的形成与致癌基因有关已是公认的事实。科学家们开始考虑用 DNA 探针去诊断癌症，这种方法具有快速准确的特点。目前，世界上几家大的生物技术公司都在加紧进行研究和开发工作。

1.3.2 在农业方面的应用

从 20 世纪 70 年代至今，植物基因工程随着 DNA 重组技术、基因遗传转化技术及植物组织培养技术的完善，已取得了重大进展。通过基因工程手段已培育出了高产、优质和抗逆的作物新品种，为解决全人类共同面临的粮食短缺问题带来了希望。

植物基因工程的研究主要分三个方面：

1. 目的基因的分离与改造

已分离的供植物基因工程使用的基因已有上百个，比如，抗病毒、细菌和真菌的基因，能杀死害虫或使害虫拒食的基因，能抵抗各种除草剂的基因，抵抗逆境（干旱、盐碱、寒冷、高温等）的基因和能够提高蛋白含量或品质的基因。

2. 培育具有改良的经济性状的转基因植物

1994年统计表明：已经有140种植物，包括烟草、矮牵牛、胡萝卜、番茄、马铃薯、向日葵、油菜、苜蓿、亚麻、甜菜、棉花、芹菜、荷花、黄瓜、拟南芥菜、大豆、水稻、玉米、莴苣和杨树等被改造，培育出了一些抗病、抗虫、抗除草剂、抗逆性和高产优质的作物新品种。研究的内容还涉及果蔬储藏、作物固氮能力、药物生产及环境美化等方面。

3. 培育具有生物反应器功能的转基因植物

利用植物合成微生物或哺乳动物的一些特殊蛋白已取得进展，将来有可能通过转基因植物生产各种药用蛋白。

1.3.3 在畜牧业方面的应用

基因工程技术在畜牧业方面的应用具有无法估量的潜力。应用范围不仅在家畜品种改良上，而且在利用动物生产特殊药物方面展示了广阔的前景。

1. 改良品种

利用显微注射技术已成功地培育出了转基因鱼。我国学者朱作言于1985年首次将小鼠MT／人GH融合基因注入金鱼受精卵中，获得了转基因金鱼。至今，他的实验室已获得鲫鱼、鲤鱼和泥鳅的转人生长激素基因鱼。国际上，美国、加拿大等国家获得了转基因鳟鱼和鲑鱼。利用基因工程和显微注射技术还培育出了转基因鸡和转基因猪。

2. 遗传病动物模型的研制

将致癌基因导入受精卵原核内，形成转致癌基因小鼠，这种转基因动物即为“癌模型鼠”，可用于某些癌基因的致癌机理和表达调控的研究。目前，已有10多种癌基因被用来建立“癌模型鼠”。

3. 生物反应器

把目的基因导入动物体内形成转基因动物。基因在动物体内

表达，人们可以从其乳汁和血液内获得目的基因产物，使动物像一个活的发酵罐一样生产目的基因的产物，这种途径将发展成为新一代的基因工程，建立新型的工业基地——分子耕作（molecular farming）或基因耕作（gene farming）。

中国、英国、美国的科学家在兔、羊、鼠的生物反应器研究方面都取得了进展。

人们成功地培育出了可在乳腺中高效表达外源蛋白质的转基因小鼠。应用这种方法目前已能合成人类组织纤溶酶原激活物和尿激酶。这些蛋白质在小鼠乳汁中的表达量很高，且具有良好的生物活性。赖特（Wright）等人成功地培育出一种其乳汁能够分泌 α_1— 抗胰蛋白酶的转基因绵羊。艾博特（Ebert）等获得了能分泌一系列人组织纤溶酶原激活物（tPA）的转基因山羊。转基因动物的培育成功，为利用动物乳汁生产人类需要的各种蛋白质奠定了基础。

总之，随着基因工程研究和技术的不断深入和完善，会有更多的基因工程产品问世而造福于人类。

思考题

1. 对基因工程的诞生起了重要作用的理论发现和技术成果是什么？

2. 基因工程的主要研究内容。

3. 举例说明基因工程的应用。

需要全本请访问 www.ertongbook.com

第二章

基因工程的基本操作程序

基因工程的基本操作程序主要包括五方面内容：（1）带有目的基因的 DNA 片段的制备；（2）DNA 片段与载体 DNA 体外重组；（3）DNA 重组体转入受体细胞；（4）重组体克隆的筛选与鉴定；（5）外源基因的表达。

2.1 带有目的基因的 DNA 片段的制备

制备 DNA 片段可通过两个途径：（1）从已有的生物基因组中分离；（2）人工合成。

2.1.1 从已有的生物基因组中分离

完成这一步骤有三种主要的方法，即限制酶法、mRNA 或 cDNA 钓取法和分离法。

1. 限制酶法

生物的基因组中含有各种各样的基因，这些成千上万的基因

（人类的基因组大约有 10 万个基因）同存在于一个 DNA 分子中，要把某一特定的基因识别并分离出来是非常困难的。限制酶的应用是分离基因技术的一大突破。限制性酶能在特定的核苷酸序列上切断双股 DNA，把 DNA 分子切成许多带有一定序列的片段。如果这些片段平均长度能达到几千个核苷酸，在一个片段中便有可能包含一个目的基因。

在基因工程经常使用的一种叫鸟枪法（Shoot gun）的方法中，应用了限制酶来获得 DNA 片段。鸟枪法的基本步骤是：将含有目的基因的全 DNA 用限制性内切酶切割；使获得的 DNA 片段插入到载体中；转化大肠杆菌；分离无性繁殖系，形成基因库；用目的基因的转录产物（RNA）做探针，通过菌落杂交技术筛选出含有该基因的菌落。应用这种方法，曾分离过蚕丝蛋白、鸡卵蛋白、兔和鼠的 β 株等基因，以及人生长激素、人生长催乳激素的基因片段和 rRNA 等基因。

2. mRNA 或 cDNA 钓取法

这种方法是利用 mRNA 或 cDNA 钓取含有相应基因的 DNA 片段。第一步是获得相应的 mRNA；第二步，在逆转录酶的作用下体外合成 cDNA；第三步，用 cDNA 来钓取目的基因片段。什么是 cDNA 呢？cDNA 是一种能与纯 mRNA 互补，由反转录酶合成的 DNA。它在分子杂交的研究中可用来作为十分敏感和特异的探针。由于 cDNA 能区别具有高度相似性的核苷酸序列，可以作为鉴定任何含有反转录顺序的 RNA 群体纯度的一种方法。

1976 年，威斯曼（Weissman）就是利用这种方法获得了珠蛋白基因片段。

3. 分离法

有一些基因在碱基组成上与总体 DNA 有明显的区别，所以可以利用物理性质的差别将这些基因从总 DNA 中分离出来。例如，在一基因组中有多拷贝基因，这种基因在 CsCl 或 Cs_2SO_4 密

度梯度离心时，相应的 DNA 可形成一种区别于主要 DNA 带的“卫星带”。利用这一特性便可将其从总 DNA 中分离出来。

利用这种方法曾分离出了第一个真核基因——南非爪蟾核糖体 RNA 基因。

2.1.2 人工合成法

人工合成带有目的基因的 DNA 片段有两种方法，即酶合成法和化学合成法。

1. 酶合成法

酶合成法是以 mRNA 为模板，用逆转录酶合成全长或接近全长的 cDNA，然后进行克隆。这是获得真核基因的常用方法。

方法的整个过程包括以下几个步骤（图 2-1）：

（1）以 polyA+RNA 为模板，以脱氧胸腺嘧啶作引物加入四种三磷酸脱氧核苷（dNTPs），在逆转录酶作用下合成第一条 DNA 互补链，这条链的末端会弯回形成一个发夹结构。

（2）碱处理降解 RNA·DNA 杂合双链中的 RNA 模板链。

（3）以第一条 cDNA链为模板，以发夹结构作为引物，在反转录酶或 DNA 聚合酶 I 的作用下，加入四种三磷酸脱氧核苷，合成第二条 DNA 链。

（4）用能特异切除单链的 S1酶切除发夹环部分，得到双链的 cDNA 最后进行克隆。

2. 化学合成法

合成基因的另一个途径是利用化学合成的方法或者化学法与酶合成法相结合来实现的。

1972 年，霍拉纳（Khorana）等人采用化学法合成了酵母丙氨酸 tRNA 的结构基因，但未实现表达。在此之后他们又开始进行大肠杆菌酪氨酸校正 tRNA 前体基因的合成，于 1979 年完成。20 世纪 80年代，由于 DNA 的结构分析手段和重组 DNA 技术的迅

速发展，大大促进了基因化学合成的发展。DNA 合成仪的问世，使任何 DNA 片段的合成成为可能。目前，在市场上可以买到许多合成基因，例如胰岛素基因、干扰素基因、乳糖操纵基因等等。

由于方法比较繁琐，故不详细介绍。

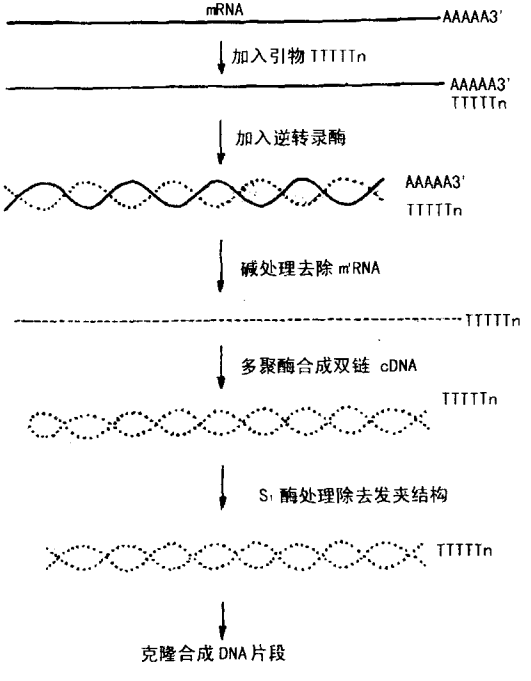

图 2-1　酶合成法合成 cDNA

2.2 DNA 片段与载体 DNA 体外重组

分离到带有目的基因的 DNA 片段后，要选择一种能够自我复制的复制子 DNA 作为载体，在体外进行人工重组，以便转入受体细胞。被用做 DNA 载体的有质粒、噬菌体和粘粒等，这些载体很重要。关于它们的特性、运载原理将在以后的章节中详细介绍。

DNA 片段与载体 DNA 的体外重组首先是使用某种方法将 DNA 分子进行剪切，然后进行两种 DNA 分子的连接。

2.2.1 DNA 分子的剪切

这一步骤是将带有目的基因的 DNA 片段和载体 DNA 同时使用某种方法进行处理，创造一种可将它们连接起来的条件。

最常用的方法是使用限制性内切酶进行剪切。20 世纪 70 年代以前，人们还没有办法将双链 DNA 分子切成彼此分离的片段。自从 1970 年在流感嗜血杆菌中发现了第一种限制性内切酶——*Hind* Ⅲ，这一问题便得到了解决。

除了用限制性内切酶剪切 DNA 分子外，还可用非特异的核酸内切酶处理、化学降解和机械剪切等方法。

2.2.2 DNA 分子的连接

带有目的基因的 DNA 片段与载体 DNA 在限制性内切酶剪切后产生了粘性末端。两者在末端处相结合形成了一个带有缺口的结合体。这种缺口可以用 DNA 连接酶封补，形成了一个完整的双链。

将 DNA 片段连接成为人工重组体的方法主要有三种。

1. 粘末端法

这种方法是使用限制酶处理目的基因 DNA 片段和载体 DNA 片段，产生相同的单股粘性末端。在退火条件下，末端单股碱基配对，在 DNA 连接酶的作用下，共价连接形成一个新的 DNA 分子。

退火(anneal) 是一种在加热后逐渐冷却的过程。在分子遗传学中，应用在使不同来源的核苷酸形成杂合核酸分子的研究中。

2. 接尾法

有的时候，DNA 不具备产生粘性末端的条件，这就需要采用某种方法在 DNA 片段上制造一个粘性末端。例如，在目的基因片段的 3′端加上一小段单股的 polyA 或 dG，在载体 DNA 的 3′端加上一段 poly dT 或 dC，这样利用 A—T 和 G—C 碱基配对，可以使两种 DNA 片段连接起来。

3. 人工接头法

使用人工接头法的目的也是为两种拟连接的 DNA 片段造成连接的条件。目前，使用较普通的人工接头有三种类型，即接头(linker)、衔接子（adaptor）和克隆盒（cassette cloning)。

(1) 接头(linker)

接头是一些化学合成的短分子。分子的序列中设计有一个特异的限制酶识别位点。

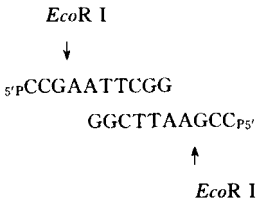

图 2 - 2　一个 *Eco*R I 接头

需要全本请访问 www.ertongbook.com