

# 第十三章 遗传工程

# 第一节 遗传工程概述

**遗传工程**(genetic engineering)： 也称生物工程 (biological engineering)。

指利用工程技术的方法改造和修饰生物体，  
使其产生新的性状或产品，  
从而改良生物体的一种遗传学手段。

**广义遗传工程包括：**

**基因工程、细胞工程、酶工程、发酵工程、染色体工程、细胞器工程等。**

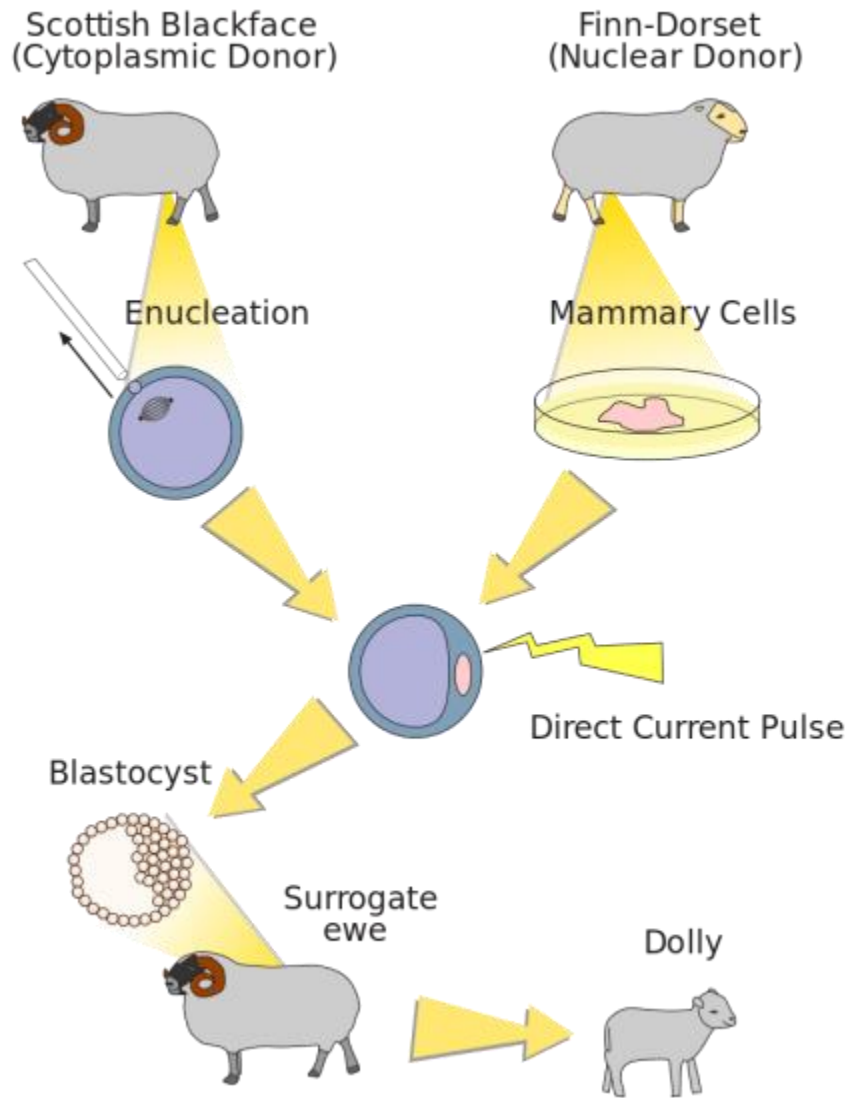
**狭义遗传工程是指：**

**基因工程(重组DNA技术)。**

# 细胞工程

- 在离体 (*in vitro*) 条件下以细胞为基本单位, 借助人工培养基, 对生物细胞进行培养、繁殖, 或者使其发生变异, 从而改良生物品种、创造新品种、加速繁育, 或利用细胞培养生产有用物质的过程。
- 细胞工程包括细胞培养、细胞融合、细胞器转移、生物体的克隆与规模化繁殖等。

# 第一个哺乳动物的克隆——Dolly羊



# 酶工程

- 利用酶的催化作用，在一定的生物反应器中，将相应的原料转化成所需要的产品。
- 是酶学理论与化工技术相结合的新技术体系。

# 发酵工程

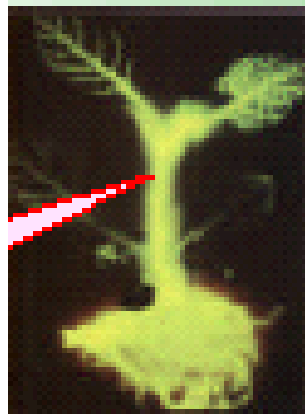
- 利用微生物与现代化工程技术相结合，工厂化生产人类需要的物质的一种技术体系。
- 目前医用抗生素、农用抗生素绝大部分都是发酵工程产品。

## 基因工程概述:

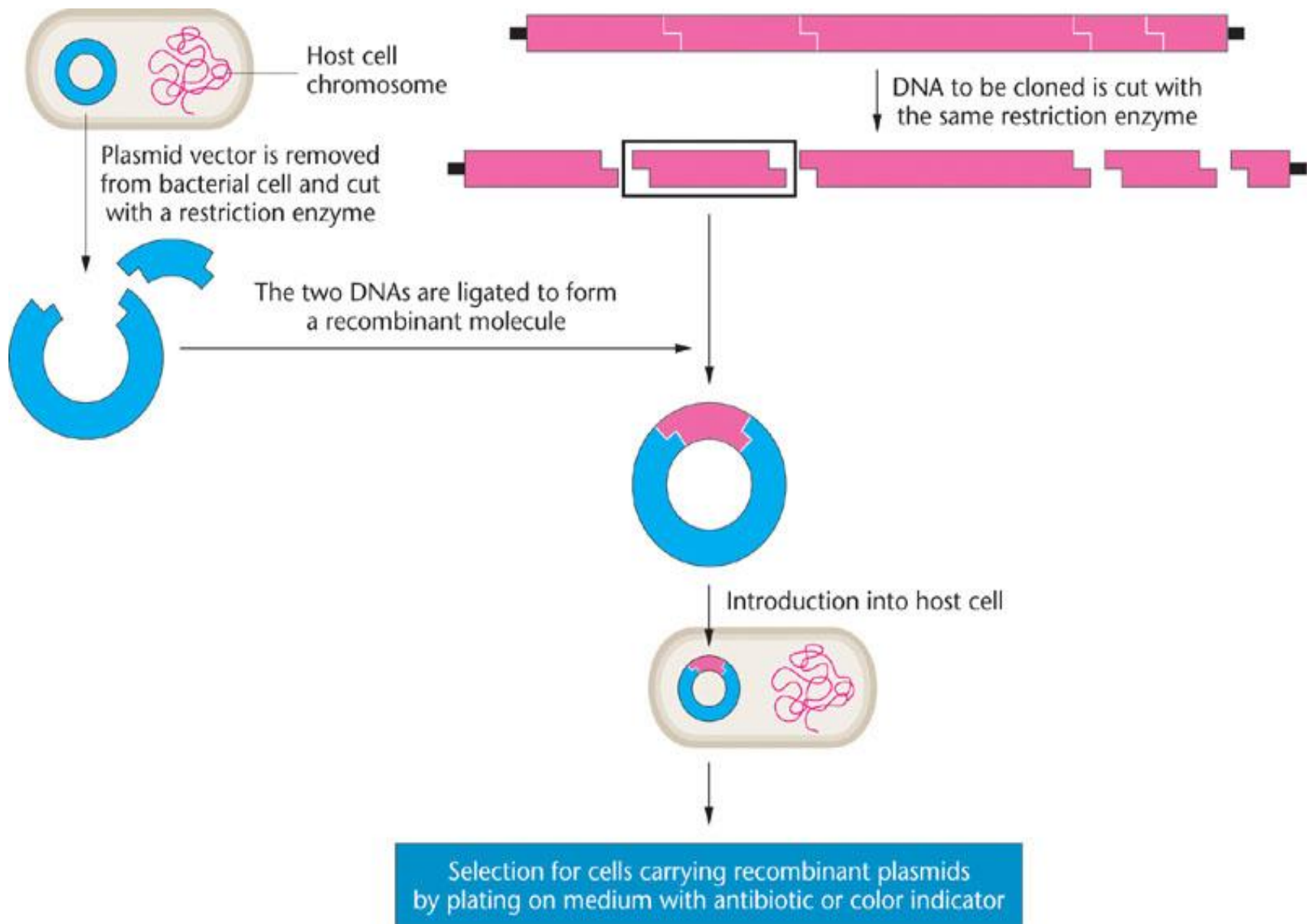
**概念** (P253) :

利用人工的方法把生物的遗传物质在体外进行切割、拼接和重组, 获得重组DNA分子然后导入宿主细胞或个体, 使受体的遗传特性得到修饰或改变的过程。

- 基因工程操作的对象是DNA分子。
- 又称为重组DNA技术







## 重组DNA技术流程

- 20世纪70年代诞生
- 2001年我国的转基因农作物和林木已达22种，其中转基因棉花、大豆、马铃薯、烟草、玉米、花生、菠菜、甜椒、小麦等进行了田间试验，转基因棉花已经大规模商品化生产。



# 步骤(P254):

①. 从细胞和组织中**分离DNA(目的基因)**;

②. **表达载体构建**

**限制性内切酶酶切DNA分子, 制备DNA片段;**

**将酶切DNA分子与载体DNA连接,构建能在宿主细胞内自我复制的  
重组DNA分子;**

③. **把重组DNA分子引入宿主受体细胞复制;**

**重组DNA随宿主细胞的分裂而分配到子细胞,建立无性繁殖系  
(Clone)或发育成个体;**

④. **转化体中目的基因检测**

**从细胞群体中选出所需要的无性繁殖系或个体。**

## 第二节 基因的分离

# 一、基因工程的工具酶（P255）：

内切核酸酶(endonuclease)

DNA连接酶(ligase)

DNA聚合酶（DNA polymerase）

RNA聚合酶（RNA polymerase）

反转录酶（reverse transcriptase）（逆转录酶）

最重要的工具酶是限制性核酸内切酶（restriction endonuclease）

## **(一) 限制性内切酶**(restriction enzyme) (P255) :

一种水解DNA的磷酸二酯酶，遗传工程中重要工具。

**是在识别双链DNA分子中某些特定核苷酸序列的基础上，切割DNA双链的内切酶。**

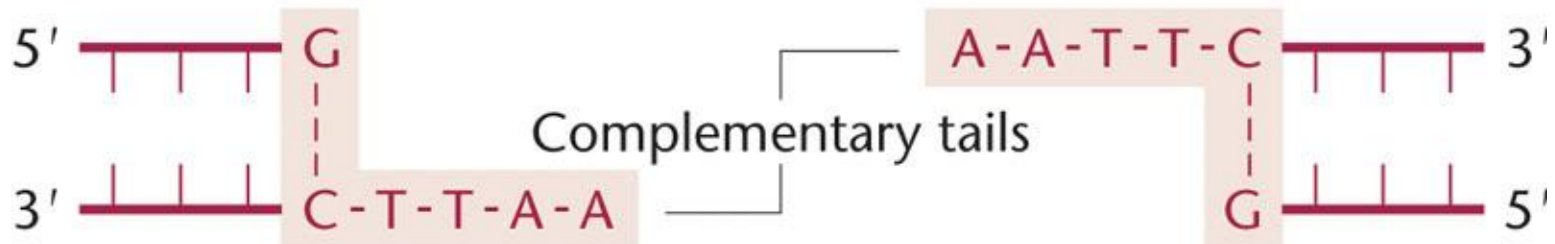
在细菌中这些酶的功能是降解外来DNA分子，以限制(restriction)或阻止病毒侵染。

这类酶能识别双链DNA分子中特异的核苷酸序列，并在特定的位置将双链DNA分子切断。

Recognition site



Treatment with *Eco*RI



*Eco* R I

细菌细胞中存在**限制修饰系统**：

- **限制**：降解外源DNA，防御异源遗传信息进入的手段。
- **修饰**：修饰外源DNA片段后，保留在新细胞中。
- 目前已分离和鉴定出200多种不同的限制酶



## (1) . 限制性内切酶的命名:

根据其来自的生物名称, 用英文字母和数字表示;  
如: *EcoR*I (*E*: 属名; *co*: 种名; *R*: 株; I: 发现次序)

➤ 如 *EcoR* I 来自大肠杆菌 (*Escherichia coli*) R菌株, 读作echo-r-one;

➤ *Hind* III 来自流感噬血杆菌  
(*Hemophilus influenzae*) d菌株, 读作  
hind-three

# 限制酶的分类

- 限制性核酸内切酶的工作分为2个步骤：  
识别特定的DNA序列  
在特定的位置切割DNA分子
- 根据其作用特点, 可以将限制性酶分为三种类型：  
I 型  
II 型  
III 型。
- 在基因工程中用途最广泛的是 II 型限制酶。

# I 型限制酶

- 有特定的识别序列
- 但切割位置远离识别位置
- 有的种类可以在同识别序列相距1000bp的位置上随机切割DNA分子
- 在基因工程中没有什么用途

## III型限制酶

- 有特定的识别序列
- 切割位置在识别序列3'端相距20bp处，  
可以产生各种类型的单链末端。
- III型限制酶在基因工程中有特定的用途，  
但总体来说，用途不大。

## II 型限制酶

- 在DNA上有特定的识别序列
- 而且其切割位点就在识别序列内部
- 基因工程中用途最广
- 识别序列是**对称的**，在一条链中从5'到3'方向的序列与其互补链从5'到3'方向的序列完全相同，称为**回纹对称序列 (palindrome)**。

## 第II类限制性酶

➤ 识别和切割位点：回文结构 4~6 bp

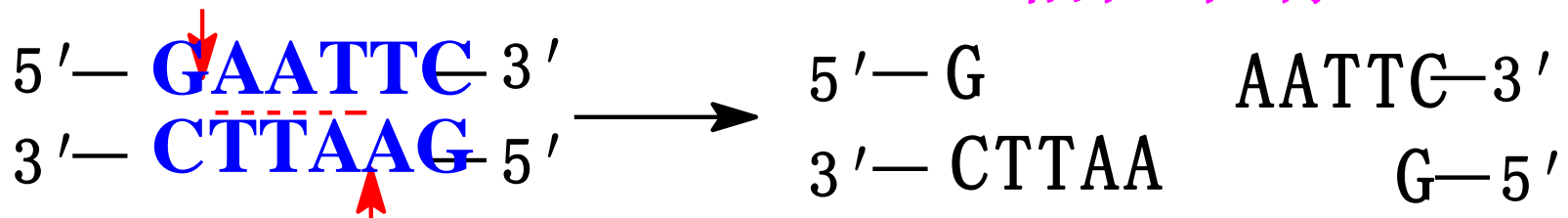
➤ 出现两种末端：

- 粘性末端 (粘端)
- 平头末端 (平端)

## 粘性末端与平头末端

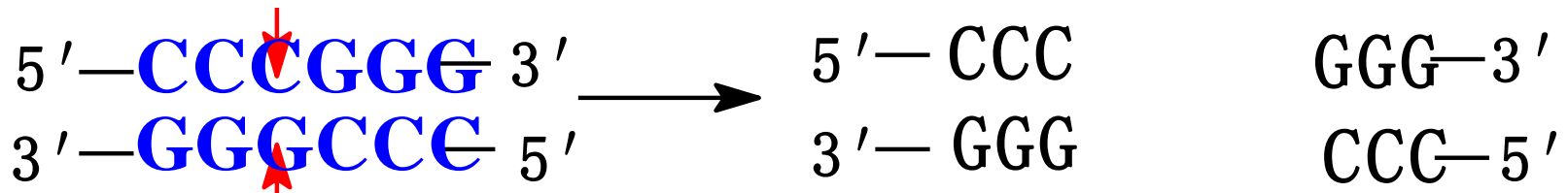
*EcoRI*

粘性末端



*SmaI*

平头末端





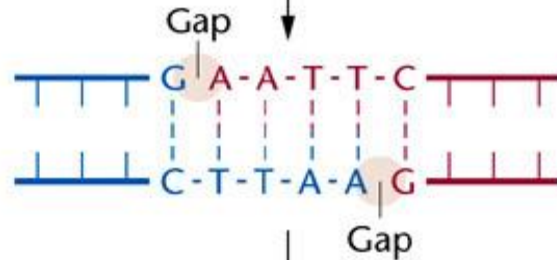
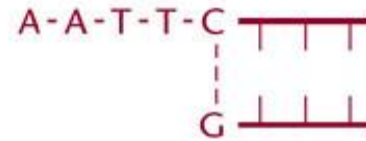
Cleavage with *Eco*RI



Fragments with complementary tails

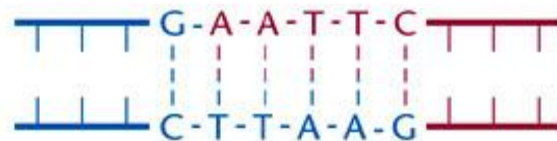


Cleavage with *Eco*RI



Annealing allows recombinant DNA molecules to form by complementary base pairing. The two strands are not covalently bonded as indicated by shaded gaps:

DNA ligase

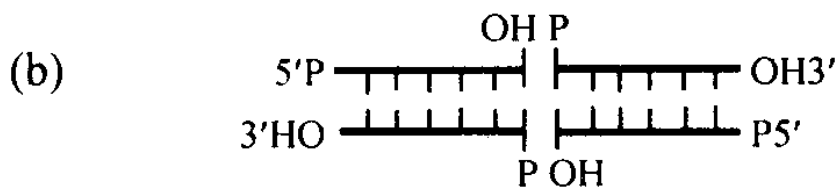


DNA ligase seals the gaps, covalently bonding the two strands.



## (二) DNA连接酶(P257):

催化DNA中相邻的3'-OH和5'-磷酸基末端之间形成磷酸二酯键并把两段DNA连接起来。



DNA连接酶  
+  $\text{NAD}^+$   
或  
ATP

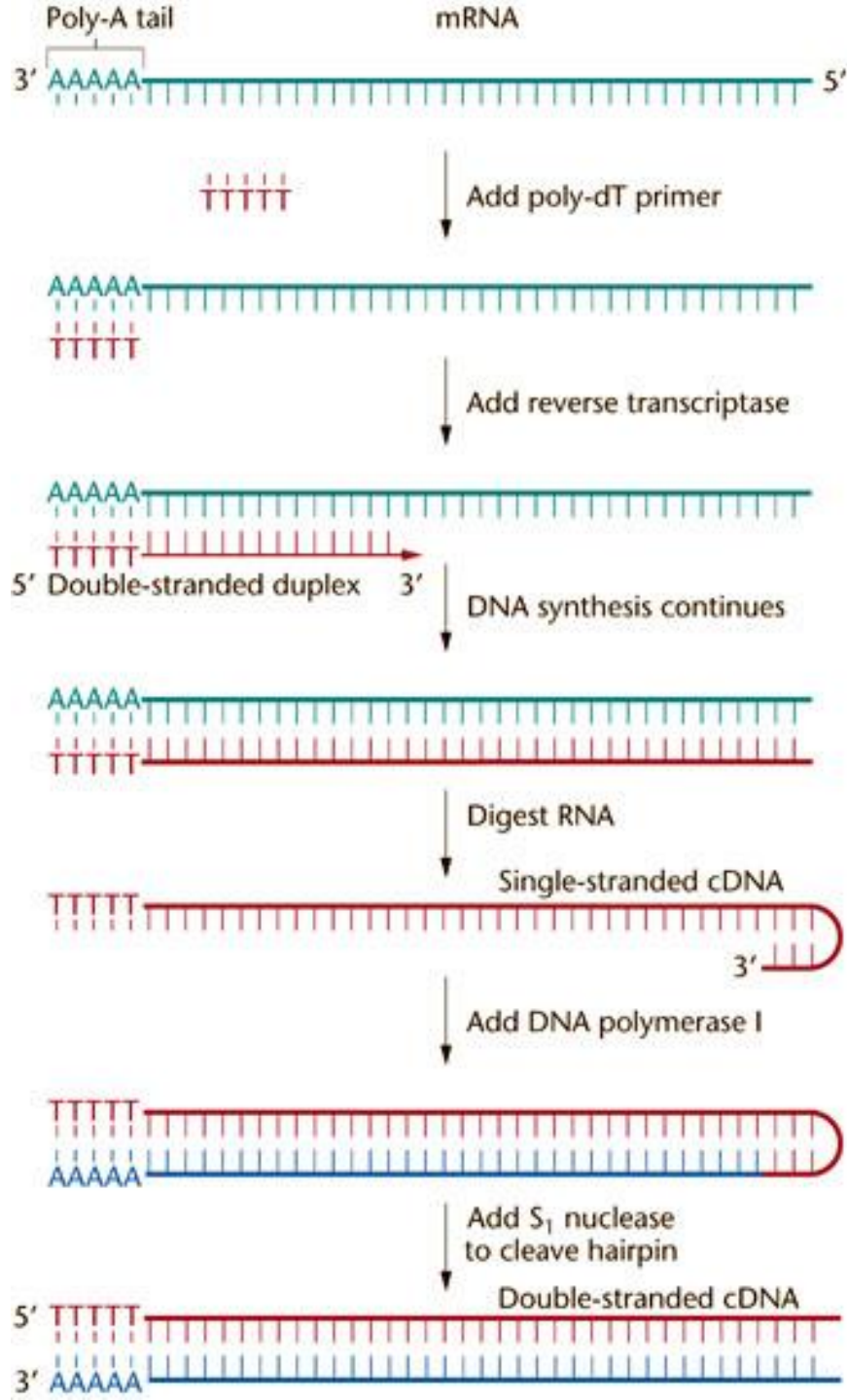


+  
NMN  
或  
AMP

### (三) 逆转录酶 reverse transcriptase

- 以**RNA为模板**来指导DNA合成的**DNA聚合酶**，  
又称依赖于RNA的DNA聚合酶。
- 在基因工程中主要用途是以**mRNA为模板合成互补的DNA链**（complementary, **cDNA**）。

# 反转录酶

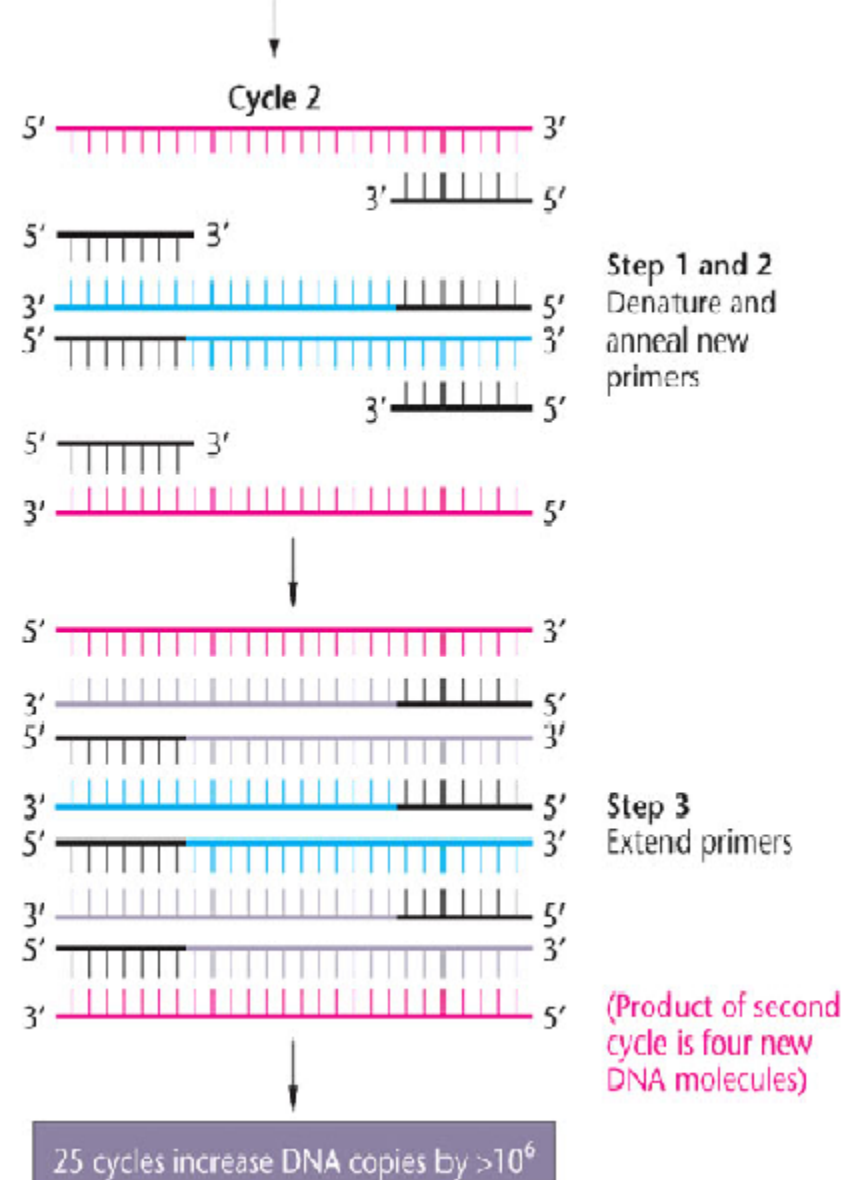
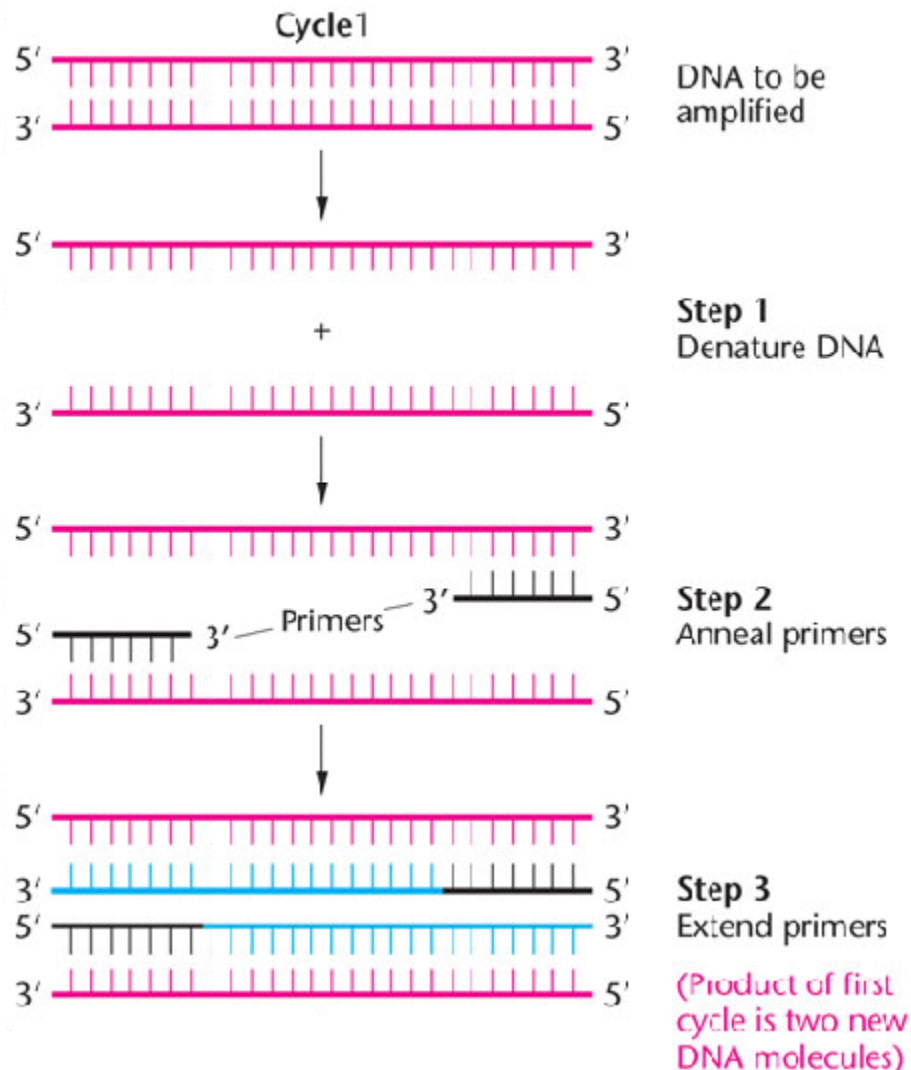


## (四) 聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR)

### ➤ 基本原理:

根据待扩增基因的部分序列合成成对引物，在体外合成两个引物之间的DNA序列。

是利用DNA片段旁侧两个短的单链引物，在体外快速扩增特异DNA片段的技术。该方法利用双链DNA在不同温度具有不同的生物特性，在3个温度区反复循环，使反应液中特定的微量片断得以大量扩增。



## 聚合酶链式反应 (PCR, polymerase chain reaction)

# PCR反应

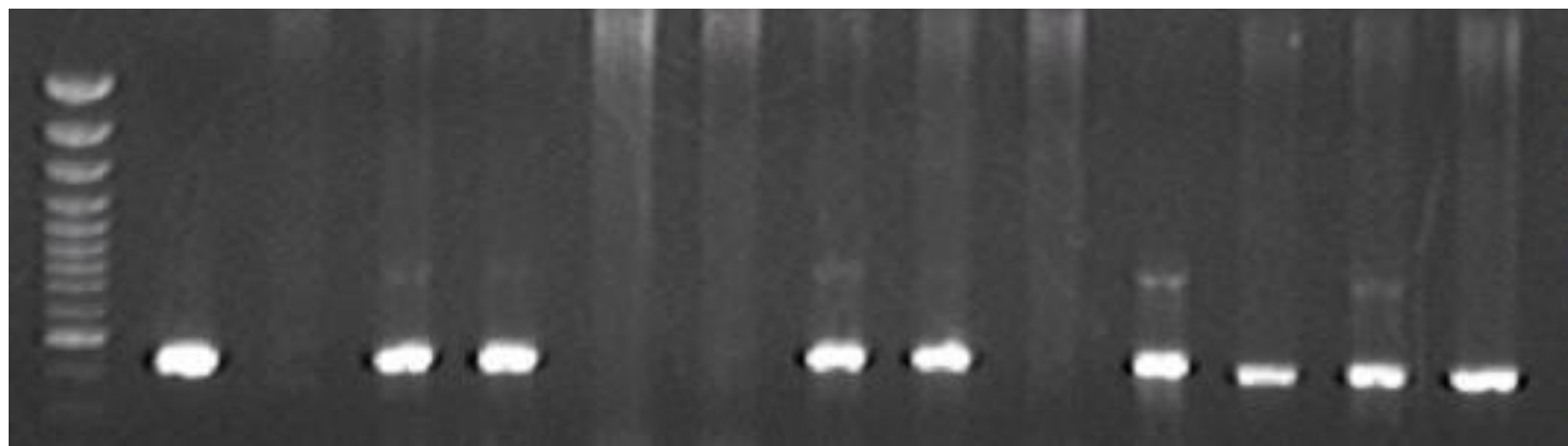
- 根据待扩增基因序列合成两个引物，10-20bp，分别与待扩增基因二条链的两端互补。
- 在DNA模板变性成单链后，两个引物分别与单链DNA复性，在耐热的Taq polymerase及4种脱氧核苷酸存在下，由引物引导合成DNA新链。
- 3个步骤：
  - 变性 94-95℃，双链变性成单链
  - 复性 50-70℃，两个引物分别与单链DNA互补
  - 延伸 72℃，在引物Taq酶的作用下从5' → 3' 的方向合成模板DNA的互补链。

- PCR反应常有25 – 35个循环
- 经过25个循环以后，理论上原来一个分子DNA可以扩增为 $10^6$ 个拷贝。
- 仅用少量的模板DNA分子，可以得到大量扩增产物。
- 通常可以扩增5kb左右的DNA片段。
- 性能更好的Taq酶可以扩增长达40kb的DNA片段。
- PCR扩增的DNA序列经过核酸序列测定分析后，可作为基因工程的目的基因。

## PCR循环数与产物拷贝数之间的关系

循环数	PCR产物拷贝数		
1	$2^1$	2	
5	$2^5$	32	
10	$2^{10}$	1024	
15	$2^{15}$	32768	
20	$2^{20}$	1048576	$1 \times 10^6$
25	$2^{25}$	33554432	$3 \times 10^7$
30	$2^{30}$	1073741824	$1 \times 10^9$





# PCR技术的关键

- 人工合成寡核苷酸片段（引物）
- 耐热的***Taq* DNA polymerase**  
（来自***Thermus aquaticus***, 94kDa）

- PCR方法已成为分子生物学研究常规手段
- 而且还用于遗传、发育、进化、疾病诊断、法医学等领域
- PCR技术的发明是现代生物学发展史上的又一个里程碑
- 发明(1986年)人获得了1993年诺贝尔化学奖



1966年，穆利斯毕业于佐治亚理工学院化学系。

1972年，穆利斯在加州大学伯克利分校取得生物化学博士学位。

1983年，穆利斯发明了PCR技术。

1993年，因为发明PCR技术，穆利斯和迈克尔·史密斯分享了诺贝尔化学奖，同年还获得日本国际奖。

2019年8月7日，穆利斯因肺炎去世，享年74岁。

## 二 载体(vector)

- 将外源DNA片段运送进宿主细胞(host cell)进行扩增或表达的运载工具称为载体。
- 载体也是DNA分子。

## 步骤:

①. 从细胞和组织中**分离DNA(目的基因)**;

②. **表达载体构建**

**限制性内切酶酶切DNA分子, 制备DNA片段;**

**将酶切DNA分子与载体DNA连接, 构建能在宿主细胞内自我复制的重组DNA分子;**

③. **把重组DNA分子引入宿主受体细胞复制;**

**重组DNA随宿主细胞的分裂而分配到子细胞, 建立无性繁殖系(Clone)或发育成个体;**

④. **转化体中目的基因检测**

**从细胞群体中选出所需要的无性繁殖系或个体。**

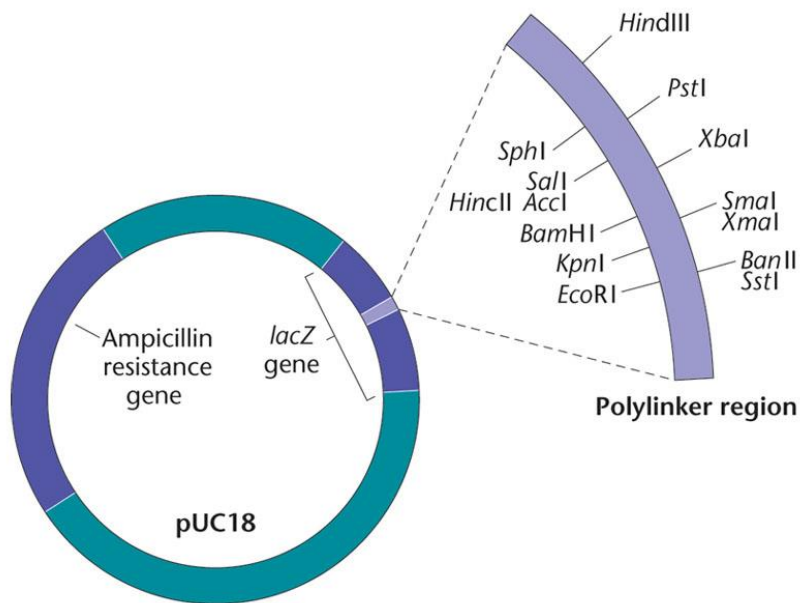
# 载体(vector)

- 载体是将外源基因送入受体细胞的工具。
- 可作为DNA载体的有质粒、噬菌体、病毒、细菌或酵母菌人工染色体BAC、YAC等

将外源DNA片段运送进宿主细胞(host cell)进行扩增或表达的运载工具称为载体。  
载体也是DNA分子。

## 载体的条件：

- ①在宿主细胞中能独立复制，有**独立的复制起始位点**；
- ②.载体DNA分子中有一段不影响其复制的非必需区域，即限制酶切位点又称**多克隆位点**；
- ③.有**选择标记**，便于选择含重组DNA分子的宿主细胞；
- ④.相对分子质量小，多拷贝，易于操作。



质粒载体

- ①分子量小(2.69kb),但能携带较大的外源片段；②拷贝数多,在每个宿主细胞可达500个；③酶切位点多,克隆方便；④具有 $\alpha$ -互补显色表型,便于检测。



# 载体种类

载体有多种，对载体的分类方法较多

## 1、据使用目的分类

(1) 克隆载体：繁殖目的基因，称克隆载体

(2) 表达载体：表达目的基因

## 2、据载体来源分

(1) 质粒

(2) 噬菌体 如： $\lambda$ -噬菌体

(3) 人工载体：YAC、BAC

## (一) 质粒载体：

**质粒**是细菌细胞内独立于细菌染色体外存在的一种能自我复制、易分离和导入的环状双链DNA分子。

质粒具有**重组表型检测标记**，检测是否携带外源DNA片段。

## 在细胞内的复制程度：

**严紧型：** 一个细菌细胞内的质粒数量有1~3个

**松弛型：** 每个细胞内有10个以上，可高达200个

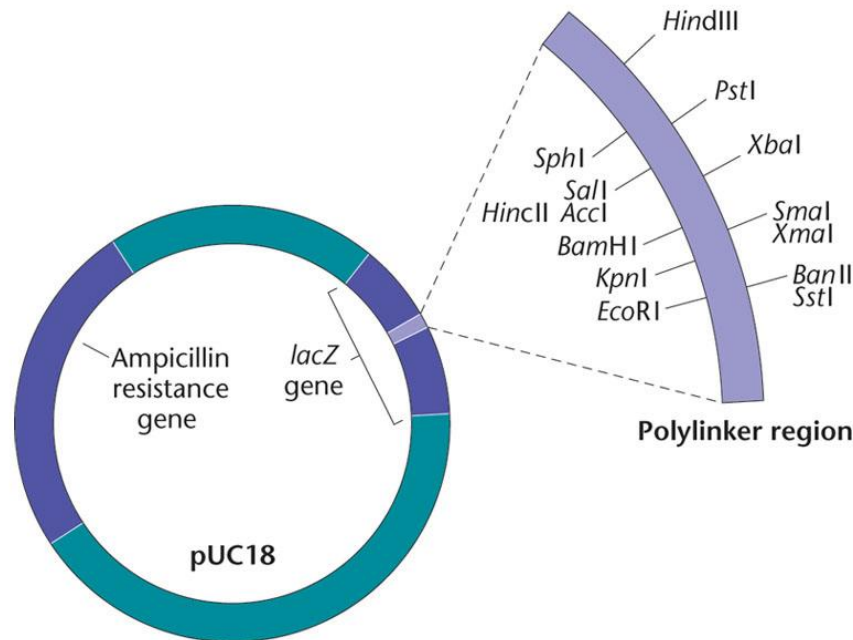
如pUC18质粒具有以下特点(P280):

- ①. 分子量小，可接受较大外源片段(<10Kb);
- ②. 拷贝数多，每个细胞中有500个;
- ③. 克隆位点的酶切位点多，克隆方便;
- ④. 具有 $\alpha$ -互补显色表型，用于检测重组质粒的选择标记。

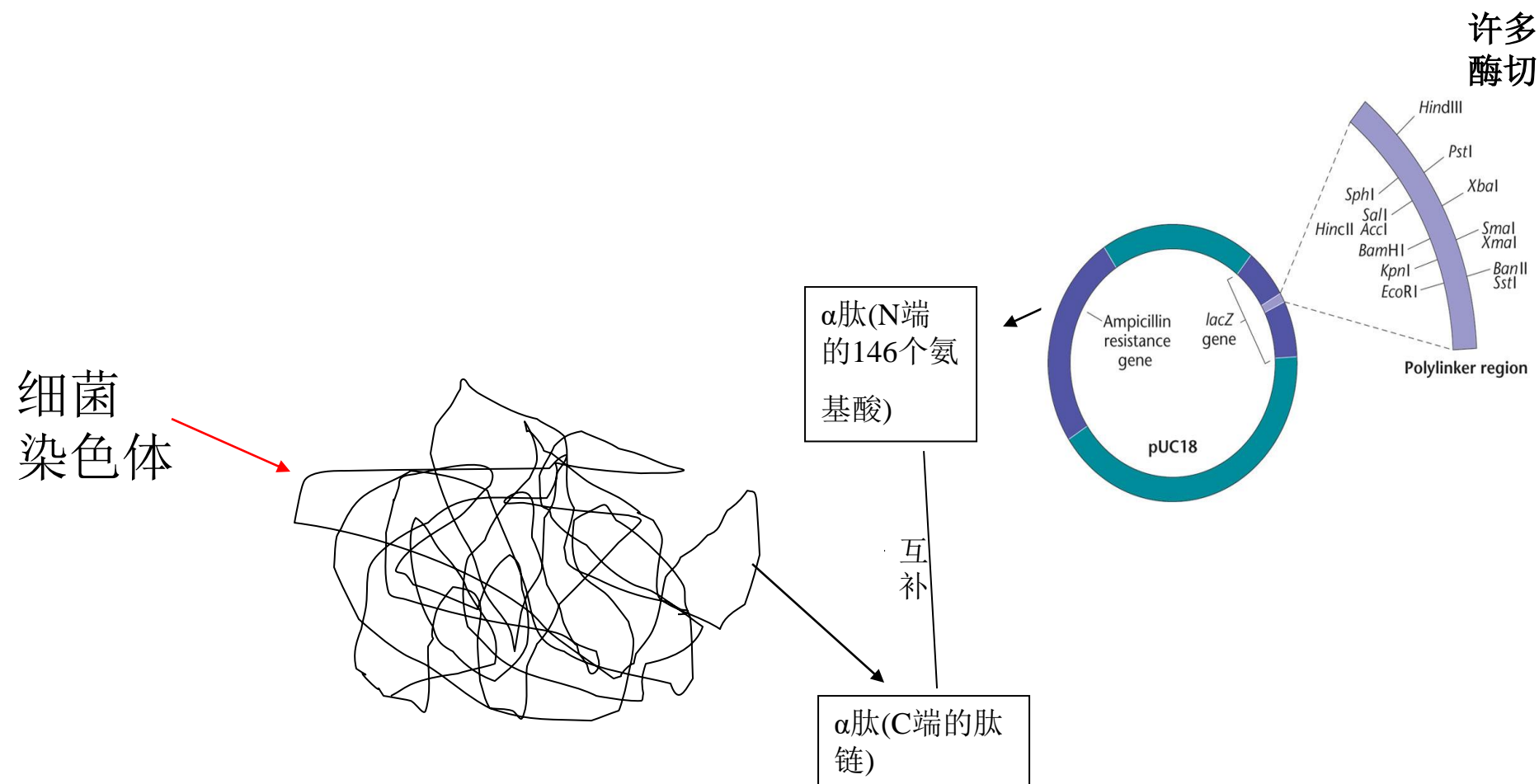
缺点：质粒携带的外源基因小于10Kb

# $\alpha$ 互补

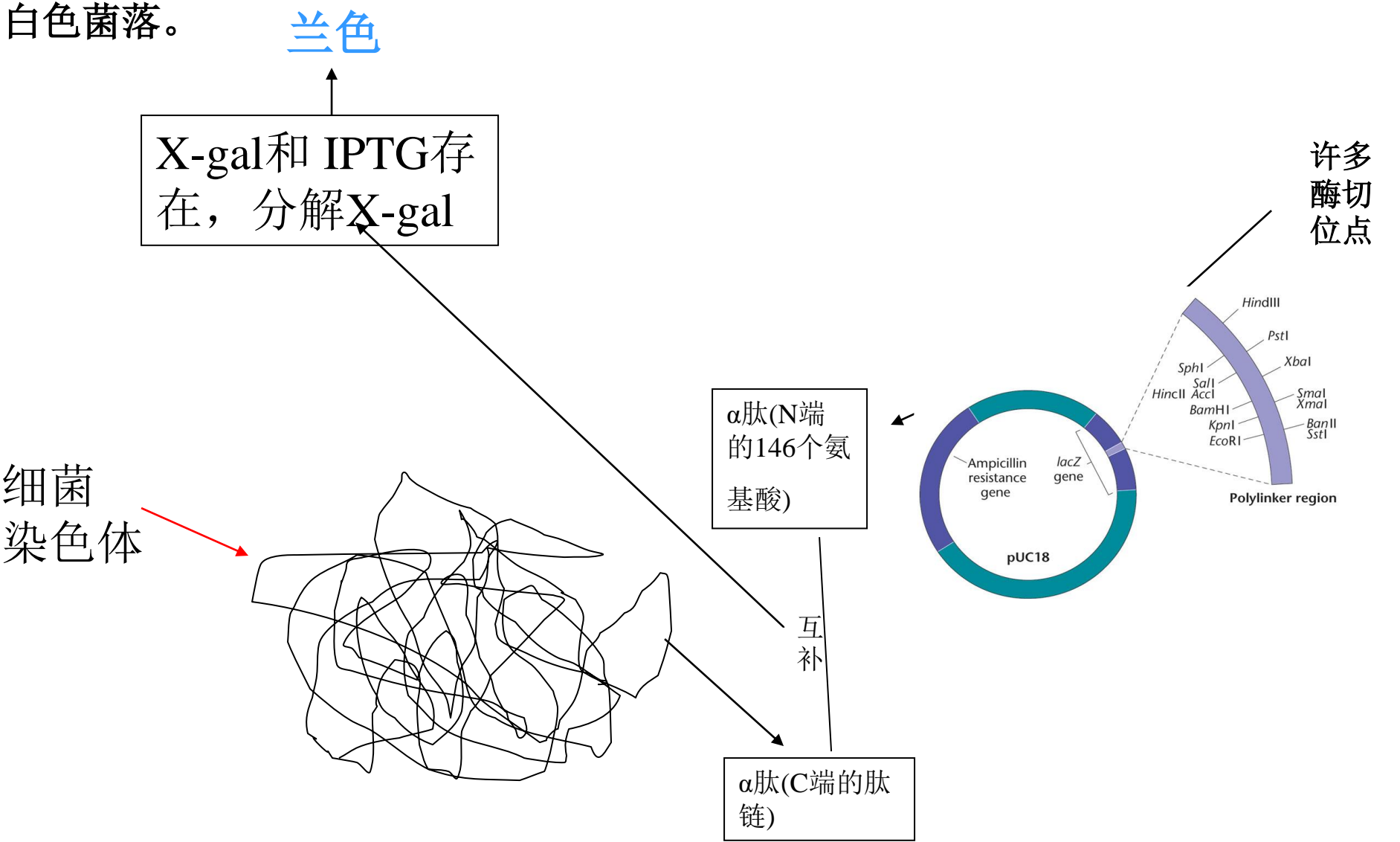
在质粒载体上带有一个大肠杆菌DNA的短区段，其中含有 $\beta$ -半乳糖苷酶基因（*LacZ*）的调控序列和头146个氨基酸的编码序列。在这一编码区中插入有一个多克隆位点。



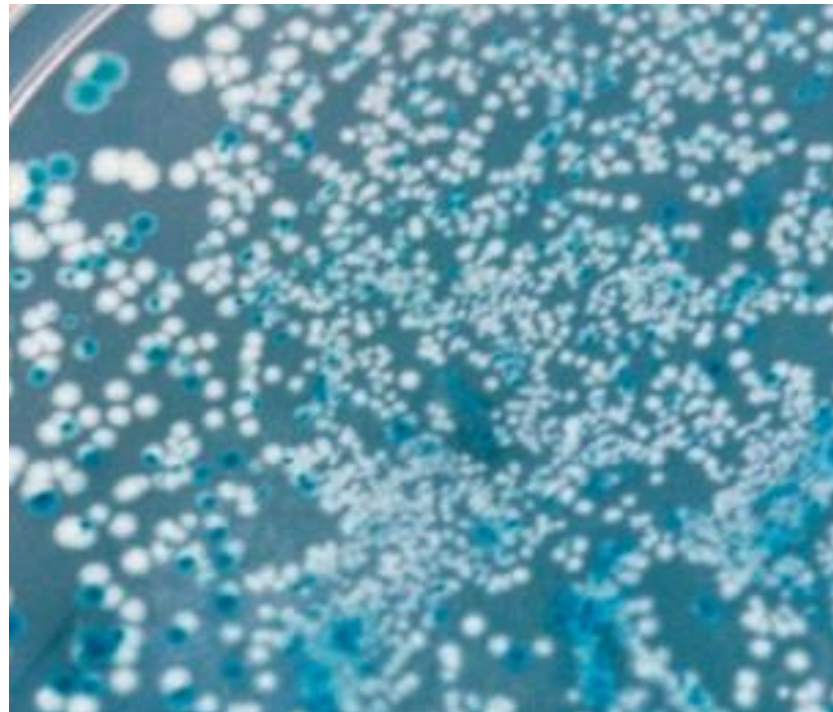
宿主编码 (C端的肽链)和质粒编码的片段虽都没有酶活性，但它们同时存在时，可形成具有酶学活性的蛋白质，称为  $\alpha$ -互补



由 $\alpha$ -互补而产生的LacZ<sup>+</sup>细菌在诱导剂IPTG的作用下，在生色底物X-gal存在时产生蓝色菌落，因而易于识别。然而，当外源DNA插入到质粒的多克隆位点后，几乎不可避免地导致无 $\alpha$ -互补能力的氨基端片段，使得带有重组质粒的细菌形成白色菌落。



由 $\alpha$ -互补而产生的LacZ<sup>+</sup>细菌在诱导剂IPTG的作用下，在生色底物X-Gal存在时产生蓝色菌落，因而易于识别。然而，当外源DNA插入到质粒的多克隆位点后，几乎不可避免地导致无 $\alpha$ -互补能力的氨基端片段，使得带有重组质粒的细菌形成白色菌落。

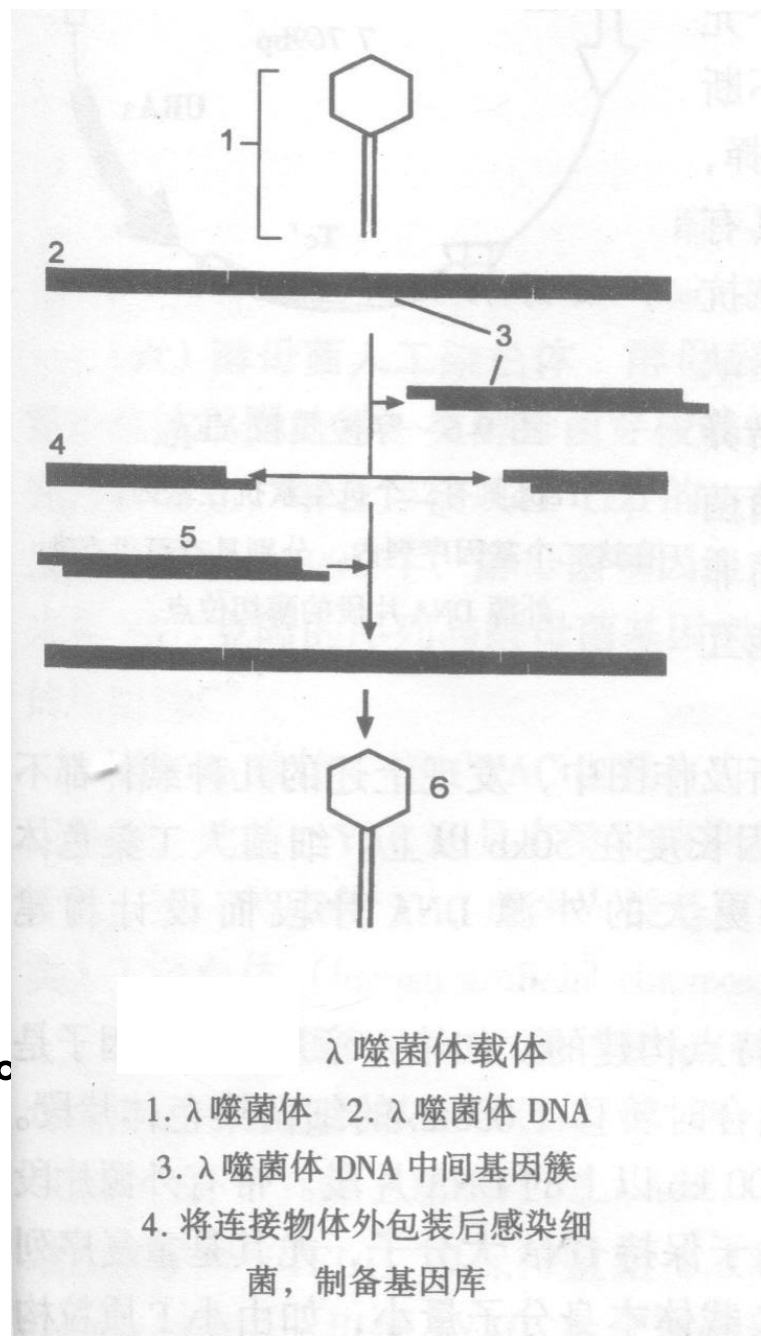


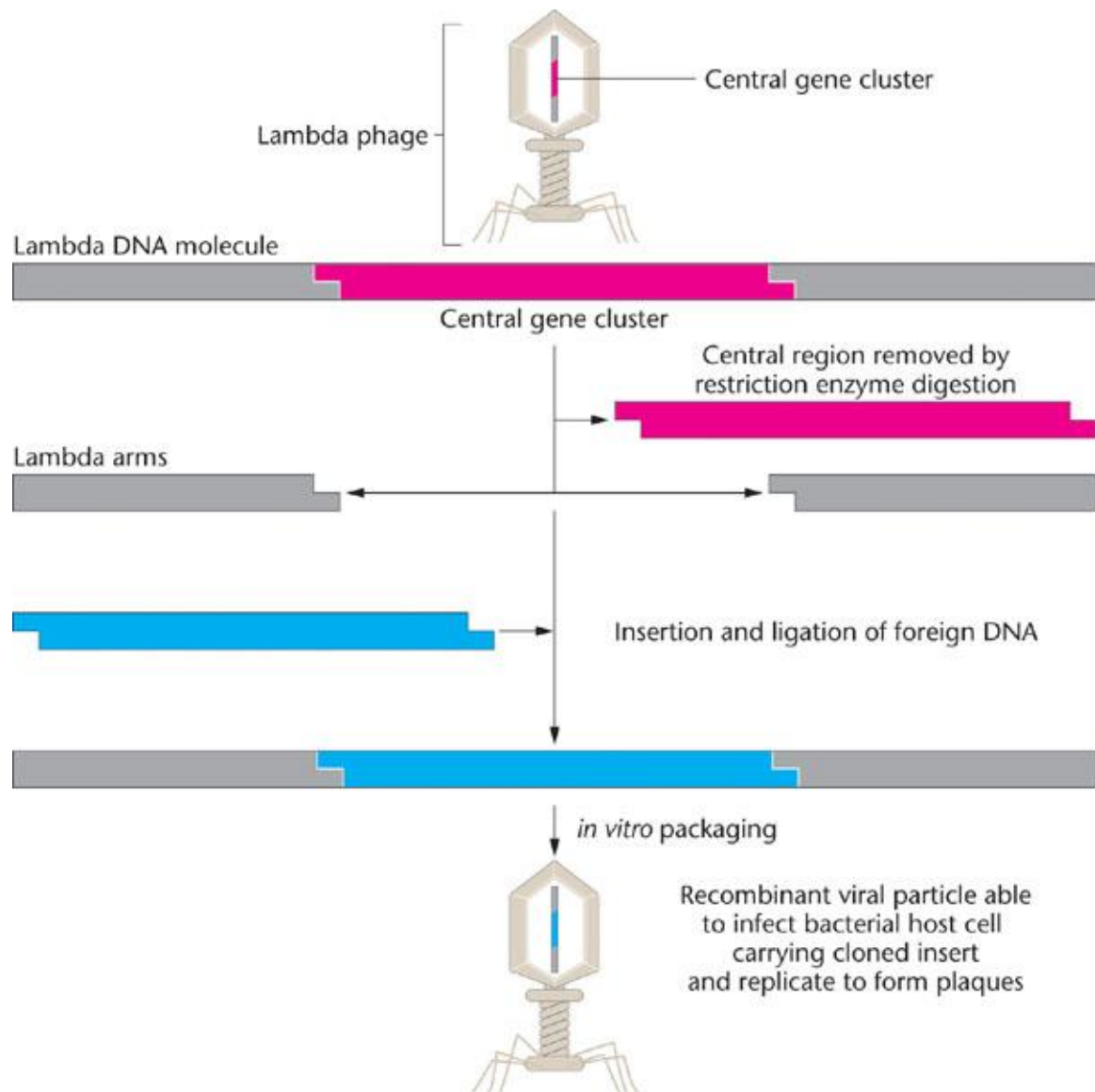


## (二) 病毒载体

### 以 $\lambda$ 噬菌体为例：

- 基因组全长48kb。
- $\lambda$ 噬菌体DNA中间约2/3的序列为中间基因簇，位于两端的为DNA左、右臂。
- 中间基因簇可被外源DNA替代而不影响浸染细菌的能力。
- 能接受15-23kb外源DNA片段，既可做克隆载体又可做表达载体。





**λ噬菌体 (30kb)**

### (三) 克隆大片段DNA的载体：

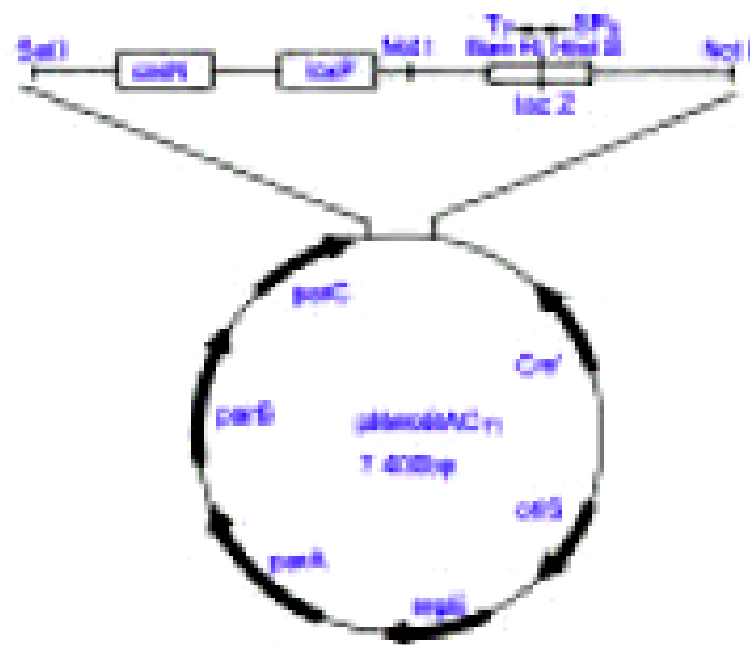
以细菌人工染色体 (BAC) 为例：

bacterial artificial chromosome

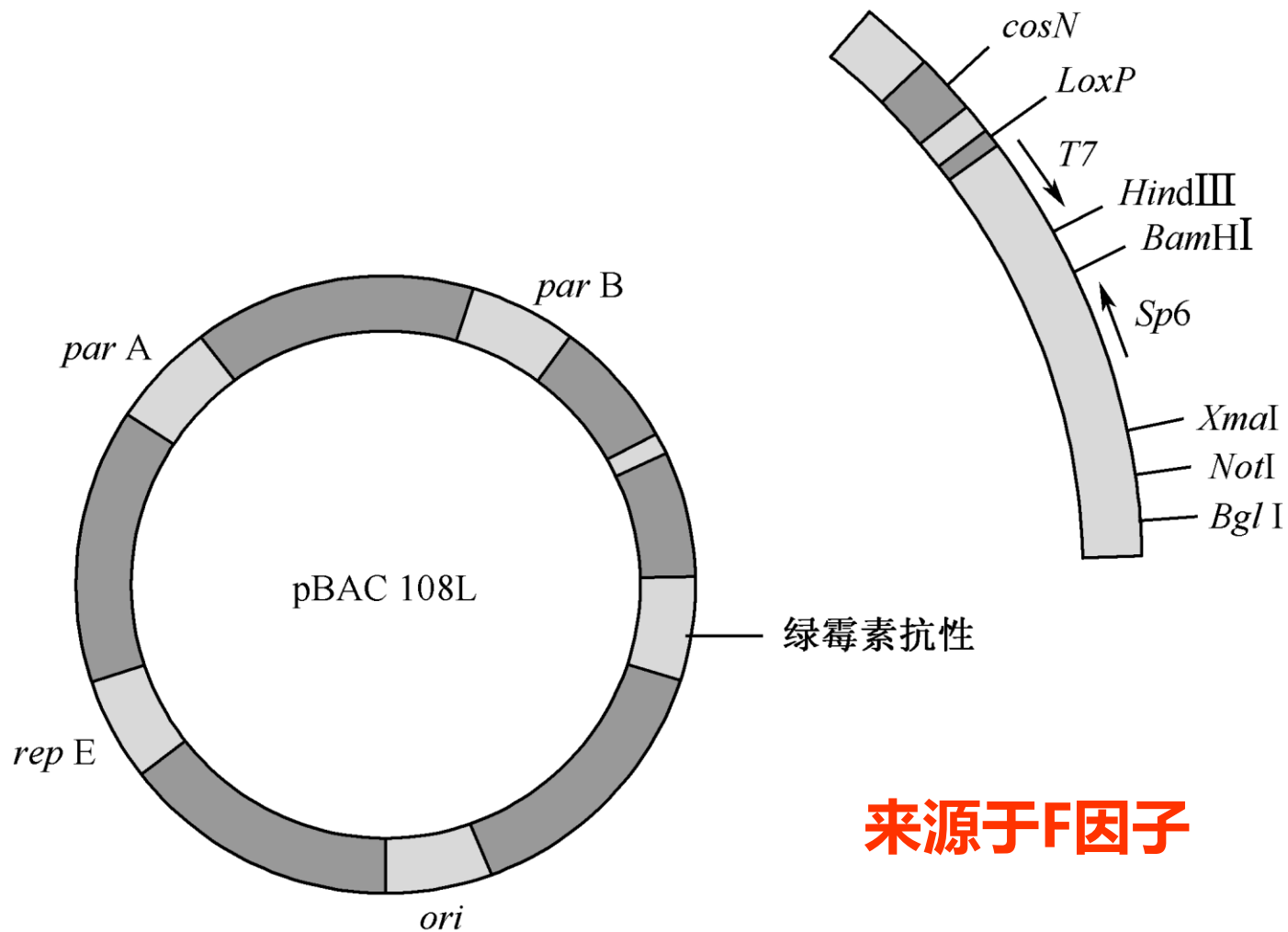
*F*因子经基因工程改造成BAC载体，可用于克隆100kb以上的DNA片段。

特点：

- 带有外源DNA的BAC载体在细胞中是单拷贝的。
- 载体本身分子量很小(7.4kb)；
- 选择标记：氯霉素抗性基因；

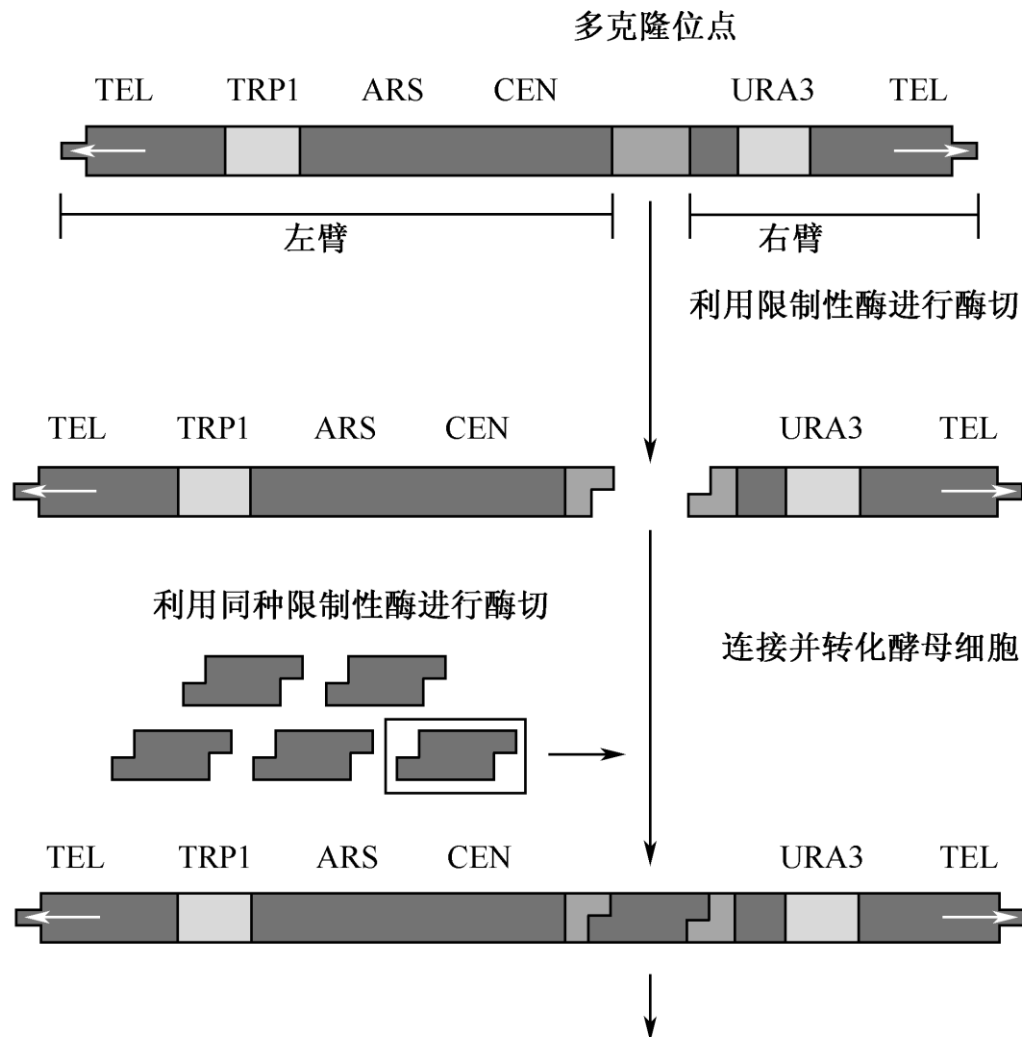


细菌人工染色体pBacBAC11



来源于F因子

细菌人工染色体BAC (300kb)  
bacterial artificial chromosome



带有克隆插入片段的酵母人工染色体被转化到酵母细胞中

**YAC (1Mb)**  
**yeast artificial chromosome**

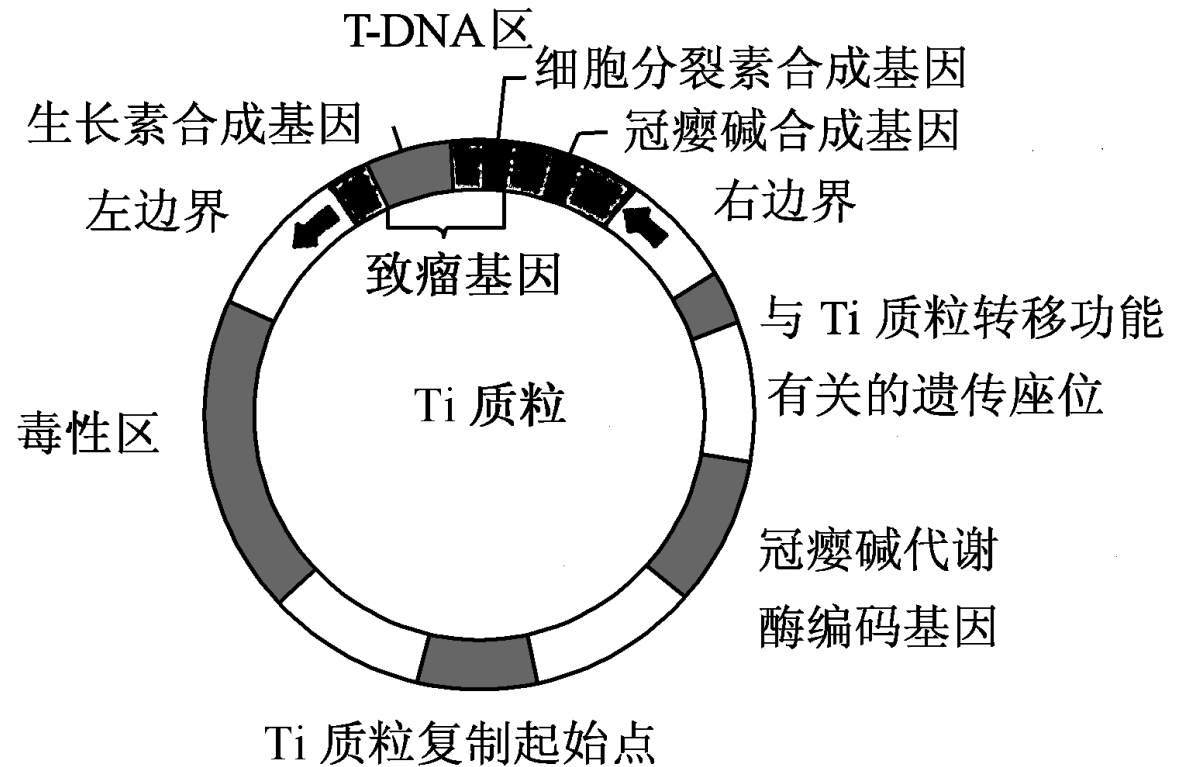
#### (四)Ti质粒

- Ti质粒是根癌农杆菌的染色体外遗传物质
- 双链闭合环状DNA，150 ~ 200kb
- 植物基因工程常用的载体

## ■ T-DNA

### Transfer DNA

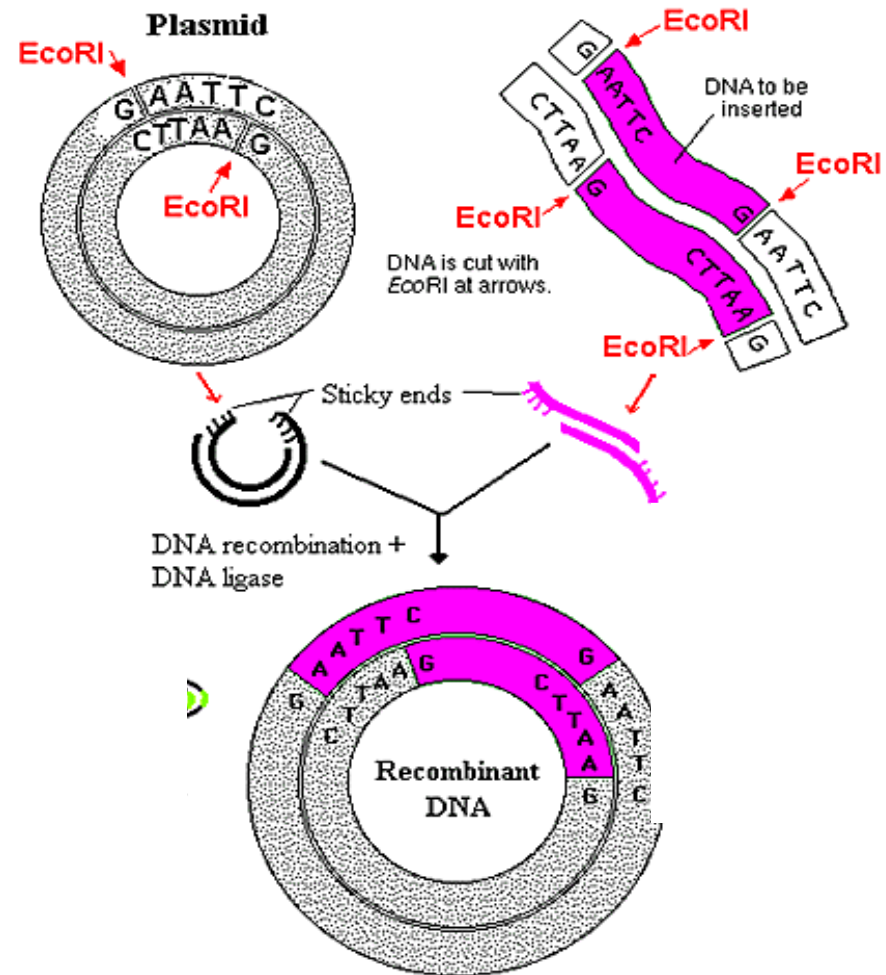
- 是农杆菌侵入植物细胞时从Ti质粒上转移到植物细胞的一段DNA
- T-DNA两端各有一段25bp的同向重复序列，是T-DNA的边缘区
- LB; RB
- 在同一条单链的LB和RB内各形成一个缺口，单链T-DNA进入植物细胞



Ti质粒结构

# DNA的体外重组

1. 体外通过**限制性内切酶**的修剪和**DNA连接酶**的连接；
2. **目标DNA分子** + **载体DNA**，共价连接；
3. 获得**重组DNA分子**。



Inserting a DNA Sample into a Plasmid



### **三、目的基因的分离与鉴定**

**(一)同源或已知序列克隆法：**

**基于生物基因的同源性，已知基因的序列  
和生物信息学的发展**

1992 年，第一个抗病基因 *Hm1* 被克隆 (Johal and Briggs, 1992)。迄今已经从不同植物中克隆了约 50 个抗病基因，分别赋予植物体针对病毒、细菌、真菌、线虫和昆虫等广泛病原物类型的特异性抗性（汪旭升等，2005）。尽管这些基因来自上百个不同的植物种属，特异识别的病原物类型各自不同，其核苷酸序列的同源性也较低，但是，其编码的蛋白质产物在结构上却有极大相似性，它们都拥有一些共同的结构域，如富含亮氨酸重复序列（LRR）、核苷酸结合位点（NBS）、丝氨酸—苏氨酸激酶区域（STK）、Toll 和白介素-1 区域（TIR）和亮氨酸拉链（LZ）等。考虑到尚未被克隆的抗病基因其编码产物可能也存在类似结构域，90 年代，许多研究者便提出了利用同源序列法快速克隆抗病基因的设想，其基本思路便是依据这些结构域中的高度保守区域，设计特异性的简并引物，通过 PCR 扩增 R 基因同源序列（Resistance gene analogs, RGAs），最后利用这些 RGAs 来快速分离 R 基因。

## **(二) 图位克隆法：**

图位克隆(Map - based cloning) 又称定位克隆(positional cloning)

用该方法分离基因是根据功能基因在基因组中都有相对稳定的基因座，再利用分子标记技术对目的基因进行精确定位的基础上，用与目的基因紧密连锁的分子标记筛选DNA文库，从而构建目的基因区域的物理图谱，再利用此物理图谱通过染色体步移逐步逼近目的基因或通过染色体登陆的方法，最终克隆目的基因并通过遗传转化实验可以研究目的基因的功能。

- 1986 年首先由剑桥大学的Alan coulson 提出 ,用该方法分离基因是根据目的基因在染色体上的位置进行的,无需预先知道基因的DNA 顺序,也无需预先知道其表达产物的有关信息,但应有以下两方面的基本情况:一是有一个根据目的基因的有无建立起来的遗传分离群体,如F2、 DH、 BC、 RI 等。

## 步骤

- 1) 首先找到与目标基因紧密连锁的分子标记;
- 2) 用遗传作图和物理作图将目标基因定位在染色体的特定位置;
- 3) 构建含有大插入片段的基因组文库(BAC 库或YAC);
- 4) 以与目标基因连锁的分子标记为探针筛选基因组文库;
- 5) 用获得阳性克隆构建目的基因区域的跨叠群;
- 6) 通过染色体步行、登陆或跳跃获得含有目标基因的大片段克隆;
- 7) 通过亚克隆获得含有目的基因的小片段克隆;
- 8) 通过遗传转化和功能互补验证最终确定目标基因的碱基序列。

## 基于基因文库的基因分离方法

### 1. 构建基因库 (library) :

**基因文库**是由单一来源的特定组织或器官的**DNA**或**cDNA**片段汇集形成的**克隆**群体。

#### ①. 基因组文库(genomic library) :

将某生物全部基因组**DNA**酶切后与载体连接构建而成的。理想的核基因库应能包括全部基因组序列。

#### ②. cDNA文库:

以**mRNA**为模板**→**经逆转录酶合成**cDNA****→**构建基因库。

### 2. 从基因库中分离特定的基因:

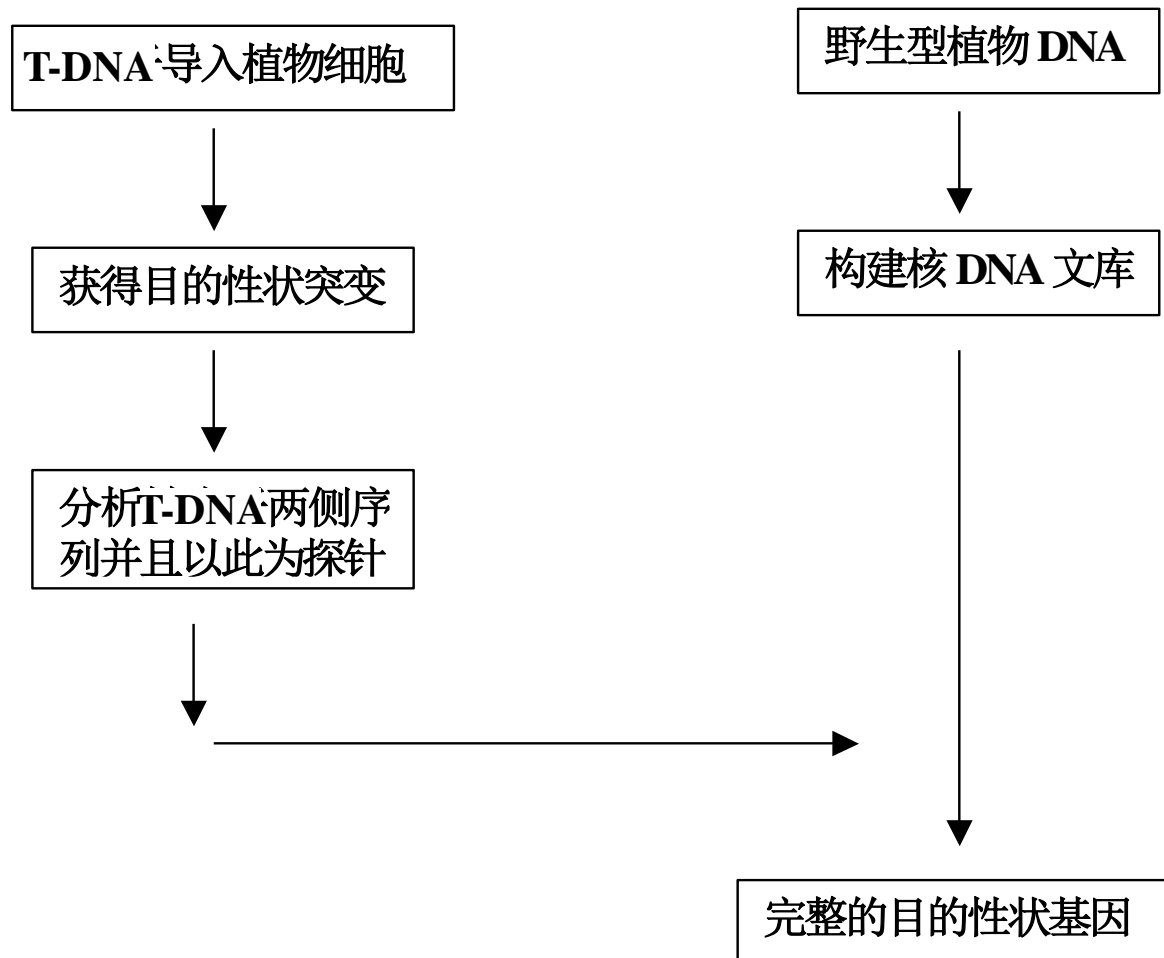
#### ①. DNA探针:

- 是待筛选的目的基因或克隆的一段互补的核酸序列。
- 利用**DNA探针**可以从基因库中筛选特定的克隆;
- 制备的探针可以是双链也可以是单链, 但在**杂交反应中使用的是单链**;
- 探针必须带有**标记**, 如同位素、荧光素等

#### ②. 筛选基因库:

#### ③. 序列测定和分析:

### (三)、*T-DNA*标签或转座子标签分离基因:



## **（四）差异表达基因克隆法：**

基因表达差异的分析通常用稳定状态下mRNA的丰度高低及有无来比较

- 表达谱测序，基因芯片， mRNA差异显示，消减杂交技术等



## **(五) 蛋白质组分析克隆法：**

蛋白质组(Proteome)的概念最先由Marc Wilkins提出，指由一个基因组(Genome)，或一个细胞、组织表达的所有蛋白质(protein)。

双向凝胶电泳技术与质谱技术是目前应用最为广泛的研究蛋白质组学的方法。

## **(六) 酵母双杂交系统克隆法：**

酵母双杂交系统是将待研究的两种蛋白质的基因分别克隆到酵母表达质粒的转录激活因子（如GAL4等）的DNA结合结构域基因和GAL4激活结构域基因，构建成融合表达载体，从表达产物分析两种蛋白质相互作用的系统。

## **(七) 人工合成基因:**

**根据已知的基因或氨基酸序列,通过化学合成法制备基因。**

# 第三节 外源基因导入宿主

## 一、重组DNA导入原核生物

### ➤ 转化

CaCl<sub>2</sub>处理转化

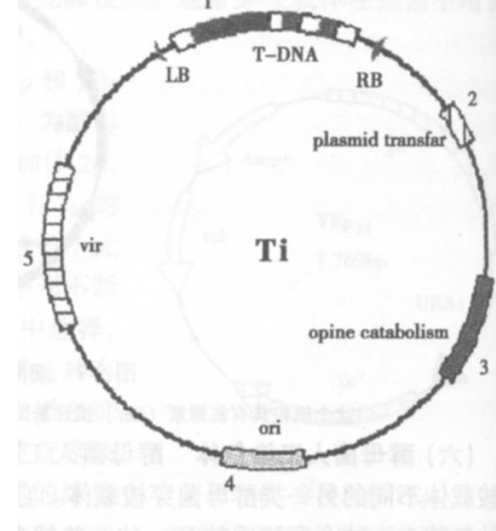
电激转化

### ➤ 接合

## 二、外源基因导入植物

### (一) 植物表达载体：

- 能作为媒介将外源基因导入到植物细胞中去，并且整合到宿主细胞的基因组DNA上；
- 能提供被宿主细胞复制和转录所识别的DNA序列，以保证转化的外源基因在植物细胞中进行复制和表达：**启动子**和**复制起始位点**。



## Ti质粒 (tumor-Inducing plasmid, Ti)

- 一种细菌质粒，它自然存在于土壤农杆菌细胞中。
- Ti质粒一部分DNA叫转移DNA (transfer DNA, T-DNA)，
- 当农杆菌感染植物时，T-DNA便转移到植物的染色体上，诱导冠瘿瘤，
- 并能合成冠瘿碱，作为农杆菌的碳源和氮源。



# Ti质粒特点:

➤ 具有五个主要功能区域:

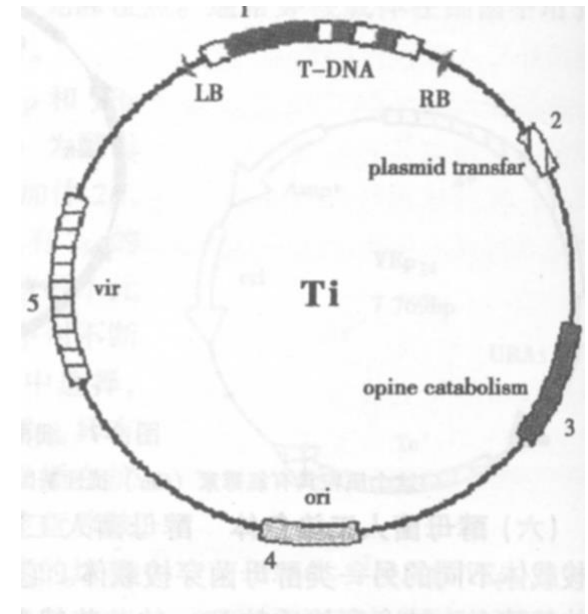
①. T-DNA

②. 质粒转移区;

③. 冠瘿碱(opine)代谢区;

④. 复制原点;

⑤. 毒性区



➤ T-DNA中直接参与转移并整合的序列: 仅是T-DNA两端与其它序列交界处的25bp不完全直接重复,

右端的这段序列称为右界(RB), 左端的序列称为左界(LB)。

➤ Vir区的毒性基因: T-DNA转移所必需。

# Ti质粒的衍生载体

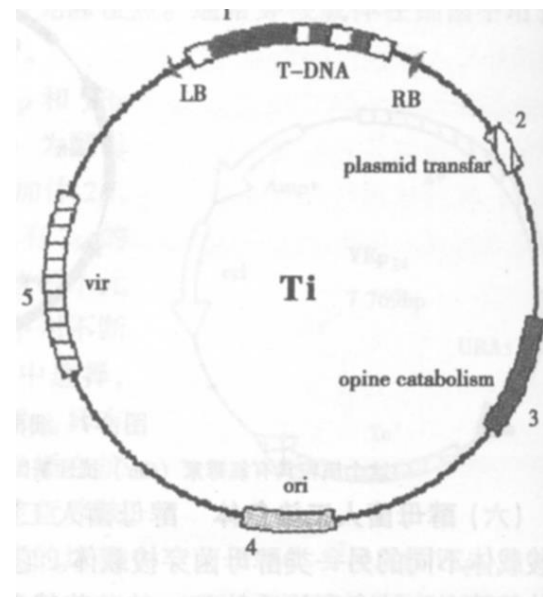
➤ **双元载体(binary vectors)**：这个系统具有两个质粒：

①. **用于克隆外源基因片段的克隆质粒**：在 *E. coli* 和农杆菌中复制，容易操作，并可在二者间转移，是一种**穿梭质粒**；

②. **非致病质粒**：具有毒性基因，没有 *T-DNA* 序列。

➤ **共整合载体(integrated vectors)**：

这个系统包括两个质粒，一个用作克隆外源基因的质粒，另一个具有毒性基因，但**这两个质粒有一同源序列**，在农杆菌中重组整合成一个载体。





# Ri质粒的衍生载体

- Ri质粒是在发根土壤杆菌细胞中存在的一种染色体外自主复制的环形双链DNA分子。它控制不定根的形成，可作为基因工程的载体。

## (二) 外源基因导入植物:

➤ 农杆菌介导法

➤ 基因枪法

➤ 花粉管通道法

# 根癌农杆菌转化技术

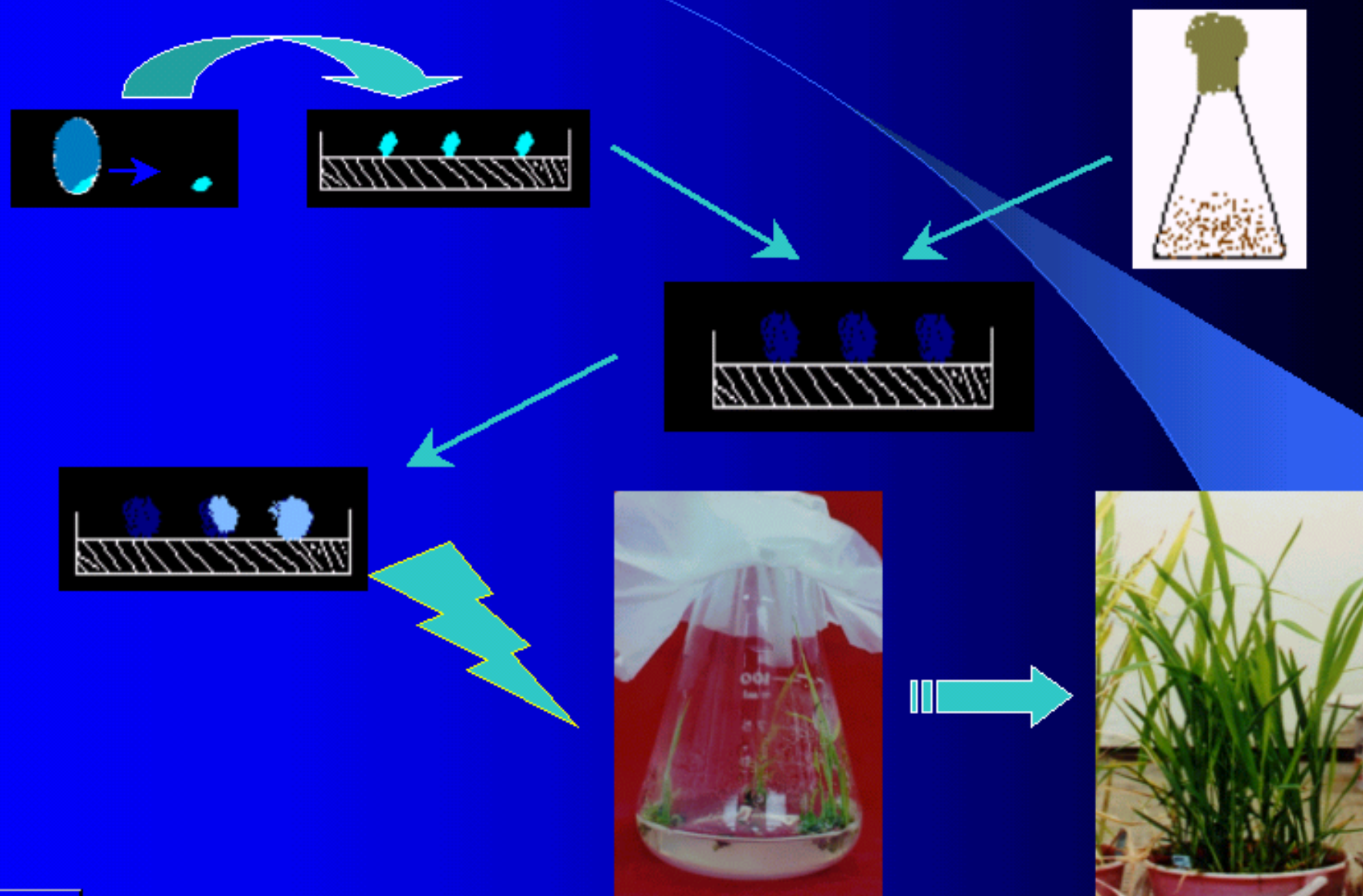
- 根癌农杆菌

(*Agrobacterium tumefaciens*)

- 根癌农杆菌介导的植物转化是应用得最早而广泛的一种植物转化方法。
- 双子叶植物、单子叶植物都可以用。

- 将目的基因与花椰菜花叶病毒35S启动子及终止子组成嵌合DNA分子
- 插入到Ti衍生质粒的RB与LB之间构成重组质粒
- 转化根瘤土壤杆菌细胞
- 重组根瘤土壤杆菌感染植物细胞
- 使质粒的部分DNA与目的基因一起整合到植物染色体上，实现遗传转化

# 根癌农杆菌介导的水稻高效转化技术

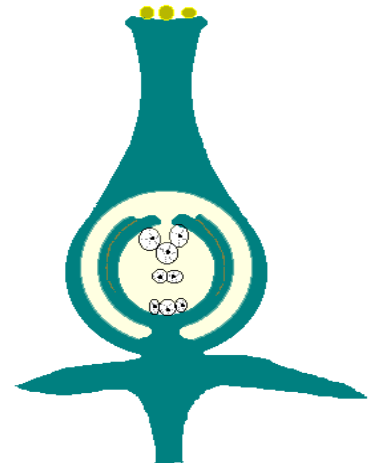


# 基因枪法

- 基因枪 (gene gun) 法, 又称微粒轰击法 (microprojectile bombardment, biolistics)
- 依赖高速的金属微粒将外源基因导入植物细胞
- 优点: 无宿主限制, 可用于任何基因型的材料
- 缺点: 转化频率低, 结果重复性差, 多拷贝导入导致基因沉默, 实验成本高

# 花粉管通道法

- **花粉管通道法**:在授粉后向子房注射含目的基因的DNA溶液，利用植物在开花、受精过程中形成的花粉管通道，将外源DNA导入受精卵细胞，并进一步地被整合到受体细胞的基因组中，随着受精卵的发育而成为带转基因的新个体。该方法于80年代初期由我国学者周光宇提出，我国目前推广面积最大的转基因抗虫棉就是用花粉管通道法培育出来的。该法的最大优点是不依赖组织培养人工再生植株，技术简单，不需要装备精良的实验室，常规育种工作



## 第四节 转基因生物的检测与鉴定

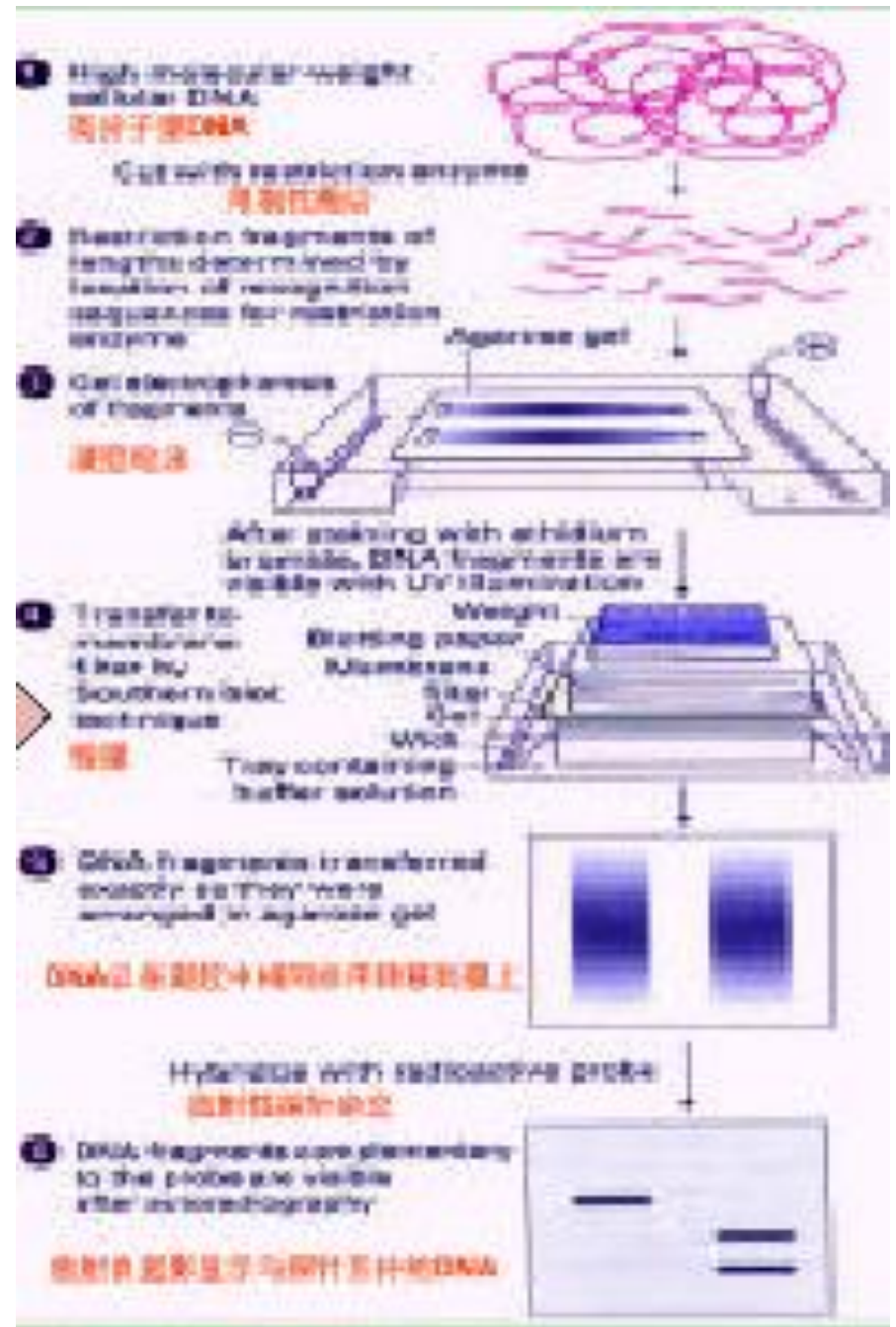
### 一、分子检测

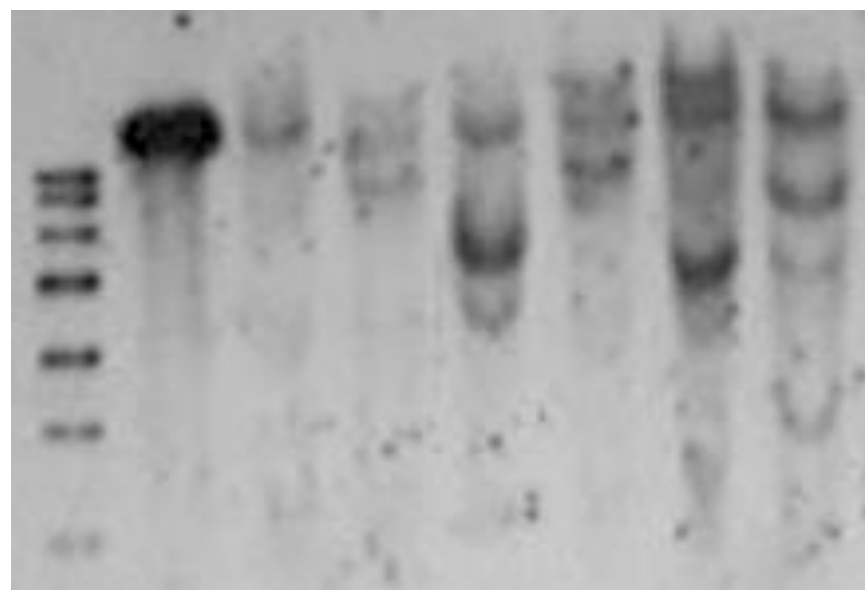
PCR检测；Southern杂交；Northern杂交，  
Western杂交。



**Southern杂交分析：**由英国Southern发明(1975)，一种将琼脂糖中的DNA转移到尼龙膜→进行DNA分子杂交分析的方法。

筛选基因库得到阳性克隆后→将限制性酶酶切与Southern杂交结合→绘制限制性酶图谱。





**Northern杂交分析：** 与Southern杂交相同的原理和程序。

用于分析克隆的基因在某一细胞或组织的转录水平，**检测mRNA的存在。**

**Western 杂交分析：**  
用于蛋白质的分析。

## 二、生物学性状的鉴定



## 第五节 基因工程的应用

### 一、基因工程的应用

基因工程是生物学基础研究的重要手段（研究基因的功能与表达，研究癌变机理）；利用基因工程改良动、植物（改良抗性，改良品质）；生物反应器；基因治疗。









# 生物科学基础研究的重要手段

- 基因结构的重叠现象和不连续性
- mRNA的剪辑
- 转座因子
- 基因表达的调控
- 生物与环境信号的识别
- 癌变机理



# 改良植物

- 抗虫植物
- 抗除草剂植物
- 1996年开始转基因作物投入生产
- 2003年，抗虫作物           1000万 $\text{hm}^2$   
                                抗除草剂作物 5000万 $\text{hm}^2$
- 美国转基因棉花 80%；全球 50%
- 我国进口的大豆绝大部分是转基因大豆

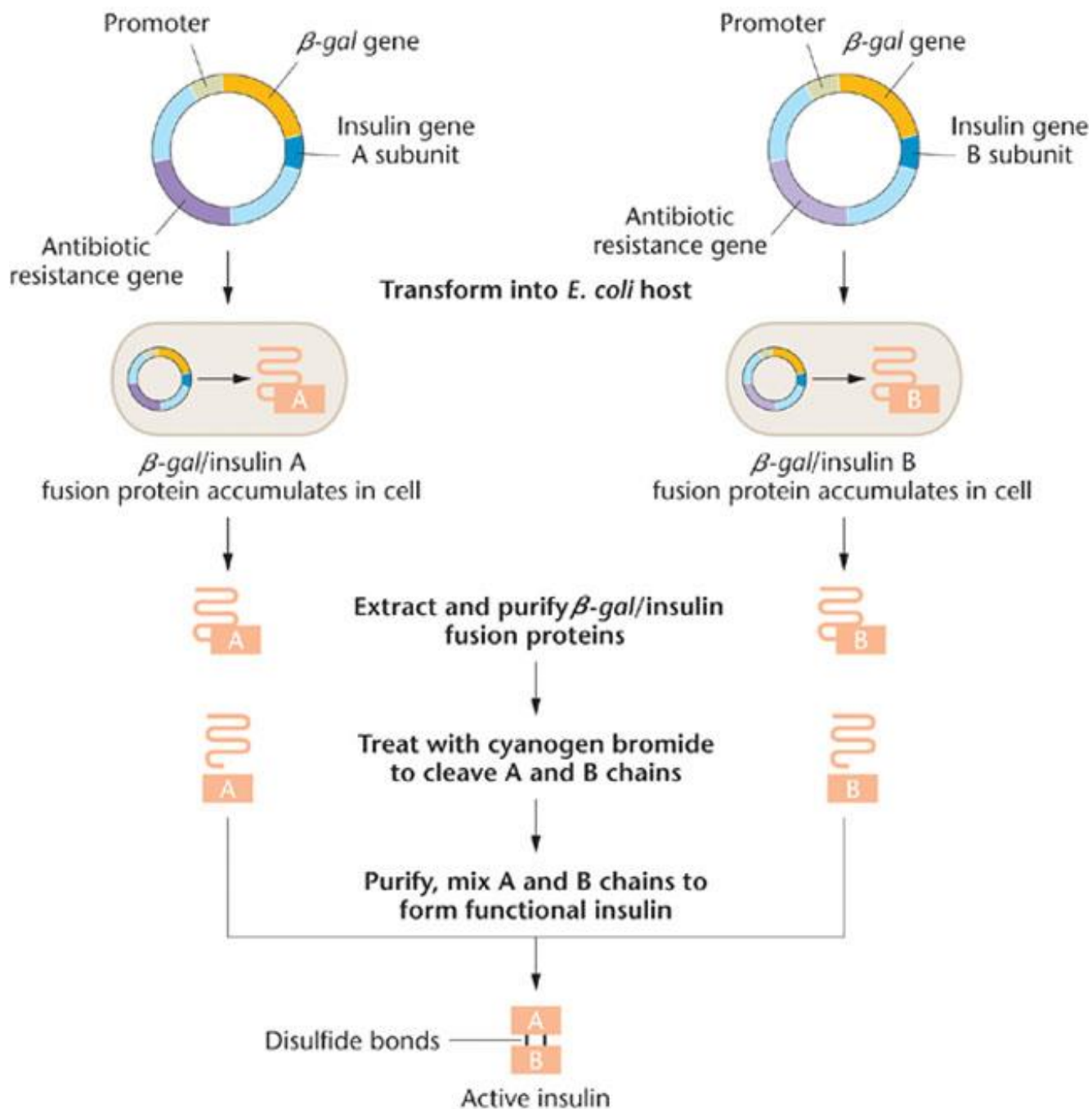
# 改良动物

- ❑ 比转基因植物发展慢
- ❑ 原因：涉及社会伦理和宗教问题
- ❑ 在技术上动物细胞的再生能力
- ❑ 克隆羊Dolly
- ❑ 转基因鱼是比较成功的
- ❑ 将重组DNA导入受体合子细胞核中，借助于母体环境实现转基因动物生产

# 基因工程工业

- 生产工业、农业、药用蛋白质
- 转移花色基因或特异性状，改变花卉的花色和外观，提高观赏价值

# 人工生产胰岛素



# 疾病诊断和基因治疗

- 正常基因替代缺陷基因
- 修复突变基因
- 制造疾病诊断试剂盒
- 生产疫苗

用酵母菌生产人乙肝疫苗是第一个真核生物基因工程的商业化产品

- 有人设想将蜘蛛丝弹性蛋白基因转入植物，生产弹性蛛丝蛋白，治疗人类软骨细胞增生

# 基因工程用于环境保护

利用转基因微生物降解污染物

如：油船事故的处理

## 二、安全性评价

- 1、外源基因的毒性
- 2、人体免疫系统潜在过敏反应问题
- 3、抗生素抗性风险问题
- 4、“超级杂草”及生物多样性
- 5、转基因食品的安全性

转基因研发安全管理条例与办法，包括且不局限于：  
《农业转基因生物安全管理条例》

[http://www.moa.gov.cn/ztzl/zjyqwgz/zcfg/201007/t20100717\\_1601306.htm](http://www.moa.gov.cn/ztzl/zjyqwgz/zcfg/201007/t20100717_1601306.htm)

《农业转基因生物安全评价管理办法》

[http://www.moa.gov.cn/ztzl/zjyqwgz/zcfg/201712/t20171227\\_6129154.htm](http://www.moa.gov.cn/ztzl/zjyqwgz/zcfg/201712/t20171227_6129154.htm)



# A、国外对转基因食品管理的现状

## 1. 国际组织

实质等同原则

表型性状的等同成分

2000年 《卡塔赫纳生物安全协定书》 62个国家签署

2001年 《生物安全议定书》 130多个国家签署

2003年 《生物技术食品的风险评估草案》 226个国家表示欢迎

- 实质等同原则是在1993年被经合组织（OECD）首次提出来的，并得到了世界卫生组织和联合国粮农组织的认可。OECD的官方文字是这样说的：
- Substantial equivalence embodies the concept that if a new food or food component is found to be substantially equivalent to an existing food or food component, it can be treated in the same manner with respect to safety.（如果一种新的食品或者食物成分与现有的食品或者食物成分实质等同，那么就可以认为两者的安全性是一样的。）
- 读完这句话你有什么感觉？反正我当年第一次读时完全摸不着头脑。事实上，后来有很多专家也认为这个定义是故意语焉不详的，因为这里面有一些说不清道不明的细节很难向公众解释。下面我分三个层面为大家解读一下这个原则，我个人认为这是理解食品安全法规，甚至是其他相关领域的国家管理条例的关键。
- 首先，专家们认为，DNA是“一般认为安全”（Generally Recognized as Safe，简称GRAS）的食品成分，无需专门检验。有些人可能对此不理解，很多病毒不就是一段有毒DNA吗？事实上任何病毒要想传染，必须有外壳蛋白质的参与，仅凭一段DNA是不行的。如果只是一段单纯的DNA，无论序列多么奇怪，进了肚子就被分解成ATCG了，不会对人体造成任何不良影响。真正需要警惕的是蛋白质，它们才是潜在毒性（或者致敏性）的罪魁祸首。所以，科学家认为，如果一种转基因食品并没有生产出任何新的蛋白质，那么它和同类的传统食品就是实质等同的，无需额外检验。比如，转Bt基因的食品和传统食品相比就多了一种Bt蛋白，但是这种蛋白质已经作为生物杀虫剂安全使用了几十年，其毒性和致敏性都有定论，对人体无害，所以转Bt基因的食品和传统食品一样对待就可以了。
- 其次，与实质等同原则对应的是预防性原则，前者被美国采用，后者被欧盟采用，两者在操作过程中最大的不同就是前者只看最终产品，后者需要检查生产过程。如果拿汽车做个比喻的话，美国人只要检查一下这辆车的各个部件，比如刹车板是否可靠，轮胎是否抓地等等，就可以允许上市销售了。但是欧洲人却更关心这辆车是哪家工厂生产的，生产工艺是否有所不同。具体到转基因，假如有人想培育出一种抗虫西红柿，他既可以通过转基因的方式把一种来自野生西红柿的抗虫基因导入商业品种，也可以通过杂交的方式把这个基因导入商业品种。美国人对这两种方法一视同仁，只要最终的西红柿不含有任何新的有毒蛋白质就可以放行了。但欧洲人却把重点放在了转基因技术上，对产自这一技术的西红柿百般刁难，却放过了通过杂交得来的西红柿。但实际上任何一个生物学家都会告诉你，杂交才最有可能把来自野生西红柿的某个有毒蛋白质带进来，这才是最不安全的方法。

- 第三，为什么要采取实质等同原则？原因很简单：**为了省出时间和精力关注真正重要的事情。**很多批评实质等同原则的人都犯了只见树木不见森林的错误，单独把这个原则拿到放大镜下挑错，自然能挑出很多错误。想想看，如果没有这个原则，FDA对于每一种新的食品或者食物成分都从头到尾查个底儿掉，当然是最安全的做法，或者按照公知们的说法，是“对人民负责的做法”。但是请你想想，这个做法有可能实现吗？就拿“DNA是GRAS”这个原则来说，我们每天吃的食物中都含有大量未知序列的DNA，它们原则上都可以被认为是“新”食品，如果你要求FDA对于每一种“新”食品都挨个检查一遍，那FDA就啥事也别想干了。“DNA是GRAS”这个原则帮助FDA省下了大量时间和精力去做别的更重要的事情。另外，出于商业考虑，目前上市的所有转基因品种事实上都被FDA仔细检查了一遍，结果都没问题。转基因食品已经被人类安全食用了将近20年，目前尚无一例被确认的食品安全问题是转基因引起的，对于这样一种安全的食品，如果你还是坚持要求FDA区别对待，其结果就是FDA被迫浪费了大量时间和精力去放空枪，无法腾出手来对付真正的敌人。
- 这个原则可以延伸到很多其他领域。我说过很多次，任何一个规章制度（或者行业标准），如果你单独拿出来看的话，一定会发现很多问题，但绝大多数情况下，法规制定者需要全盘考虑，这里面涉及到的人力财力物力等等都是普通老百姓想不到的。这就是为什么我们必须相信专家的意见，而不是盲目地相信自己的那点可怜的智慧，因为你本人也许不笨，但你缺乏对全局的统一认识，无法做到像专家那样高瞻远瞩

[http://www.moa.gov.cn/ztzl/zjyqwgz/spxx/201704/t20170421\\_5578860.htm](http://www.moa.gov.cn/ztzl/zjyqwgz/spxx/201704/t20170421_5578860.htm)



[http://www.moa.gov.cn/ztzl/zjyqwgz/zcfg/201712/t20171227\\_6129154.htm](http://www.moa.gov.cn/ztzl/zjyqwgz/zcfg/201712/t20171227_6129154.htm)

实质等同原则是在1993年被经合组织（OECD）首次提出来的，并得到了世界卫生组织和联合国粮农组织的认可。OECD的官方文字是这样说的：

Substantial equivalence embodies the concept that if a new food or food component is found to be substantially equivalent to an existing food or food component, it can be treated in the same manner with respect to safety.（如果一种新的食品或者食物成分与现有的食品或者食物成分实质等同，那么就可以认为两者的安全性是一样的。）

## 2. 美国

- ◆ 1992年美国FDA公布了转基因作物不需由FDA作市场前评价，除非它引起新的安全性问题。2000年4月，在国会科学委员会下属的基础研究委员会的调查报告中，坚持认为没有科学的证据之前不能将GMF作为一个新的食品级别
- ◆ 2000年1月美国政府对转基因玉米的种植颁布了禁令，以防止害虫对转基因玉米中毒素形成抗药性。美国环境保护局禁令美国大部分玉米产区的农场主应至少种植20%的传统玉米，在同时种植玉米和棉花的地区，传统玉米要达到50%
- ◆ 2001年7月出台了《转基因食品管理草案》规定，来源于植物且被用于人类或动物的GMF在进入市场之前至少120天，生物工程制造商必须提出申请，并提供此类食品的相关资料，以确认此类食品与相应的传统产品相比具有等同的安全性

### 3. 欧盟

- ◆ 欧盟对GMF持反对态度，1998年提出转基因技术安全性之后，其反对态度更加强硬。他们对转基因技术培育的农作物、家畜以及再加工食品加以抵制，尤其对美国的转基因玉米已终止了进口，然而对于西班牙和德国的转基因玉米却没有采取措施
- ◆ 欧盟的法律由两项：欧盟理事会90 / 220令，于1990年4月颁布实施，该法令中规定了转基因生物的批准程序；1997年5月《新食品法》规定对转基因产品必须加贴标签

## 4. 其它国家

- ◆日本、澳大利亚、俄罗斯、加拿大、韩国、泰国、巴西的政策基本与国际组织的相同，但是巴西最近宣布在未查清转基因作物对环境的影响之前，暂时停止种植转基因大豆。
- ◆发展中国家迫切需要解决粮食问题，对于高产的转基因产品表示欢迎，这些国家技术落后，没有相关的转基因成分的检测条件，对于标识问题也只能处于被动地位，基本是按国际组织的要求和《生物安全议定书》要求执行



## B、我国对转基因食品的对策

- ◆ 1993年12月24日，国家科委颁布实施了《**基因工程安全管理办法**》
- ◆ 1996年7月10日，国家农业部颁布实施了《**农业生物基因工程安全管理实施办法**》
- ◆ 2001年6月6日国务院颁布了《**农业转基因生物安全管理条例**》
- ◆ 2002年4月8日国家卫生部颁布了《**转基因食品卫生管理办法**》

<https://baike.sogou.com/v5963452.htm?fromTitle=%E8%BD%AC%E5%9F%BA%E5%9B%A0%E9%A3%9F%E5%93%81%E5%8D%AB%E7%94%9F%E7%AE%A1%E7%90%86%E5%8A%9E%E6%B3%95>

## 第一章 总 则

**第一条** 为了加强对转基因食品的监督管理，保障消费者的健康权和知情权，根据《中华人民共和国食品卫生法》（以下简称《食品卫生法》）和《农业转基因生物安全管理条例》，制定本办法。

**第二条** 本办法所称转基因食品，系指利用基因工程技术改变基因组构成的动物、植物和微生物生产的食品 and 食品添加剂，包括：

- （一）转基因动植物、微生物产品；
- （二）转基因动植物、微生物直接加工品；
- （三）以转基因动植物、微生物或者其直接加工品为原料生产的食品 and 食品添加剂。

**第三条** 转基因食品作为一类新资源食品，须经卫生部审查批准后方可生产或者进口。未经卫生部审查批准的转基因食品不得生产或者进口，也不得用作食品或食品原料。

**第四条** 转基因食品应当符合《食品卫生法》及其有关法规、规章、标准的规定，不得对人体造成急性、慢性或其他潜在性健康危害。

**第五条** 转基因食品的食用安全性和营养质量不得低于对应的原有食品。

**第六条** 转基因食品的生产企业须达到国家有关食品生产企业卫生规范的要求。

转基因食品的生产经营者应当保证所生产经营的转基因食品的食用安全性和营养质量。

转基因食品的生产者应当保留转基因食品进（出）货记录，包括进（出）货单位、地址、数量，相关记录至少保留二年备查。

## 第二章 食用安全性与营养质量评价

**第七条** 卫生部建立转基因食品食用安全性和营养质量评价制度。

卫生部制定和颁布转基因食品食用安全性和营养质量评价规程及有关标准。

**第八条** 转基因食品食用安全性和营养质量评价采用危险性评价、实质等同、个案处理等原则。

**第九条** 卫生部设立转基因食品专家委员会，负责转基因食品食用安全性与营养质量的评价工作。委员会由食品安全、营养和基因工程等方面的专家组成。

**第十条** 卫生部根据转基因食品食用安全性和营养质量评价工作的需要，认定具备条件的检验机构承担对转基因食品食用安全性与营养质量评价的验证工作。

## 第三章 申报与批准

**第十一条** 生产或者进口转基因食品必须向卫生部提出申请，并提交下列材料：

- （一）申请表；
- （二）国家有关部门颁发的批准文件；
- （三）企业标准；
- （四）食用安全性的保证措施；
- （五）设计包装及标识样稿；
- （六）与食用安全性和营养质量评价有关的技术资料；
- （七）申请单位对转基因食品食用安全性和营养质量评价报告和卫生部认定的检验机构出具的对转基因食品食用安全性和营养质量评价的验证报告；
- （八）其他有助于转基因食品食用安全性与营养质量评价的资料。

**第十二条** 本办法第十一条第（六）项规定的转基因食品食用安全性和营养质量评价有关的技术资料包括：

- （一）转基因食品的（物种）名称；
- （二）转基因食品的理化特性、用途与需要强调的功能；
- （三）转基因食品可能的食品加工方式与终产品种类以及主要食物成分（包括营养和有害成分）；
- （四）基因修饰的目的与预期技术效果，以及对食品产品特性的预期影响；
- （五）基因供体的名称、特性、食用史；载体物质的来源、特性、功能、食用史；基因插入的位点及特性；
- （六）引入基因所表达产物的名称、特性、功能及含量；
- （七）表达产物的已知或可疑致敏性和毒性，以及含有此种表达产物食用安全性的依据；
- （八）可能产生的非期望效应（包括代谢产物的评价）。

**第十三条** 申请进口转基因食品的除必须提交本办法第十一条、第十二条规定的材料外，还应当提供出口国（地区）政府批准在本国（地区）生产、经营、使用的证明文件。

**第十四条** 卫生部自受理转基因食品申请之日起六个月内作出是否批准的决定。

**第十五条** 批准的转基因食品，由卫生部列入可用于食品生产、经营的转基因食品品种目录。

#### 第四章 标 识

**第十六条** 食品产品中（包括原料及其加工的食品）含有基因修饰有机体或/和表达产物的，要标注“转基因XX食品”或“以转基因XX食品为原料”。

转基因食品来自潜在致敏食物的，还要标注“本品转XX食物基因，对XX食物过敏者注意”。

**第十七条** 转基因食品采用下列方式标注：

- （一）定型包装的，在标签的明显位置上标注；
- （二）散装的，在价签上或另行设置的告示牌上标注；
- （三）转运的，在交运单上标注；
- （四）进口的，在贸易合同和报关单上标注。

**第十八条** 转基因食品的标签应当真实、客观，不得有下列内容：

- （一）明示或暗示可以治疗疾病；
- （二）虚假、夸大宣传产品的作用；
- （三）卫生部规定的禁止标识的其他内容。

#### 第五章 监 督

**第十九条** 卫生部对已经批准生产或者进口的转基因食品发现有下列情形之一的，进行重新评价：

- （一）对转基因食品食用安全性和营养质量的科学认识发生改变的；
- （二）转基因食品食用安全性和营养质量受到质疑的；
- （三）其他原因需要重新评价的。

**第二十条** 卫生部对转基因食品的生产经营组织定期或者不定期监督检查，并向社会公布监督检查结果。

**第二十一条** 卫生部认定的转基因食品食用安全性和营养质量检验机构须按照卫生部制定的规程及有关标准进行评价。

对出具虚假检验报告或者疏于管理难以保证检验质量的，由卫生部责令改正，并予以通报批评；情节严重的，收回认定资格。

**第二十二条** 从事转基因食品检验、评审和监督工作的人员应当具备相应的专业素质和职业道德。

**第二十三条** 转基因食品生产经营的经常性卫生监督管理，按照《食品卫生法》及有关规定执行。

#### 第六章 附 则

**第二十四条** 违反本办法，由卫生行政部门按照《食品卫生法》的有关规定进行处罚。

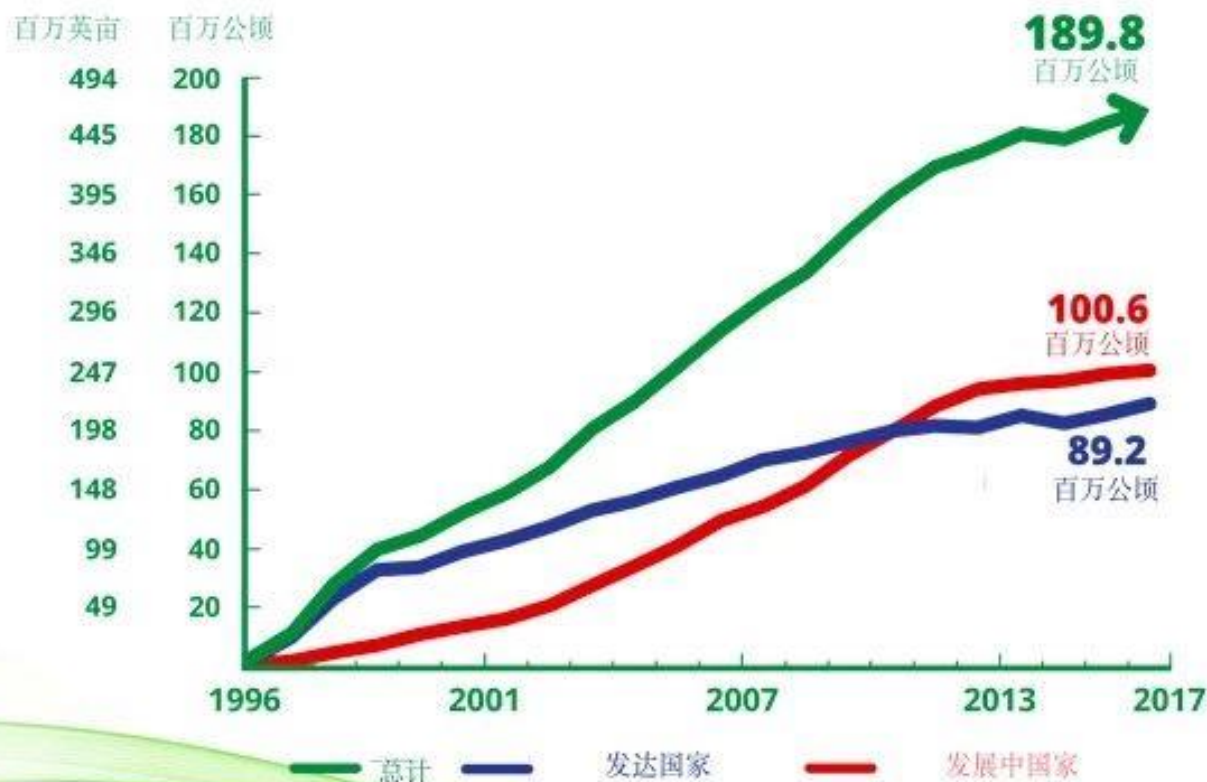
**第二十五条** 本办法由卫生部负责解释。

**第二十六条** 本办法自2002年7月1日起施行。

《转基因食品卫生管理办法》（2001年12月11日卫生部部务会讨论通过，2002年4月8日卫生部令第28号发布，自2002年7月1日起施行。）是为了加强对转基因食品的监督管理，保障消费者的健康权和知情权，根据《中华人民共和国食品卫生法》和《农业转基因生物安全管理条例》而制定的办法。

公信度

全球转基因作物的种植面积（1996 – 2017）：  
发达国家和发展中国家（百万公顷, 百万英亩）

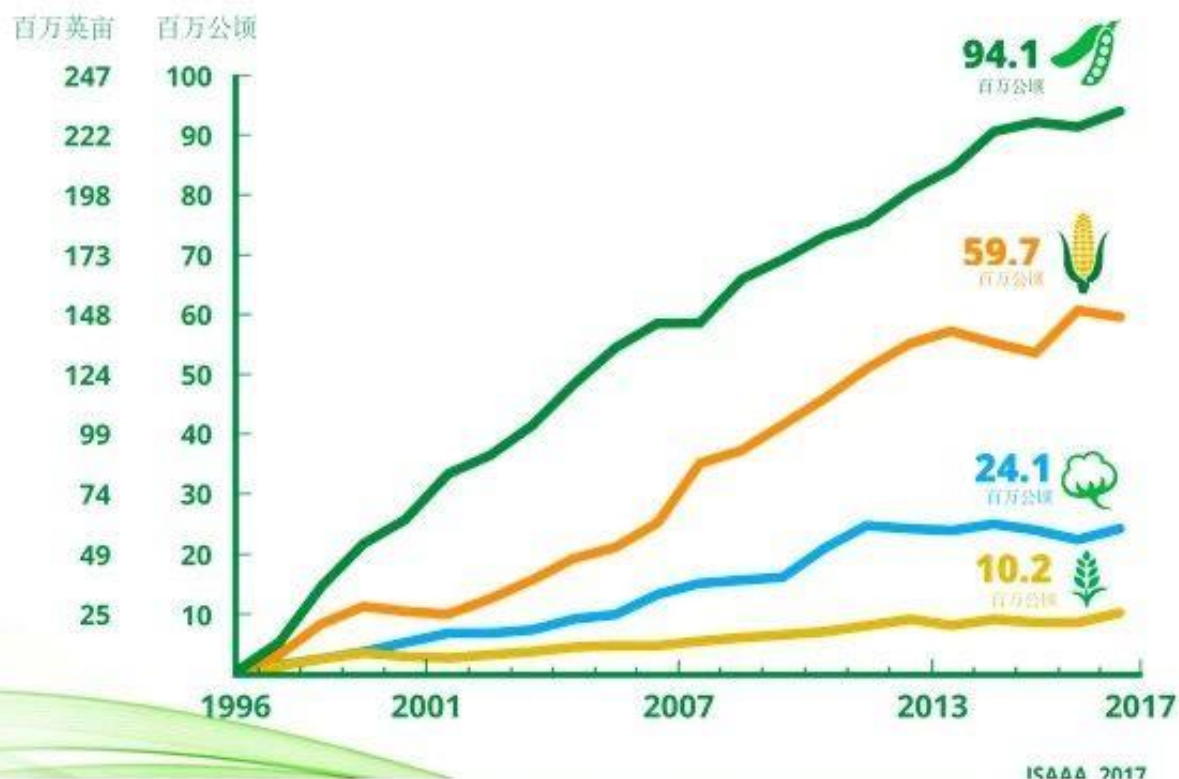


ISAAA, 2017

发展中国家占**53%**；发达国家占**47%**



全球转基因作物的种植面积（1996-2017）：  
按作物划分（百万公顷, 百万英亩）



转基因玉米种植面积占全球转基因作物总种植面积的百分率保持在 **50%**；  
转基因棉花的种植面积增加到 **13%**

## 2017年五大转基因作物种植国(面积和应用率)



**3 个发展中国家（巴西、阿根廷和印度）和 2 个发达国家（美国和加拿大）的总种植面积占全球种植面积的 91.3%**



- 美国耕地总面积将近2亿公顷，其中40%种植的是转基因作物。玉米、大豆、棉花三大作物中，转基因的种植比例均超过90%，并且2/3的转基因谷物用于美国本土消费。简言之，美国是世界第一大转基因种植国，也是第一大转基因的消费国。



## 转基因作物对粮食安全、可持续发展及气候变化的贡献



### 增加作物产量

1996年~2016年，全球转基因作物使农业收入增加

**1861亿美元**



### 保护生物多样性

1996年~2016年通过转基因技术增加的产量，节约了用于耕种的土地

**1.83亿公顷**



### 提供更好的环境

减少了农药的使用

1996年~2016年降低了除草剂和杀虫剂对环境的影响，使用量下降了**18.4%**



### 减少CO<sub>2</sub>排放

CO<sub>2</sub>排放量减少了**271亿公斤**，相当于**1年**在公路上减少**1670万辆汽车**



### 帮助缓解贫困与饥饿

转基因作物帮助了**1600万~ 1700万**小农户及其家庭，总共**超过6500万人口**

资料来源：Brookes 和 Barfoot, 2018年

## 2017 年转基因作物为消费者提供了更加多样性的选择



加拿大, Gen 1和Gen 2 防褐变马铃薯, 40 公顷



美国, 北极苹果, 101 公顷



加拿大, AquaBounty 转基因三文鱼, 4.5 吨



哥斯达黎加, 粉色菠萝, 25 公顷



孟加拉国, Bt 茄子, 2400 公顷



HarvXtra 低木质素苜蓿, 80000 公顷 (美国), 3000 公顷 (加拿大)



## 在产品线中的转基因作物和性状



富含 $\beta$ -胡萝卜素



抗枯萎病、香蕉叶斑病及束顶病，并富含 $\beta$ -胡萝卜素



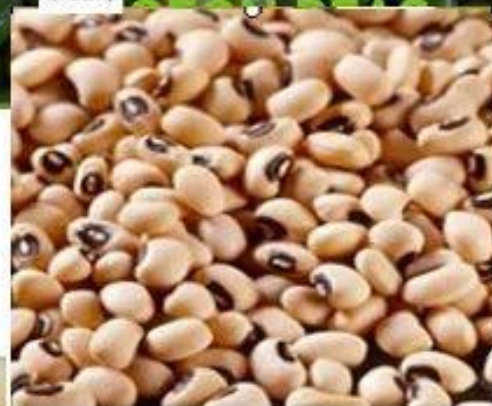
少谷蛋白



延迟成熟



抗虫



抗花叶病和褐条病



耐旱与高产

## 通过新育种技术开发的生物技术产品



防褐变蘑菇：敲除 *ppo* 基因，已上市



改变淀粉组成：删除 *wax* 基因



高产油量：基因敲除



减少木质素：基因敲除

ISAAA



抗大斑病：等位基因替换



减少黑斑：敲除 *ppo5* 基因



## 本章重点

- (1) 遗传工程的概念和包含的内容;
- (2) 基因工程的基本原理和技术流程;
- (3) 基因工程常用的工具酶、载体的基本特点和常见类型;
- (4) 目的基因分离方法、外源基因导入宿主的方法;
- (5) 转基因生物检测与鉴定的基本原理和方法。