

21 世纪高等院校教材——生物工程系列

基 因 工 程

李立家 肖庚富 编著

科 学 出 版 社

北 京

内 容 简 介

本书共分 8 章,第 1 章介绍基因工程及其发展,希望读者从整体上了解这一门学科;第 2 章讲述基因工程的载体和工具酶;第 3 章侧重于讨论 DNA 重组技术的方法原理;第 4~6 章,介绍不同生物中基因表达的应用研究,既讲一些成功的事例,让学生掌握怎样设计完成一个完整的基因工程工作,也强调可能或已经遇到的困难障碍,以及怎样克服它们;第 7 章基因治疗是医学发展中的一种重要手段,应了解掌握;第 8 章介绍“第二代基因工程”——蛋白质工程原理。本书在讲述方法、技术的过程中详细介绍了基因工程的基本理论,还援引了许多最新研究成果,力求内容新颖、通俗易懂。

本书适于作为生物、农林、医学和制药专业本科生和研究生的教材,也可作为这些领域中研究人员的参考书。

图书在版编目(CIP)数据

基因工程/李立家,肖庚富编著.—北京:科学出版社,2004.3

(21 世纪高等院校教材——生物工程系列)

ISBN 7-03-012925-3

I. 基… II. ①李… ②肖… 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(2004)第 011354 号

责任编辑:周 辉 贾学文 李久进/责任校对:朱光光

责任印制:安春生

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2004 年 3 月第 一 版 开本:B5(720×1000)

2006 年 1 月第四次印刷 印张:13 3/4

印数:10 001—15 000 字数:256 000

定价:23.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换〈路通〉)

序

现代生物技术已被广泛应用于医药卫生、农牧渔业、资源开发及环境保护等领域,并对相关产业的发展产生了深刻的影响。基因工程是现代生物技术的核心,也是发展最迅速的方向。进入 21 世纪以来,越来越多的科技工作者,尤其是青年学子投身于这一重要研究领域,高等院校生命科学类几乎所有专业(理、工、农、医)都先后开设了基因工程这门课程。

武汉大学生命科学学院的李立家、肖庚富尝试编写了这本《基因工程》教材。教材第 1 章概述基因工程及其发展;第 2、3 章讲述载体、工具酶及 PCR 等常用技术的原理;第 4、5、6 章分别讲述基因在大肠杆菌、酵母中高效表达的策略、转基因植物与转基因动物,既讲基本原理与成功的范例,也强调可能遇到的困难与解决办法;第 7 章介绍基因工程在医学中的重要应用——基因治疗,包括病毒与非病毒载体,遗传病、恶性肿瘤、病毒病的基因治疗策略;第 8 章介绍“第二代基因工程”——蛋白质工程,包括定点突变、定向进化技术及药物、工业用酶的蛋白质工程实例。

两位作者分别是武汉大学植物发育生物学国家重点学科和微生物学国家重点学科的青年教师(博士、副教授),在一线从事植物基因工程与病毒基因工程及相关的研究,多年来主讲基因工程及相关课程。该书参考了大量国内外书籍与期刊文献及截至 2003 年 9 月的中英文网上资料,并结合作者的教学与科研经验写成,有 50 余幅插图,内容简明、新颖、实用,可读性较强。第 2~8 章均附有 4~6 个思考题,不少思考题都是需要查阅课外资料并归纳综合才能完成的。相信本书的出版将为生物、农林、医学和制药等专业的本科生和研究生的教学提供帮助,该书也可作为相关领域研究人员的参考书。

科学出版社高等教育分社出版系列生物技术类教材,将有助于加强我国生物技术领域的人才培养,推动和促进生物技术的研究及其在国民经济中的应用。

谨此为序。



中国科学院院士

2003 年 11 月

前 言

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。近几年来，越来越多的科技工作者投身于这个神奇的研究和应用领域，而且高校中生命科学几乎所有专业（理、工、农、医）都先后开设了这门课程。目前用作教学的教材有的偏重于方法学的介绍，有的只是好的参考书或专著。在教学实践中，我们感觉到基因工程课程应该像其他的课程如细胞生物学、生物化学那样有一本真正适应教学和学生学习的教材。

基因工程这门课程是介于分子生物学等基础课程和 DNA 重组技术实验课之间的课程，与它们紧密联系又要尽量避免重复。作为一门基础课或应用基础课的教材，应能提供比较全面而系统的基本原理和概念，但同时应限制在不太大的篇幅内，使学生在 54 学时的时间内能掌握、了解基因工程的基本理论。

正是考虑到这个现实的需要，作者尝试编写了这本书。在此书中，不仅系统地介绍了基因工程的基本理论，还援引了许多最新研究成果，力求内容基础而又新颖，简捷而又通俗易懂。我们希望它能成为一本符合高等院校学生学习的教材和参考书，为加速我国这方面的人才培养，推动和促进基因工程技术及其企业在我国国民经济中的发展与应用发挥作用。

在编写过程中我们参考了最新的国内外参考书和一些文献资料，并结合了自己的教学经验。主要的参考书有《基因工程原理》（吴乃虎编著，1999），*Molecular Biology*（Robert F. Weaver 著，2000），《分子克隆实验指南》（J. 萨姆布鲁克和 D. W. 拉塞尔著、黄培堂等译，2002），《精编分子生物学实验指南》（F. Ausubel 等著、颜子颖等译，1998），《转基因动物》（周荣家等编著，1998），以及其他有关基因工程的参考书，还参考了复旦大学和北京大学等单位的网上资料及许多中文综述，许多文献名和作者的名字没有一一列出，请见谅，在此一并表示衷心的感谢。

肖庚富博士负责编写第 4、第 7 和第 8 章。李立家博士负责其余部分内容的组织编写工作。编写此书过程中还得到了许多老师和学生的大力支持和帮助，李得加博士为第 5、6 章收集了大量资料并负责了初稿的编写，龚睿、何启强、谢莉、杨金铃、童琼、李兵勇、易佳林、方骢为资料的收集和整理、绘图及文字输入等付出了大量劳动，在此表示诚挚的谢意。

由于时间较短，水平有限，有不足之处，真诚地希望专家和读者批评指教。

李立家 肖庚富
2003 年 10 月于武汉大学

目 录

1 基因工程概述	(1)
1.1 基因工程的发展简史	(1)
1.1.1 什么是基因工程	(1)
1.1.2 基因工程的开端	(1)
1.1.3 基因工程的发展	(2)
1.2 基因工程的研究意义和应用	(3)
1.2.1 基因工程在工业领域的应用	(3)
1.2.2 基因工程在农业领域的应用	(5)
1.2.3 基因工程在医药领域的应用	(7)
1.3 结语	(8)
1.4 基因工程课程与其他课程之间的关系	(8)
2 基因工程的载体和工具酶	(9)
2.1 载体	(9)
2.1.1 质粒载体	(9)
2.1.2 噬菌体载体	(17)
2.1.3 其他载体	(24)
2.2 工具酶	(25)
2.2.1 限制性内切核酸酶	(25)
2.2.2 DNA 聚合酶和 Klenow 大片段酶	(29)
2.2.3 DNA 连接酶	(30)
2.2.4 碱性磷酸酶	(31)
2.2.5 末端脱氧核苷酸转移酶	(31)
3 基因工程的常规技术	(32)
3.1 凝胶电泳技术	(32)
3.1.1 琼脂糖凝胶电泳的原理	(32)
3.1.2 琼脂糖凝胶电泳的影响因素	(33)
3.2 杂交技术	(34)
3.2.1 探针与探针标记	(34)
3.2.2 Southern 杂交	(35)
3.2.3 Northern 杂交	(36)
3.2.4 Western 杂交	(36)

3.2.5	菌落(噬菌斑)原位杂交	(36)
3.3	PCR 技术	(36)
3.3.1	PCR 技术的基本成分	(37)
3.3.2	PCR 技术的原理和过程	(40)
3.3.3	荧光定量 PCR	(42)
3.4	生物芯片	(43)
3.4.1	基因芯片	(44)
3.4.2	蛋白芯片	(45)
3.5	基因文库构建	(46)
3.5.1	基因组文库构建	(46)
3.5.2	cDNA 文库的构建	(47)
3.6	酵母双杂交系统	(48)
3.6.1	酵母双杂交系统的基本原理	(48)
3.6.2	酵母双杂交系统的应用	(49)
3.6.3	酵母双杂交系统存在的问题	(50)
3.7	DNA 测序	(50)
3.7.1	Sanger 双脱氧链终止法	(51)
3.7.2	Maxam-Gilbert 化学修饰法	(51)
4	基因在大肠杆菌、酵母中的高效表达	(53)
4.1	基因的表达系统与表达策略	(53)
4.1.1	基因的表达系统	(53)
4.1.2	根据表达蛋白用途选择基因的表达策略	(54)
4.2	基因在大肠杆菌中的高效表达	(56)
4.2.1	基于 T7 噬菌体 RNA 聚合酶/启动子的大肠杆菌表达系统	(56)
4.2.2	蛋白质的融合表达	(60)
4.2.3	蛋白质的分泌型表达	(66)
4.2.4	蛋白质的包含体形式表达与蛋白质复性	(68)
4.2.5	重组大肠杆菌的高密度培养	(71)
4.3	基因在酵母中的高效表达	(74)
4.3.1	酵母表达系统概述	(74)
4.3.2	甲醇酵母表达系统	(75)
4.3.3	组织纤溶酶原激活剂在甲醇酵母中的表达	(80)
5	转基因植物	(84)
5.1	植物的转基因技术	(84)
5.1.1	植物细胞培养技术	(84)
5.1.2	植物转基因技术的基本路线	(85)

5.1.3	转基因的受体系统	(85)
5.1.4	外源基因导入植物的方法	(86)
5.2	转基因植物的筛选与检测	(93)
5.2.1	报告基因	(93)
5.2.2	分子生物学检测方法	(97)
5.3	改进转基因的技术	(98)
5.3.1	转基因植物中外源基因的沉默	(99)
5.3.2	提高外源基因表达水平的策略	(100)
5.4	农作物基因工程	(104)
5.4.1	抗虫转基因作物	(104)
5.4.2	抗病毒作物	(106)
5.4.3	抗细菌和真菌作物	(107)
5.4.4	抗除草剂转基因作物	(107)
5.4.5	抗非生物胁迫作物	(108)
5.5	生物反应器	(108)
5.6	转基因植物的安全性	(111)
5.6.1	标记基因的安全性	(111)
5.6.2	转基因植物的安全性评价和争论的问题	(112)
6	转基因动物	(117)
6.1	动物转基因技术	(117)
6.1.1	显微注射法	(118)
6.1.2	逆转录病毒法	(122)
6.1.3	胚胎干细胞法	(123)
6.1.4	精子载体法	(132)
6.1.5	体细胞核移植法	(134)
6.1.6	受体介导法	(135)
6.2	提高转基因效率的策略	(136)
6.3	转基因动物的应用	(137)
6.3.1	转基因动物在基因功能等生命科学基础研究中的应用	(137)
6.3.2	转基因技术在动物育种中的应用	(138)
6.3.3	转基因动物在医药科学研究中的应用	(139)
6.4	转基因动物研究存在的问题及展望	(144)
7	基因治疗	(146)
7.1	基因治疗的概念与发展	(146)
7.1.1	基因治疗的概念和策略	(146)
7.1.2	基因治疗的基本程序	(147)

7.1.3	基因治疗的现状与展望	(149)
7.2	基因治疗的载体	(150)
7.2.1	病毒载体	(151)
7.2.2	非病毒载体	(158)
7.2.3	载体与基因治疗中的靶向性问题	(160)
7.3	重要疾病的基因治疗	(163)
7.3.1	遗传病的基因治疗	(163)
7.3.2	肿瘤的基因治疗	(166)
7.3.3	病毒病的基因治疗	(172)
8	蛋白质工程	(180)
8.1	蛋白质工程的理论基础、诞生和发展	(180)
8.1.1	蛋白质工程的理论基础	(180)
8.1.2	蛋白质结构测定与结构预测	(184)
8.1.3	蛋白质工程的诞生和发展	(187)
8.2	蛋白质工程的关键技术	(188)
8.2.1	定点突变	(189)
8.2.2	定向进化	(192)
8.2.3	其他技术(高突变菌株、tRNA 介导蛋白质工程)	(197)
8.3	蛋白质工程的应用及实例	(199)
8.3.1	定点突变与蛋白质药物工程: 胰岛素	(199)
8.3.2	定点突变、定向进化与工业用酶: 枯草杆菌蛋白酶等	(202)
8.3.3	结构域的拼接与金属硫蛋白工程	(204)
8.3.4	抗体工程	(206)
主要参考文献		(208)

1 基因工程概述

1.1 基因工程的发展简史

1.1.1 什么是基因工程

基因工程是 20 世纪 70 年代在微生物遗传学和分子生物学发展的基础上形成的学科。所谓基因工程，就是在分子水平上，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或生产不同的产物或定向地创造生物的新性状，并能稳定地遗传给后代。基因工程又名遗传工程（genetic engineering）、DNA 重组技术（recombinant DNA technique）、分子克隆（molecular cloning）或基因克隆（gene cloning）。基因工程的核心内容包括基因克隆和基因表达。

1.1.2 基因工程的开端

基因工程的出现是建立在几个重大发现和发明基础上的。1953 年，Watson 和 Crick 发现了主要遗传物质 DNA 的双螺旋结构，阐明了遗传信息传递的中心法则，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，限制性内切核酸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内切核酸酶 *EcoR* I，在体外对猿猴病毒 SV40 DNA 和 λ 噬菌体 DNA 分别进行酶切，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，并因此分享了 1980 年的诺贝尔化学奖。1973 年，S. Cohen 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，基因工程也由此宣告诞生。

基因工程技术从诞生到现在仅 30 年，但发展速度迅猛，无论是在基础研究方面，还是实际应用中，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了一个新的阶段。

1.1.3 基因工程的发展

基因工程的出现一方面引起了人们的极大关注和担心，另一方面吸引了许多科学家参与到这一崭新的研究领域。在基因工程诞生的最初几年，为了消除人们对这一技术的恐慌和忧虑，科学家们对重组 DNA 所涉及的载体和受体系统进行了有效的安全性改造，包括噬菌体 DNA 载体的有条件包装、质粒载体的转移性改造及受体细胞遗传重组和感染寄生缺陷突变株的筛选，同时还建立了一套严格的 DNA 重组实验室设计与操作规范，这些改造工作实际上加速了基因工程的发展。基因工程是在分子生物学等学科基础上发展起来的，基因工程的发展是和这些学科的发展相联系的，反过来它也渗透到生命科学的各个领域，促进着生命科学各学科的研究与应用。同时这门技术巨大的潜在的商业价值引来众多的投资者，终于使 DNA 重组应用技术迅速发展起来，使它很快走出实验室，进入商业化应用。所以基因工程的大发展也就是它在多学科以及商业上的应用发展。下面我们讨论的基因工程应用也就是它的大发展成就。

基因工程要有基因才能完成工程化基因应用于研究和生产，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，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开始启动，历经 10 余年时间，耗资约 30 亿美元，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惟一的发展中国家，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 序列测定，为这一研究计划做出了重要贡献。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和加速了基因工程的发展和应用。

随着计算机技术的发展，基因工程和计算机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到基因内部。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 基因工程的研究意义和应用

随着时间的推移，基因工程技术在农业、林业、医药、食品、环保等行业和领域的研究和应用都取得了很大的进展，既为工农业生产和医药卫生等开拓了新途径，又给高等生物的细胞分化、生长发育、肿瘤发生等基础研究提供了有效的实验手段。在传统工业中，基因工程技术的运用可降低损耗、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。在生命科学领域，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。

1.2.1 基因工程在工业领域的应用

1.2.1.1 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，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；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降解质粒转移、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 博士等将在研究对硫磷降解时得到的水解酶基因 *opd* 转化到 *Streptomyces lividians* 中，最后得到的转化菌株能稳定地水解硫磷，此菌株发酵液可用在农药厂废水的处理中；Charabarty 博士将降解性质粒 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 15h 内完全分解掉 400mg/L 的邻羟基苯甲酸。

1.2.1.2 酶制剂工业

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。以往，酶是从动物脏器和植物种子中获得的，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，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。基因工程技术则将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 M-淀粉酶基因转移到枯草杆菌中，使受体菌产酶能力提高 2500 倍。日本科学家把耐热的 α -淀粉酶基因转移到枯草杆菌后，增加了耐热的 α -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，如今用这种技术已经使 DNA 连接酶的产量提高了 500 倍。

1.2.1.3 食品工业

DNA 重组技术在食品工业中有广泛的应用，通过 DNA 重组技术研制转基因植物，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做色拉油，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。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工程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工程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。

1.2.1.4 化学与能源工业

化学工业中涉及大量的有机物生产，如丙酮、丁醇、醋酸、丙烯酸、乙醇、甘油等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，已有利用重组 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 *Zymomonas mobilis* 中提取编码乙醇的基因 (*pdh*、*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。Roessler 等则从微藻中分析提取了乙酰辅酶 A 羧化酶的全基因，这种酶是用于柴油的脂类物质合成的关键酶。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。科学家们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、食物的下脚料等都可用来生产乙醇。通过基因工程技术，从工业废弃物、农林业副产品中制造的沼气，将能极大满足人们对能源的需求。此外，石油开采上也应用了生物工程技术。由于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，并增高油层内的压力，因而增加了石油流出量。

1.2.2 基因工程在农业领域的应用

随着人口的不断增加，在世界上不少地方食品的供给都成了大问题。生物工程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可培育出具备抗寒、抗旱、抗盐碱、抗病等特性的新品种，使得适合农作物生长的范围大大增加。科学家还发现了一种与合成脯氨酸有关的基因，将其转入固氮菌后，后者获得了既固氮又抗盐的能力，从而有助于植物的生长。植物光合作用效率的高低决定了其产量的多少，英国剑桥的植物育种所研究了如何转移叶绿体基因，将其中的高光效基因转移到另一种品种中去，以增加其光合效率，从而能产生更多的粮食。

应用基因工程技术还可以使粮食中的蛋白质含量提高。美国威斯康星大学的研究人员从菜豆提取了储藏蛋白基因，并将其转移到向日葵中后，表达了该基

因。美国明尼苏达大学也进行了类似的实验，他们把玉米醇溶蛋白基因转移到了向日葵根部的细胞中。这些实验取得的进展都表明了通过改良作物品种来增加粮食作物产量的良好前景。

根瘤菌可帮助豆科植物固定、吸收和利用空气中游离的氮，科学家们曾把肺炎克氏杆菌的固氮基因转入大肠杆菌，使大肠杆菌也能直接利用空气中的氮。日本已成功将固氮基因转移到水稻根际微生物中，这种微生物可向水稻提供 $1/5$ 的需氮量，因而可减少氮肥的使用量。

除草剂在农业中的使用较为广泛，但对农作物的产量有很大影响。美国的研究者利用基因工程技术从能杀死杂草的真菌中分离出毒素，将此毒素喷施在大豆田中，可以杀死杂草而不伤害其作物。

水稻是我国的重要农作物之一，我国科学家在杂交水稻的研究中取得了众多研究成果，两系杂交稻已进入生产阶段，又开始了超级杂交水稻、转基因水稻的研究。已在染色体上精细定位了光敏、温敏核不育基因及广亲和基因，并且很快就能得以克隆。我国的科学家应用花粉管通道法转基因技术研制出单价 Bt 抗虫转基因棉花；建立了有效的分子标记育种体系，培育成功了抗黄矮病、白粉病和赤霉病等多种抗病小麦新品种；获得了抗稻瘟病转基因水稻及转有抗菌肽基因的马铃薯等转基因植株。此外，大量的抗虫转基因水稻、玉米、大豆、杨树等基因工程技术产品也都在试验中。

基因工程技术在动物科学的应用范围也很广，利用生物工程技术已研制成功了许多动物基因工程药物、疫苗，特别是转基因动物的研制成功不仅改良了动物的性状，培育出抗病、产肉产蛋量高的家禽、家畜，而且转基因动物还可作为有效的表达系统生产出许多重要重组蛋白及满足人们的其他需求。

疫苗的传统制备方法是利用理化方法灭活病原体，或以毒力减弱的病原体制备而获得，但此类疫苗在安全性、免疫性及保存等方面都有不足，使得应用效果不尽如人意。基因工程疫苗则是指利用基因工程技术在培养的细菌、酵母或动物细胞中扩增病原体的保护性抗原基因制成的疫苗。由于基因工程疫苗只含有病原体的部分抗原成分，因而比传统的灭活疫苗和减毒疫苗的安全性要高，副作用小，且能降低成本。如 DNA 重组乙肝疫苗是利用基因工程技术分离出的有效的抗原成分，通过酵母菌发酵生产而成，产品不受动物和血源的影响。在兽医临床中，猪伪狂犬病疫苗和预防幼畜腹泻的致病性大肠杆菌菌毛疫苗已经投产。

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。1997 年 2 月，第一头无性繁殖的克隆羊多莉 (Dolly) 的问世，标志着克隆哺乳动物的成功。美国科学家于 2000 年 10 月宣布培育出了世界上首只转基因猴，这是世界上首次培育成功转基因灵长类动物。转基因动物具有重要的医学价值，不仅可用来开发多种药物，如促红细胞生成素 (EPO)、血清蛋白素

(HSA)、组织纤溶酶原激活剂 (TPA) 等, 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。转基因植物和转基因动物将在后面的章节中具体讲述。

1.2.3 基因工程在医药领域的应用

1.2.3.1 基因工程药物

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是两类: 基因重组多肽和蛋白质类药物如干扰素、人生长激素、白细胞介素-2、肿瘤坏死因子、人表皮生长因子; 酶类基因工程药物, 包括尿激酶原、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、囊纤维变性和一些遗传病中, 并形成了一个独立的新型高科技产业。

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个国内生产的基因工程药物。到目前, 我国已有 10 多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。

1.2.3.2 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, 在疾病诊断与治疗方面也正发挥着日益重要的作用。基因诊断是利用重组 DNA 技术作为工具, 直接从 DNA 水平监测人类遗传性疾病的基因缺陷, 因而比传统的诊断手段更加可靠。在基因诊断技术中, 基因探针检测具有准确而灵敏度高的特点, 它是利用 DNA 碱基互补的原理, 用已知的带有标记的 DNA 通过核酸杂交的方法检测未知的基因。基因探针技术在诊断遗传性疾病方面发展迅速, 对 60 多种遗传性疾病已可进行产前诊断; 有关基因探针还可直接用于分析遗传性疾病的基因缺陷, 如用 α -珠蛋白基因探针检测镰状细胞贫血; 也有的可用于间接分析与 DNA 多态紧密连锁的遗传性疾病, 如用 β -珠蛋白基因探针检测地中海贫血症和用苯丙氨酸转移酶基因探针检测苯丙酮酸症等。经过多年的实践和完善, 基因探

针技术在传染病、流行病、肿瘤及遗传性疾病的诊断的应用中已取得重要成果，如已用白血病细胞中分离的某些癌基因制备基因探针，用于检测白血病。

随着医学的进步，基因治疗的开展运用，使得医学专家在某些曾经束手无策的顽症面前又找回了自信。基因治疗被认为是征服肿瘤、心血管疾病、糖尿病尤其是遗传性疾病最有希望的手段。基因治疗是指将外源正常基因导入靶细胞，取代突变基因，补充缺失基因或关闭异常基因，达到从根本上治疗疾病的目的。1990年美国医学家第一次成功应用基因疗法，他们用 mini 基因（ADAcDNA）和逆转录病毒双拷贝载体（DC）治疗腺苷脱氨酶缺乏症取得疗效。现在已有试验设计将正常基因连接到温和病毒 DNA 载体上构建重组 DNA，把体外包装后的完整病毒颗粒转导骨髓细胞，这种构建的基因工程细胞可用于某些酶缺陷遗传病的试验治疗，而基因疗法在黑色素瘤、镰刀状贫血、囊性纤维变、血友病等的治疗中也有不错的效果。在后面的章节中将专门讨论这方面的内容。

1.3 结语

人类已跨入 21 世纪，崭新的基因操作技术、不断涌现的基因科技成果表明了基因工程时代的到来。基因工程将更加深入地渗透到工农业、林业、畜牧业、医疗卫生等多学科、多领域。对当代一些重大的问题如环境污染、人口老龄化现象突出、温室效应等，基因工程技术都将参与发挥重要影响。尽管这当中还存在着各种各样的问题，人们对基因工程也表现出不同的担心和忧虑，但是只要正确利用这一技术，解决其中的不足，使其为人类造福，我们的未来必将是绚烂多彩的！

1.4 基因工程课程与其他课程之间的关系

基因工程是在生命科学各专业中的一门非常重要的专业基础课或专业课。基因工程是在分子生物学等学科基础上建立发展起来的，所以这门课的开设是建立在遗传学、微生物学和分子生物学等课程的基础上的。学生应具备这些课程的基础知识。基因工程的发展反过来也渗透到生命科学的各个领域，促进着生命科学各学科研究与应用的发展。通过这门课程的学习，希望学生掌握基因工程的基本原理和应用策略，为他们今后进一步的研究生学习或科研工作打下重要的理论基础。

思 考 题

1. 通过本章的学习，请举两个基因工程应用的具体例子并加以简单说明。

2 基因工程的载体和工具酶

2.1 载体

基因工程中，携带目的基因进入宿主细胞进行扩增和表达的工具称为载体。在 Cohen 和 Boyer 的实验中所用的质粒都可以在大肠杆菌中复制，因此，它们都可以作为允许重组 DNA 复制的载体。所有的基因克隆实验都需要这种载体，因为被克隆的外源 DNA 片段没有复制起始点，即 DNA 复制开始的地方，所以除非被置于一个具有复制起始点的载体中，否则它不能复制。从 20 世纪 70 年代中期开始，许多载体应运而生，它们主要分为两类，即质粒载体和噬菌体载体。目前还发展出细菌人工染色体及酵母人工染色体载体等。作为基因工程所用的克隆载体必须具备以下条件：①复制子，这是一段具有特殊结构的 DNA 序列，载体有复制起点才能使与它结合的外源基因在宿主细胞中独立复制繁殖；②有一个或多个利于检测的遗传表型，易于识别和筛选，如抗药性、显色表型反应等；③有一或几个限制性内切核酸酶的单一识别位点，便于外源基因的插入；④适当的拷贝数，一般而言，较高的拷贝数不仅利于载体的制备，同时还会使细胞中克隆基因的剂量增加。另外可插入一段较大的外源 DNA，又不影响本身的复制，也是载体发展的目标。

2.1.1 质粒载体

2.1.1.1 质粒的生物学特征

质粒载体是基因工程中最常用的载体之一。质粒最初发现于细菌中，是染色体外能自主复制的双链共价闭合的环状 DNA 分子，大小在 1~200kb 之间（图 2-1）。质粒常含有一些编码对细菌生存有利的基因，包括抗生素抗性基因，降解复杂有机物的酶、大肠杆菌素等，正是由于这些质粒的存在，寄主细胞便获得了各自不同的性状特征，人们就是根据这些特征来鉴别他们，对它们进行分类。通过多年的研究努力，人们已经在众多的细菌菌株中找到了各种不同类型的质粒，并对一些质粒的生物学特征进行了比较详尽的研究，其中主要有 F 质粒即 F 因子或性质粒、R 质粒即抗药性因子和 Col 质粒即大肠杆菌素因子，现在

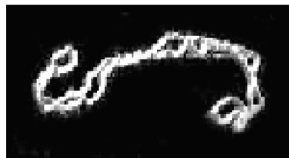


图 2-1 质粒的电子显微镜图

许多具有各种不同功能的基因工程载体就是在这些质粒的基础之上发展而来的。

一个质粒就是一个复制子，复制子往往有宿主专一性，如大肠杆菌的复制起点不一定能在其他生物细胞中繁殖。但人们也发现可以在两种不同的宿主体内复制的复制子，以此可以构建穿梭载体（shuttle vector），即可以在两种生物体内复制的载体分子，穿梭载体可用来运载基因在两种生物之间穿梭，大大地简化了克隆手续。

根据复制类型，质粒可分为两类：一类是低拷贝数的质粒，每个细胞仅含有一个或几个质粒分子，这种类型称为“严紧型”复制的质粒；另一类是高拷贝数的质粒，拷贝数一般在 20 个以上，这种类型称为“松弛型”复制的质粒。质粒的复制和分配是受遗传控制的，从而保证质粒在细胞中拷贝数的稳定和在细胞分裂后的准确分配。在克隆实验中，高拷贝数的载体通常是人们希望的。对于松弛型质粒，在质粒制备时，人们常使用氯霉素来提高质粒 DNA 产量，因为在细菌生长后期，加入氯霉素抑制细菌蛋白质的生物合成，而蛋白质是细菌染色体 DNA 合成起始所必需而非质粒复制所必需的，因此细胞中质粒 DNA 复制而染色体 DNA 停止合成，这样经过几个小时的扩增，细胞中可能累积数千个质粒 DNA。

质粒有转移性和非转移性，转移性质粒能通过接合作用从一个细胞转移到另一个细胞中。质粒的这种移动特性，与质粒本身有关，也决定于宿主菌的基因型。非转移性质粒可以为转移性质粒所带动转移，这个过程依赖于 *mob* 和 *tra* 基因的相互作用。

质粒命名规则是用小写字母“p”表示质粒（plasmid），“p”后面的两个大写字母代表发现或构建该质粒的作者或实验室名称，其后数字是该质粒的实验编号。pBR322 就是按照这一标准命名的。

2.1.1.2 质粒 DNA 的制备

科学家已经建立了许多种分离质粒 DNA 的方法，如 SDS 碱裂解法、煮沸裂解法和层析柱过滤法。目前一般使用碱变性法制备质粒 DNA，这个方法主要包括培养收集细菌菌体，裂解细胞，将质粒 DNA 与染色体 DNA 分开及除去蛋白质和 RNA 以纯化 DNA。破坏和裂解细胞通常使用溶菌酶和 SDS。苯酚和氯仿是除去蛋白质的最好有机试剂，多次苯酚和氯仿抽提可以很好地纯化 DNA，利于后继的各种 DNA 操作如 DNA 酶切。在这个方法中，细菌悬浮液在高 pH 的碱性条件下，染色体 DNA 和蛋白质变性，质粒 DNA 由于其超螺旋共价闭合环状结构，尽管其 DNA 的大部分氢键也断裂，但双链 DNA 仍然不会分离，当以 pH4.8 的高盐缓冲液调节其 pH 恢复到中性时，质粒 DNA 再次形成双链，留在溶液中。在裂解过程中，变性的蛋白质和染色体 DNA 会相互缠绕在一起，并与

SDS 形成复合物离心后一起沉淀下来而被除去。使用不含 DNA 酶的 RNase 除去 RNA。真实的 DNA 分子结构只能在电镜下观察到（图 2-1），但分离得到的质粒 DNA 在琼脂糖凝胶电泳后用溴化乙锭染色可以检测到（图 2-2）。我们可以用琼脂糖凝胶电泳来鉴定 DNA，检测其浓度、纯度及相对分子质量。琼脂糖凝胶电泳不仅可以分离不同相对分子质量的 DNA，而且也可以区分相对分子质量相同而构型不同的 DNA 分子。提取的同一种质粒 DNA 在琼脂糖凝胶电泳中常呈现多条带，这是由于不同的 DNA 构型所引起的。从跑得慢到快分别为开环分子 OC-DNA，线状分子 L-DNA 和双链共价闭环环状分子 CCC-DNA。

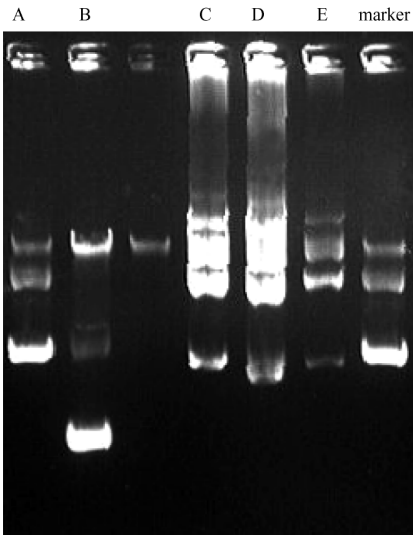


图 2-2 质粒的电泳图

A~E 为不同质粒电泳图，marker 为 λ DNA 的 *Hind*III 酶切图

2.1.1.3 质粒载体

天然存在的质粒可以被引入合适的细胞中，并且能够复制繁殖，这一特征符合基因工程载体的基本要求。基因工程的目的是要得到基因的无性繁殖系，并且要求得到最大量的某一基因或基因产物，因此一般要求用属于松弛型的质粒作为载体。然而天然存在的质粒有许多不足，往往不符合作为载体的其他要求，因此必须对它们进行修饰改造。①去掉不必要的 DNA 区域。除保留质粒复制等必要部分外，尽量缩小质粒的相对分子质量，以提高外源 DNA 片段的装载量。发展构建大装载量的克隆载体一直是科学家努力的目标之一。②减少限制性内切核酸酶酶切位点。这是早期载体改造中常碰到的问题，一个质粒含有某一限制性内切

核酸酶切位点越多，则酶切后的 DNA 片段也越多，给克隆外源 DNA 造成不便。现在已发展了许多具有多种单一的限制性内切核酸酶识别位点的载体。缺失突变法，限制性内切核酸酶、核酸外切酶和连接酶的共同作用，机械破碎和质粒之间的重组等方法减少限制性酶切位点的常用手段。③加入易于检出的选择性标记，便于检测含有重组质粒的受体细胞。一般情况下，所要扩增的基因不便于选择，所以作为载体的质粒要求具有选择标记，通过质粒之间的重组，可以使质粒带有合适的选择性标记。抗生素抗性是绝大多数载体使用的最好的标记之一，主要有氨苄青霉素抗性、四环素抗性和卡那霉素抗性。组织化学显色法和荧光法也是目前在构建载体中经常采用的方法。④关于质粒安全性能的改造。要求质粒载体或重组质粒不能随便转移，以免污染环境。⑤改造或增加基因表达的调控序列。外源基因的性状表达需要启动子，启动子有强弱之分，也有组织细胞专一性，所以在重组 DNA 操作中，根据不同的研究目的可以改进构造或选择不同特点的质粒载体。下面介绍几个代表性质粒，在介绍这些质粒中，分析构建过程，讨论不同质粒载体的特点，进而了解质粒载体的选择及认识其物理图谱。

(1) pBR322

在克隆时代的初期，Boyer 和他的同事发展了一套当时广泛使用的载体，即 pBR 质粒系列。这种曾经一度流行的载体现在很少用到了，已经为其他更好的载体所代替。但是这里提到了其中一个质粒 pBR322，因为它能为我们提供对克隆方法和原理的一种简单说明，它也是载体构建的一个很好的例子。pBR322 质粒是以 4 个不同质粒 DNA 为基础通过 DNA 重组技术发展构建而成的克隆载体（图 2-3）。质粒 pSC101 提供四环素抗性基因（ Tc^r ），pMB1 质粒提供复制起点（ori），质粒 R1drd19 提供氨苄青霉素抗性基因，而 ColE1 质粒也参与了构建过程。pSC101 质粒是从一个大肠杆菌天然质粒 R6 改造而来，具有 *EcoR* I 单克隆位点及四环素抗性标记，是第一个成功地用于克隆真核 DNA 的大肠杆菌质粒载体。但 pSC101 质粒是一种严紧型复制非转移性质粒，平均每个寄主细胞仅有 1~2 个拷贝，分子质量仍然较大约为 9kb。ColE1 质粒属于大肠杆菌 Col 类质粒中的一种，质粒大小为 6.3kb，它是具有 *EcoR* I 单一酶切位点的松弛型复制子，平均每个寄主细胞约有 20 个拷贝。培养含有 ColE1 质粒的细菌培养物时，可以加氯霉素以抑制蛋白质的合成，增加质粒拷贝数，因此，ColE1 质粒的松弛型复制子在质粒载体的构建中得到了广泛使用。质粒 R1drd19 带有转座子 Tn3，其编码氨苄青霉素抗性。转座子能转座到其他复制子 DNA 上而赋予它们的抗性。在 pBR322 质粒构建过程中，首先将质粒 R1drd19 分别和质粒 ColE1 及质粒 pMB1 共同转入同一细菌中，在细胞体内质粒 R1drd19 通过转座作用将其转座子 Tn3 分别转座到质粒 ColE1 和 pMB1 上，由此产生的新质粒 pSF2124 和 pMB3 都增加了氨苄青霉素抗性标记。为了减小质粒 pMB3 的大小，用 *EcoR* I 酶在其

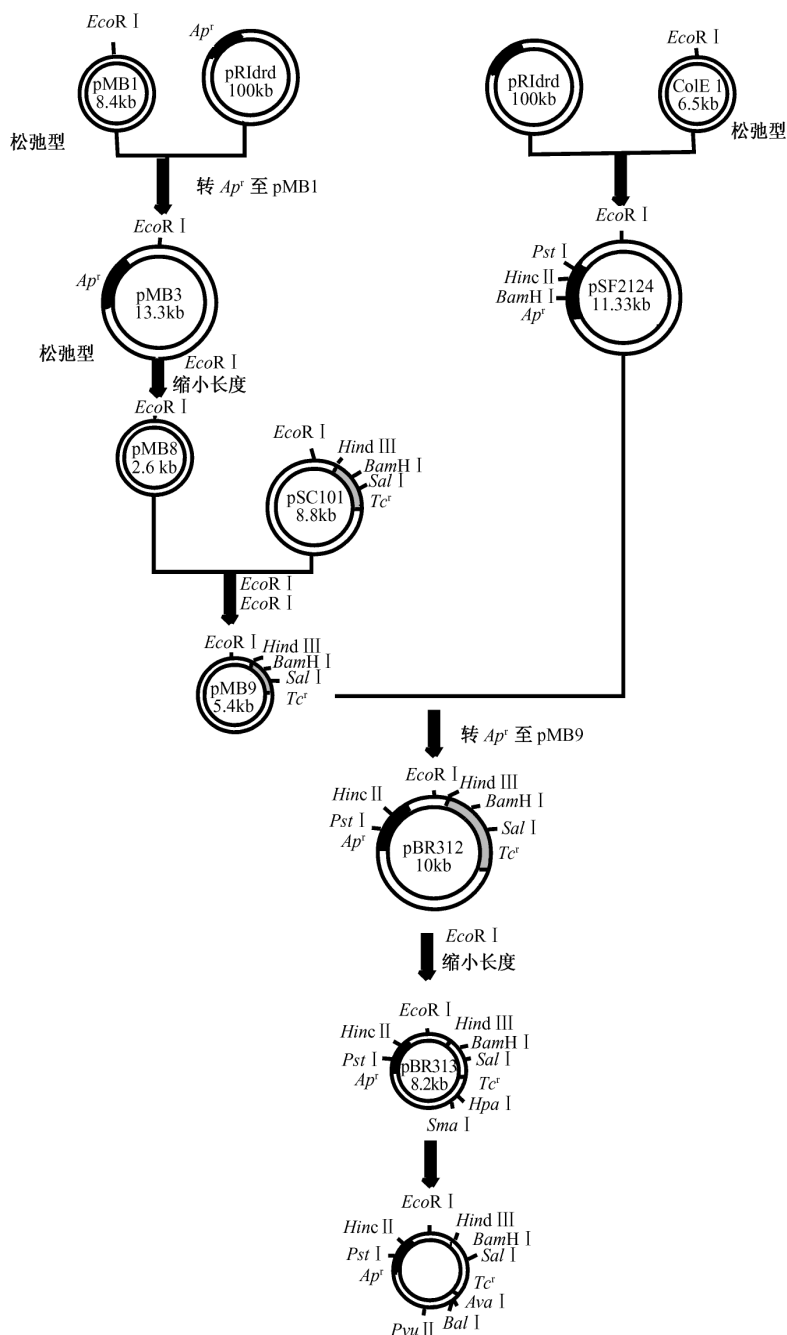


图 2-3 质粒 pBR322 的构建过程

星号活性条件下切割 pMB3 DNA，然后转入细菌中进行重组复制选择，得到一个较小的质粒 pMB8，仅仅 2.6kb 大小，但是失去氨苄青霉素抗性基因片段。同样用 *EcoR* I 酶在其星号活性条件下切割质粒 pSC101 DNA，再和质粒 pMB8 DNA 重组，筛选将质粒 pSC101 的四环素抗性基因转移到 pMB8 上的重组子，结果获得了重组质粒 pMB9。为了获得两种抗性选择标记，又将质粒 pMB9 和质粒 pSF2124 转入同一细菌中，利用转座作用，将氨苄青霉素抗性基因从 pSF2124 转座到 pMB9 上，得到含有氨苄青霉素和四环素双重抗性标记的重组质粒 pBR312，大小约为 10kb。为了缩小相对分子质量，又采用 *EcoR* I 酶星号切割法处理该质粒，最后获得大小约为 8kb 的质粒 pBR313，同时也消除了转座子 Tn3 上的 *Bam*H I 位点，破坏了转座子的转移能力，从而氨苄青霉素抗性基因得以稳定。在此基础上进一步去掉其他多余的酶切位点，最后构建成质粒 pBR322。

这样构建的 pBR322（见图 2-4）具有分子质量小（质粒大小仅为 4.3kb）、拷贝数高及包含了四环素和氨苄青霉素两种抗生素抗性基因作为选择标记的优点，而复制起始位点就位于这两个基因之间，对多种常见的限制性内切核酸酶只

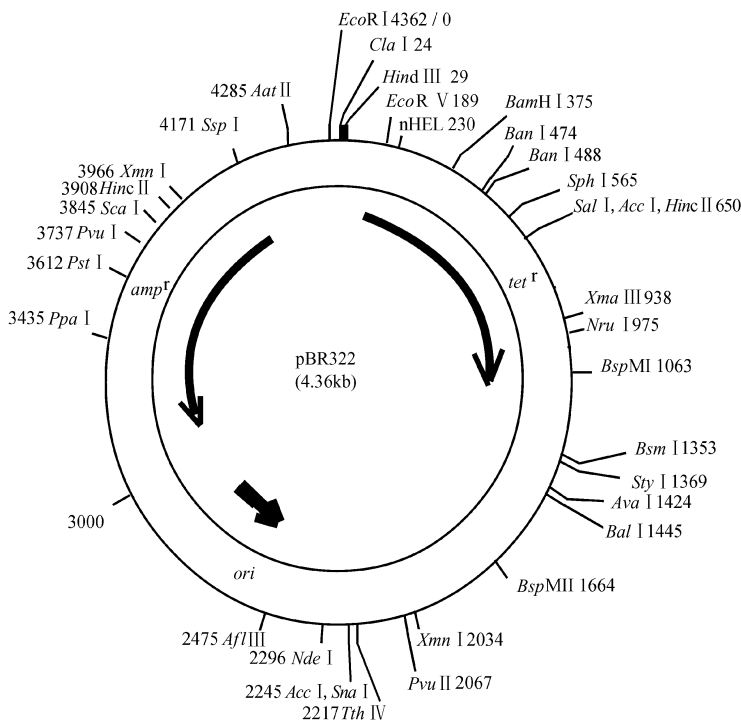


图 2-4 pBR322 质粒的物理图

含有一个能切割的位点。这些酶包括 *EcoR* I、*Bam*H I、*Pst* I、*Hind*III 和 *Sal* I, 这些专一性位点为我们克隆提供了方便, 因为它们使我们能够用某种酶来创造一个使外源片段插入的位点而不损失任何质粒 DNA。另外许多酶的识别位点位于抗性基因内部, 所以在这些限制性酶切位点上插入外源 DNA 都会使抗性基因失活。

以克隆一个外源 DNA 片段进入 pBR322 上的 *Pst* I 位点为例 (图 2-5)。首先, 用 *Pst* I 酶来切这个载体以产生这个酶的特异性黏性末端。同时用 *Pst* I 酶切割外源 DNA 使其产生同样的黏性末端。然后, 通过 DNA 连接酶连接切割过的载体和外源 DNA 片段。由于载体和外源 DNA 上的黏性末端会立刻配对, DNA 连接酶封闭切口, 使两个 DNA 分子共价连接。一旦连接上, 除非再次用 *Pst* I 切割, 否则 DNA 分子不会再分开。下一步, 用连接的 DNA 转化大肠杆菌细胞。如果所有切割的外源 DNA 都能连接到质粒上形成重组 DNA, 那将是一件非常好的事情, 可是那是不可能的。取而代之, 我们得到的是自身连接的质粒、

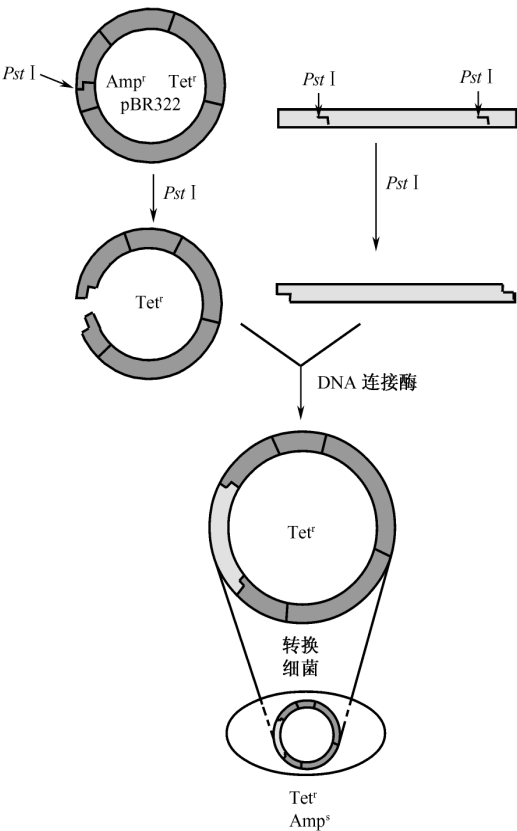


图 2-5 质粒 pBR322 为载体的克隆过程

自身连接的插入子，以及重组子形成的混合物。怎样将它们区分开来呢？这就是为什么需要两个抗生素抗性基因作为标记。在克隆实验中，同时使用两种抗性标记，一种抗性标记用来正选择转化子，另一种通过插入失活而可以鉴定重组子。比如在这个例子中，在四环素平板上出现的菌落必定是获得了质粒的转化子，在此基础上，如果四环素抗性转化子又抗氨苄青霉素，那么此转化子的质粒是空载体；若四环素抗性转化子对氨苄青霉素敏感，则说明在载体中有外源片段插入而使氨苄青霉素抗性基因失活，这就是我们需要的重组子。因此 pBR322 是一种很好的克隆载体，在早期的 DNA 重组中受到人们的青睐而得到广泛的应用。

(2) pUC18/pUC19

除了 pBR 质粒以外还有很多非常有用的质粒克隆载体可供选择。例如，pUC 系列就是一种广泛使用的质粒载体。这些载体是以 pBR322 质粒载体为基础，将其中包括四环素抗性基因在内的 40% 的 DNA 剔除。pUC18/pUC19 质粒含有一个改进的 pMB1 复制子并且具有很高的拷贝数，故在细菌培养物中没有必要加入氯霉素来提高拷贝数。而且，pUC 载体的克隆位点集中到了一个称为多克隆位点（multiple cloning site, MCS）的一个很小的区域。多克隆位点是含有多个限制酶的单识别位点的一段核苷酸序列，它的使用极大地简化了 pBR322 质粒载体的改造过程。pUC 载体仍然保留有氨苄青霉素抗性基因以用来筛选吸收了载体或含有载体的重组 DNA 分子的细菌。除此以外，为了弥补四环素抗性基因的丢失，在其 pUC 载体 5' 端加入了带有一段多克隆位点的 *lacZ'* 基因，使 pUC 载体成为具有双功能检测特性的新型质粒载体系列。pUC18 和 pUC19 质粒载体除多克隆位点以互为相反的方向排列外，其他方面都相同。

pUC18 和 pUC19（图 2-6）的多克隆位点存在于编码 β -半乳糖苷酶（标记为 *lacZ'*）的氨基酸末端顺序（ α -肽链）的 DNA 序列中。与 pUC 载体一起使用的宿主菌携带一个编码 β -半乳糖苷酶 C 端序列的基因片段。仅就其本身用这个部分基因片段产生的 β -半乳糖苷酶片段是没有活性的，但是它们可以通过被称为 α -互补作用的机制在体内相互弥补，换句话说，这两个部分基因产物可以结合形成一个有活性的 β -半乳糖苷酶。因此，当 pUC18/pUC19 转化到有部分 β -半乳糖苷酶基因的细菌细胞中时，有活性的 β -半乳糖苷酶就产生了。如果我们将这些克隆放置在含有 β -半乳糖苷酶指示剂的平板上培养，含有 pUC 质粒的克隆就会改变颜色。例如指示剂 X-gal 就是一种合成的、无色的半乳糖苷；当 β -半乳糖苷酶作用 X-gal 的时候，它释放出半乳糖和一种可以将菌落染成蓝色的染料，导致菌落呈现蓝色。但是另一方面，如果我们通过插入外源 DNA 到多克隆位点中而打断了 β -半乳糖苷酶的部分基因，那么它不再产生 α -肽链，所以不能和宿主细胞产生的多肽片段结合形成有活性的 β -半乳糖苷酶，因此在平板上 X-gal 保持无色的，菌落当然也是无色的。故而，检出有插入片段的重组克隆成了一件简单的事。重组

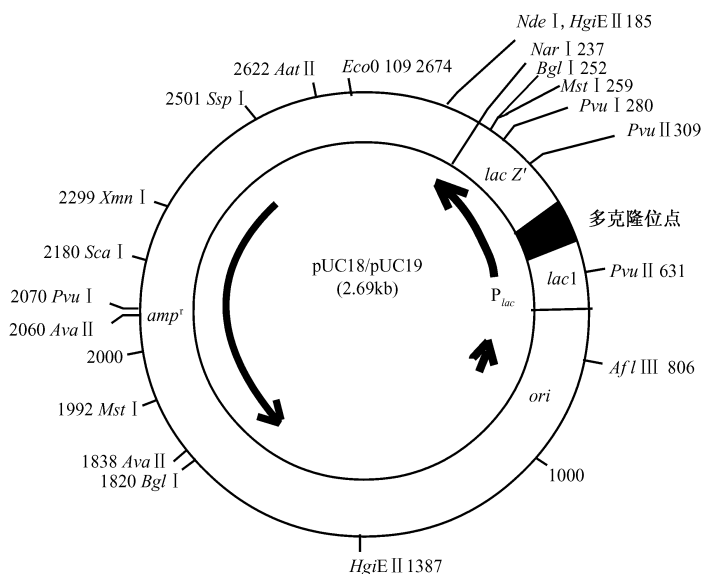


图 2-6 pUC18/19 质粒的物理图

子菌落是白（无）色的，而自连空载体转化的菌落则是蓝色的。与 pBR322 的检出相比较，另一个优势是，这种检出是一个单步骤程序。我们能够在平板上同时看到这个克隆的特征：①抗氨苄青霉素；② 当 X-gal 存在时，白色菌落是重组子，蓝色菌落是空载体转化子。但是，pUC 克隆的颜色筛选试验有时会出现假阳性即白色菌落中的质粒却没有外源片段插入。一般认为这种状况的发生是由于载体的末端在连接之前就被可能污染的核酸酶轻微降解了，这样的空载体自连后，*lacZ'* 基因被改变，所以这样的转化子也无 β -半乳糖苷酶而成为白色菌落。

多克隆位点也使人们能用两种不同的限制性内切核酸酶进行切割（如 *EcoR* I 和 *Bam*H I）而克隆出有一个 *EcoR* I 末端和一个 *Bam*H I 末端的一段 DNA，这被称为定向克隆或者强迫克隆，因为这是通过迫使插入 DNA 以一个方向进入载体（插入序列的 *EcoR* I 末端和 *Bam*H I 末端必须和它们在载体上的互补碱基相对应）。两种不同的限制性内切核酸酶的使用的克隆策略也是防止载体本身的自连接的一个有效手段，因为它的两个限制性位点是不能互补的。

2.1.2 噬菌体载体

噬菌体（bacteriophage, phage）是一类细菌病毒的总称，由遗传物质核酸和

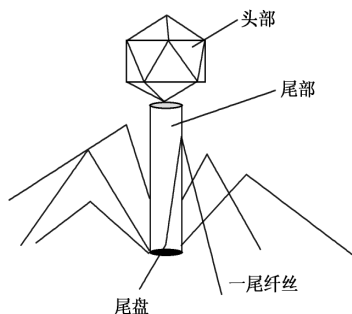


图 2-7 T4 噬菌体的结构模式图

其外壳组成。噬菌体颗粒外壳是蛋白质分子，内部的核酸一般是双链线性 DNA 分子，也有双链环形 DNA、单链线性 DNA、单链环形 DNA 及单链 RNA 等多种形式。大多数噬菌体是具尾部结构的 20 面体，如 T4 噬菌体（图 2-7）。噬菌体又可以分为烈性噬菌体和温和噬菌体。烈性噬菌体仅仅有溶菌生长周期，而温和噬菌体既能进入溶菌生长周期又能在感染过程中不产生子代噬菌体颗粒，噬菌体 DNA 整合到寄主细胞染色体 DNA 上，成为它的一个组成部分。以游离 DNA 分子形式存

在细胞中的噬菌体 DNA 叫非整合噬菌体 DNA。噬菌体在将细菌 DNA 从一个细胞转移到另一个细胞中起着天然载体的作用，所以用噬菌体对所有种类的 DNA 进行同样的加工是一件很自然的事情。噬菌体载体与质粒相比，其结构要比质粒复杂，噬菌体作为基因克隆载体在克隆实验时具有天然的优势，它们感染细胞比质粒转化细胞更为有效，所以噬菌体的克隆产量通常要高一些。

2.1.2.1 λ 噬菌体载体

λ 噬菌体是目前研究最清楚的大肠杆菌的一种双链 DNA 温和噬菌体，也是最早使用的克隆载体之一。 λ 噬菌体 DNA 大小约为 50kb，其线性双链 DNA 分子的两端，各有一个长为 12bp 的互补单链，称为黏性末端。当 λ 噬菌体进入寄主细胞内后，其黏性末端能通过碱基互补作用，形成环状 DNA 分子。黏性末端形成的双链区域称为 cos 位点，它是包装蛋白的识别位点， λ 噬菌体的包装与 DNA 特性和其他序列无关，对包装的 DNA 大小有要求，包装范围在 35kb~51kb。通过改造 λ 噬菌体，人们发展了许多不同用途的噬菌体载体。以 λ 噬菌体为基础而构建的常用载体可分两类：①替换型载体，这种载体具有两个对应的酶切克隆位点，在两个位点之间的 λ DNA 区段是 λ 噬菌体复制等的非必需序列，可被外源插入的 DNA 片段取代，如 Charon 系列。替换型载体由于去掉了许多 DNA 序列，所以能克隆较大的外源 DNA 片段（20~25kb）。②插入型载体，这种载体仅仅有一个可供外源 DNA 插入的克隆位点，如 λ gt 系列。插入型载体只能插入较小的外源 DNA 片段（小于 10kb）。最早是 Fred Blattner 和他的同事们通过改造 λ 噬菌体构建了第一个噬菌体载体。他们去掉了噬菌体 DNA 的中间不必要区域，而保留了噬菌体复制需要的基因。这样丢失的噬菌体基因便可以由外源 DNA 代替。Blattner 以古典神话中冥河上的船夫 Charon 的名字将这些载体命名为 Charon 噬菌体。正如 Charon 专司在斯蒂克斯河（River Styx）上运送灵魂带

入阴间，Charon 噬菌体将外源 DNA 转入细菌细胞。

(1) Charon 载体

Charon 4 是一个 Charon 载体，它是一种取代型载体，因为 λ DNA 非必需部分被去掉并被外源 DNA 取代形成重组 DNA。与质粒载体相比较， λ 噬菌体的一个优点是它能够容纳更多的外源 DNA 片段。例如，Charon 4 可插入的最大外源片段为 20kb，而大多数质粒载体的容量极限仅为 10kb。我们什么时候需要如此大的容量呢？一个普通的应用是用载体构建基因组文库。假如我们要克隆整个人类基因组，明显我们需要大量的克隆。载体中可容纳的外源片段越大，所需的克隆数就越少。事实上， λ 载体已经广泛的应用在人类和其他生物基因组文库构建上。除了它的高容量以外， λ 载体包装 DNA 有包装下限的限制，在克隆中这也是一种优势。图 2-8 所示是用 Charon 4 载体插入外源片段的重组过程。有 3 个切点在噬菌体 DNA 中部附近，用 *EcoR* I 切 Charon 4 DNA 产生两个臂和两个填充片段。然后我们用电泳或超离心纯化回收臂而舍弃填充片段。最后将插入外源片段代替填充片段与两臂相连接构建重组噬菌体 DNA，感染细胞得到克隆噬菌斑。从这个克隆过程图中可以知道两个臂自我连接的情况可能会出现，但是这种情况不会产生克隆。因为两个臂自我连接的 DNA 片段太小不足以包装到噬菌体中去。包装过程是在体外完成的，只需简单的将重组 DNA 和需要的包装蛋白组分混合即可完成体外包装。现在我们没有必要自己酶切纯化噬菌体两臂，我们可以从公司购买到纯化好的噬菌体臂和克隆中所需要的包装提取物。正如我们刚才提到的提取物对包装 DNA 的片段大小的要求相当严格，除了插入臂 DNA 外，至少需要插入的外源片段大小为 12kb，但不大于 20kb，才能被包装蛋白包装。由于可以确定每一个基因文库中克隆的片段至少有 12kb，因此没有必要担心小于 12kb 的 DNA 干扰克隆。这是非常重要的，因为即使每个克隆有 12~20kb 的外源片段，也至少需要 50 万个克隆才能保证所有的人类基因有一个克隆。用 pBR322 或 pUC 载体构建人类基因组文库就要难得多，因为细菌选择性吸收和繁殖小的质粒，因此大多数克隆包含几千或几百个碱基对的小插入片段，这样的文库就要好几百万个克隆以保证它的覆盖面。

(2) λ -DASH 载体

λ -DASH 载体也是一种用来克隆大基因组片段的取代型载体。这类载体含有两套多克隆位点，在这个位点的两侧分别安装有 T3 和 T7 启动子。 λ -DASHII 载体（图 2-9）克隆系统利用了 *spi* 选择方法，即利用对 P2 抑制敏感性，带有活性 *red* 和 *gam* 基因的 λ 噬菌体不能在带有 P2 溶原性噬菌体的宿主菌中生长，而没有这两个基因的 λ 噬菌体则能在带有 P2 溶原性噬菌体的宿主菌中生长，如 XL1-BlueMRA (P2) 就是一个带有 P2 溶原性噬菌体的宿主菌。*red* 和 *gam* 基因位于

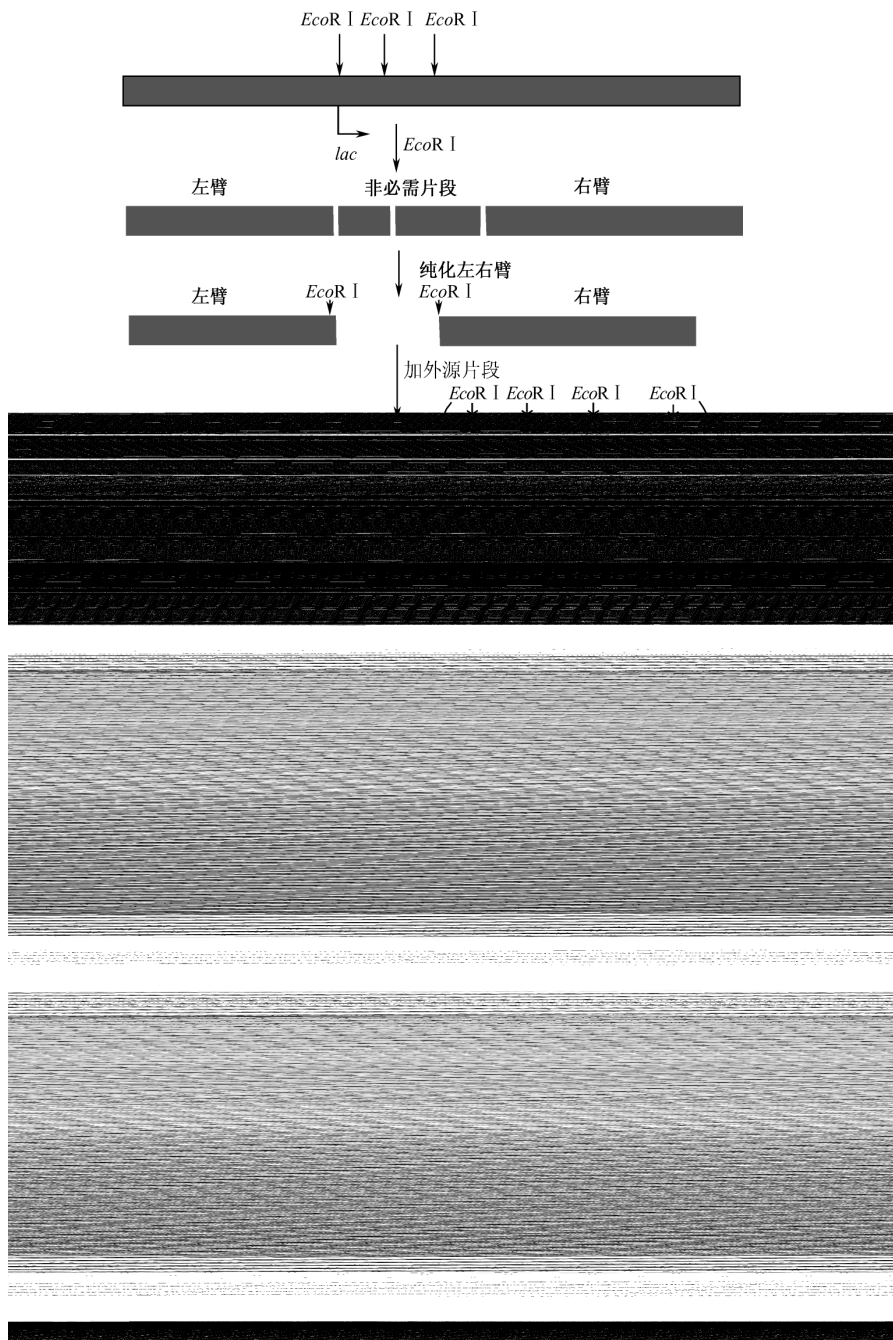


图 2-8 在 Charon 4 载体中克隆外源 DNA

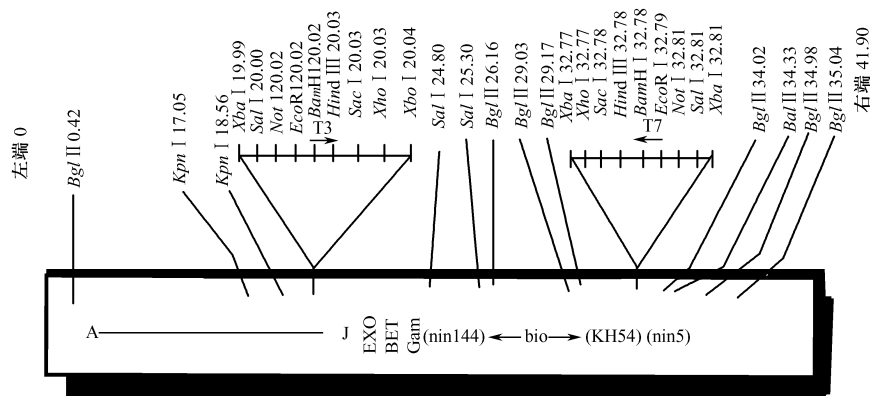


图 2-9 λ-DASHII 载体的物理图

λ噬菌体的取代片段区域，所以野生型的λDASHII噬菌体不能在XL1-BlueMRA (P2) 宿主菌中生长，当用这个载体进行克隆实验或构建文库时，取代区域被外源片段取代形成新的重组噬菌体时，由于 *red* 和 *gam* 基因缺失，所以这样的重组噬菌体能在XL1-BlueMRA (P2) 宿主菌中生长繁殖。XL1-BlueMRA 菌株在文库构建好后用来繁殖噬菌体。利用在插入片段的两侧的 T3 和 T7 启动子能产生末端专一性 RNA 探针来进行染色体步移和物理定位。

(3) 柯斯质粒

柯斯质粒 (cosmid) 是另外一种以λ噬菌体为基础专门为克隆大片段而设计并和质粒共同构建的杂合载体。柯斯质粒由λ噬菌体 DNA 的 *cos* 位点序列和质粒的复制子所组成，具有质粒和噬菌体的双重特征，所以称为 cosmid，意思是指带有黏性末端位点的质粒。它有噬菌体 DNA 的黏性末端 *cos* 位点，可以使柯斯质粒重组 DNA 像λ噬菌体 DNA 一样被噬菌体包装蛋白包装。由于它含有质粒的复制起始位点，所以柯斯质粒可以像质粒一样在细菌中复制。因为除了 *cos* 位点外，这部分 DNA 大小约为 5kb，λ 基因组的其余部分都被切割掉了，所以它具有高容量的克隆能力，可以容纳 40~50kb 的插入片段。一旦这些外源片段插入到正确的位置，形成重组的柯斯质粒，就可以包装到噬菌体颗粒中。由于缺少噬菌体的复制起点 DNA，这些噬菌体颗粒不能像噬菌体一样复制，但是因其有感染力，所以可以携带重组 DNA 进入细菌细胞中去。进入细胞后，DNA 可以利用质粒的复制起始位点像质粒一样复制。但用柯斯质粒载体在大肠杆菌细胞中克隆大片的真核基因组 DNA 有两个缺点：一方面经过限制性内切核酸酶切割产生的线性柯斯质粒载体 DNA，彼此间会连接形成多聚体分子，即自我重组，而也

被包装蛋白识别包装形成克隆子，这样一来减低了含有外源 DNA 重组子的重组频率；另一方面经限制性内切核酸酶部分消化的真核基因组产生出来的 DNA 片段，在随后的连接反应中往往会出现由两个或多个片段随机再连接的情况，而它们的结合顺序并不符合在真核基因组中的固有排列顺序，因此使用含有这种插入片段的克隆作 DNA 序列分析，所得出的 DNA 在染色体上的排列是错误的。解决这一问题的方法是用磷酸化酶处理部分酶切片段而阻止自连现象的发生。

2.1.2.2 M13 噬菌体载体

另外一种作为克隆载体的噬菌体是丝状噬菌体 M13。Joachim Messing 和他的合作伙伴将 β -半乳糖苷酶基因片段和 pUC 载体家族的多克隆位点转移到 M13 噬菌体 DNA 中构建新类型载体。事实上，M13 噬菌体先被改造为载体，然后人们在发展 pUC 系列载体时将 M13 噬菌体载体上有用的克隆位点转移到 pUC 系列载体上以增加 pUC 载体的克隆功能。

M13 噬菌体颗粒的外形呈丝状，其基因组 DNA 长约 6.4kb，成熟的噬菌体为闭环状单链正链 DNA。M13 单链 DNA 的复制型是呈双链环形，此时的 DNA 可同质粒 DNA 一样进行提取和体外操作。不论是双链的或是单链的 M13 DNA，均能感染寄主细胞，产生噬菌斑或形成侵染的菌落。M13 噬菌体吸附在细菌的性纤毛上，其外壳蛋白脱落，它的正链 DNA 进入大肠杆菌寄主细胞，在细胞内 DNA 聚合酶的作用下，以正链 DNA 为模板，合成互补的负链 DNA，从而形成双链复制型 DNA (RF DNA)。RF DNA 快速复制，细胞内形成大量的 RF DNA 分子，但 RF DNA 达到一定拷贝数时，细胞内也形成了大量的单链 DNA 结合蛋白，这种蛋白与 RF DNA 结合，从而阻止了其负链 DNA 的合成，这样一来正链 DNA 大量积累。这些噬菌体正链 DNA 并不裂解宿主细胞，而是从细胞膜上挤出去。通常可以通过裂解细菌细胞像分离质粒 DNA 一样分离 RF DNA，也可以从 M13 噬菌体感染的细菌培养物的上清液中收集 M13 噬菌体颗粒来制备单链 M13DNA。

M13 噬菌体作为载体有什么优点呢？从上面的描述知道最主要的是由于这种噬菌体的基因组是单链 DNA，所以克隆到此载体的 DNA 能产生单链形式的 DNA (图 2-10)。位点特异性诱变容易在单链 DNA 上产生，利用这种方法，可以预先对任何一个克隆基因进行 DNA 诱变，同样单链 DNA 也使 DNA 测序容易方便得多。在 M13 噬菌体中的 DNA 是单链的，但是它感染 *E. coli* 细胞后，单链将变换为双链 DNA 的复制型 (RF)。用于克隆的正是这种双链复制型的噬菌体 DNA。用一种或两种限制性内切核酸酶切割其多克隆位点后，具有同样酶切末端的外源 DNA 片段便可以插入这个载体的相应酶切位点了。然后用这种重组 DNA 转化到宿主细胞中，转化细胞能产生单链重组 DNA 的子代噬菌体。含有噬