



基因工程

Gene engineering

湖南师范大学生命科学学院
袁婴洲



课程内容安排

- 第一章 基因工程概述
- 第二章 基因工程的工具酶和载体
- 第三章 目的基因的制备与鉴定
- 第四章 基因工程在基因功能研究中的应用
- 第五章 转基因植物
- 第六章 转基因动物
- 第七章 基因治疗
- 第八章 基因工程药物



教材

- **《基因工程》**，袁蓂洲主编，化学工业出版社出版社，2010年第一版。国家精品课程建设教材。



参考书与参考资料

- 李立家, 肖庚富编著, 《基因工程》, 科学出版社, 2004年。
- 徐晋麟、陈淳、徐沁编著, 《基因工程原理》, 科学出版社。2007年。
- 楼士林、杨盛昌、龙敏南、章军编著, 《基因工程》, 科学出版社。2002年。
- 孙明主编, 《基因工程》, 高等教育出版社。2006年。
- 刘祥林、聂刘旺主编, 《基因工程》, 科学出版社。2005年。
- 张惠展编著, 《基因工程》, 华东理工大学出版社。2005年。
- 杨晓、黄培堂、黄翠芬主编, 《基因打靶技术》, 科学出版社。2003年。
- 傅继梁主编, 王铸钢副主编, 《基因工程小鼠》, 上海科学技术出版社。2006年。
- 曾北危主编, 《转基因生物安全》, 化学工业出版社, 2004年。
- 沈孝宙编, 《转基因之争》, 化学工业出版社。2008年。
- (英国) 布鲁克斯编, 黄尚志主译, 《基因治疗: 应用DNA作为药物》, 化学工业出版社。2007年。
- 李元主编, 《基因工程药物》, 第二版, 化学工业出版社。2007年。
- 李德山主编, 《基因工程制药》, 化学工业出版社。2010年。



基因工程课程网页

- <http://jpkc.hunnu.edu.cn>（湖南师范大学精品课程网站）
- <http://202.197.120.40/ec/C339/Course/Index.htm>（湖南师范大学基因工程课程网站）
- <http://202.197.120.40/skyclass/>（湖南师范大学天空教室网络课堂）



第一章 基因工程概述

- 基因工程概念与基本流程
- 基因工程的发展简史
- 基因工程的研究意义和应用
- 趣味讨论：基因工程与克隆人的讨论



一、基因工程概念与基本流程

1. 基因工程的概念

- 基因工程（gene engineering）是指采用类似于工程设计的方法，根据人们事先设计的蓝图，人为地在体外将外源目的基因插入质粒、病毒或其它载体中，构成遗传物质的新组合即重组载体DNA分子，并将这种含有目的基因的重组载体分子转移到原先没有这类目的基因的受体细胞中去扩增和表达，从而使受体或受体细胞获得新的遗传特性，或形成新的基因产物。



基因工程的概念

- 通俗地说，基因工程就是指将一种供体生物体的目的基因与适宜的载体在体外进行拼接重组，然后转入另一种受体生物体内，使之按照人们的意愿稳定遗传并表达出新的基因产物或产生新的遗传性状的DNA体外操作程序。也称为分子克隆技术。
- 因此，**供体基因、受体细胞、载体**是重组DNA技术的三大基本元件。



2、基因工程的基本流程

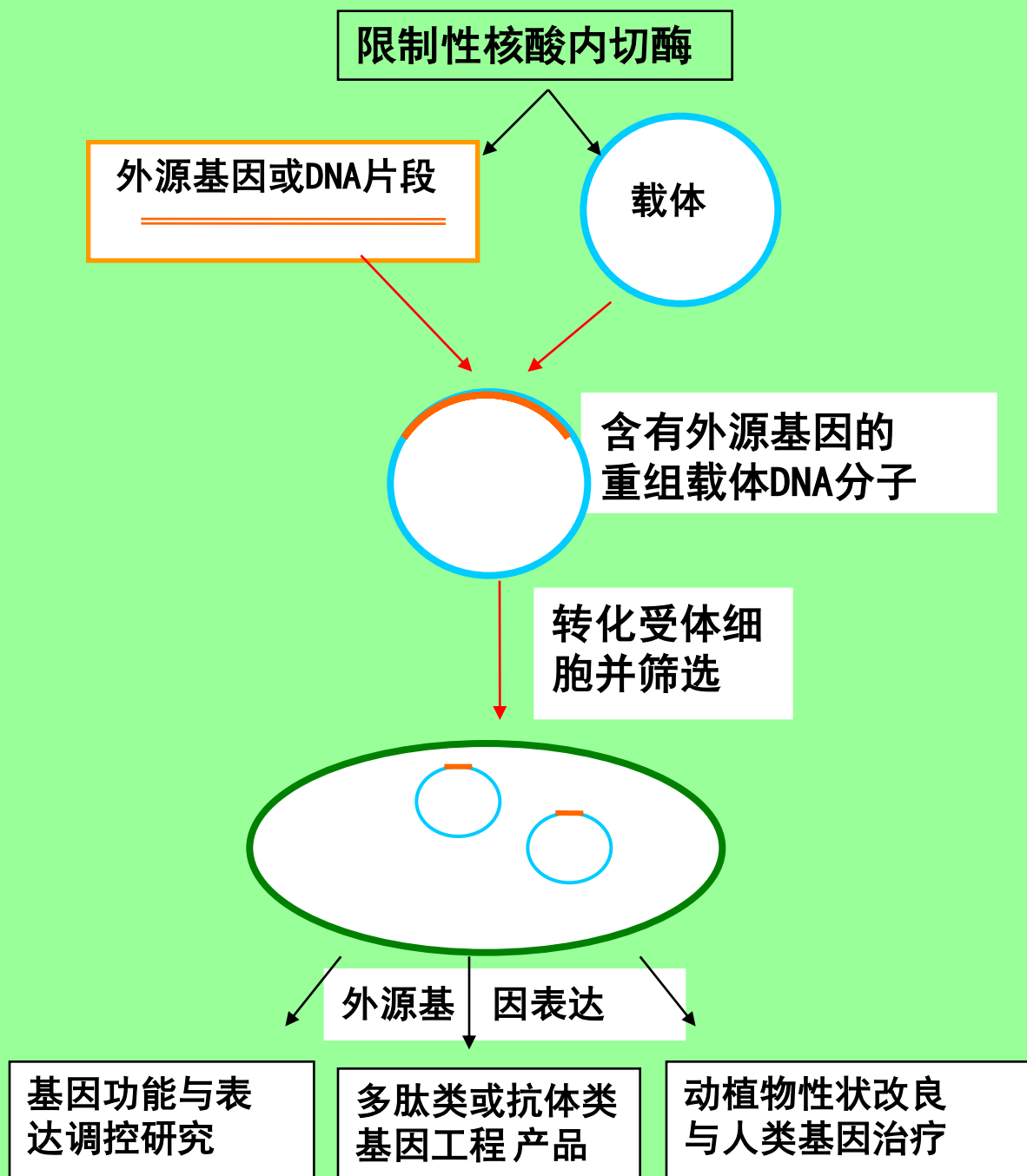
- 1) 从复杂的生物体基因组中，经过酶切消化等步骤，分离带有**目的基因**的DNA片段，或用酶学和化学方法人工合成基因。
- 2) 将外源DNA分子（目的基因或片段）与能够自我复制并且具有选择标记的**载体**分子在体外连接，形成**重组DNA分子**。



- 3) 把重组DNA分子引入到适宜的受体（寄主）细胞中进行扩增。
- 4) 从繁殖的大量细胞群体中筛选和鉴定已经获得重组DNA分子的受体细胞的克隆。
- 5) 从所筛选的受体细胞克隆提取已扩增的目的基因后，或再将其克隆到表达载体上，导入寄主细胞，以便在新的背景下实现功能表达，产生人们所需的物质；或将已扩增的目的基因作进一步的分析研究。



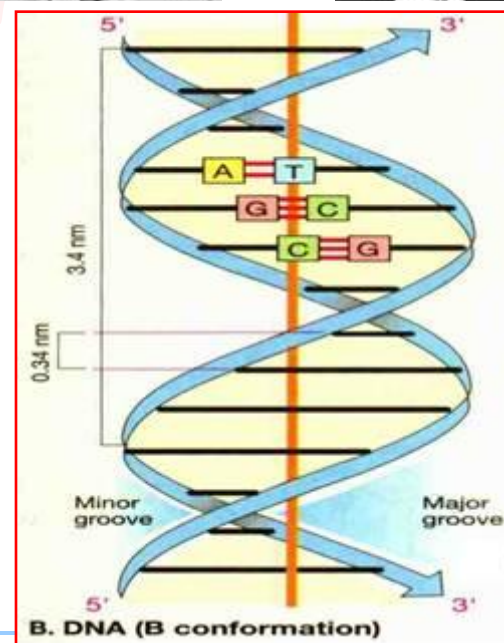
基因工程的流程图



二、基因工程发展简史

1. 基因工程诞生的背景

- 理论上三大发现：遗传物质是DNA，DNA的双螺旋结构与半保留复制机理以及中心法则的发现。
- 技术上三大发明：限制性核酸内切酶及各种工具酶的发现；载体分子的研究与发现；逆转录酶的发现





2、基因工程诞生的标志

- 1972年， P. Berg领导的研究小组，在世界上第一次成功地实现了DNA的体外重组。他们使用限制性核酸内切酶EcoR I，在体外对猿猴病毒SV40的DNA和 λ 噬菌体的DNA分别进行酶切，然后再用T4DNA连接酶把两种酶切的DNA片段连接起来，从而获得了世界上第一个体外重组的杂种DNA分子。他们因此获得1980年诺贝尔化学奖(同Sanger、Gilbert分享)。
- 1973年， S. Cohen等人将大肠杆菌的抗四环素的质粒PSC101和鼠伤寒沙门氏菌的抗链霉素和磺胺的质粒RSF1010，在体外用限制性核酸内切酶EcoRI切割，连接成新的重组质粒，然后转化到大肠杆菌中，在含四环素和链霉素的平板培养中，选出了抗四环素和链霉素的重组菌落。这是基因工程发展史上第一次实现重组体转化成功的实验，基因工程从此诞生了！



3. 基因工程的发展

- 基因工程的发展：

- 1976年，Genentech 成立；

- 1977年，生长激素抑制素（Somatostatin）

- 1978年，人重组胰岛素；1982年上市（Eli Lilly）

- 1980年，美国/瑞士人， α 干扰素一基因；

- 1984年，日本人，白细胞介素2（IL-2）；

基因工程的腾飞：

- 1982年，美国人，大鼠生长激素基因转入小鼠；

- 1983年，美国人，Ti质粒导入烟草细胞（细菌Neor基因）

- 1985年，基因工程微生物杀虫剂走向市场；PCR技术问世

- 1990年，美国人，腺苷脱氨酶（ADA）基因治疗，重度联合免疫缺陷症（SDID）

- 1991年，美国倡导，人类基因组计划 10^9 bp，15年时间30亿USD；

- 1996年，克隆多利绵羊和转基因波莉绵羊



三、基因工程的研究意义和应用

1、基因工程在功能基因组学研究中的应用

- ① 基因定位和基因功能研究；
- ② 基因表达调控的顺式元件和反式因子的鉴定和转录调控机制的研究；
- ③ 发育的遗传学和基因组学；
- ④ 非编码DNA与RNA的类型、含量、分布及所包含的信息与功能；
- ⑤ 基因转录、蛋白质合成和翻译后事件的相互协调；
- ⑥ 在大分子功能复合体中蛋白质间的相互作用；
- ⑦ 人类蛋白质组学研究；
- ⑧ 个体间单核苷酸多态性变异（SNPs, Single-based DNA variations among individual）与健康 and 疾病之间的关系；
- ⑨ 基因突变与疾病发生和发展之间的关系；
- ⑩ 药理基因组学等等。



2、基因工程在工业领域的应用

环保工业：石油降解质粒，农药降解质粒，工业污染物降解质粒，尼龙和洗涤剂降解质粒

水质与土壤重金属污染的清除：金属结合蛋白或金属结合肽

能源工业：生物能，清洁汽油（乙醇），纤维素质原料，生物柴油

食品工业：食品添加剂，氨基酸，食用油（油酸、亚油酸）



基因工程与环保工业

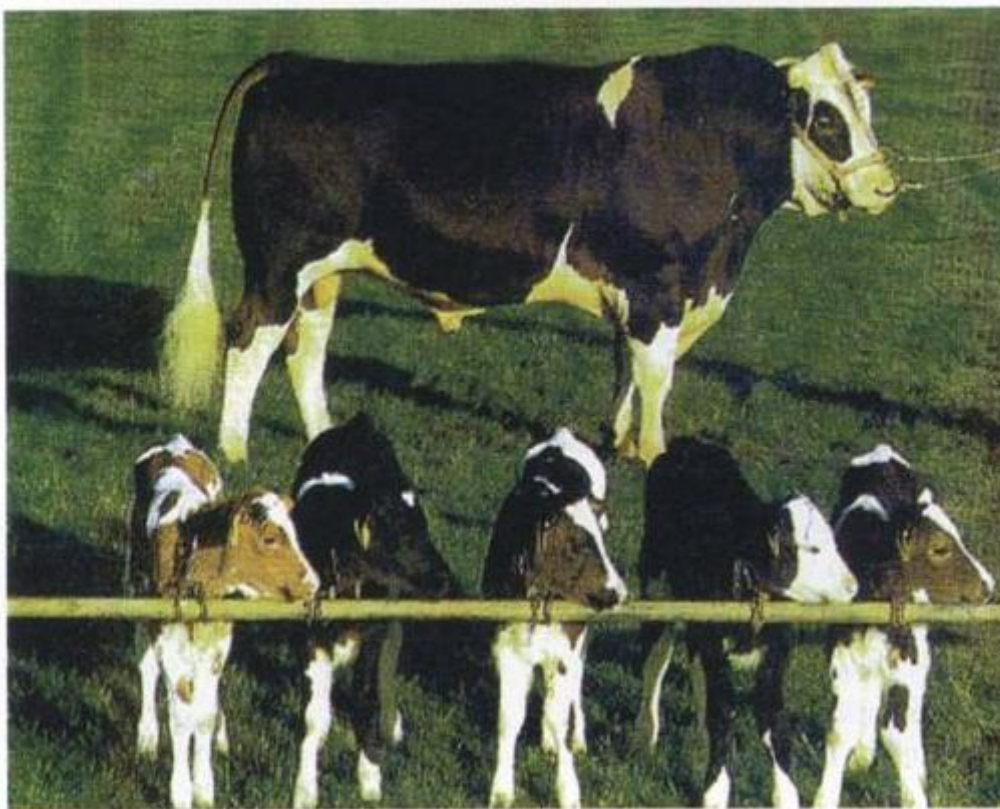




3、基因工程在农业领域的应用

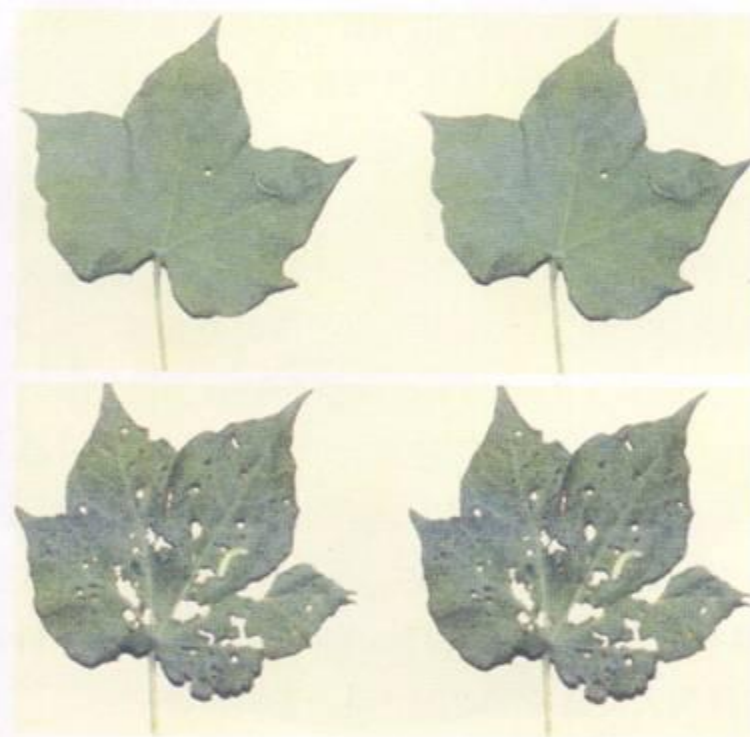
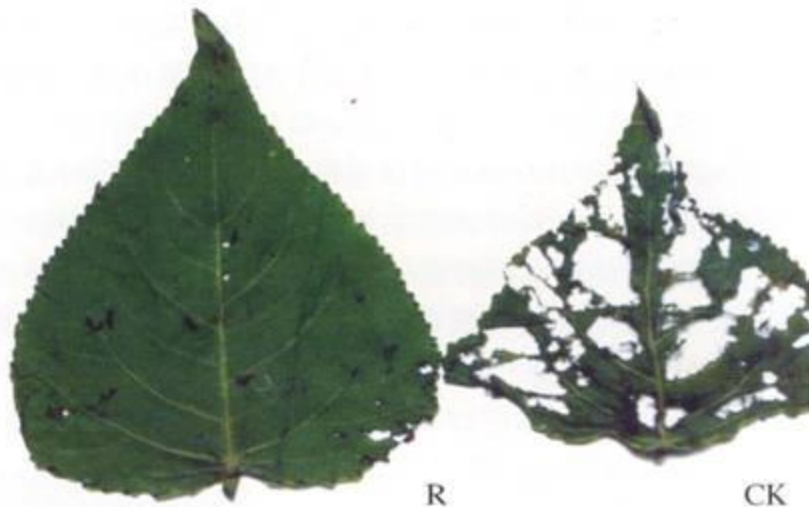
- 第一次农业革命
- 第二次农业大革命（绿色革命 → 基因革命）
 1. 抗性转基因农作物
 - 2. 高产优质作物
 - 3. 花卉颜色与形状；
 4. 固氮
 - 5. 转基因动物
 - 6. 动物生物反应器

动物器官反应器：血液反应器和乳腺反应器



转基因植物

转基因抗虫植株叶片与
非转基因叶片的对照
CK-非转基因欧洲黑杨树的
叶片
R-转基因欧洲黑杨植株的
叶片



转基因抗虫棉(上)与普
通棉(下)



抗除草剂的水稻





4、基因工程在医药领域的应用

制药工业：重组人胰岛素（1982，Eli.lilly公司生产，Genentech研制），干扰素，人生长激素，白细胞介素，肿瘤坏死因子，红细胞生成素EPO，组织纤溶酶原激活剂和乙肝甲肝疫苗等

1997年销售额150亿美元，2004年450亿美元，2025年2万亿美元

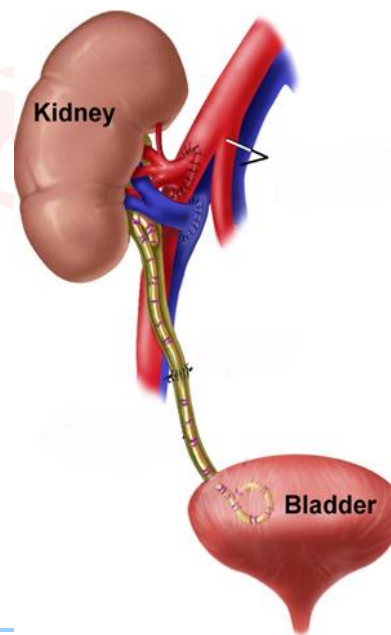
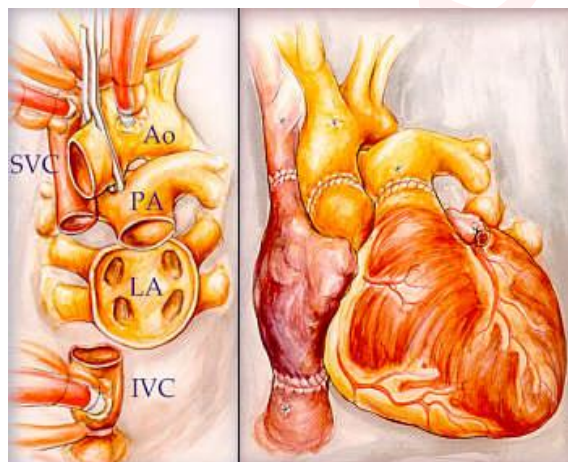
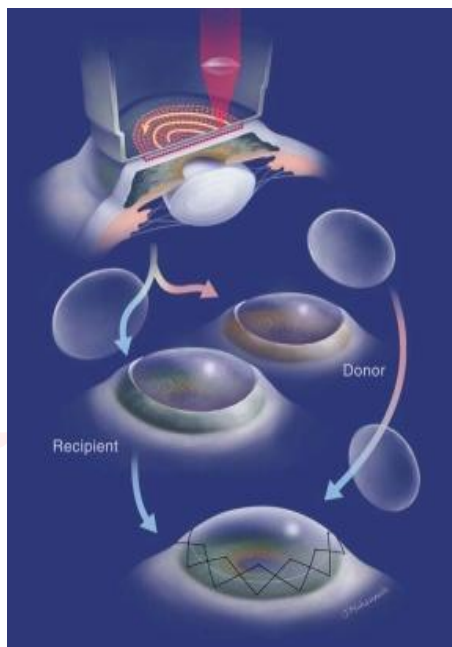
- 动物疾病模型的建立
- 基因诊断
- 基因治疗
- 器官移植

基因治疗



接受过基因疗法的美国女孩

器官移植



四、趣味讨论：基因工程与克隆人的讨论

Clone(克隆)：无性繁殖的集合体





克隆 Clone

- 克隆是指遗传上完全相同的分子、细胞或来自同一祖先的生物个体的无性繁殖群体。在不发生突变的情况下，它们的遗传组成应该完全相同。
- 1997年3月，世界卫生组织将克隆定义为：**遗传上同一的机体或细胞系的无性繁殖。**

植物细胞克隆

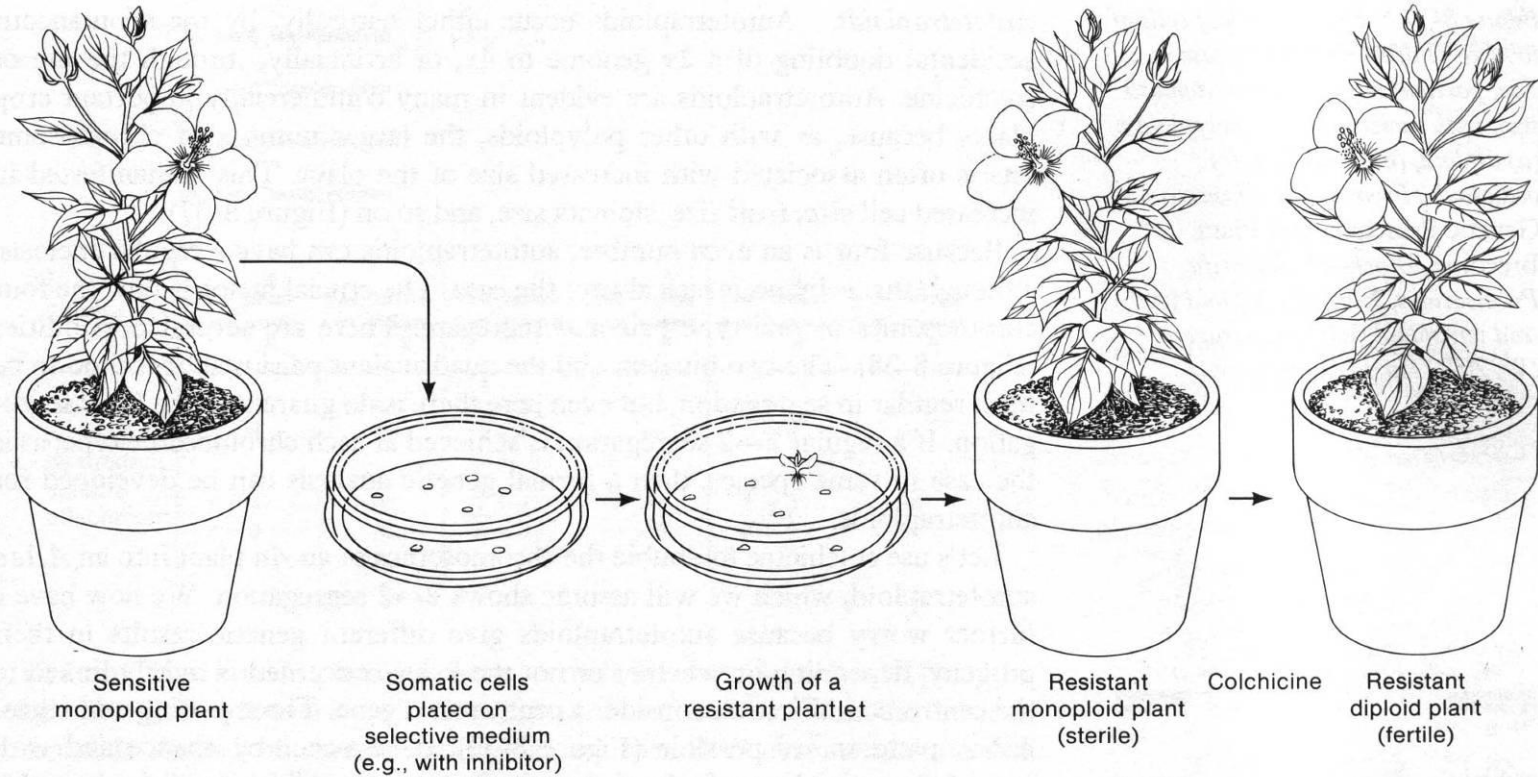


Figure 8-35. Using microbial techniques in plant engineering. Haploid cells have their cell walls removed enzymatically. The cells are then exposed to a mutagen and plated on an agar medium containing a selective agent, such as a toxic compound produced by a plant parasite. Only those cells containing a resistance mutation that allows the cells to live within the presence of this toxin will grow. After treatment with the appropriate plant hormones, they will grow into mature monoploid plants and, with proper colchicine treatment, can be converted into homozygous diploid plants.

上帝创造的克隆人



Identical twins: identical genotypes but different people. (Copyright © Charles Harbutt/Magnum Photos, Inc.)



世界上第一本挑战生命工程和克隆技术的书

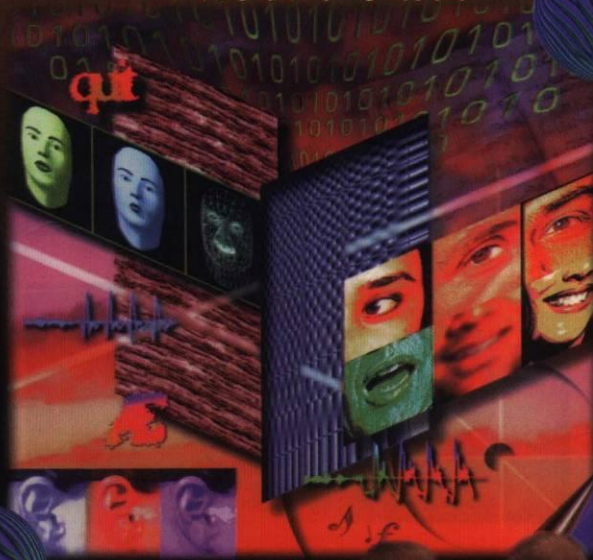
基因工程

〔美〕安德鲁·金柏利

我们不要克隆！！
誓死保卫我们的基因！

克隆

——人的设计与销售



国外热门书译丛
科学文化卷

2010

大学生命科学学院

克隆高潮的掀起：1996年7月5日



小羊多利与她

(兼荐《克隆——通向多利之路及展望》一书)

🐑 羊 亭

1996年7月5日下午5时，在苏格兰罗斯林研究所通往罗斯林城路边的一间畜棚里，一只历史上最著名的羊在这里诞生。

这是一个不平凡而又无人关注的时刻。没有人开香槟酒，没有人拍照。只有研究所的少数人员和照料母羊临产的当地兽医在场。这只毛绒绒的、有着浅灰白色羊毛和一张雪白面孔的小母羊，像散布在苏格兰绵延起伏的小山



反对的声音

- 1997年2月23日，英国的胚胎学家伊恩-维尔穆特博士报道克隆绵羊多利的诞生；
- 1997年2月25日，德国政府官员要求禁止克隆人；加拿大政府官员要求禁止克隆人；
- 1997年2月27日，法国总统希拉克反对将克隆技术应用于人类；
- 1997年3月5日，阿根廷议会立法禁止克隆人；意大利卫生部长罗西· 檳迪宣布禁止克隆实验；丹麦暂停克隆研究；



- **1997年3月7日**，阿根廷总统卡洛斯·梅内姆下令禁止克隆人；日本学术审议会禁止为克隆人研究提供经费；
- **1997年3月11日**，马来西亚政府反对任何企图克隆人类的尝试；世界卫生组织总干事中岛宏宣称反对克隆人的研究；欧盟委员会声明反对克隆人。
- 美国总统克林顿在维尔穆特克隆羊出现后，召集一群科学家，限他们在90天之内就该不该让“克隆人”成为可能给出一个答案；
- 法国总统密特朗在听到杰里·豪关于人体胚胎复制的消息时曾打电话说：“这个消息令人毛骨悚然。”



支持的声音

- 一波未平，一波又起。1998年1月6日，美国科学家里查德·伯格在美国《科学》杂志上公开声明，准备进行克隆人的研究！
- 比尔·盖茨说：“当然应该克隆人。如果谁第一个掌握了这个技术，他就是我真正的、也是唯一的竞争对手。”
- 英国和俄罗斯也不反对克隆人。

被传说的克隆婴儿



意大利医生塞维里
诺 安蒂诺里3/9/02



法国科学家布里吉特 布瓦瑟利耶2002年12月25日通过电话告诉法新社，世界上第一个克隆婴儿“夏娃”已经降生。03年1月3日她又宣布，第二个克隆人降生。



克隆人的正面影响

- 再生人类，抚平丧子之痛
- 试管婴儿，不孕者的救星
- 冷冻胚胎，优生选择
- 代理母亲，借腹怀胎
- 复制明星，圆追星梦
- 添加基因，创基因贵族
- 基因再造，器官移植

- 世界上第一例试管婴儿名叫路易斯-布朗，是1978年7月25日在英格兰诞生的；
- 1985年4月，我国台湾也诞生了第一例试管婴儿；1988年8月，我国北京医科大学也报道了试管婴儿的诞生。

试管婴儿





冷冻受精卵，筛选胚胎

- 订做亲爱宝贝——爱丽丝的故事：对冷冻胚胎的身高，体重，外表，生理及身体的特征，天生的性格与智能特征，易患复杂及传染疾病的先天倾向，单一基因严重异常的概率等作一预测与综合评价，从而决定选择哪一个受精卵进行胚胎移植。

代理孕母

- <http://www.surrogach.com> 美国



英国吉尔·霍金斯

1号生于1992年8月

2号生于1994年8月

3号生于1998年2月

4号生于2001年10月

5号生于2002年

6号生于2004年8月

7号生于2005年11月

8号将于2010年10月

吉尔·霍金斯已先后生下7个“代孕宝宝”

把那些基因注射
给他；他最后终
会出名的！



添加基因

创基因贵族



器官再造

• 艾妮莎·艾亚拉 (Anissa Ayala) 的故事:

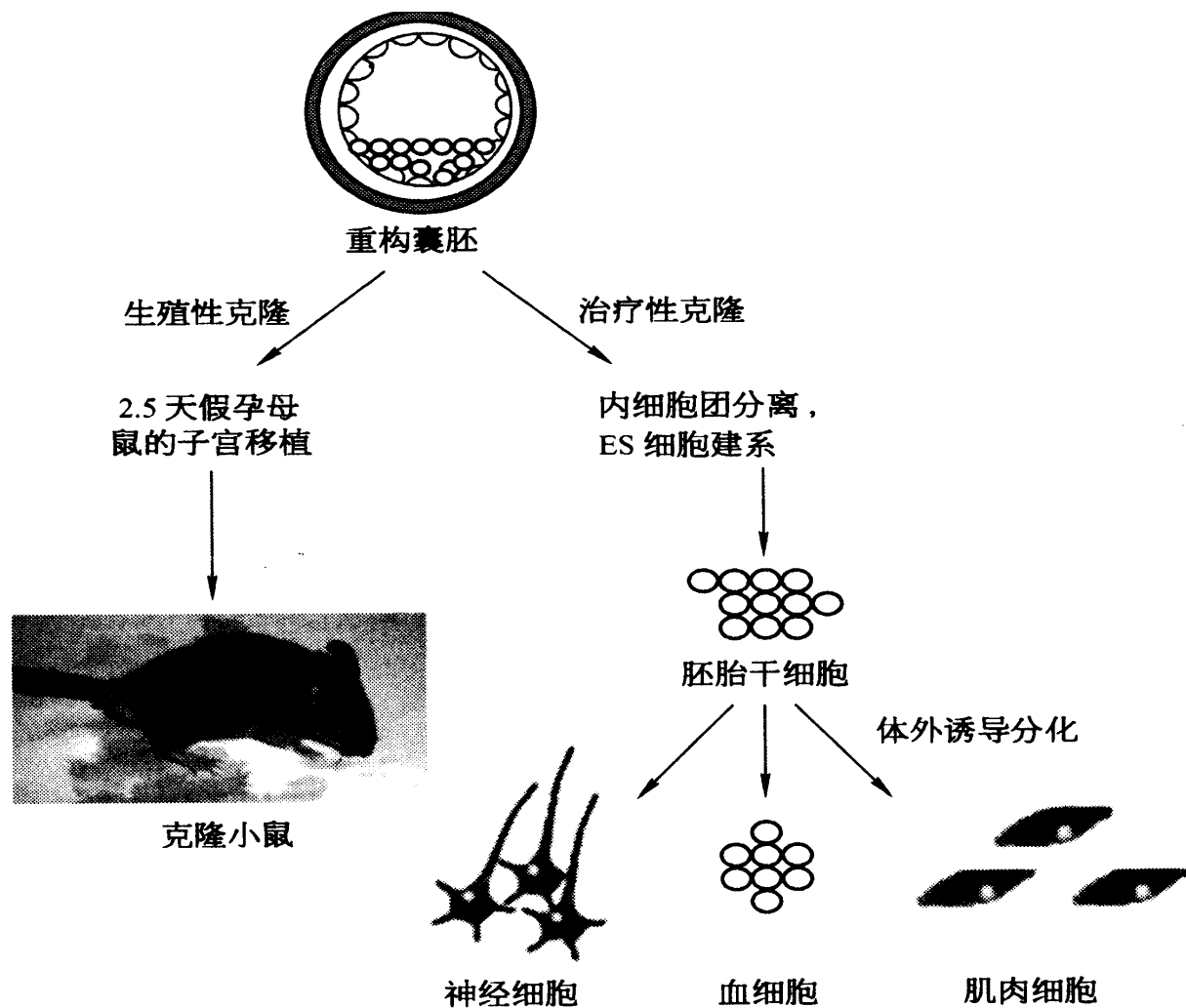
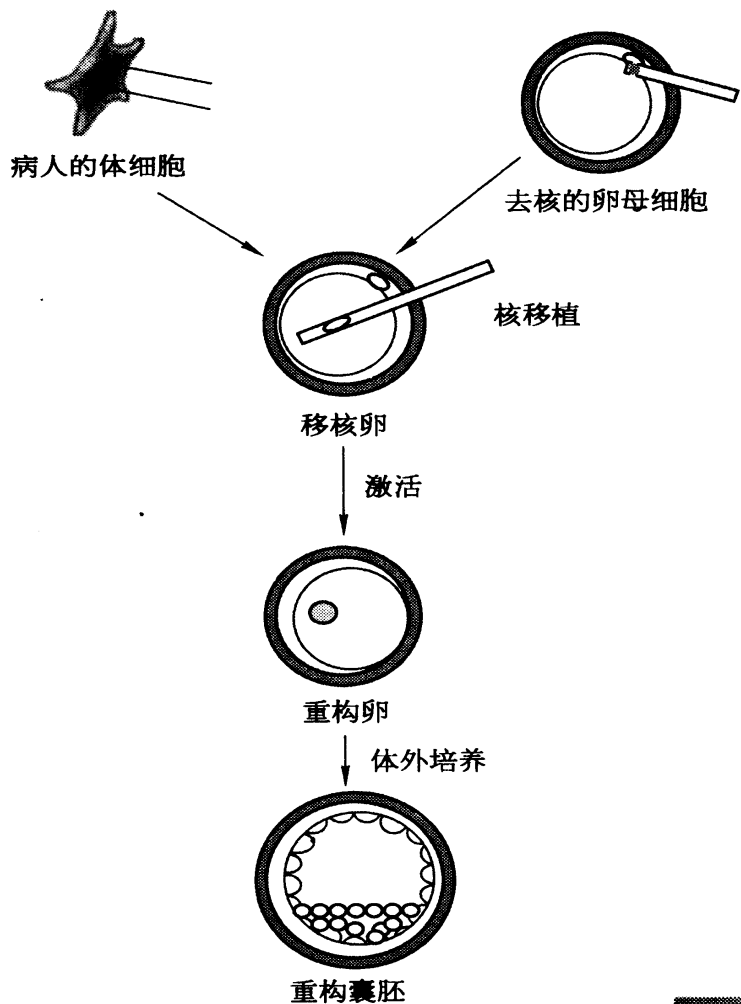
1988年的春天，艾妮莎还是一名高二的学生时，突然患了骨髓淋巴瘤。要彻底治疗，必须彻底清除其原有的骨髓干细胞，换以新的相容的骨髓细胞。艾妮莎的父母四处奔走，搜寻骨髓捐赠者，但两年的努力均告失败。艾妮莎的45岁的父亲与42岁的母亲决心与命运一搏，再度怀孕，于1990年4月生下了艾妮莎的妹妹玛瑞莎。14个月以后，妹妹与姐姐做了骨髓移植手术，艾妮莎终于健康地活下来了。



克隆人的负面影响

- 社会问题：基因父母，生父母，养父母
- 伦理问题：妈妈 还是 姐姐 或？
- 人的价值问题：买卖的商品而非爱的结晶？ 个性的发挥等。
- 人的进化问题
- 预防犯罪

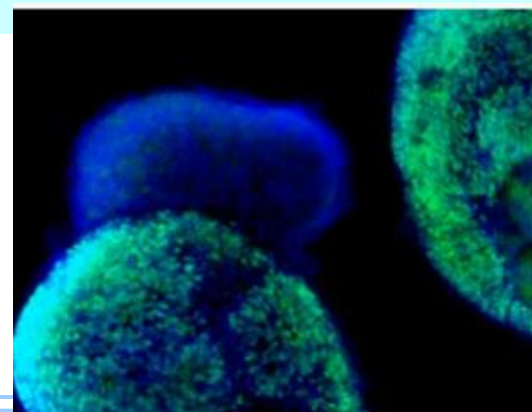
治疗性克隆



iPS 细胞：诱导的多能干细胞

- 2007年，美国威斯康星大学麦迪逊分校一个研究小组和日本京都大学一个研究小组分别向成纤维细胞和面部皮肤细胞中植入一组4个基因，通过基因重新编排，使皮肤细胞具备胚胎干细胞的功能。这种被改造过的细胞被称作“iPS细胞”
- 美国研究小组：2007年11月22日出版的《科学》杂志
- 日本研究小组：2007年11月30日出版的《细胞》杂志

威斯康星大学的该研究组利用iPS细胞在体外成功分化出视网膜细胞
(PNAS, 2009-8-24)





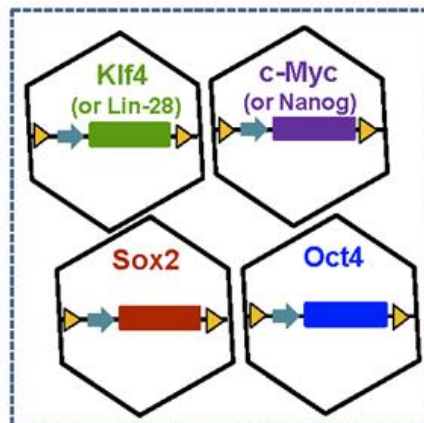
iPS 细胞

日本: *OCT4*, *SOX2*,
NANOG, *LIN28*

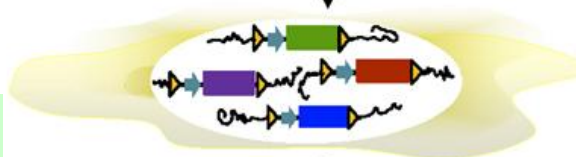
美国: *Oct3/4*, *Sox2*,
Klf4, *c-Myc*

A

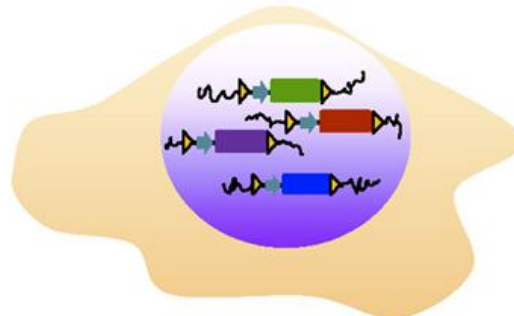
Retroviral/ lentiviral
vector



Infect somatic cells
Integrate into the genome



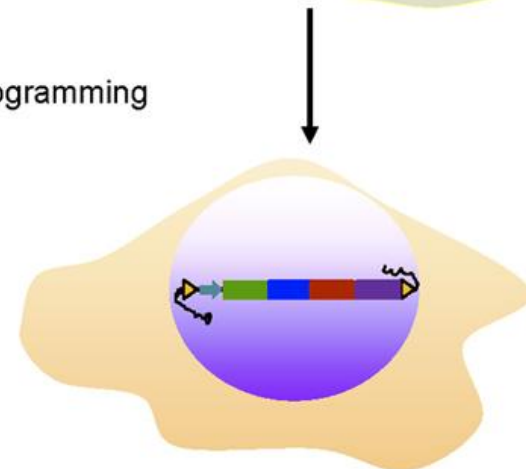
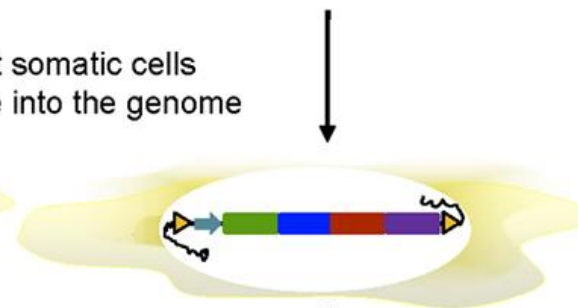
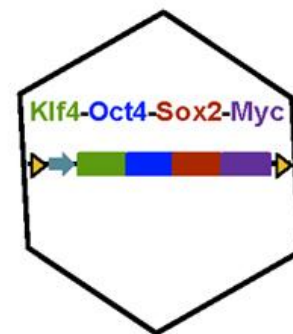
Reprogramming



iPS cells

B

Polycistronic lentiviral
vector



iPS cells



iPS 细胞

《美国科学院院刊》（PNAS 2009-10-19），哥伦比亚大学科学家利用人骨髓干细胞在体外培育出部分颌骨

- 《柳叶刀》（*The Lancet*, 2009-11）法国I-STEM研究所首次成功的利用人类皮肤干细胞提取出了角质生成细胞，而后通过细胞生物学和药理学方法的帮助，利用此角质生成细胞在体外成功制造出了一块完整的表皮，并移植至小鼠背部的伤口上，12周后，移植区域皮肤完全恢复正常。

