

12

第十二章

生物技术与人类未来

第一节 生物技术及其发展历史

- 一、生物技术的定义和特点
- 二、生物技术包含的主要内容
- 三、生物技术发展的历史概况

第二节 重组 DNA 技术——基因工程

- 一、获得目的基因
- 二、基因重组和克隆
- 三、转化受体细胞和转化子筛选
- 四、转化子分析——Southern 印迹

第三节 蛋白质工程、发酵工程和细胞工程简介

- 一、蛋白质工程
- 二、发酵工程
- 三、细胞工程

第四节 生物技术在农业、医药等方面的应用

- 一、农业生物技术
- 二、分子诊断
- 三、基因治疗
- 四、生物芯片技术

第五节 生物技术面临的问题与挑战

- 一、转基因技术的安全性问题
- 二、克隆人的伦理问题
- 三、个人基因信息的隐私权问题
- 四、基因治疗的应用范围问题
- 五、生物技术引发的其他问题

第六节 生物科技造福人类

- 一、21世纪是生物科技大发展的世纪
- 二、生命有形，梦想无限——代结束语

生物技术包括基因工程、细胞工程、发酵工程与蛋白质工程。生命有形、梦想无限。让我们准备好，去迎接生物技术与生物经济时代的挑战。

第一节 生物技术及其发展历史

一、生物技术的定义和特点

生物科学成为当今世界自然科学的热点和重点，主要有两方面的原因：(1) 20世纪后叶，分子生物学领域一系列突破性成就，使生命科学在自然科学中的地位发生了革命性的变化；(2) 建立在实验室研究基础上的生物技术的发展为人类带来了巨大的利益和财富。科学与技术是密切关联、不可分割的两个方面，是当今社会发展最重要的推动力。技术的发明常常源于科学的发现。Watson 和 Crick 发现了 DNA 双螺旋结构，导致遗传密码的破译。随后分子生物学一系列重大的突破终于使得 DNA 的操作——将外源目的基因转入微生物生产有价值的产品成为可能，基因工程技术应运而生。也许 Watson 和 Crick 当初并没有料到，他们的科学研究会在生命科学领域以至整个自然科学领域引发如此巨大的技术革命。正是重组DNA技术的重大突破带动了现代生物技术的兴起，并很快产生了许多生命科学的高技术产业。

有人又称**生物技术**为**生物工程**(bioengineering)，但两者是有差别的。前者偏重研发，后者更偏重应用或实施产业化。如何对生物技术下定义，一直是一个有争论的问题。

1982年，国际合作与发展组织对生物技术的定义为：生物技术是应用自然科学及工程学的原理，依靠微

生物、动物、植物体作为反应器将物料进行加工以提供产品为社会服务的技术。

美国政府技术顾问委员会(OAT)对生物技术的定义是：应用生物或来自生物体的物质制造或改进一种商品的技术，其还包括改良有重要经济价值的植物与动物以及利用微生物改良环境的技术。该定义强调了生物技术的商品属性，有一幅漫画生动形象地表述了生物技术的商品属性(图12-1)。

生物技术的成果及其成功应用首先需要实验室大量复杂的基础研究工作，生物技术还是微生物学、分子生物学、化学工程、材料科学等多学科交叉的综合性学科。高技术(精细和密集的复杂技术)、高投入(尤其是前期科研投入高)、高利润是生物技术产业的显著特点。

二、生物技术包含的主要内容

一般认为，生物技术通常包括基因工程、细胞工程、发酵工程和蛋白质(酶)工程4个方面内容。其中，以克隆和重组DNA为核心技术的基因工程发展最快，也带动和促进了细胞工程、发酵工程和蛋白质工程的发展。**基因工程**是通过DNA的体外重组，实现不同物种之间基因的转移，或者在基因的水平上设计和改造生物结构和功能，最终获得具有目的性状的生物个体或表达产物。**细胞工程**是以组织、细胞和细胞器为对象进行操作，在细胞水平上重组细胞的结构和内含物，或者通过一定规模的细胞培养或组织培养，最终获得所需要的组织、细

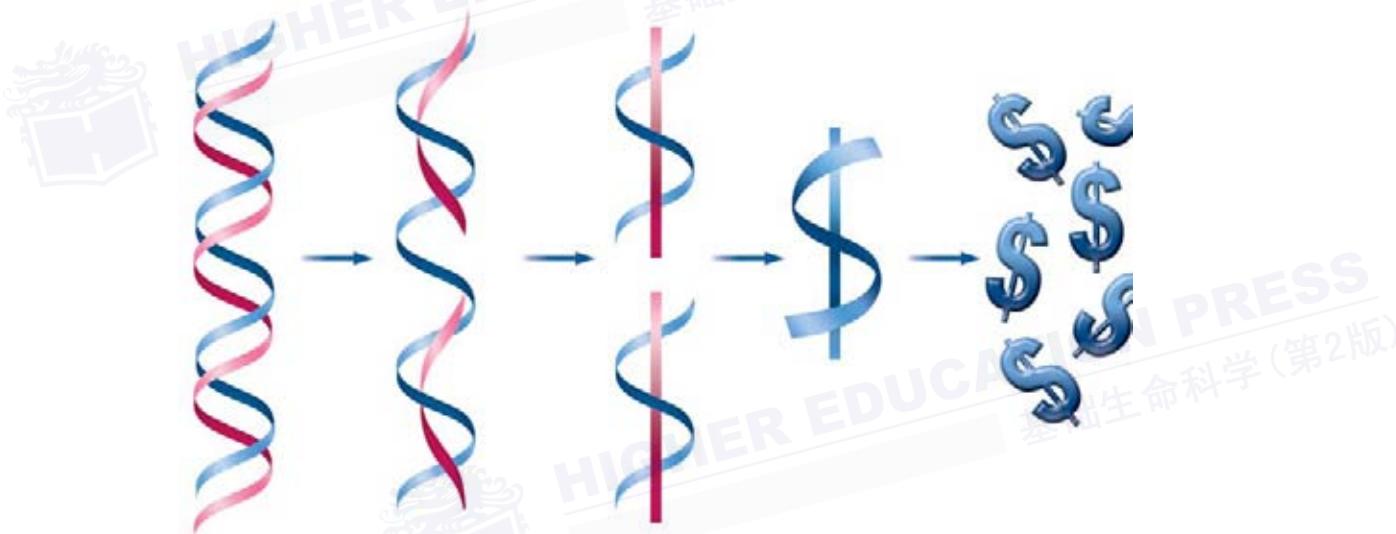


图 12-1 生物技术的商品属性 什么是生物技术呢？不需要更多的文字说明，图中的 DNA 双螺旋结构被改造成了美元 (\$)。该漫画形象地表述了，以 DNA 操作为核心的生物技术就是通过其商品属性获得高额利润的。

胞和生物体及其产物。**发酵工程**通过对微生物菌株的选择、培育或改造，对发酵罐和反应器的设计和对发酵工艺的改进，实现目标工程菌或细胞的规模化发酵培养，最终从发酵液或细胞中分离提取所需要的生物工程产品。

蛋白质工程是在对蛋白质结构与功能解析的基础上，对蛋白质结构进行改造，或通过对蛋白质结构的反向设计，选择或改造相应的基因，获得所需要的蛋白质。这些蛋白质可以是一些特殊药物，也可以是加速化学反应的蛋白质酶类，也可以是一系列代谢反应的靶蛋白等等。

从有关生物技术的定义来看，除了基因工程、细胞工程、发酵工程和蛋白质工程等方面内容外，基因诊断与基因治疗技术、克隆技术、生物芯片技术、生物材料技术、生物能源技术、开发利用可以生产化学药物、生物多聚物（如可降解生物塑料）、氨基酸、酶制剂和食品添加剂的微生物、用生物降解环境中有毒有害化合物的技术等等都是生物技术范畴的重要内容。

现代生物技术实际上是建立在多学科基础之上、涉及面广泛的综合技术，与生物技术直接相关联的学科至少包括分子生物学、微生物学、生物化学、遗传学、细胞生物学、化学工程学、医药学、材料科学等。对人类和社

会生活各方面影响最大的生物技术领域还可按行业分为农业生物技术、医药生物技术、环境生物技术、海洋生物技术、材料生物技术、能源生物技术等等。以农业生物技术为例，其包括的具体内容有：以基因工程（DNA重组技术）为手段，培育高产、高品质和高营养的农作物，培育抗病、抗虫和抗病毒农作物，培育抗寒、抗旱农作物，培育抗除草剂农作物，培育抗早熟或抗倒伏农作物等；利用动物转基因技术，培育优良品种，促进家畜、家禽（包括水产养殖的鱼、虾等）的生长，改善家畜家禽的遗传特性和禽畜产品的品质，提高禽畜的抗病性等。以现代医药生物技术为例，其包括的具体内容有：疾病的分子诊断及基因诊断（含基因芯片诊断），基因治疗，基因工程重组疫苗研制，生长因子、神经营养因子、细胞因子、抗病毒药物和受体等蛋白和多肽药物的设计和开发，生物医用材料的研制等等。生物技术按其进行的顺序和性质一般包含以重组DNA等实验室操作为主的上游技术和以发酵工程等为主的工业化生产的下游技术（图12-2）。总之，现代生物技术的领域非常广泛，随着生命科学的发展和不断突破，许多生命科学的重大成果都隐含着良好的应用前景和商机，也不断拓展着生物技术领域的范围，显示



图12-2 生物技术一般包含以实验室操作为主的上游技术和以工业化生产为主的下游技术 (a) 科学家在实验室内进行转基因和蛋白表达分析实验。(b) 利用小型发酵罐等制备生物工程产品的中试装置。(c) 扩大生产规模的发酵生产车间。

表 12-1 生物技术发展的大事件

1822—1884 年	Mendel 创立了经典的遗传学法则，被誉为经典遗传学之父。
1822—1895 年	Pasteur 创立了微生物学，在微生物发酵研究领域做出了巨大的贡献。
1929—1943 年	Alexander Fleming 发明青霉素，最终导致大规模工业生产青霉素。
1944 年	Avery 等的肺炎球菌实验，证明蛋白质不是遗传物质，DNA 是遗传物质。
1953 年	Watson、Crick 发现 DNA 双螺旋结构。
1960—1970 年	超速离心、层析技术、电泳技术、光谱技术、色谱技术、放射性同位素标记技术等日趋成熟。
1970 年	核酸限制性内切酶(分子手术刀)和连接酶相继被发现。
1973 年	Cohn 和 Boyer 等完成了 DNA 体外重组，一举打开基因工程学大门。
1976 年	Swanson 与 Cohn 合作，全球第一家生物技术公司——Genetech 公司问世。两年后该公司首次用基因工程技术在大肠杆菌中表达和生产胰岛素。
1981 年	第一个单克隆抗体诊断试剂盒在美国被批准使用。
1988 年	美国 Kary Mullis 发明 PCR 技术。
1997 年	英国科学家 Wilmut 等人完成了首例哺乳动物——绵羊“多莉”的克隆。生物芯片问世。
1999 年 12 月	人类基因组计划获得重要进展，科学家宣布，人类第 22 号染色体（人类 23 对染色体中最小的染色体）所含的 3.34×10^7 个碱基序列的测定已经全部完成，这是人类完成的第一个人类自身染色体的全序列测定。
2000 年 6 月 26 日	在多方参与和协作下，人类基因组工作框架图完成，标志着功能基因组时代的到来。
2001 年 2 月	人类基因组框架图数据结果正式发表，人类 23 对染色体上的基因数为 3 万至 3.5 万。
2002 年 4 月	水稻基因组框架图数据结果正式发表，中国科学家在该项研究中贡献突出。

了未来生物技术产业美好的前景。

三、生物技术发展的历史概况

以酿酒发酵等为代表的传统生物技术可追溯到 19 世纪，但直到 20 世纪后叶，分子生物学领域一系列重大发现和突破才使得现代生物技术蓬勃地发展起来。**表 12-1** 列举了部分对生物技术的发展具有里程碑意义的大事件，从这些大事件中，我们可以追溯现代生物技术在 20 世纪兴起的脉络。

20 世纪 70 年代以来，现代生物技术的重要支柱——基因工程技术的重要成就，为世界农业及粮食生产和制药产业的发展提供了广阔的发展空间。一些国家将转基因技术运用于农业，取得了显著的成绩。例如，1983 年首批转基因烟草和马铃薯问世，1986 年首批通过转基因开发的抗虫和抗除草剂作物进入田间试验，1993 年延熟保鲜转基因番茄被批准上市销售，到 20 世纪末，世界各国已累计批准了约 5 000 个(次)转基因作物释放于田间，

其中近 50 个转基因作物产品已经进入市场，转基因作物的种植面积近 4 000 万公顷，产值达 15 亿美元。在中国，已知正在研究和开发的转基因作物有 50 多种，涉及各类基因 100 多个。中国已批准的转基因产品包括转基因棉花、转基因西红柿、转基因抗病毒辣椒等等，中国的转基因鱼、转基因羊和转基因猪等项成果也处于世界领先地位。另外，以袁隆平院士为代表的中国科学家在杂交水稻的遗传育种和推广应用方面取得了举世瞩目的成绩。在生物制药和诊疗方面，近几十年来中国也积累了丰硕的成果，早在 1988 年，中国科技人员就研制成功了乙型肝炎基因工程疫苗，1992 年又完成了对甲肝和丙肝有特殊疗效的合成人工干扰素等基因药物的研制，到目前为止，至少已有 18 种基因工程药物与疫苗进入市场。在美国，生物技术产业已经达到相当的规模。据统计，2001 年美国共有 1 457 家生物技术公司，其中 342 家是上市公司；市场资本总额达到 2 240 亿美元，年收入有 276 亿美元；生物技术产业雇佣从业人员 17.9 万人。据生物技术

工业组织(BIO)的统计,1999年,生物技术产业的直接活动、间接活动等就为美国经济贡献了437 400个工作岗位和470亿美元的商业收入,来自生物技术产业的税收约为100亿美元。

由于生物技术是世界上科学研究密集程度最高的产业之一,其技术创新周期长,投入大,其产品涉及公共卫生和安全等重要方面,因此生物技术产品从研发到进入市场至少需要5年以上的时间。全世界生物技术产业目前还只处于初期发展阶段,生物技术产业要在世界经济中要占据主导地位还需要很长时期的培育和发展。

第二节 重组 DNA 技术——基因工程

以基因克隆(gene cloning)操作为主的重组DNA技术是基因工程的核心技术,该技术包括了一系列的分子

生物学操作步骤。所谓**基因工程**(genetic engineering)就是有意识地把一个生物体中有用的目的基因转入另一个生物体中,使后者获得新的遗传性状或表达所需要的产物。

一般重组DNA操作通常包括以下步骤:(1)获得需要的目的基因(gene of interest)(又称外源基因);(2)在限制性内切酶(restriction enzyme)和连接酶作用下与克隆载体连接,形成新的重组DNA分子(recombinant DNA),这一步往往需要对重组DNA分子进行克隆和筛选;(3)用重组DNA分子转化受体细胞,使之进入受体细胞并能够在受体细胞中复制和遗传;(4)对**转化子**即获得外源基因的受体细胞进行筛选和鉴定;(5)对获得外源基因的细胞或生物体通过发酵、细胞培养、养殖或栽培等,最终获得所需要的遗传性状或表达出所需要的产物(图12-3)。

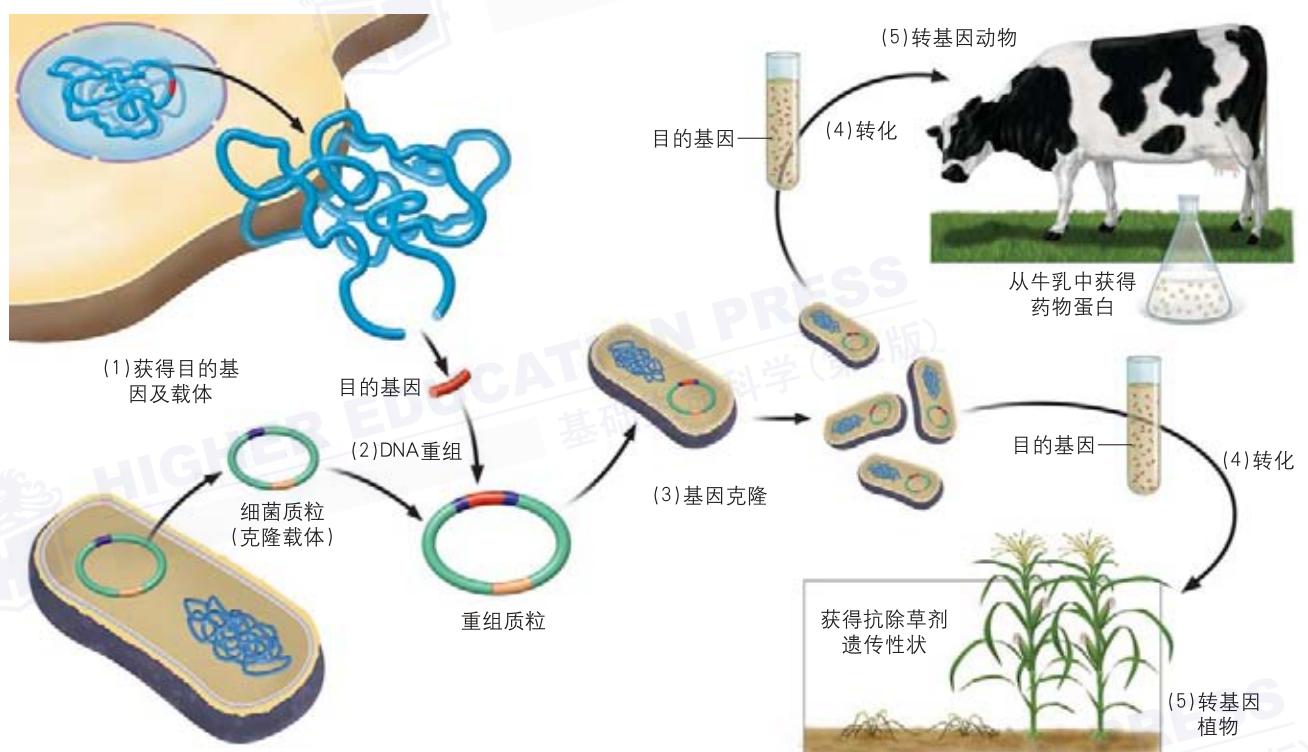


图 12-3 重组 DNA 操作的通常步骤 (1) 获得需要的目的基因,并获得克隆载体(如细菌质粒,噬菌体等)。(2)用限制性内切酶切下所需基因片段和克隆载体,然后在连接酶的作用下将它们连接,形成新的重组DNA。(3)使携带目的基因的载体(重组DNA)进入细菌,随着细胞的无性繁殖,携带目的基因的质粒也得以复制,以获得大量的目的基因拷贝,即完成了目的基因的克隆。(4)用克隆的目的基因或进一步构建的重组DNA分子对第二宿主(如植物、动物或其他微生物)进行转化,使外源目的基因能在其中稳定地遗传和表达;该步骤需要对获得外源目的基因的受体细胞(生物)进行筛选鉴定和分子检测。(5)对获得外源目的基因的细胞或生物体进行发酵、细胞培养、养殖或栽培等,最终获得目的基因表达产物(蛋白质)或获得具有某种所需遗传性状的生物体。本图中的目的基因及操作过程反映了基因克隆和转基因步骤,其中红色目的基因泛指可能的不同功能的基因。

与DNA操作相关的技术方法有很多，本节主要以目的基因的获取、在大肠杆菌中的克隆、受体细胞的转化、筛选和鉴定等为主要线索，介绍DNA体外重组最基本的原理和最常见的过程。

一、获得目的基因

进行DNA重组操作，首先要获得需要的目的基因，最常用的方法包括：①直接从生物体中提取总DNA，构建基因文库（gene library），从中调用目的基因；②以mRNA为模板，逆转录合成互补的DNA片段；③利用聚合酶链反应（PCR）特异性地扩增所需要的目的基因片段等等。

（1）构建基因文库 细胞内总DNA的提取分离程序已经在第二章做了详细介绍（图2-39），在提取分离到的总DNA中，目的基因片段含量很少，且掩埋在无数其他基因片段中，难以检出和分离。因此，科学家们用限制性内切酶将总DNA切开成为许多小的片段，把这些片段分别插入到环状的DNA载体即质粒（plasmid）中，这些质粒载体可以转入细菌并随着细菌的繁殖而复制，这个过程又称为**基因克隆**。关于限制性内切酶和克隆将在本节

下一部分进一步介绍。这些大量被复制拷贝的各载体上的外源基因可以进一步地被分析鉴定和分离。将总DNA包含的基因组各片段分别克隆在质粒或噬菌体载体上，便构成了该生物的**基因文库**（图12-4）。科学家们一般用与目的基因部分序列互补并标记了放射性同位素的一小段单链DNA作为探针（probe），对克隆的基因文库进行杂交实验，从中选出感兴趣的目的基因。以后再做重组DNA操作时，可以从基因文库中调用所需要的目的基因。

（2）逆转录人工合成互补DNA 构建基因文库并获取目的基因费时费事，也会出现其他问题，如真核生物细胞的基因组都含有较多非编码蛋白的内含子序列，给构建基因文库并获取目的基因增添了许多麻烦。为了避免这一问题，科学家发明了逆转录人工合成互补DNA的方法（图12-5）。首先，细胞核内的基因组经过转录，产生出前体mRNA，经剪切作用后，其中的内含子被除去，形成了只有外显子（编码蛋白质的基因序列）的成熟mRNA。从细胞中分离出所需要的mRNA，再以mRNA为模板，以短的寡核苷酸[oligo(dT)]分子作引物，加入dATP, dTTP, dGTP和dCTP, oligo(dT)与mRNA分子的多聚A尾巴碱基配对，在逆转录酶（reverse transcriptase）

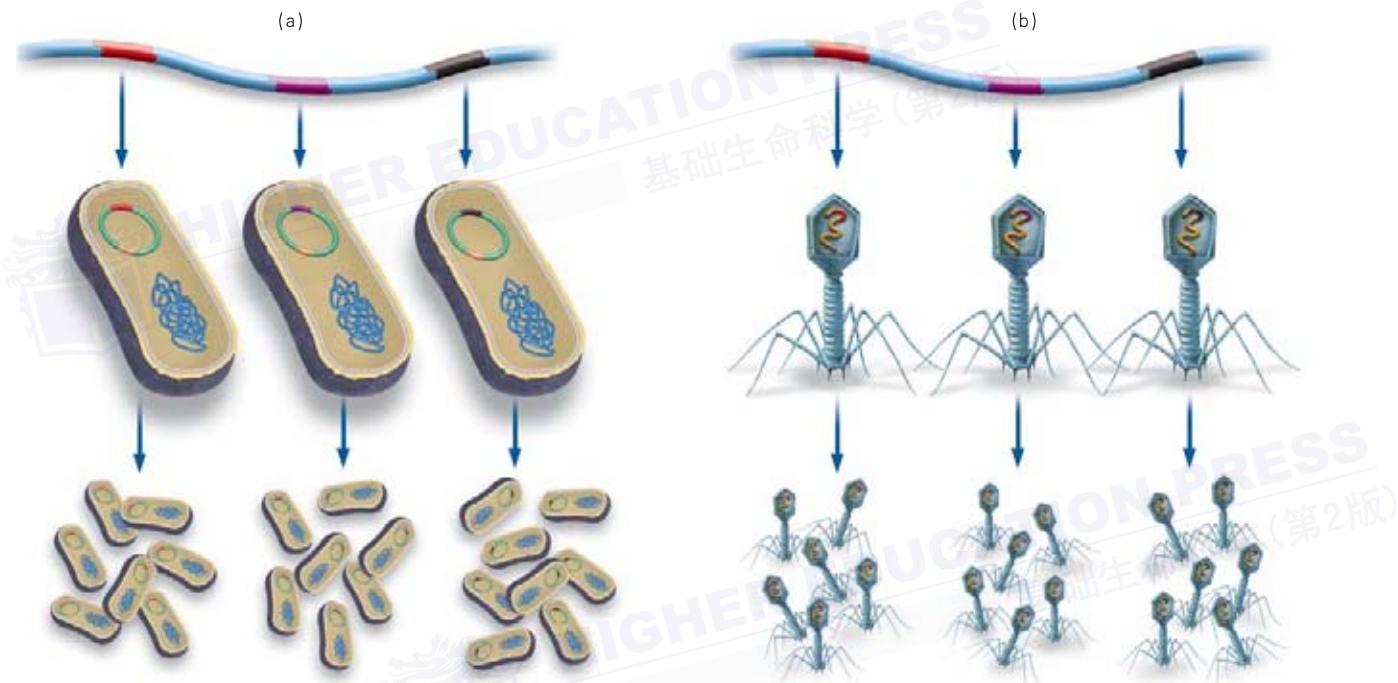


图12-4 构建基因文库 （a）将不同的基因片段（在总DNA上用不同的颜色表示）克隆到细菌质粒载体上，构建相应的基因文库。（b）将不同的基因片段克隆在噬菌体载体上，构建相应的基因文库。基因文库构建的操作参见下一部分有关基因克隆的操作。

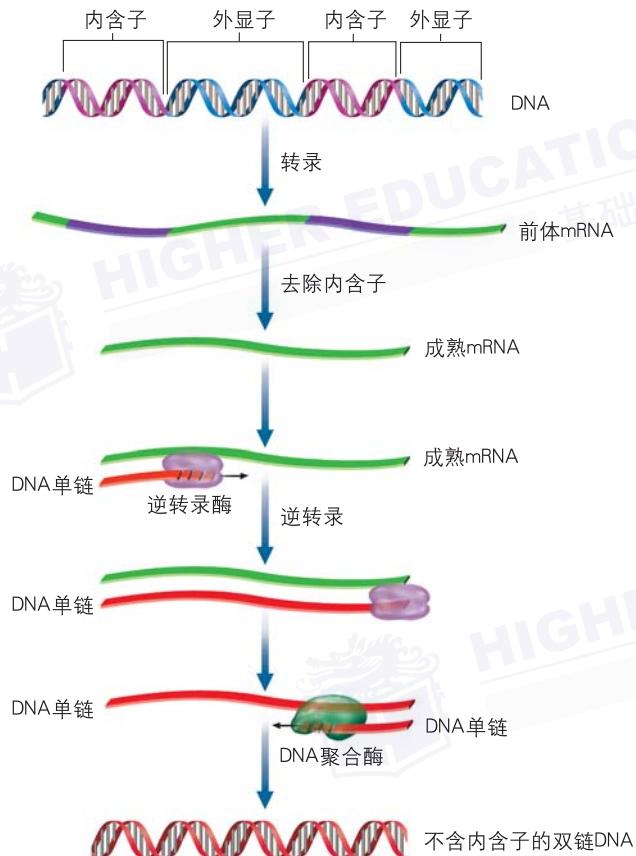


图 12-5 逆转录人工合成互补 DNA (1) 细胞内 DNA 转录为前体 mRNA。(2) 前体 mRNA 经剪切作用, 去除非编码蛋白的内含子序列, 成为只有外显子的成熟 mRNA。(3) 以从细胞内分离提取的成熟 mRNA 为模板, 在逆转录酶的作用下, 根据碱基互补原则合成一条 DNA 子链。(4) 逆转录完成, RNA 被降解, 在 DNA 聚合酶的作用下, 以已合成的 DNA 单链为模板, 人工合成另一条互补的 DNA 子链。(5) 最终形成不含内含子的双链 DNA。

的作用下, 根据碱基互补原则人工合成一段与之互补的 DNA 片段, 这一过程称为**逆转录**(reverse transcription)。逆转录完成时, RNA 被降解。接着, 在大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片段的作用下, 再以第一条 DNA 为模板, 人工合成另一条互补的 DNA 子链。这种经过 mRNA 逆转录人工合成的 DNA 被称为互补 DNA (complementary DNA, cDNA)。在细胞分化的不同阶段, 或经外界条件诱导, 根据代谢反应的特殊需要, 细胞往往特异性地转录产生编码特殊蛋白的 mRNA。因此, 在特定的情况下用 cDNA 方法获取的 DNA 片段往往是具有特定功能的目的基因, 这是逆转录人工合成互补 DNA 方法的优势。

(3) 聚合酶链反应 **聚合酶链反应**(polymerase chain reaction, PCR) 技术, 即 PCR 技术是在体外的小试管

(eppendorf tube)中通过酶促反应有选择地大量扩增(包括分离)一段目的基因的技术(图 12-6)。该技术高效、快捷、特异性好。完成 PCR 需要在小试管中加入 4 种物质: ①作为模板的 DNA 序列, 即从细胞中提取分离的微量总 DNA; ②与计划获取的目的基因双链各自 3' 端序列相互补的两种 DNA 引物(人工合成的约 20 个碱基的短 DNA 小片段); ③TaqDNA 聚合酶, 该酶来源于一种嗜热菌, 具有很好的热稳定性; ④4 种脱氧核苷酸, 简写为 dNTP (包括 dATP, dTTP, dGTP 和 dCTP)。

整个聚合酶链反应在特制的 PCR 仪中进行, 4 种反应混合物经历了变性、退火、延伸三步曲(图 12-6)。①变性: 在 95℃ 高温下, 作为模板的双链 DNA 解链成为单链 DNA; ②退火: 反应体系的温度降至 55~60℃, 使得部分引物与模板的单链 DNA 的特定互补部位相配对并结合; ③延伸: 反应体系的温度回升到 72℃ 左右, TaqDNA 聚合酶在该合适温度条件下以目的基因为模板, 逐个将 4 种脱氧核苷酸依照模板 DNA 的碱基顺序按碱基互补的原则连接在引物之后, 使合成的新链延伸, 形成互补的 DNA 双链。新形成的双链 DNA 又可以作为下一轮反应的模板, 如此重复进行 30 轮循环, 即可有选择地大量扩增(包括分离)一段需要的目的基因。每一轮聚合酶链反应可使目的基因片段增加一倍, 30 轮循环理论上共可获得 2^{30} (1.07×10^9) 个基因片段。

PCR 的发明是 DNA 操作技术的革命, 它是 1988 年由美国科学家 Kary Mullis 发明的。据说 Mullis 教授是一个兴趣广泛, 爱好户外活动, 性格特殊的人。一次外出的返家途中, 他驾驶着汽车行驶在一条逶迤弯曲的山路上, 在汽车开始驶入山脚下平坦笔直的公路时, 他突发联想: 已经经过的山路好像是折叠缠绕的 DNA 双螺旋, 被热变性成两条解开的 5' → 3' 的单链就是山脚下平坦笔直的双向车道, 它们可以是 DNA 合成的模板, 如果开始行驶的小汽车代表了一小段 DNA 引物, 后来又是引导新链延伸的聚合酶, 4 种脱氧核苷酸好像车后排放的尾气……正是当时他开汽车时的联想, 使他以后发明了 PCR 技术(图 12-7)。因为这一项重大创新成果, Mullis 教授于 1993 年获得了诺贝尔奖。PCR 技术问世以来, 已经在分子生物学、医学、考古学、法学、人类学等许多领域获得了广泛的应用, 随着 PCR 技术的发展, 科学家又发明了反向 PCR、锚定 PCR、定量 PCR、原位 PCR 等方法, 大大扩展了 PCR 技术的应用范围。

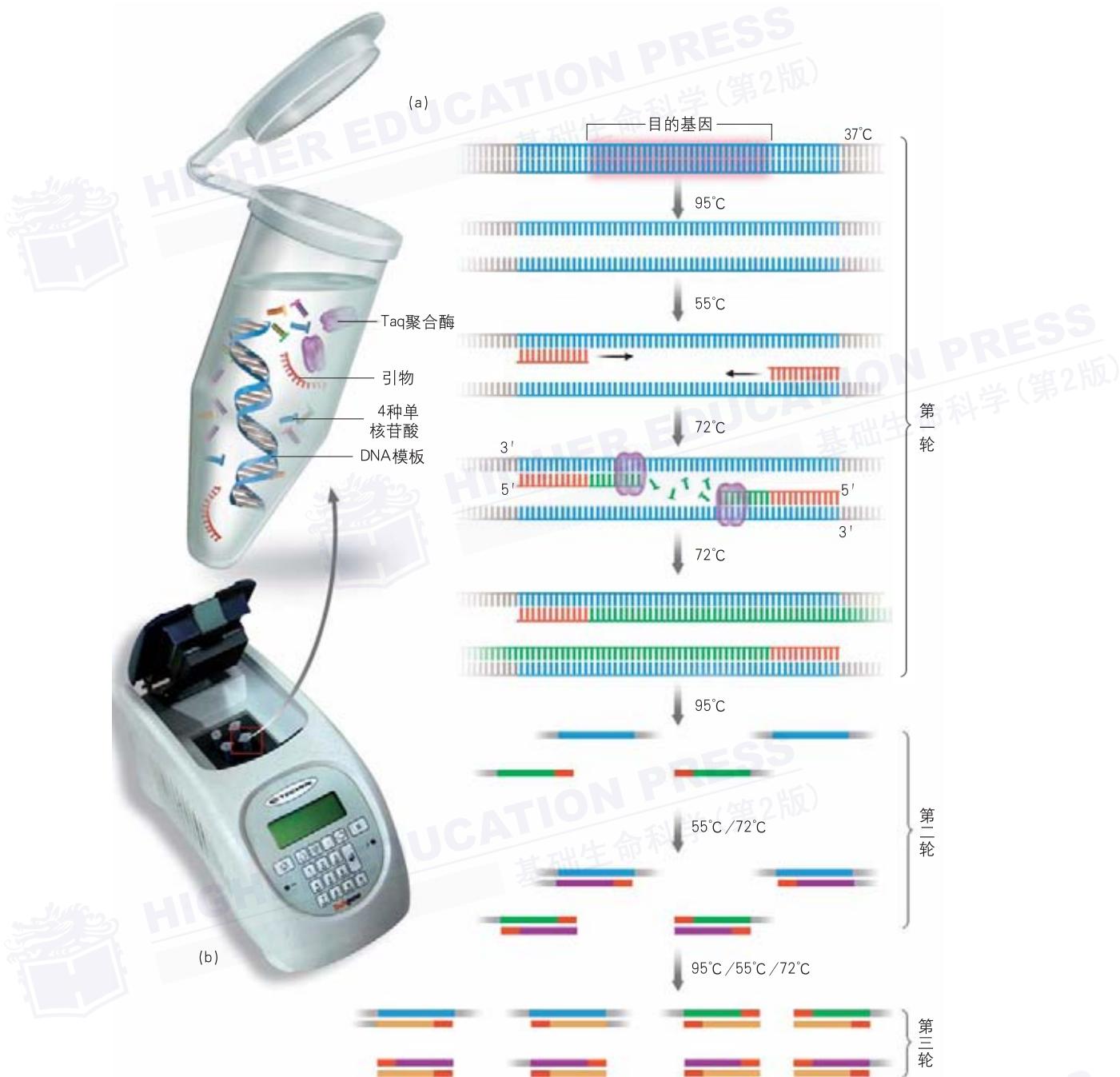


图 12-6 聚合酶链反应 (a) 聚合酶链反应的过程。将微量总DNA、TaqDNA聚合酶、引物及4种核苷酸底物的混合溶液放入 eppendorf管中: (1) 将待扩增双链DNA加热(95℃)变性, 形成单链模板。(2) 降温(55~60℃), 引物以氢键与互补的目的基因外端部相连, 每条DNA序列与一条引物相连。(3) 在TaqDNA聚合酶工作的最适温度(72℃), TaqDNA聚合酶从两个引物的3'羟基端后按照模板的DNA碱基序列合成互补的新生DNA链。重复上述操作, 循环30次, 可以从微量总DNA分子中扩增到大量目的基因。(b) PCR仪。PCR技术问世后, 美国Perkin-Elmer(PE)公司与Cetus公司合作, 制造了世界上第一台PCR扩增仪。仪器改进的核心部件是加热冷却系统和微电脑控制的自动化系统。



图 12-7 Mullis 教授在盘山公路上开车时的联想使他以后发明了 PCR 技术

二、基因重组和克隆

基因重组和克隆操作最重要的工具是限制性内切酶、载体 (vector) 和宿主菌 (host bacterium)。微量的目的基因必须经过基因克隆获得大量的拷贝后，才能实现进一步的重组、转化和表达等操作。

限制性内切酶是从细菌中分离提纯的核酸内切酶，可以识别一小段特殊的核酸序列并将其在特定位点处切开。Werner Arber、Hamilton Smith 和 Daniel Nathans 因为在发现限制性内切酶方面开创性的工作而共同获得了 1978 年的诺贝尔奖。迄今为止，人们已发现和鉴定出了 200 多种限制性内切酶。由于它们可以在 DNA 序列的特殊位点将 DNA 切割成需要的片段，所以被喻为 DNA 操作的分子手术刀。正是因为有了这些分子手术刀，才使基因克隆操作成为现实。图 12-8 列出了几种最常用的限

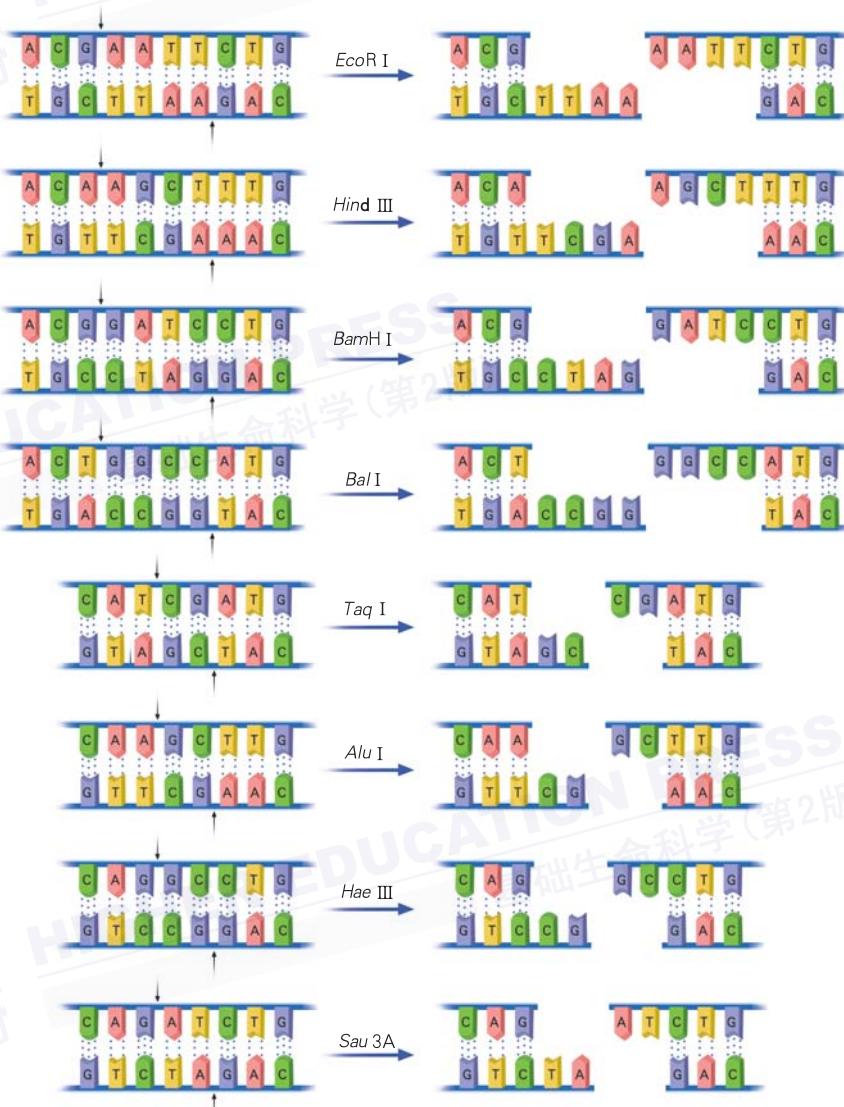


图 12-8 几种常用的限制性内切酶 在 DNA 重组中，用于 DNA 分子切割、片段修饰和连接等的酶统称工具酶。限制性内切酶即为一类切割工具酶，在合适的反应条件下，该酶能使每条链的一个磷酸二酯键断开，产生具有 3'-OH 和 5'-P 基团的 DNA 片段。限制性内切酶根据其来源命名。如从 *Haemophilus influenzae* Rd 中提取的第三种酶叫 Hind III。

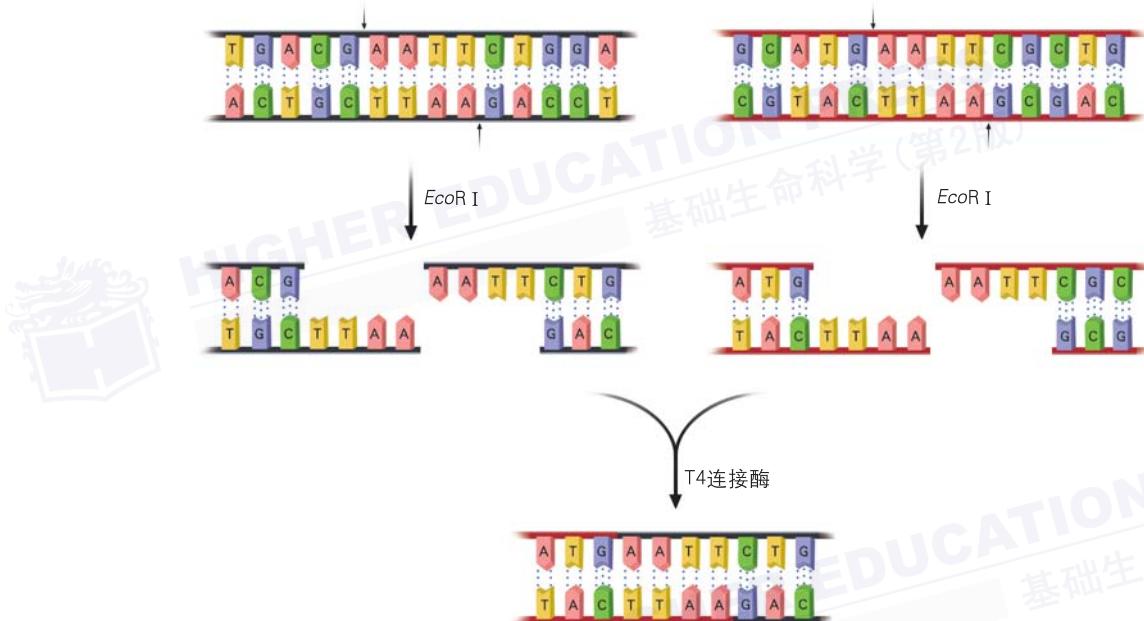


图 12-9 限制性内切酶切开的两个 DNA 双链片段在 T4 连接酶作用下连成重组片段 能催化两个 DNA 片段末端之间—P 基团和—OH 基团形成磷酸二酯键，使两个末端连接的酶称为 DNA 连接酶。现在用于连接 DNA 的连接酶只有两种：由大肠杆菌基因组编码的 DNA 连接酶，称为 *E. coli* 连接酶；由 T4 噬菌体 DNA 编码的 DNA 连接酶，称为 T4 连接酶。

制性内切酶，注明了其来源、缩写名、识别序列和切割位点。

例如，*Eco* RI 是最早被发现的限制性内切酶，它特异性地识别由 GAATTC 及其互补的 6 个碱基组成的双链片段，被 *Eco* RI 切开的双链 DNA 在端口各形成 4 个碱基暴露在外的单链，即形成黏性末端。两条具有碱基互补黏性末端的 DNA 片段在一种称为 T4 连接酶的作用下很容易相互连接起来（图 12-9）。

被限制性内切酶切割开的 DNA 并不能直接进入到细菌等宿主细胞中，切出的目的基因连入到一个合适的载体中，才可能被转入到宿主细胞中并且随之繁殖而复制。载体是运送目的基因片段进入宿主细胞的工具，目前最常用的载体包括细菌质粒、λ 噬菌体、cosmid 质粒等。以下以最常用的细菌质粒 pUC118 为例，介绍该类载体的结构和工作原理。

质粒是细菌细胞中自然存在于染色体外可以自主复制的一段环状 DNA 分子。进入到宿主细胞中的一个质粒可以大量增加其拷贝数。pUC118（或 pUC18，下同）就是一种已经被修饰和改造为适用于基因工程操作的实用质粒载体（图 12-10），它有以下特点：

- (1) 该质粒比较小，可以插入一段较长的DNA片段。
- (2) 进入宿主细菌细胞后，pUC118在每个细胞中可

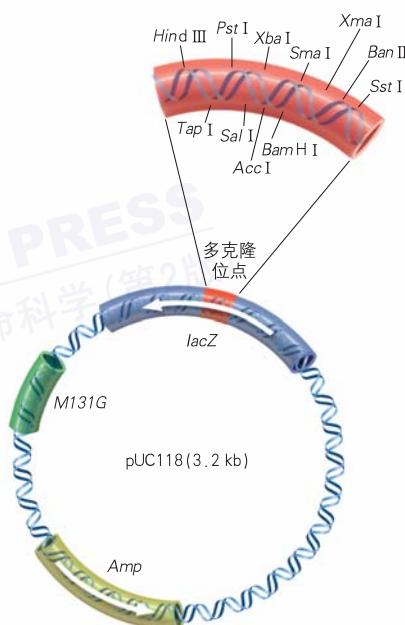


图 12-10 作为克隆载体质粒的基本结构 质粒是细菌细胞中存在于染色体外可以自主复制的一段环状 DNA 分子。载体是在基因工程中，可与包括目的基因的外源 DNA 片段构成重组体，并能将重组体 DNA 导入受体细胞，使目的基因得以复制或表达的 DNA。细菌质粒是目前常用的一种载体。经过人工修饰和改造（如插入一段多克隆位点），可使其成为适用于基因工程操作的实用工具。如质粒 pUC118 就是一种已经被修饰和改造为适用于基因工程操作的实用工具。在 pUC118 中有一段人为设计和插入的具有多种限制性内切酶切位点的序列，即多克隆位点，便于根据目的基因片段的需要，选用不同限制性内切酶分别对质粒和外源 DNA 进行切割，产生相互匹配的末端，方便了进一步连接。

复制形成大约 500 个拷贝，于是也大大增加了插入在该质粒中的外源目的基因的拷贝数。质粒载体上的外源基因片段在宿主细胞中，通过宿主的无性繁殖被大量复制的过程称为基因克隆。

(3) 在 pUC118 中有一小段人为设计和插入的具有多种限制性内切酶位点的序列，即多克隆位点(图 12-10)。在这一段序列上，可根据目的基因片段的需要，选用不同的限制性内切酶对质粒进行切割，再对外源 DNA 进行切割，产生相互匹配的末端，为进一步的连接提供了方便。

(4) pUC118 中有一个 lacZ 基因，上述的多克隆位点就位于 lacZ 基因之中(图 12-10)。lacZ 基因编码 β -半乳糖苷酶的一个蛋白亚基。它可以使细菌在含有 X-gal(5-溴-4-氯-3-吲哚- β -D-半乳糖)底物和 IPTG(一种乳糖类似物)的培养基上形成蓝色的菌落，即 X-gal 被 lacZ 基因编码产生的 β -半乳糖苷酶水解成蓝色。

当外源 DNA 片段插入到多克隆位点区时就隔断了 lacZ 基因，使 lacZ 基因失去活性和表达功能。因此，凡是插入了外源 DNA 片段的 pUC118(重组质粒)进入到宿主细菌后，这些细菌由于不能利用 X-gal，结果在含有 X-gal 底物的培养基上形成了白色的菌落，而不是蓝色的菌落。如此，利用这一特性很容易将携带重组质粒的细菌克隆从没有携带重组质粒的细菌中筛选出来(图 12-11)。

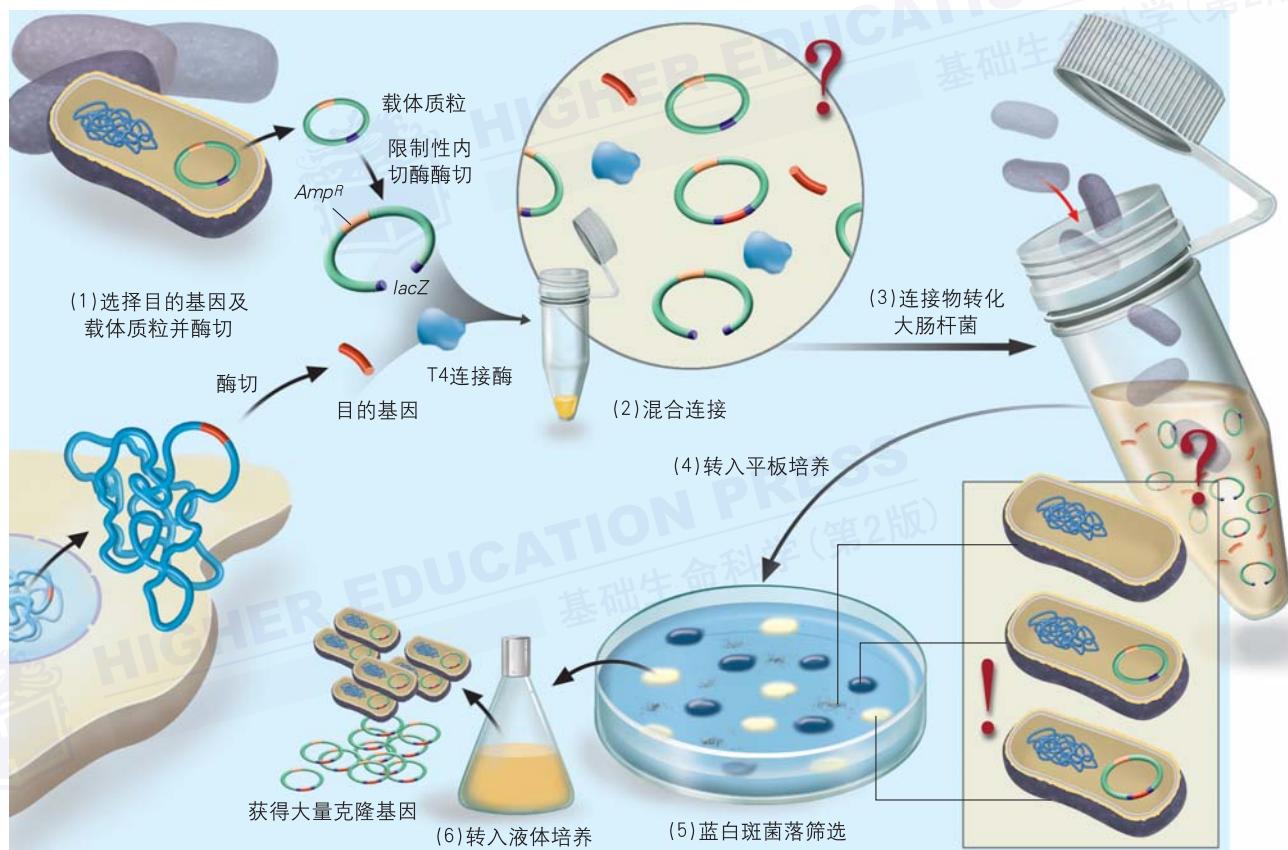


图 12-11 将目的基因克隆到大肠杆菌中的操作步骤 (1) 选择合适的限制性内切酶分别对外源目的基因和载体质粒进行酶切。(2) 然后将两者混合，用 T4 连接酶连接以形成重组质粒。(3) 将混合并被连接处理后的 DNA 混合物统统加入到大肠杆菌的细胞中，对大肠杆菌进行转化，即让可能形成的重组质粒进入到大肠杆菌中并随之繁殖而复制。由于 DNA 混合物中的情况较复杂，有的质粒没有连入外源目的基因便闭合了，虽然正确连入的几率较小，但有的质粒还是连入了外源目的基因。(4) 将被 DNA 混合物转化后的细菌倒入含 X-gal、IPTG 和氨苄青霉素的培养基平板上。(5) 经过保温培养，凡是沒有载体质粒进入的大肠杆菌在平板上都被氨苄青霉素杀死(如图中平板上的黑色斑点痕所示)，凡是有载体质粒进入的大肠杆菌在平板上都能抗氨苄青霉素，因此生长繁殖成由无数大肠杆菌堆积成的小菌落，其中，如果外源目的基因没有插入 lacZ 基因中，携带这样质粒的大肠杆菌能够正常表达半乳糖苷酶，后者使 X-gal 水解成蓝色，因此这样的菌落呈蓝色；而插入了目的基因的重组质粒，lacZ 基因被外源 DNA 隔断而失活，携带重组质粒的大肠杆菌不能利用 X-gal，因此形成白色菌落。(6) 挑出(筛选)出白色菌落，转入液体培养，随着大肠杆菌的分裂，全部大量的大肠杆菌细胞中都有含目的基因的质粒，如此目的基因便被克隆了。

(5) pUC118还携带了氨苄青霉素抗性基因(*Amp^R*)，它使细菌能在含氨苄青霉素的培养基中生长，而没有转入pUC18的细菌则全部会被杀死。因此，用含氨苄青霉素的培养基可很方便地对携带pUC18的细菌做筛选。

基因克隆过程是通过将携带目的基因的重组DNA分子转入到宿主细胞中来完成的。有一些原核生物和真核生物或噬菌体都可以是基因克隆的宿主。在实验室中，大肠杆菌是一种常用的宿主菌。将目的基因转入到大肠杆菌细胞中的操作步骤(图12-11)通常包括：

(1)用特定的限制性内切酶酶解(切割)已获取的目的基因片段和质粒载体；

(2)用T4连接酶将已形成特定末端序列的目的基因与质粒相互连接，形成重组DNA分子，即重组质粒；

(3)用物理方法处理大肠杆菌细胞，使其易于接纳外源重组DNA分子(制备感受态细胞)，在大肠杆菌细胞中加入了少量重组DNA分子后，使其进入到宿主细胞中，这一过程又称为转化(transformation)；

(4)培养大肠杆菌，让重组DNA分子及其外源目的基因形成大量的拷贝；

(5)用抗生素和X-gal筛选出含重组质粒的大肠杆菌细胞；

(6)将筛选出含重组质粒的大肠杆菌转入液体培养，获得大量遗传背景相同的细胞，从中分离出质粒，进行DNA分子的检查，确定目的基因已被正确克隆，或直接对已克隆了目的基因的大肠杆菌细胞进行鉴定。

以真核生物或噬菌体作为基因克隆宿主的有关操作步骤和原理可进一步阅读其他有关分子生物学教材。

实验室一般常用酶切和电泳方法来检查克隆的基因。科学家们首先用类似于提取分离细胞中总DNA的方法将克隆了目的基因的重组质粒从大肠杆菌中分离出来，根据在载体部分和目的基因片段上已知的酶切位点，选择合适的限制性内切酶对重组质粒进行酶解，然后利用琼脂糖凝胶电泳的方法对大小不等的酶解片段进行分离和鉴定。

凝胶电泳(gel electrophoresis)是用于分离、纯化和鉴定DNA片段最常规的实验技术。DNA片段上的磷酸基团都带有负电荷，把大小不同的DNA片段装入琼脂糖凝胶(包含电解质的多孔支持介质)一端并将其置于静电场中，DNA分子便向阳极移动。DNA长度增加，来自电场的驱动力和来自凝胶的阻力之间的比率就会降低，

不同长度的DNA片段就会表现出不同的迁移率。即较长的DNA分子(片段)电泳迁移率低，在凝胶上移动慢，较短的DNA分子(片段)电泳迁移率高，在凝胶上移动快，因而就可依据DNA分子的大小来使其分离。该过程可以通过把示踪染料和相对分子质量标准参照物与样品一起进行电泳而得到检测。相对分子质量标准参照物可以提供一个用于确定DNA片段大小的依据。最后，根据电泳条带分析的结果，可知重组质粒经酶切后产生了大小为多少的几段DNA分子，是否与所设计构建的重组质粒结构相吻合(图12-12)。

除了从细菌细胞中提取质粒做酶切电泳分析或DNA测序分析外，还可以利用DNA杂交的技术直接鉴定带有重组质粒的细菌克隆。根据重组质粒上目的基因的部分DNA序列，人工合成(或用PCR技术合成)与之互补的一小段单链DNA(或RNA)，利用带有³²P-磷酸的dATP使其标记上放射性同位素，这一小段与重组质粒上目的基因的部分序列互补的核酸分子称为**DNA探针**(DNA probe)。短小的DNA探针可以通过氢键特异性地与重组质粒上的目的基因DNA分子相结合，使其被同位素所标记。根据这种核酸杂交(nucleic acid hybridization)的原理，便可从许多未知的菌落中挑选出克隆了目的基因的菌落。利用核酸杂交技术鉴定克隆基因的具体的操作步骤包括：(1)将琼脂培养基上的菌落原位印迹(转移)到一张滤膜上。(2)对滤膜及细胞做原位物理和化学处理，使其DNA暴露并变成单链；将同位素探针液加入到滤膜上保温一定时间使之与克隆的目的基因杂交。(3)冲洗滤膜，除去未结合的探针分子；将滤膜铺放在光学胶片上，具有放射性同位素的杂交分子造成光学胶片的原位局部曝光，即放射自显影。(4)根据光学胶片上放射自显影的具体斑点位置，确定和挑选出克隆了目的基因的菌落(图12-13)。

三、转化受体细胞和转化子筛选

基因克隆以后便有了大量目的基因，下一步就是使其在合适的宿主细胞中表达，产生需要的基因表达产物或使宿主生物具备所需要的性状，同时，该外源目的基因还能在宿主细胞中稳定地遗传。这一过程就是遗传转化。所谓合适的**宿主细胞**就是接纳外源DNA的细胞，它们可以是细菌等原核生物，也可以是植物或动物细胞。

如果需要让克隆的基因表达和产生大量的编码蛋

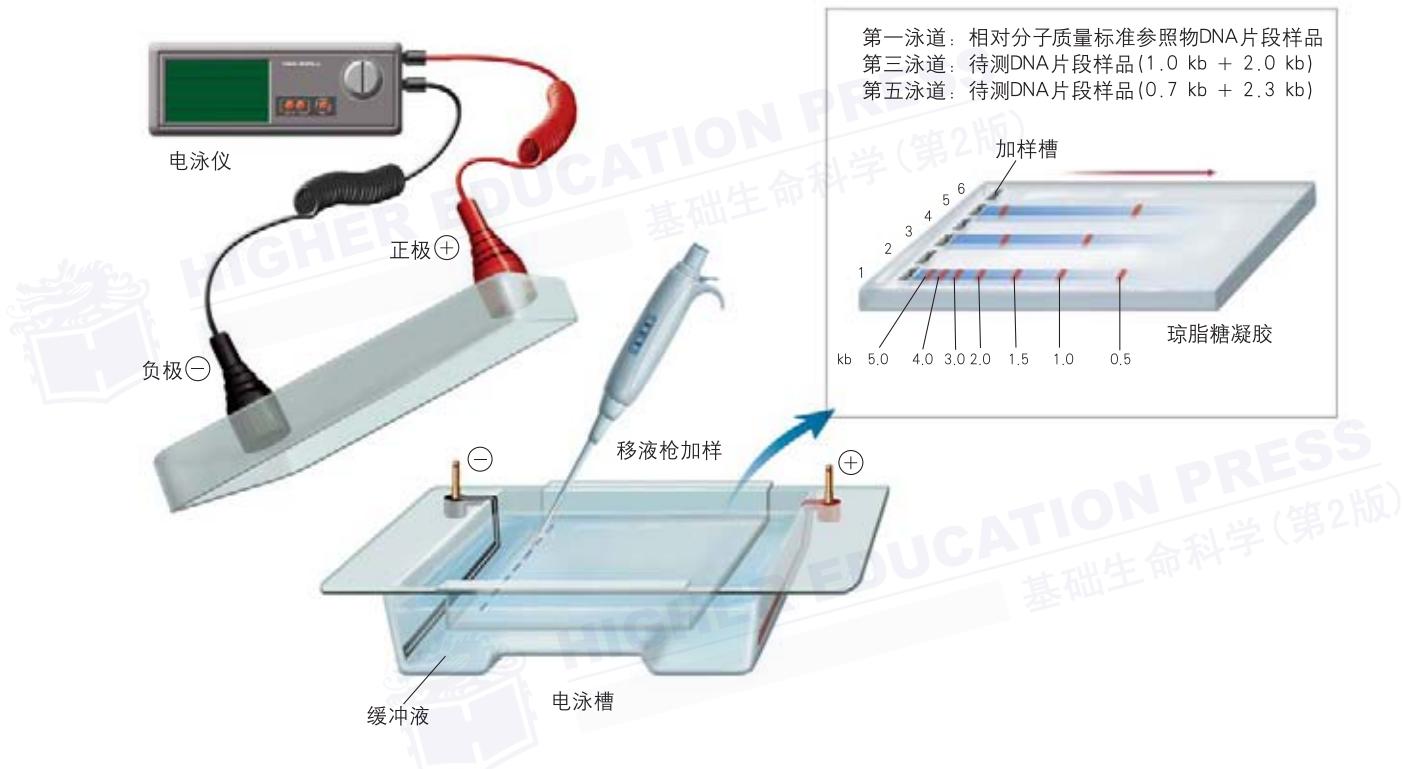


图 12-12 DNA 片段的凝胶电泳 凝胶电泳是用于分离、纯化和鉴定 DNA 片段最常规的实验技术。以凝胶作为介质, 将凝胶浸泡在电泳槽内的缓冲液中, 带有负电荷的 DNA 片段在电场作用下将在介质中泳动。不同长度的 DNA 片段会表现出不同的迁移率, 因而就可依据 DNA 分子的大小来使其分离。该过程可将相对分子质量标准参照物与样品一起电泳, 以提供一个用于确定 DNA 片段大小的依据。一般来说, 较长的片段落于后方, 较短的片段位于前方, 可用染色、荧光标记或同位素标记将其显示。

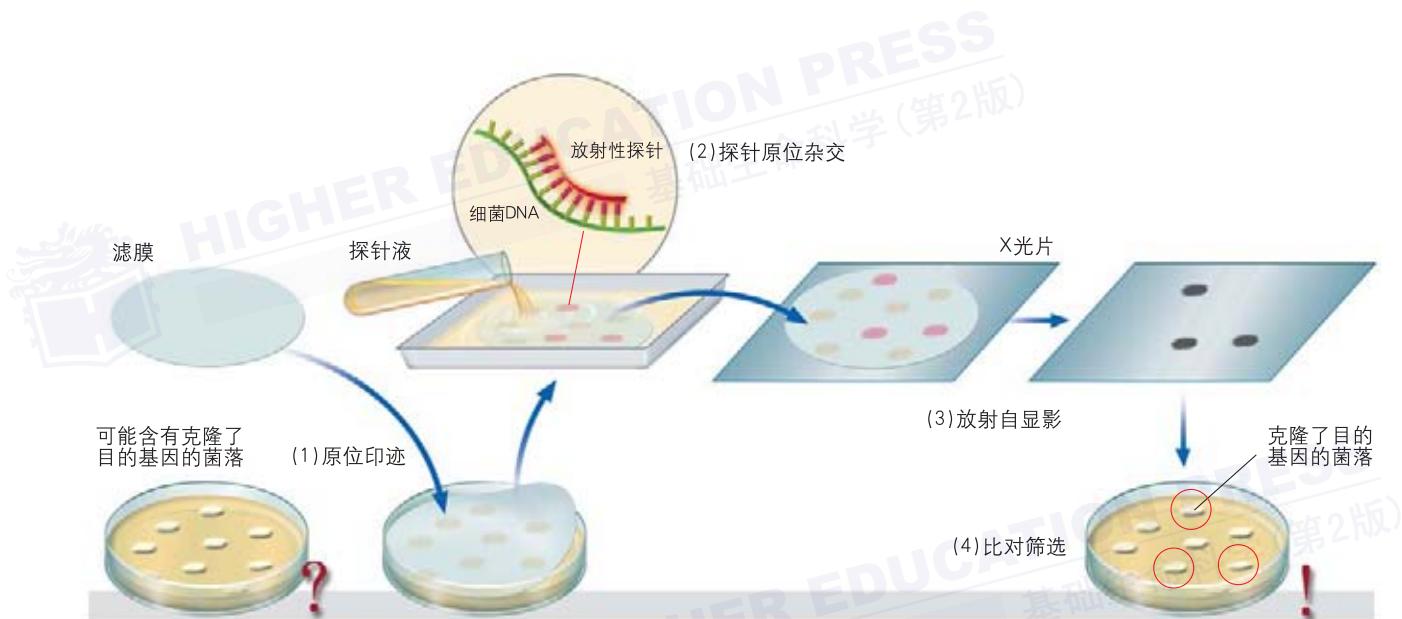


图 12-13 利用 DNA 杂交技术直接鉴定携带克隆基因的菌落 (1) 将原培养基上的菌落原位转移至滤膜。(2) 对滤膜进行物理和化学处理, 使其上细菌 DNA 变性成为单链; 将含有放射性同位素的探针液(含有人工合成的与目的基因部分序列互补的单链 DNA 或 RNA)加入滤膜, 保温, 使探针与菌落印迹中可能的目的基因杂交。(3) 冲洗去滤膜上未结合的探针分子, 具有放射性同位素的杂交分子使光学胶片的原位局部曝光。(4) 根据光学胶片上曝光部位, 确定和挑选克隆了目的基因的菌落。

白，科学家们往往将该基因插入到一种表达载体中，用带有目的基因的表达载体再转化大肠杆菌，对大肠杆菌进行大量培养使该目的基因在大肠杆菌细胞中大量表达和积累，通过对表达产物的分离纯化，便可以获得需要的产物。

通过DNA体外重组技术构建的重组质粒还可以直接用以转化蓝藻（又称蓝细菌）等原核生物或其他一些原生生物，如单细胞绿藻等。例如，*chlL*基因是蓝藻（蓝细菌）*Synechocystis* sp. PCC 6803（简称S.6803）中控制叶绿素合成的基因。为了研究*chlL*基因的功能，研究该基因对叶绿素合成的控制及相关的光合作用机理，需要构建该种生物缺失*chlL*基因的突变株细胞。本书作者设计了如图12-14所示的技术路线并在实验室中实施DNA的操作。首先，用PCR技术扩增S.6803的*chlL*基因片段，将它克隆到质粒pUC118（与pUC18类似的质粒）中，获得pFQ2质粒。将pFQ2质粒中*chlL*基因中部0.8 kb的*Bst*I-*Nhe*I片段删除，用一段来源于pRL-425质粒的红霉素抗性基因取代之，得到重组质粒pFQ22。将pFQ22质粒直接加入到S.6803细胞中用以转化S.6803

野生型细胞，部分重组质粒直接进入到S.6803野生型细胞中后与野生型细胞染色体DNA相应的片段发生同源重组，即部分相同DNA序列的两个片段间发生交换，使染色体DNA相应片段通过重新组合变化，产生出缺失*chlL*基因的突变株细胞。用含30 mg/L红霉素的培养基平板可以将转化子（缺失*chlL*基因的突变株细胞）筛选出来。

植物和动物的遗传转化常用的方法包括载体法转化和基因的直接转移。利用农杆菌介导的转化是以经过改造的农杆菌Ti质粒为载体，将外源基因转入植物细胞中。例如将农杆菌与植物原生质体（去除了细胞壁的植物细胞）共同培养，然后诱导转化细胞分化并再生植株。基因的直接转移方法包括：①利用高压电脉冲的电激穿孔作用把外源DNA引入动植物细胞或组织中；②基因枪法，用粒子枪把表面吸附有外源DNA的金属微粒高速地射入动植物细胞或组织中（图12-15）；③微注射法，利用显微注射仪等将外源DNA直接注入细胞核或细胞质中。对于植物细胞，常用除去了细胞壁的原生质体为受体；对于动物细胞，常用的受体包括受精卵、胚胎干细胞等。与目的基因在大肠杆菌或蓝藻等原核生物中的转化和表达相比较，对植物或动物的遗传转化往往要困难和复杂得多，这一部分的详细操作可进一步阅读有关分子生物学和生物技术专著。

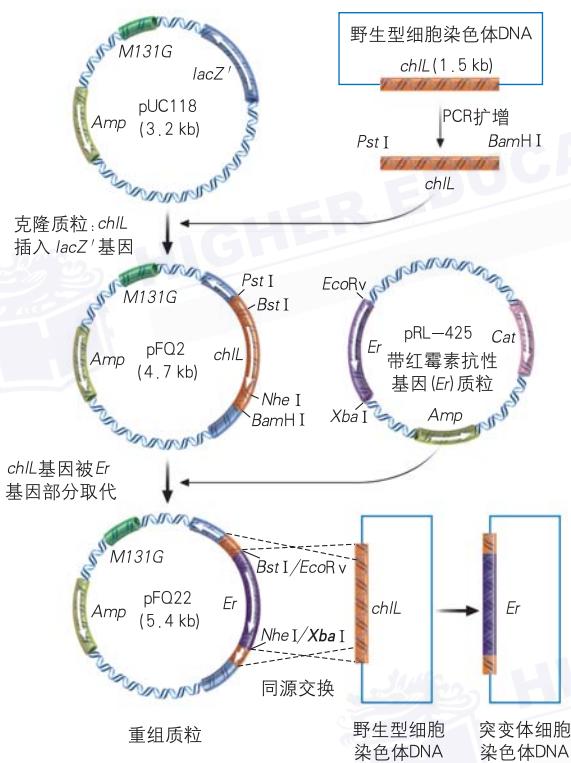


图12-14 构建缺失*chlL*基因的蓝藻突变株

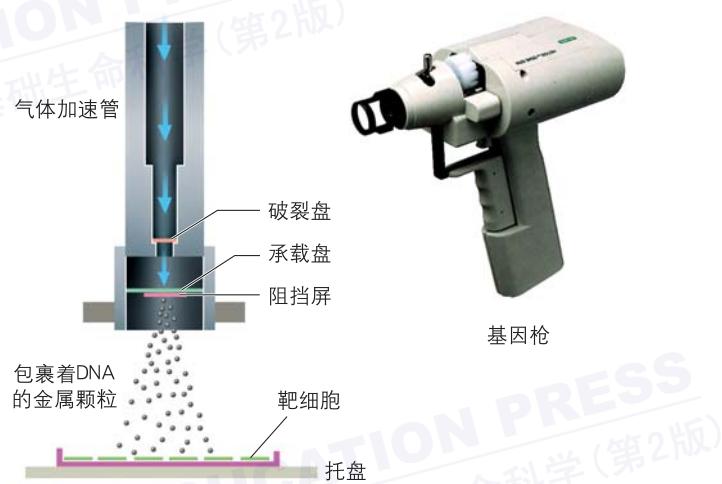


图12-15 基因直接转移的基因枪法 左图为基因枪工作原理示意图。利用微小的金、钨等金属颗粒将DNA吸附，然后利用高压气体冲击金属颗粒，当压力超过破裂盘的承受能力，气体喷出，经过加速的颗粒射向靶细胞。由于颗粒的直径一般在0.5~0.9 mm之间，远小于细胞，因此可直接将DNA导入质粒中，这种方法能有效地使DNA在活体组织、贴壁细胞和悬浮细胞中表达。右图示基因枪外部形状。

四、转化子分析——Southern印迹

通过 PCR、酶切、连接、克隆、转化、筛选等一系列 DNA 的操作, 获得了转基因生物(transgenic organism)(又称转化子)后, 常用核酸杂交的方法对转基因生物中外源目的基因的情况进行检测和分析。为了纪念其发明者 Edward Southern, 这种核酸杂交的技术被称为 **Southern 印迹**(Southern blot)。它的具体操作过程包括以下步骤(图 12-16): (1) 从转化子中提取出总的 DNA; (2) 根据外源目的基因片段上和前后的酶切位点情况选择合适的限制性内切酶, 对总 DNA 进行酶解; (3) 对酶解产物做琼脂糖凝胶电泳, 与重组质粒酶切后只形成很少的 DNA 片段不同, 总 DNA 上有许多相同的酶切位点, 酶解后产生出许多 DNA 片段。因此, 在琼脂糖凝胶上形成许多连续无法辨认的条带, 其中可能有外源目的基因的片段和相应的酶切位点; (4) 在电泳后的凝胶上覆盖一片杂交滤膜, 上下铺盖许多纸巾并压一重物, 通过纸巾的毛细管吸水作用, 琼脂糖凝胶上的全部 DNA 条带便转移印迹到滤膜上; (5) 用碱性溶液对滤膜及 DNA 做变性处理, 使双链 DNA 解开成为单链分子; (6) 用与外源目的基因的部分序列互补、并带有放射性同位素的核酸分子作为 DNA 探针, 将同位素探针液加入到滤膜上保温一定时间使之与外源目的基因的 DNA 变性单链杂交形成双链分子; (7) 用缓冲液冲洗滤膜, 使其他不能互补的多余放

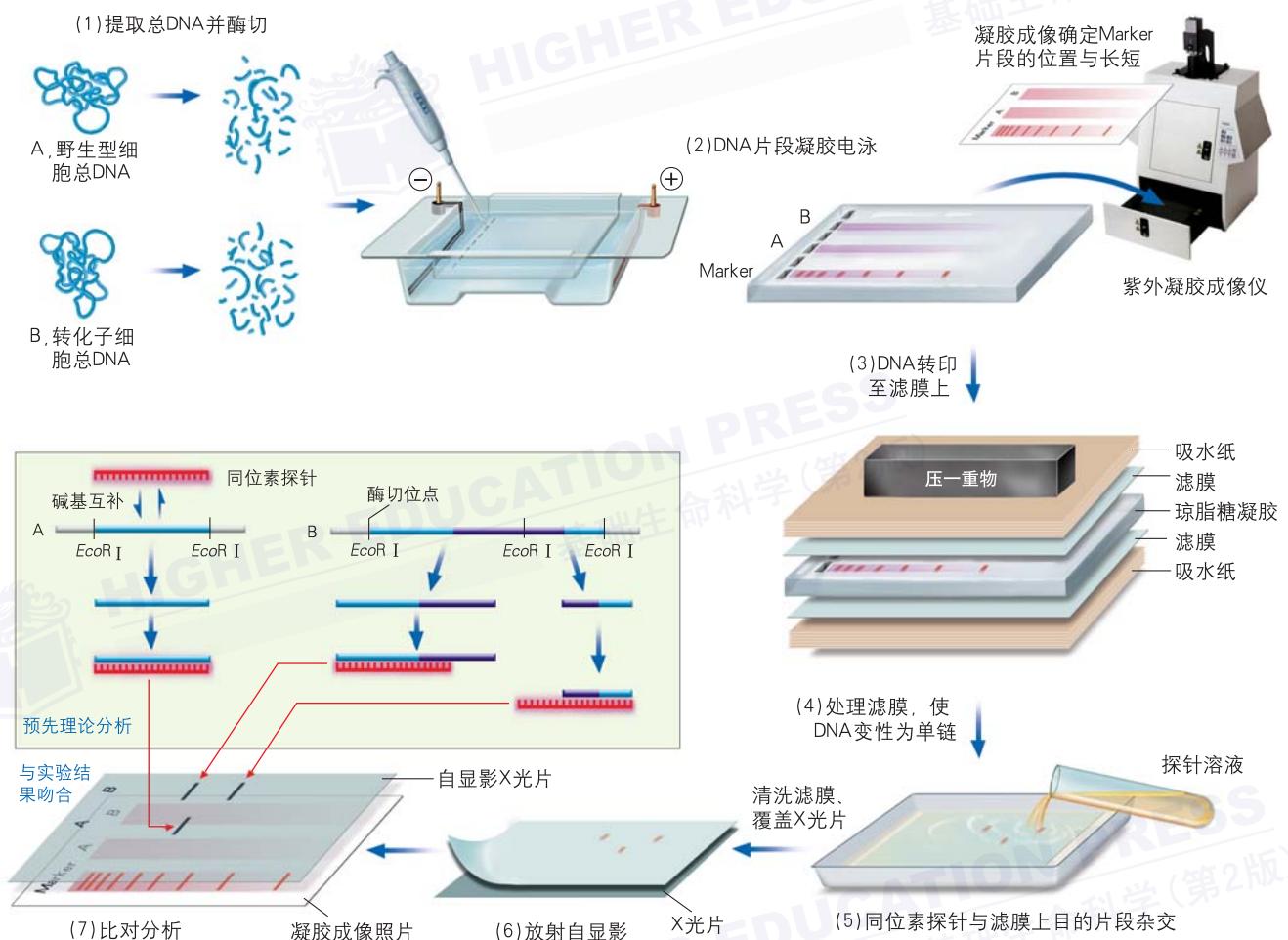


图 12-16 Southern 印迹实验过程 (1) 分别从野生型和突变体细胞中提取总 DNA, 选择适当的限制性内切酶分别对它们进行酶切。(2) 对两种样品的酶切片段分别进行凝胶电泳分离, 再对凝胶上分离的 DNA 片段拍照(成像)。(3) 在电泳后的凝胶上覆盖一片杂交滤膜, 上下覆盖吸水纸并压一重物, 使凝胶上 DNA 条带转印至滤膜。(4) 对滤膜做物理和化学处理, 使 DNA 变性为单链分子。(5) 加入与外源目的基因部分序列互补, 并带有放射性同位素的探针杂交。(6) 冲洗去滤膜上多余的探针分子, 覆盖 X 光片, 滤膜上的放射性片段显影至胶片。(7) 根据胶片上具体条带位置, 以野生型细胞总 DNA 的杂交结果为对照, 分析确定在转化子中是否存在外源目的基因及相应的酶切位点。

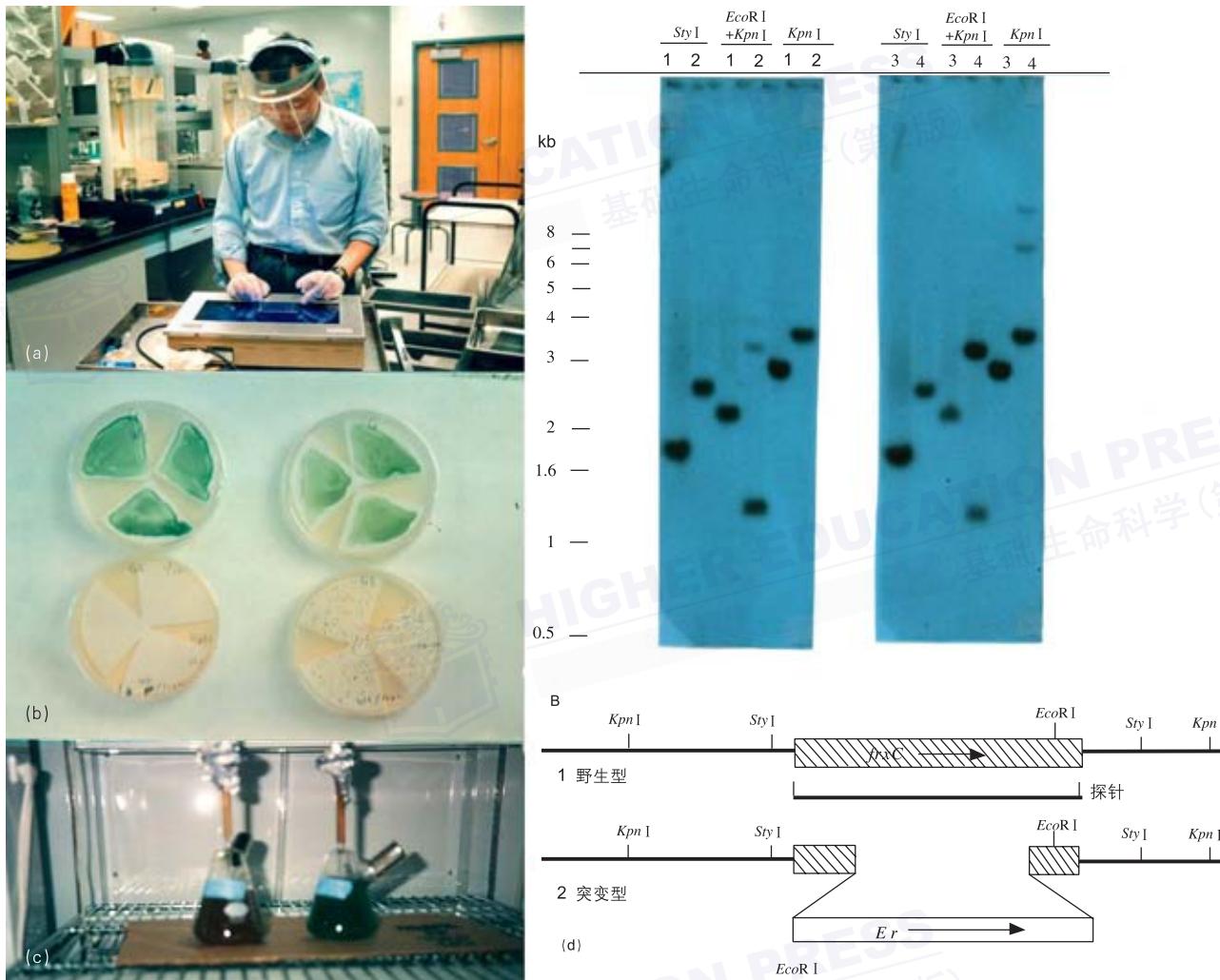


图 12-17 缺失 *chlL* 基因的蓝细菌 (S.6803) 突变株细胞 Southern 印迹实验及其分析结果 (a) 作者正在做 DNA 体外重组实验。(b) 用抗生素筛选转化子细胞。(c) 培养突变株 (转化子) 细胞。(d) Southern 印迹实验结果显示, 外源目的基因 (*Er*) 已经转入突变株细胞中。

射性探针分子被除去; (8) 把杂交后的滤膜铺放在光学胶片上, 具有放射性同位素的杂交分子造成光学胶片的原位局部曝光, 即**放射自显影**; (9) 根据光学胶片上放射自显影的具体条带位置, 以野生型细胞总 DNA 的 Southern 印迹实验结果为对照, 分析确定在转化子总 DNA 中是否存在外源目的基因及相应的酶切位点。图 12-17 显示了缺失 *chlL* 基因的蓝细菌 (S.6803) 突变株细胞 (转化子) 与野生型细胞比较的 Southern 印迹实验及其分析结果。

对转化子的分析检测还可以用其他有关分析技术, 例如, 对转基因生物中的外源目的基因片段进行核苷酸的序列测定等等。

1973 年, 由美国斯坦福大学教授 Cohn 和美国加州

大学教授 Boyer 带领各自的研究组几乎在同时分别完成了 DNA 体外重组, 一举打开了基因工程学的大门, 生命科学领域由此掀起了一场技术革命。

第三节 蛋白质工程、发酵工程和细胞工程简介

一、蛋白质工程

生物体中, DNA 是基本遗传物质, 通过基因的复制、转录、翻译和表达调控, 细胞中所有的代谢过程受到精确地控制。但是, DNA 本身不直接参与细胞结构的组成, 也不直接参与和催化代谢反应。对生物体的结构和功能直接发生作用的是 DNA 表达产物——蛋白质。因此, 通

过工程化方法直接设计、改造或合成出具优良性质和功能的蛋白质产品或酶制剂产品，具有立竿见影的商业效果。一些科学家甚至提出，“后基因组时代”将是“蛋白质组学时代”，即从对基因信息的研究转向对蛋白质信息的研究，包括研究蛋白质结构、功能与应用以及蛋白质相互关系和作用。**蛋白质工程**（protein engineering）就是在对蛋白质的化学、晶体学、动力学等结构与功能认识的基础上，人工改造与合成蛋白质，从而获得具有商业化价值的产品。在现阶段，蛋白质工程主要是改造和表达现有的蛋白质，包括通过修改氨基酸序列来改善蛋白质的结构或构象，以提高蛋白质的活性、稳定性和产率。

蛋白质工程的主要步骤通常包括：（1）从生物体中分离纯化需要改造的目的蛋白；（2）测定其氨基酸序列；（3）借助于核磁共振和X射线晶体衍射等实验手段，尽可能地了解蛋白质的二维重组和三维晶体结构；（4）设计各种处理条件，了解蛋白质的结构变化，包括折叠与去折叠等对其活性与功能的影响；（5）设计编码该蛋白的基因改造方案，如通过改变其中的核苷酸，来改变蛋白质的一级结构，造成一个氨基酸的插入、缺失或被替换（又称为点突变），使蛋白质的活性中心或整个构象发生变化，其中包括选择合适的载体和宿主来表达改造过的基因片段；（6）分离、纯化新蛋白，功能检测后投入实际使用。例如，研究人员通过在蛋白质分子中导入二硫键，提高了某种蛋白酶的热稳定性（图12-18）。具体

的做法是，用点突变的方法将蛋白质分子第3位的异亮氨酸（Ile3）变成半胱氨酸（Cys3），使之与97位上的半胱氨酸（Cys97）之间形成二硫键。科学家们还通过定点诱变，改造了枯草杆菌的Tyr-tRNA合成酶的活性中心，增加了酶对底物的亲和力，从而提高了酶的催化活性。另外，研究人员在组织纤溶酶原激活物（tPA）、人的生长激素（GH）、人胰岛素等蛋白质工程的研究方面也取得了不同程度的进展。

研究一些蛋白质的结构、功能、与其他蛋白质或化学物质的相互作用，据此设计和生产特殊构型和构象的分子药物，用这些分子药物与特定的蛋白质结合或作用，提高或减低该蛋白的活性，用以控制人体内某些特定的代谢反应，达到治疗特定疾病的目的，也属于蛋白质工程的内容。

目前已被人们发现的蛋白质酶有几千种。用蛋白质工程技术改造的蛋白酶投入商业应用的虽然很少，但已经显示了诱人的发展前景。

二、发酵工程

1854年，Pasteur首创了著名的“巴斯德消毒法”，又用令人信服的实验证明了酵母菌在发酵中的基本作用，奠定了发酵工程的基础。早在19世纪，人们就利用微生物发酵大规模酿酒，后来又生产酒精、乳酸、面包酵母、柠檬酸和蛋白酶等初级代谢产品。现代发酵工程主要是

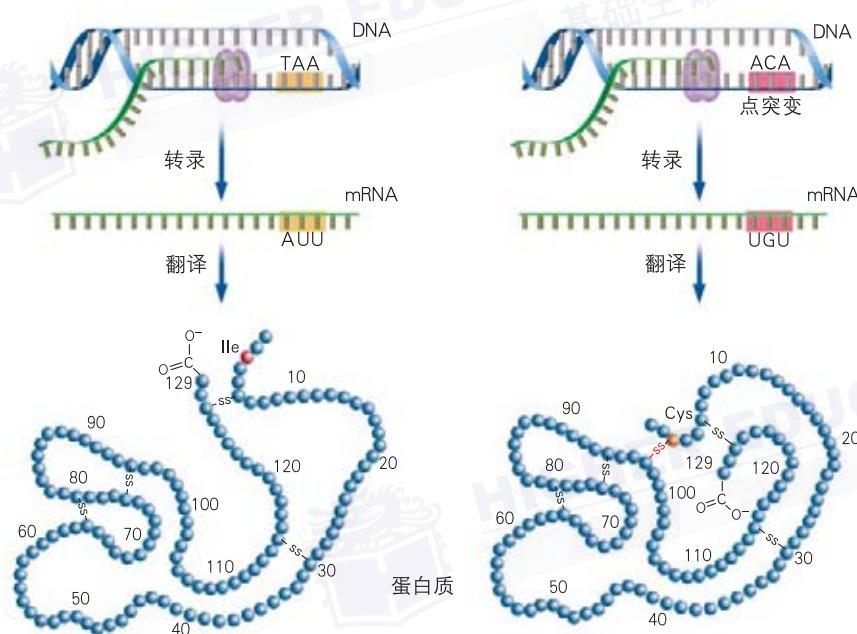


图 12-18 用基因的点突变技术改变蛋白酶的活性 蛋白质工程中的点突变技术是与基因的点突变相呼应的。基因控制蛋白质的合成，改变基因上含氮碱基的种类、数目和排列顺序即可改变蛋白质的活性中心和空间构象，如镰形细胞贫血症的发生。蛋白质工程中的点突变技术就是通过设计编码该蛋白的基因改造方案，来达到改造蛋白质的目的。



图 12-19 发酵工程现场 (a) 用于微生物发酵实验的发酵罐。发酵罐分为机械搅拌式发酵罐(包括通用式发酵罐和自吸式发酵罐)、通风搅拌式发酵罐和厌氧发酵设备。(b)生物技术公司内的发酵车间。现代发酵工程应用的范围广泛,其过程中对培养基的养分、温度、搅拌、通气、pH等条件的要求很苛刻,现代大型发酵罐或生物反应器就适应了这种需要,有自动化、高效化、功能多样化、大型化等特点。

指利用微生物、包括利用DNA重组技术改造过的微生物在全自动发酵罐或生物反应器中生产某种商品的技术。发酵工程的产品从食品、药品、精细化工产品到许多工业用原料等等,范围非常广泛。

现代发酵工程是分子生物学、生物代谢、微生物生长动力学、大型发酵罐或生物反应器研制、化工原理密切结合和应用的结果。因此,除了需要了解发酵产品在细胞内的代谢过程与机理,搞清楚培养基的养分、温度、搅拌、通气、pH、收获时间和批次等对微生物生长、发酵产物产量与质量的影响以外,研制和选用适合的发酵罐或生物反应器也十分重要,因为将实验室内的微生物的培养过程转为工业化生产过程并非只是简单的规模放大,涉及到许多条件参数的改变和监测技术与控制技术的应用,还涉及大型发酵设备及其培养基的灭菌工艺的设计与优化(图12-19)。一般发酵工程包括以下基本步骤:

①菌种选育,即筛选和培育出生长快、产物含量高、易于大规模培养的微生物菌种,还包括利用细胞诱变或基因工程技术改造获得的工程菌等;②细胞大规模培养即发酵过程,这一过程需要设置一系列有利于细胞生长和

发酵产物产量增加的条件,需要对发酵条件和产物产量与质量实时监测与控制;③生产活性的诱导,采用各种化学或物理方法在发酵过程的特定阶段诱导产生最多所需要的代谢产物;④菌体及产物的收获,利用浓缩、吸附、过滤、离心、萃取、干燥、重结晶等手段对微生物细胞进行收获,从细胞或培养液中分离纯化所需要的代谢产物。

如果把整个微生物生物技术产品的研制过程比作河流,基因重组及微生物育种技术应属于上游技术,微生物的发酵生产技术是其中的生物反应工程,发酵液及微生物细胞中的产物分离到产品的制作技术则是生物技术产品研制过程的下游技术。发酵工程下游技术的工艺流程一般可包括预处理、提取、精制和成品制作等4个阶段(图12-20)。

现代发酵工程在工业和医药等领域应用非常广泛,常见的商业化产品的种类见表12-2。除了上表中列出的产品种类外,研究人员利用发酵工程还开发生产出了一种名为聚β-羟基丁酸酯的生物可降解塑料(简称PHB)。PHB物理化学性质与塑料相似,在自然条件下可被微生物



图 12-20 发酵工程下游技术的工艺流程及具体技术方法

表 12-2 部分现代发酵工程产品种类

抗菌素	有机酸	抗肿瘤剂	神经系统药物
色 素	除草剂	抗氧化剂	各类气体化合物
类固醇	杀虫剂	心血管药物	有机化学溶剂
核苷酸	多肽类	抗病毒剂	免疫调节剂
酶制剂	氨基酸	维生素	食品与饮料

物分泌的酶降解,因而不会在环境中积累造成白色污染。PHB在微生物体内的代谢途径已经研究清楚,其合成原料为乙酰CoA,代谢反应过程有一系列的蛋白酶参与。经过多年的研究,英国ICI公司采用真养产碱杆菌突变株在限磷条件下发酵,获得了 β -羟基丁酸及 β -羟基戊酸酯共聚物塑料,商品名为Biopol。以后研究人员以葡萄糖、蔗糖和丙醇等为原料,用转PHB基因的大肠杆菌进行发酵生产PHB,其表达量可达到菌体干重的70%左右(图12-21)。可以预见,随着生物技术的快速发展,发酵工程技术将会为人类提供更多更好的产品。

三、细胞工程

细胞工程是指通过组织、细胞和细胞器水平上的筛选或改造,获得有商业价值的细胞株、细胞系或细胞组织,再通过规模培养,获得特殊商品的技术与过程。细胞工程包括动物细胞工程和植物细胞工程,它们分别以动物细胞和植物细胞为主要生产对象,以细胞或组织培养为主要过程和内容。

将动物组织或细胞分散成单个细胞,在模拟机体内的生长环境条件下,使其在体外环境继续生长增殖的过程,称为**动物细胞培养**。体外培养可分为原代培养与继代培养。原代培养是指将机体取出的组织或细胞进行初

次培养的过程,初次培养的细胞大约繁殖10代左右,称为原代细胞。此时,细胞分裂增殖扩展连片,占满器皿表面,这时需对其进行分离重新培养,称为**继代培养**。

动物细胞培养的操作步骤包括,先对动物体的胚胎、肌肉、肾脏等组织经酶解消化分离出单个细胞。例如,成纤维细胞的培养就是先从人的组织中取下一小片样品,经胰蛋白酶酶解,消化组织中的胶原纤维和细胞外的其他成分,获得单个的成纤维细胞悬浮液;然后将分散的细胞转入含有葡萄糖、氨基酸和无机盐的特殊培养液中,于二氧化碳培养箱中进行保温培养;再将原代细胞分装到多个扁形的瓶中进行继代培养(图12-22)。研究人员还发展了1L和100L的动物细胞培养反应器。利用动物细胞工程生产的产品以一些药品为主,包括集落刺激因子(CSF)、红细胞生成素(EPO)、抗血友病因子、组织纤溶酶原激活物(tPA)等等。

植物细胞培养与动物细胞相比有较大的差异。一些单细胞的低等植物如单细胞藻类的大规模培养成为细胞工程的重要组成部分(图12-23),原因是微体藻类本身的优点与特征:

(1)没有根、茎、叶,整个植物体都具有营养价值,只有极少的细胞部分难以消化。

(2)有些单细胞微藻含有大量的蛋白质,有的高达65%或70%,是维管植物种子和叶的2~4倍。有些单细胞微藻含有其他具有特殊商业用途的精细化学成分。

(3)微藻具有很高的高产潜力,可通过调节种群密度,搅拌使细胞运动,获得高效的太阳能利用与转化。

(4)生活史可控制,生产周期短。

(5)不需要土壤,不与农业争土地。可利用海水进行大规模培养和生产,开发海洋。

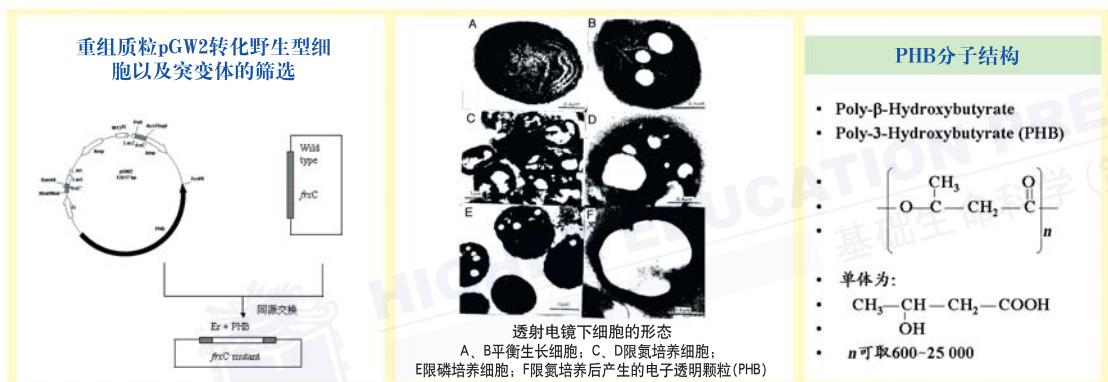


图 12-21 用转基因的大肠杆菌进行发酵生产 PHB



图 12-22 动物细胞培养 动物细胞培养的基本原理与微生物细胞相同,但动物细胞对于营养的要求更为苛刻,对于培养的环境适应性更差,培养时间要求更长。因此,往往需要多种氨基酸、维生素、辅酶、核酸、嘌呤、嘧啶、激素和生长因子等,其中很多成分系用血清、胚胎浸出液等提供,在很多情况下还需加入10%的胎牛或新生牛血清,在环境方面也需严加控制,常用空气、氧、二氧化碳和氮的混合气体进行供氧和调节pH。另外,还需防止污染问题。

(6) 可连续培养,每天收获,生产过程易自动化。
微藻细胞的经济利用和开发可追溯到很久以前。20世纪50年代以后,世界许多国家的科学家进行利用微藻获得单细胞蛋白质资源的研究,同时,用高效氧化塘进行水产养殖微藻以获取食物资源。微藻细胞培养真正的商业应用开始于20世纪60年代。首先在前苏联,科学家



图 12-23 单细胞藻类的大规模工厂化培养

发现嗜盐的绿藻 *Dunaliella* (杜氏藻)是最好的β-胡萝卜素资源。直到现在,澳大利亚、以色列和美国仍然在进行 *Dunaliella* 的商业化或半商业化的开发。近10年来人们对蓝藻(又称蓝细菌)中的螺旋藻的开发产生了进一步的兴趣,主要用于保健食品。据报道,螺旋藻是富含β-胡萝卜素的食品,其β-胡萝卜素含量比胡萝卜高10倍。螺旋藻含有γ-亚油酸,有超过60%的蛋白和多种氨基酸,低脂肪、低热量,其维生素B的含量比肝组织高两倍。另外螺旋藻含比其他食品高20倍的铁,富含钙、RNA、DNA和多种微量元素,含1%叶绿素,15%藻胆蛋白。一些生物技术公司生产的微藻细胞产品包括了螺旋藻和小球藻粉剂、片剂、粒剂、胶囊和间接用微藻细胞制作的营养食品。

高等植物细胞具有全能性。从高等植物的幼胚以及根、茎、叶、花和果实等不同器官的组织中分离的单个细胞,经过特殊培养形成愈伤组织(callus),并可进一步诱导生成完整的植株(图12-24)。利用细胞分离改造及组织培养技术,可从植物细胞中获得大量需要的产物。表12-3列举了部分利用植物细胞工程生产的商品种类。

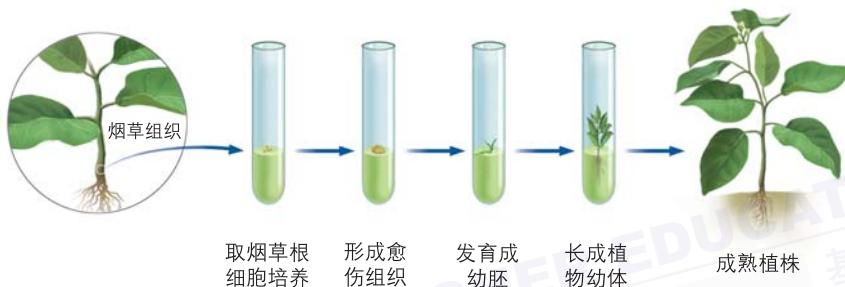


图 12-24 经单细胞特殊培养形成的愈伤组织诱导生成完整的植株 植物细胞培养方法有悬浮培养法、平板培养法、看护培养法和微室培养等。植物组织培养也即植物“克隆”技术,是在无菌条件下利用人工培养基对植物体的某一部分(包括原生质体、细胞、组织和器官)进行培养。根据所培养的植物材料不同,组织培养可分为5种类型,即愈伤组织培养、悬浮细胞培养、器官培养、茎类分生组织培养和原生质体培养。这种无性繁殖在作物脱毒和快速繁殖上都有着广泛的应用。

表 12-3 利用植物细胞工程生产的部分商品

生物碱	甜味素	强心苷	天然杀虫剂
紫杉醇	黄酮类	抗病毒剂	苯基苯乙烯酮
麻醉剂	香水	植物激素	抗肿瘤因子
单宁	芳香剂	橡胶乳液	甾醇类及其衍生物
有机酸	苯醌	植物多糖	核酸及核苷酸
苯酚	色素	植物油脂	萜类及其衍生物
青蒿素	维生素	抗过敏剂	各种蛋白及多肽
风味素	蛋白酶	酶抑制剂	植物生长调节剂

除了动物和植物细胞大规模培养外，细胞融合、细胞重组和杂交瘤技术等也是细胞工程的重要内容。细胞融合是将不同种类的两种细胞经过特殊处理后放在一起，在某些促融因子作用下发生融合，形成杂种细胞。如人与蛙的细胞融合，番茄与马铃薯细胞的融合等等，使杂种细胞具有新的遗传性状。促融因子及条件可包括病毒、化学试剂或电场作用等等。细胞重组是把不同种类的细胞的细胞器重新组合装配，包括核的移植、叶绿体移植、核糖体重建及线粒体装配等。核移植技术是借助于显微操作把一个细胞中的核吸出，再注射到另一个除去核的细胞中，如把胚胎细胞的核移植到去除了核的受精卵中，在体外保温形成胚胎后，植入适合的雌性动物子宫发育成熟为具有优良性状的新个体。杂交瘤技术是通过细胞融合产生特异杂交瘤细胞，进而使杂交瘤细胞产生单一的抗体（单克隆抗体），在医药业用作药物或诊断试剂。

20世纪70年代末，单克隆抗体(monoclonal antibody)技术得到了快速发展。**单克隆**是指所有制备抗体的细胞都是同一个细胞的拷贝，因此其产生的抗体也完全相同。单克隆抗体是大规模细胞培养的产物，而不是直接来自于动物血清。

由于抗体具有标记特定分子和细胞的能力，可以应用于疾病的临床诊断和科学研究，因此抗体的制备具有重要的商业价值。过去，通常通过化学纯化过程获得特定的抗原，把这些抗原注射到动物体中（通常用小白鼠或家兔），被注射动物会对抗原作出反应产生抗体，然后再从动物的血清中分离纯化相应的抗体。由于注射到动物体内的抗原具有多种不同的抗原决定簇，结果产生了针对多种抗原决定簇的不同抗体，它们被称为**多克隆抗体**。如此制备出的抗体用于标记和结合特定分子和细胞时敏感性很低，往往会与其他相近的抗原分子产生交叉

反应，结果严重限制了抗体的应用。

制备单克隆抗体的过程涉及到细胞培养、细胞融合等多种步骤。首先，向小鼠体内注射特定的抗原蛋白（免疫小鼠），同时体外培养小鼠骨髓瘤(myeloma)细胞。将免疫后的小鼠杀死，从其脾脏中分离出能分泌特定抗体的B淋巴细胞。将B淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合，从获得的杂交细胞中筛选出能产生特定抗体的克隆，培养出既有肿瘤细胞迅速生长繁殖特征，又具有B淋巴细胞分泌特异性抗体能力的杂交瘤细胞。将阳性克隆（细胞）进行小鼠体内或体外培养，从小鼠腹水或从细胞的培养液便可分离获得针对特定抗原决定子的单克隆抗体（图12-25）。

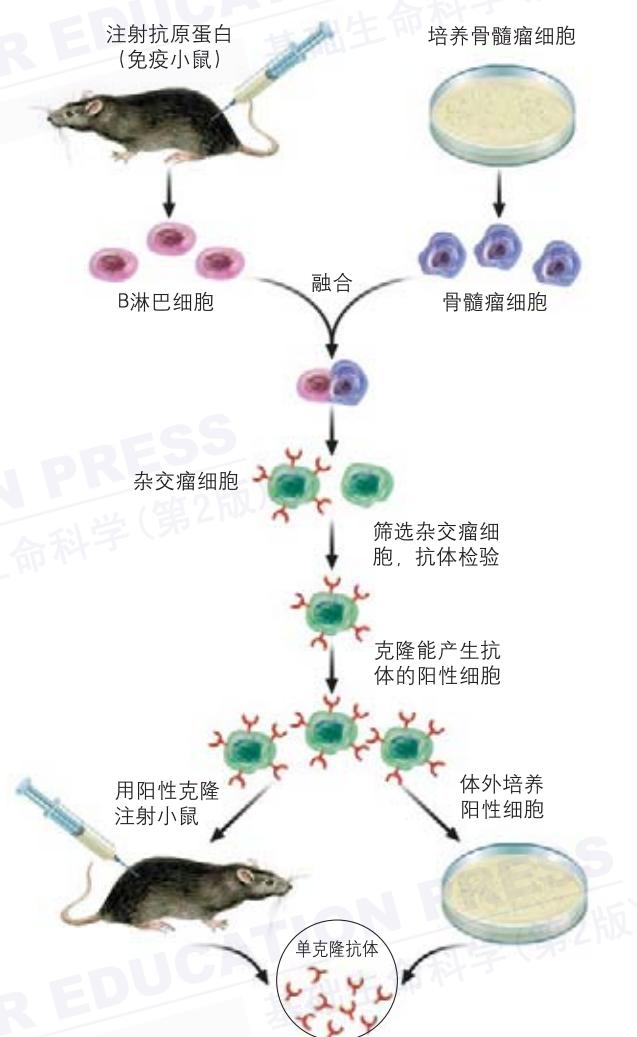


图12-25 单克隆抗体的制备 用抗原免疫小鼠，获得能产生抗体的B淋巴细胞，与可连续分裂的骨髓瘤细胞进行细胞融合。经筛选获得杂交瘤细胞，检验其分泌的抗体，克隆能产生抗体的阳性细胞，然后对其进行细胞体外培养或小鼠的体内培养，以获得单克隆抗体。

除了理论研究外，单克隆抗体技术现已应用于临床诊断和疾病的治疗。用单克隆抗体做受孕检查或引起性病的细菌检测灵敏性很高，这些单克隆抗体可以标记和显示受孕后的激素或细菌。单克隆抗体技术在癌症的研究治疗中具有应用潜力，针对癌细胞表面抗原制备出能与消灭癌细胞药物结合的单克隆抗体，被这类抗体标记的癌细胞就很容易被特定药物准确地发现并消灭，因而这种特定的结合了单克隆抗体的药物又被人们称为分子导弹。

另外，干细胞与动物克隆也可属于细胞工程的范畴，该部分内容已在发育一章中作详细介绍。

第四节 生物技术在农业、医药等方面的应用

重组DNA技术是基因工程的核心技术，之所以称为“工程”，是因为其目的、原理和步骤等类似于现代工程学科中的设计与施工过程。实施基因工程，就好比在微观的细胞中设计并构建一栋新的“建筑”。

一、农业生物技术

基因工程技术在农业上的应用最为广泛。目前转基因动物主要应用于促进动物生长，改善畜产品的产量，提高动物的抗病性和生产药用蛋白等。畜牧业中的基因工程产品还包括动物疫苗、生长激素等。例如，一些奶牛被注射了用转基因大肠杆菌生产的激素后增加了牛奶的产量，也加速了生长。利用转基因大肠杆菌生产的纤

维素酶使原先没有多少利用价值的植物纤维素被酶解后成为良好的动物饲料。科学家从利用基因工程技术获得的转基因羊的羊奶中，提取出了一种治疗心脏病的药物tPA（图12-26），从克隆牛产出的牛奶中提取出制药的原料。

植物基因工程在种植业生产上显示了更好的应用前景。用携带了外源基因的农杆菌Ti质粒转化植物原生质体，使外源DNA与植物染色体DNA相整合，通过原生质体的培养分化成愈伤组织，最后发育成具有新性状的完整植株——转基因植物（图12-27）。一些水稻、小麦和大豆通过转基因，具有了抗化学除草剂的特性，在使用化学除草剂大面积杀死大田杂草时，这些转基因作物可以免受伤害。现在至少已培育出分别抗敌稗、镇草宁等4种以上除草剂的转基因植物。关于其分子机理，迄今研究得最为透彻的是除草剂阿特拉津的抗性机理。它进入植物体内与QB蛋白结合，从而抑制光合过程。玉米、高粱等作物由于能将其降解，或通过叶片组织内特有的谷胱甘肽转移酶与之形成复合物而解除毒性，从而表现出抗性，但杂草却由于不具备这一防卫机制而遭灭杀。科学家们还培育出一种转基因西红柿。西红柿的成熟需要一种起催化作用的蛋白酶参与反应，他们先将编码这种蛋白酶的基因从西红柿植株中克隆出来，接着又克隆了它的互补基因，将互补基因转入西红柿植株后即转录生成了一种互补的mRNA，它与原来该蛋白酶基因正常转录的mRNA碱基互补配对形成双链片段，使后者不能正常地翻译合成催化西红柿成熟作用需要的蛋白酶。未成熟的西红柿有利于长期保存、保鲜和运输。需要供应

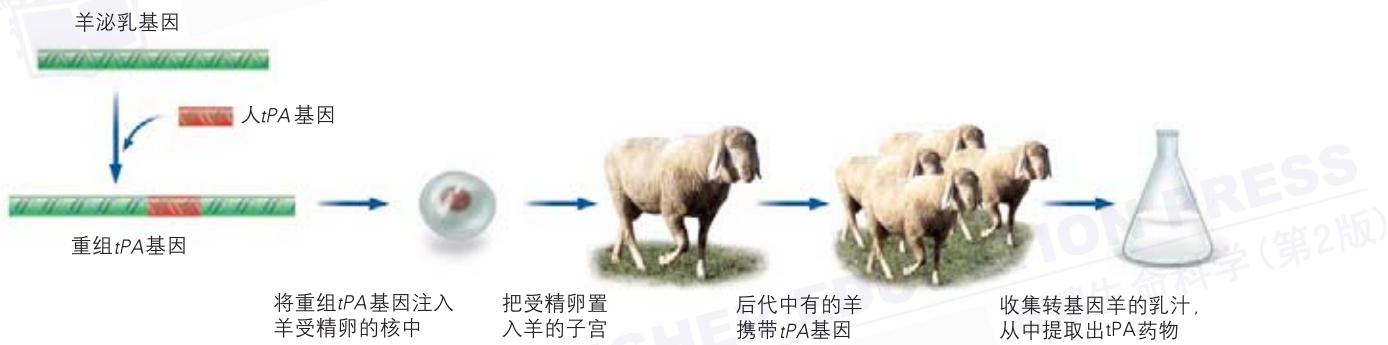


图12-26 从转基因羊的羊奶中提取出治疗心脏病的药物tPA tPA是用于溶化人类血凝块的组织纤溶酶原激活物，克隆编码tPA的基因被YFG放在 β -球蛋白启动子控制之下，使YFG只能在乳腺细胞内才具有活性。用显微注射法把此目的基因与表达载体的DNA重组体注入卵内，再把被注射的卵种入借腹怀孕的寄养母体内。根据YFG的序列设计引物，利用PCR鉴定表达YFG的幼羊的染色体，转基因羊通过YFG基因的表达，在乳汁中可产出一定浓度的tPA蛋白。



图12-27 农杆菌Ti质粒转化植物技术 农杆菌介导法是植物基因转化的最为普遍的方法,农杆菌的Ti质粒可诱导植物组织产生肿瘤细胞。对天然Ti质粒进行改造,切除T-DNA区上与肿瘤形成有关的基因,同时插入外源目的基因,利用重组Ti质粒转化农杆菌,使农杆菌携带外源目的基因。再将人为造成伤口的叶片小块浸入这样的农杆菌菌液中,让农杆菌侵染植物细胞,同时让外源目的基因转移到植物细胞的染色体上并有效表达。然后,将被农杆菌侵染的叶片在含有抗生素的培养基上培养,被转化的植物细胞形成愈伤组织,再进一步分化发育成完整的转基因植株。

市场时,只要用微量的乙烯气体对未成熟的西红柿熏一次,很快就能获得成熟的西红柿(图12-28)。

植物基因工程在农业上应用的另一项有重大效益的研究是将一种土壤微生物的Bt基因经过修饰以后转入烟草中,该基因表达产生一种ICP毒蛋白,对鳞翅目昆虫

具有特异的毒性杀灭作用。以后这一项转基因技术推广到玉米、棉花和马铃薯中获得成功。据统计1999年美国、加拿大、墨西哥三国转Bt基因作物的种植面积达1170万公顷,我国的转Bt基因棉花的种植面积也达到30万公顷。有良好应用前景的转基因作物的研究还包括将细菌

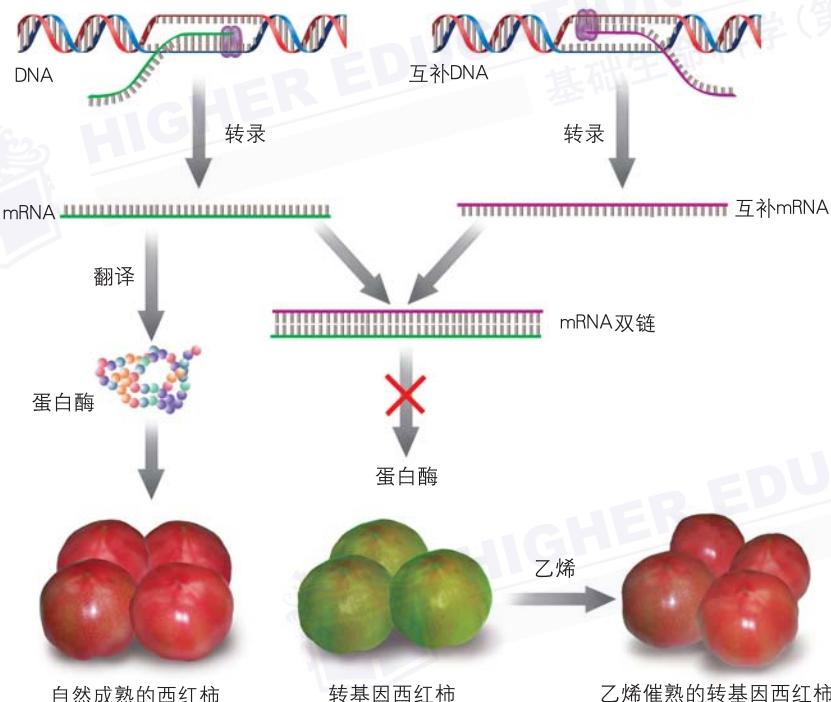


图12-28 转基因西红柿 果实的成熟是某些编码纤维素和多聚半乳糖醛酸酶的基因在果实成熟的过程中被诱导表达的结果。只要干扰它们中的一种或几种基因的表达,就可以推迟果实的成熟过程。将多聚半乳糖醛酸酶基因的反义DNA(互补DNA序列片段)对应转入西红柿后,多聚半乳糖醛酸酶的mRNA及其编码产物的酶活性均下降了90%,从而达到了延迟果实成熟的目的。

和蓝藻生物中特有的固氮酶基因转入水稻、小麦等粮食作物中,有这种固氮酶基因的农作物能固定大气中的氮,因而不需要额外使用氮肥。目前,科学家已经将固氮酶基因克隆出来,分析了这些基因的序列和结构。已经取得或有希望取得重要突破的新成果还包括:将人类DNA移植到苜蓿属植物中生产 β -干扰素、胰岛素、麦谷蛋白、白细胞介素-2和其他抗体蛋白;研制可产生聚合物的基因改性油菜,用来生产生物降解塑料;从转基因烟草中分离白细胞介素-10,用以治疗肠炎并发症;用含抗乙肝口服疫苗的基因工程马铃薯进行人体试验;给水稻添加基因,生产人体需要的 β -胡萝卜素等。

基因工程技术还被应用于环境保护,如利用转基因微生物吸收环境中的重金属,降解有毒有害化合物,处理工业废水等方面的研究已经取得了许多进展。

二、分子诊断

在临幊上,分子生物学技术的应用首先为传染性疾病的诊断开辟了崭新的途径。利用PCR技术或PCR与分子杂交标记相结合,可以快速准确地检测出病原性物质。这些病原性物质包括病毒、细菌、真菌、寄生虫等等。通过对病原性物质的基因分析,获得它们的DNA序列图谱,再相应地检测它们是否感染了人体的组织和器官。例如艾滋病病毒(HIV)的DNA序列现已完全测定清楚,医生可以根据HIV的DNA序列先人工合成小段引物,再以受检病人血液或组织细胞样品中的微量DNA为模板,进行DNA的扩增实验,如获得与HIV的DNA序列相同的特定长度的DNA片段(实验呈阳性),便可确定受检人携带了艾滋病病毒基因(图12-29)。艾滋病的分子诊断说明,分子生物学技术应用于传染性疾病的诊断具有专一性强(即只对特定的病原分子产生阳性反应)、灵敏度高(只需极其微量的目标样品)、且抗干扰性好和操作快速简便等优点。

分子诊断除了在传染性疾病的应用方面具有优势外,对于遗传性疾病更是大有用武之地。目前,已经有200多种人类遗传性疾病可用分子生物学技术做出早期诊断。更有意义的是,该技术可以在遗传病发生前、甚至在胎儿出生前便可对将来发生的疾病准确地作出判断。胎儿出生前诊断应用最多的方法是羊水和胎盘绒毛膜检测,利用注射器从母体内抽取羊水,再做染色体和单基因分析(图12-30),也可利用导管深入母体的子

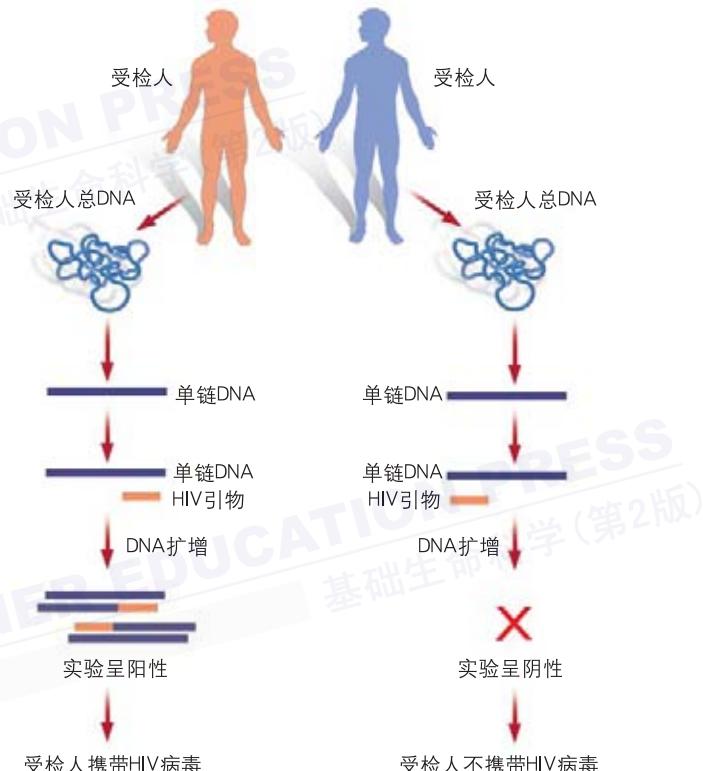


图12-29 利用PCR与分子杂交标记快速准确地检测出病原性物质
HIV检测通常有常规血清学、外周血单核细胞培养、唾液检测、尿液检测、DNA PCR等方法,其中以DNA PCR为最敏感和快速。它能够检测出1~10个HIV前病毒DNA拷贝,其准确性大于99%。

宫中取出一小片绒毛膜组织,进行细胞学、生物化学和分子生物学的检查。特别是通过对这些样品进行DNA分析,可从DNA的缺陷与反常结果预先得知胎儿出生后将出现的遗传病症状。对镰形细胞贫血症胎儿出生前的基因组型分析,就是一种人类遗传病早期诊断成功的实例。

镰形细胞贫血症是一种常染色体退化遗传病,病人的死亡率很高。引起镰形细胞贫血症的原因就是基因的点突变,即编码血红蛋白 β 肽链上一个决定谷氨酸的密码子GAA变成了GUA,使得 β 肽链上的谷氨酸变成了缬氨酸,引起血红蛋白的结构和功能发生了根本的改变。与正常血红蛋白相比,该病患者的红细胞由正常的圆盘形变成了镰刀形(图12-31)。 β -血红蛋白基因上单个核苷酸的替换($A \rightarrow U$)恰好使该基因片段丢失了可被MstII或CvnI切开的一个限制性内切酶位点。由于基因突变改变了限制性酶切的结果,用Southern印迹(参见图12-16)分析方法和限制性片段长度多态性(简称RFLP)分

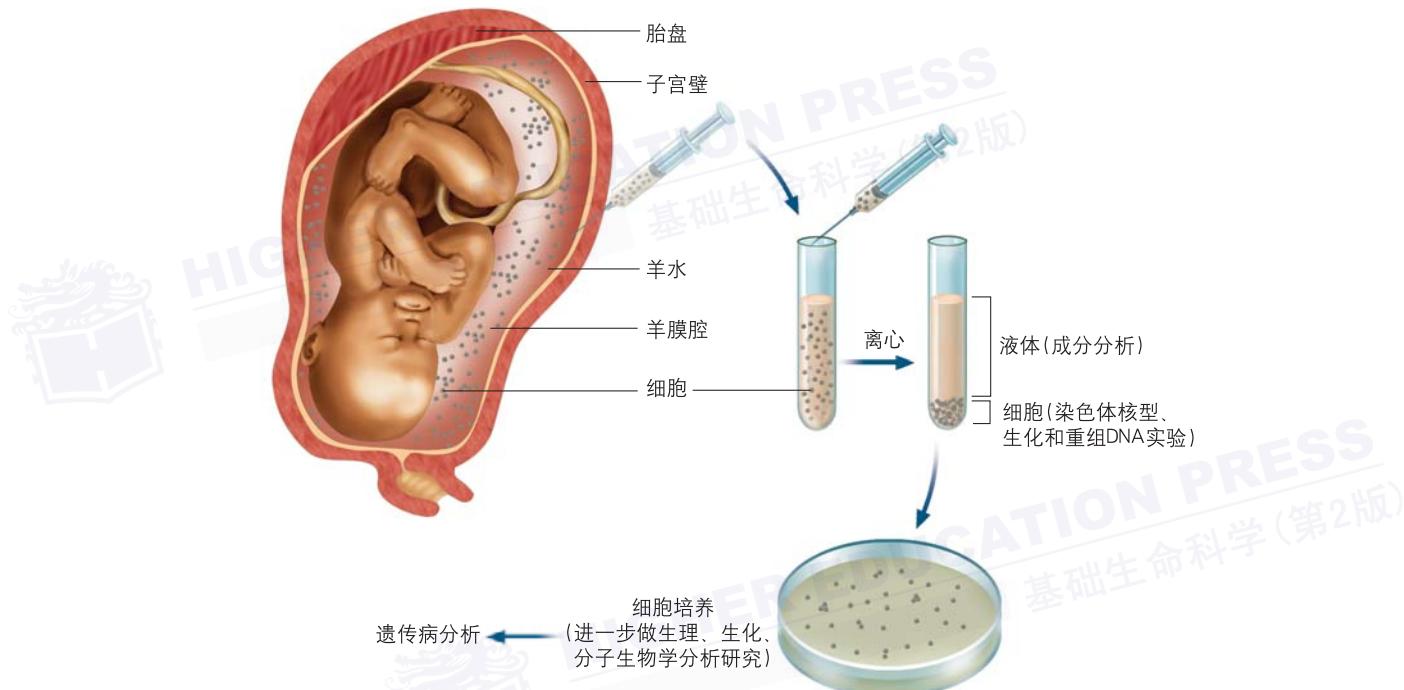


图12-30 羊水和胎盘绒毛膜检测遗传性疾病 在B型超声波监视下,用消毒注射器抽取羊水,分析羊水中胎儿脱落细胞进行产前诊断的方法,称为羊膜腔穿刺术,是当今对遗传病进行产前基因诊断最主要途径。绒毛取样术是早孕时用导管自宫内吸取绒毛组织进行检查,其最大优点是取样时间比常规羊水细胞检查提前8星期左右,一旦发现胎儿有遗传缺陷,可以及早采取有效措施,避免中期引产而导致的种种风险。

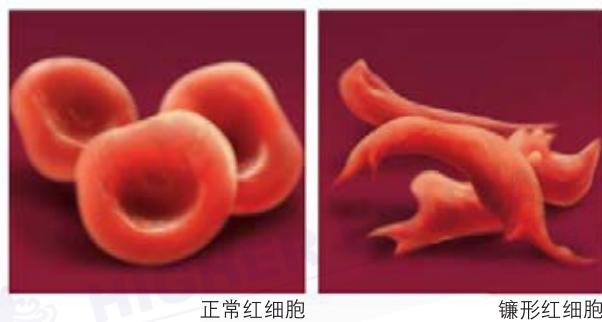


图12-31 正常红细胞与镰形红细胞 正常的血红蛋白分子(负责把氧从肺运输到身体各个部分)由两个 α 链和两个 β 链构成。罹患镰形细胞贫血症的个体有条突变的 β 链,第6位的谷氨酸被缬氨酸代替。该突变形成的血红蛋白分子被称为HbS,只含有HbS的细胞在低氧张力的情况下易于变成新月(镰形)形状,这些细胞易于破裂,氧合能力差,且不能像正常细胞那样通过毛细血管,进而导致贫血,也可能引起人的死亡。

析方法即可对镰形细胞贫血症胎儿做产前诊断,或对发病家族成员的基因型进行分析。

对胎儿的早期诊断从提取羊水或绒毛膜的DNA开始,然后用限制性内切酶(如MstII)对DNA酶解。该酶在正常 β -血红蛋白基因(β^A)中切开3处,产生可被相应放射性DNA探针标记的两小段DNA片段,电泳及

Southern印迹分析实验中,在放射自显影胶片上出现两个小的条带(图12-32a)。但是,如果 β -血红蛋白基因发生突变,单个核苷酸的替换($A \rightarrow U$)成为突变基因(β^S),造成MstII位点丢失。用MstII对DNA酶解时只能切开两处,产生可被相应放射性DNA探针标记的一个大的DNA片段,在放射自显影胶片上就会只出现一个大的条带(图12-32a)。相对杂合子,即 β -血红蛋白等位基因中一个是正常的,具有3个MstII位点,另一个携带着突变片段,即只有2个MstII位点,RFLP分析结果便会同时出现两个小的条带和一个大的条带(图12-32a)。在图12-32a中,父母都是镰形细胞贫血症基因的杂合子(β^A/β^S),经分子诊断,他们的第一个孩子是带有正常 β -血红蛋白基因的纯合子(β^A/β^A),不会得镰形细胞贫血症;第二个孩子是带有突变基因的纯合子(β^S/β^S),必然是患有镰形细胞贫血症的病人;第三个尚未出生的胎儿,经产前诊断检测,放射自显影胶片上同时出现两个小的条带和一个大的条带,显示该胎儿是镰形细胞贫血症基因的杂合子(β^A/β^S),虽然出生以后不会出现镰形细胞贫血症,但他(她)是遗传病基因的携带者,其将来的子女有可能会是镰形细胞贫血症的患者。

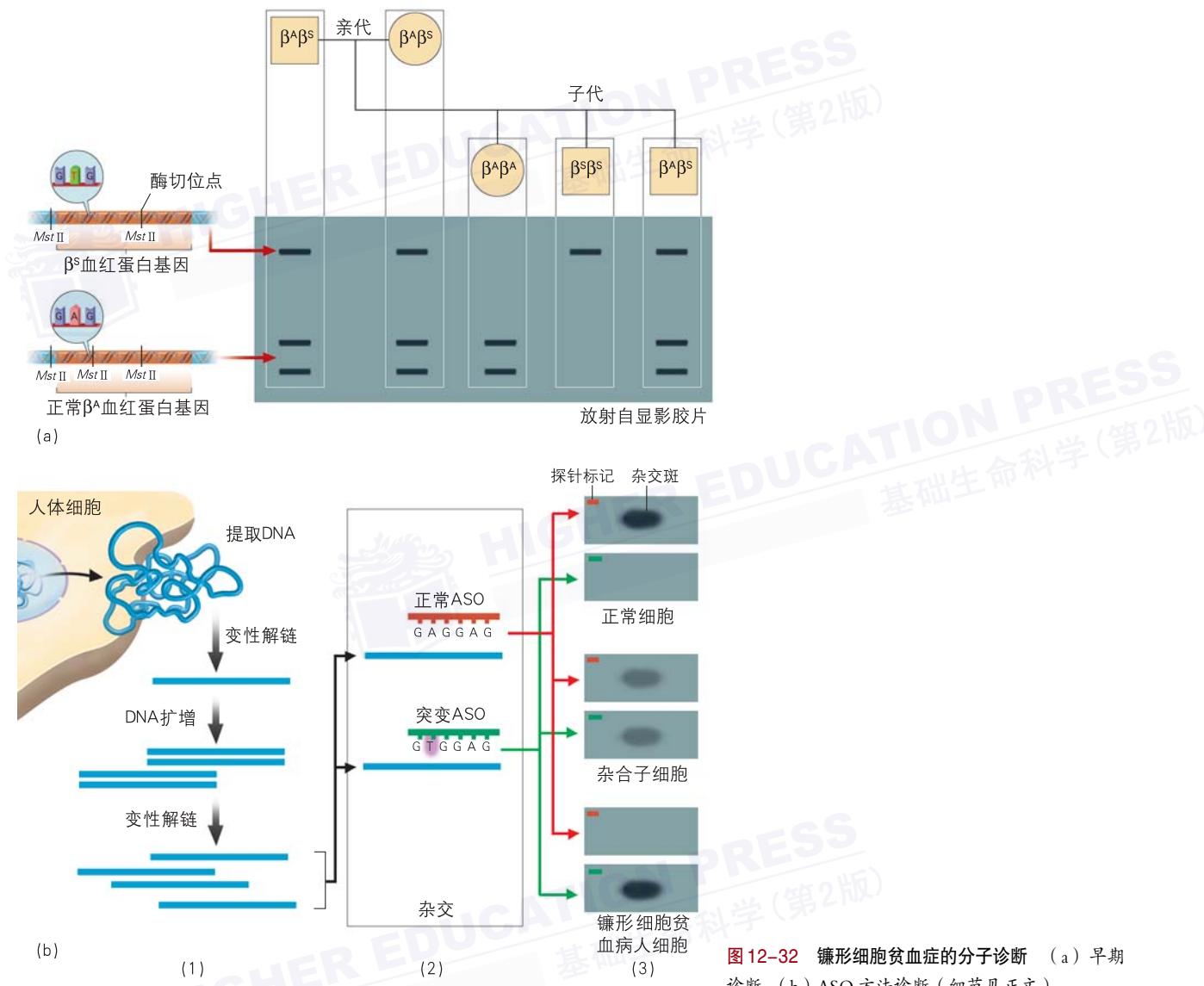


图 12-32 嫌形细胞贫血症的分子诊断 (a) 早期诊断。(b) ASO 方法诊断 (细节见正文)。

另外,研究人员还发明了另一种更加快速、简便和高效地诊断单个基因突变遗传病的新方法,称为特异性互补寡核苷酸法。该方法根据被检基因特定的DNA序列,人工合成两种特异性寡核苷酸分子探针(简称ASO),一种与正常的基因序列完全互补,另一种与突变的基因序列完全互补。我们仍然以嫌形细胞贫血症的早期诊断为例,说明该方法的原理和操作步骤(12-32b):
 (1)首先从受检者的血液中提取DNA,热处理成为单链DNA;(2)以单链DNA为模板,仅对可能发生突变的核苷酸区域设计引物进行PCR扩增,将扩增获得的DNA片段转移到滤膜上,热变性成单链;(3)分别用两种ASO对滤膜杂交。用正常序列的探针做杂交时(如图中的红

色箭头线条指示),在滤膜上正常人的样品会出现很深的杂交斑,嫌形细胞贫血症病人的样品处不出现杂交斑,杂合子介于两者之间,出现浅色的杂交斑;相反,用突变基因序列的探针做杂交时(如图中的绿色箭头线条指示),在滤膜上正常人的样品处不出现杂交斑,嫌形细胞贫血症病人的样品会出现很深的杂交斑,杂合子介于两者之间,出现浅色的杂交斑。根据被检测DNA样品的两组探针杂交结果的组合,便很容易判断受检人是否患有嫌形细胞贫血症。由于ASO方法可以对许多种人类遗传病进行分子诊断,灵敏性高,诊断费用较低,是一种广泛使用的分子诊断方法。

三、基因治疗

据临床统计,大约25%的生理缺陷、30%的儿童死亡和60%的成年人疾病都是由遗传疾病(包括单基因和多基因遗传疾病)引起的。迄今为止,对人类绝大部分疾病的治疗都依靠药物和外科手术,即使用由基因工程技术研制的药物(如人胰岛素)等,也属于药物治疗的范畴。所谓**基因治疗**,简单地说,就是利用基因工程技术来治疗人类遗传性疾病和多因素疾病。从理论上分析,许多正常的人类基因都可以克隆并引入遗传病患者的体细胞,以替代、修复或纠正有缺陷的基因,从而根治一些遗传性疾病。

基因治疗通常需要在DNA水平上认识发病机制,掌握基因的克隆分离、体外操作和适量表达的技术,再应用合适的载体或基因转移系统将人正常的结构基因以及相关的调节序列送入到人体组织和细胞中去,使之稳定、安全地表达。目前,通常使用一种逆转录病毒作为基因治疗的转移系统,该病毒3个基因构成的基因簇被删除,同时插入克隆的人类基因(图12-33),然后与病毒的蛋白外壳重新组合成新的病毒转移系统。重组的载体可以感染人的组织和细胞,但不再自我复制,因为其中的病毒基因已被删除,否则可能有致癌效应。当重组的病毒载体携带克隆的目的基因进入人体细胞后,便会移向细胞核并整合到染色体基因组中。以下以一种重症综合性免疫缺乏症(简称SCID)为例,介绍基因治疗的

原理和步骤。

SCID患者缺乏正常的人体免疫功能,只要稍被细菌或病毒感染,就会发病死亡。经过研究证实,SCID病人细胞的一个常染色体上编码腺苷酸脱氨酶(简称ADA)的基因(*ada*)发生了突变。治疗方案采取先将人体正常*ada*基因克隆后用来替换逆转录病毒的原有基因,构建成重组载体及逆转录病毒转移系统;再从SCID患者体内分离出免疫系统有缺陷的T淋巴细胞;将这些T淋巴细胞与携带了正常*ada*基因的逆转录病毒混合在一起,让病毒感染T淋巴细胞,使正常的*ada*基因拷贝插入到T淋巴细胞的基因组中;在实验室中通过细胞培养并确认转入的基因表达后,用注射器将成千上万个重建的转基因T淋巴细胞注射到人体骨髓组织中(图12-34)。1990年,研究人员用上述步骤对一个患SCID的女孩进行了基因治疗,3年以后,该患者体内50%的T淋巴细胞出现了新的*ada*基因并合成了腺苷酸脱氨酶,免疫功能的修复使她开始了正常人的生活(图12-35)。在此前后,世界各国的科学家们不断探索对各种遗传性疾病进行基因治疗和临床试验,设计出多种基因治疗方案,在这些试验和治疗中,有些取得了成功,也有些失败了,因为其中仍然有许多理论和技术难点需要进一步的探索和解决。

近年来,随着人类基因组研究的深入,一种RNA干扰技术在基因治疗的研究中显示了良好的应用前景。所谓RNA干扰(RNA interference, RNAi)技术,就是利用一小段双链RNA(dsRNA)导入人体或其他哺乳动物细胞中,使特定的基因表达产生沉默。基因表达沉默的原因在于真核细胞有一种天然的防御机制,能对侵入细胞的外源dsRNA产生应答,激发细胞产生一种称为Dicer的RNA酶,Dicer将入侵的外源dsRNA切割成22~25 bp大小的许多小片段,这些小段双链RNA称为小分子干扰RNA(small interfering RNA, siRNA)。同时siRNA又诱导组装出一种称为RNA诱导沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC)的核酸酶,RISC与siRNA结合,这时,细胞自身的mRNA如果含有与此小片段即siRNA同源的序列,就会被降解,因此引起转录该序列的基因表达表现出沉默,即所谓的基因沉默(gene silence)(图12-36)。实际上, RNAi是一种操纵基因表达、使特定基因沉默的新技术,它有望用于基因治疗或基因药物的研制。现在至少已有20多个制药公司正在利用siRNA技术进行基因治疗和基因药物的开发,

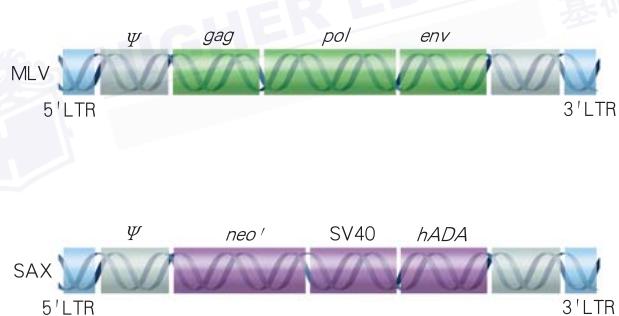


图 12-33 逆转录病毒作为基因治疗的转移系统 用 Moloney 鼠白血病病毒(Moloney MLV)构建逆转录病毒载体,MLV自身的基因组包括包装所需的序列和编码膜蛋白的基因 *gag*、依赖RNA的DNA聚合酶基因 *pol* 和表面糖蛋白基因 *env*。在每一个末端连接着长的末端重复序列(LTR),它控制基因转录及整合到宿主基因组上。SAX载体保留了LTR,包括用作选择标记的细菌新霉素抗性基因(*neo'*)。载体携带人的腺苷脱氨酶基因(*hADA*),整合了一个SV40启动子/增强子。SAX结构是用于人基因治疗的典型的逆转录病毒载体。

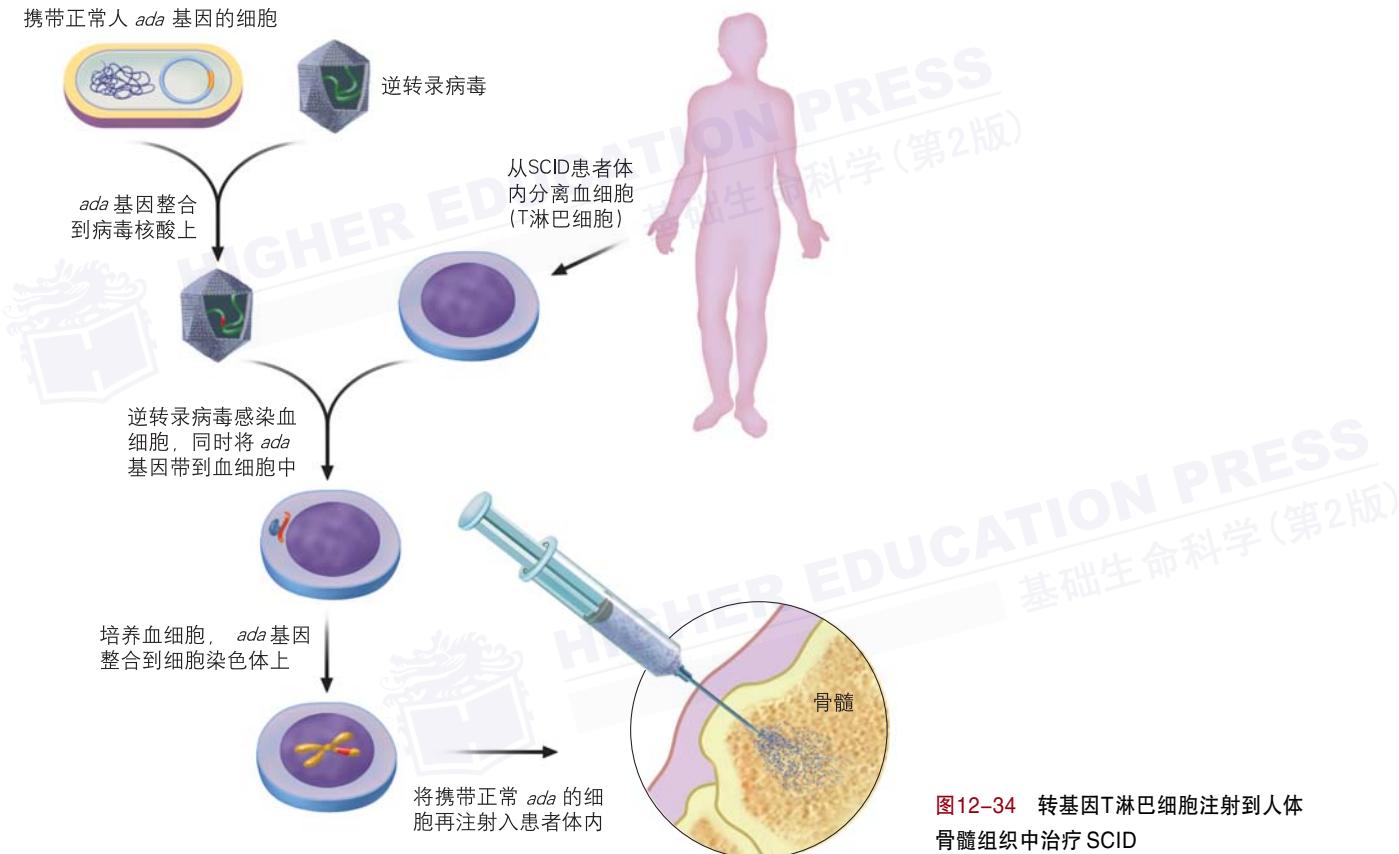


图 12-34 转基因 T 淋巴细胞注射到人体骨髓组织中治疗 SCID



图 12-35 美国的 SCID 患儿正在接受基因治疗，患 SCID 的女孩基因治疗成功后，免疫功能的修复使她开始了正常人的生活

例如，德国的 Ribopharma 公司根据人类黑色素瘤基因序列合成了 25 bp 长的 siRNA，用来抑制黑色素瘤基因的表达，已进入临床实验，而且证明了低剂量 siRNA 即能生效，目前该产品已获得欧洲专利。Benitec 公司研发 siRNA 药物的目标是治疗癌症、自体免疫病、艾滋病和病毒性肝炎等，已有 10 多家公司专门从事与 RNAi 技术

有关试剂的生产与服务。

在过去的几年中，许多生物技术公司都加大了对基因治疗产品的研究开发的力度。正在进行基因治疗和临床研究的遗传疾病包括 ADA 缺乏症、艾滋病、癌症、黑色素瘤、囊性纤维化病等等。研究已表明，目前令人畏惧的癌症、艾滋病等绝症，或是高血压、心脏病、糖尿病、帕金森氏综合症等临幊上难以治愈的病症，都与遗传基因或基因的缺陷相关。据估计，因基因缺陷而引起的疾病有 6 千多种，今后都可能通过基因工程进行彻底或有效的治疗。到 1999 年底，全世界已有近 400 个注册的基因治疗方案，接受过基因治疗的患者达 3 000 多名，治愈的疾病有血友病、严重贫血病、关节炎和心血管病等 15 种以上。1995 年科学家发现了 3 种人体遗传基因——控制眼睛形成基因、老年痴呆基因和精神分裂症基因；1996 年，科学家又发现了影响人性格的 *D4DR* 基因和影响人体肥瘦的 *RIH-b* 基因。人类基因组计划的完成，可精确地绘制人类基因组图谱，使人类更了解自己，将大大促进疾病和人类进化的研究。因此可以预计，在 21 世纪，基因治疗研究和应用必将会出现更大的突破。

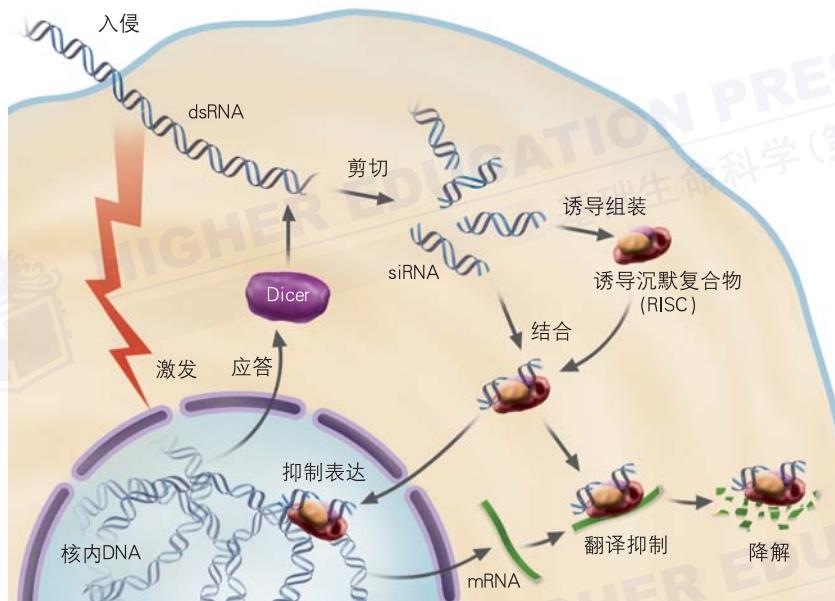


图 12-36 RNA 干扰技术原理的示意图 当外源 dsRNA 入侵，细胞应答产生 Dicer (RNA 酶)，后者切割 dsRNA 成小片段的 siRNA，并与 RISC 核酸酶复合物结合，这时，siRNA 能使与其同源的细胞本身的 mRNA 序列发生降解，结果便是表达该 mRNA 的基因沉默了。RNAi 是一种操纵基因表达、使特定基因沉默的新技术，它有望用于基因治疗或基因药物的研制。

四、生物芯片技术

生物芯片 (biological chip) 是指本身贮存有大量的生物信息，并能够对生物分子或组分进行高通量快速并行处理和分析的薄型固体器件。目前最主要的生物芯片是 DNA 芯片 (DNA chip) 或基因芯片 (gene chip)，它们是 DNA 杂交探针技术与半导体工业技术相结合的结晶。该技术系指将大量 (通常每平方厘米点阵密度高于 400) 探针分子固定于支持物上后与带荧光标记的 DNA 样品分子进行杂交，通过检测每个探针分子的杂交信号强度进而获取样品分子的数量和序列信息。1996 年底，美国的 Affymetrix 结合照相平版印刷、计算机、半导体、寡核苷酸合成、荧光标记、核酸探针分子杂交和激光共聚扫描等高新技术，研制创造了世界第一块 DNA 芯片，DNA 芯片的问世由于其巨大的应用潜力，立即引起科学界的极大兴趣和高度关注。

DNA 芯片本身是一种专门刻制和加工的仅为 2 cm^2 左右大小的玻璃片，它被嵌在一小块胶片上。芯片被分隔成许许多多的小格，每一小格大约只有一根头发丝的一半那么细，小格上特别的交联分子与一个含有 20 个左右核苷酸的 DNA 探针相连。一般的芯片有 400 000 个小格，更多的可达到 1 600 000 格。每一格上的 DNA 探针都各不相同。在对 DNA 样品分子检测时，从细胞中提取的 DNA 样品用一种或若干种限制酶进行酶切，这些酶切

片段被荧光染料标记并熔解成为单链，然后它们被滴加到芯片上与 DNA 探针杂交。凡是与芯片上的探针互补的酶切片段便牢固地结合在特定的小格中，而那些与芯片上各探针都不能互补的酶切片段就会被洗脱掉。接下来，用一种特制的激光扫描器对芯片上小格和荧光进行扫描与解读。解读的信息被输入到计算机中，由专门的程序软件进行分析，最终获得被检测样品的序列信息 (图 12-37)。

DNA 芯片技术包括了芯片基质材料的选择和处理，核酸芯片的制作，核酸杂交，杂交信号的读取和杂交数据的分析等 5 个方面。DNA 芯片由于同时将大量探针固定于支持物上，所以可以一次性对样品大量序列进行检测和分析，从而解决了传统核酸杂交 (如 Southern 印迹和 Northern 印迹等) 技术操作繁杂、自动化程度低、操作序列数量少、检测效率低等问题。而且，通过设计不同的探针阵列、使用特定的分析方法可使该技术具有多种应用价值，如基因表达谱测定、突变检测、多态性分析、基因组文库作图及杂交测序等。

DNA 芯片可用于大规模筛查由基因突变所引起的疾病。例如，科学家已经成功地利用 DNA 芯片来扫描检测人体细胞中的一种 p53 基因的突变状态，p53 基因突变在癌症患者中发生的比例高达 60%。DNA 芯片用于检测遗传性乳腺癌和卵巢癌患者 BRCA1 基因第 11 外显子全长 3.45 kb 序列的突变，检测了 15 例病人样品，发现 14 例有基因突变，为遗传性乳腺癌和卵巢癌的早期诊断提供

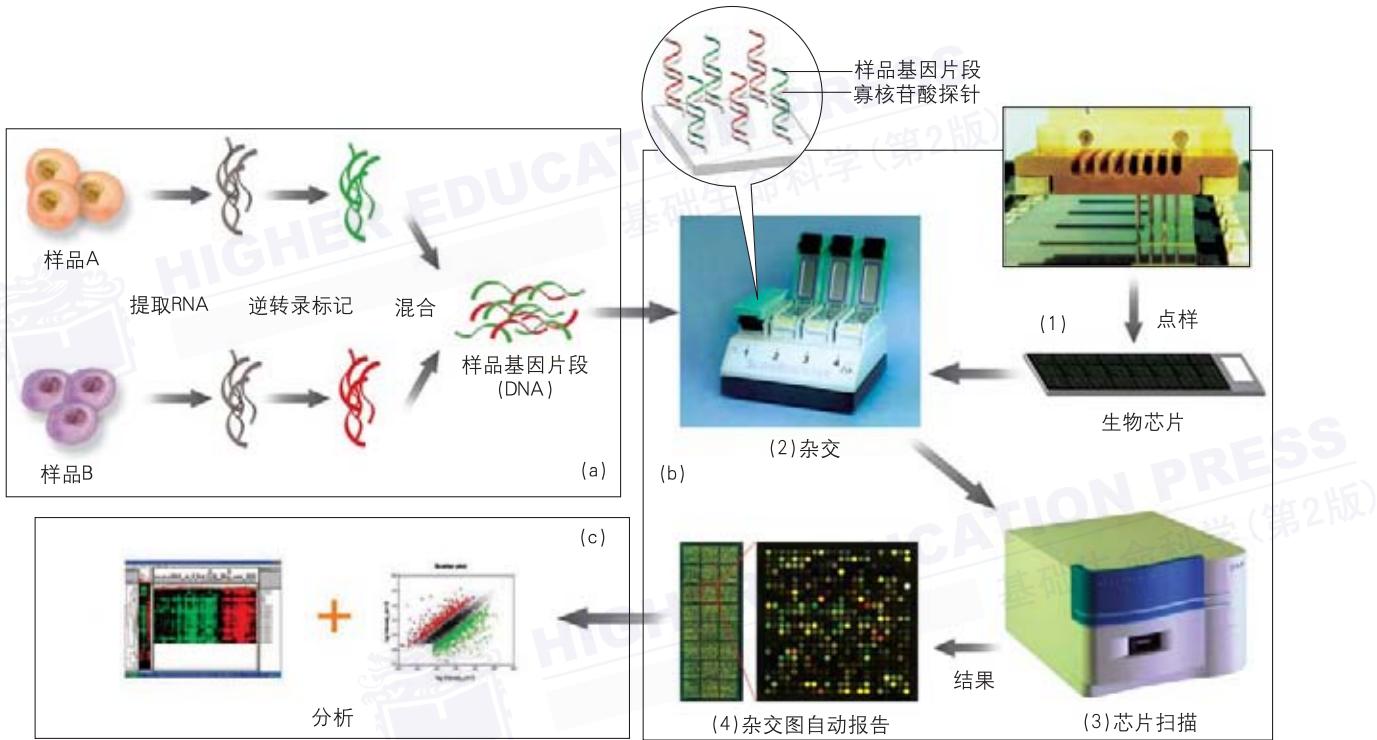


图 12-37 DNA 芯片 (a) 样品制备: 将目的基因提取出来, 通过分子生物学方法对样品进行荧光标记, 制备成可以与基因芯片进行杂交反应的样品。(b) 芯片制备和杂交: (1) 根据检测的目的基因序列设计并合成寡核苷酸探针, 用点样机械手进行芯片印制, 每张经过表面化学修饰的 $25\text{ mm} \times 75\text{ mm}$ 的芯片最高可印制 2 万多个样品点, 点样后的芯片经过特殊的处理过程就成为可以用来实验的基因芯片。(2) 杂交反应, 把一定量的荧光标记样品加到芯片上, 让样品和芯片上的探针在一定条件下进行一段时间的杂交反应。杂交中微阵列芯片的局部放大部分显示, 芯片上排列着成千上万的寡核苷酸探针, 样品基因片段杂交水平的差异表现出不同颜色的荧光信号可被激光共聚焦扫描器及计算机所记录和分析。(3) 芯片扫描, 将反应后的芯片洗涤干燥, 放入芯片专用激光扫描器中进行扫描。(4) 杂交图, 通过扫描就可以得到相应的杂交图。(c) 芯片分析: 将得到的杂交图用图像分析软件进行数据提取就可以把图像文件转化成数据文件, 然后再用数据分析软件对得到的数据进行统计分析就可以得到检测的目的基因的信息。(本图根据清华大学程京教授及生物芯片北京国家工程研究中心提供图片绘制。)

了有效的手段。另外, DNA 芯片技术在心脏病、糖尿病等多种疾病的诊断研究方面也取得了重要进展, 预计 DNA 芯片诊断技术不久将会在疾病的分子诊断方面得到广泛的应用。

人类基因组计划完成后, 利用 DNA 芯片分析基因组及发现新基因等具有很大的优势。DNA 芯片技术用于基因组分析时, 具有样品用量小、信息量大、分析方法简易快速、自动化程度高等多项优点, 特别适合于寻找新基因、基因表达检测、突变检测、基因组多态性分析和基因文库作图以及杂交测序等方面。例如, 在基因表达检测的研究上, 人们已比较成功地对包括拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 及人等多种生物的基因组表达情况进行了研究, 并且用该技术 (共 157 112 个探针分子) 一次性检测了几种不同株酵母间数千个基因表达谱的差异。

除了 DNA 芯片, 生物芯片还包括蛋白质芯片和芯片实验室等类型。蛋白质芯片以蛋白质作为检测目的物, 在固相载体上预先设定了特殊的蛋白质 (抗原或抗体) 分子, 形成蛋白质微阵列, 然后加入可与之特异性结合的标记蛋白质分子, 通过标记物实现对蛋白质的高效检测。蛋白质芯片在医药与临床诊断方面具有很广阔前景。芯片实验室是集样品制备、基因扩增、核酸标记及检测并能完成其他生化检测全部分析的微分析系统。

生物芯片具有仪器体积小、重量轻、便于携带等特点, 作为一项全新的技术, 具有集成化、并行化、高通量、自动化和微型化的优势, 因此在生命科学研究、疾病诊断和治疗、药物开发、食品卫生监督、司法鉴定、农业技术和航空航天等领域具有广泛的应用。

尽管生物芯片技术已经取得了长足的发展, 但目前仍然存在着许多需要进一步解决的问题。这些问题

包括技术成本昂贵、复杂，检测灵敏度较低，重复性差，分析范围较狭窄等。在样品的制备、探针合成与固定、分子的标记、数据的读取与分析等几个方面还需要完善。

第五节 生物技术面临的问题与挑战

科学是一把双刃剑，生物技术的发展为人类带来了巨大的利益，同时也带来了某些潜在的威胁和社会伦理等问题。生命科学与人类社会的联系比其他任何自然学科都更加紧密，它关系到每一个人的命运和前途。生物技术给人类带来的负面效应尽管比它为人类带来的利益小得多，但由于其事关生命与人类的未来，还是理所当然地引起人们的高度关注和激烈争论。生物技术领域涉及的人类安全和社会伦理问题有许多方面，以下仅简略讨论其中最主要的若干问题。

一、转基因技术的安全性问题

基因工程是现代生物技术发展最快的领域，其核心技术是在基因水平上进行操作，改变已有的基因，改良甚至创造新的物种。DNA是生命的蓝图，基因一旦被改动，一方面可能引起生物体内一系列未知的结构与功能的变化；另一方面，转基因操作对生物体的影响会通过遗传传递，产生无数拷贝并代代相传。如果转基因技术应用不当，一旦产生不良后果，其危害会不断扩展和传递。例如，人们普遍关心，外源基因引入生物体特别是引入人体后，是否会影响其他重要的调节基因，甚至会激活原癌基因？转基因技术的广泛应用是否会导致难以消灭的新病原物的出现？是否会造成生态灾难？人类摄食大量转基因食品是否会影响人类及其后代的健康（图12-38）？这些问题目前还难以用确切的实验证据来作出明确的答复，因为某些影响和作用目前还难以检测，或者还需要经过对几代人的分析后才能下结论。

二、克隆人的伦理问题

自从1997年克隆羊“多莉”问世以后，很快在全世界引发了一场克隆人问题的激烈讨论。从理论和技术层面上看，实现人的克隆是完全可能的。很多人忧虑，在克隆阶段，如果有关胚胎发育的基因重新编排或启动不完全，对新生儿可能产生什么严重后果呢？克隆技术一



图12-38 人们关注转基因食物的安全问题

旦用于人类自身，人类新成员就可以被人为地创造，成为实验室高科技产物，他们不是来自合乎法律与道德标准的家庭，兄弟、姐妹、父母、子女之间的相互关系全都乱了套……人们很难想象和接受这种对人类社会基本组织——家庭的巨大冲击。克隆动物技术发展引发的威胁人类社会现有法律、伦理、道德和观念的问题是人类必须面对的严峻挑战。因此，在克隆羊诞生不到两个月的时间内，美国、英国和中国等许多国家政府都明确宣布不支持任何将克隆技术应用于人类的研究。尽管如此，在克隆动物已经非常普遍的今天，人类是否应该克隆自己的争论也从最初的街头小报、严肃的媒体上升到科学界。2001年意大利和美国的3位科学家联手推出了克隆人的计划，并宣称，如果遭到有关法律的禁止，它们将在公海上实施该项计划。2001年8月7日，支持与反对克隆人的科学家们在美国科学院进行了科学界第一次人类克隆问题的直面交锋。也有科学家提出，应支持器官克隆和干细胞培养和分化器官，用于医学和临床治疗。2005年联合国大会上，中国政府代表明确表示，应该支持用于医学和维护人类健康的克隆研究实验。

三、个人基因信息的隐私权问题

在人类基因组计划建立之初，科学家们就十分关注基因组信息如何被正确地应用，个人与社会的利益如何有效地被保护等问题。为此，作为人类基因组计划的一

部分，还特别设立了人类基因信息利用的伦理、法律和社会影响计划，称之为 ELSI 项目（Ethical, Legal and Social Implication Program）。

ELSI 项目目前主要关注以下 4 方面：① 应用和解释基因信息时的隐私权和公正性；② 基因信息由实验室研究向实际医疗应用的转化；③ 人类基因组计划参与者相互协调和成果发布；④ 公众与专业教育。之所以设立 ELSI 项目，另一个重要原因是许多人担心现代生物技术的研究结果会给某些人提供种族或个人歧视的借口或依据。某些种族主义者会根据不同人群基因组的差别将人类分成不同优劣等级，甚至据此实施其侵略与灭绝种族的暴行。

个人基因信息的隐私权更是一个现实的问题。人类基因组计划的完成，一方面使我们能够鉴定或预测越来越多的与疾病相关的基因并设法治疗这些遗传疾病；但另一方面，个人的基因信息资料由谁来负责保管、保护和保密，有基因缺陷或差异的人在社会活动中是否能受到真正平等和公正的对待。提出这些问题是因为个人基因信息的泄露可能会得到不正确的解释或推测，也必然会影响一个人的升学、求职、婚姻、人寿保险费用与医疗保险费用及其他待遇等一系列的问题。

四、基因治疗的应用范围问题

生物技术的深入发展促进了医疗技术的提高。随着在分子水平上对遗传疾病致病机理的深入研究，最终可以用分子生物学技术将变异基因转变成为正常的基因，这就是基因治疗。可以预料，基因治疗技术今后还将有更深入的发展和更广泛的应用。从社会伦理和人类自身安全考虑，基因治疗仍然需要限制或规范在一定的应用范围中。目前基因治疗的应用仍有一些禁区。例如，对胚细胞或生殖细胞的基因治疗操作就存在社会伦理与安全问题。到目前为止所实施的所有基因治疗病例都以病人的体细胞为转基因的受体或靶细胞，这种体细胞基因治疗只影响一个个体。同时，这种基因操作得到了知情患者的同意或批准。如果把基因治疗引入胚细胞或生殖细胞，这种涉及到后代（未出生婴儿）基因结构的改变虽然有可能彻底治疗某种遗传疾病，但这一改变将直接影响这个“未来人”甚至影响到其后代。在这个“未来人”不知情也没有同意的情况下实施基因治疗本身就涉及到伦理问题。从伦理学角度看，一个人有权决定另一

个人的基因结构或未来命运吗？更严重的是，万一这种基因操作失败了或者造成了将来才能发现的不可挽回的缺陷和后果，谁承担责任呢？

涉及基因治疗应用范围的另一个问题是基因治疗技术不仅限于疾病治疗，还可用于增强人的体能。例如，如果某种可以增强人的体能特征的基因被确定和被克隆以后，是否可以通过基因治疗的操作来增加运动员的身高或短跑速度？这与运动员服用兴奋剂有什么本质区别？就目前来看，人们还不能接受将基因治疗技术扩展到用于增加人的体能方面，但不同的意见和观点仍然在激烈地争论着。涉及基因治疗应用范围问题争论的结果有可能影响到人类及其个体成员的命运。

五、生物技术引发的其他问题

生物技术的发展可能引发的问题还很多。在 20 世纪 60 年代起，随着生物科技的进展，有关人体实验、安乐死、器官移植、辅助生殖、借腹产子、生育控制、性别选择、遗传优生等道德或伦理难题不断出现在人们面前（图 12-39）。医学专家们至今仍然在争论，能否在病人或受试者不知情的情况下对其进行人体实验或药物实验？在器官严重短缺时能否容许器官买卖？如何确定试管婴儿的父母？是否应该阻止有遗传缺陷的胎儿出生？关闭一个脑死亡病人的生命维持系统或拔去长期痛苦不堪植物人的呼吸管是否违背医学宗旨？于是，从具体到抽象，一门新兴的交叉学科——生命伦理学应运而生了。生命伦理学专家提出了自主、有利、不伤害、公正四原

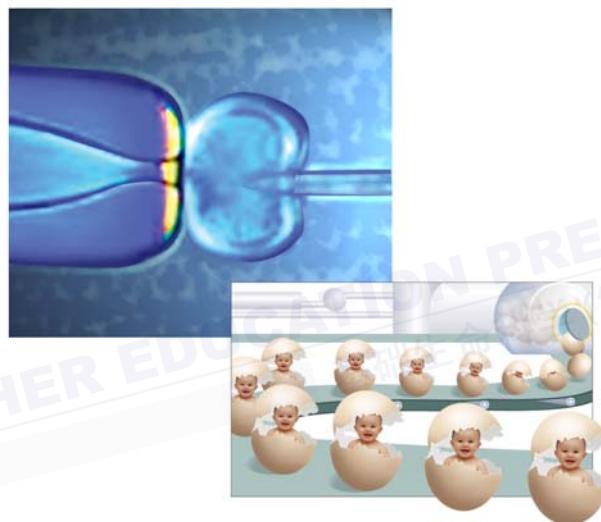


图 12-39 克隆技术的社会伦理问题

则来面对生物科技引发的伦理难题。而尊重生命则是生命伦理学的根本宗旨或主旨。尽管尊重生命的宗旨被大家广泛地接受，但如何处理许多由生物技术引发的实际问题，这一主旨或上述生命伦理的四原则有时仍然显得无能为力。

生物技术除了引发伦理问题，还引发了许多社会问题。例如，生物技术难度大，费用高，有钱人可以首先使用它来保护或增强自身的健康，而穷人则不敢问津。这就可能引发许多社会不公的问题。对于发达国家，由于其科技先进，研究经费充足，就可能首先获得一些涉及人类生存与发展的重要生物技术，如果发达国家对这些技术实行垄断应用，其后果将不堪设想。如果将生物技术应用于武器制造和战争，对人类可能将是一场比原子弹爆炸更为可怕和持久的灾难。生物技术的发展和应用还会引发哪些问题？可能其中有许多问题是目前无法预料或想象的。

经常有人向作者提问：转基因等生物技术可能会对人类的安全造成威胁吗？提出问题的人多数对专家和权威的答复并不满意。我的建议是，你必须在加强生命科学基础知识学习的基础上，亲自做出判断。知识就是力量。只有掌握了知识，才能正确面对生物技术的挑战，做到既不阻碍科学的发展，又不冒险造成不可挽回的损失甚至造成一场灾害。

第六节 生物科技造福人类

一、21世纪是生物科技大发展的世纪

在我们重点讨论生物技术面临的问题和挑战的时候，我们始终应该认识到，生物技术发展的正面作用要远远大于负面作用，而且在实践和发展中，人类也有智慧和能力来面对并逐步解决好由生物技术引发的一系列问题。在第一章中我们就明确了，解决人类生存与发展面临的一系列重大问题和挑战，在很大程度上将依赖于生命科学的发展。生命科学对人类经济、科技、政治和社会发展的作用是全方位的。生命科学与生物技术之间没有截然的分水岭，它们相互促进，相互带动。我们今天学好生命科学的基础理论知识，正是为了明天让生物技术更好地造福于人类。

进入21世纪，生命科技发展的势头越来越强劲。每天我们打开电视、电台、报纸、杂志、网站等，大量生物科技发展的报道或资讯扑面而来（图12-40）。恰好在全世界隆重纪念DNA双螺旋理论建立50周年以后，我们回顾过去的一年（2004年）世界生物技术领域的进展，基因破译、蛋白质解构、干细胞操作、克隆动物催生、新药物发明、生物技术农作物面积大幅增长，一项又一项重要成果带给人们一个又一个惊喜。



图12-40 生物科技发展的报道和资讯经常见诸报端
生物技术领域成果出现在新闻媒体上的频次远远高于其他科技领域。

例如，2004年10月，人类基因组草图的精确版已涵盖99%人类染色体组的图谱，人类蛋白编码基因数只有20 000~25 000，比2001年公布的要低。迄今为止，科学家已经从破译出人类的第13、14、16、19、20、21、22号和23号Y染色体中发现了与一些人类重大疾病相关的基因。2004年，美国科学家首次完成了牛基因草图，中国科学家领衔完成了第一张母鸡基因谱图。中国科学家已在水稻基因组和家蚕组的研究方面做出了突出的贡献。

2004年，日本科学家成功合成了世界上最小的蛋白质。迄今为止，国际上已经启动了包括由美国牵头的人类血浆蛋白质组计划、中国牵头的人类肝脏蛋白质组计划、德国牵头的人类脑蛋白质组计划、瑞士牵头的大规模抗体计划、英国牵头的蛋白质组标准计划、加拿大牵头的模式动物蛋白质组计划和日本牵头的糖蛋白质组计划。

2004年干细胞研究依然是全球的热门研究项目。经动物实验证实，多种胚胎干细胞及成体干细胞分别具有分化成肌肉、骨、软骨和结缔组织等多种组织细胞的能力，显示了干细胞研究在医学临床应用方面的重要价值。

在转基因研究方面，最为轰动的成果是美国科学家通过转基因实验，将能加快人体新陈代谢、加速脂肪“燃烧”的PPAR-DELTA转移到老鼠中，成功地培育出“马拉松”老鼠，它能比自然生长的老鼠跑得更远、耐力更久。

2004年，中国克隆的北山羊出世，美国成功完成了克隆牛的再克隆试验。虽然人类的克隆仍然是禁区，但美国科学家这一年还是成功地克隆出人类早期胚胎，并从中提取出胚胎干细胞。

2004年，全球生物技术作物大幅增长。有17个国家的近825万农民种植了生物技术作物，比2003年增加了125万。生物技术作物种植面积超过5万公顷的国家从2003年的10个增加到14个。2004年，中国种植了370万公顷的生物技术棉花，比2003年提高了32%。短期内对生物技术水稻的批准种植将极大地促进世界范围内生物技术粮食、饲料以及纤维作物的生产应用。农业生物技术应用国际服务组织预计，到2010年年底，世界上将多达30个国家的1 500万农民种植生物技术作物。

日新月异的克隆技术、基因芯片技术、蛋白芯片技术、育苗技术、蛋白质变构技术、基因重组技术、化学

基因组学技术、药物基因组学技术、血管发生抑制因子技术、基因治疗技术、生物医学材料技术、生物医学工程技术等不断进步和实现新的突破，使全球生物技术药物的研发与上市的步伐不断加快。其中最引人注目的有英克隆公司(ImClone Systems)的直肠癌治疗药物Erbitux、基因泰克公司(Genentech)的抗肿瘤药物Avastin、Biogen Idec公司的多发性硬化症治疗药Tysabri等等。

从21世纪初的几年中生物技术发展的情况看，我们不难预测生物技术在21世纪的燎原之势。许多人说，21世纪是生物科技世纪，这种说法可能有点排他性，不容易被其他学科领域的学者所接受。但所有学科的专家都会同意，21世纪一定是生命科学与生物技术大发展的世纪。

与生命科技发展同步，人类社会进入21世纪以后，生物技术产业正在全世界范围内高速增长。据统计，生物技术产业达到了每3年增加5倍的增长速度，全球生物技术产业销售额约每5年翻一番，增长率高达25%~30%，是世界经济平均增长率的10倍左右。仅2004年，全球生物技术产业就吸引了200亿美元的投资，生物技术股市总市值达4 000亿美元。在发达国家，生物技术相关产业的产值一般要占GDP的20%~30%。2005年，全球生物技术市场规模达3万亿美元，2020年将达到15万亿美元。21世纪，继信息技术产业拉动信息经济以后，生物技术产业拉动生物经济的时代即将到来。所谓**生物经济**就是充分利用现代生物技术进步的成果进行生物及其附属产品市场化运作或直接为改善生命主体(特别是人类)生存质量服务的市场化运作的一种经济形态。与人们对物质生活需求和期望相比，21世纪的人类对生命质量和生命健康的追求与期望会越来越高。这种目前还看不到“拐点”的发展趋势正是拉动生物技术或生物经济发展的强劲动力之一(图12-41)。站在生物技术革命浪潮的前沿，抓住生物技术产业兴起的重大机遇，将有助于人类社会实现可持续发展和跨越式发展的目标。

21世纪，生命科学成为自然科学的带头学科，并将人类社会推进到“生物技术和生物经济的时代”。有人惊呼：第四次浪潮——生物经济，惊涛拍岸，汹涌而至！如何培养掌握生命科学与生物技术复合型人才来应对生物技术与生物经济的竞争和挑战？这是我们每一个人亟须严肃、认真、冷静思索的问题。

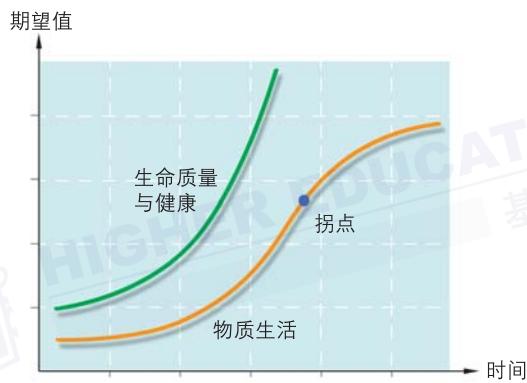


图 12-41 随着时间的推移，人们对物质生活的需求及期望与对生命质量及生命的追求与期望的比较示意图。随着时间的推移，人们对物质生活的需求和期望日益高涨，但其上升曲线(红线)在某一时期会出现数学图形上的拐点；进入 21 世纪以后，人类对于生命质量和生命的追求和期望曲线(蓝线)呈现指数方程曲线的形式，即从目前的发展趋势看，数学图形上看不到拐点。

二、生命有形，梦想无限——结语

细胞是生命的基本组成单位；新陈代谢、生长和运动是生命的本能；生命通过繁殖而延续，DNA 是生物遗传的基本物质；生物具有个体发育的经历和系统进化的历史；生物对外界刺激可产生应激反应并对环境具有适应性。所有生命个体，无论是单细胞还是多细胞，都具有与其功能高度协调的内部结构和外部形态。通过本课程的学习，我们应深切地认识到，生命有形有色，丰富多彩，世间万物，唯独生命是最美的。生命之美不但在“形”，更在其内在的规律及本质。人是生命的最高级形式，人体之美不但在“形”，更在其创新的思维和梦想。

我们享受生活，热爱学习，又乐于创新，因为我们具有生命。在本课程即将结束的时候，我们能初步领略到，生命又是一种艺术，这种艺术的精彩与魅力就在于：生命有形，梦想无限！

例如，暂且让我们来分享这样一个梦想：光合作用

的分子生物学是作者主持的实验室研究方向之一。有朝一日，科学家搞清楚了植物光合作用的全部机理，又能够利用重组 DNA 技术将光合作用的全套基因从叶片上转移到人的头发中，那时，只要在头上撒点水，再晒晒太阳，人的头发就能像叶片一样完成二氧化碳与水通过光合作用合成葡萄糖的过程，葡萄糖再输送到人体的各部分(图 12-42)……于是，人类就不再有饥饿，色、香、味、形俱佳的食物就成了满足人们味觉需要或精神需要的艺术品。我不敢说，这样的梦想就一定能实现；但谁也不要说，这个梦想将来就一定不能实现。

亲爱的年轻同学，本课程学完后，您是否也已经编织了什么梦想？

有形的生命，无限的梦想。同学们，祝你们学业有成、梦想成真！

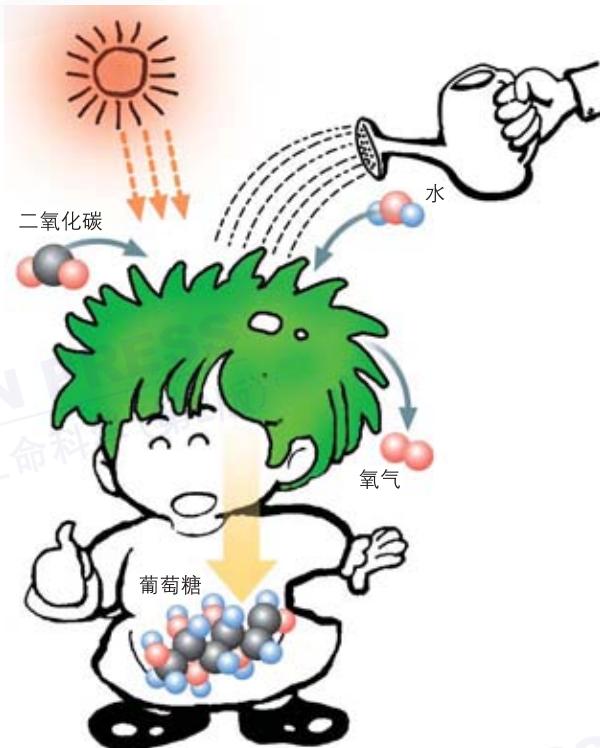


图 12-42 漫画：一个梦想



思考与讨论

1. 试讨论生物技术的定义和内容，为什么要突出强调生物技术的商品属性？
2. 为什么要将“工程”一词用于基因的操作？
3. 请给出基因克隆的定义。如何理解分子生物学家常说的“把某个基因克隆到某种生物中去”？克隆是名词，动词，还是既可做名词又可做动词？
4. 用逆转录方法从 mRNA 合成互补的目的基因片段有什么独到的好处？
5. 在 PCR 反应中，为什么科学家常合成 20 个左右碱基的核苷酸片段作为引物，而不用更多或更少碱基的核苷酸片段？
6. 一位神经生理学家对编码人脑细胞中一种神经递质蛋白的基因发生了兴趣。他已经知道这种蛋白质的氨基酸序列。请问，他如何识别编码神经递质的基因？他如何得到大量基因的拷贝？他如何生产这种神经递质？
7. 请简单说明电泳的原理和 Southern 印迹的操作步骤。
8. 请讨论重组 DNA 技术的实践意义。
9. 什么是生物芯片，你能说出生物芯片的工作原理与应用例证吗？
10. 请讨论分子诊断和基因治疗在防治疾病方面的应用前景。
11. 你认为目前若实施人体克隆，在技术上还存在哪些难题？会引起哪些社会问题？你认为克隆人最终会出现在我们身边吗？
12. 有人惊呼：生物经济，人类技术革命的第四次浪潮，惊涛拍岸，汹涌而至！请讨论：改善大学生的知识结构和培养生命科学与生物技术复合型人才对于应对生物技术与生物经济的竞争和挑战的重要性。

练习题

1. 名词解释：

生物技术 基因工程 蛋白质工程 细胞工程 发酵工程 转化 转化子 基因文库 基因克隆
逆转录 cDNA PCR 限制性内切酶 载体 质粒 凝胶电泳 DNA 探针 Southern 印迹
基因治疗 RNA 干扰技术 生物芯片 原代培养 继代培养 细胞融合 细胞重组 核移植
杂交瘤技术 单克隆抗体 生命伦理四原则 生物经济

2. 在进行 DNA 重组实验中，首先要获得目的基因，一般不使用下面哪种方法（ ）。

- a. 从细胞内部总 DNA 提取分离目的基因
- b. 构建基因文库，从中调取目的基因
- c. 以 mRNA 为模板，逆转录合成互补的 DNA 片段
- d. 利用 PCR 特异性地扩增所需的目的基因

3. PCR 反应中使用 TaqDNA 聚合酶，延伸过程一般所需要的温度是（ ）℃。

- a. 95
- b. 72
- c. 55
- d. 68

4. 电泳是常用的 DNA 检测方法,在电泳中 DNA 分子的泳动方向是()。
- 从负极向正极
 - 从正极向负极
 - 和正负极没有关系
 - 大片段向负极,小片段向正极
5. 在 Southern 印迹实验中,一般使用的探针是()。
- 带有同位素标记的单链 RNA 分子
 - 带有同位素标记的双链 DNA 分子
 - 带有同位素标记的单链 DNA 分子
 - 带有同位素标记的小分子蛋白
6. 为了重复克隆羊实验,从 A 猴子的体细胞中提取双倍体核,转入去核的 B 猴子的卵细胞中,植入 C 猴子的子宫当中进行培养,实验进行很成功,最后生下的猴子()。
- 与 A 相像
 - 与 B 相像
 - 与 C 相像
 - 同时具有 A、B、C 的特征
7. DNA 芯片技术和下面()技术的原理更相似。
- PCR
 - Northern 印迹
 - 电泳
 - 大规模集成电路
8. 在治疗 SCID 患者的过程中,最终导入患者体内的是()。
- 携带有正常 *ada* 基因的细菌
 - 已经整合了 *ada* 基因的病毒
 - 转入了 *ada* 基因的转基因 T 淋巴细胞
 - 直接将 *ada* 基因导入体内
9. 在用 ASO 方法对人类遗传病进行分子诊断时,正常的 ASO 和突变的 ASO 都显示浅色的杂交斑,则被检测样品属于()。
- 正常细胞
 - 杂合子细胞
 - 病变细胞
 - 无法判断
10. 下列()不是基因重组和克隆操作中最重要的工具。
- 限制性内切酶
 - 载体
 - Taq 酶
 - 宿主菌
11. 不可以作为基因重组载体的是()。
- 细菌质粒
 - 噬菌体
 - cosmid 质粒
 - 大肠杆菌
12. 关于限制性内切酶,下列说法错误的是()。
- 限制性内切酶是从细菌中分离提纯的蛋白酶
 - 限制性内切酶可以识别一小段特殊的核酸序列,并将其在特定位点处切开
 - 利用限制性内切酶可将外源基因连接到不同的载体上
 - 限制性内切酶是基因重组和克隆操作的重要工具
13. 科学家预言:人类历史上的第四次技术革命是()。
- 以计算机、网络为标志的电子信息技术
 - 以纳米材料为标志的材料技术
 - 以重组 DNA 和基因克隆为标志的生物技术
 - 以宇宙飞船、航天飞机为标志的航天技术

14. 利用大肠杆菌生产人胰岛素采用的技术是()。
- a. 基因工程技术
 - b. 蛋白质工程技术
 - c. 发酵工程技术
 - d. 细胞工程技术
15. RNA 干扰技术是用()来干扰相关基因的表达,让基因()。
- a. 一段内源 RNA 转录表达
 - b. 一段外源 RNA 沉默
 - c. 一段外源 DNA 转录表达
 - d. 一段外源 RNA 与 RNA 结合



相关网站

<http://biotech.icmb.utexas.edu/>
<http://www.icgeb.trieste.it/>
<http://www.biotech-monitor.nl/>
<http://www.hhmi.org/genetictrail/>
<http://www.nih.gov/sigs/bioethics/>