

第3章

基因工程

我国是棉花的生产和消费大国。棉花在种植过程中，常常会受到一些害虫的侵袭，其中以棉铃虫最为常见。棉铃虫可以使棉花产量减少三分之一，严重时，甚至能使一片棉田绝收。大量施用农药杀虫不仅会提高生产成本，还可能造成农产品和环境的污染。要是能培育出自身就能抵抗虫害的棉花新品种，这一问题就会迎刃而解，我国拥有自主知识产权的转基因抗虫棉就是在这样的背景下产生的。为什么传统的杂交育种方法培育不出抗虫棉，基因工程却可以呢？基因工程是如何进行操作的？它给我们的生产和生活带来了怎样的影响？



基因工程是指按照人们的愿望，通过转基因等技术，赋予生物新的遗传特性，创造出更符合人们需要的新的生物类型和生物产品。从技术操作层面看，由于基因工程是在DNA分子水平上进行设计和施工的，因此又叫作重组DNA技术。

基因工程的诞生和发展

基因工程是在生物化学、分子生物学和微生物学等学科的基础上发展起来的，正是这些学科的基础理论和相关技术的发展催生了基因工程。

1944年，艾弗里 (O. Avery, 1877—1955) 等人通过肺炎链球菌的转化实验，不仅证明了遗传物质是DNA，还证明了DNA可以在同种生物的不同个体之间转移。

1958年，梅塞尔森 (M. Meselson, 1930—) 和斯塔尔 (F. W. Stahl, 1929—) 用实验证明了DNA的半保留复制。随后不久，克里克提出中心法则。

1961年，尼伦伯格 (M. W. Nirenberg, 1927—2010) 和马太 (J. H. Matthaei, 1929—) 破译了第一个编码氨基酸的密码子。截至1966年，64个密码子均被成功破译。



限制酶产品

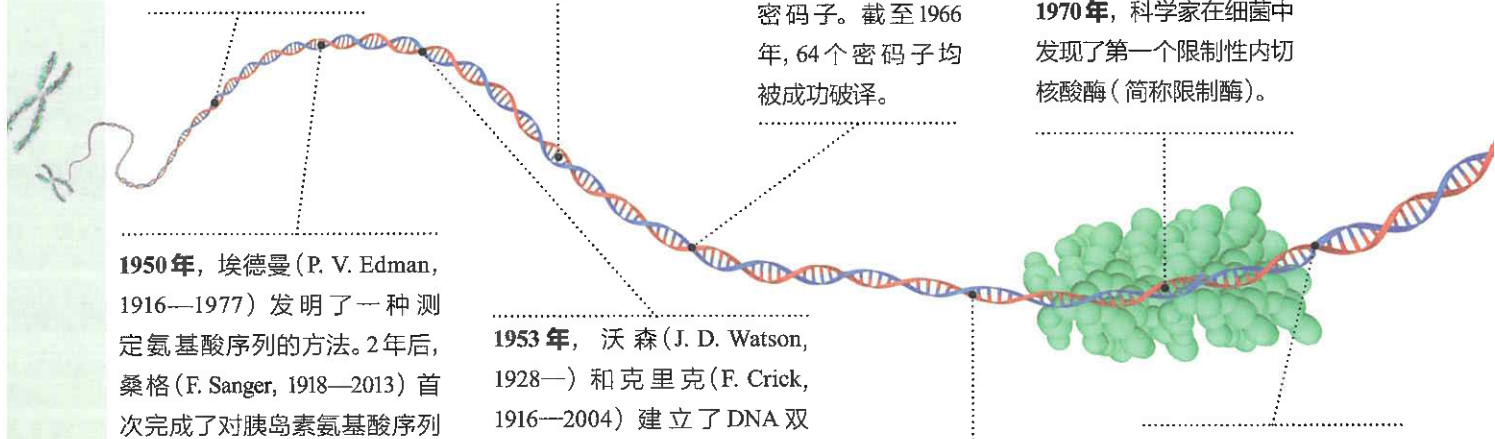
1970年，科学家在细菌中发现了第一个限制性内切核酸酶 (简称限制酶)。

1950年，埃德曼 (P. V. Edman, 1916—1977) 发明了一种测定氨基酸序列的方法。2年后，桑格 (F. Sanger, 1918—2013) 首次完成了对胰岛素氨基酸序列的测定。

1953年，沃森 (J. D. Watson, 1928—) 和克里克 (F. Crick, 1916—2004) 建立了DNA双螺旋结构模型并提出了遗传物质自我复制的假说。

1967年，科学家发现，在细菌拟核DNA之外的质粒有自我复制能力，并可以在细菌细胞间转移。

20世纪70年代初，多种限制酶、DNA连接酶和逆转录酶被相继发现。这些发现为DNA的切割、连接以及功能基因的获得创造了条件。



DNA双螺旋结构模型

上述仅是按照时间顺序简要提及基因工程相关基础理论的突破和技术的创新。有些你已经学习过，更多的将在本章中展开。科学提供对自然界的说明，技术将科学原理应用于认识自然、造福人类的实践，工程则综合运用多种技术来生产人类所需要的产品。科学、技术、工程和社会的互动，不断调整着人类与自然界的的关系，推动着文明的进步。



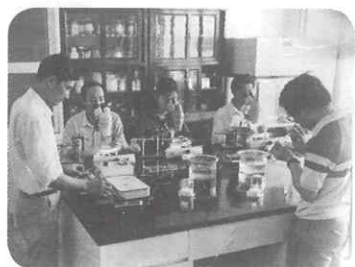
1972年，伯格（P. Berg, 1926—）首先在体外进行了DNA改造的研究，成功地构建了第一个体外重组DNA分子。

1977年，桑格等科学家发明了DNA序列分析的方法，为基因序列图的绘制提供了可能。此后，DNA合成仪的问世为体外合成DNA提供了方便。

1982年，第一个基因工程药物——重组人胰岛素被批准上市。基因工程药物成为世界各国研究和投资开发的热点。

1983年，科学家采用农杆菌转化法培育出世界上第一例转基因烟草。此后，基因工程进入了迅速发展的阶段。

1984年，我国科学家朱作言（1941—）领导的团队培育出世界上第一条转基因鱼。



朱作言（左一）研究小组在工作

1973年，科学家证明质粒可以作为基因工程的载体，构建重组DNA，导入受体细胞，使外源基因在原核细胞中成功表达，并实现物种间的基因交流。至此，基因工程正式问世。

1985年，穆里斯（K. Mullis, 1944—2019）等人发明PCR，为获取目的基因提供了有效手段。

1990年，人类基因组计划启动。2003年，该计划的测序任务顺利完成。

21世纪以来，科学家发明了多种高通量测序技术，可以实现低成本测定大量核酸序列，加速了人们对基因组序列的了解。



高通量基因测序仪

2013年，华人科学家张锋（1982—）及其团队首次报道利用最新的基因组编辑技术——CRISPR（成簇规律间隔短回文重复）技术编辑了哺乳动物基因组。该技术可以实现对特定基因的定点插入、敲除或替换。

第1节

重组DNA技术的基本工具

从社会中来

番木瓜容易受番木瓜环斑病毒的侵袭。当番木瓜被这种病毒感染后，产量会大大下降。科学家通过精心设计，用“分子工具”培育出了转基因番木瓜，它可以抵御番木瓜环斑病毒。

DNA双螺旋的直径只有2 nm，对如此微小的分子进行操作，是一项非常精细的工作，更需要专门的“分子工具”。那么，科学家究竟用到了哪些“分子工具”？这些“分子工具”各具有什么特征呢？



转基因番木瓜（左）与非转基因番木瓜（右）

本节聚焦

- 重组DNA技术所需的三种基本工具是什么？它们的作用分别是什么？
- 基因工程载体需要具备什么条件？

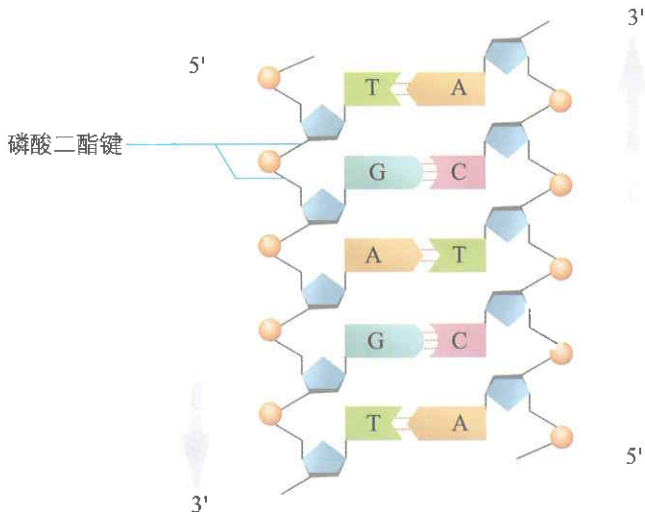
“工欲善其事，必先利其器”。在培育转基因番木瓜时，首先要在体外对含有所需要基因的DNA分子进行“切割”、改造和“拼接”；然后，将重组DNA分子导入番木瓜体细胞内，并使其在细胞中表达。实现这一精确的操作过程至少需要三种“分子工具”，即准确切割DNA分子的“分子手术刀”、将DNA片段再连接起来的“分子缝合针”和将体外重组好的DNA分子导入受体细胞的“分子运输车”。科学家正是靠这三种必需的工具（图3-1），才使培育转基因番木瓜这一奇妙构想变成了现实。



▲ 图3-1 重组DNA技术所需的三种基本工具示意图

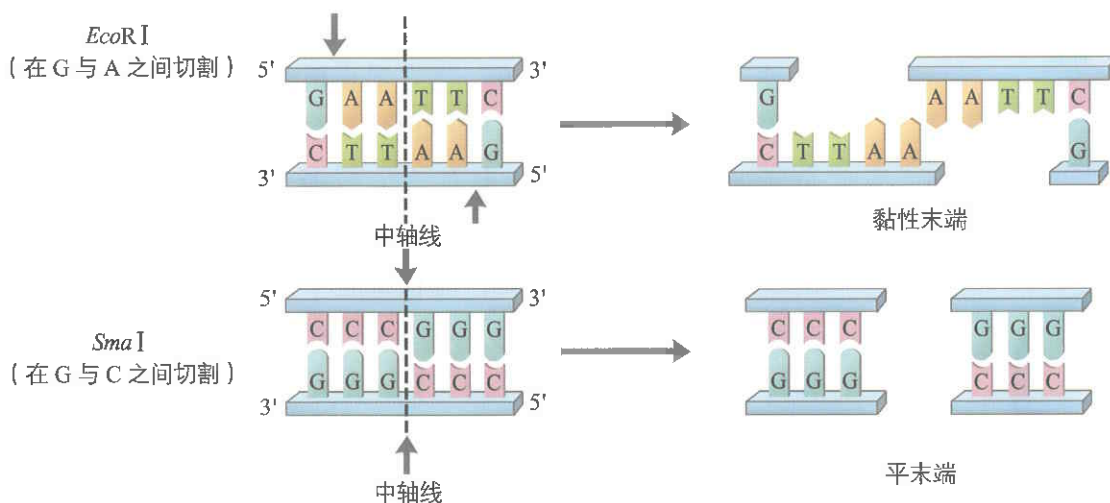
限制性内切核酸酶——“分子手术刀”

切割DNA分子的工具是限制性内切核酸酶（restriction endonuclease），又称限制酶（restriction enzyme）。这类酶主要是从原核生物中分离纯化出来的。迄今分离的限制酶有数千种，许多已经被商业化生产。它们能够识别双链DNA分子的特定核苷酸序列，并且使每一条链中特定部位的磷酸二酯键（图3-2）断开。



▲ 图3-2 双链DNA的结构和磷酸二酯键的位置示意图

大多数限制酶的识别序列由6个核苷酸组成。例如，*EcoRI*、*SmaI* 限制酶的识别序列均为6个核苷酸，也有少数限制酶的识别序列由4个、8个或其他数量的核苷酸组成。DNA分子经限制酶切割产生的DNA片段末端通常有两种形式——黏性末端和平末端（图3-3）。当限制酶在它识别序列的中心轴线（图中虚线）两侧将DNA分子的两条链分别切开时，产生的是黏性末端；当限制酶在它识别序列的中心轴线处切开时，产生的是平末端。



▲ 图3-3 限制酶切割DNA分子产生两种不同末端的示意图（箭头表示酶的切割位置）



你能根据所掌握的知识，推测限制酶存在于原核生物中的主要作用是什么吗？

资料卡

限制酶名字的由来

限制酶是如何命名的呢？是用生物属名的头一个字母与种加词的头两个字母，组成了3个字母的略语，以此来表示这个酶是从哪种生物中分离出来的。例如，一种限制

酶是从大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 的R型菌株分离来的，就用字母 *EcoR* 表示；如果它是从大肠杆菌R型菌株中分离出来的第一种限制酶，则进一步表示成 *EcoRI*。



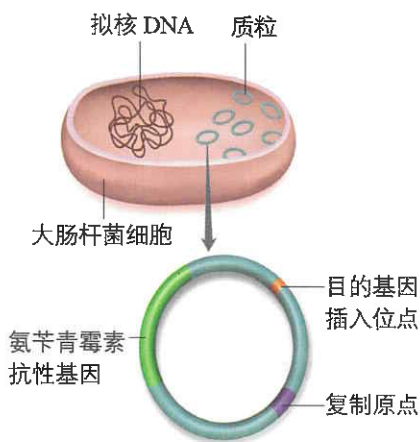
DNA 连接酶与 DNA 聚合酶是一回事吗？为什么？

DNA 连接酶——“分子缝合针”

将切下来的DNA片段拼接成新的DNA分子，是靠DNA连接酶来完成的。1967年，世界上几个实验室几乎同时发现了一种能够将两个DNA片段连接起来的酶，称之为DNA连接酶 (DNA ligase)。在基因工程操作中，DNA连接酶主要有两类：一类是从大肠杆菌中分离得到的，称为 *E.coli* DNA连接酶；另一类是从T4噬菌体中分离出来的，称为T4 DNA连接酶。这两类酶都能将双链DNA片段“缝合”起来，恢复被限制酶切开的磷酸二酯键，但这两种酶的作用有所差别。*E.coli* DNA连接酶只能将具有互补黏性末端的DNA片段连接起来，不能连接具有平末端的DNA片段。而T4 DNA连接酶既可以“缝合”双链DNA片段互补的黏性末端，又可以“缝合”双链DNA片段的平末端，但连接平末端的效率相对较低。

基因进入受体细胞的载体——“分子运输车”

怎样才能将外源基因送入细胞呢？通常是利用质粒 (plasmid) 作为载体 (vector)，将基因送入细胞。质粒是一种裸露的、结构简单、独立于真核细胞细胞核或原核细胞拟核DNA之外，并具有自我复制能力的环状双链DNA分子。质粒DNA分子上有一个至多个限制酶切割位点，供外源DNA片段 (基因) 插入其中。携带外源DNA片段的质粒进入受体细胞后，能在细胞中进行自我复制，或整合到受体DNA上，随受体DNA同步复制。在基因工程操作中，真正被用作载体的质粒，都是在天然质粒的基础上进行过人工改造的。这些质粒上常有特殊的标记基因，如四环素抗性基因、氨苄青霉素抗性基因等，便于重组DNA分子的筛选 (图3-4)。



▲ 图3-4 大肠杆菌及质粒结构模式图

在基因工程中使用的载体除质粒外，还有噬菌体、动植物病毒等。它们的来源不同，在大小、结构、复制方式以及可以插入外源DNA片段的大小上也有很大差别。这些基因工程载体，相当于一种运输工具，因此将它们比喻为“分子运输车”。

思考·讨论

重组 DNA 分子

请在两张纸上分别写上下列两段DNA序列：

5' -ATAGCATGCTATCCATGAATTCGGCATAC- 3'

3' -TATCGTACGATAGGTAAGCCGTATG- 5'

5' -TCCTAGAATTCTCGGTATGAATTCATAC- 3'

3' -AGGATCTTAAGAGCCATACTTAAGGTATG- 5'

请你根据图3-3中的相关信息找到两条片段上 *EcoRI* 的识别序列和切割位点。然后，用剪刀进行“切割”。待切割位点全部切开后，将从下面那条DNA链上切下的片段重组到上面那条DNA链的切口处，并用透明胶条将切口粘连起来。

讨论

1. 剪刀和透明胶条分别代表哪种“分子工具”？
2. 你制作的黏性末端的碱基能不能互补配对？如果不能，可能是什么原因造成的？
3. 你插入的DNA片段能称得上一个基因吗？

到社会中去

随着生物技术的飞速发展，生产和销售“分子工具”的公司大量涌现。感兴趣的话，你可以登录这些公司的网站，查询和了解相关产品的特点、价格和使用说明等。有些这样的公司已成功上市，你还可以通过分析公司的股票价格走势，大致了解公司的经营状况以及投资者目前对该行业的认可程度。



基因工程操作的部分用品

DNA 的粗提取与鉴定

DNA、RNA、蛋白质和脂质等在物理和化学性质方面存在差异，可以利用这些差异，选用适当的物理或化学方法对它们进行提取。例如，DNA 不溶于酒精，但某些蛋白质溶于酒精，利用这一原理，可以初步分离 DNA 与蛋白质。DNA 在不同浓度的 NaCl 溶液中溶解度不同，它能溶于 2 mol/L 的 NaCl 溶液。在一定温度下，DNA 遇二苯胺试剂会呈现蓝色，因此二苯胺试剂可以作为鉴定 DNA 的试剂。

目的要求

1. 了解 DNA 的物理和化学性质，理解 DNA 粗提取和鉴定的原理。
2. 学会 DNA 粗提取的方法以及用二苯胺试剂对 DNA 进行鉴定。

材料用具

1. 材料：新鲜洋葱（也可以选择香蕉、菠菜、菜花和猪肝等作为实验材料，提取 DNA 的方法可能稍有不同）、研磨液、体积分数为 95% 的酒精、2 mol/L 的 NaCl 溶液、二苯胺试剂和蒸馏水等。研磨液和二苯

胺试剂的配制方法参见本书附录 2。

2. 用具：烧杯、量筒、玻璃棒、研钵、纱布、漏斗、试管、试管架、试管夹、酒精灯、石棉网、三脚架、火柴、刀片和天平等。

方法步骤

1. 称取约 30 g 洋葱，切碎，然后放入研钵中，倒入 10 mL 研磨液，充分研磨。

2. 在漏斗中垫上纱布，将洋葱研磨液过滤到烧杯中，在 4 °C 冰箱中放置几分钟后，再取上清液。也可以直接将研磨液倒入塑料离心管中，在 1 500 r/min 的转速下离心 5 min，再取上清液放入烧杯中。

3. 在上清液中加入体积相等的、预冷的酒精溶液（体积分数为 95%），静置 2~3 min，溶液中出现的白色丝状物就是粗提取的 DNA。用玻璃棒沿一个方向搅拌，卷起丝状物，并用滤纸吸去上面的水分；或者将溶液倒入塑料离心管中，在 10 000 r/min



研磨洋葱

练习与应用

一、概念检测

1. DNA 连接酶是重组 DNA 技术常用的一种工具酶。下列相关叙述正确的是（ ）
 - A. 能连接 DNA 分子双链碱基对之间的氢键
 - B. 能将单个脱氧核苷酸加到 DNA 片段的末端，形成磷酸二酯键
 - C. 能连接用同种限制酶切开的两条 DNA 片段，重新形成磷酸二酯键
 - D. 只能连接双链 DNA 片段互补的黏性末端，不能连接双链 DNA 片段的平末端
2. 在重组 DNA 技术中，将外源基因送入受

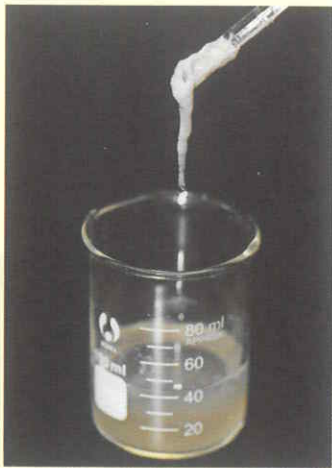
体细胞的载体可以是

()

- A. 大肠杆菌的质粒
- B. 切割 DNA 分子的酶
- C. DNA 片段的黏性末端
- D. 用来识别特定基因的 DNA 探针

二、拓展应用

1. 想一想，为什么限制酶不切割细菌本身的 DNA 分子？
2. 有 2 个不同来源的 DNA 片段 A 和 B，A 片段用限制酶 *Spe*I 进行切割，B 片段分别用限制酶



用冷却的酒精析出DNA

的转速下离心5 min，弃上清液，将管底的沉淀物（粗提取的DNA）晾干。

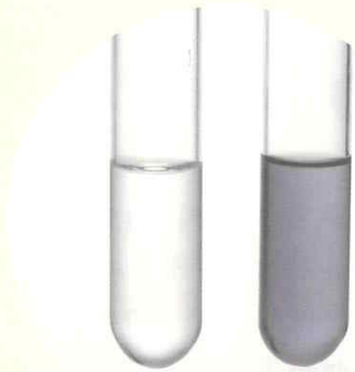
4. 取两支20 mL的试管，各加入2 mol/L的NaCl溶液5 mL。将丝状物或沉淀物溶于其中一支试管的NaCl溶液中。然后，向两支试管中各加入4 mL的二苯胺试剂。混合均匀后，将试管置于沸水中加热5 min。待试管冷却后，比较两支试管中溶液颜色的变化。

结果分析与评价

1. 你提取出白色丝状物或沉淀物了吗？用二苯胺试剂鉴定的结果如何？



鉴定DNA



鉴定结果

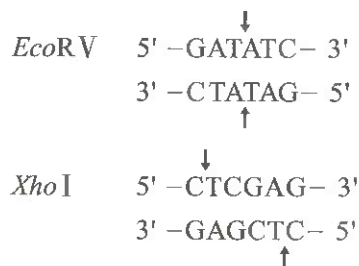
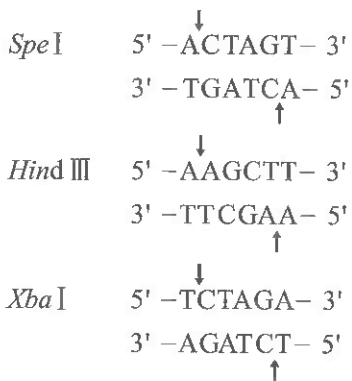
2. 你能分析出粗提取的DNA中可能含有哪些杂质吗？

3. 与其他同学提取的DNA进行比较，看看实验结果有何不同，分析产生差异的原因。

进一步探究

本实验只是对DNA进行了粗提取，请查阅资料，了解实验室提取纯度较高的DNA的一种方法，并与本实验中所使用的方法进行比较，总结两种方法的异同。

Hind III、*Xba* I、*Eco*RV和*Xho* I进行切割。各限制酶的识别序列和切割位点如下。



(1) 哪种限制酶切割B片段产生的DNA片段能与限制酶*Spe*I切割A片段产生的DNA片段相连接？为什么？

(2) 不同的限制酶切割可能产生相同的黏性末端，这在基因工程操作中有什么意义？

第2节

基因工程的基本操作程序

从社会中来

1997年，我国政府首次批准商业化种植转基因抗虫棉。到2015年，我国已育成转基因抗虫棉新品种100多个，减少农药用量40万吨，增收节支社会经济效益450亿元。你知道转基因抗虫棉抗虫的机制是什么吗？培育转基因抗虫棉一般需要哪些步骤？



转基因抗虫棉（使棉铃虫死亡，左）与非转基因抗虫棉（右）

◎ 本节聚焦

- 基因工程的基本操作程序主要包括哪几个步骤？
- 基因工程操作的每一步涉及的技术和方法有哪些？

培育转基因抗虫棉主要需要四个步骤：目的基因的筛选与获取、基因表达载体的构建、将目的基因导入受体细胞、目的基因的检测与鉴定。

第一步：目的基因的筛选与获取

在基因工程的设计和操作中，用于改变受体细胞性状或获得预期表达产物等的基因就是目的基因。根据不同的需要，目的基因是不同的，它主要是指编码蛋白质的基因，如与生物抗逆性、优良品质、生产药物、毒物降解和工业用酶等相关的基因。

苏云金杆菌（*Bacillus thuringiensis*）通过产生苏云金杆菌伴孢晶体蛋白（Bt抗虫蛋白），破坏鳞翅目昆虫的消化系统来杀死棉铃虫。科学家通过实验，将该细菌的“杀虫基因”转到棉花里，让棉花也能产生Bt抗虫蛋白抵抗虫害。这个“杀虫基因”就是培育转基因抗虫棉用到的目的基因——Bt抗虫蛋白基因，简称Bt基因。

那么，如何筛选目的基因呢？

筛选合适的目的基因

在浩瀚的“基因海洋”中找到所需要的目的基因往往不容易，从相关的已知结构和功能清晰的基因中进行筛选是较为有效的方法之一。在培育转基因抗虫棉之前，用苏

云金杆菌制成的生物杀虫剂广泛用于防治棉花虫害已有多年的历史。研究表明，苏云金杆菌的杀虫作用与*Bt*基因有关。科学家不仅掌握了*Bt*基因的序列信息，也对*Bt*基因的表达产物——*Bt*抗虫蛋白有了较为深入的了解。因此，*Bt*基因是培育转基因抗虫棉较为合适的目的基因。

随着测序技术的发展，以及序列数据库（如GenBank）、序列比对工具（如BLAST）等的应用，越来越多的基因的结构和功能为人们所知，这也为科学家找到合适的目的基因提供了更多的机会和可能。

明确了目的基因后，该怎么获得它呢？

利用 PCR 获取和扩增目的基因

获取目的基因的方法有多种。在我国首批具有较高抗虫活性的转基因抗虫棉的培育过程中，科学家人工合成了目的基因。现在，常用PCR特异性地快速扩增目的基因。

PCR是聚合酶链式反应的缩写。它是一项根据DNA半保留复制的原理，在体外提供参与DNA复制的各种组分与反应条件，对目的基因的核苷酸序列进行大量复制的技术（表3-1）。该技术由穆里斯等人于1985年发明，为此，穆里斯于1993年获得了诺贝尔化学奖。

▼表3-1 DNA复制所需的基本条件

参与的组分	在DNA复制中的作用
解旋酶（体外用高温代替）	打开DNA双链
DNA母链	提供DNA复制的模板
4种脱氧核苷酸	合成DNA子链的原料
DNA聚合酶	催化合成DNA子链
引物	使DNA聚合酶能够从引物的3'端开始连接脱氧核苷酸

PCR反应需要在一定的缓冲溶液中才能进行，需提供DNA模板，分别与两条模板链结合的2种引物，4种脱氧核苷酸和耐高温的DNA聚合酶；同时通过控制温度使DNA复制在体外反复进行。扩增的过程是：目的基因DNA受热变性后解为单链，引物与单链相应互补序列结合；然后以单链DNA为模板，在DNA聚合酶作用下进行延伸，

相关信息

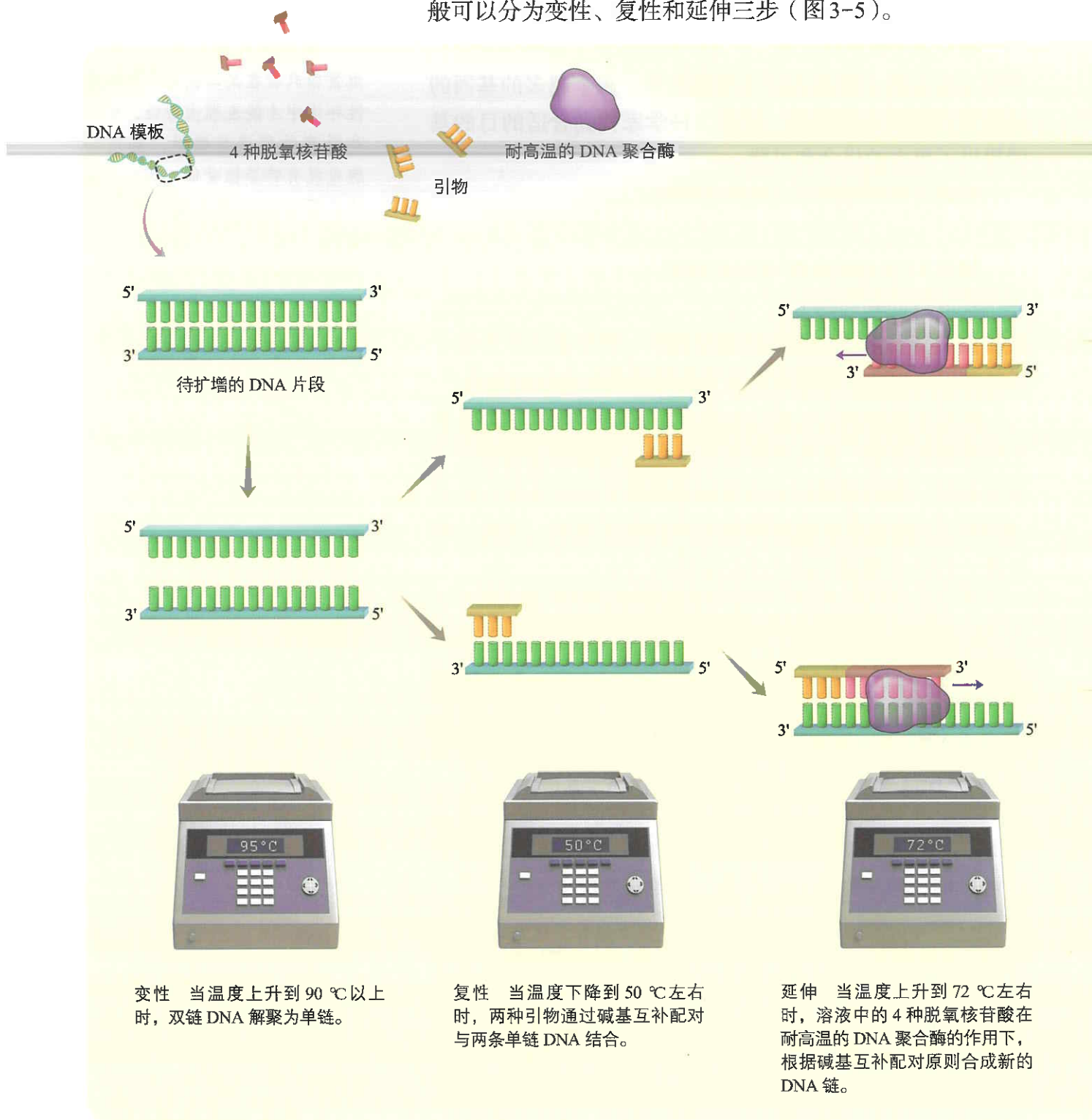
当*Bt*抗虫蛋白被分解为多肽后，多肽与害虫肠上皮细胞的特异性受体结合，导致细胞膜穿孔，最后造成害虫死亡。*Bt*抗虫蛋白只有在某类昆虫肠道的碱性环境中才能表现出毒性，而人和牲畜的胃液呈酸性，肠道细胞也没有特异性受体。因此，*Bt*抗虫蛋白不会对人畜产生上述影响。

相关信息

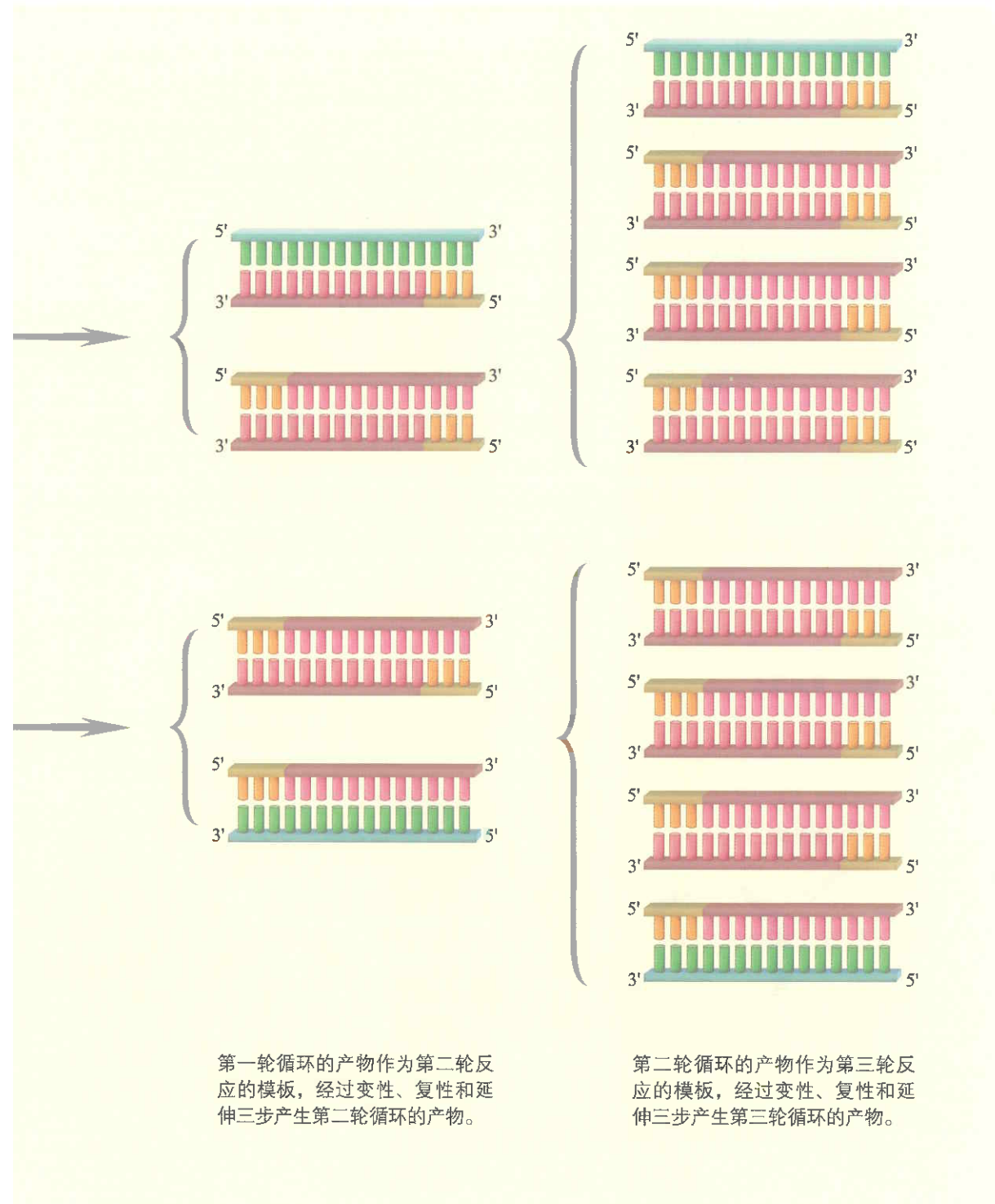
真核细胞和细菌的DNA聚合酶都需要 Mg^{2+} 激活。因此，PCR反应缓冲溶液中一般要添加 Mg^{2+} 。

引物是一小段能与DNA母链的一段碱基序列互补配对的短单链核酸。用于PCR的引物长度通常为20~30个核苷酸。

即将4种脱氧核苷酸加到引物的3'端，如此重复循环多次。由于延伸后得到的产物又可以作为下一个循环的模板，因而每一次循环后目的基因的量可以增加一倍，即成指数形式扩增（约为 2^n ，其中 n 为扩增循环的次数）。每次循环一般可以分为变性、复性和延伸三步（图3-5）。



▲ 图3-5 PCR反应过程示意图
（注：示意图中的引物长度和待扩增的DNA片段的长度均短于实际长度。）



上述过程可以在PCR扩增仪（PCR仪）中自动完成，完成以后，常采用琼脂糖凝胶电泳来鉴定PCR的产物。



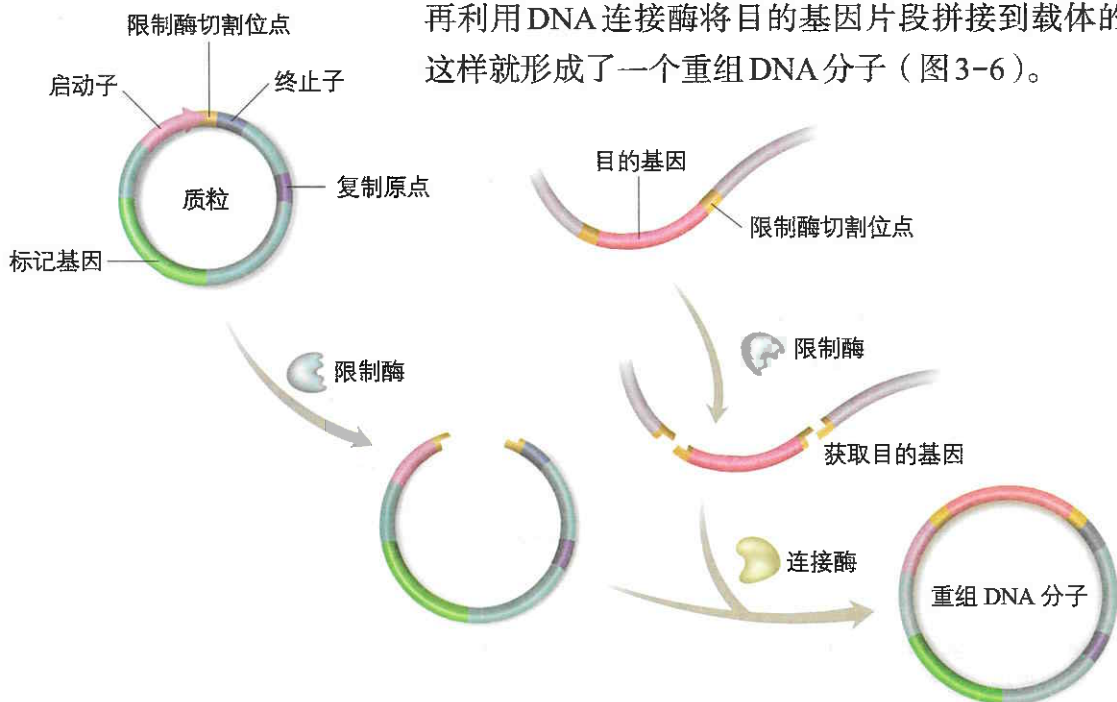
将生物的所有DNA直接导入受体细胞不是更简便吗？如果这么做，效果会怎样？

第二步：基因表达载体的构建

获取了足够量的 *Bt* 基因后，下一步就是要让基因在受体细胞中稳定存在，并且遗传给下一代；同时，使 *Bt* 基因能够表达和发挥作用，这就需要构建基因表达载体。这一步是培育转基因抗虫棉的核心工作。

基因表达载体是载体的一种，除目的基因、标记基因外，它还必须有启动子（promoter）、终止子（terminator）等。启动子是一段有特殊序列结构的DNA片段，位于基因的上游，紧挨转录的起始位点，它是RNA聚合酶识别和结合的部位，有了它才能驱动基因转录出mRNA，最终表达出人类需要的蛋白质。有时为了满足应用需要，会在载体中人工构建诱导型启动子，当诱导物存在时，可以激活或抑制目的基因的表达。终止子相当于一盏红色信号灯，使转录在所需要的地方停下来，它位于基因的下游，也是一段有特殊序列结构的DNA片段。

在构建抗虫棉的基因表达载体时，首先会用一定的限制酶切割载体，使它出现一个切口；然后用同种限制酶或能产生相同末端的限制酶切割含有目的基因的DNA片段；再利用DNA连接酶将目的基因片段拼接到载体的切口处，这样就形成了一个重组DNA分子（图3-6）。



▲图3-6 基因表达载体构建模式图

第三步：将目的基因导入受体细胞

构建好的基因表达载体需要通过一定的方式才能进入受体细胞。我国科学家采用他们独创的一种方法——花粉管通道法，将 *Bt* 基因导入了棉花细胞。花粉管通道法有

多种操作方式。例如，可以用微量注射器将含目的基因的DNA溶液直接注入子房中；可以在植物受粉后的一定时间内，剪去柱头，将DNA溶液滴加在花柱切面上，使目的基因借助花粉管通道进入胚囊。除此之外，将目的基因导入植物细胞常用的方法还有农杆菌转化法。

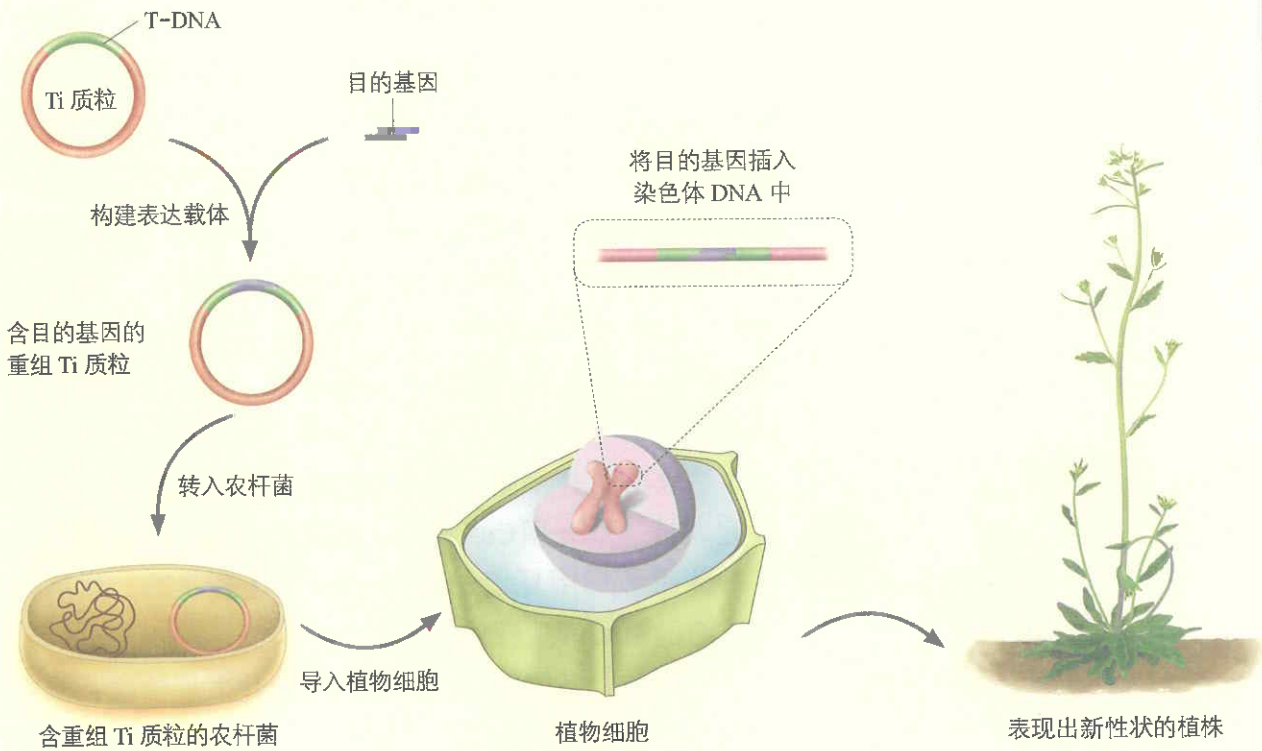
资料卡

农杆菌转化法

转化 (transformation) 是指目的基因进入受体细胞内，并且在受体细胞内维持稳定和表达的过程。

农杆菌是一种在土壤中生活的微生物，能在自然条件下侵染双子叶植物和裸子植物，而对大多数单子叶植物没有侵染能力。农杆菌细胞内含有Ti质粒，当它侵染植物细胞后，能将Ti质粒上的T-DNA (可转移的DNA) 转移到被侵染的细胞，并且将其整合到该细胞的染色体DNA上。根据农杆菌的这种特点，如果将目

的基因插入Ti质粒的T-DNA中，通过农杆菌的转化作用，就可以使目的基因进入植物细胞。根据受体植物的不同，所用的具体转化方法有所区别。例如，可以将新鲜的从叶片上取下的圆形小片与农杆菌共培养，然后筛选转化细胞，并再生成植株；可以将花序直接浸没在含有农杆菌的溶液中一段时间，然后培养植株并获得种子，再进行筛选、鉴定等。随着转化方法的突破，用农杆菌侵染水稻、玉米等多种单子叶植物也取得了成功。



农杆菌转化法示意图

第四步：目的基因的检测与鉴定

目的基因进入受体细胞后，是否稳定维持和表达其遗传特性，只有通过检测与鉴定才能知道，这也是检查转基因抗虫棉是否培育成功的一步。

首先是分子水平的检测，包括通过PCR等技术检测棉花的染色体DNA上是否插入了*Bt*基因或检测*Bt*基因是否转录出了mRNA；从转基因棉花中提取蛋白质，用相应的抗体进行抗原—抗体杂交，检测*Bt*基因是否翻译成*Bt*抗虫蛋白等。

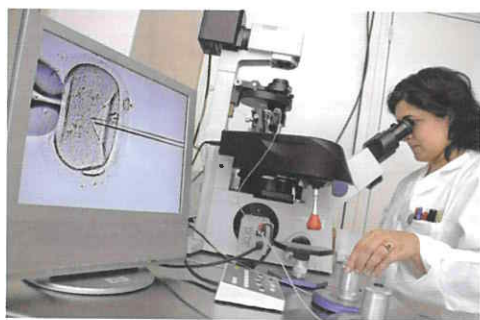
其次，还需要进行个体生物学水平的鉴定。例如，通过采摘抗虫棉的叶片饲喂棉铃虫来确定*Bt*基因是否赋予了棉花抗虫特性以及抗性的程度。

上述培育转基因抗虫棉的四个步骤，其实就反映了基因工程的基本操作程序（图3-7）。



▲ 图3-7 基因工程的基本操作流程图

在获得转基因产品的过程中，还可以通过构建基因文库来获取目的基因，并且由于不同转基因产品所需要的目的基因不同，受体细胞又有植物、动物、微生物之分，因此基因表达载体的构建方法不是千篇一律的，将目的基因导入受体细胞的方法也不是完全相同的。例如，将目的基因导入动物受精卵最常用的一种方法是利用显微注射将目的基因注入动物的受精卵中（图3-8），这个受精卵将发育成为具有新性状的动物。在基因工程操作中，常用原核生物作为受体细胞，其中以大肠杆菌应用最为广泛。研究人员一般先用 Ca^{2+} 处理大肠杆菌细胞，使细胞处于一种能吸收周围环境中DNA分子的生理状态，然后再将重组的基因表达载体导入其中。



▲ 图3-8 研究人员正在进行显微注射操作

目前，基因工程已经步入产业化发展阶段，具有巨大的生产力和发展潜力，我们在充满信心和期待的同时，还要严格规范操作流程，科学、客观地评估风险，只有这样，才能让基因工程永葆生机。

转基因抗虫棉在世界范围内被广泛种植，有效控制了棉铃虫的种群数量，显著减少了农药的用量。面对棉铃虫的危害，有了抗虫棉是否就可以一劳永逸、高枕无忧呢？根据棉铃虫对传统农药产生抗性的发展历史，科研人员推测棉铃虫存在对Bt抗虫蛋白产生抗性的可能。请你查阅资料，了解以下问题。

1. 在实际种植过程中，棉铃虫是否对转*Bt*基因的抗虫棉产生了严重的抗性？证据是什么？
2. 科研工作者在没有发现棉铃虫出现抗性之前，就应该想办法应对。他们想出的延缓棉铃虫对Bt抗虫蛋白产生抗性的措施有哪些？这些措施的原理是什么？有效吗？

练习与应用

一、概念检测

1. 研究人员将一种海鱼的抗冻蛋白基因*afp*整合到土壤农杆菌的Ti质粒上，然后用它感染番茄细胞，获得了抗冻的番茄品种。判断下列相关表述是否正确。

(1) *afp*基因是培育抗冻番茄用到的目的基因。 ()

(2) 构建含有*afp*基因的Ti质粒需要限制酶、DNA连接酶和核酸酶。 ()

(3) 只要检测出番茄细胞中含有*afp*基因，就代表抗冻番茄培育成功。 ()

2. 利用PCR既可以快速扩增特定基因，也可以检测基因的表达。下列有关PCR的叙述错误的是 ()

- A. PCR用的DNA聚合酶是一种耐高温酶
- B. 变性过程中双链DNA的解开不需要解旋酶
- C. 复性过程中引物与模板链的结合遵循碱基互补配对原则
- D. 延伸过程中需要DNA聚合酶、ATP和4种核糖核苷酸

二、拓展应用

1. 研究人员在研究转基因烟草中外源卡那霉素抗性基因的遗传稳定性时，发现44株转基因烟草中有4株该基因的遗传不符合孟德尔遗传规律，在它们的自交后代中出现了较多的没有卡那霉素抗性的植株。请查找相关资料，尝试对这个问题作出解释。

2. 八氢番茄红素合酶（其基因用*psy*表示）和胡萝卜素脱饱和酶（其基因用*crtI*表示）参与 β -胡萝卜素的合成。*pmi*为磷酸甘露醇异构酶基因，它编码的蛋白质可使细胞在特殊培养基上生长。科学家将*psy*和*crtI*基因转入水稻，使水稻胚乳中富含 β -胡萝卜素，由此生产出的大米称为“黄金大米”。请根据以上信息回答下列问题。



普通大米（左）和“黄金大米”（右）
【这项研究成果发表在《自然·生物技术》
(*Nature Biotechnology*)杂志上】

(1) 科学家在培育“黄金大米”时，将*crtI*和*psy*基因导入含*pmi*基因的质粒中，构建了质粒pSYN12424。该项研究的目的是_____，标记基因是_____，质粒pSYN12424的作用是_____。

(2) 在构建质粒载体时，目的基因序列中能否含有用到的限制酶的识别序列？为什么？

(3) 请查找相关资料，了解科学家为什么要培育“黄金大米”以及当前关于“是否要推广‘黄金大米’”的各种争论。你还可以提出自己的看法，并与同学交流讨论。

DNA 片段的扩增及电泳鉴定

利用PCR可以在体外进行DNA片段的扩增。PCR利用了DNA的热变性原理，通过调节温度来控制DNA双链的解聚与结合。PCR仪实质上就是一台能够自动调控温度的仪器。一次PCR一般要经历30次循环。

DNA分子具有可解离的基团，在一定的pH下，这些基团可以带上正电荷或负电荷。在电场的作用下，这些带电分子会向着与它所带电荷相反的电极移动，这个过程就是电泳。PCR的产物一般通过琼脂糖凝胶电泳来鉴定。在凝胶中DNA分子的迁移速率与凝胶的浓度、DNA分子的大小和构象等有关。凝胶中的DNA分子通过染色，可以在波长为300 nm的紫外灯下被检测出来。



方法步骤

1. 用微量移液器按照右栏中的配方或PCR试剂盒的说明书，在微量离心管中依次加入各组分。



PCR加样操作

目的要求

1. 了解PCR和电泳鉴定的基本原理。
2. 尝试进行PCR的基本操作并用电泳鉴定PCR的产物。

材料用具

PCR仪、微量离心管、微量移液器、一次性吸液枪头、电泳装置（包括电泳仪、电泳槽等）、4种脱氧核苷酸的等量混合液、2种引物、*Taq* DNA聚合酶、模板DNA、扩增缓冲液、无菌水、电泳缓冲液、凝胶载样缓冲液、琼脂糖和核酸染料等。相关试剂的配方参见本书附录3。



琼脂糖凝胶电泳装置

PCR反应体系的配方

10倍浓缩的扩增缓冲液	5 μL
20 mmol/L的4种脱氧核苷酸的等量混合液	1 μL
20 $\mu\text{mol/L}$ 的引物 I	2.5 μL
20 $\mu\text{mol/L}$ 的引物 II	2.5 μL
H ₂ O	28~33 μL
1~5 U/ μL 的 <i>Taq</i> DNA聚合酶	1~2 U
模板DNA	5~10 μL
总体积	50 μL

注：模板DNA的用量为1 pg~1 μg 。

2. 待所有的组分都加入后, 盖严离心管的盖子。将微量离心管放入离心机里, 离心约 10 s, 使反应液集中在管的底部。

3. 参照下表的参数, 设置好 PCR 仪的循环程序。将装有反应液的微量离心管放入 PCR 仪中进行反应。

循环程序	变性	复性	延伸
预变性	94 °C, 5 min	/	/
30 次	94 °C, 30 s	55 °C, 30 s	72 °C, 1 min
最后 1 次	94 °C, 1 min	55 °C, 30 s	72 °C, 1 min

4. 根据待分离 DNA 片段的大小, 用电泳缓冲液配制琼脂糖溶液, 一般配制质量体积比为 0.8% ~ 1.2% 的琼脂糖溶液。在沸水浴或微波炉内加热至琼脂糖融化。稍冷却后, 加入适量的核酸染料混匀。

5. 将温热的琼脂糖溶液迅速倒入模具, 并插入合适大小的梳子, 以形成加样孔。

6. 待凝胶溶液完全凝固, 小心拔出梳子, 取出凝胶放入电泳槽内。

7. 将电泳缓冲液加入电泳槽中, 电泳缓冲液没过凝胶 1 mm 为宜。

8. 将扩增得到的 PCR 产物与凝胶载样缓冲液 (内含指示剂) 混合, 再用微量移液器将混合液缓慢注入凝胶的加样孔内。留一个加样孔加入指示分子大小的标准参照物。

9. 接通电源, 根据电泳槽阳极至阴极之间的距离来设定电压, 一般为 1 ~ 5 V/cm。待指示剂前沿迁移接近凝胶边缘时, 停止电泳。

10. 取出凝胶置于紫外灯下观察和照相。



观察电泳鉴定结果

注意

1. 为避免外源 DNA 等因素的污染, PCR 实验中使用的微量离心管、枪头和蒸馏水等在使用前必须进行高压灭菌处理。

2. 该实验所需材料可以直接从公司购买, 缓冲液和酶应分装成小份, 并在 -20 °C 储存。使用前, 将所需试剂从冰箱拿出, 放在冰块上缓慢融化。

3. 在向微量离心管中添加反应组分时, 每吸取一种试剂后, 移液器上的枪头都必须更换。

4. 在进行操作时, 一定要戴好一次性手套。

结果分析与评价

1. 你是否成功扩增出 DNA 片段? 判断的依据是什么?

2. 你进行电泳鉴定的结果是几条条带? 如果不止一条条带, 请分析产生这个结果的可能原因。



往凝胶加样孔内加样的操作



历史不能忘记中国科学家对 PCR 的贡献

PCR从畅想到实现，真的就是穆里斯一个人的功劳吗？其实这里也有中国人的贡献。

1972年，穆里斯在加州大学伯克利分校获得有机合成专业博士学位。1979年，他进入“西特斯”(Cetus)生物技术公司任职，负责合成供实验用的寡核苷酸(短链的DNA分子)。1983年8月，他首次在公司里做了有关PCR原理的报告，但大家反应冷淡，认为这个原理太简单了，如果可行，早就有人做了。

1986年5月，穆里斯经公司主管向沃森推荐，第一次受邀在一次“人类分子生物学”专题研讨会上做了PCR原理及实验应用的报告，这形成了先入为主的印象，即PCR是穆里斯一人发明的，为此，1993年穆里斯获得了诺贝尔化学奖。然而，将PCR变成真正成熟技术的“临门一脚”，则是由中国科学家

钱嘉韵完成的，是她发现并分离了耐高温的DNA聚合酶。

钱嘉韵是我国台湾的科学家，她是第一个报道分离耐高温DNA聚合酶工作的人。1973年，钱嘉韵就读于美国俄亥俄州辛辛那提大学生物系，她的导师对在黄石国家公园热泉中发现的嗜热菌十分好奇，他让钱嘉韵以该菌作为研究对象。钱嘉韵不负师望，从该菌中成功地分离了耐高温的DNA聚合酶，并于1976年在《细菌学杂志》上以第一作者身份发表了相关论文。这篇论文在科学界被广泛引用。“西特斯”公司的工作人员正是按照钱嘉韵等人发明的操作步骤，才成功地分离了这种DNA聚合酶，并将其用于PCR。该酶不但专一性和活性优于之前使用的DNA聚合酶，而且它使PCR变得十分简捷，大大降低了成本。自此，PCR被逐渐推广应用。



美国黄石国家公园的热泉

第3节

基因工程的应用

从社会中来

胰岛素是治疗糖尿病的特效药物。传统生产胰岛素的方法是从猪、牛等动物的胰腺中提取。曾经生产供一位糖尿病病人使用一年的胰岛素，需要上千头牛，生产的成本非常高。1978年，科学家将编码人胰岛素的基因导入大肠杆菌细胞中，使大肠杆菌表达重组人胰岛素。我国拥有自主知识产权的基因工程药物——重组人胰岛素已经研制成功并得到广泛应用。除了生产胰岛素，基因工程还有哪些应用呢？



重组人胰岛素注射液

基因工程自20世纪70年代兴起后，得到了飞速的发展，在农牧业、医药卫生和食品工业等方面，展示出广阔的前景。

基因工程在农牧业方面的应用

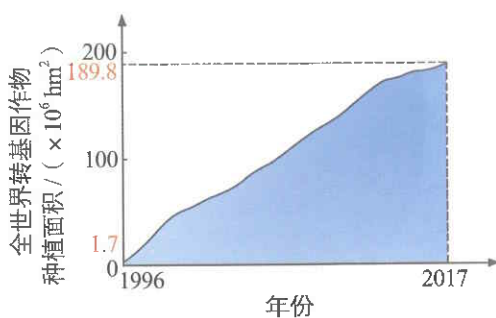
基因工程在农牧业中的应用发展迅速。1996—2017年，全世界转基因作物的种植面积增加了一百多倍，从 $1.7 \times 10^6 \text{ hm}^2$ 发展到 $1.898 \times 10^8 \text{ hm}^2$ (图3-9)。据2016年世界范围的统计数据表明，转基因作物的种植使化学杀虫剂施用量减少了8.2%，作物产量增加了 $6.6 \times 10^8 \text{ t}$ ，增加经济收益近1.3万亿元。美国是世界上转基因作物种植面积最大的国家，转基因棉花、大豆、玉米的种植面积占相关作物种植面积的比例都超过了90%。2017年，我国转基因作物的种植面积位居世界第八位，商业化种植的转基因作物有棉花和番木瓜。

在转基因动物方面，近些年几乎每年都有令人瞩目的研究成果报道，有些成果正在进入实用化和商业化开发的阶段。2015年11月，第一种用于食用的转基因动物——转基因大西洋鲑（俗称“三文鱼”）在美国获得批准上市。

目前，基因工程技术已被广泛用于改良动植物品种、提高作物和畜产品的产量等方面。

本节聚焦

- 基因工程的应用有哪些？
- 怎样理性地看待基因工程在生产和生活中的应用？



▲ 图3-9 1996—2017年，全世界转基因作物种植趋势变化



▲ 图3-10 转基因抗虫水稻（绿色植株）与对照（被害虫侵害的黄色植株）

转基因抗虫植物 从某些生物中分离出具有抗虫功能的基因，将它导入作物中培育出具有抗虫性的作物，是目前防治作物虫害的一种发展趋势。已问世的转基因抗虫植物有转基因抗虫棉花、玉米、大豆、水稻（图3-10）和马铃薯等。

转基因抗病植物 许多栽培作物由于自身缺少抗病基因，因此用常规育种的方法很难培育出抗病的新品种。科学家将来源于某些病毒、真菌等的抗病基因导入植物中，培育出了转基因抗病植物，如转基因抗病毒甜椒（图3-11）、番木瓜和烟草等。



▲ 图3-11 转基因抗病毒甜椒



▲ 图3-12 施用除草剂后的转基因抗除草剂玉米田

转基因抗除草剂植物 杂草常常危害农业生产，而大多数除草剂不仅能杀死田间杂草，还会损伤作物，导致作物减产。将降解或抵抗某种除草剂的基因导入作物，可以培育出抗除草剂的作物品种。这样在喷洒除草剂时，田间杂草会被杀死而作物不会受到损伤。目前已经获得转基因抗除草剂玉米（图3-12）、大豆（图3-13）、油菜和甜菜等。

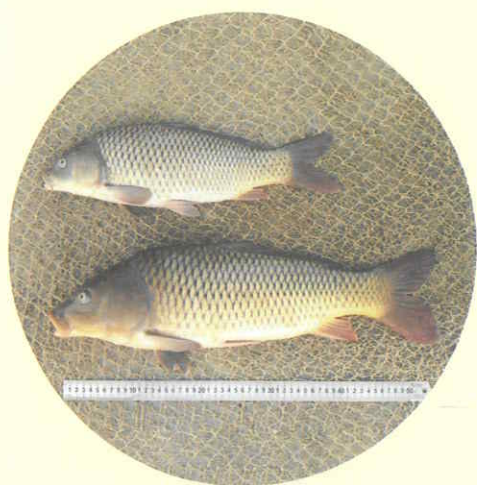
▼ 图3-13 种植转基因抗除草剂大豆的农田



改良植物的品质 随着生活水平的提高，人们越来越关注植物的营养价值、观赏价值等，利用转基因技术可以改良这些品质。例如，将必需氨基酸含量多的蛋白质编码基因导入植物中，可以提高这种氨基酸的含量，科学家培育的某种转基因玉米中赖氨酸的含量比对照高30%。我国科学家成功地将与植物花青素代谢相关的基因导入矮牵牛中，使它呈现出自然界没有的颜色变异，大大提高了它的观赏价值（图3-14）。



▲图3-14 转基因矮牵牛



▲图3-15 转生长激素基因的鲤鱼（下）
与非转基因鲤鱼（上）

提高动物的生长速率 由于外源生长激素基因的表达可以使转基因动物生长得更快，因此科学家将这类基因导入动物体内，以提高动物的生长速率。例如，我国科学家将外源生长激素基因导入鲤鱼，在同等养殖条件下，转基因鲤鱼的生长速率比非转基因鲤鱼提高了42%~115%（图3-15）。

改善畜产品的品质 有些人由于乳糖酶分泌少，不能完全消化牛奶中的乳糖，食用牛奶后会出现腹泻等不适症状，这称为乳糖不耐受。我国约有1/3的成年人对乳糖不耐受。为了解决这一问题，科学家将肠乳糖酶基因导入奶牛基因组，使获得的转基因牛分泌的乳汁中，乳糖的含量大大降低，而其他营养成分不受影响。



基因工程在医药卫生领域的应用

对微生物或动植物的细胞进行基因改造，使它们能够生产药物，是目前基因工程取得实际应用成果非常多的领域。这些药物包括细胞因子、抗体、疫苗和激素等，它们可以用来预防和治疗人类肿瘤、心血管疾病、传染病、糖尿病和类风湿关节炎等。我国生产的重组人干扰素、血小板生成素、促红细胞生成素和粒细胞集落刺激因子等基因工程药物均已投放市场（图3-16）。



▲ 图3-16 我国生产的部分基因工程药物

资料卡

干扰素

干扰素是一种具有干扰病毒复制作用的糖蛋白，在临床上被广泛用于治疗病毒感染性疾病。此外，干扰素对治疗乳腺癌、淋巴瘤、多发骨髓瘤和某些白血病等也有一定的疗效。传统生产干扰素的方法是从人血液中的白细胞内提取，每300 L血液只能提取出1 mg干扰素。1980—1982年，科学家用基因工程方法从大肠杆菌及酵母菌细胞内获得了干扰素，从1 kg培养物中可以得到20~40 mg干扰素。1993年，我国批准生产重组人干扰素 $\alpha-1b$ ，它是我国批准生产的第一个基因工程药物，目前主要用于治疗慢性乙型肝炎

炎、慢性丙型肝炎等。



以侯云德院士（右）为首的研究人员，成功研制出我国第一个基因工程药物——重组人干扰素 $\alpha-1b$

利用基因工程技术，还可以让哺乳动物批量生产药物。科学家将药用蛋白基因与乳腺中特异表达的基因的启动子等调控元件重组在一起，通过显微注射的方法导入哺乳动物的受精卵中，由这个受精卵发育成的转基因动物在进入泌乳期后，可以通过分泌乳汁来生产所需要的药物，这称为乳腺生物反应器或乳房生物反应器。目前，科学家已经在牛、山羊等动物乳腺生物反应器中，获得了抗凝血酶、血清白蛋白、生长激素和 α -抗胰蛋白酶等重要的医药产品。

基因工程技术还可能使建立移植器官工厂的设想成为

现实。目前，人体移植器官短缺是一个世界性难题。为此，人们不得不把目光移向寻求可替代的移植器官。由于猪的内脏构造、大小、血管分布与人的极为相似，而且与灵长类动物相比，猪体内隐藏的、可导致人类疾病的病毒要少得多，是否可以用猪的器官来解决人类器官移植的来源问题呢？实现这一目标的最大难题是免疫排斥。目前，科学家正尝试利用基因工程技术对猪的器官进行改造，采用的方法是在器官供体的基因组中导入某种调节因子，以抑制抗原决定基因的表达，或设法除去抗原决定基因，然后再结合克隆技术，培育出不会引起免疫排斥反应的转基因克隆猪器官。

基因工程在食品工业方面的应用

利用基因工程菌除了可以生产药物，还能生产食品工业用酶、氨基酸和维生素等。例如，阿斯巴甜是一种普遍使用的甜味剂，主要由天冬氨酸和苯丙氨酸形成，这两种氨基酸就可以通过基因工程实现大规模生产。

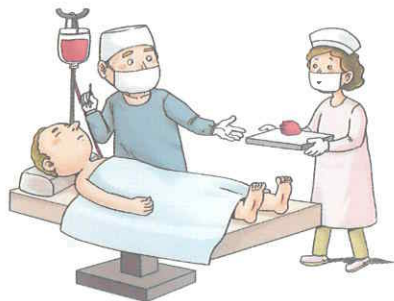
奶酪是一种被广泛食用的发酵奶制品。大多数奶酪的生产需要使用凝乳酶来凝聚固化奶中的蛋白质。传统的制备凝乳酶的方法是通过杀死未断奶的小牛，然后将它的第四胃的黏膜取出来进行提取。随着人口的增长和人们饮食需求的变化，单纯依靠宰杀小牛来获得凝乳酶的方法已不能满足日益增长的市场需求。于是，科学家将编码牛凝乳酶的基因导入大肠杆菌、黑曲霉或酵母菌的基因组中，再通过工业发酵批量生产凝乳酶。用这种方法生产的凝乳酶已于1990年投入市场，截至2008年，它已占据市场份额的80%以上。

加工转化糖浆需要的淀粉酶，加工烘烤食品要用到的脂酶等也都可以通过构建基因工程菌，然后用发酵技术大量生产。相比从天然产物中提取的酶，用基因工程技术获得的工业用酶的纯度更高，而且它的生产成本显著降低，生产效率较高。

基因工程使人们更容易培育出具有优良性状的动植物品种，获得很多过去难以得到的生物制品，甚至还能培育出可以降解多种污染物的“超级细菌”来处理环境污染，利用经过基因改造的微生物来生产能源……未来，期待基因工程带给我们更多的惊喜。

异想天开

假如某位心脏病病人换上经过改造的猪心脏后，过上了健康人的生活。在生活中，他会遭到歧视吗？对此你怎么看？



相关信息

用基因工程的方法，使外源基因得到高效表达的菌类一般称为基因工程菌。



到社会中去

转基因技术自诞生以来,发展迅速,研发对象已涵盖至少35科、200多种的植物,涉及大豆、玉米和棉花等重要作物,以及牧草、花卉和林木等。请调查:

1. 目前我国批准发放了哪些转基因作物的生产应用安全证书和进口安全证书?
2. 你或你的亲朋好友在日常生活中使用的生物产品,哪些在生产过程中用到了转基因技术?

练习与应用

一、概念检测

1. 将大肠杆菌的质粒连接上人生长激素的基因后,重新导入大肠杆菌的细胞内,再通过发酵工程就能大量生产人生长激素。下列相关叙述正确的是 ()

- A. 转录生长激素基因需要解旋酶和DNA连接酶
- B. 发酵产生的生长激素属于大肠杆菌的初生代谢物
- C. 大肠杆菌获得的能产生人生长激素的变异可以遗传
- D. 大肠杆菌质粒标记基因中腺嘌呤和尿嘧啶的含量相等

2. 基因工程应用广泛,成果丰硕。下列不属于基因工程应用的是 ()

- A. 培育青霉菌并从中提取青霉素
- B. 利用乳腺生物反应器生产药物
- C. 制造一种能降解石油的“超级细菌”
- D. 制造一种能产生干扰素的基因工程菌

二、拓展应用

1. 除草剂的有效成分草甘膦能够专一地抑制EPSP合酶的活性,从而使植物体内多种代谢途径受到影响而导致植物死亡。草甘膦没有选择性,它在除掉杂草的同时也会使作物受损。解决这个问题之一方法就是培育抗草甘膦的作物。

(1) 下面是探究“转入外源EPSP合酶基因能否使矮牵牛抗草甘膦”的流程,请补充完整。

- ① 用_____等处理含有目的基因的DNA片段和Ti质粒,构建重组Ti质粒;
- ② 将重组Ti质粒转入农杆菌中;

③ 利用含有重组Ti质粒的农杆菌感染_____细胞,再通过培育得到转基因植株;

④ 用草甘膦同时喷洒转基因植株和对照组植株。

结果:对照组植株死亡,转基因植株存活,但也受到了影响。

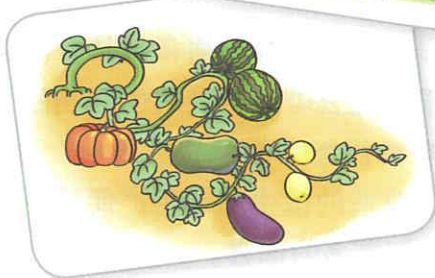
结论:_____。

(2) 请思考并回答下列问题。

① 在该实验中,对照组是怎样设计的?

② 如果增加转入的外源EPSP合酶基因的数量,转基因矮牵牛对草甘膦的抗性是否会增加?请你给出进一步探究的思路。

2. 下图是某同学画的两幅基因工程卡通图。一幅是一头能进行光合作用的奶牛,一幅是一株能同时结出多种蔬菜和水果的植物。请你像这位同学一样,展开想象的翅膀,畅想基因工程的未来,并用图画、文字或用音乐创作等表达出来。



第4节

蛋白质工程的原理和应用

从社会中来

你见过用细菌画画吗？右图是用发出不同颜色荧光的细菌“画”的美妙图案。这些细菌能够发出荧光，是因为在它们的体内导入了荧光蛋白的基因。

最早被发现的荧光蛋白是绿色荧光蛋白，科学家通过改造它，获得了黄色荧光蛋白等。这些荧光蛋白在细胞内生命活动的检测、肿瘤的示踪研究等领域有着重要应用。那么，科学家是怎样对蛋白质分子进行设计和改造的呢？



用细菌“画”的画

对蛋白质分子的设计和改造是通过蛋白质工程来实现的。蛋白质工程是指以蛋白质分子的结构规律及其与生物功能的关系作为基础，通过改造或合成基因，来改造现有蛋白质，或制造一种新的蛋白质，以满足人类生产和生活的需要。它是在基因工程的基础上，延伸出来的第二代基因工程，是包含多学科的综合科技工程。

随着分子生物学、晶体学以及计算机技术的迅猛发展，蛋白质工程取得了很大的进展。目前，它已成为研究蛋白质结构和功能的重要手段，并将广泛应用于医药和其他工农业生产中。

蛋白质工程崛起的缘由

为什么要进行蛋白质工程的研究呢？我们知道，将一种生物的基因转移到另一种生物体内，后者可以产生它本不能产生的蛋白质，进而表现出新的性状，这就是基因工程的实质。基因工程原则上只能生产自然界中已存在的蛋白质，这些天然蛋白质是生物在长期进化过程中形成的，它们的结构和功能符合特定物种生存的需要，却不一定完全符合人类生产和生活的需要。例如，玉米中赖氨酸的含量比较低，原因是赖氨酸合成过程中的两种关键酶——天冬氨酸激酶和二氢吡啶二羧酸合成酶的活性，受细胞内赖

本节聚焦

- 蛋白质工程的基本原理是什么？
- 蛋白质工程已有哪些实际的应用？



你知道人类蛋白质组计划吗？它与蛋白质工程有什么关系？我国科学家承担了什么任务？

氨酸浓度的影响较大。赖氨酸达到一定浓度就会抑制这两种酶的活性，所以赖氨酸含量很难提高。如果我们将天冬氨酸激酶中第352位的苏氨酸变成异亮氨酸，将二氢吡啶二羧酸合成酶中第104位的天冬酰胺变成异亮氨酸，就可以使玉米叶片和种子中游离赖氨酸的含量分别提高5倍和2倍。

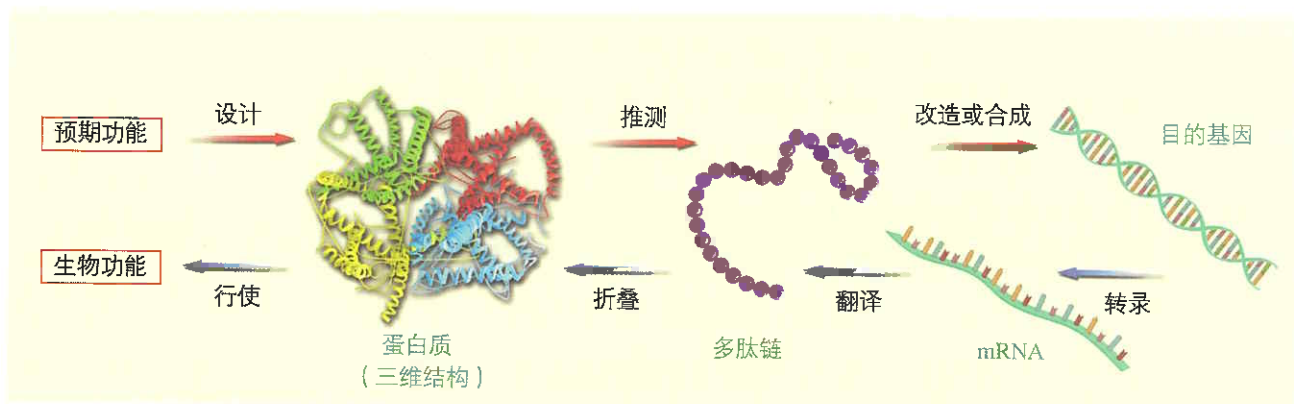
蛋白质工程的基本原理

蛋白质工程是怎样进行的呢？蛋白质工程的目标是根据人们对蛋白质功能的特定需求，对蛋白质的结构进行设计改造。由于基因决定蛋白质，因此要对蛋白质的结构进行设计改造，最终还必须通过改造或合成基因来完成。

我们知道，天然蛋白质合成的过程是按照中心法则进行的：基因→表达（转录和翻译）→形成具有特定氨基酸序列的多肽链→形成具有高级结构的蛋白质→行使生物功能。而蛋白质工程却与之相反，它的基本思路是：从预期的蛋白质功能出发→设计预期的蛋白质结构→推测应有的氨基酸序列→找到并改变相对应的脱氧核苷酸序列（基因）或合成新的基因→获得所需要的蛋白质（图3-17）。

学科交叉

蛋白质工程经常要借助计算机来建立蛋白质的三维结构模型；要利用晶体学技术来获得蛋白质的结晶体，然后通过X射线衍射技术，分析晶体的结构；要用到基因的定点突变技术来进行碱基的替换。



▲图3-17 蛋白质工程的基本思路

思考·讨论

蛋白质工程基本思路的应用

某多肽链的一段氨基酸序列是：



讨论

1. 怎样得出决定这一段肽链的脱氧核苷酸序列？请把相应的碱基序列写出来。
2. 确定目的基因的碱基序列后，怎样才能合成或改造目的基因？

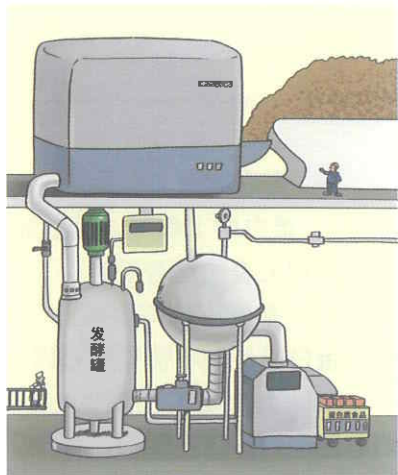
蛋白质工程的应用

蛋白质工程取得的进展向人们展示出诱人的前景。研发速效胰岛素类似物就是生动的实例。天然胰岛素制剂容易形成二聚体或六聚体，皮下注射胰岛素后往往要经历一个逐渐解离为单体的过程，这在一定程度上延缓了疗效。因此，科学家希望对胰岛素进行改造，从而降低它的聚合作用。研究人员通过解析人胰岛素的晶体结构发现，人胰岛素由A链和B链构成，其中B链的第20~29位氨基酸是胰岛素分子相互作用形成多聚体的关键区域，改变这个区域氨基酸的组成就有可能降低胰岛素分子间的作用力。目前，科学家已通过改造胰岛素基因实现了对相应氨基酸序列的改造，使B28位脯氨酸替换为天冬氨酸或者将它与B29位的赖氨酸交换位置，从而有效抑制了胰岛素的聚合，由此研发出的速效胰岛素类似物产品已经在临床上广泛应用。

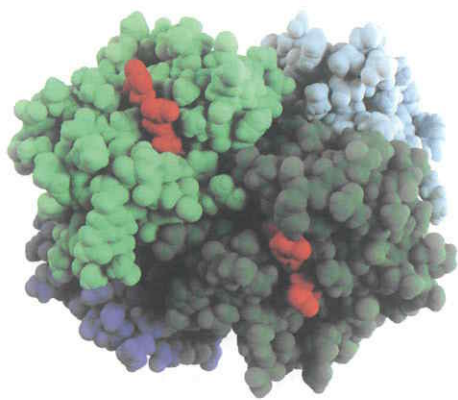
在医药工业方面，利用蛋白质工程研发药物并不少见。例如，干扰素在体外保存相当困难，如果将干扰素分子上的一个半胱氨酸变成丝氨酸，那么在 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的条件下，干扰素可以保存半年；小鼠单克隆抗体会使人产生免疫反应，从而导致它的治疗效果大大降低，科学家将小鼠抗体上结合抗原的区域“嫁接”到人的抗体上，经过这样改造的抗体诱发免疫反应的强度就会降低很多。在其他工业方面，蛋白质工程被广泛用于改进酶的性能或开发新的工业用酶。例如，枯草杆菌蛋白酶具有水解蛋白质的作用，因此常被用于洗涤剂工业、丝绸工业等。迄今为止，利用蛋白质工程获得的该酶的突变体已有上百种，从中可能筛选出一些符合工业化生产需求的突变体，从而提高这种酶的使用价值。在农业方面，科学家正在尝试改造某些参与调控光合作用的酶，以提高植物光合作用的效率，增加粮食的产量；还有科学家利用蛋白质工程的思路来设计优良微生物农药，通过改造微生物蛋白质的结构，使它防治病虫害的效果增强。

蛋白质工程是一项难度很大的工程，主要是因为蛋白质发挥功能必须依赖于正确的高级结构，而这种高级结构往往十分复杂（图3-18）。科学家要设计出更加符合人类需要的蛋白质，还需要不断地攻坚克难。我们相信，随着科学技术的深入发展，蛋白质工程将会给人类带来更多的福祉。

能不能根据人类需要的蛋白质的结构，设计相应的基因，导入合适的宿主细胞中，让宿主细胞生产人类所需要的蛋白质食品呢？



蛋白质食品的工厂化生产想象图



▲ 图3-18 由计算机建立的血红蛋白三维结构模型

酶制剂在食品工业、医药工业等方面都有广泛的应用。现在，酶制剂的生产已经形成一个市场可观的新兴产业。蛋白质工程的应用又为酶制剂产业的发展提供了强大助力。请查阅资料，了解我国酶制剂产业发展的现状和趋势，分析蛋白质工程在酶制剂产业中的作用。

练习与应用

一、概念检测

1. 蛋白质工程可以说是基因工程的延伸。判断下列相关表述是否正确。

(1) 基因工程需要在分子水平对基因进行操作，蛋白质工程不需要对基因进行操作。 ()

(2) 蛋白质工程需要改变蛋白质分子的所有氨基酸序列。 ()

(3) 蛋白质工程可以改造酶，提高酶的热稳定性。 ()

2. 蛋白质工程是在深入了解蛋白质分子的结构与功能关系的基础上进行的，它最终要达到的目的是 ()

- A. 分析蛋白质的三维结构
- B. 研究蛋白质的氨基酸组成
- C. 获取编码蛋白质的基因序列信息
- D. 改造现有蛋白质或制造新的蛋白质，满足人类的需求

3. 水蛭素是一种蛋白质，可用于预防和治

疗血栓。研究人员发现，用赖氨酸替换水蛭素第47位的天冬酰胺可以提高它的抗凝血活性。在这项替换研究中，目前可行的直接操作对象是 ()

- A. 基因
- B. 氨基酸
- C. 多肽链
- D. 蛋白质

二、拓展应用

T4溶菌酶是一种重要的工业用酶，但是它在温度较高时容易失去活性。为了提高T4溶菌酶的耐热性，科学家首先对影响T4溶菌酶耐热性的一些重要结构进行了研究。然后以此为依据对相关基因进行改造，使T4溶菌酶的第3位异亮氨酸变为半胱氨酸。于是，在该半胱氨酸与第97位的半胱氨酸之间形成了一个二硫键，T4溶菌酶的耐热性得到了提高。这项工作属于什么工程的范畴？在该实例中引起T4溶菌酶空间结构发生改变的根本原因是什么？如果要将该研究成果应用到生产实践，还需要做哪些方面的工作？

课外实践

基于网络数据分析基因和蛋白质的序列信息

科研数据共享能够提高科研工作者的工作效率。GenBank是目前国际上广泛使用的序列数据库之一，它的数据主要是各国的实验室、测序机构等发布的序列信息。利用这个数据库，我们可以便捷地检索到基因和蛋白质的序列信息。BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, 基本局部比对搜索工具) 是一种能对两个或多个序列 (包括

DNA序列和蛋白质序列) 进行相似性比较，或将某个序列与序列数据库中的序列进行快速比对分析的工具。

请你尝试在GenBank中检索几种生物的某个基因和蛋白质的序列信息 (如人、猪、牛胰岛素的基因和蛋白质的序列信息)。然后，用BLAST进行比对，并初步分析它们之间的差异。

本章小结

理解概念

● 基因工程是指按照人们的愿望，通过转基因等技术，赋予生物新的遗传特性，从而创造出更符合人们需要的新的生物类型和生物产品。

● 基因工程是一种DNA操作技术，需要借助限制酶、DNA连接酶和载体等工具才能进行。它的基本操作程序包括：目的基因的筛选与获取、基因表达载体的构建、将目的基因导入受体细胞和目的基因的检测与鉴定。

● 基因工程在农牧业、医药卫生和食品工业等方面有广阔的应用前景。

● 蛋白质工程是基因工程的延伸，是指以蛋白质分子的结构规律及其与生物功能的关系作为基础，通过改造或合成基因，来改造现有蛋白质，或制造一种新的蛋白质，以满足人类生产和生活的需求。蛋白质工程在医药及其他工农业生产中有很大的应用价值。

发展素养

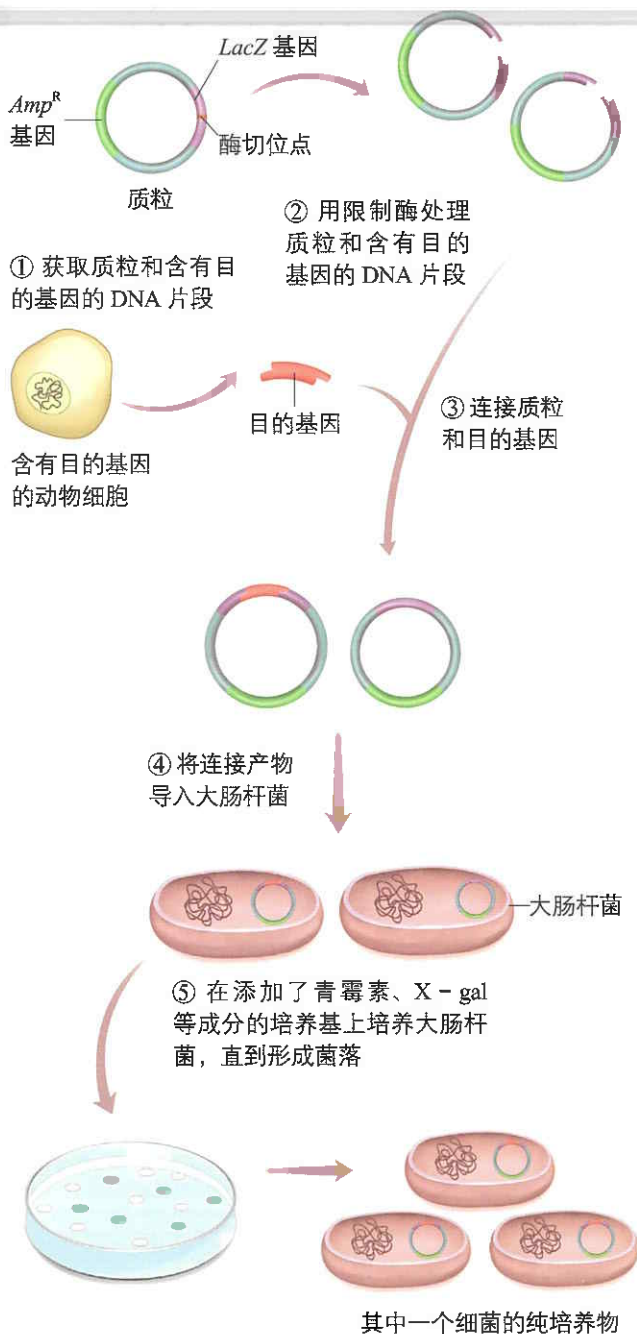
通过本章的学习，应在以下几方面得到发展。

● 能够基于基因工程应用的事实，运用基因工程的原理，参与有关推广和应用基因工程产品等社会行为的讨论，理性地作出个人决策。

● 认同基因工程给现代农牧业、食品及医药等行业带来了深刻的变化，产生了巨大的社会效益和经济效益。

复习与提高

1. 某动物体内含有研究者感兴趣的目的基因，研究者欲将该基因导入大肠杆菌的质粒中保存。该质粒含有氨苄青霉素抗性基因 (Amp^R)、 $LacZ$ 基因及一些酶切位点，其结构和简单的操作步骤如下图所示。



注： $LacZ$ 基因编码产生的 β -半乳糖苷酶可以分解 X-gal 产生蓝色物质，使菌落呈现蓝色；否则菌落为白色。

请根据以上信息回答下列问题。

- (1) 在第②步中，应怎样选择限制酶？
- (2) 在第③步中，为了使质粒 DNA 与目的基因能连接，还需要在混合物中加入哪种物质？
- (3) 选用含有 Amp^R 和 $LacZ$ 基因的质粒进行实验有哪些优势？
- (4) 含有重组质粒的大肠杆菌菌落将呈现什么颜色？为什么？

2. 科学家将 $Oct3/4$ 、 $Sox2$ 、 $c-Myc$ 和 $Klf4$ 基因通过逆转录病毒转入小鼠成纤维细胞中，然后在培养 ES 细胞的培养基上培养这些细胞。2~3 周后，这些细胞显示出 ES 细胞的形态、具有活跃的分裂能力，它们就是 iPS 细胞。请回答下列问题。

- (1) 在这个实验过程中，逆转录病毒的作用是什么？
- (2) 如何证明 iPS 细胞的产生不是由于培养基的作用？

(3) 如果要了解 $Oct3/4$ 、 $Sox2$ 、 $c-Myc$ 和 $Klf4$ 基因在诱导 iPS 细胞时，每个基因作用的相对大小，该如何进行实验？请你给出实验设计的思路。

(4) 若将病人的皮肤成纤维细胞诱导成 iPS 细胞，再使它转化为需要的细胞，用这些细胞给该病人治病，这是否会引起免疫排斥反应？为什么？iPS 细胞具有分裂活性，用它进行治疗时可能存在什么风险？

3. 水稻根部一般没有根瘤菌，在种植时常需要施加氮肥。科学家想利用基因工程技术来减少施用氮肥的生产成本及可能造成的环境污染，他们提出了以下两种方案。

方案一 把根瘤菌的固氮相关基因导入水稻根系微生物中，使微生物能在根系处固氮，从而减少氮肥的施用量。

方案二 直接将固氮相关基因导入水稻细胞中，建立水稻的“小型化肥厂”，让水稻直接固氮，这样就可以免施氮肥了。

- (1) 请评估这两种方案哪种更容易实现。
- (2) 如果两个方案都实现的话，你认为哪种更值得推广？请说出你的理由。