

改造生物的技术（一）

文_孙万儒

孙万儒 中国科学院微生物研究所研究员，博士生导师，中国科学院老科学家科普演讲团副团长、中国生物工程学会继续教育工作委员会主任，曾获北京市科普先进工作者和中国科学院科普先进工作者奖励。



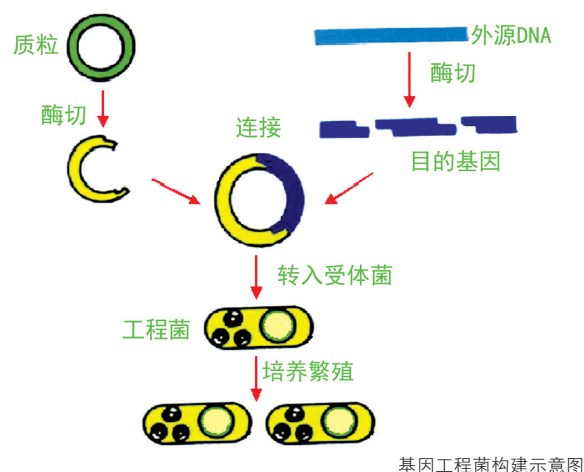
人类从早期的农耕社会开始，在种植和饲养过程中，就不断地挑选那些长得好、长得快、个头大的动植物品种进行繁殖，淘汰那些人们不满意的品种。经千百年的不断挑选和淘汰，人们获得了大量的优良家畜和农作物品种，这就是优良品种的选育过程。随着人类文明和科学技术的不断进步，人们发现不同品种之间可以杂交，而且产生的后代更好，于是，杂交成了获得优良品种的重要方法。而近代遗传学的发展，使人们认识到利用物理、化学方法诱变可以改变基因。这种方法被广泛地应用于动植物和微生物的优良品种培育上，为农业、养殖业和发酵工业的发展做出了不可磨灭的贡献。传统的育种方法费时、费力、目的性差、实用性有限、成功率低，而生物技术的发展为我们有目的、高效率、广泛改造生物，满足人们的各种需求开辟了广阔前景。基因转移技术能在改造生物时实现省时、省力、目的性强、成功率高的目的。

◎ 基因转移

“种瓜得瓜，种豆得豆”。为什么种瓜一定得瓜，种豆一定会得豆？难道种瓜就不能得豆？回答是肯定的，过去不行，现在也还不行。但是现在的生物技术有可能做到让种出的瓜有豆子的成分。

生物发生变异的根源就在于繁殖过程中，基因发生了肉眼看不到的某种改变而引起生物性状的变化。过去，人们通过杂交，或利用物理、化学的方法进行处理，引发基因突变，达到改变生物性状的目的。为获得优良品种，用这种方法既费时费力，又有很大的盲目性。现在我们可以把所需要的基因从动物、植物或微生物细胞中分离出来，再把它转移到其他生物的细胞里，比如放在其他微生物、动物或植物细胞里，进而培育出带有这种特殊基因的转基因生物，使之获得我们需要的某种特性。利用这些转基因生物的特性生产各种产品，这就是基因工程，生产的产品称为基因工程产品。

为了转移基因，首先要拿到我们需要的基因，称为“目的基因”。最早采用的是“鸟枪法”，所谓的鸟枪法，就是像用霰弹枪（老式火枪）朝着有很多鸟的树开一枪那样，打出无数颗“弹丸”，打着哪只算哪只。这也就是说，要拿到目的基因并不简单，很多



情况下都要看运气。

找基因的时候，首先要从细胞中把全部 DNA 分离出来，这是个很大的分子，可以利用物理方法，如用高速搅拌的剪切力，或用超声波将 DNA 打成小的 DNA 碎片；更好的方法是用一种非常灵巧的工具，能够切割 DNA 的限制性核酸内切酶，把 DNA 切成一段一段的小片段。然后利用连接酶将这些片段与适当的载体结合，再转到受体细菌里，一般是使用大肠杆菌作为受体菌，获得含有不同 DNA 片段的大量菌株，称为基因文库。

构建基因组文库的第 2 种方法是利用 λ 噬菌体作载体。先选用特定的限制性内切酶将 DNA 进行部分酶切，得到众多的 DNA 片段，然后选用适当的限制性内切酶酶切 λ 噬菌体载体的 DNA，经适当处理，将基因组的 DNA 片段与 λ 噬菌体载体进行重组，利用体外包装系统将重组体包装成完整的颗粒，用重组的噬菌体颗粒浸染大肠杆菌，形成大量噬菌斑，从而获得带有不同 DNA 片断的噬菌体。

当生物的基因组比较小时，用这种方法比较容易成功；当生物的基因组很大时，构建其完整的基因组文库就并非易事，从庞大的“文库”中去筛选目的基因工作量也很大。

找基因的另一种方法是从组织细胞中分离成熟 mRNA，以它为模板，经反转录酶催化，在体外反转录成 cDNA，与适当的载体（常用噬菌体或质粒载体）连接后转化受体菌，则每个细菌含有 1 段 cDNA，并能繁殖扩增，这样包含着细胞全部 mRNA 信息的重组 DNA 群体称为该基因的 cDNA 文库。

虽然可用基因组文库法来获取真核生物的目的基因，但是由于高等真核生物基因组 DNA 文库比其 cDNA 文库大得多，相关工作量同样大得多。更为重要的是，在真核生物基因组中含有大量的间隔序列或内含子，但在大肠杆菌等原核生物中没有类似序列的存在，所以大肠杆菌不能从真核生物基因的初级转录本中去除间隔序列，即不能表达真核生物 DNA。而在真核生物成熟 mRNA 中已不存在间隔序列（已在拼接过程中被去除），所以可以以真核生物成熟 mRNA 为模板，逆转录而成的 cDNA 可被大肠杆菌表达。因此，cDNA 文库法是从真核生物细胞中分离目的基因的常用方法。

根据目的基因和它表达产物的特点设计适当的筛选方法，从文库中的众多转化的菌株中挑选出含有目的基因的菌株，再从这个菌株的细胞中回收我们需要的目的基因。虽然这种方法比较笨拙，但是有可能从基因文库中筛选到许多有用的基因。

当然，如果已经知道基因的核酸序列，并且又不是太大，也可以采用化学方法合成我们需要的目的基因。

现在，生物技术已经使我们可以有目的地拿到我们需要的基因。比如，如果我们已经从某种生物拿到了所需要的蛋白质，我们先测定这个蛋白质两端的氨基酸的排列顺序，一般不要太多，测定 10 到 20 多个；再根据 1 个氨基酸由 3 个核苷酸决定的三联密码子原理，推测它的相应基因的核苷酸排列顺序，用人工合成的方法合成基因两端的大约每个有 30 个以上核苷酸的 DNA 片段，用它们做“探针”，以提取的单链 DNA 为模版，合成我们所需要的基因。因为单链 DNA 能够和与它具有互补序列的单链 DNA 配对，“DNA 探针”会与目的基因两端的 DNA 序列配对，而“锚定”在所需的基因的两端，然后用化学方法，就可以沿着模板合成相应的 DNA，也就是我们所需要的基因。这种方法称为基因扩增法，简称“PCR”。

另外还需要运载目的基因的工具——载体，叫做质粒，它是从细菌中提取的一种双链环状 DNA。为了使用方便，载体需进行人工改造，在上面加上一些特殊的基因，比如控制基因大量复制的“启动子”、使基因复制停止的“终止子”和“标记基因”。所谓的标记基因大多数是能够破坏抗生素的物质的基因，比如破坏青霉素的青霉素酶基因，破坏卡那霉素的卡那霉素酶基因等。带有这样标记的质粒如果转入细菌，这个细菌就能够在含有抗生素的培养基上生长，而没有转入质粒的细菌就不能在含有抗生素的培养基上生长。在使用这样的质粒时，首先用核酸内切酶这把手术刀先把质粒切出一个切口，再把目的基因连接上去，构成一个新的质粒。这个质粒就是人工构建带有目的基因的质粒。然后通过电击穿等方法，把这个质粒转入细菌，比如大肠杆菌的细胞里，这个大肠杆菌就获得了我们加给它的基因。因为它带有破坏抗生素的基因，能够在含有抗生素的培养基上生长，这使得我们能够很容易地直接在含有抗生素的培养基上，将带有目的基因的细菌挑选出来，获得我们需要的基因工程菌。

现在，生物技术不仅可以让人们把基因转入大肠杆菌，也可以把基因转到其他微生物的细胞里，比如枯草芽孢杆菌、酵母、真菌等。而目前在工业上用于生产的主要还是大肠杆菌，因为现在人们对大肠杆菌的研究很多，对它的生理生化特性、遗传学和基因了解最透彻，目的基因转入后可能发生的变化也容易预测和掌握。更重要的是，大肠

杆菌繁殖快，在适宜的条件下，1 个细胞可以在 20 分钟内进行 1 次分裂，1 个小时可以分裂 3 次，一个细胞就可以变成 8 个细胞。而且需要的营养比较简单，给它供给充足的营养，在短短的十几个小时就可以繁衍出上亿细胞。如此快的繁殖速度在工业化生产各种产品具有很大的优越性。

这样构建的菌株，称为工程菌。在适当的条件下培养工程菌，让它们大量地繁殖，大肠杆菌细胞在繁殖生长过程中，目的基因就会起作用，合成由它决定的我们需要的产物。基因表达的产物都是蛋白质。当然不同基因表达的蛋白质是不同的，有的可以作为药物，用于治疗；有的是酶，可以作为工业催化剂使用，用于生产各种产品。利用基因工程菌生产的药物，称为基因工程药物。我国现在可以生产近 30 种基因工程药物，美国现在大概有 40 种，日本大概可以生产 35 种，它们都在临床上得到广泛应用。

如果用大肠杆菌作为受体菌，又称为“宿主菌”，其长处是基因表达量高，形成的产品多。但是，这种方法也有缺点：产生的产物都集中在细胞内，不能够分泌到细胞外。要想得到产品，必须首先将细胞打破，让产物从细胞中释放出来，这就增加了细胞破碎生产工艺。还有一个缺点，就是虽然大肠杆菌表达的产物量大，但是，表达量越大，形成的产物大多数因为蛋白质链的空间构型不正确，而没有生物活性，这样表达的没有活性的产物，称为“包涵体”。将细胞破碎后得到的包涵体，需要进行“变性”和“复性”。所谓的变性，就是先将没有活性的包涵体，用表面活性剂处理，使蛋白质链伸展开；然后复性，就是逐渐去掉表面活性剂，使蛋白质链重新排列组合，形成正确结构，使蛋白质具有生物活性。经过这样的折腾，产品回收率就降低了很多，也增加了生产成本。

为了解决这些问题，人们想出了许多新的办法，比如在启动子上和表达载体上做文章。启动子是控制基因表达的起始时间和表达程度的“元件”，就像“开关”，决定基因的活动。启动子有多种类型，如在表达载体上带有组成型启动子，它一直不停地使目的基因表达，通常表达量比较高，成本低。但是如果表达的蛋白质对宿主细菌生长有害，反而会影响到表达产物的积累。如果在表达载体上使用诱导型启动子，只有在诱导剂存在的条件下基因才能表达目的产物。这种方法有助于避免菌体生长前期高表达产物对菌体生长的影响，又可减少宿主菌的蛋白酶对目标产物的降解，增加活性产物的表达量。

表达载体上带有一段特别的 DNA 序列，称为“融合表达标签”，与目的基因连接后，表达的产物一端上带有一段“多余”小分子蛋白质（确切地称为多肽），这样表达的蛋白质称为“融合蛋白”。这一段小分子蛋白不是随便加上去的，它有特殊的功能，比如能与专一性的亲和配

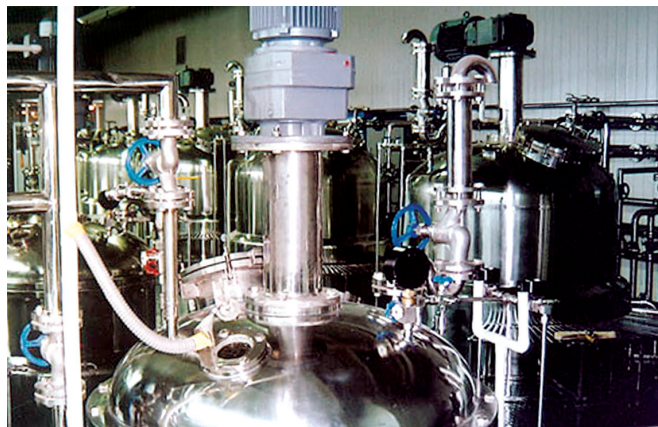
基或金属离子结合，在后面的纯化工艺上进行亲和色谱，能够高效率地将产物分离纯化出来，然后再用特殊的酶或化学方法将其切掉，获得目的产物，可以保证获得高产量、高质量的产品。

有时还可以在启动子和目的基因之间加入信号肽的DNA序列，可以引导表达的目的蛋白穿越细胞膜，分泌到细胞外，或分泌到细胞膜和细胞壁之间的周质空间，可避免表达产物在细胞内的过度累积而影响细胞生长，或者形成包涵体。表达产物是可溶的活性状态时，就不需要变性和复性，大大提高了生产效率。大肠杆菌表达效率很高，特别是使用强启动子时，目的蛋白来不及折叠而形成不溶的包涵体颗粒，包涵体虽然容易纯化，但是复性效率不高，直接影响到后续工艺和生产效率。另外，也可以将目的基因转到芽孢杆菌、酵母和真菌中，获得具有分泌能力的工程菌。但总体比较，大肠杆菌做宿主还有它的优势，目前在工业生产上使用最多的宿主菌还是大肠杆菌。

◎ 神奇的生长激素

孩子的发育、生长离不开生长激素，如果一个孩子脑垂体发生病变，或其他原因不能够产生足够的生长激素，这个孩子的发育就会不正常，个子长得很矮，四肢短，头很大，这就是我们所说的侏儒症。过去没有什么好的办法治疗这种疾病。

实际上科学家早在1920年就知道了在人体存在生长激素，但这一发现直到1958年才被用于临床治疗。但那时的生长激素是从死亡的人脑垂体中提取出来的，提取几滴生长激素需要数千个尸体的脑垂体。这种生长激素在用了几年后，发现几个使用者被传染上了致命的病毒，病人肌肉逐渐萎缩，痴呆，几年后死亡，后来证实是疯牛病。因此美国食品药品监督管理局（FDA）在上世纪80年代命令停止一切从尸体脑垂体提取的生长激素在临床上使用。



人生长激素的生产车间

转基因技术的发展为治疗这种疾病带来了希望。既然这种生长激素是由人体产生的，我们体内肯定就有它的基因。于是人们做了大量的探索，终于从人的细胞中找到了人的生长激素基因，然后利用前面提过的方法，将人的生长激素基因转到大肠杆菌里，构建了带有人生长激素基因的工程菌。但直到1985年，才利用基因工程菌生产出人的生长激素，经过精密的分离纯化，获得了纯粹的人生长激素。最早用基因技术获得的（Genentech公司生产）人生长激素是由192个氨基酸组成的，比天然的人生长激素多了1个甲硫氨酸，因此可以说并未完全成功。

直到1986年美国礼来药厂利用基因工程技术，成功地制造出了191个氨基酸的人生长激素。这时不但可以大量生产人生长激素，而且价钱也比较便宜。然而FDA还是只批准在患有侏儒症的无法正常生长的儿童身上使用人生长激素。在121个矮小儿童使用人生长激素的临床报告中指出，这些矮小儿童经2~10年补充人生长激素治疗后，共有80位身高达到正常理想高度，与未使用人生长激素的对照组相比，男孩平均长高约9.2厘米，女孩平均长高5.75厘米。另一份报告指出，在未成年前持续使用人生长激素，到成人时身高会比未使用者增高5厘米左右。后来其他医生也纷纷效仿，使许多缺乏人类生长素而发育迟缓的青少年得到了有效治疗。人生长激素作为药物给患有侏儒症的孩子注射，因为获得正常数量的生长激素，他就可以正常发育、正常生长，侏儒症就得到治疗，成长为一个健康的人。

在我国，构建人生长激素的工程菌于1988年获得成功，1998年批准临床应用，并开始工业生产。

生长激素具有促进合成代谢、增长肌肉块头、促进儿童期和青少年期骨骼生长、加强肌腱和增大内部器官的作用，因此成为帮助生长激素分泌不足或患矮小症的孩子长大、长高的利器。但作为药物，生长激素使用起来有非常严格的限制。有些运动员使用生长激素用于强壮肌肉，增加力量，以便获取比赛优势，不但违背了公平竞争的奥林匹克精神，也完全是非法的行为。

人随着年龄的增加，肌体的各个器官和代谢功能都会改变，人体内的生长激素会随着年龄的增加而减少，这属于正常的生理变化。而现在的人生长激素的生产厂家和美容机构却在大力宣传人生长激素的抑制衰老和美容作用。声称人生长激素可以达到减肥、去脂、增强身体免疫力、消除皱纹、保持皮肤细致光滑、促进毛发再生、促进心肌细胞生长、加速伤口愈合，以及促进新的骨骼生长等功能，似乎人生长激素成了灵丹妙药，可以使身体的每一个器官更新生长。

人生长激素真的有那么神奇的效果吗？有关专家解释说，如果身体确实出现因缺少人生长激素而引发疾病或某



注射用重组人生长激素

些问题,合理正确地使用人生长激素确实能起到延缓衰老、恢复体力等疗效,但一定要对症下药。如果老年人出现器官功能衰竭,使用人生长激素治疗,有延缓器官衰老的作用。但若是精力旺盛、没有相关疾病和问题的人,根本不需要使用这一药物,即使使用了也不会有什么效果。一般来说,使用正常剂量的人生长激素进行治疗,没有明显的副作用。

有关专家指出,生长激素不仅对肌肉有生长功能,对身体各个部位都有助长的作用,体内若有小型的癌细胞,本来可能终身不会长大、发病,但注射了生长激素,就可能让癌细胞也壮大起来,使癌症发病率大增。此外,不恰当地使用生长激素还会引起关节肿胀或关节痛,将水分滞留在体内,并提高血糖,极易导致心脏病和糖尿病。国外研究还发现,成人生长激素缺乏症患者在长期注射生长激素后,罹患大肠癌的几率增高,日本还出现过生长激素使用者罹患血癌的病例。

据了解,不少美容和瘦身场所将人生长激素用于瘦身、除皱,令许多爱美人士和演艺人员趋之若鹜,却使医生担心不已。因为目前所有关于生长激素在美容方面的研究,成效都不明显。而自身生长激素分泌过多就会造成肢端肥大症和巨人症,外源性的额外补充注射人生长激素可能出现很大的副作用。在一切的一切都不明确的情况下,实在不应将自己当成做试验的小白鼠。

人生长激素是由人的脑垂体分泌产生的,具有能促进体内细胞数目增加和变大的作用,从而使身体各部分组织和器官增大,因此,人生长激素是每一个人发育、成长的重要因素。但是,如果脑垂体出现肿瘤,或在其他部位出现肿瘤,会促使脑垂体分泌过量的人生长激素,使身体过度

生长发育,引发人体“疯长”,甚至持续到20岁以上,长成巨人,则是一种病态,被称为巨人症。患有巨人症的病人,在发病前期,食欲强,肌肉发达,性欲旺;在发病衰退期,精神不振,肌无力,背佝偻,性欲低,反应迟钝,还可能并发其他疾病。本文图中的女孩身高比姚明还高,但是她不能做运动员。不仅不能做运动员,而且肌肉无力,骨骼疏松,剧烈活动还会造成骨折。

所以人体内生长激素必须恰当好处,少了不行,会生病;多了也不行,也会生病。我们体内的生长激素数量,要不多不少才合适。实际上,决定我们体内激素水平的有多种因素,其中最根本的是基因和调控基因表达的各种因素。在我们人的细胞中,生长激素基因一直存在,但是只有在青春发育期时它才努力工作,指挥合成生长激素,促使儿童和青少年生长发育。如果合成的生长激素过少,就会得侏儒症,而合成过多,就会得巨人症。当过了青春期,虽然生长激素基因还在,但是各种控制因素控制它合成的生长激素的量大大减少,人也就停止生长发育,并且随着年龄的增加,生长激素会越来越来少,到了中老年,如果人体内还在大量合成生长激素,照样会引发一系列疾病。

有人觉得自己个子不高,希望长高一些,是不是可以通过注射人生长激素来达到目的呢?如果你正处在青春发育期,确实是因为生长激素水平低,在医生诊断确诊的情况下,在医生指导下进行治疗是可以的。如果体内的生长激素水平正常,再注射生长激素,必然会造成生长激素过量,就会引起疾病。如果过了发育期,注射人生长激素不仅不能使身体长高,反而会引发疾病。究竟是利大还是弊大,就要自己判断了。■



侏儒症患者和巨人症患者