

学科发展

基 因 工 程 进 展

莽 克 强

(微生物研究所)

〔摘要〕 本文较详细地综述了国际上近年来基因工程在医药、农业、食品等方面的产品开发和在生命科学基础研究及应用基础研究方面的应用;分析了我国基因工程的现状;并对我国今后基因工程的发展提出了建议。

基因工程高技术虽然才有短短的 17 年历史,但却对医药、农业、食品等方面的产品开发以及对生命科学的基础研究和应用基础研究都显示出了独特的作用和巨大的潜力。

一、在产品开发方面的应用

1. 医药方面: 仅以领先的美国和日本为例, 经 FDA (Food Drug Administration) 批准的已有 10 多种生物工程新药和疫苗投产并见于市场, 还开发了大量的单抗诊断盒和 DNA 探针。具体情况请参阅表 1。

表 1

品 名	用 途	商品名和厂家
(1) 干扰素- $\alpha 2a$	治疗发状细胞白血病 Kaposi 肉瘤	RoFeron-A; Roch 公司(1989)
(2) 干扰素- $\alpha 2b$	治疗发状细胞白血病 慢性骨髓性白血病 Kaposi 肉瘤	Intron-A; Shering-Plough 公司(1989)
(3) 干扰素 r	防治肿瘤	日本公司
(4) 血液因子 VIII	治血友病	Monoclate; Armour 公司
(5) 胰岛素	糖尿病	Humulin Eli Lilly 公司(1982)
(6) 人生长激素	儿童生长激素缺乏症	Protropin; Genentech 公司(1985) Humatrope; Eli Lilly 公司 Somatonorm 或 Genotropin; 日本公司
(7) 乙肝疫苗	预防乙型肝炎	Recombivax HB; Merk 公司(1986) Hepatitis B Vac; 日本公司
(8) OKT ₃ (单抗)	预防肾移植排斥	Orthoclone OKT ₃ ; Ortho 公司

续 表

品 名	用 途	商品名和厂家
(9) tpA	急性心肌梗死	Activase; Genentech 公司(1987) Eminase; Smith-Kline 公司 Beecham 公司(1988)
(10) LH—RH (合成肽)	抗肿瘤	日本公司
(11) EPO (Erythropoietin)	慢性贫血	Epogen; Amgen 公司(1989)
(12) 白介素-2(被丹麦批准)	肾癌	Proleukin; Cetus 公司(1989)
(13) 单抗诊断盒——300 多种		
(14) DNA 探针——15 种		

此外,已处于第三期临床试验或等待批准的有十多种,见表 2:

表 2

品 名	用 途	商品名和厂家
(1) α -干扰素(注射剂)	AIDs、肾癌-膀胱癌、生殖器 疱疹	α -Leukoferon; Viragen 公司
(2) β -干扰素	肿瘤细菌性疾病	Betaseron; Cetus 公司,日本公司
(3) γ -干扰素	小细胞肺癌 黑色素瘤 结直肠癌 风湿性关节炎,肾癌	Genentech 公司,日本公司
(4) 尿激酶原	心肌梗塞	Immuneron; Biogen 公司
(5) G/CS 因子(粒细胞 集落刺激因子)	AIDs, 白血症 先天性贫血	Collaborative Research Sandoz 公司 Nupogen; Amgen 公司
(6) GM/CS 因子(颗粒、巨 噬细胞集落刺激因子)	AIDs, 白血症 先天性贫血症 骨髓移植 Hodgkin 氏症	Hoechst-Roussel 和 Immunex 公司
(7) 白介素-2	肿瘤	Amgen 公司,日本公司
(8) EGF	愈伤、眼外科	Chiron 公司,日本公司
(9) GRF	激素释放	
(10) 流感嗜血杆菌联价疫苗	预防流感嗜血杆菌的感染	Praxis Biologics 公司
(11) 单抗盒	中毒性休克(治疗)	Centoxin; Centocor 公司
	黑色素瘤(诊断)	Xomen-Es; Xoma 公司
	骨髓移植排斥(治疗)	Xoma Zyme-Mel; Xoma 公司, Pfizer 公司
	结直肠癌(诊断)	Xoma Zyme.H65; Xoma 公司 Panorex; Centocor 公司

另有 50 多种处于 I 或 II 期临床; 300 多种在申请临床试验。预计 1995 年左右美日两国将分别有 100 多种新药、疫苗投产,其中绝大部分都是过去常规法所不能生产的。随着基础研究的进展,可预见 90 年代全球性的 AIDS 爱滋病,甲型肝炎、非甲非乙型肝炎、疟疾、麻疯等重要疾病的防治将会解决或有重大突破。

从经济效益看, 1988 年 hGH、tPA 和胰岛素每种销售额在 1 亿美元以上, 乙肝疫苗为 3000 多万美元, OKT₃ 为 1500 多万美元, DNA 探针约 2000 万美元。单抗盒的世界销售额约为 2 亿美元。

2. 植物农业

80 年代植物生物工程的外源基因转化方法不断翻新花样, Ti 质粒载体、PEG 和电激穿、微量注射、花粉管导入和基因枪相继出现。禾本科、豆科的一些主要作物原生质体培养及其完整植株的再生相继成功。尽管上述关键技术转化、再生频率方面有待改进, 但已结合利用现有分子生物学和微生物学的知识, 获得了一批抗病毒、抗鳞翅目和鞘翅目害虫、抗除莠剂或含其它外源基因的转基因植物, 其中一些有实用价值的已在进行大田试验。预计 1995 年前, 最早进入实用的将是抗除莠剂的植物, 在美国会产生约 7500 万美元的效益。随后投入市场的将是抗病毒的蔬菜和一些经济作物。也有充分根据预测今后 5—10 年内, 将会出现一批抗除莠剂抗病毒或抗虫的水稻、玉米、小麦等粮食作物。尽管所有这些将是令人鼓舞的, 然而要使植物生物工程给农业生产带来深刻的变革, 实现下一次绿色革命, 还需在植物分子遗传、生理生化的基础研究方面做长期艰苦的努力, 并必须与植物育种、农艺、园艺学家密切合作。预计今后将在下列基础性工作方面会有大量积累或令人鼓舞的突破: (1) 利用 RELP 遗传图谱发合植物育种学, 定位、分离有农业价值的基因; (2) 植物基因组结构, 基因表达受不同组织、结育阶段以及光、温度培养的调控分子机理; (3) 植物抗逆(盐、碱、旱、高温、低温)和抗病、抗

表 3

性 状	技术路线原理	转基因植物	公 司
一、抗除莠剂			
1. 抗 Atrazine (阿特拉津)	利用人工合成类似玉米体内天然 Glutathion-s-transferase 的解毒作用 利用光合系统 II, 32K 蛋白的突变基因	烟草	Ciba-Geigy
2. 抗 Glyphosate (草甘磷)	选择压诱变鼠伤寒沙门氏菌, 分离编码 EPSP 酶突变抗性基因, 降低与草甘磷亲和力和修饰 EPSP 基因使过量形成	Ti 质粒转化烟草、蕃茄、油菜 Ti 质粒转化烟草、棉花、大豆、油菜、蕃茄 (已进行大田试验)	Calgen Monsanto
3. 抗 Sulfonyleurea 或 Imidazolinone	选择压诱变沙门氏菌, 分离 ALS 酶突变抗性基因	烟草	Du pont
4. 抗 phosphino-thricin (PPT)	从吸水链霉菌分离 PPT-乙酰转移酶基因。解毒作用	Ti 质粒转化烟草、马铃薯、甜菜 (已进入大田试验) 苜蓿、花椰菜	plant Genetic System 公司 (PGS 公司)
5. Bromoxynil	从克氏杆菌找到可降解这类药物的酶基因	Ti 质粒转化烟草、蕃茄	Calgene
抗除莠剂植物的问题: (1) 抗性转基因植物往往产量低 (2) 遗传稳定性差 (3) 担心环境污染进一步恶化			

(续表)

性 状	技术路线原理	转基因植物	公 司
二、抗病毒			
1. 抗烟草花叶病毒 (TMV)	利用同源病毒外壳蛋白基因	Ti 质粒转化烟草、蕃茄	Monsanto 公司
2. 抗黄瓜花叶病毒 (CMV)	同上	同上 (以上已进入大田试验)	同上
3. 抗苜蓿花叶病毒 (AMV)	同上	烟草	同上
4. 抗烟草裂病毒 (TRV)	同上	同上	J. Bol 实验室
5. 抗烟草斑病毒 (TSV)	同上	同上	同上
6. 抗马铃薯 X 和 Y 病毒 (PVX, PVY)	同上	马铃薯	Monsanto 公司
7. 抗 PVY 病毒	利用异源病毒(大豆花叶病毒)的外壳蛋白基因	烟草	同上
三、抗虫			
1. 抗 <i>Manduca Sexta</i> (烟青虫) <i>Heliothis Zea</i> (烟芽夜蛾) <i>Keiferia lycopersicilla</i> (茄茎 长蛾)	Ti 质粒转化 B. t 毒蛋白基因	蕃茄 (大田试验完成)	同上
2. 抗棉铃虫、红铃虫	同上	棉花	同上
3. 抗烟青虫	同上	烟草	Agricetus Agrigenetics PGS
4. 抗烟芽夜蛾	Ti 质粒转化豇豆蛋白酶抑 制剂	烟草	Plant Breeding Inst. (英国剑桥)
抗虫问题: 1. Bt 毒蛋白的基因在植物体内表达量甚低 2. 外源基因表达的组织特异性问题 3. 开发新的抗虫基因 4. 出现昆虫抗毒性 5. 安全性			
四、保鲜 延迟蕃茄果实软化	利用反义 RNA 抑制 polygalacturonase 的酶活	蕃茄	Calgene
问题: 应兼顾品质问题。			

虫的分子机理;(5)植物光合、呼吸、固氮的分子生物学。

目前 26 种转基因植物中有应用价值的见表 3。

二、在基础和应用基础方面的应用

1. 基因及其产物功能的研究: 传统方法是利用化学或物理法诱变某个基因,并结合表型性状的改变确定基因的功能,但这些方法的诱变是随机的,因此,针对某个特定基因的诱变频率往往很低。利用基因工程方法可使某特定基因由于插入某个寡核苷酸片段,或缺失一段核苷酸,或采用点突变方法而达到特异的突变,进而可阐明 1—2 个碱基的结构变化与功能的关系。利用反意 RNA 特异地抑制某基因的表达,或是将某个基因分离出来使其在异源或同源受体体内表达,借此来研究基因所编码的蛋白及其生物功能。

2. 病毒的复制: 研究真核病毒的难点之一是对病毒基因组 (无论是 DNA 或 RNA) 所编码的非结构蛋白的功能的了解。这主要是由于难以得到足够量的这类蛋白。利用基因工程方法将它们的基因分离转入微生物扩增、表达可以解决这个困难, 并得以进一步分析其理化性质和功能, 如花椰菜花叶病毒 (CaMV) ORFV 就是这样被确定为反转录酶的; 也可将某完整基因或突变基因转入寄主以观察其寄主范围、致病性, 病毒在体内复制运转等生物功能。对于过去难对付的 RNA 病毒, 可先转录为 cDNA 以进行上述类似的研究。

3. 顺式一和反式活化因子 (Cis-, trans-acting factor): 真核细胞基因表达的调控, 如能转录、翻译、器官或组织的特异性表达调控, 往往受控于顺式一或/和反式一活化因子。如某些植物 RNA 病毒 (AMV、TMV) 的翻译, 起始密码上游的 5'-端前导序列是病毒翻译的加强子; CaMV 的 35s 启动子上游的 -343 至 -46 片段是转录的加强子。HIV (人爱滋病毒) 的前病毒转录需要有 "TAT" 基因编码的蛋白 (即反式活化因子) 与前病毒 5'-LTR 序列结合; 豌豆 Rubisco (核酮糖, 1, 5-二磷酸羧化酶) rbc-s 基因的器官和组织特异性的表达受光的诱导和调控, 也是通过另一基因所编码的蛋白与 rbc-s 基因 5'-端一侧起加强子作用的较短 DNA 序列结合起来完成的。研究顺一, 反-式活化因子对真核基因表达的调控已成为热门课题之一。

4. 遗传病因和基因治疗: 已知人的遗传病有 3000 多种, 确定某病因是防治的关键。近年来, 利用基因工程和 RFLP (限制性酶切片长度多型性) 技术取得了突破性的进展。如遗传病中最普遍的一种囊肿纤维变性症, 即 CF (cystic fibrosis) 症, 在西方每出生 2000 个儿童就有一患者, 若双亲都是缺陷基因的携带者, 所生子为的 1/4 会患 CF 症, 已确定该缺陷基因位于人 7[#] 染色体上; 早老性痴呆症 (Alzheimer dementia) 致病基因位于 21[#] 染色的两个小片段, 其中一个与 Amyloid β 基因有关; 神经分裂症的致病基因则在 5[#] 染色体上。在此基础上, 使得分离、定性这些基因以及利用这些基因进行诊断成为可能。值得提出的是, 不久前在体外利用病毒为载体, 将正常的 CF 基因转入病人胰腺和肺细胞内而使病人得到了治疗。深入研究这些治疗基因编码的蛋白及其功能, 将会进一步阐明其致病机制, 为开拓治疗的新途径提供线索。

5. 肿瘤抑制基因 (Tumour Suppressor gene): 过去 10 多年只知道有致癌基因, 近几年又找到了肿瘤抑制基因, 这确是一新的突破。例如成视网膜细胞瘤的发生是由于肿瘤抑制基因, 即 RB 基因的丢失或突变造成功能缺损, 之后又发现 RB 基因的不正常与小细胞肺癌、乳腺癌的发生也密切相关。RB 基因所编码的蛋白可被腺病毒或 SV₄₀ 的致癌蛋白所结合, 从而丧失抑制细胞失控生长的能力。又如细胞中 NM₂₃ 基因是抑制癌细胞扩散的, 凡乳腺癌扩散的细胞, 其 NM₂₃ 表达量极低, 有可能利用 NM₂₃ 蛋白进行诊断甚至治疗。另一种抗肿瘤扩散的基因是 TIMP-2 (Tissue Inhibitor Metalproteinase-2), TIMP-2 蛋白是一种蛋白酶抑制剂, 特异地抑制胶原酶 IV, 该酶由肿瘤细胞分泌, 降解结缔组织中的胶原蛋白有助于癌细胞扩散, 体外试验表明 TIMP-2 确能抑制癌细胞扩散。

6. RFLP 遗传图谱和转座子标记法: 目前, 植物基因工程的重要障碍之一是如何定位分离有价值的基因, 如抗病虫等基因, 尤其是一些由多基因控制的性状, 如抗逆、品质、产量等。RFLP 方法的出现并与传统的育种相配合, 已鉴定了蕃茄抗 TMV、镰刀菌枯萎病、细菌斑点病、线虫病和玉米抗矮花叶病毒、莴苣抗霜霉病的基因。目前已有约 7 种作物如马铃薯、水稻

辣椒等的 RFLP 图谱已完成,预测它们将在植物生物工程方面发挥重要作用。利用转座子(原核或真核)随机插入植物基因组,使其基因突变,从而表型性状也相应改变,据此可确定突变基因的功能,并可利用已知转座子序列为探针,分离出该突变基因。此法也有望用于开发植物有价值的基因。

7. 蛋白质工程: 这项被喻为第二代基因工程的高技术,是以基因工程、点突变晶体衍射以及电脑图像识别等技术为基础,并与分子生物学和生理生化等知识相结合而形成的一门新学科。它已经创造出了一些新型蛋白用于医疗,预计今后 10 年可能会出现更多的新型蛋白广泛用于医、农、轻工甚至化工和环保等部门。目前在医药方面已用于临床试验的有: 爱滋病毒蛋白酶抑制剂、治疗青光眼的碳酸酐酶抑制剂、治疗高血压的血管紧张肽原酶抑制剂等。今后,该技术在新药设计方面将会发挥更大作用。同时蛋白质工程还会使人们能更深入地了解蛋白质折叠、结构与功能等分子生物学的基本问题。

8. 两项有战略意义的基础研究计划:

(1) 日本计划 5 年内获得大肠杆菌基因组全序列,这对人们所最熟知其遗传学背景的原核模式生物将会有更全面而深入的了解,对真核生物的基础研究以及生产实践也会有极大帮助。

(2) 由美国发起,有 13 国 40 多人组成国际联合会,计划投资 30 亿美元、耗时 15 年完成人体基因组 3×10^9 碱基序列分析及译出所编码的约 10 万个基因密码。如获成功将可阐明人类 3000 多种遗传病因,预测疾病,同时对了解人体复杂生理、免疫、神经系统、细胞分化发育、癌症产生的机理有巨大作用。但德国目前已能用高能量紫外光的激光刀将单个染色体定点切成 20 Mbase 片段,来研究遗传病因,从而认为无需期待这一计划的完成。

上述两项计划都将广泛地应用分子生物学、基因工程和分子免疫学技术。总之基因工程高技术已广泛深入地渗透到分子生物学、分子遗传学和分子免疫学的各领域,已经解决或发现了过去传统方法所未能解决或发现的问题,也派生出一些定位、分离基因的新方法,所有这些基础研究已为或将为生物工程新产品的开发提供了新的途径和可靠的理论基础。

三、我国基因工程现状

我国生物工程研究和开发在国家“七五”攻关、高技术规划和国家自然科学基金委员会的支持

表 4

品 名	用 途	基因工程主要元件	阶 段	单 位
(1) HBsAg 疫苗	预防乙型肝炎	HBsAg 基因, 痘苗病毒为载体, P7.5 启动子, 在鸡胚细胞中表达	中试, 母婴阻断 临床试验	中科院上海生化所 卫生部北京生物制品所
(2) 同上	同上	HBsAg 基因, SV ₄₀ 启动子 dhfr 基因增强效应, CHO 细胞中表达	同上	中国预防医科院病毒所 卫生部长春生物制品所
(3) α_1 I-干扰素	外用治疗疱疹性角膜炎, 乳头状瘤病毒引起的慢性宫颈糜烂	合成 cDNA, 载体 pKc-30pl. 启动子, 在 pBv867/K ₁₂ BMH71-18 中表达	试生产	同上

(续表)

品 名	用 途	基因工程主要元件	阶 段	单 位
(4) α Za-干扰素 抗病态	注射用治疗发 状细胞白血病 尖锐湿疣	Roch 公司 cDNA P α A 为载 体, 在大肠杆菌 DH52 中表 达	中试-临床试验 中试临床试验	中国预防医科院病毒所 卫生部上海生物制品所 中国预防医科院病毒所 卫生部长春生物制品所
(5) 人生长激素	儿童生长激素 缺乏症伤口愈合	合成基因, pI 启动子在 E. Coli 中表达 MT-CD ⁺⁺ 诱导启动子 CHO 细胞中表达	中试, 申请临床 试验中	中科院上海细胞所 中科院上海生物工程中心 中科院动物研究所 中科院上海药物所
(6) 青霉素酰化酶	生产半合成青 霉素底物6-ApA 的关键酶	从 E. Coli D816 克隆该酶基 因, 载体 pBR ₃₂₂ , E. Coli A ₉₆ 中表达	完成中试	

下取得了可喜的进展。1990年底国家“七五”攻关项目已全部验收, 共取得成果 233 项, 其中重大成果 88 项。有关基因工程的工作有:

1. 基因工程在医药方面的应用(见表 4)。

此外尚有 β -、r-干扰素, 白细胞介素-2, EGF, TNF, tPA 等基因工程产品以及外源基因在兔体或蚕体中的表达正分别处于完成试验室试验, 进入中试、或在申请临床试验中。

2. 基因工程在农业方面的应用(见表 5)。

表 5

品 名	用 途	基因工程主要元件	阶 段	单 位
(1) K ₁₄ -K ₉ , 双 联猪幼畜疫 苗	预防猪腹泻	流行株的抗原基因质粒, pBR ₃₂₂ 载体受体菌 E. Coli C ₆₀₀	中试高密度发 酵已完成待鉴定	中科院上海植物生理所 中科院上海生物工程中心
(2) 猪生长激素	增加生长速率和 瘦肉率	猪脑垂体 mRNA \rightarrow cDNA, 载 体 pCZ ₃ , 受体菌 E. Coli N4830	中试, 大田试 验中	北京农业大学
(3) 抗 TMV 烟 草	抗病烟草优 良品种	TMV 外壳蛋白基因, Ti 整合 型载体质粒	大田试验中	中科院微生物所 河南农科院植保所
(4) 抗 CMV 烟 草	同上	CMV 外壳蛋白基因, Ti 整合 型载体质粒 35s 启动子	同上	同 上
(5) 抗 CMV + TMV 的双 价烟草	同上	CMV + TMV, 外壳蛋白基因, Ti 整合型载体质粒, 分别由 35s 启 动子驱动	同上	同 上
(6) 抗 CMV 蕃 茄	抗病蕃茄良种	同上	试验室	中科院微生物所
(7) 抗 PVX 马 铃薯	同上	PVX 外壳蛋白基因, Ti 质粒, 35s 启动子	同上	同 上 北京农业大学
(8) 抗鳞翅目害 虫烟草	抗虫烟草	B. t 毒蛋白基因, Ti 二元载体质 粒转入烟草, 35s 启动子, 串联两个 加强子	完成试验室包 括系统虫测	中科院微生物所 中科院上海昆虫所 中科院动物所

四、对我国基因工程发展的建议

1. 应适当加强基础和应用基础研究。纵观我国 10 年来基因工程的进展,不难看出绝大部分课题是移植西方的思路、技术、甚至重要的研究材料,并以产品作为龙头,独创性的工作,特别是基础和应用基础研究很少。从国际生物工程开发生产日趋激烈及我国财政情况考虑,大部分关键技术应依靠自力更生解决,靠引进的只能是极小部分。基因工程研究和开发在国际上已开展了 17 年,过去几十年研究成果的储备,特别是可开发利用的基因,已基本上被开发利用。17 年的实践已使人们觉悟到,要使基因工程得到进一步开发和普遍应用,必须首先解决好基础研究的问题,特别是为了达到商品生产的目的更是如此,而不应象最初预期的那样,企图一蹴而就。在基础研究方面虽然也提出不少新理论或动人的假说,但还需要继续探索和验证。我国经济基础较薄弱,按照科研面向经济建设的原则,安排较多的以产品为龙头的课题是应当的,但若不有意识地注意安排有关的基础和应用基础研究,我国的基因工程工作有可能除极少数重复国外已成熟的商品外,而陷入无米为炊、进退维谷的境地。虽然政府在这方面已有较好的安排,相对来说对长远规划也有较强的投资,但受急功近利的思想的影响,竭泽而渔之事屡见不鲜,亟需政策研究部门根据国情、国力统筹规划,使应用与基础研究在实际工作中有适当的比例,并给以必要的支持。

2. 加强中试研究和下游开发能力。基因工程产品要经历试验室、中试、试生产三个阶段,最后才能形成生产力。统计我国“七五”攻关和“长远规划”两个投资渠道的资金分配不难看出,过去 3—5 年对试验室阶段的投资占绝大部分。考虑到我国原有基因工程基础薄弱,需要装备和消耗性费用,在一定时期内重点加强实验室是必要的。但“七五”结束后,我国已有一批产品完成了试验室工作,待进入中试,少数已完成中试进入试生产阶段。实践证明,中试不完全是实验室成果的简单放大,有些还要研究中试工艺的改进和完善,并进行大量的临床或大田试验,其所需的装备、消耗性材料和时间都远远超过试验室阶段。再者,我国原有的生物制品厂家大都是采用传统工艺,原有设备和安全设施都不能满足基因工程产品的要求。“七五”期间国家在中科院和有条件的医药生物制品所投巨资新建或扩建了至少四个中试基地,目前的问题是,如何尽快配备合格的技术人员调整经营管理方针,以高质量的工作来吸引试验室成果进行中试。同时也应允许或鼓励地方投资建中试厂。建议管理部门总结“七五”投资的经验和教训,得出适合我国国情和国力的试验室阶段与中试阶段的投资比例。

3. 加强合作。基因工程研究特别是基因工程商品的研制是多学科的综合课题。我国各研究所、大学、产业部门各有优势,学科间、部门间、上游与下游之间的优势互补,才能达到多快好省的目的。“七五”攻关的成功经验已充分证明了这一点。因此,在组织“八五”攻关和“863”计划时也应应在项目、课题、中试等多层次的管理中充分注意加强相互协作,对协作搞得好的可考虑给以必要的奖励。