

生物科学
生物技术
系 列

CONCISE MOLECULAR BIOLOGY

普通高等教育“十一五”规划教材

简明分子生物学

李兴玉 主编 赵军 王晓华 副主编



化学工业出版社



普通高等教育“十一五”规划教材

简明分子生物学

concise molecular biology

李兴玉 主编

赵 军 王晓华 副主编



化学工业出版社

· 北 京 ·

图书在版编目 (CIP) 数据

简明分子生物学/李兴玉主编. —北京: 化学工业出版社, 2009. 2

普通高等教育“十一五”规划教材

ISBN 978-7-122-04403-7

I. 简… II. 李… III. 分子生物学-高等学校-教材
IV. Q7

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2008) 第 211954 号

责任编辑: 赵玉清

文字编辑: 焦欣渝

责任校对: 郑捷

装帧设计: 尹琳琳

出版发行: 化学工业出版社 (北京市东城区青年湖南街 13 号 邮政编码 100011)

印 装: 三河市延风印装厂

720mm×1000mm 1/16 印张 18³/₄ 字数 374 千字 2009 年 3 月北京第 1 版第 1 次印刷

购书咨询: 010-64518888 (传真: 010-64519686) 售后服务: 010-64518899

网 址: <http://www.cip.com.cn>

凡购买本书, 如有缺损质量问题, 本社销售中心负责调换。

定 价: 29.80 元

版权所有 违者必究

《简明分子生物学》编写组成员名单

主 编：李兴玉

副主编：赵 军 王晓华

编写组成员（以下按姓氏笔画为序）及单位：

王晓华 广州医学院 生物化学教研室

开国银 上海师范大学 生命与环境科学学院

许 燕 上海师范大学 生命与环境科学学院

乔中东 上海交通大学 分子生物学教研室

李勤喜 厦门大学 生物医学系

李兴玉 上海师范大学 生命与环境科学学院

宋 磊 上海师范大学 生命与环境科学学院

赵 军 上海师范大学 生命与环境科学学院

赵惠芳 上海师范大学 生命与环境科学学院

高 霞 中国科学院上海营养所

程 呈 中科院上海生命科学研究院 生化与细胞所

魏亚明 广州医学院第一附属医院

前 言

分子生物学是一门从分子水平揭示生命本质的学科。它的发展,为人类的生活、生存带来了福音。应用这一高新技术,使人类面临的粮食短缺问题、环境污染问题、重大疾病的诊断和治疗等问题有望得到解决。正是由于分子生物学技术具有非常诱人的前景,不少初学者或非生物专业的科研工作者都想了解分子生物学究竟用什么方法、哪些高超技术解决这些令人棘手的问题。闲余之际,书市浏览,见到分子生物学方面书籍,兴奋不已。但那些大厚本子专著,令人生畏。从希望了解或愿意学习到教材的不适宜,确实有一很复杂的矛盾,甚至可能将一个人学习的热情埋没其中。鉴于此种情况,急需一本简明扼要、通俗易懂的分子生物学教材,鼓励人们的学习积极性,满足这一人群美好的心愿,从而为深入学习和研究分子生物学奠定良好的基础。

实际上,不管是从事分子生物学研究的专业人员手头上的工具书或专著,还是生物技术专业本科学学生使用的分子生物学教材,与生物化学、遗传学、生物物理学、细胞生物学、微生物学、免疫学等学科内容均重复很多,因为分子生物学起源于上述学科。尽管经过百余年的发展,分子生物学基本上自成体系,但与发展起源的各学科之间仍有非常紧密的联系。因此,分子生物学专著或大学使用的教材越编越厚,内容越来越多,各学科之间的重复有增无减。同学们在学习分子生物学课程时,有些内容在其他课程中已经讲过了,所以感到乏味,没有新鲜感。但作为学校规定的课程,不学也不妥,学吧,浪费时间,增加了负担。由于所学内容重复,学生听讲不专心,对于授课老师来说,所经历的最失败的事,莫过于此。此时只有一个念头:教材改革!

另外,由于近年来纳米技术和新材料学科的兴起,不少化学专业的研究工作者为自己创造的新产品寻找新的出路,比如磁性纳米微球即作为一种新的材料问世。但经过研究,在其表面修饰特殊的化学基团,连接单克隆抗体等生物活性物质,利用铁剂所具备的磁响应性和单克隆抗体与抗原结合的特异性,分离造血干细胞,用于治疗血液科常见的再生障碍性贫血、白血病以及其他实体瘤,从而为临床治疗增添了新的方法。还有稀土材料的不断发现,荧光物质的不断发明。这些为人类的进步、科学技术的发展作出贡献的专家,也希望自己的成果用于生物学,同样也需要易学易懂的教材充实自己。

鉴于上述原因,我们组织了多年从事生物化学、分子生物学、基因工程学教学及临床检验专业的专家、教授,基于分子生物学技术,编写了《简明分子生物学》一书,力图以短时、快速的方式使学习者掌握分子生物学相关知识,为深入研究生

物学中的疑难问题奠定坚实的理论基础。

作为教材，以培养人才、传播知识为主。教材编写过程中，杜绝抄袭，但其中也引用了相关图书的示图，如有不当之处，恳请谅解并在此向相关作者表示致谢。由于时间仓促，加之作者水平有限，书中存在不妥之处，在所难免，敬请读者及同行学者斧正。

《简明分子生物学》编写组
2008年10月于上海

目 录

第 1 章 绪论	1	2.3.2 光复活修复	34
1.1 分子生物学研究的内容	1	2.3.3 切除修复	34
1.1.1 核酸	1	2.3.4 重组修复	35
1.1.2 蛋白质	1	2.3.5 错配修复	35
1.1.3 细胞信号转导与通讯	2	2.3.6 SOS 修复	36
1.2 分子生物学发展的历史	2	2.4 核酸含量检测	36
1.2.1 分子生物学的开创时期	2	2.4.1 定糖法	36
1.2.2 近代分子生物学的发展 时期	3	2.4.2 定磷法	36
1.2.3 分子生物学技术的深入发展 应用时期	4	2.4.3 紫外分光光度法	37
1.3 分子生物学的发展前景	6	2.5 核酸研究新进展 (专题讲座, 授课老师选题并安排)	37
1.3.1 分子克隆技术的发展	6	参考文献	38
1.3.2 环境分子生物学	7	第 3 章 基因转录与调控	39
1.3.3 艾滋病研究	8	3.1 基因结构	39
1.3.4 肿瘤分子生物学研究	9	3.1.1 原核生物基因组	39
1.3.5 细胞膜受体的研究	10	3.1.2 真核生物基因组	40
1.3.6 中医分子生物学	13	3.2 真核细胞的转录	44
参考文献	15	3.2.1 RNA 聚合酶	45
第 2 章 核酸	16	3.2.2 转录过程	46
2.1 DNA 复制	16	3.2.3 转录产物的加工	47
2.1.1 DNA 复制体系	17	3.3 真核细胞表达调控	51
2.1.2 原核生物 DNA 复制的 过程	23	3.3.1 真核细胞表达调控的特点	51
2.1.3 真核生物 DNA 复制的 特点	26	3.3.2 转录水平的调控	53
2.1.4 线粒体 DNA 的复制	27	3.3.3 前体 mRNA 转录和加工	57
2.2 RNA 种类及其特点	28	3.3.4 翻译水平的调控	57
2.2.1 tRNA 结构及功能	29	3.3.5 翻译后水平的调控	58
2.2.2 rRNA 结构及功能	31	3.4 原核细胞的转录	59
2.2.3 mRNA 结构及功能	31	3.4.1 RNA 聚合酶	59
2.2.4 nRNA 的功能	32	3.4.2 转录单位	61
2.3 DNA 的损伤与修复	33	3.4.3 转录过程	61
2.3.1 DNA 聚合酶的“校正”修复	33	3.4.4 转录产物的加工	63
		3.5 原核生物基因表达调控	64
		3.5.1 原核转录起始调控最重要的 模式——操纵子	65

3.5.2 其他转录调节机制	67	5.3.7 PCR 反应的特异性	103
3.5.3 翻译水平的调节	69	5.3.8 PCR 扩增产物的分析	104
3.6 基因表达调控的新进展	70	5.3.9 PCR 注意事项	104
参考文献	71	5.4 PCR 的扩展	109
第 4 章 基因工程	72	5.4.1 逆转录 PCR	109
4.1 工具酶	72	5.4.2 定量 PCR	110
4.1.1 核酸内切酶的发展历史	72	5.4.3 荧光 PCR	110
4.1.2 核酸内切酶的命名与种类	73	5.4.4 锚式 PCR	111
4.1.3 DNA 聚合酶	75	5.4.5 差显 PCR	112
4.1.4 DNA 连接酶	76	5.5 PCR 技术的新进展	113
4.2 载体与宿主	76	参考文献	114
4.2.1 载体的种类和特性	76	第 6 章 核酸序列分析	116
4.2.2 克隆载体	77	6.1 Sanger 双脱氧链末端终止测 序法	117
4.2.3 表达载体	80	6.1.1 Sanger 双脱氧链末端终止测 序法的基本原理	117
4.2.4 原核细胞宿主	84	6.1.2 Sanger 双脱氧链末端终止测 序法的所需的关键试剂	119
4.2.5 真核细胞宿主	85	6.1.3 Sanger 双脱氧链末端终止法 测序过程	121
4.3 基因文库构建	87	6.2 Maxam-Gilbert 化学降解测 序法	123
4.3.1 基因组文库构建	88	6.2.1 Maxam-Gilbert 化学降解测 序的基本原理	123
4.3.2 cDNA 文库构建	88	6.2.2 Maxam-Gilbert 法的优 缺点	126
4.4 基因重组	89	6.3 杂交测序	126
4.4.1 基因重组技术	90	6.4 DNA 自动化测序	127
4.4.2 重组体的鉴定	91	6.5 测序策略	129
4.5 基因转染技术	92	6.5.1 随机测序	130
4.5.1 物理转化法	92	6.5.2 定向测序	130
4.5.2 生物转染法	93	6.5.3 随机法与定向法的选择	131
4.6 基因工程研究新进展	94	6.6 BigDye 测序法	132
4.6.1 基因工程疫苗	94	6.6.1 BigDye 测序法基本原理	133
4.6.2 基因工程抗体	95	6.6.2 BigDye 测序的实验方法	133
参考文献	95	6.7 RNA 测序	133
第 5 章 PCR 技术	96	参考文献	133
5.1 PCR 概述	96	第 7 章 蛋白质合成	135
5.2 PCR 基本原理	96	7.1 人体 20 种氨基酸的特性	135
5.3 实现 PCR 的基本条件	98		
5.3.1 模板 (DNA 或 mRNA)	98		
5.3.2 引物	99		
5.3.3 dNTP	100		
5.3.4 酶	101		
5.3.5 辅基	101		
5.3.6 PCR 的通用操作程序	102		

7.1.1 蛋白质的组成元素	135	8.4.1 放射性同位素标记	180
7.1.2 蛋白质的基本结构单位	135	8.4.2 荧光标记技术	181
7.1.3 氨基酸的分类	136	8.4.3 生物素标记技术	182
7.2 氨基酸遗传密码的简并性	138	8.4.4 地高辛标记技术	183
7.2.1 氨基酸的遗传密码	139	8.5 探针的合成方法	184
7.2.2 遗传密码的简并性	140	8.5.1 缺口平移法	184
7.3 蛋白质的生物合成	140	8.5.2 随机引物法	184
7.3.1 生物合成蛋白质的基本 原理	140	8.5.3 RNA 探针体外转录法	186
7.3.2 生物合成蛋白质运输及加工 修饰过程	148	8.5.4 末端标记法	186
7.3.3 生物合成蛋白质的分离纯化 及复性	149	8.5.5 聚合酶链反应标记法	188
7.4 蛋白质测序	150	8.5.6 光促合成法	188
7.5 寡肽或多肽及蛋白质的人工 合成	151	8.6 核酸杂交前沿技术	189
7.5.1 肽的概念	152	参考文献	189
7.5.2 多肽和蛋白质人工合成的基 本原理	152	第9章 转基因食品的检测及 分析	190
7.5.3 寡肽、多肽或蛋白质合成的 方法选择	155	9.1 转基因食品的概述	190
参考文献	156	9.1.1 转基因食品的定义	190
第8章 分子杂交技术	157	9.1.2 转基因食品的发展现状	191
8.1 核酸分子杂交概况	157	9.1.3 转基因食品的利弊与发展 前景	192
8.1.1 核酸分子杂交的基本 原理	159	9.2 转基因食品的 DNA 抽提与 纯化	193
8.1.2 最佳杂交效果创建	160	9.2.1 CTAB 法	193
8.2 分子杂交的方法	164	9.2.2 SDS 法	194
8.2.1 Southern 印迹	165	9.2.3 核酸的磁分离法	194
8.2.2 Northern 印迹	168	9.3 转基因食品的检测	195
8.2.3 Western 印迹	170	9.3.1 核酸水平的检测	195
8.2.4 斑点杂交及狭缝杂交	175	9.3.2 蛋白质水平的检测	201
8.2.5 原位杂交	176	9.3.3 基因芯片检测	204
8.3 探针标记	177	9.3.4 其他检测方法	208
8.3.1 DNA 探针	178	9.4 转基因产品安全性及其评价	209
8.3.2 cDNA 探针	178	9.4.1 转基因食品安全的 背景	209
8.3.3 RNA 探针	179	9.4.2 转基因食品的安全性	210
8.3.4 寡核苷酸探针	179	9.4.3 转基因产品的安全性 评价	211
8.4 标记物的类型	180	9.4.4 对待转基因技术的正 确态度	212
		9.5 转基因产品检测研究新进展	213

9.5.1 转基因食品拥有 DNA “条形码”	213	11.3 蛋白质分离的新方法	239
9.5.2 国内监督:转基因食品要贴标签	213	11.3.1 样品制备	239
9.5.3 我国转基因产品检测已达国际先进水平	213	11.3.2 样品分离	240
参考文献	214	11.4 细胞表面膜受体的检测	245
第 10 章 细胞信号转导	217	11.4.1 膜受体的分类	245
10.1 概述	217	11.4.2 膜受体检测分析	245
10.2 细胞受体	217	11.5 新基因的筛选	246
10.2.1 受体概念和特点	217	11.5.1 克隆已知生物活性的新基因	246
10.2.2 受体的种类与结构	218	11.5.2 筛选细胞分化表达基因	247
10.2.3 膜信号的转换	222	11.5.3 用微卫星 DNA 多态性标记筛选新抑癌基因	248
10.3 细胞信号分子	223	11.5.4 用基因芯片 (DNA chip) 筛选肿瘤相关基因	249
10.3.1 蛋白质分子	224	11.5.5 用微阵列比较基因组杂交筛选新的肿瘤相关基因	249
10.3.2 激素分子	225	11.5.6 用双向电泳、质谱技术筛选肿瘤异常表达基因	249
10.3.3 气体信号分子	225	11.5.7 高通量细胞筛选新基因	249
10.3.4 其他信号分子	225	11.5.8 反义核酸筛选新基因	250
10.4 细胞信号转导通路	225	11.6 基因芯片	251
10.4.1 cAMP 信号转导	225	11.6.1 基因芯片种类	251
10.4.2 IP_3 / Ca^{2+} 信号转导	227	11.6.2 基因芯片制作	251
10.4.3 酪氨酸激酶信号转导	229	11.6.3 基因表达谱芯片	252
10.4.4 核受体信号转导	231	11.7 基因敲除	254
10.5 信号转导前沿技术 (专题讲座, 授课老师选题并安排)	233	参考文献	255
参考文献	233	第 12 章 分子生物学在实践中的应用	258
第 11 章 分子生物学中的新技术及原理	234	12.1 基因诊断	258
11.1 分子信标技术	234	12.1.1 基因诊断的概念和特点	259
11.1.1 分子信标简介	234	12.1.2 主要的基因诊断技术及其原理	259
11.1.2 分子信标的结构	234	12.1.3 基因诊断在临床上的应用	265
11.1.3 分子信标作用原理	235	12.2 基因治疗	268
11.1.4 影响分子信标的主要因素	235	12.2.1 基因治疗的概念及现状	269
11.1.5 分子信标的应用	236	12.2.2 基因治疗的策略	270
11.1.6 前景与展望	237	12.2.3 基因治疗的基本材料及步骤	271
11.2 mRNA 磁分离	238		
11.2.1 原理	238		
11.2.2 磁分离应用	238		

12.2.4 基因治疗的临床应用	274
12.3 基因工程药学	276
12.3.1 概述	276
12.3.2 基因工程制药的原理	282
12.3.3 基因工程的步骤	283

12.3.4 范例(基因工程方法生产重组人胰岛素)	285
参考文献	286
缩略语	287

第 1 章 绪 论

分子生物学是由生物化学、微生物学、遗传学、生物物理学、细胞生物学、免疫学等学科发展起来的一门从分子水平揭示生命本质的学科。经过百余年的发展,基本上自成体系,但与发展起源的学科之间仍有非常紧密的联系,也是当前生命科学中发展最快的一门学科,已成为解决所有生命科学难题的领头学科。

1.1 分子生物学研究的内容

分子生物学的研究对象是核酸和蛋白质大分子的结构与功能。以核酸为中心,研究蛋白质与 DNA 相互作用的规律、蛋白质与蛋白质相互作用的现象等,从分子水平了解生命活动的本质。分子生物学的主要研究内容为核酸、蛋白质大分子物质的结构与功能及细胞信号传导与通讯等。

1.1.1 核酸

自从发现核酸以来,人们就已经认识到核酸是携带遗传信息的载体,通过表达为蛋白质使基因的功能得以实现。因此,核酸分子与其表达蛋白质的功能密切相关。人体每个体细胞基因组有 31×10^8 bp, 其中包含了 3 万~5 万个基因。除细胞核基因组外,在人体细胞中,还有线粒体基因组。因此,在一个体细胞内有 2 套基因:一大套基因为细胞核中的基因组,就是我们熟知的 HGP 测序的那部分 DNA;还有一小套基因,即线粒体基因组,它也是 DNA。经过研究证实,线粒体基因组有 16569bp, 含有 37 个基因,其中 24 个基因编码合成蛋白质时所需的 RNA (22 个 tRNA 和 2 个 rRNA), 还有 13 个基因参与编码呼吸链关键性复合酶的亚单位。在这些基因组中蕴藏着大量的遗传信息,保持着种系之间的特异性。每一个生物种群在生长发育过程中都有各自的特点,通过基因表达的 mRNA, 翻译成蛋白质,实现其功能。这一过程是个非常复杂的过程,需要众多酶和 tRNA 的参与,最终完成了合成蛋白质的任务,使得生物体在不同生长发育时期的生长过程有条不紊地进行。

1.1.2 蛋白质

在一个生物个体中,来自任何部位的基因都是一致的,但在一个个体内的蛋白质种类各种各样。就免疫学而言,自然界中大约有 10^{10} 以上的抗原决定簇,人体要应付这些病原菌的侵袭,需要建立完整的免疫系统,才能对抗这些病原微生物,因此必须产生相应数量的抗体。分子生物学对蛋白质的研究主要是蛋白质大分子结构及其参与生命活动的整个过程的功能,虽然针对蛋白质的研究有很长的历史,但由

于在生物体内蛋白质的种类繁多、功能复杂,与核酸分子生物学的研究相比,发展相对较慢。世界各国科学家早已注意到这一问题,于是在1994年于意大利召开的第一次国际蛋白质组学专题研讨会上,澳大利亚的两位科学家 Wilkins 和 Williams 提出了蛋白质组学 (proteome) 一词,意指细胞内所表达的全套蛋白质,后引申为一种基因组全部蛋白质的存在及其活动方式。蛋白质是生命活动的基础,生物体内细胞的增殖、分化、生长、衰老、死亡、代谢、神经传导、免疫过程,都是由蛋白质发挥着重要功能。蛋白质的功能多种多样,生物体内的各种活动过程都离不开蛋白质,因此有人提出了蛋白质的功能无限,可见蛋白质在生命活动中的重要性。总的来说,蛋白质具有:组织修复功能;调节生理功能;载体功能和供应能量功能。分子生物学的主要任务就是研究蛋白质大分子与上述这些功能的关系及与之相关的各种活动过程。

1.1.3 细胞信号转导与通讯

为探讨细胞与细胞之间的共生规律,细胞信号与转导已成为分子生物学研究的另一主要任务。由 10^{15} 细胞组成的人体,是一个庞大的群体,也称为“细胞社会”。在这一社会里,每个细胞都有自己专一的职责。它们之间和平共处,个个平等,一旦有突变的细胞,侵占正常细胞赖以生存的营养物质时,就会有免疫细胞干预,其结果导致突变细胞凋亡。但有时免疫监视细胞也会出现“失职”,或由于突变细胞产生的“麻痹因子”,封闭了免疫细胞,出现免疫逃逸现象,最终发生了肿瘤。凡此种种,细胞和细胞之间究竟是怎么维持其共生关系的?怎样进行信息交流的呢?细胞信号转导与通讯的初步研究成果解释了这些问题。体内众多的信号分子是细胞间和细胞内信息传递的桥梁,使得每个细胞的增殖、分化、完成专一性功能都处在有序的状态中。细胞在体内完成这些信号传递,必须具备完整的“视”、“听”、“触”等功能。这些功能均在细胞膜上得到体现。体液中的细胞信号分子多种多样,归结起来有三类:激素,局部介质和神经介质。但作为细胞膜受体,只有蛋白质。细胞信号传递的受体-配体是今后研究的主要任务。

1.2 分子生物学发展的历史

分子生物学是一年轻而又古老的学科。早在1871年, Lankester 提出:生物不同种系间的化学和分子差异的发现和分折,对确定系统发生的关系,要比总体形态的比较研究更为重要。

分子生物学一词最早出现在 Weaver 对洛氏基金会的报告中,他写道:“在基金会给予支持的研究中,有一系列属于比较新的领域,可称为分子生物学 (molecular biology)。”一年以后, Astbury 使用了这一名词,之后变得越来越普遍。

1.2.1 分子生物学的开创时期

1864年: Hoope-Seyler 用 X 射线结晶学研究得到了一种晶体物质,命名为血

红蛋白。

1868年：瑞士科学家 Miescher 发现核酸并在 1871 年才发表了论文。

1871年：Lankester 首先提出了化学和分子差异分析种系的理论。

1879年：德国生物学家 Flanming 发现细胞核内的染色体。

1912年：英国布拉格父子 (W. H. Bragg, W. L. Bragg) 应用晶体学技术测定了一些结构复杂的蛋白质分子，他们还在以后的工作中相继检测了毛发、肌肉等纤维蛋白以及胃蛋白酶、烟草花叶病毒等的分子结构。W. H. Bragg 为生物大分子结晶结构的形成和发展奠定了基础。

1924年：德国细胞学家福尔根发现了核糖核酸 (RNA) 和脱氧核糖核酸 (DNA)。

1926年：Sumaer 从刀豆的提取物中得到脲酶并得到结晶物，证实蛋白质结晶有催化活性。

1931年：Pauling 发表了第一篇化学键特性的论文。

1938年：美国生物学家、遗传学家 Bidel 与美国生物化学家 Tatmul 提出遗传基因通过一定的化学反应起作用的理论。

1934年：Bernal 和 Crowfoot 发表了第一张胃蛋白酶结晶的 X 射线衍射图谱。

1941年：Astbury 获得了第一张 DNA 的 X 射线衍射图。

1944年：Avery 提出了在细菌的转化中，携带遗传信息的是 DNA。

1950年：Chergaff 用不同来源的 DNA 建立了碱基组成的一般规律，即 $[A]=[T]$ 和 $[G]=[C]$ 。

1951年：Pauling 和 Corey 应用 X 射线衍射晶体学理论证实了蛋白质的 α 螺旋和 β 折叠结构。

1952年：美国遗传学家 Landeberg 发现了通过噬菌体的“转导”实现的不同细菌间的基因重组现象。

1.2.2 近代分子生物学的发展时期

1953年：Watson 和 Crick 推导出 DNA 的双螺旋结构模型，为认识核酸与蛋白质的关系奠定了坚实的理论基础；同时 Sanger 完成了胰岛素的氨基酸全序列分析。这一年是开创生命科学新时代的一年，也是具有里程碑意义的一年。

1954年：Gamnow 研究了遗传密码的规律。

1956年：Volkins 和 Astrachan 发现了 mRNA。

1958年：Hoagland 等发现了 tRNA 在蛋白合成中的作用。Meselson 和 Stahl 建立了半保留复制。

1960年：Marmur 和 Dofy 发现了 DNA 的复性。

1961年：Jacob 和 Monod 提出了操纵子学说。

1962年：Arber 提出限制性核酸酶的存在。

1965 年: Holley 首先测定了酵母丙氨酸 tRNA 一级结构。

1967 年: Gellert 发现 DNA 连接酶。

1.2.3 分子生物学技术的深入发展应用时期

1972~1973 年: Berg、Boyer 和 Cohen 先后创立了 DNA 克隆化技术。

1975 年: Southern 发明了 DNA 电泳印迹技术

1975 年: 英国生物化学家 Sanger 发明了确定 RNA 和 DNA 分子中碱基排列顺序的技术; 美国分子生物学家 Gilbert 发明了 DNA 碱基的快速分析方法; 德国免疫学家 Georges Kohler、英国生物化学家 Cesar Milstein 合作开发出了单克隆抗体技术。

1976 年: Bishop 等发现了原癌基因。

1977 年: Berget 等发现了“断裂”基因, Sanger、Maxam 和 Gilbert 分别创立了双脱氧(酶)法和化学裂解法测定 DNA 序列, 尤其是 Sanger 双脱氧法至今仍然是一种非常可靠的测序方法, 广泛用于新发现基因的测序和人类基因组计划基因序列图的制作。

1979 年: Solomon 和 Bodmer 创立了 RFLP。

1980 年: Wigler 等通过与某个选择性标记物共感染, 把外源基因导入哺乳动物细胞中。

1981 年: Cech 等发现四膜虫 26S rRNA 前体的自我剪接能力, 此发现对于分子进化研究开辟了新的研究领域; Banerji 等发现了增强子和 5' 调节序列, 人们开始认识到基因表达的复杂性; Brinster 等通过显微注射法把基因注射到一个受精的鼠胚细胞的前核中得以表达, 将大鼠的生长激素基因注射到小鼠的受精卵中, 小鼠的体重增加 2 倍, 从此产生了超级小鼠; 中国科学家培养出一条“克隆鱼”, 至今还是世界上唯一的一条克隆鱼。

1982 年: Presiner 等在感染瘙痒病的仓鼠中发现了朊病毒。

1983 年: Herrera-Estrella 等用 Ti 质粒作为转基因载体转化植物细胞获得成功。

1984 年: McGinis 等发现果蝇、非洲爪蟾等同源异形基因中的同源异形盒的核苷酸序列。

1985 年: Saiki 等发明了 PCR; Sinsheimer 首先提出有类基因组图谱制作计划的设想; Smith 等报道了荧光 DNA 测序方法; Miller 等发现 DNA 结合蛋白的锌指结构。

1986 年: Dryja 等发现成视网膜细胞瘤(Rb)基因; Robin 等采用 X 射线晶相学, 证实了 DNA 结合蛋白的螺旋-转角-螺旋结构。

1987 年: Mirkin 等在酸性溶液的质粒中发现了三股螺旋链; 酵母(YAC)作为载体克隆大片段 DNA。

1988年：Landschalz发现亮氨酸的序列的周期性。

1989年：Greder等首先在原生动物的发现了端粒酶，它是内源性的并以RNA为模板的逆转录酶；Hiatt等首次报道了在植物中亦可产生单克隆抗体。

1990年：人类基因组计划全面正式启动；Simpson等发现了对mRNA前体编辑起指导作用的小分子RNA（guide RNA）；Sinclair等在人类Y染色体上发现了新的性别决定基因——SRY基因。

1991年：由欧共体完成了酵母3号染色体的315kb的测序工作；Hake等首次报道在植物中发现含有同源异形盒基因；Blackburn等提出调节聚合序列〔通式为 $(T/A)_m G_{n,m} = 124, n=1\sim 8$ 〕的单链DNA可形成分子内或分子间的四螺旋结构，起着稳定染色体的作用。

1991年：Jurnak等发现一种新型蛋白结构——平行 β 螺旋；Yuan等发现哺乳动物细胞参与细胞凋亡的蛋白质——IL-1 β 转化酶。

1994年：日本科学家发表了水稻基因组遗传图；Wilson等完成了线虫3号染色体连续的2.2Mb的基因测定。

1995年：Cuenonud等发现了具有酶活性的DNA；Tu发现了具有转运与信使双功能的RNA-10 Sa RNA。

1996年：Lee等首次报道了酵母转录因子GCN4中的氨基酸片段能自动催化合成自我复制的肽；洪国藩等采用“指纹-锚标”战略构建了高分辨率水稻基因物理图，DNA片段的长度为120kb；Goffeau等完成了酵母DNA全序列（ 1.25×10^7 bp）的测定。

1997年：芬兰的一家公司将红细胞生成素基因转移到牛乳房细胞中，在牛奶中提取红细胞生成素，这头牛价值为42亿美元。

1997年：“多莉”克隆羊小组用“化学剪刀”改变牛血液基因制造人血浆，估计这只重组动物每年生产的血液相当于1万名献血员的献血量。全美每年凝血因子Ⅷ需要120g，常规提取需120万升血（需600万名献血员），而用转基因牛每头每年产奶10000kg，每千克牛奶中提取10mg因子Ⅷ，仅需一头牛就可满足需要。

1998年：Renard等用体细胞打靶操作技术获得克隆牛Marguerite；Gene Bank公布了最新的“基因图谱98”；Venter对人的基因组计划提出新测序战略——全基因随机测序，毛细管电泳测序仪启动。

2000年：2月26日，国际HGP组织宣布人类基因组序列测序工作已完成。中国科学家参加完成了测序工作，我国是发展中国家唯一的HGP成员。

2001年：3月，HGP正式宣布，人类基因组包含3万~4万个基因。历时10年的人类基因组计划暂告一段，同时又进入了紧迫的后基因组——功能基因组工作。

2002年：科学家提出影响干细胞分化的因子，鉴定出2000多个相关基因。

2003年：第一只体细胞克隆动物（绵羊）“多莉”死亡；中国内地、台湾、香

港科学家宣布联手启动“中华人类基因组单体型图”计划；中、美、日、德、法、英 6 国科学家联合宣布完成人类基因序列图；中、美科学家分别测定出非典型肺炎病毒的基因图谱。

2004 年：FDA 批准首个 DNA 微阵列试验系统 AmpliChip Cytochrome P450 Genotyping Test；美国首个 RNAi 产品进入临床。

2005 年：多国科学家宣布完成水稻基因组序列全序列的绘制，使水稻成为迄今第一个为人类所掌握的农作物；英国桑格实验室完成了人类 X 染色体基因测序。

2006 年：世界上首次 RNAi 临床试验初获成功；中国科学家参与人类 3 号染色体测序结果和分析说明在《Nature》杂志上公布；发现了人类差异性基因不是 0.1%，而是 10%；发现了 piRNA (piwi-interacting nucleotides)，小分子 RNA 家族增添新成员。

中国科学家在分子生物学研究中的主要贡献：

1965 年：中国科学家人工合成了牛胰岛素。

1973 年：中国科学家用 0.18nm X 射线分析测定了猪胰岛素的空间结构。

1981 年：中国科学家完成了酵母丙氨酸 tRNA 的全序列合成。中国科学家培育出一条克隆鱼。这是一尾采用鲫鱼的体细胞核移植克隆技术培育成功的世界上第一尾“克隆鱼”。这尾鲫鱼存活了两年。

2000 年：我国南方基因组研究中心完成了人类 3 号染色体的测序工作，占 HGP 的 1%。

2002 年：中国科学家在《自然》杂志发表论文，宣布完成水稻基因组的全部序列测定。

2003 年：中、美科学家分别测定了非典型肺炎病毒基因图谱。

1.3 分子生物学的发展前景

1.3.1 分子克隆技术的发展

分子克隆实际上就是基因克隆，是分子生物学在实际应用中的体现。它以可靠的技术、先进的成果，给人们的生活带来了极大的快乐和享受。在 1972~1973 年间，Boyer、Cohn 和 Berg 等创立了 DNA 克隆重组技术。从此生物物种间界线被打破，真核生物基因可在原核细胞中表达，在大肠杆菌中产生真核生物的蛋白质，成为治疗人类重大疾病的药物，这一技术的诞生是分子生物学研究的里程碑。因此，科学界公认基因克隆是 20 世纪最重要的科学成就之一，也标志着人类从被动的适应自然环境转变为主动改造自我的过程。分子克隆技术的成功，已经产生了非常显著的社会效益和经济效益，尤其在医药工业中，具有强劲的优势。1983 年 Taniguchi 等首次成功克隆了人 IL-2 基因以来，先后有许多基因工程药物诞生。近 20 年来，由美国 FDA 批准的生物技术药物近百种。通过分子生物学技术制备的基