

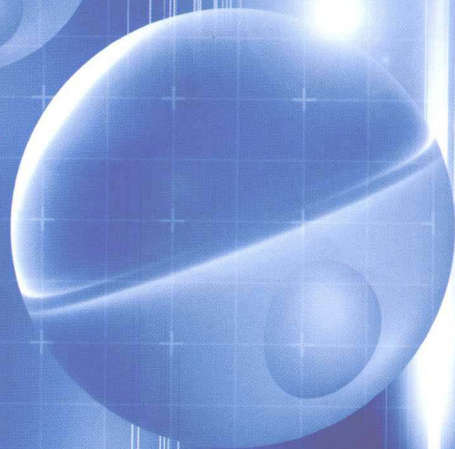
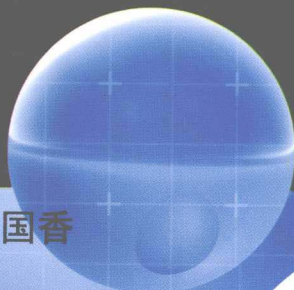
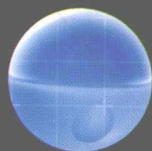
环境分子生物学研究技术与方法

HUANJINGFENZISHENGWUXUEYANJIUJISHUYUFANGFA

高等学校“十二五”规划教材



市政与环境工程系列丛书



主编 许志茹 那冬晨 李永峰 郑国香
主审 徐菁利



哈尔滨工业大学出版社

内 容 提 要

编者根据多年的教学科研经验,结合环境分子生物学及其他教材、专著、文献资料编写此书。本书分五篇,共13章,第一篇绪论包括分子生物学导论和环境样品核酸的提取;第二篇环境组学包括环境微生物基因组学、环境微生物蛋白质组学、环境微生物转录组学和环境微生物代谢组学;第三篇环境分子生物学技术包括PCR技术、分子标记技术、荧光原位杂交技术、基因差异表达研究技术、生物芯片技术;第四篇为环境分子生物学技术的应用;第五篇为现代分析仪器。

本书适合作为环境科学、环境工程等相关专业的本科生和研究生教学用书,也可作为相关专业研究人员的参考书。

图书在版编目(CIP)数据

环境分子生物学研究技术与方法/许志茹等主编.

—哈尔滨:哈尔滨工业大学出版社,2012.7

(市政与环境工程系列丛书)

ISBN 978-7-5603-3739-5

I. ①环… II. ①许… III. ①环境生物学-分子生物学-研究 IV. ①X17

中国版本图书馆CIP数据核字(2012)第171428号

策划编辑 贾学斌

责任编辑 张 瑞

封面设计 卞秉利

出版发行 哈尔滨工业大学出版社

社 址 哈尔滨市南岗区复华四道街10号 邮编 150006

传 真 0451-86414749

网 址 <http://hitpress.hit.edu.cn>

印 刷 黑龙江省委党校印刷厂

开 本 787mm×1092mm 1/16 印张 15.75 字数 370千字

版 次 2012年8月第1版 2012年8月第1次印刷

书 号 ISBN 978-7-5603-3739-5

定 价 32.00元

(如因印装质量问题影响阅读,我社负责调换)

《市政与环境工程系列丛书》

编审委员会

名誉主任委员 任南琪 杨传平

主任委员 周琪

执行主任委员 李永峰

委员 (按姓氏笔画顺序排列)

马放	王鹏	王文斗	王晓昌	王爱杰
毛宗强	田禹	冯玉杰	刘广民	刘鸣达
刘勇弟	那冬晨	孙德志	李文彬	李玉文
李盛贤	汪大永	汪群惠	张颖	张国财
陈兆波	陈晨文	季宇彬	周雪飞	郑天凌
赵庆良	赵晓祥	姜霞	徐春霞	徐菁利
黄民生	曾光明	楼国庭	蔡伟民	蔡体久
颜涌捷				

《环境分子生物学研究技术与方法》

编委会名单

主编 许志茹 那冬晨 李永峰 郑国香

主审 徐菁利

编委 (按姓氏笔画顺序排列)

王文斗	许志茹	那冬晨	李永峰	郑国香
姬虎太				

前 言

环境保护是当今世界各国人民共同关心的重大的社会经济问题,也是科学技术领域里重大的研究课题。环境科学是在现代社会经济和科学发展过程中形成的一门综合性科学。环境分子生物学作为环境科学与分子生物学的交叉学科,是从分子水平对自然环境的生物因素,特别是环境微生物进行研究。通过研究我们可以了解环境中的微生物种类、微生物之间的关系以及微生物与生境的相互作用,从而对环境做出评价、预测环境的变化趋势。此外还可以通过对环境微生物的研究,发现对人类有价值的新的基因资源,开发其潜在的应用价值。

随着社会经济的发展,当今世界上大气、水、土壤和生物所受到的污染和破坏已达到危险的程度。自然界的生态平衡受到严重的干扰,自然资源受到大规模破坏,自然环境正在退化。环境科学就是为解决人类面临的严重的环境问题,为创造更适宜、更美好的环境而逐渐发展起来的。它的兴起和发展,标志着人类对环境的认识、利用和改造进入了一个新的阶段。

环境分子生物学是一门新兴的学科,为了让学生及有关读者能够更扎实地掌握环境分子生物学研究技术,我们综合了分子生物学、环境微生物学及相关教材和专著,结合编者的科学研究和教学实践,在广泛查阅国内外有关资料的基础上编写此书。全书分为五篇,共13章。第一篇、第二篇为基础理论部分,第三篇为环境分子生物学的相关技术,第四篇为环境分子生物学技术在相关领域的应用,第五篇为现代分析仪器。

本书由许志茹、那冬晨、李永峰、郑国香主编。编写分工如下:第1章至第6章由许志茹编写;第12章由郑国香编写;第7章第10章由那冬晨、王文斗、姬虎太编写;第11、13章由李永峰、郑国香编写。本书的出版得到东北林业大学主持的“溪水林场生态公园的生态规划与建设(No. 43209029)”、“环境保护部公益研究基金制药废水排放及环境预警研究(2010)”和“上海市科委重点科技攻关生态氢的制备及其有机储氢(No. 071605122)”项目的技术成果和资金的支持,在此特别表示感谢。电子课件与李永峰教授(dr_lyf@163.com)联系。

由于编者水平有限,疏漏之处在所难免,真诚欢迎和期待专家、读者批评指正!

编 者
2012年1月

目 录

第一篇 绪 论

第 1 章 分子生物学导论.....	1
1.1 分子生物学概述	1
1.2 分子生物学简史	2
1.3 分子生物学的现状与展望	6
1.4 分子生物学在环境微生物研究中的应用	8
第 2 章 环境样品核酸的提取	11
2.1 环境样品 DNA 的提取	11
2.2 环境样品 RNA 的提取	16

第二篇 环境组学

第 3 章 环境微生物基因组学	25
3.1 宏基因组学定义.....	26
3.2 宏基因组学的研究策略.....	27
3.3 宏基因组学与相关学科的联系.....	36
3.4 宏基因组学的应用及研究现状.....	36
3.5 宏基因组学面临的挑战与发展前景.....	40
第 4 章 环境微生物蛋白质组学	42
4.1 宏蛋白质组的研究策略.....	42
4.2 宏蛋白质组学的应用.....	48
4.3 宏蛋白质组学研究展望.....	50
第 5 章 环境微生物转录组学	53
5.1 转录组与转录组学.....	53
5.2 转录组的研究方法.....	54
5.3 转录组的应用.....	59
5.4 展 望.....	60
第 6 章 环境微生物代谢组学	61
6.1 代谢组概述.....	61
6.2 微生物代谢组学研究流程.....	63
6.3 代谢组学在微生物领域的研究进展.....	74
6.4 展望.....	77

第三篇 环境分子生物学技术

第7章 PCR 技术	78
7.1 PCR 实验室的建立	78
7.2 PCR 反应的基本原理	80
7.3 定量 PCR	93
第8章 分子标记技术	99
8.1 分子标记技术概述	99
8.2 限制性片段长度多态性(RFLP)	101
8.3 随机扩增多态性(RAPD)	109
8.4 扩增的限制性片段长度多态性(AFLP)	114
8.5 扩增性限制性酶切片分析(ARDRA)	119
8.6 AP-PCR 指纹图谱	121
8.7 变性梯度凝胶电泳技术(DGGE)	124
8.8 SSCP 技术	131
8.9 其他分子标记技术	137
第9章 荧光原位杂交技术	141
9.1 荧光原位杂交的基本原理	141
9.2 FISH 技术的主要步骤及操作要点	144
9.3 FISH 探针和标记技术	147
9.4 常用的 FISH 技术	148
第10章 基因差异表达研究技术	153
10.1 差别杂交与扣除杂交	153
10.2 mRNA 差异显示技术	156
10.3 代表性差异分析技术	159
10.4 抑制性扣除杂交技术	160
第11章 生物芯片技术	163
11.1 生物芯片的分类	163
11.2 生物芯片的制作	166
11.3 生物芯片的检测	170
11.4 生物芯片在环境分析中的应用	172

第四篇 环境分子生物学技术的应用

第12章 环境分子生物学技术的应用	174
12.1 PCR 技术在环境微生物研究中的应用	174
12.2 原位生物修复微生物群体的 PCR-DGGE 分析	176
12.3 PCR-SSCP 技术在环境微生物领域的应用	193

12.4	肽核酸探针技术的应用	197
12.5	16S rRNA 序列分析技术的应用	204
12.6	FISH 技术在环境微生物研究中的应用	207
12.7	生物芯片技术的应用	215
12.8	mRNA 差异显示技术	219
12.9	Biolog 技术在环境微生物研究中的应用	221

第五篇 现代分析仪器

第 13 章	现代分析仪器的应用	226
13.1	仪器分析发展现状及特点	226
13.2	仪器分析技术的基础地位	227
13.3	仪器分析法的特点	227
13.4	现代生命科学分析仪器	228
参考文献		241

第一篇 绪 论

第 1 章 分子生物学导论

分子生物学是多门学科相互交叉渗透并集中在分子水平上研究生命现象与规律的新兴学科。它的逐步形成和发展,与其他生物学科以及化学和物理学的发展有着密切的联系,尤其是与生物化学、细胞学、遗传学和微生物学的发展关系更为密切。随着分子生物学的迅猛发展,多种重要生物的基因组计划的完成,为人类认识生命现象带来了前所未有的机遇,也为人类利用和改造生物创造了极为广泛的前景。

1.1 分子生物学概述

什么是分子生物学?这个术语有多种定义。广义的定义是在分子水平解释生物学现象,但这种定义难以与生物化学相区分。另一种更为严格,同时也更为有用的定义是指在分子水平上研究生命的重要物质(注重于核酸、蛋白质等生物大分子结构)的化学物理结构、生理功能及其结构功能的相关性,揭示复杂生命现象本质的一门现代科学。它是在细胞学、遗传学、微生物学、生理学、生物化学等多门生物分支学科发展的基础上建立起来的新学科,其后随着新理论和新技术的发展又为研究各种生物学现象奠定了坚实的基础。

自从有了人类文明史,就有了人们对生命现象的记载与描述,人们对大自然、对生命现象的观察与思考。分子生物学的形成经历了漫长的历史发展过程:由形态结构→细胞结构→分子结构;由定性分析→定位分析→定量分析;由表现型→基因型→表现型,不断深化、不断成熟。分子生物学源于遗传学和生物化学。由于早期的遗传学家还不知道基因的分子本质,根据定义对基因的早期研究不能归入分子生物学或分子遗传学,称其为传递遗传学(Transmission Genetics),研究遗传性状从亲本向子代的传递。直到 1944 年基因的化学组成搞清楚以后,将基因作为分子进行研究成为可能,分子生物学才得以诞生。

从表面上看,分子生物学涉及范围极广,研究内容似乎包罗万象。事实上,从当今世界生物发展的潮流和研究方向来看,它所研究的内容包括生物遗传信息携带者——核酸的化学、生物信息和传递相关生物大分子结构——蛋白质的化学、生物遗传信息的传递规律(传递的中心法则、复制、转录、翻译等)、生物基因的突变与修复、生物基因的重组与转移、生物遗传信息表达与调控的功能单位与调控规律、生物性状遗传过程与生物进化原动

力的分子基础等。分子生物学从人们决定打破细胞、研究组成细胞的大分子(如核酸、蛋白质、多糖)的结构与生物学功能开始,逐步在分子水平上认识了生物的遗传、变异、进化、遗传信息的传递、基因的表达与调控、细胞内和细胞间的信号调节、细胞分化和细胞癌变(增生)及凋亡、个体发育过程调控、感染、病理及机体预防,直到认识高等动植物乃至人类基因组学、蛋白质组学。这样,分子生物学的发展又回到了整体生物学,而生物学的各学科则可能在分子生物学的基础上统一为整体生物学或总体生物学。

1.2 分子生物学简史

20 世纪初,人们重新发现与证实了孟德尔遗传定律,从此,生物学研究按照正确的基本原理与法则突飞猛进。同时,与之相关的化学、数学、物理学与计算机等基础学科的理论、技术及其各项新成果向生命科学不断渗透,推动了生物大分子结构与功能的研究。核酸、蛋白质、生物催化剂(蛋白酶、核酶)、多糖等大分子物质的分子结构、理化性质、生理功能、作用机制以及结构与功能之间的关系等方面研究都有大量的文献资料积累和重大的理论与技术突破。尤其是随着核酸化学研究的进展,1953 年 Watson 和 Crick 共同提出了脱氧核糖核酸的双螺旋模型。这个模型的建立为揭开遗传信息的复制和转录奠定了基础,也是分子生物学学科形成的奠基石。

有人把分子生物学的发展大致分为三个阶段:①从 19 世纪后期到 20 世纪 50 年代初的准备和酝酿阶段,在这一阶段产生了两点对生命本质的认识上的重大突破:确定了蛋白质是生命的主要基础物质、确定了生物遗传的物质基础是 DNA;②从 20 世纪 50 年代初到 70 年代初的现代分子生物学的建立和发展阶段,在此期间的主要进展包括:遗传信息传递中心法则的建立、对蛋白质结构与功能的进一步认识;③20 世纪 70 年代后的初步认识生命本质并开始改造生命的深入发展阶段,此阶段以基因工程技术的出现作为新的里程碑,标志着人类深入认识生命本质并能够改造生命的新时期开始,其间的重大成就包括:重组 DNA 技术的建立和发展、基因组研究的发展、单克隆抗体及基因工程抗体的建立和发展。基因表达调控机理、细胞信号转导机理研究成为新的前沿领域。

而对于分子生物学(Molecular Biology)一词最早出现在 1938 年由 Warren Weaver 写给洛克菲勒基金会的一份年度报告(Report of the Rockefeller Foundation)中。当时,洛克菲勒基金会支持了 Bernal 和 Crowfoot 发表的第一张胃蛋白酶晶体的 X 线衍射图谱的有关研究,以及 Astbury 和 Bell 关于 DNA 的 X 线晶体图谱所揭示的 DNA 结构像“一叠钱币”的研究。这一系列的研究工作已经开始应用相当精细的技术进行了生命活动的定量研究,研究的内容已经涉及生命活动的精细过程。人们的目光已经注意到生命现象的深层次问题——大分子生命物质的分子结构与功能的相关性,一个新的研究领域已经被开辟。针对这些研究,Warren Weaver 在报告中讲到:在基金会给予支持的研究中,有一系列属于比较新的领域,可以称为分子生物学。1945 年,William Astbury 正式使用“分子生物学”这一术语,并将分子生物学定义为生物大分子的化学和物理结构的研究。此后,以分子生物学命名的研究机构和刊物相继出现。1956 年,英国剑桥医学研究委员会生物系统分子研究单位改名为剑桥医学委员会分子生物学实验室;1959 年,出现分子生物学杂志;1963

年,出现“欧洲分子生物学组织”等国际性学术机构。

自生物学分支、形成分子生物学的一个多世纪以来,它是生命科学范围中发展最为迅速的一个前沿学科,推动着整个生命科学的发展。在此期间,生命科学经历了许多重大事件,也正是这些重大事件构成了分子生物学发展的历程。

1866年,奥地利的 Mendel 在《植物杂交试验》的论文中,提出细胞中的某种遗传因子(即孟德尔因子、基因)决定生物某种遗传性状,并提出了遗传因子的分离法则和自由组合法则。

1869年,德国学者 Miescher 首次从莱茵河鲑鱼精子中提取了 DNA。

1871年,Lankester 最早提出分子分类学观点,认为在确定生物系统发生关系的研究中,分析与寻找生物不同种属间化学和分子间的差异比形态学的比较研究更为重要、更为精确。

1900年,荷兰的 Vries、德国的 Correns 和奥地利的 Tschrmak 分别重新发现与证实了孟德尔遗传法则。

1902年,Boveri 和 Sutton 根据细胞减数分裂研究,提出了“染色体遗传理论”,首次把遗传因子与染色体联系起来。

1909年,Johannsen 在《科学遗传要义》著作中,首次用“基因”(Gene)一词取代孟德尔提出的“遗传因子”,并提出“表现型”与“基因型”等概念。

1910年,德国科学家 Kossel 获得了诺贝尔生理医学奖,他首先分离出腺嘌呤、胸腺嘧啶和组氨酸。

1926年,Morgan、Bridges 和 Sturtevant 发现果蝇的伴性遗传,证明基因在染色体上的直线排列方式,提出了连锁遗传法则。同年,Morgan 发表了《基因论》。

1934年,Bernal 和 Crowfoot 表了第一张胃蛋白酶晶体详尽的 X 线衍射图谱。

1944年,Avery 等人通过肺炎双球菌转化实验证明,引起遗传性状改变的物质是 DNA 而不是蛋白质或其他物质。

1951年,McClintock 发表了关于玉米控制成分的论文,揭示了生物基因组的流动性,从而打破了孟德尔关于基因在各个独立的染色体上固定排列的僵化概念。

1952年,Briggs 和 King 将蛙胚胎细胞核注射到卵内,构建重组胚,发育成克隆蛙。这是基因工程的前奏曲。

1953年,Watson 和 Crick 通过对 DNA 结构的 X 线衍射的分析,提出了脱氧核糖核酸的双螺旋模型。这一模型被 Wilkins 和 Franklin 所拍摄的电镜直观形象照片所证实。这是分子生物学发展史上最具突破性的事件,开创了分子生物学的新纪元。

1954年,Gamow 首先提出遗传密码的问题,指出 mRNA 碱基序列和相应蛋白质中氨基酸序列之间存在着相互关系。

1956年,A. Kornberg 发现 *E. coli* DNA 聚合酶 I,1958年分离该酶并在体外环境下酶促合成有活性的 DNA,因此于 1959 年获得诺贝尔奖。

1958年,Meselson 用著名的“密度转移”实验证实了 DNA 的“半保留复制”,建立了密度梯度离心技术。1968年,冈崎片段发现后提出 DNA 复制是半保留不连续复制。

1958年,Crick 提出次了“三联体密码”,同时阐明了 DNA 在活体内的复制方式,并提出了生物遗传信息单向不可逆传递的“中心法则”,认为基因就是连续的 DNA 序列,生命

世界就是 DNA——蛋白质的世界。这一法则被生物学界公认,并统治生化界 20 余年。

1959 年, S. Weiss 发现转录酶。

1959 年, Uchoa 发现了细菌的多核苷酸磷酸化酶,成功地合成了核糖核酸,研究并重建了将基因内的遗传信息通过 RNA 中间体翻译成蛋白质的过程。而 Kornberg 则实现了 DNA 分子在细菌细胞和试管内的复制。他们共同获得了当年的诺贝尔生理医学奖。

1960 年, Jacob 和 Monod 经 10 余年研究后提出了乳糖操纵子模型,这是第一个原核基因表达控制的模型,同时还预言 mRNA 的存在。

1961 年, S. Spiegelman 在 T2 感染的 *E. coli* 中发现了 mRNA,并建立了分子杂交技术。

1961 年,法国分子生物学家 Jacob 和 Monod 提出了原核生物基因表达调控的操纵子模型,并预言基因调控研究将推动生物大分子间特别是 DNA 和蛋白质间的相互作用研究。

1962 年, Watson 和 Crick 因为在 1953 年提出了 DNA 的反向平行双螺旋模型而与 Wilkins 共同获得诺贝尔生理医学奖,后者通过对 DNA 分子的 X 射线衍射研究证实了 Watson 和 Crick 的 DNA 模型。

1965 年, R. W. Holley 测定酵母丙氨酸 tRNA 的一级结构,提出 tRNA 的“三叶草”结构模型。

1965 年, Jacob 和 Monod 由于提出并证实了操纵子作为调节细菌代谢的分子机制而获得了诺贝尔生理医学奖。同时他们还预言了 mRNA 分子的存在。

1966 年, M. W. Nirenberg 和 H. G. Khorana 完成全部遗传密码的破译,证明 64 个密码中 3 个是终止密码子。

1967 年, Kates 和 McAuslan 发现真核转录酶,1970 年发现真核 mRNA 含有 polyA 尾巴(在天花病毒感染细胞中发现),于是用 oligo(dT) 柱分离纯化真核 mRNA 从而促进研究进展。

1968 年, M. Gellert 等五个实验室发现 DNA 连接酶,为发展体外 DNA 重组技术奠定了基础。

1969 年, Nirenberg 由于在破译 DNA 遗传密码方面的贡献,与 Holly 和 Khorana 等人共同获得了诺贝尔生理医学奖。Holly 的主要功绩在于阐明了酵母丙氨酸 tRNA 的核苷酸序列,并证实所有 tRNA 具有结构上的相似性。Khorana 第一个合成了核酸分子,并且人工复制了酵母基因。

1970 年, H. M. Temin 和 D. Baltimore 同时发现不同反转录病毒的逆向转录酶,补充了“中心法则”。

1970 年, H. O. Smith 发现了第一个 II 型 DNA 限制性内切核酸酶 Hind II,导致之后一系列 DNA 限制性内切核酸酶的发现及应用,和 DNA 连接酶一起促进了 DNA 体外重组的发展。

1970 年, Khorana 用化学合成方法合成了酵母丙氨酸 tRNA 基因,这是生物学史上首次人工合成基因。

1972 年, P. Berg 等人建立了 DNA 重组技术,建立了第一个体外 DNA 重组分子(λ dvgal DNA 片段克隆到 SV40)。并建立了含有哺乳动物激素基因的工程菌株,促进了 DNA 克隆技术的发展和应

1973 年, Cohen 和 Boyer 等成功地将非洲爪蟾的 rDNA 与 *E. coli* pSC101 质粒拼接在一起, 重组成一个嵌合质粒在 *E. coli* 中获得表达, 证明基因工程技术已达到可使真核基因在原核生物中复制与表达的水平。

1975 年, Furuichit 和 Miura 研究质型多角体病毒, 发现真核 mRNA 中的 m⁷Gppp 帽子结构。

1975 年, Temin 和 Baltimore 由于发现在 RNA 肿瘤病毒中存在以 RNA 为模板, 逆转录生成 DNA 的逆转录酶而共同获得诺贝尔生理学奖。

1977 年, P. Sharp 和 P. Leder 分别从腺病毒 II 型和鸡卵蛋白基因中发现真核基因内部含有内含子。

1977 年, Gilbert 和 F. Sanger 分别发明了不同的 DNA 测序技术, 前者发明了化学断裂法技术; 后者发明了加减法和聚合酶链式反应终止技术(即双脱氧终止技术), 帮助人们研究基因的精细结构和排列乃至对人类基因组的研究。Sanger 因此第二次获得诺贝尔奖(第一次因首次测定蛋白质——牛胰岛素的氨基酸顺序而获奖)。

1979 年, J. A. Shapiro 提出了描述转座子转座过程的 DNA 转座重组模型, 即 Shapiro 模型。

1979 年, Sharp 和 Roberts 发现了断裂基因, 与单向不可逆传递的“中心法则”发生冲突。

1980 年, Sanger 因设计出一种测定 DNA 分子内核苷酸序列的方法而获得了诺贝尔生理学奖。DNA 序列分析法至今仍被广泛应用, 是分子生物学最重要的研究手段之一。

1981 年, Cech 等人发现四膜虫大 rRNA 体前分子的自我拼接。这一拼接反应在没有任何蛋白质存在的情况下就能够进行, 提出核酶的概念, 与单向不可逆传递的“中心法则”再次发出挑战。

1983 年, Mullis 建立体外快速扩增特定基因或 DNA 序列的方法, 即 DNA 聚合酶链式反应(PCR)。这一试管中的克隆技术是分子生物学在技术上的一次革命, 是现代分子生物学研究的一大创举。

1984 年, Kohler、Milstein 和 Jerne 由于发展了单克隆抗体技术, 完善了极微量蛋白质的检测技术而共同获得了诺贝尔生理学奖。

1985 年, Smithies 等人首次报道在肿瘤细胞中实现了人工打靶载体与内源 β -球蛋白基因间的同源重组。

1987 年, Burke 等人首次构建了基因组 DNA 的 YAC 分子克隆库, 使 YAC 克隆技术迅速成为真核基因组制图与致病基因克隆和分离的一个重要工具。

1988 年, Mansour 等人设计了一种称为“正负筛选”的系统, 使正确克隆富集的倍数大大提高。

1988 年, McClintock 由于在 20 世纪 50 年代提出并发展了可移动的遗传因子而获得了诺贝尔生理学奖。

1989 年, Altman 和 Cech 由于发现某些 RNA 具有酶的功能(称为核酶)而共享诺贝尔化学奖。Bishop 和 Varmus 由于发现正常的细胞同样带有原癌基因而共享当年的诺贝尔生理学奖。

1990 年,人类基因组计划开始实施,借助先进的 DNA 测序技术及相关基因分析手段探明人类自身基因组(Genome)全部核苷酸顺序。

1993 年,Roberts 和 Sharp 由于在断裂基因方面的工作而荣获诺贝尔生理医学奖。Mullis 由于发明 PCR 仪而与第一个设计基因定点突变的 Smith 共享诺贝尔化学奖。

1994 年,Gilman 和 Rodbell 由于发现了 G 蛋白在细胞内信息传导中的作用而共享诺贝尔生理医学奖。

1994 年,Cu 等人首次研制成功条件基因打靶小鼠,采用 flox-and-delete 策略设计了打靶载体,建立了定向改变细胞或生物遗传信息的技术。Wilkins 首次公开使用“Proteome”(蛋白质组)一词。

1995 年,全基因组覆盖率达 94% 的人类基因组物理图问世。3、12、16、22 号染色体高密度物理图以及 30 余万左右 cDNA(EST)序列测序的《人类基因组指南》由 Nature 出版。

1995 年,Lewis、Nusslei-Volhard 和 Wieschaus 由于在 20 世纪 40~70 年代先后独立鉴定了控制果蝇体节发育基因而共同获得诺贝尔生理医学奖。

1997 年,Wilmut 等人用成年绵羊的乳腺上皮细胞作为供体,成功克隆出“多利”羊。

2000 年,首次宣布完成人类基因组的工作框架图,同时提出 RNA 组学。

2001 年,人类基因组计划正式完成,国际人类基因组计划与美国 Celera 公司分别在 Nature、Science 公布人类基因组草图。将蛋白质组学研究提上议事日程。

2003 年,美国 Science 杂志连续三年将 RNA 组学研究成果(包括 RNA 干扰以及 siRNA 和 miRNA 在内的小分子调控 RNA)评为当年十大科技突破之一。

2005 年,与人类最近亲的黑猩猩基因组序列草图公布。

随着划时代研究成果——人类基因组序列草图的完成,生命科学领域的新纪元——后基因组时代已经开始,分子生物学在迅速的发展中涌现出更多新成果、新技术。从基因到基因组(Genomic),从蛋白质(Protein)到蛋白质组(Proteomic);从基因学(Genetics)到基因组学(Genomics)到蛋白质组学(Proteomics)到代谢组学(Smetabolismics)到核糖核酸组学(RNomics),这不是一个简单的转变,而是一个巨大的跨越。分子生物学已成为带动生命科学的前沿学科。当今,分子生物学的核心就是功能基因组学研究,而蛋白质组学研究、核糖核酸组学研究与代谢组学研究则是这一核心研究的技术平台。21 世纪生命科学中一切重大事件都将围绕这一核心主题发生,关于生命本质的研究也将因新一轮重大事件的发生而获得更大的进展。与此同时,新的挑战、新的课题、新的学科分支、新的技术平台将会不断出现。

1.3 分子生物学的现状与展望

分子生物学拥有着令人鼓舞的现状和世人瞩目的发展,成为生命科学范围内发展最为迅速的一个前沿领域,同时推动着整个生命科学的发展。20 世纪 90 年代以来分子生物学在理论和技术方面都取得了重要进展,在 DNA 的复制、修复、转录、翻译和调控的分子机理等方面都得到了进一步的阐明,如拓扑异构酶 I (Topoisomerase I) 的晶体结构、

核糖体结构的研究使得我们对 DNA 的复制、翻译等的认识比过去更深入了许多。2003 年 4 月,由美、日、英、法、俄、中六国科学家共同宣布人类基因组计划的完成,标志着人们开始从被动地认识自然界转向主动地改造自然界;结构分子生物学是由分子生物学发展出来的最有价值的一个分支,实际上它是现代分子生物学的重要组成部分。而 X 射线衍射及其他高分子研究技术的相继问世,使得建立生物大分子三维构象库的梦想逐步实现。根据 2001 年的数据统计,共有 20 000 余套蛋白质构象入库。此外,DNA 重组技术广泛的应用,使得基因克隆分析日益成为全世界数以万计的科学工作者手中的“常规武器”,每年有上千个新的基因序列被存入人类基因文库,总共有 200 多种植物被转化成功。

分子生物学已广泛渗透入生物学各个领域,使得这些领域大大发展。人们不仅从宏观和微观角度认知生命世界,也从分子水平、细胞水平、个体水平甚至群体水平等不同层次展开对各种生命现象的研究,揭开生命的奥秘。生物学革命也为数学、物理学、化学、信息科学、材料与工程科学注入了新鲜的血液,促使这些学科在理论和方法上提出许多新概念、新问题和新思路。

分子生物学与细胞生物学关系密切,现已形成一门新的学科——分子细胞生物学。许多细胞生物学问题如细胞分裂、细胞骨架、细胞因子的研究都进入了分子水平。免疫学与分子生物学结合,产生了分子免疫学。病理学与分子生物学结合,产生了分子病理学,其中病毒学与分子生物学结合,就是分子病毒学。目前,分子生物学几乎已渗入到所有生物科学的各个领域,甚至最古老的动物和植物的分类学也开始采用分子生物学研究物种的亲缘关系,于是有了分子系统学的出现。

结构分子生物学是 20 世纪 90 年代以来兴起的一门新学科,它专门研究生物大分子的空间结构和功能。目前,生物大分子三维结构的研究进展极快,在全世界范围内已达到平均每天能解析出 3 种蛋白质晶体结构的速度。高分辨率的蛋白质晶体结构使我们更加深入地了解蛋白质多肽链的折叠结构与相应功能的关系。DNA 和蛋白质的相互作用是结构分子生物学中另一个热点领域,它对分子生物学的理论研究至关重要。

遗传学是分子生物学发展以来受影响最大的学科。孟德尔著名的分离规律和自由组合规律以及摩尔根的连锁与互换规律,在近 20 年内相继得到分子水平上的解释。越来越多的遗传学原理正在被分子水平的实验所证实或摒弃,许多病害已经得到控制,许多经典遗传学无法解决的问题和无法破译的奥秘也相继被攻克,分子遗传学已成为人类了解、阐明和改造自然界的重要武器。

蛋白质工程技术与分子生物学结合是促进分子生物学发展的一条途径,采用定点突变方法使基因结构发生改变,从而可以改变基因表达产物中的氨基酸残基,就有可能使我们了解蛋白质中每个氨基酸甚至每个化学基团所起的作用。

我国自 20 世纪 50 年代以来,通过征集和考察共收集 1 160 种作物种质资源 36 万份,成为在数量上处于世界第二位的种质资源最为丰富的国家,并且建成了现代化的国家作物种质库,实现了长期保存和复份保存。同时由于核酸技术的进步,人们摆脱了过去专门依靠形态等表观特征探讨生物亲缘关系的局限性,开始利用现代分子生物技术对种质资源进行鉴定、遗传多样性分析及优良基因的跟踪与转移,这也直接导致了分子系统学的出现。

人类基因组计划被称为使人类历史上最为宏伟的三大成就之一。而随着该研究的完

成,蛋白质组计划或者说后基因组计划成为目前研究工作者最为迫切解决的问题。蛋白质工程技术与分子生物学的结合是促进其发展的一条途径。采用定点突变技术使基因组结构发生改变,从而定向改变基因表达产物的功能,就有可能帮助我们了解蛋白质中每个氨基酸甚至到核酸中某个核苷酸所起的作用。

分子生物学的发展趋势一是纵深求索,二是横向交叉。以“大学科”态势协同攻关探索生命的深层奥秘,在整体水平上系统协调揭示生命的复杂规律。纵深求索就是不断将本学科的理论与技术引向深入,在相当长的时期内,在基因组研究、基因表达调控研究、结构分子生物学研究、生物信号传导等四大前沿领域开展深入持久的工作,并由此开拓新的前沿领域和新的生长点。横向交叉就是不断地与生命科学的其他学科及非生命科学的自然学科、文史学科相互融合。综合应用化学、数学、物理学、计算机等学科的理论与技术,形成相关学科群,并以“大学科”的模式研究生命的实质问题。使各种复杂的生命现象与生命本质之间的联系在分子、细胞、整体水平和谐统一,使表现型和基因型的相关性得到客观准确的解释。

21 世纪分子生物学正以突飞猛进之势向前发展。基本规律与原理的新发现、新思维与新方法的提出,新知识与新成果的积累,大大加快了人类了解自身、征服自然的进程。分子生物学已成为现代生命科学的共同语言。今后,分子生物学在实践方面的发展也是令人乐观的。在医学方面,基因治疗目前已在研究之中。在动植物方面转基因动植物的培育,也已进入重点研究之列,成为生物技术的主要内容。随着分子生物学和生物技术的发展,它们在医学和农业方面必将对人类的健康和生活作出更大的贡献。

1.4 分子生物学在环境微生物研究中的应用

目前,人类越来越深刻地认识到解决各种环境问题的重要性和迫切性。环境生物学作为环境科学的重要分支学科之一,一方面需要在理论上研究受污染和破坏的环境与人和生物之间的相互作用机理和过程;另一方面需要结合其他学科,发展新的技术和方法,以便更有效地评价环境质量、控制污染、恢复和管理生态系统、评估和预测人类干预可能造成的生态风险,从而维持可持续利用的生物圈。而微生物在环境治理过程中扮演着极其重要的角色,了解特定环境下微生物群落的种群分布、遗传多样性及其动态变化规律和认识微生物群落的稳定性及功能菌的作用是环境微生物学研究的重要内容。传统的微生物群落分析方法建立在微生物纯种培养分离基础上,但自然环境中 99% 以上的微生物还不能通过人工培养,给微生物的分析和研究工作带来了极大的障碍。随着分子生物学技术的深入发展,特别是 PCR 技术的发明和完善,使得从不同来源(如生物、土壤和水体)的极微量样品中,通过特异性扩增得到目的 DNA 成为可能,从而使有关的分子生物学技术迅速渗透到环境生物学的许多分支学科,如污染生态学、环境毒理学、环境生物技术、保护生态学等不同研究领域。这样就从微观、动态、机理、调控等多个角度推动了环境生物学的发展。

分子生物学是研究核酸、蛋白质等生物大分子的功能、形态结构特征及其重要性、规律性和相互关系的科学。分子生物学的研究内容包含 4 个方面:DNA 重组技术,基因表

达调控研究,生物大分子的结构功能研究,基因组、功能基因组与生物信息学研究。在环境中应用的分子生物技术有:基因重组技术、电泳技术、分子杂交与印记技术、PCR-DGGE 技术、荧光原位杂交(FISH)技术、PCR-SSCP 技术、免疫技术、生物传感技术和生物芯片等。利用分子生物学技术已揭示了许多污染生态学中的重要机理,同时,先进的分子生物学技术也为环境监测、环境污染的治理和生物修复等应用技术提供了更快速、更灵敏、更科学的依据与方法,从而极大地推进了污染治理的实践进展。

分子生物技术在环境微生物分类、监测、治理污染等方面应用显著。

1.4.1 在环境微生物分类中的应用

用核酸探针技术可以发现核酸分子的同源序列,生物间亲缘关系越近,其间的 DNA/DNA 或 DNA/RNA 同源率越高。其中 DNA/DNA 杂交最适合进行一级水平的研究。Johanson 总结提出了依据 DNA/DNA 杂交同源性与亲源关系的判断标准:杂交同源性为 60%~100%,属同一种细菌;同源性为 60%~70%,属同一种内不同亚种;同源性为 20%~60%,属属内紧密相关的种;同源性小于 20%,则属于有关的不同属。

在对微生物群体进行多样性研究的方法中,大多数方法的先决条件是该群体的微生物能被分离纯化,而我们知道,绝大多数微生物很难或无法纯培养。据统计,通常环境中,不可培养的细菌占到细菌总数的 85%~99.99%。即使得到纯培养,但其形态和生理也可能发生很多变化。随着人们对环境微生物的原位生态状况的研究,发现常规的分离培养方法很难全面评估环境微生物群落的多样性,只能反映极少数微生物的信息,从而影响到我们对环境微生物种群的准确评估。DGGE、FISH、RFLP、RAPD 等分子生物学技术的引入,降低了研究环境微生物生态对培养技术的依赖,为环境微生物的多样性研究提供了新的理论和方法。

1.4.2 在环境微生物监测中的应用

核酸杂交、PCR、多态性研究等分子生物学技术已能在 rDNA 测序和有关结构基因分析的基础上监测和定量复杂的混合微生物群落中的一些特殊的微生物。同时,一些作为分子标记的基因工程菌也应用到环境微生物技术中,结合使用这些分子生物学技术,在系统发生基础上对培养物中的微生物进行快速的测定,从而为监测自然界和基因工程体系中的菌落结构和生物多样性提供重要的依据。所以这些分子生物学技术的共同特点是具有特异性,它们能快速、灵敏地检测环境微生物的结构基因并对其进行定量研究,从而能准确测定微生物的活性,有效地对环境微生物进行监测。

微生物的多样性机能及丰富的现存量是生态系统的基础,它起到维持环境平衡及物质循环的作用。许多已被分离出来的微生物,能够对传统方法难以处理的有害物质进行强有力的酶解转化。但在特定的生态系统中,只有微生物的个别亚群对特定有毒化合物的降解起关键作用。受污染地区的生物整治和处理工业废物的活化污泥生物反应器,都依赖于微生物群落。因此,了解微生物有效群体的动态,并发展出测定其生存压力和鉴别其活性的方法相当重要。以 16S rDNA 序列和相关的结构基因为基础的分子生物学技术,为鉴别和量化环境中特定微生物的系统发育群体提供了许多强有力的工具。

虽然现已做过鉴定的微生物种类极为有限,但在自然的土壤、水体和大气以及人工微

生物系统中,一定隐含着大量不同的具高效净化和抗污染能力的微生物。传统的微生物计数方法,如平板培养法,用于环境生物学研究时,存在许多不足:

(1)环境只有不超过百分之几的微生物可以培养,而污水和底泥中生存的主要细菌群落还不一定能用培养的方法分析。

(2)不能充分揭示生物反应器实时的、有意义的信息。

(3)当特定微生物系统不具竞争性且相关的结构基因未被诱导出来时,传统方法就不可能检验该系统降解污染物的能力。

(4)传统的显微方法,难以获得微生物群落结构和空间分布的有关信息,因而不利于根据微生物群落多样性的变化迅速判断环境的变化。

以下评述的分子生物学技术,有助于解决上述问题。

1.4.3 在环境微生物治理污染中的应用

利用微生物来治理污染快速高效,因此,利用基因重组技术构建高效菌种来治理污染,特别是环境中复杂或难以降解的有毒有害化合物,如人工合成塑料、除草剂、杀虫剂等成为环境微生物技术的热点之一;再如超级细菌就在石油烃污染的环境修复中发挥了重要作用。微生物分解纤维素和木质素的基因如转入到中温细菌中,使发酵能在较高温度下进行,提高转化速度,用于发酵某些废弃物产生天然气。基因重组技术对污染物的治理、预报、修复都作出了重大贡献。