

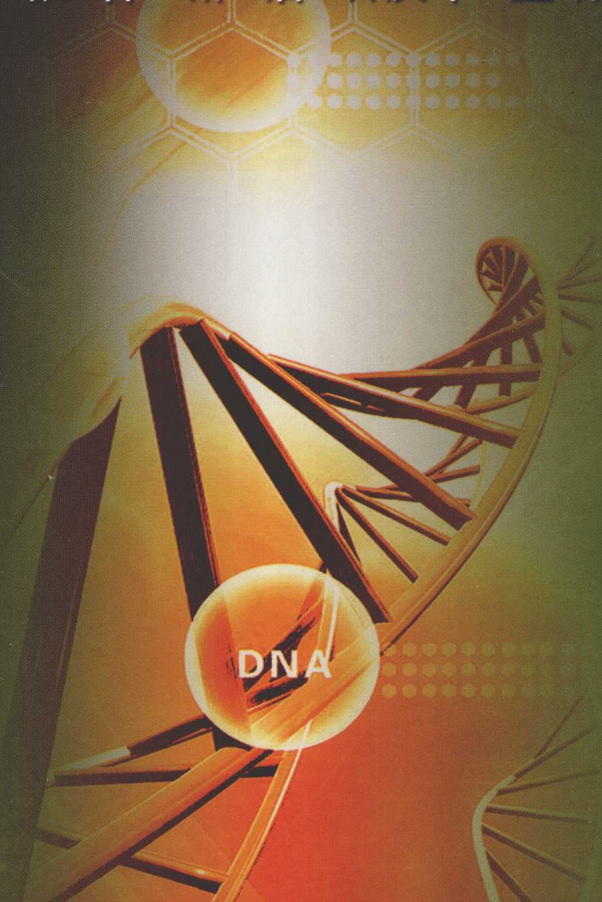


全国高等农林院校“十二五”规划教材

分子生物学原理与应用

FENZI SHENGWUXUE
YUANLI YU YINGYONG

张 桦 麻 浩 石庆华·主编



 中国农业出版社

014038115

Q7
71

全国高等农林院校“十二五”规划教材

分子生物学 原理与应用

张桦 麻浩 石庆华 主编



中国农业出版社



北航

C1723806

Q 7
71

图书在版编目 (CIP) 数据

分子生物学原理与应用/张桦, 麻浩, 石庆华主编

· 一北京: 中国农业出版社, 2013. 7

全国高等农林院校“十二五”规划教材

ISBN 978-7-109-18141-0

I. ①分… II. ①张…②麻…③石… III. ①分子生物学—高等学校—教材 IV. ①Q7

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2013) 第 165219 号

中国农业出版社出版

(北京市朝阳区农展馆北路 2 号)

(邮政编码 100125)

责任编辑 刘 梁

文字编辑 浮双双

中国农业出版社印刷厂印刷 新华书店北京发行所发行

2013 年 7 月第 1 版 2013 年 7 月北京第 1 次印刷

开本: 787mm×1092mm 1/16 印张: 23.75

字数: 578 千字

定价: 45.00 元

(凡本版图书出现印刷、装订错误, 请向出版社发行部调换)



北航

C1723806

内容简介

本教材符合农业人才培养目标和教学要求, 主要介绍分子生物学的基本原理和技术应用, 包括核酸的结构与功能、基因与基因组、遗传信息的传递、DNA重组、基因表达调控、分子生物学实验技术、植物基因工程、分子标记技术、蛋白质研究技术。本教材特色在于应用部分, 与其他分子生物学教材相比增加了分子生物学的研究应用技术, 这些技术往往更适合当前农学学科特点和各农业院校、科研院所及相关单位的要求, 力求简明扼要地将分子生物学的基本原理和技术应用编入各章节, 每章后附有思考题便于读者学习。

本教材的出发点是编写适合农科类专业学生的教材, 教材内容全面, 取材合适, 具有较宽的专业适用面, 适用于种子科学与工程、生物技术、植物保护、农学、草业科学、园艺等专业的分子生物学教学。

编写人员

主 编 张 桦 麻 浩 石庆华

副主编 王希东 陈全家 曲延英 祝建波

编写人员 (按姓名笔画排序)

王希东 (新疆农业大学)

王显生 (南京农业大学)

石庆华 (新疆农业大学)

曲延英 (新疆农业大学)

刘红玲 (石河子大学)

李树伟 (塔里木大学)

李鸿彬 (石河子大学)

张 桦 (新疆农业大学)

张海燕 (塔里木大学)

陈全家 (新疆农业大学)

祝建波 (石河子大学)

姚正培 (新疆农业大学)

耿洪伟 (新疆农业大学)

夏木斯亚 (新疆农业大学)

高文伟 (新疆农业大学)

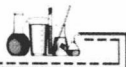
麻 浩 (南京农业大学)

葛 杰 (新疆农业大学)

前 言

随着现代科学技术突飞猛进地发展, 生命科学也正经历着巨烈的变化。在这一转变中, 最突出的是分子生物学渗入到各个学科之中, 如农学、植物保护、细胞生物学、发育生物学、遗传学、微生物学、林学、生理学等各学科都无一例外地应用分子生物学的理论和技术。因此, 分子生物学在生物学教学中占有重要的位置, 我们深感分子生物学教材的重要性。多年来, 在对农业院校本科生和研究生开设分子生物学等课程的过程中, 发现在大农学各学科中, 如种子科学与工程、农学、植物保护、林学、园艺等学科, 随着这些学科的发展对掌握分子生物学理论、技术及应用的知识体系要求越来越高, 但大农学各学科本身的专业课程很多, 不可能开设基础生物化学与分子生物学两门课后再开设其他的相关课程, 如基因工程、蛋白质工程等, 所以力求在分子生物学课程除讲授分子生物学基本理论外, 还要讲授与农学类学科相关的从分子水平上研究农学、种子科学与工程、作物遗传育种等应用内容, 如分子生物学实验技术、基因工程、分子标记技术、蛋白质研究技术等知识体系。

我们在编写中不断听取意见和修改补充, 形成这一教材。它一方面力求简明地阐述分子生物学的原理, 另一方面介绍分子生物学技术的应用, 使整个教材理论联系实际, 教学结合大农学的科研和生产应用。教材分为两个部分, 第一部分为基础理论篇, 第二部分为应用篇。基础理论篇即教材的前六章, 主要介绍分子生物学理论, 第一章首先了解分子生物学的研究内容; 第二章介绍 DNA 作为遗传物质的结构、性质及研究手段; 第三章是基因和基因组的特点和研究进展, 介绍不同种类生物基因组的特点和基因组学的研究方法; 第四章介绍从 DNA 到蛋白质这一遗传信息在分子的流向过程, 即中心法则的过程; 第五章介绍 DNA 重组的方式和过程; 第六章里主要讲述原核生物和真核生物基因表达调控的特点、过程和研究手段及研究进展。通过这六章的内容, 基本将分子生物学基础理论体系介绍完毕。从第七章到第十章, 就是教材的应用篇, 主要介绍分子生物学技术及其在农业上的应用, 第七章主要介绍常用的分子生物学技术的原理和操作要点; 第八章是植物基因工程的原理和应用, 重点介绍转基因植物的研究内容; 第九章介绍分子标记技术的理论和实际应用; 第十章主要介绍蛋白质研究技术, 重



点介绍农学类专业常用蛋白质技术的理论和方法。

本教材是由新疆农业大学、南京农业大学、石河子大学和塔里木大学的多年从事分子生物学教学和科研的老师集体编写的。其中,张桦和麻浩老师编写第一章,李树伟老师编写第二章,张海燕和刘红玲老师编写第三章,祝建波和李鸿彬老师编写第四章,姚正培和石庆华老师编写第五章,张桦和王希东老师编写第六章,王希东和葛杰老师编写第七章,陈全家和耿洪伟老师编写第八章,曲延英和高文伟老师编写第九章,麻浩和王显生老师编写第十章,夏木斯亚老师编写附录部分,所有参与教材编写的老师都认真负责地编写各自的章节,为教材保质保量地完成作出了重要贡献,在此深表感谢。在教材的统稿和出版过程中,得到新疆维吾尔自治区教育厅的大力支持,新疆大学生命科学与技术学院的张富春教授在审稿中提出了宝贵意见,使内容不断改进,在本书出版之际,再次对大家的帮助和支持深表感谢。

分子生物学涉及的知识面广,发展迅速,不断涌现新的概念和研究成果,文献资料浩如烟海,要编写好一本分子生物学教材难度很大,编者虽尽力吸收各方面的研究材料,但限于作者水平,纰漏之处在所难免,希望读者批评指正。

编者

2013年2月

目 录

前言

第一部分 基础理论篇

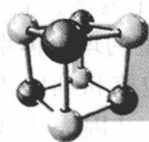
第一章 绪论	1
第一节 分子生物学概述	1
第二节 分子生物学发展简史	5
第三节 分子生物学资源库	9
第二章 核酸的结构与功能	16
第一节 细胞中的遗传物质	16
第二节 核酸的化学组成与共价结构	23
第三节 DNA 的二级结构	30
第四节 DNA 分子的高级结构	37
第五节 核酸的变性、复性、分子杂交	39
第三章 基因与基因组	45
第一节 基因和基因组概述	45
第二节 病毒基因和基因组	49
第三节 原核生物基因与基因组	52
第四节 真核生物基因与基因组	54
第五节 基因组学	67
第四章 遗传信息的传递	78
第一节 遗传信息的传递概述	78
第二节 核酸的复制和修复	80
第三节 转录——从 DNA 到 RNA	94
第四节 翻译——从 mRNA 到蛋白质	115
第五节 RNA 的复制——病毒遗传物质的复制和表达	133
第五章 DNA 的重组	136
第一节 同源重组	136
第二节 位点特异性重组	142
第三节 转座作用	145



第四节 逆转录转座子	152
第六章 基因表达的调控	156
第一节 基因表达调控概述	156
第二节 原核生物基因表达的调控	161
第三节 真核生物基因表达的调控	172
第四节 真核生物转录水平的调控	186
第五节 真核生物转录后水平的调控	201
第六节 真核生物翻译水平的调控	207

第二部分 应用篇

第七章 分子生物学实验技术	212
第一节 DNA 的提取与分离	212
第二节 RNA 的提取和 cDNA 制备	217
第三节 分子克隆技术	224
第四节 DNA 序列分析	248
第八章 植物基因工程	260
第一节 植物基因工程概述	260
第二节 目的基因分离与克隆	264
第三节 植物表达载体构建	270
第四节 转基因技术	275
第五节 转基因植物检测技术	278
第六节 转基因植物概况	281
第七节 转基因植物存在的问题	293
第九章 分子标记技术	298
第一节 分子标记技术概述	298
第二节 分子标记技术的原理与方法	300
第三节 分子标记数据的处理和分析	307
第四节 分子标记技术的应用	310
第十章 蛋白质研究技术	326
第一节 蛋白质研究技术的发展简史	326
第二节 蛋白质主要研究技术	328
第三节 蛋白质研究技术在农业上的应用	349
主要参考文献	355
附录 中英文专业术语索引	360



第一部分 基础理论篇

第一章 绪 论

分子生物学是从分子水平上研究生命本质的科学，本章主要是了解分子生物学的研究内容和分子生物学的发展概况及其在农业上的主要应用。同时，也介绍了分子生物学的发展方向和主要的分子生物学资源。

第一节 分子生物学概述

一、分子生物学的基本含义

分子生物学是从分子水平研究生命本质的一门新兴学科，它以核酸和蛋白质等生物大分子的结构及其在遗传信息和细胞信息传递中的作用为研究对象，是当前生命科学中发展最快并正与其他学科广泛交叉与渗透的重要前沿领域。分子生物学的发展为人类认识生命现象带来了前所未有的机会，也为人类利用和改造生物创造了极为广泛的前景。

在分子水平上研究生命的本质主要是指对遗传、生殖、生长和发育等生命基本特征的分子机理的阐明，从而为利用和改造生物奠定理论基础和提供新的手段。这里的分子水平指的是那些携带遗传信息的核酸和在遗传信息传递及细胞内、细胞间通信过程中发挥着重要作用的蛋白质等生物大分子。这些生物大分子均具有较大的分子质量，由简单的小分子核苷酸或氨基酸排列组合以蕴藏各种信息，并且具有复杂的空间结构以形成精确的相互作用系统，由此构成生物的多样化和生物个体精确的生长发育和代谢调节控制系统。阐明这些复杂的结构及结构与功能的关系是分子生物学的主要任务。

分子生物学在含义上有两种划分，一种是广义的分子生物学：蛋白质及核酸等生物大分子结构和功能的研究都属于分子生物学的范畴，即从分子水平阐明生命现象和生物学规律。还有一种是狭义的分子生物学：偏重于核酸（基因）的分子生物学，主要研究基因或 DNA 的复制、转录、表达和调控等过程，当然也涉及与这些过程相关的蛋白质和酶的结构与功能的研究。

二、分子生物学的主要研究内容

广义的分子生物学主要包含以下研究内容：



1. 核酸的分子生物学 核酸的分子生物学研究核酸的结构及其功能。由于核酸的主要作用是携带和传递遗传信息,因此分子遗传学(molecular genetics)是其主要组成部分。由于20世纪50年代以来分子遗传学的迅速发展,该领域已形成了比较完整的理论体系和研究技术,是目前分子生物学内容最丰富的一个领域。研究内容包括细胞核和细胞质基因组的结构,遗传信息的复制、转录与翻译,核酸的损伤、修复与突变,基因表达调控和基因工程技术的发展和运用等。遗传信息传递的中心法则(central dogma)是其理论体系的核心。

2. 蛋白质的分子生物学 蛋白质的分子生物学研究执行各种生命功能的主要大分子——蛋白质的结构与功能。尽管人类对蛋白质的研究比对核酸研究的历史要长得多,但由于其研究难度较大,与核酸分子生物学相比发展较慢。蛋白质的性质和生理功能与其分子的特定结构有着密切的关系,这是形形色色的蛋白质所以能表现出丰富多彩的生命活动的分子基础。研究蛋白质的结构与功能的关系也是分子生物学研究的一个重要内容。发现和鉴定具有新功能的蛋白质,仍是蛋白质研究的内容。近年来虽然在认识蛋白质的结构及其与功能关系方面取得了很多进展,但是对其基本规律的认识尚缺乏突破性的进展。

3. 基因组、转录组、蛋白质组等组学研究 人类基因组计划完成后生物科学进入了人类后基因组时代,在这个时代,生命科学的主要研究对象是功能基因组学,包括结构基因组研究和蛋白质组研究等。基因表达成蛋白质要经过转录这一中间环节,但并非所有基因组序列都能转录,因此有必要研究转录组。转录组学是在基因组学之后新兴的一门学科,主要研究细胞在某一功能状态下基因组产生的全部转录物的种类。上述研究主要以高通量、大规模实验方法及统计与计算机分析为特征,在已有大量序列信息的基础上,从生物体整体分子水平上理解生命的过程。组学的研究,使分子生物学的研究由微观转向宏观,由分析转向综合。

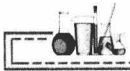
4. 分子生物学技术 20世纪70年代DNA重组技术诞生以来,分子生物学技术迅速发展起来,使人们有可能对基因组及单个基因的结构进行研究,分析其功能特征,了解其变化规律。现代分子生物学技术除对分子生物学理论研究作出巨大贡献外,也促进了其他生命学科的发展,而且分子生物学技术已经广泛应用到农业、工业、医疗卫生等与人类生活息息相关的领域。所以,不断地研究和开发新的分子生物学技术也是分子生物学的研究内容之一。

除此之外,分子生物学还研究细胞信号转导、分子进化、生物大分子的结构,随着人类基因组全序列的发表,从分子水平上研究基因与疾病之间的关系,转基因研究以及基因组学和生物信息学等也成为分子生物学的研究内容。总之,分子生物学的研究内容随着学科的发展一直在扩展。

考虑到农学本科学士生所需掌握的分子生物学的基本内容,本书将分为10个部分,主要介绍分子生物学的基本原理和分子生物学技术及其在农业的主要应用。

三、分子生物学技术在农业上的应用

分子生物学是第二次世界大战后,由生物化学、遗传学、微生物学、病毒学、结构分析及高分子化学等不同研究领域结合而形成的一门交叉科学。目前分子生物学已发展成生命科



学中的带头学科，具有自身的理论体系和研究技术。其中的分子生物学技术也深入到生命科学的相关领域，为人类健康和社会发展作出更多贡献。

1. 植物基因工程迅速发展 20 世纪 70 年代是分子生物学突飞猛进的时代，先后有很多科学家用人工方法合成了重组 DNA 分子，并进行了 DNA 分子克隆。20 世纪 80 年代中期聚合酶链式反应 (PCR) 技术迅速渗透到分子生物学的各个领域，现已广泛应用于植物基因克隆、外源基因的检测等。分子生物学技术为各个领域的基础理论研究和实践应用等均开辟了新纪元。近年来，随着分子生物学的飞速发展，植物遗传转化技术的不断完善，植物基因工程取得了令人瞩目的成就，创制了如抗虫棉、抗除草剂大豆这类广泛种植的农作物品种。现在尤其是利用转基因植物生产医药、工业、食品以及环境用外源蛋白已成为植物基因工程领域研究的一个生长点，具有极大的市场前景和商业价值。目前在植物中表达的疫苗有几十种，包括乙肝病毒表面抗原、诺沃克病毒外壳蛋白、大肠杆菌热不稳定肠毒素 B 亚基 (LT-B)、霍乱毒素的 A 亚基和 B 亚基、冠状病毒的免疫原糖蛋白 S 多肽、狂犬病毒糖蛋白、口蹄疫病毒抗原、水貂肠炎病毒抗原、犬细小病毒抗原等。目前世界上已有多种药物蛋白在番茄、马铃薯、莴苣和香蕉等植物上成功表达。随着该领域研究的进展，转基因植物用于生产低成本药用蛋白的产业化将显示出越来越良好的发展前景。在今后 20 年内，将有相当数量的高新生物技术产品不断涌现并与消费者见面。这种“分子农业”的出现及普及将会对我国现有的农作物种植结构产生显著影响，对增强我国农产品的竞争力，极大地提高农民的收入以及维持农业的可持续发展具有重要意义。同时，也有利于形成新的产业链，培育较大的产业集团。

2. 分子标记技术日臻完善 DNA 分子标记技术也称 DNA 分子鉴别技术，是分子生物学的主要技术手段。它通过直接分析遗传物质的多态性来鉴别生物内在核苷酸排布及其外在性状表现规律的技术，包括随机扩增多态性 DNA (RAPD)、扩增片段长度多态性 (AFLP)、简单序列重复 (SSR)、DNA 序列标记等分子生物技术。目前分子标记技术已应用于分子遗传图谱的构建、亲缘关系分析、遗传多样性与种质鉴定、重要农艺性状相关基因的定位、分子标记辅助选择、重要农艺性状的图位克隆、杂种优势分析与预测、作物的起源与进化关系研究等诸多方面且已取得了一定的成效。优良品种是作物生产的基础，品种混杂和纯度下降会明显降低作物的品质。DNA 指纹图谱是鉴别品种、品系的有力工具。它具有迅速、准确等优点。在目前市场经济发展的形势下，DNA 指纹图谱技术在种子质量标准化、品种分类与鉴定、假种辨别、产权纠纷中均有重要作用。植物育种中分子标记辅助选择 (MAS) 是通过分析与目标基因紧密连锁的分子标记来判断目标基因的存在。通过分子标记分析可筛选出与目标基因 (性状) 紧密连锁的 DNA 片段或数量性状基因座 (QTL)，作为辅助育种的分子标记。由于它不受环境、植物生长发育的限制，分析手段既快速又简便，因而可进行早期 (代) 选择，从而缩短育种年限，提高选择强度、效率和准确度。

3. 蛋白质技术的广泛应用 蛋白质是由基因控制的，生物蛋白质的多样性也反映了其遗传多样性。在农作物的种群划分中，植物同工酶和种子储藏蛋白电泳技术因具有简单、方便、快速、价廉，一次可分析多个样品等优点而被广泛地应用于植物遗传多样性、杂种优势研究以及品种真实性和纯度鉴定中，并获得了较为准确的结果。种子储藏蛋白中的水溶蛋白、盐溶蛋白、醇溶蛋白都曾经作为蛋白质标记应用于类群划分的研究。近年来，生物技术



的发展带来了新的品种真实性和纯度鉴定技术,如蛋白质指纹技术和DNA指纹技术等。但比较而言,蛋白质电泳技术由于用种量少、时间短、结果稳定性好且重复性高、技术简单、费用低廉等优点而被广泛应用于品种真实性和纯度鉴定。

生物某一遗传性状的表现涉及多个基因的表达、多个蛋白质的参与,而且这些蛋白质在时空上的特异性和分子间的相互作用是非常复杂的生命活动过程。利用蛋白质研究技术可以建立作物的蛋白质组数据库及确定各蛋白质的作用模式、功能机理、调节控制以及蛋白质之间的相互作用,这对于研究作物的生长发育机理、病虫害防治及遗传育种都具有重要的理论意义和实用价值。

四、分子生物学与其他学科的关系

1953年,DNA双螺旋结构的提出标志着分子生物学的诞生,随后由生物化学、生物物理学、遗传学、微生物学、细胞生物学以及信息科学等多学科相互渗透、综合融会而发展起来,经过凝聚了不同专长的科学家的共同努力,逐步形成了系统的体系。分子生物学虽产生于上述各个学科,但自身已形成独特的理论体系和研究手段,成为一个独立的学科。

在所有相关学科中,生物化学与分子生物学关系最为密切。两者同在我国教育部和科学技术委员会颁布的一个二级学科中,称为“生物化学与分子生物学”,但两者还是有区别的。生物化学是从化学角度研究生命现象的科学,它着重研究生物体内各种生物分子的结构、转变与新陈代谢。传统生物化学的中心内容是代谢,包括糖、脂类、氨基酸、核苷酸以及能量代谢等与生理功能的联系。分子生物学则着重阐明生命的本质——主要研究生物大分子核酸与蛋白质的结构与功能、生命信息的传递和调控。国际生物化学学会和中国生物化学学会现已分别改名为国际生物化学与分子生物学学会和中国生物化学与分子生物学学会。

细胞生物学与分子生物学关系也十分密切。传统的细胞生物学主要研究细胞和亚细胞器的形态、结构与功能。细胞作为生物体基本的构成单位是由许多分子组成的复杂体系,光学显微镜和电子显微镜下所见到的规则结构是各种分子有序结合而形成的。探讨组成细胞的分子结构比单纯观察其大体结构能更加深入认识细胞的结构与功能,因此现代细胞生物学的发展越来越多地应用分子生物学的理论和方法。分子生物学则是从研究各个生物大分子的结构入手,但各个分子不能孤立发挥作用,生命绝非组成成分的随意添加和(或)混合,分子生物学还需要进一步研究各生物分子间的高层次组织和相互作用,尤其是细胞整体反应的分子机理。这在某种程度上是向细胞生物学的靠拢。分子细胞学或细胞分子生物学就因此而产生,成为人们认识生命的基础。

由于分子生物学涉及认识生命的本质,它也就自然广泛地渗透到了医学各学科领域中,成为现代医学重要的基础。在医学各个学科中,包括生理学、微生物学、免疫学、病理学、药理学以及临床各学科分子生物学都正在广泛地交叉与渗透,形成了一些交叉学科,如分子遗传学、分子免疫学、分子病毒学、分子病理学和分子药理学等,大大促进了医学的发展(图1-1)。

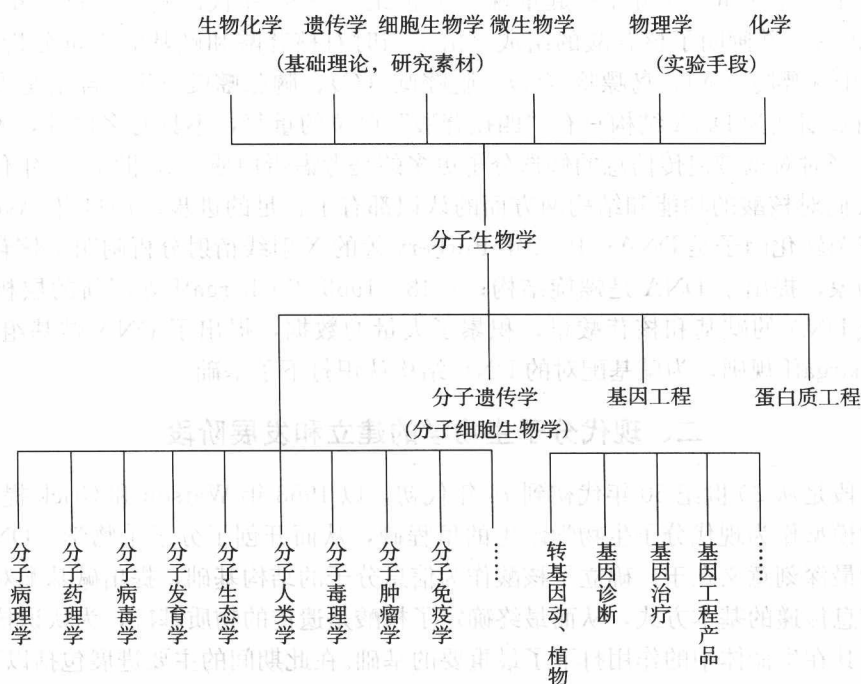


图 1-1 分子生物学与各学科的关系

第二节 分子生物学发展简史

分子生物学的发展大致可分为 3 个阶段。

一、准备和酝酿阶段

19 世纪后期到 20 世纪 50 年代初，是现代分子生物学诞生的准备和酝酿阶段。在这一阶段从两个方面产生了对生命本质的认识上的重大突破。

一是确定了蛋白质是生命的主要物质基础。19 世纪末 Buchner 兄弟证明酵母无细胞提取液能使糖发酵产生酒精，第一次提出酶 (enzyme) 的名称，酶是生物催化剂。20 世纪 20~40 年代提纯和结晶了一些酶 (包括尿素酶、胃蛋白酶、胰蛋白酶、共同酶、细胞色素 c、肌动蛋白等)，证明酶的本质是蛋白质。随后陆续发现生命的许多基本现象 (物质代谢、能量代谢、消化、呼吸、运动等) 都与酶和蛋白质相联系，可以用提纯的酶或蛋白质在体外实验中重复出来。在此期间对蛋白质结构的认识也有了较大的进步。1902 年 Emil Fisher 证明蛋白质结构是多肽；20 世纪 40 年代末，Sanger 创立二硝基氟苯 (DNFB) 法，Edman 发展异硫氰酸苯酯法分析肽链 N 端氨基酸；1953 年 Sanger 和 Thompson 完成了第一个多肽分子——胰岛素 A 链和 B 链的氨基酸全序列分析。由于结晶 X 射线衍射分析技术的发展，1950 年 Pauling 和 Corey 提出了 α 角蛋白的 α 螺旋结构模型。所以在这个阶段对蛋白质一级结构和空间结构都有了认识。

二是确定了生物遗传的物质是 DNA。虽然 1868 年 Miescher 就发现了核素 (nuclein)，



但是在此后的半个多世纪中并未引起重视。20 世纪 20~30 年代已确认了自然界有 DNA 和 RNA 两类核酸,并阐明了核苷酸的组成。由于当时对核苷酸和碱基的定量分析不够精确,得出 DNA 中腺嘌呤(A)、鸟嘌呤(G)、胞嘧啶(C)、胸腺嘧啶(T)含量是大致相等的结果,因而长期认为 DNA 结构只有“四核苷酸”单位的重复,不具有多样性,不能携带更多的信息,当时对携带遗传信息的候选分子更多的是考虑蛋白质。20 世纪 40 年代以后的实验事实使人们对核酸的功能和结构两方面的认识都有了长足的进步。1944 年 Avery 等证明了肺炎链球菌转化因子是 DNA;1952 年 Furbery 等的 X 射线衍射分析阐明了核苷酸并非平面的空间构象,提出了 DNA 是螺旋结构;1948—1953 年 Chargaff 等用新的层析和电泳技术分析组成 DNA 的碱基和核苷酸量,积累了大量的数据,提出了 DNA 碱基组成 $A=T$ 、 $G=C$ 的 Chargaff 规则,为碱基配对的 DNA 结构认识打下了基础。

二、现代分子生物学的建立和发展阶段

这一阶段是从 20 世纪 50 年代初到 70 年代初,以 1953 年 Watson 和 Crick 提出的 DNA 双螺旋结构模型作为现代分子生物学诞生的里程碑,从而开创了分子生物学。DNA 双螺旋结构发现的最深刻意义在于:确立了核酸作为信息分子的结构基础,提出碱基配对是核酸复制、遗传信息传递的基本方式,从而最终确定了核酸是遗传的物质基础,为认识核酸与蛋白质的关系及其在生命体中的作用打下了最重要的基础。在此期间的主要进展包括以下几方面:

遗传信息传递中心法则的建立。在发现 DNA 双螺旋结构同时, Watson 和 Crick 就提出 DNA 复制的可能模型。其后在 1956 年 Kornberg 首先发现了 DNA 聚合酶;1958 年 Meselson 和 Stahl 同位素标记和超速离心分离实验为 DNA 半保留模型提供了证明;1968 年 Okazaki (冈崎)提出 DNA 不连续复制模型;1972 年证实了 DNA 复制开始需要 RNA 作为引物;20 世纪 70 年代初获得 DNA 拓扑异构酶,并对真核 DNA 聚合酶特性做了分析研究。这些研究结果都逐渐完善了人们对 DNA 复制机理的认识。

在研究 DNA 复制将遗传信息传给子代的同时,出现了 RNA 在遗传信息传到蛋白质过程中起着中介作用的假说。1958 年 Weiss 及 Hurwitz 等发现依赖于 DNA 的 RNA 聚合酶;1961 年 Hall 和 Spiegelman 用 RNA-DNA 杂交,证明 mRNA 与 DNA 序列互补,逐步阐明了 RNA 转录合成的机理。

在此同时认识到蛋白质是接受 RNA 的遗传信息而合成的。20 世纪 50 年代初 Zamecnik 等在形态学和分离的亚细胞组分实验中已发现微粒体(microsome)是细胞内蛋白质合成的部位;1957 年 Hoagland、Zamecnik 及 Stephenson 等分离出 tRNA 并对它们在合成蛋白质中转运氨基酸的功能提出了假设;1961 年 Brenner 及 Gross 等观察到在蛋白质合成过程中 mRNA 与核糖体的结合;1965 年 Holley 首次测出了酵母丙氨酸 tRNA 的一级结构;特别是在 20 世纪 60 年代在 Nirenberg、Ochoa 以及 Khorana 等几位科学家的共同努力下破译了 RNA 上编码合成蛋白质的遗传密码,随后研究表明这套遗传密码在生物界具有通用性,从而认识了蛋白质翻译合成的基本过程。

上述重要发现共同建立了以中心法则为基础的分子遗传学基本理论体系。1970 年 Temin 和 Baltimore 又同时从鸡肉瘤病毒颗粒中发现以 RNA 为模板合成 DNA 的反转录酶,又进一步补充和完善了遗传信息传递的中心法则。

对蛋白质结构与功能的进一步认识。1956—1958 年 Anfinsen 和 White 根据对酶蛋白的



变性和复性实验, 提出蛋白质的三维空间结构是由其氨基酸序列来确定的。1958 年 Ingram 证明正常的血红蛋白与镰刀状细胞溶血症病人的血红蛋白之间, 亚基的肽链上仅有一个氨基酸残基的差别, 使人们对蛋白质一级结构影响功能有了深刻的印象。与此同时, 对蛋白质研究的手段也不断改进。1969 年 Weber 开始应用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测定蛋白质分子量; 20 世纪 60 年代先后分析出血红蛋白、核糖核酸酶 A 等一批蛋白质的一级结构; 1973 年氨基酸序列自动测定仪问世。中国科学家在 1965 年人工合成了牛胰岛素; 1973 年用 X 射线衍射分析法测定了牛胰岛素的空间结构, 为认识蛋白质的结构作出了重要贡献。

三、初步认识生命本质并开始改造生命的深入发展阶段

20 世纪 70 年代后, 以基因工程技术的出现作为新的里程碑, 标志着人类认识生命本质并能主动改造生命的新时期的开始。其间的重大成就包括以下几方面:

1. 重组 DNA 技术的建立和发展 分子生物学理论和技术发展的积累使得基因工程技术的出现成为必然。1967—1970 年 Yuan 和 Smith 等发现的限制性核酸内切酶为基因工程提供了有力的工具; 1972 年 Bery 等将 SV40 病毒的 DNA 与噬菌体 P22 的 DNA 在体外重组成功, 转化大肠杆菌, 使本来在真核生物中合成的蛋白质能在细菌中合成, 打破了种属界限; 1977 年 Boyer 等首先将人工合成的生长激素释放抑制因子 14 肽的基因重组入质粒, 成功地在大肠杆菌中合成得到这种 14 肽; 1978 年 Itakura (板仓) 等使人生长激素 191 肽在大肠杆菌中表达成功; 1979 年美国基因技术公司用人工合成的人胰岛素基因重组转入大肠杆菌中合成人胰岛素。至今我国已有重组人干扰素、重组人白细胞介素 2、重组人粒细胞集落刺激因子、重组人乙型肝炎病毒疫苗、基因工程幼畜腹泻疫苗等多种基因工程药物和疫苗进入生产或临床试用, 世界上还有几百种基因工程药物及其他基因工程产品在研制中, 成为当今农业和医药业发展的重要方向, 将对医学和工农业发展作出新贡献。

转基因动、植物和基因剔除植物的成功是基因工程技术发展的结果。1982 年 Palmiter 等将克隆的生长激素基因导入小鼠受精卵细胞核内, 培育得到比原小鼠个体大几倍的“巨鼠”, 激起了人们创造优良品种家畜的热情。我国水生生物研究所将生长激素基因转入鱼受精卵, 得到的转基因鱼, 其生长显著加快、个体明显增大。转基因猪也正在研制中。用转基因动物还能获取治疗人类疾病的重要蛋白质, 导入了凝血因子Ⅸ基因的转基因绵羊分泌的乳汁中含有丰富的凝血因子Ⅸ, 能有效地用于血友病的治疗。在转基因植物方面, 1994 年能比普通西红柿保鲜时间更长的转基因西红柿投放市场。1996 年转基因玉米、转基因大豆相继投入商品生产, 美国最早研制得到转基因抗虫棉花, 我国科学家将自己发现的蛋白酶抑制剂基因转入棉花获得抗棉铃虫的棉株。1996 年全世界已有 25 万 hm^2 土地种植转基因植物。

基因诊断与基因治疗是基因工程在医学领域发展的一个重要方面。1991 年美国向一患先天性免疫缺陷病 (遗传性腺苷脱氨酶 ADA 基因缺陷) 的女孩体内导入重组的 ADA 基因, 获得成功。我国也在 1994 年用导入人凝血因子Ⅸ基因的方法成功治疗了乙型血友病的患者。在我国用作基因诊断的试剂盒已有近百种之多。基因诊断和基因治疗正在发展之中。

这时期基因工程的迅速进步得益于许多分子生物学新技术的不断涌现, 包括核酸的化学合成从手工发展到全自动合成。1975—1977 年 Sanger、Maxam 和 Gilbert 先后发明了 3 种 DNA 序列的快速测定法; 20 世纪 90 年代全自动核酸序列测定仪的问世; 1985 年 Cetus 公



司 Mullis 等发明的聚合酶链式反应 (PCR) 的特定核酸序列扩增技术, 更以其高灵敏度和特异性被广泛应用, 对分子生物学的发展起到重大的推动作用。

2. 基因组研究的发展 目前分子生物学已经从研究单个基因发展到研究生物整个基因组的结构与功能。1977 年 Sanger 测定了 Φ X174-DNA 全部 5 375 个核苷酸的序列; 20 世纪 80 年代 λ 噬菌体 DNA 48 502bp 序列全部测出, 随后一些小的病毒包括乙型肝炎病毒、艾滋病病毒等基因组的全序列也陆续被测定, 接着许多科学家共同努力测出了大肠杆菌基因组 DNA 的全序列长 (4×10^6 bp)。测定整个生物基因组核酸的全序列无疑对理解这一生物的生命信息及其功能有极大的意义。1990 年人类基因组计划 (human genome project) 开始实施, 这是生命科学领域有史以来最庞大的全球性研究计划, 2000 年绘出了人类基因组全部 DNA 3×10^9 bp 的序列草图, 到 2006 年人类最后一个染色体——1 号染色体的 DNA 测序完成。现在正通过后基因组计划, 最终确定人类约 5 万个基因的一级结构, 这将使人类能够更好地掌握自己的命运。除了人类基因组, 现在很多生物的基因组都已经和即将完成测序, 这得益于测序技术的飞速发展。目前, 随着高通量测序技术的发展和普及, 基因组学、转录组学研究以及蛋白质组研究将会对分子生物学理论和技术进步产生极大的推动力。

3. 基因表达调控机理 20 世纪 60 年代, Jacob 和 Monod 最早提出的操纵子学说打开了人类认识基因表达调控的窗口, 人们开始认识原核生物基因表达调控的一些规律, 70 年代以后才逐渐认识了真核基因组结构和调控的复杂性。1977 年最先发现猴 SV40 病毒和腺病毒中编码蛋白质的基因序列是不连续的, 这种基因内部的间隔区 (内含子) 在真核基因组中是普遍存在的, 揭开了认识真核基因组结构和调控的序幕。1981 年 Cech 等发现四膜虫 rRNA 的自我剪接, 从而发现核酶 (ribozyme)。80~90 年代, 人们逐步认识到真核基因的顺式调控元件与反式转录因子参与蛋白质间的分子识别与相互作用是基因表达调控根本所在。现在, 又了解到一类被称为“微 RNA”的小型 RNA 在决定基因表达中也扮演着重要角色, 它们是通过与某些信使 RNA 结合, 抑制这些信使 RNA 的翻译或以使其沉默的方式发挥作用的。基因表达调控研究不断地揭示着生物体从 DNA 到蛋白质的调控过程。

4. 细胞信号转导机理研究成为新的前沿领域 细胞信号转导机理的研究可以追溯到 20 世纪 50 年代。1957 年 Sutherland 发现 cDNA, 1965 年提出第二信使学说, 是人们认识受体介导和细胞信号转导的第一个里程碑。1977 年 Ross 等用重组实验证实 G 蛋白的存在和功能, 将 G 蛋白与腺苷酸环化酶的作用相联系起来, 深化了对 G 蛋白偶联信号转导途径的认识。70 年代中期以后, 癌基因和抑癌基因的发现、蛋白酪氨酸激酶的发现及其结构与功能的深入研究、各种受体蛋白基因的克隆和结构功能的探索等, 使近 10 年来细胞信号转导的研究有了长足的进步。目前, 对于某些细胞中的一些信号转导途径已经有了初步的认识, 尤其是在免疫活性细胞对抗原的识别及其活化信号的传递途径方面和细胞增殖控制方面等形成了一些基本的概念, 当然要达到最终目标还需相当长时间的努力。

以上简要介绍了分子生物学的发展过程, 可以看到在近半个世纪中它是生命科学领域发展最为迅速的学科, 推动着整个生命科学的发展。至今分子生物学仍在迅速发展, 新成果、新技术不断涌现, 这也从另一方面说明分子生物学发展还处在初级阶段。分子生物学已发现的基本规律给人们认识生命的本质描绘出了光明的前景, 分子生物学的历史还不长, 积累的资料还不够多, 例如: 在地球上千姿百态的生物携带庞大的生命信息, 迄今人类所了解的只是极少的一部分, 还未认识核酸、蛋白质组成生命的许多基本规律; 又如即使我们已经