



生命科学辅导丛书 **之**  
名·师·点·拨·系·列


# 基因工程

张应玖 主编

名师点拨系列



科学出版社

The background of the cover is a close-up, artistic view of a microscope's eyepiece and objective lens. The lens is in sharp focus, showing its intricate glass elements and metal housing. The lighting is dramatic, with bright highlights on the lens surfaces and deep shadows in the surrounding metal, creating a sense of depth and precision. The overall color palette is dominated by cool blues and greys, with some warmer tones from the light reflecting off the glass.

# 基因工程

第四版 上册

生命科学辅导丛书之名师点拨系列

# 基因工程

主 编 张应玖

副主编 张金祥 王嘉鹏

科学出版社

北 京

## 内 容 简 介

本书是国家级规划教材《基因工程》的辅导书,也是普通高等教育中基因工程课程学习的参考书。全书共分8章,包括绪论,DNA重组,基因克隆载体,目的基因的制备,目的基因导入受体细胞,外源基因的表达,基因工程应用,基因工程的争论和安全措施。每章包括重点提示、核心概念、知识要点、试题精选和参考答案5个部分。本书最后附有5套模拟试题并配以参考答案,方便读者自测有关基因工程的学习效果。

本书可作为生命科学相关专业本科生、研究生和相关人员的学习参考书以及教师的教学辅导书,也可作为硕士研究生入学考试的参考用书。

### 图书在版编目(CIP)数据

基因工程/张应玖主编. —北京:科学出版社,2011.6

(生命科学辅导丛书·名师点拨系列)

ISBN 978-7-03-031217-4

I. ①基… II. ①张… III. ①基因工程-高等学校-教学参考资料  
IV. ①Q78

中国版本图书馆CIP数据核字(2011)第099755号

责任编辑:席慧 王国栋 景艳霞/责任校对:宋玲玲  
责任印制:张克忠/封面设计:北京科地亚盟图文设计有限公司

科学出版社出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

北京市文林印务有限公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

\*

2011年6月第一版 开本:720×1000 1/16

2011年6月第一次印刷 印张:10

印数:1—4 000 字数:250 000

定价:26.00元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

# 前 言

进入 21 世纪的第二个十年，现代生命科学的空前发展无疑为基因工程的理论与技术的发展提供了更加广阔的平台。基因工程也是当今生命科学领域中应用最广泛的学科之一。然而，随着学科的飞速发展，基因工程的内容越来越丰富，真正全面、系统地掌握基因工程的理论和技术并不容易，一本凝练了基因工程内容的学习参考书和教学辅导书能使学生和教师在有限的学与教的时间内较好地掌握这门课程的内容，这无疑是非常必要的。

掌握基因工程的理论和技术对于生命科学各相关专业的学生都十分重要。如何帮助学生理解并掌握基因工程的基本理论和实验技术，一直是任课教师关注的问题。笔者在科学出版社的积极倡导下组织编写了生命科学辅导丛书之名师点拨系列中的《基因工程》一书。本书提炼了基因工程的核心内容，同时吸纳了学科的最新进展，并结合笔者多年的教学实践经验编写而成。本书的特点是简明扼要，重点突出，侧重基础和核心要点。本书部分习题选自有关书籍和资料，其余部分是从自建的教学试题库中挑选的，全部习题均提供了参考答案。另外，基因工程的发展十分迅速，有些问题的解答会随着科学的发展而不断地加以完善。

本书在编写过程中得到了关可兴、黄雪媚、李雁飞、周旺、谷艳芹、郝倩、邹雪、崔理立、曹昊、高键、滕藤、梁小博、郑宇、程柏淇、陈天睿等的大力支持和帮助，在此对他们表示衷心感谢！并对科学出版社的大力支持表示衷心感谢！

由于编者水平有限，难免存在不足之处，望读者批评指正。

张应玖

2011 年 4 月于长春吉林大学

# 目 录

前言

第一章 绪论	1
【核心概念】	1
【知识要点】	1
【试题精选】	5
【参考答案】	5
第二章 DNA 重组	6
【核心概念】	6
【知识要点】	8
【试题精选】	13
【参考答案】	22
第三章 基因克隆载体	29
【核心概念】	29
【知识要点】	31
【试题精选】	36
【参考答案】	43
第四章 目的基因的制备	50
【核心概念】	50
【知识要点】	53
【试题精选】	57
【参考答案】	65
第五章 目的基因导入受体细胞	77
【核心概念】	77
【知识要点】	78
【试题精选】	84
【参考答案】	93
第六章 外源基因的表达	98
【核心概念】	98
【知识要点】	100
【试题精选】	107
【参考答案】	114

第七章 基因工程应用	120
【核心概念】	120
【知识要点】	120
【试题精选】	123
【参考答案】	124
第八章 基因工程的争论和安全措施	126
【知识要点】	126
【试题精选】	127
【参考答案】	128
附录一 模拟试题	129
模拟试题 (1)	129
模拟试题 (2)	131
模拟试题 (3)	133
模拟试题 (4)	135
模拟试题 (5)	137
附录二 参考答案	141
模拟试题 (1)	141
模拟试题 (2)	143
模拟试题 (3)	146
模拟试题 (4)	149
模拟试题 (5)	151

# 第一章 绪 论

**重点提示：**基因工程的含义（掌握），基因工程的理论依据（掌握），基因工程研究发展史（熟悉），基因工程研究内容（掌握），基因工程的安全性问题（了解）。

## 【核心概念】

1. 基因（gene）：基因是一个具有遗传功能的特定核苷酸序列的 DNA 片段。基因是遗传信息的基本单位。

2. 基因工程（gene engineering）：按照人们的愿望，进行严密的设计，通过体外 DNA 重组（基因重组）和基因转移等技术，有目的地改造受体细胞或生物种性，使受体细胞或生物物种在短时间内具有人们所期望的特性或功能，从而创造出更符合人们需求的新的生物物质或生物类型。

3. 基因重组（gene recombination）：涉及 DNA 分子内断裂-复合的基因交流过程。基因的重新组合形成了新的 DNA 分子。

4. 基因转移（gene transfer）：基因或 DNA 片段在不同生物个体之间的传递过程。

## 【知识要点】

### 一、基因工程的含义

基因工程是按照人们的愿望（设想），在体外对不同生物的遗传物质（基因）进行重组，然后通过基因转移技术转入微生物、植物或动物细胞（受体细胞、宿主细胞）内进行无性繁殖，并表达出基因产物或实现对生物体的改造，即获得符合人类需求的生物物质或新的生物类型。

基因工程最突出的两个特性是：①跨物种性，可以实现遗传物质（基因）跨物种重组、转移和表达；②无性扩增，可以实现外源 DNA 在宿主细胞内大量扩增和高水平表达，实现基因复制和表达的工程化。

### 二、基因工程诞生的理论基础

(1) 不同基因具有相同的物质基础。所有生物的基因都是一个具有遗传功能的特定核苷酸序列的 DNA 片段（某些 RNA 病毒的基因可由互补 DNA，即 cDNA 表示），而所有生物的 DNA 的基本结构都是一样的。因此，不同生物的基因



(DNA 片段)原则上可以重组。

(2) DNA 的双螺旋结构。DNA 通常以双链形式存在,形成双股螺旋结构。两条 DNA 链总是按照碱基 A 与 T 互补配对、G 与 C 互补配对的原则,通过氢键形成稳定的双螺旋结构。由于双链 DNA 中碱基是互补配对的,所以当一条链的核苷酸序列已知时,另一条链的核苷酸序列也可知。

(3) DNA 的半保留复制机制。细胞内 DNA 绝大多数以半保留复制方式合成。在复制过程中首先需碱基间氢键断裂并使双链解旋和分开,然后每条链可作为模板,在其上合成新的互补链,结果由一条链可以形成互补的两条链。这样新合成的两个 DNA 分子与原来的 DNA 分子的碱基序列完全一样。

(4) 基因是可切割的。除少数基因是重叠排列外,大多数基因都是线性排列的,彼此之间存在间隔序列。因此,每个基因都可以从长链 DNA 分子上被完整地切割下来,即使是重叠排列的基因,也可以将目的基因切割下来,但与其相重叠的基因便被破坏了。

(5) 基因是可以转移的。生物体内有的基因可以在同一染色体 DNA 上移动,甚至可以在不同染色体 DNA 间跳跃。基因的这种可转移性便实现了基因重组。因此基因以及基因组是可以重组的。

(6) 中心法则。多肽链与基因之间存在对应关系,一条多肽链就有一种相应的基因,二者之间依据遗传密码存在对应关系,因此,基因的重组与转移可以根据其表达的多肽链的性质来检测。

(7) 遗传密码是通用的。遗传密码(三联体密码)在所有生物体中都是通用的,所有遗传密码(除了少数几个外)与氨基酸之间的对应关系在所有生物体中都是相同的。因此,基因可以跨物种转移。

(8) 基因可以通过复制把遗传信息传给下一代。经重组的基因若能稳定复制则也能传代,由此可获得相对稳定的转基因生物。

### 三、基因工程诞生的技术突破

以下技术和进展为基因工程的诞生提供了技术保障:①发现了 DNA 连接酶;②细菌质粒和  $\lambda$  噬菌体作为载体在细菌细胞里实现了大量扩增;③证实了经过氯化钙处理的大肠杆菌容易吸收噬菌体 DNA 或质粒 DNA。

### 四、基因工程的研究发展史

基因工程是在生物化学、分子生物学和分子遗传学综合发展基础上于 20 世纪 70 年代诞生的一门崭新的生物技术科学。基因工程的发展主要分为以下几个阶段。

#### 1. 基因工程的理论基础准备阶段

1944~1952 年,美国微生物学家 Avery 等通过肺炎双球菌转化实验证明了

DNA 是基因的分子载体，接着美国遗传学家 Alfred Hershey 和他的学生 Marsha Chase 用噬菌体感染细菌进一步证明遗传物质是 DNA。1953 年，美国生物学家 J. D. Watson 和英国物理学家 F. H. C. Crick 揭示了 DNA 分子的双螺旋结构和半保留复制机制。1958~1971 年，由多名科学家先后确立了中心法则，并破译了 64 种遗传密码，成功地揭示了遗传信息由 DNA 到蛋白质的流向和表达的规律。

### 2. 基因工程的技术基础准备阶段

20 世纪 60 年代末至 70 年代初，多名科学家先后发现了限制性内切核酸酶和 DNA 连接酶，并在体外实现了 DNA 分子的切割与连接。1972 年前后，首次构建成了一个重组 DNA 分子。1970~1972 年，M. Mandel 和 A. Higa 发现小分子的细菌质粒以及  $\lambda$  噬菌体作载体，可以使体外重组的 DNA 分子进入经过处理的宿主细胞，并在其中实现了体外重组 DNA 的大量扩增和有效表达。

### 3. 基因工程的问世

在有了以上理论和技术的基础上，1972~1973 年，以美国微生物学家和生物化学家 P. Berg、美国生物化学家 S. Cohen 和 H. Boyer 为代表的多名科学家实现了基因的体外重组、基因转移以及基因的复制和表达。基因工程由此诞生。

### 4. 基因工程的迅速发展阶段

自 1980 年起，基因工程进入快速发展阶段，主要包括：①发展了一系列新的基因工程操作技术，如 1985 年，K. B. Mullis 发明了聚合酶链反应（polymerase chain reaction, PCR）技术，使体外人工复制 DNA 得以实现；②构建了多种功能强大的、可供转化（转导）原核或真核细胞的外源 DNA 载体；③不但获得了大量的转基因菌株，还培养出了转基因动物和转基因植物。

## 五、基因工程的研究内容

### 1. 基因工程克隆载体的研究

基因工程的诞生和发展与基因克隆（无性繁殖）载体的发现和发展息息相关。由于大多数 DNA 片段是不具有自我复制能力的，因此，为了实现在受体细胞中进行大量繁殖（或表达），就必须将这种 DNA 片段连接到一种在特定体系中具备自我复制能力的 DNA 分子上，即基因的克隆载体（vector）。显而易见，载体的性能直接关系到基因复制（或包括表达）的效果，因此，虽然迄今已构建了数以千计的克隆载体，但继续开发理想的载体仍是基因工程研究的重要内容之一。

### 2. 基因工程受体系统的研究

受体是克隆载体的宿主，是外源目的基因表达的场所，包括原核生物和真核生物，其中也包括人体细胞。早期采用的最好的受体系统是原核生物大肠杆菌和

单细胞真核生物酵母菌，它们一起被看做是第一代基因工程受体系统。依据基因工程的目的不同，所要求的载体也不同，相应地所要求的受体系统也是不同的。随着基因工程的发展和基因克隆载体技术的发展，开发理想的受体系统也是基因工程研究的重要内容之一。

### 3. 目的基因的研究

基因是一种资源，而且是一种有限的战略性资源。一直以来，开发有价值的基因资源已成为各个国家之间竞争激烈的研究内容之一。谁拥有的基因资源多、意义大，谁就能在基因工程领域占据主导地位。因此，开发人们所需的目的是基因是一项长期的战略任务。获得目的基因的途径主要是通过构建基因组文库或 cDNA 文库，目前 PCR 技术和人工化学合成方法应用更广。

### 4. 基因工程工具酶的研究

基因工程工具酶泛指体外进行 DNA 合成、切割、修饰和连接等系列过程中所需要的酶，包括 DNA 聚合酶、限制性内切核酸酶、修饰酶和连接酶等。显然，拥有有效的工具酶是实现基因工程目的的保障。

### 5. 基因工程新技术的研究

自从基因工程问世以来，用于基因工程的新技术不断涌现，由此也推动了基因工程的不断发展。针对基因工程系列过程的每一个环节，需要更加行之有效的技术。

### 6. 基因工程的应用研究

早期的基因工程技术主要应用于药物领域，目前基因工程技术已广泛应用于医药、食品、农业、林业、畜牧业、渔业、能源、环境保护等领域，以提高人们的生活水平、生活质量，达到改善生存环境等目的。扩大基因工程的应用范围，是建立和发展基因工程的最终目的，但也需要时刻消除基因工程可能带来的负面效应甚至危害。

基因工程自问世以来，已显示出了巨大的活力，使传统的生产方式和产业结构发生了变化。今后十年或更长一些时间，基因工程将重点开展基因组学、基因工程药物、动植物生物反应器和环境保护等方面的研究。

## 六、基因工程的安全性问题

基因工程自诞生以来，其安全性问题一直受到人们的关注。随着基因工程研究的不断深入和应用范围的不断扩大以及越来越多的基因工程产品的面市，基因工程的安全性问题已成为人们关注的焦点之一。地球上现有的基因组合是长期进化过程的产物，而基因工程技术的应用严重干预了自然过程，尤其是基因工程操作过程中引入的筛选标记基因或报告基因是否会对人类、牲畜有害，是否会被病原菌利用，以及是否会产生其他的负面效应，甚至是否会给自然生态带来灾难性

影响，目前尚无定论，但的确应该引起足够的重视。虽然目前还没有发现基因工程研究成果对人类、牲畜造成危害的实例，但是部分人群依然抵制基因工程产品的上市。

对基因工程的担忧主要包括：对环境的影响、新型微生物（病毒）的出现、癌症扩散、人造生物扩散等。为了确保基因工程研究的安全性，尽可能消除出现的不安全因素，一些国家已制定了一系列基因工程研究法则，让基因工程这块绿洲的上方永远是蓝色的天空。

## 【试题精选】

### 简答题

1. 什么是基因工程？
2. 简述基因工程的理论依据。
3. 简述基因工程的主要研究内容。
4. 为什么人们会质疑基因工程的安全性？目前人们应该如何做？

## 【参考答案】

1. 答：按照人们的愿望，进行严密的设计，通过体外 DNA 重组（基因重组）和基因转移等技术，有目的地改造受体细胞或生物种性，使受体细胞或生物物种在短时间内具有人们所期望的特性或功能，从而创造出更符合人们需求的新的生物物质或生物类型。

2. 答：基因工程的理论依据包括：①不同基因具有相同的物质基础；②基因是可切割的；③基因是可转移的；④多肽链与基因之间存在对应关系；⑤遗传密码是通用的；⑥基因可以通过复制把遗传信息传给下一代。

3. 答：基因工程的主要研究内容包括：①基因工程克隆载体的研究；②基因工程受体系统的研究；③目的基因的研究；④基因工程工具酶的研究；⑤基因工程新技术的研

究；⑥基因工程的应用研究等。

4. 答：基因工程的安全性问题引起人们关注，其问题主要集中在用于筛选的标记基因或报告基因是否会对人类、牲畜有害，是否会被病原菌利用，以及是否会产生其他的负面效应，甚至是否会给自然生态带来灾难性影响。为了确保基因工程研究的安全性，尽可能消除出现的不安全因素，一些国家已制定了一系列基因工程研究法则和基因工程的安全管理办法。同时，全世界从事基因工程研究的科技工作者应该携起手来，严格遵守基因工程研究的各项安全措施，坚决抵制从事危及人类生存的研制工作，让基因工程这块绿洲的上方永远是蓝色的天空。

## 第二章 DNA 重组

**重点提示：**DNA 的组成（掌握），DNA 的空间结构（熟悉），DNA 复制起始位点和复制子（复制单位）及其结构（掌握），转录启动子和转录区（掌握），外显子（掌握），内含子（掌握），DNA 转录终止子（掌握），DNA 的提取（了解），DNA 的纯化（掌握），DNA 的浓缩（掌握），DNA 变性（掌握），DNA 复性（掌握），限制性内切核酸酶及其作用机制（掌握），限制性内切核酸酶的识别序列（熟悉），限制性内切核酸酶切割 DNA 的位点（熟悉），限制性内切核酸酶的反应系统（了解），DNA 的片段化（掌握），星活性（了解），DNA 片段的黏性末端和平末端（掌握），PCR 及其基本原理（掌握），PCR 扩增特异性 DNA 片段的主要条件（掌握），DNA 片段的化学合成（熟悉），DNA 的凝胶电泳（熟悉），DNA 连接酶（掌握），DNA 片段之间的连接（掌握），DNA 重组的概念（掌握），DNA 的重组类型（了解）。

### 【核心概念】

1. DNA 重组 (DNA recombination)：按照人们的愿望，进行严密的设计，在生物体外通过人为的 DNA 片段化和重新连接，产生新的重组 DNA 分子，使其遗传信息发生变化，达到基因重组等预期的目标。

2. DNA 的 5'端和 3'端 (5' end and 3' end of a DNA)：在 DNA 的脱氧核苷酸链中，具有游离的 5'磷酸基团 (5'-P) 的一端称为 5'端；而具有游离的 3'羟基 (3'-OH) 的一端称为 3'端。

3. DNA 复制起始位点 (DNA replication origin site)：DNA 的复制总是从特殊的位点起始，这个位点具有一定的核苷酸序列，将此核苷酸序列区域称为 DNA 的复制起始位点。

4. 复制子/复制单位 (replicon)：从复制起点开始复制出一个 DNA 分子或一个 DNA 片段的核苷酸序列称为一个复制单位，或一个复制子。

5. 外显子 (exon)：是指 mRNA 上的一个基因编码序列。

6. 内含子 (intron)：是指 mRNA 上的非编码序列。

7. 回文结构 (palindrome structure)：双链 DNA 分子中的一段旋转对称结构，在轴的两侧序列相同而反向，也称为倒置（反向）重复序列。当该序列的双链被打开后，可形成局部“十”字形结构。

8. 发夹结构 (hairpin structure)：RNA 分子中由短的茎区（双链区、螺旋区）和环区（单链区）组成的类似于发夹状的结构。发夹结构是 RNA 中最普通

的二级结构形式。

9. DNA 变性 (DNA denaturation): 双链 DNA 在一定条件下因氢键断开而解链成无规则单链 DNA 的过程称为 DNA 变性。

10. 变性温度、解链温度 ( $T_m$ ): 是指当 DNA 双链有一半被解开时的温度, 用  $T_m$  表示。

11. DNA 复性 (DNA renaturation): DNA 分开的两条单链又会重新结合成双链 DNA 的过程称为复性。

12. SD 序列 (Shine-Dalgarno sequence): 在原核生物结构基因的起录点下游不远处, 总有一个 5'-AGGAGG-3' 的序列, 转录出 mRNA 上的 5'-AGGAGG-3' 序列, 与核糖体 30S 亚基 16S rRNA 3' 端的 5'-CCUCCU-3' 互补, 成为 30S 亚基识别和结合 mRNA 的位点。把此序列称为 SD 序列。

13. 限制性内切核酸酶 (restriction endonuclease): 是一类能识别双链 DNA 中特殊核苷酸序列, 并使每条链的一个磷酸二酯键断开的内切脱氧核糖核酸酶 (endo-dexzyribonuclease)。

14. 黏性末端 (cohesive end): 当一种限制性内切核酸酶在其识别序列处切断 DNA 时, 在切口处一条 DNA 链的末端多出 1 至几个核苷酸, 这些片断可以与具有互补核苷酸的另一 DNA 片段末端通过形成氢键黏结, 或者通过分子内反应环化, 因此称这些末端具有黏性, 这样的 DNA 片段末端称为黏性末端。

15. 平末端 (blunt end): 当一种限制性内切核酸酶在其识别序列处切断 DNA 时, 产生的 DNA 片段末端是平齐的, 这样的 DNA 片段末端称为平末端。

16. 同裂酶 (isoschizomer): 来源不同, 但是具有相同识别序列的一类限制性内切核酸酶被称为同裂酶。

17. 同尾酶 (isocaudarner): 识别序列不同, 但是切割 DNA 分子所得到的 DNA 片段具有相同黏性末端的一类限制性内切核酸酶。

18. 星活性 (star activity): 某些限制性内切核酸酶在特定条件下, 可以在不是原来的特异性识别序列处切割 DNA, 这种现象称为星活性。

19. DNA 分子的限制性图谱/物理图谱 (restriction map/physical map): 在 DNA 分子上绘制出各种限制性内切核酸酶识别的部位, 这样的识别部位分布图称为 DNA 分子的限制性图谱/物理图谱。

20. PCR (polymerase chain reaction): 聚合酶链反应。

21. 寡核苷酸连杆 (linker): 一种设计成以中线为轴两侧碱基互补对称的、化学合成的寡核苷酸片段。寡核苷酸连杆一般由 8~12 个核苷酸组成, 其上有一种或几种限制性内切核酸酶的识别序列。

22. 衔接头 (adaptor): 一种设计成一端或两端带有一种或两种限制性内切核酸酶切割产生的黏性末端的、化学合成的寡核苷酸片段。

23. DNA 芯片 (DNA chip): 将 DNA 片段按预先设计的排列方式固定在载

玻片或尼龙膜上而形成的密集分子排列。

24. DNA 连接酶 (DNA ligase): 能催化双链 DNA 片段紧靠在一起的 3' 羟基末端与 5' 磷酸基团末端之间形成磷酸二酯键, 使两末端连接的酶。

25. 重组 DNA 技术 (recombinant DNA technique): 在体外重新组合脱氧核糖核酸 (DNA) 分子, 并使它们在适当的细胞中增殖的遗传操作。这种操作可把特定的基因组合到载体上, 并使之在受体细胞中增殖和表达。因此它不受亲缘关系限制, 为遗传育种和分子遗传学研究开辟了崭新的途径。

26. 裂口 (gap): 是指双链 DNA 分子上的一条链断裂, 并且缺少一个或数个核苷酸时所出现的 DNA 单链缺失。

27. 缺口 (nick): 双链 DNA 分子的单链断裂, 即在相邻的 2 个核苷酸分子之间没有磷酸二酯键的连接。

## 【知识要点】

### 一、DNA 的组成

DNA 是承载和传递遗传信息的物质, 是一类由 4 种脱氧核糖核苷酸按照一定的顺序聚合而成的大分子。脱氧核糖核苷酸分子由脱氧核糖、磷酸和碱基组成。在 DNA 分子长链中, 各个脱氧核糖和磷酸基团的结构和位置是一致的, 而不同的只是碱基。组成 DNA 的碱基有 4 种, 分别是腺嘌呤 (A)、鸟嘌呤 (G)、胞嘧啶 (C) 和胸腺嘧啶 (T)。

### 二、DNA 的空间结构

DNA 通常以反向双链形式存在。两条 DNA 链总是按照碱基 A 与 T 互补配对、G 与 C 互补配对的原则, 通过氢键形成稳定的双螺旋结构, 成为双链 DNA。只有少数病毒和噬菌体中的 DNA 是以单链形式存在的。

由于双链 DNA 中碱基是互补配对的, 所以当一条链的核苷酸序列已知时, 另一条链的核苷酸序列也就可以知道了。因此双链 DNA 的核苷酸序列往往以其中一条单链 DNA 的核苷酸序列按 5'→3' 的走向表示。

双链 DNA 分子在受热时 (如 90°C) 因链间氢键断裂而变性, 缓慢冷却时又可复性, 但快速冷却时, 因碱基无法正确配对形成链间氢键而无法复性。

根据 DNA 双螺旋结构的螺距与旋转方向不同, 可以分为 B-DNA、A-DNA 和 Z-DNA。B-DNA 在生物体中较多见, 因此通常以 B-DNA 的空间结构来代表双链 DNA 的空间结构。

几乎所有真核生物的染色体 DNA 都是线形 DNA, 而大部分原核生物的染色体 DNA 和全部线粒体 DNA、叶绿体 DNA 以及细菌的质粒 DNA 是环状 DNA 分子。环状 DNA 分子一般以共价闭合的超螺旋形式存在, 即 ccc-DNA; 当

DNA 一条链的一个磷酸二酯键断开时，则成为开环 DNA 分子，即 oc-DNA；而当两条链中相对应的两个磷酸二酯键同时断开时，则成为线形 DNA 分子，即 l-DNA。

### 三、DNA 复制起始位点和复制子的结构

DNA 的功能之一是使所携带的遗传信息可以精确地传代。在细胞内 DNA 依据碱基互补原理以半保留复制机制进行复制，复制后，新产生的双链 DNA 分子中含有一条旧的链和一条新的链。DNA 的复制从复制起始位点开始，形成复制叉，进行单向复制或双向复制。每个复制子都含有控制复制起始的起点 (origin) 和终止复制的终点 (terminus)。

### 四、转录启动子和转录区

DNA 的另一种重要功能是转录生成各种 RNA。DNA 的转录包括转录启动子和转录区。在转录过程中，构成转录启动子的序列不转录出相应的 RNA，只有转录区的序列才转录出相应的 RNA。一个基因或一个操纵子能否有效转录，首先取决于其上游是否有启动子。启动子是 RNA 聚合酶识别、结合和开始转录的位点，在结构上具有序列的相对保守性。在原核生物中，启动子是由两段彼此分开且高度保守的核苷酸序列组成：在基因的 -4~-13 区有一个由 6 个核苷酸组成的典型序列，多数情况是 TATAAT 序列，被称为 pribnow 框或 -10 区；在 -35 前后还有一个比较保守的 TTGACA 序列，被称为 -35 区。真核生物基因的启动子虽然不像原核生物基因的启动子那样具有高度保守、功能明确的 -10 区和 -35 区，但也发现有 3 个比较保守的核苷酸序列区与转录启动相关，这 3 个区分别是 -25~-35 区的 TATA 序列，-70~-80 区的 CAAT 序列，以及 -80~-100 区的 GC 序列。

转录区从转录 RNA 的起录点开始，包括基因编码区和转录终止子。原核生物基因的起录点多数是 CAT，少数是 CAC 或 TAC，但一般从 A 开始转录。真核生物基因的起录点不如原核生物基因的那样固定，但多数仍从 A 开始转录，少数从 G 开始转录。

基因编码区是指转录生成的 mRNA 上自起始密码 AUG (少数情况是 GUG) 至终止密码 UAG (或 UAA、UGA) 之间的核苷酸序列。原核生物的转录区有的是由两个或两个以上基因组成的操纵子。组成同一操纵子的所有基因共用一个启动子，但是每个基因编码区都含有各自的起始密码和终止密码。两个基因编码区之间往往含有非编码的间隔序列区。真核生物的转录区较为复杂，一个启动子只控制转录一个基因编码区，而且一个基因编码区内除了外显子外，往往含有一个或几个长度各异的内含子。

在基因编码区下游的转录终止子终止转录。一个原核操纵子虽然由多个基因



组成，但是与启动子一样也只需一个终止子。终止子的结构虽然不同生物之间有明显的差别，但是一般为富含 G、C 的反向互补序列，由此序列转录出的 RNA 序列回折形成发夹结构。

## 五、天然 DNA 的提取

天然 DNA 包括染色体 DNA、病毒 DNA（噬菌体 DNA）、质粒 DNA、线粒体 DNA 和叶绿体 DNA 等，可以从不同的生物体中提取。

由于提取 DNA 的目的、种类、所用的生物、组织材料、实验条件等不同，DNA 的提纯有很多方法。其中最常用的是碱抽提法。但是不管用哪一种方法提取 DNA，一般都是先准备合适的生物材料，随后裂解细胞，再进一步分离和抽提 DNA。

根据实验要求不同，有的实验需要高纯度的 DNA，对提取的 DNA 样品需进一步纯化，具体方法有：氯化铯-溴化乙锭连续梯度离心法、离子交换层析法、琼脂糖凝胶电泳洗脱法、“基因纯”试剂纯化法。有时因实验要求，需要将 DNA 浓缩，具体方法有以下几种：乙醇沉淀法、正丁醇抽提法和聚乙二醇浓缩法。

纯化的 DNA 需进行含量和纯度的测定，主要的方法包括：①紫外光谱法，利用 DNA 在 260nm 波长处有特异的紫外吸收峰进行测定；②琼脂糖凝胶电泳法，溴化乙锭 (EB) 能插入 DNA 分子中，在紫外线照射下发出红色荧光，与已知浓度的 DNA 电泳带荧光强度对比，就可以估计出 DNA 的含量和纯度。

## 六、限制性内切核酸酶和 DNA 的片段化

DNA 体外重组，首先必须获得需要重组和能够重组的 DNA 片段，这些 DNA 片段主要是利用限制性内切核酸酶切割所制备的 DNA 分子而获得。在 DNA 体外重组中，限制性内切核酸酶切割天然的 DNA 分子，可获得含有完整基因、复制起始位点、转录启动子或转录区等，具有特定功能的 DNA 片段。

基因工程操作中真正有用的是 II 型酶（限制性内切核酸酶的分类详见第四章）。限制性内切核酸酶以环状和线形的 DNA 为底物，在合适的反应条件下，识别一定的核苷酸序列，使两条核糖链上特定位置的磷酸二酯键断开，产生具有 3'-OH 基团和 5'-P 基团的片段。不同限制性内切核酸酶各有相应的识别序列，可以以 5'→3'走向的单链 DNA 表示。有的限制性内切核酸酶可识别两种以上的核苷酸序列。其切割位点一般在识别序列内部，少数在识别序列的两侧。DNA 分子经限制性内切核酸酶切割产生的 DNA 片段末端因所用限制性内切核酸酶的不同而不同，分为黏性末端和平末端。

限制性内切核酸酶与其他酶类一样，反应系统应包括酶、底物和反应缓冲液，并且还需要合适的反应温度。限制性内切核酸酶的底物是双链 DNA 分子（或 DNA 片段），作用位点在识别序列上，但是限制性内切核酸酶的催化效率与