

分子生物学

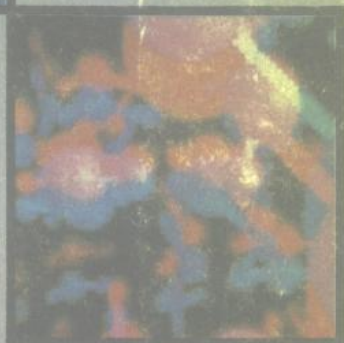
广西科学技术出版社

邵金荣 叶林柏

● 编 著

高尚荫 刘年翠

● 审 校



分子生物学

邵金荣 叶林柏 编者

高尚荫 刘年翠 审校

广西科学技术出版社

分子生物学

部金荣 叶林柏 编著

*

广西科学技术出版社出版、发行

(南宁市河堤路14号)

广西大学印刷厂印刷

*

开本850×1168 1/32 印张16.25 字数402 000

1991年1月第1版 1991年1月第1次印刷

印数: 1—1000册

ISBN 7-80565-403-4

Q·3

定价: 7.50元

序 言

高尚荫^①

近十年来生物学发生了飞跃的进展，尤其是近年来所发展的新技术使过去最优秀的实验生物学家都难以进行的实验成了常规的实验室工作，分子生物学的新发展，使生物工程以惊人的速度建立起来了，更重要的是它改变了人们对生物体，从病毒到人的新认识。

生物学过去一直是描述性科学。成千上万的生物，它们的种类、特性和结构等都是在整体或显微术水平上了解的。因而生物学家只能了解它们生命过程的结果，而不是引起结果的动力。实验工作者可以观察一种细菌的致病过程或一个胚胎的发育，但是这些观察并没有对任何基本机理的真正了解提供线索。

显微技术的发展大大增强了我们观察细胞和亚细胞细胞器的能力。电镜技术进一步显示了细胞的精微结构，但对它们的生命活动的基本机理并没有得到解释。这使我们认识到许多生物学现象的最后因果机理依赖于发挥作用的细胞内外的特异性分子。最重要的当然是带有遗传信息的DNA。现在DNA能被分开、拼接修饰和重组，能增殖为许多拷贝，并且有可能用DNA生产人们所需大小和成分的RNA，再合成蛋白质分子。对这些新的发展，基因克隆技术起了决定性作用。由于理论研究的需要而发展相应的技术和方法，而技术方法又反过来促进理论研究的深入。两者是相辅相成的，基因克隆技术和生物学进展的关系正是如此。

在人们的心目中“发现”是科学的象征。新的发现往往容易

^①高尚荫系中国科学院学部委员，武汉大学一级教授。

受到重视。因此新闻界常以新的发现衡量科学。诺贝尔奖金的授予条件是以新发现，特别是对人类有益的发现为标准的。但是如果以为科学仅仅是事实的累积会使人们发生误解。生命科学中同样可能在其它科学中，大部分的主要进展都引出了新的概念或改进已有的概念。认识世界也可以说是通过概念的改进而不仅是由于新的发现实现的。当然这两者是有联系的。1953年DNA双螺旋结构的发现使基因概念更新了，从而将“经典遗传学”发展为“分子遗传学”。

武汉大学的郅金荣和叶柏林两位老师通过几年来的教学实践，以讲义的形式使用了这本即将出版的分子生物学。它有两个特点：第一，这本书突出重点以基因的分子生物学和分子遗传学为主，也包括参与基因表达调控的蛋白质的结构特点及调控机理，但它并不包括分子生物学全部内容，主要是结合生物系、病毒系学生的课程设置，为了尽量避免分子生物学与其它邻近学科在内容上的重复。第二，作者参考了近10年来国内外有关的一些专著，教科书以及研究文献。所以这本书内容比较丰富，取材也比较新颖，着重阐明了近年来分子生物学研究的新进展、新方法、新技术、新成果以及新概念，并略述了一些历史背景。书后还收集了与这本书有关的习题200多道，其中包括120多道英文习题及其标准答案，更丰富了其内容。本书可以作为本科生的教材。也可供研究生以及分子生物学科工作者和教师参考。

1989年2月于中国·武汉

目 录

第一章 绪论	(1)
第二章 核酸	(6)
第一节 DNA的物理及化学结构	(6)
第二节 决定DNA结构的因素	(10)
第三节 复性	(20)
第四节 分子杂交	(25)
第五节 环状超螺旋DNA	(28)
第六节 左手螺旋DNA	(32)
第七节 RNA	(34)
第八节 核酸的水解	(37)
第九节 核酸的结构分析	(40)
第三章 蛋白质	(49)
第一节 蛋白质的结合位点	(49)
第二节 具有亚基的蛋白质	(51)
第三节 蛋白质活性的调节	(54)
第四节 DNA与一个识别专一碱基顺序的蛋白质的相 互作用	(59)
第四章 遗传物质	(66)
第一节 遗传物质的证明	(66)
第二节 遗传物质的性质	(72)
第三节 遗传物质—RNA	(78)
第四节 遗传密码的破译	(79)
第五节 摇摆假设	(88)
第六节 基因和基因组	(89)

第五章 DNA复制	(92)
第一节 DNA复制的机制	(93)
第二节 DNA复制的酶学	(98)
第三节 复制过程	(115)
第四节 真核生物染色体复制	(124)
第五节 DNA复制的调控	(126)
第六章 DNA损伤修复和基因突变	(129)
第一节 避免差错的DNA损伤修复	(131)
第二节 避免差错的DNA损伤修复和基因突变	(136)
第三节 应急修复反应(SOS)	(137)
第四节 诱变剂、诱变、基因突变和突变体	(143)
第五节 基因突变的校正	(153)
第七章 转录	(155)
第一节 RNA的酶促合成	(155)
第二节 RNA分子的种类及转录后加工	(172)
第三节 真核生物中的转录	(182)
第八章 翻译	(196)
第九章 基因表达的调控	(215)
第一节 乳糖系统和操纵子模型	(216)
第二节 半乳糖操纵子	(232)
第三节 色氨酸操纵子	(237)
第四节 λ 噬菌体基因表达的调节	(249)
第五节 DNA重排对基因表达的调节	(260)
第六节 sigma因子对基因表达的调控	(262)
第七节 转录后的调控	(268)
第十章 质粒	(280)
第一节 质粒的一般性质和类型	(280)
第二节 质粒DNA的转移	(283)

第三节	质粒的复制	(285)
第四节	几种细菌质粒的性质	(290)
第十一章	同源DNA序列之间的遗传重组	(297)
第一节	同源重组的机制	(298)
第二节	细菌转化中的重组	(304)
第三节	同源双链DNA分子之间的交换	(306)
第四节	同源重组模型	(314)
第五节	RecA和Rec BC蛋白在重组中的作用	(321)
第十二章	转座因子	(326)
第一节	插入顺序	(326)
第二节	转座子	(334)
第十三章	真核基因组及其基因表达的调控	(342)
第一节	真核生物基因组	(342)
第二节	真核基因的结构	(356)
第三节	真核基因的基因重排	(373)
第四节	真核基因表达的调控	(382)
第十四章	重组DNA与遗传工程	(396)
第一节	载体	(397)
第二节	工具酶	(413)
第三节	载体和外源DNA制备	(421)
第四节	连接反应	(429)
第五节	重组DNA转染细胞	(434)
第六节	重组DNA克隆的筛选和鉴定	(441)
第七节	真核基因克隆与表达	(444)
思考题		(457)

第一章 绪 论

一个世纪以来，许多生物学家认为活细胞具有生命力，假如细胞一旦被弄破，这些生命力就随之丧失。因此这些生命论者们认为要想获得有关生命的知识，莫过于对完整细胞进行研究。正如后来科学发展情况所证实的，他们的想法是错误的。当人们第一次决定去打开活细胞并研究其内的各种活动（workings）时，分子生物学就诞生了。

分子生物学这一术语是在1945年被 William Astbury首次使用的，他所指的是生物大分子的化学和物理结构的研究。那时生物化学家们已经发现了许多细胞内基本的化学反应，某些特异的反应和蛋白质的结构对于特定细胞的一些性质的重要性。但是分子生物学的发展必须有待于通过对一些简单的系统如细菌与噬菌体系统的研究来取得一些进展。虽然细菌和噬菌本身在生物学上是颇为复杂的，但是从细菌和噬菌体系统中获得有关基本生物学过程的情报要比从动物细胞中获得容易得多。是通过这些系统科学家才确定DNA是包含细胞绝大部分（假如不是全部的话）遗传信息的分子。随着这一发现，在50年代末和60年代初分子遗传学的崛起并提出了许多新概念，其发展速度可与二十年代的量子研究发展相媲美。

分子遗传学初期的成功和积累的大量研究资料，使科学家们能够把该领域的技术和强有力的逻辑思维方法应用于对肌肉和神经的功能、膜的结构、抗生素的作用模式、细胞的分化和发育以及免疫学等课题的研究。人们相信生命过程是一致的，也从而相信控制简单生物如细菌和病毒的活动的某些基本生物学原则也可以用于更复杂的细胞，只不过在细节方面可能有所不同而已，这

个信念已被实验结果证明是完全正确的。

分子生物学是研究所有生物学现象的分子基础，从这个意义上可以说分子生物学包括所有的生物学。然而生物学中的某些课目，分子生物学家们并不把它列为分子生物学范畴。如果某种生物学反应就象一个标准的化学反应一样通过反应物的效果和产物的浓度被简单地调节，对这些调节的研究就属于生物化学的范围。但如果一个酶催化的反应是通过酶分子的结构改变而被调节，分子生物学家就有权把这类课题列入分子生物学范围。这类似于把细胞内的化学成分的安排和结构的研究叫做细胞生物学。在最初就不将行为生物学列入分子生物学似乎是很清楚的。但当人们分离到了昆虫和某些原虫的行为突变体后，也要对其进行分子生物学分析，因此分子生物学与生物学其他各分枝之间的界限越来越不明显了，也许有一天，生物学的微观研究不再重要，生物学统一的术语将再一次富有意义。

随着科学的不断发展，生物学与其他学科互相渗透越来越深入，物理和化学的理论、术语和方法不断地用于生物学研究。目前已经建立了分子生物学研究的方法、系统及一般的逻辑推理原则。这样就使分子生物学研究能迅速地向深度和广度发展。

分子生物学最早研究的两个问题就是遗传物质的鉴定和蛋白质合成的机制。一旦证明了DNA是遗传物质，立即就又产生了两个问题，DNA是如何复制的和信息是如何从DNA获得的；后一个问题很快被弄清楚了，并且弄清楚了蛋白质分子的氨基酸顺序都是由DNA分子上的核苷酸所决定的。有关机制问题基本解决了，剩下的一些细节还需要进一步研究。

细菌中的蛋白质合成的机制与动物细胞中的虽然相关但不完全相同，这是显而易见的。在对细菌—噬菌体系统进行了25年的深入细致的研究之后，分子生物学技术已逐渐发展到利用更复杂的系统，例如将动物细胞用于分子生物学研究。建立细胞培养技

术是对动物细胞早期研究的课题之一，使动物细胞在培养液中生长。由于诸多原因，这一技术进展很慢。大多数动物细胞在培养中至少24小时分裂一次，相比之下细菌的倍增过程则只需要25分钟。在70年代中期，人们已经意识到，通过集中力量对简单而又迅速生长的细胞的研究，可能会更快地获得动物细胞的大分子生物学知识，这就像通过对更简单的细菌——酵母系统的研究去了解一些基本现象方面取得了最快进展一样。面包酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 是一种单细胞生物，它的倍增时间是70分钟，人们已经把它作为一种有价值的实验对象，因为它的大分子合成和调控机制与那些更为复杂的动物细胞近乎相同。

人们一旦较好地了解了基本合成机——问题之后，代谢调节问题就被提到议事日程上来了。细胞很少制造它们不需要的东西，但如果需要某种东西时，细胞在收到“需要”这种信号后就会很快启动合成这种东西。总的来说，这些信号的本质就在于所有的起始和终止信号的各自特性仍然是一个重要问题。在一些复杂的体系如噬菌体的生活史中，不是采用一般的方式进行调控的。在这些体系中，时间顺序以及所有组分的合成的量都是预先决定的，而且一切都进行得非常有效。少数几种噬菌体系统及其它们的特征（尤其是大肠杆菌的噬菌体 λ 和T7）已经被人们详细地研究过，人们对它们所有的起始、终止和调控因子大致都已搞清楚了。

许多细胞内物质在细胞内的浓度是高度守恒的，对允许哪些物质进入细胞也是高度选择性的，这些选择性取决于膜的理化性质、各种运载分子及泵系统。这些运输系统的特性、它们怎样进行工作以及不同的膜的结构等问题是人们感兴趣的问题，也是人们一直在积极探讨和寻求答案的问题。

在分化了的动物细胞例如肌肉和神经细胞中，存在着许多神秘的问题。肌肉收缩是怎样发生的？什么东西引起电的刺激沿着

神经细胞传递？又是什么东西使电荷通过神经细胞的细胞膜？为什么一种细胞产生血红蛋白而另一种细胞产生胰岛素？

分子生物学的最有价值和最有用的分枝之一是结构生物学，实际上它是现代分子生物学的发祥地。没有一种结构是 没有 功能的，要了解一种生物大分子的功能通常要先研究其结构。例如对DNA的结构的研究常导致认识突变并推测复制及遗传重组发生的可能。观察到多种多样形式的RNA打开了蛋白质生物合成的研究领域。蛋白质合成的机器—核糖体已经被很清楚地了解了其特性，在核糖体上蛋白质合成的步骤均已很清楚。tRNA分子的三维结构的研究解释了DNA上遗传信息是如何被翻译到蛋白质的氨基酸顺序中去的。

目前，结构生物学有两个领域，一是研究单个生物大分子的原子排列，另一是研究生物大分子在巨大聚集物中的组织(Organization)。前者的典型例子是DNA，其结构早已清楚。目前最流行的是研究蛋白质，焦点是搞清楚催化化学反应的酶分子的表面结构。生物化学家们急切地期待着每个酶分子有关这方面的研究资料。不幸的是获得在原子水平上的详细的分子结构仅靠又冗长又困难的X-光衍射分析技术，分析一个结构往往需要很长时间。第二个领域是研究生物大分子聚集物，有些结构如腱、头发和羊毛等已搞清楚。有关肌球蛋白(Myosin)以及有关肌动蛋白(Actin)和微管蛋白(Tubulin)还遗留许多问题有待去积极地解决。技术的发展以及我们对结构作用的了解，使人们试图对含有不同类型大分子的聚集物的结构进行研究并解决一些问题，例如努力地去研究含有DNA和几种蛋白质的染色体和含有几种类型的蛋白质和脂蛋白的膜的结构。

另外有关真核生物基因的分子生物学研究也是当前一个十分活跃的领域。主要是研究真核基因的结构特点、真核基因表达的调控，希望能建立一个象大肠杆菌中的乳糖操纵子那样的调控模

型。当然这比研究大肠杆菌(E.coli)要困难得多。但如果一旦能解决真核生物的基因表达调控问题,那么就有可能解决衰老问题、遗传学疾病以及癌症等问题。真核基因的分子生物学研究的道路可能是漫长的,但可以肯定地说前景是美好的。

第二章 核 酸

脱氧核糖核酸 (DNA) 是活细胞中最重要的分子, 含有各种特定细胞的遗传信息。本章将讨论其典型结构及物理化学性质。核糖核酸 (RNA) 的某些性质也将叙及。

第一节 DNA的物理及化学结构

这一节将讨论核苷酸之间的相互作用以及形成互补顺序的两条多核苷酸双螺旋。

早期对DNA的研究和各种实验指出DNA分子是一个延伸的长链并具有高度有序的结构。通过X-光衍射分析, 得知关于DNA分子的各个部分的大小和排列。最有意义的是观察到的DNA分子是螺旋形的, 核苷酸的碱基是平面堆积, 并且两个碱基之间的距离是 $3.4\text{\AA}$ 。从许多有机体分离的DNA分子碱基组成的化学分析证明它们含有腺嘌呤(A)、胸腺嘧啶(T)、鸟嘌呤(G)和胞嘧啶(C), 并且四种碱基的比是 $[A]=[T]$, $[G]=[C]$ 。Jams Watson和Frances Crick结合物理和化学的数据, 设想DNA分子是两条链互相缠绕在一起形成的一个双螺旋。在这个模型里, 核糖一磷酸的骨架在分子的外侧按螺旋的方式排列; 碱基伸向双螺旋的内部, 一条链的碱基与另一条链同一平面上的碱基通过氢键而形成嘌呤—嘧啶碱基配对: $A \cdot T$ 和 $G \cdot C$ 。由于每对碱基中含有双环的嘌呤(A或G)和一个单环的嘧啶(T或C), 所以每个碱基对的长度几乎是一样的。DNA双螺旋很象一个假设的绳梯一样。

每对碱基在同一平面上, 并且与双螺旋的轴垂直, 每个相邻

的碱基对之间的旋转度为 36° ，每个螺圈有10个碱基对。双螺旋的直径为 $20\text{ \AA}$ 每微米长的DNA双螺旋的分子量为 2×10^8 。一个典型的细菌DNA分子的分子量大约为 2×10^9 ，其长度有一毫米或 $10^6\text{ \AA}$ 。所以DNA分子是极其细长的。

DNA双螺旋有两个槽沟，一个大的深而宽(Major groove)和一个小的浅而窄(Minor groove)；这些槽沟的大小足够蛋白质分子进入与碱基接触。碱基配对是DNA的一个重要性质，它意味着两条链的碱基顺序是互补的，也就是说如果一条链的顺序是AATGCT，那么另一条链必是TTACGA。这就暗示了DNA的复制机制，因为复制时只要合成互补链就行了。

DNA双螺旋的两条多核苷酸链是反向平行的，即线性DNA分子的一条链的 $3'$ -OH末端和另一条链的 $5'$ -P末端(5'-Phosphate)相邻(图2-1)。反向平行有两种含意：(1)双螺旋分子的每一端都有一个 $3'$ -OH末端和一个 $5'$ -P末端，(2)两条链

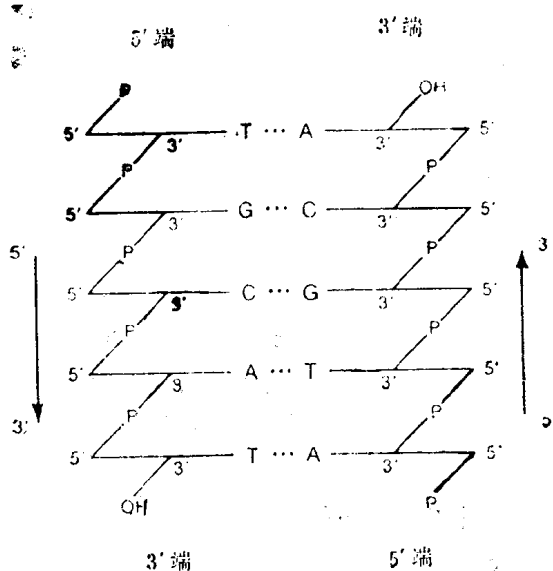


图2-1 DNA的两条互补链反向平行

走向不同，所谓走向不同是指一条链的糖环向上另一条链的糖环向下。一般书写时5'-P在左边，如pATCG-3'-OH也常写为pApTpCpG……。

不同生物DNA的碱基组成不同。A = T, G = C这当然是众所周知的事实。还有一种比率就是G + C/A + T总含量的比，这个比率实际上是很不规则的，例如不同细菌的G + C/A + T的变化范围从0.37到3.16。通常所采用的碱基比率是G + C/总碱基，这样测定G + C的含量对于高等生物来说G + C含量一般变化不大，在50%左右；不同种之间的变化在49~51%。而低等生物G + C含量变化很大，如细菌中梭状芽孢杆菌 (Genus *Clostridium*) G + C含量极低，只有27%。而八叠球菌 (Genus *Sarcina*) G + C含量达76%之高。大肠杆菌DNA中G + C含量为50%。测定一种生物的G + C含量的一个便利的方法是用CsCl平衡梯度离心，因为在CsCl溶液中DNA的密度与G + C含量成线性关系 (图2-2)。

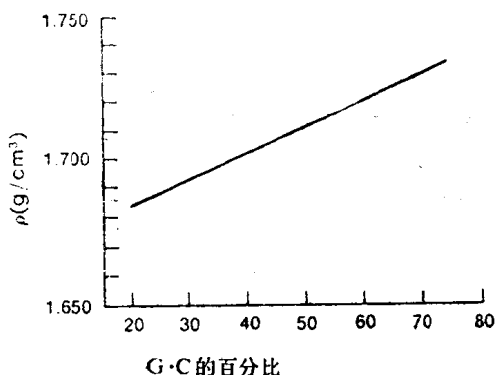


图2-2 DNA在CsCl中的密度(ρ)，以此测定DNA的G+C含量。

$$(\rho) = [(G+C) \times 0.00098] + 1.660 \text{g/cm}^3$$

在不同的条件下DNA螺旋有不同形式，一般天然的DNA都是典型的Watson—Crick结构，即右手螺旋结构。但在合成的

DNA分子中在某些条件下具有左手螺旋形式，在天然DNA分子中有些区域明显是左手螺旋。

DNA的双螺旋结构是通过X-光衍射的数据得到的，这就要求DNA分子是定向的。从一个粘度很大的DNA溶液中取出DNA，要求DNA样品保持不干，并且还要保证定向的分子不向无定向排列转变，这就必须保持一定的湿度。发现湿度不同对DNA的结构有影响，在相对湿度为66%时DNA为A型，相对湿度为92%时DNA为B型。A型DNA每个螺圈为11个碱基对，而B型DNA为典型的Watson-Crick模型。左手螺旋DNA-Z-DNA是每螺圈12个碱基对，且Z-DNA只有一个槽沟（Groove）。

不同生物的DNA分子的大小不同。在病毒和原核生物中，某种类的病毒或细胞的整个基因组由单条DNA分子缠绕而成（RNA病毒除外）。在真核生物中，包括单细胞生物象藻类、酵母和原虫，DNA分子是分成一定数目的染色体，每条染色体是由一条巨大的DNA分子组成。表2—1是不同有机体的DNA的分子量，用M表示。

DNA的长度和分子量的关系是 $1\mu\text{m} = 2 \times 10^6 \text{d}$ ，从表2—1

表 2—1 不同DNA分子的大小

有机体或粒子	分子量M	有机体或粒子	分子量M
15质粒	$1.4 \times 10^6 \text{d}$	痘苗病毒	$121 \times 10^6 \text{d}$
多瘤病毒	$3.2 \times 10^6 \text{d}$	鸟痘病毒	$178 \times 10^6 \text{d}$
噬菌体186	$18 \times 10^6 \text{d}$	F'450双质粒	$210 \times 10^6 \text{d}$
噬菌体T7	$25 \times 10^6 \text{d}$	支原体	$5.3 \times 10^6 \text{d}$
噬菌体λ	$32 \times 10^6 \text{d}$	大多数细菌	$2.0 - 2.6 \times 10^9 \text{d}$
F质粒	$62 \times 10^6 \text{d}$	酵母菌	$6 \times 10^8 \text{d}$
F' lac质粒	$95 \times 10^6 \text{d}$	果蝇	$7.9 \times 10^{10} \text{d}$
噬菌体T4	$106 \times 10^6 \text{d}$	人	$8 \times 10^{10} \text{d}$