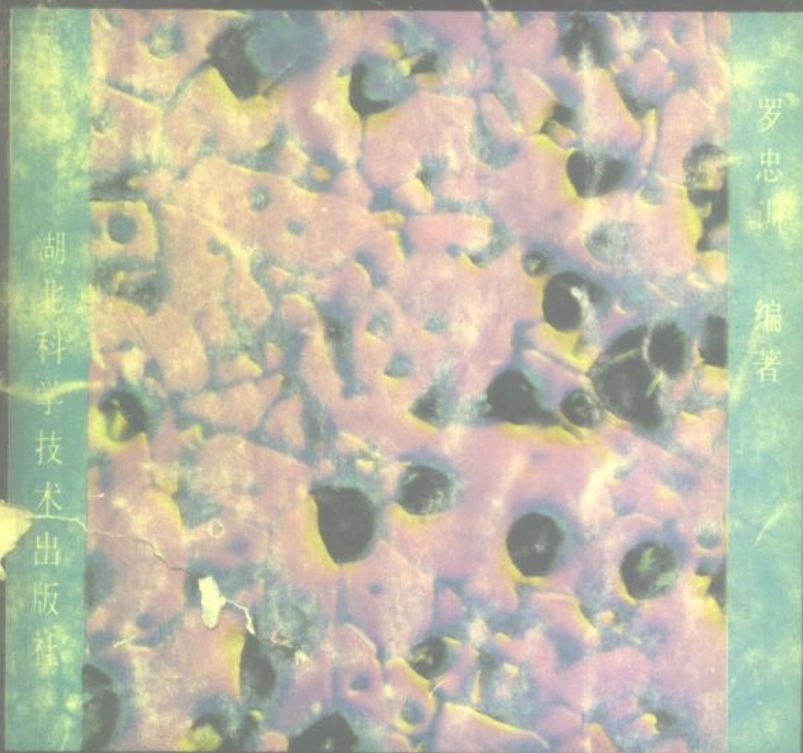


# 分子生物学与分子克隆概论

FENZISHENGWUXUEYUFENZIKELONGGAILUN

湖北科学技术出版社

罗忠训 编著



鄂新登字03号

**分子生物学与分子克隆概论**

罗忠训 编著

\*

湖北科学技术出版社出版发行 新华书店湖北发行所经销

湖北科学技术出版社黄冈印刷厂印刷

850×1168毫米 32开本 9.125印张 2插页 217千字

1991年10月第1版 1991年10月第1次印刷

ISBN 7-5352-0738-3/Q·1

印数：1—20 00 定价：4.85元

# 前 言

分子生物学是研究生物大分子的结构与功能的一门学科。在很多情况下，人们常常把基因的结构与功能的研究称为分子生物学，这是分子生物学中最具代表性、影响最为广泛的部分。自从1953年 Watson 和 Crick 提出 DNA 分子的双螺旋结构模型以来，基因的分子生物学得到了迅速的发展。随着第二类限制性内切核酸酶和其他工具酶的发现，70年代建立了遗传工程技术。这项技术与 DNA 序列分析技术的不断发展和完善，大大促进了分子生物学的发展，使人们对基因的结构和功能的研究进入核苷酸水平。

分子生物学是现代生物学发展的生长点，它不但促进了生物学各个领域的研究，使古老的生物学逐步摆脱了仅仅对形态的描述和分析，深入到分子水平，向揭示生命现象的本质前进了一大步，而且促进了工农医等多学科的发展，成为新技术革命的重要支柱，对人类的生产和生活将产生不可估量的影响。近10年来，分子生物学与基因工程的研究已经在我国逐步发展起来，并取得了一批成果。在这种形势下，在高等学校生物学有关专业开设分子生物学课程已经是势在必行了。

本书是根据近9年来给生物系高年级学生开设遗传工程和分子生物学选修课的经验，参考国外目前开设的分子生物学课的主要内容编写而成的。在介绍 DNA 的主要性质和结构特点的基础上，重点介绍基因的结构与功能，基因表达的调节，基因的分离与鉴定，DNA 序列分析技术，分子克隆技术在高等动植物育种中

的应用等。

由于编者水平的限制，查阅的文献资料难免有遗漏，书中不足和错误之处，敬请有关专家和读者批评指正。

**罗忠训**

一九九一年三月

# 目 录

## 第一部分 分子生物学

第一章 DNA .....	2
一、DNA 是主要遗传物质 .....	2
1. 肺炎双球菌的转化作用 .....	2
2. 噬菌体感染实验 .....	3
二、DNA 的一些重要性质 .....	4
1. 紫外吸收 .....	4
2. 变性和溶解曲线 .....	5
3. 复性(退火) .....	6
4. 溶解性 .....	7
5. 与荧光染料溴乙锭的作用 .....	7
三、DNA 的若干结构特征 .....	8
1. 单链核酸内部的二级结构 .....	8
2. DNA 的逆向重复与二级结构 .....	8
3. 几种结构不同的 DNA .....	9
4. 环状 DNA 的超级卷曲结构 .....	10
第二章 DNA 复制 .....	12
一、DNA 复制的基本特点 .....	12
1. 复制子的概念 .....	12
2. 半保留复制 .....	14

3. 半不连续复制 .....	14
二、DNA 复制中的酶和蛋白因子 .....	15
1. DNA 聚合酶 .....	15
2. 引物酶和引物体 .....	17
3. 解链酶和拓扑异构酶 .....	17
4. DNA 连接酶 .....	19
5. DNA 单链结合蛋白 .....	19
三、DNA 复制机理 .....	20
1. 复制过程 .....	20
2. 复制叉的几种类型 .....	22
四、DNA 的损伤与修复 .....	24
1. DNA 损伤的主要类型 .....	24
2. DNA 修复作用的认识 .....	25
3. DNA 修复机制 .....	26
第三章 RNA 的生物合成——转录 .....	32
一、RNA 聚合酶与启动子 .....	32
1. RNA 聚合酶的基本组成单位及其功能 .....	32
2. RNA 聚合酶的特异识别序列——启动子 .....	33
二、影响启动子活性的因素 .....	35
1. 调节蛋白的作用 .....	35
2. 上游序列对启动子的影响 .....	36
3. 模板 DNA 的超螺旋张力对启动子效率的影响 .....	36
三、转录的起始与延伸 .....	36
1. 启动子复合物的形成——转录的起始 .....	36
2. RNA 的合成方向 .....	38
3. $\sigma$ 因子, NusA 蛋白和 RNA 的延伸 .....	38
四、转录的终止 .....	39
1. 不依赖 $\rho$ 因子的终止 .....	39
2. 依赖 $\rho$ 因子的终止 .....	40

3. 抗终止作用 .....	41
五、转录产物及其加工 .....	43
1. mRNA 的结构特点及生活期 .....	43
2. 前体 rRNA 和前体 tRNA 的结构特点 .....	45
3. 前体 tRNA 的加工 .....	46
4. 前体 rRNA 的加工 .....	47
第四章 蛋白质的生物合成——翻译 .....	50
一、概述 .....	50
1. 蛋白质合成的机制 .....	50
2. 蛋白质合成的步骤 .....	51
3. 蛋白质合成的速度和方向 .....	51
二、遗传密码 .....	52
1. 两种重要的实验技术 .....	52
2. 遗传密码的阐明 .....	53
3. 密码和反密码的相互作用 .....	56
三、蛋白质合成的接头分子——tRNA .....	58
1. tRNA 的组成和二级结构 .....	58
2. tRNA 的三级结构 .....	59
四、合成蛋白质的工厂——核糖体 .....	60
1. 核糖体的组成 .....	60
2. rRNA 的二级结构和功能 .....	61
3. 核糖体中的活性中心 .....	63
五、翻译的模板——mRNA .....	63
1. mRNA 的稳定性问题 .....	64
2. mRNA 的结构特点 .....	64
3. 多顺反子 mRNA 的翻译 .....	66
六、蛋白质合成过程 .....	67
1. 氨酰-tRNA 的形成——氨基酸的活化 .....	67
2. 合成的起始 .....	69

3. 肽链的延伸 .....	70
4. 肽链的释放——翻译终止 .....	72
七、新生多肽的加工与分泌 .....	73
1. 加工与修饰 .....	73
2. 信号肽与蛋白质的分泌 .....	73
八、蛋白质的离体合成 .....	74
第五章 基因表达中的调控作用 .....	77
一、转录水平的调控 .....	77
1. 阻遏物的作用——半乳糖苷酶基因的表达 .....	77
2. 代谢活化因子蛋白 (CAP) 的作用 .....	80
3. 衰减作用 .....	82
4. 营养条件对基因表达的影响——ppGpp 调控系统 .....	84
二、翻译水平的调控 .....	86
1. mRNA 分子内的发卡结构对翻译起始的抑制 .....	86
2. mRNA 分子间的双链结构对翻译的抑制 .....	88
3. 核糖体蛋白质对翻译的自我抑制 .....	83
4. 翻译终止步骤的调节 .....	91
三、发育过程中的调控—— $\lambda$ 噬菌体的溶源途径 和溶菌途径 .....	92
1. $\lambda$ 噬菌体的两种发育途径 .....	92
2. $\lambda$ 噬菌体的基因图谱 .....	92
3. $\lambda$ 噬菌体遗传开关的组成 .....	94
4. 遗传开关的工作原理 .....	96
5. $\lambda$ 噬菌体基因表达的几个阶段 .....	99
6. 决定 $\lambda$ 噬菌体发育途径的因素 .....	101
第六章 真核基因组的结构特点 .....	103
一、DNA 的含量和组成 .....	103
1. C 值的概念 .....	103
2. DNA 的复性动力学与基因组的复杂度 .....	104



3. 真核基因组中的几种组成成分 .....	106
二、内含子和外显子 .....	107
1. 基因内插入序列的发现 .....	107
2. 内含子和外显子的概念 .....	108
3. 内含子与物种进化的关系 .....	110
三、RNA 拼接机制 .....	111
1. 前体 tRNA 的拼接 .....	112
2. rRNA 的自我拼接 .....	113
3. 前体 mRNA 的拼接机制 .....	114
4. 关于内含子的功能问题 .....	115
四、基因家族 .....	116
1. 珠蛋白基因家族 .....	116
2. 组蛋白基因家族 .....	118
3. rDNA 家族 .....	118
4. tRNA 基因家族 .....	119
5. 高度重复的 DNA .....	119
五、自私 DNA 设想 .....	120
第七章 高等真核基因的功能 .....	122
一、染色质的组成和结构 .....	122
1. 染色质的组成 .....	122
2. 染色质的基本结构 .....	123
3. 染色质的高级结构 .....	124
二、染色质与基因表达 .....	125
1. 异染色质与常染色质 .....	125
2. 多线染色体与基因表达 .....	126
3. 染色质对 DNase I 的敏感性 .....	127
4. 染色质基本结构的变化 .....	128
三、高等真核基因的转录 .....	128
1. RNA pol I 的转录作用 .....	128

2. RNA pol II 的转录作用 .....	129
3. RNA pol III 的转录作用 .....	132
4. RNA pol II 转录产物在核内的修饰 .....	132
四、蛋白质的合成、修饰和转移 .....	136
1. 蛋白质的合成 .....	136
2. 蛋白质的加工与修饰 .....	138
3. 蛋白质的转移 .....	139
五、真核基因表达的调节 .....	141
1. 组蛋白基因 .....	141
2. 热刺激基因 .....	141
3. 甾体激素的调控作用 .....	142
第八章 细胞器基因组 .....	144
一、线粒体 DNA (mtDNA) .....	144
1. 线粒体 DNA 的性质 .....	144
2. 线粒体基因表达系统 .....	146
3. 线粒体基因组及其表达 .....	148
二、叶绿体 DNA (ctDNA) .....	151
1. 叶绿体 DNA 的性质 .....	151
2. 叶绿体基因组及其基因的排布 .....	152
3. 叶绿体基因的启动子序列 .....	156
4. 线粒体基因组中的叶绿体 DNA .....	158
第九章 可移动的基因 .....	160
一、原核生物中的移位因子 .....	161
1. 插入序列 (IS) .....	161
2. 转座子 (Tn) .....	162
二、移位机理 .....	163
三、真核细胞中的移位因子 .....	164
1. 酵母中的 Ty 因子 .....	165
2. 果蝇中的 Copia 因子和 P 因子 .....	165

3. 玉米中的控制因子 .....	166
4. RNA 肿瘤病毒 .....	169
第十章 抗体基因 .....	171
一、免疫系统与抗体分子 .....	171
1. 免疫作用的基本概念 .....	171
2. 抗体分子的基本结构 .....	171
3. 抗体分子的基本类型 .....	172
二、抗体多样性的遗传基础 .....	173
1. 生殖细胞理论与体细胞理论 .....	173
2. 体细胞理论的实验依据 .....	174
3. 生殖细胞中抗体基因的存在状态 .....	175
三、抗体基因的装配 .....	176
1. 轻链基因的装配——V-J 结合 .....	176
2. 重链基因的装配——D-J 结合和 V-DJ 结合 .....	178
四、抗体多样性的其他来源 .....	181
1. V、D、J 连接点的可变性 .....	181
2. 抗体基因的超级突变作用 .....	182
3. 抗体多样性的估计 .....	183

## 第二部分 分子克隆

第十一章 分子克隆基本原理 .....	186
一、概述 .....	186
1. 分子克隆的诞生 .....	186
2. 分子克隆的安全问题 .....	186
3. 分子克隆的主要步骤 .....	187
二、限制性内切酶和其他工具酶 .....	188
1. 限制性内切酶 .....	188
2. 其他工具酶 .....	191
三、克隆载体 .....	192

1. 克隆载体的基本条件 .....	192
2. 质粒载体 .....	193
3. 噬菌体载体 .....	199
四、重组 DNA 分子的构建与重组克隆的筛选 .....	203
1. 构建重组 DNA 分子的一般方法 .....	203
2. 重组 DNA 向受体细菌的转移 .....	206
3. 重组克隆的筛选 .....	209
五、特定重组克隆的鉴别 .....	209
1. 核酸杂交法 .....	210
2. 免疫化学法 .....	213
第十二章 真核基因的分离 .....	214
一、基因文库的构建 .....	214
1. 外源 DNA 片段的制备 .....	215
2. 载体 DNA 的准备 .....	216
3. 离体包装混合物的制备 .....	217
4. 连接、包装与扩增 .....	217
二、cDNA 的合成与克隆 .....	219
1. mRNA 的准备 .....	219
2. cDNA 的合成与克隆 .....	219
三、目的 cDNA 的鉴别 .....	221
四、从基因文库中筛选目的基因 .....	222
第十三章 基因的鉴定 .....	225
一、酶切图谱的制定 .....	225
1. 琼脂糖凝胶电泳 .....	225
2. 制定酶切图谱的若干方法 .....	227
二、基因的初步定位——沙登吸印杂交 .....	229
三、DNA 序列分析 .....	230
1. M13 克隆载体——末端终止法 .....	231
2. 化学切割法 .....	234

3. DNA 序列分析数据的计算机处理 .....	235
四、基因结构的研究 .....	236
1. 模板链的确定 .....	236
2. 内含子的检测 .....	236
五、基因的精确定位 .....	237
1. 末端标记 .....	237
2. S1 核酸酶定位法 .....	238
3. 引物延伸法定位 .....	239
六、调控序列的鉴定 .....	240
1. 调控序列的鉴别 .....	240
2. 调控序列的分析——点突变 .....	242
七、分子生物学新技术简介 .....	243
1. 逆转电场凝胶电泳 .....	244
2. DNA 聚合酶链反应技术 .....	245
第十四章 克隆基因的表达 .....	247
一、真核基因在大肠杆菌中的表达 .....	247
1. 表达的基本条件 .....	247
2. 生长激素释放抑制因子基因的表达 .....	249
二、真核基因在真核细胞中的表达 .....	256
1. 珠蛋白基因在 SV40 载体中的表达 .....	256
2. 哺乳动物细胞的共转化 .....	259
第十五章 高等动植物基因工程 .....	264
一、外源基因在高等动物中的表达——超级	
小白鼠试验 .....	264
1. 重组质粒的构建和融合基因的转移 .....	265
2. 转基因小白鼠的鉴定 .....	265
3. 基因移植在动物育种中的意义 .....	266
二、使用 Ti 质粒载体的植物基因工程 .....	267
1. 冠瘿肿瘤与 T. 质粒 .....	267

2. Ti 质粒载体 .....	268
3. 具有抗虫能力的转基因烟草 .....	269
三、向单子叶植物中转移外源基因 .....	271
1. 基础研究的若干方面 .....	271
2. 主要的研究进展 .....	274
3. 问题与展望 .....	277

第一部分

# 分子生物学

# 第一章 DNA

## 一、DNA 是主要遗传物质

早在本世纪 20 年代,人们就已经认识到染色体有两种主要的组成成分,即脱氧核糖核酸 (DNA) 和组蛋白。由于蛋白质的基本组成单位氨基酸有 20 种,而 DNA 的基本组成单位核苷酸只有 4 种,这些基本组成单位通过不同的排列形成蛋白质和 DNA,前者的多样性比后者应该高得多。因此,当时人们认为,只有蛋白质才可能是遗传物质。这种认识是相当顽固的,直到后来的许多实验结果逐渐改变了这种看法,DNA 是主要遗传物质的观点才被公认。

### 1. 肺炎双球菌的转化作用

1928 年,英国微生物学家 F. Griffith 做了有名的肺炎双球菌 (Pneumococcus) 感染小白鼠的实验。这种细菌有三种类型 (I、II、III), 它们都有自己特定的荚膜多糖外壳 (Capsular polysaccharides), 因此,看起来其表面是平滑的 (Smooth), 称为 S 型。这种荚膜多糖外壳对细菌有保护作用,因而它们可以在小白鼠体内大量繁殖。这种多糖具有毒性,使小白鼠染上肺炎而死。上述 3 种 S 型细菌都能产生一种突变体,它们没有荚膜,看起来其表面是粗糙的 (Rough), 称为 R 型。由于没有荚膜多糖存在,细菌失去保护,不能在小白鼠体内繁殖。同时,由于没有病原物质存在,小白鼠也不会染病致死。为了研究 S 型和 R 型的转化作用,



他进行了著名的转化实验。

他的实验是这样做的：

(1) S型：注射小白鼠，死亡。

(2) S型，65℃加热：注射小白鼠，活。

(3) R型：注射小白鼠，活。

(4) (S型，65℃加热) + R型：注射小白鼠，死亡。

从死鼠体内分离细菌，得到了S型细菌。

从实验(4)可以作出这样的判断，在杀死的S型细菌中，仍有某种活性物质存在，它可以使R型细菌变为S型，从而使小白鼠染病而死。但是，这种活性物质是什么，当时并不清楚。

1944年，美国洛克菲勒研究所的Oswald Avery等改进了上述实验。他们发现，S型细菌的无细胞提取物可以使R型细菌转变为S型细菌，而且多次纯化的S型细菌的DNA也可以使R型细菌转变为S型细菌。为了排除DNA中可能混有的少量蛋白质的影响，确证是DNA而不是蛋白质使细菌发生转化，他们用DNase降解S型无细胞提取物，发现它就失去了转化作用。但是，用胰蛋白酶降解S型无细胞提取物后，它仍具有转化作用。这个实验令人信服地证明，细菌中遗传物质是DNA而不是蛋白质。

## 2. 噬菌体感染实验

已经证明了细菌中的遗传物质是DNA，而不是蛋白质。在其他生物中是否也是这样呢？1952年，美国冷泉港实验室的Alfred Hershey和Martha Chase进行了著名的T2噬菌体感染大肠杆菌的实验。我们知道，DNA和蛋白质在元素组成上的突出差别是，DNA含有P，而蛋白质含有S。利用这个不同点，他们进行了如下实验：

用含有<sup>35</sup>S和<sup>32</sup>P的培养基培养大肠杆菌，然后用T2噬菌体感染经过标记的大肠杆菌，从而得到有<sup>35</sup>S和<sup>32</sup>P标记的T2噬菌体，并用来感染未经标记的大肠杆菌。感染后数分钟内，搅拌菌液，使噬菌体从细菌表面脱落下来。然后取出一定量的菌液，离心后分