

医学分子生物学教材

现代生物化学理论与研究技术

XIANDAI SHENGWUHUAXUE LILUN YU YANJIU JISHU

主 编 孙志贤

副主编 汲言山 王升启 林汝仙 瞿成奎



军事医学科学出版社

医学分子生物学教材

现代生物化学理论与研究技术

主 编：孙志贤

副主编：汲言山 王升启 林汝仙 瞿成奎

编 委(按姓氏笔画顺序)

王会信	王嘉玺	王升启	王 菲	毛建平
龙建银	孙存普	孙志贤	孙启鸿	任蕴芳
李成文	汲言山	吕 星	吴加金	吴雅旭
周平坤	林汝仙	贺福初	欧阳应斌	施 维
赵春文	钱小红	蒋滋慧	葛伟文	蔡宁生
薛沿宁	瞿成奎			



军事医学科学出版社

1995年4月出版

内 容 简 介

本书除绪论概述分子生物学研究体系外,分上、下篇共23章。第一章至第七章介绍了蛋白质、酶、糖蛋白、脂蛋白、抗体分子、天然毒素分子、多肽生长因子的结构与功能;第八章至第十三章集中讨论了核酸结构,DNA复制及相关蛋白,基因转录及转录后加工,多肽链合成、修饰和分泌,以及基因表达调控,DNA损伤与修复等重要分子学事件;第十章至第十七章论及了生物膜结构与功能,受体学和信号转导机制。此外,生物自由基鉴于它在医学分子生物学中的重要性,也列为一章。编辑上述内容的指导思想是强调生命运动的分子形式,强调现代生物化学理论的分子学基础。

本书下篇第十八章至第二十三章,从科学研究设计与实践的高度,详细概述了应用于现代医学生物化学研究中主要的新技术:蛋白质、酶与重组蛋白的纯化策略和蛋白质定量、分析与鉴定技术,核酸研究的有关技术(诸如DNA合成,DNA纯化,PCR,核酸杂交,序列分析及反义核酸技术);转录调控研究方法;以及对真核基因在大肠杆菌表达研究策略的评述。这里叙述的大多数技术是作者实验室实践过的,具有实验设计的指导作用和可操作性。

此外,还特意编入“核酸和蛋白质研究中计算机辅助实验设计方法”的新内容。

本书可作为医学、生物学博士研究生、硕士研究生,中高级科研人员,教师以及大学生物化学、生物工程学、遗传学、微生物学、免疫学、细胞学、基础医学等相关专业学生的参考用书。

责任编辑 程 云

*

图书在版编目(CIP)数据

现代生物化学理论与研究技术 / 孙志贤编著. —北京:军事医学科学出版社, 1995. 4
ISBN 7-80121-008-5

I. 现… II. 孙… III. ①生物化学-基础理论-高等学校:医学院校-教材 ②生物化学-基础理论-研究-教学参考资料 IV. Q5

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (95) 第 05069 号

军事医学科学出版社出版

(北京太平路 27 号 邮政编码: 100850)

新华书店总店科技发行所发行

解放军第 1201 工厂印刷

*

开本: 787 mm × 1092 mm 1/16 印张: 31.625 字数: 765 千字

1995 年 4 月第 1 版 1995 年 4 月第 1 次印刷

印数: 1—2 800 册 定价: 36.00 元

ISBN 7-80121-008-5/R·001

DR83/241

序

本书定名为《现代生物化学理论与研究技术》。这实在是一个非常庞大的领域，它的内容广泛，为生命科学的基础，也是军事医学的基础。既然是军事医学的基础，它当然包括不同的生物层次或水平，如群体水平、个体水平（临床医学）、器官和组织水平、细胞水平、分子水平和可能的亚分子水平，而分子水平是跨世纪的军事医学基础要奋斗的目标。

用有限的篇幅，有限的精力，写好这样一本书实在是一项艰巨的任务。这本书是我院多年来对研究生教学经验的总结。过去是按每位教员的爱好的讲授的，难免有些零乱，不成系统，缺乏总体构想。这次能将有些教材集中起来，去粗存精，写成一本系统的教学参考书，有一定的教学效益和社会效益，对我院培养跨世纪的青年科技人才是一个重要的贡献，值得赞誉。

这本教学参考书的读者对象在简介中已有详述，内容较全面，深入浅出，条理分明，其特点是既有理论部分也有实验技术的介绍，值得阅读。

当今科学进展十分迅猛，日新月异，有些内容不免有不恰当之处，将来随着形势的发展可以在适当的时候予以修正。这本书是我院优秀中年科学家孙志贤同志作为主笔人编写的，他善于组织，思想敏锐，善于捕捉新生事物，工作勤奋，不畏艰苦，因此能及时地将此书编写而成。为此，我很高兴写短序祝贺此书的出版。

周廷冲

1994—10—15

前 言

今天，人们可以在更广阔的时空来谈论生物化学这门科学的内涵。可以说它很成熟，因为它早以其独立完整的体系，阐述着生命存在的运动形式，阐述着活细胞中蛋白质、酶、核酸以及糖、脂等一系列生命物质新陈代谢的运动规律。但也可以说它还很年轻，它蕴育有强大的生命力，吸收着更新更丰富的营养，正在勃勃生机地发育着。然而，更应该说的是，它同生物学、医学乃至整个自然科学发展的紧密联系，它对人类创造新文明的巨大诱惑和推动力量。人类在举臂欢呼：二十一世纪生命科学新纪元的到来！

发展中的中国需要科学，也需要发展生物化学。正是为了这种发展，为了培养跨世纪高级科技人才的责任，我院在不同研究领域长期从事第一线科研实践的中青年科学家们，通力合作编写了这部医学分子生物学教材《现代生物化学理论与研究技术》。其后，这部书在历时四年的研究生教学中又不断修改和充实，今天得以正式出版，奉献给国内读者。

应该指出：它仅仅是考虑现代医学科学发展，从生物化学的分子学基础角度编写的，由蛋白质分子结构与功能，核酸结构和主要功能，膜结构与功能，受体学，信号转导机理这样几部分构成的、有内在联系的一部新教材。目的是为有幸从事现代医学、生物学科学研究和教学的同志们提供一部学习生物化学新专业知识，并能进行专业生物化学实验设计和学习新技术的参考书。

第一次编写一部这样体系的新书，并非易事：新知识积累的不足，科研实践范围的局限，以及其他诸多方面的困难。然而，在周廷冲院士及其他前辈的关怀下，我们还是做了这次尝试。本书在体系和结构上一定还不够完备，一定还有不少缺点和错误，但它至少是一部开卷有益之作。敬希各位专家、学者批评指正，以便在今后的修订中走完它的成功之路。

军事医学科学院 孙志贤

1994年10月于北京

目 录

绪 论 分子生物学研究体系	(1)	第二章 酶分子	(25)
第一节 什么是分子生物学	(1)	第一节 酶是生物催化剂	(25)
第二节 分子生物学的逻辑	(1)	一、酶的研究历史	(25)
第三节 分子生物学的研究成果及当代 活跃前沿	(2)	二、酶的新概念	(26)
第四节 分子生物学研究体系介绍	(4)	三、酶的特性	(26)
上 篇 生物化学理论	(9)	四、酶的组成	(27)
第一章 蛋白质的结构与功能	(9)	第二节 酶的结构与催化功能	(28)
第一节 蛋白质概论	(9)	一、酶的一级结构与催化活性	(28)
一、蛋白质的定义与组成	(9)	二、酶的二级和三级结构与催化活性	(29)
二、蛋白质的分类	(10)	三、酶的四级结构与催化活性	(30)
三、蛋白质的溶液性质	(10)	第三节 酶促反应机制	(31)
四、蛋白质的生物学功能	(12)	一、酶作用的专一性	(31)
第二节 蛋白质的一级结构及测定	(13)	二、酶促反应的本质	(33)
一、一级结构	(13)	三、酶促反应机制的研究方法	(36)
二、一级结构的测定	(13)	四、抗体酶和 ribozyme 的催化反应	(37)
三、一级结构与功能	(15)	五、酶促反应动力学	(41)
第三节 蛋白质分子构象	(15)	第四节 酶的调节作用	(49)
一、蛋白质二级、三级与四级结构的 含义	(15)	一、酶本身活性的调控	(49)
二、维持蛋白质分子构象的化学键	(16)	二、参与代谢调控的酶	(53)
第四节 蛋白质的二级结构	(17)	三、酶调控作用的机制	(58)
一、二级结构的类型	(17)	第五节 酶活性分析	(60)
二、二级结构的测定	(17)	一、酶的活性	(60)
三、二级结构的预测	(18)	二、影响酶活性的因素	(61)
第五节 蛋白质的三级结构与四级结构	(18)	三、酶活性保持	(64)
一、球蛋白分子三级结构的一般特征	(19)	四、酶活性的测定	(65)
二、一级结构与高级结构的关系	(19)	第三章 糖蛋白	(68)
三、四级结构	(20)	第一节 糖蛋白的种类与分布	(68)
第六节 蛋白质构象与功能的关系	(20)	第二节 糖蛋白的结构	(70)
一、蛋白质的变性与复性	(20)	一、糖链中糖苷键类型	(70)
二、血红蛋白分子的构象与功能	(21)	二、糖链种类数量的差异	(73)
三、抗体分子的结构和功能	(21)	第三节 蛋白多糖的结构	(74)
四、蛋白质分子的变构作用是学习过程的 基本机制	(22)	一、氨基多糖的结构特点	(75)
第七节 蛋白质工程	(22)	二、氨基多糖在蛋白多糖中的连接方式	(78)
一、蛋白质工程及基本程序	(22)	第四节 糖蛋白和蛋白多糖的生物学功能	(78)
二、蛋白质工程的研究方法和策略	(23)	一、外源凝集素	(78)
三、蛋白质工程的应用	(24)	二、免疫球蛋白	(79)
		三、具有载体和运输作用的糖蛋白	(82)
		四、血液凝固因子糖蛋白	(83)
		五、糖蛋白激素	(83)
		六、粘液分泌的糖蛋白	(84)

七、细胞膜糖蛋白	(84)	二、概念和名称	(118)
八、免疫学常用的几种糖蛋白	(85)	第二节 多肽生长因子的分类	(118)
九、蛋白多糖及其生物功能	(86)	一、多肽生长因子作用的特点	(118)
第五节 糖蛋白的生物合成与代谢	(87)	二、多肽生长因子的分类	(120)
一、糖蛋白的生物合成	(87)	第三节 多肽生长因子受体的结构与功能 ...	(128)
二、糖蛋白及蛋白多糖的分解代谢	(89)	一、生长因子受体的概念	(128)
第四章 脂蛋白	(91)	二、生长因子受体的结构区段及其功能 ...	(128)
第一节 脂蛋白的分类	(91)	三、生长因子受体的分类	(129)
第二节 脂蛋白的化学性质	(92)	四、生长因子受体的调节	(132)
一、脂质	(92)	五、生长因子受体介导的细胞内信号	
二、载脂蛋白	(93)	系统	(134)
第三节 脂蛋白的结构	(95)	第四节 生长因子及其受体与癌基因	(136)
一、HDL 的结构	(95)	第七章 天然毒素分子	(142)
二、LDL 的结构	(96)	第一节 概论	(142)
三、VLDL 和乳糜微粒的结构	(97)	一、天然毒素的定义和种类	(142)
第四节 脂蛋白的代谢	(97)	二、天然毒素研究的主要内容	(142)
一、乳糜微粒的代谢	(97)	第二节 天然毒素分子结构与功能关系	
二、VLDL 的代谢	(98)	的研究	(143)
三、LDL 的代谢	(98)	一、一级结构与功能的关系	(143)
四、HDL 的代谢	(99)	二、空间结构与功能的关系	(145)
第五节 脂蛋白结构与功能的关系	(100)	第三节 天然毒素作用机制的研究	(148)
第六节 载脂蛋白的生理功能	(102)	一、受体结合	(148)
一、Apo E	(102)	二、膜离子通道途径	(149)
二、Apo A, Apo B, Apo C	(103)	三、抑制核酸蛋白质合成	(149)
三、Apo D	(103)	四、作用于参加生化效应的酶系	(150)
第七节 动脉硬化与脂蛋白的关系	(104)	第四节 天然毒素分子生物学研究进展	(150)
第五章 抗体分子	(106)	第五节 天然毒素的应用研究	(152)
第一节 抗体概论	(106)	一、毒素作为药物	(152)
一、抗体生化本质的早期研究	(106)	二、毒素作为生命科学重要的研究工具 ...	(152)
二、近代抗体研究的重大成就与展望	(106)	三、天然毒素作为生物武器	(153)
第二节 抗体分子的结构与功能	(107)	第八章 核酸结构	(154)
一、Ig 轻链	(108)	第一节 核酸研究的历史	(154)
二、Ig 重链	(109)	第二节 核酸的基本成分	(155)
三、Ig 片段	(109)	一、碱基	(155)
第三节 Ig 的基本类别和特性	(110)	二、戊糖	(155)
一、IgG	(111)	三、核苷	(156)
二、IgM	(112)	四、核苷酸	(156)
三、IgA	(112)	五、DNA 和 RNA	(157)
四、IgD	(112)	六、核酸的修饰成分	(159)
五、IgE	(112)	七、核酸成分的表达方法	(159)
第四节 抗原抗体反应	(113)	第三节 脱氧核糖核酸	(160)
第五节 抗体制备方法	(114)	一、DNA 的一级结构	(160)
第六章 多肽生长因子	(117)	二、DNA 的二级结构	(165)
第一节 多肽生长因子简介	(117)	三、DNA 的三级结构	(166)
一、研究历史	(117)	四、变性和复性	(168)

第四节 核糖核酸	(169)	与作用	(213)
一、rRNA	(170)	三、真核 mRNA 的帽子结构和蛋白质合成 的起始	(214)
二、tRNA	(171)	四、核糖体中 RNA 在蛋白质生物合成中 的作用	(216)
三、mRNA	(173)	第二节 多肽的修饰	(217)
第九章 DNA 复制与相关蛋白	(175)	一、多肽链的切除修饰	(217)
第一节 半保留 DNA 复制	(175)	二、多肽 N 末端和 C 末端的修饰	(218)
第二节 DNA 复制反应	(176)	三、多肽的烷基化和去烷基化修饰	(219)
一、关于 DNA 复制的回顾	(176)	四、糖基的修饰	(220)
二、DNA 复制的特殊机制	(178)	第三节 多肽的分泌	(220)
三、DNA 复制的酶和因子	(179)	一、多肽分泌的一般过程	(220)
四、末端复制：前导链的引物替代	(185)	二、各种分泌模型	(221)
第三节 复制的起始：复制起始区和 复制元	(185)	三、信号肽的结构特点	(222)
一、复制起始区	(185)	四、影响蛋白分泌的一些因素	(222)
二、复制元	(187)	五、分泌型载体的构建	(223)
三、复制元和 DNA 扩增	(188)	第十二章 基因表达的调控	(224)
第四节 DNA 修复	(189)	第一节 基因表达调控的研究历史及概况	(224)
一、错配修复	(189)	第二节 原核生物基因表达的调控：乳糖操 纵子模型	(225)
二、化学物或辐射引起的 DNA 改变 的修复	(190)	一、诱导和阻遏受小分子物质的控制	(225)
第五节 在真核细胞中染色体蛋白的复制	(191)	二、调节基因控制着结构基因	(226)
一、染色体蛋白的合成	(191)	三、操纵子的控制回路	(228)
二、核小体和 DNA 复制	(193)	四、组成型突变解释了阻遏物的作用	(228)
第十章 基因转录及转录后加工	(196)	五、顺式显性的操纵区	(229)
第一节 概论	(196)	六、启动区或阻遏物的非诱导型突变	(230)
第二节 RNA 聚合酶	(196)	七、阻遏物如何阻止转录	(230)
一、大肠杆菌中 RNA 聚合酶	(196)	八、操纵区中的接触部位	(230)
二、真核生物 RNA 聚合酶	(197)	九、阻遏物亚基的相互作用	(232)
第三节 基因转录的分子机制	(199)	十、作为 DNA 结合蛋白的阻遏物	(232)
一、启动子的结构	(199)	十一、阻遏物从 DNA 上的脱落	(233)
二、RNA 聚合酶与模板 DNA 结合	(201)	十二、剩余阻遏物的储存	(234)
三、基因转录的起始	(202)	十三、诱导作用的矛盾统一	(235)
四、转录的延伸	(203)	第三节 真核细胞基因表达调控的层次及 调控机制	(235)
五、转录的终止	(204)	一、染色质与基因调控	(236)
第四节 基因转录后加工处理	(206)	二、转录调控的顺式作用分子机制	(244)
一、mRNA 的转录后加工	(206)	三、反式作用的转录因子及其调控机制	(247)
二、核糖体 RNA (rRNA) 的转录 后加工	(209)	四、转录因子的转录活化结构域	(255)
三、转运 RNA (tRNA) 的转录 后加工	(211)	五、转录因子的活化机制	(256)
第十一章 多肽的生物合成、修饰 及分泌	(212)	六、转录因子活性的调节	(256)
第一节 多肽的生物合成	(212)	第十三章 DNA 损伤和修复	(259)
一、多肽生物合成的基本过程	(212)	第一节 DNA 分子的自发性损伤	(259)
二、氨酰-tRNA 合成酶在转译中的地位 与作用	(213)	一、DNA 复制中的损伤	(259)
		二、DNA 碱基的自发性化学改变	(259)

第二节 物理因素引起的 DNA 损伤	(261)	三、生物膜与信号传递	(291)
一、紫外线引起的 DNA 损伤	(261)	四、膜融合现象	(292)
二、电离辐射引起的 DNA 损伤	(261)	五、信号肽与导肽	(292)
第三节 化学因素引起的 DNA 损伤	(262)	第四节 生物膜的病理生理学意义	(293)
一、烷化剂对 DNA 的损伤	(262)	一、与生物膜结构损伤有关的疾病	(293)
二、碱基类似物对 DNA 的损伤	(263)	二、与生物膜功能改变有关的疾病	(294)
第四节 DNA 结构损伤的细胞学后果	(263)	三、生物膜与癌	(294)
一、DNA 碱基损伤的细胞学后果	(263)	第五节 膜生物工程	(295)
二、其他类型 DNA 损伤的细胞学后果	(265)	一、人工膜技术	(295)
第五节 DNA 修复的概念及意义	(265)	二、人工膜技术的应用	(296)
第六节 DNA 损伤的修复机理	(266)	第六节 生物膜谱学	(297)
一、回复修复	(266)	一、生物膜的小角 X 衍射研究	(297)
二、切除修复	(267)	二、生物膜的中子衍射 (或散射)	
三、错配修复	(268)	的研究	(297)
四、损伤的“耐受”	(270)	三、生物膜的冰冻蚀刻电子显微镜观测	(298)
第七节 DNA 修复基因和蛋白	(272)	第七节 生物膜的制备	(298)
一、核苷酸切除修复基因	(272)	一、细胞的破碎	(299)
二、碱基切除修复酶	(273)	二、离心分离	(299)
三、其他 DNA 修复基因	(276)	三、红细胞膜的制备	(300)
第八节 DNA 修复的基因特异性和		四、组织或细胞质膜的制备	(300)
链特异性	(276)	五、细胞膜组分的标志	(300)
一、DNA 修复的基因特异性	(276)	六、质膜的贮存条件	(300)
二、DNA 修复的链特异性	(277)	第十五章 受体学概论	(302)
第九节 DNA 修复缺陷病	(278)	第一节 受体学发展简史	(302)
一、Bloom 综合征	(278)	一、药理学研究阶段	(302)
二、着色性干皮病	(278)	二、生物化学研究阶段	(303)
三、Cockayne 综合征	(278)	三、分子生物学研究阶段	(304)
四、Fanconi 贫血	(278)	第二节 受体概念及基本特性	(304)
五、毛细血管扩张性运动失调症	(278)	第三节 受体的分类	(306)
第十节 DNA 损伤和基因突变的分子学		第四节 受体的结构与功能	(308)
检测方法	(279)	一、配体门控离子通道型受体的结构	
一、DNA 损伤的检测	(279)	和功能	(308)
二、基因突变的检测	(280)	二、G 蛋白偶联型受体	(309)
第十四章 生物膜的结构与功能	(282)	三、酪氨酸激酶型受体	(312)
第一节 细胞的膜系统	(282)	四、DNA 转录调节型受体	(314)
第二节 生物膜的结构	(283)	第十六章 信号转导机制	(317)
一、生物膜的化学组成	(284)	第一节 信号转导机制研究简介	(317)
二、脂双层是生物膜的基本结构	(284)	第二节 受体信号转导中的信号分子	(321)
三、流动镶嵌式的生物膜模型	(285)	一、G 蛋白与效应酶的调节	(321)
四、膜脂及其结构特征	(287)	二、蛋白激酶与蛋白质的磷酸化	(327)
五、膜蛋白及其特征	(288)	三、Ca ²⁺ 与细胞功能的调节	(331)
六、生物膜的结构理论问题	(289)	四、磷酸酶、磷酸二酯酶与信号传递的	
第三节 生物膜的功能	(290)	抑制	(332)
一、生物膜与物质转运	(290)	第三节 受体信号转导机制的生理意义	(334)
二、生物膜和能量转换	(291)	一、血小板活化中的信号转导	(334)

二、平滑肌收缩的信号转导	(334)
三、兴奋性氨基酸受体介导的信号转导 ..	(335)
四、细胞增殖的信号转导	(336)
第四节 信号转导机制的基本规律	(339)
一、信号的接收与传送	(339)
二、信号的抑制与放大	(339)
三、信号的发生与消失	(339)
四、信号的协同与拮抗	(340)
五、信号的正反馈和负反馈	(340)
六、信号的通用性与特异性	(341)
第五节 信号转导机制的研究展望	(341)
第十七章 生物自由基	(343)
第一节 自由基分子基础	(343)
一、自由基	(343)
二、未偶电子	(343)
三、自由基的性质	(344)
四、活性氧自由基的种类及其生物学 意义	(346)
五、金属离子和氧应激	(349)
六、活性氮自由基	(349)
第二节 研究生物自由基的基本手段	(351)
一、物理法	(351)
二、化学法	(352)
第三节 生物自由基的产生与清除	(353)
一、生物自由基的产生	(353)
二、生物自由基的清除	(354)
第四节 生物自由基的利用与危害	(356)
一、自由基的利用	(356)
二、自由基的危害	(357)
下 篇 研究技术	(363)
第十八章 蛋白质、酶与重组蛋白分离 纯化实践	(363)
第一节 蛋白质纯化战略考虑	(363)
第二节 材料选择与细胞破碎	(365)
一、生物材料选取	(365)
二、细胞破碎方法	(366)
第三节 离子交换层析	(366)
一、离子交换剂类型	(366)
二、离子交换剂的选取	(368)
三、缓冲液的选择	(368)
四、离子交换层析实践	(369)
第四节 疏水作用层析	(371)
一、疏水性凝胶的选择	(371)
二、层析实践要点	(371)

第五节 凝胶过滤层析	(372)
一、几种重要类型凝胶的特点	(374)
二、凝胶过滤层析实践要点	(375)
第六节 亲和层析	(375)
一、载体	(375)
二、亲和层析类型	(376)
三、偶联凝胶的配基固定	(377)
四、通用性配体亲和层析应用	(377)
五、亲和层析操作要点	(378)
第七节 羟基磷灰石柱层析	(380)
一、HA 柱操作规则	(380)
二、上柱	(381)
三、洗脱	(381)
第八节 蛋白质纯化中的衔接技术	(382)
一、浓缩	(382)
二、脱盐	(383)
三、盐析	(383)
四、酶与蛋白质生物活性的保持	(384)
五、蛋白监测	(384)
六、蛋白质纯度鉴定标准	(385)
第九节 基因工程重组蛋白的纯化策略	(386)
一、分泌型表达	(386)
二、细胞内可溶性表达	(387)
三、包涵体中重组蛋白复性与纯化	(387)
第十节 酶与蛋白质纯化实例	(389)
第十九章 蛋白质的分析和鉴定技术	(392)
第一节 蛋白质的定量分析	(392)
一、染料结合法测定蛋白质	(392)
二、紫外光谱吸收法测定蛋白质	(394)
三、胶体金测定蛋白质的方法	(396)
第二节 蛋白质的分析鉴定	(399)
一、电泳技术	(399)
二、蛋白质免疫印迹分析	(404)
三、蛋白质结构分析的基本策略	(408)
四、蛋白质变性和复性分析	(413)
第二十章 核酸研究技术	(418)
第一节 DNA 自动合成技术	(418)
一、DNA 自动合成的化学原理	(418)
二、合成寡核苷酸的后处理	(419)
三、修饰寡核苷酸的合成	(420)
第二节 多聚酶链式反应技术	(421)
一、PCR 技术的原理	(422)
二、PCR 技术的一般反应条件	(422)
三、PCR 技术的分类与应用	(423)
第三节 核酸纯化技术	(425)

一、哺乳动物细胞高分子量 DNA 的 分离	(425)	六、DNA 结合蛋白的分离纯化技术	(446)
二、哺乳动物细胞总 RNA 纯化 技术	(426)	七、编码 DNA 结合蛋白的 cDNA 克隆的 筛选	(446)
三、哺乳动物细胞 mRNA 纯化技术	(428)	第二十二章 真核基因在大肠杆菌中表达 研究的策略	(448)
第四节 核酸杂交技术	(432)	第一节 原核基因工程导论	(448)
一、原理	(432)	第二节 真核基因 (DNA 或 cDNA) 克隆	(448)
二、分类及应用	(432)	一、人工合成法	(449)
三、基本操作	(432)	二、逆转录法	(449)
四、应用实例——Northern 印迹	(433)	三、DNA 限制性内切酶法	(451)
第五节 反义核酸技术	(435)	第三节 克隆化真核基因在大肠杆菌中的 表达	(452)
一、反义 RNA	(435)	一、真核基因在原核细胞中表达的特点	(452)
二、核酶	(435)	二、真核基因在大肠杆菌中表达的载体	(452)
三、反义 DNA	(437)	三、影响真核基因在大肠杆菌中表达效率 的主要因素	(453)
第六节 DNA 序列测定技术	(437)	四、真核基因在大肠杆菌中的表达形式	(456)
一、Sanger 双脱氧链终止法的原理	(437)	第四节 真核基因在大肠杆菌中表达产物的 检测与鉴定	(458)
二、样品的制备	(438)	第五节 真核基因在大肠杆菌中表达的范例 ——人粒细胞集落刺激因子 cDNA 克隆与在大肠杆菌中的高效表达	(458)
三、测序酶反应	(440)	一、高活性 hG-CSF DNA 克隆与鉴定	(459)
四、变性 PAGE 电泳	(441)	二、hG-CSF 在大肠杆菌中的高效表达	(459)
五、放射自显影与结果读出	(441)	第六节 基因工程成就与展望	(460)
第二十一章 转录调控研究技术	(442)	第二十三章 核酸和蛋白质研究中计算机 辅助实验设计方法	(462)
第一节 基因功能状态研究	(442)	第一节 分子生物学中的数据库	(463)
一、DNase I 超敏感分析法	(442)	第二节 序列同源性比较和对库同源检索	(467)
二、DNA 甲基化分析	(443)	第三节 蛋白质结构和功能位点预测	(470)
三、进行中的核转录分析	(443)	第四节 实验辅助设计	(472)
四、差示文库	(443)	一、基因表达调控的分析	(472)
第二节 顺式调控元件作用的研究手段	(444)	二、PCR 引物的设计	(480)
一、体外转录	(444)	三、蛋白抗原决定簇的预测	(484)
二、氯霉素乙酰转移酶分析	(444)	第五节 药物分子设计简介	(489)
第三节 反式作用因子分析方法	(445)		
一、凝胶滞留法	(445)		
二、滤膜结合法	(445)		
三、Southwestern 印迹法	(445)		
四、足纹法	(446)		
五、蛋白-核酸紫外交联法	(446)		

绪论 分子生物学研究体系

1938年, Warren Weaver 在他的洛克菲勒基金会年度报告〔Report of the Rockefeller Foundation (1938)〕中写道:“……在基金会所支持的研究项目中, 有一系列工作属于一个较新的领域, 这一领域可称之为分子生物学。人们正在这一领域应用精细的现代技术来研究某些生命过程的微小细节。”这看来是“分子生物学”一词的首次出现。50多年来, 分子生物学的发展很快, 已成为科学史上最富有成果的研究领域之一。本章将对分子生物学发展做一概述, 着重介绍分子生物学研究常用的体系。

第一节 什么是分子生物学

我们知道, 生命运动是物质运动的最高形式, 人类长期以来不断研究探索生命运动的本质和规律, 在这方面知识的积累和充实形成了生物学。早期的生物学研究偏重于宏观的描述。随着研究工作的进展, 特别是现代物理、化学等概念和技术的渗透, 生物学研究日益从宏观发展到微观, 从现象深入到本质, 从结构联系到功能, 终于形成了生物学的带头学科——分子生物学。分子生物学的出现是集有关生物学科(生物化学、生物物理学、遗传学、微生物学、细胞生物学、有机化学、物理化学及技术科学)的大成, 它的产生又将生物学的研究推向分子水平, 并使各个领域在分子水平上密切联系, 相互渗透, 因此分子生物学已成为生物科学中各学科间的共同语言。它的最终目标是了解所有生物学现象的分子基础, 从这个意义上来说, 分子生物学包括全部生物学。也许某一天, 生物学研究的分支领域不再是重要的了, 而统一的字眼生物学又将重行其义。生物学的发展日益显示出带头学科的趋势, 因此有人预言下个世纪将是生物学世纪。

第二节 分子生物学的逻辑

在分子生物学中经常出现三类逻辑推理, 即以效率为基础的论点、模型分析和强烈推理, 正是因为有了这一点, 分子生物学才有别于本世纪的生物学。

1. 效率论点

活细胞已经经历了亿万年的进化, 在此期间效率经受了竞争和生存的严峻选择。也就是说, 如果在一群较为浪费的细胞中产生了一个浪费较少的突变体(亦即更有效率), 这个突变体应该比群体中的其他细胞生长得稍快一些, 最终这个群体将全部由这种突变体组成。因此, 在提出一种机制时, 人们常会试图考虑一个系统借以避免浪费和差错的方式, 经验表明这往往是一种卓有成效的方法, 这种方法在分子遗传学新概念的建立初期曾经是一个重要因素。例如, 分子遗传学家不断适应 DNA 和 RNA 分子中存在的起始信号、终止信号和调节位点, 以及其它避免浪费的方式。尽管如此, 还是不应该把效率的概念看得毫无问题, 因为至少在目前, 它还不能解释真核细胞的特性中某些复杂的方面。

1107482

2. 模型分析

模型是对系统工作方式的试探性解释。它提出事件的组成部分、相互作用和前后顺序。模型的一个重要功能是提出进一步实验的建议模型使实验者做出预测，为了验证模型，必须通过实验进行检测。如果预测与实验结果不符，就必须按现实情况考虑到该模型是不正确的。这种矛盾的情况就需要对模型作一更改。仅仅通过作出一次正确的预测，还不能证明模型是正确的，认识到这点很重要。然而，如果模型作出许多正确的预测，即使它不完全正确，那也可能是近乎正确的。要严格说明一个模型的真实性和在逻辑上是不可能的，但有些模型就其精巧和效能来说是极其有说服力的。

3. 强烈推理

大量的生物学推理是采用归纳法得出的。也就是说，某些事情可以多次观察到，因此人们推论这是一个真实的现象，或者一个理论可以解释众多的现象，因此人们相信这个理论是正确的。但是，强烈推理是建立在排除其他可能性基础上的逻辑过程。这是分子生物学中最有力的逻辑推论法之一。在强烈推论方法中，先对某个特定现象提出所有可能的解释，然后用实验逐一排除可能性。在只剩下一种可能性时，这种可能性就被推断是正确的。只要可能性能被排除，并且多种可能性已被说明，这种方法就是可能的。但实际上，在分子生物学中考虑到全部的可能性是不常有的。通常，分子生物学家从其他生物系统中直觉和概括，并仅考虑那些看来合理的可能性。由于这个原因，在科学期刊的文章中，在对实验数据进行分析时，常用“很可能”这个字眼。

第三节 分子生物学的研究成果及当代活跃前沿

自分子生物学诞生到现在，已经过去 50 多年了，试图列出所有需从分子角度作出解释的生物现象是不可能的，但是列出已经用分子生物学方法解决的问题以及描述出当代活跃前沿领域的进展却是有用处的，特别是在证明 DNA 双螺旋结构 40 周年，建立 DNA 重组技术 20 周年的今天。

- 1938 分子生物学一词首次出现，洛克菲勒基金支持了关于蛋白质X射线晶体的研究
Astbury和Bell关于DNA X射线晶体研究揭示了DNA的结构象——“一叠钱币”
- 1941 脉孢菌生化遗传学证明选用恰当的生物是实验成败的关键，是生化和遗传相结合取得的第一个重大进展
- 1946 Lederberg和Tatum 利用大肠杆菌双生化突变体证明了细菌中的重组，再一次证明选择恰当生物的重要性
- 1949 Pauling证明镰状细胞性贫血为“分子病”
噬菌体重组表明噬菌体在遗传分析中是有用的
- 1951 Sanger 发表胰岛素序列的论文
Barbara McClintock关于玉米转座子的全面报告
- 1953 DNA 的双螺旋结构，使一直是很神秘的分子生物学成为了解所有生命的基础
- 1961 Jacob预言了操纵子理论和蛋白质合成中基因的表达调控存在不稳定RNA的中间体
- 1963 蛋白质的固相合成

1973 Cohen 建立了体外重组 DNA 方法, 标志着生物工程学的诞生
1978 胰岛素基因在大肠杆菌中获得表达, 显示出重组 DNA 技术的应用前景
1981 四膜虫 rRNA 的自我拼接
1983 Ti 质粒被用作转化植物细胞的载体
1985 PCR 首次以文字形式出现

1987 酵母人工染色体(YAC)成为克隆很大 DNA 片段的工具

1992 发现蛋白质激酶, 从而探明蛋白质磷酸化的真谛

在科学技术飞跃发展的今天, 生物技术和概念的更新周期日趋缩短。预计今后 10 年内生物技术的发展离不开自动化, 计算机生物学将走向成熟。

当代活跃的前沿包括以下几个方面:

1. 分子遗传学

分子遗传学是分子生物学中研究最为活跃、发展最快的一个领域。它的前沿研究工作包括: ①真核细胞基因的表达与调控; ②转录后 mRNA 的加工及小的核 RNA(SnRNA)在转录后调控中的作用; ③细胞癌变与遗传性疾病的分子机制。

2. DNA 序列分析及遗传语言的研究

DNA 序列分析是搞清基因、基因组以至于染色体结构与功能的基础, 始终是个引人注目的问题。含 315 356 bp 的酵母染色体 DNA 全序列已获得, 据称这一研究结果为与人类第一次登月同样重要的遗传工程上的重大突破。估计年末可测出百分之九十的人类基因图。

3. 蛋白质工程与生物大分子结构和功能

蛋白质工程一词最早出现于 1983 年, 它是分子遗传学、蛋白质晶体学、分子动力学与计算机技术等多学科融合的产物。它借助于计算机改变或者创造新的蛋白质分子, 蛋白质工程的出现为了解生物大分子结构与功能的关系开辟了前所未有的前景, 目前已成为分子生物学中最热门的话题之一。这方面的前沿有: ①X 射线晶体学的新革命: 对复杂生物大分子精细结构的了解, 获取生物大分子反应时瞬间结构信息是生物大分子结构与功能研究的核心问题; ②生物大分子溶液构象与分子动力学研究; ③蛋白质的卷曲及重卷曲规律性、蛋白质能量计算以及从一级结构预测高级结构的研究。

4. 生物膜和生物能力学

生物膜是蛋白质、脂质和糖等组成的一种复合结构, 包括细胞表面质膜和各种细胞器膜, 其主要功能是在膜的内外进行物质、能量交换及信息传递, 这一领域的前沿研究包括: ①膜受体信息传递; ②膜蛋白的结构及功能与膜脂关系的研究。

5. 糖分子生物学

糖类是生物体内除蛋白质与核酸外的又一类生物大分子, 对蛋白质的功能有影响。

6. 神经分子生物学

神经分子生物学是神经生物学与分子生物学的边缘学科。有两方面的研究值得注意:

①神经递质受体及离子通道研究; ②脑特异 mRNA 的研究。

7. 免疫系统分子生物学

免疫学的研究在国际上进展十分迅速, 是与分子遗传学并行的另一大主流研究。不仅因为免疫学方法及单克隆抗体被广泛应用于分子生物学的各领域, 而且免疫系统分子生物

学研究近年来取得了重要进展。这是一个与人类对疾病的预防、治疗密切相关的重要研究领域。

8. 发育的分子生物学

控制基因代代相传的规律已完全清楚,但控制基因在发育过程中的表现规律还所知有限。主要目标是用分子生物学的新技术将基因表达的调控和产物同整个生物个体的发育联系起来。

9. 植物分子生物学研究

迄今分子生物学的主要进展及研究成果多取自动物及医学,但是从根本上讲人类的存在依赖于植物。近十年来植物遗传工程的成果已展现了分子生物学在改良品种方面的巨大潜力。由于植物固有的特点,其发展势头已超过动物领域,为原来落后的植物分子生物学带来勃勃生机。

第四节 分子生物学研究体系介绍

分子生物学发展的初期,局限在对生物大分子的化学和物理结构的研究,那时,生物学家已经发现了细胞内许多基本的化学反应,也认识到一些特殊的反应和决定细胞中许多性质的蛋白结构的重要性。但是,直到研究了象细菌和噬菌体那样的简单系统,取得了最富有成果的进展之后,分子生物学才得以发展。但令人们惊讶的是在分子生物学这段辉煌的阶段之后紧接着的是一段间隔期,在此期间人们普遍认为所有重大问题都已解决,某些工作领域例如微生物遗传学,似乎已成多余(1968年)。其后的结果是,许多知名的分子生物学家进入了所谓的“动物园时代”(zoo period)。他们放弃了对噬菌体或细菌的研究,而开始以复杂的真核细胞系统为实验对象(如果蝇、鱼类、线虫、轮虫、水蛭等),而且,许多研究的特定目标都是探求这些生物个体的中枢神经系统是如何工作的,这类工作中的某一些取得了很大成功,并延续至今。然而,紧接着令人意想不到的是“动物园时代”很快又被分子生物学的全新发展所取代。

下面将介绍分子生物学研究常用的一些系统(如细菌、酵母菌、四膜虫、线虫、果蝇及转基因动物等)及一些研究成果。

1. 病毒

分子生物学的一个重要命题是阐明基因调控原理。但是真核基因组的结构与调控原理十分复杂,而动物病毒(virus)却可提供一个简便的研究模型。实际上,在分子生物学中已知的有关真核基因组结构与调控原理,有许多是通过分子病毒学的研究获得的。

众所周知,正是由于RNA肿瘤病毒逆转录酶的发现,才导致对中心法则进行了重大修改。病毒基因结构和表达的研究还阐明了有关真核基因表达调控的某些原理,如基因重叠、内含子的发现、转录后剪接、重复序列和增强子的存在等等,都大大丰富了分子生物学的内容。另外,多种病毒载体的出现,也为研究真核细胞基因表达提供了一个重要手段。

2. 细菌

细菌(bacteria)是自由生活的单细胞生物,具有单个染色体,无核。与真核生物相比,它们的物理结构简单,是受到很好调节的高效生物。细菌具有许多特性,使得它们成为研究基本生物学过程的合适材料。归纳起来有以下几个特点:

(1) 生长快, 个体小。分子生物学领域中最常用的细菌是大肠杆菌(*Escherichia coli*, 通常用 *E. coli* 表示), 在最适条件下, 37℃ 时, 每 20 min 分裂一次, 因此实验周期短, 易于取得数据。因为个体小, 细胞密度大, 因而所得数据的统计学可靠性较大。

(2) 易培养, 易操作。细菌能够在液体培养基或者固体培养基上生长, 对培养基的成分要求简单, 因此很容易培养和操作。

(3) 代谢作用旺盛。环境因素对于分散的细胞能起均匀而直接的作用, 在液体培养基中能在短时间内积累大量代谢产物。

(4) 基因结构比较清楚。用细菌很容易获得营养缺陷型, 便于作为基因精细结构、基因作用及突变的研究材料, 能被用作研究复杂体系生物的简单模型。

(5) 具有游离的质粒。有许多类型的质粒可利用, 在遗传工程上就有很大的选择余地, 所以细菌早已被广泛地用作遗传工程菌。

(6) 具有转座子, 对研究重组和基因表达提供了简单方便的模型。

(7) 能受噬菌体的侵袭。用细菌作材料所取得的成果, 许多都离不开噬菌体的作用。噬菌体的结构(通常含有 2 至 20 种组分)以及生活周期比细菌要简单得多, 然而却具有基本的生命属性, 能提供细菌中大分子和调节过程的重要信息。

3. 酵母菌

酵母菌(yeast)是酿造业、面包发酵业的主要菌种, 也是许多生化试剂如酶制剂等的主要生产菌。自古以来人们就对酵母进行了大量的研究; 积累了丰富的资料, 为现代酵母分子生物学研究打下了厚实的基础。酵母菌作为一种简单的真核微生物, 在分子生物学领域中具有得天独厚的特点, 其研究的深度、系统性和全面性仅次于原核生物中的大肠杆菌。因而, 它拥有真核生物中的大肠杆菌的美名。酵母菌与细菌具有很多相似之处, 如个体小, 生长快, 生长周期为 70 min 左右, 易培养, 易操作, 对人体没有毒害作用; 遗传基因结构研究得比较清楚, 仅次于大肠杆菌, 是继续深入工作有用的信息库; 酵母菌的基因缺陷型也很容易筛选, 几乎是应有尽有, 得心应手; 另外酵母菌也有自身的转座子和游离的质粒, 是基因工程的良好受体菌。酵母菌作为一种低等真核生物, 具有许多特殊的性质, 使之具有理论研究和实际应用的广泛前景。

(1) 减数分裂是真核生物中最明显的一种有性现象。在酵母中, 可通过四分子分析来考察一次减数分裂的四个产物的情况, 这在高等动植物中一般是办不到的。通过四分子的不同类型的相对频率计算可以用来研究基因连续等一系列遗传学规律。

(2) 许多高等真核的 DNA 在酵母中可以自由复制, 也就是说, 这些片段都能被酵母的复制系统识别, 起着复制起点的作用。但这些片段在原来的生物中是否也具有复制起点的作用, 还是一个疑问。

(3) 四膜虫、果蝇等染色体的端粒结构可以在酵母中发挥功能。Szostak 等人发现四膜虫和酵母的端粒都有一个(C4A2)_n 的结构, 并且估计所有的染色体都可能有一个这样的共同端粒顺序, 说明端粒结构有着很强的保守性, 并为染色体末端的复制提供了一个良好的模型。

(4) 染色体着丝粒基因结构的研究已在酵母中取得了很大的进展。11 个着丝粒基因已得到克隆, 且都具有使质粒成为单拷贝, 并使之在有丝分裂中稳定存在, 具有典型的减数分裂分离现象等特征。含着丝粒、端粒、复制起点等酵母基因片段组成的酵母人工染色体

(YAC), 弥补了无酵母病毒带来的困难, 为研究高等生物的染色体结构打下了基础。最近法国遗传研究中心构建了“兆 YAC”, 可存储上万个碱基, 大大加快了人类基因组计划的研究速度。

(5) 酵母中有几个分泌系统。如 α -因子就是目前研究得比较深入的一个, 其基因在改造后接上外源片段就可使产物分泌到细胞外。这在生物工程中有很大应用价值。此外, 许多高等动植物的分泌信号也能在酵母中发挥作用。

(6) 酵母具有糖基化酶系统, 具有翻译后加工系统。

(7) 酵母中某些基因含有内含子, 因而具有真核特有的转录后加工系统。没有像细菌那样的操纵子结构, 但有基因簇的结构。

(8) 酵母中含有类似于致癌基因的结构。这是最近发现与高等生物非常类似的地方。由此可见酵母菌将是研究癌基因的简单模型。

(9) 酵母与动物细胞有许多共同的分子和生命过程, 如泛素、包涵素、肌动蛋白和微管蛋白、核内小分子 RNA 及内吞等, 都是现代分子生物学的重要研究课题, 用酵母可以进行富有成果的研究。

4. 四膜虫

四膜虫(tetrahymena)与人们熟悉的草履虫一样, 都是单细胞的原生动物。口位于细胞的前端, 内有三小膜, 口的边缘有一个波动膜, 故称四膜虫。四膜虫可以在简单的培养液中无菌培养, 每 3 h 分裂一次, 能迅速繁殖到每毫升 5×10^5 个细胞的密度。四膜虫有许多独特的生物学特性。例如, 其细胞核的两态性, 大核发育过程中, 种质(germinal line)基因组发生广泛的断裂、缺失、拼接、多倍化和 rRNA 基因的扩增等, 为分子生物学的研究提供了一个很好的模型。近十多年来, 人们利用四膜虫 rDNA 的优越条件获得了分子生物学的几项重大发现。

(1) RNA 催化功能的发现: 1981 年, Cech 等发现, 四膜虫 rRNA 可以自己精确地将一段内含子切除, 并将两侧 RNA 拼结起来。这段内含子具有催化加工特定序列的功能, 被称为类酶 RNA(ribozyme)。这是对生物酶认识的一次重大突破, 为此获得 1989 年诺贝尔化学奖。多数的真菌线粒体、绒泡菌 rRNA 和一些噬菌体 RNA 都有类酶 RNA。

(2) 染色体端粒结构及其复制机制的阐明: 研究端粒的结构和功能对于解释真核生物线性 DNA 的完整复制有重要意义。1978 年 Blackburn 发现四膜虫 rDNA 的末端为 (C4A2)_n, 后来又发现一种具有端粒特异性的端粒酶(telemerase), 含有反转录酶和一段 RNA 序列, 其中包含 CAACCCCAA 序列。端粒延伸反应很可能是以 RNA 为模板合成 DNA 的一种反转录反应。

5. 线虫

分子生物学研究中常用的线虫(nemathelminth)是秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*), 是一种以细菌为食的自由生活的小线虫。它的优点是:

- (1) 容易培养和保存。
- (2) 生活周期短, 做一次杂交仅需 3 天时间。
- (3) 实验操作简单, 结果稳定, 受环境因素的影响甚小。
- (4) 突变体性状特征明显, 其变异一般可在显微镜下从形态上加以判断。
- (5) 有性别分化: 雄体和雌雄两性体, 二者从形态上可以区别。其中雌雄两性体具