

现代生物医学文库(新世纪研究生用书)

基因工程

JIYIN
GONGCHENG
YUANLIYU
FANGFA

原理与方法

●主 编 孙树汉



人民军医出版社

PEOPLE'S MILITARY MEDICAL PUBLISHER

现代生物医学文库(新世纪研究生用书)

基因工程原理与方法

JIYIN GONGCHENG YUANLI YU FANGFA

主 编 孙树汉

副主编 张平武 戴建新 陈蕊雯

编 者 (以姓氏笔画为序排列)

王易伦	车文良	孙树汉	李 坚
吴 丹	张平武	杨 桦	陆惠萍
陈蕊雯	武圣明	胡振林	郭瀛军
唐建伟	寇志华	颜宏利	戴建新

人 民 军 医 出 版 社

北 京

图书在版编目(CIP)数据

基因工程原理与方法/孙树汉主编. —北京:人民军医出版社,2001.7
ISBN 7-80157-248-3

I. 基… II. 孙… III. 基因-遗传工程 IV. Q78

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2001)第 07264 号

人民军医出版社出版
(北京市复兴路 22 号甲 3 号)
(邮政编码:100842 电话:68222916)
人民军医出版社激光照排中心排版
北京国马印刷厂印刷
桃园装订厂装订
新华书店总店北京发行所发行

*

开本:787×1092mm 1/16·印张:22·字数:505 千字

2001 年 7 月第 1 版(北京)第 1 次印刷

印数:0001~4000 定价:35.00 元

(购买本社图书,凡有缺、倒、脱页者,本社负责调换)

内 容 提 要

本书由十数位中青年医学分子生物学专家集体编著。详细系统地介绍了基因和基因工程概论、基因组的结构、基因的转移和重组、基因表达的调控、工具酶及其应用、基因工程载体及其选用、聚合酶链反应、基因的克隆及其进展、外源基因表达系统、转基因动物、基因诊断、基因工程抗体、基因工程药物、基因治疗及基因工程疫苗等,还收录了数十种常用的分子生物学实验方法。具有简明扼要、图文并茂、可操作性强等特点。非常适合医学院校研究生及青年基础医学科研工作者参考。

责任编辑 新纯桥

前 言

自从 20 世纪 70 年代初基因工程技术诞生以来,在短短的 20 多年时间内,发展非常迅速。它是 20 世纪生命科学一项最伟大的成就,也是当今新技术革命的重要组成部分。当前,这门学科的基本原理和方法已广泛渗透到包括医学在内的生命科学的各个领域,对这些学科的发展起着重要的作用。

随着基因工程的广泛应用,“基因工程”已不仅仅被视为是将不同来源基因在体外人工剪切组合的一种方法,已经形成了关于基因的结构、功能研究的一整套理论和方法,这些原理和研究方法大大加快了对重大和复杂生命现象的阐明。因此,从医学院学生培养的总体目标出发,不应仅局限于传授经典遗传学的理论和方法,还应使他们了解现代分子遗传学基因的研究策略,使他们能适应当前医学科学发展的趋势,培养跨世纪的医学工作者,这就是我们编写这本教材的主要指导思想。

基因工程是一门涉及遗传学、微生物学和生物化学等多学科的边缘学科,许多理论是在微生物(如细菌、噬菌体等)分子遗传学的基础上建立和发展起来的。侧重于人体形态和功能研究的医学教育在这方面的知识构成相对薄弱。我们在编写本书时,增加了这方面的理论知识,而减少了与生物化学、分子生物学等相关学科重叠交叉的内容,力求在保持这门学科完整体系的前提下,按照现有医学院校研究生的知识结构加以重点突出。在阐述一些概念如基因、基因组、操纵子、操作子等时,均经过作者反复斟酌推敲而定。

全书共分四篇,前三篇分为 18 章,包括基因和基因工程概论、基因组的结构、基因的转移和重组、基因表达的调控、工具酶及其应用、基因工程载体及其选用、聚合酶链反应、已知序列基因克隆、未知序列基因的克隆、基因克隆策略新进展、体外突变、外源基因表达系统、转基因动物、基因诊断、基因工程抗体、基因工程药物、基因治疗、基因工程疫苗。最后第四篇收录了我校常用的分子生物学实验,本着可操作的原则,力求简明扼要。本书可作为医学、药学、医院管理等专业的研究生教材,也可供相关学科的青年教师和科研工作者参考。

由于基因工程是一门年轻的学科,许多工作仍处于一种探索阶段,加之本书编写过程还显得仓促,难免有不妥和疏漏之处,需经实践中不断修正,并期望读者提出宝贵意见,以利再版时修正。

编 者

2001 年 3 月于第二军医大学

目 录

第一篇 基因的基础理论

第一章 基因与基因工程概论 (3)	五、人类基因组计划..... (35)
第一节 基因概念的发展..... (3)	第四节 病毒基因组 (36)
一、基因学说 (3)	一、病毒基因组的结构特点..... (36)
二、DNA 是遗传信息的载体..... (3)	二、动物 DNA 病毒 (36)
三、基因与顺反子 (5)	三、动物 RNA 病毒 (38)
四、基因在 DNA 顺序上的多样性 (6)	第五节 染色体外 DNA (43)
五、基因的移动性 (6)	一、质粒 DNA (43)
六、基因及其产物 (7)	二、细胞器 DNA (44)
第二节 基因工程..... (9)	第三章 基因的转移和重组 (46)
一、基因工程及其基本内容 (9)	第一节 基因的转移 (46)
二、基因工程问世后的社会反应 (11)	一、细菌的接合..... (46)
三、基因工程与医学..... (12)	二、细菌的转化..... (49)
第二章 基因组的结构 (16)	三、转导..... (50)
第一节 基因的基本结构和命名 (16)	四、转染..... (51)
一、基因的基本结构..... (17)	五、转座..... (51)
二、基因的命名..... (17)	第二节 基因的遗传重组 (57)
第二节 原核生物基因组 (18)	一、同源重组..... (58)
一、原核生物基因组的结构特点 (19)	二、非同源重组..... (60)
二、复制有关的结构..... (19)	第四章 基因表达的调控 (62)
三、转录有关的结构..... (20)	第一节 原核生物的基因表达 调控 (62)
四、翻译相关的结构..... (23)	一、操纵子水平的转录调控..... (62)
第三节 真核生物基因组 (24)	二、色氨酸操纵子中的弱化子 ——基因转录的翻译调控..... (65)
一、真核生物基因组的特征性 结构..... (24)	三、其他调节方式..... (67)
二、复制有关的结构..... (31)	第二节 真核生物的基因表达 调控 (71)
三、转录有关的结构..... (32)	一、真核生物基因表达调控的 特点..... (71)
四、翻译有关的结构..... (35)	二、真核生物基因表达调控的 基本方式..... (72)

第二篇 基因操作的相关技术

第五章 工具酶及其应用	(85)	第四节 哺乳动物细胞表达载体	(106)
第一节 限制性内切酶	(85)	一、理想的哺乳动物细胞表达载体的结构特点	(106)
一、限制性内切酶的命名方法	(85)	二、哺乳动物细胞表达载体	(108)
二、限制性内切酶的识别特点	(85)	三、影响外源基因表达的因素	(109)
三、限制性内切酶的切割方式	(86)	第五节 常用的真核病毒载体	(109)
四、识别位点与切割方式之间的关系	(86)	一、猴空泡病毒	(109)
五、限制酶产生的末端的连接	(86)	二、牛痘病毒	(111)
六、内切酶反应的影响因素	(87)	三、腺病毒	(112)
七、内切酶的星号活性	(87)	四、逆转录病毒	(114)
八、限制酶在分子克隆中的应用	(88)	第七章 聚合酶链反应	(116)
第二节 其他工具酶	(88)	第一节 聚合酶链反应及其反应条件的优化	(116)
一、DNA 聚合酶	(88)	一、聚合酶链反应原理	(116)
二、T4 噬菌体 DNA 连接酶	(90)	二、Taq DNA 聚合酶简化并推动了 PCR 的发展	(117)
三、T4 多聚核苷酸激酶	(90)	三、各种来源的 DNA 都可作 PCR 扩增的模板	(118)
四、碱性磷酸酶	(90)	四、PCR 的特异性、效率和忠实性	(119)
五、核酸酶	(91)	第二节 常用聚合酶链反应技术	(120)
第六章 基因工程载体及其选用	(92)	一、套式 PCR	(120)
第一节 质粒	(92)	二、原位 PCR	(120)
一、质粒的一般特性	(92)	三、多重 PCR	(120)
二、组建理想质粒载体必须具备的条件	(94)	四、定量 PCR	(120)
三、常用的质粒载体	(95)	五、RNA PCR	(121)
第二节 噬菌体类	(100)	六、PCR 测序	(121)
一、 λ 噬菌体	(100)	第八章 已知序列基因的克隆	(124)
二、 λ 噬菌体载体	(101)	第一节 外源 DNA 片段的获得	(124)
三、 λ DNA 的体外包装	(102)	第二节 目的 DNA 片段的克隆	(125)
四、粘粒	(103)	一、目的 DNA 片段与载体的连接	(125)
五、M13 噬菌体	(103)	二、重组 DNA 分子转入宿主细胞	
第三节 酵母质粒	(103)		
一、酵母 $2\mu\text{m}$ 质粒的生物学特性	(103)		
二、酵母质粒 DNA 的提取和纯化	(104)		
三、酵母细胞的基因克隆载体	(104)		
四、酵母人工染色体	(105)		

的方式	(126)	第一节 基于生物大分子间相互作用	
第三节 重组子的筛选与鉴定	(127)	用的 cDNA 克隆策略	(152)
一、针对遗传表型的变化筛选	(128)	一、噬菌体显示法与功能结合法	
二、根据重组子的结构特征筛选	(128)	的联合应用	(152)
第四节 目的基因的确定及分析		二、酵母双杂交系统	(152)
DNA 序列测定	(130)	三、酵母单杂交系统	(155)
一、概述	(130)	四、三杂交系统	(155)
二、末端终止法	(130)	五、反向双杂交系统和反向单	
三、化学裂解法	(131)	杂交系统	(156)
四、DNA 序列测定自动化	(132)	六、哺乳动物细胞双杂交系统	
第九章 未知序列基因的克隆	(133)	和细菌双杂交系统	(157)
第一节 基因克隆和分离的三个		第二节 比较并克隆组织或细胞	
步骤	(133)	间差异表达基因 cDNA	
一、选择含目的基因的实验材料	(133)	的策略	(157)
二、选择合适的方法制备 DNA 片		一、差别显示反转录 PCR	(157)
段并使之克隆	(134)	二、基于 PCR 的递减杂交技术	(158)
三、选择合适方法筛选目的基因	(135)	第三节 表型相关基因组基因的	
第二节 cDNA 克隆	(135)	克隆策略	(160)
一、cDNA 合成	(135)	一、基因组错配技术	(160)
二、cDNA 克隆	(136)	二、代表性差异分析	(160)
第三节 目的 cDNA 克隆的筛选	(137)	第四节 生物信息及其在人类基	
一、用核酸探针筛选目的 cDNA	(137)	因组研究中的应用	(162)
二、用寡核苷酸探针筛选目的		一、新基因的克隆与功能分析	(163)
cDNA	(138)	二、完整基因组的比较研究	(163)
三、差示筛选组织特异的 cDNA	(142)	三、大规模基因功能表达谱的	
四、用抗体筛选目的 cDNA	(142)	分析	(163)
五、功能结合法筛选目的 cDNA	(145)	四、生物大分子的结构模拟与	
第四节 目的 DNA 的结构及功能		药物设计	(164)
分析	(148)	五、非编码区信息结构分析	(164)
一、目的 cDNA 的结构分析	(148)	六、遗传密码起源和生物进化	
二、cDNA 产物的功能分析	(148)	的研究	(164)
第十章 基因克隆策略新进展	(152)	第十一章 体外突变	(166)
		第一节 随机突变	(166)
		一、限制性内切酶法	(166)
		二、接头插入法	(168)
		三、系列缺失法	(169)
		四、接头扫描突变法	(171)
		五、核苷酸随机取代法	(171)
		第二节 定点突变	(174)

一、寡核苷酸诱导的定点突变 法 (174)	第十三章 转基因动物 (203)
二、寡核苷酸诱导的盒式突变 法 (177)	第一节 转基因动物的原理 (203)
三、全基因合成法 (177)	一、转基因与转基因动物 (203)
四、PCR 突变法 (178)	二、转基因技术的发展史 (203)
第三节 定点突变与蛋白质工程... (180)	三、转基因动物的原理 (204)
一、提高蛋白质的生物活性及 稳定性 (180)	第二节 转基因动物遗传修饰的 策略及其发展 (204)
二、改变种属特异性 (180)	一、导致产生新功能的基因组 修饰 (204)
三、增高蛋白质的专一性 (180)	二、导致功能缺失的基因组修饰 (205)
第十二章 外源基因表达系统 (182)	三、导致基因替换的基因组修饰 (205)
第一节 大肠杆菌表达系统 (182)	四、染色体畸变 (205)
一、大肠杆菌表达的特点 (182)	第三节 转基因动物的构建 (206)
二、外源基因在原核细胞中表达 的重要调控元件 (182)	一、转基因动物技术体系的组成 (206)
三、真核基因在大肠杆菌中表达 的形式 (187)	二、外源基因的构建 (207)
四、大肠杆菌表达系统的问题 ... (188)	三、建立转基因动物的途径 (207)
第二节 酵母表达系统 (188)	第四节 转基因动物的检测 (211)
一、酵母表达系统的特点 (188)	一、染色体及基因水平的检测 ... (211)
二、啤酒酵母表达系统 (189)	二、转录水平的检测 (211)
三、毕赤酵母表达系统 (191)	三、蛋白质水平的检测 (212)
第三节 昆虫细胞表达系统 (195)	第五节 转基因动物的命名 (212)
一、昆虫细胞的表达载体 (195)	一、转基因动物命名的要求 (213)
二、昆虫细胞宿主 (195)	二、转基因动物命名法则 (213)
三、重组病毒载体的转染 (196)	第六节 转基因动物研究中存在 的问题 (214)
四、分泌性表达 (197)	一、转基因动物的效率 (214)
五、缺点 (197)	二、外源基因的整合造成宿主的 基因突变 (214)
第四节 哺乳类细胞表达系统 (197)	三、外源基因的表达 (214)
一、常用的增强子——启动子 ... (198)	四、动物模型的表型与预期的 不同 (215)
二、宿主细胞 (201)	
三、重组载体导入受体细胞的 方法 (201)	
四、缺点 (202)	

第三篇 基因工程在医学中的应用

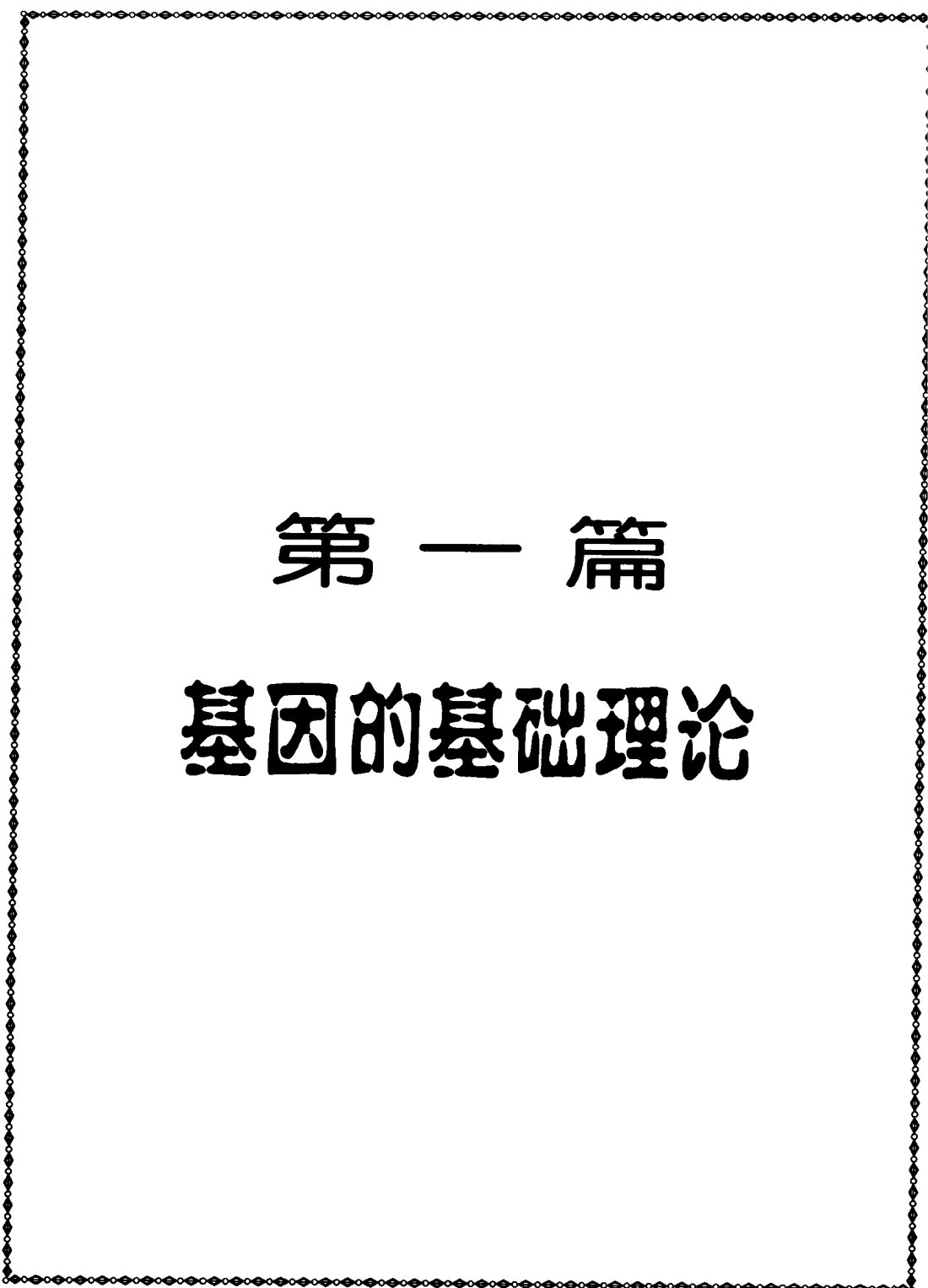
第十四章 基因诊断 (219)	一、直接分析法 (219)
第一节 酶谱分析法 (219)	二、间接分析法 (220)

第二节 探针杂交分析法..... (220)	第十七章 基因治疗..... (242)
一、寡聚核苷酸探针分析法 (220)	第一节 基因治疗历史与现状..... (242)
二、基因芯片 (222)	第二节 基因转移的方法..... (245)
第三节 PCR 为基础的诊断技术 (224)	一、基因转移的物理方法 (245)
一、PCR-单链构象多态性 (224)	二、基因转移的化学方法 (245)
二、PCR-变性梯度凝胶电泳 (225)	三、基因转移的生物方法 (246)
第十五章 基因工程抗体..... (226)	第三节 基因治疗的靶细胞..... (250)
第一节 概述..... (226)	一、造血干细胞 (250)
第二节 鼠单抗的人源化..... (227)	二、成纤维细胞 (251)
一、恒定区人源化——人-鼠 嵌合抗体 (227)	三、肝细胞 (251)
二、可变区的人源化 (227)	四、肌细胞 (252)
三、通过抗体库技术获得完全 人源化的抗体 (228)	五、淋巴细胞 (252)
第三节 小分子抗体和抗体融合 蛋白..... (229)	第四节 基因治疗的应用..... (252)
一、小分子抗体 (229)	一、遗传病的基因治疗 (253)
二、抗体融合蛋白 (229)	二、恶性肿瘤的基因治疗 (253)
第四节 噬菌体抗体库技术..... (230)	三、病毒性感染的基因治疗 (255)
一、原理 (231)	第五节 问题与展望..... (256)
二、基本技术 (231)	一、安全性 (257)
三、应用和展望 (233)	二、稳定性 (257)
第五节 基因工程抗体的现状与 展望..... (233)	三、免疫原性 (257)
第十六章 基因工程药物..... (235)	四、伦理问题 (257)
第一节 表达系统特点和选择 原则..... (235)	第十八章 基因工程疫苗..... (259)
第二节 基因工程药物..... (236)	第一节 基因工程活疫苗..... (259)
一、激素类及神经递质类药物 ... (236)	一、基因缺失活疫苗 (260)
二、细胞因子类药物 (238)	二、基因工程活载体疫苗 (260)
三、酶类药物及凝血因子 (240)	第二节 基因工程亚单位疫苗..... (261)

第四篇 基因工程基本实验

实验一 质粒的小量提取..... (271)	实验四 溴化乙锭——标准 DNA 浓度比较法测定 DNA 浓度..... (277)
实验二 大规模制备质粒 DNA ——碱变性法..... (274)	实验五 基因的 PCR 扩增技术 ... (278)
实验三 紫外吸收检测 DNA 的 浓度与纯度..... (276)	实验六 逆转录 PCR 扩增目的

基因.....	(281)	实验十六 离子交换层析.....	(311)
实验七 DNA 的限制性内切酶		实验十七 亲和层析.....	(315)
酶切及电泳.....	(283)	实验十八 凝胶过滤层析.....	(318)
实验八 DNA 片段回收及连接 ...	(287)	实验十九 蛋白质聚丙烯酰胺	
实验九 感受态细胞的制备及重		凝胶电泳.....	(320)
组 DNA 转化大肠杆菌 ...	(290)	实验二十 蛋白印迹分析.....	(325)
实验十 重组 DNA 的快速制备		实验二十一 蛋白质浓度的测定...	(328)
和鉴定.....	(293)	实验二十二 蛋白质等电点测定...	(331)
实验十一 DNA 探针制备	(296)	附表 1 1982~1998 年美国获准上	
实验十二 菌落(噬菌斑)原位		市生物高技术药物和疫苗	
杂交.....	(298)	一览表	(332)
实验十三 Southern 印迹杂交 ...	(301)	附表 2 国内预防、诊治、治疗用医	
实验十四 Northern 印迹杂交 ...	(304)	药生物技术产品研究开发	
实验十五 大肠杆菌发酵技术.....	(307)	进展	(334)



第一篇

基因的基础理论

原书空白

第一章 基因与基因工程概论

第一节 基因概念的发展

生命科学研究进入 20 世纪以来,基因研究就成了带动分子生物学、分子遗传学特别是基因工程学发展的主线内容。根据不同历史时期的研究水平和特点,基因研究大体上可分为三个阶段:在 20 世纪 50 年代以前,主要从细胞染色体水平上进行研究,属于基因的染色体遗传学阶段;50 年代之后,特别是当 Watson-Crick DNA 双螺旋结构的发现,把遗传学研究引入基因的分子生物学阶段;进入 70 年代,随着以 DNA 重组为中心的基因工程学的不断完善,人们改变了从表型到基因型的传统研究基因的途径,而能够直接从克隆目的基因出发,研究基因的功能及其与表型间的关系,使基因的研究进入反向生物学阶段。

一、基因学说

1866 年,奥地利遗传学家 G. Mendel 根据他坚持近 10 年的豌豆杂交试验,首次提示了遗传学的基本规律,如分离定律和自由组合定律。Mendel 这一工作的重要性在于阐明了遗传不是性状本身,而是决定性状的遗传因子(hereditary factor)。

1909 年,丹麦生物学家 W. Johannsen 根据希腊文“给予生命”之义,创造了基因(gene)一词,并用它代替 Mendel 的 hereditary factor,尽管当时 W. Johannsen 所定义的基因不是物质实体,而仅是一种与细胞的任何可见形态结构毫无关系的抽象单位,但

是,这一术语却一直沿用至今,并发展为决定遗传性状的物质概念。

1910 年, T. H. Morgan 以果蝇为材料,确认遗传物质基础存在于染色体中并提出基因连锁和互换定律。由此, Morgan 在完善 Mendel 遗传规律和遗传的染色体理论的基础上提出了基因论,他指出:“种质(germ plasm)必须由某种独立的要素组成,正是这些要素我们叫做遗传因子,或者更简单地叫做基因”。Morgan 的重大贡献还在于,他第一次将代表某一特定性状的基因同某一特定的染色体联系起来,创立了遗传的染色体理论(chromosomal theory of inheritance)。为随后基因连锁图的建立,染色体上基因的线性排列顺序的发现打下了理论基础。Mendel-Morgan 创立的遗传学定律是基因学说的主要内容。这些定律以及相应的实验方法至今仍被遗传学界广泛地接受和应用。基因学说的缺陷在于当时的基因概念仍缺乏确切的物质内容,因此,不能回答基因的结构特征、基因如何复制和如何控制生物性状等遗传学的重大问题。

二、DNA 是遗传信息的载体

(一)遗传物质是 DNA 的实验依据

Morgan 等人的工作促使基因学说得到了生物学界的普遍认可,但是人们对基因的理解仍缺乏确切的物质内容。真正认识到基因的化学本质是 DNA 分子是通过以下几个

实验得以实现的。

1. 细菌转化实验 1928年, F. Griffith 首先发现了肺炎双球菌(*streptococcus pneumoniae*)的转化现象:把加热杀死的有毒 S 型(有荚膜光滑型)细菌和无毒 R 型(无荚膜粗糙型)活细菌一起注射到小鼠体内,小鼠受感染而死亡,而且它的心脏血液中可以找到活的 S 型细菌,单独注射 R 型细菌或加热杀死的 S 型细菌作为对照,小鼠均不死亡。这个实验表明:加热杀死的 S 型细菌必定以某种方式使 R 型菌转化为 S 型菌。

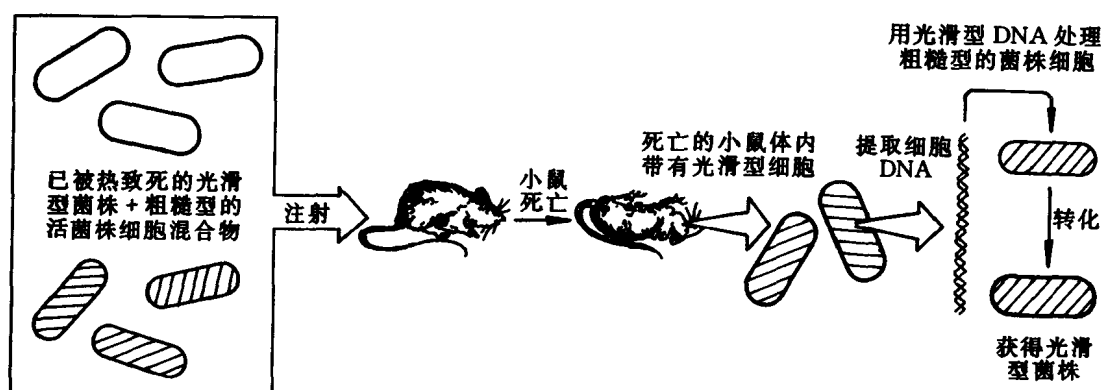


图 1-1 细菌转化的遗传本质是 DNA 分子

无论是被热致死的光滑型肺炎链球菌,还是粗糙型的活的肺炎链球菌,单独注射都不能使小鼠致死,而两者混合物注射则会使小鼠致死。从混合物注射致死的小鼠体内分离出了活的光滑型的肺炎链球菌,在体外将光滑型菌株的 DNA 提取物加到粗糙型菌株的培养物中,也可以使后者转化成为具毒性的光滑型菌株

2. 噬菌体感染实验 1952年, A. Hershey 和 M. Chase 用他们的实验进一步肯定了 Avery 的结论。他们根据噬菌体由蛋白质外壳和 DNA 核心组成,蛋白质中含硫不含磷, DNA 却含磷不含硫等性质,用³⁵S 和³²P 分别标记噬菌体的外壳蛋白质和核心 DNA,随后再用双标记的噬菌体感染大肠杆菌,再分别测定放射量,结果表明:噬菌体的蛋白外壳没有进入细菌体内,只有 DNA 进入到细菌细胞中,新增殖的噬菌体所生成的外壳蛋白质,完全是由带³²P 的亲代 DNA 所决定的。进一步证实了遗传物质是

转化因子是什么? 1944年,美国著名的微生物学家 O. T. Avery 与他的合作者 C. M. Macleod 及 M. McCarty, 重复了 F. Griffith 的转化实验,并进一步对无毒细菌变成有毒细菌的转化物质进行了分离和化学上的鉴定。结果发现,只有 DNA 成分能够将某些 R 型细菌转化成 S 型细胞(图 1-1),而且 DNA 纯度越高,转化效率越大,一旦用 DNA 酶处理 DNA 后,就不发生这种转化。因此,转化实验直接证明了转化因子是 DNA 分子,而不是蛋白质。

DNA 分子,而不是蛋白质(图 1-2)。

(二)双螺旋模型为确认遗传物质只能是 DNA 提供结构基础

如前所述, O. T. Avery 等人为遗传物质是 DNA 还是蛋白质的争论划上了句号。之后,基因是具有一定遗传效应的 DNA 片段的观点被普遍接受。

1953年, J. Watson 和 F. Crick 的 DNA 双螺旋结构模型成为解密 DNA 分子的复制过程的钥匙,特别是 DNA 半保留复制规律的揭示使遗传学家长期感到困惑的基因自我复制问题得到了最后的解决,也为基因存在

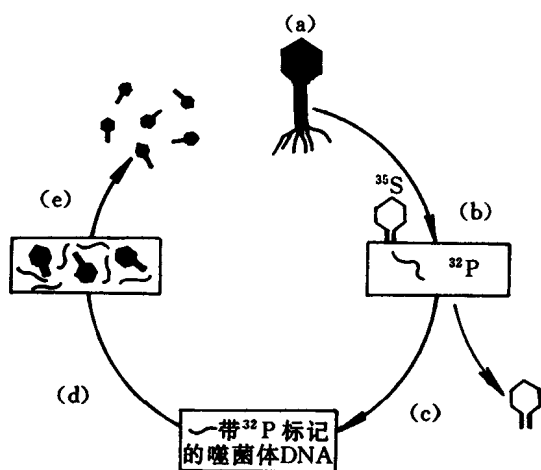


图 1-2 用放射性同位素 ^{35}S 和 ^{32}P 双标记法证明遗传信息的载体是 DNA 而不是蛋白质的 Hershey-Chase 实验示意图

(a)噬菌体的蛋白质外壳只含有 S,因此当其生长在含 ^{35}S 的培养基中时,它的蛋白质便被特异性地标记上,而当噬菌体是在含 ^{32}P 的培养基中增殖时,它的 DNA 也会被特异性地标记上,因为它的外壳蛋白质中没有 P;(b)用这种带上双标记的噬菌体感染大肠杆菌宿主,噬菌体颗粒吸附在细菌上,并将其 DNA 注入细胞内;(c)将感染的细菌培养物在混合搅拌器中剧烈振荡,使吸附在细菌上的已经中空的噬菌体外壳脱落下来;(d)在感染的寄生细胞内,噬菌体 DNA 大量复制(其中只有亲本 DNA 链才带有 ^{32}P 同位素)并装配成子代噬菌体颗粒;(e)宿主细胞破裂,释放出新的子代噬菌体颗粒,其中有少量的噬菌体 DNA 带有 ^{32}P 标记,但没有一个蛋白质外壳具有 ^{32}P 标记

于 DNA,遗传信息可以通过 DNA 的半保留复制而传代下去的认识提供了基础。

三、基因与顺反子

自从 Morgan 第一次把代表某一性状的特定基因与某一染色体上的特定位置相联系之后,在相当长的一段时间里(直至 20 世纪 40 年代中期)人们认为基因是遗传上不可分割的单位,它既是一个遗传的功能单位,也是

一个突变单位和交换单位,即遗传交换只能在基因之间进行而不能发生在基因内部。但是,后来许多研究工作证明并非如此。

T4 噬菌体感染大肠杆菌约 30min,即可使宿主菌裂解死亡,并释放出 100 个左右的子代噬菌体。这种控制宿主细胞致死效应的功能是由该噬菌体的 r II 区编码的。S. Benzer 以一类称作 r II 突变型的 T4 噬菌体为材料进行研究,发现 r II 区可分为 r II A 和 r II B 两个亚区,它们各产生一种特殊的物质。只有这两种物质同时存在时,其宿主菌大肠杆菌 K 株细胞才会发生溶解。用 rIIA 突变型和 r II B 突变型分别感染大肠杆菌 K 株,都不能正常生长使细菌裂解。而用这两种突变型混合感染 K 株细菌时,就能像未发生突变的野生型 T4 噬菌体一样正常生长并行使功能。这表明,r II A 和 r II B 是互补的突变型。在 r II A 亚区发生了突变的 T4 噬菌体,可以和在 r II B 亚区发生突变的 T4 噬菌体互补,但它们都不能跟与自己一样在同一亚区内发生突变的任何 T4 噬菌体互补。显然, r II A 和 r II B 是两个不同的功能单位。1955 年, S. Benzer 正式使用“顺反子”(cistron)这一术语,将这两个亚区分别叫做 r II A 顺反子和 r II B 顺反子。

由此可见:每一个顺反子就是一段核苷酸序列,在功能单位的意义上讲,一个顺反子相当于一个基因的 DNA 或 RNA 单元,它的产物是一种完整的肽链或者 RNA 分子。但是一个顺反子包含着许多突变单位和重组单位,因此,一个突变顺反子的遗传效应能用反式构型的野生拷贝进行互补产生。以上说明,基因不是最小单位,它仍然是可分的。这就不同于以往的基因是“功能、突变、重组”三位一体的概念。

1961 年, F. Jacob 和 J. Monod 提出的操纵元概念中,将基因分为结构基因、调节基因和所谓“操纵基因”(operator gene)以及后来发现的所谓“启动基因”(promoter gene)。

很显然,“操纵基因”和“启动基因”概念与顺反子学说是相悖的,即这两个所谓“基因”的突变拷贝是无法用反式构型中的野生拷贝进行互补的,因为它们不编码可在细胞内扩散的产物(蛋白质或 RNA)。鉴于上述原因,目前将这两类“基因”改为 operator(操纵子)和 promoter(启动子)或者 operator site(操纵位点)和 promoter region(启动区)。

四、基因在 DNA 顺序上的多样性

(一)基因的不连续性

基因不连续性是真核类基因的普遍现象,这样的基因称为断裂基因(split gene),是指基因编码序列在 DNA 分子中是不连续的,为不编码序列所间隔。与编码产物无关的间隔区称为内含子(intron),编码序列称为外显子(exon)。断裂基因的表达程序是:先转录成不均一的细胞核 RNA(hnRNA),即前体 RNA,然后经剪接去除内含子,形成有功能的 mRNA、rRNA 和 tRNA 分子。

(二)基因的重叠性

基因的重叠性又称重叠基因(overlapping gene),是指同一段 DNA 顺序中含有 2 种以上基因的现象。基因重叠可以是部分顺序重叠,也可以是一个基因存在于另一个基因中。

遗传密码由三个碱基组成,在理论上,当一段 DNA 顺序中存在二种或三种不同相的开放阅读框(open reading-frame, ORF),它们均可能被细胞的翻译机构所识别。目前,基因重叠现象仅发现于一些噬菌体和病毒基因组中。

(三)重复序列(repeated sequence)

重复序列是指在一个 DNA 分子中出现不止一次的序列,重复序列可彼此相同方向(正向重复),也可以相反方向(反向重复)。

目前已知,几乎所有真核类基因组(除单细胞的酵母以外)中,都存在重复序列。

1. 重复序列类别 根据重复程度,可以将 DNA 序列分为三种类型:①单一或轻度重复序列,基因组中只有一个拷贝或重复频率很低的序列;②中等重复序列,重复次数几十次到几百次的序列;③高度重复序列,重复次数几百次到几百万次的序列。

一般而言,真核生物的大多数蛋白质基因是单一序列,极少数为中等重复序列,编码 rRNA 和 tRNA 的基因均属中等重复序列。中等重复序列中的大多数虽被转录但无编码产物,这类序列平均长约 300bp,真核类基因中常有数千种这类序列,每种平均重复数百次,散布在单一序列之间,构成一个序列家族(如 Alu 家族),它们的作用与基因调控有关。

高度重复序列长度多为 2~10bp,一般都不被转录,呈串联集中分布,有些高度重复中 A、T 含量很高,在密度梯度超离心时形成所谓卫星 DNA。高度重复序列一般都处于异染色质部分或染色体上的中心粒或端粒附近,可能与细胞分裂时染色体运动有关。

2. 基因家族 基因家族是指来源相同、结构相似和功能相关的一组基因,例如血红蛋白基因家族。从广义上说,一个基因家族的各个基因可以看成是重复基因。

五、基因的移动性

基因的移动性是相对于基因组中基因位置、数目和功能静止不变的概念而言,在一定条件下,细胞内的 DNA 分子发生有规律的断裂——复合,导致 DNA 序列重新排列,即所谓遗传重组或基因重组,根据重组条件,有以下几种类型的重组。

(一)同源重组

同源重组是指发生在 DNA 同源序列之间的重组,其特点是相应的酶以任一同源序列为基质,但重组频率在整个基因组中并非恒定,并受染色体结构的影响。真核生物非姐妹染色体的交换,姐妹染色体的交换,细菌