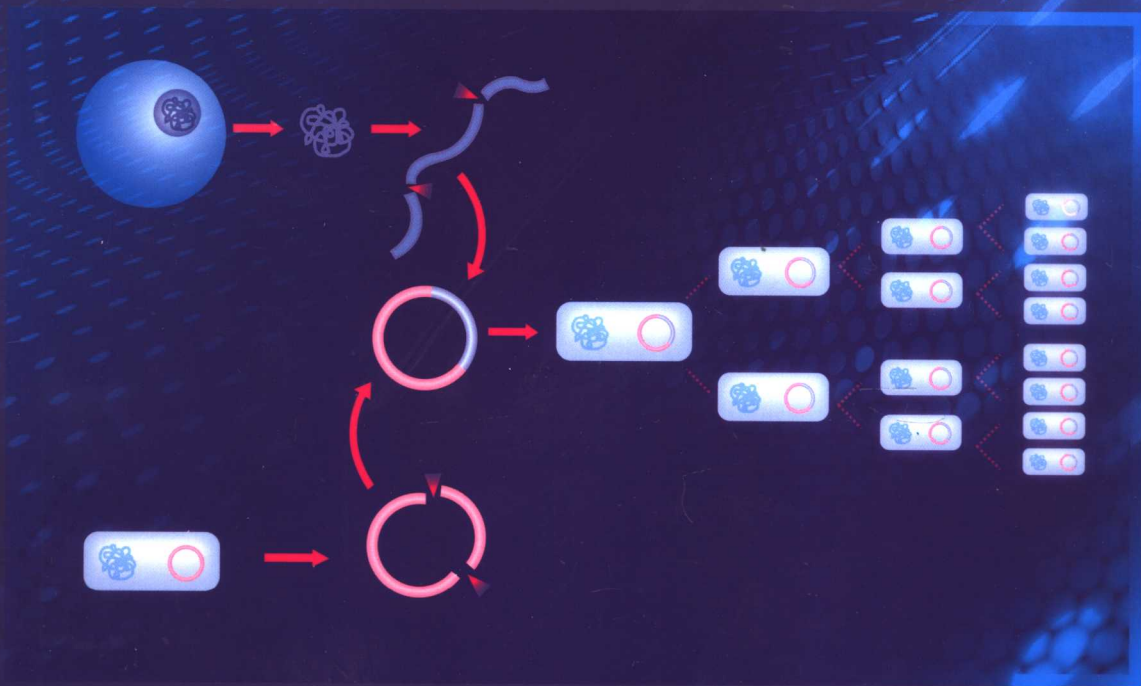


高等学校教材

G
ENE ENGINEERING
TECHNOLOGY

基因工程技术

钟卫鸿 主编



化学工业出版社

高等学校教材

GENE ENGINEERING
TECHNOLOGY

基因工程技术

钟卫鸿 主编



化学工业出版社

·北京·

本书按照原理支持技术、理论服务应用、经典知识结合现代进展的思路,在讲述了基因和基因工程概念和分子生物学知识的基础上,详细阐述了基因工程的基本技术,涵盖工具酶的选择、基因工程载体的构建、目的基因的获取、重组基因的导入和重组子的筛选鉴定以及基因表达系统的选择策略等内容,并融入了基因工程技术的操作方法和最新进展。最后,本书介绍了基因工程技术在医学、农业、环境保护和工业领域的应用进展。全书图文并茂,便于读者学习理解。

本书可作为高等院校生物工程、生物制药、食品工程等专业师生的教材,也可供环境工程、生物医学等相关专业的研究人员和师生参阅。

图书在版编目 (CIP) 数据

基因工程技术/钟卫鸿主编. —北京: 化学工业出版社, 2007. 6

高等学校教材

ISBN 978-7-122-00394-2

I. 基… II. 钟… III. 基因-遗传工程 IV. Q78

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2007) 第 063140 号

责任编辑: 梁静丽 郎红旗
责任校对: 陶燕华

装帧设计: 张 辉

出版发行: 化学工业出版社 (北京市东城区青年湖南街 13 号 邮政编码 100011)

印 刷: 北京市振南印刷有限责任公司

装 订: 三河市宇新装订厂

787mm×1092mm 1/16 印张 17 $\frac{3}{4}$ 字数 468 千字 2007 年 7 月北京第 1 版第 1 次印刷

购书咨询: 010-64518888 (传真: 010-64519686) 售后服务: 010-64518899

网 址: <http://www.cip.com.cn>

凡购买本书, 如有缺损质量问题, 本社销售中心负责调换。

定 价: 29.80 元

版权所有 违者必究

编写人员名单

钟卫鸿 张礼星 崔志峰 陈振明

邱乐泉 钟 莉 朱廷恒

前 言

由于分子生物学和基因工程技术的快速发展,尤其是2001年人类基因组计划的完成及与其他学科领域的交叉渗透,对基因工程技术的理论和实践在各个层面上均产生了巨大的推进和影响作用。国内高校的生物技术或生物工程类专业纷纷开设了基因工程及相关方向的课程,包括理论和实验课程。笔者从2000年开始在浙江工业大学生物工程专业开始讲授基因工程课程,在教学中强调将基因工程技术理论与实验指导结合的教学模式,这有利于基因工程技术教学取得良好的效果。该课程于2005年被列为浙江省精品课程。但国内配套这种教学模式的教材尚未见出版。因而,我们在自编讲义《基因工程技术》和《基因工程实验指导》的基础上,尝试编写并出版《基因工程技术》和《基因工程技术实验指导》配套姐妹教材,既是浙江省精品课程建设的需要,也是该类教材出版的一种新尝试。

《基因工程技术》在编写中强调原理与技术、理论与应用、经典与现代的结合,全书分四篇共十七章介绍基因工程技术的原理、方法及应用。第一篇“基因与基因工程概述”,简述人们对基因和基因组的认识发展过程及基因工程的概念和发展概况;第二篇“基因工程的分子生物学基础”,简述核酸复制、转录和翻译过程的机制和基因表达的调控;第三篇“基因工程基本技术”,围绕工具酶、载体、受体表达系统以及目的基因的获得等要素阐述了基因工程技术的方法和最新进展;第四篇“基因工程技术应用”,介绍了基因工程技术在医学、农业、工业和环境保护等领域的应用情况。

本书编写人员由从事基因工程教学和科研的专业人员组成,他们大都具有国外博士后工作经验。其中,张礼星负责编写第二篇;崔志峰负责编写第十二章;陈振明负责编写第十章;朱廷恒负责编写第十五章;邱乐泉负责编写第十四章;钟莉负责编写第一、二章;崔志峰、邱乐泉、钟卫鸿共同编写第九章;钟卫鸿教授任全书主编并负责编写第三、八、十一、十三、十六、十七章。另外柳华贵、孙柯丹、陈君、张毅、金陵等为本教材书稿的资料整理、文字校对和排版等做了不少工作。同时要感谢“浙江工业大学重点教材建设项目”的资助以及编写和出版过程中化学工业出版社的支持和帮助。

由于基因工程技术快速发展,资料浩瀚,虽然编写过程中力求内容上反映最新理论研究和最新技术进展,增加一些实用的最新信息,但限于篇幅和作者水平,仍然会有疏漏和不当之处,恳请广大读者和专家批评指正。

钟卫鸿

2007年5月

目 录

第一篇 基因与基因工程概述

第一章 基因概念的发展	1
一、经典遗传学关于基因的概念	2
二、分子遗传学关于基因的概念	3
三、基因的顺反子与操纵子概念	5
四、基因的多样性	7
五、基因重组	11
六、基因及其产物	12
第二章 基因组的结构	14
一、基因的基本结构	14
二、病毒基因组	15
三、细菌基因组	20
四、真核生物基因组	22
五、染色体外 DNA	29
第三章 基因工程概述	36
一、基因工程的诞生	36
二、基因工程的定义及主要研究内容	38
三、基因工程的发展概况	39
四、基因工程的安全性问题	41

第二篇 基因工程的分子生物学基础

第四章 DNA 分子的复制	43
一、DNA 合成的化学基础	44
二、DNA 聚合酶的作用机制	44
三、DNA 分子复制的一般特点	47
四、复制叉	48
五、DNA 聚合酶的特异化	51
六、DNA 复制的起始	52
七、复制起始的机制	55
八、结合和解旋	56
九、DNA 复制的复杂调控过程	59
十、复制结束	61
十一、DNA 分子复制的高度精确性和准确性	64
第五章 RNA 的转录和加工	65
一、RNA 的结构	65
二、RNA 的种类	66

三、RNA 合成的基本特征	67
四、RNA 聚合酶	67
五、与转录调控有关的 DNA 序列——启动子	68
六、RNA 的转录周期	70
七、RNA 转录后加工	79
八、逆转录和逆转录酶	85
第六章 翻译——蛋白质的生物合成	87
第一节 遗传密码	87
第二节 参与蛋白质生物合成的生物大分子及其功能	89
一、转移 RNA	89
二、氨酰 tRNA 合成酶	90
三、信使 RNA	92
四、核糖体	93
五、各种蛋白质因子	94
第三节 蛋白质生物合成的过程	96
一、基本概念	96
二、蛋白质合成的起始	97
三、多肽链合成的延伸	98
四、多肽链合成的终止	101
五、多肽链合成的校对机制	103
六、真核细胞和原核细胞蛋白质合成的不同	104
第四节 蛋白质翻译后的修饰和加工	105
一、末端氨基的脱乙酰化和 N 端甲硫氨酸的切除	105
二、多肽链的水解断裂	106
三、氨基酸侧链的修饰	106
四、蛋白质的折叠	107
五、分子伴侣及其折叠	108
第七章 基因表达的调控	110
第一节 原核生物基因表达的调控	110
一、转录调控的原理	110
二、转录起始的调控	112
三、转录起始后的基因调控	115
第二节 真核生物基因表达的调控	119
一、真核生物基因表达调控的特点	119
二、真核生物基因转录调节的保守机制	120
三、通过活化子募集基因结合的蛋白复合体	123
四、信号整合与组合的控制	126
五、信号转导对转录调节子的调控	127
六、转录的负调控	128
七、转录起始后的真核基因调节	131
八、基因调节中的 RNAi	133

第三篇 基因工程基本技术

第八章 基因工程技术的工具酶及其应用	136
第一节 限制性内切酶	136
一、限制性内切酶的命名方法	137
二、限制性内切酶的识别特点	137
三、限制性内切酶的切割方式	137
四、内切酶的星号活性	138
第二节 其他工具酶	138
一、DNA 聚合酶	138
二、DNA 连接酶	140
三、S1 核酸酶	140
四、 <i>Bal31</i> 核酸酶	140
五、碱性磷酸酶	140
六、逆转录酶	141
第九章 基因工程载体及其选用	142
第一节 质粒	142
一、质粒的一般特性	142
二、组建理想质粒载体必备的条件	143
三、常用的质粒载体	144
第二节 噬菌体载体	146
一、 λ 噬菌体	146
二、 λ 噬菌体载体	147
三、柯斯质粒	148
四、M13 噬菌体载体	150
第三节 酵母质粒	151
一、酵母 $2\mu\text{m}$ 质粒的生物学特性	151
二、酵母质粒 DNA 的制备和纯化	155
三、酵母质粒载体	155
四、酵母人工染色体	156
五、表达载体	157
第四节 常用的真核病毒载体	157
一、腺病毒载体	157
二、痘病毒载体	159
三、逆转录病毒载体	161
四、单纯疱疹病毒载体	162
五、猴病毒 40 载体	163
第十章 目的基因的获得	165
第一节 已知序列基因的克隆	165
一、外源 DNA 片段的获得	165
二、目的 DNA 片段的克隆	166
三、重组子的筛选与鉴定	167
四、目的基因的确定及分析——DNA 序列测定	169

第二节 未知序列基因的克隆	171
一、基因克隆和分离的步骤	171
二、cDNA 克隆	173
三、目的 cDNA 克隆的筛选	175
四、目的 DNA 的结构及功能分析	180
第三节 基因克隆策略新进展	184
一、基于生物大分子间相互作用的 cDNA 克隆策略	184
二、比较并克隆组织或细胞间差异表达基因 cDNA 的策略	187
三、表型相关基因组基因的克隆策略	189
四、基于生物信息学的基因克隆策略	190
第十一章 重组基因的导入和鉴定	191
第一节 基因转移的方法	191
一、基因转移的物理方法	191
二、基因转移的化学方法	192
三、基因转移的生物方法	192
第二节 重组体的筛选与鉴定	193
一、遗传检测法	193
二、物理检测法	194
三、菌落或噬菌斑杂交筛选法	195
四、免疫化学检测法	195
五、DNA-蛋白质筛选法	195
六、转译筛选法	195
第十二章 外源基因表达系统	197
第一节 大肠杆菌表达系统	197
一、大肠杆菌表达系统的特点	197
二、大肠杆菌表达载体重要调控元件	197
三、常用大肠杆菌表达系统举例	198
四、大肠杆菌表达系统存在的问题	201
第二节 酵母表达系统	203
一、酵母表达系统的特点	203
二、啤酒酵母表达系统	204
三、毕赤酵母表达系统	206
第三节 昆虫细胞表达系统	207
一、昆虫细胞表达载体	208
二、昆虫细胞宿主	209
三、重组病毒载体的转染	210
四、分泌产物的表达与检测	210
五、昆虫细胞表达系统的缺点	211
第四节 哺乳动物细胞表达系统	212
一、哺乳动物细胞表达载体	212
二、哺乳动物细胞宿主	214
三、哺乳动物细胞表达系统	214
四、哺乳动物细胞高效表达载体的构建	215

五、宿主细胞的改造	218
第十三章 外源基因在宿主细胞中的高效表达	220
一、有效的转录起始与基因的高效表达	220
二、mRNA 的有效延伸和转录终止与基因的高效表达	220
三、mRNA 的稳定性与基因的高效表达	221
四、有效的翻译起始与基因的高效表达	221
五、遗传密码应用的偏倚性与基因的高效表达	222
六、mRNA 的二级结构与基因的高效表达	224
七、RNA 的加工与基因的高效表达	224
八、mRNA 序列上终止密码的选择	224
九、表达质粒(或载体)的拷贝数及稳定性与基因的高效表达	224
十、外源蛋白的稳定性与基因的高效表达	225
十一、减少基因沉默提高外源基因表达效率	225

第四篇 基因工程技术应用

第十四章 转基因技术与基因治疗和药物生产	227
第一节 转基因技术与基因治疗	227
一、基因治疗的实施条件	227
二、基因治疗的策略	227
三、基因治疗的方法	228
四、基因治疗的优点	229
五、基因治疗的临床应用	230
第二节 转基因技术与药用蛋白的生产	231
一、基因工程抗体	232
二、基因工程疫苗	233
三、重组细胞因子	235
第十五章 转基因技术与农业	240
第一节 转基因农作物	240
一、抗虫农作物	241
二、抗病害农作物	242
三、抗除草剂农作物	245
四、抗胁迫农作物	246
五、转基因技术与细胞质雄性不育	248
第二节 转基因植物与日常生活	249
一、转基因植物与服装	249
二、转基因园艺植物	250
三、转基因食品和饮料	251
四、植物基因工程疫苗	253
第三节 转基因动物	254
一、转基因技术与畜禽生产性状改良	255
二、转基因技术与抗病品系培育	255
三、转基因动物反应器	255

第十六章 基因工程技术与环境保护	257
第一节 转基因植物与植物修复技术	257
一、重金属污染植物修复技术	257
二、转基因植物的重金属污染修复技术	257
第二节 构建基因工程菌的构建与污染控制	260
一、优化污染物的降解途径的基因工程	260
二、提高污染物生物可利用性的基因工程	262
三、增强细菌的环境适应性的基因工程	262
第十七章 基因工程技术与工业	264
第一节 基因工程技术与制药工业	264
第二节 基因工程技术与食品工业	265
一、食品生物资源的改造	266
二、提高食品品质和改善食品风味	266
三、食品卫生检测	267
四、基因食品的安全性	267
第三节 基因工程技术与饲料工业	268
一、饲料作物的基因修饰	268
二、提高饲料营养价值的手段	268
三、基因工程酶制剂	268
第四节 基因工程技术在其他工业中的应用	269
一、生物能源和燃料	269
二、木质素和造纸	269
三、塑料	269
参考文献	271

第一篇 基因与基因工程概述

第一章 基因概念的发展

基因的概念随着遗传学、分子生物学、生物化学、微生物学等领域的发展而不断突破和完善。在遗传学发展的早期阶段，基因仅仅是一个逻辑推理的概念，而到了现代，遗传学对基因的认识不再局限于是一种已经证实了的物质和结构，而且不断深入细致，目前遗传学家认为，应该把基因看做是 DNA 分子上具有特定功能（或具有一定遗传效应）的核苷酸序列，包括合成有功能的蛋白质、多肽链或 RNA 所必需的全部核苷酸顺序（通常是 DNA 顺序）。

早在 1865 年，遗传学的奠基人孟德尔（Johann Gregor Mendel, 1822—1884）就在豌豆试验中提出了抽象的“遗传因子”概念，1909 年遗传学家约翰森（W. L. Johannsen, 1857—1927）提出“基因（gene）”的概念代替“遗传因子”，遗传学开始用“基因”这一名词来表示遗传的独立单位。在 20 世纪 30 年代，由摩尔根（Thomas Hunt Morgan, 1866—1945）证明了基因是以直线的形式排列在染色体上，他认为基因是染色体上的最小遗传单位，并且提出基因是功能、突变、重组三位一体的不可分割的单位。20 世纪 50 年代以后，随着分子遗传学的发展，沃森（James Dewey Watson, 1928~）和克里克（Francis Harry Compton Crick, 1916~）提出了 DNA 的双螺旋结构，之后人们普遍认为基因是 DNA 的片段，确定了基因的化学本质。20 世纪 60 年代，本泽（S. Benzer, 1921~）又提出基因内部具有一定的结构，可以区分为突变子、重组子和顺反子三个不同单位：DNA 分子上一个碱基的变化可以引起基因突变，因此可以看成是一个突变子；两个碱基之间可以发生互换，可以看成是一个互换子；一个顺反子是具有特定功能的一段核苷酸序列，作为功能单位的基因应该是顺反子。基因内部突变子、重组子的发现，表明基因是可以分割的，从而打破了摩尔根提出的基因三位一体的概念。

从分子水平来看，基因就是 DNA 分子上的一个个片段，经过转录和翻译能合成一条完整的多肽链。现在由于发现了许多非编码基因而修正了这个概念，过去认为基因都是可以表达的，现在发现了许多非表达基因，通过近年来的研究，发现有些基因在转录产生 RNA 以后，不再翻译成蛋白质，如 rRNA 和 tRNA 就属于这种类型；另外，还有一类基因，如操纵基因，它们既没有转录作用，又没有翻译产物，仅仅起着控制和操纵基因活动的作用。特别是近年来发现，在 DNA 分子上有相当一部分片段，只是某些碱基的简单重复，这类不含有遗传信息的碱基片段，在真核细胞生物中数量可以很大，甚至达 50% 以上。把基因看成是一段连续的 DNA 序列的认识已被后来发现的断裂基因所修正；把基因看成是一段固定的 DNA 序列的认识则随着许多可移动基因（moveable gene）的发现而被修正；基因是 DNA 链上的一段独立序列的认识也随着许多重叠基因（overlapping gene）发现而需要修正；长期以来，认为基因始终在 DNA 上、遗传信息流总是从 DNA→RNA 的概念也需要修正，因为逆转录酶（reverse transcriptase, RT）证明了遗传信息可以从 RNA 反向流到 DNA，特别是反转子（retron）、反转录转座子（retrotransposon）等的发现，使基因的概念得到了很大的发展。由此可见，由于科学研究水平的不断提高，由浅入深，由宏观到微观，基因的概念也在不断地修正和发展。

本章将按照基因概念的发展和演变过程进行详细介绍。

一、经典遗传学关于基因的概念

生物体的性状在亲代和子代之间存在遗传和变异的现象，性状是由什么决定的？性状的遗传规律是怎样的呢？问题的答案最早是在 1866 年由现代遗传学之父——奥地利生物学家孟德尔 (Mendel, 1822—1884) (图 1-1) 找到的。他进行了 8 年的豌豆杂交试验，提出了性状的遗传遵循两个基本规律，即分离定律和自由组合定律，并认为生物的性状是由“遗传因子”决定的。



图 1-1 孟德尔
(1822—1884)

1856 年，孟德尔开始用豌豆做杂交试验，他的初衷只是希望获得优良品种，在试验的过程中，逐步把重点转向了探索遗传规律。孟德尔挑选出 22 个豌豆品种用于试验，它们都具有某种可以相互区分的稳定性状，例如高茎或矮茎、圆种子或皱种子、灰色种皮或白色种皮等。经过 8 个寒暑的辛勤劳作，孟德尔发现了生物遗传的基本规律，并得到了相应的数学关系式。人们分别称他的发现为“孟德尔第一定律——分离定律”和“孟德尔第二定律——自由组合定律”，它们揭示了生物遗传奥秘的基本规律。除

了豌豆以外，孟德尔还对其他植物做了大量的类似研究，其中包括玉米、紫罗兰和紫茉莉等，以期证明他发现的遗传规律对大多数植物都是适用的。从生物的整体形式和行为中很难观察并发现遗传规律，而从个别性状中却容易观察。孟德尔不仅考察生物的整体形式，更着眼于生物的个别性状，这是他与以往生物学家的重要区别之一。孟德尔选择的试验材料也非常科学。因为豌豆属于具有稳定品种的自花授粉植物，容易栽种，容易逐一分离计数，这对于他发现遗传规律提供了有利的条件。孟德尔并未描述过基因，也没有观测到基因以及使用“基因”这个词。但他发现了遗传定律，通过繁育豌豆，画出其结果图，再经分析、验证而得出了卓越的结论。孟德尔发现，在预先可测知规律控制下的组合，亲代可将其独特的特性传给子代。

孟德尔清楚自己的发现所具有的划时代意义，但他还是慎重地重复实验了多年，以期更加完善。1865 年，孟德尔总结出著名的遗传规律，在布尔诺 (Brno) 自然科学学会宣读了他的论文《植物杂交试验》(*Experiments in Plant Hybridization*)，尽管绝大多数与会者是学会会员，其中既有化学家、地质学家，也有生物学专业的植物学家、藻类学家，但听众对连篇累牍的数字和繁复枯燥的论证毫无兴趣，他们跟不上孟德尔的思维，因此无法估计孟德尔发现的重要性。第二年，孟德尔在学会的杂志上发表了得到的试验结果，也没引起科学界的注意。孟德尔的论文在此后 30 余年中未被科学界所知。

1881 年，德国学者编了一本植物学杂交论文的目录，力求无所不包，孟德尔的论文很幸运地被列了进去，并最终导致了在 1900 年被三位生物学家——荷兰的德弗里斯 (Hugo De Vries, 1848—1935)、德国的柯灵斯 (Carl Erich Correns, 1864—1933) 和澳大利亚的契马克 (Erich von Tschermak-Seysenegg, 1871—1962) 同时独立地“重新发现”孟德尔遗传定律，从此，遗传学进入了孟德尔时代。

德弗里斯用月见草为研究材料研究遗传变异规律。1900 年，德弗里斯认为自己已发现了遗传定律，将论文分寄至法兰西科学院和德国植物学学会。法语版的论文先登了出来，柯灵斯读了以后，发觉实际上就是孟德尔所发现的定律，就给德弗里斯寄去了一份孟德尔的论文。德弗里斯赶在德语版论文出来之前，匆忙在论文中加注了孟德尔的论文，但声明“在实验就要全部完成并已得出结论后，才读到孟德尔的论文”。

柯灵斯也在做植物杂交的实验，在德弗里斯之后也赶紧发表了实验结果。他在论文中提到了孟德尔，但也像德弗里斯一样，声明是在自己独立地发现了遗传定律之后才读到孟德尔的论文的。

契马克也在几星期后发表了论文，在论文中引用了孟德尔，但同样称自己独立地发现了遗传定律，然后才验证孟德尔的实验。不论他们发表论文的动机如何，这三位著名的生物学家在一年之内同时发表论文宣扬孟德尔，使孟德尔定律很快引起了生物学界的重视。生物学界掀起了验证孟德尔定律的热潮。

1909年，丹麦生物学家约翰逊（Wilhelm Ludwig Johannsen, 1857—1927）根据希腊文“给予生命”之义，创造了“基因（gene）”一词，并用这个术语代替孟德尔的“遗传因子”。不过他所说的基因并不代表物质实体，而是一种与细胞的任何可见形态结构毫无关系的抽象单位。因此，那时所指的基因只是遗传性状的符号，还没有具体涉及基因的物质概念。

1910年，摩尔根（Thomas Hunt Morgan, 1866—1945）（图1-2）及其同事以果蝇、玉米为材料，经过大量研究，建立了以基因和染色体为主体的经典遗传学。摩尔根对基因学说的建立做出了卓越的贡献。1915~1928年，他和他的助手以果蝇作为实验材料，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。随后遗传学家又应用当时发展的基因作图（gene mapping）技术，构筑了基因的连锁图，进一步揭示了在染色体载体上基因是按线性顺序排列的。



图1-2 摩尔根
(1866—1945)

综上所述，概括经典遗传学关于基因的概念有如下几个要点：

① 基因是不连续的颗粒状因子，在染色体上有固定的位置，并且呈直线排列，具有相对的稳定性；

② 基因作为一个功能单位控制有机体的性状表达；

③ 基因以整体进行突变，是突变的最小单位；

④ 基因在交换中不再被分割，是重组的最小单位；

⑤ 基因能自我复制，在有机体内通过有丝分裂有规律地传递，在上下代之间能通过减数分裂和受精作用有规律地传递。

从上述可知，经典遗传学认识到了基因既是一个结构单位，又是一个功能单位，但关于基因是什么物质构成的，基因的本质是什么，经典遗传学无法回答。

二、分子遗传学关于基因的概念

1. 肺炎链球菌转化实验

英国微生物学家格里菲思（Griffith）于1928年就发现：将肺炎链球菌无毒型的R型活细菌注入，小鼠不死亡；将有毒型的S型活细菌注入，小鼠死亡；将灭活的有毒型的S型细菌注入，小鼠不死亡；将无毒性的R型细菌与灭活的有毒型的S型细菌混合注入小鼠，小鼠死亡。格里菲思由此推测，在S型的死菌体中必有一种转化因子，能使R型转化为S型，而且这种转化可以遗传给后代。他和他的合作者在纽约进行细菌转化的研究，实验材料是肺炎链球菌，结果说明，使细菌性状发生转化的因子是DNA（即脱氧核糖核酸），而不是蛋白质或RNA（即核糖核酸）。

1945年，加拿大生物化学家艾弗里（Oswald Theodore Avery, 1877—1955）和他的同事用体外的转化实验证明基因的化学本质就是DNA分子（图1-3）。他们在格里菲思转化实验的基础上从活的S型菌中分离出蛋白质、荚膜的成分（黏多糖）和DNA，将这几种成分分别同活的R型菌混合培养，发现只有DNA能使活的R型转化为S型，即使无荚膜、不致病的转化为有荚膜、能致病的肺炎链球菌。如果用酶将DNA分解，则不会转化。证明了格里菲思所说的转化因子就是DNA。这项实验第一次证明了遗传物质是DNA而不是蛋白质。这一十分重要的成果却引起很大争论，一方面受传统思想的影响，很多人怀疑他所分离出的DNA不

纯，可能还是混杂的蛋白质在起作用；但是这一成就无疑地也刺激了人们对 DNA 化学组成和晶体结构的研究。虽然这一发现曾引起争论和怀疑，但的确推动了 DNA 的研究，直至 1953 年 DNA 双螺旋结构的发现。

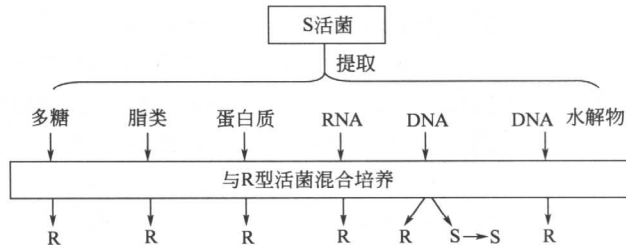


图 1-3 体外转化实验

2. 噬菌体重组实验

1952 年，美国微生物学家赫尔希 (Alfred Day Hershey, 1908—1997) 等人设计了噬菌体重组实验，将蛋白质和 DNA 完全分开，单独观察 DNA 的作用，证实了传递遗传信息的是 DNA 而不是蛋白质。他们的实验材料是 T2 噬菌体，实验证实，进入细菌细胞的噬菌体是核酸，进而说明，携带遗传信息的是核酸，而不是蛋白质。噬菌体的 DNA 不但包括噬菌体自我复制的信息，而且包括合成噬菌体蛋白质所需要的全部信息。

这一重大的发现轰动了整个生物界。因为当时许多研究者都认为，只有像蛋白质这样复杂的大分子才能决定细胞的特征和遗传。而艾弗里等人的工作打破了这种信条，在遗传学理论上树起了全新的观点，即 DNA 分子是遗传信息的载体。1952 年，赫尔希和他的学生共同发表报告，肯定了艾弗里的结论。此后，再也无人怀疑 DNA 是遗传物质了。

3. DNA 的 X 射线衍射与 DNA 螺旋结构

1950 年，爱尔兰科学家威尔金斯 (Maurice Wilkins, 1916~) 的研究小组测定了 DNA 在较高温度下的 X 射线衍射，由于测定中保持了 DNA 纤维的湿润状态，得到了精美的图片。

英国女科学家罗沙琳德·弗兰克林 (Rosalind Franklin, 1920—1958, 图 1-4)，获取了不同温度下 DNA 的 X 射线晶体衍射图，把各种局部的结构汇总后，DNA 的衍射图片就越来越全面。1952 年 5 月她也获得了一张清晰的 DNA 的 X 射线晶体衍射图片。



图 1-4 罗沙琳德·弗兰克林 (1920—1958)



图 1-5 沃森 (Waston) (1928~) 和克里克 (Crick)

1951 年，Waston 前住意大利参加生物大分子结构会议。威尔金斯和弗兰克林关于 DNA 的 X 射线晶体衍射图分析报告吸引了 Waston。博士毕业后，Waston 在英国的卡文迪什实验室与 Crick 相遇并共同研究 DNA 的结构。起初，Waston 与 Crick 认为 DNA 的螺旋结构应该

是三螺旋，并开始了“搭积木”式的研究（图 1-5）。Waston 与 Crick 按照他们的理解搭出了 DNA 三螺旋的结构。虽然受威尔金斯和弗兰克林的报告的启发，但是，DNA 具体是一个什么样的螺旋结构，是双链、三链还是四链的，Waston 和 Crick 心中并没有谱。

在 1953 年 2 月 14 日的讨论中，威尔金斯出示了一幅弗兰克林获得的非常清晰的 DNA X 射线晶体衍射图片。这张照片突然激发了 Waston 头脑中的思维，DNA 链只能是双链的才会显示出这样漂亮而清晰的图像。1953 年 2 月 28 日，Waston 和 Crick 重新搭建出了正确的 DNA 双螺旋结构。1953 年 4 月 25 日《自然》杂志发表了 Waston 与 Crick 的 DNA 双螺旋结构假说——不到 1000 字的短文《核酸的分子结构——脱氧核糖核酸的一个结构模型》，并配有威尔金斯和弗兰克林的两篇文章，以支持 Waston 和 Crick 的假说。后来鲍林和其他科学家的研究也从不同方面证明了 DNA 的双螺旋结构。一个月后，Waston 与 Crick 在《自然》杂志上又发表一篇论文，讨论了遗传物质复制的机制。DNA 双螺旋结构的发现标志着分子生物学从此诞生。它不仅说明了 DNA 为什么是遗传信息的携带者，而且说明了基因的复制和突变等机理。

4. RNA 作为遗传物质的发现

随着研究的深入，人们已经了解到生物界并非所有的基因都是由 DNA 构成的，如某些病毒和噬菌体的遗传物质基础是 RNA。1956 年，德国科学家吉尔（Alfred Gierer）和施拉姆（G. Schramm）在研究烟草花叶病毒时，首先发现了 RNA 分子能够传递遗传信息，同时他们还发现烟草花叶病毒的 RNA 在感染的植株叶片中能够诱导合成新的病毒颗粒。

综上所述，最初由孟德尔提出的遗传因子（hereditary factor）的概念，通过摩尔根、艾弗里、赫尔希和 Waston、Crick 等数位科学家的研究，终于明确了生物遗传的物质基础是 DNA。科学家们围绕 DNA 的结构和作用继续开展研究，取得了一系列重大进展。1961 年，美国生物学家尼伦伯格（Marshall Warren Nirenberg, 1927~）等人成功破译了遗传密码，以无可辩驳的科学依据证实了 DNA 双螺旋结构的正确性。现在，基因已经以一种真正的分子物质呈现出来，不再是一种神秘成分了。科学家可以像研究其他大分子一样，客观地探索基因的结构和功能，并已经开始向控制遗传机制、防治遗传疾病、合成生命等更大的造福于人类的工作方向前进。

三、基因的顺反子与操纵子概念

1. 顺反子概念

自从摩尔根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，分子遗传学的进一步发展使人们对基因的化学本质有了正确的认识，而对于基因的精细结构的研究又使人们对基因本质的认识迈进了一大步。

1955 年，美国的本泽（S. Benzer, 1921~）用 *E. coli*（大肠杆菌）T4 噬菌体作为材料，研究快速溶菌（rapid lysis）突变型 rII 的基因精细结构，发现在一个基因内部的许多位点可以发生突变，并可以在这些位点之间发生交换，从而说明一个基因是一个遗传功能单位，但并不是一个突变单位和交换单位，因此，一个基因可以包括许多突变单位和许多重组单位。

T4 噬菌体感染 *E. coli* 引起溶菌，突变型 rII 会产生大而边缘清楚的噬菌斑（即快速溶菌），而野生型 rII⁺ 的噬菌斑小而边缘模糊，如表 1-1。Benzer 对快速溶菌突变型 rII 进行了详细而深入的研究。

通过互补测验，Benzer 发现：rII 突变型可分成 rII A 和 rII B 两个互补群。所有 rII A 突变型的突变位点都在 rII 区的一头，是一个独立的功能单位；所有 rII B 突变型的突变位点都

表 1-1 T4 噬菌体的突变型 rII 和野生型 rII⁺ 在不同菌株上的噬菌斑

类 型	不同大肠杆菌菌斑平板上的表型		
	B	K(λ)	S
野生型 rII ⁺	小噬菌斑	小噬菌斑	小噬菌斑
突变型 rII	大噬菌斑	无噬菌斑(致死)	噬菌斑

在 rII 区的另一头,凡是属于 rII A 互补群的突变不能互补,同理属于 rII B 互补群的突变也不能互补,只有 rII A 的突变和 rII B 的突变可以互补。互补测验的结果说明:

① 基因位于 DNA 分子上,一个基因相当于 DNA 分子上的一个区段。

② 每一个基因都携带有特殊的遗传信息,这些遗传信息或者被转录为 RNA 进而被翻译为多肽;或者只被转录为 RNA 即可行使功能;或者对其他基因的活动起调控作用。

③ 基因在结构上并不是不可分割的最小单位,它仍然是可分的。打破了摩尔根提出的基因是“功能、突变、重组”三位一体的概念。基因可以分为以下几个单位: a. 突变单位(突变子, muton): 发生突变的最小单位是一个核苷酸对。 b. 重组单位(重组子, recon): 核苷酸对是基因内不能由重组分开的遗传单位,即基因内出现重组的最小区间。 Benzer 的重组测验中最低的重组值为 0.01%。 c. 功能单位(顺反子, cistron, 又叫作用子): 从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,它的产物是一个完整的肽链或者 RNA 分子,平均大小约为 500~1500bp。

顺反子与经典概念的功能单位相当,表示基因是一个在遗传功能上起作用的最小单位。 Benzer 把在反式构型中不能互补的各个突变型在染色体上所占的一个区域称为一个顺反子。顺反测验结果表明,顺反子是一个必须保存完整才具有正常生理功能的遗传物质最小单位,实际上它是基因的同义词,是一个功能水平上的基因。 rII 区内有两个基因,但可在许多位点发生突变和重组,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。

每个顺反子在染色体(DNA)上的区域称为基因座(loca),而每个基因座上有许多突变位点(site),即一个顺反子内部能发生突变的最小结构单位(突变子)——一个核苷酸对。DNA 中每一核苷酸对的改变都可引起肽链中氨基酸的改变,从而影响顺反子的功能,但它本身没有独立的功能,它们之间可以重组,而重组的最小结构单位称为重组子,重组子可以小到邻近碱基对间的重组。由此可见,顺反子既具有功能上的完整性,又具有结构上的可分割性。

2. 操纵子概念

1961 年,雅各布(F. Jacob)和莫诺(Jacques Monod, 1910—1976)提出操纵子概念,将基因分为结构基因、调节基因和所谓“操纵基因”以及后来发现的所谓“启动基因”。目前将这两类“基因”改为操纵子和启动子或者操纵位点和启动区。操纵子理论在生物学史上具有划时代的意义,其重要性不亚于 Waston-Crick 的 DNA 双螺旋分子模型。

操纵子理论(详见后文)认为:在大肠杆菌中,控制乳糖代谢的三个结构基因(β -半乳糖苷酶基因 *lacZ*、 β -半乳糖苷通透酶基因 *lacY* 和 β -半乳糖苷转乙酰酶基因 *lacA*)是在细胞染色体的相邻位置上,受同一“开关”的控制,因为这三种酶的产量总是相关的,而且这些基因的排列是顺型的。决定开关的基因被称为“操纵基因”。操纵基因(*lacO*)位于三个结构基因 *lacZ*、*lacA*、*lacY* 与 *lacZ* 相邻的一端。操纵基因与结构基因组成一个操纵子。过去作为诱导基因的 *lacI*,实际上是一个调节基因,决定着一种阻遏物的生成,并区别于直接决定蛋白质(酶)结构的结构基因。*lacI* 位于 *lacO* 的另一端,*lacO* 则在 *lacI* 和 *lacZ* 两基因之间。开关调控的机制是:当细菌细胞内诱导物(如乳糖)不存在时,*lacI* 产生的阻遏物阻止了操纵基因(*lacO*)的开动,mRNA 不能转录结构基因上的密码,蛋白质(酶)的合成不能进行,即这时