

环境污染与人体健康关系

学术报告汇编

(二)

山东省卫生防疫站

山东环境卫生监测站

一九八〇年二月

说 明

为提高各级卫生防疫站和环境卫生监测站专业人员的环境医学基础理论水平和业务技术能力,中华医学会山东分会、山东省卫生防疫站和山东省环境卫生监测站于一九七九年十月份联合举办了《环境污染与人体健康关系》学术报告会。

会上聘请了全国有关的科研、医学院校和卫生防疫系统等单位十五位专家、教授,讲授了十九个与环境医学相关联的专题报告,现将报告内容分类汇编成三册,供环境卫生监测专业人员工作中参考。

目 录

第一部分 遗传工程

李 辉

一、遗传的物质基础	(1)
(一) 历史	(1)
(二) 核酸的化学结构	(3)
(三) DNA 的复制	(5)
1、连续复制	(5)
2、不连续复制	(7)
二、遗传情报的转录	(8)
(一) 核酸的结构及遗传情报	(8)
(二) 遗传情报的流向	(8)
(三) 前核生物遗传情报的储存	(9)
(四) RNA多聚酶(转录酶)	(10)
(五) 转录	(10)
(六) 转录的调控	(11)
(七) Ribosome合成的调控	(12)
(八) 噬菌体DNA的增殖及转录调控	(12)
三、遗传工程——基因操纵	(14)
(一) 限制性内切酶的发展	(14)
(二) DNA重组实验	(17)

1、染色体DNA的切断	(17)
2、载体DNA	(18)
3、供体DNA与载体结合	(19)
4、宿主系统	(20)
5、Clone化基因的检出	(21)
6、Clone化的DNA的分析	(21)
Sanger氏及Coulson氏法	(21)
Maxam—Gilbert法	(23)
(三) 人工基因及基因操作	(25)
(四) 利用爪蛙卵进行重组实验	(26)
(五) 前景	(28)

第二部分 癌变机制

(电离辐射、化学及病毒性致癌因子的作用)

高天祥

一、前言	(31)
二、电离辐射	(31)
三、化学致癌物质	(33)
四、日常环境中的致突变性物质和潜在性致癌物质	(39)
五、化学致癌物质的作用	(41)
六、体细胞突变与致癌	(43)
七、DNA修复与致癌	(44)
八、促致癌物质和抗致癌物质	(48)
九、致癌病毒	(51)

遗传工程

山东医学院 李辉

一、遗传的物质基础

(一) 历史

1866年Mendel 就曾提出, 遗传的特征是由“遗传因子”——“基因”来决定的, 但这种基因是什么, 他不能说明。之后, 在1883—1889年间August Weissmann在研究的基础上提出遗传物质是一种特殊的具有一定分子结构的物质。

对植物及动物细胞的染色体进行化学分析指出, 其中含有两个主要成分, 即蛋白质和核酸, 二者均为长链的多聚体, 是由许多相似的亚单位通过化学键连结在一起组成, 一个蛋白质可能由几百个氨基酸亚单位组成, 因为有20多个不同氨基酸, 在许多蛋白质中共同找到, 所以可以交换的数目是天文学的。而核酸只有四种不同的核苷组成, 因此可互换的数目是非常小的。由于当时知识的限制, 认为核酸间只有非常小的不同, 所以错误地产生遗传性状决定于蛋白质。

瑞士生化学家Friedrick Miescher于1897年在脓细胞的核中发现一种酸性的物质称核酸, 但它的生物学意义, 不能被正确估价。

1928年Fred Griffith在小鼠中用无毒力的粗糙型菌株(R)和加热杀死的光滑型(S)细菌, 一起注入小鼠中, 小鼠死于败血症, 而且从心血中可分离出活的光滑型细菌。这个实验称为transformation (转型)。

1944年Avery等用体外法证实了上述的实验, 他们从活的S型肺炎球菌抽提出DNA、蛋白质及荚膜成分, 分别把每一种成份与活的R型细菌混悬在一个合成培养基中, 发现只有DNA组分, 可以使某些R型细胞转化为S型。而且DNA的纯度愈高, 这个转型过程, 也愈有效, 如果用DNA酶处理, 使DNA分解, 则不发生转型。而且当从一种表现型的细胞而来的DNA掺入至不同表现型的细胞中时, 可能发生遗传性的变化, 从而提出了DNA是遗传物质。但是仍有一些人, 认为DNA中有蛋白质的混入, 因而仍有争论。直至1949年DNA中蛋白质的污染减少至0.02%仍可引起转型, 而且纯度愈大, 转型的频率愈高, 进一步证明了DNA的作用。

1956年Heinz Fraenkel-Conrat用烟草花叶病毒TMV感染烟叶, 可引起烟草花叶病, 这种病毒是由大量的蛋白质亚单位(2130)盘绕成一个中空圆柱状外壳, 内面是螺旋状的RNA分子(6400个核苷酸长), 用化学分组法可将RNA及蛋白质分离开来, 分离出来的RNA可以感染烟叶, 而不是蛋白质, 并可产生正常的子代病毒。用RNA酶处理后, 失去感染性。用分离聚合法能产生杂交病毒颗粒, 它具有一般TMV株的蛋白质外壳, 以

及HR株 (Holmes Rib Grass) 的RNA见图一。杂交病毒感染植物时, 其症状是RNA供者的, 而且从感染的病灶中分出了病毒颗粒, 可被抗HR株的抗体所灭活。十分清楚, 子代病毒颗粒, 具有HR株的RNA及蛋白质外壳, 这正是RNA, 而不是蛋白质, 含有复制及产生新的病毒所必须的全部信息。

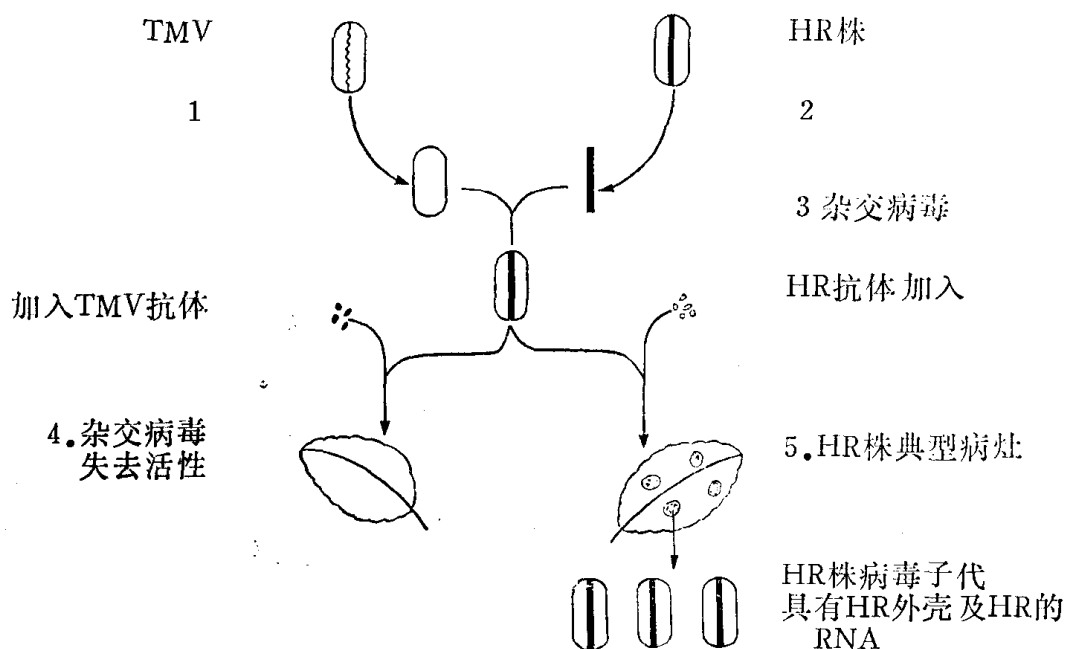


图1 病毒的杂交试验

1. 从TMV中分出蛋白质外壳
2. 从HR中分出核酸
3. 将1及2进行杂交, 得到杂交病毒
4. 加TMV抗体后, 杂交病毒失去治性
5. 加HR抗体后, 杂交病毒无影响, 感染烟叶后出现典型株具有的典型病灶。

用噬菌体体外合成, 也证明了核酸是遗传物质。

在高等生物中, 也证明DNA是遗传的物质基础。它的证据是令人信服的:

1. DNA是所有染色体的唯一共同的成份。
2. DNA只在染色体中找到 (线粒体及叶绿体例外, 它们可以自己复制)。
3. 在任何生物中, 每一核的DNA是恒定的 (生殖细胞的核的各半, 由二个亲代而来)。

4. 无论在前核类或真核类生物中, 改变DNA结构的化学物质, 可以引起遗传性的变化及突变, 因此可以得出结论, 从病毒到人, DNA是遗传物质, 唯一的例外是某些病毒, 它们的遗传物质是由RNA扮演的。

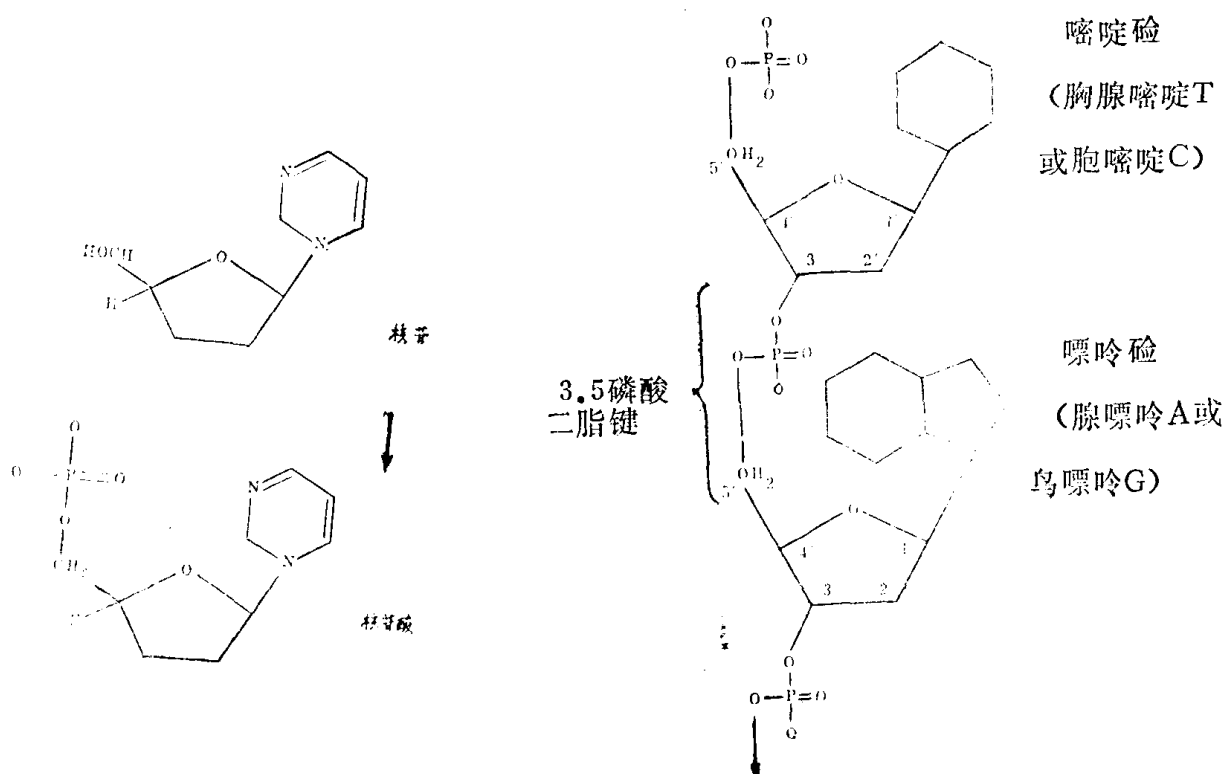
(二) 核酸的化学结构

DNA是非常长的，由大量的核苷酸亚单位连结在一起组成一条长的多核苷酸链，每一核苷酸由三个成分组成。

1. 去氧五碳糖。

2. 磷酸组。

3. 硷基：可以是嘌呤（腺嘌呤或鸟嘌呤）或嘧啶（胞嘧啶或胸腺嘧啶），每一个糖 + 硷基为一个核苷nucleoside，而每一个糖 + 磷酸 + 硷基为一个核苷酸nucleotide。



RNA的化学结构基本上与DNA相同，除了以五碳糖代替去氧五碳糖，以尿嘧啶代替胸腺嘧啶。

核苷酸的单体是通过磷酸残基相连接的，每一个磷酸残基与一个去氧五碳糖分子的3'碳原子和另一个去氧五碳糖5'碳原子通过磷酸二脂键结合。

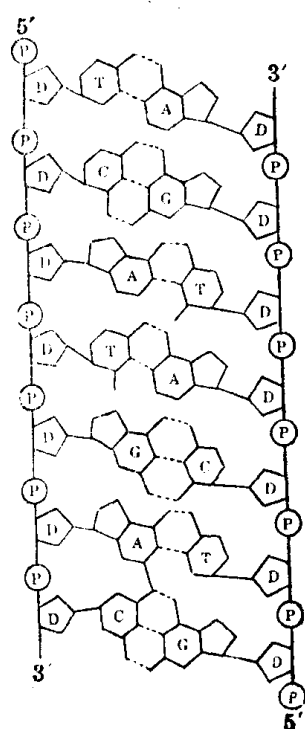
重要的是DNA分子的不对称性是极性的，如果分子开始于一个碳原子的5'末端，那末另一个末端将有一个3'位的碳原子，这样的结果是如果一个核苷酸，对另一个核苷酸不是相反的关系，它就不能附着在延伸的多核苷酸链上。腺嘌呤(A)、鸟嘌呤(G)、胸腺嘧啶(T)（或尿嘧啶U）及胞嘧啶(C)是四种最常见的硷基，但也有少数的硷基，它们的分子中可加入甲基或氢氧甲基，如某些噬菌体中胞嘧啶可被氢氧甲基胞嘧啶(MHC)所代替，在另一些较高等生物是甲基胞嘧啶代替。

1949—1951年间Erwin Chargaff作了二个非常有意义的观察，他发现：

1. DNA的碱基成分按其生物学来源而有广泛的不同, 因此DNA可以携带遗传信息。

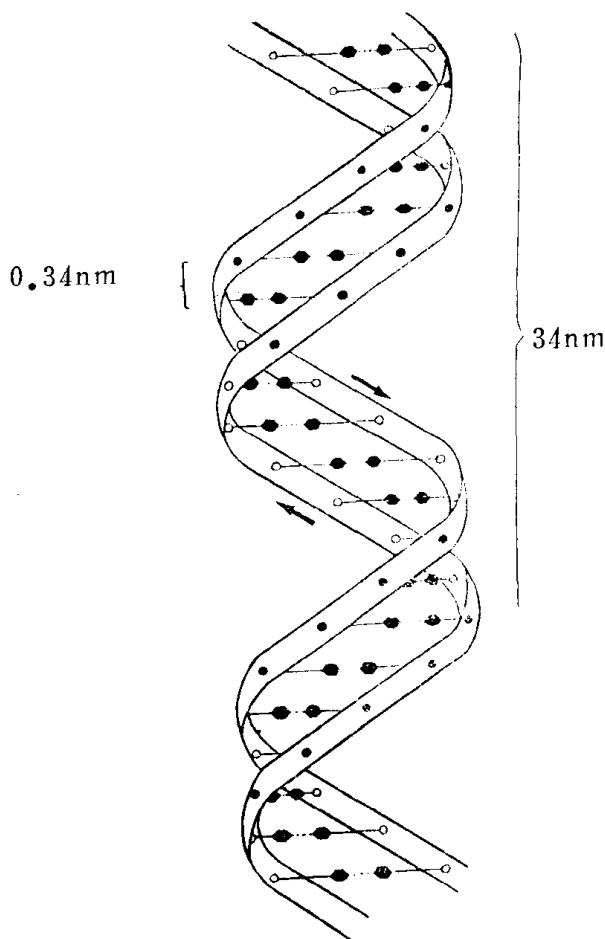
2. DNA中常有等量(即分子的等价数)的A及T和C及G, 因此 $A/T = G/C = 1$ 。

遗传信息储存在沿着多核苷酸链的四个碱基对的特异性顺序中, Maurice Wilkins在制备DNA高度定向的纤维成功, 并用X-衍射结晶图谱技术作试验, 得到衍射图所产生的关于结晶的分子结构信息, 但是Wilkins等未能将这个结晶转为推论性的分子结构, 而被剑桥医学研究所工作的Francis Crick及James Watson提出三维结构模型铺平了道路。他们考虑过许多可能结构, 但他们已有的X-线图是低质量的, 所以得不出任何结论。当他们看到了Wilkin实验中Rosalind Franklin 拿出的一个图谱显出以前从未见过的许多细节时, 他们得以提出解释这个图谱的模型。



DNA的二维结构

由二条方向相反的多核苷酸组成, 碱基对间以弱键相连(虚线)



DNA的三维结构

二条带代表糖磷酸骨, 架园点代表去氧核糖组, 以氢键相连

图2 DNA的二维及三维空间结构

结论是:

1. 多核苷酸的链是螺旋状的。

2. 螺旋有 2 nm 直径。

3. 螺旋每 3 — 4 nm 产生一个旋转。

4. 连续的核苷酸间的距离是0.34nm, 即每一圈螺旋有10个核苷酸。

5. 在一个螺旋上有二条多核苷酸链。

Watson及Crick对DNA结构的模型特点是:

1. DNA是由二条多核苷酸链相互缠绕在一起, 形成双链, 很象二条缠绕在一起的绳子, 每一链的骨架是交替着的糖——磷酸基, 二条链是反方向的, 即一条链中的原子顺序是另一链的位置的相反顺序, 它们是相反平衡的, 一个链上的硷基常与另一链上的同一水平的一个硷基配对, 二者间以氢键相连。

见图2: DNA的二维及三维空间结构。

整个结构像一个绳状的梯子, 沿着它的轴缠绕, 边上的绳子与骨架的糖——磷酸相应, 而梯子与硷基相应。

2. 硷基的配对不是任意的, 嘌呤硷相当大, 而嘧啶硷又相当小, 因此带有二个氢键的硷基(A或T), 就不可能与带有三个氢键的硷基(G或C)相配对, 因此唯一可能的配对是A对T, G对C。其结果是一个链常与另一链互补。如果在链上有一个顺序是AATCGATC, 那么在另一链上的相应顺序, 将是TTAGCTAG。因此这个模型要求有等价的A和T及C和G。Chargaff注意到这个模型在沿着分子的硷基对的次序上排列是有限度的, 所以没有理由认为从一种生物到另一种生物A—T到G—C的比例数目, 必须是相同的。

(三) DNA的复制

1. 连续复制:

如果遗传信息是打印在沿着DNA分子的硷基顺序上, 那么当细胞分裂时, 这个顺序必须维持不变, 因此当DNA分子复制时, 必须产生二个相互相同的子分子。

Watson及Crick提出DNA复制时的模型。

首先, 在硷基对间的氢键断裂。如图3。

DNA的复制 A、T、G及C是四种硷基, 在复制时亲代分子(1)间的氢键断裂解链, 每一根子链作为子代链的模板, (2)合成新的链, 最后, 二个相同的子代DNA链形成。

分子的二股链解开, 但并不分开, 暴露出硷基, 就要吸引它的互补硷基, 因为特异性配对的关系一个暴露的A吸引一个T核苷酸, 一个G吸引一个C核苷酸, 当在适当的位置上, 自由的核苷酸通过相邻去氧核糖基间的磷酸二酯键的形成而连结在一起。当这个过程是完全时, 结果将有二条与亲代完全相同的子代链形成, 每一亲代的链作为复制子代链的模板, 这种类型的复制称半—保守复制, 也就是说亲代DNA的二条链是被分别保存的, 它们分开后就成为复制子代分子的模板, 以形成新的链。

Watson及Crick在1953年提出的DNA复制模型, 直到1958年Matthew Meselson及Franklin W. Stahl设计了一个实验方法, 才得以证实DNA是以半保守形式复制的。它们使用了Jerome Vinograd的密度梯度离心技术, 它使在密度上具有很小差异的分子分开, 当某些盐, 如氯化铯 CsCl 的浓的溶液遭到非常高的离心力时(100,000G), 盐的分子由于非常强的离心力而沉下至离心管底部; 同时弥散作用也引起Cs⁺及Cl⁻离子分散至

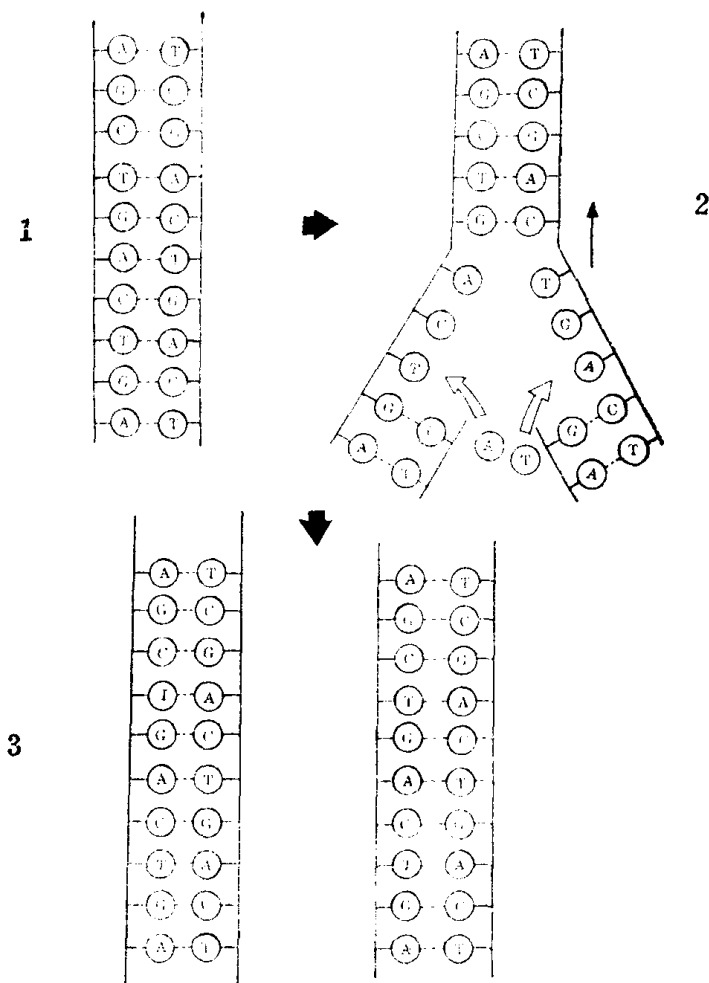
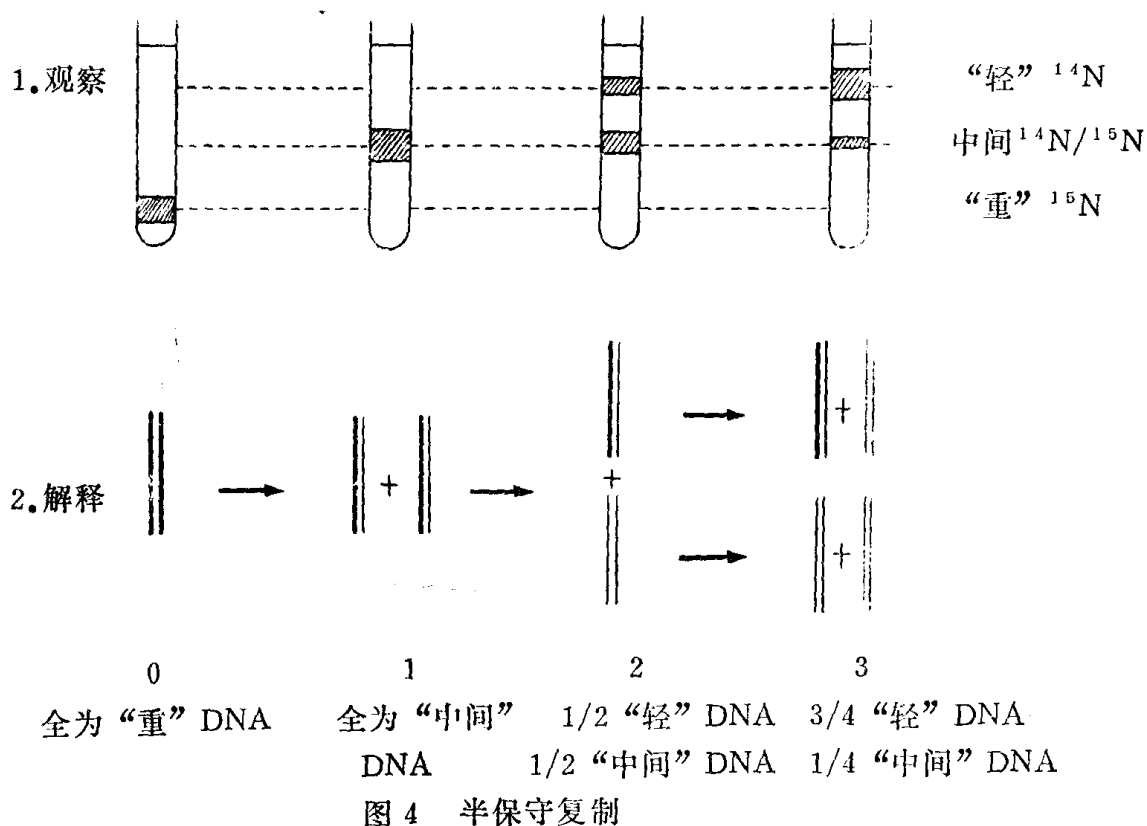


图3 DNA复制模型

整个溶液中，以对抗离心力。几小时后达到平衡状态，并在弥散的反作用力和沉降力之间建立了一个连续浓度的密度梯度；溶液密度最大的在试管底部，最小的在顶部。如果DNA分子是溶在Cscl溶液中，它们将逐渐地集中在一个狭带中，狭带中的DNA分子的密度是与Cscl在这一带中的密度是相等的，因此，如果用重同位素 ^{15}N 标记的DNA，将在离心管的下部，而用 ^{14}N 的“轻”DNA的带将在上部，DNA在管中的水平及DNA的量可从离心管中紫外吸收照像以测定之。

Meselson及Stahl把 *E. coli* (Theodor Escherich所发现而命名) 培养在以 ^{15}N 为唯一氮源的培养基中，它比 ^{14}N 有较大的重量，在许多代生长后，在细菌DNA中所有的氮都是带 ^{15}N 的，然后转移至只含 ^{14}N 为氮源的培养基中，在不同时间取培养物，作成标本以测定不同密度中DNA的含量。他们发现，在 ^{15}N 培养基中生长的*E. coli*浸出之DNA集中在“重”带中，而在 ^{14}N 培养基中生长一代周期后，所有的DNA又集中在另一个带中，但这个带是形成在纯 ^{15}N 及纯 ^{14}N 所形成的带之间的位置上。因为每个子代将含有一个 ^{15}N 链及一个 ^{14}N 链，所以是在中间密度，在 ^{14}N 培养基中再培养一代后，见到一半DNA是中间密度，一半是“轻”DNA带中，如预期所设想的，他们是按半保守方式复制，见图4。



他们又将杂交的DNA温和地加热，使二条链分开，并再离心，这时二条链中一条为“重” ^{15}N 链，一条为“轻” ^{14}N 链令人信服地证明第一代杂交分子是双链的，一条是亲代的 (^{15}N)，一条是新合成的 (^{14}N) 链。

2. 不连续复制:

在复制点上(复制叉)所发生的变化，我们是知道得很少的。

1. 我们知道在DNA复制时，把连续的核苷酸连在一起有一个酶，称依赖DNA的DNA多聚酶，简称DNA多聚酶，它只能在5'到3'方向起作用，因此当DNA多聚酶严格按Watson及Crick的模型进行复制时，只能复制其中的一条链，而另一条链是从3'到5'的，这一条链如何复制，尚不清楚，但似乎是有一短片的DNA在5'到3'方向中起模板作用。然而酶结合在生长着的链上，因此，真正的合成是在5'到3'方向。虽然这个链的整个延伸是在3'到5'方向。不连续复制需要一个酶，以便将新的DNA链的全部连结在一起，这个酶称为连接酶Ligase。这个酶可以将DNA双体上的单条链裂口上的自由末端结连在一起。见图5。

DNA的不连续复制:

双螺旋的二条链各自作为模板，以合成新的子代链。亲代的(+)链作为子代的新的(-)链的模板，由5'到3'方向合成。对亲代的(-)链而产生新的(+)链如下:

- (1) 由5'到3'方向产生小片断模板，以对应于亲代的(-)链。
- (2) 当这个短片断合成增加时，由酶将其连结在新的(+)链上。
- (3) 同时双螺旋进一步解开，另一片断开始合成，也是由5'到3'方向。

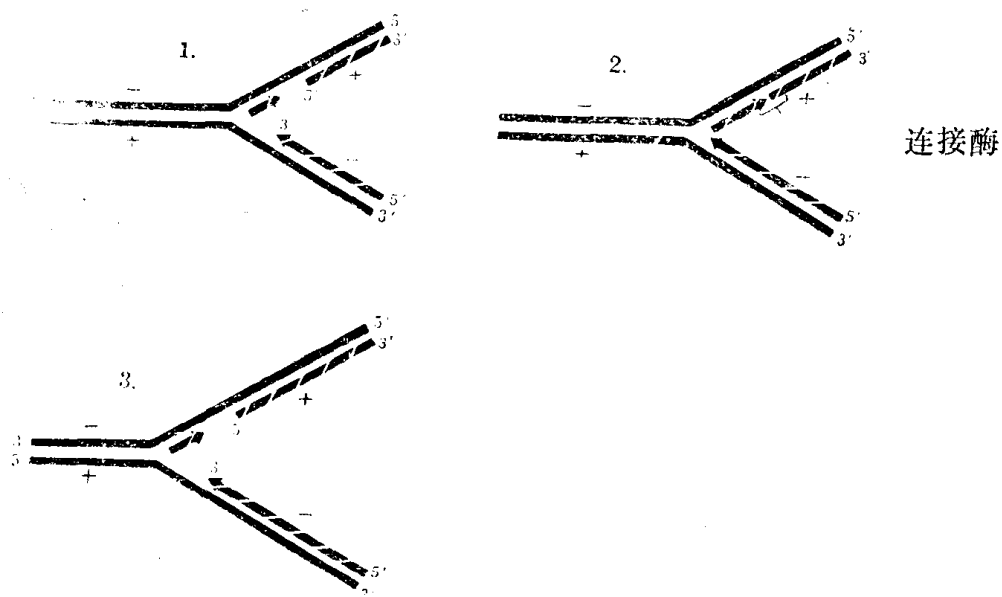


图5 DNA的不连续复制

2.尚不清楚的是，DNA多聚酶不仅需要—个模板链以复制，而且每一个新的DNA部分似乎需要一个引物以起始DNA的合成，每一新的DNA部分由—短片的RNA所引发的，这个短片RNA是被依赖DNA的多聚酶所合成，这个酶提供—条短的核糖核苷酸顺序，然后DNA多聚酶将它加在去氧核糖核苷酸上。可以推测这些短片的RNA引物是在被DNA连接酶连接以前，从增长着的DNA链上由酶切下来的。

二、遗传情报的转录

(一) 核酸的结构及遗传

生物材料中之DNA一般是双股单链DNA分子呈右手螺旋的结构，在双股螺旋的外侧，有二股磷酸去氧核糖聚合的链，形成骨架，硷基与1'位碳原子结合，硷基只有A(adenine)、G(Guanine)、C(Cytosine)和T(thymine)。嘌呤和嘧啶硷在空间上保持相等的距离，形成互补的硷基排列，使双螺旋链稳定。

形成双螺旋的两股多聚去氧核苷酸链，在其5'—3'的磷酸二脂键的方向上是相互逆平行的，RNA分子与DNA相比是单股的。在同一分子内逆平行的互补硷基间可形成双股的环，名发卡状结构(hairpin)。无论是DNA或RNA，使双股螺旋稳定的因子有：

- ①分子内维持非极性硷基的憎水性相互作用。
- ②硷基对间的氢键。
- ③硷基与螺旋垂直的平面上，在上下硷基间的Von der waal力和双极子(dipole—dipole)结合力。

DNA的双螺旋结构，除直接表示基因复制机制的同时，作为基因表现的第一阶段，是DNA硷基排列转录为与之互补的RNA硷基排列。见图6。

(二) 遗传情报的流向

1961年Jacok及Monod提出基因是控制蛋白质合成的设想，并进行了实验，提出

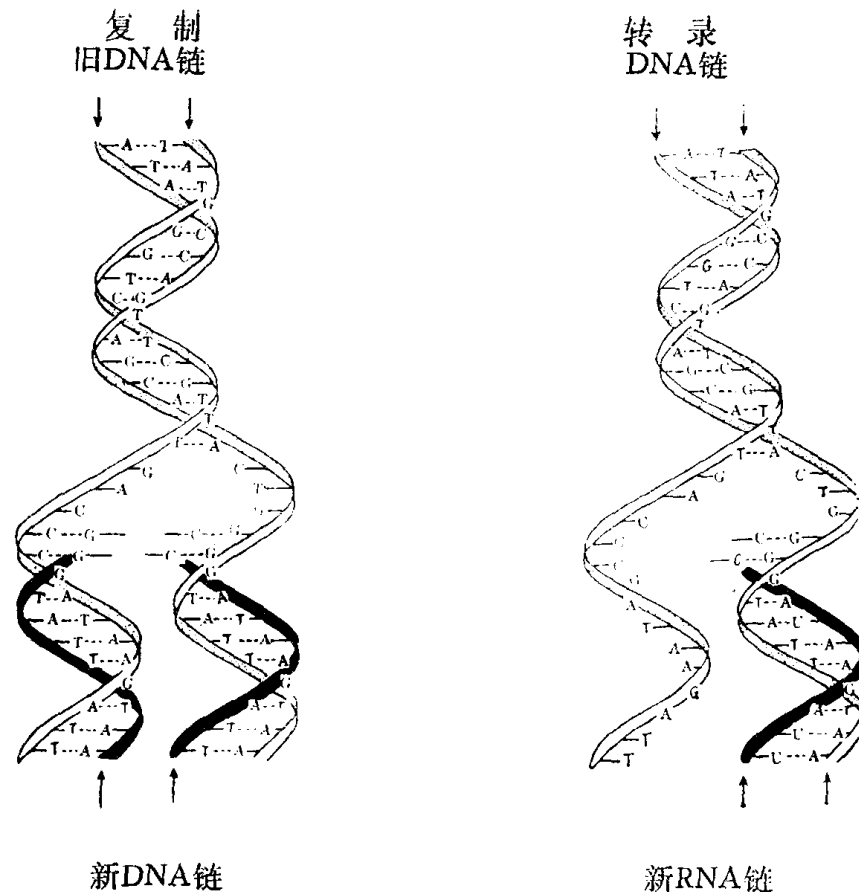


图6 DNA链的复制及转录

DNA链上的基因情报转录为信使RNA (mRNA)，细胞浆中的核糖体 (Ribosome) 把 mRNA 上的情报翻译成氨基酸排列，这样产生的多肽链，进行折叠，形成三维结构，或几个多肽亚单位进行结合，形成具有特异性生理机能的酶蛋白及细胞内其他结构蛋白，从而使基因得以表现。

基因表现的调控是生物对外环境及内环境的变化，进行适应的最基本的和重要的机能，这种调控机制在基因水平上是通过DNA合成的调控来完成的。

(三) 前核生物遗传情报的储存

除RNA病毒及具有单股环状DNA的少数DNA病毒外，几乎所有的生物的遗传情报，都是双股DNA分子，研究最多的模型生物是大肠杆菌，其DNA分子为 2.5×10^6 的环状双螺旋DNA，每个细胞有2—4个拷贝，若把双螺旋拉成直线，其长度为1.3mm，约相当于平均大小的蛋白质情报的3000—4500。到目前为止，已知每一大肠杆菌细胞约有100种蛋白质，因此，在DNA核苷酸排列上遗传情报是如何分布？它又如何投影成为蛋白质分子的氨基酸排列的呢？

在无细胞多肽合成系统中，加入mRNA时，可见氨基酸聚合成成为多肽链，没有DNA时，仍可进行蛋白质合成，这是因为转录于mRNA上的遗传情报指令氨基酸的排列顺序，外加的已知的RNA碱基排列，和体内合成的多肽氨基酸排列，具有相互对应的关系，下表1是氨基酸及其三连碱基（名遗传密码）的相互关系，下表记录极性的5'—3'

的mRNA密码，和极性的3'—5'的模板DNA基因密码。

表1 生物的遗传密码

第一碱基 DNA/RNA	第二碱基 A U 氨基酸 DNA mRNA	G C 氨基酸 DNA mRNA	T A 氨基酸 DNA mRNA	C G 氨基酸 DNA mRNA
A/U	AAA UUU } AAG UUC } AAT UUA } AAD UUG }	AGA UCU AGG UCC AGT UCA AGC UCG	ATA UAU } ATG UAC } ATT UAA 终止 ATC UAG 终止	ACA UGU } ACG UGC } ACT UGA 终止 ACC UGG Trp
	GAA CUU GAG CUC GAT CUA GAC CUG	GGA CCU GGG CCC GGT CCA GGC CCG	GTA CAU } GTG CAC } GTT CAA } GTC CAG }	GCA CGU GCG CGC CCT CGA GCC CGG
	TAA AUU TAG AUC TAT AUA TAC AUG	TGA ACU TGG ACC TGT ACA TGC ACG	TTA AAU } TTG AAC } TTT AAA } TTG AAG }	TCA AGU } TCG AGC } TCT AGA } TCC AGG }
	GAA GUU CAG GUC CAT GUA CAC GUG	CGA GUC CGG GCC CGT GCA CGC GCG	CTA GAU } CTG GAU } CTT GAA } CTC GAG }	CCA GGU CCG GGC CCT GGA CCC GGG

(四) RNA多聚酶 (转录酶)

RNA多聚酶具有复杂的结构，具有活性的酶分子量约为500,000，沉降系数为15S，是由5个不同的多肽亚单位 α 、 β 、 β' 、 δ 及 ω 组成， α 为二个亚单位，其他亚单位各为一个，所以用 $\alpha_2\beta\beta'\delta\omega$ 表示之。 δ 是初发反应必要的因子，比较容易分离； $\alpha_2\beta'$ 复合体称核心酶，不问有无 δ 都可在核苷酸间形成磷酸二脂键； ρ 为终止信号，可辨认DNA上转录终止碱基排列，结合于转录酶的核心上，使合成的RNA从模板上分离下来。

(五) 转录

根据生物的中心法则，遗传情报从DNA指向RNA，再由RNA指向蛋白质，当RNA从DNA转录时，双股DNA中的一股链，由于形成互补的碱基对，吸引去氧核苷三磷酸，使之聚合，此时RNA作为具有一定长度的转录单位而产生多肽链。能够编码一个多肽氨基酸排列的DNA部份叫作基因，它的转录产物为mRNA，此外，在DNA链上还有Ribo-some RNA和tRNA等的基因。

在体外实验中，当有 δ 亚单位存在时可以识别双股DNA中的单股链的起始信号，从



正确的开始点进行合成。本酶对DNA的含有开始识别信号的启动子领域可牢固结合，结合部位的双股链立即在局部解开，并以一股链为模板，开始合成RNA。开始识别部位的DNA碱基排列，在各种例子中，都有差异，但在其后RNA聚合酶结合部位是由7个

5'TAPuATG3'

碱基形成的一般排列，为3'ATPyTAC5'，其中含有多量的AT，说明容易发生热变性，这意味着双股链容易解开，由RNA多聚酶进行转录。

(六) 转录的调控

具有蛋白质结构情报的基因称构造基因，构造基因又分为受调控的及不受调控的二种，后者与外界条件无关，是对细胞必要的酶和其他蛋白质进行编码的基因，故又名构成基因。构成基因只有单一的调控要素及启动子，故其转录速度是由多聚酶结合于启动子的亲和力所决定的，亲和力越强，转录进行越快，而启动子的碱基排列，决定亲和力的强弱。

受调控的构造基因，对在特定条件下所需要的蛋白质进行编码，对分解代谢途径上某特异的酶进行编码的基因，被该代谢通路的分子所活化或诱导。在合成代谢通路上的特异酶，由于该代谢通路的最终产物而被去活化或抑制。例如，在培养中乳糖可诱导合成 β -半乳糖苷酶，而氨基酸可抑制色氨酸通路上的酶的产生（合成），与乳糖的分解或色氨酸的合成有关的一系列基因，常常形成一组，共同进行转录，产生一个多基因的mRNA，在前核细胞中这样的转录单位名叫操纵子，大的操纵子可以含有20个构造基因。属于同一个操纵子的基因，受同样的调控。前核细胞mRNA的半衰期很短为2—3分钟，故操纵子支配的酶的合成速度，取决于mRNA的转写速度，操纵子的转录调控至少需要三个调控单位：①操纵子转录开始及停止的调控基因。②与RNA多聚酶进行特异性结合的DNA上的启动子。③启动子相邻部位的短的DNA部位，称操纵子(Operator)，它可和调控基因的产物及调控蛋白质发生特异性结合。

现以monod及Jacob的E.coli乳糖利用系统为例，进行说明。

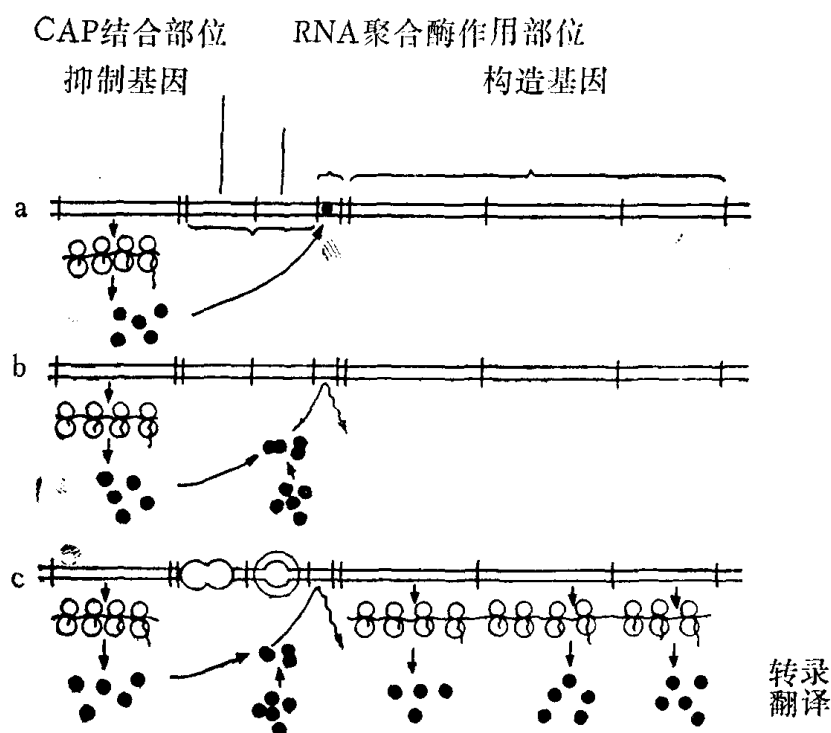
乳糖操纵子含有同时进行转录的三个构造基因Z、y、a，各自编码 β -半乳糖苷酶， β -半乳糖苷通渗酶和硫半乳糖苷乙酰基转移酶。这三种酶在无乳糖的培养中进行增殖的细菌细胞中只有几个分子，加入乳糖后可增加几百倍，促进乳糖的利用。通渗酶使乳糖容易通过细胞膜，进入细胞内的乳糖被 β -半乳糖苷酶水解为半乳糖和葡萄糖，随后再通过一般代谢途径被分解利用。图七：

a、大肠菌培养液中无乳糖时

b、加入乳糖后

c、以乳糖作为碳源，CAP：代谢活性蛋白

当葡萄糖作为碳源而进行代谢时，乳糖的操纵子受到抑制，当葡萄糖耗尽时，乳糖操纵子立即被诱导，这与3'—5'—环AMP增加有关，cAMP结合于代谢活化蛋白CAP上，使之成为活化型，因而结合于乳糖操纵子的启动子，同时抑制基因指令的抑制子成为非活性抑制子（调控蛋白）从操纵子上解离，乳糖操纵子进行转录，产生半乳糖苷酶、半乳糖苷通渗酶、硫半乳糖苷乙酰基转位酶等酶蛋白。



a. 大肠菌培养液中无乳糖时 b. 加入乳糖时

c. 以乳糖作为碳源 CAP: 代谢活性蛋白

图7 Monod及Jacob模型

调控基因编码的抑制子是四聚体蛋白质，一个亚单位的分子量为4万，各亚单位上各有一个诱导物结合部位，乳糖是它的天然诱导物，变化所产生的异乳糖，进行非竞争性结合，其解离常数为 $KD \approx 10^{-6}M$ 在无诱导物时抑制子与操纵子的结合 $KD \approx 10^{-12}M$ 。

(七) Ribosome合成的调控

当缺乏氨基酸时，大肠杆菌的rRNA及tRNA合成停止，称为紧急调控 (Stringen, Control)。Ribosome合成的抑制是由于Ribosome RNA及Ribosome蛋白质二方面的合成被抑制，有一种因子分子量为75,000的蛋白质与Ribosome结合，从ATP与GTP产生PPGPP，储聚于细胞之内，对Ribosome或tRNA操纵子的转录有抑制作用。

(八) 噬菌体的增殖及转录调控

λ 噬菌体DNA感染大肠杆菌后有二个命运，一是在菌体内增殖，产生子代噬菌体，菌体裂解称为溶菌性感染，二是噬菌体的基因组组入宿主染色体，称溶原状态，作为宿主染色体的一部份进行复制， λ 噬菌体的DNA分子量为 32×10^6 ，由50个基因组成，当溶原性感染时， C_1 基因被转录翻译为分子量52,000的二聚体蛋白，形成 λ 抑制子， λ 抑制子在 C_1 基因的左右，有二个 λ Phage的特异性早期Operon的Operator发生牢固的结合，使双螺旋不解开，从而防止转录，二侧的operator都是由约75个碱基对形成，都有三个相类似的与 λ 抑制子结合的碱基排列。

在紫外线等对DNA合成有抑制作用的条件下， λ 抑制子去活化，此时早期的二个

operon被转录，左侧的早期operon编码与重组有关的酶，使前噬菌体从细菌染色体断离，变为溶菌性感染，溶菌性感染是由二个阳性蛋白调控的，它们是二个基因N及Q的产物，n基因当溶菌性感染开始时立刻由RNA多聚酶进行转录，产生的n蛋白质可促进早期operon的转录，在早期operon的远侧端有Q基因，其产物Q蛋白可促进后期operon的产物产生病毒的结构蛋白，n和Q这二个调控蛋白的作用机制是作用于存在于operon的起始附近的转录停止信号，与停止因子 ρ 相竞争，从而防止前期的终结，使operon完全转录。

T_4 噬菌体是在大肠杆菌中的大型DNA病毒，有200个基因，与 λ 相比，有复杂的调控作用，有许多operon；根据感染后进行表现的时间，有四个基因组：即Immediate early、delayed early、Quasi-late及late，开始的二个基因组属于同一个operon，靠近promotor的是Immediate early远离promotor的是delayed early早期转录终止时，新的Promotor组被辨认，Quasi-Late基因进行表现。在感染后期，第三个Promotor被辨认，引起后期operon的转录，同时使Quasi-Late基因的转录减少，这样的基因表现的变化，是由于细菌RNA多聚酶的变化引起的，感染后细菌RNA多聚酶的 α 单位，立即加上一个腺嘌呤，对 σ 亚单位的亲和力降低，在感染后期 β 亚单位发生变化，这时后期基因表现所必须的 T_4 噬菌体基因33和55的产物P-33和P-55蛋白，与多聚酶的核心相结合，识别后期基因的操纵子（promotor），进行后期转录：

由此可见，基因表现的时间调控，是由于换置新的阳性调控蛋白引起的，使RNA多聚酶的核心发生变化，随着时间的推延，渐次识别不同的操纵子（promotor），并与之结合。图8

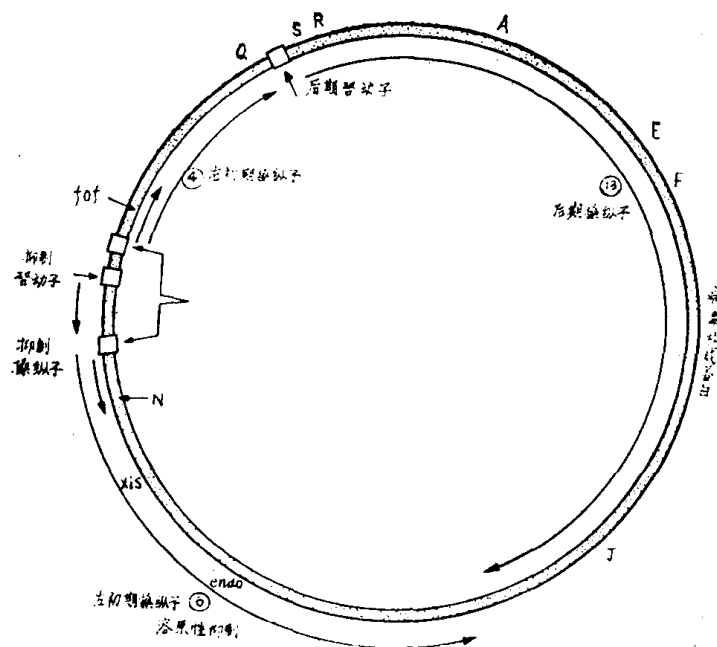


图8 基因表现的时间调控

三、遗传工程——基因操纵

遗传工程也叫基因工程，或基因调控gene manipulation。它是分子生物学领域出现的一门新的分支学科，它是在分子水平上主要研究基因的调控以及重组，研究调控某一性状的基因，如何从一个生物体转移到另一个生物体中，并使后者表现出与前者相同的生理学与遗传学特性。

由于限制性内切酶的发现，Nathans等使用Hind II、III，把SV₄₀的DNA切成11个片段，并分离成功。使以前无法进行的遗传基因的分离工作，成为可能。

近年来快速有效的测定DNA核苷酸顺序的方法成功，使基因DNA分析变为容易，而三年前对于任何生物的全基因组的全部核苷酸顺序进行测定工作是非常困难的。现在对SV₄₀的全基因组的物理地图已经弄清。

1972年Berg等把二个直线状病毒DNA接合起来，从而有可能与病毒DNA相结合，成为重组DNA。

Mandel及Higa用氯化钙处理大肠杆菌，使噬菌体DNA可以通过细胞膜，非常容易地进入细菌体内。

这样，基因操作所必须的三个条件，已经具备，这就是：

- 1.用限制性内切酶切断DNA。
- 2.二个异源DNA分子的结合，形成重组DNA。
- 3.DNA重组体导入至大肠杆菌中。

Cohen等于1973年用质粒作成第一个重组体，开始在大肠菌中研究基因操作。1974年又将非洲爪蛙的核糖体RNA (rRNA) 遗传基因导入于大肠杆菌中，这意味着任何生物种的DNA都可导入细菌，进行复制。因此，基因的这种转移可以在同一种内不同个体之间进行，也可在不同种生物间进行，可以在真核细胞与原核细胞之间进行，这样就使人们有可能定向地控制、干预和改变生物体的遗传与变异，就有可能制造出新的生物类型。

基因工程自最初的论文至今不到十年的时间，发展形势之迅速，似有应用于各种生物问题之研究的趋势，其主要原因还与核酸有关的分子生物学、酶学的显著进展有关，特别是对：

(1) replicon 复制子等自己增殖因子的遗传学的化学分析技术的进展。

(2) 酶学的发展，特别是以限制性内切酶为中心，发现了许多酶，如连结酶(ligase)、修饰酶、末端核苷酸转化酶等酶学研究的进展，有了这些工具酶，切割DNA分子有了可能。

(3) 把DNA从一个细胞转导到另一个细胞中去的技术的发展。由于这三个方面几乎是同时的发展，有可能制造出超越“生物种”的屏障，而造成重组分子，展示了发展的广阔前途，吸引了许多科学工作者，从而促进了这个科学领域的发展。

(一) 限制性内切酶的发展

为什么存在可以切断DNA特异部位的限制性内切酶？它有什么生物学意义？