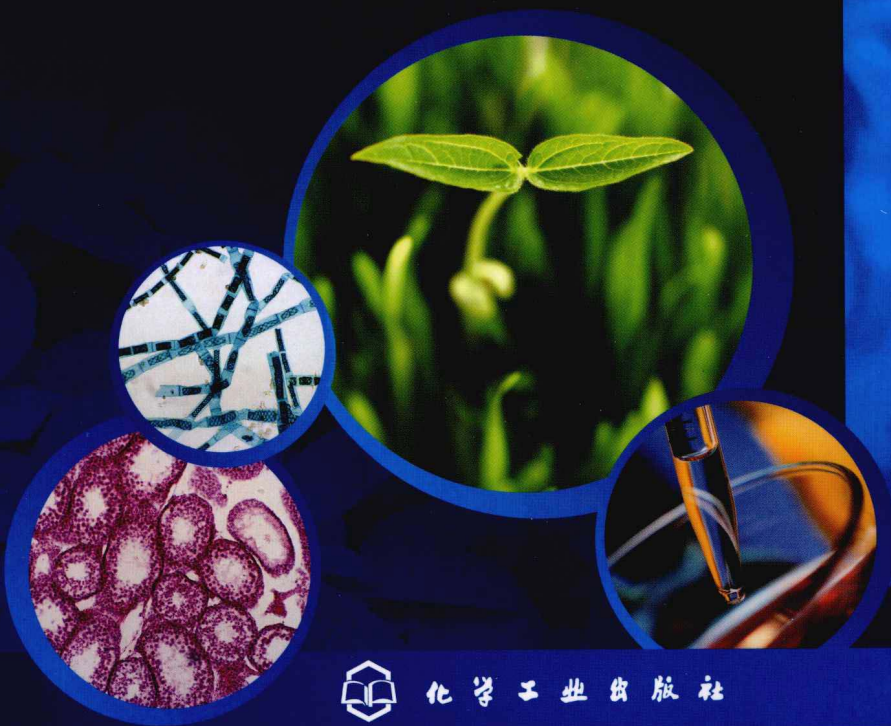


普通高等教育“十一五”规划教材

生物科学 生物技术系列

现代分子生物学 与基因工程

李海英 杨峰山 邵淑丽 等编著



化学工业出版社



普通高等教育“十一五”规划教材

现代分子生物学与基因工程

李海英 杨峰山 邵淑丽 等编著



化学工业出版社

· 北京 ·

图书在版编目 (CIP) 数据

现代分子生物学与基因工程/李海英, 杨峰山, 邵淑丽等编著. —北京: 化学工业出版社, 2008. 1

普通高等教育“十一五”规划教材

ISBN 978-7-122-01794-9

I. 现… II. ①李…②杨…③邵… III. ①分子生物学-高等学校-教材②基因-遗传工程-高等学校-教材 IV. Q7

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2007) 第 205268 号

责任编辑: 赵玉清

文字编辑: 刘 畅

责任校对: 陶燕华

装帧设计: 关 飞

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 装: 北京市兴顺印刷厂

787mm×1092mm 1/16 印张 17 字数 454 千字 2008 年 2 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

《现代分子生物学与基因工程》

编写人员：（按姓氏笔画排序）

于 冰 马春泉 杨峰山

李海英 邵淑丽 高传军

前 言

20 世纪 50 年代, DNA 双螺旋结构模型的提出, 开启了现代分子生物学的新纪元。半个世纪以来, 分子生物学以空前的速度迅猛发展, 已成为现代生命科学中发展最迅速、取得成果最多的学科之一。分子生物学是研究核酸、蛋白质等生物大分子的结构与功能, 并从分子水平上阐述蛋白质与核酸、蛋白质与蛋白质之间相互作用的关系及其基因表达调控机理的科学。分子生物学从分子水平上研究生命现象、生命本质、生命活动及其规律, 它涵盖了生命科学的各个领域, 改变了或正在改变着整个生物学的面貌, 其研究成果已在工业、农业、医药、食品、材料、能源、冶金、环保等领域得到了广泛的应用。

随着分子生物学的飞速发展, 产生了许多其他技术。20 世纪 70 年代, 重组 DNA 技术的发现标志着基因工程的诞生, 使人们能够根据自己的意愿来操作基因、改造基因。基因工程已经在基因工程药物、转基因植物、转基因动物等方面取得了喜人的成果, 并且正在以新的势头继续向前迅猛发展, 成为当今生命科学研究中最具生命力、最引人注目的前沿学科之一。

在生命科学的教学, 分子生物学是生命科学领域十分重要的专业基础课, 基因工程是分子生物学的重要应用, 两者之间关系紧密。随着分子生物学和基因工程的发展, 为适应高等学校本科生课程体系和教学内容的需要, 作者花费大量时间搜集、整理资料, 参阅了大量国内外文献, 结合多年的教学、科研实践经验编著了本教材。全书分为现代分子生物学和基因工程两篇, 将分子生物学与基因工程内容有机融合在一起, 适合综合、师范、医药、农林类院校等生物科学、生物技术、生物工程、制药工程、食品工程等相关专业的本科生教学及教师、科研人员参考。

本书内容丰富、取材新颖、简明扼要、条理清晰、语言简练, 将基础性、前瞻性、系统性与可读性有机统一, 是指导本科生在有限时间掌握分子生物学和基因工程基础知识和技术的理想教材。

本书第一章由黑龙江大学李海英教授和齐齐哈尔大学邵淑丽教授撰写; 第四章、第五章、第七章、第十一章、第十二章由黑龙江大学杨峰山副教授撰写; 第二章、第三章由黑龙江大学于冰老师撰写; 第六章、第十章、第十三章由黑龙江大学马春泉老师撰写; 第八章、第九章由黑龙江大学高传军老师撰写。全书由李海英教授、杨峰山副教授和邵淑丽教授负责统稿。

由于现代分子生物学和基因工程发展迅速, 专家学者们关注侧重点往往不同, 因此本书难以面面俱到, 疏漏之处在所难免, 敬请广大读者批评指正。

李海英

2007 年 10 月于黑龙江大学

目 录

上篇 现代分子生物学

第一章 绪论	1	本章小结	40
第一节 分子生物学的概念及发展状况	1	思考题	40
一、分子生物学的概念及研究内容	1	第三章 RNA	41
二、DNA 的发现	3	第一节 RNA 的结构与种类	41
三、Chargaff 规律及 DNA 双螺旋模型	4	一、RNA 的结构概述	41
四、分子生物学的发展	4	二、不同种类 RNA 分子的结构及功能	41
第二节 基因工程的概念及发展状况	5	第二节 RNA 的合成	45
一、基因工程的概念	5	一、DNA 转录的一般特征	45
二、基因工程的发展	7	二、RNA 合成的酶学	46
三、基因工程的应用	7	第三节 启动子与增强子	47
四、生物安全性问题	9	一、原核生物的启动子	47
五、干细胞研究及人类伦理观念	10	二、真核生物的启动子	48
思考题	11	三、增强子	49
第二章 染色体与 DNA	12	第四节 原核生物转录	50
第一节 染色体的结构和包装	12	一、转录的起始	50
一、原核生物的染色体	12	二、转录的延伸	50
二、真核生物的染色体	12	三、转录的终止	51
三、核小体和染色质的高级结构	14	第五节 真核生物的转录	53
第二节 DNA 的结构	16	一、真核生物的转录	53
一、DNA 的一级结构	16	二、真核生物的转录后加工	53
二、DNA 的二级结构	17	第六节 遗传密码	56
三、DNA 的三级结构	19	一、遗传密码的破译	56
第三节 DNA 的复制	21	二、遗传密码表	58
一、DNA 的半保留复制机理	21	三、遗传密码的性质	59
二、半保留复制的过程	22	四、遗传密码的突变	60
三、复制的起始、方向和速度	23	本章小结	62
四、DNA 复制的酶学	24	思考题	63
五、原核生物 DNA 的复制	27	第四章 蛋白质	64
六、真核生物 DNA 的复制	29	第一节 蛋白质合成的概述	64
七、聚合酶链式反应	30	一、蛋白质合成的主要元件	64
八、随机扩增多态性 DNA 技术	32	二、氨基酸的活化	66
第四节 DNA 的损伤、修复及突变	34	三、蛋白质合成的相关因子	67
一、DNA 损伤	34	第二节 原核生物的蛋白质合成	69
二、DNA 修复	35	一、肽链合成的起始	69
三、DNA 突变	37	二、肽链合成的延伸	70
第五节 DNA 的转座	38	三、肽链合成的终止	71
一、原核生物转座子的分类和结构特征	38	四、原核生物蛋白质生物合成的抑制剂	71
二、转座作用的机制	38	第三节 真核生物蛋白质的合成	72
三、转座作用的遗传效应	39	一、肽链合成起始	72
四、真核生物中的转座子	39	二、肽链合成的延伸	74

三、肽链合成的终止	74	第二节 基因组	106
四、真核生物蛋白质生物合成的特异抑制剂	74	一、基因组的概念	106
第四节 蛋白质的加工与修饰	75	二、原核生物基因组的结构与特征	107
一、蛋白质的折叠	75	三、真核生物基因组的结构与特征	109
二、蛋白质生物合成初始产物的后加工	76	四、人类基因组计划	115
第五节 蛋白质运转机制	78	第三节 基因组学	117
一、翻译-转运同步机制	78	一、结构基因组学	117
二、翻译后转运机制	80	二、功能基因组学	117
本章小结	82	三、与基因组学相关的几个概念	118
思考题	82	本章小结	118
第五章 基因表达调控	83	思考题	119
第一节 原核生物基因表达调控	83	第七章 生物信息学基础	120
一、概述	83	第一节 生物信息学资源简介	120
二、转录水平调控	84	一、基本数据库	120
三、转录后水平调控	88	二、DNA 数据库	120
四、翻译水平调控	88	三、基因组数据库	122
第二节 真核生物基因表达调控	91	四、蛋白质序列数据库	124
一、概述	91	五、结构数据库	126
二、DNA 和染色体水平	91	六、WEB 中的重要搜索工具	128
三、转录水平	94	七、WEB 部分生物信息学相关新闻组资源	132
四、转录后水平	98	八、常用工具的网址	133
五、翻译水平的调控	98	第二节 生物信息学方法与应用	133
本章小结	100	一、电子克隆	133
思考题	100	二、启动子分析	133
第六章 基因与基因组	101	三、表达谱分析	134
第一节 基因	101	四、基因调控网络构建	136
一、基因的概念	101	本章小结	137
二、基因的结构与种类	102	思考题	137

下篇 基因工程

第八章 基因工程的工具酶	138	二、黏性末端连接技术	151
第一节 限制性核酸内切酶	138	三、AFLP 技术	153
一、限制性核酸内切酶的发现	138	第四节 基因工程的其他酶类	154
二、限制性核酸内切酶的分类	139	一、核酸修饰酶	154
三、限制性核酸内切酶的命名	142	二、核酸酶	156
四、DNA 分子的片段化	142	三、琼脂糖酶	158
第二节 DNA 聚合酶	146	四、蛋白酶 K	158
一、大肠杆菌 DNA 聚合酶 I (全酶)	146	五、溶菌酶	159
二、Klenow DNA 聚合酶	147	本章小结	159
三、T4 DNA 聚合酶	147	思考题	159
四、T7 噬菌体 DNA 聚合酶	148	第九章 基因克隆载体	160
五、耐热 DNA 聚合酶	148	第一节 概述	160
六、逆转录酶	149	第二节 质粒载体	160
第三节 DNA 连接酶	149	一、质粒的概念	160
一、连接酶反应	149	二、质粒的基本性质	161
		三、常用的质粒载体	163

四、酵母质粒载体	166	第三节 目的基因表达系统	217
第三节 噬菌体载体	167	一、大肠杆菌表达系统	218
一、 λ 噬菌体克隆载体	167	二、酵母表达系统	225
二、M13 噬菌体载体	172	本章小结	231
三、P1 噬菌体载体	174	思考题	231
第四节 噬菌体-质粒杂合载体	175	第十二章 基因文库技术	232
一、柯斯质粒克隆载体	175	第一节 基因组文库技术	232
二、噬菌粒载体	176	一、基因组文库的概念	232
第五节 人工染色体克隆载体	178	二、基因组文库的大小	232
一、酵母人工染色体载体	178	三、基因组文库的构建	233
二、细菌人工染色体载体	180	第二节 cDNA 文库技术	236
三、P1 人工染色体载体	181	一、cDNA 文库的概念	236
本章小结	182	二、cDNA 文库的构建	236
思考题	182	三、mRNA 丰度高低与 cDNA 文库大小 的关系	241
第十章 重组 DNA 的构建、筛选及鉴定 分析	183	四、cDNA 文库的优越性与局限性	242
第一节 重组 DNA 导入宿主细胞	183	本章小结	243
一、目的基因的获得	183	思考题	243
二、重组 DNA 的构建	187	第十三章 基因功能验证	244
三、重组 DNA 导入宿主细胞的方法	189	第一节 转基因技术	244
四、重组 DNA 转化宿主细胞	191	一、转基因植物	244
第二节 重组子的筛选	193	二、转基因动物	247
一、遗传表型筛选法	194	第二节 RNA 干扰技术	249
二、快速裂解菌落鉴定重组 DNA 分子	197	一、RNAi 的分子机制	250
三、核酸分子杂交检测法	198	二、Dicer 和 RdRP 酶	251
四、免疫化学检测法	204	三、RNAi 技术的特点	251
五、转译筛选法	205	四、RNAi 操作的基本程序	252
六、亚克隆法	206	五、RNAi 技术的应用	253
第三节 阳性重组子的验证与分析	207	第三节 基因敲除技术	253
一、阳性重组子的验证	207	一、基本原理	253
二、DNA 的序列分析	208	二、基因敲除技术的操作程序	253
本章小结	212	三、基因敲除技术的应用	254
思考题	212	第四节 酵母杂交技术	254
第十一章 目的基因的表达	213	一、酵母双杂交系统	255
第一节 目的基因表达的机制	213	二、酵母单杂交系统与酵母三杂交 系统	257
一、目的基因的起始转录及 mRNA 的 延伸	213	第五节 拉下实验	257
二、目的基因 mRNA 的翻译	213	第六节 蛋白质组学研究	259
三、提高目的蛋白的表达	214	一、蛋白质组学概念	259
第二节 目的基因表达的制约因素	214	二、蛋白质组学的相关技术	260
一、制约目的基因表达的常见因素	214	三、蛋白质组学信息学	261
二、原核系统高效表达外源真核基因的 措施	216	四、蛋白质组学的应用	261
参考文献		本章小结	261
		思考题	262
			263

上篇 现代分子生物学

第一章 绪 论

第一节 分子生物学的概念及发展状况

一、分子生物学的概念及研究内容

(一) 分子生物学的概念

从广义上讲,分子生物学是研究核酸、蛋白质等所有生物大分子形态、结构与功能及其重要性、规律性和相互关系的科学,是人类从分子水平上真正揭开生物世界的奥秘,由被动地适应自然界转向主动地认识和改造自然界的基础学科。

从狭义上讲,分子生物学研究的范畴偏重于核酸,主要研究基因和 DNA 的复制、转录、表达和调控等过程,其中也涉及与这些过程有关的蛋白质和酶的结构与功能的研究。

(二) 分子生物学的研究内容

分子生物学是研究所有生物学现象的分子基础。从这个意义上说分子生物学包括了所有的生物学学科,分子生物学与生物学其他各分支之间的界限越来越不明显了。尽管分子生物学涉猎的范围十分广泛,研究内容也包罗万象,但是按照狭义分子生物学的定义,我们可将现代分子生物学的研究内容概括为以下几个大的方面。

1. 基因与基因组的结构与功能

基因的研究一直是影响整个分子生物学发展的主线。在不同的历史时期对基因的研究有不同的内容:20 世纪 50 年代以前,主要从细胞、染色体水平上进行研究,是基因的染色体遗传学内容;20 世纪 50 年代之后,主要从 DNA 大分子水平上进行研究,属于基因的分子生物学阶段;近 20 多年来,由于重组 DNA 技术的不断完善和应用,人们已经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的关系,使基因的研究进入了反向生物学阶段。在这个历程中对基因与基因组的微观的、高级的结构与功能的研究始终是分子生物学研究内容中最基础最重要的部分。

2. DNA 的复制、转录和翻译

这一方面研究的重点是 DNA 或基因怎样在各种相关的酶与蛋白质因子的作用下,按照中心法则进行自我复制、转录和翻译,以及对 mRNA 分子剪接、加工、编辑和对新生多肽链折叠成为功能结构的研究。

3. 基因表达调控的研究

基因表达的实质是遗传信息的转录和翻译。在生物个体的生长、发育和繁殖过程中,遗传信息的表达按照一定的时空发生变化(时空调节的表达);并且,随着内外环境的变化而不断地加以修正(环境调控表达)。

基因表达的调控主要发生在转录水平和翻译水平上。原核生物的基因组和染色体结构都比真核生物简单,转录和翻译在同一时空内发生,基因表达调控主要发生在转录水平。真核生物有细胞核结构,转录和翻译过程在时间和空间上都分隔开,且在转录和翻译后都有复杂的加工过程,其基因表达的调控可以发生在各种不同的水平。基因表达调控主要表现在对上

游调控序列、信号转导、转录因子以及 RNA 剪辑等几个方面。

4. DNA 重组技术

DNA 重组技术, 即基因工程, 是 20 世纪 70 年代初兴起的一门科学技术。应用此技术能将不同的 DNA 片段进行定向的连接, 并且在特定的宿主细胞中与载体同时复制、表达。作为分子生物学研究的内容之一, 它的主要目的是: (1) 用于大量生产某些在正常细胞代谢中产量很低的多肽, 如激素、抗生素、酶类及抗体等, 提高产量, 降低成本, 使许多有价值的多肽类物质得到广泛的应用, 例如, 用于治疗艾滋病的基因工程白介素 12 (IL-12), 可有效地阻止病情发展, 恢复 HIV 病毒携带者的免疫系统和功能。(2) 用于定向改造某些生物的基因组结构, 使它们所具备的特殊功能更符合人类生活的需要, 提高其经济价值。(3) DNA 重组技术还被用来进行基础研究。分子生物学研究的核心是遗传信息的结构、传递和控制, 在这个过程中 DNA 重组技术是不可缺少的手段之一。

5. 结构分子生物学

任何一个生物大分子当它在发挥生物学功能时都必须具备两个前提, 一是必须拥有特定的空间结构 (三维结构); 二是在它发挥生物学功能的过程中必定存在着结构和构象的变化。结构分子生物学就是研究生物大分子特定的空间结构以及结构的动态变化与其生物学功能关系的科学, 它包括结构的测定、结构动态变化规律的探索和结构与功能相互关系 3 个方向的研究。结构分子生物学在今后仍然是生命科学发展的基础学科。在这一领域中, 仍需要有生物学家、生物化学家、物理学家、化学家以及计算机和工程学的专家共同努力。

分子生物学已经渗透到生物学科各个领域之中, 并正在产生一系列新的分支学科, 改变了或正在改变着整个生物学的面貌, 其研究成果已在工业、农业、医学以及生物制药等领域得到广泛的应用。对分子生物学的深入研究将使整个生物学在分子水平上统一起来, 即普通生物学 (general biology), 愈来愈多的研究成果说明生命的本质具有高度的一致性, 这就是所谓生长、发育与进化的统一理论。

(三) 分子生物学在生命科学中的位置

分子生物学是从生物化学发展出来的, 由于蛋白质及核酸生物化学的研究逐渐深入到这些生物大分子结构和功能的研究中, 提出了 DNA 双螺旋模型, 此后核酸的分子生物学 (狭义) 得到了迅速发展, 形成分子生物学一门独立的新学科, 它的发展使生命科学各个学科的研究深入到分子水平。分子生物学、细胞生物学、神经生物学被认为是当代生物学研究的三大主题。分子生物学与其他许多学科息息相关, 许多新问题和新思路促使许多学科在理论和方法上得到提高。

1. 与微生物学的关系

早期分子生物学的研究对象都是原核生物, 特别是大肠杆菌 (*E. coli*)。对大肠杆菌的 DNA 和 RNA 及其复制、转录、翻译和调控过程已经了解得非常清楚。现在研究基因表达也往往是用大肠杆菌 (*E. coli*) 作为宿主, 所以有人认为, 目前的分子生物学主要是“*E. coli* 的分子生物学”。

2. 与遗传学的关系

遗传学是分子生物学发展以来受影响最大的学科, 孟德尔著名的遗传分离规律, 在近 20 年内得到了分子水平上的解释, 分子生物学的发展极大地丰富了遗传学的内容, 产生了分子遗传学 (molecular genetics)。

3. 与细胞生物学的关系

细胞生物学与分子生物学也有密切的关系。现在的细胞生物学已经不限于从细胞水平研究细胞的形态、结构与功能, 而是进一步从分子水平上探讨构成细胞各种组分的基因及其表达, 产生了新学科分子细胞生物学 (molecular cell biology)。

4. 与发育生物学的关系

发育生物学是研究动物、植物的生长发育的科学。近年来，分子生物学渗入到发育生物学以后形成发育分子生物学（development molecular biology），使得发育生物学的面貌大为改观。现在我们已经认识到不论低等生物或是高等生物，它们的发育都是受基因组中 DNA 控制的，并且按照特定的时间和空间顺序依次表达出来的。

二、DNA 的发现

在美国科学家沃森（Waston）和英国科学家克里克（Crick）于 1953 年提出 DNA 双螺旋模型之前，人们对于基因的理解仍然是抽象的、概念化的，缺乏准确的物质内容。

早在 1928 年，英国科学家格里弗斯（Griffith）就发现，肺炎双球菌有 2 种，一种是致病力较强的光滑型（S 型），这种肺炎双球菌的 DNA 产生荚膜多糖，荚膜多糖的作用是使肺炎双球菌避免小鼠白细胞攻击，使小鼠致死；另一种是致病力弱的粗糙型（R 型），这种肺炎双球菌的 DNA 不能产生荚膜多糖，不能使小鼠死亡，这是一项基础研究。

在这一研究基础上，首先用实验证明基因就是 DNA 分子的是美国著名的微生物学家埃弗里（Avery），他共做了 4 项实验（图 1-1）：第一项，用活的 S 型菌侵染小鼠，小鼠死亡；第二项，用活的 R 型菌侵染小鼠，小鼠存活；第三项，将 S 型菌烧煮杀灭活性以后侵染小鼠，小鼠存活；第四项，将经烧煮杀死的 S 型菌和活的 R 型菌混合后再侵染小鼠，小鼠死亡。

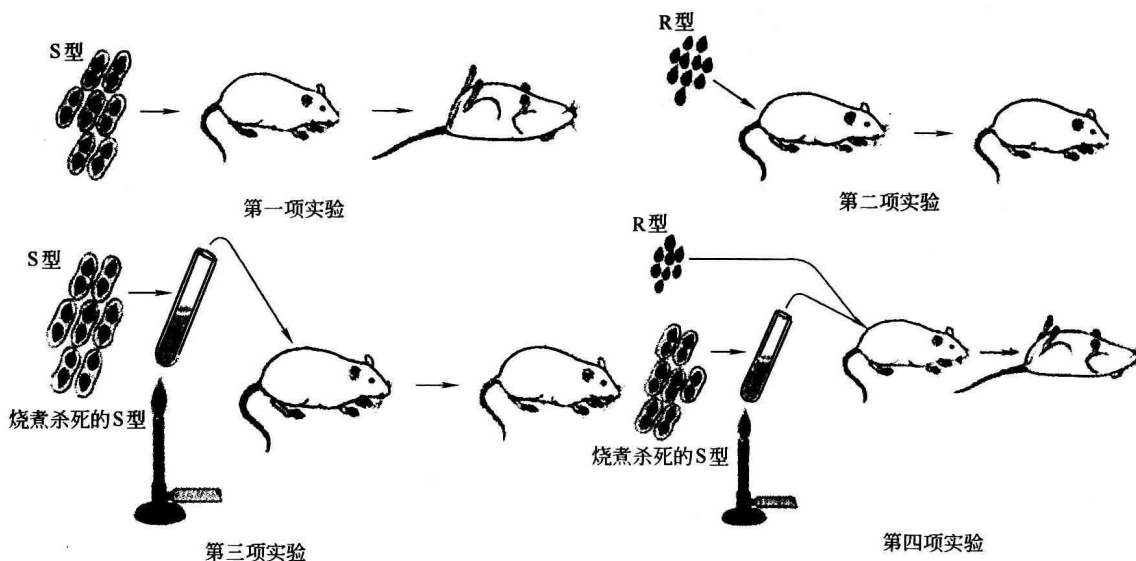


图 1-1 Avery 进行的不同肺炎双球菌侵染小鼠的实验

第一项实验的解释是：S 型菌的 DNA 产生荚膜多糖，荚膜多糖的作用是使肺炎双球菌避免小鼠白细胞攻击，使小鼠致死；

第二项实验的解释是：活 R 型菌的 DNA 能正常复制、转录、翻译，但不能产生荚膜多糖，因而被小鼠白细胞杀死，小鼠存活。

第三项实验的解释是：死 S 型菌的 DNA 不能进行正常复制、转录、翻译，不能产生荚膜多糖，侵入小鼠时受到小鼠白细胞攻击，小鼠存活。

第四项实验的解释是：死 S 型菌 + 活 R 型菌，S 型菌的 DNA 转化进入 R 型菌内，利用 R 型菌环境进行复制、转录、翻译，产生荚膜多糖，结果是活 R 型菌转变成活 S 型，产生荚膜多糖，小鼠致死。

进一步的实验证明死亡小鼠中含有大量活的 S 型菌，推测死 S 型菌中的某一种成分将无致病能力的活 R 型菌转化为有致病能力的活 S 型菌，从而导致小鼠死亡。S 型菌有一种物质

(转化源)能够进入R型菌,并引起稳定的遗传变异,能够指导荚膜多糖的形成。从死的S型菌提取的DNA能使活的R型菌转化成为活的S型菌这一事实证明了DNA是转化源,也就是说引起细菌遗传性状改变的物质是DNA。如果在这一转化过程中加入少量DNA酶来降解DNA,这一转化现象立即消失,以上实验充分证明了引起细菌遗传性状改变的物质是DNA。

三、Chargaff 规律及 DNA 双螺旋模型

(一) Chargaff 规律

1949年Chargaff从不同来源的DNA测定出4种核酸碱基,即胸腺嘧啶(T)、胞嘧啶(C)、腺嘌呤(A)、鸟嘌呤(G),并发现A与T的量(A+T)和G与C的量(G+C)并不相等,也就是 $(A+T)/(G+C)$ 的比值随不同来源的DNA而有所不同,同时他发现G与C的量,A与T的量总是相等,即 $G=C$, $A=T$,这一规律称为Chargaff规律。

(二) DNA 双螺旋模型



图 1-2 Waston (左) 与 Crick (右) 和他们的 DNA 双螺旋模型

1953年,美国科学家 Waston 和英国科学家 Crick 提出了 DNA 双螺旋模型(图 1-2),主要观点是两条多核苷酸链是反向平行的,即一条链是从 $5' \rightarrow 3'$,另一条链则是 $3' \rightarrow 5'$,两条链的碱基是互补配对的,成为双螺旋状(double helix)。

这个模型表明 DNA 具有自身互补的结构,根据碱基配对原则,DNA 中储存的遗传信息可以准确地进行复制,这些理论奠定了分子生物学的基础,两位科学家也因此获得 1962 年诺贝尔生理医学奖。一般认为,分子生物学的起源就是从 Waston 和 Crick 提出了 DNA 双螺旋结构模型时开始,这个具有划时代意义的模型不仅展示了细胞遗传信息分子 DNA 的结构,而且还在分子水平上尝试解释 DNA 复制的机制和自发突变的

根源。因此,DNA 双螺旋结构模型的提出开辟了在 DNA 水平上研究生命现象及其规律的新领域,迎来了分子生物学的新时代。

四、分子生物学的发展

到目前为止,分子生物学的发展大致上分为两个阶段:理论体系形成阶段和深入发展阶段。

(一) 理论体系形成阶段

从 1953 年以 DNA 双螺旋结构模型提出为标志的分子生物学诞生,到 1970 年具有较完整体系的分子生物学著作出版,这是分子生物学的理论体系形成阶段。其间,提出了从 mRNA 到蛋白质的三联子遗传密码规律;美国生物化学家 Kornberg 与 Ochoa 用人工合成的方法制备了 DNA 和 RNA;Khorana 还进行了 64 种可能的遗传密码的化学合成与功能测试;Crick 提出了遗传信息传递从 DNA 到 RNA 再到蛋白质的中心法则。同时,mRNA、DNA 聚合酶、RNA 聚合酶、DNA 半保留复制机制、操纵子调控模式和遗传密码等先后被发现。这些学说与成果奠定了分子生物学理论体系形成的基础。1965 年,第一本《基因的分子生物学》著作(Waston 等人编写)的问世,及 1970 年该书的再版,标志着分子生物学这门新兴的生物学科有了较完整的理论体系。

(二) 深入发展阶段

分子生物学的深入发展阶段是以一系列重要的技术突破和重大研究成果为标志的。1970

年以后, 分子生物学飞速发展, 理论和技术体系不断扩大。蛋白质结构与功能、生物大分子的相互作用等已成为分子生物学的重要研究内容。自 20 世纪 70 年代以来, 分子生物学不仅产生了基因重组、DNA 测序、核酸印迹、单克隆抗体、DNA 体外扩增、基因转移与基因敲除以及体细胞克隆等多项重要技术, 而且取得了基因工程药物和疫苗、基因诊断与治疗、转基因动植物、动物的体细胞克隆、人类基因组序列图等重大成果。分子生物学的发展对整个生命科学乃至对整个人类社会产生了深远的影响。

1986 年, 美国科学家 Thomas Roderick 提出了基因组学 (genomics) 的概念, 指对所有基因进行基因组作图 (包括遗传图谱、物理图谱、转录图谱)、核苷酸序列分析、基因定位和基因功能分析的一门科学, 这一名词现已作为“研究基因组的结构与功能的科学”而被普遍接受。

计算机和信息技术与分子生物学的结合又大大加速了分子生物学的发展, 由此产生了一门以应用计算机和信息技术进行基因组信息的获取、处理、存储、分配、分析和解释为目标的新兴交叉学科——生物信息学 (bioinformatics)。

回顾分子生物学的形成与发展, 可以发现基因的研究始终是这一过程的主线。一部分分子生物学发展史, 实际上也是基因研究与认识的历史。分子生物学不仅是目前自然科学中发展最迅速、最具活力和生气的领域, 也是新世纪的带头学科。

第二节 基因工程的概念及发展状况

一、基因工程的概念

(一) 基因工程技术

基因工程 (genetic engineering), 也叫基因操作、遗传工程或重组 DNA 技术, 它是一项将生物的某个基因通过载体运送到另一种生物的活体细胞中, 并使之无性繁殖 (称为“克隆”) 和行使正常功能 (称为“表达”), 从而创造生物新品种或新物种的遗传学技术。

基因工程中外源 DNA 插入载体分子所形成的杂合分子又称为嵌合 DNA 或 DNA 嵌合体 (DNA chimera), 构建这类重组分子, 并对重组分子进行无性繁殖过程称为分子克隆 (molecular cloning), 基因克隆 (gene cloning) 或重组 DNA (recombinant DNA)。

在典型的基因工程实验中, 被操作的基因不仅能够克隆, 而且能够表达。但是另外一种情况下, 为了制备和纯化一段 DNA 序列, 我们只需要这一段 DNA 在宿主细胞中克隆就可以了, 无需让它表达, 这也是一种基因工程实验。

(二) 基因克隆与表达的操作步骤

1. 基因克隆的操作步骤

(1) 从复杂的生物有机体基因组中, 经过酶切消化或 PCR 扩增等步骤, 分离出带有目的基因的 DNA 片段;

(2) 在体外, 将带有目的基因的外源 DNA 片段连接到能够自我复制的并具有选择标记的载体分子上, 形成重组 DNA 分子;

(3) 将重组 DNA 分子转移到适当的宿主细胞, 并与之一起增殖;

(4) 从大量的细胞繁殖群体中, 筛选出获得了重组 DNA 分子的宿主细胞克隆;

(5) 从这些筛选出来的宿主细胞克隆中提取出已经得到扩增的目的基因, 供进一步分析研究使用。

2. 基因表达的操作步骤

(1) 从复杂的生物有机体基因组中, 经过酶切消化或 PCR 扩增等步骤, 分离出带有目的基因的 DNA 片段;

(2) 将目的基因克隆到表达载体上, 导入宿主细胞, 使之在新的遗传背景下实现功能表达, 产生出人类所需要的物质。

(三) 基因工程的研究内容

基因工程问世以来, 科技工作者始终十分重视基础研究, 包括构建一系列克隆载体和相应的表达系统、建立不同物种的基因组文库和 cDNA 文库、开发新的工具酶、探索新的操作方法等, 各方面取得了丰硕的研究成果, 使基因工程技术不断趋向成熟。

1. 基因工程克隆载体的研究

基因工程的发展是与克隆载体的构建密切相关的, 由于最早构建和发展了用于原核生物的克隆载体, 所以以原核生物为对象的基因工程研究首先得以迅速发展。随着 Ti 质粒的发现以及成功地构建了 Ti 质粒衍生的克隆载体后, 植物基因工程研究随之就迅速发展起来。动物病毒克隆载体的构建成功, 使动物基因工程研究也有一定的进展。可以认为构建克隆载体是基因工程技术路线中的核心环节, 至今已构建了数以千计的克隆载体, 但是构建新的克隆载体仍是今后研究的重要内容之一, 尤其是适合用于高等动植物转基因的表达载体和定位整合载体还需大力发展。

2. 基因工程宿主系统的研究

基因工程的宿主与载体是一个系统的两个方面。前者是克隆载体的宿主, 是外源目的基因表达的场所。宿主可以是单个细胞, 也可以是组织、器官、甚至是个体。用作基因工程的宿主可分为 2 类, 即原核生物和真核生物。

原核生物大肠杆菌是早期被采用的最好宿主系统, 应用技术成熟, 几乎是现有一切克隆载体的宿主; 目前, 已经以大肠杆菌为宿主建立了一系列基因组文库和 cDNA 文库, 以及大量转基因工程菌株, 开发了一批已投入市场的基因工程产品。蓝细菌(蓝藻)、酵母菌、植物、动物、人的体细胞都可以作为基因工程的宿主。

3. 目的基因的研究

基因是一种资源, 而且是一种有限的战略性资源。因此开发基因资源已成为发达国家之间激烈竞争的焦点之一, 谁拥有基因专利多, 谁就在基因工程领域占主导地位。基因工程研究的基本任务是开发人们特殊需要的基因产物, 这样的基因统称为目的基因。具有优良性状的基因理所当然的是目的基因, 而致病基因在特定情况下同样可作为目的基因, 具有很高的开发价值。即使是那些今天尚不清楚功能的基因, 随着研究的深入, 也许以后会成为具有很高开发价值的目的基因。现在已获得的目的基因大致可分为 3 大类: 第一类是与医药相关的基因; 第二类是抗病、虫害和恶劣环境的基因; 第三类是编码具特殊营养价值的蛋白或多肽的基因。

近年来越来越重视基因组的研究工作, 试图搞清楚某种生物基因组的全部基因, 为全面开发各种基因奠定基础。1998 年完成基因组测序的生物有 11 种。2003 年 4 月 14 日, 美国联邦国家人类基因组在华盛顿宣布, 美、英、日、法、德和中国六国科学家经过 13 年努力共同绘制完成了人类基因组序列图, 对人类基因的面貌有了新的发现。以稻米为主食的我国于 2001 年 10 月 12 日宣布具有国际领先水平的中国水稻(籼稻)基因组“工作框架图”和数据库在我国已经完成, 这一成果标志着我国已成为继美国之后, 世界上第二个能够独立完成大规模全基因组测序和组装分析能力的国家, 表明我国在基因组学和生物信息学领域不仅掌握了世界一流的技术, 而且具备了组织和实施大规模科研项目开发的能力。此外, 中国和英国合作的“家猪基因组计划”也已经启动。

4. 基因工程新技术的研究

自从基因工程问世以来, 用于基因工程的研究技术不断出现, 不断更新。除了基因工程工具酶的研究外, 同时发展了一系列用于不同类型宿主细胞的 DNA 转化方法和病毒转导方

法；除常规 PCR 技术外还发展了多种特殊的 PCR 技术，如长片段 PCR 技术、反转录 PCR 技术、免疫 PCR 技术、不对称 PCR 技术、定量 PCR 技术、锚定 PCR 技术、重组 PCR 技术、加端 PCR 技术等；凝胶电泳技术可以在凝胶板上把不同分子大小的 DNA 分子分开，但是只能分辨几万碱基的 DNA 分子，脉冲电泳技术的问世，不仅能分开上百万碱基的 DNA 分子，而且能够使完整的染色体彼此分开。

基因工程研究新技术层出不穷，推动了基因工程的迅速发展。同时随着基因工程研究的不断深入，将会出现更多新的研究技术。

二、基因工程的发展

1972 年，美国斯坦福大学（Stanford University）的 Berg 等首次用限制性核酸内切酶 *EcoR* I 切割病毒 SV40DNA（一种猴病毒）和噬菌体 λ DNA，又将两者连接在一起，成功地构建了第一个体外重组的人工 DNA 分子。1973 年 Cohen 等人首次在体外将重组的 DNA 分子导入大肠杆菌中，成功地进行无性繁殖，从而完成了 DNA 分子体外重组和扩增的全过程，这是基因工程发展史上第一个克隆转化并取得成功的例子，因此，这一年被评定为基因工程诞生之年，Cohen 创立了基因工程的基本模型，是基因工程的创始人。在这个工作的基础上，又经历 20 年的时间，有关领域的科学家已能使异源基因在宿主细胞成功地表达具有特异生物学活性的蛋白质。通过体外基因重组，可以人工创造出新的生物物种。

基因工程技术经历了安全问题的争论和改造载体阶段，当前已将突破点集中于外源基因在宿主细胞内的表达问题上，确切地说，更集中于真核基因在原核细胞表达的基因工程技术。基因工程技术的迅速发展得益于现代遗传学和生物化学成果的积累和工作。限制性核酸内切酶的发现，对噬菌体和细菌质粒的生物学研究成果以及 Southern 印迹技术、聚合酶链式反应、脉冲场凝胶电泳技术等重大发现和技术革新都给基因工程带来新的进展与突破。现在，已经有了快速自动化的 DNA 序列分析技术和 DNA 合成技术，以及灵敏度极高的基因检测和基因表达检测技术，一些原先非常繁杂的基因工程技术在一定程度上自动化或常规化了。

三、基因工程的应用

基因工程为生物学、医药学、遗传学、农业科学、环境科学和某些工业研究开拓了广阔的、革命性的发展前景。生物学中长期无法解决的许多问题，现在都变得可能。自然界创造新的生物物种一般需要几十万年乃至几百万年，但是在实验室用基因工程技术可能在几天内完成这个过程。重组 DNA 技术彻底打破了常规育种种属间不可逾越的鸿沟，动物和植物，细菌和人的基因都可连接在一起，形成杂种生物，这是以往科学家难以想象的奇迹。基因工程使人类从单纯地认识生物和利用生物的传统模式跳跃到随心所欲改造生物和创造生物的新时代。

（一）利用微生物制药

基因工程技术能把珍贵的人类激素基因插入到可以用工业规模生长的微生物中，来大量生产人类激素，如生长激素、胰岛素、促红细胞生成素等。下面以重组微生物生产胰岛素为例介绍基因工程在微生物制药方面的应用。

目前世界上大约有 6 000 万糖尿病患者，大部分患者是体内胰脏产生的胰岛素不足。其中 400 万人定期注射胰岛素进行治疗，以避免出现更严重的后果。根据传统方法，胰岛素是从猪或牛的胰脏中提取纯化出来的，一位患者每年需要 3~5kg 的胰脏组织，这相当于 40 头牛或 50 头猪的胰脏。不难看出，用传统方法生产胰岛素必然会遇到原材料来源困难的问题。而且更麻烦的是，来源于猪或牛的胰岛素和人的胰岛素有 1 个或 3 个氨基酸的差异，这毫无疑问地会影响治疗的效果，还会使某些患者产生过敏反应。

1978 年，美国哈佛大学的 Gilbert 等把老鼠胰岛素基因与大肠杆菌的青霉素酶基因连接，转化 *E. coli*，产生了胰岛素。这是基因工程的一大突破，美国的基因工程胰岛素已经在

1981 年投放市场。1985 年, 日本也获得成功并投放市场。据报道, 加拿大用大肠杆菌生产胰岛素, 产量达 100mg/L, 也就是说, 只要 100L 这样的培养液就相当于 1t 猪、羊胰腺的提取量。我国上海细胞研究所, 用大肠杆菌表达胰岛素基因的水平为 40mg/L。

(二) 农作物的基因工程育种

在过去的 100 年间, 人们利用传统的育种方法已经培育出许多农作物新品种, 并且获得了可观的经济效益。中国在杂交水稻、杂交玉米和优良小麦品种的选育方面取得了举世瞩目的成就。但是, 传统的育种方法存在着许多不足之处, 例如, 培育新品种所需的时间较长, 过程繁杂, 需耗费大量的人力和物力, 而且通过杂交获得优良品种的方法容易受到亲本材料的限制, 如远缘亲本难以杂交, 即便能杂交也难以从性状分离的后代群体中选择到具有理想性状的重组表型。而植物基因工程则为解决这些问题提供了新的思路和方法。例如, 可以不受作物亲本的限制获得所需性状; 可以在一种植物中表达另一种植物, 甚至动物的基因; 转入的带有所需性状的基因一般不会妨碍植物原有的优良性状的表达, 等等。从目前获得的数据来看, 转入的外源基因可按照孟德尔定律进行遗传, 因此, 经过几代的杂交选育, 就可以获得纯合的转基因植物, 从而大大缩短了培育新品种所需的时间。

对植物进行基因改造比对动物进行基因改造有优势, 原因在于植物可以很容易地从单个未分化细胞培养长成完整的植株。所以, 只要在一个植物细胞中采用微注射法、基因枪法以及农杆菌介导的转化方法导入新的基因, 再分化成为遗传改变的个体, 就能获得我们想要的新品种, 也就是转基因植物。目前已经获得了转基因抗虫、抗病毒、抗除草剂、抗不良环境、抗衰老及改善品质的转基因作物。

(三) 动物克隆与转基因动物



图 1-3 克隆羊 “Dolly” 和他的第一只羊羔 “Bany”

克隆是英文 “clone” 的音译, 源于希腊文 “klon”, 原意是指植物幼苗或嫩枝以无性繁殖或营养繁殖的方式培育, 也就是指用除种子之外的植物体的任何一部分进行无性繁殖。现在它的范围扩大了, 凡是没有精卵结合过程, 而由同一个祖先细胞获得的两个以上的细胞、细胞群或生物体, 或是由同一个亲本 DNA 序列产生子代 DNA 的方式就是克隆, 用这种方式分化发育得到的生物体与母体的基因是完全相同的。目前比较科学的描述是: 克隆是指生物体通过体细胞进行的无性繁殖, 以及由无性繁殖形成的基因型完全相同的后代个体组成的种群。1996 年 7 月 5 日世界上第一只基于核移植技术的克隆动物 “Dolly” 诞生 (图 1-3), 它是苏格兰罗斯林

研究所和 PPL 医疗公司的共同作品。至此, 得到大量基因相同的动物不再是一个奢望。

多年以来, 杂交选择一直是改良家畜遗传性状的主要途径。随着现代生物技术的发展, 传统的杂交选择法的各种缺陷日益明显, 而现代分子育种技术却显示出越来越强大的生命力, 逐渐成为动物育种的趋势和主流。但是真正操作并没有想像的那么简单。一直到一只巨鼠的出现, 才宣布了首例转基因动物的成功。科学家们克隆了鼠生长激素的基因, 将此基因连接在一个由钙诱导的启动子后面, 转入小鼠中。然后科学家们只要加入钙, 就可以使此基因表达, 从而得到了正常小鼠两倍大的巨鼠。随后, 人们又得到了转入人的生长激素基因的超大型猪。

运用相关转基因技术对多细胞动物进行遗传改造, 这些年的进展非常迅速。目前, 转基因技术已经发展成为很多基础问题研究的一种有力手段。

四、生物安全性问题

基因工程研究在 20 世纪 70 年代曾引起了广泛的讨论，主要是担心基因工程某些实验可能会引起的危险。有人认为重组体分子的建立及将其插入微生物或高等生物中可能创造出新的生物，这些新生物可能会由于疏忽而致使它们从实验室中逃逸出来，成为对人类及环境的生物危害。另一些人认为，这种带有外加遗传物质的新生物绝对竞争不过自然界中存在的正常生物品系。

1959 年获 Nobel 奖的 Kornberg（致力于 DNA 复制的研究）指出，正如大多数人不能区别原子和分子，病毒和细胞，细胞和生物一样，恐惧是由于对基因工程缺乏理解而造成的。研究人员也用事实消除了人们的恐惧心理。在基因工程研究初期，一般用大肠杆菌 KL2 作为基因工程的宿主细菌。人们担心它通过研究者的消化道逃出实验室，对接触过大肠杆菌 KL2 的重组质粒的人员进行粪便检查，每 2~3 天一次，持续两年，始终未发现大肠杆菌 KL2 和重组质粒。后来，为了防止大肠杆菌可能变成环境中的危险生物，人们通过遗传构建了一种特别的大肠杆菌株系，这种株系只能在特定的实验室条件下生长，即使它从实验室逃逸出来，也不可能造成危险。

GMO 是 Genetic Modification Organism 的简称，即基因被改变的生物。1994 年 Calgene 公司研制的抗早熟保鲜番茄在美国批准上市，开创了转基因植物商业化的先河。自此以后，基因工程技术的发展日新月异。迄今为止，以美国为例，1/4 的耕地面积种植的是转基因作物，美国市场上已有近 4 000 种食品来自转基因作物。与此同时，人们对转基因食品产生了一些担心。有些杂志上赫然出现了“基因工程食品是危及自身的食品”、“基因工程食品是冒险食品”等标题，而事实上，科学家们在研究转基因作物时，首先要充分考虑的就是安全性问题，如果这个问题解决不了，转基因作物就不可能走出实验室，走上市场。对于转基因食品，人们最关心的问题莫过于转基因植物中标记基因的毒性问题、食品中是否有过敏源的问题以及转基因食品是否会引起其他不良反应，特别是有无可积累的长期作用。这些问题科学家们早已替人们考虑到了。实际上，转基因食品走上市场之前，就已经做了严格的安全性评估。

（一）转基因食品有毒性吗

美国对食品安全的高标准是举世公认的。美国食品和药物管理局（U. S. Food and Drug Administration, FDA）是美国负责对上市食品和药品进行安全性评估的部门，它有严格的标准，因此得到了公众的信任。FDA 对一般食品评估批准一般需 12~18 个月，而批准一个 GMO 的时间却可能长达 6 年。这就足以看出在转基因食品上市之前，对它们安全性的考虑可以说是慎之又慎。

我国首次获得抗黄瓜花叶病毒的转基因番茄。在转基因番茄进入商品化生产之前，根据我国基因工程安全法的要求，对转基因番茄进行了毒理分析，分析指标包括：急性毒性半数致死量（LD₅₀）测试，微核测验（是否诱发微核产生），精子畸变试验，Ames 试验（对 4 种细菌有无诱变作用），30 天动物喂养试验。喂养试验检测实验动物在饲喂了转基因番茄后动物的活动情况，包括毛色、摄食及排泄情况，生长发育的变化，血清学指标，血液生化指标的变化，脏器如心脏、肝、脾、肺、肾、胃、睾丸或卵巢的变化，通过病理切片检查器官的组织病变。所有的这些试验结果表明，转基因番茄对动物不会造成任何不良作用。说明转基因番茄是安全的。

尽管英国举国上下对于转基因食品陷入恐慌，然而各种基因改造的农作物的数千个田间试验，以及全球三千多万公顷转基因作物的商品化，并没有提供任何证据说明它对人体或环境存在安全问题。在转基因作物问世 24 年中，人们吃转基因食品已有 11 年。美国市场上近 4 000 种转基因食品中，各种转基因玉米、大豆等商品，包括婴儿食品，也并未报道过一例转基因食品安全事件。