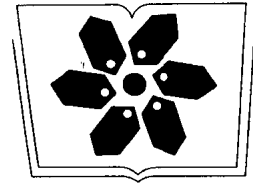


基因工程原理

第二版 (下 册)

吴乃虎 编著

科学出版社



中国科学院科学出版基金资助出版

基因工程原理

下册

(第二版)

吴乃虎 编著

科学出版社

2002

内 容 简 介

本书是在第一版的基础上,吸收了本学科的新进展,增加了大量的新内容,重新审订、编写而成。

全书共十二章,分上下两册,书末附有基因工程名词术语解释及索引。本书由二个有机联系的部分组成。第一部分论述基因工程赖以创立的理论及技术基础,重点介绍基因研究的发展及基因的现代概念;基因研究与基因工程的相互依赖关系;基因操作主要技术的基本原理;与基因克隆有关的一系列核酸酶的生化特性和在 DNA 重组中的应用等。第二部分由第四章至第八章组成,系本书的核心。它详细地叙述了基因工程学所涉及的主要内容,包括各类分子克隆载体的构建、特点与应用;基因文库的构建、目的基因的分离与鉴定;克隆基因的表达与调控以及真核基因在大肠杆菌中表达的原理、方法及实例等。第三部分即本书的后四章,主要论述基因工程实际应用方面的内容。它着重叙述高等植物及哺乳动物基因工程的研究目标、现状与进展,以及重组 DNA 技术在临床医学、农业生产、食品工业、化学制剂等若干重要领域的实际应用情况。

本书是一部有自己特色、体系新颖、基础理论与实际应用并重的基因工程学术专著。在内容的安排上注重科学性、先进性、系统性和条理性。它不仅对我国基因工程的教学与研究,而且对其它生物技术以及分子生物学、分子遗传学等学科的教学与研究都有很好的参考价值。本书可作为生物、农林、医学等专业的本科生、研究生及教师的教学用书,也可作为有关科研人员的参考书。

图书在版编目(CIP)数据

基因工程原理(下册)(第二版)/吴乃虎编著.-2版.-北京:科学出版社,2001

ISBN 7-03-009708-4

I. 基… II. 吴… III. 基因-遗传工程-理论 IV. Q78

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2001)第 055583 号

科学出版社 出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

源海印刷厂 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

1989年10月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2001年9月第 二 版 印张:34 1/2

2002年4月第四次印刷 字数:794 000

印数:7 261—12 260

定价:68.00元

(如有印装质量问题,我社负责调换(新欣))

目 录

第七章 基因的表达与调节	(1)
第一节 概述	(1)
第二节 原核基因的表达与调节	(4)
1. 大肠杆菌基因组结构概述	(4)
(1) 基因组结构	(4)
(2) 操纵子	(5)
(3) 基因表达信号	(6)
2. 大肠杆菌基因的转录	(6)
(1) RNA 合成的化学特性	(7)
(2) RNA 合成的不同阶段	(8)
(3) 转录终止的类型	(11)
(4) RNA 分子的类型	(15)
3. 大肠杆菌基因的转译	(17)
(1) 转译的概述	(17)
(2) 转译的三个步骤	(19)
(3) 转译的调节	(23)
(4) mRNA 稳定性的转译效应	(25)
4. 大肠杆菌基因表达的调节	(26)
(1) 转录调节的特点	(26)
(2) 大肠杆菌基因表达的诱导与阻遏	(27)
(3) 大肠杆菌基因表达的正调节与负调节	(28)
(4) 大肠杆菌基因表达的操纵子模型	(29)
(5) 弱化作用调节	(38)
第三节 真核基因组及基因的结构	(41)
1. 染色质与染色体	(42)
(1) 染色质的组分	(42)
(2) 核小体	(43)
(3) 核小体结构的修饰	(44)
(4) 活性染色质与转录	(44)
(5) 染色体	(46)
2. 真核基因组的结构	(47)
(1) 蛋白质编码基因	(48)
(2) 遗传元件	(49)
(3) 转位子与内源性反转录病毒	(50)
(4) 卫星 DNA	(52)
(5) DNA 重排	(52)
(6) DNA 扩增	(54)

3. 真核基因的结构	(55)
(1) polI 基因	(56)
(2) polIII 基因	(57)
(3) polII 基因	(60)
第四节 真核基因的转录与调节	(65)
1. 真核 RNA 聚合酶与基因转录	(65)
(1) RNA 聚合酶的类型	(65)
(2) 真核 mRNA 的结构特征	(66)
(3) pre-mRNA 的剪辑	(68)
(4) mRNA 的稳定性	(68)
2. 真核基因启动子	(71)
(1) 启动子元件的鉴定	(71)
(2) 启动子的结构模型	(74)
3. 增强子的功能特性	(75)
(1) 增强子的一般特性	(75)
(2) 细胞专一性增强子	(76)
(3) 调节型增强子	(77)
4. 真核基因转录调节的若干问题	(78)
(1) 调节的水平	(78)
(2) 转录的控制	(79)
(3) 转录的激活	(80)
(4) 转录的抑制	(82)
5. 真核基因转录的激素调节	(82)
(1) 类固醇激素对真核基因转录的激活效应	(82)
(2) 类固醇激素激活真核基因转录的分子机理	(84)
6. 真核基因转录的甲基化调节	(86)
(1) DNA 甲基化的转录效应	(86)
(2) 甲基化作用的克隆遗传	(87)
第五节 转录因子的结构与功能	(88)
1. 转录因子的概述	(88)
2. 转录因子的结构	(90)
(1) 转录因子的组件结构特性	(90)
(2) DNA 结合域	(92)
(3) 转录激活域	(96)
3. 转录因子的纯化与克隆	(97)
(1) 应用 DNA 亲和层析法纯化转录因子	(98)
(2) 应用 DNA 识别位点亲和层析法纯化转录因子	(98)
(3) 应用基因克隆技术纯化转录因子	(102)
4. 转录因子克隆基因的应用	(103)
(1) 阐释转录因子的特性	(103)
(2) 制备大量的转录因子蛋白质	(103)
(3) 转录因子 DNA 结合域定位	(103)

(4) 转录因子 DNA 结合域的突变研究及其基序的鉴定	(105)
(5) 转录因子激活域的鉴定——结构域交换试验	(105)
5. 转录因子的功能作用	(107)
(1) 转录因子的激活效应	(107)
(2) 转录因子的抑制效应	(109)
第八章 真核基因在大肠杆菌中的表达	(112)
第一节 真核基因的大肠杆菌表达体系	(112)
1. 大肠杆菌表达体系	(112)
2. 克隆基因正确表达的基本条件	(113)
3. 克隆基因表达活性的检测	(114)
第二节 大肠杆菌的表达载体	(116)
1. 大肠杆菌表达载体的基本成分	(116)
(1) 启动子	(116)
(2) 转录终止子	(117)
(3) 转译起始序列	(119)
(4) 转译增强子	(119)
(5) 转译终止子	(119)
2. 功能启动子的分离	(119)
(1) 分离功能启动子的一般程序	(119)
(2) 使用 tet ^r 作报告基因分离功能启动子	(120)
(3) 使用 galK 作报告基因分离功能启动子	(122)
3. 常用的大肠杆菌表达载体	(126)
(1) lac 启动子的表达载体	(126)
(2) trp 启动子的表达载体	(128)
(3) P _L 启动子的表达载体	(131)
第三节 克隆的真核基因在大肠杆菌细胞中的表达	(135)
1. 外源蛋白质在大肠杆菌细胞中的表达部位	(135)
(1) 细胞质中表达	(135)
(2) 周质中表达	(137)
(3) 胞外表达	(137)
2. 融合蛋白质的表达	(138)
(1) 融合蛋白质配偶体	(139)
(2) 表达融合蛋白质的策略	(139)
(3) 表达融合蛋白质策略的优点	(142)
(4) 融合蛋白质的纯化	(142)
(5) 融合蛋白质的切割	(144)
3. 外源蛋白质在大肠杆菌细胞中的稳定性	(148)
(1) 蛋白质的酶解作用	(150)
(2) 结构决定因子与蛋白质的稳定性	(151)
(3) 表达部位与蛋白质的稳定性	(152)
(4) 表达天然的蛋白质	(152)
(5) 分子伴侣的稳定作用	(153)

(6) 大肠杆菌突变体菌株与蛋白质的稳定性	(154)
第四节 影响克隆基因在大肠杆菌中表达效率的因素	(154)
1. 5'-UTR 对克隆基因表达效率的影响	(155)
(1) 启动子结构对表达效率的影响	(155)
(2) 启动子与克隆基因的间隔距离对表达效率的影响	(155)
(3) 提高克隆基因表达效率的实验方案	(157)
2. 质粒载体的生物学特性对基因表达效率的影响	(158)
(1) 质粒载体的拷贝数对表达效率的影响	(158)
(2) 质粒载体的不稳定性对表达效率的影响	(161)
3. mRNA 转录本的分子特性对基因表达效率的影响	(163)
(1) 转译起始序列对表达效率的影响	(163)
(2) mRNA 的稳定性对表达效率的影响	(164)
4. 遗传密码子的使用对基因表达效率的影响	(167)
(1) 密码子使用的偏爱性	(167)
(2) 密码子使用偏爱性的原因	(168)
(3) 密码子使用偏爱性对基因表达效率的影响	(168)
5. 寄主细胞的生理状态对基因表达效率的影响	(169)
第九章 植物基因工程	(171)
第一节 植物基因的克隆与分离	(173)
1. 根据基因的功能分离目的基因	(174)
2. 根据 mRNA 特异性分离目的基因	(174)
3. 根据 DNA 的插入作用分离目的基因	(177)
(1) 转位子标签法	(177)
(2) T-DNA 标签法	(180)
第二节 植物基因工程研究常用的基因	(183)
1. 选择标记基因	(183)
(1) 新霉素磷酸转移酶基因	(185)
(2) bar 基因	(186)
2. 报告基因	(186)
(1) 报告基因的应用	(187)
(2) 常用的报告基因	(188)
3. 杀虫基因	(191)
(1) 微生物源的杀虫基因	(192)
(2) 植物源的杀虫基因	(195)
(3) 动物源的杀虫基因	(201)
4. 抗病基因	(201)
(1) 抗病毒基因	(201)
(2) 抗细菌基因	(206)
(3) 抗真菌基因	(209)
(4) 植物抗病的分子机理	(211)
5. 非生物胁迫的抗性基因	(218)
(1) 重金属抗性基因	(218)

(2) 抗盐基因	(219)
(3) 抗低温胁迫基因	(221)
(4) 抗除草剂基因	(222)
(5) 抗氧化胁迫基因	(224)
第三节 植物基因转移的病毒载体	(225)
1. 单链 RNA 植物病毒	(225)
2. 单链 DNA 植物病毒	(227)
(1) 双子座病毒组病毒的一般生物学特性	(227)
(2) 番茄金色花叶病毒作为植物基因转移载体的可能性	(228)
3. 双链 DNA 植物病毒	(229)
(1) 花椰菜花叶病毒组的一般生物学特性	(231)
(2) CaMV DNA 的特性	(232)
(3) CaMV 的生活史模式	(233)
4. 花椰菜花叶病毒 DNA 载体	(234)
(1) CaMV DNA 的表达	(235)
(2) DNA 的缺失或插入与 CaMV 的感染性	(235)
(3) CaMV 克隆载体的发展	(236)
(4) CaMV DNA 作为克隆载体的评价	(237)
第四节 植物基因转移的质粒载体	(238)
1. 病原土壤杆菌	(238)
2. 植物冠瘿的诱发与冠瘿细胞的特性	(240)
3. Ti 质粒的遗传特性	(241)
(1) 冠瘿瘤诱发之遗传本质	(241)
(2) Ti 质粒的遗传功能	(244)
(3) 以 Ti 质粒为媒介的接合转移	(245)
(4) Ti 质粒的限制图及基因图	(246)
4. T-DNA 的结构与功能	(247)
(1) Ti 质粒与 T-DNA	(247)
(2) T-DNA 的整合机理	(247)
(3) T-DNA 的编码基因及功能	(250)
5. Ti 质粒载体的构建	(251)
(1) T-DNA 转化的选择记号	(251)
(2) 共合载体法	(252)
(3) 双元载体系统	(255)
(4) 隔端载体法	(257)
6. Ri 质粒载体系统	(260)
第五节 培育转基因植物的实验方法	(261)
1. 根瘤土壤杆菌的转化	(261)
(1) 两步接合转移法	(262)
(2) 三亲株杂交转移法	(262)
2. 植物细胞的转化	(263)
(1) 根瘤土壤杆菌介导的植物细胞转化法	(263)

(2) 生物弹击法	(271)
(3) 其它方法	(271)
3. 转基因植株的再生	(273)
(1) 愈伤组织培养	(274)
(2) 原生质体培养	(274)
第六节 转基因植物中外源基因的表达与调节	(278)
1. 高等植物基因表达调节概述	(278)
(1) 高等植物基因表达的类型	(278)
(2) 叶绿体基因的表达与调节	(279)
(3) 花发育过程中基因的表达与调节	(281)
(4) 植物激素与发育调节	(281)
2. 转基因沉默及其机理	(282)
(1) 转基因沉默的分子机理	(283)
(2) 转基因沉默的模式	(285)
(3) DNA 甲基化与转基因沉默	(286)
(4) 基质附着区的功能	(286)
3. 环境因素对转基因表达活性的影响	(287)
4. 提高转基因表达水平的若干技术途径	(287)
(1) 启动子及终止子的修饰与改造	(287)
(2) 转基因的修饰与改造	(288)
(3) 使用植物偏爱的密码子	(289)
(4) 蛋白质的定向运输	(290)
第十章 哺乳动物基因工程	(291)
第一节 哺乳动物基因转移的遗传选择标记	(291)
1. 嘌呤和嘧啶的生物合成	(291)
2. 胸苷激酶基因选择系统	(293)
(1) TK ⁻ 细胞	(293)
(2) HAT 选择法	(293)
(3) 共转化选择	(294)
3. 二氢叶酸还原酶基因选择系统	(296)
(1) 基本原理	(296)
(2) 主要优点	(297)
(3) 显性选择	(298)
4. 氯霉素乙酰转移酶基因选择系统	(298)
(1) CAT 质粒载体	(298)
(2) CAT 酶活性的测定	(299)
5. 黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶基因选择系统	(299)
(1) 基本原理	(299)
(2) pSV2 及其派生的质粒载体	(301)
(3) pRSV 及其派生的质粒载体	(303)
6. 氨基糖苷磷酸转移酶基因选择系统	(303)
第二节 外源 DNA 导入哺乳动物细胞的方法	(305)

1. 磷酸钙转染技术	(305)
(1) 磷酸钙转染的基本步骤	(305)
(2) 影响磷酸钙转染效率的因素	(305)
2. DEAE-葡聚糖转染技术	(308)
(1) DEAE-葡聚糖转染的一般程序	(308)
(2) DEAE-葡聚糖转染的可能机理及影响因素	(308)
(3) DEAE-葡聚糖转染法的评价	(308)
3. 聚阳离子-DMSO 转染技术	(309)
4. 基因显微注射技术	(309)
(1) 显微注射法	(309)
(2) 穿刺法	(310)
5. 电穿孔 DNA 转移技术	(310)
(1) 基本原理	(310)
(2) 操作程序	(310)
(3) 影响因素	(311)
6. 脂质体载体法	(311)
(1) 脂质体的制备	(312)
(2) 脂质转染法	(312)
(3) 脂质体载体法的优越性	(312)
7. 哺乳动物细胞基因打靶	(314)
(1) 基因打靶的分子基础	(314)
(2) 基因打靶的类型与应用	(315)
(3) 正负选择法	(316)
(4) 一触即脱选择法	(318)
(5) 哺乳动物细胞基因剔除实验	(318)
第三节 SV40 病毒载体	(320)
1. SV40 病毒的基本生物学特性	(321)
(1) SV40 病毒的生命周期	(321)
(2) SV40 病毒的基础分子生物学	(322)
(3) SV40 病毒的增强子序列	(323)
2. 取代型重组病毒载体	(323)
(1) 晚期区段取代载体	(324)
(2) 早期区段取代载体	(328)
3. 重组的病毒-质粒载体	(329)
(1) 含有完整早期区段和复制起点的病毒-质粒载体	(329)
(2) 微型病毒复制子-质粒载体	(330)
第四节 反转录病毒载体	(331)
1. 反转录病毒的一般生物学特性	(332)
(1) 生命周期	(332)
(2) 反转录病毒基因组的特点	(333)
(3) 反转录病毒的复制	(335)
(4) 原病毒 DNA 的表达	(336)

2. 反转录病毒载体的主要类型	(338)
(1) 辅助病毒互补的反转录病毒质粒载体	(338)
(2) 不需要辅助病毒互补的反转录病毒质粒载体	(339)
(3) 广寄主的反转录病毒载体	(342)
(4) 反转录病毒表达载体	(342)
第五节 其它的病毒载体	(344)
1. 痘苗病毒载体	(344)
(1) 痘苗病毒的特性	(344)
(2) 痘苗病毒载体的构建	(344)
2. 乳头瘤病毒载体	(346)
(1) 牛乳头瘤病毒基因组的结构特点	(347)
(2) 牛乳头瘤病毒载体	(347)
3. 腺病毒载体	(349)
(1) 腺病毒的一般生物学特性	(350)
(2) 腺病毒载体的构建	(351)
第十一章 重组 DNA 与现代生物技术	(352)
第一节 若干重大农业生产问题的探索	(352)
1. 提高光合作用效率的基因工程基础研究	(352)
(1) 光合作用概述	(352)
(2) 光合作用基因工程的主要目标	(354)
(3) 叶绿体基因组的转化	(356)
2. 生物固氮与固氮基因转移	(360)
(1) 根瘤菌的固氮作用	(360)
(2) 固氮酶复合体	(363)
(3) 生物固氮的基因工程	(364)
3. 农作物产品质量的修饰	(365)
(1) 改善脂肪酸的质量	(365)
(2) 提高种子蛋白的营养价值	(367)
(3) 延迟水果的成熟期	(369)
(4) 修饰淀粉的成分	(371)
第二节 重组 DNA 技术与药品制造业	(373)
1. 重组疫苗	(374)
(1) 疫苗的设计	(375)
(2) 重组亚基疫苗	(375)
(3) 重组病毒活疫苗	(377)
2. 抑生长素	(379)
(1) 抑生长素基因的化学合成	(380)
(2) 抑生长素基因的克隆策略	(380)
(3) 克隆抑生长素基因的意义	(383)
3. 胰岛素	(384)
(1) 合成重组人胰岛素的第一种策略	(386)
(2) 合成重组人胰岛素的第二种策略	(388)

4. 干扰素	(389)
(1) 淋巴因子	(389)
(2) 人干扰素的功能及其作用的分子机理	(390)
(3) 人干扰素的基因工程	(391)
5. 人生长激素	(392)
(1) 人生长激素的生理功能	(392)
(2) 重组人生长激素的生产	(394)
(3) 重组人生长激素的改良	(396)
第三节 重组 DNA 技术在工业生产中的应用	(396)
1. 纤维素的开发利用	(396)
(1) 纤维素的生物降解	(397)
(2) 纤维素酶基因的分离	(398)
(3) 纤维素酶基因工程	(400)
2. 食品工业	(401)
(1) 乳制品发酵	(401)
(2) 单细胞蛋白质	(402)
(3) 酿酒工业	(403)
3. 新型抗菌素的生产	(404)
(1) 聚酮类抗菌素的合成	(405)
(2) 新型抗菌素的合成	(406)
(3) 聚酮类抗菌素的突变改造	(407)
第四节 蛋白质工程	(407)
1. 生产新型蛋白质的途径	(407)
(1) 应用化学合成和修饰法生产工程蛋白质	(408)
(2) 应用化学合成的 DNA 序列表达工程蛋白质	(408)
(3) 应用基因定点诱变技术生产新型蛋白质	(408)
(4) 应用随机诱变技术生产新型蛋白质	(410)
(5) 应用蛋白质连接酶生产新型蛋白质	(411)
2. 蛋白酶工程	(411)
(1) 组织纤溶酶原激活物的定点改造	(411)
(2) α_1 -抗胰蛋白酶的定点改造	(412)
(3) 枯草蛋白酶的定点改造	(413)
3. 抗体工程	(414)
(1) 抗体特异性的分子基础	(414)
(2) 单克隆抗体	(416)
(3) 重组的单克隆抗体	(418)
(4) 人源化的单克隆抗体	(421)
(5) 双特异性的单克隆抗体	(423)
第五节 环境生物技术学	(423)
1. 塑料污染的生物防治	(424)
(1) 生物降解塑料	(424)
(2) 应用转基因植物生产生物降解塑料	(426)

2. 农药污染的生物防治	(429)
(1) 五氯苯酚污染的生物防治	(430)
(2) 除草剂污染的生物防治	(431)
(3) 有机磷污染的生物防治	(432)
3. 石油污染的生物防治	(435)
第十二章 重组 DNA 与医学研究	(438)
第一节 癌症研究	(438)
1. 癌基因	(438)
(1) 病毒癌基因	(438)
(2) 细胞癌基因	(441)
2. 肿瘤抑制基因	(443)
(1) 存在肿瘤抑制基因的实验证据	(443)
(2) 肿瘤抑制基因的功能作用	(444)
(3) p53 肿瘤抑制基因	(445)
(4) RB1 肿瘤抑制基因	(446)
3. 细胞癌化	(446)
(1) 蛋白质激酶	(447)
(2) ras 族癌基因	(448)
(3) myc 族癌基因	(448)
4. 癌症的基因治疗	(449)
(1) 转录因子诱捕法	(449)
(2) RNA 转染法	(450)
(3) 自杀基因治疗法	(450)
(4) 肿瘤抑制基因治疗法	(450)
(5) 反义基因阻断治疗法	(450)
第二节 艾滋病研究	(450)
1. 艾滋病与 HIV 病毒	(450)
(1) HIV 病毒的起源	(451)
(2) HIV 病毒的变异性	(452)
(3) HIV 病毒的感染与治疗	(453)
2. HIV-1 病毒基因组的结构	(455)
(1) tat 基因	(456)
(2) rev 基因	(457)
(3) nef 基因	(459)
(4) 其它基因	(460)
3. HIV 疫苗的研制	(460)
(1) 制约 HIV 疫苗研制的困难因素	(460)
(2) HIV 疫苗研制的现状	(461)
(3) 展望	(463)
第三节 遗传性疾病的基因诊断与治疗	(464)
1. 遗传与疾病	(464)
2. 遗传性疾病的基因诊断	(465)

(1) 遗传性疾病的核酸探针检测法	(465)
(2) 遗传性疾病的产前诊断	(466)
(3) 胎儿的 DNA 分析	(467)
3. 遗传性疾病的基因治疗	(468)
(1) 基因治疗的转基因载体	(468)
(2) 基因打靶与基因治疗	(470)
(3) 基因治疗的若干病例	(471)
第四节 DNA 疫苗	(474)
1. DNA 疫苗的概述	(474)
(1) DNA 疫苗的构成	(474)
(2) DNA 疫苗的作用机理	(475)
(3) DNA 疫苗的优势性	(475)
2. DNA 疫苗的优化	(476)
(1) DNA 载体的优化	(476)
(2) 抗原编码序列的优化	(478)
(3) 免疫佐剂的应用	(478)
3. DNA 疫苗的导入方式	(479)
(1) 基因枪法	(479)
(2) 脂质体法	(479)
(3) 减毒有机体法	(480)
4. DNA 疫苗的安全性	(480)
5. 结论	(481)
附录 名词术语解释	(482)
参考文献	(506)
索引	(519)
后记	(536)

第七章 基因的表达与调节

第一节 概 述

生物有机体的遗传信息,是以基因的形式储藏在细胞的 DNA 分子上。而 DNA 分子的基本功能之一,则是把它所承载的遗传信息转变成蛋白质分子,从而决定生物有机体的遗传表型。这种从 DNA 到 RNA 再到蛋白质的过程叫做基因的表达(gene expression)。

对于某些基因,例如转运 RNA(tRNA)和核糖体 RNA(rRNA)分子的编码基因,表达的最终产物是 RNA 转录本,这些分子本身就具有重要的生物学功能;而对于绝大多数的其它基因,它们的 RNA 转录本还需要转译成各种蛋白质分子之后,才能表现出相应的功能。

mRNA 转录本有两种不同的类型:原核生物基因的转录本是基因的全长拷贝;真核生物断裂基因的转录本,则只是其表达子的相应拷贝。其实大多数的 RNA 转录本并不仅仅是基因编码序列区的拷贝,它们同时也包含有基因编码序列两翼的非编码序列区,即转录起始信号序列和转录终止信号序列。因此,除了表达子序列之外,准确地测定转录的起点和终点的位置,也是十分重要的。

在基因表达的特性方面,原核基因和真核基因之间存在着很大的差别。真核细胞具有细胞核结构,在其中转录产生的 mRNA 前体,经加工和剪辑之后才被输送到细胞质供作合成蛋白质的模板。因此,在真核基因的表达过程中,转录和转译两个步骤在时间和空间上都是分开进行的[图 7-1(b)]。而原核细胞则与此相反,它不存在细胞核结构,因此在其基因的表达过程中,转录和转译是紧密偶联发生的,在细胞质中产生的初级转录本 mRNA 分子是直接供作合成蛋白质的模板[图 7-1(a)]。

原核基因和真核基因表达的第二个差别是,真核基因的新生 RNA 分子要经过十分广泛的加工之后,才转变为成熟的 mRNA,其中包括 5'-端的加帽和 3'-端的加尾。当然最重要的一点是,几乎所有的或者说是绝大多数高等真核生物结构基因的前体 RNA 都要通过剪辑步骤,除去间隔子序列,并把表达子序列连接起来,如此才能产生具有连续信息的成熟的 mRNA 分子。

最近 20 余年,随着重组 DNA 技术的迅速发展,我们对于克隆基因表达问题的研究也日渐深入,并积累了相当丰富的知识。在这方面的早期研究工作中就已经认识到,为了使克隆的外源真核基因能够在原核细菌中实现功能表达,就必须使基因置于寄主细胞的转录和转译机理的控制之下。众所周知,大肠杆菌是现代分子生物学研究中最常用的材料之一,不但对于它的分子生物学和分子遗传学方面已经掌握了大量的资料,而且在基因表达方面也有了深刻的了解。因此,很自然地大肠杆菌便被选作表达外源基因的寄主细胞。

我们知道,在大肠杆菌细胞中,参与特定新陈代谢活动的基因,是趋于成簇地集成为一个转录单位,即操纵子。操纵子的主要控制片段,包括操纵单元和启动子,是位于它的起始部位。在基因表达过程中,操纵子先转录成多顺反子 mRNA,然后再转译成蛋白质多肽

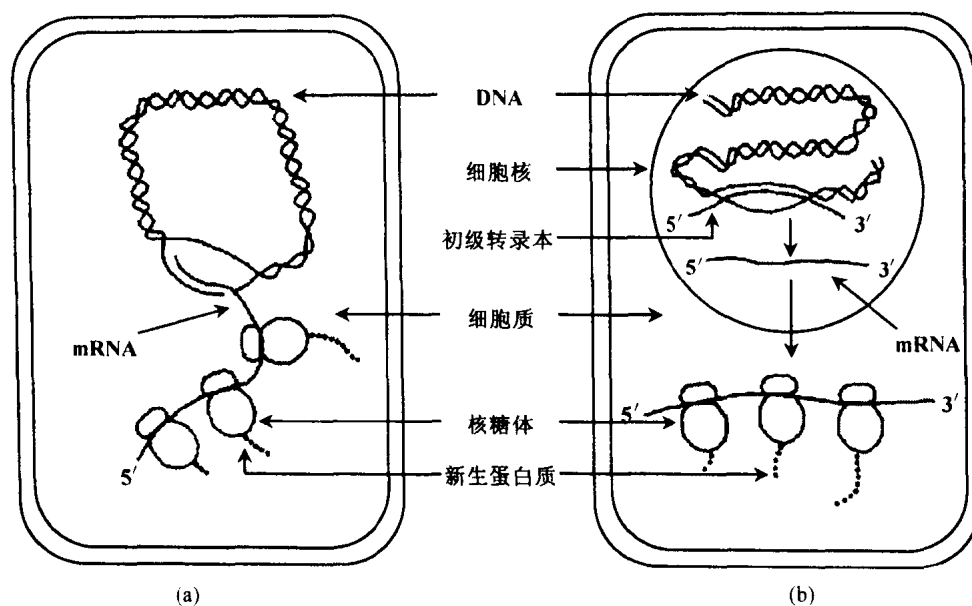


图 7-1 原核基因与真核基因表达特性的比较

(a)在原核基因的表达过程中,转录和转译是偶联发生的;(b)在真核基因表达过程中,转录和转译在空间和时间上都是分开进行的

分子。克隆的基因在大肠杆菌细胞中的表达,如同正常基因的表达程序一样,也包括DNA分子的有效转录和mRNA分子的有效转译这两个主要步骤,而且在有的情况下,还涉及到表达产物蛋白质分子的转译后修饰的问题。

1974年, A. C. Y. Chang 和 S. N. Cohen 证实金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 的 amp^r 基因,能够在没有亲缘关系的大肠杆菌中实现功能表达。在这一发现的激发下,人们期望如同遗传密码的通用性一样,从基因到表型的生化途径也应该是通用的。据此便设想,任何细菌的基因也都应该能够在别种细菌中表达。随后, K. Struhl 等人 (1976) 和 D. Vapnek 等人 (1977) 又相继发现,两种比较低等的真核生物,酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 和粗糙链孢霉 (*Neurospora crassa*) 的基因,同样也能够在大肠杆菌中进行表达。这样,便进一步地增强了人们的此种想法。基于这样的原因,当时有不少研究工作者纷纷推测,高等真核生物的基因也应该能够在细菌中实现正常的表达。然而遗憾的是,后来有越来越多的研究报告指出,大多数克隆的基因,事实上并不能够在新的遗传背景中实现表达。对此的一种解释认为,这是由于从基因到表型的过程中,有若干步骤发生了障碍的缘故。

一种功能蛋白质的合成,不但取决于基因的适当转录和 mRNA 的有效转译,而且在许多情况下,也还同转译后的加工和新生多肽的装配有关。在这些过程中,只要有一个步骤未能正确地进行,有关的基因也就不能实现其表达。克隆基因的有效转录,取决于有一个能被 RNA 聚合酶识别的启动子,而 mRNA 的有效转译,则必须具备核糖体的结合位点。在大肠杆菌 mRNA 的前导序列区,有一段同 16S 核糖体 RNA 3'-末端碱基互补的保守序列。1974 年澳大利亚堪培拉 (Canberra) 的两位科学家 J. Shine 和 L. Dalgarno, 首先提出转译过程需要这种保守序列的存在。故这种保守序列通常叫做 Shine-Dalgarno 序

列,简称 SD 序列,它已经在几乎所有研究过的大肠杆菌 mRNA 中找到。已鉴定的 SD 序列的长度范围为 3~9 个碱基,位于转译起始密码子上游 3~12 个碱基的位置,因此,通过它与 16S rRNA 之间的碱基配对作用,能够将转译起始密码子(AUG 或 GUG)安置在核糖体的适当方位,从而启动转译反应。蛋白质转译后修饰的一个共同特点是信号序列的切割,信号序列的功能是引导蛋白质分子穿过细胞膜。再一种可能同蛋白质加工有关的现象是蛋白质的降解作用。已经知道,在大肠杆菌中,凡是发生了无义突变的基因,它们所编码的蛋白质短肽链在合成后不久,就会被降解掉。与此相反,野生型的蛋白质则十分稳定。所以不难设想,如果外源蛋白质的分子构型或其氨基酸序列,不能保护它们自己免受胞内蛋白酶的作用,就会很快被迅速地降解掉。根据上述这些讨论可以清楚地看到,一个克隆的外源结构基因在大肠杆菌细胞中的表达,首先需要使这个基因置于大肠杆菌启动子的控制之下。在这种情况下,蛋白质产物就会从 N 末端开始合成,但所产生的往往是融合蛋白质(表 7-1)。值得指出的是,在有些实验中发现,这些融合的蛋白质可以在体外被切割成为天然的多肽分子。

表 7-1 细菌启动子指导的克隆基因合成的蛋白质类型

蛋白质类型	举 例
融合的蛋白质	鼠生长激素 卵清蛋白 成纤维细胞干扰素
可切割的融合蛋白质	抑生长素 β -内啡肽 人胰岛素
天然蛋白质(从其 N 末端合成的蛋白质)	SV40 t 抗原 人生长激素 小鼠二氢叶酸还原酶

克隆基因表达调节的研究工作,既具有重要的理论意义,也有着广泛的实际应用前景。通过克隆基因的遗传操作和体内表达活性的分析,我们便有可能深入地研究基因表达调节中的一些根本性的问题:诸如 mRNA 分子 5'-末端非转译区(5'-UTR)和 3'-末端非转译区(3'-UTR)的结构特征与功能、转录终止作用的分子机理、转录因子的功能效应,以及 RNA 剪辑和转译控制的分子本质等。而随着这些问题的解决,再配合转基因技术,特别是利用植物细胞全能性这一特点,我们就不仅有可能阐明真核基因表达调节的分子机理,而且还有可能从整体水平上研究高等生物的发育与分化的复杂过程。

此外,克隆基因表达调节方面的研究成果,潜在着为揭示蛋白质结构与功能之间的关系,提供新的研究手段的可能性。例如,运用重组 DNA 技术,能够获得可以在大肠杆菌细胞中进行有效表达的杂种蛋白质的嵌合基因。这样,我们便可以将这种蛋白质分子纯化出来,在体外进行生物学方面的研究。这类工作深入下去,就可以用来检测体外突变所产生的变异氨基酸在蛋白质多肽链中的位置,并测定出因此种改变而对酶催功能造成的效应。

在实际的应用方面,尤其是在农业生产实践中,基因表达调节的研究也有着不可忽视的重要性。尽管目前基因工程的发展,无论是在理论探讨还是应用研究方面,都已经取得