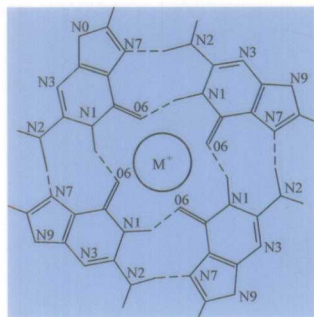


环境科学与工程系列规划教材



环境分子生物学教程

HUANJING FENZI SHENGWUXUE JIAOCHENG

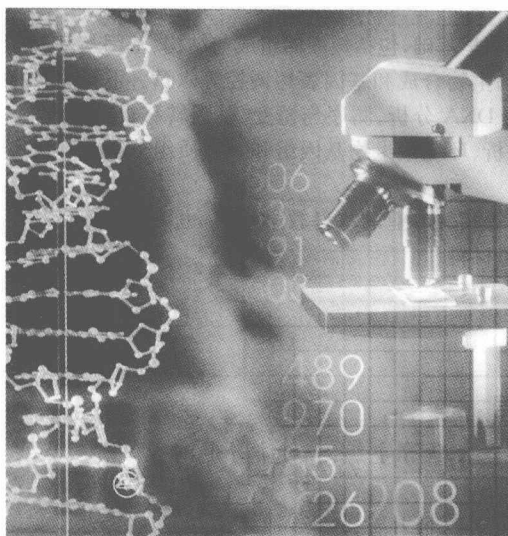
主编 李永峰 那冬晨 魏志刚 赵 桃



上海交通大学出版社
SHANGHAI JIAO TONG UNIVERSITY PRESS

Environmental Science and Engineering

环境科学与工程系列规划教材



主编

李永峰 那冬晨

魏志刚 赵桃

环境分子 生物学教程

HUANJING FENZI
SHENGWUXUE JIAOCHENG

上海交通大学出版社

内 容 提 要

全书分为上下两篇,上篇为分子生物学基础,包括核酸的组成与结构、基因与基因组、DNA 复制、基因的转录、蛋白质的生物合成和基因表达调控等六章。下篇为环境微生物研究技术,包括基因克隆与 DNA 分析、测序与诱变、基因转移、环境微生物的分子分类、环境微生物多样性分析、环境微生物基因组和蛋白质组分析及环境微生物群落结构和动态研究等七章。

本书适合作为环境科学、环境工程等相关专业的本科教学用书,也可作为环境保护和环境监测等相关工作人员的参考材料。

图书在版编目(CIP)数据

环境分子生物学教程/李永峰等主编. —上海:上海交通大学出版社,2009

(环境科学与工程系列规划教材)

ISBN 978-7-313-06160-7

I. ①环… II. ①李… III. ①环境生物学—分子生物学—高等学校—教材 IV. ①X17

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2009)第 238373 号

环境分子生物学教程

李永峰 等主编

上海交通大学出版社出版发行

(上海市番禺路 951 号 邮政编码 200030)

电话: 64071208 出版人: 韩建民

上海交大印务有限公司印刷 全国新华书店经销

开本: 787mm×960mm 1/16 印张: 26 字数: 489 千字

2009 年 12 月第 1 版 2009 年 12 月第 1 次印刷

ISBN 978-7-313-06160-7/X 定价: 45.00 元

版权所有 侵权必究

前 言

环境是人类赖以生存和发展的物质条件的综合体,包括自然环境和社会环境。自然环境是直接或间接影响到人类的一切自然形成的物质及其能量的总体。在我们生存的自然环境中生活着各种各样的微生物,这些环境微生物在自然界的物质循环中起着关键的作用。它们通过对环境中各种有机物质、无机物质的分解利用,完成了自身生长繁衍与进化的任务,同时降解了人类活动所产生的废弃物和有机污染物,维持了自然生态系统的相对平衡,保护了人类的居住环境。

随着工业、交通和城市建设的飞速发展,人类的生存环境发生了巨大变化,一方面创造了前所未有的物质文明,另一方面产生了日益尖锐的环境问题。环境科学越来越被人们所重视。环境分子生物学作为环境科学与分子生物学的交叉学科,是从分子水平对自然环境的生物因素,特别是环境微生物进行研究。通过研究我们可以了解环境中的微生物种类、微生物之间的关系以及微生物与生境的相互作用,从而对环境做出评价,预测环境的变化趋势。此外还可以通过对环境微生物的研究发现对人类有价值的新的基因资源,开发其潜在的应用价值。

环境分子生物学是一门新兴的学科,为了让学生及有关读者能循序渐进地了解环境微生物研究技术,我们综合了分子生物学、环境微生物学及相关教材和专著,结合编者的科学研究和教学实践,在广泛查阅国内外有关资料的基础上编写了本书。全书分为上下两篇,共 13 章。上篇为分子生物学基

础,以遗传物质——核酸为主线展开论述,主要包括核酸的组成与结构、基因与基因组、核酸的复制、转录、表达及其调控等内容,以此作为环境微生物研究技术的基础理论。下篇为环境微生物研究技术,包括常见的现代生物技术——基因克隆与DNA分析、测序与诱变、基因转移,生物技术在环境微生物研究中的应用——环境微生物的分子分类、多样性分析、基因组和蛋白质组分析、群落结构和动态研究等,其中涉及了国内外一些先进的研究技术与手段,与本学科发展前沿相接轨。总之,本书是遵循由基础理论到研究技术的思路,希望能带领读者从理论到技术、从基础到应用循序渐进地获取环境分子生物学的有关知识。

本书由李永峰、那冬晨、魏志刚和赵桃主编。编写分工为:第1~6章由那冬晨编写;第7~9章由魏志刚编写;第10~13章由李永峰和赵桃编写。全书由李永峰、那冬晨统稿。

由于环境分子生物学是一门正在不断发展与完善的学科,加之编者水平和时间所限,书中有不妥及错漏之处恳请读者批评指正,以便进一步修订完善。

编 者
2009年6月

目 录

上篇 分子生物学基础

1	核酸的组成与结构	3
1.1	核酸的种类及组成	3
1.2	DNA 的结构	5
1.3	RNA 种类及结构	18
1.4	核酸的紫外光吸收特性	23
2	基因与基因组	24
2.1	概述	24
2.2	原核生物基因与基因组	28
2.3	噬菌体与病毒基因组	31
2.4	真核生物基因与基因组	39
3	DNA 复制	50
3.1	DNA 复制体系	50
3.2	DNA 复制特点	55
3.3	原核生物 DNA 复制	58
3.4	真核生物 DNA 复制	62
3.5	DNA 复制修复	66
4	基因的转录	69
4.1	基因转录的理论基础	69

4.2	转录过程	78
4.3	初始转录本的加工与转录后调节	83
5	蛋白质的生物合成	93
5.1	遗传密码	93
5.2	核糖体	97
5.3	与蛋白质合成有关的辅助因子	101
5.4	蛋白质的合成过程	103
5.5	蛋白质修饰	110
6	基因表达调控	118
6.1	原核生物基因表达调控	118
6.2	真核生物基因表达调控	131

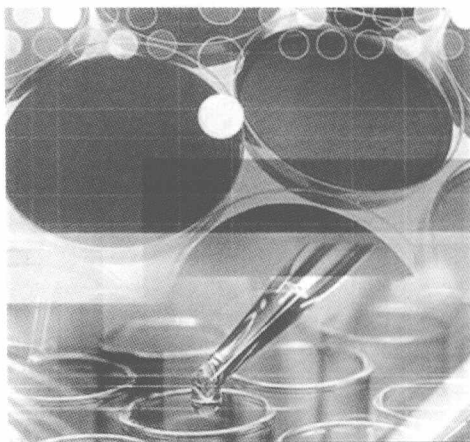
下篇 环境微生物研究技术

7	基因克隆与 DNA 分析	153
7.1	基因克隆	153
7.2	DNA 分析及其应用	171
8	测序与诱变	182
8.1	测序	182
8.2	诱变	205
9	基因转移	215
9.1	基因自然转移	216
9.2	基因自然转移的类型	216
9.3	细菌的自然基因转移	217
9.4	细菌与真核生物间自然基因转移	221
9.5	真核生物细胞间的自然基因转移	224
9.6	人为的基因转移——基因工程	225
9.7	生态与进化安全保障	248

10	环境微生物的分子分类	249
10.1	微生物的分类系统	249
10.2	DNA 组成分析	256
10.3	DNA - DNA 分子杂交技术	267
10.4	16S rRNA 序列分析技术	277
10.5	rDNA 转录间隔区序列分析技术	291
10.6	分子系统发育进化树的构建	299
11	环境微生物多样性分析	310
11.1	RFLP 在环境微生物检测中的应用	310
11.2	随机扩增多态性 DNA 技术及应用	316
11.3	DNA 单链构象多态(SSCP)技术	320
11.4	扩增的限制性片段长度多态性(AFLP)技术	325
11.5	环境微生物多样性分析的其他分子标记技术	331
12	环境微生物基因组和蛋白质组分析	339
12.1	环境微生物基因组分析	339
12.2	嗜盐古细菌 sp. NRC - 1 基因组概述	343
12.3	嗜热自养甲烷杆菌 δ H 菌株基因组概述	345
12.4	詹氏甲烷球菌	346
12.5	闪烁古生球菌	349
12.6	环境群体微生物基因组的比较分析	351
12.7	环境微生物的大规模蛋白质分离技术	355
12.8	高通量蛋白质鉴定技术	366
12.9	环境微生物蛋白质组学	370
13	环境微生物群落结构和动态研究	377
13.1	FISH 技术的应用	377
13.2	DGGE 技术的应用	393
13.3	SSCP 分析技术的应用	401

上篇

分子生物学基础



1

核酸的组成与结构

1.1 核酸的种类及组成

核酸(nucleic acid)是生物细胞中重要的大分子化合物之一,其上携带着大量的遗传信息,在生物个体生长发育、繁殖、遗传和变异等生命活动中起着重要作用,是分子生物学的研究对象之一。随着自然科学的快速发展,核酸研究已成为生物科学的核心,是揭示生命过程奥秘的重要切入点。

自然界中存在着两种类型的核酸——核糖核酸(ribonucleic acid, RNA)和脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid, DNA)。其中 DNA 是主要的遗传物质,贮存着大量的遗传信息。在一些不含 DNA 的病毒中, RNA 是主要的遗传物质。DNA 主要存在于细胞核中, RNA 多存在于细胞质中。

核酸的基本组成单位是核苷酸,核苷酸由核苷和磷酸组成,核苷由戊糖和碱基组成(图 1-1)。



图 1-1 核酸的组成

1. 戊糖

组成核酸的戊糖为呋喃型环状结构,分为两种类型——呋喃核糖和脱氧呋喃核糖(图 1-2)。组成 DNA 的核糖为 β -D-2'-脱氧呋喃核糖,组成 RNA 的

核糖为 β -D-呋喃核糖。

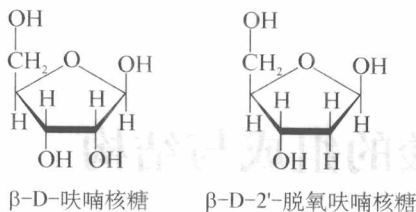


图 1-2 戊糖

2. 碱基

组成核酸的碱基分为两类,即嘌呤类碱基和嘧啶类碱基。嘌呤类碱基为双环结构,有腺嘌呤和鸟嘌呤两种。嘧啶类碱基为单环结构,有胞嘧啶、胸腺嘧啶和尿嘧啶三种,其中胸腺嘧啶只存在于 DNA 中,尿嘧啶只存在于 RNA 中。五种碱基的结构如图 1-3。

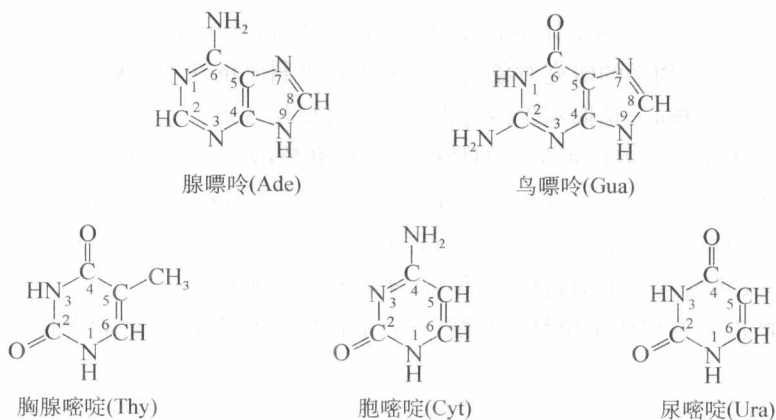


图 1-3 碱基的结构

核酸中还存在着一些稀有碱基,大多数为碱基的甲基化合物,含量不超过 5%。

3. 核苷

戊糖的第一个碳原子与碱基通过糖苷键(N—C 键)相连形成核苷。通常戊糖的第 1 位碳原子与嘌呤碱基的第 9 位氮原子相连,与嘧啶碱基的第 1 位氮原子相连(图 1-4)。

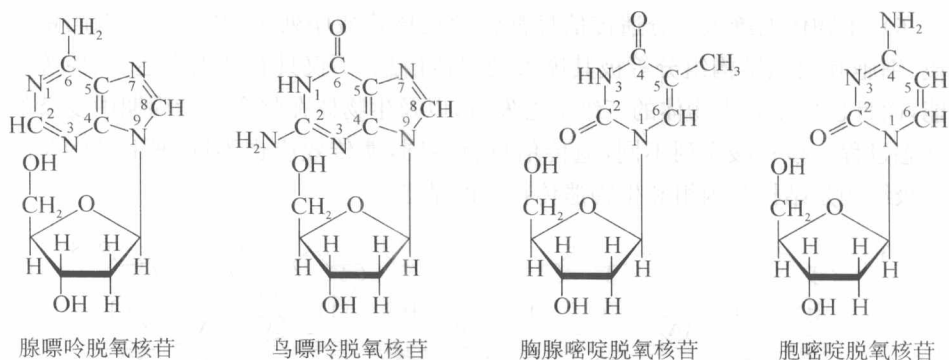


图 1-4 四种脱氧核苷

4. 核苷酸

核糖上的羟基与磷酸基团发生酯化反应形成核苷酸(nucleotide),分为脱氧核糖核苷酸和核糖核苷酸两种。生物有机体内游离的核苷酸为 5'-核苷酸, 5'-磷酸基团的进一步磷酸化,形成 5'-二磷酸核苷酸和 5'-三磷酸核苷酸(图 1-5)。

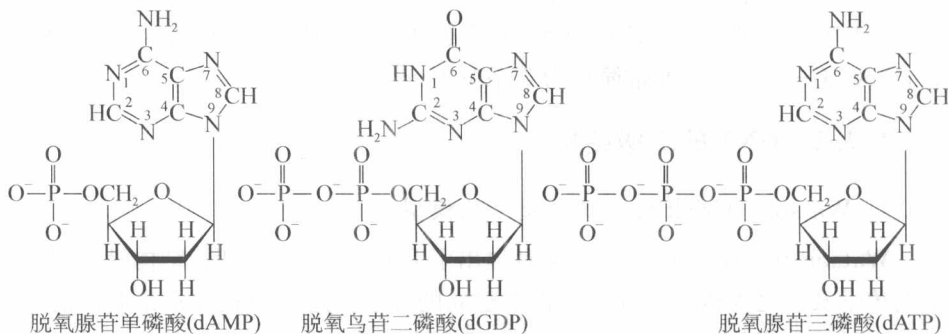


图 1-5 核苷酸

1.2 DNA 的结构

1.2.1 DNA 的一级结构

DNA 的一级结构是指 DNA 分子中核苷酸的排列顺序,也称碱基顺序(图

1-6)。生物体的绝大部分遗传信息都包含在核苷酸序列中,其中包括编码蛋白质、细胞和组织结构组分等极其庞大的遗传信息,不仅具有基因表达、调控等功能,而且也控制着生物体的三维形态发育,以及生物体在整个生命周期中复杂的动态过程。核苷酸序列不同,遗传信息就不同,遗传效应也不同,所以 DNA 的一级结构是结构基因组和生物遗传特征的基础。

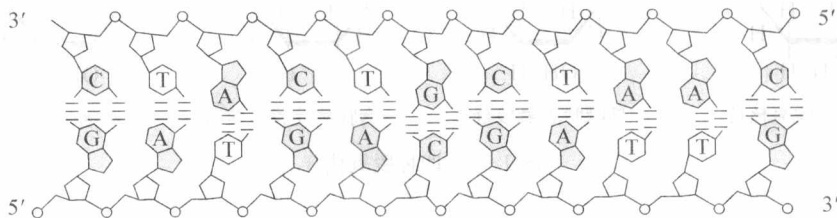


图 1-6 DNA 一级结构示意图

DNA 分子是四种脱氧核苷酸通过磷酸二酯键连接而成的长链高分子多聚体。相邻的脱氧核苷酸之间通过 3'-羟基与 5'-磷酸基团脱水形成 3',5'-磷酸二酯键连接,DNA 分子端部核苷酸的 5'-磷酸基团或 3'-羟基未参与形成 3',5'-磷酸二酯键,而是游离出 5'-磷酸基团或 3'-羟基,分别被称为 5'-磷酸端(5'-端)或 3'-羟基端(3'-端)。一条核苷酸链通常从 5' 端到 3' 端由左向右表示为 5' pApGpC...pTpC3',通常简化为 5' pAGC...TC3'。

1.2.2 DNA 的二级结构

1. Watson-Crick 右手双螺旋结构模型

Watson 和 Crick 在 1953 年 4 月提出了 DNA 的右手双螺旋结构模型,是分子遗传学及以之为核心的分子生物学建立的标志。这一成就并不是偶然的,而是许多科学家艰苦细致,甚至一时看来可能是毫无意义的工作结晶。20 世纪 40 年代,W. T. Astbury 用 X 光衍射研究了 DNA 的结构;1950 年 Chargaff 从大量不同来源的 DNA 样品分析中发现了 DNA 组成的当量规律, $A=T$, $G=C$, $A+G=T+C$;1952 年 M. H. Wilkins 用高度定向的 DNA 纤维作出了极其出色的 X 光衍射照片;Watson 和 Crick 很早就设想过 DNA 分子多种可能的结构模型,但缺乏高质量的 X 光衍射照片,当他们得到 M. H. Wilkins 的高质量 X 光衍射照片时,很快就发表了他们的右手双螺旋结构模型。

DNA 双螺旋结构模型的基本特征(图 1-7):

(1) DNA 分子中两条多脱氧核苷酸链以反向平行的方式围绕一个公共轴

组成右手双螺旋结构,螺旋直径约为 2.0 nm。

(2) 脱氧核糖和磷酸基团构成螺旋的骨架,位于双螺旋结构的外侧。

(3) 碱基位于双螺旋的内侧,碱基平面与螺旋轴垂直,两条链中对应的嘌呤和嘧啶碱基以其疏水的、近于平面的环形结构彼此密切接近,以氢键相连,称为碱基互补配对 (base pairing),碱基互补配对规律为 $A = T$, $G = C$ 。

(4) 相邻碱基对间的距离为 0.34 nm,每一个螺旋内含有 10 个碱基对,螺距为 3.4 nm。

(5) 双螺旋的表面形成两条凹槽,一条宽而深(大沟),一条窄而浅(小沟),其中大沟对功能蛋白识别 DNA 双螺旋结构上的特定信息是非常重要的。

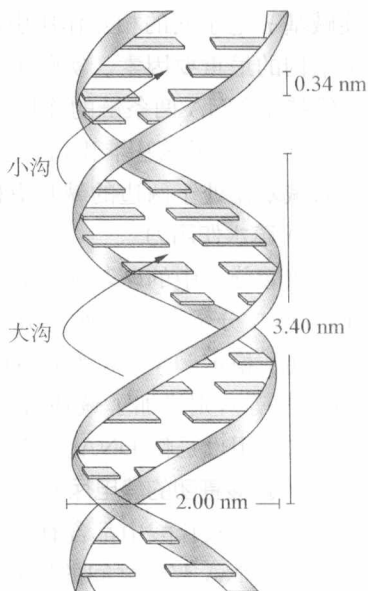


图 1-7 DNA 双螺旋结构示意图

2. 决定双螺旋结构的因素

维持 DNA 双螺旋结构的因素有氢键、碱基堆积力、疏水作用力和磷酸基团的静电斥力等。

1) 氢键

DNA 双螺旋结构的重要特征之一就是互补链上的对应碱基之间能形成氢键, A 与 T 之间形成两个氢键, G 与 C 之间形成三个氢键, 互补碱基之间氢键的形成与 DNA 的许多性质密切相关。

在正常情况下, DNA 双螺旋结构中的氢键处于不断地断裂和复合的热平衡状态。溶液中 DNA 分子内 50% 双链结构被解链时的温度称为 DNA 的熔解温度 (T_m)。 T_m 与 G+C 的百分含量成正比, G+C 含量越高, T_m 值越大。计算公式为: $T_m = 4(G + C) + 2(A + T)$ 。

DNA 互补碱基之间的氢键键长约为 0.28~0.30 nm, 键能约为 4~6 kcal/mol (1 cal=4.187 J)。氢键的一个突出特点就是具有方向性, 如果供体原子、氢原子和受体原子三者在一 条直线上, 形成的氢键最强。在 DNA 分子中, 相邻碱基之间的堆积力恰好为互补碱基间形成最强的氢键提供了有利条件。

2) 碱基堆积力

DNA 分子中各个碱基对之间的纵向相互作用力叫做碱基堆积力, 它是芳香

族碱基 π 电子间的相互作用引起的。目前普遍认为碱基堆积力是稳定 DNA 二级结构的最重要因素。实际上,碱基堆积力与疏水作用、氢键是相辅相成的,氢键维持了 DNA 两条链的连接,疏水作用促使碱基成簇,使碱基芳香环的环面相互接近,促成了碱基堆积,稳定了 DNA 的双螺旋结构。在碱基堆积中,处于中间的碱基比处于两边的碱基更稳定,两边的碱基越多,中间的碱基越稳定。

3) 疏水作用力

核酸分子中的碱基为含有多种取代基的杂环芳香族化合物,有很强的疏水性。DNA 分子在水溶液中,由于碱基有规则的排列,产生了较强的疏水作用,从而起到了稳定 DNA 双螺旋结构的作用。如果在 DNA 溶液中加入极性调节剂(如甲醇等),则增加了碱基的亲水性,使 DNA 的溶解温度 T_m 大大降低,由此推测疏水作用也是使 DNA 双螺旋结构稳定的重要因素之一。

4) 磷酸基团的静电斥力

每一个核苷酸中都含有一个带负电荷的磷酸基团。如果这些负电荷没有被中和,则 DNA 双链之间的这种强有力的静电斥力将驱使两条链分开,当有盐类加入时,这些带负电荷的磷酸基团被正电离子所中和,即正电离子围绕在磷酸基团周围形成“离子云”,有效地屏蔽了磷酸基团之间的静电斥力,这就是 Debye - Hückel 离子屏蔽理论。在生理盐浓度(约 0.2 mol/L)时就发生了这种屏蔽作用。当离子浓度降低时,这种屏蔽作用减弱,斥力增大, T_m 值随之降低。在纯蒸馏水中的 DNA 在室温下就会变性,就是这个缘故。在盐溶液中,DNA 的 T_m 值随着离子强度的增加而上升,就是因为高盐浓度增加了碱基的疏水作用,促进了双螺旋结构的稳定。 T_m 值与盐浓度的关系如图 1-8。

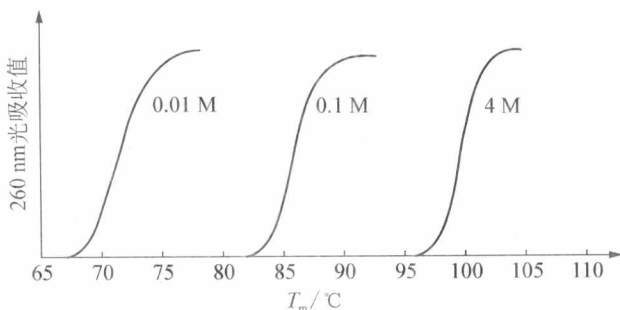


图 1-8 T_m 值与中性盐 NaCl 浓度的关系

5) 碱基分子内能

当由于温度等因素使碱基分子内能增加时,碱基的定向排列遭受破坏,

从而削弱了碱基的氢键结合力和碱基的堆积力,使 DNA 双螺旋结构受到破坏。

在上述因素中,氢键、碱基堆积力和疏水作用力有利于维持 DNA 分子的双螺旋构型,磷酸基团的静电斥力和碱基分子内能不利于维持 DNA 分子双螺旋构型。DNA 分子结构状态就是这些因素竞争的结果。

3. 双螺旋结构的呼吸作用

DNA 分子中互补碱基对间的氢键处于连续不断地断裂和再生的动态平衡之中,这种过程称为 DNA 链的呼吸作用。

DNA 分子中碱基上的氨基是能形成氢键的一个基团,在甲醛存在的情况下,甲醛与 DNA 碱基上自由的氨基发生反应,使 DNA 发生不可逆变性。这种反应只有在互补碱基间的氢键断裂产生自由氨基时才发生。所以 DNA 双螺旋结构的呼吸作用可以通过甲醛变性试验得到证明。

在 DNA 分子中,富含 A—T 的节段,呼吸作用更为明显,经常发生瞬间的单链泡状结构,这种现象对某些转录因子与 DNA 链结合并阅读其上的遗传信息具有重要作用。

4. 双螺旋结构的多态性

Watson 和 Crick 提出的 DNA 双螺旋结构属于 B 型双螺旋,是根据在生理盐溶液中抽出的 DNA 纤维在 92% 相对湿度下的 X 射线衍射图谱进行推测的,是 DNA 分子在水性环境和生理条件下最稳定的结构。但后来的研究表明, DNA 的结构是动态的。在以钠、钾或铯作反离子,相对湿度为 75% 时, DNA 分子的 X 射线衍射图谱给出的是 A 构象。DNA—RNA 杂交分子, RNA—RNA 双链结构也均采取 A 构象。在 A—DNA 构象中,每一个螺旋含 11 个碱基对,而且大沟变窄、变深,小沟变宽、变浅,蛋白质对 DNA 分子的识别也随之发生了变化。C 构象是以锂为反离子,在 66% 相对湿度下测定出来的,目前尚无证据说明生物有机体内有 C—DNA 构象的存在。D 构象和 E 构象仅适用于缺少 G≡C 对的 DNA 分子。

1979 年 A. H. - J. Wang 等人用 X 光衍射技术对六聚体 d(CpGpCpGpCpG) 单晶的结构进行了研究,发现了一种全新的左手双螺旋构象,由于其脱氧核糖-磷酸骨架按之字形(zigzag)路径从一端伸向另一端,所以这种构象被命名为 Z 构象。不同 DNA 双螺旋构象的结构特征见表 1-1。