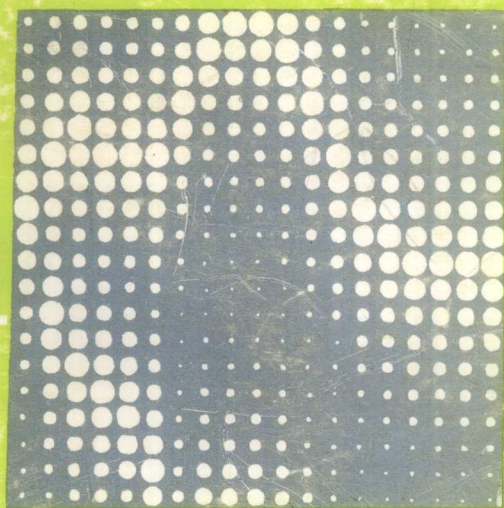


细胞分子生物学

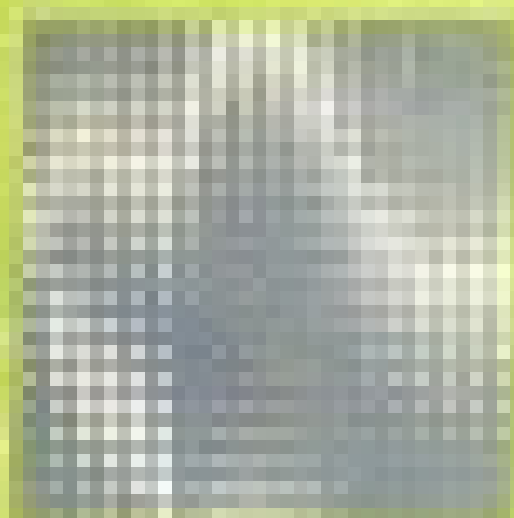
袁仕取 林焯唐 主编



陕西科学技术出版社

细胞分子生物学

第三版 周建德 主编



清华大学出版社 北京

细胞分子生物学

袁仕取 林焯唐 主编

作者: 袁仕取
林焯唐
蒋东霞
绘图: 韩卫宁

陕西科学技术出版社

(陕)新登字第 002 号

细胞分子生物学

袁仕取 林焯唐 主编

陕西科学技术出版社出版发行

(西安北大街 131 号)

新华书店经销 陕师大印刷厂印刷

787×1092 毫米 16 开本 23 印张 53 万字

1994 年 12 月第 1 版 1995 年 2 月第 1 次印刷

印数: 1—2000

ISBN 7—5369—0881—4 / S · 89

定 价: 18.50 元

前 言

自 1665 年 R.Hooke 发现细胞, 迄今 300 多年了, 对细胞的研究经历了细胞水平、亚细胞水平和分子水平三个具有时代特征的研究层次。近年来, 由于不断引入新技术, 对细胞的研究在分子水平上突飞猛进, 积累了大量的资料。在细胞生物学的教学、科研中, 我们深切地感到仅靠开设一门细胞生物学必修课, 难以介绍其全部内容。从 1988 年开始, 我们在讲授普通细胞生物学以后, 对高年级学生开设了《细胞分子生物学》选修课。在讲授此课程的过程中, 我们翻译了 Bruce Alberts 等合著的《Molecular Biology of the Cell》一书中的第 1 和 12—19 章的全部内容, 翻阅了《科学》1978 年以来的有关文章, 并参考国内最新的细胞生物学教科书和细胞生物学进展 1—2 卷的有关内容, 编写了《细胞分子生物学》一书, 1992 年又被列入有关院校动物学专业硕士学位研究生学位课。这门新课程的开设, 无论是对广大高年级学生或研究生来说, 都深受欢迎, 也得到同行们的鼓励。在大家的激励下, 我们对原书进行了较大的修改, 增添了新的内容, 共同编写了本书。第 1—4 章由袁仕取 (陕西师范大学) 编写; 第 5—6 章由蒋东霞 (河南肿瘤研究所) 编写; 第 7—8 章由林焯唐 (河南肿瘤研究所) 编写。本书献给从事生命科学的研究人员、大专院校生物学专业的师生, 希望能为细胞生物学的教学及研究工作做出一些贡献。

本书取名为《细胞分子生物学》, 是因为其主要内容来源于《Molecular Biology of the Cell》一书中的有关章节。全书共分 8 章: 绪论、细胞的进化、细胞的粘合和细胞外基质、细胞间的化学通讯、生殖细胞和受精、发育的细胞机制、分化细胞和组织维持、免疫系统。本书取材严谨, 图文并茂, 概念清楚, 逻辑性强, 观点新颖, 概括了本世纪 90 年代以前该领域内的主要研究成果。本书的特点是力图从生命系统的分子组分这个角度来讨论生命现象, 它与传统的生物学不同, 传统的生物学是描述性的科学, 它将形形色色的生物分门别类, 把它们的各种性状逐一列举, 以这种方式描述生物的性状 (即表型), 接触到的只是生命过程的结果, 而不是其原动力。许多生命现象的根本机制依赖于细胞内外特定分子的功能, 阐明隐含生命现象的分子机制远比描述生命现象重要。本书集中了这方面大量的研究成果和资料, 我

们希望能对广大读者有所帮助。

陕西科技出版社为本书的出版给予了大力支持，责任编辑郭一博同志为本书问世付出了辛勤劳动，还有从事生物学的学者对本书提出了许多宝贵的建议，部分研究生参加了书稿的校对工作。对此，特致以衷心的感谢！

细胞分子生物学是一门新兴的前沿科学，涉及面广，内容浩繁，发展迅速。由于作者知识浅薄，能力有限，本书中的缺点和错误在所难免，热诚欢迎广大读者批评指正。

袁仕取 林焯唐

1994年12月

目 录

第一章 绪 论	(1)
第二章 细胞的进化	(11)
第一节 化学进化与细胞起源	(11)
第二节 从原核细胞到真核细胞	(26)
第三节 从单细胞有机体到多细胞有机体	(41)
第三章 细胞的粘合和细胞外基质	(52)
第一节 细胞识别和细胞粘合	(52)
第二节 细胞连接	(59)
第三节 细胞外基质	(67)
第四章 细胞间的化学通讯	(87)
第一节 化学信号的三种类型: 局部化学调节、 激素和神经递质	(87)
第二节 细胞内受体介导的通讯	(98)
第三节 细胞表面受体介导的通讯: cAMP 和钙离子 作为第二信使	(103)
第四节 环腺苷酸和钙离子的作用方式是作为第二信使	(113)
第五章 生殖细胞和受精	(126)
第一节 有性生殖的优越性	(126)
第二节 减数分裂	(133)
第三节 配 子	(139)
第四节 受 精	(152)
第六章 发育的细胞机制	(161)
第一节 卵裂和囊胚形成	(161)
第二节 原肠(胚)、神经(胚)和体节的形成	(165)
第三节 模式形成中的早期阶段: 鼠	(174)

第四节	决定和分化	(181)
第五节	空间模式	(196)
第六节	在附肢发育中的位置信息	(203)
第七节	上皮发育中的诱导作用	(217)
第八节	逐个细胞地研究多细胞生物的发育: 线虫	(220)
第九节	迁移细胞	(227)
第七章	分化细胞和组织维持	(234)
第一节	分化状态的维持	(234)
第二节	具有永久性细胞的组织	(240)
第三节	细胞通过自身复制而更新	(244)
第四节	通过干细胞的更新: 表皮	(252)
第五节	通过多潜能干细胞的更新: 血细胞形成	(261)
第六节	休眠的干细胞: 骨骼肌细胞	(272)
第七节	柔软的细胞和坚硬的基质: 骨组织的生长、更新和修复	(277)
第八节	成体的稳定性	(283)
第八章	免疫系统	(286)
第一节	免疫的细胞基础	(287)
第二节	抗 体	(302)
第三节	补体系统	(335)
第四节	T 淋巴细胞和细胞介导的免疫	(341)
第五节	免疫系统的特征	(359)
主要参考文献		(362)

第一章 绪 论

近二三十年来,学者们越来越重视从分子结构来揭示细胞生命活动的机理,并在这方面形成一门独立学科,即分子生物学(Molecular Biology),它主要研究生物大分子,特别是核酸和蛋白质的生物学作用,而细胞生物学(Cell Biology)以生命的基础结构和功能单位——细胞为研究对象。这两门学科有着内在的不可分割的联系。把细胞的生命活动同亚细胞成分的分子结构变化联系起来研究,就形成了一门崭新的学科细胞分子生物学(Molecular Biology of the Cell),它使细胞生物学发展到了一个新的阶段。

细胞生物学的基础知识在现有的细胞生物学教材中已有系统的介绍。本章主要介绍分子生物学和细胞分子生物学的研究对象与任务,以及相关的重组DNA技术。

1.1 分子生物学的研究对象和任务

大约一个世纪以来,许多生物学家认为,活细胞具有某种生命力,如果打碎细胞,这种生命力也就消失了。因此当时生机论者认为,要想了解生命现象,除了研究完整的细胞外,很难从其他方面获知什么东西。事实的发展证明生机论者错了,当人们第一次决定打开活细胞,并研究它的内部活动时,分子生物学就诞生了。

1945年William Astbury首次使用分子生物学这个术语,他是指对生物大分子的化学和物理结构的研究。那时生物化学家已经发现了细胞内许多基本的化学反应,特别是认识到蛋白质对细胞内一些特殊反应和许多性质具有重要作用。科学家对细菌和噬菌体所谓“简单”系统的研究取得了最富有成果的进展,他们认为,细胞中绝大部分的遗传信息包含在DNA分子中,生命具有自我复制、自我装配和自我调控的基本特征,这些现象反映在细胞的各级结构水平上,特别是分子水平上。这样,细胞生物学的研究范围必然要从细胞的超微结构深入到分子水平。

50年代末至60年代初,分子遗传学取得了突飞猛进的发展。1953年在Watson和Crick发现DNA分子双螺旋结构后,1958年Crick又提出了遗传信息的“中心法则”(Central Dogma);1960年Jacob和Monod提出了蛋白质合成控制的操纵子学说;1970年Baltimore在肿瘤病毒的研究中发现了逆转录酶;1977年底第一次把高等动物生长激素释放抑制素(Somatostatin,SRIF)基因引入大肠杆菌得到表达,合成了生长激素释放抑制素;1979年哈佛大学一研究组把小鼠胰岛素基因引入大肠杆菌,合成了胰岛素。70年代以来由于DNA重组、切割技术的迅速发展,遗传工程已经兴起。1981年我国人工合成了酵母丙氨酸转移核糖核酸(丙-tRNA),这是我国继世界领先人工合成牛胰岛素之后,取得的又一项重要成果。

在形态学方面，人们既然能利用电子显微看清细胞的超微结构，那么就一定能利用新工具显示出超微结构的分子三维结构。以电子显微镜同衍射原理相结合研制成的晶体显微镜朝这方面迈出了重要一步。据报导，1985年，日本一研究组在高压电镜下已观察到了DNA分子的三维双螺旋结构。1986年美国、日本研制成功的扫描型隧道显微镜，显示出晶体表面的原子布阵，并拍摄了原子和原子键的照片。这些新技术的应用，使人们有可能用直接显示的方法，查清细胞生理活动过程中的分子结构变化。

所以说，分子生物学是在分子水平上研究生物的结构、组织和功能的科学。它试图根据化学和物理规律来解释生物现象。

那么，生物化学和分子生物学有什么区别呢？从分子水平上考虑，生物具有两个特点——代谢和结构。在代谢方面，细胞呼吸中糖分子在糖酵解时的各个环节，葡萄糖分子的所有变化，催化这些过程的酶、辅因子，以及能量的产生，都属于与细胞内较小分子的代谢转化，是有关生物化学的课题。而在结构方面，蛋白质分子、磷脂和胆固醇是如何被组建在细胞膜内的，或者在肌肉的收缩过程中蛋白质分子又是如何被组织的，属于结构分子生物学范畴。换言之，涉及到细胞结构的大分子组成问题。因此，分子生物学主要研究蛋白质、核酸、其他大分子以及它们之间的相互作用。

分子生物学的研究目标主要有四点：(1) 生物大分子的本质，即它们的化学结构、大小、形状和三维结构。(2) 生物大分子的功能及其与结构的关系。分子生物学的主要目标之一就是试图将大量的生物功能与分子水平上发生的事件联系起来。(3) 生物大分子在细胞成分中的组织结构方式。(4) 从较小单体亚单位构建生物大分子的方式，以及活细胞合成过程中如何克服“能障”和解决熵的问题。

1.2 细胞分子生物学的对象和任务

分子生物学的飞速发展，为细胞生物学的发展增添了新的活力。由于它们向细胞生物学的渗透，于80年代中期汇合形成了细胞分子生物学。

分子生物学的发展深刻地揭示了生命现象的许多奥秘，使细胞生物学发展到一个崭新的阶段。但是分子不同于细胞，分子，包括大分子，只不过是细胞的组成成分，任何大分子单独存在都不是生物体的基本单位，也不能形成独立生存的生命实体。分子的存在和变化只有在细胞整体结构中才具有生命意义。因此，分子生物学不能取代细胞生物学，正如分子不能取代细胞一样。

细胞分子生物学的研究对象是细胞，生命寓于细胞之中。细胞分子生物学最关心的是细胞的时间、空间变化，其任务是在细胞这个生物体最基本的结构单位里探索生命活动的规律性，并通过细胞来认识生命的共同本质。细胞分子生物学涉及到生物学中许多分支学科的内容，例如遗传、发育、生理、代谢等，但它具有自己的独立体系，并不是各个学科内容的简单累加。生物学各个分支学科都有各自观察问题、分析问题的范畴和角度，可是要把各种生命活动同细胞结构相联系，并在细胞水平上统一起来，则是细胞分子生物学的任务，其它任何学科无法取代。例如，细胞内蛋白质生物合成这样复杂的过程，如果脱离细胞结构只从生物化学角度来讨论，就无法阐明清楚。细胞是有秩序的立体结构，为各种分子参加生命活动提供了特定的微环境，脱离了这一微环境，大分子

的某些属性也要发生质的变化。例如，线粒体内膜上的 F_1 因子，作为线粒体的正常结构时，能催化 ADP 和磷酸根合成 ATP，但将其分离到体外时，却催化 ATP 水解成 ADP 和磷酸。因此，各种分子必须在细胞内构成一定的有秩序的关系，互相协调配合，才能表现出有生命意义的现象。单纯无秩序的大分子变化，只能是生物化学反应，还不能称其为生命活动。因此，从分子水平上阐明生命现象时，决不可以忽视细胞这一基本结构单位的整体性。细胞分子生物学的发展，必然为生物学各分支学科的发展提供更深刻的依据。

1.3 细胞分子生物学的发展与重组 DNA 技术

细胞分子生物学的兴起和发展，是不断引入新研究方法的结果。除了显微镜技术，细胞培养、细胞化学、细胞及其组分的分离与纯化等技术以外，最重要的是重组 DNA 技术。本节只介绍重组 DNA 技术，其它技术在细胞生物学教材中都有详细的介绍。

重组 DNA 技术由几种技术混合组成，其中最重要的技术有：(1) 用限制性核酸酶特异性剪切 DNA；(2) 核酸杂交。利用核苷酸顺序与其互补核苷酸顺序结合的能力，可以非常精确和灵敏地识别 DNA 或 RNA 的特殊顺序；(3) DNA 克隆。把一段特殊的 DNA 片段插入到快速繁殖的遗传成分（质粒或病毒）中，这个片段可在细菌或酵母细胞中扩增；(4) 测定被克隆的 DNA 片段的核苷酸顺序。下面将介绍如何利用这些技术解决分子生物学和细胞分子生物学发展过程中所遇到的一个个难题。

1.3.1 分子生物学研究的主要对象由蛋白质转向核酸

在活细胞的许多生命分子中，人们最感兴趣的是蛋白质、RNA、DNA 这三类。它们都是大分子，即由简单的小单元（单体）连接而成的线状多聚物。直到本世纪 60 年代前，最受注目的一直是蛋白质。其原因今天回顾起来是很清楚的，在某些特化的组织中能聚集起大量的单一类型的蛋白质，例如红细胞含有几乎是纯的血红蛋白，软骨基本上全由胶原蛋白组成，毛发的成份主要是角蛋白。生物化学家首先研究的就是这样的蛋白质，因为它们容易纯化，而纯化是进一步研究的前提。随着一系列复杂的生化技术的问世，那些在活细胞的化学“杂烩汤”中含量极微的蛋白质也能被纯化了，于是，生物化学家可以集中力量研究具有酶功能的蛋白质：酶在活细胞里催化着成千上万种生化反应，所有这些反应的整体就是细胞的新陈代谢。研究酶的工作进展顺利，因为有许多反应很容易在试管里重复出来，只要把反应物和催化反应的酶适当地加以混合就行了。

进入 60 年代以后，蛋白质的主角地位逐渐被其它大分子抢走了，先是 RNA，随后是 DNA。这有两条重要原因：头一条颇有讽刺意味，恰恰就是由于在蛋白质生物化学方面研究的巨大成就，积累了关于成千种蛋白质和生化反应的浩如烟海的数据，以至于很快就使人觉得，靠进一步研究个别的树木来了解整座森林是没有什么指望的，究竟是什么东西在组织、指挥着如此众多复杂的结构和过程？答案不在蛋白质，而是携带着遗传信息的核酸。使核酸，特别是 DNA 占据了中心位置的另一个原因是重组 DNA 技术的出现。重组 DNA 技术可以将 DNA 切开、修改，再重新连接起来；可以扩增许多拷贝；而最说明问题的或许就是人们可以通过 DNA，按照所需要的大小和成份来制造 RNA，再产生蛋白质。所有这一切操作的中心环节就是基因克隆。

基因克隆的基础奠定于1953年。这一年，Watson 和 Crick 研究提出了DNA的双螺旋结构。单股的DNA是一条核苷酸链，每个核苷酸含有下列四种碱基之一：腺嘌呤(A)、鸟嘌呤(G)、胸腺嘧啶(T)和胞嘧啶(C)。双螺旋一条单链上的A与另一条单链上的T配对，G则与C配对，因此两条单链互补。碱基的顺序规定了氨基酸连接成蛋白质的顺序。当一个基因中的信息被解读(表达)时，它的碱基顺序就复制(转录)到一条RNA链上，这个信使RNA(mRNA)再作为合成蛋白质的模板：它的碱基顺序将被翻译成一种蛋白质的氨基酸顺序。

为蛋白质编码只是DNA功能的一小部分，因而只占DNA所包含信息的一小部分。要想了解这一点以及其他一些简单的事实，首先必须了解DNA顺序的整体结构，以及DNA的单位——单个基因——在生物全部遗传内容(称为基因组)中相互作用的方式。然而，对复杂生物基因组进行分析是困难的。即使是一个细菌细胞，DNA的含量也很大；哺乳动物细胞的基因组更大，它的染色体DNA上排列着大约25亿个碱基对，碱基顺序上间断地分布着区域化的信息——单个基因。一个哺乳动物细胞基因组里有五万到十万个基因，每一个基因都被认为是规定一种特殊的基因产物的结构，通常是一种蛋白质，所以人们的注意力就集中到研究单个的基因。但是直到不久以前仍然毫无建树，因为无法将单个基因分离出来加以研究。在缺少有效的富集、分离技术的情况下，单个的细胞基因只能是一种抽象的概念。遗传学分析说明单个基因是存在的，但就是无法对它们的实体进行直接的生化分析。

1.3.2 限制性核酸酶剪切和DNA顺序分析技术

上面所说的困难局面通过对病毒的研究部分得到了解决。病毒的基因组比细胞的基因组小得多，而病毒的基因和被其所感染细胞的基因相类似。研究较多的是动物病毒——猿猴病毒SV₄₀，其DNA基因组只有5,243个碱基对，一共只有五个基因。所以在对单个基因进行分析时不会受太多无关DNA顺序的干扰。而且这种病毒基因组能在一个被感染细胞中扩增几十万个拷贝，所以不难把病毒DNA与细胞DNA分离开来。

相对简单的病毒DNA一旦得到纯化，就可以用来分析基因结构、信使RNA的转录和加工、蛋白质合成等以前无法进行的研究。然而，即使分析病毒这样小的基因组的结构细节和碱基顺序，若用传统的生化分析方法，即把构成多聚体的单体一个一个地拆开，就是仅含有五千多个碱基对的SV₄₀也使人望而生畏。七十年代中期，两项革命性技术的广泛应用，使DNA结构分析的问题才从根本上得到简化。

第一项技术来源于切割DNA的酶——限制性内切酶的发现。这类从细菌中提取的酶只在DNA双螺旋上某些特定的碱基顺序出现处把DNA分子切开。例如常用的限制酶EcoRI，每当遇到GAATTC就切上一刀，限制酶SmaI只切CCCGGG，等等。构成各种酶识别位点的顺序在任何一段DNA上都可以以一定的统计概率出现。限制酶成了实验者的有力工具。它们的作用就象是在一条沿途没有任何特征的道路建立起一系列便于识别的固定路标，使人们可以把一条很长的DNA分子化为一系列不连续的片段，每段的长度是几百到几千个碱基。利用凝胶电泳可以把这些片段按照大小逐一分开，于是就能对每个片段分别作进一步的分析。

另一项技术革命就是对DNA的顺序分析。新发明的几种方法可以相当迅速地测定

限制酶切出的 DNA 片段的全部碱基顺序。1978 年，用这种方法终于确定了 SV₄₀ 基因组的全部核苷酸顺序。由于 DNA 顺序翻译成氨基酸顺序的遗传密码已经知道，就可以把基因上特定区域的碱基顺序翻译成氨基酸顺序，于是就可以从它的 DNA 结构推测出 SV₄₀ 的蛋白质结构。在此之前，要对蛋白质进行艰苦漫长的生化分析才能确定其顺序，现在通过快速的 DNA 顺序分析确定蛋白质的顺序所需时间要少得多。DNA 顺序分析还揭示了 SV₄₀ 基因组上其他一些区域的结构，它们并不编码蛋白质，而是与基因表达的调控以及 DNA 的复制有关。

1.3.3 基因克隆获得大量选择性的 DNA

细胞分子生物学进一步的进展有赖于分离细胞的单个基因。这项成就来自七十年代初开始的细菌遗传学研究，从中产生的基因分离技术归根到底建立在一切实物（从细菌到哺乳动物）分子结构的共性之上。细菌与哺乳动物的 DNA 的基本结构是一致的，所以来自两种不同生命形态的 DNA 可以融为一体。

DNA 结构的共性还可以推广到许多噬菌体（感染细菌的病毒）和质粒（寄生在细菌中的 DNA 小环）。噬菌体能把自身的 DNA 注入细菌，使之在细菌中复制成许多拷贝，并用病毒蛋白外壳把它们包装起来，最后杀死细菌并从细菌中释放出噬菌体的后代，再去感染别的能被感染的宿主。质粒的情况更为简单，它们与所寄宿的细菌细胞有一种互利的共生关系。质粒可以携带一些有利于宿主细胞的基因，例如，使细菌对抗生素有抵抗力的基因。宿主细胞则报之以允许质粒 DNA 在细胞中有限度地复制，从而保证了亲代细胞分裂产生的每一个子代细胞中都有质粒存在。

有些噬菌体和质粒的 DNA 分子不大，只含有几千到几万个碱基，正因为如此，才可以利用各种新发展的手段来对其进行操作加工。例如这些分子很容易被大量、完整地分离纯化；可以用限制酶在一系列特定的位点上切开，切成的片段又可以相互连接恢复成原来的分子，或者与外源 DNA 连接而构成杂种分子。酶切片段的重新连接借助于一种很容易从细菌中得到的酶，即 DNA 连接酶，此酶能识别 DNA 分子的末端，能将它们融合起来而丝毫不留下连接过的痕迹。

把质粒与外源的（如哺乳动物的）遗传物质融合成的杂种 DNA 分子再送回细菌细胞，质粒又能在其中复制。这意味着质粒基因组可以作为一个“载体”，用来把外源 DNA 从一个细菌运载到另一个细菌中。当载体 DNA 进行复制时，插入的外源 DNA 也得到复制。

克隆过程是从一种生物（例如哺乳动物）细胞的全部 DNA 开始的。首先将它切成大小适合于某一种载体能容纳的片段（大约 1,000 到 30,000 个碱基）。一个复杂的基因组，例如人的基因组，可以切成大小几十万到几百万个 DNA 片段，每一个片段可以分别插进一个载体 DNA 分子中。只需把几百万插入 DNA 和载体 DNA 分子混在一起，再加入 DNA 连接酶，在几分钟内全部过程即可完成。只要得到的杂种分子数量足够多，所感兴趣的任何单个基因都必定可以在与载体组相连的某一段外源 DNA 中找到。

然后可以把每一个这样的杂种分子（一半是载体，一半是哺乳动物 DNA 的插入片段）分别送进一个细菌细胞，并在细菌中复制许多次。于是每一个杂种分子都繁衍出一群后代，其中所有的成员都和最初的那个片段相同，这样的群体通常称为一个“克

隆”，它表示其中所有的成员都是同一个祖先的后代，而且彼此都是相同的。

“克隆”这个词还有另一个意义，就是特指一个杂种分子群体中所包含的外源 DNA 片段。每一个插入片段原先都存在于一个复杂基因组的 DNA 中，与千千万万个大小相仿、复杂程度近似的其他 DNA 片段相混杂。而上述操作过程一旦完成，同一片段在它那个克隆群体中就以纯净的状态存在，与之混杂的只有载体 DNA。将一个 DNA 插入片段从它的原始环境中分离出来，选择性地加以扩增，这就“克隆”了这个片段，象这样被纯化了的 DNA 插入片段本身往往也叫做一个“克隆”。

1.3.4 制备特异性探针鉴别特定的基因

插入和扩增的结果是得到了几十万个不同的克隆群体，每个群体都是一个杂种 DNA 分子的后代。如果在扩增之前将最初的杂种混合物先进行适当的稀释，就可以把带有不同 DNA 插入片段的克隆群体彼此分开。一旦建立起这样一大批不同的克隆群体，即所谓“文库”之后，实验者面临的问题就是怎样从中鉴别出携带着所需 DNA 插入片段的那一个或几个群体来，这也就是克隆过程中要求完成另一个棘手的步骤。

如果一个相关的基因或者 DNA 片段先前已经被克隆，那么鉴别工作很简单。可以给先前克隆出来的 DNA 加上放射性同位素标记，得到的放射性 DNA 在适当的条件下将优先附着在有关的克隆上（因为互补的 DNA 单链可以通过碱基配对相互“杂交”），从而将它们鉴别出来。不过最有价值的克隆工作自然是分离那些从来没有被克隆过的，甚至连相关的基因也不曾被克隆过的基因。为了解决这个难题，科学家找到了一系列巧妙的方法，目标是得到一种特异性的探针，用来在克隆文库中搜索所需要的克隆。

有一种制备探针的方法基于如下事实，就是某些蛋白质能在特化的细胞中高水平地表达。例如，在红细胞的前体中，珠蛋白（血红蛋白的蛋白质部分）合成的数量大大超过其他任何一种蛋白质，因此指导珠蛋白合成的 mRNA 的含量也非常高，这就不难将它们与同一细胞中的其他 mRNA 分开。提纯了的 mRNA 或者 mRNA 的 DNA 拷贝就可以用来作为探针，因为它可以杂交到基因文库中对应的基因序列上。从这种方法衍生出了种种复杂的技术，可以用来从一种细胞的总的 mRNA 中把只占千分之一的编码特定蛋白质的 mRNA 选择性地分离出来。

而实际上，要求从中取得基因的蛋白质往往十分稀少。因此，它的 mRNA 也就不容易分离到。这时可以把少量的蛋白质纯化，测定它的一部分氨基酸顺序，利用已知的遗传密码，反过来推测编码这个蛋白质的 DNA 碱基顺序。然后按照所推测的碱基顺序用现成的核苷酸装配成小片段的 DNA。这种人造的基因片段也可以作为探针来鉴定有关的克隆。

还有一种从蛋白质出发的方法依靠的是针对这种蛋白质的抗体，而这个蛋白质的基因正是我们想要克隆的。让一个细菌被带有所需基因的噬菌体感染之后，就能少量地合成由这个基因编码的蛋白质。因此，可以用适当的抗体来筛选噬菌体文库。这个抗体与有关的蛋白质结合，从而鉴别出带有这个基因的克隆。

利用以上介绍的以及其他一些实验方法，现在已经有适当的技术可以克隆任何一个基因，只要这个基因的蛋白质产物是已知的并且可以分离得到，哪怕只得到很少的一点，只要有足够的兴趣，把已知的几百种酶之中任何一种酶的基因都可以分离出来。细

胞里构成蛋白质的重要基因，包括决定细胞整体结构的蛋白质基因，都被克隆了。还分离到编码胰岛素、干扰素、白细胞介素，以及若干生长激素等细胞间信使的基因。事实上，克隆基因和测定顺序比充分解释所得到的数据还要容易得多。大多数DNA顺序现在被存储在计算机的数据库里，也许未来的生物学家靠新的分析手段，能充分地解释它们。

在一个复杂生物体的全部遗传内容中，编码已知蛋白质的基因只占一小部分；其余的大多数基因或许也为蛋白质编码，但迄今为止这些基因的存在还只能通过它们对细胞，以及生物结构和功能的效应来加以推测。其中有些支配着细胞中的生化反应，有些支配着复杂的发育过程，使胚胎发育成一定的结构和形状，还有一些基因可能决定生物体的行为属性。这些基因目前还无从捉摸，因为把它们从基因文库中鉴别出来的手段还很有限。

1.3.5 重组DNA技术成为生物技术工业的基石

一旦把基因从基因组搬到了基因文库里，能做的事情就不仅仅限于详细的描述DNA和蛋白质的结构了。克隆了一个基因以后可以把它送进外源细胞，迫使这些细胞表达它，合成这个基因在它“老家”所编码的蛋白质。

为了使一个基因能够表达，可以把它从克隆载体上切下来进行重要的修改。之所以需要修改，是因为哺乳动物的基因带有一些调节顺序，在它原先的细胞中这些调节顺序可以促使基因转录mRNA，但在细菌细胞中却不能，所以必须用细菌的调节顺序来取代它们，然后将修改过的基因接到“表达载体”上。表达载体是一种有利于基因在外源细胞环境中表达的专门设计的质粒。最后可将带有细菌调节顺序的哺乳动物基因（或者是经过类似的加工改造的植物基因）输入所选择的外源宿主（通常是某一种细菌或者酵母细胞）。

如果一种蛋白质在它正常宿主中合成的数量有限，只要将它的基因重新设计，使之能在细菌或酵母中高水平地表达，就可以大量地合成这种蛋白质，从而带来巨大的经济效益，这就是生物技术工业的理论基础。带有克隆基因的微生物可以在发酵罐里廉价地大量培养，使蛋白质的生产能大规模进行。目前正在生产或考虑要生产的产品包括胰岛素、干扰素（用于抗感染，或许还能抑制肿瘤生长）、尿激酶以及血纤维蛋白溶解酶原激活因子（用于溶解凝血块）、凝乳酶（用于把牛奶制成奶酪）、肿瘤坏死因子（可能用于治疗癌症）、纤维素酶（用于从植物纤维素制造糖）、病毒肽抗原（用于制造安全的新疫苗）等等。

另一种安插基因的方式是把克隆在细菌里的哺乳动物基因输送到培养的哺乳动物细胞中而不是微生物中去。虽然哺乳动物的培养细胞不象细菌或酵母那样可以经济地大量培养，但能够对哺乳动物基因编码的蛋白质作微小的，然而却是重要的修饰。例如某些哺乳动物蛋白质的氨基酸骨架如果接上糖或者脂类的侧链，就能更好地发挥功能。这些侧链只有在哺乳动物细胞中才能正常地加上，而不能在细菌细胞中加上。

1.3.6 按照人的愿望改造生物性状

现在，不仅能将克隆的基因插入微生物或哺乳动物细胞，还能插入完整的多细胞植物或动物的基因组中，其目的与为实现大规模生产所需基因产物的单细胞微生物遗传工

程完全不同。对植物和动物作遗传上的改造是为了改变它们的生长速度、抗病能力、适应新环境的能力等生物学性状。

把基因插入多细胞生物，与插入单个的培养细胞完全不同，将克隆的基因输进一株植物或者一个动物的多数类型细胞之后，只有得到了这个基因的少数细胞的行为才发生改变。显然，如果能使整个生物及其后代都发生改变，意义将会大得多。这就要求将基因特异性地插进生殖细胞（精子或卵），再由它们把遗传信息从亲代传给子代。

目前，已经能将基因插入哺乳动物、果蝇以及某些植物的生殖细胞，方法是直接把克隆基因注射进早期胚胎，或者通过病毒载体把基因带进胚胎细胞。同样，由胚胎长成的动物（或植物）也只有一部分细胞带有插入的基因，但有可能这个基因出现在它的一部分生殖细胞中，生殖细胞有了这个基因，将使生物体的一部分子代把这个插入的基因连同其他亲代基因一起继承下来，使之出现在子代个体的全部细胞中。于是这个基因就参入了后代的种系，并可以继续传给下一代，影响后代的个体。

目前，生殖细胞插入技术仍在几个方面受到较大的限制，也许将来永远都是这样。因为插入位置是完全随机的，这些技术不能确保外源 DNA 插入（“整合”）到染色体的特定位点，而且也无法去掉生物体原有的一个基因而用外源 DNA 代替它；能做到的只是在原有的基因组中加入新的 DNA。还有，基因组中原有的基因能在发育过程中适当时机开启或关闭，而插入的基因却不能象原有的基因那样精确地发挥功能。

然而，生殖细胞插入技术还是卓有成效的。已经得到带有能传给后代的具有额外生长激素基因的小鼠，其结果是巨型小鼠（比正常个体大一半）的诞生；改变了生长特性的牛亦将问世；并且已经得到了带有各种不同的插入基因的果蝇，这些将使人们对果蝇发育的分子生物学有新的认识。另外，目前正在培育带有对除草剂有抗性基因的农作物。随着生殖细胞插入技术的改进以及新基因被克隆，将会大大增加改变生物性状的可能性。分子生物学家不再只是被动地面对作为自然进化最终产物的各种生命形态，他们将成为引起生物变化的主动干预者。

1.3.7 基因克隆是重组 DNA 技术的中心环节

综上所述，在重组 DNA 技术的各种方法中，克隆占有极为重要的地位。通过克隆可以对生命系统进行三个层次的分析。首先与某一生物学问题有关的基因可以被分离出来，分析其 DNA 顺序，揭示其功能与调控。其次，一个基因的 DNA 一旦克隆成功，就可以大量地制造由它转录的 RNA 供研究。RNA 能以多种方式调节基因的表达，RNA 的结构及其加工对于充分了解基因的功能是至关重要的。第三点或许是克隆带来的最大好处，就是能对基因编码的蛋白质进行分析。各种各样的蛋白质是怎样起作用引起细胞里无数种反应的，从前只能得到极少量的用来进行研究的蛋白质，而现在一旦分离了这些蛋白质的基因就可以大量制造。总之，生命系统中三种主要的大分子组份现在都能以纯净的形式大量地得到了。

此外，基因克隆还照亮了生物学的另一角——进化发展的历史。人类以今天这样面目出现才不过几十万年，很快便介入了某些进化过程，而这些进化过程早在一、二十亿年前就开始塑造今天繁衍生息于地球上的种种生命形态了。产生第一个细胞生命形态的步骤也许永远不会为人所知，但那以后的许多变化却记录在今天生物体的 DNA 中，所

以人们可以用基因克隆和顺序分析等方法对这些变化加以鉴别，只要分析一下各种生物 DNA 的克隆片段，就可以明白无误地确定它们之间的关系。为了帮助分析这些 DNA 顺序并且确定进化关系，生物学家还动用了一些复杂的计算机程序。

生命的系统发育过程之所以可以重建，是因为不同生物中有一些由共同祖先传下来的 DNA 顺序，虽然进化上相距遥远，但仍然表现出明显的保守性，这种保守性一方面对于分子生物学家具有极大的实用价值；另一方面，在一种生物中难以研究的基因及其有关的生物学问题，可以在容易进行研究的另一种生物中得到解决。例如，有一些癌基因的功能在人癌细胞中很难分析，但在酵母 DNA 中鉴别出了与它们十分接近的基因，这本身就是一个重要的发现。它表明这些基因早在多细胞生物出现很久之前，就已经发挥重要的正常生理功能了。由于酵母细胞相对来说较为简单，而且可以对它进行一些精巧的操作，这就使一些用哺乳动物细胞无法进行的实验可以在酵母中实现。这些实验的结果首先是对了解癌细胞的功能提供了信息，把结果推广到哺乳动物细胞，将对迅速增长的癌基因基础知识作出贡献。

克隆技术在研究进化方面的应用也影响到对于人种的了解。人种和其他物种一样，也是由许多个体组成的具有遗传异质性的群体，这种多样性里埋藏着未来进化的种子。在人类的基因库中，某些人携带的特殊形式的基因在遇到未来的自然选择力时可能给人类带来好处；而另一些类型的基因在目前显然是不利的，例如那些决定镰刀状细胞贫血症、动脉粥样硬化症、癌症、血友病以及其他许多代谢异常病的基因。与这些疾病有关的基因正在迅速地得到鉴定与克隆，随之而来的是这样的前景：人们可以对成人、甚至胚胎的由遗传决定的疾病预先作出明确的诊断。

当认识到人类基因库中存在着遗传多样性和遗传损伤，也就刺激了对于修复缺陷基因的研究，包括病人及其后代的缺陷基因。目前已经能将克隆基因输入某些体细胞（非生殖细胞）组织，例如骨髓和皮肤。所要克隆的基因可以是与病人细胞中的缺陷基因相对应的健康的完整基因，将这样的基因送进病人的体细胞，就可能纠正（至少是部分地纠正）某些遗传损伤造成的不良效应。将克隆基因插入人类生殖细胞也可能会实现，那么，传给病人后代的遗传缺陷将可望得到医治。基因治疗作为一种全新的治病手段正开始进入临床试验。基因治疗是指将遗传物质导入载体或受体细胞通过替代缺陷基因、修正错误基因、对抗异常基因、调节基因产物的表达等方式以实现治疗疾病的目的。

1.3.8 重组 DNA 技术发展的展望

重组 DNA 技术使人们获得了干预生命系统的能力。现在可以把基因及其编码的蛋白质重新加以设计，赋予它们新的功能，这样就能改变一个生命系统中相互作用的各个组份之间的关系，使整个系统产生新的、往往是富于启发性的变化。基因的重新设计就是用所谓定位诱变的方法来改变 DNA 顺序，即用一个新的限制酶切片段来取代克隆基因中的原有片段，或者是把化学合成的 DNA 片段插入到基因中去，取代原有的顺序，或增添新的顺序信息。此外，当然也可以置换单个核苷酸造成点突变，这是一个基因所能发生的最细微的改变。基因经过几亿年的自然进化才积累起来的遗传改变，现在只需要在实验室里几个星期的操作就可以模仿出来，或者被取而代之了。

经过改造的基因可以再放回它们正常存在的生命系统中去。于是，与底物亲和力和很