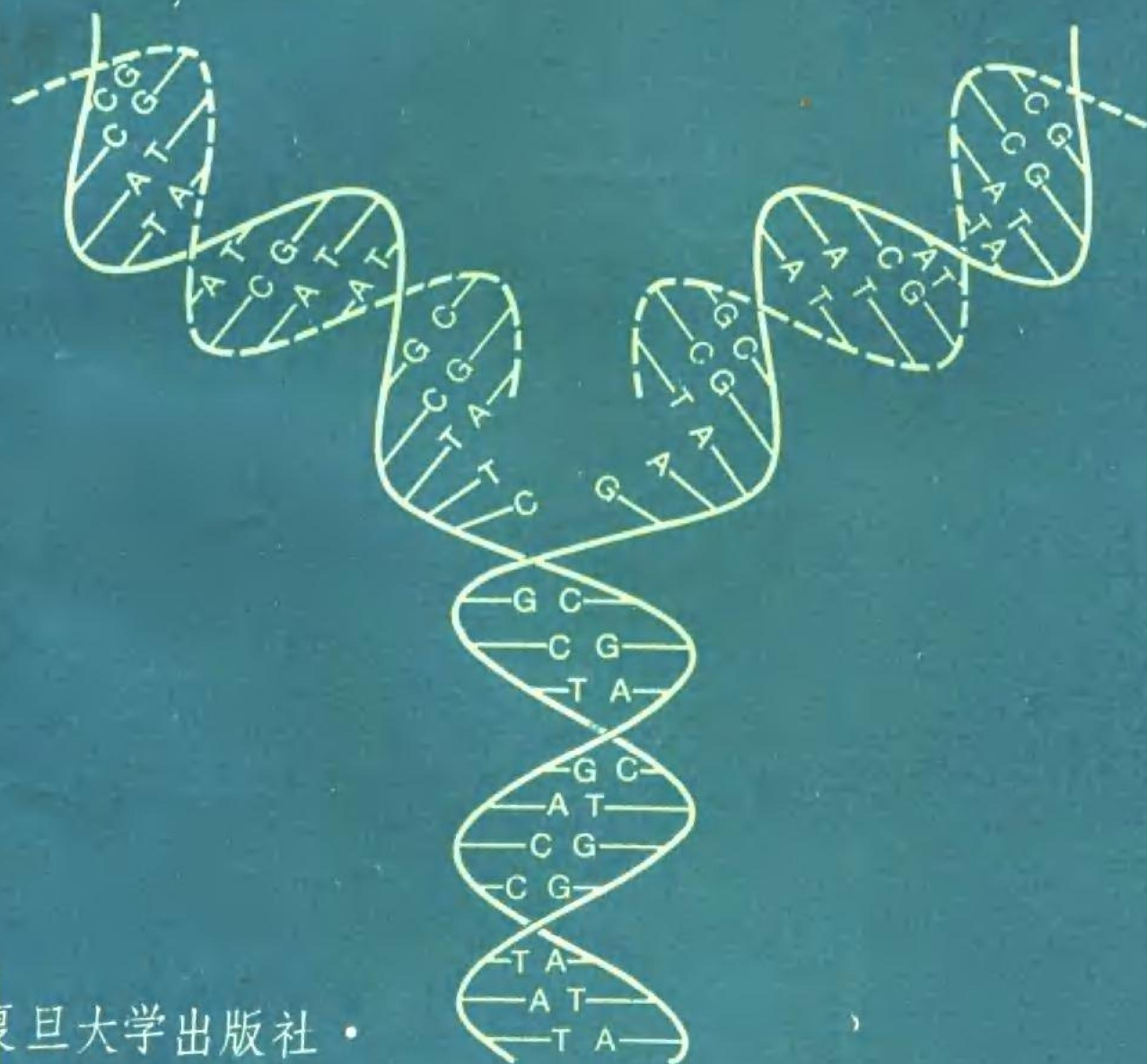


分子生物学导论

[美] 戴维·弗雷费尔德著 刘承健 蔡武城译 赵寿元校



复旦大学出版社 ·

分子生物学导论

[美] 戴维·弗雷费尔德 著

刘承健 蔡武城 译

赵寿元 校

复旦大学出版社

内 容 提 要

全书 16 章, 简明扼要介绍分子生物学的体系和概念, 以及最新进展的信息。前 5 章介绍大分子的性质及其相互作用; 第 6~11 章在介绍了遗传物质后, 系统阐述 DNA 复制、修复、转录、翻译和突变; 最后 5 章分别介绍质粒和转座因子、重组 DNA 和遗传工程、原核生物和真核生物基因活性的调节以及噬菌体等。本书可作为分子生物学课程的教材和参考书。

David Freifelder
Essentials of Molecular Biology
Jones and Bartlett Publishers, Inc. 1985

分子生物学导论

[美] 戴维·弗雷费尔德 著

刘承健 蔡武城 译 赵寿元 校

责任编辑 徐士菊

复旦大学出版社出版

(上海国权路 579 号)

新华书店上海发行所发行 复旦大学印刷厂印刷

开本 787×1092 1/16 印张 14.75 字数 366,000

1989 年 11 月第 1 版 1989 年 11 月第 1 次印刷

印数 1—4,000

ISBN 7-309-00292-X/Q·13

定价: 3.35 元

译 序

近 20 多年来分子生物学的突飞猛进使得这门年轻学科变得越发具有吸引力,学生和研究、教学人员都希望有一本内容新颖、篇幅合适的教科书。戴维·弗雷费尔德根据其在分子生物学发展前期大量的研究工作和长期教学经验,编写了第一本较全面的课本《分子生物学——原核生物和真核生物总论》(该书中译本已由科学出版社出版);为了适应更多的读者及一些短期课程的需要,作者又在此基础上经删节、重组和改写,出版了这本精炼而又自成体系的《分子生物学导论》。

本书既系统、全面地介绍了分子生物学的体系和概念,又简明扼要地提供了该学科中的一些最新进展的信息,无论对初入门者或对有一定基础的读者均有参考阅读价值。

本书作者戴维·弗雷费尔德一直对中国怀有友好的感情,曾计划来华访问讲学,但由于健康原因未能成行并过早去世。他曾在来信中说:“我对中国的文化特别感兴趣,首先因为她历史悠久,其次因为她在近 40 年来发生了巨大变化”。1987 年 3 月 8 日的信是给我们的最后一封信,他遗憾地告诉我们,因为化学治疗暂时不能按计划来华,并深情地说:“我一如既往,有着一睹中国真貌的强烈愿望”。我们谨将本书的翻译出版献给作者以及他和我们共同为之奉献的事业——分子生物学。

本书第 1~5、14、16 章由刘承健翻译 第 6~13、15 章由蔡武城翻译,经赵寿元校阅。译文中如有不当之处敬请批评指正。

译校者

1988 年 6 月于复旦大学

前 言

1983年,《分子生物学——原核生物和真核生物总论》出版了。这是为分子生物学全部课程而写的一部近千页的教科书。在出版后的几年中,我很高兴地收到了许多赞赏该书的意见。但是,也有不少教师说,该书篇幅太长,超出某些课程的使用要求,为此建议我另写一本内容简炼的版本。

1984年中期,我开始了这项工作。我删节并调整了原来的材料,但很快发现此法行不大通,因为在我所保留的章节中,删去了许多需参阅的内容,以致思路常被打断。因此,许多段落显然必须重写,还得加上连接的词句。在做这些工作的同时,我还利用这个机会在必要之处更新原来内容,加入新的信息,以求写出一本较好的“短篇”。删去的多半是高深的内容和技术介绍以及某些事实的实验证据。教师或学生在必要时可阅读《分子生物学——原核生物和真核生物总论》。(该书中译本已由科学出版社出版——译者注)

《分子生物学》¹没有附带供学生练习的习题,但另出了一本《分子生物学习题集》(Problems for Molecular Biology)。(该书中译本将由科学出版社出版——译者注)《分子生物学导论》也从该书中选用了部分习题和答案。

我希望这本短篇教科书对要求出版这本书的人以及其他读者都会有用。

戴维·弗雷费尔德

1984年11月于加利福尼亚,圣地亚哥

目 录

第一章 分子生物学的系统和方法

细菌	1
细菌的代谢调节	2
噬菌体	3
酵母菌	5
动物细胞	5
遗传学和分子生物学	6
突变型的应用, 一些实例	6
突变型的遗传学分析	7
遗传重组和遗传作图	8
互补作用	9

第二章 大 分 子

几类主要大分子的化学结构	11
蛋白质	11
核酸	13
多糖	15
决定蛋白质和核酸三维结构的非共价相互作用	15
无规线团	15
氢键	15
疏水性相互作用	15
离子键	16
范德瓦耳斯力	16
非共价相互作用效应小结	17
凝胶电泳	17

第三章 核 酸

DNA 的物理和化学结构	14
决定 DNA 结构的因素	21
复性	23
DNA 异源双链	26
环状和超螺旋 DNA	27
RNA 的结构	28
核酸的水解	29
核酸顺序测定	29

左手螺旋 DNA	30
真核 DNA 的顺序结构	20

第四章 蛋白质分子的物理结构

蛋白质分子的基本特征	33
多肽链的折叠	33
α 螺旋和 β 结构	35
蛋白质结构	37
具有亚基的蛋白质	39
酶	41
酶-底物复合物	42
酶-底物复合物的形成理论	42
酶-底物复合物的分子细节	43

第五章 大分子的相互作用和复合聚集物的结构

DNA 的复合结构:大肠杆菌染色体	45
染色体和染色质	47
DNA 与识别特定碱基顺序的蛋白质之间的相互作用	51
生物膜	52

第六章 遗传物质

DNA 是遗传物质的证明	56
转化实验	56
捣碎器实验	58
遗传物质的特性	59
DNA 对遗传信息的贮存和传递	60
信息从亲代传给子代	60
DNA 及其信息含量的化学稳定性	60
DNA 发生变化的能力, 突变	61
RNA 作为遗传物质	62

第七章 DNA 的复制

双链 DNA 的半保留复制	63
DNA 复制的酶学	66
聚合反应和聚合酶	66
DNA 连接酶	70
不连续复制	70
复制叉上发生的事件	74
复制叉上发生事件的小结	75
前导链合成的起始	76
全程起始	76

共价延伸的起始:滚环复制	78
双向复制	78
真核生物染色体的复制	80

第八章 修 复

DNA 分子的改变	83
错误碱基的修复	84
胸腺嘧啶二聚体的修复	85
光复活	86
切割修复	86
重组修复	87
SOS 修复	88

第九章 转 录

RNA 的酶促合成	91
转录信号	93
RNA 分子的种类	96
信使 RNA	96
稳定的 RNA: 核糖体 RNA 和转移 RNA	97
真核生物中的转录	98
研究细胞内 RNA 的方法	102

第十章 翻 译

翻译过程的概貌	104
遗传密码	105
tRNA 和氨酰合成酶	106
摆动假说	109
多顺反子 mRNA	110
重叠基因	110
多肽合成	111
核糖体	111
原核生物中多肽合成的步骤	113
复杂的翻译单位	116
抗生素	117

第十一章 突变形成、突变和突变型

突变的类型	118
突变型的生物化学基础	119
突变形成	120
碱基类似物诱变剂	120
化学诱变剂	121

• 4 • 目 录

紫外线辐射	122
嵌入剂引起的突变形成	122
插入 DNA 长片段(转座因子)诱发突变	123
增变基因	123
突变的热点	123
回复	124
基因内回复	124
基因间的回复和抑制	125
回复作为检测诱变剂和致癌物的手段	127

第十二章 质粒和转座因子

质粒 DNA	129
质粒 DNA 的转移	129
特定质粒的性质	132
质粒的复制	133
拷贝数的控制	134
转座因子的结构	134
转座作用	136
转座作用的机制	137
真核生物中的转座因子	139
转座子中介的遗传现象	140

第十三章 重组 DNA 和遗传工程

特定 DNA 片段的分离和鉴定	143
DNA 分子的连接	146
特定 DNA 分子插入载体	150
重组体分子的鉴定	151
筛选特定的重组体	153
基因工程的应用	153
商业上的可能性	154
研究工作中的应用	154
真核生物蛋白质的生产	155
用于基因工程的动物病毒	155

第十四章 原核生物基因活性的调节

调节的原则	157
大肠杆菌乳糖系统和操纵子模型	159
色氨酸操纵子;生物合成系统	164
自身调节	168
反馈抑制	168

第十五章 噬 菌 体

典型噬菌体裂解性生活周期的各个阶段·····	171
专一的噬菌体·····	173
大肠杆菌 T4 噬菌体·····	174
大肠杆菌 T7 噬菌体·····	177
大肠杆菌 ϕ X174 噬菌体 ·····	178
大肠杆菌 λ 噬菌体:裂解性生活周期 ·····	180
大肠杆菌 λ 噬菌体:溶源性生活周期·····	183
转导噬菌体 ·····	187

第十六章 真核生物基因活性的调节

原核生物与真核生物在遗传结构上的几点重要区别·····	190
基因家族·····	191
基因剂量和基因扩增 ·····	193
转录的调节·····	194
加工的调节·····	195
超敏感位点和上游调节位点 ·····	195
翻译调控·····	197
同一段 DNA 编码多种蛋白质 ·····	198
基因重排:免疫系统中编码顺序的连接 ·····	199
 习 题·····	 202
 解 答·····	 216

第一章 分子生物学的系统和方法

分子生物学这个术语是 1945 年由 William Astbury 首次提出的,他所指的是对生物大分子的化学和物理结构的研究。当时,生物化学家已经发现了细胞内许多基本的化学反应,也认识到了一些特殊的反应和决定细胞中许多性质的蛋白质结构的重要性。但是,直到研究了像细菌和噬菌体(细菌病毒)那样的简单系统,取得了最富有成果的进展之后,分子生物学才得以发展,这是因为这些“简单”系统比动物细胞更容易提供有关基本生物学过程的信息。尽管在生物学上细菌和噬菌体本身相当复杂,但它们使科学家能够确定,细胞中绝大部分(如果不是全部)的遗传信息包含在 DNA 分子中。继此发现后,50 年代末 60 年代初,分子遗传学的新领域发展迅速,提出新概念的速度之快只有在 20 年代的量子力学发展能与之相比。初期的成功和积累的大量信息,使研究者能够将分子遗传学的技术和有力的逻辑方法应用于诸如肌肉和神经功能、膜的结构、抗体的作用方式、细胞分化和发育、免疫等学科。对生命过程的基本一致性的信念是取得这样迅速进展的重要因素。也就是说,人们相信,支配简单生物诸如细菌和病毒等活动的基本生物学原理,一定也适用于更为复杂的细胞;只是具体细节有所差异。这种信念已为实验结果充分证明是正确的。

本书要对原核生物和真核生物分别加以讨论,并将两者比较对照。因为原核生物比较简单,故通常先作讨论。为此,我们从讲述细菌性质开始,细菌在分子生物学研究中占有重要地位。

细 菌

细菌是自由生活的单细胞生物。它们具有单个染色体,染色体并不包裹在核中,所以它们是原核生物,与真核生物相比,它们的物理结构简单。细菌可看作是一种包装在坚固细胞壁中、含有几千种化合物和一些具有一定结构的颗粒的溶液。

细菌具有许多特性,使得它们成为研究基本生物学过程的合适材料。例如,它们生长容易、迅速,与多细胞生物体中的细胞相比,细菌对营养的需要比较简单。分子生物学领域中最常用的细菌是大肠杆菌 (*Escherichia coli*, 通常用 *E. coli* 表示)。大肠杆菌在最适条件下,37℃ 时,每 20 分钟分裂一次。因此,在约 20 小时之后,一个细菌可变成 10^9 个细菌。细菌能够在液体培养基 (liquid growth medium) 或者在固体表面生长。生长在液体培养基中的群体称为细菌的培养物 (culture)。如果液体是生物物质的复合抽提物,就称为肉汤 (broth)。如果培养基是只含糖这样的碳源不再有其他有机化合物的简单混合物,它就称为基本培养基 (minimal medium)。典型的基本培养基包含下面各种离子: Na^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 NH_4^+ 、 Cl^- 、 HPO_4^{2-} 和 SO_4^{2-} , 以及一种碳源如葡萄糖、甘油或乳酸盐。如果细菌能够在基本培养基中生长,也就是说,如果它能够合成所有必需的有机物质如氨基酸、维

生素和脂类,这种细菌就称为原养型 (prototroph)。如果某种细菌必须加入除碳源外的任何有机物质后才能生长,这种细菌就称为营养缺陷型 (auxotroph)。例如:若在培养基中需要亮氨酸,这种细菌就是亮氨酸缺陷型;这种细菌的遗传学符号是 Leu^- , 它们的原养型则是 Leu^+ 。细菌经常生活在固体表面。最早应用的供细菌生长的表面是生的马铃薯片。此后,为白明胶凝固后的培养基所取代。因为许多细菌能分泌消化白明胶的酶,所以又找到另一种惰性胶化剂琼脂 (agar),这是一种从多种海藻中提取的、在日本烹饪中广泛用作调厚剂的胶化剂,它不被细菌的酶所分解,已被普遍采用。如果液体培养基是肉汤,固体培养基就称为营养琼脂培养基;如果基本培养基被胶化,形成的固体培养基就称为基本琼脂培养基。固体培养基一般铺在培养皿 (petri dish) 中,用实验室术语讲,含固体培养基的培养皿称为平板 (plate),而将细菌涂布在琼脂上的操作称为涂平板 (plating)。

生长在琼脂表面的细菌会发生分裂。因为在固体表面多数细菌不能明显移动,子代细菌停留在很靠近初始细菌的位置旁。子代细菌数目增长如此之快,以至出现一簇可见的细菌。这个细菌簇称为细菌菌落 (bacterial colony) (图 1-1)。菌落的形成可以使人们测定培养基中细菌的数目。例如,如果有 100 个细胞涂在平板上,第二天将出现 100 个菌落。

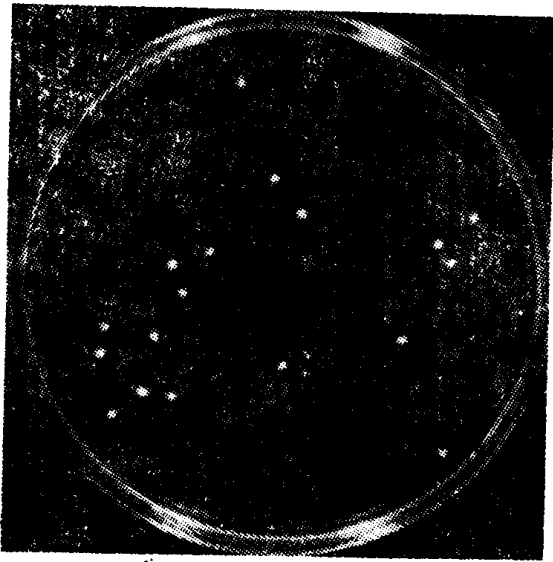


图 1-1 含有琼脂的培养皿,上面长着大肠杆菌菌落

涂平板是确定某种细菌是否属于营养缺陷型的一种方法。操作方法如下。准备好基本琼脂培养基和营养琼脂培养基平板。每块平板上涂上几百个细菌,在温箱保温培养过夜。随后在营养琼脂培养基上可发现几百个菌落,因为这种培养基含有各种物质,差不多可以满足任何一个细菌的需要。如果在基本琼脂培养基上也发现菌落,这种细菌就是原养型;如果没有发现菌落,则是营养缺陷型,因为在基本琼脂培养基中缺少某种需要的物质。然后制备基本培养基平板,补充各种物质。如果这种细菌是亮氨酸缺陷型,加入亮氨酸就能使菌落形成。如果必需加入亮氨酸和组氨酸,这种细菌就是这两种物质的营养缺陷型。

细菌的代谢调节

细菌是受到很好调节的高效率的生物。例如,它们很少合成不需要的物质。因此,如果在生长培养基中含有色氨酸,细菌就不会形成合成色氨酸的酶系统,但是当培养基中的色氨酸用完后,这种酶系统就会迅速形成。参与各种能源利用的系统也有效地受到调节。研究得比较清楚的一个例子是作为替代葡萄糖碳源的乳糖代谢。色氨酸合成和乳糖降解的调控是代谢调节 (metabolic regulation) 的两个例子。这种非常普遍的现象将在全书中广泛探讨。读者将会看到较简单和较复杂的不同调节系统,所有这些系统的作用是决定在不同时间和不同场合下,某一特定化合物可被利用多少,以及细胞内各种化合物该合成多少。这将阐明所谓的简单细胞已能如此地有效利用有限的资源,以及为了有效生长而使代谢途径最优化。

噬 菌 体

细菌会受到更小的生物，即噬菌体 (bacteriophage 或简称 phage) 的侵袭。这些噬菌体是小的颗粒，是通常称为病毒粒子中的一部分，只能生长在细菌里面。大量的实验选用噬菌体*作为研究对象，因为它们的结构(通常含有 2~10 种组分)以及生活周期比细菌要简单得多，然而却具备最基本的或可说是最低限度的生命属性。

多数噬菌体仅含几类不同的分子——通常是 1~10 种蛋白质的几百个分子(取决于该噬菌体的复杂程度) 以及一个核酸分子。蛋白质分子以三种方式中的一种组成。最普遍的模式是蛋白质分子组成一个称为外壳 (coat) 或噬菌体头部 (phage head) 的蛋白质外壳，上面通常附着一个尾部 (tail)；核酸分子包含在头部(图 1-2)。噬菌体另一种形式是只有头部，不带尾部。最罕见的形式是一条纤丝，其中蛋白质分子形成一个管状结构，核酸分子包埋在里面。已知噬菌体含有双链 DNA (最常见)、单链 DNA、单链 RNA 和双链 RNA (最不常见)这些类型。

噬菌体是寄生物，只能在宿主细菌中增殖。因此噬菌体一定要能够进入细菌，进行增殖，然后释放。完成这一过程有好多方式。然而，基本的生活周期可概述如下，并用图1-3描述。



图 1-2 大肠杆菌 T4 噬菌体。DNA 包含在头部。尾部有基片，上面长有尾丝

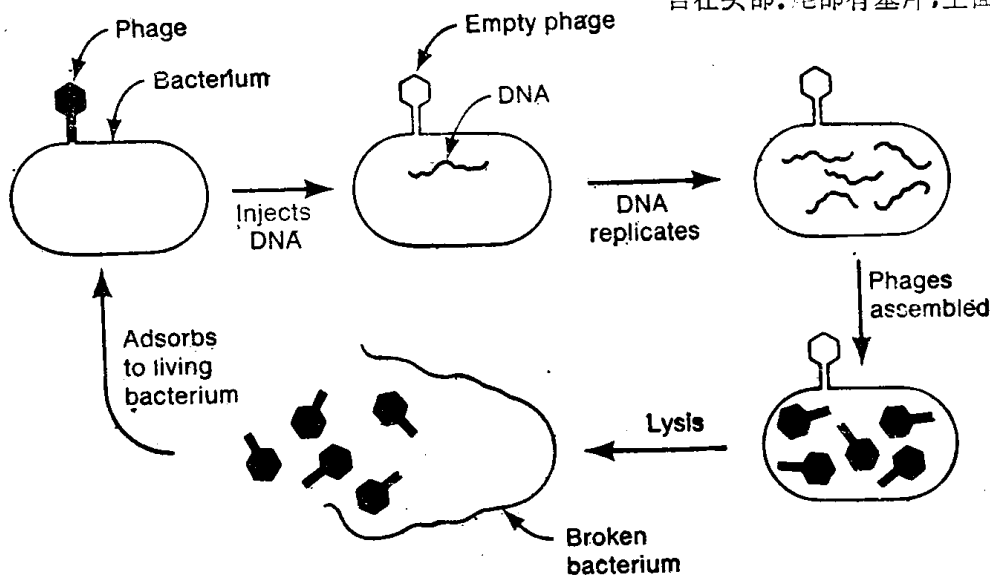


图 1-3 一个典型的噬菌体生活周期示意图。释放的噬菌体数目通常从 20~500 不等

噬菌体的生活周期从噬菌体颗粒吸附于敏感细菌表面开始。然后，噬菌体核酸离开噬菌体颗粒，通过噬菌体尾部(如果此噬菌体具有尾部)穿过细菌细胞壁进入细菌，噬菌体以

* 复数词 phages 指不同的噬菌体；phage 这个词既是单数形式又是复数形式，用作复数形式时指同一类的许多颗粒。因此，T4 和 T7 都是 phages，但一个试管可能含有 1 个 T7 phage 或 100 个 T7 phage。

一种复杂但可以理解的方式将这个细菌转变为噬菌体的合成场所。在大约一个小时内，时间长短随噬菌体种类而异，受感染的细菌破裂或裂解 (lyse)，几百个子代噬菌体释放出来。新合成的噬菌体悬液称为噬菌体裂解物 (phage lysate)。

噬菌体增殖比细菌快得多。一个典型的细菌大约半小时倍增一次，而一个噬菌体颗粒在同一时间内产生100多个子代。这些子代噬菌体中的每一个又能感染更多的细菌，在第二轮感染中所释放的那些噬菌体还能感染更多的细菌。这样，在两个小时中，对一个细菌和一个噬菌体来说，各有4个循环的增殖和感染，但一个细菌变成 $2^4=16$ 个细菌，而一个噬菌体则变成 $100^4=10^8$ 个噬菌体颗粒。

如果采用一些方法使细菌的细胞膜和细胞壁通透，也可用游离DNA代替噬菌体颗粒进行感染。这是一种特别有用的技术，称为转染 (transfection)，实验者可以用化学或物理方法改变DNA分子，然后用这种改变了的DNA转染细胞，研究这种变化的效应。转染是遗传工程中的一种基本方法，已经广泛应用于动物和植物病毒的研究中。

噬菌体的生活周期是受到高度调节的，不过与细菌的代谢调节方式稍有不同。噬菌体完全依赖于它们的宿主细菌的代谢，所以宿主的调节系统往往控制了基本代谢过程，例如能量产生，以及DNA、RNA和蛋白质的前体合成。进行感染的噬菌体的任务是通过合成自身的核酸和结构蛋白质来进行自我复制，并最后导致细菌细胞壁破裂，使子代噬菌体逃离。噬菌体形成的各个步骤都需要有时间上的控制。对这种调控的研究已经成为分子生物学研究的一个重要部分，并已经得到有关所有细胞基本过程的大量信息。在第十四章中可以看到一些例子。

噬菌体计数采用一种称为噬菌斑试验 (plaque assay) 的技术(图1-4)。将大约 10^8 个

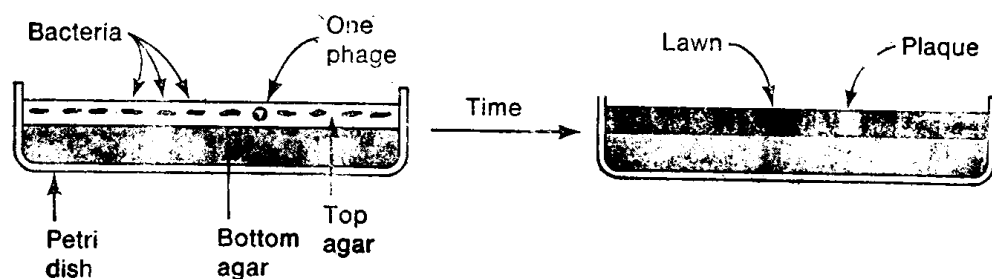


图1-4 噬菌斑形成的示意图。细菌生长形成半透明的菌苔。

噬菌斑是透明的，附近没有细菌



图1-5 大肠杆菌T4噬菌体的噬菌斑。有两类噬菌斑。野生型噬菌体形成小噬菌斑；rII突变体形成大噬菌斑

细菌和一份噬菌体样品加入温热的液体琼脂，将其倾倒在固体培养基表面，使之凝固。细菌在琼脂中增殖，形成一层混浊的菌苔。在细菌增殖的同时，每个噬菌体吸附于一个细胞上开始感染，受感染的细胞释放出大约100个噬菌体，留在琼脂中受感染细胞四周。这些子代噬菌体再吸附于近旁的细菌上进行增殖，经过几个循环的感染，在混浊的细菌层中产生一个清澈、透明的空斑。这个透明区域称为噬菌斑 (plaque) (图1-5)。由于每个噬菌体形成一个噬菌斑，所以可对噬菌体进行计数。不同的突变型噬菌体往往产生不同特征的噬菌斑，在遗传分析中这是一种很有用的技术。

酵母菌

酵母菌是几千年来一直用来酿造葡萄酒和啤酒的单细胞生物(图 1-6a, b)。早期生物化学的大量研究是用酵母菌而不是用细菌来进行的。这方面的工作主要由于人们对啤酒酿造的了解和改进感兴趣而得到促进。

酵母细胞可在实验室中培养,并以与细菌十分相似的方式计数。它们生长在液体悬液



图 1-6 (a) 酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 细胞的相差光学显微镜照片。许多细胞在芽殖。(b) 一个细胞的荧光显微镜照片,细胞用与核酸结合的荧光染料染色。亮点是核。暗区是液泡,这是一个不含核酸而充满液体的囊体

中,这种悬液或是化学成分确定的培养基,或是复合液体培养基。它们也能生长在固体表面形成菌落。除了裂殖酵母外,所有酵母菌的增殖机制与成熟细菌不同,酵母细胞并不分裂,而行出芽增殖。(图1-6a)。这种增殖方式就是每个母细胞的细胞壁上长出一个“芽”,形成子细胞。子细胞生长和成熟后也能通过芽殖产生后代细胞。母细胞可以出芽增殖多次。

过去,分子生物学中的大部分研究工作是用细菌和病毒进行的,因为它们较之真核生物更为简单。近年来,技术上的进步使得真核生物的研究变得更有效、更富于成果。酿酒酵母成为重要的研究目标:它具有真核生物的遗传结构和高等生物所特有的调节方式,而其操作的简便和生长的速度又如同典型的微生物,特别令人感兴趣的还有,酵母菌具有单倍体期和二倍体期。单倍体细胞有两种形式,它们可以行有性交配形成稳定的二倍体细胞系。在一定的营养条件下,二倍体发生减数分裂,产生单倍体性孢子。利用这套交配系统可以进行详细的遗传试验,使得酵母菌成为研究遗传重组和减数分裂的有用系统。

其他单细胞真核生物,如藻类中的衣藻[(*Chlamydomonas*)]和原生动物中的四膜虫(*Tetrahymena*)]也具有酵母菌的许多属性,这些正越来越多地应用于真核分子生物学研究。

动物细胞

正当有关细菌的基本机制获得越来越多的信息时,对于动物细胞的研究也作出了越来越多的努力。用动物细胞所进行的研究是令人振奋的,因为我们正在开始了解诸如激素调节、卵发育成为成体那样的复杂过程,以及深入探索正常细胞和癌细胞之间的差别。但是,用动物细胞比用细菌所进行的研究工作要缓慢得多,这有两方面原因。首先,动物细胞每 24~48 小时分裂一次,而许多细菌每 25~50 分钟分裂一次,所以用动物细胞进行实验所花时间往往要比用细菌进行实验长得多。其次,培养物中生长的细菌与自然界中的细菌

没有显著的差别, 但用动物细胞做实验, 需要将细胞从动物身上取下, 并常常要把细胞彼此



图 1-7 在玻璃培养皿表面
生长了几天的中国仓鼠成纤维细胞的小集落

分离开来。这样处理过的细胞已经失去了获得养料的正常途径, 肯定处在一种非天然状态。已经研制了许多生长培养基, 使细胞能生长成培养物。这些生长培养基设计得使细胞尽可能存活得长久些, 但是, 它们常常不能维持细胞的正常状态。最明显的区别是取自机体的多数细胞在数星期内死亡。此外, 在这段时间中, 细胞的生长和分裂不同于在活体中处于正常的、未被触动状态下的细胞。少量细胞存活下来并无限生长下去, 即所谓已经“永生 (immortalized)”, 并得到了建成的细胞系 (established cell line)。经过一段时间后, 这些细胞的染色体数目发生异常 (常出现额外染色体), 细胞变得有点像肿瘤细胞。关于用动物细胞进行研究的详细讨论超越本书的范围; 在此只需提及已有多种技术可对动物细胞进行实验。这方面内容可参阅任何一本细胞生物学教科书。图 1-7 显示在培养物中生长的细胞。

遗传学和分子生物学

遗传学是一个抽象和逻辑的系统, 利用它可以弄清决定活细胞某些特性的各个遗传因子的相对位置, 可以定量表达这些特性的变化。遗传学单独无法证实任何分子机制, 因为它所得出的结论和生物现象的分子基础无关。然而, 遗传分析已经成为分子机制直觉知识的主要来源, 已经迫使科学家考虑那些可能会被忽略的现象。以遗传学为基础的论点对阐明某种特定机制极有启发, 所提出的机制经常地被证明是正确的, 因此分子生物学家常把与其相左的另一些观点视为不值得考虑的。以下几节介绍遗传学在分子生物中最普通的几种应用。

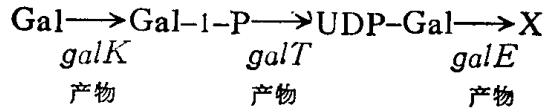
突变型的应用: 一些实例

分子生物学中某些值得注意的进展是应用了突变型而获得的。以下介绍曾采用过的几种方法。

1. 一种突变型说明一种功能 例如, 细菌摄取 Fe^{3+} 可能是一种通过细胞膜的被动扩散, 也可能有负责这一过程的某个系统。野生型大肠杆菌能够从 10^{-6}mol/L 的溶液中摄取 Fe^{3+} , 但是, 曾发现某些突变型不能做到这点, 除非铁离子浓度非常高。这个发现表明, 有一个遗传学上确定的系统决定着铁的摄取, 不过, 这种观察无法告知这个系统是什么。大肠杆菌的温度敏感突变型在解释功能方面特别有用。例如, 曾分离到不能合成 DNA 的大肠杆菌温度敏感突变型。这些突变型至少属于 10 种不同的类型, 提示至少存在 10 种 DNA 合成所必需的蛋白质。其中有一种突变型, 缺少一种通常位于细胞膜上的特殊蛋白质; 这一实验结果的解释并不明确, 但是确实提示 DNA 合成和细胞膜有某种联系。

2. 突变型可以导致生化阻断, 有助于阐明代谢途径 例如, 半乳糖代谢需要 *galK*, *galT*, *galE* 3 种不同的基因活性。如果把放射性的半乳糖 ($[^{14}\text{C}]\text{Gal}$) 加入 *gal*⁺ 细胞培养物, 在半乳糖代谢以后, 可以发现许多不同的放射性化合物。在加入 $[^{14}\text{C}]\text{Gal}$ 后很短时间, 可以检测到 3 种有关化合物: $[^{14}\text{C}]$ 半乳糖-1-磷酸 (Gal-1-P)、 $[^{14}\text{C}]$ 尿苷二磷酸半乳糖

(UDP-Gal) 和 [^{14}C] 尿苷二磷酸葡萄糖 (UDP-Glu)。不同的突变型基因在代谢途径的不同阶段阻断。如果细胞是 $galK^-$ 突变型, [^{14}C] gal 标记只出现在半乳糖中。因此知道 $galK$ 基因参与代谢的第一步。如果用 $galT^-$ 突变型, Gal-1-P 积累。因此, 发现反应次序的第一步是由 $galK$ 基因产物(即半乳糖激酶)把半乳糖转变成 Gal-1-P。如果用 $galE^-$ 突变型, 发现有一些 Gal-1-P; 但主要的放射性化合物是 UDP-Gal。因此这个生化途径一定是:



从这些遗传学实验还不能决定 X 是何物。

3. 突变型使人们能够了解代谢调节 已经分离到许多突变型, 它们改变了某一蛋白质的合成量, 或改变了合成量对外界信息作出反应的方式。这些突变型解释了调节系统。例如, 在细胞中通常不存在对应于 $galK$, $galT$, $galE$ 基因的酶, 只能在培养基中加入半乳糖后才会出现。然而, 曾分离到突变型, 不管是否有半乳糖, 这些酶总是存在。这表明某个基因参与开放和关闭产酶系统, 这个调节基因必定会对半乳糖的存在与否作出反应。

4. 突变型能确定对应于生物功能或细胞内蛋白质的生化体系 多年来对大肠杆菌的 DNA 聚合酶 I 作了详尽的研究。纯化的聚合酶能在体外合成 DNA, 所以当时认为这个酶在细菌体内也参与 DNA 的合成。然而, 分离到一种大肠杆菌突变型 ($polA^-$), 它的聚合酶 I 活力降至 1/50, 而突变型细菌仍能正常生长和合成 DNA。这个观察有力地说明聚合酶 I 不可能是细胞内合成 DNA 的唯一的一种酶。实际上, $polA^-$ 突变型抽提物的生化分析表明, 还存在另外两种酶, 即聚合酶 II 和聚合酶 III, 经纯化后它们也能够合成 DNA。在进一步研究中还发现 $dnaE$ 基因的温度敏感突变, 尽管在 30℃ 时能正常合成 DNA, 但在 42℃ 时不能合成 DNA。从 $dnaE^-(Ts)$ 突变型培养物中分离出 3 种酶, 即聚合酶 I、II、III, 并对每种酶进行测试。虽然聚合酶 I 和 II 在 30℃ 和 42℃ 条件下都有活性, 但聚合酶 III 在 30℃ 条件下有活性, 但在 42℃ 条件下无活性, 所以聚合酶 III 就被确定为 $dnaE$ 的产物, 这个酶参与细胞内 DNA 的合成。

5. 突变型确定外加试剂的作用位点 抗生素利福平阻止 RNA 的合成。在首次发现时, 尚不知利福平究竟是通过阻止前体分子的合成(通过与 DNA 结合, 从而阻止 DNA 转录为 RNA) 发生作用, 还是与参与 RNA 合成的 RNA 聚合酶相结合而发生作用。已分离到对利福平有抗性的突变型。这些突变型有两类: 一类细菌的细胞壁发生变化, 因此, 利福平不能进入细胞(无信息的突变型); 另一类 RNA 聚合酶稍有变化。后一类突变型的发现证明了这种抗生素通过与 RNA 聚合酶结合发生作用。

6. 突变型能够指出表面上无关的系统之间的关系 λ 噬菌体通常吸附于大肠杆菌上, 并在大肠杆菌中生长, 但不能吸附于不能代谢麦芽糖的细菌突变型上。这种吸附故障与不能代谢其他糖类的突变型无关, 与任何其他噬菌体也没有关系, 这意味着在 λ 噬菌体吸附中, 有麦芽糖代谢的某些产物或中间产物参与。

突变型的遗传学分析

把分离到的各种突变以不同形式进行组合, 可以获得关于分子机制的大量信息。这