

# 第一章 绪 论

## 一、DNA 重组技术发展大事纪

1973 年美国 S.Cohen 等人将大肠杆菌两种质粒 DNA 片段重组，并引入 *E.coli* 中进行分子纯系扩增，在国际上创立了 DNA 体外重组技术。当时由于对新兴技术前景缺乏科学预见，曾引起公众对 DNA 重组过程潜在危险性的关注，忧虑有可能产生致病的新微生物。

1974 年有人呼吁在世界范围暂时禁止某些 DNA 重组试验。

1975 年英国在政府报告中叮嘱专门实验室要慎重从事重组 DNA 的研究。同年在美国加利福尼亚的 Asilomar 国际会议上，有人强烈要求正式通过一个关于管理 DNA 重组实验的准则。要求保证重组质粒和转化细胞不得从实验室逃逸。

1976 年美国国家卫生研究院 (NIH) 颁布了第一个禁止多种 DNA 重组实验的条例，公众密切关注这些条例的生

效。纽约时代杂志发表文章强烈要求禁止对 DNA 重组研究授予诺贝尔奖。

1977 年在美国成立了第一个遗传工程公司 (Genentech)，拨专款用于通过 DNA 重组技术制造重要医用药物。同年第一次创建了断裂基因 (Split gene)，并在 1977 年发展了对长片段 DNA 分子进行迅速序列测定的实验方法，

1978 年限制性内切酶的发现和应用获得了诺贝尔医学奖。同年第一个 DNA 重组产物——人生长激素释放因子 (Somatostatin) 问世。

1979 年美国 NIH 放宽了 1976 年制订的“条例”，允许用 DNA 重组技术研究病毒 DNA。

1980 年美国着手建立通过 DNA 重组技术生产胰岛素的大工厂。同年诺贝尔化学奖授予了第一个进行重组 DNA 分子克隆的科学家 S.Cohen 和发明高效 DNA 序列方法的科学家 F.Sanger。

1981 年美国政府提供超过 2 亿美元的投资，为遗传工程公司筹建了第一个重组 DNA 贮备库。

1983 年国际上首次大规模工业生产重组生长激素 (1.5 克 / 升培养液)。

1984 年以来，通过基因工程生产的重组产物，除前面提到的生长激素释放因子、胰岛素、生长激素外，还有血栓溶解素、血凝因子Ⅷ、各型干扰素、多种细胞因子及乙型肝炎病毒外壳蛋白等。据 1988 年资料，基因工程产物已达 26 种之多。

由上述发展过程可看出，70 年代初 DNA 重组只限于实验室研究，虽几经波折，仍发展迅速；到 70 年代末，基因工程技术已应用到重组产物的商品生产，把科学技术转变为生产力，走上商业化道路。目前不仅发达国家积极开展此项研究，发展中国家或地区也急起直追开展了这方面研究。

我国近年来十分重视重组技术的研究，研究队伍不断壮大，在国家大力支持下，在乙肝疫苗、细胞因子等遗传工程方面先后获得成果，正为实现重组产物商品化生产努力奋斗。

## 二、分子生物学技术的应用

(一) 应用于核酸分子结构的研究。运用 DNA 克隆到序列分析的一整套技术，可揭示出基因结构和功能的关系。例如通过对起动子区、控制位点、核糖体结合位点，核酸与其他蛋白质结合点的序列分析，可深刻地了解这些区域或位

点的结构，这对于解释这些区域的作用很有帮助。

(二) 通过分子生物学技术，已经发现了癌基因，这使对肿瘤的研究不只限于发病机制，而且也有可能进行预防。

(三) 由于脉冲凝胶电泳 (PFGE) 系统的发展，现已能分离和分析 DNA 巨片段，分离的 DNA 可转移到杂交膜上，再用特异探针检测遗传基因，测定出基因在染色体上的位置，从而可确定基因组总图，从中发现遗传病基因。应用此技术还可将每个人的 DNA 作特有的指纹图谱，每个人的重复 DNA (染色体 DNA 中的小随体 DNA) 的数量和结构都不同，因此基因组 DNA 杂交中，用小随体 DNA 作探针，可形成每个人所特有的图样，成为 DNA 个体指纹图谱。与通常指头上的指纹比较，DNA 指纹图更为精细。法医上可用此技术判定个体及亲缘关系；也可用于遗传进化及分子分类。

(四) 在诊断遗传疾病方面，可穿刺腹壁，从羊膜腔吸取羊水，分离胚胎细胞，通过 Southern 印迹法，以标记同位素的 cDNA 或寡核苷酸探针，探查基因突变以发现遗传疾病。目前在 500 多种遗传病中，有 40 种以上可用上述技术早期测定。例如镰刀状红血细胞贫血病和  $\beta$  地中海贫血症，是由单个基因突变引起的，可用 cDNA 或寡核苷酸探

针测定。

(五) 如前所述，分子生物学技术，通过遗传工程已生产出多种多肽及病毒外壳蛋白重组产物，并取得了巨大的经济效益和社会效益，这些重组产物在细菌中表达比用组织材料提取更易大规模生产，流程短且节约投资。此外，若按需要在体外修饰基因以生产酶，可以提高酶稳定性，这对工业规模生产酶具有重要的意义。

(六) 在农业方面，遗传工程已引入培育抗病作物品种和提高作物产量。畜牧业亦应用此技术于品种改良，目前正在研究之中，预期得到突破。

## 第二章 核酸结构

### 一、核酸成分及一级结构

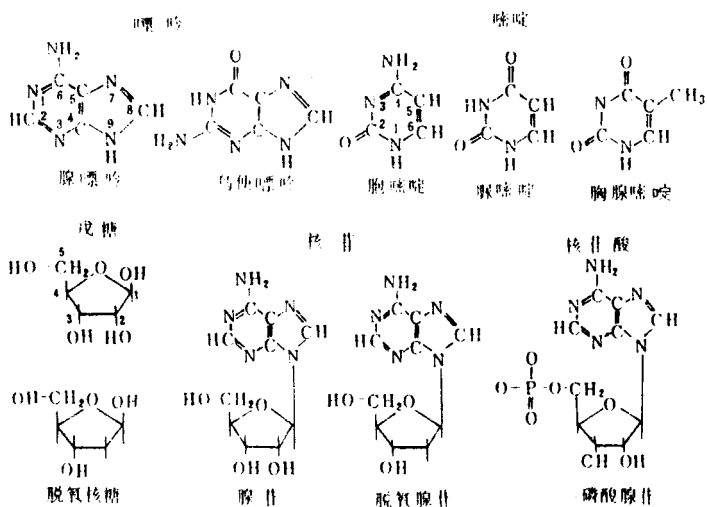


图1 碱基、核苷、核苷酸的结构

核酸是细胞中遗传信息的载体和传递者，是一类大分子聚合物。它的单体叫核苷酸。核苷酸分子包含三个成分：戊糖、磷酸及碱基。细胞中存在两种不同的核酸，即核糖核酸 (RNA) 和脱氧核糖核酸 (DNA)。RNA 和 DNA 的区别为：RNA 的戊糖为核糖 (ribose)，DNA 的戊糖为脱氧核糖 (2'-deoxyribose)；碱基中 RNA 存在尿嘧啶 (U)，DNA 存在胸腺嘧啶 (T)；腺嘌呤 (A)、鸟嘌呤 (G) 和胞嘧啶 (C) 同时存在于 RNA 和 DNA。新近发现 RNA 中出现胸腺嘧啶，DNA 中也出现了尿嘧啶。一个戊糖与一个碱基结合形成一个核苷 (nucleoside)，核苷再连接上磷酸成为核苷酸 (nucleotide)。各种碱基、核苷及核苷酸的结构见图 1 所示。

核苷酸中碱基、核糖 (脱氧核糖) 及磷酸连接的位置是一定的，碱基结合到戊糖第 1 碳原子 (1') 位置上，磷酸通过磷酸酯键连接到核苷的糖的第 5 位碳原子 (5') 上。应注意 (') 只表示糖的原子数目，而不是嘌呤或嘧啶碱的碳原子位置。在后面章节中常出现 5' 或 3' 符号，均指糖的碳原子位置。

由一个核苷酸的磷酸和另一个核苷酸的 3 羟基结合形

成第 2 个磷酸酯键，把两个核苷酸连接在一起，延续成 5'→3'磷酸二酯键，该磷酸二酯键处于两个相邻的糖之间。这一连接方式连续进行，可形成很长的多核苷酸 (polynucleotide) 分子。每个多核苷酸都有一个游离的磷酸末端和另一端的一个 3' 游离—OH 末端，因此核苷酸分子存在两极性 (polarity)。这两个末端称为 5' 和 3' 末端 (图 2)。

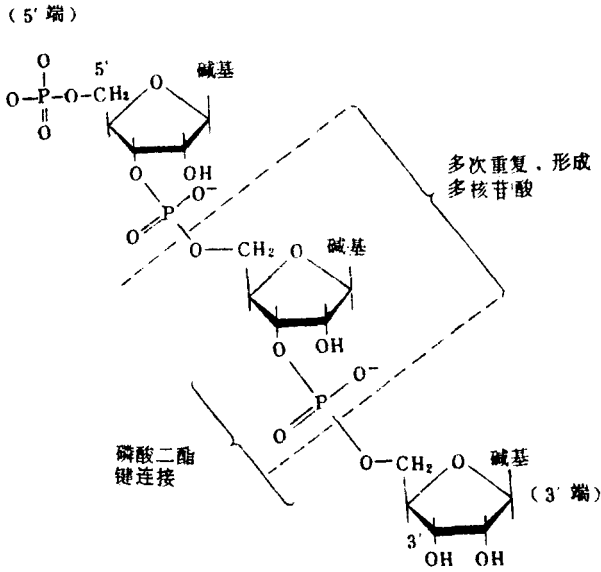


图 2 多核苷酸结构

核苷酸分子的碱基序列为核酸的一级结构。一般从核苷酸分子的 5'端开始测定核酸序列，然后用大写字母表示，例如 **CGGATCT**。由于在分子的全长中糖和磷酸的结构和位置是一致的，只是碱基有所不同，因此应注意，加点（'）不表示糖和磷酸基团，在必要的时候，磷酸基团可用字母表示，例如 **5'pCGGATCT3'**，其意义为磷酸存在于分子的 5'末端。

## 二、核酸二级结构

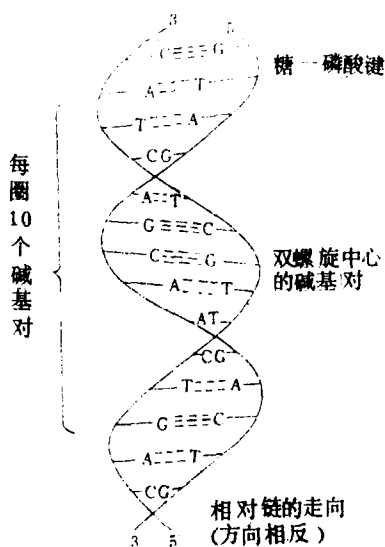


图 3 DNA 双螺旋结构

(一) DNA 双股螺旋：DNA 通常不以单链形式存在，而以双股形式存在，成对的碱基在分子中间，外面为糖—磷酸键（图 3）。DNA 结构的基本性质取决于双股螺旋中互补的碱基序列。图 4 示出胸腺嘧啶与腺嘌呤的氢键形成互补，胞嘧啶与鸟嘌呤形成互补。

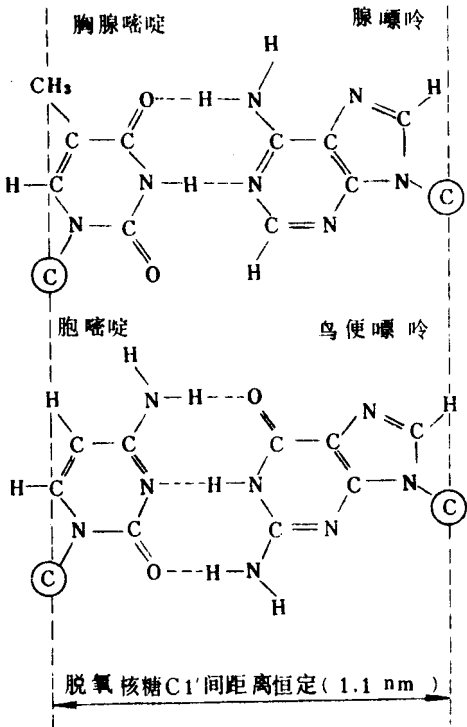


图 4 DNA 中的碱基对

⊙ 为脱氧核糖 c<sub>1</sub>' 存在位置

因此在 DNA 结构中总是 C: G、T: A 成碱基对，形成稳定的双股螺旋，而且两股核苷酸之间键也保持稳定距离。由于碱基互补，如果一股的碱基为已知时，那么另一股的碱基也可以知道。两股中的各单股 DNA 人为地标出“+”号（plus）或“-”号（minus），以区别转录 RNA 时以哪条 DNA 链为模板（template）。

DNA 的另一个重要性质是两股链反向平行（anti-parallel），它们的走向相反。例如：



（二）DNA 变性与复性：DNA 两股链之间结合的能力不强，因为它们之间只靠互补碱基之间的氢键的微弱能量和碱基对之间疏水基的相互作用的力量控制在一起，只需要很小能量就可把它们分开。例如双链 DNA 在较高温度条件下容易解链（melting）为单链 DNA。这种解链又叫 DNA 变性（denaturation）。在室温条件下一对单链 DNA 又可能很快结合在一起，即复性（renaturation）。

DNA 溶液加热到 90℃ 时，有足够的动能使 DNA 完全变性，解链为单链。这一变性可以通过测定 260nm 时分光光度吸收峰而测试出来。双链 DNA 中成对结合的碱基吸收

光的能力小于单链 DNA 中游离碱基吸收光的能力。因此当 DNA 变性后，由于增色效应（hyperchromic effect），在波长 260nm 时吸收值增加。

如把 260nm 时 DNA 溶液抗温度的吸收值绘成图表示，即可得到一个解链曲线（图 5）。图中显示当温度低于

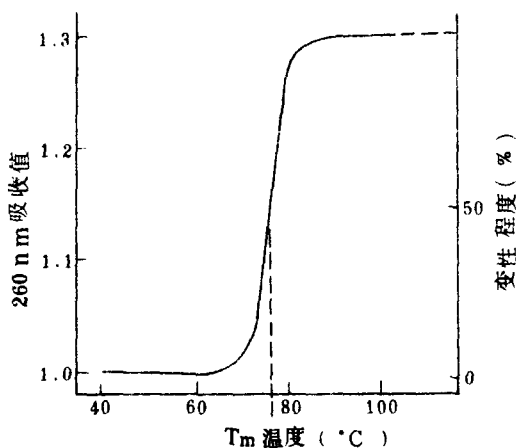


图 5 DNA 变性曲线

70 时变性较小，但进一步升高温度时变性明显增大。达到一定温度时 DNA 完全变性而解链。把 DNA 达 50%变性的温度称为解链温度 ( $T_m$ )。不同 DNA 的  $T_m$  值有所差别， $T_m$  取决于 DNA 性质。如把几个不同 DNA 标本进行

解链，会发现 C、G 含量高的 DNA 其  $T_m$  也高，因此  $T_m$  可用来测定 DNA 分子中 C+G 的百分含量。 $T_m$  与 (G+O 含量成正比关系，因为 DNA 分子中的碱基对 C 和 G 之间存在 3 个氢键，而 T 和 A 之间只有 2 个氢键 (图 4)，因此要用更多的热能分离 C: G 碱基对。

如果变性 DNA 被逐渐冷却，则分离的链又重新结合而复性。对于短链 DNA，复性时互补链互相接触，碱基能精确配对，又形成完全双链 DNA；但对于链很长、较复杂（含基因数目多）的 DNA 完全形成双链的可能性不大，有些区域碱基配对错位。利用测定复性中恢复双链的比例，有可能测出受分析 DNA 的复杂程度。

(三) RNA 二级结构特点：RNA 几乎都以单链形式存在，但在某些位置往往也含有互相互补的序列，这是由分子的适当折叠，造成某些碱基得到配对的机会，成为局部的双链。转移 RNA (tRNA) 即是一个很好的例子。在 tRNA 的第 70-80 序列的长度之间，有 4 个互补碱基对 (图 6) 形成双链，其余为单链，形成三叶草 (clover leaf) 形态的二级结构。

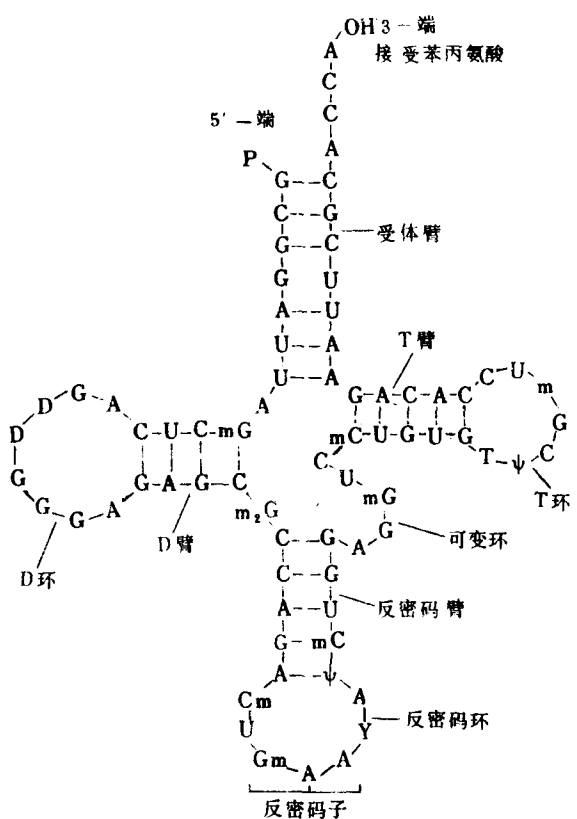


图 6 酵母 tRNA 二级结构

由 76 个核苷酸单链通过互补序列之间的碱基对形成 4 个双链臂区。存在 **UUU** 或 **UUC** 的反密码子都是苯丙氨酸编码器。苯丙氨酸通过氨酰 tRNA 合成酶连接到 3'-末端。

**RNA** 与 **DNA** 之间如果序列中碱基互补，它们的链也能互相结合，成为杂交分子双链（**RNA** 的 **U** 与 **DNA** 的 **A** 配对）。在杂交分子中，如果 **RNA** 链或 **DNA** 链标记有同位素，则对加入的待测 **DNA** 分子可起探针（**probe**）作用，因为待测 **DNA** 与探针互补时，它们可以结合。探针对于从复杂混合物中分离特异 **DNA** 片段是非常有用的工具。

## 第三章 核酸的功能

### 一、RNA 分类

细胞及大多数病毒的遗传信息以 **DNA** 形式被贮存，此信息引导 **RNA** 分子的合成。**RNA** 主要分三大类：信使 **RNA**(messenger **RNA**, **mRNA**)，核糖体 **RNA**(ribosomal **RNA**, **rRNA**) 和转移 **RNA**(transfer **RNA**, **tRNA**)。

**mRNA** 中存在核糖核酸序列，它编码出蛋白质的氨基酸序列。在真核细胞，一条 **mRNA** 编码出一条多肽链；而在原核细胞，一条 **mRNA** 链可能编码出几条多肽链。**rRNA** 是核糖体的结构部分，核糖体是蛋白质生物合成的场所。每个核糖体只含有 3-4 个不同的 **rRNA** 分子，后者与占总量约 55-75% 的蛋白质形成复合物。**tRNA** 在蛋白质生物合成中把氨基酸运送到核糖体，通过 **mRNA** 与氨基酸反应后按特定顺序把氨基酸结合在一起形成多肽链。对每一种氨基酸来说最少有一种类型的 **tRNA** 携带它。

为一条 **RNA** 或一个蛋白质编码的一个 **DNA** 片段称为

一个基因；一个细胞，细胞器或病毒的全部基因位点形成其基因组（**genome**）。一个细胞及其细胞器可能含多于一个基因组的拷贝。

## 二、DNA 复制

染色体 **DNA** 按一定比率复制，此比率符合细胞分裂的比率。复制的开始序列称为复制的起始点（**origin**），它包含在 **DNA** 一个短片段上分开的两股 **DNA**，酶在此与 **DNA** 和 **RNA** 片段结合（图 7）。

在原核细胞，以暴露的每条 **DNA** 链作板模，通过 **RNA** 多聚酶合成一条短的互补的 **RNA** 链。**DNA** 多聚酶 III（**polIII**）也以 **DNA** 作板模，以一小段 **RNA** 作引物（**primer**）合成一条 **DNA** 链。**DNA** 链的合成遵循 **5'→3'** 方向，但由于 **DNA** 的两条链是反向的，因此只有一条链按连续的方式合成；另一条先合成相对短的分枝，然后仍按 **5'→3'** 方向，每条分枝也以 **RNA** 为引物继续合成。这些 **RNA** 引物在由 **5'→3'** 方向起作用的外切酶—**DNAPolI** 的切割下移去，留下的缺口中充满多聚酶，分隔的 **DNA** 片段由 **DNA** 连接酶（**ligase**）连接在一起而得到连续的 **DNA** 链（图 7）。真核细胞的 **DNA** 复制要比原核细胞的 **DNA** 复制