

第十章 核酸的生物合成

在生物界，物种通过遗传使其生物学特性、形状能世代相传。现代科学已经证明遗传的物质基础是核酸。核酸是贮存和传递遗传信息的生物大分子。生物体的遗传信息是以密码的形式编码在 DNA 分子上，表现为特定的核苷酸排列顺序。在细胞分裂过程中通过 DNA 的复制把遗传信息由亲代传递给子代，在子代的个体发育过程中遗传信息由 DNA 传递到 RNA，最后翻译成特异的蛋白质，表现出与亲代相似的遗传性状。

1958 年，Crick 提出了概括遗传信息从一种分子传向另一种分子的理论——中心法则（Central dogma）：



这个由 DNA 决定 RNA 分子的碱基顺序又由 RNA 决定蛋白质分子的氨基酸顺序的理论称为中心法则。

在某些情况下 RNA 也是重要的遗传物质，如在 RNA 病毒中，RNA 是遗传信息的携带者，具有自我复制的能力，并同时作为 mRNA，指导病毒蛋白质的生物合成。在致癌 RNA 病毒中，RNA 在逆转录酶的作用下，以逆转录（reverse transcription）的方式将遗传信息 RNA 传递给 DNA 分子。

因此，1971 年，Crick 对中心法则作了进一步补正与完善。修改的中心法则如图 10-1 所表示。

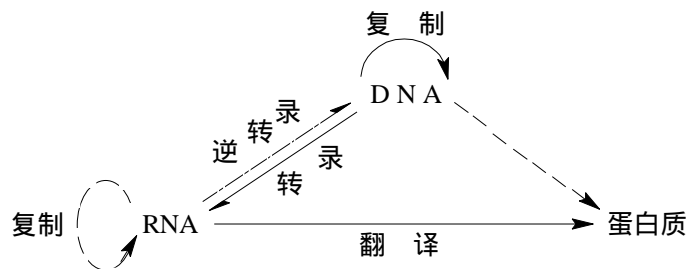


图 10-1 中心法则

图中实线表示遗传信息的一般流向，虚线表示特殊的流向情况。这个中心法则揭示了核酸与蛋白质合成之间的密切联系和共同规律。

遗传信息的传递和表达主要通过复制、转录和翻译进行。复制（replication）是指以原来 DNA 分子为模板，合成出相同 DNA 分子的过程；转录（transcription）是以 DNA 分子为模板合成出与其核苷酸顺序相对应的 RNA 的过程；翻译（translation）是在由 rRNA 和蛋白质组成的核糖核蛋白体（简称核糖体）上，以 mRNA 为模板，根据每 3 个相邻核苷酸决定一种氨基酸的三联体密码规则，由 tRNA 运送活化的氨基酸，GTP 提供所需能

量，合成出具有特定氨基酸顺序的蛋白质肽链的过程。

第一节 DNA 的生物合成

DNA 分子是由两条多核苷酸链组成的，它可以在生物体内进行合成作用。合成作用进行时，需要有一条模板链指导多核苷酸链合成中核苷酸的排列顺序。以 DNA 作为模板指导的 DNA 合成作用，复制出新的 DNA 分子，如此将 DNA 携带的信息传递给子代 DNA。DNA 的合成也能以 RNA 为模板，反转录合成 DNA 分子，这种反转录合成常见于 RNA 病毒。环境因素可以造成 DNA 结构发生损伤，损伤的 DNA 可进行修复（repair）合成，即校正错误的序列，继续进行正确的合成反应，以保持遗传信息的稳定性。

一、半保留复制

DNA 呈双股螺旋结构，这样的结构对于维持遗传物质的稳定性和复制的准确性都是极为重要的。两条链是严格遵循 A-T 和 G-C 碱基配对所形成的氢键联合在一起，这两条链是互补的。一条链上的核苷酸顺序决定另一条链核苷酸排列顺序。Watson 和 crick 提出 DNA 双螺旋结构模型时推测，在 DNA 复制时，亲代 DNA 的双螺旋先行解旋和分开，然后以每条链为模板，按照碱基配对原则，在这两条链上各形成一条互补链（图 10-2）。这样，从亲代 DNA 的分子可以精确地复制成 2 个子代 DNA 分子。每个子代 DNA 分子中，有一条链是从亲代 DNA 来的，另一条则是新形成的，这叫做半保留复制（semiconservative replication）（图 10-3）。与此同时也有人提出全保留复制方式，即复制后亲代 DNA 的两条链不变，子代 DNA 的两条链都是新合成的。1957 年 Meselson 及 Stahl 通过实验证实了半保留复制的模式。

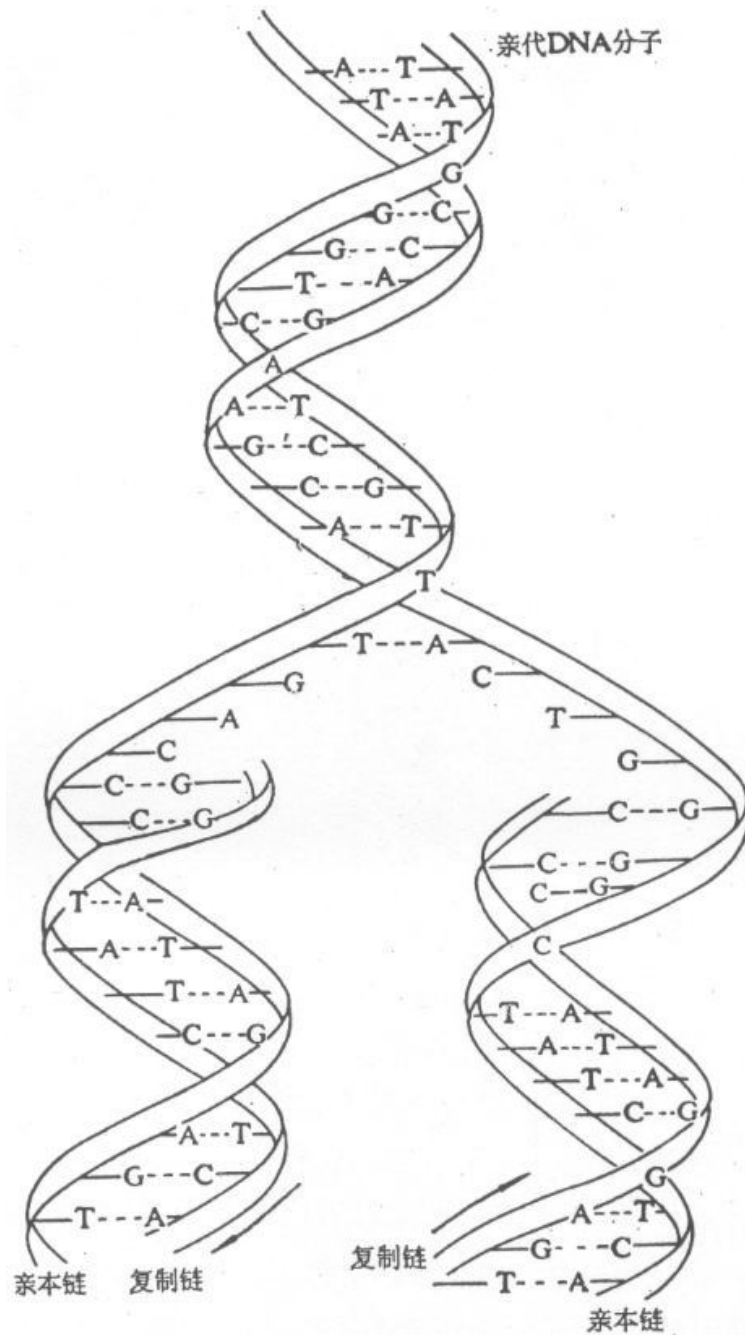


图 10-2 Watson 和 Crick 提出的 DNA 双螺旋复制模型

以大肠杆菌作为实验材料，在培养基中生长繁殖。首先在培养基中以 ^{15}N 标记的 NH_4Cl 作为氮的唯一来源（即重培养基）。大肠杆菌在重培养基中繁殖约 15 代（每代约 20 ~ 30min），DNA 可全部为 ^{15}N 所标记，然后将细菌转移到含有 ^{14}N 标记 NH_4Cl 的培养基（即轻培养基）中进行培养。在培养不同代数时，收集细菌，裂解细胞，用 CsCl 密度梯度离心法分析 DNA。实验结果表明，在重培养基中培养出的 (^{15}N) DNA 显示为一条重密度带。转入轻培养基中繁殖两代。第一代得到了一条中密度带，这是由于其为 ($^{15}\text{N}^{14}\text{N}$)

DNA 的杂交分子。第二代有中密度带及低密度带两个区带，这表明它们分别为 ($^{15}\text{N}^{14}\text{N}$) DNA 及 ($^{14}\text{N}^{14}\text{N}$) DNA。随着在轻培养基中培养代数的增加，低密度带增强，而中密度带逐渐减弱。此实验结果符合半保留复制方式(图 10-4)。在半保留或全保留复制方式中，DNA 分子中 ^{15}N 万

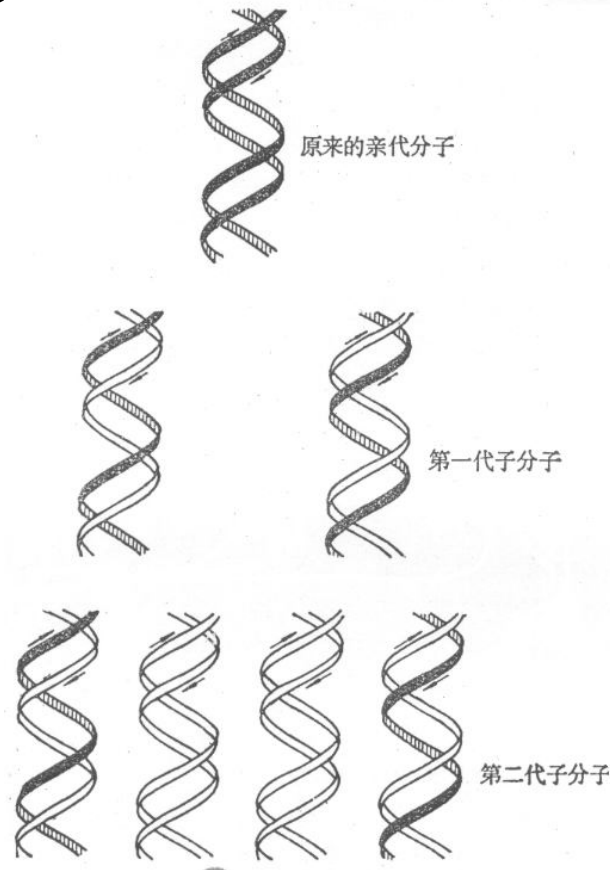


图 10-3 DNA 的半保留复制

第一代子分子含有一条亲代的链(用黑色表示),与另一条新合成的链(用白色表示)配对。在以后的连续复制过程中,原来亲代的两条链仍然保持完整,因此总有两个分子各具有一条原来亲代的链

为了证实第一代杂交分子确实是 ($^{15}\text{N}^{14}\text{N}$) DNA,将杂交分子经 100 加热变性,对于变性前后的 DNA 分别进行 CsCl 密度梯度离心。结果变性前为一条中密度带,变性后则分为两条区带,即重密度带 (^{15}N -DNA) 及低密度带 (^{14}N -DNA)。这说明杂交分子中一条为 ^{15}N 链,另一条为 ^{14}N 链,这进一步证实了 DNA 的半保留复制方式。

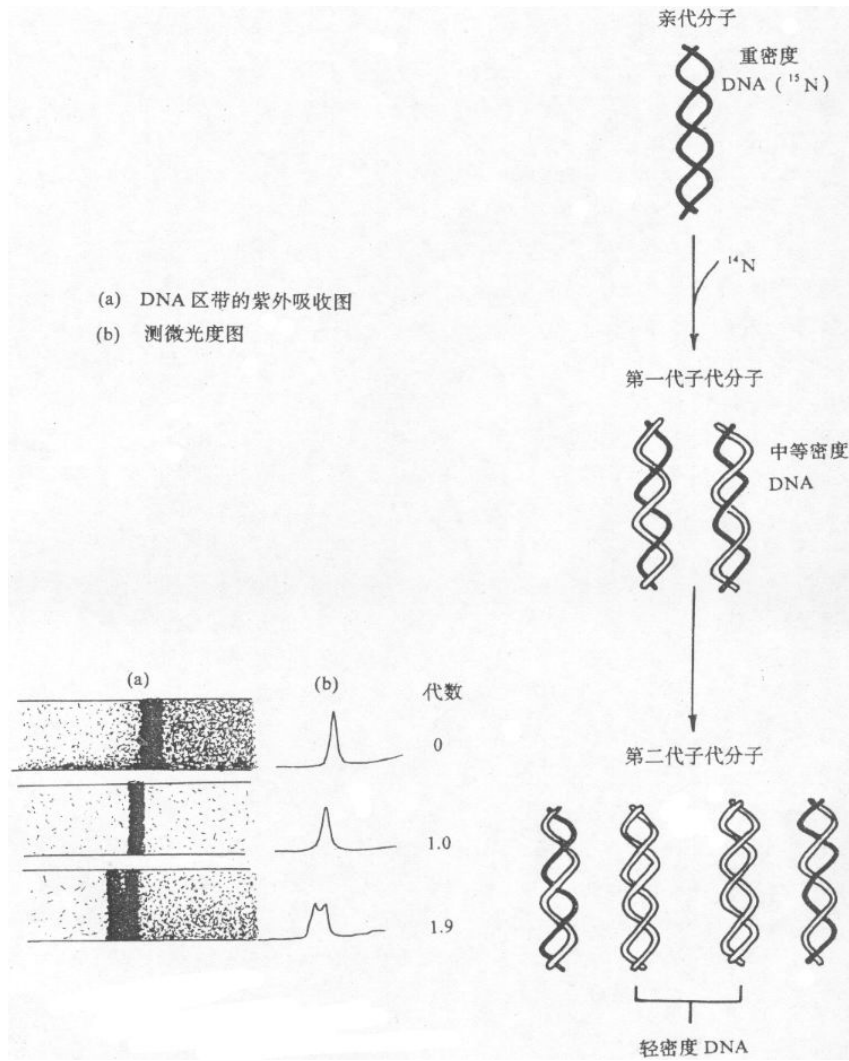


图 10-4 ^{15}N 标记的 DNA 在 ^{14}N 培养基中复制两代时的实验结果
(a) DNA 区带的紫外吸收图 (b) 光密度圈

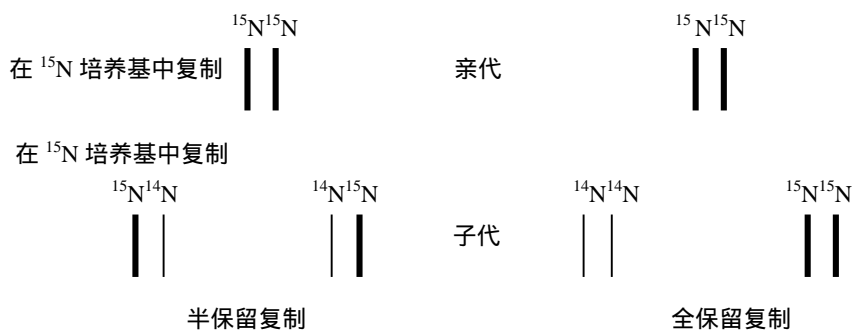


图 10-5 半保留及全保留复制时 DNA 中标记链的分布

(一) 复制的起始点与方向

DNA 分子复制时,在亲代分子一个特定区域内双链打开,随之以两股链为模板复制生成两个子代 DNA 双链分子。开始时,复制起始点呈现一叉形(或 Y 形),称之为复制叉(replication fork)。复制进行中,复制叉乃向前移动(图 10-6)。

1. 复制的起始点

DNA 复制要从 DNA 分子的特定部位开始,此特定部位称为复制起始点(origin of replication),可以用 ori 表示。在原核生物中复制起始点常位于染色体的一个特定部位,即只有一个起始点。例如大肠杆菌染色体是一个含有 4×10^6 碱基对的 DNA 分子,其中有一段 250 个核苷酸的片段为复制起始点 oriC。通过对大肠杆菌、鼠伤寒沙门氏菌及肠道产气杆菌等数种细菌的 oriC 进行分析,得知它们的结构上有相似之处。

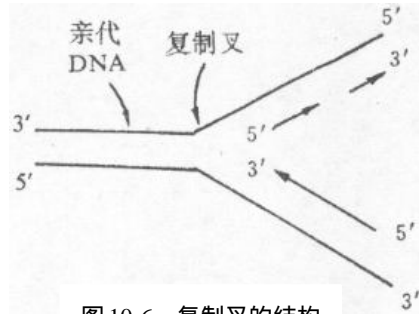


图 10-6 复制叉的结构

真核生物的染色体是在几个特定部位上进行 DNA 复制的,有几个复制起始点的。酵母基因组与真核生物基因组相同,具有多个复制起始点。例如, *S.cerevisiae* 的 17 号染色体中约有 400 个起始点。在酵母的复制起始点中至少有 100 ~ 200 个碱基与复制功能有关。

2. 复制的方向

复制的方向可以有三种不同的机制。其一是从两个起始点开始,各以相反的单方向生长出一条新链,形成两个复制叉(图 10-7a),例如腺病毒 DNA 的复制。其二是从一个起始点开始,以同一方向生长出两条链,形成一个复制叉(图 10-7b),例如质粒 ColE I。其三是从一个起始点开始,以相反的方向生长出两条链,形成两个复制叉(图 10-7c)。这种方式最为

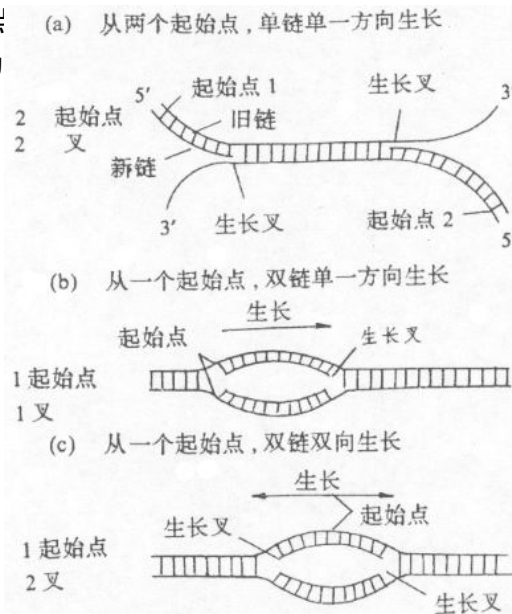
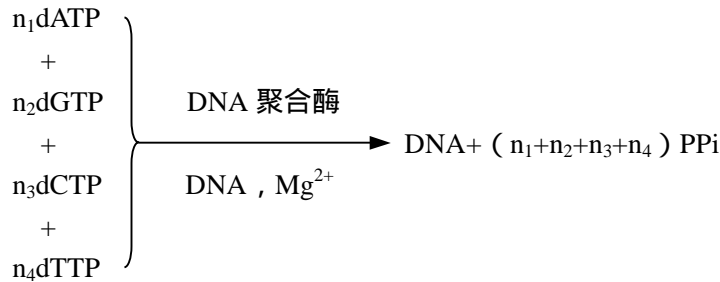


图 10-7 DNA 链复制方向的三种机制

以后用许多种原核生物和真核生物也证明了 DNA 的半保留复制。DNA 的半保留复制可以使遗传信息的传递保持相对的稳定性，这和它的遗传功能是相吻合的，说明半保留复制具有重要的生物学意义。但是这种稳定性是相对的，在一定条件下 DNA 会发生损伤，需要修复；在复制和转录中 DNA 会有损耗，必须进行更新；在发育和分化过程中，DNA 特定序列可能被修饰，删除，扩增和重排。

(二) DNA 聚合反应有关的酶及相关蛋白因子

DNA 的合成是以四种三磷酸脱氧核糖核苷为底物的聚合反应，该过程除了需要酶的催化之外，还需要适量的 DNA 为模板，RNA (或 DNA) 为引物和镁离子的参与。DNA 的聚合反应可以表示如下：



DNA 合成的反应是很复杂的，催化这个反应的酶也有多种，除 DNA 聚合酶外，还有 RNA 引物合成酶 (即引发酶)，DNA 连接酶、拓扑异构酶、解螺旋酶及多种蛋白质因子参与。现将与 DNA 合成有关的几种酶和相关的蛋白质因子简要介绍如下：

1. 引物合成酶

引物合成酶亦称引发酶 (primase) 此酶以 DNA 为模板合成一段 RNA 这段 RNA 作为合成 DNA 的引物 (Primer)。催化引物 RNA 合成的酶对利福平 (rifampicin) 不敏感，而且在一定程度上可用脱氧核糖核苷酸代替核糖核苷酸作为底物，与经典的 RNA 聚合酶不同。大肠杆菌的引物酶为一条单链多肽，分子量为 60 000。

2. DNA 聚合酶

目前已知的 DNA 聚合酶 (DNA polymerase) 有多种，它们的性状和在 DNA 合成中的功能均不相同。在大肠杆菌中发现有 3 种 DNA 聚合酶，分别称为 DNA 聚合酶 I、II、III。DNA 聚合酶 I 最初是在 1955 年由 Kornberg 在大肠杆菌内发现的，并将其高度纯化。纯化的酶是一条单链多肽，呈球状，直径约为 6.5nm，是 DNA 直径的 3 倍左右。分子量为 109 000。每个分子含一个锌原子。这个锌原子与酶的催化作用有关。DNA 聚合酶 I 是多功能酶，它具有 5' → 3' 聚合酶，5' → 3' 外切酶及 3' → 5' 外切酶的活性。它的主要功能是对 DNA 损伤的修复，以及在 DNA 复制时，RNA 引物切除后，填补其留下的空隙。

当有底物和模板存在时，DNA 聚合酶 I 可将脱氧核糖核苷酸逐个地加到具有 3'-OH 末端的多核苷酸 (RNA 引物或 DNA) 链上形成 3',5'-磷酸二酯键 (图 10-8)。至今已发现的 DNA 聚合酶都不能从无到有开始合成 DNA 链，只能在已有的引物链 3' 端游离-OH 上合成延伸 DNA，合成链的延伸方向为 5' → 3'。该酶具有 3' → 5' 核酸外切酶的活性，

能在 3'-OH 端将 DNA 链水解。在正常聚合条件下, 3'→5' 外切酶将错配的核苷酸切除, 然后继续进行正常的聚合反应。3'→5' 核酸外切酶被认为具有校对的功能。5'→3' 核酸外切酶的功能是由 5' 端水解双链 DNA, 切下单核苷酸或一段寡核苷酸。它可能起着切除 DNA 损伤部分或将 5' 端 RNA 引物切除的作用。DNA 聚合酶 在细胞中担负着多种功能, 如双链缺口的填补, 单股链的置换合成, 具有引物的环形、线形单股链的合成。

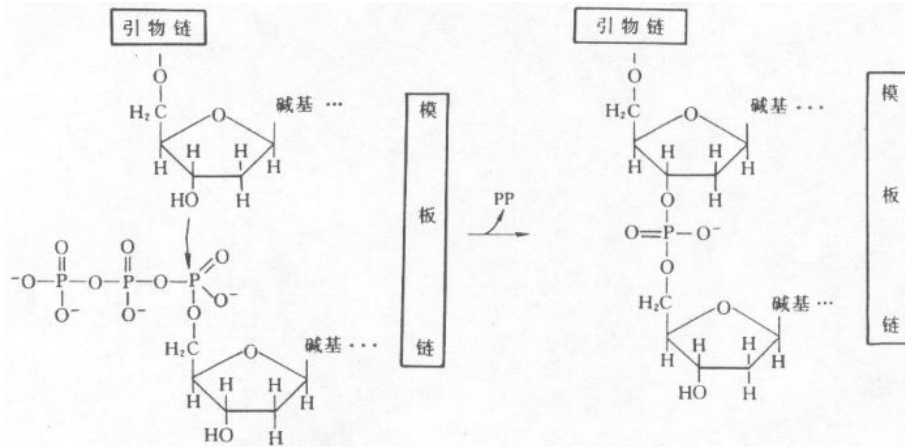


图 10-8 DNA 聚合酶催化的 DNA 链延伸反应

DNA 聚合酶 和 与聚合酶 的特性和功能有相同之处, 也有区别, 如表 10-1 所示。

DNA 聚合酶 是由一条分子量为 120 000 的多肽链组成, 它的活力很低, 其生理功能尚不清楚。可能在修复紫外光照射引起的 DNA 损伤中起某种作用。

表 10-1 大肠杆菌三种 DNA 聚合酶的性质比较

| 项目 | DNA 聚合酶 | DNA 聚合酶 | DNA 聚合酶 (复合物) |
|------------------------|---------|---------|-------------------------------------------------|
| 分子结构 | 单链分子 | 单链分子 | 核心酶 3 个亚基, 全酶 22 个亚基 |
| 分子量 | 109 000 | 120 000 | 400 000 |
| 每个细胞所含 | 400 | 100 | 10~20 |
| 5'→3' 聚合作用 | + | + | + |
| 3'→5' 核酸外切酶 | + | + | + |
| 5'→3' 核酸外切酶 | + | | |
| 模板和引物 | | | |
| 完整的双链 DNA | | | |
| 具有引物的长单链 DNA | + | | 全酶+ |
| 具有缺口(<100 个核苷酸)的双链 DNA | + | + | 核心酶+ |
| DNA | | | |
| 聚合速度 (37℃ 核苷酸/min. 分子) | 1 000 | 100~300 | 15 000 以上 |
| 结构基因 | Pol A | pol B | pol C, hol E, dna N, dna X, dna Z, dna Q, hol A |

DNA 聚合酶 极为复杂，目前已知它的全酶含有 10 种共 22 个亚基组分和锌原子，其组成是 $2 \ 2 \ 2 \ 2 \ 2 \ 2 \ 2 \ 2 \ 2 \ 2 \ 4$ ，如表 10-2 所示。其中 亚基的分子量为 132 000，具有 5[′] 3[′] DNA 聚合酶活性。a、 和 三种亚基组成全酶的核心酶（称为 pol_{III}）。

亚基具有 3[′] 外切酶的校对功能，提高 DNA 复制的保真性。核心酶本身活力较低，只作用于带缺口的双链 DNA。加上 亚基后成为二聚体，称 pol_{III}²，pol_{III}² 就可以利用带有引物的长单链 DNA。 和 亚基则与酶功能的持续性有关，它们与 、 和 亚基组装成 复合体，进一步与核心酶结合，成为 pol_{III}^{*}，即“天然的”聚合酶，它与 亚基结合形成全酶。 亚基在复制起始中对引物的识别和结合有关，一旦全酶结合到 DNA 复制的起始部位， 亚基就被释放出来。现在一般认为，DNA 聚合酶 是原核生物 DNA 复制的主要聚合酶。

表 10-2 DNA 聚合酶 全酶的亚基组成

| 亚基 | 分子量 | 亚基数目 | 其它名称 |
|----|--------|------|------------------------------------|
| | 132000 | 2 | } pol _{III} ，核心酶 } (a) |
| | 27000 | 2 | |
| | 10000 | 2 | } pol _{III} ² |
| | 71000 | 2 | |
| | 52000 | 2 | } pol _{III} [*] |
| | 35000 | 2 | |
| | 33000 | 2 | |
| | 15000 | 2 | |
| | 12000 | 2 | |
| | 37000 | 4 | |
| | | | } 复合体 |
| | | | } 全酶 |

3. 真核细胞的 DNA 聚合酶

在真核细胞内已发现四种 DNA 聚合酶，分别用 、 、 和 表示。这四种聚合酶的特性见表 10-3。现在一般认为 DNA 聚合酶 和 的作用是复制染色体 DNA，主要的根据是它们在细胞内活力水平的变化与 DNA 复制有明显的平行关系，在分裂细胞的 S 期达到高峰，聚合酶 催化随后链的合成，而聚合酶 催化领头链的合成，它还具有 3[′] 5[′] 外切酶的活力。DNA 聚合酶 的功能主要是修复作用。DNA 聚合酶 是从线粒体中分离得到的，推测它与线粒体 DNA 的复制有关。

表 10-3 真核生物的 DNA 聚合酶

| | DNA 聚合酶 | DNA 聚合酶 | DNA 聚合酶 | DNA 聚合酶 |
|------------|-----------------|---------|---------|-------------------------------|
| 分子量 | 110 000~220 000 | 45 000 | 60 000 | 122 000 |
| 亚基数 | 4~8 个 | 1 个 | 1 个 | 1 个 |
| 细胞内分布 | 细胞核 | 细胞核 | 线粒体 | 细胞核 |
| 酶活力占总量的百分比 | ~80% | 10%~15% | 2%~15% | 10%~25% |
| 核酸外切酶活力 | 无 | 无 | 无 | 3 [′] 5 [′] |

4. DNA 连接酶 (DNA ligase)

DNA 连接酶 (DNA ligase) 的作用是催化双链 DNA 中的切口处的相邻 5'-磷酸基与 3'-羟基之间形成磷酸酯键。但是它不能将两条游离的 DNA 单链连接起来。

大肠杆菌的 DNA 连接酶要求 NAD^+ 提供能量, 产物是 AMP 和烟酰胺单核苷酸 (图 10-9)。而在高等生物中, 则要求 ATP 提供能量, 产物是 AMP 和焦磷酸。大肠杆菌的 DNA 连接酶是分子量为 75 000 的多肽链。在哺乳动物细胞中发现至少有两种连接酶, 分别称为连接酶 I 和连接酶 II。连接酶 I 的分子量为 200 000, 连接酶 II 为 85 000。连接酶 I 主要在正在繁殖的细胞中起作用。连接酶 II 则在停止分裂的细胞中起作用。DNA 连接酶在 DNA 复制、修复、重组中均起重要作用。

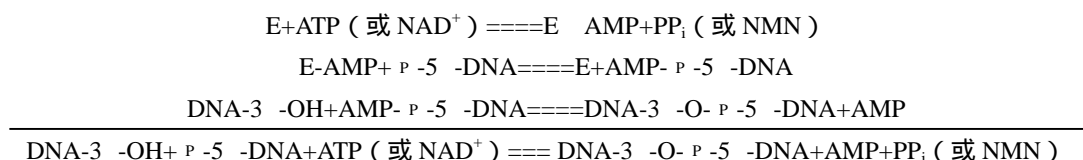


图 10-9 DNA 连接酶催化反应的机理

5. 拓扑异构酶

生物体内 DNA 分子通常处于超螺旋状态, 而 DNA 的许多生物功能需要解开双链才能进行。拓扑异构酶 (topoisomerase) 就是催化 DNA 的拓扑连环数发生变化的酶, 它可分为拓扑异构酶 I 和拓扑异构酶 II (也称为旋转酶, gyrase)。I 型酶可使双链 DNA 分子中的一条链发生断裂和再连接, 反应不需要提供能量, 它们主要集中在活性转录区, 同转录有关。II 型酶能使 DNA 两条链同时发生断裂和再连接, 当它引入负超螺旋时需要由 ATP 提供能量。一个拓扑异构酶 II 的分子 1min 可引入 100 个负超螺旋。它们主要分布在染色质骨架蛋白和核基质部位, 同复制有关。拓扑异构酶 I 可减少负超螺旋; 拓扑异构酶 II 可引入负超螺旋, 它们协同作用控制着 DNA 的拓扑结构。拓扑异构酶在重组、修复和 DNA 的其它转变方面起着重要的作用。

6. 解螺旋酶 (helicase)

解螺旋酶 (helicase) 类能通过水解 ATP 将 DNA 的两条链打开。ATP 水解活力要有单链 DNA 存在。大肠杆菌中的 rep 蛋白 (rep 基因的产物) 就是这样一种酶。由分子量为 65 000 的一条多肽链组成。每解开一对碱基需要水解 2 个 ATP 分子。

7. 其它蛋白因子

(1) 单链结合蛋白 (single strand DNA-binding protein, SSB), 它的功能是稳定已被解开的 DNA 单链, 阻止复性和保护单链不被核酸酶降解。

(2) 引发前体 (preprimosome), 它是由 6 种蛋白质即 dna B、dna C、n、n、n 和 i 组成。引发前体再与 RNA 引物合成酶 (引发酶) 结合, 组装成引发体 (primosome)。引发体结合到随后链的模板上, 具有识别合成起始位点的功能, 可以沿模板链 5'→3' 方向移动, 移动到一定位置上即可以引发 RNA 引物的合成。

(三) DNA 的复制过程

DNA 的复制按一定的规律进行, 双螺旋 DNA 是边解开边合成新链的。复制从特定

位点开始，可以单向或双向进行，但是以双向复制为主。由于 DNA 双链的合成延伸均为 5' → 3' 的方向，因此复制是以半不连续 (semidiscontinuous) 的方式进行，即其中一条链相对地连续合成，称之为领头链 (leading strand)，另一条链的合成是不连续的，称为随后链 (lagging strand)。在 DNA 复制叉上进行的基本活动包括双链的解开；RNA 引物的合成；DNA 链的延长；切除 RNA 引物，填补缺口，连接相邻的 DNA 片段。

1. 双链的解开

很多实验都证明了复制是从 DNA 分子的特定位置开始的，这一位置叫复制原点，常用 ori 表示。许多生物的复制原点都是富含 A、T 的区段。这一区段产生的瞬时单链与单链结合蛋白结合，对复制的起始十分重要。原核生物基因组一般只有一个复制原点。所有 DNA 的复制原点都处于双螺旋结构内部，就是线状 DNA 也不是从末端开始复制的。DNA 复制速率的调节主要在于起始频率，而 DNA 延长的速度则大体上是恒定的。在迅速生长的细菌中，当第一次复制起始后，在复制未完成之前，复制原点可以起始第二次复制，这可加快复制的速度。真核细胞可以在 DNA 链上的多个不同位点同时起始进行复制，所以原核细胞的复制速度尽管比真核细胞快，但由于真核细胞可以在多个位点同时进行，其总速度反而比原核细胞快。

在 DNA 的复制原点，双股螺旋解开，成单链状态，分别作为模板，各自合成其互补链。在起点处形成一个“眼”状结构。在“眼”的两端，则出现两个叉子状的生长点，称为复制叉 (replication fork)。在复制叉上结合着各种各样与复制有关的酶和辅助因子，合体称为复制体 (replication complex)。

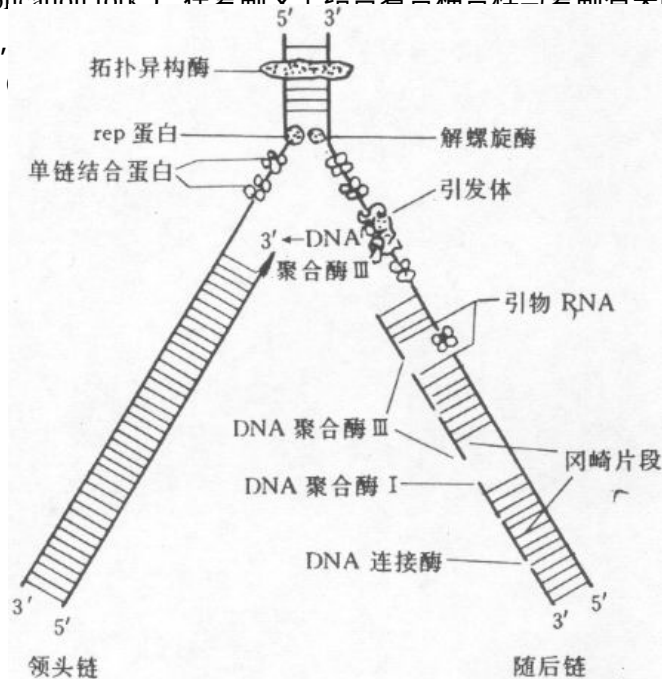


图 10-10 大肠杆菌的复制叉结构示意图

2. RNA 引物的合成

在 DNA 复制的起始处双链解开，领头链先引发开始合成，与其模板形成双链结构，

而另一条亲代链则被置换出来。只有在领头链将另一条亲本链的特别序列置换出来，才能产生随后链的前体片段的前引发作用。需要引发酶与引发前体结合形成引发体。引发体在复制叉上移动，识别合成的起始点，引发 RNA 引物的合成。移动和引发均需要由 ATP 提供能量。以 DNA 为模板按 5' → 3' 的方向，合成一段引物 RNA 链。引物长度约为几个至 10 个核苷酸。在引物的 5' 端含 3 个磷酸残基，3' 端为游离的羟基。

3. DNA 链的延长

当 RNA 引物合成之后，在 DNA 聚合酶的催化下，以四种脱氧核糖核苷 5'-三磷酸为底物，在 RNA 引物的 3' 端以磷酸二酯键连接上脱氧核糖核苷酸并释放出 PPi。DNA 链的合成是以两条亲代 DNA 链为模板，按碱基配对原则进行复制的。亲代 DNA 的双股链呈反向平行，一条链是 5' → 3' 方向，另一条链是 3' → 5' 方向。在一个复制叉内两条链的复制方向不同（图 10-11），所以新合成的二条子链极性也正好相反。由于迄今为止还没有发现一种 DNA 聚合酶能按 3' → 5' 方向延伸，因此子链中有一条链沿着亲代 DNA 单链的 3' → 5' 方向（亦即新合成的 DNA 沿 5' → 3' 方向）不断延长。这条新链称为领头链。而另一条链的合成方向与复制叉的前进方向相反，只能断续地合成 5' → 3' 的多个短片段。1968 年冈崎发现了这些片段故又称冈崎片段（Okazaki fragment）。它们随后连接成大片段，这条新链称为随后链。这种领头链是连续合成，随后链是断续合成的方式称为半不连续复制（semidiscontinuous replication）。原核细胞冈崎片段长度约为 1 000 ~ 2 000 个核苷酸。真核细胞的较短，长度约 100 ~ 200 个核苷酸。

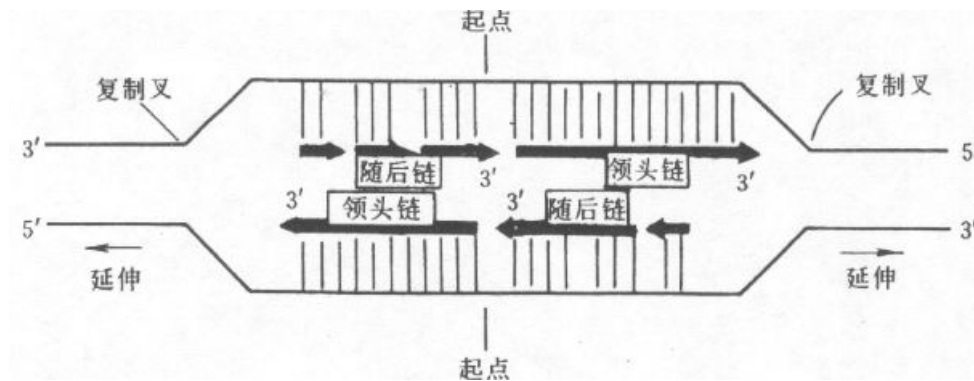


图 10-11 DNA 的双向复制

尽管领头链的合成总是领先一段，但是从来没有发现领头链跑得太远，而总是与随后链保持相对稳定的一段距离。1988 年 Kornberg 等人从大肠杆菌中分离出 800kDa 的 pol ^{III} 和 900kDa 的 pol ^I 全酶，其中各个亚基均有两个，并证明是具有双活性部位的非对称结构，这表明同一个 pol ^I 全酶可能同时负责领头链和随后链的复制。根据实验资料提出如下复制模型（图 10-12），随后链的模板在 DNA 聚合酶 ^I 全酶上绕转 180 度形成一个小环，使冈崎片断的合成方向能够与领头链的合成方向以及复制体的移动方向保持一致。随着冈崎片断的延长，这个大环从 DNA 聚合酶 ^I 上释放。在此之前，领头链的合成已将另一部分随后链的模板置换出来，并在适于引发的位点上由引发体合成新的引物，

然后再形成一个小环，进行新的冈崎片断的合成。

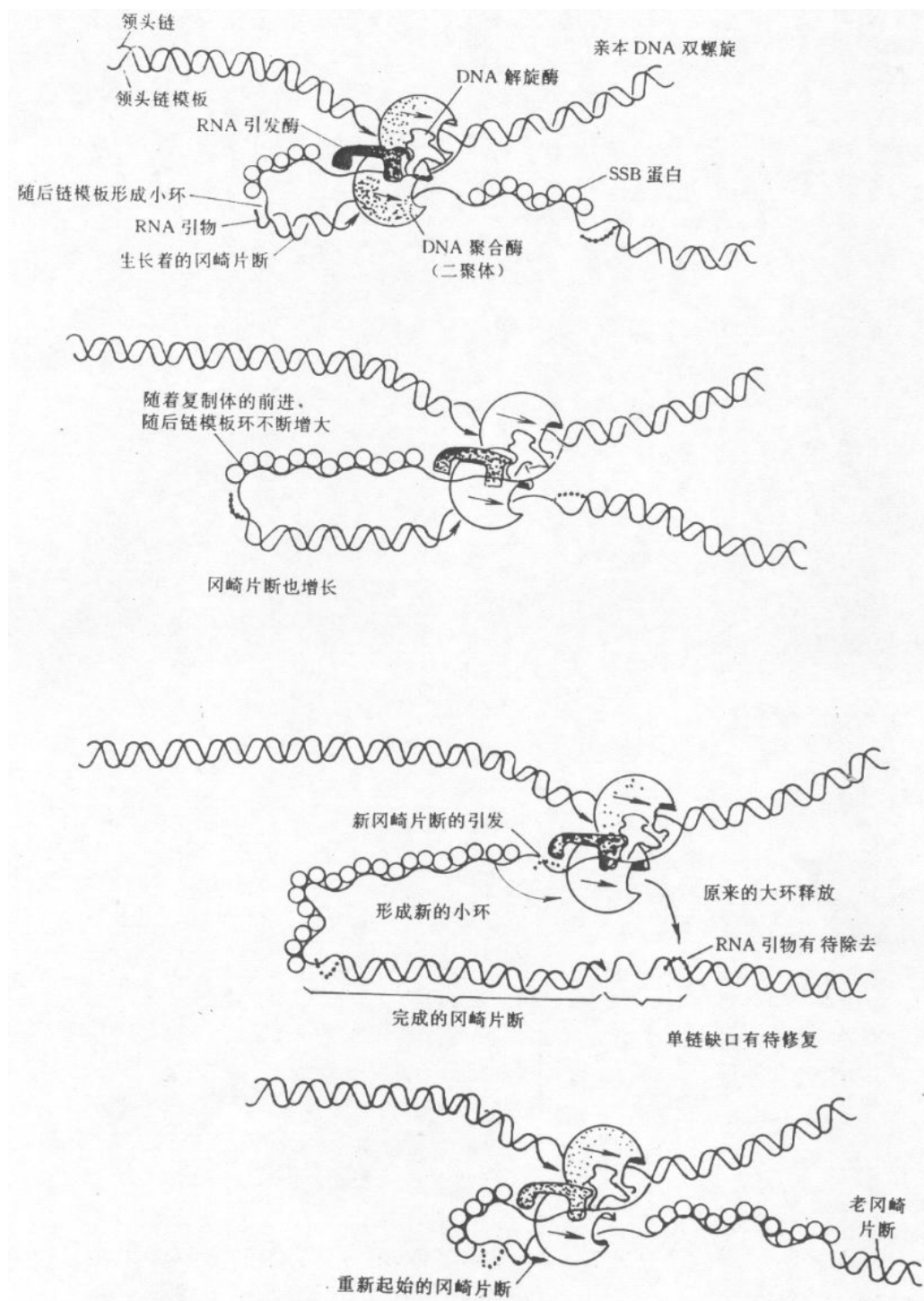


图 10-12 领头链-随后链同时复制模型

4. 切除引物，填补缺口，连接修复

当新形成的冈崎片段延长至一定长度，其 3'-OH 端与前面一条老片段的 5' 端接近时，即发生下列变化：在 DNA 聚合酶 的作用下，在引物 RNA 与 DNA 片段的连接处切断；切去 RNA 引物后留下的空隙，由 DNA 聚合酶 催化合成一段 DNA 填补上；在 DNA 连接酶的作用下，连接相邻的 DNA 链；修复掺入 DNA 链的错配碱基。这样以两条亲代 DNA 链为模板，各自形成一条新的 DNA 互补链，结果是形成了两个 DNA 双股螺旋分子。

二、逆向转录

以 RNA 为模板，按照 RNA 中的核苷酸顺序合成 DNA，这与通常转录过程中遗传信息流从 DNA 到 RNA 的方向相反，故称为逆向转录(reverse transcription)。在六十年代 Temin 根据有关的实验结果提出，由 RNA 肿瘤病毒逆向转录为 DNA 前病毒，然后由 DNA 前病毒再转录为 RNA 肿瘤病毒的设想，但当时未得到重视。直至 1970 年，Temin 和 Baltimore 各自在鸟类劳氏肉瘤病毒和小鼠白血病病毒等 RNA 肿瘤病毒中找到了逆转录酶，才证明了逆向转录过程。现在人们已发现各种高等真核生物的 RNA 肿瘤病毒都有逆转录酶。鸟类的劳氏肉瘤病毒的逆转录酶具有三种分子形式，分别为 α 、 β 和 γ ，其中 α 是主要形式。 α 亚基分子量为 63 000， β 亚基分子量为 94 000， γ 亚基是 α 亚基的水解产物。只有 α 亚基具有酶活性。哺乳动物的 RNA 肿瘤病毒的逆转录酶一般为单亚基结构。如小鼠白血病病毒中的逆转录酶是分子量为 70 000 的单条多肽链。逆转录酶需要以 RNA (或 DNA) 为模板，以四种 dNTP 为原料，要求短链 RNA (或 DNA) 作为引物，此外还需要适当浓度的二价阳离子 Mg^{2+} 和 Mn^{2+} ，沿 5' → 3' 方向合成 DNA，形成 RNA-DNA 杂交分子 (或 DNA 双链分子)。以后，再以 RNA-DNA 杂交分子中的 DNA 链为模板，在寄主细胞的 DNA 聚合酶作用下，可合成另一条 DNA 互补链，这样便形成新的双链 DNA 分子。

逆转录酶是一种多功能酶，它除了具有以 RNA 为模板的 DNA 聚合酶和以 DNA 为模板的 DNA 聚合酶活性外还兼有 RNaseH、DNA 内切酶、DNA 拓扑异构酶、DNA 解链酶和 tRNA 结合的活性。逆转录酶的发现，表明遗传信息也可以从 RNA 传递到 DNA，从而丰富了分子遗传中心法则的内容。

几乎所有真核生物的 mRNA 分子的 3' 末端都有一段多聚腺苷酸。当加入寡聚 dT 作引物时，mRNA 就可以成为逆转录酶的模板，在体外合成与其互补的 DNA，称为 cDNA。这种方法已成为生物技术和分子生物学研究中最常见的方法之一。使逆转录酶得到广泛的应用。

三、DNA 突变

DNA 突变是指 DNA 的碱基顺序发生突然而永久性的变化，从而影响 DNA 的复制，并使 DNA 的转录和翻译也跟着改变，因而表现出异常的遗传特征。DNA 的突变可以有

几种形式：(1) 一个或几个碱基对被置换 (replacement)；(2) 插入 (insertion) 一个或几个碱基对；(3) 一个或多个碱基对缺失 (deletion)。置换和插入的变化是可逆的，缺失则是不可逆的。最常见的突变形式是碱基对的置换。嘌呤碱之间或嘧啶碱之间的置换称为转换 (transition)，嘌呤和嘧啶之间的置换称为颠换 (transversion)。突变有自发突变和诱发突变。自发突变的机率很低。据估计在 DNA 的合成中，大约每 10^9 个碱基对发生一次突变，然而，逆转录酶合成的 DNA 保真度差，错配碱基的出现率要比真核生物或大肠杆菌的高 1~3 个数量级，所以各种 RNA 肿瘤病毒具有很高的自发突变频率。诱发突变可以由物理因素或化学因素引起，物理因素如电离辐射和紫外光等均可以诱发突变。在农业技术上常利用辐射诱变进行育种。化学因素的诱变，如脱氨剂和烷化试剂均可诱发突变。亚硝酸为强脱氨剂，可使腺嘌呤转变为次黄嘌呤，鸟嘌呤转变为黄嘌呤，胞嘧啶转变为尿嘧啶，而导致碱基配对错误。烷化剂如硫酸二甲酯 (DMS) 可使鸟嘌呤的 N_7 位氮原子甲基化，使之成为带一个正电荷的季铵基团，减弱 N_9 位上的 N-糖苷键，至使脱氧核糖苷键不稳定，发生水解而丢失嘌呤碱，以后可被其它碱基取代，或引起 DNA 的链断裂。

四、DNA 损伤与修复

某些物理化学因子，如紫外线、电离辐射和化学诱变剂等，都能引起生物突变和致死。因为它们均能作用于 DNA，造成其结构和功能的破坏。例如 X 射线可以在 DNA 链上形成缺口 (nick)；紫外线照射可以使 DNA 分子中同一条链两相邻胸腺嘧啶碱基之间形成二聚体 (TT)。这种二聚体是由两个胸腺嘧啶碱基以共价键联结成环丁烷的结构而形成的 (图 10-13)。其他嘧啶碱基之间也能形成类似的二聚体 (CT、CC)，但数量较少。嘧啶二聚体的形成，影响了 DNA 的双螺旋结构，使其复制和转录功能均受到阻碍。

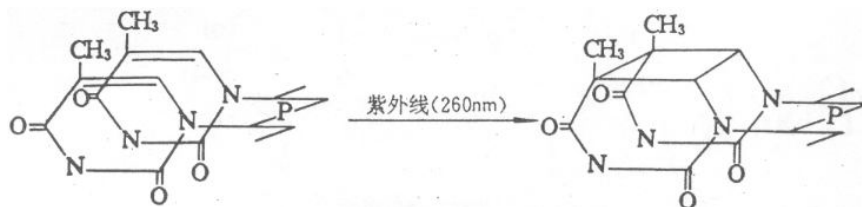


图 10-13 胸腺嘧啶二聚体的形成

细胞内具有一系列起修复作用的酶系统，可以除去 DNA 上的损伤，恢复 DNA 的正常双螺旋结构。目前已经知道有四种修复系统：光复活 (photoreactivation)，切除修复 (excision repair)，重组修复 (recombination repair) 和诱导修复 (induction repair)。后三种机制不需要光照，因此又称为暗修复 (dark repair)。

(一) 光复活

早在 1949 年即已发现光复活现象。光复活的机制是可见光 (最有效波长为 400nm 左右) 激活了光复活酶 (photoreactivating enzyme)，它能分解由于紫外线照射而形成的嘧啶二聚体 (图 10-14)。

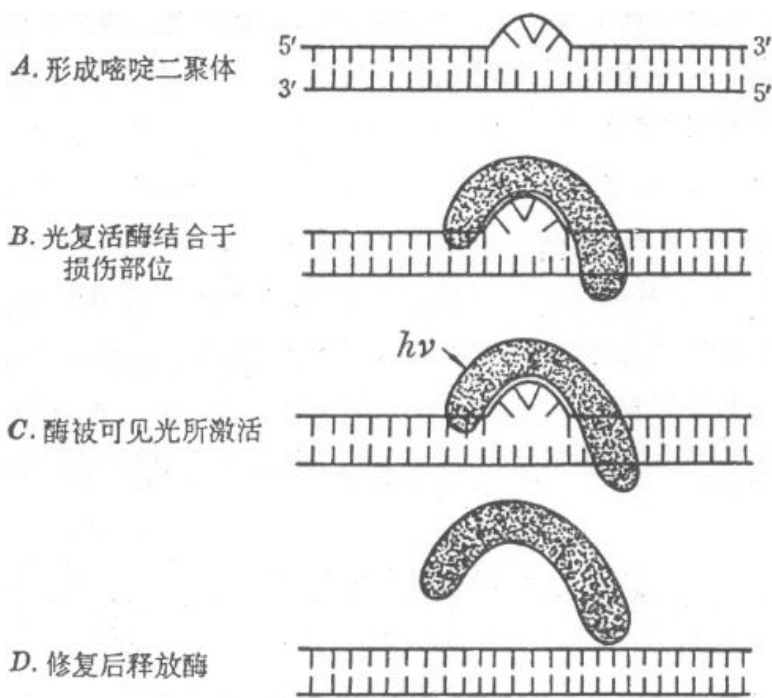


图 10-14 紫外线损伤的光复活过程

光复活作用是一种高度专一的修复方式。它只作用于紫外线引起的 DNA 嘧啶二聚体。光复活酶在生物界分布很广，从低等单细胞生物一直到鸟类都有，而高等的哺乳类却没有。这说明在生物进化过程中该作用逐渐被暗修复系统所取代，并丢失了这个酶。

(二) 切除修复

所谓切除修复，即是在一系列酶的作用下，将 DNA 分子中受损伤部分切除掉，并以完整的那一条链为模板，合成出切去的部分，然后使 DNA 恢复正常结构的过程。这是比较普遍的一种修复机制，它对多种损伤均能起修复作用。参与切除修复的酶主要有：特异的核酸内切酶、外切酶、聚合酶和连接酶。细胞内有多种特异的核酸内切酶可识别由紫外线或其他因素引起的 DNA 的损伤部位，在其附近将核酸单链切开（incision），再由核酸外切酶将损伤链切除（excision），然后由 DNA 聚合酶进行修复合成，最后由 DNA 连接酶将新合成的 DNA 链与已有的链接上。大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 兼有 5' 核酸外切酶活力，因此修复合成和切除两步可由同一酶来完成。真核细胞的 DNA 聚合酶不具有外切酶活力，切除必须由另外的外切酶来进行。现在已能利用有关的酶在离体情况下实现 DNA 损伤的切除修复。

电离辐射（如 X 射线、 γ 射线等）的作用比较复杂，除射线的直接效应外，还可以通过水分子电离时所形成的自由基起作用（间接效应）。DNA 链可以出现双链打断或单链打断的情况。大剂量照射时，还有碱基的破坏。实验证明，DNA 聚合酶和 DNA 连接酶在电离辐射损伤的修复过程中起着重要的作用。但是，与紫外线损伤的切除修复不完全相同，对于单链断裂的修复，核酸内切酶并不是必需的。

除紫外线与电离辐射引起 DNA 的损伤外，某些化学诱变剂（如烷化剂）造成 DNA 结构的破坏，大致也能以相似的方式被修复。甲基磺酸甲酯是一种单功能的烷化剂，它作用于 DNA 时，可以使鸟嘌呤第 7 位的氮原子烷基化，从而活化 N^7 -糖苷键，造成脱嘌呤作用。酸也能使 DNA 脱嘌呤。此外，在 DNA 复制过程中聚合酶对 dTTP 和 dUTP 的分辨能力是不高的，因此常有少量脱氧尿苷酸掺入到 DNA 链中去。大肠杆菌的 dUTP 酶

可以分解 dUTP 或 dUMP，但是它的作用有限，仍然不能完全避免 dUTP 的混入。而且，胞嘧啶脱氨基后也会转变成尿嘧啶。对于 DNA 链上出现的这些尿嘧啶，细胞中的尿嘧啶-N 糖苷酶可以把它除去。腺嘌呤脱氨形成次黄嘌呤，这一不正常的碱基可被次黄嘌呤-N 糖苷酶切掉。无嘌呤（apurinic）或无嘧啶（apyrimidinic）位置的 3 端磷酸二酯键可在 AP 核酸内切酶作用下打开，最后在 DNA 聚合酶和连接酶的作用下进行修复。无嘌呤或无嘧啶位置的另一种修复方式是在插入酶（insertase）作用下重新接上一个正确配对的碱基。切除修复过程可总结如图 10-15 所示。

由此可见，修复作用是一种普遍的功能，它并不局限于某种特殊原因造成的损伤，而能一般地识别 DNA 双螺旋结构的改变，对遭到破坏而呈现不正常结构的部分加以去除。细胞的这种功能，对于保护遗传物质 DNA，使它不轻易被破坏，是有很大大意义的。失去这种修复功能的细菌突变株，即表现出容易被紫外线所杀死，同样也提高了化学诱变剂的致死效应。

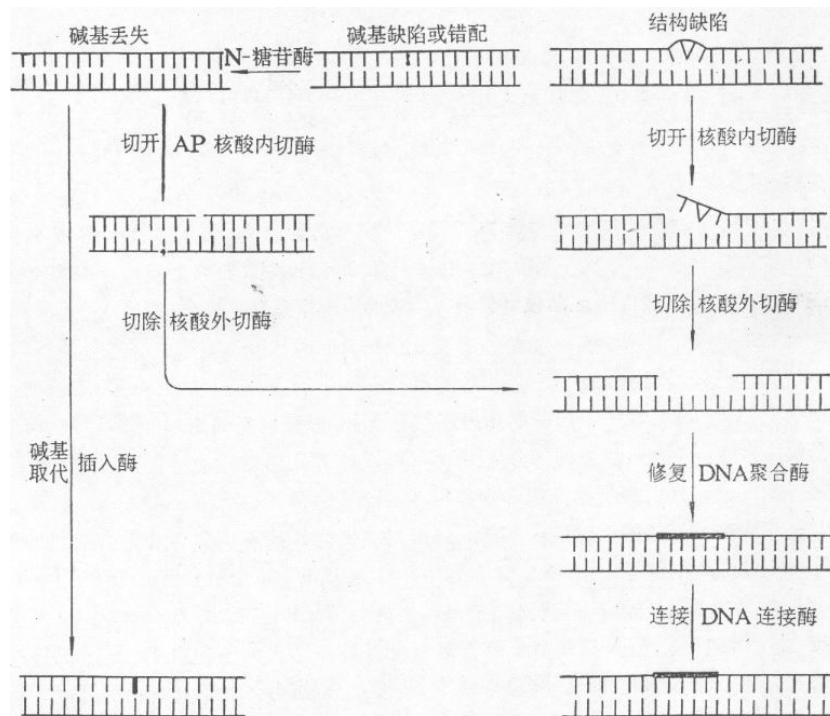


图 10-15 DNA 损伤的切除修复过程

细胞修复系统和癌症的发生也有一定的关系。有一种称为着色性干皮病（xeroderma pigmentosa）的遗传病，这种病患者对日光或紫外线特别敏感，往往容易出现皮肤癌。经分析表明，患者皮肤细胞中缺乏紫外线特异性核酸内切酶，因此对紫外线引起的 DNA 损伤不能修复。这说明修复系统的障碍可能是癌症发生的一个原因。

(三) 重组修复

上述切除修复过程发生在 DNA 复制之前，因此又称为复制前修复。然而，当 DNA 发动复制时尚未修复的损伤部位也可以先复制再修复。例如，含有嘧啶二聚体，烷基化引起的交联和其他结构损伤的 DNA 仍然可以进行复制，但是复制酶系在损伤部位无法通过碱基配对合成子代 DNA 链，它就跳过损伤部位，在下一个冈崎片段的起始位置或前导链的相应位置上重新合成引物和 DNA 链，结果子代链在损伤相对应处留下缺口。这种遗传信息有缺损的子代 DNA 分子可通过遗传重组而加以弥补，即从完整的母链上将相应核苷酸序列片段移至子链缺口处，然后用再合成的序列来补上母链的空缺（图 10-16）。此过程称为重组修复，因为发生在复制之后，又称为复制后修复（postreplication repair）。

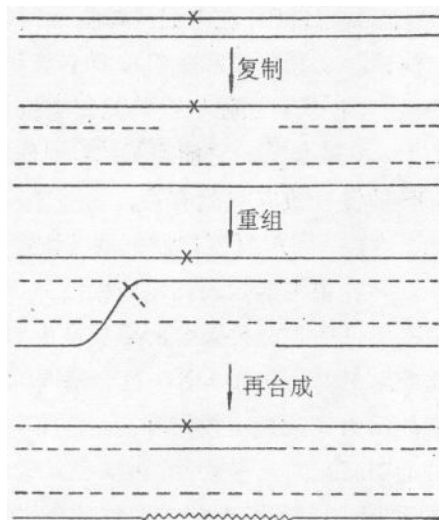


图 10-16 重组修复的过程

X 表示 DNA 链受损伤的部位。虚线表示通过得制新合成的 DNA 链。锯齿线表示重组后缺口处再合成的 DNA 链。

在重组修复过程中，DNA 链的损伤并未除去。当进行第二论复制时，留在母链上的损伤仍会给复制带来困难，复制经过损伤部位时所产生的缺口还需通过同样的重组过程来弥补，直至损伤被切除修复所消除。但是，随着复制的不断进行，若干代后，即使损伤始终未从亲代链中除去，而在后代细胞群中也被稀释，实际上消除了损伤的影响。

参与重组修复的酶系统包括与重组有关的主要酶类以及修复合成的酶类。重组基因 *rec A* 编码一种分子量为 40 000 的蛋白质，它具有交换 DNA 链的活力。*rec A* 蛋白被认为在 DNA 重组和重组修复中均起着关键的作用。*rec B* 和 *Rec C* 基因分别编码核酸外切酶 V 的两个亚基，该酶亦为重组和重组修复所必需。修复合成需要 DNA 聚合酶和连接酶，其作用如前所述。

(四) 诱导修复

前面介绍的 DNA 损伤修复功能可以不经诱导而发生。然而许多能造成 DNA 损伤或

抑制复制的处理均能引起一系列复杂的诱导效应，称为应急反应（SOS response）。SOS 反应包括诱导出现的 DNA 损伤修复效应、诱变效应、细胞分裂的抑制以及溶源性细菌释放噬菌体等等。细胞的癌变也可能与 SOS 反应有关。

SOS 反应是细胞 DNA 受到损伤或复制系统受到抑制的紧急情况下，为求得生存而出现的应急效应。SOS 反应诱导的修复系统包括避免差错的修复（error free repair）和倾向差错的修复（error prone repair）两类。光复活、切除修复和重组修复能够识别 DNA 的损伤或错配碱基而加以消除，在它们的修复过程中并不引入错配碱基，因此属于避免差错的修复。SOS 反应能诱导切除修复和重组修复中某些关键酶和蛋白质的产生，使这些酶和蛋白质在细胞内的含量升高，从而加强切除修复和重组修复的能力。此外，SOS 反应还能诱导产生缺乏校对功能的 DNA 聚合酶，它能在 DNA 损伤部位进行复制而避免了死亡，可是却带来了高的变异率。SOS 的诱变效应与此有关。

SOS 反应使细菌的细胞分裂受到抑制，结果长成丝状体。其生理意义可能是在 DNA 复制受到阻碍的情况下避免因细胞分裂而产生不含 DNA 的细胞，或者使细胞中有更多进行重组修复的机会。

现在知道，SOS 反应是由 Rec A 蛋白和 Lex A 阻遏物相互作用引起的。Rec A 蛋白不仅在同源重组中起重要作用，而且它也是 SOS 反应最初发动的因子。在有单链 DNA 和 ATP 存在时，Rec A 蛋白被激活而表现出蛋白水解酶的活力，它能分解噬菌体的阻遏蛋白和 Lex A 蛋白。Lex A 蛋白（分子量为 22 000）是许多基因的阻遏物。当它被 Rec A 的蛋白水解酶分解后可使一系列基因得以表达，其中包括紫外线损伤的修复基因 *uvrA*、*uvrB*、*uvrC*（分解编码核酸内切酶的基因），以及 Rec A 和 Lex A 基因本身，此外还有编码单链结合蛋白 SSB 的基因，与噬菌体 DNA 整合有关的基因 *him A*，与诱变作用有关的基因 *umu DC*，与细胞分裂有关的基因 *sul A*、*ruv* 和 *lon* 以及一些功能还不清楚的基因 *din A*、*B*、*D*、*F* 等。SOS 反应的机制见图 10-17。

SOS 反应广泛存在于原核生物和真核生物，它是生物在不利环境中求得生存的一种基本功能。SOS 反应主要包括两个方面：DNA 修复和导致变异。在一般环境中突变常是不利的，可是在 DNA 受到损伤和复制被抑制的特殊条件下生物发生突变将有利于它的生存。因此 SOS 反应可能在生物进化中起着重要作用。然而，另一方面，大多数能在细菌中诱导产生 SOS 反应的作用剂，对高等动物都是致癌的：如 X-射线、紫外线、烷化剂、黄曲霉毒素等。而某些不能致癌的诱变剂却并不引起 SOS 反应，如 5-溴尿嘧啶。因此猜测，癌变可能是通过 SOS 反应造成的。目前有关致癌物的一些简便检测方法即是根据 SOS 反应原理而设计的，因为在动物身上诱发肿瘤的试验需要花费较多人力、物力和较长的时间，而细菌的 SOS 反应则很易测定。

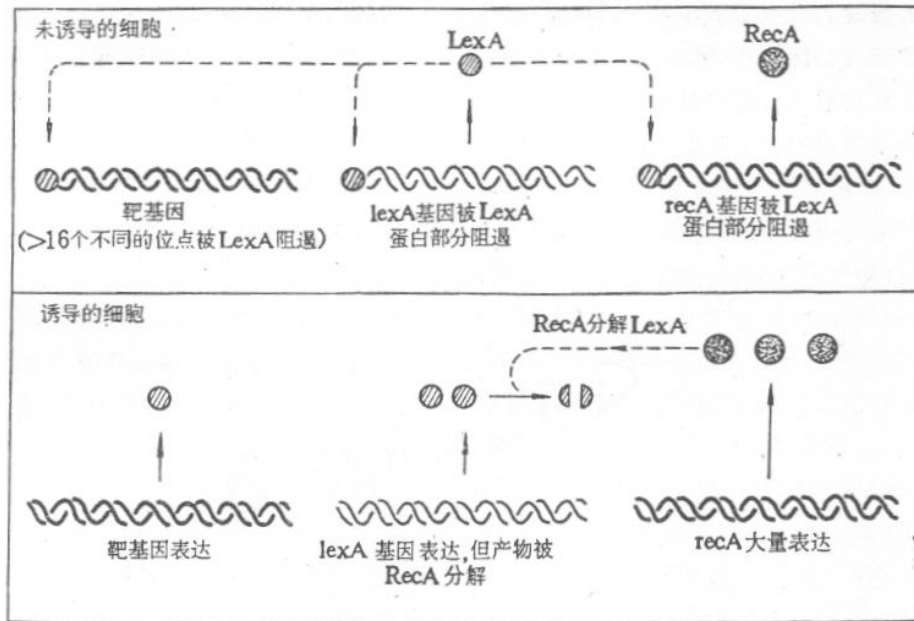


图 10-17 SOS 反应的机制

第二节 RNA 的生物合成

以 DNA 的一条链为模板在 RNA 聚合酶催化下，以四种核糖核苷酸为底物按照碱基配对原则，形成 3' 5' 磷酸二酯键，合成一条与 DNA 链的一定区段互补的 RNA 链的过程称为转录（transcription）。RNA 的转录起始于 DNA 模板的一个特定位点，并在另一位点处终止。在生物体内，DNA 的两条链中仅有一条链可作为转录的模板，这称为转录的不对称性（transcription asymmetry）。用作模板的链称为反义链（antisense strand），另一条链称为有义链（sense strand），因为有义链的脱氧核苷酸序列正好与转录出的 RNA 的核苷酸序列相同（只是 T 与 U 的区别），所以也称编码链。但各个基因的有义链不一定位于同一条 DNA 链。RNA 的合成沿 5' 3' 方向进行（DNA 模板链方向为 3' 5'），5' 末端为核糖核苷三磷酸，即 5' 位保留 PPP。

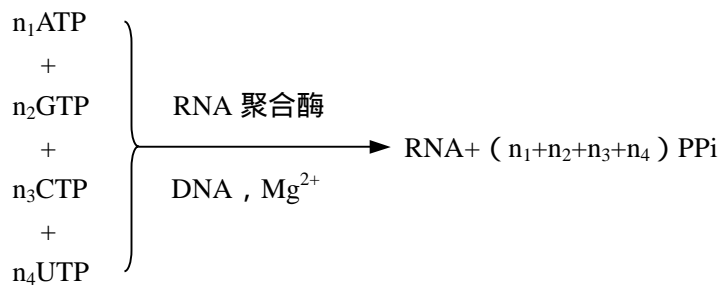
在真核生物细胞里，转录是在细胞核内进行的。合成的 RNA 包括 mRNA、rRNA 和 tRNA 的前体。rRNA 的合成发生在核仁内，而合成 mRNA 和 tRNA 的酶则定位在核质中。另外叶绿体和线粒体也进行转录。原核细胞中转录酶类存在于细胞液中。

一、DNA 的转录

（一）RNA 聚合酶

在 20 世纪 60 年代初分离得到了 DNA 指导的 RNA 聚合酶。该酶需要以四种核糖核苷三磷酸为底物，适量的 DNA 为模板， Mg^{2+} 存在下，催化所有形式的 RNA 的合成反应。

通式如下：



目前对大肠杆菌的 RNA 聚合酶已有较深入的研究。这个酶的全酶由 5 种亚基 (α , β , β' , γ , ω) 组成, 还含有 2 个 Zn 原子(表 10-4)。分子量为 460 000, 酶分子直径约 10nm, 它与 DNA 结合时约覆盖 60 个核苷酸。在 RNA 合成起始之后, σ 因子便与全酶分离。不含 σ 因子的酶仍有催化活性, 称为核心酶 (core enzyme)。 σ 亚基具有与启动子结合的功能, ω 亚基催化效率很低, 而且可以利用别的 DNA 的任何部位作模板合成 RNA。加入 σ 因子后, 则具有了选择起始部位的作用, σ 因子可能与核心酶结合, 改变其构象, 从而使它能特异地识别 DNA 模板链上的起始信号。

表 10-4 大肠杆菌 RNA 聚合酶的组成

| 亚基 | 分子量 | 亚基数目 | 功能 |
|----|--------|------|--------------|
| | 65 000 | 2 | 与启动子结合 |
| | 15 000 | 1 | 含催化部位, 起催化作用 |
| | 51 000 | 1 | 与 DNA 结合 |
| | 11 000 | 1 | |
| | 70 000 | 1 | 识别起始位点 |

真核细胞的细胞核内有 RNA 聚合酶 I、II 和 III, 表(9-5), 分子量约为 500-700kDa, 通常由 4~6 种亚基组成, 并含有 Zn^{2+} 。RNA 聚合酶 I 存在于核仁中, 主要催化 rRNA 前体的转录。RNA 聚合酶 II 和 III 存在于核质中, 分别催化 mRNA 前体和小分子量 RNA 的转录。此外线粒体和叶绿体也含有 RNA 聚合酶, 其特性类似原核细胞的 RNA 聚合酶。

表 10-5 真核细胞 RNA 聚合酶

| 酶类 | 分布 | 产物 | -鹅膏蕈碱对酶的作用 | 分子量 | 反应条件 |
|----|----|-------------|------------|-------------------|-----------------------------------------------|
| | 核仁 | rRNA | 不抑制 | 500 000 ~ 700 000 | 低离子强度, 要求 Mg^{2+} 或 Mn^{2+} |
| | 核质 | mRNA | 低浓度抑制 | ~ 700 000 | 高离子强度 |
| | 核质 | tRNA 5SrRNA | 高浓度抑制 | - | 高 Mn^{2+} 浓度 |

在 RNA 聚合酶的催化反应中以天然的 (双链) DNA 为模板比变性 (单链) DNA 更为有效。事实上,有许多实验说明, RNA 聚合酶以完整双链 DNA 为模板, DNA 的解链仅发生在与 RNA 聚合酶的结合部分, 约有 17 个碱基对。在解开的模板链上合成出互补的 RNA 链, 已合成的 RNA 链迅速离开 DNA 模板链 (图 10-18), 被解开的两条 DNA 链又重新形成双螺旋结构。

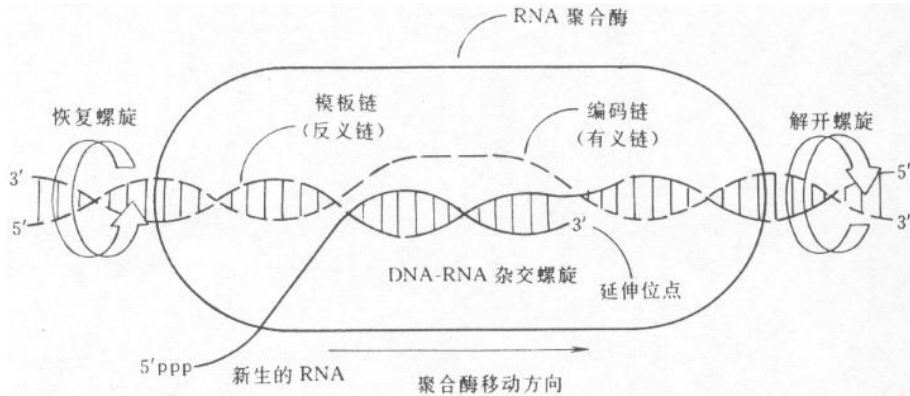


图 10-18 RNA 聚合酶沿 DNA 模板链移动合成 RNA

(二) RNA 的转录过程

RNA 转录过程如图 10-19 所示, 具体步骤为起始位点的识别、起始、延伸、终止。以大肠杆菌的研究为例作如下介绍。

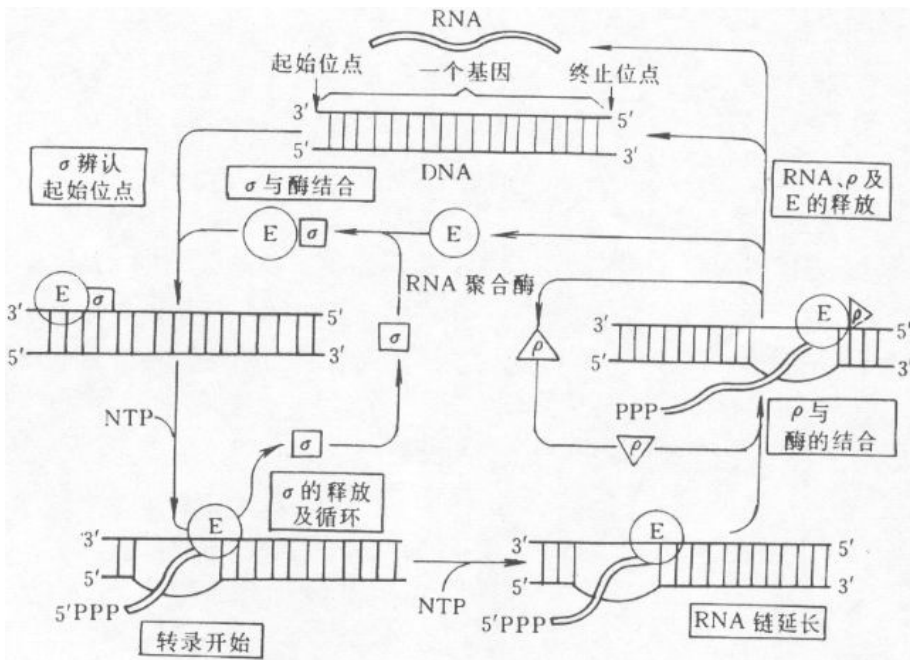


图 10-19 DNA 指导下的 RNA 转录过程示意图

1. 起始位点的识别

RNA 的合成不需要引物。体外试验表明,不含 σ 亚基的核心酶会随机地在一个基因的两条链上启动。当有 σ 亚基时就会选择正确的起点。RNA 聚合酶先与 DNA 模板上的特殊启动子部位结合, σ 因子起着识别 DNA 分子上的起始信号的作用。DNA 分子上的起始信号,即“启动序列”称为启动子。为方便起见,在 DNA 上使 RNA 分子开始合成的第一个核苷酸标为+1,它的 5' 上游标为(-),3' 下游标为(+)。通过比较原核生物的启动子的结构,发现在转录起点上游大约 -10 处有 6 个碱基的 TATATA 保守序列,称为 Pribnow 框,约在 -35 处有 TTGACA 保守序列。启动子的结构至少由三部分组成:-35 序列提供了 RNA 聚合酶全酶识别的信号;-10 序列是酶的紧密结合位点;第三部分是 RNA 合成的起始点。虽然单独的核心酶能与 DNA 结合,但主要是由于碱性蛋白质与酸性核酸之间的非特异性静电引力造成的,DNA 仍保持双螺旋形式,而 σ 亚基能改变 RNA 聚合酶与 DNA 之间的亲和力,大大地增加酶与启动子的结合常数和停留时间。因此开始时核心酶在 σ 亚基参与下与 DNA 分子接触,形成非专一性复合物,这样的复合物是很不稳定的,酶分子可在 DNA 链上滑动。在 σ 亚基作用下帮助全酶迅速找到启动子,并与之结合生成较松弛的封闭型启动子复合物。这时酶与 DNA 外部结合,识别部位大约在启动子的 -35 位点处。接着是 DNA 构象改变活化,得到开放型的启动子复合物,此时酶与启动子紧密结合,在 -10 位点处解开 DNA 双链,识别其中的模板链。由于该部位富含 A-T 碱基对,故有利于 DNA 解链。开放型复合物一旦形成,DNA 就继续解链,酶移动到起始位点。

2. 起始

停留在起始位点的全酶结合第一个核苷三磷酸。加入的第一个核苷三磷酸常是 GTP 或 ATP。所形成的启动子、全酶和核苷三磷酸复合物称为三元起始复合物,第一个核苷酸掺入的位置称为转录起始点。这时 σ 亚基被释放脱离核心酶。

3. 延伸

从起始到延伸的转变过程,包括 σ 因子由缔合向解离的转变。DNA 分子和酶分子发生构象的变化,核心酶与 DNA 的结合松弛,核心酶可沿模板移动,并按模板序列选择下一个核苷酸,将核苷三磷酸加到生长的 RNA 链的 3'-OH 端,催化形成磷酸二酯键。转录延伸方向是沿 DNA 模板链的 3'→5' 方向按碱基配对原则生成 5'→3' 的 RNA 产物。RNA 链延伸时, RNA 聚合酶继续解开一段 DNA 双链,长度约 17 个碱基对,使模板链暴露出来。新合成的 RNA 链与模板形成 RNA-DNA 的杂交区,当新生的 RNA 链离开模板 DNA 后,两条 DNA 链则重新形成双股螺旋结构。

4. 终止

在 DNA 分子上(基因末端)有终止转录的特殊碱基顺序称为终止子(terminators),它具有使 RNA 聚合酶停止合成 RNA 和释放 RNA 链的作用。这些终止信号有的能被 RNA 聚合酶自身识别,而有的则需要有 σ 因子的帮助。 σ 因子是一个分子量为 200kDa 的四聚体蛋白质,它能与 RNA 聚合酶结合但不是酶的组分。它的作用是阻止 RNA 聚合酶向前移动,于是转录终止,并释放出已转录完成的 RNA 链。对于不依赖于 σ 因子的终止子序列的分析,发现有两个明显的特征:即在 DNA 上有一个 15~20 个核苷酸的二重对称区,

位于 RNA 链结束之前，形成富含 G-C 的发夹结构。接着有一串大约 6 个 A 的碱基序列，它们转录的 RNA 链的末端为一连串的 U。寡聚 U 可能提供信号使 RNA 聚合酶脱离模板。由 rU-dA 组成的 RNA-DNA 杂交分子的碱基配对结合力很弱，利于 RNA 链释放。在真核细胞内，RNA 的合成要比原核细胞中的复杂得多。

二、转录后加工

在转录中新合成的 RNA 往往是较大的前体分子，需要经过进一步的加工修饰，才转变为具有生物学活性的、成熟的 RNA 分子，这一过程称为转录后加工。主要包括剪接、剪切和化学修饰。

(一) mRNA 的加工

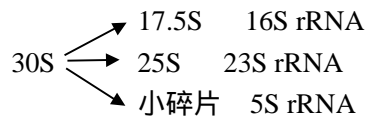
在原核生物中转录翻译相随进行，多基因的 mRNA 生成后，绝大部分直接作为模板去翻译各个基因所编码的蛋白质，不再需要加工。但真核生物里转录和翻译的时间和空间都不相同，mRNA 的合成是在细胞核内，而蛋白质的翻译是在胞质中进行，而且许多真核生物的基因是不连续的。不连续基因中的插入序列，称为内含子 (intron)；被内含子隔开的基因序列称为外显子 (exon)。一个基因的外显子和内含子都转录在一条很大的原初转录本 RNA 分子中，分子量达 $1 \times 10^7 \sim 2 \times 10^7$ 。而且很不均一，故称为核内不均一 RNA (hnRNA)。它们的寿命很短，只有几分钟。首先降解为分子较小的 RNA，再经其它修饰转化为 mRNA。真核细胞 mRNA 的加工包括：(1) hnRNA 被剪接 (splicing)，除去由内含子转录来的序列，将外显子的转录序列连接起来。(2) 在 3' 末端连接上一段约有 20~200 个腺苷酸的多聚腺苷酸 (poly A) 的“尾巴”结构。不同 mRNA 的长度有很大差异。(3) 在 5' 末端连接上一个“帽子”结构 $m^7GpppmNp$ 。(4) 在内部少数腺苷酸的腺嘌呤 6 位氨基发生甲基化 (m^6A)。

(二) tRNA 的加工

原核生物的 tRNA 基因的转录单元大多数是多基因的。不但相同或不同的 tRNA 的几个基因可转录在一条 RNA 中，有的 tRNA 还与 rRNA 组成转录单元，因此 tRNA 前体的加工过程包括剪切、剪接 (需要核酸内切酶和连接酶催化)，在 3' 末端添加-CCA_{OH}、以及核苷酸修饰转化为成熟的 tRNA。tRNA 中含有许多稀有碱基，所有这些碱基均是在转录后由四种常见碱基经修饰酶催化，发生脱氨、甲基化、羟甲基化等化学修饰而生成的。

(三) rRNA 的加工

原核细胞首先生成的是 30S 前体 rRNA，经核糖核酸酶作用，逐步裂解为 16S、23S 和 5S 的 rRNA，其裂解过程可归纳如下：



原核生物 16S rRNA 和 23S rRNA 含有较多的甲基化修饰成分，特别是 2-甲基核糖。一般 5S rRNA 中无修饰成分。在真核细胞中 rRNA 的转录后加工与原核细胞类似，但更为复杂。rRNA 在核仁中合成，生成一个更大 35~45S 前体 rRNA。前体分裂而转变为 28S、

18S 和 5.8S 的 rRNA 分子。真核生物 5S rRNA 前体是由独立于上述三种 rRNA 之外的基因转录的。真核生物 rRNA 中也含有较多的甲基化成分。

有关 RNA 剪接、剪切机制的研究不仅发现了 RNA 分子本身具有催化功能，促使人们对酶的本质是蛋白质的传统观念进行重新评价，而且对于了解生命的起源和进化是有力的推动。1981 年 Cech 研究组首次报导了喜温四膜虫 26S rRNA 前体能自我切除内含子，这一过程完全没有蛋白质参与。目前已发现的具有催化功能的 RNA 有磷酸二酯酶（核糖核酸酶）、磷酸单酯酶、核苷酸转移酶、磷酸转移酶、RNA 限制性内切酶、tRNA 5 端成熟酶、-1,4-葡聚糖分支酶和肽基转移酶等。人们把具有催化活性的 RNA 称为核酶（ribozyme）。

目前研究表明核酶催化 rRNA、tRNA、mRNA 的剪接机理是不相同的。RNA 内含子有四种类型，即 I 型自我拼接内含子、II 型自我拼接内含子、核 mRNA 内含子和核 tRNA 内含子。

I 型内含子自我拼接首先发现于原生动物的喜温四膜虫 26S rRNA 前体（约 6400 个核苷酸）中，一个含 413 个核苷酸的内含子的切除。此拼接过程需要有一价和二价阳离子以及鸟苷（或鸟苷酸）存在，方可自我催化剪接。该过程为二次磷酸基的转移反应，无需供给能量。鸟苷在此作为辅因子，提供游离的 3'-OH，接受内含子的 5'-磷酸基，产生上游外显子 3'-OH。紧接着发生类似的第二次磷酸基的转移，即下游外显子 5'端磷酸基转移到上游外显子 3'-OH 上，释放出内含子，两个外显子完成拼接。

II 型内含子自我拼接主要存在于线粒体和叶绿体的 RNA 前体和 mRNA 的前体中，拼接反应是另一种类型的内含子自我剪切，它不需要鸟苷辅因子而是依靠内含子中一个腺苷酸的 2'-OH 接受内含子的 5'-磷酸基，同样发生二次磷酸基的转移。完成拼接并释放套索式的内含子。核 mRNA 前体的拼接过程与 I 型内含子类似，不同之处在于它是在 U-snRNP（富含尿嘧啶的核内小分子 RNA 和蛋白质复合物）的参与下完成的。

核 tRNA 前体的拼接过程是先由核酸内切酶切除内含子顺序，然后在激酶、连接酶和磷酸酯酶的作用下把两个 tRNA 半分子连接起来。1984 年美国 Altman 证实了 tRNA 前体的 5'-末端成熟过程由 RNase P 催化。该酶除了蛋白质组分外，还含有一条 375 个核苷酸的 RNA 分子。在体外，当提高 Mg^{2+} 浓度时，单独的 RNA 组分就可催化 tRNA 5'-末端的剪切过程。Cech 和 Altman 因 20 世纪 80 年代初的重要发现，同获 1989 年度的诺贝尔化学奖。

类病毒、拟病毒和卫星 RNA 的自我剪切机制目前已有许多实验表明只要满足“锤头”状（或发夹状）二级结构和十几个核苷酸的保守序列，剪切反应就会在锤头结构右上方自动发生。

三、RNA 的复制

大多数生物的遗传信息贮藏在 DNA 中，遗传信息按中心法则由 DNA 转录成 RNA，再由 RNA 翻译成蛋白质。对 RNA 病毒的研究表明，某些 RNA 病毒是以 RNA 作模板复制出病毒 RNA 分子。

研究 RNA 复制较多的是噬菌体 Q，它以单链 RNA 作为它的遗传物质。当 Q 侵染大肠杆菌时，噬菌体 RNA 通过复制产生新的噬菌体 RNA，这一过程被一个高度专一的以 RNA 为模板的 RNA 聚合酶（或称为 RNA 复制酶）所催化。

Q 噬菌体 RNA 的复制可分为两个阶段：(1) 当 Q 噬菌体侵染大肠杆菌细胞后，其单链 RNA 充当 mRNA，利用宿主细胞中的核糖体合成噬菌体外壳蛋白质和复制酶 亚基；(2) 当复制酶的 亚基和宿主细胞原有的、 亚基自动装配成 RNA 复制酶以后，就进行 RNA 复制。以侵染的噬菌体 RNA 作模板，通过 RNA 复制酶合成互补的 RNA 链。常把具有 mRNA 功能的链称为正链，与它互补的链称为负链。在噬菌体特异的复制酶装配好后不久，酶就吸附到正链 RNA 的 3' 末端，以它为模板合成出负链（图 10-20），直至合成结束，然后负链从正链模板上释放出来。同一个酶又吸附到负链 RNA 的 3' 末端，合

和负链的 RNA 聚合酶

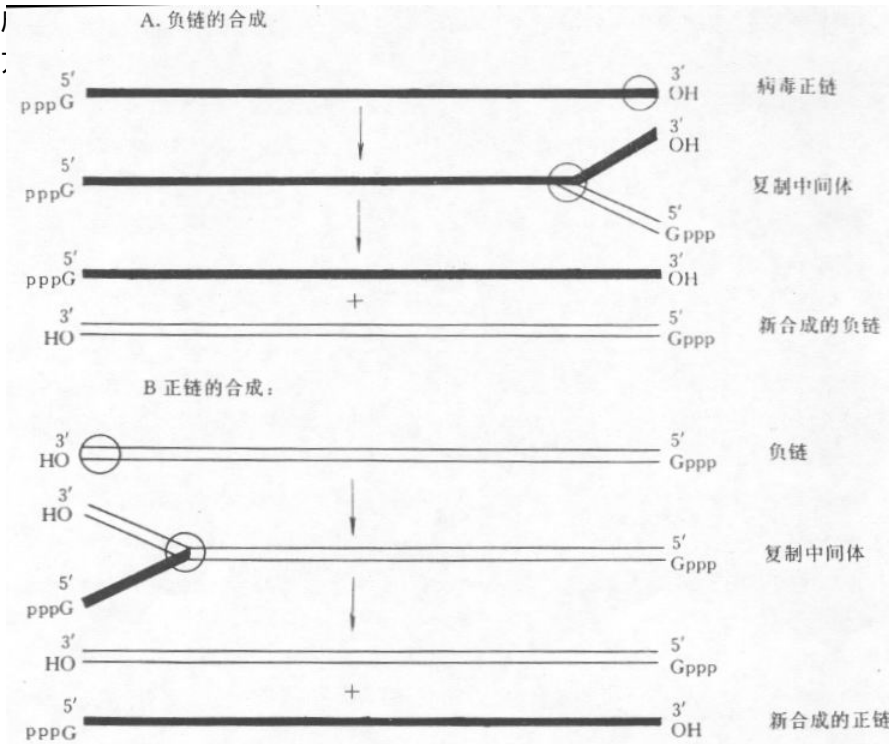


图 10-20 噬菌体 Q RNA 的合成

第三节 基因工程简介

一、基因工程的概念

基因工程就是采用类似工程技术的方法，将不同生物或人工合成的 DNA，按照设计方案重新组合，并在特定的受体细胞中与载体一起得到复制与表达。70 年代开创的 DNA 重组技术是分子生物学发展中的一项极其重大的成果。基因工程主要包括两个步骤：首

先是从某些生物细胞中取得所需要的 DNA 片段，或在人工控制下合成这种 DNA 片段，即获得目的基因，再取得基因的载体，使二者进行体外重组；然后将重组的 DNA 转化到受体的活细胞中去，改变受体细胞的遗传特性。由于新基因在受体细胞中的表达，有可能产生大量人类所需要的某种物质，或授于受体细胞特定的优良性状。

二、基因工程的操作技术

(一) 目的基因

体外操作 DNA 的首要步骤之一是提取载体 DNA 和所需要的外源目的基因。在细胞中 DNA 并非以游离态分子存在，而是和 RNA 及蛋白质结合在一起形成复合体。DNA 纯化的基本步骤是 (1) 从破坏的细胞壁和膜里释放出可溶性的高分子 DNA；(2) 通过变性或蛋白质分解，使 DNA 和蛋白质的复合体解离；(3) 将 DNA 从其它大分子中分离出来；(4) DNA 浓度和纯度的光学测定。

要进行 DNA 重组，首先要取得我们所需要的目的基因，而基因处于 DNA 长链中某一特定部位，现在广泛采用的是限制性核酸内切酶降解法。这类酶能够催化双链 DNA 的断裂，产生限制性片段。整个基因组可切成许多片段，通过凝胶电泳将这些片段分离。然后用能够与目的基因特异结合的探针分别与这些 DNA 片段进行分子杂交，能够与探针杂交的 DNA 片段就是目的基因。探针可以是目的基因所对应的 mRNA；或 mRNA 反转录获得的 cDNA；或者利用目的基因表达产物的氨基酸序列，根据三联体密码学说推断的碱基序列，通过化学方法合成的一段寡聚脱氧核糖核苷酸。

(二) 载体

外源 DNA 片段 (目的基因) 要进入受体细胞，必须有一个适当的运载工具将带入细胞内，并载着外源 DNA 一起进行复制与表达，这种运载工具称为载体 (vector)。

1. 载体必须具备下列条件：

(1) 在受体细胞中，载体可以独立地进行复制。所以载体本身必须是一个复制单位，称复制子 (replicon)，具有复制起点。而且插入外源 DNA 后不会影响载体本身复制的能力。

(2) 易于鉴定、筛选。也就是说，容易将带有外源 DNA 的重组体与不带外源 DNA 的载体区别开来。

(3) 易于引入受体细胞。

2. 常用的载体

常用的载体主要有以下几类：细菌和酵母的质粒 (plasmid)，噬菌体如 噬菌体和 M13 以及病毒。

(1) 质粒是一种在细菌染色体以外的遗传单元，根据染色体对质粒复制的控制程度是否严格，可以将质粒分成松弛型控制 (relaxed control) 质粒和严紧型控制 (stringent control) 质粒。前一类质粒的复制并不严格地受宿主细胞染色体复制过程的控制。这类质粒可以独立进行复制，所以它的拷贝数也较多，每个细胞可含 10~20 个拷贝。当加入蛋白质合成抑制物如氯霉素时，拷贝数可以大大增加，每个细胞可含数千个拷贝。所以这

类质粒可以用作载体。但是，目前用于基因工程的质粒大多数是经过人工改造过的，因为除了有自我复制能力外，还必须有某种限制性内切酶的单一切点，以供外源 DNA 的插入，并且插入后不致于影响质粒自身的复制能力。

最常用的质粒是大肠杆菌质粒 pBR322 (图 10-21) 及其衍生质粒。

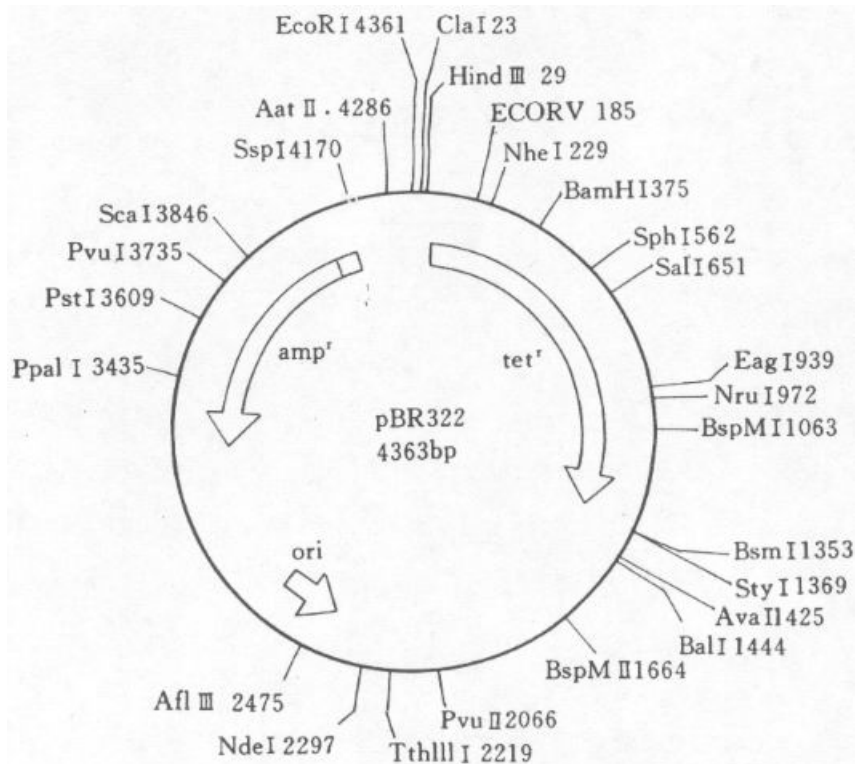


图 10-21 质粒 pBR322

pBR322 质粒是环形双链 DNA，由 4 363bp 组成。具有一个复制起点 (ori) 和一个抗氨苄青霉素 (amp^r) 及一个抗四环素基因 (tet^r)，所以非常便于筛选。EcoRI、PstI、HindIII、BamHI、SalI 等限制酶在 pBR322 上都只有一个切点，而且，BamHI，Hind III 和 SalI 的切点位于抗四环素基因上，PstI 切点位于抗氨苄青霉素基因上，在这些位点如插入外源 DNA 片段后，相应的抗菌素的基因被破坏，宿主细胞就失去相应的抗菌性，致使在含在该种抗菌素的培养基上不能生长，利用插入抑制，很易将带有外源 DNA 的重组体筛选出来。

除了大肠杆菌质粒外，枯草杆菌也有质粒可用作以枯草杆菌为受体菌的 DNA 重组工作。酵母中也有质粒，常见的是 zu 环形 DNA 称为 (zuDNA)，可用作真核细胞外源基因表达的载体。

(2) 噬菌体是细菌病毒，可独立复制，用作载体的主要有 噬菌体和 M13 噬菌体。

噬菌体是大肠杆菌中的一种噬菌体，为 50 000bp 左右的 DNA，两端有 12 个核苷酸组成的粘性末端。在整个 噬菌体基因组中，有很大一部分 DNA 序列对于噬菌体的感染性

来说并不是必需的。因此可以用外源 DNA 取代这部分 DNA，噬菌体作为载体的优点是易于使宿主细胞感染，携带外源 DNA 一起增殖。M13 噬菌体含有单链 (+) DNA，当它感染大肠杆菌时，此正链 DNA 经复制而形成双链 (+-) 复制型 (RF) DNA。RF 型 DNA 可用作载体。

(三) 连接

外源 DNA 与载体 DNA 之间可以通过多种方式相连接，例如：粘性末端连接形成重组体。许多限制性内切酶并不是齐头切割 DNA 双链形成一段末端 DNA 单链，称为粘性末端。先用某一种限制性内切酶切割外源 DNA，并用凝胶电泳将拟插入的那个片段分离出来。再用同一种酶去切割载体 DNA (应该是单一切点) 使外源 DNA 和载体 DNA 具有互补的粘性末端，它们可以通过粘性末端彼此连接起来。催化双链 DNA 之间连接反应的酶是 DNA 连接酶 (DNA ligase)，实验室中常用的是噬菌体 T₄ DNA 连接酶 (图 10-22)。此外还可以用平头末端连接；在 DNA 片段末端加上均聚寡核苷后连接；用接头 (adapter) 连接等方法产生重组体。

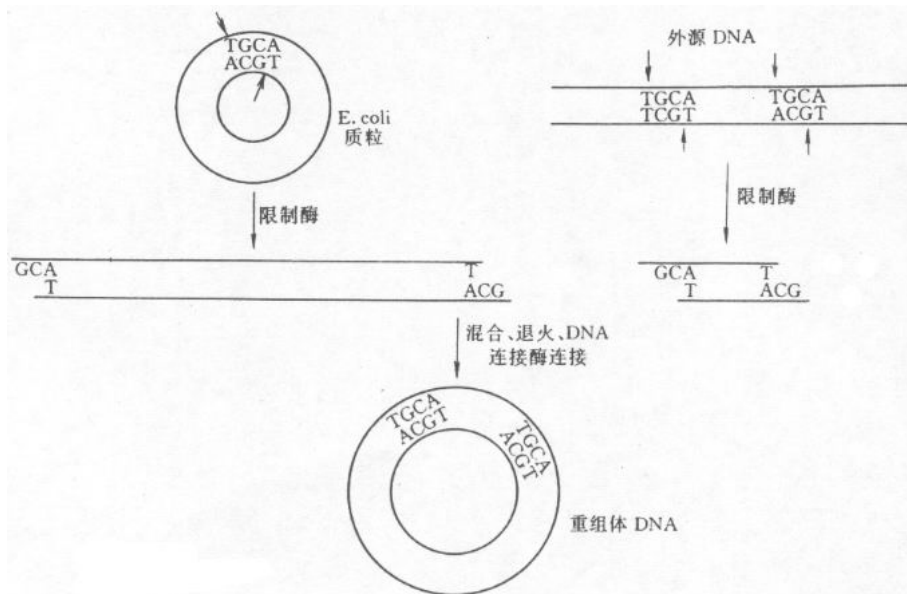


图 10-22 粘性末端连接

(四) 转化

任何外源 DNA 重组到载体上，然后转入受体细胞中复制繁殖，这一过程称为 DNA 的克隆 (DNA cloning)。许多细菌细胞和真核细胞都可以从环境中吸入 DNA 分子，但吸入的频率极低，约为 $1/10^6$ 。现在已经知道可以用一定浓度的 Ca^{2+} 处理细胞，使细胞变得容易吸收外源 DNA。外源 DNA 进入受体细胞并使它获得新遗传特性的过程称为转化。所以转化作用是将外源 DNA 引入细胞的过程。最常用的大肠杆菌受体菌为 HB101。

噬菌体很易感染宿主细胞，所以携带有外源 DNA 的噬菌体可以通过感染而将外源 DNA 带入受体菌。也可以用动物病毒作载体将重组 DNA 带入动物细胞，用 Ti 质粒作

载体将重组 DNA 带入植物细胞。也可以用微量注射器将重组 DNA 注射到培养细胞的核内。所用注射器针头的直径很小，为 0.1~0.5 μm 。一个熟练的核技术人员，每小时可以注射 500~1 000 个细胞，成功率为 50%左右。

在植物细胞的基因工程中，可以用高频电流处理细胞，使细胞膜出现瞬时的裂口，以使外源 DNA 乘机进入。

(五) 筛选

由于细胞转化的频率较低，所以从大量的宿主细胞中筛选出带有重组体的细胞并不是很容易的，当前，在实验室中，常用的筛选手段有以下几种：

1. 插入失活

这种方法在前面介绍载体时已谈到了，这里不再重复。利用这种方法，可以轻易地将大量没有插入外源 DNA 的细菌筛选掉。

2. 菌落原位杂交

这是一种十分灵敏而且快速的方法。其大致步骤如下。将生长在平碟上的菌落转移到硝酸纤维素滤膜(nitrocellulose filter)上，然后用 NaOH 处理膜上的菌落，使菌落裂解，DNA 变性，中和后用蛋白水解酶处理，淋洗，DNA 吸附到纤维素膜上。将膜在 80 烘干 4~5h ,使 DNA 牢固地吸附在膜上。将纤维素膜与 ^{32}P 标记的探针在杂交管内进行杂交。杂交一般要持续一个晚上，然后用一定离子强度的溶液将非专一的结合的，仅仅是吸附在膜上的放射性物质除去，再烘干纤维素膜，进行放射自显影。从显影后的底片上，可以显示出曝光的黑点，即代表杂交上的菌落。全部过程如图 10-23 所示。再按底片上菌落的位置找出培养基上相应的菌落，将它扩大培养后制备出质粒 DNA，作进一步分析。这些分析包括：插入 DNA 的长度，限制酶图谱，甚至 DNA 序列等等。噬菌体在平碟培养基上所产生的噬菌斑也可以用上述类似的方法进行原位杂交加以筛选。

3. 免疫学方法

如果插入的外源 DNA 经表达后产生蛋白质，亦可以用免疫学的方法加以筛选。固体培养基上由菌落产生的蛋白质，可以转移到硝酸纤维素膜上。然后用相应的放射性标记的抗体(一般用 ^{125}I 标记) 进行反应，洗去非特异性吸附的放射性后，用放射自显影显示结果。

此外，对重组体转化的鉴定还可以采用表现型的鉴定；对重组质粒纯化并重新转化；限制性酶切图谱的绘制；重组质粒上的基因定位等更深入的方法。

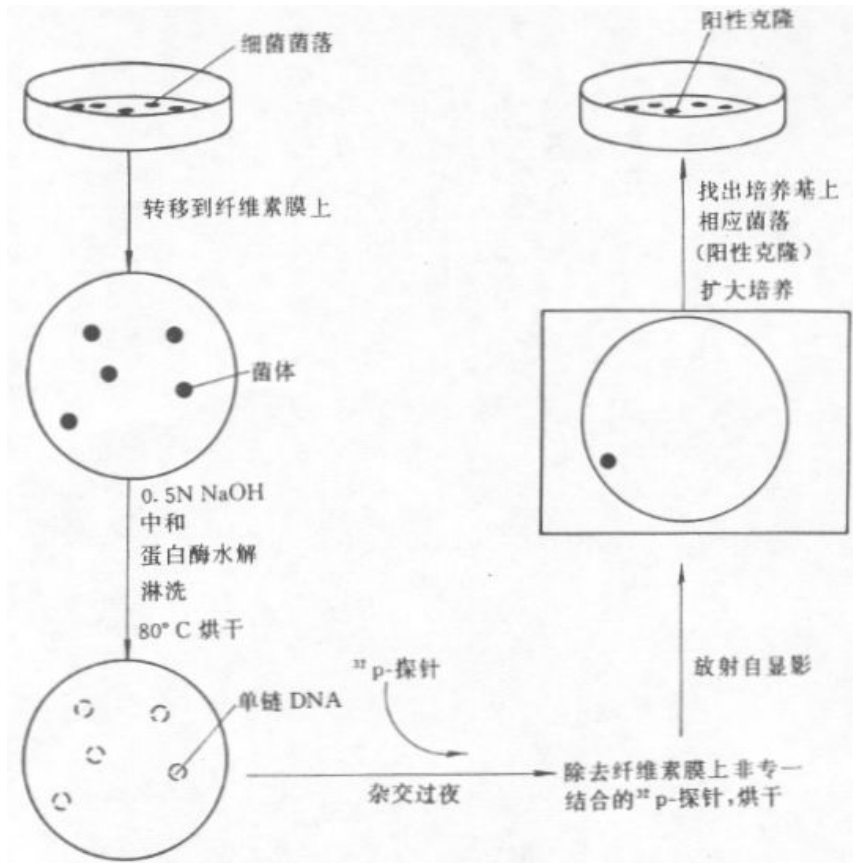


图 10-23 原位杂交法筛选 DNA 重组体图解

三、DNA 的固相合成

随着基因工程的发展，定向地修改、设计生物基因组的日子已经到来了。快速的合成 DNA 片段的方法又是一个为生物化学发展铺平道路的研究技术。核酸化学合成的方法（亚磷酸三酯法）最初是由 H.Gobind Khorana 在 20 世纪 70 年代发明的。目前市场上已有完全自动化的固相合成 DNA 片段的仪器出售。这种仪器可以在几小时或一天内合成出长度为几十个核苷酸或 100 多个核苷酸的 DNA 片段，供实验室应用。

DNA 固相合成的原理如下：全部反应是在一个不大的固相柱子中进行的。首先要将待活化的核苷酸上的某些游离基团保护（封闭）起来，使反应按设计的方向进行。5'-OH 用二对甲氧三苯甲基（dimethoxytrityl, DMT）保护，碱基上的氨基用苯甲酸保护。然后对 3'-OH 则用氨基磷酸化合物（phosphoramidite）进行活化。从图 3-36 中可见：第一个核苷酸的 3'-OH 与固相（树脂）结合在一起，它的 5'-OH 与活化的单体（核苷酸）之间形成一个亚磷酸三酯，活化单体上的 5'-OH 及碱环上的氨基等由于受到保护而不会参与反应。在第二步反应中，亚磷酸三酯经碘氧化形成磷酸三酯；第三步反应中，加入二氯乙酸除去生长链中的 5'-OH 上的保护剂 DMT。至此，DNA 链已延伸了一个核苷酸单位，

并可投入下一轮延伸反应。按事先输入的程序，整个 DNA 片段合成完毕后，用苯硫酚（thiophenol）除去 5'-OH 上的保护剂 DMT，用浓氢氧化铵将 DNA 片段与固相树脂断开，使 DNA 得以洗脱下来。再用浓氢氧化铵在加热条件下使碱基上的保护剂除去。最后除去氢氧化铵，在真空中抽干。样品即可溶于适量水中进行分析。由于合成反应不可能都是完全达到终点的，所获得的 DNA 片段长短不一。可用液相色谱，或用聚丙烯酰胺凝胶电泳进行纯化，收集最大部分的分子（见图 10-24）。

四、PCR 技术

聚合链式反应（Polymerase Chain Reaction），即 PCR 技术，是一种在体外快速扩增特定基因或 DNA 序列的方法，故又称为基因的体外扩增法。这种技术是由美国 Cetus 公司人类遗传研究室的科学家 K. B. Mullis 于 1983 年发明的。它可以在试管中建立反应，经数小时之后，就能将极微量的目的基因或某一特定的 DNA 片段扩增数十万倍，乃至千百万倍，从而获得足够数量的精确的 DNA 拷贝。PCR 技术操作简单，容易掌握，结果也较为可靠，为基因的分析与研究提供了一种强有力的手段，对整个生命科学的研究与发展都有着深远的影响。现在，PCR 技术不仅可以用来扩增与分离目的基因，而且在农业分子辅助育种、临床医学诊断、基因突变与检测、以及法医鉴定等诸多领域都有着重要的用途。

PCR 技术的原理与细胞内发生的 DNA 复制过程十分类似。首先是双链 DNA 分子在高温下加热时分离成两条单链 DNA 分子，然后 DNA 聚合酶以单链 DNA 为模板并利用反应混合物中的 4 种脱氧核苷三磷酸（dNTPs）合成新生的 DNA 互补链。

当 PCR 反应体系中存在分别与两条链互补的引物时，两条单链 DNA 都可作为模板合成新生互补链。并且每一条新生链的合成都是从引物的退火结合位点开始，并沿着相反链延伸，这样在每一条新合成的 DNA 链上都具有新的引物结合位点。然后反应混合物经再次加热使新、旧两条链分开，并加入下轮的反应循环。经 n 次循环之后，反应

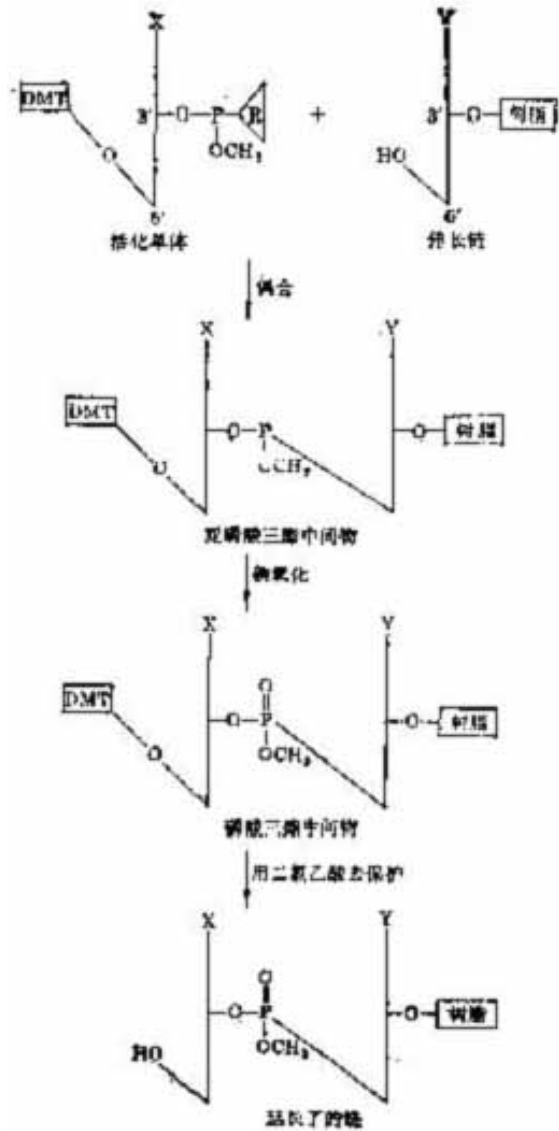


图 10-24 DNA 固相合成

混合物中所含有的双链 DNA 分子数，即两条引物结合位点之间的 DNA 区段的拷贝数，理论上的最高值应是 2^n 。可见，PCR 反应涉及多次重复进行的温度循环周期，而每一个温度循环周期均是由高温变性、低温退火及适温延伸等 3 个步骤组成。

PCR 技术具有指导特定的微量 DNA 序列得以迅速大量扩增的特点，这就意味着分子生物学分析现在已可应用于只含有痕量 DNA 的样品，包括一撮头发、血迹等，这对于法医学具有特别的应用价值。

近年来在 PCR 技术的基础上，人们已经建立了若干种分离与克隆发育基因的新方法。如 P, Liang 和 A. Pardee (1992) 首次提出并运用了 mRNA 差别显示技术 (mRNA differential display of reverse transcriptional PCR, DDRT-PCR) 来进行基因的分离。现在又发展出代表性差别分析 (Representational difference analysis, RDA) 和抑制性减法杂交 (Suppression subtractive hybridization, SSH) 等一些更新的方法，推进了现代的核酸研究进入以功能研究为主的基因组时代。

五、基因工程的应用与展望

基因工程是现代生物科学的一个巨大成就，引起人们的极大重视，在工农业生产、医学领域的应用上有着广阔的前景。

基因工程首先在医药工业上被广泛应用，开发新药的研究也很活跃，远景令人鼓舞。1977 年美国科学家成功地将合生长素释放抑制因子的基因移殖到大肠杆菌中，使细菌合成这种激素。1978 年已将人工合成的胰岛素基因转移到大肠杆菌中，从而制造出人的胰岛素，这就可以改变医用胰岛素从家畜胰脏提取的产量少、价格贵的状况。1980 年，在美国、比利时、瑞士也已成功地用基因工程方法生产出干扰素，干扰素不仅可以治疗一些病毒性疾病，而且还有抑制细胞增殖及调节免疫的作用，因而具有抗癌作用。干扰素不仅具有抗菌作用，而且对损伤 DNA 的修复也有重要作用。如果从白血球中提取干扰素数量极微，成本高，用基因工程可生产廉价的干扰素。目前，利用基因工程方法生产并投放市场的多肽、蛋白质类药物除了胰岛素、干扰素之外，还有生长激素释放抑制因子、人生长激素、猪（牛或鸡）的生长激素、促红细胞生长激素、松弛素等等。已成功的或正在研制的基因工程疫苗有乙型肝炎病毒、口蹄疫病毒、疱疹病毒、狂犬病毒和小儿麻痹病毒等疫苗。此外基因工程还可用于制备各种人血浆蛋白，提高酶制剂，氨基酸和抗生素的产量。在农业上科学家们踊跃探索利用基因工程培育新品种的可能性。目前许多国家正在开展利用基因重组技术，把根瘤菌的固氮基因转移到水稻等植物中，培育不需高氮肥的作物新品种的研究。1981 年，美国威斯康星大学的 Holl 等人又把菜豆的基因转移到向日葵细胞中，培育出新的“向日葵豆”。不仅如此，日本农林水产食品综合研究所还从大豆中分离出产生大豆蛋白的基因，并把它转移到大肠杆菌中，该大肠杆菌成功地生产出微量的大豆蛋白。联邦德国的 Schell 把某种蛋白质的基因引入烟草中，得到能制造蛋白质的烟草，而且这种性状能够遗传给后代。这些成果证明用基因工程改良植物品种是可能的。这些事实都展现出基因工程为作物育种及解决粮食问题的前景。

最近有人把大鼠的生长素基因转移到小鼠的受精卵精细胞内，出生后发育成新型小鼠，其生长速度比原来的小鼠的受精卵细胞内，出生后发育成新型小鼠，其生长速度比原来的小鼠快 50%，体重也比对照的重得多，因此把这种新型小鼠称为超级小鼠。如果我们能把类似的方法应用到家畜培育中，将具有重要的生产价值。

总之，基因工程的研究成果将变成巨大的生产力。它能迅速提高农业和畜牧业的产量，为人医和畜医提供更好的药物，以及解决许多生物学中的重大问题。

主要参考文献

- [1] 沈同，王镜岩主编．生物化学（下）．北京：高等教育出版社，1991
- [2] 阎龙飞，张玉麟主编．分子生物学．北京：北京农业大学出版社，1993
- [3] 孙乃恩，孙东旭，朱德煦编著．分子遗传学．南京：南京大学出版社，1990
- [4] Marians, K. J. Prokaryotic DNA replication. *Ann. Rev. Biochem.* 1992, 61:673-719

迟乃玉，钟鸣

| | |
|--------------------|-----|
| 第十章 核酸的生物合成 | 293 |
| 第一节 DNA 的生物合成..... | 294 |
| 一、半保留复制 | 294 |
| 二、逆向转录 | 306 |
| 三、DNA 突变..... | 306 |
| 四、DNA 损伤与修复..... | 307 |
| 第二节 RNA 的生物合成..... | 312 |
| 一、DNA 的转录..... | 312 |
| 二、转录后加工 | 316 |
| 三、RNA 的复制..... | 317 |
| 第三节 基因工程简介 | 318 |
| 一、基因工程的概念 | 318 |
| 二、基因工程的操作技术 | 319 |
| 三、DNA 的固相合成..... | 323 |
| 四、PCR 技术..... | 324 |
| 五、基因工程的应用与展望 | 325 |