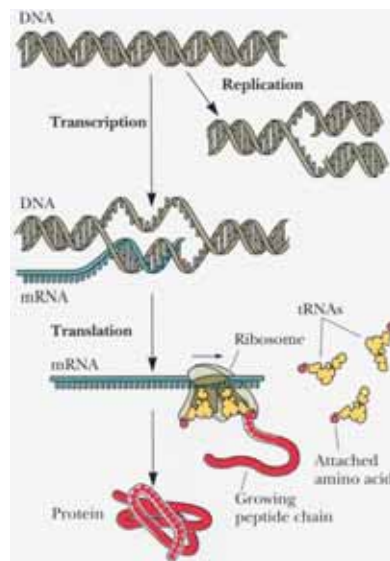


### 第三章 核苷酸和核酸

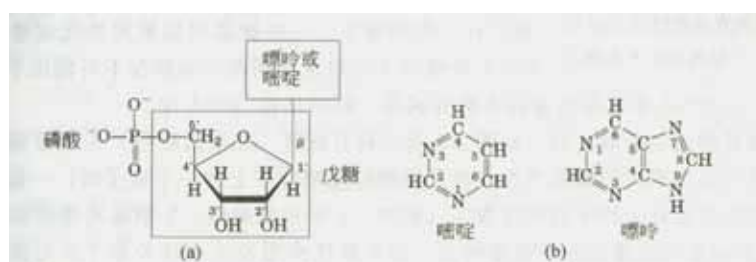
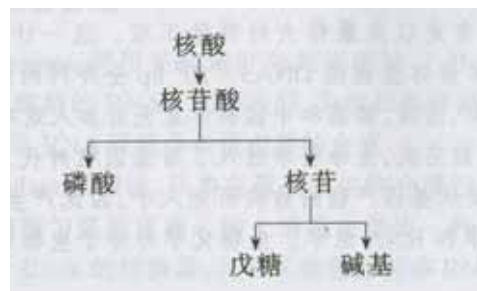
核酸： 是一类重要的生物大分子，是生物遗传物质。生物体中的各种蛋白质，乃至细胞的每种组分都是核酸顺序编码的信息产物。核酸包括 DNA 和 RNA ( mRNA, tRNA, rRNA ) 两大类

核苷酸：是核酸的组成单位，是能量代谢转换过程中“货币”



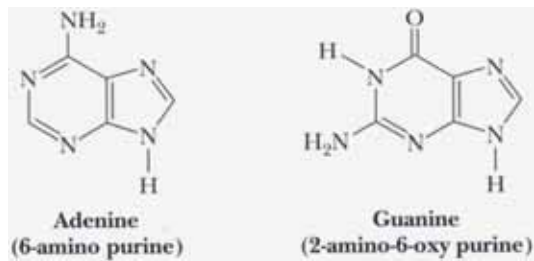
### 第一节 碱基、核苷和核苷酸

#### 一. 碱基、核苷和核苷酸的结构与种类

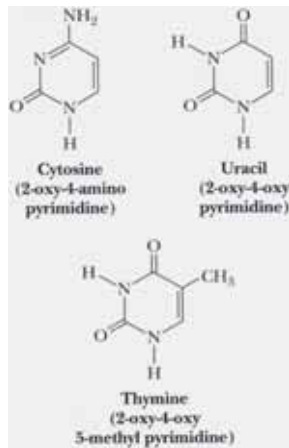


## 1. 碱基的结构和种类

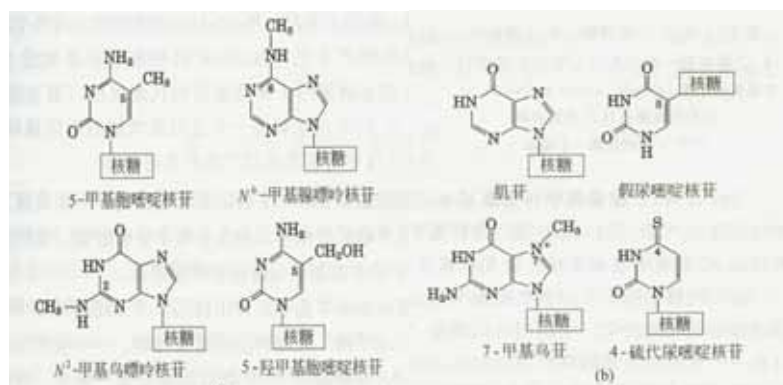
(1) 嘌呤碱：腺嘌呤 (Adenine)、鸟嘌呤 (Guanine)



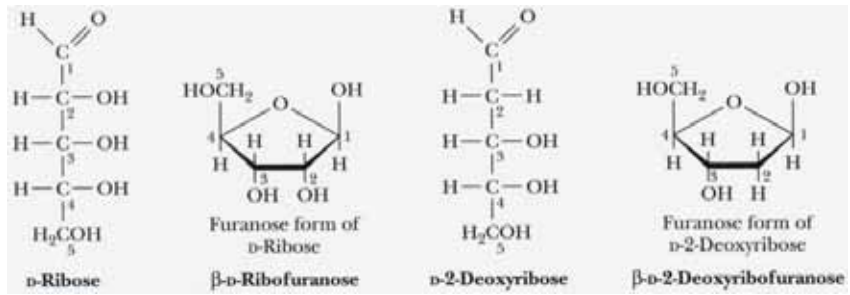
(2) 嘧啶碱：胞嘧啶 (Cytosine)、尿嘧啶 (Uracil)、胸腺嘧啶 (Thymine)



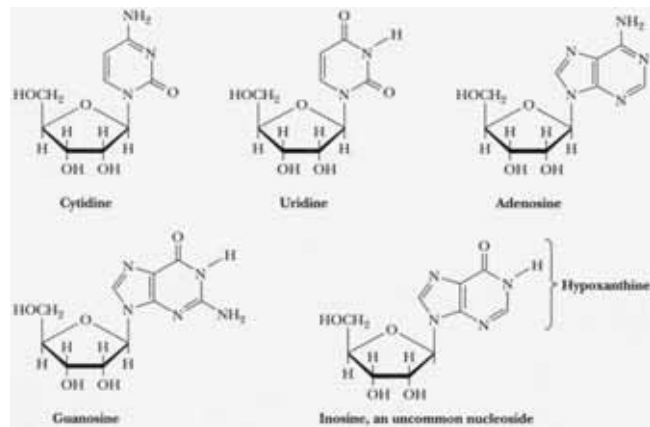
(3) 一些稀有碱基



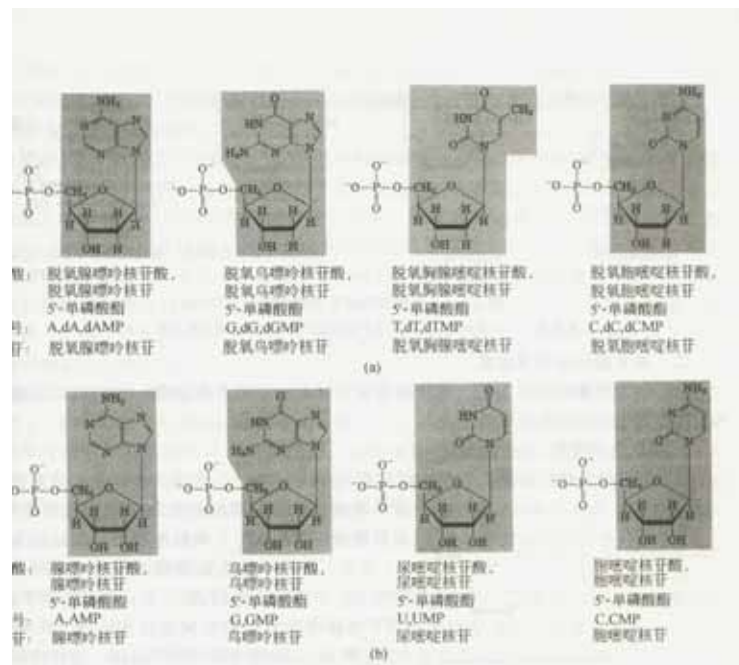
2. 核糖的结构和种类



### 3. 核苷的结构及主要核苷

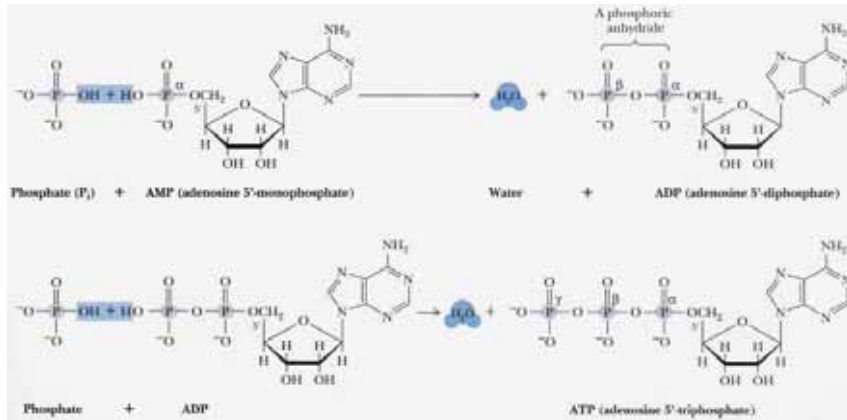


### 4. 核苷酸的结构

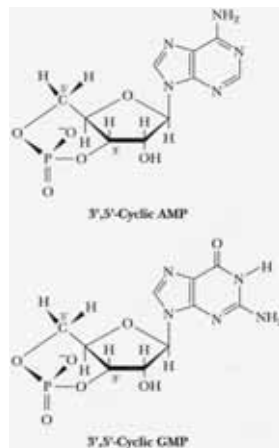


## 二. 核苷酸的生物学功能

1. 细胞中的携能核苷酸：ATP 和 ADP (GTP、GDP、CTP、CDP、UTP、UDP)



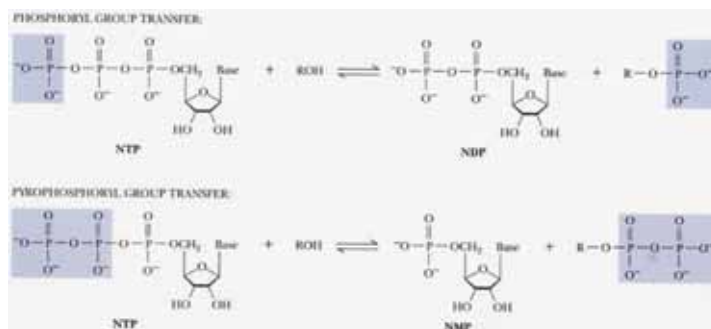
2. 一些核苷酸是细胞通讯的媒介(第二信使分子)：cAMP, cGMP



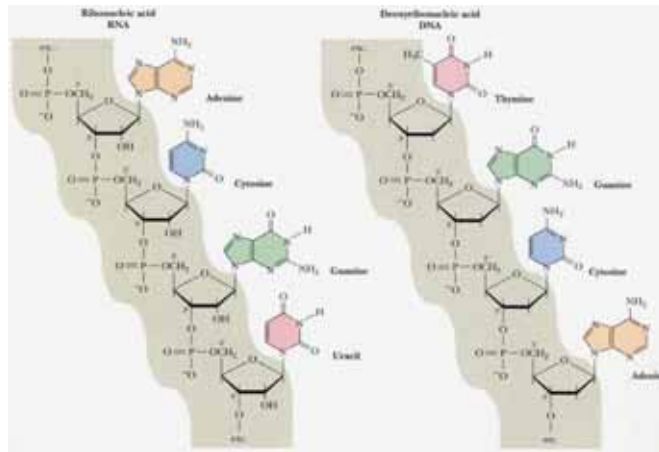
3. 核苷酸是许多酶辅助因子的结构成分

第二节 磷酸二酯键与多核苷酸

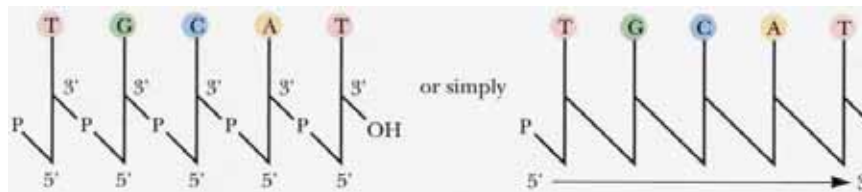
1. 核苷酸磷酸基团的转移



2. 多核苷酸的合成

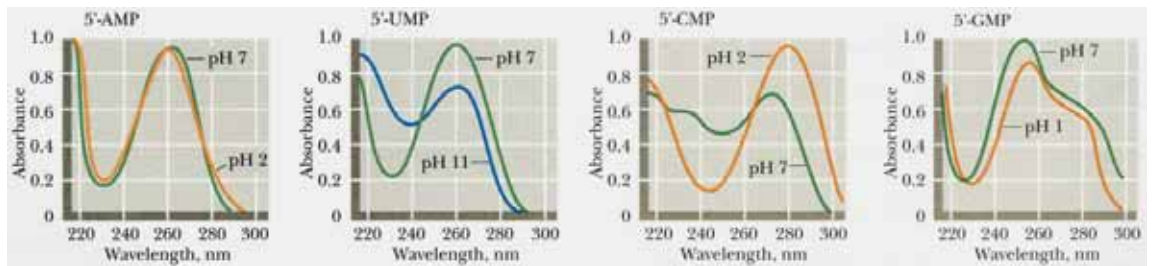


### 3. 多核苷酸链的简单表示

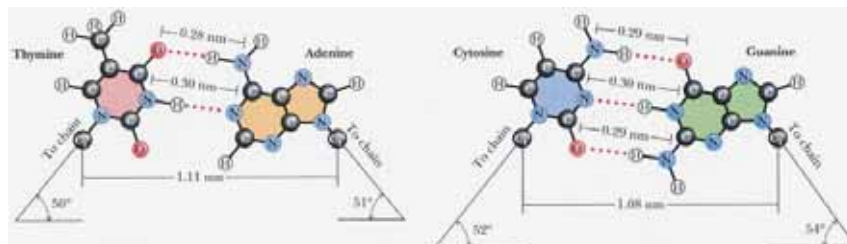


## 第三节 碱基的性质影响核酸的结构

### 1. 核苷酸的紫外光吸收性质



### 2. 氢键的形成

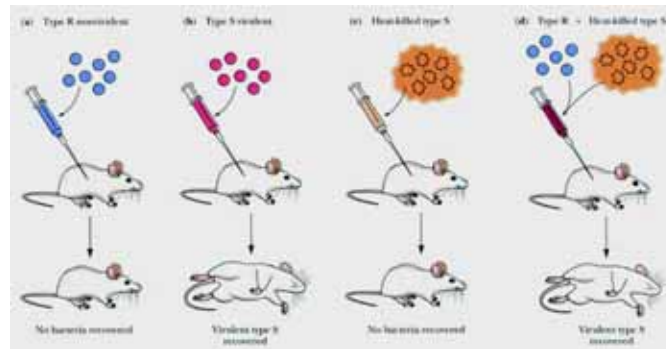


Watson Crick 1953 年确定 A—T(U), C—G 间形成氢键

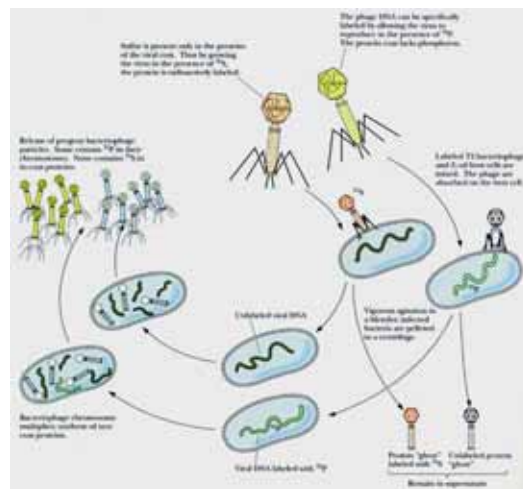
## 第四节 DNA 的结构

### 一. DNA 储存遗传信息的证实

1. 1928 年 Frederick Griffith 和 1944 年 O. Avery 等的有毒肺炎双球菌转化实验



2. 1952 年 Hershey and Chase 细菌病毒 T2 (噬菌体) 标记实验



### 二 各物种 DNA 有着独特的碱基组成

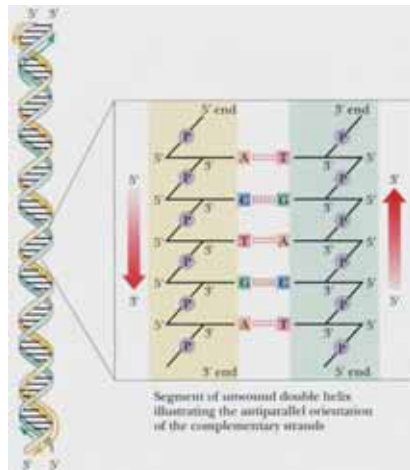
DNA 结构有关重要线索来自 Chargaff 等的研究结果：

1. 不同物种 DNA 碱基组成一般不同
2. 同一物种不同组织 DNA 碱基组成相同
3. DNA 碱基组成不因个体年龄、营养、环境而改变

4. 任何 DNA 的嘌呤残基总数等于嘧啶残基的总数

$$[A]=[T] \quad [G]=[C] \quad [A]+[T]=[G]+[C] \quad \text{Chargaff 规则}$$

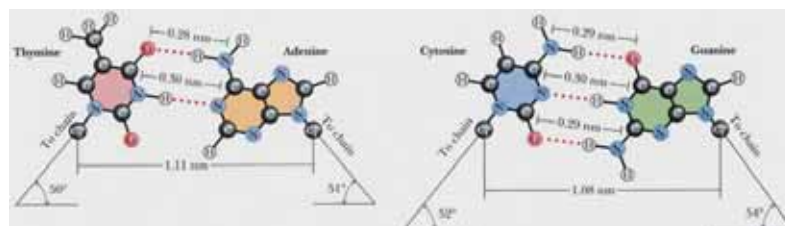
### 三. Watson-Crick DNA 双螺旋结构(1953)



#### DNA 双螺旋结构的特点

1. 两条 DNA 链围绕同一中心轴缠绕形成右手双螺旋
2. 两条 DNA 链反向互补平行，亲水性主链位于螺旋的外侧。
3. 两条链的嘌呤嘧啶具有疏水性，有近乎平面的结构，它们相互贴近，堆积在双螺旋的内部并垂直于螺旋轴。
4. 维持 DNA 双螺旋结构的力是互补碱基对形成的氢键 (A=T C G) 和碱基堆积力 (疏水作用和范德华力)
5. 一个螺旋( $360^\circ$ )含 10 个碱基对 (10.5)，每个螺旋 3.4 nm

#### Watson Crick 的碱基对 A:T 和 C:G

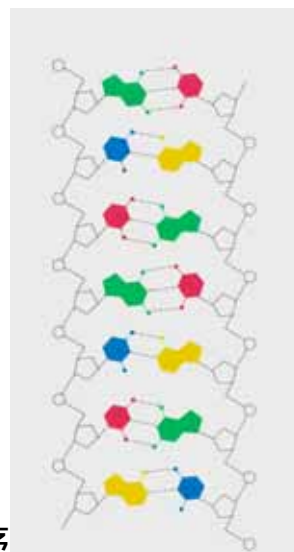


6. 由于两条链间的空间关系，DNA 产生一条大沟和一条小沟

7. 两条 DNA 链的互补性可以进行互补的子代链的合成

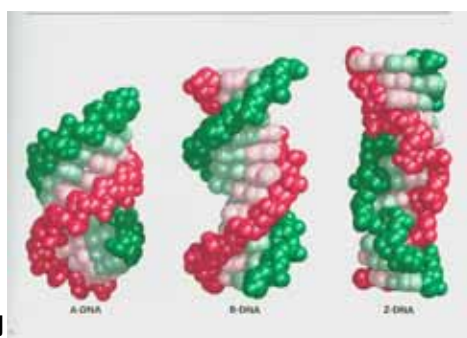


#### 四. DNA 的结构



1. DNA 的一级结构：核苷酸的顺序

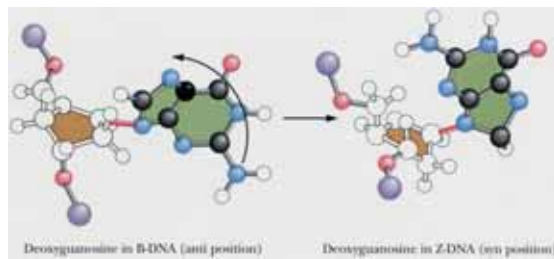
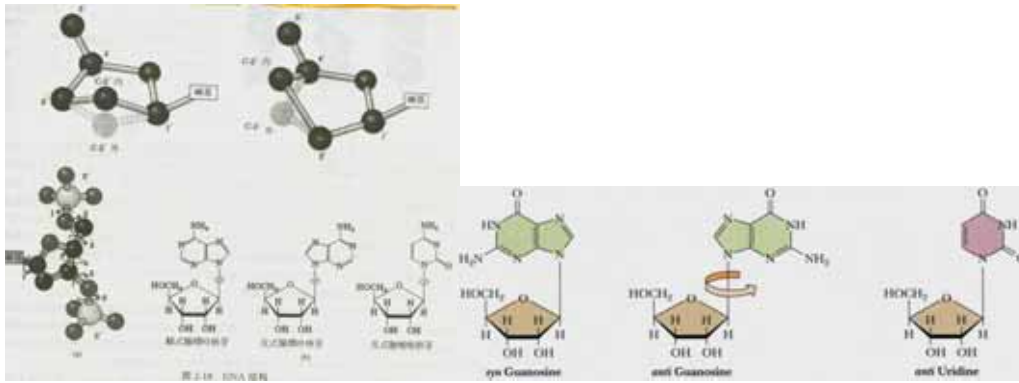
2. DNA 的二级结构：A 型、B 型、Z 型



(1) A, B, Z 模型



## (2) 三种二级结构形成的原因

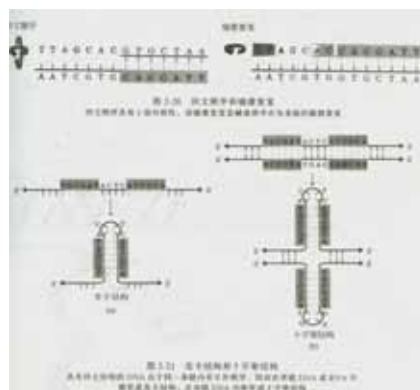


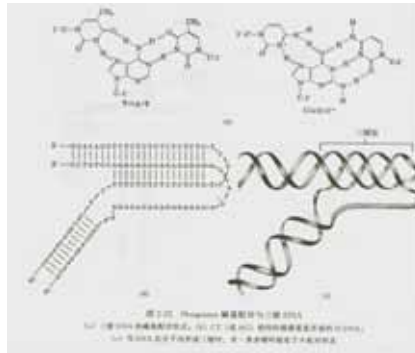
## (3) 三种二级结构的比较

表 13-6 A 型、B 型和 Z 型 DNA 的比较

	螺旋类型		
	A	B	Z
外形	粗短	适中	细长
螺旋方向	右手	右手	左手
螺旋直径	2.55 nm	2.37 nm	1.84 nm
碱基轴升	0.23 nm	0.34 nm	0.38 nm
碱基夹角	32.7°	34.6°	60° <sup>(1)</sup>
每圈碱基数	11	10.4	12
螺距	2.46 nm	3.32 nm	4.56 nm
轴心与碱基对的关系	不穿过碱基对	穿过碱基对	不穿过碱基对
碱基倾角	19°	1°	9°
糖环折叠	C <sub>2</sub> 内式	C <sub>2</sub> 内式	唯唯 C <sub>2</sub> 内式, 唯唯 C <sub>3'</sub> 内式
糖苷键构象	反式	反式	C, T 反式, G 顺式
大沟	很狭、很深	很宽、较深	平坦
小沟	很宽、浅	狭、深	较狭、很深

## (4) 特殊的二级结构 A. 回文结构和镜像重复

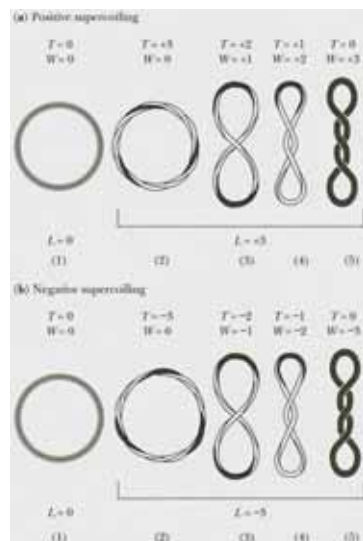




## B. H-DNA

### 3. DNA 的三级结构：

DNA 的三级结构是指 DNA 分子(双螺旋)通过扭曲和折叠所形成的特定构象,包括不同二级结构单元间的相互作用、单链与二级结构单元间的相互作用以及 DNA 的拓扑特征。超螺旋结构是三级结构的一种。



## 第五节 RNA 的种类和结构

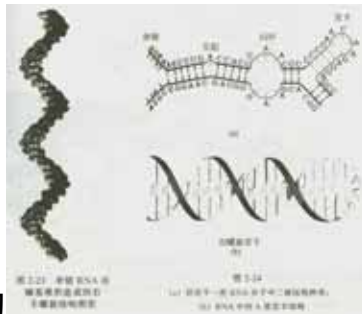
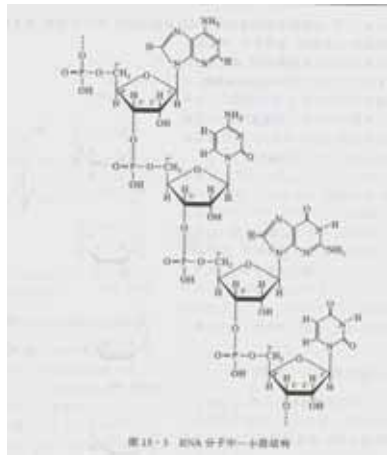
### 一. RNA 的种类

1. 核糖体 RNA ( ribosome RNAs ,rRNAs ): 是核糖体的结构成分。核糖体作为 RNA 和蛋白质的复合物负责细胞内蛋白质的合成,是蛋白质合成的场所。

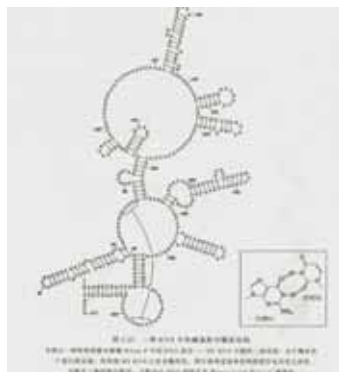
2. 信息 RNA(messenger RNAs , mRNAs) :是携带一个或几个基因信息到核糖体的核酸 , 它们指导蛋白质的合成。
3. 转移 RNA ( transfer RNAs, tRNAs ) : 是把 mRNA 的信息准确地翻译成蛋白质中氨基酸顺序并将这些氨基酸准确转移至核糖体。

## 二 . RNA 的结构

### 1 . RNA 的一级结构 :



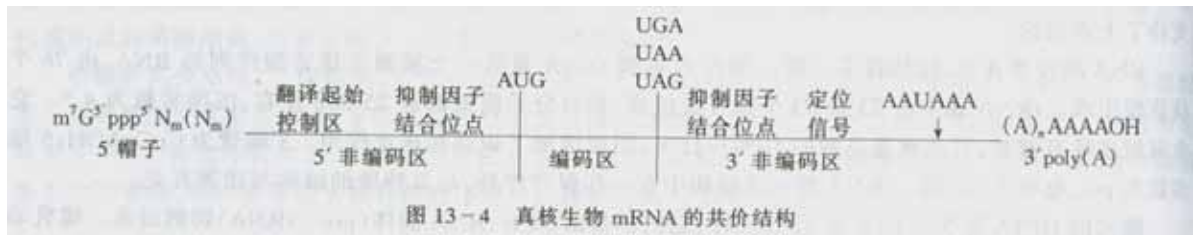
### 2. RNA 的高级结构



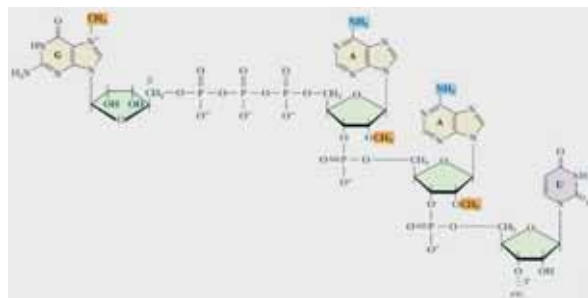
### 3 . mRNA、 tRNA 和 rRNA 的结构特征

## (1) mRNA 的结构特征

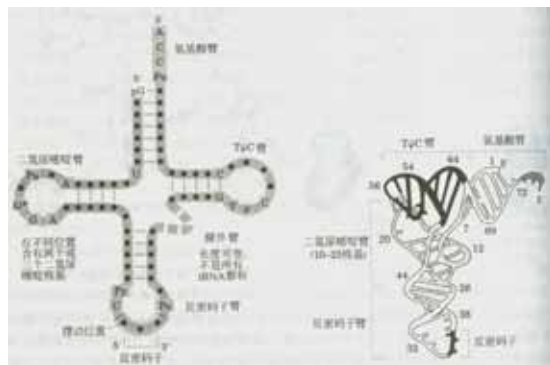
### mRNA 的一级结构



mRNA的帽子结构 I:  $m^7G^{5'} ppp^{5'} NmpNp$ ; II:  $m^7G^{5'} ppp^{5'} NmpNmpNp$



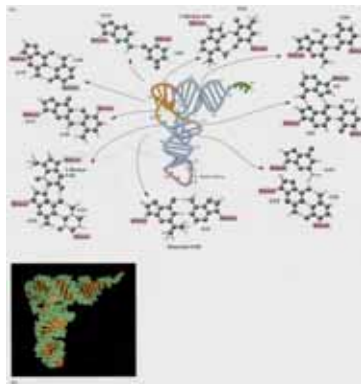
## (2) tRNA 的结构特征



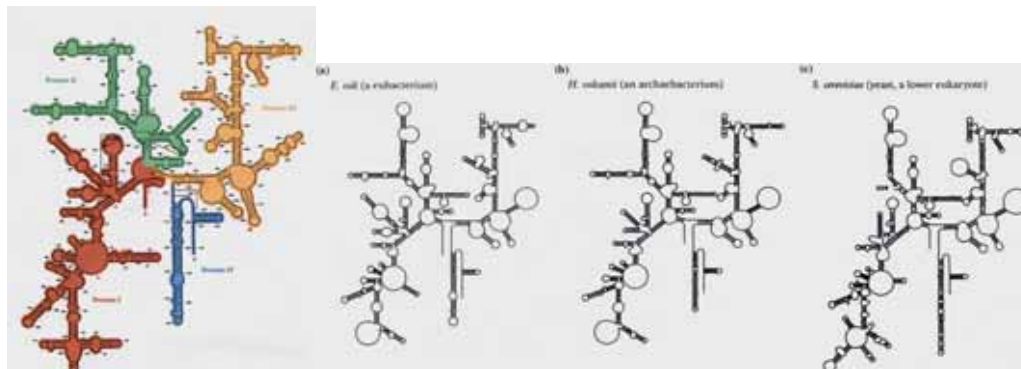
- tRNA 一般含有 73-94 核苷酸，单链，主要以氢键连接。
- 一种氨基酸一个 tRNA，有的二个或更多，体内有 32 种 tRNA。
- tRNA 二级结构为典型的发卡结构，使互补链相接近形成双螺旋区，在氢键的作用下，分子呈三叶草形。
- 每分子有四个氢键区，三个环和一个臂：D 环、反密码子环、T C 环和氨基酸臂
- 所有 tRNA 有 8 个或更多修饰碱基，主要是甲基化，5' 端大多数是鸟

嘌呤核苷酸，3'端是 CCA 序列。

F. 链内碱基配对：A-U、 G-C、 G-U



### (3) rRNA 的结构特征



## 第六节 核酸的变性，复性和杂交

### 一、DNA 的变性与复性

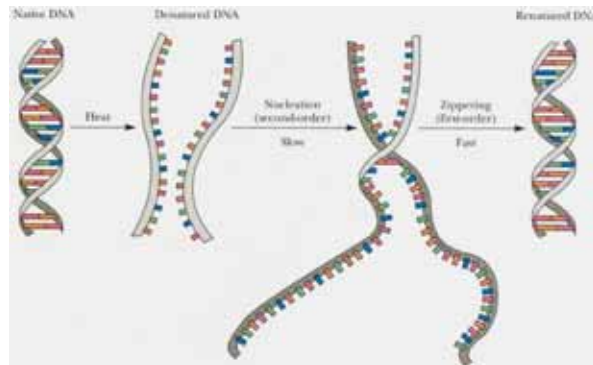
1. 变性 (denaturation)：在某些因素 (如温度、pH 等) 的影响下，DNA 双螺旋区的氢键断裂和碱基堆积力的破坏，使双链变成单链，但不发生共价键的断裂。变性 DNA 黏度降低，紫外吸收增加 (增色效应)。

2. 复性 (renature)：当变性因素消除后，变性 DNA 的两条链通过碱基配对重新形成双螺旋的过程，紫外吸收降低。

3. DNA 的淬火 (quench)：双螺旋 DNA 溶液加热变性之后，使

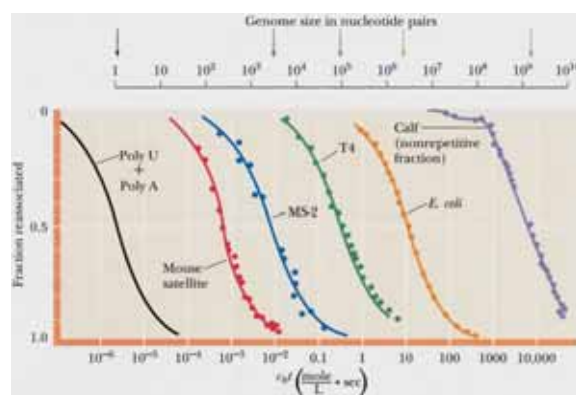
溶液的温度急速降至零度，DNA 不能复性而保持单链状态，这种冷处理过程叫做“淬火”。

4. 退火 (anneal)：变性 DNA 在缓慢冷却时，可以复性，此过程称为“退火”



## 5. DNA 复性动力学

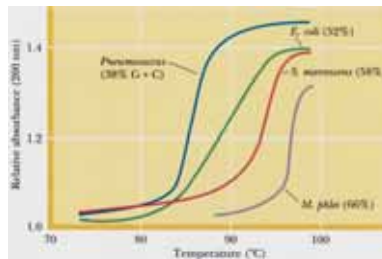
DNA 复性过程基本上符合二级反应动力学，其中第一步是缓慢的，因为两条链必须依靠随机碰撞找到一段碱基配对的部分，首先形成双螺旋。第二步快的多，尚未配对的其他部分碱基配对相结合，象拉锁链一样迅速形成双螺旋。



## 二. DNA 的熔解温度 (melting temperature $T_m$ )

DNA 在加热变性时，双螺旋结构失去一半时 (紫外吸收增加值达总

增加值一半时) 的温度 称为该 DNA 的变性温度, 也称熔点或熔解温度, 用  $T_m$  表示。DNA 的  $T_m$  值一般在 82—95 度之间, 每种 DNA 都有一个特征性的  $T_m$  值。



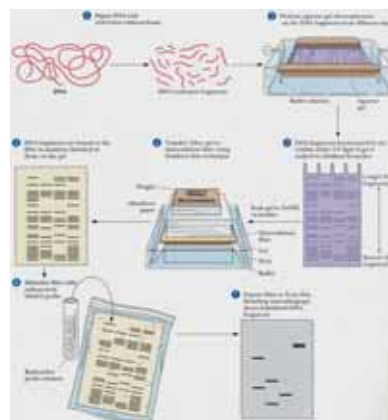
### 三 . 核酸的杂交及应用

#### 1 . 概念 :

(1) 分子杂交 (hybridization) : 不同来源的核酸链 (DNA 或 RNA), 根据它们的顺序互补性, 在“退火”之后形成双螺旋的过程。分子杂交技术广泛应用于分子生物学研究, 依靠这些技术对基因和 RNA 进行分离和鉴定。

(2) 探针 (probe) : 互补于靶基因顺序的单链 DNA 或 RNA 片段, 通常带有标记物如: 放射性同位素、荧光化合物或半抗原地高辛等, 以检测目的基因。

#### 2 . 原理 : 碱基互补

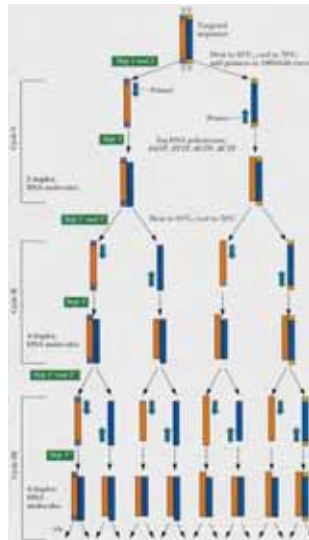


#### 3 . 方法 (Southern blotting)

4. 应用 : 生物进化研究 ; 疾病预测 ; 癌基因的检查 ( 基因芯片 ); 法医和刑侦鉴定等

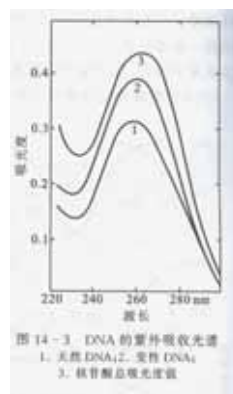
#### 四 . DNA 聚合酶链反应

聚合酶链反应 ( Polymerase chain reaction PCR ): 是一种体外扩增 DNA 的生物技术。 1984 年 Kary Mullis 在研究 DNA 聚合酶反应时发明了该技术 , 现已被最广泛应用 ( 基因克隆、 探针制备、 刑侦鉴定、 DNA 重组、 癌基因检查、 遗传病的诊断、 定位诱变、 基因改造等 )



#### 第七节 核酸的理化性质及化学反应

##### 一 . 核酸的紫外光吸收

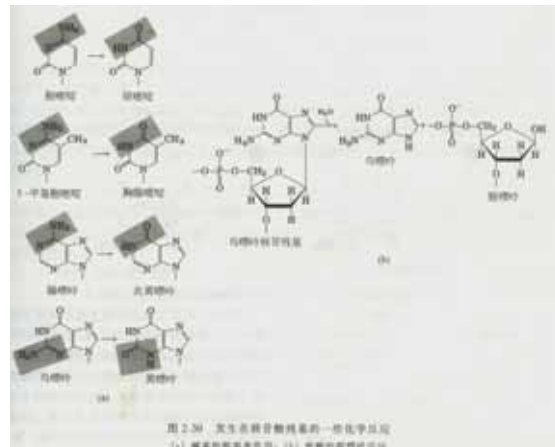


纯 DNA :  $A_{260} / A_{280}$  应大于 1.8 , 纯 RNA 该比值应达到 2.0 。对

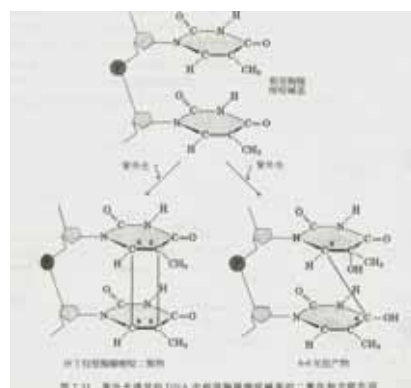
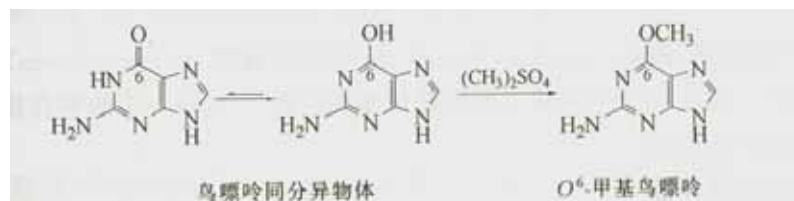


于纯样品：260 nm A值为 1 时，相当于 50  $\mu\text{g/ml}$  双链DNA，或 40  $\mu\text{g/ml}$ 单链DNA ( 或RNA )，20  $\mu\text{g/ml}$ 寡核苷酸。 DNA由双链变成单链的变性过程会导致溶液紫外光吸收的增加，此现象为增色效应。

## 二． 脱氨基作用和脱氧核苷酸的水解：



## 三． 紫外线和一些化学因子对 DNA 的损伤



## 四． DNA 的酶法甲基化

甲基化是一种非常重要的可逆共价修饰

1． 甲基供体：S—腺苷甲硫氨酸

2． 甲基受体：各种被修饰碱基

碱基的甲基化修饰不是随机的，而是限于一定的顺序或 DNA 的某一区域，在甲基化酶的作用下进行，甲基化是可逆的。

## 第八节 核酸酶和 DNA 限制性内切酶

### 一. 核酸酶

1. 定义：能水解核酸的酶为核酸酶，核酸酶都是磷酸二酯酶。

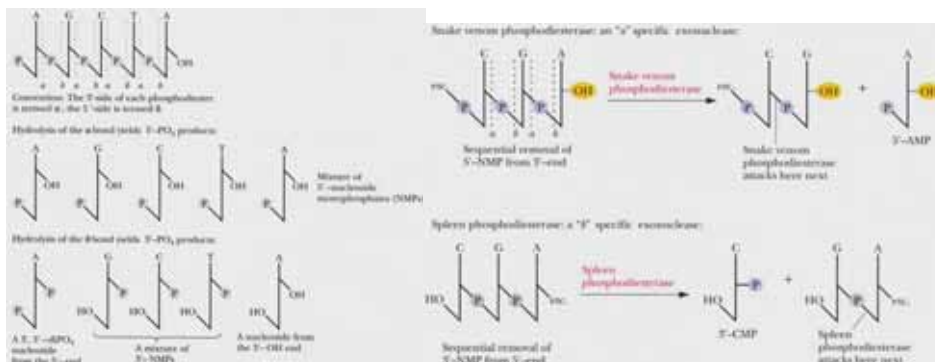
2. 分类：

(1) 按底物专一性分类：核糖核酸酶和脱氧核糖核酸酶

(2) 按作用方式分类：内切核酸酶和外切核酸酶

内切核酸酶：从核酸的内部切割核酸链，产生核酸链片段。

外切核酸酶：从核酸链的一端逐个切断磷酸二酯键，释放单核苷酸。按磷酸二酯键断裂方式：3'-核酸酶和5'-核酸酶



### 二. 限制性内切酶

限制性内切酶是从细菌中分离的一类专门识别和水解特定核苷酸序列的内切酶类。这类酶在原核生物体内，用于“防御”外来 DNA 的入侵，将外来 DNA 以独特的方式切成无感染能力的片段，而自身不受损害，这是由于存在甲基化作用。

1. 限制性内切酶的种类 (约 1000 多种)

2. 限制性内切酶图谱:

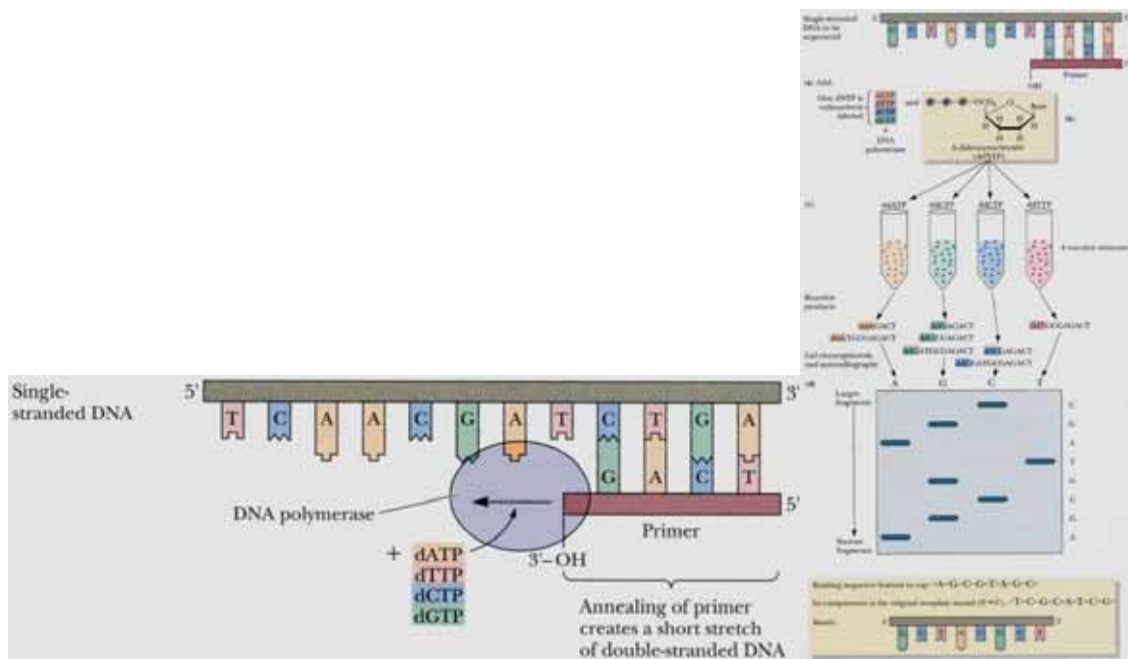
限制性图谱是各种限制性内切酶切点在某一 DNA 分子或 DNA 片段上的排列, 由于各酶切点之间的距离是以碱基对 (kbp mbp) 表示的, 所以可计算出二切点间的绝对距离, 因此限制图也称物理图。



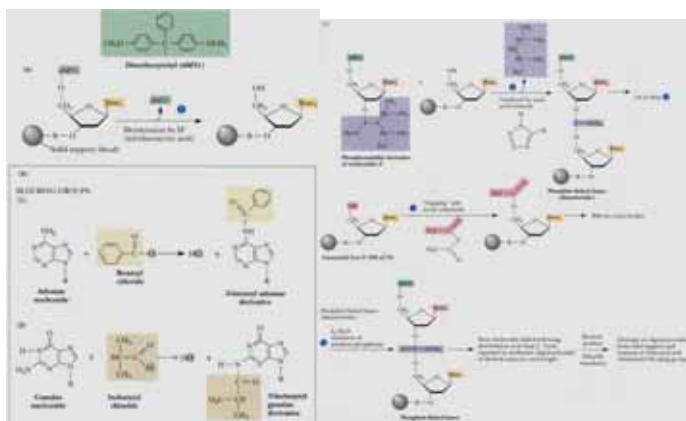
## 第九节 DNA 的一级结构的测定和化学合成

一. DNA 碱基顺序的测定 (双脱氧末端终止法 Sanger 1977)

测定方法: 建立 4 套 DNA 合成体系, 每套分别含有一种带同位素 ( $^{32}\text{P}$  或  $^{35}\text{S}$ ) 标记的 dNTP 和一种 ddNTP, 如 ddATP 或 ddGTP 或 ddCTP 或 ddTTP。由于 ddNTP 缺少 3 位羟基, 所以, 当其掺入 DNA 后, 正在合成的 DNA 就会停止。这样就会合成长短不一并带有标记的四组 DNA 片段。经电泳分离、X-片曝光后, 可读出 DNA 顺序。



## 二. DNA 的化学合成 (亚磷酸三酯法)



## 第十节 基因和基因组

### 一. 基因与基因组的基本概念

#### 1. 基因

(1) 经典生物学: 基因是决定或影响生物体某一性状或某一表现型的染色体上的某一部分。

(2) 分子水平的定义 : 基因是遗传物质上的一个片段, “基因编码一个酶” 或 “基因编码一个蛋白”

(3) 基因的生物化学定义: 基因是为各种多肽链或 RNA 顺序编码

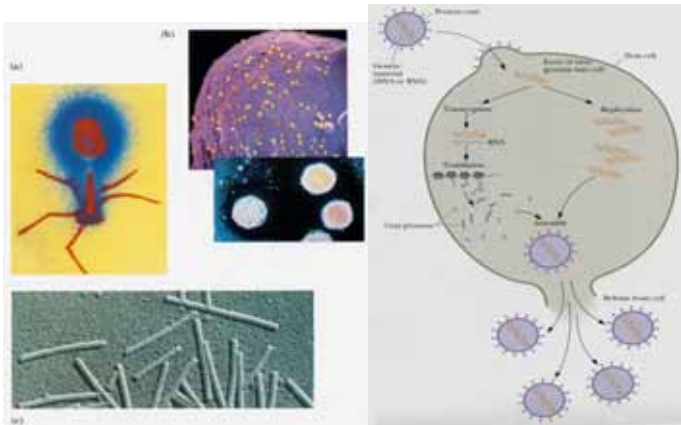
的 DNA 片段。

(4) 基因也可以称为顺反子，一个顺反子就是一个基因。

2. 基因组：一个细胞中，所有基因和基因间 DNA 的总和称为基因组 ( Genome )。现在人们也把能独立传递遗传信息的病毒 DNA，质粒 DNA 称为病毒基因组和质粒基因组。

## 二．天然 DNA 分子的大小与顺序特征

### 1 病毒 DNA 分子



病毒基因组可以由 RNA 组成，也可以由 DNA 组成，一般只含其中一种，但几乎所有植物病毒和某些细菌病毒，动物病毒是 RNA 病毒。RNA 病毒基因组较小。DNA 病毒基因组分子量变化较大。

2. 细菌染色体 DNA：环形，只含一个染色体，所有基因几乎都是单拷贝。

3. 细菌质粒 DNA：细菌胞内，染色体外遗传因子，环状，分子量小，能复制产生子代质粒。质粒所携带的抗性基因可使寄主菌产生抗性。

4. 真核细胞染色体 DNA：线形 DNA 分子。一个人体细胞 DNA 全长约 2m，一个成人全部 DNA 的长度为  $2 \times 10^{14}$ m 或  $2 \times 10^{11}$  km，是地

球周长的  $5 \times 10^6$  倍。真核细胞DNA含有重复顺序（高重复顺序、中等重复顺序），重复顺序每个小于 10bp，以同向重复的方式串联起来。

## 第十一节 DNA 超螺旋和染色体结构

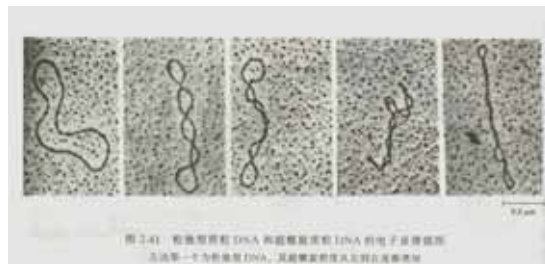
### 一. DNA 的超螺旋结构及形成

#### 1. 什么是超螺旋（螺旋的螺旋）



#### 2. DNA 的超螺旋结构

细胞内 DNA 都是以超螺旋形式存在的，超螺旋是 DNA 三级结构的重要特征。



### 3. DNA 超螺旋结构的形成

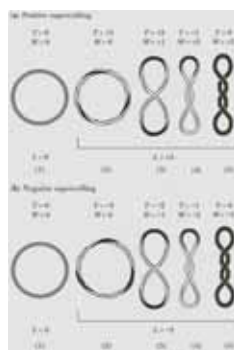
#### (1). 关于超螺旋结构的基本概念

- A. 超螺旋 DNA：DNA 是以双螺旋的形式围绕着同一个轴缠绕的。当双螺旋 DNA 的这个轴再弯曲缠绕时，DNA 就处于超螺旋状态，DNA 超螺旋状态是结构张力的表现。

B. 连系数 (连环数 linking number  $L$ ): 一个闭合环形 DNA 分子的连系数, 严格地等于没有任何超螺旋情况的 DNA 两条链以右手方向相互缠绕的次数。



C. 比连系差: 用于比较不同长度 DNA 分子的超螺旋程度  
 $= (L - L_0) / L_0$   $L_0$  为 DNA 分子处于松弛状态时连系数,  $L$  为实际连系数。 值也称超螺旋密度, 用于衡量 DNA 超螺旋水平。

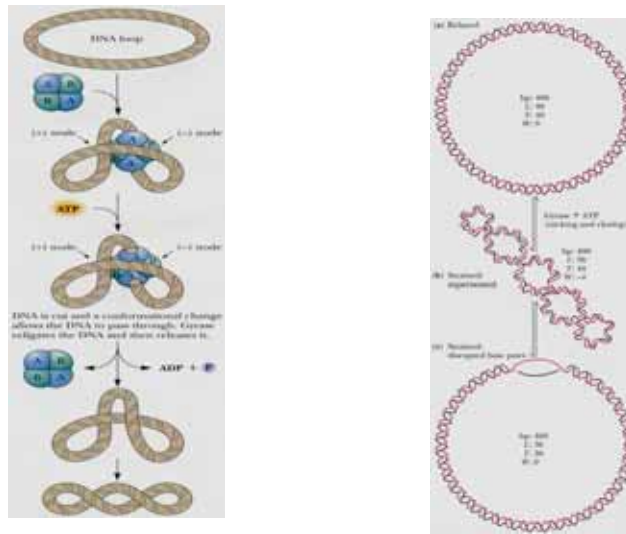


## (2) DNA 超螺旋结构的形成 (DNA 拓扑异构酶)

DNA 拓扑异构酶: 在每个细胞内含有一些专门使 DNA 超螺旋或松弛 DNA 超螺旋的酶类, 这些增加或减少 DNA 超螺旋程度的酶, 叫做 DNA 拓扑异构酶。DNA 拓扑异构酶主要分两大类, I 型和 II 型。

I 型酶: 临时性地切开双链 DNA 中的一条链, 使切口的一端围绕未切割链旋转一圈, 并重新连接切口。这类 DNA 拓扑酶每次作用改变 DNA 分子的拓扑连系数为 1。

II 型酶：二型 DNA 拓扑异构酶同时切开 DNA 的两条链，一次作用改变 DNA 分子的拓扑连系数为 2。

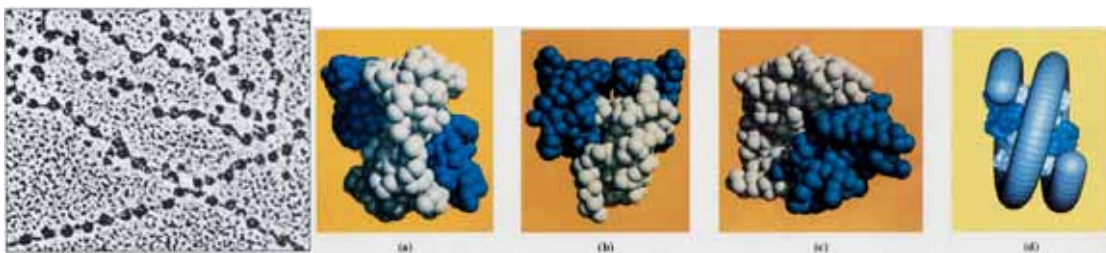


## 二． 染色体结构

### 1． 核小体是染色质的基本结构

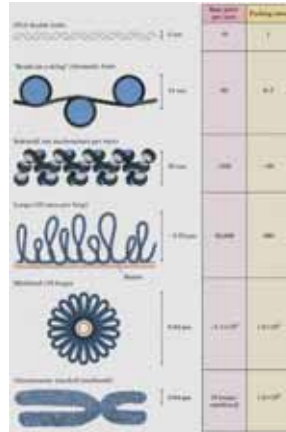
核小体的结构：146 bp 紧紧缠绕由 H2A、H2B、H3 和 H4 形成的八聚体组蛋白核心，每两个核小体间有 54bp 连接成串珠状。

核小体在 DNA 连系下再以线圈形盘绕，形成直径 30nm 核小体纤维。串珠状核小体（染色质的基本结构单位）电子显微镜图；



### 2． 人染色体 4 的包装过程





- a. 双螺旋 DNA : 2 nm
- b. 染色质形式 : (核小体链, 每个核小体 200bp) 11 nm
- c. 螺线管 : (纤丝 每圈 6 个核小体), 30 nm 核小体纤维
- d. 突环 : 约 0.25 μm , 20 , 000-100 , 000bp , 与核骨架相连 , 核骨架由几种蛋白组成 , 以 H1 和 II 型拓扑酶为主。
- e. 玫瑰花结 : ( 18 环 , 6 环 , 30 梅花结为一个螺旋圈 )
- f. 染色体 : 每个染色单体含 10 个螺旋圈



## 第十二节 核酸的分离纯化和鉴定

在核酸研究中,首先要分离和鉴定核酸。核酸的制备中最重要的是防止核酸的降解和变性,需注意以下几个方面:(1)防止过酸、过碱对磷酸二酯酶的破坏(一般在 pH 4-10 下进行),避免剧烈搅拌。(2)防止核酸酶(DNase, RNase)的作用。对所制备核酸的评定指标包

括：相对分子量、紫外吸收、沉降系数、电泳迁移率、粘度等。

## 一．核酸的分离

### 1． DNA 的分离

(1) 改变盐浓度提取：1mol / L NaCl 溶解 DNP, 0.14mol/LNaCl 沉淀 DNP, 苯酚抽提，去除蛋白。

(2) 氯仿—异戊醇与 DNP 溶液震荡，借助表面变性除去蛋白质。

(3) 氯化铯密度梯度离心

2． RNA 的分离 RNA 不稳定，同时 RNase 无处不在，因此 RNA 的分离非常困难。要创造一个无 RNase 环境：

(1) 所有用于制备 RNA 的玻璃器皿都要经过高温焙烤，塑料用品要高压灭菌或用 DEPC(焦碳酸二乙酯)处理（抑制 RNase 活性）。

(2) 在破碎细胞的同时加入强变性剂（如异硫氰酸胍）

(3) 加入 RNase 抑制剂（如 RNasin）

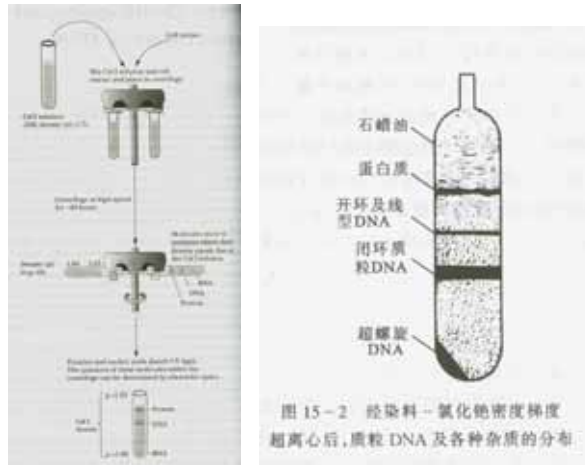
常用的制备 RNA 的方法有两种：（1）异硫氰酸胍 / 酚 / 氯仿 抽提法 （2）胍盐 / 氯化铯密度梯度离心法

## 二．核酸含量的测定

核酸的含量测定主要采用紫外分光光度法。

三．核酸的超速离心 是核酸研究的重要手段。

核酸密度的测定（氯化铯密度梯度离心）：



用于:(1). 测定 DNA 中 G—C 含量:

$$G-C(\text{mol}\%) = (\text{ } -1.660 \text{ })/0.098 \times 100$$

(2). 溶液中核酸构象的研究:

(3). 用于核酸的制备:

四. 核酸的凝胶电泳: 是当前核酸研究中最常用的方法, 常用于检测核酸的分子量、纯度、结构变化、序列分析等

1. 琼脂糖凝胶电泳 (1% - 1.5% ) EB 染色

2. 聚丙烯酰胺凝胶电泳 分辨率可达 1bp 常用于测序。

