

第三章 核 酸

核酸 (nucleic acid) 是生物特有的重要的大分子化合物, 广泛存在于各类生物细胞中, “种瓜得瓜, 种豆得豆” 的遗传现象即源于核酸上所携带的遗传信息。核酸的组成单位

核苷酸 (nucleotides) 还是生物体各种生物化学成分代谢转换过程中的能量“货币”(如 ATP), 而具有传递激素及其他细胞外刺激的化学信号能力的环化核苷酸 (如 cAMP), 被誉为生物体的第二信使, 并且核苷酸还是一系列酶的辅助因子和代谢中间体。因此, 核酸及其组成单位在生物的个体发育、生长、繁殖、遗传和变异等生命过程中起着重要的作用。1953 年, Watson 和 Crick 建立了 DNA 分子双螺旋结构模型, 被认为是 20 世纪在自然科学中的重大突破之一。它揭开了分子生物学的序幕, 尤其是 DNA 重组技术及 DNA 测序技术的出现, 使生命科学成为自然科学中最为引人注目的领域。核酸的研究成果启动了分子生物学的突破性的进程, 从此生命现象和生命过程的研究开始全面进入分子水平。

通过本章的学习, 了解核酸的基础知识, 包括核酸的种类, 在细胞内的分布及其生物学功能; 核酸的化学组成、分子结构及理化性质, 为以后进一步学习核酸的代谢、基因表达调控及分子生物学技术奠定基础。

第一节 概 述

核酸研究已有一百多年历史。早在 1868 年, 瑞士的一位年轻科学家 F. Miescher (1844~1895 年) 从外科绷带上脓细胞的细胞核中分离出了一种有机物质, 它的含磷量之高超过任何当时已经发现的有机化合物, 并且有很强的酸性。由于这种物质是从细胞核分离出来的, 当时就称它为核素 (nuclein)。Miescher 所分离到的核素就是我们今天所指的脱氧核糖核蛋白。直到 1889 年, 才有人成功地分离得到不含蛋白质的这种新物质, 因为是从细胞核中分离出来的酸性物质, 所以叫核酸。后来研究发现细胞质、线粒体、叶绿体、无核结构的细菌和没有细胞结构的病毒都含有核酸, 但“核酸”这一名称仍然保留而沿用至今。

核酸的生物学作用是在发现核酸以后 50 多年才被证明的。1944 年, 由艾弗里 (O. T. Avery) 等人的著名的肺炎球菌转化试验 (图 3-1) 问世后, 核酸是主要遗传物质的地位才被确立。Avery 等的实验是为了寻找导致细菌转化的原因, 他从光滑型肺炎双球菌 (S 型, 有荚膜, 菌落光滑) 分别提取 DNA、蛋白质及多糖物质, 并分别与粗糙型的肺炎双球菌 (R 型, 无荚膜, 菌落粗糙) 一起培养, 发现只有 DNA 能使一部分粗糙型细菌转变成为光滑型, 并能继续繁殖, 且转化率与 DNA 纯度呈正相关, 若将 DNA 预先用 DNA 酶降解, 转化就不发生。这种从一个供体菌得到的 DNA 通过一定途径给另一种细菌, 从而使后者 (受体菌) 的遗传特性发生改变的作用称转化作用 (transformation)。转化作用的实质是外源 DNA 与受体细胞基因组间的重组, 使受体细胞获得新的遗传信息。实验结果表明, 是 S 型菌的 DNA 将其遗传特性传给了 R 型菌, DNA 就是遗传物质, 是遗传信息的载体,

而不是蛋白质。此后，人们对遗传物质的注意力逐渐从蛋白质移到核酸上。

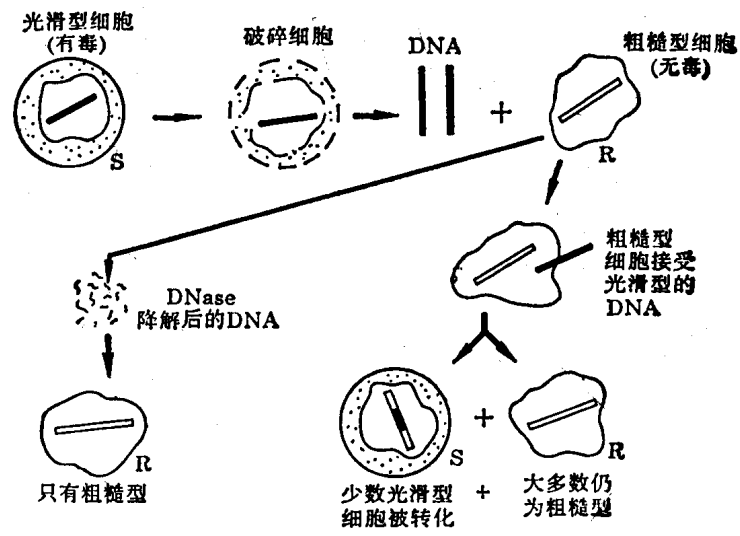


图 3-1 肺炎球菌转化作用图解

1952年，赫尔歇（A. D. Hershey）等人用同位素标记法研究 T_2 噬菌体的感染作用，既用同位素 ^{32}P 标记噬菌体的 DNA， ^{35}S 标记蛋白质，然后感染大肠杆菌。结果只有 ^{32}P -DNA 进入细菌细胞内， ^{35}S -蛋白质仍留在细胞外，从而进一步肯定了 DNA 的遗传作用。

这些重要的早期实验和许多其他证据已经准确无误地说明 DNA 是活细胞中唯一携带全部遗传信息的载体，而不是蛋白质。

1950年以后，Chargaff, Markham 等提出了 A-T、G-C 之间互补的概念。这一极其重要的发现，为以后 Watson-Crick 建立 DNA 双螺旋结构模型提供了重要依据。

1953年 DNA 双螺旋结构模型的提出，被认为是本世纪在自然科学中的重大突破之一。分子生物学所取得的突飞猛进的发展与 DNA 双螺旋结构模型的建立是分不开的。

20世纪70年代 DNA 重组技术的出现，被认为是分子生物学的第二次革命。人们终于可以按照拟定的蓝图设计出新的生物体。它改变了分子生物学的面貌，并导致一个新的生物技术产业群的兴起。

DNA 重组技术的出现极大地推动了 DNA 和 RNA 的研究。其三大关键技术即 DNA 切割技术、分子克隆技术和快速测序的不断成熟，使人们可以通过 DNA 操作改造生物机体的性状特征、改造基因、以至改造物种。DNA 研究带动 RNA 研究在理论上或技术上高潮迭起，许多传统观点被打破，核酸研究成为最活跃的研究领域之一。

真核 DNA 绝大部分存在于细胞核中，而蛋白质合成则发生在细胞质内的核糖体上。因此，必定有另一类分子把遗传信息从核内带到细胞质中以指导蛋白质的合成，在 20 世纪 50 年代初期，RNA 被估计为执行这种功能的最合适的候选分子。80 年代 RNA 研究出现了第二个高潮，取得了一系列生命科学研究领域最富挑战性的成果。1981 年 T. Cech 发现四膜虫 rRNA 前体能够通过自我拼接切除内含子，表明 RNA 也具有催化功能，称为核酶 (ribozyme)。这是对“酶一定是蛋白质”的传统观点一次大的冲击。1983 年 R. Simons

等以及 T. Mizuno 等分别发现反义 RNA (antisense RNA), 表明 RNA 还具有调节功能。1986 年 R. Benne 等发现锥虫线粒体 mRNA 的序列可以发生改变, 称为编辑 (editing), 于是基因与其产物蛋白质的共线性关系也被打破。1986 年 W. Gilbert 提出 “ RNA 世界 ” 的假说, 这对 “ DNA 中心 ” 的观点是一次有力的冲击。1987 年 R. Weiss 论述了核糖体移码, 说明遗传信息的解码也是可以改变的。

1990 年 10 月美国政府决定出资 30 亿美元, 用 15 年时间 (1991 - 2005 年) 完成 “ 人类基因组计划 ”。 “ 人类基因组计划 ” 是生物学有史以来最巨大和意义深远的一项科学工程。完成人类基因组 DNA 全序列测定的意义是十分明显的, 人类对自己遗传信息的认识将有益于人类健康、医疗、制药、人口、环境等诸多方面, 并且对生命科学也将有极大贡献。由于技术上的突破, 计划进度一再提前, 全序列的测定现已基本完成。一些低等生物的 DNA 全序列也已陆续被测定。生命科学已经进入了后基因组时代 (post-genome era)。

在后基因组时代, 科学家们的研究重心已从揭示基因组 DNA 的序列转移到在整体水平上对基因组功能的研究。这种转向的第一个标志就是产生了一门称为功能基因组学 (functional genomics) 的新学科。

随着自然科学的发展, 核酸的研究越来越成为生物科学的核心, 带动了生物化学、分子生物学和分子遗传学乃至整个生命科学的发展。在此基础上发展起来的核酸操作技术正在逐步地打开控制不同生物性状的生命之谜, 同时, 核酸的研究也使生物技术产业获得了空前规模的发展。据统计, 信息技术对世界经济的贡献比率达到 18%, 而生物技术对世界经济的推动作用将不亚于信息技术。

第二节 核酸的种类与分布

一、分 类

核酸分脱氧核糖核酸 (deoxyribonucleic acid , DNA) 和核糖核酸 (ribonucleic acid , RNA) 两大类。所有生物细胞都含有这两类核酸。它们是各种有机体遗传信息的载体。生物体中的各种蛋白质, 以及每种细胞的组成都是细胞中核酸序列编码的信息产物。每种蛋白质的氨基酸顺序和 RNA 的核苷酸顺序都是由细胞中的 DNA 的核苷酸顺序决定的。含有合成一个功能性生物分子 (蛋白质或 RNA) 所需信息的 DNA 片段可以看成是一个基因 (gene), 一个最简单的细胞也有成千上万个基因, 因此 DNA 分子是极大的。至今人们知道的 DNA 的功能是贮存生物信息。

DNA 主要集中在细胞核内, 线粒体和叶绿体也含有 DNA。RNA 主要分布在细胞质中。但是对于病毒来说, 要么只含 DNA, 要么只含 RNA。还没有发现既含 DNA 又含 RNA 的病毒。

核酸是由碱基、戊糖、磷酸组成的, 按其所含的戊糖种类的不同分为两大类:

核糖核酸 (ribonucleic acid 即 RNA): 戊糖为核糖

脱氧核糖核酸 (deoxyribonucleic acid 即 DNA): 戊糖为脱氧核糖

核糖核酸 (RNA) 按其功能的不同分为三大类：

核糖体 RNA (ribosomal RNAs, rRNAs) 约占 RNA 总量的 80%，它们与蛋白质结合构成核糖体的骨架。核糖体是蛋白质合成的场所，所以 rRNAs 的功能是作为核糖体的重要组成成分参与蛋白质的生物合成。rRNAs 是细胞中含量最多的一类 RNA，且分子量比较大，代谢都不活跃，种类仅有几种，原核生物中主要有 5S rRNAs、16S rRNAs 和 23S rRNAs 三种，真核生物中主要有 5S rRNAs、5.8S rRNAs、18S rRNAs 和 28S rRNAs 四种。

信使 RNA (messenger RNAs, mRNAs)，约占 RNA 总量的 5%。mRNAs 是以 DNA 为模板合成的，又是蛋白质合成的模板。它是携带一个或几个基因信息到核糖体的核酸。由于每一种多肽都有一种相应的 mRNAs，所以细胞内 mRNAs 是一类非常不均一的分子。但就每一种 mRNAs 的含量来说又十分低。这也解释了为什么 mRNAs 的发现比 rRNAs 与 tRNAs 要迟。

转移 RNAs (transfer RNAs, tRNAs) 约占 RNA 总量的 15%。tRNAs 的分子量在 2.5×10^4 左右，由 70~90 个核苷酸组成，因此它是最小的 RNA 分子。它的主要功能是在蛋白质生物合成过程中把 mRNA 的信息准确地翻译成蛋白质中氨基酸顺序的适配器 (adapter) 分子，具有转运氨基酸的作用，并以此氨基酸命名。此外，它在蛋白质生物合成的起始作用中，在 DNA 反转录合成中及其他代谢调节中也起重要作用。细胞内 tRNA 的种类很多，每一种氨基酸都有其相应的一种或几种 tRNA。

此外，在细胞中还含有其他的 RNA，如真核细胞中还有少量核内小 RNA (small nuclear RNA，缩写成 snRNA)、染色体 RNA (chrRNA)。

二、分 布

(一) DNA 的分布

核酸广泛分布于各类生物细胞中，一般占细胞干重的 5%~15%。在真核细胞中，95%~98% 的 DNA 分布于细胞核中，DNA 与组蛋白结合成染色体的形式存在，每个染色体含有一个高度压缩的 DNA 分子。线粒体、叶绿体中也有少量 DNA 存在，但不与蛋白质结合，且比细胞核中的染色体 DNA 要小得多。在原核细胞中，DNA 存在于细胞质中的核质区，通常只含有一个高度压缩的单纯 DNA 分子，也称为染色体(但与真核细胞的染色体不同)。有关大肠杆菌的研究表明，它的染色体是一个环状的 DNA 分子。在某些细菌中还存在一些游离于染色体之外的小的 DNA 分子，称为质粒。

(二) RNA 的分布

RNA 主要存在于细胞质中，约占总量的 90%，细胞核中也有少量的存在，约占总量的 10%。

病毒是非细胞形态的生物，主要由蛋白质和核酸组成。在病毒内部含有核酸，或是 DNA，或是 RNA，据此划分为 DNA 病毒和 RNA 病毒。

上述两大类核酸在细胞内的分布状况是与它们的功能相一致的。细胞中的 DNA 起着贮存和传递遗传信息的作用。细胞质中的 RNA 在核内接受了 DNA 的“指令”，到细胞质指导并直接参与蛋白质的合成。

第三节 核酸的化学组成

在讨论核酸的分子结构之前，必须先搞清楚核酸的化学组成。核酸分子很大，但可在酸、碱和酶的催化下逐步降解，所以可以通过分离鉴定降解的中间产物和最终产物，来分析核酸的组成成分以及这些成分的相互关系。核酸逐步降解的过程如图 3-2。

根据这个过程，可以总结出：核酸的基本结构单位是核苷酸 (nucleotide)，核酸是由几百甚至几千万个核苷酸聚合而成的生物大分子，所以又称多聚核苷酸 (polynucleotide)。核酸经部分水解可产生核苷酸，如经完全水解则产生磷酸、碱基和戊糖。每分子核苷酸含有一分子磷酸、一分子含氮碱基和一分子戊糖，见图 3-3

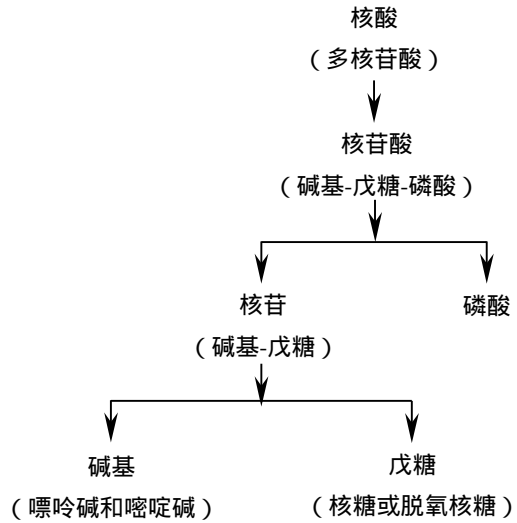


图 3-2 核酸连续水解的降解产物

(a)。也就是说，核酸的基本“元件”是碱基、戊糖和磷酸。两类核酸的组成成分中，有相同的，也有不同的。含氮碱基是两种母体化合物嘌呤和嘧啶的衍生物，见图 3-3 (b)。

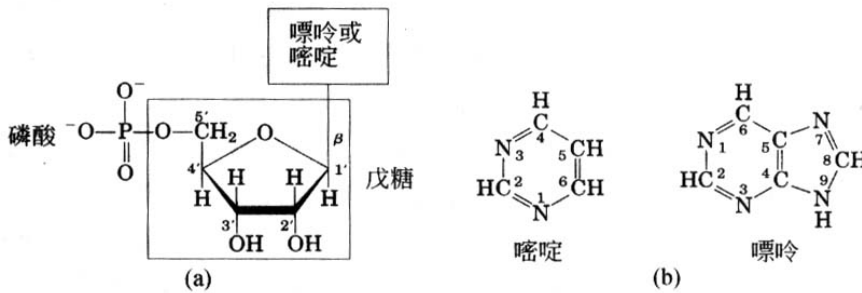


图 3-3 (a) 核苷酸的一般结构，呋喃式五碳糖以 β 型糖苷与碱基相连，磷酸基团以酯键与 5' 位碳原子相连，这是核糖核苷酸的分子结构，在脱氧核糖核苷酸中 2' 位羟基被氢原子所取代；

(b) 碱基的母体化合物 嘧啶和嘌呤环上原子的编号

一、碱基

核酸中的碱基有两类：嘌呤碱 (pyrimidine) 和嘧啶碱 (purine)。它们是含氮的杂环化合物，所以称为碱基，也称含氮碱。

(一) 嘌呤碱

核酸中的嘌呤碱是嘌呤的衍生物。DNA 和 RNA 中含有相同的两种主要的嘌呤碱：腺嘌呤 (adenine) 和鸟嘌呤 (guanine), 分别用 A 和 G 表示。RNA 和 DNA 均含这两种嘌呤碱基, 它们都是嘌呤的 2 位或 6 位碳原子上的氢被氨基或酮基取代而形成的。核酸中还含有一些修饰嘌呤碱 (也称稀有嘌呤碱), 如次黄嘌呤、N⁶-甲基腺嘌呤、7-甲基鸟嘌呤等 (见图 3-4)。

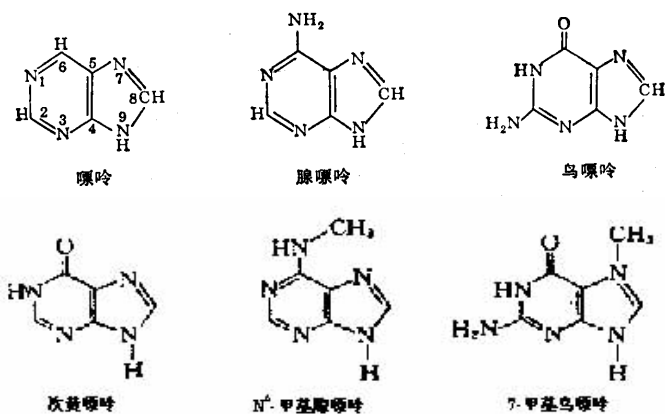


图 3-4 核酸中的嘌呤碱基

(二) 嘧啶碱

核酸中的嘧啶碱是嘧啶的衍生物, 有三种, 即胞嘧啶 (cytosine)、尿嘧啶 (uracil) 和胸腺嘧啶 (thymine), 分别用 C、U 和 T 表示。RNA 中含有的是胞嘧啶和尿嘧啶, DNA 含有胞嘧啶和胸腺嘧啶。从结构上看, 它们都是在嘧啶的 2 位碳原子上由酮基取代氢, 在

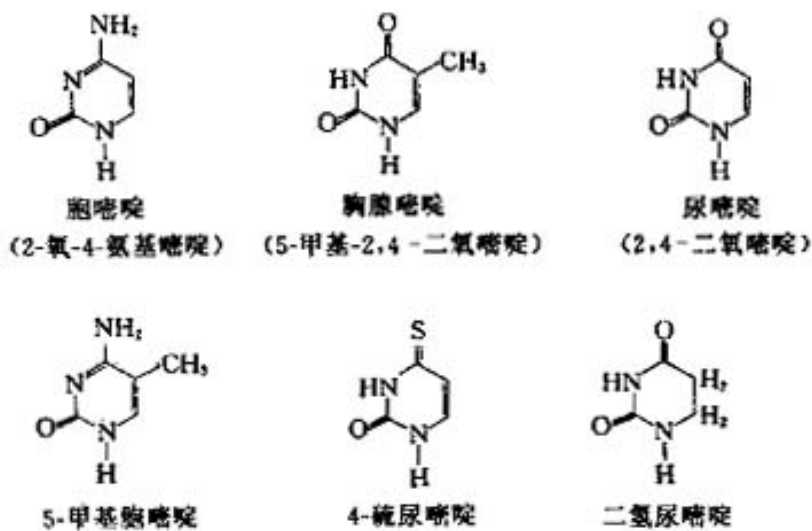


图 3-5 核酸中的嘧啶碱基

4 位碳原子上由氨基或酮基取代氢而形成的。同样，核酸中也含有一些修饰（稀有）嘧啶碱，如 5-甲基胞嘧啶、4-硫尿嘧啶、二氢尿嘧啶等（见图 3-5）。

核酸中含氮碱基均为无色固体，熔点高，大多在 200 ~300 ，在有机溶剂中溶解度很小，在水中溶解度也不大，一般溶于稀酸或稀碱。用 X 光衍射分析法已证明了各种嘌呤和嘧啶的三度空间结构。嘧啶是平面分子，嘌呤也很接近平面，但稍有翘折。图 3-6 为腺嘌呤分子的立体结构（单位为 nm）。

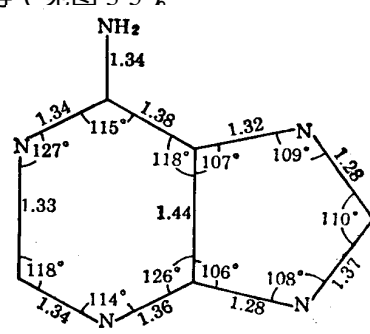


图 3-6 腺嘌呤分子的立体结构（单位为 nm）

二、戊糖

核酸是按其所含戊糖不同而分为两大类的。DNA 所含的戊糖是 D-2'-脱氧核糖，RNA 所含的戊糖是 D-核糖。另外，RNA 中还含有少量的修饰戊糖，即 D-2'-O-甲基核糖。核酸中的这些戊糖均以 β -呋喃型环状结构存在（见图 3-7）。

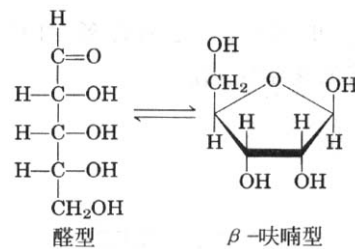


图 3-7 核糖的构象

在溶液中游离核糖的直链型结构与环型结构（ β -呋喃型）结构处于平衡状态

三、磷酸

核酸是含磷的生物大分子，任何核酸都含有磷酸，所以核酸呈酸性，可与 Na^+ 、多胺、组蛋白结合。核酸中的磷酸参与形成 3',5'-磷酸二酯键，使核酸连成多核苷酸链。

以上三种基本“元件”再进一步连接，碱基与戊糖以糖苷键形成核苷，核苷再与磷酸以磷酸酯键形成核苷酸，核苷酸是核酸的基本结构单位，相当于“部件”。DNA 与 RNA 的基本化学组成见表 3-1。

表 3-1 两类核酸的基本化学组成

	DNA	RNA
嘌呤碱 (purine bases)	腺嘌呤 (adenine) 鸟嘌呤 (guanine)	腺嘌呤 (adenine) 鸟嘌呤 (guanine)
嘧啶碱 (pyrimidine bases)	胞嘧啶 (cytosine) 胸腺嘧啶 (thymine)	胞嘧啶 (cytosine) 尿嘧啶 (uracil)
戊糖	D-2'-脱氧核糖	D-核糖
酸	磷酸	磷酸

四、核 苷

核苷 (riboside) 由戊糖和碱基缩合而成, 并以糖苷键连接。糖环上的 C_1' 与嘧啶碱的 N_1 或与嘌呤碱的 N_9 相连接。所以糖与碱基之间的键是 N-C 键, 称为 N-糖苷键。糖环中 C_1' 是不对称碳原子, 所以有 β 和 α 两种构型。但核酸分子中的糖苷键均为 β 糖苷键。应用 X-光衍射分析证明, 核苷中的碱基与糖环平面互相垂直。

核苷可以分成核糖核苷与脱氧核糖核苷两大类。腺嘌呤核苷 (简称腺苷) 胞嘧啶脱氧核苷 (脱氧胞苷) 的结构如图 3-8 (糖环中的碳原子标号用 $1'$, $2'$ 表示)。表 3-2 为常见核苷的名称。

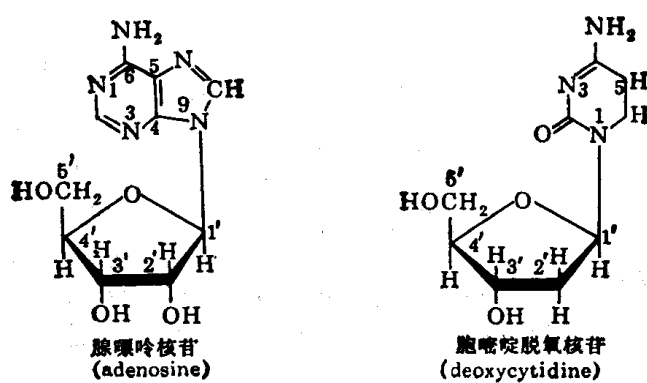


图 3-8 DNA 中的脱氧腺嘌呤核苷 (dT) 与 RNA 中的胞嘧啶核苷 (C)

表 3-2 各种常见核苷

碱基	核糖核苷	脱氧核糖核苷
腺嘌呤	腺苷 (adenosine)	脱氧腺苷 (deoxyadenosine)
鸟嘌呤	鸟苷 (guanosine)	脱氧鸟苷 (deoxyguanosine)
胞嘧啶	胞苷 (cytidine)	脱氧胞苷 (deoxycytidine)
尿嘧啶	尿苷 (uridine)	
胸腺嘧啶		脱氧胸苷 (deoxythymidine)

核酸中含有多种稀有碱基, 它们可与戊糖形成相应的稀有核苷, 例如次黄嘌呤核苷、5-甲基胞苷等。此外, 还有些稀有核苷是由正常碱基与 2'-O-甲基核糖结合而形成的, 或由正常碱基以特殊方式与核糖连接所形成的。如假尿嘧啶核苷, 它的核糖与尿嘧啶的 C_5 相连, 为 C-C 糖苷键。RNA 中的稀有核苷大部分存在于 tRNA 中, 而 DNA 中的稀有核苷主要是从噬菌体中分离得到的。

五、核苷酸

核苷中的戊糖羟基被磷酸酯化，就形成核苷酸。核苷酸分成核糖核苷酸与脱氧核糖核苷酸两大类。下面为图

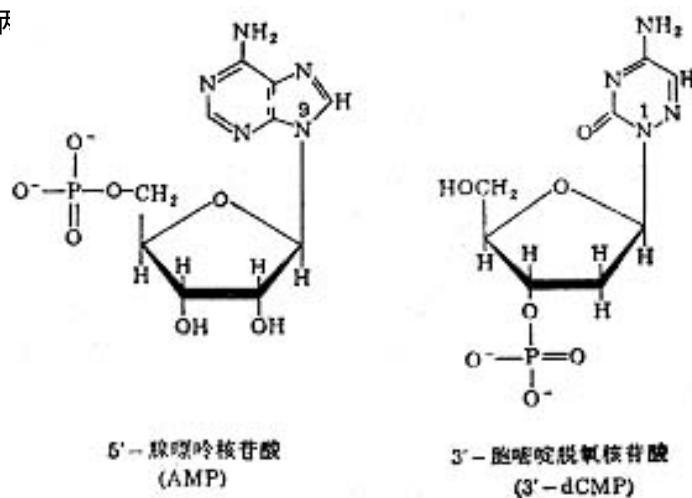


图 3-9 RNA 中的腺嘌呤核苷酸(AMP)与 DNA 中的胞嘧啶脱氧核苷酸(dCMP)

生物体内存在的游离核苷酸多是 5'-核苷酸。用碱水解 RNA 时，可得到 2'-核糖核苷酸与 3'-核糖核苷酸的混合物。

常见的核苷酸见表 3-3。

表 3-3 常见的核苷酸

碱基	核糖核苷酸	脱氧核糖核苷酸
腺嘌呤(A)	腺嘌呤核苷酸 (adenosine monophosphate, AMP)	腺嘌呤脱氧核苷酸 (deoxyadenosine monophosphate, dAMP)
鸟嘌呤(G)	鸟嘌呤核苷酸 (guanosine monophosphate, GMP)	鸟嘌呤脱氧核苷酸 (deoxyguanosine monophosphate, dGMP)
胞嘧啶(C)	胞嘧啶核苷酸 (cytidine monophosphate, CMP)	胞嘧啶脱氧核苷酸 (deoxycytidine monophosphate, dCMP)
尿嘧啶(U)	尿嘧啶核苷酸 (uridine monophosphate, UMP)	
胸腺嘧啶(T)		胸腺嘧啶脱氧核苷酸 (deoxythymidine monophosphate, dTMP)

六、细胞中的游离核苷酸及其衍生物

除了上述存在于 RNA 和 DNA 中的核苷酸外,生物体细胞中还有一些以游离形式存在的核苷酸。多磷酸核苷酸以及它们的衍生物,并具有重要的生理功能。比如 5'-腺苷酸 (adenosine monophosphate, AMP) 可进一步磷酸化形成腺嘌呤核苷二磷酸 (简称腺二磷, adenosine diphosphate, ADP) 和腺嘌呤核苷三磷酸 (简称腺三磷, adenosine triphosphate, ATP), 见图 3-10。

ADP 中含有一个高能磷酸键 (用 “~” 表示高能磷酸键), ATP 中含有两个高能磷酸键。高能磷酸键水解时释放出的能量为 30kJ/mol, 而普通磷酸键能为 14kJ/mol。生物获得的能量可转换成 ATP, 当需要能量时, ATP 中的高能键水解, 将贮存的能量释放出来, 可参与多种生物合成反应。

除 ADP、ATP 外, 生物体中的其他 5'-脱氧核苷酸也可以进一步磷酸化为相应的核苷二磷酸和核苷三磷酸以及脱氧核苷二磷酸和脱氧核苷三磷酸, 并都具有各自的生理功能。例如, UDP 作为葡萄糖的载体参与多糖的合成; CDP 作为胆碱的载体参与磷脂的合成; 各种核苷三磷酸和脱氧核苷三磷酸分别是合成 RNA 和 DNA 的前体。

此外, 在生物细胞中, 还存在着环化核苷酸, 其中研究得最多的是 3',5'-环腺苷酸 (3',5'-cyclic adenosine monophosphate, cAMP) 子形成双酯环化而成的, 其中 3'位的酯键为高能磷酸键, 水解后可释放 49.7kJ/mol 自由能。cAMP 具有放大激素作用信号的功能, 所以在细胞代谢调节中起重要作用。此外, 3',5'-环鸟苷酸 (3',5'-cyclic guanosine monophosphate, cGMP) 也是一种具有代谢调节作用的环化核苷酸 (图 3-11)。

生物体中还存在着一些核苷酸的衍生物, 它们在生活中也起着重要的作用。如烟酰胺腺嘌呤二核苷酸、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸、黄素单核苷酸、黄素腺嘌呤二核苷酸和辅酶 A 等, 都是核苷酸的衍生物, 它们在生物体中作为辅酶或辅基参与代谢作用。

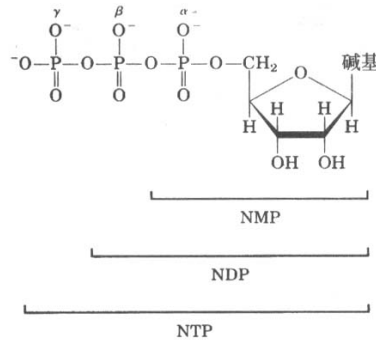


图 3-10 核酸 5'-单磷酸, 5'-二磷酸和 5'-三磷酸的一般结构和它们的标准缩写 (在 DNA 中缩写为 dNMP, dNDP, dNTP), 图中 N 表示任意一个碱基

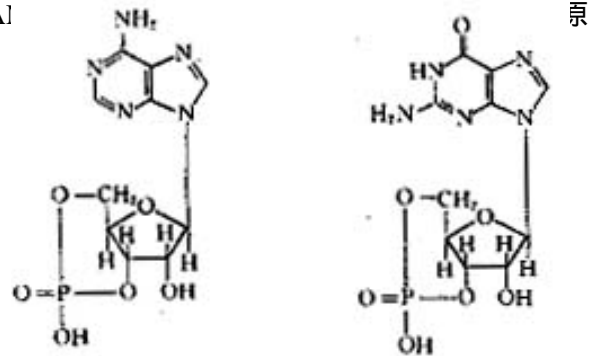


图 3-11 3',5'-环腺苷酸 (cAMP), 3',5'-环鸟苷酸 (cGMP)

第四节 脱氧核糖核酸

一、DNA的碱基组成

Watson 和 Crick 发现 DNA 结构是科学史上的重大事件，它导致一些全新学科的诞生，并影响许多学科的进程。现在对细胞如何储存和利用遗传信息的基础知识都是在这个发现的基础上进行研究获得的。

和 DNA 结构有关的最重要的线索来自于 20 世纪 40 年代后期 Erwin Chargaff 及其同事的研究工作。Chargaff 等应用纸层析及紫外分光光度计对各种生物 DNA 的主要四种碱基（腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶）的组成进行了定量测定，发现来自不同物种的 DNA 有着不同的碱基比例，不同碱基在数量上是紧密相关的，收集来自许多物种 DNA 碱基组成资料，导致 Chargaff 得出如下规律：

1. 所有 DNA 中腺嘌呤与胸腺嘧啶的摩尔含量相等，即 $[A]=[T]$ ；鸟嘌呤与胞嘧啶的摩尔含量相等，即 $[G]=[C]$ 。因此，嘌呤的总含量与嘧啶的总含量相等，即 $[A]+[G]=[C]+[T]$ 。

2. DNA 的碱基组成具有种的特异性，即不同生物种的 DNA 具有自己独特的碱基组成比例（又称不对称率 *dissymmetry ratio*），可表示为 $([A]+[T])/([G]+[C])$ 。亲缘相近的生物，其 DNA 的碱基组成相似，即不对称比率相近。

3. 同一种生物 DNA 的碱基组成没有组织和器官的特异性。生长发育阶段、营养状态和环境的改变都不影响 DNA 的碱基组成。

以上这些数量关系被称为 Chargaff 定则，这个结果后来被许多研究所肯定，它们是建立 DNA 三维结构和了解 DNA 如何编码遗传信息并把它们代代相传的关键。

二、DNA的一级结构

如研究蛋白质结构一样，把核酸结构根据一级、二级、三级分级讨论。核酸的一级结构是它的共价结构和核苷酸顺序，在核酸中由部分或所有核苷酸残基所形成的任何有规律的稳定结构都可以看成是二级结构。细菌中的拟核及真核生物中巨大染色体的复杂折叠方式一般被看成是三级结构。

DNA 的一级结构是由数量极其庞大的四种脱氧核糖核苷酸，即脱氧腺嘌呤核苷酸、脱氧鸟嘌呤核苷酸、脱氧胞嘧啶核苷酸和脱氧胸腺嘧啶核苷酸，通过 3',5'-磷酸二酯键连接起来的直线形或环形多聚体。由于脱氧核糖中 C_2' 上不含羟基， C_1' 又与碱基相连接，唯一可以形成的键是 3',5'-磷酸二酯键，所以 DNA 没有侧链。图 3-12A 表示 DNA 多核苷酸链的一个小片段。

由于核酸链的一端是一个游离的 5'-磷酸基，称 5'-端，另一端是游离的 3'-羟基，称 3'-端，因此 DNA 链是有极性的。书写碱基的顺序是从 5'-端到 3'-端。图 3-12B、C 是多核苷酸的几种缩写法。B 为线条式缩写，竖线表示核糖的碳链，A、C、T、G 表示不同的碱基，P 引出的斜线一端与 C_3' 相连，另一端与 C_5' 相连。C 为文字式缩写，P 在碱基的左侧，表

示 P 在 C_{5'}位置上。P 在碱基的右侧，表示 P 与 C_{3'}相连。有时，多核苷酸中磷酸二酯键上的 P 也可省略，而写成 pA-C-T-G。这两种写法对 DNA 和 RNA 分子都适用。

DNA 分子上四种核苷酸排列顺序（序列）的问题，是分子生物学家多年来要解决的重要问题，因为生物的遗传信息贮存于 DNA 的核苷酸序列中，生物界物种的多样性就在于 DNA 分子四种核苷酸千变万化的不同排列之中。测定 DNA 上核苷酸排列顺序的问题曾经是一个较为困难的问题。但是随着分子生物学的发展，现在测定 DNA 的序列已经成为分子生物学实验室的一种常规方法。

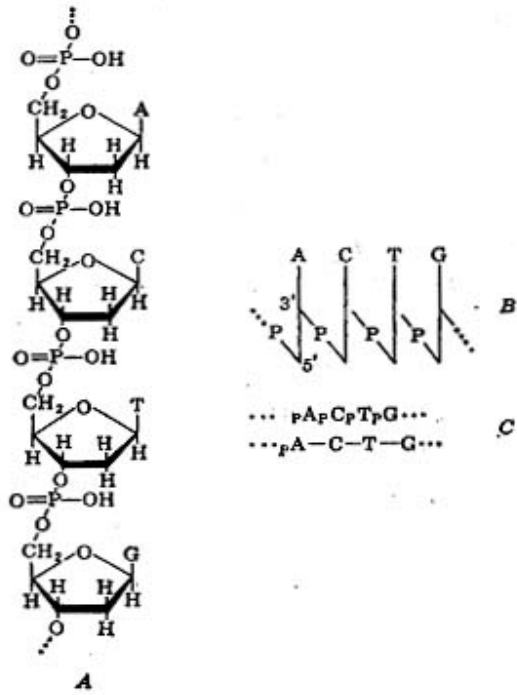


图 3-12 DNA 中多核苷酸链中的一个小片段及缩写符号。
A 为 DNA 中多核苷酸链中的一个小片段，B 为线条式缩写，C 为文字式缩写。

三、DNA 的空间结构

20 世纪 50 年代早期，Rosalind Franklin 和 Maurice Wilkins 使用强有力的 X-射线衍射方法分析 DNA 纤维和 DNA 晶体，结果证明 DNA 能产生有特征的 X-射线衍射图，见图 3-13。从这个衍射图他们确定 DNA 多聚物是沿着它们的长轴有着两种周期性的螺旋结构，第一个周期距离 0.34nm，第二个周期距离 3.4nm，这个图还表明 DNA 含有两条链，这个线索对 DNA 结构的确定是极其重要的。

目前公认的 DNA 双螺旋结构模型主要根据 Chargaff 定则及 X-射线衍射图的结构，在 1953 年由 Watson 和 Crick 两人提出的。DNA 分子双螺旋结构模型在分子生物学发展史上具有划时代的意义，为分子生物学和分子遗传学的发展奠定了基础。由于当时还不可能获得

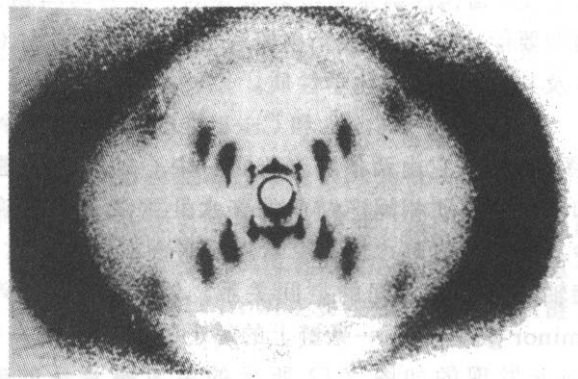


图 3-13 DNA 的 X-射线衍射
在中心形成交叉的许多衍射点表明 DNA 具有螺旋结构，左右两端的深色带是由重复出现的碱基造成的

DNA 分子结晶, Watson 和 Crick 所用的资料来自在相对湿度为 92% 时所得到的 DNA 钠盐纤维。这种 DNA 称为 B 型 DNA (B-DNA)。在相对湿度低于 75% 时获得的 DNA 钠盐纤维, 其结构有所不同, 称为 A-DNA。此外还有 Z-DNA 将在后面讨论。在这里, 我们将比较详细的讨论 B-DNA, 因为生物体内天然状态的 DNA 几乎都以 B-DNA 存在。

(一) B-DNA 的结构

根据 Watson 和 Crick 所提出的模型 (见图 3-14), B-DNA 具有以下特征:

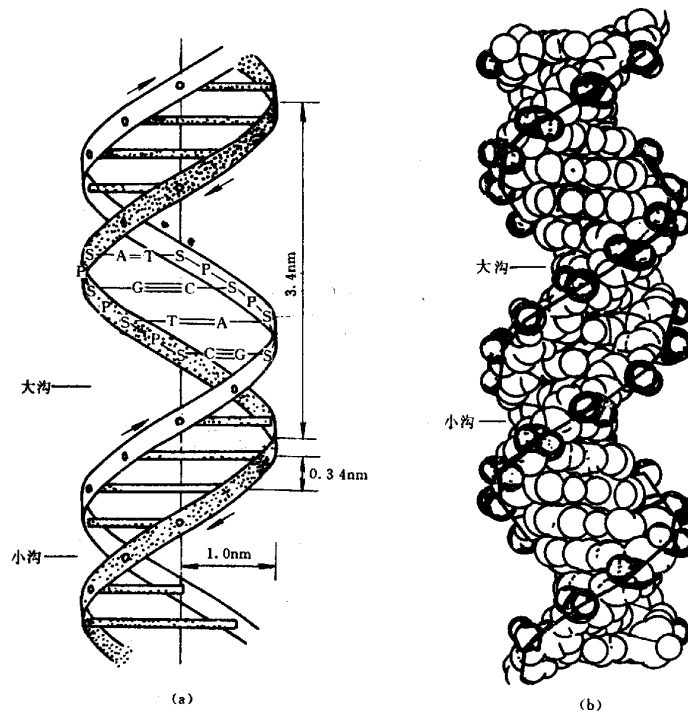


图 3-14 DNA 的双螺旋结构模型

(a) 双螺旋结构示意图 (b) 双螺旋结构原子模型图

1. 两条反向平行的多核苷酸链围绕同一中心轴相互缠绕。

2. 嘌呤碱基与嘧啶碱基位于双螺旋的内侧, 磷酸与核糖在外侧, 彼此通过 3',5'-磷酸二酯键相连接, 形成 DNA 分子的骨架。碱基平面与纵轴垂直, 糖环的平面则与纵轴平行。多核苷酸链的方向取决于核苷酸间磷酸二酯键的走向。习惯上以 C_{5'}—C_{3'} 为正向。两条链均为右手螺旋。双螺旋结构上有二条螺形凹沟, 一条较深, 一条较浅。较深的沟称大沟 (major groove), 较浅的称小沟 (minor groove)。大沟的宽度为 1.2nm, 深度为 0.85nm。小沟的宽度为 0.6nm, 深度为 0.75nm。

3. 双螺旋的平均直径为 2nm, 两个相邻的碱基对之间相距的高度, 即碱基堆积距离为 0.34nm, 两个核苷酸之间的夹角为 36°。因此, 沿中心轴每旋转一周有 10 个核苷酸。每一圈的高度 (即螺距) 为 3.4nm。

4. 两条核苷酸链依靠彼此碱基之间形成的氢键相连而结合在一起。根据分子模型的

计算，一条链上的嘌呤碱必须与另一条链上的嘧啶碱相匹配，其距离才正好与双螺旋的直径相吻合，碱基之间所形成的氢键，根据对碱基构象研究的结果，A 只能与 T 相配对，形成两个氢键；G 与 C 相配对，形成三个氢键。所以 GC 之间的连接较为稳定（图 3-15）。

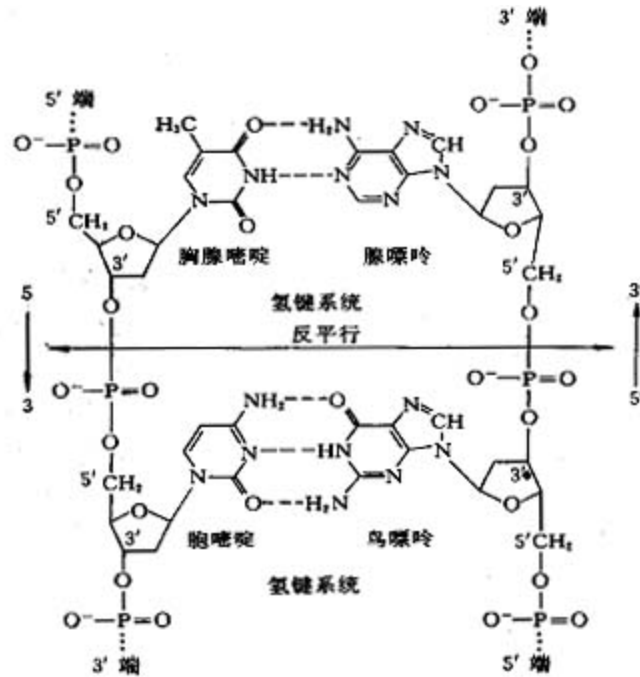


图 3-15 DNA 的碱基配对氢键

上述碱基之间配对的原则称为碱基互补 (base complementary)。根据碱基互补原则，当一条多核苷酸链的序列被确定以后，即可推知另一条互补链的序列。碱基互补原则具有极重要的生物学意义。DNA 复制、转录、反转录等的分子基础都是碱基互补配对。

由于 Watson 和 Crick 的模型是根据 Franklin 和 Wilkins 所提供的 DNA 纤维的 X-光衍射分析资料推导出来的，它所提供的只是 DNA 结构的平均特征。后来，对 DNA 晶体所作的 X-衍射分析才提供了精确的信息。K. Dickerson 等人用人工合成的多聚脱氧核糖核苷酸（十二聚体）晶体进行 X-光衍射分析后，认为这种十二聚体的结构与 Watson 和 Crick 模型所提供的结构十分相似，但在结构上并不象 Watson-Crick 模型所说的那样均一。这是由于碱基序列的不同，以致在局部结构上有较大差异。这些差异是：

1. Watson-Crick 模型认为每一螺周含有 10 个碱基对，所以两个核苷酸之间的夹角是 36° 。但在 Dickerson 的十二聚体中，两个碱基间的夹角为 28° 至 42° 不等。
2. Dickerson 所研究的十二聚体结构中，组成碱基对的两个碱基的分布并非在同一平面上，而是碱基对沿长轴旋转一定的角度，从而使碱基对的形状象螺旋桨叶片的样子（图 3-16），故称为螺旋桨状扭曲 (propeller twisting)。这种结构可提高碱基堆积力，使 DNA 结构更稳定。

在生物体内，绝大部分 DNA 是以 B-DNA 形式存在的。由于 DNA 是生命活动中非常

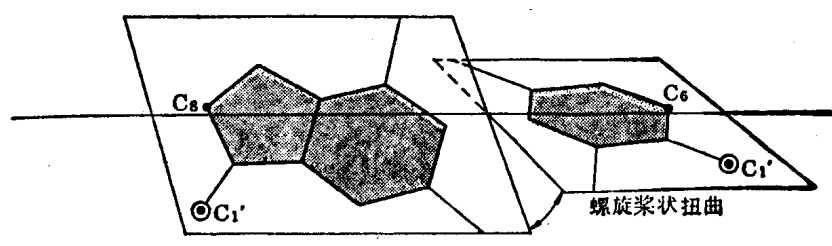


图 3-16 碱基对的螺旋桨状结构

重要的生物大分子，所以有必要对其某些重要特性加以讨论。

1. DNA 分子的长度

天然 DNA 分子往往是很长的。以大肠杆菌染色体 DNA 为例，分子量为 2.6×10^9 或由 4×10^6 碱基对 (base pair, bp) 组成，长度为 1.4×10^6 nm。就其长度与直径之比而言，这是一种极其不对称的分子。如此细长的分子对任何机械力的作用都十分敏感，难怪用一般方法制备的 DNA 样品往往是降解了的 DNA 片段。DNA 的长度可用电子显微镜直接测量。

2. DNA 分子结构中的碱基互变异构体

DNA 分子的某些化学性质与其碱基上氢原子的位置有关。1953 年以前，许多人认为这些氢原子可以在嘌呤或嘧啶环上的氮或氧原子之间随便移动而无固定位置，使碱基处于它们的互变异构作用的平衡之中，形成碱基互变异构体 (tautomeric form)。但是现在已公认，虽然这种氢原子的移动也是可以发生的，但事实上碱基环上的氢原子有其较为固定的位置：腺嘌呤和胞嘧啶环上的氮原子常处于氨基 ($-\text{NH}_2$) 状态，只有极少数处于亚氨基 ($=\text{NH}$) 状态。同样，鸟嘌呤和胸腺嘧啶环上的 C_6 上的氧原子常为酮式 ($\text{C}=\text{O}$)，很少有烯醇式 ($\text{C}-\text{OH}$)。

氢原子在碱基上有较固定的位置具有重要的意义。试设想一下，如果 DNA 分子碱基上的氢原子没有固定的位子，A 就极易与 C 配对，G 则极易与 T 配对。这样 DNA 双螺旋结构中 A-T, G-C 碱基互补的原则就不复存在。DNA 分子也就难以成为遗传物质了。从另一方面也应该看到，A 与 C 上的氮原子偶尔也可以形成亚氨基，G 与 T 上的氧原子偶尔也可形成烯醇式。可能这就是 DNA 复制时引起突变的原因之一。这种突变是生物进化的动力。

3. DNA 分子的稳定性

DNA 双螺旋结构在生理状态下是很稳定的。维持这种稳定性的主要因素是碱基堆积力 (base stacking force)。嘌呤与嘧啶碱形状扁平，呈疏水性，分布于双螺旋结构内侧。大量碱基层层堆积，两相邻碱基的平面十分贴近，于是使双螺旋结构内部形成一个强大的疏水区，与介质中的水分子隔开。其次，大量存在于 DNA 分子中的其他弱键在维持双螺旋结构的稳定上也起一定作用。这些弱键包括：互补碱基对之间的氢键；磷酸基团上的负电荷与介质中的阳离子之间形成的离子键；范德华引力 (van der waal's force)。

4. DNA 分子的可塑性

在溶液中 DNA 分子具有较大的可塑性。由于分子上局部区域受热力学的作用，往往

使 DNA 分子发生弯曲，缠绕或伸展。这种分子变形并不是由于互补碱基对之间的氢键瞬间断裂的结果，而是由于 DNA 分子多核苷酸链的骨架上的共价键的转角改变所引起的。

(二) A-DNA 的结构

前面提到 DNA 的双螺旋结构又称双螺旋构象，是由主链上的各种单键（键）旋转变形成的一种构象。在不同湿度和盐浓度下，DNA 的右手双螺旋可采取不同的构象，根据 X-衍射分析分为 A-型、B-型、C-型、D-型，呈现这些构象类型的 DNA 分别称为 A-DNA、B-DNA、C-DNA、D-DNA。天然状态的水溶液中的 DNA 具有 Watson-Crick 双螺旋特征，其双螺旋构象属于 B-型，称为 B-DNA。在相对湿度为 75% 以下所获得的 DNA 纤维的 X-衍射分析资料表明，这种 DNA 纤维具有不同于 B-DNA 的结构特点，称为 A-DNA。若降低湿度或在水溶液中加入乙醇，可使 B-DNA 转变为 A-DNA。A-DNA 也是由反向的两条多核苷酸链组成的双螺旋，也为右手螺旋，但是螺体较宽而短，碱基对与中心轴的倾角也不同，呈 19° 。A-DNA 的生物学意义还不很清楚，研究发现 RNA 分子的双螺旋区以及 RNA-DNA 杂交双链具有与 A-DNA 相似的结构，推测在 DNA 的复制（需要引物 RNA）、转录和逆转录过程中 B-DNA 转变为 A-DNA。RNA 分子由于在糖环上有 $2'-OH$ 存在，从空间结构上说不能形成 B-型结构。

(三) Z-DNA 分子的结构

除了 A-DNA 和 B-DNA 以外，自然界中还发现有一种 Z-DNA。A.Rich 在研究 CGCGCG 寡聚体的结构时发现了这类 DNA。虽然，CGCGCG 在晶体中也呈双螺旋结构，但它不是右手螺旋，而是左手螺旋。所以这种 DNA 称左旋 DNA。在 CGCGCG 晶体中，各磷原子之间的联结线呈锯齿形 (zig-zag)，即磷酸基在多核苷酸骨架上的分布呈 Z 字形 (图 3-17)，所以也称它 Z-DNA。Z-DNA 只有一条大沟，而无小沟。

目前仍然不清楚 Z-DNA 究竟具有何种生物学功能。但实验证明，天然 B-DNA 的局部区域可以出现 Z-DNA 的结构，说明 B-DNA 与 Z-DNA 之间是可以互相转变的，并处于某种平衡状态，一旦破坏这种平衡，基因表达可能失控，所以推测 Z-DNA 可能和基因表达的调控有关。

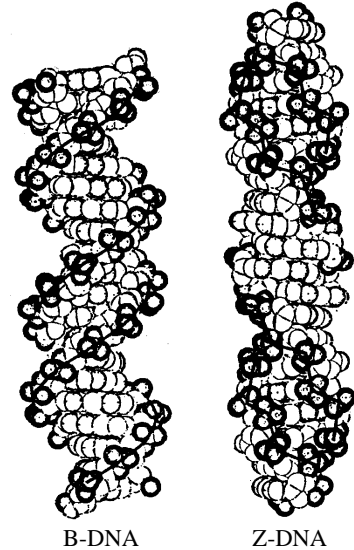


图 3-17 Z-DNA 与 B-DNA 的比

四、DNA 的三级结构

DNA 的二级结构大多为线形的，但电镜观察结果表明，生物体内有些 DNA 是以双链环形 DNA 形式存在的，如某些病毒 DNA，某些噬菌体 DNA，细菌质粒 DNA，真核细胞中的线粒体 DNA，以及许多细菌染色体 DNA 都是环形的。线形结构 DNA 的两端有粘末端，可以借助于 DNA 连接酶将互补的粘末端连接起来，成为环形 DNA。环状结构进一步扭曲成为更复杂的三级结构

DNA 的三级结构包括线状 DNA 形成的纽结、超螺旋 (superhelical form) 和多重螺旋以及环状 DNA 形成的结、超螺旋和连环等多种类型,其中超螺旋是最常见的,所以,DNA 的三级结构主要是指双螺旋进一步扭曲形成的超螺旋。这种折叠应该是高度有序的,因为它们不仅要适合它们所处的细小空间,而且这种折叠和包装还得允许 DNA 能被接近以进行复制和转录。

超螺旋意味着在螺旋的基础上再螺旋。例如,电话话筒和电话机之间的电话线一般是螺旋的,这种螺旋线的再卷曲缠绕就形成了超螺旋。DNA 是以双螺旋的形式围绕着一个轴缠绕的,当双螺旋 DNA 的这个轴在弯曲缠绕时,DNA 就处于超螺旋状态 (DNA supercoiling)。DNA 的超螺旋状态是结构张力的表现。当双螺旋轴沿有“净弯曲”(net bending),

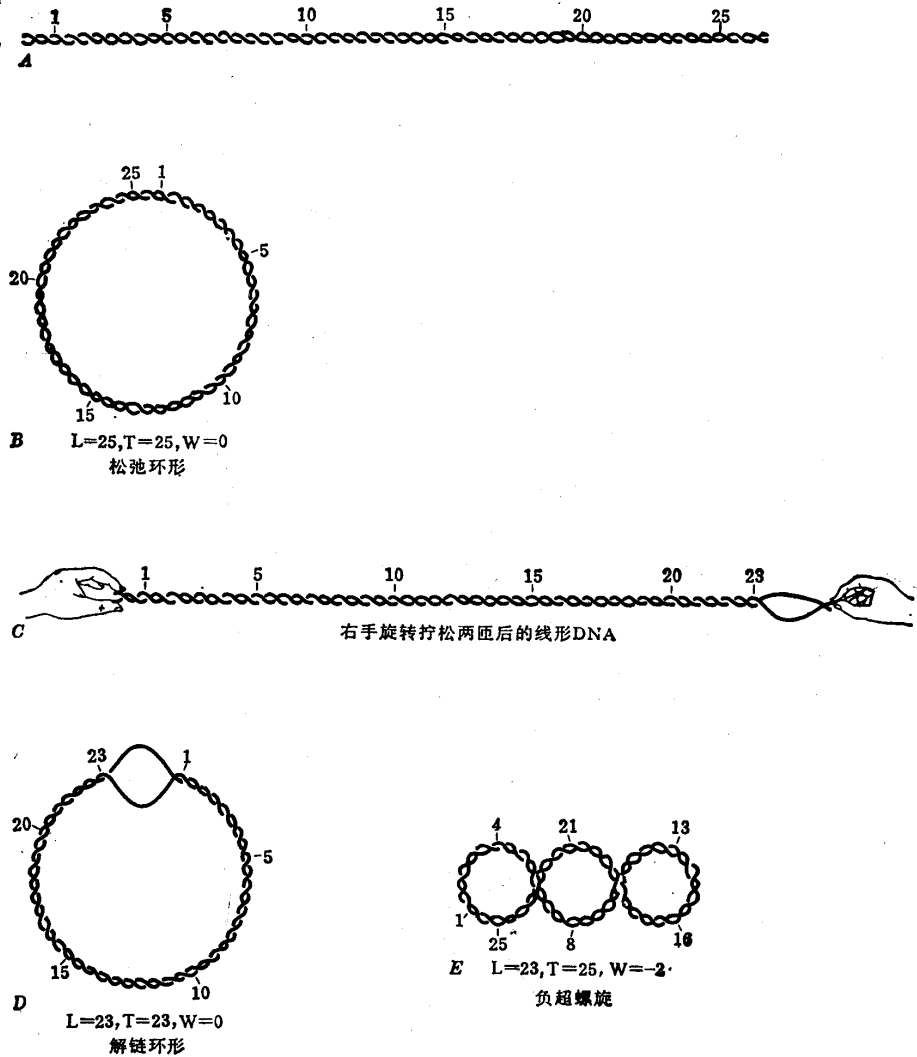


图 3-18 环形 DNA 的不同构象

J.Vinkgrad 在环形 DNA 的研究上有很大贡献。下面就环形 DNA 的基本性质作一些讨论。

DNA 超螺旋的性质是可以量化的, 这种量化的研究可引用拓扑学 (topology) 知识, 以加深对 DNA 分子构象和功能的了解。拓扑学是数学的一个分支, 专门研究物体变形后仍然保留下来的结构特性。为了说明问题起见, 以一段由 250 碱基对组成的线形 B-DNA 为例来加以讨论。图 3-18A 中为一段长 250 碱基对的 B-DNA。这段 DNA 的螺旋数应为 25 ($250/10=25$)。当将此线形 DNA 连接成环形时, 此环形 DNA 称为松弛型 DNA (relaxed DNA) (图 3-18B)。但是若将线形 DNA 的螺旋先拧松两周再连接成环形时, 可以形成两种环形 DNA。一种称解链环形 DNA (unwound circle DNA) (图 3-18D), 它的螺旋数为 23, 还含有一个解链后形成的突环。另一种环形 DNA 称为超螺旋 DNA (superhelix DNA) (图 3-18E), 它的螺旋数仍为 25, 但同时具有两个超螺旋周。从力能学的观点来说, 超螺旋 DNA 更易形成。超螺旋 DNA 具有更为致密的结构, 可以将很长的 DNA 分子压缩在一个极小的体积内。在生物体内, 绝大多数 DNA 的确是以超螺旋的形式存在的。由于超螺旋形 DNA 有较大的密度, 在离心场中移动较线形或开环形 DNA 要快, 在凝胶电泳中泳动的速度也较快。应用超离心及凝胶电泳可以很容易地将不同构象的 DNA 分离开来。

下面讨论环形 DNA 的一些重要的拓扑学特性。

1. 连环数

连环数是环形 DNA 的一个很重要的特性。一个闭合环型 DNA 分子的连环数 (linking number), 严格地等于没有任何超螺旋情况下的螺旋数。连环数具有拓扑异构学性质, 因为不管一闭合环形 DNA 分子如何缠绕或变形, 只要两条 DNA 链不被切开, 它的值就不变。连环数指在双螺旋 DNA 中, 一条链以右手螺旋绕另一条链缠绕的次数, 以字母 L 表示。对于一个闭合环形 DNA 分子而言, 连系数是个整数。习惯上, DNA 双链如以右手方向互相缠绕, 即为右手螺旋, 连系数被定义为正值 (+)。相反如果以左手方向缠绕, 则定义为负值 (-)。

如果要使一个闭合环形 DNA 分子两条链之间的关系保持拓扑结构性质, 这两条链的任意一条都不能有切口 (nick)。如果有一个切口, 则这两条链基本上可以被解螺旋, 并可被完全分开, 因此在这种情况下, 拓扑键是不存在的, 他的 L 值是不定的。

拓扑连环数可被分割成两个结构成分, 一个称缠绕数, 一个称超螺旋周数。这两项值不具有拓扑学性质。

2. 缠绕数 (twisting number) 指 DNA 分子中的 Watson-Crick 螺旋数目, 可近似地看成是 DNA 双链的互相缠绕数, 以 T 表示。上述解链环形与超螺旋形 DNA 虽都具有相同的 L 值, 但它们却具有不同的 T 值。前者 $T=23$, 后者为 25。

3. 超螺旋周数 (number of turns of superhelix) 或扭曲数 (writhing number) 可以近似地看成是螺旋轴的缠绕数, 以 W 表示。上述解链环形与超螺旋形 DNA 的 W 值也是不同的, 前者为 0, 后者为 -2。

L 、 T 、 W 三者之间的关系为:

$$L=T+W。$$

T 与 W 值可以是小数, 但 L 值必须是整数。

L 值相同的 DNA 之间可以不经链的断裂而互相转变。具有不同连环数的同一种 DNA 分子称为拓扑异构体 (topoisomer)。拓扑异构酶可以催化拓扑异构体之间的转换。拓扑异

构体之间的 L 值相差为 1 时，即可以用琼脂糖凝胶电泳将它们分开。

4. 比连环差 (specific linking difference) 以 σ 表示。它用来表示 DNA 的超螺旋程度。

$$\sigma = (L - L_0) / L_0$$

上式中， L_0 是指松弛环形 DNA 的 L 值，如上述超螺旋 DNA 的 $L=23$ ， $L_0=25$ ，所以 $\sigma = -0.08$ 。也可以将 σ 值视为超螺旋密度 (superhelix density)。天然 DNA 的超螺旋密度一般在 -0.03 到 -0.09 之间。负号代表超螺旋周为左手螺旋。上面已经提到，负超螺旋 DNA 是由于两条链的缠绕不足引起的。负超螺旋 DNA 很容易解链，在 DNA 的复制、重组和转录等需要将两条链分开时，宜于进行解链反应。

DNA 的拓扑异构体之间的转变是通过拓扑异构酶 (topoisomerase) 来实现的。J.Wang 和 M.Gellert 首先发现了这类酶。这种酶可以改变 DNA 拓扑异构体的 L 值。拓扑异构酶有两类。I 类能使双链超螺旋 DNA 转变成松弛形环状 DNA，每一次催化作用可使 L 值增加 1。II 类酶刚好相反，可使松弛形环状 DNA 转变成双链超螺旋 DNA，每次催化作用，使 L 值减少 2。拓扑异构酶 II 也称促旋酶 (gyrase)。这两种拓扑异构酶的作用刚好相反，所以细胞内两种酶的含量受严格的控制，使细胞内 DNA 保持在一定的超螺旋水平。

第五节 核糖核酸

一、RNA 的结构

RNA 是细胞内核酸的第二种主要类型，它在把 DNA 中的遗传信息变成功能性蛋白的过程中起中介作用。RNA 是无分支的线形多聚核糖核苷酸，主要由四种核糖核苷酸组成，即腺嘌呤核糖核苷酸 (AMP)，鸟嘌呤核糖核苷酸 (GMP)，胞嘧啶核糖核苷酸 (CMP) 和尿嘧啶核糖核苷酸 (UMP)。这些核苷酸中的戊糖不是脱氧核糖，而是核糖。RNA 分子中还有某些稀有碱基。图 3-19 为 RNA 分子中的一小段，以示 RNA 的结构。

组成 RNA 的核苷酸也是以 3',5'-磷酸二酯键彼此连接起来的。但 RNA 分子比 DNA 分子小得多 (含几十至几千个核苷酸)，且不象 DNA 那样都是双螺旋结构，而是单链线形分子。尽管 RNA 分子中核糖环 C_{2'} 上有一羟基，但并不形成 2',5'-磷酸二酯键。用牛脾磷酸二酯酶降解天然 RNA 时，降解产物中只有 3'-核苷酸，并无 2'-核苷酸，就支持了上述结论。

天然 RNA 只有局部区域为双螺旋结构。这些双链结构是由于 RNA 单链分子通过自身回折使得互补的碱基对相遇，通过氢键结合形成反平行右手双螺旋结构 (称为茎)，不能配对的区域形成突环 (loop，称为环)，被排斥在双螺旋结构之外 (图 3-20)。RNA 中的双螺旋结构为 A-DNA 类型的结构。每一段双螺旋区至少需要有 4~6 对碱基才能保持稳定，同样以氢键和碱基堆积力为稳定因素。一般说，双螺旋区约占 RNA 分子的 50%。RNA 的这种结构称为茎环结构，是各种 RNA 的共同的二级结构特征。在此基础上 RNA 分子进一步扭曲折叠便形成更为复杂的三级结构。下面分别讨论三类主要的 RNA 分子结构。

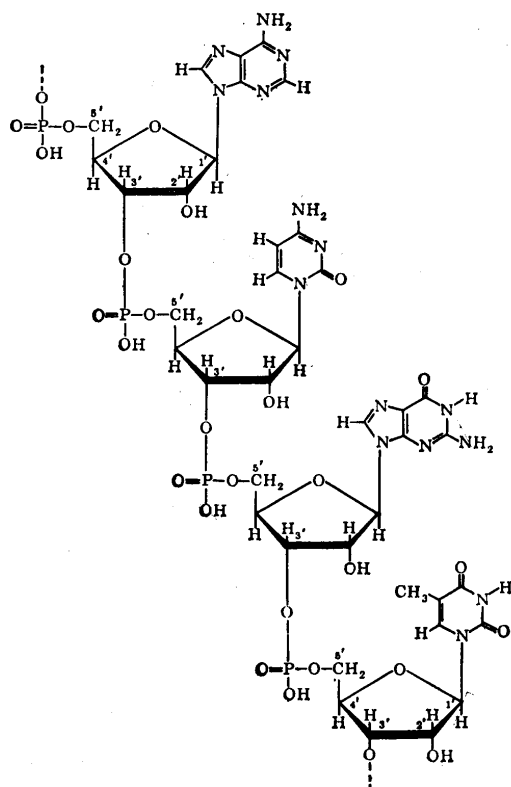


图 3-19 RNA 分子中一段结构

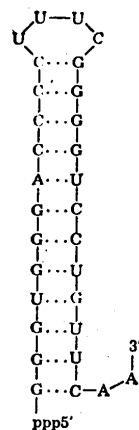


图 3-20 RNA 分子自身回折形成双螺旋区 (茎环结构)

(一) tRNA

1. tRNA 的一级结构

tRNA 的一级结构指 tRNA 分子中核苷酸的排列顺序。1965 年 Holley 等首先测定了酵母丙氨酸 tRNA 的核苷酸的排列顺序。目前已测定一级结构的 tRNA 有二百多种 (不同生物来源的各种 tRNA)，根据这些已测定一级结构的 tRNA 资料分析，tRNA 的一级结构有以下特征：

分子量在 25kd 左右，由 74~93 个核苷酸组成，大多数为 76 个核苷酸组成的单链，沉降系数在 4S 左右；(注：沉降系数又称沉降常数，指单位离心力场中沉降分子下沉的速度，为了纪念超离心法创始人 Svedberg，用 S 作为沉降系数的单位， $1S = 10^{-13}s$ ，S 常用来描述核酸分子、蛋白质分子和核糖体等的大小，参见第二章)。

碱基组成中有较多的稀有碱基，每个 tRNA 分子中少则含有 2 个，多则含有 19 个修饰核苷酸，它们的功能还不清楚。

3 末端都为 $-pC_pC_pA_{OH}$ ，用来接受活化的氨基酸。所以这个末端称接受末端。

5 末端大多为 $pG-$ ，也有 $pC-$ 的。

有十几个位置上的核苷酸在几乎所有的 tRNA 中都是不变的，即为恒定核苷酸，如第 8 位的 U，第 18、19 位的 G 等，这些恒定核苷酸对于维持三级结构和实现生物功能起

着重要作用，也说明 tRNA 在进化上的保守性。

2. tRNA 的二级结构

tRNA 的二级结构都呈三叶草形（图 3-21）。这种三叶草形的 tRNA 二级结构是 1965 年 Holley 等首先提出的，随后被许多物理和化学的研究及 X-射线衍射分析的结果所证实。除发现哺乳动物线粒体丝氨酸 tRNA 的二级结构为二叶草形外，各种 tRNA 的二级结构都呈三叶草形。双螺旋区构成了叶柄，突环区好象是三叶草的三片小叶。tRNA 的二级结构十分稳定。

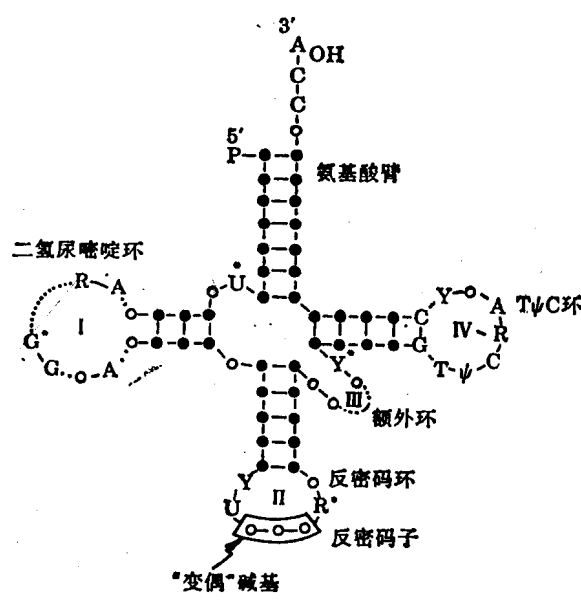


图 3-21 tRNA 的三叶草形二级结构模型

R: 嘌呤核苷酸 Y: 嘧啶核苷酸 T: 胸腺嘧啶核糖核苷酸 : 假尿苷酸 黑圆点: 螺旋内的碱基 白圆点: 不互补的碱基

tRNA 三叶草形结构的基本特征是：在 3' 末端有一段以 -CCA 为主的单链区，由 7 对碱基组成，称氨基酸茎(amino acid arm)。由于双螺旋结构所占比例甚高（大约有 50% 的核苷酸配对），分别形成了 4 个双螺旋区，称为茎（或称为臂）。这 4 个茎是：氨基酸接受茎、二氢尿嘧啶茎（简称 D 茎）、反密码子茎和 T-C 茎。大约有 50% 的核苷酸不配对，分别形成了 4 个环：二氢尿嘧啶环（简称 D 环）、反密码子环、T-C 环和额外环（又称可变环）。不同的 tRNA 分子在长度上的变化主要发生在三个区域，即 D 环、额外环的核苷酸数目及 D 茎上配对的核苷酸数目不同。根据这三个区域的核苷酸数目不同可将 tRNA 分成三种类型，以 D 茎为 4 对核苷酸、额外环为 3~6 个核苷酸的类型约占 tRNA 总数的 50%。

从上述特征可知，tRNA 的三叶草形结构一般可分为四茎四环共 8 个结构区域，其名称由来与核苷酸的组成与功能有关。二氢尿嘧啶环（dihydrouridine loop, D 环）由 8~12 个核苷酸组成，具有两个二氢尿嘧啶核苷（D）而得名，通过由 3~4 对碱基组成的 D 茎与

tRNA 分子的其余部分相连；反密码环 (anticodon loop) 是由 7 个核苷酸组成，环中部为由 3 个碱基组成的反密码子，可与 mRNA 的相应密码子反平行配对结合，次黄嘌呤核苷酸 (也称肌苷酸，缩写成 I) 常出现于反密码子中，反密码环通过由 5 对碱基组成的反密码茎与 tRNA 的其余部分相连；额外环 (extra loop) 由 3~18 个核苷酸组成，不同的 tRNA 具有不同大小的额外环，所以是 tRNA 分类的重要指标；T^ψC 环由于存在假尿苷 (ψ) 胸苷 (T) 和胞苷 (C) 序列而得名，一般由 7 个核苷酸组成，通过 T^ψC 茎与 tRNA 的其余部分相连，除个别例外，几乎所有 tRNA 在此环中都含有 T^ψC；氨基酸茎富含鸟嘌呤，由于紧连 3' 端的 -XCCA (注：X 为 A 或 G 等)，其中的 A 通过共价结合而接受活化的氨基酸，故得名。但只有这些结构区域进一步形成三级结构之后，tRNA 才具有特定的生物学功能。

3. tRNA 的三级结构 tRNA 三级结构的形状象一个倒写的 L 字母 (图 3-22)。Kim (1973) 和 Robertus (1974) 应用 X-光衍射分析对酵母苯丙氨酸 tRNA 晶体进行研究并先后阐明了 tRNA 的三级结构。随后用同样方法测定了其它几种 tRNA 三级结构，结果表明了倒 L 型结构是 tRNA 三级结构的共同特征。

(二) mRNA

mRNA 是以 DNA 为模板合成的。mRNA 又是蛋白质合成的模板，每一种多肽都有一种特定的 mRNA 负责编码，所以细胞内 mRNA 的种类是很多的，分子大小不一。mRNA 的二级结构也是通过单链自身折叠而形成的茎环结构，如兔珠蛋白 mRNA 有 55%~62% 的核苷酸处于双螺旋之中。

原核生物和真核生物 mRNA 的结构有所不同，其特点区别如下：

1. 原核生物的 mRNA 是多顺反子，真核生物的 mRNA 是单顺反子。

“顺反子”(cistron) 是通过顺反测验鉴定的遗传功能单位，相应于一个多肽链的 DNA 顺序加上翻译的起始和终止信号，也就是一个多肽链的基因。典型的原核生物 mRNA 是由多顺反子转录来的，可编码几条不同的多肽链，故称为多顺反子 mRNA，如大肠杆菌的乳糖操纵子中三个结构基因转录成一条多顺反子 mRNA。多顺反子 mRNA 的 5' 端和 3' 端都有非编码区，编码区之间也有非编码的间隔区，间隔区长短不一；每个编码区都有自己的起始密码子和终止密码子。目前研究过的真核生物 mRNA 都是单顺反子，只编码一条多肽链，其 5' 端和 3' 端也各有一段非编码区。

2. 绝大多数真核细胞 mRNA 在 3'-末端有一段长约 200 个核苷酸的 polyA。

polyA (polyadenylic acid) 是在转录后经 polyA 聚合酶的作用而添加上去的。polyA 聚合酶对 mRNA 专一，不作用于 rRNA 和 tRNA。原核生物的 mRNA 一般无 3'-polyA，但某

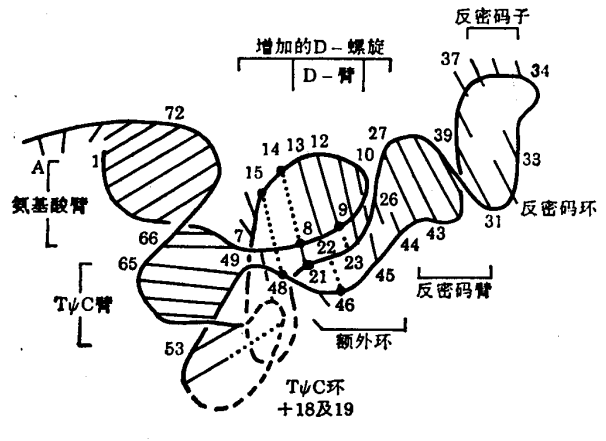


图 3-22 酵母苯丙氨酸 tRNA 的三级结构
(按 Robertus 等 1974 年提出的模型)

些病毒 mRNA 也有 3'-polyA。polyA 可能有多方面功能：与 mRNA 从细胞核到细胞质的转移有关；与 mRNA 的半寿期有关，新合成的 mRNA，polyA 链较长，而衰老的 mRNA，polyA 链缩短。

3. 真核细胞 mRNA 5'-末端还有一个特殊的结构 5'-m⁷G-5'ppp5'-N_m-3'-P，称为 5'-帽子 (cap)(图 3-23)。

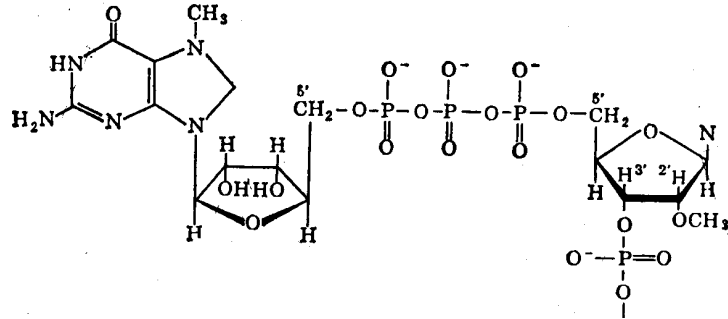


图 3-23 mRNA 5'-末端的“帽子”结构

mRNA 的 5'-末端的鸟嘌呤 N₇ 被甲基化。鸟嘌呤核苷酸经焦磷酸与相邻的一个核苷酸相连，形成 5',5'-磷酸二酯键。目前认为 5'-帽子结构的功能是：封闭 mRNA 的 5'端，使其没有游离的 5'-磷酸，这种结构有抗 5'-核酸外切酶降解的作用，使 mRNA 更稳定；作为 mRNA 与核糖体结合的信号，无帽子结构的 mRNA 不能与核糖体的 40S 亚基结合；可能与蛋白质合成的正确起始作用有关，帽子结构附近区域能形成发夹结构，缩短了帽子结构与起始密码子之间的空间距离，因此推测帽子结构可能是蛋白质合成的起始辨认信号的一部分。某些真核细胞病毒也有 5'-帽子结构。

(三) rRNA

rRNA 是核糖体的组成成分，约占核糖体重量的三分之二左右。rRNA 的种类、大小一般用沉降系数 (S) 表示。rRNA 是由大约 120~5 000 个核苷酸组成的单链，不少 rRNA

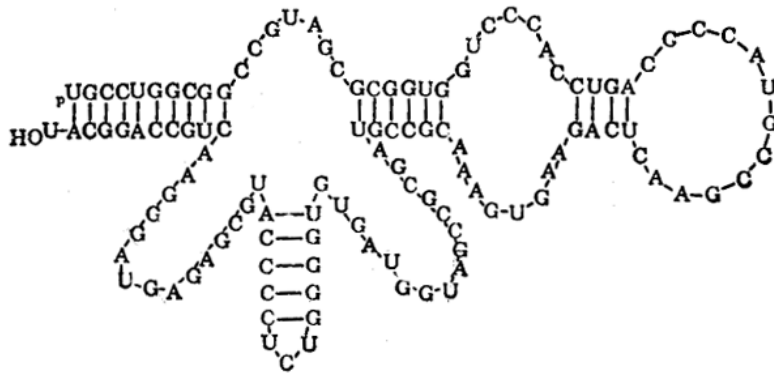


图 3-24 大肠杆菌 5SrRNA 的二级结构示意图(共 120 个核苷酸，图中的环分为：左为多分支环，中为中间环，右为发夹环)

的一级结构已经测定,如大肠杆菌核糖体中的 5SrRNA 含 120 个核苷酸、16SrRNA 含 1 542 个核苷酸、23SrRNA 含 2 904 个核苷酸。由一级结构推导出来 rRNA 的二级结构都已阐明,也是通过单链自身折叠形成的茎环结构,分子越大茎环结构越复杂。由于 rRNA 分子柔性较大,三级结构的研究较困难,目前对 rRNA 的三级结构还了解不多。图 3-24 为大肠杆菌 5SrRNA 的结构。

第六节 核酸的理化性质与最常用的研究方法

核酸的理化性质及研究方法内容十分庞杂,本节只可能对若干比较重要的核酸理化性质和研究方法作概要叙述。

一、一般物理性质

1. 溶解度 DNA 为白色纤维状固体, RNA 为白色粉末状固体, 它们都微溶于水, 其钠盐在水中的溶解度较大。它们可溶于 2-甲氧乙醇, 但不溶于乙醇、乙醚和氯仿等一般有机溶剂, 因此, 常用乙醇从溶液中沉淀核酸, 当乙醇浓度达 50% 时, DNA 就沉淀出来, 当乙醇浓度达 75% 时 RNA 也沉淀出来。DNA 和 RNA 在细胞内常与蛋白质结合成核蛋白, 两种核蛋白在盐溶液中的溶解度不同, DNA 核蛋白难溶于 0.14mol/L 的 NaCl 溶液, 可溶于高浓度 (1~2mol/L) 的 NaCl 溶液, 而 RNA 核蛋白则易溶于 0.14mol/L 的 NaCl 溶液, 因此常用不同浓度的盐溶液分离两种核蛋白。

2. 分子大小 DNA 分子极大, 分子量在 10^6 以上, RNA 的分子比 DNA 分子小得多。核酸分子的大小可用长度、核苷酸对 (或碱基对) 数目、沉降系数 (S) 和分子量等来表示。

3. 形状及粘度 核酸 (特别是线形 DNA) 分子极为细长, 其直径与长度之比可达 $1:10^7$, 因此核酸溶液的粘度很大, 即使是很稀的 DNA 溶液也有很大的粘度。RNA 溶液的粘度要小得多。核酸若发生变性或降解, 其溶液的粘度降低。

二、核酸的紫外吸收

嘌呤碱和嘧啶碱具有共轭双键, 使碱基、核苷、核苷酸和核酸在 240~290nm 的紫外波段有一强烈的吸收峰, 因此核酸具有紫外吸收特性。DNA 钠盐的紫外吸收在 260nm 附近有最大吸收值 (图 3-25), 其吸光率 (absorbance) 以 A_{260} 表示, A_{260} 是核酸的重要性质, 在核酸的研究中很有用处。

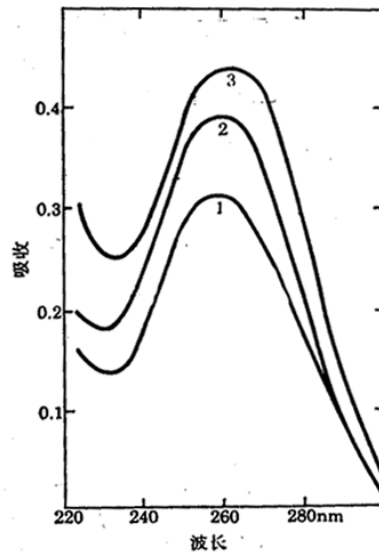


图 3-25 DNA 的紫外吸收光谱

1.天然 DNA 2.变性 DNA 3.核苷酸总吸收值

在 230nm 处为吸收低谷，RNA 钠盐的吸收曲线与 DNA 无明显区别。不同核苷酸有不同的吸收特性。所以可以用紫外分光光度计加以定量及定性测定。

实验室中最常用的是定量测定小量的 DNA 或 RNA。对待测样品是否纯品可用紫外分光光度计读出 260nm 与 280nm 的 OD 值，因为蛋白质的最大吸收在 280nm 处，因此从 A_{260}/A_{280} 的比值即可判断样品的纯度。纯 DNA 的 A_{260}/A_{280} 应为 1.8，纯 RNA 应为 2.0。样品中如含有杂蛋白及苯酚， A_{260}/A_{280} 比值即明显降低。不纯的样品不能用紫外吸收法作定量测定。对于纯的核酸溶液，测定 A_{260} ，即可利用核酸的比吸光系数计算溶液中核酸的量，核酸的比吸光系数是指浓度为 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的核酸水溶液在 260nm 处的吸光率，天然状态的双链 DNA 的比吸光系数为 0.020，变性 DNA 和 RNA 的比吸光系数为 0.022。通常以 1OD 值相当于 $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ 双螺旋 DNA，或 $40 \mu\text{g}/\text{mL}$ 单螺旋 DNA（或 RNA），或 $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ 寡核苷酸计算。这个方法既快速，又相当准确，而且不会浪费样品。对于不纯的核酸可以用琼脂糖凝胶电泳分离出区带后，经吡啶溴红染色而粗略地估计其含量。

三、核酸的沉降特性

溶液中的核酸分子在引力场中可以下沉。不同构象的核酸（线形，开环，超螺旋结构）蛋白质及其他杂质在超离心机的强大引力场中，沉降的速率有很大差异，所以可以用超离心法纯化核酸，或将不同构象的核酸进行分离，也可以测定核酸的沉降常数与分子量。

应用不同介质组成密度梯度进行超离心分离核酸时，效果较好。RNA 分离常用蔗糖梯度。分离 DNA 时用得最多的是氯化铯梯度。氯化铯在水中有很大的溶解度。可以制成浓度很高（ $8\text{mol}/\text{L}$ ）的溶液。

应用吡啶溴红 氯化铯密度梯度平衡超离心，很容易将不同构象的 DNA、RNA 及蛋白质分开。这个方法是目前实验室中纯化质粒 DNA 时最常用的方法。如果应用垂直转头，当转速为 $65\ 000\text{r}/\text{min}$ （Beckman L-70 超离心机），只要 6h 即可以完成分离工作。但是如果采用角转头，转速为 $45\ 000\text{r}/\text{min}$ 时，则需 36h。离心完毕后，离心管中各种成分的分布可以在紫外光照射下显示得一清二楚（图 3-26）。蛋白质漂浮在最上面，RNA 沉淀在底部。超螺旋 DNA 沉降较快，开环及线形 DNA 沉降较慢。用注射针头从离心管侧面在超螺旋 DNA 区带部位刺入，收集这一区带的 DNA。用异戊醇抽提收集到的 DNA 以除去染料，然后透析除 CsCl，再用苯酚抽提 1~2 次，即可用乙醇将 DNA 沉淀出来。这样得到的 DNA 有很高的纯度，可供 DNA 重组、测定序列及绘制限制酶图谱等。在少数情况下，需要特别纯的 DNA 时，可以将此 DNA 样品再进行一次氯化铯密度梯度超离心分离。

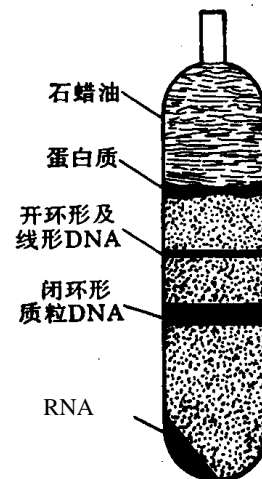


图 3-26 经染料-氯化铯密度梯度超离心后，质粒 DNA 及各种杂质的分布

四、核酸的两性解离及凝胶电泳

核酸既含有呈酸性的磷酸基团，又含有呈弱碱性的碱基，故为两性电解质，可发生两性解离。但磷酸的酸性较强，在核酸中除末端磷酸基团外，所有形成磷酸二酯键的磷酸基团仍可解离出一个 H^+ ，其 pK 为 1.5；而嘌呤和嘧啶碱基为含氮杂环，又有各种取代基，既有碱性解离又有酸性解离的性质，解离情况复杂，但总的来看，它们呈弱碱性。所以，核酸相当于多元酸，具有较强的酸性，当 $pK > 4$ 时，磷酸基团全部解离，呈多阴离子状态。

核酸是具有较强的酸性的两性电解质，其解离状态随溶液的 pH 而改变。当核酸分子的酸性解离和碱性解离程度相等，所带的正电荷与负电荷相等，即成为两性离子，此时核酸溶液的 pH 就称为等电点 (isoelectric point, 简称 pI)。核酸的等电点较低，如酵母 RNA 的 pI 为 2.0~2.8。根据核酸在等电点时溶解度最小的性质，把 pH 调至 RNA 的等电点，可使 RNA 从溶液中沉淀出来。

根据核酸的解离性质，用中性或偏碱性的缓冲液使核酸解离成阴离子，置于电场中便向阳极移动，这就是电泳 (electrophoresis)。凝胶电泳可算是当前核酸研究中最常用的方法了。它有许多优点：简单、快速、灵敏、成本低。常用的凝胶电泳有琼脂糖 (agarose) 凝胶电泳和聚丙烯酰胺 (polyacrylamide) 凝胶电泳。可以在水平或垂直的电泳槽中进行。凝胶电泳兼有分子筛和电泳双重效果，所以分离效率很高。

(一) 琼脂糖凝胶电泳

以琼脂糖为支持物。电泳的迁移率决定于以下因素：

1. 核酸分子大小 迁移率与分子量对数成反比；
2. 胶浓度 迁移率与胶浓度成反比。常用 1% 胶分离 DNA；
3. DNA 的构象 一般条件下超螺旋 DNA 的迁移率最快，线形 DNA 其次，开环形最慢。但在胶中加入过多的吡啶溴红时，上述分布次序会发生改变；
4. 电压 一般不大于 $5V/cm$ 。在适当的电压差时，迁移率与电流大小成正比；
5. 碱基组成 有一定影响，但影响不大；
6. 温度 $4\sim 30$ 都可，常在室温。

琼脂糖凝胶电泳常用于分析 DNA。由于琼脂糖制品中往往带有核糖核酸酶 (RNase) 杂质，所以用于分析 RNA 时，必须加入蛋白质变性剂，如甲醛等，以使核糖核酸酶变性。

电泳完毕后，将胶在荧光染料吡啶溴红的水溶液中染色 ($0.5 \mu g/ml$)。吡啶溴红为一扁平分子，很易插入 DNA 中的碱基对之间。DNA 与吡啶溴红结合后，经紫外光照射，可发射出红 橙色可见荧光。 $0.1 \mu g$ DNA 即可用此法检出，所以此法十分灵敏。可根据荧光

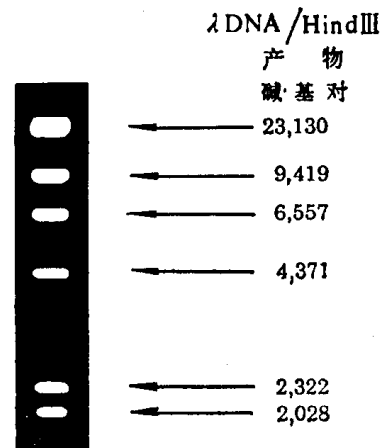


图 3-27 (λ DNA/Hind III 片段) 琼脂糖凝胶电泳图

强度可以大体判断 DNA 样品的浓度。若在同一胶上加一已知浓度的 DNA 作参考,则所测得的样品浓度更为准确。可以用灵敏度很高的负片将凝胶上所呈现的电泳图谱在紫外光照射下拍摄下来,作进一步分析与长期保留。图 3-27 即为凝胶电泳图谱。

应用凝胶电泳可以正确地测定 DNA 片段的分子大小。实用的方法是在同一胶上加一已知分子量的样品(如图 3-27 中的 DNA/Hind 的片段)。电泳完毕后,经吡啶溴红染色、照相,从照片上比较待测样品中的 DNA 片段与标准样品中的哪一条带最接近,即可推算出未知样品中各片段的大小。目前许多试剂公司都能提供各种不同分子量的标准样品。凝胶上的样品,还可以设法回收,以供进一步研究。回收的方法很多,可参考其他资料。最常用的方法是在紫外光照射下将胶上某一区带切割下来,切下的胶条放在透析袋中,装上电泳液,在水平电泳槽中进行电泳,使胶上的 DNA 释放出来并进一步粘在透析袋内壁上,电泳 3~4 小时后,将电极倒转,再通电 30~60s,粘在壁上的 DNA 重又释放到缓冲液中。取出透析袋内的缓冲液(丢弃胶条),用苯酚抽提 1~2 次,水相用乙醇沉淀。这样回收的 DNA 纯度很高,可供进一步进行限制酶分析、序列分析或作末端标记。回收率在 50% 以上。

(二) 聚丙烯酰胺凝胶电泳

以聚丙烯酰胺作支持物。常用垂直板电泳。单体丙烯酰胺在加入交联剂后,就成聚丙烯酰胺。由于这种凝胶的孔径比琼脂糖凝胶的要小,所以可用于分析分子量小于 1 000bp 的 DNA 片段。聚丙烯酰胺中一般不含有 RNase,所以可用于 RNA 的分析。但仍要留心缓冲液及其他器皿中所带的 RNase。

聚丙烯酰胺凝胶上的核酸样品,经吡啶溴红染色,在紫外光照射下,发出的荧光很弱,所以浓度很低的核酸样品不能用此法检测出来。

五、核酸的变性、复性

(一) 变性

变性(denaturation)作用是核酸的重要物化性质。核酸的变性指核酸双螺旋区的氢键断裂,变成单链的无规则线团,使核酸的某些光学性质和流体力学性质发生改变,有时部分或全部生物活性丧失(图 3-28),并不涉及共价键的断裂。多核苷酸骨架上共价键(3', 5'-磷酸二酯键)

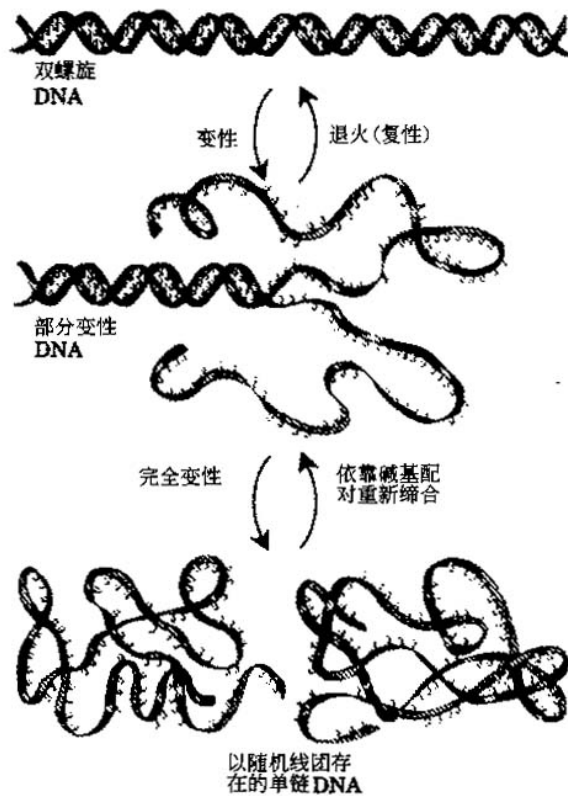


图 3-28 DNA 的变性与复性

的断裂称核酸的降解。降解引起核酸分子量降低。

当将 DNA 的稀盐溶液加热到 80~100 时，双螺旋结构即发生解体，两条链分开，形成无规则线团。一系列物化性质也随之发生改变：粘度降低，浮力密度升高等，同时改变二级结构，有时可以失去部分或全部生物活性。

DNA 变性后，由于双螺旋解体，碱基堆积已不存在，藏于螺旋内部的碱基暴露出来，这样就使得变性后的 DNA 对 260nm 紫外光的吸光率比变性前明显升高（增加），这种现象称为增色效应（hyperchromic effect）。常用增色效应跟踪 DNA 的变性过程，了解 DNA 的变性程度。

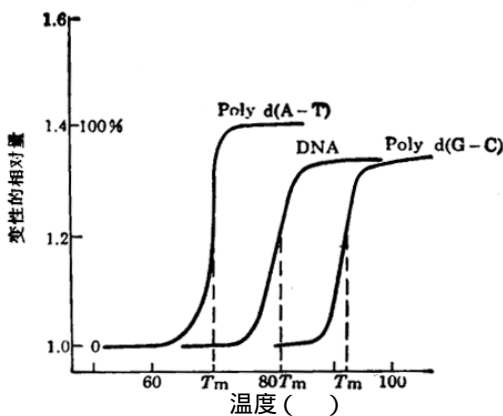


图 3-29 某些 DNA 的 T_m 值

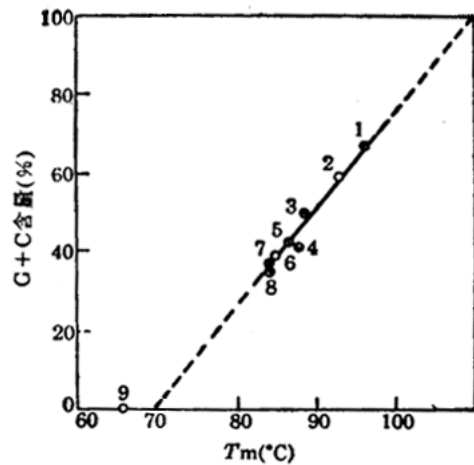


图 3-30 DNA 的 T_m 值与 G+C 含量关系

DNA 来源：1. 草分支杆菌 2. 沙门氏杆菌 3. 大肠杆菌 4. 鲑鱼精子 5. 小牛胸腺 6. 肺炎球菌 7. 酵母 8. 噬菌体 T6 9. 多聚 d(A=T)

可以引起核酸变性的因素很多，如加热、极端的 pH、有机溶剂、酰胺、尿素等。由温度升高而引起的变性称热变性。由酸碱度改变引起的变性称酸碱变性。尿素是用聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定 DNA 序列常用的变性剂。甲醛也常用于琼脂糖凝胶电泳法测定 RNA 的分子大小。

DNA 变性的特点是爆发式的。当病毒或细菌 DNA 分子的溶液被缓慢加热进行 DNA 变性时，溶液的紫外吸收值在到达某温度时会突然迅速增加，并在一个很窄的温度范围内达到最高值。其紫外吸收增加 40%，此时 DNA 变性发生并完成。DNA 热变性时，其紫外吸收值到达总增加值一半时的温度，称为 DNA 的变性温度。由于 DNA 变性过程犹如金属在熔点的熔解，所以 DNA 的变性温度亦称为该 DNA 的熔点或熔解温度（melting temperature），用 T_m 表示。DNA 的 T_m 值一般在 70~85 之间（图 3-29），常在 0.15mol/L NaCl，0.015mol/L 柠檬酸三钠（sodium chloride-sodium citrate, SSC）溶液中进行测定。

DNA 的 T_m 值大小与下列因素有关：

1. DNA 的均一性

均一性愈高的 DNA 样品，熔解过程愈是发生在一个很小的温度范围内。

2. $G_1\hat{C}$ 的含量

$G_1\hat{C}$ 含量越高， T_m 值越高，二者成正比关系（图 3-30）。这是因为 $G_1\hat{C}$ 对比 $A=T$ 对更为稳定的缘故。所以测定 T_m 值可推算出 $G_1\hat{C}$ 对的含量。其经验公式为：

$$G_1\hat{C}\% = (T_m - 69.3) \quad 2.44$$

3. 介质中的离子强度

一般说离子强度较低的介质中，DNA 的熔解温度较低，熔解温度的范围较宽。而在较高的离子强度的介质中，情况则相反（图 3-31）。所以 DNA 制品应保存在较高浓度的缓冲液或溶液中。常在 1mol/L NaCl 中保存。RNA 分子中有局部的双螺旋区，所以 RNA 也可发生变性，但 T_m 值较低，变性曲线也不那么陡。

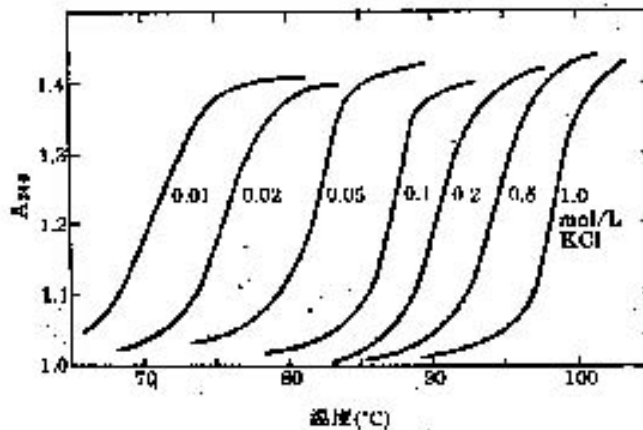


图 3-31 大肠杆菌 DNA 在不同 KCl 浓度中的熔解

(二) 复性

变性 DNA 在适当条件下，两条彼此分开的链重新缔合（reassociation）成为双螺旋结构的过程称为复性（renaturation）。DNA 复性后，许多物化性质又得到恢复，生物活性也可以得到部分恢复。复性过程基本上符合二级反应动力学，其中第一步是相对缓慢的，因为两条链必须依靠随机碰撞找到一段碱基配对部分，首先形成双螺旋。第二步快得多，尚未配对的其他部分按碱基配对相结合，象拉锁链一样迅速形成双螺旋。

反应的进行与许多因素有关。将热变性的 DNA 骤然冷却时，DNA 不可能复性，例如用同位素标记的双链 DNA 片段进行分子杂交时，为获得单链的杂交探针，要将装有热变性 DNA 溶液的试管直接插入冰浴，使溶液在冰浴中骤然冷却至 0°C 。由于温度降低，单链 DNA 分子失去碰撞的机会，因而不能复性，保持单链变性的状态，这种处理过程叫“淬火”（quench）。热变性 DNA 在缓慢冷却时，可以复性，这种复性称为退火（annealing）。DNA 的片段越大，复性越慢。DNA 的浓度越大，复性越快。在一定条件下，复性反应的速度可以用 Cot 来衡量。 C_0 为变性 DNA 的原始浓度，以核苷酸的摩尔浓度表示， t 为时间，以秒表示。实验证明，两种浓度相同但来源不同的 DNA，复性时间的长短与基因组的大小有关（图 3-32）。具有很多重复序列的 DNA，复性也快。

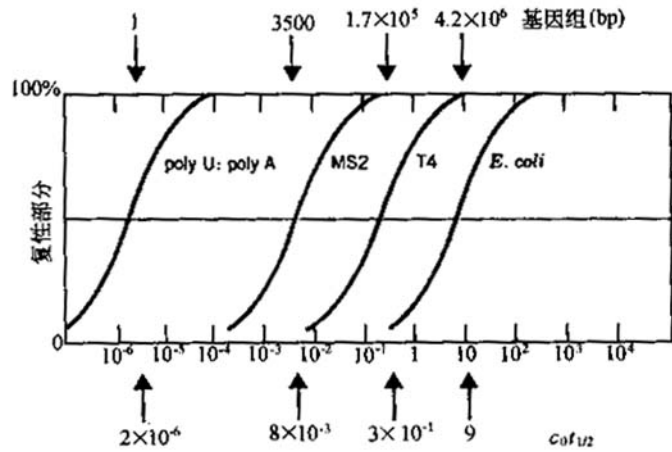


图 3-32 各种不同 DNA 分子的复性动力学曲线

DNA 复性后，其溶液的 A_{260} 值减小，最多可减小至变性前的 A_{260} 值，这现象称减色效应 (hypochromic effect)。引起减色效应的原因是碱基状态的变化，DNA 复性后其碱基又藏于双螺旋内部，碱基对又呈堆积状态，它们之间介电子的相互作用又得以恢复，这样就使碱基吸收紫外光的能力减弱。可用减色效应的大小来跟踪 DNA 的复性过程，衡量复性的程度。

(三)核酸的杂交(hybridization)

根据变性和复性的原理，将不同来源的 DNA 变性，若这些异源 DNA 之间在某些区域有相同的序列，则退火条件下能形成 DNA-DNA 异源双链，或将变性的单链 DNA 与 RNA 经复性处理形成 DNA-RNA 杂合双链，这种过程称为分子杂交 (molecular hybridization)。核酸的杂交在分子生物学和分子遗传学的研究中应用极广，许多重大的分子遗传学问题都是用分子杂交来解决的。

核酸杂交可以在液相或固相上进行。目前实验室中应用较广的是用硝酸纤维素膜作支持物进行的杂交。英国的分子生物学家 E.M.Southern 所发明的 Southern 印迹法 (southern blotting) 就是将凝胶上的 DNA 片段转移到硝酸纤维素膜上后再进行杂交的。这里以 DNA-DNA 杂交为例，较详细地介绍 Southern 印迹法。将 DNA 样品经限制性内切酶降解后，用琼脂糖凝胶电泳进行分离。将胶浸泡在碱 (NaOH) 中使 DNA 变性，并将变性 DNA 转移到硝酸纤维素膜上 (硝酸纤维素膜只吸附变性 DNA!)，在 80 °C 烤 4~6h，使 DNA 牢固地吸附在纤维素膜上。然后与放射性同位素标记的变性后 DNA 探针进行杂交。杂交须在较高的盐浓度及适当的温度 (一般 68 °C) 下进行数小时或十余小时，再通过洗涤，除去未杂交上的标记物。将纤维素膜烘干后进行放射自显影。全部过程见图 3-33。

除了 DNA 外，RNA 也可用作探针 (probe)。用 ^{32}P 标记核酸时 (用作探针)，可以在 3' 或 5' 末端标记，也可采用均匀标记。

应用类似的方法也可分析 RNA，即将 RNA 变性后转移到纤维素膜上再进行杂交。此方法称 Northern 印迹法 (Northern blotting)。

不同来源的核酸链的杂交形成了近代分子遗传学许多重要实践技术的基础。在有一段合适的互补 DNA 单链的情况下（通常对这个 DNA 链进行适当的标记），通过杂交可以在许多其他 DNA 顺序存在时检出一个特殊 DNA 序列或基因。应用核酸杂交技术，可以将含量极少的真核细胞基因组中的单拷贝基因钓出来。

六、核酸的酸解、碱解与酶解

核酸在酸、碱和酶的作用下，发生共价键断裂，多核苷酸链被打断，分子量变小，此过程称为降解。下面简要讨论酸、碱和酶对核酸的降解作用。

（一）酸解

酸对核酸的作用因酸的浓度、温度和作用时间长短而不同。用温和的或稀的酸作短时间处理，DNA 和 RNA 都不发生降解。但延长处理时间或提高温度，或提高酸的强度，则会使核酸中的部分糖苷键发生水解，先是嘌呤碱基被水解下来，生成无嘌呤的核酸，同时少数磷酸二酯键也发生水解，使链断裂。若用中等强度的酸在 100℃ 下处理数小时，或用较浓的酸（如 2~6mol/L HCl）处理，则可使嘧啶碱基水解下来，更多的磷酸二酯键断裂，核酸降解程度增加。

（二）碱解

RNA 在稀碱条件下很容易水解生成 2'-核苷酸和 3'-核苷酸。因为 RNA 中的核糖具有 2'-OH，在碱催化下 3',5'-磷酸二酯键断裂，先形成中间物 2',3'-环核苷酸，它不稳定而进一步水解，生成 2'-核苷酸和 3'-核苷酸的混合物。反应过程见图 3-34。

RNA 碱解所用的 KOH（或 NaOH）的浓度可因温度和作用时间而不同，如 1 mol/L KOH（或 NaOH）在 80℃ 下作用 1h，或 0.3 mol/L KOH（或 NaOH）在 37℃ 下作用 16h 均可以使 RNA 水解成单核苷酸。在同样的稀碱条件下，DNA 是稳定的，不会被水解成单核苷酸，因为 DNA 中的脱氧核糖 C_{2'}位没有 -OH，不能形成 2',3'-环核苷酸。DNA 在碱的作用下，只发生变性，不发生磷酸二酯键的水解。

根据碱对 DNA 和 RNA 的不同作用，可用碱解法从 RNA 制取 2'-和 3'-核苷酸；用碱处理 DNA 和 RNA 混合液，使 RNA 水解成单核苷酸保留在溶液中，再把 DNA 从溶液中沉淀下来，分别进行定量测定。

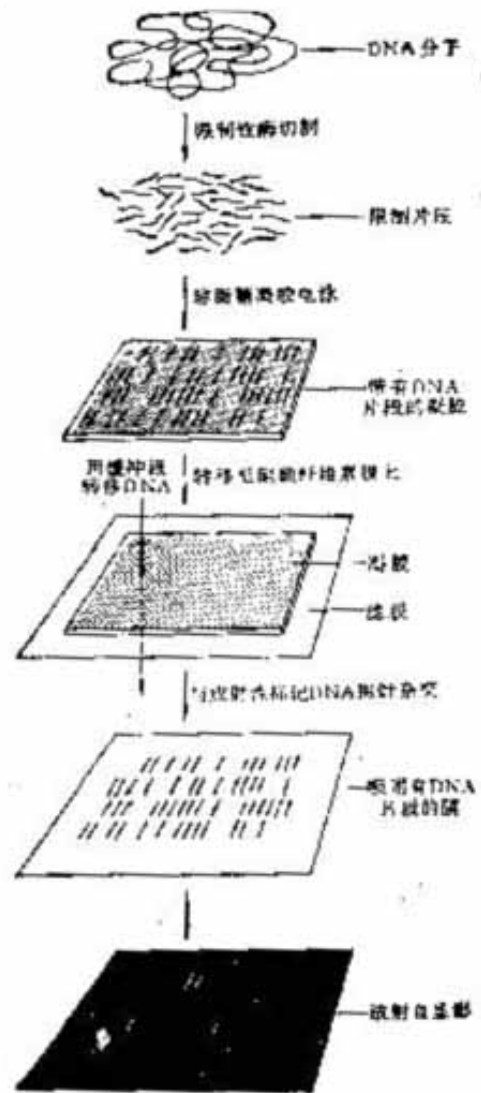


图 3-33 Southern 印迹法图解

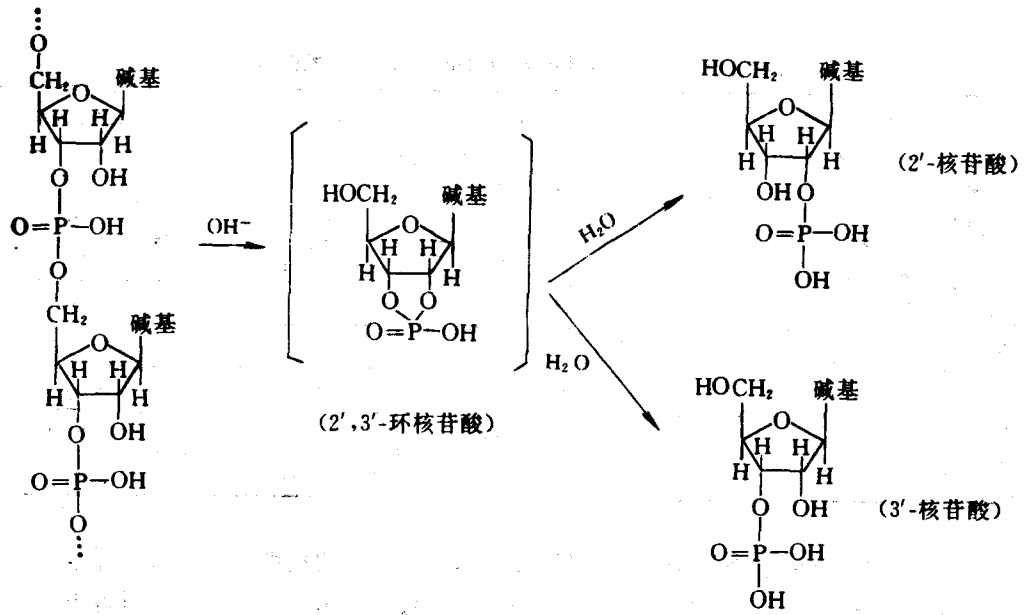


图 3-34 RNA 碱解反应过程

(三) 核酸的酶解

1. 核酸的酶法水解与核酸酶的分类

能水解核酸的酶称为核酸酶 (nucleases)。实际上所有的细胞中都含有各种核酸酶。它们参加正常的核酸代谢过程。有些器官如胰脏, 可以提供含有大量核酸酶的消化液以水解食物中的核酸。核酸酶都是“磷酸二酯酶”(phospho diesterases), 它们催化在水参与下磷酸二酯键的断裂。由于核酸链是由两个酯键将核苷酸连接而成的, 核酸酶切割磷酸二酯键的位置不同会产生不同的末端产物。

核酸酶分为内切核酸酶 (endonuclease) 和外切核酸酶 (exonucleases)。外切核酸酶只从一条核酸链的一端逐个切断磷酸二酯键释放单核苷酸。而内切核酸酶在核酸链的内部切割核酸链, 产生核酸片段 (参见第九章)。

与大部分的酶一样, 核酸酶对它们作用底物的性质表现出选择性或特异性。有些核酸酶只作用于 DNA, 称为脱氧核糖核酸酶 (DNases), 而有些核酸酶只作用于 RNA, 称为核糖核酸酶 (RNases)。既能水解 DNA 亦能水解 RNA 的称非特异性核酸酶, 例如两种非特异性核酸酶蛇毒磷酸二酯酶和脾磷酸二酯酶, 它们在特异性上是互补的, 蛇毒磷酸二酯酶以游离的 3'-OH 末端开始切割产生 5'-单磷酸核苷, 而脾磷酸二酯酶从游离的 5'-OH 末端开始切割产生 3'-单磷酸核苷。

核酸酶还表现出对二级结构的特异性, 有些核酸酶只水解单链核酸; 有些则只水解双链核酸。有些核酸酶选择核酸链含某一碱基的核苷酸处切割核酸链 (碱基特异性); 有些则要求切割点具有 4~8 个核苷酸残基的特殊核苷酸顺序, 对分子生物学家来说, 核酸酶是在实验室中切割和操作核酸的工具。

2. 限制性内切酶

限制性内切酶 (restriction endonuclease) 也称限制性酶 (restriction enzyme), 是由 W. Arber, H. Smith 和 D. Nathans 等人 (1979 年) 从细菌中分离的一类酶。限制酶具有极高的专一性, 识别双链 DNA 上特定的位点, 将两条链都切断, 形成粘末端或平末端。限制酶可以用来解剖纤细的 DNA 分子, 在分析染色体结构、制作 DNA 的限制酶谱、测定较长的 DNA 序列、基因的分选、基因的体外重组等研究中是不可缺少的工具。对于研究 DNA 的分子生物学家来说, 这是一把天赐神刀——分子生物刀。

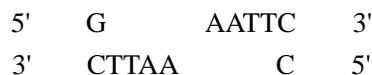
限制性酶的生物学功能在于防御或“限制”入侵细胞的外 DNA (如噬菌体 DNA)。原核生物利用他们独特的限制性内切酶把外来 DNA 切成无感染性的片段。但不能降解自身细胞中的染色体 DNA, 因为细胞内还有“共座”的 DNA 甲基化酶修饰相应序列使之受到保护。

限制酶可被分成三种类型。I 型和 II 型限制酶水解 DNA 需要消耗 ATP, 全酶中的部分亚基有通过在特殊碱基上补加甲基基团对 DNA 进行化学修饰的活性。I 型限制性内切酶在随机位点切割 DNA; II 型限制酶识别双链 DNA 的特异核苷酸序列, 并在这个位点内或附近切开 DNA 双链。

型限制性内切酶已被广泛应用于 DNA 分子的克隆和序列分析, 这是因为它们水解 DNA 不需要 ATP, 并且也不以甲基化或其他方式修饰 DNA。最重要的是它们在它们所识别的特殊核苷酸顺序内或附近切割 DNA 链。这些特殊序列常常含 4 个或 6 个核苷酸残基, 通常具回文结构 (palindromic structure), 切割后形成粘末端 (或平末端)。例如, 大肠杆菌的一限制酶称 *EcoR* I, 它识别下列六核苷酸顺序:



这种回文结构的两条链以 5' 3' 方向阅读序列都是一样的结构, 当 *EcoR* I 遇到 DNA 的这种序列时, 它会对这种 DNA 链进行交错切割, 产生突出的 5' 末端。



有些限制酶, 如 *Pst* I, 它识别序列 5'-CTGCAG-3', 并在 A 与 G 之间切割 DNA 双链产生 3' 突出粘性末端。还有些限制酶, 如 *Bal* I, DNA 链产生具有平末端 (blunt end) 的 DNA 片段。

限制酶的命名较为特殊。以 *EcoR* I 为例加以说明。第一个大写字母 E 为大肠杆菌 *E. coli* 的属名的第一个字母, 第二、三两个小写字母 co 为它的种名的头两个字母。第四个大写字母 R, 表示所用大肠杆菌的菌株。最后一个罗马字表示从该细菌中分离出来的这一类酶的编号。目前提纯的限制酶已很多, 常用的约有 100 多种, 并且已转化成为商品。大大节约了研究人员的时间。

3. DNA 的限制酶图谱

在研究某一种 DNA 时，弄清楚这种 DNA 分子有哪些限制酶切点是很重要的，这就是制作 DNA 的限制酶图谱（restriction map）。建立限制酶图谱是进一步深入分析此 DNA 的基础。

图谱的制作十分简单。将纯化的 DNA（往往用分子克隆法，从单一克隆中扩增而制备）用不同的限制酶切割，进行凝胶电泳分析。对环形 DNA 要先找出一个对该 DNA 只有一个切点的酶，以此点作为参考点。根据测量凝胶电泳图上各酶切片段的长度，就可以决定各切点的位置。有时，需要用两种酶相继降解，有时需要用一种酶部分降解才能决定其酶切位点的位置。

如果将 DNA 的一端（3'，或 5'端都可）先进行放射性同位素标记，再用不同酶分头切割（完全降解，部分降解或双酶相继降解），各切点位置的确定就要容易得多了。

图 3-35 为一种小分子环形 DNA 分子质粒 pBR322DNA 的限制酶图谱（参阅第十章）。此图表明限制图实际上是各种限制性内切酶在某一 DNA 分子上或 DNA 片段上切点的排列。由于各种酶切位点之间的距离是以碱基对表示的[对大的染色体 DNA 则以千碱基对（kilobase pair, kb）或百万碱基对（Mb）表示，也可计算出两切点间的绝对距离，因此，限制图也称物理图谱。

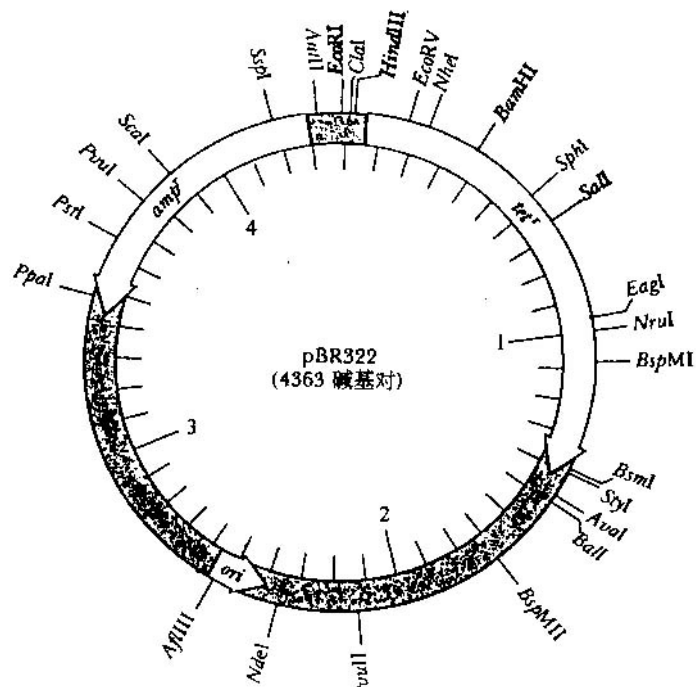


图 3-35 E. coli pBR322 质粒的限制图
长度单位：kb

第七节 染色体结构

一、染色体

染色体 DNA 在细胞中以更高级有序的结构形式存在（见图 3-36）。染色体（chromosome）这个名词现在可以看成是病毒、细菌、真核生物或细胞器中储存遗传信息的核酸分子。但是，这个名词最初是在真核细胞染色后观察到的细胞核中的一种高密度着

色实体而得名的。真核染色体这个词原先的意义只限于定义体细胞有丝分裂期间这种有特定形状的实体。在不分裂的真核细胞中，这种染色体物质被称为“染色质” (chromatin)。它们是不定形的，且有点随机地分散在整个核中。但是当细胞准备分裂时，染色质凝集，并组装成因物种不同而数目和形状特异的染色体。

研究从细胞中分离出来的染色质发现，它们是由差不多等量的DNA 紧紧地 and 一类称为组蛋白 (histones) 的蛋白质结合而组成的，染色质中还发现一些非组蛋白蛋白 (nonhistone proteins)。一些非组蛋白蛋白参与调节特殊基因的表达，以核小体为基础，染色体可以形成更高级有序的结构。

二、组蛋白

所有真核染色质的组蛋白都是相对分子质量在 11 000~21 000 之间的小的碱性蛋白，富含碱性氨基酸

精氨酸和赖氨酸。这两种氨基酸之和可达全部氨基酸残基的 $\frac{1}{4}$ 。主要的组蛋白有五种

H₁、H₂A、H₂B、H₃、H₄，它们具有不同的分子量和氨基酸组成。组蛋白 H₃ 的氨基酸顺序几乎在所有的真核生物中都相同。而组蛋白 H₄ 的情况也一样。这个事实说明这些组蛋白生物学功能的重要性。比较分子中的 102 个氨基酸残基，人们发现豆科植物和牛的这种组蛋白只有两个氨基酸的差异。人和酵母只有 8 个氨基酸的差异。在真核生物中组蛋白 H₁、H₂A、H₂B 具有较低的同源性。

每种组蛋白都存在着不同的形式，这是由于其氨基酸侧链被酶法修饰而甲基化、ADP-核糖基化、磷酸化和乙酰化的缘故。这种修饰改变了组蛋白的静电荷、形状和其他性质，使它们在基因转录的调节中起重要作用。

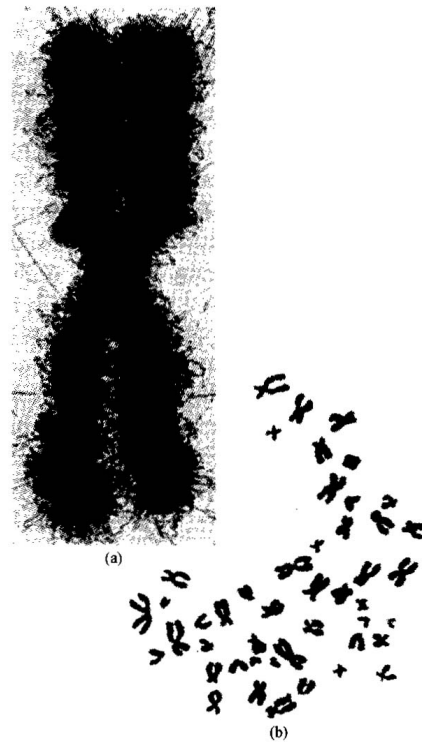


图 3-36 真核染色体

(a) 一条人的染色体；(b) 人白细胞的整套染色体

三、核小体

DNA 和组蛋白形成的复合物叫作核小体, (图 3-37)。核小体是染色质的最基本结构单位, 成球状体, 每个核小体含有 8 个组蛋白, 含 H₂A、H₂B、H₃、H₄ 各两个分子, 球状体之间有一定间隔, 被 DNA 链连成串珠状。在染色质上每个核小体和间隔所含的 DNA 约 200 碱基对 (bp), 其中 146bp 紧紧缠绕着组蛋白八聚体核心, 其余的用于连接两个核小体, 称为连接 DNA (linker DNA), 组蛋白 H₁ 不参与核小体的组成, 但它通常和连接 DNA 相结合。当染色体用 DNA 核酸酶处理时, 连接 DNA 被水解后释放出核小体颗粒。由于每个颗粒含有的 DNA 受蛋白质的保护而不被降解。用这种方法得到的核小体已被结晶, 并用 X-射线衍射分析获得了有关核小体结构的资料。

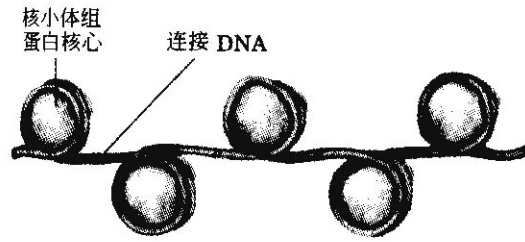


图 3-37 核小体结构模式图

四、核小体包装的高级形式

一个长约 $10^5 \mu\text{m}$ 的真核染色体 DNA 被高密度包装在直径约 $5 \sim 10 \mu\text{m}$ 的细胞核中, 这种包装是由几个层次高度有序地折叠组成的。人们将 DNA(或 RNA)与包装它的细胞器长度之比称为包装比。形成核小体后 DNA 的包装为 1:7。但是在真核染色体中, DNA 的包装比超过 10 000 倍, 这个事实说明, 染色体本身是个高度有序的结构。用很温和的方法制备的染色体样品中, 核小体是一种称为“30nm 核小体纤维” (30nm fiber) 的结构存在的, 这种核小体纤维结构的形成需要另一种组蛋白 (H₁) 的参与。每一个核小体含一个组蛋白 H₁ 分子。在 30nm 核小体纤维中 DNA 获得 100 倍的包装比, 30nm 核小体纤维的存在是有电子显微镜证据的。

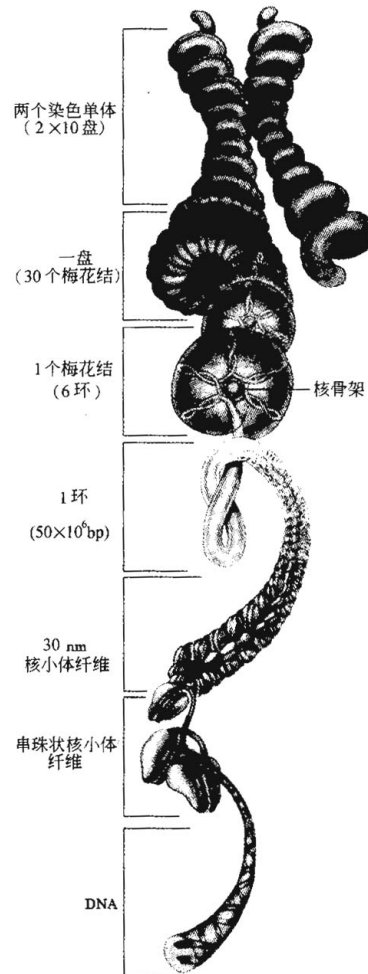


图 3-38 真核染色不同层次的结构模型

更高层次的 DNA 折叠包装组织情况尚不

清楚。但是有证据表明，染色体 DNA 的某一些部分和“核骨架”(nuclear scaffold)相连。这些与核骨架相联系的部分，把染色体 DNA 隔成许多含 20 000 ~ 10 0000bp 长的 DNA 环，每个“环”(loops)有相对的独立性。当一个环被打断或被核酸酶所松弛时，其他环仍可保持超螺旋状态。每个环中含有一些相关的基因。例如，果蝇的一整套为组蛋白编码的基因就串联在一起共处于同一个环中。核骨架含有好几种蛋白，其中，组蛋白 H₁ 和 型 DNA 拓扑异构酶占大部分。型 DNA 拓扑异构酶的存在进一步说明了 DNA 负超螺旋对染色质组装的重要性。有些实验事实表明真核染色体还有更高层次的组织，每个层次都使得染色体的包装变得更致密。这种高层次包装的一个模型(如图 3-38)说明这样一个原理：真核染色体 DNA 包装好象是一次缠绕再接一次更高级的缠绕。

五、细菌染色体 DNA 的高级形式

细菌没有核膜，染色体 DNA 被压缩成“拟核”(nucleoid)结构，它占据细菌细胞相当大的一部分空间。细菌染色体 DNA 附着在细菌细胞质膜内表面的一个点上。在细菌细胞中有一些与真核组蛋白性质类似的“类组蛋白”，其中作过详细研究的是 HU 蛋白，它有两亚基，相对分子量 19 000。但人们尚未证实这些蛋白是否能和细菌染色体 DNA 形成有规律性的结构。

细菌染色体是一个更加动态的结构，细菌细胞的分裂周期最短可以是 15m，而一般的真核细胞可能几个月只分裂一次。另外，结构基因占原核染色体 DNA 的大部分，这些与真核染色体的不同点都是与原核生物细胞 DNA 快速转录、复制、代谢相统一的。

主要参考文献

- [1] 吴显荣，基础生物化学(第二版)，北京：中国农业出版社，1997
- [2] 沈同，王镜岩，生物化学(第二版)，北京：高等教育出版社，1990
- [3] 王镜岩，朱圣庚，许长法，生物化学(第三版)，北京：高等教育出版社，2002
- [4] 于自然，黄熙泰，现代生物化学，北京：化学工业出版社，2001
- [5] Lubert stryer, Biochemisty, 3rd ed. W.H.Freeman and co., New York, 1988

钟鸣

第三章 核 酸	64
第一节 概 述	64
第二节 核酸的种类与分布	66
一、分 类	66
二、分 布	67
第三节 核酸的化学组成	68
一、碱 基	68
二、戊 糖	70
三、磷 酸	70
四、核 苷	71
五、核苷酸	72
六、细胞中的游离核苷酸及其衍生物	73
第四节 脱氧核糖核酸	74
一、DNA 的碱基组成	74
二、DNA 的一级结构	74
三、DNA 的空间结构	75
四、DNA 的三级结构	79
第五节 核糖核酸	82
一、RNA 的结构	82
第六节 核酸的理化性质与最常用的研究方法	87
一、一般物理性质	87
二、核酸的紫外吸收	87
三、核酸的沉降特性	88
四、核酸的两性解离及凝胶电泳	89
五、核酸的变性、复性	90
六、核酸的酸解、碱解与酶解	94
第七节 染色体结构	97
一、染色体	97
二、组蛋白	98
三、核小体	99
四、核小体包装的高级形式	99
五、细菌染色体 DNA 的高级形式	100